

# 基于单细胞转录组学探讨二陈汤修复回肠免疫屏障改善 饮食诱导的肥胖小鼠体质量机制

陈家葳<sup>1</sup>, 刘茂辉<sup>1</sup>, 陈继兰<sup>1</sup>, 朱九霜<sup>2</sup>, 梅英秀<sup>1</sup>, 金悦<sup>1</sup>, 夏修文<sup>1\*</sup>, 丁维俊<sup>1\*</sup>

(1. 成都中医药大学基础医学院, 成都 611137; 2. 重庆市中医院基础研究室, 重庆 400021)

**[摘要]** 目的:探讨二陈汤对高脂饮食诱导的单纯性肥胖小鼠体质量改善的影响及作用机制。方法:首先,应用前期单细胞转录组学(Sc-RNAseq)分析正常组和高脂饮食诱导的肥胖模型组小鼠回肠组织转录水平变化。然后,通过高脂饮食喂养构建单纯性肥胖小鼠模型,将造模成功的小鼠随机分为模型组,二陈汤低、中、高剂量组(7.5、15、30 g·kg<sup>-1</sup>),每组8只,另取8只同龄小鼠作为正常组。灌胃4周期间固定时间测量体质量。葡萄糖耐量测试、行为学、苏木素-伊红(HE)染色和生化检测评估二陈汤改善肥胖的整体疗效。蛋白对接预测对应蛋白之间的结合程度。分子对接预测二陈汤关键成分与靶蛋白之间的结合程度。实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)检测回肠肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )、诱导型一氧化氮合酶(iNOS)、白细胞介素-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ )、CD68、CD206、闭锁小带蛋白-1(ZO-1)和紧密连接蛋白-5(Claudin-5) mRNA表达水平。免疫荧光染色观察Claudin-5和ZO-1表达与分布。**结果:**前期单细胞测序结果提示与正常组比较,模型组小鼠免疫细胞差异基因基因本体(GO)分析生物学功能富集主要与脂质代谢和炎症代谢有关,且与“Janus酪氨酸蛋白激酶(JAK)/信号转导及转录激活因子(STAT)信号通路”炎症通路相关。与正常组比较,模型组小鼠体质量显著增加( $P<0.01$ ),血糖水平显著升高( $P<0.01$ ),四肢力量显著下降( $P<0.01$ ),肝脏质量明显增加( $P<0.05$ ),血清丙氨酸氨基转移酶(ALT)和天冬氨酸氨基转移酶(AST)明显升高( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ),肝脏脂肪空泡增多,附睾与腹股沟白色脂肪组织脂肪细胞体积明显增大,炎症增加;与模型组比较,二陈汤各剂量组小鼠体质量显著下降( $P<0.01$ ),血糖水平显著降低( $P<0.01$ ),四肢力量明显增加( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ),肝脏质量明显下降( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ),血清ALT和AST明显下降( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ),肝脏脂肪空泡减少,附睾与腹股沟白色脂肪组织脂肪细胞体积明显减小,炎症改善。蛋白CD68与ZO-1、Claudin-5和CD206与ZO-1、Claudin-5之间存在互作可能性。二陈汤关键成分Nobiletin、Diosmetin和Naringenin与靶蛋白ZO-1和Claudin-5均有较强的结合能。与正常组比较,模型组小鼠促炎基因TNF- $\alpha$ 、iNOS、IL-1 $\beta$ 、CD68 mRNA表达明显升高( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ),抑炎基因CD206 mRNA表达显著下降( $P<0.01$ ),紧密连接蛋白基因Claudin-5和ZO-1 mRNA表达明显下降( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ );与模型组比较,二陈汤各剂量组小鼠促炎基因TNF- $\alpha$ 、iNOS、IL-1 $\beta$ 、CD68 mRNA表达明显下降( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ),抑炎基因CD206 mRNA表达明显升高( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ),紧密连接蛋白基因Claudin-5和ZO-1 mRNA表达明显升高( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ )。与正常组比较,模型组小鼠紧密连接蛋白Claudin-5和ZO-1表达显著下降( $P<0.01$ );与模型组比较,二陈汤各剂量组小鼠Claudin-5和ZO-1蛋白表达明显升高( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ )。**结论:**二陈汤可显著改善高脂饮食引起的肥胖体质量增加,其机制可能与改善回肠炎症环境进而改善受损的回肠免疫屏障有关。

**[关键词]** 肥胖; 脂肪组织; 炎症; 免疫屏障; 紧密连接蛋白

**[中图分类号]** R58;R285;R289 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2026)14-0226-11

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.20251712

**[网络出版地址]** <https://link.cnki.net/urlid/11.3495.r.20251127.1144.001>

**[网络出版日期]** 2025-11-27 16:39:32 **[增强出版附件]** 内容详见 <http://www.syfjxzz.com> 或 <http://cnki.net>



## Exploring Mechanisms of Erchentang in Repairing Ileal Immune Barrier and Reducing Weights of Diet-induced Obese Mice Based on Single-cell Transcriptomics

CHEN Jiawei<sup>1</sup>, LIU Maohui<sup>1</sup>, CHEN Jilan<sup>1</sup>, ZHU Jiushuang<sup>2</sup>, MEI Yingxiu<sup>1</sup>,  
JIN Yue<sup>1</sup>, XIA Xiuwen<sup>1\*</sup>, DING Weijun<sup>1\*</sup>

**[收稿日期]** 2025-09-26

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目(82374176);中央引导地方科技发展基金项目(2023ZYD0048);国家资助博士后研究人员计划和中国博士后科学基金项目(GZB20240086)

**[第一作者]** 陈家葳,在读博士,从事中西医结合防治内分泌代谢疾病的基础研究,E-mail:ChenJW0112@163.com

**[通信作者]** \*夏修文,博士后,助理研究员,从事中西医结合防治内分泌代谢疾病的基础研究,Email:xxiuwen@163.com;

\*丁维俊,博士,教授,博士生导师,从事中西医结合防治内分泌代谢疾病的基础研究,E-mail:dingweijun@cdutcm.edu.cn

(1. School of Basic Medical Sciences, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine (TCM),  
Chengdu 611137, China;  
2. Basic Research Laboratory, Chongqing TCM Hospital, Chongqing 400021, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the effects of Erchentang (ECD) on the body weight of the mouse model of simple obesity induced by a high-fat diet (HFD) and decipher the underlying mechanisms. **Methods:** Firstly, single-cell transcriptomics (Sc-RNAseq) was employed to analyze the transcriptional changes in the ileum tissue of mice in the normal group and model group. Then, a mouse model of simple obesity was established with a high-fat diet. The successfully modeled mice were randomly allocated into the following four groups ( $n=8$ ): model, low-dose ( $7.5 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) ECD, medium-dose ( $15 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) ECD, and high-dose ( $30 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) ECD. Additionally, 8 mice of the same age were selected as the normal group. The body weight was measured at fixed time points during the 4-week gavage period. The overall efficacy of ECD in alleviating obesity was evaluated through glucose tolerance testing, behavioral analysis, hematoxylin-eosin (HE) staining, and biochemical testing. Protein docking was employed to predict the degree of binding between corresponding proteins. Molecular docking was employed to predict the binding degree between key components of ECD and target proteins. Real-time PCR was employed to determine the mRNA levels of tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), inducible nitric oxide synthase (iNOS), interleukin- $1\beta$  (IL- $1\beta$ ), CD68, CD206, zonula occludens-1 (ZO-1), and Claudin-5 in the ileum. Immunofluorescence staining was used to observe the expression and distribution of Claudin-5 and ZO-1. **Results:** The Sc-RNAseq results indicated that the differentially expressed genes of immune cells in the model group in comparison with the normal group were primarily enriched in biological functions related to lipid metabolism and inflammatory metabolism. Additionally, these genes were associated with the janus kinases (JAK)/signal transducers and activators of transcription (STAT) signaling pathway, an inflammation-related pathway. Compared with the normal group, the model group showed increases in body weight ( $P<0.01$ ) and blood glucose level ( $P<0.01$ ), a decrease in limb strength ( $P<0.01$ ), an increase in liver weight ( $P<0.05$ ), and elevated serum alanine amino-transferase (ALT) and aspartate transferase (AST) levels ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ). Additionally, the model group exhibited increased hepatic fat vacuoles, notably enlarged adipocytes in the epididymal and inguinal white adipose tissue, and increased inflammation. Compared with the model group, ECD groups showed reduced body weights ( $P<0.01$ ) and blood glucose levels ( $P<0.01$ ), increased limb strength ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ), decreased liver weights ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ), and declined serum ALT and AST levels ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ). Additionally, ECD reduced hepatic fat vacuoles and the adipocyte volume in the epididymal and inguinal white adipose tissue, and alleviated inflammation. Potential interactions existed between CD68 and ZO-1/Claudin-5, as well as between CD206 and ZO-1/Claudin-5. The key components of ECD, nobiletin, diosmetin, and naringenin, all demonstrated strong binding affinity with the target proteins ZO-1 and Claudin-5. Compared with the normal group, the model group exhibited up-regulated mRNA levels of the pro-inflammatory cytokines TNF- $\alpha$ , iNOS, IL- $1\beta$ , and CD68 ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ) and down-regulated mRNA levels of the anti-inflammatory cytokine CD206 ( $P<0.01$ ) and the tight junction proteins Claudin-5 and ZO-1 ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ). In comparison with the model group, the ECD groups showed down-regulated mRNA levels of TNF- $\alpha$ , iNOS, IL- $1\beta$ , and CD68 ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ) and up-regulated mRNA levels of CD206, Claudin-5, and ZO-1 ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ). Compared with the normal group, the model group exhibited down-regulated expression of tight junction proteins Claudin-5 and ZO-1 ( $P<0.01$ ). Compared with the model group, ECD groups showed up-regulated expression of Claudin-5 and ZO-1 ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ). **Conclusion:** ECD can significantly ameliorate HFD-induced obesity and excessive body weight gain in mice by improving the inflammatory microenvironment in the ileum and further restoring the integrity of the impaired ileal barrier.

**[Keywords]** obesity; adipose tissue; inflammation; immune barrier; tight junction proteins

肥胖是全球范围内广泛流行的健康疾病,与癌症<sup>[1]</sup>、2型糖尿病(T2DM)<sup>[2]</sup>、心血管疾病<sup>[3]</sup>密切相关,为人类带来了巨大的经济负担和心理压力<sup>[4]</sup>。在我国,肥胖同样是主要的公共卫生问题。2015—2019年的最新全国肥胖患病率估计为6岁以下儿童超重6.8%,肥胖3.6%,6~17岁儿童和青少年超重11.1%,肥胖7.9%,成人( $\geq 18$ 岁)超重34.3%,肥胖16.4%<sup>[5]</sup>,其导致的非传染性疾病相关死亡人数逐年增加<sup>[6]</sup>,是目前全球亟待解决的健康问题。白色脂肪组织(WAT)是哺乳动物用于能量储存的主要代谢器官,慢性热量过剩导致WAT通过脂肪细胞增生

和肥大而膨胀,从而导致体质量增加和肥胖<sup>[7]</sup>,进而引起的全身慢性亚急性组织炎症是胰岛素抵抗和代谢功能障碍发病机制的主要原因<sup>[8]</sup>。研究表明,肥胖引起的肠道炎症增加会导致肠道黏膜损伤,肠道屏障功能紊乱,紧密连接蛋白闭锁小带蛋白-1(ZO-1)和紧密连接蛋白-5(Claudin-5)表达下降,肠道通透性增加,肠道组织长期暴露于大量抗原中<sup>[9-11]</sup>,而肠道通透性则被认为是西式饮食有关的肥胖疾病发展中的一个主要事件<sup>[10]</sup>。

中医传统理论将肥胖归为“肥人”“膏人”范畴。《黄帝内经》记载,“甘肥贵人,则膏粱之疾也”。《礼

记》记载“肤革充盈,人之肥也”。传统医学认为肥胖多因过食肥甘厚味之品引起。二陈汤出自宋代著名医书《太平惠民和剂局方》,书中记载“痰饮为患,或呕吐恶心,或头眩心悸,或中脘不快,或发为寒热,或因食生冷,脾胃不和”,方由法半夏、陈皮、炙甘草、茯苓、乌梅、生姜6味药组成,全方共奏燥湿化痰、理气和中之效,是古今临床上常用的祛痰剂。方中法半夏、陈皮两味药以陈久者良,《医方集解》记载“陈皮、半夏贵其陈久,则无燥散之患,故名二陈”。现代多项药理学研究发现二陈汤可以改善肥胖引起的体质量增加、血脂异常及肝功能异常等<sup>[12-13]</sup>。现代有研究从猪肠中分离出潜在益生菌嗜酸乳杆菌,并发现可以减轻高脂饮食喂养小鼠体质量和炎症<sup>[14]</sup>,但是益生菌的作用在个体间存在较大差异,并且治疗作用比较单一,西药改善肠屏障类药物往往具有较为明显的不良反应,而中药复方二陈汤具有多成分、多靶点的治疗作用,是改善饮食诱导的肥胖和炎症的潜在治疗策略。然而关于二陈汤如何通过改善高脂饮食引起的回肠免疫屏障功能障碍进而降低肥胖小鼠体质量的机制目前尚未明确,本实验基于课题组前期回肠单细胞转录组学的发现,构建高脂饮食诱导的单纯性肥胖小鼠,进一步深入探讨二陈汤改善肥胖的机制。技术路线图见增强出版附加材料。

## 1 材料

**1.1 动物** SPF级C57BL/6J雄性小鼠50只,体质量(20±2.5)g,购自斯贝福(北京)生物技术有限公司。实验动物生产合格证号SCXK(京)2019-0010。小鼠饲养于成都中医药大学实验动物中心SPF级环境中,期间小鼠进食饮水自由,每12h昼夜节律光照,室温22~24℃、相对湿度保持在50%~60%,保持通风良好。

**1.2 伦理** 本实验经成都中医药大学动物福利伦理委员会批准,符合动物伦理相关要求(伦理号2025005)。

**1.3 药物** 二陈汤由6味药组成,法半夏15g(批号2402145)、陈皮15g(批号2402116)、茯苓9g(批号2406036)、炙甘草4.5g(批号2404004)、乌梅3g(批号2303006)、生姜3.5g,均购买于四川新荷花有限公司。所有中药饮片由成都中医药大学药学院徐世军教授鉴定均为正品。将上述药品加入10倍体积纯净水的圆底烧瓶中浸泡30min,采用大火煮沸,随后小火加热回流法煎煮提取1h,收集第1次中药液,向圆底烧瓶中加入10倍体积纯净水加热回流法

再次煎煮1h,将2次得到的药液合并,经过200目纱布过滤得到总的中药水提液。最后将水提液浓缩为终质量浓度0.83g·mL<sup>-1</sup>,储存于-20℃冰箱备用。

**1.4 试剂** 苏木素-伊红(HE)染色液试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司,批号C0105S);RNA提取试剂盒(成都福际生物技术有限公司,批号RE-03014);逆转录试剂、实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)试剂盒(南京诺唯赞生物技术有限公司,批号分别为R333-01、Q221-01);天门冬氨酸氨基转移酶(AST)、丙氨酸氨基转移酶(ALT)测定试剂盒(深圳迈瑞生物医疗电子股份有限公司,批号分别为140122010、140222011);0.1%核糖核酸酶(RNase)抑制剂(美国Clontech公司,批号2313A);ZO-1抗体(武汉三鹰生物技术有限公司,批号21773-1-AP);Claudin-5抗体(优品生物科技有限公司,批号YP-Ab-16961);Alexa 488标记的驴抗兔抗体(美国赛默飞世尔科技公司,批号a-11206);4',6-二脒基-2-苯基吡啶(DAPI)染色液(北京索莱宝科技有限公司,批号C0065)。

**1.5 仪器** Panoramic SCAN II型高分辨切片扫描分析系统(匈牙利3DHISTECH公司);Microfuge 20R型高速低温冷冻离心机(美国贝克曼库尔特股份有限公司);D8938型组织研磨机(美国Sigma公司);K30型旋涡振荡器(上海青浦沪西仪器厂);BS-240VET型全自动生化分析仪(深圳迈瑞动物医疗科技股份有限公司);qTOWER3 G型Real-time PCR仪(德国Analytikjena公司);ZH-PT/5S型小动物实验跑台(安徽正华生物仪器设备有限公司);GA-3型血糖仪及血糖试纸(中国三诺生物传感股份有限公司)。

## 2 方法

**2.1 高脂饮食诱导的肥胖模型建立、分组给药及取材** 50只小鼠适应性喂养1周后,随机抽取10只小鼠作为正常组,予以低脂饲料喂养,另40只小鼠作为模型组,予以高脂饲料喂养。造模期间观察小鼠活动等一般状态,每周固定时间称量小鼠体质量,造模12周后,当模型组小鼠体质量为正常组小鼠体质量1.2倍时则认为高脂饮食诱导的肥胖小鼠造模成功<sup>[15]</sup>。造模成功后,将8只低脂饲料喂养小鼠继续作为正常组,将造模成功的小鼠随机分为模型组,二陈汤低、中、高剂量组,每组各8只。依据《药理试验中动物间和动物与人体间的等效剂量换算》<sup>[16]</sup>的相关计算方法得到给药剂量,确定二陈汤低、中、高剂量组分别为7.5、15、30g·kg<sup>-1</sup>,每日灌胃

1次,持续4周,4周灌胃期间正常组小鼠继续喂食低脂饲料,模型组、二陈汤低、中、高剂量组继续喂食高脂饲料。灌胃4周结束后,各组小鼠禁食不禁水12 h过夜,腹腔注射戊巴比妥钠麻醉(50 mg·kg<sup>-1</sup>),解剖取各组小鼠肝脏、内脏脂肪、皮下脂肪、回肠;每种内脏组织一部分放入装有4%多聚甲醛固定液的离心管中,常温放置,另一部分于-80 °C冻存备用。

**2.2 体质量等一般指标检测** 每周测量1次小鼠体质量,灌胃治疗结束取材前进行力竭测试。取材后,将肝脏进行称质量。

**2.3 HE染色观察肝脏、附睾脂肪及腹股沟WAT** 麻醉取材后将肝脏、附睾脂肪、腹股沟WAT固定于4%多聚甲醛中24 h以上。固定后按照步骤将上述组织进行石蜡包埋并行HE染色,中性树脂封片后在显微镜下观察小鼠在上述不同组织中的形态及结构。

**2.4 Real-time PCR检测炎症基因及连接蛋白mRNA表达** 总RNA提取试剂盒提取小鼠回肠总RNA,逆转录得到cDNA,用SYBR Real-time PCR Master Mix进行Real-time PCR扩增,引物序列由擎科生物科技有限公司合成,见表1。反应程序依次设置为95 °C预变性5 min、95 °C变性15 s、60 °C退火1 min、72 °C延伸30 s,循环40次,以 $\beta$ -肌动蛋白( $\beta$ -actin)为内参基因,采用2<sup>- $\Delta\Delta$ C<sub>t</sub></sup>法进行定量分析。

**2.5 单细胞测序研究** 采用单细胞RNA测序技术解析正常组与模型组小鼠回肠组织的细胞异质性,正常组和模型组各3只动物。

**2.5.1 单细胞悬液制备及测序** 获取新鲜回肠组织后,通过酶解法分离单细胞悬液,具体而言,将组织样品切成<0.5 cm的碎片,并使用玻璃摇摆组织研磨机匀浆。将组织用研磨杵A匀浆25次,在2 mL冷的核EZ裂解缓冲液中用研磨杵B再次匀浆25次。然后将样品置于另外3 mL冷EZ裂解缓冲液中并在冰上孵育5 min,而后4 °C下12 000 r·min<sup>-1</sup>离心5 min(离心半径12.5 cm,下同),然后用冰冷的EZ裂解缓冲液5 mL洗涤,并在冰上孵育5 min,再次离心5 min,用核悬浮液5 mL和0.1%RNase抑制剂洗涤核。严格把控单细胞悬液的浓度和质量,使用合格的样品进行百创DG1000单细胞转录组测序。

**2.5.2 数据质量评估及表达定量** 高通量测序下机得到的原始图像文件经CASAVA碱基识别转化为测序读段,以FASTQ格式存储。百创DG1000单细胞转录组测序数据每个样本的数据包含I1、R1、

表1 引物序列

Table 1 Primer sequences

引物	序列(5'-3')	长度/bp
TNF- $\alpha$	上游 CAGGCGGTGCCTATGTCTC	19
	下游 CGATCACCCGAAGTTCAGTAG	22
iNOS	上游 GTTCTCAGCCCAACAATACAAGA	23
	下游 GTGGACGGGTCGATGTCAC	19
IL-1 $\beta$	上游 GAAATGCCACCTTTTGACAGTG	22
	下游 TGGATGCTCTCATCAGGACAG	21
CD68	上游 TGTCTGATCTTGCTAGGACCG	21
	下游 GAGAGTAACGGCCTTTTGTGA	22
CD206	上游 CTCTGTTTCAGCTATTGGACGC	21
	下游 TGGCACTCCCAACATAATTGA	23
Claudin-5	上游 TGGCATCGTGACAAAGTACG	20
	下游 AAGAGTCCAGGCTTGACGAC	20
ZO-1	上游 AGCAGCCAGACAAAGTACCG	22
	下游 TGGGACAGGTAGGTGGATGA	23
$\beta$ -actin	上游 GGCTGTATCCCTCCATCG	23
	下游 CCAGTTGGTAACAATGCCATGT	24

R2, I1 存储了 index 信息;R1 即 read1,包含细胞 barcode 和唯一分子标识(UMI)信息;R2 即 read2,包含了插入片段信息。使用fastqc软件对每个样本的read2数据做质控分析。BSCMatrix对每个Barcode的每个基因会去除重复的UMI,统计unique UMI数目作为该细胞内该基因的表达量,通过UMI可以区分一条read是否属于生物学重复还是技术重复,能够有效地去除PCR效应;BSCMatrix还会根据每个Barcode的总UMI数,将UMI数较高的Barcode识别为高质量的细胞,UMI数较低的Barcode识别为背景噪声,对数据中的细胞和非细胞进行区分。

**2.5.3 细胞亚群分析** 利用单细胞转录组测序分析可以对细胞类型、细胞亚型分类、标记基因进行鉴定,实现对细胞群体的划分与细胞群体间基因表达差异的检测。分析步骤如下,首先,通过细胞过滤进行高质量细胞筛选,细胞过滤参数设置为:(1)线粒体基因比例 $\leq$ 20%,排除凋亡、破裂的细胞;(2)单个细胞鉴定到的UMI数目 $\geq$ 100;(3)单个细胞鉴定到的基因数目为500~7 000,以判断GEMs油滴中是否包含1个以上细胞或者细胞是否发生破裂。基因表达至少在10个细胞中检测到才会被认为是可信检出。接下来进行细胞聚类分析,对所有样本数据进行批次效应校正,校正原理是利用seurat软件将典型关联分析(CCA)与互近邻(MNN)算法结

合起来,认为相同类型和状态的细胞之间的基因表达差异是技术偏倚引起的,通过计算并校正技术偏倚引起的基因表达差值,从而实现不同单细胞数据集的整合。使用seurat软件通过主成分分析(PCA)方法对数据进行降维,PCA降维是一种线性降维方法,运用方差分解,将高维的数据映射到低维的空间中;然后基于脉冲神经网络(SNN)聚类算法对细胞进行聚类和分群,构建细胞间的聚类关系;最后将降维后的数据传递到t分布随机邻域嵌入(t-SNE)与UMAP进行可视化展示,细胞之间的基因表达模式越相似,在t-SNE/UMAP图中的距离也越接近。基于降维聚类得到的结果,使用非参数检验方法(Wilcoxon秩和检验),鉴定在每个cluster中特异表达的基因,将差异倍数(FC) $\geq 2$ 且Thred $< 0.1$  [parameter is: 错误发现率(FDR)]作为筛选标准,筛选得到每个Cluster最显著的差异基因,即Marker基因。最后进行细胞亚群注释,细胞聚类分析是根据细胞之间的相似性,将相似度最高的一群细胞识别为一个Cluster,这些Clusters在没有进行细胞类型鉴定之前无法得出有价值的生物学探讨方向,需要通过细胞注释将这些Cluster转变成具有生物学意义的细胞类型。细胞注释主要有2种方法,基于参考数据库利用软件工具进行自动化;基于参考数据库、文献资料确定已知细胞类型的特征表达基因(Marker标记)列表和相关通路进行人工注释。

**2.6 免疫荧光检测回肠ZO-1和Claudin-5蛋白** 采用免疫荧光染色技术检测小鼠回肠组织中ZO-1和Claudin-5的定位与表达水平。通过Leica CM1950低温恒温器将回肠切成7  $\mu\text{m}$ 的冠状切片。室温下在摇床上用0.3%含聚山梨醇酯-20的磷酸盐缓冲液(PBST)清洗切片3次,每次5 min,随后在室温下用5%牛血清白蛋白(BSA)封闭组织30 min。接着,在4  $^{\circ}\text{C}$ 下,将回肠切片与ZO-1抗体(1:500)、Claudin-5抗体(1:100)一起孵育过夜。在室温下,将切片与稀释好的荧光二抗(1:1 000)一起孵育75 min。在室温下用DAPI染色液对细胞核染色5 min。数字图像通过高分辨切片扫描机采集。通过Image J软件定量分析各组回肠中ZO-1和Claudin-5蛋白的表达。

**2.7 蛋白对接** 本研究根据CD68、CD206、ZO-1、Claudin-5序列利用AlphaFold3进行结构预测,根据预测局部距离差异测试(pLDDT)值选择排名第一的结构作为实验模型。预测模板建模(pTM)分数和界面预测模板建模(ipTM)分数均源自TM score。pTM+ipTM分值高于0.5,则认为蛋白具有互作可能

性,分值高于0.75则认为蛋白互作可能性高。利用HawkDock服务器的MM/GBSA计算结合自由能,并将蛋白和蛋白结合过程以立体三维结构展示。

**2.8 分子对接** 本实验通过前期二陈汤广泛靶向质谱鉴定结果并结合查阅文献[17],将川陈皮素、香叶木素、柚皮素鉴定为二陈汤治疗肥胖的核心活性成分,故而本实验将上述3种化合物作为分子对接配体。ZO-1和Claudin-5是广泛研究的肠道紧密连接蛋白,故而本实验将其作为分子对接受体。通过PubChem数据库获取化合物成分的SDF格式文件,在蛋白质结构数据库收集蛋白结构,使用PyMOL 2.1.0软件对靶点进行清除水分子和小分子配体等优化处理并用AutoDock Tools 1.5.6进行加氢与电荷处理,利用pyrx软件内部的Vina 2.0进行分子对接,使用PyMOL 2.1.0进行可视化。

**2.9 葡萄糖耐量测试(GTT)和生化分析** 禁食不禁水12 h后,通过测试条血糖传感器从尾静脉血中测量空腹血糖水平。腹腔注射2  $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 葡萄糖溶液后,在30、60、90和120 min记录血糖水平,计算曲线下面积。全自动生化分析仪检测血清AST和ALT水平。

**2.10 统计学方法** 采用SPSS 27.0软件进行数据分析,剂量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,先对样本进行正态分布的检验及方差齐性的检验,当数据满足方差齐性的条件时,选用最小显著性差异法(LSD)来执行组间的逐一比较;当方差不齐时,则采用非参数的秩和检验法。在比较两组时,使用非配对t检验分析数据。在比较3组以上时,使用单因素方差分析或双向方差分析并用Tukey's进行多重比较测试。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

### 3 结果

**3.1 基于单细胞测序的基因差异表达结果** 通过对正常组与模型组小鼠回肠组织的单细胞RNA测序分析,单细胞图谱构建与细胞亚群鉴定经聚类分析鉴定出11个主要细胞亚群。将其中免疫细胞亚群单独提取进行细胞聚类分析,聚类得到7个Cluster。为确定每个Cluster的细胞亚型及功能,结合Marker基因分析和数据库注释分析提示Cluster0注释为巨噬细胞(Macrophages)亚群。Cluster1注释为浆细胞(效应B细胞)亚群,Cluster4注释为前B细胞亚群。其每个cluster的Marker基因见表1,提示cluster6高表达H2-Aa可能为树突状细胞。模型组中巨噬细胞、B细胞比例增加,提示肥胖疾病状态下肠道免疫微环境重塑。见增强出版附加材料。

表1 每个Cluster的Marker基因

Table 1 Marker genes for each Cluster

细胞类型	标记
Macrophages	Il34
	Zeb2
	P1pp3
	Adgrl3
	Igha
Efeector B cell	Slc28a2
	Errfi1
	Ebfl
	Opcml
	Celf2
Pre-B cell	C7
	H2-Aa

在各细胞亚群中,模型组相较于正常组均表现出显著差异表达基因(DEGs)。例如,免疫细胞亚群中模型组上调基因[如含卷曲螺旋域蛋白3(Ccdc3)、神经酰胺合酶6(Cers6)和酰基辅酶A合成酶长链家族成员3(Acs13),这3个基因与炎症和脂肪代谢密切相关],而免疫细胞亚群中模型组显

著富集的通路包括“Janus 酪氨酸蛋白激酶(JAK)/信号转导及转录激活因子(STAT)信号通路”,JAK/STAT 信号通路已被广泛报道参与调节炎症因子表达<sup>[18-19]</sup>,故而本课题的单细胞测序结果提示肥胖时肠道炎症反应的激活。另外,有研究发现乌药水提取物可以通过JAK/STAT 信号通路调控结肠炎小鼠肠道炎症并通过上调Occludin等紧密连接蛋白保护肠屏障<sup>[20]</sup>。本实验通过对巨噬细胞亚群和B细胞亚群差异基因进行基因本体(GO)分析,发现这两类免疫细胞表达的差异基因生物学功能主要富集在与脂质代谢和炎症反应,提示肥胖疾病状态下免疫细胞激活状态改变,调节脂质代谢和炎症代谢紊乱。见增强出版附加材料。

**3.2 二陈汤对高脂饮食诱导的肥胖小鼠体质量及一般情况的影响** 与正常组比较,模型组小鼠体质量显著增加( $P<0.01$ );与模型组比较,二陈汤中剂量组小鼠体质量显著下降( $P<0.01$ )。与正常组比较,模型组小鼠血糖曲线下面积显著升高( $P<0.01$ ),四肢力量显著下降( $P<0.01$ );与模型组比较,二陈汤各剂量组小鼠血糖曲线下面积显著下降( $P<0.01$ ),四肢力量明显增加( $P<0.05, P<0.01$ )。见表2。

表2 二陈汤对C57小鼠体质量、血糖曲线下面积、力竭时间的影响( $\bar{x}\pm s, n=8$ )

Table 2 Effect of Erchentang on body weight, area under glucose curve, exhaustion time of C57 mice ( $\bar{x}\pm s, n=8$ )

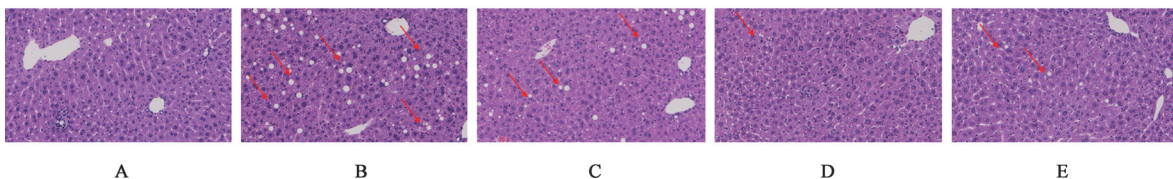
组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	体质量/g	血糖曲线下面积	力竭时间/s
正常组		27.98±2.61	1 394.83±200.58	96.00±17.69
模型组		33.18±0.99 <sup>1)</sup>	2 533.16±562.14 <sup>1)</sup>	54.16±12.28 <sup>1)</sup>
二陈汤低剂量组	7.5	31.00±1.06	1 838.83±178.81 <sup>3)</sup>	76.00±4.33 <sup>2)</sup>
二陈汤中剂量组	15	29.01±0.81 <sup>3)</sup>	1 617.33±197.31 <sup>3)</sup>	101.00±14.53 <sup>3)</sup>
二陈汤高剂量组	30	30.41±0.91	1 777.16±133.49 <sup>3)</sup>	89.50±8.87 <sup>3)</sup>

注:与空白组比较<sup>1)</sup> $P<0.01$ ;与模型组比较<sup>2)</sup> $P<0.05, ^3)$  $P<0.01$ (表5同)

**3.3 二陈汤对肥胖小鼠肝脏质量、肝功能、肝脏脂质沉积的影响** 与正常组比较,模型组小鼠肝脏质量、血清ALT和AST明显升高( $P<0.05, P<0.01$ );与模型组比较,二陈汤各剂量组小鼠肝脏质量、血清ALT和AST明显下降,差异具有统计学意义( $P<0.05, P<0.01$ );与正常组比较,模型组小鼠肝细胞出

现明显脂肪变性,表现为胞质内出现大量大小不等的圆形脂滴和脂肪空泡;与模型组比较,二陈汤各剂量组小鼠脂滴和脂肪空泡明显减少。见图1、表3和增强出版附加材料。

**3.4 二陈汤显著改善肥胖小鼠附睾和腹股沟WAT炎症** 附睾脂肪组织HE染色结果显示,正常组小



注:A.正常组;B.模型组;C-E.二陈汤低、中、高剂量组(图2-图4同)

图1 二陈汤对小鼠肝脏病理形态的影响(HE,×200)

Fig. 1 Effect of Erchentang on pathological morphology of mouse liver (HE,×200)

表3 二陈汤对C57小鼠肝脏质量、血清ALT、血清AST的影响 ( $\bar{x}\pm s, n=6$ )

Table 3 Effect of Erchentang on liver weight, serum ALT, and serum AST in C57 mice ( $\bar{x}\pm s, n=6$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	肝脏质量/g	血清ALT/U·L <sup>-1</sup>	血清AST/U·L <sup>-1</sup>
正常组		0.91±0.08	22.96±4.89	154.05±16.64
模型组		1.64±0.29 <sup>2)</sup>	92.36±33.53 <sup>2)</sup>	204.40±31.23 <sup>1)</sup>
二陈汤低剂量组	7.5	1.14±0.26 <sup>4)</sup>	35.55±7.73 <sup>4)</sup>	151.50±28.49 <sup>3)</sup>
二陈汤中剂量组	15	1.00±0.20 <sup>4)</sup>	29.30±9.52 <sup>4)</sup>	151.88±26.07 <sup>3)</sup>
二陈汤高剂量组	30	1.02±0.24 <sup>4)</sup>	26.80±9.78 <sup>4)</sup>	145.65±32.36 <sup>4)</sup>

注:与正常组比较<sup>1)</sup>P<0.05,<sup>2)</sup>P<0.01;与模型组比较<sup>3)</sup>P<0.05,<sup>4)</sup>P<0.01(表4同)

鼠脂肪细胞大小正常,未见明显M1型巨噬细胞围绕在凋亡或坏死的脂肪细胞周围形成的冠状结构。与正常组比较,模型组小鼠脂肪细胞体积明显增大,由M1型巨噬细胞环绕形成的冠状结构明显增多。与模型组比较,二陈汤各剂量组小鼠脂肪细胞体积减小,冠状结构明显减少,其中二陈汤中剂量组小鼠改善最为明显。见图2。

腹股沟WAT HE染色结果显示,正常组小鼠脂肪细胞大小正常,未见明显冠状结构。与正常组比较,模型组小鼠脂肪细胞体积明显增大,冠状结构明显增多。与模型组比较,二陈汤各剂量组小鼠脂肪细胞体积明显减小,冠状结构减少。附睾和腹股沟WAT的HE染色结果提示二陈汤改善肥胖引起的脂肪细胞体积增大和脂肪组织炎症增加。见图3。

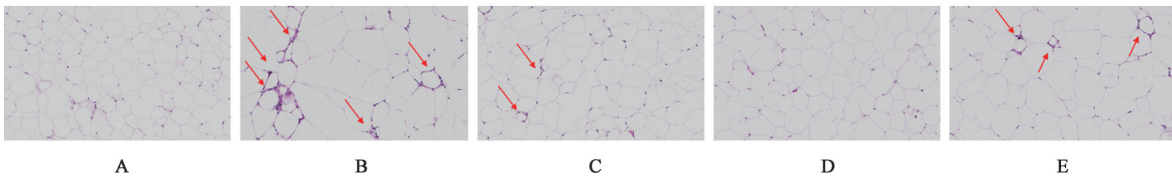


图2 二陈汤对肥胖小鼠附睾脂肪组织病理变化的影响 (HE, ×200)

Fig. 2 Effect of Erchentang on pathological changes of epididymal adipose tissue in obese mice (HE, ×200)

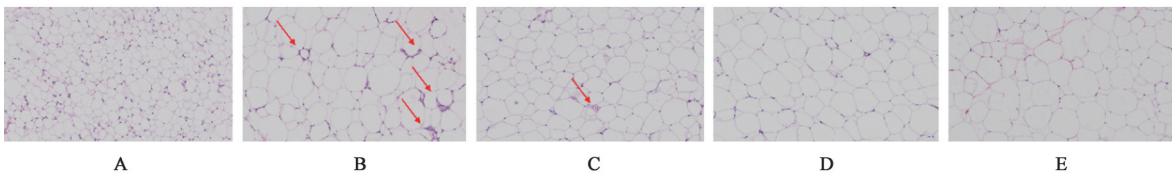


图3 二陈汤对肥胖小鼠腹股沟脂肪组织病理变化的影响 (HE, ×200)

Fig. 3 Effect of Erchentang on pathological changes of inguinal adipose tissue in obese mice (HE, ×200)

**3.5 蛋白对接预测** 根据课题组前期正常组与肥胖组小鼠回肠单细胞转录组学研究提示,本研究将CD68分别与ZO-1、Claudin-5, CD206分别与ZO-1、Claudin-5进行蛋白对接预测蛋白之间互作的可能性。结果提示,CD68与ZO-1 ipTM=0.27、pTM=0.34,结合自由能为-245.44 kcal·mol<sup>-1</sup>(1 cal≈4.184 J)。CD68与Claudin-5 ipTM=0.2、pTM=0.42,结合自由能为-70.73 kcal·mol<sup>-1</sup>。CD206与ZO-1 ipTM=0.43、pTM=0.47,结合自由能为-386.73 kcal·mol<sup>-1</sup>。CD206与Claudin-5 ipTM=0.28、pTM=0.48,结合自由能为-47.25 kcal·mol<sup>-1</sup>,上述预测结果表明蛋白之间存在互作可能性。见增强出版附加材料。

**3.6 分子对接预测** 在AutoDockTools 1.5.6软件中,通过对核心靶点ZO-1、Claudin-5和核心活性成

分陈皮素、香叶木素、柚皮素进行分子对接。结果发现,ECD中3种核心活性成分与关键靶点结合能均为负值,表明活性成分与核心靶点具有一定的结合活性,见增强出版附加材料。其中Claudin-5-香叶木素结合能为-6.6 kcal·mol<sup>-1</sup>,Claudin-5-柚皮素结合能为-6.2 kcal·mol<sup>-1</sup>,Claudin-5-陈皮素结合能为-5.9 kcal·mol<sup>-1</sup>,ZO-1-香叶木素结合能为-6.5 kcal·mol<sup>-1</sup>,ZO-1-柚皮素结合能为-6.6 kcal·mol<sup>-1</sup>,ZO-1-陈皮素结合能为-5.7 kcal·mol<sup>-1</sup>,并使用PyMOL 2.1.0进行可视化处理。见增强出版附加材料。

**3.7 二陈汤显著改善肥胖小鼠回肠炎症、紧密连接蛋白mRNA和紧密连接蛋白表达** 与正常组比较,模型组小鼠促炎基因TNF-α、iNOS、IL-1β、CD68

mRNA 表达明显升高 ( $P<0.05, P<0.01$ ), 抑炎基因 CD206 mRNA 表达显著下降 ( $P<0.01$ ); 与模型组比较, 二陈汤各剂量组小鼠 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、CD68 mRNA 表达明显下降 ( $P<0.05, P<0.01$ ), CD206 mRNA 表达明显升高 ( $P<0.05, P<0.01$ )。与正常组

比较, 模型组小鼠回肠紧密连接蛋白基因 Claudin-5 和 ZO-1 mRNA 表达明显下降 ( $P<0.05, P<0.01$ ); 与模型组比较, 二陈汤各剂量组小鼠 Claudin-5 和 ZO-1 mRNA 表达明显升高, 差异有统计学意义 ( $P<0.05, P<0.01$ )。见表 4。

表 4 二陈汤对 C57 小鼠回肠 TNF- $\alpha$ 、iNOS、IL-1 $\beta$ 、CD68、CD206、Claudin-5、ZO-1 mRNA 水平的影响 ( $\bar{x}\pm s, n=6$ )

Table 4 Effect of Erchentang on mRNA expression levels of TNF- $\alpha$ , iNOS, IL-1 $\beta$ , CD68, CD206, Claudin-5, and ZO-1 in ileum of C57 mice ( $\bar{x}\pm s, n=6$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	TNF- $\alpha$	iNOS	IL-1 $\beta$	CD68	CD206	Claudin-5	ZO-1
正常组		1.03±0.56	0.67±1.04	1.03±0.31	0.87±0.43	1.89±0.45	1.78±0.54	1.67±0.29
模型组		1.67±0.87 <sup>1)</sup>	1.35±0.65 <sup>2)</sup>	2.34±0.35 <sup>2)</sup>	1.89±0.65 <sup>2)</sup>	0.87±0.56 <sup>2)</sup>	1.17±0.37 <sup>1)</sup>	0.59±0.39 <sup>2)</sup>
二陈汤低剂量组	7.5	0.98±0.32 <sup>3)</sup>	1.11±0.43	1.54±0.56 <sup>3)</sup>	0.98±0.14 <sup>3)</sup>	1.54±0.53 <sup>3)</sup>	1.93±0.32 <sup>4)</sup>	1.98±0.21 <sup>4)</sup>
二陈汤中剂量组	15	0.87±0.54 <sup>4)</sup>	0.63±0.43 <sup>4)</sup>	1.31±0.56 <sup>4)</sup>	1.15±0.36 <sup>4)</sup>	1.78±0.35 <sup>4)</sup>	1.49±0.43 <sup>3)</sup>	1.35±0.65 <sup>3)</sup>
二陈汤高剂量组	30	0.67±0.45 <sup>4)</sup>	1.12±0.54	1.45±0.64 <sup>3)</sup>	0.75±0.14 <sup>4)</sup>	1.76±0.19 <sup>4)</sup>	1.56±0.25	1.54±0.43 <sup>4)</sup>

免疫荧光染色结果显示, 与正常组比较, 模型组小鼠紧密连接蛋白 Claudin-5 和 ZO-1 表达显著下降 ( $P<0.01$ ); 与模型组比较, 二陈汤各剂量组小鼠

ZO-1 蛋白表达明显升高 ( $P<0.05, P<0.01$ ), 二陈汤中剂量组 Claudin-5 蛋白表达显著升高 ( $P<0.01$ )。见图 4 和表 5。

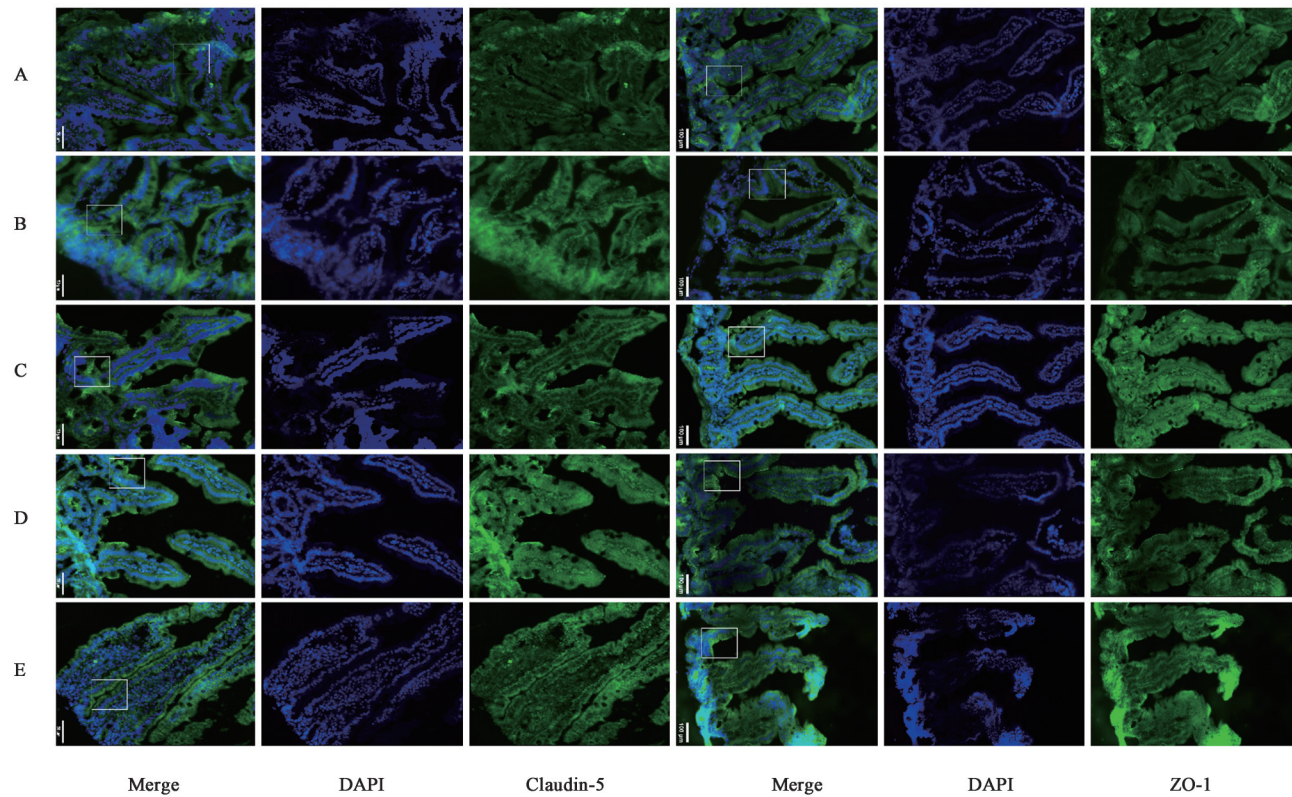


图 4 二陈汤对 C57 肥胖小鼠回肠 ZO-1 和 Claudin-5 表达水平的影响 (免疫荧光,  $\times 200$ )

Fig. 4 Effect of Erchentang on expression levels of ZO-1 and Claudin-5 in ileum of C57 obese mice (IF,  $\times 200$ )

#### 4 讨论

世界卫生组织 (WHO) 将肥胖定义为对健康构成风险的异常或过度脂肪积累<sup>[21]</sup>, 曾被认为只代表疾病风险因素, 但是世界肥胖联合会宣布肥胖本身是一

种慢性、复发性进行性疾病<sup>[22]</sup>。中医药在肥胖管理与治疗方面显示出巨大的潜力, 中医临床最常用的减重干预是针刺、艾灸等外治疗法配合中药或膳食调理体质<sup>[23]</sup>。目前越来越多的国内外研究显示, 中医药对治

表5 二陈汤对C57肥胖小鼠ZO-1和Claudin-5表达水平的影响  
( $\bar{x}\pm s, n=4$ )

Table 5 Effect of Erchentang on expression levels of ZO-1 and Claudin-5 in obese mice ( $\bar{x}\pm s, n=4$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	ZO-1 荧光强度	Claudin-5 荧光强度
正常组		74.47±5.14	76.17±7.04
模型组		52.47±4.71 <sup>1)</sup>	44.37±9.90 <sup>1)</sup>
二陈汤低剂量组	7.5	69.62±4.61 <sup>2)</sup>	49.67±2.18
二陈汤中剂量组	15	73.62±4.64 <sup>3)</sup>	79.10±1.70 <sup>3)</sup>
二陈汤高剂量组	30	68.02±3.64 <sup>3)</sup>	50.35±4.67

疗单纯性肥胖具有良好的疗效和安全性<sup>[24-27]</sup>。

笔者在之前的研究中发现二陈汤可以显著改善高脂饮食引起的肥胖小鼠血糖异常升高<sup>[17]</sup>，在本实验中，二陈汤同样显著改善了肥胖小鼠葡萄糖代谢紊乱。另外，粪便含水量测定表明二陈汤治疗可以改善因高脂饮食喂养引起的粪便含水量增加。肥胖会引起肌肉力量下降，表现为乏力，本研究发现二陈汤可以显著改善乏力症状<sup>[28]</sup>。既往研究表明，肥胖会引起肝脏脂肪变性，肝体积增大，肝细胞胞质内出现大小不等的脂滴空泡<sup>[29]</sup>，本实验表明二陈汤可以显著降低肝脏质量，改善肥胖引起的肝脂肪变性，另外还可以显著改善肥胖引起的肝功能异常。

肥胖时附睾WAT与腹股沟WAT表现为脂肪细胞体积增大，另外，M1型巨噬细胞围绕在坏死或凋亡的脂肪细胞周围形成冠状结构，这表示肥胖状态下脂肪组织炎症浸润增加<sup>[30-32]</sup>，本实验表明二陈汤治疗后改善了肥胖引起的脂肪细胞体积增大和脂肪组织炎症浸润的情况。

本课题组前期回肠单细胞转录组学发现模型组与正常组相比免疫细胞差异基因GO分析生物学功能富集主要与脂质代谢和炎症代谢有关，且与“JAK/STAT信号通路”炎症通路相关，这提示肥胖状态下肠道炎症反应的激活。健康状态下肠道屏障不仅可以促进营养吸收，还可以限制有害或者不需要的物质进入体内<sup>[33]</sup>。脂肪组织的积聚和炎症浸润会破坏肠道屏障结构，损害肠屏障完整性，影响紧密连接蛋白表达和分布，肠道屏障完整性的丧失和肠道通透性增加目前被广泛认为是肥胖并发症<sup>[34]</sup>。研究显示，高脂饮食诱导的肥胖小鼠肠道炎症增加，肠道通透性增加，小肠紧密连接蛋白ZO-1和Claudin-1水平降低<sup>[35]</sup>。本实验在课题组前期单细胞测序研究的基础上进一步探索回肠炎症和免疫屏障与肥胖之间的关系。蛋白对接预测提示炎症蛋白CD68与ZO-1、Claudin-5，CD206与ZO-1、

Claudin-5存在互作可能性。分子对接预测提示二陈汤鉴定到的关键化合物陈皮素、香叶木素、柚皮素与ZO-1、Claudin-5均有较好的结合活性。Real-time PCR结果表明二陈汤可以显著抑制回肠促炎基因CD68、TNF- $\alpha$ 、iNOS、IL-1 $\beta$ 表达，促进抑炎基因CD206表达。回肠免疫荧光染色提示二陈汤治疗后回肠紧密连接蛋白ZO-1和Claudin-5表达增加。ZO-1和Claudin家族蛋白构成了肠黏膜屏障，而高脂饮食会导致上述肠连接蛋白表达下调<sup>[36-37]</sup>。

综上所述，本实验通过体质量等一般情况的监测、血糖、血清肝功能、肝脏和内脏及皮下WAT病理学分析在整体水平上评估二陈汤改善肥胖的整体疗效。课题组前期单细胞测序分析为本实验的机制研究提供了依据，本实验发现二陈汤可以显著降低肥胖小鼠体质量，这与二陈汤显著改善回肠炎症环境，增加紧密连接蛋白ZO-1和Claudin-5表达，进而修复肥胖小鼠回肠免疫屏障有关。见增强出版附加材料。

## 5 不足与展望

首先，蛋白预测结果提示pTM/ipTM分值较低，虽然意味着预测的蛋白之间的结合能力较弱，但是不能直接证明蛋白之间没有互作可能性，在今后的实验中将完善该部分研究。其次，本实验中二陈汤中剂量组对肥胖小鼠体质量改善最为显著，但是在其他指标方面有的结果以低剂量效果最为显著或者以高剂量效果最为显著，这可能是由于二陈汤具有多靶点、多通路的调控作用，因此不同剂量可能激活或抑制不同的生物过程，从而导致对不同病理指标的作用差异。另外，本实验基于课题组前期对正常小鼠和高脂饮食诱导的肥胖小鼠回肠单细胞转录组学研究二陈汤改善肥胖的机制，在今后的研究中可以将二陈汤最佳剂量组纳入单细胞转录组学研究以更加深入地探讨其作用机制。上述不足之处，将在今后的研究中不断完善，以更加全面深入地研究二陈汤改善高脂饮食诱导的单纯性肥胖小鼠体质量的作用机制。尽管存在上述不足之处，本研究仍然为肥胖的机制研究及临床用药提供了理论支持，为今后的临床转化提供依据。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

## [参考文献]

- [1] LI J, CHEN Z, WANG Q, et al. Microbial and metabolic profiles unveil mutualistic microbe-microbe interaction in obesity-related colorectal cancer[J]. Cell Rep Med, 2024, 5(3):101429.

- [ 2 ] HARIHARAN R, ODJIDJA E N, SCOTT D, et al. The dietary inflammatory index, obesity, type 2 diabetes, and cardiovascular risk factors and diseases[J]. *Obes Rev*, 2022, 23(1):e13349.
- [ 3 ] POWELL-WILEY T M, POIRIER P, BURKE L E, et al. Obesity and cardiovascular disease: A scientific statement from the American Heart Association[J]. *Circulation*, 2021, 143(21):e984-e1010.
- [ 4 ] JEBEILE H, KELLY A S, O'MALLEY G, et al. Obesity in children and adolescents: Epidemiology, causes, assessment, and management[J]. *Lancet Diabetes Endocrinol*, 2022, 10(5):351-365.
- [ 5 ] PAN X F, WANG L, PAN A. Epidemiology and determinants of obesity in China[J]. *Lancet Diabetes Endocrinol*, 2021, 9(6):373-392.
- [ 6 ] TSATSOULOS A, PASCHOU S A. Metabolically healthy obesity: Criteria, epidemiology, controversies, and consequences[J]. *Curr Obes Rep*, 2020, 9(2):109-120.
- [ 7 ] HILDRETH A D, MA F, WONG Y Y, et al. Single-cell sequencing of human white adipose tissue identifies new cell states in health and obesity[J]. *Nat Immunol*, 2021, 22(5):639-653.
- [ 8 ] LEE Y S, OLEFSKY J. Chronic tissue inflammation and metabolic disease[J]. *Genes Dev*, 2021, 35(5/6):307-328.
- [ 9 ] LIU Z, ZHAO J, SUN R, et al. *Lactobacillus plantarum* 23-1 improves intestinal inflammation and barrier function through the TLR4/NF- $\kappa$ B signaling pathway in obese mice[J]. *Food Funct*, 2022, 13(11):5971-5986.
- [ 10 ] LOMBARDO G E, NAVARRA M, CREMONINI E. A flavonoid-rich extract of bergamot juice improves high-fat diet-induced intestinal permeability and associated hepatic damage in mice[J]. *Food Funct*, 2024, 15(19):9941-9953.
- [ 11 ] YANG J, LI W, WANG Y. Capsaicin reduces obesity by reducing chronic low-grade inflammation[J]. *Int J Mol Sci*, 2024, 25(16):8979.
- [ 12 ] DENG G, LI J, HUANG M, et al. Erchentang alleviates the progression of NAFLD by inhibiting lipid accumulation and iron overload through Caveolin-1 signaling [J]. *J Ethnopharmacol*, 2024, 319(Pt 3):117320.
- [ 13 ] ZHANG L, CHEN N, ZHAN L, et al. Erchentang alleviates obesity-related hepatic steatosis via modulating gut microbiota-driven butyric acid contents and promoting fatty acid  $\beta$ -oxidation[J]. *J Ethnopharmacol*, 2023, 317:116811.
- [ 14 ] KANG Y, KANG X, YANG H, et al. *Lactobacillus acidophilus* ameliorates obesity in mice through modulation of gut microbiota dysbiosis and intestinal permeability [J]. *Pharmacol Res*, 2022, 175:106020.
- [ 15 ] 朱梦梦, 王立鑫, 封若雨, 等. 脾虚湿阻型单纯性肥胖小鼠模型的构建及评价[J]. *中国中医基础医学杂志*, 2021, 27(2):247-250, 328.
- ZHU M M, WANG L X, FENG R Y, et al. Construction and evaluation of a mouse model of simple obesity with spleen deficiency and damp stagnation[J]. *Chin J Basic Med Tradit Chin Med*, 2021, 27(2):247-250, 328.
- [ 16 ] 黄继汉, 黄晓晖, 陈志扬, 等. 药理试验中动物间和动物与人体间的等效剂量换算[J]. *中国临床药理学与治疗学*, 2004, 9(9):1069-1072.
- HUANG J H, HUANG X H, CHEN Z Y, et al. Dose conversion among different animals and healthy volunteers in pharmacological study[J]. *Chin J Clin Pharmacol Ther*, 2004, 9(9):1069-1072.
- [ 17 ] CHEN J W, LIU M H, YANG Z D, et al. Erchentang alleviates anxiety and depression-like behaviors in high-fat diet-induced obesity mice via the adipose-brain axis [J]. *J Ethnopharmacol*, 2025, 352:120218.
- [ 18 ] YANG X, WANG Q, SHAO F, et al. Cell volume regulation modulates macrophage-related inflammatory responses via JAK/STAT signaling pathways[J]. *Acta Biomater*, 2024, 186:286-299.
- [ 19 ] FU X, SUN Z, LONG Q, et al. Glycosides from Buyang Huanwu decoction inhibit atherosclerotic inflammation via JAK/STAT signaling pathway[J]. *Phytomedicine*, 2022, 105:154385.
- [ 20 ] WANG Y, LAI W, ZHENG X, et al. *Linderae Radix* extract attenuates ulcerative colitis by inhibiting the JAK/STAT signaling pathway[J]. *Phytomedicine*, 2024, 132:155868.
- [ 21 ] DICKER D, KARPATI T, PROMISLOW S, et al. Implications of the European Association for the Study of Obesity's new framework definition of obesity prevalence and association with all-cause mortality [J]. *Ann Intern Med*, 2025, 178(8):1065-1072.
- [ 22 ] SALTIEL A R, OLEFSKY J M. Inflammatory mechanisms linking obesity and metabolic disease[J]. *J Clin Invest*, 2017, 127(1):1-4.
- [ 23 ] 中华中医药学会《中医体重管理临床指南》专家组, 广东省针灸学会肥胖专病联盟. 肥胖症中医诊疗方案专家共识 [J]. *北京中医药大学学报*, 2022, 45(8):786-794.
- Panel of Clinical Guideline for Body Weight Management in TCM of China Association of Chinese Medicine, Obesity League of Guangdong Association of Acupuncture-Moxibustion. Expert consensus on diagnosis and treatment of obesity in TCM[J]. *J Beijing Univ Tradit Chin Med*, 2022, 45(8):786.
- [ 24 ] 王萍, 符宇, 颜焱, 等. 清热祛湿颗粒对湿热型单纯性肥胖患者的临床疗效[J]. *中成药*, 2024, 46(12):4002-4009.
- WANG P, FU Y, YAN Y, et al. Clinical effects of Qingre Qushi granules on patients with simple obesity due to damp-heat type[J]. *Chin Tradit Pat Med*, 2024, 46(12):4002-4009.
- [ 25 ] 程诗雨, 陈晓云, 谭奚扬, 等. 橘红提取物对非酒精性脂肪肝合并肥胖肠道菌群及中医体质影响的随机对照研究[J]. *中国中西医结合杂志*, 2024, 4(10):1206-1214.
- CHENG S Y, CHEN X Y, TAN X Y, et al. Effects of *Exocarpium Citri Rubrum* extract on intestinal flora and Chinese medicine constitution in non-alcoholic fatty liver

- disease with obesity: A randomized controlled trial[J]. *Chin J Integr Tradit West Med*, 2024, 44(10): 1206-1214.
- [26] 郑宏, 赵文杰, 任明月. 半夏泻心汤加味治疗儿童单纯性肥胖胃强脾滞证的临床随机对照观察[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2024, 30(15): 107-113.
- ZHENG H, ZHAO W J, REN M Y. Modified Banxia Xiexintang for treatment of simple obesity in children with syndrome of stomach hyperactivity and spleen stagnation: A randomized controlled study [J]. *Chin J Exp Tradit Med Form*, 2024, 30(15): 107-113.
- [27] ZHOU Y, ZHANG D, CHENG H, et al. Repairing gut barrier by traditional Chinese medicine: Roles of gut microbiota[J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2024, 14: 1389925.
- [28] XIANG X, ZHU Y, PAN X, et al. ER stress aggravates diaphragm weakness through activating PERK/JNK signaling in obesity hypoventilation syndrome [J]. *Obesity*, 2023, 31(8): 2076-2089.
- [29] WU T, LIU Q, LI Y, et al. Feeding-induced hepatokine, Manf, ameliorates diet-induced obesity by promoting adipose browning via p38 MAPK pathway[J]. *J Exp Med*, 2021, 218(6): e20201203.
- [30] DING L, YANG Q, ZHANG E, et al. Notoginsenoside Ft1 acts as a TGR5 agonist but FXR antagonist to alleviate high fat diet-induced obesity and insulin resistance in mice [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2021, 11(6): 1541-1554.
- [31] SON YL, HOU J, KATO-SUZUKI M, et al. Eval deficiency prevents obesity-induced metabolic disorders by reducing visceral adipose dysfunction [J]. *Metabolism*, 2025, 168: 156235.
- [32] SAKAMOTO K, BUTERA M A, ZHOU C, et al. Overnutrition causes insulin resistance and metabolic disorder through increased sympathetic nervous system activity [J]. *Cell Metab*, 2025, 37(1): 121-137.
- [33] DE V W, TILG H, VAN H M, et al. Gut microbiome and health: Mechanistic insights[J]. *Gut*, 2022, 71(5): 1020-1032.
- [34] MAQOUD F, CALABRESE F M, CELANO G, et al. Role of increasing body mass index in gut barrier dysfunction, systemic inflammation, and metabolic dysregulation in obesity [J]. *Nutrients*, 2024, 17(1): 72.
- [35] HUANG C C, WANG C H, YEH H Y, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha/\gamma$  and cannabinoid receptor 2 agonist attenuated nonalcoholic steatohepatitis exosome-related abnormalities in mice[J]. *Am J Pathol*, 2025, 195(2): 188-203.
- [36] GAO Y, GUO M, CHEN J, et al. A ginseng polysaccharide protects intestinal barrier integrity in high-fat diet-fed obese mice[J]. *Int J Biol Macromol*, 2024, 277(Pt 1): 133976.
- [37] ZHANG Z, LIN T, MENG Y, et al. FOS/GOS attenuates high-fat diet induced bone loss via reversing microbiota dysbiosis, high intestinal permeability and systemic inflammation in mice[J]. *Metabolism*, 2021, 119: 154767.

[责任编辑 顾雪竹]