

银杏内酯 B 通过 PI3K/AKT 信号通路抑制 MH7A 人成纤维样滑膜细胞增殖及其促细胞凋亡

刘璘琛¹, 徐晓龔¹, 孙春萌², 俞济荣¹, 施青¹, 孙君君¹, 逢丹丹¹, 卫斐然¹, 刘兴^{3*}

(¹ 东南大学附属中大医院风湿科, 南京 210009; ² 中国药科大学药学院药剂系, 南京 210009; ³ 东南大学医学院, 南京 210009)

摘要 探讨银杏内酯 B (ginkgolide B, GB) 对 MH7A 人成纤维样滑膜细胞 (fibroblast-like synoviocytes, FLS) 的增殖抑制作用及其潜在机制。采用 20 $\mu\text{g/L}$ 肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 刺激 MH7A 构建关节炎细胞模型。经不同浓度 GB 作用于 MH7A 细胞后, CCK-8 法检测细胞活力; Transwell 实验检测细胞侵袭力; 流式细胞术检测细胞凋亡率和细胞周期; 实时荧光定量 PCR (Real-time quantitative PCR, RT-qPCR) 和蛋白免疫印迹分别检测基因转录和蛋白表达量。与对照组相比, GB 对细胞活力的抑制作用呈现出一定的浓度和时间依赖性; GB 显著抑制细胞侵袭力、增加细胞凋亡率和 G₀/G₁ 期比例; GB 显著上调细胞 Bcl-2 相关 X 蛋白 (Bcl-2-associated X protein, Bax) 和 p21 mRNA 和下降 Bcl-2、髓系白血病 1 (myeloid cell leukemia 1, Mcl-1)、蛋白激酶 B (protein kinase B, PKB; 又称 AKT)、磷脂酰肌醇-3 激酶 (phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K)、Cyclin D1 和细胞周期调节蛋白激酶 4 (cyclin-dependent kinase 4, CDK4) mRNA 转录水平; 同时, GB 显著上调 Bax、p21 和 Cleaved-caspase 3 蛋白和下调 Bcl-2、Mcl-1、p-AKT、p-PI3K、Cyclin D1 和 CDK4 蛋白表达量, 且伴有 p-PI3K/PI3K、p-AKT/AKT 和 Bcl-2/Bax 比值的降低。综上, GB 通过抑制 PI3K/AKT 信号通路, 阻滞 MH7A 细胞 G₁ 期向 S 期转化、抑制细胞活力和侵袭力, 并诱导 MH7A 人成纤维样滑膜细胞凋亡。

关键词 银杏内酯 B; 磷脂酰肌醇 3-激酶/蛋白激酶 B; 类风湿性关节炎; MH7A 细胞; 凋亡

中图分类号 R965 **文献标志码** A **文章编号** 1000-5048(2025)02-0216-09

doi: 10.11665/j.issn.1000-5048.2024091403

引用本文 刘璘琛, 徐晓龔, 孙春萌, 等. 银杏内酯 B 通过 PI3K/AKT 信号通路抑制 MH7A 人成纤维样滑膜细胞增殖及其促细胞凋亡 [J]. 中国药科大学学报, 2025, 56(2): 216–224.

Cite this article as: LIU Linchen, XU Xiaoyan, SUN Chunmeng, *et al.* Ginkgolide B inhibits cell proliferation and promotes cell apoptosis of MH7A human fibroblast-like synoviocytes through PI3K/AKT pathway[J]. *J China Pharm Univ*, 2025, 56(2): 216–224.

Ginkgolide B inhibits cell proliferation and promotes cell apoptosis of MH7A human fibroblast-like synoviocytes through PI3K/AKT pathway

LIU Linchen¹, XU Xiaoyan¹, SUN Chunmeng², YU Jirong¹, SHI Qing¹, SUN Junjun¹, PANG Dandan¹, WEI Feiran¹, LIU Xing^{3*}

¹Department of Rheumatology, Southeast University, Zhongda Hospital, Nanjing 210009; ²Department of Pharmaceutics, School of Pharmacy, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009; ³School of Medicine, Southeast University, Nanjing 210009, China

Abstract To explore the inhibitory effect of ginkgolide B (GB) on MH7A human fibroblast-like synoviocytes (FLS) and its potential mechanism. Firstly, 20 $\mu\text{g/L}$ tumor necrosis factor- α (TNF- α) was pretreated with MH7A to establish a cell model of arthritis. After incubation of MH7A cells with various concentrations of GB, CCK-8 assay, Transwell assay, and flow cytometry (FCM) were separately used to detect cell viability, cell invasion, and cell apoptosis rate and cell cycle; Real-time quantitative PCR and Western blot assay were performed to detect the apoptosis- and cycle-related gene transcriptions and protein expressions, respectively. The results showed that compared with the control group, GB dose- and time-dependently suppressed cell viability to a greater extent; GB

收稿日期 2024-09-14 *** 通信作者** Tel: 18066068585 E-mail: llc2430782663@163.com

基金项目 国家自然科学基金项目 (No. 22278442)

significantly reduced cell invasive ability and increased cell apoptosis rate and proportion of G₀/G₁ phase in MH7A cells, along with increased transcription levels of Bcl-2-associated X protein (Bax) and p21 mRNA and decreased transcription levels of Bcl-2, myeloid cell leukemia 1 (Mcl-1), protein kinase B (PKB; AKT), IP3K, Cyclin D1 and cyclin-dependent kinase 4 (CDK4) mRNA; GB remarkably increased expression levels of Bax, p21, and cleaved-Caspase 3 protein and decreased expression levels of Bcl-2, Mcl-1, p-AKT, p-PI3K, Cyclin D1, and CDK4 protein, with decreased ratios of p-PI3K/PI3K, p-AKT/AKT, and Bcl-2/Bax. In conclusion, GB blocks the G₁-to-S cell cycle transition, suppresses cell viability and cell invasion and induces cell apoptosis of MH7A human RA-FLS via suppressing the PI3K/AKT signaling pathway.

Key words ginkgolide B; PI3K/AKT; rheumatoid arthritis; MH7A cell; cell apoptosis

This study was supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 22278442)

类风湿性关节炎 (rheumatoid arthritis, RA) 是一种由免疫系统异常激活和免疫耐受引起的自身免疫性疾病, 其特征是过度滑膜增生和进行性关节破坏^[1]。流行病学调查显示: RA 几乎发生于全世界任何地区或各个民族, 以女性多见, 主要与遗传、雌激素、生殖和神经内分泌等宿主危险因素以及吸烟、空气暴露、外源性感染等环境危险因素有关^[2]; RA 在全球的发病率为 0.5%~1.0%, 在中国大陆为 0.42%^[3]。成纤维样滑膜细胞 (fibroblast-like synoviocytes, FLS) 是人类 RA 滑膜组织中增生性滑膜的主要细胞类型, 在高水平肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor, TNF- α) 等炎症因子的持续刺激下, 表现出肿瘤样异常增殖、侵袭、凋亡障碍以及滑膜组织炎性增生和关节破坏等病理特点^[4], 由此可见 FLS 功能改变在 RA 进展过程中起到关键作用。因此, 通过有效抑制 RA-FLS 异常过度增殖和侵袭以及促进其凋亡可能对减轻软骨破坏和改善 RA 临床症状有着重要作用。

MH7A 是由 RA 患者的 FLS 经 SV40T 抗原基因转染而来的永生化细胞株, 延续了人 RA-FLS 的特点, 目前已成为 RA 病理机制和体外药物筛选的主要研究载体之一^[5]。了解中草药有效成分在 FLS 凋亡中的诱导途径, 不仅有助于阐明中药治疗 RA 的分子机制, 而且有利于从天然草药中寻找新的候选治疗药物^[6]。银杏内酯 B (ginkgolide B, GB) 是从银杏叶内提取的萜内酯类单体成分, 具有抗炎、抗氧化活性和抗血栓形成的作用^[7]。本实验通过研究 GB 对 TNF- α 诱导的 MH7A 细胞活力、侵袭力和凋亡的影响, 初步探讨基于磷脂酰肌醇 3-激酶 (phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K)/蛋白激酶 B (protein kinase B, PKB/AKT) 通路的相关蛋白, 为

临床抗 RA 的新药开发利用提供理论依据。

1 材料

1.1 试剂

高糖 DMEM 培养基 (美国 Sigma-Aldrich 公司); CCK-8 试剂盒 (日本同仁化学研究所); Matrigel 胶 (BD 美国 Biosciences 公司); 凋亡检测试剂盒 (美国 BD 公司); TRIzol 试剂盒 [宝日医生生物技术 (北京) 有限公司]; SYBR[®]Green 荧光定量检测试剂盒和 GB (美国 Sigma 公司); 放射免疫沉淀法 (radioimmunoprecipitation assay, RIPA) 细胞裂解液 (武汉博士德生物工程有限公司); BCA 试剂盒 (广州伟伯科技有限公司); Bax、Bcl-2、Mcl-1、cleaved-Caspase 3、CyclinD1、CDK4、p21 和 p-AKT 抗体 (美国 Abcam 公司); PI3K 和 p-PI3K 抗体 (美国 Cell Signaling Technology 公司); AKT 和 GAPDH 抗体 (美国 Proteintech 公司); 辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG (美国 Jackson Immuno Research 公司); 其他试剂均为市售分析纯。

细胞株来源于上海冠导生物科技有限公司。

1.2 仪器

Multiskan FC 酶标仪 (美国 ThermoFisher 公司); IX53 倒置显微镜 (日本 Olympus 公司); FACS Calibur 流式细胞分析仪 (美国 BD 公司)。

2 方法

2.1 细胞培养

MH7A 细胞培养参照文献 [8-9]。MH7A 细胞置于含 10% FBS、青霉素 (100 U/mL)-链霉素 (100 μ g/mL) 的 DMEM 培养基中, 置 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱培养。隔天加入含 20 μ g/L TNF- α 的 DMEM

培养基中继续培养,选取 TNF- α 刺激下 MH7A 对数生长期的细胞进行传代和后续试验。

2.2 CCK-8 法检测细胞活力

离心收集经 0.25% 胰酶消化处理的 MH7A 细胞(每升 5×10^7 个),将每孔单细胞悬液 100 μ L 接种于 96 孔板,置 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 细胞培养箱培养。待细胞贴壁生长 24 h 后,将原培养液更换为 20 μ g/L TNF- α 的 DMEM 培养基和不同质量浓度的 GB(0、10、20、40 和 80 μ g/mL),分别继续培养 24、48 和 72 h。弃去含药培养液,每孔加入 CCK-8 应用液 10 μ L,37 $^{\circ}$ C 避光反应,1 h 后应用 Multiskan FC 酶标仪测量 450 nm 处各孔的吸收度 A ,用各实验组 A 与对照组 A 的比值表示细胞活力。

2.3 Transwell 实验检测细胞侵袭力

将 MH7A 细胞(约每孔 1.0×10^4 个)接种到涂有 Matrigel 胶(1:5 稀释)的 Transwell 小室(直径 6.5 mm,孔径 8.0 μ m)的上室,置于终浓度为 20 μ g/L TNF- α 的 DMEM 培养基中,分别加入质量浓度为 0、10、20 和 40 μ g/mL GB;下室中加入含有 20% 胎牛血清的 DMEM 培养基。在 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 条件下培养,24 h 后用磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)洗涤小室 3 次,并用棉签擦拭小室内表面的细胞,用 4% 多聚甲醛固定迁移至小室外膜下的细胞 20 min,然后用 0.1% 结晶紫染色 10 min。再次用 PBS 洗涤细胞后,采用 Image J 软件(2.6 版)随机拍摄倒置显微镜下 5 个视野中各组细胞图像并进行计数。

2.4 流式细胞术(flow cytometry, FCM)检测细胞凋亡率

离心收集经 0.25% 胰酶消化处理的 MH7A 细胞(每升 5×10^7 个),将每孔单细胞悬液 2 mL 接种于 6 孔板,置 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 细胞培养箱,待细胞贴壁生长 24 h 后,更换原培养液为含 20 μ g/L TNF- α 以及含质量浓度 0、10、20 和 40 μ g/mL GB 的 DMEM 培养基,继续培养 48 h。胰酶消化后收集细胞,预冷 PBS 洗涤细胞 2 次,加结合缓冲液($1 \times$)500 μ L 悬浮细胞,并依次加入膜联蛋白 V(annexin V)-异硫氰酸荧光素(fluorescein isothiocyanate, FITC)5 μ L 和碘化丙啶(propidium iodide, PI)5 μ L,轻轻混匀,置 4 $^{\circ}$ C 暗处孵育 15 min,采用 FCM 检测细胞凋亡率,并用 BD Accuri C6 软件分析实验数据。

2.5 FCM 检测细胞周期

同“2.4”项下方法预处理 MH7A 细胞 48 h,胰酶消化细胞, PBS 洗涤细胞 2 次;经预冷的 70% 乙醇固定并低温下孵育 3 h,离心洗涤后,悬浮于 50 μ g/mL PI 染液中,室温下避光振摇,调整细胞浓度为每毫升 1×10^6 个,30 min 内上 FCM 检测细胞周期分布。

2.6 实时荧光定量聚合酶链式反应(RT-qPCR)检测 mRNA 转录

同“2.4”预处理 MH7A 细胞 48 h,消化收集细胞,采用 TRIzol 试剂盒提取总核糖核酸(ribonucleic acid, RNA)和测定其浓度、反转录试剂盒逆转录成互补脱氧核糖核酸(complementary DNA, cDNA),以 GAPDH 为内参,按照 SYBR[®]Green 荧光定量检测试剂盒的操作流程进行 PCR 定量测定目的基因 mRNA 表达。引物序列由上海生物工程有限公司合成, Bcl-2 正义链为 5'-GGTGGGGTTCATGTGTGTGG-3',反义链为 5'-CGGTTCAGGTACTCAGTCA TCC-3'; Bax 正义链为 5'-CCCGAGAGGTCTTTTTC CGAG-3',反义链为 5'-CCAGCCCATGATGGTTC TGAT-3'; CyclinD1 正义链为 5'-GCTGCGAAGTGG AAACCATC-3',反义链为 5'-CCTCCTTCTGCACAC ATTTGAA-3'; AKT 正义链为 5'-TCCTCCTCAAG AATGATGGCA-3',反义链为 5'-GTGCGTTCGAT GACAGTGGT-3'; PI3K 正义链为 5'-AAACAGAGC CAAAGGGAAGG-3',反义链为 5'-ATACC AGCCA CAAAGGCTTC-3'; Mcl-1 正义链为 5'-AGACGATG TGAAATCG-3',反义链为 5'-TAACTAGCCAGTCC CG-3'; CDK4 正义链为 5'-GAGGCGACTGGAGGC TTTT-3',反义链为 5'-GGATGTGCACAGACGTC C-3'; p21 正义链为 5'-GCCCA GTGGACAGCGAG CAG-3',反义链为 5'-GCCGGCGTTTGGAGTGG TAG-3'; GAPDH 正义链为 5'-GCACCGTCAAGGC TGAGAAC-3',反义链为 5'-TGGTGA AGACGCCA GTGGA-3'。PCR 扩增程序如下:95 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 95 $^{\circ}$ C 变性 5 s, 60 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 65 $^{\circ}$ C 延长 1 min, 35 个循环,每个样品设 3 个复孔。最后用 2^{- $\Delta\Delta$ CT} 方法计算目的基因 mRNA 相对表达量。

2.7 Western blot 检测蛋白表达

同“2.4”项下方法预处理 MH7A 细胞 48 h,消化收集细胞,加入 RIPA 细胞裂解液后置于冰上裂解 30 min,以提取各组总蛋白。经 1000 r/min 离心 5 min,采用 BCA 试剂盒测定上清液蛋白含量。蛋

白变性后十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳, 转膜, 5% 脱脂牛奶封闭, 1 h 后用含 Tween-20 的 Tris 盐缓冲液 (tris-borate-sodium Tween-20, TBST) 漂洗 3 次 ($\times 15$ min), 分别加入 1:1000 稀释的 Bax、Bcl-2、Mcl-1、cleaved-Caspase 3、CyclinD1、CDK4、p21、AKT、p-AKT、PI3K、p-PI3K 和 GAPDH 一抗, 置 4 °C 摇床孵育过夜。TBST 漂洗后加入 1:5000 稀释的辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG 二抗, 常温孵育 1 h。TBST 再次漂洗后加入电化学发光工作液显色, 应用 Image J 1.44 软件分析各蛋白条带灰度值。

2.8 统计学分析

计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用 t 检验或方差分析; 计数资料以率 (%) 表示, 组间比较采用

χ^2 检验; 用 SPSS 26.0 统计学软件进行数据分析, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对 MH7A 细胞活力和细胞侵袭力的影响

与对照组相比, 同一干预时间点, 各组 MH7A 细胞活力伴随着 GB 浓度的增大呈现出下降趋势; 同一质量浓度 GB ($< 80 \mu\text{g/mL}$) 作用 MH7A 细胞不同时间, 细胞活力伴随着作用时间延长呈现出下降趋势, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。当 GB 达 $80 \mu\text{g/mL}$ 时, 48 和 72 h 的细胞存活率均小于 50%, 但两组间差异无统计学意义 ($P > 0.05$) (图 1)。鉴于上述 CCK-8 检测结果, 选择 10, 20 和 $40 \mu\text{g/mL}$ GB 为后续实验研究。

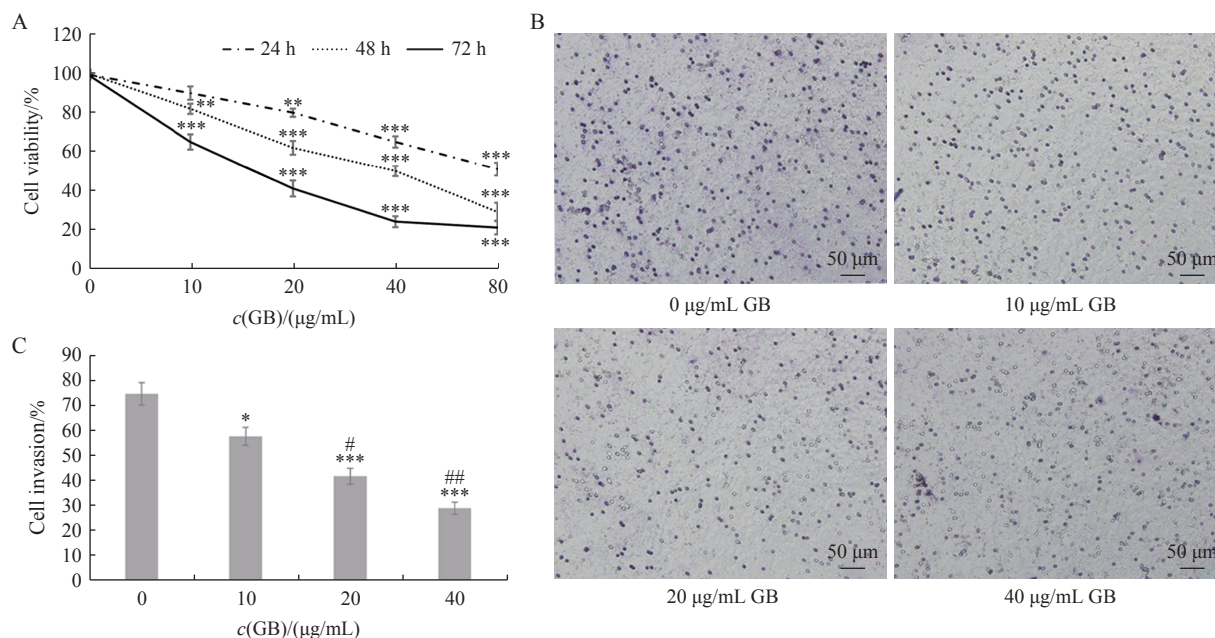


Figure 1 Effects of ginkgolide B (GB) on MH7A cell viability and cell invasion ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

A: Cell viability determined by CCK-8 assay after incubation of MH7A cells with 0 (control group), 10, 20, 40, and $80 \mu\text{g/mL}$ GB for 24, 48 and 72 h; B: Representative image of cell invasion detected by Transwell assay after incubation of MH7A cells with 0 (control group), 10, 20 and $40 \mu\text{g/mL}$ GB for 24 h; C: Bar graph of cell invasion ability in MH7A cells

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs control group; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ vs $10 \mu\text{g/mL}$ GB group

经不同质量浓度 GB 作用 MH7A 细胞 24 h, Transwell 试验结果显示: 与对照组相比, TNF- α 刺激下的 MH7A 细胞侵袭能力伴随着 GB 浓度的升高而显著降低 ($P < 0.05$)。且 20 和 $40 \mu\text{g/mL}$ GB 组细胞侵袭力均较 $10 \mu\text{g/mL}$ GB 组明显下降 ($P < 0.05$)。

3.2 对 MH7A 细胞凋亡率的影响

经不同浓度 GB 作用 MH7A 细胞 48 h, 各组细

胞凋亡率均较对照组细胞增高, 并且细胞凋亡率伴随着 GB 浓度的增大呈现出增高趋势 ($P < 0.05$) (图 2)。

3.3 对 MH7A 细胞周期的影响

与对照组相比, 不同浓度 GB 作用 MH7A 细胞 48 h 后, 各组 G_0/G_1 期细胞比例呈上升趋势 ($P < 0.05$), S 期细胞比例呈下降趋势 ($P < 0.05$), 但 G_2/M 期细胞比例呈下降趋势, 但各组间差异无统计

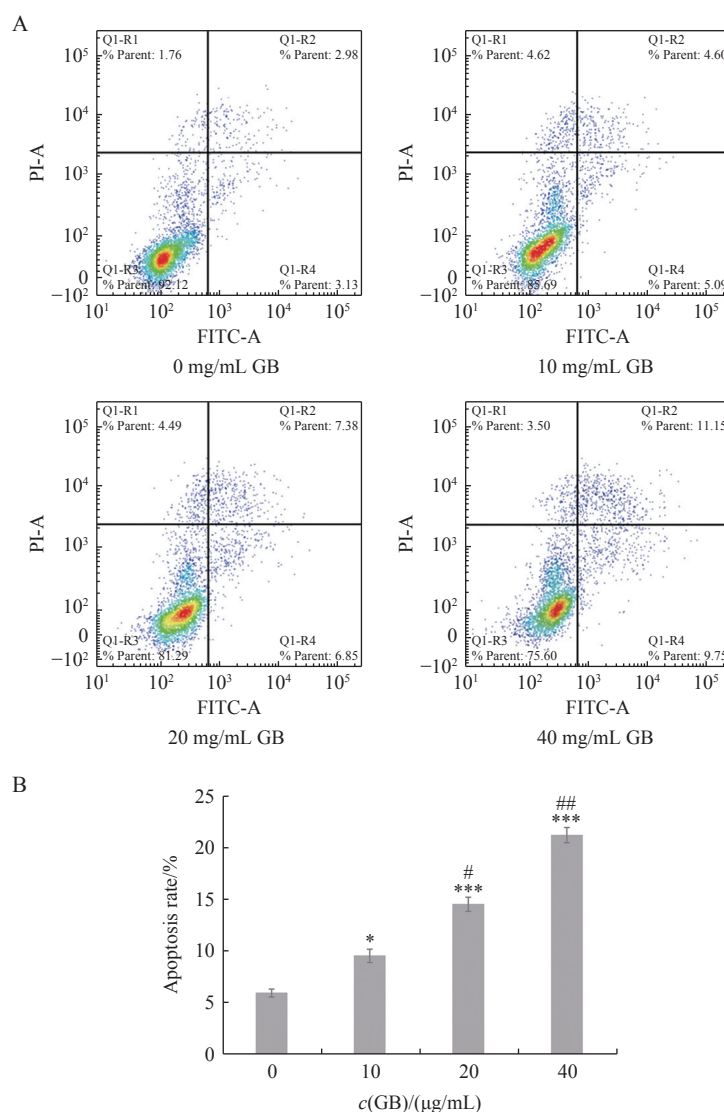


Figure 2 GB on cell apoptosis ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

A: Representative flow cytometry analysis of cell apoptosis after incubation of MH7A cells with 0 (control group), 10, 20, and 40 $\mu\text{g/mL}$ GB for 48 h;

B: Bar graph of cell apoptosis in MH7A cells

* $P < 0.05$, *** $P < 0.001$ vs control group; # $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs 10 $\mu\text{g/mL}$ GB group

学意义($P > 0.05$)(图 3), 提示 GB 浓度依赖性地阻滞 MH7A 细胞于 G_0/G_1 期。

3.4 对 MH7A 细胞 mRNA 转录水平的影响

与对照组相比, 不同浓度 GB 作用 MH7A 细胞 48 h, 各组 Bax 和 p21 mRNA 转录水平均显示出上升趋势, 而 Bcl-2、Cyclin D1、CDK4、AKT、PI3K 和 Mcl-1 mRNA 转录水平均呈现出下降趋势, 且随着 GB 质量浓度的增大, 作用效果越明显($P < 0.05$)(图 4)。

3.5 对 MH7A 细胞凋亡相关蛋白表达水平的影响

与对照组相比, 不同浓度 GB 作用 MH7A 细胞 48 h, 各组 Bax 和 cleaved-Caspase 3 蛋白表达量

均呈现出上升趋势, 而 Bcl-2、Mcl-1、p-AKT 和 p-PI3K 蛋白表达量均呈现出下降趋势(图 5-A, 5-B), 并伴有 p-PI3K/PI3K、p-AKT/AKT(图 5-C)和 Bcl-2/Bax 比值降低(图 5-D), 且随着 GB 质量浓度的增加, 作用效果越明显($P < 0.05$)。

3.6 对 MH7A 细胞中周期相关蛋白表达水平的影响

与对照组相比, 不同浓度 GB 作用 MH7A 细胞 48 h, 各组 p21 蛋白表达量呈现出上升趋势, 而 CyclinD1 和 CDK4 蛋白表达量均呈现出下降趋势, 且伴随着 GB 质量浓度的增加, 作用效果越明显($P < 0.05$)(图 6-A, 6-B)。

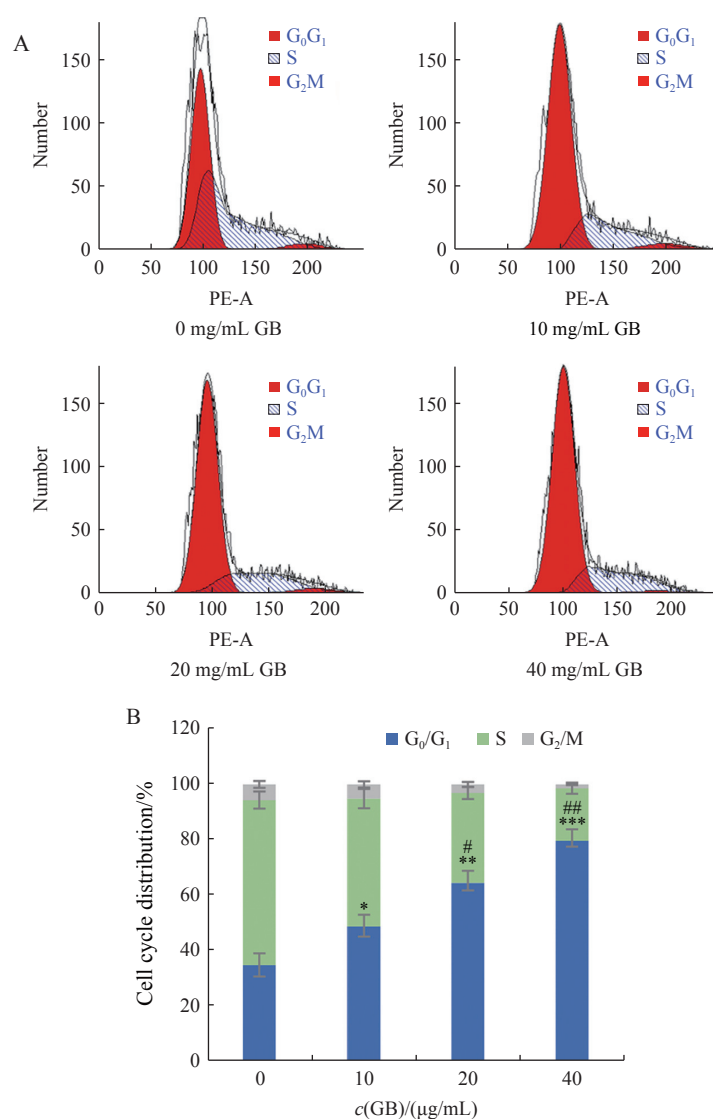


Figure 3 Effect of GB on cell cycle ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

A: Representative FCM analysis of cell cycle after incubation of MH7A cells with 0 (control group), 10, 20 and 40 μg/mL GB for 48 h; B: Bar graph of cell cycle distribution in MH7A cells

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs control group; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ vs 10 μg/mL GB group

4 讨论

目前,临床上针对 RA 的治疗目标主要是控制疾病症状、减缓疾病进一步损害^[10]。中药银杏叶的二萜类化合物 GB 具有明显的抗炎和抗肿瘤等药理作用^[11-12]。GB 通过下调 TLR4-NF-κB 通路抑制小胶质 BV2 细胞活化及炎症反应^[13]。最近研究表明,GB 还能够通过抑制 JAK2/STAT3 信号通路发挥其抗肿瘤作用^[12]。本研究中 GB 干预高浓度 TNF-α 持续刺激下的 MH7A 细胞,其肿瘤样异常增殖和侵袭能力均呈现出明显下降。Xie 等^[14]证实了 GB 具有减轻类风湿关节炎模型中小鼠关节软骨和骨质

的破坏等作用,其机制与 Wnt5a/JNK/NF-κB 轴调控的 RA-FLSs 凋亡和炎性细胞因子释放有关。上述数据表明 GB 有助于抑制 RA 滑膜组织中 FLS 异常增殖和侵袭,缓解 RA 的症状和疾病进展。

RA 发病机制复杂,涉及细胞内多种信号分子的调节,其中 PI3K/AKT 信号通路为重要的信号转导通路之一^[6,15]。活化的 AKT 激活或抑制 PI3K/AKT 信号通路的下游靶点,在细胞增殖、侵袭转移、周期和凋亡相关靶点的调控中发挥着重要作用^[16]。在各种促进细胞炎性增殖的反应中,首先可通过调节 G₁ 期检查点分子和活化 AKT 信号传导

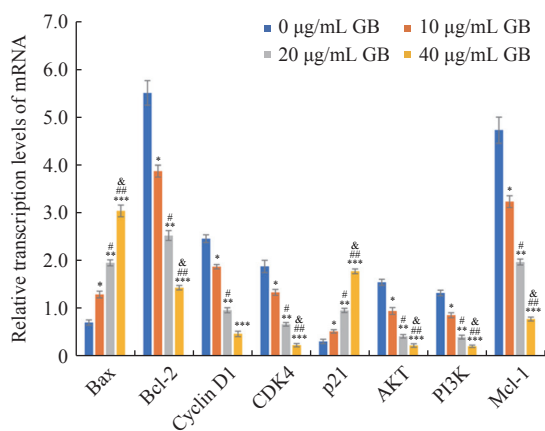


Figure 4 Effect of GB on the transcription levels of mRNA ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

qRT-PCR analysis of levels of transcription mRNA after incubation of MH7A cells with 0 (control group), 10, 20, and 40 µg/mL GB for 48 h
* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs control group; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ vs 10 µg/mL GB group; & $P < 0.05$ vs 20 µg/mL GB group

来促进 G_1 期到 S 期转变, 从而加速人非小细胞肺癌的生长^[17]。值得注意的是, $1 \times 10^{-9} \sim 1 \times 10^{-5}$ mol/L GB 浓度依赖性抑制牛主动脉平滑肌细胞增殖, 其与细胞周期 G_1 期转换到 S 期阻滞有关^[18]。本研究

中 GB 通过下调 Cyclin D1 和 CDK4 以及上调 p21 基因转录和蛋白表达, 阻滞 MH7A 细胞 G_1 期向 S 期转化, 从而影响 DNA 复制和抑制其增殖。

细胞凋亡是细胞的一种基本生物学现象, 在多细胞生物去除不需要的或异常细胞中起着关键性作用^[19]。研究发现, PI3K/AKT 通路中 AKT 活化可激活其下游靶点 Bax, 增强 Bcl-2 因子的转录, 发挥抗凋亡作用^[20–21]。Caspase 家族中的 caspase 3 是细胞凋亡最重要的调控蛋白, 参与细胞凋亡启动和执行过程^[22]。GB 通过活性氧生成、c-Jun N 末端激酶激活、线粒体膜电位丧失和 caspase-3 激活诱导小鼠胚胎干细胞(ESC-B5)凋亡^[23]。本研究中 GB 剂量依赖性地上调 Bax 基因转录和蛋白表达量、下调 MH7A 细胞中 Bcl-2、Mcl-1、AKT 和 PI3K 基因转录以及 p-PI3K、p-AKT、Bcl-2 和 Mcl-1 蛋白表达量, 致使 p-PI3K/PI3K、p-AKT/AKT 和 Bcl-2/Bax 比值下降。其中 Bcl-2/Bax 比值下降可导致线粒体外孔膜形成, 释放细胞色素 C 入胞质, 激活下游的 cleaved-Caspase 3 表达量增加, 并进一步促进 MH7A 细胞凋亡。

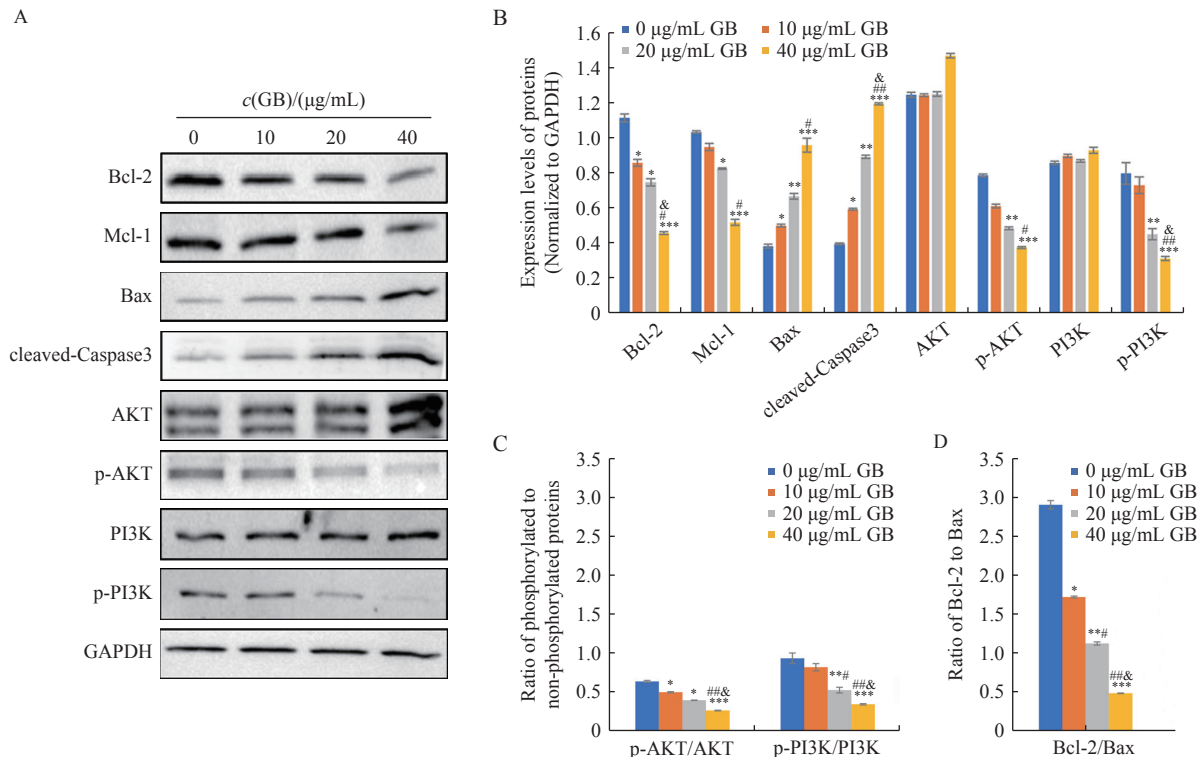


Figure 5 Effect of GB on the expression levels of apoptosis-related protein ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

A: Representative image of Western blot assay after incubation of MH7A cells with 0 (control group), 10, 20, and 40 µg/mL GB for 48 h; B: Relative expression levels of apoptosis-related proteins; C: Ratio of phosphorylated to non-phosphorylated proteins; D: Ratio of Bcl-2 to Bax protein

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs control group; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ vs 10 µg/mL GB group; & $P < 0.05$ vs 20 µg/mL GB group

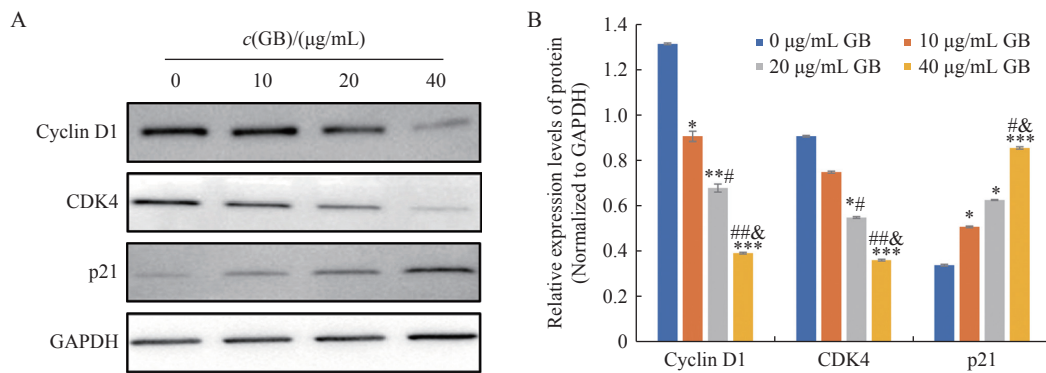


Figure 6 Effect of GB on the expression levels of cell cycle-related protein ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

MH7A cells were collected and the expression levels of protein were quantitatively determined by Western blot assay after incubation with 0 (control group), 10, 20, and 40 µg/mL GB for 48 h

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs control group; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ vs 10 µg/mL GB group; & $P < 0.05$ vs 20 µg/mL GB group

综上所述, GB 通过抑制 PI3K/AKT 信号通路, 阻滞 MH7A 细胞 G₁ 期向 S 期转化、抑制细胞活力和侵袭力, 并诱导人成纤维样滑膜 MH7A 细胞凋亡。这可能是 GB 抗 RA 的信号分子调节机制之一, 但该作用机制还有待于进一步体内研究。

References

- [1] Li N, Jiang L, Cai YH, *et al.* The correlation between interleukin-34 and bone erosion under ultrasound in rheumatoid arthritis[J]. *Mod Rheumatol*, 2020, **30**(2): 269-275.
- [2] Romão VC, Fonseca JE. Etiology and risk factors for rheumatoid arthritis: a state-of-the-art review[J]. *Front Med (Lausanne)*, 2021, **8**: 689698.
- [3] Tian XP, Wang Q, Li MT, *et al.* 2018 Chinese guidelines for the diagnosis and treatment of rheumatoid arthritis[J]. *Rheumatol Immunol Res*, 2021, **2**(1): 1-14.
- [4] Chen YX, Dang JL, Lin XR, *et al.* RA fibroblast-like synoviocytes derived extracellular vesicles promote angiogenesis by mirna-1972 targeting p53/MTOR signaling in vascular endothelial cell[J]. *Front Immunol*, 2022, **13**: 793855.
- [5] Castrejon I. Evaluation and monitoring of established rheumatoid arthritis[J]. *Best Pract Res Clin Rheumatol*, 2019, **33**(5): 101480.
- [6] Zhang Q, Liu J, Zhang MM, *et al.* Apoptosis induction of fibroblast-like synoviocytes is an important molecular-mechanism for herbal medicine along with its active components in treating rheumatoid arthritis[J]. *Biomolecules*, 2019, **9**(12): 795.
- [7] Meng W, Ye HB, Ma ZF, *et al.* Perfluorocarbon nanoparticles incorporating ginkgolide b: artificial O₂ carriers with antioxidant activity and antithrombotic effect[J]. *Chem Med Chem*, 2024, **19**(1): e202300312.
- [8] Yang JL, Li YX, Wang LL, *et al.* LncRNA H19 aggravates TNF-α-induced inflammatory injury via TAK1 pathway in MH7A cells[J]. *Biofactors*, 2020, **46**(5): 813-820.
- [9] Mo X, Chen J, Wang X, *et al.* Krüppel-like factor 4 regulates the expression of inducible nitric oxide synthase induced by TNF-α in human fibroblast-like synoviocyte MH7A cells[J]. *Mol Cell Biochem*, 2018, **438**: 77-84.
- [10] Wang Y, Chen S, Du K, *et al.* Traditional herbal medicine: therapeutic potential in rheumatoid arthritis[J]. *J Ethnopharmacol*, 2021, **279**: 114368.
- [11] Xiang YJ, Zhang SY, Lu J, *et al.* Ginkgolide B protects human pulmonary alveolar epithelial A549 cells from lipopolysaccharide-induced inflammatory responses by reducing TRIM37-mediated NF-κB activation[J]. *Biotechnol Appl Biochem*, 2020, **67**(6): 903-911.
- [12] Chen K, Sun WJ, Jiang Y, *et al.* Ginkgolide B suppresses TLR4-mediated inflammatory response by inhibiting the phosphorylation of JAK2/STAT3 and p38 MAPK in high glucose-treated HUVECs[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2017, **2017**: 9371602.
- [13] Wan F, Zang SS, Yu GQ, *et al.* Ginkgolide B suppresses methamphetamine-induced microglial activation through TLR4-NF-κB signaling pathway in BV2 cells[J]. *Neurochem Res*, 2021, **46**(10): 2881-2891.
- [14] Xie CM, Jiang J, Liu JP, *et al.* Ginkgolide B attenuates collagen-induced rheumatoid arthritis and regulates fibroblast-like synoviocytes-mediated apoptosis and inflammation[J]. *Ann Transl Med*, 2020, **8**(22): 1497.
- [15] Rahmani F, Ziaemehr A, Shahidsales S, *et al.* Role of regulatory miRNAs of the PI3K/AKT/mTOR signaling in the pathogenesis of hepatocellular carcinoma[J]. *J Cell Physiol*, 2020, **235**(5): 4146-4152.
- [16] Chen KL, Zhu PF, Chen WH, *et al.* Melatonin inhibits proliferation, migration, and invasion by inducing ROS-mediated apoptosis via suppression of the PI3K/Akt/mTOR signaling pathway

- in gallbladder cancer cells[J]. *Aging (Albany NY)*, 2021, **13**(18): 22502-22515.
- [17] Zhao YY, Ye X, Chen RF, *et al.* Sirtuin 7 promotes non-small cell lung cancer progression by facilitating G₁/S phase and epithelial-mesenchymal transition and activating AKT and ERK1/2 signaling[J]. *Oncol Rep*, 2022, **44**(3): 959-972.
- [18] Wei EH, Rao MR, Ji ND, *et al.* Inhibitory effects of ginkgolide B on proliferation of bovine aortic smooth muscle cells[J]. *Acta Pharm Sin*, 2002, **37**(2): 90-93.
- [19] Sun R, Zhai R, Ma C, *et al.* Combination of aloin and metformin enhances the antitumor effect by inhibiting the growth and invasion and inducing apoptosis and autophagy in hepatocellular carcinoma through PI3K/Akt/mTOR pathway[J]. *Cancer Med*, 2020, **9**(3): 1141-1151.
- [20] Wang LF, Wang N, Zhao Q, *et al.* Pectolinarin inhibits proliferation, induces apoptosis, and suppresses inflammation in rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes by inactivating the phosphatidylinositol 3 kinase/protein kinase B pathway[J]. *J Cell Biochem*, 2019, **120**(9): 15202-15210.
- [21] Zhou MJ, Tan W, Hasimu H, *et al.* Euphorbium total triterpenes improve Freund's complete adjuvant-induced arthritis through PI3K/AKT/Bax and NF- κ B/NLRP3 signaling pathways[J]. *J Ethnopharmacol*, 2023, **306**: 116146.
- [22] Nichani K, Li JZ, Suzuki M, *et al.* Evaluation of Caspase-3 activity during apoptosis with fluorescence lifetime-based cytometry measurements and phasor analyses[J]. *Cytometry A*, 2020, **97**(12): 1265-1275.
- [23] Chan WH. Ginkgolide B induces apoptosis and developmental injury in mouse embryonic stem cells and blastocysts[J]. *Hum Reprod*, 2006, **21**(11): 2985-2995.

· 征订启事 ·

欢迎订阅 2025年《中国药科大学学报》

《中国药科大学学报》是由中华人民共和国教育部主管，中国药科大学主办的药学中文核心期刊，主要刊登合成药物化学、天然药物化学、生药学、中药学、药剂学、药物分析、药代动力学、药物生物技术、药理学、药事管理等学科的原创新研究论著。

《中国药科大学学报》在药学界享有较高的学术声誉，目前已被国际上多家著名权威数据库 (CA, IPA, SCOPUS, JST, EMBASE) 等所收录，被国内权威数据库《中文核心期刊要目总览》(2023 年版)，中国科学引文数据库 (CSCD)、中国科技论文统计源数据库等列为药学类核心期刊，屡获原国家新闻出版总署、教育部、科技部等各种优秀期刊奖。

2024 年，《中国药科大学学报》被再度评为中国高校百佳科技期刊，成功入选 2024 年度中国高校科技期刊建设示范案例库·百佳科技期刊。根据中国知网《中国学术期刊影响因子年报》的数据显示：《中国药科大学学报》2024 年复合影响因子为 1.119，在药学期刊界的学术声誉和影响力稳步提升，在高等院校、科研机构、制药企业、医院等单位拥有众多读者。

本刊为双月刊，128 页。国际标准开本，国内外公开发行。欢迎到当地邮局订阅，漏订者可直接与编辑部联系。

国内刊号:CN 32-1157/R

国内邮发代号:28-115

地址:南京市童家巷 24 号

电话:025-83271566

E-mail:xuebao@cpu.edu.cn

ISSN:1000-5048

定价:40 元/期，全年 240 元

邮政编码:210009

<https://jcpcpu.cpu.edu.cn>