

# 推拿改善 T2DM 大鼠糖脂代谢性炎症损伤的分子机制研究

王康<sup>1</sup> 孟凤仙<sup>1</sup> 钮妍<sup>2</sup> 薛恬珏<sup>3</sup> 国生<sup>1</sup> 沈潜<sup>1</sup> 魏培栋<sup>1</sup> 付国兵<sup>1</sup>

(1 北京中医药大学东方医院,北京,100078; 2 北京中医药大学第三附属医院,北京,100029; 3 北京中医药大学,北京,100029)

**摘要** 目的:观察推拿对2型糖尿病(Type 2 Diabetes Mellitus, T2DM)大鼠腹直肌组织腺苷酸活化蛋白激酶 $\alpha_2$  (AMPK $\alpha_2$ )、核因子- $\kappa$ B (Nuclear Factor- $\kappa$ B, NF- $\kappa$ B)及白细胞介素-6 (Interleukin-6, IL-6)基因转录及蛋白表达的影响,探讨其改善 T2DM 大鼠代谢性炎症损伤的分子机制。方法:选取 40 只 Wistar 大鼠,随机取出 6 只为空白组,其余高脂高糖饮食联合低剂量 (35 mg/kg)链脲佐菌素腹腔注射建立 T2DM 模型,成模大鼠 32 只随机分入模型组、西药组、推拿组及西药推拿组。空白组及模型组每日灌胃蒸馏水,西药组每天以 250 mg/kg 标准进行二甲双胍灌胃 1 次,推拿组每日给予推拿手法治疗 1 次,西药推拿组在相同给药标准基础上每日加用推拿治疗 1 次。共干预 8 周,分别记录第 2、4、8 周的空腹血糖 (Fast Blood Glucose, FBG) 值,并运用 real-time-PCR 测定腹直肌 AMPK $\alpha_2$ 、NF- $\kappa$ B 及 IL-6 基因转录,Western-blot 测定腹直肌 AMPK $\alpha_2$  及 NF- $\kappa$ B 蛋白含量,ELISA 测定 IL-6 蛋白含量。结果:与模型组比较,西药组及西药推拿组 FBG 在第 2、4、8 周时显著下降,差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ),推拿组 FBG 在第 4、8 周时显著下降,差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ );与西药组比较,西药推拿组在第 4 周降糖效果更为显著,差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ );与推拿组比较,西药推拿组在第 4、8 周时降糖效果更为显著,差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ );与 0 周时比较,各观察组 FBG 在第 2、4、8 周时,均显著降低,差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )。与空白组比较,模型组 AMPK $\alpha_2$  mRNA 转录及蛋白表达均下降,差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ );与模型组比较,西药组、推拿组、西药推拿组 AMPK $\alpha_2$  mRNA 转录及蛋白表达均升高,差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。与空白组比较,模型组 NF- $\kappa$ B mRNA 转录显著升高,差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ ),蛋白表达升高,差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ );与模型组比较,西药组 NF- $\kappa$ B mRNA 转录下降,差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ );与模型组比较,推拿组 NF- $\kappa$ B mRNA 转录及蛋白表达均下降,差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ );与模型组比较,西药推拿组 NF- $\kappa$ B mRNA 转录和蛋白表达显著下降,差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ ,  $P < 0.05$ );与空白组比较,模型组 IL-6 mRNA 转录升高,差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ),蛋白表达显著升高,差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ );与模型组比较,西药组、推拿组及西药推拿组 IL-6 基因转录均显著下降,差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ),蛋白表达均显著下降,差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ )。结论:推拿可改善 T2DM 大鼠的空腹血糖,并通过上调骨骼肌 AMPK $\alpha_2$  基因转录与蛋白表达,下调 NF- $\kappa$ B、IL-6 基因转录与蛋白表达,发挥其改善糖脂代谢性炎症损伤的手法效应。

**关键词** 推拿; 2 型糖尿病; AMPK; 代谢性炎症损伤; 分子机制

## Study on Molecular Mechanism of Tuina in Improving Glucose and Lipid Metabolic Induced Inflammatory Injury in T2DM Rats

Wang Kang<sup>1</sup>, Meng Fengxian<sup>1</sup>, Niu Yan<sup>2</sup>, Xue Tianjue<sup>3</sup>, Guo Sheng<sup>1</sup>, Shen Qian<sup>1</sup>, Wei Peidong<sup>1</sup>, Fu Guobing<sup>1</sup>

(1 Dongfang Hospital, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100078, China; 2 Third Affiliated Hospital of Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China; 3 Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China)

**Abstract Objective:** To observe the effects of Tuina on the gene transcription and protein expression of 5'AMP-activated protein kinase $\alpha_2$  (AMPK $\alpha_2$ ), nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) and interleukin (IL-6) in rectus abdominis muscle of type 2 Diabetes Mellitus (T2DM) rats. To explore the molecular mechanism of Tuina on improving the metabolic inflammatory injury in T2DM. **Methods:** A total of 6 Wistar rats out of 40 were randomly selected as the blank group (CON). Others were feed with high-fat and high-sugar diets combined with low-dose (35 mg/kg) streptozotocin to establish a T2DM model. A total of 32 successfully modeled rats were randomly divided into the model group (MOD), western medicine group (MET), and Tuina group (TNA) and western medicine combined Tuina group (MIX). The CON and the MOD were perfused with distilled water daily. The MET was daily given a dose of 250 mg/kg for metformin, and the TNA was given daily for manual treatment, and the MIX was given both intervention from MET and TNA. After 8 weeks of intervention, the values of fast blood glucose (FBG) at 2<sup>nd</sup>, 4<sup>th</sup>, and 8<sup>th</sup> week were recorded, and real-

基金项目:国家自然科学基金面上项目(81574092);北京中医药大学青年教师项目(2017-jms-js-104)

作者简介:王康(1985.03—),男,博士,主治医师,研究方向:推拿手法的生化效应机制研究, E-mail: wangkang@bucm.edu.cn

通信作者:付国兵(1961.10—),男,学士,主任医师,研究方向:腹部推拿改善代谢性疾病的临床及实验研究, Email:dfyam@163.com

time PCR was used to measure the gene transcription of AMPK $_{\alpha 2}$ , NF- $\kappa$ B, and IL-6 in the rectus abdominis. Western-blot was used to measure the protein expression of AMPK $_{\alpha 2}$  and NF- $\kappa$ B in the rectus abdominis muscle, and the protein expression of IL-6 was determined by ELISA. **Results:** Compared with the MOD, the FBG of the MET and the MIX decreased significantly at the 2<sup>nd</sup>, 4<sup>th</sup>, and 8<sup>th</sup> week ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), and the FBG of the TNA decreased significantly at the 4th and 8th week ( $P < 0.05$ ). Compared with the MET, the MIX had a more significant hypoglycemic effect at the 4th week ( $P < 0.05$ ), and compared with the TNA, the MIX had a more significant hypoglycemic effect at the 4th and 8th week ( $P < 0.05$ ). Compared with 0 weeks, FBG of each treatment group was significantly decreased at the 2<sup>nd</sup>, 4<sup>th</sup>, and 8<sup>th</sup> week ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ). Compared with the CON, the mRNA and protein expression of AMPK $_{\alpha 2}$  in the MOD was decreased ( $P < 0.05$ ). Compared with the MOD, the mRNA and protein expression of AMPK $_{\alpha 2}$  in the MET, the TNA and the MIX were increased ( $P < 0.05$ ). Compared with the CON, the transcription of NF- $\kappa$ B mRNA in the MOD was significantly increased ( $P < 0.01$ ), and the protein expression was increased ( $P < 0.05$ ). Compared with the MOD, the transcription of NF- $\kappa$ B mRNA in the MET was decreased ( $P < 0.05$ ). Compared with the MOD, the transcription of NF- $\kappa$ B mRNA in the MET was significantly decreased ( $P < 0.01$ ), and the protein expression was decreased ( $P < 0.05$ ). Compared with the CON, the IL-6 mRNA expression in the MOD was increased ( $P < 0.05$ ), and the protein expression was significantly increased ( $P < 0.01$ ). Compared with the MOD, the IL-6 gene transcription in the MET, the TNA and the MIX was all significantly decreased ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), and protein expression was also decreased significantly ( $P < 0.01$ ). **Conclusion:** Tuina can improve the FBG of T2DM rats, and up-regulate the gene transcription and protein expression of AMPK $_{\alpha 2}$  in skeletal muscle, down-regulate the gene transcription and protein expression of NF- $\kappa$ B and IL-6, in order to improve the metabolic damage caused by glycolipid toxicity.

**Key Words** Tuina; Type 2 diabetes; AMPK; Metabolic inflammatory injury; Molecular mechanism

中图分类号: R587.1; R244.1 文献标识码: A doi: 10.3969/j.issn.1673-7202.2018.12.038

随着社会发展和人民生活水平的提高, 2 型糖尿病 (Type 2 Diabetes Mellitus, T2DM) 已成为继心脑血管疾病、肿瘤之后另一个严重危害人民健康的慢性非传染性疾病。我国糖尿病的患病率近年来呈快速上升趋势, 成人糖尿病患病率达 11.6%, 糖尿病前期患病率更高达 50.1%<sup>[1]</sup>。既往普遍认为, IR 和胰岛  $\beta$  细胞功能衰竭是 T2DM 的 2 个主要发病机制, 但随着近年来研究的不断深入, 相继发现糖脂毒性、慢性炎性反应、微循环功能异常及胰岛  $\beta$  细胞去分化等因素也与 T2DM 的发病关系密切<sup>[2]</sup>。其中改善糖脂毒性并控制其引起的慢性炎性损伤已成为 T2DM 的临床治疗的核心<sup>[3]</sup>。因此, 骨骼肌 AMPK $_{\alpha 2}$  以其对糖脂代谢及炎性反应的强大调控能力成为了近年来学术界研究的热门靶点, AMPK $_{\alpha 2}$  的激活不仅可通过调控 GluT4、ACC1/2 等分子改善机体糖脂代谢, 还可抑制 NF- $\kappa$ B 信号途径介导机体的慢性炎性反应, 从而缓解糖脂毒性对机体的损伤<sup>[4]</sup>。

近年来, 推拿已广泛应用于 T2DM 的临床治疗, 且随着大量临床研究的开展, 已基本明确了推拿的临床疗效, 但对于手法作用机制的研究当前仍处于起步阶段, 本团队在前期研究中已发现推拿可通过调节 AMPK/Glut4 信号链改善 T2DM 大鼠的糖代谢水平<sup>[5]</sup>。因此, 本次研究继续对推拿在抑制 T2DM 慢性炎性反应中发挥的手法效应机制进行了分子层面的深入探索。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 动物 4 周龄 SPF 级雄性 Wistar 大鼠 40 只, 体重 (100 ± 10) g, 由北京维通利华实验动物技术有限公司提供。

1.1.2 药物 Streptozotocin (SIGMA, 美国, S0130-100), 盐酸二甲双胍 (源叶生物, 1105-70-4)

1.1.3 试剂及仪器 超纯 RNA 提取试剂盒 (康为世纪生物), HiFi-MMLV cDNA 第一链合成试剂盒 (康为世纪生物), SYBR FAST qPCR Kit Master Mix (2 ×) Universal (KAPA Biosystems, 美国), AMPK $_{\alpha 2}$  抗体 (Abcam, 英国, ab3760)、NF- $\kappa$ Bp65 抗体 (Abcam, 英国, ab16502), 大鼠 IL-6 Elisa 试剂盒 (Multisciences)。全自动多功能酶标仪 (MULTISKAN MK3, Thermo, 美国), 荧光定量 PCR 仪 (ABI7500, 美国), 凝胶成像仪 (Tanon-6600, 中国)。

### 1.2 方法

1.2.1 分组与模型制备 将 40 只大鼠适应性喂养于北京中医药大学东方医院实验动物中心 SPF 级动物房, 温度 18 ~ 22 °C, 相对湿度 40% ~ 60%, 自由进食和饮水。1 周后随机取出 6 只作为空白组, 其余 34 只给予高脂饲料 (70% 普通饲料、10% 蔗糖、10% 猪油、10% 蛋黄粉, 由北京华阜康生物科技股份有限公司提供) 喂养 4 周后, 禁食 12 h, 按 30 mg/kg 一次性腹腔注射 1% 浓度 STZ。空白对照组腹腔注射相

同剂量柠檬酸缓冲液。3 d 后,以空腹血糖(FBG)  $\geq$  11.1 mmol/L,视为造模成功。将成模大鼠随机分为模型组、推拿组、西药组及西药推拿组。剔除造模失败及干预中死亡的大鼠,最终各组取材大鼠分别为6只。

1.2.2 干预方法 空白对照组(Control Group, CON):相同饲养条件下不做任何处理,但在其他组进行干预时,给予相同的鼠袋固定 15 min,固定后给予 1 mL 蒸馏水灌胃,1 次/d,共 8 周。疾病模型组(Model Group, MOD):干预方法同空白对照组。西药观察组(Drug Group, MET):将配置好的二甲双胍水溶液,按照 250 mg/(kg · d)灌胃给药,并在灌胃给药结束后用相同鼠袋进行固定,1 次/d,共干预 8 周。推拿观察组(Tuina Group, TNA):将大鼠用鼠袋套住头及胸部(黑暗环境有利于实验大鼠状态平静,治疗依从性高),然后给予推拿干预。具体操作如下:以神阙为中心顺时针揉腹 5 min,三指振腹法于小鼠关元、神阙、天枢区域施术 5 min,频率(240  $\pm$  10)次/min,行弹拨法于大鼠双侧梁丘血海 5 min,频率(120  $\pm$  10)次/min。整套手法共计 15 min,手法结束后给予 1 mL 蒸馏水灌胃,1 次/d,共干预 8 周。西药推拿组(Combined Group, MIX):首先给予推拿组相同的手法干预,然后给予西药组相同标准的二甲双胍灌胃,1 次/d,共干预 8 周。

1.2.3 组织标本采集及处理 大鼠在末次干预结束当天晚上 9 点,禁食不禁水 12 h 后,依次按 0.7 mL/kg 的剂量腹腔注射 5% 的水合氯醛腹腔麻醉,腹主动脉取血后处死,冰浴下(4  $^{\circ}$ C 冰盘),取腹直肌并快速去除多余脂肪和结缔组织后,放入冻存管内,投入液氮保存,处死动物。随后将动物组织置于 -80  $^{\circ}$ C 超低温冰箱保存。

1.2.4 指标检测与方法 1) RT-PCR 方法检测 AMPK $_{\alpha 2}$ 、NF- $\kappa$ B 及 IL-6 的 mRNA 转录水平 Trizol 法提取大鼠腹直肌总 RNA,取 1  $\mu$ g 继续反转录程序,得到 cDNA 溶液,存于 -20  $^{\circ}$ C 备用。引物序列及产物长度见表 1,以 cDNA 做模板,应用 real-time PCR 仪进行扩增,采用熔解曲线分析方法,首先对基因进行 PCR 扩增循环,待扩增循环完成后,依据熔解曲线对产物进行分析,以确定产物纯度。采用相对定量法,以 GAPDH 作为内参基因,  $\Delta\Delta$ Ct = (Ct 目的基因 - Ct 内参基因)实验组 - (Ct 目的基因 - Ct 内参基因)对照组。

2) Western Blot 测定 AMPK $_{\alpha 2}$ 及 NF- $\kappa$ B 蛋白表达水平取各组大鼠腹直肌组织,加入 RIPA 裂解液,彻

底混匀。冰上孵育 20 min 后,13 000 r/min(4  $^{\circ}$ C)离心 20 min。取上清,用 BCA 蛋白定量试剂盒测定蛋白浓度上样,SDS-PAGE 电泳,转膜后,抗体孵育,ECL 显色,胶片曝光。最后,采用凝胶图像分析系统对 western blot 蛋白杂交条带进行扫描,并用 Imagesystem 4.00 软件对图像进行灰度分析。相对含量的变化 = 目的蛋白灰度/GAPDH。

表 1 各引物序列及扩增产物大小

引物名称	引物序列(5'to3')	扩增产物大小(bp)
AMPK $_{\alpha 2}$	ACGACATTATGCCGGAGGTG GCTGGAATCGACACTTGACC	278
IL-6	AGAGACTTCCAGCCAGTTGC AGTCTCCTCTCCGGACTTGT	85
NF- $\kappa$ Bp65	AACCGCTCCAACCTGAAGAT TGTCTGTGAACATCCGTGGG	188
GAPDH	TGTGAACGGATTTGGCCCTA GATGCTGATGGGTTCCCGT	208

3) ELISA 测定 IL-6 含量取各组大鼠腹直肌组织,具体步骤按照试剂盒说明书进行。

1.3 统计学方法 采用 SPSS 21.0 统计软件对数据进行统计学分析,计量资料以均数  $\pm$  标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,组间比较采用单因素方差分析(One-Way ANOVA),方差齐时两两比较用 LSD 方法,方差不齐时用 Games Howell 法,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 对 T2DM 大鼠 FBG 水平的影响 干预前,模型组、西药组、推拿组、西药推拿组与空白组比较,FBG 值显著高于空白组,差异有统计学意义;西药组、推拿组、西药推拿组与模型组比较,差异无统计学意义。与模型组比较,西药组 FBG 值在第 2、4、8 周时均显著下降,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ),推拿组 FBG 在第 4、8 周时显著下降,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),西药推拿组 FBG 在第 2、4、8 周时均显著下降,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ );与西药组比较,西药推拿组在第 4 周时对 FBG 调节效应更为显著,差异有统计学意义( $P < 0.05$ );与推拿组比较,西药推拿组在第 4、8 周时对 FBG 调节效应更为显著,差异有统计学意义( $P < 0.05$ );与 0 周时比较,各观察组在第 2、4、8 周时,均可显著降低 FBG,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )。见表 2。

2.2 对 T2DM 大鼠腹直肌 AMPK $_{\alpha 2}$ 、NF- $\kappa$ B、IL-6 mRNA 转录及蛋白表达的影响 与空白组比较,模型组 AMPK $_{\alpha 2}$  mRNA 转录及蛋白表达均下降,差异有

表 2 各组大鼠不同时段空腹血糖值( $\bar{x} \pm s, n=6, \text{mmol/L}$ )

	0 周	第 2 周	第 4 周	第 8 周
空白组	5.68 ± 0.52	5.38 ± 0.62	5.65 ± 0.79	5.91 ± 0.74
模型组	26.98 ± 3.70 **	26.27 ± 4.87 **	25.15 ± 4.29 **	27.13 ± 2.46 **
西药组	26.87 ± 2.14	20.73 ± 3.78 ▲■	20.38 ± 2.59 ▲■■	18.66 ± 2.80 ▲▲■■■
推拿组	26.27 ± 2.26	22.03 ± 3.03 ■	21.35 ± 2.66 ■■■	21.96 ± 4.43 ■■■
药推组	26.42 ± 5.19	18.08 ± 4.63 ▲■	16.55 ± 3.87 ▲▲■■■□	16.47 ± 4.30 ▲▲■■■□

注:与空白组比较, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ ;与模型组比较, ▲  $P < 0.01$ , ▲▲  $P < 0.01$ ;与西药组比较, ▲  $P < 0.05$ , ▲▲  $P < 0.01$ ;与推拿组比较, □  $P < 0.05$ ;与 0 周比较, ■  $P < 0.05$ , ■■  $P < 0.05$

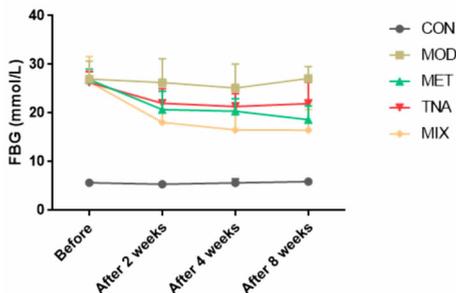


图 1 各组不同时期 FPG 水平比较

表 3 各组大鼠腹直肌 AMPK $\alpha_2$  mRNA 转录及蛋白表达( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

组别	AMPK $\alpha_2$	
	mRNA 转录	蛋白表达
空白组	1.10 ± 0.09	0.62 ± 0.03
模型组	0.62 ± 0.13 *	0.31 ± 0.01 *
西药组	0.78 ± 0.10 $\Delta$	0.46 ± 0.02 $\Delta$
推拿组	0.71 ± 0.05 $\Delta$	0.50 ± 0.07 $\Delta$
药推组	0.90 ± 0.10 $\Delta$	0.50 ± 0.06 $\Delta$

注:与空白组比较, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ ;与模型组比较,  $\Delta P < 0.01$ ,  $\Delta\Delta P < 0.01$

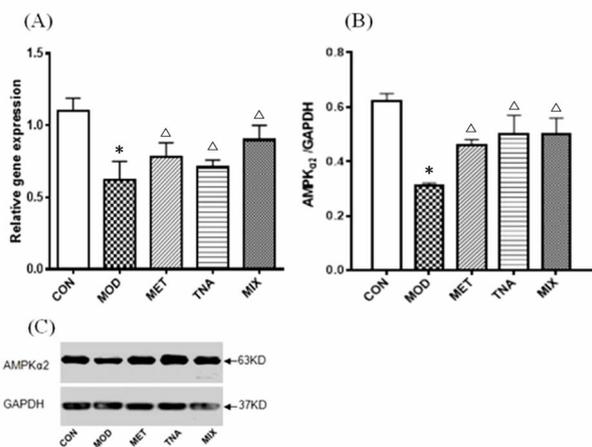


图 2 推拿对各组腹直肌组织 AMPK $\alpha_2$  mRNA 转录(A)、蛋白表达(B)及电泳结果(C)的影响

注:与空白组比较, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ ;与模型组比较,  $\Delta P < 0.05$ ,  $\Delta\Delta P < 0.01$

统计学意义( $P < 0.05$ );与模型组比较,西药组、推拿组、西药推拿组 AMPK $\alpha_2$  mRNA 转录及蛋白表达均升高,差异有统计学意义( $P < 0.05$ );与西药组及推

拿组比较,西药推拿组的 AMPK $\alpha_2$  基因转录有升高趋势,差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。见表 3、图 2。

表 4 各组大鼠腹直肌 NF- $\kappa$ B mRNA 转录及蛋白表达( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

组别	NF- $\kappa$ B	
	mRNA 转录	蛋白表达
空白组	1.03 ± 0.04	0.27 ± 0.07
模型组	1.79 ± 0.13 **	0.51 ± 0.06 *
西药组	1.38 ± 0.17 $\Delta$	0.48 ± 0.04
推拿组	1.40 ± 0.15 $\Delta$	0.30 ± 0.09 $\Delta$
药推组	1.22 ± 0.14 $\Delta\Delta$	0.33 ± 0.09 $\Delta$

注:与空白组比较, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ ;与模型组比较,  $\Delta P < 0.01$ ,  $\Delta\Delta P < 0.01$

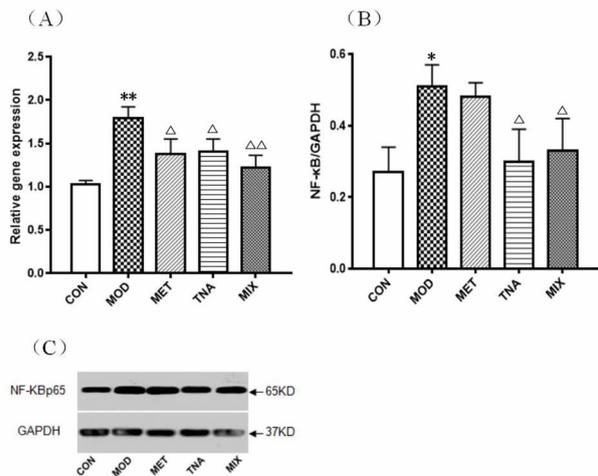


图 3 推拿对各组腹直肌组织中 NF- $\kappa$ B mRNA 转录(A)、蛋白表达(B)及电泳结果(C)的影响

注:与空白组比较, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ ;与模型组比较,  $\Delta P < 0.05$ ,  $\Delta\Delta P < 0.01$

与空白组比较,模型组 NF- $\kappa$ B mRNA 转录显著升高,差异有统计学意义( $P < 0.01$ ),蛋白表达升高,差异有统计学意义( $P < 0.05$ );与模型组比较,西药组 NF- $\kappa$ B mRNA 转录下降,差异有统计学意义( $P < 0.05$ );与模型组比较,推拿组 NF- $\kappa$ B mRNA 转录及蛋白表达均下降,差异有统计学意义( $P < 0.05$ );与模型组比较,西药推拿组 NF- $\kappa$ B mRNA 转录显著下降,差异有统计学意义( $P < 0.01$ ),蛋白表达下降,差异有统计学意义( $P < 0.05$ );与西药组及推

推拿组比较,西药推拿组 NF- $\kappa$ BmRNA 转录有下降趋势,差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。见表 4、图 3。

与空白组比较,模型组 IL-6 mRNA 转录升高,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),蛋白表达显著升高,差异有统计学意义( $P < 0.01$ );与模型组比较,西药组、推拿组及西药推拿组 IL-6 基因转录均显著下降,差异有统计学意义( $P < 0.05, P < 0.01$ ),蛋白表达均显著下降,差异有统计学意义( $P < 0.01$ );西药推拿组较其他两观察组对 IL-6 mRNA 转录及蛋白表达的调节效应更为显著。见表 5、图 4。

表 5 各组大鼠腹部脂肪 IL-6 基因转录水平比较

( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

组别	IL-6	
	mRNA 转录	蛋白表达 (pg/mg)
空白组	1.01 $\pm$ 0.09	42.74 $\pm$ 10.58
模型组	1.61 $\pm$ 0.22 *	96.68 $\pm$ 9.66 **
西药组	1.34 $\pm$ 0.15 $\Delta$	78.88 $\pm$ 9.80 $\Delta\Delta$
推拿组	1.43 $\pm$ 0.20 $\Delta$	70.85 $\pm$ 4.85 $\Delta\Delta$
药推拿组	1.31 $\pm$ 0.05 $\Delta\Delta$	61.34 $\pm$ 9.50 $\Delta\Delta$

注:与空白组比较, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ ;与模型组比较,  $\Delta P < 0.01, \Delta\Delta P < 0.01$

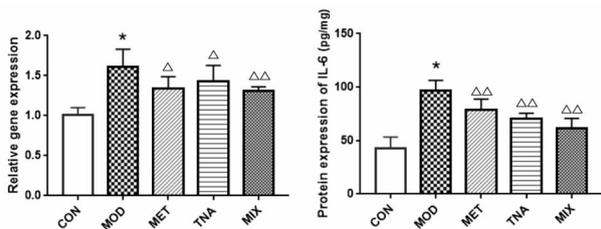


图 4 推拿对各组腹部脂肪组织 IL-6 mRNA 转录和蛋白表达的影响

注:与空白组比较, \*  $P < 0.05$ ;与模型组比较,  $\Delta P < 0.05, \Delta\Delta P < 0.01$

### 3 讨论

中医理论认为,脾在体合肌肉、主四肢,因此,我国历代医家尤其重视推拿与导引在“脾失健运”相关疾病中的防治作用,本次研究中运用到的核心手法——振腹法主要作用为培元固本,补益肝肾;辅以揉摩天枢以调畅气机,沟通上下;点按梁丘、血海以健脾清胃,化痰降浊。近年来,推拿治疗的疾病谱逐渐由原先的骨伤类疾病向内科慢病的方向回归,在我国 T2DM 的防治领域推拿有着广阔的应用前景。然而,国内外对于推拿改善 T2DM 的生物学机制研究尚处于起步阶段,急需相应的基础研究为推拿的临床应用提供现代科学的理论依据。

近年来研究发现,慢性炎症反应参与了整个 T2DM 的发病过程,其程度与 IR 及  $\beta$  细胞损伤呈正相关。糖毒性不仅可直接引起外周组织慢性炎症反

应,还可通过糖基化终末产物(Advanced Glycation End Products, AGEs)、UPR、己糖胺途径(Hexosamine Pathway)、胰脏淀粉酶沉积、 $\beta$  细胞去分化等途径间接引发组织慢性炎症反应<sup>[6]</sup>。而脂质的异位沉积引发的脂毒性,可招募炎性细胞浸润,诱导 OS、ERS 及线粒体功能障碍等病理损伤也被认为是机体慢性炎症反应引起 IR 及 T2DM 发生发展的重要机制<sup>[7]</sup>。

NF- $\kappa$ B 作为与免疫调控、介导炎症反应密切相关的核因子,广泛分布于真核生物细胞中,细胞在静息状态下 NF- $\kappa$ B 的 p50/p65 亚基与抑制蛋白 I $\kappa$ B 以三具体形式存在于细胞质中。当受到 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6 及 FFA 等细胞因子或信号分子刺激后,与其抑制因子 I $\kappa$ B 解离,继而进入细胞核与相应靶基因结合,发挥转录调节作用。在复杂的炎症反应细胞因子网络中,NF- $\kappa$ B 的活化或是其中的一个中心环节,调控着大量细胞因子之间的相互作用<sup>[8]</sup>。

当前,围绕推拿的免疫调节机制方面的研究正呈现上升趋势。有研究发现按摩可显著提高小鼠的胸腺及脾脏的 T 淋巴细胞数量,并认为其可作为免疫缺陷相关疾病的辅助治疗方法<sup>[9]</sup>。亦有学者在治疗肥胖型 2 型糖尿病的临床研究中,发现推拿联合药物治疗可进一步改善血清炎症反应因子 IL-6、TNF- $\alpha$  及 CRP 水平,使炎症反应水平得到控制<sup>[10-11]</sup>。本研究从基因与蛋白的层面均反映出了推拿对骨骼肌 AMPK $\alpha_2$ 、NF- $\kappa$ B 及 IL-6 的调节作用,且其对 IL-6 蛋白的抑制作用可在与二甲双胍联用后进一步加强。尽管有研究<sup>[12]</sup>表明二甲双胍可通过肝脏 AMPK 途径抑制 IKK $\alpha$  和 IKK $\beta$  表达,调节相关炎症反应因子,但在本研究中,二甲双胍对骨骼肌 NF- $\kappa$ B 蛋白表达的抑制作用并不显著。而推拿干预对骨骼肌 NF- $\kappa$ BmRNA 转录及蛋白表达有显著的抑制作用,且在 2 种干预方式联用的情况下仍存在这一效应。AMPK 作为细胞能量代谢的“开关”,不仅能够调节糖脂代谢,在抑制炎症反应中同样扮演重要角色<sup>[13]</sup>。而推拿抗炎效应的产生是否由 AMPK $\alpha_2$  信号网络介导,有待进一步实验验证;如果存在相关性,则推拿很有可能通过 AMPK $\alpha_2$  的下游分子 SIRT1 而对 NF- $\kappa$ B 合成产生抑制效应<sup>[14-15]</sup>。总之,当前的实验结果为解释推拿在大量 T2DM 临床研究<sup>[16-18]</sup>中体现出的抗炎效应机制提供了重要的科学依据。

此外,从对 FBG 的调节程度来看,与单纯西药或推拿组比较,西药联合推拿组在整个干预周期内体现了更稳定的血糖调控效应。推拿组自身对照显示降糖效应在 4 周时效果最好,在第 8 周时血糖值

再次升高,这一现象或与老鼠的整体状况随病情进展而恶化有关,提示了推拿的独立降糖能力有限,或更适用于轻、中度 T2DM 患者的临床治疗。但与模型组的比较仍可以看出,其改善机体炎症反应,减缓 T2DM 病情进展的作用是可以肯定的。

然而,本次研究仍存在一定的不足之处,如仅对 AMPK $\alpha_2$  与 NF- $\kappa$ B 的总蛋白表达进行了测定,在后续研究中应补充对其磷酸化蛋白水平的测定,以便于进一步明确推拿手法对这 2 个信号分子的活性是否存在调节作用。此外, Irisin<sup>[19-20]</sup>、LP、ADP、Chemerin<sup>[21-22]</sup> 等肌肉及脂肪因子均存在对 AMPK $\alpha_2$  与 NF- $\kappa$ B 的上游调节作用,对这些因子的筛选,也将有利于完善推拿改善 T2DM 代谢性炎症损伤机制的科学假说。

综上所述,本研究初步揭示了推拿可改善 T2DM 大鼠的 FBG 水平,增强骨骼肌 AMPK $\alpha_2$  基因转录与蛋白表达,同时降低骨骼肌炎症因子 NF- $\kappa$ B 及 IL-6 的基因转录与蛋白表达,其与二甲双胍联用可体现较好的协同降糖与抗炎效应。但 NF- $\kappa$ B、IL-6 与 AMPK $\alpha_2$  三者间的关联性,仍有待进一步探索。

#### 参考文献

[1] 汪会琴,胡如英,武海滨,等. 2 型糖尿病报告发病率研究进展[J]. 浙江预防医学,2016,28(1):37-39,57.

[2] Chatterjee S, Khunti K, Davies MJ. Type 2 diabetes[J]. Lancet, 2017,389(10085):2239-2251.

[3] Romeo GR, Lee J, Shoelson SE. Metabolic syndrome, insulin resistance, and roles of inflammation--mechanisms and therapeutic targets[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol,2012,32(8):1771-1776.

[4] Herzig S, Shaw RJ. AMPK: guardian of metabolism and mitochondrial homeostasis[J]. Nat Rev Mol Cell Biol,2018,19(2):121-135.

[5] 王康,国生,钮妍,等. 振腹推拿对 T2DM 大鼠骨骼肌 AMPK/Glut 4 信号链的影响[J]. 环球中医药,2017,10(11):1224-1228.

[6] Kahn SE, Cooper ME, Del PS. Pathophysiology and treatment of type 2 diabetes: perspectives on the past, present, and future[J]. Lancet, 2014,383(9922):1068-1083.

[7] Bensellam M, Laybutt DR, Jonas JC. The molecular mechanisms of pancreatic  $\beta$ -cell glucotoxicity: recent findings and future research directions[J]. Mol Cell Endocrinol,2012,364(1-2):1-27.

[8] 唐佳雯,朱涛. 核因子  $\kappa$ B 抑制物在糖尿病周围神经病变中的研

究进展[J]. 医学综述,2017,23(8):1613-1617.

[9] Major B, Rattazzi L, Brod S, Pilipović I, Leposavić G, D'Acquisto F. Massage-like stroking boosts the immune system in mice[J]. Sci Rep, 2015,5:10913.

[10] 王朝辉,齐伟,韩东岳,宋柏林,王之虹. 经穴推拿对肥胖 2 型糖尿病患者血清炎症因子的影响[J]. 南京中医药大学学报,2014,30(2):111-113.

[11] 王朝辉,齐伟,韩东岳,等. 腹部经穴推拿联合盐酸二甲双胍对肥胖 2 型糖尿病患者脂联素蛋白表达的影响[J]. 上海中医药杂志,2014,48(3):45-47.

[12] Lund SS, Tarnow L, Stehouwer CD, et al. Impact of metformin versus repaglinide on non-glycaemic cardiovascular risk markers related to inflammation and endothelial dysfunction in non-obese patients with type 2 diabetes[J]. Eur J Endocrinol,2008,158(5):631-641.

[13] Green CJ, Pedersen M, Pedersen BK, et al. Elevated NF- $\kappa$ B activation is conserved in human myocytes cultured from obese type 2 diabetic patients and attenuated by AMP-activated protein kinase[J]. Diabetes,2011,60(11):2810-2819.

[14] Garcia D, Shaw RJ. AMPK: Mechanisms of Cellular Energy Sensing and Restoration of Metabolic Balance[J]. Mol Cell,2017,66(6):789-800.

[15] Cokorinos EC, Delmore J, Reyes AR, et al. Activation of Skeletal Muscle AMPK Promotes Glucose Disposal and Glucose Lowering in Non-human Primates and Mice[J]. Cell Metab,2017,25(5):1147-1159. e10.

[16] 宋柏林,朴春丽,陈曦,等. 推拿配合二甲双胍治疗肥胖 2 型糖尿病患者 80 例临床观察[J]. 世界中西医结合杂志,2011,6(3):206-209.

[17] 商德俊,李页,冯科. “减肥八穴”穴位埋线结合健脾祛湿推拿法治疗单纯性肥胖症(脾虚湿盛型)的疗效观察[J]. 中医药导报,2016,22(1):57-59.

[18] 宋柏林,朴春丽,于淼,等. 从改善脂肪组织炎症方面探讨推拿手法治疗肥胖 2 型糖尿病胰岛素抵抗机制[J]. 中国老年学杂志,2011,31(6):1084-1085.

[19] 李欣,刘师伟. 肌肉因子 Irisin 与糖尿病血管并发症的最新研究进展[J]. 中国药物与临床,2017,17(7):987-989.

[20] 张怡,孙易,丁树哲. 新的肌肉因子——鸢尾素[J]. 中国生物化学与分子生物学报,2017,33(5):429-435.

[21] 宋威巍,柏友萍. Chemerin、肥胖与运动研究进展[J]. 安徽师范大学学报:自然科学版,2018,41(1):98-102.

[22] 宫计划,徐昭. 2 型糖尿病患者血清脂肪细胞因子 Chemerin 表达水平及临床价值[J]. 中国医学创新,2018,15(27):22-25.

(2018-02-06 收稿 责任编辑:杨阳)