

电针通过下丘脑 TSC1-mTOR 信号通路减轻肥胖大鼠体重的机制研究

李珂[△] 何虹 胡茂清 张林

摘要 目的 探讨电针通过下丘脑结节性硬化症基因 1 (tuberous sclerosis complex 1, TSC1) - 哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (mammalian target of rapamycin, mTOR) 信号通路减轻食源性肥胖 (diet-induced obesity, DIO) 大鼠体重的机制。**方法** 40 只雄性 SD 大鼠随机分为造模组 (30 只) 和正常组 (10 只)。采用高脂饲料饲养 12 周制备食源性肥胖大鼠模型, 将造模成功的 19 只大鼠随机分为模型组 (9 只) 和针刺组 (10 只)。针刺组选天枢、三阴交、中脘、足三里穴进行治疗, 每天 1 次, 每周连续针刺 5 天, 休息 2 天, 治疗 4 周。模型组和正常组不予以干预治疗。观察各组大鼠体重变化; 采用重亚硫酸盐的测序法检测 TSC1 启动子甲基化程度; 采用 RT-PCR 检测 mTOR 基因表达。**结果** 与本组治疗前比较, 针刺组大鼠体重下降 ($P < 0.05$); 与正常组比较, 治疗后模型组和针刺组大鼠体重差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。模型组大鼠下丘脑 TSC1 启动子甲基化率 (94.0 ± 4.5)% 高于正常组的 (87.0 ± 3.6)%, 针刺组 TSC1 启动子甲基化率 (87.4 ± 3.9)% 低于模型组, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。模型组大鼠下丘脑 mTOR 基因表达 (1.84 ± 0.51) 高于正常组 (1.02 ± 0.22), 针刺组 (1.46 ± 0.29) 低于模型组, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。**结论** 电针可通过下调下丘脑 TSC1 启动子甲基化程度, 调节 mTOR 基因表达减轻 DIO 大鼠体重。

关键词 电针; 结节性硬化症基因 1; 哺乳动物雷帕霉素靶蛋白; 甲基化

Mechanism of Electropuncture for Reducing Diet-induced Obesity Rat Weight through Hypothalamus TSC1-mTOR Signal Pathway LI Ke, HE Hong, HU Mao-qing, and ZHANG Lin *Third Affiliated Hospital of Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Department of Internal Medicine, Diabetes Mellitus Prevention and Cure Center of Sichuan Province, Chengdu (610041)*

ABSTRACT Objective To explore the mechanism of electropuncture (EA) for reducing diet-induced obesity (DIO) rat weight through tuberous sclerosis complex 1 (TSC1)-mammalian target of rapamycin (mTOR) signal pathway in hypothalamus. **Methods** Forty male SD rats were randomly divided into the model group ($n = 30$) and the normal control group ($n = 10$). DIO rat model was prepared by high fat forage for 12 successive weeks. Successfully modeled 19 rats were further randomly divided into the model group ($n = 9$) and the EA group ($n = 10$). EA at Tianshu (ST25), Sanyinjiao (SP6), Zhongwan (RN12), Zusanli (ST36) was performed in the EA group, 5 successive days per week with a 2-day rest, 4 weeks in total. No intervention was given to rats in the model group and the normal control group. Body weight was observed in all rats. Methylation of TSC1 promotor was detected by bisulfite sequencing method. mRNA expression of mTOR in hypothalamus was detected by RT-PCR. **Results** After EA treatment body weight in the EA group were obviously reduced ($P < 0.05$). Compared with the normal control group, body weight was not statistically different between the model group and the EA group after treatment ($P > 0.05$). Methylation rate of TSC1 promotor was higher in model group ($94.0\% \pm 4.5\%$) than in the normal control group ($87.0\% \pm 3.6\%$) and the EA group ($87.4\% \pm 3.9\%$) ($P < 0.05$). Expression of mTOR in the model group (1.84 ± 0.51) was higher than that in the normal control group (1.02 ± 0.22) and the EA

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (No. 81202844)

作者单位: 成都中医药大学第三附属医院 四川省糖尿病防治中心内科 (成都 610041)

通讯作者: 张林, Tel: 028-86119860, E-mail: zhanglxh@163.com

△ 现单位在遂宁市射洪县中医院

DOI: 10.7661/CJIM.2016.07.0875

group (1.46 ± 0.29) ($P < 0.05$). Conclusion EA could lower DIO rats' body weight by down-regulating methylation rate of TSC1 promotor and regulating expression of mTOR in hypothalamus.

KEYWORDS electropuncture; tuberous sclerosis complex 1; mammalian target of rapamycin; methylation

单纯性肥胖不单纯是体形特征的变化,还会增加非传染性疾病如高血压病、心脑血管意外、糖尿病、睡眠呼吸暂停等的患病率和死亡率。有研究发现下丘脑哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin, mTOR)信号参与了肥胖的发生^[1]。结节性硬化症基因 1 (tuberous sclerosis complex 1, TSC1) 是 mTOR 的上游抑制因子。本课题组前期研究发现肥胖大鼠下丘脑 TSC1 启动子甲基化明显增高, mTOR 活性上调与肥胖的发病机制有关^[2]。本课题采用电针干预肥胖大鼠, 观察下丘脑 TSC1 启动子甲基化及 mTOR 基因的变化, 从表观遗传角度进一步探讨针刺治疗肥胖的可能机制。

材料与方 法

1 动物 40 只雄性 SD 大鼠, 3~4 周龄, 均购自成都达硕生物科技有限公司, 许可证号: SCXK(川) 2013-24。

2 试剂及仪器 TaqDNA 聚合酶(上海生工, 批号: SC0010), dNTP(上海生工, 批号: A610056), cDNA 合成试剂盒(上海生工, 批号: SK2445); 感受态细胞制备试剂盒(上海生工, 批号: SK9307); 质粒抽提试剂盒(美国 Axygen, 批号: AP-MN-P-50); 测序序列分析仪(美国 ABI 公司, ABI PRISM 3730); 荧光定量 PCR 仪(美国 ABI 公司, StepOne)。

3 动物分组及造模方法 大鼠适应性喂养 1 周后随机分为高脂喂养组(30 只)和正常组(10 只), 正常组给予基础饲料喂养, 高脂饲料依据 Deng G 等^[3]方法配制。造模期间所有大鼠自由摄食和饮水, 实验室温度保持在(22 ± 3) °C, 共饲养 12 周, 超过正常组平均体重的 20% 为肥胖^[4], 共 19 只大鼠造模成功, 成模率为 63%。造模成功的食源性肥胖(diet-induced obesity, DIO)大鼠随机分为模型组(9 只)和针刺组(10 只)。

4 针刺干预 针刺治疗前将所有大鼠放入自制的大鼠固定器中预固定, 20 min/次, 每天 1 次, 适应 5 天后进行针刺治疗。腧穴选择: 选择天枢(脐中旁开约 5 mm)、三阴交(后肢内踝尖直上 10 mm)、中脘(大鼠的腹正中线上, 以剑突为一定位点, 以耻骨联合上缘为另一定位点, 两者连线的上 1/3 段与下 2/3 段的交

点)、足三里(取双后肢膝关节后外侧, 腓骨小头下约 5 mm 处)穴进行电针干预治疗。穴位定位参照《实验针灸学》^[5]进行。针刺操作: 75% 酒精棉消毒后, 用 0.25 mm × 13 mm 毫针以 18 Hz 的频率, 2 mA 的强度在“天枢”斜刺 4 mm, 三阴交直刺 4 mm, 足三里直刺 6~7 mm, “中脘”直刺 2 mm, 以穴位皮肤轻微抖动为度, 治疗 20 min 后出针, 左右侧轮换取穴, 每天 1 次, 每周连续针刺 5 天, 休息 2 天, 共治疗 4 周。模型组和正常组同针刺组同法固定, 但不予以干预治疗。

5 样本采集 各组动物于实验结束时以利多卡因腹腔麻醉, 并断头处死, 迅速在冰浴中剥离脑组织后置于液氮罐保存, 检测 TSC1 启动子甲基化和 mTOR 基因表达。

6 检测指标及检测方法

6.1 大鼠体重检测 采用电子秤称量各组大鼠治疗前后清晨体重变化。

6.2 TSC1 启动子甲基化检测 采用重亚硫酸盐的测序法检测 TSC1 启动子甲基化^[6]。DNA 亚硫酸氢钠修饰: 将约 2 μg DNA 用双蒸水稀释, 加 5.5 μL 新鲜配制的 3M NaOH, 42 °C 水浴 30 min。加 10 mmol/L 对苯二酚 30 μL 至上述水浴后混合液中, 加亚硫酸氢钠, 避光混匀。加 200 μL 石蜡油, 50 °C 避光水浴 16 h。加 300 μL 结合液到 EP 管中。混匀后移到 UNIQ 柱中, 室温静置 2 min。室温离心 1 min。加入洗液 650 μL, 室温离心 1 min, 重复清洗 1 次。室温离心 1 min。把 UNIQ 柱放入新的 EP 管中, 55 °C 烘箱放置 10 min, 加入预热的双蒸水 50 μL, 55 °C 烘箱放置 20 min。室温离心 2 min, 收集洗脱液, 使体积终体积为 50 μL。加 5.5 μL 新鲜配制的 3 mol/L NaOH, 室温放置 15 min。加 8 μL 3 mol/L 乙酸钠、4 μL 10 mg/mL 糖原和 270 μL 冰无水乙醇, 置于 -20 °C, 过夜沉淀。离心 10 min, 加 500 μL 70% 乙醇, 离心 5 min, 去上清。再加同量乙醇, 倒掉上清, 常温离心后, 将附壁乙醇离至 EP 管底, 移液器小心将残余液体吸净, 室温干燥 5 min, 加入 20~30 μL 双蒸水, 溶解沉淀。PCR 扩增: 引物: M-Tsc1-F: 5'-GATTGTTGTTAATAATAATGTGATGTG-3'; M-Tsc1-R: 5'-TCACCACAACACTACTCCTACT-CAAC-3', 配制 50 μL 反应体系, 反应条件: 98 °C 预

变性4 min,94 °C 变性 45 s,66 °C 退火 45 s,72 °C 延伸1 min,40 个循环,72 °C 8 min 修复延伸。将 PCR 纯化产物连接到 pUC18-T 载,制备感受态细胞,选择在 IPTG/X-gal 平板上生长的白色菌落,挑至含氨苄青霉素的液体培养基,37 °C 培养过夜,提取质粒,进行测序。甲基化率(%) = 被甲基化位点/55 × 100% (55 为每个样本可被甲基化的位点)。

6.3 RT-PCR 检测 mTOR mRNA 表达 运用 cDNA 合成试剂盒合成 cDNA 第一链。mTOR 引物序列:上游:5'-GCGTCCGGGGTGTAGAGTA-3',下游:5'-TGGGTCATCCTTGTTCGTGT-3',选择 β-actin 为内参,引物序列:上游:5'-CGTAAAGACCTC-TATGCCAACA-3',下游:5'-AGCCACCAATCCA-CACAGAG-3',按照 PCR 试剂盒内说明书配制 20 μL 反应体系,反应条件为 95 °C 起始模板变性 2 min,95 °C 变性 10 s,65 °C 退火 40 s,68 °C 延伸 1 min,循环 40 次,采用 2^{-ΔΔCt} 方法计算 mTOR mRNA 相对表达量。

7 统计学方法 采用 SPSS 11.5 进行统计分析。计量数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间两两比较采用 LSD 法;同组间治疗前后的比较采用配对 t 检验。P < 0.05 为差异有统计学意义。

结 果

1 各组大鼠治疗前后体重比较(表 1) 与本组治疗前比较,针刺组大鼠治疗后体重明显下降(P < 0.05);与正常组比较,治疗前模型组和针刺组大鼠体重明显增高(P < 0.05);治疗后模型组和针刺组大鼠体重差异无统计学意义(P > 0.05)。

表 1 各组大鼠治疗前后体重比较 (g, $\bar{x} \pm s$)

组别	n	时间	体重
正常	10	治疗前	384.20 ± 43.01
		治疗后	416.85 ± 41.17
模型	9	治疗前	467.01 ± 24.54 ^Δ
		治疗后	496.73 ± 37.94
针刺	10	治疗前	478.24 ± 20.67 ^Δ
		治疗后	417.78 ± 38.84 [*]

注:与本组治疗前比较,*P < 0.05;与正常组比较,ΔP < 0.05

2 各组大鼠 TSC1 启动子甲基化率和 mTOR mRNA 表达比较(表 2) 与正常组比较,模型组大鼠下丘脑 TSC1 启动子甲基化率和 mTOR mRNA 表达均明显增高(P < 0.05);与模型组比较,针刺组大鼠下丘脑 TSC1 启动子甲基化率和 mTOR mRNA 表达均降低(P < 0.05)。

表 2 各组大鼠 TSC1 启动子甲基化率和 mTOR mRNA 表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	TSC1 启动子甲基率(%)	mTOR mRNA
正常	10	87.0 ± 3.6	1.02 ± 0.22
模型	9	94.0 ± 4.5 [*]	1.84 ± 0.51 [*]
针刺	10	87.4 ± 3.9 ^Δ	1.46 ± 0.29 ^Δ

注:与正常组比较,*P < 0.05;与模型组比较,ΔP < 0.05

讨 论

中医学称肥胖症患者为“肥人”,《素问·奇病论》^[7]云“肥者令人内热”,王燕昌指出“肥人之病,皆因脾湿致生胃痰”,《丹溪治法心要·中风》^[8]中提出“肥白人多痰湿”,汪昂说“肥人多痰而经阻,气不运也”。故本病病机多与脾胃失调有关,故针刺治疗肥胖时多以任脉、足太阴和足阳明经腧穴为主。中脘为胃之募穴、腑会,刺之可加强脾胃消化功能;天枢为大肠募穴,调理肠胃、降脂消浊;三阴交、足三里配用可健运脾胃、利水湿。四穴配用可收健脾胃、利脏腑、化脂消浊之功。

林小苗等^[9]对 1979—2008 年期间有关针刺治疗单纯性肥胖症临床疗效的文献进行 Meta 分析结果显示:针刺治疗单纯性肥胖症临床有效率可能优于西药食欲抑制剂(西布曲明、芬氟拉明);且体质量、体质量指数的改善可能优于西布曲明。另有系统评价结果显示与生活方式相比,针刺可降低约 1.72 kg 体重,与假针刺或安慰针相比体重下降 1.56 kg^[10]。以上研究提示针刺治疗单纯性肥胖的有效性。

针刺治疗单纯性肥胖的机制研究取得一定的进展^[11],近年发现表观遗传参与了单纯性肥胖的发生^[12,13],本课题从表观遗传角度探讨了针刺治疗肥胖的可能机制。表观遗传是在基因 DNA 序列无发生改变的情况下,研究基因表达水平的变化,DNA 甲基化是表观遗传的最常见形式。课题组在前期研究发现下丘脑 TSC1 启动子甲基化变化及 mTOR 信号参与了食源性肥胖发生的研究基础上^[2],采用电针对单纯性肥胖大鼠模型进行干预,本实验结果发现 DIO 大鼠较基础饲料喂养正常组大鼠下丘脑 TSC1 启动子甲基化率明显增加,mTOR mRNA 表达上调;电针干预后肥胖大鼠下丘脑 TSC1 启动子基因甲基化率与正常组相似,mTOR 表达高于正常组,低于模型组。实验结果提示电针减轻单纯性肥胖者体重的作用可能通过降低下丘脑 TSC1 启动子甲基化率,减少了对 mTOR 基因的抑制作用,使 mTOR 表达上调而实现。

本课题的不足之处:未对 TSC1 启动子甲基化进行阻断,观察大鼠体重变化及 mTOR 表达,未明确电针对 TSC1 启动子甲基化率与 mTOR mRNA 表达变化的因

果关系。

本研究探讨针刺通过下调 TSC1 启动子甲基化程度,调节 mTOR mRNA 表达治疗单纯性肥胖的可能机制,为从表观遗传角度研究针刺治疗肥胖的机制提供了思路。

参 考 文 献

[1] Mori H, Inoki K, Münzberg H, et al. Critical role for hypothalamic mTOR activity in energy balance [J]. *Cell Metab*, 2009, 9(4): 362 - 374.

[2] 张林, 李珂, 何虹, 等. 食源性肥胖大鼠下丘脑 Tsc1 启动子区甲基化率、mTOR 表达变化[J]. *四川大学学报(医学版)*, 2015, 46(1): 47 - 50.

[3] Deng G, Long Y, Yu YR, et al. Adiponectin directly improves endothelial dysfunction in obese rats through the AMPK-eNOS pathway [J]. *Int J Obes (Lond)*, 2010, 34(1): 165 - 171.

[4] 骆悠, 黄桂宝, 樊莉, 等. 针刺对肥胖大鼠 MSH 及 POMC 影响的实验研究[J]. *新中医*, 2014, 46(7): 189 - 190.

[5] 余曙光, 郭义主编. *实验针灸学*[M]. 上海:上海科学技术出版社, 2009:151 - 152.

[6] Reed K, Poulin ML, Yan L, et al. Comparison of bisulfite sequencing PCR with pyrosequencing for measuring differences in DNA methylation[J]. *Anal Biochem*, 2010, 397(1): 96 - 106.

[7] 田代华整理. *黄帝内经素问*[M]. 北京:人民卫生出版社, 2005: 89.

[8] 朱震亨. *丹溪治法心要*[M]. 北京:人民出版社, 1983: 80.

[9] 林小苗, 黎波, 杜元灏, 等. 针刺治疗单纯性肥胖症临床疗效比较的系统评价[J]. *中国针灸*, 2009, 29(10): 856 - 860.

[10] Cho SH, Lee JS, Thabane L, et al. Acupuncture for obesity: a systematic review and meta-analysis[J]. *Int J Obes (Lond)*, 2009, 33(2): 183 - 196.

[11] 李珂, 张林, 胡茂清. 针刺治疗单纯性肥胖的中枢响应机制研究概况[J]. *湖南中医杂志*, 2014, 30(3): 168 - 170.

[12] Symonds ME, Budge H, Frazier-Wood AC. Epigenetics and obesity: a relationship waiting to be explained[J]. *Hum Hered*, 2013, 75(2-4): 90 - 97.

[13] 张林, 胡茂清. 表观遗传和肥胖[J]. *中国糖尿病杂志*, 2013, 21(4): 376 - 378.

(收稿:2014 - 10 - 19 修回:2015 - 12 - 02)

中国中西医结合杂志社微信公共账号已开通

中国中西医结合杂志社已经开通微信公共账号,可通过扫描右方二维码或者搜索微信订阅号“中国中西医结合杂志社”加关注。本杂志社将通过微信不定期发送《中国中西医结合杂志》、*Chinese Journal of Integrative Medicine* 的热点文章信息,同时可查看两本期刊的全文信息,欢迎广大读者订阅。

