

- [18] Solhaug A, Wisbech C, Christoffersen T E, et al. The mycotoxin alternariol induces DNA damage and modify macrophage phenotype and inflammatory responses[J]. *Toxicol Lett*, 2015, 239(1): 9-21.
- [19] Li Y, Zhao L, Sun C, et al. Regulation of gut microflora by *Lactobacillus casei* Zhang attenuates liver injury in mice caused by anti-Tuberculosis drugs[J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(11): 9444.
- [20] Trepka K R, Kidder W A, Kyaw T S, et al. Expansion of a bacterial operon during cancer treatment ameliorates fluoropyrimidine toxicity[J]. *Sci Transl Med*, 2025, 17(794): eadq8870.
- [21] Wang L, Zhang K, Zeng Y, et al. Gut mycobiome and metabolic diseases: the known, the unknown, and the future[J]. *Pharmacol Res*, 2023, 193: 106807.
- [22] Cao Z, Sugimura N, Burgermeister E, et al. The gut virome: a new microbiome component in health and disease[J]. *EBioMedicine*, 2022, 81: 104113.
- [23] Ruaud A, Esquivel-Elizondo S, de la Cuesta-Zuluaga J, et al. Syntrophy via interspecies H₂ transfer between *Christensenella* and *Methanobrevibacter* underlies their global cooccurrence in the human gut[J]. *mBio*, 2020, 11(1): e03235-19.
- [24] Madigan K E, Bundy R, Weinberg R B. Distinctive clinical correlates of small intestinal bacterial overgrowth with methanogens[J]. *Clin Gastroenterol Hepatol*, 2022, 20(7): 1598-1605. e2.

左归丸对妊娠糖尿病孕鼠胎盘外泌体分泌及外泌体miR-127-3p表达的影响

王超群, 孙凯男, 许凯霞, 吴玉洁, 杨敏, 任晓怡, 王永辉^{*}
(山西中医药大学, 山西晋中 030619)

摘要: 目的 研究左归丸对妊娠糖尿病 (GDM) 孕鼠胎盘外泌体分泌及外泌体miR-127-3p表达的影响。方法 SD大鼠以雌雄2:1同笼结合链脲佐菌素腹腔注射的方法复制GDM大鼠模型, 造模成功后, 空白组和模型组给予生理盐水灌胃, 胰岛素组给予甘精胰岛素20 U/kg皮下注射, 左归丸组给予左归丸(4.5、9、18 g/kg)灌胃给药。于受孕第3天(E3d)、E6d、E18d及E21d记录随机血糖情况; E6d、E18d、E21d记录体质量情况。E21d时, 检测孕鼠血清FBG、FINS, 并计算HOMA-IR值; 超速离心提取羊水胎盘外泌体并用透射电镜、NTA、Western blot法鉴定后检测其含量, RNA-seq技术检测胎盘外泌体中miR-127-3p表达, HE染色观察胎盘组织病理变化。结果 E6d, 与空白组比较, 模型组血糖升高($P<0.01$)。E21d, 与空白组比较, 模型组血清FBG、HOMA-IR升高($P<0.01$), 血清FINS、羊水胎盘外泌体、PLAP与miR-127-3p的表达量降低($P<0.01$); 与模型组比较, 胰岛素组和左归丸各剂量组血清FBG、HOMA-IR降低($P<0.01$), 血清FINS、羊水胎盘外泌体及PLAP升高($P<0.01$), miR-127-3p表达升高($P<0.01$); 与胰岛素组比较, 左归丸各剂量组血清FBG、HOMA-IR升高($P<0.01$), PLAP及miR-127-3p表达降低($P<0.05$, $P<0.01$)。模型组胎盘较空白组病理性改变严重; 左归丸干预后胎盘病变略有减轻, 中剂量组减轻较多; 胰岛素组病变相对最轻。结论 左归丸通过促进GDM孕鼠胎盘外泌体分泌, 提高miR-127-3p表达, 改善胎盘病理病变。

关键词: 左归丸; 妊娠糖尿病; 葡萄糖稳态; 胎盘外泌体; miR-127-3p

中图分类号: R285.5

文献标志码: B

文章编号: 1001-1528(2025)11-3772-07

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2025.11.036

妊娠糖尿病 (gestational diabetes mellitus, GDM) 指妇女在妊娠期间出现的血糖异常升高的现象, 会导致流产、死胎、滑胎等不良妊娠结局^[1]。胎盘外泌体是妊娠期间参与母体生理功能和胎儿生长发育的主要外泌体。正常情况下, 胎盘外泌体通过调节母体葡萄糖稳态及胰岛素抵抗促

进其营养物质的合理分配, 调节子代的正常发育。而在GDM中, 对母体的调节能力减弱可引起子代代谢疾病的发生^[2-3], 且GDM会改变胎盘的糖原细胞积累, 增加其氧化应激反应, 损害胎盘血管形成。据报道, 哺乳动物miRNA能够促进胎盘滋养层的形成, 增强胎盘免疫功能, 促进胎

收稿日期: 2025-03-07

基金项目: 国家自然科学基金青年项目(82205173); 山西省中医药管理局重点研究室项目(zyyys2024023); 山西中医药大学优秀博士毕业生来晋工作奖励经费科研启动基金项目(2022BKS15); 山西中医药大学博士科研启动基金项目(ZYYBS202303)

作者简介: 王超群(1992—), 女, 博士, 讲师, 从事中药药理与方剂配伍作用的研究。E-mail: 1529971436@qq.com

*通信作者: 王永辉(1974—), 男, 博士, 教授, 从事中药药理与方剂配伍作用的研究。E-mail: wyh766188@sina.com

盘血管生成^[4-7]。其中, miR-371-3p 作为维持胎盘生理结构的主要 miRNA 是本研究的主要指标之一^[8]。

妊娠糖尿病属于中医“消渴”范畴, 其病机本质为肾精不足。左归丸由熟地、山药、枸杞、山茱萸、川牛膝、菟丝子、鹿角胶、龟板胶 8 味中药组成, 是《景岳全书》中培补左肾之元阴, 纯补无泻的主要方剂^[9]。课题组前期研究发现, 左归丸可通过改善母体葡萄糖稳态及胎盘病理结构提升子代胰腺发育基因的表达^[10], 但该作用是否与胎盘外泌体相关, 目前尚不明确。故本实验欲通过左归丸干预 GDM 孕鼠, 研究其能否通过胎盘外泌体调控 miR-127-3p 改善母体葡萄糖稳态维持胎盘生理功能与结构。

1 材料

1.1 实验动物 SPF 级 SD 大鼠, 雌性 90 只, 11 周龄, 体质量(260±20) g; 雄性 45 只, 8 周龄, 体质量(200±20) g, 购自北京维通利华实验动物技术有限公司湖北分公司 [实验动物生产许可证号 SCXK (鄂) 2022-0030], 饲养于山西中医药大学科研楼动物房 [实验动物使用许可证号 SYXK (晋) 2020-0006], 饲养环境温度 (20±2) °C, 相对湿度 (50±10) %, 12 h/12 h 交替光照, 实验期间保持大鼠自由饮水、摄食。本实验获得山西中医药大学实验动物伦理委员会批准 (批准号 2022DW125)。

1.2 药物 熟地黄、麸炒山药、菟丝子 (安国市荣华本草中药材有限公司, 批号 G177230901、C014230901、C196220303); 枸杞子、山萸肉 (安国市祁澳中药饮片有限公司, 批号 2311346135、2309811171); 川牛膝 (河北胡氏宇博药业有限公司, 批号 C212220801); 龟甲胶、鹿角胶 (湖南爱敬堂制药有限公司, 批号 200809、201008), 中药饮片均购自山西中医药大学国医堂。饮片分别以药物总重量 8 倍、4 倍的水煎煮制备质量浓度为 0.945 g/mL 的药液并混合, 将龟甲胶、鹿角胶烊化兑入混合后的药液中, 将配制好的药液于 4 °C 冰箱保存备用, 临用前取出回温并充分摇匀。

1.3 试剂 链脲佐菌素 (STZ, 北京索莱宝科技有限公司, 批号 2231116008); 甘精胰岛素注射液 [赛诺菲 (北京) 制药有限公司, 批号 DBJL058]; 异氟烷 (瑞沃德生命科技有限公司, 批号 20230902); 胎盘碱性磷酸酶 (placental alkaline phosphatase, PLAP) 抗体 (武汉三鹰生物技术有限公司, 批号 10002108); BCA 蛋白浓度测定试剂盒 (上海碧云天生物技术股份有限公司, 批号 061223231101); mirVana miRNA Isolation Kit (美国 Ambion 公司, 批号 7E1620G4); NEBNext Small RNA Library Prep Set for Illumina 试剂盒 (美国 NEB 公司, 批号 175040127)。

1.4 仪器 2016 型转轮式切片机、DFC450C 型显微镜 (德国徕卡公司); JT-12S 型自动脱水机 (武汉俊杰电子有限公司); BMJ-A 型组织包埋机、PHY-III 型病理组织漂烘仪 (常州市中威电子仪器有限公司); BA210 型数码三目摄像显微镜 (麦克奥迪实业集团有限公司); 7700 型透射电镜 (日本 HITACHI 公司); 纳米颗粒跟踪分析仪 (德国

Particle Metrix 公司); ChemiScope 3000 mini 型化学发光凝胶成像系统 (上海勤翔科学仪器有限公司); GA-3 型血糖仪 (三诺生物传感股份有限公司); 双垂直 DYCZ-24DN 型电泳仪及转印电泳仪 (北京六一生物科技有限公司); Image Quant LAS 500 型化学发光仪 (美国 Alpha Innotech 公司); Nanodrop 2000 和 Agilent 2100 生物分析仪 (美国 Agilent Technology 公司)。

2 方法

2.1 造模、分组及给药 大鼠适应性喂养 1 周后开始造模, 下午 5: 00 将雌雄大鼠按 2:1 比例同笼饲养, 于次日上午 8: 00 取雌鼠进行阴道涂片, 镜下观察见精子者确定为受孕第 0 天 (记为 E0d), 受孕成功的孕鼠在 E3d 时腹腔注射 STZ 33 mg/kg, 制备 GDM 模型^[11]。72 h 后检测孕鼠空腹血糖 (fasting blood glucose, FBG) 及随机血糖, 依据中国 2 型糖尿病防治指南 (2017 年版)^[12], 以 FBG ≥ 11.1 mmol/L 或随机血糖 ≥ 16.7 mmol/L 者视为造模成功。将未受孕雌鼠按上述方法继续同笼饲养, 直到受孕造模成功为止。由于大鼠受孕时间不同, 按照分批造模的方式, 除去各组中死亡孕鼠外, 造模成功 60 只。

E3d 时, 应用随机数字表法从正常受孕的雌鼠中随机选择 12 只作为空白组; 将 GDM 模型制备成功的孕鼠随机分为模型组、胰岛素组和左归丸低、中、高剂量组。胰岛素组皮下注射 20 U/kg 甘精胰岛素, 根据《实验动物学》实验动物与人给药换算关系^[13], 左归丸低、中、高剂量组分别灌胃给予 4.5、9、18 g/kg 左归丸药液, 空白组和模型组灌胃给予等体积生理盐水, 每天 1 次, 连续 15 d (E6d 至 E21d)。

2.2 一般情况观察 每日观察并记录孕鼠的活动、精神、毛发及死亡情况, 于 E3d、E6d、E18d 以及 E21d 记录随机血糖变化情况, 于 E6d、E18d、E21d 记录体质量变化。

2.3 FBG、空腹胰岛素 (FINS) 及胰岛素抵抗指数 (HOMA-IR) 检测 分别于 E3d、E6d、E18d、E21d 前, 各组孕鼠禁食 12 h, 用灭菌手术剪剪去孕鼠少量尾尖, 擦拭第 1 滴血液, 检测孕鼠 FBG 值并记录。E21d, 每组随机选取 6 只孕鼠杀检, 其余孕鼠正常生产, 用于后期子代胰腺发育的研究, 禁食 12 h 后取材, 次日清晨检测大鼠 FBG 后, 予以异氟烷麻醉, 腹主动脉取血, 离心半径 8 cm, 3 000 r/min 离心 20 min, 分离血清, 按照 ELISA 试剂盒说明书步骤操作, 检测大鼠空腹胰岛素 (fasting serum insulin, FINS) 水平。胰岛素抵抗指数 (homeostasis model assessment of insulin resistance, HOMA-IR) = FINS × FBG/22.5。

2.4 HE 染色观察大鼠胎盘组织病理学改变 大鼠麻醉后分离胎盘组织, 放入 4% 多聚甲醛液中进行固定, 进行常规脱水、透明、石蜡包埋, 切成 3 μm 切片, 烘干后经二甲苯脱蜡、乙醇梯度脱水、HE 染色、乙醇梯度脱水、二甲苯透明、梯度乙醇水化和中性胶封片后, 于光学显微镜下观察胎盘病理形态结构。

2.5 胎盘外泌体的分离与鉴定

2.5.1 胎盘外泌体分离 大鼠麻醉后分离子宫并收集羊水, 将羊水放置于13 mL的离心管内, 4 ℃、2 000×g离心30 min, 将上清液移至新的离心管中, 4 ℃、100 000×g离心45 min, 以去除较大的囊泡; 取上清, 经0.45 μm滤膜过滤, 收集过滤液; 将过滤液移至新的离心管中, 4 ℃、100 000×g离心70 min; 去除上清, 用10 mL预冷的1×PBS重悬后, 4 ℃、100 000×g离心70 min; 去除上清, 用150 μL预冷的1×PBS重悬, 取20 μL于电镜下观察, 10 μL用于粒径分析, 50 μL用于蛋白提取, 剩余外泌体于-80 ℃保存^[14-15]。

2.5.2 胎盘外泌体电镜观察及纳米颗粒追踪分析 取20 μL外泌体置于铜网上沉淀1 min后, 滤纸吸去浮液后, 滴加醋酸双氧铀10 μL于铜网上沉淀1 min, 滤纸吸去浮液, 干燥后100 kV进行电镜检测成像, 获得透射电镜成像结果。10 μL外泌体样本用1×PBS稀释后注射入样品室, 在PMX120型号纳米颗粒跟踪分析仪上进行纳米颗粒追踪分析(nanoparticle tracking analysis, NTA)。

2.5.3 Western blot法检测外泌体PLAP蛋白表达 取50 μL外泌体, 加入10倍体积的RIPA裂解液, 混匀后在冰上裂解30 min, 4 ℃、12 000 r/min离心10 min, 收集上清液, 即为总蛋白溶液, BCA蛋白浓度测定试剂盒测总蛋白浓度。蛋白溶液加入5×还原型蛋白上样缓冲液, 金属浴95 ℃加热变性10 min。配制12% SDS-PAGE电泳胶, 加样, 电泳后转膜, 封闭, 加入稀释后的PLAP、β-actin一抗溶液, 4 ℃孵育过夜, TBST洗膜3次, 每次5 min, 加入二抗孵育, TBST洗膜3次, 每次5 min, 采用ECL法显影成像, 以β-actin为内参, 计算PLAP蛋白相对表达量。

2.6 RNA-seq法检测胎盘外泌体中miR-127-3p表达 收集胎盘外泌体, 按照miRNA Isolation Kit试剂盒说明书提供的方法提取总RNA。使用Nanodrop 2000和Agilent 2100生物分析仪分别对RNA的总量和完整性进行评估。每个样品取1 μg总RNA, 按照NEBNext Small RNA Library Prep Set for Illumina试剂盒构建小RNA文库, 高通量测序

后进一步对低质量的reads进行过滤, 得到clean reads。对clean reads在参考基因组中的长度分布, 然后用Bowtie软件将序列与Rfam v10.1数据库进行比对, 注释出rRNA、scRNA、Cis-reg、snRNA、tRNA等序列并做过滤处理, 随后用Bowtie软件再依次和cDNA序列、物种重复序列库Rephbase数据库、miRBase数据库进行比对注释去除降解的转录本序列和重复序列, 并实现对已知miRNA的鉴定和注释, 同时对品中已知的miRNA表达模式进行分析并检测miR-127-3p表达量。

2.7 统计学分析 通过SPSS 27.0软件进行处理, 符合正态分布的实验数据以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示, 非正态分布的数据以中位数(四分位数)[$M(P25, P75)$]表示。数据先进行正态分布和方差齐性检验, 若数据符合正态分布, 组间比较采用单因素方差分析, 两两比较采用最小显著性差异法(LSD)检验, 多组间多因素分析采用双因素方差分析法; 若数据不符合正态分布, 采用非参数检验(Kruskal-Wallis检验)。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 孕鼠一般情况 空白组孕鼠精神状态良好, 腹部体积增大, 体型呈“鸭梨形”, 精力充沛, 毛发致密有光泽, 摄食量及饮水量正常; 模型组孕鼠精神不佳, 成皮包骨样, 活动减少, 毛发暗淡无光泽, 但摄食与饮水量增加, 为正常组的2倍以上; 胰岛素组孕鼠精神略欠佳, 活动较空白组少, 毛发稍欠光泽, 饮水与摄食量较模型组略有减少, 但比正常组多, 为其1.2倍左右; 左归丸各剂量组孕鼠精神状态一般, 与模型组比较明显好动, 毛发整齐有光泽, 各组孕鼠均无死亡与流产情况。

3.2 左归丸对GDM孕鼠体质量的影响 E6d, 各组孕鼠体质量无显差异($P>0.05$)。E18d、E21d, 与空白组比较, 模型组孕鼠体质量降低($P<0.01$); 与模型组比较, 胰岛素组及左归丸各剂量组孕鼠体质量增加($P<0.01$); 与胰岛素组比较, 左归丸高剂量组孕鼠体质量降低($P<0.05$, $P<0.01$)。结果见表1。

表1 各组孕鼠体质量比较(g, $\bar{x}\pm s$, n=12)

组别	E6d	E18d	E21d
空白组	292.85±22.14	318.85±26.07	313.65±14.44
模型组	281.45±13.40	284.95±13.32 ^{**}	267.95±17.25 ^{**}
胰岛素组	286.45±20.48	327.50±10.79 [#]	315.45±16.63 [#]
左归丸低剂量组	283.45±18.78	312.35±17.92 [#]	305.95±9.42 [#]
左归丸中剂量组	283.65±19.13	317.45±12.54 [#]	307.85±12.11 [#]
左归丸高剂量组	296.35±17.57	303.25±18.38 [#] [▲]	292.45±16.45 [#] [▲]

注: 与空白组比较, ^{**} $P<0.01$; 与模型组比较, [#] $P<0.01$; 与胰岛素组比较, [▲] $P<0.05$, ^{▲▲} $P<0.01$ 。

3.3 左归丸对GDM孕鼠随机血糖的影响 E3d, 空白组、胰岛素组、模型组及左归丸各剂量组间随机血糖无显著性差异($P>0.05$)。E6d, 与空白组比较, 模型组孕鼠随机血糖升高($P<0.01$); 与模型组比较, 胰岛素组及左归丸各剂量组孕鼠随机血糖无显著性差异($P>0.05$)。E18d、E21d, 与空白组比较, 模型组孕鼠随机血糖升高($P<0.01$); 与模型组比较, 胰岛素组及左归丸各剂量组孕鼠随机血糖降低($P<0.01$)。结果见表2。

3.4 左归丸对GDM孕鼠FBG、FINS及HOMA-IR的影响 与空白组比较, 模型组孕鼠FBG、HOMA-IR升高($P<0.01$), FINS降低($P<0.01$); 与模型组比较, 胰岛素组及左归丸各剂量组孕鼠FBG、HOMA-IR降低($P<0.01$),

FINS 升高 ($P<0.01$)；与胰岛素组比较，左归丸各剂量组 ($P>0.05$)，见表 3。

孕鼠 FBG、HOMA-IR 升高 ($P<0.01$)，FINS 无显著差异

表 2 各组孕鼠随机血糖比较 (mmol/L, $\bar{x}\pm s$, $n=12$)

组别	E3d	E6d	E18d	E21d
空白组	5.57±0.45	5.95±0.10	7.27±0.37	5.35±0.30
模型组	5.15±0.42	17.45±0.65 **	24.55±0.80 **	18.87±0.71 **
胰岛素组	5.43±0.50	17.47±0.29	13.23±0.39 ##	7.12±0.36 ##
左归丸低剂量组	5.18±0.50	17.67±0.57	13.63±0.69 ##	9.78±0.37 ##▲▲
左归丸中剂量组	5.12±0.40	17.30±0.37	11.07±0.43 ##▲▲	8.72±0.49 ##▲▲
左归丸高剂量组	5.10±0.59	17.68±0.57	13.38±0.72 ##	9.85±0.49 ##▲▲

注：与空白组比较，** $P<0.01$ ；与模型组比较，## $P<0.01$ ；与胰岛素组比较，▲▲ $P<0.01$ 。

表 3 各组孕鼠 FBG、FINS 及 HOMA-IR 比较 ($\bar{x}\pm s$, $n=6$)

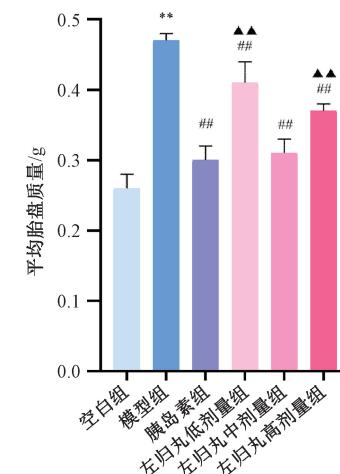
组别	FBG/(mmol·L ⁻¹)	FINS/(mU·mL ⁻¹)	HOMA-IR
空白组	5.76±0.49	25.64±0.77	6.55±0.41
模型组	25.04±0.69 **	17.76±0.25 **	75.42±2.34 **
胰岛素组	7.27±1.02 ##	36.42±2.07 ##	18.22±2.47 ##
左归丸低剂量组	15.29±0.51 ##▲▲	40.88±3.56 ##	41.40±2.31 ##▲▲
左归丸中剂量组	10.97±0.40 ##▲▲	46.94±5.17 ##	27.78±3.08 ##▲▲
左归丸高剂量组	14.14±0.42 ##▲▲	37.27±4.23 ##	36.02±3.12 ##▲▲

注：与空白组比较，** $P<0.01$ ；与模型组比较，## $P<0.01$ ；与胰岛素组比较，▲▲ $P<0.01$ 。

3.5 左归丸对 GDM 孕鼠胎盘重量的影响 与空白组比较，模型组孕鼠胎盘平均质量增加 ($P<0.01$)；与模型组比较，胰岛素组及左归丸各剂量组孕鼠胎盘平均质量降低 ($P<0.01$)；与胰岛素组比较，左归丸低、高剂量组孕鼠胎盘平均质量增加 ($P<0.01$)，中剂量组孕鼠胎盘平均质量无显著差异 ($P>0.05$)，见图 1。

3.6 胎盘外泌体鉴定 透射电镜观察到各组胎盘外泌体均呈现具有明显边界的杯托状脂质双分子膜结构，内含低密度物质，直径在 130 nm 左右，符合国际公认的外泌体标准，见图 2。

各组胎盘外泌体 PLAP 高度表达，提示提取外泌体为胎盘外泌体。与正常组比较，模型组孕鼠胎盘外泌体 PLAP 蛋白表达降低 ($P<0.01$)；与模型组比较，胰岛素组及左归丸各剂量组孕鼠胎盘外泌体 PLAP 蛋白表达升高 ($P<0.01$)；与胰岛素组比较，左归丸各剂量组孕鼠胎盘外泌体 PLAP 蛋白表达降低 ($P<0.05$, $P<0.01$)，见图 3。



注：与空白组比较，** $P<0.01$ ；与模型组比较，## $P<0.01$ ；与胰岛素组比较，▲▲ $P<0.01$ 。

图 1 各组孕鼠胎盘质量比较 ($\bar{x}\pm s$, $n=6$)

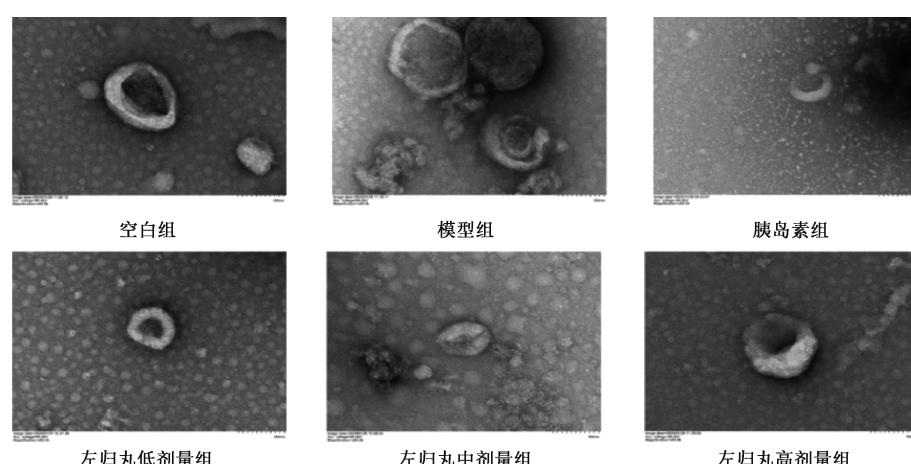
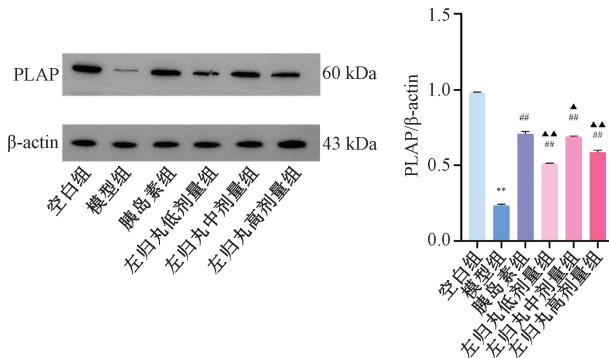


图 2 各组孕鼠胎盘外泌体形态 (透射电镜, $\times 60\,000$)



注: 与空白组比较, ** $P < 0.01$; 与模型组比较, ## $P < 0.01$; 与胰岛素组比较, ▲ $P < 0.05$, ▲▲ $P < 0.01$ 。

图3 各组孕鼠胎盘外泌体PLAP蛋白表达比较($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

3.7 左归丸对GDM孕鼠羊水中胎盘外泌体的纳米颗粒跟踪分析 通过纳米颗粒跟踪技术检测各组外泌体粒径及浓度,发现各组胎盘外泌体粒径分布集中在100~150 nm。与空白组比较,模型组孕鼠羊水中胎盘外泌体浓度降低($P < 0.01$);与模型组比较,胰岛素组及左归丸各剂量组孕鼠胎盘外泌体浓度升高($P < 0.01$);与胰岛素组比较,左归丸各剂量组胎盘外泌体浓度降低($P < 0.05$, $P < 0.01$),见表4。

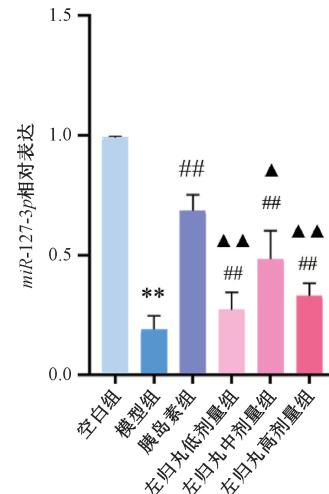
表4 各组孕鼠羊水中胎盘外泌体粒径及浓度比较($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

组别	粒径/nm	浓度/($\times 10^6$ Particles·mL $^{-1}$)
空白组	133.60±8.40	5.33±0.48
模型组	135.08±10.13	2.53±0.22 **
胰岛素组	131.73±9.94	4.47±0.42 ##
左归丸低剂量组	128.13±13.42	3.47±0.26 ##▲▲
左归丸中剂量组	124.30±5.57	4.03±0.29 ##▲
左归丸高剂量组	139.43±5.70	3.55±0.24 ##▲▲

注: 与空白组比较, ** $P < 0.01$; 与模型组比较, ## $P < 0.01$; 与胰岛素组比较, ▲▲ $P < 0.01$ 。

3.8 左归丸对GDM孕鼠胎盘外泌体中miR-127-3p表达的影响 与空白组比较,模型组孕鼠胎盘外泌体中miR-127-3p表达降低($P < 0.01$);与模型组比较,胰岛素组及左归丸各剂量组孕鼠胎盘外泌体中miR-127-3p表达升高($P < 0.01$);与胰岛素组比较,左归丸各剂量组孕鼠胎盘外泌体中miR-127-3p表达降低($P < 0.05$, $P < 0.01$),见图4。

3.9 左归丸对GDM孕鼠胎盘生理结构的影响 空白组大鼠胎盘组织结构完整,各层分界清晰,蜕膜带为胶原纤维和成纤维样细胞交错排列组成,巨细胞滋养层紧邻蜕膜带为体积较大的单核细胞,形态不一,胞质弱碱性,海绵滋养层由细胞滋养层、糖原细胞及母体血窦组成,细胞滋养层细胞胞体较大,呈多边形,多为单核,偶见双核,细胞排列成条索状并交织成网。与空白组比较,模型组见明显病理改变,胎盘局部海绵滋养层坏死,坏死组织结构不清,正常海绵滋养层被纤维素样物质和坏死细胞碎片所替代,迷路滋养层为吻合成网的血管,血管外覆盖少量间充质及2~3层的滋养层细胞。与模型组比较,胰岛素组迷路滋养



注: 与空白组比较, ** $P < 0.01$; 与模型组比较, ## $P < 0.01$; 与胰岛素组比较, ▲ $P < 0.05$, ▲▲ $P < 0.01$ 。

图4 各组孕鼠胎盘外泌体中miR-127-3p表达比较($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

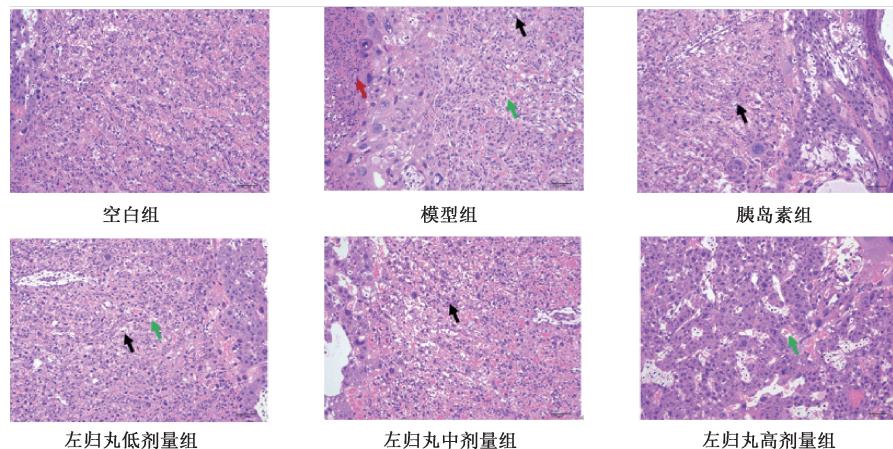
层细胞变性坏死程度明显减轻;左归丸低剂量组迷路滋养层细胞变性坏死、迷路滋养层血管数量减少、炎性细胞浸润;左归丸中剂量组迷路滋养层细胞变性坏死、炎性细胞浸润程度减轻;左归丸高剂量组迷路滋养层细胞变性坏死、迷路滋养层血管数量减少。结果见图5。

4 讨论

GDM作为妊娠期的常见并发症,属于中医“消渴”的范畴,中医认为其根本病机为肾精不足。作为填补肾之真阴的常用方剂,左归丸中熟地、枸杞子、龟板胶滋肾益精,鹿角胶温补肾阳以阳中求阴,菟丝子平补肝肾,佐以山茱萸、山药、牛膝肝脾肾并补,以达滋肾填精,育阴潜阳之效^[16]。胎盘外泌体作为调节GDM对子代作用的载体,在调节母体葡萄糖代谢和胰岛素抵抗,维持胎盘生理结构方面发挥重要作用。课题组前期也证实了左归丸对调控葡萄糖稳态有调节作用^[17-19],但其调节作用是否与外泌体的分泌有关,目前研究尚不明确,故本实验对此进行研究。

妊娠后期,胎盘激素的增加会促进胰岛素抵抗的产生^[20],而孕妇对该抵抗的适应性调节是维持葡萄糖稳态及胎儿生长发育的主要环节。本研究发现,经雌雄同笼联合STZ腹腔注射造模后,孕鼠阴道涂片见大量精子,血糖升高,且造模后孕鼠精神及体态欠佳,成皮包骨样,摄食与饮水量明显增加,符合GDM模型标准。GDM孕鼠血清FBG、HOMA-IR升高, FINS降低,说明GDM孕鼠胰岛功能降低,胰岛素分泌减少,胰岛素抵抗增加;经左归丸干预后,FBG、HOMA-IR降低, FINS升高,说明左归丸能改善胰岛素抵抗,这与课题组前期研究结果相符。本研究还发现,左归丸通过提升PLAP表达促进胎盘外泌体的分泌,且随外泌体分泌增加,孕鼠胰岛素抵抗改善情况越好,说明左归丸可通过促进胎盘外泌体的分泌降低胰岛素抵抗以维持GDM孕鼠的葡萄糖稳态。

妊娠过程中,胎盘的正常生理结构是保证子代营养的



注: 红色箭头指示海绵滋养层坏死, 黑色箭头指示迷路滋养层细胞变性坏死, 绿色箭头指示迷路滋养层血管数量减少。

图5 各组孕鼠胎盘组织病理变化 (HE染色, $\times 100$)

前提, 而维持葡萄糖稳态、改善高糖环境对GDM孕鼠胎盘的发育至关重要。滋养层-子宫螺旋动脉相互调节是胎盘适应环境应激源的关键组成部分。胎盘外泌体可通过促进血管平滑肌细胞迁移参与螺旋动脉重铸^[21]。这一过程又需要其诱导的滋养细胞的侵袭和分化^[22], 说明胎盘外泌体的分泌有助于胎盘结构的形成。本研究发现, GDM孕鼠的胎盘生理结构损害严重; 经左归丸干预后, 胎盘病理结构明显改善, 且胎盘外泌体分泌增加, 推测左归丸可能通过促进胎盘外泌体的分泌改善GDM孕鼠胎盘的病理结构。而胎盘生理结构的形成与miR-127-3p的表达关系密切。有研究表明, 小鼠miR-127/miR-136簇调控胎盘迷宫区胎儿毛细血管形成^[23]。Ito等^[24]研究发现, miR-127-3p的增加能抑制Rtl1表达以缩小miR-127基因敲除小鼠胎盘体积, 导致胎儿质量减轻。本研究发现, 模型组miR-127-3p表达降低, 孕鼠单个胎盘平均质量异常升高, 约为空白组的2倍, 其胎盘组织迷路滋养层细胞变性坏死、迷路滋养层血管数量明显减少; 经左归丸干预后, 随着胎盘外泌体分泌的增加, miR-127-3p表达升高, 左归丸组的胎盘质量越接近于空白组, 各药物组孕鼠胎盘病理性改变好转, 说明左归丸可通过促进胎盘外泌体的分泌提升miR-127-3p表达, 改善胎盘病理结构。

综上所述, 左归丸可能通过促进胎盘外泌体的分泌, 降低胰岛素抵抗以提升GDM孕鼠的葡萄糖稳态与miR-127-3p表达, 改善孕鼠胎盘病理结构, 提高其子代的发育质量。然而, miR-127-3p与GDM宫内葡萄糖稳态的关系, 目前尚没有确定论, 需要在今后的课题中进一步研究。

参考文献:

- [1] O'Malley E G, Reynolds C M E, Killalea A, et al. Maternal obesity and dyslipidemia associated with gestational diabetes mellitus (GDM) [J]. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 2020, 246: 67-71.
- [2] James-Allan L B, Rosario F J, Barner K, et al. Regulation of glucose homeostasis by small extracellular vesicles in normal pregnancy and in gestational diabetes[J]. *FASEB J*, 2020, 34 (4): 5724-5739.
- [3] Jayabalan N, Lai A, Ormazabal V, et al. Adipose tissue exosomal proteomic profile reveals a role on placenta glucose metabolism in gestational diabetes mellitus[J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2019, 104(5): 1735-1752.
- [4] Huynh J, Dawson D, Roberts D, et al. A systematic review of placental pathology in maternal diabetes mellitus[J]. *Placenta*, 2015, 36(2): 101-114.
- [5] Ladfors L, Shaat N, Wiberg N, et al. Fetal overgrowth in women with type 1 and type 2 diabetes mellitus[J]. *PLoS One*, 2017, 12(11): e0187917.
- [6] Nelson S M, Coan P M, Burton G J, et al. Placental structure in type 1 diabetes: relation to fetal insulin, leptin, and IGF-I[J]. *Diabetes*, 2009, 58(11): 2634-2641.
- [7] Meng Q, Shao L, Luo X C, et al. Expressions of VEGF-A and VEGFR-2 in placentae from GDM pregnancies[J]. *Reprod Biol Endocrinol*, 2016, 14(1): 61.
- [8] Morales-Prieto D M, Ospina-Prieto S, Schmidt A, et al. Elsevier Trophoblast Research Award Lecture: origin, evolution and future of placenta miRNAs[J]. *Placenta*, 2014, 35 Suppl: S39-S45.
- [9] 张介宾. 景岳全书(上册) [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2006: 424.
- [10] 王超群. 基于PDX-1通路研究补肾经方对GDM模型孕鼠胎鼠胰腺发育及胰岛素分泌细胞形成的影响 [D]. 武汉: 湖北中医药大学, 2021.
- [11] 李佳, 魏波, 塔娜, 等. 不同剂量链脲佐菌素建立妊娠期糖尿病大鼠模型稳定性的比较 [J]. 第四军医大学学报, 2009, 30(22): 2500-2502.
- [12] 中华医学会糖尿病学分会. 中国2型糖尿病防治指南(2017年版) [J]. 中国实用内科杂志, 2018, 38(4): 292-344.
- [13] 陈民利, 苗明三. 实验动物学 [M]. 北京: 中国中医药出版社, 2020: 184-189.
- [14] Burkova E E, Sedykh S E, Nevinsky G A. Human placenta

- exosomes: biogenesis, isolation, composition, and prospects for use in diagnostics[J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(4): 2158.
- [15] 陈星星, 赛依帕, 胡筱霞, 等. 人脐带间充质干细胞来源外泌体对脑瘫小鼠神经功能损伤的保护作用[J]. 基础医学与临床, 2023, 43(8): 1201-1207.
- [16] 周敏, 方晓阳. 左归丸及右归丸创方思想的历史考察[J]. 中医杂志, 2015, 56(11): 901-905.
- [17] 冯忆, 孙凯男, 任晓怡, 等. 基于Pdx1路径探讨左归丸对妊娠糖尿病模型子鼠胰腺β细胞超微结构及氧化应激的影响[J]. 中草药, 2024, 55(19): 6599-6606.
- [18] 许凯霞, 杨敏, 吴玉洁, 等. 左归丸对孕期糖代谢异常大鼠肝损伤及其子代HPA轴功能的影响[J]. 中国中医基础医学杂志, 2024, 30(11): 1877-1881.
- [19] 王悦尧, 王永辉, 许凯霞, 等. 左归丸对GDM大鼠胎盘组织11β-HSD1表达的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2015, 21(11): 127-130.
- [20] Zhu B, Zhang L, Fan Y Y, et al. Metformin versus insulin in gestational diabetes mellitus: a meta-analysis of randomized clinical trials[J]. *Ir J Med Sci*, 2016, 185(2): 371-381.
- [21] Nteeba J, Varberg K M, Scott R L, et al. Poorly controlled diabetes mellitus alters placental structure, efficiency, and plasticity[J]. *BMJ Open Diabetes Res Care*, 2020, 8(1): e001243.
- [22] Sáez T, de Vos P, Sobrevia L, et al. Is there a role for exosomes in foetoplacental endothelial dysfunction in gestational diabetes mellitus? [J]. *Placenta*, 2018, 61: 48-54.
- [23] Malnou E C, Umlauf D, Mouysset M, et al. Imprinted microRNA gene clusters in the evolution, development, and functions of mammalian placenta[J]. *Front Genet*, 2019, 9: 706.
- [24] Ito M, Sferruzzi-Perri A N, Edwards C A, et al. A trans-homologue interaction between reciprocally imprinted miR-127 and Rtl1 regulates placenta development[J]. *Development*, 2015, 142(14): 2425-2430.

养荣润肠舒合剂调控PI3K/Akt信号通路对肠燥津亏型便秘大鼠的影响

石宇¹, 张洋¹, 孔祥瑞¹, 梁勇², 张虹玺^{1*}

(1. 辽宁中医药大学附属第三医院肛肠外科, 辽宁沈阳 110000; 2. 辽宁中医药大学, 辽宁沈阳 110000)

摘要: 目的 探究养荣润肠舒合剂对肠燥津亏型便秘大鼠的影响。方法 SD大鼠随机分为对照组、模型组、养荣润肠舒合剂低、中、高剂量组、麻仁软胶囊组, 每组16只。采用持续毛果芸香碱注射复合大黄酸灌胃的“汗下复合法”造模方法构建肠燥津亏型便秘大鼠模型, 对照组、模型组大鼠灌胃生理盐水, 养荣润肠舒合剂低、中、高剂量组分别灌胃养荣润肠舒合剂11.4、22.8、45.6 g/kg, 麻仁软胶囊组灌胃麻仁软胶囊0.6 g/kg, 每天1次, 连续给药14 d。观察大鼠排便总粒数及粪便质量, HE染色观察大鼠结肠组织病理变化, TUNEL法观察大鼠结肠组织细胞凋亡情况, Western blot法检测大鼠结肠组织AQP3、AQP8及PI3K/Akt信号通路蛋白表达情况。结果 与对照组比较, 模型组大鼠结肠组织杯状细胞数量减少, 结肠组织细胞凋亡率增加($P<0.05$), 排便粒数及粪便质量降低($P<0.05$), AQP3、AQP8蛋白表达升高($P<0.05$), PI3K、Akt蛋白表达降低($P<0.05$); 与模型组比较, 养荣润肠舒合剂各剂量组以及麻仁软胶囊组杯状细胞数量增加, 结肠组织细胞凋亡率减少($P<0.05$), 排便的总粒数及粪便质量增加($P<0.05$), AQP3、AQP8蛋白表达降低($P<0.05$), PI3K、Akt蛋白表达增加($P<0.05$)。结论 养荣润肠舒合剂能够减少肠燥津亏型便秘大鼠的结肠损伤, 增加排便的总粒数及粪便质量, 其机制可能与PI3K/Akt信号通路的激活相关。

关键词: 养荣润肠舒合剂; 肠燥津亏型便秘; 结肠损伤; PI3K/Akt信号通路

中图分类号: R285.5

文献标志码: B

文章编号: 1001-1528(2025)11-3778-05

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2025.11.037

肠燥津亏型便秘是指由于大肠阴津亏虚, 传导不利, 以大便燥结、排便困难为主证的症候^[1-2]。多因素导致体阴亏, 或年老阴血不足, 或吐泻、久病、温热病后期等耗伤

阴液, 或因失血、妇女产后出血过多, 以致阴血津液亏虚, 大肠失于濡润所致。临幊上通常表现为大便干燥、口干咽燥等^[3-5]。目前治疗肠燥津亏型便秘的药物有增液承气汤、

收稿日期: 2025-04-23

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(82174371); 沈阳市科技计划项目(24-214-3-186)

作者简介: 石宇(1991—), 男, 硕士, 主治中医师, 从事中医外科学肛肠方向研究。Tel: 17702432854, E-mail: 80401516@qq.com

*通信作者: 张虹玺(1973—), 男, 博士, 主任中医师, 从事中医外科学肛肠方向研究。Tel: 18940156671, E-mail: zhanghongxi999@163.com