

本文引用:李 芊,欧阳里知,刘惠娟,彭 涵,刘红华,葛君芸,常小荣,刘迈兰.隔药饼灸对高脂血症兔 IGF-1/Sp1 蛋白及基因表达的影响[J].湖南中医药大学学报,2022,42(10): 1688-1694.

隔药饼灸对高脂血症兔 IGF-1/Sp1 蛋白及基因表达的影响

李 芊¹,欧阳里知¹,刘惠娟¹,彭 涵¹,刘红华²,葛君芸¹,常小荣¹,刘迈兰^{1*}

(1.湖南中医药大学针灸推拿学院,湖南 长沙 410208;2.湖南中医药大学护理学院,湖南 长沙 410208)

[摘要] 目的 探究隔药饼灸对高脂血症兔胰岛素样生长因子1(insulin-like growth factor 1, IGF-1)/特异性蛋白1(specificity protein 1, Sp1)蛋白及基因表达的影响。方法 将36只雄性新西兰兔随机分为正常组、模型组和隔药饼灸组,每组12只。造模各组予高胆固醇配方饲料喂养8周制备高脂血症模型,正常组普食饲养。模型组捆绑操作,隔药饼灸组隔药饼灸干预,施灸穴位分为腹背两组,腹组为“巨阙”与双侧“天枢”“丰隆”,背组为双侧“心俞”“肝俞”“脾俞”,每天只施灸一组穴位,两组穴位交替施灸,持续8周。干预8周后,取各组兔血清、主动脉组织及肝组织样本,采用ELISA、RT-PCR技术检测IGF-1、Sp1指标。结果 (1)干预8周后,与正常组比较,模型组血清IGF-1、Sp1含量上升($P<0.01$);与模型组比较,隔药饼灸组血清IGF-1、Sp1含量下降($P<0.01$)。 (2)与正常组比较,模型组主动脉IGF-1的mRNA表达量显著上升($P<0.001$),与模型组比较,隔药饼灸组主动脉IGF-1的mRNA表达量下降($P<0.01$)。 (3)与正常组比较,模型组肝组织IGF-1和Sp1的mRNA表达量显著上升($P<0.001, P<0.01$);与模型组比较,隔药饼灸组肝组织IGF-1和Sp1的mRNA表达量下降($P<0.01$)。结论 隔药饼灸可能影响IGF-1/Sp1信号通路,通过胆固醇逆转环节,调节LDL-C的摄取和转运而缓解高脂血症。

[关键词] 高脂血症;隔药饼灸;胰岛素样生长因子1;特异性蛋白1;胆固醇逆转;低密度脂蛋白胆固醇;IGF-1/Sp1信号通路;血脂

[中图分类号]R245.8

[文献标志码]A

[文章编号]doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2022.10.016

Effects of herbal cake-separated moxibustion on IGF-1/Sp1 protein and gene expression in hyperlipidemia rabbits

LI Qian¹, OUYANG Lizhi¹, LIU Huijuan¹, PENG Han¹, LIU Honghua², GE Junyun¹, CHANG Xiaorong¹, LIU Mailan^{1*}

(1. College of Acu-moxibustion and Massage, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China;

2. Nursing College, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the effects of herbal cake-separated moxibustion on the expressions of insulin-like growth factor 1 (IGF)/specificity protein 1 (Sp1) protein and gene expression in rabbits with hyperlipidemia. **Methods** A total of 36 male New Zealand rabbits were randomly divided into normal group, model group and herbal cake-separated moxibustion group, with 12 rabbits in each. The hyperlipidemia models were prepared in each modeling group by feeding with high cholesterol formula for 8 weeks. The normal group was fed with common food; the model group was bundled; and the herbal cake-separated moxibustion group was treated with herbal cake-separated moxibustion with the applied acupoints divided into the

[收稿日期]2022-03-21

[基金项目]国家自然科学基金项目(82074559);湖南省自然科学基金项目(2018JJ3097, 2020JJ5414, 2021JJ40401);湖南省院士专家工作站(石学敏)开放基金项目(2019YSZJJ10);湖南省教育厅优秀青年基金项目(19B435, 19B428);长沙市杰出创新青年培养计划项目(kq1905036);湖南省大学生研究性学习和创新性实验计划(2018-15)。

[第一作者]李 芊,女,硕士研究生,研究方向:针灸治病机制研究。

[通信作者]*刘迈兰,女,博士,副教授, E-mail:445007305@qq.com。

abdominal and dorsal groups. "Jueque" (CV14), bilateral "Tianshu" (S25) and "Fenglong" (S40) were chosen for the abdominal groups, and bilateral "Xinshu" (BL15), "Ganshu" (BL18) and "Pishu" (BL20) for the back group. Moxibustions were applied only to one group of acupoints per day, and the two groups of acupoints were alternately applied for 8 weeks. After 8 weeks of intervention, serum, aortic tissue and liver tissue samples were taken from each group, and the IGF-1/Sp1 indicators were detected by ELISA, RT-PCR techniques. **Results** (1) After 8 weeks of intervention, compared with the normal group, the levels of serum IGF-1/Sp1 increased in the model group ($P<0.01$); compared with the model group, the serum IGF-1/Sp1 content in the herbal cake-separated moxibustion group decreased ($P<0.01$). (2) Compared with the normal group, the mRNA expression of IGF-1 in the aorta of the model group was significantly reduced ($P<0.001$). Compared with the model group, the mRNA expression of IGF-1 in the aorta of the herbal cake-separated moxibustion group decreased ($P<0.01$). (3) Compared with the normal group, the mRNA expression of IGF-1/Sp1 in liver tissues of the model group increased significantly ($P<0.001$, $P<0.01$); compared with the model group, the mRNA expression levels of IGF-1/Sp1 in liver tissues of herbal cake-separated moxibustion group decreased ($P<0.01$). **Conclusion** Herbal cake-separated moxibustion may affect IGF-1/Sp1 signaling pathway, and regulate the intake and transport of low density lipoprotein cholesterol through cholesterol reverse transport, thus alleviating hyperlipidemia.

〔**Keywords**〕 hyperlipidemia; herbal cake-separated moxibustion; insulin-like growth factor 1; specificity protein 1; cholesterol reversal; low density lipoprotein cholesterol; IGF-1/Sp1 signaling pathway; blood lipid

高脂血症(hyperlipidemia, HLP)是因机体脂质转运或代谢异常而引起的血液中甘油三酯(triglyceride, TG)水平和(或)总胆固醇(total cholesterol, TC)水平、低密度脂蛋白胆固醇(low-density lipoprotein cholesterol, LDL-C)过高,和(或)高密度脂蛋白胆固醇(high density lipoprotein cholesterol, HDL-C)水平过低的一种病症,是动脉粥样硬化等心血管事件的重要危险因素。隔药饼灸是通过艾灸与中药的结合,共同刺激腧穴治疗疾病的针灸特色疗法。临床试验与基础实验研究表明,隔药饼灸能降低 LDL-C、升高 HDL-C 和升高高密度脂蛋白与胆固醇的比值,肯定了隔药饼灸的降脂调脂效果^[1-2]。胆固醇逆转运(reverse cholesterol transport, RCT)是参与调节 HLP 的重要的机制之一^[3],而胰岛素样生长因子 1(insulin-like growth factor 1, IGF-1)、特异性蛋白 1(specificity protein 1, Sp1)在 RCT 过程中起着重要的调控作用^[4-5]。IGF-1 是防止 LDL-C 水平升高的一个保护因素,保持一定的 IGF-1 水平可以调节血液 LDL-C 浓度^[6]。下调 IGF-1 的 mRNA 表达,可介导 RCT,对 HLP 起到治疗作用^[4]。Sp1 通过增强肝细胞代谢体内胆固醇的能力,促进 RCT 过程,调节血液中 LDL-C 与 HDL-C 的水平^[5]。本次研究以 HLP 兔为研究对象,运用隔药饼灸干预治疗,探讨隔药饼灸的血脂调节机制是否通过 IGF-1/Sp1 通路,调节 RCT 和 HLP 进程。

1 材料与方法

1.1 实验动物与分组

雄性新西兰兔 36 只,体质量 1.5~2.5 kg,购自湖南太平生物有限公司[普通级,许可证号:SCXK(湘)2020-0005],单笼兔圈养于湖南中医药大学实验动物中心,饮水不限,喂食定量。饲养环境以明暗灯光模拟昼夜交替过程,湿度 50%~70%,温度 20~25 ℃。

1.2 主要仪器与试剂

1.2.1 主要仪器 台式高速冷冻离心机(型号:75007685,美国赛默飞世尔科技公司);全自动生化分析仪(型号:Chemray 120,深圳雷杜生命科学股份有限公司);高速低温离心机(型号:D3024R,SCILOGBX 公司);GloMax 酶标仪(型号:GM3030, Promega 公司);振荡仪(型号:10RTEX-5,海门市其林贝尔仪器制造有限公司);超微量分光光度计(型号:NanoVue Plus, NannoVue 公司);基因扩增仪(型号:ETC811,苏州东胜兴业科学仪器有限公司)。

1.2.2 主要试剂 TG 检测试剂盒(批号:20200507)、LDL-C 检测试剂盒(批号:20200619)、TC 检测试剂盒(批号:20200526)均来自深圳雷杜生命科学股份有限公司;蛋白酶抑制剂(批号:04693132001, Roche);磷酸酶抑制剂(批号:04906837001, Roche 公司);RNA 提取试剂盒(批号:RN03,艾德莱生物技术有限公司);逆转录试剂盒(批号:FSQ-101,

TOYOBO); IGF-1 ELISA 试剂盒(批号: JL17113, 上海江莱生物科技有限公司); Sp1 ELISA 试剂盒(批号: SY-00967, 上海双赢生物科技有限公司)。

1.3 HLP 模型制备与评定

采用外源性高胆固醇、高脂饮食诱导法^[7]制备 HLP 模型, 高胆固醇和高脂饮食饲料配方为 84% 基础饲料(实验兔专用)、10% 蛋黄粉、5% 猪油、1% 胆固醇。造模期间每只实验兔单笼饲养, 饮水不限, 饲料喂养 120~150 g/只, 连续 8 周(56 d)。

HLP 模型制备: 适应性喂养 1 周后, 各组实验兔耳中动脉采血, 检测造模前各组血脂水平(血清 TC、TG、LDL-C), 记录正常血脂水平并评估各组间的造模前基线。自第 2 周起, 各模型制备组以高胆固醇、高脂饲料喂养, 正常组以普通实验兔专用基础饲料喂养, 在造模 8 周后行耳中动脉采血, 造模后测各组血脂水平, 对比造模前与造模 8 周后组间血脂水平及各组造模 8 周血脂变化。

模型评定: 新西兰兔正常血清 TC 含量为 1~2 mmol/L, 当造模各组血清 TC 值高于此值(或正常组 TC 值)3 倍以上, 血清 TG 和 LDL-C 含量与正常组相较升高($P < 0.05$), 则判定 HLP 模型成立^[7]。

1.4 干预方法

所有实验兔在适应性喂养 1 周后, 分为正常组、模型组、隔药饼灸组, 每组 12 只。除正常组喂食基础饲料外, 其余 2 组每天喂食高胆固醇、高脂饲料, 持续 8 周, 制备 HLP 兔模型。造模成功后, 各组均喂食普通饲料。每天上午 7:00, 正常组和模型组予以单纯捆绑操作; 隔药饼灸组在捆绑固定于兔台后予以隔药饼灸操作, 干预 30 min。各组干预持续 8 周, 各实验兔每天总食量 120~150 g/只。分别在造模前(适应性喂养 1 周后)、造模 8 周后经兔耳中动脉采血, 干预 8 周后腹主动脉采血, 4 °C 静置 2 h 后以 3000 r/min, 半径 168 mm, 离心 10 min, 取上清, 检测血脂水平。

隔药饼灸操作: 模型制备成功后, 实验兔膻穴部位剃毛处理, 固定于兔台, 取穴定位, 局部聚维酮碘消毒, 涂抹凡士林, 在穴位敷上新制作的药饼, 医用镊子夹持中等强度艾炷点燃, 放置于药饼上方施灸, 每穴需连灸 4 壮, 每壮需彻底燃烧后再更换, 两组穴位交替施灸, 每天 1 组穴位, 连灸 8 周, 每灸 6 d 休息

1 d。施灸穴位分为腹背 2 组; 腹组取“巨阙”和双侧“天枢”“丰隆”; 背组取双侧“脾俞”“肝俞”“心俞”。取穴方法参考余曙光、徐斌主编的《实验针灸学》^[8]及拟人比照法定。药饼制作方法: 选取大黄、泽泻、郁金、山楂、丹参, 按 1:1 打磨机粉碎为末; 在每次施灸之前, 将粉末以醋调成糊状, 捏压成直径 1 cm 左右、厚约 5 mm 的药饼。

1.5 指标采集与检测

1.5.1 指标采集 20% 乌拉坦耳缘静脉注射 4 mL/kg 麻醉实验兔, 腹主动脉取血 5 mL, 3000 r/min 离心 15 min, 取上清。剪取主动脉一段, 取 3 mm×3 mm×5 mm 肝组织分别在无菌培养皿内 PBS 冲洗血液后, 放入冻存管。上述标本均于 -80 °C 冰箱保存待测。

1.5.2 血脂检测 使用全自动生化仪 Rayto-Chemray120 测实验兔血清中 TC、TG 和 LDL-C 的含量。

1.5.3 ELISA 法检测血清中 IGF-1、Sp1 的含量 (1) 取出血清样品, 置于冰上融化, 待融化完毕后, 震荡摇匀。(2) 将 IGF-1、Sp1 标准品于 10 000 r/min 下离心 1 min, 然后加入标准品 1 mL 稀释液于标准管中, 旋紧管盖, 静置 10 min, 上下颠倒数次, 使其充分溶解混匀后, 配制成不同浓度的标准品。然后根据需要进行 2 倍比稀释, 配制出不同浓度的标准品。(3) 取不同浓度标准品 50 μL 加入标准孔, 另加入其他孔 50 μL 待测样品。用封板膜封后放置于 37 °C 烘箱中培育 90 min。弃液, 甩干, 于每孔中加入 100 μL 生物素化抗体工作液, 混匀, 再以封板膜封后置于 37 °C 烘箱中培育 60 min。甩尽孔内液体, 于每孔加 350 μL 洗涤液, 浸泡 1~2 min, 甩掉酶标板内的液体, 重复洗板步骤 5 次。每孔加 100 μL 酶结合物工作液, 加上覆膜, 用封板膜封后置于 37 °C 烘箱中培育 30 min。弃液, 甩干, 洗板 5 次。每孔加底物溶液三甲基苯 90 μL, 用封板膜封后置于 37 °C 烘箱中培育 15 min。每孔加 50 μL 终止液, 终止反应。(4) 在 450 nm 波长下测量各孔的吸光度(OD 值)。在加终止液后 15 min 以内进行测定。最后根据所得标准曲线, 计算每个组织指标含量。

1.5.4 RT-PCR 法测主动脉 IGF-1 的 mRNA 表达量和肝组织 IGF-1、Sp1 的 mRNA 表达量 (1) β-actin、IGF-1 和 SP1 共 3 对 RT-PCR 引物的设计(见表 1)。(2) RNA 提取: 分别取主动脉、肝脏样品 100 mg 加

液氮研磨;取 Trizol 1 mL 室温下裂解 5 min,在 4 ℃、12 000 r/min 下离心 10 min;取上清,每 1 mL 裂解液中加入氯仿 0.2 mL,震荡 15 s,室温孵育 3 min,于 4 ℃、12 000 r/min 下离心 10 min,样品分 3 层后,取最上层,记录其水相体积;加与水相体积一半的乙醇,混匀转移至吸附柱,以 12 000 r/min 离心 45 s;加去蛋白液 500 μL 再以 12 000 r/min 离心 45 s,加 500 μL 漂洗液洗两次,12 000 r/min 离心 45 s;用 100 μL 水洗脱 RNA,微量酶标仪测定 RNA 浓度。(3)RNA 逆转录:每个样品取 1 μg 进行逆转录,配制逆转录体系。(4)RT-PCR 上机检测进行程序扩增。琼脂糖凝胶电泳检测:分别于每个样品中取 1.5 μL 在 1%琼脂糖凝胶电泳检测,电泳 10 min,使用凝胶成像仪成像。

表 1 β-actin、IGF-1 和 Sp1 引物信息表

基因名称	引物序列(5'-3')	长度/bp
β-actin	正向:CTGGCTCCTAGCACCATGAA	180
β-actin	反向:AAAACGCAGCTCAGTAACAGTC	
IGF-1	正向:GCTGCTGACGCTCTTCA	189
IGF-1	反向:GAACGAGCTGACTTTGTAGG	
Sp1	正向:TACCACCCTTACACCCAT	130
Sp1	反向:GATCCCTGAAGTACCCAAT	

1.6 统计学方法

所有数据在 SPSS 25.0 中进行统计分析。RT-PCR 检验统计方法为多组 *One-way ANOVA* 法。当计量资料不满足正态分布时,多组间比较选择非参数秩和检验—K 个独立样本 *Kruskal Wallis* 检验,以“M (IQR)”表示,当组间差异有统计学意义时则行多重比较,以“ $\bar{x}\pm s$ ”表示。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组实验兔血清中 TC、TG、LDL-C 的含量比较

造模前,各组血清中 TC、TG、LDL-C 含量水平差异无统计学意义($P>0.05$),具有可比性。造模后,模型组与隔药饼灸组的 TC 值均高于正常组($P<0.05$),表明造模成功。造模后,正常组因腹泻死亡 1 只,隔药饼灸组因骨折后感染死亡 1 只。干预后,模型组因腹泻死亡 1 只、体表脂肪瘤破溃感染死亡 1 只,隔药饼灸组因捆绑固定致伤口感染死亡 2 只。

造模后,模型组、隔药饼灸组与正常组比较,血

清中 TC、TG、LDL-C 含量升高($P<0.05$);隔药饼灸组与模型组比较,组间差异无统计学意义($P>0.05$)。干预后,模型组、隔药饼灸组与正常组比较,血清中 TC、TG、LDL-C 含量升高($P<0.05$);与模型组比较,隔药饼灸组血清中 TC、TG、LDL-C 含量降低($P<0.05$)。详见表 2。

表 2 各组实验兔造模前、造模后、干预后 TC、TG、LDL-C 含量比较[M(IQR),mmol/L]

指标	时间	正常组(n=11)	模型组(n=10)	隔药饼灸(n=9)
TC	造模前	1.204(1.403)	1.595(0.773)	1.489(0.919)
	造模后	1.951(0.846)	21.46(3.329)*	20.942(11.835)*
	干预后	2.079(1.151)	17.66(3.545)*	9.860(1.781)* [△]
TG	造模前	0.652(0.351)	0.834(0.628)	0.727(0.415)
	造模后	0.392(0.481)	2.175(2.068)*	1.271(1.614)*
	干预后	0.413(0.132)	2.438(1.197)*	0.833(0.203)* [△]
LDL-C	造模前	0.457(0.869)	0.779(0.456)	0.755(0.565)
	造模后	0.794(0.649)	15.594(1.806)*	14.507(9.014)*
	干预后	0.798(0.372)	10.75(2.723)*	5.251(1.865)* [△]

注:与正常组比较,* $P<0.05$;与模型组比较,[△] $P<0.05$ 。

2.2 各组实验兔血清中 IGF-1、Sp1 蛋白含量比较

干预后,与正常组比较,模型组血清中 IGF-1、Sp1 含量上升($P<0.01$);与模型组比较,隔药饼灸组血清中 IGF-1、Sp1 含量下降($P<0.01$)。详见表 3。

表 3 各组实验兔血清中 IGF-1、Sp1 蛋白含量比较($\bar{x}\pm s$)

分组	n	IGF-1/(pg/mL)	Sp1/(μg/mL)
正常组	11	91.86±37.24	2.91±0.75
模型组	10	212.40±61.56**	5.73±2.25**
隔药饼灸组	9	127.66±18.42 ^{##}	3.72±0.71 ^{##}

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

2.3 各组测实验兔主动脉 IGF-1 的 mRNA 表达量比较

与正常组比较,模型组主动脉 IGF-1 的 mRNA 表达量明显上升($P<0.001$);与模型组比较,隔药饼灸组 IGF-1 的 mRNA 表达量明显下降($P<0.01$)。详见表 4。

表 4 各组实验兔主动脉 IGF-1 的 mRNA 表达量比较($\bar{x}\pm s$)

分组	n	IGF-1/(pg/mL)
正常组	11	1.00±0.06
模型组	10	2.69±0.15***
隔药饼灸组	9	2.07±0.27 ^{##}

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

2.4 各组实验兔肝组织 IGF-1、Sp1 的 mRNA 表达量的比较

与正常组比较,模型组肝组织 IGF-1、Sp1 的 mRNA 表达量显著上升($P<0.001$ 、 $P<0.01$);与模型组比较,隔药饼灸组 IGF-1、Sp1 的 mRNA 表达量均明显下降($P<0.01$)。详见表 5。

表 5 各组实验兔肝组织 IGF-1、Sp1 的 mRNA 表达量比较($\bar{x}\pm s$)

分组	n	IGF-1/(pg/mL)	Sp1/(μ g/mL)
正常组	11	1.00 \pm 0.14	1.00 \pm 0.34
模型组	10	3.34 \pm 0.19***	2.16 \pm 0.26**
隔药饼灸组	9	2.13 \pm 0.18 [#]	1.05 \pm 0.18 [#]

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

3 讨论

HLP 是由于体内脂质代谢紊乱导致脂质水平异常的代谢性疾病。血脂的异常明显受饮食及生活方式的影响,饮食治疗和生活方式的改善是治疗血脂异常的基础措施^[9]。故本研究在高脂饮食造 HLP 兔模型成功后,将模型组和隔药饼灸组更换为普通饲料喂养,观察饮食方式的改变对 HLP 模型兔的影响。更换为普食后,与高脂饮食造模后相比,模型组与隔药饼灸组 TC、LDL-C 水平均有下降,虽然差异无统计学意义,但可继续关注饮食生活方式对血脂异常的影响,做进一步的研究。隔药饼灸能够将穴位刺激作用、中药药理作用和艾灸温热作用结合,是课题组临床试验与基础研究多年的成果,其选取心俞、脾俞、肝俞和巨阙、天枢、丰隆作为主要施灸穴位^[10-11]。巨阙,为心之募穴,理气宽胸止痛。心俞,主强心通脉活血。丰隆、脾俞、肝俞和天枢 4 穴共用,为辨证配穴,旨在健脾疏肝畅胃肠。上述 6 穴共用,起到活血逐瘀、疏肝理气及健脾祛痰之效。课题组前期关于 RCT 机制研究表明,隔药饼灸可通过增加肝过氧化酶体增殖物激活型受体(peroxisome proliferator-activated receptors, PPAR) γ 的表达、诱导清道夫受体 B 类 1 型(scavenger receptor class B member 1, SR-B1)表达^[12];可抑制拉斯同源家族成员 A/RhoA 相关螺旋激酶 1(ras homolog family member A/Rho associated coiled-coil containing protein kinase 1, RhoA/ROCK1)mRNA 表达,激发肝脏 X 受体(liver X receptor, LXR)mRNA 表达^[13];可能增强

肝脏 RCT 核受体 LXR α 的表达^[14],从而促进 RCT,调节血脂发挥抗动脉粥样硬化的作用。

本实验在高脂高胆固醇饮食造模 8 周后,与正常组比,模型组与隔药饼灸组血清 TC、TG、LDL-C 含量均升高,并且 TC 值高于正常组 TC 值 3 倍以上,血清 TG 和 LDL-C 含量与正常组相较升高,说明 HLP 模型造模成功。隔药饼灸干预 8 周后,与模型组比较,隔药饼灸组 TC、TG、LDL 含量均下降,其中 TG 含量下降至正常值水平,与前期研究一致^[1],肯定了隔药饼灸的降脂疗效。本研究发现,隔药饼灸组与模型组比较,下调了 HLP 兔血清中 IGF-1、Sp1 的蛋白含量,下调了主动脉 IGF-1 的 mRNA 和肝组织 IGF-1、Sp1 的 mRNA 表达量。

IGF-1 结构与胰岛素相似,是由 70 多个氨基酸组成的单链多肽,参与体内蛋白、糖、脂质等代谢,可以在生物体内的肝脏、心脏等多组织器官中检测到^[4]。IGF-1 通过特异性结合靶细胞表面 IGF-1 受体而发挥生物学效应,促进肝脏及肌肉对外源性氨基酸和葡萄糖的摄取,促进脂肪动员^[5]。IGF-1 是防止 LDL-C 水平升高的一个保护因素,保持一定的 IGF-1 水平可以调节血清 LDL-C 浓度^[6]。IGF-1 缺陷的小鼠表现出脂质代谢相关基因和参与肝脏中胆固醇合成酶的表达失调^[6]。IGF-1 潜在的促动脉粥样硬化作用能增强 LDL 的摄取和胆固醇酯化^[7]。有研究发现,TC、LDL-C、HDL-C 和 TG 随着 IGF-1 皮质醇水平的上升而增加^[8]。电针丰隆穴能通过下调 IGF-1 的 mRNA 表达,从而介导 RCT^[4]。RCT 是通过 LDL-C 将其携带的胆固醇转运到外周组织细胞,通过 HDL-C 将其携带的胆固醇从外周组织细胞转运回肝脏进行消除的过程^[9]。低密度脂蛋白受体(low density lipoprotein receptor, LDL-R)负责 RCT 介导 HDL-C 和 LDL-C 分别从血液中摄取^[20]。本研究发现,与模型组比较,隔药饼灸组下调了 HLP 兔血清中 IGF-1 的含量,下调了主动脉、肝组织 IGF-1 的 mRNA 表达量。故推测隔药饼灸通过下调血清中 IGF-1 的含量,下调组织中 IGF-1 的 mRNA 表达量,调节对 LDL-C 的摄取,从而参与 RCT 过程,发挥血脂调节作用。FRIEDRICH 等^[21]提出血清 IGF-1 是多发性硬化发展的风险预测因素。更有研究表明血清 IGF-1 和心血管疾病之间存在 U 型关系,高和低水平 IGF-1 均可预测心血管疾

病死亡率^[22]。因现有研究关于IGF-1与人类代谢疾病关系存有争议与矛盾,故根据“U型关系理论”,IGF-1水平过低或过高均可预测心血管疾病死亡率,推测隔药饼灸通过将IGF-1水平下调至生理最优区间水平,从而起到调节血脂代谢的作用。

Sp1属于Sp蛋白家族(Sp1~Sp9),能通过结合这些基因调控区的GC/GT区以及通过磷酸化、糖基化、甲基化、乙酰化等多种翻译后修饰,发挥对基因转录的促进/抑制作用和调控编码蛋白活性的作用^[23]。Sp1转录因子在与脂肪酸合成相关的基因转录中发挥重要作用^[24],而这些基因对于维持脂肪组织的稳态具有重要意义^[25-26]。LDL-C水平的升高会促进Sp1磷酸化来增加RCT过程中的关键蛋白SR-B1在肝脏中的表达,从而加速血浆中HDL-C摄取进入肝细胞的RCT过程^[19]。同时,Sp1和SR-B1协同激活LDL-R启动子,上调肝细胞中LDL-R,降低血液LDL-C水平^[27]。前期研究表明,隔药饼灸可以通过诱导SR-B1表达,促进RCT调节血脂^[12]。本研究中,与模型组比较,隔药饼灸组下调了HLP兔血清中Sp1的含量,下调了肝组织Sp1的mRNA表达量。故推测隔药饼灸能够下调HLP模型兔Sp1含量与表达,协同激活SR-B1,调控肝细胞中LDL-R,降低血液LDL-C水平,促进RCT。富含GC的区域内的Sp1位点可能是IGF-1受体信号传导的靶标^[28]。胰岛素增加了Sp1与IGF-1基因启动子的结合^[29]。Sp1结合活性升高诱导IGF-1增强了酪氨酸转录,介导热量营养的摄入;IGF-1增加了Sp1蛋白水平,而用IGF-1受体抗体阻断IGF-1受体后可抑制Sp1蛋白水平的升高^[30]。所以Sp1可通过结合IGF-1受体基因调控区的GC/GT区,激活IGF-1信号通路。Sp1转录因子是IGF-1作用的一个关键介质,它通过激活P450侧链裂解酶(P450_{scc})基因的表达^[31],介导类固醇生成作用^[32]。故Sp1转录因子通过介导IGF-1诱导P450_{scc}基因的表达介导类固醇物质的生成^[33],激活IGF-1/Sp1信号通路,从而调节胆固醇物质的生成与转化。

综上所述,隔药饼灸通过下调血清中IGF-1的含量,下调组织中IGF-1的mRNA表达量,调节对LDL-C的摄取;通过下调Sp1含量与表达,调控肝细胞中LDL-R,降低血液LDL-C水平,促进RCT。所以IGF-1和Sp1通过调节对LDL-C的摄取,参

与RCT过程。故推测隔药饼灸影响IGF-1/Sp1信号通路,通过RCT环节,调节LDL-C的摄取和转运,从而缓解HLP。

参考文献

- [1] 严洁,常小荣,岳增辉,等.隔药饼灸对高脂血症兔血脂含量的影响[J].中国中医药科技,2004,11(6):358.
- [2] 汪厚莲.隔药饼灸对动脉粥样硬化兔胆固醇转运核受体LXR α 的调节作用[D].长沙:湖南中医药大学,2017.
- [3] 李洪铭,谢晓莹,陈振华,等.中药降血脂机制研究进展[J].海峡药学,2021,33(7):37-40.
- [4] 乐薇.电针丰隆对高脂血症模型大鼠胆固醇转运通路的影响[D].武汉:湖北中医药大学,2013.
- [5] 杨帆.转录因子Sp1对胆固醇转运关键基因调控机制的研究[D].北京:北京协和医学院,2014.
- [6] ZHAO Q Q, JIANG Y Z, ZHANG M, et al. Low-density lipoprotein cholesterol levels are associated with insulin-like growth factor-1 in short-stature children and adolescents: A cross-sectional study[J]. *Lipids in Health and Disease*, 2019, 18(1): 120.
- [7] 宋琪,马于巽,张艳贞,等.基于血脂数据变化的实验性高脂血症动物模型制备[J].中国公共卫生,2020,36(11):1566-1573.
- [8] 余曙光,徐斌.实验针灸学[M].2版.北京:人民卫生出版社,2016:290-296.
- [9] 诸骏仁,高润霖,赵水平,等.中国成人血脂异常防治指南(2016年修订版)[J].中国循环杂志,2016,31(10):937-953.
- [10] 常小荣,符凌,张亮,等.隔药饼灸对兔动脉粥样硬化斑块中基质金属蛋白酶-2,9 mRNA表达的影响[J].中国康复理论与实践,2010,16(10):934-936,1001.
- [11] 岳增辉,何新群,常小荣,等.隔药饼灸对动脉粥样硬化兔血清载脂蛋白A及载脂蛋白B水平的影响[J].中国中医药信息杂志,2011,18(9):33-34.
- [12] 邹逸凡,马明珠,赵钊,等.隔药饼灸对高脂血症合并动脉粥样硬化兔肝脏过氧化酶体增殖物激活型受体 γ 、B类I型清道夫受体蛋白及基因表达的影响[J].针刺研究,2018,43(2):86-91.
- [13] 易丽贞.基于RhoA/ROCK-LXR信号通路探讨隔药饼灸对动脉粥样硬化易损斑块兔的影响[D].长沙:湖南中医药大学,2021.
- [14] 刘霞,刘迈兰,汪厚莲,等.隔药饼灸对动脉粥样硬化兔胆固醇转运核受体LXR α 的调节作用[J].针灸推拿医学(英文版),2019,17(1):1-8.
- [15] 武海亮,刘雅娟,刘芳,等.代谢综合征患者胰岛素样生长因子-1及胰岛素抵抗与内皮损害的关系[J].宁夏医学杂志,2011,33(2):99-101.
- [16] DE ITA J R, CASTILLA-CORTÁZAR I, AGUIRRE G A, et al. Altered liver expression of genes involved in lipid and glucose

- metabolism in mice with partial IGF-1 deficiency: An experimental approach to metabolic syndrome[J]. *Journal of Translational Medicine*, 2015, 13: 326.
- [17] HOCHBERG Z, HERTZ P, MAOR G, et al. Growth hormone and insulin-like growth factor-I increase macrophage uptake and degradation of low density lipoprotein[J]. *Endocrinology*, 1992, 131(1): 430-435.
- [18] RICOTTI R, SOLITO A, MARIOTTI ZANI E, et al. The relationship between cortisol and IGF-I influences metabolic alteration in pediatric overweight and obesity[J]. *European Journal of Endocrinology*, 2020, 182(3): 255-264.
- [19] YANG F, DU Y, ZHANG J, et al. Low-density lipoprotein up-regulate SR-BI through Sp1 Ser702 phosphorylation in hepatic cells[J]. *Biochimica et Biophysica Acta-Molecular and Cell Biology of Lipids*, 2016, 1861(9): 1066-1075.
- [20] KOH O. Current concept of reverse cholesterol transport and novel strategy for atheroprotection[J]. *Journal of Cardiology*, 2012, 60(5): 339-343.
- [21] FRIEDRICH N, NAUCK M, SCHIPF S, et al. Cross-sectional and longitudinal associations between insulin-like growth factor I and metabolic syndrome: A general population study in German adults[J]. *Diabetes/Metabolism Research and Reviews*, 2013, 29(6): 452-462.
- [22] VAN BUNDEREN C C, OOSTERWERFF M M, VAN SCHOOR N M, et al. Serum IGF1, metabolic syndrome, and incident cardiovascular disease in older people: A population-based study [J]. *European Journal of Endocrinology*, 2013, 168(3): 393-401.
- [23] RISTOLA M, ARPIAINEN S, SALEEM M A, et al. Regulation of Neph3 gene in podocytes: Key roles of transcription factors NF-kappaB and Sp1[J]. *BMC Molecular Biology*, 2009, 10: 83.
- [24] XIONG S, CHIRALA S S, WAKIL S J. Sterol regulation of human fatty acid synthase promoter I requires nuclear factor-Y-and Sp-1-binding sites[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2000, 97(8): 3948-3953.
- [25] MARIMAN E C M, WANG P. Adipocyte extracellular matrix composition, dynamics and role in obesity[J]. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2010, 67(8): 1277-1292.
- [26] RUIZ DE EGUINO G, INFANTE A, SCHLANGEN K, et al. Sp1 transcription factor interaction with accumulated prelamin a impairs adipose lineage differentiation in human mesenchymal stem cells: Essential role of sp1 in the integrity of lipid vesicles[J]. *Stem Cells Translational Medicine*, 2012, 1(4): 309-321.
- [27] GIERENS H, NAUCK M, ROTH M, et al. Interleukin-6 stimulates LDL receptor gene expression via activation of sterol-responsive and Sp1 binding elements[J]. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 2000, 20(7): 1777-1783.
- [28] LI T, CHEN Y H, LIU T J, et al. Using DNA microarray to identify Sp1 as a transcriptional regulatory element of insulin-like growth factor I in cardiac muscle cells[J]. *Circulation Research*, 2003, 93(12): 1202-1209.
- [29] KAYTOR E N, ZHU J L, PAO C I, et al. Insulin-responsive nuclear proteins facilitate Sp1 interactions with the insulin-like growth factor-I gene[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2001, 276(40): 36896-36901.
- [30] WANG G Y, LEITER A B, ENGLANDER E W, et al. Insulin-like growth factor I increases rat peptide YY promoter activity through Sp1 binding sites[J]. *Endocrinology*, 2004, 145(2): 659-666.
- [31] SAMSON S L A, WONG N C W. Role of Sp1 in insulin regulation of gene expression[J]. *Journal of Molecular Endocrinology*, 2002, 29(3): 265-279.
- [32] DENNER L, BODENBURG Y H, JIANG J, et al. Insulin-like growth factor-I activates extracellularly regulated kinase to regulate the P450 side-chain cleavage insulin-like response element in granulosa cells[J]. *Endocrinology*, 2010, 151(6): 2819-2825.
- [33] URBAN R J, GARMEY J C, SHUPNIK M A, et al. Insulin-like growth factor type I increases concentrations of messenger ribonucleic acid encoding cytochrome P450 cholesterol side-chain cleavage enzyme in primary cultures of Porcine granulosa cells[J]. *Endocrinology*, 1990, 127(5): 2481-2488.

(本文编辑 匡静之)