

白凤菜总黄酮对类风湿关节炎滑膜细胞增殖和凋亡的影响

刘慧丽¹, 林燕燕², 蔡阳艳¹, 蔡媛¹, 阙文忠^{3*}

1. 漳州卫生职业学院 医学技术学院 转化医学检测应用技术协同创新中心, 福建 漳州 363000

2. 漳州卫生职业学院 基础医学院, 福建 漳州 363000

3. 福州市第一总医院 风湿免疫科, 福建 福州 350009

摘要: 目的 探讨白凤菜总黄酮对类风湿关节炎成纤维样滑膜细胞增殖、凋亡及迁移的影响及其作用机制。方法 采用 CCK-8 法检测白凤菜总黄酮对成纤维样滑膜细胞增殖的抑制作用, 流式细胞术分析细胞凋亡与细胞周期分布, 荧光显微镜检测线粒体膜电位变化, RT-PCR 检测磷脂酰肌醇-3 激酶 (PI3K) /蛋白激酶 B (Akt) 通路相关基因表达及 Western blotting 检测 E-钙黏蛋白 (E-cadherin)、PI3K、p-PI3K、Akt、p-Akt 蛋白表达, 划痕实验及 Transwell 实验评价细胞迁移及侵袭能力。结果 与对照组相比, 白凤菜总黄酮对成纤维样滑膜细胞有明显的体外增殖抑制作用 ($P < 0.01$)。与对照组相比, 白凤菜总黄酮组可诱导细胞凋亡并伴随线粒体膜电位下降 ($P < 0.05$ 、 0.01)。细胞周期分析显示, 与对照组相比, 白凤菜总黄酮 50、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组细胞群中处于 G₁ 期的细胞比例显著减少, 而 S 期的细胞比例相应增加 ($P < 0.05$ 、 0.01)。与对照组相比, 白凤菜总黄酮组 PI3K 和 Akt mRNA 相对表达量明显下降 ($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001)。与对照组相比, 白凤菜总黄酮 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组 E-cadherin 蛋白相对表达量较对照组显著增高 ($P < 0.05$)。与对照组相比, 白凤菜总黄酮各浓度组 Akt 和 p-Akt 蛋白相对表达量显著降低 ($P < 0.01$)。白凤菜总黄酮 50、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组 PI3K、p-PI3K 蛋白相对表达量显著下调 ($P < 0.01$)。结论 白凤菜总黄酮通过抑制 PI3K/Akt 信号通路、诱导细胞周期 S 期阻滞、抑制其迁移与侵袭能力, 并诱导线粒体依赖性凋亡及上调 E-cadherin 表达等多途径, 综合抑制成纤维样滑膜细胞的异常生物学活性。

关键词: 白凤菜总黄酮; 类风湿关节炎; 成纤维样滑膜细胞; 细胞凋亡; 磷脂酰肌醇-3 激酶; 蛋白激酶 B; E-钙黏蛋白

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-5515(2025)12-2972-09

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2025.12.002

Effects of total flavonoids from *Gynura Formosana* Kitam on proliferation and apoptosis of fibroblast-like synoviocytes in rheumatoid arthritis

LIU Huili¹, LIN Yanyan², CAI Yangyan¹, CAI Yuan¹, QUE Wenzhong³

1. Department of Medical Technology, Collaborative Innovation Center for Translation Medical Testing and Application Technology Zhangzhou, Zhang Zhou Health Vocational College, Zhangzhou 363000, China

2. College of Basic Medical Sciences, Zhangzhou Health Vocational College, Zhangzhou 363000, China

3. Department of Rheumatology, Fuzhou First General Hospital, Fuzhou 350009, China

Abstract: Objective To investigate the effects and underlying mechanism of total flavonoids from *Gynura formosana* Kitam on the proliferation, apoptosis, and migration of rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes. **Methods** The inhibitory effect of total flavonoids from *Gynura formosana* on fibroblast-like synoviocytes proliferation was assessed using the CCK-8 assay. Cell apoptosis and cell cycle distribution were analyzed by flow cytometry. Changes in mitochondrial membrane potential were observed via fluorescence microscopy. The mRNA expression of PI3K/Akt pathway-related genes was detected by RT-PCR, while the protein expression levels of E-cadherin, PI3K, p-PI3K, Akt, and p-Akt were measured by Western blotting. Cell migration and invasion capabilities were evaluated using wound healing and Transwell assays, respectively. **Results** Compared with the control group, the total flavonoids from *Gynura formosana* had a significant inhibitory effect on the proliferation of fibroblastoid synoviocytes *in vitro* ($P < 0.01$). Compared with the control group, total flavonoids from *Gynura formosana* group could induce apoptosis and be

收稿日期: 2025-09-18

基金项目: 福建省自然科学基金资助项目 (2024J011251); 福建省卫健委科技计划项目医学创新课题 (2023CXA052); 福州市卫生健康科技计划-中青年人才科项目 (2022-S-rc2); 漳州卫生职业学院院级科研项目 (ZWYZ202308)

作者简介: 刘慧丽, 硕士, 主要从事植物提取物抗肿瘤的机制研究。E-mail: liuhuili1518@163.com

*通信作者: 阙文忠 E-mail: quewenzhong@163.com

accompanied by a decrease in mitochondrial membrane potential ($P < 0.05, 0.01$). Cell cycle analysis showed that compared with the control group, the proportion of cells in the G₁ phase in the total flavonoids from *Gynura formosana* 50 and 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ groups was significantly reduced, while the proportion of cells in the S phase increased accordingly ($P < 0.05, 0.01$). Compared with the control group, the relative expression levels of PI3K and Akt mRNA in the total flavonoids from *Gynura formosana* group were significantly decreased ($P < 0.05, 0.01, 0.001$). Compared with the control group, the relative expression level of E-cadherin protein in the total flavonoids from *Gynura formosana* group 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ group was significantly higher than that in the control group ($P < 0.05$). Compared with the control group, the relative expression levels of Akt and p-Akt proteins in each concentration group of total flavonoids from *Gynura formosana* were significantly decreased ($P < 0.01$), and the relative expression levels of PI3K and p-PI3K proteins in the total flavonoids from *Gynura formosana* 50 and 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ groups were significantly down-regulated ($P < 0.01$).

Conclusion The total flavonoids from *Gynura formosana* comprehensively inhibit the abnormal biological activities of fibroblast-like synovial cells through multiple pathways, including inhibiting the PI3K/Akt signaling pathway, inducing S-phase arrest of the cell cycle, suppressing their migration and invasion abilities, inducing mitochondrial-dependent apoptosis, and up-regulating the expression of E-cadherin.

Key words: total flavonoids from *Gynura formosana* Kitam; rheumatoid arthritis; fibroblast-like synoviocytes; apoptosis; PI3K; Akt; E-cadherin

类风湿关节炎是系统性自身免疫性疾病,以关节为主要损伤靶点,呈反复活动性发作,最终造成关节破坏^[1-2]。国内外统计类风湿关节炎的患病率为0.34%~0.36%,且预后较差,给患者造成严重的疼痛、残疾甚至过早死亡,并给个人和社会带来严重的经济负担^[3]。目前,类风湿关节炎的临床治疗仍以甲氨蝶呤、来氟米特和羟氯喹等抗风湿药物为主,同时一些针对炎症细胞因子的阻断剂,如肿瘤坏死因子- α (TNF- α)阻断剂也较常用^[4-5]。这些药物治疗虽在一定程度上能控制病情的继续发展,但仍有部分患者存在疗效欠佳、不良反应大、易产生耐药等问题^[6-7]。

近年来,靶向调控成纤维样滑膜细胞异常活化已成为类风湿关节炎治疗的新策略。研究表明,这类细胞不仅具有肿瘤样侵袭特性,其凋亡抵抗机制更直接参与滑膜血管翳形成^[8-9]。通过诱导成纤维样滑膜细胞凋亡恢复滑膜稳态,可能为突破现有治疗瓶颈提供新途径。在此背景下,天然产物因其多靶点作用特征备受关注,其中植物黄酮类化合物凭借显著的抗炎、促凋亡活性,在类风湿关节炎治疗领域展现出独特优势^[10-11]。白凤菜 *Gynura formosana* Kitam.作为传统药用植物,白凤菜总黄酮已被证实具有调控炎症信号通路的潜力^[12]。本研究将探讨白凤菜总黄酮对成纤维样滑膜细胞增殖抑制及凋亡诱导效应,旨在将白凤菜总黄酮开发为类风湿关节炎的候选治疗药物提供实验理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

成纤维样滑膜细胞(货号 HTX1834)购自厦门

施科生物科技有限公司。黄酮标准品(CAS 621-82-9、11135-24-6、970-74-1、327-97-9、482-35-9、520-26-3、480-19-3、5041-82-7、1553-18-4、99-50-3)购于厦门阿尔法派技术开发有限公司;DMEM 培养液(货号 SH30022.01)购于美国 Hyclone 公司;磷酸盐缓冲液(货号 C10010500BT)和胎牛血清(货号 10099-141)购于美国 Gibco 公司;Matrigel 基质胶(货号 354234)和 Transwell 小室(货号 3422)购于康宁公司;胰酶(货号 MA0153)、细胞周期(货号 MA0312)、凋亡检测试剂盒(货号 MA0220)、CCK8 试剂盒(货号 MA0218)、线粒体膜电位试剂盒(货号 MA0398)购于大连美仑生物技术有限公司;Western blotting 相关抗体 E-钙黏蛋白(E-cadherin, 货号 20874-1-AP)、磷脂酰肌醇-3 激酶(PI3K, 货号 67071-1-Ig)、p-PI3K(货号 CY6506)、蛋白激酶 B(Akt, 货号 60203-2-Ig)、p-Akt(货号 66444-1-Ig)购于武汉三鹰生物技术有限公司;反转录试剂盒(货号 A3500)购于美国 Promega 公司。

FACSVerso 流式细胞仪(美国 BD 公司)、Mini-PROTEAN Tetra 电泳系统(美国 Bio-Rad 公司)、IX53 倒置显微镜(日本 Olympus 公司),1530MultiskanSky 多功能酶标仪、HeracellTM 150i CO₂ 培养箱, QuantStudioTM 5 荧光定量 PCR 仪、invitrogen EVOS FL 荧光显微镜(美国 Thermo 公司),Qtrap5500 液相色谱质谱联用仪(美国 SCIEX)。

1.2 方法

1.2.1 白凤菜总黄酮的制备 为保证实验样品的一致性,本研究所有实验均使用同一批次制备的白凤菜总黄酮提取物。实验所用白凤菜采自本院药用

植物园(经漳州卫生职业学院基础医学院副教授林燕燕鉴定为菊科菊三七属植物 *Gynura formosana* Kitam, 凭证标本号 GF2023-001)。取干燥全草粉末 1.0 kg, 采用 70% 乙醇加热回流提取 3 次, 每次 2 h。合并提取液, 减压浓缩后上样于 AB-8 型大孔吸附树脂柱, 依次以去离子水和 70% 乙醇进行洗脱, 收集 70% 乙醇洗脱部位, 经旋转蒸发浓缩、冷冻干燥, 获得原料中白凤菜总黄酮(全草粉末)质量分数为 8.56%, 于-20 °C 密封保存。临用前, 取适量浸膏以双蒸水溶解, 依次经 0.45、0.22 μm 微孔滤膜过滤, 即得白凤菜总黄酮浓度样液为 2.76 mg/mL^[13]。

1.2.2 细胞培养 将成纤维样滑膜细胞接种于含有 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液中, 37 °C、5% CO₂、湿度饱和的恒温培养箱中培养, 每 1~2 d, 待细胞基本长满培养瓶底面时, 用 0.25% 胰蛋白酶消化细胞使其脱壁离散, 制成细胞悬液后进行传代培养, 取对数生长期细胞为实验对象。

1.2.3 细胞存活率检测 采用 CCK-8 法检测白凤菜总黄酮对成纤维样滑膜细胞增殖的影响。取对数生长期细胞悬液按 5×10³ 个/孔接种于 96 孔板, 设置 4 个复孔。实验组分别添加终浓度为 12.5、25、50、100、150、200 μg/mL 的白凤菜总黄酮溶液, 未处理组作为阴性对照, 另设仅含培养基与 CCK-8 试剂的空白对照组。各组样本于 5% CO₂、37 °C 恒温孵箱中分别培养 24、48、72 h 后, 每孔加 10 μL CCK-8 试剂, 混匀后继续培养 4 h。终止反应后使用酶标仪于 450 nm 波长测定吸光度(A)值。

$$\text{细胞存活率} = (A_{\text{实验}} - A_{\text{空白}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}})$$

1.2.4 细胞形态学观察 收集对数生长期细胞, 6 孔板每孔接种 5×10⁵ 个细胞, 设置白凤菜总黄酮对照(0 μg/mL)组及 25、50、100 μg/mL 4 个白凤菜总黄酮处理浓度, 于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中孵育 24 h, 在倒置显微镜下进行细胞形态学观察并拍照。

1.2.5 线粒体膜电位检测 取对数生长期的细胞进行铺板, 在 6 孔板中接种成纤维样滑膜细胞, 3×10⁵ 个/孔, 白凤菜总黄酮按 0、25、50、100 μg/mL 处理成纤维样滑膜细胞 24 h 后, PBS 洗涤 2 次, 加入 1 mL JC-1 染色工作液, 充分混匀, 细胞培养箱 37 °C 孵育 20 min。37 °C 孵育结束后, 吸除上清, 用冰浴的 JC-1 染色缓冲液洗涤 2 次, 每孔加入 2 mL 细胞培养液, 使用荧光显微镜采集随机视野图像。

1.2.6 细胞划痕检测 取对数生长期的成纤维样滑膜细胞, 以 5×10⁵ 个/孔的密度接种于 6 孔板。

待细胞融合至 90% 以上后, 使用 200 μL 无菌枪头尖端垂直于板底划痕线划出笔直划痕。PBS 轻柔洗涤 2 次后, 更换为含终浓度 0、25、50、100 μg/mL 白凤菜总黄酮的完全培养基, 每组 3 复孔。分别于划痕后 0 h 及培养 24 h 后, 于倒置显微镜下对同一区域拍照, 采用 Image J 软件测量划痕面积, 并按公式计算细胞迁移率。

$$\text{细胞迁移率} = (0 \text{ h 面积} - 24 \text{ h 面积}) / 0 \text{ h 面积}$$

1.2.7 细胞侵袭 Transwell 实验 在冰浴条件下, 用预冷无血清培养基将 Matrigel 基质胶按 1:8 稀释, 取 100 μL 均匀铺于 Transwell 小室聚碳酸酯膜上, 37 °C 孵育 4~5 h 成胶。将经不同浓度(0、25、50、100 μg/mL)白凤菜总黄酮预处理 24 h 的成纤维样滑膜细胞用无血清培养基重悬至 1×10⁵ 个/mL, 取 200 μL 接种于上室。下室加入 600 μL 含 20% 胎牛血清的完全培养基作为趋化剂, 37 °C、5% CO₂ 培养 24 h。取出小室, 用棉签移除上室基质胶及未侵袭细胞, 4% 多聚甲醛固定 30 min, 0.1% 结晶紫染色 20 min, PBS 漂洗后于显微镜下随机选取 5 个视野拍照并计数侵袭细胞, 取平均值分析。

1.2.8 细胞凋亡检测 采用 Annexin V-FITC/PI 双染法进行细胞凋亡检测。将对数生长期成纤维样滑膜细胞按 5×10⁴ 个/mL 密度接种于 6 孔板(3 mL/孔), 37 °C、5% CO₂ 条件下贴壁培养 12 h。分组同前, 干预 24 h 后收集上清和细胞。1 000 r/min 离心 5 min 获取细胞沉淀, 以预冷缓冲液 195 μL 轻柔重悬。依次添加 5 μL Annexin V-FITC 及 10 μL PI, 混匀后置于暗反应条件下双染 15 min。样本经 200 目滤网过滤后, 使用 BD 流式细胞仪检测。

1.2.9 细胞周期检测 采用碘化丙啶(PI)单染法进行细胞周期分析。将对数生长期成纤维样滑膜细胞按 5×10⁴ 个/mL 接种于 6 孔板(3 mL/孔), 设置对照(0 μg/mL)、25、50、100 μg/mL 4 个白凤菜总黄酮处理组, 于 37 °C、5% CO₂ 条件下持续处理 24 h。收集上清及细胞, 经 1 000 r/min 离心 5 min 获取细胞沉淀后, 1 mL 预冷 PBS 重悬洗涤转 70% 乙醇 4 °C 固定 2 h, PBS 洗涤 2 次。染色阶段加入 0.5 mL PI 工作液, 37 °C 暗反应 30 min。样本经 200 目滤网滤过后, 使用 BD 流式细胞仪检测。

1.2.10 相关基因表达的 Real-time PCR 检测 根据 TRIzol RNA 提取试剂说明书, 提取样本的总 RNA。纯度及浓度检测后, 使用反转录试剂盒合成 cDNA。选取基因甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)作为内

参, 每个样品设置 3 个复孔。RT-PCR 检测反应在荧光定量 PCR 仪上进行。反应条件为 95 °C、30 s; 然后 95 °C、5 s, 60 °C、30 s, 共 40 个循环, 最

后进行熔解曲线反应, 实验重复 3 次。Real-time PCR 数值分析采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 分析法, 相关引物的序列见表 1。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequence

目的名称	上游引物序列	下游引物序列	扩增片段长/bp
GAPDH	AGGTCGGTGTGAACGGATTTG	AGGTCGGTGTGAACGGATTTG	183
Bax	GGATGCGTCCACCAAGAAG	CCGGAGGAAGTCCAATGTC	280
Bcl-2	GACTTCGCCGAGATGTCCA	CCCCACCGAACTCAAAGAA	136
PI3K	CAATACTTGATGTGGCTGAC	CAATACTTGATGTGGCTGAC	280
Akt	GACATGAACGGCTGAGGAG	GGCTGGTGGTATTGTGAGGA	200

1.2.11 Western blotting 检测 将细胞接种到 10 cm 的皿中培养过夜, 分组同前, 处理 24 h。Western 和 IP 细胞裂解缓冲液裂解细胞, 收集上清液, 用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒测定蛋白质浓度。等体积上样, 10% SDS-PAGE 分离蛋白, 转膜, 用快速封闭液封闭 10 min, 一抗 1:1 000 体孵育 4 °C 过夜。用相应的二抗室温孵育 1 h 后, 用化学发光成像仪曝光并拍照。

1.3 统计学方法

使用统计软件 SPSS 21.0 进行数据统计分析, 本实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组数据比较采用 Student-*t* 检验。

2 结果

2.1 白凤菜总黄酮对成纤维样滑膜细胞存活率的影响

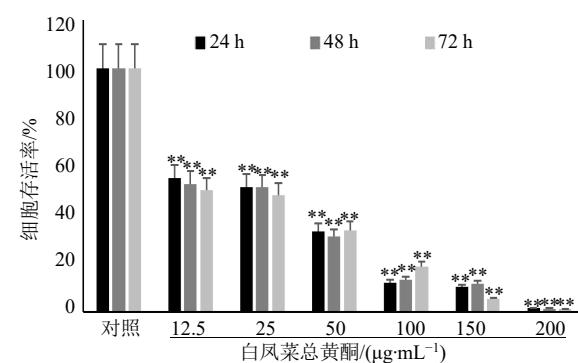
如图 1 所示, 与对照组相比, 白凤菜总黄酮对成纤维样滑膜细胞有明显的体外抑制作用 ($P < 0.01$), 白凤菜总黄酮作用 24 h 后, 白凤菜总黄酮对其抑制作用有浓度和时间相关性。得到白凤菜总黄酮对成纤维样滑膜细胞作用 24、48、72 h 的 IC_{50} 分别为 45.87、44.21、42.00 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

2.2 白凤菜总黄酮对成纤维样滑膜细胞形态的影响

如图 2 所示, 成纤维样滑膜细胞呈梭形生长, 随着白凤菜总黄酮干预浓度的增大, 成纤维样滑膜细胞贴壁面积显著减少, 伪足回缩, 细胞数量减少, 部分细胞体积进一步缩小、变亮, 或呈现碎片状, 折光度降低, 胞体内含物减少, 甚至成球形。

2.3 线粒体膜电位检测

如图 3 所示, 对照组中细胞数量明显更甚, 并且排列相对紧密, 胞体发出红色荧光, 未见绿色凋亡荧光细胞; 白凤菜总黄酮 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组中细胞数量略少、但形态与对照组无明显差异, 线粒体膜电



与对照组比较: $^{**}P < 0.01$ 。

$^{**}P < 0.01$ vs control group.

图 1 白凤菜总黄酮对成纤维样滑膜细胞存活的影响
($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 1 Effect of total flavonoids of *Gynura formosana* on the cell survival of fibroblastoid synovial cells
($\bar{x} \pm s, n = 3$)

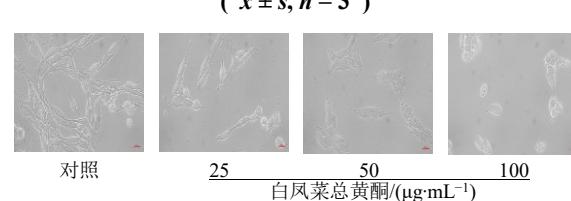


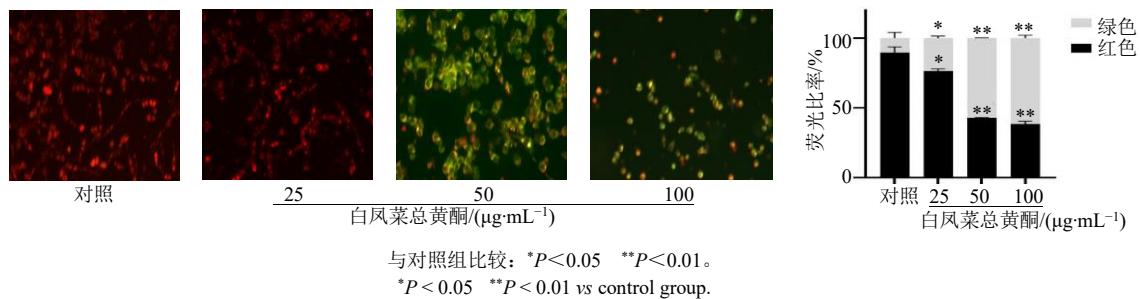
图 2 成纤维样滑膜细胞形态的变化 ($\times 400$)

Fig. 2 Morphological changes of fibroblastoid synovial cells ($\times 400$)

位 (红绿荧光比值) 下降 ($P < 0.05$); 白凤菜总黄酮 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组细胞数量减少明显, 细胞形态难见正常的梭形, 部分细胞的细胞膜受损, 线粒体膜电位显著下降 ($P < 0.01$); 白凤菜总黄酮 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组中细胞数量下降明显, 胞体皱缩不均一, 呈现较多亮绿色荧光细胞, 与对照组相比, 活细胞群体其线粒体膜电位出现了显著下降 ($P < 0.01$)。

2.4 细胞划痕实验

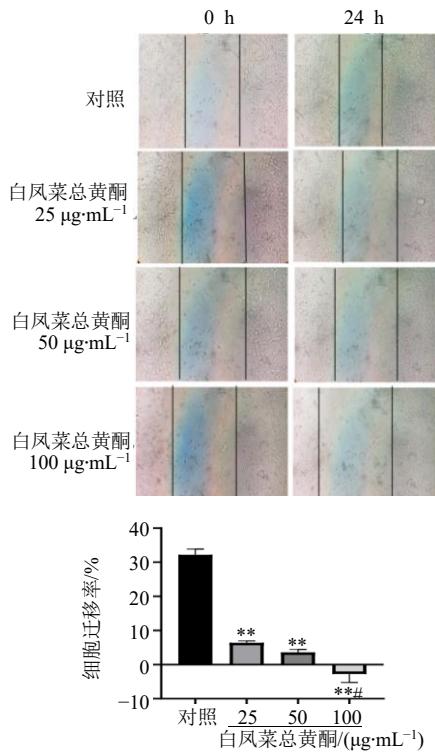
划痕实验结果显示, 干预 24 h 后, 白凤菜总黄酮 25、50、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组迁移率分别为 (8.35 ±

图 3 白凤菜总黄酮对细胞线粒体膜电位变化的影响 ($\times 400$, $\bar{x} \pm s$, $n = 3$)Fig. 3 Influence of total flavonoids of *Gynura formosana* on the changes of mitochondrial membrane potential in cells ($\times 400$, $\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

1.02%、(6.59±1.12)%、(-3.14±1.81)%，显著低于对照组(32.60±1.25)% ($P<0.01$)，白凤菜总黄酮 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组迁移率低于白凤菜总黄酮 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组 ($P<0.05$)，见图 4。

2.5 细胞侵袭 Transwell 实验

如图 5 所示，结晶紫染色结果显示，与对照组相比，白凤菜总黄酮组穿过基质胶膜的细胞数量明

图 4 白凤菜总黄酮对成纤维样滑膜细胞迁移的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)Fig. 4 Effect of total flavonoids of *Gynura formosana* Kitam on the migration of fibroblastoid synovial cells ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

显减少。定量分析进一步表明，与对照组相比，白凤菜总黄酮 25、50、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组成纤维样滑膜细胞侵袭细胞数显著降低 ($P<0.001$)。

2.6 白凤菜总黄酮对成纤维样滑膜细胞凋亡的影响

如图 6 所示，与对照组相比，白凤菜总黄酮 25、50、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组凋亡率明显增加 ($P<0.001$)。

2.7 白凤菜总黄酮对成纤维样滑膜细胞周期的影响

细胞周期分析结果显示，白凤菜总黄酮可诱导成纤维样滑膜细胞发生周期阻滞。如图 7、表 2 所示，与对照组相比，白凤菜总黄酮 50、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组细胞群中处于 G₁ 期的细胞比例显著减少，而 S 期的细胞比例相应增加 ($P<0.05$ 、0.01)。这表明白凤菜总黄酮可能通过阻止细胞从 S 期向 G₂/M 期进展，从而将细胞阻滞在 DNA 合成期，抑制其完成正常的有丝分裂周期。

2.8 相关基因表达的 RT-PCR 检测

结果显示，与对照组相比，白凤菜总黄酮组 *PI3K* 和 *Akt* mRNA 相对表达量明显下降 ($P<0.001$)，其中 *PI3K* mRNA 相对表达量随着白凤菜总黄酮浓度的增加而降低 ($P<0.05$ 、0.01)，见图 8。

2.9 Western blotting 检测相关蛋白表达量

检测结果如图 9 所示，白凤菜总黄酮 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组 E-cadherin 蛋白相对表达量较对照组显著增高 ($P<0.05$)；如图 10 所示，与对照组相比，白凤菜总黄酮各浓度组 *Akt* 和 *p-Akt* 蛋白相对表达量显著降低 ($P<0.01$)，白凤菜总黄酮 50、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组 *PI3K*、*p-PI3K* 蛋白相对表达量显著下调 ($P<0.01$)。

3 讨论

类风湿关节炎的病理进程与成纤维样滑膜细胞的异常增殖和抗凋亡特性密切相关^[14]，而传统药

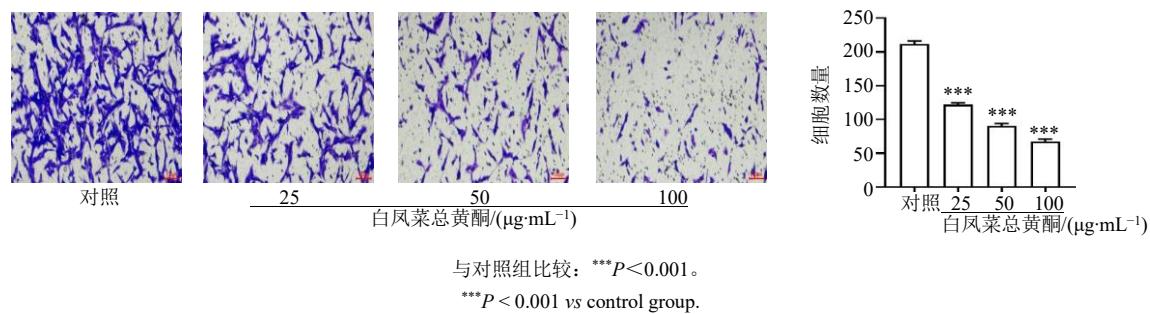
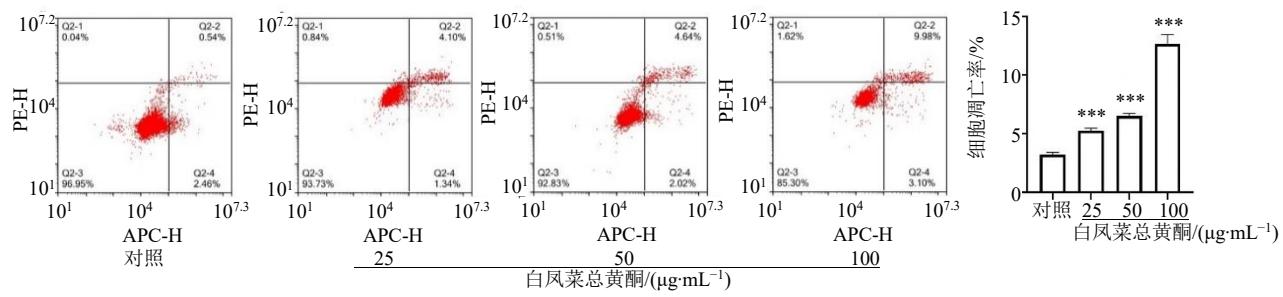
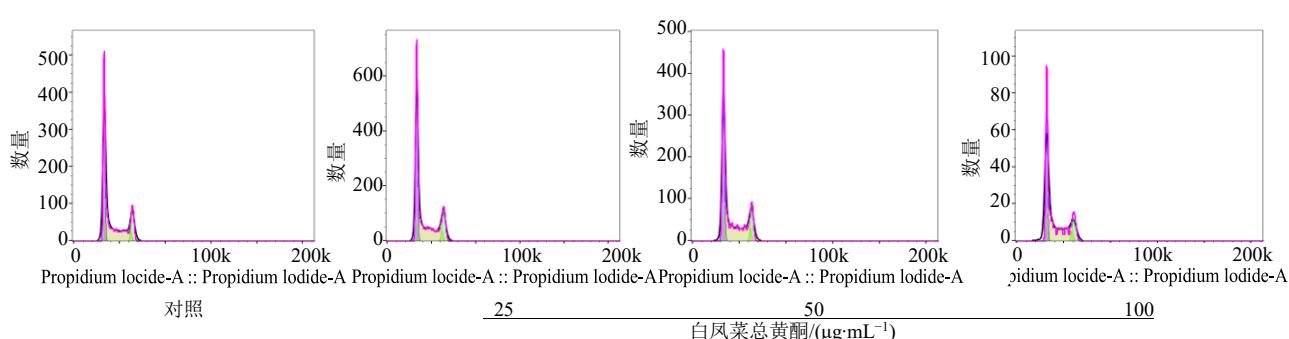
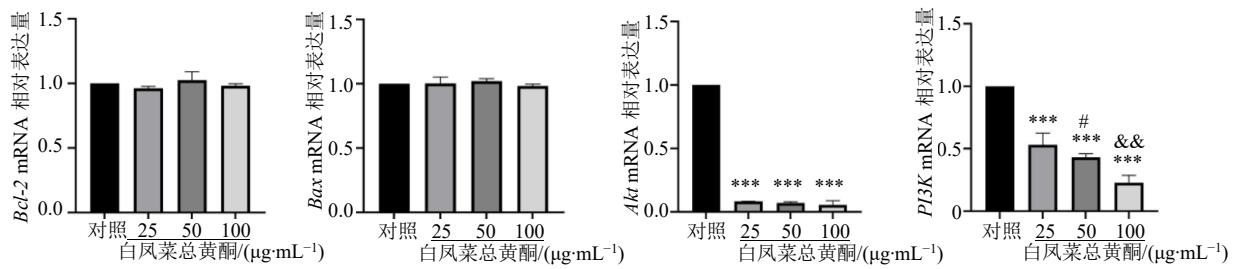
图5 白凤菜总黄酮对成纤维样滑膜细胞侵袭的影响 ($\times 100$, $\bar{x} \pm s$, $n = 3$)Fig. 5 Effect of total flavonoids of *Gynura formosana* on invasion of fibroblastoid synovial cells ($\times 100$, $\bar{x} \pm s$, $n = 3$)图6 白凤菜总黄酮对成纤维样滑膜细胞凋亡的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)Fig. 6 Effect of total flavonoids of *Gynura formosana* on apoptosis of fibroblastoid synovial cells ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

图7 白凤菜总黄酮对成纤维样滑膜细胞周期的影响

Fig. 7 Effect of total flavonoids of *Gynura formosana* on cell cycle of fibroblastoid synovial cells表2 白凤菜总黄酮对成纤维样滑膜细胞周期的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)Table 2 Effect of total flavonoids of *Gynura formosana* Kitam on the cell cycle of fibroblastoid synovial cells ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

细胞周期	对照	白凤菜总黄酮/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)		
		25	50	100
G ₁	46.61±0.26	47.70±0.16	41.52±0.14*	36.10±0.22**
S	39.53±0.16	38.96±0.19	44.33±0.11*	49.93±0.25**
G ₂ /M	13.86±0.15	13.34±0.14	14.15±0.12	13.97±0.21

与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ 。* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs control group.

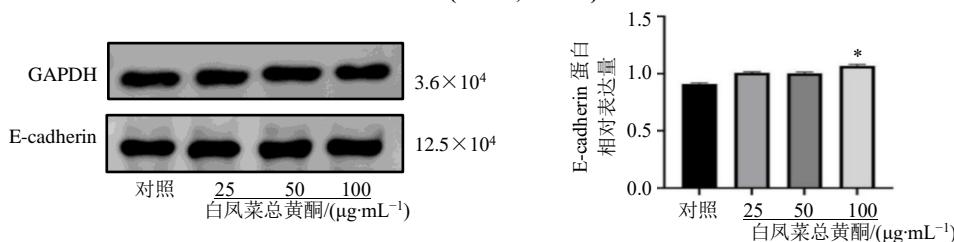


与对照组比较: *** $P<0.001$; 与白凤菜总黄酮 25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 组比较: # $P<0.05$; 与白凤菜总黄酮 50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 组比较: && $P<0.01$ 。

*** $P<0.001$ vs control group; # $P<0.05$ vs total flavonoids of *Gynura formosana* 25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ group; && $P<0.01$ vs total flavonoids of *Gynura formosana* 50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ group.

图 8 白凤菜总黄酮对成纤维样滑膜细胞相关基因表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 8 Effect of total flavonoids of *Gynura formosana* Kitam on the expression of genes related to fibroblastoid synoviocytes ($\bar{x} \pm s, n=3$)

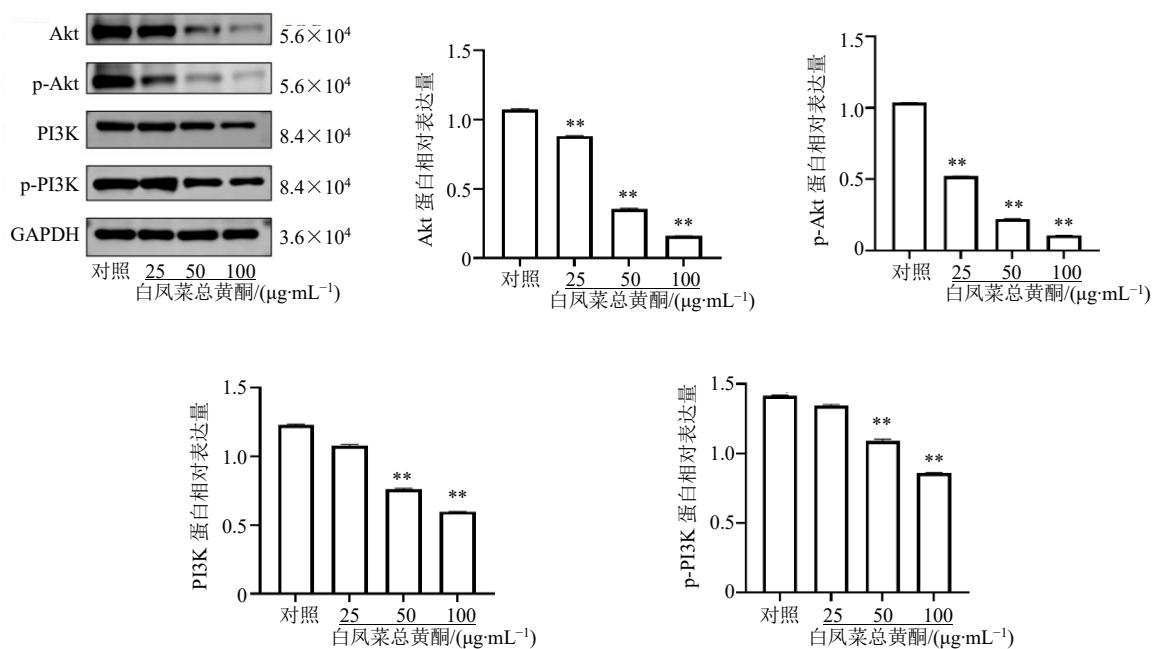


与对照组比较: * $P<0.05$ 。

* $P<0.05$ vs control group.

图 9 白凤菜总黄酮对成纤维样滑膜细胞 E-cadherin 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 9 Effect of total flavonoids of *Gynura formosana* Kitam on the expression of E-cadherin protein in fibroblastoid synovial cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)



与对照组比较: ** $P<0.01$ 。

** $P<0.01$ vs control group.

图 10 白凤菜总黄酮对成纤维样滑膜细胞 Akt、p-Akt、PI3K、p-PI3K 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 10 Effect of total flavonoids of *Gynura formosana* on protein expression of Akt, p-Akt, PI3K and p-PI3K in fibroblast-like synoviocytes ($\bar{x} \pm s, n=3$)

物如甲氨蝶呤的局限性促使研究者探索新型治疗策略。本研究揭示了白凤菜总黄酮在体外抑制成纤维样滑膜细胞增殖、诱导凋亡并阻滞细胞周期的作用,为其作为潜在抗类风湿关节炎药物的开发提供了实验依据。

本研究发现,白凤菜总黄酮对成纤维样滑膜细胞的增殖抑制呈现浓度和时间相关性特征。随着作用时间延长(24~72 h), IC_{50} 值从45.87 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 降至42.00 $\mu\text{g}/\text{mL}$,提示长期暴露可能增强白凤菜总黄酮的生物活性。其中,白凤菜总黄酮25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 即表现出良好的抑制效果,细胞皱缩、胞体缩小及折光度降低,提示其可能具备较高的生物利用度优势。线粒体膜电位结果进一步证实,白凤菜总黄酮50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组显著增加绿色荧光信号,表明细胞膜通透性改变,提示有可能为线粒体凋亡途径通路的激活。此前研究报道,黄酮类化合物可通过调控Bcl2/Bax蛋白平衡诱导凋亡^[15],但是在本实验中Bcl2/Bax中各组未见改变,但qPCR检测白凤菜总黄酮显著抑制PI3K及Akt蛋白表达,PI3K/Akt通路可能在成纤维样滑膜细胞的存活和增殖中起作用^[16-17]。Western blotting检测结果显示与对照组相比,白凤菜总黄酮组中磷酸化的PI3K和Akt蛋白水平显著下调,而总PI3K和Akt蛋白量也下降。这一结果直接证实,白凤菜总黄酮能特异性抑制了PI3K/Akt信号通路的激活。此发现与前期qPCR结果相互印证,共同揭示了白凤菜总黄酮靶向该通路的多个调控层面。成纤维样滑膜细胞的侵袭性迁移是关节软骨破坏的关键步骤,而白凤菜总黄酮干预后,白凤菜总黄酮对PI3K/Akt通路的抑制,可能解除了其对E-cadherin的转录抑制或蛋白稳定性破坏,E-cadherin表达的增加可能使成纤维样滑膜细胞像“上皮样”表型转变促进其黏附,可减少侵袭,这与实验结果表现一致^[18]。白凤菜总黄酮通过抑制PI3K/Akt信号通路,抑制增殖、诱导凋亡、阻滞细胞周期及抑制迁移等多重途径发挥抗成纤维样滑膜细胞活性,且具备低浓度高效的特点。作为天然来源的候选药物,白凤菜总黄酮有望为类风湿关节炎治疗提供新思路。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Wu G F, Nie W B, Wang Q, et al. Umbelliferone ameliorates complete freund adjuvant-induced arthritis via

reduction of NF- κ B signaling pathway in osteoclast differentiation [J]. *Inflammation*, 2021, 44(4): 1315-1329.

- [2] Dalmasso C, Derbois C, Veyssiére M, et al. Identification of biological pathways specific to phases preceding rheumatoid arthritis development through gene expression profiling [J]. *Int J Immunogenet*, 2021, 48(3): 239-249.
- [3] Savvides C S, James E A, Buckner J H. Rheumatoid arthritis—the role of T cells in this complex systemic autoimmune disease [J]. *Curr Opin Immunol*, 2025, 94: 102555.
- [4] 姜泉, 巩勋, 焦娟, 等. 类风湿关节炎病证结合诊疗指南(2025年) [J]. 中医杂志, 2025, 66(17): 1842-1856.
- [5] 胡越. 来氟米特联合甲氨蝶呤对类风湿关节炎血清CRP、ESR水平的影响 [J]. 吉林医学, 2025, 46(6): 1426-1429.
- [6] 张倩, 吕天琦, 黄华, 等. ABC转运蛋白与类风湿关节炎甲氨蝶呤治疗耐药关系的研究进展 [J]. 浙江医学, 2023, 45(9): 998-1003.
- [7] 王佳, 毛妮, 谢希, 等. 多药耐药基因-1高表达可加剧类风湿关节炎患者对氨甲蝶呤的耐药 [J]. 中国医学科学院学报, 2019, 41(5): 595-600.
- [8] Zhai K F, Duan H, Khan G J, et al. Salicin from alangium Chinense ameliorates rheumatoid arthritis by modulating the Nrf2-HO-1-ROS pathways [J]. *J Agric Food Chem*, 2018, 66(24): 6073-6082.
- [9] Wang Y O, Wang Z H, Zhu S B, et al. MiR-326 regulates cell proliferation and apoptosis in fibroblast-like synoviocytes in rheumatoid arthritis [J]. *Hum Cell*, 2023, 36(3): 987-996.
- [10] 王洁雪, 彭思蓉, 李月, 等. 女萎菜黄酮类成分及抗炎活性研究 [J]. 中草药, 2025, 56(16): 5731-5738.
- [11] 谢鲜丽, 梁建丽, 卿丽婷, 等. 基于一测多评结合化学模式识别、TOPSIS模型的小叶三点金总黄酮质量评价与抗炎活性研究 [J]. 药物评价研究, 2025, 48(8): 2213-2223.
- [12] 罗秀针, 林燕燕, 林泽燕, 等. 白凤菜总黄酮治疗小鼠细菌性阴道炎效果 [J]. 社区医学杂志, 2021, 19(15): 906-911.
- [13] 郑晓艳. 正交实验优选白凤菜总黄酮提取工艺 [J]. 生物化工, 2022, 8(4): 44-47.
- [14] 沙拉依丁·艾尔西丁, 高健, 阿力木江·阿不都肉苏力, 等. 巨噬细胞极化调控类风湿关节炎骨破坏的作用机制 [J]. 中国组织工程研究, 2026, 30(10): 2484-2490.
- [15] 赵彩权, 赵雅茹, 赵鹏, 等. 碱韭总黄酮通过调控细胞程序性死亡发挥抗肿瘤作用的机制研究 [J]. 中国细

- 胞生物学学报, 2024, 46(7): 1387-1398.
- [16] 李辉明, 邢涛, 魏国俊, 等. PI3K/Akt 信号通路在类风湿关节炎中的作用研究进展 [J]. 中国骨质疏松杂志, 2024, 30(7): 1060-1066.
- [17] 孙建国, 李慧娟, 宝文萍, 等. 网络药理学、分子动力学和实验验证探究秦艽环烯醚萜苷抗类风湿性关节炎关键成分和作用机制 [J]. 中草药, 2024, 55(17): 5853-5866.
- [18] 方全钢, 刘海芸, 万静, 等. MMP25 和 E-cadherin 在类风湿关节炎中的诊断价值 [J]. 江西医药, 2024, 59(2): 143-147.

【责任编辑 高源】