

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2023.10.004

· 基础研究 ·

## 银杏内酯 B 通过阻抑 PI3K/Akt/mTOR 信号通路抑制胃癌 HGC-27 细胞的恶性生物学行为

何锋, 狐鸣, 冯世林, 唐丽华, 马云涛(甘肃省酒泉市人民医院 普通外科, 甘肃 酒泉 735000)

**[摘要]** **目的:** 探讨银杏内酯 B(GKB) 是否通过阻抑 PI3K/Akt/mTOR 信号通路抑制胃癌 HGC-27 细胞的增殖、凋亡、迁移及侵袭。**方法:** 将 HGC-27 细胞分为对照、GKB 低剂量(100 mg/L)、GKB 高剂量(200 mg/L)、GKB 高剂量(200 mg/L)+740Y-P(PI3K 激活剂)、Ly294002(PI3K 抑制剂)组。采用 MTT、Edu、FCM、Transwell 实验分别检测各组细胞的增殖、凋亡、迁移和侵袭能力, qPCR 和 WB 法分别检测各组细胞中 PI3K mRNA、Akt mRNA、mTOR mRNA 和 Ki-67、caspase-3、p-PI3K/PI3K、p-Akt/Akt、p-mTOR/mTOR 蛋白的表达。构建胃癌 HGC-27 细胞裸鼠移植瘤模型, 观察 GKB 对移植瘤生长的影响, WB 法检测移植瘤组织中 Ki-67、caspase-3、p-PI3K/PI3K、p-Akt/Akt、p-mTOR/mTOR 蛋白的表达。**结果:** 体外实验结果表明, 与对照组相比, GKB 低剂量组、GKB 高剂量组、Ly294002 组 HGC-27 细胞的增殖活力及细胞增殖率、迁移和侵袭细胞数, PI3K、Akt、mTOR mRNA 表达, 以及 Ki-67、p-PI3K/PI3K、p-Akt/Akt、p-mTOR/mTOR 蛋白表达均显著降低(均  $P < 0.05$ ); 细胞凋亡率、caspase-3 蛋白表达均显著升高(均  $P < 0.05$ ); 740Y-P 可部分逆转 GKB 对 HGC-27 细胞的抑制作用(均  $P < 0.05$ )。荷瘤裸鼠实验结果显示, GKB 可显著抑制 HGC-27 细胞裸鼠移植瘤的生长( $P < 0.05$ ), 且可下调 PI3K/Akt/mTOR 通路相关蛋白的表达。**结论:** GKB 可通过阻抑 PI3K/Akt/mTOR 信号通路而抑制胃癌 HGC-27 细胞增殖、迁移与侵袭并促进其凋亡。

**[关键词]** 银杏内酯 B; 胃癌; HGC-27 细胞; PI3K/Akt/mTOR 信号通路; 增殖; 迁移; 凋亡**[中图分类号]** R735.2; R730.52 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385x(2023)10-0874-07

## Ginkgolide B inhibits the malignant biological behaviors of gastric cancer HGC-27 cells by blocking the PI3K/Akt/mTOR signaling pathway

HE Feng, HU Ming, FENG Shilin, TANG Lihua, MA Yuntao (Department of General Surgery, Jiuquan People's Hospital, Jiuquan 735000, Gansu, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate whether ginkgolide B (GKB) inhibits the proliferation, apoptosis, migration and invasion of gastric cancer HGC-27 cells by blocking the PI3K/Akt/mTOR signaling pathway. **Methods:** Gastric cancer HGC-27 cells were divided into control group, low-dose GKB (100 mg/L) group, high-dose GKB (200 mg/L) group, high-dose GKB (200 mg/L)+740Y-P (PI3K activator) group, and Ly294002 (PI3K inhibitor) group. MTT and Edu, FCM, Transwell tests were used to detect the proliferation, apoptosis, migration and invasion abilities of HGC-27 cells in each group. The expressions of PI3K mRNA, Akt mRNA, mTOR mRNA, and the protein expressions of Ki-67, caspase-3, p-PI3K/PI3K, p-Akt/Akt, and p-mTOR/mTOR in cells of each group were detected by qPCR and Western blotting. A nude mouse transplanted tumor model of gastric cancer HGC-27 cells was established. The effect of GKB on the growth of transplanted tumors was observed. Western blotting was used to detect the protein expressions of Ki-67, caspase-3, p-PI3K/PI3K, p-Akt/Akt, and p-mTOR/mTOR in transplanted tumor tissues. **Results:** The results of *in vitro* experiments indicated that, compared with the control group, the proliferative activity, cell proliferation rate, the numbers of cell migration and invasion, the expression levels of PI3K mRNA, Akt mRNA and mTOR mRNA, and the protein expression levels of Ki-67, p-PI3K/PI3K, p-Akt/Akt, p-mTOR/mTOR of HGC-27 cells in low-dose GKB group, high-dose GKB group and Ly294002 group, reduced significantly (all  $P < 0.05$ ). The apoptosis rate and the expression of caspase-3 protein increased significantly (all  $P < 0.05$ ). 740Y-P could partially reverse the inhibitory effect of GKB on HGC-27 cells (all  $P < 0.05$ ). Tumor-bearing nude mouse experience showed that GKB could significantly inhibit the growth of nude mouse transplanted tumors of HGC-27 cells ( $P < 0.05$ ) and downregulate the expressions of PI3K/Akt/mTOR pathway-related proteins. **Conclusion:** GKB may inhibit the proliferation, migration and invasion and promote the apoptosis of gastric cancer HGC-27 cells by blocking the PI3K/Akt/mTOR signaling pathway.

**[Key words]** ginkgolide B (GKB); gastric cancer; HGC-27 cell; PI3K/Akt/mTOR signaling pathway; proliferation; migration; apoptosis

[Chin J Cancer Biother, 2023, 30(10): 874-880. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2023.10.004]

**[基金项目]** 甘肃省外科肿瘤分子诊断与精准治疗重点实验室项目(No. 2019GSZDSYS04)**[作者简介]** 何锋(1981—), 男, 在职研究生, 副主任医师, 主要从事消化系统肿瘤的临床治疗研究, E-mail: gethe5046@21cn.com**[通信作者]** 马云涛, E-mail: 3575515665@qq.com

据世界卫生组织(WHO)统计,2020年胃癌居恶性肿瘤发病率的第五位、病死率的第四位<sup>[1]</sup>。患者所处环境和生活习惯是胃癌发病的主要原因<sup>[2]</sup>。目前,发达国家的胃癌发病率已得到一定程度控制,但中国胃癌发病率和病死率仍然居高不下,且呈升高趋势<sup>[3]</sup>。手术和化疗等手段对胃癌的治疗效果仍然不尽人意,胃癌发生发展的机制还不甚明确,因此探究胃癌发生发展的机制和寻找新的治疗药物具有重要的意义<sup>[4]</sup>。银杏内酯B(ginkgolide B, GKB)是一种二萜类化合物,具有抗肿瘤活性,抑制肿瘤细胞增殖并促进其凋亡<sup>[5]</sup>。研究<sup>[6-7]</sup>表明,GKB通过上调miR-1-223p抑制ZEB1表达,进而抑制膀胱癌细胞迁移和侵袭;GKB可抑制肺癌A549和H1975细胞增殖、侵袭,并诱导其自噬死亡。PI3K/Akt/mTOR信号通路除参与细胞增殖、蛋白质转录、葡萄糖代谢及细胞凋亡外,还参与多种肿瘤的发生发展<sup>[8]</sup>;SNHG6通过激活PI3K/Akt/mTOR信号通路和抑制细胞自噬促进胃癌进展<sup>[9]</sup>;敲低HOXB13可抑制PI3K/Akt/mTOR信号通路进而抑制胃癌细胞增殖、迁移和侵袭,过表达HOXB13可激活PI3K/Akt/mTOR信号通路进而促进胃癌细胞增殖、迁移和侵袭<sup>[10]</sup>。因此,PI3K/Akt/mTOR信号通路在胃癌细胞增殖、迁移和侵袭中起重要调控作用。本研究通过观察GKB对胃癌HGC-27细胞增殖、迁移、侵袭及其裸鼠移植瘤生长的影响,探讨PI3K/Akt/mTOR信号通路在胃癌发生发展中的作用机制,以期GKB治疗胃癌提供参考依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 细胞、动物及主要试剂

胃癌HGC-27细胞购自深圳市豪地华拓生物科技有限公司。雌性、(20±2)g的BALB/c裸鼠购自厦门大学[实验动物许可证号:SCXK(闽)2018-0003],适应性饲养1周,饲养温度(22±2)°C,相对湿度(60±5)%,光照为12 h光-暗循环(AM7:00~PM7:00)。

GKB(J14893)购自上海金穗生物科技有限公司,PI3K激活剂740Y-P(040-63)购自北京孚博生物科技有限公司,PI3K抑制剂Ly294002(KGR0049)购自江苏凯基生物技术股份有限公司,胰蛋白酶(WN-C26328)购自武汉华尔纳生物科技有限公司,胎牛血清(JA-500-FBS)购自上海江林生物科技有限公司,RPMI 1640培养基(CB005)购自上海雅酶生物医药科技有限公司,MTT(C11019-2)、Edu(C10310)试剂盒购自广州市锐博生物科技有限公司,抗Ki-67(ab270650)、caspase-3(ab145046)、PI3K(ab140307)、p-PI3K(ab278545)、Akt(ab18785)、p-Akt(ab38449)、p-mTOR(ab109268)、mTOR(ab32028)、GAPDH

(ab9485)一抗及HRP标记的兔抗鼠二抗(ab6728)均购自英国Abcam公司。

### 1.2 细胞培养与分组

HGC-27细胞在RPMI 1640培养基中,于37 °C、5% CO<sub>2</sub>的培养箱中培养,待细胞长到对数生长期时,收集细胞并传代。

参照文献[7, 11],将对数生长期HGC-27细胞分为对照、GKB低剂量(100 mg/L)、GKB高剂量(200 mg/L)、GKB高剂量(200 mg/L)+740Y-P(10 μmol/L)、Ly294002(25 μmol/L)组,对照组为未处理细胞,其他各组细胞进行相应处理。培养48 h后进行后续实验。

### 1.3 MTT、EdU法检测HGC-27细胞的增殖能力

MTT法检测:于96孔板中接种HGC-27细胞(1×10<sup>4</sup>个/孔),在培养24、48 h时,分别加入10 μL MTT溶液,继续培养4 h后,再加入150 μL二甲亚砜,震荡溶解后,酶标仪检测各孔波长490 nm处的光密度(D)值。

EdU法检测:将各组HGC-27细胞接种于96孔板(细胞密度为1×10<sup>5</sup>/mL、接种量为0.1 mL/孔)中培养36 h,之后每孔加入10 μmol/L EdU继续培养2 h,按照试剂盒说明书进行EdU及DAPI染色,荧光显微镜获取各组细胞图像,采用Image J软件定量分析各组中EdU阳性细胞数及总细胞数,依据公式(增殖率=EdU阳性细胞数/总细胞数×100%)计算细胞增殖率。

### 1.4 FCM检测HGC-27细胞的凋亡水平

收集各组HGC-27细胞,PBS清洗、离心后收集细胞,将细胞重悬于500 μL结合缓冲液中,根据凋亡试剂盒说明书步骤,加入10 μL Annexin V-FITC溶液与5 μL PI试剂,室温下避光反应15 min,通过FCM检测细胞的凋亡情况。

### 1.5 Transwell实验检测HGC-27细胞的迁移和侵袭能力

细胞迁移实验:用胰蛋白酶消化处理对数生长HGC-27细胞,重悬细胞,调整细胞浓度至5×10<sup>5</sup>个/mL。在Transwell上室中加入200 μL细胞悬液,在下室中加入600 μL含血清的RPMI 1640培养基,培养24 h后,取出小室,PBS洗涤后,用4%多聚甲醛固定10 min,0.1%结晶紫染液染色10 min,在光学显微镜下选取5个视野观察、计数迁移细胞数。

细胞侵袭实验:除在Transwell上室中加入细胞前需预铺基质胶外,其余步骤同细胞迁移实验。

### 1.6 qPCR法检测HGC-27细胞中PI3K、Akt、mTOR mRNA表达

使用TRIzol试剂提取各组HGC-27细胞总RNA,将RNA逆转录为cDNA后,以cDNA为模板进行

qPCR 扩增。引物序列:PI3K 上游引物为 5'-CCTCAGCTCTCACCCCTCCT-3', 下游引物为 5'-TTGGTCTCTCTTTCCGCTCAC-3'; Akt 上游引物为 5'-TGA GAAGAAGCTGAGCCAC-3', 下游引物为 5'-TAG GAGAAGCTGATCAGGCGG-3'; mTOR 上游引物为 5'-CCGCTACTGTGTCTTGGCAT-3', 下游引物为 5'-CAGCTCGCGGATCTCAAAGA-3'; GAPDH 上游引物为 5'-GGTCGGAGTCAACGGATTTG-3', 下游引物为 5'-ATGAGCCCCAGCCTTCTCCAT-3'。PCR 反应条件:95 °C 预变性 10 min; 94 °C 变性 30 s, 60 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 30 s, 共循环 40 次。用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  方法计算 PI3K、Akt 和 mTOR 基因 mRNA 的相对表达量。

### 1.7 WB 法检测 HGC-27 细胞中 PI3K/Akt/mTOR 信号通路相关蛋白的表达

将各组 HGC-27 细胞进行裂解, 提取各组细胞中总蛋白质, 并检测各组细胞蛋白质浓度, 对蛋白质进行变性, 用 10% SDS-PAGE 分离蛋白并转移到 PVDF 膜上, 5% 脱脂奶粉溶液中封闭 2 h, 加入稀释比例均为 1:2 000 的 Ki-67、caspase-3、PI3K、p-PI3K、Akt、p-Akt、mTOR、p-mTOR、GAPDH 一抗, 4 °C 摇床反应过夜。次日, 洗膜后分别加入稀释比例为 1:5 000 的 HRP 标记兔抗鼠二抗且反应 40 min, 使用 ECL 发光液曝光、显影, 用 Image-Pro Plus 软件分析蛋白质条带的灰度值。

### 1.8 HGC-27 细胞裸鼠移植瘤模型的构建及观察

将 200  $\mu\text{L}$  密度为  $1 \times 10^6$  个/mL 的 HGC-27 细胞悬液注射到 BALB/c 裸鼠背部皮下, 以建立 HGC-27 细胞裸鼠移植瘤模型。当移植瘤长到约 100  $\text{mm}^3$  时, 将荷瘤裸鼠分为对照组、GKB 组, 10 只/组<sup>[12-13]</sup>。GKB 组给予 40  $\text{mg}/(\text{kg} \cdot \text{d}^{-1})$  灌胃, 对照组给予等体积的生理

盐水, 持续 15 d。用药结束后处死裸鼠, 取出移植瘤, 测定肿瘤体积、称瘤质量, 依据公式[抑瘤率=(对照组移植瘤质量-GKB 组移植瘤质量)/对照组移植瘤质量 $\times 100\%$ ]计算抑瘤率。切取部分移植瘤组织冰浴研磨匀浆, 采用 RIPA 裂解液裂解、离心获取总蛋白质, 采用 WB 法检测移植瘤组织中 PI3K/Akt/mTOR 信号通路相关蛋白的表达(操作步骤同 1.7)。

### 1.9 统计学处理

以上主要实验均独立重复 3 次。采用 Graphpad Prism 8.0 软件对实验数据进行分析, 呈正态分布的计量数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 多组间比较采用单因素方差分析, SNK-*q* 检验用于多组内两两比较。以  $P < 0.05$  或  $P < 0.01$  表示为差异有统计学意义。

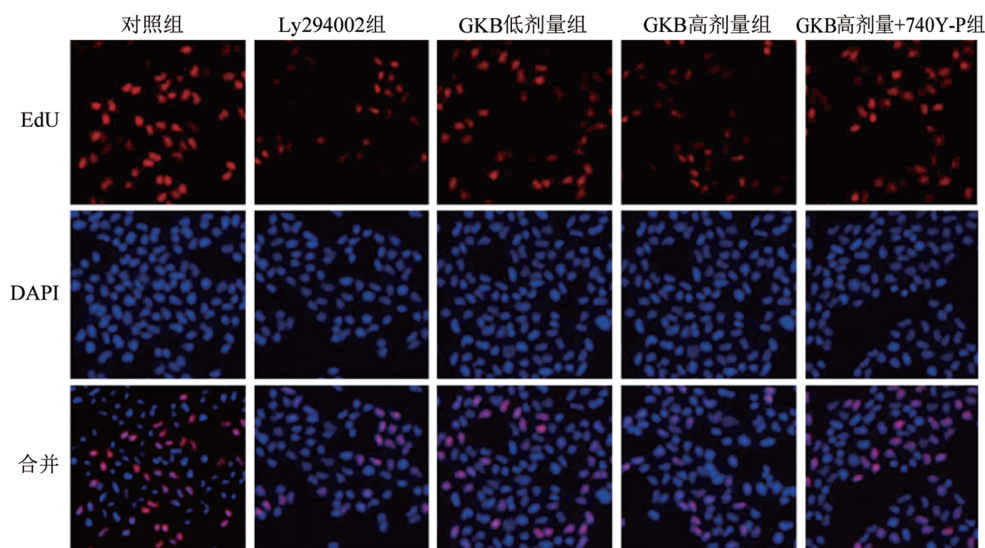
## 2 结果

### 2.1 GKB 可显著降低胃癌 HGC-27 细胞的增殖能力

MTT、EdU 法检测结果(表 1、图 1)显示, 与对照组相比, Ly294002 组、GKB 低剂量组、GKB 高剂量组 HGC-27 细胞增殖活力和增殖率均显著降低(均  $P < 0.05$ ); 与 GKB 高剂量组相比, GKB 高剂量+740Y-P 组细胞增殖活力和细胞增殖率显著升高(均  $P < 0.05$ )。结果表明, GKB 可抑制 HGC-27 细胞增殖能力, 而 PI3K 激活剂 740Y-P 可部分逆转该抑制作用。

### 2.2 GKB 可显著促进胃癌 HGC-27 细胞凋亡

FCM 检测结果(表 1、图 2)显示, 与对照组相比, Ly294002 组、GKB 低剂量组、GKB 高剂量组 HGC-27 细胞凋亡率均显著升高(均  $P < 0.05$ ); 与 GKB 高剂量组相比, GKB 高剂量+740Y-P 组 HGC-27 细胞凋亡率显著降低( $P < 0.05$ )。结果表明, GKB 可促进 HGC-27 细胞凋亡, 而 740Y-P 可逆转凋亡促进作用。



红色为 Edu 阳性细胞, 蓝色为 DAPI 阳性细胞。

图 1 GKB、Ly294002、740Y-P 对 HGC-27 细胞增殖的影响( $\times 200$ )

表1 GKB、Ly294002、740Y-P对胃癌HGC-27细胞增殖、凋亡、迁移及侵袭的影响(n=6)

分组	增殖活力/ $D_{490}$	增殖率/%	凋亡率/%	迁移细胞数/个	侵袭细胞数/个
对照组	0.74±0.08	43.68±4.52	8.47±1.36	144.85±6.72	126.43±5.37
Ly294002组	0.45±0.04*	19.37±2.12*	37.82±2.83*	68.59±2.53*	62.73±2.24*
GKB低剂量组	0.61±0.05*	31.46±2.87*	21.66±2.15*	105.42±5.28*	97.84±4.32*
GKB高剂量组	0.42±0.04 <sup>△</sup>	17.54±1.73 <sup>△</sup>	39.94±3.78 <sup>△</sup>	56.74±1.84 <sup>△</sup>	51.38±1.65 <sup>△</sup>
GKB高剂量+740Y-P组	0.68±0.06 <sup>▲</sup>	38.94±4.26 <sup>▲</sup>	13.76±1.57 <sup>▲</sup>	132.68±6.39 <sup>▲</sup>	118.96±5.67 <sup>▲</sup>

与对照组比较,\* $P<0.05$ ;与GKB低剂量组比较,<sup>△</sup> $P<0.05$ ;与GKB高剂量组比较,<sup>▲</sup> $P<0.05$ 。

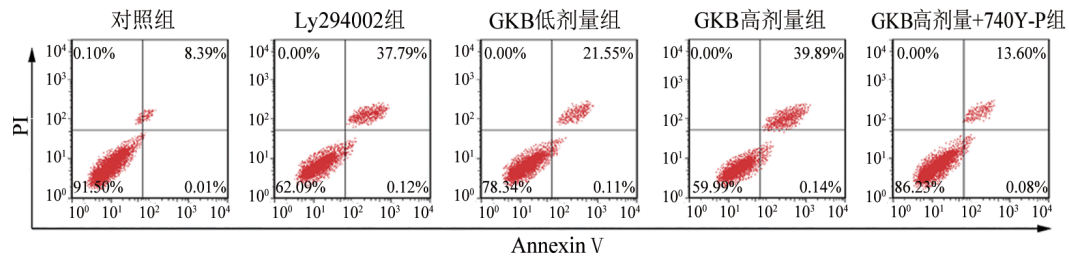


图2 GKB、Ly294002、740Y-P对HGC-27细胞凋亡的影响

### 2.3 GKB可显著降低胃癌HGC-27细胞的迁移和侵袭能力

Transwell实验结果(表1、图3)显示,与对照组相比, Ly294002组、GKB低剂量组、GKB高剂量组迁移和侵袭细胞数均显著降低(均 $P<0.05$ );与GKB高剂量组

相比,GKB高剂量+740Y-P组迁移和侵袭细胞数均显著升高(均 $P<0.05$ )。结果表明,GKB可抑制HGC-27细胞迁移和侵袭,而740Y-P可部分逆转迁移和侵袭的抑制作用。

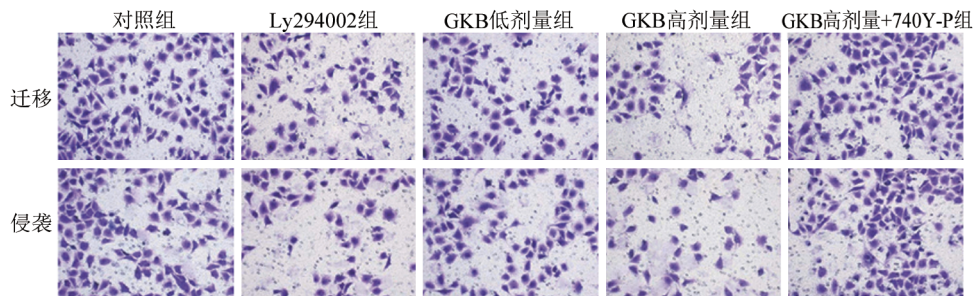


图3 GKB、Ly294002、740Y-P对HGC-27细胞迁移和侵袭的影响(×100)

### 2.4 GKB对HGC-27细胞PI3K、Akt和mTOR mRNA表达的影响

qPCR法检测结果(图4)显示,与对照组相比, Ly294002组、GKB低剂量组、GKB高剂量组HGC-27细胞中PI3K、Akt和mTOR mRNA表达水平均显著降低(均 $P<0.05$ );与GKB高剂量组相比,GKB高剂量+740Y-P组HGC-27细胞中PI3K、Akt和mTOR mRNA的表达水平均显著升高(均 $P<0.05$ )。结果表明,GKB可下调PI3K、Akt和mTOR mRNA的表达,而740Y-P可上调PI3K、Akt和mTOR mRNA的表达。

### 2.5 GKB对胃癌HGC-27细胞相关蛋白表达的影响

WB法检测结果(图5)显示,与对照组相比, Ly294002组、GKB低剂量组、GKB高剂量组HGC-27

细胞Ki-67、p-PI3K/PI3K、p-Akt/Akt、p-mTOR/mTOR蛋白表达水平均显著降低(均 $P<0.05$ ), caspase-3蛋白表达显著升高( $P<0.05$ );与GKB高剂量组相比,GKB高剂量+740Y-P组HGC-27细胞中Ki-67、p-PI3K/PI3K、p-Akt/Akt、p-mTOR/mTOR蛋白表达水平均显著升高(均 $P<0.05$ ), caspase-3表达显著降低( $P<0.05$ )。结果表明,GKB可降低Ki-67、p-PI3K/PI3K、p-Akt/Akt、p-mTOR/mTOR蛋白表达,上调caspase-3蛋白表达,而740Y-P可部分逆转相关蛋白表达结果。

### 2.6 GKB抑制HGC-27细胞裸鼠移植瘤的生长

裸鼠荷瘤实验结果显示,与对照组相比,GKB组裸鼠的移植瘤质量和体积均显著降低[质量:(0.31±0.03) vs (0.85±0.08) g,  $P<0.05$ ; 体积:(0.56±0.04) vs

( $1.31 \pm 0.16$ )  $\text{cm}^3$ ,  $P < 0.05$ ], 其抑瘤率达 ( $63.53 \pm 3.27$ )%。

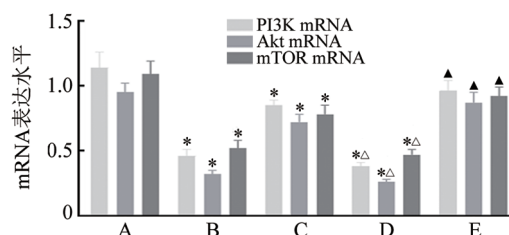
WB实验结果(图6)显示,与对照组相比,GKB组裸鼠移植瘤组织中Ki-67、p-PI3K/PI3K、p-Akt/Akt、p-mTOR/mTOR蛋白表达均显著降低(均  $P < 0.05$ ),caspase-3蛋白表达显著升高( $P < 0.05$ )。

以上实验结果表明,GKB可抑制HGC-27细胞裸鼠移植瘤的生长,且可下调PI3K/Akt、mTOR通路相关蛋白的表达。

### 3 讨论

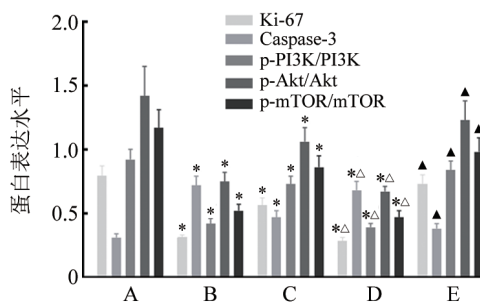
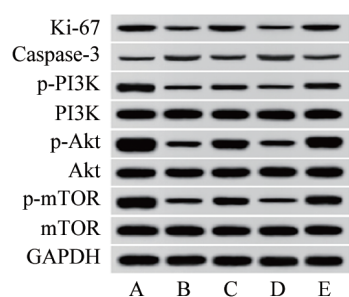
中国的胃癌发病率居肿瘤发病率的第二位,每年新增胃癌患者达40万例以上<sup>[14]</sup>。胃癌早期不易被发现,确诊时已到疾病的中晚期,肿瘤细胞已发生转移<sup>[15]</sup>。胃癌通常需要进行手术切除治疗,后期再辅助

化疗,但胃癌患者的预后较差、生存率极低<sup>[16]</sup>。因此,探索胃癌发生发展的机制并寻找新的治疗靶点和药物具有重要的临床意义。



A: 对照组; B: Ly294002组; C: GKB低剂量组; D: GKB高剂量组; E: GKB高剂量+740Y-P组。与对照组比较,\* $P < 0.05$ ; 与GKB低剂量组比较<sup>△</sup> $P < 0.05$ ; 与GKB高剂量组比较,<sup>△</sup> $P < 0.05$ 。

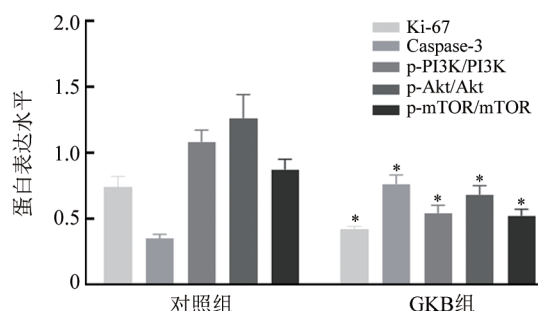
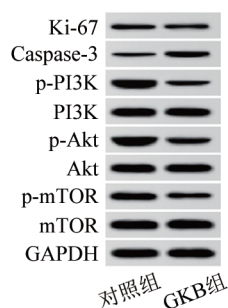
图4 GKB、Ly294002、740Y-P对HGC-27细胞PI3K、AktNA、mTOR mRNA表达的影响



A: 对照组; B: Ly294002组; C: GKB低剂量组; D: GKB高剂量组; E: GKB高剂量+740Y-P组。

与对照组比较,\* $P < 0.05$ ; 与GKB低剂量组比较,<sup>△</sup> $P < 0.05$ ; 与GKB高剂量组比较,<sup>△</sup> $P < 0.05$ 。

图5 GKB、Ly294002、740Y-P对HGC-27细胞中PI3K/Akt/mTOR通路相关蛋白表达的影响



与对照组比较,\* $P < 0.05$ 。

图6 GKB对裸鼠HGC-27细胞移植瘤组织中PI3K/Akt/mTOR通路相关蛋白表达的影响

GKB是从银杏叶中提取的中药成分,具有抗氧化、抗炎、抗肿瘤、清除自由基等作用<sup>[17]</sup>。LOU等<sup>[13]</sup>研究表明,GKB通过抑制PAFR/NF- $\kappa$ B通路增强胰腺癌细胞对吉西他滨的敏感性,抑制肿瘤细胞的增殖并促进细胞凋亡。JIANG等<sup>[18]</sup>研究发现,GKB在BRCA1突变细胞中通过抑制肿瘤细胞的增殖和肿瘤生长。本研究利用不同浓度的GKB干预胃癌HGC-27细胞,结果显示,GKB可抑制HGC-27细胞的增殖、迁移及侵

袭能力,并促进细胞凋亡,与上述研究结果一致。Ki-67是一种细胞周期相关的蛋白,在细胞分裂过程中高表达,可促进细胞增殖。Caspase-3是细胞凋亡通路下游最主要的凋亡蛋白酶,可以激活激酶级联反应,加速细胞凋亡。本研究结果表明,GKB可抑制Ki-67蛋白表达,促进caspase-3蛋白表达。上述结果表明,GKB降低HGC-27细胞的增殖活性,抑制细胞的迁移和侵袭能力,并促进细胞凋亡。为进一步验

证该结论, 本实验进行了裸鼠荷瘤实验, 结果发现, GKB组裸鼠HGC-27细胞移植瘤质量和体积、Ki-67蛋白均显著降低, 凋亡相关蛋白caspase-3表达显著升高, 抑瘤率达到63.53%, 实验结果提示, GKB可以抑制胃癌HGC-27细胞裸鼠移植瘤的生长, 促进细胞凋亡相关蛋白表达, 降低增殖相关蛋白的表达。

ATTAHI等<sup>[19]</sup>研究发现, 激活的PI3K可促进丙酮酸脱氢酶1与Akt结合、磷酸化Akt蛋白, Akt磷酸化后进一步激活下游分子mTOR蛋白并使其磷酸化, 而后作用于底物eIF4E结合蛋白1, 进而参与肿瘤的发生发展。毛兰素在体内外通过抑制PI3K/Akt/mTOR信号通路抑制肺癌细胞增殖和移植瘤的生长<sup>[20]</sup>。泛素结合酶E2S(ubiquitin conjugating enzyme E2S, UBE2S)可以激活PI3K/Akt/mTOR信号通路, 促进卵巢癌的发生发展; 敲低UBE2S可以抑制PI3K/Akt/mTOR信号通路而阻滞卵巢癌细胞的细胞周期, 抑制细胞增殖和迁移并促进细胞凋亡<sup>[21]</sup>。本研究结果表明, GKB干预后, 胃癌HGC-27细胞中PI3K、Akt、mTOR mRNA和蛋白表达均显著降低(均 $P<0.05$ ), 推测GKB可能通过阻抑PI3K/Akt/mTOR信号通路抑制胃癌HGC-27细胞增殖。

Ly294002为PI3K抑制剂, Ly294002组HGC-27细胞各项检测指标与GKB高剂量组在同一水平, 提示GKB可以阻抑PI3K/Akt/mTOR信号通路实现对胃癌细胞的抑制作用。为进一步验证该结论, 本实验在GKB干预基础上添加PI3K激活剂740Y-P进行干预, 结果发现740Y-P可以逆转GKB对胃癌HGC-27细胞的抑制作用, 进一步证明GKB通过阻抑PI3K/Akt/mTOR信号通路抑制胃癌HGC-27细胞增殖和迁移, 并促进凋亡。裸鼠成瘤实验结果也表明, GKB组裸鼠HGC-27细胞移植瘤质量和体积均较对照组裸鼠显著降低(均 $P<0.05$ ), 移植瘤组织中p-PI3K/PI3K、p-Akt/Akt、p-mTOR/mTOR等蛋白表达水平均显著降低(均 $P<0.05$ ), 提示GKB通过阻抑PI3K/Akt/mTOR信号通路抑制裸鼠胃癌HGC-27细胞移植瘤的生长。

综上所述, GKB可能通过阻抑PI3K/Akt/mTOR信号通路在体内外抑制胃癌HGC-27细胞的增殖。但中药在体内外作用靶点不专一或缺乏特异性, GKB可能还对胃癌细胞中其他通路产生影响, 后续还需进一步对其他作用通路进行研究。

#### [参考文献]

- [1] IWASAKI K, SUDA T, TAKANO Y, *et al.* Postoperative outcomes of gastric carcinoma with lymphoid stroma[J/OL]. *World J Surg Oncol*, 2020, 18(1): 102[2023-05-22]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7243312/>. DOI: 10.1186/s12957-020-01878-9.
- [2] BAJOGHLI A A, PISELLI A, KEMPRECOS H, *et al.* Gastric carcinoma's primary presentation as multiple cutaneous nodules throughout the body[J/OL]. *Cancer Treat Res Commun*, 2022, 31: 100532[2023-05-22]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35217487/>. DOI: 10.1016/j.ctarc.2022.100532.
- [3] 哈文韬, 赵孙燕, 魏晓为, 等. 白术水提物通过PI3K-Akt-NF-κB通路抑制胃癌SGC-7901细胞的潜在机制[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2023, 30(3): 223-229. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2023.03.006.
- [4] MIZUGUCHI A, TAKAI A, SHIMIZU T, *et al.* Genetic features of multicentric/multifocal intramucosal gastric carcinoma[J]. *Int J Cancer*, 2018, 143(8): 1923-1934. DOI: 10.1002/ijc.31578.
- [5] HUANG J, YANG J, ZOU X J, *et al.* Ginkgolide B promotes oligodendrocyte precursor cell differentiation and survival via Akt/CREB/bcl-2 signaling pathway after white matter lesion[J/OL]. *Exp Biol Med (Maywood)*, 2021, 246(10): 1198-1209[2023-05-22]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8142115/>. DOI: 10.1177/1535370221989955.
- [6] ZHI Y, PAN J H, SHEN W H, *et al.* Ginkgolide B inhibits human bladder cancer cell migration and invasion through microRNA-223-3p[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2016, 39(5): 1787-1794. DOI: 10.1159/000447878.
- [7] WANG X, SHAO Q H, ZHOU H, *et al.* Ginkgolide B inhibits lung cancer cells promotion via beclin-1-dependent autophagy[J/OL]. *BMC Complement Med Ther*, 2020, 20(1): 194[2023-05-22]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7310550/>. DOI: 10.1186/s12906-020-02980-x.
- [8] XU F, NA L X, LI Y F, *et al.* Roles of the PI3K/AKT/mTOR signalling pathways in neurodegenerative diseases and tumours[J/OL]. *Cell Biosci*, 2020, 10(1): 54[2023-05-22]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7110906/>. DOI: 10.1186/s13578-020-00416-0.
- [9] CHEN W L, LI Z, DUAN J F, *et al.* LncRNA SNHG6 inhibits autophagy of gastric carcinoma cells via PI3K/AKT/mTOR signaling pathway[J/OL]. *Am J Transl Res*, 2022, 14(5): 2861-2873[2023-05-22]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9185092/>.
- [10] GUO C M, CHU H J, GONG Z H, *et al.* HOXB13 promotes gastric cancer cell migration and invasion via IGF-1R upregulation and subsequent activation of PI3K/AKT/mTOR signaling pathway[J/OL]. *Life Sci*, 2021, 278: 119522[2023-05-22]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33894267/>. DOI: 10.1016/j.lfs.2021.119522.
- [11] GONG C W, AI J Y, FAN Y, *et al.* NCAPG promotes the proliferation of hepatocellular carcinoma through PI3K/AKT signaling[J]. *Oncotargets Ther*, 2019, 12: 8537-8552. DOI: 10.2147/OTT.S217916.
- [12] WANG B, LI J Y. Piceatannol suppresses the proliferation and induced apoptosis of osteosarcoma cells through PI3K/AKT/mTOR pathway[J/OL]. *Cancer Manag Res*, 2020, 12: 2631-2640[2023-05-22]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7182703/>. DOI: 10.2147/CMAR.S238173.
- [13] LOU C J, LU H B, MA Z G, *et al.* Ginkgolide B enhances gemcitabine sensitivity in pancreatic cancer cell lines via inhibiting PAFR/NF-κB pathway[J]. *Biomedicine Pharmacother*, 2019, 109: 563-572. DOI: 10.1016/j.biopha.2018.10.084.
- [14] HUSSEIN U K, HA S H, AHMED A G, *et al.* FAM83H and SCRIB stabilize β-catenin and stimulate progression of gastric carcinoma[J/OL]. *Aging (Albany NY)*, 2020, 12(12): 11812-11834[2023-05-

- 22]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7343515/>. DOI: 10.18632/aging.103351.
- [15] 高慎硕, 张智凯, 尹国庆, 等. MiR-875-5p通过靶向USF2抑制胃癌细胞的增殖、迁移和侵袭[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2022, 29(1): 23-29. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2022.01.004.
- [16] DAO T V, NGUYEN C V, NGUYEN Q T, *et al.* Evaluation of tumor budding in predicting survival for gastric carcinoma patients in Vietnam [J/OL]. *Cancer Control*, 2020, 27(1): 1073274820968883[2023-05-22]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7791444/>. DOI: 10.1177/1073274820968883.
- [17] LEE C W, LIN H C, WANG B Y, *et al.* Ginkgolide B monotherapy reverses osteoporosis by regulating oxidative stress-mediated bone homeostasis[J]. *Free Radic Biol Med*, 2021, 168: 234-246. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2021.03.008.
- [18] JIANG W, QIU W L, WANG Y S, *et al.* Ginkgo may prevent genetic-associated ovarian cancer risk: multiple biomarkers and anticancer pathways induced by ginkgolide B in BRCA1-mutant ovarian epithelial cells[J]. *Eur J Cancer Prev*, 2011, 20(6): 508-517. DOI: 10.1097/CEJ.0b013e328348fbb7.
- [19] FATTAHI S, AMJADI-MOHEB F, TABARIPOUR R, *et al.* PI3K/AKT/mTOR signaling in gastric cancer: epigenetics and beyond [J/OL]. *Life Sci*, 2020, 262: 118513[2023-05-22]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33011222/>. DOI: 10.1016/j.lfs.2020.118513.
- [20] ZHANG H Q, XIE X F, LI G M, *et al.* Erianin inhibits human lung cancer cell growth via PI3K/Akt/mTOR pathway *in vitro* and *in vivo* [J]. *Phyther Res*, 2021, 35(8): 4511-4525. DOI: 10.1002/ptr.7154.
- [21] ZHANG M J, LIU Y, YIN Y, *et al.* UBE2S promotes the development of ovarian cancer by promoting PI3K/AKT/mTOR signaling pathway to regulate cell cycle and apoptosis[J/OL]. *Mol Med*, 2022, 28(1): 62 [2023-05-22]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9166599/>. DOI: 10.1186/s10020-022-00489-2.

[收稿日期] 2023-05-24

[修回日期] 2023-08-20

[本文编辑] 党瑞山, 沈志超