

电针通过调控 PPAR- γ /NF- κ B 通路改善糖尿病大鼠骨骼肌胰岛素抵抗

叶杨阳¹, 刘霄潇¹, 易玮¹, 孙健¹, 张海华², 李知行³

(¹广州中医药大学针灸康复临床医学院, 广州 510006; ²深圳市中医院推拿科, 广东深圳 518033; ³深圳市中医院筋伤科, 广东深圳 518033)

【摘要】目的:观察电针“三阴交”“足三里”对2型糖尿病(T2DM)模型大鼠骨骼肌过氧化物酶体增殖物激活受体- γ (PPAR- γ)、核因子 κ B(NF- κ B)磷酸化蛋白的表达及下游葡萄糖转运体4(GLUT4)表达的影响,探讨电针改善和治疗胰岛素抵抗(IR)和T2DM的可能机制。方法:18只雄性2月龄ZDF(Lep^{fa/fa})大鼠以高脂饲料喂养4周制备糖尿病模型,成模后随机分为模型组、电针组和西药组,每组6只。6只同系对照Zucker瘦鼠(Lep^{+/fa})作为对照组。电针组取双侧“三阴交”“足三里”电针治疗,20 min/次;西药组采用吡格列酮溶液(10 mg/kg)灌胃;两组均1次/d,每周连续5 d,休息2 d,治疗4周。实验期间每周测量空腹体质量(FBW),取材前1天检测空腹血糖(FBG)。取材后采用ELISA法检测各组大鼠血清空腹胰岛素(FINS)、游离脂肪酸(FFA)、低密度脂蛋白(LDL)、总胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、C肽和C反应蛋白(CRP)含量,计算胰岛素抵抗稳态模型评估(HOMA-IR)指数;HE染色法和油红O染色法分别观察大鼠骨骼肌病理和脂质蓄积情况;Western blot法检测各组大鼠骨骼肌组织PPAR- γ 蛋白表达水平及NF- κ B蛋白磷酸化水平;免疫荧光染色检测各组大鼠骨骼肌TNF- α 和GLUT4表达情况。结果:与对照组比较,模型组FBW、FBG、FINS和HOMA-IR指数水平,血清FFA、LDL、TG、TC和TNF- α 、C肽和CRP含量升高($P < 0.01$),骨骼肌PPAR- γ 蛋白表达和GLUT4阳性表达水平降低($P < 0.01$)、NF- κ B蛋白磷酸化水平和TNF- α 表达升高($P < 0.01$),油红O染色显示骨骼肌细胞内大量鲜红色脂滴,脂质蓄积严重,HE染色显示骨骼肌纤维断裂。与模型组相比,西药组FBW升高($P < 0.01$);电针组和西药组的FBG、FINS、HOMA-IR指数降低($P < 0.05$, $P < 0.01$),血清FFA、LDL、TG、TC和TNF- α 、C肽和CRP含量降低($P < 0.01$, $P < 0.05$),骨骼肌PPAR- γ 蛋白表达和GLUT4阳性表达水平升高($P < 0.01$)、NF- κ B蛋白磷酸化水平和TNF- α 表达降低($P < 0.01$),油红O染色显示骨骼肌细胞脂滴均明显减少,脂质蓄积程度减轻,HE染色显示纤维断裂改善。结论:电针可改善T2DM大鼠的能量代谢紊乱,减轻骨骼肌脂质异位堆积,缓解炎症反应,其作用机制与调控骨骼肌PPAR- γ /NF- κ B信号通路表达有关。

【关键词】 2型糖尿病;胰岛素抵抗;电针;炎症反应;过氧化物酶增殖激活受体- γ ;核因子 κ B

Electroacupuncture ameliorates skeletal muscle insulin resistance in diabetic rats via PPAR- γ /NF- κ B signaling pathway

YE Yang-yang¹, LIU Xiao-xiao¹, YI Wei¹, SUN Jian¹, ZHANG Hai-hua², LI Zhi-xing³ (¹Clinical Medical College of Acupuncture, Moxibustion, and Rehabilitation, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China; ²Department of Massage, Shenzhen Traditional Chinese Medicine Hospital, Shenzhen 518033, Guangdong Province; ³Department of Soft Tissue Traumatology, Shenzhen Traditional Chinese Medicine Hospital, Shenzhen 518033, Guangdong Province)

【ABSTRACT】 Objective To observe the effect of electroacupuncture (EA) at “Sanyinjiao” (SP6) and “Zusanli” (ST36) on the expressions of peroxisome proliferator-activated γ receptor (PPAR- γ), nuclear factor- κ B (NF- κ B) and

【DOI】10.13702/j.1000-0607.20241170

引用格式:叶杨阳,刘霄潇,易玮,等.电针通过调控PPAR- γ /NF- κ B通路改善糖尿病大鼠骨骼肌胰岛素抵抗[J].针刺研究,2025,50(12):1412-1420.

项目来源:深圳市科技计划项目(No.JCYJ20230807094802005);国家自然科学基金项目(No.81804167,81774394,82374569)

通信作者:李知行, E-mail: devil-fade@163.com

glucose transporter 4 (GLUT4) in skeletal muscle of Zucker Diabetic Fatty (ZDF) rats with type 2 diabetes mellitus (T2DM), so as to explore its possible mechanism in improving insulin resistance (IR). **Methods** Eighteen male 2-month-old ZDF ($Lepr^{fa/fa}$) rats were fed with a high-fat diet for 4 weeks to establish a diabetic model. After the model was confirmed, the rats were randomly divided into model, EA and medication groups, with 6 rats in each group. Additionally, 6 Zucker lean rats ($Lepr^{+/fa}$) of the same age were used as the control group. EA (15 Hz, 1 mA) was applied to bilateral SP6 and ST36 for 20 min; the medication group was administered pioglitazone solution (10 mg/kg) via gastric gavage; both groups were treated once daily, 5 d a week for 4 weeks. Fasting body weight (FBW) was measured weekly, fasting blood glucose (FBG) was measured the day before sampling. The levels of serum fasting insulin (FINS), free fatty acid (FFA), low density lipoprotein (LDL), total cholesterol (TC), triglyceride (TG), tumor necrosis factor- α (TNF- α), C peptide and C reactive protein (CRP) were detected by ELISA, and the homeostasis model assessment of insulin resistance (HOMA-IR) index was calculated. HE staining and oil red O staining were used to observe the pathological changes and lipid droplet accumulation of skeletal muscle in rats respectively. The protein expression levels of PPAR- γ , NF- κ B and phosphorylated (p)-NF- κ B in skeletal muscle tissue of rats were detected by Western blot. The positive expressions of TNF- α and GLUT4 in skeletal muscle of rats were detected by immunofluorescence. **Results** Compared with the control group, the FBW, FBG, HOMA-IR index, the serum levels of FINS, FFA, LDL, TG, TC, TNF- α , C-peptide and CRP, NF- κ B phosphorylation level, as well as the positive expression of TNF- α and p-NF- κ B/NF- κ B in skeletal muscle were increased ($P<0.01$), while the PPAR- γ expression and the positive expression of GLUT4 in skeletal muscle were decreased ($P<0.01$) in the model group. Oil red O staining showed a large number of bright red lipid droplets and serious lipid accumulation in skeletal muscle cells, HE staining showed that the skeletal muscle fibers were broken in the model group. Compared with the model group, the FBW of the medication group, the expression levels of PPAR- γ and GLUT4 of both EA and medication groups were increased ($P<0.01$). Conversely, the levels of FBG, HOMA-IR index, FINS, FFA, LDL, TG, TC, TNF- α , C-peptide and CRP, the phosphorylation level of NF- κ B protein and TNF- α expression were decreased ($P<0.05$, $P<0.01$) in the EA and medication groups. The oil red O staining showed that the lipid droplets in the skeletal muscle cells were significantly reduced, and the degree of lipid accumulation was alleviated, whereas HE staining showed reduced skeletal-muscle fiber disruption in the EA and medication groups compared to those in the model group. **Conclusion** EA can ameliorate energy metabolism disorders in T2DM rats, reduce ectopic lipid accumulation in skeletal muscle, and alleviate inflammatory responses, which may be related to the regulation of the PPAR- γ /NF- κ B signaling pathway.

【KEYWORDS】 Type 2 diabetes mellitus; Insulin resistance; Electroacupuncture; Inflammation; PPAR- γ ; NF- κ B

2型糖尿病(T2DM)是一种由胰岛素抵抗(IR)和胰岛素分泌不足引起的慢性代谢性疾病。随着现代生活方式和饮食结构的变化,T2DM的发病率呈逐年上升趋势,预计到2045年,这一数字将上升至7亿多^[1]。其中,T2DM患者占糖尿病总数的90%以上,并与心血管疾病、肥胖和代谢综合征密切相关^[2]。肥胖是T2DM的主要危险因素之一,其特征为脂肪组织的异常扩增和脂质过量堆积,不仅储存过多的脂肪酸,导致游离脂肪酸(FFA)升高,还会释放出大量促炎细胞因子,如肿瘤坏死因子- α (TNF- α)。作为人体最主要的葡萄糖储存和利用器官,骨骼肌胰岛素敏感性的下降被认为是T2DM发生发展的关键环节^[2]。其中,过氧化物酶体增殖物激活受体- γ (PPAR- γ)和核因子 κ B(NF- κ B)信号通路发挥着关键作用。PPAR- γ 是一种重要的脂质代谢调控因子,能够通过促进脂肪细胞分化、抑制促炎因子的表达而改善IR^[3]。然而,肥胖会导致

NF- κ B信号通路被激活,其作为一种重要的转录因子,能够上调多种促炎基因的表达,从而引发低度慢性炎症反应,进而破坏PPAR- γ 的保护作用^[4]。NF- κ B的持续激活不仅会抑制胰岛素信号传导通路,还能够通过降低葡萄糖转运体4(GLUT4)在骨骼肌中的表达水平,导致外周组织对胰岛素的敏感性下降^[5]。此外,炎症因子的分泌还会进一步诱导脂质代谢的异常,造成甘油三酯(TG)、总胆固醇(TC)的升高,脂质代谢紊乱,加剧骨骼肌中的脂毒性,形成了IR与炎症反应之间的恶性循环^[6-7]。因此,PPAR- γ /NF- κ B信号通路在T2DM及肥胖相关代谢疾病的发病机制中具有重要的调控作用。

目前,治疗T2DM及其相关IR的主要药物之一——吡格列酮,是一种典型的PPAR- γ 激动剂。它通过直接激活PPAR- γ ,调控脂肪细胞分化和脂质代谢,减少脂毒性并提高胰岛素敏感性^[8]。然而,吡格列酮虽能有效缓解IR,但其长期应用可能带来

体质量增加、水肿及心血管异常等不良反应^[9-10]。近年来,越来越多的研究聚焦于通过非药物手段,如针灸治疗,来改善 T2DM 及其相关的代谢紊乱^[11-12]。针灸已被证实在调控代谢性疾病中的炎症反应和 IR 方面具有独特的优势^[13-14]。本团队前期研究证实,电针可通过抑制 NF- κ B 活性显著改善糖尿病大鼠 IR^[15]。为进一步探讨电针改善 IR 的作用机制,本研究以 ZDF 大鼠为研究对象,探究电针是否可通过调控骨骼肌 PPAR- γ /NF- κ B 信号通路,减轻炎症反应,影响下游 GLUT4 表达,改善 T2DM 大鼠的 IR 状态,为电针的临床应用提供实验证据。

1 材料与方法

1.1 实验动物

2月龄健康 SPF 级雄性 ZDF (Lepr^{fa/fa}) 大鼠 18 只,体质量 180~230 g, 2 月龄同系对照 Zucker 瘦鼠 (Lepr^{+/fa}) 6 只,体质量 140~180 g, 均购自北京维通利华实验动物科技有限公司,生产许可证号:SCXK(京)2021-0006。所有大鼠均饲养于 SPF 级动物房内,环境温度 22~24 °C、相对湿度 40%~60%、12 h/12 h 光/暗循环。普通饲料适应性饲养 1 周后,造模大鼠自由进食 Purina#5008 高脂饲料(组成:粗蛋白 \geq 23.0%,粗脂肪 \geq 6.5%,粗纤维 \geq 4.0%)并饮用无菌水。Zucker 瘦鼠予普通饲料喂养。所有实验程序均经过广州中医药大学实验动物中心伦理委员会批准(伦理批号:20181103001),并按照中国实验动物管理规定(GB14925-2001 和 MOST 2006a)执行。

1.2 主要仪器与试剂

罗氏血糖仪、血糖试纸(上海罗氏),华佗牌 SDZ-V 型电子针疗仪(苏州医疗用品厂),无菌针灸针(0.22 mm \times 13 mm,北京中研太和),电泳仪、转膜仪(美国 Bio-Rad),全自动酶标仪(美国 Thermo Scientific),涡旋混合器、离心机(海门其林贝尔),冰冻切片机、石蜡切片机、荧光显微镜(德国徕卡),病理切片扫描仪(宁波江丰),电子分析天平(瑞士梅特勒-托利多)。

戊巴比妥钠(上海上药新亚),Purina#5008 饲料(美国 PMI Foods),盐酸吡格列酮片(大连远大),ECL 超敏发光试剂盒(苏州新赛美),BCA 蛋白定量试剂盒、油红 O 染色液(北京索莱宝),胰岛素、C 肽 ELISA 试剂盒(广州和光),TNF- α 、C 反应蛋白(CRP)ELISA 试剂盒(杭州联科),FFA ELISA 试剂盒(南京建成),低密度脂蛋白(LDL)、TC、TG ELISA 试剂盒(上海江莱),TNF- α 抗体、GLUT4 抗

体(武汉赛维尔),Tissue-Tek(美国樱花),PPAR- γ 抗体(武汉三鹰),NF- κ B、磷酸化(p)-NF- κ B、 β -actin 抗体(美国 Cell Signaling Technology),HRP 标记羊抗兔 IgG(江苏亲科),Alexa Fluor 488 标记山羊抗小鼠 IgG、CY3 标记山羊抗兔 IgG(北京中杉金桥)。

1.3 造模方法与分组

作为自发性糖尿病动物模型,ZDF 大鼠表现出人类 T2DM 患者的糖尿病前期和末期症状,并出现晚期 IR 和高血糖^[16]。使用 Purina#5008 高脂饲料喂养,加速诱导 T2DM 和 IR 的发生发展。在诱导过程中,每周末于大鼠尾尖采集血样以测量空腹血糖(FBG);在第 4 周末时对所有大鼠进行口服葡萄糖耐量实验(OGTT),以 ZDF 大鼠 120 min 时血糖值 $>$ 11.1 mmol/L 和血糖曲线下面积(AUC)显著高于 Zucker 大鼠作为诱导模型成功的标准^[17-18]。将造模成功的 ZDF 大鼠,按照空腹体质量(FBW)高低随机分为模型组、电针组和西药组,每组 6 只。6 只同系对照 Zucker 瘦鼠血糖稳定,无 IR 和 T2DM 症状,作为对照组。干预期间,所有造模大鼠均以 Purina#5008 饲料继续喂养,以确保实验的一致性和可靠性^[19]。

1.4 干预方式

将电针组大鼠用黑布罩住头部,采用固定装置物理束缚后,用 0.22 mm \times 13 mm 一次性无菌针灸针,直刺双侧“三阴交”和“足三里”,深度 7 mm,同侧针柄连接电子针疗仪输出端,进行电针刺激,参数设置为连续波,频率 15 Hz,电流强度 1 mA,20 min/次,1 次/d,每周连续 5 d,休息 2 d,治疗 4 周,共 20 次;西药组进行同期 4 周的吡格列酮溶液(盐酸吡格列酮片+0.9%氯化钠溶液)灌胃,按照 10 mg/kg 剂量,1 次/d,每周停药 2 d;对照组、模型组仅给予同等物理束缚,不做干预。

1.5 观察指标与检测方法

组织取材:予大鼠 10% 戊巴比妥钠(40 mg/kg)腹腔注射进行麻醉后,从腹主动脉采集血液样本,静置 20 min 后,于 4 °C 离心 10 min,取上层血清样本,于 -80 °C 冰箱冻存;用 0.9% 氯化钠溶液灌洗体腔以去除血液,暴露股四头肌并切取约 2.5 mm \times 2.5 mm \times 0.8 mm 样本,置于 4% 多聚甲醛溶液中固定 24 h,随后依次使用梯度乙醇脱水,并用二甲苯透明后,浸入石蜡中包埋,使用石蜡切片机将包埋好的组织切成 4~5 μ m 厚的切片;选取 2.5 mm \times 1.5 mm \times 0.3 mm 大鼠股四头肌并迅速置于冰冷的 PBS 中清洗,去除多余脂肪和结缔组织后,将组织样本置于

4%多聚甲醛中固定6 h,然后依次进行梯度脱水处理(10%、20%、30%的蔗糖溶液,各处理12 h),直到组织完全沉降,接着将脱水后的组织置于Tissue-Tek包埋剂中进行包埋,并在-80℃冰箱中冷冻保存,之后用冷冻切片机将组织切成5~8 μm的薄片,并将切片铺展在玻片上,室温晾干数小时以便组织片更好地附着;用无菌剪刀和镊子切取适量的股四头肌肌肉组织(约50~100 mg),立即放入液氮中快速冷冻,以保持蛋白质的稳定性,将冷冻的组织样本储存在-80℃冰箱中备用。

FBW、IR的稳态模型评估(HOMA-IR)指数、OGTT和血液指标测定:实验期间各组大鼠每周末空腹12 h后,使用精密电子秤测量FBW。造模第4周进行OGTT检测成模情况:按体质量用灌胃针吸取相应体积葡萄糖溶液经大鼠口腔沿上腭插入食管至胃内缓慢注入;灌胃前(0 min)及灌胃后30、60、90、120 min,通过温水浸泡尾尖、消毒、采血针刺破尾尖采血,用血糖仪测血糖浓度。干预结束后,于取材前1天禁食12 h后,对各组大鼠尾尖采血,使用血糖仪检测FBG。取冻存血清,按照各ELISA试剂盒说明书指示,准备标准品并稀释成不同浓度梯度溶液,将终止反应后的微孔板放入酶标仪中,于波长450 nm处检测吸光度值,根据标准曲线计算各样本中空腹胰岛素(FINS)、FFA、LDL、TC、TG、TNF-α、C肽和CRP水平。计算HOMA-IR指数用来评估IR程度, $HOMA-IR指数=FBG(mmol/L) \times FINS(\mu U/mL) \div 22.5$ 。

HE染色法观察大鼠骨骼肌病理变化:石蜡切片经过脱蜡和梯度乙醇复水后进行HE染色。苏木精染色5 min、1%盐酸乙醇分化,并经纯水充分返蓝后,再用伊红染色2 min。染色后切片经梯度乙醇脱水及二甲苯透明,最后用中性树胶封片剂封片。显微镜下采集图像观察大鼠骨骼肌病理变化。

油红O染色法观察大鼠骨骼肌脂滴积聚:将冰冻切片在室温下风干10 min,然后将切片浸入丙酮中10 min。用PBS溶液洗涤3次,每次5 min。将切片浸入60%异丙醇中2 min,然后放入油红O染色液中,室温染色10 min。染色后,将切片用60%异丙醇洗涤两次,每次2 min,并用PBS洗涤切片3次,每次5 min。最后,用甘油明胶封片液封片。显微镜下采集图像观察染色结果,并拍照记录。

Western blot法检测骨骼肌PPAR-γ蛋白表达及NF-κB磷酸化水平:取储存在-80℃冰箱中的肌肉组织样本,称取适量股四头肌组织(约20~30 mg),

置于预冷的匀浆管中,加入RIPA裂解液进行匀浆,然后4℃离心15 min,取上清液测定蛋白浓度。取等量蛋白样品(30~50 μg),加入5×蛋白上样缓冲液,100℃煮沸5 min,随后进行SDS-PAGE电泳。电泳完成后,将蛋白转移至PVDF膜上。用5%脱脂奶粉室温封闭1 h,随后加入一抗PPAR-γ(1:2 000)、NF-κB(1:1 000)、p-NF-κB(1:1 000)、β-actin(1:1 000),于4℃孵育过夜。次日,用TBST缓冲液洗膜3次,每次10 min。加入HRP标记的二抗(1:5 000),室温孵育1 h后,用TBST缓冲液洗膜3次,每次10 min。然后将PVDF膜浸泡在ECL发光试剂中,室温反应1 min后,迅速将膜置于X线胶片上,在暗室中曝光适当时间。采用Image J软件分析蛋白条带灰度值。目的蛋白与内参蛋白条带灰度值的比值为目的蛋白的相对表达量。

免疫荧光法检测骨骼肌TNF-α和GLUT4阳性表达:取冷冻切片,首先使用PBS清洗3次,每次5 min,去除表面包埋剂残留,然后进行抗原修复。此后,将切片置于含0.3% Triton X-100的PBS中透化20 min,增加细胞膜通透性,并用PBS清洗3次。切片放入5%正常山羊血清中,室温封闭1 h,以减少非特异性结合。之后,将一抗GLUT4(1:1 000)、TNF-α(1:500)滴加于切片上,置于湿盒中,4℃孵育过夜。次日,PBS洗涤3次,每次5 min。滴加山羊抗小鼠IgG(1:200)、山羊抗兔IgG(1:200)荧光二抗,室温避光孵育1 h,再用PBS洗涤3次,每次5 min。将DAPI染液(1 μg/mL)滴加到切片上,室温避光孵育5 min,PBS洗涤3次,封片。玻片在避光条件下自然晾干,在荧光显微镜下观察并采集图像,Image J软件测量荧光强度。

1.6 统计学分析

使用SPSS25.0软件进行统计分析。采用Shapiro-Wilk检验评估数据分布的正态性,符合正态分布以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,并确认方差齐性。采用重复测量方差分析对OGTT血糖值进行统计学分析。在多个独立组之间进行比较时,先进行单因素方差分析,然后进行Bonferroni事后检验;若方差不齐,则采用Brown-Forsythe检验,然后进行Tamhane's t_2 事后检验。以 $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义的标准。

2 结果

2.1 OGTT检测大鼠糖尿病模型制备

在高脂饲料加速诱导的第4周,对所有实验大

鼠进行 OGTT,以评估糖尿病模型的构建是否成功。结果显示,Zucker大鼠在灌胃后血糖水平轻微升高,60 min后下降并恢复至基础水平;ZDF大鼠表现出显著的葡萄糖耐受不良,其血糖水平在60 min达到峰值后,呈缓慢下降趋势,但在120 min时仍显著高于基础水平,且在每个时间点与Zucker大鼠比较差异均有统计学意义($P<0.01$)。图1的柱状图展示了Zucker大鼠与ZDF大鼠AUC的比较,结果显示,ZDF大鼠的AUC显著高于Zucker大鼠,差异具有统计学意义($P<0.001$)。这些结果表明,ZDF大鼠具有明显的葡萄糖耐受受损特征,饮食诱导成功构建了糖尿病IR大鼠模型。见图1。

2.2 各组大鼠FBW、FBG、FINS和HOMA-IR指数比较

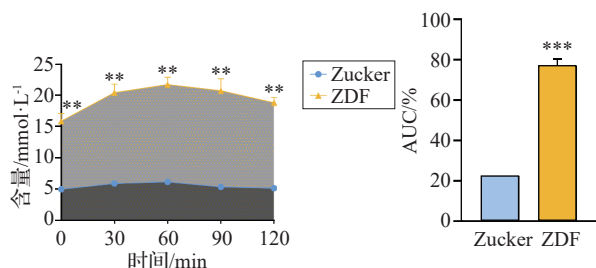
干预前,各组大鼠FBW组间比较,差异无统计学意义。干预后,与对照组相比,模型组FBW升高($P<0.01$);与模型组相比,西药组FBW升高($P<0.01$),电针组FBW呈现下降趋势,但差异无统计学意义。干预后,与对照组相比,模型组的FBG、FINS、HOMA-IR指数升高($P<0.01$);与模型组相比,电针组和西药组FBG、FINS、HOMA-IR指数降低($P<0.05, P<0.01$)。见图2。

2.3 各组大鼠血清FFA、LDL、TC和TG含量比较

与对照组相比,模型组大鼠血清FFA、LDL、TC和TG含量升高($P<0.01$);与模型组相比,电针组和西药组大鼠血清FFA、LDL、TC和TG含量均降低($P<0.01, P<0.05$)。见图3。

2.4 各组大鼠血清TNF- α 、CRP和C肽含量比较

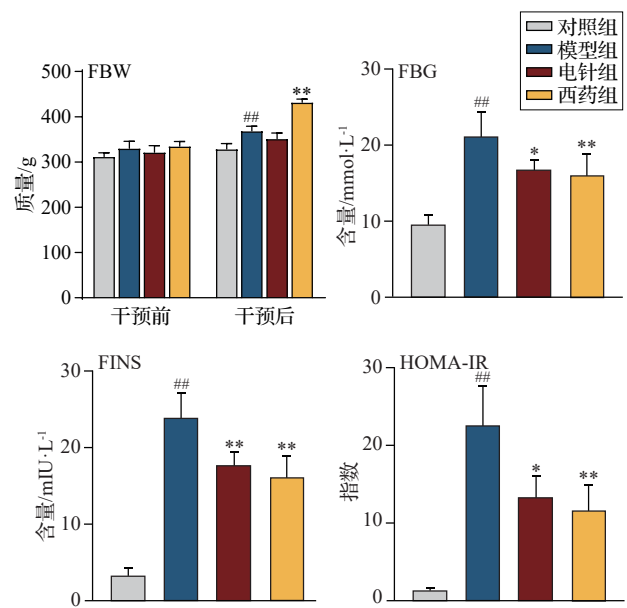
与对照组相比,模型组大鼠的血清TNF- α 、CRP和C肽含量升高($P<0.01$);与模型组相比,电



注:OGTT为口服葡萄糖耐量实验,AUC为曲线下面积。与同时间点模型组比较,** $P<0.01$,*** $P<0.001$ 。

图1 Zucker对照大鼠与ZDF糖尿病模型鼠干预前OGTT和AUC比较($\bar{x}\pm s$,Zucker大鼠6只,ZDF大鼠18只)

Fig. 1 Comparison of OGTT and AUC before intervention between Zucker control rats and ZDF diabetic model rats ($\bar{x}\pm s$, 6 Zucker rats, 18 ZDF rats)



注:FBW为空腹体重,FBG为空腹血糖,FINS为空腹胰岛素,HOMA-IR为胰岛素抵抗稳态模型评估。与同时间点对照组比较,## $P<0.01$;与同时间点模型组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$ 。

图2 各组大鼠干预前后FBW及干预后FBG、FINS和HOMA-IR指数比较($\bar{x}\pm s$,6只鼠/组)

Fig. 2 Comparison of FBW before and after intervention as well as FBG, FINS and HOMA-IR indices after intervention in rats of the 4 groups ($\bar{x}\pm s$, 6 rats/group)

针组和西药组大鼠血清TNF- α 、CRP和C肽含量降低($P<0.05, P<0.01$)。见图4。

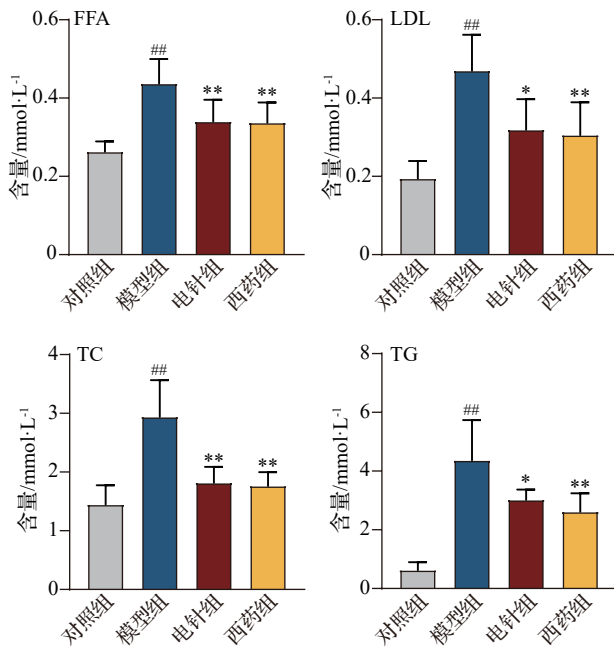
2.5 各组大鼠骨骼肌组织形态比较

HE染色显示,对照组大鼠骨骼肌肌纤维排列整齐、形态规则、界限清晰,未见明显病理改变;模型组肌纤维结构紊乱,肌束排列松散,出现明显的肌纤维断裂、变形及萎缩现象,间隙明显增大;电针组肌纤维形态较模型组有所改善,肌纤维排列较为紧密,断裂及萎缩现象减轻,组织间隙较模型组缩小,纤维化减轻;西药组肌纤维形态有一定改善,肌纤维排列相对整齐,存在少量肌纤维断裂及萎缩现象。见图5。

油红O染色显示,对照组大鼠骨骼肌细胞核染为蓝色,仅有轻微橘红色脂滴;模型组骨骼肌细胞内可见大量鲜红色脂滴,弥漫分布,脂质蓄积严重。与模型组相比,电针组骨骼肌细胞脂滴明显减少,呈暗红色,脂质蓄积程度减轻;西药组骨骼肌细胞内脂滴有所减少,脂质蓄积程度减轻。见图5。

2.6 各组大鼠骨骼肌组织PPAR- γ 蛋白表达水平及NF- κ B蛋白磷酸化水平比较

与对照组相比,模型组大鼠骨骼肌的PPAR- γ



注:FFA为游离脂肪酸,LDL为低密度脂蛋白,TC为总胆固醇,TG为甘油三酯。与对照组比较,^{##} $P<0.01$;与模型组比较,^{*} $P<0.05$,^{**} $P<0.01$ 。

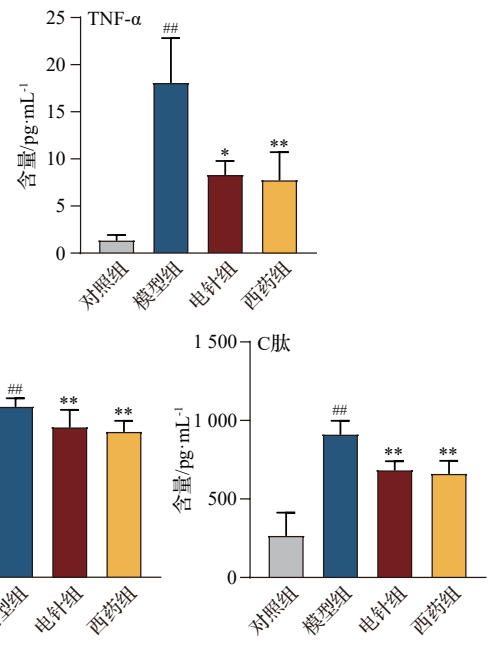
图3 各组大鼠血清FFA、LDL、TC和TG含量比较 ($\bar{x}\pm s$,6只鼠/组)

Fig. 3 Comparison of serum contents of FFA, LDL, TC and TG of rats in the 4 groups ($\bar{x}\pm s$, 6 rats/group)

蛋白表达水平降低($P<0.01$),NF- κ B蛋白磷酸化水平升高($P<0.01$);与模型组相比,电针组和西药组的PPAR- γ 蛋白表达水平升高($P<0.01$),NF- κ B蛋白磷酸化水平降低($P<0.01$)。见图6。

2.7 各组大鼠骨骼肌组织TNF- α 和GLUT4阳性表达比较

与对照组比较,模型组大鼠骨骼肌TNF- α 表达



注:TNF- α 为肿瘤坏死因子 α ,CRP为C反应蛋白。与对照组比较,^{##} $P<0.01$;与模型组比较,^{*} $P<0.05$,^{**} $P<0.01$ 。

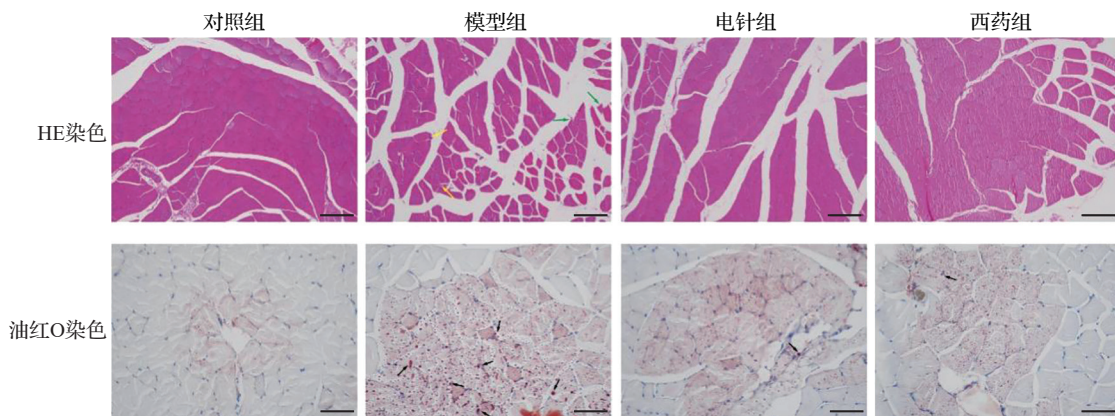
图4 各组大鼠血清TNF- α 、CRP和C肽含量比较 ($\bar{x}\pm s$,6只鼠/组)

Fig. 4 Comparison of serum contents of TNF- α , CRP, and C-peptide of rats in the 4 groups ($\bar{x}\pm s$, 6 rats/group)

增加($P<0.01$),GLUT4表达减少($P<0.01$);与模型组相比,电针组和西药组的TNF- α 表达减少($P<0.01$),GLUT4表达增加($P<0.01$)。见图7。

3 讨论

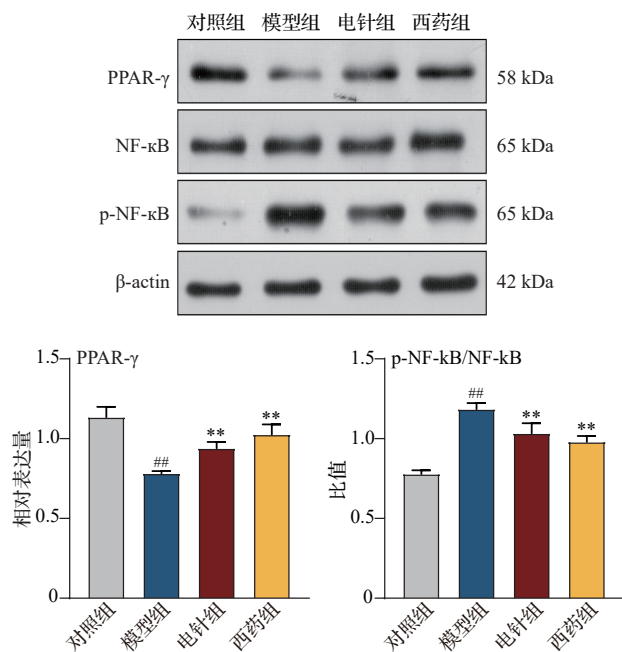
中医学认为T2DM的病因病机主要为阴虚燥热、热伤津液,长病久病则导致阴液耗损,气血两虚,正气不足而邪气实。《古今医鉴》云:“手阳明大



注:上图为HE染色图,标尺=200 μ m;下图为油红O染色图,标尺=100 μ m。绿色箭头示肌纤维断裂,黄色箭头示炎性细胞浸润,黑色箭头示红色脂质沉积。

图5 各组大鼠骨骼肌组织形态和脂滴积聚比较

Fig. 5 Comparison of skeletal muscle tissue morphology and lipid droplet accumulation of rats in the 4 groups



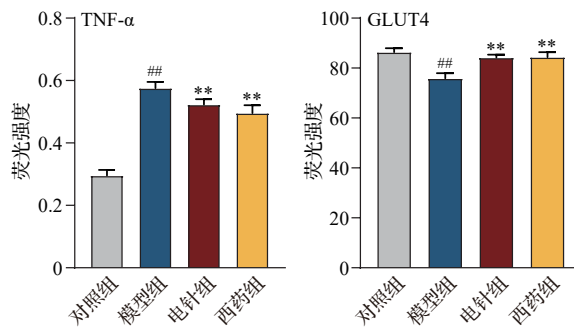
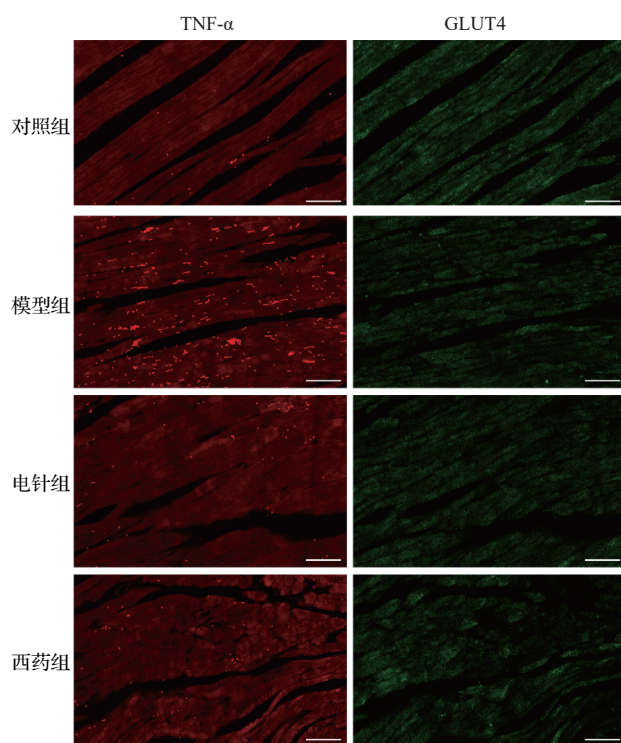
注: PPAR-γ 为过氧化物酶体增殖物激活受体-γ, NF-κB 为核因子 κB, p-NF-κB 为磷酸化核因子 κB。与对照组比较, [#] $P < 0.01$; 与模型组比较, ^{**} $P < 0.01$ 。

图6 各组大鼠骨骼肌组织 PPAR-γ 蛋白表达水平及 NF-κB 蛋白磷酸化水平比较 ($\bar{x} \pm s$, 4 只鼠/组)

Fig. 6 Comparison of the protein expression level of PPAR-γ and the protein phosphorylation level of NF-κB in skeletal muscle tissue of rats in the 4 groups ($\bar{x} \pm s$, 4 rats/group)

肠主津液,病消则目黄口干,乃津液不足也;足阳明胃主血,若热则消谷善饥,血中伏火,乃血不足也。”脾主运化水谷精微,胃主受纳腐熟,是气血生化之源;肾主藏精,脾肾亏虚则气血失调,水液代谢失衡,湿浊内停,久则化热生痰,引起“痰热交阻”“阴虚火旺”的复杂病机。这些病机与现代医学中 T2DM 的多种代谢紊乱有共通之处:如 IR、脂代谢障碍等。因此,在针灸治疗 T2DM 时,应当重视脾胃调理、滋阴清热及益气养阴,足三里与三阴交配伍,可实现“培土生金、补肾固本”的治疗原则,能够在改善 IR 中发挥显著效果,是临床常用组合^[20]。本研究采用了自发性 T2DM 大鼠模型,并通过高脂饮食诱导。结果显示,模型大鼠的 FBG、FINS、HOMA-IR 及 FFA、LDL、TC 和 TG 水平升高,提示 ZDF 大鼠存在 IR 及糖脂代谢紊乱。经过 4 周电针干预后,以上代谢指标均有所改善,表明电针可有效调整 ZDF 大鼠的能量代谢紊乱,缓解 IR。

骨骼肌是全身最主要的葡萄糖利用组织,约占体内葡萄糖摄取总量的 80%,其能量代谢紊乱与 IR 之间存在密切关系^[21]。在正常状态下,胰岛素通过



注: TNF-α 为肿瘤坏死因子-α, GLUT4 为葡萄糖转运体 4。标尺 = 100 μm。与对照组比较, [#] $P < 0.01$; 与模型组比较, ^{**} $P < 0.01$ 。

图7 各组大鼠骨骼肌组织 TNF-α 和 GLUT4 阳性表达比较 (免疫荧光染色, $\bar{x} \pm s$, 6 只鼠/组)

Fig. 7 Comparison of the positive expressions of TNF-α and GLUT4 in the skeletal muscle tissue of rats in the 4 groups (immunofluorescence staining, $\bar{x} \pm s$, 6 rats/group)

促进骨骼肌摄取葡萄糖并增加糖酵解和糖原合成,从而维持能量代谢平衡^[22]。然而,当骨骼肌能量代谢发生紊乱时,胰岛素信号传导受阻,导致葡萄糖摄取减少和糖原合成障碍,引发 IR^[23]。研究^[24]表明,骨骼肌中 FFA 和 TG 等脂质代谢产物的堆积,尤其是脂质异位沉积,会抑制胰岛素信号通路中关键蛋白的磷酸化,从而削弱胰岛素对葡萄糖代谢的调节作用。本研究 HE 染色和油红 O 染色结果显示, ZDF 大鼠的糖脂代谢异常伴随着骨骼肌内脂质异位堆积,出现了肌纤维紊乱及部分肌纤维断裂的病

理现象,而电针及吡格列酮干预均在不同程度上改善了这些病理改变,其他相关研究也报道了类似的骨骼肌形态变化^[25]。吡格列酮作为PPAR- γ 激动剂,能够直接激活骨骼肌中的PPAR- γ 通路,促进脂质代谢基因的表达,增加脂肪细胞对FFA的摄取和利用,从而降低FFA及脂质代谢紊乱相关指标^[26]。电针干预对上述指标的改善,表明其同样可能通过影响骨骼肌PPAR- γ 通路,改善脂质代谢紊乱。相关研究也支持了电针通过调控PPAR- γ 信号通路改善脂代谢的结果^[27]。

PPAR- γ 作为一种核受体转录因子,通过调节脂质代谢和胰岛素信号通路来增强胰岛素敏感性,它的激活能够促进脂肪细胞分化,减少FFA的释放,缓解脂质积聚带来的代谢压力^[28]。同时,PPAR- γ 还能增加GLUT4在骨骼肌中的表达和定位,促进葡萄糖摄取,从而有效改善IR^[29]。与此相反,NF- κ B的激活,尤其是其磷酸化形式的增加,会引发骨骼肌中的炎症反应,导致胰岛素信号转导受损^[30]。NF- κ B是IR中重要的炎症调控因子,它能够通过激活炎症反应相关因子如TNF- α ,加剧IR^[31]。这种低度慢性炎症反应不仅影响胰岛素受体的信号转导,还会进一步降低GLUT4的转运效率,减少骨骼肌对葡萄糖的摄取,导致血糖水平的升高^[32]。PPAR- γ 的上调能抑制NF- κ B信号通路,减少炎症因子释放,从而减轻慢性炎症对胰岛素信号的抑制作用。TNF- α 作为一种促炎因子,在糖尿病的发病机制中起着关键作用^[33]。已有研究^[34-35]表明,TNF- α 通过激活NF- κ B信号通路,促进炎症反应并抑制胰岛素的作用,从而加剧IR。本实验结果进一步验证了这一点,ZDF大鼠骨骼肌中TNF- α 表达升高与IR的加重密切相关。与此同时,GLUT4作为胰岛素依赖的葡萄糖转运蛋白,其表达水平直接影响骨骼肌对葡萄糖的摄取与代谢^[36]。在本研究的模型组中,GLUT4的表达显著下降,提示葡萄糖代谢的紊乱。电针治疗后,ZDF大鼠骨骼肌中TNF- α 的表达显著下降,GLUT4的表达显著升高,表明电针能够有效减轻糖尿病大鼠骨骼肌中的炎症反应,并促进GLUT4的表达,从而改善胰岛素敏感性,这一作用可能与电针激活PPAR- γ /NF- κ B通路有关。

作为PPAR- γ 激动剂,吡格列酮在改善能量代谢和调节炎症反应方面比电针效果更显著。然而,电针通过多靶点、多途径发挥作用,与服用吡格列酮等西药产生的耐药性或不良反应相比,更适合临床的长期干预,其整体调节作用有助于缓解IR。此

外,研究显示,吡格列酮治疗后的大鼠FBW高于其他组大鼠,而其FBG降低,这可能与吡格列酮促进脂肪细胞分化及脂肪沉积,从而引起体质量增加有关,与此同时,吡格列酮能够通过改善IR,提升胰岛素敏感性,从而有效降低血糖水平。然而,这一现象的具体机制尚需进一步探讨。

综上所述,电针能改善ZDF大鼠能量代谢紊乱和慢性炎症反应,减轻骨骼肌脂质异位沉积,缓解IR,其机制可能与增加骨骼肌PPAR- γ 蛋白表达和降低NF- κ B蛋白活性有关。

利益冲突 所有作者声明不存在利益冲突。

参考文献

- [1] SUN H, SAEEDI P, KARURANGA S, et al. IDF diabetes atlas: global, regional and country-level diabetes prevalence estimates for 2021 and projections for 2045[J]. *Diabetes Res Clin Pract*, 2022, 183: 109119.
- [2] ZHENG Y, LEY S H, HU F B. Global aetiology and epidemiology of type 2 diabetes mellitus and its complications [J]. *Nat Rev Endocrinol*, 2018, 14(2): 88-98.
- [3] AHMADIAN M, SUH J M, HAH N, et al. PPAR γ signaling and metabolism: the good, the bad and the future [J]. *Nat Med*, 2013, 19(5): 557-566.
- [4] DONATH M Y, SHOELSON S E. Type 2 diabetes as an inflammatory disease [J]. *Nat Rev Immunol*, 2011, 11(2): 98-107.
- [5] MATSUDA N, YAMAMOTO S, YOKOO H, et al. Nuclear factor-kappaB decoy oligodeoxynucleotides ameliorate impaired glucose tolerance and insulin resistance in mice with cecal ligation and puncture-induced sepsis [J]. *Crit Care Med*, 2009, 37(10): 2791-2799.
- [6] LIU Y C, MIAO Q Y, LIU Y, et al. Effects of chitosan guanidine on blood glucose regulation and gut microbiota in T2DM [J]. *Int J Biol Macromol*, 2024, 279: 135422.
- [7] DU C, ZUO F, CAO Y, et al. Anti-diabetic effects of natural and modified 'Ganzhou' navel orange peel pectin on type 2 diabetic mice via gut microbiota [J]. *Food Funct*, 2023, 14(24): 10977-10990.
- [8] GENUTH S M. How does pioglitazone prevent progression of impaired glucose tolerance to diabetes? [J]. *Diabetes*, 2013, 62(11): 3663-3665.
- [9] DEFRONZO R A, INZUCCHI S, ABDUL-GHANI M, et al. Pioglitazone: The forgotten, cost-effective cardioprotective drug for type 2 diabetes [J]. *Diab Vasc Dis Res*, 2019, 16(2): 133-143.
- [10] HARASHIMA K, HAYASHI J, MIWA T, et al. Long-term pioglitazone therapy improves arterial stiffness in patients with type 2 diabetes mellitus [J]. *Metabolism*, 2009, 58(6): 739-745.
- [11] CHEOK Y C, MOHD SHARIFF Z, CHAN Y M, et al. Effectiveness of acupuncture as adjunctive therapy in type 2

- diabetic: Study protocol for a randomized controlled trial[J]. PLoS One, 2023, 18(9): e0284337.
- [12] PAN T, LI X F, GUO X L, et al. Electroacupuncture improves insulin resistance in type 2 diabetes mice by regulating intestinal flora and bile acid [J]. Diabetes Metab Syndr Obes, 2023, 16: 4025-4042.
- [13] JUNG H, WON T, KIM G Y, et al. Efficacy of acupuncture on cardiovascular complications in patients with diabetes mellitus in Korea: a nationwide retrospective cohort [J]. J Integr Med, 2023, 21(2): 176-183.
- [14] WANG H L, CHEN X H, CHEN C H, et al. Electroacupuncture at lower He-sea and front-mu acupoints ameliorates insulin resistance in type 2 diabetes mellitus by regulating the intestinal flora and gut barrier [J]. Diabetes Metab Syndr Obes, 2022, 15: 2265-2276.
- [15] 蓝丹纯, 廖荣臻, 李知行, 等. 电针对胰岛素抵抗模型大鼠血管内皮NF- κ B通路的影响[J]. 中国老年学杂志, 2020, 40(3): 590-593.
- LAN D C, LIAO R Z, LI Z X, et al. Effect of electroacupuncture on expression of NF- κ B in vascular endothelium with insulin resistance rats (in Chinese) [J]. Chinese Journal of Gerontology, 2020, 40(3): 590-593.
- [16] MARTÍN-CARRO B, DONATE-CORREA J, FERNÁNDEZ-VILLABRILLE S, et al. Experimental models to study diabetes mellitus and its complications: limitations and new opportunities[J]. Int J Mol Sci, 2023, 24(12): 10309.
- [17] AL-AWAR A, KUPAI K, VESZELKA M, et al. Experimental diabetes mellitus in different animal models [J]. J Diabetes Res, 2016, 2016: 9051426.
- [18] SÁRKÖZY M, ZVARA A, GYÉMÁNT N, et al. Metabolic syndrome influences cardiac gene expression pattern at the transcript level in male ZDF rats [J]. Cardiovasc Diabetol, 2013, 12: 16.
- [19] KOSER F, HOBACH A J, ABDELLATIF M, et al. Acetylation and phosphorylation changes to cardiac proteins in experimental HFpEF due to metabolic risk reveal targets for treatment[J]. Life Sci, 2022, 309: 120998.
- [20] 李知行, 蓝丹纯, 张海华, 等. 基于数据挖掘的针灸治疗胰岛素抵抗用穴规律研究[J]. 针刺研究, 2016, 41(6): 545-549.
- LI Z X, LAN D C, ZHANG H H, et al. Acupoints selection exploring for acupuncture treatment of insulin resistance based on data mining (in Chinese) [J]. Acupuncture Research, 2016, 41(6): 545-549.
- [21] DEFRONZO R A, TRIPATHY D. Skeletal muscle insulin resistance is the primary defect in type 2 diabetes[J]. Diabetes Care, 2009, 32(Suppl 2): S157-S163.
- [22] PETERSEN M C, SHULMAN G I. Mechanisms of insulin action and insulin resistance[J]. Physiol Rev, 2018, 98(4): 2133-2223.
- [23] MERZ K E, THURMOND D C. Role of skeletal muscle in insulin resistance and glucose uptake [J]. Compr Physiol, 2020, 10(3): 785-809.
- [24] DEN HARTOGH D J, VLAVCHESKI F, GIACCA A, et al. Attenuation of free fatty acid (FFA)-induced skeletal muscle cell insulin resistance by resveratrol is linked to activation of AMPK and inhibition of mTOR and p70 S6K[J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(14): 4900.
- [25] KOPECKY C, HAUG M, REISCHL B, et al. Effect of insulin insufficiency on ultrastructure and function in skeletal muscle [J]. J Cachexia Sarcopenia Muscle, 2024, 15(1): 112-123.
- [26] BANSAL G, THANIKACHALAM P V, MAURYA R K, et al. An overview on medicinal perspective of thiazolidine-2, 4-dione: a remarkable scaffold in the treatment of type 2 diabetes[J]. J Adv Res, 2020, 23: 163-205.
- [27] TANG Q Q, LU M J, XU B, et al. Electroacupuncture regulates inguinal white adipose tissue browning by promoting sirtuin-1-dependent PPAR γ deacetylation and mitochondrial biogenesis[J]. Front Endocrinol (Lausanne), 2021, 11: 607113.
- [28] ODEGAARD J I, RICARDO-GONZALEZ R R, GOFORTH M H, et al. Macrophage-specific PPAR γ controls alternative activation and improves insulin resistance [J]. Nature, 2007, 447(7148): 1116-1120.
- [29] FANG T, DI Y B, LI G K, et al. Effects of telmisartan on TNF α induced PPAR γ phosphorylation and insulin resistance in adipocytes [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2018, 503(4): 3044-3049.
- [30] CHEN X Q, LIU Z Q, LIU W J, et al. NF- κ B-inducing kinase provokes insulin resistance in skeletal muscle of obese mice [J]. Inflammation, 2023, 46(4): 1445-1457.
- [31] WULLAERT A, VAN LOO G, HEYNINCK K, et al. Hepatic tumor necrosis factor signaling and nuclear factor-kappa B: effects on liver homeostasis and beyond [J]. Endocr Rev, 2007, 28(4): 365-386.
- [32] YORE M M, SYED I, MORAES-VIEIRA P M, et al. Discovery of a class of endogenous mammalian lipids with anti-diabetic and anti-inflammatory effects [J]. Cell, 2014, 159(2): 318-332.
- [33] AKASH M S H, REHMAN K, LIAQAT A. Tumor necrosis factor-alpha: role in development of insulin resistance and pathogenesis of type 2 diabetes mellitus [J]. J Cell Biochem, 2018, 119(1): 105-110.
- [34] AL MADHOUN A, KOCHUMON S, HADDAD D, et al. Adipose tissue caveolin-1 upregulation in obesity involves TNF- α /NF- κ B mediated signaling [J]. Cells, 2023, 12(7): 1019.
- [35] YANG H M, XIE T T, LI D R, et al. Tim-3 aggravates podocyte injury in diabetic nephropathy by promoting macrophage activation via the NF- κ B/TNF- α pathway [J]. Mol Metab, 2019, 23: 24-36.
- [36] LETO D, SALTIEL A R. Regulation of glucose transport by insulin: traffic control of GLUT4 [J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2012, 13(6): 383-396.