

温胆汤对肥胖痰湿证大鼠相关炎症因子及 JAK2/STAT3 通路关键分子 STAT3 表达的影响

喻松仁, 舒晴, 白洋, 姚琦, 王河宝, 周丽, 王萍, 程绍民*
(江西中医药大学, 南昌 330004)

[摘要] **目的:**观察温胆汤对肥胖痰湿证大鼠外周血肿瘤坏死因子- α (TNF- α), 白细胞介素 (IL)-6, IL-17, IL-22 等相关炎症因子以及下丘脑组织 Janus 激酶 2/信号传导子及转录激活子 3 (JAK2/STAT3) 信号通路关键分子 STAT3 mRNA 和蛋白表达的影响, 探讨温胆汤干预肥胖痰湿证的内在作用机制。**方法:**将 100 只大鼠随机分成 2 组 (空白组 30 只和造模组 70 只), 空白组采用基础饲料喂养, 造模组采用高脂饲料喂养, 共 6 周, 制作肥胖痰湿证动物模型。造模成功后, 视体质量情况, 按顺序淘汰体质量过轻者, 遴选出 16 只肥胖大鼠, 并随机分成模型组和温胆汤干预组, 每组 8 只; 另在空白组大鼠中随机选取 8 只设为正常组。温胆汤干预组按剂量 $15 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ (以生药量计算) 进行灌胃, 模型组和正常组均给予等量蒸馏水进行灌胃, 每天 1 次, 共 6 周。麻醉处理前 12 h 禁食不禁水, 麻醉后进行样本取材, 检测并计算大鼠体质量, Lee's 指数和肥胖率, 根据试剂盒要求采用全自动生化分析仪检测大鼠总胆固醇 (TC), 甘油三酯 (TG), 低密度脂蛋白胆固醇 (LDL-C) 和高密度脂蛋白胆固醇 (HDL-C) 水平; 采用酶联免疫吸附测定法 (ELISA) 检测大鼠外周血血清中相关细胞因子 TNF- α , IL-17, IL-22, IL-6 的表达; 采用实时荧光定量聚合酶链式反应 (Real-time PCR) 技术检测大鼠下丘脑组织中 STAT3 mRNA 的表达; 采用蛋白免疫印迹法 (Western blot) 测定大鼠下丘脑组织中 STAT3 蛋白的表达。**结果:**高脂饲料喂养成功复制了肥胖大鼠模型, 造模组大鼠肥胖率 $> 20\%$, 且与空白组比较, 造模组体质量和 Lee's 指数显著升高 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。与正常组比较, 模型组大鼠体质量显著升高 ($P < 0.01$), 血脂水平显著改变 ($P < 0.01$), 相关炎症因子 (TNF- α , IL-6, IL-17 和 IL-22) 的水平显著升高 ($P < 0.01$), 下丘脑组织中 STAT3 mRNA 和蛋白的表达显著升高 ($P < 0.01$)。与模型组比较, 温胆汤干预组大鼠体质量和 Lee's 指数显著下降 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 血脂水平显著变化 ($P < 0.01$), 相关炎症因子 (TNF- α , IL-6, IL-17 和 IL-22) 的水平显著下降 ($P < 0.01$), 下丘脑组织中 STAT3 mRNA 和蛋白的表达显著下降 ($P < 0.01$)。**结论:**温胆汤可改善肥胖大鼠痰湿病理状态, 其作用机制可能与调节 JAK2/STAT3 信号通路进而改善机体的慢性炎症状态有关, 为温胆汤干预肥胖痰湿证提供了实验依据。

[关键词] 肥胖痰湿证; 温胆汤; 炎症因子; 信号传导子及转录激活子 3 (STAT3); Janus 激酶 2/STAT3 通路; Lee's 指数; 慢性炎症

[中图分类号] R22; R24; R28; C37; R723.14 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2019)06-0039-06

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20190448

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20181031.1012.019.html>

[网络出版时间] 2018-11-02 10:03

Effect of Wendantang on Related Inflammatory Factors and Expression of STAT3 as a Key Molecule in JAK2/STAT3 Pathway of Rats with Obesity Phlegm-dampness Syndrome

YU Song-ren, SHU Qing, BAI Yang, YAO Qi, WANG He-bao, ZHOU Li, WANG Ping, CHENG Shao-min*
(Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the effect of Wendantang on tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin (IL)-6, IL-17, IL-22 and other related inflammatory factors in peripheral blood and the expression of STAT3 [the key molecule of Janus kinase 2/signal transducer and activator of transcription 3 (JAK2/STAT3)]

[收稿日期] 20180919(012)

[基金项目] 江西省自然科学基金项目(20171BAB205080); 江西省教育厅科学技术研究项目(GJJ170712, GJJ160830); 国家中医药管理局第四批全国中医(临床, 基础)优秀人才研修项目(国中医药人教发【2017】24号)

[第一作者] 喻松仁, 博士, 副教授, 硕士生导师, 从事中医证的本质研究, Tel: 0791-87119829, E-mail: 48877086@qq.com

[通信作者] *程绍民, 教授, 硕士生导师, 从事中医证的基础研究, E-mail: 21674494@qq.com

signal pathway in hypothalamus] mRNA and protein of obese rats with syndrome of phlegm-dampness, so as to explore the internal mechanism of Wendantang in interfering obesity with syndrome of phlegm-dampness. **Method:** A total of 100 rats were randomly divided into blank group (30 rats) and modeling group (70 rats), rats in the blank group was fed with basic feed and the modeling group was fed with high-fat feed for 6 weeks. Animal model of obesity with syndrome of phlegm-dampness was established by the method in literature. After successful modeling, 16 obese rats were selected and randomly divided into the model group and Wendantang intervention group with 8 rats in each group, and another 8 rats in the blank group were randomly selected as the normal group. Rats in Wendantang intervention group were given $15 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ of crude drug by gavage, while the model group and the normal group were given the same amount of distilled water for gavage once a day for 6 weeks. No eating but no prohibiting drinking before dealing with 12 h and then taking samples after anesthesia. The body weight, Lee's index and obesity rate of rats were measured, the levels of blood lipids [total cholesterol (TC), triglyceride (TG), low density lipoprotein cholesterol (LDL-C) and high density lipoprotein cholesterol (HDL-C)] of rats were detected with a full-automatic biochemical analyzer according to the requirements of the kit, the expression of TNF- α , IL-17, IL-22 and IL-6 in peripheral blood of rats was detected with enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), STAT3 mRNA expression in hypothalamus of rats was detected with real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction (Real-time PCR) and the expression of STAT3 protein in hypothalamus of rats was detected with Western blot. **Result:** The high-fat feed feeding could successfully replicate the obese rat model, and the obesity rate of rats in the modeling group was greater than 20%, and compared with the blank group, the body weight and Lee's index of rats in the modeling group were significantly increased ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Compared with the normal group, the body weight of rats in the model group was significantly increased ($P < 0.01$), blood lipid level changed greatly ($P < 0.01$), levels of related inflammatory factors were significantly increased ($P < 0.01$), the STAT3 mRNA and protein expression in hypothalamus tissue of rats was significantly increased ($P < 0.01$). Compared with the model group, the body weight and Lee's index of rats in Wendantang intervention group significantly decreased ($P < 0.05$, $P < 0.01$), blood lipid level significantly changed ($P < 0.01$), levels of related inflammatory factors were significantly decreased ($P < 0.01$), the STAT3 mRNA and protein expression in hypothalamus tissue of rats in Wendantang intervention group was significantly decreased ($P < 0.01$). **Conclusion:** Wendantang has a good effect on improving phlegm-dampness in obese rats, and the mechanism may be related to regulating JAK2/STAT3 signal pathway then to improve the chronic inflammatory state of the body, and all of which provides a scientific basis for Wendantang in intervening obesity with syndrome of phlegm-dampness.

[**Key words**] obesity with syndrome of phlegm-dampness; Wendantang; inflammatory factors; signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3); Janus kinase 2/STAT3 (JAK2/STAT3) pathway; Lee's index; chronic inflammation

肥胖不仅是一种严重的慢性代谢障碍性疾病,更是诱发糖尿病、心血管疾病及癌症等多种复杂性疾病的重要危险因素,现已被世界卫生组织列为导致疾病负担的六大危险因素之一。中医认为肥胖与“痰湿”密切相关,“痰湿”在肥胖及相关疾病的分型和辨证中是极其重要的证素^[1-3];研究已证实,以温胆汤(出自姚僧垣的《集验方》)随症加减应用于肥胖及肥胖相关疾病,取得了显著效果^[4-6]。现代研究表明肥胖与慢性炎症的关系极为密切^[7],且 Janus 激酶 2 (JAK2)/信号传导子及转录激活子 3 (STAT3) 信号通路是介导众多细胞因子及炎症介质信号转导的重要途径,并与肿瘤坏死因子- α (TNF-

α), 白细胞介素 (IL)-6, IL-17 和 IL-22 等相关免疫炎症因子的表达密切相关^[8-9]。本实验拟选择高脂喂养法制备大鼠肥胖痰湿证模型^[10],文献[10]已明确提出高脂喂养的大鼠不仅符合痰湿证的特征,且具有肥胖、脂肪肝、高脂血症、葡萄糖耐受异常和胰岛素抵抗等特点,本课题组前期研究也发现高脂喂养的肥胖大鼠确实存在 Lee's 指数、血脂和血糖等指标的明显改变^[11]。故本实验借助高脂喂养大鼠来模拟人类肥胖痰湿病理的形成与发展情况,并采用温胆汤进行干预,观察该复方对肥胖大鼠外周血中相关炎症因子以及下丘脑组织 JAK2/STAT3 信号通路关键分子 STAT3 的 mRNA 和蛋白表达的影响,

以探讨温胆汤干预肥胖痰湿证的内在机制。

1 材料

Aeroset-2000 型全自动生化分析仪(美国 Abbott 公司), Synergy2 型酶标仪(美国 BioTek 公司), AC8 型洗板机(美国 Thermo Labsystems 公司), TG16W 型微量高速离心机(湖南吉尔森科技发展有限公司), GNP-9080 型隔水式恒温培养箱(湖南湘鑫科贸发展有限公司), ZYTEST-I-20L 型纯水仪(四川卓越水处理设备有限公司), Odyssey 型双色红外荧光成像系统(美国 LI-COR 公司); T100-Thermal Cycler 型聚合酶链式反应(PCR)仪, 2800-00 型实时荧光定量 PCR (Real-time PCR) 仪和 164-5052 型 Powerpac-HC 电泳仪(美国 Bio-Rad 公司), DU-730 型紫外分光光度计(美国 Beckman 公司), Tanon-5200 型全自动化学发光分析仪(上海天能科技有限公司)。

血脂总胆固醇(TC), 甘油三酯(TG), 低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)和高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)试剂盒(南京建成生物工程研究所, 批号分别为 AD20180109, AD20180109, AD20180105, AD20180109); 肿瘤坏死因子- α (TNF- α), 白细胞介素(IL)-6, IL-17 和 IL-22 试剂盒(安迪华泰生物科技有限公司, 批号分别为 AD20180105, AD20180106, AD20180105, AD20180105); Trizol(美国 Ambion 公司, 批号 117303), SYBR Green PCR 试剂盒(美国 KAPA Biosystems 公司, 批号 005196-21-1), 逆转录 PCR 试剂盒(日本 Takara 公司, 批号 AK5017), 脱氧核糖核酸酶 I (DNase I, 加拿大 Fermentas 公司, 批号 00173124), 引物由南京金斯瑞生物科技有限公司合成, 信号传导子及转录激活子 3(STAT3) 抗体(英国 Abcam 公司, 批号 GR160821-3), 甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH, 德国 CST 公司, 批号 5174), 化学发光试剂盒(美国 Millipore 公司, 批号 1801501), 显影定影试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司, 批号 042018180723); 焦碳酸二乙酯(DEPC, 批号 20171212), 二抗——山羊抗兔免疫球蛋白(Ig)G(批号 20170505)和山羊抗鼠 IgG(批号 20170711)均购自北京 Solarbio 公司; 水为蒸馏水。

雄性 SPF 级 SD 大鼠共 100 只, 体质量(60 \pm 10) g, 由湖南斯莱克景达实验动物有限公司提供, 合格证号 SCXK(湘)2016-0002, 经江西中医药大学实验动物伦理委员会审查通过, 批准号 JZLISC2018-028。

2 方法

2.1 造模 采用高脂饮食诱导制作肥胖 SD 大鼠痰湿证模型^[10]。饲料配方为在 100 g 基础饲料中加入猪油和全脂奶粉各 15 g, 蛋黄粉 10 g, 猪胆盐 0.5 g 及浓缩鱼肝油适量等组成, 由湖南斯莱克景达实验动物有限公司加工成条索状, B 级。将 SD 大鼠置于江西中医药大学基础医学院动物中心动物房适应性饲养 1 周, 之后随机分成 2 组, 其中造模组 70 只, 空白组 30 只。造模组给予高脂饲料喂养, 空白组采用基础饲料喂养, 共 6 周。按造模大鼠正常消耗配予高脂饲料, 以次日略有剩余为度。6 周后称取体质量, 视体质量情况按顺序淘汰体质量过轻者。以肥胖模型建立的标准[(造模动物体质量 - 正常动物体质量)/正常动物体质量 \geq 20%]纳入动物。以血脂显著升高作为肥胖痰湿形成的微观指标^[10,12]。

2.2 药物的制备及用法 温胆汤(由陈皮 10 g, 半夏 10 g, 茯苓 10 g, 炙甘草 3 g, 竹茹 10 g, 枳实 10 g, 生姜 5 片和大枣 1 枚等组成)所含的药材均由江西中医药大学杏林国医研究室中医门诊部提供, 经江西中医药大学曹岚副教授鉴定, 均符合 2015 年版《中国药典》的相关规定。以上药物加 10 倍量水浸泡 1 h 左右, 煎煮 2 次, 每次约 50 min, 过滤, 合并 2 次滤液, 水浴浓缩成生药质量浓度为 1 g·mL⁻¹ 的药液, 无菌包装密封, 4 $^{\circ}$ C 冰箱保存备用。

2.3 分组与给药 造模成功后将造模大鼠随机分成模型组和温胆汤干预组, 另设正常组(从空白组中随机选择), 每组 8 只。模型组和温胆汤干预组停止喂养高脂饲料, 与正常组一样均采用基础饲料喂养。温胆汤干预组使用已制备的温胆汤按剂量 15 g·kg⁻¹ 进行灌胃给药(该剂量是在前期研究基础上确定的^[13]), 灌胃药物总量需根据大鼠具体体质量确定。而模型组和正常组均给予等量水进行灌胃。每天 1 次, 自由饮水, 共持续 6 周。

2.4 样本取材及保存 造模 6 周后, 称定大鼠体质量, 用皮尺测量大鼠鼻尖至肛门长度。在药物干预 6 周后取材, 麻醉处理前 12 h 禁食不禁水。称重后用 2% 戊巴比妥钠按剂量 45 mg·kg⁻¹ 腹腔注射麻醉, 用皮尺测量大鼠鼻尖至肛门的长度, 作为体长; 将大鼠固定在固定板上, 依次切开腹部皮肤, 分离出腹主动脉, 采用 5 mL 的采血管(含乙二胺四乙酸 5~10 mg)进行插管取血, 各抽取 2 管, 每管约 3 mL, 于 4 $^{\circ}$ C 保存, 待提取血清后分别用于检测血脂(TC, TG, LDL-C, HDL-C)含量和相关炎性因子

(TNF- α , IL-6, IL-17 和 IL-22) 表达水平。另取下丘脑组织, 置于 1.5 mL 离心管中, 于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 环境下冷藏保存, 用于进行 STAT3 mRNA 和蛋白表达的检测。

2.5 指标检测

2.5.1 Lee's 指数和肥胖率检测 Lee's 指数和肥胖率的计算公式分别为 Lee's 指数 = (末次体质量 \times 1 000)^{1/3}/体长和肥胖率 = (造模组体质量 - 空白组体质量)/空白组体质量。

2.5.2 血脂检测 提取血清后根据试剂盒说明书, 用全自动生化分析仪进行血脂检测。检测时每个样取 3 个复孔。

2.5.3 TNF- α , IL-6, IL-17 和 IL-22 的检测 取备用血于 4 $^{\circ}\text{C}$, 4 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 低温离心 15 min, 提取血清放置在 -20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存待测。采用酶联免疫吸附测定法 (ELISA) 检测大鼠外周血血清中相关细胞因子的表达水平, 按酶标仪程序测定各孔的吸光度 A 。检测时每个样取 3 个复孔。

2.5.4 下丘脑组织 STAT3 mRNA 水平的检测 取每只大鼠下丘脑组织样本 100 mg, 以 GAPDH 为内参, 以 RT-PCR 检测 STAT3 的 mRNA 水平。采用 Trizol 法抽提总 RNA, 清除 DNase I 后利用紫外分光光度计测定其浓度, 取总 RNA 1 μg , 以 Oligo (dT) 18 为引物, M-MuLV 为逆转录酶进行逆转录反应 (逆转录反应程序为 42 $^{\circ}\text{C}$, 60 min; 70 $^{\circ}\text{C}$, 15 min; 16 $^{\circ}\text{C}$ 进行逆转录; 逆转录产物置于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用), 参照 GenBank 数据库中靶基因 mRNA 的序列设计引物, 见表 1。靶基因和内参分别在最佳条件下及 PCR 循环的线性期内扩增 (扩增反应程序为 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 3 min, 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 5 s, 56 $^{\circ}\text{C}$ 退火 10 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 25 s, 39 个循环; 65 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 5 s, 95 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 50 s), 按照仪器使用说明进行 Real-time PCR 扩增, 收集数据, 数据采用仪器自带软件 (qBasePlus 2.0) 分析, 利用 2^{- $\Delta\Delta C_t$} 法分析数据。

表 1 STAT3 和 GAPDH 的 PCR 引物序列

Table 1 PCR primer sequences of STAT3 and GAPDH

引物	序列 (5'-3')	长度/bp
STAT3	上游 GCCACTCTGGTGTTCATA	102
	下游 GATTCTTCGCAGGTTGTG	102
GAPDH	上游 CAAGTTCACGGCACAG	138
	下游 CCAGTAGACTCCACGACAT	138

2.5.5 下丘脑组织 STAT3 蛋白表达检测 以 GAPDH 为内参, 利用蛋白免疫印迹法 (Western

blot) 检测各组大鼠下丘脑组织中 STAT3 蛋白含量。取每只大鼠的下丘脑组织样本 100 mg, 匀浆后提取总蛋白, 采用考马斯亮蓝法 (Bradford 法) 检测蛋白浓度, 调整加样浓度后进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 分析, 电泳至溴酚蓝刚跑出时终止电泳, 转膜之后采用一抗, 二抗进行免疫反应 (STAT3, 1:2 000; GAPDH, 1:1 000; 山羊抗兔 IgG, 1:1 000; 山羊抗鼠 IgG, 1:1 000), 反应之后采用全自动化学发光分析仪检测, 显影和定影之后将胶片进行扫描存档, 利用 Image J 1.48u 软件分析目标带的灰度值。

2.6 统计学分析 实验指标所收集的数据均为计量资料, 所有数据均用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 运用 SPSS 21.0 软件进行数据处理。两组比较用两独立样本 t 检验法。多组比较用单因素方差分析法, 方差齐时, 组间比较采用最小显著性差异法 (LSD); 方差不齐时, 选择 Tamhane's T_2 检验进行组间比较。

3 结果

3.1 造模 6 周后肥胖率、体质量和 Lee's 指数 造模 6 周后, 造模组大鼠体型显著大于空白组, 与空白组比较, 造模组大鼠的体质量和 Lee's 指数均显著升高 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 见表 2。根据肥胖率公式计算造模组肥胖率 26.36%, 发现造模组与空白组比较体质量增长 $> 20\%$, 符合肥胖的判定标准^[14], 说明肥胖大鼠造模效果较好。

表 2 造模组与空白组大鼠的体质量, Lee's 指数比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Comparison of body weight and Lee's index of rats between modeling group and blank group ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	体质量/g	Lee's 指数
空白	8	343.35 \pm 24.60	3.00 \pm 0.06
造模	16	433.87 \pm 38.19 ¹⁾	3.07 \pm 0.09 ²⁾

注: 与正常组比较¹⁾ $P < 0.01$, ²⁾ $P < 0.05$ 。

3.2 温胆汤对大鼠肥胖率、体质量和 Lee's 指数的影响 与正常组比较, 模型组体质量显著升高 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 温胆汤干预组大鼠体质量和 Lee's 指数显著下降 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。根据肥胖率公式计算温胆汤干预组大鼠的肥胖率仅 1.06%, 而模型组大鼠肥胖率则达 15.51%。结果提示随着停用高脂饲料, 肥胖大鼠存在一定的自我减重现象, 但在温胆汤干预后大鼠体质量下降明显, 表明温胆汤有较好的减肥作用。见表 3。

3.3 温胆汤对血脂的影响 与正常组比较, 模型组大鼠的 TC, TG, LDL-C 水平显著升高 ($P < 0.01$),

表 3 温胆汤对肥胖痰湿证大鼠体质量和 Lee's 指数的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 8$)

Table 3 Effect of Wendantang on body weight and Lee's index of obese rats with syndrome of phlegm-dampness ($\bar{x} \pm s$, $n = 8$)

组别	体质量/g	Lee's 指数
正常	441.61 ± 23.95	2.92 ± 0.07
模型	510.10 ± 32.48 ¹⁾	2.99 ± 0.04
温胆汤干预	446.28 ± 32.87 ²⁾	2.90 ± 0.09 ³⁾

注:与正常组比较¹⁾ $P < 0.01$;与模型组比较²⁾ $P < 0.01$,³⁾ $P < 0.05$ (表 4~6 同)。

HDL-C 水平显著下降 ($P < 0.01$),说明肥胖痰湿病

表 4 温胆汤对肥胖痰湿证大鼠血脂水平的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 24$)

Table 4 Effect of Wendantang on blood lipid level of obese rats with syndrome of phlegm-dampness ($\bar{x} \pm s$, $n = 24$) mmol·L⁻¹

组别	TC	TG	HDL-C	LDL-C
正常	1.33 ± 0.18	1.07 ± 0.32	0.56 ± 0.06	0.56 ± 0.21
模型	6.41 ± 0.31 ¹⁾	3.35 ± 0.29 ¹⁾	0.31 ± 0.06 ¹⁾	4.74 ± 0.38 ¹⁾
温胆汤干预	4.36 ± 0.22 ²⁾	2.59 ± 0.30 ²⁾	0.41 ± 0.06 ²⁾	2.91 ± 0.26 ²⁾

表 5 温胆汤对肥胖痰湿证大鼠相关炎症因子表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 24$)

Table 5 Effect of Wendantang on expression of related inflammatory factors of obese rats with syndrome of phlegm-dampness ($\bar{x} \pm s$, $n = 24$) ng·L⁻¹

组别	TNF- α	IL-6	IL-17	IL-22
正常	100.36 ± 8.23	60.14 ± 13.39	69.68 ± 14.28	84.19 ± 10.33
模型	335.68 ± 30.07 ¹⁾	256.92 ± 33.21 ¹⁾	212.06 ± 49.14 ¹⁾	345.25 ± 84.24 ¹⁾
温胆汤干预	220.74 ± 65.64 ²⁾	157.03 ± 25.00 ²⁾	139.46 ± 26.49 ²⁾	162.91 ± 30.89 ²⁾

3.5 温胆汤对下丘脑组织 STAT3 mRNA 和蛋白表达的影响 与正常组比较,模型组大鼠下丘脑组织 STAT3 的 mRNA 和蛋白表达显著升高 ($P < 0.01$)。与模型组比较,温胆汤干预组大鼠下丘脑组织 STAT3 的 mRNA 和蛋白表达显著下降 ($P < 0.01$)。说明温胆汤可有效调节大鼠下丘脑组织中 STAT3 mRNA 及蛋白的表达水平,见表 6。

表 6 温胆汤对肥胖痰湿证大鼠下丘脑组织 STAT3 mRNA 和蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 6 Effect of Wendantang on expression of STAT3 mRNA and protein in hypothalamus of obese rats with syndrome of phlegm-dampness ($\bar{x} \pm s$)

组别	STAT3 mRNA ($n = 24$)	STAT3 蛋白 ($n = 8$)
正常	1.06 ± 0.35	0.44 ± 0.09
模型	7.78 ± 5.37 ¹⁾	1.07 ± 0.07 ¹⁾
温胆汤干预	2.27 ± 0.98 ²⁾	0.74 ± 0.09 ²⁾

注:mRNA 检测时每个样取 3 个复孔,而蛋白表达则取 1 个样本检测。

4 讨论

温胆汤始载于南北朝名医姚僧垣的《集验方》,

理模型确已形成。与模型组比较,温胆汤干预组大鼠的 TC, TG, LDL-C 含量显著降低 ($P < 0.01$), HDL-C 水平则显著升高 ($P < 0.01$)。提示温胆汤对血脂指标有较明显的调节作用,能有效改善肥胖痰湿病理状态,见表 4。

3.4 温胆汤对相关炎症因子表达的影响 与正常组比较,模型组大鼠的 TNF- α , IL-6, IL-17 和 IL-22 水平显著升高 ($P < 0.01$)。与模型组比较,温胆汤干预组大鼠的 TNF- α , IL-6, IL-17 和 IL-22 水平显著下降 ($P < 0.01$)。说明温胆汤可改善外周血相关炎症因子的表达水平,见表 5。

转载于唐代孙思邈的《备急千金要方》及王焘的《外台秘要》,主要由半夏、陈皮、竹茹、枳实、甘草、生姜等组成。古今医家在临床上灵活变通、加减化裁,现已广泛应用于胆郁痰扰所致的多种疾病,且疗效显著^[13]。《丹溪治法心要》首次提出“肥白人多痰湿”的观点,后世医家多有阐释,如喻昌在《医门法律》中有“肥人湿多”的详尽论述,王燕昌在《王氏医存》中也指出了肥胖的病因,即“肥人之病,皆因脾湿致胃生痰”。说明肥胖与“痰湿”密切相关,据此,有研究提出了肥胖的主要衍变规律,即饮食失节→脾胃虚弱→痰湿内生→痰湿生变(或兼发气滞,或兼发血瘀等),提出其主要病变部位在脾胃和肌肤,病理关键为痰湿,认为痰湿蓄积化为浊脂流于肌肤而易于发生或加重肥胖^[15]。故本研究选取温胆汤这一治“痰”基础方来改善肥胖痰湿而生浊脂的病理状态。本课题组前期研究已发现温胆汤能降低饮食诱导的肥胖动物的体质量、血脂、血糖等水平,改善肥胖痰湿病理状态^[11]。本研究采用高脂饲料喂养制作肥胖大鼠模型,计算了大鼠的体质量、肥胖率和

Lee's 指数,并检测了大鼠的血脂表达水平,结果显示造模后大鼠体质量, Lee's 指数和肥胖率均明显升高,血脂水平也出现了明显改变,这与前期的研究结果一致。而温胆汤干预后,大鼠的体质量, Lee's 指数, TC, TG, LDL-C 指标水平明显下降,而 HDL-C 水平显著升高,再次验证了温胆汤的“化痰”功效对肥胖大鼠脂肪代谢具有较好的调节作用,这也与姚风云等^[16]采用加味温胆汤抗大鼠营养性肥胖的研究结果基本一致。

现代医学认为,肥胖是一种慢性低度炎症状态^[7],这种低度炎症状态主要是由营养和能量过剩触发一系列与传统炎症相似的分子和信号通路引起的^[17]。研究发现,肥胖者存在 JAK2/STAT3 信号通路的异常激活,血中促炎症因子 IL-6 和 TNF- α 等浓度明显上升^[18-19]。研究也证明炎症的发生与痰湿有着密切关系^[20],故认为随着肥胖的逐渐形成,体内痰湿日益蓄积,脂质代谢异常也愈趋明显,在诱发 JAK2/STAT3 信号通路关键分子 STAT3 异常表达的同时,引发了体内的慢性炎症,这也加速了肥胖痰湿证的发展。本研究结果也证实,与正常组相比,模型组大鼠相关炎症因子(TNF- α , IL-6, IL-17 和 IL-22)和下丘脑组织关键分子 STAT3 mRNA 及蛋白的表达水平显著升高,而采用温胆汤干预后相关数值则出现了明显下降,这一方面说明了肥胖大鼠确实存在 JAK2/STAT3 信号通路的异常改变和慢性炎症的发生;另一方面也提示温胆汤的“化痰”作用可能与调控肥胖大鼠相关炎症因子和下丘脑组织关键分子 STAT3 mRNA 及蛋白的表达有关。

综上所述,温胆汤具有较好的减肥效果,且其对肥胖的抑制与干预可能是通过调节 JAK2/STAT3 信号通路,进而改善机体的慢性炎症状态,消除体内痰湿和脂浊等病理物质,从而达到减肥的作用,这可为温胆汤的理论研究及临床应用提供借鉴。但温胆汤是如何调节 JAK2/STAT3 信号通路,改善机体的慢性炎症状态是否还有其他的作用机制,这些仍然不是十分明确,后续将采用通路阻断剂或运用基因敲除技术设立阳性组来明确药物的作用靶点,进而阐明温胆汤干预肥胖痰湿证的内在机制。

[参考文献]

[1] 李君玲. 中医辨证治疗儿童肥胖症 67 例[J]. 中医儿科杂志, 2012, 8(1): 33-34.
[2] 孙璐, 唐咸玉, 张鹏, 等. 益气化痰活血法改善超重/肥胖 2 型糖尿病患者糖脂代谢紊乱及肥胖抑制素的临床观察[J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(6):

180-185.

[3] 史晓娜, 陶枫, 陆灏, 等. 肥胖证候和证素分布特征的文献研究[J]. 上海中医药大学学报, 2014, 28(4): 53-57.
[4] 黄慧芹. 加味温胆汤治疗单纯性肥胖症 52 例临床观察[J]. 中医临床研究, 2010, 2(16): 58-59.
[5] 姚风云, 刘春花, 刘成, 等. 加味温胆汤抗大鼠营养性肥胖的机制探讨[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(19): 280-282.
[6] 连东辉. 加味温胆汤治疗痰湿壅盛型肥胖性高血压病 60 例[J]. 河南中医, 2012, 32(7): 913-914.
[7] Hotamisligil G S. Inflammatory pathways and insulin action[J]. Int J Obes Relat Metab Disord, 2003, 27(Suppl 3): 53-55.
[8] 薛翔. JAK2/STAT3 信号通路在应激性溃疡大鼠胃粘膜炎症反应中的作用研究[D]. 南京: 南京大学, 2015.
[9] Hiller J, Hagl B, Effner R, et al. STAT1 gain-of-function and dominant negative STAT3 mutations impair IL-17 and IL-22 immunity associated with CMC[J]. J Invest Dermatol, 2018, 138(3): 711-714.
[10] 刘涛, 徐秋玲, 杨叔禹. 高脂饮食诱导痰湿证动物模型的建立与评价[J]. 长春中医药大学学报, 2009, 25(3): 333-335.
[11] 杨海燕, 王萍, 喻松仁. 温胆汤对大鼠肥胖评价指标及血糖血脂水平的影响[J]. 中华中医药学刊, 2017, 35(3): 544-546.
[12] 宋剑南, 刘东远, 牛晓红, 等. 高脂血症与中医痰浊关系的实验研究[J]. 中国中医基础医学杂志, 1995, 1(1): 49-51.
[13] 杨海燕, 王萍. 温胆汤减轻肥胖大鼠体重及对血清脂联素水平的影响[J]. 江西中医药, 2014, 45(9): 14-16.
[14] Chandler P C, Viana J B, Oswald K D, et al. Feeding response to melanocortin agonist predicts preference for and obesity from a high-fat diet[J]. Physiol Behav, 2005, 85(2): 221-230.
[15] 喻松仁, 王萍, 舒晴, 等. 肥胖痰湿衍变规律探析[J]. 中华中医药杂志, 2018, 33(4): 1483-1485.
[16] 姚风云, 石强, 王炳志, 等. 加味温胆汤抗大鼠营养性肥胖的实验研究[J]. 四川中医, 2009, 27(8): 13-15.
[17] 詹莉莉, 杨志秋, 傅正伟. 肥胖与慢性炎症的研究进展[J]. 中国细胞生物学学报, 2011, 33(3): 297-305.
[18] Gustafson B. Adipose tissue, inflammation and atherosclerosis[J]. J Atheroscler Thromb, 2010, 17(4): 332-341.
[19] 陈伟仁, 刘文俊, 柴纪严, 等. 香砂六君丸对肥胖大鼠胃黏膜 JAK2/STAT3 通路的影响[J]. 中国医学创新, 2017, 14(8): 32-35.
[20] 郑璐玉, 杨玲玲, 李玲孺, 等. 液相芯片技术检测痰湿体质人群 TNF- α , IL-6, CRP 及 MCP-1 的表达研究[J]. 中国中西医结合杂志, 2013, 33(7): 920-923.

[责任编辑 刘德文]