

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2023.02.006

L- 瓜氨酸对于产前子痫中的氧化应激和滋养层细胞侵袭的调控机制研究 *

吴益青¹ 计 静¹ 李亚妮¹ 邢燕妮¹ 王 瑞^{2Δ}

(西北妇女儿童医院 1 产二科; 2 产一科 陕西 西安 710061)

摘要 目的:研究 L- 瓜氨酸(L-Cit)对于产前子痫(PE)大鼠模型的治疗作用,及其对氧化应激和滋养层细胞侵袭的影响。**方法:**建立 N- 硝基-L- 精氨酸甲酯(L-NAME)诱导的 PE 大鼠模型后,将大鼠分为 Control 组、PE 组、PE+ 低、中和高剂量 L-Cit 组(依次为 L-L-Cit、M-L-Cit 和 H-L-Cit 组,剂量依次为 100、200 和 500 mg/kg),n=6,连续给药 7 d。在孕第 21 d 时,检测各组大鼠收缩压(SBP)、24 h 尿蛋白、血清超氧化物歧化酶(SOD)和丙二醛(MDA)水平,并对胎盘组织进行苏木精伊红(HE)染色。将 HTR-8/Svneo 细胞分为 Control 组、缺氧/复氧(H/R)组、H/R+L-Cit 组和 H/R+L-Cit+sc-221593 组,分别对细胞进行 H/R 处理,并使用 L-Cit(200 μg/mL)和特异性 ERK1/2 抑制剂 sc-221593(10 μmol/L)培养细胞 48 h。通过 Transwell 测定细胞侵袭。通过 Western blotting 检测 total-ERK1/2、p-ERK1/2、total-p38、p-p38、基质金属蛋白酶(MMP)-2 和 MMP-9 的蛋白表达。**结果:**与 PE 组比较,L-L-Cit 组、M-L-Cit 组和 H-L-Cit 组的 SBP 和 24 h 尿蛋白水平均降低($P<0.05$);胎盘组织形态明显改善;血清 SOD 升高,MDA 降低($P<0.05$);胎盘组织中 ERK1/2 和 p38 的磷酸化水平及 MMP-2 和 MMP-9 的蛋白表达水平均升高($P<0.05$)。与 H/R 组比较,H/R+L-Cit 组的侵袭细胞数量升高($P<0.05$);ERK1/2 和 p38 的磷酸化水平及 MMP-2 和 MMP-9 的蛋白表达水平均升高($P<0.05$)。与 H/R+L-Cit 组比较,H/R+L-Cit+sc-221593 组的上述变化均被逆转($P<0.05$)。**结论:**L-Cit 可能通过激活 ERK/JNK 通路减轻 PE 中的氧化应激并促进滋养层细胞侵袭,从而减轻 PE 症状。

关键词:子痫前期;L- 瓜氨酸;氧化应激;滋养层细胞;侵袭

中图分类号:R-33;R714.245 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2023)02-232-07

The Regulatory Mechanism of L-Citrulline on Oxidative Stress and Trophoblast Invasion in Preeclampsia*

WU Yi-qing¹, JI Jing¹, LI Ya-ni¹, XING Yan-ni¹, WANG Ru^{2Δ}

(1 2nd Obstetrics; 2 1st Obstetrics, North-West Women and Children's Hospital, Xi'an, Shaanxi, 710061, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the therapeutic effect of L-Citrulline (L-Cit) on preeclampsia (PE) rat model and its effect on oxidative stress and trophoblast cell invasion. **Methods:** After establishing the PE rat model induced by N-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME), the rats were divided into Control group, PE group, PE+ low, middle and high dose L-Cit groups (L-L-Cit, M-L-Cit and H-L-Cit groups in sequence, with doses of 100, 200 and 500 mg/kg in sequence), n=6, continuous administration for 7 days. On the 21st day of pregnancy, systolic blood pressure (SBP), 24-hour urinary protein, serum superoxide dismutase (SOD) and malondialdehyde (MDA) were measured, and placental tissue was stained with hematoxylin-eosin (HE). The HTR-8/Svneo cells were divided into Control group, hypoxia/reoxygenation (H/R) group, H/R+L-Cit group and H/R+L-Cit+sc-221593 group. The cells were treated with H/R, respectively, and cultured with L-Cit (200 μg/mL) and the specific ERK1/2 inhibitor sc-221593 (10 μmol/L) for 48 h. Cell invasion was determined by Transwell assay. The protein expressions of total-ERK1/2, p-ERK1/2, total-p38, p-p38, matrix metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9 in placental tissues and cells were detected by Western blotting. **Results:** Compared with PE group, the SBP and 24 h urinary protein levels of the rats in L-L-Cit group, M-L-Cit group and H-L-Cit group were decreased ($P<0.05$); the placental tissue morphology was significantly improved; serum SOD was increased, while MDA was decreased ($P<0.05$); the phosphorylation levels of ERK1/2 and p38 and the protein expression levels of MMP-2 and MMP-9 in placental tissue were increased ($P<0.05$). Compared with H/R group, the number of invasive cells in H/R+L-Cit group increased ($P<0.05$); the phosphorylation levels of ERK1/2 and p38 and the protein expression levels of MMP-2 and MMP-9 increased ($P<0.05$). Compared with the H/R+L-Cit group, the above changes in the H/R+L-Cit+sc-221593 group were reversed ($P<0.05$). **Conclusions:** L-Cit may alleviate the symptoms of PE by reducing oxidative stress in PE and promoting trophoblast invasion by activating the ERK/JNK pathway.

Key words: Preeclampsia; L-citrulline; Oxidative stress; Trophoblast; Invasion

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R714.245 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2023)02-232-07

* 基金项目:陕西省重点研发计划项目 - 社会发展领域(2021SF-009)

作者简介:吴益青(1978-),女,硕士,副主任医师,E-mail: YQwusx8@163.com

Δ 通讯作者:王瑞(1975-),女,E-mail: 972173916@qq.com

(收稿日期:2022-06-30 接受日期:2022-07-27)

前言

子痫前期(Preeclampsia, PE)是妊娠期常见的特发性疾病。虽然PE的确切病因尚不清楚,但普遍认为滋养层侵袭不足引起的螺旋动脉重构受损是本病的主要病因^[1]。据报道,螺旋动脉重构受损可引起胎盘血液供应不足并使胎盘处于持续低氧状态,导致滋养层细胞的侵袭能力降低,并发生胎盘浅着床,从而引起PE的发生^[2]。因此,抗氧化是治疗PE的有效策略。瓜氨酸是西瓜汁中发现的非蛋白质氨基酸,其主要存在形式为L-瓜氨酸(L-Citrulline, L-Cit)^[3],其可作为L-精氨酸的前体化合物^[4]。文献报道,L-精氨酸能够降低L-NAME诱导的妊娠高血压小鼠尿蛋白和血压水平^[5],然而,L-精氨酸在体内代谢过快,限制了其临床应用^[6]。因此,本研究考察了L-Cit对一氧化氮合酶抑制剂N-硝基-L-精氨酸甲酯(N^o-nitro-L-arginine-methylesterhydrochloride, L-NAME)诱导的PE大鼠的治疗作用,并通过建立人绒毛膜滋养层细胞(HTR-8/Svneo)缺氧/复氧(Hypoxia/re-oxygenation, H/R)模型,进一步研究了L-Cit对滋养层细胞侵袭能力的影响及机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验试剂 L-Cit(货号:C7629)购自美国Sigma公司。ERK1/2抑制剂sc-221593(货号:CAS 1049738-54-6)购自美国Santa Cruz公司。L-NAME(货号:ST1555-10g)、苏木精和伊红(HE)染色试剂盒(货号:C0105M)、Cell Counting Kit-8(货号:C0038)、RIPA裂解液(货号:P0013C)、BCA蛋白测定试剂盒(P0012S)、BeyoECL Plus(货号:P0018S)购自碧云天生物技术有限公司。超氧化物歧化酶(SOD,货号:A001-3-2)试剂盒、丙二醛(MDA,货号:A003-1-2)试剂盒购自南京建成生物工程研究所。RPMI1640培养基(货号:R8758)购自美国Sigma公司。Transwell测定(货号:3422)购自美国Corning公司。total-ERK1/2(ab184699)、p-ERK1/2(ab201015)、total-p38(ab170099)、p-p38(ab178867)、基质金属蛋白酶(MMP)-2(ab51075)、MMP-9(ab76003)、 β -actin(ab8227)和IgG-HRP(ab205719)抗体购自英国Abcam公司。

1.1.2 实验动物和细胞 40只7-8周龄雌性Sprague-Dawley(SD)大鼠(体重200-250g)和20只7-8周龄雄性SD大鼠(体重240-300g)购自陕西中医药大学实验动物中心(生产许可证:SCXK(陕)2021-001)。大鼠饲养在25℃,55%相对湿度,12h-12h光暗照明的环境中,不限制饮食。将雌性和雄性大鼠按照2:1比例同笼饲养,观察到雌性阴道中精子并有阴栓脱落为孕第0d。

人绒毛膜滋养层细胞(HTR-8/Svneo,货号:AC-2537H)购自美国ATCC。

1.2 方法

1.2.1 PE大鼠模型建立 参考文献^[7]方法建立L-NAME诱导的PE模型大鼠。孕第11天开始,取30只大鼠每天经皮下注射1mL 200mg/kg的L-NAME,连续4d。孕第15天测量收缩压(Systolic blood pressure, SBP),若收缩压升高30mmHg则表示建模成功。

1.2.2 大鼠分组及给药 孕第15天时,30只建模的大鼠共有25只建模成功,取24只建模成功大鼠随机分为以下4个组:PE模型组(PE组)、PE+低剂量L-Cit组(L-L-Cit组)、PE+中剂量L-Cit组(M-L-Cit组)和PE+高剂量L-Cit组(H-L-Cit组),每组6只。Control组的6只大鼠每天皮下注射1mL的0.9%氯化钠溶液。孕第15天时,Control组和PE组大鼠每天灌胃1mL的0.9%氯化钠溶液。L-L-Cit组、M-L-Cit组和H-L-Cit组大鼠分别每天灌胃1mL的100、200或500mg/kg的L-Cit溶液。连续给药7d。L-Cit的剂量参考文献^[4,8]设定。

1.2.3 SBP的测量 应用无创尾动脉血压测量分析系统ZH-HX-Z(安徽正华生物仪器设备有限公司)测量大鼠SBP。

1.2.4 24h尿蛋白的测定 孕第21天时,使用大鼠代谢笼收集尿液,4℃下2000rpm离心15min,取上清液。通过日立7600-020型全自动生化分析仪测定24h尿蛋白。

1.2.5 大鼠胎盘组织HE染色 孕第21天时,剖宫取大鼠胎盘组织,4%多聚甲醛固定,石蜡包埋,切成4 μ m厚切片,按照试剂盒说明步骤进行HE染色。

1.2.6 血清氧化应激指标检测 孕第21天时,大鼠眼眶静脉丛采血0.5mL,离心分离血清。使用SOD或MDA试剂盒分别检测大鼠血清中SOD和MDA的水平。

1.2.7 HTR-8/Svneo细胞培养 HTR-8/Svneo细胞在RPMI1640培养基(含10%胎牛血清(FBS)和1%双抗)中于5%的CO₂和37℃条件下培养。

1.2.8 细胞毒性测定 将对数生长期的HTR-8/Svneo细胞接种到96孔板中(1.5 $\times$ 10⁴个细胞/孔),分别用不同浓度的L-Cit(0、1、10、50、100、200、400、800 μ g/mL)在5%的CO₂和37℃条件下培养48h,每孔100 μ L。然后向每个孔中加入10 μ L的CCK8试剂,并在相同条件下培养4h。然后用酶标测定每个孔在450nm处的光密度(OD)。选择L-Cit的最适宜实验使用浓度。

1.2.9 HTR-8/Svneo细胞分组及处理 将HTR-8/Svneo细胞分为Control组、H/R组、H/R+L-Cit组和H/R+L-Cit+sc-221593组。Control组细胞在常氧条件(5%CO₂,20%O₂,75%N₂)下培养,不使用药物处理。H/R组、H/R+L-Cit组和H/R+L-Cit+sc-221593组细胞在细胞三气培养箱中缺氧处理8h(5%CO₂,2%O₂,93%N₂),然后常氧培养16h,2个循环共48h。H/R+L-Cit组细胞培养基中添加200 μ g/mL的L-Cit, H/R+L-Cit+sc-221593组细胞培养基中添加200 μ g/mL的L-Cit和特异性ERK1/2抑制剂sc-221593(10 μ mol/L)。

1.2.10 细胞侵袭测定 细胞处理后,通过Transwell测定细胞侵袭。Transwell放入24孔板中,上室预涂有100 μ L matrigel基质胶。将200 μ L HTR-8/Svneo细胞(2 $\times$ 10⁴个细胞/孔)加入上室,上室培养基中含有1%FBS。同时将700 μ L补充有10%FBS的完全培养基加入下室。在5%的CO₂和37℃的培养箱中培养48h。擦除未侵袭的细胞,用PBS冲洗2次,4%多聚甲醛固定20min,0.2%结晶紫染色10min。最后,在200倍放大倍数下随机选择5个视野,计数侵袭细胞数量。

1.2.11 Western blotting蛋白表达水平检测 使用含有磷酸酶抑制剂和蛋白酶抑制剂的RIPA缓冲液从胎盘组织或HTR-8/Svneo细胞中分离总蛋白。采用BCA法测定总蛋白含

量。蛋白样品用 10% SDS-PAGE 电泳分离,然后转移到 PVDF 膜上 5%的牛血清白蛋白封闭膜 1 h, 然后与均为 1:1000 稀释的抗 total-ERK1/2、p-ERK1/2、total-p38、p-p38、MMP-2、MMP-9 和 β -actin 在 4℃ 孵育过夜。TBST 缓冲液洗涤 3 次后, 与 1:2000 稀释的 IgG-HRP 二抗室温孵育 2 h, 使用 BeyoECL Plus 显色。用 ImageJ 软件计算条带灰度值。以 β -actin 作为内参。

1.3 统计学分析

使用 SPSS18.0 软件进行数据分析, 组间比较采用单因素方差分析及 LSD 检验。 $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 L-Cit 对 L-NAME 诱导的 PE 大鼠血压和 24 h 尿蛋白的影响

孕第 21 天时, 与 Control 组比较, PE 组的 SBP 和 24 h 尿蛋白水平均升高 ($P<0.05$); 与 PE 组比较, L-L-Cit 组、M-L-Cit 组和 H-L-Cit 组的 SBP 和 24 h 尿蛋白水平均降低 ($P<0.05$)。见表 1。

表 1 各组大鼠的 SBP 和 24 h 尿蛋白水平

Table 1 SBP and 24 h urine protein levels of rats in each group

Groups	SBP(mmHg)	24 h urine protein(mg)
Control	115.68± 10.21	6.76± 0.71
PE	154.94± 6.09*	13.24± 1.01*
L-L-Cit	133.81± 8.61 [#]	8.12± 0.36 [#]
M-L-Cit	131.93± 4.73 [#]	7.55± 0.35 [#]
H-L-Cit	120.76± 8.51 [#]	7.01± 0.87 [#]
F	22.255	84.901
P	<0.001	<0.001

Note: Compared with Control group, * $P<0.05$; Compared with PE group, [#] $P<0.05$.

2.2 L-Cit 对 L-NAME 诱导的 PE 大鼠胎盘组织形态的影响

胎盘组织 HE 染色结果显示, Control 组大鼠胎盘组织形态正常; PE 组大鼠胎盘出现钙化、坏死和水肿; 相较于 PE 组大

鼠, L-L-Cit 组、M-L-Cit 组和 H-L-Cit 组大鼠的胎盘组织形态发生明显改善。见图 1。

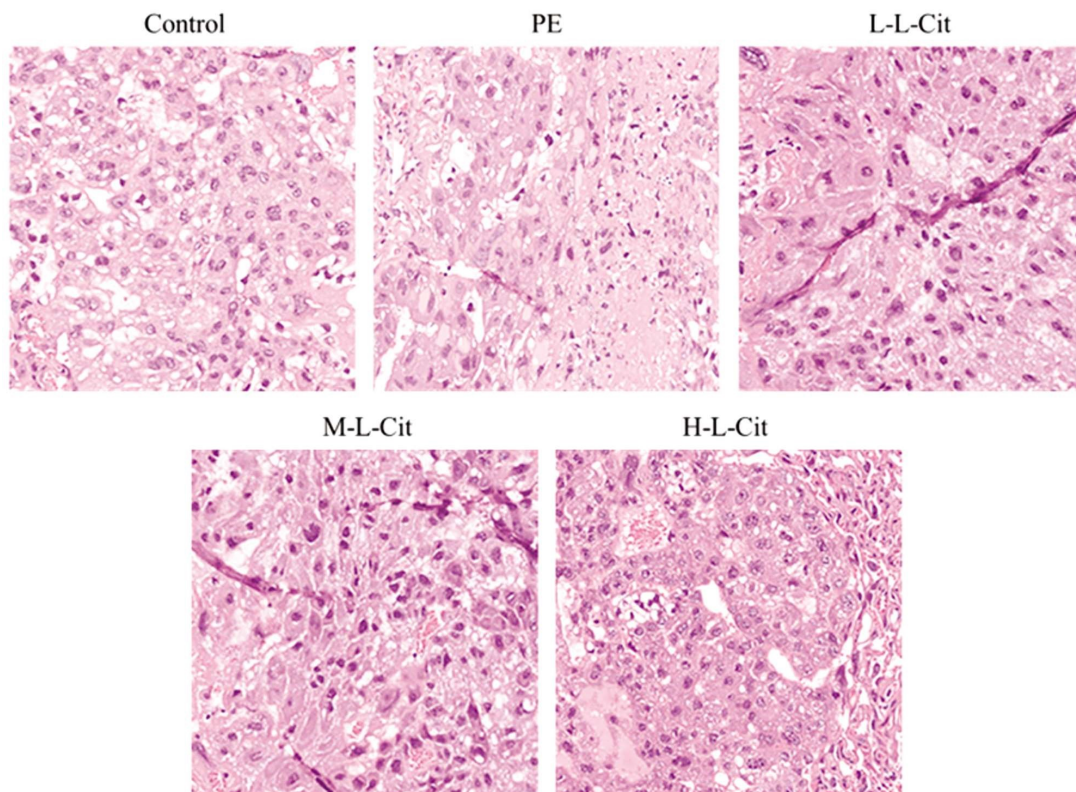


图 1 各组大鼠胎盘组织 HE 染色

Fig.1 HE staining of placental tissue of rats in each group

Note: magnification: × 200

2.3 L-Cit 对 L-NAME 诱导的 PE 大鼠血清氧化应激指标的影响

与 Control 组比较,PE 组大鼠血清中 SOD 水平降低,

MDA 水平升高 ($P<0.05$); 与 PE 组比较,L-L-Cit 组、M-L-Cit 组和 H-L-Cit 组大鼠血清中 SOD 水平升高,MDA 水平降低 ($P<0.05$)。见表 2。

表 2 各组大鼠的血清 SOD 和 MDA 水平

Table 2 Serum SOD and MDA levels of rats in each group

Groups	SOD(U/mL)	MDA (nmol/mL)
Control	23.18± 2.81	1.57± 0.19
PE	11.07± 3.42*	3.64± 0.84*
L-L-Cit	19.25± 1.52 [#]	2.03± 0.29 [#]
M-L-Cit	27.01± 1.74 [#]	1.65± 0.15 [#]
H-L-Cit	29.56± 2.17 [#]	1.46± 0.06 [#]
F	53.227	28.738
P	<0.001	<0.001

Note: Compared with Control group, * $P<0.05$; Compared with PE group, [#] $P<0.05$.

2.4 L-Cit 对 L-NAME 诱导的 PE 大鼠胎盘组织 ERK/MAPK 通路的影响

Western blotting 结果显示,与 Control 组比较,PE 组大鼠胎盘组织中 ERK1/2 和 p38 的磷酸化水平及 MMP-2 和

MMP-9 的蛋白表达水平均降低 ($P<0.05$); 与 PE 组比较,L-L-Cit 组、M-L-Cit 组和 H-L-Cit 组大鼠胎盘组织中 ERK1/2 和 p38 的磷酸化水平及 MMP-2 和 MMP-9 的蛋白表达水平均升高($P<0.05$)。见图 2。

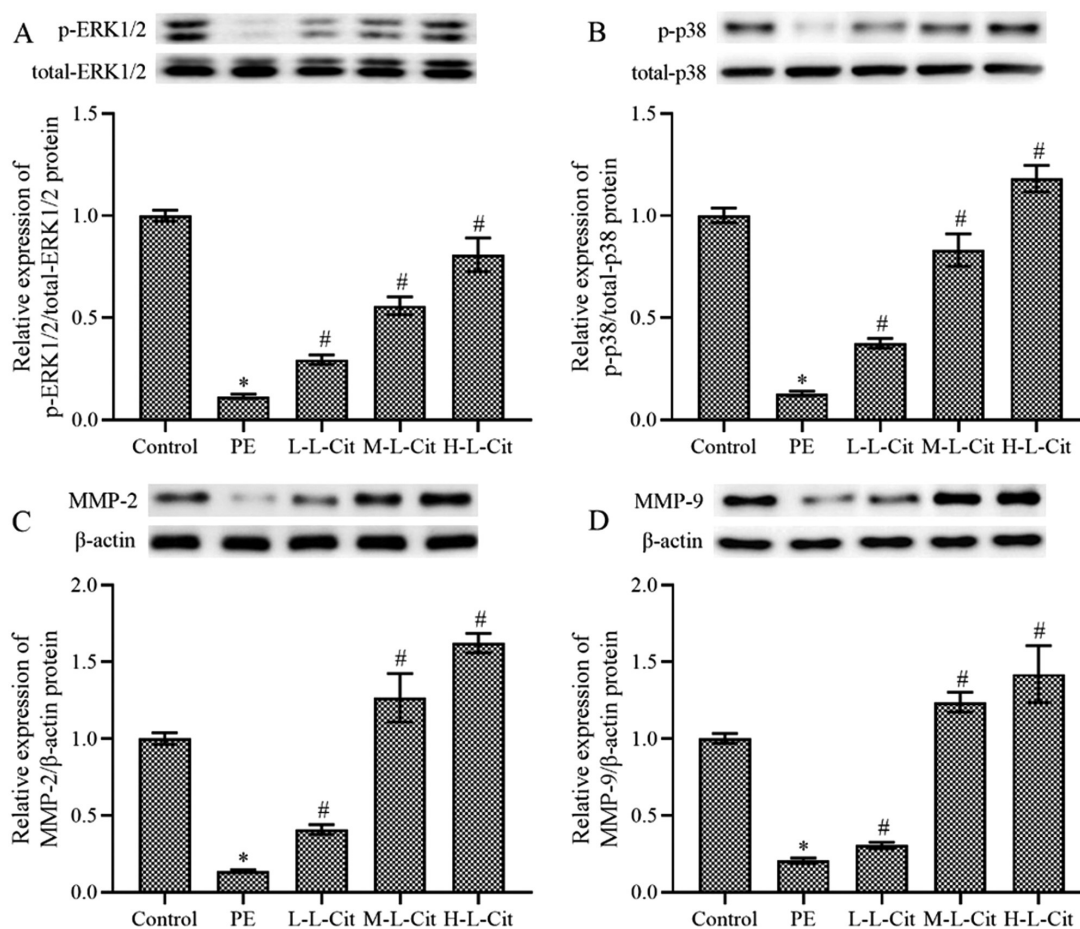


图 2 各组大鼠胎盘组织中 total-ERK1/2、p-ERK1/2、total-p38、p-p38、MMP-2 和 MMP-9 的蛋白表达

Fig. 2 Protein expression of total-ERK1/2, p-ERK1/2, total-p38, p-p38, MMP-2 and MMP-9 in placental tissue of rats in each group

Note: A: Phosphorylation level of ERK1/2; B: Phosphorylation level of p38; C: Protein expression level of MMP-2; D: Protein expression level of MMP-9; Compared with Control group, * $P<0.05$; Compared with PE group, [#] $P<0.05$.

2.5 L-Cit 对 HTR-8/Svneo 细胞的毒性测试

不同浓度的 L-Cit 培养 HTR-8/Svneo 细胞 48 h 后, 与 0 $\mu\text{g/mL}$ 比较, 400 $\mu\text{g/mL}$ 和 800 $\mu\text{g/mL}$ 浓度的 L-Cit 处理下相对细胞活力显著降低 ($P<0.05$, 见图 3)。后续实验中, 将 L-Cit 的处理浓度设置为 200 $\mu\text{g/mL}$ 。

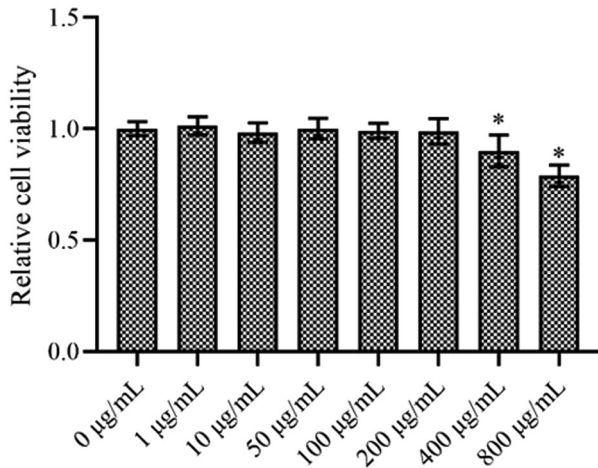


图 3 不同浓度处理的 HTR-8/Svneo 细胞的相对活力

Fig. 3 Relative viability of HTR-8/Svneo cells treated with different concentrations

Note: * $P<0.05$ vs 0 $\mu\text{g/mL}$.

2.6 L-Cit 对 H/R 诱导的 HTR-8/Svneo 细胞侵袭的影响

Transwell 结果显示, 与 Control 组比较, H/R 组的侵袭细胞数量降低 ($P<0.05$); 与 H/R 组比较, H/R+L-Cit 组的侵袭细胞数量升高 ($P<0.05$); 与 H/R+L-Cit 组比较, H/R+L-Cit+sc-221593 组的侵袭细胞数量降低 ($P<0.05$)。见图 4。

2.7 L-Cit 对 H/R 诱导的 HTR-8/Svneo 细胞中 ERK/MAPK 通路的影响

Western blotting 结果显示, 与 Control 组比较, H/R 组细胞中 ERK1/2 和 p38 的磷酸化水平及 MMP-2 和 MMP-9 的蛋白表达水平均降低 ($P<0.05$); 与 H/R 组比较, H/R+L-Cit 组细胞中 ERK1/2 和 p38 的磷酸化水平及 MMP-2 和 MMP-9 的蛋白表达水平均升高 ($P<0.05$); 与 H/R+L-Cit 组比较, H/R+L-Cit+sc-221593 组细胞中 ERK1/2 和 p38 的磷酸化水平及 MMP-2 和 MMP-9 的蛋白表达水平均降低 ($P<0.05$)。见图 5。

3 讨论

PE 是一种妊娠期特有的疾病, 是孕产妇、胎儿和新生儿死亡的主要原因之一, 对 PE 的防治具有重要意义^[9]。研究证实 L-精氨酸能够降低 L-NAME 诱导的妊娠小鼠尿蛋白和血压水平, 调节体内血管舒缩平衡, 改善子宫-胎盘-胎儿循环^[9]。由于 L-Cit 可作为 L-精氨酸的前体化合物, 因此本研究推测 L-Cit 可能对 PE 具有防治作用^[4]。本研究表明, 100、200 和 500

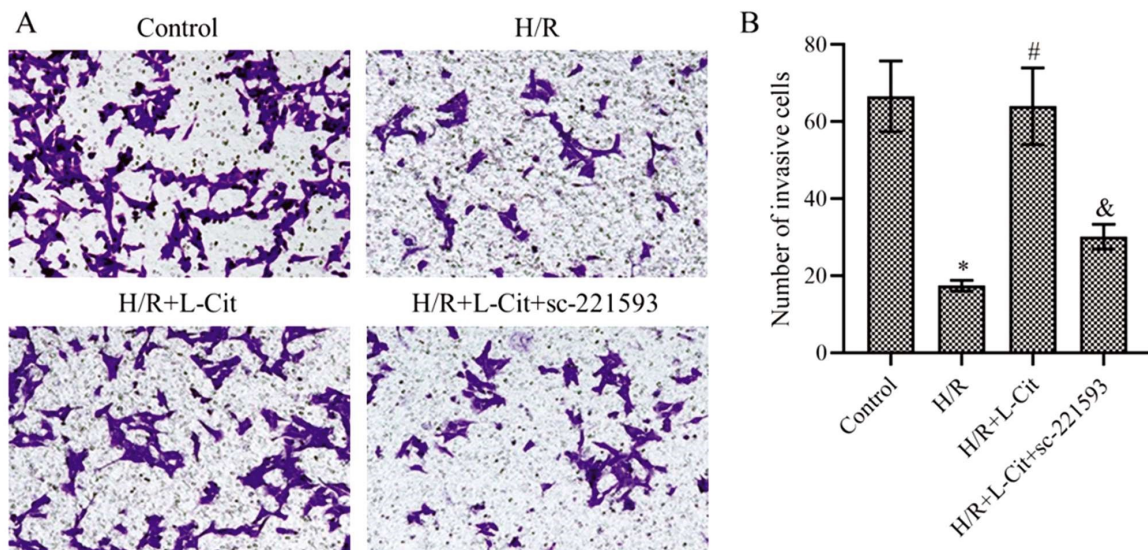


图 4 各组 HTR-8/Svneo 细胞的侵袭能力

Fig. 4 Invasion ability of HTR-8/Svneo cells in each group

Note: A: Transwell image, magnification: $\times 200$; B: Number of invasive cells; Compared with Control group, * $P<0.05$; Compared with H/R group; Compared with H/R+L-Cit group, & $P<0.05$.

mg/kg 的 L-Cit 连续给药 7 d 后, PE 大鼠的 SBP 和 24 h 尿蛋白水平呈剂量依赖性降低, HE 染色结果证实 L-Cit 减轻了 PE 大鼠胎盘损伤, 这些结果证实了 L-Cit 对 PE 的治疗作用。Man 等人报道, L-Cit 可降低 PE 大鼠的血压并改善胎盘功能^[10]。因此, L-Cit 可能是治疗 PE 的潜在药物。

PE 的发生发展与抗氧化失衡密切相关^[11]。活性氧的过量生成会损伤 PE 患者胎盘内皮细胞, 引起内皮细胞功能障碍^[12]。抗氧化酶 SOD 在孕妇胎盘中降低, 并且与病情程度有关^[13], 而

脂质氧化代谢物 MDA 在 PE 患者血液中升高^[14]。L-Cit 具有较好的抗氧化性能^[15]。本研究显示, L-Cit 升高了 PE 大鼠血清 SOD 活性, 而降低了 MDA 含量。这些结果说明 L-Cit 治疗 PE 的机制与其抗氧化活性有关。

妊娠早期是绒毛外滋养细胞 (EVTs) 侵袭和螺旋动脉重塑的关键时期, EVT 侵入母体蜕膜和子宫壁, 促使母体螺旋动脉重塑为高流量管道, 为发育中的胎儿维持充足的营养和氧气供应^[16]。EVTs 侵袭不足和螺旋动脉重塑是导致 PE 的主要病理机

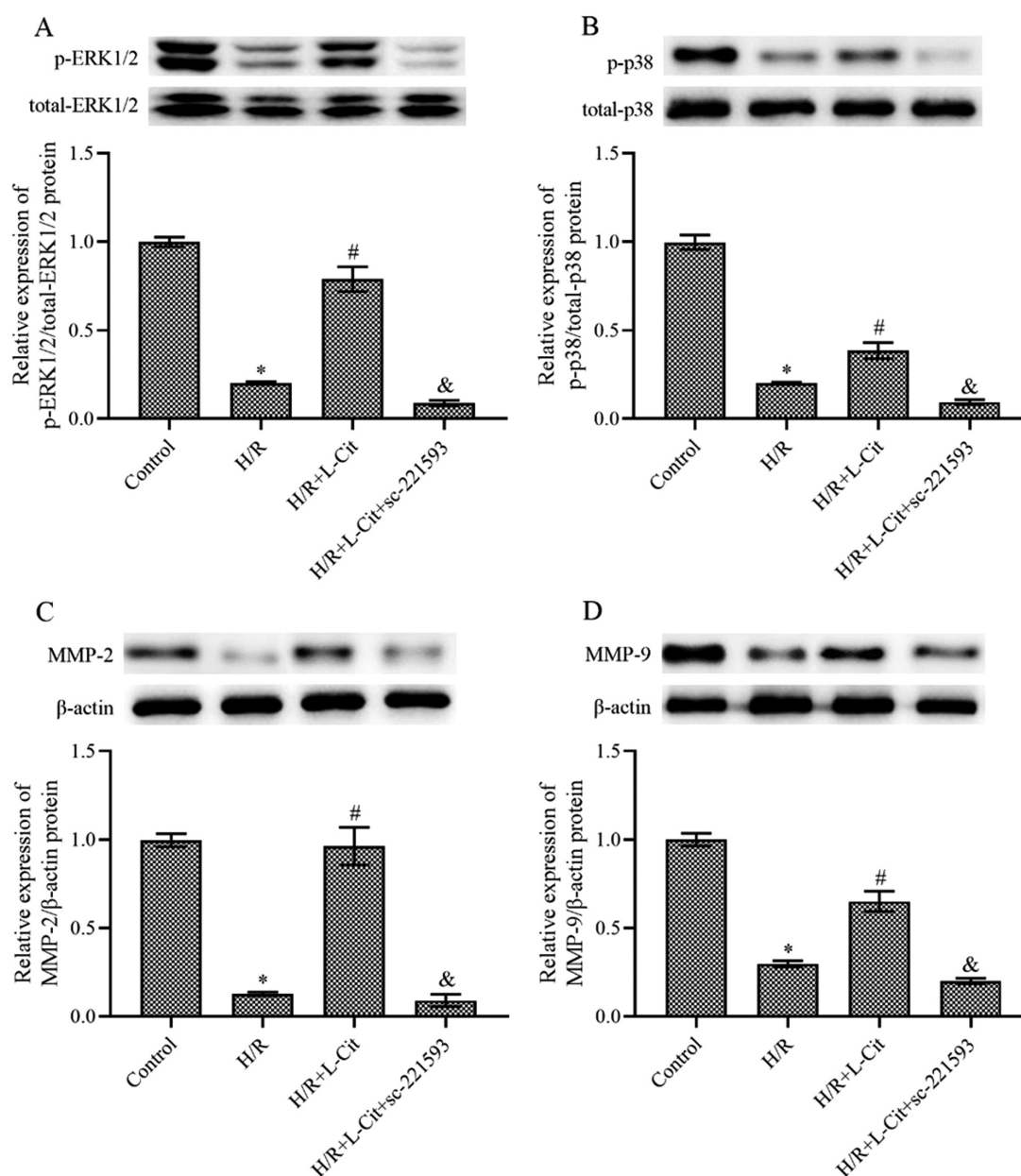


图5 各组 HTR-8/Svneo 细胞中 total-ERK1/2、p-ERK1/2、total-p38、p-p38、MMP-2 和 MMP-9 的蛋白表达

Fig. 5 Protein expression of total-ERK1/2, p-ERK1/2, total-p38, p-p38, MMP-2 and MMP-9 in HTR-8/Svneo cells in each group

Note: A: phosphorylation level of ERK1/2; B: phosphorylation level of p38; C: protein expression level of MMP-2; D: protein expression level of MMP-9; Compared with Control group, * $P < 0.05$; Compared with H/R group; Compared with H/R+L-Cit group, & $P < 0.05$.

制, 胎盘缺氧、缺血再灌注损伤可引起 EVT 侵袭不足, 从而无法重塑子宫螺旋动脉, 导致胎盘浅着床, 引发 PE^[7]。为了进一步考察 L-Cit 治疗 PE 的可能机制, 本研究建立了 HTR-8/Svneo 细胞 H/R 模型, 在体外模拟滋养层细胞微环境。研究显示, 200 $\mu\text{g/mL}$ 的 L-Cit 促进了 H/R 诱导的 HTR-8/Svneo 细胞侵袭, 在 PE 中 L-Cit 可能增加了缺氧缺血后 EVT 的侵袭能力, 这可能是其发挥 PE 保护作用的机制。

细胞外基质 (ECM) 降解所需的酶活性与滋养层细胞侵袭能力有关, PE 患者胎盘组织中 ECM 的降解酶发生异常^[8]。MMP-2 和 MMP-9 能够消化基底膜的主要成分 IV 型胶原, 从而参与 ECM 的降解^[9]。在妊娠早期, MMP-2 和 MMP-9 主要定位于胎盘床, 在调节滋养细胞侵袭中起着重要的作用^[10]。本研究表明 L-Cit 上调了 PE 大鼠胎盘组织及 H/R 诱导的

HTR-8/Svneo 细胞中 MMP-2 和 MMP-9 的表达。MMP-2 和 MMP-9 的表达受到 MAPK 等多种信号通路的调节。在 MAPK 家族成员中, p38、ERK1/2 和 JNK 是细胞内信号转导的主要激酶, 这些酶调节胎盘的正常生长、发育和形态发生^[21]。另外, 包括 ERK1/2、JNK 和 p38 在内的 MAPK 通路也参与滋养层细胞侵袭的调节^[22]。据报道, ERK、P38 和 JNK 信号通路的失活抑制了 MMP-2 和 MMP-9 的表达^[23]。而 ERK/JNK 通路的激活增加了 MMP-9 的表达^[24]。上述研究提示 L-Cit 对 MMP-2 和 MMP-9 的表达调控作用可能是由 ERK/JNK 通路介导的。因此, 本研究考察了 ERK/JNK 通路的激活情况, 结果表明 L-Cit 上调了 PE 大鼠胎盘组织及 H/R 诱导的 HTR-8/Svneo 细胞中 ERK1/2 和 p38 的磷酸化水平。然而, 使用 ERK1/2 抑制剂 sc-221593 处理 H/R 诱导的 HTR-8/Svneo 细胞则抑制了 ERK/JNK 通路的激

活, 并抑制了 HTR-8/Svneo 细胞的侵袭。尹翠等人研究表明, L-Cit 降低了肾缺血 / 再灌注损伤大鼠肾组织 ERK1/2 和 Akt 的磷酸化水平, 但升高了 p38 MAPK 的磷酸化水平^[8]。其原因可能是 ERK/JNK 通路在不同疾病中的激活模式不同。

氧化应激可引起 MAPK 通路异常^[25]。ERK1/2 的失活会加重滋养层细胞的氧化损伤, 这表明 ERK1/2 通路有利于细胞存活和抗氧化损伤^[26]。Dong 等人报道, 辛伐他汀可能通过激活 ERK/MAPK 信号通路降低 L-NAME 诱导的 PE 大鼠的血压, 恢复血管生成平衡, 减轻炎症和氧化应激^[27]。白术内酯通过激活 MAPK/ERK 信号通路抑制 HTR-8/SVneo 细胞的凋亡和氧化应激^[28]。基因上述研究背景, 我们推测 L-Cit 可能通过激活 ERK/JNK 通路减轻了 PE 中的氧化应激, 并促进了滋养层细胞侵袭, 从而减轻了 PE 症状。

综上所述, 本研究表明 L-Cit 可能通过激活 ERK/JNK 通路减轻 PE 中的氧化应激并促进滋养层细胞侵袭, 从而减轻 PE 症状。L-Cit 可能是一种治疗 PE 的潜在药物。

参考文献(References)

- [1] Yang Y, Xi L, Ma Y, et al. The lncRNA small nucleolar RNA host gene 5 regulates trophoblast cell proliferation, invasion, and migration via modulating miR-26a-5p/N-cadherin axis [J]. *J Cell Biochem*, 2019, 120(3): 3173-3184
- [2] Lala PK, Nandi P. Mechanisms of trophoblast migration, endometrial angiogenesis in preeclampsia: The role of decorin [J]. *Cell Adh Migr*, 2016, 10(1-2): 111-125
- [3] 程志强, 刘文革, 邓云, 等. 西瓜果实中 L- 瓜氨酸的提取与测定[J]. *果树学报*, 2010, 27(4): 650-654
- [4] 继灵山, 尹翠, 田霞, 等. L- 瓜氨酸对大鼠胃缺血再灌注损伤的保护作用[J]. *解放军医学杂志*, 2011, 36(2): 167-169
- [5] 吴燕, 张雅琴, 徐道银, 等. L- 精氨酸对 L-NAME 诱导的妊娠高血压小鼠的影响[J]. *中国妇幼保健*, 2008, 23(27): 3894-3897
- [6] Morris SM, Jr. Enzymes of arginine metabolism [J]. *J Nutr*, 2004, 134(10): 2743-2747
- [7] 张园, 钟梅, 刘凤岩. 低分子肝素抑制子痫前期样大鼠胎盘细胞凋亡[J]. *南方医科大学学报*, 2012, 32(6): 862-866
- [8] 尹翠, 韩东, 刘迪, 等. L- 瓜氨酸预处理对大鼠缺血 / 再灌注损伤肾的功能及蛋白表达影响[J]. *徐州医学院学报*, 2013, 33(6): 360-363
- [9] Turbeville HR, Sasser JM. Preeclampsia beyond pregnancy: long-term consequences for mother and child [J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2020, 318(6): 1315-1326
- [10] Man AWC, Zhou Y, Lam UDP, et al. L-Citrulline ameliorates pathophysiology in a rat model of superimposed preeclampsia [J]. *Br J Pharmacol*, 2022, 179(12): 3007-3023
- [11] Aouache R, Biquard L, Vaiman D, et al. Oxidative stress in preeclampsia and placental diseases [J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(5): 1496
- [12] Burke SD, Zsengeller ZK, Khankin EV, et al. Soluble fms-like tyrosine kinase 1 promotes angiotensin II sensitivity in preeclampsia [J]. *J Clin Invest*, 2016, 126(7): 2561-2574
- [13] 杨建会, 宋光辉, 潘子红, 等. 轻度子痫前期孕妇胎盘中维生素 E 及氧化应激损伤指标的监测 [J]. *中国妇幼保健*, 2018, 33(15): 3429-3431
- [14] Schoots MH, Gordijn SJ, Scherjon SA, et al. Oxidative stress in placental pathology [J]. *Placenta*, 2018, 69: 153-161
- [15] 赵国栋, 李晓斌, 李婷婷, 等. L- 瓜氨酸对游泳力竭小鼠生长性能及血清生化指标影响的研究 [J]. *中国畜牧兽医*, 2020, 47(4): 1035-1040
- [16] Wallace AE, Fraser R, Cartwright JE. Extravillous trophoblast and decidual natural killer cells: a remodelling partnership [J]. *Hum Reprod Update*, 2012, 18(4): 458-471
- [17] Chappell LC, Cluver CA, Kingdom J, et al. Pre-eclampsia [J]. *Lancet*, 2021, 398(10297): 341-354
- [18] Goldman-Wohl D, Yagel S. Regulation of trophoblast invasion: from normal implantation to pre-eclampsia [J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2002, 187(1-2): 233-238
- [19] de Oliveira Demarchi AC, Zambuzzi WF, Paiva KB, et al. Development of secondary palate requires strict regulation of ECM remodeling: sequential distribution of RECK, MMP-2, MMP-3, and MMP-9 [J]. *Cell Tissue Res*, 2010, 340(1): 61-69
- [20] Walter I, Boos A. Matrix metalloproteinases (MMP-2 and MMP-9) and tissue inhibitor-2 of matrix metalloproteinases (TIMP-2) in the placenta and interplacental uterine wall in normal cows and in cattle with retention of fetal membranes [J]. *Placenta*, 2001, 22(5): 473-483
- [21] Nadeau V, Charron J. Essential role of the ERK/MAPK pathway in blood-placental barrier formation [J]. *Development*, 2014, 141(14): 2825-2837
- [22] Anton L, Brown AG, Parry S, et al. Lipopolysaccharide induces cytokine production and decreases extravillous trophoblast invasion through a mitogen-activated protein kinase-mediated pathway: possible mechanisms of first trimester placental dysfunction [J]. *Hum Reprod*, 2012, 27(1): 61-72
- [23] Chen HJ, Lin CM, Lee CY, et al. Kaempferol suppresses cell metastasis via inhibition of the ERK-p38-JNK and AP-1 signaling pathways in U-2 OS human osteosarcoma cells [J]. *Oncol Rep*, 2013, 30(2): 925-932
- [24] Li Y, Zhang M, Dorfman RG, et al. SIRT2 promotes the migration and invasion of gastric cancer through RAS/ERK/JNK/MMP-9 pathway by increasing PEPCK1-related metabolism [J]. *Neoplasia*, 2018, 20(7): 745-756
- [25] Ebegboni VJ, Balahmar RM, Dickenson JM, et al. The effects of flavonoids on human first trimester trophoblast spheroidal stem cell self-renewal, invasion and JNK/p38 MAPK activation: Understanding the cytoprotective effects of these phytonutrients against oxidative stress [J]. *Biochem Pharmacol*, 2019, 164: 289-298
- [26] Torry DS, Mukherjee D, Arroyo J, et al. Expression and function of placenta growth factor: implications for abnormal placentation [J]. *J Soc Gynecol Investig*, 2003, 10(4): 178-188
- [27] Dong X, Shi D. Simvastatin alleviates pathology in a rat model of preeclampsia involving ERK/MAPK pathway [J]. *Reprod Sci*, 2017, 24(7): 1053-1061
- [28] Liu M, Wang RB, Xing JH, et al. Atractylenolide inhibits apoptosis and oxidative stress of HTR-8/SVneo cells by activating MAPK/ERK signalling in preeclampsia [J]. *Phytomedicine*, 2021, 93: 153773