

本文引用: 王光祖, 王少敏, 乔素兰, 李晓敬, 姚春霞, 布兰娜. 芹菜素调节 AMPK/mTOR 通路对子痫前期胎盘滋养细胞自噬的影响研究[J]. 湖南中医药大学学报, 2023, 43(8): 1394-1401.

## 芹菜素调节 AMPK/mTOR 通路对子痫前期胎盘 滋养细胞自噬的影响研究

王光祖<sup>1</sup>, 王少敏<sup>1</sup>, 乔素兰<sup>1</sup>, 李晓敬<sup>1</sup>, 姚春霞<sup>2</sup>, 布兰娜<sup>1\*</sup>

1. 邯郸市妇幼保健院, 邯郸市儿童医院 新生儿科, 河北 邯郸 056000; 2. 河北工程大学医学院, 河北 邯郸 056038

**[摘要]** **目的** 探究芹菜素对子痫前期(preeclampsia, PE)胎盘滋养细胞自噬的影响及可能的作用机制。**方法** 取人绒毛膜滋养层 HTR-8/Svneo 细胞, 采用缺氧复氧 1 h(hypoxic-reoxygenation 1 h, H<sub>1</sub>R<sub>1</sub>)诱导建立 PE 细胞模型, 并通过 MTT 法检测芹菜素对 HTR-8/Svneo 细胞毒性的影响。取对数生长期的 HTR-8/Svneo 细胞, 分为对照组、H<sub>1</sub>R<sub>1</sub> 组、腺苷酸活化蛋白激酶(adenosine monophosphate-activated protein kinase, AMPK)激活剂阿卡地新(acadesine, AICAR)组(1 mmol/L)、芹菜素低剂量组(10 μmol/L)、芹菜素高剂量组(20 μmol/L)、芹菜素+AICAR 组(芹菜素 20 μmol/L+AICAR 1 mmol/L)。采用 MTT 法检测细胞活力; 透射电子显微镜观察细胞自噬情况; 划痕实验和 Transwell 小室实验检测细胞迁移、侵袭能力; Western blot 法检测细胞 AMPK/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin, mTOR)通路和自噬、侵袭相关蛋白的表达。**结果** 与对照组比较, 10、20 μmol/L 芹菜素对 HTR-8/Svneo 细胞增殖有促进作用( $P<0.05$ )。与对照组比较, H<sub>1</sub>R<sub>1</sub> 组细胞在 24、48、72 h 时细胞活力、划痕愈合率和穿膜细胞数、N-钙黏蛋白(N-cadherin)表达、p-mTOR/mTOR 比值显著降低( $P<0.05$ ), 微管相关蛋白 1 轻链 3-II (microtubule-associated protein 1 light chain 3-II, LC3 II)/微管相关蛋白 1 轻链 3-I (microtubule-associated protein 1 light chain 3-I, LC3 I) 比值、Beclin-1 和 E-钙黏蛋白(E-cadherin)表达、p-AMPK/AMPK 比值显著升高( $P<0.05$ ), 自噬小体数量增多( $P<0.05$ ); 与 H<sub>1</sub>R<sub>1</sub> 组比较, 芹菜素低、高剂量组细胞活力、划痕愈合率和穿膜细胞数、N-cadherin 表达、p-mTOR/mTOR 比值显著升高( $P<0.05$ ), LC3II/LC3I 比值、Beclin-1 和 E-cadherin 表达、p-AMPK/AMPK 比值显著降低( $P<0.05$ ), 自噬小体数量减少( $P<0.05$ ); 与芹菜素高剂量组比较, 芹菜素+AICAR 组细胞在 24、48、72 h 时细胞活力、划痕愈合率和穿膜细胞数、N-cadherin 表达、p-mTOR/mTOR 比值显著降低( $P<0.05$ ), LC3II/LC3I 比值、Beclin-1 和 E-cadherin 表达、p-AMPK/AMPK 比值显著升高( $P<0.05$ ), 自噬小体数量增多( $P<0.05$ )。**结论** 芹菜素能增强滋养细胞的侵袭能力, 改善 PE, 其作用机制可能与抑制 AMPK/mTOR 通路介导的胎盘滋养细胞过度自噬有关。

**[关键词]** 芹菜素; 子痫前期; 胎盘滋养细胞; 自噬; 迁移; 侵袭; 腺苷酸活化蛋白激酶; 哺乳动物雷帕霉素靶蛋白

**[中图分类号]** R285.5

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2023.08.008

## Effects of apigenin on autophagy of placental trophoblast cells in preeclampsia by regulating AMPK/mTOR pathway

WANG Guangzu<sup>1</sup>, WANG Shaomin<sup>1</sup>, QIAO Sulan<sup>1</sup>, LI Xiaojing<sup>1</sup>, YAO Chunxia<sup>2</sup>, BU Lanna<sup>1\*</sup>

1. Department of Neonatology, Handan Maternal and Child Health Hospital & Handan Children's Hospital, Handan, Hebei 056000, China; 2. School of Medicine, Hebei University of Engineering, Handan, Hebei 056038, China

**[Abstract]** **Objective** To explore the effects of apigenin on autophagy of placental trophoblast cells in preeclampsia (PE) and its possible mechanism of action. **Methods** Human chorionic trophoblast HTR-8/Svneo cells were taken and hypoxia-reoxygenation 1 h (H<sub>1</sub>R<sub>1</sub>) was used to induce the establishment of PE cell models. The effects of apigenin on HTR-8/Svneo cytotoxicity was tested by

**[收稿日期]** 2023-05-22

**[基金项目]** 河北省自然科学基金项目(H2020402004); 邯郸市科学技术研究与发展计划项目(19422083040ZC)。

**[第一作者]** 王光祖, 男, 主治医师, 研究方向: 新生儿临床治疗。

**[通信作者]** \* 布兰娜, 女, 副主任医师, E-mail: wxuj21@163.com。

MTT method. In addition, HTR-8/Svneo cells in logarithmic growth phase were taken and divided into control group, H<sub>1</sub>R<sub>1</sub> group, adenosine monophosphate-activated protein kinase (AMPK) activator acadesine (AICAR) group (1 mmol/L), low-dose apigenin group (10 μmol/L), high-dose apigenin group (20 μmol/L), and apigenin+AICAR group (apigenin 20 μmol/L+AICAR 1 mmol/L). Cell viability was determined by MTT method; cell autophagy was observed by transmission electron microscope; cell migration and invasion ability were tested by scratch assay and Transwell chamber assay. Western blot method was used to examine the related protein expressions of cellular AMPK/mammalian target of rapamycin (mTOR) pathway, autophagy, and invasion. **Results** Compared with the control group, 10 and 20 μmol/L apigenin had a promoting effect on the proliferation of HTR-8/Svneo cells ( $P<0.05$ ). Compared with the control group, the cell viability at 24, 48, and 72 h, scratch healing rate, number of transmembrane cells, N-cadherin expression, and p-mTOR/mTOR ratio of the H<sub>1</sub>R<sub>1</sub> group were significantly lower ( $P<0.05$ ), while the microtubule-associated protein 1 light chain 3 II (LC3II)/microtubule-associated protein 1 light chain 3 I (LC3I) ratio, Beclin-1 and E-cadherin expressions, p-AMPK/AMPK ratio were significantly higher ( $P<0.05$ ), and the number of autophagosomes increased ( $P<0.05$ ); compared with the H<sub>1</sub>R<sub>1</sub> group, the cell viability at 24, 48, and 72 h, scratch healing rate, number of transmembrane cells, N-cadherin expression, and p-mTOR/mTOR ratio in low- and high-dose apigenin groups were significantly elevated ( $P<0.05$ ), while LC3II/LC3I ratio, Beclin-1 and E-cadherin expressions, and p-AMPK/AMPK ratio were significantly reduced ( $P<0.05$ ), and the number of autophagosomes became lower ( $P<0.05$ ); compared with high-dose apigenin group, the cell viability at 24, 48 and 72 h, scratch healing rate, number of transmembrane cells, N-cadherin expression, and p-mTOR/mTOR ratio of apigenin+AICAR group were significantly lower ( $P<0.05$ ), while LC3II/LC3I ratio, Beclin-1 and E-cadherin expressions, and p-AMPK/AMPK ratio were significantly higher ( $P<0.05$ ), and the number of autophagosomes increased ( $P<0.05$ ). **Conclusion** Apigenin can enhance the invasion ability of trophoblast cells and thus improve PE, and its mechanism of action may be related to the inhibition of the excessive autophagy of placental trophoblast cells mediated by AMPK/mTOR pathway.

[**Keywords**] apigenin; preeclampsia; placental trophoblast cells; autophagy; migration; invasion; adenosine monophosphate-activated protein kinase; mammalian target of rapamycin

子痫前期(preeclampsia, PE)是妊娠期女性常见的一种母婴共患疾病,胎盘是PE发病机制的核心,与异常滋养层细胞浸润有关<sup>[1]</sup>。自噬在胚胎发生、植入和妊娠维持中起着重要作用,过度自噬被认为是PE发病过程中胎盘的一个重要特征<sup>[2]</sup>,对滋养细胞自噬的调节是治疗PE的重点。芹菜素是一种黄酮类化合物,具有抗氧化和抗炎作用,亦可降低胰岛素抵抗,改善妊娠糖尿病,而胰岛素抵抗为PE的病因之一<sup>[3]</sup>。此外,芹菜素还可抑制内质网应激,改善妊娠糖尿病大鼠胰腺组织损伤和胰岛细胞凋亡<sup>[4]</sup>,并可改善妊娠高血压<sup>[5]</sup>。芹菜素的作用可能与其控制自噬的能力有关<sup>[6-7]</sup>。然而,芹菜素是否能调节PE中滋养细胞自噬尚未可知。

哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin, mTOR)是调节细胞自噬的关键蛋白,已有研究证实,PE期间p-mTOR胎盘表达降低、mTOR信号通路抑制,通过降低滋养层细胞的侵袭能力诱导PE的发生<sup>[8]</sup>;激活mTOR信号通路可增强PE大鼠胎盘滋养细胞增殖分化<sup>[9]</sup>。而在PE期间,与mTOR通路相关的基因p-AMPK胎盘表达增加,并且与正常孕妇相比,严重PE患者腺苷酸活化蛋白激酶(adenosine monophosphate-activated protein kinase,

AMPK)较高<sup>[10]</sup>。AMPK是细胞能量代谢的关键调节因子,对于正常胎盘和胚胎发育至关重要。AMPK的过度激活会损害PE中滋养细胞的侵袭性<sup>[11]</sup>。mTOR是AMPK的下游靶标之一,AMPK和mTOR的活性在自噬调节方面具有拮抗作用,AMPK激活负向调节mTOR活性、正向调节自噬活性<sup>[12]</sup>。据报道,重度PE患者胎盘中mTOR活性下降,滋养细胞自噬过度激活,侵袭能力降低;抑制胎盘滋养细胞自噬,可延缓PE进展<sup>[13]</sup>。这提示,PE患者胎盘中AMPK的激活可下调mTOR活性,诱导滋养细胞过度自噬,可能是PE发病的重要机制。基于以上研究,本研究推测芹菜素可能通过AMPK/mTOR通路调控PE胎盘滋养细胞自噬,并对此展开研究。

## 1 材料

### 1.1 细胞

人绒毛膜滋养层HTR-8/Svneo细胞购自武汉普诺赛生命科技有限公司,批号:20210615;HTR-8/Svneo维持在RPMI1640培养基(含10%胎牛血清、1%青-链霉素)中,于37℃、5%CO<sub>2</sub>的环境中培养。

### 1.2 药品与主要试剂

芹菜素(纯度>98%,批号:201109,成都瑞芬思

生物科技有限公司);阿卡地新(acadesine, AICAR) (AMPK 激活剂,批号:20210724)、MTT 试剂盒(批号:20210805)、RIPA 裂解液(批号:20210622)均购自上海碧云天生物技术有限公司;胎牛血清(批号:210316)、RPMI1640 培养基(批号:210409)、胰蛋白酶(批号:210420)均购自美国 Gibco 公司;兔源一抗微管相关蛋白 1 轻链 3(microtubule-associated protein 1 light chain 3, LC3) II/I(批号:20210812)、E-钙黏蛋白(E-cadherin)(批号:20210524)、N-钙黏蛋白(N-cadherin)(批号:20210608)、AMPK(批号:20210519)、p-AMPK(批号:20210420)、mTOR(批号:20210615)、p-mTOR(批号:20210617)、Beclin-1(批号:20210506)抗体均购自英国 Abcam 公司。

### 1.3 主要仪器

超薄切片机(型号:Leica EM UC7,德国 Leica 公司);多功能酶标仪(型号:iMark680,美国 Bio-Rad 公司);倒置荧光显微镜(型号:IX73,日本 Olympus 公司);透射电子显微镜(型号:JEM-1230,日本 Jeol 公司)。

## 2 方法

### 2.1 PE 细胞模型建立及芹菜素的细胞毒性实验

采用缺氧复氧 1 h(hypoxic-reoxygenation 1 h, H<sub>1</sub>R<sub>1</sub>)诱导建立 PE 细胞模型<sup>[4]</sup>。取 HTR-8/Svneo 细胞( $1 \times 10^5$  个/mL),接种于 96 孔板(200  $\mu$ L/孔),培养 24 h,待细胞达到 70%~80%融合时,换用含芹菜素终浓度为 0、5、10、20、40、80  $\mu$ mol/L 的培养基处理 24 h。然后,将细胞置于低氧环境(1%O<sub>2</sub>、5% CO<sub>2</sub>、94%N<sub>2</sub>)中培养 1 h,再进行常氧(21%O<sub>2</sub>)处理。H<sub>1</sub>R<sub>1</sub>后,向每个孔中加入 40  $\mu$ L MTT 溶液(5 mg/mL),继续孵育 2 h。使用酶标仪检测 570 nm 波长下各孔吸光度(A)值,与未经芹菜素处理的对照细胞相比,计算芹菜素处理组的细胞活力。细胞活力=(芹菜素处理组 A 值-空白孔 A 值)/(未经芹菜素处理组 A 值-空白孔 A 值) $\times 100\%$ 。

### 2.2 细胞分组与处理

取 HTR-8/Svneo 细胞,分为对照组(常氧 21%O<sub>2</sub> 培养,不作处理)、H<sub>1</sub>R<sub>1</sub>组(1%O<sub>2</sub>/21%O<sub>2</sub> 培养)、AICAR 组(给予 AMPK 激活剂 AICAR 1 mmol/L 处理)、芹菜素低剂量组(10  $\mu$ mol/L)、芹菜素高剂量组(20  $\mu$ mol/L)、芹菜素+AICAR 组(给予芹菜素 20  $\mu$ mol/L 和 AICAR

1 mmol/L 处理)。此外,AICAR 组、芹菜素各剂量组和芹菜素+AICAR 组细胞分别给予相应剂量的药物处理 24 h 后,进行 H<sub>1</sub>R<sub>1</sub> 诱导建立 PE 细胞模型。

### 2.3 MTT 法检测细胞活力

HTR-8/Svneo 细胞以  $2 \times 10^4$  个/孔的密度接种于 96 孔板中,每孔 200  $\mu$ L(细胞密度为  $1 \times 10^5$  个/mL),按照“2.2”项分组进行处理后,在 24、48、72 h 分别向每孔加入 40  $\mu$ L MTT 溶液(5 mg/mL),孵育 2 h。检测各组细胞在 570 nm 处的 A 值(A<sub>570 nm</sub> 值),评估细胞活力。

### 2.4 透射电子显微镜观察细胞自噬

将各组细胞用 2.5%戊二醛-1%锇酸固定,PBS 洗后,梯度乙醇和丙酮进行脱水,然后包埋在纯 812 包埋剂中,在 60  $^{\circ}$ C 烘箱中聚合 48 h;使用超薄切片机将样品切成 60~80 nm 的超薄切片。切片用 3%醋酸铀-枸橼酸铅双染色,在透射电子显微镜下观察细胞自噬。

### 2.5 划痕实验检测细胞迁移能力

取对数生长期的 HTR-8/Svneo 细胞,以  $1 \times 10^5$  个/mL 的密度接种在 60 mm 培养皿中,并使其生长 24 h。用无菌蓝色移液管的尖端刮擦划一道划痕。随后,按照“2.2”项进行分组与处理,并将细胞再培养 24 h。在 0 h 和 24 h 时在同一位置用倒置显微镜拍照,计算划痕愈合率。划痕愈合率=(1-24 h 划痕宽度/0 h 划痕宽度) $\times 100\%$ 。

### 2.6 Transwell 实验检测细胞侵袭能力

取 HTR-8/Svneo 细胞按照“2.2”项进行分组和处理后,重悬在无血清培养液中( $2 \times 10^4$  个/mL)。取 200  $\mu$ L 细胞悬液加入上室(预先包被 Matrigel),600  $\mu$ L 培养基(含 10%胎牛血清)加入下室。培养 48 h 后,将穿膜细胞固定在 4%多聚甲醛中 30 min,在结晶紫染液中染色 20 min 后,在倒置显微镜下对侵袭细胞进行计数。

### 2.7 Western blot 法检测细胞 AMPK/mTOR 通路和自噬、侵袭相关蛋白的表达

RIPA 裂解液提取经芹菜素和 H<sub>1</sub>R<sub>1</sub> 处理后的 HTR-8/Svneo 细胞总蛋白。测量蛋白浓度后,十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离等量蛋白样品(30  $\mu$ g),并转至聚偏二氟乙烯膜上。将膜封闭在 5%脱脂牛奶中 1 h,将膜在 4  $^{\circ}$ C 下与在封闭溶液中稀释的一抗(AMPK、p-AMPK、mTOR、p-mTOR、Beclin-1、LC3 II/I、E-cadherin、N-cadherin、 $\beta$ -actin,

1:1 000)孵育过夜。将膜在室温下用二抗(1:4 000)孵育 1 h 后,显影,检测条带灰度值,计算目的蛋白表达量。

## 2.8 统计学分析

采用 SPSS 22.0 软件进行统计分析,计量资料用“ $\bar{x}\pm s$ ”表示,数据分布的正态性和方差齐性分别通过 Kolmogorov-Smirnov 检验和 Levene 检验进行分析,多组间比较符合正态分布且方差齐时采用单因素方差分析,组间两两比较采用 LSD-*t* 检验;方差不齐时,选择 Dunnett-*t*3 检验;不服从正态分布者,采用秩和检验。 $P<0.05$  表示差异有统计学意义。

## 3 结果

### 3.1 不同浓度的芹菜素对 H<sub>1</sub>R<sub>1</sub> 诱导的 HTR-8/Svneo 细胞毒性的影响

与 0  $\mu\text{mol/L}$  的芹菜素浓度比较,5、10、20、40  $\mu\text{mol/L}$  的芹菜素对 HTR-8/Svneo 细胞无明显毒性作用。10  $\mu\text{mol/L}$  芹菜素对 HTR-8/Svneo 细胞增殖有促进作用( $P>0.05$ ),20  $\mu\text{mol/L}$  时促进作用更明显,差异有统计学意义( $P<0.05$ ),当剂量达到 80  $\mu\text{mol/L}$  时有抑制 HTR-8/Svneo 细胞增殖的趋势( $P<0.05$ )。详见表 1。故选择 10、20  $\mu\text{mol/L}$  芹菜素用于后续实验。

表 1 芹菜素对 HTR-8/Svneo 细胞活力的影响( $\bar{x}\pm s, n=6$ )

芹菜素浓度/ $(\mu\text{mol/L})$	细胞活力/%
0	100.00 $\pm$ 0.00
5	103.12 $\pm$ 14.58
10	110.39 $\pm$ 17.06
20	129.05 $\pm$ 15.42 <sup>#</sup>
40	105.70 $\pm$ 13.98
80	83.68 $\pm$ 12.11 <sup>#</sup>

注:与 0  $\mu\text{mol/L}$  的芹菜素浓度比较,<sup>#</sup> $P<0.05$ 。

### 3.2 芹菜素对 H<sub>1</sub>R<sub>1</sub> 诱导的 HTR-8/Svneo 细胞活力的影响

与对照组比较,H<sub>1</sub>R<sub>1</sub> 组细胞在 24、48、72 h 时

细胞活力显著降低( $P<0.05$ );与 H<sub>1</sub>R<sub>1</sub> 组比较,AICAR 组细胞活力显著降低( $P<0.05$ ),芹菜素低、高剂量组细胞活力显著升高( $P<0.05$ );与 AICAR 组比较,芹菜素+AICAR 组细胞活力显著升高( $P<0.05$ );与芹菜素高剂量组比较,芹菜素+AICAR 组细胞活力显著降低( $P<0.05$ )。详见表 2。

表 2 各组 HTR-8/Svneo 细胞活力比较( $\bar{x}\pm s, n=6$ )

组别	细胞活力( $A_{570\text{ nm}}$ 值)		
	24 h	48 h	72 h
对照组	0.427 $\pm$ 0.039	0.638 $\pm$ 0.067	0.981 $\pm$ 0.075
H <sub>1</sub> R <sub>1</sub> 组	0.316 $\pm$ 0.028 <sup>#</sup>	0.415 $\pm$ 0.046 <sup>#</sup>	0.524 $\pm$ 0.063 <sup>#</sup>
AICAR 组	0.205 $\pm$ 0.024 <sup>*</sup>	0.299 $\pm$ 0.035 <sup>*</sup>	0.413 $\pm$ 0.049 <sup>*</sup>
芹菜素低剂量组	0.384 $\pm$ 0.041 <sup>*</sup>	0.496 $\pm$ 0.052 <sup>*</sup>	0.615 $\pm$ 0.074 <sup>*</sup>
芹菜素高剂量组	0.412 $\pm$ 0.045 <sup>*</sup>	0.524 $\pm$ 0.061 <sup>*</sup>	0.702 $\pm$ 0.085 <sup>*</sup>
芹菜素+AICAR 组	0.320 $\pm$ 0.036 <sup>△△</sup>	0.421 $\pm$ 0.055 <sup>△△</sup>	0.548 $\pm$ 0.062 <sup>△△</sup>

注:与对照组比较,<sup>#</sup> $P<0.05$ ;与 H<sub>1</sub>R<sub>1</sub> 组比较,<sup>\*</sup> $P<0.05$ ;与 AICAR 组比较,<sup>△</sup> $P<0.05$ ;与芹菜素高剂量组比较,<sup>△△</sup> $P<0.05$ 。

### 3.3 芹菜素对 H<sub>1</sub>R<sub>1</sub> 诱导的 HTR-8/Svneo 细胞自噬的影响

与对照组比较,H<sub>1</sub>R<sub>1</sub> 组细胞中自噬小体数量增多( $P<0.05$ );与 H<sub>1</sub>R<sub>1</sub> 组比较,AICAR 组细胞中自噬小体数量增多( $P<0.05$ ),芹菜素低、高剂量组细胞中自噬小体数量减少( $P<0.05$ );与 AICAR 组比较,芹菜素+AICAR 组细胞中自噬小体数量减少( $P<0.05$ );与芹菜素高剂量组比较,芹菜素+AICAR 组细胞中自噬小体数量增多( $P<0.05$ )。详见表 3、图 1。

表 3 各组 HTR-8/Svneo 细胞中自噬小体数比较( $\bar{x}\pm s, n=6$ )

组别	自噬小体/(个/视野)
对照组	2.85 $\pm$ 0.39
H <sub>1</sub> R <sub>1</sub> 组	5.22 $\pm$ 0.56 <sup>#</sup>
AICAR 组	7.03 $\pm$ 0.62 <sup>*</sup>
芹菜素低剂量组	4.19 $\pm$ 0.50 <sup>*</sup>
芹菜素高剂量组	3.24 $\pm$ 0.48 <sup>*</sup>
芹菜素+AICAR 组	5.10 $\pm$ 0.62 <sup>△△</sup>

注:与对照组比较,<sup>#</sup> $P<0.05$ ;与 H<sub>1</sub>R<sub>1</sub> 组比较,<sup>\*</sup> $P<0.05$ ;与 AICAR 组比较,<sup>△</sup> $P<0.05$ ;与芹菜素高剂量组比较,<sup>△△</sup> $P<0.05$ 。

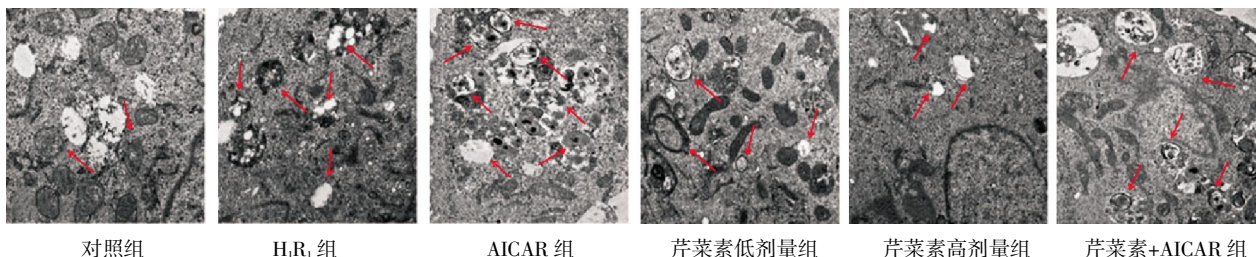


图 1 各组 HTR-8/Svneo 细胞中自噬小体形成情况(透射电子显微镜, $\times 11\ 500$ )

注:红色箭头表示自噬小体。

### 3.4 芹菜素对 $H_1R_1$ 诱导的 HTR-8/Svneo 细胞迁移、侵袭能力的影响

与对照组比较,  $H_1R_1$  组细胞划痕愈合率和穿膜细胞数显著降低 ( $P<0.05$ ); 与  $H_1R_1$  组比较, AICAR 组细胞划痕愈合率和穿膜细胞数显著降低 ( $P<0.05$ ), 芹菜素低、高剂量组细胞划痕愈合率和穿膜细胞数显著升高 ( $P<0.05$ ); 与 AICAR 组比较, 芹菜素+AICAR 组细胞划痕愈合率和穿膜细胞数显著升高 ( $P<0.05$ ); 与芹菜素高剂量组比较, 芹菜素+AICAR 组细胞划痕愈合率和穿膜细胞数显著降低 ( $P<0.05$ )。详见表 4、图 2。

表 4 各组 HTR-8/Svneo 细胞的划痕愈合率和穿膜细胞数比较 ( $\bar{x}\pm s, n=6$ )

组别	划痕愈合率/%	穿膜细胞数/(个/视野)
对照组	63.85±7.64	142.63±15.42
$H_1R_1$ 组	38.34±5.81 <sup>#</sup>	74.67±10.13 <sup>#</sup>
AICAR 组	27.46±4.92 <sup>*</sup>	53.05±7.72 <sup>*</sup>
芹菜素低剂量组	49.22±6.54 <sup>*</sup>	86.42±9.85 <sup>*</sup>
芹菜素高剂量组	56.45±7.12 <sup>*</sup>	109.71±8.67 <sup>*</sup>
芹菜素+AICAR 组	45.33±5.54 <sup>△△</sup>	83.25±11.09 <sup>△△</sup>

注:与对照组比较,<sup>#</sup> $P<0.05$ ;与  $H_1R_1$  组比较,<sup>\*</sup> $P<0.05$ ;与 AICAR 组比较,<sup>△</sup> $P<0.05$ ;与芹菜素高剂量组比较,<sup>△△</sup> $P<0.05$ 。

### 3.5 芹菜素对 $H_1R_1$ 诱导的 HTR-8/Svneo 细胞中自噬、侵袭相关蛋白表达的影响

与对照组比较,  $H_1R_1$  组细胞中 LC3 II/LC3 I 比值、Beclin-1 和 E-cadherin 表达显著升高 ( $P<0.05$ ),

N-cadherin 表达显著降低 ( $P<0.05$ ); 与  $H_1R_1$  组比较, AICAR 组细胞中 LC3 II/LC3 I 比值、Beclin-1 和 E-cadherin 表达显著升高 ( $P<0.05$ ), N-cadherin 表达显著降低 ( $P<0.05$ ), 芹菜素低、高剂量组细胞中 LC3 II/LC3 I 比值、Beclin-1 和 E-cadherin 表达显著降低 ( $P<0.05$ ), N-cadherin 表达显著升高 ( $P<0.05$ ); 与 AICAR 组比较, 芹菜素+AICAR 组细胞中 LC3 II/LC3 I 比值、Beclin-1 和 E-cadherin 表达显著降低 ( $P<0.05$ ), N-cadherin 表达显著升高 ( $P<0.05$ ); 与芹菜素高剂量组比较, 芹菜素+AICAR 组细胞中 LC3 II/LC3 I 比值、Beclin-1 和 E-cadherin 表达显著升高 ( $P<0.05$ ), N-cadherin 表达显著降低 ( $P<0.05$ )。详见图 3、表 5。

### 3.6 芹菜素对 $H_1R_1$ 诱导的 HTR-8/Svneo 细胞中 AMPK/mTOR 通路的影响

与对照组比较,  $H_1R_1$  组细胞中 p-AMPK/AMPK 比值升高、p-mTOR/mTOR 比值降低 ( $P<0.05$ ); 与  $H_1R_1$  组比较, AICAR 组细胞中 p-AMPK/AMPK 比值升高、p-mTOR/mTOR 比值降低 ( $P<0.05$ ), 芹菜素低、高剂量组 p-AMPK/AMPK 比值降低、p-mTOR/mTOR 比值升高 ( $P<0.05$ ); 与 AICAR 组比较, 芹菜素+AICAR 组 p-AMPK/AMPK 比值降低、p-mTOR/mTOR 比值升高 ( $P<0.05$ ); 与芹菜素高剂量组比较, 芹菜素+AICAR 组细胞中 p-AMPK/AMPK 比值升高、p-mTOR/mTOR 比值降低 ( $P<0.05$ )。详见图 4、表 6。

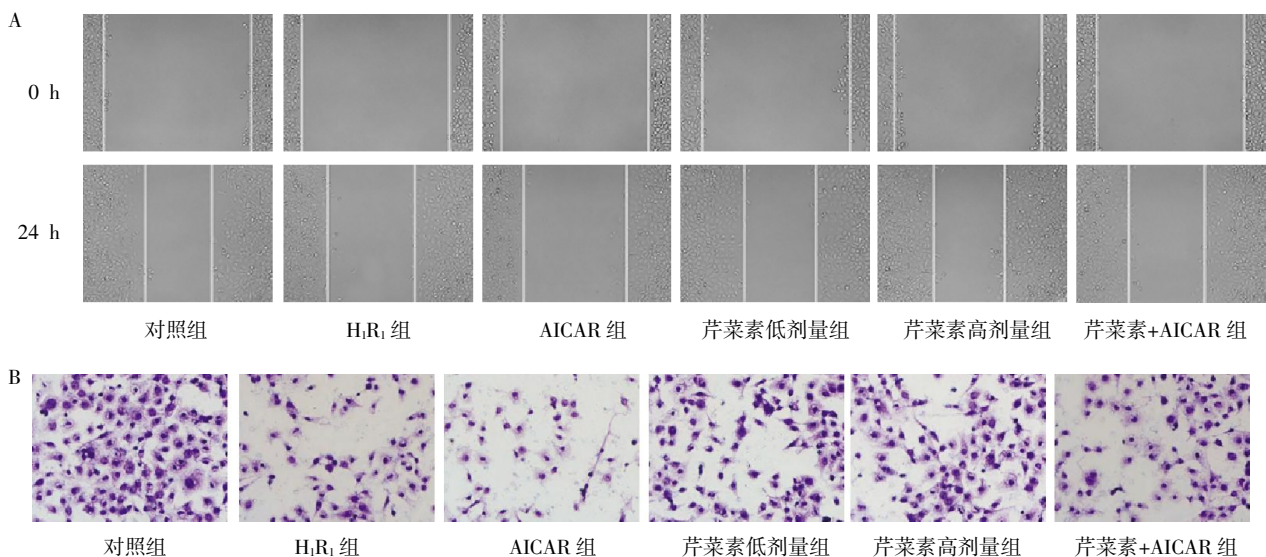


图 2 各组 HTR-8/Svneo 细胞的迁移、侵袭情况比较

注:A.细胞迁移情况图;B.细胞侵袭情况图。

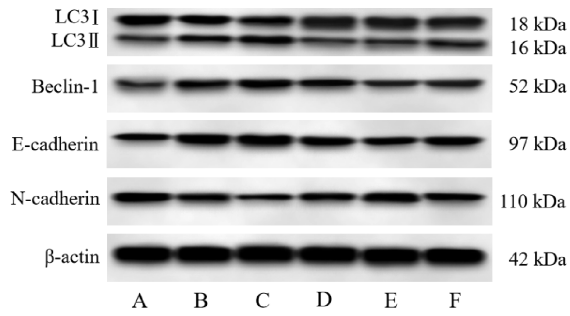


图3 各组 HTR-8/Svneo 细胞中自噬、侵袭相关蛋白的表达  
注:A.对照组;B.H<sub>1</sub>R<sub>1</sub>组;C.AICAR组;D.芹菜素低剂量组;E.芹菜素高剂量组;F.芹菜素+AICAR组。

表5 各组 HTR-8/Svneo 细胞中自噬、侵袭相关蛋白表达的比较( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

组别	LC3II/LC3I	Beclin-1	E-cadherin	N-cadherin
对照组	0.34±0.05	0.21±0.04	0.40±0.06	0.65±0.08
H <sub>1</sub> R <sub>1</sub> 组	0.65±0.08 <sup>#</sup>	0.48±0.07 <sup>#</sup>	0.71±0.09 <sup>#</sup>	0.41±0.06 <sup>#</sup>
AICAR组	0.78±0.09 <sup>*</sup>	0.59±0.08 <sup>*</sup>	0.82±0.10 <sup>*</sup>	0.30±0.05 <sup>*</sup>
芹菜素低剂量组	0.55±0.07 <sup>*</sup>	0.40±0.05 <sup>*</sup>	0.59±0.08 <sup>*</sup>	0.48±0.07 <sup>*</sup>
芹菜素高剂量组	0.46±0.06 <sup>*</sup>	0.34±0.04 <sup>*</sup>	0.48±0.07 <sup>*</sup>	0.56±0.08 <sup>*</sup>
芹菜素+AICAR组	0.58±0.08 <sup>△△</sup>	0.45±0.07 <sup>△△</sup>	0.63±0.08 <sup>△△</sup>	0.44±0.06 <sup>△△</sup>

注:与对照组比较,<sup>#</sup> $P<0.05$ ;与 H<sub>1</sub>R<sub>1</sub> 组比较,<sup>\*</sup> $P<0.05$ ;与 AICAR 组比较,<sup>△</sup> $P<0.05$ ;与芹菜素高剂量组比较,<sup>△△</sup> $P<0.05$ 。

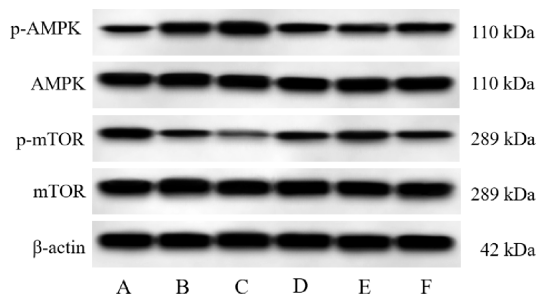


图4 各组 HTR-8/Svneo 细胞中 AMPK/mTOR 通路相关蛋白的表达

注:A.对照组;B.H<sub>1</sub>R<sub>1</sub>组;C.AICAR组;D.芹菜素低剂量组;E.芹菜素高剂量组;F.芹菜素+AICAR组。

表6 各组 HTR-8/Svneo 细胞中 AMPK/mTOR 通路相关蛋白表达的比较( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

组别	p-AMPK/AMPK	p-mTOR/mTOR
对照组	0.41±0.07	0.68±0.08
H <sub>1</sub> R <sub>1</sub> 组	0.75±0.09 <sup>#</sup>	0.34±0.05 <sup>#</sup>
AICAR组	0.96±0.11 <sup>*</sup>	0.21±0.04 <sup>*</sup>
芹菜素低剂量组	0.64±0.08 <sup>*</sup>	0.45±0.06 <sup>*</sup>
芹菜素高剂量组	0.55±0.07 <sup>*</sup>	0.53±0.07 <sup>*</sup>
芹菜素+AICAR组	0.68±0.08 <sup>△△</sup>	0.40±0.05 <sup>△△</sup>

注:与对照组比较,<sup>#</sup> $P<0.05$ ;与 H<sub>1</sub>R<sub>1</sub> 组比较,<sup>\*</sup> $P<0.05$ ;与 AICAR 组比较,<sup>△</sup> $P<0.05$ ;与芹菜素高剂量组比较,<sup>△△</sup> $P<0.05$ 。

## 4 讨论

在正常妊娠中,胎盘的滋养细胞侵入子宫壁并用低阻力的血管系统取代高阻力的子宫螺旋动脉和小动脉,而这种重塑在 PE 中是有缺陷的(可能继发于胎儿-母体间期免疫反应的改变),可能导致胎盘缺血<sup>[5]</sup>。PE 长期以来一直被认为是胎盘的缺血性疾病,缺氧可引起细胞侵袭力减弱,并影响滋养细胞向侵袭性表型分化<sup>[6]</sup>;此外,H<sub>1</sub>R<sub>1</sub> 可诱导滋养细胞 AMPK 激活,可有效诱导 HTR8/SVneo 滋养细胞 PE 前期研究模型<sup>[4]</sup>,因此,本研究通过 H<sub>1</sub>R<sub>1</sub> 诱导建立 PE 滋养细胞模型。结果显示,与常氧处理细胞相比,H<sub>1</sub>R<sub>1</sub> 可降低滋养细胞的迁移、侵袭能力,并上调 p-AMPK/AMPK 比值,激活 AMPK。

芹菜素是在芹菜、欧芹、洋葱、茶和葡萄柚等蔬菜和水果中发现的天然黄酮类化合物之一。黄酮类化合物可以作为抗氧化剂,保护生物分子免受氧化损伤。据报道,芹菜素可改善妊娠糖尿病和妊娠高血压,并降低胰岛素抵抗<sup>[3,5]</sup>。而氧化应激会导致胎盘功能异常,糖尿病是 PE 的高危因素,胰岛素抵抗为其病因之一,这提示芹菜素可能对 PE 具有保护作用。本研究首次探究了不同浓度的芹菜素对滋养细胞 HTR-8/Svneo 的影响,结果显示,5、10、20、40  $\mu\text{mol/L}$  的芹菜素对 HTR-8/Svneo 细胞无明显毒性作用,并且 10、20  $\mu\text{mol/L}$  芹菜素对 HTR-8/Svneo 细胞有促增殖作用,而当剂量达到 80  $\mu\text{mol/L}$  时有抑制 HTR-8/Svneo 细胞增殖的趋势,表明高浓度的芹菜素对 HTR-8/Svneo 细胞有明显毒性,因此,选择低浓度芹菜素(10、20  $\mu\text{mol/L}$ )进一步研究其对 HTR-8/Svneo 细胞迁移与侵袭的影响,后续将在此试验剂量范围内设置多个浓度来进一步评估剂量依赖性。在妊娠期,滋养细胞通过上皮-间充质转化获得迁移、侵袭能力,进而侵入子宫内膜以重塑螺旋动脉,胎盘功能障碍与滋养细胞的迁移和侵袭不足密切相关<sup>[7]</sup>。本研究结果显示,10、20  $\mu\text{mol/L}$  芹菜素可显著增加经 H<sub>1</sub>R<sub>1</sub> 处理后的 HTR-8/Svneo 细胞的迁移与侵袭能力;Western blot 结果也证实,芹菜素可降低 E-cadherin 表达,升高 N-cadherin 表达。这表明芹菜素可增强 H<sub>1</sub>R<sub>1</sub> 处理后的 HTR-8/Svneo 细胞的迁移和侵袭能力,在 PE 中具有重要作用,然而,其调控

HTR-8/Svneo 细胞迁移和侵袭的机制尚不明确。

自噬在胚胎发生、植入和妊娠维持中起着重要作用, NAKASHIMA 等<sup>[18-19]</sup>研究显示, 自噬机制在 PE 中受损, 自噬抑制与胎盘不良有关, 是 PE 胎盘的一个重要特征。然而, 过度自噬也被认为是 PE 发病过程中胎盘的一个重要特征<sup>[2,20]</sup>。当 mTOR 的磷酸化被阻止时, 滋养细胞自噬过度激活, 妊娠早期滋养细胞侵袭能力降低<sup>[21]</sup>; 通过 mTOR 途径调节自噬可进一步影响滋养细胞的侵袭和黏附<sup>[22]</sup>。以上研究表明, mTOR 介导的细胞自噬可影响滋养细胞的侵袭。AMPK 是 mTOR 的上游调控因子, 也是调节细胞自噬的关键蛋白<sup>[12]</sup>。AMPK 协调细胞生长、分化和营养运输以维持细胞存活, 在多种缺血性疾病中发挥重要作用<sup>[23]</sup>。AMPK 的适当调节对于正常胎盘和胚胎发育至关重要, 其失调可能导致妊娠相关疾病, 如宫内生长受限、胎盘功能不全或 PE。据报道, 胎盘滋养层细胞中 AMPK 敲低会导致细胞形态和功能改变<sup>[24]</sup>, AMPK 激活可诱导滋养细胞分化, 改善受异常胎盘影响的人胎盘中滋养细胞的功能<sup>[25]</sup>。但是, AMPK 的过度激活会降低 PE 中滋养细胞的侵袭性<sup>[11]</sup>。 TSAI 等<sup>[8]</sup>研究指出, 在 PE 期间, 胎盘中 p-mTOR 表达降低, p-AMPK 表达增加; KOROGLU 等<sup>[10]</sup>也发现, 严重 PE 患者的 AMPK 表达水平显著高于健康孕妇和无严重特征的 PE 患者。本研究结果显示, H<sub>1</sub>R<sub>1</sub> 后 HTR-8/Svneo 细胞中 p-AMPK/AMPK 比值升高, p-mTOR/mTOR 比值降低, 并且采用 AMPK 激活剂 AICAR 上调 p-AMPK/AMPK 后, p-mTOR/mTOR 比值进一步降低, HTR-8/Svneo 细胞的自噬增加, 侵袭能力减弱, 这与 TSAI 等<sup>[8]</sup>的研究结果一致, 与 NAKASHIMA 等<sup>[18-19]</sup>研究结果不一致, 推测其原因可能与自噬的双重作用有关。由此猜想: 在 PE 患者胎盘中, 过度激活的 AMPK 可能通过抑制 mTOR 活化, 诱导滋养细胞过度自噬。而经芹菜素处理后, HTR-8/Svneo 细胞中 AMPK 的激活被抑制, mTOR 活化增加, 细胞自噬减少, 迁移与侵袭能力增强; 并且使用 AICAR 可明显减弱芹菜素对 AMPK 激活和自噬的抑制作用, 并削弱芹菜素对 HTR-8/Svneo 细胞迁移和侵袭的促进作用。上述结果提示芹菜素可能通过抑制 AMPK 的激活, 促进 mTOR 活化, 进而抑制滋养细胞过度自噬, 增强其侵袭能力。AICAR 为 AMPK/mTOR

通路的激活剂, 可进一步增强自噬, 降低滋养细胞的迁移、侵袭能力, 芹菜素与 AICAR 联合使用后, AICAR 对 AMPK/mTOR 通路的激活作用减弱了芹菜素对胎盘滋养细胞过度自噬的抑制作用, 表明芹菜素可能通过抑制 AMPK/mTOR 通路发挥作用。

芹菜素可增强滋养细胞的侵袭能力, 改善 PE, 其作用机制可能与抑制 AMPK/mTOR 通路介导的胎盘滋养细胞过度自噬有关。本研究结果尚需体内动物模型进一步证实。

## 参考文献

- [1] RANA S, LEMOINE E, GRANGER J P, et al. Preeclampsia: Pathophysiology, challenges, and perspectives[J]. *Circulation Research*, 2019, 124(7): 1094-1112.
- [2] GU S Y, ZHOU C C, PEI J D, et al. Esomeprazole inhibits hypoxia/endothelial dysfunction-induced autophagy in preeclampsia[J]. *Cell and Tissue Research*, 2022, 388(1): 181-194.
- [3] 赵岗, 杨丽, 樊秀梅. 芹菜素通过 PI3K/Akt 通路对妊娠期糖尿病大鼠胰岛素抵抗的作用[J]. *药物评价研究*, 2020, 43(3): 417-422.
- [4] 陈雪宁, 黄河, 蔡志善, 等. 芹菜素对妊娠期糖尿病大鼠内质网应激 CHOP 信号通路的影响[J]. *中国比较医学杂志*, 2021, 31(2): 45-50.
- [5] BOGACZ A, MIKOŁAJCZAK P Ł, WOLEK M, et al. Combined effects of methyl dopa and flavonoids on the expression of selected factors related to inflammatory processes and vascular diseases in human placenta cells—an in vitro study[J]. *Molecules*, 2021, 26(5): 1259-1277.
- [6] MENG Z Q, GAO M, WANG C Y, et al. Apigenin alleviated high-fat-diet-induced hepatic pyroptosis by mitophagy-ROS-CTSB-NLRP3 pathway in mice and AML12 cells[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2023, 71(18): 7032-7045.
- [7] ZHANG Y Z, YANG Y, YU H T, et al. Apigenin protects mouse retina against oxidative damage by regulating the Nrf2 pathway and autophagy[J]. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2020, 2020: 9420704.
- [8] TSAI K, TULLIS B, JENSEN T, et al. Differential expression of mTOR related molecules in the placenta from gestational diabetes mellitus (GDM), intrauterine growth restriction (IUGR) and preeclampsia patients[J]. *Reproductive Biology*, 2021, 21(2): 100503-100511.
- [9] LAI W S, DING Y L. GNG7 silencing promotes the proliferation and differentiation of placental cytotrophoblasts in preeclampsia rats through activation of the mTOR signaling pathway[J]. *Inter-*

- national Journal of Molecular Medicine, 2019, 43(5): 1939–1950.
- [10] KOROGLU N, TOLA E, TEMEL YUKSEL I, et al. Maternal serum AMP-activated protein kinase levels in mild and severe preeclampsia [J]. The Journal of Maternal–Fetal & Neonatal Medicine, 2019, 32(16): 2735–2740.
- [11] YANG X T, XU P, ZHANG F M, et al. AMPK hyper-activation alters fatty acids metabolism and impairs invasiveness of trophoblasts in preeclampsia [J]. Cellular Physiology and Biochemistry, 2018, 49(2): 578–594.
- [12] HAN D D, JIANG L L, GU X L, et al. SIRT3 deficiency is resistant to autophagy-dependent ferroptosis by inhibiting the AMPK/mTOR pathway and promoting GPX4 levels [J]. Journal of Cellular Physiology, 2020, 235(11): 8839–8851.
- [13] 薛平平, 樊文强, 王慧艳, 等. 滋养细胞自噬在子痫前期胎盘中的形成及调控机制 [J]. 中华围产医学杂志, 2017, 20(10): 712–717.
- [14] 杨晓涛, 韩顶立, PHILIP N B, 等. 体外缺氧诱导子痫前期滋养细胞模型优化及代谢组学鉴定 [J]. 重庆医科大学学报, 2017, 42(8): 1045–1052.
- [15] ZHOU W B, WANG H Y, YANG Y Q, et al. Trophoblast cell subtypes and dysfunction in the placenta of individuals with preeclampsia revealed by single-cell RNA sequencing [J]. Molecules and Cells, 2022, 45(5): 317–328.
- [16] 杨娟, 谢莹莹. miR-182 调控 HIF-2 $\alpha$  通路对低氧诱导子痫前期滋养细胞侵袭的影响 [J]. 安徽医科大学学报, 2020, 55(6): 62–67.
- [17] 方婕, 何洁, 吴侠霏, 等. 基于生物信息学筛选的 CEBPA 在子痫前期胎盘组织的表达及对滋养细胞上皮间质转化的影响 [J]. 实用妇产科杂志, 2022, 38(5): 358–363.
- [18] NAKASHIMA A, CHENG S B, IKAWA M, et al. Evidence for lysosomal biogenesis proteome defect and impaired autophagy in preeclampsia [J]. Autophagy, 2020, 16(10): 1771–1785.
- [19] NAKASHIMA A, TSUDA S, KUSABIRAKI T, et al. Current understanding of autophagy in pregnancy [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2019, 20(9): 2342–2354.
- [20] 殷荷, 王艳华, 吴琪瑞, 等. MiR-5088-5p 在子痫前期患者胎盘组织中的表达及其对滋养细胞自噬的影响 [J]. 实用医学杂志, 2020, 36(24): 3312–3316.
- [21] KNUTH A, LIU L, NIELSEN H, et al. Placenta growth factor induces invasion and activates p70 during rapamycin treatment in trophoblast cells [J]. American Journal of Reproductive Immunology, 2015, 73(4): 330–340.
- [22] YANG D Y, DING J L, WANG Y Q, et al. YY1-PVT1 affects trophoblast invasion and adhesion by regulating mTOR pathway-mediated autophagy [J]. Journal of Cellular Physiology, 2020, 235(10): 6637–6646.
- [23] 肖颖馥, 王能, 盛文, 等. 莓茶提取物对 2 型糖尿病大鼠糖脂代谢及肝脏 SIRT1、AMPK、PGC-1 $\alpha$  蛋白表达的影响 [J]. 湖南中医药大学学报, 2023, 43(5): 807–813.
- [24] CAREY E A, ALBERS R E, DOLIBO A S R, et al. AMPK knock-down in placental trophoblast cells results in altered morphology and function [J]. Stem Cells and Development, 2014, 23(23): 2921–2930.
- [25] DREWLO S, JOHNSON E, KILBURN B A, et al. Irisin induces trophoblast differentiation via AMPK activation in the human placenta [J]. Journal of Cellular Physiology, 2020, 235(10): 7146–7158.

(本文编辑 周旦)