【基础研究】

山柰酚调节 Nrf2/SLC7A11/GPX4 信号通路对高糖诱导的滋养层细胞铁死亡的影响

吕 璐，翟春霞，李静静
（鹤壁市人民医院妇产科，河南鹤壁 458030）

摘要：目的 探讨山柰酚调节核因子 E2 相关因子（nuclear factor erythroid-2 related factor，Nrf）2/ 溶质载体家族 7 成员（solute carrier family 7 member，SLC7A）11/ 谷胱甘肽过氧化物酶（glutathione peroxidase，GPX）4 信号通路对高糖诱导滋养层细胞铁死亡的影响。**方法** 体外培养人绒毛膜滋养层细胞 HTR-8/SVneo，分为对照组、模型组（25 mmol/L 葡萄糖）、山柰酚组、ML385 组（Nrf2 抑制剂）、山柰酚＋ ML385 组。采用细胞计数 kit-8 法检测细胞存活率；采用流式细胞仪检测细胞凋亡率；酶联免疫吸附试验法检测细胞中乳酸脱氢酶（lactate dehydrogenase，LDH）、白介素（interleukin，IL）-6、IL-18 以及肿瘤坏死因子（tumor necrosis factor，TNF）-α 水平；生化法检测细胞中抗氧化因子超氧化物歧化酶（superoxide dismutase，SOD）、过氧化氢酶（catalase，CAT）、谷胱甘肽（glutathione，GSH）、丙二醛（malondialdehyde，MDA）、铁含量以及活性氧（reactive oxygen species，ROS）相对水平；蛋白质印迹法检测各组 HTR-8/SVneo 细胞中 Nrf2/SLC7A11/GPX4 信号相关蛋白表达。**结果** 山柰酚可升高细胞存活率、SOD、CAT、GSH 水平和 Nrf2、SLC7A11、GPX4 蛋白表达，降低 LDH 释放量、细胞凋亡率、IL-6、IL-18、TNF-α、MDA、ROS 水平及铁含量，抑制高糖诱导的滋养层细胞铁死亡；ML385 可增强高糖诱导的滋养层细胞铁死亡，且 ML385 可减弱山柰酚对高糖诱导的滋养层细胞铁死亡的抑制作用。**结论** 山柰酚可能通过激活 Nrf2/SLC7A11/GPX4 信号通路，抑制高糖诱导的滋养层细胞炎症与脂质过氧化，减轻铁死亡。

关键词：山柰酚；核因子 E2 相关因子 2/ 溶质载体家族 7 成员 11/ 谷胱甘肽过氧化物酶 4；高糖；滋养层细胞；铁死亡
中图分类号：R33 **文献标志码：**A **文章编号：**1672-9188（2023）09-0914-08
DOI：10.13683/j.wph.2023.09.005

Effects of kaempferol on ferroptosis in trophoblast cells induced by high glucose by regulating Nrf2/SLC7A11/GPX4 signaling pathway

LYU Lu, ZHAI Chunxia, LI Jingjing
(*Department of Gynecology and Obstetrics, the People's Hospital of Hebi, Hebi 458030, Henan Province, China*)

Abstract: ***Objective*** To investigate the effects of kaempferol on ferroptosis in trophoblast cells induced by high glucose by regulating nuclear factor erythroid-2 related factor (Nrf) 2/solute carrier family 7 member (SLC7A) 11/glutathione peroxidase (GPX) 4 signaling pathway. ***Methods*** Human chorionic trophoblast cells HTR-8/SVneo were cultured *in vitro* and divided into control group, model group (25 mmol/L glucose), kaempferol group, ML385 (Nrf2 inhibitor) group, kaempferol＋ML385 group. Cell counting kit-8 was used to detect the cell survival rate. Flow cytometry was used to detect the apoptosis rate. Enzyme linked immunosorbent assay was used to detect the levels of lactate dehydrogenase (LDH), interleukin (IL)-6, IL-18, and tumor necrosis factor (TNF)-α. The biochemical method was used to detect the antioxidant factors superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione (GSH), malondialdehyde (MDA), iron content and relative

收稿日期：2022-09-22；修回日期：2023-07-05
作者简介：吕璐，主治医师，研究方向：妊娠期糖尿病。
基金项目：河南省医学科技攻关计划项目（2018020289）

levels of reactive oxygen species (ROS). Western blot was used to detect the expression of Nrf2/SLC7A11/GPX4 signal-related proteins in HTR-8/SVneo cells of each group. ***Results*** Kaempferol can increase the cell survival rate, SOD, CAT, GSH levels and the protein expressions of Nrf2, SLC7A11 and GPX4, reduce LDH release, apoptosis rate, IL-6, IL-18, TNF-α, MDA, ROS levels and iron content, and inhibit the ferroptosis of trophoblast cells induced by high glucose. ML385 can enhance the ferroptosis of trophoblast cells induced by high glucose, and weaken the inhibitory effect of kaempferol on the ferroptosis of trophoblast cells induced by high glucose. ***Conclusion*** Kaempferol may inhibit high glucose-induced inflammation and lipid peroxidation in trophoblast cells by activating Nrf2/SLC7A11/GPX4 signaling pathway, and alleviate ferroptosis.

Key words: kaempferol; nuclear factor erythroid-2 related factor 2/solute carrier family 7 member 11/glutathione peroxidase 4; high glucose; trophoblast; ferroptosis

妊娠期糖尿病（gestational diabetes mellitus，GDM）是妊娠期女性常见的并发症，可导致胎儿发育异常、流产，甚至围产期死亡[1—2]。高血糖可下调溶质载体家族 7 成员（solute carrier family 7 member，SLC7A）11 和谷胱甘肽过氧化物酶（glutathione peroxidase，GPX）4 的表达，增加活性氧（reactive oxygen species，ROS）的产生和消耗谷胱甘肽（glutathione，GSH）含量，诱导脂质过氧化和铁死亡，损伤滋养层细胞，而抑制铁死亡可减轻高糖诱导的滋养层细胞损伤[3—6]。激活核因子 E2 相关因子（nuclear factor erythroid-2 related factor，Nrf）2 信号可上调 SLC7A11 和 GPX4 的表达，抑制胎盘组织铁沉积，减轻铁死亡[7]，同时抑制氧化应激，改善 GDM 小鼠妊娠结局[8]。

山柰酚是一种黄酮类化合物，具有抗炎、抗凋亡和抗氧化活性[9—10]。其可通过激活 Nrf2/SLC7A11/GPX4 信号通路增强神经元抗氧化能力，并抑制脂质过氧化和铁死亡，改善氧 - 葡萄糖剥夺 / 复氧（oxygen-glucose deprivation/reoxygenation，OGD/R）诱导的神经元损伤凋亡[11]。现通过高糖诱导人绒毛膜滋养层细胞 HTR-8/SVneo 建立体外细胞模型，探究山柰酚调节 Nrf2/SLC7A11/GPX4 信号通路对高糖诱导的滋养层细胞铁死亡的影响。

1 材料与方法

1.1 试剂及仪器

人绒毛膜滋养层细胞 HTR-8/SVneo（CM-H561）购自上海盖宁生物科技有限公司；DMEM/F12 无糖培养基（PM150322）、DMEM/F12 完全培养基（含 HEPES、10% 胎牛血清，PM150310B）均购自武汉普诺赛生命科技有限公司；山柰酚（纯度≥ 98%，K8220）、Nrf2 抑制剂 ML385（纯度≥ 98%，IM1020）、D- 无水葡萄糖（纯度≥ 99.8%，G8150）、Annexin V-FITC/PI 细胞凋亡检测试剂盒（CA1020）、大鼠白介素（interleukin，IL）-6 酶联免疫吸附试验（enzyme linked immunosorbent assay，ELISA）试剂盒（SEKH-0013）、大鼠肿瘤坏死因子（tumor necrosis factor，TNF）-α ELISA 试剂盒（SEKH-0047）、大鼠 IL-18 ELISA 试剂盒（SEKH-0028）、铁含量检测试剂盒（BC4355）、ROS 检测试剂盒（CA1410）、磷酸盐缓冲液（phosphate buffer saline，PBS，P1010）均购自北京索莱宝科技有限公司；细胞计数 kit（cell counting kit，CCK）-8 细胞活力检测试剂盒（G021-1-1）、过氧化氢酶（catalase，CAT）测定试剂盒（A007-1-1）、GSH 测定试剂盒（A006-2-1）、超氧化物歧化酶（superoxide dismutase，SOD）测定试剂盒（A001-3-1）、乳酸脱氢酶（lactate dehydrogenase，LDH）试剂盒（A020-2-2）、细胞丙二醛（malondialdehyde，MDA）测定试剂盒（A003-4-1）均购自南京建成生物工程研究所有限公司；二喹啉甲酸（bicinchoninic acid assay，BCA）蛋白检测试剂盒（ab102536）、兔源抗大鼠 SLC7A11 一抗（ab175186）、兔源抗大鼠 3- 磷酸甘油醛脱氢酶（glyceraldehyde-3-phosphate

dehydrogenase，GAPDH）一抗（ab8245）、兔源抗大鼠 Anti-Nrf2 抗体（ab137550）、辣根过氧化物酶（horseradish peroxidase，HRP）偶联山羊抗兔二抗（ab6721）、兔源抗大鼠 GPX4 一抗（ab125066）均购自美国 Abcam 公司。

酶标分析仪（ZG-660）购自无锡集佳智能科技有限公司；成像型流式细胞仪（Attune CytPix）购自赛默飞世尔科技（中国）有限公司；电泳仪电源（KEEBIO-600N）、垂直电泳槽（KEEBIO-VE180）、转移电泳槽（KEEBIO-VE186）、化学发光成像分析系统（JP-K300）均购自上海金鹏分析仪器有限公司。

1.2 方法

1.2.1 高糖诱导细胞铁死亡浓度筛选

将 HTR-8/SVneo 细胞以 1×10^4 个细胞 / 孔的密度接种在无菌 96 孔板，培养 24 h 后，根据参考文献[12]和前期预试验结果，用含不同浓度（0、5、10、15、25 及 50 mmol/L）葡萄糖的高糖培养基处理 24 h 后，每孔加 10 μl CCK-8 溶液，在 37 ℃、5% 二氧化碳下孵育 1 h 后，用酶标仪在 450 nm 波长下测量吸光度，计算细胞存活率。细胞存活率＝（山柰酚处理组吸光值－空白对照组吸光值）/（0 μmol/L 山柰酚处理组吸光值－空白对照组吸光值）×100%。收集并裂解细胞，检测细胞内铁离子含量。采用蛋白质印迹法（western blotting，WB）检测细胞内 GPX4 蛋白表达水平。根据细胞存活率、铁离子含量及 GPX4 蛋白表达水平选取最佳浓度。

1.2.2 山柰酚浓度筛选

将 HTR-8/SVneo 细胞于 39.5 ℃水浴中快速解冻，离心洗涤后，用 DMEM/F12 完全培养基培养，细胞融合率约 80% 时传代，并将细胞以 1×10^4 个 / 孔的密度接种在无菌 96 孔板，培养 24 h 后更换为含 25 mmol/L 的葡萄糖的高糖 DMEM/F12 培养基[13]，同时加入浓度为 0、6.25、12.5、25、50、75 以及 100 μmol/L 山柰酚处理 24 h，每个处理组 6 个孔，设未接种细胞的 6 个孔作为空白对照[9—10]，采用 CCK-8 细胞活力检测试剂盒检测各组细胞，并计算细胞存活率，选择最佳浓度。

1.2.3 构建高糖模型及分组

将 HTR-8/SVneo 细胞以 1×10^5 个 / 孔的密度接种在无菌 24 孔板中传代，培养 24 h 后，随机分为对照组、模型组、山柰酚组、ML385 组、山柰酚＋ML385 组，除对照组外的其余各组以含最佳浓度葡萄糖的高糖 DMEM/F12 培养基诱导高糖模型，同时山柰酚组以最佳浓度的山柰酚处理，ML385 组以 1 μmol/L 的 ML385 处理[11]，山柰酚＋ML385 组加入最佳浓度的山柰酚和 1 μmol/L 的 ML385 联合处理，各组细胞均处理 24 h，对照组和模型组不加任何药物进行处理，然后收集其细胞沉淀和各组培养基备用。

1.2.4 CCK-8 法检测细胞存活率

将各组 HTR-8/SVneo 细胞采用 CCK-8 法检测细胞存活率，具体步骤按照 CCK-8 细胞活力检测试剂盒说明书操作。

1.2.5 流式细胞仪检测细胞凋亡率

以 PBS 重悬“**1.2.3**”中收集的各组细胞沉淀，采用细胞计数板测其密度，每组取 2.5×10^5 个细胞，采用 Annexin V-FITC/PI 细胞凋亡检测试剂盒检测各组细胞凋亡率，具体步骤按照试剂盒说明书指导操作。

1.2.6 ELISA 法检测细胞的 LDH、IL-6、IL-18 以及 TNF-α 水平

取“**1.2.3**”中收集的各组细胞培养基，350 *g*，离心 15 min，得到培养基上清，采用 ELISA 试剂盒检测 LDH、IL-6、IL-18 以及 TNF-α 水平，具体步骤按照各自 ELISA 试剂盒说明书指导操作。

1.2.7 BCA 法检测细胞的 SOD、CAT、GSH、MDA 水平、铁含量、ROS 相对水平

取“**1.2.3**”中收集的各组细胞，分别加入适量 RIPA 裂解液混匀裂解，离心 1 400 *g*，20 min 得到总蛋白样品液，采用 BCA 蛋白检测试剂盒测蛋白浓度，然后每组取 450 μl 检测其中 SOD、CAT、GSH 与 MDA 水平、铁含量、ROS 相对水平，具体步骤按照各自试剂盒说明书指导操作，ROS 相对水平＝试验

组 ROS 水平 / 对照组 ROS 水平。

1.2.8 WB 检测相关蛋白水平表达

将“**1.2.7**”中剩余的细胞蛋白样品液中蛋白浓度调至各组相同，然后每组各取 20 μl 煮沸变性其中总蛋白，蛋白样品经电泳分离，湿转移十二烷基硫酸钠 - 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离胶中蛋白至硝酸纤维素膜，孵育 3% 牛血清白蛋白溶液封闭膜上蛋白非特异抗原，裁下 GAPDH、Nrf2、SLC7A11、GPX4 蛋白，分别孵育兔源抗大鼠 GAPDH、Nrf2、SLC7A11 及 GPX4 一抗，洗涤后加入 HRP 偶联山羊抗兔二抗，洗涤后滴加化学发光试剂，使二抗偶联的 HRP 显色，将显色后的各组蛋白膜置于化学发光成像分析系统中采集图像，以 Image J 软件定量其灰度值，后量化得出各蛋白相对表达水平。

1.3 统计学方法

运用 SPSS26.0 软件进行统计学分析，定量变量以 $(\bar{x}\pm s)$ 进行描述，且所有数据均符合正态分布，采用 t 检验进行两组间比较；采用单因素方差分析进行多组间比较，组间两两进一步比较，行 SNK-q 检验，以 $P<0.01$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 高糖诱导细胞铁死亡浓度筛选结果

与 0 mmol/L 葡萄糖组比较，10、15、25 以及 50 mmol/L 葡萄糖组细胞存活率以及 GPX4 蛋白表达水平显著降低，铁含量显著升高（$P<0.01$），且 25 mmol/L 葡萄糖组对细胞存活率、铁含量和 GPX4 蛋白表达水平的影响最明显，见表 1、图 1，故选择 25 mmol/L 作为高糖诱导滋养层细胞铁死亡的最佳浓度。

表 1 不同浓度葡萄糖组对细胞存活率、铁含量及 GPX4 蛋白表达的影响 $(\bar{x}\pm s)$

Table 1 Effects of different concentrations of glucose on cell survival rate, iron content and GPX4 protein expression $(\bar{x}\pm s)$

葡萄糖浓度/mmol·L^{-1}	细胞存活率/%	铁含量/μmol(g·prot)$^{-1}$	GPX4
0	100.00±2.48	1.95±0.32	1.05±0.11
5	95.72±8.12	2.13±0.40	1.02±0.10
10	81.46±7.50[a]	4.42±0.49[a]	0.74±0.08[a]
15	60.35±6.27[a]	6.10±0.63[a]	0.59±0.06[a]
25	47.08±5.31[a]	7.89±0.80[a]	0.46±0.05[a]
50	52.66±7.04[a]	6.75±0.71[a]	0.55±0.07[a]

注：较 0 mmol/L 葡萄糖组，[a]$P<0.01$。

Note: *vs* 0 mmol/L glucose group, [a]$P<0.01$.

2.2 山柰酚浓度筛选

与 0 μmol/L 山柰酚［(100.00±3.51)%］相比，其余不同浓度的山柰酚组均可升高高糖诱导的 HTR-8/SVneo 细胞存活率，且随剂量的升高而作用增强。当山柰酚浓度为 50 μmol/L 时，对细胞存活率的升高作用进入稳定期，故选择 50 μmol/L 山柰酚进行后续试验，见图 2。

2.3 山柰酚对高糖诱导的 HTR-8/SVneo 细胞损伤的影响

与对照组相比，模型组细胞存活率降低，LDH 释放量及细胞凋亡率升高（$P<0.01$）。与模型组相比，山柰酚组细胞存活率升高，LDH 释放量及细胞凋亡率降低（$P<0.01$）；ML385 组细胞存活率降低，LDH 释放量与细胞凋亡率升高（$P<0.01$）。与山柰酚组相比，山柰酚＋ ML385 组细胞存活率降低，

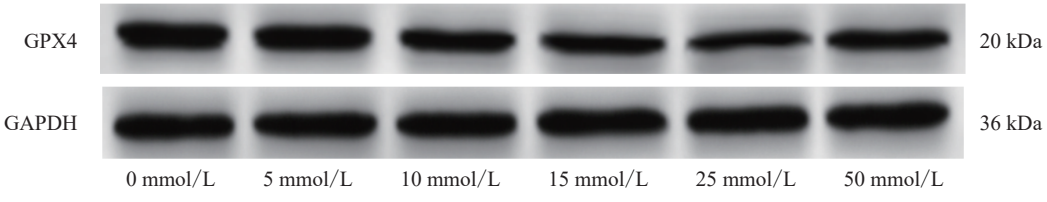


图 1 不同浓度葡萄糖组对 GPX4 蛋白表达的影响

Figure 1 Effects of different concentrations of glucose on GPX4 protein expression

LDH 释放量与细胞凋亡率升高（$P < 0.01$），见表 2、图 3。

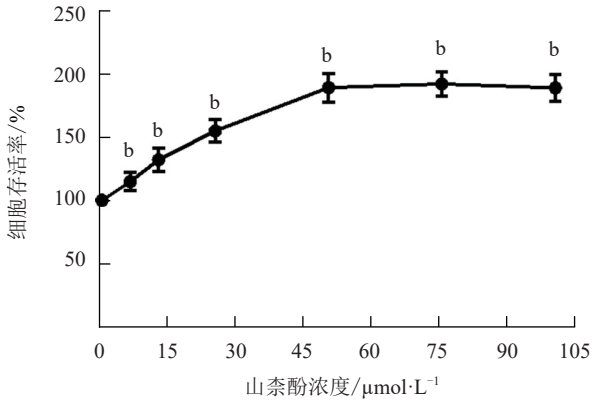
表 2　各组细胞存活率、LDH 释放量以及细胞凋亡率（$\bar{x} \pm s$）

Table 2　Cell survival rate, LDH release and apoptosis rate in each group（$\bar{x} \pm s$）

组别	细胞存活率/%	LDH释放量/U·L^{-1}	细胞凋亡率/%
对照组	100.00±4.15	38.75±5.27	3.74±0.67
模型组	45.19±7.02*	120.58±18.46*	57.26±7.82*
山奈酚组	92.03±8.51$^{\#}$	45.20±6.42$^{\#}$	9.12±1.48$^{\#}$
ML385组	21.97±4.96$^{\#}$	187.45±23.14$^{\#}$	85.31±10.17$^{\#}$
山奈酚＋ML385组	56.53±6.95$^{\triangle}$	109.86±15.81$^{\triangle}$	48.01±6.96$^{\triangle}$

注：较对照组，*$P < 0.01$；较模型组，$^{\#}P < 0.01$；较山奈酚组，$^{\triangle}P < 0.01$。

Note: *vs* control group, *$P < 0.01$; *vs* model group, $^{\#}P < 0.01$; *vs* kaempferol group, $^{\triangle}P < 0.01$.



注：较 0 μmol/L 山奈酚，$^{b}P < 0.01$。

Note: *vs* 0 μmol/L kaempferol, $^{b}P < 0.01$.

图 2　不同浓度山奈酚对高糖诱导的 HTR-8/SVneo 细胞存活率的影响

Figure 2　Effects of kaempferol concentration on survival rate of HTR-8/SVneo cells induced by high glucose

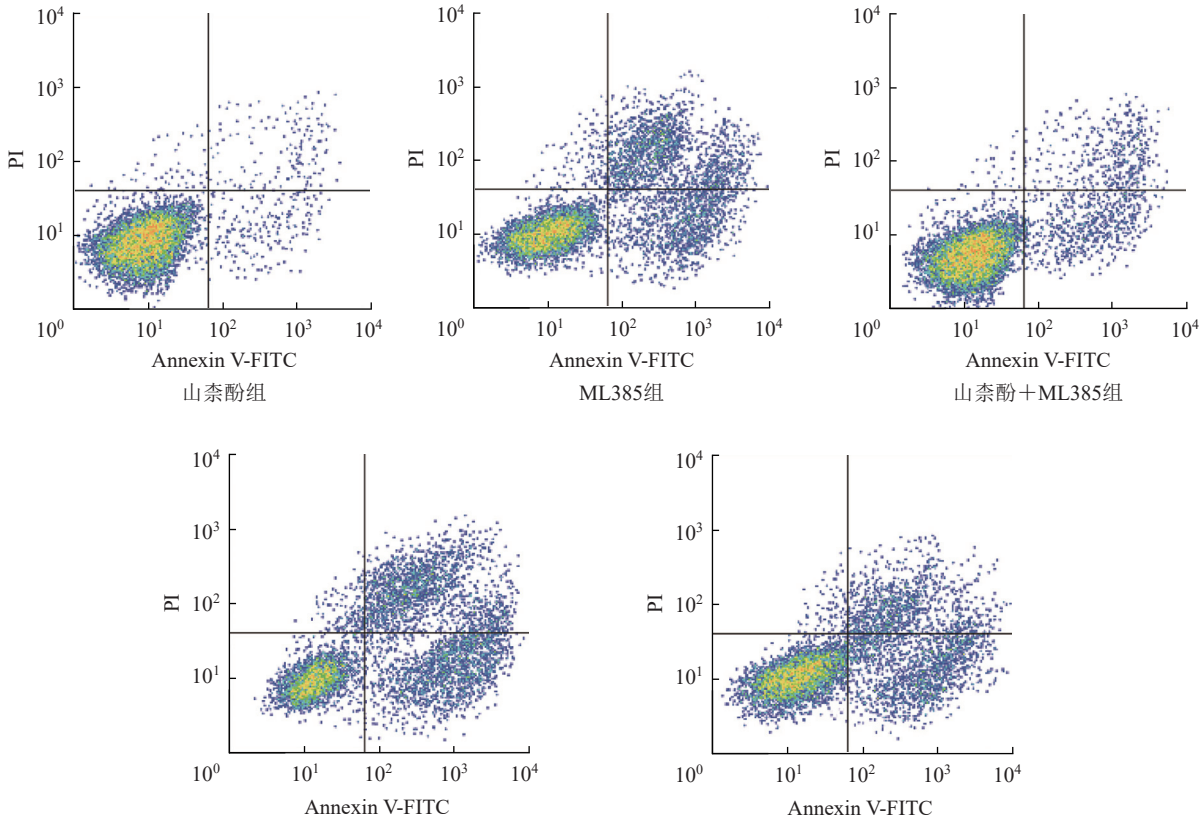


图 3　流式细胞法检测细胞凋亡情况

Figure 3　The apoptosis detected by flow cytometry

2.4 山柰酚对细胞促炎因子释放的影响

与对照组相比，模型组细胞中 IL-6、IL-18 以及 TNF-α 水平升高（$P < 0.01$）。与模型组相比，山柰酚组细胞中 IL-6、IL-18 以及 TNF-α 水平降低（$P < 0.01$）；ML385 组细胞中 IL-6、IL-18 以及 TNF-α 水平升高（$P < 0.01$）。与山柰酚组相比，山柰酚＋ML385 组细胞培养基上清中 IL-6、IL-18 以及 TNF-α 水平升高（$P < 0.01$）。见表 3。

表 3 各组 IL-6、IL-18 以及 TNF-α 水平
（$\bar{x}\pm s$，单位：pg/ml）
Table 3 The levels of IL-6, IL-18 and TNF-α in each group（$\bar{x}\pm s$, unit: pg/ml）

组别	IL-6	IL-18	TNF-α
对照组	265.42±35.48	239.63±34.50	126.30±18.24
模型组	674.53±68.92*	693.56±57.84*	518.45±42.46*
山柰酚组	289.10±40.63#	252.38±36.21#	147.12±20.94#
ML385组	963.84±84.26#	984.72±72.68#	879.67±60.83#
山柰酚＋ML385组	659.37±71.52△	672.14±61.32△	501.23±45.79△

注：较对照组，*$P < 0.01$；较模型组，#$P < 0.01$；较山柰酚组，△$P < 0.01$。
Note: *vs* control group, *$P < 0.01$; *vs* model group, #$P < 0.01$; *vs* kaempferol group, △$P < 0.01$.

2.5 山柰酚对细胞抗氧化因子水平的影响

与对照组相比，模型组细胞 SOD、CAT 以及 GSH 水平均降低（$P < 0.01$）。与模型组相比，山柰酚组细胞 SOD、CAT 以及 GSH 水平均升高（$P < 0.01$）；ML385 组细胞 SOD、CAT 水平以及 GSH 水平均降低（$P < 0.01$）。与山柰酚组相比，山柰酚＋ML385 组细胞 SOD、CAT 以及 GSH 水平均降低（$P < 0.01$），见表 4。

2.6 山柰酚对细胞铁死亡相关指标的影响

与对照组相比，模型组细胞 ROS 相对水平、铁含量以及 MDA 水平均升高（$P < 0.01$）。与模型组相比，山柰酚组细胞 ROS 相对水平、铁含量以及 MDA 水平均降低（$P < 0.01$）；ML385 组细胞 ROS 相对水平、铁含量以及 MDA 水平均升高（$P < 0.01$）。与山柰酚组相比，山柰酚＋ML385 组细胞 ROS 相对水平、铁含量以及 MDA 水平均升高（$P < 0.01$），见表 5。

表 4 各组细胞抗氧化因子水平（$\bar{x}\pm s$）
Table 4 Cell antioxidant factor levels in each group（$\bar{x}\pm s$）

组别	CAT/U（mg·prot）$^{-1}$	SOD/U（mg·prot）$^{-1}$	GSH/nmol（mg·prot）$^{-1}$
对照组	5.48±0.42	7.14±0.50	23.63±4.28
模型组	2.35±0.11*	2.52±0.21*	8.24±0.79*
山柰酚组	5.19±0.39#	6.98±0.62#	20.92±4.46#
ML385组	0.82±0.07#	0.79±0.08#	1.97±0.36#
山柰酚＋ML385组	2.63±0.20△	2.74±0.17△	8.71±0.80△

注：较对照组，*$P < 0.01$；较模型组，#$P < 0.01$；较山柰酚组，△$P < 0.01$。
Note: *vs* control group, *$P < 0.01$; *vs* model group, #$P < 0.01$; *vs* kaempferol group, △$P < 0.01$.

表 5 各组 ROS、铁含量以及 MDA 水平（$\bar{x}\pm s$）
Table 5 ROS, iron content, and MDA levels in each group（$\bar{x}\pm s$）

组别	ROS/U（kg·prot）$^{-1}$	铁含量/μmol（g·prot）$^{-1}$	MDA/μmol（g·prot）$^{-1}$
对照组	1.00±0.00	1.96±0.37	4.35±0.62
模型组	6.92±0.84*	7.84±0.78*	10.54±1.35*
山柰酚组	1.17±0.23#	2.08±0.42#	4.89±0.72#
ML385组	11.04±1.30#	12.05±1.21#	15.13±1.40#
山柰酚＋ML385组	6.38±0.75△	7.21±0.59△	9.95±1.46△

注：较对照组，*$P < 0.01$；较模型组，#$P < 0.01$；较山柰酚组，△$P < 0.01$。
Note: *vs* control group, *$P < 0.01$; *vs* model group, #$P < 0.01$; *vs* kaempferol group, △$P < 0.01$.

2.7 山柰酚对细胞 Nrf2/SLC7A11/GPX4 信号相关蛋白表达的影响

与对照组相比，模型组细胞 Nrf2、SLC7A11 以及 GPX4 蛋白表达降低（$P < 0.01$）。与模型组相比，山柰酚组细胞 Nrf2、SLC7A11 以及 GPX4 蛋白表达升高（$P < 0.01$）；ML385 组细胞 Nrf2、SLC7A11 以及 GPX4 蛋白表达降低（$P < 0.01$）。与山柰酚组相比，山柰酚＋ ML385 组细胞 Nrf2、SLC7A11 以及 GPX4 蛋白表达降低（$P < 0.01$），见表 6、图 4。

3 讨论

临床可因 GDM 患者高血糖致早期流产、巨大儿、胎儿发育迟缓以及畸形儿等各种不良妊娠结局。研究显示，高糖环境可损害滋养层细胞增殖活性，造

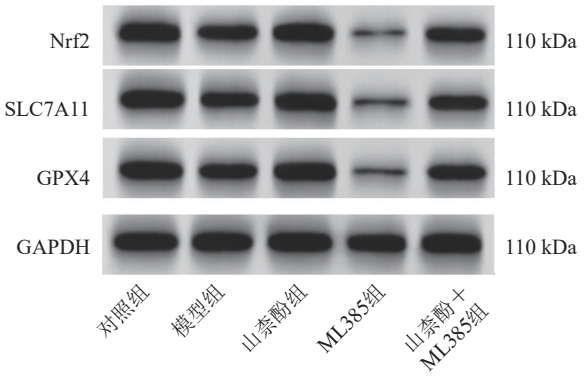


图 4 WB 检测各组细胞 Nrf2/SLC7A11/GPX4 信号相关蛋白表达

Figure 4 Expressions of Nrf2/SLC7A11/GPX4 signaling related proteins in each group by WB

表 6 各组细胞 Nrf2、SLC7A11 以及 GPX4 蛋白相对表达 ($\bar{x}\pm s$)

Table 6 The relative expression of Nrf2, SLC7A11 and GPX4 proteins in each group ($\bar{x}\pm s$)

组别	Nrf2/GAPDH	SLC7A11/GAPDH	GPX4/GAPDH
对照组	0.93±0.14	1.03±0.16	1.14±0.15
模型组	0.40±0.05*	0.48±0.07*	0.50±0.09*
山柰酚组	0.89±0.09#	0.98±0.17#	1.09±0.13#
ML385组	0.08±0.02#	0.12±0.03#	0.14±0.04#
山柰酚+ML385组	0.44±0.05△	0.52±0.08△	0.56±0.12△

注：较对照组，*$P<0.01$；较模型组，#$P<0.01$；较山柰酚组，△$P<0.01$。

Note: *vs* control group, *$P<0.01$; *vs* model group, #$P<0.01$; *vs* kaempferol group, △$P<0.01$.

成胎盘发育异常及功能障碍，是导致 GDM 不良妊娠结局的主要因素[13—14]。本研究根据前期预试验和参考文献，最终选择 25 mmol/L 葡萄糖浓度的高糖培养基，体外培养人绒毛膜滋养层细胞 HTR-8/SVneo，建立 GDM 细胞模型。

铁死亡与 GDM 的发生发展密切相关，抑制炎症和铁累积，纠正细胞氧化还原稳态失衡，可减轻高糖诱导的 HTR-8/SVneo 细胞脂质过氧化和铁死亡，改善 GDM 所致的胎盘损伤[5,15—16]。山柰酚可减少 ROS 的生成，减轻氧化型低密度脂蛋白诱导的内皮细胞氧化应激、炎症及凋亡损伤[17]，同时能减弱高糖诱导的肾小球系膜细胞氧化应激和胞外基质积聚[18]，并可通过促进 Nrf2/SLC7A11/GPX4 信号传导抑制 OGD/R 诱导的神经元铁死亡和脂质过氧化，从而缓解神经元损伤[11]。这与本研究结果一致，提示山柰酚可通过抑制高糖诱导的滋养层细胞铁死亡促使其存活，发挥细胞保护作用。

研究表明，GDM 患者血清脂质过氧化浓度升高，而 GPX4 浓度降低，与血糖水平呈显著负相关[19]，通过提高 Nrf2、血红素加氧酶 -1、SLC7A11 和 GPX4 蛋白表达，可降低高糖诱导的高水平 ROS 和细胞内铁蓄积，减轻 DM 小鼠氧化损伤和铁死亡[20]。本研究结果表明，下调 Nrf2/SLC7A11/GPX4 通路可加重高糖造成的滋养层细胞铁死亡及凋亡损伤，而山柰酚可逆转 Nrf2、SLC7A11、GPX4 蛋白表达降低，表明 Nrf2/SLC7A11/GPX4 信号参与介导山柰酚组铁死亡的抑制过程，山柰酚＋ ML385 组相比山柰酚组，可降低细胞存活率、SOD、CAT、GSH 水平、Nrf2 及 SLC7A11、GPX4 蛋白表达，升高 LDH 释放量、细胞凋亡率、IL-6 及 IL-18、TNF-α、MDA 水平、铁含量以及 ROS 相对水平，表明 ML385 可降低山柰酚的抗炎和抗氧化活性，减弱其对铁死亡及脂质过氧化的抑制作用，最终逆转山柰酚对高糖诱导的滋养层细胞的保护作用。以上提示山柰酚减弱高糖诱导的滋养层细胞铁死亡是通过激活 Nrf2 信号实现的。

4 结论

综上所述，山柰酚可上调 Nrf2/SLC7A11/GPX4 通路，抑制促炎因子和 ROS 产生，提高抗氧化酶活性，减少高糖诱导的滋养层细胞铁蓄积和脂质过氧化，改善铁死亡引发的滋养层细胞凋亡损伤，激活 Nrf2/SLC7A11/GPX4 信号途径可能是其药理机制之一，为山柰酚在临床 GDM 防治中的应用提供了新的科学依据，有利于改善 GDM 患者妊娠结局。在未来的研究中，将采用体内动物试验对山柰酚的药动学与药效学进行分析，进一步验证山柰酚的作用与机制，为临床应用提供参考。

参考文献：

[1] Huang TT, Sun WJ, Liu HY, *et al*. P66Shc-mediated oxidative stress is involved in gestational diabetes mellitus[J]. World J Diabetes, 2021, 12(11): 1894-1907.

[2] He H, Liu Y, Sun M. Nesfatin-1 alleviates high glucose/high lipid-induced injury of trophoblast cells during gestational diabetes mellitus[J]. Bioengineered, 2021, 12(2): 12789-12799.

[3] Chen W, Wang H, Liu J, *et al*. Interference of KLF9 relieved the development of gestational diabetes mellitus by upregulating DDAH2[J]. Bioengineered, 2022, 13(1): 395-406.

[4] Gautam S, Alam F, Moin S, *et al*. Role of ferritin and oxidative stress index in gestational diabetes mellitus[J]. J Diabetes Metab Disord, 2021, 20(2): 1615-1619.

[5] Han D, Jiang L, Gu X, *et al*. SIRT3 deficiency is resistant to autophagy-dependent ferroptosis by inhibiting the AMPK/mTOR pathway and promoting GPX4 levels[J]. J Cell Physiol, 2020, 235(11): 8839-8851.

[6] Ma H, Wang X, Zhang W, *et al*. Melatonin suppresses ferroptosis induced by high glucose via activation of the Nrf2/HO-1 signaling pathway in type 2 diabetic osteoporosis[J]. Oxid Med Cell Longev, 2020, 2020: 9067610-9067627.

[7] Zhang Y, Hu M, Jia W, *et al*. Hyperandrogenism and insulin resistance modulate gravid uterine and placental ferroptosis in PCOS-like rats[J]. J Endocrinol, 2020, 246(3): 247-263.

[8] Hou X, Zhang J, Ma H, *et al*. Hypoxia-reoxygenation treatment attenuates gestational diabetes mellitus[J]. Endocr Connect, 2021, 10(1): 84-91.

[9] 李雅娟, 孙姣姣, 刘广益, 等. 山柰酚对脂多糖诱导小胶质细胞炎性介质释放与吞噬的影响[J]. 神经解剖学杂志, 2021, 37(2): 182-188.

[10] 郭晓燕, 胡春艳, 李芳晓, 等. 山柰酚减轻高糖条件下人肾小球内皮细胞氧化应激及凋亡的作用及机制研究[J]. 重庆医学, 2020, 49(19): 3201-3204.

[11] Yuan Y, Zhai Y, Chen J, *et al*. Kaempferol ameliorates oxygen-glucose deprivation/reoxygenation-induced neuronal ferroptosis by activating Nrf2/SLC7A11/GPX4 axis[J]. Biomolecules, 2021, 11(7): 923.

[12] Sarina, Li DF, Feng ZQ, *et al*. Mechanism of placenta damage in gestational diabetes mellitus by investigating TXNIP of patient samples and gene functional research in cell line[J]. Diabetes Ther, 2019, 10(6): 2265-2288.

[13] Cao S, Zhang S. Forkhead-box C1 attenuates high glucose-induced trophoblast cell injury during gestational diabetes mellitus via activating adenosine monophosphate-activated protein kinase through regulating fibroblast growth factor 19[J]. Bioengineered, 2022, 13(1): 1174-1184.

[14] Zhang C, Zhao D. MicroRNA-362-5p promotes the proliferation and inhibits apoptosis of trophoblast cells via targeting glutathione-disulfide reductase[J]. Bioengineered, 2021, 12(1): 2410-2419.

[15] Ke W, Chen Y, Zheng L, *et al*. MiR-134-5p promotes inflammation and apoptosis of trophoblast cells via regulating FOXP2 transcription in gestational diabetes mellitus[J]. Bioengineered, 2022, 13(1): 319-330.

[16] Zheng Y, Hu Q, Wu J. Adiponectin ameliorates placental injury in gestational diabetes mice by correcting fatty acid oxidation/peroxide imbalance-induced ferroptosis via restoration of CPT-1 activity[J]. Endocrine, 2022, 75(3): 781-793.

[17] 康桂兰, 景增秀. 山柰酚通过调控AMPK/Nrf2/HO-1信号通路缓解ox-LDL介导的内皮细胞损伤[J]. 中国免疫学杂志, 2018, 34(4): 525-530.

[18] 玄露露, 李彦秋, 王怀杰, 等. 山柰酚调控AMPK/NOX4通路抑制高糖诱导的肾小球系膜细胞氧化应激和胞外基质积聚[J]. 天然产物研究与开发, 2021, 33(7): 1102-1111.

[19] Zhang B, Zhang T, Hu S, *et al*. Association of serum lipid peroxidation and glutathione peroxidase 4 levels with clinical outcomes and metabolic abnormalities among patients with gestational diabetes mellitus: a case-control study in the Chinese population[J]. Front Biosci(Landmark Ed), 2022, 27(2): 68.

[20] Song JX, An JR, Chen Q, *et al*. Liraglutide attenuates hepatic iron levels and ferroptosis in db/db mice[J]. Bioengineered, 2022, 13(4): 8334-8348.

（编辑：沈佳婕）