

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2019.16.001  
文章编号: 1005-8982 (2019) 16-0001-09

基础研究·论著

## 穗花杉双黄酮对 3T3-L1 细胞增殖、凋亡及生物钟的影响\*

王曜晖, 赵智权, 杜运松, 袁冰舒, 王刚

(遵义医学院, 贵州 遵义 563003)

**摘要: 目的** 探讨穗花杉双黄酮对 3T3-L1 细胞增殖、凋亡及生物钟的影响。**方法** 采用不同浓度穗花杉双黄酮处理正常和过表达昼夜节律运动输出周期故障蛋白 (CLOCK) 的 3T3-L1 细胞, CCK-8 和 EdU 检测细胞增殖情况; 流式细胞仪检测细胞凋亡情况; real-time RT-PCR 检测生物钟基因 *CLOCK* 和 *BMAL1* 的表达; Western blotting 检测 Cleaved caspase-3、Bcl-2、*CLOCK* 及 *BMAL1* 蛋白的表达。**结果** 低浓度 (2.5 ~ 10.0 mg/L) 穗花杉双黄酮作用于 3T3-L1 细胞后, 3T3-L1 细胞增殖和凋亡无影响 ( $P > 0.05$ ), 但是当浓度达 20 和 40 mg/L 反而抑制增殖 ( $P < 0.05$ ); 通过上调 Cleaved caspase-3 表达, 下调 Bcl-2 表达, 促进凋亡的发生。较低浓度穗花杉双黄酮对 3T3-L1 细胞 *CLOCK*、*BMAL1* 基因和蛋白的表达无影响 ( $P > 0.05$ ), 而浓度达 20 和 40 mg/L 则呈抑制作用 ( $P < 0.05$ ); 过表达 *CLOCK* 基因可减弱穗花杉双黄酮对 3T3-L1 细胞的抑制作用 ( $P < 0.05$ )。 **结论** 3T3-L1 细胞在培养状态仍保持昼夜节律性, 较高浓度穗花杉双黄酮可抑制 3T3-L1 细胞增殖并促进凋亡, 其可作为抑制细胞增殖的药物, 其作用机制与生物钟基因表达有关。

**关键词:** 双黄酮类; 细胞增殖; 细胞凋亡; 生物钟

**中图分类号:** R394.2

**文献标识码:** A

## Effects of amentoflavone on proliferation, apoptosis and circadian clock of 3T3-L1 cells\*

Yao-hui Wang, Zhi-quan Zhao, Yun-song Du, Bing-shu Yuan, Gang Wang

(Zunyi Medical University, Zunyi, Guizhou 563003, China)

**Abstract: Objective** To explore the effects of amentoflavone on the proliferation, apoptosis and circadian clock of 3T3-L1 cells. **Methods** Normal and over-expressing 3T3-L1 cells were treated with different concentrations of amentoflavone. CCK8 and EdU kit were used to detect cell proliferation. Flow cytometry was used to detect apoptosis. RT-PCR was used to detect the expression of *CLOCK* and *BMAL1* gene. And western blot was used to detect the expression of caspase-3, Bcl-2, *CLOCK* and *BMAL1* protein. **Result** Lower concentration of amentoflavone (2.5, 10 mg/L) had a little effect on the proliferation ( $P > 0.05$ ) and apoptosis ( $P > 0.05$ ) of 3T3-L1 cells. But when the concentration ranged from 20 mg·L<sup>-1</sup> to 40 mg L<sup>-1</sup>, it up-regulated the expression of caspase-3 ( $P < 0.05$ ) and down-regulated Bcl-2 expression to inhibit proliferation ( $P < 0.05$ ) and promote the occurrence of apoptosis ( $P < 0.05$ ). Low concentration of amentoflavone has little effect on the expression of *CLOCK* and *BMAL1*

收稿日期: 2018-09-04

\* 基金项目: 国家自然科学基金 (No: 81560569); 贵州省自然科学基金 (No: 黔科合 J 字 [2011]2124); 遵义市汇川区科技计划项目 (No: 遵汇科合 201424)

[通信作者] 王刚, E-mail: 8512895@qq.com; Tel: 0851-28643616、15085117580

gene and protein in 3T3-L1 cells ( $P > 0.05$ ), but the high concentration amentoflavone (20 mg/L, 40 mg/L) inhibited the expression of CLOCK and BMAL1 ( $P < 0.05$ ). Over-expression of CLOCK gene could significantly recovery the inhibitory effect of amentoflavone on proliferation of 3T3-L1 cells ( $P < 0.05$ ). **Conclusions** The 3T3-L1 cells still maintain circadian rhythms in the cultured state, and higher concentrations of amentoflavone can inhibit 3T3-L1 cell proliferation, suggesting that it may be as a drug that inhibits proliferation and the mechanism is related to CLOCK genes.

**Keyword:** flavonoids; cell proliferation; apoptosis; biological clocks

穗花杉双黄酮是卷柏中的一种多酚化合物<sup>[1]</sup>, 具有降低血糖、抗炎、抗氧化、抗病毒、抗辐射及抗肿瘤等多种生物学功能<sup>[2-15]</sup>。肥胖与前脂肪细胞的过度分化、增生及脂肪细胞肥大密切相关<sup>[16]</sup>。肥胖机体出现炎症细胞浸润, 相关炎症基因表达升高<sup>[17]</sup>。昼夜节律运动输出周期故障蛋白 (circadian locomotor output cycles kaput, CLOCK)、脑及肌肉组织芳香烃受体核转运蛋白的类似蛋白 1 (the brain and muscle arnt-like protein-1, BMAL1) 的异常表达可导致脂质代谢异常<sup>[18-20]</sup>。本实验将不同浓度的穗花杉双黄酮作用于正常和过表达 CLOCK 的 3T3-L1 细胞后, 观察其对 3T3-L1 细胞增殖、凋亡的影响, 并探讨其与生物钟基因的关系。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材料与试剂

穗花杉双黄酮 (160523, 纯度 >98%) 购自成都瑞芬恩科技有限公司, 3T3-L1 购自中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心, 鼠抗 CLOCK、兔抗 BMAL1、兔抗 Cleaved caspase-3 及兔抗 Bcl-2 均购自美国 Proteintech 公司, 抗鼠二抗、抗兔二抗及 Click-iT™ EdU Alexa Fluor™ 555 Imaging Kit 均购自美国 Sigma 公司, 逆转录试剂和 RealMasterMix (SYBR Green) 购自北京天根生物化学科技有限公司, 正反引物由上海捷瑞生物工程有限公司合成。

### 1.2 主要仪器

CFX96 touch 荧光定量聚合酶链反应 (quantitative real-time polymerase chain reaction, qRT-PCR) 仪 (美国 Bio-Rad 公司), Gallios 流式细胞仪 (美国 Beckman Coulter 公司)。

### 1.3 实验方法

**1.3.1 药物配制** 穗花杉双黄酮用二甲基亚砷溶解, 储存浓度为 10 g/L, 0.22 μm 孔径滤膜过滤除菌, 于 4℃ 冰箱保存备用, 使用前用培养基稀释至所需浓度。

**1.3.2 3T3-L1 细胞培养和分组** 3T3-L1 细胞培养于含 10% 胎牛血清的达尔伯克改良伊格格培养基, 培养条件为 37℃, 5% 二氧化碳 CO<sub>2</sub>。穗花杉双黄酮按 0.0、2.5、5.0、10.0、20.0 及 40.0 mg/L 质量浓度分成 6 组。

**1.3.3 CCK-8 检测细胞增殖** 将 3T3-L1 细胞接种到 96 孔板中, 200 μl/孔细胞悬液, 贴壁培养 24 h, 加入不同质量浓度的穗花杉双黄酮培养基, 继续培养 24 h, 以换液的方式加入含 10% CCK-8 的培养基, 培养 4 h, 测定 450 nm 处的吸光度, 参比波长 600 ~ 650 nm。

**1.3.4 实时逆转录聚合酶链反应 (real-time reverse transcription-polymerase chain reaction, real-time RT-PCR) 检测生物钟基因的表达** 从 0 h 开始, 每间隔 4 h (共 6 次) 提取 3T3-L1 细胞的总核糖核酸 (RNA), 并检测培养箱中 3T3-L1 细胞 CLOCK 和 BMAL1 的表达情况。见表 1。

表 1 real-time RT-PCR 引物序列

基因	引物序列	长度 /bp
CLOCK	正向: 5'-GAGTTTGGGGTGGGACTACTA-3'	21
	反向: 5'-GTCGGAAAAGCACTAAACAATG-3'	21
BMAL1 (Arntl)	正向: 5'-GTCCTAAAGTCAACGGGACCAC-3'	23
	反向: 5'-AGGCATCGACATGATAGACAACG-3'	23
β-Actin	正向: 5'-AGCCATGTACGTAGCCATCC-3'	20
	反向: 5'-ACCCTCATAGATGGGCACAG-3'	20

将不同浓度穗花杉双黄酮作用于 3T3-L1 细胞, 培养 24 h 后提取总 RNA, 逆转录后用 real-time RT-PCR 检测其表达情况, 反应条件: 95℃ 预变性 5 min, 95℃ 变性 5 s, 57℃ 退火 30 s, 57℃ 延伸 5 s, 共循环 40 次。real-time RT-PCR 结束后, 计算 CLOCK 和 BMAL1 mRNA 与 β-actin 的相对表达量。

**1.3.5 Western blotting 检测生物钟蛋白的表达** 在 6 孔板中种入细胞, 24 h 后观察各孔细胞贴壁均匀, 将不同质量浓度穗花杉双黄酮加入 6 孔板。在 37℃、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 24 h, 取出置于冰上。吸去培

养液, 加入 2 ml/孔预冷的 0.01 mol/L 磷酸盐缓冲液 (phosphate buffer saline, PBS), 吸弃。加入 200  $\mu$ l/孔预冷的 RIPA 裂解液, 放置 1 min 后, 用细胞刮将板底的细胞刮掉。将细胞悬浮液吸入 1.5 ml 离心管, 置于冰上。每 3 min 震荡 15 s, 重复 5 次。将离心管置于冷冻离心机中, 12 000 r/min 离心 20 min, 取上清液存至  $-80^{\circ}\text{C}$  冰箱, 作为后续 Western blotting 的样本。

将收取的蛋白样品从  $-80^{\circ}\text{C}$  取出, 溶解后用酶标仪检测蛋白浓度。各组取等量的蛋白样品混入  $6 \times$  Loading Buffer, 加入适量的蛋白裂解液将体积补为 20  $\mu$ l, 混匀后于  $4^{\circ}\text{C}$  备用。制备 8% 分离胶和 5% 浓缩胶, 放于电泳槽, 加入适量电泳液, 拔出梳子后, 按顺序加入蛋白样品。80 V 恒压 30 min 后, 转为 120 V 恒压跑 2 h。  $4^{\circ}\text{C}$  转膜过夜。转膜结束后, 用 TBST 溶液溶解 5% 脱脂奶粉, 将膜置于封闭液封闭 1 h。按照抗体说明书建议浓度稀释抗体, 抗体稀释液为 0.5% 脱脂奶粉。一抗室温孵育 4 h 后, TBST 洗 3 次, 20 min/次。按抗体说明书稀释二抗, 室温孵育 1 h, TBST 洗 3 次, 每次 20 min。在膜上滴加适量的 ECL 发光检测混合液后, 拍照并分析。

**1.3.6 流式细胞仪检测细胞凋亡情况** 将不同质量浓度穗花杉双黄酮作用于 3T3-L1 细胞, 培养 24 h 后用胰酶消化收集细胞, 用冰冷的 PBS 调整待测细胞的浓度为  $5 \times 10^5 \sim 1 \times 10^6$  个/ml。取 1 ml 细胞,  $4^{\circ}\text{C}$ 、1 000 r/min 离心 5 min, 弃上清, 再次使用冰冷的 PBS 悬浮细胞后, 以同样的条件进行离心, 弃上清液, 每管加入 100  $\mu$ l Binding buffer 悬浮细胞。依次加入 5  $\mu$ l Annexin V-FITC 和 5  $\mu$ l 碘化丙啶, 室温避光条件下, 继续孵育 5 min, 加入 Binding buffer 至 500  $\mu$ l, 轻轻混匀, 用流式细胞仪检测 0.0、2.5、5.0、10.0、20.0 及 40.0 mg/L 穗花杉双黄酮对细胞凋亡的影响。

**1.3.7 EdU 检测细胞增殖** 20 mg/L 穗花杉双黄酮可以抑制 3T3-L1 细胞的增殖, 20 mg/L 穗花杉双黄酮引起 CLOCK mRNA 和蛋白表达降低。为证明穗花杉双黄酮与 CLOCK 基因的相关性, 将 3T3-L1 细胞分为 3 组: ①药物组: 加入 20 mg/L 穗花杉双黄酮; ②联合组: 20 mg/L 穗花杉双黄酮处理 3T3-L1 细胞 24 h 后, 过表达 Pc-DNA-CLOCK 质粒; ③对照组: 未做任何处理。检测 3 组细胞 24 h 时的增殖情况。将细胞消化并接种于 96 孔板, 细胞数量为  $5 \times 10^4$  个/孔。培养 24 h 后, 将配好的 EdU 溶液

(20  $\mu$ mol/L) 分别加入各孔, 100  $\mu$ l/孔, 孵育 4 h。将 96 孔板取出, 吸弃液体, 0.01 mmol/L PBS 清洗 2 遍后, 加入 4% 多聚甲醛固定 4 h。室温 0.01 mol/L PBS 清洗 2 次后, 用 1% TritonX-100 处理 1 h, 加入染色液室温处理 1 h。吸弃染色液后用 0.01 mol/L PBS 清洗 2 次, 用 DAPI 进行染色, 荧光显微镜下观察染色情况。

## 1.4 统计学方法

数据分析采用 SPSS 17.0 统计软件。计量资料以均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 比较用方差分析, 进一步两两比较用 SNK- $q$  检验。  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 3T3-L1 细胞 CLOCK 和 BMAL1 的周期性表达

不同时间点 3T3-L1 细胞 CLOCK 和 BMAL1 RNA 的相对表达量比较, 经方差分析, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ); 各相邻组间进一步两两比较, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 0、12 及 18 h 表达量较为接近, 从中选取 18 h 进行后续实验。见表 2 和图 1。

表 2 生物钟基因 mRNA 相对表达量 ( $\times 10^{-3}$ ,  $\bar{x} \pm s$ )

时间点	CLOCK mRNA	BMAL1 mRNA
0 h	0.605 $\pm$ 0.003	0.621 $\pm$ 0.002
4 h	0.675 $\pm$ 0.001	0.784 $\pm$ 0.003
8 h	1.011 $\pm$ 0.004	0.953 $\pm$ 0.003
12 h	1.423 $\pm$ 0.005	1.430 $\pm$ 0.003
16 h	1.193 $\pm$ 0.004	1.331 $\pm$ 0.003
18 h	1.114 $\pm$ 0.003	1.124 $\pm$ 0.013
20 h	1.025 $\pm$ 0.003	1.130 $\pm$ 0.004
F 值	92.698	93.745
P 值	0.000	0.000

### 2.2 穗花杉双黄酮对 3T3-L1 细胞增殖的影响

不同质量浓度穗花杉双黄酮作用时的 3T3-L1 细胞活性比较, 经方差分析, 差异有统计学意义 ( $F = 194.485$ ,  $P = 0.000$ ); 与 0.0 mg/L 比较, 2.5、5.0 及 10.0 mg/L 穗花杉双黄酮对 3T3-L1 细胞增殖无影响 ( $P > 0.05$ ), 20 和 40 mg/L 穗花杉双黄酮对 3T3-L1 细胞的增殖产生抑制作用 ( $P < 0.05$ )。见表 3 和图 2。

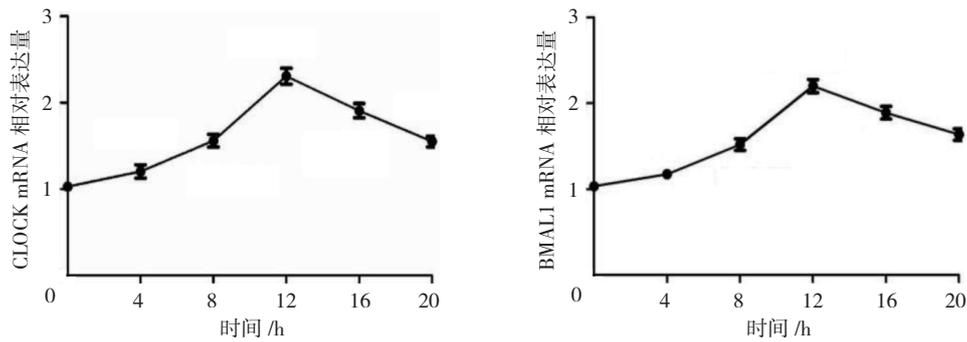
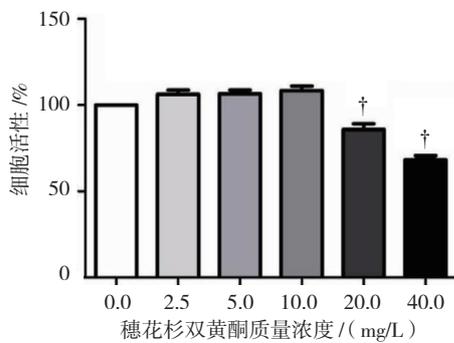


图 1 不同时间点 3T3-L1 细胞 BMAL1 和 CLOCK mRNA 的表达变化

表 3 不同质量浓度穗花杉双黄酮作用时的 3T3-L1 细胞活性比较 (%,  $\bar{x} \pm s$ )

药物质量浓度	细胞相对活性
0.0 mg/L	103.17 ± 5.683
2.5 mg/L	107.72 ± 2.725
5.0 mg/L	108.768 ± 4.040
10.0 mg/L	108.664 ± 4.631
20.0 mg/L	94.599 ± 1.991 <sup>†</sup>
40.0 mg/L	69.931 ± 1.0678 <sup>†</sup>
F 值	194.485
P 值	0.000

注: † 与 0.0 mg/L 比较,  $P < 0.05$



† 与 0.0 mg/L 比较,  $P < 0.05$

图 2 不同质量浓度穗花杉双黄酮对 3T3-L1 细胞活性的影响 ( $\bar{x} \pm s$ )

### 2.3 穗花杉双黄酮对 3T3-L1 细胞凋亡的影响

各组早期凋亡率、总凋亡率比较, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ); 与 0.0 mg/L 组比较, 2.5、5.0 及 10.0 mg/L 穗花杉双黄酮对 3T3-L1 细胞总凋亡率无影响 ( $P > 0.05$ ), 20.0 和 40.0 mg/L 穗花杉双黄酮促进 3T3-L1 细胞凋亡 ( $P < 0.05$ )。见表 4。

### 2.4 穗花杉双黄酮对 3T3-L1 细胞凋亡相关蛋白的影响

不同质量浓度穗花杉双黄酮作用时, 3T3-L1 细

表 4 不同质量浓度穗花杉双黄酮对 3T3-L1 细胞凋亡的影响 (%,  $\bar{x} \pm s$ )

药物浓度	早期凋亡率	晚期凋亡率	总凋亡率
0.0 mg/L	3.89 ± 1.65	1.24 ± 0.97	5.2 ± 2.55
2.5 mg/L	3.64 ± 1.73	1.52 ± 0.64	5.5 ± 3.03
5.0 mg/L	4.02 ± 0.79	1.26 ± 1.32	4.91 ± 0.96
10.0 mg/L	4.73 ± 1.25	2.1 ± 0.68	5.19 ± 3.57
20.0 mg/L	8.37 ± 1.93	3.32 ± 2.12	11.24 ± 4.5 <sup>†</sup>
40.0 mg/L	19.34 ± 2.36	3.26 ± 1.23	23.44 ± 2.75 <sup>†</sup>
F 值	39.459	3.263	24.009
P 值	0.000	0.430	0.000

注: † 与 0.0 mg/L 比较,  $P < 0.05$

胞凋亡相关蛋白 Cleaved-caspase-3 和 Bcl-2 比较, 经方差分析, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ); 与 0.0 mg/L 比较, 2.5、5.0 及 10.0 mg/L 穗花杉双黄酮不影响 3T3-L1 细胞中 Cleaved caspase-3 的表达 ( $P > 0.05$ ), 20 和 40 mg/L 穗花杉双黄酮促进 3T3-L1 细胞中 Cleaved-caspase-3 的表达 ( $P < 0.05$ ); 与 0.0 mg/L 比较, 2.5、5.0 及 10.0 mg/L 穗花杉双黄酮不影响 3T3-L1 细胞中 Bcl-2 的表达 ( $P > 0.05$ ), 20 和 40 mg/L 穗花杉双黄酮抑制 Bcl-2 的表达 ( $P < 0.05$ )。见表 5 和图 3。

表 5 不同质量浓度穗花杉双黄酮对 3T3-L1 细胞凋亡相关蛋白相对表达量的影响 ( $\bar{x} \pm s$ )

药物质量浓度	Cleaved caspase-3	Bcl-2
0.0 mg/L	1.013 ± 0.169	1.066 ± 0.171
2.5 mg/L	1.025 ± 0.189	1.013 ± 0.172
5.0 mg/L	1.037 ± 0.153	1.084 ± 0.135
10.0 mg/L	1.022 ± 0.155	1.032 ± 0.133
20.0 mg/L	1.533 ± 0.162 <sup>†</sup>	0.693 ± 0.129 <sup>†</sup>
40.0 mg/L	1.723 ± 0.147 <sup>†</sup>	0.512 ± 0.125 <sup>†</sup>
F 值	20.393	15.057
P 值	0.000	0.000

注: † 与 0.0 mg/L 比较,  $P < 0.05$

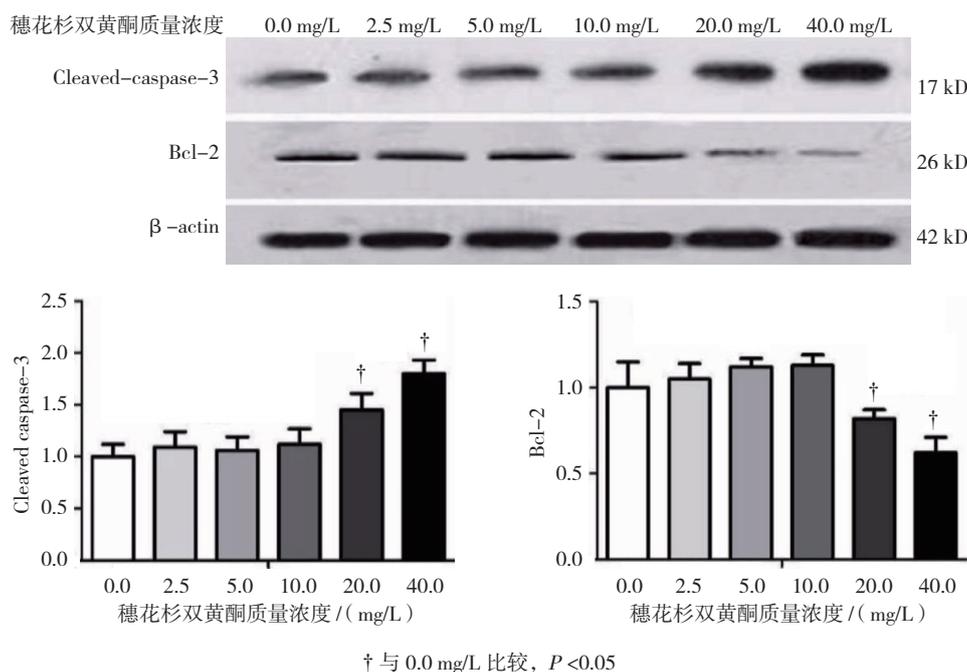


图 3 穗花杉双黄酮对 3T3-L1 细胞凋亡相关蛋白的影响 ( $\bar{x} \pm s$ )

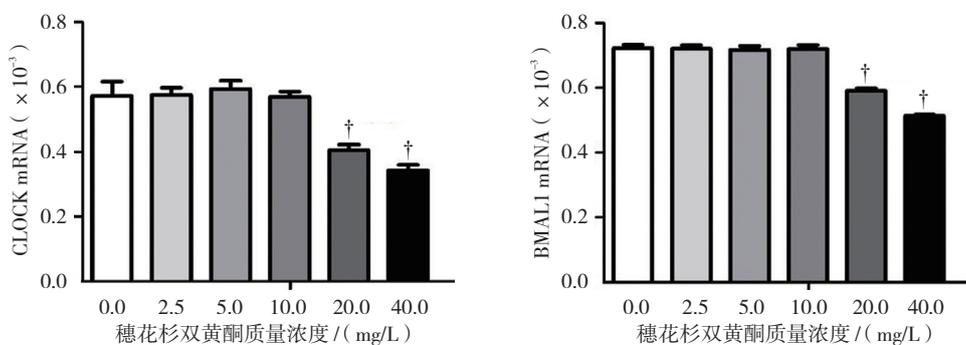
### 2.5 穗花杉双黄酮对 3T3-L1 细胞 CLOCK 和 BMAL1 mRNA 的影响

不同质量浓度穗花杉双黄酮作用时, 3T3-L1 细胞 CLOCK 和 BMAL1 mRNA 相对表达量比较, 经方差分析, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ); 与 0.0 mg/L 比较, 2.5、5.0 及 10.0 mg/L 穗花杉双黄酮对 3T3-L1 细胞 18 h 时 CLOCK mRNA 的转录无影响 ( $P > 0.05$ ), 20 和 40 mg/L 抑制 CLOCK mRNA 的转录 ( $P < 0.05$ ); 与 0.0 mg/L 比较, 2.5、5.0 及 10.0 mg/L 穗花杉双黄酮对 3T3-L1 细胞 18 h BMAL1 mRNA 的转录无影响 ( $P > 0.05$ ), 20 和 40 mg/L 穗花杉双黄酮抑制 3T3-L1 细胞 BMAL1 mRNA 的转录 ( $P < 0.05$ )。见表 6 和图 4。

表 6 不同质量浓度穗花杉双黄酮作用时 3T3-L1 BMAL1 和 CLOCK mRNA 相对表达量比较 ( $\times 10^{-3}$ ,  $\bar{x} \pm s$ )

药物浓度	CLOCK mRNA	BMAL1 mRNA
0.0 mg/L	0.572 ± 0.044	0.723 ± 0.010
2.5 mg/L	0.575 ± 0.023	0.721 ± 0.011
5.0 mg/L	0.594 ± 0.025	0.718 ± 0.011
10.0 mg/L	0.570 ± 0.016	0.720 ± 0.012
20.0 mg/L	0.405 ± 0.017 <sup>†</sup>	0.591 ± 0.008 <sup>†</sup>
40.0 mg/L	0.343 ± 0.017 <sup>†</sup>	0.513 ± 0.005 <sup>†</sup>
F 值	34.888	255.412
P 值	0.000	0.000

注: † 与 0.0 mg/L 比较,  $P < 0.05$



† 与 0.0 mg/L 比较,  $P < 0.05$

图 4 不同质量浓度穗花杉双黄酮对 BMAL1 和 CLOCK mRNA 的影响 ( $\bar{x} \pm s$ )

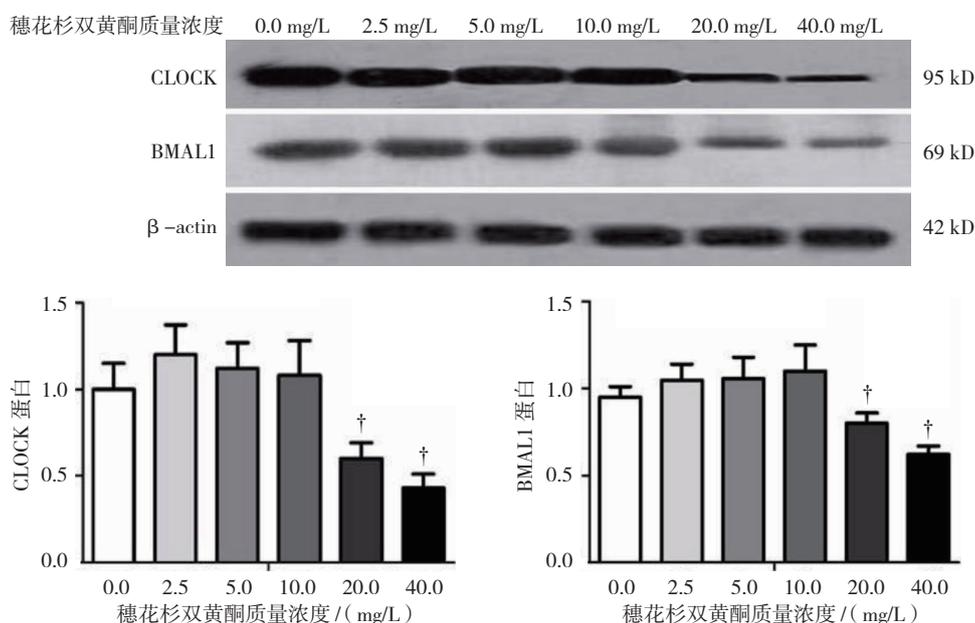
### 2.6 穗花杉双黄酮对 3T3-L1 细胞 CLOCK 和 BMAL1 蛋白的影响

不同质量浓度穗花杉双黄酮作用时,3T3-L1 细胞 CLOCK 和 BMAL1 蛋白相对表达量比较,经方差分析,差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ); 进一步两两比较用 SNK- $q$  检验,与 0.0 mg/L 比较,2.5、5.0 及 10.0 mg/L 穗花杉双黄酮对 3T3-L1 细胞的 18 h 时 CLOCK 蛋白的表达无影响 ( $P > 0.05$ ),20 和 40 mg/L 穗花杉双黄酮抑制 CLOCK 蛋白的表达 ( $P < 0.05$ ); 与 0.0 mg/L 比较,2.5、5.0 及 10.0 mg/L 穗花杉双黄酮对 3T3-L1 细胞 18 h 时 BMAL1 蛋白的表达无影响 ( $P > 0.05$ ),20 和 40 mg/L 穗花杉双黄酮抑制 BMAL1 蛋白的表达 ( $P < 0.05$ )。见表 7 和图 5。

表 7 不同质量浓度穗花杉双黄酮处理后 CLOCK 和 BMAL1 蛋白相对表达量比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

药物浓度	CLOCK 蛋白	BMAL1 蛋白
0.0 mg/L	1.053 ± 0.167	0.953 ± 0.035
2.5 mg/L	1.173 ± 0.201	1.033 ± 0.110
5.0 mg/L	1.116 ± 0.110	1.043 ± 0.093
10.0 mg/L	1.114 ± 0.129	1.097 ± 0.172
20.0 mg/L	0.551 ± 0.088 <sup>†</sup>	0.723 ± 0.040 <sup>†</sup>
40.0 mg/L	0.447 ± 0.049 <sup>†</sup>	0.547 ± 0.050 <sup>†</sup>
F 值	17.389	15.219
P 值	0.000	0.000

注: † 与 0.0 mg/L 比较,  $P < 0.05$



† 与 0.0 mg/L 比较,  $P < 0.05$

图 5 不同质量浓度穗花杉双黄酮处理后 BMAL1 和 CLOCK 蛋白的表达变化 ( $\bar{x} \pm s$ )

### 2.7 CLOCK 基因对穗花杉双黄酮抑制 3T3-L1 细胞增殖的影响

药物组、联合组、对照组 3T3-L1 细胞增殖情况和 CLOCK 蛋白相对表达量比较,经方差分析,差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ); 进一步两两比较经 SNK- $q$  检验,联合组 EdU 阳性细胞率和 CLOCK 蛋白相对表达量高于药物组 ( $P < 0.05$ ),但低于对照组 ( $P < 0.05$ )。见表 8 和图 6 ~ 8。

表 8 不同处理对 3T3-L1 细胞增殖和 CLOCK 蛋白表达的影响 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	Edu 阳性细胞率 /%	CLOCK
对照组	56.333 ± 1.528	0.984 ± 0.127
药物组	19.333 ± 2.082	0.459 ± 0.074
联合组	39.667 ± 2.517	0.734 ± 0.065
F 值	237.718	36.151
P 值	0.000	0.000

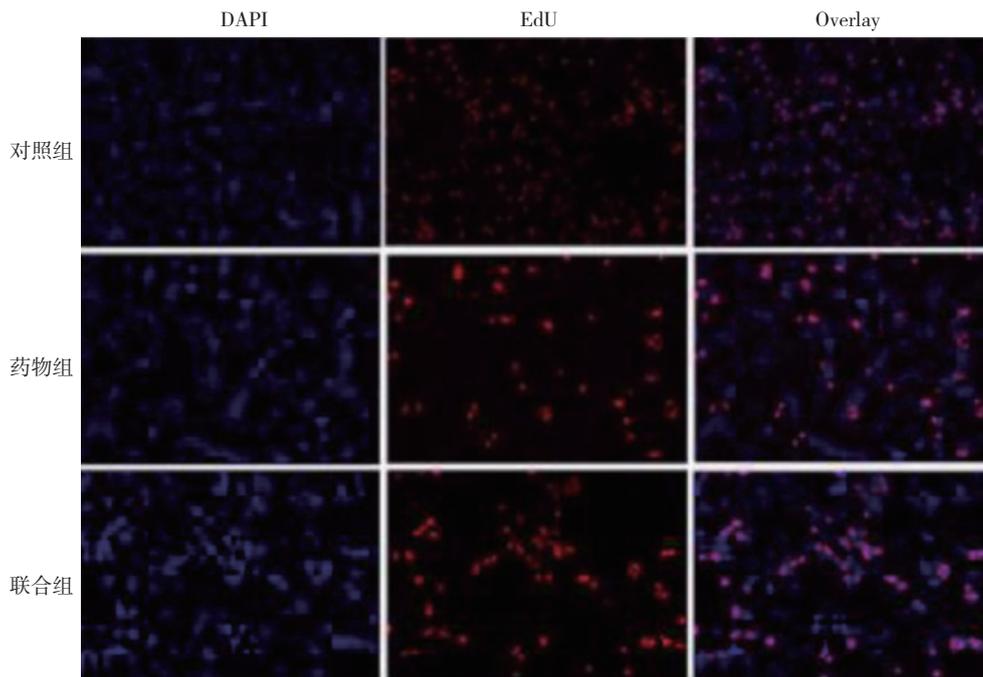


图 6 各组 3T3-L1 细胞增殖情况

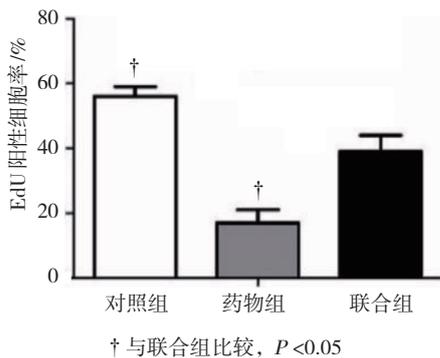


图 7 3 组 EdU 阳性细胞率比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

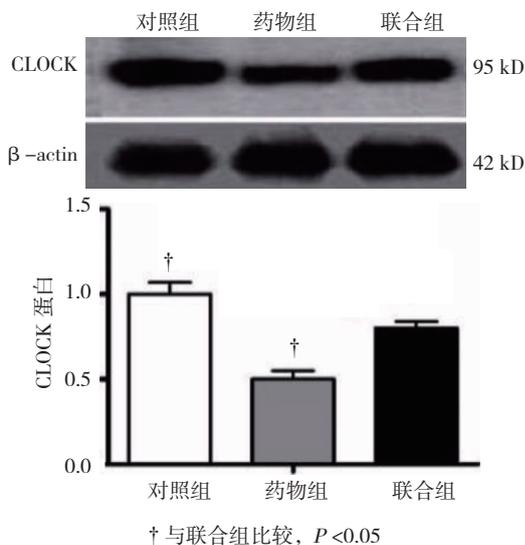


图 8 3 组 3T3-L1 细胞 CLOCK 蛋白相对表达量比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

### 3 讨论

24 h 生物节律被称作昼夜节律。昼夜节律的形成与生物钟系统的表达密切相关<sup>[21]</sup>。现已知的生物钟基因主要有 9 种, 在下丘脑视交叉上核的作用下, 调节生物体的节律性活动。*BMAL1* 基因处于生物钟体系的上游, 其转录翻译后的蛋白产物是正反馈环路中的调节因子, 并与 CLOCK 蛋白结合形成异二聚体, 这些正性成分启动后经转录和翻译生成相应的蛋白。同时 PER 和 CRY 等负性成分表达, 阻止正性成分的表达和功能, 形成完整的反馈通路。

在离体 3T3-L1 细胞培养的过程中, 笔者发现即使脱离机体中枢 SCN 生物钟的影响, 脱离周期性的日光照射, 离体 3T3-L1 细胞在无光照的培养箱中进行培养, 其生物钟基因 CLOCK 和 *BMAL1* 仍然呈现出昼夜节律的周期性表达, 其表达呈午时偏高, 而凌晨和夜晚偏低的节律, 这与 TODA 等<sup>[22]</sup>在离体情况所做的 NIH3T3 中相关基因的节律性表达相近似, 也从侧面证实生物钟基因节律的形成可能与地球自转和公转有关。

肥胖及其并发症在全球范围内广泛存在, 其诱因相对复杂, 主要由代谢异常引起。有资料显示, 肥胖症的发生与倒班等昼夜节律异常有关<sup>[23]</sup>。研究发现, *BMAL1* 基因在脂质代谢、糖平衡和能量代谢中也有十分重要的作用。与此同时, *BMAL1* 与 CLOCK 组成

的异二聚体在调节葡萄糖的动态平衡和胰岛素抵抗中意义重大。研究表明, *BMAL1* 和 / 或 *CLOCK* 基因异常的小鼠表现出肥胖或体脂减少等症状, 这些都表明 *BMAL1*、*CLOCK* 基因与肥胖密切相关。

穗花杉双黄酮有降血糖和抗氧化等作用<sup>[2]</sup>, 在抑制肥胖的发生中有十分重要的潜在药用价值。穗花杉双黄酮能否影响 3T3-L1 细胞中生物钟基因的转录、翻译, 从而影响细胞的增殖和凋亡, 尚未有明确的结论。

细胞是生物体的基本组成部分, 3T3-L1 作为脂肪前体细胞在生物体脂肪细胞的形成及肥胖的发生过程中都有着十分重要的作用。穗花杉双黄酮在较低浓度时对 3T3-L1 细胞的增殖和凋亡影响不大, 高浓度时抑制其增殖而促进其凋亡。Cleaved caspase-3 是半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶家族的成员, 在细胞凋亡的执行阶段起重要作用, 而 Bcl-2 通过结合 Bax 抑制细胞凋亡。结果显示, 高浓度穗花杉双黄酮通过上调 Cleaved caspase-3 表达, 下调 Bcl-2 的表达, 促进凋亡的发生。这提示穗花杉双黄酮可能成为潜在的抑制肥胖发生的药物, 但有待于在整体动物和临床试验中进一步验证。

通过检测不同质量浓度穗花杉双黄酮对生物钟基因 *CLOCK*、*BMAL1* mRNA 和蛋白的影响发现, 其 mRNA 和蛋白促进细胞增殖, 抑制细胞凋亡, 同时穗花杉双黄酮处理后, 过表达 *CLOCK* 基因使被抑制的 3T3-L1 细胞增殖率得到一定恢复, 这提示穗花杉双黄酮对 3T3-L1 增殖和凋亡的影响与生物钟基因的表达有关。

#### 参 考 文 献:

- [1] 张金丽, 曹文娟, 熊喜峰, 等. 穗花杉双黄酮抑制人脐静脉内皮细胞血管形成的实验研究 [J]. 中山大学学报 (自然科学版), 2016, 55(6): 148-152.
- [2] 郑晓珂, 苏成福, 张莉. 卷柏中穗花杉双黄酮降血糖作用 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2016, 19(17): 198-202.
- [3] HUANG N, RIZSHSKY L, HAUCK C C, et al. The inhibition of lipopolysaccharide-induced macrophage inflammation by 4 compounds in hypericum perforatum extract is partially dependent on the activation of SOCS3[J]. Phytochemistry, 2012, 76: 106-116.
- [4] TSAI S C, LIANG Y H, CHIANG J H, et al. Anti-inflammatory effects of calophyllum inophyllum L. in RAW264.7 cells[J]. Oncol Rep, 2012, 28(3): 1096-1102.
- [5] WOO E R, LEE J Y, CHO I J, et al. Amentoflavone inhibits the induction of nitric oxide synthase by inhibiting NF-kappa B activation in macrophages[J]. Pharmacol Res, 2005, 51(6): 539-546.
- [6] BANERJEE T, VALACCHI G, ZIBOH V A, et al. Inhibition of TNF alpha induced cyclooxygenase-2 expression by amentoflavone through suppression of NF-kappaB activation in A549 cells[J]. Mol Cell Biochem, 2002, 238: 105-110.
- [7] ERDOGAN-ORHAN I, ALTUN M L, SEVER-YILMAZ B, et al. Anti-acetylcholinesterase and antioxidant assets of the major components (salicin, amentoflavone, and chlorogenic acid) and the extracts of viburnum opulus and viburnum lantana and their total phenol and flavonoid contents[J]. J Med Foo, 2011, 14: 434-440.
- [8] XU G H, RYOO I J, KIM Y H, et al. Free radical scavenging and antielastase activities of flavonoids from the fruits of thuja orientalis[J]. Arch Pharm Res, 2009, 32: 275-282.
- [9] YAMAGUCHI L F, VASSÃO D G, KATO M J, et al. Biflavonoids from brazilian pine araucaria angustifolia as potentials protective agents against DNA damage and lipoperoxidation[J]. Phytochemistry, 2005, 66(18): 2238-2247.
- [10] LÉBOUVIER N, HNAWIA E, LÉBLANC K, et al. Structure-activity relationship study of biflavonoids on the Dengue virus polymerase DENV-NS5 RdRp[J]. Planta Med, 2013, 79(14): 1313-1318.
- [11] MA S C, BUT P P, OOI V E, et al. Antiviral amentoflavone from Selaginella sinensis[J]. Biol Pharm Bull, 2001, 24(3): 311-312.
- [12] LEE C W, NA Y, PARK N H, et al. Amentoflavone inhibits UVB-induced matrix metalloproteinase-1 expression through the modulation of AP-1 components in normal human fibroblasts[J]. Appl Biochem Biotechnol, 2012, 166(5): 1137-1147.
- [13] PARK N H, LEE C W, BAE J H, et al. Protective effects of amentoflavone on lamin a-dependent UVB-induced nuclear aberration in normal human fibroblasts[J]. Bioorg Med Chem Lett, 2011, 21(21): 6482-6284.
- [14] LI D, QIAN Y, TIAN Y J, et al. Optimization of ionic liquid-assisted extraction of biflavonoids from Selaginella doederleinii and evaluation of its antioxidant and antitumor activity[J]. Molecules, 2017, 22(4): 586-602.
- [15] WANG G, YAO S, ZHANG X X, et al. Rapid screening and structural characterization of antioxidants from the extract of Selaginella doederleinii hieron with DPPH-UPLC-Q-TOF/MS method[J]. International Journal of Analytical Chemistry, 2015, 2015: 1-9.
- [16] CHEN G, HAN Y, HE W, et al. Amentoflavone protects against high fat-induced metabolic dysfunction: possible role of the regulation of adipogenic differentiation[J]. Int J Mol Med, 2016, 38(6): 1759-1767.
- [17] ITOH M, SUGANAMI T, HACHIYA R, et al. Adipose tissue remodeling as homeostatic inflammation[J]. Int J Inflamm, 2011, 2011: 720926.
- [18] TUREK F W, JOSHUA C, KOHSAKA A, et al. Obesity and metabolic syndrome in circadian CLOCK mutant mice[J]. Science, 2005, 308(5724): 1043-1045.
- [19] MARCHEVA B, RAMSEY K M, BUHR E D, et al. Disruption

- of the CLOCK components CLOCK and BMAL1 leads to hypoinsulinaemia and diabetes[J]. *Nature*, 2010, 466(7306): 627-631.
- [20] LIN F, CHEN Y, LI X, et al. Over-expression of circadian CLOCK gene BMAL1 affects proliferation and the canonical Wnt pathway in NIH-3T3 cells[J]. *Cell Biochem Funct*, 2013, 31(2): 166-172.
- [21] CZEISLER C A, GOOLEY J J. Sleep and circadian rhythms in humans[J]. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 2007, 72: 579-597.
- [22] TODA K, HITOE S, TAKEDA S, et al. Passionflower extract induces high-amplitude rhythms without phase shifts in the expression of several circadian CLOCK genes in vitro and in vivo[J]. *Int J Biomed Sci*, 2017, 13(2): 84-92.
- [23] de BACQUER D, van RISSEGHEM M, CLAYS E, et al. Rotating shift work and the metabolic syndrome: a prospective study[J]. *Int J Epidemiol*, 2009, 38(3): 848-854.

(唐勇 编辑)