

本文引用: 黄鸿宇, 郭子莘, 朱文雄, 袁轶峰, 贺菊乔, 刘涛, 谭梅鑫, 杨金玉, 曹雨昱, 张熙. 前癯通胶囊介导 miR-216a-5p/TPT1/mTORC1 通路调控良性前列腺增生的实验研究[J]. 湖南中医药大学学报, 2024, 44(3): 374-382.

## 前癯通胶囊介导 miR-216a-5p/TPT1/mTORC1 通路 调控良性前列腺增生的实验研究

黄鸿宇<sup>1,2</sup>, 郭子莘<sup>1,2</sup>, 朱文雄<sup>3</sup>, 袁轶峰<sup>3</sup>, 贺菊乔<sup>3</sup>, 刘涛<sup>3</sup>, 谭梅鑫<sup>1</sup>, 杨金玉<sup>2</sup>, 曹雨昱<sup>2</sup>, 张熙<sup>1\*</sup>

1.湖南省脑科医院(湖南省第二人民医院), 湖南长沙 410021; 2.湖南中医药大学中西医结合学院, 湖南长沙 410208;

3.湖南中医药大学第一附属医院, 湖南长沙 410007

**【摘要】目的** 通过细胞实验探讨前癯通胶囊(qian long tong capsule, QLTC)能否通过调控 miR-216a-5p/肿瘤蛋白翻译控制1/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白复合物1(miR-216a-5p/tumor protein translationally controlled 1/mammalian target of rapamycin complex 1, miR-216a-5p/TPT1/mTORC1)信号通路抑制良性前列腺增生(benign prostatic hyperplasia, BPH)。**方法** 将25只大鼠随机分为对照组(等体积生理盐水), QLTC低(56.25 mg/mL)、中(112.50 mg/mL)、高(225.00 mg/mL)剂量组, LBSC组(168.75 mg/mL), 每组5只。每组灌胃1 mL/次, 2次/d, 连续5 d。各组大鼠麻醉后制备含药血清。根据实验目的不同, 将CP-H022细胞分5步做实验处理, 每部分实验进行独立分组。将 miR-216a-5p 过表达和沉默表达, 及 TPT1 过表达进行对照研究; RT-qPCR 法检测正常和 BPH 模型 CP-H022 细胞内 miR-216a-5p 表达量, 并观察不同浓度 QLTC 处理的 BPH 细胞中 miR-216a-5p 表达量的差异; 细胞集落形成实验检测细胞增殖能力; CCK-8 法检测 BPH 模型细胞增殖; RT-qPCR 法检测 miR-216a-5p、TPT1 mRNA 表达水平; 流式细胞术检测细胞凋亡; 生信分析、双荧光素酶实验验证 miR-216a-5p 与 TPT1 的靶向关系; 过表达 TPT1 后, Western blot 法检测 BPH 细胞中 TPT1/mTORC1 信号通路相关分子表达情况。**结果** 与对照组 1 比较, 模型组 1 的 CP-H022 细胞内 miR-216a-5p 表达量下调( $P<0.05$ ); 不同浓度的 QLTC 均能上调 miR-216a-5p 表达量( $P<0.05$ ); 根据本实验结果, 本研究将选用 QLTC(高剂量)组 CP-H022 细胞进行后续实验。与模型组 2 比较, QLTC 组 2 细胞增殖减少、凋亡增加( $P<0.05$ ), B 细胞淋巴瘤-2(B-cell lymphoma-2, Bcl-2)表达降低( $P<0.05$ ), Bcl-2 关联 X 蛋白单克隆抗体(monoclonal antibody to Bcl-2 associated X protein, Bax), cleaved Caspase-3 表达升高( $P<0.05$ )。敲低 miR-216a-5p 后, 与模型组 4 比较, QLTC 组 4 细胞增殖增强、凋亡减少( $P<0.05$ ), Bcl-2 表达升高( $P<0.05$ ), Bax, cleaved Caspase-3 表达降低( $P<0.05$ )。与 mimic-NC 组比较, miR-216a-5p mimic 组 TPT1 表达量降低( $P<0.05$ ); QLTC 处理后, 细胞 TPT1, p-mTORC1 表达均降低( $P<0.05$ ); 过表达 TPT1 后 BPH 细胞增殖功能增强( $P<0.05$ ), 凋亡减少( $P<0.05$ ), Bcl-2 表达升高( $P<0.05$ ), Bax, cleaved Caspase-3 表达下降( $P<0.05$ )。**结论** QLTC 可通过介导 miR-216a-5p 下调 TPT1/mTORC1 通路, 进而抑制 BPH。

**【关键词】** 前癯通胶囊; 良性前列腺增生; 细胞实验; miR-216a-5p; 肿瘤蛋白翻译控制 1; 哺乳动物雷帕霉素靶蛋白复合物 1; 信号通路

【中图分类号】R277.5

【文献标志码】A

【文章编号】doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2024.03.005

## Experimental study of Qianlongtong Capsule on mediating miR-216a-5p/ TPT1/mTORC1 pathway to regulate benign prostate hyperplasia

HUANG Hongyu<sup>1,2</sup>, GUO Zishen<sup>1,2</sup>, ZHU Wenxiong<sup>3</sup>, YUAN Yifeng<sup>3</sup>, HE Juqiao<sup>3</sup>, LIU Tao<sup>3</sup>,

TAN Meixin<sup>1</sup>, YANG Jinyu<sup>2</sup>, CAO Yutan<sup>2</sup>, ZHANG Xi<sup>1\*</sup>

【收稿日期】2023-11-17

【基金项目】湖南省自然科学基金项目(2021JJ30396); 湖南省卫生健康委科研计划项目(202103051239); 湖南省中医药科研计划项目(2021108)。

【通信作者】\* 张熙, 女, 教授, 博士研究生导师, E-mail: cmxfyjzx2049@126.com。

1. Hunan Brain Hospital (Hunan Second People's Hospital), Changsha, Hunan 410021, China; 2. School of Integrated Chinese and Western Medicine, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China; 3. The First Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410007, China

**[Abstract] Objective** To investigate whether Qianlongtong Capsule (QLTC) can inhibit benign prostatic hyperplasia (BPH) by regulating the signaling pathway of miR-216a-5p/tumor protein translationally controlled 1/mammalian target of rapamycin complex 1 (miR-216a-5p/TPT1/mTORC1) through cell experiments. **Methods** A total of 25 rats were randomized into control (equal volume of normal saline), low-(56.25 mg/mL), medium-(112.50 mg/mL), and high-dose (225.00 mg/mL) QLTC, and LBSC groups (168.75 mg/mL), with five rats in each group. The rats in each group were given corresponding drug 1 mL by gavage, twice a day, for continual five days. Drug-containing serum was prepared from rats in each group after anesthesia. According to different experimental purposes, CP-H022 cells were treated experimentally by five steps, and each part of the experiment was grouped independently. The comparative study on overexpression and silencing expression of miR-216a-5p, and TPT1 overexpression was performed; RT-qPCR was used to determine the expression levels of miR-216a-5p in normal and BPH model CP-H022 cells, and observe the differences of miR-216a-5p expression levels in BPH cells treated with different concentrations of QLTC; cell colony formation assay was used to examine cell proliferation; CCK-8 was used to test the proliferation of BPH model cells; RT-qPCR was used to determine the expression levels of miR-216a-5p and TPT1 mRNA; cell apoptosis was checked by flow cytometry; bioinformatics analysis and dual luciferase assay were used to verify the targeting relationship between miR-216a-5p and TPT1; after overexpression of TPT1, Western blot was used to examine the expression of TPT1/mTORC1 signaling pathway related molecules in BPH cells. **Results** Compared with the control group, the expression level of miR-216a-5p in CP-H022 cells in the model group 1 downregulated ( $P<0.05$ ); different concentrations of QLTC can upregulate the expression of miR-216a-5p; based on the results of this experiment, QLTC (high-dose) group CP-H022 cells will be selected for subsequent experiments in this study. Compared with the model group 2, cell proliferation decreased and apoptosis increased in QLTC group 2 ( $P<0.05$ ), Bcl-2 expression decreased ( $P<0.05$ ), and expressions of Bax and cleaved Caspase-3 increased ( $P<0.05$ ); compared with the model group 4, after knocking down miR-216a-5p, the QLTC group 4 showed higher cell proliferation and lower apoptosis ( $P<0.05$ ), increased expression of Bcl-2 ( $P<0.05$ ), and decreased expressions of Bax and cleaved Caspase-3 ( $P<0.05$ ). Compared with the mimic-NC group, the expression of TPT1 of miR-216a-5p mimic group decreased ( $P<0.05$ ); after QLTC treatment, the expressions of TPT1 and p-mTORC1 in cells decreased ( $P<0.05$ ); after overexpression of TPT1, the proliferation function of BPH cells was higher ( $P<0.05$ ), apoptosis was lower ( $P<0.05$ ), Bcl-2 expression increased ( $P<0.05$ ), and expressions of Bax and Cleaved Caspase-3 decreased ( $P<0.05$ ). **Conclusion** QLTC can inhibit benign prostatic hyperplasia by mediating miR-216a-5p to downregulate TPT1 / mTORC1 pathway.

**[Keywords]** Qianlongtong Capsule; benign prostatic hyperplasia; cell experiment; miR-216a-5p; tumor protein translationally controlled 1; mammalian target of rapamycin complex 1; signaling pathway

良性前列腺增生(benign prostatic hyperplasia, BPH)是中老年男性最常见的泌尿系统疾病之一,其特征是前列腺非恶性肿大导致的尿液储存和膀胱排空障碍<sup>[1]</sup>。目前,治疗手段主要包括手术疗法和药物治疗法(如 $\alpha$ 受体阻断剂、5 $\alpha$ -还原酶抑制剂等),但常伴随一系列不良反应<sup>[2]</sup>。近年来有研究表明,中药复方有助于BPH患者自身免疫功能的提高和机体修复<sup>[3]</sup>。因此,中医药已成为治疗BPH的重要方法之一。前癉通胶囊(qian long tong capsule, QLTC)由黄芪、丹参、三七、穿山甲、牛痘精液、蒲公英等组成,是贺菊乔教授广研中医文献并根据多年临床经验研制

的治疗BPH的中药复方<sup>[4]</sup>。前期研究证实,QLTC能明显改善BPH国际前列腺症状评分、尿流率和残余尿量,缩小增生的前列腺体积,其治疗BPH临床疗效显著<sup>[5-6]</sup>。由于BPH是由于前列腺过渡区(prostate transition zone, PTZ)和尿道周围区域的上皮和肌纤维组织不受调节地增生生长所致<sup>[7]</sup>,故控制前列腺纤维细胞过度增殖是治疗BPH的关键。目前研究发现,miR-216a-5p与前列腺成纤维细胞的增殖相关<sup>[8]</sup>,但miR-216a-5p在BPH中的调节作用及病理生理过程中涉及的具体分子通路还有待深入研究。亦有研究指出,在胰腺癌治疗中,miR-216a-5p可靶向调控

肿瘤蛋白翻译控制 1 (tumor protein translationally controlled 1, TPT1) 和哺乳动物雷帕霉素靶蛋白复合物 1 (mammalian target of rapamycin complex 1, mTORC1) 信号, 可有效抑制肿瘤发生<sup>[9]</sup>。然而, 在 BPH 治疗相关研究中, TPT1 是否受 miR-216a-5p 调控以及 TPT1 是否参与 miR-216a-5p 介导的协同作用目前尚未有研究讨论。本文从 QLTC 介导 miR-216a-5p 调控前列腺成纤维细胞增殖和凋亡的分子机制展开研究, 拟进一步确认 QLTC 能否介导 miR-216a-5p 靶向 TPT1/mTORC1 信号通路对 BPH 进行有效治疗, 以期为临床应用 QLTC 延缓 BPH 提供实验依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 动物和细胞

25 只 SD 雄性大鼠, 6 周龄, 体质量 180~220 g, 购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司[许可证号 SCXK(湘)2019-0004], 在湖南中医药大学第一附属医院实验动物中心饲养(温度 25 ℃, 湿度 50%)。伦理编号: 2020(K)034。饲养笼具、垫料、饮水的制备与消毒均符合 SPF 级实验动物饲养要求。人前列腺成纤维细胞(武汉普诺赛生命科技有限公司, 批号: CP-H022)。

### 1.2 主要药物和试剂

QLTC(湖南中医药大学第一附属医院制剂中心, 规格: 0.5 g×40 粒/瓶, 批号: 090223); 癃闭舒胶囊(long bi shu capsule, LBSC)(石家庄科迪药业有限公司, 国药准字 Z20050356, 0.3 g/片, 批号: 171004); Trizol 试剂盒(美国赛默飞世尔科技公司, 批号: 15596026); miRNA 逆转录试剂盒、mRNA 逆转录试剂盒(中国北京康为世纪生物科技有限公司, 批号: CW2141、CW2569); B 细胞淋巴瘤-2(B-cell lymphoma-2, Bcl-2)、Bcl-2 关联 X 蛋白单克隆抗体(monoclonal antibody to Bcl-2 associated X protein, Bax)、TPT1 抗体、辣根过氧化物酶 HRP 标记亲和纯化山羊抗兔 IgG、293T 细胞、oe-TPT1(长沙艾碧维生物科技有限公司, 批号: AWA43352、AWA47651、AWA43641、AWS0002、HG-NC002、HG-H0003295); cleaved Caspase-3 抗体(美国 CST 生物公司, 批号: #9661); mTORC1 抗体、磷酸化 mTORC1 抗体(p-mTORC1)(美国 Abcam 公司, 批号: ab134903、ab109268); HRP 标记的二抗山羊抗兔 IgG 抗体(武汉三鹰生物技术有限公司, 批号: SA00001-2);

APC 凋亡试剂盒(江苏凯基生物技术股份有限公司, 批号: KGA1007); miR-216a-5p mimics 及 inhibitor、野生型人 TPT1 基因双荧光素酶报告质粒(ψiCHECK-2-TPT1)、突变型人 TPT1 基因双荧光素酶报告质粒(ψiCHECK-2-TPT1-MUT)(上海皓元生物医药科技有限公司, 批号: HY-R00451、HY-R00385、HY-R00451); 双荧光素酶检测试剂盒(普洛麦格生物技术有限公司, 批号: E1910)。

### 1.3 主要仪器

化学发光成像系统(勤翔科学仪器有限公司, 型号: ChemiScope6100); 电泳仪(中国北京六一生物技术有限公司, 型号: DYY-2C); 酶标仪(美国伯腾仪器有限公司, 型号: 800TS); 荧光定量 PCR 仪、荧光 PCR 板(美国赛默飞世尔科技公司, 型号: PIKO-REAL96、SPL0960); 流式细胞仪(贝克曼库尔特生物科技有限公司, 型号: A00-1-1102); 显微镜(北京中显恒业仪器仪表有限公司, 型号: DSZ2000X)。

### 1.4 含药血清制备

将 25 只大鼠随机分为对照组, QLTC 低、中、高剂量组, LBSC 组, 每组 5 只。根据团队前期研究, QLTC 低、中、高剂量组大鼠给予相应浓度的 QLTC 药液(取 QLTC 中药粉溶于蒸馏水中; QLTC 低、中、高剂量组浓度分别为 56.25、112.50、225.00 mg/mL); LBSC 组大鼠给予 LBSC 药液(取 LBSC 中药粉溶于蒸馏水中, 配制成 168.75 mg/mL 药液); 对照组大鼠给予等体积生理盐水进行灌胃<sup>[10]</sup>。每组灌胃 1 mL/次, 2次/d, 连续 5 d。末次灌胃后 1 h, 用戊巴比妥钠将各组大鼠麻醉, 从后腹主动脉及心室采血, 无菌分离血清, 灭活除菌后分装入小瓶, 保存于 -80 ℃ 冰箱。

### 1.5 细胞培养与分组处理

CP-H022 细胞使用含 10% FBS 和 1% P/S 的 MEM 培养基培养。细胞均于 37 ℃、5% CO<sub>2</sub> 的饱和湿度培养箱中培养。为了模拟体内雄激素诱导的 BPH, 均用 10 nm DHT 处理接种的 CP-H022 细胞 72 h<sup>[11]</sup>。根据实验目的不同, 分 4 步做实验处理, 每部分实验进行独立分组。

第一部分实验中, 将 CP-H022 细胞随机分为 6 组。对照组 1: CP-H022 细胞+10% 对照组大鼠血清; 模型组 1: CP-H022 细胞+10% 对照组大鼠血清+10 nm DHT; QLTC(低剂量)组: CP-H022 细胞+10% QLTC 低剂量组大鼠含药血清+10 nm DHT; QLTC(中剂

量)组:CP-H022 细胞+10%QLTC 中剂量组大鼠含药血清+10 nm DHT;QLTC(高剂量)组:CP-H022 细胞+10%QLTC 高剂量组大鼠含药血清+10 nm DHT;LBSC 组:CP-H022 细胞+10%LBSC 组大鼠血清含药血清+10 nm DHT。

第二部分实验中,将 CP-H022 细胞随机分为 4 组。模型组 2:CP-H022 细胞+10%对照组大鼠血清+10 nm DHT;QLTC 组 2:CP-H022 细胞+10% QLTC 高剂量组大鼠含药血清+10 nm DHT;QLTC+inhibitor-NC 组:CP-H022 细胞(转染 inhibitor-NC)+10%QLTC 高剂量组大鼠含药血清+10 nm DHT;QLTC+miR-216a-5p inhibitor 组:CP-H022 细胞(转染 miR-216a-5p inhibitor)+10%QLTC 高剂量组大鼠含药血清+10 nm DHT。

第三部分实验中,将 CP-H022 细胞随机分为 4 组。inhibitor-NC 组:CP-H022 细胞(转染 inhibitor-NC)+10 nm DHT;miR-216a-5p inhibitor 组:CP-H022 细胞(转染 miR-216a-5p inhibitor)+10 nm DHT;mimic-NC 组:CP-H022 细胞(转染 mimic-NC)+10 nm DHT;miR-216a-5p mimic 组:CP-H022 细胞(转染 miR-216a-5p mimic)+10 nm DHT。

第四部分实验中,将 CP-H022 细胞随机分为 4 组。模型组 4:CP-H022 细胞+10%对照组大鼠血清+10 nm DHT;QLTC 组 4:CP-H022 细胞+10%QLTC 高剂量组大鼠含药血清+10 nm DHT;QLTC+oe-NC 组:CP-H022 细胞(转染 oe-NC)+10%QLTC 高剂量组大鼠含药血清+10 nm DHT;QLTC+oe-TPT1 组:CP-H022 细胞(转染 oe-TPT1)+10%QLTC 高剂量组大鼠含药血清+10 nm DHT。

## 1.6 细胞转染

CP-H022 细胞在体外用 MEM 培养基(含 10% FBS 和 1% P/S)培养在 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 的培养箱中。将转染所需质粒和转染试剂 Lip2 000 加入无血清 MEM 培养基中配置转染液,混匀。CP-H022 细胞与转染混合液 37 °C 下孵育 6 h 后,更换完全培养基进行培养。

## 1.7 RT-qPCR 法检测各组细胞中 miR-216a-5p、TPT1 mRNA 的表达水平

收集细胞样本,使用 Trizol 试剂盒提取各组细胞总 RNA, RNA 的浓度和纯度通过带紫外波长滤光片

的酶标仪测定。参照 miRNA 逆转录试剂盒, mRNA 逆转录试剂盒说明书合成 cDNA。使用 SYBR Green RT-PCR 试剂盒扩增 DNA 片段,重复 3 次。以相对定量 2<sup>- $\Delta\Delta C_t$</sup>  法分析细胞中 miR-216a-5p、TPT1 mRNA 的表达量。所有基因均来源于人类。TPT1 内参为  $\beta$ -actin, miR-216a-5p 内参为 U6。引物序列详见表 1。

表 1 靶基因引物列表

基因	引物序列	引物长度/bp
$\beta$ -actin	正向: ACCCTGAAGTACCCATCGAG	224
	反向: AGCACAGCTGGATAGCAAC	
U6	正向: CTCGCTTCGGCAGCACA	94
	反向: AACGCTTCACGAATTTGCGT	
miR-216a-5p	正向: TAATCTCAGCTGGCAACTGTGA	86
	反向: GCTGTCAACGATACGCTACGTAA	
TPT1	正向: CAAGCTCTCCAGGCTTGCTA	85
	反向: GGAACACATCGGAGTTGGGT	

## 1.8 细胞集落形成实验

CP-H022 细胞按照每孔 200 个的密度种植在 6 孔板内,每 3 天更换一次培养基。当菌落明显形成时,终止培养。用 4% 多聚甲醛固定细胞,待菌落被结晶紫染色,对细胞菌落进行拍照和计数。

## 1.9 CCK-8 实验

胰酶消化后,根据 5 $\times$ 10<sup>4</sup> 个细胞/孔的密度将 CP-H022 细胞接种于 12 孔板内,培养 24 h。按照 50  $\mu$ L/孔的浓度,用完全培养基配制 CCK-8 溶液,每孔 CP-H022 细胞加入 500  $\mu$ L 含有 CCK-8 的培养基。CP-H022 细胞在 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 条件下继续孵育 2 h 后转移到 96 孔板,并于多功能酶标仪 450 nm 测量吸光度。每组设置 3 复孔,取均值做柱状图。

## 1.10 流式细胞术检测细胞凋亡

CP-H022 细胞被胰酶(无 EDTA)消化后,收集细胞悬液,1 000 r/min 离心 5 min(离心半径 9 cm)。洗涤细胞沉淀后,500  $\mu$ L 的 Binding buffer 被加入离心管中悬浮细胞。使用 APC 细胞凋亡检测试剂盒对 CP-H022 细胞进行染色,避光孵育 10 min。CP-H022 细胞的凋亡情况使用流式细胞仪观察并记录。

## 1.11 双荧光素酶实验

采用 TargetScan 数据库(<http://www.Targetscan.org/>)预测 miR-216a-5p 与 TPT1 的结合位点。分别构建 miR-216-5p inhibitor 和 miR-216a-5p mimic

质粒,将 CP-H022 细胞培养于 MEM 培养基中。将 psiCHECK-2-TPT1、psiCHECK-2-TPT1-MUT 进行转染级质粒大提。为检测 miR-216a-5p 与 TPT1 的结合位点,将 CP-H022 细胞随机分为以下 4 组。TPT1-WT+hsa-miR-216a-5p NC 组;CP-H022 细胞共转染 psiCHECK-2-TPT1 大提质粒+hsa-miR-216a-5p NC(终浓度 50 nm)的 293T 细胞;TPT1-WT+hsa-miR-216a-5p mimic 组;CP-H022 细胞共转染 psiCHECK-2-TPT1 大提质粒+hsa-miR-216a-5p mimics(终浓度 50 nm)的 293T 细胞;TPT1-MUT+hsa-miR-216a-5p NC 组;CP-H022 细胞共转染 psiCHECK-2-TPT1-MUT 大提质粒+hsa-miR-216a-5p NC(终浓度 50 nm)的 293T 细胞;TPT1-MUT+hsa-miR-216a-5p mimic 组;CP-H022 细胞共转染 psiCHECK-2-TPT1-MUT 大提质粒+hsa-miR-216a-5p mimics(终浓度 50 nm)的 293T 细胞。细胞共转染和培养 48 h 后收集细胞沉淀,采用双萤光素酶活性检测试剂盒根据说明书检测细胞萤光素酶活性并计算海肾萤光素酶与萤火虫萤光素酶的比值。

### 1.12 Western blot 检测 TPT1 和 mTORC1 蛋白表达情况

RIPA 缓冲液提取细胞蛋白裂解物。BCA 法检测蛋白浓度。SDS-PAGE 凝胶电泳于室温封闭 1.5 h,将分离的蛋白转移到 PVDF 膜。洗膜 3 次后加 Bcl-2(1:3 000)、Bax(1:3 000)、cleaved Caspase-3(1:3 000)、TPT1(1:3 000)、p-mTORC1(1:3 000)、mTORC1(1:3 000)和  $\beta$ -actin(1:1 000)抗体稀释液于 4 °C 孵育过夜;洗膜 3 次后加二抗 HRP 山羊抗兔 IgG(1:6 000),室温孵育 1.5 h 后添加 ECL 显影液显影。结果运用 Quantity One 软件进行分析。

### 1.13 统计学分析

采用 GraphPad Prism 8.0 软件进行分析,符合正态分布的数据以“ $\bar{x} \pm s$ ”表示。两组之间比较采用非配对 *t* 检验;3 组及以上数据比较采用 *one-way ANOVA*,*Tukey's* 进行事后检验。 $P < 0.05$  表示差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 BPH 细胞中 miR-216a-5p 相对表达情况

与对照组 1 比较,模型组 1,QLTC(低、中、高剂量)组,LBSC 组 miR-216a-5p 的相对表达量均下调( $P < 0.05$ );与模型组 1 比较,QLTC(低、中、高剂量)组和

LBSC 组 miR-216a-5p 的相对表达量均上调( $P < 0.05$ );与 QLTC(低剂量)组比较,QLTC(中、高剂量)组和 LBSC 组中 miR-216a-5p 相对表达量均上调( $P < 0.05$ );与 QLTC(中剂量)组比较,QLTC(高剂量)组和 LBSC 组中 miR-216a-5p 的相对表达量均上调( $P < 0.05$ );与 QLTC(高剂量)组比较,LBSC 组 miR-216a-5p 的相对表达量下调( $P < 0.05$ )。根据本实验结果,本研究将选用 QLTC(高剂量)组 CP-H022 细胞进行后续实验。详见图 1。

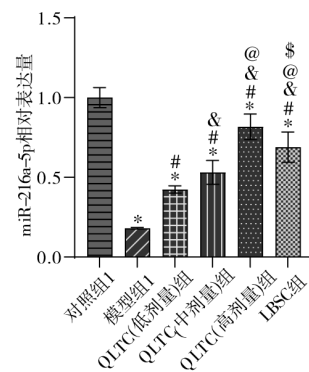


图 1 QLTC 干预下 CP-H022 细胞中 miR-216a-5p 表达情况

注:与对照组 1 比较,\* $P < 0.05$ ;与模型组 1 比较,# $P < 0.05$ ;与 QLTC(低剂量)组比较,\$ $P < 0.05$ ;与 QLTC(中剂量)组比较,@ $P < 0.05$ ;与 QLTC(高剂量)组比较,& $P < 0.05$ 。

### 2.2 QLTC 干预后 BPH 细胞中 miR-216a-5p 表达情况及细胞增殖情况

与模型组 2 比较,QLTC 组 2、QLTC+inhibitor-NC 组的 miR-216a-5p 相对表达量上调,集落形成数减少,在 24 h、48 h、72 h 时细胞增殖能力均减弱,CP-H022 细胞凋亡率增加,Bcl-2 蛋白相对表达降低,Bax、cleaved Caspase-3 蛋白相对表达升高( $P < 0.05$ );与 QLTC 组 2、QLTC+inhibitor-NC 组比较,QLTC+miR-216a-5p inhibitor 组 miR-216a-5p 相对表达量下降,集落形成数增多,在 24 h、48 h、72 h 时细胞增殖能力均增强,CP-H022 细胞凋亡率减少,Bcl-2 蛋白相对表达升高,Bax、cleaved Caspase-3 蛋白相对表达降低( $P < 0.05$ )。详见图 2。

### 2.3 BPH 细胞中 TPT1 与 miR-216a-5p 的靶向关系情况

生信分析检测,发现 miR-216a-5p 与 TPT1 存在碱基互作,详见图 3A。与 TPT1-WT+hsa-miR-216a-5p NC 组比较,TPT1-WT+hsa-miR-216a-5p 组海肾萤光素酶/萤火虫萤光素酶比值降低( $P < 0.05$ ),详见图 3B。与 inhibitor-NC 组比较,miR-216a-5p inhibitor

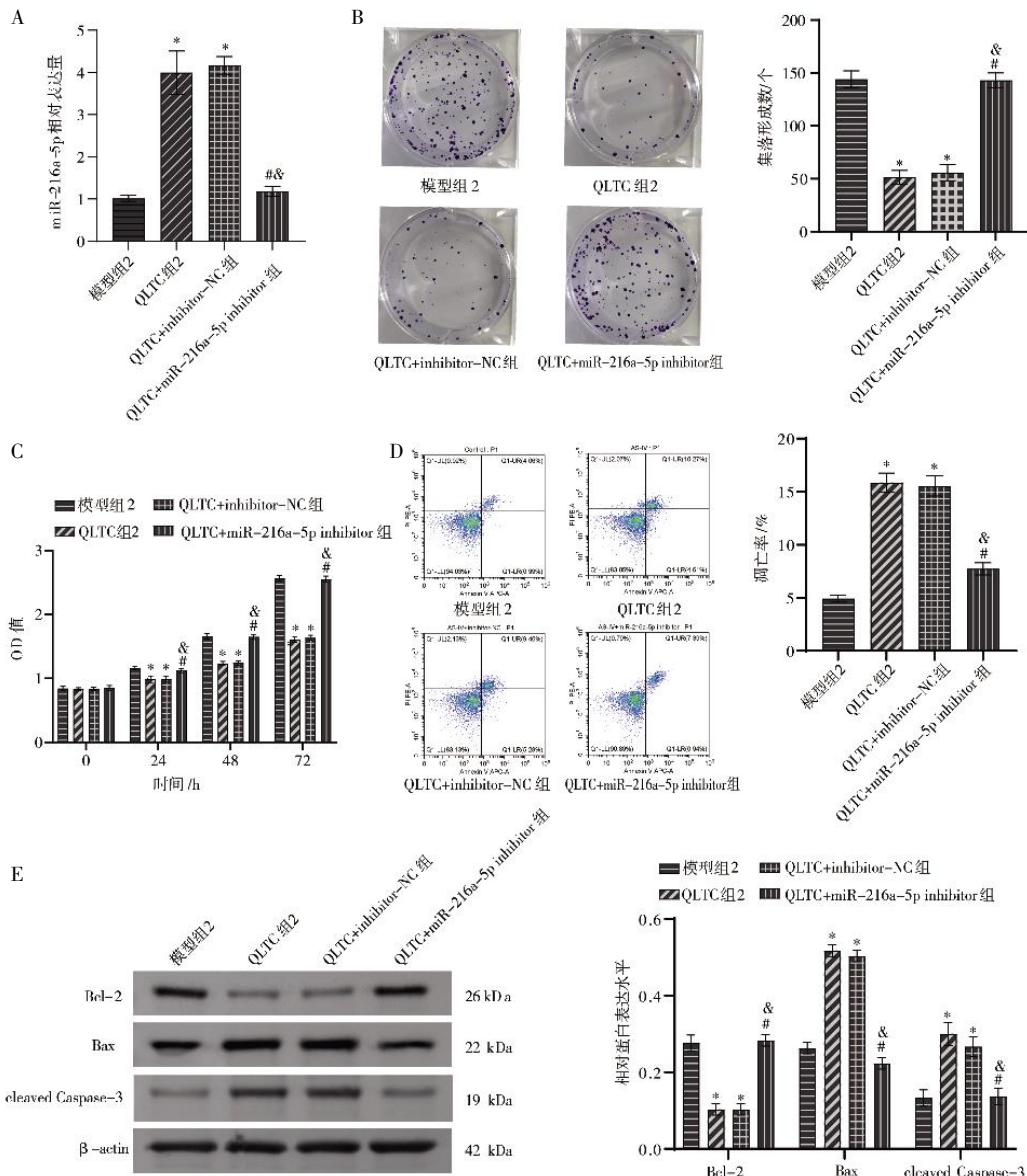


图2 BPH细胞中QLTC介导miR-216a-5p对BPH细胞增殖的影响

注:A. RT-qPCR检测miR-216a-5p表达;B. 集落形成实验计数癌细胞集落和集落形成实验数据图;C. CCK-8检测细胞增殖;D. 流式细胞仪检测细胞凋亡;E. 细胞凋亡相关蛋白表达量条带图。与模型组2比较,\* $P < 0.05$ ;与QLTC组2比较,# $P < 0.05$ ;与QLTC+inhibitor-NC组比较,\* $P < 0.05$ 。

组 TPT1 的 mRNA 表达和蛋白相对表达水平增加 ( $P < 0.05$ ), miR-216a-5p mimic 组 TPT1 的 mRNA 表达和蛋白相对表达水平降低 ( $P < 0.05$ ); 与 miR-216a-5p inhibitor 组比较, miR-216a-5p mimic 组、mimic-NC 组 TPT1 的 mRNA 表达和蛋白相对表达水平降低 ( $P < 0.05$ ); 与 mimic-NC 组比较, miR-216a-5p mimic 组 TPT1 的 mRNA 表达和蛋白相对表达水平降低 ( $P < 0.05$ )。详见图 3C、D。

### 2.4 QLTC 介导 miR-216a-5p/TPT1/mTORC1 信号通路对 BPH 细胞增殖和凋亡的影响

与模型组 4 比较, QLTC 组 4 和 QLTC+oe-NC 组的 TPT1、p-mTORC1/mTORC1 蛋白相对表达降低, 集

落形成数减少, 在 48 h、72 h 时细胞增殖减弱, BPH 细胞凋亡率增加, Bcl-2 蛋白相对表达降低, Bax、cleaved Caspase-3 蛋白相对表达升高 ( $P < 0.05$ ); 与 QLTC 组 4、QLTC+oe-NC 组比较, QLTC+oe-TPT1 组 TPT1、p-mTORC1/mTORC1 蛋白相对表达均升高, 集落形成数增多, 在 48 h、72 h 时细胞增殖能力增强, BPH 细胞凋亡率减少, Bcl-2 蛋白相对表达升高, Bax、cleaved Caspase-3 蛋白相对表达下降 ( $P < 0.05$ )。详见图 4。

## 3 讨论

BPH 是中老年男性泌尿系统中最常见的疾病之

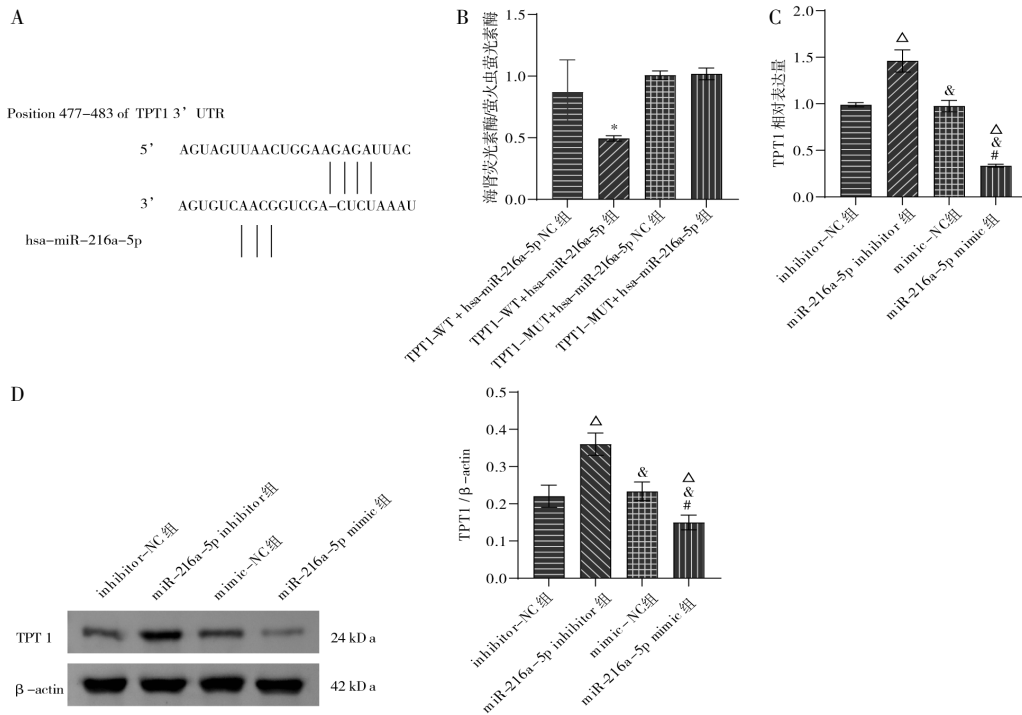


图3 miR-216a-5p在BPH细胞中与TPT1的靶向关系情况

注:A. miR-216a-5p与TPT1生信预测;B.CP-H022细胞中miR-216a-5p与TPT1双荧光素酶活性检测;C.RT-qPCR检测CP-H022细胞株中TPT1的mRNA表达水平;D. CP-H022细胞株中TPT1的蛋白相对表达水平。与TPT1-WT+hsa-miR-216a-5p NC组比较,\* $P<0.05$ ;与inhibitor-NC组比较, $^{\Delta}P<0.05$ ;与miR-216a-5p inhibitor组比较, $^{\#}P<0.05$ ;与mimic-NC组比较, $^{\#}P<0.05$ 。

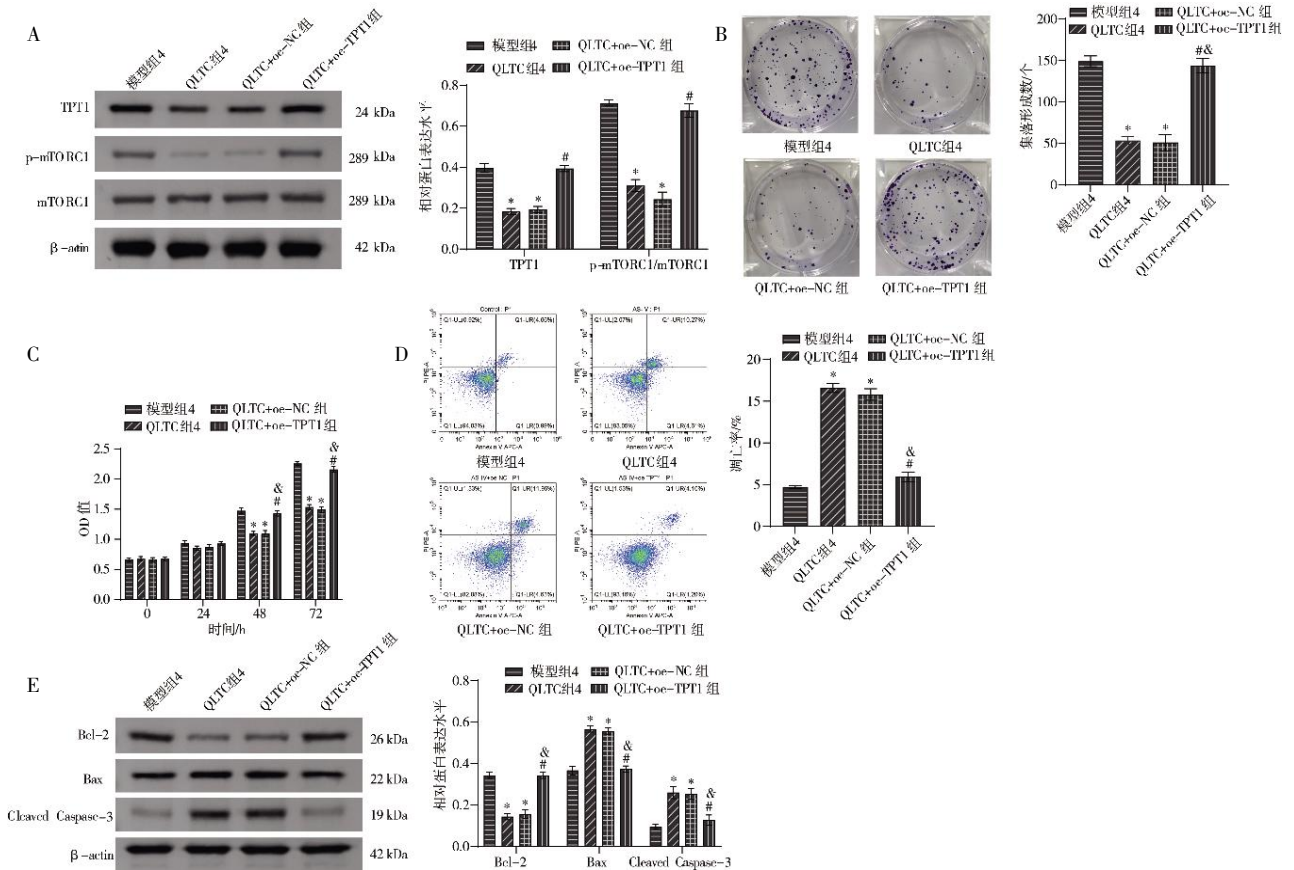


图4 QLTC介导miR-216a-5p/TPT1/mTORC1信号通路对BPH细胞增殖和凋亡的影响

注:A. TPT1/mTORC1通路蛋白TPT1,mTORC1,p-mTORC1的蛋白相对表达水平;B.集落形成实验检测癌细胞集落数;C. CCK-8检测细胞增殖;D. 流式细胞仪测定细胞凋亡;E. 细胞凋亡相关蛋白表达量。与模型组4比较,\* $P<0.05$ ;与QLTC组4比较, $^{\#}P<0.05$ ;与QLTC+oe-NC组比较, $^{\Delta}P<0.05$ 。

一,在50~65岁的男性中发病率高达15%~25%<sup>[12-13]</sup>。BPH典型表现是小腹胀痛、排尿困难和夜尿频多,使得中老年男性生活质量严重下降。前列腺切除治疗和药物治疗等联合疗法在BPH的临床应用中日趋成熟,但其不良反应仍未得到有效改善,且机体容易出现耐药现象<sup>[14-15]</sup>。BPH病理表现为前列腺体积增大,属于中医学“癥瘕”范畴,且中医药治疗BPH有独特优势<sup>[16-17]</sup>。中医学认为,BPH病因病机是肾气衰惫、气化失司、气血运行不畅、瘀滞日久,其基本病机是气虚血瘀。有研究表明,QLTC对BPH有良好的治疗效果,QLTC方中重用黄芪为君药,味甘性温,归肺、脾经,益气利水,培补后天;丹参、三七、水蛭、穿山甲活血化瘀、软坚散结为之臣;王不留行具有利尿、活血化瘀之效,为佐使药,以辅助君臣药益气利水、活血散瘀之效。诸药合用,共奏益气利水、活血散结之功<sup>[4]</sup>。

有研究前期通过体外细胞实验证实,QLTC含药血浆可抑制前列腺间质细胞增殖,促进前列腺间质细胞凋亡<sup>[18]</sup>。进一步研究发现,QLTC含药血浆可通过抑制前列腺间质细胞 *Fibronectin* 与 *Collagen IV* 基因表达<sup>[19]</sup>,从而抑制基质细胞增生。动物实验研究表明,QLTC能显著改善BPH大鼠前列腺上皮组织增生,降低间质面积,缩小前列腺体积,降低前列腺湿重、体积及指数<sup>[20]</sup>。有研究表明,QLTC在BPH的治疗中能产生良好作用<sup>[21-22]</sup>,但具体机制不明,而本研究表明,QLTC能够上调 miR-216a-5p,导致 TPT1/mTORC 信号通路的下调,从而延缓 BPH 发展。研究发现,miR-216a-5p 与前列腺癌细胞的分裂失控有关<sup>[8]</sup>。作为 miRNA 家族成员之一,miR-216a-5p 在细胞的生长周期调控过程中发挥关键作用<sup>[23]</sup>。miR-216a-5p 在体外和体内均能有效抑制肿瘤增殖和转移<sup>[24]</sup>。本研究结果显示,BPH 细胞中 miR-216a-5p 表达量降低,并且 QLTC 对 miR-216a-5p 的表达上调作用随剂量增多而增强。本研究的实验均围绕 QLTC 和 miR-216a-5p 对 BPH 细胞增殖功能的具体作用展开,本研究结果证实,QLTC 介导 miR-216a-5p 上调可抑制 BPH 细胞增生,并促进 BPH 细胞凋亡。TPT1 基因是抑癌基因 *P53* 和癌症干细胞的关键调节因子<sup>[25]</sup>。mTORC1 在维持 TPT1 的高蛋白水平方面起关键作用<sup>[26]</sup>。抑制 TPT1 可通过 mTORC1 依赖性途径(进一步使 mTOR 上的 Ser371 残基去磷酸化)和 mTORC1

非依赖性途径(抑制 Bcl-2)增强雷帕霉素诱导的自噬<sup>[27]</sup>。已有研究表明,miRNAs 转录后能够下调目的基因的表达,从而在肿瘤的恶性过程中发挥作用<sup>[28]</sup>。在神经胶质瘤细胞中,TPT1 可以与 miR-770-5p 竞争性结合,从而影响肿瘤进程<sup>[29]</sup>。同时有研究证实,miR-216a-5p 通过靶向 TPT1/mTORC1 抑制胰腺癌的肿瘤发生<sup>[9]</sup>。TPT1 在恶性前列腺增生中过表达<sup>[30-31]</sup>。前文实验已经证实,miR-216a-5p 在 BPH 中呈现低表达现象,故推测在 BPH 中 miR-216a-5p 和 TPT1/mTORC1 之间存在类似胰腺癌中的调控通路。生物信息学分析和荧光素酶报告系统提示,TPT1 是 miR-216a-5p 的重要结合靶点。

本研究结果进一步证实,miR-216a-5p 在 BPH 中下调 TPT1 的表达。TPT1/mTORC1 通路在癌症中的高度活跃与癌症预后不良相关<sup>[32]</sup>。过表达 TPT1 后,BPH 细胞集落形成增多,增殖能力增强,凋亡减少的同时 mTORC1 磷酸化增加。这一系列结果表明,TPT1/mTORC1 促进 BPH 发展。结合前文实验结果,QLTC 通过介导 miR-216a-5p 上调抑制 TPT1/mTORC1 信号通路,从而抑制 BPH 的发展。但本研究仅在体外进行实验,对 QLTC 介导 miR-216a-5p 的针对性治疗以及对 BPH 的临床效果尚未可知,有待进一步深入研究。

综上所述,QLTC 抑制 BPH 病程可能与 QLTC 介导 miR-216a-5p 下调 TPT1/mTORC1 信号通路相关。本研究结果在一定程度上揭示了,QLTC 对 BPH 抑制作用的分子机制,表明 QLTC 可能是一种极具潜力的治疗 BPH 的中成药,而 miR-216a-5p/TPT1/mTORC1 也有望成为 BPH 分子靶向疗法的新靶标。

## 参考文献

- [1] MIERNIK A, GRATZKE C. Current treatment for benign prostatic hyperplasia[J]. *Deutsches Arzteblatt International*, 2020, 117(49): 843-854.
- [2] PLOCHOCKI A, KING B. Medical treatment of benign prostatic hyperplasia[J]. *The Urologic Clinics of North America*, 2022, 49(2): 231-238.
- [3] 程 巍. 黄莪胶囊联合西药治疗良性前列腺增生症临床研究[J]. *新中医*, 2023, 55(18): 66-70.
- [4] 陈其华. 前癥通胶囊治疗良性前列腺增生症临床观察及其对间质细胞作用的实验研究[D]. 长沙, 湖南中医药大学, 2011.
- [5] 杨 晶, 贺哲淳, 袁轶峰, 等. 前癥通胶囊治疗良性前列腺增生症 120 例[J]. *中国民间疗法*, 2015, 23(1): 41-43.



- [6] 贺哲淳, 杨晶, 贺菊乔, 等. 前癯通胶囊对良性前列腺增生症前列腺体积影响的临床观察[J]. 湖南中医药大学学报, 2014, 34(11): 40-42.
- [7] DEVLIN C M, SIMMS M S, MAITLAND N J. Benign prostatic hyperplasia—what do we know?[J]. *BJU International*, 2021, 127(4): 389-399.
- [8] YANG B, GAO G, WANG Z X, et al. Long non-coding RNA HOTTIP promotes prostate cancer cells proliferation and migration by sponging miR-216a-5p[J]. *Bioscience Reports*, 2018, 38(5): BSR20180566.
- [9] ZHANG J, GAO S H, ZHANG Y D, et al. MiR-216a-5p inhibits tumorigenesis in Pancreatic Cancer by targeting TPT1/mTORC1 and is mediated by LINC01133[J]. *International Journal of Biological Sciences*, 2020, 16(14): 2612-2627.
- [10] 朱文雄, 袁轶峰, 陈立蔓, 等. 前癯通胶囊对前列腺增生大鼠前列腺组织 TFF2、Wnt4、Wnt6 的影响[J]. 湖南中医药大学学报, 2022, 42(5): 743-747.
- [11] JIN B R, LIM C Y, KIM H J, et al. Antioxidant mitoquinone suppresses benign prostatic hyperplasia by regulating the AR-NLRP3 pathway[J]. *Redox Biology*, 2023, 65: 102816.
- [12] 杨国荣, 吕超, 吕凯凯, 等. 单中心 10 年 2050 例良性前列腺增生手术围手术期数据分析[J/OL]. 解放军医学杂志, 1-10[2024-02-22].
- [13] 逢瑗博, 吕俊刚, 凌存保, 等. 探讨体质量指数和血脂指标对良性前列腺增生前列腺体积的影响[J/OL]. 现代泌尿外科杂志, 1-5[2024-02-22].
- [14] JOSEPH D B, HENRY G H, MALEWSKA A, et al. 5-Alpha reductase inhibitors induce a prostate luminal to club cell transition in human benign prostatic hyperplasia[J]. *The Journal of Pathology*, 2022, 256(4): 427-441.
- [15] 赫艳梅, 盛涛, 邵欢, 等. 益肾通癯方联合经尿道等离子电切术对肾气虚型良性前列腺增生症患者 PSA、PGE2、IL-6 及尿动力学的影响[J]. 浙江中医杂志, 2023, 58(11): 800-802.
- [16] 罗郭峰, 迟振海, 毛强健, 等. 近 5 年中西医治疗良性前列腺增生研究进展[J]. 中国民间疗法, 2023, 31(4): 106-110.
- [17] 韩涛, 赵逢腾. 前列腺增生患者行中药八正散治疗的临床效果研究[J]. 中国实用医药, 2023, 18(13): 134-136.
- [18] 凌智, 刘慧, 杨晶, 等. 前癯通胶囊含药血浆对前列腺间质细胞 Smad4 基因表达的影响[J]. 中华男科学杂志, 2014, 20(8): 730-733.
- [19] 陈其华, 刘慧, 凌智, 等. 前癯通对前列腺间质细胞 Fibronectin 和 CollagenIV 基因表达的影响[J]. 中医学报, 2015, 30(5): 719-721.
- [20] 袁轶峰, 李毅, 朱文雄, 等. 前癯通胶囊对良性前列腺增生模型大鼠前列腺组织病理形态学的影响[J]. 中医杂志, 2018, 59(19): 1685-1688.
- [21] 张熙, 贺菊乔, 袁轶峰, 等. 前癯通治疗前列腺增生前后血清 IL-6、IL-23、CD8、CD20 表达变化分析[C].//中国转化医学和整合医学研究会, 中华高血压杂志社. 中国转化医学和整合医学研讨会(广州馆)论文综合刊. 长沙: 湖南中医药大学, 2015.
- [22] YUAN Y F, YANG J, ZHU W X, et al. Qianlongtong inhibits proliferation and induces apoptosis of hyperplastic prostate cells[J]. *American Journal of Men's Health*, 2018, 12(5): 1548-1553.
- [23] LI H, LI T, FAN J, et al. MiR-216a rescues dexamethasone suppression of osteogenesis, promotes osteoblast differentiation and enhances bone formation, by regulating c-Cbl-mediated PI3K/AKT pathway[J]. *Cell Death and Differentiation*, 2015, 22(12): 1935-1945.
- [24] PATRA S, PRADHAN B, NAYAK R, et al. Apoptosis and autophagy modulating dietary phytochemicals in cancer therapeutics: Current evidences and future perspectives[J]. *Phytotherapy Research*, 2021, 35(8): 4194-4214.
- [25] WEI W, HUANG X H, SHEN X W, et al. Overexpression of lncRNA TPT1-AS1 suppresses hepatocellular carcinoma cell proliferation by downregulating CDK2[J]. *Critical Reviews in Eukaryotic Gene Expression*, 2022, 32(1): 1-9.
- [26] 张飞. 翻译控制肿瘤蛋白(TCTP)增加 Pim-3 蛋白稳定性促进胰腺癌形成的实验研究[D]. 上海: 复旦大学, 2013.
- [27] GOUVEIA ROQUE C, HOLT C E. Growth cone tctp is dynamically regulated by guidance cues[J]. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 2018, 11: 399.
- [28] 周超瑞, 马伟斌, 叶孝乾, 等. 基于小鼠黑色素瘤肺转移模型探讨丙泊酚上调 DR5 表达发挥抑瘤作用的研究[J]. 中华全科医学, 2022, 20(7): 1126-1130.
- [29] JIA L, SONG Y W, MU L Y, et al. Long noncoding RNA TPT1-AS1 downregulates the microRNA-770-5p expression to inhibit glioma cell autophagy and promote proliferation through STMN1 upregulation[J]. *Journal of Cellular Physiology*, 2020, 235(4): 3679-3689.
- [30] BAE S Y, BYUN S, BAE S H, et al. TPT1 (tumor protein, translationally-controlled 1) negatively regulates autophagy through the BECN1 interactome and an MTORC1-mediated pathway[J]. *Autophagy*, 2017, 13(5): 820-833.
- [31] JUN J, ZHANG B T, ZHANG Z Q, et al. Novel gene signatures predictive of patient recurrence-free survival and castration resistance in prostate cancer[J]. *Cancers*, 2021, 13(4): 917.
- [32] LIN Z B, ZHANG X, WANG J L, et al. Translationally controlled tumor protein promotes liver regeneration by activating mTORC2/AKT signaling[J]. *Cell Death & Disease*, 2020, 11(1): 58.