DOI:10.13193/j.issn.1673-7717.2025.09.032

左归丸调节 JAK2－STAT3 信号通路在产前应激子鼠视网膜发育中的作用

喻小明[1,2],田文静[1],江晓翠[2,3],邹悦[4],陈思易[5],张玮珩[1],萧闵[2,3]
(1.湖北中医药大学基础医学院,湖北 武汉 430065;2.湖北中医药大学时珍实验室,湖北 武汉 430065;
3.湖北中医药大学实验动物中心,湖北 武汉 430065;4.湖北中医药大学体育健康学院,湖北 武汉 430065;
5.湖北中医药大学中医学院,湖北 武汉 430065)

摘要:目的 探讨左归丸调节 Janus 蛋白酪氨酸激酶 2(Janus kinase 2,JAK2)/信号转导子和转录激活子 3(signal transducer and activator of trans cription 3,STAT3)信号通路在产前应激(prenatal stress,PS)子鼠视网膜发育中的作用。方法 制备 SD 孕鼠 32 只,随机分为空白对照组、模型组、左归丸组(18.9 g·kg^{-1})、维生素 E 组(1.44 mg·kg^{-1}),每组 8 只;除空白对照组以外,其余各组均采用慢性不可预测轻度应激法(chronic unpredictable mild stress,CUMS)建立 PS 孕鼠模型。通过行为学测试评估 PS 孕鼠模型;酶联免疫吸附实验(enzyme linked immunosorbent assay,ELISA)检测血清糖皮质激素(glucocorticoids,GC)和血清甲状腺素 4(thyroxine 4,T4)含量;苏木精－伊红(hematoxylin eosin,HE)染色观察胚胎 18 d(E18)、出生当天(P0)、出生 21 d(P21)子鼠视网膜形态变化;免疫荧光检测子鼠视网膜表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor,EGFR)蛋白表达;蛋白免疫印迹法(Western blot,WB)检测子鼠视网膜组织 EGFR、JAK2/STAT3 通路相关蛋白表达;结果 与空白对照组比较,模型组孕鼠糖水偏爱度、运动探索能力、血清 T4 含量均降低,GC 水平升高($P<0.05$);与模型组比较,左归丸组与维生素 E 组孕鼠糖水偏爱度、运动探索能力、T4 水平升高,GC 水平降低($P<0.05$);模型组子鼠在 E18 和 P0 视网膜分化滞后,P21 视网膜病理损伤严重,EGFR 阳性信号减弱,视网膜组织 p－EGFR/EGFR、p－JAK2/JAK2、p－STAT3/STAT3 蛋白表达水平均降低($P<0.05$);给予左归丸和维生素 E 干预后可不同程度改善上述异常指标。结论 母代干预左归丸可通过 JAK2－STAT3 改善 PS 对子代大鼠视网膜发育的影响。

关键词:左归丸;JAK2－STAT3 通路;产前应激;子代;视网膜发育
中图分类号:R289.5 **文献标志码**:A **文章编号**:1673-7717(2025)09-0173-08

基金项目:国家自然科学基金青年科学基金项目(82104704);湖北省自然科学基金项目(2023AFB990);湖北省中医药管理局基金项目(ZY2023F134)
作者简介:喻小明(1983－),男,湖北武汉人,副教授,硕士研究生导师,博士,研究方向:临床中药学及男科理论和临床。
通讯作者:萧闵(1981－),女(土家族),湖北恩施人,副研究员,硕士研究生导师,博士,研究方向:动物模型及中西医结合防治不孕不育。E-mail:ccxiao520@hbtcm.edu.cn。

[17] OBYRNE K J, BARR M P, GRAY S G. The role of epigenetics in resistance to Cisplatin chemotherapy in lung cancer[J]. Cancers (Basel), 2011, 3(1): 1426－1453.
[18] MORENO－BUENO G, PORTILLO F, CANO A. Transcriptional regulation of cell polarity in EMT and cancer[J]. Oncogene, 2008, 27(55): 6958－6969.
[19] LAM V K, SHARMA P, NGUYEN T, et al. Morphology, motility, and cytoskeletal architecture of breast cancer cells depend on keratin 19 and substrate[J]. Cytometry A, 2020, 97(11): 1145－1155.
[20] KAWAI T, YASUCHIKA K, ISHII T, et al. Keratin 19, a cancer stem cell marker in human hepatocellular carcinoma[J]. Clin Cancer Res, 2015, 21(13): 3081－3091.
[21] VANDER BORGHT S, KOMUTA M, LIBBRECHT L, et al. Expression of multidrug resistance－associated protein 1 in hepatocellular carcinoma is associated with a more aggressive tumour phenotype and may reflect a progenitor cell origin[J]. Liver Int, 2008, 28(10): 1370－1380.
[22] BAKIR B, CHIARELLA A M, PITARRESI J R, et al. EMT, MET, plasticity, and tumor metastasis[J]. Trends Cell Biol, 2020, 30(10): 764－776.
[23] WANG H, ZHANG G, ZHANG H, et al. Acquisition of epithelial－mesenchymal transition phenotype and cancer stem cell－like properties in cisplatin－resistant lung cancer cells through AKT/β－catenin/Snail signaling pathway[J]. Eur J Pharmacol, 2014, 723: 156－166.
[24] HASLEHURST A M, KOTI M, DHARSEE M, et al. EMT transcription factors snail and slug directly contribute to cisplatin resistance in ovarian cancer[J]. BMC Cancer, 2012, 12: 91.
[25] TAN J X, YOU Y, XU T B, et al. Par－4 downregulation confers cisplatin resistance in pancreatic cancer cells *via* PI3K/Akt pathway－dependent EMT[J]. Toxicol Lett, 2014, 224(1): 7－15.
[26] AMETLLER E, GARCÍA－RECIO S, COSTAMAGNA D, et al. Tumor promoting effects of CD95 signaling in chemoresistant cells[J]. Mol Cancer, 2010, 9: 161.
[27] KIM H, CHOI G H, NA D C, et al. Human hepatocellular carcinomas with "Stemness"－related marker expression: keratin 19 expression and a poor prognosis[J]. Hepatology, 2011, 54(5): 1707－1717.

Effect of Zuogui Pill(左归丸) on Regulation of JAK2 – STAT3 Signaling Pathway in Development of Retina in Prenatal Stressed Rats

YU Xiaoming[1,3], TIAN Wenjing[1], JIANG Xiaocui[2,3], ZOU Yue[4], CHEN Siyi[5], ZHANG Weiheng[1], XIAO Min[2,3]
(1. School of Basic Medicine, Hubei University of Chinese Medicine, Wuhan 430065, Hubei, China;
2. Shi Zhen Laboratory, Hubei University of Chinese Medicine, Wuhan 430065, Hubei, China;
3. Laboratory Animal Center, Hubei University of Chinese Medicine, Wuhan 430065, Hubei, China;
4. College of Physical Education and Health, Hubei University of Chinese Medicine, Wuhan 430065, Hubei, China;
5. College of Traditional Chinese Medicine, Hubei University of Chinese Medicine, Wuhan 430065, Hubei, China)

Abstract: *Objective* To investigate the role of Zuogui Pill(左归丸) in regulating Janus kinase 2(JAK2) signal transducer and activator of transcription 3(STAT3) in the retinal development of prenatal stress(PS) rats. *Methods* Thirty – two pregnant SD rats were randomly divided into blank control group, model group, Zuogui Pill group(18.9 g · kg $^{-1}$) and vitamin E group(1.44 mg · kg $^{-1}$), with 8 rats in each group. The other groups were established PS model by chronic unpredictable mild stress(CUMS). The PS model was evaluated by behavioral tests, and the serum levels of glucocorticoid(GC) and thyroxine – 4(T4) were measured by enzyme – linked immunosorbent assay(ELISA). The morphological changes of the retina of the hematoxylin – eosin(HE) staining at 18, 21 and 21 days after birth were observed, and the expression of epidermal growth factor receptor(EGFR) protein in the retina of the offsprings was detected by immunofluorescence. The protein expressions of EGFR and JAK2/STAT3 pathway were detected by Western blotting. *Results* Compared with those in the model group, the preference of sugar water, the ability of exercise exploration and the content of serum T4 were decreased, while the level of GC was increased in the model group($P < 0.05$). In Zuogui Pill group and vitamin E group, the glucose preference, exercise exploring ability and T4 levels of pregnant mice were increased, while the GC level was decreased($P < 0.05$) compared with those of the model group. The model group showed delayed retinal differentiation in E18 and P0, severe retinal pathological damage in P21 and weakened EGFR positive signal. The expression levels of p – EGFR/EGFR, p – JAK2/JAK2 and p – STAT3/STAT3 in the retina were significantly decreased($P < 0.05$). Zuogui Pill group and vitamin E group can improve the above abnormal indexes in different degrees. *Conclusion* The maternal intervention of Zuogui Pill can improve the effect of PS on the retinal development of offspring rats through JAK2 – STAT3.

Keywords: Zuogui Pill(左归丸); JAK2 – STAT3 signaling pathway; prenatal stress; offspring; retinal development

弱视是一种视觉剥夺或视觉信息处理功能障碍性疾病,主要表现为单眼或双眼最佳矫正视力低于正常[1]。在怀孕期间女性暴露异常会扰乱宫内环境,影响子代视网膜结构正常发育[2],与弱视的发生发展密切相关[3-4]。近年来,国内外关于产前应激(prenatal stress,PS)对子代中枢神经系统发育的影响主要集中在海马区、杏仁核和前额叶皮层[5-6],而被视为中枢神经系统延伸的视网膜的研究却不多见。调查显示,弱视在儿童中患病率为 1% ~6%,是儿童视力障碍的常见原因[7]。其治疗关键在于早发现早干预,如错过最佳治疗时机,不仅会造成患者的终生视力缺陷,还会导致严重的心理疾病。

中医古籍中无弱视病名,根据仅视物模糊的症状将其归为“视瞻昏渺”“小儿青盲”等范畴。主要责于先天肾精禀赋不足,导致肾阴精亏损,精气不能上注于目,目失濡养,神光发生无源,致目视不明。Janus 蛋白酪氨酸激酶 2(Janus kinase 2,JAK2)/信号转导子与转录激活子 3(signal transducer and activator of trans cription 3,STAT3)参与胚胎组织发育过程,可调控视网膜神经节细胞、Müller 细胞存活等[8]。课题组先前已证实左归丸通过填补母代肾精可防治 PS 致子鼠脑、睾丸、胸腺等发育障碍[9-10],然而左归丸能否通过调控 JAK2 – STAT3 信号通路挽救 PS 子代视网膜发育异常尚不明确。因此,本研究从动物水平拟探讨左归丸调控 JAK2/STAT3 信号通路对 PS 子鼠视网膜发育起保护作用,为临床防治弱视疾病提供一定的理论依据。

1 材料

1.1 实验动物

6 ~8 周龄 SD 雌性大鼠 32 只,雄性大鼠 10 只,体质量为(200 ±20) g,购自河南斯克贝斯生物科技股份有限公司,许可证编号 SCXK(豫)2020 – 0005。所有动物饲养于湖北中医药大学实验动物中心,室温(22 ±2)℃,相对湿度 50% ~70%。本实验通过湖北中医药大学实验动物伦理委员会批准(HUCMS30443041)。

1.2 主要药物与试剂

左归丸(仲景宛西制药股份有限公司,批准文号国药准字 Z41020696)、维生素 E 软胶囊(青岛双鲸药业股份有限公司,批准文号国药准字 H37023086);大鼠糖皮质激素(glucocorticoids,GC)、大鼠甲状腺素 4(thyroxine 4,T4)酶联免疫吸附法(enzyme linked immunosorbent assay,ELISA)试剂盒(上海江莱生物科技有限公司,货号 JL27073、JL12403);FAS 眼球固定液、STAT3 抗体、JAK2 抗体、p – JAK2 抗体、表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor,EGFR)抗体、磷酸化表皮生长

因子受体(p-EGFR)抗体、β-actin抗体、山羊抗兔辣根过氧化物酶(HRP)标记IgG二抗(武汉塞维尔生物科技有限公司,货号 G1109、GB12176、GB11325、GB114585、GB111504、GB115662、GB11001、GB23303);p-STAT3抗体(Bio-Swamp公司,货号RMAB49994)。

1.3 主要仪器

KZ-Ⅲ-FP低温型组织研磨仪(武汉赛维尔生物科技有限公司);CR21G型冷冻高速离心机(日立公司);DYCZ-24DH型电转仪、DYCZ-40D转膜仪(北京六一仪器厂);全自动化学发光分析仪(上海天能Tanon-5200);E100型荧光显微镜(NIKON公司);E100型显微镜(日本尼康公司);SCG-W2000化学发光成像仪(武汉赛维尔生物科技有限公司)。

2 方法

2.1 动物造模、分组及给药

大鼠适应性喂养7 d后,于晚间雌雄2∶1的比例进行自然交配。第2日清晨检查阴道涂片判断雌鼠是否怀孕,若精子阳性视为妊娠第0天,单笼、繁殖饲料喂养。使用随机数字法将32只孕鼠分为空白对照组,模型组,左归丸组,维生素E组,每组8只。造模方法参考文献[11-12],除空白对照组外,其他各组从受孕第1天起,采用仿地震平台、光电刺激箱、强迫游泳复合应激,复刻子代先天肾虚模型,直到孕鼠分娩。

①仿地震平台法:将孕鼠轻柔地放入地震平台模拟震动,振幅2~3 cm,频率2~5 Hz。

②光电刺激箱法:将孕鼠轻柔地放入光电刺激箱内,足底电击5 s,停止2 min,再次足底电击,重复3次电击实验。

③游泳法:将孕鼠轻柔地放入泳槽内,水深60 cm,水温(30±2)℃,进行1 h游泳运动(孕鼠在水面漂浮不动或尾巴支持于泳槽底部,用玻璃棒在孕鼠周围轻轻搅动,引导孕鼠进行游泳运动)。当孕鼠鼠鼻没入水面下2 s时,立即取出孕鼠并用吹风机吹干。受孕20 d时,采用糖水偏好实验、旷场实验及ELISA检测血清GC水平评估PS模型建立是否成功[13]。

造模11 d后,即受孕第12天开始相应药物给药。根据大鼠与人体间的面积换算公式[14],空白对照组、模型组均给予10 mL·kg^{-1}蒸馏水,左归丸组给予18.9 g·kg^{-1},左归丸维生素E组给予1.44 mg·kg^{-1}维生素E软胶囊。均以灌胃方式进行给药。

2.2 行为学分析

2.2.1 蔗糖偏好实验 实验开始前48 h,每笼孕鼠给予2瓶250 mL蔗糖水(1%)随意饮用,12 h后用一瓶等体积的纯净水替换。适应训练完成后禁水禁食1 d,次日清晨每只孕鼠给予1瓶250 mL蔗糖水和1瓶250 mL纯净水自由饮用,估量6 h内2瓶水的饮用量。为了避免孕鼠饮水习惯行为对实验结果造成影响,间隔1 h交换2瓶水位置。计算动物糖水偏爱度按公式计算:糖水偏爱度(%) = 糖水摄入量/(糖水摄入量+纯水摄入量)×100%。

2.2.2 旷场实验 旷场箱底部和四壁涂为黑色,底部用白色线条分割为5×5个方格,体积100 cm×100 cm×30 cm,中央3×3个方格设置为中心区域。将孕鼠放入旷场箱中心区域内,观察孕鼠10 min内的活动轨迹,记录孕鼠总路程、中心区域路程、总活动次数(总活动次数=水平穿越方格数+前肢离地垂直活动次数)。每测完一只孕鼠,立即用酒精湿巾擦拭箱底再继续测试下一只孕鼠,避免前一只孕鼠气味干扰下一只孕鼠的实验结果。

2.3 标本收集

2.3.1 收集血清 采用1%戊巴比妥钠(30 mg·kg^{-1})腹腔注射,待母鼠深度麻醉后,心脏抽取血液样本,静置2 h,以4000 r/min离心10 min吸取上清液。子鼠使用快速断头法安乐死取血,提取血清方式与母鼠一致。随后将血清储存在-80 ℃用于ELISA检测。

2.3.2 收集视网膜组织 将胚胎18 d(E18),出生当天(P0),出生21 d(P21)各组子鼠置于解剖显微镜下,用剪刀按压眼球边缘,将眼球暴露于外,迅速摘取眼球,用无菌冷PBS冲洗,左侧眼球放入FAS眼球固定液内,用于HE染色、免疫荧光检测。右侧眼球用组织剪去除其他组织,显微镊分离视网膜组织,储存在-80 ℃用于蛋白免疫印迹法(Western blot,WB)检测。

2.4 ELISA检测各组母鼠、P0子鼠血清GC、T4含量

取出冻存血清,严格按照ELISA试剂盒说明书步骤谨慎操作,检测GC、T4含量。

2.5 苏木精-伊红(hematoxylin-eosin,HE)染色观察E18、P0、P21各组子鼠视网膜组织形态变化

取出固定在FAS眼球固定液中视网膜组织,脱水石蜡包埋,切片,进行HE染色。使用光学显微镜观察各组子鼠视网膜各层结构改变。

2.6 免疫荧光检测P21各组子鼠视网膜组织中EGFR蛋白表达

取各组子鼠视网膜组织蜡块,切片,脱蜡,封闭,冲洗,抗原修复,加入EGFR抗体,4 ℃冰箱孵育过夜,次日冲洗,常温孵育二抗2 h,DAB显色,封片,荧光显微镜拍照,利用Image J图像分析EGFR荧光强度。

2.7 WB检测P21各组子鼠视网膜组织中JAK2、p-JAK2、STAT3、p-STAT3、EGFR、p-EGFR蛋白表达

取各组子鼠视网膜组织放入EP管中,提取蛋白,BCA法对分离的蛋白质进行定量。每个孔中加入20 μL样品,在80 V的初始电压和120 V的分离电压下分离蛋白质。PVDF转膜90~120 min,5%脱脂奶粉孵育2 h,TBST洗膜,随后分别加入一抗JAK2(1∶1000)、p-JAK2(1∶600)、STAT3(1∶1500)、p-STAT3(1∶2000)、EGFR(1∶1000)、p-EGFR(1∶500)、β-actin(1∶1000),4 ℃孵育过夜,TBST洗膜,加入HRP标记二抗(1∶10 000),37 ℃孵育2 h,洗膜,显影,使用Image J图像分析软件分析结果。

2.8 统计学方法

图片采用Image J软件分析,所有数据均使用Graphpad Prism 9.0软件分析和作图,各组间结果数据的比较采用单因素方差分析,并以 $\bar{x} \pm s$ 的形式表示。统计结果以$P<0.05$表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 左归丸对PS孕鼠行为学的影响

采用蔗糖偏爱评估孕鼠快感程度[15]。结果表明,模型组孕鼠蔗糖偏爱度较空白对照组明显降低($P<0.01$);与模型组比较,干预左归丸与维生素E后均明显提高孕鼠蔗糖偏爱度

表1 左归丸对PS孕鼠行为学试验的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	n	蔗糖偏爱度/(%)	总路程/(cm)	中心区域路程/(cm)	总活动次数/(次)
空白对照组	10	62.96 ± 4.31	1 404.09 ± 214.80	129.93 ± 31.34	70.10 ± 9.04
模型组	10	41.16 ± 3.88**	1 062.46 ± 194.30**	75.30 ± 27.90**	54.50 ± 11.42**
左归丸组	10	59.18 ± 2.49##	1 400.08 ± 186.20##	125.35 ± 25.44##	74.40 ± 12.13##
维生素E组	10	55.77 ± 4.37#	1 332.16 ± 195.00#	121.50 ± 37.46##	68.50 ± 8.58#

注：**与空白对照组比较，$P<0.01$；#与模型组比较，$P<0.05$；##与模型组比较，$P<0.01$。

表2 左归丸对母鼠、出生当天子鼠血清GC、T4的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	n	GC/(g/L)		T4/(pmol/L)	
		母鼠	子鼠	母鼠	子鼠
空白对照组	10	45.64 ± 4.01	39.65 ± 2.16	15.34 ± 0.75	5.02 ± 0.22
模型组	10	66.97 ± 5.45**	63.84 ± 2.95**	13.25 ± 1.01*	3.89 ± 0.28*
左归丸组	10	52.24 ± 3.34#	51.42 ± 1.26#	14.90 ± 1.00#	4.51 ± 0.28#
维生素E组	10	56.51 ± 5.27#	55.62 ± 3.05#	13.84 ± 1.16	4.15 ± 0.17

注：*与空白对照组比较，$P<0.05$；**与空白对照组比较，$P<0.01$；#与模型组比较，$P<0.05$。

($P<0.01$，$P<0.05$)。见表1。

采用旷场行为学评估孕鼠焦虑感[16]。模型组孕鼠活动总路程、中心区域路程及总活动次数较空白对照组均显著减少($P<0.01$)，提示PS孕鼠在新的环境运动和探索行为减少，处于焦虑状态。与模型组比较，经过干预左归丸和维生素E后，孕鼠总路程、中心区域路程及总活动次数均明显增加($P<0.01$，$P<0.05$)。见表1。

3.2 左归丸对各组母鼠、P0子鼠血清GC、T4水平的影响

ELISA结果显示，模型组母鼠、子鼠血清GC水平均显著高于空白对照组($P<0.01$)，T4含量均低于空白对照组($P<0.05$)；左归丸组与维生素E组母鼠、子鼠血清GC水平均明显低于模型组($P<0.05$)，T4含量高于模型组($P<0.05$)。见表2。

3.3 左归丸对各组E18、P0、P21子鼠视网膜形态的影响

E18空白对照组视网膜组织细胞形态正常，结构完整，外层神经细胞层细胞排列紧密、深染，内层神经细胞层细胞排列疏松、染色较浅；与空白对照组比较，模型组内、外层神经细胞层分界不清，细胞排列紊乱；与模型组比较，左归丸组与维生素E内、外层细胞排列整齐，分界清晰，结构相对完整。

P0空白对照组视网膜细胞形态正常，排列整齐，界限清晰，神经节细胞层(retinal ganglion cell，RGC)变薄，神经母细胞层(neuroblastoma layer，NBL)增厚；与空白对照组比较，模型组与维生素E组NBL显著变薄，RGC尚未分化为3～4层结构；与模型组比较，左归丸组视网膜形态有所改善，各层分界清晰，细胞排列尚规整，细胞数量基本正常。

P21空白对照组视网膜形态正常，各层完整，细胞排列整齐；与空白对照组比较，模型组视网膜形态结构严重紊乱，RGC数量减少，内核层(inner nuclear layer，INL)及外核层(outer nuclear layer，ONL)厚度变薄；与模型组比较，左归丸组视网膜形态基本正常，细胞排列相对规则，RGC数量明显增加；维生素E组内核层细胞排列紊乱、数量减少。见插页XXXV图1。

3.4 左归丸对各组子鼠视网膜组织EGFR蛋白的影响

21日龄子鼠视网膜组织EGFR蛋白免疫荧光染色，使用荧光显微镜观察视网膜组织蛋白表达，Image J软件定量分析EGFR阳性荧光信号(红色)平均荧光强度。结果显示，与空白对照组比较，模型组与维生素E组EGFR阳性荧光信号较弱；与模型组比较，左归丸组EGFR阳性荧光信号增强。见插页XXXVI图2。

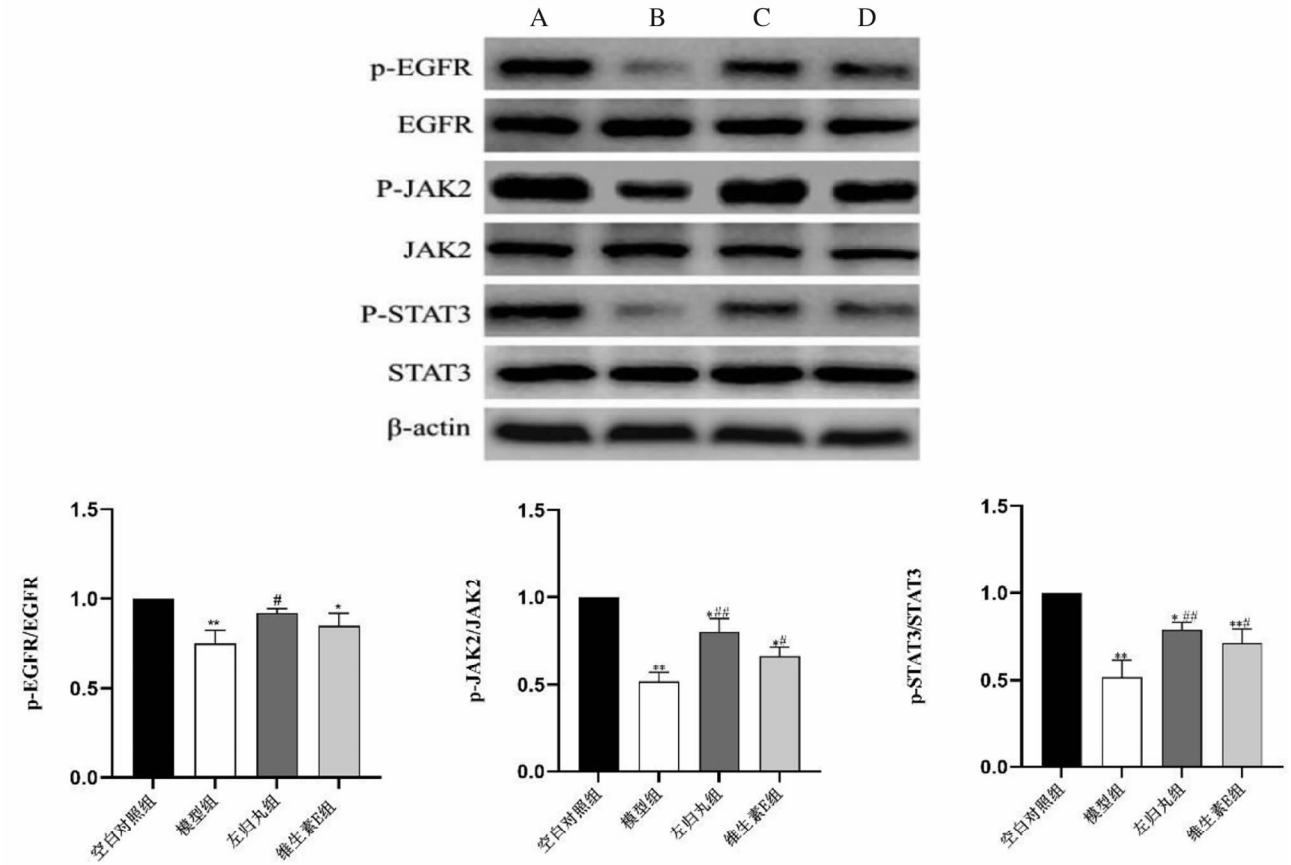
3.5 左归丸对各组子鼠视网膜组织EGFR、p－EGFR、JAK2、p－JAK2、STAT3、p－STAT3各蛋白表达的影响

WB检测结果表明，模型组子鼠视网膜组织p－JAK2、p－STAT3、p－EGFR蛋白表达含量均弱于空白对照组，差异具有统计学意义($P<0.01$)；左归丸组和维生素E组子鼠视网膜组织p－JAK2、p－STAT3、p－EGFR蛋白表达含量均高于模型组，差异具有统计学意义($P<0.01$，$P<0.05$)。见图3。

4 讨论

目的形成有赖于精，目之能视，凭借于精[17]。肾精的濡养，命门之火的温煦是视觉功能产生的条件。先天之精来源于父母生殖之精，若禀赋不足，则目中肾精亏虚，肾精难以滋养瞳神，视物不明，继而引发弱视疾病[18]。《医贯·眼目论》曰："肾藏精，故治目者以肾为主"。因此，填补母代肾精是防治弱视疾病的基本方法。目前，防治PS应激和参与机体生殖功能的常用药物有维生素类，但是否是防治PS对子代机体影响的最佳药物有待商榷[19]。本实验根据"子病治母""未病先防"的中医理论，选用"滋阴补肾，填精生髓"的经典名方——左归丸。左归丸出自明代张景岳的《景岳全书》，方中重用熟地黄为君药，补肾养阴，填精益髓，山茱萸滋养肝肾，山药补气健脾，以补后天而滋先天，枸杞子补肾益精，加龟甲胶、鹿角胶血肉有情之品，填精补髓养血之力尤甚，佐牛膝补肾强腰，活血化瘀，菟丝子平补肾中阴阳，此方在肾精不足、髓海不充的发育障碍疾病中发挥重要的作用。在本病的治疗过程中，应始终秉承填补母代肾精的治则治法，以加强肾脏功能，促使肾精产生，协调调动存储于其他脏腑中的精气，保证子代先天肾精充盈。

现代分子学认为，下丘脑－垂体－肾上腺(hypothalamo－pituitary－adrenal axis，HPA)轴活动平衡是肾精功能的体现。当母体处于应激状态时，HPA轴活性增加导致GC升高，刺激胎盘促肾上腺皮质激素释放激素(corticotropin－releasing hormone，CRH)分泌，致胎儿HPA轴活动紊乱[20]。因此本研究采用慢性不可预测轻度应激法(chronic unpredictable mild stress，



注：＊与空白对照组比较，$P<0.05$；＊＊与空白对照组比较，$P<0.01$；#与模型组比较，$P<0.05$；##与模型组比较，$P<0.01$。

图 3 左归丸对 P21 子鼠视网膜组织 EGFR、p－EGFR、JAK2、p－JAK2、STAT3、p－STAT3 蛋白表达（$n=3$，$\bar{x}\pm s$）

CUMS）建立 PS 模型。实验结果表明，相比于空白对照组，模型组孕鼠血清 GC 水平升高，糖水偏爱度和探索能力降低，提示 PS 孕鼠模型制备成功。T4 是检测肾虚证的关键指标之一，当母体孕期 T4 不足时，可通过直接和间接作用影响胚胎器官发育[21]。实验结果发现，模型组母鼠、子鼠血清 T4 水平降低，证实 HPA 轴受影响，提示 PS 通过 HPA 轴引起母代肾虚，致使子代先天肾虚。

大鼠的视网膜生成从妊娠中期开始，一直持续到出生后 14 d 左右视网膜 10 层结构清晰可见，其过程与妊娠晚期人类视网膜发育高度相似[22]。大鼠视网膜始于视杯，随时间的推移逐渐分化出视网膜各层细胞。组织学观察表明，在 E18 时，视网膜神经上皮层已逐渐分化为内外两层，且与视网膜色素上皮层间隙较宽，直到 P0 时，NBL 增厚，而 RGC 变薄，约 3～4 层，两层之间出现内网层。此后，视网膜开始出现外网层以及内、外核层，从而形成典型的片层化结构，视网膜 10 层结构清晰可见。如插页XXXV图 1 所示，E18 空白对照组可看到内、外两层，而模型组内、外两层尚未出现，且神经上皮层与色素上皮层之间间隙相对较窄；P0 模型组中 RGC 尚未分化为 3～4 层结构且 NBL 厚度相对较薄；P21 模型组视网膜结构严重紊乱，RGC 减少，内、外核层厚度变薄。由此说明，母体暴露在 PS 环境下可导致子代视网膜片层化滞后，诱导视网膜细胞凋亡。这种现象一方面由于 PS 通过 HPA 轴引起孕鼠肾精不足，则孕育后代机体精血不足，后代禀受于母体先天肾精亏虚，目失所养，目络枯涩，目发育迟滞所致。另一方面因孕期受到外界刺激致子鼠视皮质神经细胞大量死亡、树突棘改变导致神经细胞减少[23]。给予左归丸治疗后，视网膜组织片层化正常，各层分界清晰，细胞排列整齐，其可能通过填补母代肾精、改善子代先天肾虚、保护视网膜神经元、抑制细胞凋亡而发挥促发育的作用。

EGF 是维护视网膜发育和稳态的重要生长因子之一，通过与细胞表面的 EGFR 结合，激发受体络氨酸激酶的活性，调控细胞增殖与分化，在眼部组织广泛表达[24]。EGFR 可激活 JAK2－STAT3 信号通路。该通路涉及多个生物学过程，参与免疫反应、胚胎发育和修复中枢神经系统损伤等[25－26]。JAK2 广泛存在于大鼠神经元与少数胶质细胞内，与多种细胞因子受体结合后激活 STAT3 等转录因子[27]。STAT3 可促使神经干细胞的增殖与分化，抑制神经细胞凋亡。激活 JAK2/STAT3 信号通路可以有效地保护胚胎组织正常发育[27－29]。FOSHAY K 等[30]对心肌细胞进行观察，发现 JAK2－STAT3 在心肌细胞中高表达，可促进心肌细胞分化，参与心脏发育的初始阶段，当 JAK2－STAT3 表达异常时则易导致胚胎死亡。张堃等[31]探讨了槲皮素通过激活 JAK2/STAT3 信号通路提高孕鼠激素水平，推断 JAK2/STAT3 信号通路是保护胎儿健康发育，防止先兆性流产的主要途径。基于上述文献发现，JAK2/STAT3 信号通路确实参与了胚胎组织发育途径。本实验 WB 检测研究结果显示模型组子鼠视网膜组织中 p－EGFR、p－JAK2、p－STAT3 蛋白表达较空白对照组明显下调，经左归丸干预后可逆转上述

指标。

综上,通过本实验我们发现左归丸对 PS 子鼠视网膜发育具有保护作用,其机制可能与提高母鼠子鼠血清 T4 含量,上调 EGFR 蛋白表达,激活 JAK2/STAT3 信号通路有关。本研究初步探讨了左归丸在 PS 子鼠视网膜发育中的作用,但视网膜发育是一个复杂的生理过程,其中涉及多种机制通路的交叉影响和共同作用。因此,未来的研究应当更深入探究左归丸在这些信号通路中的作用,全面了解其在 PS 中的作用机制,为预防儿童弱视疾病提供新的思路。

参考文献

[1] 陈进莲,邓斯元. 中医治疗弱视的临床研究进展[J]. 中医临床研究,2024,16(33):129 - 133.

[2] CASTILLO O, GONZÁLEZ I, PRIETO E, et al. Efectos de la exposición prenatal a alcohol, tabaco y otras drogas de abuso sobre el desarrollo retiniano[J]. Arch De La Soc Espaola De Oftalmol,2019,94(1): 18 - 24.

[3] TARUTTA E P,KHUBIEVA R R,MILASH S V,et al. Correlation of chorioretinal parameters with anatomical, optical and functional indicators of eyes with amblyopia of various origins[J]. Vestn Oftalmol,2022,138(6): 82 - 91.

[4] LIANG M,XIAO H,XIE B,et al. Morphologic changes in the visual cortex of patients with anisometropic amblyopia: a surface - based morphometry study[J]. BMC Neurosci,2019,20(1): 39.

[5] FŇAŠKOVÁ M,ŘÍHA P,NEČASOVÁ M,et al. Lifelong effects of prenatal and early postnatal stress on the hippocampus, amygdala, and psychological states of Holocaust survivors[J]. Sci Rep, 2023, 13(1): 13835.

[6] ZHAO F,WANG K,WEN Y,et al. Contribution of hippocampal BDNF/CREB signaling pathway and gut microbiota to emotional behavior impairment induced by chronic unpredictable mild stress during pregnancy in rats offspring[J]. PeerJ,2022,10: e13605.

[7] KAUR S,SHARDA S,AGGARWAL H,et al. Comprehensive review of amblyopia: types and management[J]. Indian J Ophthalmol, 2023,71(7): 2677 - 2686.

[8] LEE K,CHOI J O,HWANG A,et al. Ciliary neurotrophic factor derived from astrocytes protects retinal ganglion cells through PI3K/AKT,JAK/STAT,and MAPK/ERK pathways[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci,2022,63(9): 4.

[9] 萧闵,曹继刚,江晓翠,等. 基于 Cx43 研究产前应激对子代大鼠睾丸发育的影响及左归丸干预作用[J]. 中国中药杂志,2024,49(1): 197 - 207.

[10] 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.

[11] BURGUEÑO A L,JUÁREZ Y R,GENARO A M,et al. Prenatal stress and later metabolic consequences: Systematic review and meta - analysis in rodents[J]. Psychoneuroendocrinology, 2020, 113: 104560.

[12] GUAN S Z,FU Y J,ZHAO F,et al. The mechanism of enriched environment repairing the learning and memory impairment in offspring of prenatal stress by regulating the expression of activity - regulated cytoskeletal - associated and insulin - like growth factor - 2 in hippocampus[J]. Environ Health Prev Med,2021,26(1): 8.

[13] BLOCK C L,EROGLU O,MAGUE S D,et al. Prenatal environmental stressors impair postnatal microglia function and adult behavior in males[J]. Cell Rep,2022,40(5): 111161.

[14] 黄继汉,黄晓晖,陈志扬,等. 药理试验中动物间和动物与人体间的等效剂量换算[J]. 中国临床药理学与治疗学,2004,9(9): 1069 - 1072.

[15] LI H N,XIANG Y J,ZHU Z M,et al. Rifaximin - mediated gut microbiota regulation modulates the function of microglia and protects against CUMS - induced depression - like behaviors in adolescent rat[J]. J Neuroinflammation,2021,18(1): 254.

[16] 谢皓然,冯文娟,王希,等. 茶多酚通过调节海马小胶质细胞极化改善衰老 2 型糖尿病大鼠抑郁样行为[J]. 卫生研究,2024,53(1):71 - 76,87.

[17] 李佳贤,梁丽娜,许凯,等. 基于肾精与干细胞的关系阐释补肾益精法在视网膜变性治疗中的作用机理[J]. 北京中医药大学学报,2023,46(9):1301 - 1306.

[18] 潘李斌,颉瑞萍. 中西医治疗儿童弱视的研究进展[J]. 中国中西医结合儿科学,2023,15(5):416 - 419.

[19] 李宏,樊泽民,肖圣盈,等. 营养学在近视性弱视中的研究进展[J]. 中国中医眼科杂志,2023,33(9):886 - 890.

[20] RUFFANER - HANSON C, NOOR S, SUN M S, et al. The maternal - placental - fetal interface: adaptations of the HPA axis and immune mediators following maternal stress and prenatal alcohol exposure[J]. Exp Neurol,2022,355: 114121.

[21] 郝士丹,许颖,张景义. 甲状腺激素治疗妊娠期亚临床甲减对子代生长发育的影响[J]. 中国计划生育学杂志,2023,31(5): 1067 - 1071.

[22] 孔维芳,周洁,金海啸,等. 小鼠视网膜片层化及神经干细胞的增殖与分化[J]. 解剖学报,2013,44(1): 13 - 18.

[23] 席艳,周洁,孔维芳,等. 孕期酒精暴露对视网膜发育及细胞分化的影响[J]. 生理学报,2013,65(5): 505 - 512.

[24] 王晓杰,惠琦,金子,等. 生长因子在眼的发育及眼部疾病调控中的作用[J]. 浙江大学学报(医学版),2022,51(5): 613 - 625.

[25] XIN P,XU X Y,DENG C J,et al. The role of JAK/STAT signaling pathway and its inhibitors in diseases[J]. Int Immunopharmacol, 2020,80: 106210.

[26] 宁家辉,王蕾,衣红杰,等. 基于 JAK - STAT 信号通路探讨首乌益智胶囊对血管性认知障碍神经保护机制[J]. 中国老年学杂志,2023,43(17): 4237 - 4240.

[27] HUANG B,LANG X,LI X. The role of IL - 6/JAK2/STAT3 signaling pathway in cancers[J]. Front Oncol,2022,12: 1023177.

[28] 赵佳琳,陈萍,徐广立,等. 补肾活血方通过下调 JAK2/STAT3 通路改善小鼠的复发性流产[J]. 南方医科大学学报,2023,43(2): 265 - 270.

[29] ZHOU Q,REN Q,JIAO L,et al. The potential roles of JAK/STAT signaling in the progression of osteoarthritis[J]. Front Endocrinol (Lausanne),2022,13: 1069057.

[30] FOSHAY K,RODRIGUEZ G,HOEL B,et al. JAK2/STAT3 directs cardiomyogenesis within murine embryonic stem cells *in vitro*[J]. Stem Cells,2005,23(4): 530 - 543.

[31] 张堃,吕向坤,焦艾丽,等. JAK2/STAT3 通路槲皮素对先兆流产大鼠的保胎作用及对激素水平的影响[J]. 武警医学,2021,32(11): 963 - 968.

左归丸调节 JAK2－STAT3 信号通路在产前应激子鼠视网膜发育中的作用

（正文见 173－178 页）

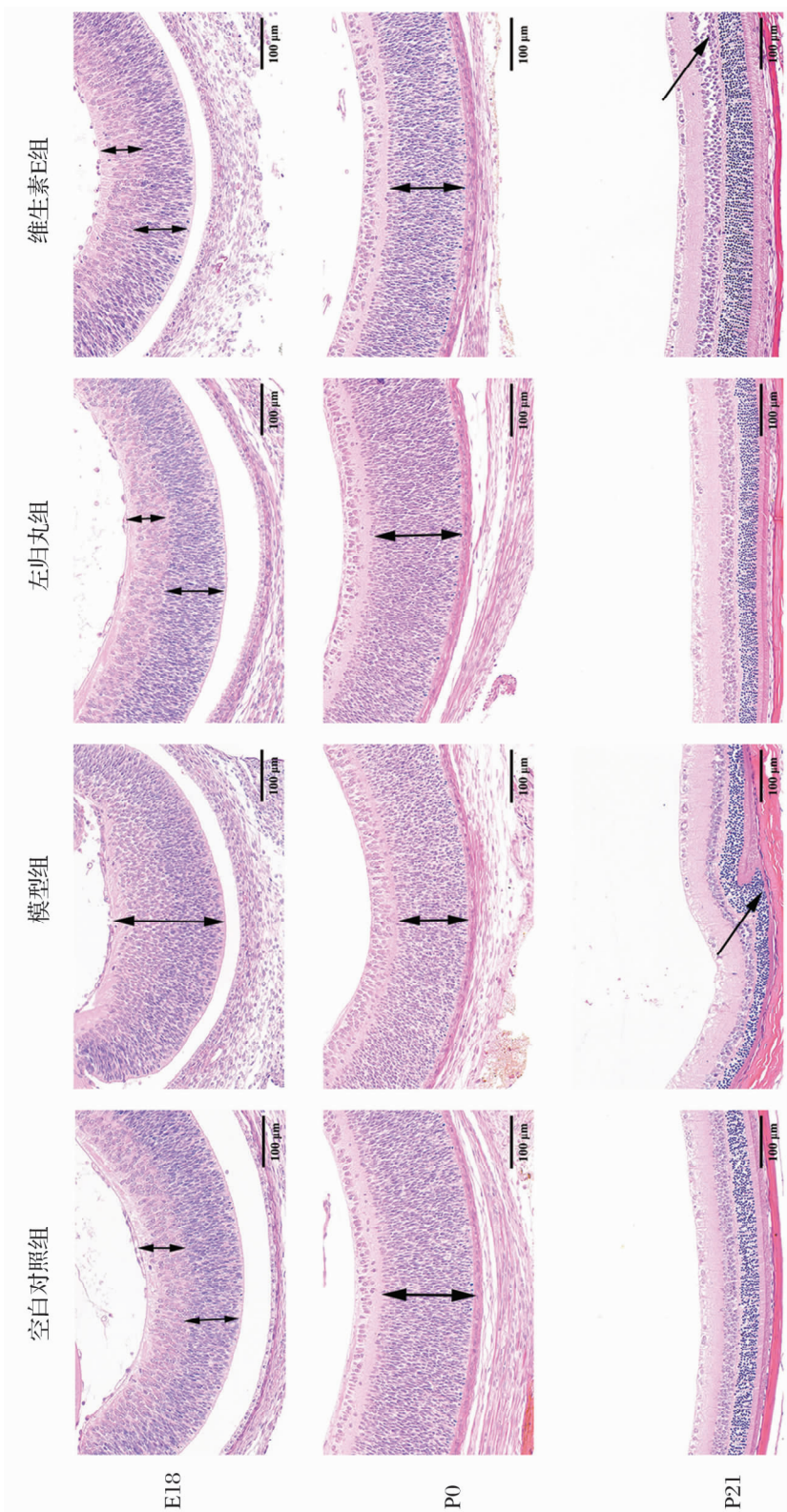
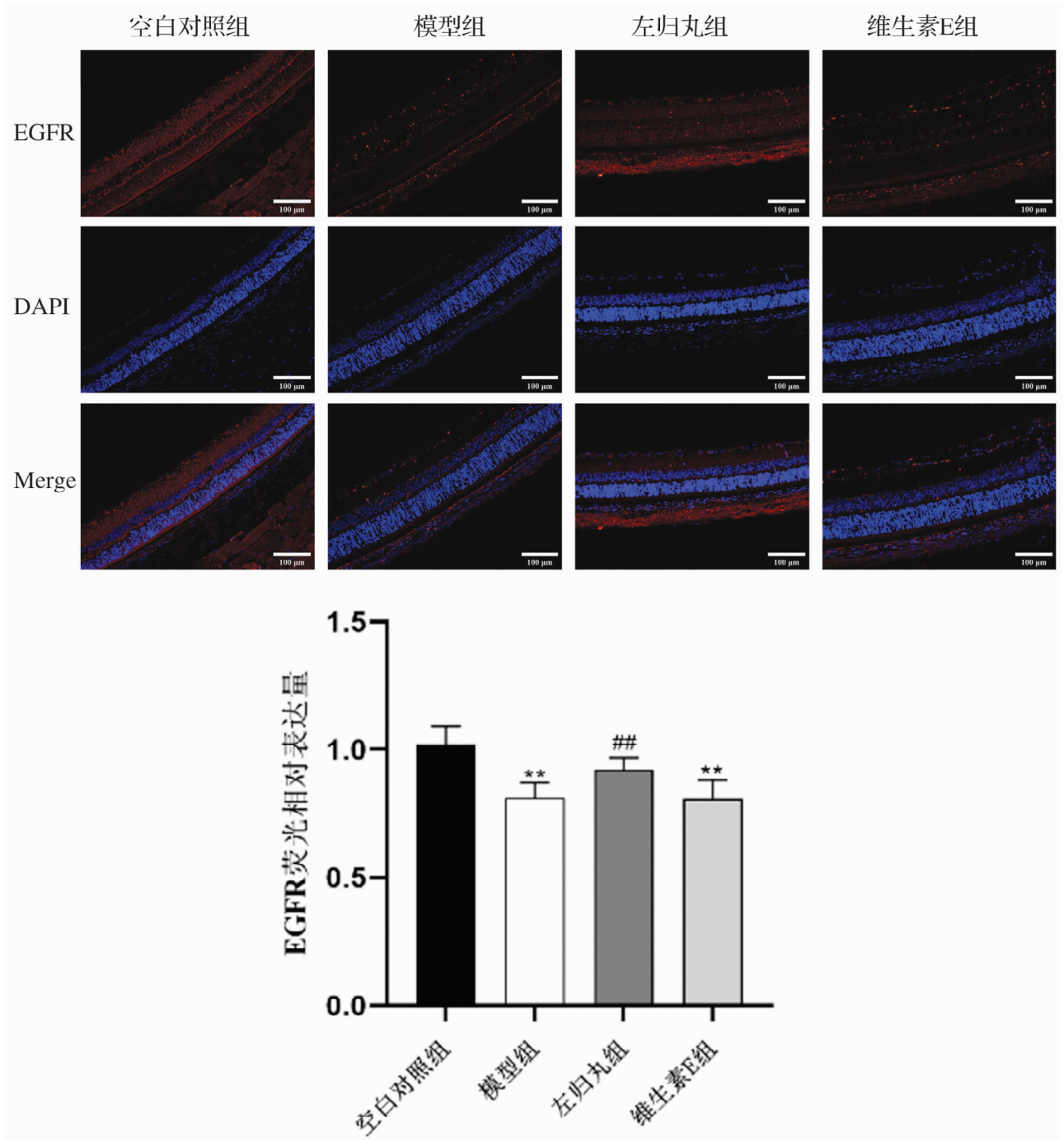


图 1　左归丸对 E18、P0、P21 鼠视网膜组织形态的影响（HE，×400）



注：＊＊与空白对照组比较，$P<0.01$；##与模型组比较，$P<0.01$。

图 2　左归丸对 P21 子鼠视网膜组织 EGFR 蛋白的影响（免疫荧光，×200；$n=6$，$\bar{x}\pm s$）