吴茱萸碱对高糖诱导的滋养层细胞增殖、迁移、侵袭的影响及机制Δ

王丽娟[1*]，刘元涛[2]，田鹏飞[3#]（1.淄博市第一医院内分泌科，山东 淄博 255200；2.山东齐鲁医院青岛院区内分泌科，山东 青岛 266011；3.淄博市第一医院老年医学科，山东 淄博 255200）

中图分类号 R965　　**文献标志码** A　　**文章编号** 1001-0408(2024)12-1463-06
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2024.12.09

摘　要　目的 基于晚期糖基化终末产物（AGE）/晚期糖基化终末产物受体（RAGE）信号通路探讨吴茱萸碱对高糖诱导的滋养层细胞增殖、迁移、侵袭能力的影响及潜在机制。**方法** 将人滋养层细胞HTR-8/SVneo分为对照组、高糖组、吴茱萸碱低浓度组（2 μmol/L）、吴茱萸碱高浓度组（4 μmol/L）、pc-NC组（转染pc-NC质粒+4 μmol/L吴茱萸碱）、pc-RAGE组（转染pc-RAGE质粒+4 μmol/L吴茱萸碱）。除对照组外的其余各组细胞均在高糖（25 mmol/L葡萄糖）环境下培养，除对照组、高糖组外的其余各组细胞均转染相应质粒和（或）接受相应药液干预。检测各组细胞的存活率、凋亡率、划痕愈合率、侵袭数，以及AGE、RAGE、核因子κB p65（NF-κB p65）、基质金属蛋白酶2（MMP-2）、MMP-9蛋白及mRNA的表达情况。**结果** 与对照组比较，高糖组细胞的存活率、划痕愈合率、侵袭数和MMP-2、MMP-9蛋白及mRNA的表达水平均显著降低（$P<0.05$），其凋亡率，AGE、RAGE蛋白及mRNA的表达水平，NF-κB p65 mRNA的表达水平和NF-κB p65蛋白的磷酸化水平均显著升高（$P<0.05$）；与高糖组比较，吴茱萸碱低、高浓度组细胞上述指标均显著改善，且高浓度组的效果显著优于低浓度组（$P<0.05$）；过表达RAGE会减弱吴茱萸碱对高糖诱导的滋养层细胞上述指标（AGE mRNA及蛋白除外）的改善作用（$P<0.05$）。**结论** 吴茱萸碱可促进高糖诱导的滋养层细胞增殖、迁移、侵袭，改善其功能损伤，上述作用与抑制AGE/RAGE信号通路有关。

关键词 吴茱萸碱；高糖；滋养层细胞；增殖；迁移；侵袭；AGE/RAGE信号通路

Impact of evodiamine on the proliferation, migration and invasion of trophoblastic cells induced by high glucose and its mechanism

WANG Lijuan[1], LIU Yuantao[2], TIAN Pengfei[3] (1. Dept. of Endocrinology, Zibo First Hospital, Shandong Zibo 255200, China; 2. Dept. of Endocrinology, Qingdao Branch, Shandong Qilu Hospital, Shandong Qingdao 266011, China; 3. Dept. of Geriatrics, Zibo First Hospital, Shandong Zibo 255200, China)

ABSTRACT　OBJECTIVE To investigate the impact of evodiamine on the proliferation, migration and invasion abilities of trophoblastic cells induced by high glucose and its potential mechanism based on advanced glycation end products (AGE)/receptor for advanced glycation end products (RAGE) signaling pathway. **METHODS** Human trophoblastic cells HTR-8/SVneo were divided into control group, high glucose group, evodiamine low-dose group (2 μmol/L), evodiamine high-dose group (4 μmol/L), pc-NC group (transfected with pc-NC plasmid+4 μmol/L evodiamine), and pc-RAGE group (transfected with pc-RAGE plasmid+4 μmol/L evodiamine). Cells in all groups except for the control group were cultured in a high sugar (25 mmol/L glucose) environment, and cells in all groups except for the control group and the model group were transfected with the corresponding plasmids and/or received the corresponding drug interventions. The survival rate, apoptotic rate, scratch healing rate, and invasion number, as well as the protein and mRNA expressions of AGE, RAGE, nuclear factor-κB p65 (NF-κB p65), matrix metalloproteinase-2 (MMP-2), and MMP-9 were examined in each group. **RESULTS** Compared with the control group, the cell survival rate, scratch healing rate, invasions number, and the mRNA and protein expressions of MMP-2 and MMP-9 in the high glucose group significantly decreased ($P<0.05$), while the apoptotic rate, the mRNA and protein expressions of AGE and RAGE, the mRNA expression of NF-κB p65, and the phosphorylation level of NF-κB p65 protein significantly increased ($P<0.05$); compared with the high glucose group, the above indexes of cells in evodiamine low-dose and high-dose groups were significantly improved, and the effect of the high-dose group was significantly better than that of the low-dose group ($P<0.05$); overexpression of RAGE attenuated the ameliorative effect of evodiamine on the above indexes in high glucose-induced trophoblast cells (except for AGE mRNA and protein) ($P<0.05$). **CONCLUSIONS** Evodiamine can promote the proliferation, migration and invasion of high glucose-induced trophoblast

Δ**基金项目** 山东省自然科学基金面上项目（No.ZR2022MH086）

＊**第一作者** 主治医师，硕士。研究方向：内分泌与代谢疾病。E-mail：812705889@qq.com

\# **通信作者** 主治医师，硕士。研究方向：心血管内科。E-mail：329426742@qq.com

cells and ameliorate their functional impairment, and the above effects are associated with the inhibition of the AGE/RAGE signaling pathway.

KEYWORDS evodiamine; high glucose; trophoblast cells; proliferation; migration; invasion; AGE/RAGE signaling pathway

妊娠期糖尿病（gestational diabetes mellitus，GDM）是指妊娠前糖代谢正常，但妊娠期首次发现糖耐量异常的一种常见妊娠并发症[1]。GDM的病因和发病机制十分复杂，可能与遗传、环境、胰岛素抵抗、胰岛β细胞功能障碍和胎盘泌乳素生成等多种因素有关[2]。随着当代女性育龄、饮食模式和生活方式的改变，GDM的发病率逐年增加，若GDM患者未得到及时治疗，可能会产生不良结局，如妊娠高血压和早产、死产、巨婴等[3]。因此，早期诊断和及时治疗策略对降低GDM患者不良结局至关重要，然而目前临床尚缺乏有效的GDM治疗药物。

研究指出，作为母体和胎儿循环之间的桥梁，胎盘对母体激素分泌、炎症反应和代谢调节具有一定影响[4]。滋养层细胞是胎盘屏障的主要组成部分，是母体与胎儿之间的首道屏障，其增殖、迁移、侵袭和凋亡与胎盘和胎儿的正常发育密切相关，其生物学功能受母体血糖的直接影响[5]。可见，增强滋养层细胞的增殖、迁移、侵袭功能可能是GDM治疗的潜在手段之一。

吴茱萸碱是从中药吴茱萸中提取的一种生物碱活性物质，除抗炎、抗感染、抗肿瘤、保护神经作用外，还具有一定的降血糖活性，可缓解糖尿病大鼠的高血糖，并减轻其胰岛素抵抗，缓解肝脏、胰腺、肾脏的病理损伤[6]，但吴茱萸碱能否缓解GDM尚未可知。晚期糖基化终末产物（advanced glycation end product，AGE）是在非酶条件下，由大分子物质（包括蛋白、脂质和核酸）的游离氨基与还原糖的醛基发生一系列反应所生产的一种异质分子，可通过与其受体（receptor for advanced glycation end product，RAGE）结合而促进氧化应激和炎症反应的发生[7]。研究发现，AGE/RAGE信号通路的激活与机体慢性高血糖环境有关，当该通路受到抑制时，GDM大鼠的空腹血糖、空腹胰岛素、高密度脂蛋白水平均可显著改善，提示AGE/RAGE信号通路在GDM发生发展中具有重要作用[8]。此外，有研究指出，吴茱萸碱可通过调控AGE/RAGE信号通路而抑制口腔鳞癌细胞的恶性生物学行为[9]。基于现有证据，本研究拟在高糖环境下培养人滋养层细胞HTR-8/SVneo，初步探讨吴茱萸碱对高糖诱导的滋养层细胞增殖、迁移、侵袭的影响及潜在机制，旨在为GDM的治疗及吴茱萸碱的应用提供参考。

1 材料

1.1 主要仪器

本研究所用主要仪器包括Synergy H1型酶标仪（美国BioTek公司）、VHX-7000型光学显微镜（日本KEYENCE公司）、FACS Calibur型流式细胞仪（美国BD Biosciences公司）、ABI Prism® 7500型定量实时聚合酶链式反应（quantitative real-time PCR，qRT-PCR）仪（美国ABI公司）、Gel Doc EZ型凝胶成像仪（美国Bio-Rad公司）等。

1.2 主要药品与试剂

吴茱萸碱对照品（批号B6398，纯度≥98%）购自北京康瑞纳生物科技有限公司；Annexin Ⅴ-FITC/PI细胞凋亡试剂盒（批号70-AP101）购自杭州联科生物技术股份有限公司；TRIzol试剂（批号EZB-TZ1）购自上海海方生物技术有限公司；PCR扩增试剂盒（批号XY0122）购自上海信裕生物科技有限公司；反转录试剂盒（批号K1622）购自赛默飞世尔科技（中国）有限公司；兔AGE多克隆抗体（批号ab23722）、兔RAGE多克隆抗体（批号ab37647）、兔磷酸化核因子κB p65（phosphorylated nuclear factor-κB p65，p-NF-κB p65）单克隆抗体（批号ab76302）、兔NF-κB p65单克隆抗体（批号ab16502）、兔基质金属蛋白酶2（matrix metalloproteinase-2，MMP-2）单克隆抗体（批号ab92536）、兔MMP-9单克隆抗体（批号ab76003）、鼠甘油醛-3-磷酸脱氢酶（GAPDH）单克隆抗体（批号ab8245）和辣根过氧化物酶（HRP）标记的山羊抗兔免疫球蛋白G二抗（批号ab6721）均购自英国Abcam公司；DMEM培养基（批号abs9561）购自爱必信（上海）生物科技有限公司；Lipofectamine® 2000转染试剂（批号YZ-11668）、高效RIPA裂解液（批号R0010）均购自北京索莱宝科技有限公司；CCK-8试剂、化学发光试剂（批号分别为C0038、P0018S）购自上海碧云天生物技术股份有限公司；pc-NC（阴性对照）和pc-RAGE（过表达RAGE）质粒由广州市锐博生物科技有限公司提供。

1.3 细胞

人绒毛膜滋养层细胞系HTR-8/SVneo购自美国ATCC细胞库。

2 方法

2.1 细胞培养与分组

将HTR-8/SVneo细胞接种于含10%胎牛血清、100 U/mL青霉素、100 μg/mL链霉素的DMEM培养基（以下简称“DMEM完全培养基”）中，于37 ℃、5%CO_2条件下培养（培养条件下同），每2～3 d换液1次，待细胞生长至对数期时进行实验。

将处于对数生长期的HTR-8/SVneo细胞分为对照组、高糖组、吴茱萸碱低浓度组、吴茱萸碱高浓度组、pc-NC组、pc-RAGE组，每组设置6个复孔。对照组细胞加入含5.5 mmol/L葡萄糖的DMEM完全培养基；高糖组细胞加入含25 mmol/L葡萄糖的DMEM完全培养基（葡萄糖浓度参考相关文献[10]设置）；吴茱萸碱低、高浓度组

细胞分别加入含25 mmol/L葡萄糖+2 μmol/L吴茱萸碱或含25 mmol/L葡萄糖+4 μmol/L吴茱萸碱的DMEM完全培养基（吴茱萸浓度参考本课题组前期预实验和相关文献[11]设置）；pc-NC组和pc-RAGE组细胞分别使用Lipofectamine 2000转染试剂转染pc-NC和pc-RAGE质粒（经qRT-PCR法检测，若pc-RAGE组细胞中RAGE mRNA表达较吴茱萸碱高浓度组和pc-NC组显著升高，则提示转染成功），再加入含25 mmol/L葡萄糖+4 μmol/L吴茱萸碱的DMEM完全培养基。

2.2 细胞存活率检测

采用CCK-8法检测。取对数生长期细胞，按“2.1”项下方法分组、处理，并设置不含细胞、不含药物的空白组。培养24 h后，每孔加入CCK-8试剂10 μL，于37 ℃下孵育2 h，使用酶标仪于450 nm波长处检测各孔的吸光度（A）值，并按下式计算细胞存活率：细胞存活率（%）=（$A_{实验组}-A_{空白组}$）/（$A_{对照组}-A_{空白组}$）×100%。

2.3 细胞凋亡情况检测

采用流式细胞术检测。取对数生长期细胞，按“2.1”项下方法分组、处理。培养24 h后，收集细胞，用磷酸盐缓冲液（PBS）洗涤后，加入binding buffer 100 μL重悬；随后，依次加入Annexin Ⅴ-FITC染液5 μL和PI染液5 μL，于室温下避光孵育15 min，使用流式细胞仪检测细胞凋亡情况。

2.4 细胞迁移能力检测

采用划痕实验检测。取对数生长期细胞，培养，待其融合至90%后，用200 μL移液器枪头在各孔底部中央划一直线，用PBS清洗后，将细胞按“2.1”项下方法分组、处理。分别于培养0、24 h时使用显微镜观察各组细胞的划痕宽度，并按下式计算划痕愈合率：划痕愈合率（%）=（0 h时的划痕宽度－24 h时的划痕宽度）/0 h时的划痕宽度×100%。

2.5 细胞侵袭能力检测

采用Transwell实验检测。取对数生长期细胞，以不含血清的DMEM培养基重悬，制成5×10^5个/mL的单细胞悬液。取上述单细胞悬液0.25 mL，接种于预先用基质胶处理5 h的Transwell小室上层；取含10%胎牛血清的DMEM培养基600 μL，置于小室下层。上室细胞按“2.1”项下方法分组、处理。培养24 h后，收集穿膜细胞，用4%多聚甲醛固定20 min，再以0.1%结晶紫染液染色10 min，使用显微镜观察侵袭细胞（呈紫色）并计数。

2.6 细胞中相关mRNA表达检测

采用qRT-PCR法检测。取对数生长期细胞，按“2.1”项下方法分组、处理。培养24 h后，收集细胞，使用TRIzol试剂提取其总RNA，检测其纯度和浓度后，使用反转录试剂盒将RNA反转录为cDNA，然后以此cDNA为模板进行PCR扩增。PCR反应体系包括SYBR® Premix Ex Taq™（2×）10 μL、PCR正向引物（10 μmol/L）0.8 μL、PCR反向引物（10 μmol/L）0.8 μL、cDNA（200 ng/μL）2 μL和无菌水6.4 μL。PCR反应条件为：94 ℃预变性5 min；94 ℃变性30 s，54 ℃退火30 s，72 ℃延伸2 min，共40个循环。以GAPDH为内参，采用$2^{-\Delta\Delta Ct}$法分析AGE、RAGE、NF-κB p65、MMP-2、MMP-9 mRNA的表达水平，结果以对照组为参照进行归一化处理。PCR引物序列及产物长度见表1。

表1 PCR引物序列及产物长度

目的基因	正向引物（5′→3′）	反向引物（5′→3′）	产物长度/bp
AGE	CTACCCTGCCACTGGCCCCTAT	AGCATGGCGAGGCACCACTC	383
RAGE	GTGTCCTTCCCAACGGCTC	ATTGCCTGGCACCGGAAAA	280
NF-κB p65	GATCAATGGCTACACAGGACCA	GTCCTCTTTCTGCACCTTGTCA	551
MMP-2	TCAAGTTCCCCGGCGATG	AGTTGGCCACATCTGGGTTG	139
MMP-9	AGACCTGGGCAGATTCCAAAC	CGGCAAGTCTTCCGAGTAGT	114
GAPDH	TGTTCGTCATGGGTGTGAAC	ATGGCATGGACTGTGGTCAT	462

2.7 细胞中相关蛋白表达检测

采用Western blot法检测。取对数生长期细胞，按“2.1”项下方法分组、处理。培养24 h后，收集细胞，用RIPA裂解液提取总蛋白，以BCA法测定蛋白浓度后进行加热变性。取变性蛋白，经12%十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离并转移到聚偏二氟乙烯膜上，用5%脱脂牛奶封闭1 h；洗膜后，加入AGE、RAGE、p-NF-κB p65、NF-κB p65、MMP-2、MMP-9、GAPDH一抗（稀释比例均为1∶1 000），于4 ℃下孵育过夜；洗膜后，加入相应二抗（稀释比例为1∶2 000），于室温下孵育2 h；使用化学发光试剂显色并置于凝胶成像仪下成像。以GAPDH为内参，使用Image J软件量化AGE、RAGE、MMP-2、MMP-9蛋白的表达水平，并记录p-NF-κB p65与NF-κB p65蛋白的条带灰度值比值（即NF-κB p65蛋白的磷酸化水平）。

2.8 统计学方法

使用GraphPad Prism 9.0软件对数据进行统计分析。数据以$\bar{x}\pm s$表示，多组间比较采用单因素方差分析，进一步两两比较采用SNK-q检验。检验水准$\alpha=0.05$。

3 结果

3.1 吴茱萸碱对高糖诱导的滋养层细胞存活率的影响

与对照组[（98.14±4.18）%]比较，高糖组细胞的存活率[（67.32±3.42）%]显著降低（$P<0.05$）；与高糖组比较，吴茱萸碱低、高浓度组细胞的存活率[（78.59±3.67）%、（88.25±3.85）%]均显著升高，且吴茱萸高浓度组的改善效果显著优于低浓度组（$P<0.05$）；与吴茱萸碱高浓度组和pc-NC组[（87.69±3.73）%]比较，pc-RAGE组细胞的存活率[（80.41±3.54）%]显著降低（$P<0.05$）。

3.2 吴茱萸碱对高糖诱导的滋养层细胞凋亡的影响

与对照组[（3.76±0.27）%]比较，高糖组细胞的凋亡率[（21.64±2.19）%]显著升高（$P<0.05$）；与高糖组比

较，吴茱萸碱低、高浓度组细胞的凋亡率[(16.13±1.73)%、(9.42±1.28)%]均显著降低，且吴茱萸高浓度组的改善效果显著优于低浓度组（$P<0.05$）；与吴茱萸碱高浓度组和pc-NC组[(10.38±1.32)%]比较，pc-RAGE组细胞的凋亡率[(14.97±1.54)%]显著升高（$P<0.05$）。结果见图1。

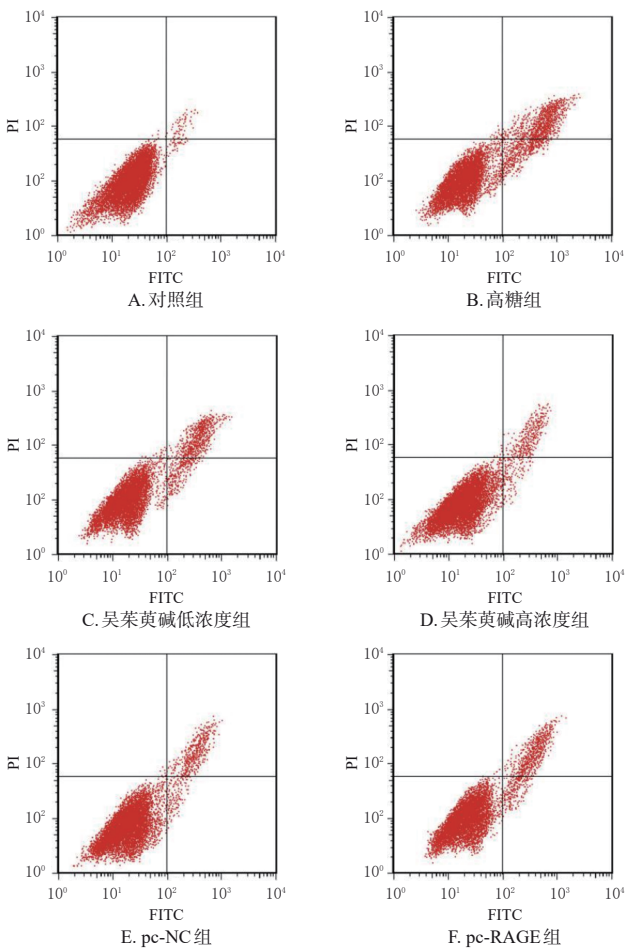


图1　吴茱萸碱对高糖诱导的滋养层细胞凋亡的影响

3.3　吴茱萸碱对高糖诱导的滋养层细胞迁移和侵袭能力的影响

与对照组比较，高糖组细胞的划痕愈合率和侵袭数均显著降低（$P<0.05$）；与高糖组比较，吴茱萸碱低、高浓度组细胞的划痕愈合率和侵袭数均显著升高，且吴茱萸高浓度组的改善效果显著优于低浓度组（$P<0.05$）；与吴茱萸碱高浓度组和pc-NC组比较，pc-RAGE组细胞的划痕愈合率和侵袭数均显著降低（$P<0.05$）。结果见图2、图3、表2。

3.4　吴茱萸碱对高糖诱导的滋养层细胞相关mRNA表达的影响

与对照组比较，高糖组细胞AGE、RAGE、NF-κB p65 mRNA的表达水平均显著升高，MMP-2、MMP-9 mRNA的表达水平均显著降低（$P<0.05$）；与高糖组比较，吴茱萸碱低、高浓度组细胞AGE、RAGE、NF-κB p65 mRNA的表达水平均显著降低，MMP-2、MMP-9 mRNA的表达水平均显著升高，且吴茱萸高浓度组的改善效果显著优于低浓度组（$P<0.05$）；与吴茱萸碱高浓度组和pc-NC组比较，pc-RAGE组细胞RAGE、NF-κB p65 mRNA的表达均显著上调，MMP-2、MMP-9 mRNA的表达均显著下调（$P<0.05$）。结果见表3。

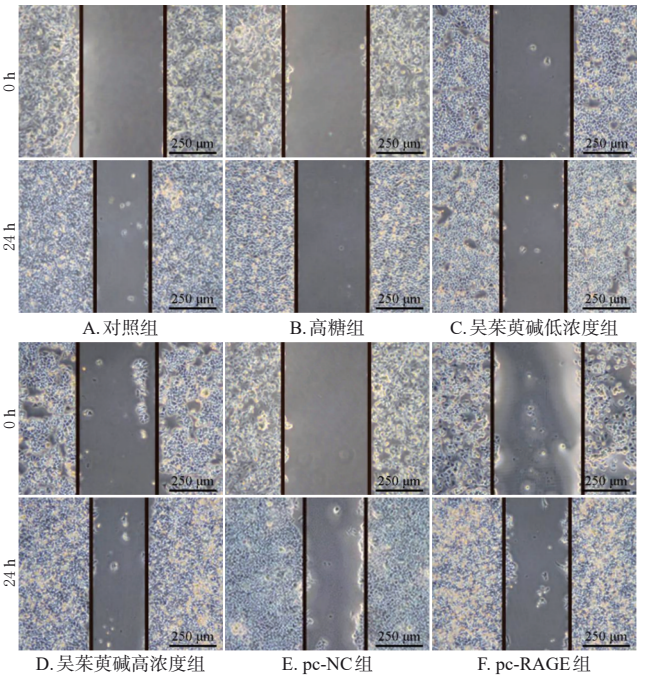


图2　吴茱萸碱对高糖诱导的滋养层细胞迁移能力的影响（划痕实验）

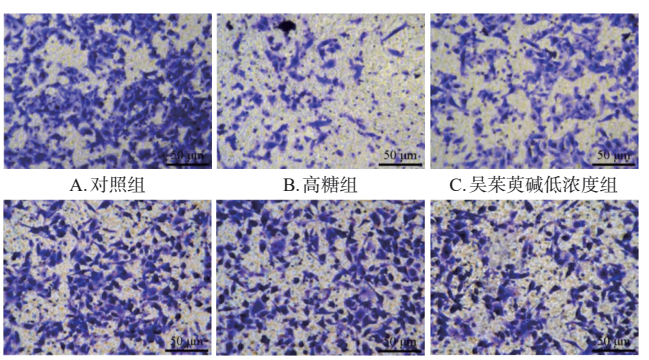


图3　吴茱萸碱对高糖诱导的滋养层细胞侵袭能力的影响（Transwell实验）

表2　吴茱萸碱对高糖诱导的滋养层细胞迁移和侵袭能力的影响（$\bar{x}\pm s$，$n=6$）

组别	划痕愈合率/%	侵袭细胞数	组别	划痕愈合率/%	侵袭细胞数
对照组	37.29±2.26	129.17±5.93	吴茱萸碱高浓度组	25.78±1.93^{bc}	102.17±4.51^{bc}
高糖组	11.53±1.43^{a}	62.33±3.46^{a}	pc-NC组	24.06±2.07	98.33±4.45
吴茱萸碱低浓度组	16.29±1.58^{b}	85.83±3.92^{b}	pc-RAGE组	18.35±1.84^{de}	89.67±4.07^{de}

a：与对照组比较，$P<0.05$；b：与高糖组比较，$P<0.05$；c：与吴茱萸碱低浓度组比较，$P<0.05$；d：与吴茱萸碱高浓度组比较，$P<0.05$；e：与pc-NC组比较，$P<0.05$。

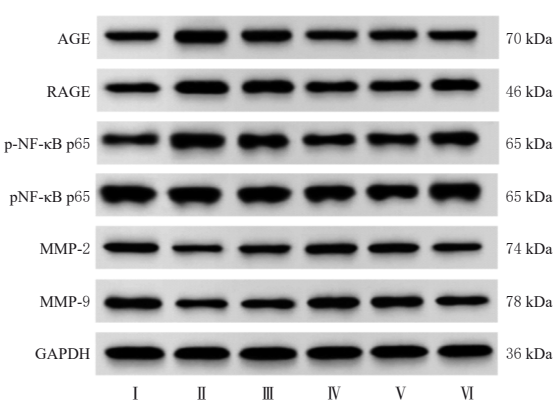
表3　吴茱萸碱对高糖诱导的滋养层细胞相关mRNA表达的影响（$\bar{x}\pm s$，$n=6$）

组别	AGE mRNA	RAGE mRNA	NF-κB p65 mRNA	MMP-2 mRNA	MMP-9 mRNA
对照组	1	1	1	1	1
高糖组	1.67±0.18[a]	1.63±0.17[a]	1.71±0.18[a]	0.45±0.05[a]	0.51±0.06[a]
吴茱萸碱低浓度组	1.42±0.15[b]	1.39±0.16[b]	1.48±0.14[b]	0.62±0.06[b]	0.69±0.08[b]
吴茱萸碱高浓度组	1.15±0.13[bc]	1.11±0.12[bc]	1.20±0.11[bc]	0.87±0.09[bc]	0.86±0.10[bc]
pc-NC组	1.17±0.14	1.10±0.13	1.18±0.13	0.85±0.08	0.85±0.07
pc-RAGE组	1.23±0.16	1.35±0.15[de]	1.44±0.15[de]	0.69±0.07[de]	0.71±0.08[de]

a：与对照组比较，$P<0.05$；b：与高糖组比较，$P<0.05$；c：与吴茱萸碱低浓度组比较，$P<0.05$；d：与吴茱萸碱高浓度组比较，$P<0.05$；e：与pc-NC组比较，$P<0.05$。

3.5　吴茱萸碱对高糖诱导的滋养层细胞相关蛋白表达的影响

与对照组比较，高糖组细胞AGE、RAGE蛋白的表达水平和NF-κB p65蛋白的磷酸化水平均显著升高，MMP-2、MMP-9蛋白的表达水平均显著降低（$P<0.05$）；与高糖组比较，吴茱萸碱低、高浓度组细胞AGE、RAGE蛋白的表达水平和NF-κB p65蛋白的磷酸化水平均显著降低，MMP-2、MMP-9蛋白的表达水平均显著升高，且吴茱萸高浓度组的改善效果显著优于低浓度组（$P<0.05$）；与吴茱萸碱高浓度组和pc-NC组比较，pc-RAGE组细胞RAGE蛋白的表达水平和NF-κB p65的磷酸化水平均显著升高，MMP-2、MMP-9蛋白的表达水平均显著降低（$P<0.05$）。结果见图4和表4。



Ⅰ：对照组；Ⅱ：高糖组；Ⅲ：吴茱萸碱低浓度组；Ⅳ：吴茱萸碱高浓度组；Ⅴ：pc-NC组；Ⅵ：pc-RAGE组。

图4　吴茱萸碱对高糖诱导的滋养层细胞相关蛋白表达影响的电泳图

表4　吴茱萸碱对高糖诱导的滋养层细胞相关蛋白表达的影响（$\bar{x}\pm s$，$n=6$）

组别	AGE/GAPDH	RAGE/GAPDH	p-NF-κB p65/NF-κB p65	MMP-2/GAPDH	MMP-9/GAPDH
对照组	0.45±0.05	0.51±0.06	0.38±0.03	0.84±0.08	0.89±0.09
高糖组	0.97±0.10[a]	0.93±0.09[a]	0.89±0.09[a]	0.32±0.03[a]	0.43±0.04[a]
吴茱萸碱低浓度组	0.78±0.08[b]	0.75±0.07[b]	0.73±0.07[b]	0.46±0.04[b]	0.57±0.06[b]
吴茱萸碱高浓度组	0.53±0.06[bc]	0.58±0.06[bc]	0.49±0.06[bc]	0.67±0.06[bc]	0.82±0.08[bc]
pc-NC组	0.50±0.05	0.60±0.06	0.54±0.05	0.69±0.07	0.78±0.07
pc-RAGE组	0.52±0.06	0.73±0.07[de]	0.67±0.07[de]	0.55±0.05[de]	0.64±0.05[de]

a：与对照组比较，$P<0.05$；b：与高糖组比较，$P<0.05$；c：与吴茱萸碱低浓度组比较，$P<0.05$；d：与吴茱萸碱高浓度组比较，$P<0.05$；e：与pc-NC组比较，$P<0.05$。

4　讨论

研究发现，具有正常生物学功能的滋养层细胞对胎盘的发育至关重要，当滋养层细胞长期处于高糖环境时，其侵袭、迁移和增殖会受到抑制，进而导致孕妇流产和胎儿早产[10]。本研究通过在高糖环境下培养人绒毛膜滋养层细胞HTR-8/SVneo以体外模拟GDM，结果显示，经高糖处理后，HTR-8/SVneo细胞的存活率和迁移、侵袭能力均较对照组显著降低或减弱，凋亡率较对照组显著升高，提示高糖环境会损伤HTR-8/SVneo细胞的生物学功能。

作为中药吴茱萸的活性成分之一，吴茱萸碱可减轻游离脂肪酸诱导的人脐静脉内皮细胞的炎症损伤，是治疗胰岛素抵抗和2型糖尿病的潜在药物[12]；而妊娠期胰岛素抵抗可导致胰岛β细胞功能障碍而使葡萄糖耐量受损，最终引发GDM[2]。此外，吴茱萸碱具有降血糖作用，能显著降低2型糖尿病大鼠的空腹血糖，并有一定的胰腺、肝脏保护作用[13]。以上研究表明，吴茱萸碱可能是GDM的潜在治疗药物。另有研究显示，胎盘滋养层细胞侵袭子宫的行为受多因素的严格调控，其中MMP-2、MMP-9蛋白的合成和激活是必需环节，两者可显著增强滋养层细胞的侵袭能力[14]。本研究结果显示，经吴茱萸碱干预后，高糖诱导的HTR-8/SVneo细胞的存活率和迁移、侵袭能力均显著升高或增强，凋亡率显著降低，且MMP-2、MMP-9 mRNA及蛋白的表达均显著上调，提示该成分可减轻高糖条件下滋养层细胞的损伤，改善受损滋养层细胞的生物学功能。

AGE是由蛋白、脂质和核酸的游离氨基与还原糖的醛基发生非酶基化等一系列反应而产生的化合物。在糖尿病中，高血糖可导致AGE积累，激活AGE/RAGE通路，进而加剧高糖诱导的细胞功能损伤[15]；同时，活化的AGE可结合RAGE，进一步触发NF-κB介导的炎症反应，最终影响糖尿病大鼠的骨代谢[16]。另有研究发现，GDM产妇脐带血样品中AGE水平过高，是新生儿低血糖发生的危险因素[17]；同时，GDM孕妇血清样品中RAGE水平高于非GDM孕妇，提示该指标对孕妇发生胰岛素抵抗及不良妊娠结局具有一定临床指导价值[18]。本研究结果显示，在高糖环境中，HTR-8/SVneo细胞中AGE、RAGE蛋白及mRNA的表达水平、NF-κB p65 mRNA的表达水平和NF-κB p65蛋白的磷酸化水平均显著升高，提示高糖环境会激活细胞中的AGE/RAGE信号通路。经吴茱萸碱干预后，HTR-8/SVneo细胞的上述指标均显著降低，与Dai等[8]的研究结果基本一致，提示吴茱萸碱可通过调节AGE/RAGE信号通路缓解高糖诱导的滋养层细胞功能损伤，促进其增殖、迁移和侵袭。为了进一步验证上述结果，本研究在HTR-8/SVneo细胞中转染pc-RAGE以过表达RAGE，结果显示，过表达RAGE会减弱吴茱萸碱对高糖诱导的滋养层细胞功能

损伤的改善作用，初步证实了AGE/RAGE信号通路是吴茱萸碱发挥上述作用的潜在靶点。

综上所述，吴茱萸碱可促进高糖诱导的滋养层细胞的增殖、迁移、侵袭，改善其功能损伤，上述作用与抑制AGE/RAGE信号通路有关。本研究初步从细胞层面研究了吴茱萸碱对GDM的保护作用，后续将通过体内动物实验基于AGE/RAGE信号通路深入探讨吴茱萸碱对GDM的改善作用及机制。

参考文献

[1] GENNARO G D, PALLA G, BATTINI L, et al. The role of adipokines in the pathogenesis of gestational diabetes mellitus[J]. Gynecol Endocrinol, 2019, 35(9): 737-751.

[2] PLOWS J F, STANLEY J L, BAKER P N, et al. The pathophysiology of gestational diabetes mellitus[J]. Int J Mol Sci, 2018, 19(11): 3342.

[3] ZHANG J, BAI W P. C1q/tumor necrosis factor related protein 6 (CTRP6) regulates the phenotypes of high glucose-induced gestational trophoblast cells via peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARγ) signaling[J]. Bioengineered, 2022, 13(1): 206-216.

[4] LEGG-ST PIERRE C B, MACKOVA M, MISKIEWICZ E I, et al. Insulinotropic nucleobindin-2/nesfatin-1 is dynamically expressed in the haemochorial mouse and human placenta[J]. Reprod Fertil Dev, 2018, 30(3): 519-532.

[5] LORENZON A R, MORELI J B, DE MACEDO MELO R, et al. Stromal cell-derived factor (SDF) 2 and the endoplasmic reticulum stress response of trophoblast cells in gestational diabetes mellitus and *in vitro* hyperglycaemic condition[J]. Curr Vasc Pharmacol, 2021, 19(2): 201-209.

[6] YU Y J, LU Q Y, CHEN F, et al. Serum untargeted metabolomics analysis of the mechanisms of evodiamine on type 2 diabetes mellitus model rats[J]. Food Funct, 2022, 13(12): 6623-6635.

[7] SHEN C Y, LU C H, WU C H, et al. The development of Maillard reaction, and advanced glycation end product (AGE)-receptor for AGE (RAGE) signaling inhibitors as novel therapeutic strategies for patients with AGE-related diseases[J]. Molecules, 2020, 25(23): 5591.

[8] DAI S G, MENG X Y, CAI X Q, et al. Therapeutic effect of ursolic acid on fetal development in pregnant rats with gestational diabetes mellitus via AGEs-RAGE signaling pathway[J]. J Food Biochem, 2021, 45(4): e13651.

[9] REN L Y, LOU Y, SUN M Y. The anti-tumor effects of evodiamine on oral squamous cell carcinoma (OSCC) through regulating advanced glycation end products (AGE)/receptor for advanced glycation end products (RAGE) pathway[J]. Bioengineered, 2021, 12(1): 5985-5995.

[10] PENG H Y, LI M Q, LI H P. High glucose suppresses the viability and proliferation of HTR-8/SVneo cells through regulation of the miR-137/PRKAA1/IL-6 axis[J]. Int J Mol Med, 2018, 42(2): 799-810.

[11] LV Q L, XUE Y, LI G D, et al. Beneficial effects of evodiamine on P2X(4)-mediated inflammatory injury of human umbilical vein endothelial cells due to high glucose [J]. Int Immunopharmacol, 2015, 28(2): 1044-1049.

[12] XUE Y, GUO T, ZOU L F, et al. Evodiamine attenuates $P2X_7$-mediated inflammatory injury of human umbilical vein endothelial cells exposed to high free fatty acids[J]. Oxid Med Cell Longev, 2018, 2018: 5082817.

[13] 董坤伦，陶雷，杨洁，等. 吴茱萸碱降低2型糖尿病大鼠血糖水平[J]. 基础医学与临床，2018，38(10)：1443-1445.
DONG K L, TAO L, YANG J, et al. Evodiamine decreases blood glucose in type 2 diabetes rats[J]. Basic Clin Med, 2018, 38(10): 1443-1445.

[14] 马婧，萨日娜，俞兰. 胎盘滋养层细胞侵袭行为与MMP-2和MMP-9的研究进展[J]. 医学研究杂志，2021，50(12)：152-155.
MA J, SARINA, YU L. Research progress on invasion behavior of placental trophoblast cells and MMP-2 and MMP-9[J]. J Med Res, 2021, 50(12): 152-155.

[15] BHATTAMISRA S K, KOH H M, LIM S Y, et al. Molecular and biochemical pathways of catalpol in alleviating diabetes mellitus and its complications[J]. Biomolecules, 2021, 11(2): 323.

[16] MAHMOUD A M, ALI M M. High glucose and advanced glycation end products induce CD147-mediated MMP activity in human adipocytes[J]. Cells, 2021, 10(8): 2098.

[17] 袁二伟，朱雷，许津莉，等. 妊娠期糖尿病产妇脐血FTM、AGE水平与新生儿低血糖的相关性研究[J]. 河北医科大学学报，2023，44(11)：1312-1316.
YUAN E W, ZHU L, XU J L, et al. Study on the correlation between umbilical cord blood FTM, AGE levels and neonatal hypoglycemia in pregnant women with gestational diabetes mellitus[J]. J Hebei Med Univ, 2023, 44(11): 1312-1316.

[18] 张译心，包向敏，王琛琛. GDM孕妇血清SHBG、RAGE、Gal-13预测胰岛素抵抗及母婴结局价值[J]. 中国计划生育学杂志，2023，31(11)：2717-2720，2727.
ZHANG Y X, BAO X M, WANG C C. Values of the levels of serum sex hormone-binding globulin, receptor for advanced glycation end products, and galactin-13 of pregnant women with gestational diabetes mellitus for predicting their insulin resistance and maternal and infant outcomes [J]. Chin J Fam Plan, 2023, 31(11): 2717-2720, 2727.

（收稿日期：2023-11-27　修回日期：2024-05-09）
（编辑：张元媛）