

· 基础研究 ·

## 妊娠期糖尿病胎盘滋养细胞铁死亡超微结构及铁死亡相关基因 ACSL4、GPX4 的表达

曹晓蓉<sup>1</sup>, 林倩楠<sup>1</sup>, 王慧艳<sup>1\*</sup>, 余广彤<sup>1</sup>, 周文柏<sup>2</sup>, 夏丹丹<sup>1</sup>

<sup>1</sup>南京医科大学常州医学中心, 常州市妇幼保健院产科, <sup>2</sup>实验室, 江苏 常州 213016

**[摘要]** 目的: 观察妊娠期糖尿病(gestational diabetes mellitus, GDM)孕妇胎盘滋养细胞超微结构, 探讨铁死亡在GDM发生发展中的作用。方法: 选取2020年9月—2022年12月在常州妇幼保健院分娩的孕妇, 孕24~28周行口服葡萄糖耐量试验。以确诊GDM的孕产妇为研究对象, 分为通过饮食治疗控制血糖满意组(G1组)、口服二甲双胍控制血糖组(G2组)、胰岛素控制血糖组(G3组)、血糖控制不满意但拒用药组(G4组)各30例, 正常健康孕妇为对照组(N组)。通过透射电镜观察各组胎盘滋养细胞超微结构; 普鲁士蓝染色检查胎盘铁沉积情况; 免疫组化检测胎盘长链脂酰辅酶A合成酶4(acyl-CoA synthetase long chain family member 4, ACSL4)、谷胱甘肽过氧化物酶4(glutathione peroxidase 4, GPX4)在合体滋养细胞层的定位和表达; Western blot和qRT-PCR分别检测胎盘ACSL4、GPX4蛋白和mRNA转录水平。结果: 透射电镜下G1、G2、G3、G4组GDM产妇胎盘均可见不同程度的线粒体形态学改变, 其中G1、G2、G3组线粒体改变较轻, G4组见典型的铁死亡萎缩线粒体。普鲁士蓝染色显示5组胎盘均见含铁颗粒, G1、G2、G3、G4组胎盘中含铁颗粒较N组明显增多, G1、G2、G3组胎盘中的含铁颗粒较G4组明显减少。Western blot结果显示, 与N组相比, G1、G2、G3、G4组产妇胎盘中ACSL4蛋白表达增加而GPX4蛋白表达下降, qRT-PCR结果显示各组间ACSL4、GPX4的mRNA转录水平无显著性差异。结论: GDM孕妇胎盘滋养细胞中存在铁死亡, 且与病情严重程度和用药相关。GDM孕妇胎盘中ACSL4、GPX4表达异常, 二甲双胍和胰岛素有改善胎盘滋养细胞铁死亡的作用。

**[关键词]** 铁死亡; 妊娠期糖尿病; 胎盘; 合体滋养细胞

**[中图分类号]** R714

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-4368(2024)01-017-07

**doi:** 10.7655/NYDXBNSN230601

## Ultrastructure of ferroptosis and expression of ferroptosis-related ACSL4 and GPX4 genes in placental trophoblasts of gestational diabetes mellitus

CAO Xiaorong<sup>1</sup>, LIN Qiannan<sup>1</sup>, WANG Huiyan<sup>1\*</sup>, SHE Guangtong<sup>1</sup>, ZHOU Wenbo<sup>2</sup>, XIA Dandan<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Changzhou Medical Center, Nanjing Medical University, Department of Obstetrics, <sup>2</sup>Laboratory, Changzhou Maternal and Child Health Care Hospital Affiliated to Nanjing Medical University, Changzhou 213016, China

**[Abstract]** **Objective:** To observe the ultrastructure of placental trophoblast cells of pregnant women with gestational diabetes mellitus (GDM), and to investigate the role of ferroptosis in the occurrence and development of GDM. **Methods:** Pregnant women who delivered at the Changzhou Maternal and Child Health Hospital from September 2020 to December 2022 were enrolled and underwent an oral glucose tolerance test at 24–28 weeks of gestation. Pregnant women diagnosed with GDM were selected as the research subjects and divided into four groups: diet-controlled glucose satisfaction group (G1 group), oral metformin-controlled glucose group (G2 group), insulin-controlled glucose group (G3 group), and unsatisfactory glucose control but refused to use medication group (G4 group), each with 30 cases. Normal healthy pregnant women were included as the control group (N group). The ultrastructure of placental trophoblast cells in each group was observed by transmission electron microscopy. The placental iron deposition was detected by Prussian blue staining. The localizations and expressions of Acyl-CoA synthetase long chain family member 4 (ACSL4) and glutathione peroxidase 4 (GPX4) in the syncytiotrophoblast layer were detected by immunohistochemistry. The protein expressions and the mRNA transcription levels of ACSL4 and GPX4 in the placenta were detected by Western blot and qRT-PCR, respectively. **Results:** Under

**[基金项目]** 常州市科技局应用基础项目(CJ20220117, CJ20220259)

\*通信作者(Corresponding author), E-mail: huiyanwang@njmu.edu.cn

transmission electron microscopy, varying degrees of mitochondrial morphological changes were observed in the placentas of GDM women in the G1, G2, G3, and G4 groups, with G1, G2, and G3 groups showing milder mitochondrial changes, and the G4 group exhibiting typical ferroptosis with shrunken mitochondria. Prussian blue staining demonstrated iron particles in all five groups, with a significant increase in iron particles in the G1, G2, G3, and G4 groups compared to the N group and a significant decrease in iron particles in the G1, G2 and G3 groups compared to the G4 group. Western blot results showed an increase in ACSL4 protein expression and a decrease in GPX4 protein expression in the placenta of G1, G2, G3, and G4 groups compared to the N group, while qRT-PCR results showed no significant difference in ACSL4 and GPX4 mRNA transcription levels between the groups. **Conclusion:** Ferroptosis exists in placental trophoblast cells of pregnant women with GDM, and it is correlated with the severity of the disease and medication. Abnormal expression of ACSL4 and GPX4 in the placenta of GDM pregnant women. Metformin and insulin have a role in improving ferroptosis of placental trophoblast cells.

[Key words] ferroptosis; gestational diabetes mellitus; placenta; syncytiotrophoblast

[J Nanjing Med Univ, 2024, 44(01):017-023]

妊娠期糖尿病 (gestational diabetes mellitus, GDM) 指妊娠前糖代谢正常, 妊娠期出现的糖尿病<sup>[1]</sup>。随着我国经济条件改善, 超重肥胖等健康问题日益普遍, GDM 患病率持续上升。研究表明氧化应激、慢性炎症反应、脂质代谢异常、胰岛素抵抗及一些胎盘因素都参与了 GDM 的发生发展<sup>[2]</sup>。GDM 的发病机制复杂, 研究发现妊娠早期铁蛋白水平高的女性罹患 GDM 的风险升高 21%<sup>[3]</sup>, 血清铁含量的增加可以引起铁死亡和异常脂质过氧化<sup>[4]</sup>。铁死亡是一种由铁依赖性脂质过氧化导致的新程序性细胞死亡<sup>[5]</sup>, 可能与 GDM 相关。本研究使用透射电镜观察胎盘滋养细胞超微结构, 检测正常胎盘和不同病情程度的 GDM 胎盘铁死亡相关标志物, 比较各组铁死亡发生的程度, 探讨铁死亡在 GDM 发生发展中的作用及用药对铁死亡可能产生的影响。

## 1 对象和方法

### 1.1 对象

选取 2020 年 9 月—2022 年 12 月在常州市妇幼保健院定期产检并分娩的单胎 GDM 孕妇为研究对象, 年龄 22~39 岁, 纳入标准: ①常州市常住居民; ②从事轻体力劳动; ③在孕 24~28 周行 75 g 葡萄糖耐量试验 (oral glucose tolerance test, OGTT) 阳性; ④孕妇及家属签署知情同意书。75 g OGTT 正常标准: 空腹血糖 (fasting blood glucose, FBG) 及服糖后 1 h 血糖 (1-hour postprandial glucose, 1hPG)、2 h 血糖 (2-hour postprandial glucose, 2hPG) 分别低于 5.1、10.0、8.5 mmol/L, 任何一时间点血糖值达到或超过上述标准, 同时 FBG < 7.0 mmol/L、2hPG < 11.1 mmol/L 即诊断为 GDM。排除标准: ①孕前有糖尿病、高

血压病史; ②围产期合并其他并发症者, 如子痫前期、妊娠合并胆汁淤积症、妊娠合并传染性疾病、胎膜早破、羊水粪染中转剖宫产、产后宫腔感染等。对诊断为 GDM 的研究对象, 首先给予饮食控制, 监测血糖, 观察 2~4 周。血糖控制良好的标准是 FBG < 5.3 mmol/L, 餐后 1hPG < 7.8 mmol/L, 餐后 2hPG < 6.7 mmol/L。若饮食控制血糖未能达标, 根据孕妇自愿原则给予二甲双胍或胰岛素控制血糖。其中, 30 例饮食指导后血糖控制良好者纳入 G1 组, 30 例二甲双胍治疗者纳入 G2 组, 30 例胰岛素治疗者纳入 G3 组, 30 例血糖控制不佳拒绝用药者纳入 G4 组, 按年龄、孕产次匹配 30 例正常孕妇为正常对照组 (N 组)。本研究获得常州市妇幼保健院医学伦理委员会的批准 (CZFY2022046)。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 GDM 治疗方案

孕妇诊断为 GDM 后, 转至营养门诊由营养师进行个体化饮食指导, 根据孕妇的身高、体重、孕周、体力劳动强度计算每天的总能量。轻体力劳动者孕中晚期总能量 = 理想体重 × 30 kcal/(kg·d) + 200 kcal, 碳水化合物的推荐摄入量为 33%~40%, 蛋白质 20% 及脂肪 40%, 以满足胎儿营养需要。饮食控制 3 d 后监测并记录空腹及餐后血糖, 每周复诊 1 次, 调整饮食方案至血糖控制满意, 督促孕妇孕期定期随访, 按配餐进食。饮食治疗血糖控制不佳者, 自愿口服二甲双胍治疗需排除使用二甲双胍的禁忌证 (肝肾功能损伤、感染风险), 其起始剂量每日 500 mg, 连用 1 周后无明显不适, 可根据血糖调整用量为 500 mg/次, 每日 2 次, 或 500 mg/次, 每日 3 次, 2 周内据血糖情况调整, 每日最大剂量不超过 2 500~

3 000 mg<sup>[6]</sup>。其中,二甲双胍治疗效果不佳需联用胰岛素者予以剔除。选用胰岛素治疗组予超短效胰岛素餐前皮下注射,必要时联合长效胰岛素睡前注射,初始剂量0.3~0.8 U/(kg·d),根据孕期病情进展及血糖情况及时调整。

### 1.2.2 主要试剂

2.5%戊二醛固定液购自福州飞净生物科技有限公司,普鲁士蓝染色试剂购自索莱宝公司,长链脂酰辅酶A合成酶4(acyl-CoA synthetase long chain family member 4,ACSL4)、谷胱甘肽过氧化物酶4(glutathione peroxidase 4,GPX4)抗体购自美国Abcam公司,内参GAPDH抗体购自上海碧云天生物技术公司,cDNA第一链合成试剂盒购自日本TaKaRa公司。

### 1.2.3 样本采集

新鲜胎盘分娩后,3 min内避开出血、钙化等区域,尽快在胎盘母体面用无菌剪切出厚度适中的胎盘组织5片(约2 cm×2 cm×2 cm),无菌盐水冲洗干净。2片置于10%福尔马林溶液固定后,石蜡包埋。2片浸于RNAlater保存液置于EP管中,编号后冻存于-80℃冰箱。将最后1片分成1 mm×1 mm×1 mm大小的组织,新鲜置入预冷2.5%戊二醛固定液中,4℃冰箱避光储存。

### 1.2.4 透射电镜观察胎盘滋养细胞

新鲜胎盘置入2.5%戊二醛固定液浸泡,1%锇酸室温固定2 h,乙醇梯度脱水,每次15 min。100%丙酮置换3次,树脂包埋固化、切片,3%醋酸铀、柠檬酸铅双重染色,漂洗后在透射电镜下观察和拍摄细胞形态。

### 1.2.5 普鲁士蓝染色

石蜡切片按常规方法烘烤、脱蜡和水化,然后普鲁士蓝入染色工作液浸染30 min。水洗后入核固红染色液,染细胞核5 min后水洗。然后常规方法乙醇脱水、二甲苯透明、封片,最后中性树胶固封,于显微镜下观察并拍照。

### 1.2.6 免疫组化

将切片常规脱蜡、水化、高温修复,用1%过氧化氢溶液封闭内源性过氧化物酶。ACSL4、GPX4抗体(1:500)滴入切片后4℃过夜,磷酸盐缓冲液洗涤,结合二抗,滴加SABC溶液孵育显色,显微镜下观察见棕褐色颗粒视为显色完成,放入水中停止显色,脱水封片。

### 1.2.7 Western blot

提取每组胎盘组织中的蛋白质,使用BCA蛋白定量试剂盒测量蛋白质浓度。通过10%聚丙烯酰

胺凝胶电泳分离蛋白质,然后转移到聚偏二氟乙烯膜,5%脱脂奶粉封闭,加入ACSL4抗体(1:1 000)和GPX4抗体(1:1 000),以GAPDH为内参,4℃孵育过夜。使用TBST缓冲液冲洗3次,每次5 min。随后加入相应二抗孵育1 h,洗膜后显色,应用Bio-Rad Gel Doc EZ凝胶成像系统和Image J软件分析目标条带的灰度值。

### 1.2.8 qRT-PCR

应用TRizol试剂盒提取胎盘组织中的总RNA,通过紫外分光光度计测定RNA的浓度和纯度。通过荧光定量PCR系统和SYBR Green试剂盒进行qRT-PCR。引物序列如下:ACSL4,上游5'-ATACCTGGACTGGGACCGAA-3',下游5'-TGCTGGACTGGTCAGAGAGT-3'。GPX4,上游5'-CAGTGAGGCAAGACCGAAGT-3',下游5'-CCGAACGTGTTACACGGAA-3'。反应条件如下:95℃预变性10 min,95℃10 s,57℃30 s,72℃30 s,45个循环,最后72℃延伸5 min。GAPDH作为内参基因。通过 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算基因的相对表达量。

### 1.3 统计学方法

使用统计软件SPSS 27.0进行数据分析。计量资料均用均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示。样本均数比较采用One-way ANOVA检验,组间比较方差齐时采用LSD检验,方差不齐时采用Dunnett's T3检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 一般情况及妊娠结局比较

比较5组孕妇的年龄、孕周、孕次、产次,差异均无统计学意义( $P > 0.05$ )。G1、G2、G3组孕前体重指数(body mass index, BMI)高于N组( $P < 0.05$ ),G3组孕前BMI高于G1组( $P < 0.05$ ),G2、G3组孕前BMI高于G4组( $P < 0.05$ )。N组、G1组新生儿体重低于G4组( $P < 0.05$ ),5组均未发生新生儿窒息(表1)。

### 2.2 胎盘滋养细胞超微结构

电镜下,N组胎盘滋养细胞线粒体结构基本正常,未见明显线粒体皱缩及嵴断裂,而G1、G2、G3、G4组GDM胎盘滋养细胞中线粒体萎缩、变小,膜密度增加,线粒体变圆,嵴加深,其中G4组最为严重,高度符合铁死亡细胞的特征。而饮食治疗的G1组线粒体改变程度最轻,其次是口服二甲双胍治疗的G2组(图1)。

### 2.3 胎盘普鲁士蓝染色结果

使用普鲁士蓝染色,铁被染成蓝色,细胞质呈

浅粉色,核被染为红色。5组胎盘中均可见含铁颗粒,与N组比较,G1、G2、G3、G4组GDM胎盘中含铁

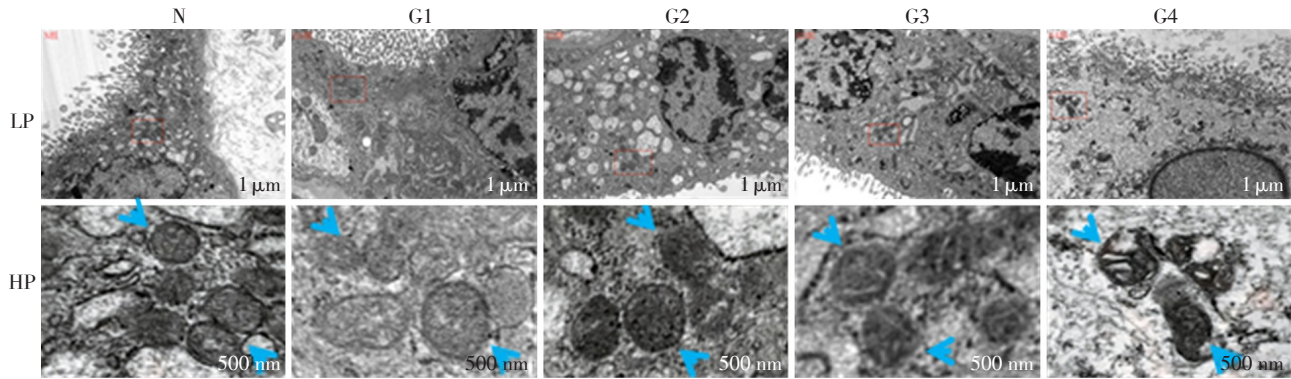
颗粒明显增多,与G4组比较,G1、G2、G3组胎盘中含铁颗粒明显减少(图2)。

表1 5组孕妇临床资料比较

**Table 1 Comparison of clinical data of pregnant women in five groups** ( $\bar{x} \pm s$ )

Variables	N(n=30)	G1(n=30)	G2(n=30)	G3(n=30)	G4(n=30)	F	P
Age(years)	30.47 ± 4.05	33.03 ± 3.97	32.30 ± 3.62	31.17 ± 4.20	32.40 ± 4.52	1.926	0.109
Gestational age(weeks)	38.80 ± 0.67	38.73 ± 0.57	39.06 ± 0.82	38.68 ± 0.58	38.65 ± 0.73	1.751	0.142
Gravidity	2.43 ± 1.10	2.47 ± 1.20	2.20 ± 1.03	2.53 ± 1.38	2.77 ± 1.28	0.857	0.492
Parity	1.77 ± 0.68	1.63 ± 0.56	1.47 ± 0.63	1.53 ± 0.78	1.80 ± 0.61	1.456	0.219
BMI before pregnancy(kg/m <sup>2</sup> )	22.05 ± 2.20	23.58 ± 3.72 <sup>*</sup>	24.94 ± 2.88 <sup>*△</sup>	25.26 ± 2.22 <sup>*△</sup>	23.11 ± 3.42	6.050	< 0.001
Weight gain during pregnancy(kg)	13.95 ± 2.98	12.33 ± 5.18	12.16 ± 4.97	12.01 ± 3.03	15.07 ± 5.87	2.761 <sup>a</sup>	0.034
Newborn birth weight(g)	3 353.33 ± 254.60 <sup>△</sup>	3 373.67 ± 157.67 <sup>△</sup>	3 634.67 ± 550.52	3 496.33 ± 492.62	3 653.67 ± 386.87	5.827 <sup>a</sup>	< 0.001
Asphyxia neonatorum cases	0	0	0	0	0	-	-

Compared with N group, <sup>\*</sup>P < 0.05; compared with G1 group, <sup>\*</sup>P < 0.05; compared with G3 group, <sup>▽</sup>P < 0.05; compared with G4 group, <sup>△</sup>P < 0.05. a: Welch method.



LP: low power lens(×10 000); HP: high power lens(×20 000); blue arrows mark mitochondria.

图1 TEM下5组胎盘超微结构图

Figure 1 Ultrastructure of placenta in five groups under TEM

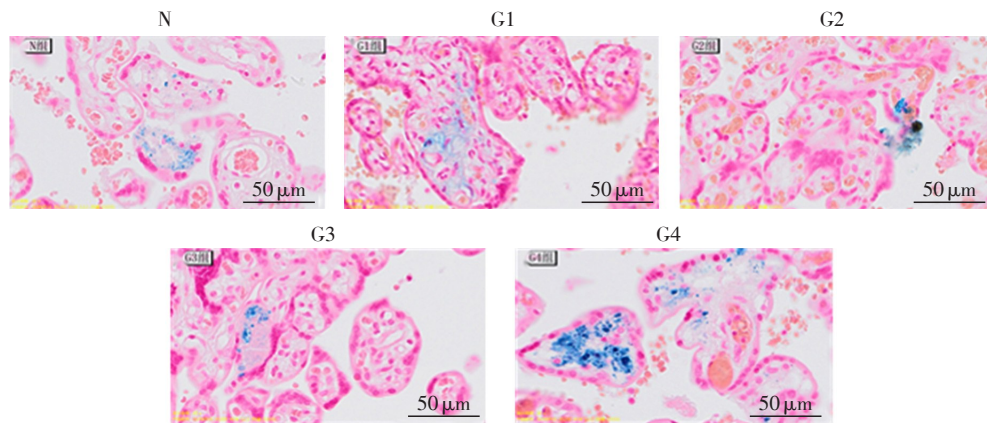


图2 5组胎盘普鲁士蓝染色(×200)

Figure 2 Prussian blue stain in placenta of five groups(×200)

#### 2.4 胎盘滋养细胞免疫组化结果

ACSL4、GPX4主要在合体滋养细胞细胞质中表达。ACSL4在N组呈阴性(-),在G1组呈弱阳性

(+),在G2、G3、G4组呈强阳性(+++)。GPX4在G1、G2、G3、G4组呈弱阳性(+),在N组呈中度阳性(++) (图3)。

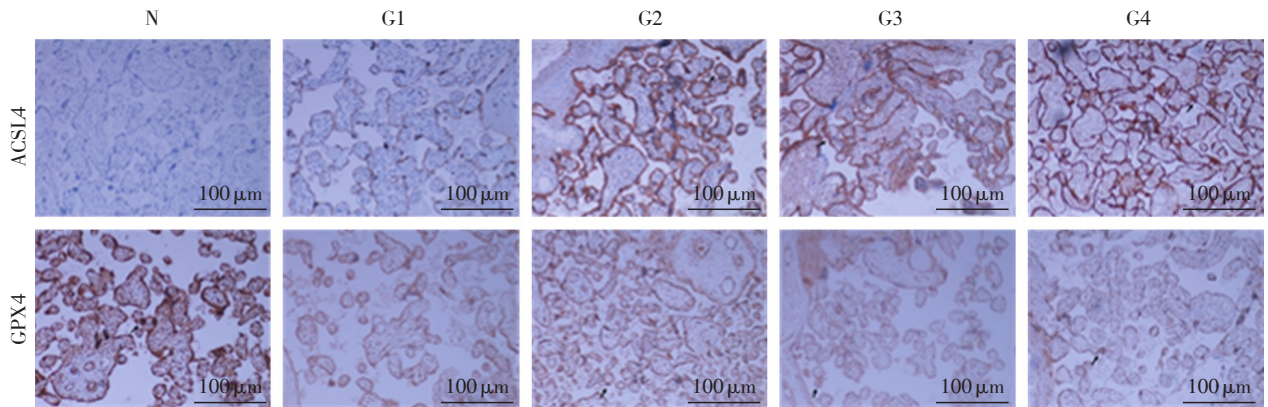


图3 5组胎盘ACSL4、GPX4免疫组化表达(×100)

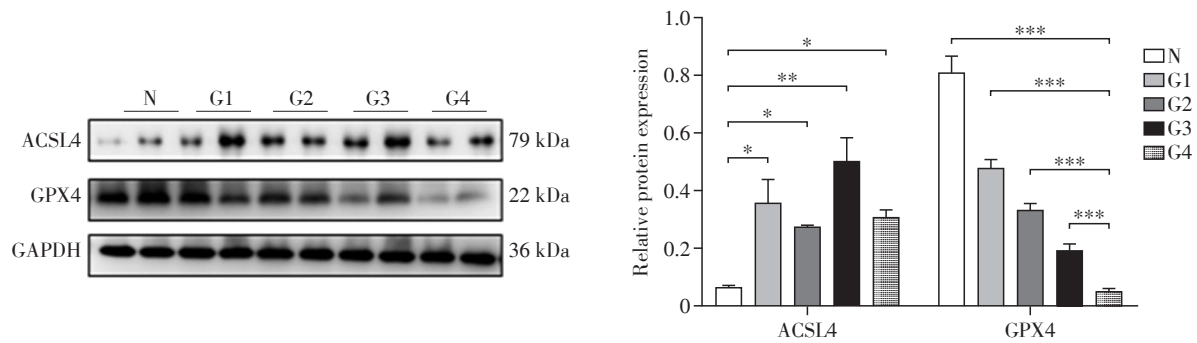
Figure 3 Expression of ACSL4 and GPX4 in placenta of five groups by immunohistochemistry (×100)

### 2.5 胎盘 Western blot 结果

G1、G2、G3、G4组 ACSL4 表达高于 N 组，G1、G2、G3、G4组 GPX4 表达低于 N 组( $P < 0.05$ ，图 4)。

### 2.6 胎盘 qRT-PCR 结果

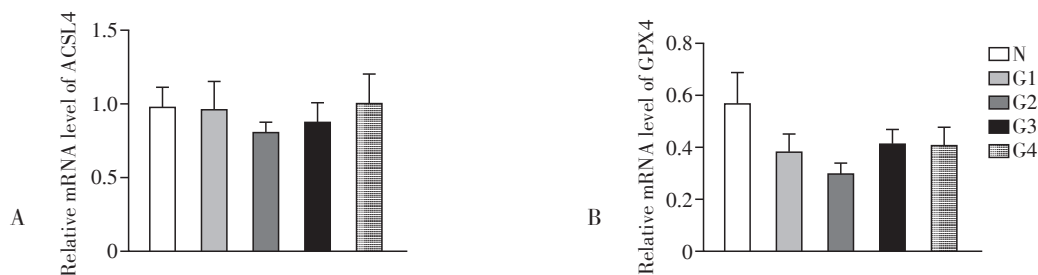
组间 ACSL4 mRNA 表达量无显著性差异( $P > 0.05$ ，图 5A)，G1、G2、G3、G4组 GPX4 mRNA 表达量低于 N 组，但差异无统计学意义( $P > 0.05$ ，图 5B)。



The expression of ACSL4 and GPX4 in placenta of five groups were detected by Western blot. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  ( $n=30$ ).

图4 5组胎盘ACSL4、GPX4蛋白表达水平

Figure 4 Expression of ACSL4 and GPX4 in placenta of five groups



A: Relative mRNA level of ACSL4 in each group. B: Relative mRNA level of GPX4 in each group ( $n=30$ ).

图5 5组胎盘ACSL4、GPX4转录水平

Figure 5 mRNA level of ACSL4 and GPX4 in placenta of five groups

## 3 讨论

3.1 GDM胎盘滋养细胞铁死亡形态学的特征性改变  
铁死亡作为区别于自噬、凋亡的新型细胞死亡

方式,有其独特的形态学特征。铁死亡细胞的形态学特征主要表现为细胞膜断裂和出泡,线粒体萎缩、膜密度增加、细胞核形态正常,无染色体凝集<sup>[7]</sup>。本研究观察胎盘滋养细胞透射电镜下的微观结构,

发现4组GDM胎盘滋养细胞中均有不同程度的铁死亡现象,其中血糖控制不佳病情最重的G4组铁死亡线粒体改变最明显,而G1、G2、G3组线粒体改变较轻。

同时,考虑到铁死亡的作用机制与铁负荷过重密切相关,本研究用普鲁士蓝检测胎盘组织中存在的铁。正常胎盘中含铁颗粒极少,其次是血糖控制满意的G1、G2、G3组,血糖控制不佳的G4组含铁颗粒最多。以上结果提示GDM患者胎盘滋养细胞中存在铁死亡,铁死亡与患者的治疗用药及病情严重程度相关,使用二甲双胍和胰岛素治疗均可改善胎盘滋养细胞铁死亡。

### 3.2 GDM胎盘铁死亡相关基因ACSL4、GPX4的表达

铁死亡调控机制复杂,可大致分为3类:第1类涉及铁代谢,包括核受体共激活因子4(nuclear receptor coactivator 4, NCOA4)对铁蛋白降解的调控,以及影响铁的核因子红细胞2相关因子-血红素加氧酶1(nuclear factor erythroid-2-related factor 2-heme oxygenase 1, Nrf2-HO-1)途径<sup>[8]</sup>,例如缓解糖尿病心肌缺血/再灌注损伤中发生的铁死亡可通过抑制NCOA4的表达实现<sup>[9]</sup>;第2类是抗氧化系统谷胱甘肽(glutathione, GSH)/GPX4途径<sup>[10]</sup>,包括胱氨酸/谷氨酸反向转运蛋白途径、转硫途径、甲羟戊酸途径、谷氨酰胺途径和p53途径,Wang等<sup>[11]</sup>发现硫化钠可增加GPX4表达,抑制糖尿病小鼠前额叶皮质层细胞发生铁死亡;第3类涉及脂质代谢,如ACSL4调控通路及铁死亡抑制蛋白1-辅酶Q10通路<sup>[12]</sup>,其通过减少磷脂过氧化从而抑制铁死亡的发生。

抑制基因GPX4和促进基因ACSL4是铁死亡经典的两大标志物,两者分别通过不同途径参与铁死亡的调控。GPX4通过还原脂质过氧化物抑制铁死亡,其失活可导致活性氧和脂质过氧化物在β细胞中积累最终发生铁死亡<sup>[13]</sup>。而脂肪酸代谢酶ACSL4则通过催化花生四烯酸(arachidonic acid, AA)转化成乙酰辅酶A,形成易被氧化的膜磷脂促进铁死亡<sup>[14]</sup>。本研究中,免疫组化及Western blot检测发现GPX4在4组GDM胎盘上的表达均低于正常组,ACSL4在4组GDM胎盘上的表达均高于正常组。qRT-PCR结果虽提示ACSL4及GPX4的mRNA表达量组间无显著差异,但GPX4表达趋势与前结果一致。因此,GDM胎盘铁死亡与GPX4下调和ACSL4上调相关。

### 3.3 病情和用药对GDM患者胎盘铁死亡的影响

在透射电镜下,血糖控制满意的G1、G2、G3组

线粒体形态相较血糖控制不满意的G4组明显改善,提示病情和用药与GDM胎盘滋养细胞铁死亡相关。其中,病情轻、通过饮食治疗血糖控制满意的G1组线粒体萎缩不明显,二甲双胍治疗者其次。二甲双胍主要的降糖机制是通过一磷酸腺苷激活的蛋白激酶(adenosine monophosphate-activated protein kinase, AMPK)途径抑制肝糖异生和糖原分解,促进外周组织对葡萄糖的摄取和利用,增加对胰岛素的敏感性<sup>[15]</sup>。

本研究GDM分组中,G2、G3组是在孕妇饮食治疗效果不佳的情况下,按自愿原则给予孕妇二甲双胍或胰岛素治疗,其中二甲双胍治疗效果不佳者已剔除出组,故用药前G2和G3组孕妇病情相近。电镜结果提示二甲双胍改善胎盘滋养细胞中铁死亡的作用可能更佳。已有研究在构建多囊卵巢综合征(polycystic ovary syndrome, PCOS)小鼠模型并给予二甲双胍治疗的过程中,发现二甲双胍治疗可以增加PCOS小鼠卵巢中GPX4表达,从而逆转铁死亡过程<sup>[16]</sup>。Zhao等<sup>[17]</sup>发现二甲双胍可通过AMPK通路抑制铁死亡发生,减缓动脉粥样硬化的发展,这也间接提示了当二甲双胍通过AMPK途径发挥降糖作用时,可能抑制了铁死亡的发生。本研究电镜结果也提示二甲双胍可以减轻铁死亡。在二甲双胍治疗的G2组胎盘中,GPX4的蛋白表达显著高于病情重的G4组,但2组中ACSL4的蛋白表达无显著差异,提示二甲双胍可能通过GPX4相关通路促进了GPX4的表达,从而发挥抑制铁死亡的作用。2015年起国际妇产科联盟(Federation International of Gynecology and Obstetrics, FIGO)将二甲双胍作为GDM的一线治疗用药<sup>[18]</sup>,2022年妊娠期高血糖诊治指南认为目前尚未发现二甲双胍对子代有明确不良作用<sup>[19]</sup>,孕妇无法使用胰岛素时,推荐使用二甲双胍控糖。二甲双胍作用机制广泛,本实验从改善铁死亡方面体现了二甲双胍治疗的优势。

目前,国内外针对铁死亡与GDM机制的研究主要围绕细胞或动物模型展开<sup>[20]</sup>。本研究收集GDM孕妇的胎盘以初步探究铁死亡对GDM的影响,这是本文的创新之处。本研究亦有不足之处,铁死亡与GDM之间的调节机制尚不能明确,GDM孕妇不同孕期铁代谢水平不同<sup>[21]</sup>,铁死亡可能通过影响细胞内铁含量水平和氧化应激水平,参与了GDM的发病过程。因实验条件限制,本研究缺少胎盘氧化应激水平的辅证,且样本例数偏少,需加大样本量,结

合细胞及动物模型,进一步梳理铁死亡在GDM中可能的分子机制及二甲双胍对铁死亡的调控作用,为未来GDM的治疗提供新思路。

综上所述,本研究在GDM孕妇胎盘滋养细胞中观察到了铁死亡现象,与病情严重程度及用药相关。GDM孕妇胎盘中ACSL4、GPX4表达异常,二甲双胍可能通过GPX4通路抑制铁死亡。

#### [参考文献]

- [1] 谢 幸,孔北华,段 涛. 妇产科学[M]. 北京:人民卫生出版社,2018:105-106
- [2] 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
- [3] RAWAL S, HINKLE S N, BAO W, et al. A longitudinal study of iron status during pregnancy and the risk of gestational diabetes: findings from a prospective, multiracial cohort[J]. *Diabetologia*, 2017, 60(2):249-257
- [4] MINTZ J, MIRZA J, YOUNG E, et al. Iron therapeutics in women's health: past, present, and future[J]. *Pharmaceuticals*, 2020, 13(12):449
- [5] DIXON S J, LEMBERG K M, LAMPRECHT M R, et al. Ferroptosis: an iron-dependent form of nonapoptotic cell death[J]. *Cell*, 2012, 149(5):1060-1072
- [6] 陈 佳,李映桃,王振宇,等. 2018年美国妇产科学会与2019年美国糖尿病学会妊娠期糖尿病指南比较[J]. *国际妇产科学杂志*, 2019, 46(3):336-341
- [7] XIE Y, HOU W, SONG X, et al. Ferroptosis: process and function[J]. *Cell Death Differ*, 2016, 23(3):369-379
- [8] SHAKYA A, MCKEE N W, DODSON M, et al. Anti-ferroptotic effects of Nrf2: beyond the antioxidant response [J]. *Mol Cells*, 2023, 46(3):165-175
- [9] LI W Y, LI W, WANG Y, et al. Inhibition of DNMT-1 alleviates ferroptosis through NCOA4 mediated ferritinophagy during diabetes myocardial ischemia/reperfusion injury [J]. *Cell Death Discov*, 2021, 7(1):267
- [10] ZHOU Y. The protective effects of cryptochlorogenic acid on  $\beta$ -cells function in diabetes in vivo and vitro via inhibition of ferroptosis[J]. *Diabetes Metab Syndr Obes*, 2020, 13:1921-1931
- [11] WANG Y, WANG S W, XIN Y, et al. Hydrogen sulfide alleviates the anxiety-like and depressive-like behaviors of type 1 diabetic mice via inhibiting inflammation and ferroptosis[J]. *Life Sci*, 2021, 278:119551
- [12] BERSUKER K, HENDRICKS J M, LI Z P, et al. The CoQ oxidoreductase FSP1 acts parallel to GPX4 to inhibit ferroptosis[J]. *Nature*, 2019, 575(7784):688-692
- [13] IMAI H, MATSUOKA M, KUMAGAI T, et al. Lipid peroxidation-dependent cell death regulated by GPx4 and ferroptosis [M]//*Current Topics in Microbiology and Immunology*. Cham: Springer International Publishing, 2016: 143-170
- [14] KAN C F K, SINGH A B, DONG B, et al. PPAR $\delta$  activation induces hepatic long-chain acyl-CoA synthetase 4 expression in vivo and in vitro [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2015, 1851(5):577-587
- [15] 苏 青. 二甲双胍降糖作用的分子机制[J]. *中华内分泌代谢杂志*, 2016, 32(9):716-722
- [16] PENG Q J, CHEN X J, LIANG X X, et al. Metformin improves polycystic ovary syndrome in mice by inhibiting ovarian ferroptosis [J]. *Front Endocrinol*, 2023, 14:1070264
- [17] ZHAO Y H, ZHAO Y Z, TIAN Y, et al. Metformin suppresses foam cell formation, inflammation and ferroptosis via the AMPK/ERK signaling pathway in ox-LDL-induced THP-1 monocytes [J]. *Exp Ther Med*, 2022, 24(4):636
- [18] Society of Maternal-Fetal Medicine (SMFM) Publications Committee. SMFM statement: pharmacological treatment of gestational diabetes [J]. *Am J Obstet Gynecol*, 2018, 218(5):B2-B4
- [19] 中华医学会妇产科学分会产科学组,中华医学会围产医学分会,中国妇幼保健协会妊娠合并糖尿病专业委员会. 妊娠期高血糖诊治指南(2022)[第一部分][J]. *中华妇产科杂志*, 2022, 57(1):3-12
- [20] HAN D D, JIANG L L, GU X L, 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
- [21] 田芸芳,李 洁,卜蓓蓓,等. 不同BMI的缺铁性贫血孕妇补铁治疗效果的比较[J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2018, 38(11):1598-1600,1614

[收稿日期] 2023-06-14

(本文编辑:戴王娟)