

☆ XXXX ☆

经皮耳穴迷走神经刺激对糖尿病前期血糖平衡的时序性调控特征研究

朱溶瑾, 李雅静, 周舟, 骆敏, 宿杨帅, 景向红
(中国中医科学院针灸研究所, 北京 100700)

【摘要】 目的:观察经皮耳穴-迷走神经刺激(taVNS)对糖尿病前期小鼠血糖平衡的调节作用,并初步探讨潜在机制。**方法:**本研究分为低风险糖尿病前期和高风险糖尿病前期两部分实验,每部分实验中雄性C57BL/6J小鼠被随机分为正常组、模型组和taVNS组,每组12只。采用高脂饮食喂养小鼠1周或8周,分别建立低风险与高风险糖尿病前期模型。低风险模型小鼠自第4天起进行taVNS干预,每日1次,每次20 min;高风险模型小鼠自第5周起进行taVNS干预,每周3次,每次20 min。测定血糖、糖耐量、胰岛素、胰高血糖素、谷丙转氨酶(ALT)、谷草转氨酶(AST)含量;HE染色观察胰腺和肝脏形态变化;Western blot法检测胰岛β细胞中内质网应激相关蛋白以评估胰岛素合成能力,PCR法检测肝细胞糖原合成相关指标以评估胰岛素敏感性;免疫荧光法观察迷走神经背核(DMV)中乙酰胆碱转移酶(ChAT)⁺/磷酸化细胞外信号调节激酶(p-ERK)⁺共标神经元数量。**结果:**在低风险糖尿病前期小鼠中,与正常组相比,模型组血糖、糖耐量、血清胰岛素含量均显著升高($P<0.001$, $P<0.01$),胰岛β细胞中激活转录因子6(ATF6)、内质网核心信号1(ERN1)、真核翻译起始因子2α激酶3(EIF2AK3)蛋白含量明显增加($P<0.01$, $P<0.001$);与模型组相比,taVNS组小鼠血糖自第4天起显著下降($P<0.01$),胰岛素含量显著升高($P<0.01$),胰岛β细胞中ATF6、ERN1、EIF2AK3蛋白表达显著下调($P<0.01$, $P<0.001$),同时DMV脑区中ChAT⁺/p-ERK⁺共标神经元明显增加($P<0.05$)。在高风险糖尿病前期小鼠中,与正常组相比,模型组血糖、糖耐量、胰岛素含量均显著升高($P<0.01$, $P<0.001$),胰岛体积增大,肝脏出现明显的炎性浸润,血清ALT及AST水平均明显升高($P<0.05$, $P<0.001$);与模型组相比,taVNS组小鼠血糖自第6周起显著下降($P<0.05$),糖耐量明显改善($P<0.05$),同时胰岛体积有所缩小,肝脏炎性浸润减轻,血清ALT及AST水平显著降低($P<0.05$),肝细胞中葡萄糖磷酸变位酶1(PGM1)、UDP-葡萄糖焦磷酸化酶2(UGP2)、糖原合成酶2(Gys2)的表达水平明显上调($P<0.01$, $P<0.05$)。**结论:**taVNS有效恢复糖尿病前期小鼠血糖平衡,在低风险阶段,其机制主要与缓解内质网应激,恢复胰岛β细胞胰岛素合成能力有关;在高风险阶段则通过促进肝细胞糖原合成,增加肝脏胰岛素敏感性发挥作用。

【关键词】 经皮耳穴刺激;糖尿病前期;胰岛功能;胰岛素敏感性;糖原合成

Temporal and stage-specific regulation of glucose homeostasis by transcutaneous auricular vagus nerve stimulation in prediabetic mice

Zhu Rongjin, Li Yajing, Zhou Zhou, Luo Min, Su Yangshuai, Jing Xianghong (Institute of Acupuncture and Moxibustion, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China)

【ABSTRACT】 Objective To observe the regulatory effect of transcutaneous auricular vagus nerve stimulation (taVNS) on blood glucose homeostasis in prediabetic mice, so as to explore the underlying mechanisms. **Methods** The study consisted of two sub-experiments targeting low-risk and high-risk prediabetes. In each experiment, male C57BL/6J mice were randomly divided into normal, model, and taVNS groups ($n = 12$ per group). Mice were fed a high-

【DOI】10.13702/j.1000-0607.20260444

引用格式:朱溶瑾,李雅静,周舟,等.经皮耳穴迷走神经刺激对糖尿病前期血糖平衡的时序性调控特征研究[J].针刺研究,XXXX,XX(X):1-11.

项目来源:国家自然科学基金面上项目(No.82574924);国家自然科学基金青年项目(No.82505783);中国中医科学院优秀青年人才专项项目(No.ZZ19-YQ-027)

通信作者:李雅静,18811742375@163.com

fat diet for 1 week or 8 weeks to establish low-risk and high-risk prediabetic models, respectively. For the low-risk model, taVNS was applied from the 4th day (20 min/day, once daily); for the high-risk model, taVNS was applied from the 5th week (20 min/session, 3 times/week). Fasting blood glucose, glucose tolerance, insulin, glucagon, alanine aminotransferase (ALT), and aspartate aminotransferase (AST) levels were measured. Morphological changes in the pancreas and liver were evaluated via HE staining. Western blot was used to detect endoplasmic reticulum stress-related proteins in pancreatic β -cells to assess insulin synthesis capacity. PCR was used to detect glycogen synthesis-related indices in hepatocytes to assess insulin sensitivity. Immunofluorescence was used to observe the number of choline acetyltransferase (ChAT)+/phosphorylated extracellular signal-regulated kinase (p-ERK)+ co-labeled neurons in the dorsal motor nucleus of the vagus (DMV). **Results** (1) In low-risk prediabetic mice, compared with the normal group, the model group showed significantly increased blood glucose, glucose tolerance, and serum insulin levels ($P<0.001$, $P<0.01$, $P<0.01$); the protein expressions of activating transcription factor 6 (ATF6), endoplasmic reticulum to nucleus signaling 1 (ERN1), and eukaryotic translation initiation factor 2- α kinase 3 (EIF2AK3) in pancreatic β -cells were significantly increased ($P<0.01$, $P<0.01$, $P<0.001$). Compared with the model group, the taVNS group showed significantly reduced blood glucose starting from day 4 ($P<0.01$), further increased insulin levels ($P<0.01$), and significantly down-regulated the expressions of ATF6, ERN1, and EIF2AK3 ($P<0.01$, $P<0.01$, $P<0.001$). Meanwhile, the number of ChAT⁺/p-ERK⁺ co-labeled neurons in the DMV was significantly increased ($P<0.05$). (2) In high-risk prediabetic mice, compared with the normal group, the model group showed significantly increased blood glucose, glucose tolerance, and insulin levels ($P<0.01$, $P<0.001$, $P<0.001$), along with enlarged islet volume, distinct hepatic inflammatory infiltration, and significantly elevated serum ALT and AST levels ($P<0.05$, $P<0.001$). Compared with the model group, taVNS group show significantly decreased blood glucose from week 6 ($P<0.05$), improved glucose tolerance ($P<0.05$), reduced islet volume, alleviated hepatic inflammation, and decreased serum ALT and AST levels ($P<0.05$, $P<0.05$). Furthermore, the mRNA expressions of phosphoglucomutase 1 (Pgm1), UDP-glucose pyrophosphorylase 2 (Ugp2), and glycogen synthase 2 (Gys2) in hepatocytes were significantly up-regulated ($P<0.01$, $P<0.05$, $P<0.01$). **Conclusion** taVNS can effectively restore glucose homeostasis in prediabetic mice through stage-specific mechanisms. In the low-risk stage, the mechanism is mainly related to alleviating endoplasmic reticulum stress and restoring insulin synthesis capacity of pancreatic β -cells; in the high-risk stage, it exerts its effects by promoting hepatic glycogen synthesis, thereby enhancing hepatic insulin sensitivity.

【KEYWORDS】 Transcutaneous auricular vagus nerve stimulation (taVNS); Prediabetes; Islet function; Insulin sensitivity; Glycogen synthesis

糖尿病前期是血糖值介于正常和糖尿病诊断标准之间的异常状态,其本质是机体血糖调节功能由代偿走向失代偿的时序性衰退过程。国际糖尿病联合会报道,2024年全球约有11.23亿成年人处于糖尿病前期,占全球成人总数的21.2%^[1],每年由糖尿病前期发展为Ⅱ型糖尿病患者的比率高达12.5%^[2],且心血管疾病、慢性肾脏疾病、视网膜病变等风险增加^[1,3]。糖尿病前期临床表现为空腹血糖受损(IFG)和/或糖耐量受损(IGT),标准为6.1 mmol/L $\leq$ 空腹血糖值 $<$ 7.0 mmol/L和/或7.8 $\leq$ 糖负荷2 h后血糖值 $<$ 11.1 mmol/L和/或5.7% $\leq$ 糖化血红蛋白含量 $<$ 6.5%^[4-5]。其核心病机包括胰岛 β 细胞功能障碍和胰岛素抵抗,二者同时存在并相互影响^[6-7]。内质网是胰岛 β 细胞合成胰岛素的场所,内质网应激是胰岛 β 细胞功能障碍的重要表现^[8],其标志物为激活转录因子6(ATF6)、内质网核心信号1(ERN1)、真核翻译起始因子2 α 激酶3

(EIF2AK3)。肝糖原合成是降低血糖的关键生物过程,糖原合成酶减少是肝脏胰岛素抵抗的重要标志^[9-10],糖原合成酶包括葡萄糖磷酸变位酶1(PGM1)、UDP-葡萄糖焦磷酸化酶2(UGP2)、糖原合成酶2(Gys2)。因此,恢复胰岛 β 细胞功能及肝糖原合成能力是延缓糖尿病前期向糖尿病进展的关键^[11-12]。目前二甲双胍等糖尿病药物干预虽然能延缓疾病进展,但常伴随胃肠道反应、感染等不良反应^[6,13]。

针刺作为一种非药物治疗,操作简便、不良反应少且临床疗效显著^[14]。耳穴疗法是中医经典治疗手段,迷走神经刺激术是通过电刺激迷走神经调控神经功能的治疗手段。耳甲区是体表唯一迷走神经传入纤维分布的部位,且恰好为肝胆、肝等耳穴内脏区的分布区域。经皮耳穴-迷走神经刺激(taVNS)是将二者有机结合的治疗手段,通过无创刺激激活迷走神经耳支,经迷走神经背核(DMV)调

节自主神经及代谢功能^[15-16],近年来的研究表明taVNS可通过室旁核-下丘脑外侧区的食欲素依赖性神经回路,增强胰岛素敏感性,降低高脂喂养小鼠食欲^[17],也可通过上调肝脏等组织中胰岛素受体表达,提高胰岛素敏感性并增加胰岛素分泌,调节糖耐量受损大鼠的血糖平衡^[18]。然而,其具体的适用人群及最佳干预时机尚不明确。

糖尿病前期是控制血糖的关键时期,此时寻找一种便捷的非药物治疗方法调控自身的血糖平衡,对于糖尿病前期患者尤为重要。因此本研究着眼于taVNS在糖尿病前期对血糖平衡的调控效应及机制探索,观察taVNS对不同风险阶段糖尿病前期小鼠血糖调节效应,明确其作用时间窗并初步探索维持血糖稳态的作用机制,以期对糖尿病前期患者寻找适宜便捷的治疗手段。

1 材料与方法

1.1 实验动物与分组

清洁级C57BL/6J雄性小鼠72只,8周龄,体重20~22 g,由北京维通利华实验动物技术有限公司提供,生产许可证号:SCXK(京)2021-0006,饲养于中国中医科学院针灸研究所动物房,温度20~24℃,相对湿度(55±2)%,12 h/12 h昼夜交替照明,给予普通饲料适应性饲养1周。在低风险和高风险实验中,各随机选取12只小鼠为正常组继续普通饲料喂养,其余小鼠给予高脂饲料。高脂饲料配方:每100 g高脂饲料含酪蛋白(Casein, Lactic, 30 Mesh)22.86 g,胱氨酸(Cystine, L)0.34 g,麦芽糊精(Lodex 10)27.54 g,蔗糖(Sucrose, Fine Granulated)16 g,猪油(Lard)19.54 g,大豆油(Soybean Oil, USP)1.94 g,纤维素(Solka Floc, FCC200)5.71 g,混合矿物质(S10026B)5.71 g,酒石酸氢胆碱(Choline Bitartrate)0.23 g,混合维生素(V10001C)0.11 g。测量小鼠血糖达糖尿病前期标准后,分别于低风险和高风险实验中随机分为模型组和taVNS组,每组12只。低风险实验中每组6只小鼠用于测定血清胰岛素、胰高血糖素水平和胰腺、肝脏病理染色,其中3只另用于观察DMV中ChAT⁺/p-ERK⁺共标神经元,剩余6只用于检测胰岛β细胞中内质网应激指标ATF6、ERN1、EIF2AK3蛋白含量;高风险实验中每组6只小鼠用于测定胰岛素、胰高血糖素、谷丙转氨酶(ALT)和谷草转氨酶(AST)水平及胰腺、肝脏病理染色,剩余6只用于检测肝细胞糖原合成相关酶PGM1、

UGP2、Gys2的基因表达。本实验经中国中医科学院针灸研究所伦理委员会审查通过(Y 2025-3-12-01),实验过程严格遵守相关动物伦理规定^[19]。

1.2 主要试剂与仪器

异氟烷(中国鲁南贝特),乌拉坦、驴血清、苏木精-伊红染色试剂盒、RIPA快速裂解液(北京索莱宝),4%多聚甲醛(天津华东),TritonX-100(美国Sigma),胶原酶P(瑞士Roche),糖化血红蛋白试剂盒、胰岛素试剂盒、胰高血糖素试剂盒、Vazyme RNA提取试剂盒、实时荧光定量PCR试剂盒(南京诺唯赞),ALT、AST检测试剂盒(南京建成),乙酰胆碱转移酶(ChAT)抗体(德国Merck),磷酸化细胞外信号调节激酶(p-ERK)抗体(美国Cell Signaling Technology),Alexa Flour 488荧光素二抗、Alexa Flour 594荧光素二抗(美国Thermo Fisher),ATF6、ERN1、EIF2AK3、β-actin抗体、辣根过氧化物酶(HRP)-山羊抗兔二抗、HRP-山羊抗小鼠二抗(美国Proteintech)。

血糖仪(美国强生),电刺激器(德国Multi-Channel Systems),冷冻离心机(德国Eppendorf),冰冻切片机(德国Leica),全自动多功能全景组织细胞扫描分析系统、倒置光学显微镜(日本Olympus),全光谱扫描共聚焦显微镜(日本Nikon),蛋白免疫印迹电泳系统、全自动凝胶成像仪(美国Bio-Rad),酶标仪(美国Molecular Devices),PCR仪(瑞士Roche)。

1.3 模型制备

高脂饲料喂养1周制备低风险糖尿病前期模型,于每天同一时间检测血糖;高脂饲料喂养8周制备高风险糖尿病前期模型,于每周同一时间检测血糖。实验结束后检测糖耐量。造模成功标准为6.1 mmol/L≤空腹血糖<7.0 mmol/L和/或7.8 mmol/L≤糖耐量<11.1 mmol/L^[5,20-21]。

1.4 干预方法

低风险实验:造模第4~7天,给予taVNS组小鼠干预,每日1次,共4次;高风险实验:造模第5~8周予taVNS组小鼠干预,每周3次,共12次^[22]。用4%异氟烷(0.6 L/min)麻醉小鼠,1%异氟烷维持麻醉,使用自制磁吸电极片吸于小鼠两耳甲(耳穴内脏区“胰胆”“肝”)处,连接电刺激器正负极给予电刺激:强度1 mA,频率2 Hz/15 Hz,疏密波,每次20 min^[23-24]。正常组和模型组进行相同麻醉处理,不予其他干预。

1.5 观察指标及检测方法

空腹血糖检测:干预前小鼠于检测日上午禁食6 h后测定血糖,自第4天或第5周起,小鼠在上午同一时间禁食6 h,taVNS干预后15 min测量血糖^[25]。采血针快速轻刺小鼠尾静脉,弃去第一滴血样,沿尾巴根部向尾尖方向轻轻挤压,血糖试纸前端虹吸口接触第二滴血样,记录血糖仪的数值。

糖耐量检测:干预结束后,小鼠禁食6 h,记录0 min血糖值,腹腔注射2 g/kg葡萄糖溶液后,记录15、30、60、120 min血糖值。

酶联免疫吸附法测定血清胰岛素、胰高血糖素、谷丙转氨酶、谷草转氨酶:实验结束后采用4%异氟烷(0.6 L/min)诱导麻醉小鼠,眼眶取血采集全血样本,室温静置2 h后1 000×g离心20 min获得上清。根据试剂盒说明书,向孔板中依次加入血清样本、反应液、显色液、终止液等,用酶标仪测定吸光度值,分别计算血清胰岛素、胰高血糖素、ALT和AST水平。

HE染色观察组织病理变化:实验结束时取小鼠胰腺、肝脏组织固定于4%多聚甲醛中,经过脱水、石蜡包埋、切片(5 μm)后,分别通过苏木精、伊红染色,封片后在光镜下观察胰腺和肝脏组织病理改变。

免疫荧光染色法检测低风险糖尿病前期小鼠DMV中ChAT⁺/p-ERK⁺共标神经元:低风险糖尿病前期小鼠taVNS干预结束后,每只小鼠在腹腔注射0.5 mL 10%乌拉坦麻醉的状态下,用4%多聚甲醛心脏灌流,取出脑组织于4%多聚甲醛中后固定,2 h后转移至25%蔗糖溶液(溶剂为0.1 mol/L PB)于4℃冰箱沉糖脱水24 h。取出已沉底的组织用OCT包埋,于冰冻切片机中切片,设定厚度为40 μm。参照小鼠脑图谱挑取包含DMV区域的脑片^[26],用0.1 mol/L PB清洗组织切片,置于封闭液(3%驴血清、0.5% TritonX-100、0.1 mol/L PB)中封闭45 min后,加入一抗(ChAT 1:1 000, p-ERK 1:1 000)于4℃摇床中过夜,再次清洗后加入Alexa Flour 488、Alexa Flour 594荧光素二抗(1:1 000)室温避光孵育1 h,组织贴片后使用50%甘油封片^[27-28]。使用激光共聚焦显微镜对组织玻片进行观察并拍照记录每组小鼠DMV中ChAT⁺/p-ERK⁺共标神经元数量。

Western blot法检测胰岛β细胞内质网应激指标(ATF6、ERN1、EIF2AK3):1周低风险实验结束后处死小鼠暴露腹腔,游离胆总管并在贴近十二指

肠壁处结扎,轻轻剥离周围脂肪组织,在胆总管起始处插入套管针并连接注射器,缓慢灌注胶原酶P至胰腺充分膨大后分离,置于内有2 mL胶原酶溶液的离心管中,于37℃水浴振荡消化15 min。加入15 mL HBSS缓冲液终止消化,1 500×g离心10 min弃去上层液体,继续加入15 mL HBSS得到混悬液,将该混悬液缓慢加至预先制备的Percoll梯度液上层,900×g离心30 min后形成交界层,胰岛β细胞聚集在该层中,小心吸出该界面层于离心管中,弃去上层液体保留沉淀物^[29-31]。向胰岛β细胞沉淀中加入裂解液裂解30 min提取蛋白样品,使用二BCA法检测蛋白浓度。制备含量10%的SDS-PAGE凝胶,100℃加热蛋白样品15 min,冷却后加至凝胶的上样孔中,依次经过凝胶电泳分离(电压80 V运行50 min)、湿转(电流320 mA运行100 min)、封闭(5%脱脂牛奶室温1 h)、TBST缓冲液洗涤后,加入ATF6、ERN1、EIF2AK3一抗(1:1 000)和内参蛋白β-actin抗体(1:1 000)4℃孵育过夜。洗涤后加入相应二抗(1:2 000)室温孵育1 h。显影后通过凝胶系统成像并统计条带灰度值,以β-actin为内参,以目的蛋白与内参蛋白条带灰度值的比值为目的蛋白相对表达量^[32]。

q-PCR技术检测肝细胞中糖原合成指标(PGM1、UGP2、Gys2)的mRNA表达水平:8周高风险实验结束后处死小鼠暴露腹腔并游离门静脉,用套管针进行门静脉插管并固定。快速剪开下腔静脉作为流出道,立即灌注37℃HBSS缓冲液冲洗肝脏内的血液至肝脏颜色变白,随后灌注0.2 mg/mLⅣ型胶原酶(溶剂为HBSS缓冲液)至肝脏质地变软后分离置于装有HBSS的培养皿中,钝性分离肝包膜并撕裂肝叶,用移液枪反复轻柔吹打分散细胞团块,用75 μm细胞筛过滤细胞悬液,低速离心,去除上清并洗涤后得到原代肝细胞。使用试剂盒提取RNA,使用紫外分光光度计测量浓度。以提取的RNA为模板反转录为cDNA后扩增,设置反应程序为:95℃,10 min;95℃,15 s,60℃,30 s,共40个循环。选择HPRT1为内参,用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算mRNA的相对表达量。引物序列见表1。

1.6 统计学分析

使用SPSS Statistics 27及Graphpad Prism 10软件进行数据处理分析和图形绘制。使用shapiro-wilk检验评估数据分布的正态性,符合正态分布的数据以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,并采用Levene进行方差齐性检验。空腹血糖和糖耐量各时点数据

表1 引物序列
Table 1 Primer sequences

基因名称	序列(5'→3')	产物长度/bp
PGM1	上游 ACAGTGGAGATTGTGGACTCAGTG	122
	下游 ATGGCGTCTATGCGGATCTTCAG	
UGP2	上游 TCTCAAGATGGTGCTTCTCAGTTCC	104
	下游 TCATGTGAGGCTGCTGTGGTAAG	
Gys2	上游 AATTCCACCTAGAGCCCACATCAC	135
	下游 CATCTTCTTCGTCTTCCGCATCAC	
HPRT1	上游 CAGTCCCAGCGTCGTGATTA	101
	下游 GGCCTCCCATCTCCTTCATG	

采用重复测量方差分析,其他数据多组间比较使用单因素方差分析,若方差齐性,组间两两比较采用Tukey's 检验;若方差不齐则采用Dunnett's *t*3 检

验。以 $P\leq 0.05$ 为差异具有统计学意义的标准。

2 结果

2.1 taVNS对外周血糖的影响

本实验首先观察了taVNS对不同风险糖尿病前期小鼠空腹血糖的影响。对低风险糖尿病前期小鼠,在高脂饮食第2天,其空腹血糖值可达 6.43 ± 0.48 mmol/L,较正常组明显升高($P<0.001$),并持续1周至观察结束。taVNS干预后其空腹血糖逐渐下降,在第4~7天较模型组显著降低($P<0.01$, $P<0.001$)。对高风险糖尿病前期小鼠,高脂饮食4周后其空腹血糖值为 6.93 ± 0.74 mmol/L,较正常组明显升高($P<0.01$)且达到IFG标准,并持续至8周观察结束。taVNS干预后其血糖值在第6、8周较模型组显著降低($P<0.05$)。这些结果表明taVNS干预对不同时长高脂饮食引起的高血糖均有缓解作用。见图1。

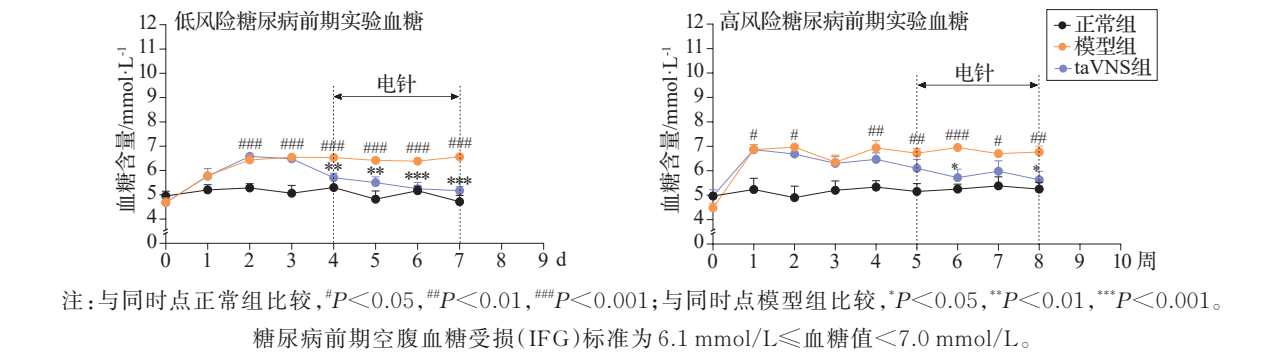


图1 各组小鼠血糖含量比较($\bar{x}\pm s$, 6只鼠/组)
Fig. 1 Comparison of blood glucose content of mice in the 3 groups ($\bar{x}\pm s$, 6 mice/group)

2.2 taVNS对糖耐量的影响

在观察血糖的基础上,我们也观察了糖耐量的变化。低风险糖尿病前期小鼠各时点血糖值显著升高($P<0.001$, $P<0.01$);taVNS干预后,其在15、120 min时明显降低($P<0.01$, $P<0.05$)。高风险模型组各时点血糖值均显著升高($P<0.01$, $P<0.001$),120 min血糖值为 9.18 ± 0.80 mmol/L,已达到糖尿病前期IGT标准;taVNS干预后在各时点血糖值显著降低($P<0.001$, $P<0.01$, $P<0.05$),表明taVNS对不同时长高脂饮食引起的糖耐量增加均有改善作用。见图2。

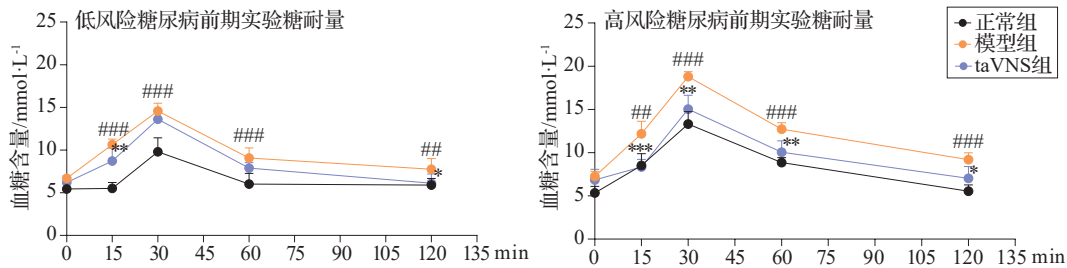
2.3 taVNS对血清胰岛素、胰高血糖素含量的影响

胰岛素和胰高血糖素是机体维持血糖稳态的核心调节激素,因此也同步观察了两者含量。低风险和高风险糖尿病前期小鼠血清胰岛素含量明显增加($P<0.01$, $P<0.001$),taVNS干预后低风险阶

段小鼠血清胰岛素水平显著上升($P<0.01$),高风险阶段小鼠血清胰岛素含量与模型组相比差异无统计学意义,表明taVNS能促进低风险糖尿病前期小鼠的胰岛素分泌,而对高风险糖尿病前期小鼠的调节作用不明显。各组小鼠血清胰高血糖素含量差异无统计学意义。见图3。

2.4 taVNS对胰腺、肝脏病理形态的影响

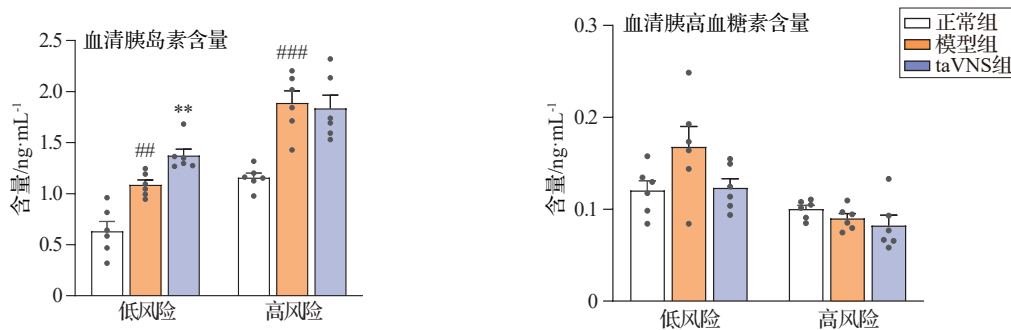
胰腺和肝脏是血糖调控的重要器官,因此我们采用HE染色观察taVNS对小鼠胰腺和肝脏病理损伤的作用。低风险阶段各组小鼠的胰岛组织结构规整,肝脏组织结构完整;高风险模型组小鼠胰岛体积增大,肝脏门管区炎性细胞浸润明显,taVNS干预后小鼠的胰岛体积仅略有增大,肝脏门管区少量炎性细胞浸润,表明taVNS对高风险阶段小鼠胰岛、肝脏的病理损伤具有改善作用。见图4。



注:与同时点正常组比较, $^{##}P<0.01$, $^{###}P<0.001$;与同时点模型组比较, $^{*}P<0.05$, $^{**}P<0.01$, $^{***}P<0.001$ 。糖尿病前期糖耐量受损(IGT)标准为 $7.8 \text{ mmol/L} \leq \text{糖负荷 } 2 \text{ h} < 11.1 \text{ mmol/L}$ 。

图2 各组小鼠糖耐量曲线比较($\bar{x} \pm s$, 6只鼠/组)

Fig. 2 Comparison of glucose tolerance curve of mice in the 3 groups ($\bar{x} \pm s$, 6 mice/group)



注:与正常组比较, $^{##}P<0.01$, $^{###}P<0.001$;与模型组比较, $^{**}P<0.01$ 。

图3 各组小鼠血清胰岛素和胰高血糖素含量比较($\bar{x} \pm s$, 6只鼠/组)

Fig. 3 Comparison of serum levels of Insulin and Glucagon in serum of mice in the 3 groups ($\bar{x} \pm s$, 6 mice/group)

2.5 taVNS对低风险糖尿病前期小鼠DMV中ChAT⁺神经激活情况的影响

taVNS刺激的耳甲区是迷走神经在体表唯一的末梢分布区域。我们采用免疫荧光观察taVNS对小鼠DMV中胆碱能神经元的影响。模型组ChAT⁺/p-ERK⁺共标神经元数量与正常组相比差异无统计学意义;taVNS干预后小鼠DMV中ChAT⁺/p-ERK⁺共标神经元数量增加($P<0.05$),表明taVNS可有效激活DMV中胆碱能神经元。见图5。

2.6 taVNS对低风险糖尿病前期小鼠胰岛β细胞内质网应激的影响

在2.3中观察到taVNS在低风险阶段可促进胰岛素释放,因此检测胰岛β细胞表征胰岛素合成功能的内质网应激指标。结果显示模型组中ATF6、ERN1、EIF2AK3蛋白含量显著增加($P<0.01$, $P<0.001$),而taVNS干预后ATF6、ERN1、EIF2AK3表达水平显著降低($P<0.01$, $P<0.001$),表明taVNS干预可抑制胰岛β细胞内质网应激。见图6。

2.7 taVNS对高风险糖尿病前期小鼠肝脏功能和肝脏糖原合成的影响

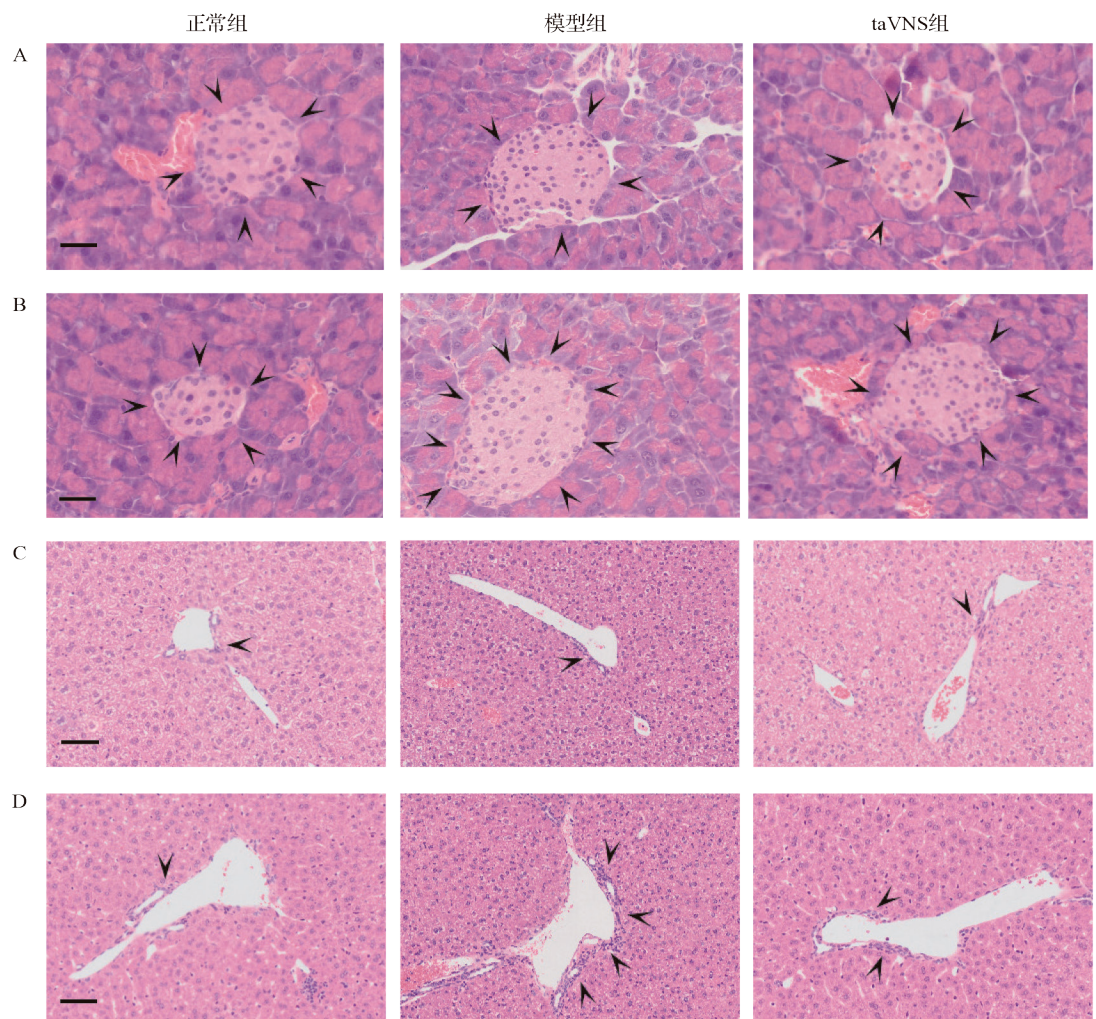
在2.4中观察到taVNS可改善高风险阶段肝组

织损伤,因此检测高风险实验小鼠血清肝功能指标。结果显示,模型组小鼠血清ALT及AST含量显著增加($P<0.05$, $P<0.001$);taVNS干预后ALT和AST水平明显下降($P<0.05$),表明taVNS可缓解肝功能损伤。见图7。

进一步检测肝细胞糖原合成相关酶PGM1、UGP2、Gys2的基因表达,结果显示,模型组中三者的表达无明显变化;而taVNS干预后,肝细胞中PGM1、UGP2和Gys2的mRNA表达水平均显著升高($P<0.01$, $P<0.05$),表明taVNS干预可能促进肝细胞糖原合成。见图8。

3 讨论

糖尿病前期是糖尿病进展的关键阶段,根据发生糖尿病的风险可进行人群分层,单纯IFG或IGT为低风险人群,IFG合并IGT人群为高风险人群^[5]。本研究高脂喂养1周实验中小鼠第2天空腹血糖为 $6.43 \pm 0.48 \text{ mmol/L}$,处于IFG范围并保持至实验结束,糖负荷2h为 $7.75 \pm 1.25 \text{ mmol/L}$,未达IGT标准,可模拟低风险糖尿病前期状态;高脂喂养8周实验中,4周后小鼠空腹血糖可达 $6.93 \pm 0.74 \text{ mmol/L}$,糖负荷2h为 $9.18 \pm 0.80 \text{ mmol/L}$,符合IFG合并



注:A为低风险糖尿病前期实验各组小鼠胰腺组织,B为高风险糖尿病前期实验各组小鼠胰腺组织,标尺=50 μm 。C为低风险糖尿病前期实验各组小鼠肝脏组织,D为高风险糖尿病前期实验各组小鼠肝脏组织,标尺=100 μm 。黑色箭头所示为胰岛和肝脏门管区炎性细胞浸润区域。

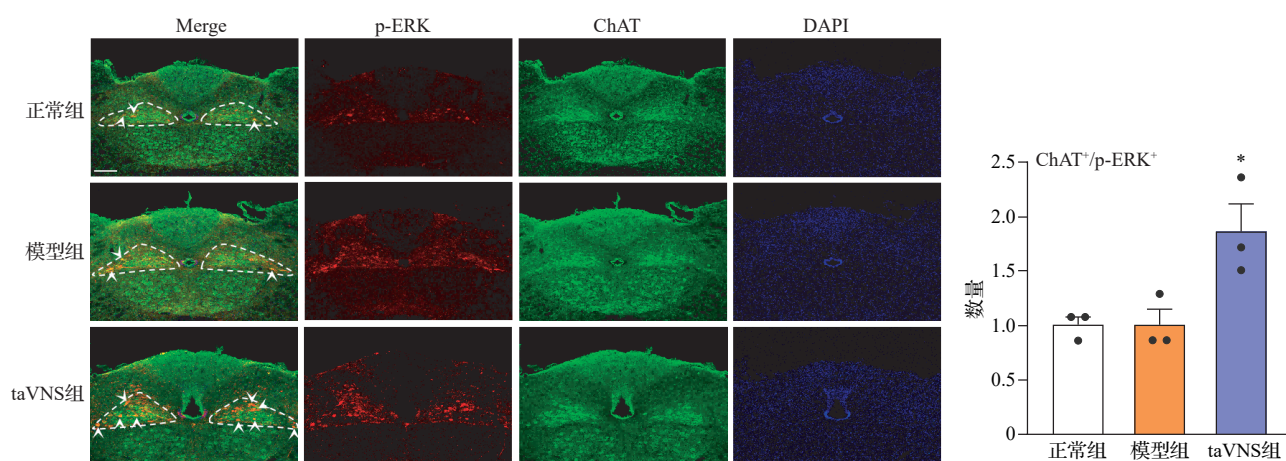
图4 各组小鼠胰腺和肝脏组织形态比较(HE染色,6只鼠/组)

Fig.4 Comparison of pancreatic and liver tissue morphology of mice in the 3 groups (HE staining, 6 mice/group)

IGT标准,可模拟高风险糖尿病前期状态。本研究显示无论是低风险还是高风险阶段的糖尿病前期小鼠,taVNS干预均能有效改善其空腹血糖、糖耐量水平,但其调控机制呈现明显的阶段特异性。在低风险糖尿病前期,taVNS干预后小鼠胰岛素水平显著上升,同时胰岛 β 细胞内质网应激标志物ATF6、ERN1、EIF2AK3显著下调;而在高风险阶段,尽管对胰岛素和胰高血糖素的调节作用不显著,但taVNS明显改善胰岛和肝脏的病理性损伤,降低血清ALT、AST水平,并促进肝脏糖原合成酶PGM1、UGP2、Gys2的基因表达。此外,由于在低风险糖尿病前期阶段小鼠胰腺尚未出现明显的病理损伤,且taVNS干预可显著增加胰岛素含量,提示此时胰岛 β 细胞仍处于可逆转的功能损伤阶段。

因此,相较于高风险阶段,在低风险阶段实施早期干预更具临床参考价值,故我们选择低风险糖尿病前期作为主要研究阶段,并在本实验中考察taVNS对DMV中ChAT⁺神经元的激活。p-ERK能灵敏指示神经元的激活情况,研究结果显示taVNS干预后DMV脑区中ChAT⁺/p-ERK⁺共标神经元明显增加,证实taVNS能够有效激活低风险糖尿病前期小鼠DMV中的胆碱能神经元,因此,taVNS对低风险糖尿病前期小鼠血糖的调控作用可能通过以下途径实现:taVNS激活耳甲区迷走神经传入纤维,兴奋DMV中的胆碱能神经元,最终经迷走神经传出通路调节胰腺功能影响血糖代谢。

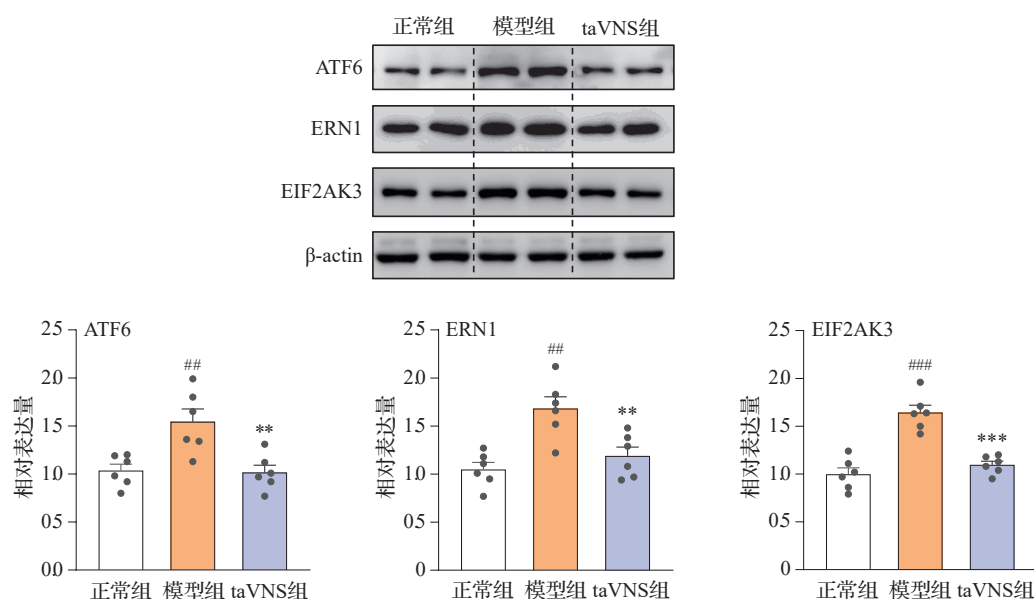
2025年针灸科学研究联盟发布的《针灸科学研究行动计划》指出:围绕神经—内分泌—免疫—代



注:DMV为迷走神经背核,ChAT为乙酰胆碱转移酶,p-ERK为磷酸化细胞外信号调节激酶。白色箭头示DMV中ChAT⁺和p-ERK⁺共标神经元,标尺=50 μm。与模型组比较,* $P<0.05$ 。

图5 各组小鼠DMV中ChAT⁺/p-ERK⁺双标神经元数量比较(免疫荧光染色, $\bar{x}\pm s$,3只鼠/组)

Fig. 5 Comparison of the number of ChAT⁺/p-ERK⁺ co-labeled neurons in DMV of mice in the 3 groups (immunofluorescence staining, $\bar{x}\pm s$, 3 mice/group)



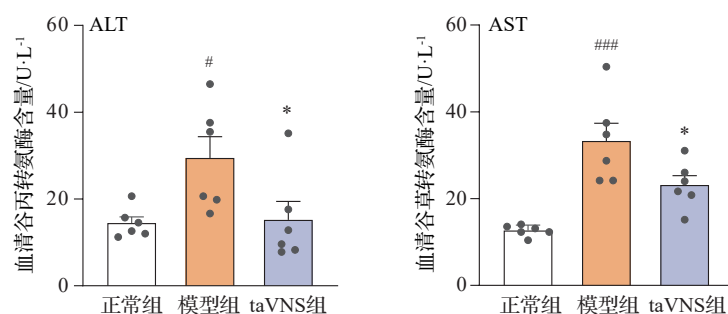
注:ATF6为激活转录因子6,ERN1为内质网核心信号1,EIF2AK3为真核翻译起始因子2 α 激酶3。与正常组比较,## $P<0.01$,### $P<0.001$;与模型组比较,** $P<0.01$,*** $P<0.001$ 。

图6 各组小鼠胰岛 β 细胞内质网应激标志物表达水平比较($\bar{x}\pm s$,6只鼠/组)

Fig. 6 Comparison of the expression levels of endoplasmic reticulum stress markers in pancreatic β cells of mice in the 3 groups ($\bar{x}\pm s$, 6 mice/group)

谢交互网络,聚焦中枢与外周器官功能互作规律解析针灸的调控特征^[33]。近年来的研究虽已证实taVNS在血糖调控方面的潜在价值,但多数报道仅聚焦于单一时间点的干预,缺乏对疾病进展不同阶段的系统比较。与既往研究相比,本研究的核心创新在于不仅验证了taVNS在糖尿病前期模型中的降糖效应,并且从阶段性动态视角初步阐明了其调控机制的时序性特征,在低风险糖尿病前期taVNS

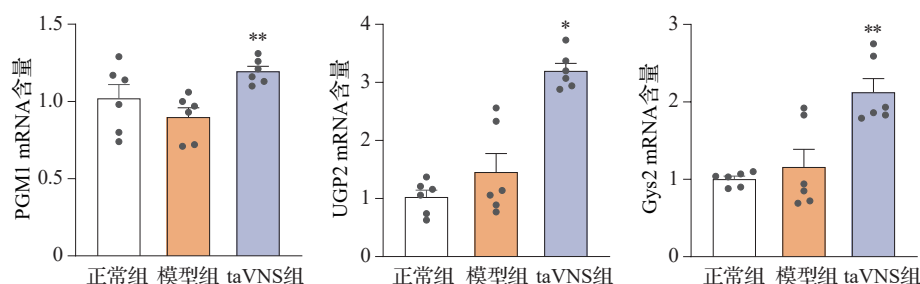
的降糖机制可能以改善胰岛功能促进胰岛素分泌为主,而在高风险阶段可能主要通过改善肝脏糖代谢与减轻组织病理损伤以维持血糖稳态。同时本研究在细胞器与分子层面揭示了taVNS调节血糖平衡的新机制。胰岛 β 细胞是机体合成胰岛素的唯一细胞类型,内质网是胰岛 β 细胞中合成胰岛素的场所。生理状态下,细胞核内胰岛素原基因表达胰岛素原分子,胰岛素原分子在内质网内氧化折叠后



注:ALT为谷丙转氨酶,AST为谷草转氨酶。与正常组比较,[#] $P<0.05$,^{***} $P<0.001$;与模型组比较,^{*} $P<0.05$ 。

图7 各组小鼠血清ALT和AST含量比较($\bar{x}\pm s$,6只鼠/组)

Fig.7 Comparison of levels of ALT and AST in serum of mice in the 3 groups ($\bar{x}\pm s$, 6 mice/group)



注:PGM1为葡萄糖磷酸变位酶1,UGP2为UDP-葡萄糖焦磷酸化酶2,Gys2为糖原合成酶2。与模型组比较,^{*} $P<0.05$,^{**} $P<0.01$ 。

图8 各组小鼠肝细胞糖原合成标志物mRNA表达比较($\bar{x}\pm s$,6只鼠/组)

Fig.8 Comparison of mRNA expression levels of glycogen synthesis markers of liver cells of mice in the 3 groups ($\bar{x}\pm s$, 6 mice/group)

形成胰岛素二聚体随后经聚合转运等过程释放至外周循环。肝脏是胰岛素降糖作用的关键靶器官,肝细胞的糖原合成能力增强是降低外周血糖的关键机制,胰岛素可识别肝细胞表面胰岛素受体,提高血液中葡萄糖转化为肝糖原的比例,降低外周血糖^[34]。在糖尿病前期,持续的高血糖刺激产生过高的胰岛素合成需求,远超内质网的处理能力,内质网超负荷工作,导致大量未折叠或错误折叠蛋白质在内质网中大量堆积引起内质网应激^[35-36],ATF6、ERN1、EIF2AK3是表征内质网应激的关键指标^[37]。低风险实验结果中,与对照组相比,模型组胰岛 β 细胞内质网应激标志物水平升高,与模型组相比taVNS组降低;模型组较对照组胰岛素水平升高,与模型组相比taVNS组胰岛素含量增加。由于胰岛素对高糖环境具有高度敏感性,高糖状态下胰岛素水平代偿性升高,而此时出现内质网应激表明胰岛 β 细胞已出现功能受损。本文研究结果显示taVNS干预缓解内质网应激,增加胰岛素释放以控制血糖,提示在此阶段胰岛功能损伤及胰岛 β 细胞内质网应激仍属于可逆阶段,可通过taVNS治疗手段干预恢复胰岛素分泌功能降低血糖。PGM1、UGP2、Gys2是糖原合成酶,是表征肝糖原合成能力

的关键指标^[10,38]。本研究结果显示,在持续高糖损伤的高风险阶段,taVNS虽已无法增加胰岛中胰岛素释放,但可通过促进肝脏中糖原合成提高胰岛素利用效率,发挥降糖效应。上述结果表明,taVNS对渐进性发展的糖尿病前期可能存在胰岛-肝脏时序性调控特征,这是本研究的主要创新点。

本研究虽然初步明确了taVNS可能通过激活迷走神经调控胰腺和肝脏从而影响小鼠血糖水平,但未将糖化血红蛋白纳入评估指标,也未进一步验证该神经通路 with 血糖调控及靶器官功能之间的因果联系。同时本研究只在高脂饮食诱导的糖尿病前期小鼠模型中进行,无法完全模拟人体糖尿病前期复杂的代谢状态和病程演变。

针对上述局限性,后续我们将补充长期干预对血糖累积效应的证据,同时通过神经示踪或在体电生理记录等技术开展神经通路的直接验证研究,并在糖尿病前期人群中开展基于时间窗的分层临床试验以验证taVNS对糖尿病前期患者的早期干预作用。基于以上研究,有望阐明taVNS调控血糖的中枢-外周环路机制,为其在糖尿病前期不同时间窗的精准干预提供了基础实验依据。

利益冲突 所有作者声明不存在利益冲突。景向红为本刊

副主编,但未参与本文的审理。

参考文献

- [1] Unnikrishnan R, Shaw J E, Chan J C N, et al. Prediabetes [J]. Nat Rev Dis Primers, 2025, 11: 49.
- [2] Davoodian N, Lotfaliany M, Huxley R R, et al. Prediabetes transitions to normoglycaemia or type 2 diabetes and associated risk factors in the Obesity, Diabetes and Cardiovascular Disease Collaboration: an individual-level pooled analysis of 19 prospective cohort studies [J]. Lancet Glob Heal, 2025, 13(9): e1533-e1542.
- [3] Kobayashi E, Linden-Santangeli N J, Chan N, et al. Longitudinal metabolic trajectories in diabetes prevention program participants reveal subgroups with varying micro- and macrovascular complication risks [J]. Diabetes Care, 2025, 48(10): 1704-1712.
- [4] ElSayed N A, Aleppo G, Aroda V R, et al. 2. classification and diagnosis of diabetes: standards of care in diabetes-2023 [J]. Diabetes Care, 2023, 46(Suppl 1): S19-S40.
- [5] 中华医学会内分泌学分会, 中华医学会糖尿病学分会, 中国医师协会内分泌代谢科医师分会. 中国成人糖尿病前期干预的专家共识(2023版) [J]. 中华糖尿病杂志, 2023, 15(6): 484-494.
Chinese Society of Endocrinology, Chinese Diabetes Society, China Medical Doctor Association Endocrinology and Metabolism Branch. Intervention for adults with pre-diabetes: a Chinese expert consensus (2023 edition) (in Chinese) [J]. Chinese Journal of Diabetes Mellitus, 2023, 15(6): 484-494.
- [6] Echouffo-Tcheugui J B, Perreault L, Ji L N, et al. Diagnosis and management of prediabetes: a review [J]. JAMA, 2023, 329(14): 1206-1216.
- [7] Lu X, Xie Q X, Pan X H, et al. Type 2 diabetes mellitus in adults: pathogenesis, prevention and therapy [J]. Sig Transduct Target Ther, 2024, 9: 262.
- [8] Diane A, Allouch A, Mu-U-Min R B A, et al. Endoplasmic reticulum stress in pancreatic β -cell dysfunctionality and diabetes mellitus: a promising target for generation of functional hPSC-derived β -cells *in vitro* [J]. Front Endocrinol, 2024, 15: 1386471.
- [9] Bo T, Gao L, Yao Z Y, et al. Hepatic selective insulin resistance at the intersection of insulin signaling and metabolic dysfunction-associated steatotic liver disease [J]. Cell Metab, 2024, 36(5): 947-968.
- [10] Chen J, Zhou Y B, Liu Z H, et al. Hepatic glycogenesis antagonizes lipogenesis by blocking S1P *via* UDPG [J]. Science, 2024, 383(6684): eadi3332.
- [11] Retnakaran R, Pu J J, Shen J W, et al. The central role of recovery of β -cell function in the remission of prediabetes: a prospective cohort study in Canada [J]. Lancet Diabetes Endocrinol, 2025, 13(10): 829-837.
- [12] Barovic M, Hahn J J, Heinrich A, et al. Proteomic and metabolomic signatures in prediabetes progressing to diabetes or reversing to normoglycemia within 1 year [J]. Diabetes Care, 2025, 48(3): 405-415.
- [13] Khetan A K, Rajagopalan S. Prediabetes [J]. Can J Cardiol, 2018, 34(5): 615-623.
- [14] Liu S B, Wang Z F, Su Y S, et al. A neuroanatomical basis for electroacupuncture to drive the vagal-adrenal axis [J]. Nature, 2021, 598(7882): 641-645.
- [15] Kim A Y, Marduy A, de Melo P S, et al. Safety of transcutaneous auricular vagus nerve stimulation (taVNS): a systematic review and meta-analysis [J]. Sci Rep, 2022, 12(1): 22055.
- [16] Zou N Y, Zhou P J, Zhou Q, et al. Brain-gut interaction for holistic regulation: Transcutaneous auricular vagus nerve stimulation in modulating glucose and lipid metabolic disorders [J]. Clin Nutr, 2026, 56: 106544.
- [17] Zhang Y Y, Song D K, Liu R X, et al. Transcutaneous auricular vagus nerve stimulation inhibits food intake and body weight gain through the orexin dependent pathway in high fat diet mice [J]. Sci Rep, 2025, 15: 19286.
- [18] 张悦, 李少源, 王俊英, 等. 经皮耳穴-迷走神经刺激对糖耐量受损模型大鼠血糖及胰岛素受体表达的影响 [J]. 针刺研究, 2020, 45(11): 882-887, 919.
Zhang Y, Li S Y, Wang J Y, et al. Effect of transcutaneous auricular vagus nerve stimulation on hyperglycemia and insulin receptors expression in impaired glucose tolerance rats (in Chinese) [J]. Acupuncture Research, 2020, 45(11): 882-887, 919.
- [19] 《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(2): 220.
Editorial Board of Acupuncture Research. Review list of welfare ethics of experimental animals in *Acupuncture Research* (in Chinese) [J]. Acupuncture Research, 2024, 49(2): 220.
- [20] 李雅静, 朱溶瑾, 宿杨帅, 等. 电针“足三里”恢复糖尿病前期血糖稳态的效应机制研究 [J]. 针刺研究, 2026, 51(5): 545-558.
Li Y J, Zhu R J, Su Y S, et al. Study on the underlying mechanisms of electroacupuncture at “Zusanli” (ST36) in restoring blood glucose homeostasis in prediabetes mice (in Chinese) [J]. Acupuncture Research, 2026, 51(5): 545-558.
- [21] Xu D Q, Jiang Z Z, Sun Z R, et al. Mitochondrial dysfunction and inhibition of myoblast differentiation in mice with high-fat-diet-induced pre-diabetes [J]. J Cell Physiol, 2019, 234(5): 7510-7523.
- [22] Liu Y, Yu Z, Wang X, et al. Neurophysiological mechanisms of electroacupuncture in regulating pancreatic function and adipose tissue expansion [J]. World J Diabetes, 2025, 16(5): 101354.
- [23] Wang J Y, Zhang Y, Chen Y, et al. Mechanisms underlying antidepressant effect of transcutaneous auricular vagus nerve stimulation on CUMS model rats based on hippocampal α 7nAChR/NF- κ B signal pathway [J]. J Neuroinflammation, 2021, 18(1): 291.

- [24] 张煜郑姮, 辛陈, 张紫璇, 等. 褪黑素介导的经皮耳迷走神经电刺激降糖效应机制[J]. 针刺研究, 2023, 48(8): 812-817.
Zhang Y, Xin C, Zhang Z X, et al. Mechanism of melatonin-mediated antihyperglycemic effect of transcutaneous auricular vagus nerve stimulation (in Chinese) [J]. Acupuncture Research, 2023, 48(8): 812-817.
- [25] Fu J, Liu S, Li M Y, et al. Optimal fasting duration for mice as assessed by metabolic status[J]. Sci Rep, 2024, 14: 21509.
- [26] Paxinos G, Franklin K B J. The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates[M]. 2nd ed. San Diego, CA, USA: Academic Press, 2001.
- [27] 王莉莉, 万红叶, 邢敏, 等. 电针“足三里”改善慢性心力衰竭小鼠心功能的效应机制研究[J]. 针刺研究, 2024, 49(12): 1231-1238.
Wang L L, Wan H Y, Xing M, et al. Mechanism of electroacupuncture at “Zusanli” (ST36) in improving cardiac function in mice with chronic heart failure (in Chinese) [J]. Acupuncture Research, 2024, 49(12): 1231-1238.
- [28] 李桐, 刘筱羽, 万红叶, 等. 电针“天枢”改善小鼠结肠炎性反应的自主神经机制初探[J]. 针刺研究, 2025, 50(5): 567-575.
Li T, Liu X Y, Wan H Y, et al. Study on the underlying autonomic nervous mechanism of electroacupuncture in improving colonic inflammation in mice with chronic ulcerative colitis (in Chinese) [J]. Acupuncture Research, 2025, 50(5): 567-575.
- [29] Steiger L, Baumann Z, Keller L, et al. Protocol for isolation and spectral flow cytometry analysis of immune cells from the murine exocrine and endocrine pancreas [J]. STAR Protoc, 2023, 4(4): 102664.
- [30] Huang J S, Guo B B, Wang G H, et al. DGAT1 inhibitors protect pancreatic β -cells from palmitic acid-induced apoptosis [J]. Acta Pharmacol Sin, 2021, 42(2): 264-271.
- [31] Wang T, Sun P, Chen L, et al. Cinnamtannin D-1 protects pancreatic β -cells from palmitic acid-induced apoptosis by attenuating oxidative stress[J]. J Agric Food Chem, 2014, 62(22): 5038-5045.
- [32] 阎琪琪, 孙诗月, 谭连红, 等. 经皮耳穴迷走神经刺激对类风湿关节炎大鼠骨与软骨破坏的影响[J]. 针刺研究, 2022, 47(3): 237-243.
Yan Q Q, Sun S Y, Tan L H, et al. Effects of transcutaneous auricular vagus nerve stimulation on bone and cartilage destruction in rats with rheumatoid arthritis (in Chinese) [J]. Acupuncture Research, 2022, 47(3): 237-243.
- [33] 针灸科学研究联盟. 针灸科学研究行动计划[J]. 针刺研究, 2025, 50(1): 1-2.
Acupuncture Scientific Research Alliance. A plan for acupuncture-moxibustion scientific research (in Chinese) [J]. Acupuncture Research, 2025, 50(1): 1-2.
- [34] Kubota N, Kubota T, Kadowaki T. Physiological and pathophysiological actions of insulin in the liver[J]. Endocr J, 2025, 72(2): 149-159.
- [35] Sue N, Thai L M, Boslem E, et al. ER stress disrupts insulin release in murine models of type 2 diabetes by impairing retromer action and constitutive secretion[J]. Cell Rep, 2025, 44(5): 115691.
- [36] Urbaniak E, Henry S, Lalowski M, et al. Molecular puzzle of insulin: structural assembly pathways and their role in diabetes [J]. Front Cell Dev Biol, 2025, 13: 1502469.
- [37] Liu Y J, Yang X C, Zhou J, et al. OSGEP regulates islet β -cell function by modulating proinsulin translation and maintaining ER stress homeostasis in mice [J]. Nat Commun, 2024, 15(1): 10479.
- [38] Chen S L, Zhang C Z, Liu L L, et al. A GYS2/p53 negative feedback loop restricts tumor growth in HBV-related hepatocellular carcinoma [J]. Cancer Res, 2019, 79(3): 534-545.

收稿日期:2026-04-15 修回日期:2026-07-09