

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

冯 忆, 孙凯男, 任晓怡, 吴玉洁, 杨 敏, 王永辉*

山西中医药大学, 山西 晋中 030619

摘要: 目的 采用链脲佐菌素 (streptozotocin, STZ) 诱导的妊娠糖尿病 (gestational diabetes mellitus, GDM) 模型, 观察 GDM 模型大鼠孕期进行左归丸干预后其子代胰腺发育情况, 并进一步探讨胰腺十二指肠同源框蛋白 1 (pancreatic and duodenal homeobox 1, Pdx1) 路径对 GDM 模型子鼠胰腺 β 细胞超微结构及氧化应激的影响。方法 将孕鼠分为对照组、模型组、地特胰岛素 (15 U/kg) 组和左归丸低、中、高剂量 (0.95、1.89、3.78 g/kg) 组, 每组 6 只。除对照组外, 在大鼠妊娠第 3 天 (E3d) 时 ip STZ 构建 GDM 模型, 对照组 ip 等体积柠檬酸钠缓冲液, 通过测定空腹血糖判断孕鼠是否造模成功。除对照组和模型组外, 其余各组孕鼠在 E6d 开始给药至分娩前, 每日 1 次。待孕鼠自然分娩, 子鼠由母鼠喂养至离乳第 21 天 (B21d), 从各组母鼠子代中随机选取 1 雌 1 雄子鼠作为对照组、模型组、地特胰岛素组、左归丸低、中、高剂量组, 每组 12 只。在各组子鼠 B22d 时, 采用血糖仪测定空腹血糖 (fasting blood glucose, FBG), 记录子鼠体重、体长 (测定尾根至鼻尖的距离), 处死子鼠, 分离血清。采用 ELISA 法检测空腹胰岛素水平 (fasting plasma insulin, FINS) 并计算胰岛素抵抗指数 (homeostasis model assessment of insulin resistance, HOMA-IR); 采用苏木素-伊红 (hematoxylin-eosin, HE) 染色法观察子鼠胰腺病理结构; 在透射电子显微镜下观察子鼠胰腺 β 细胞超微结构; 采用 ELISA 法检测子鼠血清及胰腺组织中超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD)、丙二醛 (malonaldehyde, MDA)、过氧化氢酶 (catalase, CAT) 水平; 采用 Western blotting 法检测子鼠胰腺组织 Pdx1、神经因子 3 (neurogenin 3, Ngn3)、肌筋膜性纤维肉瘤癌基因同源物 A (v-maf avian musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene family protein A, Mafa) 的蛋白表达。结果 与对照组比较, 模型组子鼠体重增加、体长减少 ($P < 0.01$), FBG、FINS 水平以及 HOMA-IR 升高 ($P < 0.01$), 胰腺组织病理结构及胰腺 β 细胞超微结构损伤明显, 血清及胰腺组织氧化应激指标 (SOD、MDA、CAT) 水平降低 ($P < 0.05$ 、 0.01), 胰腺组织中 Pdx1、Ngn3、Mafa 蛋白表达量显著降低 ($P < 0.01$)。与模型组比较, 各给药组子鼠体重减少、体长增加 ($P < 0.01$); FBG、FINS 水平以及 HOMA-IR 降低 ($P < 0.05$ 、 0.01), 血清及胰腺组织氧化应激指标 (SOD、MDA、CAT) 水平升高 ($P < 0.05$ 、 0.01), 胰腺组织病理结构及胰腺 β 细胞超微结构损伤减轻, 胰腺发育关键蛋白 (Pdx1、Ngn3、Mafa) 表达升高 ($P < 0.05$ 、 0.01)。结论 左归丸能有效改善 GDM 模型子代胰腺发育, 其作用机制可能与抑制氧化应激反应从而保护子鼠胰腺 β 细胞超微结构有关。

关键词: 宫内高糖; 左归丸; 子代发育; 氧化应激; 超微结构; Pdx1

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2024)19-6599-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2024.19.014

Effect of Zuogui Pills on ultrastructure and oxidative stress of pancreatic β cells in gestational diabetes mellitus model offsprings based on Pdx1 pathway

FENG Yi, SUN Kainan, REN Xiaoyi, WU Yujie, YANG Min, WANG Yonghui

Shanxi University of Chinese Medicine, Jinzhong 030619, China

Abstract: Objective To observe pancreatic development in the offsprings and investigate further effect of pancreaticoduodenal homeobox 1 (Pdx1) pathway on the ultrastructure of pancreatic β cells and oxidative stress in gestational diabetes mellitus (GDM) using a streptozotocin (STZ)-induced GDM model, Zuogui Pills (左归丸) were administered during pregnancy. **Methods** Pregnant rats were divided into control group, model group, detemir insulin (15 U/kg) group, and low, medium, and high-dose Zuogui Pills (0.95, 1.89, 3.78 g/kg) groups, with six rats in each group. Except for the control group, the others were established by intraperitoneal

收稿日期: 2024-04-24

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (82274378); 山西省卫生健康委员会方药配伍及功用重点研究室建设项目 (zyyyjs2024023)

作者简介: 冯 忆, 硕士研究生, 从事中药药理与方剂配伍作用研究。Tel: 13882565599 E-mail: 404443743@qq.com

*通信作者: 王永辉, 硕士生导师, 从事中药药理与方剂配伍作用研究。Tel: 18636117158 E-mail: wyh766188@sina.com

injection (ip) STZ on the third day of pregnancy (E3d) in pregnant rats. Pregnant rats in the control group were given an equal volume of sodium citrate buffer. The formation of the GDM model in pregnant rats was determined by measuring fasting blood glucose. Except for the control group and the model group, pregnant rats in the remaining groups were administered once daily from E6d until delivery. After pregnant rats delivered naturally, the offsprings were fed by their mothers until they were weaned at 21st d (B21d). One female and one male offspring from each group of mothers were randomly selected to form control group, model group, detemir insulin group, and low, medium, and high-dose Zuogui Pills groups, with 12 offsprings in each group. On the 22nd day of life (B22d), fasting blood glucose (FBG) levels were measured using a glucometer in offsprings from each group. Body weight and body length (measured from the base of the tail to the tip of the nose) were recorded. The offsprings were then euthanized, and serum was separated for the detection of fasting insulin (FINS) levels by ELISA, which was used to calculate the homeostasis model assessment of insulin resistance (HOMA-IR). The pathological structure of the pancreas was observed using hematoxylin-eosin (HE) staining. Ultrastructural changes in β -cells were examined under a transmission electron microscope. Serum and pancreatic tissue levels of superoxide dismutase (SOD), malondialdehyde (MDA), and catalase (CAT) were determined by ELISA. Western blotting was performed to assess the relative protein expression of Pdx1, neurogenin 3 (Ngn3), and v-maf avian musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene family protein A (Mafa) in the pancreatic tissue of offsprings. **Results** Compared with the control group, offsprings in the model group exhibited increased body mass, reduced body length ($P < 0.01$), and elevated levels of FBG, FINS, and HOMA-IR levels ($P < 0.01$). Notably, significant pathological damage and ultrastructural impairment were observed in pancreatic tissue and β -cells. Furthermore, serum and pancreatic tissue levels of oxidative stress markers (SOD, MDA, CAT) were decreased ($P < 0.05, 0.01$), accompanied by significantly reduced protein expression of Pdx1, Ngn3, and Mafa in pancreatic tissue ($P < 0.01$). In contrast, compared to the model group, all treatment groups showed decreased body mass and increased body length ($P < 0.01$). Additionally, there were reductions in FBG, FINS, and HOMA-IR levels ($P < 0.01$), along with increased serum and pancreatic tissue levels of oxidative stress markers (SOD, MDA, CAT) ($P < 0.05, 0.01$). The pathological damage and ultrastructural impairment in pancreatic tissue and β -cells were alleviated, and the expression of key pancreatic developmental proteins (Pdx1, Ngn3, Mafa) was upregulated ($P < 0.05, 0.01$). **Conclusion** Zuogui Pills can effectively improve the pancreatic development of offsprings in the GDM model, and its mechanism of action may be related to inhibiting oxidative stress responses, thereby protecting the ultrastructure of β -cells.

Key words: high intrauterine sugar; Zuogui Pills; offspring development; oxidative stress; ultrastructure; Pdx1

妊娠糖尿病 (gestational diabetes mellitus, GDM) 患者的子代患代谢类疾病的风险高于正常人群, 宫内高血糖是代谢类疾病的致病因素之一^[1]。子代生长发育的关键时期暴露于宫内高糖环境下, 会导致胚胎过早分泌胰岛素, 从而对子代胰腺的发育产生不良的影响, 导致减弱成年后机体对能量代谢负荷的适应能力, 进而造成不可逆的改变。氧化应激与子鼠胰腺 β 细胞的损伤息息相关, 子鼠胰腺 β 细胞损伤导致胰岛素分泌不足, 最终会引发糖尿病的代际传播。宫内高糖环境的氧化应激会影响子代胚胎期的发育^[2], 导致胰腺 β 细胞减少、功能减退, 进而引发胰岛素分泌功能障碍。胰腺 β 细胞内抗氧化酶的水平较低, 对活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 的清除能力较弱, 因此对 ROS 诱导的损伤较为敏感^[3-4]。ROS 能促进胰腺 β 细胞的凋亡, 影响胰岛素信号传递的路径, 从而抑制胰腺 β 细胞释放胰岛素的能力^[5-6]。胰腺 β 细胞功能被抑制后胰岛素分泌水平降低、分泌高峰延迟、血糖出现波动, 进一步会对细胞造成损伤, 损伤轻度的细胞

能够被修复, 而损伤严重的细胞会出现凋亡并最终出现坏死^[7]。过量 ROS 可能通过线粒体途径干扰胰腺 β 细胞的增殖甚至诱导其凋亡^[8-9], 胰腺 β 细胞中的抗氧化酶极易受到 ROS 的损伤, ROS 可激活子鼠胰腺 β 细胞内线粒体及内质网的肿胀, 影响胰岛素的合成, 降低机体胰岛素的抵抗^[10]。

左归丸出自《景岳全书》, 本方纯补无泻, 具有滋阴补肾、填精益髓的功效, 主治真阴不足之证。《医学举要》卷五言: “方用熟地之补肾为君; 山药之补脾, 山茱萸之补肝为臣; 配以枸杞补精, 川牛膝补血, 菟丝子补肾中之气, 鹿角胶、龟板胶补督任之元”^[11]。本研究对 GDM 模型大鼠进行左归丸药物干预, 通过“补母益子”的作用, 在改善孕鼠血糖的基础上, 调控其子代早期的发育, 减轻因宫内高糖对子代胰腺发育的影响, 进而调节子代“先天肾虚”的体质^[12-13]。

1 材料

1.1 动物

7 周龄 SPF 级 Wistar 大鼠, 雌鼠 90 只, 雄鼠

45 只, 体质量 (235 ± 10) g, 由北京维通利华实验动物研究中心提供, 实验动物许可证号 SCXK(京) 2021-0011, 饲养于山西中医药大学屏障环境动物实验室, 室内温度 $21 \sim 22$ °C, 相对湿度 40%~60%, 12 h 光照/12 h 黑暗。动物实验经山西中医药大学动物伦理委员会批准 (批准号 2022DW003)。

1.2 药品与试剂

左归丸 (国药准字 Z41020696, 批号 210309) 由河南仲景宛西制药股份有限公司提供; 地特胰岛素 (国药准字 S20217003, 批号 LVG3E36) 由天津诺和诺德制药有限公司提供; 链脲佐菌素 (streptozocin, STZ, 批号 20230306011, 质量分数 75%) 购自北京索莱宝科技有限公司; 空腹胰岛素水平 (fasting plasma insulin, FINS) 酶联免疫吸附测定试剂盒 (批号 MM-45303M1) 购自江苏酶免实业有限公司; 苏木素-伊红 (hematoxylin-eosin, HE) 染液 (批号 G1003)、 β -actin 抗体 (批号 GB11001-100)、DAPI 染液 (批号 G1012)、过氧化氢酶 (catalase, CAT) 试剂盒 (批号 MPC2309056) 均购自武汉塞维尔生物科技有限公司; 胰腺十二指肠同源框蛋白 1 (pancreatic and duodenal homeobox 1, Pdx1) 抗体 (批号 10951-1-AP)、HRP 标记的山羊抗小鼠 IgG 二抗 (批号 20001102) 均购自武汉三鹰生物技术有限公司; 神经因子 3 (neurogenin 3, Ngn3) 抗体 (批号 bs-0922R)、肌筋膜性纤维肉瘤癌基因同源物 A (v-maf avian musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene family protein A, Maf) 抗体 (批号 bs-0924R) 均购自北京博奥森生物技术有限公司; 超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 试剂盒 (批号 20230905)、丙二醛 (malonaldehyde, MDA) 试剂盒 (批号 20230908) 均购自南京建成生物工程研究所有限公司。

1.3 仪器

GA-3 型血糖仪 (长沙三诺生物传感股份有限公司); L3660D 型离心机 (上海知信实验仪器技术有限公司); JXFSTPRP-48J 型高速组织研磨仪 (上海净信实业发展有限公司); TGL-16 型高速离心机 (江苏科析仪器有限公司); SCIOLOGEX CF1 524 R 型台式冷冻离心机 (北京兰杰柯科技有限公司); DS-S100 型数显钟摆摇床 (武汉塞维尔生物科技有限公司); MV-100 型旋涡混合器 (武汉塞维尔生物科技有限公司); HITACHI HT 7800 型透射电子显微镜 (日立中国有限公司); PHY-III 型病理组织漂

烘仪 (常州市中威电子仪器有限公司); EL204 型电子天平 (梅特勒托利多科技中国有限公司)。

2 方法

2.1 动物分组、造模及给药

动物适应性喂养 7 d 后, 按照雌雄 2:1 比例合笼, 次日清晨, 若在阴栓或阴道涂片镜检中观察到精子, 则为妊娠第 0.5 天 (E0.5d), 在 E3d 将孕鼠按数字表法, 随机抽取 15 只作为对照组, 其余孕鼠禁食 12 h 后 ip STZ (35 mg/kg) 构建 GDM 模型, 对照组孕鼠 ip 等体积柠檬酸钠缓冲液。在 ip STZ 72 h 后检测孕鼠空腹血糖 (fasting blood glucose, FBG), 依据中国 2 型糖尿病防治指南 (2017 年版) 和相关研究^[14-15], $\text{FBG} \geq 6.9$ mmol/L 或餐后血糖 ≥ 10.0 mmol/L 即视为造模成功, 淘汰未成模孕鼠。本实验雌鼠受孕率为 60%, 成模率约为 70%。

将造模成功的孕鼠随机分为模型组、地特胰岛素组 (15 U/kg) 和左归丸低、中、高剂量 (0.95、1.89、3.78 g/kg, 分别相当于临床等效剂量的 0.5、1、2 倍) 组, 每组 6 只。地特胰岛素给药剂量以初始剂量 2 U/只, 次日以 1 U 为单位逐渐增加药量, 直至 $\text{FBG} < 6.1$ mmol/L 或随机血糖 < 11.1 mmol/L, 最终平均每只孕鼠给药剂量为 15 U/kg。将左归丸制成相应浓度的混悬液, 左归丸各给药组给药体积均为 20 mL/kg, 对照组和模型组每日 ig 等体积蒸馏水。各组孕鼠初始血糖无显著性差异, 每组孕鼠于 E6d 到分娩前 ig 相应的药物, 每日 1 次。

2.2 指标检测

2.2.1 样本采集 于子鼠离乳第 21 天 (B21d) 从各组的每只孕鼠中随机选取其 1 雌 1 雄子鼠, 每组 12 只, 禁食不禁水 12 h。测量子鼠体质量和体长后, ip 2% 戊巴比妥钠 (2 mL/kg) 进行麻醉, 腹部碘伏消毒后, 腹主动脉采血, 解剖后取子鼠胰腺。

2.2.2 胰岛素抵抗指数 (homeostasis model assessment of insulin resistance, HOMA-IR) 检测 剪尾后用血糖仪检测 FBG 水平, ELISA 法检测血清 FINS 水平, 并计算 HOMA-IR。

$$\text{HOMA-IR} = \text{FINS} \times \text{FBG} / 22.5$$

2.2.3 血清氧化应激水平检测 通过 ELISA 法检测血清中氧化应激指标 SOD、MDA、CAT 水平。

2.2.4 胰腺组织氧化应激水平检测 称取胰腺组织, 制备匀浆组织液, 2 500 r/min, 离心 10 min, 取上清液, 按照试剂盒说明书进行测定。

2.2.5 胰腺组织蛋白表达的检测 采用 Western

blotting 检测 Pdx1、Ngn3、Mafa 蛋白表达。将胰腺组织匀浆裂解离心后取上清液，BCA 法测定蛋白浓度，封闭后加入按比例稀释好的 Pdx1、Ngn3、Mafa 及 β -actin 一抗，孵育过夜，TBST 洗膜 3 次，每次 5 min，加入二抗孵育后，TBST 洗膜 3 次，每次 5 min。采用 ECL 显影成像。

2.2.6 胰腺组织病理结构观察 胰腺组织经 4%多聚甲醛固定，经脱水、石蜡、包埋、SOP 制备组织切片和烘片后，进行 HE 染色。封片后于显微镜下观察并拍照。

2.2.7 胰腺 β 细胞超微结构观察 胰腺组织经 2%戊二醛 4 $^{\circ}\text{C}$ 固定 12 h 后，常规制备成超薄切片 (60~80 nm)，进行铅铀双染色，在透射电子显微

镜下观察，采集图像进行分析。

2.3 统计学分析

采用 SPSS 22.0 软件进行统计学分析，数据以至少 3 次独立实验的 $\bar{x} \pm s$ 表示，采用单因素方差分析进行多组间比较，方差齐采用最小显著性差异法，方差不齐采用 Dunnett's T3 法。

3 结果

3.1 左归丸对 GDM 模型离乳子鼠体质量、体长的影响

如表 1 所示，与对照组比较，模型组子鼠体质量显著增加，体长显著降低 ($P<0.01$)；与模型组比较，各给药组子鼠体质量均显著降低 ($P<0.01$)，体长显著增加 ($P<0.01$)。

表 1 左归丸对 GDM 模型离乳子鼠体质量、体长的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

Table 1 Effects of Zuogui Pills on body weight and body length in weaned offsprings of GDM model ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

组别	剂量	体质量/g	体长/cm
对照	—	40.00 $\pm$ 3.94	11.79 $\pm$ 0.34
模型	—	57.92 $\pm$ 2.61 ^{##}	8.23 $\pm$ 0.45 ^{##}
胰岛素	15.00 U $\cdot$ kg ⁻¹	48.55 $\pm$ 1.19 ^{**}	11.29 $\pm$ 0.33 ^{**}
左归丸	0.95 g $\cdot$ kg ⁻¹	42.61 $\pm$ 0.86 ^{**}	11.79 $\pm$ 0.34 ^{**}
	1.89 g $\cdot$ kg ⁻¹	36.59 $\pm$ 2.80 ^{**}	10.13 $\pm$ 0.56 ^{**}
	3.78 g $\cdot$ kg ⁻¹	40.29 $\pm$ 4.66 ^{**}	12.04 $\pm$ 0.42 ^{**}

与对照组比较：[#] $P<0.05$ ^{##} $P<0.01$ ；与模型组比较：^{*} $P<0.05$ ^{**} $P<0.01$ ，下表同。

[#] $P<0.05$ ^{##} $P<0.01$ vs control group; ^{*} $P<0.05$ ^{**} $P<0.01$ vs model group, same as below tables.

3.2 左归丸对 GDM 模型离乳子鼠 FBG、FINS 及 HOMA-IR 的影响

如表 2 所示，与对照组比较，模型组离乳子鼠 FBG、FINS 水平及 HOMA-IR 均显著升高 ($P<0.01$)；与模型组比较，胰岛素组和左归丸中、高剂量组离乳子鼠 FBG、FINS 水平及 HOMA-IR 均显著降低 ($P<0.05$ 、 0.01)，左归丸低剂量组 FBG 水平及 HOMA-IR 显著降低 ($P<0.05$ 、 0.01)。

3.3 左归丸对 GDM 模型离乳子鼠血清氧化应激水平的影响

如表 3 所示，与对照组比较，模型组离乳子鼠血清 SOD 活性降低 ($P<0.05$)，MDA 水平升高 ($P<0.01$)。与模型组比较，各给药组离乳子鼠血清 SOD 活性升高 ($P<0.05$ 、 0.01)，MDA 水平显著降低 ($P<0.01$)，左归丸低剂量组离乳子鼠血清 CAT 活性显著升高 ($P<0.01$)。

表 2 左归丸对 GDM 模型离乳子鼠 FBG、FINS 及 HOMA-IR 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 2 Effects of Zuogui Pills on FBG, FINS and HOMA-IR in weaned offsprings of GDM model ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量	FBG/(mmol $\cdot$ L ⁻¹)	FINS/(mU $\cdot$ mL ⁻¹)	HOMA-IR
对照	—	3.30 $\pm$ 0.50	36.67 $\pm$ 0.52	5.38 $\pm$ 0.86
模型	—	5.58 $\pm$ 0.35 ^{##}	45.41 $\pm$ 3.37 ^{##}	11.26 $\pm$ 1.34 ^{##}
胰岛素	15.00 U $\cdot$ kg ⁻¹	3.85 $\pm$ 0.33 ^{**}	41.37 $\pm$ 2.44 ^{**}	7.07 $\pm$ 1.05 ^{**}
左归丸	0.95 g $\cdot$ kg ⁻¹	4.25 $\pm$ 0.29 [*]	44.11 $\pm$ 1.92	8.33 $\pm$ 1.06 ^{**}
	1.89 g $\cdot$ kg ⁻¹	3.70 $\pm$ 0.24 ^{**}	42.53 $\pm$ 1.74 [*]	6.96 $\pm$ 1.10 ^{**}
	3.78 g $\cdot$ kg ⁻¹	3.42 $\pm$ 0.32 ^{**}	39.37 $\pm$ 0.99 ^{**}	5.98 $\pm$ 0.46 ^{**}

表 3 左归丸对 GDM 模型离乳子鼠血清氧化应激水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 3 Effect of Zuogui Pills on oxidative stress levels in weaned offsprings of GDM model serum ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量	SOD/(U·mg ⁻¹)	MDA/(nmol·mg ⁻¹)	CAT/(U·mg ⁻¹)
对照	—	465.18 ± 57.42	4.75 ± 0.43	34.87 ± 11.58
模型	—	382.51 ± 66.00 [#]	12.25 ± 6.17 ^{##}	38.20 ± 10.77
胰岛素	15.00 U·kg ⁻¹	459.82 ± 54.04 [*]	4.36 ± 1.20 ^{**}	48.86 ± 13.40
左归丸	0.95 g·kg ⁻¹	450.88 ± 34.40 [*]	4.26 ± 1.13 ^{**}	71.95 ± 12.80 ^{**}
	1.89 g·kg ⁻¹	509.42 ± 56.80 ^{**}	5.78 ± 1.70 ^{**}	48.06 ± 17.60
	3.78 g·kg ⁻¹	478.59 ± 39.98 [*]	4.56 ± 1.16 ^{**}	59.36 ± 15.37

3.4 左归丸对 GDM 模型离乳子鼠胰腺组织氧化应激水平的影响

如表 4 所示, 与对照组比较, 模型组离乳子鼠 SOD、CAT 活性降低, MDA 水平显著升高 ($P < 0.05$)。与模型组比较, 左归丸低剂量组 SOD、CAT 活性升高 ($P < 0.05$); 左归丸中剂量组 MDA 水平降低 ($P < 0.05$), SOD 活性升高 ($P < 0.05$); 左归丸高剂量组 SOD、CAT 活性升高, MDA 水平降低 ($P < 0.05$)。

3.5 左归丸对 GDM 模型离乳子鼠胰腺病理结构的影响

如图 1 所示, 对照组离乳子鼠胰腺组织形状规则, 细胞形态正常, 小叶间质内未见变性、坏死以及炎性细胞浸润; 模型组离乳子鼠胰腺组织体积减小, 胰腺组织间质内血管周围可见少量淋巴细胞浸润; 左归丸各给药组离乳子鼠胰腺组织体积未减小, 胰腺组织内细胞无淋巴细胞浸润, 未见细胞坏死。

表 4 左归丸对 GDM 模型离乳子鼠胰腺组织氧化应激水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 4 Effect of Zuogui Pills on oxidative stress levels in weaned offsprings of GDM model pancreatic tissue ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量	SOD/(U·mg ⁻¹)	MDA/(nmol·mg ⁻¹)	CAT/(U·mg ⁻¹)
对照	—	622.52 ± 69.44	0.78 ± 0.34	49.54 ± 12.09
模型	—	562.61 ± 69.72	1.05 ± 0.53 [#]	35.81 ± 6.87
胰岛素	15.00 U·kg ⁻¹	594.89 ± 72.64	0.34 ± 0.17 ^{**}	36.58 ± 7.47
左归丸	0.95 g·kg ⁻¹	659.25 ± 53.96 [*]	0.74 ± 0.25	55.54 ± 13.61 [*]
	1.89 g·kg ⁻¹	672.83 ± 112.34 [*]	0.44 ± 0.46 [*]	43.06 ± 24.15
	3.78 g·kg ⁻¹	640.34 ± 53.74	0.55 ± 0.22 [*]	48.98 ± 4.57

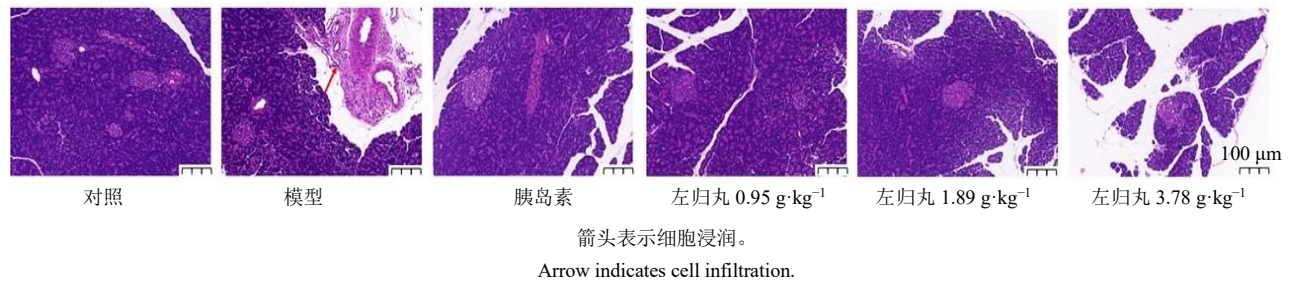


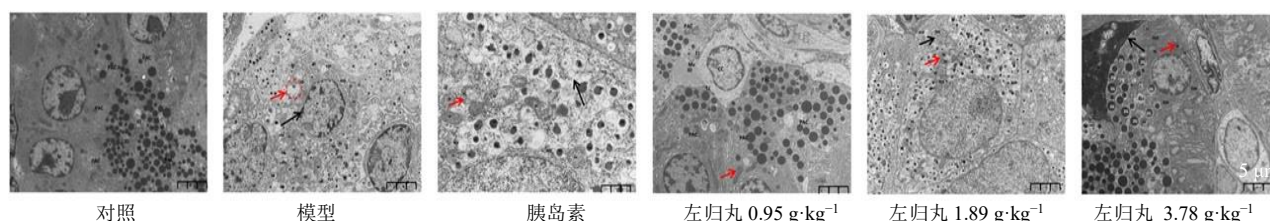
图 1 左归丸对 GDM 模型离乳子鼠胰腺病理结构的影响 (HE, $\times 100$)

Fig. 1 Effect of Zuogui Pills on pathological structure of pancreas in weaned offsprings of GDM model (HE, $\times 100$)

3.6 左归丸对 GDM 模型离乳子鼠胰腺 β 细胞超微结构的影响

如图 2 所示, 对照组子鼠胰腺 β 细胞腺泡膜边界清晰, 胞质未见明显水肿, 细胞核核膜双层结构清晰可见, 线粒体结构良好、膜较完整、粗面内质网数量丰富。模型组子鼠胰腺 β 细胞损伤严重, 细胞膜边界不清晰, 细胞核异染色质增加, 线粒体肿胀, 损伤严重者可见局部空泡变, 内质网严重扩张, 分泌颗粒数量减少, 结构松散。胰岛素

组子鼠胰腺 β 细胞细胞核染色质均匀、核膜完整, 线粒体轻度肿胀、粗面内质网大多轻度扩张、少量中度扩张、个别趋于空泡化。左归丸低剂量组腺泡细胞胞质均匀, 细胞器部分肿胀明显, 线粒体部分轻度肿胀、部分中度肿胀局部空泡化、粗面内质网结构扩张。左归丸中剂量组腺泡细胞轻微水肿, 线粒体轻度肿胀、嵴排列紊乱、粗面内质网轻度扩张。左归丸高剂量组线粒体轻微肿胀、基质分布略不均、粗面内质网轻度扩张。



红色箭头表示线粒体，黑色箭头表示核周间隙。

Red arrow indicates mitochondria, black arrow indicates the perinuclear space.

图 2 左归丸对 GDM 模型离乳子鼠胰腺 β 细胞超微结构的影响

Fig. 2 Effect of Zuogui Pills on ultrastructure of pancreatic β cells in weaned offsprings of GDM model

3.7 左归丸对 GDM 模型离乳子鼠胰腺组织 Pdx1、Ngn3、Mafa 蛋白的影响

如图 3 和表 5 所示，与对照组比较，模型组离乳子鼠胰腺组织中 Pdx1、Ngn3、Mafa 蛋白相对表达量显著降低 ($P < 0.01$)；与模型组比较，胰岛素组和左归中、高剂量组子代 Pdx1、Ngn3、Mafa 蛋白相对表达量显著升高 ($P < 0.01$)，左归丸低剂量组 Pdx1、Ngn3 蛋白相对表达量升高 ($P < 0.05$)。

4 讨论

Pdx1 对子鼠胰腺 β 细胞的发育以及功能的成熟有着持续性的调控作用^[1]；Ngn3 是能够使内分泌

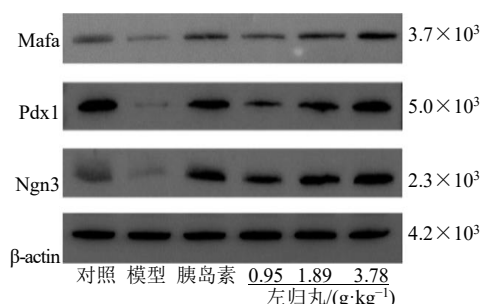


图 3 左归丸对 GDM 模型离乳子鼠胰腺组织 Pdx1、Ngn3、Mafa 蛋白的影响

Fig. 3 Effects of Zuogui Pills on Pdx1, Ngn3 and Mafa proteins in pancreatic tissue of GDM offsprings

表 5 左归丸对 GDM 模型离乳子鼠胰腺组织 Pdx1、Ngn3、Mafa 蛋白的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

Table 5 Effects of Zuogui Pills on Pdx1, Ngn3 and Mafa proteins in pancreatic tissue of GDM offsprings ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

组别	剂量	蛋白相对表达量		
		Pdx1	Ngn3	Mafa
对照	—	0.95 ± 0.04	1.07 ± 0.25	0.93 ± 0.06
模型	—	0.60 ± 0.08 ^{##}	0.46 ± 0.02 ^{##}	0.64 ± 0.11 ^{##}
胰岛素	15.00 U·kg ⁻¹	0.89 ± 0.01 ^{**}	0.93 ± 0.03 ^{**}	0.91 ± 0.11 ^{**}
左归丸	0.95 g·kg ⁻¹	0.72 ± 0.08 [*]	0.64 ± 0.08 [*]	0.70 ± 0.08
	1.89 g·kg ⁻¹	0.79 ± 0.08 ^{**}	0.74 ± 0.03 ^{**}	0.90 ± 0.12 ^{**}
	3.78 g·kg ⁻¹	0.86 ± 0.01 ^{**}	0.85 ± 0.05 ^{**}	0.91 ± 0.11 ^{**}

谱系细胞定向分化为胰腺 β 细胞的潜在启动子，Mafa 的表达与胰岛素分泌功能呈正相关^[16]，二者均可受到上游因子 Pdx1 的直接调控^[17-18]。Pdx1-Ngn3-Mafa (NPM 因子^[19]) 共同调控胰岛素基因的转录并促进胰岛的发育^[1]。NPM 因子缺失会导致胰腺 β 细胞功能异常^[20]，无法应对机体的胰岛素需求进而引起血糖升高和胰岛素抵抗^[21-22]。

活性过氧化损伤线粒体 DNA^[23-24]，使信号传导出现异常，引发胰岛素抵抗以及胰腺 β 细胞的功能受损^[25]。线粒体是内源性 ROS 生成的主要场所^[26-27]，氧化应激是高血糖环境介导子代胰岛素抵抗的慢性启动因素^[21,28]，过高的 ROS 会抑制胰岛素信号的传递，进而导致胰岛素抵抗^[29-30]。氧化应激水平升高

是胰岛素抵抗、糖尿病以及心血管疾病的共同发病基础^[31-32]。高糖环境下，胰腺 β 细胞中抗氧化酶的缺失将导致氧化应激增加^[1]，ROS 水平升高，出现细胞发育周期停滞以及 DNA 水平的下降。本研究结果显示，GDM 模型子代对胰岛素的敏感程度在离乳时已表现出不同，模型组子代的 NPM 因子在子代发育过程中受到了抑制，给予 GDM 模型左归丸治疗后其子代胰腺中 Ngn3、Mafa 的蛋白表达呈现不同程度的增加。GDM 模型子代在体质量及体长上也表现出异常，这是由于胚胎在宫内生长发育时会母体过多的脂类物质储存于体内，因而会出现体质量升高的情况，此外，细胞生长分化功能因受到抑制，所以导致其体长降低。

GDM 模型子鼠在离乳后胰腺 β 细胞功能趋于成熟^[1], 胰腺 β 细胞功能的成熟与 Pdx1 路径的改变有关, Pdx1 路径的改变导致未成熟胰腺 β 细胞的增加^[33]。而 NPM 因子的缺失会导致线粒体形态、功能以及周转受损, 影响胰岛素的释放。有研究表明, NPM 能改善胰岛素释放^[34]。宫内高血糖环境对子代胰腺 β 细胞超微结构能够产生不良的影响, 会引起胰岛素分泌的增加、胰腺 β 细胞中线粒体肿胀受损甚至数量减少, 进而使机体氧化应激增加, 引起胰腺的结构发育异常, 最终导致胰岛功能障碍^[23]。结果显示, 左归丸各给药组通过激活 Pdx1 路径的表达从而改善线粒体和内质网的损伤情况。母体中过多的葡萄糖会导致胚胎中 ROS 增加, 胰腺组织的氧化应激水平能在一定程度上反映胰腺 β 细胞的损伤情况。宫内高糖环境会刺激胰腺 β 细胞, 抑制线粒体的呼吸功能, 引起胰岛素的合成和分泌受损, 降低胰岛素的敏感性, 导致血糖的升高, 最终出现胰腺 β 细胞的衰竭^[23,35]。SOD 可以清除机体的自由基, 减少因自由基带来的细胞损伤; MDA 反映组织内抗氧化能力和 ROS 生成的程度; CAT 能清除机体内的过氧化氢; SOD、CAT 能中和体内的超氧阴离子自由基, 促进葡萄糖的利用, 降低血糖水平, 改善糖代谢。线粒体异常将会加重胰岛素抵抗。高水平的 ROS 会形成氧化应激-高血糖之间的恶性循环^[7]。模型组子鼠清除自由基以及过氧化氢的能力减弱, 且体内脂质过氧化氢物无法清除, 在细胞内出现蓄积, 导致氧化应激水平升高。本研究结果表明, GDM 模型子代胰腺及血清中 MDA 水平与对照组比较显著升高, 表明胰腺以及全身均处于氧化应激的状态, 且模型组子代 SOD、CAT 活性均降低, 其清除自由基的能力变弱, 细胞更容易受到氧化损伤, 导致氧化应激水平的失衡, 通过给予 GDM 模型大鼠左归丸干预后, 能改善其子代全身以及局部的氧化应激水平。

NPM 因子与维持胰腺 β 细胞的增殖、促进细胞活力、减少细胞氧化损伤、提高胰岛素含量、刺激胰岛素分泌功能等方面密切相关。氧化应激能影响 Pdx1 的表达、损害其核定位能力, 对胰腺 β 细胞的功能和存活产生抑制作用^[1]。高糖环境使子代氧化应激加剧, 最终造成子代器官发生过程中的关键细胞损伤^[7,21]。宫内血糖环境会导致子代机体抗氧化防御系统的活性被抑制, 同时体内氧化应激水平升高, 可能会导致机体胰岛素抵抗、血脂异常、胰腺

β 细胞功能障碍以及糖耐量受损^[21,36]。

健康和疾病的发育起源学说提示了早期胚胎生长环境的异常改变会形成代谢印迹, 导致其成年期心血管疾病的发生^[37]。宫内高糖环境会改变子一代印迹基因的表达, 并通过子一代生殖细胞传递给子二代^[38-39]。目前, 临床仅对 GDM 患者进行血糖调控, 而缺乏对患者子代胰腺发育的调控和保护。中药“多靶点”的治疗优势在改善 GDM 症状的同时, 对子代胰腺 β 细胞的保护也展现出良好的应用前景, 并逐渐受到临床的广泛关注^[40]。

本研究发现左归丸能够通过促进 Pdx1 路径, 保护子代胰岛免受氧化损伤, 以促进子代胰腺 β 细胞功能; 并能够降低脂质过氧化指标 MDA 水平, 提高抗氧化指标 SOD、CAT 活性。结果表明, 左归丸能降低 GDM 模型子鼠的氧化应激水平、抑制胰腺 β 细胞的凋亡、改善胰岛素抵抗以及弱化子代 II 型糖尿病的易感性。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Baumel-Alterzon S, Scott D K. Regulation of Pdx1 by oxidative stress and Nrf2 in pancreatic beta-cells [J]. *Front Endocrinol*, 2022, 13: 1011187.
- [2] Öztürk H N O, Türker P F. Fetal programming: Could intrauterine life affect health status in adulthood? [J]. *Obstet Gynecol Sci*, 2021, 64(6): 473-483.
- [3] Argav-Frenkel L, Rosenzweig T. Redox balance in type 2 diabetes: Therapeutic potential and the challenge of antioxidant-based therapy [J]. *Antioxidants*, 2023, 12(5): 994.
- [4] Sthijns M M J P E, Rademakers T, Oosterveer J, *et al*. The response of three-dimensional pancreatic alpha and beta cell co-cultures to oxidative stress [J]. *PLoS One*, 2022, 17(3): e0257578.
- [5] Anastasiou I A, Eleftheriadou I, Tentolouris A, *et al*. The effect of oxidative stress and antioxidant therapies on pancreatic β -cell dysfunction: Results from *in vitro* and *in vivo* studies [J]. *Curr Med Chem*, 2021, 28(7): 1328-1346.
- [6] Das A K, Kalra S, Punyani H, *et al*. 'Oxidative stress'—A new target in the management of diabetes mellitus [J]. *J Family Med Prim Care*, 2023, 12(11): 2552-2557.
- [7] Yarbeygi H, Sathyapalan T, Atkin S L, *et al*. Molecular mechanisms linking oxidative stress and diabetes mellitus [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2020, 2020: 8609213.
- [8] Catalani E, Fanelli G, Silvestri F, *et al*. Nutraceutical strategy to counteract eye neurodegeneration and oxidative stress in *Drosophila melanogaster* fed with high-sugar diet [J]. *Antioxidants*, 2021, 10(8): 1197.
- [9] Rivera Nieves A M, Wauford B M, Fu A. Mitochondrial bioenergetics, metabolism, and beyond in pancreatic β -cells

- and diabetes [J]. *Front Mol Biosci*, 2024, 11: 1354199.
- [10] Lin H P, Suzuki K, Smith N, *et al*. A role and mechanism for redox sensing by SENP1 in β -cell responses to high fat feeding [J]. *Nat Commun*, 2024, 15(1): 334.
- [11] 任梅荣. 基于 Wnt/ β -catenin 通路探讨左归丸对先天肾虚仔鼠免疫功能的影响及其机制研究 [D]. 武汉: 湖北中医药大学, 2022.
- [12] 喻小明, 萧闵, 张小艳, 等. 左归丸母代干预对先天肾虚仔鼠脑皮质层发育及 ADAMTS-4、Reelin、Fyn 调控因子的影响 [J]. *时珍国医国药*, 2023, 34 (4): 853-856.
- [13] 任梅荣, 曹继刚, 桑红灵 等. 基于自身免疫调节因子探讨左归丸对先天肾虚仔鼠 T 细胞迁移的影响 [J]. *中华中医药杂志*, 2021, 36 (4): 1934-1939.
- [14] 江心泳. 妊娠糖尿病 SD 大鼠模型的构建 [D]. 福州: 福建中医药大学, 2021.
- [15] 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.
- [16] Zhang Y J, Fang X Y, Wei J H, *et al*. PDX-1: A promising therapeutic target to reverse diabetes [J]. *Biomolecules*, 2022, 12(12): 1785.
- [17] Honoré C, Rescan C, Hald J, *et al*. Revisiting the immunocytochemical detection of neurogenin 3 expression in mouse and man [J]. *Diabetes Obes Metab*, 2016, 18(Suppl 1): 10-22.
- [18] Zhu Y X, Liu Q, Zhou Z G, *et al*. PDX1, neurogenin-3, and MAFA: Critical transcription regulators for beta cell development and regeneration [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2017, 8(1): 240.
- [19] Zhou Q, Melton D A. Pancreas regeneration [J]. *Nature*, 2018, 557(7705): 351-358.
- [20] Al-Khawaga S, Memon B, Butler A E, *et al*. Pathways governing development of stem cell-derived pancreatic β cells: Lessons from embryogenesis [J]. *Biol Rev Camb Philos Soc*, 2018, 93(1): 364-389.
- [21] Eguchi N, Vaziri N D, Dafoe D C, *et al*. The role of oxidative stress in pancreatic β cell dysfunction in diabetes [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(4): 1509.
- [22] Yu X X, Xu C R. Understanding generation and regeneration of pancreatic β cells from a single-cell perspective [J]. *Development*, 2020, 147(7): dev179051.
- [23] Roma L P, Jonas J C. Nutrient metabolism, subcellular redox state, and oxidative stress in pancreatic islets and β -cells [J]. *J Mol Biol*, 2020, 432(5): 1461-1493.
- [24] Li J H, Inoue R, Togashi Y, *et al*. Imeglimin ameliorates β -cell apoptosis by modulating the endoplasmic reticulum homeostasis pathway [J]. *Diabetes*, 2022, 71(3): 424-439.
- [25] Rutter G A, Sidarala V, Kaufman B A, *et al*. Mitochondrial metabolism and dynamics in pancreatic beta cell glucose sensing [J]. *Biochem J*, 2023, 480(11): 773-789.
- [26] Ježek P, Jabůrek M, Plecítá-Hlavatá L. Contribution of oxidative stress and impaired biogenesis of pancreatic β -cells to type 2 diabetes [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2019, 31(10): 722-751.
- [27] Malko P, Ding R, Jiang L H. TRPM2 channel in oxidative stress-induced mitochondrial dysfunction and apoptotic cell death [J]. *Adv Protein Chem Struct Biol*, 2021, 125: 51-72.
- [28] Duan Y, Sun F Q, Li Y Q, *et al*. High glucose and high lipid induced mitochondrial dysfunction in JEG-3 cells through oxidative stress [J]. *Open Life Sci*, 2023, 18(1): 20220561.
- [29] Das A K, Hossain U, Ghosh S, *et al*. Amelioration of oxidative stress mediated inflammation and apoptosis in pancreatic islets by lupeol in STZ-induced hyperglycaemic mice [J]. *Life Sci*, 2022, 305: 120769.
- [30] Lee P, Chandel N S, Simon M C. Cellular adaptation to hypoxia through hypoxia inducible factors and beyond [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2020, 21(5): 268-283.
- [31] Zhang P J, Li T, Wu X Y, *et al*. Oxidative stress and diabetes: Antioxidative strategies [J]. *Front Med*, 2020, 14(5): 583-600.
- [32] Abnosi M H, Tabandeh M R, Mosavi-Aroo F. Betaine ameliorates high glucose-induced oxidative stress in granulosa cells [J]. *Reprod Fertil Dev*, 2023, 35(6): 395-405.
- [33] Gauthier B R, Wiederkehr A, Baquió M, *et al*. PDX1 deficiency causes mitochondrial dysfunction and defective insulin secretion through TFAM suppression [J]. *Cell Metab*, 2009, 10(2): 110-118.
- [34] Soleimanpour S A, Ferrari A M, Raum J C, *et al*. Diabetes susceptibility genes Pdx1 and Clec16a function in a pathway regulating mitophagy in β -cells [J]. *Diabetes*, 2015, 64(10): 3475-3484.
- [35] 陈奕任, 陈铭, 徐小惠, 等. MiR-124a 对 2 型糖尿病小鼠胰腺组织氧化应激损伤的影响 [J]. *中国药理学通报*, 2023, 39(8): 1493-1499.
- [36] 许玉荣, 盛璇, 郭晶晶, 等. 柚皮苷对高糖引起血管内皮损伤的保护作用与 CX3CL1 及抗氧化有关 [J]. *中国药理学通报*, 2016, 32(11): 1608-1613.
- [37] Pan L, Leng J H, Liu G S, *et al*. Pregnancy outcomes of Chinese women with gestational diabetes mellitus defined by the IADPSG's but not by the 1999 WHO's criteria [J]. *Clin Endocrinol*, 2015, 83(5): 684-693.
- [38] Gao C H, Sun X, Lu L, *et al*. Prevalence of gestational diabetes mellitus in mainland China: A systematic review and meta-analysis [J]. *J Diabetes Investig*, 2019, 10(1): 154-162.
- [39] Farrar D, Simmonds M, Bryant M, *et al*. Hyperglycaemia and risk of adverse perinatal outcomes: Systematic review and meta-analysis [J]. *BMJ*, 2016, 354: i4694.
- [40] 蔡少鹏, 郑丽莎, 蔡惠连, 等. 综合生物信息学、网络药理学、分子对接及实验验证探讨补肾健脾方改善 2 型糖尿病的作用机制 [J]. *广州中医药大学学报*, 2023, 40(10): 2597-2605.