· 基础研究 ·

定心方Ⅲ号方调控 JAK2/STAT3 通路对肥胖小鼠脂肪炎症的影响

张丽芳[1]　胡　芳[1]　程赛博[1]　刘晓瑜[2]　何培坤[1]　朱严欣[1]　李钊泳[1]　贾钰华[1]

摘要　目的　探讨定心方Ⅲ号方（DXR Ⅲ）调控蛋白质酪氨酸激酶 2（JAK2）/ 信号转导和转录激活因子 3（STAT3）信号通路对肥胖小鼠脂肪组织慢性炎症的影响。**方法**　32 只 8 周龄雄性 ApoE$^{-/-}$ 小鼠按随机数字表法分为模型组，DXR Ⅲ低、中、高剂量组，每组 8 只，另取 8 只同龄 C57BL/6J 雄性小鼠作为正常组。ApoE$^{-/-}$ 小鼠连续喂食西方饮食饲料 12 周建立肥胖模型后，DXR Ⅲ低、中、高剂量组分别予 6.5、13、26 g/kg DXR Ⅲ中药煎剂灌胃，正常组和模型组以等量生理盐水灌胃。各组均每天给药 1 次，连续给药 12 周。每周测量小鼠体重。干预结束后，取小鼠内脏脂肪组织称重并计算内脏脂肪指数；采用生化法检测小鼠血清 TC、TG、LDL-C、HDL-C 水平；HE 染色观察小鼠内脏脂肪组织病理学变化；IL-1β 免疫组化染色分析内脏脂肪组织炎症浸润程度；RT-PCR 检测脂肪组织炎症因子 IL-1β、IL-6、肿瘤坏死因子 -α（TNF-α）、单核细胞趋化蛋白 -1（MCP-1）mRNA 表达，巨噬细胞极化标志物诱导型一氧化氮合酶（iNOS）和精氨酸酶 -1（Arg-1）mRNA 表达；Western Blot 检测小鼠脂肪组织 JAK2、磷酸化 JAK2（p-JAK2）、STAT3、磷酸化 STAT3（p-STAT3）、iNOS、Arg-1 蛋白表达。**结果**　与正常组比较，模型组小鼠体重、体重增加值、内脏脂肪重量、内脏脂肪指数与血清中 TC、TG、LDL-C、HDL-C 水平均升高（P<0.05，P<0.01），HE 染色显示脂肪细胞肥大，免疫组化染色显示 IL-1β 水平上调，脂肪组织中 IL-1β、IL-6、TNF-α、MCP-1、iNOS mRNA 表达增加，iNOS 蛋白、JAK2、STAT3 蛋白磷酸化水平亦增加（P<0.05，P<0.01），Arg-1 mRNA 及蛋白表达降低（P<0.05）；与模型组比较，DXR Ⅲ各剂量组小鼠体重增加值、内脏脂肪重量、内脏脂肪指数与血清中 TC、LDL-C 水平均下降（P<0.05，P<0.01），HE 染色显示脂肪细胞变小，免疫组化染色显示 IL-1β 水平下调；DXR Ⅲ低、中剂量组小鼠血清 TG 水平下降（P<0.05），脂肪组织 IL-1β、IL-6、iNOS mRNA 表达下降，iNOS 蛋白、JAK2、STAT3 蛋白磷酸化水平亦下降（P<0.05，P<0.01），Arg-1 mRNA 及蛋白表达增加（P<0.05，P<0.01）；DXR Ⅲ高剂量组小鼠血清 HDL-C 水平上升（P<0.01），脂肪组织 MCP-1 mRNA 表达及 JAK2、STAT3 蛋白磷酸化水平均下降（P<0.05，P<0.01）。**结论**　DXR Ⅲ可减轻内脏脂肪组织慢性炎症，作用机制可能与其抑制 JAK2 / STAT3 信号通路，改善巨噬细胞极化失衡相关。

关键词　定心方Ⅲ号方；脂肪组织炎症；巨噬细胞极化；蛋白质酪氨酸激酶 2；信号转导和转录激活因子 3

Dingxin Recipe Ⅲ Attenuates Inflammation of Adipose Tissue in Obese Mice by Regulating JAK2/STAT3 Pathway

ZHANG Li-fang[1], HU Fang[1], CHENG Sai-bo[1], LIU Xiao-yu[2], HE Pei-kun[1], ZHU Yan-xin[1], LI Zhao-yong[1], and JIA Yu-hua[1]　*1 School of Traditional Chinese Medicine, Southern Medical University, Guangzhou (510515); 2 Department of Traditional Chinese Medicine, Pingshan General Hospital of Southern Medical University, Guangdong (518118)*

ABSTRACT　Objective　To explore the effect of Dingxin Recipe Ⅲ (DXR Ⅲ) on chronic inflammation of adipose tissue in obese mice by regulating the Janus protein tyrosine protein kinase 2 (JAK2) / signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) signaling pathway. **Methods**　Thirty-two 8-week-old male

基金项目：国家自然科学基金资助项目（No. 81973802，No. 82174299）；广东省自然科学基金资助项目（No. 2021A1515011603）

作者单位：1. 南方医科大学中医药学院（广州 510515）；2. 南方医科大学坪山总医院中医科（广东 518118）

通讯作者：贾钰华，Tel：020-61648520，E-mail：jyh@smu.edu.cn

DOI：10.7661/j.cjim.20220406. 043

中国中西医结合杂志

ApoE$^{-/-}$ mice were divided into the model group，low，medium，high dose DXR Ⅲ groups by random digit table，with 8 in each group，and another 8 C57BL/6J male mice of the same age were recruited as normal group. ApoE$^{-/-}$ mice were fed with Western diet for 12 weeks to establish the obesity model. Mice in the low，medium，high dose DXR Ⅲ groups were administered with 6.5，13 and 26 g · kg^{-1} DXR Ⅲ respectively and equal volume of distilled water were administered to mice in the model and normal group. All the above groups were administered once a day for consecutive 12 weeks. Monitor the body weight of the mice weekly. After the intervention，all visceral adipose tissue were carefully collected and calculated the visceral adipose tissue index. Serum TC，TG，LDL-C and HDL-C levels were measured with the method of biochemical kits. HE staining was used to observe the histopathology of the visceral adipose tissue. IL-1β immunohistochemistry was performed to evaluate the degree of inflammatory infiltration. The IL-1β，IL-6，TNF-α，monocyte chemoattractant protein-1（MCP-1），inducible nitric oxide synthase（iNOS）and arginase-1（Arg-1）mRNA expression were detected by RT-PCR. Protein levels of iNOS，Arg-1，JAK2，p-JAK2，STAT3 and p-STAT3 were assessed by Western Blot. **Results** Compared with the normal group，the body weight，weight gain，the weight of viceral adipose tissue，visceral adipose tissue index，and the serum levels of TC，TG，LDL-C and HDL-C increased（P<0.05，P<0.01），HE staining showed adipocyte hypertrophy，immunohistochemical staining showed the level of IL-1β increased，the mRNA expressions of IL-1β，IL-6，TNF-α，MCP-1，iNOS increased，protein level of iNOS and the phosphorylation of JAK2 and STAT3 also increased（P<0.05，P<0.01），while Arg-1 mRNA and protein decreased（P<0.05）in model group. Compared with the model group，the weight gain，the weight of viceral adipose tissue，visceral adipose tissue index and the serum levels of TC and LDL-C decreased（P<0.05，P<0.01），HE staining showed adipocytes became smaller，immunohistochemical staining showed the level of IL-1β decreased in each DXR Ⅲ group. In low and medium dose DXR Ⅲ groups，the serum level of TG decreased（P<0.05），mRNA expressions of IL-1β，IL-6，iNOS decreased，protein levels of iNOS and the phosphorylation of JAK2 and STAT3 also decreased（P<0.05，P<0.01），while Arg-1 mRNA and protein increased（P<0.05，P<0.01）. In high dose DXR Ⅲ group，the serum level of HDL-C increased（P<0.01），the mRNA expression of MCP-1 and the phosphorylation of JAK2 and STAT3 decreased（P<0.05）. **Conclusion** DXR Ⅲ could attenuate chronic inflammation of visceral adipose tissue，and the potential mechanism is closely related to the improvement of polarization imbalance of macrophages regulated by JAK2/STAT3 signaling pathway.

KEYWORDS Dingxin Recipe Ⅲ；adipose tissue inflammation；macrophage polarization；Janus protein tyrosine protein kinase 2；signal transducer and activator of transcription 3

随着生活方式的改变和饮食营养的增加，全球肥胖人数逐年增加，据估计，到 2030 年，全球近 60% 的成年人口（约 33 亿人）将肥胖或超重[1]。肥胖会增加动脉粥样硬化[2]、2 型糖尿病[3，4]、非酒精性脂肪肝[4]等多种代谢性疾病的患病率。肥胖及其所引起的代谢综合征与脂肪组织慢性炎症密切相关[5，6]，巨噬细胞作为炎症的主要调节因子，具有高度的可塑性，在不同病理状态下可极化为促炎 M1 型和抗炎 M2 型。在肥胖进程中，巨噬细胞由 M2 型极化成 M1 型，加重脂肪组织慢性炎症[7]。蛋白质酪氨酸激酶（Janus protein tyrosine protein kinase，JAK）/ 信号转导和转录激活因子（signal transducer and activator of transcription，STAT）信号通路可在多种细胞因子刺激下激活，启动下游靶基因，进而在细胞增殖、分化、损伤、氧化应激、炎症反应、凋亡及免疫调节中发挥重要调控作用。研究发现 JAK2/STAT3 参与调控巨噬细胞极化和炎症反应[8]。

定心方Ⅲ号方（DXR Ⅲ）是南方医院中医科的经验方[9]，适用于以糖脂代谢异常为主要病理特征的冠心病、动脉粥样硬化、非酒精性脂肪肝等疾病。DXR Ⅲ以栀子、黄连为君药，清热泻火解毒；配以虎杖、决明子加强清热泻火功效，辅以丹参、三七活血祛瘀，四药合而为臣，以配合君药更好地发挥清热解毒，活血化瘀作用；栝楼宽胸理气为佐药；赤芍凉血柔肝而调和诸药为使药。全方诸药合而共奏清热解毒，活血祛瘀，清热凉血，利湿去浊之功效。本课题组前期研究发现 DXR Ⅲ有效成分黄连素[10]、三七皂苷[11]、栀子苷[12，13]等可通过多靶点调控机体炎症反应。本实验观察 DXR Ⅲ对西方饮食诱导的肥胖模型小鼠 JAK2/STAT3 信号通路、巨噬细胞极化和炎症相

关指标变化，探讨 DXR Ⅲ改善脂肪组织慢性炎症的机制，为肥胖及肥胖相关代谢性疾病的临床治疗提供理论依据。

材料与方法

1　动物　SPF 级 8 周龄雄性 ApoE 基因敲除（$ApoE^{-/-}$）小鼠 32 只，体重（20 ± 2）g，购自赛业模式生物研究中心（太仓）有限公司，生产许可证号：SYXK（粤）2016-0167，另取 8 只同周龄 SPF 级 C57BL/6J 雄性小鼠作为正常组，小鼠饲养于 SPF 级动物房，恒温恒湿，自由饮水和进食，3 天更换 1 次垫料。西方饮食饲料（蛋白 15.5 %、碳水化合物 42.5 %、脂肪 42 %，能量 4.7 kcal/g）和普通饲料均由广东省医学实验动物中心提供，许可证号：SCXK（粤）2013-0002。本实验通过南方医科大学实验动物伦理审查（No. L2020054）。

2　药物　DXR Ⅲ（组成：栀子 10 g　黄连 10 g　虎杖 15 g　决明子 15 g　丹参 20 g　三七 10 g　全栝楼 10 g　赤芍 10 g）中药饮片均购自南方医院中药房，并经南方医科大学中医药学院药用植物学与中药鉴定学教研室晁志教授鉴定。中药水煎浓缩为含生药量 2.5 g/mL，4 ℃保存，备用。

3　主要试剂及仪器　TC、TG、LDL-C、HDL-C 测定试剂盒：批号：20201212、20200912、20210312、20210612，上海科华生物工程股份有限公司；Trizol：批号：ET101-01，北京全式金生物技术股份有限公司；逆转录试剂盒与 SYBR Green qPCR 试剂盒：批号：AG11711、AG11701，艾瑞科生物；兔多克隆抗体 p-JAK2：批号：WL02997，沈阳万类生物科技有限公司；兔多克隆抗体 STAT3、兔多克隆抗体诱导型一氧化氮合酶（inducible nitric oxide synthase，iNOS）、兔多克隆抗体精氨酸酶 -1（arginase-1，Arg-1）：批号：10252-2-AP、18985-1-AP、16001-1-AP，美国 Proteintech 公司；兔多克隆抗体 p-STAT3：批号：9145S，美国 Cell Signaling Technology 公司；兔多克隆抗体 IL-1β：批号：bs-6319R，北京博奥森生物技术有限公司；兔多克隆抗体蛋白质酪氨酸激酶 2（tyrosine-protein kinase Janus 2，JAK2）、兔单克隆抗体 GAPDH、HRP 标记的山羊抗兔 IgG：批号：GB11325、GB11002、GB23303，武汉谷歌生物科技有限公司；BCA 蛋白浓度测定试剂盒：批号：SJ256263，上海碧云天生物技术有限公司；ECL 发光液、PVDF 膜：批号：1705102、IPVH00010，美国 MiLlipore 公司。KZ-Ⅱ型高速组织研磨仪（武汉谷歌生物科技有限公司）；全波长酶标仪（美国 Thermo Electron 公司）；化学发光凝胶成像系统（型号：ChemiDox XRS，美国伯乐公司）；罗氏实时定量 PCR 仪（瑞士 Roche 公司）。

4　动物造模及干预方法　32 只 $ApoE^{-/-}$ 小鼠按随机数字表法分为模型组，DXR Ⅲ低、中、高剂量组，每组 8 只，另取 8 只 C57BL/6J 雄性小鼠作为正常组。适应性喂养 1 周后，正常组继续以普通饲料饲养，其他各组以西方饮食饲料喂养 12 周建立肥胖模型。12 周后，检测各组小鼠体重，以模型组和 DXR Ⅲ各剂量组小鼠体重大于正常组小鼠体重的 20 % 为肥胖模型构建成功的标准[14]，本研究通过 12 周高脂膳食后，32 只 $ApoE^{-/-}$ 小鼠体重均达到肥胖标准，最终各组用于后续干预研究的样本量为 8 只。模型构建成功后，DXR Ⅲ各组给药剂量参照《药理实验方法学》[15]中不同实验动物与人的等效剂量比值标准进行换算，DXR Ⅲ低、中、高剂量组分别予 6.5、13、26 g/kg DXR Ⅲ中药煎剂（分别相当于成人临床等效剂量的 4.55、9.1、18.2 倍），正常组和模型组以等量生理盐水灌胃。各组均每天给药 1 次，连续 12 周。

5　取材方法　药物干预后，实验前 12 h 禁食不禁水，1 % 戊巴比妥钠（0.1 mL/20 g）腹腔注射麻醉，取血并收集新鲜内脏脂肪组织（附睾及肾周脂肪）称重记录，部分内脏脂肪组织冻存于 -80 ℃冰箱用于 Western Blot 和实时荧光定量 PCR（reverse transcription-polymerase chain reaction，RT-PCR）实验，部分投入脂肪组织专用固定液中用于后续切片制作进行 HE 染色和免疫组化染色。

6　检测指标及方法

6.1　小鼠体重、内脏脂肪重量及内脏脂肪指数检测　每周称量并记录小鼠体重。处死小鼠后，收集内脏脂肪组织称重，并计算内脏脂肪指数 [内脏脂肪指数（%）= 内脏脂肪重量 / 体重 × 100%]。

6.2　小鼠血清 TC、TG、LDL-C、HDL-C 水平检测　取血后静置 30 min，待血凝后，3 000 r/min 离心 10 min 提取血清，按照试剂盒说明书检测血清中 TC、TG、LDL-C、HDL-C 水平。

6.3　脂肪组织病理学观察　石蜡包埋的内脏脂肪组织间断均匀切片，切片厚度为 4 μm。切片经脱蜡复水后，苏木素染 10 min，1% 盐酸酒精分化 10 s，流水冲洗 10 min，伊红染 3 min，梯度酒精脱水，二甲苯透明，中性树胶封片，显微镜下观察脂肪细胞的大小、形状、排列，并用 Image J 软件计算各组脂肪细胞平均面积。

6.4 免疫组化检测内脏脂肪组织 IL-1β 表达 石蜡包埋的内脏脂肪组织间断均匀切片，切片厚度为 4 μm，切片经脱蜡复水后，用柠檬酸钠行抗原修复，3% H_2O_2 阻断内源性过氧化物酶，5 % BSA 室温封闭 15 min，滴加浓度为 1∶400 的一抗，将切片置于湿盒内 4 ℃孵育过夜，次日室温孵育生物素标记的第二抗体和链霉菌抗生物素 – 过氧化物酶溶液各 10 min，DAB 显色，镜下观察见棕黄色颗粒着色时，立即终止反应。苏木素复染胞核 3 min，脱水，透明，中性树胶封片，显微镜下观察各组小鼠脂肪组织 IL-1β 表达。

6.5 RT-PCR 法检测脂肪组织 IL-1β、IL-6、TNF-α、MCP-1、iNOS、Arg-1 mRNA 表达 使用 Trizol 试剂提取小鼠内脏脂肪组织总 RNA，根据试剂盒说明书将 RNA 逆转录为 cDNA。以 GAPDH 为内参，将获得的 cDNA 按照 RT-PCR 试剂盒说明书进行扩增，反应体系为 20 μL，反应条件如下：95℃，3 min；95℃，5 s；56 ℃，10 s；72℃，25 s；65 ℃，5 s；95 ℃，50 s。共 40 个循环。采用 $2^{-\triangle\triangle Ct}$ 法计算各基因的相对表达量。GAPDH、IL-1β、IL-6、TNF-α、MCP-1、iNOS、Arg-1 引物由生工生物工程（上海）股份有限公司合成，引物序列见表 1。

6.6 Western Blot 法检测脂肪组织 JAK2、p-JAK2、STAT3、p-STAT3、iNOS、Arg-1 蛋白表达 用 RIPA 裂解液提取内脏脂肪组织总蛋白，BCA 蛋白定量试剂盒进行蛋白浓度测定，每孔上样总蛋白 15 μg，电泳及转膜后，用 5 % BSA 室温封闭 2 h，4 ℃孵育一抗过夜，二抗室温孵育 1 h，采用 ECL 化学发光法进行曝光、显影和拍照。将目的蛋白与 GAPDH 灰度值的比值作为目的蛋白的相对表达水平，磷酸化蛋白与总蛋白灰度值的比值作为蛋白磷酸化水平。

7 统计学方法 使用 SPSS 22.0 软件进行数据分析处理，实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示，所有资料均进行正态性检验，符合正态分布者，多组间比较采用单因素方差分析，若方差齐采用 *LSD-t* 检验进行两两比较，若方差不齐则采用 *Dunnett's T3* 检验进行两两比较；不符合正态分布者采用秩和检验。*P*<0.05 为差异有统计学意义。

表 1 RT-PCR 引物序列

引物名称	引物序列（5'→3'）	引物长度（bp）
GAPDH	上游 CAAAGTGGAGATTGTTGCCAT	21
	下游 CCGTTGAATTTGCCGTGA	18
IL-1β	上游 GATAAGGAGCTATCACTTGACC	22
	下游 TCTCATCAGGACAGCCCAG	19
MCP-1	上游 CACTCACCTGCTGCTACTCA	20
	下游 GCTTGGTGACAAAAACTACAGC	22
IL-6	上游 CAGTTGCCTTCTTGGGACTGA	21
	下游 GAAGTCTCCTCTCCGGACTTG	21
TNF-α	上游 TAACTTAGAAAGGGGATTATGGC	23
	下游 TGTCCCAGCATCTTGTGT	18
iNOS	上游 TCCTACACCACACCAAAC	18
	下游 CTCCAATCTCTGCCTATCC	19
Arg-1	上游 CCAGCTTGTCTACTTCAGTCA	21
	下游 CCAGCTTGTCTACTTCAGTCA	21

结 果

1 各组小鼠体重、体重增加值、内脏脂肪重量及内脏脂肪指数比较（表 2） 与正常组比较，模型组小鼠体重、体重增加值、内脏脂肪重量、内脏脂肪指数升高（*P*<0.01）；与模型组比较，DXR Ⅲ各剂量组小鼠体重增加值、内脏脂肪重量、内脏脂肪指数明显下降（*P*<0.01）。

2 各组小鼠血清 TC、TG、LDL-C、HDL-C 水平比较（表 3） 与正常组比较，模型组小鼠血清 TC、TG、LDL-C、HDL-C 水平均升高（*P*<0.05，*P*<0.01）；与模型组比较，DXR Ⅲ低、中剂量组小鼠血清 TC、TG、LDL-C 水平下降（*P*<0.05，*P*<0.01）；DXR Ⅲ高剂量组 TC、LDL-C 水平下降（*P*<0.01），HDL-C 水平升高（*P*<0.01）。

3 各组小鼠脂肪组织 HE 染色及脂肪细胞平均面积统计（图 1，表 4） HE 染色显示：正常组小鼠脂肪细胞排列紧密，细胞大小、形态均一，呈多边形或圆形；与正常组比较，模型组小鼠脂肪细胞肥大，

表 2 各组小鼠体重、体重增加值、内脏脂肪重量及内脏脂肪指数比较 （$\bar{x} \pm s$）

组别	*n*	体重（g）	体重增加值（g）	内脏脂肪重量（g）	内脏脂肪指数（%）
正常	8	31.30 ± 1.89	10.58 ± 1.14	0.89 ± 0.34	3.32 ± 1.47
模型	8	61.02 ± 3.05*	36.18 ± 3.09*	6.50 ± 0.57*	11.59 ± 0.62*
DXR Ⅲ低剂量	8	53.62 ± 4.18	26.66 ± 5.50△	3.58 ± 1.24△	7.18 ± 1.75△
DXR Ⅲ中剂量	8	52.79 ± 7.54	27.58 ± 4.78△	4.03 ± 0.72△	8.21 ± 1.10△
DXR Ⅲ高剂量	8	53.02 ± 4.33	26.40 ± 6.36△	3.62 ± 0.88△	7.52 ± 0.89△

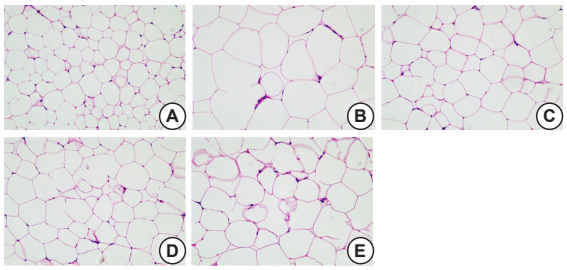
注：与正常组比较，*P<0.01；与模型组比较，△P<0.01

中国中西医结合杂志

表 3　各组小鼠血清 TC、TG、LDL-C、HDL-C 水平比较 （mmol/L，$\bar{x} \pm s$）

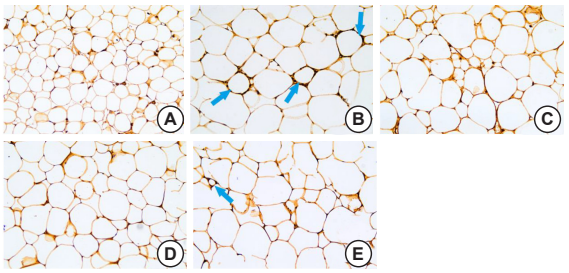
组别	n	TC	TG	LDL-C	HDL-C
正常	8	2.76 ± 0.08	0.72 ± 0.10	0.11 ± 0.02	1.32 ± 0.10
模型	8	47.57 ± 7.62**	1.59 ± 0.30*	14.24 ± 2.52**	1.67 ± 0.39*
DXR Ⅲ低剂量	8	32.12 ± 7.54△△	0.96 ± 0.10△	9.27 ± 2.58△△	1.85 ± 0.36
DXR Ⅲ中剂量	8	26.02 ± 8.05△△	0.84 ± 0.34△	6.84 ± 2.03△△	1.91 ± 0.17
DXR Ⅲ高剂量	8	33.06 ± 9.46△△	0.97 ± 0.26	8.32 ± 2.19△△	2.14 ± 0.13△△

注：与正常组比较，*P<0.05，**P<0.01；与模型组比较，△P<0.05，△△P<0.01



注：A 为正常组；B 为模型组；C 为 DXR Ⅲ低剂量组；D 为 DXR Ⅲ中剂量组；E 为 DXR Ⅲ高剂量组

图 1　各组小鼠脂肪组织病理改变比较 （HE，×200）



注：A 为正常组；B 为模型组；C 为 DXR Ⅲ低剂量组；D 为 DXR Ⅲ中剂量组；E 为 DXR Ⅲ高剂量组；箭头所指为花冠样结构

图 2　各组小鼠脂肪组织 IL-1β 水平比较 （IHC，×200）

表 4　各组小鼠脂肪细胞平均面积比较（μm^2，$\bar{x} \pm s$）

组别	n	脂肪细胞平均面积
正常	8	2426.65 ± 301.19
模型	8	8126.93 ± 321.86*
DXR Ⅲ低剂量	8	4775.81 ± 711.38△
DXR Ⅲ中剂量	8	4554.65 ± 284.25△
DXR Ⅲ高剂量	8	4835.78 ± 331.75△

注：与正常组比较，*P<0.01；与模型组比较，△P<0.01

呈大空泡状，细胞壁变薄；与模型组比较，DXR Ⅲ各剂量组小鼠脂肪细胞大小减小，细胞壁增厚。Image J 统计各组小鼠脂肪细胞平均面积结果显示：与正常组比较，模型组小鼠脂肪细胞平均面积明显增大（P<0.01）；与模型组比较，DXR Ⅲ各剂量组小鼠脂肪细胞平均面积明显减小（P<0.01）。

4　各组小鼠脂肪组织 IL-1β 表达比较（图 2）IL-1β 免疫组化染色显示：正常组阳性表达弱，模型组见强阳性染色，脂肪细胞周围大量炎症因子浸润，形成花冠样结构，DXR Ⅲ低、中剂量组见弱阳性染色，未见明显花冠样结构，DXR Ⅲ高剂量组见较强阳性染色，花冠样结构较模型组少。

5　各组小鼠 IL-1β、IL-6、TNF-α、MCP-1、iNOS、Arg-1 mRNA 表达比较（表 5）　与正常组比较，模型组 IL-1β、IL-6、TNF-α、MCP-1、iNOS mRNA 表达增加（P<0.05，P<0.01），Arg-1 mRNA 表达降低（P<0.05）；与模型组比较，DXR Ⅲ低、中剂量组 IL-1β、IL-6、iNOS mRNA 表达减少（P<0.05，P<0.01），Arg-1 mRNA 表达增加（P<0.05，P<0.01）；DXR Ⅲ高剂量组 MCP-1 mRNA 表达减少（P<0.01）。

6　各组小鼠 iNOS、Arg-1、JAK2、p-JAK2、STAT3、p-STAT3 蛋白水平比较（表 6，图 3）　与正常组比较，模型组 iNOS 蛋白表达增加（P<0.01），Arg-1 蛋白表达下降（P<0.05），p-JAK2/JAK2、p-STAT3/STAT3 蛋白比值水平升高（P<0.05，P<0.01）；与模型组比较，DXR Ⅲ低、中剂量组 iNOS 蛋白表达下降（P<0.05），Arg-1 蛋白表达增加（P<0.05），DXR Ⅲ各剂量组 p-JAK2/JAK2、p-STAT3/STAT3 蛋白比值水平下降（P<0.05，P<0.01）。

表 5　各组小鼠脂肪组织 IL-1β、IL-6、TNF-α、MCP-1、iNOS、Arg-1 mRNA 表达比较 （$\bar{x} \pm s$）

组别	n	IL-1β	IL-6	TNF-α	MCP-1	iNOS	Arg-1
正常	8	1.00 ± 0.11	1.00 ± 0.10	1.00 ± 0.10	1.00 ± 0.11	1.00 ± 0.33	1.00 ± 0.24
模型	8	3.86 ± 0.17**	1.64 ± 0.11*	4.73 ± 0.08**	8.16 ± 0.52*	2.33 ± 0.87**	0.44 ± 0.22*
DXR Ⅲ低剂量	8	1.68 ± 0.57△△	0.96 ± 0.31△	1.57 ± 0.17	2.59 ± 0.44	1.19 ± 0.12△△	1.20 ± 0.34△
DXR Ⅲ中剂量	8	2.20 ± 0.36△△	0.89 ± 0.40△△	1.98 ± 0.41	1.92 ± 0.10	1.27 ± 0.16△	1.25 ± 0.37△△
DXR Ⅲ高剂量	8	3.46 ± 0.15	1.23 ± 0.28	1.43 ± 0.05	0.96 ± 0.11△△	2.26 ± 0.21	0.71 ± 0.32

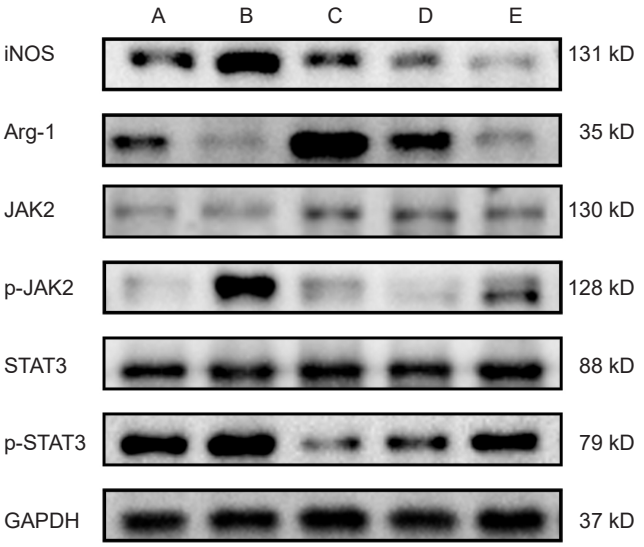
注：与正常组比较，*P<0.05，**P<0.01；与模型组比较，△P<0.05，△△P<0.01

中国中西医结合杂志

表 6 各组脂肪组织 iNOS、Arg-1、p-JAK2/JAK2、p-STAT3/STAT3 蛋白相对灰度比较（$\bar{x} \pm s$）

组别	n	iNOS	Arg-1	p-JAK2/JAK2	p-STAT3/STAT3
正常	8	0.49 ± 0.13	1.31 ± 0.17	0.32 ± 0.11	0.75 ± 0.16
模型	8	1.09 ± 0.21**	0.58 ± 0.32*	1.17 ± 0.28**	1.22 ± 0.19*
DXR Ⅲ低剂量	8	0.65 ± 0.24△	1.16 ± 0.13△	0.44 ± 0.15△△	0.53 ± 0.31△△
DXR Ⅲ中剂量	8	0.53 ± 0.05△	1.18 ± 0.45△	0.55 ± 0.42△	0.59 ± 0.15△△
DXR Ⅲ高剂量	8	0.80 ± 0.35	0.67 ± 0.39	0.64 ± 0.12△	0.71 ± 0.26△

注：与正常组比较，*P<0.05，**P<0.01；与模型组比较，△P<0.05，△△P<0.01



注：A 为正常组；B 为模型组；C 为 DXR Ⅲ低剂量组；D 为 DXR Ⅲ中剂量组；E 为 DXR Ⅲ高剂量组

图 3 各组脂肪组织 iNOS、Arg-1、JAK2、p-JAK2、STAT3、p-STAT3 蛋白表达

讨 论

肥胖是多种因素引起体内脂肪积聚过多并伴随慢性低度炎症的一种代谢性疾病，随着居民生活方式和膳食结构的转变，肥胖成为影响人类健康的世界性流行病[16]，因此迫切需要寻求控制肥胖与改善肥胖相关代谢性疾病的治疗方法，而中医药在改善肥胖和肥胖相关的慢性炎症具有强大的潜力。DXR Ⅲ由栀子、黄连、虎杖、决明子等药物组成，具有清热解毒，活血散瘀，清热凉血，利湿去浊之功效。现代研究发现 DXR Ⅲ药物组成的多种成分可有效改善炎症和糖脂代谢水平。黄连素可减少小鼠脂肪组织炎症因子的分泌和巨噬细胞的募集，同时诱导巨噬细胞发生 M2 型极化，从而抑制脂肪组织炎症[17，18]。Tan Y 等[19]发现栀子苷可改善高脂饮食大鼠脂质谱，减少内脏脂肪，抑制脂肪组织中炎性细胞因子的释放，抑制高脂饮食相关的代谢性疾病的发生。虎杖的有效成分白藜芦醇可通过激活解偶联蛋白 1、过氧化物酶体增殖物激活受体 γ 等能量代谢相关蛋白表达，降低肥胖小鼠脂肪含量，减小脂肪细胞的体积，从而减少脂肪生成和脂质蓄积[20]。Zhang X 等[21]研究发现决明子的活性成分大黄素可通过抑制炎症信号通路 NF-κB 和 ERK 相关蛋白的激活，从而减弱脂肪细胞炎症。

目前常用的肥胖动物模型有营养性肥胖、精神抑制药致肥胖、维生素 D 致肥胖、下丘脑损伤致肥胖、双侧卵巢切除致肥胖等，其中营养性肥胖动物模型与人类单纯性肥胖状态较为一致[22]。在 $ApoE^{-/-}$ 小鼠中，无组织或细胞合成和分泌 ApoE，因此血浆中缺乏 ApoE，导致残存脂蛋白清除受阻，更易使血中 TC、TG、LDL-C、HDL-C 水平增高，此外 $ApoE^{-/-}$ 小鼠体内脂肪含量较正常小鼠明显增多，为此 $ApoE^{-/-}$ 小鼠是研究人类肥胖的理想动物模型[23]。本实验采用西方饮食饲料喂养 $ApoE^{-/-}$ 小鼠建立肥胖模型，西方饮食饲料喂养 $ApoE^{-/-}$ 小鼠 24 周后，小鼠除体重增加以外，体重增加值、内脏脂肪重量、内脏脂肪指数及血清中 TC、TG、LDL-C 水平高于正常小鼠，进一步提示肥胖小鼠模型构建成功[14]。经 DXR Ⅲ治疗后，小鼠体重、体重增加值、内脏脂肪重量、内脏脂肪指数及血清中 TC、TG、LDL-C 水平均下降，血清中 HDL-C 水平上升，表明 DXR Ⅲ具有减重调脂作用。

机体能量过剩会引起脂肪细胞的肥大和增生[24]，同时升高细胞因子或趋化因子水平以及急性期蛋白水平[6]，诱发机体慢性低度炎症。而巨噬细胞因其多样性和可塑性在炎症级联反应过程发挥重要作用，不同刺激可诱导巨噬细胞为经典活化巨噬细胞即促炎 M1 型和交替活化巨噬细即抗炎 M2 型。促炎 M1 型巨噬细胞的活化伴随着高水平的 iNOS 及炎症细胞因子如 IL-1β、IL-6 和 TNF-α 等，促炎巨噬细胞和炎症因子在脂肪细胞周围聚集形成典型花冠样结构[25]，而抗炎 M2 型巨噬细胞的活化使 Arg-1、IL-10、TGF-β 等表达增加[26]。在健康的脂肪组织中，巨噬细胞显示出 M2 样表型，并产生抗炎细胞因子[27]，在肥胖小鼠中则主要表现为促炎 M1 型[28，29]，并分泌 MCP-1 招募炎症细胞浸润脂肪组织，导致炎症级联反应加重，表明高热量饮食诱发的机体慢性低度炎症与巨噬细

胞表型转变相关[30]，促进巨噬细胞从 M1 转化为 M2 对于减轻炎症具有重要的病理意义。在本实验研究中，HE 染色显示模型组小鼠内脏脂肪细胞明显肥大，IL-1β 免疫组化染色显示花冠样结构形成，脂肪组织 IL-1β、IL-6、TNF-α、MCP-1 表达较正常组增加，同时 M1 型巨噬细胞标志物 iNOS 表达增加，M2 型巨噬细胞标志物 Arg-1 表达降低，经 DXR Ⅲ干预后，内脏脂肪细胞明显减小，花冠样结构减少，脂肪组织 IL-1β、IL-6、TNF-α、MCP-1 表达降低，M1 型巨噬细胞标志物 iNOS 表达降低，M2 型巨噬细胞标志物 Arg-1 表达增加，表明 DXR Ⅲ可抑制脂肪细胞肥大，抑制脂肪组织巨噬细胞 M1 型极化并诱导巨噬细胞向抗炎 M2 型转变，进而有利于维持脂肪组织稳态并改善肥胖小鼠脂肪组织慢性炎症，且以 DXR Ⅲ低、中剂量效果较为显著。

巨噬细胞在维持 M1/M2 表型平衡过程中涉及多种信号通路调节机制，而 JAK2/STAT3[26，31] 通路是调控巨噬细胞极化的重要通路之一。Shi M 等[32] 发现 JAK2/STAT3 通路的激活上调 SOCS3 表达，并诱导巨噬胞 M1 型极化，使用 JAK2 特异性抑制剂 AG490 选择性阻断 JAK2/STAT3 通路后，M1 型巨噬细胞表面标志物 iNOS 和炎症细胞因子 TNF-α 水平明显下调[33]，巨噬细胞 M1 型极化减弱。本实验研究中，经西方饮食喂养的小鼠脂肪组织 p-JAK2/JAK2、p-STAT3/STAT3 蛋白比值水平高于正常小鼠，予以 DXR Ⅲ干预后，小鼠脂肪组织 p-JAK2/JAK2、p-STAT3/STAT3 蛋白比值水平下调，结果表明 DXR Ⅲ可抑制 JAK2/STAT3 信号通路磷酸化水平。

综上，DXR Ⅲ有改善脂肪组织慢性炎症的药理作用，其机制可能与抑制 JAK2/STAT3 信号通路，抑制脂肪组织巨噬细胞 M1 型极化并诱导其向 M2 型发展相关。课题组将进一步检测 JAK2/STAT3 轴相关信号分子，深入探讨 DXR Ⅲ改善脂肪组织慢性炎症及其相关代谢性疾病的作用机制。

利益冲突：本文所涉及各方面均无任何利益冲突。

参 考 文 献

[1] González-muniesa P，Mártinez-gonzález MA，Hu FB，et al. Obesity[J]. Nat Rev Dis Primers，2017，3：17034.

[2] Neeland IJ，Ross R，Després JP，et al. Visceral and ectopic fat，atherosclerosis，and cardiometabolic disease：a position statement[J]. Lancet Diabetes Endocrinol，2019，7（9）：715–725.

[3] Liu T，Ji RL，Tao YX. Naturally occurring mutations in G protein-coupled receptors associated with obesity and type 2 diabetes mellitus[J]. Pharmacol Ther，2021：108044.

[4] Liu Z，Zhang Y，Graham S，et al. Causal relationships between NAFLD，T2D and obesity have implications for disease subphenotyping[J]. J Hepatol，2020，73（2）：263–276.

[5] Reilly SM，Saltiel AR. Adapting to obesity with adipose tissue inflammation[J]. Nat Rev Endocrinol，2017，13（11）：633–643.

[6] Christ A，Günther P，Lauterbach MAR，et al. Western diet triggers NLRP3-dependent innate immune reprogramming[J]. Cell，2018，172（1-2）：162–175.

[7] Brestoff JR，Artis D. Immune regulation of metabolic homeostasis in health and disease[J]. Cell，2015，161（1）：146–160.

[8] Tian YS，Zhong D，Liu QQ，et al. Upregulation of miR-216a exerts neuroprotective effects against ischemic injury through negatively regulating JAK2/STAT3-involved apoptosis and inflammatory pathways[J]. J Neurosurg，2018，130（3）：977–988.

[9] 杨萍，贾钰华，李杰. 定心方治疗南方地区冠心病心绞痛患者 148 例 [J]. 中医杂志，2008，49（10）：909–910.

[10] 万强，崔小冰，贾钰华，等. 黄连素通过 ERK1/2 通路降低内脏脂肪素诱导 HUVEC 分泌 TNF-α 和 IL-6 的研究 [J]. 中国实验方剂学杂志，2014，20（14）：125–129.

[11] 周兴宏，刘晓瑜，温子云，等. 三七皂苷 R1 上调 miR-146a 水平和减轻 ApoE$^{-/-}$ 小鼠肝脏炎症损伤的研究 [J]. 中药新药与临床药理，2016，27（3）：317–321.

[12] Cheng S，Zhou F，Xu Y，et al. Geniposide regulates the miR-101/MKP-1/p38 pathway and alleviates atherosclerosis inflammatory injury in ApoE$^{-/-}$mice[J]. Immunobiology，2019，224（2）：296–306.

[13] 张宇，程赛博，周凤华，等. 栀子苷对动脉粥样硬化并发非酒精性脂肪肝 ApoE$^{-/-}$ 小鼠炎症和氧化应激

中国中西医结合杂志

的影响 [J]. 中药新药与临床药理，2015，26（5）：581–586.

[14] 游翕，张林，姚俊鹏，等 . 食源性肥胖动物模型评价的研究进展 [J]. 中华中医药杂志，2021，36（4）：2184–2187.

[15] 魏伟，吴希美，李建元主编 . 药理实验方法学 [M]. 北京：人民卫生出版社，2010：69–72.

[16] Arroyo-Johnson C，Mincey KD. Obesity epidemiology worldwide[J]. Gastroenterol Clin North Am，2016，45（4）：571–579.

[17] Guo T，Woo SL，Guo X，et al. Berberine ameliorates hepatic steatosis and suppresses liver and adipose tissue inflammation in mice with diet-induced obesity [J]. Sci Rep，2016，6：22612.

[18] Lin J，Cai Q，Liang B，et al. Berberine，a traditional Chinese medicine，reduces inflammation in adipose tissue，polarizes M2 macrophages，and increases energy expenditure in mice fed a high-fat diet [J]. Med Sci Monit，2019，25：87–97.

[19] Tan Y，Lao W，Xiao L，et al. Managing the combination of nonalcoholic fatty liver disease and metabolic syndrome with Chinese herbal extracts in high-fat-diet fed rats [J]. Evid Based Complement Alternat Med，2013，2013：306738.

[20] 郑新杰，刘子惠，廖维瑶，等 . 白藜芦醇对高脂诱导肥胖小鼠脂肪组织分布的影响及其机制 [J]. 中国热带医学，2017，17（12）：1176-1180，1197.

[21] Zhang X，Zhang R，Lv P，et al. Emodin up-regulates glucose metabolism，decreases lipolysis，and attenuates inflammation *in vitro* [J]. J Diabetes，2015，7（3）：360–368.

[22] 和兴萍，罗燕，李雪，等 . 几种降脂减肥实验动物模型的建立与比较 [J]. 中华中医药学刊，2017，35（7）：1747–1751.

[23] 张文将，易健，贾平，等 . 载脂蛋白 E 基因敲除（$ApoE^{-/-}$）小鼠基因的鉴定方法及模型应用 [J]. 中国组织工程研究，2019，23（7）：1103–1108.

[24] 杨永玉，胡长平 . 肥胖与脂肪组织重构 [J]. 中国药理学通报，2016，32（1）：9–13.

[25] Cheng C，Xue F，Sui W，et al. Deletion of natriuretic peptide receptor C alleviates adipose tissue inflammation in hypercholesterolemic Apolipoprotein E knockout mice[J]. J Cell Mol Med，2021，25（20）：9837–9850.

[26] Xu M，Li X，Song L. Baicalin regulates macrophages polarization and alleviates myocardial ischaemia/reperfusion injury via inhibiting JAK/STAT pathway[J]. Pharm Biol，2020，58（1）：655–663.

[27] Sander L，Frank T. Macrophages in obesity and non-alcoholic fatty liver disease：crosstalk with metabolism[J]. JHEP Reports，2019，1（1）：30–43.

[28] Lumeng CN，Bodzin JL，Saltiel AR. Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization[J]. J Clin Invest，2007，117（1）：175–184.

[29] Zhou Y，Yu X，Chen H，et al. Leptin deficiency shifts mast cells toward anti-inflammatory actions and protects mice from obesity and diabetes by polarizing M2 macrophages[J]. Cell Metab，2015，22（6）：1045–1058.

[30] Castoldi A，Souza CN，Câmara NO，et al. The macrophage switch in obesity development[J]. Front Immunol，2015，6：637.

[31] Zhang H，Zhao B，Wei H，et al. Cucurbitacin B controls M2 macrophage polarization to suppresses metastasis via targeting JAK2/STAT3 signalling pathway in colorectal cancer[J]. J Ethnopharmacol，2021，287：114915.

[32] Shi M，Lin Z，Ye L，et al. Estrogen receptor-regulated SOCS3 modulation via JAK2/STAT3 pathway is involved in BPF-induced M1 polarization of macrophages[J]. Toxicology，2020，433–434：152404.

[33] Kong LN，Lin X，Huang C，et al. Hesperetin derivative-12（HDND-12）regulates macrophage polarization by modulating JAK2/STAT3 signaling pathway[J]. Chin J Nat Med，2019，17（2）：122–130.

（收稿：2022–01–04　在线：2022–05–16）

责任编辑：白　霞

中国中西医结合杂志