

# 左归丸胚胎期干预对妊娠糖尿病孕鼠子代糖耐量的影响及机制<sup>△</sup>

杨敏\*, 吴玉洁, 孙凯男, 王永辉, 王超群, 许凯霞<sup>#</sup>(山西中医药大学基础医学院, 山西 晋中 030619)

中图分类号 R965 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2025)16-1981-07

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2025.16.05



**摘要** **目的** 探讨左归丸胚胎期干预对妊娠糖尿病孕鼠子代糖耐量的影响及机制。**方法** 将孕鼠随机分为空白组、模型组、阳性对照组(甘精胰岛素)和左归丸低、中、高剂量组(4.725、9.45、18.9 g/kg),除空白组外,其余各组孕鼠腹腔注射链脲佐菌素制备妊娠糖尿病模型,妊娠6~18 d时各组孕鼠灌胃相应药物和蒸馏水,每日1次。子鼠出生21 d时,记录体重和体长,通过糖耐量试验计算曲线下面积(AUC)。子鼠出生22 d时,检测空腹血糖(FBG)和空腹胰岛素(FINS)、胰岛素敏感指数(ISI)、稳态模型评估胰岛素抵抗指数(HOMA-IR),观察胰腺组织形态结构;运用串联质谱标签蛋白质组学分析胰腺组织的蛋白谱,并检测载脂蛋白A1(ApoA1)、溶质载体家族27成员1(Slc27a1)、激肽原1(Kng1)、钠钾ATP酶 $\alpha$ 2亚基(Atp1a2)、溶质载体家族7成员5(Slc7a5)、溶质载体家族3成员2(Slc3a2)、胆汁酸辅酶A:氨基酸N-酰基转移酶(Baat)、真核翻译起始因子2亚基 $\gamma$ (Eif2s3)蛋白及mRNA表达水平。**结果** 与模型组比较,阳性对照组和左归丸中剂量组子鼠体重、体长、ISI均显著增加/升高( $P<0.05$ ),糖耐量和胰岛细胞增生均明显改善,AUC、FBG、FINS、HOMA-IR均显著降低( $P<0.05$ )。左归丸胚胎期干预妊娠糖尿病孕鼠子代的潜在靶蛋白有88个,涉及过氧化物酶体增殖物激活受体(PPAR)、环磷酸鸟苷-蛋白激酶G(cGMP-PKG)、脂肪消化和吸收、胆汁分泌等多条通路,与糖代谢和胰岛素抵抗等关系密切的蛋白主要有ApoA1、Slc27a1、Kng1、Atp1a2、Slc7a5、Slc3a2、Baat、Eif2s3。其中,与模型组比较,左归丸中剂量组孕鼠子代胰腺组织中Slc7a5、Slc3a2、Baat蛋白及mRNA表达量均显著上调( $P<0.05$ ),ApoA1、Slc27a1、Kng1、Atp1a2、Eif2s3蛋白及mRNA表达量均显著下调( $P<0.05$ )。**结论** 左归丸胚胎期干预能改善GDM孕鼠子代的血糖水平和胰腺病理形态,其机制可能与上调PPAR、cGMP-PKG、脂肪消化和吸收、胆汁分泌等通路中的Slc7a5、Slc3a2、Baat表达,下调ApoA1、Slc27a1、Kng1、Atp1a2、Eif2s3表达有关。

**关键词** 左归丸;妊娠糖尿病;子代发育;TMT蛋白组学

## Effect and mechanism of embryonic intervention with Zuogui pill on the glucose tolerance in offsprings of pregnant rats with gestational diabetes mellitus

YANG Min, WU Yujie, SUN Kainan, WANG Yonghui, WANG Chaoqun, XU Kaixia (School of Basic Medicine, Shanxi University of Traditional Chinese Medicine, Shanxi Jinzhong 030619, China)

**ABSTRACT** **OBJECTIVE** To explore the effect and mechanism of embryonic intervention with Zuogui pill on the glucose tolerance in offsprings of pregnant rats with gestational diabetes mellitus. **METHODS** Pregnant rats were randomly divided into blank group, model group, positive control group (insulin glargine), Zuogui pill low-, medium- and high-dose groups (4.725, 9.45, 18.9 g/kg). In addition to the blank group, streptozotocin was injected intraperitoneally to establish a gestational diabetes mellitus rat model. From day 6 to day 18 of pregnancy, each group was given relevant medicine and distilled water intragastrically, once a day. After 21 days of birth, the body weight and body length of offsprings were recorded, and the area under the curve (AUC) was calculated through a glucose tolerance test. After 22 days of birth, fasting blood glucose (FBG), fasting insulin (FINS) levels in serum, insulin sensitivity index (ISI), and homeostasis model assessment of insulin resistance (HOMA-IR) were measured, and the morphological structure of pancreatic tissue was observed. The protein spectrum of pancreatic tissue was analyzed by tandem mass tag-based proteomics, and protein and mRNA expression levels of apolipoprotein A1 (ApoA1), solute carrier family 27 member 1 (Slc27a1), kininogen 1 (Kng1) and sodium/potassium-transporting ATPase subunit alpha 2 (Atp1a2), solute carrier family 7 member 5 (Slc7a5), solute carrier family 3 member 2 (Slc3a2), bile acid-coenzyme A: amino acid N-acyltransferase (Baat), eukaryotic translation initiation factor 2 subunit gamma (Eif2s3) were detected. **RESULTS** Compared with the model group, the body weight, body length and ISI of offsprings in the positive control group and Zuogui pill medium-dose group were significantly increased ( $P<0.05$ ), while the glucose tolerance and islet cell proliferation were significantly improved, and the AUC, FBG, FINS and HOMA-IR were significantly decreased ( $P<0.05$ ). There were 88 potential target proteins for the embryonic intervention of Zuogui pill in offsprings of pregnant rats with gestational diabetes mellitus, involving multiple pathways such as peroxisome proliferator-

<sup>△</sup> 基金项目 国家自然科学基金项目(No.82274378, No.822051-73);山西省教育厅科技创新项目(No.2022L348);山西省中医药管理局重点研究室项目(No.zyyys2024023)

\* 第一作者 硕士研究生。研究方向:经典方证实质和作用机制。  
E-mail: ymazyx@163.com

<sup>#</sup> 通信作者 副教授,博士。研究方向:经典方证实质和作用机制。  
E-mail: x785551564@hotmail.com

activated receptor (PPAR), cyclic guanosine monophosphate-protein kinase G (cGMP-PKG), fat digestion and absorption, and bile secretion. The proteins closely related to glucose metabolism and insulin resistance mainly included ApoA1, Slc27a1, Kng1, Atp1a2, Slc7a5, Slc3a2, Baat, and Eif2s3. Among them, compared with the model group, protein and mRNA expressions of Slc7a5, Slc3a2, and Baat in the pancreatic tissues of pregnant rat offsprings in the Zuogui pill medium-dose group were significantly up-regulated ( $P < 0.05$ ); protein and mRNA expressions of ApoA1, Slc27a1, Kng1, Atp1a2 and Eif2s3 were all significantly down-regulated ( $P < 0.05$ ). **CONCLUSIONS** The intervention of Zuogui pill in the embryonic period on offsprings of pregnant rats with gestational diabetes mellitus can improve their blood glucose levels and pancreatic pathological morphology. The mechanism may be related to the upregulation of the expressions of Slc7a5, Slc3a2, and Baat and the down-regulation of ApoA1, Slc27a1, Kng1, Atp1a2 and Eif2s3 expressions in the PPAR, cGMP-PKG, fat digestion and absorption, and bile secretion pathways.

**KEYWORDS** Zuogui pill; gestational diabetes mellitus; offspring development; TMT proteomics

妊娠糖尿病(gestational diabetes mellitus, GDM)是指在妊娠期间首次出现或被发现的糖耐量异常状态。我国GDM的患病率为14.8%,且在不同城市、地区之间存在差异<sup>[1]</sup>。研究发现,GDM不仅会增加孕妇及其子代的不良妊娠结局风险<sup>[2]</sup>,更会导致子代出现巨大儿、新生儿儿低血糖等并发症,以及儿童期肥胖、成年期糖代谢异常和心血管疾病等风险<sup>[3]</sup>。因此,开展胚胎期干预研究,阐明GDM子代发病机制并寻找疗效确切的治疗药物具有重要的临床价值和社会意义。

左归丸出自《景岳全书》,由熟地黄、山药、枸杞子、山茱萸、川牛膝、菟丝子、鹿角胶、龟甲胶8味药材组成,可壮水之主,培肾之元阴,于子代胚胎期补肾阴,有利于培补子代先天之精,进而有利于子代胚胎发育及其后期的生长发育<sup>[4]</sup>。课题组前期实验发现,左归丸不仅能改善母代GDM,还能减少GDM对子代的不良影响,有效预防糖耐量降低的发生<sup>[5]</sup>,但是其相关作用机制复杂,需进一步探讨。胰岛是糖尿病发病涉及的关键组织,其中分泌胰岛素的 $\beta$ 细胞数量减少是大多数糖尿病的共同特征。串联质谱标签(tandem mass tag, TMT)蛋白质组学技术的高灵敏度和高通量可为解析胰腺组织中微量蛋白的变化提供技术保障。因此,本研究通过构建GDM孕鼠模型,考察了左归丸胚胎期干预对GDM孕鼠子代的影响,并运用TMT蛋白质组学技术分析子代胰腺蛋白表达谱和相关蛋白表达情况,旨在阐明GDM调控的潜在靶蛋白及其可能的相关信号通路,为开发防治GDM代际传递的靶向药物提供参考。

## 1 材料

### 1.1 主要仪器

本研究所用主要仪器有GA-3型血糖仪(长沙三诺生物传感股份有限公司),DFC450C型显微镜(德国Leica公司),Vanquish Flex型高效液相色谱仪、Orbitrap Exploris 480型串联质谱仪(美国Thermo Fisher Scientific公司),EPS-300型数显式稳压稳流电泳仪、Tanon-3500型全自动数码凝胶图像分析系统(上海天能科技有限公司),V330型扫描仪[爱普生(中国)有限公司],TGL-16E台式高速冷冻离心机(山东博科控股集团有限公司),

JC-1086A型酶标检测仪(青岛聚创嘉恒分析仪器有限公司),Micro Drop型微量分光光度计(上海宝予德科学仪器有限公司),T100型基因扩增仪(美国Bio-Rad公司),ViiA7型荧光定量聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)仪(美国ABI公司)。

### 1.2 主要药品与试剂

熟地黄、山药、菟丝子(安国市荣华本草中药材有限公司,批号分别为G177230901、C014230901、C196220303),枸杞子、山茱萸(安国市祁澳中药饮片有限公司,批号分别为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(湖北爱敬堂制药有限公司,批号分别为200809、201008)均由山西仁达药业有限公司验收员中级中药师李天明鉴定为真品。

链脲佐菌素(批号2231116008)购自北京索莱宝科技有限公司;甘精胰岛素注射液(批号DBJL058,规格300单位:3 mL)购自赛诺菲(北京)制药有限公司;苏木精-伊红(hematoxylin-eosin, HE)染液(批号BP0211)购自湖北百奥斯生物科技有限公司;胰岛素酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂盒(批号20241187R)购自江苏酶免实业有限公司;Modified Trypsin蛋白酶(批号YJ-O-002,质谱级)购自引加(上海)生物医药科技有限公司;兔源 $\beta$ -肌动蛋白( $\beta$ -actin)抗体(货号81115-1-RR)购自武汉三鹰生物技术有限公司;兔源载脂蛋白A1(apolipoprotein A1, ApoA1)、溶质载体家族27成员1(solute carrier family 27 member 1, Slc27a1)、胆汁酸辅酶A:氨基酸N-酰基转移酶(bile acid-coenzyme A: amino acid N-acyltransferase, Baat)、真核翻译起始因子2亚基 $\gamma$ (eukaryotic translation initiation factor 2 subunit gamma, Eif2s3)抗体(货号分别为A24290、A12847、A7646、A6581)均购自武汉爱博泰克生物科技有限公司;兔源激肽原1(kininogen 1, Kng1)、溶质载体家族3成员2(solute carrier family 3 member 2, Slc3a2)、钠钾ATP酶 $\alpha$ 2亚基(sodium/potassium-transporting ATPase subunit alpha 2, Atp1a2)抗体(货号分别为DF6544、DF7468、DF4527)均购自江苏亲科生物研究中心有限公司;兔源溶质载体家族7成员5(so-lute

carrier family 7 member 5, Slc7a5) 抗体(批号 GB114871-100) 购自武汉赛维尔生物科技有限公司; 辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔 IgG 二抗(货号 074-1506) 购自美国 Kirkegaard & Perry Laboratories 公司; RNA 提取试剂盒、逆转录试剂盒(货号分别为 9109、RR037A) 均购自宝生物工程(大连)有限公司; 实时荧光定量 PCR 试剂盒(货号 11201ES08) 购自翌圣生物科技(上海)股份有限公司。

### 1.3 实验动物

选取 SPF 级健康生育期 SD 大鼠, 雌性 90 只, 雄性 45 只, 体重 220~260 g, 由北京维通利华实验动物技术有限公司湖北分公司提供, 实验动物生产许可证号为 SCXK(鄂)2022-0030。大鼠饲养于山西中医药大学屏障环境动物实验室, 室内温度(24±2)°C, 相对湿度 40%~60%, 12 h 光照/12 h 黑暗, 通风良好, 动物自由摄食、饮水。动物实验经山西中医药大学医学伦理和学术委员会批准(批件号为 2022DW125)。

## 2 方法

### 2.1 左归丸药液的制备

分别取熟地黄 24 g、山药 12 g、枸杞子 12 g、山茱萸 12 g、川牛膝 9 g、菟丝子 12 g、鹿角胶 12 g、龟甲胶 12 g, 除鹿角胶、龟甲胶外, 其余药材加 10 倍量水, 大火煮沸后小火熬煮 30 min, 分离药液; 在药渣中再加入 8 倍量水, 按上述方法重复煎煮, 再次分离药液; 将两次分离的药液混合, 蒸发浓缩后, 将鹿角胶、龟甲胶粉碎, 分次缓慢烱化后加入药液中, 分别制得低、中、高质量浓度(0.472 5、0.945、1.89 g/mL, 以生药量计)的左归丸药液, 室温冷却后置于 4 °C 冰箱保存备用。

### 2.2 分组、造模与给药

大鼠适应性饲养 7 d 后, 以血糖值 <6.1 mmol/L 作为纳入标准。合格大鼠按雌、雄比例 2:1 合笼过夜, 次日早晨, 雌鼠用阴栓或阴道涂片镜检见精子者定为受孕, 记为妊娠 0.5 d。按随机数字表法选取 6 只为空白组, 其余孕鼠于妊娠 3 d 禁食 12 h 后腹腔注射链脲佐菌素(33 mg/kg), 构建 GDM 模型; 妊娠 6 d 检测血糖, 根据《中国 2 型糖尿病防治指南(2020 版)》, 若空腹血糖(fasting blood glucose, FBG) ≥7 mmol/L 或随机血糖 ≥11.1 mmol/L, 视为 GDM 造模成功。将造模成功的孕鼠随机分为模型组、阳性对照组和左归丸低、中、高剂量组, 每组 6 只。妊娠 6~18 d 期间, 空白组、模型组孕鼠灌胃蒸馏水, 阳性对照组孕鼠根据血糖水平注射甘精胰岛素, 初始剂量 2 U/只, 次日以 1 U 为单位逐渐增加药量, 直至孕鼠血糖恢复正常(平均每只孕鼠给药量为 20 U/kg); 左归丸低、中、高剂量组孕鼠分别灌胃低、中、高质量浓度的左归丸药液, 给药剂量分别为 4.725、9.45、18.9 g/kg(中剂量为临床等效剂量换算而得), 每日给药 1 次。

### 2.3 子鼠存活数量、体重、体长及糖耐量检测

各组孕鼠分娩产子后记录子鼠数量, 子鼠由母鼠喂养。于子鼠出生后第 21 天, 统计其存活数量, 并禁食不禁水 14 h, 记录体重和体长; 然后, 各组取 12 只子鼠采用口服葡萄糖耐量试验(oral glucose tolerance test, OGTT), 向各组孕鼠所产子鼠灌胃 20% 葡萄糖溶液, 分别于灌胃前和灌胃后 30、60、120 min 通过鼠尾采血检测血糖水平, 并计算曲线下面积(area under the curve, AUC)。AUC=(灌胃前血糖值+2×30 min 血糖值+3×60 min 血糖值+2×120 min 血糖值)/4。

### 2.4 样本取材与处理

根据 OGTT 结果(糖耐量受损)和随机数字表法, 取每组孕鼠所产子鼠 12 只, 于出生后第 22 天禁食不禁水 8 h, 尾部采血用于检测 FBG; 眼眶取血, 室温静置 2 h 后分离上清液, 冻存于 -80 °C 冰箱中, 用于检测胰岛素相关指标。子鼠采血后断颈处死, 于冰面上剖开腹部取胰腺, 一部分浸泡于 4% 多聚甲醛溶液中固定, 用于组织形态观察; 另一部分冻存于 -80 °C 冰箱中, 用于 TMT 蛋白质组学分析和 Western blot、荧光定量 PCR 检测。

### 2.5 子鼠 FBG 及胰岛素相关指标检测

取“2.4”项下子鼠的尾部血, 使用血糖仪检测 FBG。取“2.4”项下子鼠眼眶血的血清上清液, 采用 ELISA 法检测空腹胰岛素(fasting insulin, FINS)水平, 并计算胰岛素敏感指数(insulin sensitivity index, ISI)和稳态模型评估胰岛素抵抗指数(homeostasis model assessment of insulin resistance, HOMA-IR)。ISI= $\ln \frac{1}{\text{FBG} \times \text{FINS}}$ , HOMA-IR=(FBG×FINS)/22.5。

### 2.6 子鼠胰腺组织形态观察

将“2.4”项下固定的胰腺组织用石蜡包埋、病理切片后进行 HE 染色, 在显微镜下观察其病理学变化并拍照。

### 2.7 子鼠胰腺组织的 TMT 蛋白质组学分析

采用 TMT 蛋白质组学分析胰腺组织的蛋白表达谱。分别从空白组、模型组、阳性对照组、左归丸中剂量组(根据后文结果确定为最优剂量组, 下文同)中随机选择 5 只子鼠的胰腺组织, 提取组织蛋白并用 BCA 法测定蛋白浓度后, 进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳分析并对质量达标的蛋白样品进行还原烷基化处理。每个样品取等量蛋白进行胰蛋白酶酶解, 酶解后的肽段用 TMT 试剂标记并进行等量混合, 通过 C<sub>18</sub> 反相柱对混合后的肽段进行预分离(紫外检测波长 214 nm, 流速 200 μL/min, 梯度洗脱 48 min), 随后进行液相色谱-串联质谱分析。质谱扫描范围 *m/z* 350~1 500, 采用数据依赖性采集模式, 循环时间 2 s, 一级质谱分辨率 60 000(最大注入时间 25 ms), 以高能碰撞解离为碎裂方式, 二级分辨率 15 000(最大注入时间 22 ms), 固定起始质量 *m/z* 110。质谱数据采用 Proteome Discoverer 软件进行解析, 筛选

标准为差异倍数 (fold change, FC)  $\geq 1.2$  或  $FC \leq 0.83$ , 且  $P < 0.05$ 。对差异表达蛋白进一步进行亚细胞定位、蛋白结构域分析、蛋白质-蛋白质相互作用 (protein-protein interaction, PPI) 网络构建及基因本体 (gene ontology, GO)、京都基因和基因组数据库 (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG) 富集分析。

## 2.8 子鼠胰腺组织中糖代谢相关蛋白表达检测

采用 Western blot 法检测。分别从空白组、模型组、阳性对照组、左归丸中剂量组中随机选取 3 只子鼠冷冻的胰腺组织, 提取组织蛋白并用 BCA 法测定未变性蛋白浓度, 然后进行蛋白变性、配胶、上样、电泳、转膜、封闭后, 加入 ApoA1、Slc27a1、Kng1、Atp1a2、Slc7a5、Slc3a2、Baat、Eif2s3、 $\beta$ -actin 一抗 (稀释比例分别为 1:3 000、1:100 000、1:100 000、1:100 000、1:100 000、1:100 000、1:100 000、1:100 000、1:100 000、1:100 000), 4 °C 孵育过夜; 隔日用 TBST 缓冲液洗涤 3 次 (每次 5 min) 后, 加入二抗 (稀释比例为 1:5 000), 室温孵育 30 min, 再次用 TBST 缓冲液洗涤 3 次 (每次 5 min), 最后用 ECL 法显色。使用 AlphaEaseFC 软件分析蛋白条带的灰度值, 以  $\beta$ -actin 为内参计算目的蛋白表达量。

## 2.9 子鼠胰腺组织中糖代谢相关基因表达检测

采用荧光定量 PCR 法检测。分别从空白组、模型组、阳性对照组、左归丸中剂量组中选取 3 只子鼠冷冻的胰腺组织, 提取总 RNA, 检测 RNA 浓度后, 逆转录合成 cDNA, 于 -20 °C 保存备用。以 cDNA 为模板进行基因表达定量。扩增条件为: 95 °C 预变性 5 min; 95 °C 变性 10 s, 60 °C 退火延伸 30 s, 共 40 个循环。以  $\beta$ -actin 为内参, 采用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法计算 ApoA1、Slc27a1、Kng1、Atp1a2、Slc7a5、Slc3a2、Baat、Eif2s3 mRNA 的表达量, 实验重复 3 次。引物序列及产物长度见表 1。

表 1 待测基因的引物序列与产物长度

基因	正向引物序列 (5'-3')		产物长度/bp
	正向引物序列 (5'-3')	反向引物序列 (5'-3')	
ApoA1	GCCACTGTGTATGTGGATGC	AACCCAGAGTGCCAGTTG	121
Slc27a1	GACGTGCTAGTGATGGACGA	CTCCGTGGTGGATACGTTCT	96
Kng1	ACTTCAAGGACGCTGAGGAA	GAAACACCCGACACAGAGGT	152
Atp1a2	GATGAGATCCTCAGGGACCA	CCCTCACAATGATGAGCTT	77
Slc7a5	CTGGGAGTCATGCTCTGGAT	AGGGTCATGACACACGTGAA	197
Slc3a2	GGCTCTGAGTCTTGGTTGC	GATCGCTGGTGGATCAAGT	197
Baat	CGAACCTTTGAGGAACTGC	CTGGGCTATGGCTTGCTTAG	141
Eif2s3	AAGATCGACCCCACTTTGTG	GGACCTTTGCTGTTCTTG	163
$\beta$ -actin	TCAGCAAGCAGGAGTACGATG	GTGTAACGACGCTCAGTAACA	88

## 2.10 统计学分析

数据采用 SPSS 25.0 软件进行统计分析。数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 方差齐性时, 多组间比较采用单因素方差分析, 组间两两比较采用 LSD-*t* 检验; 方差不齐时, 则采用 Dunnett's *T3* 检验。检验水准  $\alpha = 0.05$ 。

## 3 结果

### 3.1 左归丸胚胎期干预对 GDM 孕鼠子代出生、存活数量及体重、体长的影响

与空白组比较, 模型组子鼠出生及存活数量有所下降; 与模型组比较, 各给药组子鼠出生及存活数量有所增加。与空白组比较, 模型组子鼠体重、体长均显著减少 ( $P < 0.05$ ); 与模型组比较, 阳性对照组和左归丸低、中剂量组子鼠体重 (左归丸低剂量组除外) 和体长均显著增加 ( $P < 0.05$ )。结果见表 2。

表 2 左归丸胚胎期干预对 GDM 孕鼠子代出生存活数量及体重、体长的影响

组别	出生数量/只	检测时存活数量/只	体重/g	体长/cm
空白组	74	60	50.26 ± 1.70	12.51 ± 0.43
模型组	55	43	21.72 ± 1.23 <sup>a</sup>	8.67 ± 0.50 <sup>a</sup>
阳性对照组	66	54	41.97 ± 4.64 <sup>b</sup>	11.98 ± 0.73 <sup>b</sup>
左归丸低剂量组	57	45	22.21 ± 3.41	9.49 ± 0.87 <sup>b</sup>
左归丸中剂量组	63	51	35.25 ± 3.15 <sup>b</sup>	11.24 ± 0.68 <sup>b</sup>
左归丸高剂量组	59	46	21.25 ± 1.29	8.58 ± 0.41

a: 与空白组比较,  $P < 0.05$ ; b: 与模型组比较,  $P < 0.05$ 。

### 3.2 左归丸胚胎期干预对 GDM 孕鼠子代 OGTT 的影响

各组子鼠血糖均在灌胃葡萄糖溶液后 30 min 时最高, 随后逐渐恢复至正常范围。与空白组比较, 模型组子鼠灌胃前和灌胃后 30、60、120 min 的血糖均显著升高 ( $P < 0.05$ ); 与模型组比较, 各给药组子鼠灌胃前和灌胃后 30 min (左归丸高剂量组除外)、60 min (阳性对照组和左归丸低、高剂量组除外)、120 min 的血糖均显著降低 ( $P < 0.05$ )。与空白组比较, 模型组子鼠 AUC 显著升高 ( $P < 0.05$ ); 与模型组比较, 各给药组子鼠 AUC 均显著降低 ( $P < 0.05$ )。结果见表 3。

表 3 左归丸胚胎期干预对 GDM 孕鼠子代 OGTT 的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 12$ )

组别	检测时存活数量/只	血糖/(mmol/L)				AUC/(mmol·h/L)
		0 min	30 min	60 min	120 min	
空白组	60	4.17 ± 0.46	8.67 ± 1.28	5.90 ± 0.52	5.13 ± 0.60	742.65 ± 55.75
模型组	43	5.87 ± 0.65 <sup>a</sup>	10.34 ± 1.05 <sup>a</sup>	6.69 ± 0.93 <sup>a</sup>	5.93 ± 0.91 <sup>a</sup>	877.30 ± 69.10 <sup>a</sup>
阳性对照组	54	4.52 ± 0.52 <sup>b</sup>	7.88 ± 0.69 <sup>b</sup>	6.21 ± 1.03	5.31 ± 0.47 <sup>b</sup>	743.31 ± 54.41 <sup>b</sup>
左归丸低剂量组	45	4.94 ± 0.53 <sup>b</sup>	9.01 ± 0.78 <sup>b</sup>	6.78 ± 1.10	4.86 ± 0.72 <sup>b</sup>	796.00 ± 60.65 <sup>b</sup>
左归丸中剂量组	51	4.70 ± 0.28 <sup>b</sup>	8.90 ± 1.00 <sup>b</sup>	5.97 ± 0.77 <sup>b</sup>	4.70 ± 0.40 <sup>b</sup>	746.88 ± 46.10 <sup>b</sup>
左归丸高剂量组	46	4.78 ± 0.62 <sup>b</sup>	10.62 ± 1.32	6.62 ± 1.37	4.48 ± 0.68 <sup>b</sup>	822.50 ± 70.07 <sup>b</sup>

a: 与空白组比较,  $P < 0.05$ ; b: 与模型组比较,  $P < 0.05$ 。

### 3.3 左归丸胚胎期干预对 GDM 孕鼠子代 FBG 及胰岛素相关指标的影响

与空白组比较, 模型组子鼠 FBG、FINS 及 HOMA-IR 均显著升高 ( $P < 0.05$ ), ISI 显著降低 ( $P < 0.05$ ); 与模型组比较, 阳性对照组和左归丸各剂量组子鼠 FBG、FINS 及 HOMA-IR 均显著降低 ( $P < 0.05$ ), ISI 均显著升高 ( $P < 0.05$ )。结果见表 4。

表4 左归丸胚胎期干预对GDM孕鼠子代FBG及胰岛素相关指标的影响( $\bar{x} \pm s, n=12$ )

组别	FBG/(mmol/L)	FINS/(m/L)	ISI	HOMA-IR
空白组	4.30 ± 0.27	21.18 ± 0.87	-4.51 ± 0.08	4.05 ± 0.31
模型组	6.26 ± 0.43 <sup>a</sup>	26.02 ± 0.99 <sup>a</sup>	-5.09 ± 0.08 <sup>a</sup>	7.24 ± 0.60 <sup>a</sup>
阳性对照组	4.84 ± 0.65 <sup>b</sup>	23.39 ± 0.77 <sup>b</sup>	-4.72 ± 0.15 <sup>b</sup>	5.09 ± 0.72 <sup>b</sup>
左归丸低剂量组	5.43 ± 0.27 <sup>b</sup>	23.56 ± 0.96 <sup>b</sup>	-4.85 ± 0.07 <sup>b</sup>	5.69 ± 0.37 <sup>b</sup>
左归丸中剂量组	4.97 ± 0.27 <sup>b</sup>	23.19 ± 0.85 <sup>b</sup>	-4.74 ± 0.07 <sup>b</sup>	5.12 ± 0.39 <sup>b</sup>
左归丸高剂量组	4.99 ± 0.59 <sup>b</sup>	23.95 ± 0.98 <sup>b</sup>	-4.78 ± 0.11 <sup>b</sup>	5.31 ± 0.61 <sup>b</sup>

a: 与空白组比较,  $P < 0.05$ ; b: 与模型组比较,  $P < 0.05$ 。

### 3.4 左归丸胚胎期干预对GDM孕鼠子代胰腺组织形态的影响

空白组子鼠胰腺组织中胰岛数量较为丰富,胰岛细胞胞质呈嗜酸性、成团分布、形态正常;胰岛周围腺泡细胞胞质呈嗜碱性、数量丰富、排列规则,未见明显病理变化。模型组子鼠胰腺组织整体结构出现异常,组织胰岛细胞排列不规则,组织可见较多胰岛细胞增生,但组织腺泡上皮细胞结构饱满,酶原颗粒丰富,未见明显疏松水肿坏死等变性。各给药组子鼠胰腺组织中胰岛数量较为丰富,胰岛细胞胞质呈嗜酸性、成团分布、形态正常;胰岛周围腺泡细胞胞质呈嗜碱性、数量丰富、排列规则,亦未见明显病理变化。结果见图1。

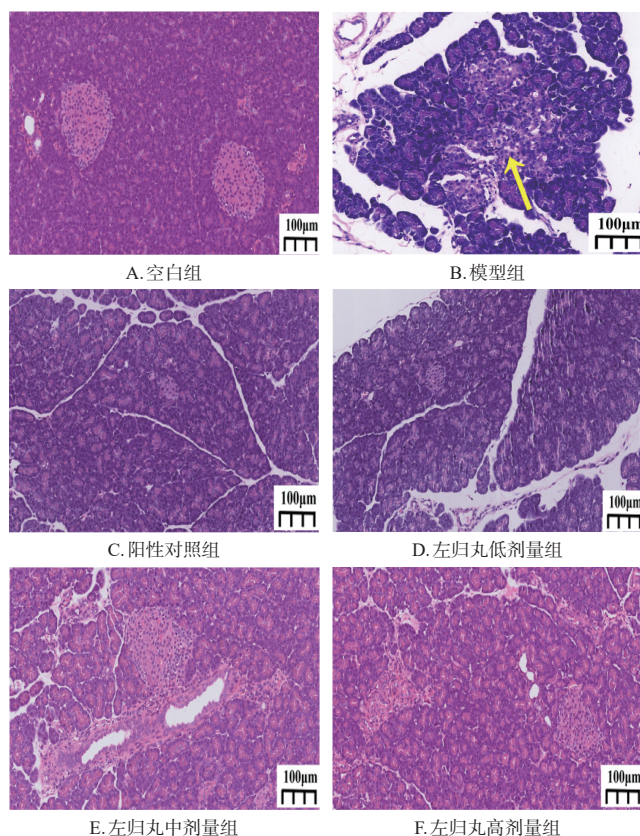


图1 左归丸胚胎期干预对GDM孕鼠子代胰腺组织形态影响的显微图(HE染色)

### 3.5 左归丸胚胎期干预对GDM孕鼠子代胰腺组织蛋白质组学的影响

TMT蛋白质组学分析共鉴定出肽段55 080条,对应蛋白34 345个,其中高可信度蛋白6 312个。所有肽段质量偏差 $\leq 10$  ppm,符合质谱鉴定精度要求。

#### 3.5.1 组间差异蛋白和潜在靶蛋白

模型组与空白组比较,共检出215个差异蛋白;左归丸中剂量组与模型组比较,共检出254个差异蛋白。215个差异蛋白和254个差异蛋白中有88个重叠蛋白,提示这88个蛋白可能为左归丸干预的潜在靶蛋白,其中46个蛋白表达上调,42个蛋白表达下调。

#### 3.5.2 潜在靶蛋白的亚细胞定位、蛋白结构域及PPI网络

亚细胞定位结果显示,潜在靶蛋白主要分布于细胞质(47.73%)中,其次为线粒体(11.36%)、内质网(10.23%)、细胞外区域(10.23%)等。蛋白结构域分析结果显示,潜在靶蛋白主要富集于Hydrolase、GTP\_EFTU、V-set等结构域。PPI网络图(图略)显示,88个潜在靶蛋白虽相对分散,但其中Slc7a5和Slc3a2联系最为密切,提示二者可能形成功能复合物。

#### 3.5.3 潜在靶蛋白的GO、KEGG富集

GO功能富集分析结果(图2)显示,潜在靶蛋白共涉及20个条目,其中分子功能主要集中在芳香族氨基酸跨膜转运蛋白活性、有机阴离子跨膜转运蛋白活性、羧酸跨膜转运蛋白活性和有机酸跨膜转运蛋白活性;生物过程主要集中在芳香族氨基酸运输、硫化物运输、丙氨酸运输等;细胞组分则主要集中在基底外侧质膜。KEGG通路富集分析结果显示,潜在靶蛋白涉及的通路包括过氧化物酶体增殖物激活受体(peroxisome proliferator-activated receptor, PPAR)、环磷酸鸟苷-蛋白激酶G(cyclic guanosine monophosphate-protein kinase G, cGMP-PKG)信号通路、补体和凝血级联反应、精氨酸和脯氨酸代谢等。结果见图3。通过查阅文献<sup>[6-16]</sup>发现,其中与糖代谢和胰岛素抵抗等关系密切的蛋白主要有ApoA1、Slc27a1、Kng1、Atp1a2、Slc7a5、Slc3a2、Baat、Eif2s3等。

### 3.6 子鼠胰腺组织中糖代谢相关蛋白表达量

与空白组比较,模型组孕鼠子代胰腺组织中Slc7a5、Slc3a2、Baat蛋白表达量均显著降低( $P < 0.05$ ),ApoA1、Slc27a1、Kng1、Atp1a2、Eif2s3蛋白表达量均显著升高( $P < 0.05$ )。与模型组比较,左归丸中剂量组孕鼠子代胰腺组织中Slc7a5、Slc3a2、Baat蛋白表达量显著升高( $P < 0.05$ ),ApoA1、Slc27a1、Kng1、Atp1a2、Eif2s3蛋白表达量均显著降低( $P < 0.05$ );阳性对照组子鼠胰腺组织中Slc7a5、Baat蛋白表达量均显著升高( $P < 0.05$ ),Slc3a2、Eif2s3蛋白表达量均显著降低( $P < 0.05$ )。结果见图4和表5。

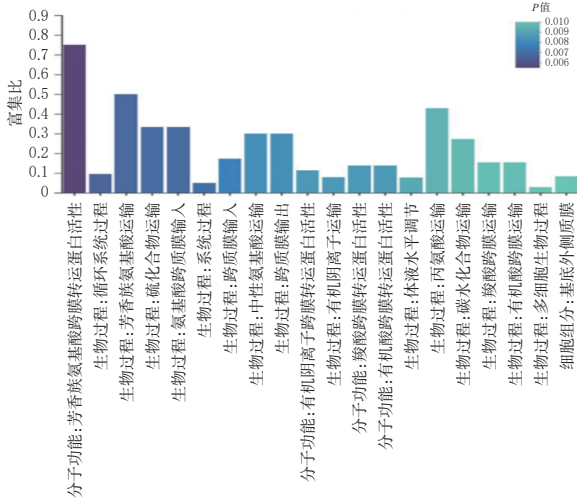


图2 左归丸胚胎期干预GDM孕鼠子代的潜在靶蛋白GO功能富集图

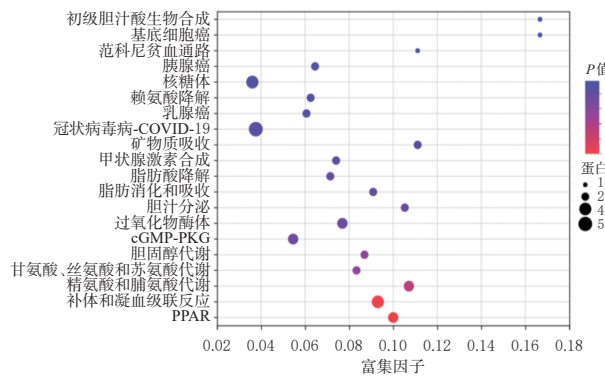
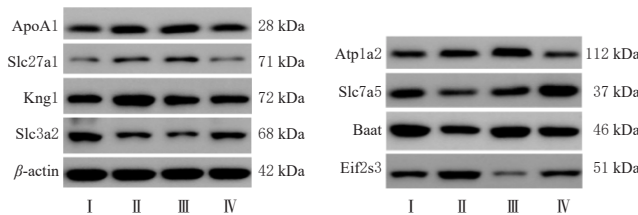


图3 左归丸胚胎期干预GDM孕鼠子代的潜在靶蛋白KEGG通路富集图



I:空白组; II:模型组; III:阳性对照组; IV:左归丸中剂量组。

图4 各组孕鼠子代胰腺组织中糖代谢相关蛋白表达的电泳图

表5 各组孕鼠子代胰腺组织中糖代谢相关蛋白表达量比较( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

组别	ApoA1	Slc27a1	Kng1	Atp1a2	Slc7a5	Slc3a2	Baat	Eif2s3
空白组	0.40 ± 0.04	0.13 ± 0.02	0.45 ± 0.09	0.42 ± 0.03	0.60 ± 0.05	0.63 ± 0.03	0.89 ± 0.03	0.37 ± 0.03
模型组	0.59 ± 0.02 <sup>a</sup>	0.31 ± 0.01 <sup>a</sup>	0.73 ± 0.06 <sup>a</sup>	0.54 ± 0.07 <sup>a</sup>	0.40 ± 0.07 <sup>a</sup>	0.38 ± 0.06 <sup>a</sup>	0.56 ± 0.05 <sup>a</sup>	0.59 ± 0.02 <sup>a</sup>
阳性对照组	0.64 ± 0.06	0.35 ± 0.07	0.61 ± 0.03	0.66 ± 0.03	0.52 ± 0.03 <sup>b</sup>	0.25 ± 0.06 <sup>a</sup>	0.79 ± 0.02 <sup>b</sup>	0.21 ± 0.03 <sup>b</sup>
左归丸中剂量组	0.49 ± 0.07 <sup>a</sup>	0.15 ± 0.01 <sup>a</sup>	0.50 ± 0.08 <sup>a</sup>	0.38 ± 0.04 <sup>a</sup>	0.75 ± 0.04 <sup>a</sup>	0.48 ± 0.01 <sup>a</sup>	0.70 ± 0.02 <sup>b</sup>	0.47 ± 0.03 <sup>b</sup>

a:与空白组比较,  $P < 0.05$ ; b:与模型组比较,  $P < 0.05$ 。

表6 各组孕鼠子代胰腺组织中糖代谢相关基因表达量比较( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

组别	ApoA1 mRNA	Slc27a1 mRNA	Kng1 mRNA	Atp1a2 mRNA	Slc7a5 mRNA	Slc3a2 mRNA	Baat mRNA	Eif2s3 mRNA
空白组	20.37 ± 0.17	19.82 ± 0.10	16.79 ± 0.05	22.40 ± 0.09	22.10 ± 0.63	16.29 ± 0.20	20.90 ± 0.02	19.63 ± 0.07
模型组	21.30 ± 0.11 <sup>a</sup>	20.72 ± 0.23 <sup>a</sup>	18.33 ± 0.19 <sup>a</sup>	23.60 ± 0.06 <sup>a</sup>	21.58 ± 0.26 <sup>a</sup>	15.79 ± 0.06 <sup>a</sup>	19.85 ± 0.05 <sup>a</sup>	20.48 ± 0.02 <sup>a</sup>
阳性对照组	20.97 ± 0.39	20.77 ± 0.07	17.80 ± 0.27	23.70 ± 0.03	22.02 ± 0.74	15.29 ± 0.16 <sup>a</sup>	20.36 ± 0.05 <sup>b</sup>	19.18 ± 0.06 <sup>b</sup>
左归丸中剂量组	20.32 ± 0.07 <sup>a</sup>	19.94 ± 0.12 <sup>b</sup>	17.42 ± 0.02 <sup>b</sup>	21.66 ± 0.03 <sup>b</sup>	22.75 ± 0.03 <sup>b</sup>	16.08 ± 0.05 <sup>b</sup>	20.12 ± 0.03 <sup>b</sup>	20.21 ± 0.05 <sup>b</sup>

a:与空白组比较,  $P < 0.05$ ; b:与模型组比较,  $P < 0.05$ 。

### 3.7 子鼠胰腺组织中糖代谢相关基因表达量

与空白组比较,模型组孕鼠子代胰腺组织中Slc7a5、Slc3a2、Baat mRNA表达量均显著降低( $P < 0.05$ ), ApoA1、Slc27a1、Kng1、Atp1a2、Eif2s3 mRNA表达量均显著升高( $P < 0.05$ )。与模型组比较,左归丸中剂量组孕鼠子代胰腺组织中Slc7a5、Slc3a2、Baat mRNA表达量显著升高( $P < 0.05$ ), ApoA1、Slc27a1、Kng1、Atp1a2、Eif2s3 mRNA表达量均显著降低( $P < 0.05$ );阳性对照组孕鼠子代胰腺组织中Baat mRNA表达量显著升高( $P < 0.05$ ), Slc3a2、Eif2s3 mRNA表达量均显著降低( $P < 0.05$ )。结果见表6。

## 4 讨论

本研究发现,左归丸胚胎期给药不仅能显著降低GDM孕鼠子代的血糖水平,还可有效改善子代胰岛细胞的形态和功能。进一步通过TMT蛋白质组学技术筛选出88个左归丸胚胎期干预GDM孕鼠子代的潜在靶蛋白,其富集GO功能包括芳香族氨基酸跨膜转运蛋白活性、循环系统过程、芳香族氨基酸运输等,富集的和糖代谢相关的KEGG通路包括PPAR、cGMP-PKG、精氨酸和脯氨酸代谢、胆汁分泌、脂肪消化和吸收等。

PPAR信号通路可能与血脂异常、糖尿病的发生有关。PPAR可调节脂质和葡萄糖代谢,当脂肪细胞内脂质过度饱和时,易诱发胰岛素抵抗<sup>[6]</sup>。ApoA1、Slc27a1存在于PPAR信号通路(即脂肪消化和吸收通路)。其中,ApoA1参与胆固醇代谢,有研究发现,糖尿病大鼠骨骼肌中ApoA1蛋白呈高表达<sup>[7]</sup>;Slc27a1与葡萄糖耐受不良、胰岛素过多、心肌梗死和肥胖等疾病的发生息息相关<sup>[8]</sup>。本研究结果显示,与模型组比较,左归丸中剂量组孕鼠子代胰腺组织中ApoA1、Slc27a1的蛋白和mRNA表达均显著下调,说明左归丸胚胎期干预能改善GDM孕鼠子代的胰岛素抵抗。

cGMP-PKG信号通路是糖尿病患者与正常对照组差异蛋白的主要富集通路,其关键蛋白Kng1和Atp1a2在代谢调控中发挥重要作用<sup>[9]</sup>。有研究发现,阴虚热综合征大鼠血清中Kng1呈高表达,表现出明显的

毛发干燥、烦躁不安、体重减轻等症状<sup>[10]</sup>；Atp1a2可通过调节细胞内钙离子浓度，影响细胞内的代谢过程，进而对糖代谢产生影响<sup>[11]</sup>。本研究结果显示，与模型组比较，左归丸中剂量组孕鼠子代胰腺组织中Kng1、Atp1a2的蛋白和mRNA表达均显著下调，说明左归丸胚胎期干预能改善GDM孕鼠子代的体重减轻及异常糖代谢等症状。

Slc7a5和Slc3a2在胰岛素抵抗、糖尿病和肥胖的发生和发展中具有重要作用<sup>[12]</sup>。Slc7a5和Slc3a2介导氨基酸转运与糖代谢，充足的氨基酸供应可以促进脂肪酸氧化，减少游离脂肪酸堆积，改善胰岛素抵抗；而氨基酸缺乏可能引发细胞内能量应激，干扰胰岛素信号传导<sup>[13]</sup>。本研究结果显示，与模型组比较，左归丸中剂量组孕鼠子代胰腺组织中Slc7a5、Slc3a2的蛋白和mRNA表达均显著上调，说明左归丸胚胎期干预能改善GDM孕鼠子代的胰岛素抵抗。

糖尿病患者肠道微生物种群变化影响葡萄糖代谢和胰岛素抵抗的机制包括炎症和胆汁酸产生<sup>[14]</sup>。Baat属于胆汁分泌等通路，可催化胆汁酸酰胺化，当Baat缺失时会导致葡萄糖耐受不良<sup>[15]</sup>。本研究结果显示，与模型组比较，左归丸中剂量组孕鼠子代胰腺组织中Baat的蛋白和mRNA表达显著上调，说明左归丸胚胎期干预能改善GDM孕鼠子代的糖耐量受损。

Eif2s3作为调控蛋白质合成的关键因子，在下丘脑-垂体轴发育及葡萄糖代谢平衡中发挥重要作用<sup>[16]</sup>。本研究结果显示，与模型组比较，左归丸中剂量组孕鼠子代胰腺组织中Eif2s3的蛋白和mRNA表达显著下调，说明左归丸胚胎期干预能改善GDM孕鼠子代的葡萄糖代谢调节功能。

综上所述，左归丸胚胎期干预能改善GDM孕鼠子代的血糖水平和胰腺病理形态等，上调Slc7a5、Slc3a2、Baat的表达，下调ApoA1、Slc27a1、Kng1、Atp1a2、Eif2s3的表达，涉及PPAR、cGMP-PKG、脂肪消化和吸收、胆汁分泌等多条通路。尽管本研究未设置假手术对照，但为后续基因编辑验证及远期代谢追踪奠定了基础。本研究为GDM子代代代谢异常的早期干预提供了新思路。

## 参考文献

[1] HAN W L, WANG J, YAN X, et al. Butyrate and isobutyrate: a new perspective on nutrition prevention of gestational diabetes mellitus[J]. *Nutr Diabetes*, 2024, 14(1):24.

[2] LOWE W L. Genetics and epigenetics: implications for the life course of gestational diabetes[J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(7):6047.

[3] ASSOCIATION A D. 2. classification and diagnosis of diabetes: standards of medical care in diabetes: 2020[J].

*Diabetes Care*, 2020, 43(Suppl. 1):S14-S31.

[4] 陈好远,沈灿,张泽权,等. 左归丸干预子代先天精亏进展及其“补益先天”探讨[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2024, 30(17):51-59.

[5] 谭贝西,赵乐,冯忆,等. 左归丸对GDM模型母鼠子鼠胰岛功能的影响[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2023, 29(17):1-8.

[6] SCHEGGI S, PINNA G, BRACCAGNI G, et al. PPAR $\alpha$  signaling: a candidate target in psychiatric disorder management[J]. *Biomolecules*, 2022, 12(5):723.

[7] SHI L, WANG J K, HE C H, et al. Identifying potential therapeutic targets of mulberry leaf extract for the treatment of type 2 diabetes: a TMT-based quantitative proteomic analysis[J]. *BMC Complement Med Ther*, 2023, 23(1):308.

[8] Rat Genome Database. Slc27a1: solute carrier family 27 member 1[EB/OL]. [2025-01-25]. <https://rgd.mcw.edu/rgdweb/report/gene/main.html?id=620927>.

[9] ZHANG X T, MAO Z Y, JIN X Y, et al. Identification of a tsRNA contributor to impaired diabetic wound healing via high glucose-induced endothelial dysfunction[J]. *Diabetes Metab Syndr Obes*, 2023, 16:285-298.

[10] DOMÍNGUEZ-LAZCANO D G, SIMÓN-LARA I, MORALES-ROMERO J, et al. Alpha-fetoprotein, glypican-3, and kininogen-1 as biomarkers for the diagnosis of hepatocellular carcinoma[J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2024, 17(11):383-395.

[11] LINDINGER M I, CAIRNS S P. Regulation of muscle potassium: exercise performance, fatigue and health implications[J]. *Eur J Appl Physiol*, 2021, 121(3):721-748.

[12] KAHLHOFER J, TEIS D. The human LAT1-4F2hc (Atp1a2-Slc3a2) transporter complex: physiological and pathophysiological implications[J]. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, 2023, 133(5):459-472.

[13] RICHIE J P, SINHA R, DONG Z, et al. Dietary methionine and total sulfur amino acid restriction in healthy adults[J]. *J Nutr Health Aging*, 2023, 27(2):111-123.

[14] BARLOW G M, MATHUR R. Type 2 diabetes and the microbiome[J]. *J Endocr Soc*, 2022, 7(2):bvac184.

[15] ALREHAILI B D, LEE M K, TAKAHASHI S, et al. Bile acid conjugation deficiency causes hypercholanemia, hyperphagia, islet dysfunction, and gut dysbiosis in mice[J]. *Hepatol Commun*, 2022, 6(10):2765-2780.

[16] GREGORY L C, FERREIRA C B, YOUNG-BAIRD S K, et al. Impaired Eif2s3 function associated with a novel phenotype of X-linked hypopituitarism with glucose dysregulation[J]. *EBioMedicine*, 2019, 42:470-480.

(收稿日期:2025-03-11 修回日期:2025-07-11)

(编辑:邹丽娟)