

• 论 著 •

HMGB1 对妊娠期糖尿病中滋养层细胞损伤及妊娠结局的影响探究*

冯国惠, 王 婧, 黄 莺[△]

新疆维吾尔自治区人民医院产科, 新疆乌鲁木齐 830000

摘要:目的 探讨高迁移率族蛋白 B1(HMGB1)对妊娠期糖尿病(GDM)中滋养层细胞损伤及大鼠妊娠结局的影响及其机制。方法 以人绒毛膜滋养层细胞 HTR8/Svneo 为研究对象,慢病毒 LV-HMGB1 转染构建稳定敲低 HMGB1 的 HTR8/Svneo 细胞株,慢病毒 LV-NC 转染作为阴性对照。采用实时荧光定量 PCR(qPCR)和蛋白质印迹法(Western blot)检测转染后 HMGB1 表达水平。将 HTR8/Svneo 细胞分为正常葡萄糖(NG)组、高糖(HG)组、sh-NC 组、sh-HMGB1 组,NG 组用 5.5 mmol/L 葡萄糖培养,其余 3 组用 30 mmol/L 葡萄糖培养。采用 CCK-8 法、Annexin V-FITC/PI 双染法、Transwell 小室法分别检测各组 HTR8/Svneo 细胞的增殖活性、凋亡率、迁移数目及侵袭数目,酶联免疫吸附试验(ELISA)检测各组 HTR8/Svneo 细胞培养上清液中肿瘤坏死因子- α (TNF- α)和白细胞介素-6(IL-6)水平,Western blot 检测各组 HTR8/Svneo 细胞中 HMGB1 下游信号通路 Toll 样受体 4(TLR4)/核因子- κ B(NF- κ B)中相关蛋白表达水平。以 30 只孕鼠为研究对象,随机分为对照组、GDM 组、HMGB1 抑制剂甘草酸(GA)组,每组 10 只,GDM 组和 GA 组在妊娠第 1 天腹腔注射 50 mg/kg 链脲佐菌素,GA 组在妊娠第 10 天以 10 mg/kg GA 灌胃,每日 1 次,连续 9 d。妊娠第 19 天,采用血糖仪和 ELISA 法测定各组孕鼠空腹血糖(FBG)、空腹胰岛素(FINS),并计算胰岛素抵抗指数(HOMA-IR)。妊娠第 20 天,观察妊娠结局、称量每窝胎鼠体重。结果 相较于未转染、转染慢病毒 LV-NC 的 HTR8/Svneo 细胞,转染敲除 HMGB1 的慢病毒 LV-HMGB1 的 HTR8/Svneo 细胞中 HMGB1 mRNA 及蛋白表达下调($P < 0.05$)。与 NG 组比较,HG 组 HTR8/Svneo 细胞增殖活性下降($P < 0.05$),凋亡率增加($P < 0.05$),迁移数目与侵袭数目减少($P < 0.05$),上清液中 TNF- α 、IL-6 水平升高($P < 0.05$),细胞中 HMGB1、TLR4、NF- κ B p65、B 淋巴细胞瘤-2(Bcl-2)相关 X 蛋白(Bax)、裂解的半胱天冬酶-3(cleaved Caspase-3)蛋白表达上调($P < 0.05$),Bcl-2 蛋白表达下调($P < 0.05$)。与 sh-NC 组比较,sh-HMGB1 组 HTR8/Svneo 细胞增殖活性升高($P < 0.05$),凋亡率减少($P < 0.05$),迁移数目与侵袭数目增加($P < 0.05$),上清液中 TNF- α 、IL-6 水平降低($P < 0.05$),细胞中 HMGB1、TLR4、NF- κ B p65、Bax 及 cleaved Caspase-3 蛋白表达下调($P < 0.05$),Bcl-2 蛋白表达上调($P < 0.05$)。与对照组比较,GDM 组孕鼠 FBG、FINS 及 HOMA-IR 升高($P < 0.05$),活胎率降低($P < 0.05$),胎鼠体重增加($P < 0.05$),窝产仔数减少($P < 0.05$);与 GDM 组比较,GA 组孕鼠 FBG、FINS 及 HOMA-IR 降低($P < 0.05$),活胎率升高($P < 0.05$),胎鼠体重减小($P < 0.05$),窝产仔数增加($P < 0.05$)。结论 敲低 HMGB1 可改善高糖诱导的 HTR8/Svneo 细胞损伤,其抑制剂甘草酸能够缓解 GDM 孕鼠症状,改善妊娠结局。

关键词:高迁移率族蛋白 B1; 妊娠期糖尿病; HTR8/Svneo 细胞; 甘草酸; Toll 样受体 4/核因子- κ B 信号通路

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2026.03.002

中图法分类号:R714.256

文章编号:1673-4130(2026)03-0265-09

文献标志码:A

Effect of HMGB1 on trophoblast cell injury and pregnancy outcomes during gestational diabetes*

FENG Guohui, WANG Jing, HUANG Ying[△]

Department of Obstetrics, Xinjiang Uygur Autonomous Region People's Hospital, Urumqi, Xinjiang 830000, China

Abstract: Objective To investigate the effect and mechanism of high mobility group protein B1 (HMGB1) on trophoblast cell injury and pregnancy outcome in rats with gestational diabetes mellitus (GDM). **Methods** Human chorionic trophoblast cell line HTR8/Svneo was used as the research object. The HTR8/Svneo cell line stably knocked down HMGB1 was constructed by lentivirus LV-HMGB1 transfection, and lentivirus LV-NC transfection was used as negative control. The expression of HMGB1 was detected by quantitative real-time PCR (qPCR) and Western blot. HTR8/Svneo cells were divided into normal glucose (NG) group, high glucose (HG) group, sh-NC group and sh-HMGB1 group. NG group was cultured with 5.5

* 基金项目:新疆维吾尔自治区自然科学基金项目(2021D01C170)。

作者简介:冯国惠,女,主任医师,主要从事围生医学相关研究。 [△] 通信作者, E-mail: rang713@sina.com。

mmol/L glucose, and the other three groups were cultured with 30 mmol/L glucose. The proliferation, apoptosis, migration and invasion of HTR8/Svneo cells were detected by CCK-8 assay, Annexin V-FITC/PI double staining and Transwell chamber assay, respectively. The levels of tumor necrosis factor- α (TNF- α) and interleukin-6 (IL-6) in the culture supernatant of HTR8/Svneo cells were detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Western blot was used to detect the expression of Toll-like receptor 4 (TLR4)/nuclear factor- κ B (NF- κ B) in HTR8/Svneo cells. Thirty pregnant rats were randomly divided into control group, GDM group and HMGB1 inhibitor glycyrrhizic acid (GA) group, with 10 rats in each group. In the GDM and GA groups, streptozotocin 50 mg/kg was injected intraperitoneally on the first day of pregnancy, and in the GA group, 10 mg/kg GA was given by gavage on the 10th day of pregnancy, once a day for 9 consecutive days. On the 19th day of pregnancy, fasting blood glucose (FBG) and fasting insulin (FINS) were measured by glucometer and ELISA. Homeostasis model assessment of insulin resistance (HOMA-IR) was calculated. On the 20th day of pregnancy, the pregnancy outcome was observed and the body weight of each litter was weighed.

Results Compared with HTR8/Svneo cells without transfection and HTR8/Svneo cells transfected with lentivirus LV-NC, the expression of HMGB1 mRNA and protein were significantly down-regulated in HTR8/Svneo cells transfected with lentivirus LV-HMGB1 ($P < 0.05$). Compared with NG group, the proliferation activity of HTR8/Svneo cells were decreased ($P < 0.05$), the apoptosis rate was increased ($P < 0.05$), the number of migration and invasion was decreased ($P < 0.05$), and the levels of TNF- α and IL-6 in the supernatant were increased in HG group ($P < 0.05$), the expression of HMGB1, TLR4, NF- κ B p65, B-cell lymphoma-2 (Bcl-2) associated X protein (Bax) and cleaved Caspase-3 protein were up-regulated ($P < 0.05$), and the expression of Bcl-2 protein was down-regulated in the cells ($P < 0.05$). Compared with the sh-NC group, the proliferation activity of HTR8/Svneo cells in the sh-HMGB1 group was significantly increased ($P < 0.05$), the apoptosis rate was decreased ($P < 0.05$), the number of migration and invasion were increased ($P < 0.05$), and the levels of TNF- α and IL-6 in the supernatant were decreased ($P < 0.05$). The expressions of HMGB1, TLR4, NF- κ B p65, Bax and cleaved Caspase-3 proteins in the cells were down-regulated ($P < 0.05$), and the expression of Bcl-2 protein was up-regulated ($P < 0.05$). Compared with the control group, the levels of FBG, FINS and HOMA-IR in the GDM group were increased ($P < 0.05$), the live birth rate was decreased ($P < 0.05$), the fetal weight was increased ($P < 0.05$), and the litter size was decreased ($P < 0.05$). Compared with the GDM group, the FBG, FINS and HOMA-IR of the pregnant rats in the GA group were decreased ($P < 0.05$), the live birth rate was increased ($P < 0.05$), the fetal weight was decreased ($P < 0.05$), and the litter size was increased ($P < 0.05$). **Conclusion** Knockdown of HMGB1 can improve the damage of HTR8/Svneo cells induced by high glucose, and its inhibitor glycyrrhizic acid can alleviate the symptoms of GDM pregnant mice and improve the pregnancy outcome.

Key words: high mobility group protein B1; gestational diabetes mellitus; HTR8/Svneo cells; glycyrrhizic acid; Toll-like receptor 4/nuclear factor- κ B signaling pathway

妊娠期糖尿病(GDM)是一种常见的妊娠期慢性疾病,指母体在妊娠期间首次出现糖耐量异常的现象,影响着全球数百万女性的健康^[1]。GDM主要由胰岛素抵抗增强和胰岛 β 细胞代偿不足引起,主要发生因素包括妊娠前母体肥胖、高龄、遗传、吸烟和妊娠期间使用全氟化学品等^[2]。GDM可能导致母体发生流产、羊水过多及高血压发生风险增加,同时引起胎儿高胰岛素血症、巨大儿、低血糖及先天性畸形等不良结局,严重威胁母婴健康^[3]。因此,探究GDM的发病机制并寻找潜在的治疗策略具有重要意义。

滋养层细胞是位于胚胎外层的细胞,在胚胎着床和胎盘发育中发挥着关键作用。滋养层细胞能通过分泌激素支持早期胚胎发育和诱导母体胰岛素抵抗,维持正常的妊娠过程^[4]。研究表明,母体GDM期间高血糖环境会诱导滋养层细胞凋亡,导致激素分泌紊

乱,损害细胞功能^[5]。此外,GDM患者胎盘常出现绒毛膜血管病变,导致滋养层细胞的侵袭能力下降,影响胎盘正常发育^[6]。高迁移率族蛋白B1(HMGB1)是一种非组蛋白核蛋白,在哺乳动物细胞和组织中广泛表达,参与调节炎症和免疫反应。在GDM患者胎盘组织中检测到HMGB1表达增加,HMGB1促进炎症因子释放,引起组织损伤及不良妊娠结局^[7]。有研究表明,高糖环境促进滋养层细胞中HMGB1表达后,引发滋养层细胞炎症反应,并抑制了细胞增殖^[8]。以上结果提示,阻断HMGB1可能是一种有潜力的治疗GDM方法,但其具体作用机制尚不明确。因此,本研究拟通过体外观察敲低HMGB1对高糖诱导的HTR8/Svneo细胞损伤的影响,探讨其干预机制,并在动物体内进行初步验证,以期GDM的诊断与治疗提供参考。

1 材料与方 法

1.1 实验动物 选用 60 只健康 SD 大鼠,包括 40 只雌性和 20 只雄性,体重 180~220 g,购自新疆医科大学实验动物中心。所有大鼠置于温度 22~25 °C、相对湿度 50%~60%、12 h 光照/12 h 黑暗的洁净动物饲养房中,给予饲料和水,适应性饲养 1 周。本研究实验经伦理委员会审核批准(批号:SYDW2023072012)。

1.2 仪器与试剂 人绒毛膜滋养层细胞 HTR8/Svneo 购自武汉诺安基因科技公司,敲除 HMGB1 的慢病毒 LV-HMGB1 及阴性对照慢病毒 LV-NC 由上海恒生物科技有限公司构建与包装,RPMI 1640 培养基购自广东环凯生物科技公司,胎牛血清和青霉素-链霉素双抗购自浙江天杭生物科技公司,嘌呤霉素购自上海联迈生物工程公司,Trizol 购自上海碧云天生物技术公司,cDNA 合成试剂盒和 SYBR Green I 试剂盒均购自无锡百泰克生物技术公司,RIPA 购自上海邦景实业有限公司,BCA 法蛋白质定量试剂盒购自武汉亚科因生物技术公司,抗体 GAPDH、HMGB1、Toll 样受体 4(TLR4)、核因子- κ B(NF- κ B) p65、B 淋巴细胞瘤-2 相关 X 蛋白(Bax)、B 淋巴细胞瘤-2(Bcl-2)、裂解的半胱天冬酶-3(cleaved Caspase-3)等购自英国 Abcam 公司,ECL 检测试剂盒、CCK-8 试剂盒、Matrigel 胶均购自江西江蓝纯生物试剂公司,Annexin V-FITC/PI 双染试剂盒购自江苏凯基生物技术有限公司,结晶紫购自江苏麦格生物科技公司,肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素(IL)-6 的酶联免疫吸附试验(ELISA)测定试剂盒购自深圳欣博盛生物科技公司,HMGB1 抑制剂甘草酸(GA,纯度 \geq 98%)购自上海沪震实业有限公司,空腹胰岛素(FINS)的 ELISA 测定试剂盒购自上海江莱生物科技公司。

1.3 方 法

1.3.1 细胞培养与转染 将 HTR8/Svneo 细胞培养于 RPMI 1640 含有 10%胎牛血清和 1%青霉素-链霉素双抗的培养基中,置于 37 °C、5%CO₂ 恒温培养箱中进行常规传代培养。取处于对数生长期的 HTR8/Svneo 细胞,调整细胞密度并按照每孔 2×10^5 个接种于 6 孔板上,按照厂商说明书进行转染,用敲除 HMGB1 的慢病毒液 LV-HMGB1 及阴性对照慢病毒液 LV-NC 分别转染细胞,恒温培养箱中培养 24 h 后弃原培养基,更换为含 10 μ mol/L 嘌呤霉素的培养基继续培养,筛选稳定转染的细胞,并在荧光显微镜下观察荧光表达,采用实时荧光定量 PCR(qPCR)和蛋白质印迹法(Western blot)检测转染后细胞中 HMGB1 表达。

1.3.2 qPCR HTR8/Svneo 细胞转染后进行 RNA 提取,用 Trizol 试剂裂解细胞,经氯仿分层、异丙醇沉淀等步骤获取 RNA。按反转录试剂盒说明书,在 PCR 管中配制体系,反应得到 cDNA。设计并合成 HMGB1 和内参基因 β -actin 的引物, HMGB1 上游引物 5'-GATCCCAATGCACCCAAGAG-3',下游引物

5'-GTGATGGGATTTCATTGAT-3'; β -actin 上游引物 5'-GGAGTCAACGGATTTGGT-3',下游引物 5'-GCCACCCGAGTGTAAACCAT-3',按照说明书配制含 SYBR Green I 染料混合物、引物、cDNA 模板的反应体系,放入荧光定量检测系统中按程序反应:95 °C 预变性 3 min,95 °C 变性 20 s,60 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 20 s,共 35 个循环。实验重复 3 次,根据循环阈值(Ct 值),用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算 HMGB1 基因相对表达水平的变化。

1.3.3 Western blot 提取转染后、不同分组处理后的 HTR8/Svneo 细胞总蛋白,用含蛋白酶和磷酸酶抑制剂的 RIPA 溶液处理细胞,获取蛋白并用 BCA 法测定蛋白浓度。将蛋白与上样缓冲液混合变性后,进行电泳分离、转膜,封闭液封闭膜。取膜分别与抗体 HMGB1、TLR4、NF- κ B p65、Bax、Bcl-2、cleaved Caspase-3(均按 1:1 000)孵育,4 °C 过夜,用辣根过氧化物酶(HRP)标记的二抗孵育,室温处理 2 h。ECL 显色并成像,分析各蛋白条带灰度值,以 GAPDH 为内参测定目的蛋白相对表达水平。

1.3.4 细胞分组与处理 将 HTR8/Svneo 细胞分为四组,分别为:(1)正常葡萄糖(NG)组,用含 5.5 mmol/L 葡萄糖的 RPMI 1640 培养液培养的 HTR8/Svneo 细胞;(2)高糖(HG)组,用含 30 mmol/L 葡萄糖的 RPMI 1640 培养液培养的 HTR8/Svneo 细胞;(3)sh-NC 组,用含 30 mmol/L 葡萄糖的 RPMI 1640 培养液培养的转染阴性对照 LV-NC 慢病毒的 HTR8/Svneo 细胞;(4)sh-HMGB1 组:用含 30 mmol/L 葡萄糖的 RPMI 1640 培养液培养的转染敲除 HMGB1 慢病毒的 HTR8/Svneo 细胞。细胞培养环境均为 37 °C、5%CO₂ 恒温培养箱。

1.3.5 CCK-8 法 HTR8/Svneo 细胞培养至贴壁后,根据 1.3.4 实验设计进行分组处理,继续培养 24、48、72 h,在以上各时间点,每孔加入 10 μ L CCK-8,混匀,恒温培养箱中孵育 1 h。孵育结束后,用酶标仪测定各孔在 450 nm 波长处的吸光度值,以此评估各组细胞的增殖活性。

1.3.6 Annexin V-FITC/PI 双染法 收集 1.3.4 分组培养 24 h 后的 HTR8/Svneo 细胞,用不含乙二胺四乙酸(EDTA)的胰酶消化,1 000 r/min 离心 5 min,预冷的 PBS 洗涤沉淀,将细胞重悬于 100 μ L Binding Buffer 中,加入 5 μ L Annexin V-FITC 和 5 μ L PI,混匀,避光室温孵育 15 min,加入 400 μ L Binding Buffer,立即用流式细胞仪检测,分析各组细胞凋亡率。

1.3.7 Transwell 小室法 侵袭实验需将 Matrigel 胶用无血清培养基稀释后均匀铺于 Transwell 小室的上室底部膜上,置于 37 °C 使胶凝固,迁移实验无需铺胶。收集各组 HTR8/Svneo 细胞,用无血清培养基饥饿培养后,调整细胞浓度,将 100 μ L 细胞悬液加入上室,下室加入 600 μ L 含血清的培养基作为催化剂,在 37 °C、5%CO₂ 恒温培养箱培养 24 h。取出小室,擦去上室未迁移或侵袭细胞,用 4%多聚甲醛固定下室

膜上的细胞,结晶紫染色。通过光学显微镜观察并随机选取 6 个视野,计数每个视野中细胞数,结果取均值。

1.3.8 ELISA 收集各组 HTR8/Svneo 细胞培养上清液,用包被缓冲液将特异性抗体稀释至适当浓度,按试剂盒说明书进行包被、封闭,加入 100 μ L 标本或标准品,37 $^{\circ}$ C 孵育 2 h,再加入 100 μ L 酶标检测抗体,37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h,洗涤后每孔加入显色液,室温避光反应 30 min,终止反应。用酶标仪测定各孔在 450 nm 波长处的吸光度值,代入标准曲线方程,计算各样本中 TNF- α 和 IL-6 水平。

1.3.9 动物分组与处理 将 40 只雌鼠与 20 只雄鼠合笼过夜,次日对雌鼠进行阴道涂片,观察到阴栓或精子,证实为妊娠,并记为妊娠第 0 天。将 30 只孕鼠随机分为对照组、GDM 组、GA 组,每组 10 只,GDM 组和 GA 组在妊娠第 1 天均单次腹腔注射 50 mg/kg 链脲佐菌素以诱导 GDM 模型^[9]。造模后,GA 组于妊娠第 10 天每日予以 10 mg/kg GA 灌胃^[10],对照组和 GDM 组予以等体积 0.9% 氯化钠溶液灌胃,连续 9 d 进行干预。

1.3.10 孕鼠血糖水平测定 于妊娠第 19 天,各组孕鼠禁食不禁水 12 h,经尾静脉采血,血糖仪测定空腹血糖(FBG)值,ELISA 法测定 FINS 值,并计算胰岛素抵抗指数(HOMA-IR), $HOMA-IR = FBG \times$

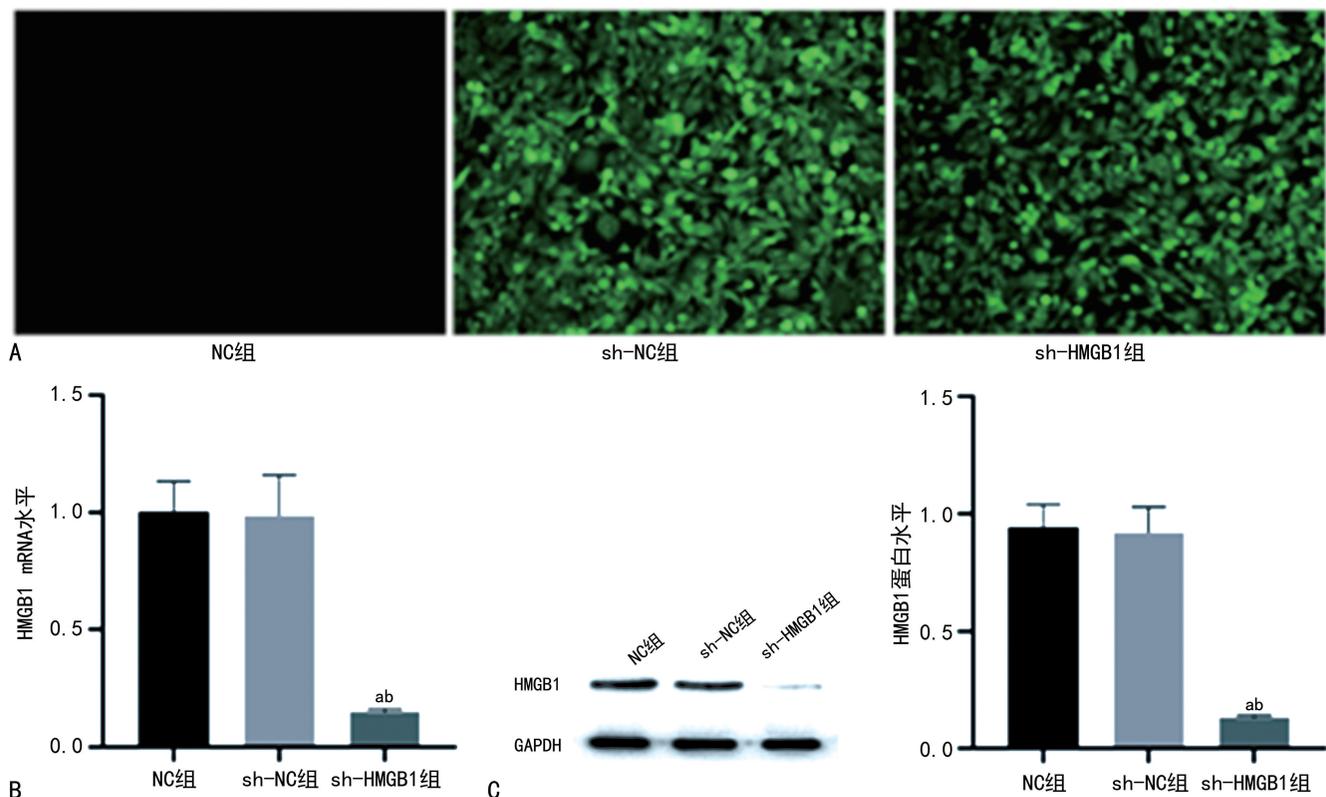
FINS/22.5。

1.3.11 妊娠结局与胎鼠体重测定 于妊娠第 20 天,对各组孕鼠行剖宫产,取出所有胎鼠计数,即为窝产仔数。观察胎鼠的活动情况,判断其是否存活,存活的胎鼠通常会有自主活动、呼吸等表现,记录活胎数,计算活胎率,活胎率($\%$)=(活胎数/窝产仔数) $\times 100\%$ 。在电子天平上称量各组孕鼠每窝胎鼠体重,结果取均值。

1.4 统计学处理 采用 SPSS23.0 软件对数据进行处理和分析,GraphPad Prism 8 软件完成图表绘制。实验数据符合正态分布,均以 $\bar{x} \pm s$ 的形式呈现。对于多组间均数的比较,采用单因素方差分析方法;组间两两均数的比较,采用最小显著差异 *t* 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 转染后 HTR8/Svneo 细胞中 HMGB1 表达比较 HTR8/Svneo 细胞转染 LV-NC、LV-HMGB1 后,荧光显微镜下观察到大量绿色荧光,转染率均在 95% 以上,见图 1A。与对照组 [(1.00 \pm 0.12)、(0.94 \pm 0.10)] 比较,sh-NC 组 [(0.99 \pm 0.14)、(0.92 \pm 0.11)] 和 sh-HMGB1 组 HTR8/Svneo 细胞中 HMGB1 mRNA 及蛋白相对表达水平均下调 ($P < 0.05$),见图 1B、1C。



注:A 为荧光显微镜观察绿色荧光蛋白($\times 40$);B 为 qPCR 检测 HMGB1 mRNA 表达;C 为 Western blot 检测 HMGB1 蛋白表达;与对照组比较,^a $P < 0.05$;与 sh-NC 组比较,^b $P < 0.05$ 。

图 1 转染后 HTR8/Svneo 细胞中 HMGB1 表达比较

2.2 各组 HTR8/Svneo 细胞增殖活性与凋亡水平比较 与 NG 组比较,HG 组 HTR8/Svneo 细胞增殖活

性降低($P < 0.05$);与 sh-NC 组比较,sh-HMGB1 组 HTR8/Svneo 细胞增殖活性升高($P < 0.05$),见图 2。与 NG 组[(2.59 ± 0.27)%]比较,HG 组 HTR8/Svneo 细胞凋亡率[(42.60 ± 4.57)%]升高($P < 0.05$);与 sh-NC 组[(42.20 ± 4.45)%]比较,sh-HMGB1 组 HTR8/Svneo 细胞凋亡率[(22.71 ± 2.43)%]降低($P < 0.05$),见图 3。

2.3 各组 HTR8/Svneo 细胞迁移、侵袭能力比较 与 NG 组[(296.47 ± 30.55)个、(168.86 ± 17.54)个]比较,HG 组 HTR8/Svneo 细胞迁移数目[(84.59 ± 8.51)个]与侵袭数目[(63.72 ± 6.56)个]减少($P < 0.05$);与 sh-NC 组[(64.85 ± 6.72)个、

(51.08 ± 5.29)个]比较,sh-HMGB1 组 HTR8/Svneo 细胞迁移数目[(160.76 ± 17.11)个]与侵袭数目[(105.78 ± 11.34)个]增加($P < 0.05$)。见图 4。

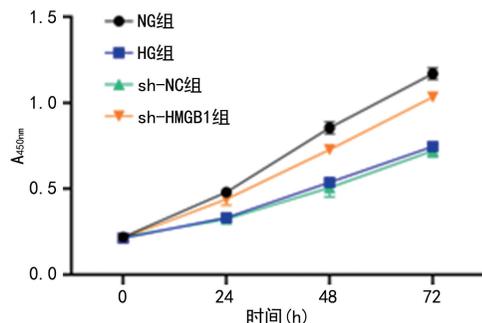
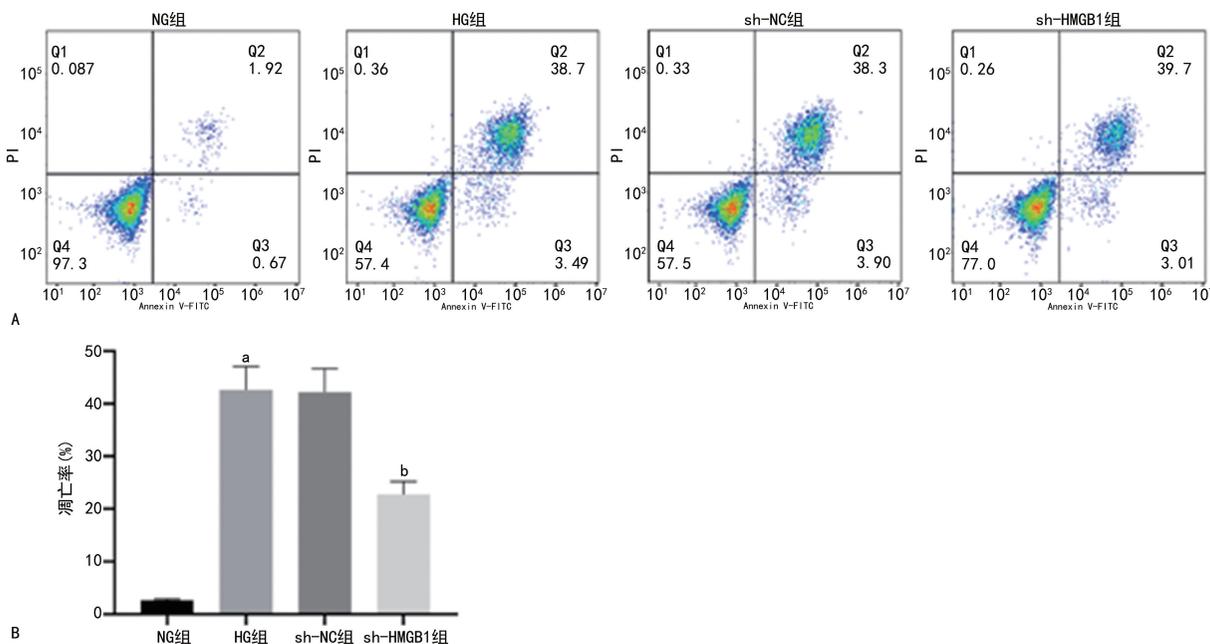


图2 各组 HTR8/Svneo 细胞增殖活性比较



注:A为细胞凋亡流式图;B为细胞凋亡柱状图;与对照组比较,^a $P < 0.05$;与 sh-NC 组比较,^b $P < 0.05$ 。

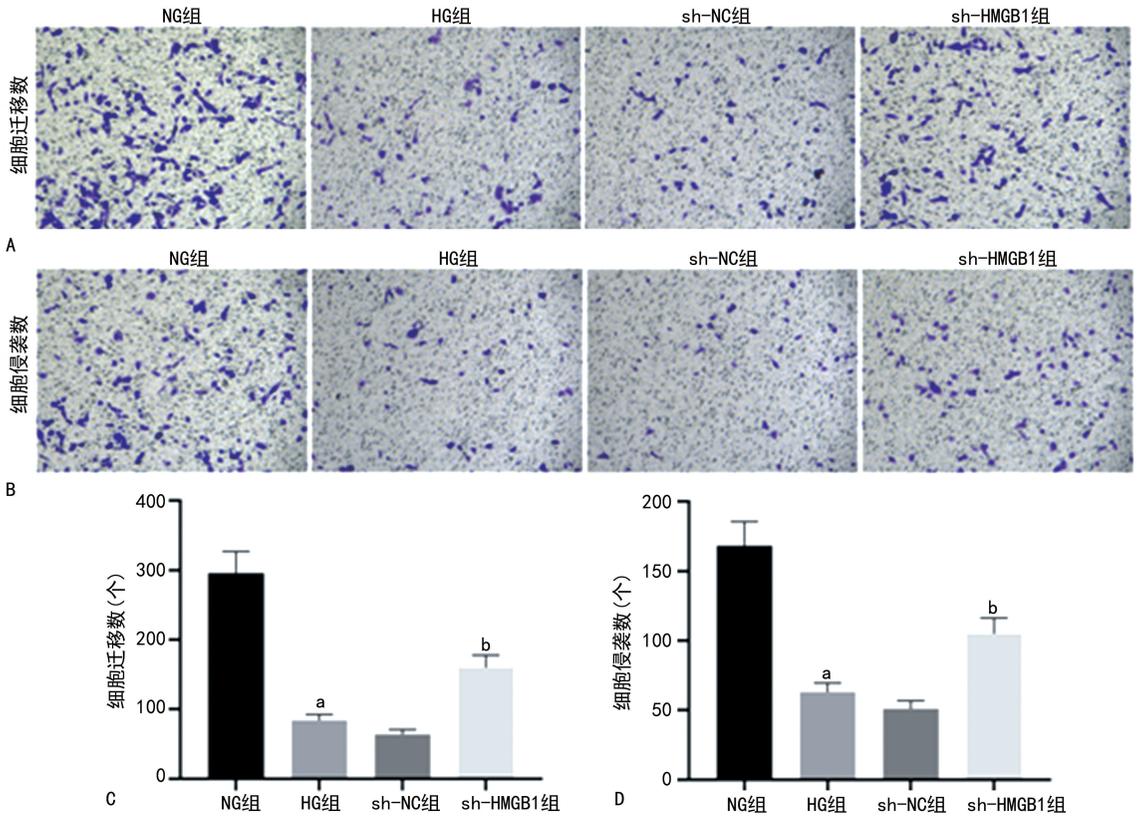
图3 各组 HTR8/Svneo 细胞凋亡率比较

2.4 各组 HTR8/Svneo 细胞上清液 TNF- α 、IL-6 水平比较 与 NG 组[(95.39 ± 9.72)pg/mL、(20.48 ± 2.13)pg/mL]比较,HG 组 HTR8/Svneo 细胞上清液中 TNF- α [(400.53 ± 42.69)pg/mL]、IL-6[(60.46 ± 6.20)pg/mL]水平升高($P < 0.05$);与 sh-NC 组[(401.94 ± 42.07)pg/mL、(60.72 ± 6.18)pg/mL]比较,sh-HMGB1 组 HTR8/Svneo 细胞上清液中 TNF- α [(206.18 ± 22.35)pg/mL]、IL-6[(30.88 ± 3.17)pg/mL]水平降低($P < 0.05$),见图 5。

2.5 各组滋养层细胞 TLR4/NF- κ B 信号通路相关蛋白表达比较 与 NG 组比较,HG 组 HTR8/Svneo 细胞中 HMGB1、TLR4、NF- κ B p65、Bax、cleaved Caspase-3 蛋白表达上调($P < 0.05$),Bcl-2 蛋白表达下调($P < 0.05$);与 sh-NC 组比较,sh-HMGB1 组 HTR8/Svneo 细胞中 HMGB1、TLR4、NF- κ B p65、Bax、cleaved Caspase-3 蛋白表达下调($P < 0.05$),Bcl-2 蛋白表达上调($P < 0.05$),见图 6。

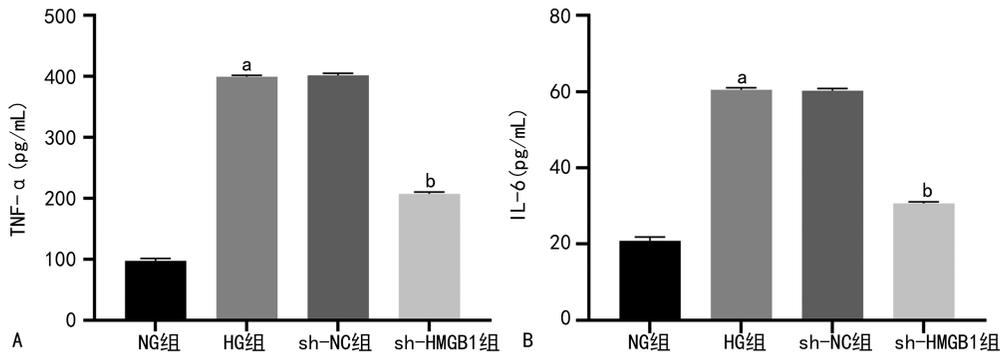
2.6 各组孕鼠血糖变化比较 与对照组[(5.34 ± 5.06)mmol/L、(25.83 ± 2.61)mU/L、(6.13 ± 0.63)]比较,GDM 组孕鼠 FBG[(14.64 ± 1.50)mmol/L]、FINS[(35.29 ± 3.48)mU/L]及 HOMA-IR(23.19 ± 2.44)升高($P < 0.05$);与 GDM 组比较,GA 组孕鼠 FBG[(10.99 ± 1.23)mmol/L]、FINS[(30.71 ± 3.14)mU/L]及 HOMA-IR(14.64 ± 1.54)降低($P < 0.05$),见图 7。

2.7 各组孕鼠妊娠结局比较 与对照组[(99.40 ± 9.83)%、(3.85 ± 3.92)g、(10.33 ± 1.07)个]比较,GDM 组孕鼠活胎率[(72.20 ± 7.58)%]降低($P < 0.05$),胎鼠体重[(4.76 ± 0.49)g]增加($P < 0.05$),窝产仔数[(3.67 ± 0.38)个]减少($P < 0.05$);与 GDM 组比较,GA 组孕鼠活胎率[(90.80 ± 9.92)%]升高($P < 0.05$),胎鼠体重[(4.33 ± 0.46)g]减小($P < 0.05$),且窝产仔数[(8.33 ± 0.85)个]增加($P < 0.05$),见图 8。



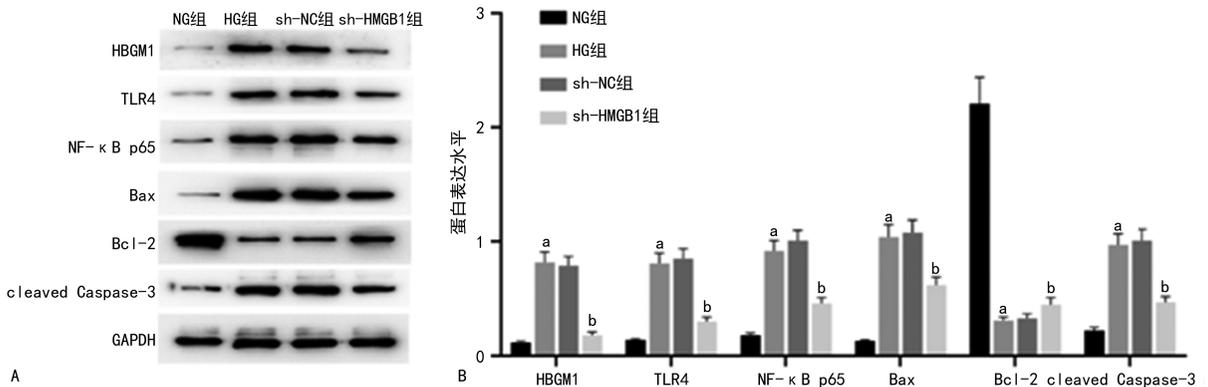
注:A、B 为各组 HTR8/Svneo 细胞迁移、侵袭数目比较($\times 40$);C、D 分别为各组 HTR8/Svneo 细胞迁移、侵袭数目柱状图;与对照组比较,^a $P < 0.05$;与 sh-NC 组比较,^b $P < 0.05$ 。

图 4 各组 HTR8/Svneo 细胞迁移、侵袭能力比较



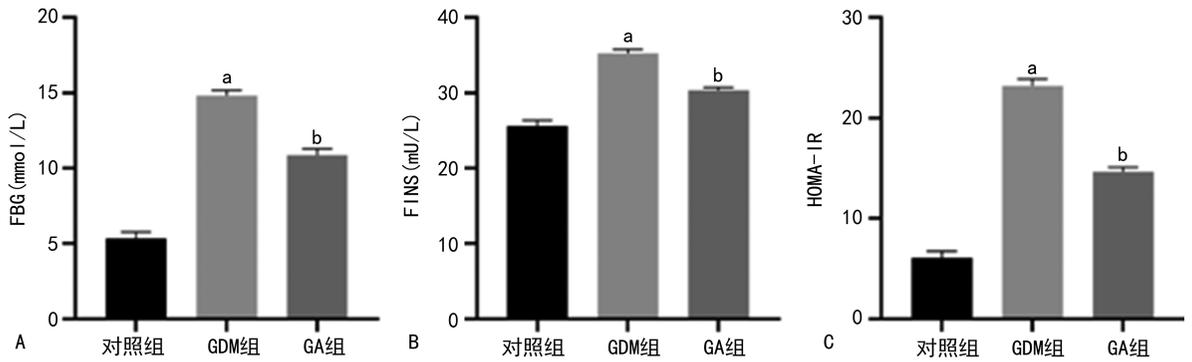
注:A、B 分别为各组 HTR8/Svneo 细胞上清液中 TNF- α 、IL-6 水平比较;与对照组比较,^a $P < 0.05$;与 sh-NC 组比较,^b $P < 0.05$ 。

图 5 各组 HTR8/Svneo 细胞上清液中 TNF- α 、IL-6 水平比较



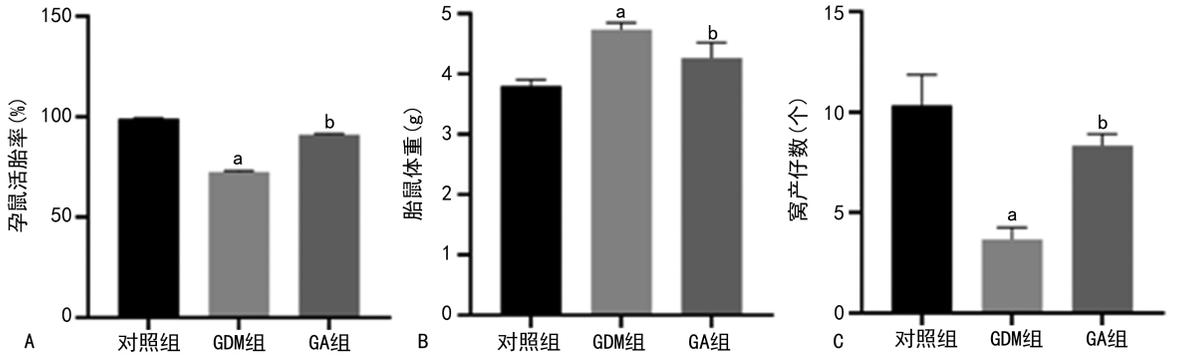
注:A 为各组 HTR8/Svneo 细胞中 TLR4/NF- κ B 信号通路相关蛋白 Western blot 图;B 为各组 HTR8/Svneo 细胞中 TLR4/NF- κ B 信号通路相关蛋白柱状图;与对照组比较,^a $P < 0.05$;与 sh-NC 组比较,^b $P < 0.05$ 。

图 6 各组 HTR8/Svneo 细胞中 TLR4/NF- κ B 信号通路相关蛋白表达



注：A、B、C 分别为各组孕鼠 FBG、FINS 及 HOMA-IR 比较；与对照组比较，^a $P < 0.05$ ；与 GDM 组比较，^b $P < 0.05$ 。

图 7 各组孕鼠 FBG、FINS 及 HOMA-IR 比较



注：A、B、C 分别为各组孕鼠活胎率、胎鼠体重及窝产仔数比较；与对照组比较，^a $P < 0.05$ ；与 GDM 组比较，^b $P < 0.05$ 。

图 8 各组孕鼠活胎率、胎鼠体质量及窝产仔数

3 讨 论

近年来,我国 GDM 发病率不断上升,这一现象增加了妊娠期多种并发症及胎儿不良结局的发生风险。胎盘作为妊娠期间母胎之间营养交换、气体交换和血液循环的关键器官,在维持胎儿正常生长发育中起着不可或缺的作用。在正常妊娠进程中,胎盘组织、脂肪组织等对胰岛素的敏感性下降,这限制了母体对葡萄糖的摄取和利用,同时促进肝脏葡萄糖输出,从而有助于将更多葡萄糖转运至胎儿,为胎儿的生长发育提供充足的营养支持。然而,当 GDM 发生时,母体的高血糖状态会影响胎盘结构并导致该器官功能改变,影响胎儿的营养供应和生长环境,导致流产、胎儿畸形等^[11]。滋养层细胞是胎盘的主要功能细胞,其迁移、侵袭能力的降低及生长受到抑制可能与胎盘发育不良有关,而胎盘发育不良又是导致 GDM 不良妊娠结局的重要因素之一。胰岛素抵抗被视作 GDM 的一项特异性病理特征。当胰腺 β 细胞的代偿性胰岛素分泌不足以维持因胰岛素抵抗所引发的循环葡萄糖浓度时,血糖水平就会超出正常范围,孕妇便会罹患 GDM^[12]。因此,深入探究高糖引起的滋养层细胞功能障碍是研究 GDM 发病机制、预防和治疗的有效途径。

HMGB1 在整个妊娠期间发挥重要作用。在妊娠早期, HMGB1 作为炎症调节因子,能够有效平衡炎症反应,这对胚胎着床和早期发育至关重要。然而,当胚胎成功着床后,抗炎环境是维持妊娠持续至分娩启动的关键^[13]。研究表明,妊娠期间 HMGB1

水平异常升高后,会通过与各种受体相互作用来触发炎症反应,导致下游释放 $\text{TNF-}\alpha$ 、IL-6 等促炎细胞因子,这可能引发一系列妊娠疾病,如胎盘炎症、先兆子痫、GDM 和抗磷脂综合征等^[14-15]。此外,母体循环及妊娠组织中 HMGB1 表达增加所引发的慢性炎症还会增加流产、早产或婴儿死亡的风险^[16]。HMGB1 在脂多糖诱导的 HTR8/Svneo 细胞炎症损伤模型中表达升高,敲低其表达可降低细胞自噬水平,促进细胞增殖和迁移,改善细胞功能障碍^[17]。子痫前期胎盘中 HMGB1 水平高于正常妊娠胎盘,体外实验发现 HMGB1 调节 HTR8/Svneo 细胞的增殖和侵袭^[18]。本研究结果显示,相较于高糖诱导的 HTR8/Svneo 细胞,高糖诱导敲低 HMGB1 表达的 HTR8/Svneo 细胞表现为增殖活性升高、迁移数目和侵袭数目增加,细胞凋亡减少,以及 $\text{TNF-}\alpha$ 、IL-6 水平降低。这提示敲低 HMGB1 表达能够促进高糖诱导的 HTR8/Svneo 细胞的增殖、迁移及侵袭能力,抑制细胞凋亡及炎症反应。

当细胞受到压力、损伤或感染时, HMGB1 释放到细胞外,可与多种细胞表面受体结合,诱导炎症反应。TLR4 是一种重要的模式识别受体,能够识别病原体相关分子模式和损伤相关分子模式。HMGB1 能够与细胞膜上的 TLR4 结合,进而启动下游的 $\text{NF-}\kappa\text{B}$ 信号通路,促使炎症因子的表达和释放,进而导致慢性炎症和组织损伤^[19]。因此,抑制由 HMGB1 介导的 TLR4/ $\text{NF-}\kappa\text{B}$ 信号通路激活可能是治疗

HMGB1 相关疾病的有效策略。HMGB1 通过 TLR2/TLR4-NF- κ B 通路激活细胞焦亡,引发无菌性炎症,导致原因不明复发性流产的发生发展;HMGB1 抑制剂阿司匹林可以降低原因不明复发性流产患者血清及蜕膜中 HMGB1 的表达水平,阻断 NF- κ B 信号通路激活,改善母胎界面的破坏^[20]。此外,有研究表明,通过抑制 NF- κ B 通路可促进高糖诱导下滋养层细胞的侵袭和迁移,改善细胞损伤及功能障碍^[21-23]。本研究结果显示,相较于高糖诱导的 HTR8/Svneo 细胞,高糖诱导敲低 HMGB1 表达的 HTR8/Svneo 细胞中 HMGB1、TLR4、NF- κ B p65 蛋白表达下调,促凋亡蛋白 Bax、cleaved Caspase-3 表达下调,抑凋亡蛋白 Bcl-2 表达上调,表明敲低 HMGB1 表达阻断了其与 TLR4 结合,从而抑制了 NF- κ B 信号通路的激活,减少了细胞凋亡。

在 GDM 中,胎盘会分泌多种激素,如胎盘生乳素、雌激素、孕激素等,这些激素会拮抗胰岛素的作用,干扰胰岛素正常发挥降血糖功效。此外,胰岛 β 细胞功能出现障碍,无法分泌足量的胰岛素来代偿胰岛素抵抗,从而使得 FBG 升高。为了维持血糖的稳定,机体在胰岛素抵抗状态下会反馈性地刺激胰岛 β 细胞分泌更多的胰岛素,因此,GDM 患者的 FINS 值通常升高^[24]。基于 FBG 和 FINS 升高,HOMA-IR 也会随之升高。本研究结果显示,使用 HMGB1 抑制剂 GA 治疗后,GDM 孕鼠 FBG、FINS 及 HOMA-IR 降低;于妊娠第 20 天进行剖宫产发现,相较于 GDM 孕鼠,经 GA 治疗的孕鼠活胎率升高、胎鼠体重减小且窝产仔数增加。以上结果提示,阻断 HMGB1 能够控制 GDM 孕鼠的血糖水平,提高活胎率,改善妊娠结局。

综上所述,本研究表明敲低 HMGB1 可有效改善高糖诱导的 HTR8/Svneo 细胞损伤,其机制可能与调控 TLR4/NF- κ B 信号通路有关,同时,HMGB1 抑制剂 GA 能够缓解 GDM 孕鼠的症状,改善血糖代谢及妊娠结局,为开发针对 GDM 的新型治疗策略提供了理论依据。但本研究中动物实验仅观察了 GA 对 GDM 孕鼠的干预效果,未对 HMGB1 潜在的调控机制进行探索,后续研究将对此进行深入挖掘。

参考文献

- [1] SWEETING A, HANNAH W, BACKMAN H, et al. Epidemiology and management of gestational diabetes[J]. *Lancet*, 2024, 404(10448): 175-192.
- [2] ALEJANDRO E U, MAMERTO T P, CHUNG G, et al. Gestational diabetes mellitus: a harbinger of the vicious cycle of diabetes[J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(14): 5003.
- [3] HANNAH W, BHAVADHARINI B, BEKS H, et al. Global burden of early pregnancy gestational diabetes mellitus (eGDM): a systematic review[J]. *Acta Diabetol*, 2022, 59(3): 403-427.
- [4] XIAO Z, YAN L, LIANG X, et al. Progress in deciphering

- trophoblast cell differentiation during human placentation [J]. *Curr Opin Cell Biol*, 2020, 67: 86-91.
- [5] MAJALI-MARTINEZ A, WEISS-FUCHS U, MIEDL H, et al. Type 1 diabetes mellitus and the first trimester placenta: hyperglycemia-induced effects on trophoblast proliferation, cell cycle regulators, and invasion[J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(20): 10989.
- [6] BEDELL S, HUTSON J, DE VRIJER B, et al. Effects of maternal obesity and gestational diabetes mellitus on the placenta: current knowledge and targets for therapeutic interventions[J]. *Curr Vasc Pharmacol*, 2021, 19(2): 176-192.
- [7] XUE L, CHEN R, LIU Y, et al. Association of maternal blood high-mobility group box 1 levels and adverse pregnancy outcomes: a systematic review and meta-analysis [J]. *Reprod Biol*, 2024, 24(2): 100859.
- [8] HEIM K R, MULLA M J, POTTER J A, et al. Excess glucose induce trophoblast inflammation and limit cell migration through HMGB1 activation of Toll-Like receptor 4[J]. *Am J Reprod Immunol*, 2018, 80(5): e13044.
- [9] 丁敬,冷在华,张秀琼.人参皂苷 Re 通过内质网应激通路对妊娠期糖尿病大鼠妊娠结局的影响及相关机制[J]. *临床和实验医学杂志*, 2021, 20(8): 804-808.
- [10] LIU F, YANG X, XING J, et al. Glycyrrhizin potentially suppresses the inflammatory response in preeclampsia rat model[J]. *Pregnancy Hypertens*, 2021, 23: 34-40.
- [11] THAWEETHAI T, SOETAN Z, JAMES K, et al. Distinct insulin physiology trajectories in euglycemic pregnancy and gestational diabetes mellitus [J]. *Diabetes Care*, 2023, 46(12): 2137-2146.
- [12] SHEN Y, ZHENG Y, SU Y, et al. Insulin sensitivity, β cell function, and adverse pregnancy outcomes in women with gestational diabetes[J]. *Chin Med J*, 2022, 135(21): 2541-2546.
- [13] GOLDSTEIN J A, GALLAGHER K, BECK C, et al. Maternal-fetal inflammation in the placenta and the developmental origins of health and disease[J]. *Front Immunol*, 2020, 11: 531543.
- [14] SAITO R C A, PADRON J G, NORMAN I N D, et al. High-mobility group box 1 is a driver of inflammation throughout pregnancy[J]. *Am J Reprod Immunol*, 2021, 85(1): e13328.
- [15] HU M, ZHANG Y, LU Y, et al. Regulatory mechanisms of HMGB1 and its receptors in polycystic ovary syndrome-driven gravid uterine inflammation[J]. *FEBS J*, 2023, 290(7): 1874-1906.
- [16] TICCONI C, MARDENTE S, MARI E, et al. High mobility group box 1 in women with unexplained recurrent pregnancy loss [J]. *J Perinat Med*, 2023, 51(9): 1139-1146.
- [17] ZHOU F, WANG Y, TAN Y, et al. HMGB1 regulates lipopolysaccharide-induced cellular dysfunction in HTR8/SVneo cells: implications for the role of HMGB1 in unexplained spontaneous miscarriage[J]. *Placenta*, 2021, 112: 16-22.

急性髓系白血病患者血小板输注疗效的影响因素分析及预测模型构建*

李 至¹, 段雨涵^{2△}

恩施土家族苗族自治州中心医院: 1. 输血科; 2. 检验科, 湖北恩施 445000

摘要:目的 分析急性髓系白血病(AML)患者血小板输注疗效的影响因素并构建预测模型。方法 选取 2022 年 3 月至 2025 年 2 月该院收治的 120 例 AML 患者为研究对象, 根据血小板输注疗效分为输注无效组($n=42$)、输注有效组($n=78$)。采用多因素 Logistic 回归分析探讨 AML 患者血小板输注疗效的影响因素; 构建列线图模型, 并评估其对 AML 患者血小板输注疗效的预测价值。结果 输注无效组输注次数多于输注有效组, 合并感染、脾肿大、使用抗菌药物、输血前白细胞计数 $\geq 50 \times 10^9$ 、输血前血小板计数 $< 50 \times 10^9$ 占比均大于输注有效组($P < 0.05$)。多因素 Logistic 回归分析结果显示, 输注次数多($OR = 2.595, 95\%CI 1.700 \sim 3.871$)、合并感染($OR = 2.282, 95\%CI 1.554 \sim 3.351$)、脾肿大($OR = 2.735, 95\%CI 1.784 \sim 4.192$)、输血前白细胞计数 $\geq 50 \times 10^9$ ($OR = 2.479, 95\%CI 1.656 \sim 3.713$)是 AML 患者血小板输注无效的危险因素($P < 0.05$)。列线图模型的一致性指数(C-index)为 0.891($95\%CI 0.839 \sim 0.943$), 内部验证分析显示, 该列线图模型具有良好的拟合效果和较高的预测准确性。列线图模型预测 AML 患者血小板输注疗效的曲线下面积($95\%CI$)为 0.884($0.832 \sim 0.936$), 特异度为 67.51%, 灵敏度为 92.03%。结论 AML 患者血小板输注无效的影响因素包括输注次数、合并感染、脾肿大、输血前白细胞计数, 基于以上因素建立的列线图模型具有良好的预测效能。

关键词:急性髓系白血病; 血小板输注; 影响因素; 列线图

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2026.03.003

中图法分类号: R733.71

文章编号: 1673-4130(2026)03-0273-06

文献标志码: A

Analysis of influencing factors and construction of prediction model for the efficacy of platelet transfusion in patients with acute myeloid leukemia*

LI Zhi¹, DUAN Yuhan^{2△}

1. Department of Blood Transfusion; 2. Department of Clinical Laboratory, Central Hospital of Enshi Tujia and Miao Autonomous Prefecture, Enshi, Hubei 445000, China

Abstract: Objective To analyze the influencing factors of the efficacy of platelet transfusion in patients with acute myeloid leukemia (AML) and construct a prediction model. **Methods** A total of 120 AML patients admitted to this hospital from March 2022 to February 2025 were selected as the research objects. According to the efficacy of platelet transfusion, they were divided into transfusion ineffective group ($n=42$) and transfusion effective group ($n=78$). Multivariate Logistic regression analysis was used to explore the influencing factors of platelet transfusion efficacy in AML patients. A nomogram model was constructed and its predictive value for the efficacy of platelet transfusion in AML patients was evaluated. **Results** The number of transfusions in the ineffective transfusion group was more than that in the effective transfusion group, and the proportion of infection, splenomegaly, use of antibiotics, white blood cell count $\geq 50 \times 10^9$ before blood transfusion, and platelet count $< 50 \times 10^9$ before blood transfusion in the ineffective transfusion group was higher than that in the effective transfusion group ($P < 0.05$). Multivariate Logistic regression analysis showed that multiple transfusions($OR = 2.595, 95\%CI 1.700 \sim 3.871$), infection($OR = 2.282, 95\%CI 1.554 \sim 3.351$), splenomegaly ($OR = 2.735, 95\%CI 1.784 \sim 4.192$) and white blood cell count $\geq 50 \times 10^9$ before transfusion ($OR = 2.479, 95\%CI 1.656 \sim 3.713$) were the risk factors of platelet transfusion refractlessness in AML patients ($P < 0.05$). The C-index of the nomogram model was 0.891 ($95\%CI 0.839 \sim 0.943$). Internal validation analysis showed that the nomogram model had good fitting effect and high prediction accuracy. The area under the curve ($95\%CI$) of the nomogram model predicting the efficacy of platelet transfusion in AML pa-

* 基金项目: 湖北省卫生健康委科研项目(WJ2023M180)。

作者简介: 李至, 女, 技师, 主要从事输血检验相关研究。 △ 通信作者, E-mail: 157250026@qq.com。