

·针灸推拿·

本文引用:刘惠娟, 欧阳里知, 李 芊, 彭 涵, 刘红华, 葛君芸, 罗 坚, 常小荣, 刘迈兰, 汪厚莲. 基于 Wnt/ β -catenin 通路探讨隔药饼灸对高脂血症兔调脂机制的影响[J]. 湖南中医药大学学报, 2023, 43(6): 1098-1104.

基于 Wnt/ β -catenin 通路探讨隔药饼灸对高脂血症兔调脂机制的影响

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

1. 湖南中医药高等专科学校, 湖南 株洲 412012; 2. 湖南中医药大学, 湖南 长沙 410208

【摘要】目的 观察隔药饼灸对高脂血症兔肝组织 Wnt1、 β -卷曲蛋白(β -catenin)、散乱蛋白-1(dishevelled-1, dvl-1)、固醇调节元件结合蛋白 1c(sterol regulatory element-binding protein 1c, SREBP1c)的 mRNA 表达量的影响, 探讨隔药饼灸调脂的作用机制。**方法** 将 48 只新西兰兔随机分为正常组、模型组、隔药饼灸组和阿托伐他汀组, 每组 12 只。正常组采用普通饲料喂养, 其余各组采用高脂饲养法喂养 8 周, 待造模成功后, 除正常组、模型组外, 隔药饼灸组选取两组穴位交替施灸(I 组穴位为巨阙、天枢、丰隆; II 组穴位为心俞、肝俞、脾俞), 阿托伐他汀组将阿托伐他汀钙片碾成粉末后拌入第一口饲料喂食, 每日 1 次, 连续 8 周。测定各组兔血清总胆固醇(total cholesterol, TC)、甘油三酯(glycerin trilaurate, TG)、低密度脂蛋白胆固醇(low density lipoprotein cholesterol, LDL-C)含量, RT-PCR 法测定各组兔 Wnt1、 β -catenin、dvl-1、SREBP1c 的 mRNA 表达量, 油红 O 染色观察肝组织脂质沉积情况。**结果** (1) 血脂结果: 与正常组相比, 模型组血清 TC、TG、LDL-C 上升($P<0.001$); 与模型组相比, 隔药饼灸组和阿托伐他汀组 TC、TG、LDL-C 下降($P<0.01$, $P<0.001$); 隔药饼灸组与阿托伐他汀组相比, TC、TG、LDL-C 差异无统计学意义($P>0.05$)。(2) RT-PCR 结果: 与正常组相比, 模型组肝组织 Wnt1、 β -catenin、dvl-1、SREBP1c 的 mRNA 表达量上升($P<0.001$); 与模型组相比, 隔药饼灸组和阿托伐他汀组肝组织 Wnt1、 β -catenin、dvl-1、SREBP1c 的 mRNA 表达量均下降 ($P<0.01$, $P<0.001$); 隔药饼灸组与阿托伐他汀组肝组织 Wnt1、 β -catenin、dvl-1、SREBP1c 的 mRNA 表达差异无统计学意义($P>0.05$)。(3) 脂质沉积结果: 与正常组相比, 模型组、隔药饼灸组、阿托伐他汀组脂质沉积均有增加, 模型组增加更明显; 与模型组相比, 隔药饼灸组、阿托伐他汀组脂质沉积明显减少; 隔药饼灸组与阿托伐他汀组无明显差异。**结论** 隔药饼灸可能通过抑制 Wnt/ β -catenin 通路, 下调高脂血症兔 SREBP1c 含量, 发挥调脂作用。

【关键词】 隔药饼灸; 高脂血症; 血脂; Wnt1; β -卷曲蛋白; 散乱蛋白-1; 固醇调节元件结合蛋白 1c

【中图分类号】R245 **【文献标志码】**A **【文章编号】**doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2023.06.022

Effects of medicinal cake-separated moxibustion on the mechanism of regulating lipid in rabbits with hyperlipidemia based on Wnt/ β -catenin pathway

LIU Huijuan¹, OUYANG Lizhi², LI Qian², PENG Han², LIU Honghua², GE Junyun², LUO Jian²,
CHANG Xiaorong², LIU Mailan^{2*}, WANG Houlian^{1*}

1. Hunan College of Chinese Medicine, Zhuzhou, Hunan 412012, China;

2. Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China

【Abstract】Objective To observe the effects of medicinal cake-separated moxibustion on Wnt1, β -catenin, dishevelled-1 (dvl-1), and sterol regulatory element-binding protein 1c (SREBP1c) in liver tissue of hyperlipidemia rabbits and to explore the

【收稿日期】2022-09-19

【基金项目】国家自然科学基金项目(82074559); 湖南省研究生科研创新项目(CX20200781); 长沙市杰出创新青年培养计划项目(kq1905036); 湖南省教育厅优秀青年基金项目(19B435, 19B428); 湖南中医药大学第一附属医院湖南省院士专家工作站(石学敏)开放基金(2019YSZJJ); 湖南省中医药科研计划课题项目(201964)。

【第一作者】刘惠娟, 女, 硕士, 研究方向: 针灸治病机理的研究。

【通信作者】* 刘迈兰, 女, 博士, 副教授, 硕士研究生导师, E-mail: 445007305@qq.com; 汪厚莲, 女, 讲师, E-mail: 1140203978@qq.com。

mechanism of action of medicinal cake-separated moxibustion on lipid regulating. **Methods** A total of 48 New Zealand rabbits were randomly divided into normal group, model group, medicinal cake-separated moxibustion group, and atorvastatin group, with 12 rabbits in each group. The normal group was fed with normal diet, while the other groups were fed with high-fat diet for 8 weeks. After successful modeling, except normal group and model group, two groups of acupoints in medicinal cake-separated moxibustion group were selected for alternating moxibustion [group I: 'Jueque' (RN14), 'Tianshu' (ST25), and 'Fenglong' (ST40); group II: 'Xinshu' (BL15), 'Ganshu' (BL18), and 'Pishu' (BL20)]; in atorvastatin group, atorvastatin calcium tablets were ground into powder and mixed into the first feed, once a day for 8 consecutive weeks in both groups. The content of total cholesterol (TC), glycerin trilaurate (TG), and low density lipoprotein cholesterol (LDL-C) in serum of rabbits in each group were determined. The mRNA expression levels of Wnt1, β -catenin, dvl-1 and SREBP1c were determined by RT-PCR. Lipid deposition in liver tissue was observed by oil red "O" staining. **Results** (1) Lipid results: Compared with normal group, serum TC, TG, and LDL-C in model group increased ($P<0.001$); compared with model group, TC, TG, and LDL-C in medicinal cake-separated moxibustion group and atorvastatin group decreased ($P<0.01$, $P<0.001$); compared with atorvastatin group, there was no significant statistical difference in TC, TG, and LDL-C in medicinal cake-separated moxibustion group ($P>0.05$). (2) RT-PCR results: Compared with normal group, mRNA expression levels of Wnt1, β -catenin, dvl-1, and SREBP1c in liver tissue in model group increased ($P<0.001$); compared with model group, mRNA expression levels of Wnt1, β -catenin, dvl-1, and SREBP1c in liver tissue in both medicinal cake-separated moxibustion group and atorvastatin group decreased ($P<0.01$, $P<0.001$). There was no significant statistical difference in mRNA expression levels of Wnt1, β -catenin, dvl-1, and SREBP1c in liver tissue between medicinal cake-separated moxibustion group and atorvastatin group ($P>0.05$). (3) Lipid deposition results: Compared with normal group, lipid deposition in model group, medicinal cake-separated moxibustion group, and atorvastatin group increased, with more significant increase in model group; compared with model group, lipid deposition in medicinal cake-separated moxibustion group and atorvastatin group reduced significantly, and there was no significant difference between medicinal cake-separated moxibustion group and atorvastatin group. **Conclusion** By inhibiting Wnt/ β -catenin pathway, medicinal cake-separated moxibustion can down-regulate the content of SREBP1c and play the role of lipid regulation.

[**Keywords**] medicinal cake-separated moxibustion; hyperlipidemia; blood lipid; Wnt1; β -catenin; dishevelled-1; sterol regulatory element-binding protein1c

高脂血症是指体内脂质代谢紊乱,使体内一种或多种脂质水平高于正常,包括高总胆固醇(total cholesterol, TC)血症、高甘油三酯(glycerin trilaurate, TG)血症,伴或不伴高密度脂蛋白胆固醇(high density lipoprotein cholesterol, HDL-C)降低和(或)低密度脂蛋白胆固醇(low density lipoprotein cholesterol, LDL-C)升高^[1-2]。高脂血症是动脉粥样硬化性心血管疾病(atherosclerotic cardiovascular disease, ASCVD)重要的危险因素,有效控制高脂血症对防控ASCVD具有重要意义^[1]。

肝脏是胆固醇与甘油三酯合成的重要场所,体内脂质代谢紊乱,胆固醇及TG在肝脏中大量积累,肝脏出现脂质沉积,进一步加速高脂血症进程^[2-3]。Wnt/ β -卷曲蛋白(β -catenin)通过调控细胞增殖、分化和遗传稳定性,以及维持成体前体细胞处于多能性状态,控制生命早期的几个发育过程和成熟组织的动态平衡,包括肝胆发育、成熟、分区^[4-7]。现有研究表明,Wnt/ β -catenin通路在肝脏发育、稳态及代谢过

程中起关键作用,并且与高脂血症的发生发展有密切关系,参与胆固醇合成、肝脏脂肪生成与累积等高脂血症形成的多个环节^[5-6,8-10],是参与高脂血症进程的重要机制之一^[10-11]。课题组前期研究表明,隔药饼灸具有良好的调脂作用^[12-15]。故本实验在前期研究结果上,以高脂血症兔为研究对象,以隔药饼灸为干预方式,探讨隔药饼灸能否通过调控Wnt/ β -catenin通路,从而调节高脂血症的进程。

1 材料与方法

1.1 实验动物与分组

雄性3月龄新西兰纯种兔48只,体质量1.5~2.5 kg,实验动物生产许可证编号:SCXK(湘)2020-0005,由湖南中医药大学动物实验中心提供,每只分笼圈养于动物中心实验室(清洁级)。饲养温度20~25℃,湿度50%~70%,自由进食及饮水。适应性喂养1周以后,将48只新西兰兔进行分组,采用随机数字表法分为正常组、模型组、隔药饼灸组和阿托伐

他汀组,每组12只。实验过程中对动物的各种处理均遵照《关于善待动物的指导性意见》的有关规定。

1.2 主要仪器与试剂

1.2.1 主要仪器 高速低温离心机(型号:D3024R,美国SCILOGBX公司);低速离心机(型号:S1010E,美国SCILOGBX公司);GloMax酶标仪(型号:GM3030,美国Promega公司);pH计(型号:PHS-3G,上海仪电科学仪器有限公司);电子天平(型号:HLD-10002,杭州友恒称重设备有限公司);电热恒温槽(型号:DK-8D,上海精宏实验设备公司);基因扩增仪(型号:ETC811,苏州东胜兴业科学仪器有限公司);超微量分光光度计(型号:NanoVue Plus,美国NannoVue公司);移液枪(型号:10~1000 μL ,德国Eppendorf公司);超净工作台(型号:SW-CJ-1FD,苏州净化设备厂);全自动生化仪(型号:Chemray 120,深圳雷杜生命科学股份有限公司)。

1.2.2 主要试剂与药物 聚氰基丙烯酸正丁酯(butyleanoacrylate, BCA)试剂盒(货号:QB214754,美国Thermo Scientific公司);RIPA裂解液(货号:R0010,北京索莱宝科技有限公司);30%丙烯酰胺(货号:BL513B, Biosharp公司);十二烷基硫酸(货号:S8010,北京索莱宝科技有限公司);甘氨酸(货号:G8200,北京索莱宝科技有限公司);磷酸酶抑制剂(货号:04906837001,瑞士Roche公司);甲醇(货号:XK13-011,国药集团);乙醇(货号:10009218,国药集团);RNA提取试剂盒(货号:RN03,艾德莱生物技术有限公司);逆转录试剂盒(货号:FSQ-101,日本TOYOBO公司);DNA聚合酶(货号:AP231, TransStart)。

1.3 模型制备

参照文献[15]复制高脂血症模型,高脂饲料具体配方为:1%胆固醇、10%蛋黄粉、5%猪油、84%基础饲料。每兔总食量为120 g,单笼饲养。模型组、隔药饼灸组、阿托伐他汀组为模型制备组。8周后,兔耳中动脉取血,当模型制备组TC值高于正常组TC值3倍以上,且TG和LDL-C与正常组比较升高($P < 0.05$),则判断模型成立^[15]。

1.4 治疗方法

造模结束后,正常组新西兰兔继续予以正常饮食喂养,模型组、隔药饼灸组、阿托伐他汀组继续予以高脂饮食喂养。隔药饼灸组给予隔药饼灸干预,阿托伐他汀组予以阿托伐他汀钙片干预,均每天1次,

1周干预6天休息1天,连续干预8周。

1.4.1 隔药饼灸组 模型制备完成后,固定新西兰兔于兔台,量取穴位后,使用宠物电推剪将穴位处毛发剔除,将中药大黄、泽泻、山楂、丹参、郁金各等分粉碎为沫,并以醋调匀,制成直径为1 cm、厚度为3 mm的降脂药饼,放于穴位处,将艾炷放在药饼上施灸,燃完后易壮再灸,每穴4壮,每天1次, I组、II组穴位交替施灸,持续时间为8周。参考余曙光、徐斌主编的《实验针灸学》(人民卫生出版社,2016年第2版)及拟人比照法制定进行新西兰兔穴位定位, I组穴位为巨阙、天枢、丰隆, II组穴位为心俞、肝俞、脾俞。

1.4.2 阿托伐他汀组 模型制备完成后,将阿托伐他汀钙片磨成细粉($1.96 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$),拌入阿托伐他汀组第一口饲料,待其食完后再补充普通饲料,连续喂养8周。

1.4.3 其他 正常组、模型组、阿托伐他汀组在同等条件下捆绑固定,但不予隔药饼灸治疗。

1.5 实验指标及检测方法

1.5.1 血脂检测 造模结束后行耳中动脉采血,治疗结束后行腹主动脉采血,普通采血管静置2 h后3000 r/min(半径4 cm)离心15 min,按试剂盒说明书检测兔血清TC、LDL-C、TG含量。使用Rayto-Chemray120全自动生化仪检测兔血清血脂含量,并在检测前进行仪器调试、参数设置、定标、质控等操作。

1.5.2 RT-PCR法检测肝组织Wnt1、 β -catenin、散乱蛋白-1(dishevelled-1, dvl-1)、固醇调节元件结合蛋白1c(sterol regulatory element-binding protein1c, SREBP1c)的mRNA表达量 治疗结束后,所有新西兰兔均进行麻醉,取肝组织约100 mg,加液氮研磨;用1 mL Trizol室温裂解5 min,4 $^{\circ}\text{C}$ 、1 2000 r/min(半径8 cm)离心10 min;取上清液,每1 mL裂解液加0.2 mL氯仿,震荡15 s,室温孵育3 min,于4 $^{\circ}\text{C}$ 、1 2000 r/min(半径8 cm)离心10 min,样品分3层,取最上层,记录水相体积;加水相体积一半的乙醇,混匀转移到吸附柱,1 2000 r/min(半径8 cm)离心45 s;加500 μL 去蛋白液1 2000 r/min(半径8 cm)离心45 s,加500 μL 漂洗液洗两次,1 2000 r/min(半径8 cm)离心45 s;用100 μL 水洗脱RNA,微量酶标仪测定RNA浓度,进行RNA逆转录,RT-PCR上机检测。 β -actin为内参基因,参考Genbank核苷酸序列资料,mRNA检测的探针情况见表1。

表1 引物信息表

基因名称	下游引物序列(5'→3')	上游引物序列(5'→3')	产物长度 /bp
Wnt1	GAGGTGATTGCGAAGATAAACG	GAAACCGCCGCTGGAACCT	103
β-catenin	CAATGGGAGAATAAAGCAAC	TCCGCATGGAGGAGATAG	132
dvl-1	CATGTGCGCTGGCTCAAT	TCACCGACTCTACCATGTCC	182
SREBP1c	GGATGGCACTGGCTCGTT	CCCAGCATAACCGCAAGGT	176
β-actin	AAAACGCAGCTCAGTAAACAGTC	CTGGCTCTAGCACCATGAA	180

1.5.3 油红 O 染色观察肝组织脂质沉积 (1)切片:4℃解冻样本,用手术刀修剪目标组织,切片用包埋剂包埋,将包埋台固定在切片机上,先对组织表面进行粗切,待组织面修切平整后开始切片,切片厚度 5~8 μm,在切取的组织切片上放置一块干净的载玻片。切片做好标记后,-20℃保存。(2)实验步骤:冰冻切片干燥 30 min 后,用 4%中性甲醛固定液在 4℃条件下固定 10 min。蒸馏水冲洗,60%异丙醇浸泡,用油红 O 染色 10 min(加盖避光)。60%异丙醇将间质分化清晰,蒸馏水洗涤。苏木精染色 3~5 min,用蒸馏水冲洗 3 min,用甘油明胶密封,最后使用显微镜观察染色结果。

1.6 统计学方法

所有数据均使用 SPSS 21.0 软件进行统计学分析。计量资料符合正态分布者,以“ $\bar{x}\pm s$ ”表示,多组间比较采用 *One-Way ANOVA* 法,进行方差齐性检验,方差齐时两两比较选择 *LSD* 法,方差不齐时选择 *Games-Howell* 法。计量资料不满足正态分布时,以“*M(IQR)*”表示,多组间选择非参数秩和检验—*K* 个独立样本 *Kruskal Wallis* 检验,组间差异有统计学意义时,行多重比较。均以 $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

RT-PCR 图片采用 ImageJ 软件进行灰度分析,数据结果与相应的内参进行对比,通过均一化处理(每组数据都与相对对照组相比)进行数据标准化;通路指标统计学方法为多组 *One-way ANOVA* 法。均以 $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 一般情况

实验期间,正常组精神状态良好,动作灵敏,毛色光泽,大小便状况无明显变化;模型组体质量增长较快,动作迟缓,目光迟钝,毛色黯淡。各治疗组精神状态尚可,反应一般。造模期间,正常组因腹泻死亡 1 只,隔药饼灸组因抽血骨折感染死亡 1 只,阿托伐他汀组因腹泻死亡 2 只;干预期间,模型组因腹泻、

体表脂肪瘤溃破各死亡 1 只,隔药饼灸组捆绑固定引发感染死亡 2 只。

2.2 模型评价

造模 8 周后,与正常组比较,模型组、隔药饼灸组、阿托伐他汀组血清 TC、TG、LDL-C 含量均明显升高($P<0.001$, $P<0.01$),TC 含量高于正常组 3 倍以上,TG、LDL-C 水平升高($P<0.01$),提示模型制备成功。造模各组间差异无统计学意义($P>0.05$)。详见表 2。

表2 造模后各组兔血脂水平比较($\bar{x}\pm s$, mmol/L)

分组	n	TC	TG	LDL-C
正常组	11	2.056±1.075	0.596±0.544	1.546±1.371
模型组	12	21.810±2.074***	5.425±2.160***	13.036±1.902***
隔药饼灸组	11	21.581±3.730***	3.727±2.154**	16.557±4.420***
阿托伐他汀组	10	21.860±4.810***	4.016±2.408**	12.677±1.865***

注:与正常组比较,*** $P<0.001$,** $P<0.01$ 。

2.3 各组兔血脂结果比较

与正常组比较,模型组 TC、TG、LDL-C 含量均明显上升($P<0.001$);隔药饼灸组、阿托伐他汀组 TC、LDL-C 含量均上升($P<0.01$, $P<0.001$),TG 含量变化差异无统计学意义($P>0.05$)。与模型组相比,隔药饼灸组、阿托伐他汀组 TC、TG、LDL-C 含量下降($P<0.05$, $P<0.01$, $P<0.001$)。隔药饼灸组与阿托伐他汀组血清 TC、TG、LDL-C 含量比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。详见表 3。

表3 各组兔血脂结果比较($\bar{x}\pm s$, mmol/L)

分组	n	TC	TG	LDL-C
正常组	11	1.847±0.914	0.566±0.228	1.568±1.569
模型组	12	21.854±2.178***	5.877±2.172***	13.564±1.380***
隔药饼灸组	11	6.503±2.646***	0.360±0.174 ^{###}	6.674±3.389***
阿托伐他汀组	10	8.539±5.685***	0.523±0.328 ^{###}	7.396±5.247***

注:与正常组比较,*** $P<0.001$,** $P<0.01$;与模型组比较,^{###} $P<0.001$,^{##} $P<0.01$,[#] $P<0.05$ 。

2.4 各组兔肝组织 Wnt1、β-catenin、dvl-1、SREBP1c 的 mRNA 表达量比较

与正常组比较,模型组肝组织 Wnt1、β-catenin、

表 4 各组兔肝组织 Wnt1、 β -catenin、dvl-1、SREBP1c 的 mRNA 表达量($\bar{x}\pm s$)

分组	n	Wnt1	β -catenin	dvl-1	SREBP1c
正常组	11	1.000±0.398	1.000±0.604	1.000±0.443	1.000±0.263
模型组	10	2.773±0.202***	4.561±1.050***	2.658±0.286***	2.518±0.247***
隔药饼灸组	9	1.723±0.169 ^{##}	2.095±0.636 ^{##}	1.803±0.255 ^{##}	1.742±0.201 ^{##}
阿托伐他汀组	10	1.148±0.416 ^{##}	2.004±0.708 ^{##}	1.730±0.031 ^{##}	1.771±0.092 ^{##}

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

dvl-1、SREBP1c 的 mRNA 表达量上升($P<0.001$);与模型组比较,隔药饼灸组、阿托伐他汀组上述指标表达量明显下降($P<0.01$, $P<0.001$);与隔药饼灸组比较,阿托伐他汀组上述指标表达差异无统计学意义($P>0.05$)。详见表 4、图 1。

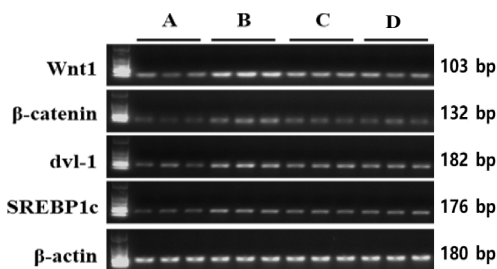


图 1 各组兔肝脏组织 Wnt1、 β -catenin、dvl-1、SREBP1c 的 mRNA 表达量 RT-PCR 检测结果

注:A.正常组;B.模型组;C.隔药饼灸组;D.阿托伐他汀组。

2.5 各组兔肝组织脂质沉积

脂质沉积结果如图 2 所示,与正常组相比,模型组、隔药饼灸组、阿托伐他汀组脂质沉积均有增加,模型组增加更明显;与模型组相比,隔药饼灸组、阿托伐他汀组脂质沉积明显减少;隔药饼灸组与阿托伐他汀组无明显差异。

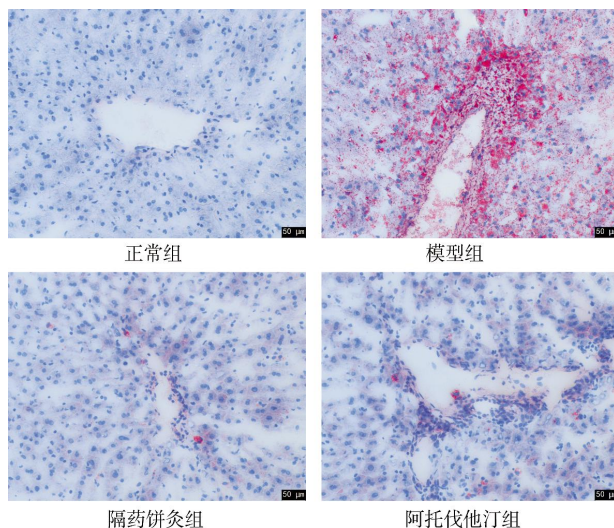


图 2 各组兔肝组织脂质沉积结果(油红 O 染色,×200)

注:蓝色为细胞核,橘红色为脂滴。

3 讨论

中医学并无“高脂血症”的记载,将其归属于中医“膏脂”“痰浊”“血浊”“脂浊”等范畴,并认为膏脂源于水谷,属于津液,存于血中,与血互为化生^[16-17]。高脂血症的中医发病机制主要为“本虚标实”,以气、血、阴、阳亏虚为本,以痰浊、血瘀为标;其病理因素主要为痰、瘀、虚,致病脏腑主要涉及肝、脾、肾^[18-20]。隔药饼灸是一种将艾灸与药物相结合的间接灸疗法。艾灸具有温通温补的效应,通可通经活络、活血化瘀、破血化痰,补可温阳补虚、益气固脱、升阳举陷^[21]。药饼所选择药物为丹参、山楂、泽泻、郁金、大黄,诸药配伍可起到活血化瘀、化浊降脂之效。施灸穴位为心俞、巨阙、脾俞、肝俞、丰隆,俞募配穴与辨证选穴相结合,共奏活血祛瘀、健脾化痰之效。隔药饼灸协同艾灸、药物、穴位三者效应,针对高脂血症的病因病机,发挥补虚、化痰、祛瘀的作用,补虚泻实、标本兼治,从而发挥降血脂的效应。

血脂实验结果显示,经隔药饼灸干预后,与模型组相比,隔药饼灸组 TC、TG、LDL-C 均有明显下降,说明隔药饼灸能明显改善高脂血症兔的血脂水平;与阿托伐他汀组相比,隔药饼灸组的血脂水平差异无统计学意义,说明隔药饼灸的降脂效应与阿托伐他汀相当,但同正常组相比,血脂水平仍均有差异,其结果可能与实验造模后血脂水平上升程度大,隔药饼灸干预时间有限,尚未达到降脂的最佳效应有关。

Wnt 信号通路参与脂质生成的过程,并与高脂血症有紧密联系^[22-23]。Wnt1 蛋白是 Wnt/ β -catenin 通路的重要活化蛋白,与卷曲蛋白及相关受体蛋白结合成复合体,通过激活 dvl-1,抑制破坏复合物的磷酸化,减少其对 β -catenin 的磷酸化及降解,使 β -catenin 含量增加,与相关受体结合,从而激活 Wnt/ β -catenin 信号通路^[24-25]。 β -catenin 是经典 Wnt 通路中的核心因子,介导 Wnt 信号从细胞膜至细胞质进

核的传递^[26],dvl-1的主要作用是抑制 β -catenin的降解,从而促进Wnt信号通路的激活,它可能存在细胞核内、细胞质或者细胞膜上,是Wnt信号通路的一个重要环节^[6,23]。

有研究表明,Wnt/ β -catenin通过特异性蛋白1(specificity protein 1, Sp1)-胰岛素样生长因子1(insulin-like growth factor 1, IGF1)通路,调节哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin, mTOR)通路的营养-敏感机械目标,导致SREBP1c表达增加,从而使脂肪生成途径增强^[25-28]。SREBP1c是脂质代谢的重要调控因子,对于维持脂代谢稳态有重要意义,尤其在肝脏和脂肪组织中,它能调控脂肪酸、TG和TC的合成,参与LDL-C代谢相关基因表达,上调脂肪合成基因表达,可明显增加游离脂肪酸、TC及LDL的合成^[29-32]。据报道,转人源nSREBP1c转基因小鼠的肝重及TG含量均显著升高^[6,31]。

Wnt/ β -catenin信号通路及相关指标结果显示,与正常组相比,模型组Wnt1、 β -catenin、dvl-1、SREBP1c的mRNA表达明显升高。与模型组相比,隔药饼灸组、阿托伐他汀组Wnt1、 β -catenin、dvl-1、SREBP1c的mRNA表达明显下降。经高脂饮食造模后,高脂血症模型肝组织Wnt1 mRNA表达升高,从而激活下游的dvl蛋白,减少 β -catenin的磷酸化,使 β -catenin表达增加,此时Wnt/ β -catenin信号通路处于激活状态,上调其下游SREBP1c蛋白的表达,使脂肪生成途径增强,血脂水平上升^[22-23,33-34],故Wnt/ β -catenin通路在脂肪细胞生成中具有重要作用^[35-36]。治疗后Wnt/ β -catenin信号通路处于抑制状态,SREBP1c蛋白表达降低,肝组织脂质沉积减少,从而起到调脂作用^[35,37-38]。阿托伐他汀钙片可以通过抑制Wnt/ β -catenin信号通路,从而改善大鼠非酒精性脂肪性肝病的肝脏损伤程度^[38]。人参皂苷Rg1也可通过抑制Wnt/ β -catenin信号通路,抑制高脂膳食诱导的小鼠非酒精性脂肪性肝病肝纤维化的进程^[28]。本研究显示,隔药饼灸组Wnt1、 β -catenin、dvl-1、SREBP1c的mRNA表达量与阿托伐他汀组相比差异无统计学意义,说明隔药饼灸与阿托伐他汀钙片对Wnt/ β -catenin信号通路的抑制作用大致相同,这也许是二者发挥调脂作用的共同机制之一。本研究初步检测了Wnt1、 β -catenin、dvl-1、SREBP1c的mRNA表达量,将在接下来的实验研究进行蛋白含量检测,为

研究隔药饼灸对Wnt/ β -catenin信号通路的影响提供更有力有力的证据。

综上所述,隔药饼灸与阿托伐他汀钙片可能通过抑制Wnt/ β -catenin信号通路,下调SREBP1c的mRNA表达,减少脂质合成,发挥调脂作用。包括阿托伐他汀钙片在内的他汀类药物是目前使用范围最为广泛的降脂药物,其降脂效果明显,但是他汀类降脂药物有横纹肌溶解、血转氨酶和肌酸激酶水平升高、胃肠道症状等毒副作用^[39]。隔药饼灸是结合艾灸效应、中药功能、穴位作用的一种安全有效、简单易行的中医外治法,其降脂效应与阿托伐他汀钙片相当,操作简便且毒副作用少,值得临床应用与推广。

参考文献

- [1] 中国成人高脂血症防治指南修订联合委员会. 中国成人高脂血症防治指南(2016年修订版)[J]. 中国循环杂志, 2016, 31(10): 937-953.
- [2] 段锐, 刘明春, 王瑜, 等. 中老年非酒精性脂肪肝患者肝脏声像图特征及其与血脂的相关性[J]. 西部医学, 2023, 35(2): 272-276.
- [3] BERBERICH A J, HEGELE R A. A modern approach to dyslipidemia[J]. Endocrine Reviews, 2022, 43(4): 611-653.
- [4] 杨涛铎, 陈观源, 陈序, 等. Wnt/ β -catenin信号通路与肝癌[J]. 中国生物工程杂志, 2023, 43(4): 59-70.
- [5] ALTSHULER-KEYLIN S, SHINODA K, HASEGAWA Y, et al. Beige adipocyte maintenance is regulated by autophagy-induced mitochondrial clearance[J]. Cell Metabolism, 2016, 24(3): 402-419.
- [6] PERUGORRIA M J, OLAIZOLA P, LABIANO I, et al. Wnt- β -catenin signalling in liver development, health and disease[J]. Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology, 2019, 16(2): 121-136.
- [7] TEICHROEB J H, KIM J, BETTS D H. The role of telomeres and telomerase reverse transcriptase isoforms in pluripotency induction and maintenance[J]. RNA Biology, 2016, 13(8): 707-719.
- [8] SATO T, VRIES R G, SNIPPERT H J, et al. Single Lgr5 stem cells build crypt-villus structures in vitro without a mesenchymal niche[J]. Nature, 2009, 459(7244): 262-265.
- [9] CHOI O M, CHO Y H, CHOI S, et al. The small molecule indirubin-3'-oxime activates Wnt/ β -catenin signaling and inhibits adipocyte differentiation and obesity[J]. International Journal of Obesity, 2014, 38(8): 1044-1052.
- [10] HE S Q, XIONG Z X, LI L X, et al. Lotus seed resistant starch ameliorates high-fat diet induced hyperlipidemia by fatty acid degradation and glycerolipid metabolism pathways in

- mouse liver[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2022, 215: 79–91.
- [11] 姚路远, 刘云, 杨茜, 等. Wnt2/β-catenin 通路在 C57BL/6 小鼠肝再生修复中的变化[J]. *安徽医科大学学报*, 2023, 58(5): 753–759.
- [12] 邹逸凡. 隔药饼灸对高脂血症患者血液流变学影响的研究[D]. 长沙: 湖南中医药大学, 2018.
- [13] 李丹. 隔药饼灸治疗高脂血症的临床疗效观察[D]. 长沙: 湖南中医药大学, 2018.
- [14] 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.
- [15] 刘未艾, 常小荣, 刘密, 等. 隔药饼灸对动脉粥样硬化兔主动脉内皮细胞 PPARγ 蛋白及斑块中 MMP-9 mRNA 表达的影响[J]. *中华中医药杂志*, 2013, 28(1): 193–197.
- [16] 冯才. 三种他汀类药物在高脂血症兔体内的药动学-药效学相关性研究[D]. 广州: 华南理工大学, 2013.
- [17] 赵钊. 隔药饼灸对高脂血症合并 AS 兔胆固醇逆转运 SR-B1 介导途径及炎症反应的影响[D]. 长沙: 湖南中医药大学, 2016.
- [18] 林晶晶, 王静, 沈涛. 中医药治疗高脂血症研究述评[J]. *四川医学*, 2015(11): 1595–1598.
- [19] 田原, 潘琳琳, 刘桂荣. 中医治疗高脂血症综述[J]. *河南中医*, 2018, 38(9): 1450–1454.
- [20] 马贵萍, 章怡祎. 高脂血症的中医药治疗研究进展[J]. *中西医结合心脑血管病杂志*, 2019, 17(14): 2116–2119.
- [21] 张国山, 刘密, 章海凤, 等. 艾灸温通、温补效应之间的关系[J]. *时珍国医国药*, 2013, 24(10): 2468–2469.
- [22] 贺佳幸. 护心康对 TLR4 基因敲除小鼠高脂血症模型 β-catenin 及 GSK-3β 的影响[D]. 长沙: 湖南中医药大学, 2019.
- [23] 丁小玉. 护心康对 TLR4 基因敲除小鼠高脂血症模型 Wnt-1 及 DVL 的影响[D]. 长沙: 湖南中医药大学, 2019.
- [24] NUSSE R, CLEVERS H. Wnt/β-catenin signaling, disease, and emerging therapeutic modalities[J]. *Cell*, 2017, 169(6): 985–999.
- [25] CHEN N, WANG J Q. Wnt/β-catenin signaling and obesity[J]. *Frontiers in Physiology*, 2018, 9: 792.
- [26] PRESTWICH T C, MACDOUGALD O A. Wnt/beta-catenin signaling in adipogenesis and metabolism[J]. *Current Opinion in Cell Biology*, 2007, 19(6): 612–617.
- [27] BRYJA V, ANDERSSON E R, SCHAMBONY A, et al. The extracellular domain of Lrp5/6 inhibits noncanonical Wnt signaling in vivo[J]. *Molecular Biology of the Cell*, 2009, 20(3): 924–936.
- [28] 马文玲. 中药对实验动物血脂及脂代谢相关因子 SREBP-1c 的干预作用 Meta 分析[D]. 沈阳: 辽宁中医药大学, 2018.
- [29] 付常振, 郑颖, 路遥, 等. SREBP1c-ACCα/FAS 和 SREBP1c-FABP3 轴向调控 HepG2 胞内脂质合成与转运[J]. *生物学杂志*, 2023, 40(2): 9–13, 26.
- [30] MOON Y A. The SCAP/SREBP pathway: A mediator of hepatic steatosis[J]. *Endocrinology and Metabolism*, 2017, 32(1): 6–10.
- [31] FERRÉ P, FOUFELLE F. Hepatic steatosis: A role for de novo lipogenesis and the transcription factor SREBP-1c[J]. *Diabetes, Obesity and Metabolism*, 2010, 12: 83–92.
- [32] 张龚庆, 杨如意. 四味余甘子方对高脂血症大鼠肝脏 SREBP-1c 及 FAS 的干预作用[J]. *中华中医药杂志*, 2022, 37(3): 1698–1703.
- [33] LI X X, HOU L L, CHENG Z P, et al. Overexpression of GAS5 inhibits abnormal activation of Wnt/β-catenin signaling pathway in myocardial tissues of rats with coronary artery disease[J]. *Journal of Cellular Physiology*, 2019, 234(7): 11348–11359.
- [34] EL-DERANY M O, EL-DEMERDASH E. Pyruvium pamoate attenuates non-alcoholic steatohepatitis: Insight on hedgehog/gli and Wnt/β-catenin signaling crosstalk[J]. *Biochemical Pharmacology*, 2020, 177: 113942.
- [35] GO G W, SRIVASTAVA R, HERNANDEZ-ONO A, et al. The combined hyperlipidemia caused by impaired Wnt-LRP6 signaling is reversed by Wnt3a rescue[J]. *Cell Metabolism*, 2014, 19(2): 209–220.
- [36] JEON M, RAHMAN N, KIM Y S. Wnt/β-catenin signaling plays a distinct role in methyl gallate-mediated inhibition of adipogenesis[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2016, 479(1): 22–27.
- [37] 田卫东. Wnt/β-Catenin 信号通路在非酒精性脂肪肝病中的作用及阿托伐他汀的干预效果[J]. *中国药业*, 2016, 25(4): 51–54.
- [38] 贺微微, 杨仁国, 罗婷婷. 人参皂苷 Rg1 对非酒精性脂肪肝病小鼠肝纤维化的作用[J]. *中药材*, 2021, 44(5): 1206–1210.
- [39] 安冬青, 吴宗贵. 动脉粥样硬化中西医结合诊疗专家共识[J]. *中国全科医学*, 2017, 20(5): 507–511.

(本文编辑 匡静之)