

基于JAK2/STAT3、PI3K/AKT双通路研究清热安胎方改善血热型先兆流产大鼠妊娠结局的作用机制[△]

马丽亚^{1*}, 申艳朵², 张家乐², 吴刘俊², 谢秉恒², 吴星霏³, 刘晨⁴, 张明昊³, 张雪琳⁵, 张大伟^{6#} (1. 河南中医药大学教务部, 郑州 450046; 2. 河南中医药大学第五临床医学院, 郑州 450002; 3. 河南中医药大学医学院, 郑州 450046; 4. 河南中医药大学第二临床医学院, 郑州 450002; 5. 河南中医药大学第三附属医院科研实验中心, 郑州 450008; 6. 河南中医药大学第三附属医院妇产科, 郑州 450008)

中图分类号 R965 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2026)09-1127-07

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2026.09.04



摘要 目的 研究清热安胎方改善血热型先兆流产大鼠妊娠结局的作用机制。方法 将妊娠成功的大鼠随机分为正常组、模型组、地屈孕酮组(0.002 g/kg)和清热安胎方组(44.1 g/kg), 每组13只。除正常组外, 其余各组大鼠自妊娠第1天开始灌胃温阳中药和相应药物, 每天1次, 连续12 d; 妊娠第13天一次性灌胃米非司酮(5 mg/kg)建立血热型先兆流产模型。妊娠第14天, 计算大鼠流产率及子宫系数, 观察大鼠妊娠子宫病理学形态, 检测大鼠血清中三碘甲状腺原氨酸(T₃)、甲状腺素(T₄)、促甲状腺激素(TSH)水平, 检测大鼠妊娠子宫中血管内皮生长因子(VEGF)、一氧化氮(NO)水平和Janus激酶2(JAK2)/信号转导与转录激活因子3(STAT3)、磷脂酰肌醇3-激酶(PI3K)/蛋白激酶B(AKT)通路相关mRNA及蛋白表达水平。结果 与正常组比较, 模型组大鼠子宫内膜组织出现损伤、蜕膜细胞数量减少, 宫内可见大量瘀血; 流产率, 血清中T₃、T₄、TSH水平, 子宫中JAK2、STAT3、细胞因子信号转导抑制因子3(SOCS3)mRNA表达水平和磷酸化JAK2、磷酸化STAT3、SOCS3蛋白表达水平均显著升高($P<0.05$); 子宫系数, 妊娠子宫中VEGF、NO水平, 血管内皮细胞生长因子受体2(VEGFR2)、PI3K、AKT、一氧化氮合酶(eNOS)mRNA表达水平, VEGFR2、PI3K、eNOS蛋白表达水平和AKT蛋白磷酸化水平均显著降低($P<0.05$)。与模型组比较, 清热安胎组大鼠子宫内膜组织损伤及充血程度明显改善, 上述定量指标水平均显著逆转($P<0.05$)。结论 清热安胎方可改善血热型先兆流产大鼠的妊娠结局, 其作用机制可能与抑制JAK2/STAT3通路、激活PI3K/AKT通路有关。

关键词 清热安胎方; 血热; 先兆流产; JAK2/STAT3通路; PI3K/AKT通路; 妊娠结局

Mechanism of Qingre antai decoction in improving pregnancy outcomes of threatened abortion rats with blood heat syndrome based on JAK2/STAT3 and PI3K/AKT dual signaling pathways

MA Liya¹, SHEN Yanduo², ZHANG Jiale², WU LiuJun², XIE Bingheng², WU Xingfei³, LIU Chen⁴, ZHANG Minghao³, ZHANG Xuelin⁵, ZHANG Dawei⁶ (1. Dept. of Educational Administration, Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China; 2. Fifth Clinical Medical College, Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450002, China; 3. School of Medicine, Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China; 4. Second Clinical Medical College, Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450002, China; 5. Research and Experimentation Center, Third Affiliated Hospital of Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450008, China; 6. Dept. of Obstetrics and Gynecology, Third Affiliated Hospital of Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450008, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE** To explore the mechanism by which Qingre antai decoction improves pregnancy outcomes of threatened abortion rats with blood heat syndrome.

△基金项目 国家自然科学基金项目(No.82074562); 河南省科技发展计划项目(No.2023ZYZD09, No.242300420168)

* **第一作者** 教授, 硕士生导师, 博士。研究方向: 中医妇科学。
E-mail: mary868@163.com

通信作者 教授, 博士生导师。研究方向: 中医妇科学。E-mail: 13938427612@126.com

METHODS The pregnant rats were randomly divided into normal group, model group, dydrogesterone group (0.002 g/kg), and Qingre antai decoction group (44.1 g/kg), with 13 rats in each group. Except for normal group, other groups were given warming-yang Chinese medicine and corresponding

drugs intragastrically, once a day, for 12 consecutive days. On the 13th day of pregnancy, a single intragastric administration of mifepristone (5 mg/kg) was performed to establish a model of threatened abortion with blood heat syndrome. On the 14th day of pregnancy, the abortion rate and uterine coefficient were calculated; the pathological morphology of pregnant uterine was observed; the serum levels of 3,5,3'-triiodothyronine (T3), thyroid hormone (T4), thyroid stimulating hormone (TSH), as well as the levels of vascular endothelial growth factor (VEGF) and nitric oxide (NO) in the pregnant uterus were all determined; the expressions of mRNA and protein related to Janus kinase 2 (JAK2)/signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) and phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/protein kinase B (AKT) pathways were detected. **RESULTS** Compared with normal group, the model group exhibited endometrial tissue damage, a reduced number of decidual cells, and a significant presence of blood stasis within the uterus; abortion rate, the serum levels of T3, T4 and TSH, the mRNA expressions of JAK2, STAT3 and suppressor of cytokine signaling 3 (SOCS3) as well as protein expressions of p-JAK2, p-STAT3 and SOCS3 in the pregnant uterus were increased significantly ($P<0.05$); uterine coefficient, the levels of VEGF and NO in pregnant uterus, mRNA expressions of VEGFR2, PI3K, AKT and endothelial nitric oxide synthase (eNOS), protein expressions of VEGFR2, PI3K and eNOS as well as phosphorylation level of AKT in the pregnant uterus were significantly reduced ($P<0.05$). Compared with model group, the endometrial tissue damage and congestion in the Qingre antai decoction group were significantly improved, and the levels of the aforementioned quantitative indicators were significantly reversed ($P<0.05$). **CONCLUSIONS** Qingre antai decoction can improve the pregnancy outcomes in rats with threatened abortion of blood heat syndrome, the mechanism of which may be associated with inhibiting JAK2/STAT3 pathway and activating PI3K/AKT pathway.

KEYWORDS Qingre antai decoction; blood heat syndrome; threatened abortion; JAK2/STAT3 pathway; PI3K/AKT pathway; pregnancy outcomes

先兆流产是妊娠期女性的常见疾病之一,发病率约占妊娠相关疾病的10%~15%,且有逐年升高的趋势,严重危害广大女性的生殖与心理健康^[1]。先兆流产发病前期会出现阴道出血,继而出现阵发性下腹痛、腰背痛及坠胀感,其病程复杂,现代医学认为该病的发生与免疫异常、内分泌失调、感染及染色体异常等因素有关,故常以黄体酮、阿司匹林等药物进行常规治疗,这虽能在一定程度上提高妊娠成功率,但总体效果并不理想^[2-3]。

先兆流产在中医理论中归为“胎漏”“胎动不安”“滑胎”等范畴,曾记载于《产经》《脉经》《医宗金鉴·妇科心法要诀》等多部典籍中,分为肾虚型、气血虚弱型、血热型、血瘀型、肝郁型等证型^[4]。起源于清代乾隆年间的中原庞氏妇科流派认为,妇女孕后阴血下注冲任以养胎,易使机体阴血偏虚,阳气偏旺,血热内生,故“热”贯穿妊娠病全过程,治疗时应重视“胎前热”^[5]。该流派第六代传人庞清治先生以清热、止血、安胎为原则,创制了清热安胎方,其治疗血热型先兆流产的效果较好^[6],但具体作用机制尚不明确。研究发现,血热与甲状腺激素分泌有关,安胎与胚胎血管生成有关^[7-8]。本课题组前期研究发现,信号转导与转录激活因子3(signal transducer and activator of transcription 3, STAT3)、蛋白激酶B(protein kinase B, AKT)是清热安胎方治疗先兆流产的主要作用靶点^[6]。研究表明,Janus激酶2(Janus kinase 2, JAK2)/STAT3通路与早期胚胎发育和甲状腺激素分泌相关,磷脂酰肌醇3-激酶(phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K)/

AKT通路则参与调控胚胎血管生成^[9-11]。然而,清热安胎方是否可通过调控JAK2/STAT3、PI3K/AKT双通路发挥改善血热型先兆流产的作用仍不清晰。基于此,本研究拟基于JAK2/STAT3、PI3K/AKT双通路,从甲状腺激素分泌调节和胚胎血管生成调控两个层面探讨清热安胎方改善血热型先兆流产妊娠结局的作用机制。

1 材料

1.1 主要仪器

本研究所用的主要仪器有BS110S型电子天平[赛多利斯科学仪器(北京)有限公司],MR-96TB型酶标仪[骋克仪器(上海)有限公司],D3024R型台式高速冷冻型微量离心机[大龙兴创实验仪器(北京)股份有限公司],CX23型光学显微镜(日本Olympus公司)。

1.2 主要药品与试剂

清热安胎方由黄芩10 g、知母30 g、金银花30 g、蒲公英30 g、荷叶10 g、旱莲草30 g、藕节30 g、升麻6 g、苏梗15 g、白术10 g、山茱萸30 g、白芍10 g、甘草4 g组成,温阳中药方(用于制备血热型先兆流产模型)由附子10 g、干姜10 g、肉桂10 g组成;上述两方中所有药材均购自河南中医药大学第三附属医院,经河南中医药大学药学院中药资源与鉴定教研室2名副教授以上职称人员鉴定为真品。清热安胎方、温阳中药方均于河南中医药大学医学机能实验室制备。清热安胎方制备过程为:称取处方量药材以蒸馏水浸泡30 min,以大火煮沸后转小火煎煮30 min,共煎3次,合并药液,再浓缩成质量浓度为

1.11 g/mL(以生药量计)的药液;温阳中药方制备过程为:称取处方量药材以蒸馏水常规煎煮,再浓缩成质量浓度为1.00 g/mL(以生药量计)的药液。

地屈孕酮片(批号363775,规格10 mg/片)购自荷兰Abbott Healthcare公司;米非司酮片(批号43210213,25 mg/片)购自华润紫竹药业有限公司;三碘甲状腺原氨酸(3,5,3'-triiodothyronine,T₃)、甲状腺素(thyroid hormone,T₄)、促甲状腺激素(thyroid stimulating hormone,TSH)测定试剂盒(批号分别为H222-1-2、H223-1-2、H087-1-2)均购自南京建成生物工程研究所有限公司;血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor,VEGF)测定试剂盒(批号ml-063019)购自上海酶联生物科技有限公司;一氧化氮(nitric oxide,NO)测定试剂盒(批号S0021)购自上海碧云天生物技术有限公司;兔抗大鼠磷酸化JAK2(p-JAK2)、磷酸化STAT3(p-STAT3)、细胞因子信号转导抑制因子3(suppressor of cytokine signaling 3,SOCS3)、 β -肌动蛋白(β -actin)抗体和辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔二抗(批号分别为GB114585-100、GB1150001-100、GB113792-100、GB15003-100、G1213-100UL)购自武汉赛维生物技术有限公司;兔抗大鼠血管内皮细胞生长因子受体2(vascular endothelial growth factor receptor 2,VEGFR2)、AKT、磷酸化AKT(p-AKT)、PI3K、一氧化氮合酶(endothelial nitric oxide synthase,eNOS)抗体(批号分别为bs-10412R、bs-5570R、bs-0115R、bs-0876R、bs-20608R)购自北京博奥森生物技术有限公司。

1.3 实验动物

本研究所用动物有10周龄健康未产雌性SD大鼠(60只,体重200~280 g)和10周龄健康雄性SD大鼠(30只,体重250~280 g),均购自郑州市惠济区华兴实验动物养殖场,动物生产许可证号为SCXK(豫)2022-0002。所有大鼠均饲养于河南中医药大学医学机能实验室,饲养环境温度为20~22℃、相对湿度为55%~60%、正常光照。本实验由河南中医药大学实验动物伦理委员会批准(编号为DWLL202401011)。

2 方法

2.1 分组、造模与给药

将60只雌性大鼠与30只雄性大鼠合笼配种,于次日清晨观察雌性大鼠阴道栓形成情况,将出现阴道栓当天记为妊娠第1天,最后确定妊娠成功大鼠共52只。选取52只雌性妊娠大鼠,随机分为正常组、模型组、地屈孕酮组(0.002 g/kg,根据临床等效剂量换算而成)和清热安胎方组(44.1 g/kg,根据本课题组前期研究结果设置,为临床等效剂量的2倍),每组各13只。

自妊娠第1天开始,模型组、地屈孕酮组和清热安胎

方组大鼠于每天上午按10 mL/kg灌胃温阳中药,每天1次,连续12 d,以建立血热模型^[12];在造模的同时,地屈孕酮组和清热安胎方组大鼠于每天下午灌胃相应药液,正常组和模型组大鼠灌胃等体积蒸馏水;除正常组外,其余各组大鼠在妊娠第13天一次性灌胃米非司酮(5 mg/kg)建立先兆流产模型。各组随机取3只大鼠,测定血清中T₃、T₄、TSH水平,并解剖观察胚胎情况,当血清中T₃、T₄、TSH水平及流产率较正常组大鼠明显升高,则表明血热型先兆流产模型构建成功^[12]。

2.2 取材

妊娠第14天,称量各组大鼠体重,再腹腔注射氨基甲酸乙酯(1 g/kg)进行麻醉;经腹主动脉采血,以3 000 r/min离心10 min收集血清,于-80℃条件下保存备用。取血完成后,解剖大鼠取出妊娠子宫,剥离周围附属组织,用生理盐水冲洗干净,依次完成称重、拍照。将妊娠子宫均分为两份,一份用4%多聚甲醛固定,另一份经液氮速冻后置于-80℃条件下保存备用。

2.3 大鼠流产率及子宫系数计算

观察拍摄的图片统计各组大鼠妊娠子宫内流产胚胎数和正常胚胎数(正常胚胎呈淡红色,且母鼠子宫腔内未见瘀血;流产胚胎呈黑褐色,且部分胚胎发生缺失),并计算流产率[流产率=流产胚胎数/(流产胚胎数+正常胚胎数)×100%]和子宫系数(子宫系数=子宫质量/大鼠体重)。

2.4 大鼠妊娠子宫病理学形态观察

取“2.2”项下于4%多聚甲醛固定的妊娠子宫组织,经梯度乙醇脱水、二甲苯透明、石蜡包埋后,制作4 μ m厚度的病理切片。取部分切片(剩余切片用于免疫组化法检测)依次经过二甲苯脱蜡、苏木素-伊红(HE)染色、梯度乙醇脱水后,再以中性树脂封片。采用光学显微镜观察妊娠子宫的病理学形态,并在400倍镜下采集相关图像。

2.5 大鼠血清中T₃、T₄、TSH水平检测

取“2.2”项下血清样品适量,按照试剂盒说明书方法操作,采用酶标仪于510 nm波长下测定吸光度,并依据标准曲线计算大鼠血清中T₃、T₄、TSH水平。

2.6 大鼠妊娠子宫中VEGF、NO水平检测

取“2.2”项下冻存的妊娠子宫100 mg,向样本中加入0.9 mL冰生理盐水,制成组织匀浆液;以3 000 r/min离心10 min后,收集上清液。严格遵循试剂盒说明书方法操作,再利用酶标仪于450 nm波长下测定吸光度,并根据标准曲线计算大鼠妊娠子宫中VEGF、NO水平。

2.7 大鼠妊娠子宫中JAK2/STAT3、PI3K/AKT通路相关mRNA表达检测

取“2.2”项下冻存的妊娠子宫100 mg,加入1 mL

TriQuick 试剂充分研磨后提取总 RNA,并检测总 RNA 浓度及纯度,然后将总 RNA 逆转录为 cDNA;以 cDNA 为模板进行 PCR 扩增,PCR 扩增条件为 95 ℃预变性 10 min;95 ℃变性 15 s,60 ℃退火 30 s,72 ℃延伸 30 s,共 40 个循环。以 *GAPDH* 基因为内参,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算目的基因的表达水平。PCR 引物由武汉塞维尔生物科技有限公司设计合成,其具体信息见表 1。

表 1 PCR 引物序列及扩增产物长度

基因	引物序列(5'→3')	扩增产物长度/bp
JAK2	上游:TTGGGCAAGCTGAAGGAGACT	336
	下游:GCCGCCACTGAGCAAAAAGGTAA	
STAT3	上游:CCCCGCCCCGAGAGTG	348
	下游:CTGGCCAGGGAAGGAGAGC	
SOCS3	上游:GGGGCCCTTCCTTTCTTTACCA	312
	下游:GGGGCCCTCTGACCTTTCTTTG	
VEGFR2	上游:GCGGGCCAGGACGAGAGAAG	350
	下游:CCCTGGGAATGGTGAAGTGTGTTT	
PI3K	上游:TACCCCGGGAAGCTACCATTT	367
	下游:CAAGACAGCCCCACCAGAGAC	
AKT	上游:AATGGGGCGAGCTCTTCTTCC	350
	下游:AGGCGCCGCACATCATCTC	
eNOS	上游:CAGCGCCACCCAGGAGAG	311
	下游:ATCGGACGCAACACCAAAAGTC	
GAPDH	上游:CTGGAGAACTGCAAGTATG	138
	下游:GGTGAAGAATGGGAGTTGCT	

2.8 大鼠妊娠子宫中 JAK2/STAT3 通路相关蛋白表达检测

采用免疫组化法检测。取“2.4”项下剩余切片,经二甲苯脱蜡、水化后,用柠檬酸盐缓冲液热修复 8 min,待温度降至室温后依次用 H₂O₂ 孵育 10 min、山羊血清孵育 30 min,然后滴加 p-JAK2、p-STAT3、SOCS3 抗体(稀释度分别为 1:500、1:1 000、1:500),于 4 ℃孵育过夜。次日将切片复温至 37 ℃后滴加二抗孵育 20 min,以磷酸盐缓冲液清洗后,以 DAB 显色 10 min;经自来水冲洗后,以苏木素复染 3 min,经乙醇梯度脱水、二甲苯透明、中性树脂封片后,采用显微镜进行观察。切片在 400 倍镜下随机选取 1 个视野,以棕黄色为阳性染色,采用 Image-Pro Plus 6.0 软件分析视野中阳性染色的积分光密度(integrated optical density, IOD)值。

2.9 大鼠妊娠子宫中 PI3K/AKT 通路相关蛋白表达检测

取“2.2”项下冻存的妊娠子宫 100 mg,加入裂解液裂解后,采用 BCA 法测定蛋白浓度;再向蛋白样品中加入上样缓冲液,于沸水浴中加热 15 min 完成蛋白变性处理。取变性后蛋白适量,采用十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳进行分离,经转膜、封闭后,加入 VEGFR2、PI3K、AKT、p-AKT、eNOS 抗体(稀释度均为 1:1 000),于 4 ℃孵育过夜;经 TBST 漂洗后,加入相应二抗于室温孵育 30 min。采用 ECL 试剂盒显影处理后,采用凝胶成像系统成像,再使用 Image J 软件测定条带灰度值,以

β -actin 作为内参,计算目的蛋白与内参蛋白的灰度值比值,以反映目的蛋白的表达水平;再计算 p-AKT 与 AKT 的表达水平比值,来反映 AKT 的磷酸化水平。

2.10 统计学方法

采用 SPSS 22.0 软件进行统计分析,计量资料均用 $\bar{x} \pm s$ 表示,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。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

3 结果

3.1 大鼠流产率及子宫系数计算结果

与正常组比较,模型组大鼠流产率显著升高($P<0.05$),子宫系数显著降低($P<0.05$);与模型组比较,地屈孕酮组和清热安胎方组大鼠流产率均显著降低($P<0.05$),子宫系数均显著升高($P<0.05$)。结果见表 2。

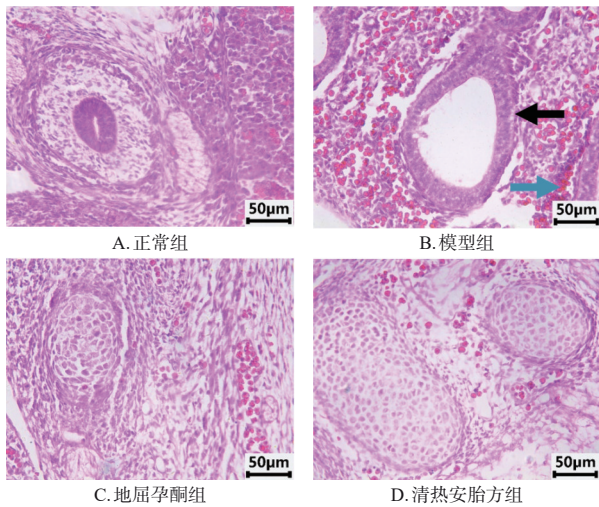
表 2 各组大鼠流产率、子宫系数比较($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	流产率/%	子宫系数/ $\times 10^{-3}$
正常组	5.31 $\pm$ 0.28	47.88 $\pm$ 9.66
模型组	22.11 $\pm$ 3.58 ^a	29.53 $\pm$ 2.60 ^a
地屈孕酮组	6.54 $\pm$ 0.45 ^b	52.65 $\pm$ 7.00 ^b
清热安胎方组	6.79 $\pm$ 0.51 ^b	47.87 $\pm$ 9.01 ^b

a:与正常组比较, $P<0.05$;b:与模型组比较, $P<0.05$ 。

3.2 大鼠妊娠子宫病理学形态观察结果

正常组大鼠妊娠子宫内膜组织无损伤,蜕膜细胞排列整齐、紧密;模型组大鼠蜕膜细胞数量减少,子宫内膜组织出现损伤,宫内可见大量瘀血;地屈孕酮组和清热安胎方组大鼠子宫内膜组织损伤及充血程度明显改善。结果见图 1。



注:黑色箭头所指为子宫内膜组织损伤;蓝色箭头所指为瘀血部位。

图 1 大鼠妊娠子宫的病理学形态显微图(HE 染色)

3.3 大鼠血清中 T3、T4、TSH 水平测定结果

与正常组比较,模型组大鼠血清中 T3、T4、TSH 水平均显著升高($P<0.05$);与模型组比较,地屈孕酮组和清热安胎方组大鼠血清中 T3、T4、TSH 水平均显著降低($P<0.05$)。结果见表 3。

表3 各组大鼠血清中T3、T4、TSH水平比较($\bar{x} \pm s, n=10, \text{ng/mL}$)

组别	T3	T4	TSH
正常组	0.44±0.05	205.82±4.25	0.71±0.29
模型组	0.92±0.06 ^a	238.90±5.87 ^a	1.24±0.06 ^a
地屈孕酮组	0.52±0.02 ^b	220.99±2.56 ^b	0.71±0.06 ^b
清热安胎方组	0.45±0.03 ^b	213.51±4.39 ^b	0.77±0.05 ^b

a: 与正常组比较, $P<0.05$; b: 与模型组比较, $P<0.05$ 。

3.4 大鼠妊娠子宫中VEGF、NO水平检测结果

与正常组比较, 模型组大鼠妊娠子宫中VEGF、NO水平均显著降低($P<0.05$); 与模型组比较, 地屈孕酮组和清热安胎方组大鼠妊娠子宫中VEGF、NO水平均显著升高($P<0.05$)。结果见表4。

表4 各组大鼠妊娠子宫中VEGF、NO水平比较($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	VEGF/(pg/mL)	NO/(mmol/mg)
正常组	145.91±1.04	9.42±0.21
模型组	77.26±6.67 ^a	5.99±0.08 ^a
地屈孕酮组	145.26±1.09 ^b	9.45±0.20 ^b
清热安胎方组	145.30±0.93 ^b	9.51±0.24 ^b

a: 与正常组比较, $P<0.05$; b: 与模型组比较, $P<0.05$ 。

3.5 大鼠妊娠子宫中JAK2/STAT3、PI3K/AKT通路相关mRNA表达水平检测结果

与正常组比较, 模型组大鼠妊娠子宫中JAK2、STAT3、SOCS3 mRNA表达水平均显著升高($P<0.05$), VEGFR2、AKT、PI3K、eNOS mRNA表达水平均显著降低($P<0.05$); 与模型组比较, 地屈孕酮组和清热安胎

方组大鼠妊娠子宫中JAK2、STAT3、SOCS3 mRNA表达水平均显著降低($P<0.05$), VEGFR2、AKT、PI3K、eNOS mRNA表达水平均显著升高($P<0.05$)。结果见表5。

表5 各组大鼠妊娠子宫中JAK2/STAT3、PI3K/AKT通路相关mRNA表达水平比较($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	JAK2 mRNA	STAT3 mRNA	SOCS3 mRNA	VEGFR2 mRNA	AKT mRNA	PI3K mRNA	eNOS mRNA
正常组	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00
模型组	1.60±0.09 ^a	1.59±0.09 ^a	1.59±0.10 ^a	0.50±0.09 ^a	0.51±0.11 ^a	0.58±0.07 ^a	0.50±0.07 ^a
地屈孕酮组	1.11±0.05 ^b	1.11±0.07 ^b	1.09±0.06 ^b	0.90±0.06 ^b	0.92±0.05 ^b	0.89±0.08 ^b	0.92±0.04 ^b
清热安胎方组	1.12±0.05 ^b	1.16±0.05 ^b	1.11±0.05 ^b	0.92±0.06 ^b	0.90±0.06 ^b	0.90±0.07 ^b	0.91±0.05 ^b

a: 与正常组比较, $P<0.05$; b: 与模型组比较, $P<0.05$ 。

3.6 大鼠妊娠子宫中JAK2/STAT3通路相关蛋白表达水平检测结果

与正常组比较, 模型组大鼠妊娠子宫中p-JAK2、p-STAT3、SOCS3蛋白表达水平均显著升高($P<0.05$); 与模型组比较, 地屈孕酮组和清热安胎方组大鼠妊娠子宫中p-JAK2、p-STAT3、SOCS3蛋白表达水平均显著降低($P<0.05$)。结果见表6、图2。

表6 各组大鼠妊娠子宫中JAK2/STAT3通路相关蛋白的IOD值比较($\bar{x} \pm s, n=10, \times 10^3$)

组别	p-JAK2	p-STAT3	SOCS3
正常组	821.19±19.65	524.38±33.10	642.38±33.10
模型组	2 109.05±90.26 ^a	2 222.11±50.18 ^a	1 885.39±49.28 ^a
地屈孕酮组	848.52±22.92 ^b	645.83±25.84 ^b	754.03±35.82 ^b
清热安胎方组	941.74±30.04 ^b	626.03±16.40 ^b	666.41±18.85 ^b

a: 与正常组比较, $P<0.05$; b: 与模型组比较, $P<0.05$ 。

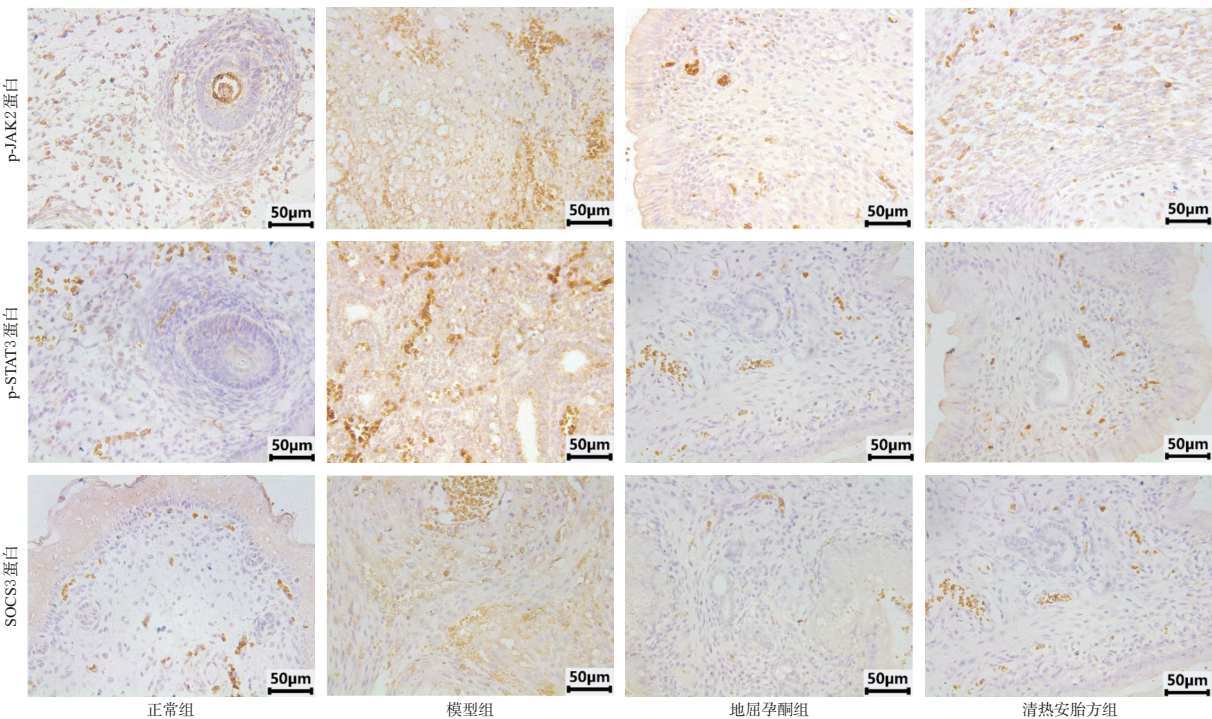


图2 大鼠妊娠子宫中JAK2/STAT3通路相关蛋白表达的免疫组化图

3.7 大鼠妊娠子宫中PI3K/AKT通路相关蛋白表达水平检测结果

与正常组比较,模型组大鼠妊娠子宫中VEGFR2、PI3K、eNOS蛋白表达水平和AKT蛋白磷酸化水平均显著降低($P<0.05$);与模型组比较,地屈孕酮组与清热安胎方组大鼠妊娠子宫中VEGFR2、PI3K、eNOS蛋白表达水平和AKT蛋白磷酸化水平均显著升高($P<0.05$)。结果见图3、表7。

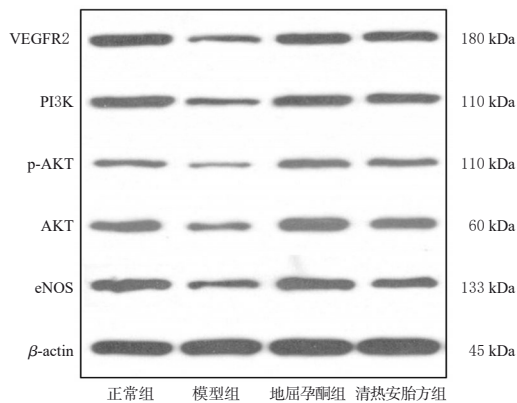


图3 大鼠妊娠子宫中PI3K/AKT通路相关蛋白表达的电泳图

表7 大鼠妊娠子宫中PI3K/AKT通路相关蛋白表达水平比较($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	VEGFR2/ β -actin	PI3K/ β -actin	eNOS/ β -actin	p-AKT/AKT
正常组	0.98 $\pm$ 0.01	0.86 $\pm$ 0.01	0.87 $\pm$ 0.01	0.99 $\pm$ 0.02
模型组	0.72 $\pm$ 0.01 ^a	0.78 $\pm$ 0.02 ^a	0.80 $\pm$ 0.01 ^a	0.71 $\pm$ 0.02 ^a
地屈孕酮组	0.95 $\pm$ 0.01 ^b	0.90 $\pm$ 0.02 ^b	0.85 $\pm$ 0.02 ^b	0.99 $\pm$ 0.01 ^b
清热安胎方组	0.94 $\pm$ 0.02 ^b	0.89 $\pm$ 0.01 ^b	0.89 $\pm$ 0.02 ^b	0.97 $\pm$ 0.02 ^b

a: 与正常组比较, $P<0.05$; b: 与模型组比较, $P<0.05$ 。

4 讨论

先兆流产是不孕症的主要发生原因之一^[13],严重危害广大女性的生殖健康。已有研究表明,使用米非司酮、米索前列醇等药物诱导的流产特征与人类自然流产类似,可以作为先兆流产动物模型的构建手段^[14]。热证是以机体阳盛阴虚、脏腑阳气亢盛为因,以机能活动亢进为表现的一种证候形式,其核心表征为甲状腺激素(T3、T4、TSH)分泌异常升高,从而激活下丘脑-垂体-甲状腺轴^[15]。本研究采用温热中药附子、干姜、肉桂配伍诱导大鼠血热,再一次性灌胃米非司酮诱导大鼠先兆流产,最后发现模型组大鼠血清中T3、T4、TSH水平和流产率均显著升高,表明血热型先兆流产模型构建成功。

流产病机核心在于气血失和,治疗应注重活血与养血、固冲与安胎的有机结合^[16]。中原庞氏妇科流派依据女性妊娠期特殊的生理病理特点,将体质与病证结合,创立了清热安胎方。方中黄芩清热燥湿、泻火解毒、止血安胎,知母滋阴降火,二者共为君药;金银花与蒲公英可清热解毒,旱莲草和藕节则能凉血止血、养阴化瘀,此

四者为臣药;苏梗理气和胃、止痛安胎,白术健脾益气、燥湿利水、止汗安胎,升麻少量配白术、荷叶可升阳止血,山茱萸、白芍兼具补血、固肾、安胎之效,这几味药作为佐药;甘草为使药,能调和各方药物,最终达到清热养阴、理气养血、安胎的效果^[17-18]。本研究结果发现,在清热层面,经清热安胎方干预后,模型大鼠T3、T4、TSH水平均显著降低;在安胎方面,经清热安胎方干预后,模型大鼠流产率显著降低,子宫系数显著升高,这提示该方可通过清除大鼠体内热邪发挥安胎作用。

JAK2/STAT3通路可参与细胞因子的调控过程,对维持机体稳态至关重要;SOCS3是STAT3的重要靶基因,活化后的STAT3可诱发SOCS3基因的转录,使SOCS3蛋白结合到p-JAK2及其受体上,从而抑制JAK2/STAT3通路转导^[19-20]。自然流产的发生通常会伴随促炎因子的过度释放,使JAK2/STAT3通路异常活化,从而导致滋养层细胞功能障碍和胚胎丢失^[21]。SOCS3理论上应通过负反馈作用抑制JAK2和STAT3的活化来缓解炎症损伤,但本研究中却发现SOCS3(蛋白或mRNA)与JAK2/STAT3通路变化趋势一致的矛盾现象。本课题组前期研究发现,血热型先兆流产的发生与母胎界面免疫失衡及炎症反应相关,由此笔者推测可能是因为促炎因子可激活JAK2/STAT3通路,从而增强了STAT3的磷酸化水平;且热证相关的高氧化应激环境会使SOCS3表达上调,从而使其失去对JAK2/STAT3通路的负反馈调控能力,进而导致上述矛盾现象的发生。然而总体而言,经清热安胎方干预后,JAK2/STAT3通路活性受到抑制,表明清热安胎方可通过抑制JAK2/STAT3通路改善模型大鼠的妊娠结局。

胚胎的定植、生长、侵袭等各阶段都依赖于胚胎血管生成,以保障营养物质供给和能量代谢交换。VEGF是血管内皮细胞分泌的一种肽类生长因子,也是血管内皮细胞特异性有丝分裂原和血管发生关键因子,具有调控血管生成和维持血管内皮细胞形态的作用^[22];PI3K作为催化生成第二信使的激酶之一,能够特异性催化磷脂酰肌醇3位羟基磷酸化反应;AKT作为PI3K信号转导途径的下游靶激酶,是PI3K/AKT通路的核心环节^[23-24]。在胚胎形成及维持过程中,高水平的VEGF与VEGFR2结合成二聚化,经磷酸化后招募PI3K,后者催化磷脂酰肌醇-4,5-二磷酸生成磷脂酰肌醇-3,4,5-三磷酸,促使AKT磷酸化;活化的p-AKT可直接激活eNOS的Ser1177位点,进而产生NO^[25-26]。NO是一种重要的气体递质,可诱导血管生成,调控血管通透性^[27]。本研究结果发现,经清热安胎方干预后,模型大鼠妊娠子宫中VEGFR2、PI3K、eNOS蛋白和mRNA表达水平以及VEGF、NO水平和AKT蛋白磷酸化水平均升高,表明清

热安胎方还可通过激活PI3K/AKT通路改善模型大鼠的妊娠结局。

综上所述,清热安胎方可改善血热型先兆流产大鼠的妊娠结局,其作用机制可能与抑制JAK2/STAT3通路、激活PI3K/AKT通路有关。

参考文献

- [1] 巫海旺,钟艳兰,罗颂平,等.补肾法调节自噬治疗自然流产的研究思路[J].中华中医药杂志,2024,39(4):1634-1637.
- [2] 苏旭晗,胡馨尹,赵国桢,等.滋肾育胎丸联合西药治疗复发性流产的临床疗效和安全性的Meta分析及GRADE分级[J].世界科学技术-中医药现代化,2023,25(2):637-646.
- [3] WANG Y, LIU H Z, LIU Y, et al. Disordered p53-MALAT1 pathway is associated with recurrent miscarriage[J]. Kaohsiung J Med Scie, 2019, 35(2):87-94.
- [4] 吴昱瑛,黄丽芝,张兆萍,等.复发性流产患者中医治疗概况及安胎结局影响因素分析[J].广州中医药大学学报,2023,40(12):3054-3061.
- [5] 严秀娟,张大伟.庞氏妇科清热安胎法述要[J].中医临床研究,2017,9(21):93-94.
- [6] 贾梦媛,张大伟,马丽亚,等.基于网络药理学和实验验证探讨庞氏安胎止血汤治疗先兆流产的作用机制[J].中药药理与临床,2023,39(7):33-40.
- [7] 柳佳,张丽,姚映芷,等.侧柏炭对血热出血证大鼠的作用及机制研究[J].中国中药杂志,2013,38(2):223-228.
- [8] 李姣姣,刘建国,赵红乐.复发性流产的中医诊疗进展[J].辽宁中医杂志,2022,49(7):210-213.
- [9] 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.
- [10] 王常麟,乔明琦,高冬梅,等.抑郁情绪通过(IL-6, TNF- α , IL-1 β)/JAK2/STAT3/VEGF通路促进甲状腺结节的发生发展[J].中国中医基础医学杂志,2025,31(10):1767-1775.
- [11] 申萌萌,刘雁峰,柳井杜莎,等.PI3K/AKT/eNOS信号通路与胚胎植入和妊娠维持[J].中国生育健康杂志,2017,28(5):489-492.
- [12] 马丽亚,张大伟,张颖,等.庞氏安胎止血汤治疗先兆流产血热证临床疗效及对T淋巴细胞亚群因子的影响[J].中华中医药杂志,2021,36(5):3049-3052.
- [13] 自然流产诊治中国专家共识编写组.自然流产诊治中国专家共识:2020年版[J].中国实用妇科与产科杂志,2020,36(11):1082-1090.
- [14] 郜洁,巫海旺,杜鑫,等.正交设计法研究羟基脲和米非司酮的优选配比制作大鼠流产模型[J].中国实验方剂学杂志,2016,22(16):114-118.
- [15] 马丽亚,赵君玫,王磊,等.CBA/J小鼠虚热型反复自然流产模型的建立[J].中医学报,2020,35(2):358-361.
- [16] 张玉珍.中医妇科学[M].2版.北京:中国中医药出版社,2007:185-189.
- [17] 马丽亚,杜玉洁,王磊,等.庞氏安胎汤对先兆流产大鼠的影响[J].中医学报,2017,32(9):1686-1689.
- [18] 马丽亚,张大伟,张颖,等.庞氏安胎汤对先兆流产大鼠血清免疫因子及激素水平的影响[J].中医杂志,2019,60(2):159-162.
- [19] YANG X L, LIU Z Q, ZHOU J W, et al. SPP1 promotes the polarization of M2 macrophages through the JAK2/STAT3 signaling pathway and accelerates the progression of idiopathic pulmonary fibrosis[J]. Int J Mol Med, 2024, 54(4):89.
- [20] YAN Y J, BAI S W, HAN H X, et al. Knockdown of trem 2 promotes proinflammatory microglia and inhibits glioma progression via the JAK2/STAT3 and NF- κ B pathways[J]. Cell Commun Signal, 2024, 22(1):272.
- [21] 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.
- [22] WANG X L, HU H, YU X H, et al. Zishen yutai pills promote angiogenesis at the maternal-fetal interface in recurrent spontaneous abortion mice by regulating miR-187/VEGF axis[J]. Drug Des Dev Ther, 2024, 18:407-423.
- [23] CHEN X, SONG Q L, WANG J Y, et al. FKBP5 regulates trophoblast-macrophage crosstalk in recurrent spontaneous abortion through PI3K/AKT and NF- κ B signaling pathways[J]. Free Radic Biol Med, 2023, 209:55-69.
- [24] MA N N, LIU B, JIN Y F, et al. Aquaporin 9 causes recurrent spontaneous abortion by inhibiting trophoblast cell epithelial-mesenchymal transformation and invasion through the PI3K/AKT pathway[J]. Biol Reprod, 2023, 109(5):736-748.
- [25] FRUMAN D A, CHIU H, HOPKINS B D, et al. The PI3K pathway in human disease[J]. Cell, 2017, 170(4):605-635.
- [26] CARLSTRÖM M, WEITZBERG E, LUNDBERG J O. Nitric oxide signaling and regulation in the cardiovascular system: recent advances[J]. Pharmacol Rev, 2024, 76(6):1038-1062.
- [27] NVALE G R, SINGH S, GHOSH K. NO donors as the wonder molecules with therapeutic potential: recent trends and future perspectives[J]. Coord Chem Rev, 2023, 481:215052.

(收稿日期:2026-01-06 修回日期:2026-03-30)

(编辑:唐晓莲)