

根皮素通过抑制 PDK1-p-PDHA1 轴影响谷氨酰胺代谢介导的前列腺癌研究

赵朋¹, 杨拓¹, 王金铸¹, 蔡科科¹, 刘鹏¹, 念学武^{2*}

1. 天津市南开医院 泌尿外科, 天津 300000

2. 天津市北辰医院 泌尿外科, 天津 300400

摘要: **目的** 探究根皮素通过抑制丙酮酸脱氢酶激酶 1 (pyruvate dehydrogenase kinase 1, PDK1)-磷酸化丙酮酸脱氢酶 E1 亚基 α 1 (phosphorylation of pyruvate dehydrogenase E1 subunit α 1, p-PDHA1) 进而影响谷氨酰胺 (glutamine, Gln) 代谢介导的前列腺癌的作用机制。**方法** 采用不同剂量根皮素 (25、50、100 $\mu\text{mol/L}$) 干预人前列腺癌 PC-3、DU145、LNCaP 细胞与人前列腺 RWPE-1 细胞, 采用细胞计数试剂盒 (cell counting kit-8, CCK-8) 测定细胞活力。将人前列腺癌 PC-3 细胞分为对照 (二甲基亚砜, dimethyl sulfoxide, DMSO) 组、根皮素 (100 $\mu\text{mol/L}$) 组及顺铂 (0.03 mmol/L) 组, Transwell 法检测细胞侵袭能力、TUNEL 法检测细胞凋亡水平。根皮素及 Gln 单独使用及联合干预 PC-3 细胞, 试剂盒测定 Gln 消耗水平、谷氨酸与腺嘌呤核苷三磷酸 (adenosine triphosphate, ATP) 产生水平, Western blotting 法测定谷氨酰胺酶 1 (glutaminase 1, GLS1) 蛋白表达水平, 同时测定细胞增殖、侵袭、凋亡等细胞生物学行为变化。利用网络药理学及生物信息学分析根皮素、前列腺癌与 Gln 代谢相关基因的交集。Western blotting 法测定各组细胞 PDK1 蛋白表达水平。将 PC-3 细胞分为空载体对照 (pcDNA3.1) 组、PDK1 过表达载体 (pcDNA3.1-PDK1) 组、PDK1 敲减载体 (KD-PDK1) 组及其对照 (KD-Control) 组、PDHA1 过表达载体 (pcDNA3.1-PDHA1) 组、KD-PDK1+pcDNA3.1-PDHA1 组及其对照 KD-PDK1+pcDNA3.1 组, 以及根皮素 (100 $\mu\text{mol/L}$) +pcDNA3.1-PDK1 组及其对照根皮素+pcDNA3.1 组, 测定各组细胞增殖、侵袭、凋亡变化、Gln 消耗水平、谷氨酸与 ATP 产生水平及 GLS1 蛋白表达水平。构建前列腺癌移植瘤小鼠模型, 通过根皮素干预治疗, 以顺铂作为阳性对照, 探究根皮素对体内肿瘤生长的影响。**结果** 根皮素对人前列腺 RWPE-1 细胞活力无显著影响, 但 100 $\mu\text{mol/L}$ 根皮素可显著抑制人前列腺癌 PC-3、DU145、LNCaP 细胞增殖 ($P<0.05$)。与对照组比较, 根皮素组细胞增殖与侵袭能力显著降低 ($P<0.05$)、凋亡水平显著增加 ($P<0.01$), Gln 消耗水平、谷氨酸和 ATP 产生水平显著降低 ($P<0.05$)、GLS1 蛋白表达水平显著下降 ($P<0.05$); Gln 干预后可逆转上述结果, 且根皮素与 Gln 联合干预 PC-3 细胞时, 根皮素能够抑制 Gln 的作用 ($P<0.05$)。网络药理学与生物信息分析表明, PDK1 为根皮素通过 Gln 代谢途径治疗前列腺癌的关键靶点之一, 且 PDK1 在 PC-3 细胞中高表达, 根皮素可显著抑制 PDK1 的表达 ($P<0.05$)。与 pcDNA3.1 组比较, 进一步过表达 PC-3 细胞中的 PDK1 能够促进细胞增殖与侵袭 ($P<0.001$)、抑制细胞凋亡 ($P<0.001$), 增强细胞中的 Gln 代谢 ($P<0.05$)。与根皮素+pcDNA3.1 组比较, 过表达 PDK1 能够部分逆转根皮素对 PC-3 细胞生物学行为及 Gln 代谢的影响 ($P<0.05$)。此外, 与 KD-Control 组比较, 敲减 PC-3 细胞中的 PDK1 有助于抑制细胞增殖与侵袭、促进细胞凋亡, 减弱 Gln 代谢水平, 然而与 KD-PDK1+pcDNA3.1 组比较, 联合过表达 PDHA1 则能够逆转这一结果 ($P<0.05$)。体内实验表明, 根皮素能够显著抑制肿瘤生长 ($P<0.05$)。**结论** 根皮素通过抑制 PDK1-p-PDHA1 轴进而影响 Gln 代谢介导的前列腺癌。

关键词: 根皮素; 前列腺癌; 丙酮酸脱氢酶激酶 1; 丙酮酸脱氢酶 E1 亚基 α 1; 谷氨酰胺代谢

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2025)04-1254-12

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2025.04.014

Phloretin influences glutaminolysis-mediated prostate cancer by inhibiting PDK1-p-PDHA1 axis

ZHAO Peng¹, YANG Tuo¹, WANG Jinzhu¹, CAI Keke¹, LIU Peng¹, NIAN Xuewu²

1. Department of Urology Surgery, Tianjin Nankai hospital, Tianjin 300000, China

2. Department of Urology Surgery, Tianjin Beichen Hospital, Tianjin 300400, China

收稿日期: 2024-09-18

基金项目: 天津市科技计划项目 (20JCQNJC00550)

作者简介: 赵朋 (1986—), 硕士研究生, 主治医师, 研究方向为前列腺癌分子生物学研究。E-mail: Zhaoppeng4418@163.com

*通信作者: 念学武 (1984—), 博士, 主治医师, 研究方向为前列腺癌分子生物学研究。E-mail: Tynianxuewu@163.com

Abstract: Objective To explore whether phloretin can affect the biological behavior of prostate cancer cells mediated by glutaminolysis by inhibiting pyruvate dehydrogenase kinase 1 (PDK1)-phosphorylation of pyruvate dehydrogenase E1 subunit alpha 1 (p-PDHA1). **Methods** Human prostate cancer cell lines PC-3, DU145, LNCaP, and human prostate epithelial cell line RWPE-1 were treated with different concentrations of phloretin (25, 50, 100 $\mu\text{mol/L}$), and cell proliferation was assessed using the cell counting kit-8 (CCK-8). PC-3 cells were divided into control (0.1% DMSO), phloretin (100 $\mu\text{mol/L}$), and cisplatin (DDP, 0.03 mmol/L) groups, and cell invasion was detected using the Transwell method while cell apoptosis was detected using the TUNEL method. PC-3 cells were treated with phloretin and/or glutamine (Gln) separately or in combination, and Gln levels, glutamate and adenosine triphosphate (ATP) production levels were measured using kits, while glutaminase 1 (GLS1) protein expression was determined by Western blotting in cell proliferation, invasion, and apoptosis were also assessed. Network pharmacology and bioinformatics were used to analyze the intersection of phloretin, prostate cancer, and Gln-related genes. Western blotting was used to measure PDK1 protein expression levels in RWPE-1, PC-3, and PC-3 + phloretin groups. Furthermore, The PC-3 cells were divided into control pcDNA3.1 group, pcDNA3.1-PDK1 group, the KD-PDK1 group and its control KD-Control group, pcDNA3.1-PDHA1 group, KD-PDK1 + pcDNA3.1-PDHA1 group and its control KD-PDK1 + pcDNA3.1 group, and phloretin + pcDNA3.1-PDK1 group and its control phloretin + pcDNA3.1 group. Changes in cell proliferation, invasion, apoptosis, Gln levels, glutamate and ATP production levels, and GLS1 protein expression in each group were measured. A prostate cancer xenograft mouse model was established, and phloretin intervention therapy was administered, with DDP treatment serving as a positive control, to investigate the effect of phloretin on tumor growth *in vivo*. **Results** Phloretin had no significant effect on the proliferation of RWPE-1 cells but significantly inhibited the proliferation of PC-3, DU145, and LNCaP cells, with the most significant effect on PC-3 cells at a concentration of 100 $\mu\text{mol/L}$ ($P < 0.05$). Compared with control group, the phloretin group showed significantly reduced cell proliferation and invasion ability ($P < 0.05$), increased apoptosis levels ($P < 0.05$), decreased Gln levels, reduced glutamate and ATP production levels ($P < 0.05$), and weakened GLS1 protein expression ($P < 0.05$). Gln intervention yielded opposite results, and when phloretin and Gln were co-administered to PC-3 cells, phloretin inhibited the Gln-induced effects ($P < 0.05$). Network pharmacology and bioinformatics analysis indicated that PDK1 is one of the key targets for phloretin in the treatment of prostate cancer through the Gln metabolism pathway. Moreover, PDK1 was highly expressed in PC-3 cells and was inhibited by phloretin ($P < 0.05$). Compared with pcDNA3.1 group, overexpression of PDK1 in PC-3 cells promoted cell proliferation and invasion ($P < 0.05$), inhibited cell apoptosis ($P < 0.05$), but enhanced Gln metabolism in cells ($P < 0.05$). Compared with the phloretin + pcDNA3.1 group, overexpression of PDK1 partially reversed the effects of phloretin on the biological behavior and Gln metabolism of PC-3 cells ($P < 0.05$). Additionally, compared with the KD-Control group, knockdown of PDK1 in PC-3 cells contributed to the inhibition of cell proliferation and invasion, promotion of cell apoptosis, and reduction of Gln metabolism levels. However, compared with the KD-PDK1 + pcDNA3.1 group, co-overexpression of PDHA1 reversed these effects ($P < 0.05$). *In vivo* experiments showed that phloretin significantly inhibited tumor growth in mice ($P < 0.05$). **Conclusion** Phloretin affects Gln metabolism-mediated prostate cancer progression by inhibiting the PDK1-PDHA1 axis.

Key words: phloretin; prostate cancer; pyruvate dehydrogenase kinase 1; pyruvate dehydrogenase E1 subunit alpha 1; glutaminolysis

前列腺癌是男性中较为常见的一种癌症，其发病率随着年龄的增长而显著上升，近年来，随着对前列腺癌研究的深入，发现前列腺癌不仅仅是一种简单的细胞增殖失控疾病，而是一种复杂的代谢异常疾病^[1-2]。例如，谷氨酰胺（glutamine, Gln）代谢在前列腺癌的发展进程中扮演着关键角色，通过调控 Gln 代谢途径，可能有效影响癌细胞的能量供应及存活能力^[3]。根皮素作为一种具有抗癌活性的类黄酮化合物，通过增加活性氧（reactive oxygenspecies, ROS）的产生、抑制抗氧化系统功能、影响 Wnt/ β -连环蛋白（ β -catenin）信号通路等机制，有效抑制了前列腺癌细胞的增殖、迁移和集落形成^[4]。然而，根皮素是否通过 Gln 代谢途径抑

制前列腺癌仍未阐明。

研究表明，丙酮酸脱氢酶激酶 1（pyruvate dehydrogenase kinase 1, PDK1）在多种癌症中高表达，并且这种高表达能够促进丙酮酸脱氢酶 E1 亚基 α 1（pyruvate dehydrogenase E1 subunit alpha 1, PDHA1）转变为磷酸化-PDHA1（phosphorylation PDHA1, p-PDHA1），进而导致癌细胞的代谢重编程，促进癌细胞的生存和转移^[5]。此外，Gln 分解不仅是肿瘤生长的主要能量来源之一，也是肿瘤生物合成的重要组成部分，在食管鳞状细胞癌中，谷氨酰胺酶（glutaminase, GLS）与 PDK1 相互作用提高 p-PDHA1 水平，并灭活丙酮酸脱氢酶，进而加速癌症细胞的有氧糖酵解^[6]。本研究通过生物信息与

网络药理学分析发现 PDK1 是根皮素、前列腺癌与 Gln 代谢相关基因的靶点交集之一, 通过体内、外实验探究根皮素能否通过抑制 PDK1-p-PDHA1 信号通路影响 Gln 代谢介导的前列腺癌进展, 为前列腺癌的分子机制研究及治疗方法提供实验基础。

1 材料

1.1 细胞株与动物

人前列腺癌细胞 PC-3、DU145、LNCaP 和人前列腺细胞 RWPE-1 (批号 SCSP-532、SCSP-5024、SCSP-5021) 由中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库提供。

SPF 级雄性 C57BL/6 小鼠 30 只, 4~5 周龄、体质量 (18±2) g, 购自天津科德生物科技有限公司, 许可号 SCXK (津滨) 2021-0001, 动物饲养于 SPF 级清洁环境中, 温度 22~26 °C, 相对湿度 40%~60%, 饲养期间动物自由获取食物和水。本研究动物实验经天津市南开医院伦理委员会批准, 批准号为 NKYY-DWLL-2023-087。

1.2 药品与试剂

根皮素对照品 (质量分数 >99%, 批号 60-82-2)、二甲基亚砜 (dimethyl sulfoxide, DMSO, 质量分数 99.98%, 批号 67-68-5) 购自美国 MedChemexpress 生物科技公司; F-12K 培养基 (批号 PM150910B)、MEM 培养基 (批号 PM150443)、RPMI Medium 1640 培养基 (批号 PM150145)、胎牛血清 (批号 164210) 购自武汉普诺赛生命科技有限公司; 脂质体 Lipofectamine 3000 转染试剂盒 (批号 BL632A) 购自兰杰柯科技有限公司; PDK1 过表达载体 (pcDNA3.1-PDK1, F: CGCGGATCCATGAGGCTGGCGCGGCTGCTT, R: CCGGAATTCCTAGGCACTGCGGAACGTCGT) 及其对应的空载体对照 (pcDNA3.1)、PDK1 敲减载体 (KD-PDK1, ATCAGTGAATGCTTGTGAAAGA) 及其对照 (KD-Control, UUCUCCGAA-CGUGUCACGUTT)、PDHA1 过表达载体 (pcDNA3.1-PDHA1, F: CGCGGATCCATGAGGAAGATGCTCGCCGCC, R: CCGGAATTCCTAAC-TGACTGACTTAACTT) 及其对照 (pcDNA3.1) 由北京合生生物公司设计并合成; 细胞计数试剂盒 (cell counting kit-8, CCK-8, 批号 PF00004) 购自武汉三鹰生物技术有限公司; 基质胶 (批号 356234) 购自北京博蕾德生物技术有限公司; Gln 试剂盒 (批号 BC5300)、谷氨酸试剂盒 (批号 BC1585)、腺嘌呤核苷三磷酸 (adenosine triphosphate, ATP) 含量

检测试剂盒 (批号 BC0305) 购自北京索莱宝科技有限公司; BCA 蛋白测定试剂盒 (批号 P0010)、十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶 (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE, 批号 P0012A)、聚偏二氟乙烯膜 (polyvinylidene fluoride, PVDF, 批号 FFP19)、RIPA 裂解液 (批号 P0013B)、TUNEL 试剂盒 (批号 C1089) 购自上海碧云天生物科技股份有限公司; PDK1 抗体 (批号 ab110025)、p-PDHA1 抗体 (批号 ab177461)、ki67 抗体 (批号 ab16667)、GLS 抗体 (批号 ab317032)、HRP 标记的山羊抗兔二抗 (批号 ab6721) 购自英国 Abcam 公司。

1.3 仪器

Varioskan ALF 型酶标仪 (美国 Thermo Fisher Scientific 公司); PowerPac HC 型电泳仪 (美国 BioRad 公司); BX43 型光学显微镜 (日本 Olympus 公司); Microfuge 20/20R 型离心机 (美国 Beckman Coulter 公司)。

2 方法

2.1 生物信息学分析

以校正后 $P < 0.05$ 、 $|\log_2FC| > 1$ 从 NCBI 网站中的 GEO DataSets (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 中筛选出基因芯片 GSE46602、GSE55945、GSE70768 中的前列腺癌差异表达基因。利用 Swiss 和 Prediction 数据库预测根皮素的相关靶点。从 MSigDB 数据库和已发表的研究^[7]中收集与 Gln 代谢相关的基因。利用 Venn 图对根皮素的分子靶点、前列腺癌差异表达基因以及 Gln 代谢相关基因进行交集分析。通过 PubChem 数据库检索并下载根皮素化合物的分子结构, 通过 PDB 数据库分别检索间质表皮转化因子 (mesenchymal to epithelial transition factor, MET) 基因和 PDK1 的三维结构。在 PyMOL 2.3.0 软件中打开检索到的“PDB”文件, 进行结构处理, 包括去除非关键蛋白链、删除水分子及其他溶剂分子等。在“AutoDock”中设置对接实验, 定义网格盒子以覆盖可能的结合位点, 调整对接参数如算法类型、搜索精度等, 探索根皮素与 MET、PDK1 之间的最佳结合模式及结合能。

2.2 细胞培养与分组

PC-3 细胞培养在添加 10% 胎牛血清的 F-12K 培养基中, DU-145 细胞与 LNCaP 细胞分别培养在含有 10% 胎牛血清、1% Gln、1% 100 mol/L 丙酮酸钠溶液的 MEM 培养基和 RPMI Medium 1640 培养

基中, RWPE-1 细胞培养在含有 15%胎牛血清和 10% DMSO 的完全培养液中。所有细胞于 37 °C、5% CO₂ 的环境中培养。

将处于对数生长期的各细胞按 5×10^5 个/孔接种于 96 孔板, 将细胞分为对照组 (0.1% DMSO), 根皮素低、中、高剂量 (25、50、100 $\mu\text{mol/L}$) 组^[8], 顺铂 (0.03 mmol/L)^[9]组, Gln (2 mmol/L) 组^[3], Gln (2 mmol/L) + 根皮素 (100 $\mu\text{mol/L}$) 组。当细胞完全贴壁后, 去除原有培养基, 分别向细胞中加入相应药物, 继续培养 12 h。

将处于对数生长期的 PC-3 细胞按 2×10^5 个/孔接种于 96 孔板。待细胞生长密度至 60%~70%, 将细胞分为空载体对照 (pcDNA3.1) 组、PDK1 过表达载体 (pcDNA3.1-PDK1) 组、PDK1 敲减载体 (KD-PDK1) 组及其对照 (KD-Control) 组、PDHA1 过表达载体 (pcDNA3.1-PDHA1) 组、KD-PDK1 + pcDNA3.1 组、KD-PDK1 + pcDNA3.1-PDHA1 组、根皮素 (100 $\mu\text{mol/L}$) + pcDNA3.1 组以及根皮素 + pcDNA3.1-PDK1 组。根据 Lipofectamine 3000 试剂盒说明书进行基因转染操作, 各组分别转染相应载体。

2.3 CCK-8 检测细胞增殖活力

将各组 PC-3 细胞以 2×10^5 个/孔接种于 96 孔板, 于 37 °C、5% CO₂ 的恒温培养箱中培养 12 h 后, 每孔加入 10 μL CCK-8 溶液, 继续培养 1 h。利用酶标仪在 450 nm 波长下测定每孔的吸光度 (A) 值并计算细胞活力。

$$\text{细胞活力} = (A_{\text{给药}} - A_{\text{空白}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}})$$

2.4 Transwell 检测细胞侵袭

将处于对数生长期的 PC-3 细胞以 1×10^5 个/孔接种于包被有基质胶的 Transwell 小室的上室, 同时添加含有 1%胎牛血清的 1640/F12 培养液; 下室添加含有 15%胎牛血清的 1640/F12 培养液, 12 h 后, 利用棉签移除上室顶部未发生侵袭的细胞, 对已成功穿透基质胶并附着于上室底部的细胞进行固定和染色。于显微镜下拍摄染色细胞, 随机选取 3 个视野进行计数。

2.5 TUNEL 检测细胞凋亡

每组取 1×10^5 个细胞, 各组样品细胞经过 PBS 洗涤 2 次后, 于 4%多聚甲醛中 4 °C 固定 30 min, 再次使用 PBS 洗涤 2 次, 用含 0.3% Triton X-100 的 PBS 溶液室温处理 5 min, PBS 洗涤细胞 2 次。按照试剂盒说明书配制 TUNEL 反应混合液, 每组细胞培养板中加入 50 μL 的 TUNEL 反应液, 于 37 °C

避光孵育 60 min。PBS 冲洗 3 次后, 用抗荧光淬灭封片液封片, 荧光显微镜在特定激发波长 (550 nm) 和发射波长 (570 nm) 下观察凋亡细胞的红色荧光标记并记录细胞凋亡数。

2.6 细胞 Gln 消耗水平、谷氨酸水平及 ATP 水平测定

分别取 5×10^6 个细胞, 按照 Gln、谷氨酸、ATP 含量检测试剂盒说明书对样本进行处理, 测定各组细胞 Gln 消耗水平、谷氨酸水平及 ATP 水平。

2.7 Western blotting 法测定相关蛋白表达水平

将各组细胞以每孔 5×10^5 个/孔接种于 6 孔板中, 使用预冷的 PBS 洗涤细胞 2 次后, 每孔加入 120 μL 含有 RIPA 的预冷 PMSF 细胞裂解液, 将其转移至 1.5 mL 离心管中, 冰上静置 30 min, 每 10 分钟混匀 1 次, 12 000 r/min 离心 10 min, 收集上清液, 采用 BCA 法测定各样品中的总蛋白浓度。取 20 μg 的总蛋白样品, 与上样缓冲液混合后, 进行加热变性处理, 蛋白样品经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 转至 PVDF 膜, 用脱脂奶粉封闭 1 h 后, 洗膜 3 次, 分别加入 GLS1 (1 : 1 000)、PDK1 (1 : 1 000)、p-PDHA1 (1 : 2 000) 一抗, 4 °C 孵育过夜, 洗膜 3 次后, 二抗 (1 : 2 000) 室温孵育 1 h。用 ECL 化学发光系统避光显影, 利用 Image-J 软件对条带计算条带的灰度值。

2.8 动物分组、造模及给药

取处于对数生长期的 PC-3 细胞制成 1×10^7 个/ μL 的细胞悬液。在无菌条件下, 向每只小鼠右侧腋背部 sc 0.15 mL 细胞悬液, 7 d 后肿瘤体积增长至约 30 mm³, 将 30 只 C57BL/6 小鼠随机分为模型组、DMSO 组、顺铂 (2 mg/kg) 组和根皮素低、高剂量 (25、50 mg/kg) 组^[10]。使用 DMSO 将根皮素溶解, 根皮素低、高剂量组 ip 相应根皮素 DMSO 溶液 (0.2 mL), DMSO 组 ig 等体积 DMSO, 顺铂组 ip 0.2 mL 顺铂溶液^[11], 每 2 天 1 次, 持续 6 周。实验期间, 每周同一时间使用游标卡尺精确测量肿瘤的长径 (a) 和横径 (b), 计算肿瘤体积。实验结束后, 对小鼠实施安乐死, 立即剥离肿瘤组织, 称定肿瘤质量。

$$\text{肿瘤体积} = ab^2/2。$$

2.9 肿瘤组织 Gln 消耗水平、谷氨酸水平、ATP 水平测定

取小鼠肿瘤组织匀浆, 12 000 $\times g$ 离心 5 min 后, 按照试剂盒说明书测定肿瘤组织 Gln 消耗水平、谷氨酸水平、ATP 水平。

2.10 免疫组织化学法相关指标检测

将肿瘤组织固定于 10%中性福尔马林, 进行常规的石蜡包埋与连续切片, 切片常规脱蜡复水、微波抗原修复后加入 3% BSA 封闭后, 分别加入 GLS1 (1:500)、ki67(1:200)、PDK1(1:200)、p-PDHA1 (1:250) 一抗, 4℃ 孵育过夜。洗涤后加入二抗室温孵育。DAB 显色、苏木素复染、二甲苯透明后封片。于显微镜下观察染色情况并采集图像, 采用 Image-Pro plus 软件分析各组肿瘤组织中 GLS1、ki67、PDK1、p-PDHA1 的平均光密度值^[12]。

平均光密度值 = 积分光密度值 / 区域面积

2.11 统计学分析

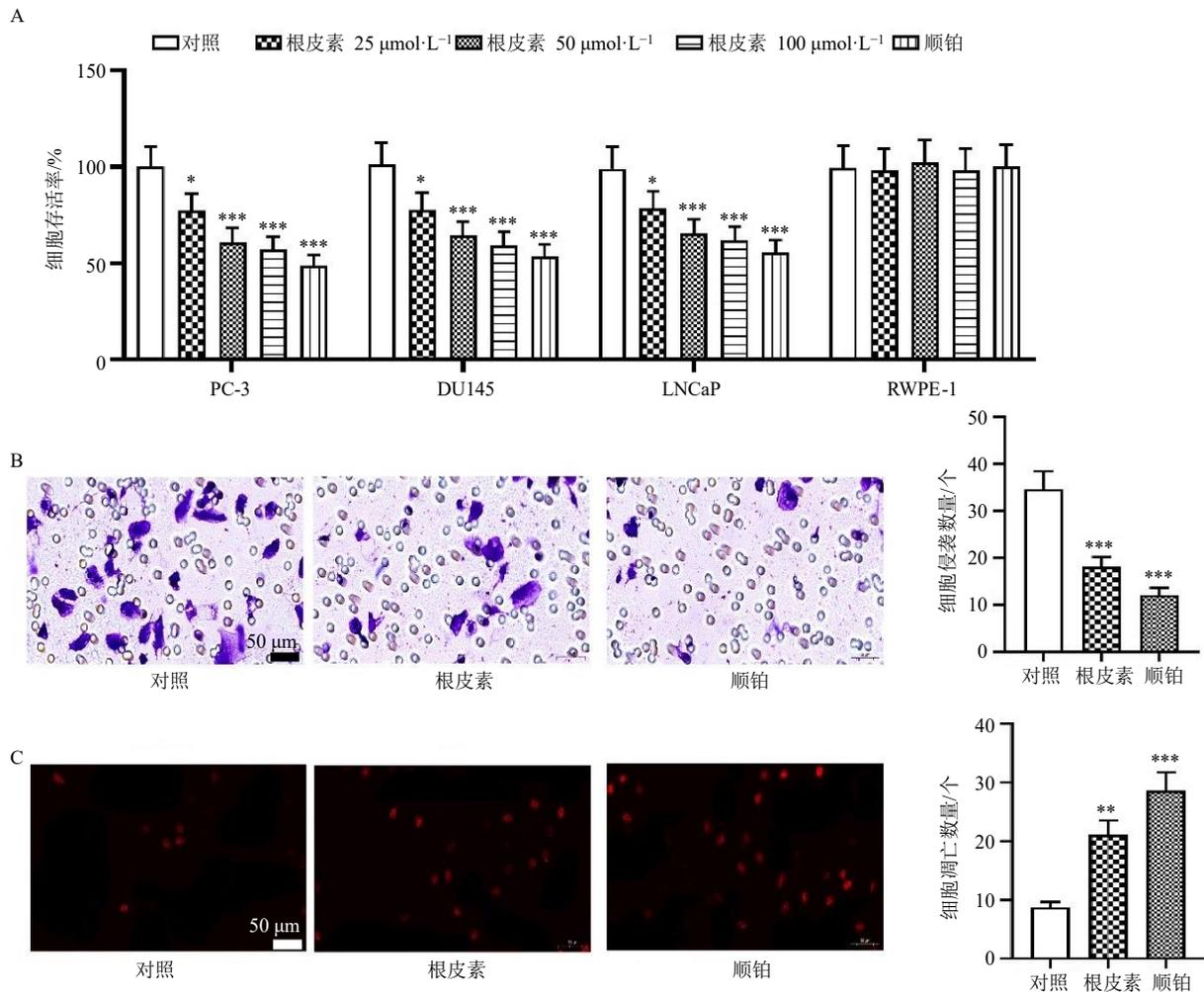
所得数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 GraphPad Prism

9.5 软件进行统计分析。两组间比较选用独立样本 *t* 检验; 多组间比较采用单因素方差分析。

3 结果

3.1 对前列腺癌细胞的增殖、侵袭及凋亡的影响

与对照组比较, 顺铂及不同剂量根皮素干预对人前列腺细胞 RWPE-1 增殖活力无明显影响, 但能够明显抑制各前列腺癌细胞增殖 (图 1-A)。初步实验结果显示 100 μmol/L 的根皮素对 PC-3 细胞增殖影响最明显, 因此选用 100 μmol/L 根皮素及 PC-3 细胞进行后续实验, 结果表明, 与对照组比较, 根皮素组细胞侵袭能力降低 ($P < 0.001$)、凋亡能力增加 ($P < 0.01$), 且呈剂量相关性 (图 1-B、C)。



A-CCK-8 检测细胞增殖活力的结果; B-Transwell 检测细胞侵袭的结果 (×200); C-TUNEL 检测细胞凋亡的结果 (×200); 与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ 。

A-results of CCK-8 detection of cell proliferation activity; B-Transwell detection of cell invasion results (× 200); C-results of TUNEL detection of cell apoptosis (× 200); * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs control group.

图 1 根皮素抑制前列腺癌细胞的增殖与侵袭并促进细胞凋亡 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

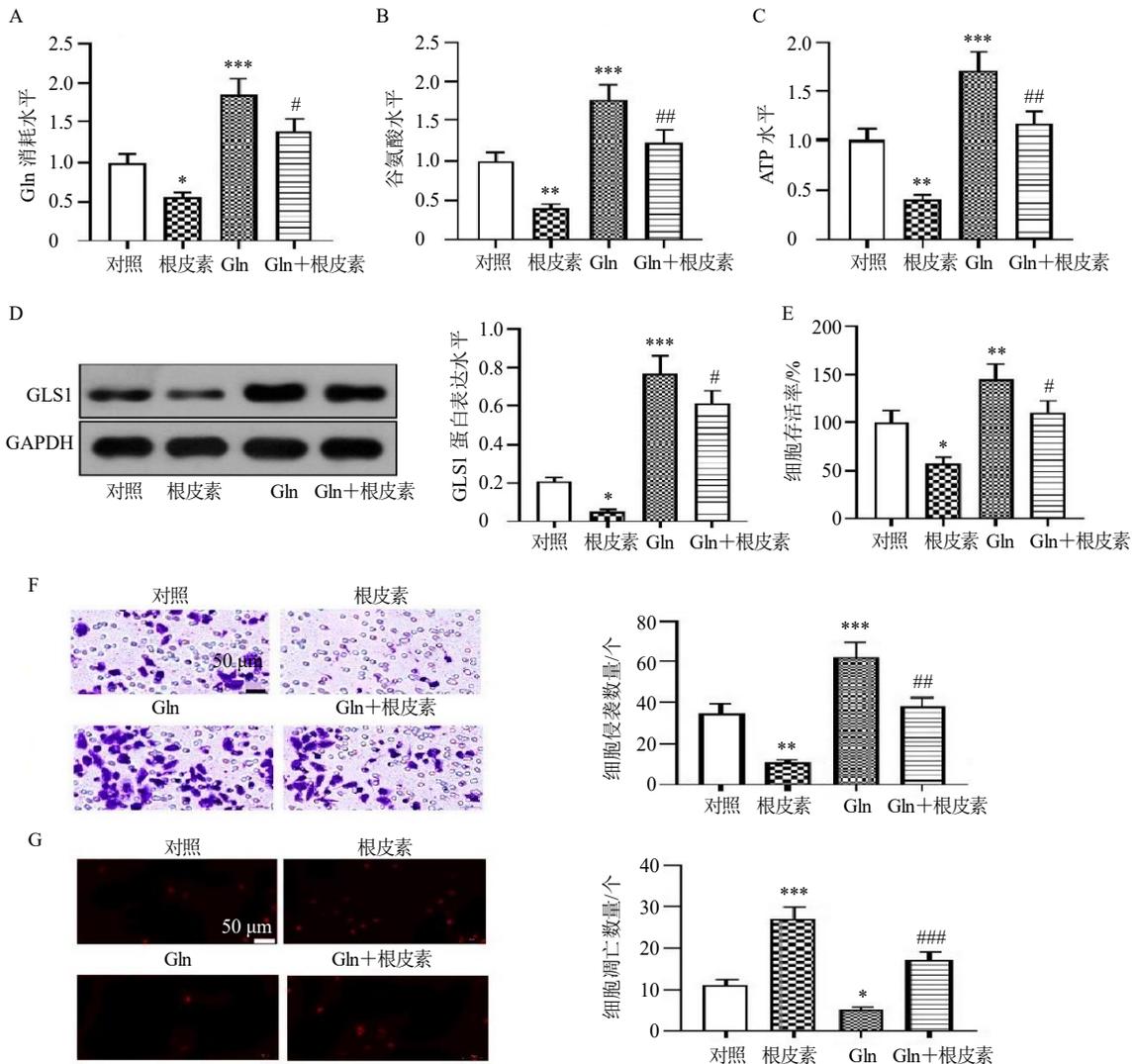
Fig. 1 Phloretin inhibits proliferation and invasion of prostate cancer cells and promotes cell apoptosis ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

3.2 对 PC-3 细胞生物学行为的影响

如图 2 所示, 与对照组比较, 根皮素组 PC-3 细胞中 Gln 消耗水平、谷氨酸与 ATP 水平下降 ($P < 0.05$ 、 0.01), GLS1 蛋白表达水平降低 ($P < 0.05$), 细胞增殖与侵袭能力降低 ($P < 0.05$ 、 0.01), 细胞凋亡数目增加 ($P < 0.001$); Gln 组 Gln 消耗水平、谷氨酸和 ATP 水平增加 ($P < 0.001$), GLS1 蛋白表达水平增加 ($P < 0.001$), 细胞增殖与侵袭能力提升 ($P < 0.01$ 、 0.001), 凋亡减少 ($P < 0.05$), 通过联合根皮素处理后则逆转了这一结果 ($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001)。

3.3 根皮素抑制 PDK1 在 PC-3 细胞中的高表达

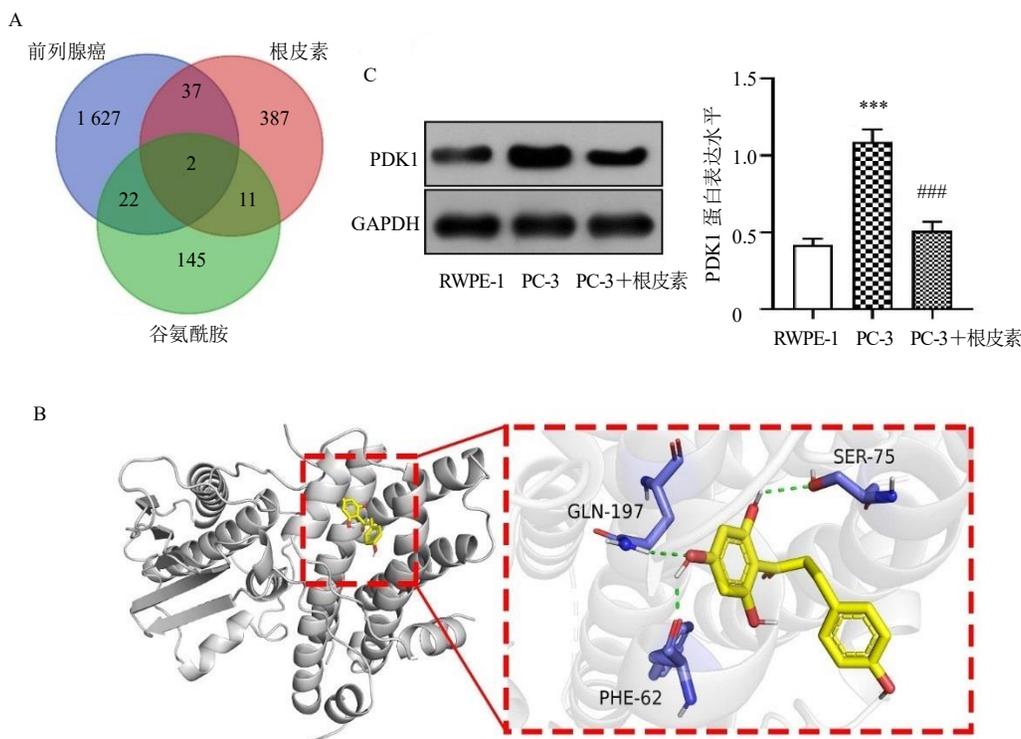
GSE46602、GSE55945、GSE70768 3 个基因芯片中共得到 1688 个前列腺癌差异表达基因, Swiss 和 Prediction 数据库预测得到 437 个根皮素相关靶点, MSigDB 网站与已发表的文献^[7]共得到 180 个 Gln 代谢相关基因, Venn 图对三者取交集共得到 12 个交集靶点 (图 3-A)。分子对接结果显示根皮素和 MET 的对接分数为 -7.3 kcal/mol ($1 \text{ kcal/mol} = 4.182 \text{ kJ/mol}$), 根皮素和 PDK1 的对接分数为 -8.0 kcal/mol , 表明根皮素和 PDK1 之间的结合能



A-Gln 消耗水平; B-谷氨酸水平; C-ATP 水平; D-GLS1 蛋白表达水平; E-CCK-8 检测细胞增殖活力; F-Transwell 检测细胞侵袭 ($\times 200$); G-TUNEL 检测细胞凋亡 ($\times 200$); 与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$; 与 Gln 组比较: # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ ### $P < 0.001$ 。 A-glutamine consumption level; B-glutamate levels; C-ATP levels; D-GLS1 protein expression level; E-CCK-8 detection of cell proliferation activity; F-Transwell detects cell invasion ($\times 200$); G-TUNEL detection of cell apoptosis ($\times 200$); * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs control group; # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ ### $P < 0.001$ vs Gln group.

图 2 根皮素抑制 Gln 代谢对 PC-3 细胞生物学行为的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 2 Effect of phloretin inhibition on Gln metabolism on biological behavior of PC-3 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)



A-前列腺癌、根皮素、Gln 代谢相关交集靶点; B-根皮素和 PDK1 的分子对接结果; C-Western blotting 测定 PDK1 蛋白表达 ($\bar{x} \pm s, n=3$); 与 RWPE-1 组比较: *** $P<0.001$; 与 PC-3 组比较: ### $P<0.001$ 。

A-intersection of prostate cancer, phloretin, and glutamine metabolism related targets; B-molecular docking results of phloretin and PDK1; C-Western blotting analysis of PDK1 protein expression ($\bar{x} \pm s, n=3$); *** $P<0.001$ vs RWPE-1 group; ### $P<0.001$ vs PC-3 group.

图 3 根皮素抑制 PDK1 在 PC-3 细胞中的高表达

Fig. 3 Phloretin inhibits high expression of PDK1 in PC-3 cells

更强(图 3-B)。Western blotting 结果如图 3-C 所示, PC-3 细胞中的 PDK1 蛋白表达显著高于 RWPE-1 细胞 ($P<0.001$), 而根皮素能够显著抑制 PC-3 细胞中的 PDK1 蛋白表达 ($P<0.001$)。

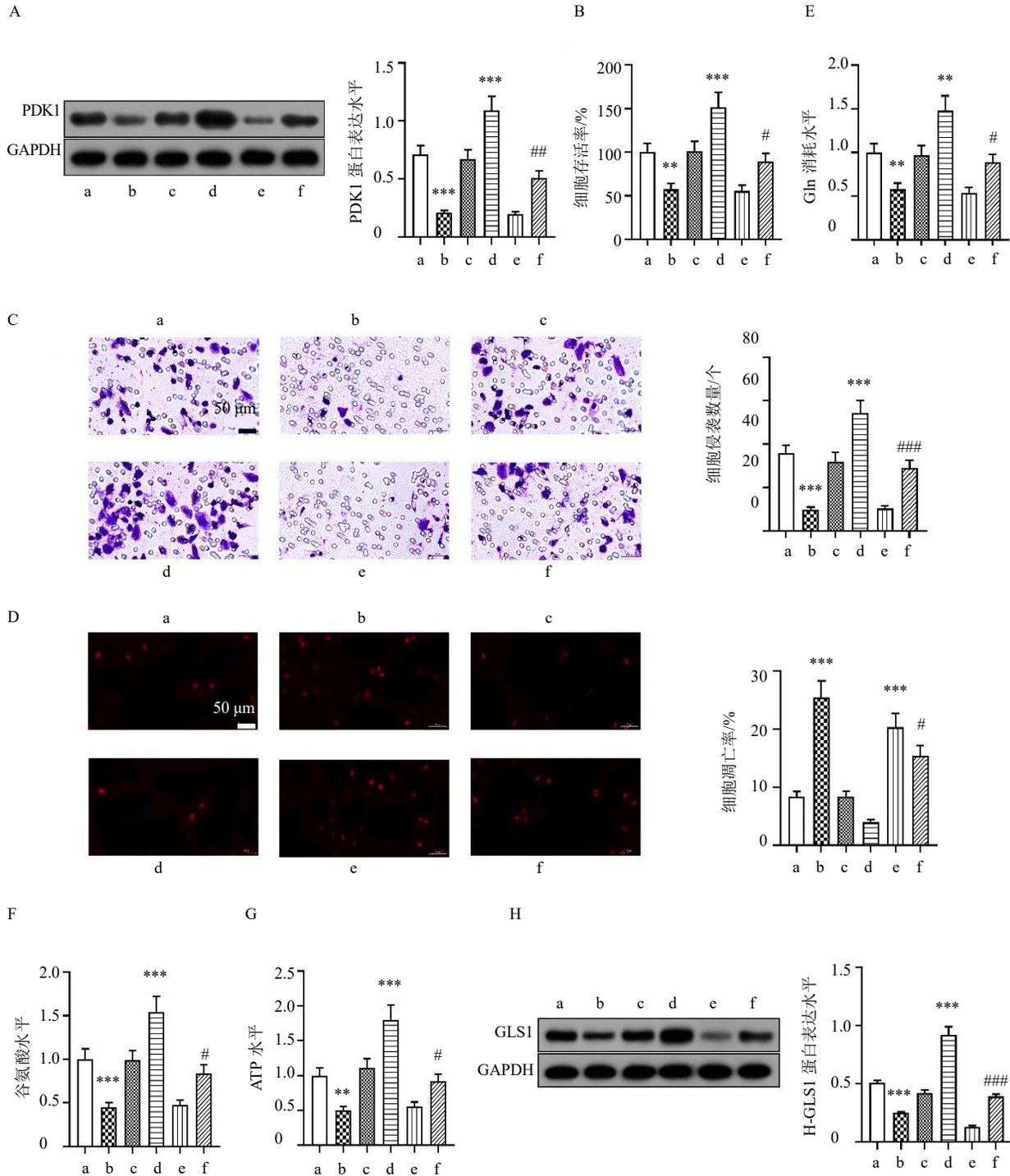
3.4 过表达 PDK1 逆转根皮素对 PC-3 细胞生物学行为及 Gln 代谢的影响

如图 4-A~H 所示, 与对照组比较, 根皮素组 PDK1 蛋白表达显著降低 ($P<0.001$), 细胞增殖与侵袭能力下降 ($P<0.01, 0.001$), 凋亡增加 ($P<0.001$), Gln 消耗水平、谷氨酸和 ATP 水平降低 ($P<0.01, 0.001$), GLS1 蛋白表达水平下调 ($P<0.001$); 与 pcDNA3.1 组比较, 根皮素+pcDNA3.1 组细胞中 PDK1 蛋白表达升高 ($P<0.001$), 细胞增殖与侵袭能力增加 ($P<0.01, 0.001$), 凋亡减少 ($P<0.001$), Gln 消耗水平、谷氨酸和 ATP 水平升高 ($P<0.01, 0.001$), GLS1 蛋白表达水平减弱 ($P<0.001$); 与根皮素+pcDNA3.1 组比较, 根皮素+pcDNA3.1-PDK1 组 PC-3 细胞中 PDK1 蛋白表达水平升高 ($P<$

0.01), 细胞增殖与侵袭能力上升 ($P<0.05, 0.001$), 凋亡减少 ($P<0.05$), Gln 消耗水平、谷氨酸和 ATP 水平上调 ($P<0.05$), GLS1 蛋白表达水平下降 ($P<0.001$)。

3.5 上调 PDHA1 逆转敲减 PDK1 对 PC-3 细胞生物学行为及 Gln 代谢的影响

与对照组比较, 敲减 PC-3 细胞中的 PDK1 后, p-PDHA1 蛋白表达被抑制 ($P<0.001$), 细胞增殖与侵袭能力降低 ($P<0.001$), 凋亡增加 ($P<0.001$), Gln 消耗水平、谷氨酸和 ATP 水平下降 ($P<0.001$), GLS1 蛋白表达水平降低 ($P<0.001$); 与 KD-PDK1+pcDNA3.1 组比较, KD-PDK1+pcDNA3.1-PDHA1 组 p-PDHA1 表达增强 ($P<0.001$), 细胞增殖与侵袭能力提升 ($P<0.05, 0.01$), 凋亡减少 ($P<0.05$), Gln 消耗水平、谷氨酸和 ATP 水平上调 ($P<0.01, 0.001$), GLS1 蛋白表达水平增加 (图 5-A~H, $P<0.01$)。

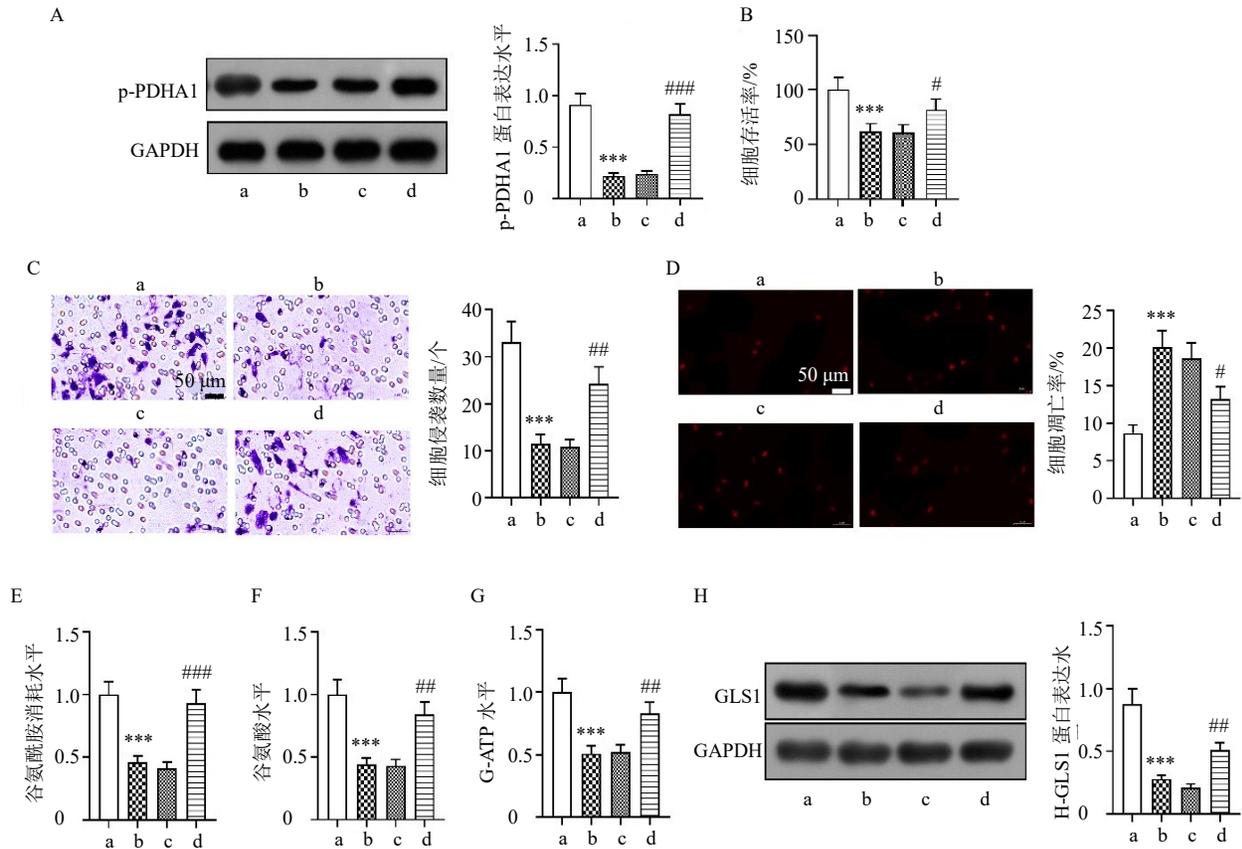


A-蛋白质印迹测定 PDK1 蛋白表达; B-CCK-8 检测细胞增殖活力; C-Transwell 检测细胞侵袭 (×200); D-TUNEL 检测细胞凋亡 (×200); E-Gln 消耗水平; F-谷氨酸水平; G-ATP 水平; H-GLS1 蛋白表达水平; a-对照组; b-根皮素组; c-pcDNA3.1 组; d-pcDNA3.1-PDK1 组; e-根皮素+pcDNA3.1 组; f-根皮素+pcDNA3.1-PDK1 组; 与对照组比较: ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$; 与根皮素+pcDNA3.1 组比较: # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ ### $P < 0.001$ 。

A-Western blotting analysis of PDK1 protein expression; B-CCK-8 detection of cell proliferation activity; C-Transwell detects cell invasion (× 200); D-TUNEL detection of cell apoptosis (× 200); E-glutamine consumption level; F-glutamate levels; G-ATP levels; H-GLS1 protein expression level; a-control group; b-phloretin group; c-pcDNA3.1 group; d-pcDNA3.1-PDK1 group; e-phloretin + pcDNA3.1 group; f-phloretin + pcDNA3.1-PDK1 group; ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs control group; # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ ### $P < 0.001$ vs phloretin + pcDNA3.1 group.

图 4 上调 PDK1 逆转根皮素对 PC-3 细胞生物学行为及 Gln 代谢的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 4 Upregulation of PDK1 reverses effect of phloretin on biological behavior and glutamine metabolism of PC-3 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)



A-蛋白质印迹测定 p-PDHA1 表达; B-CCK-8 检测细胞增殖活力; C-Transwell 检测细胞侵袭 ($\times 200$); D-TUNEL 检测细胞凋亡 ($\times 200$); E-Gln 消耗水平; F-谷氨酸水平; G-ATP 水平; H-GLS1 蛋白表达水平; a-KD-Control 组; b-KD-PDK1 组; c-KD-PDK1+pcDNA3.1 组; d-KD-PDK1+pcDNA3.1-PDHA1 组; 与 KD-control 组比较: $***P < 0.001$; 与 KD-PDK1+pcDNA3.1 组比较: $^{\#}P < 0.05$ $^{\#\#}P < 0.01$ $^{\#\#\#}P < 0.001$ 。A-Western blotting analysis of p-PDHA1 expression; B-CCK-8 detection of cell proliferation activity; C-Transwell detects cell invasion ($\times 200$); D-TUNEL detection of cell apoptosis ($\times 200$); E-glutamine consumption level; F-glutamate levels; G-ATP levels; H-GLS1 protein expression level; a-KD-control group; b-KD-PDK1 group; c-KD-PDK1 + pcDNA3.1 group; d-KD-PDK1 + pcDNA3.1-PDHA1 group; $***P < 0.001$ vs KD-Control group; $^{\#}P < 0.05$ $^{\#\#}P < 0.01$ $^{\#\#\#}P < 0.001$ vs KD-PDK1 + pcDNA3.1 group.

图 5 上调 PDHA1 逆转敲减 PDK1 对 PC-3 细胞生物学行为及 Gln 代谢的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 5 Upregulation of PDHA1 and reversal of PDK1 knockdown affect biological behavior and glutamine metabolism of PC-3 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

3.6 对小鼠移植瘤的影响

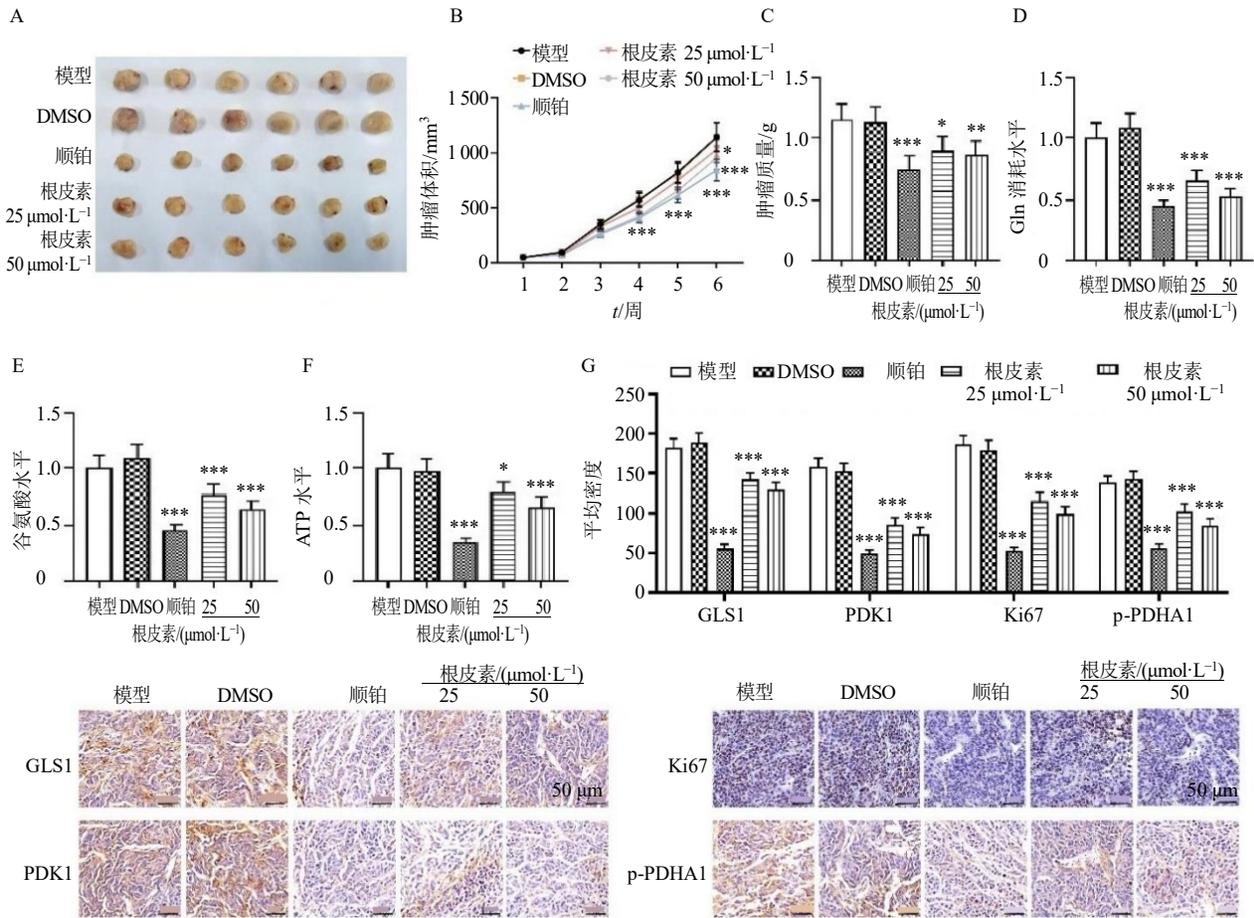
各组小鼠肿瘤组织见图 6-A, 与模型组比较, DMSO 干预未对肿瘤组织生长产生明显影响。如图 6-B~C 所示, 与 DMSO 组比较, 顺铂组、根皮素 25 mg/kg 组与根皮素 50 mg/kg 组小鼠肿瘤体积与肿瘤质量显著降低 ($P < 0.05, 0.01, 0.001$)。如图 6-D~F 所示, 肿瘤组织中 Gln 消耗水平、谷氨酸与 ATP 水平降低 ($P < 0.05, 0.001$); 如图 6-G 所示, 与 DMSO 组比较, GLS1、ki67、PDK1、p-PDHA1 表达均显著降低 ($P < 0.001$)。

4 讨论

前列腺癌是泌尿系统中最常见的恶性肿瘤之一, 其发病率在全球范围内呈现不断上升的趋势,

对老年男性患者的健康构成了严重威胁。前列腺癌的隐匿性和晚期发现的特点使得许多患者在确诊时已处于局部晚期或转移性阶段, 这进一步增加了治疗的难度和复杂性^[13]。中医药在治疗前列腺癌中具有独特的优势, 其多成分、多靶点、多途径的综合调节作用以及丰富的药物资源为前列腺癌的治疗提供了新的选择^[14]。研究表明, 根皮素通过诱导前列腺癌细胞的凋亡和周期阻滞, 显示出较强的抗肿瘤活性, 且对正常细胞毒性较小^[10]。本研究通过体内外实验证实根皮素具有作为前列腺癌治疗药物的潜力, 且抑制 PDK1-p-PDHA1 信号通路及 Gln 代谢可能是其作用机制。

Gln 是癌细胞进行能量代谢和生物合成的重



A-肿瘤图像; B-肿瘤体积; C-肿瘤质量; D~F-肿瘤组织 Gln 消耗水平、谷氨酸水平、ATP 水平; G-各组肿瘤组织 GLS1、ki67、PDK1、p-PDHA1 的平均光密度值 (×400); 与 DMSO 组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ 。

A-tumor images; B-tumor volume; C-tumor quality; D~F-tumor tissue glutamine consumption level, glutamate level, ATP level; G-average optical density values of GLS1, ki67, PDK1, and p-PDHA1 in tumor tissues of each group (×400); * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs DMSO group.

图 6 根皮素抑制小鼠移植瘤组织生长 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 6 Phloretin inhibits growth of transplanted tumor tissue in mice ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

要底物, 有研究指出沉默信息调节因子 4 (silent information regulator 4, SIRT4) 通过抑制 Gln 代谢能够抑制前列腺癌细胞的迁移、侵袭能力和增殖, 表明 Gln 代谢的活跃性对于癌细胞的这些恶性行为具有促进作用^[15]。谷氨酸是 Gln 代谢的产物之一, 其水平的变化可以反映 Gln 代谢的活跃程度, GLS1 是 Gln 代谢的关键酶, 负责将 Gln 转化为谷氨酸, 进而进入三羧酸循环产生 ATP, 通过调节这些代谢相关指标, 可以影响癌细胞的代谢状态和生长能力, 为癌症治疗开辟新的途径^[16]。本研究发现根皮素作为一种天然化合物, 其抗癌作用不仅限于直接抑制癌细胞增殖和促进凋亡, 还深入到细胞代谢层面。通过下调 GLS1 的表达, 阻断 Gln 向谷氨酸的转化, 减少 ATP 的生成, 揭示了根皮素在抑

制前列腺癌细胞 Gln 代谢中的重要机制。此外, 本研究还揭示了 Gln 补充对前列腺癌细胞生物学行为的反向作用, 以及这种作用在根皮素治疗背景下的可逆性。这一发现提示联合治疗的潜力, 在使用根皮素等抗癌药物的同时, 结合 Gln 代谢的调节策略, 可能会实现更好的治疗效果。

PDK1 是 PDK1/AKT/mTOR 信号通路中的一个关键组成部分, 当 PDK1 的表达或活性增加时, 可以激活下游的 AKT 和 mTOR, 进而促进前列腺癌细胞的恶性行为^[17]。在前列腺癌中, PDHA1 通过维持其 mRNA 的稳定性, 激活线粒体代谢, 能够促进前列腺癌的进展, 并可能减弱雄激素受体信号抑制剂对前列腺肿瘤的治疗效果^[18]。关于 PDHA1 和肝癌的研究发现, 敲除 PDHA1 能够损

坏肝癌细胞线粒体功能,促进 Gln 代谢耗竭进而抑制癌细胞增殖^[19]。本研究进一步揭示了磷酸化的 PDHA1 在前列腺癌细胞 Gln 代谢调节和癌细胞生物学行为中的作用。此外,研究表明 PDK1-p-PDHA1 信号通路在胆管癌中发挥着关键的调控作用,通过抑制此信号通路,可以恢复肿瘤细胞的正常代谢模式,抑制其增殖并促进其凋亡^[20]。本研究发现,在前列腺癌中,PDK1 及 p-PDHA1 的高表达导致 Gln 代谢途径的重编程,使细胞更倾向于通过 Gln 分解来提供能量和生物合成所需的中间产物。然而根皮素通过抑制 PDK1,阻断了 Gln 代谢途径的重编程,从而抑制了前列腺癌细胞的生长和侵袭能力,并促进了其凋亡。此外,功能实验表明过表达 PDK1 能够逆转根皮素对细胞增殖、侵袭、凋亡以及 Gln 代谢的影响;并且过表达 PDHA1 时,能够挽救敲减 PDK1 的影响,恢复前列腺癌细胞对 Gln 的依赖和能量代谢途径的重编程,从而促进细胞的生长和增殖。

综上,PDK1-p-PDHA1 信号通路在前列腺癌的 Gln 代谢中起关键作用,根皮素通过抑制 PDK1 来调控这一信号通路,进而影响前列腺癌细胞的能量代谢和生物合成途径,抑制细胞的增殖和侵袭能力,并促进凋亡。基于体外实验结果,本研究通过体内实验,进一步证实根皮素可能通过抑制 PDK1-p-PDHA1 信号通路并调控 Gln 代谢途径发挥治疗前列腺癌的作用,虽然其效果略逊于顺铂,但根皮素作为一种天然化合物可能具有更好的安全性和耐受性。因此,根皮素在治疗前列腺癌中具有潜在的应用前景,值得进一步研究和开发。然而,当前的研究主要集中在根皮素对 PDK1-p-PDHA1 信号通路及 Gln 代谢途径的初步影响上,具体的分子间相互作用仍需进一步深入探究。未来可以利用高通量测序、蛋白质组学、代谢组学等先进技术手段,全面解析根皮素对 PDK1-p-PDHA1 信号通路及 Gln 代谢途径的调控机制。同时,探讨这一调控过程与前列腺癌发生发展之间的内在联系,为前列腺癌的精准治疗提供理论依据。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

[1] Schcolnik-Cabrera A, Juárez-López D. Dual contribution of the mTOR pathway and of the metabolism of amino acids in prostate cancer [J]. *Cell Oncol*, 2022, 45(5): 831-859.
[2] Kong F M, Wang C R, Zhang J, et al. Chinese herbal

medicines for prostate cancer therapy: From experimental research to clinical practice [J]. *Chin Herb Med*. 2023, 15(4): 485-495.

- [3] Beier A K, Ebersbach C, Siciliano T, et al. Targeting the glutamine metabolism to suppress cell proliferation in mesenchymal docetaxel-resistant prostate cancer [J]. *Oncogene*, 2024, 43(26): 2038-2050.
[4] Kim U, Kim C Y, Lee J M, et al. Phloretin inhibits the human prostate cancer cells through the generation of reactive oxygen species [J]. *Pathol Oncol Res*, 2020, 26(2): 977-984.
[5] Kwak C H, Jin L, Han J H, et al. Ilimaquinone induces the apoptotic cell death of cancer cells by reducing pyruvate dehydrogenase kinase 1 activity [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(17): 6021.
[6] Zhu G Z, Guan F X, Li S L, et al. Glutaminase potentiates the glycolysis in esophageal squamous cell carcinoma by interacting with PDK1 [J]. *Mol Carcinog*, 2024, 63(5): 897-911.
[7] Fu Q, Xu L, Wang Y W, et al. Tumor-associated macrophage-derived interleukin-23 interlinks kidney cancer glutamine addiction with immune evasion [J]. *Eur Urol*, 2019, 75(5): 752-763.
[8] 康丹, 吴朝蒙, 曹润恠, 等. 根皮素引起前列腺癌 LNCaP 细胞发生凋亡的机制研究 [J]. 南京师大学报: 自然科学版, 2017, 40(2): 43-50.
[9] 余增丽, 张立实, 吴德生. 异黄酮类化合物对前列腺癌细胞 PC-3 增殖的抑制 [J]. 环境与职业医学, 2002, 19(6): 352-354.
[10] 康丹, 尹莹莹, 王方方, 等. 根皮素诱导前列腺癌 PC-3 细胞凋亡并抑制其裸鼠移植瘤的生长 [J]. 肿瘤, 2017, 37(6): 545-555.
[11] 胡培森, 崔洪泉, 赵俊峰, 等. 当归六黄汤对前列腺癌荷瘤小鼠的免疫功能调节作用及其机制 [J]. 吉林大学学报(医学版), 2021, 47(6): 1469-1475.
[12] 辛紫媛, 刘真一, 高萍, 等. 补阳还五汤通过激活大鼠海马区沉默信息调节因子 1 减轻脑缺血/再灌注损伤后炎症反应的机制 [J]. 中国药理学通报, 2023, 39(9): 1787-1793.
[13] 程帆, 蒋焜. 前列腺癌实验研究现状与展望 [J]. 中华实验外科杂志, 2023, 40(12): 2437-2441.
[14] 刘嘉, 严宝飞, 许晨新, 等. 积雪草酸调控 JAK2/STAT3 信号通路对前列腺癌细胞凋亡的影响 [J]. 药物评价研究, 2023, 46(1): 85-91.
[15] Cai G H, Ge Z H, Xu Y Q, et al. SIRT4 functions as a tumor suppressor during prostate cancer by inducing apoptosis and inhibiting glutamine metabolism [J]. *Sci Rep*, 2022, 12(1): 12208.

- [16] Zhang Y N, Niu X C, Wang Y H, *et al.* SIRT4 has an anti-cancer role in cervical cancer by inhibiting glutamine metabolism via the MEK/ERK/C-myc axis [J]. *Anticancer Res*, 2024, 44(7): 2861-2870.
- [17] Sheng W, Xu W J, Ding J, *et al.* Curcumol inhibits the malignant progression of prostate cancer and regulates the PDK1/AKT/mTOR pathway by targeting miR-9 [J]. *Oncol Rep*, 2021, 46(5): 246.
- [18] Zhong C F, Long Z N, Yang T W, *et al.* M6A-modified circRBM33 promotes prostate cancer progression via PDHA1-mediated mitochondrial respiration regulation and presents a potential target for ARSI therapy [J]. *Int J Biol Sci*, 2023, 19(5): 1543-1563.
- [19] Yang C X, Lee D, Zhang M S, *et al.* Genome-wide CRISPR/Cas9 library screening revealed dietary restriction of glutamine in combination with inhibition of pyruvate metabolism as effective liver cancer treatment [J]. *Adv Sci*, 2022, 9(34): e2202104.
- [20] Xu L, Li Y, Zhou L X, *et al.* SIRT3 elicited an anti-Warburg effect through HIF1 α /PDK1/PDHA1 to inhibit cholangiocarcinoma tumorigenesis [J]. *Cancer Med*, 2019, 8(5): 2380-2391.

[责任编辑 罗 曦]