

振腹推拿对 T2DM 大鼠骨骼肌 AMPK/Glut 4 信号链的影响

王康 国生 钮妍 沈潜 薛恬珏 孟凤仙

【摘要】 目的 观察振腹推拿对 2 型糖尿病 (type 2 diabetes mellitus, T2DM) 大鼠腓肠肌及腹直肌组织 AMPK 及 Glut4 基因转录及蛋白表达的影响,探讨其改善 T2DM 糖代谢的作用机制。**方法** 24 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,成模大鼠随机分为模型组、西药对照组及西药推拿组。空白对照组及模型组每日灌胃蒸馏水,西药对照组每日以 250 mg/kg 标准进行二甲双胍灌胃一次,西药推拿组在相同给药标准基础上每日加用振腹推拿治疗一次。分别在干预第 0、2、4、8 周测定大鼠 FBG 水平,干预 8 周后,测定腓肠肌与腹直肌 AMPK α_2 、Glut4 基因转录与蛋白表达。**结果** 与空白组比较,模型组 FBG 值在第 0、2、6、8 周时均显著上升,干预 8 周后,腹直肌 AMPK α_2 及 Glut4 基因转录及蛋白表达均显著下降,腓肠肌 AMPK α_2 基因转录及蛋白表达均显著下降,腓肠肌 Glut4 蛋白表达显著下降。与模型组比较,西药组及西药推拿组 FBG 值在第 2、6、8 周时均显著下降,西药组腹直肌 AMPK α_2 基因转录显著上升,Glut4 基因转录及蛋白表达显著上升,西药推拿组腹直肌 AMPK α_2 及 Glut4 基因转录及蛋白表达均显著上升,腓肠肌 AMPK α_2 基因转录及蛋白表达均显著上升。**结论** 在二甲双胍常规治疗基础上,联合振腹推拿可进一步改善 T2DM 大鼠的 FBG 水平,其对糖代谢的改善机制与调控骨骼肌 AMPK/Glut4 信号链有关。

【关键词】 振腹推拿; 2 型糖尿病; 腺苷酸活化蛋白激酶; 葡萄糖转运蛋白 4

【中图分类号】 R244.1 **【文献标识码】** A doi:10.3969/j.issn.1674-1749.2017.11.008

Effects of Zhenfu Tuina on AMPK/Glut4 signal chain of skeletal muscles in rats with T2DM

WANG Kang, GUO Sheng, NIU Yan, et al. Department of Tuina, Dongfang Hospital of Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100078, China

Corresponding author: MENG Fengxian, E-mail: mengfx_1955@163.com

【Abstract】 Objective To observe the influence of Zhenfu Tuina treatment on AMPK and Glut4 gene transcription and protein expression in gastrocnemius and rectus abdominis tissues in rats with type 2 diabetes mellitus (T2DM), so as to investigate the mechanism of improving glycometabolism in T2DM. **Methods** 6 Wistar rats were used as control group (C), 6 Wistar rats were given high-fat and high-sugar diets combined with intra-peritoneal injection with low dose (35 mg/kg) of streptozotocin to establish T2DM rat models. After successful established rat models, the rats were randomly divided into model group (M), western medication group (WM) and western medication combined with Tuina group (WT). Rats in C and M were given daily intragastric administration of distilled water while rats in WT were given metformin (250 mg/kg), once per day. On the basis of WM group, Zhenfu Tuina was added in the WT

基金项目: 北京中医药大学青年教师项目 (2016-JYB-JSPY-041)

作者单位: 100029 北京中医药大学东方医院推拿理疗科 (王康、国生、沈潜); 北京中医药大学第三附属医院儿科 (薛恬珏、钮妍); 北京中医药大学东方医院风湿免疫科 (孟凤仙)

作者简介: 王康 (1985-), 硕士, 主治医师。研究方向: 推拿改善代谢性疾病的分子机制。E-mail: wangkang_dfyy@163.com

通信作者: 孟凤仙 (1955-), 女, 博士, 教授。研究方向: 风湿免疫病、代谢病的中医临床及基础研究。E-mail: mengfx_1955@163.com

group. All rats were sacrificed after 8 weeks of intervention, and the level of FBG and gene transcription and protein expression of AMPK and Glut4 in gastrocnemius and rectus abdominis muscles was detected.

Results Compared with C group, level of FBG in M group was significant increase at 2, 6 and 8 week, gene transcription and protein expression of AMPK $_{\alpha 2}$ and Glut4 in rectus abdominis were significant decrease, gene transcription and protein expression of AMPK $_{\alpha 2}$ in gastrocnemius was significant decrease and the protein expression of Glut4 in gastrocnemius was decrease. Compared with M group, level of FBG was significant decrease of WM group and WT group at 2, 6 and 8 week. Compared with M group, AMPK $_{\alpha 2}$ gene transcription and protein expression of Glut4 in the rectus abdominis of WM was significant increase. Compared with M group, gene transcription and protein expression of AMPK $_{\alpha 2}$ and Glut4 in rectus abdominis of WT was significant increase. **Conclusion** On the basis of conventional treatment of metformin, combined with *Zhenfu Tuina* can further improve the FBG level in T2DM rats, and the mechanism is related to the improvement of glucose metabolism and the regulation of AMPK/Glut4 signaling chain in skeletal muscle.

【Key words】 *Zhenfu Tuina*; Type 2 diabetes mellitus; Adenosine 5'-monophosphate (AMP)-activated protein kinase; Glucose transporter type 4

据世界卫生组织统计,2005 到 2015 年间中国由于糖尿病及相关心血管疾病导致的经济损失达 5577 亿美元,糖尿病患者数量从 1980 年的 1.08 亿增加到 2014 年的 4.22 亿^[1]。2016 年国家卫计委调查显示,中国糖尿病患者已达到 1 亿,其中约 95% 为 2 型糖尿病(type 2 diabetes mellitus, T2DM)患者,儿童青少年 T2DM 发病人数近年来迅速上升^[2]。不断加深对 T2DM 发病机制的认识,积极寻找及推广符合中国国情与文化现状的治疗方式,对 T2DM 的早期防治有着积极意义。

振腹推拿作为推拿学的一个重要流派,有其完整的理论体系和传承脉络,其临床特点是以松振法为核心的一系列手法作用于腹部经络腧穴,在内科病的防治中体现了环保与舒适的优势,与针灸、中药相辅相成,为西医控制不理想的内科疾病提供了互补性的治疗措施。近年来,振腹推拿广泛应用于 T2DM 的临床防治,并发挥了较好的临床疗效,但其作用机制的相关研究较少,本研究以细胞糖代谢的关键信号分子腺苷酸活化蛋白激酶[adenosine 5'-monophosphate (AMP)-activated protein kinase, AMPK]与葡萄糖转运蛋白 4(glucose transporter type 4, Glut4)为切入点,从分子生物学的角度,初步揭示了振腹推拿改善 T2DM 糖代谢紊乱的作用机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物

健康雄性 SPF 级 Wistar 大鼠 30 只,4 周龄,体重(100±10)g,由北京维通利华实验动物技术有限公司提供,饲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℃,相对湿度 40% ~ 60%,自由进食和饮水。

1.2 试剂及仪器

链脲佐菌素(streptozocin, STZ)(美国 SIGMA 公司),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 Green PCR Mixture(康为世纪生物),大鼠 AMPK $_{\alpha 2}$ Elisa 试剂盒(华美生物工程有限公司),大鼠 GLUT-4 Elisa 试剂盒(华美生物工程有限公司)。全自动多功能酶标仪(MULTISKAN MK3, Thermo, USA),荧光定量 PCR 仪(ABI7500),凝胶成像仪(Tanon-6600 天能公司),高速冷冻离心机(Hettich 德国),电热恒温培养箱(DH4000A 天津泰斯特),分光光度计(UV-2000 上海尤尼柯公司)。

1.3 模型建立与分组

将 30 只大鼠适应性喂养 1 周后随机取出 6 只作为空白组,其余 24 只给予高脂饲料喂养 4 周后禁食,按 30 mg/kg 一次性腹腔注射 1% 浓度 STZ,STZ 配制过程避光并在冰浴中进行,15 分钟内使用。空白对照组腹腔注射相同剂量柠檬酸缓冲液。3 天后,以空腹血糖(fasting blood glucose, FBG)≥11.1 mmol/L,视为造模成功。将造模成功的 18 只大鼠随机分为模型组、西药组、西药推拿组,每组 6 只。

1.4 干预方案

于造模后进行干预,西药组给予二甲双胍灌胃,250 mg/kg,每日一次,共干预 8 周。西药推拿组在同样剂量药物基础上给予推拿手法干预,行拿揉法于大鼠双侧梁丘、血海二穴 5 分钟,频率(100±

10)次/分钟;拇食二指拿揉双侧天枢穴 5 分钟;三指振腹法于小鼠神阙穴区域,施术 5 分钟,频率(200±20)次/分钟;手法合计 15 分钟,每日一次,共干预 8 周。空白组及模型组每日仅用鼠袋固定 15 分钟,不进行任何干预。

1.5 组织标本采集及处理

大鼠在末次干预结束后,禁食 12 小时,第二天依次按 50 mg/kg 的剂量腹腔注射 2% 的戊巴比妥腹腔麻醉,腹主动脉取血后处死,冰浴下(4℃冰盘)取右侧腓肠肌及腹直肌。快速去除多余脂肪和结缔组织后,放入液氮保持,之后置于-80℃超低温冰箱保存,待测。

1.6 指标检测

1.6.1 RT-PCR 方法检测 AMPK α_2 及 GLUT4 的 mRNA 转录水平 经典 Trizol 法提取大鼠腓肠肌与腹直肌总 RNA,按 3 μ g RNA 逆转录合成 cDNA。引物序列及产物长度见表 1。以 cDNA 作模板,应用 real-time PCR 仪进行扩增,并计算相对 2^{- $\Delta\Delta C_t$} 。

表 1 各引物序列及扩增产物大小

引物名称及方向 Primer orientation	引物序列(5'to 3') Sequence	扩增产物大小 (碱基对) Length (bp)
AMPK2a-F	AAAGTCCGTGTCGTCCCTTC	385
AMPK2a-R	GTGAAAGCCGTTTGGCACAT	
Glut-4 F	GCTGGGCTGATGTGTCTGAT	248
Glut-4 R	CACACCAGCTCTATGTTGG	
GAPDH F	CAGTCCAGCCTCGTCTCAT	595
GAPDH R	AGGGGCCATCCACAGTCTTC	

1.6.2 ELISA 方法测定腓肠肌 AMPK α_2 及 GLUT4 含量 选取大鼠腹直肌与腓肠肌组织进行检测,严格按照 ELISA 试剂盒说明书检测 GLUT4 及 AMPK α_2 的蛋白表达。

1.6.3 空腹血糖 强生稳豪快速血糖仪于造模成功后的第 0、2、4、8 周后分别测定各组大鼠 FBG。

1.7 统计学处理

采用 SPSS 20.0 进行数据统计,计量资料以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,采用单因素方差分析比较,方差齐时两两比较应用 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、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($P<0.05$);西药组、西药推拿组与模型组比较,差异无统计学意义($P>0.05$),说明模型均一。

干预开始后的第 2、4、8 周,模型组 FBG 值高于空白组,差异有统计学意义($P<0.05$);西药组、西药推拿组与模型组比较,FBG 值下降,差异有统计学意义($P<0.05$);与干预前相比,西药组与西药推拿组在干预开始后的第 2、4、8 周,FBG 值均下降,差异有统计学意义($P<0.05$),见表 2。

表 2 各组大鼠干预前后 FBG 值比较($\bar{x}\pm s$, $n=6$, mmol/L)

组别	0 周	2 周	4 周	8 周
空白组	5.85±0.29	5.22±0.39	6.12±0.54	5.87±0.58
模型组	26.48±5.43 ^a	26.27±4.87 ^a	24.79±4.50 ^a	28.38±4.06 ^a
西药组	24.46±3.30 ^a	18.93±5.20 ^{abc}	16.91±4.32 ^{abc}	19.38±3.30 ^{abc}
西药推拿组	26.43±5.19 ^a	18.09±4.63 ^{abc}	15.38±4.07 ^{abc}	16.47±4.30 ^{abc}

注:与空白组比较,^a $P<0.05$;与模型组比较,^b $P<0.05$;与 0 周比较,^c $P<0.05$ 。

2.2 对 T2DM 大鼠腹直肌 AMPK α_2 及 Glut4 mRNA 转录的影响

与空白组相比,模型组腹直肌 AMPK α_2 及 Glut4 mRNA 表达下降,差异有统计学意义($P<0.05$);与模型组比较,西药组及西药推拿组 AMPK α_2 及 Glut4 mRNA 表达上升,差异有统计学意义($P<0.05$);西药推拿组较西药组对腹直肌 AMPK α_2 mRNA 表达的影响更为显著,与空白组水平更为接近,见表 3。

表 3 各组大鼠腹直肌 AMPK α_2 及 Glut4 mRNA 转录水平的比较($\bar{x}\pm s$)

组别	n	AMPK α_2	Glut4
空白组	6	2.32±0.89	1.29±0.54
模型组	6	0.89±0.07 ^a	0.78±0.11 ^a
西药组	6	1.22±0.14 ^b	1.20±0.31 ^b
西药推拿组	6	2.25±0.89 ^b	1.21±0.37 ^b

注:与空白组比较,^a $P<0.05$;与模型组比较,^b $P<0.05$ 。

2.3 对 T2DM 大鼠腹直肌 AMPK α_2 及 Glut4 蛋白表达的影响

与空白组相比,模型组腹直肌 AMPK α_2 及 Glut4 蛋白表达下降,差异有统计学意义($P<0.05$);与模型组相比,西药组 Glut4 蛋白表达上升,差异有统计学意义($P<0.05$),西药推拿组 AMPK α_2 及 Glut4 蛋白表达上升,差异有统计学意义($P<0.05$);西药推拿组较西药组对腹直肌 AMPK α_2 的蛋白表达的影响更为显著,见表 4。

表 4 各组大鼠腹直肌 AMPK α_2 及 Glut4 蛋白表达水平的比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	AMPK α_2	Glut4
空白组	6	9.44 \pm 2.08	1.02 \pm 0.29
模型组	6	6.05 \pm 1.63 ^a	0.32 \pm 0.13 ^a
西药组	6	7.48 \pm 2.71	0.57 \pm 0.23 ^b
西药推拿组	6	8.44 \pm 2.67 ^b	0.79 \pm 0.35 ^b

注:与空白组比较,^a $P < 0.05$;与模型组比较,^b $P < 0.05$ 。

2.4 对 T2DM 大鼠腓肠肌 AMPK α_2 及 Glut4 mRNA 转录的影响

与空白组相比,模型组腓肠肌 AMPK α_2 mRNA 表达下降,差异有统计学意义 ($P < 0.05$);与模型组相比,西药推拿组腓肠肌 AMPK α_2 mRNA 表达上升,差异有统计学意义 ($P < 0.05$);西药推拿组较西药组对腓肠肌 AMPK α_2 mRNA 表达的影响更为显著,接近空白组水平,见表 5。

表 5 各组大鼠腓肠肌 AMPK α_2 及 Glut4 mRNA 转录水平的比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	AMPK α_2	Glut4
空白组	6	2.57 \pm 0.57	1.71 \pm 0.34
模型组	6	1.50 \pm 0.60 ^a	1.37 \pm 0.58
西药组	6	1.88 \pm 0.36	1.45 \pm 0.08
西药推拿组	6	2.60 \pm 0.92 ^b	1.81 \pm 0.53

注:与空白组比较,^a $P < 0.05$;与模型组比较,^b $P < 0.05$ 。

2.5 对 T2DM 大鼠腓肠肌 AMPK α_2 及 Glut4 蛋白表达的影响

与空白组相比,模型组腓肠肌 AMPK α_2 及 Glut4 蛋白表达下降,差异有统计学意义 ($P < 0.05$);与模型组比较,西药推拿组 AMPK α_2 蛋白表达上升,差异有统计学意义 ($P < 0.05$),见表 6。

表 6 各组大鼠腓肠肌 AMPK α_2 及 Glut4 蛋白表达水平的比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	AMPK α_2	Glut4
空白组	6	9.43 \pm 3.42	0.94 \pm 0.38
模型组	6	6.29 \pm 1.36 ^a	0.49 \pm 0.27 ^a
西药组	6	7.80 \pm 2.73	0.66 \pm 0.50
西药推拿组	6	8.59 \pm 2.80 ^b	0.62 \pm 0.38

注:与空白组比较,^a $P < 0.05$;与模型组比较,^b $P < 0.05$ 。

3 讨论

AMPK 在进化上高度保守,是生物能量调节的关键分子,广泛表达于各种代谢相关的器官中,不

同的组织和细胞中存在不同的同型异构体,分布在骨骼肌、心脏和肝脏的主要为 α_2 亚型。它不仅作为调控糖脂代谢的重要激酶,同时也是参与炎症及自噬信号传导通路的关键蛋白^[3]。

在 T2DM 患者、肥胖患者及相应的动物模型中发现肝脏、脂肪和肌肉等外周组织中的 AMPK 活性均下降,这一现象,被称为 AMPK 失调^[4-5],研究发现恢复 AMPK 信号网络的生理功能可从糖脂代谢、炎症反应及自噬等多途径改善 T2DM 的临床症状。其中,AMPK α_2 /Glut4 信号链是该网络调控骨骼肌糖代谢关键通路,由于机体 90% 以上的葡萄糖代谢发生在骨骼肌内,因而恢复骨骼肌内 AMPK α_2 /Glut4 信号链的功能,对 T2DM 的血糖控制有着十分重要的意义。

近年来,随着国人疾病谱的改变,推拿运用到内、妇、儿科疾病的比率逐年上升。多项围绕 T2DM 的临床研究^[6-9]指出,推拿联合常规降糖药物干预 2 型糖尿病患者,可减轻患者体重,并对血糖、糖化血红蛋白、甘油三酯、胆固醇、游离脂肪酸及胰岛素抵抗指数等水平具有较好的调节作用,同时改善胰岛素抵抗及血小板活化状态,且疗效优于单独应用西药,但对手法的效应机制尚缺乏深入的研究。

团队在前期工作中发现推拿手法对骨骼肌细胞 AMPK α_2 含量有特异性调节作用,结合本次研究的结果,发现了对 T2DM 大鼠模型进行干预时,在二甲双胍常规干预基础上加上振腹推拿,可提升大鼠血糖控制的稳定性及持续性;同时,使二甲双胍对 AMPK α_2 /Glut4 信号链的激活能力得到了一定程度的提升,表明振腹推拿可直接或间接上调骨骼肌 AMPK α_2 的基因转录与蛋白表达,在腹直肌内可进一步表现出对 AMPK α_2 /Glut4 信号链的激活效应,从而达到稳定血糖与调节糖代谢的作用。

而振腹推拿在腓肠肌未能表现出对 Glut4 基因及蛋白的调控,其原因有以下几点:(1)手法操作范围:腹部操作范围较大,以面为主,腿部操作范围较小,以点为主;(2)肌肉被动运动方式:腹部操作以振法为主,肌纤维的运动是以整体的上下移动为主,力量柔和,腿部操作以拨法为主,肌纤维的运动则是以局部的左右摆动为主,力量偏强;(3)手法操作的时间:手法在腹部的操作时间是在腿部的两倍,导致一些时效性差异的出现;(4)与病变器官的相对距离:腹部操作的时候作用部位除骨骼肌外,还有胰脏、肝脏、腹部脂肪等组织器官,之间可能存在交互作用。由此可见,这一结果也从实验的角度说明了

腹部手法的应用在 T2DM 的临床治疗中的重要性。

从胰岛素抵抗、炎症反应、氧化应激到线粒体功能障碍、自噬等,可以看出 T2DM 的发病机制是多方面的,因此推拿手法对其发挥的作用机制也将不是单一通路的,骨骼肌仅是手法作用的靶点之一,脂肪、肠系膜、腹腔脏器等组织器官也是手法的作用部位。本次研究结果初步揭示了振腹推拿干预 T2DM 的部分作用机制,发现手法可通过激活腹直肌 AMPK α_2 /Glut4 信号链发挥调控机体糖代谢的作用,四肢部的手法效应或通过其他途径发挥。今后的研究应在神经—体液—内分泌的大网络下,进一步研究推拿在靶组织、靶器官中产生的生物学效应,并探索其间的联系,方能更全面地揭示推拿手法的作用机制。

参 考 文 献

- [1] World Health Organization[DB/OL]. Global report on diabetes, 2016. <http://www.who.int/diabetes/global-report/en>.
- [2] 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.

- [3] Steinberg GR, Kemp BE. AMPK in Health and Disease[J]. Physiol Rev,2009,89(3):1025-1078.
- [4] Dugan LL, You YH, Ali SS, et al. AMPK dysregulation promotes diabetes-related reduction of superoxide and mitochondrial function[J]. J Clin Invest, 2013, 123(11):4888-4899.
- [5] Shaw RJ, Lamia KA, Vasquez D, et al. The kinase LKB1 mediates glucose homeostasis in liver and therapeutic effects of metformin[J]. Science, 2005, 310(5754):1642-1646.
- [6] 王权午,马颖桃. 腹部推拿改善 2 型糖尿病脂代谢异常的临床研究[J]. 临床医药文献电子杂志,2015,2(31):6373,6376.
- [7] 王朝辉,韩东岳,王之虹,等. 腹部推拿结合二甲双胍对肥胖 2 型糖尿病患者糖脂代谢的影响[J]. 中国老年学杂志,2014,34(24):6874-6875.
- [8] 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.
- [9] 陈鹏辉,杨冰,季然,等. 振腹对 2 型糖尿病大鼠血清游离脂肪酸和甘油三酯的影响[J]. 环球中医药,2015,8(9):1070-1074.

(收稿日期:2017-02-25)

(本文编辑:董历华)