

论著·临床研究

高糖环境对滋养层细胞腺苷单磷酸活化蛋白激酶 $\alpha 1$ 亚基表达及增殖的影响

彭海燕, 李华萍

上海交通大学附属第六人民医院妇产科, 上海 200233

[摘要] **目的**·研究妊娠糖尿病患者胎盘组织中的腺苷单磷酸活化蛋白激酶 $\alpha 1$ 亚基 (protein kinase AMP-activated catalytic subunit $\alpha 1$, PRKAA1) 的表达水平, 及体外高糖环境对滋养层细胞 PRKAA1 表达水平和增殖活性的影响。**方法**·收集妊娠糖尿病患者 (19 例) 及同期正常妊娠孕妇 (20 例) 的胎盘组织, 分别利用实时荧光定量 PCR 及蛋白免疫印迹试验测定 PRKAA1 mRNA 及蛋白水平的表达情况。体外高糖处理滋养层细胞后, 测定 PRKAA1 的表达; 高糖培养基及 PRKAA1 抑制剂 dorsomorphin 分别作用于滋养层细胞后, 利用 CCK8 试剂盒测定细胞增殖活性。**结果**·相比正常妊娠孕妇, 妊娠糖尿病患者胎盘组织中 PRKAA1 mRNA 及蛋白表达量显著降低 (均 $P < 0.05$)。体外高糖培养基处理滋养层细胞可明显降低 PRKAA1 的表达水平 ($P < 0.05$); 高糖培养基和 dorsomorphin 均可抑制滋养层细胞的增殖活性 (均 $P < 0.05$)。**结论**·妊娠糖尿病患者胎盘组织中的 PRKAA1 表达水平下降, 体外高糖环境对滋养层细胞增殖活性的抑制作用可能是通过下调 PRKAA1 介导发生。

[关键词] 妊娠糖尿病; 滋养层细胞; 腺苷单磷酸活化蛋白激酶 $\alpha 1$ 亚基; 高糖; 细胞增殖

[DOI] 10.3969/j.issn.1674-8115.2018.03.011 **[中图分类号]** R714.256 **[文献标志码]** A

Influence of high glucose on PRKAA1 expression and proliferation of trophoblast cells

PENG Hai-yan, LI Hua-ping

Department of Gynecology and Obstetrics, Shanghai Sixth People's Hospital, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200233, China

[Abstract] **Objective**·To explore the expression level of protein kinase AMP-activated catalytic subunit $\alpha 1$ (PRKAA1) in placental tissues of gestational diabetes mellitus (GDM) women, and the influence of high glucose (HG) on PRKAA1 expression and proliferation viability of trophoblast cells *in vitro*. **Methods**·The placental samples of GDM women ($n=19$) and normal pregnant women ($n=20$) of the corresponding period were collected. Real-time qPCR and Western blotting assay were used to detect the mRNA and protein levels of PRKAA1 in these biopsies, respectively. Trophoblast cells were treated by HG *in vitro* and then expression level of PRKAA1 was tested. CCK8 assay was used to detect proliferation viability of the cells treated by HG medium or inhibitor of PRKAA1, dorsomorphin. **Results**·Comparing to normal pregnant women, both mRNA and protein levels of PRKAA1 in placental tissues of GDM women significantly decreased (both $P < 0.05$). HG treatment drastically downregulated expression of PRKAA1 in trophoblast cells *in vitro* ($P < 0.05$). Both HG medium and dorsomorphin suppressed proliferation viability of trophoblast cells (both $P < 0.05$). **Conclusion**·Expression level of PRKAA1 is dampened in placental tissues of GDM women. HG suppresses proliferation viability of trophoblast cells probably *via* downregulating PRKAA1 level *in vitro*.

[Key words] gestational diabetes mellitus (GDM); trophoblast cell; protein kinase AMP-activated catalytic subunit $\alpha 1$ (PRKAA1); high glucose; cell proliferation

妊娠糖尿病 (gestational diabetes mellitus, GDM) 为患者妊娠期间首次出现的不同程度的糖耐量异常, 可导致其胎儿生长发育异常、胎膜早破、宫内感染等的发生概率明显增加。研究^[1-2]显示, GDM 患者的胎盘组织存在明显的体积、结构及血流灌注异常, 影响正常妊娠维持及胎儿生长发育, 推测其可能与高糖环境对滋养层细胞的持续作用相关。

胎盘组织作为母胎营养物质交换的重要枢纽, 其正

常生理功能的发挥依赖于正常的滋养层细胞, 该细胞的增殖活性对胎盘组织的形成、发展及胎儿的生长发育至关重要^[3]。有研究^[4]报道, 滋养层细胞增殖活性受抑制可促使胎盘组织形成不良, 在妊娠早期可诱发流产, 而在妊娠中晚期则会因营养物质供应不足造成胎儿慢性宫内缺氧及生长发育迟缓。滋养层细胞作为胎盘组织组成及维持正常妊娠的重要细胞类型, 除生物学功能的改变可介导胎盘组织

[基金项目] 上海市第六人民医院预研基金 (LYZY-0053) (Shanghai Sixth People's Hospital Research Fund, LYZY-0053)。

[作者简介] 彭海燕 (1991—) 女, 硕士生; 电子邮箱: haiyan5_peng@163.com。

[通信作者] 李华萍, 电子邮箱: lihup@sjtu.edu.cn。



的异常改变外, 其作为众多生物活性物质作用的靶点及效应细胞, 与妊娠期机体胰岛素抵抗的发生也息息相关^[5], 故对 GDM 患者中滋养层细胞分子调控机制的研究有助于为 GDM 的发病机制研究寻找新的切入点。

腺苷单磷酸活化蛋白激酶 $\alpha 1$ 亚基 (protein kinase AMP-activated catalytic subunit $\alpha 1$, PRKAA1) 可通过对蛋白分子的磷酸化作用实现对众多关键信号通路的调控。研究^[6]表明, PRKAA1 可介导体外高糖环境对血管内皮细胞的氧化应激损伤; 在 2 型糖尿病中, 与机体胰岛素抵抗的发生及胎盘组织血管重铸不良相关^[7-8]。近年来有研究^[9]报道 PRKAA1 可加速 GDM 病理改变进程, 但关于 PRKAA1 在 GDM 中对滋养层细胞及胎盘组织的作用报道尚缺乏。故本研究旨在探讨 PRKAA1 是否参与高糖环境对滋养层细胞生物学功能及胎盘的形与生长的调控过程, 以期为临床上 GDM 患者的早期靶向干预及不良妊娠的预防提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 胎盘组织标本与临床病例资料收集 收集 2017 年 1—6 月于上海交通大学附属第六人民医院妇产科定期产检并足月分娩 (孕 37 周~孕 40⁺6 周) 的正常孕妇 (20 例) 及 GDM 孕妇 (19 例) 的胎盘组织及临床资料。该研究已获附属第六人民医院伦理委员会认可与批准。GDM 诊断标准为孕妇于孕 24~28 周时行口服葡萄糖耐量试验 (oral glucose tolerance test, OGTT), 测定空腹血糖 (fasting plasma glucose, FPG)、口服葡萄糖后 1 h (1 h PG) 及 2 h 的血糖 (2 h PG) 水平, 血糖值满足下述任意 1 条或多条: ① 5.1 mmol/L \leq FPG < 7.0 mmol/L。② 1 h PG \geq 10.0 mmol/L。③ 8.5 mmol/L \leq 2 h PG < 11.1 mmol/L。排除标准: ① 孕前糖尿病。② 双胞胎或多胎。③ 合并有其他疾病的孕妇。随机选择同期无妊娠合并症及并发症的正常孕妇 20 例纳入正常组。所有纳入研究的对象均签署知情同意书。待所有研究对象足月分娩、胎盘娩出且经由责任医师检查确认胎盘组织、胎膜完整后, 留取胎盘组织 (2 cm \times 2 cm \times 2 cm) 于无菌容器内, 迅速送回实验室。超净工作台内 0.9 % 无菌生理盐水冲洗样本后, 将胎盘剪切成多个 5 mm \times 5 mm \times 5 mm 组织样本, 分装入冻存管内, 置入液氮罐中保存。

1.1.2 细胞 人绒毛膜滋养层细胞系 HTR-8/SVneo 购自中国科学院细胞库。

1.1.3 主要试剂与耗材 低糖培养基 DMEM (葡萄糖

含量为 1 000 mg/L)、0.25% 含 EDTA 胰酶 (Gibco, 美国), 胎牛血清 (FBS) (ScienCell, 美国), 总 RNA 提取试剂 TRIzol、反转录试剂盒、实时荧光定量 PCR 试剂盒 (TaKaRa, 大连), 链霉素-青霉素-两性霉素 B 三抗、PRKAA1 及内参 β -肌动蛋白基因 PCR 引物 (上海生工生物工程有限公司), CCK8 细胞增殖活性测定试剂 (同仁, 日本), PRKAA1 抑制剂 dorsomorphin (MCE, 美国), RIPA 裂解液、BCA 蛋白浓度测定试剂盒 (碧云天, 上海), β -肌动蛋白与 PRKAA1 兔抗体、辣根过氧化物酶 (HRP) 标记鼠抗兔抗体 (CST, 美国)。引物序列见表 1。

表 1 PCR 引物序列
Tab 1 Primer sequences in PCR

名称	引物序列 (5' \rightarrow 3')
PRKAA1	
上游引物	TGTAAGAATGGAAGGCTGGATGA
下游引物	GGACCACCATATGCCTGTGA
β -肌动蛋白	
上游引物	TGGCACCCAGCACAAATGAA
下游引物	CTAAGTCATAGTCCGCCTAGAAGCA

1.2 方法

1.2.1 细胞培养与高糖培养基浓度控制 细胞完全培养基 (葡萄糖浓度为 5 mmol/L) 为 DMEM 内添加 10% FBS 及 1% 三抗溶液 (青霉素、链霉素、两性霉素 B 终浓度分别为 100 U/mL、100 μ g/mL、0.25 μ g/mL)。待滋养层细胞贴壁生长融合至 80%~90% 时, 胰酶消化后传代, 孵育于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱内。高糖培养基的配制, 即向完全培养基内添加 D-葡萄糖粉, 使葡萄糖终浓度为 25 mmol/L。

1.2.2 总 RNA 的提取与实时荧光定量 PCR 收集的胎盘组织样本从液氮罐中取出解冻后, 取正常组 (20 例) 和 GDM 组 (19 例) 胎盘组织, 每个样本 20~30 mg, 每管添加 1 mL TRIzol, 匀浆仪快速匀浆。

HTR-8/SVneo 细胞消化、离心后均匀种植于 6 孔板。待每孔细胞生长融合至 80% 时, 将 6 孔板内的培养基更换为新鲜的完全培养基 (即对照组, 3 个复孔) 或高糖培养基 (即高糖组, 3 个复孔), 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱内孵育 24 h 后吸除培养基, PBS 清洗 3 次, 每孔添加 1 mL TRIzol, 冰上裂解 15 min。

依据传统方法提取各样本 RNA 后, 测定每个样本 RNA 浓度及纯度, 并将 RNA 定量为 500 ng 后反转录成 cDNA 产物。依据实时荧光定量 PCR 试剂盒要求配制体系于 96 孔 PCR 板内, 加样后上机行 PCR 反应。反应

过程: 95 ℃ 预变性 30 s; 95 ℃ 变性 5 s, 60 ℃ 退火、延伸 34 s, 40 个循环; 熔解曲线分析为 95 ℃ 15 s, 60 ℃ 1 min, 95 ℃ 15 s。反应过程结束后, 利用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法对 *PRKAA1* 基因进行相对定量并分析。

1.2.3 蛋白免疫印迹 胎盘组织解冻后, 取正常组 (11 例) 和 GDM 组 (11 例) 胎盘组织, 每个样本 50 mg, 置于 EP 管内, 每管添加 300 μ L RIPA 裂解液, 匀浆仪快速匀浆, 并置于冰上裂解 30 min。

HTR-8/SVneo 细胞消化、离心后均匀种植于 6 孔板, 待细胞融合至 60% ~ 70% 时, 将 6 孔板内的培养基更换为新鲜的完全培养基 (即对照组, 3 个复孔) 或高糖培养基 (即高糖组, 3 个复孔), 37 ℃、5% CO_2 培养箱内孵育 48 h 后吸除培养基, 预冷 PBS 清洗 3 次, 晾干培养板, 每孔内加入 60 μ L RIPA 裂解液, 冰上裂解 30 min 后, 刮取细胞裂解液, 移至 EP 管内。

将装有胎盘组织裂解液、HTR-8/SVneo 细胞裂解液的 EP 管于 4 ℃ 离心, 吸取上清液。利用 BCA 蛋白浓度检测试剂盒测定上述各样品的蛋白浓度, 并按蛋白体积与上样缓冲液 4:1 的比例加入缓冲液, 95 ℃ 水浴加热 10 min, 结束后将样品置于 -20 ℃ 保存。

配制 10% SDS 分离胶与浓缩胶, 每孔内加入蛋白样品 30 μ g, 80 V 电压电泳; 待样品至分离胶时, 改用 120 V 电压继续电泳, 直至各相对分子质量蛋白完全分离。280 mA 电流转膜 90 min。将 PVDF 膜封闭 2 h, TBST 清洗 3 次, 滴加 β -肌动蛋白、PRKAA1 兔抗体 (1:1 000 稀释), 4 ℃ 孵育过夜。次日, PVDF 膜清洗 3 次后, 加入 HRP 标记鼠抗兔抗体 (1:5 000 稀释), 室温孵育 1 h。清洗 3 次后, 添加化学发光液, 发光仪内曝光。将得到的蛋白条带利用专业图像分析软件 IPP 6.0 进行分析, 得到蛋白相对灰度值。

1.2.4 滋养层细胞增殖活性测定 高糖处理: 滋养层细胞消化、离心并计数后, 均匀种植于 96 孔板, 并分为正常培养基组、高糖培养基 12 h 组 (高糖 12 h 组)、高糖培养基 24 h 组 (高糖 24 h 组) 与高糖培养基 48 h 组 (高糖 48 h 组), 每组 6 个复孔。

PRKAA1 抑制剂处理: 将滋养层细胞均匀种植于 96 孔板, 并分为正常对照组、dorsomorphin 组; dorsomorphin 组再设 2.5、5.0、10.0 及 15.0 μ mol/L 4 个浓度组, 每组 6 个复孔; 37 ℃、5% CO_2 培养箱内孵育 24 h。

将上述 96 孔板内的培养基清除, 每孔添加 10 μ L CCK8 试剂和 90 μ L 培养基, 37 ℃ 避光孵育 1 ~ 4 h 后

测定吸光度值 [$D(450\text{ nm})$]。细胞增殖指数 = 处理组 $D(450\text{ nm})$ / 对照组 $D(450\text{ nm}) \times 100\%$ 。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 19.0 软件行统计学分析, 定量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 2 组间比较采用 t 检验, 多组间比较采用方差分析。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 2 组孕妇各项指标的比较

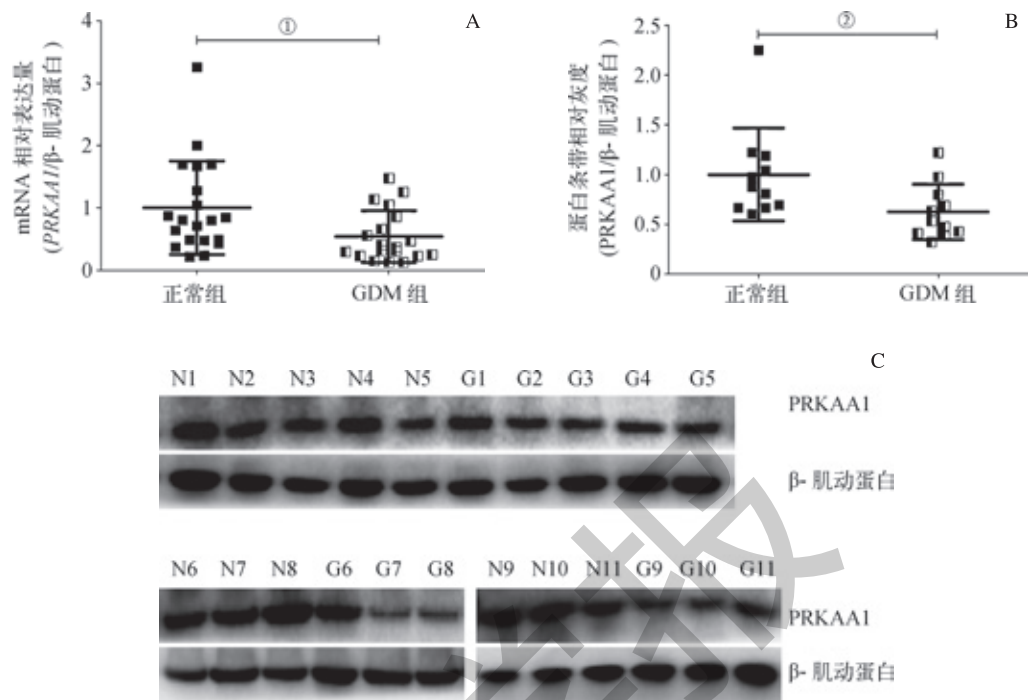
如表 2 所示, 正常组与 GDM 组的年龄、分娩孕周及孕期体重质量增加 3 个指标差异无统计学意义; GDM 组孕前 BMI 显著高于正常组 ($P=0.026$); GDM 组患者 OGTT 中的 FPG、1 h PG、2 h PG, 及糖化血红蛋白均显著高于正常组孕妇 (均 $P < 0.01$), 其新生儿体质量亦较正常组明显增加 ($P=0.034$)。

表 2 2 组孕妇各项指标的比较
Tab 2 Comparison of various indices between two groups of pregnant women

指标	正常组 (N=20)	GDM 组 (N=19)	P 值
年龄 / 岁	29.40 \pm 3.86	30.74 \pm 3.19	0.247
分娩孕周 / 周	39.36 \pm 0.97	39.09 \pm 0.95	0.393
孕前 BMI / (kg/m^2)	21.11 \pm 1.23	22.11 \pm 1.47	0.026
孕期体重质量增加 / kg	14.06 \pm 2.32	14.78 \pm 2.97	0.397
OGTT / (mmol/L)			
FPG	4.32 \pm 0.45	5.27 \pm 0.37	0.000
1 h PG	8.32 \pm 0.85	10.24 \pm 1.24	0.000
2 h PG	7.43 \pm 0.76	8.37 \pm 0.67	0.000
糖化血红蛋白 / %	4.46 \pm 0.51	5.20 \pm 0.84	0.002
新生儿体质量 / g	3 310.00 \pm 308.27	3 608.41 \pm 518.43	0.034

2.2 GDM 患者胎盘组织中 PRKAA1 的表达

如图 1A 所示, 对纳入研究的 20 例正常孕妇及 19 例 GDM 孕妇足月分娩时的胎盘组织提取 RNA 后行实时荧光定量 PCR 分析可知, GDM 患者 *PRKAA1* mRNA 相对表达量显著降低 ($P=0.023$)。随后, 选取正常孕妇及 GDM 孕妇胎盘组织各 11 例, 提取蛋白样品进行蛋白免疫印迹试验; 与正常对照孕妇相比, GDM 孕妇胎盘组织中 PRKAA1 蛋白表达量显著下降 ($P=0.033$) (图 1B、1C)。该结果表明, PRKAA1 可能为一种 GDM 相关分子, 并可能参与 GDM 发病或胎盘组织病理性改变等过程。



注: A. 实时荧光定量 PCR 比较; B. 蛋白条带相对灰度比较; C. 蛋白电泳条带。^① $P=0.023$; ^② $P=0.033$ 。N1 ~ N11 为正常组; G1 ~ G11 为 GDM 组。PRKAA1 蛋白相对分子质量约为 62 000, 内参 β -肌动蛋白相对分子质量约为 43 000。

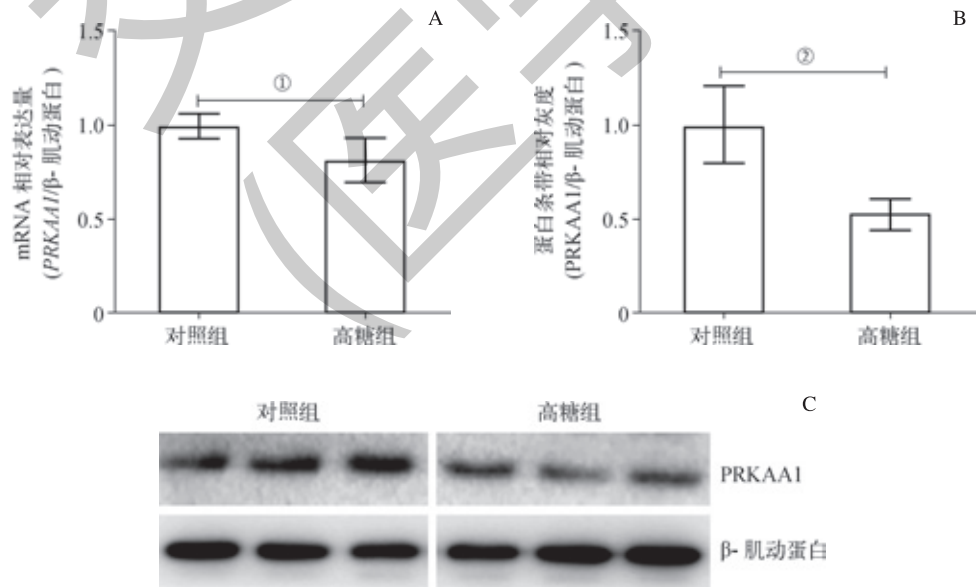
图 1 GDM 患者胎盘组织中 PRKAA1 的 mRNA 和蛋白水平

Fig 1 mRNA and protein levels of PRKAA1 in placenta tissues of GDM women

2.3 体外高糖环境对滋养层细胞 PRKAA1 表达的影响

与对照组滋养层细胞相比, 高糖组滋养层细胞 PRKAA1 mRNA 表达量降低 ($P=0.037$) (图 2A); 进一步测定 PRKAA1 蛋白表达量可知, 高糖组滋养层细胞内

PRKAA1 蛋白水平显著下降 ($P=0.021$) (图 2B、2C)。该实验结果表明, GDM 患者胎盘组织中 PRKAA1 表达水平的降低, 可能是由于高糖环境对滋养层细胞的作用。



注: A. 实时荧光定量 PCR 比较; B. 蛋白条带相对灰度比较; C. 蛋白电泳条带。^① $P=0.037$; ^② $P=0.021$ 。

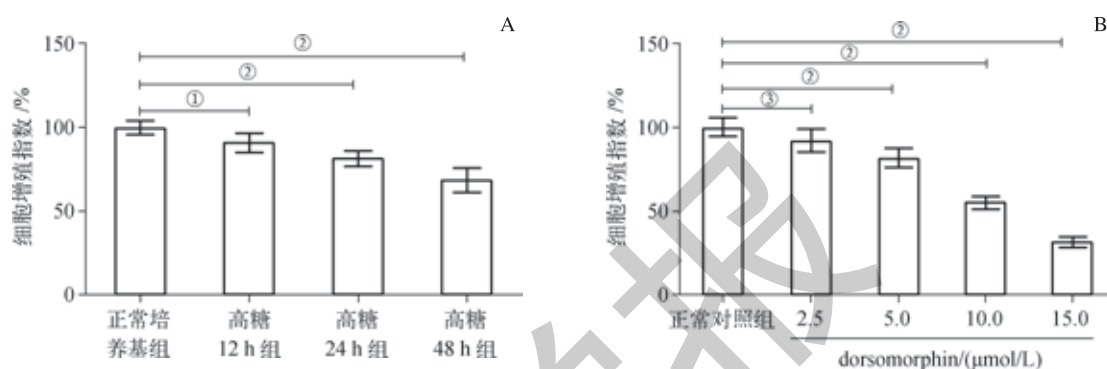
图 2 体外高糖环境对滋养层细胞 PRKAA1 的 mRNA 和蛋白表达水平的影响

Fig 2 Influence of HG on mRNA and protein levels of PRKAA1 in trophoblast cells *in vitro*

2.4 高糖和 PRKAA1 抑制剂对滋养层细胞增殖活性的影响

用高糖培养基对滋养层细胞处理后, 测定其细胞增殖活性。与正常培养基组细胞相比, 高糖 12 h 组滋养层细胞增殖活性无明显变化 ($P=0.062$); 随着高糖处理时间的延长, 滋养层细胞增殖活性明显降低 (均 $P<0.01$) (图 3A)。利用不同浓度的 PRKAA1 抑制剂 dorsomorphin 处

理滋养层细胞 24 h。与正常对照组相比, 随着 dorsomorphin 浓度的增加, 滋养层细胞增殖活性受抑制程度越明显 (图 3B)。该实验结果表明, PRKAA1 表达下调可抑制滋养细胞增殖活性, 且高糖环境可能是通过降低 PRKAA1 的表达水平抑制滋养层细胞的增殖活性。



注: A. 高糖对细胞增殖活性的影响; B. dorsomorphin 对细胞增殖活性的影响。^① $P=0.062$, ^② $P=0.000$, ^③ $P=0.073$ 。

图 3 高糖和 PRKAA1 抑制剂对滋养层细胞增殖活性的影响

Fig 3 Influence of HG and inhibitor of PRKAA1 on proliferation viability of trophoblast cells

3 讨论

临床上, GDM 患者可发生各种不良妊娠结局, 且因机体高血糖所致的“过营养”状态大大增加了巨大儿及胎盘组织体积过度增长的发生率; 而当高血糖程度较重或发生于妊娠早期时, 更易导致早期流产、胎盘形成不良、胎儿宫内发育迟缓与畸形^[10]。本研究发现, 体外高糖环境可抑制滋养层细胞的增殖活性, 但临床上多数病例则表现为巨大儿及胎盘组织体积增大, 推测引起该差异的原因可能与体外所使用的葡萄糖浓度相关。据报道^[11], 机体一定程度内的血糖浓度升高可促进组织对葡萄糖的摄取, 增加营养物质的吸收; 但当血糖浓度持续升高时, 高血糖引起的过氧化应激损伤等细胞毒性则会随之出现。目前关于机体血糖状态与体外糖浓度的相关性研究较少, 故尚无充分依据选择与 GDM 机体相对应的体外葡萄糖浓度。本实验所使用的葡萄糖浓度 (25 mmol/L) 多用于 2 型糖尿病的体外细胞研究^[12]。妊娠前即患有 2 型糖尿病者因胰岛素抵抗、血糖升高的程度较重且于妊娠早期已存在血糖水平升高, 则更易引起胎儿宫内生长受限、发育迟缓及畸形^[13], 而 GDM 患者通常被认为是轻型 2 型糖尿病或 2 型糖尿病前期状态。此外, 由多个国家参与的高血糖与妊娠不良结局 (The Hyperglycemia and Adverse Pregnancy Outcome

Study, HAPO) 流行病学研究表明, 高血糖导致不良妊娠结局并无明确界点值, 但与血糖升高程度呈正相关^[14], 故本研究结论更适用于血糖控制不佳和病情较严重的 GDM 患者。

GDM 患者除胎盘组织体积改变外, 其结构、微血管组成及血流灌注等亦常呈现病理性改变, 可引起胎儿营养供应不足、脐血流阻力增加及宫内慢性缺氧的发生^[2]。本研究中滋养层细胞增殖活性受抑制可能阻碍胎盘组织正常生长与血管重铸过程, 而血管内皮细胞的生物学功能受损及炎症因子的浸润亦可加剧胎盘组织形态及结构异常^[15-16]。PRKAA1 分子作为机体诸多代谢信号通路中的关键分子, 不仅可介导胎盘组织的血流灌注^[8], 还与机体胰岛素抵抗的发生相关^[17], 因此它很可能参与了 GDM 的发病过程, 有望成为其临床干预的关键性分子。在本研究中, 我们推测高糖环境可能通过下调 PRKAA1 分子的表达发挥对滋养层细胞增殖活性的抑制作用, 提示在 GDM 患者临床标本中差异性表达的 PRKAA1 分子可能参与胎盘形成不良、早期流产及胎儿宫内生长受限等过程。此外, 有关 PRKAA1 分子是否可作用于胎盘组织的其他成分细胞、是否可加剧 GDM 患者胰岛素抵抗, 其在 GDM 患者表达水平的改变是否早于机体血糖的改变, 及该分子发挥作用的上下游信号分子为何物均不明确, 故该研究亟需进一步的机制探讨及病因学研

究加以佐证。

总而言之,在GDM患者胎盘组织中PRKAA1分子表达降低,可能介导了高糖环境对滋养层细胞增殖活性的抑

制作用,也可能参与了调控胎盘形成与胎儿生长发育等过程。因此,该分子有望成为临床上延缓GDM进程的干预靶点,为改善GDM患者妊娠结局及预后提供新的研究方向。

参 · 考 · 文 · 献

- [1] Gauster M, Desoye G, Tötsch M, et al. The placenta and gestational diabetes mellitus[J]. *Curr Diab Rep*, 2012, 12(1): 16-23.
- [2] Huynh J, Yamada J, Beauharnais C, et al. Type 1, type 2 and gestational diabetes mellitus differentially impact placental pathologic characteristics of uteroplacental malperfusion[J]. *Placenta*, 2015, 36(10): 1161-1166.
- [3] Erboga M, Kanter M. Trophoblast cell proliferation and apoptosis in placental development during early gestation period in rats[J]. *Anal Quant Cytopathol Histopathol*, 2015, 37(5): 286-294.
- [4] Tian FJ, Qin CM, Li XC, et al. Decreased stathmin-1 expression inhibits trophoblast proliferation and invasion and is associated with recurrent miscarriage[J]. *Am J Pathol*, 2015, 185(10): 2709-2721.
- [5] Liu B, Xu Y, Voss C, et al. Altered protein expression in gestational diabetes mellitus placentas provides insight into insulin resistance and coagulation/fibrinolysis pathways[J]. *PLoS One*, 2012, 7(9): e44701.
- [6] Tseng SY, Chao TH, Li YH, et al. Cilostazol improves high glucose-induced impaired angiogenesis in human endothelial progenitor cells and vascular endothelial cells as well as enhances vasculoangiogenesis in hyperglycemic mice mediated by the adenosine monophosphate-activated protein kinase pathway[J]. *J Vasc Surg*, 2016, 63(4): 1051-1062.e3.
- [7] Zhang L, Han YJ, Zhang X, et al. Luteolin reduces obesity-associated insulin resistance in mice by activating AMPK α 1 signalling in adipose tissue macrophages[J]. *Diabetologia*, 2016, 59(10): 2219-2228.
- [8] Skeffington KL, Higgins JS, Mahmoud AD, et al. Hypoxia, AMPK activation and uterine artery vasoreactivity[J]. *J Physiol*, 2016, 594(5): 1357-1369.
- [9] Lappas M. Double stranded viral RNA induces inflammation and insulin resistance in skeletal muscle from pregnant women *in vitro*[J]. *Metabolism*, 2015, 64(5): 642-653.
- [10] Parikh RM, Joshi SR, Menon PS, et al. Intensive glycemic control in diabetic pregnancy with intrauterine growth restriction is detrimental to fetus[J]. *Med Hypotheses*, 2007, 69(1): 203-205.
- [11] Mapanga RF, Essop MF. Damaging effects of hyperglycemia on cardiovascular function: spotlight on glucose metabolic pathways[J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2016, 310(2): H153-H173.
- [12] Menegazzo L, Ciciliot S, Poncina N, et al. NETosis is induced by high glucose and associated with type 2 diabetes[J]. *Acta Diabetol*, 2015, 52(3): 497-503.
- [13] Moley KH. Hyperglycemia and apoptosis: mechanisms for congenital malformations and pregnancy loss in diabetic women[J]. *Trends Endocrinol Metab*, 2001, 12(2): 78-82.
- [14] Coustan DR, Lowe LP, Metzger BE. The hyperglycemia and adverse pregnancy outcome (HAPO) study: can we use the results as a basis for change?[J]. *J Matern Fetal Neonatal Med*, 2010, 23(3): 204-209.
- [15] Mrizak I, Grissa O, Henault B, et al. Placental infiltration of inflammatory markers in gestational diabetic women[J]. *Gen Physiol Biophys*, 2014, 33(2): 169-176.
- [16] Li J, Li J, Wei T, et al. Down-regulation of microRNA-137 improves high glucose-induced oxidative stress injury in human umbilical vein endothelial cells by up-regulation of AMPK α 1[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2016, 39(3): 847-859.
- [17] Van Berendoncks AM, Stensvold D, Garnier A, et al. Disturbed adiponectin-AMPK system in skeletal muscle of patients with metabolic syndrome[J]. *Eur J Prev Cardiol*, 2015, 22(2): 203-205.

[收稿日期] 2017-11-27

[本文编辑] 瞿麟平

