

桂枝茯苓丸加味方调控 miR-34a-5p/DLL1/Notch 信号通路促进细胞凋亡抗前列腺癌的机制

董元广¹, 杨莹¹, 孙鹏皓¹, 洪洋¹, 潘露¹, 李佳朋¹, 周立江^{1,2}, 张迪^{2*}, 袁明殿^{1,2*}

(1. 辽宁中医药大学, 沈阳 110847; 2. 辽宁中医药大学附属医院, 沈阳 110032)

[摘要] 目的: 该研究基于“阳化气, 阴成形”中医理论, 以 miR-34a-5p/ δ 样蛋白 1(DLL1)/果蝇双翅边缘缺刻同源基因 1(Notch)信号通路为切入点, 探讨桂枝茯苓丸加味方(MGZFLW)促进细胞凋亡抗前列腺癌的分子机制。方法: 采用细胞增殖与活性检测-8(CCK-8)筛选 MGZFLW 含药血清与多西他赛(DXT)最佳干预条件。将人前列腺癌细胞(PC-3)分为空白组、MGZFLW 组(10%)、DXT 组(30 nmol·L⁻¹)。通过细胞划痕、克隆形成实验评估 MGZFLW 含药血清对 PC-3 细胞迁移与增殖的影响, 原位末端标记法(TUNEL)染色检测 PC-3 细胞凋亡情况。转染 miR-34a-5p mimics 与 miR-34a-5p inhibitor, 运用实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)检测 miR-34a-5p、DLL1、Notch1 及其下游效应因子 Notch1 受体胞内结合域(NICD1)、Hes 家族碱性螺旋-环-螺旋转录因子 1(Hes1)、毛状/增强子裂相关含 YRPW 基序 1(Hey1) mRNA 水平的表达, WES 全自动蛋白系统检测 DLL1、Notch1、NICD1、Hes1、Hey1 蛋白表达的水平, 以探讨 miR-34a-5p 对 DLL1 介导的 Notch 通路的影响。进一步给予 MGZFLW 含药血清干预, 利用免疫荧光(IF)检测 DLL1、Notch1 蛋白的表达水平, Real-time PCR 检测 miR-34a-5p/DLL1/Notch 通路相关分子 mRNA 表达水平, WES 全自动蛋白系统检测 miR-34a-5p/DLL1/Notch 通路相关分子蛋白水平的表达, 探究 MGZFLW 含药血清对 miR-34a-5p/DLL1/Notch 信号通路的调控作用。结果: MGZFLW 含药血清能显著抑制 PC-3 细胞的活力、迁移与增殖, 并促进其凋亡($P<0.01$)。机制研究表明, 过表达 miR-34a-5p 可显著下调 DLL1/Notch 信号通路关键分子 mRNA 与蛋白的表达并促进细胞凋亡($P<0.01$); 而抑制 miR-34a-5p 则产生相反效应。MGZFLW 加味方含药血清能够逆转 miR-34a-5p 抑制所导致的 DLL1/Notch 信号通路激活及凋亡抑制, 上调 miR-34a-5p 表达, 并显著下调该通路相关分子的表达($P<0.01$)。结论: MGZFLW 具有抗前列腺癌作用, 其机制可能与上调 miR-34a-5p 表达, 进而抑制 DLL1/Notch 信号通路、最终促进前列腺癌细胞凋亡有关。该研究为阐明该复方抗前列腺癌的分子机制提供了实验依据。

[关键词] 桂枝茯苓丸加味方; 前列腺癌; miR-34a-5p; miR-34a-5p/ δ 样蛋白 1(DLL1)/果蝇双翅边缘缺刻同源基因 1(Notch)信号通路; 细胞凋亡

[中图分类号] R697;R285;R289 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2026)18-0122-12

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20260517

[网络出版地址] <https://link.cnki.net/urlid/11.3495.R.20260427.1333.005>

[网络出版日期] 2026-04-27 15:18:42



Modified Guizhi Fulingwan Regulates miR-34a-5p/DLL1/Notch Signaling Pathway to Promote Apoptosis and Inhibit Prostate Cancer

DONG Yuanguang¹, YANG Ying¹, SUN Penghao¹, HONG Yang¹, PAN Lu¹,
LI Jiapeng¹, ZHOU Lijiang^{1,2}, ZHANG Di^{2*}, YUAN Mingdian^{1,2*}

(1. Liaoning University of Traditional Chinese Medicine (TCM), Shenyang 110847, China;

2. Affiliated Hospital of Liaoning University of TCM, Shenyang 110032, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the molecular mechanism through which modified Guizhi Fulingwan (MGZFLW) promotes apoptosis and inhibits prostate cancer through the miR-34a-5p/ δ -like protein 1 (DLL1)/Notch signaling pathway based on

[收稿日期] 2026-01-28

[基金项目] 2024 年辽宁省科技计划联合计划(自然科学基金)项目(2024-MSLH-299)

[第一作者] 董元广, 在读硕士, 从事中医药防治肿瘤疾病研究, E-mail: 1924583665@qq.com

[通信作者] * 张迪, 副主任护师, 从事中西医结合在血管性溃疡领域的护理应用研究, E-mail: 327293084@qq.com;

* 袁明殿, 副主任中医师, 硕士, 从事中医药治疗泌尿系等疾病基础及临床研究, E-mail: yuanmingdian@163.com

the traditional Chinese medicine theory of Yang transforming Qi while Yin constituting form. **Methods:** The optimal intervention conditions of MGZFLW-containing serum and docetaxel (DXT) were screened by the cell counting kit-8 (CCK-8) method. Human prostate cancer cells (PC-3) were allocated into blank, MGZFLW (10%), and DXT (30 nmol·L⁻¹) groups. The effects of MGZFLW-containing serum on the migration and proliferation of PC-3 cells were evaluated by cell scratch and colony formation assays, and the apoptosis of PC-3 cells was detected by terminal-deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-biotin nick end labeling (TUNEL) assay. The cells were transfected with miR-34a-5p mimics and miR-34a-5p inhibitor. The mRNA levels of miR-34a-5p, DLL1, Notch1 and its downstream effector factors Notch1 intracellular domain (NICD1), Hes family basic helix-loop-helix transcription factor 1 (Hes1), and hairy/enhancer-of-split related with YRPW motif 1 (Hey1) were determined by Real-time PCR. The protein levels of DLL1, Notch1, NICD1, Hes1, and Hey1 were determined by a WES fully automatic protein system. The effect of miR-34a-5p on the DLL1-mediated Notch pathway was evaluated based on the results. Further, after MGZFLW-containing serum intervention, the expression of DLL1 and Notch1 was detected by the immunofluorescence (IF) assay, and the mRNA and protein levels of miR-34a-5p/DLL1/Notch pathway-related molecules were quantified by Real-time PCR and the WES fully automatic protein system, respectively, to explore the regulatory effect of MGZFLW-containing serum on the miR-34a-5p/DLL1/Notch pathway. **Results:** MGZFLW-containing serum inhibited the viability, migration, and proliferation and promote the apoptosis of PC-3 cells ($P<0.01$). The overexpression of miR-34a-5p down-regulated the mRNA and protein levels of key molecules in the DLL1/Notch signaling pathway and promoted cell apoptosis ($P<0.01$), while inhibition of miR-34a-5p had the opposite effects. MGZFLW-containing serum reversed the activation of the DLL1/Notch pathway and the inhibition of apoptosis caused by miR-34a-5p inhibition, up-regulated the expression of miR-34a-5p, and down-regulated the expression of related molecules in this pathway ($P<0.01$). **Conclusion:** MGZFLW can up-regulate the expression of miR-34a-5p to inhibit the DLL1/Notch signaling pathway and promote the apoptosis of prostate cancer cells, thereby inhibiting prostate cancer. This study provides experimental evidence for clarifying the molecular mechanism of the anti-prostate cancer effect of this formula.

[Keywords] modified Guizhi Fulingwan; prostate cancer; miR-34a-5p; miR-34a-5p/ δ -like protein 1 (DLL1)/Notch signaling pathway; apoptosis

前列腺癌是泌尿系统中最常见的恶性肿瘤之一,严重威胁中老年男性的身体健康。最新数据显示全球每年前列腺癌新发病例约为140万例,占有男性癌症的第2位;前列腺癌的死亡率在男性癌症相关死亡中排名第2,仅次于肺癌^[1-2]。近年来,现代医学针对前列腺癌的治疗取得了显著进展,包括激素治疗、放射治疗、手术及创新的靶向治疗等^[3-4]。尽管如此,由于前列腺癌为惰性癌症,其治疗仍面临重大挑战。传统中医药采取扶正与祛邪相结合,其多靶点、多途径、不良反应少的增效减毒作用,在抵制肿瘤发展进程中发挥着关键作用^[5-7]。中医认为肿瘤主要的病机是气血阴阳紊乱,痰、瘀、湿、热等病理因素蓄积,“阳化气”与“阴成形”失衡,造成“阴胜则阳病,阳胜则阴病”的病理状态^[8]。前列腺癌的病位在精室,其病机以体虚(肾气亏虚)为本,湿热为标,肾中阳气亏虚,温煦生化功能不足,脾肾气化功能失常,气血津液运转输布障碍,水湿不化,“阴精”成形太过,聚而成痰,阻碍气机,气滞血虚,以致多种病理因素凝结于精室精窍,发为前列腺癌^[9]。桂枝茯苓丸源自《金匮要略》,方中桂枝温通经脉、助阳化气,茯苓健脾渗湿,桃仁、牡丹皮、赤芍活血化瘀兼以凉血和营,共奏温阳通脉、活血消癥、利水渗湿之效。这与前列腺癌“肾阳亏虚为本,痰瘀凝结于精室”的核心病机高度契合。同时为应对

该病湿热为标、癌毒内结的现代临床认识,在方温通消癥的基础上,加入白花蛇舌草这一现代公认具有清热解毒、利湿通淋、抗肿瘤作用的药物,形成桂枝茯苓丸加白花蛇舌草的常用加味方。使该方从传统的活血消癥,拓展为温通扶正与清热祛毒并举的复治法,更贴合前列腺癌肾虚湿热瘀毒互结的复杂证候^[10]。然而其抗前列腺癌的现代药理机制尚未完全阐明,仍需进一步探讨。

微小RNA(miRNAs, miR)是一大类内源性非编码单链小分子RNA(20-25nt),可与靶基因mRNA特异性结合,进而发挥调控作用^[11]。miR-34a-5p在前列腺癌中的研究已被证实,其在前列腺癌的发生和发展中扮演着重要的角色^[12-13]。课题组前期通过生物学信息库预测,初步推断miR-34a-5p/蛋白1(DLL1)可能是miR-34a-5p下游的一个重要靶点, DLL1可诱导长效肿瘤血管正常化和提高肿瘤免疫治疗效果,并与果蝇双翅边缘缺刻同源基因1(Notch)信号通路在细胞分化、血管生成、个体发育等方面都发挥着重要作用^[14]。由此,本研究以“阳化气阴成形”理论为指导,从miR-34a-5p靶向DLL1调控Notch信号通路入手,初步探讨桂枝茯苓丸加味方(MGZFLW)抗前列腺癌的分子机制。为挖掘以miR-34a-5p/DLL1/Notch信号通路为有效靶点的中药抗前列腺癌的相关研究,提供新的研究途径及科学依据。

1 材料

1.1 细胞 人前列腺癌细胞系(PC-3)购自赛业(广州)生物科技有限公司(货号H6-0401),细胞传代至第6代后使用。

1.2 药品 MGZFLW基础配伍源自《金匱要略》桂枝茯苓丸,五味药采用等剂量配比,在此基础上加用白花蛇舌草,各药材用量及批号为桂枝12 g(批号2501235)、茯苓12 g(批号2508115)、赤芍12 g(批号2509221)、山桃仁12 g(批号2511041)、牡丹皮12 g(批号2508143)、白花蛇舌草30 g(批号2507152),上述中药饮片均购自安徽普仁中药饮片有限责任公司,由辽宁中医药大学附属医院闵冬雨主任药师鉴定。将上述药物分别以1 000、500 mL水煎煮2次后浓缩处理,制成 $1.1\text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的浓缩液。于4℃冰箱保存备用。

1.3 试剂 细胞增殖与活性检测-8(CCK-8)试剂盒、结晶紫(LPO)(北京索莱宝科技有限公司,货号分别为CA1210、G1062); β -肌动蛋白(β -actin)、DLL1、Notch1、Notch1受体胞内结合域(NICD1)、Hes家族碱性螺旋-环-螺旋转录因子1(Hes1)、毛状/增强子裂相关含YRPW基序1(Hey1)抗体(武汉三鹰生物技术有限公司,货号分别为66009-1-Ig、28544-1-AP、20687-1-AP、10062-2-AP、82890-3-RR、19929-1-AP);多西他赛(DXT,上海源叶生物科技有限公司,货号114977-28-5);原位末端标记法(TUNEL)细胞凋亡检测试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司,货号C1088);Ultrapure RNA Kit超纯RNA提取试剂盒(康为世纪公司,货号CW0581S)。目的引物与质粒由博迈德公司合成。

1.4 仪器 T100TM Thermal Cycler型反转录仪(美国伯乐生命医学产品有限公司);Heraeus Megafuge 8R型高速离心机、QuantStudio™3型实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR) Instrument(96-Well 0.2 mL Block)型PCR扩增仪(赛默飞世尔科技公司);ECLIPSE Ts2型光学显微镜(日本Nikon公司);INFINITE 200 PRO型酶标仪(瑞士Tecan公司);Wes型全自动蛋白表达分析系统(美国Protein Simple公司)。

2 方法

2.1 细胞培养与传代 PC-3细胞培养于Ham's F-12K完全培养基中(含10%FBS),培养条件为37℃、5%CO₂。当细胞生长至90%密度时进行传代培养。首先于培养瓶内加入磷酸盐缓冲液(PBS)2 mL润洗2遍,使用胰酶1 mL消化1.5 min,随后加

入完全培养基3 mL以终止反应。离心($800\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$, 4 min,离心半径209 mm)后弃去上清保留细胞沉淀,用完全培养基1 mL重悬细胞沉淀,按1:2进行传代。

2.2 MGZFLW含药血清制备 适应性喂养大鼠1周后,经体表面积换算予以人体等效剂量的MGZFLW $5.5\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 灌胃(10只),空白血清组大鼠给予等体积生理盐水灌胃(5只)。每日1次、每次1 mL,连续灌胃2周。2周后麻醉大鼠,经腹主动脉采血。血液静置1 h后,离心($3\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$, 10 min,离心半径85 mm),取血清置于56℃孵育30 min以去除补体,最后用0.22 μm 过滤器过滤得到含药血清。

2.3 CCK-8检测细胞活力 按每孔 4×10^3 个PC-3细胞接种至96孔板,待细胞贴壁后,分别予以不同浓度的含药血清组(0、5%、10%、15%)、空白血清组(0、5%、10%、15%)和DXT组(0、10、20、30、40、50 $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$)分别干预12、24、48 h。每孔加入含有CCK-8 10 μL 与基础培养基90 μL ,37℃条件下孵育30 min,于450 nm波长下检测吸光度 A 。细胞活力 $=\frac{(A_{\text{实验组}}-A_{\text{空白组}})}{(A_{\text{阴性组}}-A_{\text{空白组}})}\times 100\%$ 。

2.4 细胞划痕 将PC-3细胞接种在6孔板中,当细胞密度超过90%时,用200 μL 无菌吸头在细胞表面力度均匀、垂直地画一道线,并用PBS清洗掉脱落的细胞。显微镜下($\times 40$)采集0、12、24、48 h的划痕图,并用Image J 1.8.0软件分析划痕之间的距离,间接反映细胞迁移能力。迁移率 $=\frac{(0\text{ h}-X\text{ h})}{0\text{ h}}\times 100\%$ 。

2.5 细胞克隆 将PC-3细胞接种在6孔板中,“米”字形轻晃培养皿使细胞均匀分布,置于37℃和5%CO₂细胞培养箱培养,1周后终止培养。每孔加入4%多聚甲醛1 mL固定0.5 h,随后使用PBS液进行清洗2次,每孔加入结晶紫染液2 mL染色20 min,用PBS轻轻冲洗数分钟,洗去染液,开盖晾干。拍照并计算克隆形成率,克隆形成率 $=\frac{\text{克隆数}}{\text{接种细胞数}}\times 100\%$ 。

2.6 TUNEL检测细胞凋亡 PBS洗涤1次贴壁细胞,用4%多聚甲醛固定细胞30 min,用PBS洗涤1次,加入含免疫染色强力通透液PBS,室温孵育5 min。配制TUNEL检测液(TdT酶-荧光标记液-TUNEL检测液1:9:10)。使用Hank's平衡盐溶液(HBSS)洗涤2次。在样品中加入TUNEL检测液100 μL ,37℃避光孵育60 min。孵育时在空余孔和多孔板的空隙中加入适量水等以保持湿润,以减少

TUNEL检测液的蒸发。HBSS洗涤3次。使用抗荧光淬灭封片液封片后荧光显微镜下观察。使用的激发波长范围为450~500 nm,发射波长范围为515~565 nm,TUNEL染色阳性的凋亡细胞显绿色荧光。

2.7 miR-34a-5p mimics/mimics-NC、miR-34a-5p inhibitor/inhibitor-NC转染 在转染操作开始前,确认细胞生长状态良好。于转染前5~6 h,将培养基更换为无血清培养基。当细胞融合度达到60%~70%时,进行转染。按以下步骤配制转染复合物:A液为Opti-MEM培养基100 μ L,加入相应质粒2 μ L及p3000试剂5 μ L;B液为Opti-MEM培养基100 μ L,加入Lipofectamine 3000试剂10 μ L。分别混匀后静置5 min,随后将B液缓慢加入A液中,轻柔混匀并于室温下静置15 min。将形成的转染复合物逐滴均匀加入6孔板的各孔中。转染4~6 h后,更换为完全培养基继续培养。待细胞基本长满后,分别提取总RNA和总蛋白用于后续实验。后续实验分组分别为空白组、mimics-NC组、miR-34a-5p mimics组、inhibitor-NC组、miR-34a-5p inhibitor组;空白组、inhibitor-NC组、miR-34a-5p inhibitor组、inhibitor-NC+MGZFLW组、miR-34a-5p inhibitor+MGZFLW组。

2.8 免疫荧光检测DLL1,Notch1蛋白表达 细胞接种于6孔板,4%多聚甲醛室温固定15~20 min,PBS洗涤。0.1%~0.5% Triton X-100室温处理10~15 min,PBS洗涤。5%牛血清白蛋白(BSA)或血清室温封闭30~60 min。滴加一抗(用封闭液稀释,DLL1 1:100、Notch1 1:200),4 $^{\circ}$ C过夜或室温1~2 h,PBS洗涤3次。避光下滴加荧光标记二抗(1:200),室温孵育1 h,PBS洗涤3次。4',6-二脒基-2-苯基吲哚(DAPI)(1 mg $\cdot$ L $^{-1}$)染核5~10 min,PBS洗涤。抗荧光淬灭封片剂封片。荧光显微镜观察并采集图像。

2.9 Real-time PCR检测DLL1介导的Notch信号通路相关分子mRNA 采用总RNA提取试剂盒提取各组干预后的细胞RNA,5 $\times$ gDNA Eraser Buffer 2 μ L、gDNA Eraser 1 μ L、样本RNA 2 μ L、RNase Free H₂O 5 μ L,构成反应体系10 μ L进行反转录扩增cDNA,并分析其溶解曲线和扩增曲线。三步聚合酶链反应程序如下:94 $^{\circ}$ C、5 min,94 $^{\circ}$ C、38 s,57 $^{\circ}$ C、35 s,72 $^{\circ}$ C、40 s,并设置上述程序为40个循环。以U6为内参,利用2 $^{-\Delta\Delta C_t}$ 法来估算miR-34a-5p mRNA相对表达水平。其他相关mRNA使用SYBRGreen按照95 $^{\circ}$ C、10 min,95 $^{\circ}$ C、15 s,60 $^{\circ}$ C、

1 min,40个循环;95 $^{\circ}$ C、15 s,60 $^{\circ}$ C、1 min,95 $^{\circ}$ C、15 s的反应条件进行扩增,甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)作为内参,利用2 $^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法来估算目标mRNA的相对表达量。引物序列见表1。

表1 引物序列

Table1 Primer sequences

引物	序列(5'-3')	长度/bp
miR-34a-5p	CTGGCAGTGTCTTAGCTGGTTGT	68
U6	上游 CTCGCTTCGGCAGCACA	82
	下游 AACGCTTCACGAATTGCGT	
DLL1	上游 ACTGTGACGAGTGATCCGC	147
	下游 ACTCGCACACATAGCGGTG	
Notch1	上游 CGGTGAGACCTGCCTGAATG	163
	下游 CAGTAGAAGGAGGCCACACG	
NICD1	上游 TGCTATTGTGAGGCGGTTGT	109
	下游 TCTGTTGCCACCTTTCGGTT	
Hes1	上游 ATGACAGTGAAGCACCTCCG	94
	下游 AAACACCTTAGCCGCCTCTC	
Hey1	上游 CGGCTCTAGGTTCCATGTCC	176
	下游 GCTTAGCAGATCCTTGCTCCA	
GAPDH	上游 GAGAAGGCTGGGGCTCATTT	121
	下游 AGTGATGGCATGGACTGTGG	

2.10 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测DLL1介导的Notch信号通路蛋白 按照说明书的比例,将5 $\times$ master mix、样品和0.1 $\times$ 上样缓冲液混合,得到95 $^{\circ}$ C、5 min的变性上样样品。一抗利用二抗稀释液按照说明书比例稀释,在封闭环境下保存一定时间。样品准备完毕后,按照样品、封闭液、一抗(使用ProteinSimple提供的antibody Diluent II稀释液按 β -actin 1:100、DLL1 1:50、Notch1 1:50、NICD1 1:100、Hes1 1:100、Hey1 1:100稀释后使用)、二抗(使用antibody Diluent II稀释液按1:100稀释),按发光液和清洗缓冲液的顺序将其分别加入板材中。机器进行自检后,将毛细管芯和板子分别放入,然后按照预先设计的板子布局开始检测,在160 min内完成检测,最后进行结果分析。

2.11 统计学方法 数据使用SPSS 26.0软件进行分析。数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。所有实验均独立重复至少3次。若数据符合正态分布且方差齐性,则采用单因素方差分析(One-way ANOVA),随后进行最小显著性差异法(LSD)检验进行两两比较。若方差不齐或数据不符合正态分布,则采用Tamhane's T2法。 $P < 0.05$ 认为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 MGZFLW 含药血清对 PC-3 细胞活力的影响

通过 CCK-8 实验检测 MGZFLW 含药血清对 PC-3 细胞活力的影响,选取不同浓度 MGZFLW 含药血清干预 PC-3 细胞 12、24、48 h。结果显示,与空白组比较, MGZFLW 空白血清 5%~15% 浓度组的 PC-3 细胞存活率差异无统计学意义, MGZFLW 含药血清 5%~15% 浓度组的 PC-3 细胞存活率显著降低 ($P<0.01$)。随着 MGZFLW 含药血清浓度逐渐升高, PC-3 细胞存活率逐渐降低。见表 2。10% 浓度的 MGZFLW 含药血清作用 24 h 时,细胞存活率接近 50%,因此后续实验选取 10% 浓度的 MGZFLW 含药血清作用 24 h 作为干预条件。

表 2 MGZFLW 含药血清对 PC-3 细胞存活率的影响 ($\bar{x}\pm s, n=6$)
Table 2 Effect of MGZFLW containing serum on survival of PC-3 cells ($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	体积分数 /%	细胞存活率/%		
		12 h	24 h	48 h
空白组		102.01±1.25	100.45±2.04	100.13±1.45
MGZFLW 空白血清组	5	98.55±0.52	97.54±1.39	98.04±1.02
	10	96.27±1.78	97.85±3.30	97.69±0.97
	15	97.76±1.06	99.75±1.66	97.49±0.53
MGZFLW 含药血清组	5	80.22±2.20 ¹⁾	65.70±0.50 ¹⁾	63.71±0.51 ¹⁾
	10	63.38±1.57 ¹⁾	50.21±0.95 ¹⁾	39.95±1.99 ¹⁾
	15	58.30±0.36 ¹⁾	40.49±0.84 ¹⁾	33.40±0.74 ¹⁾

注:与空白组比较¹⁾ $P<0.01$ (表 3-表 6 同)

3.2 不同浓度 DXT 对 PC-3 细胞活力的影响

CCK-8 结果显示,与空白组比较,10~50 nmol·L⁻¹ 浓度的 DXT 处理后, PC-3 细胞的存活率显著降低 ($P<0.01$)。干预时间为 24 h,浓度为 30 nmol·L⁻¹ 时。PC-3 细胞的存活率接近 50%,因此后续实验选择此条件进行干预。见表 3。

表 3 DXT 对 PC-3 细胞存活率的影响 ($\bar{x}\pm s, n=6$)
Table 3 Effect of DXT on survival rate of PC-3 cells ($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	浓度 /nmol·L ⁻¹	细胞存活率/%		
		12 h	24 h	48 h
空白组		100.56±0.33	100.63±0.20	100.30±0.22
DXT 组	10	85.50±2.68 ¹⁾	80.05±3.83 ¹⁾	81.04±2.61 ¹⁾
	20	75.81±2.85 ¹⁾	69.23±4.92 ¹⁾	62.42±1.87 ¹⁾
	30	65.22±1.53 ¹⁾	50.39±0.24 ¹⁾	43.19±1.44 ¹⁾
	40	58.61±2.84 ¹⁾	47.62±2.52 ¹⁾	33.75±2.61 ¹⁾
	50	55.79±2.07 ¹⁾	36.85±2.04 ¹⁾	28.93±1.20 ¹⁾

3.3 MGZFLW 含药血清对 PC-3 细胞迁移能力的影响

利用细胞划痕实验检测 MGZFLW 含药血清对

PC-3 细胞迁移能力的影响,以划痕间距间接反映迁移能力,并在 12、24、48 h 不同时间点进行观察。结果显示随着时间的推移, PC-3 细胞迁移率逐渐升高。与空白组比较, MGZFLW 组、DXT 组 12、24、48 h PC-3 细胞迁移率显著降低 ($P<0.01$),说明 MGZFLW 含药血清能够抑制 PC-3 细胞的迁移能力。见图 1、表 4。

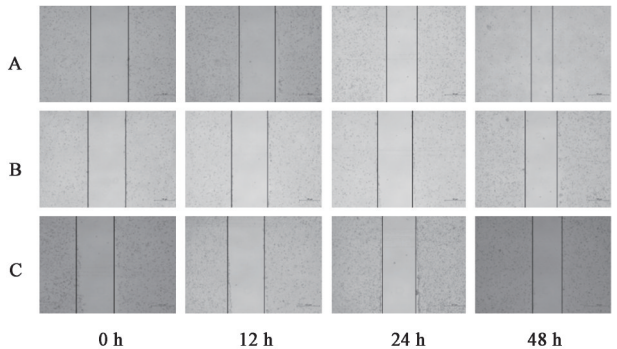


图 1 MGZFLW 含药血清对 PC-3 细胞迁移能力的影响 (倒置显微镜, ×40)
Fig. 1 Effect of MGZFLW-containing serum on migration ability of PC-3 cells (inverted microscope, ×40)

表 4 MGZFLW 含药血清对 PC-3 细胞迁移能力的影响 ($\bar{x}\pm s, n=3$)
Table 4 Effect of MGZFLW-containing serum on migration of PC-3 cells ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	浓度	细胞迁移率/%		
		12 h	24 h	48 h
空白组		29.41±1.22	36.72±0.75	51.88±0.64
MGZFLW 组	10%	15.01±0.67 ¹⁾	20.33±0.42 ¹⁾	34.56±1.05 ¹⁾
DXT 组	30 nmol·L ⁻¹	16.89±0.41 ¹⁾	24.56±1.01 ¹⁾	40.26±1.24 ¹⁾

3.4 MGZFLW 含药血清对 PC-3 细胞增殖能力的影响

用细胞克隆实验检测 MGZFLW 含药血清对 PC-3 细胞增殖能力的影响,与空白组比较, MGZFLW 组、DXT 组 PC-3 细胞集落数量显著降低 ($P<0.01$),说明 MGZFLW 含药血清能够抑制 PC-3 细胞的增殖能力。见图 2、表 5。

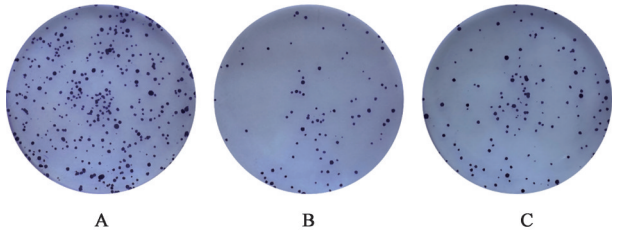


图 2 MGZFLW 含药血清对 PC-3 细胞增殖能力的影响 (结晶紫)
Fig. 2 Effect of MGZFLW-containing serum on proliferation ability of PC-3 cells (crystal violet)

表5 MGZFLW含药血清对PC-3细胞增殖能力的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)
Table 5 Effect of MGZFLW-containing serum on proliferation ability of PC-3 cells ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	浓度	细胞集落数量/个
空白组		923±72
MGZFLW组	10%	401±53 ¹⁾
DXT组	30 nmol·L ⁻¹	514±27 ¹⁾

3.5 MGZFLW含药血清对PC-3细胞凋亡能力的影响 TUNEL染色结果显示,与空白组比较, MGZFLW组、DXT组凋亡细胞荧光强度显著增强($P<0.01$),说明MGZFLW含药血清能够促进PC-3细胞凋亡的发生以达到抗肿瘤的效果。见图3、表6。

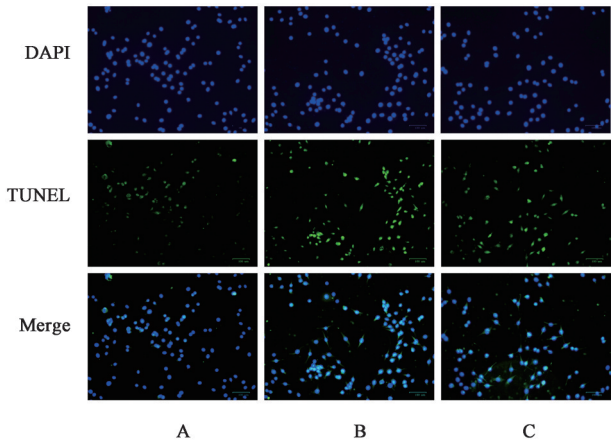


图3 MGZFLW含药血清对PC-3细胞凋亡能力的影响(免疫荧光,×200)
Fig. 3 Effect of MGZFLW drug-containing serum on apoptosis ability of PC-3 cells (IF, ×200)

3.6 miR-34a-5p mimics、miR-34a-5p inhibitor转染效率检测 Real-time PCR检测结果显示,与空白组比较, mimics-NC组、inhibitor-NC组 miR-34a-5p mRNA表达水平差异无统计学意义;与mimics-NC组比较, miR-34a-5p mimics组 miR-34a-5p mRNA表

表8 miR-34a-5p对DLL1/Notch信号通路相关分子mRNA表达水平的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 8 Effect of miR-34a-5p on mRNA expression levels of molecules related to DLL1/Notch signaling pathway ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	DLL1	Notch1	NICD1	Hes1	Hey1
空白组	1.01±0.19	1.00±0.11	1.01±0.15	1.01±0.15	1.00±0.12
mimics-NC组	1.02±0.16	1.02±0.21	1.06±0.09	1.03±0.16	1.03±0.11
miR-34a-5p mimics组	0.25±0.03 ¹⁾	0.55±0.15 ¹⁾	0.62±0.14 ¹⁾	0.76±0.13 ¹⁾	0.72±0.18 ¹⁾
inhibitor-NC组	1.01±0.05	1.01±0.22	1.03±0.10	1.00±0.05	1.01±0.10
miR-34a-5p inhibitor组	1.69±0.38 ²⁾	1.82±0.55 ²⁾	2.31±0.49 ²⁾	2.05±0.17 ²⁾	2.68±0.46 ²⁾

3.8 miR-34a-5p对DLL1介导的Notch信号通路蛋白表达水平的影响 WES结果显示,与mimics-NC

表6 MGZFLW含药血清对PC-3细胞凋亡率的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)
Table 6 Effect of MGZFLW-containing serum on apoptosis rate of PC-3 cells ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	浓度	细胞凋亡率/%
空白组		3.71±0.86
MGZFLW组	10%	21.34±2.41 ¹⁾
DXT组	30 nmol·L ⁻¹	14.79±1.84 ¹⁾

达水平显著升高($P<0.01$);与inhibitor-NC组比较, miR-34a-5p inhibitor组 miR-34a-5p mRNA表达水平显著降低($P<0.01$)。结果提示转染效率较高,因此后续实验选用此条件进行转染。见表7。

表7 miR-34a-5p mimics、miR-34a-5p inhibitor对miR-34a-5p mRNA表达的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 7 Effect of miR-34a-5p mimics and miR-34a-5p inhibitor on expression of miR-34a-5p mRNA ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	miR-34a-5p
空白组	1.01±0.02
mimics-NC组	1.01±0.05 ¹⁾
miR-34a-5p mimics组	2.27±0.34 ²⁾
inhibitor-NC组	1.02±0.11 ¹⁾
miR-34a-5p inhibitor组	0.45±0.14 ²⁾

注:与mimics-NC组比较¹⁾ $P<0.01$;与inhibitor-NC组比较²⁾ $P<0.01$ (表8-表10同)

3.7 miR-34a-5p对DLL1介导的Notch信号通路相关分子mRNA表达水平的影响 为了验证miR-34a-5p对DLL1介导的Notch信号通路的影响,笔者使用Real-time PCR检测相关分子mRNA表达水平。结果显示,与mimics-NC组比较, miR-34a-5p mimics组DLL1、Notch1、NICD1、Hes1、Hey1 mRNA表达水平显著降低($P<0.01$);与inhibitor-NC组比较, miR-34a-5p inhibitor组DLL1、Notch1、NICD1、Hes1、Hey1 mRNA表达水平显著升高($P<0.01$)。见表8。

组比较, miR-34a-5p mimics组DLL1、Notch1、NICD1、Hes1、Hey1蛋白表达水平显著降低,差异具

有统计学意义($P<0.01$);与 inhibitor-NC 组比较, miR-34a-5p inhibitor 组 DLL1、Notch1、NICD1、Hes1、Hey1 蛋白表达水平显著升高($P<0.01$),与

Real-time PCR 结果一致,因此笔者得出结论 miR-34a-5p 能够调控 DLL1 介导的 Notch 信号通路。见表 9、图 4。

表 9 miR-34a-5p 对 DLL1/Notch 信号通路相关分子蛋白表达水平的影响 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 9 Effect of miR-34a-5p on protein expression levels of molecules related to DLL1/Notch signaling pathway ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	DLL1/ β -actin	Notch1/ β -actin	NICD1/ β -actin	Hes1/ β -actin	Hey1/ β -actin
空白组	1.00 $\pm$ 0.01	1.00 $\pm$ 0.01	1.00 $\pm$ 0.01	1.00 $\pm$ 0.01	1.00 $\pm$ 0.02
mimics-NC 组	1.00 $\pm$ 0.01	0.98 $\pm$ 0.01	0.99 $\pm$ 0.04	0.99 $\pm$ 0.01	1.00 $\pm$ 0.02
miR-34a-5p mimics 组	0.82 $\pm$ 0.07 ¹⁾	0.35 $\pm$ 0.03 ¹⁾	0.55 $\pm$ 0.04 ¹⁾	0.67 $\pm$ 0.03 ¹⁾	0.72 $\pm$ 0.04 ¹⁾
inhibitor-NC 组	1.00 $\pm$ 0.05	1.00 $\pm$ 0.17	0.99 $\pm$ 0.03	1.00 $\pm$ 0.01	0.98 $\pm$ 0.10
miR-34a-5p inhibitor 组	1.50 $\pm$ 0.15 ²⁾	1.41 $\pm$ 0.15 ²⁾	1.37 $\pm$ 0.11 ²⁾	1.43 $\pm$ 0.13 ²⁾	1.50 $\pm$ 0.06 ²⁾

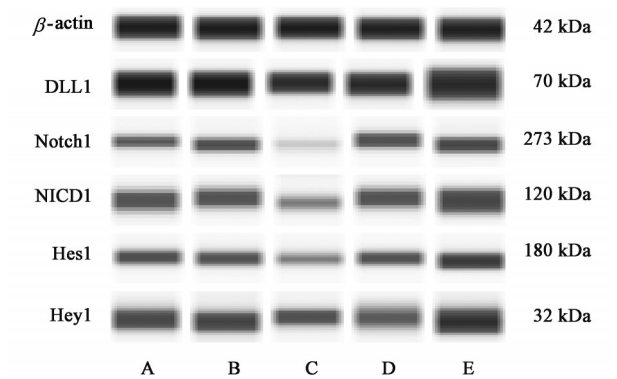


图 4 miR-34a-5p 对 DLL1/Notch 信号通路相关分子蛋白表达电泳
Fig. 4 Electrophoresis of protein expression of molecules related to DLL1/Notch signaling pathway by miR-34a-5p

3.9 miR-34a-5p 调控 DLL1 介导 Notch 信号通路对 PC-3 细胞凋亡的影响 已有研究证实 DLL1/Notch 通路能够影响肿瘤细胞凋亡的发生,为了探究 miR-34a-5p 能否通过调控 DLL1/Notch 信号通路影响 PC-3 细胞的凋亡能力,使用 TUNEL 染色检测 PC-3 细胞凋亡情况。结果显示,与 mimics-NC 组比较, miR-34a-5p mimics 组荧光强度、细胞凋亡率显著升高($P<0.01$);与 inhibitor-NC 组比较, miR-34a-5p inhibitor 组荧光强度、细胞凋亡率显著降低($P<0.01$),结果提示 miR-34a-5p 能够调控 DLL1/Notch 信号通路影响 PC-3 细胞的凋亡能力。见图 5、表 10。

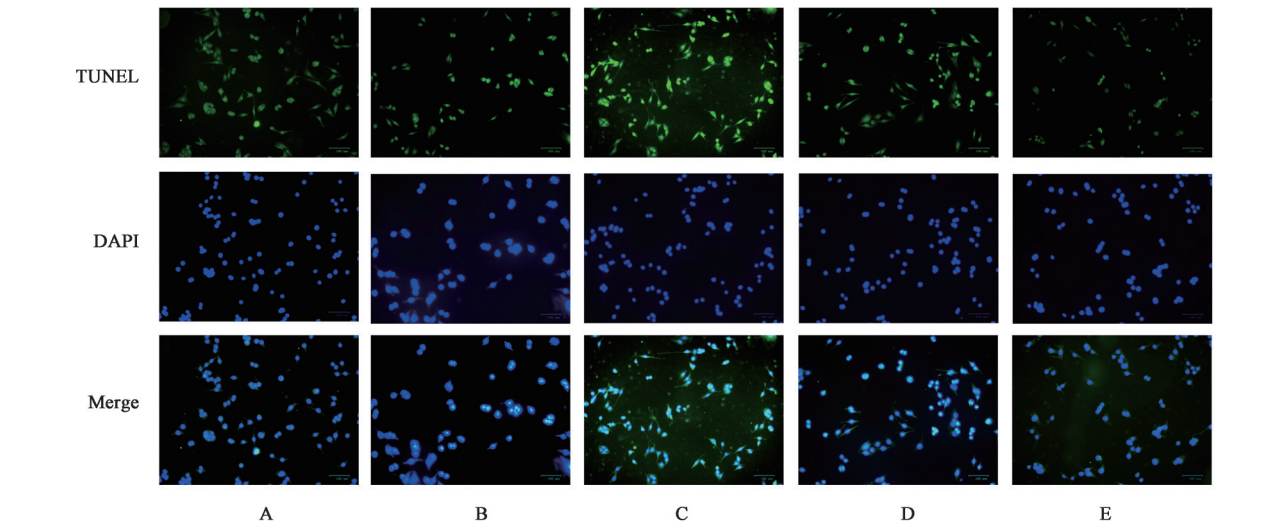


图 5 miR-34a-5p 调控 DLL1/Notch 信号通路对 PC-3 细胞凋亡能力的影响 (免疫荧光, $\times 200$)

Fig. 5 Effect of miR-34a-5p on apoptosis ability of PC-3 cells by regulating DLL1/Notch signaling pathway (IF, $\times 200$)

3.10 MGZFLW 含药血清对 miR-34a-5p 介导的 DLL1、Notch 蛋白表达水平的影响 使用免疫荧光检测敲低 miR-34a-5p 及 MGZFLW 含药血清干预后, DLL1、Notch 蛋白表达水平的变化。结果显示,与 inhibitor-NC 组比较, miR-34a-5p inhibitor 组

DLL1、Notch 蛋白表达水平显著上升,差异具有统计学意义($P<0.01$), inhibitor-NC+MGZFLW 组 DLL1、Notch 蛋白表达水平显著下降($P<0.01$);与 miR-34a-5p inhibitor 组比较, miR-34a-5p inhibitor+MGZFLW 组 DLL1、Notch 蛋白表达水平显著降低,

表 10 miR-34a-5p 调控 DLL1/Notch 信号通路对 PC-3 细胞凋亡率的影响 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 10 Effect of miR-34a-5p regulating DLL1/Notch signaling pathway on apoptosis rate of PC-3 cells ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	细胞凋亡率/%
空白组	10.46±0.86
mimics-NC 组	10.08±0.78
miR-34a-5p mimics 组	34.86±3.41 ¹⁾
inhibitor-NC 组	10.59±0.67
miR-34a-5p inhibitor 组	2.53±0.24 ²⁾

差异具有统计学意义($P<0.01$),证明 MGZFLW 含药血清能够影响 miR-34a-5p 介导的 DLL1、Notch 蛋白表达水平。见图 6。

3.11 MGZFLW 含药血清对 miR-34a-5p 介导 DLL1/Notch 信号通路 mRNA 表达水平的影响 Real-time PCR 结果显示,与 inhibitor-NC 组比较,miR-34a-5p inhibitor 组 miR-34a-5p mRNA 表达水平显著下降($P<0.01$), DLL1、Notch1、NICD1、Hes1、Hey1 mRNA 表达水平显著升高($P<0.01$),inhibitor-NC+MGZFLW 组 miR-34a-5p mRNA 表达水平显著升高($P<0.01$), DLL1、Notch1、NICD1、Hes1、Hey1 mRNA 表达水平显著下降($P<0.01$);与 miR-34a-5p inhibitor 组比较,miR-34a-5p inhibitor+MGZFLW 组 miR-34a-5p mRNA 表达水平显著升高,差异有统计学意义($P<0.01$), DLL1、Notch1、NICD1、Hes1、Hey1 mRNA 表达水平显著下降,差异有统计学意义($P<0.01$)。见表 11。

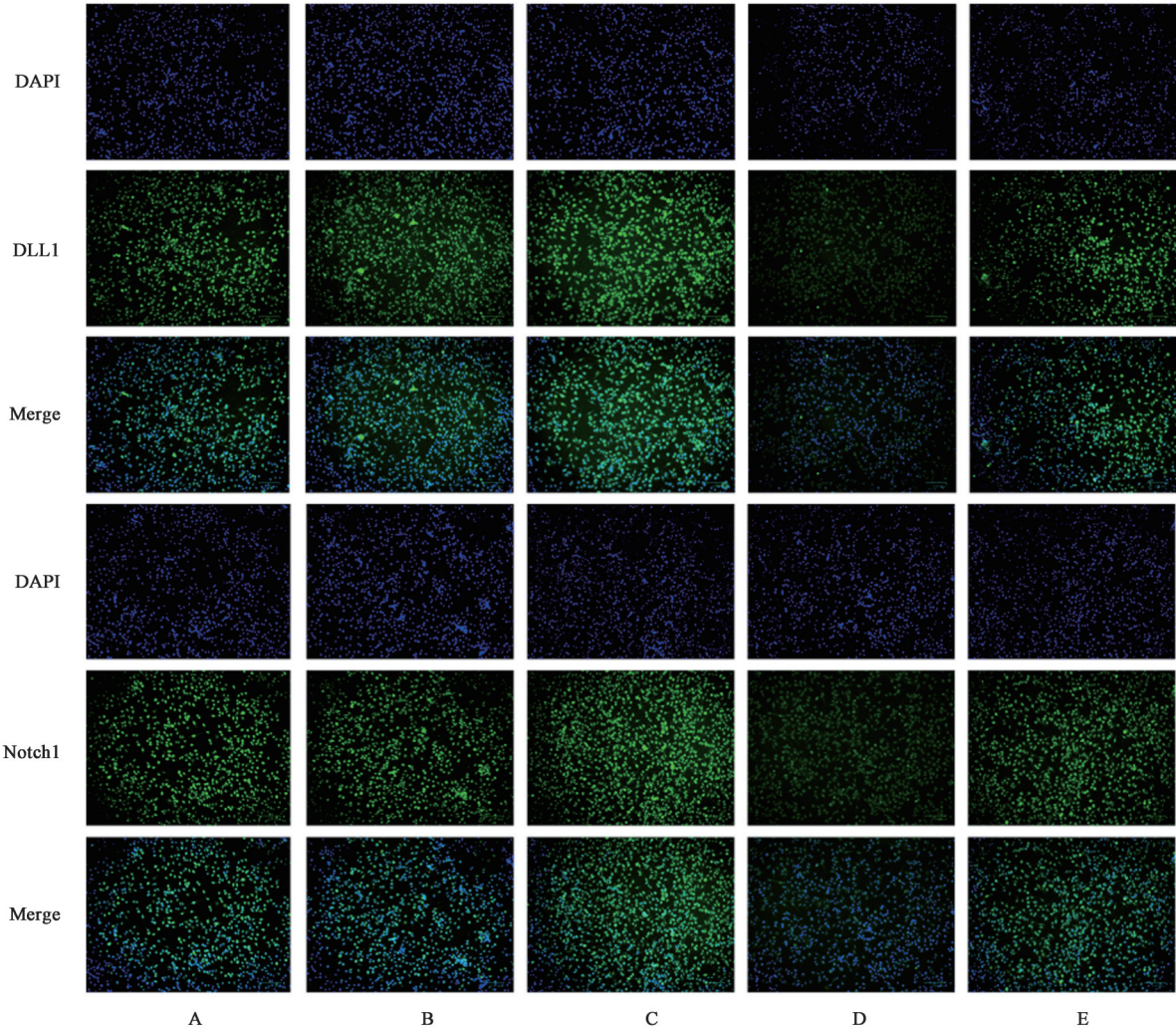


图 6 MGZFLW 含药血清对 miR-34a-5p 介导的 DLL1、Notch1 蛋白表达水平的影响 (免疫荧光, $\times 200$)
Fig. 6 Effect of MGZFLW-containing serum on expression levels of DLL1 and Notch1 proteins mediated by miR-34a-5p (IF, $\times 200$)

3.12 MGZFLW 含药血清通过调控 miR-34a-5p 介导 DLL1/Notch 信号通路蛋白表达水平的影响 Western blot 结果显示与 inhibitor-NC 组比较,

miR-34a-5p inhibitor 组, DLL1、Notch1、NICD1、Hes1、Hey1 蛋白表达水平显著升高($P<0.01$), inhibitor-NC+MGZFLW 组 DLL1、Notch1、NICD1、

表 11 MGZFLW 含药血清对 miR-34a-5p 介导 DLL1/Notch 信号通路 mRNA 表达水平的影响 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 11 Effect of MGZFLW-containing serum on mRNA expression levels of miR-34a-5p-mediated DLL1/Notch signaling pathway ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	体积分数/%	miR-34a-5p	DLL1	Notch1	NICD1	Hes1	Hey1
空白组		1.00±0.06	1.00±0.06	1.00±0.09	1.00±0.01	1.00±0.07	1.00±0.04
inhibitor-NC 组		1.00±0.08	1.00±0.11	1.00±0.01	1.00±0.02	1.01±0.06	1.05±0.04
miR-34a-5p inhibitor 组		0.30±0.07 ¹⁾	3.35±0.13 ¹⁾	1.98±0.06 ¹⁾	2.10±0.28 ¹⁾	2.76±0.40 ¹⁾	3.27±0.20 ¹⁾
inhibitor-NC+MGZFLW 组	10	1.47±0.18 ¹⁾	0.53±0.10 ¹⁾	0.76±0.08 ¹⁾	0.60±0.01 ¹⁾	0.71±0.11 ²⁾	0.61±0.08 ¹⁾
miR-34a-5p inhibitor+MGZFLW 组	10	0.54±0.04 ²⁾	2.16±0.21 ²⁾	1.30±0.08 ²⁾	1.58±0.05 ²⁾	1.85±0.11 ²⁾	1.59±0.12 ²⁾

注:与 inhibitor-NC 组比较¹⁾ $P<0.01$;与 miR-34a-5p inhibitor 组比较²⁾ $P<0.01$ (表 12 和表 13 同)

Hes1、Hey1 蛋白表达水平显著下降($P<0.01$);与 miR-34a-5p inhibitor 组比较,miR-34a-5p inhibitor+MGZFLW 组 DLL1、Notch1、NICD1、Hes1、Hey1 蛋白

表达水平显著下降($P<0.01$)。与 Real-time PCR 结果一致,说明 MGZFLW 含药血清能够调控 miR-34a-5p 介导的 DLL1/Notch 信号通路。见表 12、图 7。

表 12 MGZFLW 含药血清对 miR-34a-5p 介导 DLL1/Notch 信号通路蛋白表达水平的影响 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 12 Effect of MGZFLW-containing serum on protein expression levels of miR-34a-5p-mediated DLL1/Notch signaling pathway ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	体积分数/%	DLL1/ β -actin	Notch1/ β -actin	NICD1/ β -actin	Hes1/ β -actin	Hey1/ β -actin
空白组		1.00±0.04	1.00±0.04	1.00±0.05	1.00±0.05	1.00±0.07
inhibitor-NC 组		0.99±0.02	1.00±0.01	0.98±0.01	0.99±0.01	1.01±0.02
miR-34a-5p inhibitor 组		1.47±0.02 ¹⁾	1.24±0.03 ¹⁾	1.51±0.02 ¹⁾	1.56±0.02 ¹⁾	1.55±0.02 ¹⁾
inhibitor-NC+MGZFLW 组	10	0.63±0.10 ¹⁾	0.75±0.12 ¹⁾	0.40±0.04 ¹⁾	0.69±0.02 ²⁾	0.46±0.08 ¹⁾
miR-34a-5p inhibitor+MGZFLW 组	10	1.26±0.11 ²⁾	1.15±0.04 ²⁾	1.20±0.02 ²⁾	1.32±0.07 ²⁾	1.33±0.13 ²⁾

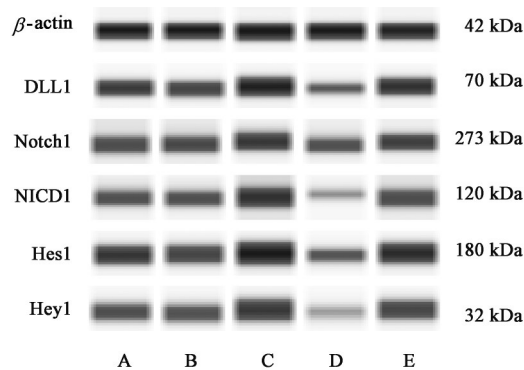


图 7 MGZFLW 含药血清对 miR-34a-5p 介导 DLL1/Notch 信号通路蛋白电泳

Fig. 7 Electrophoresis of miR-34a-5p-mediated DLL1/Notch signaling pathway proteins in MGZFLW-containing serum

3.13 MGZFLW 含药血清通过调控 miR-34a-5p 介导 DLL1/Notch 信号通路对 PC-3 细胞凋亡的影响

利用 TUNEL 染色探究 MGZFLW 含药血清调控 miR-34a-5p/DLL1/Notch 信号通路对 PC-3 细胞凋亡的影响。结果显示 inhibitor-NC 组比较,miR-34a-5p inhibitor 组 PC-3 细胞凋亡率显著下降($P<0.01$),inhibitor-NC+MGZFLW 组 PC-3 细胞凋亡率显著升高($P<0.01$);与 miR-34a-5p inhibitor 组比较,miR-

34a-5p inhibitor+MGZFLW 组 PC-3 细胞凋亡率显著升高($P<0.01$)。结果提示,MGZFLW 含药血清能够逆转 miR-34a-5p inhibitor 所导致的趋势,即 MGZFLW 含药血清能够通过调控 miR-34a-5p/DLL1/Notch 信号通路促进 PC-3 细胞凋亡以达到抗前列腺癌的疗效。见图 8、表 13。

4 讨论

前列腺癌是导致男性癌症死亡的主要原因之一。尽管传统的化疗和靶向治疗在前列腺癌的治疗中取得了一定进展,但仍然面临着高转移潜力、获得性药物耐药性及晚期患者预后不良等关键挑战^[15-17],这些问题突显了开发新型治疗策略的必要性。传统中医药在前列腺癌治疗中展现出潜在的优势,中医药可以通过多尺度的生物学相互作用调节前列腺癌细胞的动态平衡,从而延缓疾病进展、延长生存期、提高生活质量,并减轻化疗和放疗的不良反应^[18]。此外,中医药还能够通过增强免疫系统的能力来检测和摧毁癌细胞,促进肿瘤细胞凋亡,抑制肿瘤生长和转移,从而增强传统癌症治疗的效果^[19]。

桂枝茯苓丸出自汉代名医张仲景《金匮要略》

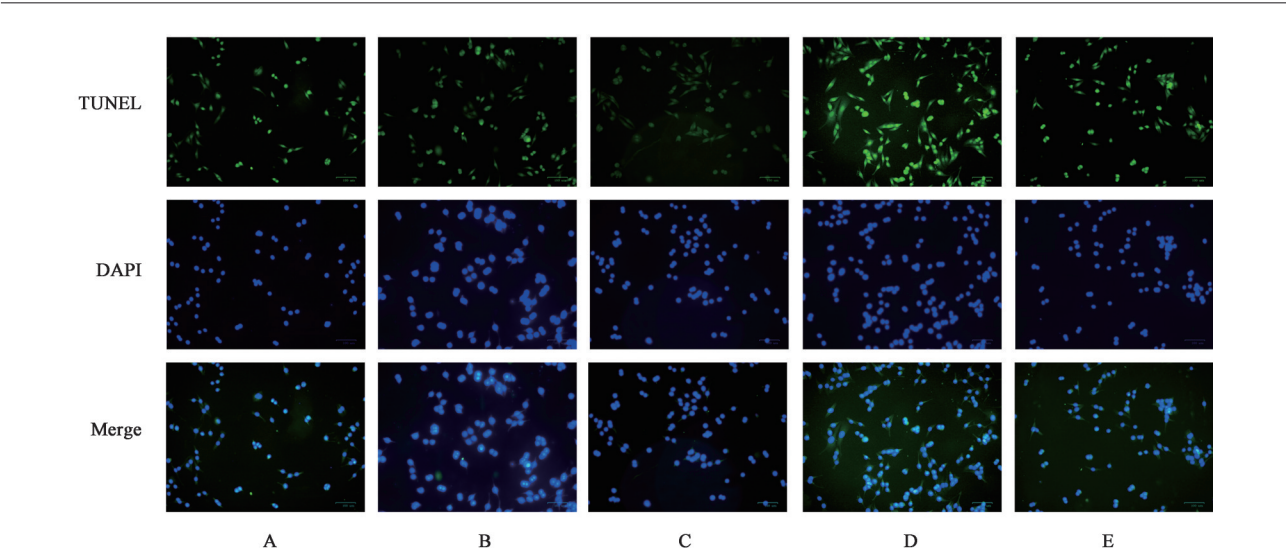


图8 MGZFLW含药血清调控miR-34a-5p/DLL1/Notch信号通路对PC-3细胞凋亡的影响(免疫荧光,×200)
Fig. 8 Effect of MGZFLW-containing serum on PC-3 cell apoptosis by regulating miR-34a-5p/DLL1/Notch signaling pathway (IF,×200)

表13 MGZFLW含药血清调控miR-34a-5p/DLL1/Notch信号通路对PC-3细胞凋亡率的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 13 Effect of MGZFLW-containing serum on apoptosis rate of PC-3 cells by regulating miR-34a-5p/DLL1/Notch signaling pathway ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	体积分数/%	细胞凋亡率/%
空白组		10.37±0.49
inhibitor-NC组		10.89±0.64
miR-34a-5p inhibitor组		3.24±0.41 ¹⁾
inhibitor-NC+MGZFLW组	10	28.69±2.51 ¹⁾
miR-34a-5p inhibitor+MGZFLW组	10	8.74±0.92 ²⁾

一书,本方由桂枝、茯苓、牡丹皮、赤芍、桃仁5味药组成,主要功效为活血化瘀消癥。众多研究者发现桂枝茯苓汤具有抗增殖、促凋亡和抗血管生成活性的作用,其能调控多种信号通路抑制宫颈癌、乳腺癌等多种癌细胞^[20-24]。白花蛇舌草是一年生茜草科草本植物,总黄酮是其主要有效成分,具有清热解毒、消肿利尿、抗肿瘤之功效^[25],临床中常作为治疗多种痈疔脓肿及癌症的辅助药物^[26]。在本研究中笔者利用CCK-8实验筛选了桂枝茯苓丸加白花蛇舌草含药血清对前列腺癌细胞的最佳干扰条件,并通过细胞克隆、细胞划痕实验证实了MGZFLW能够抑制前列腺癌细胞的增殖与迁移,同时TUNEL染色的结果证明了其促前列腺癌细胞凋亡的能力,揭示了MGZFLW的抗前列腺癌疗效。

miR-34a-5p作为一种肿瘤抑制因子,在多种癌症中均表现出抑制肿瘤生长和转移的作用^[27-29]。在前列腺癌中,miR-34a-5p的表达水平显著降低,这与肿瘤的进展和不良预后密切相关,并通过调控下

游基因的表达,能够有效抑制前列腺癌细胞的增殖、迁移和侵袭^[30]。DLL1作为Notch1的配体,通过与Notch1结合,激活Notch信号通路,进而影响下游效应因子NICD1、Hes1和Hey1的表达^[31-32]。为了探究前列腺癌中miR-34a-5p对DLL1/Notch1通路的调控情况,本研究利用瞬时转染技术,转染miR-34a-5p mimics与miR-34a-5p inhibitor以实现高表达和低表达miR-34a-5p的目的。结果显示高表达的miR-34a-5p能够抑制DLL1/Notch1通路及相关分子NICD1、Hes1、Hey1 mRNA与蛋白的表达水平,促进前列腺癌细胞的凋亡能力。而低表达的miR-34a-5p则能够升高DLL1、Notch1、NICD1、Hes1、Hey1 mRNA与蛋白的表达水平,抑制前列腺癌细胞的凋亡能力,证实了miR-34a-5p调控DLL1/Notch1信号通路促前列腺癌细胞凋亡的机制。此外还有研究发现,miR-34a-5p通过调控细胞衰老相关蛋白1(SIRT1)/肿瘤蛋白p53(TP53)轴在前列腺癌的发生中发挥作用,SIRT1在前列腺癌组织中高表达,而miR-34a-5p能够通过下调SIRT1的表达,抑制前列腺癌细胞的增殖并促进细胞凋亡^[33]。值得注意的是,miR-34a-5p还与其他非编码RNA如长链非编码RNA(lncRNA)之间存在复杂的相互作用。例如,LINC01006通过海绵吸附miR-34a-5p,从而促进前列腺癌的进展^[13],这种相互作用揭示了miR-34a-5p在前列腺癌中的多层次调控机制。

基于MGZFLW能够抑制前列腺癌细胞的增殖,促进其凋亡的发生,而miR-34a-5p能够通过抑制DLL1/Notch1信号通路提升前列腺癌细胞的凋亡能力,为了探究MGZFLW能否通过调控

miR-34a-5p介导的DLL1/Notch1信号通路促进前列腺癌细胞的凋亡达到抗肿瘤的疗效,实验选取miR-34a-5p inhibitor并给予MGZFLW干预。免疫荧光结果显示,因miR-34a-5p水平降低导致的DLL1、Notch1蛋白表达水平升高,而MGZFLW含药血清能够改变该趋势。Real-time PCR与Western blot结果显示miR-34a-5p水平降低能够升高DLL1、Notch1、NICD1、Hes1、Hey1 mRNA与蛋白的表达水平,MGZFLW含药血清干预后同样逆转了该趋势。TUNEL结果则揭示了MGZFLW含药血清通过调控miR-34a-5p/DLL1/Notch信号通路促进PC-3细胞凋亡抗前列腺癌的疗效。

综上所述,本研究揭示了MGZFLW的抗前列腺癌疗效,并初步探讨了MGZFLW通过调控miR-34a-5p/DLL1/Notch信号通路促细胞凋亡抗前列腺癌的分子机制,为该方及其他中医药防治前列腺癌提供了新的实验依据和理论基础。但本研究仍有不足之处,如缺少体内实验,缺乏对机制的深层次研究,未来将继续深入研究其他潜在的分子机制。

【利益冲突】 本文不存在任何利益冲突。

【参考文献】

- [1] DAHIYA V, HANS S, KUMARI R, et al. Prostate cancer biomarkers: From early diagnosis to precision treatment[J]. Clin Transl Oncol, 2024, 26(10): 2444-2456.
- [2] ONG W M, ZARGAR-SHOSHTARI K, SIVA S, et al. Prostate specific membrane antigen: The role in salvage lymph node dissection and radio-ligand therapy[J]. Minerva Urol Nefrol, 2018, 70(5): 450-461.
- [3] MALLAH H, DIABASANA Z, SOULTANI S, et al. Prostate cancer: A journey through its history and recent developments[J]. Cancers, 2025, 17(2): 194.
- [4] SUPLOT S, VAUGIER L, PASQUIER D, et al. OLIGOPELVIS GETUG P07, a multicenter phase II trial of combined high-dose salvage radiotherapy and hormone therapy in oligorecurrent pelvic node relapses in prostate cancer[J]. Eur Urol, 2021, 80(4): 405-414.
- [5] 李佳鑫,王冰,于森. 基于“扶正祛邪”治则的中药抗肿瘤作用机制的研究进展[J]. 中草药, 2021, 52(18): 5751-5757.
LI J X, WANG B, YU M. Research progress on antitumor mechanism of traditional Chinese medicine based on theory of "Fuzheng Quxie"[J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2021, 52(18): 5751-5757.
- [6] 李生龙,梁永林,杨秀娟,等. miRNA在前列腺癌中的作用及中医药干预研究进展[J]. 中国中药杂志, 2025, 50(10): 2619-2630.
LI S L, LIANG Y L, YANG X J, et al. Role of miRNA in prostate cancer and research progress of traditional Chinese medicine intervention[J]. Chin J Chin Mater Med, 2025, 50(10): 2619-2630.
- [7] 张健,陈东,赵刚,等. 中医药治疗前列腺癌现代机制研究进展[J]. 中华中医药学刊, 2024, 42(3): 132-137.
ZHANG J, CHEN D, ZHAO G, et al. Research and discussion on modern mechanism of traditional Chinese medicine in treatment of prostate cancer[J]. Chin Arch Tradit Chin Med, 2024, 42(3): 132-137.
- [8] 刘德果,李姿蓉,胡金辉,等. 由“阳化气,阴成形”理论探讨扶阳法在前列腺癌治疗中的应用[J]. 中华中医药杂志, 2021, 36(5): 2775-2778.
LIU D G, LI Z R, HU J H, et al. Discussion on the application of strengthening Yang Qi method in prostate cancer based on the theory of 'Yang transforming Qi, Yin constituting the body'[J]. Chin J Tradit Chin Med Pharm, 2021, 36(5): 2775-2778.
- [9] 李云智,于文晓,郭军,等. 基于“脑-心-肾-精室”轴辨治前列腺癌的优势环节探讨[J]. 科学通报, 2025, 70(35): 6040-6048.
LI Y Z, YU W X, GUO J, et al. Theoretical and practical advantages of the "brain-heart-kidney-essence chamber" axis in prostate cancer[J]. Chin Sci Bull, 2025, 70(35): 6040-6048.
- [10] 关木馨,冯佳兴,朱梦一,等. 桂枝茯苓丸治疗卵巢癌临床研究的前沿进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2025, 31(12): 296-303.
GUAN M X, FENG J X, ZHU M Y, et al. Clinical research on Guizhi Fulingwan in treatment of ovarian cancer: A review[J]. Chin J Exp Tradit Med Form, 2025, 31(12): 296-303.
- [11] DIENER C, KELLER A, MEESE E. Emerging concepts of miRNA therapeutics: From cells to clinic[J]. Trends Genet, 2022, 38(6): 613-626.
- [12] JIANG X, GUO S, ZHANG Y, et al. LncRNA NEAT1 promotes docetaxel resistance in prostate cancer by regulating ACSL4 via sponging miR-34a-5p and miR-204-5p[J]. Cell Signal, 2020, 65: 109422. 31672604.
- [13] MA E, WANG Q, LI J, et al. LINC01006 facilitates cell proliferation, migration and invasion in prostate cancer through targeting miR-34a-5p to up-regulate DAAM1[J]. Cancer Cell Int, 2020, 20(1): 515.
- [14] HUANG Y, LIN L, SHANKER A, et al. Resuscitating cancer immunosurveillance: Selective stimulation of DLL1-Notch signaling in T cells rescues T-cell function and inhibits tumor growth[J]. Cancer Res, 2011, 71(19): 6122-6131.
- [15] XU Z, SHI Y, PAN B, et al. Current landscape and therapeutic prospects of indole hybrids for prostate cancer treatment: A mini-review[J]. Eur J Med Chem, 2026, 305: 118583.
- [16] ALMEERI E M N, AWIES M, CONSTANTINOU C. Prostate cancer, pathophysiology and recent developments in management: A narrative review[J]. Curr Oncol Rep, 2024, 26(11): 1511-1519.
- [17] WASIM S, LEE S Y, KIM J. Complexities of prostate cancer[J]. Int J Mol Sci, 2022, 23(22): 14257.

- [18] LI S, JING S, ZHOU J, et al. Chinese medicines as therapeutic options for treating prostate cancer: Therapeutic effects and underlying mechanisms [J]. *J Ethnopharmacol*, 2026, 354: 120471.
- [19] LI Y, LI C, FAN J, et al. The application of traditional Chinese medicine-derived formulations in cancer immunotherapy: A review [J]. *Cancer Manag Res*, 2025, 17: 23-34.
- [20] 朱胤福, 李怡燃, 王奕, 等. 桂枝茯苓丸活性成分常春藤皂苷元通过抑制 JAK2/STAT3 通路抑制宫颈癌细胞的生长 [J]. *南方医科大学学报*, 2025, 45(7): 1423-1433.
- ZHU Y F, LI Y R, WANG Y, et al. Therapeutic mechanism of hederagenin, an active component in Guizhi Fuling pellets, against cervical cancer in nude mice [J]. *J South Med Univ*, 2025, 45(7): 1423-1433.
- [21] DAI Y, QIANG W, YU X, et al. Guizhi Fuling decoction inhibiting the PI3K and MAPK pathways in breast cancer cells revealed by HTS2 technology and systems pharmacology [J]. *Comput Struct Biotechnol J*, 2020, 18: 1121-1136.
- [22] 刘浩楠. 桂枝茯苓丸促进铁死亡治疗卵巢癌的机制初探 [D]. 天津: 天津中医药大学, 2025.
- LIU H N. A Preliminary Study on the Mechanism of Guizhi Fuling Pills in the Treatment of Ovarian Cancer by Promoting Ferroptosis [D]. Tianjin: Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, 2025.
- [23] 冯敏, 袁烁, 黄艳茜, 等. 基于网络药理学和细胞实验探讨桂枝茯苓丸对卵巢癌的作用 [J]. *中成药*, 2023, 45(9): 3081-3090.
- FENG M, YUAN S, HUANG Y Q, et al. Exploring the effects of Guizhi Fuling pill on ovarian cancer based on network pharmacology and cell experiments [J]. *Chin Tradit Pat Med*, 2023, 45(9): 3081-3090.
- [24] 马启宏. 桂枝茯苓丸调控 STAT3 信号抗卵巢癌的分子机制研究 [D]. 北京: 北京中医药大学, 2023.
- MA Q H. Study on the molecular mechanism of Guizhi Fuling pill regulating STAT3 signal to inhibit ovarian cancer [D]. Beijing: Beijing University of Chinese Medicine, 2023.
- [25] 孙晓春, 郭佳宸, 孙琛, 等. 桔梗、白花蛇舌草不同组分对人肺癌细胞 A549 的抑制作用 [J]. *中国农学通报*, 2019, 35(1): 144-148.
- SUN X C, GUO J C, SUN C, et al. The inhibitory effect of extracts from *Platycodon grandiflorum* and *Hedyotis diffusa* Willd on human lung cancer cells A549 [J]. *Chin Agric Sci Bull*, 2019, 35(1): 144-148.
- [26] 王信, 马传江, 杨培民, 等. 白花蛇舌草抗炎、抗肿瘤作用研究进展 [J]. *中国现代应用药学*, 2020, 37(19): 2420-2427.
- WANG X, MA C J, YANG P M, et al. Research progress of anti-inflammatory and anti-tumor effects of *Hedyotis Diffusa* Willd [J]. *Chin J Mod Appl Pharm*, 2020, 37(19): 2420-2427.
- [27] LI X, ZHAO S, FU Y, et al. miR-34a-5p functions as a tumor suppressor in head and neck squamous cell cancer progression by targeting Flotillin-2 [J]. *Int J Biol Sci*, 2021, 17(15): 4327-4339.
- [28] ABDOLI SHADBAD M, BAGHBANZADEH A, BARADARAN B. Hsa-miR-34a-5p enhances temozolomide anti-tumoral effects on glioblastoma: *In-silico* and *in-vitro* study [J]. *Excli J*, 2024, 23: 384-400.
- [29] XIE P, WANG Z, CHEN X, et al. Regulations of LINC0196/miR-584-5p/miR-34a-5p/TRIM59 on progression of pediatric neuroblastoma [J]. *Cell Mol Biol*, 2022, 68(6): 117-123.
- [30] AI J, LI J, SU Q, et al. rAAV-based and intraprostatically delivered miR-34a therapeutics for efficient inhibition of prostate cancer progression [J]. *Gene Ther*, 2022, 29(7/8): 418-424.
- [31] LIU F, SUN H, LI D, et al. DLL1/NOTCH1 signaling pathway maintain angiogenesis in meniscus development and degeneration [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2024, 172: 106589.
- [32] HIRANO K I, HOSOKAWA H, YAHATA T, et al. Dll1 can function as a ligand of Notch1 and Notch2 in the thymic epithelium [J]. *Front Immunol*, 2022, 13: 852427.
- [33] WEN Y, HUANG H, HUANG B, et al. HSA-miR-34a-5p regulates the SIRT1/TP53 axis in prostate cancer [J]. *Am J Transl Res*, 2022, 14(7): 4493-4504.

[责任编辑 顾雪竹]