

黄芩苷通过调控 *miR-451* 对高糖诱导滋养层细胞损伤的保护作用

田雨青¹, 任宏丽^{1*}, 梁阿娟²

(1. 上海中医药大学, 上海 201203; 2. 上海市同济医院, 上海 200065)

摘要: **目的** 探讨黄芩苷通过调控 *miR-451* 对高糖诱导滋养层细胞损伤保护作用及机制。**方法** 采用葡萄糖 (5.5、25 mmol/L) 和黄芩苷 (25、100 μ mol/L) 处理人绒毛膜滋养层细胞 HTR-8/Svneo, 随机分为对照组、高糖组、高糖+黄芩苷低剂量组、高糖+黄芩苷高剂量组。将 anti-*miR-NC* 和 anti-*miR-451* 转染后, 用葡萄糖 (25 mmol/L) 处理, 作为高糖+anti-*miR-NC* 组和高糖+anti-*miR-451* 组; 将 *miR-NC* 和 *miR-451* 转染后, 用葡萄糖 (25 mmol/L) 和黄芩苷 (100 μ mol/L) 处理, 作为高糖+黄芩苷+*miR-NC* 组和高糖+黄芩苷+*miR-451* 组。采用 CCK8 和流式细胞术检测细胞活性和凋亡, Western blot 检测 cleaved-caspase3、Bax 蛋白表达, 试剂盒检测 MDA 水平及 LDH、SOD 活性; RT-qPCR 检测 *miR-451* 表达。**结果** 与对照组比较, 高糖组细胞活性、SOD 活性降低 ($P<0.05$), 细胞凋亡率、LDH 活性、MDA 水平、cleaved-caspase3 和 Bax 蛋白表达、*miR-451* 表达升高 ($P<0.05$); 与高糖组比较, 高糖+黄芩苷低、高剂量组上述指标均得到改善。与高糖+anti-*miR-NC* 组比较, 细胞活性、SOD 活性升高 ($P<0.05$), 细胞凋亡率、LDH 活性、MDA 水平、cleaved-caspase3 和 Bax 蛋白表达、*miR-451* 表达降低 ($P<0.05$)。与高糖+黄芩苷+*miR-NC* 组比较, 高糖+黄芩苷+*miR-451* 组细胞活性、SOD 活性升高 ($P<0.05$), 细胞凋亡率、LDH 活性、MDA 水平、cleaved-caspase3 和 Bax 蛋白表达、*miR-451* 表达降低 ($P<0.05$)。**结论** 黄芩苷可抑制高糖诱导人绒毛膜滋养层细胞 HTR-8/Svneo 的凋亡和氧化应激, 促进细胞的活力, 可能与下调 *miR-451* 表达有关。

关键词: 黄芩苷; *miR-451*; 滋养层细胞; 凋亡; 氧化应激

中图分类号: R285.5

文献标志码: B

文章编号: 1001-1528(2022)04-1314-04

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2022.04.053

妊娠期糖尿病是妊娠期发生的一种严重疾病, 其中超重、肥胖、高龄产妇等是关键危险因素^[1]。该病是指在妊娠期发生或首次发现的糖耐受性降低, 会出现早产、流产、巨大儿等, 对母婴健康带来严重影响^[2]。滋养层细胞是胚胎发育而来的, 可以直接与子宫内膜的细胞接触, 在维持胚胎早期着床、母胎物质交换和排除代谢物等方面具有重要的作用, 若滋养层细胞发生异常则易引起流产、早产等^[3-4]。

黄芩苷是从黄芩中提取出的黄酮类化合物, 具有抗肿瘤、抑菌、利尿等活性^[5], 可降低妊娠期大鼠模型的血压、尿蛋白, 其作用机制与 sFIT-1、PLGF 表达有关^[6]; 能抑制肿瘤坏死因子 α (TNF- α) 诱导人早孕绒毛膜滋养层细胞的凋亡, 但在高糖环境下的研究尚不明确^[7]。*miRNA* 是非编码 RNA, 广泛参与多种疾病的发展, 包括妊娠期糖尿病^[8]。梁小娟等^[9]报道, 它在妊娠期糖尿病患者外周血中表达上调, 与胰岛素抵抗指数呈正相关。本实验在高糖环境下体外培养人绒毛膜滋养层细胞, 探讨黄芩苷通过调控 *miR-451* 影响高糖诱导滋养层细胞的活力、凋亡和氧化应激。

1 材料与方法

1.1 细胞与试剂 人绒毛膜滋养层细胞 HTR-8/Svneo 购于

美国 ATCC 典藏中心。胎牛血清、DMEM 培养基购于上海语纯生物科技有限公司; 葡萄糖购于美国 Sigma 公司; 黄芩苷购于南京青泽医药有限公司; anti-*miR-NC*、anti-*miR-451*、*miR-NC*、*miR-451* 购于上海吉玛制药有限公司; Lipofectamine 3000 试剂盒、Trizol 试剂盒购于美国 Thermo Fisher 公司; CCK8 试剂盒、凋亡试剂盒购于北京索莱宝科技有限公司; cleaved-caspase3 抗体、Bax 抗体、GAPDH 抗体购于英国 Abcam 公司; 辣根过氧化物酶标记的二抗购于武汉博士德生物工程有限公司; LDH、MDA、SOD 试剂盒购于南京建成生物工程研究所; 逆转录试剂盒、荧光定量试剂盒购于日本 TaKaRa 公司; 引物购于广州锐博生物技术有限公司。

1.2 细胞培养 从液氮内取出人绒毛膜滋养层细胞 HTR-8/Svneo, 培养在含有 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基内, 置于培养箱中, 在 37 $^{\circ}$ C、5% CO_2 下每 2 d 换 1 次培养液, 当细胞生长状态融合至 80% 时, 加入胰酶消化培养。

1.3 分组及给药 取对数生长状态良好的人绒毛膜滋养层细胞 HTR-8/Svneo, 用 5.5、25 mmol/L 葡萄糖处理, 作为对照组和高糖组; 用含 25、100 μ mol/L 黄芩苷和 25 mmol/L 葡萄糖处理细胞, 作为高糖+黄芩苷低、高剂量组; 将 anti-*miR-NC* 和 anti-*miR-451* 转染人绒毛膜滋养层细胞 HTR-

收稿日期: 2021-04-19

作者简介: 田雨青 (1996—), 女 (苗族), 硕士, 从事中医妇科文献研究。Tel: 13916006588, E-mail: noudu4@21cn.com

* 通信作者: 任宏丽 (1976—), 女, 博士, 副教授, 从事中医临床文献、中医药文化传承与发展研究

8/Svneo 后进行高糖处理,作为高糖+anti-miR-NC 组、高糖+anti-miR-451 组;将 miR-NC 和 miR-451 转染人绒毛膜滋养层细胞 HTR-8/Svneo 后,采用 25 mmol/L 葡萄糖和 100 μ mol/L 黄芩苷处理细胞,作为高糖+黄芩苷+miR-NC 组、高糖+黄芩苷+miR-451 组。参照 Lipofectamine 3000 试剂盒说明书进行细胞转染,48 h 后收集细胞,进行后续实验。

1.4 CCK8 检测细胞活性 取人绒毛膜滋养层细胞 HTR-8/Svneo,重悬后接种在 96 孔细胞板中,培养 48 h 后每孔加入 10 μ L CCK8 溶液,室温下反应 2 h,在 450 nm 波长处检测吸光度,计算细胞活性。

1.5 流式细胞术检测细胞凋亡 取人绒毛膜滋养层细胞 HTR-8/Svneo,接种在 6 孔细胞板中,离心后除去上清,加入 400 μ L 结合缓冲液吹打后加入 Annexin V-FITC、PI 各 5 μ L,避光反应 15 min,在流式细胞仪上检测细胞凋亡情况。

1.6 Western blot 检测 cleaved-caspase3、Bax 蛋白表达 取人绒毛膜滋养层细胞 HTR-8/Svneo,加 RIPA 蛋白裂解液提取总蛋白并检测浓度,100 $^{\circ}$ C 煮沸变性 5 min,取 40 μ g 在 SDS-PAGE 上进行电泳分离处理,转膜,加入脱脂奶粉封闭培养 2 h,加入 cleaved-caspase3、Bax、GAPDH 抗体,在 4 $^{\circ}$ C 下过夜培养,洗膜 3 次,加入辣根过氧化物酶标记的二抗,室温培养 2 h,洗膜 3 次,加入 ECL 发光液,显影,以 GAPDH 为内参,采用 Image J 软件扫描分析蛋白条带的灰度值。

1.7 试剂盒检测 MDA 水平及 LDH、SOD 活性 取人绒毛

膜滋养层细胞 HTR-8/Svneo,清洗后加入裂解液,离心取细胞上清液,参照相关试剂盒说明书分别检测 MDA 水平及 LDH、SOD 活性。

1.8 RT-qPCR 检测 miR-451 表达 取人绒毛膜滋养层细胞 HTR-8/Svneo,加入 Trizol 试剂进行总 RNA 提取,采用分光光度计检测 260、280 nm 波长处 RNA 浓度,参照逆转录试剂盒说明书合成 cDNA,将 cDNA 灭活后参照荧光定量试剂说明进行 PCR 扩增,以 U6 为内参,采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法检测 miR-451 表达。miR-451 正向引物序列 5'-AAACCGTTACCATTACTGAGTT-3',反向引物序列 5'-GCGAGCACAGAATTAATACGAC-3';U6 正向引物序列 5'-CTCGCTTCGGCAGCACATATACT-3',反向引物序列 5'-ACGCTTCACGAATTTGCGTGTG-3'。

1.9 统计学分析 通过 SPSS 19.0 软件进行处理,计量资料以 ($\bar{x}\pm s$) 表示,多组间比较采用单因素方差分析,2 组间比较采用 LSD-*t* 检验。 $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 不同浓度黄芩苷对高糖诱导滋养层细胞活性和凋亡的影响 与对照组比较,高糖组细胞活性降低 ($P<0.05$),细胞凋亡率、cleaved-caspase3 和 Bax 蛋白表达升高 ($P<0.05$);与高糖组比较,高糖+黄芩苷低、高剂量组细胞活性升高 ($P<0.05$),细胞凋亡率、cleaved-caspase3 和 Bax 蛋白表达降低 ($P<0.05$),见图 1、表 1。

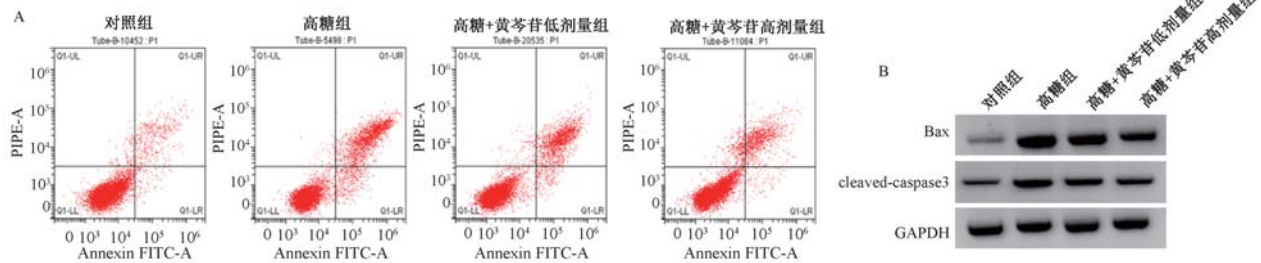


图 1 各组细胞凋亡率 (A)、凋亡相关蛋白 (B) (I)

表 1 不同浓度黄芩苷对高糖诱导滋养层细胞活性和凋亡的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=9$)

组别	细胞活性/%	细胞凋亡率/%	cleaved-caspase3	Bax
对照组	99.7 $\pm$ 8.5	5.3 $\pm$ 0.8	1.01 $\pm$ 0.07	0.99 $\pm$ 0.07
高糖组	46.3 $\pm$ 4.4 [*]	26.7 $\pm$ 2.5 [*]	2.15 $\pm$ 0.21 [*]	1.98 $\pm$ 0.21 [*]
高糖+黄芩苷低剂量组	58.2 $\pm$ 5.6 [#]	20.5 $\pm$ 2.1 [#]	1.83 $\pm$ 0.17 [#]	1.75 $\pm$ 0.16 [#]
高糖+黄芩苷高剂量组	79.1 $\pm$ 6.4 [#]	12.8 $\pm$ 1.2 [#]	1.41 $\pm$ 0.13 [#]	1.32 $\pm$ 0.14 [#]

注:与对照组比较,^{*} $P<0.05$;与高糖组比较,[#] $P<0.05$ 。

2.2 不同浓度黄芩苷对高糖诱导滋养层细胞氧化应激的影响 与对照组比较,高糖组细胞 LDH 活性、MDA 水平升高 ($P<0.05$),SOD 活性降低 ($P<0.05$);与高糖组比较,高

糖+黄芩苷低、高剂量组细胞 LDH 活性、MDA 水平降低 ($P<0.05$),SOD 活性升高 ($P<0.05$),见表 2。

表 2 不同浓度黄芩苷对高糖诱导滋养层细胞氧化应激的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=9$)

组别	LDH/(U $\cdot$ L ⁻¹)	MDA/(μ mol $\cdot$ L ⁻¹)	SOD/(U $\cdot$ mL ⁻¹)
对照组	10.4 $\pm$ 1.1	4.6 $\pm$ 0.6	31.2 $\pm$ 2.7
高糖组	40.3 $\pm$ 4.3 [*]	18.7 $\pm$ 1.5 [*]	9.5 $\pm$ 1.0 [*]
高糖+黄芩苷低剂量组	31.2 $\pm$ 2.5 [#]	15.4 $\pm$ 1.2 [#]	14.4 $\pm$ 1.4 [#]
高糖+黄芩苷高剂量组	16.7 $\pm$ 1.5 [#]	9.7 $\pm$ 0.9 [#]	23.6 $\pm$ 2.1 [#]

注:与对照组比较,^{*} $P<0.05$;与高糖组比较,[#] $P<0.05$ 。

2.3 不同浓度黄芩苷对高糖诱导滋养层细胞 *miR*-451 表达的影响 与对照组比较,高糖组细胞 *miR*-451 表达升高 ($P<0.05$);与高糖组比较,高糖+黄芩苷低、高剂量组细胞 *miR*-451 表达降低 ($P<0.05$),见表3。

表3 各组细胞 *miR*-451 表达比较 ($\bar{x}\pm s, n=9$)

组别	<i>miR</i> -451
对照组	0.95±0.07
高糖组	2.34±0.28*
高糖+黄芩苷低剂量组	1.97±0.21 [#]
高糖+黄芩苷高剂量组	1.45±0.15 [#]

注:与对照组比较,* $P<0.05$;与高糖组比较,[#] $P<0.05$ 。

2.4 干扰 *miR*-451 对高糖诱导滋养层细胞活性和凋亡的影响 与高糖+anti-*miR*-NC 组比较,高糖+anti-*miR*-451 组细胞

miR-451 表达、细胞凋亡率及 cleaved-caspase3、Bax 蛋白表达降低 ($P<0.05$),细胞活性升高 ($P<0.05$),见图2、表4。

2.5 干扰 *miR*-451 对高糖诱导滋养层细胞氧化应激的影响 与高糖+anti-*miR*-NC 组比较,高糖+anti-*miR*-451 组细胞 LDH 活性、MDA 水平降低 ($P<0.05$),SOD 活性升高 ($P<0.05$),见表5。

2.6 黄芩苷对高糖诱导滋养层细胞活性、凋亡、氧化应激的影响 与高糖+黄芩苷+*miR*-NC 组比较,高糖+黄芩苷+*miR*-451 组细胞 *miR*-451 表达、细胞凋亡率、LDH 活性、MDA 水平及 cleaved-caspase3、Bax 蛋白表达升高 ($P<0.05$),细胞活性、SOD 活性降低 ($P<0.05$),见图3、表6。

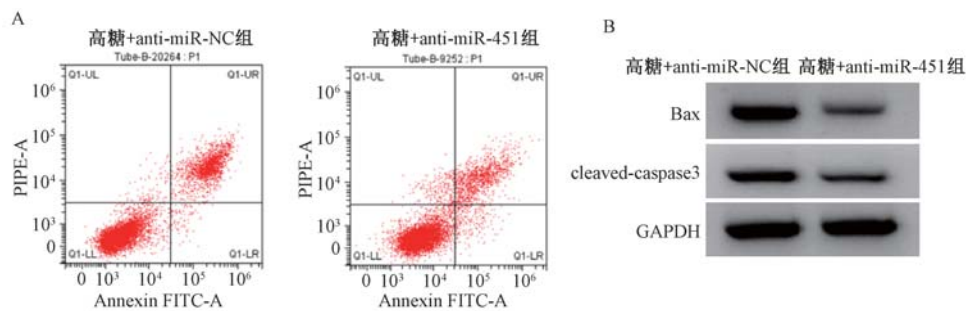


图2 各组细胞凋亡率 (A)、凋亡相关蛋白 (B) (II)

表4 干扰 *miR*-451 对高糖诱导滋养层细胞活性和凋亡的影响 ($\bar{x}\pm s, n=9$)

组别	<i>miR</i> -451	细胞活性/%	细胞凋亡率/%	cleaved-caspase3	Bax
高糖+anti- <i>miR</i> -NC 组	2.25±0.24	54.3±5.6	24.9±2.6	1.02±0.06	0.99±0.06
高糖+anti- <i>miR</i> -451 组	1.67±0.17*	71.4±6.5*	15.4±1.6*	0.47±0.05*	0.41±0.04*

注:与高糖+anti-*miR*-NC 组比较,* $P<0.05$ 。

表5 干扰 *miR*-451 对高糖诱导滋养层细胞氧化应激的影响 ($\bar{x}\pm s, n=9$)

组别	LDH/(U·L ⁻¹)	MDA/(μmol·L ⁻¹)	SOD/(U·mL ⁻¹)
高糖+anti- <i>miR</i> -NC 组	38.5±3.7	16.5±1.6	11.2±1.2
高糖+anti- <i>miR</i> -451 组	21.4±2.3*	10.3±0.9*	18.9±1.6*

注:与高糖+anti-*miR*-NC 组比较,* $P<0.05$ 。

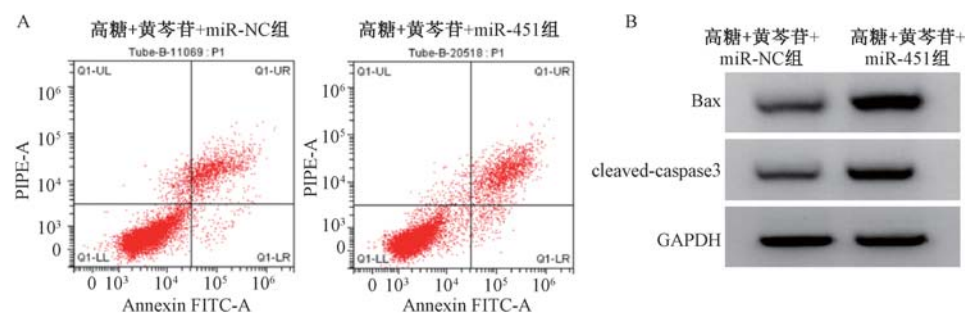


图3 各组细胞凋亡率 (A)、凋亡相关蛋白 (B) (III)

表6 黄芩苷对高糖诱导滋养层细胞活性、凋亡、氧化应激的影响 ($\bar{x}\pm s, n=9$)

组别	<i>miR</i> -451	细胞活性/%	细胞凋亡率/%	cleaved-caspase3	Bax	LDH/(U·L ⁻¹)	MDA/(μmol·L ⁻¹)	SOD/(U·mL ⁻¹)
高糖+黄芩苷+ <i>miR</i> -NC 组	1.53±0.15	79.5±7.9	14.1±1.3	0.96±0.07	0.99±0.08	18.9±1.7	10.3±1.2	23.5±2.2
高糖+黄芩苷+ <i>miR</i> -451 组	1.95±0.18*	62.5±5.7*	19.6±1.5*	1.65±0.16*	1.55±0.15*	30.2±2.7*	15.3±1.5*	16.8±1.6*

注:与高糖+黄芩苷+*miR*-NC 组比较,* $P<0.05$ 。

3 讨论

糖代谢异常是妊娠期糖尿病发生的主要原因, 高糖能够使滋养层细胞、心肌细胞等发生凋亡, 抑制细胞的增殖^[10]。高糖处理滋养层细胞, 能够使滋养层细胞的微绒毛排列紊乱和出现破坏、疏密不均等现象^[11], 促进滋养层细胞的凋亡、氧化应激和炎症反应^[12-13]。本研究中用 25 mmol/L 葡萄糖处理人绒毛膜滋养层细胞, 抑制细胞的活力, 促进细胞的凋亡率, 上调 cleaved-caspase3 和 Bax 蛋白表达, LDH 活性、MDA 水平升高, SOD 活性降低。黄芩具有泻火排毒、止血和安胎等功效, 黄芩苷是从黄芩内提取分离的黄酮类化合物, 在抗炎、抗氧化、降血压等多种药理活性^[14]。人早孕绒毛滋养层细胞经过 TNF- α 处理后, 黄芩苷促进滋养层细胞细胞的增殖, 效果优于黄芩水提取物^[15]。黄芩苷能够抑制 TNF- α 诱导的人蜕膜细胞的凋亡, 促进细胞增殖^[16]。本研究选取 25、100 μ mol/L 黄芩苷作用人绒毛膜滋养层细胞后, 促进高糖诱导的细胞活性, 抑制细胞凋亡率, 下调 cleaved-caspase3 和 Bax 蛋白表达, LDH 活性、MDA 水平降低, SOD 活性升高, 说明黄芩苷能够减缓高糖诱导的人绒毛膜滋养层细胞的凋亡和氧化应激, 促进细胞的活力。

miRNA 是一种高度保守的单链非编码 RNA 分子, 通过调控下游 mRNA, 参与滋养层细胞的增殖、凋亡等多种生物学作用^[17]。Zhou 等^[18]研究显示, miR-384 在胚胎和血浆、滋养细胞 HTR-8/SVneo 中表达上调, miR-384 通过靶向负调控 PTBP3 能够抑制滋养细胞 HTR-8/SVneo 的增殖。曹文超等^[19]研究显示, 过表达 miR-205-5p 在滋养层细胞 HTR-8/Svneo 中表达上调, 过表达 miR-205-5p 可以抑制滋养层细胞 HTR-8/Svneo 的增殖和侵袭, 促进细胞的凋亡。本研究显示, 高糖处理人绒毛膜滋养层细胞后, miR-451 表达上调, 经过 25、100 μ mol/L 黄芩苷处理后, miR-451 表达下调, 干扰 miR-451 能够促进高糖诱导的人绒毛膜滋养层细胞的活力, 抑制细胞凋亡和氧化应激。过表达的 miR-451 部分恢复, 说明黄芩苷可能通过调控 miR-451 减缓高糖诱导的人绒毛膜滋养层细胞氧化损伤。

综上所述, 高糖条件下 miR-451 表达上调, 黄芩苷能够通过下调 miR-451 的表达减缓高糖诱导的人绒毛膜滋养层细胞的凋亡和氧化应激, 促进细胞的活力, 起到保护细胞的作用。

参考文献:

[1] 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.

[2] Pan H Y, Zhang X S, Rao J W, et al. Comparison of general maternal and neonatal conditions and clinical outcomes between embryo transfer and natural conception[J]. *BMC Pregnancy Childbirth*, 2020, 20(1): 422.

[3] 林妙玲, 华 芮, 周 瑶, 等. 三氯生对人绒毛膜滋养层细

胞 HTR8-SVneo 功能影响的研究[J]. *中国实用妇科与产科杂志*, 2020, 36(5): 462-466.

[4] Brosens I, Puttemans P, Benagiano G. Placental bed research: I. The placental bed: from spiral arteries remodeling to the great obstetrical syndromes[J]. *Am J Obstet Gynecol*, 2019, 221(5): 437-456.

[5] 龙 宇, 向 燕, 谭裕君, 等. 黄芩苷药理作用及新剂型的研究进展[J]. *中草药*, 2019, 50(24): 6142-6148.

[6] 陈雅婷, 李 莉, 巫梦雪, 等. 黄芩苷对妊娠期高血压大鼠胎盘 sFIT-1 及 PLGF 表达的影响[J]. *临床和实验医学杂志*, 2019, 18(22): 2381-2385.

[7] 刘惠萍, 王若光, 夏伟瑜, 等. 黄芩苷对体外肿瘤坏死因子 α 诱导培养人早孕绒毛细胞滋养层细胞凋亡的影响[J]. *中华中医药杂志*, 2007, 22(6): 351-354.

[8] Gillet V, Ouellet A, Stepanov Y, et al. miRNA profiles in extracellular vesicles from serum early in pregnancies complicated by gestational diabetes mellitus [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2019, 104(11): 5157-5169.

[9] 梁小娟, 周 芸, 罗仕琴. 妊娠期糖尿病患者血浆中 miR-144 和 miR-451 的表达及临床价值[J]. *医学理论与实践*, 2020, 33(1): 13-16.

[10] 苏嘉霖. 高糖状态和 VE-cadherin 对滋养细胞表皮生长因子受体表达的影响[J]. *中国优生与遗传杂志*, 2020, 28(4): 451-454.

[11] 丁 娟, 徐亚廷, 汪 琳. 高糖抑制滋养层细胞表面微绒毛的形成及其机制[J]. *武汉大学学报 (医学版)*, 2020, 41(6): 917-921.

[12] 李 琴, 谢莹莹. 胰岛素生长因子 2 甲基化对高糖诱导滋养层细胞凋亡及 PI3K/Akt 通路的影响[J]. *安徽医科大学学报*, 2020, 55(5): 665-670.

[13] Sánchez-Santos A, Martínez-Hernández M G, Contreras-Ramos A, et al. Hyperglycemia-induced mouse trophoblast spreading is mediated by reactive oxygen species[J]. *Mol Reprod Dev*, 2018, 85(4): 303-315.

[14] 姚 雪, 吴国真, 赵宏伟, 等. 黄芩中化学成分及药理作用研究进展[J]. *辽宁中医杂志*, 2020, 47(7): 215-220.

[15] 刘惠萍, 王若光. 黄芩苷及黄芩水提液对体外培养的滋养细胞生长的影响[J]. *中医药导报*, 2013, 19(6): 14-16.

[16] 秦明春, 王若光, 李春梅, 等. 肿瘤坏死因子 α 诱导蜕膜细胞凋亡模型建立及黄芩苷对蜕膜细胞凋亡的影响[J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2007, 11(19): 3793-3796.

[17] Wang F R, Yan J. MicroRNA-454 is involved in regulating trophoblast cell proliferation, apoptosis, and invasion in preeclampsia by modulating the expression of ephrin receptor B4 [J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, 107: 746-753.

[18] Zhou W B, She G T, Yang K Y, et al. miR-384 inhibits proliferation and migration of trophoblast cells via targeting PTBP3[J]. *Pregnancy Hypertens*, 2020, 21: 132-138.

[19] 曹文超, 张青林. miR-205-5p 靶向 CDKN1C 调节滋养层细胞生物学行为的研究[J]. *山西医科大学学报*, 2020, 51(12): 1366-1372.