妊娠合并症

DOI:10.13406/j.cnki.cyxb.001343

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

杨晓涛，韩顶立，Philip N. Baker，漆洪波，童　超，杨　竹
（重庆医科大学附属第二医院妇产科、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　400010）

【摘　要】**目的**：探讨滋养细胞体外缺氧不同处理方法模拟子痫前期模型的优化研究。**方法**：HTR8/SVneo 滋养细胞分别在 1%O_2（缺氧环境）和 21%O_2（常氧环境）培养箱中培养 1 h（记为 H_1、N_1）或 2 h（记为 H_2、N_2），缺氧 1 h 后复氧 1 h（记为 H_1R_1）和缺氧 2 h 后复氧 2 h（记为 H_2R_2），H_1R_1 后再缺氧 1 h（记为 $H_1R_1H_1$），H_2R_2 后再缺氧 2 h（记为 $H_2R_2H_2$），H_1R_1 2 个循环（记为 $H_1R_1H_1R_1$）和 H_2R_2 2 个循环（记为 $H_2R_2H_2R_2$），缺氧 2 h 后复氧 6 h（记为 H_2R_6），持续缺氧 24 h，以及持续常氧 4 h（记为 N_4）、8 h（记为 N_8）和 24 h（记为 Normoxia），然后提取蛋白以 Western blot 检测腺苷酸活化蛋白激酶（AMP-activated protein kinase，AMPK）磷酸化水平，以验证各组处理对于诱导滋养细胞能量应激的效果；HTR8/SVneo 滋养细胞在常氧或者缺氧环境培养 24 h 后经气相质谱技术（gas chromatography mass spectrum，GS-MS）进行细胞代谢组学分析，以验证 AMPK 磷酸化水平上调是否与滋养细胞代谢组变化具有一致性。**结果**：缺氧组 AMPK 的活性（1.615 ± 0.111）明显高于常氧组（1.000 ± 0.107）和缺氧复氧组（1.277 ± 0.113）；缺氧时显著增加的代谢物有 4-甲基-2-戊酮酸（log_2 2.597 为 1.377）、水合乙醛酸（log_2 2.483 为 1.312）、组氨酸（log_2 1.188 为0.248）、苯丙氨酸（log_2 1.262 为 0.335）、缬氨酸（log_2 1.518 为 0.602）、正亮氨酸（log_2 1.519 为 0.603）、乙酰丝氨酸（log_2 1.691 为 0.758）、丝氨酸（log_2 1.783 为 0.834）、半胱氨酸（log_2 1.851 为 0.889）、蛋氨酸（log_2 2.072 为 1.051）、鸟氨酸（log_2 2.251 为 1.170）等；而棕榈反油酸（log_2 0.127 为-2.983）、11,14,17-廿碳三烯酸（log_2 0.334 为-1.583）、二十四单烯酸（log_2 0.600 为-0.738）、共轭亚油酸（log_2 0.680 为-0.557）、顺式十八碳烯酸（log_2 0.711 为-0.492）、9-十七碳烯酸（log_2 0.782 为-0.355）、二十二碳六烯酸（log_2 0.829 为-0.271）、二十碳五烯酸（log_2 0.841 为-0.250）、芥酸（log_2 0.844 为-0.244）、二十二碳五烯酸（log_2 0.898 为-0.156）、柠檬酸（log_2 0.279 为-1.842）、苹果酸（log_2 0.208 为-2.264）、琥珀酸（log_2 0.254 为-1.980）、顺乌头酸（log_2 0.260 为-1.946）、β-柠檬酸-左旋谷氨酸（log_2 0.093 为-3.430）、β-丙氨酸（log_2 0.139 为-2.851）、胱硫醚（log_2 0.267 为-1.904）、顺式-4-羟脯氨酸（log_2 0.500 为-1.000）等在缺氧时显著降低。代谢途径结果分析显示缺氧时滋养细胞中核苷酸代谢[log_2(1.811、1.149)分别为 0.857、0.201]、能量代谢[log_2(1.510、1.173、1.149)分别为 0.595、0.230、0.201]、维生素代谢[log_2(1.045、1.052、1.125)分别为 0.064、0.073、0.170]、氨基酸代谢[log_2(1.245、1.020、1.027、1.123、1.127、1.076)分别为 0.316、0.028、0.039、0.167、0.173、0.106]、信号转导（log_2 1.046 为 0.065）、蛋白翻译（log_2 1.026 为 0.037）等途径被激活，而碳水化合物[log_2(0.857、0.857、0.799)分别为-0.222、-0.222、-0.323]、脂肪酸[log_2(0.944、0.912、0.826)分别为-0.083、-0.133、-0.276]、内分泌代谢[log_2(0.885、0.799、0.799)分别为-0.176、-0.323、-0.323]和其他第二代谢物生物合成[log_2(0.947、0.871、0.743)分别为-0.079、-0.199、-0.428]等代谢途径显著受到抑制。**结论**：单纯缺氧模型更适合用于子痫前期病理生理机制的体外研究。

【关键词】子痫前期；HTR8/SVneo 滋养细胞；缺氧；腺苷酸活化蛋白激酶；气相质谱技术
【中图分类号】R714.2　　【文献标志码】A　　【收稿日期】2017-01-18

Optimization of trophoblast cell model in preeclampsia induced by hypoxia *in vitro* and metabonomics analysis

Yang Xiaotao, Han Dingli, Philip N. Baker, Qi Hongbo, Tong Chao, Yang Zhu
(*Department of Gynaecology and Obstetrics, the Second Affiliated Hospital, China-Canada-New Zealand Joint Laboratory of Maternal and Fetal Medicine, Chongqing Medical University*)

【Abstract】***Objective***: To investigate the optimal in vitro hypoxia cell mode for preeclampsia study. ***Methods***: Western blot was used to determine the phosphorylation of AMPK after HTR8/SVneo trophoblast cell being treated with 1%O_2 (hypoxia condition) or 21%O_2 (normoxia condition) for various duration. GC-MS was used for assessing metabolome of HTR8/SVneo trophoblast cell after being incubated in normoxia or hypoxia environment, to validate the synchronous alteration in AMPK phosphorylation and metabolome. ***Results***: The activity of AMPK was higher in

作者介绍：杨晓涛，Email：xiaotaocqmu@163.com，研究方向：子痫前期发病机制的研究。
通信作者：杨　竹，Email：cqyangz@vip.163.com。
基金项目：国家自然科学基金面上资助项目（编号：81671488）；重庆市教育委员会资助项目（编号：KJ1500223）；重庆医科大学资助项目（编号：CYYQ201507）。
优先出版：http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20170626.1142.008.html（2017-06-26）

hypoxia group (1.615 ± 0.111) than in normoxia group (1.000 ± 0.107) and hypoxia/reoxygenation group (1.277 ± 0.113). The increased metabonomics of the HTR8/SVneo trophoblast cell induced by hypoxia were 4-methyl-2-oxopentanoic acid (log_2 2.597=1.377), glyoxylic acid (log_2 2.483=1.312), histidine (log_2 1.188=0.248), phenylalanine (log_2 1.262=0.335), valine (log_2 1.518=0.602), norleucine (log_2 1.519=0.603), O-aacetylserine (log_2 1.691=0.758), serine (log_2 1.783=0.834), cysteine (log_2 1.851=0.889), methionine (log_2 2.072=1.051), ornithine (log_2 2.251=1.170). But palmitelaidic acid (log_2 0.127=-2.983), 11, 14, 17-eicosatrienoic acid (log_2 0.334=-1.583), nervonic acid (log_2 0.600=-0.738), conjugated linoleic acid (log_2 0.680=-0.557), cis-vaccenic acid (log_2 0.711=-0.492), 9-heptadecenoic acid (log_2 0.782=-0.355), DHA (log_2 0.829=-0.271), EPA (log2 0.841=-0.250), erucic acid (log_2 0.844=-0.244), DPA ($log_2$0.898=-0.156), citric acid (log_2 0.279=-1.842), malic acid (log_2 0.208=-2.264), succinic acid (log_2 0.254=-1.980), cis-aconitic acid (log_2 0.260=-1.946), beta-citryl-L-glutamic acid (log_2 0.093=-3.430), beta-alanine (log_2 0.139=-2.851), cystathionine (log_2 0.267=-1.904), cis-4-hydroxyproline (log_2 0.500=-1.000) were decreased in hypoxia group. The metabolic pathway analysis shown the nucleotide metabolism [log_2(1.811、1.149)=0.857, 0.201], the energy metabolism [log_2(1.510、1.173、1.149)=0.595, 0.230, 0.201], the metabolism of cofactors and vitamins [log_2(1.045、1.052、1.125)=0.064, 0.073, 0.170], the amino acid metabolism [log_2(1.245、1.020、1.027、1.123、1.127、1.076)=0.316, 0.028, 0.039, 0.167, 0.173, 0.106], the signal transduction (log_2 1.046=0.065), the translation (log_2 1.026=0.037) were activated in hypoxia group, but the carbohydrate metabolism [log_2(0.857、0.857、0.799)=-0.222, -0.222, -0.323], the lipid metabolism [log_2(0.944、0.912、0.826)=-0.083, -0.133, -0.276], the endocrine metabolism [log_2(0.885、0.799、0.799)=-0.176, -0.323, -0.323] and the biosynthesis of other secondary metabolites [log_2(0.947、0.871、0.743)=-0.079, -0.199, -0.428] were inhibited. ***Conclusion***: Hypoxia alone treated HTR8/SVneo cell model is more suitable for studying the physiopathologic mechanism of preeclampsia in vitro.

【Key words】preeclampsia; HTR8/SVneo trophoblast cell; hypoxia; AMP-activated protein kinase; gas chromatography mass spectrum

子痫前期（preeclampsia，PE）是一种常见的妊娠期高血压疾病，属于妊娠期特有的疾病，是引起母胎发病和死亡的重要原因[1]。其发病原因和机制研究甚多，但不明确，目前研究较为广泛的是胎盘滋养细胞缺血缺氧、血管内皮细胞的损伤、免疫调节功能的紊乱以及遗传、营养等因素[2-5]。经典的子痫前期发生“两阶段”学说指出第一阶段为临床前期，即子宫螺旋动脉滋养细胞重铸障碍，导致胎盘缺血、缺氧，释放多种胎盘因子；第二阶段胎盘因子进入母体血液循环，促进系统性炎症反应的激活及血管内皮损伤，引起子痫前期、子痫各种临床症状[6]。因此子痫前期也被认为是一种胎盘缺血性疾病，可能与滋养细胞代谢紊乱紧密相关[7]。腺苷酸活化蛋白激酶（AMP-activated protein kinase，AMPK）是生物能量代谢调节的关键分子，在多种代谢性疾病中发挥重要作用[8]。低氧、缺血、运动和营养缺乏都可以激活 AMPK，进而调节葡萄糖摄取和脂肪酸氧化维持细胞内的能量平衡。在多种细胞中，AMPK 磷酸化水平上调被认为是能量危机的标志[9]，然而目前国际上尚无研究采用 AMPK 磷酸化为标志验证相关低/缺氧诱导子痫前期滋养细胞模型是否成功建立。

目前主要的子痫前期病因学研究模型包括动物模型研究、体外细胞研究和体内细胞研究等[10-12]，而体外缺氧培养构建子痫前期模型是较常用的体外模拟滋养细胞。子痫前期体外缺氧模型的建立方法主要有 2 种，有的学者主张单纯缺氧模型[13-14]，而另外一些研究者支持缺氧复氧模型[15-16]，尚未有研究对上述 2 种方法在诱导滋养细胞缺氧的效率开展过比较研究。且在具体的模型建立过程中，对于滋养细胞缺氧、复氧的处理时间也未形成统一的意见与方案。

由于其缺血缺氧特征，子痫前期也被广泛认为是一种胎盘代谢性疾病。因此，已有众多研究利用代谢组学方法描绘子痫前期的特征性代谢图谱，试图筛选出子痫前期的早期预测或诊断标志物[17-18]。然而，多数研究采用外周血为检测样本，而关注子痫前期对胎盘及滋养细胞代谢组影响的研究极为有限，以 HTR8/SVneo 滋养细胞建立子痫前期模型的代谢组学研究目前尚未见报道。

在本研究中，本课题组通过不同方法对人滋养细胞系 HTR8/Svneo 滋养细胞进行体外缺氧处理，根据其 AMPK 磷酸化水平判断其缺氧效果，从而确定最优方案，目前使用的子痫前期滋养细胞体外研究模型在实验证据的支持下得到了进一步优化。并首次鉴定了 HTR8 滋养细胞的代谢图谱及缺氧诱导的子痫前期 HTR8 滋养细胞模型对代谢图谱的影响。

1 材料与方法

1.1 实验材料

一抗 AMPK(CST#5831)、p-AMPK Thr172(CST#2535)和 β-actin(CST#3700)由 Cell Signaling Technology 公司提供(Cell Signaling Technology,曼彻斯特,美国)。二抗辣根酶标记山羊抗小鼠 IgG(H+L)和辣根酶标记山羊抗兔 IgG(H+L)由中杉金桥公司提供(ZB-2305/2301,北京,中国)。抗体封闭液脱脂奶粉和化学发光仪 Image Lab 由百乐公司提供(BIO-RAD,加利福利亚,美国),ECL 显影试剂盒购自 Millipore 公司(Millipore,曼彻斯特,美国)。细胞培养箱(Thermo Fisher Scientific,贝辛斯托克,英国)由重庆医科大学中国-加拿大-新西兰联合母胎医学实验室提供。细胞质谱代谢分析仪为 Agilent Technology GC system(7890B,Agilent Technology,California,USA)耦合 MSD mass selective detector(EI)(5977A,Agilent Technology,California,USA)。测试用的气相柱是 ZB-1701 GC capillary column(0.15 μm × 250 μm id × 30 m with 5 m guard column,Phenomenex),由重庆医科大学中国-加拿大-新西兰联合母胎医学实验室提供。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞模型的建立 永生化的人早孕期绒毛外滋养细胞株 HTR8/SVneo 滋养细胞由中国科学院动物研究所王雁玲研究员惠赠。HTR8/SVneo 滋养细胞培养于 37 ℃常氧孵育箱(21%O_2),待其培养至 70%~80%时进行常氧(21%O_2)、缺氧(1%O_2)或者缺氧复氧(1%O_2/21%O_2)处理,处理后用 RIPA 裂解液(Beyotime Biotechnology,上海,中国)提取总蛋白。

1.2.2 Western blot 细胞蛋白提取后经 SDS-PAGE 凝胶分离蛋白,PVDF 转膜 2 h,5%脱脂奶粉室温封闭 1 h,一抗 4 ℃冰箱孵育过夜,二抗室温孵育 1 h,ECL 试剂盒进行化学发光显影(常氧组、缺氧组、缺氧复氧组数据均重复 3 次所取均值进行分析)。

1.2.3 气相色谱-质谱联用仪(gas chromatography-mass spectrometer,GC-MS) 生长密度达到 70%~80%的 HTR8/SVneo 滋养细胞经 21%O_2(常氧组)或者 1%O_2(缺氧组)处理 24 h,利用代谢组学方法处理后放入抽干机 speedVac 抽干 4 h。然后利用 MCF 方法进行衍生,将衍生的有机相物质转移入 GC-MS 小瓶进行上机分析。

1.2.4 代谢组学分析 应用 GeneSpring(http://www.home.agilent.com)软件进行代谢组学分析,该软件来源于 Agilent Technologies 公司。利用 AMDIS(由 NIST 发布)软件找出 GC-MS MCF 衍生分析后的代谢物,利用 KEGGpathway 软件进行代谢通路分析。所有 $\log_2$ 对数的真数为代谢物浓度。

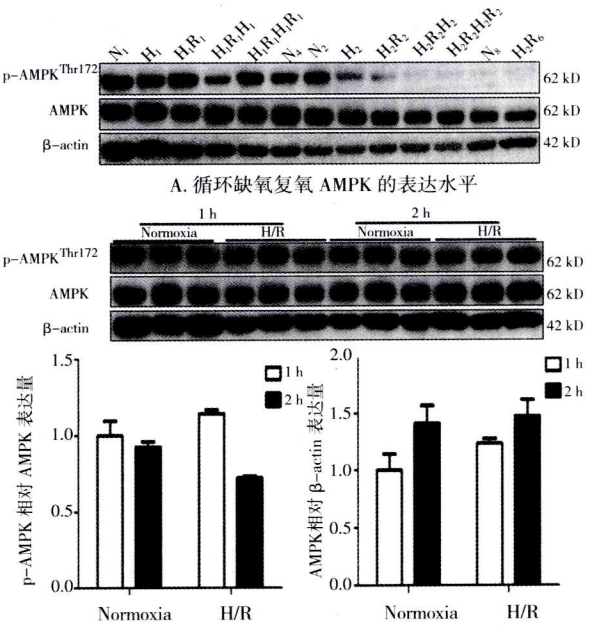
1.3 统计学方法

采用 GraphPad Prism v5.0 软件进行统计学分析。数据以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,统计学分析采用成组样本 t 检验和单因素方差分析检验,Western blot 灰度值采用 Image Lab Software Version 5.2 软件(Bio-Rad,加利福利亚,美国)进行定量分析。检验水准 α=0.05。

2 结 果

2.1 缺氧复氧处理可诱导滋养细胞 AMPK 激活

本研究首先利用体外缺氧复氧法建立子痫前期细胞研究模型,并探究诱导滋养能量应激的最优缺氧复氧方法。HTR8/SVneo 滋养细胞分别在 1%O_2 和 21%O_2 培养箱中培养 1 h(记为 H_1 或 N_1)或 2 h(记为 H_2、N_2),缺氧 1 h 后复氧 1 h(记为 H_1R_1)和缺氧 2 h 后复氧 2 h(记为 H_2R_2),H_1R_1 后再缺氧 1 h(记为 $H_1R_1H_1$),H_2R_2 后再缺氧 2 h(记为 $H_2R_2H_2$),H_1R_1 2 个循环(记为 $H_1R_1H_1R_1$)和 H_2R_2 2 个循环(记为 $H_2R_2H_2R_2$),缺氧 2 h 后复氧 6 h(记为 H_2R_6),以及持续常氧 4 h(记为 N_4)和 8 h(记为 N_8),提取蛋白后用 Western blot 检测缺氧敏感指标 p-AMPK 的表达验证细胞是否处于缺氧状态。Western blot 结果显示循环缺氧复氧时 AMPK 的磷酸化表达水平并没有升高,而缺氧 1 h 复氧 1 h(H_1R_1)时 AMPK 的活性比常氧环境和缺氧环境升高,表明 1%O_2 缺氧/21%O_2 复氧即可有效诱导 HTR8/SVneo 滋养细胞能量应激,而增加复氧次数或延长复氧时间导致滋养细胞失去缺氧表型,可能是适应了缺氧复氧环境(图 1A)。然后对 HTR8/SVneo 滋养细胞进行不同时间的缺氧复氧处理,常氧(21%O_2)培养记为 Normoxia,缺氧复氧(先 1%O_2 再 21%O_2)培养记为 H/R,结果显示缺氧复氧 1 h(H_1R_1)(1.147 ± 0.027)时 p-AMPK 的表达水平高于缺氧复氧 2 h(H_2R_2)(0.723 ± 0.010)的表达水平(图 1B,F=10.59,P=0.011),而 AMPK 的总蛋白水平[H_1R_1 与 H_2R_2 分别为(1.237 ± 0.043)、(1.472 ± 0.138)]没有明显变化(图 1B,F=0.470,P=0.511)。表明 H_1R_1 即可有效诱导HTR8/SVneo 滋养细胞子痫前期研究模型,而增加延长复氧时间减弱滋养细胞能量应激表型。



A. 循环缺氧复氧 AMPK 的表达水平

a:P<0.05,差异具有统计学意义

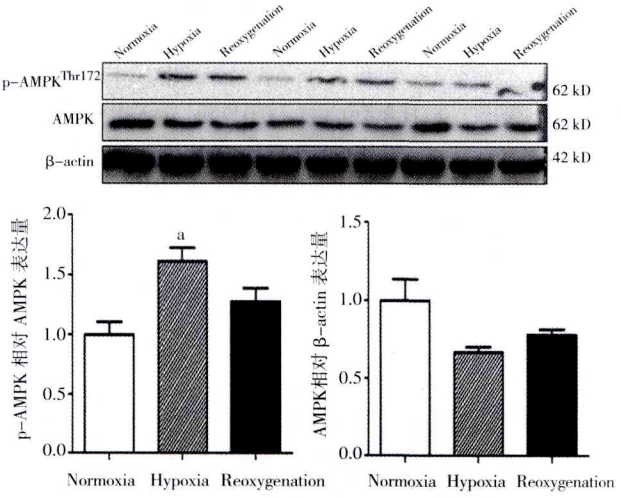
B. 缺氧复氧 AMPK 的表达水平

图 1 Western blot 检测 HTR8/SVneo 滋养细胞 AMPK 的表达水平

Fig.1 AMPK protein expression level in HTR8/SVneo trophoblast cell detected by Western blot

2.2 单纯缺氧处理激活滋养细胞 AMPK

上述实验结果表明缺氧复氧 1 h 可以使滋养细胞 AMPK 磷酸化水平显著上调，但这种改变是由缺氧引起还是复氧引起尚不明确，因此对 HTR8/SVneo 滋养细胞同时进行缺氧和缺氧复氧处理 1 h。方差分析显示 3 组间有差异（F=7.691，P=0.022），与正常组（Normoxia）（1.000 ± 0.107）比较，缺氧组（Hypoxia）（1.615 ± 0.111）p-AMPK 的表达水平明显升高，约为正常组的 1.6 倍（图 2，P=0.016），虽然复氧组（Reoxygenation）（1.277 ± 0.113）表达水平与正常组比较有升高，但并无明显差异（图 2，P=0.151）；同时与缺氧组（1.615 ± 0.111）比较，复氧组（1.277 ± 0.113）的 p-AMPK 水平呈下降趋势（图 2，P=0.101）。3 组间 AMPK 的总蛋白水平[正常组、缺氧组、复氧组分别为（1.000 ± 0.133）、（0.666 ± 0.0352）、（0.779 ± 0.035）]没有统计学差异（图 2，F=4.225，P=0.072）。表明单纯缺氧处理较缺氧复氧处理更能诱导 HTR8/SVneo 滋养细胞能量应激。



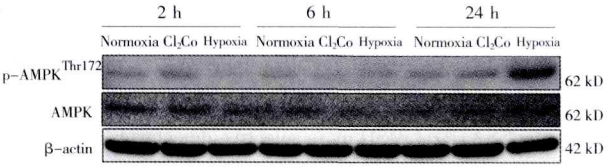
a：与常氧组比较，P<0.05，差异具有统计学意义

图 2 HTR8/SVneo 滋养细胞 AMPK 的表达活性

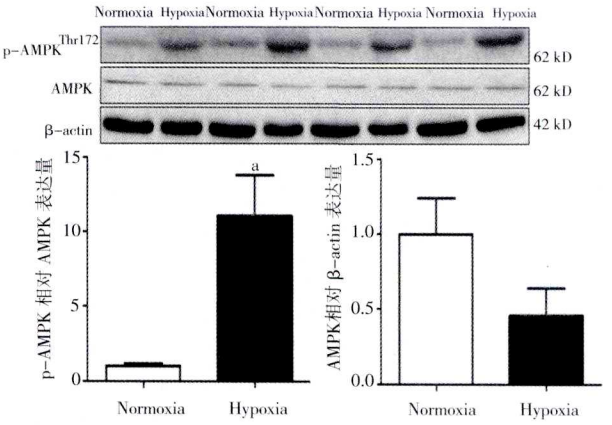
Fig.2 AMPK protein expression level of HTR8/SVneo trophoblast cell in hypoxia condition or hypoxia/reoxygenation condition

2.3 滋养细胞 AMPK 磷酸化水平对缺氧处理存在时间依赖效应

单纯缺氧处理可以诱导 HTR8/SVneo 滋养细胞的 AMPK 活化，但该效应是否具有时间依赖性有待进一步证实，为了探明诱导 HTR8/SVneo 滋养细胞缺氧的最佳处理时间，HTR8/SVneo 滋养细胞被给予不同时间（2、6、24 h）的缺氧处理，然后检测其 AMPK 磷酸化水平的变化。研究表明缺氧 24 h 后 AMPK 磷酸化水平比 2 h 组和 6 h 组明显升高，而 AMPK 总蛋白水平无明显变化（图 3A）。同时，通过电子传递链抑制剂处理 HTR8/SVneo 诱导缺氧模型，结果显示在相同的处理时间内 1%O_2 较 100 μmol/L Cl_2Co 更加有效地激活 AMPK（图 3A）。结合上述实验结果，选取对 HTR8/SVneo 滋养细胞进行缺氧 24 h 处理，结果显示 24 h 缺氧组（11.02 ± 2.756）HTR8/SVneo 滋养细胞的 p-AMPK 的水平明显高于常氧组（1.000 ± 0.171），上调 11 倍（图 3B，t=3.631，P=0.011），而 2 组间 AMPK 总蛋白水平[常氧组与缺氧组分别为（1.000 ± 0.239）、（0.4573 ± 0.181）]无统计学差异（图 3B，t=1.808，P=0.120）。表明持续低氧环境 HTR8/SVneo 滋养细胞可模拟子痫前期发生过程中滋养细胞的生理环境，而 1%O_2 处理 24 h 可显著诱导 HTR8/SVneo 滋养细胞的缺氧反应。



A. HTR8/SVneo 滋养细胞不同缺氧时间 AMPK 的表达活性



a：与常氧组比较，P<0.05，差异具有统计学意义

B. 缺氧 24 hAMPK 的表达水平

图 3 HTR8/SVneo 滋养细胞缺氧 24 h AMPK 的表达水平

Fig.3 AMPK protein expression level of HTR8/SVneo trophoblast cell in hypoxia condition

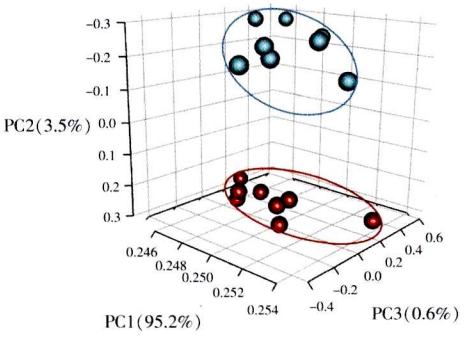
2.4 缺氧改变 HTR8/SVneo 滋养细胞代谢图谱

已有研究表明，子痫前期胎盘与正常妊娠胎盘存在显著的代谢差异。为了进一步验证缺氧处理 HTR8/SVneo 滋养细胞是否可以诱导类似子痫前期胎盘的代谢图谱。HTR8/SVneo 滋养细胞经 21%O_2（常氧组）或者 1%O_2（缺氧组）处理 24 h 后进行代谢组学分析。根据气相质谱特征进行多元数据分析，主成分分析（principal component analysis，PCA）显示缺氧组和常氧组的代谢物含量有明显的差异，主成分 PC1、PC2、PC3 分别显示了 95.2%、3.5%、0.6%的差异（n=8，图 4A），表明单纯缺氧处理可明显改变 HTR8/SVneo 滋养细胞代谢图谱。

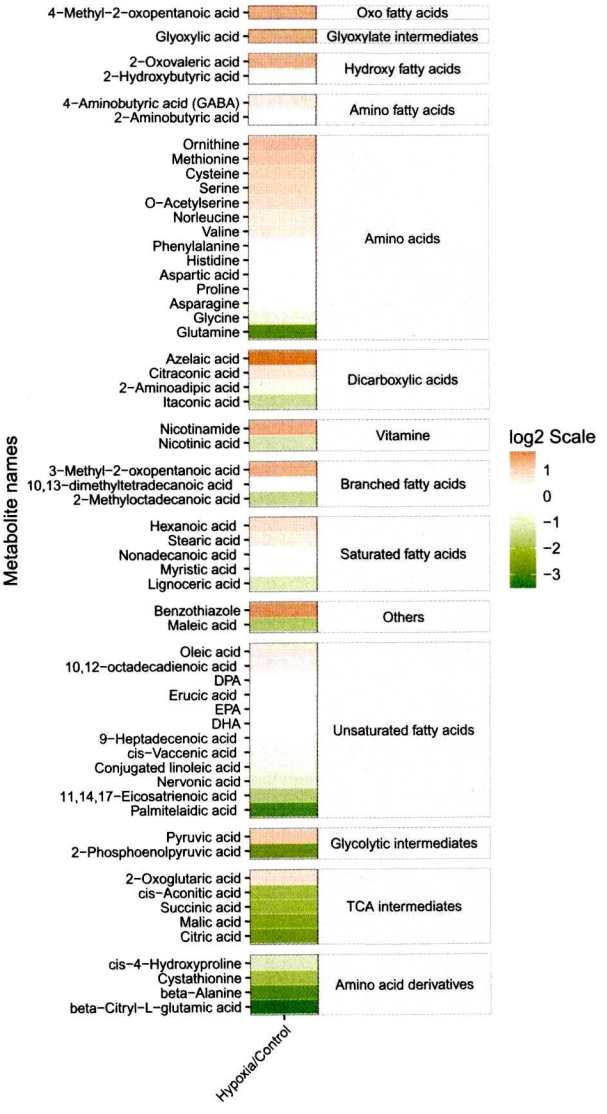
缺氧组和常氧组检均测出 98 种代谢物，其中 59 种存在明显差异（P<0.05，FDR<0.1），包括脂肪酸、TCA 中间代谢物、氨基酸及其衍生物、维生素及其他代谢物（图 4B）。在缺氧

HTR8/SVneo 滋养细胞中显著增加的代谢物有 4-甲基-2-戊酮酸(4-methyl-2-oxopentanoic acid,属于氧代脂肪酸 Oxo fatty acids,log2 2.597 为 1.377)、水合乙醛酸[glyoxylic acid,属于乙醛酸中间体(glyoxylate intermediates),log2 2.483 为1.312]、组氨酸(histidine,log2 1.188 为 0.248)、苯丙氨酸(phenylalanine,$\log_2$ 1.262 为 0.335)、缬氨酸(valine,$\log_2$ 1.518 为 0.602)、正亮氨酸(norleucine,$\log_2$ 1.519 为 0.603)、乙酰丝氨酸(O-acetylserine,$\log_2$ 1.691 为 0.758)、丝氨酸(serine,$\log_2$ 1.783 为 0.834)、半胱氨酸(cysteine,$\log_2$ 1.851 为 0.889)、蛋氨酸(methionine,$\log_2$ 2.072 为 1.051)、鸟氨酸(ornithine,$\log_2$ 2.251 为 1.170)等[属于氨基酸类(amino acids)];而棕榈反油酸(palmitelaidic acid,$\log_2$ 0.127 为-2.983)、11,14,17-廿碳三烯酸(11,14,17-eicosatrienoic acid,$\log_2$ 0.334 为-1.583)、二十四单烯酸(nervonic acid,$\log_2$ 0.600 为-0.738)、共轭亚油酸(conjugated linoleic acid,$\log_2$ 0.680 为-0.557)、顺式十八碳烯酸(cis-vaccenic acid,$\log_2$ 0.711 为-0.492)、9-十七碳烯酸(9-heptadecenoic acid,$\log_2$ 0.782 为-0.355)、二十二碳六烯酸(docosahexoenoic acid,DHA,$\log_2$ 0.829 为-0.271)、二十碳五烯酸(eicosapentaenoic acid,EPA,$\log_2$ 0.841 为-0.250)、芥酸(erucic acid,$\log_2$ 0.844 为-0.244)、二十二碳五烯酸(DPA,$\log_2$ 0.898 为-0.156)[属于不饱和脂肪酸(unsaturated fatty acids)],柠檬酸(citric acid,$\log_2$ 0.279 为-1.842)、苹果酸(malic acid,$\log_2$ 0.208 为-2.264)、琥珀酸(succinic acid,$\log_2$ 0.254 为-1.980)、顺乌头酸(cis-aconitic acid,$\log_2$ 0.260 为-1.946)[是三羧酸循环中间代谢物(TCA intermediates)],β-柠檬酸-左旋谷氨酸(beta-citryl-L-glutamic acid,$\log_2$ 0.093 为-3.430)、β-丙氨酸(beta-alanine,$\log_2$ 0.139 为-2.851)、胱硫醚(cystathionine,$\log_2$ 0.267 为-1.904)、顺式-4-羟脯氨酸(cis-4-hydroxyproline,$\log_2$ 0.500 为-1.000)[是氨基酸衍生物(amino acid derivatives)],这些物质在缺氧 HTR8/SVneo 滋养细胞中显著降低。

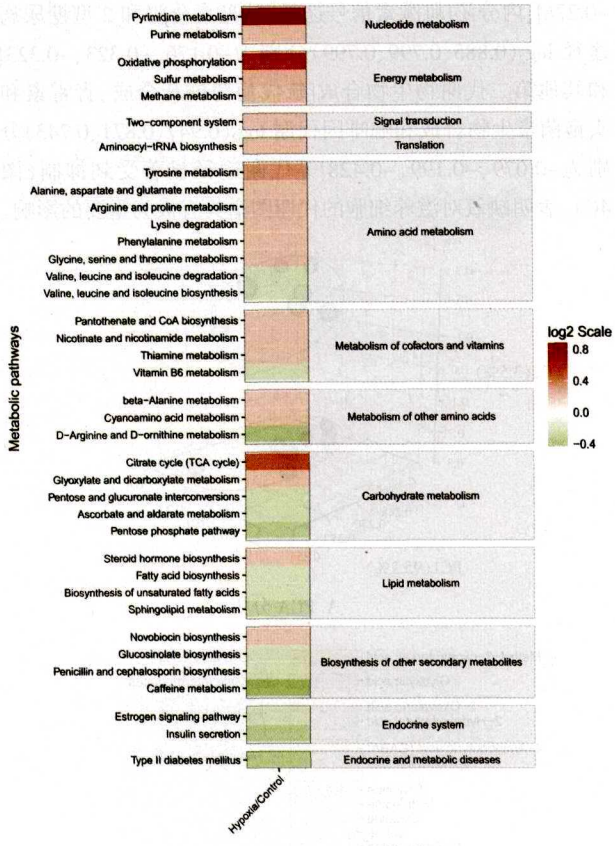
利用 KEGG pathway 软件进行代谢通路分析,结果表明缺氧时滋养细胞中核苷酸代谢[嘧啶代谢和嘌呤代谢 $\log_2$(1.811、1.149)分别为 0.857、0.201]、能量代谢[氧化磷酸化、硫代谢及甲烷代谢 $\log_2$(1.510、1.173、1.149)分别为 0.595、0.230、0.201]、维生素代谢[泛酸盐及辅酶 A 生物合成、烟酸及烟酰胺代谢和硫胺素代谢 $\log_2$(1.045、1.052、1.125)分别为 0.064、0.073、0.170]、氨基酸代谢[酪氨酸代谢、丙氨酸/天冬氨酸/谷氨酸代谢、精氨酸/脯氨酸代谢、赖氨酸降解、苯丙氨酸代谢、甘氨酸/丝氨酸/苏氨酸代谢 $\log_2$(1.245、1.020、1.027、1.123、1.127、1.076)分别为 0.316、0.028、0.039、0.167、0.173、0.106]、信号转导(双组分信号传导系统 log2 1.046 为 0.065)、蛋白翻译(氨酰基-tRNA 生物合成 $\log_2$ 1.026 为 0.037)等途径被激活,而碳水化合物[戊糖和葡萄糖醛酸酯互变代谢、抗坏血酸代谢和磷酸戊糖途径 $\log_2$(0.857、0.857、0.799)分别为-0.222、-0.222、-0.323]、脂肪酸[脂酸合成、不饱和脂酸合成和鞘磷脂代谢 $\log_2$(0.944、0.912、0.826)分别为-0.083、-0.133、-0.276]、内分泌[雌激素信号途径、胰岛素分泌和 2 型糖尿病途径 $\log_2$(0.885、0.799、0.799)分别为-0.176、-0.323、-0.323]和其他第二代谢物生物合成[硫代葡萄糖苷合成、青霉素和头孢菌素生物合成和咖啡因代谢 $\log_2$(0.947、0.871、0.743)分别为-0.079、-0.199、-0.428]等代谢途径显著受到抑制(图 4C)。表明缺氧对滋养细胞的代谢图谱具有极为重要的影响。



A. PCA 分析



B. 代谢谱的变化



C. 代谢途径变化分析

classification	Metabolites Name	Hypoxia（AVG ± STD）	Control（AVG ± STD）	P values
Amino acid derivatives	beta-Alanine	18212.01 ± 2089.71	131358.53 ± 8822.03	1.61E-20
	beta-Citryl-L-glutamic acid	1019.08 ± 472.94	10984.46 ± 2582.12	2.26E-11
	cis-4-Hydroxyproline	209430.59 ± 34121.66	419142.33 ± 35655.25	6.72E-10
	Cystathionine	2740.19 ± 426.47	10255.57 ± 1209.75	1.57E-13
Amino acids	Asparagine	959454.65 ± 209258.68	1231509.83 ± 65668.56	0.017679494
	Aspartic acid	926671.70 ± 100346.01	1128896.50 ± 105276.20	0.001129719
	Cysteine	53476.62 ± 11384.17	28885.43 ± 2897.23	2.11E-06
	Glutamine	11626.58 ± 2896.65	82839.32 ± 10881.12	8.44E-15
	Glycine	806150.43141864.57	1285252.32 ± 222120.20	7.99E-06
	Histidine	17005.01 ± 2774.27	14316.16 ± 1378.11	0.033930447
	Methionine	82471.60 ± 9178.18	39797.90 ± 1966.36	1.40E-10
	Norleucine	418298.96 ± 52679.31	275329.90 ± 36161.28	1.43E-06
	O-Acetylserine	11055.14 ± 1404.81	6537.32 ± 610.14	9.33E-09
	Ornithine	88048.82 ± 41275.82	39116.97 ± 9365.61	0.000236775
	Phenylalanine	132568.02 ± 18800.58	105082.15 ± 10533.24	0.002896308
	Proline	1796851.30 ± 72896.25	2293908.66 ± 211822.51	1.09E-07
	Serine	47961.12 ± 11193.84	26903.45 ± 4859.03	4.58E-07
	Valine	219807.17 ± 31884.73	144801.27 ± 24990.77	3.62E-05
Amino fatty acids	2-Aminobutyric acid	18518.16 ± 1006.46	22048.78 ± 2050.21	0.000454808
	4-Aminobutyric acid (GABA)	21334.14 ± 4896.04	14546.05 ± 840.49	3.43E-07
Branched fatty acids	10,13-dimethyltetradecanoic acid	3374847.56 ± 196251.73	2817167.71 ± 222922.15	2.74E-05
	2-Methyloctadecanoic acid	7058.65 ± 1199.22	18779.63 ± 6326.47	3.38E-06
	3-Methyl-2-oxopentanoic acid	6289.51 ± 1586.81	2604.99 ± 359.11	2.65E-10
Dicarboxylic acids	2-Aminoadipic acid	2721.12 ± 471.62	3974.63 ± 315.69	6.43E-05
	Azelaic acid	3172.90 ± 1264.51	929.17 ± 133.39	1.64E-07
	Citraconic acid	15802.02 ± 3685.27	10067.59 ± 2387.01	0.000593924
	Itaconic acid	715.63 ± 152.97	1826.14 ± 273.33	1.17E-07
Glycolytic intermediates	2-Phosphoenolpyruvic acid	1073.67 ± 304.52	6820.08 ± 5001.53	8.57E-07
	Pyruvic acid	4386.83 ± 2153.93	2262.15 ± 1021.54	0.013819975
	Glyoxylic acid	5711.48 ± 1725.51	2300.06 ± 375.99	1.42E-05
Hydroxy fatty acids	2-Hydroxybutyric acid	2975.64 ± 840.05	4099.73 ± 627.07	0.006804206
	2-Oxovaleric acid	25987.93 ± 3755.07	10819.50 ± 1114.83	3.64E-12
Others	Benzothiazole	3311.17 ± 456.47	1153.11 ± 135.45	1.25E-12
Oxo fatty acids	4-Methyl-2-oxopentanoic acid	8012.52 ± 841.84	3084.72 ± 260.21	9.40E-15
Saturated fatty acids	Hexanoic acid	4281.39 ± 761.34	2542.67 ± 1181.04	0.000108266
	Lignoceric acid	12661.74 ± 1445.02	25818.70 ± 6930.47	9.42E-06
	Myristic acid	629181.55 ± 61424.44	838450.99 ± 44909.75	9.77E-08
	Nonadecanoic acid	7019.89 ± 862.26	8112.40 ± 837.56	0.002456313
	Stearic acid	4933043.74 ± 353724.93	3352060.54 ± 295489.03	2.84E-09
TCA intermediates	2-Oxoglutaric acid	43832.87 ± 5872.04	27356.23 ± 4894.86	6.35E-06
	cis-Aconitic acid	3722.70 ± 865.81	14340.80 ± 2143.07	2.91E-10
	Citric acid	113872.30 ± 15625.00	408199.32 ± 44132.12	2.32E-13
	Maleic acid	18974.98 ± 4484.71	52853.82 ± 4520.22	4.75E-11
	Malic acid	16200.96 ± 3430.73	77793.61 ± 9636.43	1.02E-13
	Succinic acid	55359.60 ± 13041.37	218380.40 ± 21478.15	2.09E-13
Unsaturated fatty acids	10,12-octadecadienoic acid	763892.52 ± 63565.67	542237.06 ± 53491.79	9.66E-08
	11,14,17-Eicosatrienoic acid	23986.98 ± 4504.09	71867.96 ± 20581.76	1.24E-07
	9-Heptadecenoic acid	55346.32 ± 3945.00	70784.49 ± 3832.96	3.09E-07
	cis-Vaccenic acid	23699.76 ± 1421.99	33331.55 ± 1345.22	2.38E-10
	Conjugated linoleic acid	12760.12 ± 1081.08	18770.82 ± 1220.89	6.52E-09
	DHA	471849.28 ± 30857.98	569499.21 ± 35036.60	2.96E-05
	DPA	401302.00 ± 30206.66	447043.76 ± 33164.60	0.017302571
	EPA	125832.17 ± 9418.88	149621.14 ± 8977.04	0.000330547
	Erucic acid	110222.85 ± 6545.46	130524.48 ± 7763.80	5.95E-05
	Nervonic acid	5326.48 ± 461.27	8881.80 ± 1041.15	6.75E-09
	Oleic acid	1749375.40 ± 149252.21	1188789.09 ± 120184.60	2.25E-08
	Palmitelaidic acid	23216.86 ± 1792.06	183509.37 ± 115499.36	2.41E-05
	Nicotinamide	30356.01 ± 5824.16	13655.89 ± 3132.18	5.37E-07
	Nicotinic acid	8469.56 ± 1024.87	18704.52 ± 2063.02	5.34E-10

D. 具有差异的代谢物的具体数据

Classification	Pathway name	H_average±std	N_average±STD	P values
	Tyrosine metabolism	3961106.75±837168.65	8194446.69±822887.79	7.32E-08
	Glycine, serine and threonine metabolism	13873343.02±858823.44	17709205.17±1422656.30	3.44E-05
	Phenylalanine metabolism	5174957.09±942867.21	7713848.74±765214.81	4.48E-05
Amino acid metabolism	Lysine degradation	14929872.39±1868286.66	21948484.39±3712998.55	0.000685036
	Arginine and proline metabolism	57820843.65±3338880.27	63248216.98±2909366.82	0.003874342
	Valine, leucine and isoleucine biosynthesis	3635189.84±503959.39	3089689.40±317990.45	0.023950205
	Valine, leucine and isoleucine degradation	8150867.76±1336928.43	6778489.99±779324.26	0.0286225
	Alanine, aspartate and glutamate metabolism	17805861.22±1101939.56	19008652.72±1006200.58	0.038945644
	Caffeine metabolism	129367.73±24219.69	48301.26±7895.79	1.28E-05
Biosynthesis of other secondary metabolites	Penicillin and cephalosporin biosynthesis	1684526.60±254062.12	1065968.02±149672.93	8.69E-05
	Novobiocin biosynthesis	31302300.44±1350674.94	39546063.36±3656988.33	0.000219182
	Glucosinolate biosynthesis	11408352.54±1787856.68	9517187.85±1037725.55	0.024871129
	Citrate cycle (TCA cycle)	607486.25±84013.50	1912224.04±108209.43	6.41E-13
	Glyoxylate and dicarboxylate metabolism	20917877.37±1208543.88	25658233.96±1759045.03	3.49E-05
	Ascorbate and aldarate metabolism	1159919.82±170318.37	696031.76±133464.60	3.70E-05
Carbohydrate metabolism	Pentose and glucuronate interconversions	1258636.40±184813.55	755268.50±144823.29	3.70E-05
	Pentose phosphate pathway	161659.76±67232.97	76912.94±34732.46	0.009474736
Endocrine and metabolic diseases	Type II diabetes mellitus	28528.19±11864.64	13572.87±6129.26	0.009474736
Endocrine system	Estrogen signaling pathway	196227.57±45120.31	130914.49±7564.38	0.004414031
	Insulin secretion	61811.09±25706.72	29407.89±13280.06	0.009474736
	Oxidative phosphorylation	887296.69±223014.15	3494086.44±343650.44	4.72E-10
Energy metabolism	Sulfur metabolism	1560299.67±262504.90	2650303.11±234842.40	5.19E-07
	Methane metabolism	11611907.60±1964750.61	18450866.91±2989516.85	0.000153876
	Fatty acid biosynthesis	41633152.84±3284367.39	34359554.61±4364683.67	0.002352626
Lipid metabolism	Biosynthesis of unsaturated fatty acids	40121308.28±2242091.66	29520535.77±2412574.65	3.08E-07
	Sphingolipid metabolism	1269485.32±196062.80	672586.27±121475.70	1.07E-05
	Steroid hormone biosynthesis	46080395.77±2559033.11	56380421.42±3468623.85	1.41E-05
Metabolism of cofactors and vitamins	Vitamin B6 metabolism	789732.64±115961.44	473893.96±90869.52	3.70E-05
	Thiamine metabolism	6233479.06±871478.34	9224945.27±1473698.25	0.000400769
	Nicotinate and nicotinamide metabolism	11565130.40±1149659.27	13671348.81±1257670.49	0.003601031
	Pantothenate and CoA biosynthesis	6943053.86±787306.82	8042741.70±481624.01	0.005826289
Metabolism of other amino acids	Cyanoamino acid metabolism	19994749.45±1232279.26	24283249.08±1614796.29	4.53E-05
	beta-Alanine metabolism	7716536.35±792664.03	9990658.56±779694.79	4.73E-05
	D-Arginine and D-ornithine metabolism	911146.62±430162.60	391169.75±93656.13	0.010875626
Nucleotide metabolism	Pyrimidine metabolism	1202983.33±147409.42	8669662.75±582253.72	5.85E-10
	Purine metabolism	37217627.44±6980396.62	59227409.27±10216345.26	0.000267798
Signal transduction	Two-component system	27285937.53±2060808.81	31684104.90±2362653.98	0.001449208
Translation	Aminoacyl-tRNA biosynthesis	29720594.83±1437989.76	32375059.77±1409031.66	0.002244981

E. 具有差异的代谢途径的具体数据

图 4　HTR8/SVneo 滋养细胞代谢组学分析

Fig.4　Metabonomics analysis in HTR8/SVneo trophoblast cell

3　讨　论

子痫前期是原因不明的妊娠期特有的全身系统性疾病，是导致母儿死亡的主要产科并发症[19]。临床上，子痫前期表现为高血压、蛋白尿、水肿、伴或不伴有全身多器官系统损害等母体综合征、伴有或不伴有胎儿生长受限等[20]。虽然目前病因及病理机制未明，但普遍认为其发病机制是全身小血管痉挛，全身各系统各脏器灌流减少，尤其是供应胎儿营养和血液的子宫螺旋动脉，进而引起胎盘缺血缺氧，出现一系列临床症状[21]。因此体外建立子痫前期模型的关键是模拟体内缺血缺氧的状态，而氧浓度的改变引起的缺氧恰好可以做到这一点。

目前子痫前期的体外模型研究众说纷纭，无统一定论。有些研究者支持采用缺氧复氧（2%O_2 培养

8 h，20%O_2 培养 16 h）方法构建子痫前期体外模型[15-16]；中科院王雁玲老师课题组和华西附二院刘兴会老师课题组通过缺氧处理 HTR8/SVneo 滋养细胞（2%O_2/20%O_2）模拟子痫前期[13-14]。然而，尚无课题组采用 AMPK 磷酸化为标志检测滋养细胞是否处于缺氧应激状态，大多数研究检测 HIF1α 表达水平以确定滋养细胞的缺氧状态[14,22]。AMPK 作为代谢调控的开关蛋白，其磷酸化由 AMP/ATP 的比值调控，因而对于细胞能量变化具有高度敏感性，被认为是细胞缺氧应激的感受器[23]。已有研究证实，HIF1α 的表达受 AMPK 调控[24]，因此，在滋养细胞缺氧过程中 HIF1α 表达较 AMPK 磷酸化具有一定的滞后性。

本研究证实了缺氧复氧和缺氧均能够引起滋养细胞缺氧，激活 AMPK 的表达。但是，单纯缺氧处理更容易激活 AMPK，并且探明了缺氧 24 h 可明显上调 AMPK 磷酸化，而缺氧 6~12 h 仅能导致AMPK 磷酸化的轻微上调，表明滋养细胞对低氧具有较强的耐受性，这与之前的报道一致[25]。本研究首次对低氧诱导子痫前期的几种实验方案进行了比较，同时也比较了电子传递链抑制剂处理诱导滋养细胞缺氧的方法[26-28]，研究结果对于优化痫前期的滋养细胞体外实验具有一定的指导意义。

此外，本研究首次对缺氧诱导的 HTR8/SVneo滋养细胞子痫前期模型进行了代谢图谱分析鉴定，结果显示近 2/3 的可检测代谢物存在统计学差异，表明缺氧对于滋养细胞的代谢具有深远的影响。从代谢途径上分析，缺氧时能量代谢的相关途径显著激活，表明此时滋养细胞具有巨大的能量需求，这与 Western blot 检测到的 AMPK 磷酸化显著上调相吻合。然而碳水化合物及脂肪酸代谢途径显著受到抑制，提示在缺氧状态下，AMPK 并不能通过上调糖酵解和脂肪酸 β 氧化满足滋养细胞的能量需求。令人感兴趣的是，氨基酸降解和核苷酸代谢明显增加，显示滋养细胞在缺氧状态下可能通过循环使用蛋白质以满足其能量需求和维持基本生理功能。这一发现是否与子痫前期胎盘中存在较高自噬水平相关[29]，仍待进一步验证。这些结果与 Austdal 等利用人子痫前期胎盘所做代谢组学分析结果极为相似[30]，表明 HTR8/SVneo 滋养细胞缺氧模型可模拟人子痫前期胎盘的代谢特征，是较为可靠的子痫前期研究模型。

本研究也存在一定的局限性，仅验证了缺氧对 HTR8/SVneo 滋养细胞 AMPK Thr172 磷酸化的影响，虽然该位点在绝大多数种类细胞中催化亚基 α 激活构象[31]，在滋养细胞中与磷酸激酶活性的关系尚不确定，采用 p32 同位素标记法检测其磷酸激酶活性可更直观地反映 HTR8/SVneo 滋养细胞的缺氧应激程度[32]。此外，本研究所采用的 HTR8/SVneo 滋养细胞是最常见的永生化人滋养细胞株，HTR8/SV-neo 滋养细胞是人源性绒毛外滋养层细胞株，是通过组织培养法将早孕期人胎盘组织绒毛不经胰酶消化直接培养得到的具有滋养细胞特征的贴壁细胞，然后将 pSV3neo 质粒导入 HTR-8 细胞中形成稳定的可多代培养的人滋养细胞株[33]；因而与原代滋养细胞存在一定的差异[34-35]，因此有必要采用人原代早孕滋养细胞为研究对象重复本研究的相关实验，从而建立更加接近子痫前期真实病理情况的滋养细胞体外模型。

综上所述，1%O_2 低氧处理 24 h 可以显著上调 HTR8/SVneo 滋养细胞 AMPK 磷酸化水平，并诱导出与人子痫前期胎盘相似的代谢特征，因此模型可应用于子痫前期的细胞分子学机制研究。

参 考 文 献

[1] Mol BW, Roberts CT, Thangaratinam S, et al. Pre-eclampsia[J]. Lancet, 2016, 387(10022): 999-1011.

[2] Chelbi ST, Vaiman D. Genetic and epigenetic factors contribute to the onset of preeclampsia[J]. Molecular and Cellular Endocrinology, 2008, 282(1-2): 120-129.

[3] Schiessl B. Inflammatory response in preeclampsia[J]. Mol Aspects Med, 2007, 28(2): 210-219.

[4] Seki H. Balance of antiangiogenic and angiogenic factors in the context of the etiology of preeclampsia[J]. Acta Obstetricia et Gynecologica Scandinavica, 2014, 93(10): 959-964.

[5] Shah DA, Khalil RA. Bioactive factors in uteroplacental and systemic circulation link placental ischemia to generalized vascular dysfunction in hypertensive pregnancy and preeclampsia[J]. Biochem Pharmacol, 2015, 95(4): 211-226.

[6] Roberts JM, Hubel CA. The two stage model of preeclampsia: variations on the theme[J]. Placenta, 2009, 30(SA): 32-37.

[7] Makris A, Yeung KR, Lim SM, et al. Placental growth factor reduces blood pressure in a uteroplacental ischemia model of preeclampsia in nonhuman primates[J]. Hypertension, 2016, 67(6): 1263-1272.

[8] Grahame Hardie D. AMP-activated protein kinase: a key regulator of energy balance with many roles in human disease[J]. J Intern Med, 2014, 276(6): 543-559.

[9] Wang W, Li X, Chen J. Energy crisis and the Hippo pathway[J].

Cell Cycle,2015,14(13):1995-1996.

[10] Banek CT,Bauer AJ,Needham KM,et al. AICAR administration ameliorates hypertension and angiogenic imbalance in a model of preeclampsia in the rat[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol,2013,304(8):H1159-1165.

[11] Zhou CC,Zhang Y,Irani RA,et al. Angiotensin receptor agonistic autoantibodies induce pre-eclampsia in pregnant mice[J]. Nat Med,2008,14(8):855-862.

[12] Khoo NK,Bechberger JF,Shepherd T,et al. SV40 Tag transformation of the normal invasive trophoblast results in a premalignant phenotype. I. Mechanisms responsible for hyperinvasiveness and resistance to anti-invasive action of TGFbeta[J]. Int J Cancer,1998,77(3):429-439.

[13] He G,Xu W,Chen Y,et al. Abnormal apoptosis of trophoblastic cells is related to the up-regulation of CYP11A gene in placenta of preeclampsia patients[J]. PLoS One,2013,8(3):e59609.

[14] Luo R,Wang Y,Xu P,et al. Hypoxia-inducible miR-210 contributes to preeclampsia via targeting thrombospondin type I domain containing 7A[J]. Sci Rep,2016,6:19588.

[15] Yang Z,Bai B,Luo X,et al. Downregulated Krüppel-like factor 8 is involved in decreased trophoblast invasion under hypoxia-reoxygenation conditions[J]. Reprod Sci,2014,21(1):72-81.

[16] Zhuang B,Luo X,Rao H,et al. Oxidative stress-induced C/EBP-beta inhibits beta-catenin signaling molecule involving in the pathology of preeclampsia[J]. Placenta,2015,36(8):839-846.

[17] Kuc S,Koster MP,Pennings JL,et al. Metabolomics profiling for identification of novel potential markers in early prediction of preeclampsia[J]. PLoS One,2014,9(5):e98540.

[18] Bahado-Singh RO,Syngelaki A,Mandal R,et al. Metabolomic determination of pathogenesis of late-onset preeclampsia[J]. J Maternal Fetal Neonatal Med,2017,30(6):658-664.

[19] Sibai B,Dekker G,Kupferminc M. Pre-eclampsia[J]. Lancet,2005,365(9461):785-799.

[20] Redman CW,Sargent IL. Latest advances in understanding preeclampsia[J]. Science,2005,308(5728):1592-1594.

[21] Li W,Mata KM,Mazzuca MQ,et al. Altered matrix metalloproteinase-2 and -9 expression/activity links placental ischemia and anti-angiogenic sFlt-1 to uteroplacental and vascular remodeling and collagen deposition in hypertensive pregnancy[J]. Biochem Pharmacol,2014,89(3):370-385.

[22] Maltepe E,Krampitz GW,Okazaki KM,et al. Hypoxia-inducible factor-dependent histone deacetylase activity determines stem cell fate in the placenta[J]. Development,2005,132(15):3393-3403.

[23] Kaur M,Deep G,Jain AK,et al. Bitter melon juice activates cellular energy sensor AMP-activated protein kinase causing apoptotic death of human pancreatic carcinoma cells[J]. Carcinogenesis,2013,34(7):1585-1592.

[24] Wang L,Chen Q,Li G,et al. Ghrelin ameliorates impaired angiogenesis of ischemic myocardium through GHSR1a-mediated AMPK/eNOS signal pathway in diabetic rats[J]. Peptides,2015,73:77-87.

[25] Tuuli MG,Longtine MS,Nelson DM. Review:oxygen and trophoblast biology--a source of controversy[J]. Placenta,2011,32(S2):109-118.

[26] Belao TC,Zeraik VM,Florindo LH,et al. Control of cardiorespiratory function in response to hypoxia in an air-breathing fish,the African sharptooth catfish,Clarias gariepinus[J]. Comparative Biochemistry and Physiology. Part A,Molecular & Integrative Physiology,2015,187:130-140.

[27] Marin JJ,Lozano E,Perez MJ. Lack of mitochondrial DNA impairs chemical hypoxia-induced autophagy in liver tumor cells through ROS-AMPK-ULK1 signaling dysregulation independently of HIF-1alpha[J]. Free Radical Biology & Medicine,2016,101:71-84.

[28] Yu L,Liang H,Lu Z,et al. Membrane receptor-dependent Notch1/Hes1 activation by melatonin protects against myocardial ischemia-reperfusion injury:in vivo and in vitro studies[J]. Journal of Pineal Research,2015,59(4):420-433.

[29] Gao L,Qi HB,Kamana KC,et al. Excessive autophagy induces the failure of trophoblast invasion and vasculature:possible relevance to the pathogenesis of preeclampsia[J]. Journal of Hypertension,2015,33(1):106-117.

[30] Austdal M,Thomsen LC,Tangeras LH,et al. Metabolic profiles of placenta in preeclampsia using HR-MAS MRS metabolomics[J]. Placenta,2015,36(12):1455-1462.

[31] Salminen A,Kaarniranta K,Kauppinen A. Age-related changes in AMPK activation:role for AMPK phosphatases and inhibitory phosphorylation by upstream signaling pathways[J]. Ageing Research Reviews,2016,28:15-26.

[32] Prichard JW,Alger JR,Behar KL,et al. Cerebral metabolic studies in vivo by 31P NMR[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America,1983,80(9):2748-2751.

[33] Graham CH,Hawley TS,Hawley RG,et al. Establishment and characterization of first trimester human trophoblast cells with extended lifespan[J]. Experimental Cell Research,1993,206(2):204-211.

[34] Kliman HJ,Nestler JE,Sermasi E,et mal. Purification,characterization,and in vitro differentiation of cytotrophoblasts from human term placentae[J]. Endocrinology,1986,118(4):1567-1582.

[35] Choy MY,Manyonda IT. The phagocytic activity of human first trimester extravillous trophoblast[J]. Human Reproduction,1998,13(10):2941-2949.

（责任编辑：张辉洁）