

# 代代花总黄酮对 3T3-L1 细胞增殖活性的影响

郝云芳, 杨丽, 姜建国

(华南理工大学轻工与食品学院, 广东广州 510640)

**摘要:** 本文研究了代代花总黄酮抑制 3T3-L1 细胞增殖及诱导其凋亡的作用。不同浓度的代代花总黄酮作用于 3T3-L1 细胞 24 h 之后, 采用 MTT 法检测代代花总黄酮对细胞增殖的抑制作用; 使用倒置显微镜观察细胞形态学的变化; Annexin V-EGFP/PI 标记检测细胞凋亡率; PI 标记法检测了代代花总黄酮对细胞周期的影响; 活性氧 (ROS) 试剂盒检测细胞内 ROS 水平; 荧光定量 PCR 检测了凋亡相关基因的 mRNA 水平表达。结果表明, 高浓度 (300  $\mu\text{g}/\text{mL}$  和 400  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 的代代花总黄酮可显著抑制 3T3-L1 细胞增殖, 细胞的抑制率分别为 38% 和 63%, 且细胞形态发生了明显变化, 并显著升高了细胞内 ROS 浓度。细胞凋亡实验结果显示, 代代花总黄酮可诱导 3T3-L1 细胞早期凋亡和晚期凋亡, 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  和 300  $\mu\text{g}/\text{mL}$  代代花总黄酮处理组的细胞早期凋亡率分别为 4.6%、15.7% 和 22.5%; 晚期凋亡率分别为 14.4%、8.3% 和 32.2%。而细胞周期实验则表明, 处理后 3T3-L1 细胞 G0/G1 期细胞数比例从 58.9% 下降到 51.4%, 而相应的 S 期细胞数比例呈小幅度增加, G2/M 期细胞数比例变化不明显。凋亡相关基因 p21 及 p53 的 mRNA 表达明显升高及促凋亡基因 bax 与抗凋亡基因 bcl-2 比例的升高使 3T3-L1 进入细胞凋亡程序。

**关键词:** 代代花总黄酮; 3T3-L1 细胞; 细胞凋亡; 细胞周期

文章编号: 1673-9078(2016)9-35-40

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2016.9.006

## Effects of the Total Flavonoids from *Citrus aurantium* on Proliferation and Apoptosis of 3T3-L1 Cells

HAO Yun-fang, YANG Li, JIANG Jian-guo

(College of Food and Bioengineering, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

**Abstract:** The impact of the total flavonoids of *Citrus aurantium* (TFC) treatment on proliferation and apoptosis of 3T3-L1 cells was studied. After 3T3-L1 cells were cultured and treated with TFC in different concentrations for 24 h, the effect of TFC on cell proliferation was examined by 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay. Morphological changes of 3T3-L1 cells were observed under an inverted microscope, the cell apoptotic rate was determined by Annexin V-EGFP/PI double staining, and propidium iodide (PI) staining was used to measure the effect of TFC on cell cycle. The intracellular reactive oxygen species (ROS) level was measured using a ROS assay kit, and the mRNA expression level of apoptosis-related genes was determined by fluorescence quantitative real-time polymerase chain reaction (RT-PCR). The results showed that high concentrations of TFC (300 and 400  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) could significantly inhibit the proliferation of 3T3-L1 cells; the inhibition rates on cells were 38% and 63%, respectively, and the morphological characteristics of 3T3-L1 cells were changed. The ROS concentration in cells was also increased significantly. The apoptosis experiments indicated that TFC could induce early and late apoptosis of 3T3-L1 cells; the early apoptosis rates for the treatments with 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  and 300  $\mu\text{g}/\text{mL}$  TFC for 24 h were 4.6%, 15.7% and 22.5%, respectively, and the late apoptosis rates were 14.4%, 8.3% and 32.2%, respectively. The cell cycle results showed that the G0/G1 phase ratio of the treated 3T3-L1 cells decreased from 58.9% to 51.4%, the ratio of corresponding S phase was increased slightly, and the ratio of the cells in G2/M phase was not significantly changed. The increase in the ratio of pro-apoptotic gene bax and anti-apoptotic gene bcl-2 and the increase in the mRNA expression of apoptosis-related genes p21 and p53 promoted apoptosis in 3T3-L1 cells.

**Key words:** total flavonoids of *Citrus aurantium*; 3T3-L1 cells; cell apoptosis; cell cycle

脂肪是生物体内能量贮存的主要形式, 具有非常

收稿日期: 2015-09-07

基金项目: 国家自然科学基金青年项目 (31301453)

作者简介: 郝云芳 (1987-), 女, 博士, 研究方向: 天然产物方向

通讯作者: 姜建国 (1964-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 天然产物方向;

杨丽 (1983-), 女, 实验师, 研究方向: 天然产物方向

重要的生理功能, 与机体的代谢密切相关。脂肪组织包括脂肪细胞、不同分化程度的脂肪细胞前体等, 而肥胖的发生主要是由于脂肪细胞的过度增殖和分化导致脂肪过度沉积所引起的<sup>[1]</sup>, 肥胖是导致糖尿病、高血压、心血管疾病、高脂血症等并发症发生主要诱因之一。3T3-L1 前脂肪细胞分离自小鼠胚胎(17~19 d)

的 Swiss 3T3 细胞,能特异性地被诱导分化成成熟的脂肪细胞<sup>[2]</sup>。由于小鼠前体脂肪细胞的取材较为方便,并且关于小鼠前体脂肪细胞的培养研究技术较成熟,使得 3T3-L1 前脂肪细胞已成为国际上公认的研究脂肪代谢的细胞模型。代代花为芸香科柑橘属植物的干燥花蕾,具有消食,化痰的功效,常被用作减肥茶的配方<sup>[3]</sup>。代代花还具有抗凝血、抑菌、抗肿瘤及抗氧化等作用<sup>[4-7]</sup>。而国内外对代代花的减肥活性研究较少,本文研究了代代花总黄酮对 3T3-L1 前脂肪细胞增殖的抑制作用,并对其机制进行了初步探讨,以期为代代花的进一步开发利用及减肥活性提供有效的依据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

代代花,产自广西,购于广州清平药材市场; 3T3-L1 细胞,中国科学院上海细胞库。

### 1.2 试 剂

芦丁标品,中国食品药品检定研究所; Annexin V-FITC/PI 凋亡检测试剂盒,联科生物技术有限公司; Cell Cycle staining kit,联科生物技术有限公司; RNAiso Plus, TaKaRa; Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit, SYBR Green, Roche 公司; MTT, sigma; 细胞培养相关试剂均来自美国 Gibco 公司。

### 1.3 主要仪器设备

倒置显微镜,上海光学仪器六厂; CO<sub>2</sub> 细胞培养箱,上海博讯实业有限公司医疗设备厂; 流式细胞仪,英国 Malvern 公司; 多功能酶标仪,瑞士 TECAN 公司。

### 1.4 实 验 方 法

#### 1.4.1 代代花总黄酮的制备及含量测定

准确称取代代花粉末 100 g,置于圆底烧瓶中,加入 80%乙醇,料液比 1/10。加热回流提取 1 h,真空抽滤,用旋转蒸发仪减压浓缩,得到乙醇粗提取物,将乙醇粗提取物在 4 °C 冰箱冷置 24 h,4000 r/min 离心 15 min,弃上清,而后用水溶解,作为上样液。将上样液缓慢加入到大孔树脂上面之后,先以蒸馏水洗脱 5 个柱体积,洗去样品中水溶性杂质,再以 30%乙醇进行洗脱 5 个柱体积,去除样品中酚类物质,最后以 70%乙醇洗脱 5 个柱体积,减压浓缩后真空干燥,得到 70%部分即为总黄酮类<sup>[8]</sup>。

精密吸取芦丁标准溶液(C=0.2 mg/mL) 0、2、4、6、8 和 10 mL 于 50 mL 的容量瓶中,加蒸馏水稀释至 10 mL,然后加入 5% NaNO<sub>2</sub> 溶液 2 mL,摇匀,静置 6 min; 再加 10% Al(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub> 溶液 2 mL,摇匀,静置 6 min; 最后加入 4% NaOH 溶液 20 mL,用蒸馏水定容至刻度,摇匀,静置 15 min,用分光光度计在 510 nm 处测定吸光度值。

将代代花总黄酮样品按上述标准曲线方法进行 操作,计算代代花总黄酮含量<sup>[9]</sup>。

#### 1.4.2 3T3-L1 细胞的培养

细胞在含有 10%胎牛血清、100 U/L 青霉素、100 μg/mL 链霉素的 DMEM 高糖培养液中(以下简称 DMEM 完全培养基),于 37 °C、5% CO<sub>2</sub>、饱和湿度环境下常规培养。当细胞生长至 80%~90%融合时,用胰蛋白酶-EDTA 溶液消化细胞。

#### 1.4.3 MTT 法测定细胞抑制率<sup>[10]</sup>

将 3T3-L1 细胞以每孔 8×10<sup>3</sup> 个细胞的密度接种于 96 孔细胞培养板(100 μL/每孔),置于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养。24 h 后弃去培养液,依次加入含有不同质量浓度的代代花总黄酮培养液(50、100、200、300 和 400 μg/mL),以不含样品的 DMEM 完全培养基为空白对照,每个浓度设 5 个平行。在 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中继续培养 24 h。倒置显微镜观察细胞形态的变化后去除培养基,加入 200 μL 含有 5 mg/mL MTT 的 DMEM 培养基,培养箱孵育 4 h。小心吸弃孔内的细胞培养液,每孔加入 150 μL DMSO,震荡 10 min,置于多功能酶标仪中测定 570 nm 波长处的 OD 值。

#### 1.4.4 细胞周期<sup>[11]</sup>

细胞处理:将处于对数生长期的 3T3-L1 细胞调成浓度为每孔 4×10<sup>5</sup> 个后接种于 6 孔细胞培养板。培养过夜使细胞贴壁。吸去培养基,加入 1.5 mL 不同浓度(100、200 和 300 μg/mL)的代代花总黄酮,对照组加入 1.5 mL DMEM 完全培养基。置于 CO<sub>2</sub> 培养箱中 37 °C 培养 24 h。收集培养基于流式专用管,用 PBS 清洗细胞 1 次,加入 0.5 mL 胰蛋白酶处理消化收集细胞于流式专用管。加入 1 mL PBS 清洗残留于细胞板孔内的残留细胞,收集清洗液于上述流式专用管中。800 g 离心 5 min,去上清。加 1 mL PBS 洗涤细胞,离心,去上清。重复清洗 2 次。

用 300 μL PBS 重悬处理后的细胞,将细胞悬液逐滴加入 700 μL 冰冷的无水乙醇中,使乙醇的终浓度为 70%。置于 -20 °C 避光静置固定 12 h。800 g 离心 5 min,去上清。加入 Cell Cycle staining kit A 染液(DNA staining solution) 500 μL,混匀后 37 °C 避光孵育 30 min。置于流式细胞仪中进行检测。使用软件 Cell Quest

Research Software 进行数据处理和分析。

### 1.4.5 细胞凋亡<sup>[11]</sup>

3T3-L1 细胞用不同浓度的代代花总黄酮按照上述 1.4.4 方法处理。细胞样品处理完后按 Annexin V-FITC/PI 细胞凋亡检测试剂盒说明操作步骤进行操作, 将处理好的细胞用 500 μL 试剂盒自带的 Buffer 重悬后, 先加入 5 μL Annexin V-FITC 染液, 后加入 10 μL PI 染液, 混合均匀后立即使用流式细胞仪进行检测。流式细胞仪设置: FITC 检测: 激发波长为 488 nm, 接收波长为 515 nm。PI 检测的接收波长为大于 560 nm。使用软件 Cell Quest Research Software(Becton Dickinson) 进行数据处理和分析。

### 1.4.6 活性氧 (ROS) 检测<sup>[12]</sup>

荧光染料 DCFH-DA 本身没有荧光, 但穿过细胞膜进入细胞内后, 可以被细胞内的酯酶水解生成 DCFH。而 DCFH 不能通透细胞膜。细胞内的活性氧可以氧化无荧光的 DCFH 生成有荧光的 DCF 从而被检测反映细胞内 ROS 的水平。

3T3-L1 细胞用不同浓度的代代花总黄酮按照上述 1.4.4 方法处理。细胞收集后悬浮于稀释好的 DCFH-DA 中, 37 °C 细胞培养箱内孵育 20 min。每隔

3~5 min 颠倒混匀一下, 使探针与细胞充分接触。以无血清细胞培养液洗涤细胞三次后用荧光显微镜观察拍照。

### 1.4.7 凋亡相关基因表达检测

不同浓度 (0、100、200 和 300 μg/mL) 的代代花总黄酮处理 3T3-L1 细胞 24 h 后, 收集细胞, 用 RNAiso Plus 提取试剂盒提取 RNA, 操作步骤按照试剂盒说明进行。提取的总 RNA 经超微量核酸蛋白检测仪检测纯度和质量。提取的 RNA 根据反转录试剂盒操作逆转为 cDNA, 通过荧光实时定量 PCR 检测凋亡相关的基因 p21、p53、bax 和 bcl-2 表达水平, 以 GADPH 为内参。

PCR 引物序列如下:

反应体系为 20 μL:10 μL Super Green master, 1 μL 上游引物, 1 μL 下游引物, 2 μL cDNA, 6 μL 双蒸水, 将上述所加的样品混匀, 离心, 利用实时荧光定量 PCR 仪进行扩增。反应条件: 50 °C, 2 min; 95 °C, 10 min; 95 °C, 15 s; 循环 40 次; 60 °C, 1 min。由扩增曲线得到的 Ct 值计算目的基因与内参 (GADPH) 的 ΔCt (目的基因 Ct-内参 Ct), 然后计算 3 个对照组样本 ΔCt 的平均值。

表 1 PCR 引物

Table 1 PCR primer

基因	上游引物	下游引物
GADPH	TTTGTCTMGCTCATTTCTGGTATG	TGGGATAGGGCCTCTCTTGC
P21	GCAAAGTGTGCCGTTGTCTC	CGTCTCCGTGACGAAGTCAA
P53	AACCGCCGACCTATCCTTAC	AGGCACAAACACGAACCTCA
Bax	AGACACCTGAGCTGACCTTG	TTCATCTCCAATTCGCCGGA
Bcl-2	ACTCTTCAGGGATGGGGTGA	TGACATCTCCCTGTTGACGC

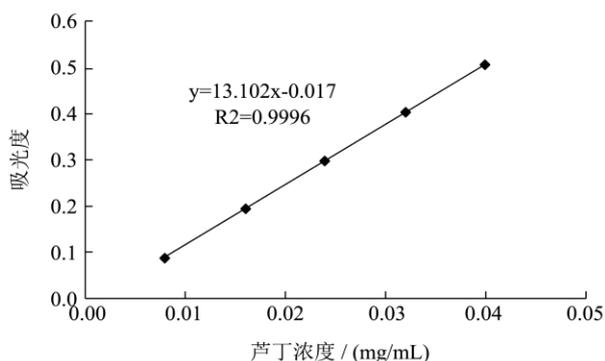


图 1 标准曲线及线性回归方程

Fig.1 Standard curve and linear regression equation

## 2 结果与讨论

### 2.1 芦丁标准曲线的建立

以芦丁对照品浓度 C 为横坐标, 吸光度 A 为纵坐

标, 做出标准曲线如图 1, 进行线性回归处理后所得标准曲线线性回归方程为:  $y=13.102x-0.017$ 。  $R^2=0.996$ 。根据吸光度计算的到代代花总黄酮的含量为: 257.61 mg/g。

### 2.2 代代花总黄酮对 3T3-L1 细胞形态的影响

不同浓度的总黄酮作用细胞 24 h 之后, 低浓度 (50~200 μg/mL) 处理组的细胞形态并没有发生明显的变化, 从图 2 中可以看出, 低浓度组与正常 3T3-L1 细胞相同, 细胞都成长梭状, 细胞饱满, 不同的是细胞间隙增大, 随着浓度增加, 细胞密度减小。而高浓度组 (300 μg/mL 和 400 μg/mL) 细胞形态发生了明显的变形, 细胞出现皱缩变圆, 细胞之间的连接变成拉丝状, 细胞数量明显的减少。在 400 μg/mL 处理组, 培养基中出现大量的细胞死亡碎片。

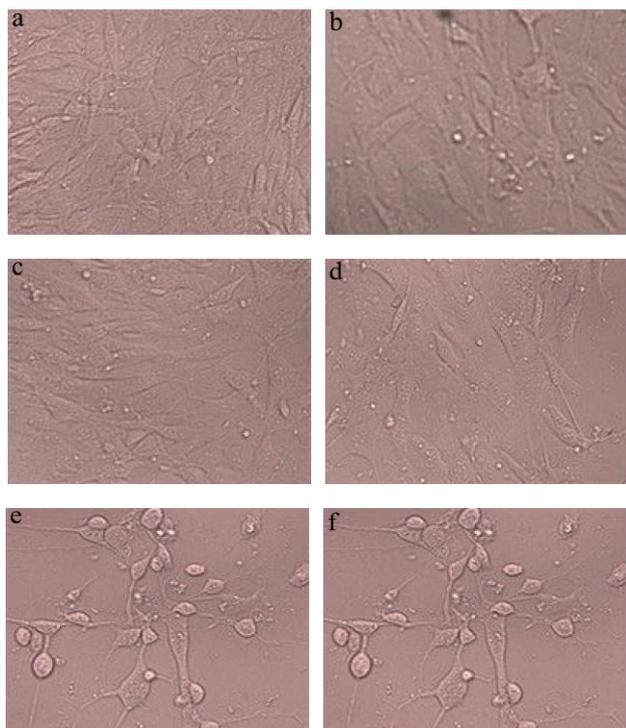


图2 不同浓度代代花总黄酮作用细胞 24 h 后对 3T3-L1 细胞形态的影响

Fig.2 Effect of the 24-h treatment with different concentrations of TFC on morphology of 3T3-L1 cells

注: a、b、c、d、e 和 f 分别代表代代花总黄酮浓度为 0、50、100、200、300 和 400 µg/mL。

### 2.3 代代花总黄酮对 3T3-L1 细胞增殖的影响

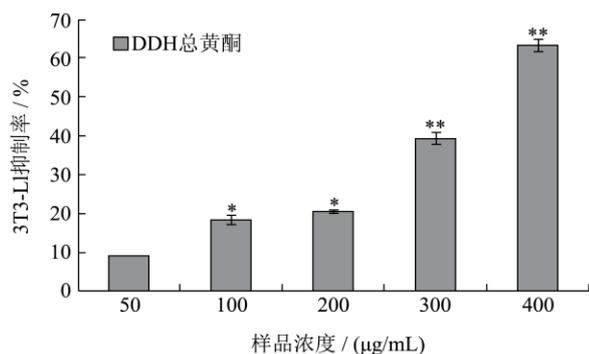


图3 不同浓度的代代花总黄酮对 3T3-L1 细胞增殖的抑制率 (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ )

Fig.3 Effects of various TFC concentrations on 3T3-L1 cell proliferation (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ )

各种浓度的代代花总黄酮对 3T3-L1 细胞的抑制作用如图 3 所示, 不同浓度的代代花总黄酮对 3T3-L1 细胞处理后均对细胞产生了抑制作用, 且呈浓度依赖性。在最大浓度 400 µg/mL 时抑制率高达 63.28%, 而在最小浓度 50 µg/mL 时细胞的抑制率为 8.87%。在样品浓度  $\leq 200$  µg/mL 时, 细胞的抑制率都没有大于百分

之二十, 说明代代花总黄酮在低浓度是对 3T3-L1 细胞的抑制作用并不明显。而在浓度大于 200 µg/mL 时, 细胞抑制率有着显著的增长。SPSS 计算得出代代花总黄酮对 3T3-L1 抑制的  $IC_{50}$  为 364.14 µg/mL。

### 2.4 代代花总黄酮对 3T3-L1 细胞凋亡的影响

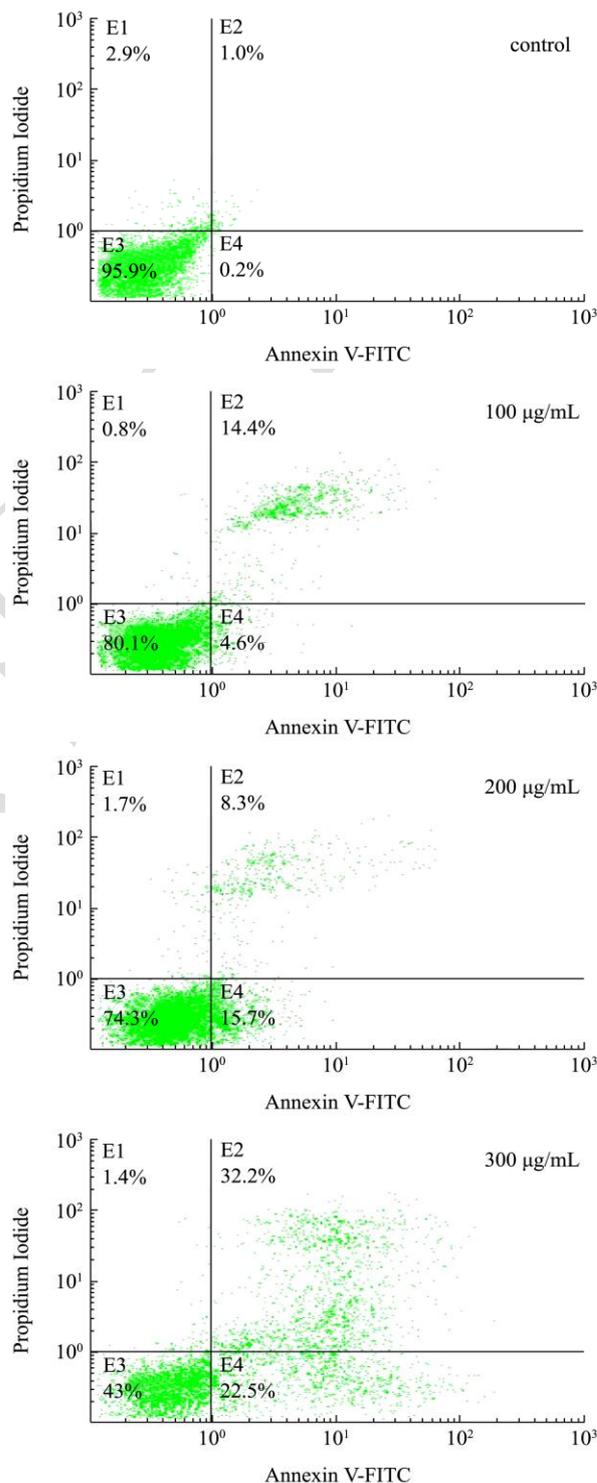


图4 不同浓度的代代花总黄酮对 3T3-L1 细胞凋亡的影响

Fig.4 Effects of various TFC concentrations on 3T3-L1 cell apoptosis

注: E1 代表坏死细胞, E2 代表晚期凋亡细胞, E3 代表正常细胞, E4 代表早期凋亡细胞。

本文使用 Annexin V-FITC/PI 双染法结合流式细胞术对代代花总黄酮介导的 3T3-L1 细胞凋亡进行分析, 如图 4 所示, 代代花总黄酮不同浓度处理实验组正常细胞比例明显下降, 具有明显的剂量效应, 跟 2.3 中 MTT 结果具有一致性。3T3-L1 细胞经 100 和 200  $\mu\text{g/mL}$  代代花总黄酮处理后, 早期凋亡细胞的比例显著增加。表明低浓度代代花总黄酮能介导 3T3-L1 细胞早期凋亡。当代代花总黄酮的浓度为 300  $\mu\text{g/mL}$  时, 3T3-L1 早期凋亡和晚期凋亡均明显增加, 尤其是晚期凋亡。表明代代花总黄酮具有高效的促进小鼠前脂肪细胞凋亡的作用。

### 2.5 代代花总黄酮对 3T3-L1 细胞周期的影响

本实验通过 PI 染色法对 3T3-L1 细胞进行染色后, 运用流式细胞术分析代代花总黄酮对 3T3-LQ 细胞周期阻滞影响。如图 5 和表 2 所示, 3T3-L1 细胞经不同浓度的代代花总黄酮处理 24 h 后, G0/G1 期细胞数比例从 58.91% 下降到 51.48%, 而相应的 S 期细胞数比例呈小幅度的增加, G2/M 期细胞数比例变化不明显。因此, 代代花总黄酮可以将一部分细胞阻滞在 S 期, 从而引起细胞凋亡。

### 2.6 代代花总黄酮对 3T3-L1 细胞内 ROS 的影响

细胞内的 ROS (如过氧化氢、过氧化物及羟基自由基等) 是评价细胞凋亡非常重要的指标, 过量的细胞内 ROS 会引起细胞 DNA 损伤的发生。不同浓度的代代花总黄酮处理 3T3-L1 细胞 24 h 后, 细胞内的绿色荧光显著增加 (图 6), 而不同浓度处理组之间的绿色荧光则无较大差异。说明代代花总黄酮可以明显增加 3T3-L1 细胞内的 ROS 浓度, 成为细胞凋亡的一个显著标志。

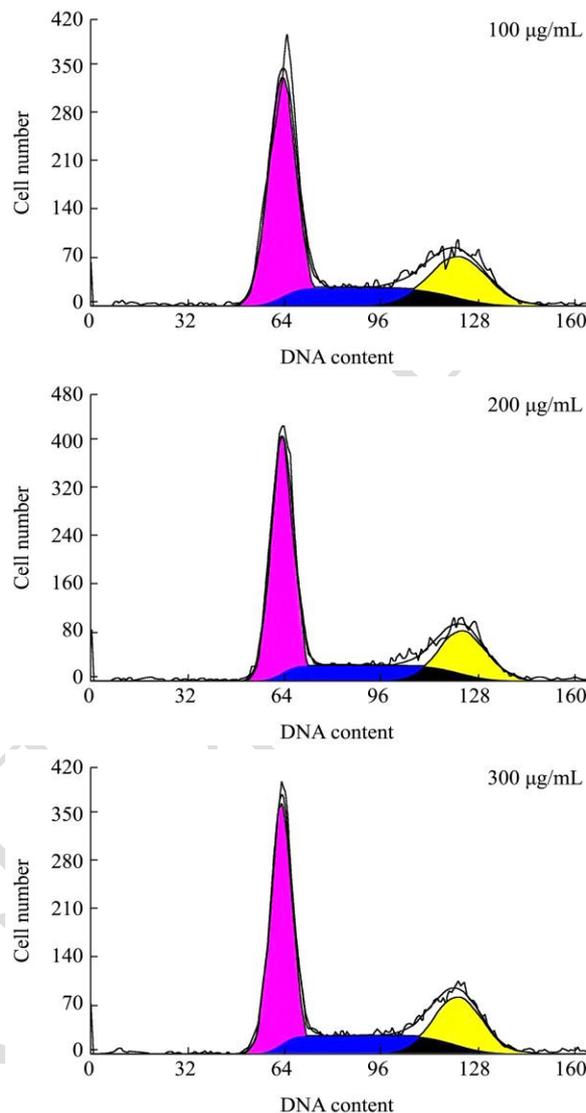
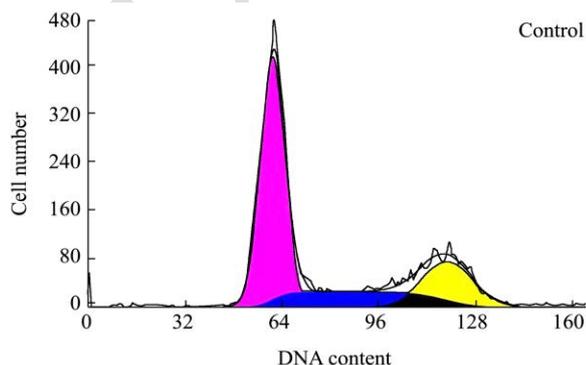


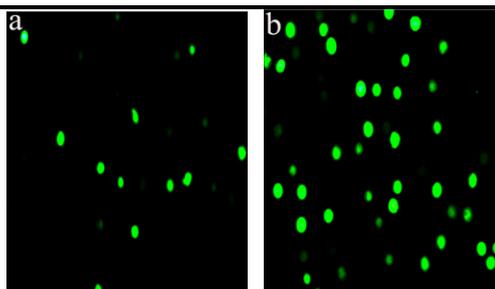
图 5 代代花总黄酮对 3T3-L1 细胞周期阻滞影响

Fig.5 Effect of TFC treatment on cell cycle arrest in 3T3-L1 cells

表 2 代代花总黄酮对 3T3-L1 细胞周期分布影响

Table 2 Effect of TFC on the cell cycle distribution in 3T3-L1 cells

Dip of 3T3-L1 cells/%	Control	代代花总黄酮/( $\mu\text{g/mL}$ )		
		100	200	300
G0/G1	58.91	54.73	54.53	51.48
S	19.79	20.96	21.75	23.16
G2/M	21.31	24.31	23.73	25.36



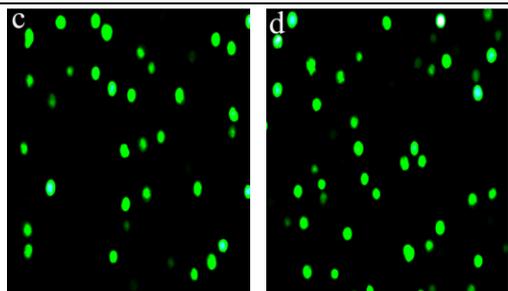


图6 不同浓度代代花总黄酮作用细胞 24 h 后对 3T3-L1 细胞内 ROS 的影响

Fig.6 Effect of various TFC concentrations on intracellular ROS in 3T3-L1 cells

注: a、b、c 和 d 分别代表代代花总黄酮浓度为 0、100、200 和 300 μg/mL。

### 2.7 代代花总黄酮对凋亡相关基因表达的影响

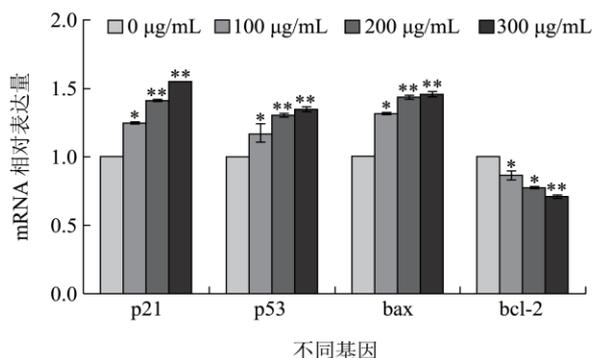


图7 不同浓度代代花总黄酮对 3T3-L1 细胞凋亡相关基因的影响 (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ )

Fig.7 Effect of various concentrations of TFC on apoptotic gene expression in 3T3-L1 cells (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ )

P21 和 p53 在癌细胞中能够促进细胞的凋亡, 而 bax 和 bcl-2 同属 Bcl-2 家族, bax 为促凋亡基因, bcl-2 为抗凋亡基因。Bax 与 bcl-2 的比值是细胞凋亡中的一个重要指标。如图 7 所示, 3T3-L1 细胞经不同浓度的代代花总黄酮处理后, 几个凋亡相关基因的 mRNA 表达发生了不同的变化。P21、p53 和 bax 的 mRNA 的相对表达量都较对照组 (0 μg/mL) 升高, 而 bcl-2 相对表达量较对照组则为下调趋势。代代花总黄酮对 p21 的相对表达量呈浓度依赖型, 随着浓度的升高, p21 的表达量逐渐升高, 低浓度样品组与对照组相比即呈显著性差异。高浓度组与中浓度样品组对 p53 和 bax 的 mRNA 的表达较对照组呈极显著差异。随着样品浓度的增加, bcl-2 的表达呈浓度依赖型下降。

### 3 结论

代代花总黄酮可显著抑制 3T3-L1 细胞的增殖, 且呈浓度依赖型,  $IC_{50}$  为 364.14 μg/mL, 在高浓度处理组 3T3-L1 细胞形态发生了明显的变化, 表现出典型的细胞凋亡特征, 且细胞内的 ROS 浓度明显的增加。代代花总黄酮可诱导 3T3-L1 细胞进入程序化死亡即早期凋亡及晚期凋亡的发生, 且没有产生过多的坏死细胞, 避免了细胞坏死引起内容物泄露, 炎症发生。流式细胞术检测代代花总黄酮对 3T3-L1 细胞周期分布的影响结果表明, 总黄酮 G0/G1 期细胞数比例小幅下降而相应的 S 期细胞数比例小幅增加, G2/M 期细胞数比例变化不明显, 代代花总黄酮对细胞周期分布的影响并不是非常显著, 因此, 代代花总黄酮仅能将部分细胞阻滞在 S 期而引起细胞凋亡, 所以细胞阻滞应该不是代代花总黄酮诱导细胞凋亡的主要途径。代代花总黄酮可以上调细胞内 p21 及 p53 基因的 mRNA 相对表达量, 且 bax 与 bcl-2 的比值也明显增加, 可见上调 p21 及 p53 基因的表达及 bax 与 bcl-2 的比值可能是代代花总黄酮诱导 3T3-L1 细胞发生凋亡的作用机制。代代花总黄酮在一定程度上可以诱导 3T3-L1 细胞的增殖, 对控制前脂肪细胞的数量上具有一定的意义, 从而起到减肥的作用。

### 参考文献

- [1] Wang Y W, Jones P J. Conjugated linolic acid and obesity control: efficacy and mechanisms [J]. International Journal of Obesity and Related Metabolic Disorders, 2004, 28(8): 941-955
- [2] Poulos Sylvia P, Dodson Michael V, Hausman Gary J. Cell line models for differentiation: preadipocytes and adipocytes [J]. Experimental Biology and Medicine, 2010, 235(10): 1185-1193
- [3] LU Qun, YANG Li, ZHAO, Hai-yan, et al. Protective effect of compounds from the flowers of *Citrus aurantium L. var. amara* Engl against carbon tetrachloride-induced hepatocyte injury [J]. Food and Chemical Toxicology, 2013, 62: 432-435
- [4] Espina L, Somolinos M, Loran S, et al. Chemical composition of commercial citrus fruit essential oils and evaluation of their antimicrobial activity acting alone or in combined processes [J]. Food Control, 2011, 22(6): 896-902
- [5] Herraiz T, Galisteo J. Tetrahydro-beta-carboline alkaloids occur in fruits and fruit juices. Activity as antioxidants and radical scavengers [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2003, 51(24): 7156-7161
- [6] Lee M K, Moon S S, Lee S E, et al. Naringenin 7-O-cetyl ether as inhibitor of HMG-CoA reductase and modulator of

- plasma and hepatic lipids in high cholesterol-fed rats [J]. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 2003, 11(3): 393-398
- [7] Morley K L, Ferguson P J, Koropatnick J. Tangeretin and nobiletin induce G1 cell cycle arrest but not apoptosis in human breast and colon cancer cells [J]. *Cancer Letters*, 2003, 251(3): 168-178
- [8] Hu Ting, He Xiao-wei, Jiang Jian-guo, et al. Efficacy evaluation of a Chinese bitter tea (*Ilex latifolia Thunb.*) via analyses of its main components [J]. *Food & Function*, 2014, 5(5): 876-881
- [9] Chang C C, Yang M H, Wen H M, et al. Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods [J]. *Journal of Food and Drug Analysis*, 2002, 10(3), 178-182
- [10] HAO Yun-fang, LU Chuan-li, LI Dong-jun, et al. Protective effects of diphenylheptanes from *Curcuma phaeocaulis* Val. on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induced cell injury [J]. *Food & Function*, 2014, 5(7): 1369-1373
- [11] LIAO Wen-zhen, LU Yun-jun, FU Jun-ning, et al. Preparation and characterization of dictyophora indusiata poly saccharide-zinc complex and its augmented antiproliferative activity on human cancer cells [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2015, 63(29): 6525-6534
- [12] Dwivedi S, Saquib Q, Al-Khedhairy A A, et al. Butachlor induced dissipation of mitochondrial membrane potential, oxidative DNA damage and necrosis in human peripheral blood mononuclear cells [J]. *Toxicology*, 2012, 302(1): 77-87