妊娠合并症

DOI:10.13406/j.cnki.cyxb.001250

妊娠糖尿病抑制胎盘 AKT-mTOR 及 SIRT1 信号通路

张　莉[1],余昕烊[1],徐　萍[1],Philip N.Baker[2],漆洪波[1],童　超[1],张　华[1]

(1. 重庆医科大学附属第一医院产科、重庆医科大学"中国—加拿大—新西兰"联合母胎医学实验室,重庆　400016;
2. 莱切斯特大学医学院,莱切斯特,英国)

【摘　要】目的:探讨 AKT-mTOR 信号通路与 SIRT1 在妊娠期糖尿病(gestational diabetes mellitus,GDM)编程胎儿生长发育中的作用。**方法**:收集重庆医科大学附属第一医院 2014 年 12 月至 2015 年 6 月分娩的 15 例 GDM 和 15 例正常产妇的胎盘组织,应用 Western blot 检测胎盘中 AKT-mTOR 磷酸化水平与 SIRT1 的表达水平。以人绒毛外滋养细胞(HTR8/SVneo)体外培养,分为空白对照组、渗透对照组和高糖组。各组处理后使用 Western blot 检测 AKT-mTOR 总蛋白和磷酸化水平,以及 SIRT1 的表达水平,应用流式细胞术(flow cytometry)检测各组的凋亡率。db/+杂合雌鼠妊娠至 18.5 d 处死后,取其胎盘组织,对其进行基因型鉴定后,选取野生型子代胎盘为 GDM 组,C57 雌鼠胎盘组织为正常对照组,每组各 6 只。然后应用 Western blot 检测胎盘组织中 AKT-mTOR 信号通路。**结果**:AKT 及其下游 mTOR 磷酸化水平在 GDM 胎盘中的表达明显低于正常胎盘(0.347 ± 0.031 vs. 1.000 ± 0.175,P=0.004;0.465 ± 0.045 vs. 1.000 ± 0.098,P=0.000)。同样,GDM 组的 SIRT1 的表达水平也明显低于正常组(0.682 ± 0.055 vs. 1.000 ± 0.127,P=0.044);在细胞模型中,经高糖处理后,AKT-mTOR 磷酸化水平明显降低(0.512 ± 0.056 vs. 1.103 ± 0.111,P=0.023;0.262 ± 0.091 vs. 1.153 ± 0.057,P=0.001),而 SIRT1 的表达同样明显降低(0.472 ± 0.034 vs. 1.013 ± 0.098,P=0.040)。高糖组的细胞凋亡率明显升高(14.550 ± 1.624 vs. 9.547 ± 0.685,P=0.032)。在动物模型中,GDM 组的 AKT-mTOR 磷酸化水平明显降低(0.527 ± 0.080 vs 1.000 ± 0.055,P=0.003;0.418 ± 0.059 vs. 1.000 ± 0.084,P=0.001)。**结论**:宫内高血糖环境可能通过抑制胎盘 AKT-mTOR 信号通路,从而编程子代的发育轨迹。

【关键词】妊娠期糖尿病;胎盘;AKT;mTOR;SIRT1

【中图分类号】R714.25　　**【文献标志码】**A　　**【收稿日期】**2016-11-24

Gestational diabetes mellitus impairs AKT-mTOR and SIRT1 signaling pathways in placenta

Zhang Li[1], Yu Xingyang[1], Xu Ping[1], Philip N. Baker[2], Qi Hongbo[1], Tong Chao[1], Zhang Hua[1]

(1. Department of Obstetrics and Gynecology, The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, China-Canada-New Zealand Joint Laboratory of Maternal and Fetal Medicine, Chongqing Medical University;
2. College of Medicine, Biological Sciences and Psychology, University of Leicester)

【Abstract】*Objective*: To explore the role of AKT-mTOR signaling pathway and SIRT1 in fetal growth and development programming of gestational diabetes mellitus(GDM). ***Methods***: Fifteen cases of GDM and 15 cases of normal maternal placental tissue were collected in the First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University from December 2014 to June 2015. Western blot was used to detect the expression of AKT-mTOR and SIRT1 in human placenta. Human transformed primary extravillous trophoblast cell line(HTR8/SVneo) cells were used to establish the model of GDM, which were divided into normal group, osmotic control, and high glucose group. After the treatment, the expressions of AKT-mTOR and SIRT1 were detected by Western blot; Flow cytometry was used to detect the apoptosis rate in each group. On day 18.5 of gestation, db/+ mice were anesthetized with pentobarbitone and a caesarean section was performed. The placentas were excised and frozen immediately for genotyping, and then the wild type placentas were selected for GDM group. C57 mice placentas were control group(normal). Then the expressions of AKT-mTOR were detected by Western blot. ***Results***: The phosphorylation of AKT and mTOR in placenta of GDM group was significantly lower than that of normal group (0.347 ± 0.031 vs. 1.000 ± 0.175, P=0.004; 0.465 ± 0.045 vs. 1.000 ± 0.098, P=0.000). Similarly, the expression of SIRT1 was obviously decreased in GDM group than in normal group (0.682 ± 0.055 vs. 1.000 ± 0.127, P=0.044). In the cell model, high glucose could decrease AKT and mTOR phosphorylation

作者介绍:张　莉,Email:Morcherl@163.com,
研究方向:妊娠期糖尿病。

通信作者:张　华,Email:zh2844@gmail.com。

优先出版:http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.r.20170426.1820.054.html (2017-04-26)

(0.512 ± 0.056 vs. 1.103 ± 0.111, *P*=0.023; 0.262 ± 0.091 vs. 1.153 ± 0.057, *P*=0.001) and SIRT1 expression(0.472 ± 0.034 vs. 1.013 ± 0.098, *P*=0.040). The apoptosis rate in high glucose group was significantly increased than that in normal group(14.550 ± 1.624 vs. 9.547 ± 0.685, *P*=0.032). In the animal model, the phosphorylation of AKT and mTOR also was significantly decreased in GDM group (0.527 ± 0.080 vs. 1.000 ± 0.055, *P*=0.003; 0.418 ± 0.059 vs. 1.000 ± 0.084, *P*=0.001). ***Conclusion***: The intrauterine environment of high glucose may inhibit placental AKT-mTOR signaling pathways, thereby programming offspring development track.

【Key words】gestational diabetes mellitus; placenta; AKT; mTOR; SIRT1

妊娠期糖尿病（gestational diabetes mellitus，GDM）是指在妊娠期发生或首次发现的不同程度的糖代谢异常[1]，近年来其发病率逐年升高[2]。研究表明，GDM 产妇在远期发生 2 型糖尿病、心血管疾病的风险明显增加[3]。GDM 不仅影响产妇的身体健康，宫内高糖环境还使胎儿发育为巨大胎儿的风险增加[4]。有文献报道，胎儿脂肪和肌肉的含量可以展现其各自独特的生长方式[5]。体成分分析结果表明，GDM 胎儿特别是巨大儿的手臂、大腿、腹部等皮下脂肪含量较正常出生体重儿明显增多，但其肌肉比例却明显下降，导致肩难产、剖宫产率明显增加[6-7]，然而目前尚不明确何种机制介导了 GDM 导致的巨大儿体成分失衡。AKT-mTOR 信号通路在细胞的生长、分化和蛋白质合成等过程中起着重要作用，并且与肥胖及代谢紊乱等疾病有关[8]。

胎盘介导的营养物质转运是联系母体营养状况与胎儿生长发育的纽带[9]。有研究指出，AKT-mTOR 信号通路作为重要的营养传感器，可通过调节胎盘氨基酸的转运实现对蛋白质的转运功能，最终影响胎儿的生长发育[10-12]，然而其是否参与宫内高血糖对新生儿体成分的调控尚未见报道；SIRT1 属于多功能的 NAD+依赖性的蛋白脱乙酰酶，它与众多肿瘤细胞以及人体细胞衰老过程相关，利用合成小分子激活 SIRT1 可通过加强脂肪氧化从而改善小鼠的代谢紊乱[13]。同样，对小鼠基因敲除 SIRT1 可导致脂肪酸代谢紊乱引起脂肪肝[14]，证实其对于脂肪酸代谢具有重要调控作用。本研究通过比较 GDM 胎盘与正常妊娠胎盘 AKT-mTOR 信号通路和 SIRT1 的表达水平，并建立高糖诱导的滋养细胞GDM 模型和利用公认的 GDM 小鼠模型[15-16]，深入探讨 AKT-mTOR 信号通路与 SIRT1 在 GDM 编程胎儿生长发育中的作用。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 胎盘组织 实验组选取 2014 年 12 月至 2015 年 6 月在重庆医科大学附属第一医院产科收治的 GDM 患者胎盘 15 例，诊断标准参照文献[1]；正常组选取同期孕晚期血压正常孕妇胎盘 15 例；所有研究对象均为单胎，以剖宫产终止妊娠，麻醉方式相同；既往无其他合并症，且孕期无感染性疾病。本研究获得重庆医科大学伦理委员会批准，受试者均知情并同意。

1.1.2 实验动物 8 周龄 C57BL/KsJ-db/+(db/+)杂合雌鼠和雄鼠由南京大学模式动物研究所提供。实验动物饲养于清洁级动物房，每日恒定光照 12 h，夏季温度 20 ℃~25 ℃，冬季温度 24~25 ℃，常年 60%相对湿度，自由饮食和饮水。将纯合雄鼠与杂合雌鼠以 1:2 的比例进行合笼，次日早上检查到雌鼠阴道栓为交配成功，与雄鼠分开饲养，并记为妊娠 0.5 d；当雌鼠妊娠至 18.5 d 时，深度麻醉加高浓度 CO_2 窒息处死后，立即收集胎盘组织于液氮中，再保存于-80 ℃超低温冰箱。本研究经重庆医科大学实验动物伦理委员会审查批准。

1.1.3 主要试剂 多克隆兔抗 AKT 抗体(#9272; Cell Signaling Technology)；多克隆兔抗 P-AKT(Ser473)抗体(#9271; Cell Signaling Technology)；单克隆兔抗 mTOR 抗体(#2983; Cell Signaling Technology)；单克隆兔抗 P-mTOR(S2448)抗体(ab109268; Abcam)；SIRT1(ab32441; Abcam)；β-actin(TA-09, ZSGB-BIO)。

1.2 方法

1.2.1 细胞及处理分组 HTR8/SVneo 细胞株由加拿大皇后大学 Graham 教授惠赠，用含 10%胎牛血清(Gibco)的 D-MEM 培养基(Gibco)培养。细胞长满瓶底 40%~50%时开始不同处理。细胞实验分组：空白对照组(空白对照)，渗透对照组(甘露醇，M4125; Sigma)，高糖组(葡萄糖)，在 37 ℃、5% CO_2、20% O2 孵箱中培养 48 h。甘露醇、葡萄糖分别用完全培养基稀释至工作浓度 30 *mmol/L*。

1.2.2 Western blot 将提取的组织和细胞蛋白浓度调至 1 μg/μL，分别取 20 μL 加入 SDS-聚丙烯酰胺进行电泳，后转至 PVDF 膜上，5%脱脂牛奶封闭 1 h，一抗(AKT、P-AKT、mTOR、P-mTOR、SIRT1、β-actin)4 ℃过夜。二抗室温孵育 1 h。ECL 试剂盒(Millipore 公司，德国)行化学发光显影。

1.2.3 流式细胞术 经过甘露醇和高糖处理的细胞于 6 孔板中培养 48 h 后，用冰 PBS 洗 2 次，胰酶消化离心收集后置于 Annexin V-FITC 和 PI 结合液中 20 min。然后用 Influx 流

式细胞仪（BD Biosciences，San Jose，CA，USA）对染色细胞进行分析，即早期凋亡与晚期凋亡细胞之和。

1.3 统计分析

采用 GraphPad Prism 5.0 软件进行统计学分析。数据以均数 ± 标准差（$\bar{x} \pm s$）表示，2 组均数间的比较采用独立样本 t 检验；多组间的均数比较采用单因素方差分析，并应用 Tukey 检验作两两比较。Western blot 灰度值采用 Image Lab Software 软件进行分析。检验水准 α=0.05。

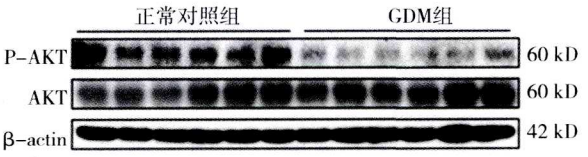
2 结 果

2.1 患者特征

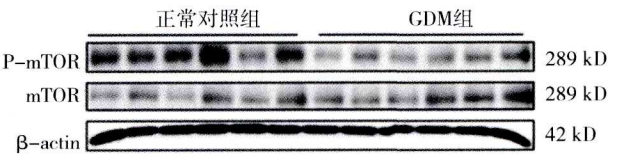
2 组孕妇在年龄、孕周、体质指数（body mass index，BMI）、血压和胎盘质量方面没有统计学差异。然而，GDM 孕妇的血糖值和胎儿出生体质量均明显高于正常对照组（P=0.000）。见表 1。

2.2 AKT-mTOR 信号通路表达水平在 GDM 组胎盘中表达下降

Western blot 检测结果显示，AKT 在孕晚期胎盘组织中存在表达，并且其表达量在 2 组间没有明显差异（t=0.318，P=0.757）；但 GDM 组胎盘组织中 P-AKT Ser473 的表达水平明显低于正常对照组，差异有统计学意义（t=0.686，P=0.004）。与之类似，mTOR 蛋白表达水平在 2 组间也无差异（t=1.506，P=0.163），而 P-mTOR S2448 在 GDM 组胎盘组织中的表达也明显低于正常对照组，差异有统计学意义（t=4.977，P=0.000）。见表 2，图 1。



A. P-AKT 和 AKT 蛋白在 GDM 组和正常对照组中的表达



B. P-mTOR 和 mTOR 蛋白在 GDM 组和正常对照组中的表达

图 1 Western blot 检测胎盘组织中 AKT-mTOR 信号通路的表达

Fig.1 AKT-mTOR signaling pathway expression in placenta detected by Western blot

2.3 SIRT1 表达水平在 GDM 组胎盘中表达下降

SIRT1 在孕晚期正常胎盘组织中具有较高的蛋白表达水平，然而在 GDM 组胎盘中 SIRT1 表达水平（0.682 ± 0.055）明显低于正常对照组（1.000 ± 0.127），差异有统计学意义（t=2.298，P=0.044），如图 2 所示。

表 1 患者一般资料

Tab.1 General information of the patients

资料项目	正常对照组（n=15）	GDM组（n=15）	t 值	P 值
年龄（岁）	28.87 ± 0.80	29.93 ± 1.05	0.807	0.430
孕周	39.26 ± 0.23	39.31 ± 0.14	0.176	0.860
孕前 BMI（kg/m²）	21.42 ± 0.81	22.52 ± 0.92	0.894	0.380
孕晚期 BMI（kg/m²）	28.00 ± 1.00	29.00 ± 0.91	0.735	0.470
空腹血糖（mmol/L）	4.49 ± 0.06	5.53 ± 0.18	5.613	0.000
餐后 1 h 血糖（mmol/L）	7.16 ± 0.30	9.87 ± 0.45	4.974	0.000
餐后 2 h 血糖（mmol/L）	5.11 ± 0.16	8.84 ± 0.30	10.940	0.000
血压（mmHg）				
收缩压	112.10 ± 1.79	116.70 ± 2.45	1.517	0.140
舒张压	68.07 ± 1.44	68.20 ± 1.41	0.066	0.950
胎儿体质量（g）	3 219.00 ± 74.27	4 025.00 ± 127.40	5.464	0.000
胎盘质量（g）	561.30 ± 11.08	582.70 ± 24.09	0.805	0.430

表 2 胎盘组织中 AKT-mTOR 信号通路蛋白水平的比较分析

Tab.2 Comparative analysis of AKT-mTOR signaling pathway protein level in placenta

组别	AKT蛋白水平	P-AKT蛋白水平	mTOR蛋白水平	P-mTOR蛋白水平
正常对照组（n=15）	1.000 ± 0.123	1.000 ± 0.175	1.000 ± 0.103	1.000 ± 0.098
GDM 组（n=15）	0.957 ± 0.058	0.347 ± 0.031	1.224 ± 0.107	0.465 ± 0.045
t 值	0.318	3.686	1.506	4.977
P 值	0.757	0.004	0.163	0.000

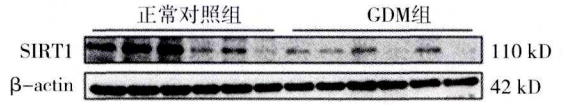
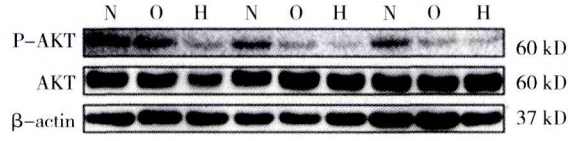


图 2 Western blot 检测胎盘组织中 SIRT1 的表达

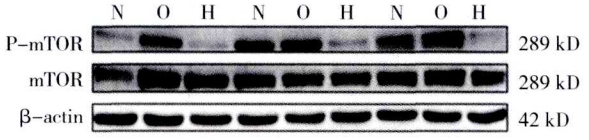
Fig.2 SIRT1 expression in placenta detected by Western blot

2.4 高糖环境抑制 HTR8/SVneo 细胞中的 AKT-mTOR 信号通路

经 30 mmol/L 葡萄糖处理 48 h 后，HTR8/SVneo 细胞 AKT 蛋白表达水平与空白对照组（P=0.713）及渗透对照组（P=0.550）相比均无明显差异。但 AKT Ser473 磷酸化水平在高糖组的表达均明显低于空白对照组（P=0.049）及渗透对照组（P=0.023）。同样，mTOR 蛋白表达水平与空白对照组（P=0.578）及渗透对照组（P=0.681）相比无明显差异。但 mTOR S2448 磷酸化水平在高糖组的表达均明显低于空白对照组（P=0.001）及渗透对照组（P=0.001）。见图 3、表 3。



A. 高糖影响 P-AKT 和 AKT 蛋白表达水平



N、O、H 分别代表空白对照组、渗透对照组和高糖组

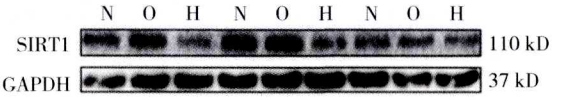
B. 高糖影响 P-mTOR 和 mTOR 蛋白表达水平

图 3 高糖对滋养细胞 AKT-mTOR 信号通路蛋白表达的影响

Fig.3 Effect of hyperglycemia on the expression of AKT-mTOR signaling pathway in HTR8/SVneo cells

2.5 高糖环境抑制 HTR8/SVneo 细胞 SIRT1 表达水平

结果显示，各组间 SIRT1 表达水平有差异（F=6.857，P=0.028），并且在高糖组的表达明显低于空白对照组及渗透对照组，差异均有统计学意义（0.472 ± 0.034 vs. 1.000 ± 0.176，P=0.044；0.472 ± 0.034 vs. 1.013 ± 0.098，P=0.040），如图 4 所示。



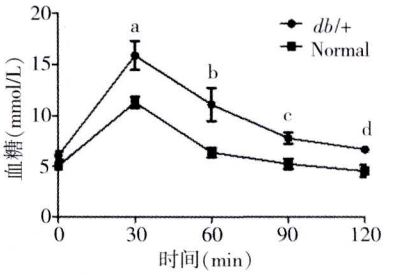
N、O、H 分别代表空白对照组、渗透对照组和高糖组

图 4 高糖对滋养细胞 SIRT1 蛋白表达的影响

Fig.4 Effect of high glucose on the expression of SIRT1 in HTR8/SVneo cells

2.6 高糖环境诱导 HTR8/SVneo 细胞凋亡

流式细胞术结果显示，各组细胞凋亡率有差异（F=13.220，P=0.006），在高糖组明显高于空白对照组及渗透对照组，差异有统计学意义（14.550 ± 1.624 vs. 7.263 ± 0.209，P=0.006；14.550 ± 1.624 vs. 9.547 ± 0.685，P=0.032）（图 5，表4）。



注：与 Normal 组比较，a：P=0.013；b：P=0.020；c：P=0.007；d：P=0.009

图 5 2 组雌性小鼠 OGTT 结果比较

Fig.5 OGTT results between two groups

2.7 GDM 小鼠胎盘中 AKT-mTOR 信号通路受到抑制

孕鼠于 17.5 d 行 OGTT 结果显示，2 组间的血糖值有明显差异，并且 db/+孕鼠的血糖值在 30、60 min 和 90、120 min 均明显高于对照组，差异有统计学意义，提示 db/+孕鼠具有 GDM 的高血糖表型。经 PCR 法进行基因分型，选取野生型子代（GDM 组）胎盘与对照组子代（Normal 组）胎盘进行比较。Western blot 结果显示，AKT 表达量在 2 组间没有明显差异（P=0.278）。AKT Ser473 磷酸化水平在 GDM 组胎盘中的表达明显低于 Normal 组，差异有统计学意义（P=0.003）。作为 AKT 的下游信号分子，mTOR 表达量在 2 组间没有明显差异（P=0.796），但 mTOR S2448 磷酸化水平在 GDM 组小鼠胎盘的表达同样明显低于 Normal 组，差异有统计学意义（P=0.001）（图 6，表 5）。

表 3 各组细胞中 AKT-mTOR 信号通路蛋白表达的比较分析

Tab.3 Comparative analysis of AKT-mTOR signaling pathway expression in each group

组别	例数	AKT蛋白水平	P-AKT蛋白水平	mTOR蛋白水平	P-mTOR蛋白水平
空白对照组	3	1.000 ± 0.209	1.003 ± 0.150	1.000 ± 0.244	1.000 ± 0.083
渗透对照组	3	0.925 ± 0.208[a]	1.103 ± 0.111[d]	1.485 ± 0.121[g]	1.153 ± 0.057[j]
高糖组	3	1.208 ± 0.113[bc]	0.512 ± 0.056[ef]	1.267 ± 0.150[hi]	0.262 ± 0.091[kl]
F 值		0.646	7.932	1.829	37.270
P 值		0.557	0.021	0.240	0.000

注：a，与空白对照组比较，P=0.955；b：与空白对照组比较，P=0.713；c：与渗透对照组比较，P=0.550；d：与空白对照组比较，P=0.812；e：与空白对照组比较，P=0.049；f：与渗透对照组比较，P=0.023；g：与空白对照组比较，P=0.216；h：与空白对照组比较，P=0.578；i：与渗透对照组比较，P=0.681；j：与空白对照组比较，P=0.404；k：与空白对照组比较，P=0.001；l：与渗透对照组比较，P=0.001

表 4 小鼠 OGTT 结果比较分析

Tab.4 Comparative analysis of OGTT between two groups

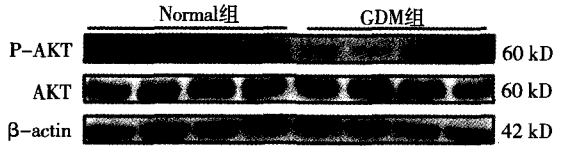
组别	0 min	30 min	60 min	90 min	120 min
Normal组（n=6）	5.033 ± 0.239	11.300 ± 0.562	6.383 ± 0.499	5.233 ± 0.507	4.533 ± 0.578
GDM 组（n=6）	6.050 ± 0.414[a]	15.900 ± 1.423[b]	11.100 ± 1.636[c]	7.767 ± 0.561[d]	6.683 ± 0.338[e]
组间比较			F=13.452，P=0.004		
时间点比较			F=23.002，P=0.000		
组 × 时间点			F=1.543，P=0.289		

注：整体分析为重复测量方差分析；与 Normal 组比较，a：P=0.059；b：P=0.013；c：P=0.020；d：P=0.007；e：P=0.009

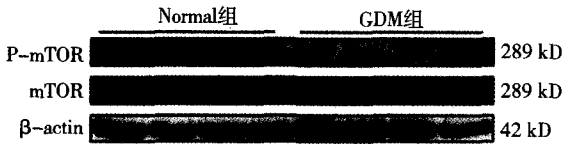
表 5 胎盘组织中 AKT-mTOR 信号通路蛋白水平的比较分析

Tab.5 Comparative analysis of AKT-mTOR signaling pathway protein level in placenta

组别	AKT蛋白水平	P-AKT蛋白水平	mTOR蛋白水平	P-mTOR蛋白水平
Normal组（n=4）	1.000 ± 0.066	1.000 ± 0.055	1.000 ± 0.266	1.000 ± 0.084
GDM 组（n=4）	1.154 ± 0.111	0.527 ± 0.080	1.096 ± 0.235	0.418 ± 0.059
t 值	1.194	4.882	0.270	5.689
P 值	0.278	0.003	0.796	0.001



A. P-AKT 和 AKT 蛋白在 GDM 和 Normal 小鼠中的表达



B. P-mTOR 和 mTOR 蛋白在 GDM 和 Normal 组中的表达

图 6 Western blot 检测小鼠胎盘组织中 AKT-mTOR 信号通路的表达

Fig.6 AKT-mTOR signaling pathway expression in mice placenta detected by Western blot

3 讨 论

妊娠期糖尿病作为一种妊娠特发性疾病，与不良妊娠结局，如巨大儿、新生儿代谢紊乱和产伤发生率的增加密切相关[17]。其发病机制主要是与胎儿长期处于母体高血糖所致的高胰岛素血症环境中导致的躯体过度发育有关。巨大儿作为 GDM 的最常见并发症，是指出生体质量≥4 000 g 的活产新生儿[18]。对重庆医科大学附属第一医院 2014 年 1 月 1 日至 2014 年 12 月 31 日产科 5 385 例入院产妇进行统计，在 4 504 例正常产妇中，巨大儿为 206 例，发病率为 4.57%。而在 881 名 GDM 产妇中，巨大儿为 92 例，发病率为 10.44%，差异有统计学意义（P=0.000）。有研究报道，GDM 后代的体质量明显高于正常[19-20]，且远期发生肥胖、2 型糖尿病、心血管疾病的概率增加[21]。

胎盘介导的营养物质传递将决定胎儿生长与发育。对于巨大儿，胎盘更是要有潜在的能力去支持它的生长发育。为了鉴别胎儿异常生长，了解胎盘发育，潜在的胎盘功能及其调节机制是很重要的[22]。

AKT-mTOR 信号通路参与介导细胞的生长、分化和蛋白合成等过程[8]。而 SIRT1 在脂肪生成、脂肪分解等脂代谢活动中扮演重要角色，故它们与 GDM 的关系逐渐被重视[9,23]。本研究于 GDM 患者的胎盘组织中发现 AKT-mTOR 磷酸化水平和 SIRT1 的表达水平均明显降低，表明胎盘组织中蛋白合成能力降低，但其脂肪酸氧化利用减少，提示宫内高血糖环境可能是通过抑制 AKT-mTOR 和 SIRT1，上调 GDM 子代的体脂率，进而增加巨大儿的风险。

为了进一步验证 AKT-mTOR 和 SIRT1 在GDM 中的作用，对 HTR8 细胞进行高糖处理模拟 GDM 体外实验模型，同样可以观察到在高糖组 AKT-mTOR 磷酸化水平和 SIRT1 的表达水平均明显降低。而 AKT 作为丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶，在维持细胞周期运行、促进细胞生长增殖和抑制细胞凋亡中起重要作用[24]。本研究也发现，细胞凋亡同样在高糖组要明显高于正常组。

转基因瘦素受体突变（db/+）小鼠是研究 GDM 的经典模型[15]，此模型的特点是非妊娠期小鼠血糖

和胰岛素水平正常，而妊娠期出现胰岛素抵抗、高血糖等 GDM 相关表现[16]。有研究表明，db/+小鼠较 WT 小鼠 IRS-1、PI3K 磷酸化水平明显降低，说明胰岛素信号通路在 db/+小鼠是受损的[25]。而本研究将 db/+母鼠的野生型子代胎盘为 GDM 组，C57 子代胎盘为对照组进行比较，进一步排除了 db/+对相关信号通路的影响，而能够较为准确的体现宫内高血糖环境对子代的影响。AKT-mTOR 磷酸化水平在 GDM 小鼠胎盘中均明显降低，表明 GDM 小鼠胎盘的蛋白合成能力是降低的，与本课题组在人 GDM 中的发现一致。然而，GDM 巨大儿的发生是否与糖代谢异常有关还值得深入探讨。同时，本研究也存在一些不足之处，没有进一步验证是否能通过调节AKT-mTOR 信号通路改善 GDM 子代体脂率，从而得到更为准确可靠的结论。

综上所述，GDM 诱导的宫内高血糖环境能够抑制胎盘中 AKT-mTOR 信号通路和 SIRT1 表达水平，这可能与 GDM 子代体脂率升高及巨大儿发生相关。因此，进一步深入探讨 AKT-mTOR 信号通路和 SIRT1 在宫内高血糖环境下对蛋白质合成及脂肪酸代谢的作用，将有可能为降低 GDM 巨大儿发生率寻找到新的干预靶点。

参 考 文 献

[1] American Diabetes Association. Classification and diagnosis of diabetes[J]. Diabetes Care, 2016, 39(s1): 13-22.

[2] Buchanan TA, Xiang AH, Page KA. Gestational diabetes mellitus: risks and management during and after pregnancy[J]. Nat Rev Endocrinol, 2012, 8(11): 639-649.

[3] Simmons D. Diabetes: diabetes risk after gestational diabetes mellitus[J]. Nat Rev Endocrinol, 2009, 5(12): 646-648.

[4] Landon MB, Rice MM, Varner MW, et al. Mild gestational diabetes mellitus and long-term child health [J]. Diabetes Care, 2015, 38(3): 445-452.

[5] Bernstein IM, Goran MI, Amini SB, et al. Differential growth of fetal tissues during the second half of pregnancy[J]. Am J Obstet Gynecol, 1997, 176(1Pt1): 28-32.

[6] Larciprete G, Valensise H, Vasapollo B, et al. Fetal subcutaneous tissue thickness(SCTT) in healthy and gestational diabetic pregnancies [J]. Ultrasound Obstet Gynecol, 2003, 22(6): 591-597.

[7] de Santis MS, Taricco E, Radaelli T, et al. Growth of fetal lean mass and fetal fat mass in gestational diabetes[J]. Ultrasound Obstet Gynecol, 2010, 36(3): 328-337.

[8] Laplante M, Sabatini DM. mTOR signaling in growth control and disease[J]. Cell, 2012, 149(2): 274-293.

[9] Martino J, Sebert S, Segura MT, et al. Maternal body weight and gestational diabetes differentially influence placental and pregnancy outcomes[J]. J Clin Endocrinol Metab, 2016, 101(1): 59-68.

[10] Roos S, Jansson N, Palmberg I, et al. Mammalian target of rapamycin in the human placenta regulates leucine transport and is down-regulated in restricted fetal growth[J]. J Physiol, 2007, 582(Pt1): 449-459.

[11] Jansson T, Aye IL, Goberdhan DC. The emerging role of mTORC1 signaling in placental nutrient-sensing[J]. Placenta, 2012, 33(S2): e23-29.

[12] Kavitha JV, Rosario FJ, Nijland MJ, et al. Down-regulation of placental mTOR, insulin/IGF-I signaling, and nutrient transporters in response to maternal nutrient restriction in the baboon[J]. FASEB J, 2014, 28(3): 1294-1305.

[13] Feige JN, Lagouge M, Canto C, et al. Specific SIRT1 activation mimics low energy levels and protects against diet-induced metabolic disorders by enhancing fat oxidation[J]. Cell Metab, 2008, 8(5): 347-358.

[14] Purushotham A, Schug TT, Xu Q, et al. Hepatocyte-specific deletion of SIRT1 alters fatty acid metabolism and results in hepatic steatosis and inflammation[J]. Cell Metab, 2009, 9(4): 327-338.

[15] Hummel KP, Dickie MM, Coleman DL. Diabetes, a new mutation in the mouse[J]. Science, 1966, 153(3740): 1127-1128.

[16] Yamashita H, Shao J, Qiao L, et al. Effect of spontaneous gestational diabetes on fetal and postnatal hepatic insulin resistance in Lepr (db/+) mice[J]. Pediatr Res, 2003, 53(3): 411-418.

[17] Waters TP, Dyer AR, Scholtens DM, et al. Maternal and neonatal morbidity for women who would be added to the diagnosis of gdm using iadpsg criteria: a secondary analysis of the hyperglycemia and adverse pregnancy outcome study[J]. Diabetes Care, 2016, 39(12): 2204-2210.

[18] Wang D, Hong Y, Zhu L, et al. Risk factors and outcomes of macrosomia in China: a multicentric survey based on birth data[J]. J Matern Fetal Neonatal Med, 2017, 30(5): 623-627.

[19] Logan KM, Emsley RJ, Jeffries S, et al. Development of early adiposity in infants of mothers with gestational diabetes mellitus[J]. Diabetes Care, 2016, 39(6): 1045-1051.

[20] Kubo A, Ferrara A, Windham GC, et al. Maternal hyperglycemia during pregnancy predicts adiposity of the offspring[J]. Diabetes Care, 2014, 37(11): 2996-3002.

[21] Brewster S, Zinman B, Retnakaran R, et al. Cardiometabolic consequences of gestational dysglycemia[J]. J Am Coll Cardiol, 2013, 62(8): 677-684.

[22] Reynolds LP, Caton JS, Redmer DA, et al. Evidence for altered placental blood flow and vascularity in compromised pregnancies[J]. J Physiol, 2006, 572(Pt1): 51-58.

[23] Gui J, Potthast A, Rohrbach A, et al. Gestational diabetes induces alterations of sirtuins in fetal endothelial cells[J]. Pediatr Res, 2016, 79(5): 788-798.

[24] Franke TF, Kaplan DR, Cantley LC. PI3K: downstream AKTion blocks apoptosis[J]. Cell, 1997, 88(4): 435-437.

[25] Ishizuka T, Klepcyk P, Liu S, et al. Effects of overexpression of human GLUT4 gene on maternal diabetes and fetal growth in spontaneous gestational diabetic C57BLKS/J Lepr(db/+) mice[J]. Diabetes, 1999, 48(5): 1061-1069.

（责任编辑：冉明会）