

基于 AMPK/mTOR/ULK1 通路探讨电针对肥胖小鼠肝脏自噬的影响

张英溶¹, 周仲瑜^{2, 3, 4, 5}, 夏郡妮¹, 王艺霏¹, 张子怡¹, 廖璐璐¹, 王佳捷^{2, 3, 4, 5}
(¹湖北中医药大学针灸骨伤学院, 武汉 430065; ²湖北省中医院, 武汉 430061; ³湖北中医药大学附属医院, 武汉 430061; ⁴湖北省中医药研究院, 武汉 430061; ⁵湖北省肥胖症针灸诊疗临床医学研究中心, 武汉 430061)

【摘要】 目的:探讨电针调控腺苷酸激活蛋白激酶(adenosine activated protein kinase, AMPK)/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin, mTOR)/unc-51 样自噬激活激酶 1(Unc-51 Like Autophagy Activating Kinase 1, ULK1)信号通路对肥胖小鼠肝脏自噬的影响。方法:C57BL/6J 小鼠随机分为正常组、模型组和电针组,每组 8 只,采用高脂饮食喂养建立肥胖小鼠模型。电针组取双侧“足三里”“天枢”电针干预,每次 30min,每周 5 次,持续 4 周。观察治疗前后各组小鼠 Lee's 指数及体质量变化;治疗结束后开展胰岛素耐量实验;ELISA 法测定空腹血清血糖、胰岛素和血脂四项(甘油三酯 TG、总胆固醇 TC、低密度脂蛋白 LDL-C 及高密度脂蛋白 HDL-C),计算胰岛素抵抗指数;称量腹部白色脂肪组织和肝脏组织重量;采用苏木精-伊红染色法观察各组小鼠腹部脂肪及肝脏组织形态改变;采用油红 O 染色观察各组小鼠肝脏组织脂质沉积变化;采用透射电镜观察肝脏组织超微结构和自噬情况;实时荧光定量 PCR 法检测各组小鼠肝脏组织 AMPK、mTOR、ULK1、微管相关蛋白 1 轻链 3-Ⅱ型(microtubule associated protein 1 light chain 3-Ⅱ, LC3-Ⅱ)、自噬相关基因 5(Autophagy-related gene 5, Atg5)、自噬相关基因 7(Autophagy-related gene 7, Atg7)、选择性自噬衔接蛋白(P62)mRNA 表达;Western blot 法检测各组小鼠肝脏组织 AMPK、mTOR、ULK1、LC3-Ⅱ、Atg5、Atg7、P62 的蛋白表达。结果:与正常组比较,模型组小鼠 Lee's 指数、体质量、血清血糖、胰岛素、TG、TC、LDL-C 水平显著升高,胰岛素耐量试验 AUC 值增加,胰岛素抵抗指数增加($P<0.01$), HDL-C 含量降低($P<0.01$),腹部白色脂肪组织和肝脏组织重量增加($P<0.01$),腹部脂肪细胞直径明显增大、单位面积细胞数目减少,肝细胞肿大,细胞排列紊乱,出现大量脂滴空泡,可见大量橘红色脂质沉积,自噬空泡减少,肝脏组织 mTOR、p62 mRNA 和 p-mTOR/mTOR、P62 蛋白表达增加($P<0.01$), AMPK、ULK1、LC3-Ⅱ、ATG5 及 ATG7 的 mRNA 和 p-AMPK/AMPK、ULK1、LC3-Ⅱ、Atg5 及 Atg7 蛋白表达降低($P<0.01$)。与模型组比较,电针组小鼠 Lee's 指数、体质量、血清血糖、胰岛素、TG、TC、LDL-C 含量、胰岛素抵抗指数及 AUC 值均显著降低($P<0.01$), HDL-C 含量升高($P<0.01$),白色脂肪组织和肝脏组织重量减少($P<0.01$),腹部脂肪细胞直径减少,单位面积内细胞数目增加,肝细胞内未见明显脂滴空泡,橘红色脂质沉积减少,自噬空泡增加,可见少量自噬小体和自噬溶酶体,肝脏组织 mTOR、P62 mRNA 和 p-mTOR/mTOR、P62 蛋白表达降低($P<0.01$), AMPK、ULK1、LC3-Ⅱ、Atg5 及 Atg7 的 mRNA 和 p-AMPK/AMPK、ULK1、LC3-Ⅱ、Atg5 及 Atg7 蛋白表达增加($P<0.01$)。结论:电针“足三里”“天枢”可促进肝脏自噬,其机制可能与调控 AMPK/mTOR/ULK1 信号通路相关。

【关键词】 肥胖;电针;AMPK/mTOR/ULK1 信号通路;自噬

【DOI】10.13702/j.1000-0607.20250909-张英溶-网络首发

引用格式:张英溶,周仲瑜,夏郡妮,等.基于 AMPK/mTOR/ULK1 通路探讨电针对肥胖小鼠肝脏自噬的影响[J].针刺研究,XXXX,XX(X):1-15.

项目来源:湖北省科技计划项目(No.2025BCB024);武汉市科技局知识创新专项项目(No.2023020201010172);湖北中医药大学“双一流”建设重点类专项科研项目(No.2023ZZXT005);第七批全国老中医药专家学术经验继承项目(No.国中医药办人教函[2021]272号);国家中医药管理局全国名老中医(王华教授)传承工作室(No.QZ202301);湖北省科技厅国际科技合作项目(No.2022EHB054)。

通信作者:王佳捷, E-mail:27717685@qq.com。

Exploring the Effects of Electroacupuncture on Hepatic Autophagy in Obese Mice via the AMPK/mTOR/ULK1 Pathway

Zhang Ying-rong¹, Zhou Zhong-yu^{2,3,4,5}, Xia Jun-ni¹, Wang Yi-fei¹, Zhang Zi-yi¹, Liao Lu-lu¹, Wang Jia-jie^{2,3,4,5} (¹School of Acupuncture-Moxibustion and Orthopedics, Hubei University of Chinese Medicine, Wuhan 430065; ²Hubei Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine, Wuhan 430061; ³Affiliated Hospital of Hubei University of Chinese Medicine, Wuhan 430061; ⁴Hubei Academy of Traditional Chinese Medicine, Wuhan 430061; ⁵Hubei Provincial Clinical Research Center for Acupuncture and Moxibustion in Obesity Treatment, Wuhan 430061)

【ABSTRACT】 **Methods** C57BL/6J mice were randomly divided into three groups (n=8 per group): normal control group, model group, and EA group. The Obese model was established by feeding the high-fat diet. The EA group was received bilateral EA at ST36 and ST25 for 30 minutes per session, 5 times per week, 4 weeks totally. Lee's index and body weight were measured before and after treatment. Insulin tolerance test (ITT) were performed after the treatment. Fasting serum glucose, insulin and lipid levels (including triglyceride (TG), total cholesterol (TC), low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C), high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C)) were determined using ELISA kits, and Insulin resistance index was calculated. The mass of abdominal white adipose tissue (WAT) and Liver tissue were weighed, morphological changes in WAT and Liver tissue were observed using hematoxylin and eosin (H&E) staining. The changes in Liver tissue lipid deposition in each group were observed by Oil red O staining. Hepatic ultrastructure and autophagy were observed by transmission electron microscopy. The mRNA expression levels of AMPK, mTOR, ULK1, microtubule associated protein 1light chain 3- II (LC3- II), Autophagy-related gene 5 (Atg5), Autophagy-related gene 7 (Atg7), P62 in liver tissue were detected by quantitative real-time PCR. The protein expression levels of these molecules were determined by Western blot analysis. **Result** Compared to the normal group, the model group exhibited significant increases in Lee's index, body weight, serum glucose, insulin, TG, TC and LDL-C levels ($P < 0.01$). The area under the curve (AUC) of ITT was significantly increased, accompanied by elevated insulin resistance index ($P < 0.01$). HDL-C levels were significantly reduced ($P < 0.01$), the mass of WAT and Liver tissues was increased ($P < 0.01$). In WAT of the abdominal region, adipocyte diameter was significantly increased with concomitant reduction in cell number per unit area. Hepatocytes exhibited marked swelling, disorganized arrangement, and abundant lipid droplet vacuolization. Prominent orange-red lipid deposits were observed, accompanied by decreased autophagic vacuoles. The mRNA of mTOR and P62 in Liver tissue were upregulated, as well as the protein expression of p-mTOR/mTOR and P62 ($P < 0.01$). The mRNA expression of AMPK, ULK1, LC3- II, Atg5 and Atg7 in Liver tissues were downregulated, as well as the protein of p-AMPK/AMPK, ULK1, LC3- II, Atg5 and Atg7 ($P < 0.01$). Compared to the model group, EA group showed significant reductions in Lee's index, body weight, serum glucose, insulin, TC, TG and LDL-C levels. AUC of ITT was significantly decreased, with a concomitant decrease in the insulin resistance index ($P < 0.05$). HDL-C levels were elevated ($P < 0.01$), the mass of WAT and Liver tissues was decreased ($P < 0.01$). In WAT of the abdominal region, adipocyte diameter was significantly decreased, with an increase in cell number per unit area. Hepatocytes exhibited no discernible lipid droplet vacuolization, with reduced orange-red lipid deposits and increased autophagic vacuoles. A limited number of autophagosomes and autolysosomes were observed. The mRNA expression of mTOR and P62 in Liver tissues were downregulated, as well as the protein of p-mTOR/mTOR and P62 ($P < 0.01$), the mRNA expression of AMPK, ULK1, LC3- II, Atg5 and Atg7 were upregulated, as well as the protein of p-AMPK/AMPK, ULK1, LC3- II, Atg5 and Atg7 ($P < 0.01$). **Conclusion** EA at ST36 and ST25 can enhance hepatic autophagy, reduce body weight, and improve blood glucose and lipid profiles in obese murine models. The mechanism is potentially linked to the modulation of the AMPK/mTOR/ULK1 pathway. **Objectiv** To explore the effect of Electroacupuncture (EA) in regulating hepatic autophagy in Obese Mice via the adenosine activated protein kinase (AMPK)/mammalian target of rapamycin (mTOR)/Unc-51 Like Autophagy Activating Kinase 1(ULK1) Pathway.

【KEYWORDS】 Obesity; Electroacupuncture; AMPK/mTOR/ULK1 Pathway; autophagy

肥胖已成为全球性公共卫生问题,且患病率逐年攀升。世界肥胖联盟发布《2025世界肥胖地图》数据预测^[1],全球肥胖成年人口数量将从2010年的

5.24亿增加至2030年的11.3亿,增幅超过115%。而我国2030年,成人超重/肥胖人数将达5.1504亿。肥胖不单是一种疾病,更是多种威胁健康的非传染

性疾病如2型糖尿病、代谢相关脂肪性肝病、中风等重要危险因素,每年因肥胖导致的过早死亡人数可达160万人。肥胖更对社会经济领域产生极大负担,数据显示,2020年用于支付肥胖/超重费用占全球经济GDP的2.4%,而到2035年预计将增至4.32万亿美元。

肝脏在能量代谢中扮演着重要角色。肥胖状态下,肝脏脂肪过度积累,代谢功能紊乱,导致胰岛素敏感性降低,脂质氧化减少,恶性循环进一步加剧肝脏的脂肪累积,最终导致胰岛素抵抗甚至出现代谢综合征^[2-4]。

自噬作为关键的细胞过程,可通过溶酶体途径降解受损的细胞器和蛋白质,维持细胞稳态^[5]。肝脏是代谢调节的核心器官,肝细胞自噬通过降解回收过量脂质和受损细胞器,防止有毒脂质中间体的积累,减少氧化应激,对于维持糖异生、糖原分解和脂肪酸氧化等功能稳态,预防代谢相关脂肪性肝病至关重要^[6-8]。肥胖状态下肝脏自噬功能受损,脂滴分解抑制,导致脂质在肝细胞内过度积累,影响线粒体功能,加剧氧化应激和炎性反应^[9]。腺苷酸激活蛋白激酶(adenosine activated protein kinase, AMPK)/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin, mTOR)/unc-51样自噬激活激酶1(Unc-51 Like Autophagy Activating Kinase 1, ULK1)通路是调控自噬的关键信号通路,AMPK作为能量感受器,能通过抑制mTOR活性,激活ULK1,促进自噬^[7,10]。研究表明^[11],小鼠高脂饮食喂养会抑制AMPK磷酸化并诱导mTOR磷酸化,导致自噬功能下降,而上调AMPK、ULK1信号表达,抑制mTOR信号表达,则可显著减轻肥胖小鼠体重,改善肝脏脂质沉积^[12]。

前期研究表明^[13-14],电针可有效减轻肥胖小鼠体重,改善糖脂代谢,达到防治肥胖的目的。因此,本研究拟进一步探索电针是否通过AMPK/mTOR/ULK1信号通路促进肝脏自噬,起到防治肥胖的作用。

1 材料与方法

1.1 实验动物与分组

38只SPF级C57BL/6JNifdc雄性小鼠(42~48天),体质量 $20\pm 2\text{g}$,由北京维通利华实验动物技术有限公司湖北分公司提供,生产许可证号:SCXK(鄂)2022-0030,饲养于湖北省中医院动物实验中心,室温 $22\pm 2^\circ\text{C}$,相对湿度 $55\pm 10\%$,每日光照时

长12小时。所有小鼠经为期1周适应性喂养后开始实验造模。采用随机数字表法将小鼠分为正常组、模型组、电针组。本研究经湖北省中医院动物实验伦理委员会审批通过,伦理号:鄂中医院动(福)第202401号。实验中对小鼠的所有操作均严格遵循中华人民共和国科学技术部颁布的《关于善待实验动物的指导性意见》及相关动物伦理规定^[15-16]。

1.2 主要仪器与试剂

主要仪器:电转仪(北京六一仪器厂,DY CZ-40),冷冻高速离心机(湖南可成仪器设备有限公司,H1-16K),Multiskan FC型酶标仪(Thermo scientific,1410101),FA系列多功能分析电子天平(常州市幸运电子设备有限公司,FA1204),PCR仪(杭州米欧仪器有限公司,PR-96),0.30 mm×13 mm环球牌一次性无菌针灸针(苏州针灸用品有限公司),HANS-200型电针治疗仪(北京华运安特科技有限责任公司),病理切片机(德国Leica RM 2016轮转式切片机),生物显微镜(尼康Fi3型),冰冻切片机(德国Leica,CM3050S),透射电子显微镜(日本JEOL,JEM-1400FLASH)。

主要试剂:苏木精(Sigma,H9627,批号SHBS6095),油红O(Amresco,0684,批号1320-06-5),水溶性封片剂(southernbiotech,0100-01,批号0000458321),磷酸酶抑制剂(Meilunbio,MB12707,批号MB12707-May-11th)、RIPA裂解液(Meilunbio,MA0151,批号:MA0151-Jul-13th)、2.5%戊二醛(AR级)(国药集团化学试剂有限公司,TCI-G0067)、丙酮(AR级)(西陇科学股份有限公司,13100201)、胞质胞核蛋白提取试剂盒(南京凯基生物,KGP150,批号20240418),BCA蛋白浓度测定试剂盒(GBCBIO,G3522)、组织细胞RNA提取试剂盒(R223-01,批号7F711L3)、SYBR Green实时荧光定量PCR预混液(Q311-02,7E712J3)均购置于VAZYME,蛋白marker(GenScript,M00521,MF028-plus-01,Mei5bio),兔多抗甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)(碧云天,AF5003),PVDF膜(Millipore,IPVH00010,ISEQ15150),HRP标记羊抗兔二抗(BA1054)、HRP标记羊抗小鼠二抗(BA1051)均购置于武汉博士德生物工程有限公司,小鼠胰岛素(SP14098)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)(SP39962)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)(SP14177)、总胆固醇(TC)

(SP14914)、甘油三酯(TG)(SP14979)ELISA试剂盒均购置于武汉赛培生物科技有限公司,兔多抗AMPK(10929-2-AP)、兔多抗磷酸化腺苷酸活化蛋白激酶(p-AMPK)(83924-1-RR)、兔多抗磷酸化哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(p-mTOR)(67778-1-Ig)、兔多抗mTOR(28273-1-AP)、兔多抗ULK1(80218-1-RR)、兔多抗微管相关蛋白1轻链3-II型(microtubule associated protein 1 light chain 3-II, LC3-II)(14600-1-AP)、兔多抗自噬相关基因5(Autophagy-related gene 5, Atg5)(10181-2-AP)、兔多抗自噬相关基因7(Autophagy-related gene 7, Atg7)(10088-2-AP)、兔多抗选择性自噬衔接蛋白(P62)(18420-1-AP)均购置于武汉三鹰生物技术有限公司

1.3 模型制备

建立营养型肥胖小鼠模型^[13],实验开始前用普通饲料适应性喂养1周。30只造模小鼠给予高脂饲料喂养(60%脂肪供能高脂饲料,纯化型XTHF60)。另8只小鼠给予普通饲料喂养作为对照。小鼠在造模期间均可自由摄食饮水,每日更换饲料和水,共喂养8周,8周结束后测量小鼠体质量。肥胖小鼠造模成功标准为造模小鼠体质量超过普通饲料喂养小鼠体质量的20%。最终16只造模成功的肥胖小鼠采用随机数字表法分为肥胖组8只、电针组8只。

1.4 干预方法

正常组:普通饲料喂养,第8周造模成功后予以电针组相同的固定和抓取,持续4周。

肥胖组:高脂饲料喂养,第8周造模成功后予以电针组相同的固定和抓取,持续4周。

电针组:高脂饲料喂养,第8周造模成功后进行电针干预。电针腧穴为小鼠双侧“足三里”“天枢”,“足三里”位于后肢膝关节后外侧,在腓骨小头下2mm左右,“天枢”位于小鼠前正中中线旁开5mm,耻骨联合以上20mm区域内^[13,17]。仰卧位固定小鼠,针刺部位常规消毒,双侧“足三里”“天枢”采用0.30mm×13mm一次性无菌针灸针直刺3mm左右^[13],双侧“足三里”“天枢”接HANS-200型电针仪,左侧“足三里”“天枢”接正极,右侧“足三里”“天枢”接负极,疏密波,频率2Hz/15Hz,强度1mA,每次30min,每周周一至周五连续治疗5次,共4周。

1.5 观察指标及检测方法

1.5.1 Lee's指数及体质量检测

实验期间,每日观察小鼠的生长状况,4周治疗

结束后对小鼠体长、体质量进行测量,计算Lee's指数。Lee's指数计算方法= $\sqrt[3]{\text{体质量} \times 10^3} / \text{体长}(\text{cm})$ 。

1.5.2 空腹血糖及胰岛素耐量试验

小鼠禁食8h,自由饮水。用剪刀剪去小鼠尾巴末端约1~2mm,轻轻挤压小鼠尾巴,让血液富集成一滴,用血糖仪测定血糖,测定值认定为0min的血糖值(空腹血糖)。小鼠适应30min之后,开始准备腹腔注射胰岛素溶液。在15min,30min,60min,120min测定每只小鼠各个时间点的血糖值,绘制小鼠各个时间段血糖曲线图,计算AUC值。

1.5.3 ELISA法检测空腹胰岛素和血脂四项水平

小鼠最后一次治疗后禁食12h,自由饮水。2%戊巴比妥钠(50mg/kg·BW)腹腔注射麻醉小鼠,摘眼球取血。血液室温下静置30min后,置于高速离心机,4℃,3000rpm,5min一次,离心2次,取血清。采用ELISA法检测小鼠空腹胰岛素和血脂四项水平,并计算胰岛素抵抗指数。胰岛素抵抗指数计算方法= $\frac{\text{空腹血糖} \times \text{空腹胰岛素}}{22.5^\circ}$

1.5.4 肠系膜白色脂肪组织和肝脏组织重量检测

小鼠最后一次治疗后禁食12h,自由饮水。2%的戊巴比妥钠(50mg/kg·BW)腹腔注射麻醉小鼠,摘眼球取血后,打开腹腔,钝性分离小鼠肠系膜白色脂肪组织,用电子天平称取重量,暴露肝脏组织,用剪刀快速剪取用电子天平称取重量,然后用剪刀快速剪取1mm×1mm×1mm大小肝脏组织,放入2.5%戊二醛固定液中固定,普通4℃冰箱保存,以待后续透射电镜观察。剩余的肝脏组织一部分放置EP管中,放入液氮速冻,置于-80℃超低温冰箱储存,一部分放入4%多聚甲醛溶液中固定,以待HE染色。将称取完重量的一部分脂肪组织放置EP管中,放入液氮速冻,置于-80℃超低温冰箱储存,一部分放入4%多聚甲醛溶液中固定,以待HE染色。

1.5.5 HE染色观察小鼠肠系膜白色脂肪组织及肝脏组织形态学

取出置于4%多聚甲醛溶液中固定的各组小鼠肠系膜白色脂肪组织及肝脏组织,用蒸馏水洗涤组织,放入70%乙醇过夜;经脱水、透明、石蜡包埋、切片和脱蜡后,进行HE染色,显微镜下观察小鼠肠系膜白色脂肪组织及肝脏组织形态学变化。

1.5.6 油红O染色观察小鼠肝脏组织形态学

取出置于4%多聚甲醛溶液中固定的各组小鼠

肝脏组织,OTC包埋,制作冰冻切片,甲醛-钙固定10 min,蒸馏水洗,60%异丙醇浸洗,油红O染液染10 min,60%异丙醇分色至背景无色,蒸馏水洗,苏木精复染数分钟,水洗(蓝化)1~3 min,蒸馏水洗后水溶性封片剂封片,显微镜下观察肝脏脂质沉积情况。

1.5.7 透射电镜观察肝脏组织超微结构

取出置于2.5%戊二醛固定液中固定的肝脏组织,丙酮逐级脱水、脱水剂和Epon-812包埋剂依次浸透、包埋、用超薄切片机制作60~90 nm超薄切片捞至铜网上、染色、透射电镜观察肝脏组织超微结构(线粒体结构、脂滴、自噬溶酶体、自噬小体等),记录图像。

1.5.8 Western blot 检测 AMPK-mOTR-ULK1 信号通路(AMPK、p-AMPK

mTOR、p-mTOR、ULK1)及自噬(LC3- II、P62、Atg5、Atg7)相关蛋白表达

称取置于-80℃超低温冰箱储存的小鼠肝脏组织,RIPA裂解液裂解,采用自动匀浆机匀浆,匀浆后将EP管置于冰上裂解,裂解30 min后,在4℃下12 000rpm离心5 min,取上清,采用BCA法测定蛋白浓度。加入5×蛋白上样缓冲液(体积比按照4:1混合),沸水浴10min,使蛋白变性。配置凝胶。在

电泳、转膜后,用含5%脱脂奶粉的TBST(封闭液)浸泡PVDF膜,室温摇床封闭2 h,用封闭液稀释相应的一抗,使PVDF膜浸泡于一抗孵育液中,4℃孵育过夜,TBST充分洗涤PVDF膜5次,5 min/次。用TBST稀释相应的HRP标记二抗1:10 000稀释,将PVDF膜浸泡于二抗孵育液中,室温摇床孵育2h。ECL法检测印迹信号。Image-Pro Plus分析胶片灰度值,以GAPDH为内参计算蛋白相对表达水平。

1.5.9 实时荧光定量PCR检测 AMPK-mOTR-ULK1 信号通路(AMPK、mTOR、ULK1)及自噬(LC3- II、P62、Atg5、Atg7)相关基因表达

称取置于-80℃超低温冰箱储存的小鼠肝脏组织,匀浆。采用组织细胞RNA提取试剂盒提取组织总RNA。测定RNA浓度及质量后,使用反转录试剂盒以组织总RNA为模板,反转录成cDNA,按照试剂盒说明书进行扩增。用PCR仪按以下反应条件进行定量PCR检测:95℃5min,1个循环,95℃10 s、60℃30 s,72℃20 s,40个循环。熔解熔解曲线程序:60℃60 s,95℃15 s,1个循环,以GAPDH为内参基因,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算AMPK、mTOR、ULK1、LC3- II、P62、Atg5、Atg7相对表达量。引物序列见表1

表1 引物序列

基因名称	引物序列(5'→3')	产物长度 / bp
AMPK	上游 ACCTGGTGACAATCGGAGC	299
	下游 GGTGGTGGGTATCAACGGG	
mTOR	上游 CTGCACTTGTGTTGCCTCC	164
	下游 TGGTCTAGCGTGCGAACAAT	
ULK1	上游 ATTGCCACTGTGCTTGGTTGTA	129
	下游 CCAGTTGGCCACAAAGCAATA	
LC3- II	上游 GACCCTAACCCCATAGGAGC	109
	下游 TCTCCCCCTTGTATCGCTCT	
P62	上游 CCTTGCCCTACAGCTGAGTC	133
	下游 CATGTTCCACATCAATGTCAACC	
Atg5	上游 CAGATGGACAGCTGCACACAC	126
	下游 GGGTTTCCAGCATTGGCTCTA	
Atg7	上游 TTGTAGCACCTGCTGACCTG	94
	下游 CCTGGAGCCACCACATCATT	
GAPDH	上游 TGTGAACGGATTTGGCCGTA	159
	下游 ACTGTGCCGTTGAATTTGCC	

注:AMPK为腺苷酸激活蛋白激酶,mTOR为哺乳动物雷帕霉素靶蛋白,ULK1为unc-51样自噬激活酶1,LC3- II为微管相关蛋白1轻链3- II型,P62为选择性自噬衔接蛋白,Atg5为自噬相关基因5,Atg7为自噬相关基因7。

1.6 统计学处理

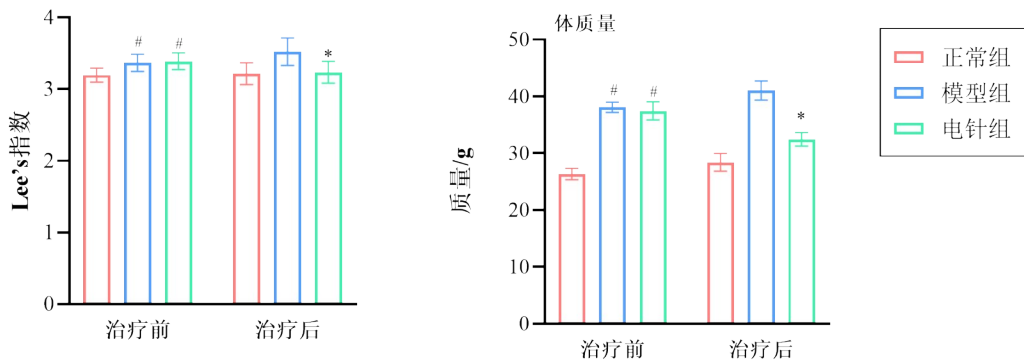
使用SPSS 27.0和Graph Pad Prism 9.5软件处理数据。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,符合正态分布与方差齐,组间用单因素方差分析,两两比较用LSD法, $P < 0.05$ 即差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组小鼠Lee's指数及体质量比较

治疗前,与正常组比较,模型组、电针组小鼠

Lee's指数增加、体质量明显增长($P < 0.01$),差异有统计学意义,提示造模成功。模型组、电针组小鼠Lee's指数及体质量差异无统计学意义($P > 0.05$)。治疗后,与正常组比较,模型组小鼠Lee's指数及体质量明显上升($P < 0.01$);与模型组比较,电针组Lee's指数及体质量明显减少($P < 0.01$)。见图1。



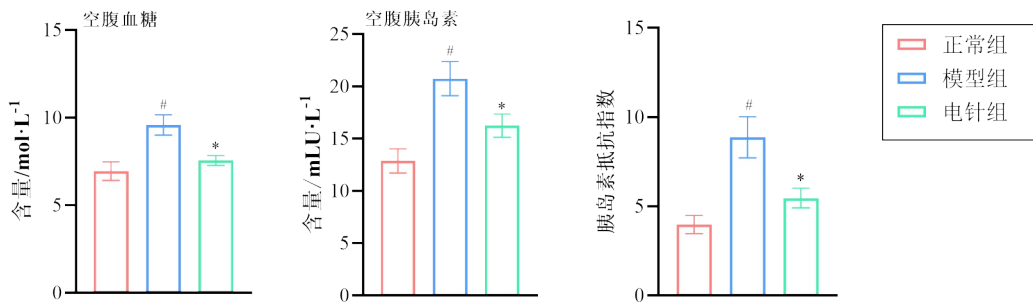
注:与同时点正常组比较,[#] $P < 0.01$;与同时点模型组比较,^{*} $P < 0.01$ 。

图1 各组小鼠治疗前后Lee's指数、体质量比较($\bar{x} \pm s$, 8只鼠/组)

2.2 各组小鼠糖代谢相关指标比较

与正常组比较,模型组小鼠空腹血糖、胰岛素水平和胰岛素抵抗指数均显著升高($P < 0.01$),与模型组比较,电针组小鼠空腹血糖、胰岛素水平和胰

岛素抵抗指数均下降($P < 0.01$);进一步通过胰岛素耐量试验,与正常组小鼠比较,模型组小鼠AUC值升高,与模型组比较,电针组小鼠AUC值明显降低($P < 0.01$)。见图2、3。



注:与同时点正常组比较,[#] $P < 0.01$;与同时点模型组比较,^{*} $P < 0.01$ 。

图2 各组小鼠治疗后空腹血糖、胰岛素水平及胰岛素抵抗指数比较($\bar{x} \pm s$, 8只鼠/组)

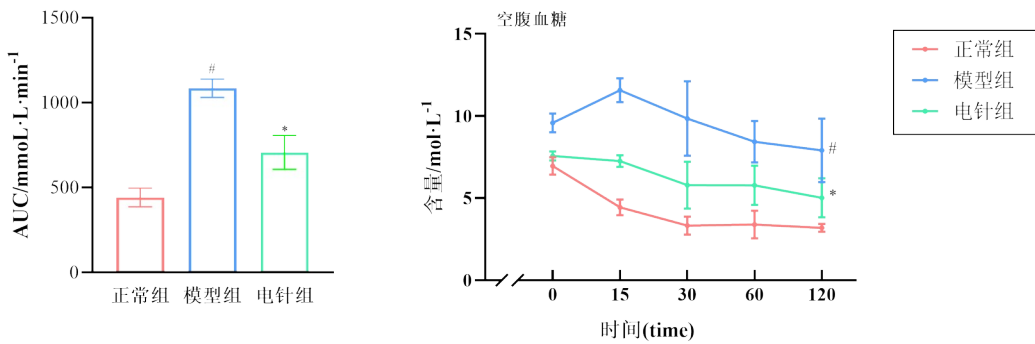
2.3 各组小鼠脂代谢相关指标比较

与正常组比较,模型组小鼠TC、TG、LDL-C指标均显著升高,HDL-C指标显著降低($P < 0.01$);与模型组比较,电针组小鼠TC、TG、LDL-C指标均下降,HDL-C指标上升($P < 0.01$)。见图4。

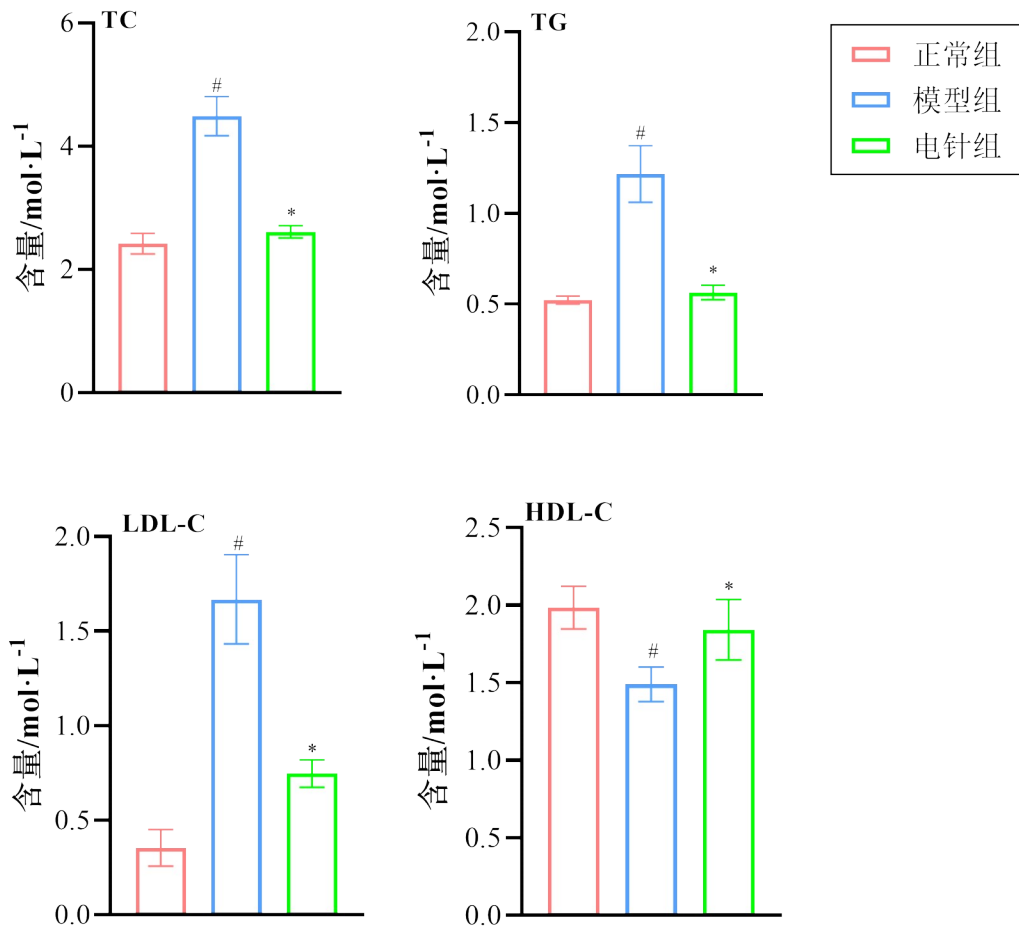
2.4 各组小鼠肠系膜白色脂肪组织和肝脏组织重量比较

与正常组比较,模型组小鼠肠系膜白色脂肪组织和肝脏组织重量显著增加($P < 0.01$);与模型组比较,电针组腹部白色脂肪组织重量显著下降($P <$

0.01), 肝脏组织重量减少($P < 0.05$)。见图5。



注: AUC为曲线下面积。与同时点正常组比较,[#] $P < 0.01$;与同时点模型组比较,^{*} $P < 0.01$ 。
图3 各组小鼠治疗后胰岛素耐量实验AUC值及不同时间段空腹血糖比较($\bar{x} \pm s$, 8只鼠/组)

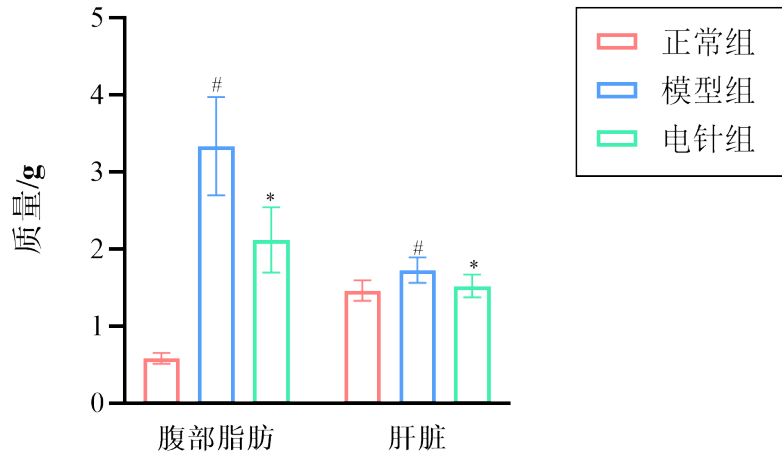


注: TC为总胆固醇, TG为甘油三酯, LDL-C为低密度脂蛋白, HDL-C为高密度脂蛋白。与同时点正常组比较,[#] $P < 0.01$;与同时点模型组比较,^{*} $P < 0.01$ 。

图4 各组小鼠治疗后脂代谢相关指标比较($\bar{x} \pm s$, 8只鼠/组)

2.6 各组小鼠肠系膜白色脂肪组织形态学观察
与正常组比较,可观察到模型组小鼠肠系膜白

色脂肪组织脂肪细胞直径明显增加,脂肪细胞面积显著增大,单位面积内脂肪细胞数量减少;与模型



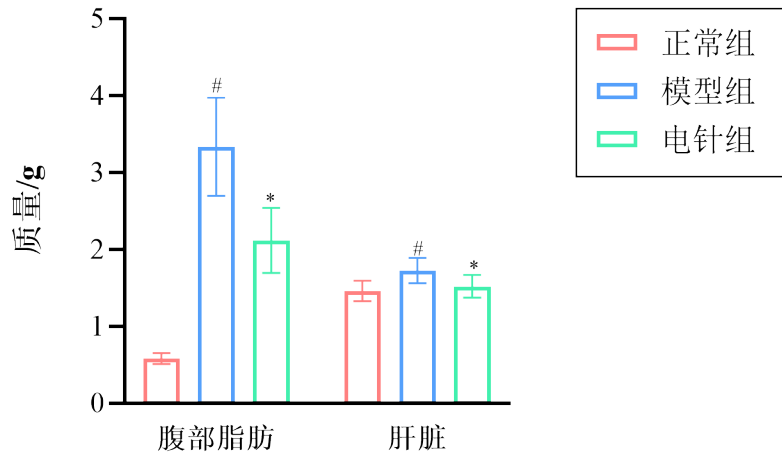
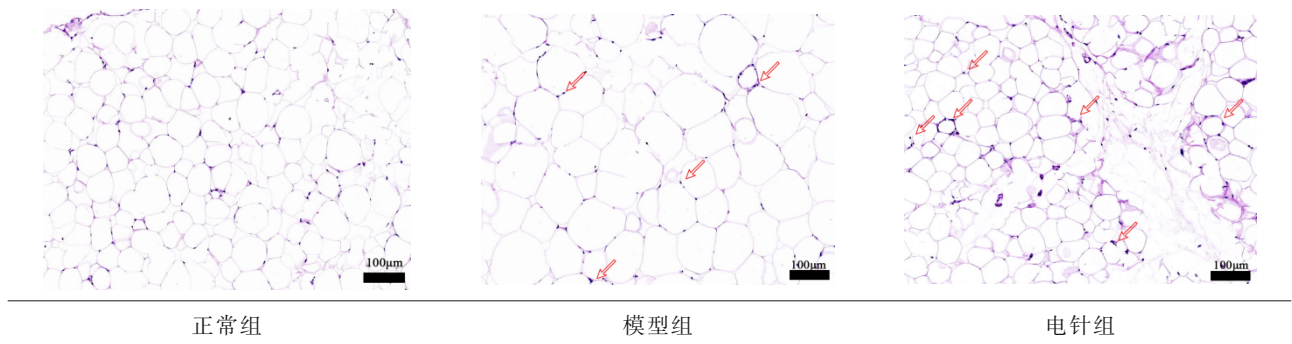
注:脂肪组织重量与同时点正常组比较[#] $P < 0.01$,与同时点模型组比较^{*} $P < 0.01$;肝脏组织重量与同时点正常组比较[#] $P < 0.01$,与同时点模型组比较^{*} $P < 0.05$ 。

图5 各组小鼠治疗后肠系膜白色脂肪组织重量比较($\bar{x} \pm s$, 8只鼠/组)

组比较,电针组脂肪细胞直径减小,脂肪细胞面积减少,单位面积细胞数目显著增加。采用ImageJ软件计算单位面积内各组间脂肪细胞总面积,与正常组比较模型组小鼠肠系膜白色脂肪细胞面积显著

增加($P < 0.01$);与模型组比较,电针组小鼠肠系膜白色脂肪细胞面积显著降低($P < 0.01$)。见图6、图7。

图6 小鼠肠系膜白色脂肪组织HE染色切片(红色箭头示炎性细胞浸润,标尺=100 μm)



注:脂肪细胞面积与同时点正常组比较[#] $P < 0.01$,与同时点模型组比较^{*} $P < 0.01$ 。

图7 各组小鼠治疗后肠系膜白色脂肪组织脂肪细胞面积比较($\bar{x} \pm s$, 8只鼠/组)

2.7 各组小鼠肝脏组织形态学观察及脂质沉积变化

HE染色结果可见,正常组小鼠肝组织结构正常,肝细胞彼此连接形成肝索,肝细胞大而饱满,细胞核居中,细胞无脂肪变性,肝窦结构规则。模型组小鼠肝细胞肿大,排列紊乱,细胞质内出现大量脂滴空泡,细胞核变小,分布不居中,肝索排列不整齐,肝窦受挤压变小。电针组小鼠肝细胞内未见明

显脂滴空泡,细胞核居中。油红O结果可见,正常组小鼠肝细胞排列整齐,无橘红色脂质沉积,与正常组比较,模型组小鼠肝细胞排列紊乱,可见大量橘红色脂质沉积,电针组肝细胞橘红色脂质沉积减少。见图8、图9。图6、8、9、10中的标尺太小或不清晰,请修改标尺,将标尺长度写在图注中(参见我刊既往文章格式)

图8 小鼠肝脏组织HE染色切片(绿色箭头示脂滴空泡,标尺=50μm)

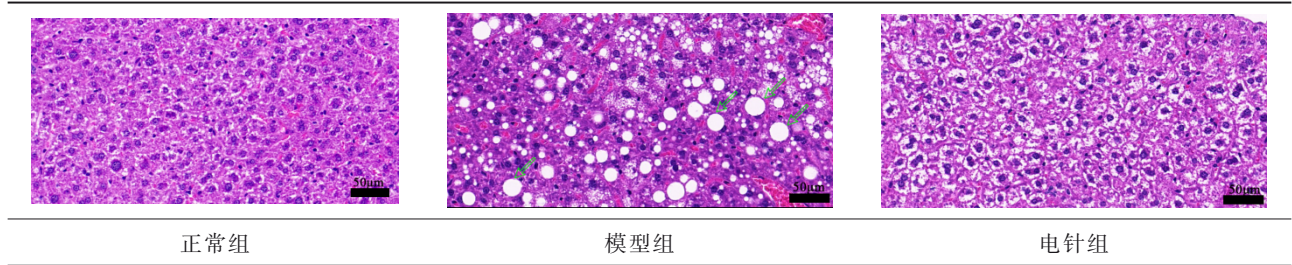
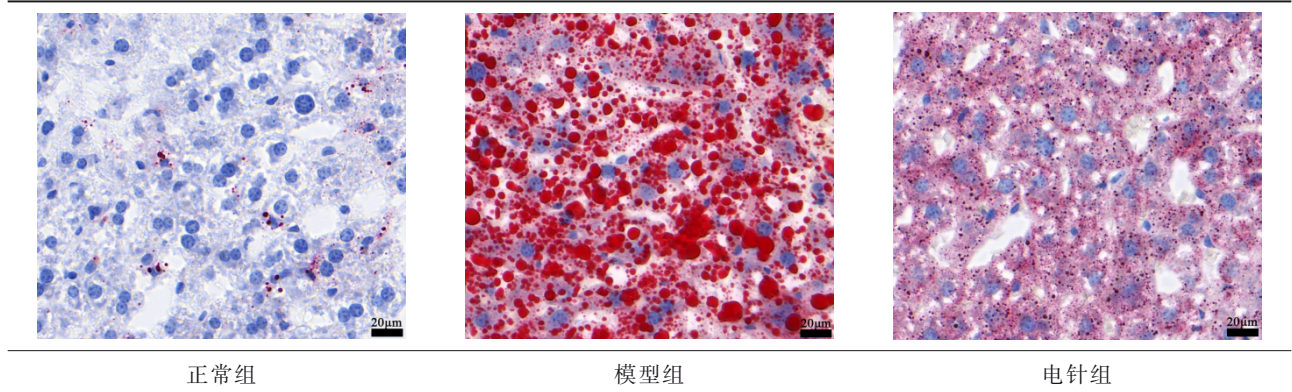


图9 小鼠肝脏组织油红O染色切片(标尺=20μm)



2.7 各组小鼠肝脏组织超微结构观察

透射电镜下,正常组小鼠肝细胞形态结构较正常,胞质内线粒体结构正常,呈长条形或圆形,嵴结构清晰、排列整齐,基质均匀,呈均一的灰黑色,胞质内还含少量自噬、初级溶酶体、脂滴和较多糖原颗粒;细胞膜连续完整。模型组小鼠肝细胞形态结构明显异常,胞质内线粒体发生皱缩,体积缩小,嵴结构排列不整齐,膜密度增高,胞质见大量初级溶酶体和脂滴堆积,还可见少量糖原颗粒,未见自噬、初级溶酶体。电针组小鼠肝细胞形态结构轻微异常,胞质内线粒体结构正常,呈椭圆形或圆形,嵴结构清晰、排列整齐,基质均匀,呈均一的灰黑色,外膜连续完整,胞质内还含较多自噬、少量初级溶酶体和脂滴以及大量糖原颗粒。见图10。

2.8 各组小鼠肝脏组织AMPK-mTOR-ULK1信号

通路mRNA和蛋白表达比较

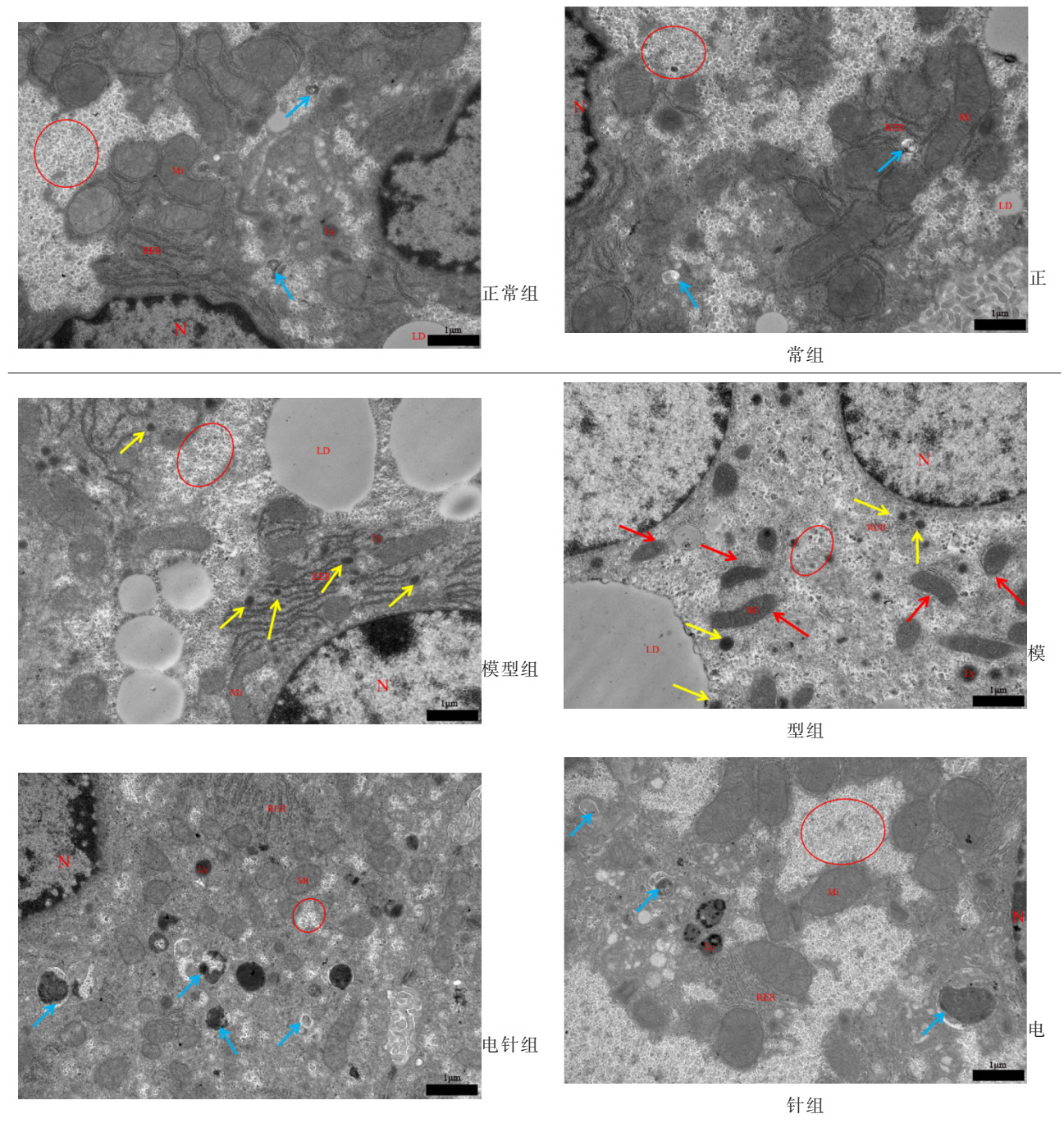
与正常组比较,模型组小鼠肝脏组织AMPK、ULK1的mRNA和p-AMPK/AMPK、ULK1的蛋白表达降低($P < 0.01$),mTOR的mRNA和p-mTOR/mTOR的蛋白表达上升($P < 0.01$);与模型组比较,电针组小鼠肝脏组织AMPK、ULK1的mRNA和p-AMPK/AMPK、ULK1的蛋白表达上调($P < 0.01$),mTOR的mRNA和p-mTOR/mTOR的蛋白表达下降($P < 0.01$)。见图11。

2.9 各组小鼠肝脏组织LC3-II、Atg5、Atg7、P62mRNA和蛋白表达比较

与正常组比较,模型组小鼠肝脏组织LC3-II、Atg5、Atg7的mRNA和蛋白表达降低($P < 0.01$),P62的mRNA和蛋白表达上升($P < 0.01$);与模型组比较,电针组小鼠肝脏组织LC3-II、Atg5、Atg7的mRNA和蛋白表达上调($P < 0.01$),P62的

mRNA 和蛋白表达下降($P<0.01$)。见图 12。

图 10 小鼠肝脏组织超微结构

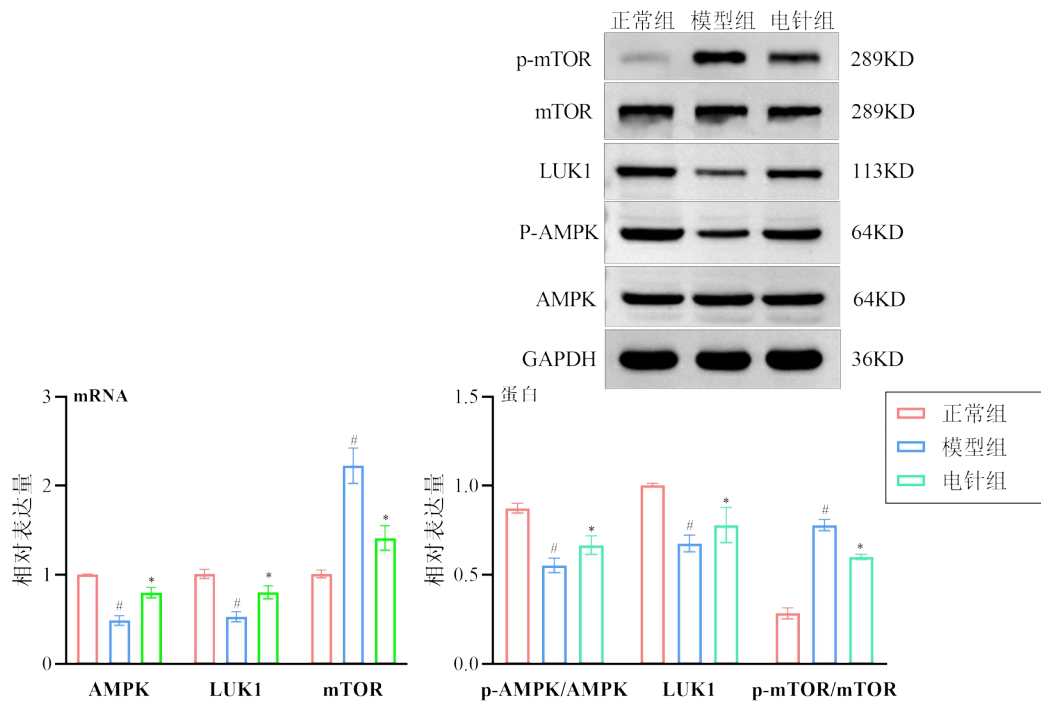


注:细胞核(N)、线粒体(Mi)、粗面内质网(RER)、脂滴(LD)、溶酶体(Ly);糖原颗粒(○)、自噬(↑)、溶酶体堆积(↑)、线粒体固缩(↑),标尺=1μm。

3 讨论

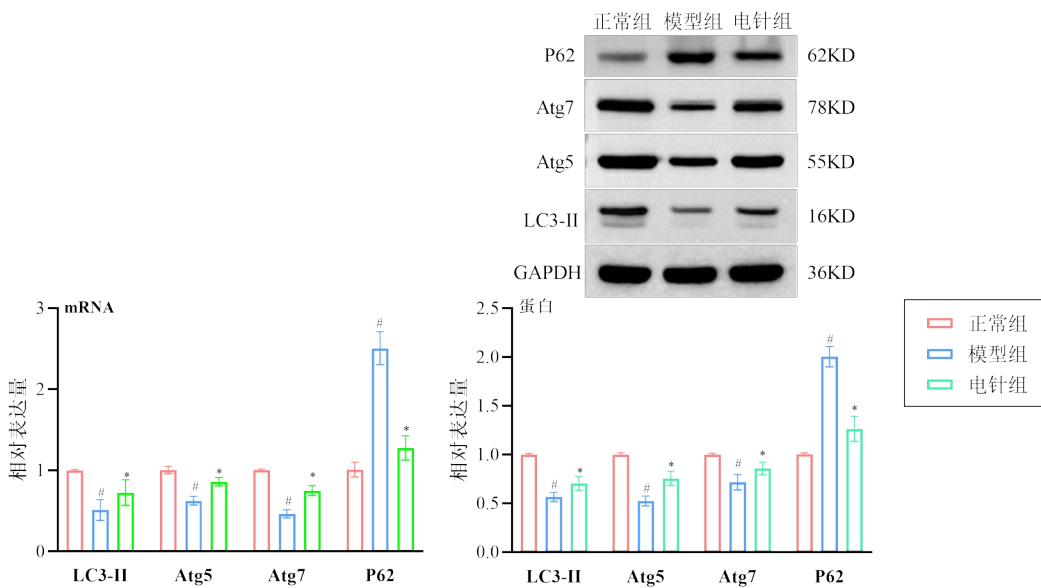
中医认为肥胖的主要病理因素为痰湿,常有“肥人多痰”“肥甘生痰”之说。《张聿青医案》记载“第体丰者多湿多痰”,吴本立《女科切要》亦提到:“肥白妇人,经闭而不通者,必是痰湿与脂膜壅塞

之故也”^[18]。“痰,病液”,“湿,幽湿也。从水,一所以覆也。覆土而有水,故湿也。”痰湿为体内水液代谢异常产物。《黄帝内经灵枢集注》云:“中焦之气,蒸津液,化其精微……润泽皮肤……溢于外则皮肉膏肥,余于内则膏育丰满。……是以膏肥之人,其肉



注:AMPK为腺苷酸活化蛋白激酶,p-AMPK为磷酸化腺苷酸活化蛋白激酶,mTOR为哺乳动物雷帕霉素靶蛋白,p-mTOR为磷酸化哺乳动物雷帕霉素靶蛋白,ULK1为unc-51样自噬激活酶1。与正常组比较[#] $P < 0.01$,与同时点模型组比较^{*} $P < 0.01$ 。

图 11 各组小鼠肝脏 AMPK、mTOR、ULK1 的 mRNA 及蛋白表达比较 ($\bar{x} \pm s$, 8 只鼠/组)



注:LC3-II为微管相关蛋白1轻链3-II型,Atg5为自噬相关基因5,Atg7为自噬相关基因7,P62为选择性自噬衔接蛋白。与正常组比较[#] $P < 0.01$,与同时点模型组比较^{*} $P < 0.01$ 。

图 12 各组小鼠肝脏组织 LC3-II、Atg5、Atg7、p62 的 mRNA 及蛋白表达比较 ($\bar{x} \pm s$, 8 只鼠/组)

淖而皮纵缓,故能纵腹垂腴,外内之相应也。”^[19]可见肥胖虽由体内痰湿聚集而致,但究其根本则在脾胃,脾胃受损,体内水液代谢异常则酿生痰湿,而发为肥胖。故针灸治疗肥胖当立其根本,以健运脾

胃,祛湿化痰为准则。《灵枢·海论》云:“胃者,水谷之海,其输在气街,下至三里。”足三里穴为足阳明之合穴,胃之下合穴,《灵枢·邪气脏腑病形》曰:“合治内腑”,《素问·咳论》曰:“治腑者,治其合”,足三

里可与“脾气”“胃气”相通,能调理脾胃功能,电针足三里可激发胃气,健补脾胃,脾胃功能得以恢复,体内水湿津液代谢则以恢复正常^[20];天枢穴为大肠募穴,足少阴、冲脉之会,可通中焦,司升降之功,“承太乙、滑肉门下传的风之余气及气冲、外陵上承的水湿之气”,具有健脾除湿化痰之功效^[21]。“天枢之上,天气主之;天枢之下,地气主之。”天枢穴可调畅天地上下之气机,气行而通水道,气旺而食滞消,针刺天枢穴可通畅气机,调节体内水液运行,体内无凝滞之津液则痰湿可消^[22]。电针“足三里”“天枢”可健运脾胃,祛湿化痰,显著减轻肥胖小鼠体质量,降低腹部脂肪含量,改善血脂水平,明确了电针降脂化浊效应^[13,23]。本研究进一步明确了电针“足三里”“天枢”可降低肥胖小鼠的血糖水平,降低AUC值,改善胰岛素抵抗,改善肥胖小鼠的糖代谢水平。通过进一步对肝脏组织的病理学和脂质沉积观察,证明电针可有效减轻肥胖小鼠肝脏的脂质沉积,明确了电针的降脂功效。

自噬参与细胞的合成与代谢,对体内的脂质代谢平衡起着重要作用。研究显示^[24-25],电针“天枢”“足三里”等穴可激活肥胖大鼠白色脂肪组织中mTOR/P70S6K信号通路,调节白色脂肪组织中自噬相关因子如细胞中B淋巴细胞瘤基因2同源结构域蛋白(Beclin-1)、LC3和P62的表达,抑制白色脂肪组织的过度自噬,达到减肥的功效。严江天等^[26]研究表明“标本配穴”电针法可下调脂肪组织中LC3-II/LC3-I比值和Beclin-1蛋白的表达,上调P62蛋白的表达,降低体内炎症因子水平,达到改善肥胖的作用。上述研究均聚焦于脂肪组织,观察电针减肥的局部作用机制。但肥胖状态下肝脏代谢能力下降,肝脏内脂肪大量蓄积,进一步加剧代谢危险性。肝脏内大量的脂肪蓄积导致肝脏自噬功能受损,进而影响自噬降解脂质的作用,长此以往,则形成恶性循环^[27]。针灸通过调理体质、脏腑功能来防治肥胖症,恢复健康代谢。研究显示,电针可通过改善肝脏胰岛素抵抗、减少肝脏脂肪蓄积,减轻炎症反应达到防治肥胖的作用^[28-29]。基于此,本研究立足能量代谢器官-肝脏,探讨电针是否可以通过调控肝脏自噬,发挥减肥的功效,进一步探索电针减肥的作用机制。

微管相关蛋白1轻链3(microtubule-associated protein 1 lightchain 3,LC3)在自噬过程中扮演着重要角色,LC3的脂化是自噬体形成的关键步骤,标志着自噬体的形成与成熟^[30],LC3在自噬相关基因

(Autophagy-related gene, Atg)Atg4的剪切作用下裂解形成LC3-I,再通过Atg7和Atg3与磷脂酰乙醇胺(PE)偶联,转化为LC3-II,最终形成自噬小体^[31]。选择性自噬衔接蛋白(sequestosome-1, SQSTM1/P62)作为经典的自噬底物,起到自噬接头的作用^[32],在自噬体形成过程中,P62可作为连接LC3和聚泛素化蛋白之间的桥梁,被选择性地包裹进自噬体,被自噬溶酶体中的蛋白水解酶降解,P62蛋白的表达量与自噬活性呈现负相关。自噬体的形成是由ATG驱动的,Atg5和Atg7在自噬中发挥重要作用^[33],Atg5是自噬泡膜延伸的关键蛋白,可与Atg12和Atg16形成复合物,激活Atg3酶活性,进而促进LC3脂化,促进自噬体的形成^[34]。通过体内体外实验表明,抑制ATG的表达可降低自噬水平,而Atg5条件性敲除小鼠的小脑中P62聚集增加,自噬体形成受损^[35-36]。Atg7作为E1类泛素化酶,在激活Atg12后可促进Atg5-Atg12-Atg16L复合物的形成,进一步促进磷脂酰乙醇胺(phosphatidylethanolamine, PE)与LC3-I的结合并形成LC3-II,进而促进LC3-II与自噬泡膜的结合^[37]。使用他莫昔芬诱导的敲除小鼠模型消融成年小鼠成熟脂肪细胞中的Atg7,使Atg7转录水平显著降低,中断了LC3-I向LC3-II的转化,自噬过程被破坏^[38]。本研究结果显示,较正常组,模型组小鼠肝脏组织中LC3-II、Atg5和Atg7表达降低,P62表达增加,通过透射电镜观察各组小鼠肝脏自噬小体情况发现,模型组肥胖小鼠较正常组小鼠肝细胞内自噬空泡减少,脂滴数量增加。表明模型组小鼠肝脏组织中的自噬受到抑制。经电针干预后,与模型组比较,电针组小鼠肝脏组织中的LC3-II、Atg5和Atg7表达上调,P62表达下调,电针组小鼠较模型组小鼠肝细胞内自噬空泡增加,可见少量的自噬小体和自噬溶酶体,脂滴数量减少,表明电针组小鼠肝脏组织自噬得以恢复,表明电针可促进肥胖小鼠肝脏自噬。

AMPK是细胞中的主要能量传感器和自噬激活剂^[39]。激活的AMPK磷酸化ULK1,启动自噬发生。此外激活的AMPK还可磷酸化RPTOR(MTORC1组成蛋白之一)和激活TSC2(MTORC1上游抑制因子)抑制MTORC1活性,诱导自噬发生^[40]。mTOR是一种丝氨酸/苏氨酸激酶,参与多种代谢和生长促进信号的整合。激活后的mTOR通过调节蛋白质合成和其他生物合成过程促进细胞生长和存活,限制自噬介导的分解代

谢^[41]。mTOR是自噬的重要负调节因子。在自噬诱导期,mTORC1通过磷酸化关键组分ULK1和ATG13来抑制ULK1复合体的活性,从而抑制自噬的启动^[42]。自噬启动的标志是自噬小体的形成,其起始过程主要依赖于ULK1复合物。ULK1是一种具有丝氨酸/苏氨酸激酶活性的分子,其活性受mTORC1的负调控,并受AMPK的正调控^[43]。研究显示^[44],高脂饮食诱导的肥胖小鼠肝细胞自噬活性降低,并加重肝脏的脂肪变性。本研究表明模型组小鼠p-AMPK/AMPK、ULK1表达较正常组减少,p-mTOR/mTOR表达上调,电针组小鼠p-AMPK/AMPK、ULK1表达上调,p-mTOR/mTOR表达下降。表明电针可以调控AMPK/mTOR/ULK1信号通路。

综上所述,电针可有效改善肥胖小鼠的血脂血糖代谢水平,可通过调控肝脏AMPK/mTOR/ULK1信号通路,上调自噬标志物LC3-II、自噬基因Atg5、Atg7的表达,抑制P62的表达,促进肥胖小鼠肝脏自噬水平,达到降脂减重的作用。但本研究未进一步采用AMPK特异性抑制剂深入干预,未能进一步验证该信号通路的靶向调控作用。今后将进一步开展实验,观察抑制AMPK/mTOR/ULK1通路后,电针对自噬的调控是否发生了改变,从而明确该信号通路在肝脏自噬的深入机制。

利益冲突 所有作者声明不存在利益冲突。

参考文献

- [1] World Obesity Federation. World Obesity Atlas 2025 [R/OL]. London: World Obesity Federation, 2025 [2025-05-12]. <https://data.worldobesity.org/publications/cat=23>.
- [2] GUERRA S, GASTALDELLI A. The role of the liver in the modulation of glucose and insulin in non alcoholic fatty liver disease and type 2 diabetes [J]. *Curr Opin Pharmacol*, 2020, 55: 165-174.
- [3] CHAO H W, CHAO S W, LIN H, et al. Homeostasis of glucose and lipid in non-alcoholic fatty liver disease [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(2): 298.
- [4] ROY N, ALENCASTRO F, ROSEMAN B A, et al. Dysregulation of lipid and glucose homeostasis in hepatocyte-specific SLC25A34 knockout mice [J]. *Am J Pathol*, 2022, 192(9): 1259-1281.
- [5] RYTER S W, BHATIA D, CHOI M E. Autophagy: a lysosome-dependent process with implications in cellular redox homeostasis and human disease [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2019, 30(1): 138-159.
- [6] WEISKIRCHEN R, TACKE F. Relevance of autophagy in parenchymal and non-parenchymal liver cells for health and disease [J]. *Cells*, 2019, 8(1): 16.
- [7] SINGH R, KAUSHIK S, WANG Y J, et al. Autophagy regulates lipid metabolism [J]. *Nature*, 2009, 458 (7242): 1131-1135.
- [8] LIN J R, HUANG C H, ZHAO J Y, et al. The novel TFEB agonist desloratadine ameliorates hepatic steatosis by activating the autophagy-lysosome pathway [J]. *Front Pharmacol*, 2024, 15: 1449178.
- [9] LIU J L, LI Y, ZHOU X Y, et al. CaMKIV limits metabolic damage through induction of hepatic autophagy by CREB in obese mice [J]. *J Endocrinol*, 2020, 244(2): 353-367.
- [10] KIM J, KUNDU M, VIOLLET B, et al. AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1 [J]. *Nat Cell Biol*, 2011, 13(2): 132-141.
- [11] LI Y, CHENG Y J, ZHOU Y, et al. High fat diet-induced obesity leads to depressive and anxiety-like behaviors in mice via AMPK/mTOR-mediated autophagy [J]. *Exp Neurol*, 2022, 348: 113949.
- [12] HAN D, KIM D, KIM H, et al. Methylsulfonylmethane ameliorates metabolic-associated fatty liver disease by restoring autophagy flux via AMPK/mTOR/ULK1 signaling pathway [J]. *Front Pharmacol*, 2023, 14: 1302227.
- [13] 张英溶, 张艳倩, 黄伟, 等. 电针调控下丘脑LKB1/AMPK信号通路对肥胖小鼠白色脂肪棕色化的影响 [J]. *针刺研究*, 2025, 50(4): 393-401.
ZHANG Y R, ZHANG Y J, HUANG W, et al. Electroacupuncture intervention promotes browning of white adipose tissue by regulating LKB1/AMPK pathway in obese mice (in Chinese) [J]. *Acupuncture Research*, 2025, 50(4): 393-401.
- [14] 张艳倩, 黄伟, 李佳, 等. 电针对肥胖大鼠白色脂肪组织PGC-1 α /Irisin/UCP1信号通路的影响 [J]. *中华中医药杂志*, 2022, 37(6): 3471-3474.
ZHANG Y J, HUANG W, LI J, et al. The effect of electricity on the PGC-1 α /Irisin/UCP1 signaling pathway in the white adipose tissue of obese rats (in Chinese) [J]. *China Journal of Traditional Chinese Medicine and Pharmacy*, 2022, 37(6): 3471-3474.
- [15] . 关于发布《关于善待实验动物的指导性意见》的通知 [J]. *畜牧兽医科技信息*, 2007(4): 35-36.
Notice on the Release of "Guidelines on Treating Laboratory Animals with Respect" (in Chinese) [J]. *Chinese Journal of Animal Husbandry and Veterinary Medicine*, 2007(4): 35-36.
- [16] 针刺研究编辑部. 《针刺研究》实验动物福利伦理审查清单 [J]. *针刺研究*, 2024, 49(02): 220.
Editorial Board of *Acupuncture Research*. List of ethical reviews for experimental animal welfare in *Acupuncture Research* (in Chinese) [J]. *Acupuncture Research*, 2024, 49(02): 220.
- [17] 中国针灸学会. 实验动物常用穴位名称与定位第3部分: 小鼠 [J]. *针刺研究*, 2021, 46(5): 445-446.
China Association of Acupuncture-Moxibustion. Nomenclature and location of acupoints commonly used in laboratory animals. Part 3: mice (in Chinese) [J].

- Acupuncture Research, 2021, 46(5): 445-446.
- [18] 喻松仁, 王萍, 舒晴, 等. 肥胖痰湿衍变规律探析[J]. 中华中医药杂志, 2018, 33(4): 1483-1485.
YU S R, WANG P, SHU Q, et al. Analysis on the evolution rules of obesity phlegm dampness (in Chinese) [J]. China Journal of Traditional Chinese Medicine and Pharmacy, 2018, 33(4): 1483-1485.
- [19] 付广威, 王浩田, 于淼, 等. 肥胖症从痰湿论治质疑[J]. 中国中医基础医学杂志, 2021, 27(7): 1069-1071, 1077.
FU G W, WANG H T, YU M, et al. Query on treatment of obesity from phlegm dampness (in Chinese) [J]. Journal of Basic Chinese Medicine, 2021, 27(7): 1069-1071, 1077.
- [20] 代辉, 陈静, 马磊, 等. 足三里穴的临床应用探析[J]. 贵州中医药大学学报, 2024, 46(6): 17-20.
DAI H, CHEN J, MA L, et al. Analysis of the Clinical Application of Zusanli Acupoint (in Chinese) [J]. Journal of Guizhou University of Traditional Chinese Medicine, 2024, 46(6): 17-20.
- [21] 陈伟, 王成, 余曙光, 等. 天枢穴主治病症及配伍规律探析: 基于随机临床对照试验[J]. 按摩与康复医学, 2023, 14(8): 97-102.
CHEN W, WANG C, YU S G, et al. The main indications and compatibility rules of Tianshu (ST25) based on randomized controlled trials (in Chinese) [J]. Chinese Manipulation and Rehabilitation Medicine, 2023, 14(8): 97-102.
- [22] 杨才雅, 黄静, 李安洪. 《针灸大成》中天枢穴的临床应用浅析[J]. 按摩与康复医学, 2023, 14(3): 90-92, 96.
YANG C Y, HUANG J, LI A H. Clinical application of acupuncture at Dacheng Zhongtianshu point (in Chinese) [J]. Chinese Manipulation and Rehabilitation Medicine, 2023, 14(3): 90-92, 96.
- [23] 高璐琪, 司原成, 康朝霞, 等. 基于TLR5-肠道菌群途径探讨电针对营养型肥胖小鼠的作用机制[J]. 华中科技大学学报(医学版), 2024, 53(3): 321-327.
GAO L Q, SI Y C, KANG Z X, et al. Effect of electroacupuncture on nutritional obese mice based on TLR5-gut microbiota pathway (in Chinese) [J]. Acta Medicinæ Universitatis Scientiæ et Technologiæ Huazhong, 2024, 53(3): 321-327.
- [24] 姚俊鹏, 张林, 周思远, 等. 电针对高脂饮食诱导的肥胖大鼠白色脂肪组织中自噬相关蛋白表达的影响[J]. 中华中医药杂志, 2021, 36(12): 7060-7065.
YAO J P, ZHANG L, ZHOU S Y, et al. The effect of electricity on the expression of autophagy-related proteins in white adipose tissue of obese rats induced by high-fat diet (in Chinese) [J]. China Journal of Traditional Chinese Medicine and Pharmacy, 2021, 36(12): 7060-7065.
- [25] 姚俊鹏, 周思远, 鄢香芸, 等. 基于mTOR/P70S6K信号通路探讨电针对肥胖大鼠脂肪组织自噬的影响[J]. 中华中医药杂志, 2022, 37(5): 2633-2638.
YAO J P, ZHOU S Y, YAN X Y, et al. Exploring the effect of electricity on autophagy in adipose tissue of obese rats based on the mTOR/P70S6K signaling pathway (in Chinese) [J]. China Journal of Traditional Chinese Medicine and Pharmacy, 2022, 37(5): 2633-2638.
- [26] 严江天, 曾林, 唐倩, 等. “标本配穴”电针调控脂肪组织自噬改善肥胖大鼠炎症[J]. 时珍国医国药, 2023, 34(3): 744-747.
YAN J T, ZENG L, TANG Q, et al. Electroacupuncture of “Biaoben acupoints” Improve inflammation in obese rats by regulating autophagy in adipose tissue (in Chinese) [J]. Lishizhen Medicine and Materia Medica Research, 2023, 34(3): 744-747.
- [27] 张博雅. 运动、饮食干预对肥胖小鼠肝脏细胞自噬的影响[J]. 辽宁体育科技, 2021, 43(5): 62-66.
ZHANG B Y. Effects of exercise and diet intervention on autophagy of liver cells in obese mice (in Chinese) [J]. Liaoning Sport Science and Technology, 2021, 43(5): 62-66.
- [28] 董滢, 李瑞, 郭卫星, 等. 电针对糖尿病肥胖大鼠肝脏Akt/FoxO1信号通路的影响[J]. 中国针灸, 2023, 43(6): 679-683, 708.
DONG Y, LI R, GUO W X, et al. Effect of electroacupuncture on liver Akt/FoxO1 signaling pathway in rats with diabetic fatty (in Chinese) [J]. Chinese Acupuncture & Moxibustion, 2023, 43(6): 679-683, 708.
- [29] 刘霞, 李祥, 郑近园, 等. 电针对单纯性肥胖大鼠肠道菌群-短链脂肪酸代谢轴的影响[J]. 针刺研究, 2024, 49(8): 805-813.
LIU X, LI X, ZHENG J Y, et al. Effect of electroacupuncture on the intestinal flora-short chain fatty acid metabolism axis in simple obesity rats (in Chinese) [J]. Acupuncture Research, 2024, 49(8): 805-813.
- [30] DING M Y, PENG Y R, LI F, et al. Andrographolide derivative as antagonist of vitamin D receptor to induce lipidation of microtubule associate protein 1 light chain 3 (LC3) [J]. Bioorg Med Chem, 2021, 51: 116505.
- [31] 曾祥意, 潘杰. 自噬调控白色脂肪细胞棕色化的研究进展[J]. 中国生物工程杂志, 2020, 40(6): 63-73.
ZENG X Y, PAN J. Progress on autophagy regulation of browning of white adipose cells (in Chinese) [J]. China Biotechnology, 2020, 40(6): 63-73.
- [32] LIN X L, LI S, ZHAO Y, et al. Interaction domains of p62: a bridge between p62 and selective autophagy [J]. DNA Cell Biol, 2013, 32(5): 220-227.
- [33] NISHIMURA T, TOOZE S A. Emerging roles of ATG proteins and membrane lipids in autophagosome formation [J]. Cell Discov, 2020, 6(1): 32.
- [34] LI W, ZHANG L N. Regulation of ATG and autophagy initiation [J]. Adv Exp Med Biol, 2019, 1206: 41-65.
- [35] TUTAS J, TOLVE M, ÖZER-YILDIZ E, et al. Autophagy regulator ATG5 preserves cerebellar function by safeguarding its glycolytic activity [J]. Nat Metab, 2025, 7(2): 297-320.
- [36] TSUJIMOTO R, YURUBE T, TAKEOKA Y, et al. Involvement of autophagy in the maintenance of rat intervertebral disc homeostasis: an *in-vitro* and *in-vivo*

- RNA interference study of Atg5[J]. *Osteoarthritis Cartilage*, 2022, 30(3): 481-493.
- [37] 李建, 曹炎, 陈迎, 等. 自噬相关蛋白 ATG5 和 ATG7 在神经干细胞体外扩增中的作用[J]. *军事医学*, 2022, 46(11): 848-854.
- LI J, CAO Y, CHEN Y, et al. Roles of autophagy-related proteins ATG5 and ATG7 in the expansion of neural stem cells *in vitro* (in Chinese) [J]. *Military Medical Sciences*, 2022, 46(11): 848-854.
- [38] RICHTER F C, FRIEDRICH M, KAMPSCHULTE N, et al. Adipocyte autophagy limits gut inflammation by controlling oxylipin and IL-10[J]. *EMBO J*, 2023, 42(6): e112202.
- [39] BRESSAN C, SAGHATELYAN A. AMPK-induced autophagy as a key regulator of cell migration[J]. *Autophagy*, 2021, 17(3): 828-829.
- [40] FENG Y Y, CHEN Y, WU X Y, et al. Interplay of energy metabolism and autophagy [J]. *Autophagy*, 2024, 20(1): 4-14.
- [41] CAYO A, SEGOVIA R, VENTURINI W, et al. mTOR activity and autophagy in senescent cells, a complex partnership[J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(15): 8149.
- [42] CHEN R J, YANG C H, YANG F, et al. Targeting the mTOR-autophagy axis: unveiling therapeutic potentials in osteoporosis[J]. *Biomolecules*, 2024, 14(11): 1452.
- [43] REN Q N, SUN Q M, FU J F. Dysfunction of autophagy in high-fat diet-induced non-alcoholic fatty liver disease [J]. *Autophagy*, 2024, 20(2): 221-241.
- [44] SUN C B, ZHANG J, HOU J, et al. Induction of autophagy *via* the PI3K/Akt/mTOR signaling pathway by Pueraria flavonoids improves non-alcoholic fatty liver disease in obese mice[J]. *Biomed Pharmacother*, 2023, 157: 114005.