

東海大學畜產與生物科技學系

Department of Animal Science and Biotechnology

Tunghai University

碩士論文

Master Thesis

指導教授：陳珠亮

Advisor : Chu-Liang Chen

聖約翰草對 3T3-L1 脂肪細胞功能與約日節律基因表現之影響

The effects of Saint John's wort on the functions and the expression of circadian-related genes in 3T3-L1 adipocytes

研究生：李儒芸

Graduate student : Ru-Yun Li

中華民國一〇四年七月

July, 2015

目錄

目錄.....	I
圖表目錄.....	V
摘要.....	1
前言.....	2
文獻檢討.....	3
壹、脂肪組織.....	3
一、脂肪細胞種類.....	3
二、脂肪細胞發育.....	3
三、脂肪組織功能.....	4
(一) 脂肪生成作用 (Lipogenesis).....	4
(二) 脂肪分解作用 (Lipolysis).....	5
(三) 脂肪激素 (Adipokine).....	6
貳、脂肪細胞研究模式.....	7
一、實驗模式.....	7
(一) 體內試驗 (<i>in vivo</i>).....	7
(二) 體外試驗 (<i>in vitro</i>).....	7
二、脂肪細胞培養.....	7
(一) 初代細胞培養.....	7
(二) 細胞株培養.....	8
(三) 脂肪細胞分化模式.....	8
(四) 脂肪細胞約日節律同步化培養模式.....	9
參、脂肪細胞分化與代謝相關基因介紹.....	10
一、過氧小體增生活化受體 (peroxisome proliferator-activated receptor, PPARs).....	10
二、脂肪細胞脂肪酸結合蛋白 (adipocyte fatty acid binding protein, A-FABP or aP2).....	11

三、激素敏感性脂質分解酶 (hormone-sensitive lipase, HSL)	11
四、脂肪滴表面蛋白 (Perilipin)	13
五、脂聯素 (Adiponectin)	14
六、瘦體素 (Leptin)	16
肆、約日節律.....	17
一、生理時鐘 (Biological clocks)	17
二、約日節律分子機制及相關基因	19
三、約日節律與細胞代謝	21
(一) CLOCK/BMAL1 與細胞代謝	21
(二) PER 與細胞能量衡定	22
(三) REV-ERBa 與細胞代謝	23
伍、聖約翰草 (Saint John's wort)	24
一、聖約翰草之應用	24
二、聖約翰草成份分析	24
三、聖約翰草成份之研究	26
(一) 對細胞分裂與凋亡之影響	26
(二) 對細胞分化之影響	27
(三) 對脂肪代謝之影響	27
(四) 其他影響	28
材料與方法.....	29
壹、試驗材料.....	29
一、脂肪細胞	29
二、聖約翰草萃取物 (St. John's wort extract, SJWE)	29
三、試驗藥劑	29
貳、方法.....	31
一、脂肪細胞培養與處理	31
二、聖約翰草成分萃取	32

三、細胞存活率分析 (MTT assay)	32
四、Oil-Red O 染色與定量	33
五、三酸甘油酯含量分析 (triglyceride assay, TG)	33
六、Leptin 含量分析	34
七、總 RNA 萃取	35
八、相對定量反轉錄聚合酶連鎖反應 (Relative quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR)	35
九、統計分析	38
結果與討論	39
試驗一、SJW 處理對 3T3-L1 脂肪細胞脂質堆積之影響	39
一、脂肪細胞外觀形態	39
二、Oil-Red O 染色與定量	39
三、三酸甘油酯含量之比較	39
四、細胞存活率分析	40
試驗二、SJW 處理對 3T3-L1 脂肪細胞能量代謝與脂肪激素相關基因表現之影響	40
一、SJW 對 3T3-L1 脂肪細胞之脂質代謝相關基因 mRNA 表現的影響	40
二、SJW 對 3T3-L1 脂肪細胞之脂肪細胞分泌激素基因 mRNA 表現的影響	41
試驗三、SJW 對 3T3-L1 脂肪細胞約日節律同步化及相關基因表現之影響	42
一、SJW 同步化 3T3-L1 脂肪細胞約日節律	42
二、SJW 對不同分化階段之 3T3-L1 脂肪細胞約日節律同步化之影響	43
三、SJW 對 3T3-L1 脂肪細胞約日節律及代謝相關基因節律性表現之影響	43
試驗四、SJW 對 3T3-L1 脂肪細胞 Leptin 分泌量及其節律性變化的影響	45
一、SJW 對 3T3-L1 脂肪細胞 Leptin 分泌量的影響	45
二、同步化對 3T3-L1 脂肪細胞 Leptin 分泌節律性變化的影響	46
結論	48
參考文獻	68



圖表目錄

表 1 聖約翰草中發現之重要生物活性成份.....	25
表 2 試驗藥劑.....	29
表 3 聚合酶連鎖反應分析 3T3-L1 脂肪細胞基因表現之引子序列.....	37
表 4 SJW 與胰島素添加對 3T3-L1 脂肪細胞之代謝以及分泌激素相關基因 mRNA 表現 之影響.....	55
圖 1 Leptin 含量之標準曲線.....	35
圖 2 SJW 處理對 3T3-L1 脂肪細胞形態之影響.....	49
圖 3 SJW 處理對 3T3-L1 脂肪細胞脂質蓄積之影響.....	50
圖 4 SJW 處理對 3T3-L1 脂肪細胞三酸甘油酯含量之影響.....	51
圖 5 SJW 濃度對 3T3-L1 脂肪細胞之細胞存活率之影響.....	52
圖 6 SJW (S) 與胰島素 (I) 添加對 3T3-L1 脂肪細胞之代謝相關基因 mRNA 表現之影響.....	53
圖 7 SJW (S) 與胰島素 (I) 添加對 3T3-L1 脂肪細胞之分泌激素相關基因 mRNA 表現之影響.....	54
圖 8 3T3-L1 脂肪細胞經高劑量血清或 SJW 刺激同步化後 <i>Per2</i> mRNA 表現.....	56
圖 9 3T3-L1 脂肪細胞分化期間經高劑量血清或 SJW 刺激同步化後 <i>Per1</i> mRNA 表現比較.....	57
圖 10 3T3-L1 脂肪細胞分化期間經高劑量血清或 SJW 刺激同步化後 <i>Per2</i> mRNA 表現比較.....	58
圖 11 SJW 或高劑量血清對 3T3-L1 脂肪細胞 <i>Per2</i> mRNA 約日節律表現型態之影 響.....	59
圖 12 SJW 或高劑量血清對 3T3-L1 脂肪細胞 <i>Bmal1</i> mRNA 約日節律表現型態之 影響.....	60
圖 13 SJW 或高劑量血清對 3T3-L1 脂肪細胞 <i>Rev-erba</i> mRNA 約日節律表現型態 之影響.....	61

圖 14 SJW 或高劑量血清對 3T3-L1 脂肪細胞代謝基因約日節律表現型態之影響	62
圖 15 SJW 或高劑量血清對 3T3-L1 脂肪細胞分泌激素基因約日節律表現型態之影響	63
圖 16 SJW 對 3T3-L1 脂肪細胞 Leptin 分泌量之影響.....	64
圖 17 SJW 或高劑量血清對 3T3-L1 脂肪細胞 Leptin 節律性變化的影響（細胞經 同步化作用後培養於 DMEM-0）	65
圖 18 SJW 或高劑量血清對 3T3-L1 脂肪細胞 Leptin 節律性變化的影響（細胞經 同步化作用後培養於 DMEM-10）	66
圖 19 SJW 或高劑量血清對 3T3-L1 脂肪細胞 Leptin 分泌量改變之節律表現的影 響.....	67



摘要

為改善人類肥胖與代謝相關疾病的發生、提高畜產動物之飼料效率與降低飼養成本。本研究嘗試以功能性的物質探討其對脂肪細胞功能之影響。試驗以3T3-L1脂肪細胞作為試驗材料，探討聖約翰草萃取物 (Saint John's wort extracts, SJWE)對脂肪細胞脂質蓄積功能與約日節律的影響。細胞經SJWE處理，由oil-Red O脂質染色與三酸甘油酯含量分析，顯示SJWE似乎可降低脂肪細胞的油脂堆積。根據相對定量聚合酶連鎖反應分析結果，顯示SJWE會降低脂質代謝與脂肪細胞分泌激素相關基因，如peroxisome proliferator-activated receptor ($PPAR\gamma$)、*Perilipin*、hormone-sensitive lipase (*HSL*)，及脂肪細胞分泌激素*Adiponectin*與*Leptin* mRNA之表現，而此抑制作用在缺乏胰島素的培養條件下更形顯著。此外，SJWE可使同步化標幟基因 - *Per2*於處理後1小時提升，並於第8小時降至低點，使細胞生理時鐘同步化；並可使*Per2*、*Bmal1*、*Rev-erba*、*PPAR\gamma*、*HSL*、*Perilipin* mRNA表現節律性變化較為鮮明。然而脂肪細胞分泌激素基因 (*Adiponectin*、*Leptin*) mRNA表現，雖於SJWE處理初期增加，但卻未影響其節律性變化。最後，細胞*Leptin*分泌量分析顯示，SJWE可顯著降低*Leptin*分泌量，而此抑制能力會隨時間而有週期性變化。綜合上述結果，SJWE可抑制3T3-L1脂肪細胞脂質蓄積及代謝與細胞激素相關基因之表現，並調節約日節律及脂質代謝相關基因的節律性變化與*Leptin*分泌量。至於SJWE抑制脂肪細胞脂質蓄積之作用機制，與約日節律間之關聯性仍有待進一步探討。

關鍵詞：脂肪細胞、約日節律基因、脂質蓄積、聖約翰草

前言

脂肪為日常飲食中不可或缺的一環，可作為能量的來源及提供生物所需之多元不飽和脂肪酸 (polyunsaturated fatty acid, PUFA)，並可透過脂肪的攝取提供與吸收脂溶性維生素 (分為 A, D, E, K 四種)。然而，過度的脂肪攝取導致人類肥胖及代謝相關疾病的產生，現今，健康意識的崛起也使得消費者對飲食習慣更為重視並轉型，畜禽肉品中過多的油脂分佈不再是購買要件之一。再者，畜禽動物過多的體脂造成飼料效率的下降，同時也導致飼養成本的提高，如何在其中取得平衡將成為畜禽產業發展之重點。

脂肪組織為調控能量平衡的關鍵之一，當體內攝取能量大於支出的能量時，可透過脂質合成作用存於脂肪組織中，並在動物體能量不足時，藉由脂解作用供能，且能分泌激素調控能量代謝，此三種生理活動相互影響，進而調控生物體內能量動態平衡，若脂肪組織功能失調，將引發一連串之心血管問題與胰島素抵抗性等代謝疾病。

聖約翰草 (Saint John's wort, SJW) 早先用於治療病毒感染、神經痛、創傷治療、皮膚潰瘍 (Ivan, 1979; Bombardelli and Morazzoni, 1995; Barnes *et al.*, 2001)，近年來，主要用作治療輕度至中度憂鬱症的藥物，減緩患者焦慮及睡眠功能的障礙。研究顯示，聖約翰草可抑制脂肪細胞的分化 (陳, 2006; 王等, 2007; Amini *et al.*, 2009)、影響肝臟細胞能量代謝基因的表現 (Krusekopf and Roots, 2005)，並降低血中的膽固醇與三酸甘油酯含量 (Zou *et al.*, 2005)。

本試驗使用 3T3-L1 脂肪細胞為試驗材料，探討聖約翰草萃取物對脂肪細胞脂質蓄積與相關代謝及細胞激素基因表現及分泌量之影響。其中，約日節律系統除了影響生物體之行為活動，也可調控周邊組織之生理反應，因此再以 SJW 對約日節律基因與脂質代謝基因之節律性型態影響做探究。本篇研究瞭解 SJW 對脂肪組織功能之影響，希冀未來能使中草藥更廣泛應用於禽畜動物的養殖，並在人類代謝疾病之治療有所幫助。

文獻檢討

壹、脂肪組織

一、脂肪細胞種類

脂肪組織在組織學中隸屬於結締組織，其在哺乳類動物中可分為兩種：白色脂肪組織（white adipose tissue, WAT）與棕色脂肪組織（brown adipose tissue, BAT），依動物體種類及年齡而有不同含量及分佈（Albright and Stern, 1998）。

WAT 主要分佈於皮下、內臟、腹部等區域，具有維持恆溫、保護臟器受到衝擊及儲存能量的功能。當能量過剩時，可以三酸甘油酯型式蓄能，反之，能量不足時，可藉由脂解作用產生游離脂肪酸供動物體使用（Vazquez-Vela *et al.*, 2008）。BAT 常見於哺乳動物之冬眠動物及初生兒中，主要分佈於肩胛間、腋窩，其次為胸、腹部。可於短時間內代謝產生熱能，並在低溫刺激時，調節體溫，以利動物體生存（Cannon and Nedergaard, 2004）。此兩種脂肪組織為調節動物體內能量平衡的關鍵。

二、脂肪細胞發育

脂肪細胞源自間葉幹細胞（mesenchymal stem cells, MSC），此類幹細胞具多向分化的能力，除了分化成脂肪細胞外（Pittenger *et al.*, 1999），也可分化成骨細胞（osteocytes）（Bruder *et al.*, 1994）、軟骨細胞（chondrocytes）（Mackay *et al.*, 1998）等。在體外培養中，當 MSC 分化成前脂肪細胞（committed preadipocytes）時，會進行增生分裂直至細胞間彼此緊密貼合，即會停止分裂，此一時期，為細胞週期之 G0/G1 階段，是前脂肪細胞進入分化時期所必要條件（Pairault and Green, 1979；Gregoire *et al.*, 1998）。此時，可藉由外加分化試劑誘導刺激，使細胞重新進入細胞週期，產生至少一次的 DNA 複製及細胞增生，此現象稱為細胞擴增（mitotic clonal expansion）。

經歷以上階段，進入到分化階段伴隨有多種基因表現參與調控。脂肪細胞分化早期，主要受到 CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP) 與 Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) 兩種轉錄因子家族所調控 (Gregoire *et al.*, 1998)。C/EBP β 和 C/EBP δ 於分化初期表現量明顯增加 (Tang and Lane, 1999)，分化中期開始下降，同時誘發 PPAR γ (Wu *et al.*, 1995; Clarke *et al.*, 1997) 和 C/EBP α (MacDougald and Lane, 1995) 表現。當 PPAR γ 和 C/EBP α 活化後，即開始調控下游與分化及代謝相關基因的表現，進而促使脂肪細胞堆積脂質 (Shao and Lazar, 1997; Gregoire *et al.*, 1998)。

三、脂肪組織功能

(一) 脂質生成作用 (Lipogenesis)

當動物體攝取過多能量時，會將多餘能量轉化為脂質形式存於體內，稱之為脂質生成作用。一般而言，脂質生成作用儲存的能量來源主要是藉由食物中之碳水化合物，以此轉化為脂肪酸，並合成三酸甘油酯。

脂肪細胞具合成脂肪酸的功能，主要合成路徑為粒線體 (mitochondria) 中的丙酮酸 (pyruvate) 氧化成乙醯輔酶 A (acetyl-CoA) 後，與草醯乙酸 (oxaloacetate, OAA) 形成檸檬酸 (citrate)，再藉由 ATP-檸檬酸分解酶 (ATP-citrate lyase, ACL) 分解成乙醯輔酶 A 和草醯乙酸。其中，乙醯輔酶 A 可由乙醯輔酶 A 羧化酶 (acetyl-CoA carboxylase, ACC) 轉化為丙二醯輔酶 A (malonyl-CoA)，並經由脂肪酸合成酶 (fatty acid synthase, FAS) 作用，形成棕櫚酸 (palmitic acid) (Bressle and Wakil, 1961)。棕櫚酸可再經碳鏈延長酶 (elongase) 與去飽和酶 (desaturase) 作用，反覆延長碳鏈或去飽和反應進而形成其他較長鏈或不飽和脂肪酸 (Martin *et al.*, 1961)。

脂肪細胞內之油滴主要以三酸甘油酯為儲存形式，由一分子甘油與三分子的脂肪酸所組成。脂肪細胞利用糖解作用 (glycolysis) 的中間產物-二羥丙酮磷酸

(dihydroxyacetone phosphate, DHAP) 作為前驅物，與甘油-3-磷酸去氫酶 (glycerol-3-phosphate dehydrogenase, GPDH) 反應，產生甘油-3-磷酸 (glycerol-3-phosphate, G3P)。脂肪酸與 ATP、CoA 藉由醯基輔酶 A 合成酶 (acyl-CoA synthetase, ACS) 作用形成脂醯基輔酶 A (fatty acyl-CoA)；兩分子之脂醯基輔酶 A 與甘油-3-磷酸反應，形成 1,2-二醯基甘油磷酸 (1,2-diacylglycerol phosphate)，再經由磷脂酸磷酸酶 (phosphatidic acid phosphatase, PAP) 活化形成 1,2-二醯基甘油 (1,2-diacylglycerol)，而另一分子之脂醯基輔酶 A 於二醯基甘油醯基轉移酶 (diacylglycerol acyltransferase, DGAT) 作用下與 1,2-二醯基甘油形成三酸甘油酯 (Coleman and Lee, 2004; Ahmadian *et al.*, 2007)。

(二) 脂質分解作用 (Lipolysis)

當動物體能量不足時，脂肪細胞內的三酸甘油酯會分解成一分子甘油與三分子的脂肪酸，稱之為脂質分解作用。此作用可受到內泌素所誘發，如兒茶酚胺 (catecholamines)、糖皮質激素 (glucocorticoids)。以兒茶酚胺為例，當其與脂肪細胞膜上的 β -adrenergic receptor 結合後，此複合體再與 Gs protein 作用，致活腺苷酸環化酶 (adenylyl cyclase, AC) 將 ATP 轉化為環腺苷單磷酸 (cyclic AMP, cAMP)，此時，protein kinase A (PKA) 活化，進而將脂肪滴表面蛋白 (Perilipin) 及激素敏感性脂質分解酶 (hormone-sensitive lipase, HSL) 磷酸化，受到磷酸化的 Perilipin 會離開脂質油滴表面，而磷酸化的 HSL 會發生易位現象，由細胞質移至脂肪油滴內進行三酸甘油酯分解作用 (Carmen and Victor, 2006; Ahmadian *et al.*, 2007; Duncan *et al.*, 2007)。脂肪細胞內的三酸甘油酯經由三酸甘油酯水解酶 (adipose triglyceride lipase, ATGL) 分解為二酸甘油酯 (diacylglycerol, DAG) 和脂肪酸，再由磷酸化的 HSL 將 DAG 分解為單酸甘油酯 (monoacylglycerol, MAG) 和脂肪酸，最後，由單酸甘油酯水解酶 (monoacylglycerol lipase, MGL) 將 MAG 分解為甘油和脂肪酸，由此一連串酵素催化的反應，即為脂質分解作用 (Jaworski

et al., 2007 ; Ahmadian *et al.*, 2010)。

脂質分解作用所產生的甘油不易被脂肪組織所利用，故需藉由血液運輸，由肝臟、腎臟等具高甘油激酶 (glycerol kinase, GK) 活性的組織所利用。GK 將甘油轉化為 G3P，再經 GPDH 催化形成 DHAP，接著可藉 glycolysis 產生 ATP 或是進入肝臟經糖質新生成作用 (gluconeogenesis) 產生葡萄糖 (Robinson and Newsholme, 1969 ; Dipple *et al.*, 2001)。

(三) 脂肪激素 (Adipokine)

近來已有許多研究證實，脂肪組織本身除了儲存能量的功能外，在調節體內能量平衡、胰島素敏感性及阻抗性、免疫反應、繁殖及生理時鐘等動物生理方面扮演重要角色，而成熟脂肪組織所分泌的激素亦具有調控能量代謝的功能，其中又以瘦體素 (Leptin) 及脂聯素 (Adiponectin, AdipoQ) 最為廣泛被探討。

Leptin 為 *ob* 基因產物，研究指出，*ob* 基因缺陷之 *ob/ob* 小鼠或 Leptin 受體基因突變導致缺少 Leptin 受體之 *db/db* 小鼠及 *fa/fa* 大鼠將造成嚴重肥胖 (Chen *et al.*, 1996 ; Iida *et al.*, 1996)。當 *ob/ob* 小鼠腦腔注射 Leptin，可降低攝食及體重，增加能量消耗 (Campfield *et al.*, 1995)。此外，Leptin 也被視為體內能量平衡的感應器，當禁餉時，動物血中 Leptin 濃度會下降 (Ahren *et al.*, 1997)，而在過度餵飼的情況下，動物體體重增加且 Leptin 濃度也隨之增加 (Kolaczynski *et al.*, 1996)。

Adiponectin 為 *apM1* 基因產物，富含於血液中，分子量約為 30 kDa，又稱為 Acrp30，其可受胰島素刺激而分泌 (Scherer *et al.*, 1995)。此外，研究發現於肥胖人體血液中的 Adiponectin 濃度顯著低於非肥胖之人體 (Arita *et al.*, 1999)，而在肥胖動物注射高濃度 Adiponectin 可提升胰島素敏感性進而增加葡萄糖的吸收 (Berg *et al.*, 2002)。

綜合以上研究發現，脂肪細胞不單只有儲存能量的功能，成熟脂肪細胞所分

泌的激素也成為調控體內能量平衡的重要因子。

貳、脂肪細胞研究模式

一、實驗模式

(一) 體內試驗 (*in vivo*)

活體動物本身為直接觀察，予以處理研究的對象，但因動物體為一複雜的生物反應器，其表現可受外在因子（光照、氣候、食物等）以及體內內分泌素的交互作用的影響，因而無法單純探究各別處理對標的細胞之影響與機制，故此類研究模式主要是從生物整體的角度來作探究。

(二) 體外試驗 (*in vitro*)

體外試驗是將動物體內的細胞、組織或器官取出體外，於人工模擬動物體內的生理環境（無菌環境、酸鹼值、溫度、溼度等）下進行培養，並提供其生長所需之營養成份，如：胺基酸、維生素及微量元素等。此實驗模式不受複雜的生存環境所影響，可單純針對合成代謝、訊息傳遞等機制進行研究，並藉由人為改變培養條件，得以進一步了解於調控因子影響下，標的物所產生的生理變化。然而，標的物於體外環境之培養條件仍與體內試驗有所差異，因此無法完整表現出生物體形態，故體外試驗所表現的生物反應並不能與體內試驗完全雷同。

二、脂肪細胞培養

細胞培養是基礎的細胞生物學研究方法，被廣泛地應用在脂肪組織相關研究上 (Novakofski, 2004)。細胞培養可分為初代細胞培養 (primary cell culture) 和細胞株 (cell line) 培養。

(一) 初代細胞培養

初代細胞培養為直接採取動物體內的器官或組織，並利用酵素、化學或機械等方式分離出細胞，進行培養。然而，此細胞生命週期短，無法多次繼代培養。初代細胞優勢在於直接取自動物體，與原生物體內的狀態和功能較為相似，並可由各物種不同時期的生長階段及部位獲取所需之細胞。初代脂肪細胞研究顯示，不同部位所取得的脂肪細胞具有不同的脂質生成能力與生化反應，如：附睪、皮下及內臟周圍的脂肪細胞大小相異，對於正腎上腺素刺激具有不同的脂質分解能力（Storck and Spitzer, 1974）。

（二）細胞株培養

細胞株是從動物體內取出細胞，經多次繼代培養、鑑定、篩選後所得之形態均一、生長能力穩定且生物性狀表現清楚的細胞群。由於其易於大量培養及保存，極適合用於研究。

脂肪細胞於長期研究下，已有許多細胞株被篩選出用於實驗探討，如：3T3-L1（Green and Kehinde, 1974b；Green and Kehinde, 1975）、3T3-F442A（Green and Kehinde, 1976）、TA1（Chapman *et al.*, 1984）、OB17（Negrel *et al.*, 1978）等。

其中，3T3-L1 與 3T3-F442A 為最廣泛被應用的細胞株（Novakofski, 2004），源自 17-19 天齡的瑞士 3T3 小鼠胚胎之纖維母細胞（Green and Meuth, 1974a），雖然誘導分化的條件兩者有些許不同，但對於生物反應表現極其相似。

（三）脂肪細胞分化培養模式

脂肪細胞的分化係指前脂肪細胞經誘導成為具有堆積油滴能力的成熟脂肪細胞。前脂肪細胞進入分化階段前，須先進行增生分裂直至細胞相互接觸，形成 confluence，此時，添加外來試劑可誘發分化。

常用於刺激脂肪細胞分化的試劑分別為胰島素（insulin, Ins）、人工合成葡萄糖皮質素（dexamethasone, DEX）和 isobutylmethylxanthine（IBMX）。此三種試

劑藉由不同的路徑誘發細胞分化：胰島素是藉由 insulin/ insulin-like growth factor-I (IGF-I) 受體的磷酸酪胺基酸激酶 (phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K) 路徑(Kohn *et al.*, 1996)及有絲分裂活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK) 路徑 (Font de Mora *et al.*, 1997) 誘導分化；DEX 可誘發 C/EBP δ 表現，進而刺激 C/EBP β 的表現，兩者再共同促使 PPAR γ 表現，使脂肪細胞分化 (Wu *et al.*, 1996)；IBMX 可增加 cAMP 濃度進而活化 PKA 路徑(Parsons *et al.*, 1988)，並可誘發 C/EBP β 表現，因而刺激 PPAR γ 促使分化(Gregoire *et al.*, 1998; Ntambi and Young-Cheul, 2000)。

(四) 脂肪細胞約日節律同步化培養模式

動物體的生理時鐘可影響自身生理、行為的表現，而在哺乳動物中，除了位於視叉上核 (suprachiasmatic nucleus, SCN) 受光照影響之中樞生理時鐘外，周邊組織也具有調控生理時鐘系統之功能，這些調控生理時鐘之基因可受到中樞生理時鐘與外在因子，如攝食而產生訊號進行調節 (Bray and Young, 2006)，動物體血液中即具多種有節律性變化之內分泌素，如：褪黑激素 (melatonin)、瘦體素 (Leptin) (Zvonic *et al.*, 2006)、促腎上腺皮質激素 (adrenocorticotrophic hormone) (Chrousos, 1998) 等。在細胞培養模式下，各細胞處於相異的節律時間，為了觀察細胞約日節律之變化，須藉由同步化作用，使細胞皆處於相同生理時間點。

至今，已有多數細胞培養實驗利用高濃度血清處理，使約日節律相關基因同步化 (Nagoshi *et al.*, 2004; Garbarino-Pico *et al.*, 2007; Nakahata *et al.*, 2008; Okazaki *et al.*, 2010)，如於 Rat-1 纖維母細胞添加 50% 血清培養，刺激 1 小時後，*Per1* 與 *Per2* mRNA 表現量立即上升，於血清刺激後 8 小時表現量降至最低 (Balsalobre *et al.*, 1998)。本研究於試驗前利用 50% 胎牛血清於 3T3-L1 脂肪細胞進行測試，也得到相同結果 (於實驗結果圖 8)，故以此作為本實驗處理脂肪細胞約日節律同步化之模式。

參、脂肪細胞分化與代謝相關基因介紹

一、過氧化小體增生活化受體 (peroxisome proliferator-activated receptor, PPARs)

PPAR 為受配體 (ligand) 活化的轉錄因子，屬於細胞核荷爾蒙受體超級家族 (nuclear hormone receptor superfamily) 之一 (Michalik *et al.*, 2006)，已被發現三種以上異構物：PPAR α 、PPAR γ 與 PPAR δ 等，分別具有不同的生理角色 (Michalik and Wahli, 1999)，諸如調控細胞分化、能量平衡、發炎反應等。於脂肪組織中，又以 PPAR γ 為主要探討對象。

PPAR γ 因不同的轉錄起點與裁切，又分為三種型態： $\gamma 1$ 、 $\gamma 2$ 、 $\gamma 3$ (Desvergne and Wahli, 1999)。PPAR $\gamma 1$ 表現於脂肪組織、肝臟、心臟、骨骼肌 (Vazquez-Vela *et al.*, 2008)；PPAR $\gamma 2$ 則專一地表現於脂肪組織中 (Tontonoz *et al.*, 1994b)；PPAR $\gamma 3$ 在結腸上皮細胞和脂肪組織有表現 (Fajas *et al.*, 1998)。PPAR $\gamma 2$ 於脂肪細胞分化後會大量表現，為脂肪細胞分化的主要基因之一，參與脂質生成作用 (Tontonoz and Spiegelman, 1994；Ren *et al.*, 2002)。

因 PPAR 為受到配體 (ligand) 活化的轉錄因子，故可由不同的配體所調控，包含多元不飽和脂肪酸 (polyunsaturated fatty acid, PUFA)、非類固醇抗發炎藥物 (nonsteroidal anti-inflammatory drugs, NSAIDs)、類降血糖藥 (thiazolidinediones, TZD) 等 (Lehmann *et al.*, 1997；Desvergne and Wahli, 1999)。

由 PPAR γ 剔除小鼠的脂肪細胞實驗中發現，脂肪細胞經分化刺激，卻無法產生油滴堆積，且下游基因 *aP2* 和 *adipsin* 也無法表現 (Rosen *et al.*, 1999)；缺乏 PPAR γ 的小鼠，也無法生成脂肪組織 (Barak *et al.*, 1999)。由此可知，PPAR γ 為脂肪細胞分化及脂質生成重要的因子。此外，PPAR γ 也具能量調節的功能，研究指出，於 3T3-L1 成熟脂肪細胞中抑制 PPAR γ 的表現量，會造成細胞尺寸變小，且三酸甘油酯含量與游離脂肪酸的吸收力降低，並促進脂解作用 (Tamori *et al.*,

2002)。然而，另有文獻有相反結果，指出給予大鼠 PPAR γ 促進劑 rosiglitazone，可使其脂肪組織之脂解作用增加 (Festuccia *et al.*, 2006)，於喪失 PPAR γ 功能之 P465L PPAR γ 小鼠中，其脂肪組織脂解的相關作用會降低 (Rodriguez-Cuenca *et al.*, 2012)。於第二型糖尿病患者處理 PPAR γ 促進劑 TZD，可增加患者對胰島素的敏感性，且降低血液中游離脂肪酸及膽固醇的濃度 (Inzucchi *et al.*, 1998; Frias *et al.*, 2000; Miyazaki *et al.*, 2002)。

二、脂肪細胞脂肪酸結合蛋白 (adipocyte fatty acid binding protein, A-FABP or aP2)

FABP 是細胞質內主要的脂質結合蛋白 (lipid-binding proteins, LBPs) 超級家族成員之一，分子量約為 15 kDa，具高度的組織專一性，目前已知九種組織存在 FABPs，包括肝臟 (L)、小腸 (I)、心肌 (H)、脂肪細胞 (A)、表皮 (E)、迴腸 (II)、腦 (B)、髓鞘 (M) 以及睪丸 (T)。FABP 主要功能為脂肪酸的吸收、運輸及代謝 (Chmurzynska, 2006)。

aP2 已被認為是脂肪細胞分化末期的標幟基因，於脂肪細胞分化期間，上游基因 PPAR γ 會與視網酸 X 受體 (retinoid X receptor, RXR) 形成二聚體，誘發 aP2 基因表現 (Tontonoz *et al.*, 1994b)。aP2 具影響胰島素抗性、脂質代謝及脂質分解的作用 (Boord *et al.*, 2002)。aP2/mall (aP2 異構物) 剔除之小鼠，葡萄糖耐受性 (glucose tolerance tests, GTT) 及胰島素耐受性 (insulin tolerance tests, ITT) 會顯著低於野生型小鼠 (Maeda *et al.*, 2005)，而 aP2 剔除小鼠相較於野生型小鼠，脂解作用會受到抑制 (Coe *et al.*, 1999; Scheja *et al.*, 1999)。此外，aP2 可與 HSL 產生交互作用，使 HSL 活性增加，進而促進脂解作用 (Shen *et al.*, 2001)。

三、激素敏感性脂質分解酶 (hormone-sensitive lipase, HSL)

HSL 為脂解作用關鍵的脂質水解酵素，可分解存於脂肪細胞內的三酸甘油酯，以提供生物所需的 FFA，也可以分解二酸甘油酯、膽固醇酯（cholesteryl esters）及 retinyl esters（Haemmerle *et al.*, 2002）。HSL 具三種異構物，分子量介於 84-130 kDa 之間（Holm *et al.*, 1988；Holst *et al.*, 1996；Mulder *et al.*, 1999）。

HSL 可被多種激素所激活，如兒茶酚胺、促腎上腺皮質激素（adrenocorticotrophic hormone, ACTH）、升糖素（glucagon），進而促使脂解作用（Vaughan *et al.*, 1964）。內泌素誘發 HSL 是藉由 PKA 之作用，內泌素與脂肪細胞膜上的 β -adrenergic receptor 結合，形成複合體，再與 Gs protein 作用，使腺苷酸環化酶將 ATP 轉化為 cAMP，而活化 PKA，進而將 HSL 磷酸化，促使磷酸化的 HSL 移至脂質油滴表面，進行脂解作用（Holm, 2003）。胰島素具抑制內泌素誘發脂解作用的能力，經由激活磷酸二酯酶 3B（phosphodiesterase 3B），降低 cAMP 濃度而致（Shakur *et al.*, 2001）；另外，Perilipin 的表現亦為 HSL 作用所需，當缺乏 Perilipin 時，脂肪細胞對藉由 β -adrenergic receptor 誘發的脂解作用幾乎失效（Tansey *et al.*, 2001），且 HSL 移至油滴表面亦受抑制（Sztalryd *et al.*, 2003）。圖 1 為內泌素對脂肪細胞之脂解作用的調控。

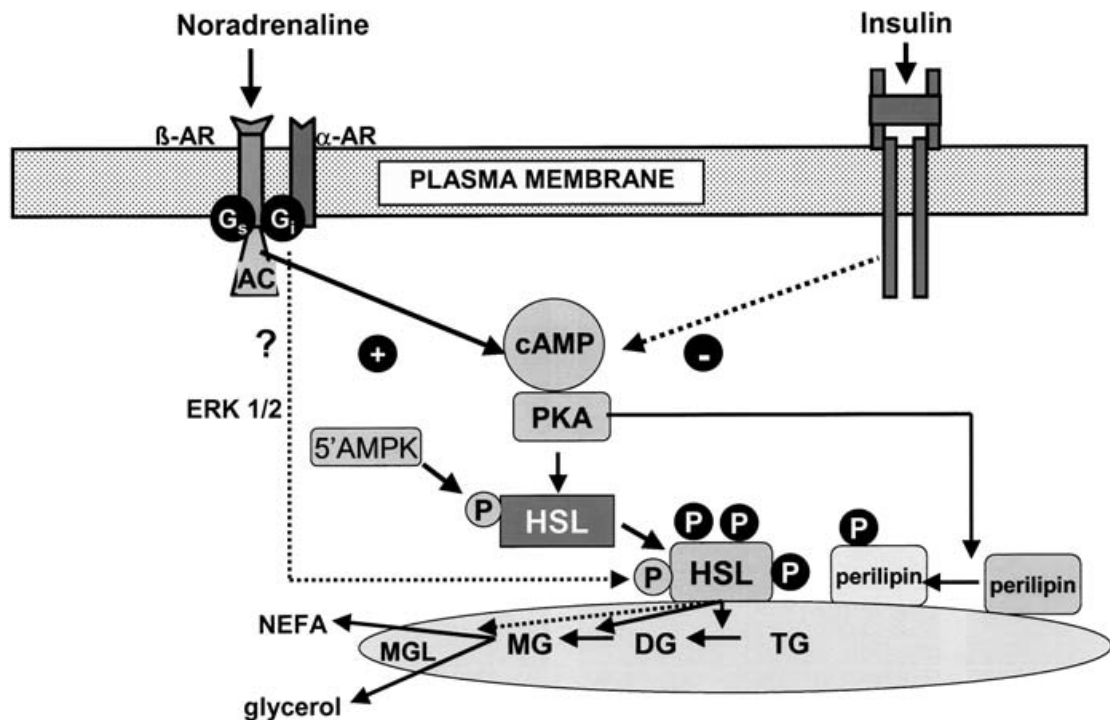


圖 1 內泌素對脂肪細胞之脂解作用的調控。

Figure 1 Hormonal control of adipocyte lipolysis.

(Holm, 2003)

HSL 影響了許多生理活動，3T3-F442A 中過度表現 HSL，導致細胞無法堆積三酸甘油酯 (Sztalryd *et al.*, 1995)。相較於野生型小鼠，於 HSL 剔除小鼠中，二酸甘油酯會在脂肪組織、肌肉及睪丸中堆積，同時，將白色脂肪組織取出進行脂解作用分析，發現 HSL 剔除小鼠之 FFA 釋放量降低，二酸甘油酯含量增加 (Haemmerle *et al.*, 2002)；此外，HSL 剔除小鼠會產生輕微程度的高血糖及高胰島素血症 (Roduit *et al.*, 2001；Muldert *et al.*, 2003)。由上述文獻可知，HSL 於成熟脂肪細胞之代謝扮演重要的角色。

四、脂肪滴表面蛋白 (Perilipin)

Perilipin 為脂肪細胞油滴表面最主要的磷蛋白，被發現於大鼠初代脂肪細胞及 3T3-L1 脂肪細胞的油滴表面，能保護油滴不被脂解酶水解 (Egan *et al.*, 1990；

Greenberg *et al.*, 1991)。目前已知，*Perilipin* 基因經選擇性剪切後可產生四種異構物，分別為 *perilipin A*、*B*、*C* 與 *D* (Lu *et al.*, 2001)，其中，*Perilipin A* 為脂肪細胞中 PKA 磷酸化的主要目標 (Egan *et al.*, 1990；Greenberg *et al.*, 1993)。

Perilipin 具有多個磷酸化的位置 (Londos *et al.*, 1999；Clifford *et al.*, 2000)，會因生物體營養狀態不同，而影響 *Perilipin* 調控脂解作用。當體內需要能量時，會刺激脂解的激素活化 PKA，促使 *Perilipin* 與 HSL 磷酸化，活化的 *Perilipin* 會使油滴表面暴露，此時，HSL 會自細胞質移至油滴表面，與之結合，進而促使三酸甘油酯分解 (Clifford *et al.*, 2000；Sztalryd *et al.*, 2003；Tansey *et al.*, 2004)；反之，胰島素可使 *Perilipin* 去磷酸化，進而抑制脂解作用 (Egan *et al.*, 1990)。此外，*Perilipin* 啟動子上具 PPRE，因此 PPAR γ 可調節之，利用 PPAR γ 的促效劑 - troglitazone (TZD) 可使脂肪細胞中 *Perilipin* 表現量增加 (Nagai *et al.*, 2004)。

Perilipin 對於調控脂解作用及三酸甘油酯的儲存具相當大的重要性。*Perilipin* 藉由在油滴表面形成蛋白質障壁，阻礙脂解酶作用率，進而使三酸甘油酯堆積量增加 ((Brasaemle *et al.*, 2000)；使 3T3-L1 脂肪細胞過度表現 *Perilipin*，將造成腫瘤壞死因子 (tumor necrosis factor α , TNF- α) 所誘發的脂解作用受到抑制 (Souza *et al.*, 1998)；於動物實驗中，在相同的能量攝取條件下，*Perilipin* 剔除小鼠與野生型小鼠相比，體脂重下降 30%，代謝速率、葡萄糖耐受性及胰島素耐受性也增加。自小鼠分離出細胞培養發現，*Perilipin* 剔除小鼠脂肪細胞基礎脂解率高於對照組，而經異丙基腎上腺素 (isoproterenol) 誘發脂解作用後，*Perilipin* 剔除小鼠脂肪細胞脂解率則低於對照組 (Martinez-Botas *et al.*, 2000；Tansey *et al.*, 2001)。由上述實驗可知，*Perilipin* 之作用為保護油滴免遭水解，進而儲存三酸甘油酯，但當生物體能量不足時，可藉由內泌素刺激，進行脂解作用。

五、脂聯素 (Adiponectin)

Adiponectin 為脂肪組織所分泌的細胞激素之一，在 1995 至 1996 年間由不

同研究方式與實驗對象中發現，而有不同的名稱，如 adipocyte complement-related protein of 30 kDa (Acrp30) (Scherer *et al.*, 1995)、adipoQ (Hu *et al.*, 1996)、adipose most abundant gene transcript 1 (apM1) (Maeda *et al.*, 1996)、gelatin-binding protein of 28 kDa (GBP28) (Nakano *et al.*, 1996)。

Adiponectin 受脂肪細胞分化轉錄因子、內分泌素及生物體本身營養狀態所調控。於大鼠實驗發現，PPAR γ 表現增加，Adiponectin 表現量也隨之提升 (Karbowska and Kochan, 2005)。此外，人類或小鼠服用 TZD 後，血液中的 Adiponectin 濃度提高。以 TZD 刺激 3T3-L1 脂肪細胞，也可使 *Adiponectin* mRNA 及培養液中 Adiponectin 濃度增加 (Maeda *et al.*, 2001)。另外，*Adiponectin* 的啟動子也可被 CCAAT/enhancer binding protein (C/EBPs) 所結合，當 C/EBPs 表現量提高，也提升 Adiponectin 的表現 (Park *et al.*, 2004)。Insulin-like growth factor 1 (IGF-1) 和 Leptin (Halleux *et al.*, 2001; Delporte *et al.*, 2004) 皆可提高 Adiponectin 的表現量；葡萄糖皮質素、TGF- α 、interleukin-6 (IL-6) (Bruun *et al.*, 2001; Maeda *et al.*, 2001; de Oliveira *et al.*, 2011) 則皆會抑制 *Adiponectin* 基因表現。許多文獻也指出，動物餵予高脂肪飼糧或以高營養分培養液刺激細胞，皆會促使 Adiponectin 表現量增加 (Park *et al.*, 2004; de Oliveira *et al.*, 2011)。

Adiponectin 具調控能量代謝的功能。*Adiponectin* 缺失小鼠及其分離出的初代脂肪細胞經內分泌素誘發脂解作用，釋放出的 glycerol 量皆顯著高於對照組者 (Qiao *et al.*, 2011)。在小鼠實驗中，相較於對照組 (*Adiponectin*^{+/+})，*Adiponectin* 缺失雜合子小鼠 (*Adiponectin*^{+/-}) 具輕微的胰島素抗性，*Adiponectin* 缺失純合子小鼠 (*Adiponectin*^{-/-}) 則有嚴重程度的胰島素抗性 (Kubota *et al.*, 2002)。另外，將重組蛋白 Adiponectin 打入小鼠體內，可增加胰島素敏感性，且在攝食量不被影響情況下，可降低小鼠體重、血漿中 FA 及葡萄糖濃度，並可使肌肉組織之 FA 氧化作用增加 (Fruebis *et al.*, 2000)。Adiponectin 雖由脂肪細胞所分泌，但有多篇文獻顯示，肥胖者血清內 Adiponectin 濃度低於非肥胖者，且其分泌量與多種

代謝症候群相關疾病（如：心血管疾病、糖尿病等）之發生率呈現負相關，並和其參數（如：體重、身體質量指數等）呈現負相關（Yang *et al.*, 2002；Matsuzawa *et al.*, 2004；Kadowaki *et al.*, 2006）。

Adiponectin 須經由與其受體結合方能行調控細胞生理之實，至今已發現 Adiponectin 在細胞膜上有三種類型的受體，分別為 Adiponectin receptor 1（AdipoR1）、Adiponectin receptor 2（AdipoR2）與 T-cadherin。AdipoR1 主要表現在骨骼肌，AdipoR2 則在肝臟表現量較高，T-cadherin 則在平滑肌細胞及血管內皮細胞所表現（Kadowaki *et al.*, 2006）。Adiponectin 與 AdipoR1 結合，可活化 p38 mitogen-activated protein kinases（p38 MAPK）路徑，增加肌肉對葡萄糖的吸收，並刺激 AMP-activated protein kinase（AMPK）路徑，降低肝臟糖質新生成作用；Adiponectin 與 AdipoR2 結合，則會激活 PPAR α ，降低脂肪酸氧化及發炎因子之相關機制，這些路徑間也具相互調控的機制，並能達到抗發炎及抗糖尿病的功能（Kadowaki and Yamauchi, 2005；Kadowaki *et al.*, 2006；Fujita *et al.*, 2008）。

六、瘦體素（Leptin）

Leptin 為 *ob* 基因產物，分子量約 16 kDa，主要由脂肪細胞所分泌，參與能量平衡、攝食、免疫及生理時鐘等生理功能的調控（Ahima and Flier, 2000；Laposky *et al.*, 2006；Galic *et al.*, 2010）。

文獻指出，注射 Leptin 於大鼠體內，可抑制神經肽 Y（neuropeptide Y, NPY）之合成，進而降低食慾（Yokosuka *et al.*, 1998）；當 *ob/ob* 小鼠每日被注射 Leptin 重組蛋白，可降低食慾並增加能量消耗；於野生型小鼠中注射，會使體重、體脂與食慾下降（Halaas *et al.*, 2005）；於小鼠初代脂肪細胞處以 Leptin 刺激，可誘發脂解作用，抑制 fatty acid synthase（FAS）表現，並增加甘油釋放量（Wang *et al.*, 1999）。以重組 Leptin 刺激大鼠分離出之胰島細胞（pancreatic islets），可降低三酸甘油酯含量，並增加 FFA 氧化（Shimabukuro *et al.*, 1997）。於 Leptin 缺失之小

鼠，其睡眠結構、活動及晝夜節律相較於對照組，會受到破壞 (Laposky *et al.*, 2006)。

Leptin 可受脂肪細胞分化轉錄因子、內分泌素及動物體營養狀態所調控，Leptin 的啟動子可被 C/EBPs 所結合，進而誘發其表現 (Mason *et al.*, 1998)。胰島素 (Hardie *et al.*, 1996)、葡萄糖皮質素 (Slieker *et al.*, 1996)、TNF- α (Kershaw and Flier, 2004) 皆能增加其表現量； β -agonists (Mantzoros *et al.*, 1996)、TZDs (Kallen and Lazar, 1996) 及動物體缺乏能量時，Leptin 表現則會受到抑制 (Beckerr *et al.*, 1995; Boden *et al.*, 1996; Ahima and Flier, 2000)。

肆、約日節律

一、生理時鐘 (Biological clocks)

在規律的日夜週期、溫度等自然界因子及動物自身活動，如攝食、睡眠等因素交互作用影響下，使動物體生理及行為表現 (包含內分泌、體溫、各組織的功能等)，隨日夜交替產生約略 24 小時的週期性變化，稱之為約日節律 (circadian rhythms) (Reppert and Weaver, 2001; Panda *et al.*, 2002; Reppert and Weaver, 2002)。這些週期性律動主要受到外在環境所調控，但若使動物體處於完全沒有外在刺激的環境下，其體內仍有內部時鐘 (internal clock) 可調控自身之生理與行為。

中樞生理時鐘位在大腦下視丘前端的 SCN，當光照刺激後，可直接由視網膜-下視丘神經徑 (retinohypothalamic tract, RHT) 或間接經膝狀體-下視丘神經徑 (geniculohypothalamic tract, GHT) 傳遞至 SCN，而使之同步化 (Dibner *et al.*, 2010)。

RHT 是由內含能接受光刺激的視黑素 (melanopsin) 之視網膜最外層的神經節細胞 (ganglionic cells) (Provencio *et al.*, 2000)，可將訊號轉化為化學訊息形式，利用麩胺酸 (glutamate) 將訊息傳導至 SCN，使 Fos 蛋白活化，進而影響 SCN

約日節律的表現 (Abe *et al.*, 1991)。GHT 乃是光刺激經由神經節細胞的視黑素所接收後，投射至內側膝狀體小葉 (intergeniculate leaflet, IGL)，利用神經胜肽 Y (neuropeptide Y, NPY) 或 γ -氨基丁酸 (gamma-aminobutyric acid, GABA) 傳至 SCN。圖 2 為影響視叉上核之主要途徑。

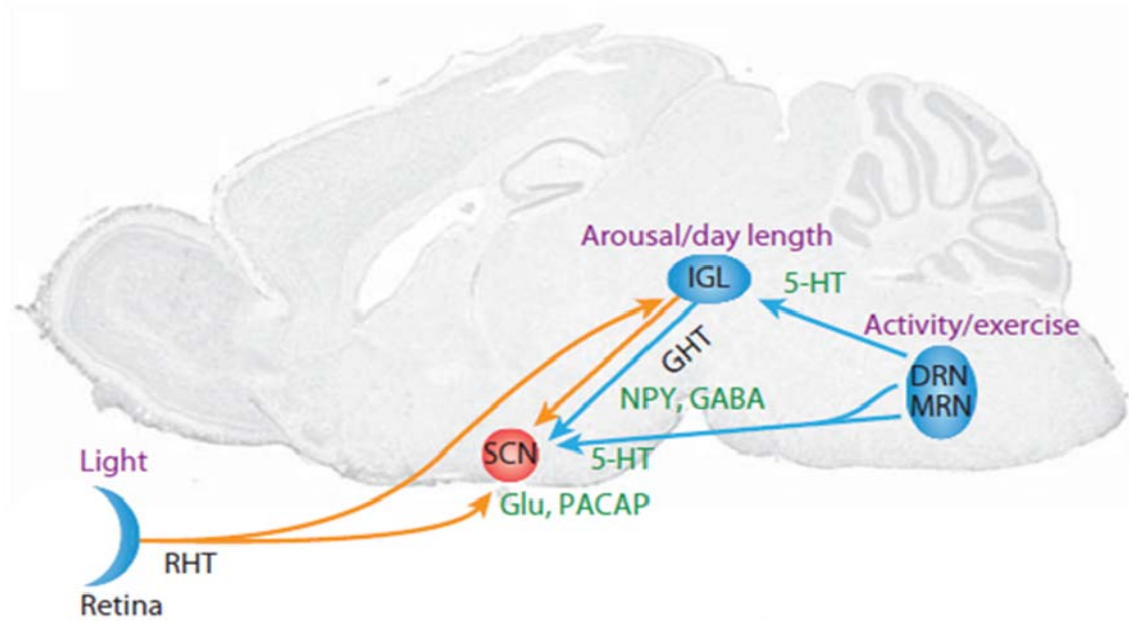


圖 2 影響視叉上核之主要途徑。

Figure 2 Main afferent pathways to the SCN. 5-HT, serotonin; DRN, dorsal raphe nucleus; IGL, intergeniculate leaflet; GABA, gamma-aminobutyric acid; GHT, geniculohypothalamic tract; Glu, glutamate; MRN, median raphe nucleus; NPY, neuropeptide Y; PACAP, pituitary adenylate cyclase-activating peptide; RHT, retinohypothalamic tract; SCN, suprachiasmatic nuclei. (Dibner *et al.*, 2010)

SCN 接收訊號後，會傳導至其他腦部區域，而影響動物之生理活動 (Lu *et al.*, 2001; Chou *et al.*, 2003; Dibner *et al.*, 2010)，且會經由神經內分泌傳導途徑將訊號傳遞至各周邊組織而影響組織內部之生理時鐘，進而影響內分泌素之分泌

(Reppert and Weaver, 2002 ; Young, 2006 ; Froy and Chapnik, 2007 ; Froy, 2010) , 故光刺激 SCN 對約日節律的影響扮演重要的角色 (Stephan and Zucker, 1972 ; Harrington and Rusak, 1986) 。周邊組織的生理時鐘除了可被中樞生理時鐘透過神經細胞傳遞節律訊號影響外,也可受外在的環境因子(如攝食、溫度等)所調控,進而影響基因表現或是生理代謝 (Damiola *et al.*, 2000 ; Bray and Young, 2006) 。圖 3 為中樞及周邊生理時鐘之機制。

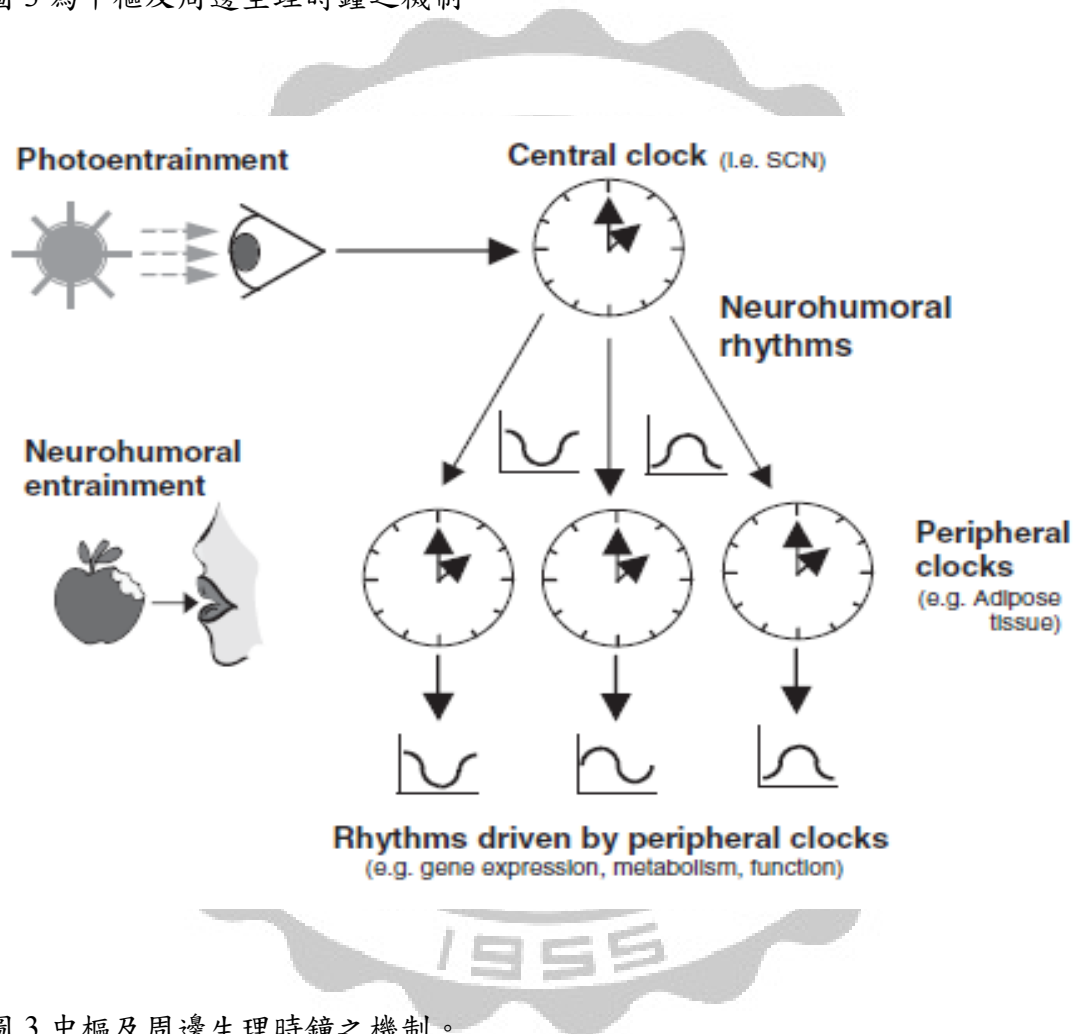


圖 3 中樞及周邊生理時鐘之機制。

Figure 3 Central and peripheral clock mechanisms.

(Bray and Young, 2006)

二、約日節律分子機制及相關基因

動物體各組織內的細胞皆具有調控約日節律系統相關基因的表現,這些基因經轉錄、轉譯作用產生蛋白質,再藉由負回饋機制去抑制原基因的表現,使蛋白

質合成量減少，進而減少其抑制基因的作用，形成封閉式回饋循環機制 (Reppert and Weaver, 2001 ; Reppert and Weaver, 2002)。

調控約日節律主要的基因包含 *Clock*、brain and muscle aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator-like protein 1 (*Bmal1*, *MOP3*)、*Period* (*Per*) 及 *Cryptochrome* (*Cry*)。 *Clock* 與 *Bmal1* 兩基因經轉錄及轉譯後，會形成二聚體 CLOCK/BMAL1，並從細胞質進入細胞核中，與啟動子 (Promotor) 含有 E-box 序列 (CACGTG) 之基因結合 (Hogenesch *et al.*, 1998)，此基因包括 *Per* 與 *Cry*，使其進行轉錄作用。而轉譯後產生的 PER/CRY 複合體可直接抑制 CLOCK/BMAL1 基因之表現，亦或被 Casein kinase 1 ϵ/δ (CK1 ϵ/δ) 磷酸化或降解，造成 CLOCK/BMAL1 受到抑制，進而降低 *Per* 與 *Cry* 的轉錄作用 (Shearman *et al.*, 2000 ; Lee *et al.*, 2001 ; Akashi and Takumi, 2005 ; Sato *et al.*, 2006)。此外，*Rev-erb*、Retinoid-related orphan receptor (*Ror*) 等含有 E-box 序列之基因也可受到 CLOCK/BMAL1 活化進行轉錄，而 REV-ERB、ROR 又可在 *Bmal1* 的啟動子上與 Ror elements (RORE) 作用，分別抑制或促進 *Bmal1* 的轉錄活化 (Preitner *et al.*, 2002 ; Sato *et al.*, 2004 ; Triqueneaux *et al.*, 2004)，形成一回饋機制，如圖 4 所示。

而後，CLOCK/BMAL1 所調控之生理時鐘相關基因，如 *Rev-erb*、*Ror* 等可再去調控下游基因，進而影響細胞生理作用，使細胞分泌之激素及生理活動具節律性的表現。

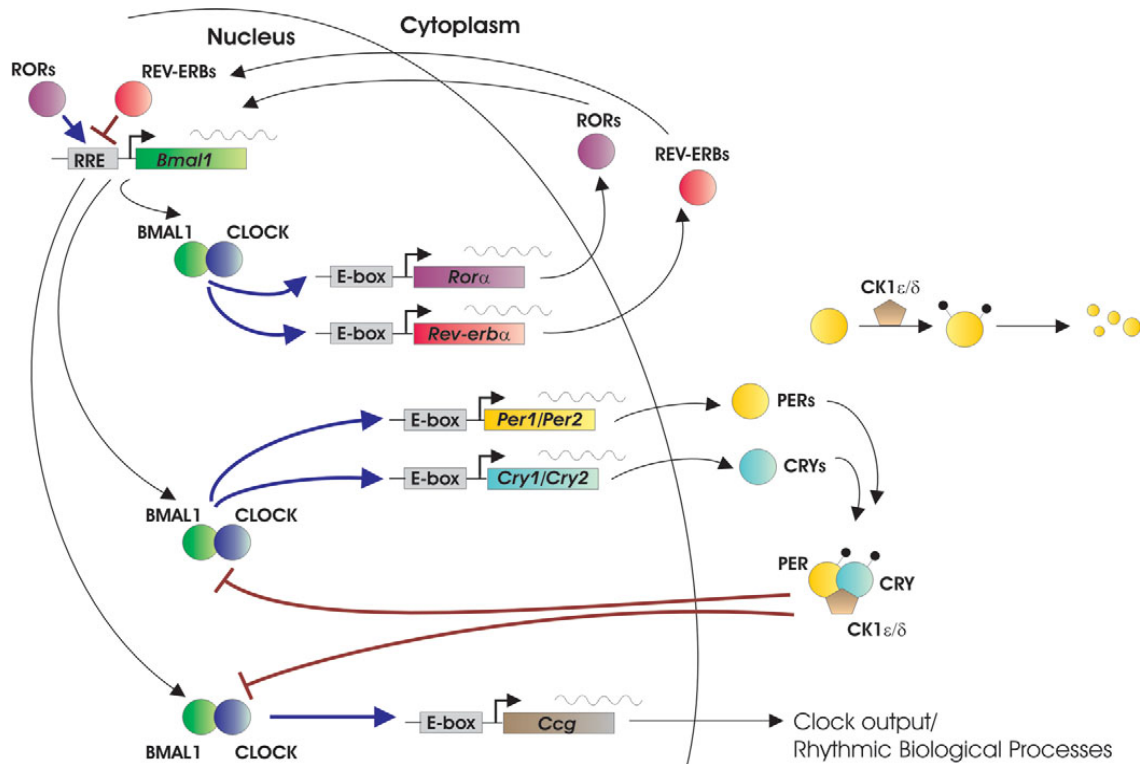


圖 4 哺乳動物約日節律之轉錄 - 轉譯回饋迴路。

Figure 4 A network of transcriptional–translational feedback loops constitutes the mammalian circadian clock. (Ko and Takahashi, 2006)

三、約日節律與細胞代謝

(一) CLOCK/BMAL1 與細胞代謝

Clock 與 *Bmal1* 為調控生理時鐘的中心基因，其形成的二聚體 CLOCK/BMAL1 除了可調控其他約日節律基因，還可影響細胞的分化及代謝。

研究顯示，*Clock* 突變小鼠相較於對照組，其晝夜節律週期會延長 (Vitamerna *et al.*, 1994); *Clock*^{-/-} 缺失小鼠活動週期會較趨緩，且約日節律相關基因表現幅度也會變小 (DeBruyne *et al.*, 2006); *Clock*^{-/-} 缺失小鼠食慾增加，造成體重上升，引發代謝疾病 (Turek *et al.*, 2005); *Clock* 突變小鼠之葡萄糖耐受性降低，由其分離出之胰島細胞，細胞大小、增生及胰島素分泌量皆低於野生型小鼠之細胞 (Marcheva *et al.*, 2010)。

BMAL1 表現量會隨脂肪細胞（小鼠初代脂肪細胞及 3T3-L1）分化天數增加而遞增，*Bmal1*^{-/-} 缺失小鼠之纖維胚胎母細胞（mice embryonic fibroblast cell, MEF）經分化試劑刺激無法堆積油滴，轉染 *Bmal1* 後，經分化始可堆積油滴；於 3T3-L1 過度表現 *Bmal1*，可使脂質生成相關轉錄因子（PPARs、C/EBPs 等）與下游基因（*FAS*、*Rev-erba* 等）表現量增加（Shimba *et al.*, 2005）；*Bmal1*^{-/-} 缺失小鼠會造成葡萄糖生成作用被破壞，同時血液中的葡萄糖和三酸甘油酯節律變化會也受到破壞（Rudic *et al.*, 2004）。

CLOCK/BMAL1 可直接調控部分具每日節律變化、與脂質代謝相關的基因，當小鼠之 CLOCK/BMAL1 表現增加時，這些基因啟動子活性會顯著增加，然而，若去除相關基因的 PPRE，其轉錄的活性即不受 CLOCK/BMAL1 表現增加之影響，綜合上述，CLOCK/BMAL1 可透過 PPRE 活化基因轉錄表現，來調節動物體內脂質的代謝，因而影響動物體內能量的平衡（Inoue *et al.*, 2005）。

（二）PER 與細胞能量衡定

PER 可受 CLOCK/BMAL1 正向調控，而 PER 可再與 CRY 形成雙聚體，負回饋調節 CLOCK/BMAL1，其中哺乳動物 *Per* 基因可分三種，分別為 *Per1*、*Per2* 與 *Per3*，其中又以 *Per1* 與 *Per2* 為參與生理時鐘調控的重要因子（Lee *et al.*, 2004），此外，也能影響能量代謝。

細胞實驗中，利用高濃度血清刺激使細胞同步化，*Per1* mRNA 表現量之節率變動與磷脂含量呈現負相關，再以 antisense oligonucleotide（ASO）降低 NIH 3T3 細胞中 *Per1* 的表現，細胞磷脂濃度會提高（Marquez *et al.*, 2004）；*Per2* 缺失小鼠之採食量與野生型小鼠無異，但其體重、體脂率及血漿中三酸甘油酯、非酯化脂肪酸（nonesterified fatty acid）濃度皆顯著低於對照組，此外 FFA 氧化能力顯著提高（Grimaldi *et al.*, 2010）；另有研究利用限飼使小鼠節律變化產生位移或直接使基因變異的 *Per1*^{-/-}/*Per2*^{-/-}（PERDKO）缺失小鼠實驗，皆可發現血清及

肝臟中的膽酸 (Bile acids) 含量皆顯著高於對照組，且膽酸合成及運輸之相關基因 (cholesterol-7 α hydroxylase、sodium-taurocholate cotransporting polypeptide) 節律性的表現也受到破壞 (Ma *et al.*, 2009)。

Grimaldi *et al.* (2010) 於 3T3-L1 實驗中證實，PER2 可藉由抑制 *PPAR γ* 的轉錄活性，進而去抑制細胞分化及調控脂質代謝，也指出 PER2 也許可透過調控組織專一性的轉錄因子而去影響其他組織能量代謝的過程。

(三) REV-ERB α 與細胞代謝

REV-ERBs 為核受體超級家族之一員 (nuclear receptor superfamily)，分為 REV-ERB α 與 REV-ERB β ，其中，*Rev-erba* 為調控約日節律的主要基因之一，過去有許多研究也證實其參與能量代謝的調節。

Rev-erba^{-/-} 缺失小鼠之膽酸合成速率及相關基因 *Cyp7A1* 表現皆低於對照組，反之，*Rev-erba* 過度表現之小鼠則有相反的結果 (Duez *et al.*, 2008)；正常飼糧情況下，*Rev-erba*^{-/-} 缺失小鼠體脂高於對照組，並有輕微高血糖症，但並無引發胰島素抗性或糖質新生成作用增加，禁飼的情況下，*Rev-erba*^{-/-} 缺失小鼠增加脂質的利用，促使糖質新生成作用的效率高於對照組，經高脂飼糧餵飼後，*Rev-erba*^{-/-} 缺失小鼠更易引發肥胖產生，且肝臟、脂肪組織與肌肉中葡萄糖 (*glut2*) 及脂質代謝相關基因 (Lipoprotein lipase、sterol regulatory element binding transcription factor 1) 表現受到破壞 (Delezie *et al.*, 2012)；Solt *et al.* (2012) 指出，利用合成性的 REV-ERB 促效劑可降低因高脂飼糧誘發肥胖的小鼠體重及體脂，並能改善高血糖症。

Rev-erba 調控細胞功能的作用機制為與其配位體 (ligand) - 血基質 (heme) 結合，誘發輔抑制物 - nuclear receptor corepressor-histone deacetylase 3 (NCoR-HDAC) 複合體與之形成蛋白質複合體，再至標的基因的啟動子上與 RORE 作用，進而去抑制約日節律、細胞分化及代謝等功能，同時也可藉由負回

饋作用，抑制 heme 的合成 (Burris, 2008 ; Yin *et al.*, 2010)。

伍、 聖約翰草 (Saint John's wort)

SJW 為多年生草本植物，生物學分類屬於藤黃科金絲桃屬，學名為 *Hypericum perforatum*，其黃色花朵盛開時期為每年六至九月 (Schwarz and Cupp, 2000)，原產地遍佈歐洲、西亞、北非、美洲及澳洲 (Lawvere and Mahoney, 2005)。

一、 聖約翰草之應用

SJW 為最古老的藥用植物之一，長久以來在歐洲廣泛被應用於治療神經痛 (neuralgia)、纖維組織炎 (fibrositis)、傷口癒合劑、及抵抗細菌和病毒 (Ivan, 1979 ; Bombardelli and Morazzoni, 1995 ; Barnes *et al.*, 2001)，於十九世紀至今，SJW 更被大量應用於抗憂鬱症 (Linde, 2009)。

二、 聖約翰草成份分析

SJW 因氣候、產地及產期等外在環境因子影響，使成份含量產生差異，但無論是新鮮或乾燥的 SJW，多會利用甲醇或乙醇先進行粗萃取，而其成份對光照及溫度極為敏感，容易失去活性 (Bilia *et al.*, 2001 ; Linde, 2009)。SJW 萃取出主要成份為 naphthodianthrones 及間苯三酚 (phloroglucinols) 的衍生物。Naphthodianthrones 衍生物包含金絲桃素 (hypericin) 與偽金絲桃素 (pseudohypericin)。間苯三酚衍生物包含貫葉金絲桃素 (hyperforin) 與 adhyperforin。其他具生物活性成份尚有類黃酮 (flavonoids) 化合物，含芸香苷 (rutin)、槲皮素 (quercetin) 與槲皮苷 (hyperoside) 等。此外，雙黃酮類 (biflavonoids)、原花青素 (procyanidins)、胺基酸 (GABA) 與 xanthons 等皆具不同功效 (Linde, 2009)。表 1 為 SJW 中重要的生物活性成分，圖 5 為 SJW

萃取物主要成份的化學結構。

表 1 聖約翰草中發現之重要生物活性成份

Table 1 Important biologically active compounds found in St. John's wort

Component group	Examples	Plant parts	Action
Naphthodianthrones (lipophilic)	hypericin pseudohypericin	flowers, buds	antidepressant, antiviral, photosensitizing
Phloroglucinols (lipophilic)	hyperforin adhyperforin	flowers, buds	antidepressant, antibiotic
Flavonoids (lipophilic/hydrophilic)	quercetin hyperoside quercitrin isoquercitrin rutin	leaves stalk buds	antidepressant, antiphlo- gistic
Biflavonoids (lipophilic)	biapigenin	flowers	sedating, antiphlogistic
Procyanidins (hydrophilic)	procyanidin catechin epicatechin	aerial parts flowers, buds	antiphlogistic, antioxidant
Essential oils (lipophilic)	terpenes alcohols	flowers, leaves	
Amino acids (hydrophilic)	GABA	flowers, leaves	antidepressant
Phenylpropanes (hydrophilic)	caffeic acid chlorogenic acid	flowers, leaves	
Xanthones (lipophilic)	norathyriol	roots, flowers	antidepressant

(Linde, 2009)



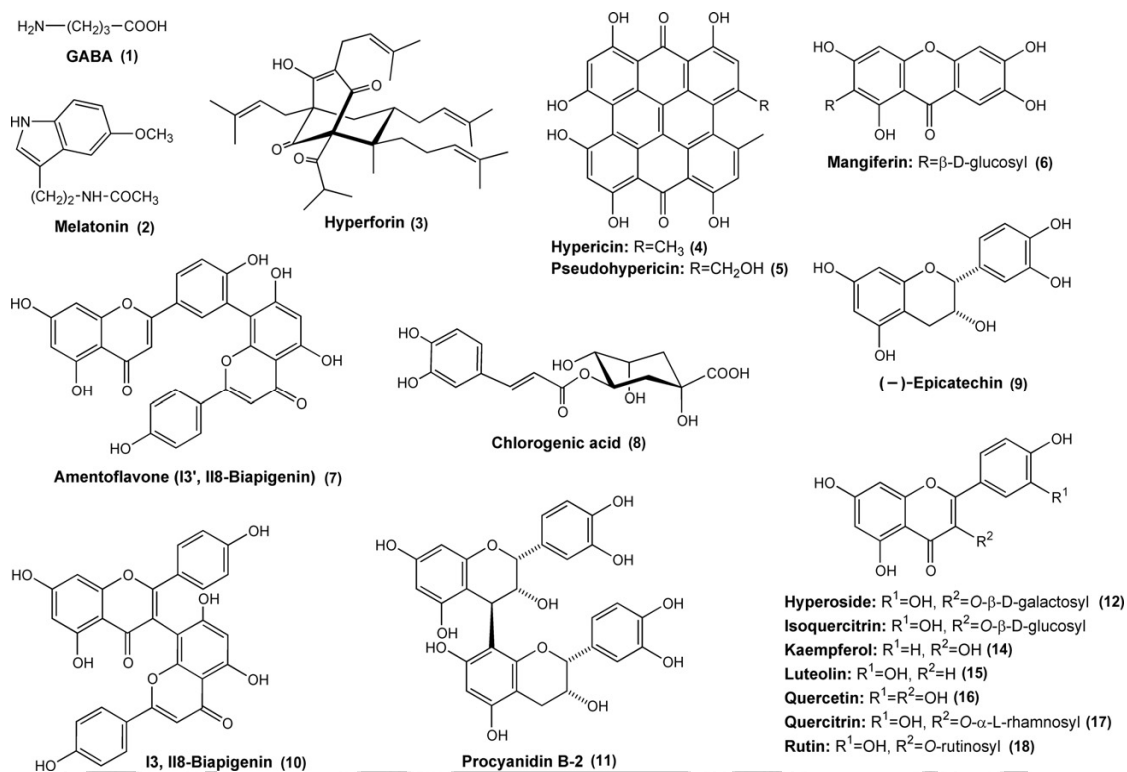


圖 5 SJW 萃取物主要成份的化學結構。

Figure 5 Structures of major constituents in SJW extract. (Onoue *et al.*, 2011)

三、聖約翰草成份之研究

(一) 對細胞分裂與凋亡之影響

SJW 對許多種細胞具有抗腫瘤或癌症的活性，例如人類神經膠質瘤細胞 (human malignant glioma cells) (Couldwell *et al.*, 1994)、人類子宮頸癌細胞 (HeLa cells) (Vantieghem *et al.*, 1998)、乳腺癌細胞 (mammary carcinoma cells) (Schempp *et al.*, 2002) 等。其作用機制之一為 hypericin 藉由抑制 PKC (Galeotti *et al.*, 2010)、表皮生長因子 (epidermal growth factor, EGF) 及蛋白質酪胺酸激酶 (protein tyrosine kinase, PTK) 活性，阻斷細胞內訊息的傳導，進而抑制腫瘤細胞生長 (Kil *et al.*, 1996)。此外， hypericin 與 hyperforin 可增加數種凋亡蛋白酶 (caspase) 之活性，因而誘發細胞程序性之死亡 (Vantieghem *et al.*, 1998; Schempp *et al.*, 2002)。

(二) 對細胞分化之影響

SJW 花與葉部位之萃取物可抑制 3T3-L1 脂肪細胞之分化 (Amini *et al.*, 2009)。Chien *et al.* (2005) 也指出, SJW 生物活性成分之一的 quercetin 可抑制 3T3-L1 脂肪細胞脂油滴堆積, 並降低脂肪細胞分化轉錄相關因子 C/EBP α 與 PPAR γ 的表現。此外, quercetin 也可抑制成骨細胞 (osteoblasts) 之分化 (Notoya *et al.*, 2004)。然而, 在不同的培養時間, quercetin 卻有不同的影響, 在短時間刺激下, 可使人類血癌細胞株 K562 自體凋亡, 但在其長時間作用下, 可誘發細胞分化 (Csokay *et al.*, 1997)。來自不同植物 (桑葉) 中所萃取之 quercetin 亦可誘發人類血癌細胞株 HL-60 之分化 (Kim *et al.*, 2000)。

(三) 對脂肪代謝之影響

SJW 花與葉部位之萃取物會引起 3T3-L1 成熟脂肪細胞之胰島素抗性 (Amini *et al.*, 2009)。注射 SJW 萃取物於高膽固醇血症大鼠體內, 可降低血中總膽固醇、三酸甘油酯及低密度脂蛋白膽固醇 (low density lipoprotein cholesterol, LDL-C) 含量, 並增加高密度脂蛋白膽固醇 (high density lipoprotein cholesterol, HDL-C) (Zou *et al.*, 2005)。另外, SJW 及其成分之一的 hyperforin 會降低肝癌細胞株 HepG2 細胞中膽固醇合成相關基因的表現, 並增加葡萄糖運輸及糖解作用相關基因的表現 (Krusekopf and Roots, 2005)。除此之外, quercetin 可增加糖尿病大鼠之葡萄糖耐受性, 降低血中的膽固醇與三酸甘油酯含量, 且可增加其肝臟中葡萄糖激酶的活性 (Vessal *et al.*, 2003)。Quercetin 也可藉由抑制胰島素受體酪胺酸激酶催化其受質, 進而破壞胰島素所調控的脂質生成作用 (Shisheva and Shechter, 1992)。於大鼠脂肪細胞實驗中, quercetin 可與腎上腺素形成協同作用, 經由增加細胞膜磷脂質的甲基化, 進而促使脂肪細胞之脂解作用 (Kuppusamy and Das, 1994)。

(四) 其他影響

目前 SJW 正被積極地應用於輕度至中度憂鬱症治療，其作用機制是藉由抑制多種自突觸間隙 (synaptic gap) 至神經元 (neuron) 中的神經傳導物質再吸收，增加突觸間隙中神經傳導物質的濃度，包含血清素 (serotonin)、正腎上腺素 (norepinephrine)、多巴胺 (dopamine)，並調控數種離子通道，因而抑制 GABA 與麩胺酸所調節的反應 (Chatterjee *et al.*, 1999; Müller, 2003)，而一般抗憂鬱症藥劑即是依作用機制分為單胺氧化酶 (monoamine oxidase, MAO) 抑制劑、正腎上腺素回收抑制劑 (norepinephrine reuptake inhibitor) 與選擇性血清素回收抑制劑 (selective serotonin reuptake inhibitor, SSRI)，藉以改善患者的焦慮、睡眠障礙等心理及生理活動 (Linde, 2009; Stough and Scholey, 2013)。

SJW 成份之一的 hypericin 可抑制 3T3 纖維母細胞之蛋白脂小體 (proteoliposome) 內的 Na^+ , K^+ -ATPase 活性，進而影響細胞膜之通透性 (Chaloupka *et al.*, 1999)，也可抑制 PKC (Takahashi *et al.*, 1989) 及數種生長因子所誘發的蛋白質激酶之活性 (de Witte *et al.*, 1993; Agostinis *et al.*, 1995)。於人類腸道上皮細胞實驗中，hyperforin 被證實可藉由 MAPK 路徑而誘發免疫反應相關因子 IL-8 的表現 (Zhou *et al.*, 2004)，此外，SJW 萃取物也可誘發肝臟中細胞色素 (cytochrom, CYP) P450 3A4 及其異構酶 (1A2、2C9 等) 之活性，因而與其他用藥產生交互作用，如精神障礙用藥 - amitriptyline (Johns *et al.*, 2002)、呼吸系統用藥 - 茶鹼 (theophylline) (Nebel *et al.*, 1999) 及抗凝血製劑 - Warfari (Yue *et al.*, 2000) 等。研究指出，SJW 及其成份 hyperforin 是經活化 pregnane X receptor (PXR)，而誘發 CYP3A4 mRNA 的表現 (Moore *et al.*, 2000)。

材料與方法

壹、試驗材料

一、脂肪細胞

本試驗細胞株採用小鼠 3T3-L1 前脂肪細胞，購自新竹食品工業研究所菌種中心。

二、聖約翰草萃取物 (St. John's wort extract, SJWE)

由中興大學農藝系鄧資新老師實驗室提供，定量之聖約翰草花之部位以甲醇萃取並保存 (2 mg/2 ml)。

三、試驗藥劑

本研究所使用試劑之名稱及來源如表 2 所示：

表 2 試驗藥劑

Table 2 Reagents applied in experiments

試劑名稱	製造公司	產品編號
RareRNA 萃取液	真興實業公司，台中，台灣	GPR02
10X PCR buffer	BioMi, 台中，台灣	C011
dNTP Mix ture 25mM	BioMi, 台中，台灣	O040
Taq DNA polymerase	BioMi, 台中，台灣	C010
蛋白質分析套組 (Bio-Rad Protein Assay)	Bio-Rad, Hercules, CA, USA	500-0006
胰島素 (insulin, Ins)	Cell, San Diego, CA, USA	128-100

三酸甘油酯分析套組 (Triglycerides GPO-PAP)	Fortress Diagnostics, Antrim, NI, UK	BXC0272C
胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS)	GIBCO®, Grand Island, NY, USA	10437-028
細胞培養液 (Dulbecco's Modified Eagle Medium, DMEM)	GIBCO®, Grand Island, NY, USA	31600-034
0.1 M DTT	Invitrogen, Burlington, ON, CA	460623
Ribonuclease H (RNase H)	Invitrogen, Burlington, ON, CA	18021-014
SuperScript® III reverse transcriptase	Invitrogen, Burlington, ON, CA	18080-044
瘦體素分析套組 (Mouse Leptin Immunoassay kit)	R&D Systems, Minneapolis, MN, USA	MOB00
3-Isobutyl-1-methylxanthine (IBMX)	Sigma, St. Louis, MO, USA	I7018
合成性葡萄糖皮質素 (dexamethasone, DEX)	Sigma, St. Louis, MO, USA	D4902
丙三醇 (glycerol)	Sigma, St. Louis, MO, USA	G6279
甲醛 (formaldehyde)	Sigma, St. Louis, MO, USA	F1635
異丙醇 (isopropanol)	Sigma, St. Louis, MO, USA	I9516
無水酒精 (ethanol)	Sigma, St. Louis, MO, USA	32221
Dimethyl sulphoxide (DMSO)	Sigma, St. Louis, MO, USA	D2650
Oil-Red O	Sigma, St. Louis, MO, USA	O0625
Thiazolyl blue tetrazolium bromide	Sigma, St. Louis, MO, USA	M5655

貳、方法

一、脂肪細胞培養與處理

3T3-L1前脂肪細胞培養於3.5 cm²培養皿中，以含有10 % FBS的DMEM培養液 (DMEM-10) 培養於37°C、5% CO₂培養箱中。待細胞長滿於培養皿時，加入外源性分化試劑 (Ins、IBMX及DEX) 誘發細胞分化，此時定義為細胞分化的第0天，其後每兩日更換為添加胰島素的DMEM-10培養，於分化第6天，將培養液更換為無添加胰島素的DMEM-10繼續培養，直至處理時間點時。本研究主要分為四試驗進行，分述如下：

試驗一、SJW處理對3T3-L1脂肪細胞脂質堆積之影響：分別添加五種濃度 (0、0.03、0.1、0.3與1 mg/ml) 之SJW於細胞培養液中，並以oil-Red O染色，觀察細胞脂質堆積的情形及分析三酸甘油酯含量，並測試細胞存活率，取最低有效濃度之SJW作為以下試驗之劑量。

試驗二、SJW處理對3T3-L1脂肪細胞能量代謝與脂肪激素相關基因表現之影響：將脂肪細胞分別培養於添加及缺乏胰島素的培養液中，並另外添加濃度0 mg/ml與1 mg/ml SJW，培養至分化第12天，並分析代謝與脂肪細胞分泌激素相關基因之表現差異。

試驗三、SJW對3T3-L1脂肪細胞約日節律同步化及相關基因表現之影響：

- (一) SJW同步化3T3-L1脂肪細胞約日節律：取3T3-L1脂肪細胞分別以0 % FBS、0 % FBS並添加SJW (1 mg/ml) 及50 % FBS之培養液處理2小時，經此同步化作用後第1及8小時，分別萃取RNA，經由RT-PCR分析，比較*Per2*基因表現量之差異。
- (二) SJW對不同分化階段之3T3-L1脂肪細胞約日節律同步化之影響：將分化第2、4、6、8天的3T3-L1脂肪細胞分別以0 % FBS、0 % FBS並添加SJW (1 mg/ml) 及50 % FBS之培養液處理2小時，經此同步化作用後第1及8小時，分別萃取RNA，經由RT-PCR分析，比較同步化標幟基因之差異。

(三) SJW對3T3-L1脂肪細胞約日節律及代謝相關基因節律性表現之影響：以0 % FBS、0 % FBS並添加SJW (1 mg/ml) 及50 % FBS之培養液刺激細胞同步化作用，經處理後第0、1、4、8、12、16、20、24、28、32、36、40、44、48小時，分別萃取RNA，經由RT-PCR分析，確認SJW對約日節律相關基因之影響。

試驗四、SJW對3T3-L1脂肪細胞Leptin分泌量及其節律性變化的影響：

- (一) SJW對3T3-L1脂肪細胞Leptin分泌量的影響：將3T3-L1脂肪細胞之培養液更換為DMEM-0 (未含血清) 或DMEM-10 (含10 % FBS)，經15小時後，再各別以0、1、3 mg/ml之SJW刺激，經刺激後第0、0.5、1.5、4.5、24小時，收集培養液，經由Leptin含量分析，確認SJW對3T3-L1脂肪細胞Leptin分泌量之影響。
- (二) 同步化對3T3-L1脂肪細胞Leptin分泌節律性變化的影響：以0 % FBS、0 % FBS並添加SJW (1 mg/ml) 及50 % FBS之培養液刺激細胞同步化作用，2小時後將培養液改為DMEM-0 (移除血清及SJW刺激) 或DMEM-10 (含10 % FBS)，經刺激後第8、14、20、26、32小時，收集培養液，經由Leptin含量分析，確認SJW對3T3-L1脂肪細胞Leptin節律性變化之影響。

二、聖約翰草成份之萃取

取聖約翰草花之部位2 g (濕重) 浸泡於甲醇中並存於4°C、72小時，將之去除雜質，以抽氣離心機萃取濃縮，並加入甲醇2 ml，將濃度定義為1 g/ml，分裝後保存於-20°C。

三、細胞存活率分析 (MTT assay)

3T3-L1 前脂肪細胞培養於 96 孔盤中直至細胞長滿，移除培養液，以 1X Hank' s balanced salt solution (HBSS) 清洗一次，分別添加不同濃度之 SJWE

於細胞培養液中，培養 48 小時後，去除培養液，以 1X phosphate buffered saline (PBS; 3 mM KH₂PO₄, 9.4 mM K₂HPO₄, 0.15 M NaCl) 清洗一次，加入 MTT 反應試劑 (0.5 mg/ml)，並於 37°C、5% CO₂ 培養箱中培養 4 小時，移除 MTT 反應試劑，加入 DMSO 藉以溶解結晶，於室溫中避光反應 10 分鐘，利用酵素免疫分析儀於波長 570 nm 下讀取吸光值。吸光值與細胞存活數成正比。

計算公式如下：

$$\text{細胞存活率 (\%)} = \left(\text{OD}_{\text{treatment}} / \text{OD}_{\text{control}} \right) \times 100$$

四、Oil-Red O 染色與定量

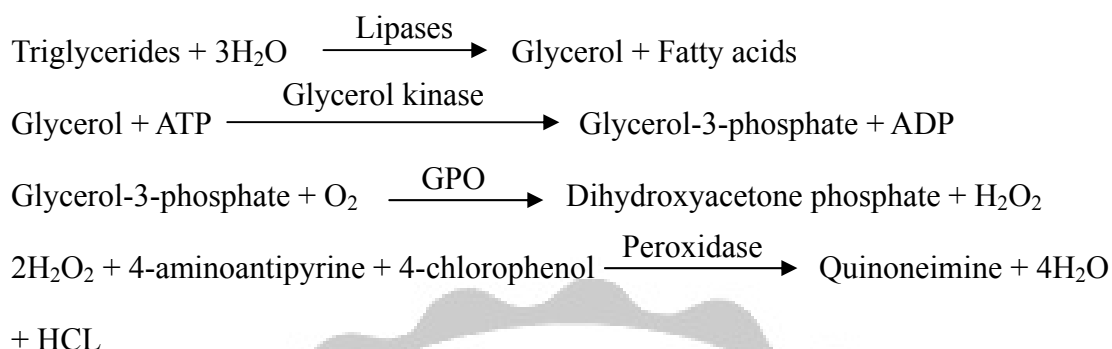
細胞培養於 3.5 cm² 培養皿中直至分化後第 12 天，去除培養液，以 1X PBS 清洗兩次，加入 10% formaldehyde，靜置於冰上 30 分鐘藉以固定細胞，再以滅菌水清洗兩次，接著加入 oil-Red O 染劑 (0.3% oil-Red O, 60% isopropanol) 將細胞內脂質染色，於室溫中避光靜置 30 分鐘，以滅菌水清洗剩餘染劑，加入 10% glycerol 保存樣本並拍照。

將 oil-Red O 染色後的樣本以滅菌水清洗兩次，加入 isopropanol 於室溫靜置 5 分鐘藉以萃取脂質，然後收集混合均勻，利用分光光度計於波長 510 nm 下讀取樣本吸光值。吸光值與脂質的濃度成正比。

五、三酸甘油酯含量分析 (triglyceride assay, TG)

細胞培養於 3.5 cm² 培養皿中直至分化後第 12 天，去除培養液，以 1X PBS 清洗兩次，加入 homogenizing buffer 500 μl (HB; 0.25 M sucrose, 1 mM EDTA, 5 mM Tris, 1 mM DTT)，用細胞刮勺將細胞從培養皿上刮下，收集至離心小管中，置於冰上，以超音波震碎均質之，再將樣品置於 4°C，12,500 rpm (roter 1159, MIKRO 22R) 離心 5 分鐘，取上清液保存之。

測定三酸甘油酯濃度原理如下：



取樣品液10 μl 與三酸甘油酯試劑1 ml混合，於37 $^{\circ}\text{C}$ 反應5分鐘，利用分光光度計於波長500 nm下讀取樣本吸光值。吸光值與甘油的濃度成正比。細胞釋出甘油含量濃度即以mmole/mg protein為單位，再以蛋白質分析套組測定樣品內總蛋白質濃度，藉以定量三酸甘油酯含量。

計算公式如下：

$$\text{TG (mmole/ mg protein)} = \frac{[(2.29 \times \text{OD}_{\text{sample}} / \text{OD}_{\text{standard}}) \times \text{培養液體積}(\mu\text{l})]}{\text{mg protein}}$$

六、Leptin含量分析

細胞培養於3.5 cm^2 培養皿直至分析時間點，收集培養液至離心小管中，以4 $^{\circ}\text{C}$ ，1,500 xg (roter 1159, MIKRO 22R) 離心3分鐘，取上清液保存之。

將樣品液與瘦體素分析套組之試劑混合，利用酵素免疫分析儀於波長 450 nm 下 (基準波長：540 nm) 讀取樣品吸光值，再以標準曲線所得之公式藉以定量瘦體素含量。圖 1 為 Leptin 含量之標準曲線 (實驗三重複取一代表之)。

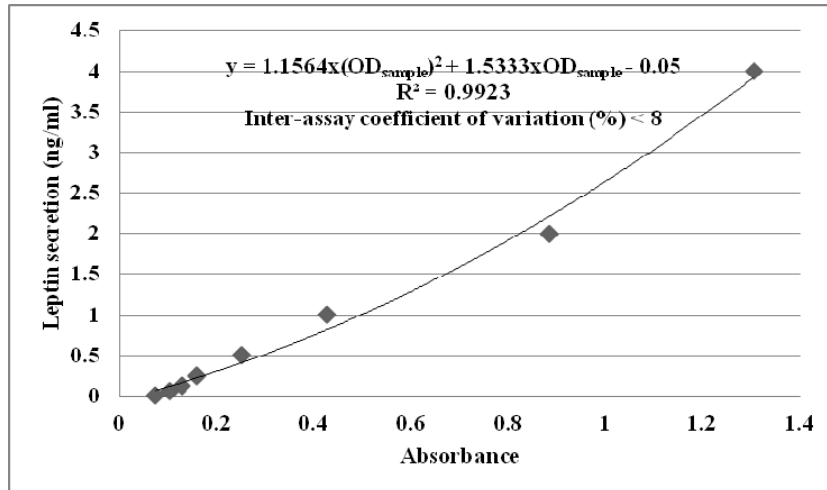


圖 1 Leptin 含量之標準曲線。

Figure 1 The standard curve of leptin levels.

七、總RNA萃取

細胞培養於3.5 cm²培養皿直至分析時間點，去除培養液，以1X PBS清洗兩次，加入Rare RNA萃取液，置於室溫5分鐘，將細胞液收集至離心小管中，加入氯仿300 μl，混合均勻，將樣品置於4°C，12,000 rpm (roter 1159, MIKRO 22R) 離心10分鐘，取上層澄清液至新的離心小管中，添加入無水酒精1 ml，混合均勻後置於-20°C，放至隔夜，將樣品置於4°C，14,000 rpm (roter 1159, MIKRO 22R) 離心10分鐘，去除上層澄清液，加入75 %酒精1 ml潤洗沉澱物，再置於4°C，14,000 rpm (roter 1159, MIKRO 22R) 離心5分鐘，去除上清液，置於室溫待其沉澱物乾燥後，加入適量的DEPC H₂O，並將樣品以60°C加熱5分鐘，以溶解離心小管內之沉澱物，後將萃取之總RNA保存於-80°C中。

八、相對定量反轉錄聚合酶連鎖反應 (Relative quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR)

首先進行反轉錄反應 (reverse transcription; RT)，將RNA (1.2 μg/ μl) 置於

PCR 離心小管內，加入random primer (3 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) 1 μl 的和滅菌水7 μl ，混合均勻，於70°C 培養10分鐘後，將樣本置於冰上，加入5X buffer 4 μl 、DTT (0.1 M) 2 μl 、dNTP (10 mM) 1 μl 和Superscript III RT (200 units/ μl) 1 μl ，混合均勻，以25°C 培養10分鐘，42°C 培養52分鐘，70°C 培養15分鐘，25°C 培養4分鐘，最後加入RNase H (2 units/ μl) 1 μl ，於37°C 培養20分鐘，完成反轉錄反應，將實驗樣品cDNA保存於-20°C。

接著進行PCR反應，每一反應放入10X PCR buffer 2.5 μl 、dNTP (2.5 mM) 2 μl 、Taq (2 units/ μl) 1 μl 、所需之引子一對 (5 μM) 各取1 μl 與18S primer pair: competitor mix (3:7) 2 μl ，以滅菌水將體積補足至24 μl ，之後加入cDNA (RT 產物) 1 μl ，則總體積為25 μl 。反應所用引子如表3所示：



表3 聚合酶連鎖反應分析3T3-L1脂肪細胞基因表現之引子序列

Table 3 Primer sequences for PCR analysis of 3T3-L1 adipocyte gene expression

基因名稱	參考序列 NCBI	引子序列 (5'→ 3')	片段長度 (bp)
Adiponectin	NM_009605.4	F : AAGGACAAGGCCGTTCTCT R : TATGGGTAGTTGCAGTCAGTTGG	219
aP2	NM_024406.2	F : CACCTGGAAGACAGCTCCTC R : CTCTCTGACCGGATGGTGAC	203
Bmal1	NM_007489.4	F : TTCTCCAGGAGGCAAGAAGA R : TTGCTGCCTCATCGTTACTG	200
Clock	NM_007715.6	F : TGCCAGCTCATGAAAAGATG R : CGCTGCTCTAGCTGGTCTTT	199
HSL	NM_010719.5	F : CCCAGGCTCACAGTTACCAT R : GCTCTCCAGTTGAACCAAGC	403
Leptin	NM_008493.3	F : AGCAGTGCCTATCCAGAAAGT R : ATTCTCCAGGTCATTGGCTAT	250
Per1	NM_011065.4	F : GGGAGCTCAAACCTTCGACTG R : TCGGATGTGATATGCTCCAA	205
Per2	NM_011066.3	F : AGAGTGTGGTGTCCCTCACC R : ATGTGCAGCCAGAACTTCCT	203
Perilipin	NM_175640.2	F : GATCGCCTCTGAACTGAAGG R : GATCCACATGGCCAGAGAGT	418
PPAR γ	NM_011146	F : TTGAGTGCCGAGTCTGTGGGGATAA R : CAGGGAGGCCAGCATCGTGTAGA	674
Rev-erb α	NM_145434.4	F : CTTCCGTGACCTTTCTCAGC R : CAGCTCCTCCTCGGTAAGTG	235

九、統計分析

本實驗以測定項目所得數據，使用統計軟體 Statistics Analysis System (SAS) 進行分析。試驗二先以 Two-way analysis of variance (Two-way ANOVA) 進行分析，再以 Least squares means (LS means) 比較組間平均值之差異顯著性。其餘試驗皆以一般線性模式 (General Linear Model) 進行 Tukey's test 檢定組間之差異，其中，試驗三再進一步以 CircWave v1.4 軟體分析約日節律基因表現型態。統計結果以 $P < 0.05$ 表示有顯著差異； $P < 0.01$ 表示有極顯著差異。



結果與討論

試驗一、SJW 處理對 3T3-L1 脂肪細胞脂質堆積之影響

過去已有研究指出，SJW 對前脂肪細胞具抑制分化之能力，其最低有效劑量約為 0.03 mg/ml (陳, 2006; Amini *et al.*, 2009)。為瞭解 SJW 對脂肪細胞脂質蓄積的影響，並決定其於後續試驗作用之有效劑量，故而，本試驗中，以分化第 8 天之 3T3-L1 脂肪細胞為試驗材料，分別利用不同濃度之 SJW 處理，持續培養至分化第 12 天，並進行分析。

一、脂肪細胞外觀形態

不同濃度 SJW 處理對 3T3-L1 脂肪細胞形態之實驗結果 (圖 2) 顯示，未經 SJW 處理之對照組，脂肪細胞內油滴數目多且分布均勻，而經濃度為 0.3 或 1 mg/ml 之 SJW 處理之組別，脂肪細胞內油滴數目明顯減少。

二、Oil-Red O 染色與定量

Oil-Red O 為親脂性染劑，可將脂肪細胞內之油滴染為紅色，當脂肪細胞內油滴堆積愈多，則 Oil-Red O 染色程度愈深。脂質染色 (圖 3A) 與定量分析 (圖 3B) 結果發現，隨著 SJW 濃度之提高，其油滴堆積之情形也隨之下降，但統計上並不顯著。

三、三酸甘油酯含量之比較

脂肪細胞中之油滴以三酸甘油酯為儲存型式，故可以其含量作為脂質堆積能力的判定。圖 4 結果顯示，SJW 劑量之提高，三酸甘油酯含量會微幅下降，但統計上並不顯著。

四、細胞存活率分析

MTT 為一種可接受氫離子的黃色染劑，在活細胞粒線體中琥珀酸脫氫酶 (succinate dehydrogenase, SDH) 作用下，可使 tetrazolium 裂開，生成藍紫色 formazan 結晶，堆積於細胞中，而死細胞因缺少 SDH 故無此功能，formazan 結晶生成量與活細胞數成正比，故可以 MTT assay 作為細胞存活率之指標。有鑒於本試驗所需最低有效劑量與前人研究結果有所差異，因而以細胞存活率評估 SJW 對脂肪細胞脂質堆積能力之抑制作用是否為高劑量所造成之毒性作用，圖 5 結果顯示，當 SJW 濃度達 3 mg/ml 時，細胞存活率顯著受到抑制，顯示對細胞已產生毒性。

綜合試驗一結果顯示，SJW 可改變細胞形態，降低脂質堆積，唯 oil-Red O 與三酸甘油酯含量在統計上並不顯著。

試驗二、SJW 處理對 3T3-L1 脂肪細胞能量代謝與脂肪激素相關基因表現之影響

脂質蓄積量可受諸多脂肪細胞脂質代謝與油滴結構的基因表現所調控 (Brown, 2001 ; Farmer, 2006)，同時，也與成熟脂肪細胞所分泌之細胞激素息息相關 (Attie and Scherer, 2009 ; Lago *et al.*, 2009)。

一、 SJW 對 3T3-L1 脂肪細胞之脂質代謝相關基因 mRNA 表現的影響

PPAR γ 是脂肪細胞關鍵轉錄因子，當其活化轉錄時，會促使許多攸關脂肪細胞的脂質堆積能力與形態的變化有關的基因表現 (Farmer, 2006)。aP2 能調節脂肪細胞之脂質及葡萄糖代謝作用 (Boord *et al.*, 2002)。Perilipin 對於三酸甘油酯的儲存與脂解作用的調控扮演重要角色 (Brasaemle, 2007)。HSL 則為脂解作用

中主要的脂質分解酵素之一 (Kraemer and Shen, 2002)。

藉由 RT-PCR 分析結果 (圖 6) 顯示, SJW (1 mg/ml) 處理組細胞, 在有或沒有胰島素添加下, 除了 *aP2* mRNA 外, *PPAR γ* 、*Perilipin* 與 *HSL* mRNA 的表現皆較對照組細胞低。胰島素處理可增加脂肪細胞 *PPAR γ* (Vidal-Puig *et al.*, 1997)、*aP2*、*Perilipin* 與 *HSL* (McTernan *et al.*, 2002) mRNA 的表現, 而 *aP2* 基因之調節區域促進子 (enhancer) 具有 *PPAR γ* 結合序列 (Graves *et al.*, 1992), 所以可能因此 *PPAR γ* 也促進 *aP2* mRNA 表現。在胰島素添加培養環境下, SJW 可使細胞中, *PPAR γ* 、*HSL* 以及 *Perilipin* 表現降至與未添加胰島素處理之細胞相同。指出 SJW 除了可能透過先前所見在沒有胰島素存在下降低細胞基因表現外, 可能也可以阻止胰島素的訊息傳遞 (signal transduction) (Richard *et al.*, 2012), 而抑制胰島素促進這些基因的表現。而於同時添加胰島素與 SJW 處理之細胞, *aP2* mRNA 表現受抑制程度並未如 *PPAR γ* 、*Perilipin* 與 *HSL* 表現, 顯示 SJW 抑制胰島素訊息傳遞作用並不影響 *aP2* mRNA 表現。

二、SJW 對 3T3-L1 脂肪細胞之脂肪細胞分泌激素基因 mRNA 表現的影響

Adiponectin 能調節動物體內能量的平衡 (Gimeno and Klaman, 2005); *Leptin* 則與攝食、脂肪儲存、能量代謝 (Trayhurn and Rayner, 1996; Ahima and Flier, 2000) 以及生理時鐘 (Laposky *et al.*, 2006) 有關。由圖 7 結果顯示, 在有或沒有添加胰島素的情形下, SJW 皆可顯著抑制 *Adiponectin* 與 *Leptin* mRNA 的表現。而胰島素處理可增加 *Leptin* 與 *Adiponectin* mRNA 的表現。有趣的是, 在胰島素存在的情形下, SJW 抑制 *Leptin* mRNA 表現的作用明顯減弱。這樣的反應與 *PPAR γ* 、*Perilipin* 以及 *HSL* mRNA 在同樣處理條件下的反應 (圖 6) 明顯不同。由表 4 可知, 對於 *Leptin* 表現量的影響, SJW 與胰島素產生交感作用, 可能是因為胰島素可增加 *Leptin* 的表現量 (Hardie *et al.*, 1996), 使得 SJW 抑制 *Leptin* 表現量的

效果受到折抵，而在無胰島素存在下，此作用可正常發揮。同時，如試驗一結果所指，SJW 可抑制脂肪細胞脂質堆積脂功能，亦即細胞儲存之能量減少，也與文獻所言，當動物體缺乏能量時，Leptin 表現則會受到抑制之結果相符 (Beckerr *et al.*, 1995 ; Boden *et al.*, 1996 ; Ahima and Flier, 2000) 。

綜合試驗二結果顯示，SJW 可抑制 3T3-L1 脂肪細胞脂質代謝相關基因 mRNA 表現，並且減少脂肪細胞分泌激素 *Adiponectin* 與 *Leptin* mRNA 的表現，而 SJW 的此種作用會受到胰島素存在與否的影響。

試驗三、SJW 對 3T3-L1 脂肪細胞約日節律同步化及相關基因表現之影響

由上述實驗結果可知，SJW 可影響 3T3-L1 脂肪細胞之代謝功能。過去已有諸多報告指出，約日節律系統也參與了調控生物體中代謝之過程 (Eckel-Mahan and Sassone-Corsi, 2009 ; Rutter *et al.*, 2002 ; Huang *et al.*, 2011)，因此，進一步瞭解於 SJW 處理後，於代謝過程中之約日節律表現型態是否有差異。

一、SJW 同步化 3T3-L1 脂肪細胞約日節律

同步化作用可使細胞皆處於相同生理時間點，以觀察細胞約日節律之變化。至今，已有多數細胞培養實驗利用高濃度血清 (50%血清) 處理，使約日節律相關基因同步化 (Nagoshi *et al.*, 2004 ; Garbarino-Pico *et al.*, 2007 ; Nakahata *et al.*, 2008 ; Okazaki *et al.*, 2010)。

由圖 8 結果顯示，同步化標幟基因-*Per2* 於 50 %血清處理下，處理 1 小時後，表現量明顯提升，並於第 8 小時降至低點，與文獻相符 (Balsalobre *et al.*, 1998)，而 SJW 處理組，也與之結果相同，相較於此，0 % FBS 於處理 1 小時後，則無法提升 *Per2* mRNA 表現量。

二、SJW 對不同分化階段之 3T3-L1 脂肪細胞約日節律同步化之影響

由於脂肪細胞分化過程，細胞形態相異，為比較不同分化時期，同步化效果是否有差異，將分化第 2、4、6、8 天的 3T3-L1 脂肪細胞分別以 0 % FBS、0 % FBS 並添加 SJW 及 50 % FBS 之培養液處理兩小時，經此同步化作用後第 0、1、8 小時，萃取 RNA，經由 RT-PCR 分析，比較同步化標幟基因之差異。

由圖 9 結果所知，同步化標幟基因之一 *Per1* mRNA 表現量，於分化第 6 天，同步化後第 8 小時，0 % FBS 處理組顯著低於其他處理組，其餘各時間點或分化階段之不同，所有組別間統計上皆無顯著差異。此結果並無如文獻所示，Rat-1 Fibroblast 於處理後第 1 小時提升，並於第 8 小時降至低點 (Balsalobre *et al.*, 1998)，但與 Otway *et al.* (1998) 實驗結果相符，其以高濃度血清刺激 3T3-L1 脂肪細胞之同步化作用，*Per1* 表現量無明顯差異，*Per2* 則有明顯的節律變化，故此差異，也許是因實驗材料不同所致。

圖 10 結果所示，*Per2* mRNA 表現量於血清刺激後第 1 小時，分化第 2 天，SJW 與 0 % FBS 之 *Per2* mRNA 表現量皆顯著高於 50 % FBS，分化第 4 天各處理組則無顯著差異，分化第 6、8 天之 SJW 與 50 % FBS 處理組皆顯著高於 0 % FBS。血清刺激後第 8 小時，分化第 2 天之 *Per2* mRNA 表現量，0 % FBS 高於 SJW，SJW 又高於 50 % FBS，分化第 6 天，50 % FBS 高於 SJW，SJW 又高於 0 % FBS，並達統計上顯著之差異，分化第 4 天與第 8 天各處理組則無顯著差異，其中，分化第 2 天之結果，與估計結果相反，推測或許是因為 3T3-L1 前脂肪細胞誘發分化時，需添加 DEX，而有報告指出 DEX 可使 3T3-L1 脂肪細胞約日節律相關基因受到改變 (Aoyagi *et al.*, 2005; Barnea *et al.*, 2013)，分化第 2 天也許仍受殘餘之 DEX 影響而有此結果。

三、SJW 對 3T3-L1 脂肪細胞約日節律及代謝相關基因節律性表現之影響

周邊組織之約日節律系統主要受到中樞生理時鐘與攝食所影響 (Damiola *et al.*, 2000), 當組織接收訊號後, 改變細胞之約日節律相關基因表現, 產生不同生理反應, 如分化或代謝作用, 使組織部分活動具有節律性變化。本試驗取 3T3-L1 脂肪細胞各別以 0 % FBS、SJW 及 50 % FBS 之培養液處理後, 於不同時間點進行約日節律、代謝及細胞激素相關基因表現分析。於處理後第 1 小時, SJW 與 50 % FBS 處理之細胞 *Per2* mRNA 表現量皆顯著高於 0 % FBS (圖 11A)。後續時間點進一步以軟體 (CircWave v1.4) 分析結果 (圖 11B) 所示, 細胞經 SJW 處理後, *Per2* 表現之振幅 (波峰與波谷之差) 較 0 % FBS 與 50 % FBS 為大。於處理後第 1 小時, SJW 與 50 % FBS 處理之細胞 *Bmal1* mRNA 表現量皆顯著高於 0 % FBS (圖 12A)。後續時間點以 CircWave v1.4 分析結果 (圖 12B) 顯示, 細胞經 SJW 處理後, *Bmal1* 表現之振幅與 50% FBS 相差無異, 而此兩組之振幅皆小於 0 % FBS。於處理後第 1 小時, SJW 與 50 % FBS 處理之細胞 *Rev-erba* mRNA 表現量皆顯著高於 0 % FBS (圖 13A)。後續時間點由 CircWave v1.4 分析結果 (圖 13B) 所示, SJW 相較於 50% FBS 處理, 有較平穩的週期; 而相較於 0 % FBS, 則有較大的振幅。

SJW 可使 *Per2* 與 *Rev-erba* 節律表現型態在振幅高於 0 % FBS, 而 *Bmal1* 則是 0 % FBS 之振幅高於 SJW 與 50 % FBS, 可能是因為在約日節律調控機制中, 位於上游基因的 *Bmal1* 可誘發 *Per2* 的轉錄作用, *Per2* 可再進行負回饋作用, 抑制 *Bmal1* 的表現 (Shearman *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 2001; Akashi and Takumi, 2005; Sato *et al.*, 2006), 此外, *Rev-erba* 也具負回饋作用, 進而抑制 *Bmal1* 的轉錄作用 (Preitner *et al.*, 2002; Sato *et al.*, 2004; Triqueneaux *et al.*, 2004), 故當 SJW 提高 *Per2* 與 *Rev-erb α* 表現時, 兩基因也藉由負回饋作用, 抑制 *Bmal1* 之表現。

在代謝相關基因的部分, 於處理後第 1 小時, SJW 與 50 % FBS 處理之細胞 *PPAR γ* 、*HSL* 與 *Perilipin* mRNA 表現量皆顯著高於 0 % FBS 處理 (圖 14A 至圖 14C)。由圖 14 可知 SJW 與 50 % FBS 可影響代謝相關基因的節律性表現。

在脂肪細胞分泌激素基因方面，圖 15A 至圖 15B 結果顯示，於處理後第 1 小時，SJW 與 50 % FBS 處理之細胞 *Adiponectin* 與 *Leptin* mRNA 表現量皆顯著高於 0 % FBS 處理。於處理後之中後期，50 % FBS 則顯著高於另外兩組。由此結果可知，SJW 與 50 % FBS 可影響脂肪細胞分泌激素基因之表現，但 SJW 雖一開始可提高 *Adiponectin* 與 *Leptin* 之表現，在中後期卻無此結果，也許是因其本身會抑制 *Adiponectin* 與 *Leptin* 之故（圖 7）。

綜合試驗三結果顯示，SJW 具使脂肪細胞生理時鐘同步化的能力，但此能力會受到分化時期所影響，此外，SJW 可影響 3T3-L1 脂肪細胞約日節律相關基因之振幅或週期，並改變代謝與脂肪細胞分泌激素相關基因節律性變化的表現量，這些可能是 SJW 影響脂肪細胞代謝功能的路徑之一。

試驗四、SJW 對 3T3-L1 脂肪細胞 *Leptin* 分泌量及其節律性變化的影響

由於試驗二實驗結果顯示，SJW 可抑制 *Leptin* mRNA 表現量，且此效果在胰島素不存在情況下更為明顯，故進一步探討在不同濃度血清培養或藉由同步化作用情況下，SJW 對 *Leptin* 節律性分泌量之影響。

一、SJW 對 3T3-L1 脂肪細胞 *Leptin* 分泌量的影響

因脂肪組織長期以來被認為其功能僅為能量儲存，但 *Leptin* 的發現，更證實脂肪組織不只可蓄能，其分泌之激素還參與調控能量平衡、神經內分泌及免疫功能之調控。

圖 16 結果顯示，10 % FBS 之 *Leptin* 基礎分泌量(0 小時)顯著高於 0 % FBS，相較於基礎分泌量，無論 SJW 的有無，隨著時間增加，0 % FBS 之 *Leptin* 分泌量僅有些微提升，10 % FBS 之 *Leptin* 分泌量則為明顯上升。於 0 % FBS 培養環

境下，處理後 24 小時，3 mg/ml SJW 處理組之 Leptin 的分泌顯著低於 0、1 mg/ml 之組別。於 10 % FBS 培養環境下，處理後 4.5 小時，3 mg/ml SJW 處理組之 Leptin 的分泌顯著低於 0、1 mg/ml 之組別，處理後 24 小時，SJW 濃度提高，Leptin 分泌量也隨之顯著降低。血清之有無可能是影響 SJW 降低 Leptin 分泌量效果的因素，因文獻指出，Leptin 可受動物體營養狀態所調控，當動物體缺乏能量時，Leptin 表現則會受到抑制 (Beckerr *et al.*, 1995; Boden *et al.*, 1996; Ahima and Flier, 2000)，而當缺乏血清時，處於低營養份的環境，Leptin 分泌量受抑制，此時若給予 SJW，則 SJW 抑制 Leptin 的效果不易顯現，但當血清存在，細胞處於可正常分泌 Leptin 的狀態，此時處以 SJW，則抑制效果得以發揮。

二、同步化對 3T3-L1 脂肪細胞 Leptin 分泌節律性變化的影響

Leptin 不單影響能量調控，其本身也具節律性變化，與生理時鐘相互影響，進而影響生物體本身之活動。故此，以約日節律同步化，探究其對 Leptin 分泌之影響。

在同步化後 8 小時（細胞培養於 DMEM-0 中），SJW 處理組之 Leptin 分泌量顯著低於其他兩組，隨時間增加，0 % FBS 與 SJW 處理組之 Leptin 分泌量有些微增加，兩組間無顯著差異，但 50 % FBS 之 Leptin 分泌量則隨之大幅提升，並於各時間點顯著高於其他兩處理（圖 17）。

由圖 16 結果可知，血清有無可影響 SJW 抑制 Leptin 分泌之作用，故將培養條件更換為同步化後之細胞培養於 DMEM-10 中，進一步觀察約日節律同步化對 Leptin 分泌之影響。圖 18 結果顯示，同步化作用後，隨著時間增加，0 % FBS 與 50 % FBS 處理組之 Leptin 分泌量隨之顯著提升，SJW 處理組之 Leptin 分泌量則有些微增加。於同步化後各時間點，SJW 處理組之 Leptin 分泌量顯著低於其他兩處理。或許同步化可提升 Leptin 之分泌，雖然根據試驗三結果，SJW 具同步化之能力，但由於 SJW 也可抑制 Leptin 表現（圖 7），故即使同步化作用本身

可提升 Leptin 分泌量，卻不敵 SJW 抑制 Leptin 之能力。

由上述結果進一步探討，SJW 對細胞分泌 Leptin 之抑制作用是否因不同時間點而有異。圖 19 結果所示，0 % FBS 處理之細胞，隨著時間增加，Leptin 分泌之增加量為持續下降的趨勢。SJW 處理同步化後，細胞 Leptin 分泌的增加量逐漸下降，於 26 至 32 小時時，不若 0 % FBS 處理之結果，而是停止下降，趨於平緩。細胞經 50 % FBS 處理同步化後，Leptin 分泌之增加量逐漸下降，並於 26 至 32 小時時，逐漸提升，但統計上並不顯著。

綜合試驗四結果顯示，細胞經 SJW 處理可抑制 Leptin 之分泌。此外，此抑制作用會隨時間而有週期性之變化。



結 論

由細胞形態觀察、oil-Red O 染色及三酸甘油酯含量分析結果顯示， SJW 可降低 3T3-L1 脂肪細胞之脂質堆積。脂肪細胞代謝與脂肪細胞分泌激素相關基因之表現結果顯示，添加 SJW 之脂肪細胞代謝相關基因 (*PPAR γ* 、*Perilipin*、*HSL*) 表現量顯著低於對照組；而對於脂肪細胞分泌激素基因- *Leptin* 而言，SJW 可使其基因表現量下降，且在胰島素移除時，抑制效果更為明顯。

脂肪細胞生理時鐘同步化與約日節律相關基因表現試驗中，同步化標幟基因-*Per2* 經 SJW 或 50 % FBS 處理後，表現量於第 1 小時增加，並在第 8 小時降至低點。此外，SJW 與 50 % FBS 的處理，可提高約日節律基因 (*Per2*、*Bmal1*、*Rev-erb α*) 之節律性表現強度，增加代謝相關基因 (*PPAR γ* 、*HSL*、*Perilipin*) 節律性表現，並在處理初期提高脂肪細胞分泌激素 (*Adiponectin*、*Leptin*) 的表現，於中期開始降低其表現。

Leptin 分泌量分析實驗中，於 10 % FBS 培養環境下，SJW 處理使細胞 *Leptin* 分泌量顯著低於對照組；於 0 % FBS 培養下，需經較長時間、高劑量作用，SJW 處理之細胞 *Leptin* 分泌量顯著低於對照組。經 50 % FBS 處理之 *Leptin* 分泌量，隨時間增加，有明顯的提升，並顯著高於 SJW 與 0 % FBS。若細胞經同步化作用後，培養於 10 % FBS 環境中，SJW 處理之細胞 *Leptin* 分泌量顯著低於其他兩組，且 *Leptin* 分泌之增加量因不同時間點而有異。

綜合上述結果，SJW 可抑制脂肪細胞脂質代謝之功能，並影響約日節律及脂質代謝相關基因的節律性變化與 *Leptin* 分泌量，同時，SJW 調控脂肪細胞功能之能力可受培養環境（血清或胰島素添加與否）所影響，而 SJW 對脂肪細胞代謝功能之影響是否藉由改變約日節律作為調控路徑之一，有待進一步的實驗去釐清。若能找出其作用機制，更可有效率地控制脂肪組織的發育，在代謝疾病的治療，提供標的性的改善，或是減少畜產動物脂肪量，提高飼料效率，並降低飼養成本。

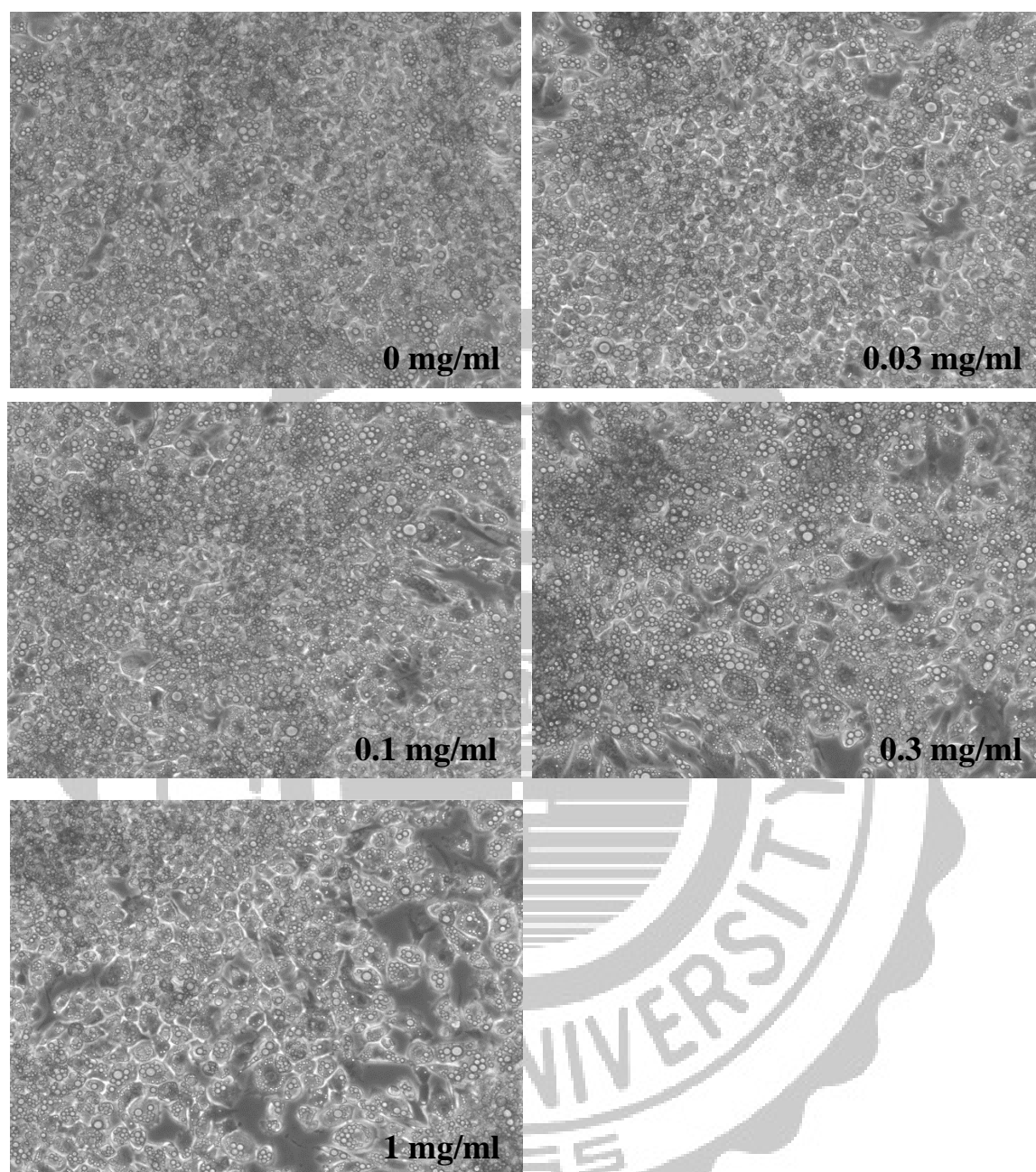
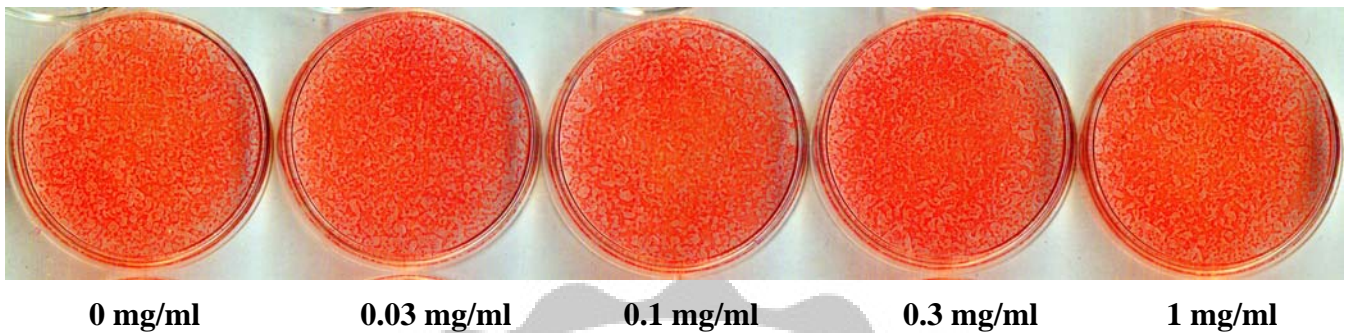


圖 2 SJW 處理對 3T3-L1 脂肪細胞形態之影響。分別以 0、0.03、0.1、0.3、1 mg/ml 之 SJW 添加至 3T3-L1 脂肪細胞（分化第 8 天）之培養液中，每 2 天換一次培養液，4 天後觀察細胞型態。放大倍率皆為 100 倍。

Figure 2 Effects of St. John's wort extracts on morphology of 3T3-L1 adipocytes.

A



B

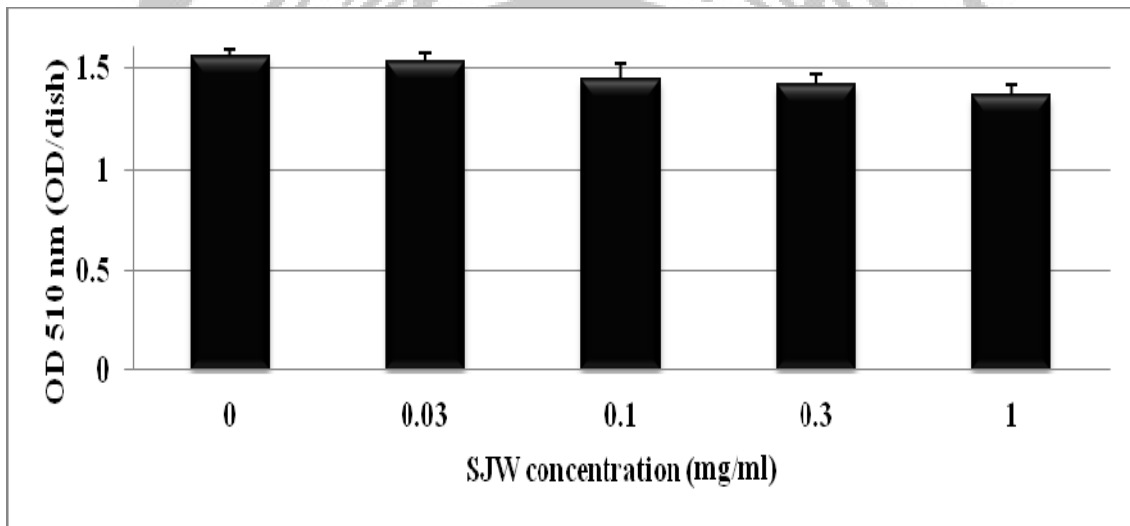


圖 3 SJW 處理對 3T3-L1 脂肪細胞脂質蓄積之影響。分別以 0、0.03、0.1、0.3、1 mg/ml 之 SJW 添加至 3T3-L1 脂肪細胞（分化第 8 天）之培養液中，每 2 天換一次培養液，4 天後進行 oil-Red O 脂質染色與定量分析。A：oil-Red O 染色之結果；B：油脂染色後定量結果。

Figure 3 Effects of St. John's wort extracts on lipid accumulation of 3T3-L1 adipocytes. Lipid accumulation was detected by oil-Red O staining (A) and quantified by OD510 detection (B). Values are means \pm SEM, n=2, the difference among treatments were not significant.

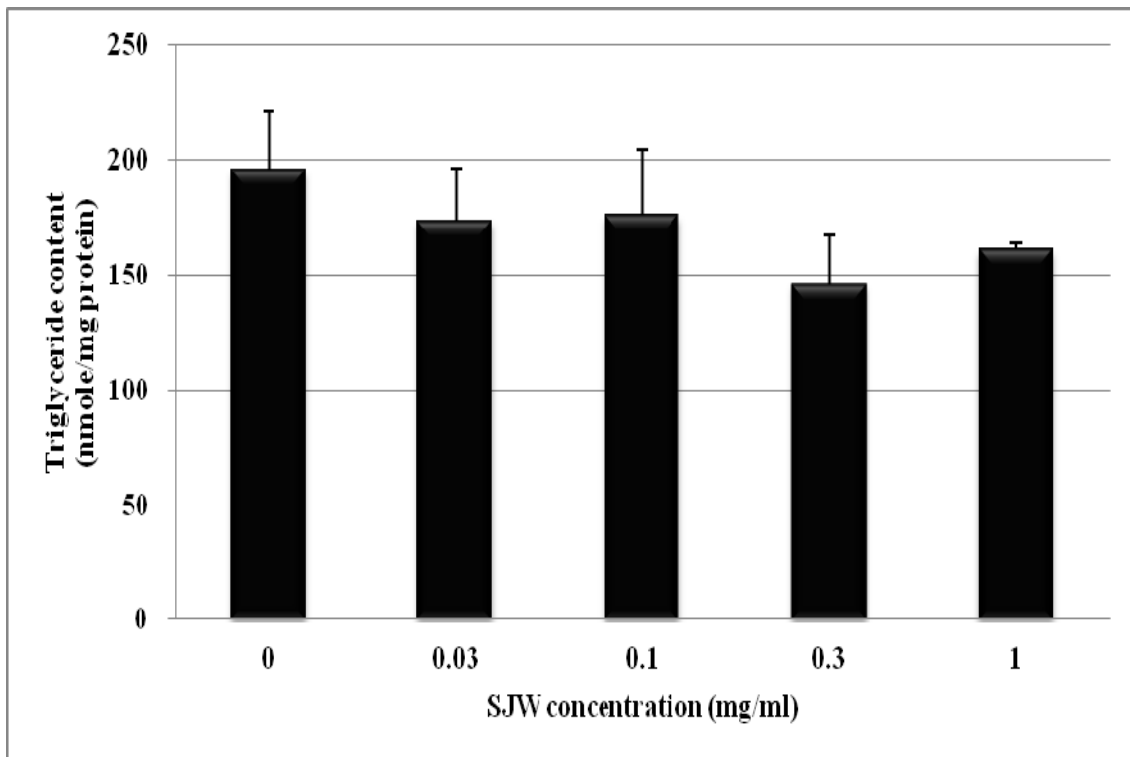


圖 4 SJW 處理對 3T3-L1 脂肪細胞三酸甘油酯含量之影響。分別以 0、0.03、0.1、0.3、1 mg/ml 之 SJW 添加至 3T3-L1 脂肪細胞（分化第 8 天）之培養液中，每 2 天換一次培養液，4 天後進行三酸甘油酯含量分析。

Figure 4 Effects of St. John's wort extracts on triglyceride content of 3T3-L1 adipocytes. Values are means \pm SEM, n=2, the difference among treatments were not significant.

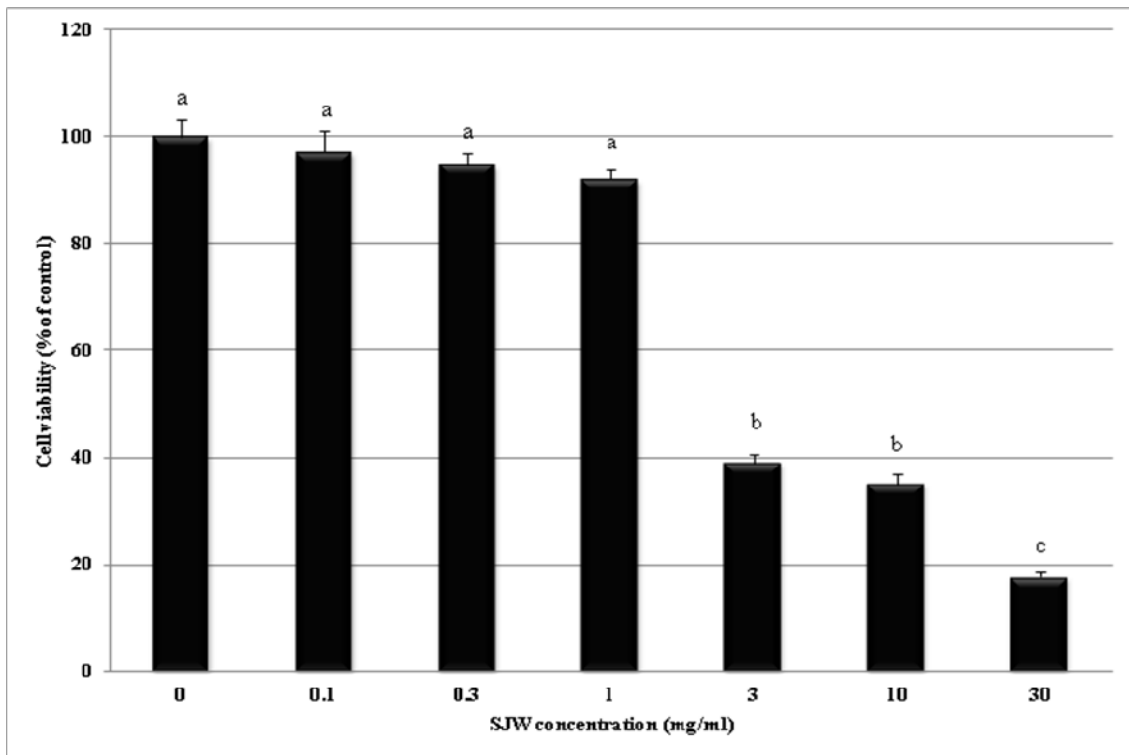


圖 5 SJW 濃度對 3T3-L1 脂肪細胞之細胞存活率之影響。分別以 0、0.1、0.3、1、3、10、30 mg/ml 之 SJW 添加至 3T3-L1 前脂肪細胞之培養液中，2 天後以 MTT assay 進行細胞存活率分析。

Figure 5 The effect of St. John's wort extract concentration on the viability in 3T3-L1 adipocytes. Values are means \pm SEM, $n=3$, ^{a-c}: values in the same bar with different superscript letters were significantly different ($P < 0.05$).

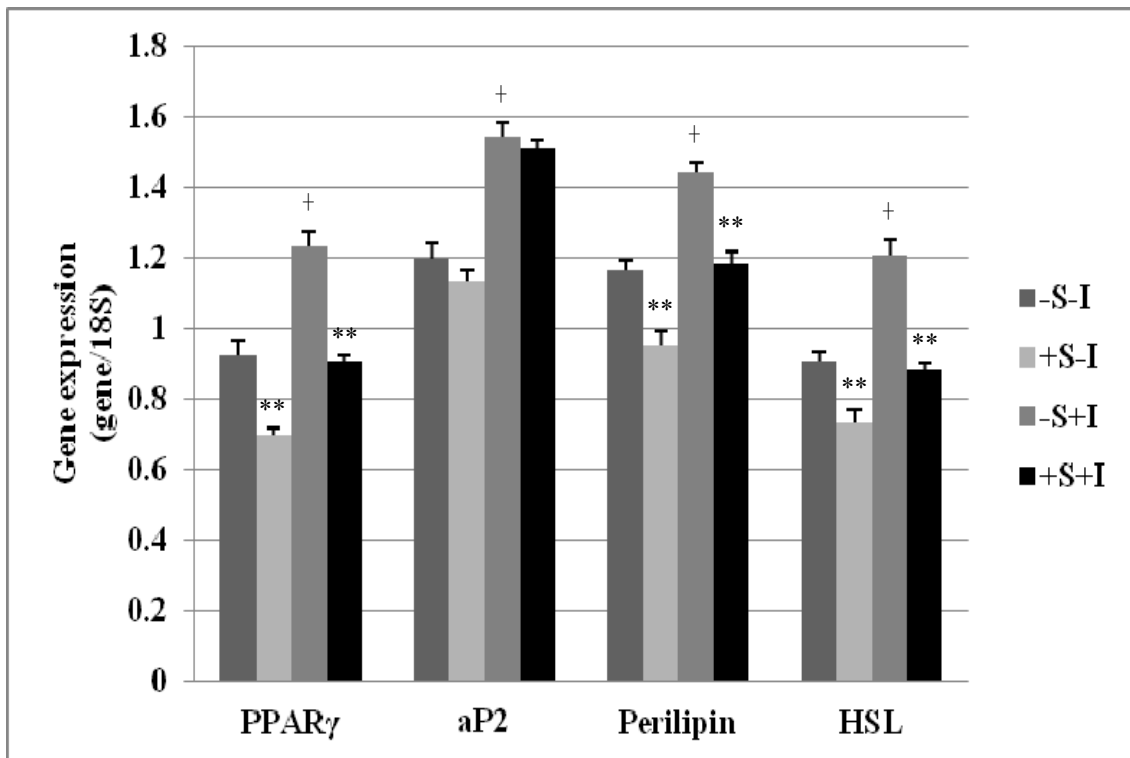


圖 6 SJW (S) 與胰島素 (I) 添加對 3T3-L1 脂肪細胞之代謝相關基因 mRNA 表現之影響。取 3T3-L1 脂肪細胞，分別添加不同組合的 SJW 及胰島素，2 天後抽取總 RNA，由 RT-PCR 偵測脂肪細胞代謝相關基因 mRNA 表現量 (PPAR γ 、aP2、Perilipin 與 HSL)，以 18S rRNA 為內源控制組。

Figure 6 Effects of St. John's wort extracts (S) and insulin (I) on the expressions of metabolism-related genes of adipocytes. Values are means \pm SEM, n=2, **: they were highly significant different between SJW and SJW(-) ($P < 0.01$), + : they were highly significantly different between insulin and insulin(-) ($P < 0.01$).

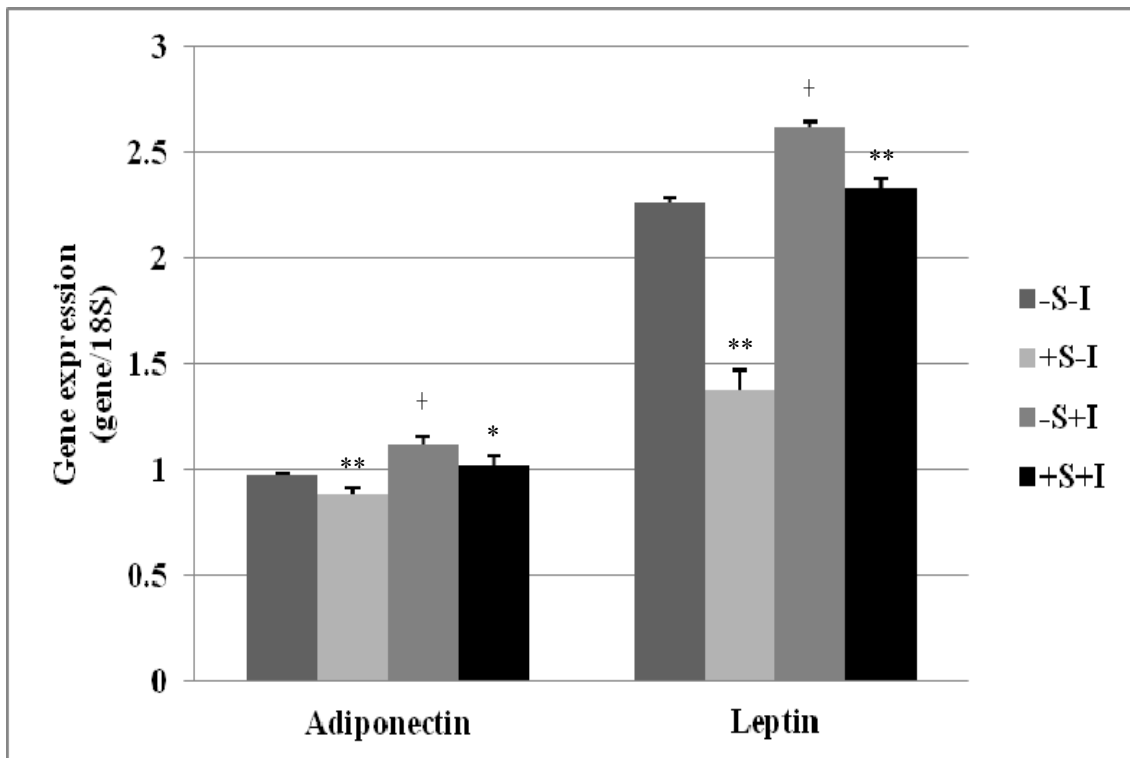


圖 7 SJW (S) 與胰島素 (I) 添加對 3T3-L1 脂肪細胞之分泌激素相關基因 mRNA 表現之影響。取 3T3-L1 脂肪細胞，分別添加不同組合的 SJW 及胰島素，2 天後抽取總 RNA，由 RT-PCR 偵測脂肪細胞分泌激素基因 mRNA 表現量 (*Adiponectin* 與 *Leptin*)，以 18S rRNA 為內源控制組。

Figure 7 Effects of St. John's wort extracts (S) and insulin (I) on the expressions of adipokine genes of adipocytes. Values are means \pm SEM, n=2, *: they were significantly different between SJW and SJW(-) ($P < 0.05$), **: they were highly significant different between SJW and SJW(-) ($P < 0.01$), + : they were highly significantly different between insulin and insulin(-) ($P < 0.01$).

表 4 SJW 與胰島素添加對 3T3-L1 脂肪細胞之代謝以及分泌激素相關基因 mRNA 表現之影響

Table 4 Effects of St. John's wort extracts and insulin on the gene expressions of metabolism and adipokine in adipocytes

	Insulin					<i>P</i> -value	
	-		+				
	SJW(-)	SJW	SJW(-)	SJW	SJW	Insulin	SJW * Insulin
PPAR γ ^{1,2}	0.9239	0.6956	1.2321	0.9050	0.0003	0.0004	0.0980
aP2 ²	1.1981	1.1315	1.5442	1.5147	0.1011	<.0001	0.4580
Perilipin ^{1,2}	1.1628	0.9512	1.4438	1.1853	0.0068	0.0312	0.5056
HSL ^{1,2}	0.9078	0.7290	1.2093	0.8842	0.0004	0.0006	0.0330
Adiponectin ^{1,2}	0.9688	0.8804	1.1219	1.0223	0.0145	0.0029	0.8177
Leptin ^{1,2}	2.2646	1.3801	2.6264	2.3348	<.0001	<.0001	0.0014

¹: they were highly significantly different between SJW and SJW(-) ($P < 0.01$), ²: they were highly significantly different between insulin and insulin(-) ($P < 0.01$).

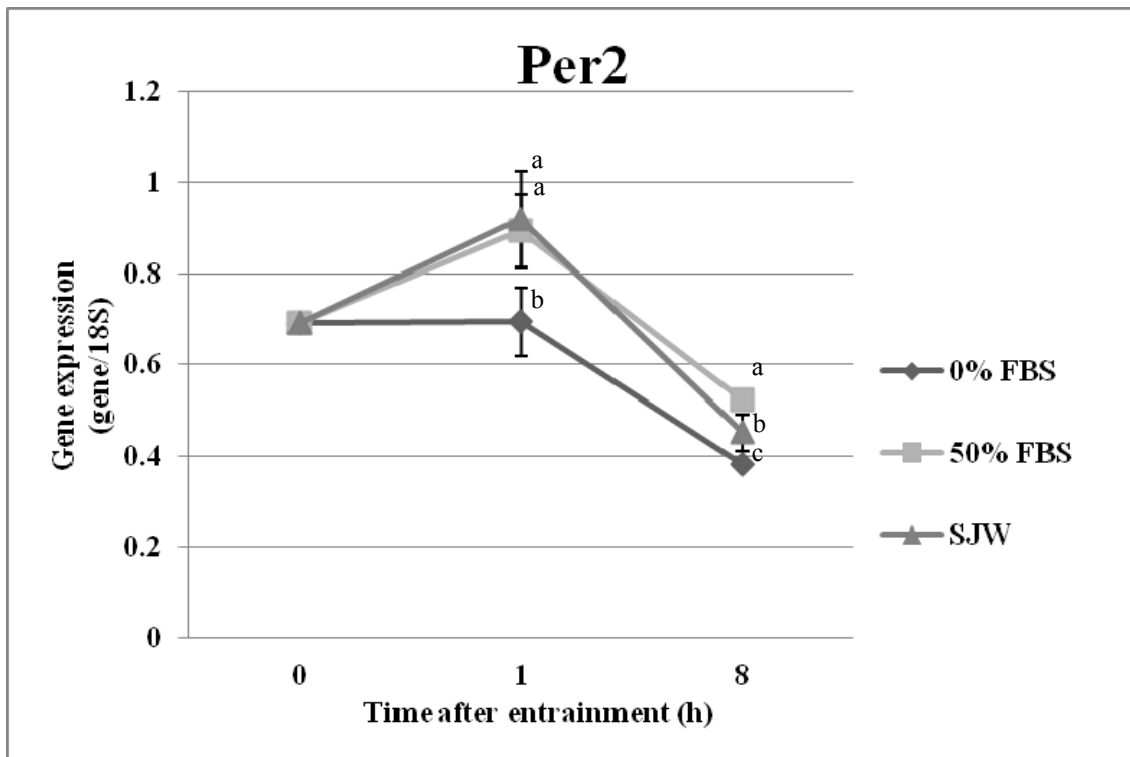


圖 8 3T3-L1 脂肪細胞經高劑量血清或 SJW 刺激同步化後 *Per2* mRNA 表現。取 3T3-L1 脂肪細胞，分別以 0% FBS、0% FBS 並添加 SJW 及 50% FBS 之培養液處理 2 小時，經此同步化作用後第 0、1、8 小時，萃取 RNA，經由 RT-PCR 偵測 *Per2* mRNA 表現量，以 18S rRNA 為內源控制組。

Figure 8 *Per2* mRNA expression in 3T3-L1 adipocytes after entrainment by serum shock or St. John's wort extracts. Values are means \pm SEM, $n=3$, ^{a-c}: values in the same bar with different superscript letters were significantly different ($P < 0.05$).

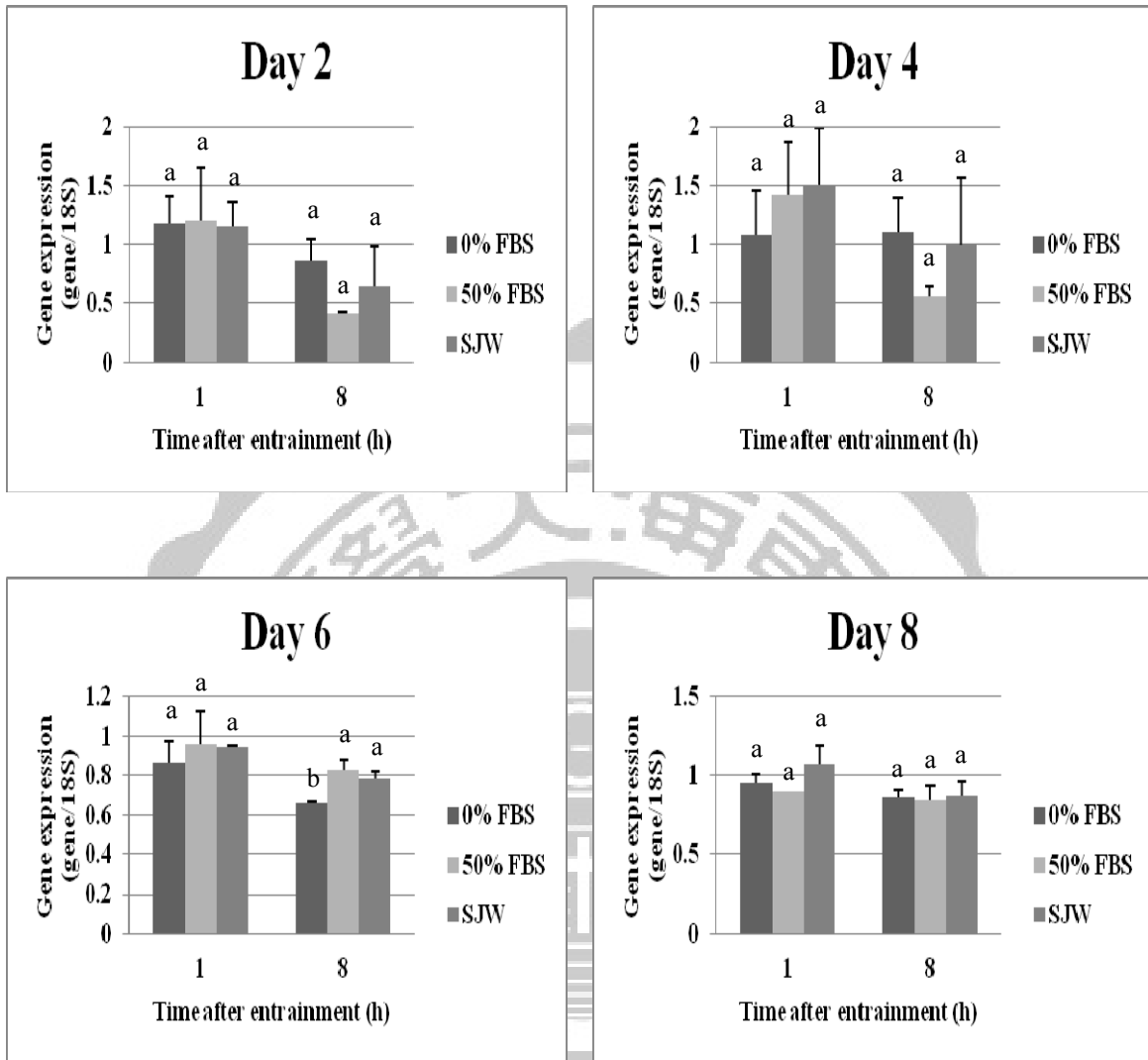


圖 9 3T3-L1 脂肪細胞分化期間經高劑量血清或 SJW 刺激同步化後 *Per1* mRNA 表現比較。取 3T3-L1 脂肪細胞，分別於分化第 2、4、6、8 天，以 0% FBS、0% FBS 並添加 SJW 及 50% FBS 之培養液處理 2 小時，經此同步化作用後第 1、8 小時，萃取 RNA，經由 RT-PCR 偵測 *Per2* mRNA 表現量，以 18S rRNA 為內源控制組。

Figure 9 *Per1* mRNA expression in differentiation in 3T3-L1 adipocytes after entrainment by serum shock or St. John's wort extracts. Values are means \pm SEM, $n=3$, ^{a-b}: values in the same bar with different superscript letters were significantly different ($P < 0.05$).

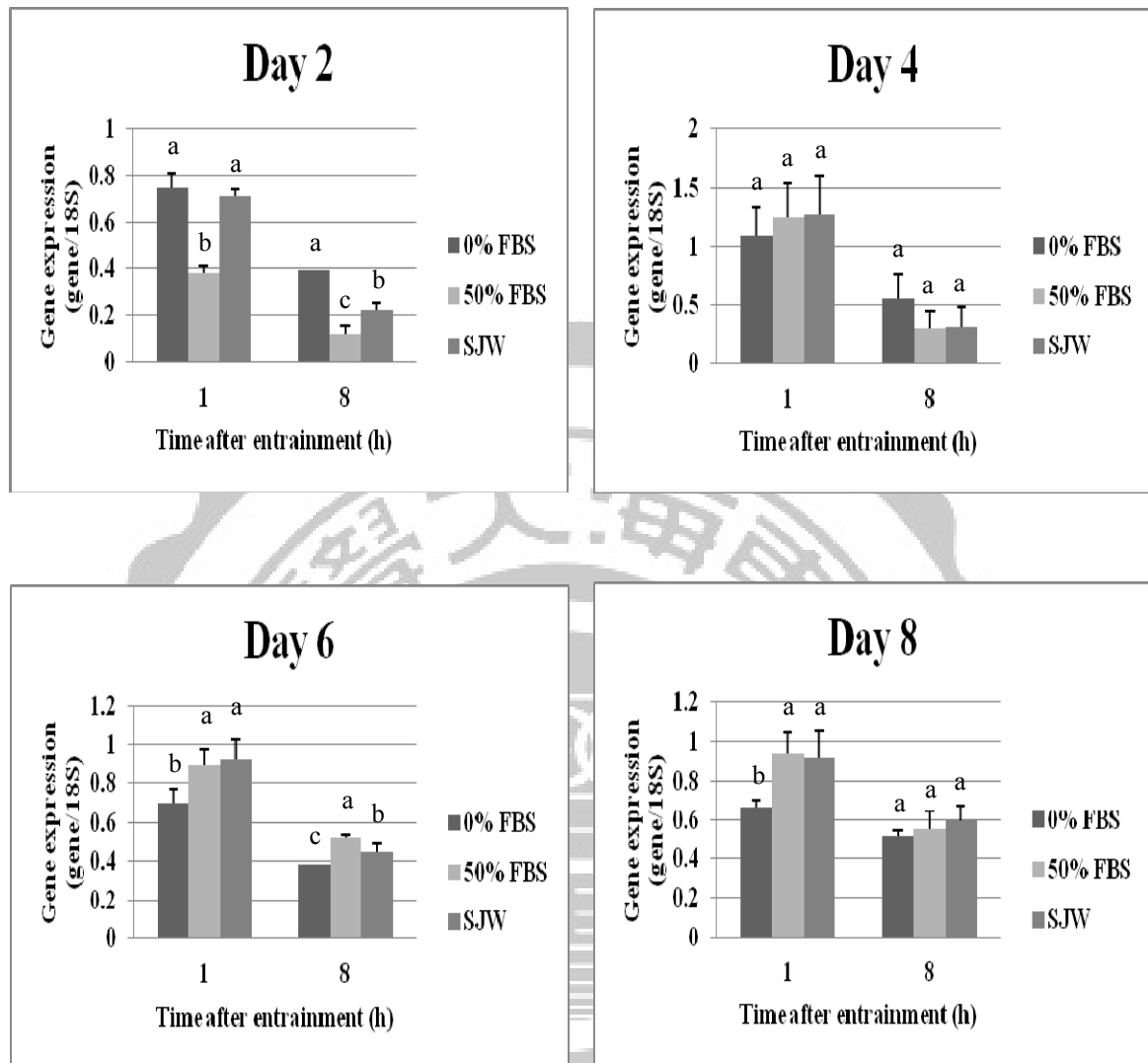
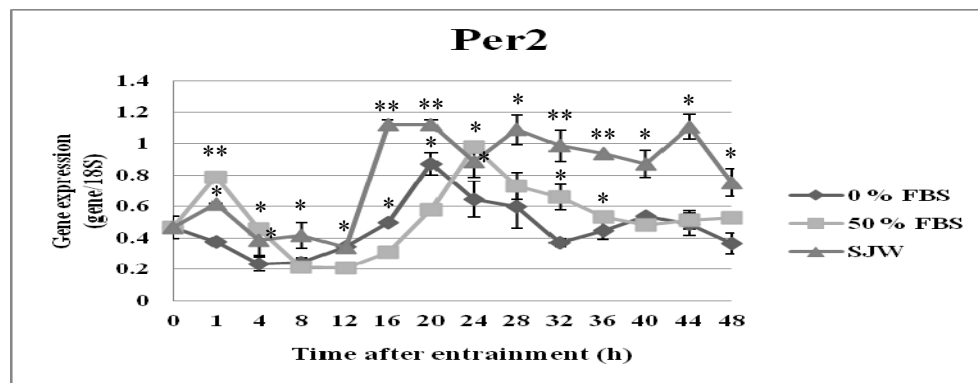


圖 10 3T3-L1 脂肪細胞分化期間經高劑量血清或 SJW 刺激同步化後 *Per2* mRNA 表現比較。取 3T3-L1 脂肪細胞，分別於分化第 2、4、6、8 天，以 0% FBS、0% FBS 並添加 SJW 及 50% FBS 之培養液處理 2 小時，經此同步化作用後第 1、8 小時，萃取 RNA，經由 RT-PCR 偵測 *Per2* mRNA 表現量，以 18S rRNA 為內源控制組。

Figure 10 *Per2* mRNA expression in differentiation in 3T3-L1 adipocytes after entrainment by serum shock or St. John's wort extracts. Values are means \pm SEM, $n=3$, ^{a-c}: values in the same bar with different superscript letters were significantly different ($P < 0.05$).

A



B

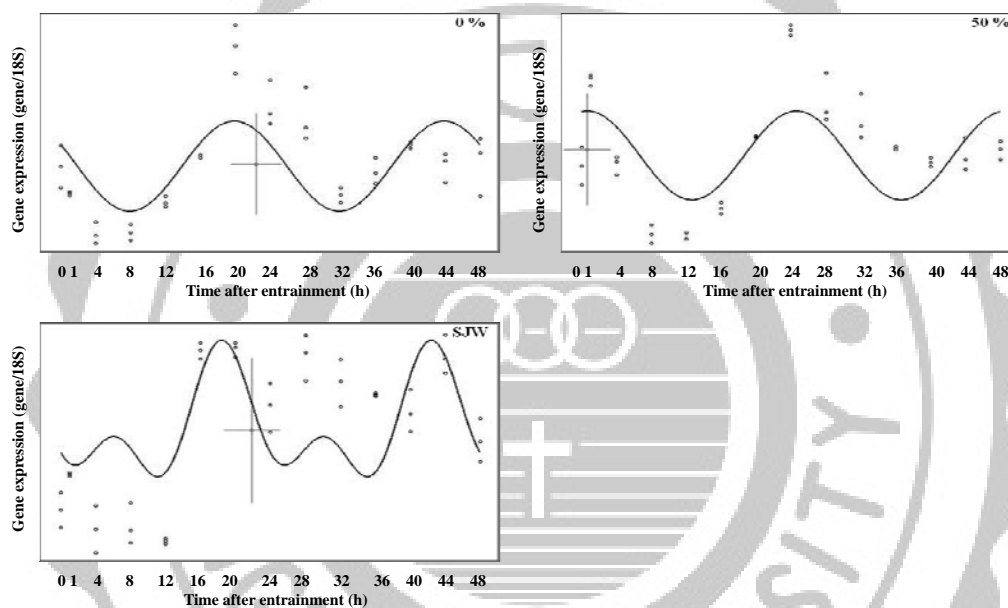
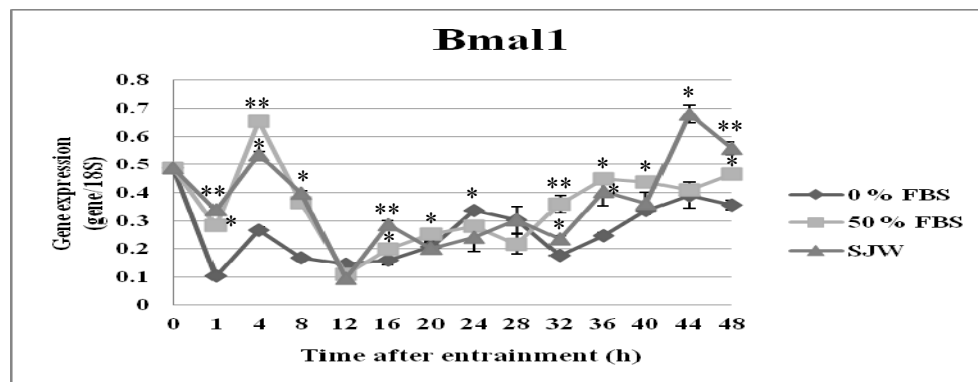


圖 11 SJW 或高劑量血清對 3T3-L1 脂肪細胞 *Per2* mRNA 約日節律表現型態之影響。取 3T3-L1 脂肪細胞，以 0% FBS、SJW 及 50% FBS 之培養液處理 2 小時，經刺激後第 0、1、4、8、12、16、20、24、28、32、36、40、44、48 小時，萃取 RNA，經由 RT-PCR 分析，以 18S rRNA 為內源控制組。A：*Per2* mRNA 表現型態；B：CircWave v1.4 軟體分析 *Per2* 表現型態。

Figure 11 Effects of circadian expression patterns of *Per2* in 3T3-L1 adipocytes by St. John's wort extracts or serum shock. *Per2* mRNA circadian expression patterns by RT-PCR (A) and CircWave v1.4 analysis (B). Values are means \pm SEM, $n=3$, *: they were significantly different with all experiments ($P < 0.05$), **: they were highly significant difference with all experiments ($P < 0.01$).

A



B

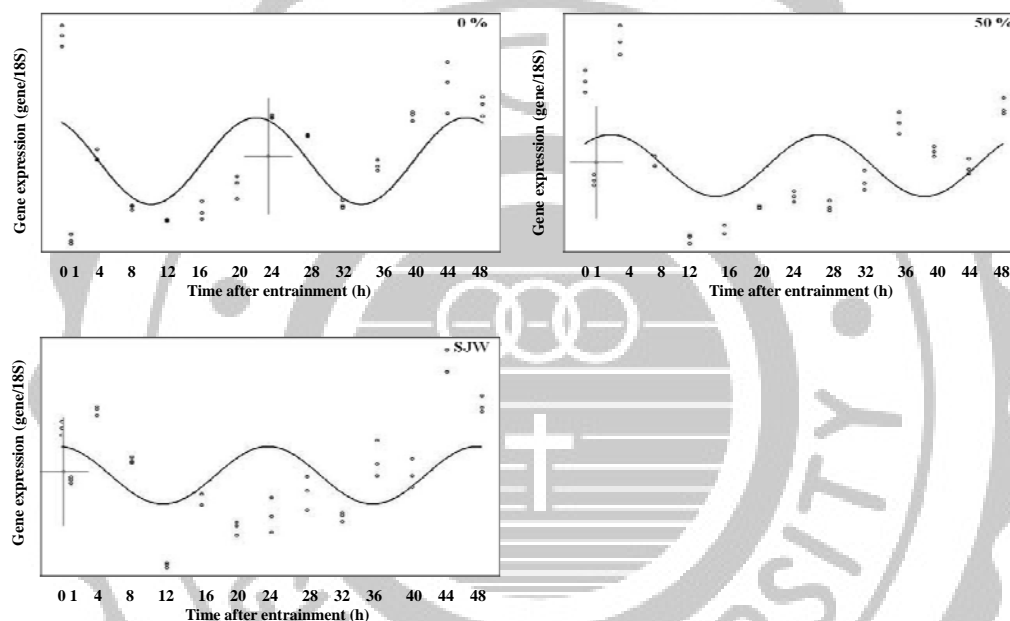
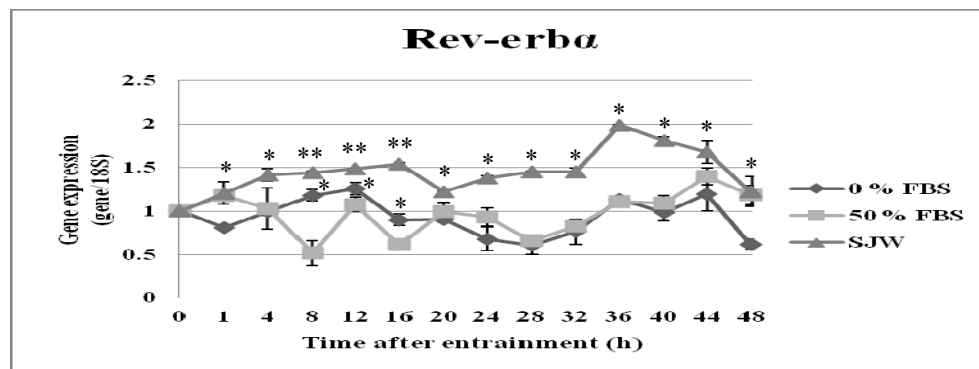


圖 12 SJW 或高劑量血清對 3T3-L1 脂肪細胞 *Bmal1* mRNA 約日節律表現型態之影響。取 3T3-L1 脂肪細胞，以 0% FBS、SJW 及 50% FBS 之培養液處理 2 小時，經刺激後第 0、1、4、8、12、16、20、24、28、32、36、40、44、48 小時，萃取 RNA，經由 RT-PCR 分析，以 18S rRNA 為內源控制組。A：*Bmal1* mRNA 表現型態；B：CircWave v1.4 軟體分析 *Bmal1* 表現型態。

Figure 12 Effects of circadian expression patterns of *Bmal1* in 3T3-L1 adipocytes by St. John's wort extracts or serum shock. *Bmal1* mRNA circadian expression patterns by RT-PCR (A) and CircWave v1.4 analysis (B). Values are means \pm SEM, n=3, *: they were significantly different with all experiments ($P < 0.05$), **: they were highly significant difference with all experiments ($P < 0.01$).

A



B

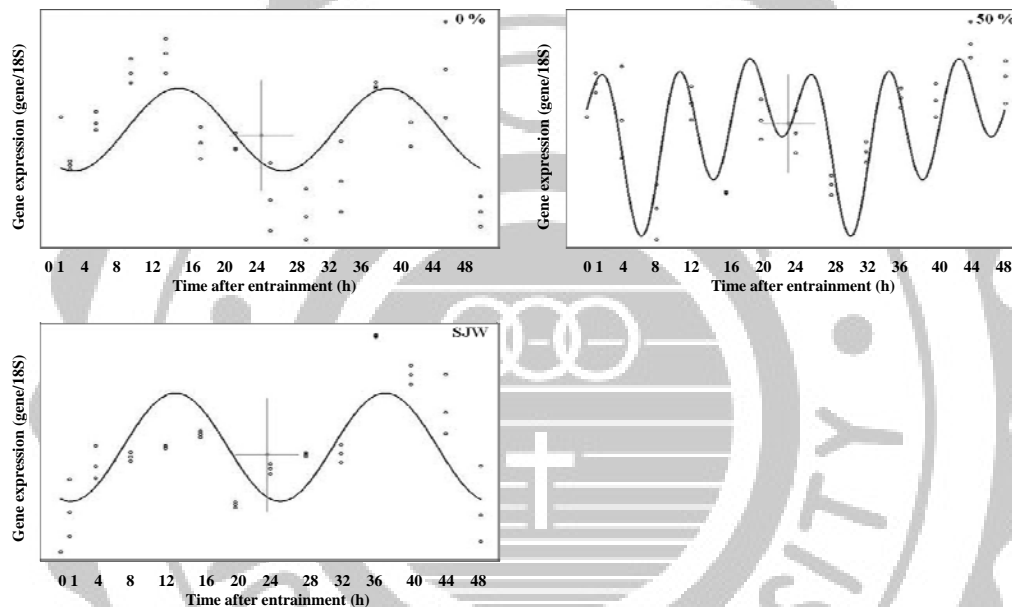


圖 13 SJW 或高劑量血清對 3T3-L1 脂肪細胞 *Rev-erba* mRNA 約日節律表現型態之影響。取 3T3-L1 脂肪細胞，以 0% FBS、SJW 及 50% FBS 之培養液處理 2 小時，經刺激後第 0、1、4、8、12、16、20、24、28、32、36、40、44、48 小時，萃取 RNA，經由 RT-PCR 分析，以 18S rRNA 為內源控制組。A：*Rev-erba* mRNA 表現型態；B：CircWave v1.4 軟體分析 *Rev-erba* 表現型態。

Figure 13 Effects of circadian expression patterns of *Rev-erba* in 3T3-L1 adipocytes by St. John's wort extracts or serum shock. *Rev-erba* mRNA circadian expression patterns by RT-PCR (A) and CircWave v1.4 analysis (B). Values are means \pm SEM, n=3, *: they were significantly different with all experiments ($P < 0.05$), **: they were highly significant difference with all experiments ($P < 0.01$).

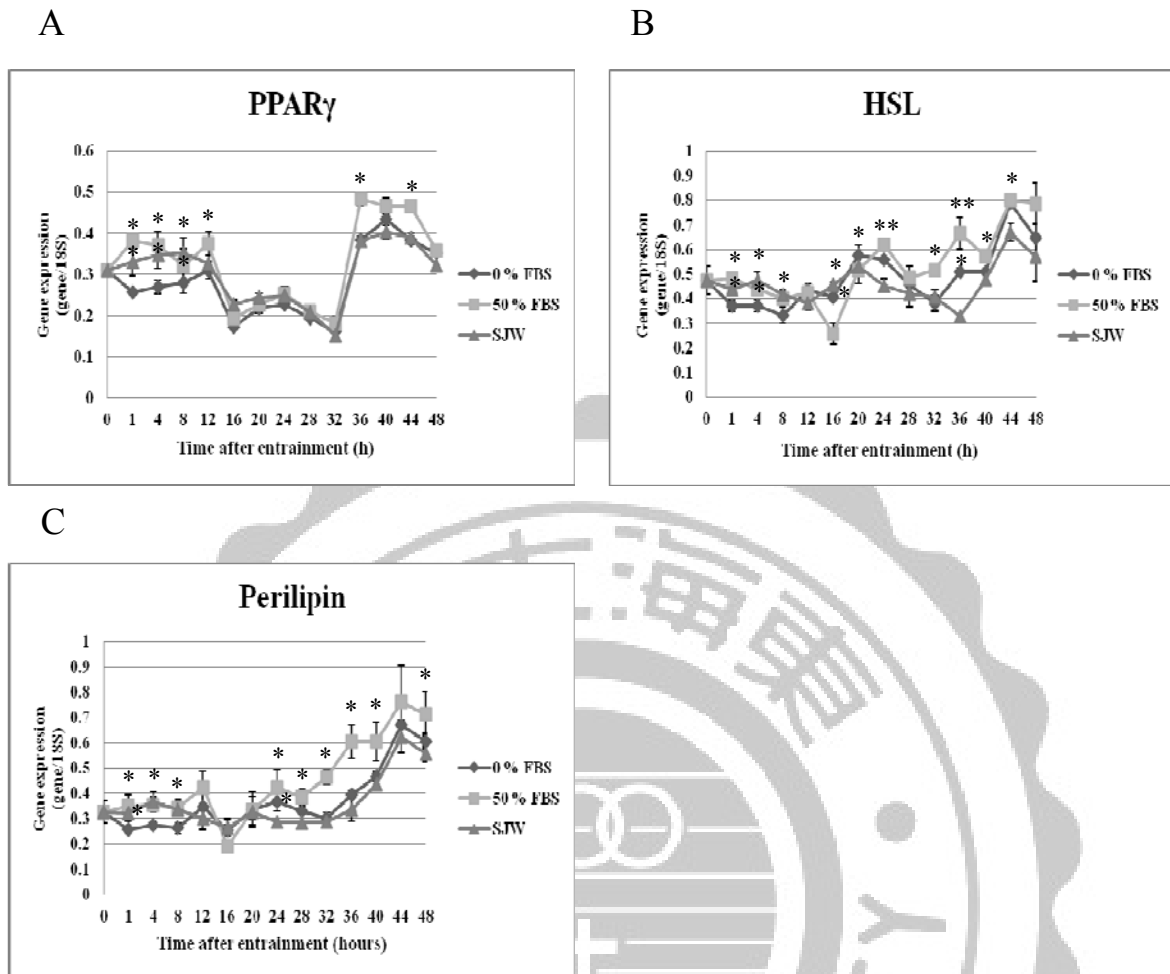
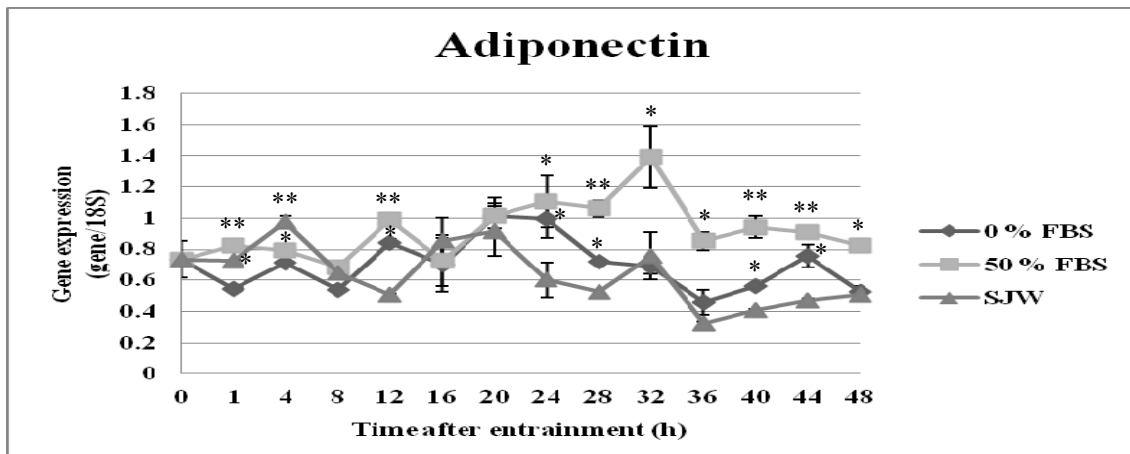


圖14 SJW或高劑量血清對3T3-L1脂肪細胞代謝基因約日節律表現型態之影響。

取3T3-L1成熟脂肪細胞，以0% FBS、0% FBS並添加SJW及50% FBS之培養液處理2小時，經刺激後第0、1、4、8、12、16、20、24、28、32、36、40、44、48小時，萃取RNA，經由RT-PCR分析，確認SJW對代謝相關基因之影響，以18S rRNA為內源控制組。A：PPAR γ mRNA表現；B：HSL mRNA表現；C：Perilipin mRNA表現。

Figure 14 Effects of circadian expression patterns of metabolism-related genes in 3T3-L1 adipocytes by St. John's wort extracts or serum shock. The mRNA levels were examined by RT-PCR of PPAR γ (A), HSL (B) and Perilipin (C). Values are means \pm SEM, n=3, *: they were significantly different with all experiments ($P < 0.05$), **: they were highly significant difference with all experiments ($P < 0.01$).

A



B

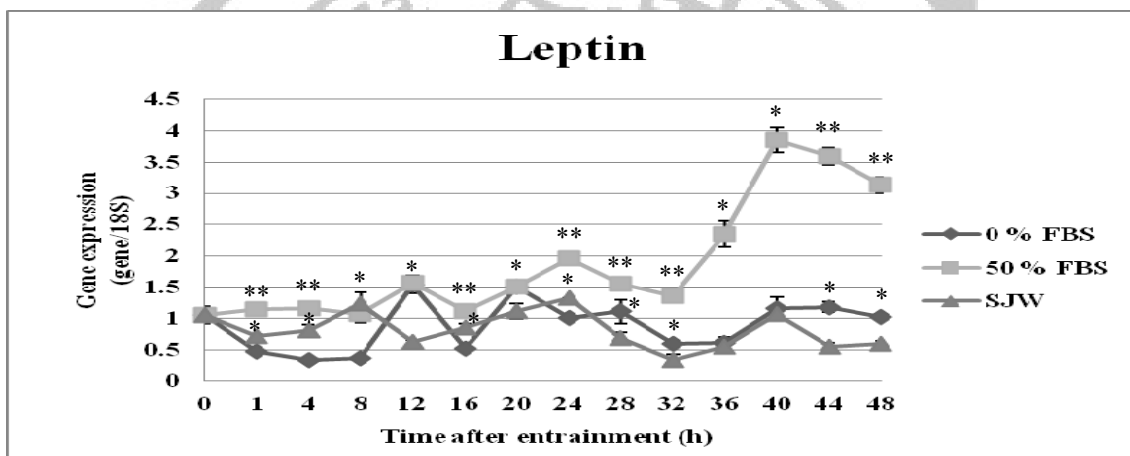


圖 15 SJW 或高劑量血清對 3T3-L1 脂肪細胞分泌激素基因約日節律表現型態之影響。取 3T3-L1 脂肪細胞，以 0 % FBS、0 % FBS 並添加 SJW 及 50 % FBS 之培養液處理 2 小時，經刺激後第 0、1、4、8、12、16、20、24、28、32、36、40、44、48 小時，萃取 RNA，經由 RT-PCR 分析，確認 SJW 對分泌激素相關基因之影響，以 18S rRNA 為內源控制組。A：Adiponectin mRNA 表現；B：Leptin mRNA 表現。

Figure 15 Effects of circadian expression patterns of adipokine genes in 3T3-L1 adipocytes by St. John's wort extracts or serum shock. The mRNA levels were examined by RT-PCR of *Adiponectin* (A) and *Leptin* (B). Values are means \pm SEM, n=3, *: they were significantly different with all experiments ($P < 0.05$), **: they were highly significant difference with all experiments ($P < 0.01$).

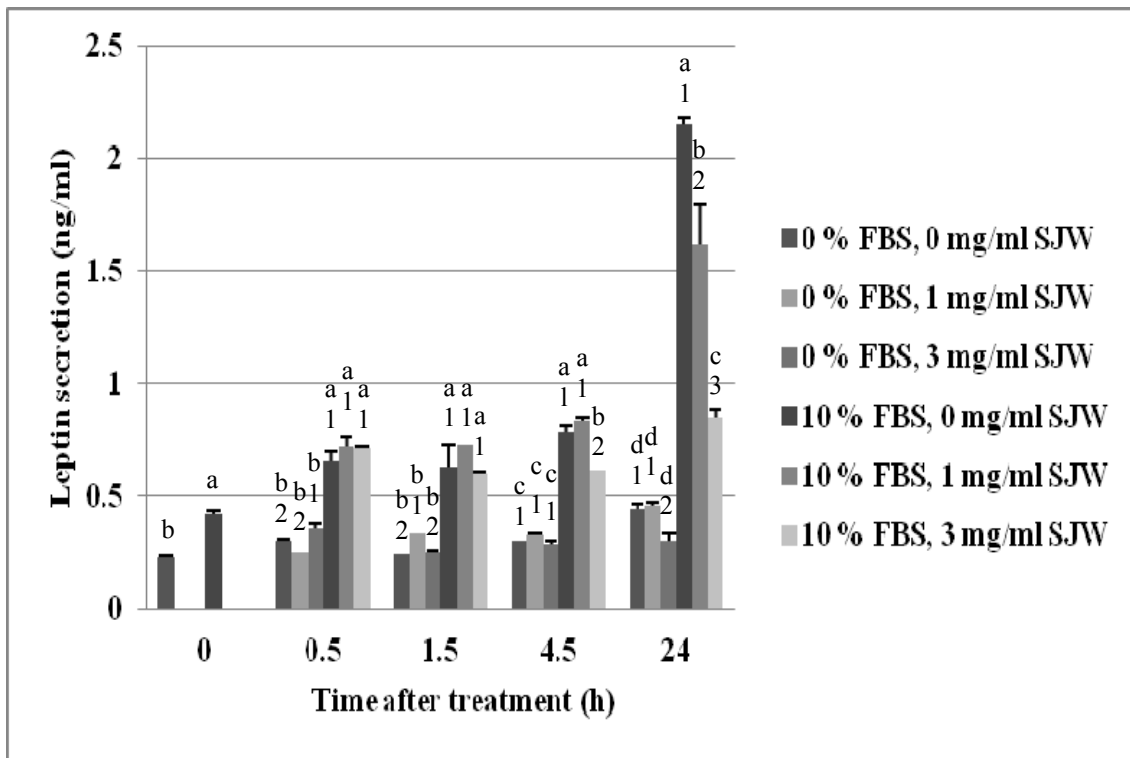


圖 16 SJW 對 3T3-L1 脂肪細胞 Leptin 分泌量之影響。將 3T3-L1 脂肪細胞之培養液更換為 DMEM-0 或 DMEM-10，經 15 小時後 (basal)，再各別以 0、1、3 mg/ml 之 SJW 刺激，經刺激後第 0、0.5、1.5、4.5、24 小時，收集培養液，經由 Leptin 含量分析，確認 SJW 對 3T3-L1 脂肪細胞 Leptin 分泌量之影響。

Figure 16 Effects of St. John's wort extracts on Leptin release in 3T3-L1 adipocytes.

Values are means \pm SEM, $n=2$, ^{a-d}: values in the same bar with different superscript letters were significantly different ($P < 0.05$), ¹⁻³: values in the same bar with different superscript numbers were significantly different ($P < 0.05$).

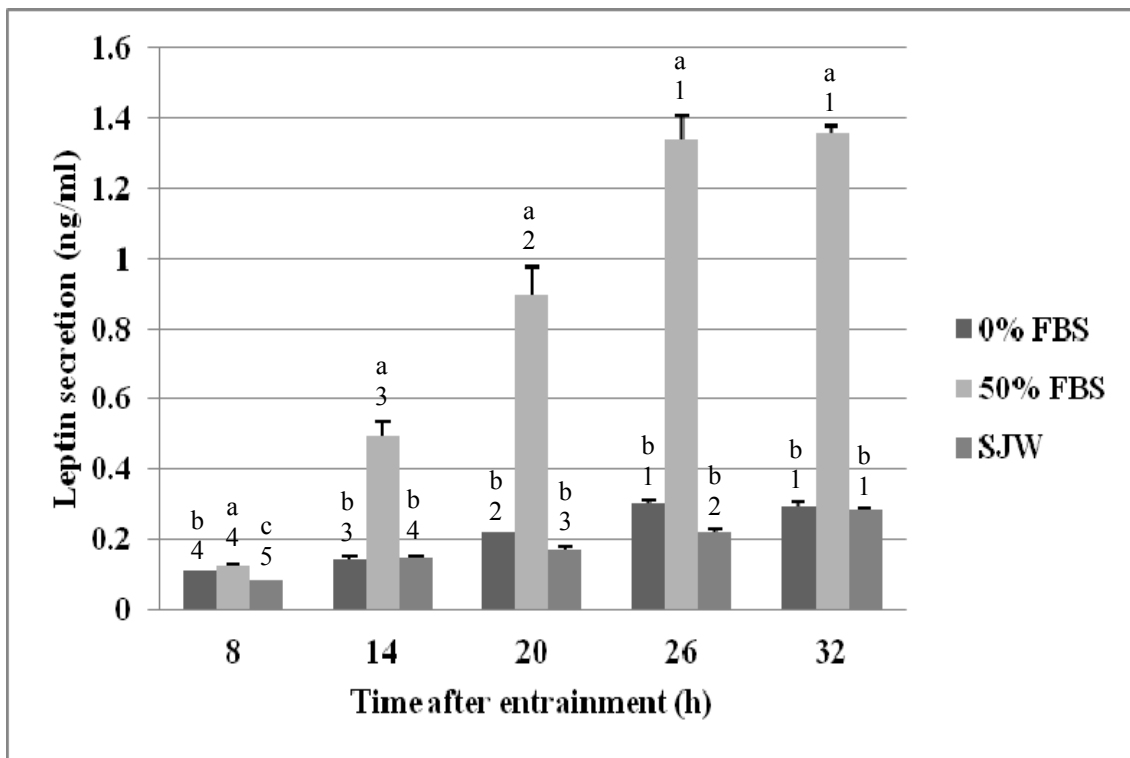


圖 17 SJW 或高劑量血清對 3T3-L1 脂肪細胞 Leptin 節律性變化的影響 (細胞經同步化作用後培養於 DMEM-0)。以 0 % FBS、0 % FBS 並添加 SJW 及 50 % FBS 之培養液刺激細胞同步化作用，2 小時後將培養液改為 DMEM-0，經刺激後第 8、14、20、26、32 小時，收集培養液，經由 Leptin 含量分析，確認同步化刺激對 3T3-L1 脂肪細胞 Leptin 節律性變化之影響。

Figure 17 Effects of St. John's wort extracts or serum shock on the circadian pattern of Leptin release in 3T3-L1 adipocytes (Adipocytes were incubated in DMEM-0 after entrainment) . Values are means \pm SEM, n=3, ^{a-c}: values in the same bar with different superscript letters were significantly different ($P < 0.05$), ¹⁻⁵: values in the same bar with different superscript numbers were significantly different ($P < 0.05$).

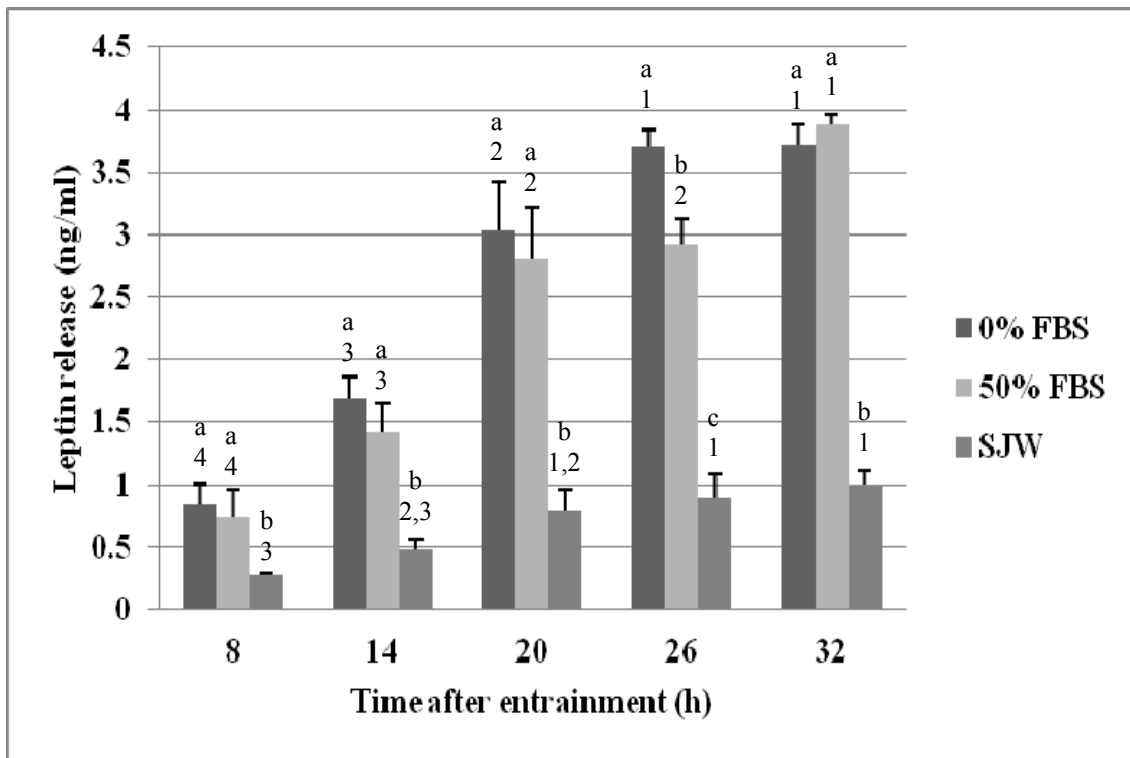


圖 18 SJW 或高劑量血清對 3T3-L1 脂肪細胞 Leptin 節律性變化的影響 (細胞經同步化作用後培養於 DMEM-10)。以 0% FBS-0% FBS 並添加 SJW 及 50% FBS 之培養液刺激細胞同步化作用，2 小時後將培養液改為 DMEM-10，經刺激後第 8、14、20、26、32 小時，收集培養液，經由 Leptin 含量分析，確認同步化刺激對 3T3-L1 脂肪細胞 Leptin 節律性變化之影響。

Figure 18 Effects of St. John's wort extracts or serum shock on the circadian pattern of Leptin release in 3T3-L1 adipocytes (Adipocytes were incubated in DMEM-10 after entrainment). Values are means \pm SEM, $n=3$, ^{a-c}: values in the same bar with different superscript letters were significantly different ($P < 0.05$), ¹⁻⁴: values in the same bar with different superscript numbers were significantly different ($P < 0.05$).

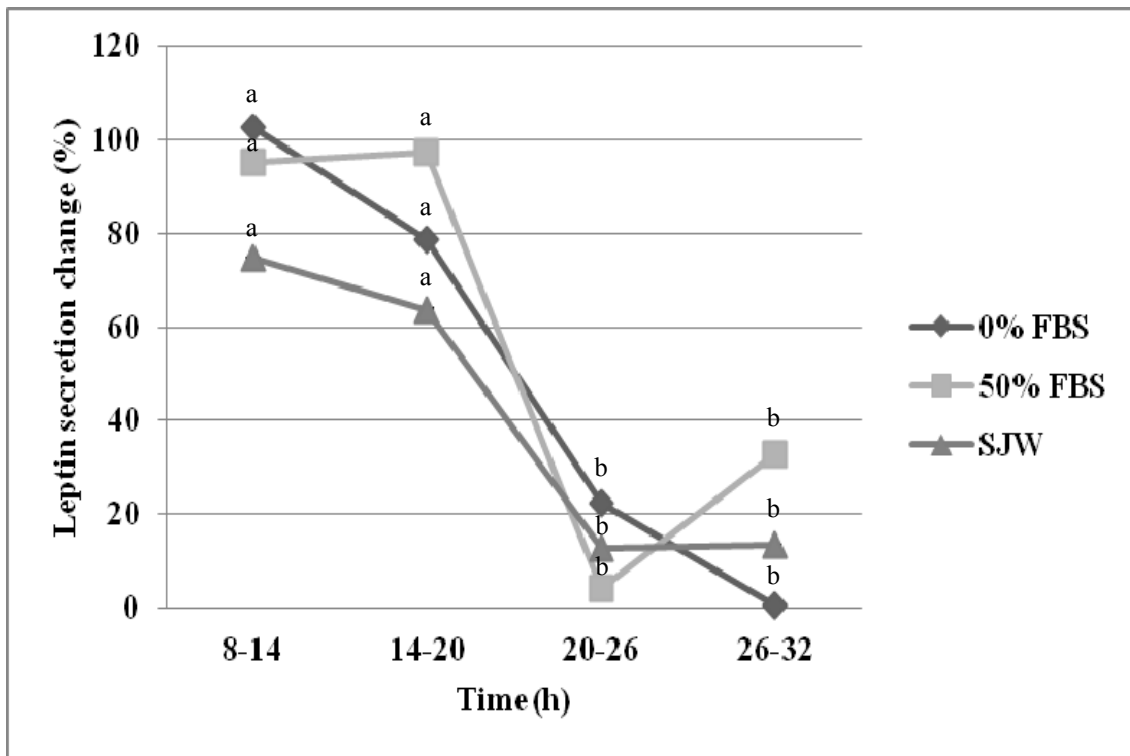


圖 19 SJW 或高劑量血清對 3T3-L1 脂肪細胞 Leptin 分泌量改變之節律表現的影響。以 0 % FBS、0 % FBS 並添加 SJW 及 50 % FBS 之培養液刺激細胞同步化作用，2 小時後將培養液改為 DMEM-10，經刺激後第 8、14、20、26、32 小時，收集培養液，分析 Leptin 含量，以培養時間每間隔 6 小時所得數值進一步計算，藉以確認同步化刺激對 3T3-L1 脂肪細胞 Leptin 分泌量改變之節律表現之影響。

Figure 19 Effects of St. John's wort extracts or serum shock on the circadian expression patterns of Leptin secretion change in 3T3-L1 adipocytes. Leptin secretion change is determined by the concentration of leptin at the beginning of each periods of 6 hours culture. Values are means \pm SEM, $n=3$, ^{a-b}: values in the same bar with different superscript letters were significantly different ($P < 0.05$).

參考文獻

- 陳品錡。2006。聖約翰草對 3T3-L1 脂肪細胞生成作用之影響。碩士論文。東海大學。台中。
- 王薇淳、鄧資新、陳珠亮。2007。聖約翰草萃取物對肉雞脂肪細胞分化之影響。東海學報 48: 9-14。
- Abe, H., B. Rusak, and H. A. Robertson. 1991. Photic induction of Fos protein in the suprachiasmatic nucleus is inhibited by the NMDA receptor antagonist MK-801. *Neurosci. Lett.* 127: 9-12.
- Agostinis, P., A. Vandenbogaerde, A. Donella-Deana, L. A. Pinna, K. T. Lee, J. Goris, W. Merlevede, J. R. Vandenheede, P. A. M. de Witte. 1995. Photosensitized inhibition of growth factor-regulated protein kinases by hypericin. *Biochem. Pharmacol.* 49: 1615-1622.
- Ahima, R. S., and J. S. Flier. 2000. Leptin. *Annu. Rev. Physiol.* 62: 413-437.
- Ahmadian, M., R. E. Duncan, K. Jaworski, E. Sarkadi-Nagy, and H.S. Sul. 2007. Triacylglycerol metabolism in adipose tissue. *Future Lipidology* 2: 229-237.
- Ahmadian, M., Y. Wang, and H. S. Sul. 2010. Lipolysis in adipocytes. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 42: 555-559.
- Ahren, B., S. Mansson, R. L. Gingerich, and P. J. Havel. 1997. Regulation of plasma leptin in mice: influence of age, high-fat diet, and fasting. *Am. J. Physiol.* 273: 113-120.
- Akashi, M. and T. Takumi. 2005. The orphan nuclear receptor ROR α regulates circadian transcription of the mammalian core-clock Bmal1. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 12: 441-448.
- Albright, A. L., and J. S. Stern. 1998. Adipose tissue. In: *Encyclopedia of Sports Medicine and Science*. Online Available: www.sportsci.org/encyc/adipose.html.

- Amini, Z., B. Boyd, J. Doucet, D. M. Ribnicky, and J. M. Stephens. 2009. St. John's Wort inhibits adipocyte differentiation and induces insulin resistance in adipocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 338: 146-149.
- Aoyagi, T., S. Shimba, and M. Tezuka. 2005. Characteristics of circadian gene expressions in mice white adipose tissue and 3T3-L1 adipocytes. *J. Health Sci.* 51: 21-32.
- Arita, Y., S. Kihara, N. Ouchi, M. Takahashi, K. Maeda, J. Miyagawa, K. Hotta, I. Shimomura, T. Nakamura, K. Miyaoka, H. Kuriyama, M. Nishida, S. Yamashita, K. Okubo, K. Matsubara, M. Muraguchi, Y. Ohmoto, T. Funahashi, and Y. Matsuzawa. 1999. Paradoxical decrease of an adipose-specific protein, adiponectin, in obesity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 257: 79-83.
- Attie, A. D., and P. E. Scherer. 2009. Adipocyte metabolism and obesity. *J. Lipid Res.* 50: S395-S399.
- Balsalobre, A., F. Damiola, and U. Schibler. 1998. A serum shock induces circadian gene expression in mammalian culture cells. *Cell* 93: 929-937.
- Barak, Y., M. C. Nelson, E. S. Ong, Y. Z. Jones, P. Ruiz-Lozano, K. R. Chien, A. Koder, and R. M. Evans. 1999. PPAR γ is required for placental, cardiac, and adipose tissue development. *Mol. Cell* 4: 585-595.
- Barnea, M., Z. Madar, and O. Froy. 2013. Dexamethasone induces high-amplitude rhythms in preadipocytes, But hinders circadian expression in differentiated adipocytes. *Chronobiology International* 30: 837-842.
- Barnes, J., L. A. Anderson, and J. D. Phillipson. 2001. St. John's wort (*Hypericum perforatum* L.): a review of its chemistry, pharmacology and clinical properties. *J. Pharm. Pharmacol.* 53: 583-600.
- Becker, D. J., L. N. Ongemba, V. Brichard, J. C. Henquin, and S. M. Brichard. 1995. Diet and diabetes-induced changes of ob gene expression in rat adipose tissue.

FEBS Lett. 371: 324-328.

Berg, A. H., T. P. Combs, and P. E. Scherer. 2002. Acrp30/adiponectin: an adipocytokine regulating glucose and lipid metabolism. *Trends Endocrinol. Metab.* 13: 84-89.

Bilia, A. R. M. C. Bergonzi, F. Morgenni, G. Mazzi, F. F. Vincieri. 2001. Evaluation of chemical stability of St. John's wort commercial extract and some preparations. *Int. J. Pharm.* 213: 199-208.

Boden, G., X. Chen, M. Mozzoli, and I. Ryan. 1996. Effect of fasting on serum leptin in normal human subject. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 81: 3419-3423.

Bombardelli, E. and P. Morazzoni. 1995. *Hypericum perforatum*. *Fitoterapia* 66: 43-68.

Boord, J. B., S. Fazio, and M. F. Linton. 2002. Cytoplasmic fatty acid-binding proteins: emerging roles in metabolism and atherosclerosis. *Curr. Opin. Lipidol.* 13: 141-147.

Brasaemle, D. L. 2007. The perilipin family of structural lipid droplet proteins: stabilization of lipid droplets and control of lipolysis. *J. Lipid Res.* 48: 2547-2559.

Brasaemle, D. L., B. Rubin, I. A. Harten, J. Gruia-Gray, A. R. Kimmel, and C. Londos. 2000. Perilipin A increases triacylglycerol storage by decreasing the rate of triacylglycerol hydrolysis. *J. Biol. Chem.* 275: 38486-38493.

Bray, M. S., and M. E. Young. 2006. Circadian rhythms in the development of obesity: potential role for the circadian clock within the adipocyte. *Obes. Rev.* 8: 169-181.

Bressler, R., and S. J. Wakil. 1961. Studies on the mechanism of fatty acid synthesis: the conversion of malonyl coenzyme A to long chain fatty acid. *J. Biol. Chem.* 236: 1643-1651.

- Brown, D. A. 2001. Lipid droplets: proteins floating on a pool of fat. *Curr. Biol.* 11: 446-449.
- Bruder, S. P., D. J. Fink, and A. I. Caplan. 1994. Mesenchymal stem cells in bone development, bone repair, and skeletal regeneration therapy. *J. Cell Biochem.* 56: 283-294.
- Bruun, J. M., S. B. Pedersen, and B. Richelsen. 2001. Regulation of interleukin 8 production and gene expression in human adipose tissue in vitro. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 86: 1267-1273.
- Burris, T. P. 2008. Nuclear hormone receptors for heme: Rev-erbalpha and rev-erbbeta are ligand-regulated components of the mammalian clock. *Mol. Endocrinol.* 22: 1509-1520.
- Campfield, L., F. Smith, Y. Gulsez, R. Devos, and P. Burn. 1995. Mouse OB protein: evidence for a peripheral signal linking adiposity and central neural networks. *Science* 269: 546-549.
- Cannon, B., and J. Nedergaard. 2004. Brown adipose tissue: function and physiological significance. *Physiol. Rev.* 84: 277-359.
- Carmen, G. Y., and S. M. Victor. 2006. Signalling mechanisms regulating lipolysis. *Cell Signal* 18: 401-408.
- Chaloupka, R., T. Obšil, J. Plasek, and F. Sureau. 1999. The effect of hypericin and hypocrellin-A on lipid membranes and membrane potential of 3T3 fibroblasts. *Biochim. Biophys. Acta* 1418: 39-47.
- Chapman, A. B., D. M. Knight, B. S. Dieckmann, and G. M. Ringold. 1984. Analysis of gene expression during differentiation of adipogenic cells in culture and hormonal control of the development program. *J. Bio. Chem.* 259: 15548-15555.
- Chatterjee, S., V. Filippov, P. Lishiko, O. Maximyuk, and O. Nöldner Krishtal. 1999. Hyperforin attenuates various ionic conductance mechanisms in the isolated

- hippocampal neurons of rat. *Life Sci.* 65: 2045–2395.
- Chen, H., O. Charlat, L. A. Tartaglia, E. A. Woolf, X. Weng, S. J. Ellis, N. D. Lakey, J. Culpepper, K. J. Moore, R. E. Breitbart, G. M. Duyk, R. I. Tepper, and J. P. Morgenstern. 1996. Evidence that the diabetes gene encodes the leptin receptor: identification of a mutation in the leptin receptor gene in db/db mice. *Cell* 84: 491-495.
- Chien, P. J., Y. C. Chen, S. C. Lu, and F. Sheu. 2005. Dietary flavonoids suppress adipogenesis in 3T3-L1 preadipocytes. *J. Food Drug Anal.* 13: 168-175.
- Chmurzynska, A. 2006. The multigene family of fatty acid-binding proteins (FABPs): function, structure and polymorphism. *J. Appl. Genet.* 47: 39-48.
- Chou, T. C., T. E. Scammell, J. J. Gooley, S. E. Gaus, C. B. Saper, and J. Lu. 2003. Critical role of dorsomedial hypothalamic nucleus in a wide range of behavioral circadian rhythms. *J. Neurosci.* 23: 10691-10702.
- Chrousos, G. P. 1998. Ultradian, circadian, and stress-related hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity- a dynamic digital-to-analog modulation. *Endocrinology* 139: 437-440.
- Coe, N. R., M. A. Simpson, and D. A. Bernlohr. 1999. Targeted disruption of the adipocyte lipid-binding protein (aP2 protein) gene impairs fat cell lipolysis and increases cellular fatty acid levels. *J. Lipid Res.* 40: 967-972.
- Coleman, R. A., and D. P. Lee. 2004. Enzymes of triacylglycerol synthesis and their regulation. *Prog. Lipid Res.* 43: 134-176.
- Couldwell, W. T., R. Gopalakrishna, D. R. Hinton, S. He, M. H. Weiss, R. E. Law, M. L. Apuzzo. 1994. Hypericin: a potential antiglioma therapy. *Neurosurgery* 35: 705-710.
- Csokay, B., N. Prajda, G. Weber, and E. Olah. 1997. Molecular mechanisms in the antiproliferative action of quercetin. *Life Sci.* 60: 2157-2163.

- Damiola, F., N. Le Minh, N. Preitner, B. Kornmann, F. Fleury-Olela, and U. Schibler. 2000. Restricted feeding uncouples circadian oscillators in peripheral tissues from the central pacemaker in the suprachiasmatic nucleus. *Genes Dev.* 14: 2950-2961.
- de Oliveira, C., A. B. de Mattos, C. Biz, L. M. Oyama, E. B. Ribeiro, C. M. do Nascimento. 2011. High-fat diet and glucocorticoid treatment cause hyperglycemia associated with adiponectin receptor alterations. *Lipids in Health and Disease* 10: 11.
- de Witte, P. A. M., P. Agostinis, J. van Lint, W. Merlevede, and J. R. Vandenheede. 1993. Inhibition of epidermal growth factor receptor tyrosine kinase activity by hypericin. *Biochem. Pharmacol.* 46: 1929-1936.
- DeBruyne, J. P., E. Noton, C. M. Lambert, E. S. Maywood, D. R. Weaver, and S. M. Reppert. 2006. A clock shock: mouse CLOCK is not required for circadian oscillator function. *Neuron* 50: 465-477.
- Delezie, J., S. Dumont, H. Dardente, H. Oudart, A. Grechez-Cassiau, P. Klosen, M. Teboul, F. Delaunay, P. Pevet, and E. Challet. 2012. The nuclear receptor REV-ERB α is required for the daily balance of carbohydrate and lipid metabolism. *FASEB J.* 26: 3321-3335.
- Delporte, M. L., E. I. Mkaem, S. A., M. Quisquater, and S. M. Brichard. 2004. Leptin treatment markedly increased plasma adiponectin but barely decreased plasma resistin of ob/ob mice. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 287: E446-E453.
- Desvergne, B., and W. Wahli. 1999. Peroxisome Proliferator-Activated Receptors: Nuclear Control of Metabolism. *Endocr. Rev.* 20: 649-688.
- Dibner, C., U. Schibler., and U. Albrecht. 2010. The mammalian circadian timing system: organization and coordination of central and peripheral clocks. *Annu.*

Rev. Physiol. 72: 517-549.

Dipple, K. M., Y. H. Zhang, B. L. Huang, L. L. McCabe, J. Dallongerille, T. Inokuchi, M. Kimura, H. J. Marx, G. O. Roederer, V. Shih, S. Yamaguchi, I. Yoshida, and E. R. McCabe. 2001. Glycerol kinase deficiency: Evidence for complexity in a single gene disorder. *Hum. Genet.* 109: 55-62.

Duez, H., J. N. van der Veen, C. Duhem, B. Pourcet, T. Touvier, C. Fontaine, B. Derudas, E. Bauge, R. Havinga, V. W. Bloks, H. Wolters, F. H. van der Sluijs, B. Vennström, F. Kuipers, B. Staels. 2008. Regulation of bile acid synthesis by the nuclear receptor Rev-erb α . *Gastroenterology* 135: 689 -698.

Duncan, R. E., M. Ahmadian, K. Jaworski, E. Sarkadi-Nagy, and H. S. Sul. 2007. Regulation of lipolysis in adipocytes. *Annu. Rev. Nutr.* 27: 79-101.

Eckel-Mahan, K., and P. Sassone-Corsi. 2009. Metabolism control by the circadian clock and vice versa. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 16: 462–467.

Egan, J. J., A. S. Greenberg, M-K. Chang, and C. Londos. 1990. Control of endogenous phosphorylation of the major CAMP-dependent protein kinase substrate in adipocytes by insulin and 8-adrenergic stimulation. *J. Biol. Chem.* 265: 18769-18775.

Fajas, L., J. C. Fruchart, and J. Auwerx. 1998. PPARgamma3 mRNA: a distinct PPARg mRNA subtype transcribed from an independent promoter. *FEBS Lett.* 438: 55-60.

Farmer, S. R. 2006. Transcriptional control of adipocyte formation. *Cell Metab.* 4: 263-273.

Festuccia, W. T., M. Laplante, M. Berthiaume, Y. Gelinias, and Y. Deshaies. 2006. PPARgamma agonism increases rat adipose tissue lipolysis, expression of glyceride lipases, and the response of lipolysis to hormonal control. *Diabetologia* 49: 2427-2436.

- Font de Mora, J., A. Porras, N. Ahn, and E. Santos. 1997. Mitogenactivated protein kinase activation is not necessary for, but antagonizes, 3T3-L1 adipocytic differentiation. *Mol. Cell Biol.* 17: 6068-6075.
- Frias, J. P., J. G. Yu, Y. T. Kruszynska, and J. M. Olefsky. 2000. Metabolic effects of troglitazone therapy in type 2 diabetic, obese, and lean normal subjects. *Diabetes Care* 23: 64-69.
- Froy, O. 2010. Metabolism and circadian rhythms—implications for obesity. *Endocr. Rev.* 31: 1-24.
- Froy, O., and N. Chapnik. 2007. Circadian oscillation of innate immunity components in mouse small intestine. *Mol. Immunol.* 44: 1964-1970.
- Fruebis, J., T. S. Tsao, S. Javarschi, D. Ebbets-Reed, M. R. Erickson, F. T. Yen, B. E. Bihain, and H. F. Lodish. 2001. Proteolytic cleavage product of 30-kDa adipocyte complement-related protein increases fatty acid oxidation in muscle and causes weight loss in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 98: 2005-2010.
- Fujita, K., N. Maeda, M. Sonoda, K. Ohashi, T. Hibuse, H. Nishizawa, M. Nishida, A. Hiuge, A. Kurata, S. Kihara, I. Shimomura, and T. Funahashi. 2008. Adiponectin protects against angiotensin II-induced cardiac fibrosis through activation of PPAR- α . *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 28: 863-870.
- Galeotti, N., E. Vivoli, A. R. Bilia, F. F. Vincieri, and C. Ghelardini. 2010. St. John's Wort reduces neuropathic pain through a hypericin-mediated inhibition of the protein kinase C gamma and epsilon activity. *Biochem. Pharmacol.* 79: 1327-1336.
- Galic, S., J. S. Oakhill, and G. R. Steinberg, 2010. Adipose tissue as an endocrine organ. *Mol. Cell Endocrinol.* 316: 129-139.
- Garbarino-Pico, E., S. Niu, M. D. Rollag, C. A. Strayer, J. C. Besharse, and C. B. Green. 2007. Immediate early response of the circadian polyA ribonuclease

- nocturnin to two extracellular stimuli. *RNA* 13: 745-755.
- Gimeno, R. E. and L. D. Klaman. 2005. Adipose tissue as an active endocrine organ: recent advances. *Curr. Opin. Pharmacol.* 5: 122-128.
- Graves, R. A., P. Tontonoz, and B. M. Spiegelman. 1992. Analysis of a tissue-specific enhancer: ARF6 regulates adipogenic gene expression. *Mol. Cell Biol.* 12: 1202-1208.
- Green, H. and M. Meuth. 1974a. An established pre-adipose cell line and its differentiation in culture. *Cell* 3: 127-133.
- Green, H. and O. Kehinde. 1974b. Sublines of mouse 3T3 cells that accumulate lipid. *Cell* 1: 113-116.
- Green, H. and O. Kehinde. 1975. An established preadipose cell line and its differentiation in culture. II. Factors affecting the adipose conversion. *Cell* 5: 19-27.
- Green, H. and O. Kehinde. 1976. Spontaneous heritable changes leading to increased adipose conversion in 3T3 cells. *Cell* 7: 105-113.
- Greenberg, A. S., J. J. Egan, S. A. Wek, M. C. Moos, Jr., C. Londos, and A. R. Kimmel. 1993. Isolation of cDNAs for perilipins A and B: Sequence and expression of lipid droplet-associated proteins of adipocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 90: 12035-12039.
- Greenberg, A. S., J. J. Egan, S. A. Wek, N. B. Garty, E. J. Blanchette-Mackie, and C. Londos. 1991. Perilipin, a major hormonally regulated, adipocyte-specific phosphoprotein associated with the periphery of lipid storage droplets. *J. Biol. Chem.* 266: 11341-11346.
- Gregoire, F. M., C.M. Smas, and H.S. Sul. 1998. Understanding adipocyte differentiation. *Physiol. Rev.* 78: 783-809.
- Grimaldi, B., M. M. Bellet, S. Katada, G. Astarita, J. Hirayama, R. H. Amin, J. G.

- Granneman, D. Piomelli, T. Leff, and P. Sassone-Corsi. 2010. PER2 controls lipid metabolism by direct regulation of PPAR γ . *Cell Metab.* 12: 509-520.
- Haemmerle, G., R. Zimmermann, M. Hayn, C. Theussl, G. Waeg, E. Wagner, W. Sattler, T. M. Magin, and R. Zechner. 2002. Hormone-sensitive lipase deficiency in mice causes diglyceride accumulation in adipose tissue, muscle, and testis. *J. Biol. Chem.* 277: 4806-4815.
- Halaas, J. L., K. S. Gajiwala, M. Maffei., S. L. Cohen, B. T. Chait, D. Rabinowitz, R. L. Lallone, S. K. Burley, and J. M. Freidman. 1995. Weight reducing effects of the plasma protein encoded by the obese gene. *Science* 269: 543-546.
- Halleux, C. M., M. Takahashi, M. L. Delporte, R. Detry, T. Funahashi, Y. Matsuzawa, and S. M. Brichard. 2001. Secretion of adiponectin and regulation of apM1 gene expression in human visceral adipose tissue. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 288: 1102-1107.
- Hardie, L. J., D. V. Rayner, S. Holmes, and P. Trayhurn. 1996. Circulating leptin levels are modulated by fasting, cold exposure and insulin administration in lean but not Zucker (fa/fa) rats as measured by ELISA. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 223: 660-665.
- Harrington, M. E., and B. Rusak. 1986. Lesions of the thalamic intergeniculate leaflet alter hamster circadian rhythms. *J. Biol. Rhythms.* 1: 309-325.
- Havel, P. J. 2000. Role of adipose tissue in body-weight regulation: mechanisms regulating leptin production and energy balance. *Proc. Nutr. Soc.* 59: 359-371.
- Hogenesch, J. B., Y. Z. Gu, S. Jain, and C. A. Bradfield. 1998. The basic-helix-loop-helix-PAS orphan MOP3 forms transcriptionally active complexes with circadian and hypoxia factors. *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.* 95: 5474-5479.
- Holm, C. 2003. Molecular mechanisms regulating hormone-sensitive lipase and

- lipolysis. *Biochem. Soc. Trans.* 31: 1120-1124.
- Holm, C., T. G. Kirchgessner, K. L. Svenson, G. Fredrikson, S. Nilsson, C. G. Miller, J. E. Shively, C. Heinzmann, R. S. Sparkes, and T. Mohandas. 1988. Hormone-sensitive lipase: sequence, expression, and chromosomal localization to 19 cent-q13. *Science* 241: 1503-1506.
- Holst, L. S., D. Langin, H. Mulder, H. Laurell, J. Grober, A. Bergh, H. W. Mohrenweiser, G. Edgren, and C. Holm. 1996. Molecular cloning, genomic organization, and expression of a testicular isoform of hormone-sensitive lipase. *Genomics* 35: 441-447.
- Hu, E., P. Liang, and B. M. Spiegelman. 1996. AdipoQ is a novel adipose-specific gene dysregulated in obesity. *J. Biol. Chem.* 18: 10697-10703.
- Huang, W., K. M. Ramsey, B. Marcheva, and J. Bass. 2011. Circadian rhythms, sleep, and metabolism. *J. Clin. Invest.* 121: 2133-2141.
- Iida, M., T. Murakami, K. Ishida, A. Mizuno, M. Kuwajima, and K. Shima. 1996. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 224: 597-604.
- Inoue, I., Y. Shinoda, M. Ikeda, K. Hayashi, K. Kanazawa, M. Nomura, T. Matsunaga, H. Xu, S. Kawai, T. Awata, T. Komoda, and S. Katayama. 2005. CLOCK/BMAL1 is involved in lipid metabolism via transactivation of the peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) response element. *J. Atheroscler. Thromb.* 12: 169-174.
- Inzucchi, S. E., D. G. Maggs, G. R. Spollett, S. L. Page, F. S. Rife, V. Walton, and G. I. Shulman. 1998. Efficacy and metabolic effects of metformin and troglitazone in type II diabetes mellitus. *N. Engl. J. Med.* 338: 867-872.
- Ivan, H. 1979. Preliminary investigations on the application of *Hypericum perforatum* in herpes therapy. *Gyogyszereszet* 23: 217-218.
- Jaworski, K., E. Sarkadi-Nagy, R. E. Duncan, M. Ahmadian, and H. S. Sul. 2007.

Regulation of triglyceride metabolism: IV. Hormonal regulation of lipolysis in adipose tissue. *Am. J. Physiol. Gastrointest Liver Physiol.* 293: G1-G4.

Johne, A., J. Schmider, J. Brockmoller, A. M. Stadelmann, E. Stormer, S. Bauer, G. Scholler, M. Langheinrich, and I. Roots. 2002 Decreased plasma levels of amitriptyline and its metabolites on comedication with an extract from St. John's wort (*Hypericum perforatum*). *J. Clin. Psychopharmacol.* 22: 46-54.

Kadowaki, T., and T. Yamauchi. 2005. Adiponectin and adiponectin receptors. *Endocr. Rev.* 26: 439-451.

Kadowaki, T., T. Yamauchi, N. Kubota, K. Hara, K. Ueki, and K. Tobe. 2006. Adiponectin and adiponectin receptors in insulin resistance diabetes, and the metabolic syndrome. *J. Clin. Invest.* 116: 1784-1792.

Kallen, C. B., and M. A. Lazar. 1996. Antidiabetic thiazolidinediones inhibit leptin (ob) gene expression in 3T3-L1 adipocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93: 5793-5796.

Karbowska, J., and Z. Kochan. 2005. Effect of DHEA on endocrine functions of adipose tissue, the involvement of PPAR gamma. *Biochem. Pharmacol.* 70: 249-57.

Kershaw, E. E., and J. S. Flier. 2004. Adipose tissue as an endocrine organ. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 89: 2548-2556.

Kil, K. S., Y. N. Yum, S. H. Seo, and K. T. Lee. 1996. Antitumor activities of hypericin as a protein tyrosine kinase blocker. *Arch. Pharmacol. Res.* 19: 490-496.

Kim, S. Y., J. J. Gao, and H. K. Kang. 2000. Two flavonoids from the leaves of *Morus alba* induce differentiation of the human promyelocytic leukemia (HL-60) cell line. *Biol. Pharm. Bull.* 23: 451-455.

Ko, C. H., and J. S. Takahashi. 2006. Molecular components of the mammalian

- circadian clock. *Hum. Mol. Genet.* 15: R271-R277.
- Kohn, A. D., S. A. Summers, M. J. Birnbaum, and R. A. Roth. 1996. Expression of a constitutively active Akt Ser/Thr kinase in 3T3-L1 adipocytes stimulates glucose uptake and glucose transporter 4 translocation. *J. Biol. Chem.* 271: 31372-31378.
- Kolaczynski, J. W., J. P. Ohannesian, R. V. Considine, C. C. Marco, and J. F. Caro. 1996. Response of leptin to short-term and prolonged overfeeding in humans. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 81: 4162-4165.
- Kraemer, F. B., and W.-J. Shen. 2002. Hormone-sensitive lipase: control of intracellular tri-(di-)acylglycerol and cholesteryl ester hydrolysis. *J. Lipid Res.* 43: 1585-1594.
- Krusekopf, S. and L. Roots. 2005. St. John's wort and its constituent hyperforin concordantly regulate expression of genes encoding enzymes involved in basic cellular pathways. *Pharmacogenet. Genom.* 15: 817-829.
- Kubota, N., Y. Terauchi, T. Yamauchi, T. Kubota, Moroi M, J. Matsui, K. Eto, T. Yamashita, J. Kamon, H. Satoh, W. Yano, R. Nagai, S. Kimura, T. Kadowaki, and T. Noda. 2002. Disruption of adiponectin causes insulin resistance and neointimal formation. *J. Biol. Chem.* 277: 25863-25866.
- Kuppusamy, U. R. and N. P. Das. 1994. Potentiation of beta-adrenoceptor agonist-mediated lipolysis by quercetin and fisetin in isolated rat adipocytes. *Biochem. Pharmacol.* 47: 521-529.
- Lago, F., R. G'omez, J. J. G'omez-Reino, C. Dieguez, and O. Gualillo. 2009. Adipokines as novel modulators of lipid metabolism. *Trends Biochem. Sci.* 34 : 500-510.
- Laposky, A. D., J. Shelton, J. Bass, C. Dugovic, N. Perrino, and F. W. Turek. 2006. Altered sleep regulation in leptin-deficient mice. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 290: 894-903.

- Lawvere, S., and M. C. Mahoney. 2005. St. John's wort. *Am. Fam. Physician.* 72: 2249-2254.
- Lee, C., D. R. Weaver, and S. M. Reppert. 2004. Direct association between mouse PERIOD and CKIepsilon is critical for a functioning circadian clock. *Mol. Cell Biol.* 24: 584-594.
- Lee, C., J. P. Etchegaray, F. R. Cagampang, A. S. Loudon, and S. M. Reppert. 2001. Posttranslational mechanisms regulate the mammalian circadian clock. *Cell* 107: 855-867.
- Lehmann, J. M., J. M. Lenhard, B. B. Oliver, G. M. Ringold, and S. A. Kliewer. 1997. Peroxisome proliferator-activated receptors α and γ are activated by indomethacin and other non-steroidal anti-inflammatory drugs. *J. Biol. Chem.* 272: 3406-3410.
- Linde, K. 2009. St. John's wort – an overview. *Forsch Komplementmed.* 16: 146-155.
- Londos, C., D. L. Brasaemle, C. J. Schultz, J. P. Segrest, and A. R. Kimmel. 1999. Perilipins, ADRP, and other proteins that associate with intracellular neutral lipid droplets in animal cells. *Semin. Cell Dev. Biol.* 10: 51-58.
- Lu, J., Y. H. Zhang, T. C. Chou, S. E. Gaus, J. K. Elmquist, P. Shiromani, and C. B. Saper. 2001. Contrasting effects of ibotenate lesions of the paraventricular nucleus and subparaventricular zone on sleep-wake cycle and temperature regulation. *J. Neurosci.* 21: 4864-4874.
- Lu, X., J. Gruia-Gray, N. G. Copeland, D. J. Gilbert, N. A. Jenkins, C. Londos, and A. R. Kimmel. 2001. The murine perilipin gene: the lipid droplet-associated perilipins derive from tissue-specific, mRNA splice variants and define a gene family of ancient origin. *Mammalian Genome* 12: 741-749.
- Ma, K., R. Xiao, H.-T. Tseng, L. Shan, L. Fu, and D. D. Moore. 2009. Circadian Dysregulation Disrupts Bile Acid Homeostasis. *PLoS ONE* 4: E6843-E6852.

- MacDougald, O. A., and M. D. Lane. 1995. Transcriptional regulation of gene expression during adipocyte differentiation. *Annu. Rev. Biochem.* 64: 345-373.
- Mackay, A. M., S. C. Beck, J. M. Murphy, F. P. Barry, C. O. Chichester, and M. F. Pittenger. 1998. Chondrogenic Differentiation of Cultured Human Mesenchymal Stem Cells from Marrow. *Tissue Eng.* 4: 415-428.
- Maeda, K., H. Cao, K. Kono, C. Z. Gorgun, M. Furuhashi, K. T. Uysal, Q. Cao, G. Atsumi, H. Malone, B. Krishnan, Y. Minokoshi, B. B. Kahn, R. A. Parker, and G. S. Hotamisligil. 2005. Adipocyte/macrophage fatty acid binding proteins control integrated metabolic responses in obesity and diabetes. *Cell Metab.* 1: 107-119.
- Maeda, K., K. Okubo, I. Shimomura, T. Funahashi, Y. Matsuzawa, and K. Matsubara. 1996. cDNA cloning and expression of a novel adipose-specific collagen-like factor, apM1 (adipose most abundant gene transcript 1). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 221: 286-289.
- Maeda, N., M. Takahashi, T. Funahashi, S. Kihara, H. Nishizawa, K. Kishida, H. Nagaretani, M. Matsuda, R. Komuro, N. Ouchi, H. Kuriyama, K. Hotta, T. Nakamura, I. Shimomura, and Y. Matsuzawa. 2001. PPAR γ ligands increase expression and plasma concentrations of adiponectin, an adipose-derived protein. *Diabetes* 50: 2094-2099.
- Mantzoros, C. S., D. Qu, R. C. Frederich, V. S. Susulic, B. B. Lowell, E. Maratos-Flier, and J. S. Flier. 1996. Activation of beta3 adrenergic receptors suppresses leptin expression and mediates a leptin-independent inhibition of food intake in mice. *Diabetes* 45: 909-914.
- Marcheva, B., K. M. Ramsey, E. D. Buhr, Y. Kobayashi, H. Su, C. H. Ko, G. Ivanova, C. Omura, S. Mo, M. H. Vitaterna, J. P. Lopez, L. H. Philipson, C. A. Bradfield, S. D. Crosby, L. JeBailey, X. Wang, J. S. Takahashi, J. Bass. 2010. Disruption of the clock components CLOCK and BMAL1 leads to

hypoinsulinaemia and diabetes. *Nature* 466: 627-631.

Marquez, S., P. Crespo, V. Carlini, E. Garbarino-Pico, R. Baler, B. L. Caputto, and M. E. Guido. 2004. The metabolism of phospholipids oscillates rhythmically in cultures of fibroblasts and is regulated by the clock protein PERIOD 1. *FASEB J.* 18: 519-521.

Martin, D. B., M. G. Horning, and P. R. Vagelos. 1961. Fatty acid synthesis in adipose tissue. I. Purification and properties of a long chain fatty acid-synthesizing system. *J. Biol. Chem.* 236: 663-668.

Martinez-Botas, J., J. B. Anderson, D. Tessier, A. Lapillonne, B. H. Chang, M. J. Quast, D. Gorenstein, K. H. Chen, and L. Chan. 2000. Absence of perilipin results in leanness and reverses obesity in *Lepr(db/db)* mice. *Nat. Genet.* 26: 474-479.

Mason, M. M., Y. He, H. Chen, M. J. Quon, and M. Reitman. 1998. Regulation of leptin promoter function by Sp1, C/EBP, and a novel factor. *Endocrinology* 139: 1013-1022.

Matsuzawa, Y., T. Funahashi, S. Kihara, I. and Shimomura. 2004. Adiponectin and metabolic syndrome. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 24: 29-33.

McTernan, P. G., A. L. Harte, L. A. Anderson, A. Green, S. A. Smith, J. C. Holder, A. H. Barnett, M. C. Eggo, and S. Kumar. 2002. Insulin and rosiglitazone regulation of lipolysis and lipogenesis in human adipose tissue in vitro. *Diabetes* 51: 1493-1498.

Michalik, L., J. Auwerx, J. P. Berger, V. K. Chatterjee, C. K. Glass, F. J. Gonzalez, P. A. Grimaldi, T. Kadowaki, M. A. Lazar, S. O'Rahilly, C. N. Palmer, J. Plutzky, J. K. Reddy, B. M. Spiegelman, B. Staels, and W. Wahli. 2006. International Union of Pharmacology. LXI. Peroxisome proliferator-activated receptors *Pharmacol. Rev.* 58: 726-741.

- Michalik, L., and W. Wahli. 1999. Peroxisome proliferator-activated receptors: three isotypes for a multitude of functions. *Curr. Opin. Biotechnol.* 10: 564-570.
- Miyazaki, Y., A. Mahankali, M. Matsuda, S. Mahankali, J. Hardies, K. Cusi, L. J. Mandarino, R. A. DeFronzo. 2002. Effect of pioglitazone on abdominal fat distribution and insulin sensitivity in type 2 diabetic patients. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 87: 2784-2791.
- Moore, L. B., B. Goodwin, S. A. Jones, G. B. Wisley, C. J. Serabjit-Singh, T. M. Willson, J. L. Collins, and S. A. Kliewer. 2000. St. John's wort induces hepat drug metabolism through activation of the pregnane X receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97: 7500-7502.
- Mulder, H., L. S. Holst, H. Svensson, E. Degerman, F. Sundler, B. Ahren, P. Rorsman, and C. Holm. 1999. Hormone-sensitive lipase, the rate-limiting enzyme in triglyceride hydrolysis, is expressed and active in beta-cells. *Diabetes* 48: 228-232.
- Mulder, H., M. Sörhede-Winzell, J. A. Contreras, M. Fex, K. Ström, T. Plong, H. Galbo, P. Arner, C. Lundberg, F. Sundler, B. Ahrén, and C. Holm. 2003. Hormone-sensitive lipase null mice exhibit signs of impaired insulin sensitivity whereas insulin secretion is intact. *J. Biol. Chem.* 278: 36380-36388.
- Müller, W. E. 2003. Current St. John's wort research from mode of action to clinical efficacy. *Pharmacol. Res.* 47: 101-109.
- Nagai, S., C. Shimizu, M. Umetsu, S. Taniguchi, I. Endo, H. Miyoshi, N. Yoshioka, M. Kubo, and T. Koike. 2004. Identification of a functional peroxisome proliferator-activated receptor responsive element within the murine perilipin gene. *Endocrinology* 145: 2346-2356.
- Nagoshi, E., C. Saini, C. Bauer, T. Laroche, F. Naef, and U. Schibler. 2004. Circadian gene expression in individual fibroblasts: Cell-autonomous and self-sustained

- oscillators pass time to daughter cells. *Cell* 119: 693-705.
- Nakahata, Y., M. Kaluzova, B. Grimaldi, S. Sahar, J. Hirayama, D. Chen, L. P. Guarente, and P. Sassone-Corsi. 2008. The NAD⁺-dependent deacetylase SIRT1 modulates CLOCK-mediated chromatin remodeling and circadian control. *Cell* 134: 329-340.
- Nakano, Y., T. Tobe, N. H. Choi-Miura, T. Mazda, and M. Tomita. 1996. Isolation and characterization of GBP28, a novel gelatin-binding protein purified from human plasma. *J. Biochem.* 120: 802-812.
- Nebel, A., B. J. Schneider, R. K. Baker, and D. J. Kroll. 1999. Potential metabolic interaction between St. John's wort and theophylline. *Ann. Pharmacother.* 33: 502.
- Negrel, R., P. Grimaldi, and G. Ailhaud. 1978. Establishment of preadipocyte clonal line from epidymal fat pad of ob/ob mouse that respond to insulin and to lipolytic hormone. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 75: 6054-6058.
- Notoya, M., Y. Tsukamoto, H. Nishimur, J. T. Woo, K. Nagai, I. S. Lee, and H. Hagiwara. 2004. Quercetin, a flavonoid, inhibits the proliferation, differentiation, and mineralization of osteoblasts in vitro. *Eur. J. Pharmacol.* 485: 89-96.
- Novakofski, J. 2004. Adipogenesis: usefulness of in vitro and in vivo experimental models. *J. Anim. Sci.* 82: 905-915.
- Ntambi, J. M., and K. Young-Cheul. 2000. Adipocyte differentiation and gene expression. *J. Nutr.* 130: 3122S-3126S.
- Okazaki, F., N. Matsunaga, H. Okazaki, N. Utoguchi, R. Suzuki, K. Maruyama, S. Koyanagi, and S. Ohdo. 2010. Circadian rhythm of transferrin receptor 1 gene expression controlled by c-Myc in colon cancer-bearing mice. *Cancer Res.* 70: 6238-6246.
- Onoue, S., Y. Seto, M. Ochi, R. Inoue, H. Ito, T. Hatano, and S. Yamada. 2011. In

- vitro photochemical and phototoxicological characterization of major constituents in St. John's Wort (*Hypericum perforatum*) extracts. *Phytochemistry* 72: 1814-1820.
- Otway, D. T., G. Frost, and J. D. Johnston. 2009. Circadian rhythmicity in murine preadipocyte and adipocyte cells. *Chronobiol. Int.* 26: 1340-1354.
- Pairault, J., and H. Green. 1979. A study of the adipose conversion of suspended 3T3 cells by using glycerophosphate dehydrogenase as a differentiation marker. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 76: 5138-5142.
- Panda, S., J. B. Hogenesch, and S. A. Kay. 2002. Circadian rhythms from flies to human. *Nature* 417: 329-335.
- Park, S. K., S. Y. Oh, M. Y. Lee, S. Yoon, K. S. Kim, and J. W. Kim. 2004. CCAAT/enhancer binding protein and nuclear factor- κ B regulate adiponectin gene expression in adipose tissue. *Diabetes* 53: 2757-2766.
- Parsons, W. J., V. Ramkumar, and G. L. Stiles. 1988. Isobutylmethylxanthine stimulates adenylate cyclase by blocking the inhibitory regulatory protein, Gi. *Mol. Pharmacol.* 34: 37-41.
- Pittenger, M. F., A. M. Mackay, S. C. Beck, R. K. Jaiswal, R. Douglas, J. M. Mosca, M. A. Moorman, D. W. Simonetti, S. Craig, and D. R. Marshak. 1999. Multilineage Potential of Adult Human Mesenchymal Stem Cells. *Science* 284: 143-147.
- Preitner, N., F. Damiola, L. Lopez-Molina, J. Zakany, D. Duboule, U. Albrecht, and U. Schibler. 2002. The orphan nuclear receptor REV-ERBa controls circadian transcription within the positive limb of the mammalian circadian oscillator. *Cell* 110: 251-260.
- Provencio, I., I. R. Rodriguez, G. Jiang, W. P. Hayes, E. F. Moreira, and M. D. Rollag. 2000. A novel human opsin in the inner retina. *J. Neurosci.* 20: 600-605.

- Qiao, L., B. Kinney, J. Schaack, and J. Shao. 2011. Adiponectin inhibits lipolysis in mouse adipocytes. *Diabetes* 60: 1519-1527.
- Ren, D., T. N. Collingwood, E. J. Rebar, A. P. Wolffe, and H. S. Camp. 2002. PPARgamma knockdown by engineered transcription factors: exogenous PPARgamma2 but not PPARgamma1 reactivates adipogenesis. *Genes Dev.* 16: 27-32.
- Reppert, S. M. and D. R. Weaver. 2001. Molecular analysis of mammalian circadian rhythms. *Ann. Rev. Physiol.* 63: 647-676.
- Reppert, S. M. and D. R. Weaver. 2002. Coordination of circadian timing in mammals. *Nature* 418: 935-941.
- Richard, A. J., Z. J. Amini, D. M. Ribnicky, and J. M. Stephens. 2012. St. John's wort inhibits insulin signaling in murine and human adipocytes. *Biochim. Biophys. Acta* 1822: 557-563.
- Robinson, J., and E. A. Newsholme. 1969. The effect of dietary conditions and glycerol concentrations on glycerol uptake by rat liver and kidney cortex slices. *Biochem. J.* 112: 449-453.
- Rodriguez-Cuenca, S., S. Carobbio, V. R. Velagapudi, N. Barbarroja, J. M. Moreno-Navarrete, F. J. Tinahones, J. M. Fernandez-Real, M. Ore sic, and A. Vidal-Puig. 2012. Peroxisome proliferator-activated receptor γ -dependent regulation of lipolytic nodes and metabolic flexibility. *Mol. Cell Biol.* 32: 1555-1565.
- Roduit, R., P. Masiello, S. P. Wang, H. Li, G. A. Mitchell, and M. Prentki. 2001. A role for hormone-sensitive lipase in glucose-stimulated insulin secretion: a study in hormone-sensitive lipase-deficient mice. *Diabetes* 50: 1970-1975.
- Rosen, E. D., P. Sarraf, A. E. Troy, G. Bradwin, K. Moore, D. S. Milstone, B. M. Spiegelman, and R. M. Mortensen. 1999. PPAR gamma is required for the

- differentiation of adipose tissue in vivo and in vitro. *Mol. Cell* 4: 611-617.
- Rudic, R. D., P. McNamara, A. M. Curtis, R. C. Boston, S. Panda, J. B. Hogenesch, and G. A. Fitzgerald. 2004. BMAL1 and CLOCK, two essential components of the circadian clock, are involved in glucose homeostasis. *PLoS Biol.* 2: 1893-1899.
- Rutter, J., M., Reick, and S. L. McKnight. 2002. Metabolism and the control of circadian rhythms. *Annu. Rev. Biochem.* 71: 307-331.
- Sato, T. K., R. G. Yamada, H. Ukai, J. E. Baggs, L. J. Miraglia, T. J. Kobayashi, D. K. Welsh, S. A. Kay, H. R. Ueda, and J. B. Hogenesch. 2006. Feedback repression is required for mammalian circadian clock function. *Nat. Genet.* 38: 312-319.
- Sato, T. K., S. Panda, L. J. Miraglia, T. M. Reyes, R. D. Rudic, P. McNamara, K. A. Naik, G. A. FitzGerald, S. A. Kay, and J. B. Hogenesch. 2004. A functional genomics strategy reveals Rora as a component of the mammalian circadian clock. *Neuron* 43: 527-537.
- Scheja, L., L. Makowski, K. T. Uysal, S. M. Wiesbrock, D. R. Shimshek, D. S. Meyers, M. Morgan, R. A. Parker, and G. S. Hotamisligil. 1999. Altered insulin secretion associated with reduced lipolytic efficiency in *ap2*^{-/-} mice. *Diabetes* 48: 1987-1994.
- Schempp, C. M., V. Kirkin, B. Simon-Haarhaus, A. Kersten, J. Kiss, C. C. Termeer, B. Gilb, T. Kaufmann, C. Borner, J. P. Sleeman, J. C. Simon. 2002. Inhibition of tumour cell growth by hyperforin, a novel anticancer drug from St. John's wort that acts by induction of apoptosis. *Oncogene* 21: 1242-1250.
- Scherer, P. E., S. Williams, M. Fogliano, G. Baldini, and H. F. Lodish. 1995. A novel serum protein similar to C1q, produced exclusively in adipocytes. *J. Biol. Chem.* 270: 26746-26749.
- Schwarz, J. T. and M. J. Cupp. 2000. St Johns wort, in *Toxicology and Clinical*

Pharmacology of Herbal Products. PP: 67-78. Humana Press, Totowa, N. J., U. S. A.

Shakur, Y., L. S. Holst, T. R. Landstrom, M. Movsesian, E. Degerman, and V. Manganiello. 2001. Regulation and function of the cyclic nucleotide phosphodiesterase (PDE3) gene family. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 66: 241-277.

Shao, D., and M. A. Lazar. 1997. Peroxisome proliferator activated receptor gamma, CCAAT/enhancer-binding protein alpha, and cell cycle status regulate the commitment to adipocyte differentiation. *J. Biol. Chem.* 272: 21473-21478.

Shearman, L. P., S. Sriram, D. R. Weaver, E. S. Maywood, I. Chaves, B. Zheng, K. Kume, C. C. Lee, G. T. van der Horst, M. H. Hastings, and S. M. Reppert. 2000. Interacting molecular loops in the mammalian circadian clock. *Science* 288: 1013-1019.

Shen, W.-J., Y. Liang, R. Hong, S. Patel, V. Natu, K. Sridhar, A. Jenkins, D. A. Bernlohr, and F. B. Kraemer. 2001. Characterization of the Functional Interaction of Adipocyte Lipid-binding Protein with Hormone-sensitive Lipase. *J. Biol. Chem.* 276: 49443-49448.

Shimba, S., N. Ishii, Y. Ohta, T. Ohno, Y. Watabe, M. Hayashi, T. Wada, T. Aoyagi, and M. Tezuka. 2005. Brain and muscle Arnt-like protein-1 (BMAL1), a component of the molecular clock, regulates adipogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102: 12071-12076.

Shimabukuro, M., K. Koyama, G. Chen, M. Y. Wang, F. Trieu, Y. Lee, C. B. Newgard, and R. H. Unger. 1997. Direct antidiabetic effect of leptin through triglyceride depletion of tissues. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94: 4637-4641.

Shisheva, A. and Y. Shechter. 1992. Quercetin selectively inhibits insulin receptor function in vitro and the bioresponses of insulin and insulinomimetic agents in

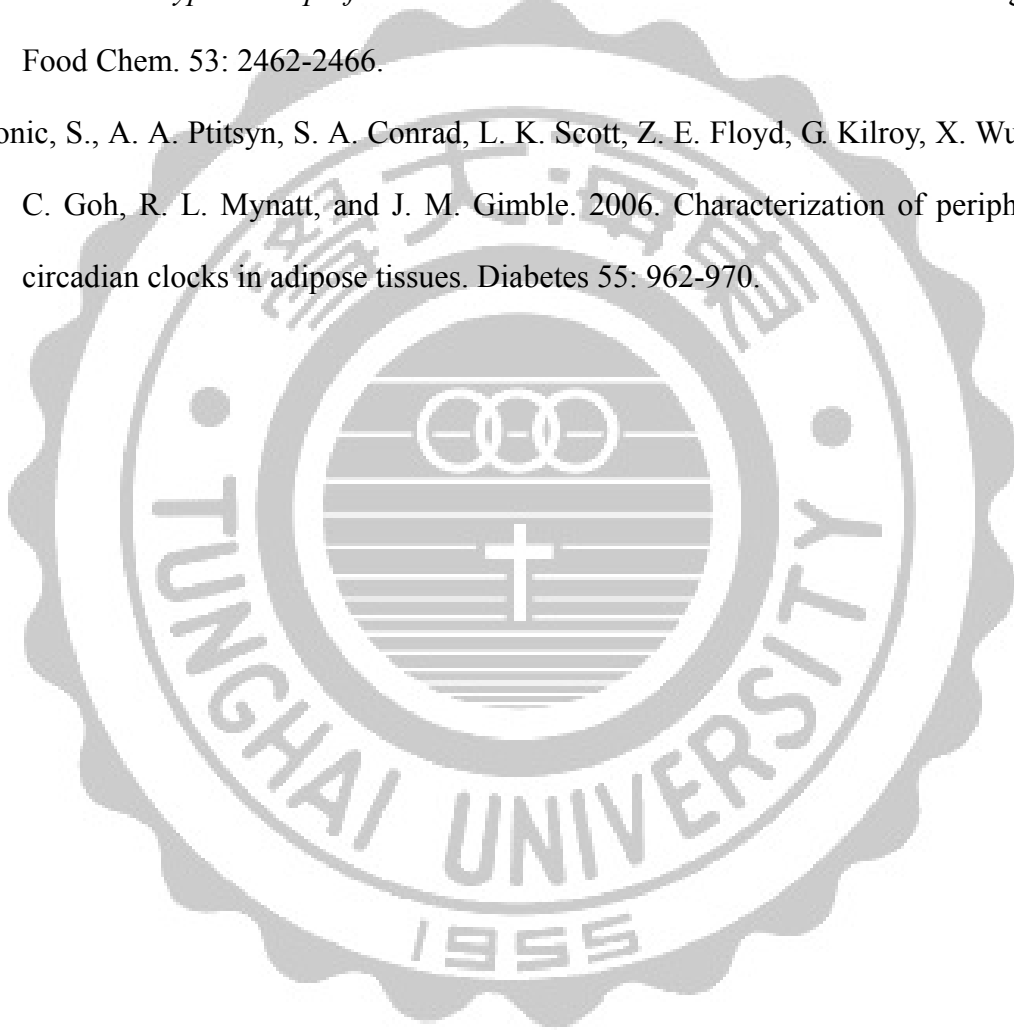
- rat adipocytes. *Biochemistry* 31: 8059-8063.
- Slieker, L. J., K. W. Sloop, P. L. Surface, A. Kriauciunas, F. LaQuier, J. Manetta, J. Bue-Valleskey, and T. W. Stephens. 1996. Regulation of expression of ob mRNA and protein by glucocorticoids and cAMP. *J. Biol. Chem.* 271: 5301-5304.
- Solt, L.A., Y. Wang, S. Banerjee, T. Hughes, D. J. Kojetin, T. Lundasen, Y. Shin, J. Liu, M. D. Cameron, R. Noel, S. H. Yoo, J. S. Takahashi, A. A. Butler, T. M. Kamenecka, and T. P. Burris. 2012. Regulation of circadian behaviour and metabolism by synthetic REV-ERB agonists. *Nature* 485: 62-68.
- Souza, S. C., L. M. de Vargas, M. T. Yamamoto, P., Lien, M. D. Franciosa, L. G. Moss, and A. S. Greenberg. 1998. Overexpression of Perilipin A and B Blocks the Ability of Tumor Necrosis Factor α to Increase Lipolysis in 3T3-L1 Adipocytes. *J. Biol. Chem.* 273: 24665-24669.
- Stephan, F. K., and I. Zucker. 1972. Circadian rhythms in drinking behavior and locomotor activity of rats are eliminated by hypothalamic lesions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 69: 1583-1586.
- Storck, R., and J. A. Spitzer. 1974. Metabolism of isolated fat cells from various tissue sites in the rat: influence of hemorrhagic hypotension. *J. Lipid Res.* 15: 200-205.
- Stough, C. K. K., and A. Scholey. 2013. *Advances in natural medicines, nutraceuticals and neurocognition.* CRC Press, N. W., U. S. A.
- Sztalryd, C., G. Xu, H. Dorward, J. T. Tansey, J. A. Contreras, A. R. Kimmel, and C. Londos. 2003. Perilipin A is essential for the translocation of hormone-sensitive lipase during lipolytic activation. *J. Cell Biol.* 161: 1093-1103.
- Sztalryd, C., M. C. Komaromy, and F. B. Kraemer. 1995. Overexpression of hormone-sensitive lipase prevents triglyceride accumulation in adipocytes. *J. Clin. Invest.* 95: 2652-2661.

- Takahashi, I., S. Nakanishi, E. Kobayashi, H. Nakano, K. Suzuki, and T. Tamaoki. 1989. Hypericin and pseudohypericin specifically inhibit protein kinase C: possible relation to their antiretroviral activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 165: 1207-1212.
- Tamori, Y., J. Masugi, N. Nishino and M. Kasuga. 2002. Role of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma in maintenance of the characteristics of mature 3T3-L1 adipocytes. *Diabetes* 51: 2045-2055.
- Tang, Q. Q., and M. D. Lane, 1999. Activation and centromeric localization of CCAAT/enhancer-binding proteins during the mitotic clonal expansion of adipocyte differentiation. *Genes Dev.* 13: 2231-2241.
- Tansey, J. T., C. Sztalryd, E. M. Hlavin, A. R. Kimmel, and C. Londos. 2004. The central role of perilipin A in lipid metabolism and adipocyte lipolysis. *IUBMB Life* 56: 379-385.
- Tansey, J. T., C. Sztalryd, J. Gruia-Gray, D. L. Roush, J. V. Zee, O. Gavrilova, M. L. Reitman, C. X. Deng, C. Li, A. R. Kimmel, and C. Londos. 2001. Perilipin ablation results in a lean mouse with aberrant adipocyte lipolysis, enhanced leptin production, and resistance to diet-induced obesity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98: 6494-6499.
- Tontonoz, P., E. Hu, and B. M. Spiegelman. 1994. Stimulation of adipogenesis in fibroblasts by PPAR γ 2, a lipid-activated transcription factor. *Cell* 79: 1147-1156.
- Tontonoz, P., E. Hu, R. A. Graves, A. I. Budavari, and B. M. Spiegelman. 1994b. mPPAR γ 2: tissue-specific regulator of an adipocyte enhancer. *Genes Dev.* 8: 1224-1234.
- Trayhurn, P. and D. V. Rayner. 1996. Hormones and the ob gene product (leptin) in the control of energy balance. *Biochem. Soc. Trans.* 24: 565-570.

- Triqueneaux, G., S. Thenot, T. Kakizawa, M. P. Antoch, R. Safi, J. S. Takahashi, F. Delaunay, and V. Laudet. 2004. The orphan receptor Rev-erb α gene is a target of the circadian clock pacemaker. *J. Mol. Endocrinol.* 33: 585-608.
- Turek, F. W., C. Joshu, A. Kohsaka, E. Lin, G. Ivanova, E. McDearmon, A. Laposky, S. Losee-Olson, A. Easton, D. R. Jensen, R. H. Eckel, J. S. Takahashi, and J. Bass. 2005. Obesity and metabolic syndrome in circadian Clock mutant mice. *Science* 308: 1043-1045.
- Vantieghem, A., Z. Assefa, P. Vandenabeele, W. Declercq, S. Courtois, J. R. Vandenheede, W. Merlevede, P. de Witte, and P. Agostinis. 1998. Hypericin-induced photosensitization of HeLa cells leads to apoptosis or necrosis. Involvement of cytochrome c and procaspase-3 activation in the mechanism of apoptosis. *FEBS Lett.* 440: 19-24.
- Vaughan, M., J. E. Berger, and D. Steinberg. 1964. Hormone-sensitive lipase and monoglycerol lipase activities in adipose tissue. *J. Biol. Chem.* 239: 401-409.
- Vazquez-Vela, M. E. F., N. Torres, and A. R. Tovar. 2008. White adipose tissue as endocrine organ and its role in obesity. *Arch. Med. Res.* 39: 715-728.
- Vessal, M., M. Hemmati, and M. Vasei. 2003. Antidiabetic effects of quercetin in streptozocin-induced diabetic rats. *Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol.* 135: 357-364.
- Vidal-Puig, A. J., R. V. Considine, M. Jimenez-Linan, A. Werman, W. J. Pories, J. F. Caro, and J. S. Flier. 1997. Peroxisome proliferator-activated receptor gene expression in human tissues. Effects of obesity, weight loss, and regulation by insulin and glucocorticoids. *J. Clin. Invest.* 99: 2416-2422.
- Vitaterna, M. H., D. P. King, A. M. Chang, J. M. Kornhauser, P. L. Lowrey, J. D. McDonald, W. F. Dove, L. H. Pinto, F. W. Turek, and J. S. Takahashi. 1994. Mutagenesis and mapping of a mouse gene, Clock, essential for circadian

- behavior. *Science* 264: 719-725.
- Wang, M.-Y., Y. Lee, and R. H. Unger. 1999. Novel form of lipolysis induced by leptin. *J. Biol. Chem.* 274: 17541-17544.
- Wisse, B. E. 2004. The Inflammatory syndrome: The role of adipose tissue cytokines in metabolic disorders linked to obesity. *J. Am. Soc. Nephrol.* 15:2792-2800.
- Wu, Z., N. L. Bucher, and S. R. Farmer. 1996. Induction of peroxisome proliferator-activated receptor gamma during the conversion of 3T3 fibroblasts into adipocytes is mediated by C/EBPbeta, C/EBPdelta, and glucocorticoids. *Mol. Cell Biol.* 16: 4128-4136.
- Wu, Z., Y. Xie, N. L. Bucher, and S. R. Farmer. 1995. Conditional ectopic expression of C/EBP beta in NIH-3T3 cells induces PPAR gamma and stimulates adipogenesis. *Genes Dev.* 9: 2350-2363.
- Yang, W. S., W. J. Lee, T. Funahashi, S. Tanaka, Y. Matsuzawa, C. L. Chao, C. L. Chen, T. Y. Tai, and L. M. Chuang. 2002. Plasma adiponectin levels in overweight and obese Asians. *Obes. Res.* 10: 1104-1110.
- Yin, L., N. Wu, and M. A. Lazar. Nuclear receptor Rev-erbalpha: a heme receptor that coordinates circadian rhythm and metabolism. *Nuclear Receptor Signaling* 8: E001.
- Yokosuka, M., B. Xu, S. Pu, P. S. Kalra, S. P. Kalra. 1998. Neural substrates for leptin and neuropeptide Y (NPY) interaction: hypothalamic sites associated with inhibition of NPY-induced food intake. *Physiol. Behav.* 64: 331-338.
- Young, M. E. 2006. The circadian clock within the heart: potential influence on myocardial gene expression, metabolism, and function. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 290: H1-H16.
- Yue, Q. Y., C. Bergquist, and B. Gerden. 2000. Safety of St John's wort (*Hypericum perforatum*). *Lancet* 355: 576-577.

- Zhou, C., M. M. Tabb, A. Sadatrafiey, F. Grün, A. Sun, and B. Blumberg. 2004. Hyperforin, the active component of St. John's wort, induces IL-8 expression in human intestinal epithelial cells via a MAPK-dependent, NF- κ B-independent pathway. *J. Clin. Immunol.* 24: 623-636.
- Zou, Y., Y. Lu, and D. Wei. 2005. Hypocholesterolemic effects of a flavonoid-rich extract of *hypericum perforatum* L. in rats fed a cholesterol-rich diet. *J. Agric. Food Chem.* 53: 2462-2466.
- Zvonic, S., A. A. Ptitsyn, S. A. Conrad, L. K. Scott, Z. E. Floyd, G. Kilroy, X. Wu, B. C. Goh, R. L. Mynatt, and J. M. Gimble. 2006. Characterization of peripheral circadian clocks in adipose tissues. *Diabetes* 55: 962-970.



The effects of Saint John's wort on the functions and the expression of circadian-related genes in 3T3-L1 adipocytes

Ru-Yun Li

ABSTRACT

In order to improve obesity and metabolic disorders in human and feed conversion in domestic animals, this study attempted to explore the effects of functional materials on the functions of adipocytes. The experiments were performed to investigate the effects of Saint John's wort extracts (SJWE) on fat accumulation, adipokine secretion, and biological clock of adipocytes using 3T3-L1 adipocyte model. Fat accumulation of adipocytes was decreased by SJWE treatments as evidenced by morphological observation, oil-Red O staining and triglycerides assays. The mRNA levels, measured by RT-PCR analysis, of lipid metabolism-related genes, including peroxisome proliferator-activated receptor (*PPAR* γ), *Perilipin*, hormone-sensitive lipase (*HSL*), *Adiponectin* and *Leptin*, were lower in the SJWE-treated cells than those in the control cells. The inhibitory effect of SJWE on the *Leptin* mRNA level was enhanced in the absence of insulin. In addition, SJWE, mimicking the effect of 50% FBS, synchronized the biological clocks of adipocytes and their metabolic performances, as evidenced by the mRNA analysis of circadian- and metabolism-related genes. Finally, *Leptin* secretion was inhibited in the cells treated with SJWE, and this effect of SJWE was related to the biological clocks of cells. Taken together, SJWE has effects on regulating lipid metabolism, adipokine secretion, and biological clocks of adipocytes, and may be used for the improvement of metabolic disorders in human and feeding efficiency in domestic animals.

Keywords: Adipocytes, Circadian genes, Fat accumulation, Saint John's wort