doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2019.01.010

槲皮素对节律钟基因的调控研究 *

刘佐君[1] 胡文静[2] 孙世民[2] 张树菊[1] 钱民先[1△]

（1 深圳大学医学中心 广东 深圳 518060；2 山东理工大学生命科学学院 山东 淄博 255000）

摘要 目的：探讨槲皮素对节律钟基因表达的影响。**方法：**通过 50%的马血清刺激诱导人骨肉瘤 U2OS 细胞同步化，利用槲皮素处理同步化后的 U2OS 细胞。进一步利用荧光定量 PCR 检测节律钟关键基因的变化。利用 western blot 检测槲皮素对组蛋白乙酰化的影响，并且通过试剂盒测定槲皮素对细胞内氧化型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸（NAD^+）的影响。通过尼克酰胺和槲皮素同时处理 U2OS 细胞，利用荧光定量 PCR 检测节律钟关键基因的变化。**结果：**U2OS 细胞经过槲皮素处理后节律钟关键基因芳烃受体核转位蛋白 3（brain and muscle Arnt-like protein-1，*BMAL1*），节律周期蛋白 2（*Period 2, PER2*），孤儿核受体 alpha（*REV–ERBα*）和蓝光受体蛋白 1（Cryptochrome 1，*CRY1*）在转录水平的表达水平有明显的升高。槲皮素处理可以显著降低 U2OS 细胞的组蛋白乙酰化的水平，并且显著升高 U2OS 细胞内的氧化型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸的水平。进一步研究发现，尼克酰胺（Nicotinamide，NAM）处理完全抑制了槲皮素对节律基因的影响。**结论：**槲皮素显著地激活了节律钟关键基因的 mRNA 表达水平，槲皮素对于节律基因的调控依赖于 Sirtuins 的活性，其机制可能是由于槲皮素增加了细胞内的氧化型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸的水平所导致。

关键词：节律钟；槲皮素；氧化型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸；组蛋白乙酰化

中图分类号：R-33；Q75；Q493.5 **文献标识码：**A **文章编号：**1673-6273（2019）01-47-05

Effects of Quercetin on the Circadian Expression Pattern of Human Bone Osteosarcoma Epithelial U2OS Cells *

LIU Zuo-jun[1], HU Wen-jing[2], SUN Shi-min[2], ZHANG Shu-ju[1], QIAN Min-xian[1△]

（1 Shenzhen University Health Science Center, Shenzhen, Guangdong, 518060, China;

2 School of Life Sciences, Shandong University of Technology, Zibo, Shandong, 255000, China）

ABSTRACT Objective: To investigate the effects of quercetin on the cell autonomous circadian rhythm of U2OS cells. **Methods:** The human U2OS cells were synchronized by 50% horse serum, and treated with DMSO or 200 μmol/L quercetin. The oscillation profiles of key circadian genes were examined by qRT-PCR. The histone acetylation levels were determined by western blot. The cellular levels of NAD^+ were measured by NAD/NADH Quantitation Colorimetric Kit. U2OS cells were treated with Nicotinamide and quercetin. The expression of circadian genes were examined by qRT-PCR. **Results:** Quercetin significantly increased the amplitude of the mRNA levels of several key clock components, including *BMAL1*, *CRY1*, *PER2* and *REV–ERBα*. Western blot analysis revealed quercetin treatment led to reduced histone acetylation levels. Quercetin dramatically increased cellular NAD^+ levels. Moreover, the Sirtuins inhibitor, NAM, totally blocked the effects of quercetin on the expression of clock genes. **Conclusions:** Quercetin is a strong activator of circadian clock. The regulation of circadian genes expression by quercetin is totally dependent on Sirtuins activity, which might be due to elevated cellular NAD^+ levels.

Key words: Circadian clock; Quercetin; Histone acetylation; NAD^+

Chinese Library Classification(CLC): R-33; Q75; Q493.5 Document code: A

Article ID: 1673-6273(2019)01-47-05

前言

槲皮素（quercetin）是自然来源的黄酮醇类的化合物，存在于许多蔬菜以及水果中。早期的研究发现，槲皮素可以作为一种膳食补充剂，具有抗氧化的功能，对于人体的健康具有很重要的作用[1,2]。在临床实验的研究中发现，槲皮素具有抗炎症、抗癌以及保护心血管的作用[3-6]。由于槲皮素具有天然抗氧化的作用，其在抗衰老方面的作用也有一系列的研究。在细胞学方面的研究发现槲皮素可以有效地延长人原代纤维细胞的寿命[7]。槲皮素的抗衰老作用还体现在其与其他药物合用可以有效地清除机体内的衰老细胞，进一步起到防止疾病的产生以及延长健康寿命的作用[8-10]。节律钟是从低等到高等生物都存在的一种进化上保守的、为了适应 24 小时昼夜变化的生物体内在的调控体系。节律钟的功能在衰老过程中会逐渐减弱，而节律钟功能的丧失也会导致衰老相关疾病的产生，并且缩短小鼠的寿命[11-13]。鉴于槲皮素对于人类健康的许多有益的作用，本研究旨

* 基金项目：国家自然科学基金项目（81601215）；深圳市科技创新基础研究项目（JCYJ20150525092941002）

作者简介：刘佐君（1982-），博士后，主要研究方向：衰老与生物节律，E-mail: ijing1982@szu.edu.cn

△通讯作者：钱民先（1987-），副教授，主要研究方向：衰老的发生发展机制，E-mail: qmx@szu.edu.cn，电话：18576785764

（收稿日期：2018-06-28 接受日期：2018-07-23）

在通过研究槲皮素对人骨肉瘤 U2OS 细胞节律钟的调控功能以及进一步对探索槲皮素调控节律钟的机制，阐明槲皮素是否可能有益于缓解衰老导致的生物节律的紊乱。

1 材料与方法

1.1 材料

人的肝癌 U2OS 细胞系来自本实验室冻存。胎牛血清(FBS)购自 pan-biotech 公司。槲皮素和尼克酰胺购自 sigma 公司。TRIzol 和马血清(Horse serum)购自 invitrogen 公司。反转录试剂盒和荧光定量试剂盒购自宝生物公司。组蛋白乙酰化的抗体购自 abcam 公司。Real-time PCR 仪购自美国 bio-rad 公司。烟酰胺腺嘌呤二核苷酸测定试剂盒购自 Biovision 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养与分组处理 U2OS 细胞培养于 DMEM 培养基含有 10%的 FBS、100 μg /mL 青霉素、100 μg /mL 链霉素中。细胞经过 50%的马血清处理 2 小时诱导细胞同步化，然后培养在无血清的 DMEM 培养基中继续培养，实验组加入 200 μmol/L 槲皮素，对照组加入 DMSO。细胞处理 12 小时后取样，每隔 4 小时取一次样共取六次。分别收取 12 h，16 h, 20 h，24 h，28 h 和 32 h 不同时间点的细胞样品。U2OS 细胞实验组 1 加入 200 μmol/L 槲皮素，实验组 2 加入 100 mmol/L 的尼克酰胺，实验组 3 同时加入 200 μmol/L 槲皮素和 100 mmol/L 的尼克酰胺，对照组加入 DMSO 处理 24 小时后收取细胞样品。细胞经过 TRIzol 裂解后提取 mRNA，经过反转录成 cDNA 后利用 Realtime PCR 检测相关基因的表达变化。荧光定量 PCR 通过 BIO-RAD CFX ConnectTM Real-time PCR 仪器进行检测和分析。读取基因扩增的 Ct 值，以 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算基因的相对表达量。

1.2.2 组蛋白乙酰化水平的检测 U2OS 细胞实验组加入 200 μmol/L 槲皮素，对照组加入 DMSO，处理 24 小时后 SDS-loading buffer 裂解，煮沸 10 分钟。通过 SDS-PAGE 电泳转膜到含有正电荷的 PVDF 膜。TBST 含有 5%的脱脂奶粉封闭 1 小时，加入一抗 4℃ 过夜后，用 TBST 洗三遍，加入羊抗兔的二抗孵育 1 小时，后经过 TBST 洗三遍后经过化学发光显影。利用 Image J 软件对 Western-blot 的条带进行灰度分析。

1.2.3 细胞内烟酰胺腺嘌呤二核苷酸浓度的测定 U2OS 细胞实验组加入 200 μmol/L 槲皮素，对照组加入 DMSO，处理 24 小时后利用试剂盒测定细胞内的氧化型烟酰胺二核苷酸的浓度。

1.3 统计学分析

统计学分析采用 SPSS 17.0 统计软件。计量数据以均数 $\bar{x}\pm s$ 标准差表示，组间比较采用 t 检验进行(两组比较)或者双因素方差分析(Two-Way ANOVA；多组比较)。$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 槲皮素对 U2OS 细胞节律基因 mRNA 的影响

首先我们利用人的 U2OS 细胞研究生物节律基因的表达，U2OS 细胞经过 50%马血清刺激诱导细胞同步化。进一步比较槲皮素处理组和对照组节律钟关键基因转录水平发现，槲皮素处理导致节律钟关键基因 *BMAL1*，*CRY1*，*PER2* 和 *REV-ERBα* 转录水平有非常明显的升高。例如，槲皮素处理组与对照组节律基因 *BMAL1*，*CRY1*，*PER2* 和 *REV-ERBα* 在处理 32 小时的相对表达量分别为：2.79 ± 0.32 Vs 0.48± 0.03，2.42 ± 0.37 Vs 1.37 ± 0.04，6.66 ± 1.50 Vs 2.24 ± 0.37，12.95 ± 0.43 Vs 3.60± 0.81。见图 1。

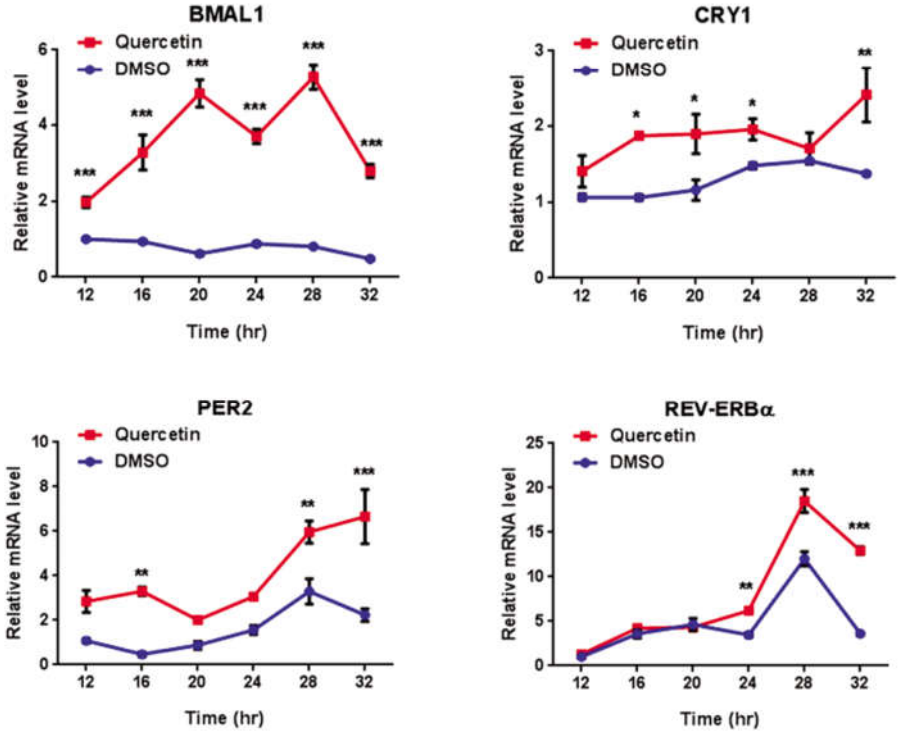

图 1 槲皮素对 U2OS 细胞节律基因 mRNA 表达模式的影响

Fig.1 Effection of quercetin on circadian genes mRNA expression

Note: Data are expressed as $\bar{x}\pm$ SD, n=3. *$P< 0.05$, **$P< 0.01$, ***$P< 0.001$, compared with control group.

2.2 槲皮素对 U2OS 细胞组蛋白乙酰化的影响

蛋白质的乙酰化修饰可以显著影响节律钟基因的表达水平[14]，为了研究槲皮素调控节律钟基因表达的机制，我们进一步检测了槲皮素对组蛋白乙酰化水平的影响。结果表明，槲皮素处理显著降低了组蛋白 3 第 9 位的赖氨酸，组蛋白 3 第 56 位赖氨酸，组蛋白 3 第 18 位赖氨酸 18 以及组蛋白 4 第 16 位赖氨酸的乙酰化水平。见图 2。

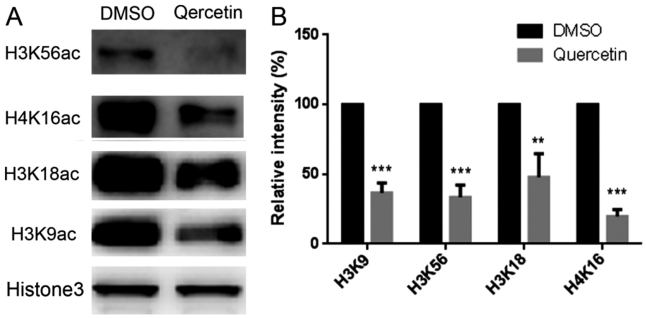

图 2 槲皮素对 U2OS 细胞组蛋白乙酰化的影响

Fig.2 Effection of quercetin on histone acetylation levels

Note: Data are expressed as $\bar{x}\pm$ SD, n=3. **$P< 0.01$, ***$P< 0.001$, compared with control group.

2.3 槲皮素对 U2OS 细胞氧化型烟酰胺二核苷酸浓度的影响

研究表明，组蛋白去乙酰化酶 Sirtuins 家族可以去乙酰化组蛋白，并且激活 Sirtuins 可以显著增加节律基因的表达[13]。细胞内的氧化型烟酰胺二核苷酸是组蛋白去乙酰化酶 Sirtuins 家族的激活剂[15-18]。因此，我们进一步检测了槲皮素对细胞内氧化型烟酰胺二核苷酸水平的影响。我们发现槲皮素处理显著升高了细胞内氧化型烟酰胺二核苷酸的含量，对照组和槲皮素处理组中氧化型烟酰胺二核苷酸的含量分别是 0.74± 0.13 vs 1.93± 0.09（$P<0.01$）。见图 3。

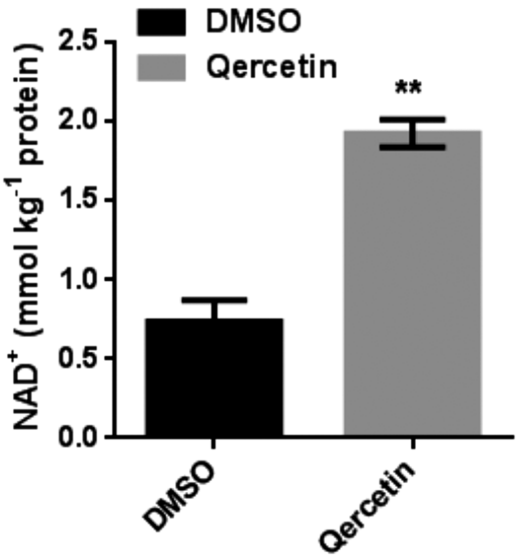

图 3 槲皮素对 U2OS 细胞内氧化型烟酰胺二核苷酸含量的影响

Fig.3 Effection of quercetin on the cellular NAD+ levels

Note: Data are expressed as $\bar{x}\pm$ SD, n=3. **$P< 0.01$ compared with control group.

2.4 尼克酰胺抑制了槲皮素对节律基因的调控作用

为了阐明槲皮素对节律基因的影响是否依赖于 Sirtuins 基因家族的，我们利用 Sirtuins 基因家族的抑制剂尼克酰胺处理 U2OS 细胞。首先我们发现相比于对照组尼克酰胺处理组中节律基因 *BMAL1*，*CRY1*，*PER2* 和 *REV-ERBα* 转录水平有明显的降低，而槲皮素处理组相比于对照组有明显的升高。进一步检测尼克酰胺和槲皮素同时处理组发现节律基因 *BMAL1*，*CRY1*，*PER2* 和 *REV-ERBα* 转录水平相比于对照组有明显的降低，并且其表达水平与尼克酰胺处理组相近。节律基因 *BMAL1*，*CRY1*，*PER2* 和 *REV-ERBα* 在槲皮素处理组、尼克酰胺处理组、尼克酰胺与槲皮素同时处理组以及对照组中 mRNA 的相对表达水平分别是：2.08 ± 0.30，0.67 ± 0.05，0.71 ± 0.07，1.00± 0.01；2.29 ± 0.78，0.56 ± 0.11，0.75± 0.01，1.01± 0.15；9.00 ± 2.10，0.61 ± 0.08，0.62± 0.04，1.04± 0.22；1.76 ± 0.07，0.55 ± 0.03，0.63± 0.11，1.01± 0.07。见图 4。

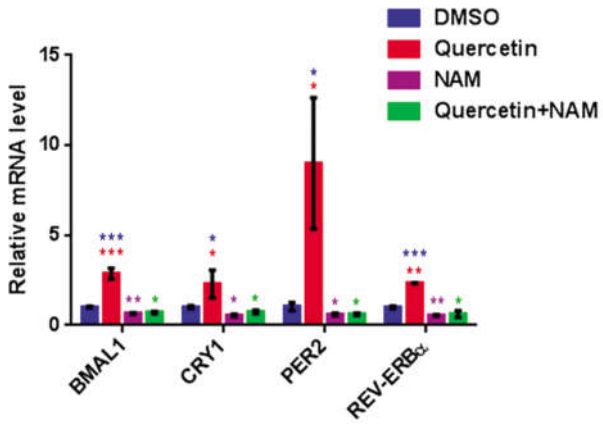

图 4 槲皮素和尼克酰胺对 U2OS 细胞节律基因表达的影响

Fig.4 Effection of quercetin and NAM on expression of circadian genes

Note: Data are expressed as $\bar{x}\pm$ SD, n=3. *$P< 0.05$, **$P< 0.01$, ***$P< 0.001$. *, red color represents Quercetin compared with DMSO group; *, purple color represents NAM compared with DMSO group; *, green color represents Quercetin+NAM compared with DMSO group; * blue color represents Quercetin+NAM compared with Quercetin group.

3 讨论

对于高等动物的节律钟的研究发现，生物节律的形成依赖于 24 小时的光照周期。位于下丘脑的视交叉神经上核（suprachiasmatic nucleus，SCN）是人体节律控制的中枢，SCN 节律性地控制了人体睡眠 - 觉醒、进食以及激素的释放等许多生理行为，进一步调节了外周组织包括肝脏、肾脏、脂肪以及肌肉等组织器官的节律。不仅是整个人体的行为，人体的各个组织器官，甚至单个人体的体细胞都具有生物节律。而节律钟在分子水平的调控的研究已经比较清楚，细胞水平的节律钟的维持是由一系列的反馈负反馈调节环来调控的[19]。简而言之，转录因子BMAL1 和 CLOCK 形成异源二聚体激活下下游基因 Period（PER）和 Cryptochrome（CRY）的表达。PER 和 CRY 形成异源二聚体从细胞质进入细胞核与 BMAL1 和 CLOCK 形成复合物通过抑制 BMAL1 的转录活性而抑制其自身的表达。而另

外一个调控环包括两个核受体家族 RER-ERBs 和 RORs 分别抑制和激活 BMAL1 的转录。槲皮素的天然抗氧化的作用使其在抗衰老方面的应用很有潜力,但是槲皮素在生物节律相关的研究还未见有报道。研究细胞的自主节律可以为研究整个个体的节律提供理论依据，而 U2OS 细胞是目前公认的研究细胞自主节律的比较常用的来源于人的细胞系。因此,我们通过研究槲皮素对 U2OS 细胞自主性节律的影响发现，槲皮素处理显著升高了节律钟关键基因 *BMAL1*、*CRY1*、*PER2* 和 *REV-ERBα* 的转录水平，由于 *BMAL1* 基因是调控节律钟下游基因的关键转录因子，因此槲皮素应该是影响了 *BMAL1* 上游调控因子的功能进而使得所有的节律钟的关键基因的表达水平都出现上调。

槲皮素作为一种黄酮醇类的多酚化合物,其作用的靶点一直都不是很清楚。研究发现,槲皮素是许多信号分子的激活剂或者抑制剂 [20,21]。例如，研究发现槲皮素可以直接结合 Phosphoinositide 3-Kinase 进一步抑制其活性。而最新的研究表明槲皮素还可以与内质网应激反应的关键基因 Inositol-requiring enzyme-1 相结合而激活内质网应激反应下游基因的表达。然而槲皮素是否还有其他更为重要的靶点,以及其如何起到抗衰老的作用机制并不明确。我们发现槲皮素可以显著升高细胞内氧化型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸的水平,并且降低组蛋白的乙酰化水平。氧化型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸是组蛋白去乙酰化酶 Sirtuins 家族的激活剂,而激活 Sirtuins 可以降低细胞内的组蛋白乙酰化的水平,这和我们的结果也是一致的。我们进一步发现,Sirtuins 家族的广谱性抑制剂尼克酰胺可以完全抑制槲皮素对节律基因的调控作用,这表明槲皮素可能是通过激活 Sirtuins 来调控节律钟基因的表达,而其机制可能是由于槲皮素增加了细胞内氧化型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸的水平。从我们的组蛋白乙酰化的实验可以看出来,几乎所有的组蛋白乙酰化水平在槲皮素处理之后都有明显的下降。由于组蛋白 3 第 9 位的赖氨酸乙酰化是 Sirt1 和 Sirt6 的共同底物，组蛋白 3 第 56 位的赖氨酸乙酰化是 Sirt6 的特异性底物,组蛋白 4 第 16 位的赖氨酸乙酰化是 Sirt1 的特异性底物,而组蛋白 3 第 18 位赖氨酸乙酰化是 Sirt7 的特异性底物[18-22],这表明槲皮素并不是特异性的激活了某个 Sirtuin 基因，而是激活了整个 Sirtuins 基因家族。Sirtuins 是存在于低等到高等动物的一类保守的基因家族,对其功能的研究发现 Sirtuins 基因对于寿命的延长以及抗衰老具有非常重要的作用[18]。哺乳动物的 Sirtuins 家族有七个成员,其中 Sirt1、Sirt6 和 Sirt7 基因突变小鼠会导致寿命显著缩短,而过表达或者激活 Sirt1 和 Sirt6 基因可以显著延缓衰老相关疾病的产生[18]。有趣的是 Sirt1 是调控节律钟的一个重要的基因,对外周组织的节律的研究发现,Sirt1 可以去乙酰化 PER2 导致 PER2 蛋白被降解 [23]。Sirt1 还可以去乙酰化 BMAL1 调控 BMAL1 的转录活性[24]。不仅如此,Sirt1 还参与了中央节律的调控,Sirt1 的转基因小鼠可以恢复老年老鼠的节律钟的功能,并且可以显著提高节律钟基因的表达水平[13-25]。因此,槲皮素应该是通过激活 Sirt1 的活性进而调控节律钟基因的表达的。

衰老会导致的节律钟基因的表达水平的降低[13],而节律钟关键基因 *BMAL1* 和 CLOCK 的缺失会导致小鼠出现早衰的表型。因此,增加膳食中槲皮素的摄入可能可以延缓甚至恢复老年人节律钟的功能。节律钟的紊乱会导致许多代谢疾病的产生,包括肥胖、脂肪肝和糖尿病等。研究发现,提高节律钟基因的表达水平可以有效地减轻肥胖导致的代谢类的疾病。例如,一种天然的黄酮类的化合物 Nobiletin 被发现可以有效地激活 RORs 基因家族的活性，由于 RORs 基因家族是 BMAL1 的转录激活因子，因此 Nobiletin 显著增加 *BMAL1*、*CRY1* 和 *PER2* 的表达水平。在高脂喂养小鼠的膳食中补充 Nobiletin 可以显著减轻小鼠体重,以及降低血糖和脂肪肝的产生[26]。同样作为黄酮类的天然化合物,有一些研究表明槲皮素对于肥胖类的代谢类疾病具有很好的保护作用[1]。但是槲皮素具有其他天然化合物所不具有的许多优势。例如,槲皮素的来源非常广泛,在许多的水果以及蔬菜中的含量都非常丰富[1],而且槲皮素已经大量地应用于许多临床研究。

近年来研究发现,通过膳食补充氧化型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸或者其前体代谢物可以有效地缓解衰老相关疾病的产生,包括肌肉萎缩、肥胖糖尿病等[15,17,27]。通过膳食补充槲皮素是否也可以增加体内氧化型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸的水平还有待于进一步的研究。由于老年人节律失调的主要表现为睡眠质量下降,膳食补充槲皮素是否可以提高老年人的睡眠质量值得进一步的关注。槲皮素是如何增加细胞内氧化型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸的机制依然未知,我们推测槲皮素可能影响了烟酰胺腺嘌呤二核苷酸的代谢调控的关键酶。综上所述,我们的研究发现槲皮素可能是 Sirtuins 家族的潜在的激活剂，其可以显著的升高细胞内的氧化型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸的水平,进而增加节律基因的表达水平,这位槲皮素之后的临床应用提供了相关的理论依据。

参 考 文 献(References)

[1] D'Andrea G. Quercetin: A flavonol with multifaceted therapeutic applications?[J]. Fitoterapia, 2015, 106256-271

[2] Galati G, Moridani MY, Chan TS, et al. Peroxidative metabolism of apigenin and naringenin versus luteolin and quercetin: glutathione oxidation and conjugation [J]. Free Radic Biol Med, 2001, 30(4): 370-382

[3] Dower JI, Geleijnse JM, Gijsbers L, et al. Effects of the pure flavonoids epicatechin and quercetin on vascular function and cardiometabolic health: a randomized, double-blind, placebo-controlled, crossover trial[J]. Am J Clin Nutr, 2015, 101(5): 914-921

[4] Dower JI, Geleijnse JM, Gijsbers L, et al. Supplementation of the Pure Flavonoids Epicatechin and Quercetin Affects Some Biomarkers of Endothelial Dysfunction and Inflammation in (Pre)Hypertensive Adults: A Randomized Double-Blind, Placebo-Controlled, Crossover Trial[J]. J Nutr, 2015, 145(7): 1459-1463

[5] Hung CH, Chan SH, Chu PM, et al. Quercetin is a potent anti-atherosclerotic compound by activation of SIRT1 signaling under oxLDL stimulation[J]. Mol Nutr Food Res, 2015, 59(10): 1905-1917

[6] Yang F, Song L, Wang H, et al. Combination of Quercetin and 2-Methoxyestradiol Enhances Inhibition of Human Prostate Cancer LNCaP and PC-3 Cells Xenograft Tumor Growth [J]. PLoS One, 2015, 10(5): e0128277

[7] Chondrogianni N, Kapeta S, Chinou I, et al. Anti-ageing and

rejuvenating effects of quercetin [J]. Exp Gerontol, 2010, 45 (10): 763-771

[8] Ogrodnik M, Miwa S, Tchkonia T, et al. Cellular senescence drives age-dependent hepatic steatosis[J]. Nat Commun, 2017, 815691

[9] Schafer MJ, White TA, Iijima K, et al. Cellular senescence mediates fibrotic pulmonary disease[J]. Nat Commun, 2017, 814532

[10] Zhu Y, Tchkonia T, Pirtskhalava T, et al. The Achilles' heel of senescent cells: from transcriptome to senolytic drugs[J]. Aging Cell, 2015, 14(4): 644-658

[11] Kondratov RV, Kondratova AA, Gorbacheva VY, et al. Early aging and age-related pathologies in mice deficient in BMAL1, the core component of the circadian clock [J]. Gene Dev, 2006, 20 (14): 1868-1873

[12] Dubrovsky YV, Samsa WE, Kondratov RV. Deficiency of circadian protein CLOCK reduces lifespan and increases age-related cataract development in mice[J]. Aging-Us, 2010, 2(12): 936-944

[13] Chang HC, Guarente L. SIRT1 mediates central circadian control in the SCN by a mechanism that decays with aging [J]. Cell, 2013, 153 (7): 1448-1460

[14] Sato S, Solanas G, Peixoto FO, et al. Circadian Reprogramming in the Liver Identifies Metabolic Pathways of Aging [J]. Cell, 2017, 170 (4): 664-677, e611

[15] Yoshino J, Mills KF, Yoon MJ, et al. Nicotinamide mononucleotide, a key NAD (+) intermediate, treats the pathophysiology of diet- and age-induced diabetes in mice[J]. Cell Metab, 2011, 14(4): 528-536

[16] Zhang H, Ryu D, Wu Y, et al. NAD (+) repletion improves mitochondrial and stem cell function and enhances life span in mice [J]. Science, 2016, 352(6292): 1436-1443

[17] Fang EF, Kassahun H, Croteau DL, et al. NAD (+) Replenishment Improves Lifespan and Healthspan in Ataxia Telangiectasia Models via Mitophagy and DNA Repair[J]. Cell Metab, 2016, 24(4): 566-581

[18] Lavu S, Boss O, Elliott PJ, et al. Sirtuins--novel therapeutic targets to treat age-associated diseases [J]. Nat Rev Drug Discov, 2008, 7(10): 841-853

[19] Mohawk JA, Green CB, Takahashi JS. Central and peripheral circadian clocks in mammals[J]. Annu Rev Neurosci, 2012, 35445-462

[20] Hawley SA, Ross FA, Chevtzoff C, et al. Use of Cells Expressing gamma Subunit Variants to Identify Diverse Mechanisms of AMPK Activation[J]. Cell Metabolism, 2010, 11(6): 554-565

[21] Walker EH, Pacold ME, Perisic O, et al. Structural determinants of phosphoinositide 3-kinase inhibition by wortmannin, LY294002, quercetin, myricetin, and staurosporine [J]. Mol Cell, 2000, 6 (4): 909-919

[22] Houtkooper RH, Pirinen E, Auwerx J. Sirtuins as regulators of metabolism and healthspan [J]. Nat Rev Mol Cell Bio, 2012, 13(4): 225-238

[23] Asher G, Gatfield D, Stratmann M, et al. SIRT1 regulates circadian clock gene expression through PER2 deacetylation[J]. Cell, 2008, 134 (2): 317-328

[24] Nakahata Y, Kaluzova M, Grimaldi B, et al. The NAD^+-dependent deacetylase SIRT1 modulates CLOCK-mediated chromatin remodeling and circadian control[J]. Cell, 2008, 134(2): 329-340

[25] Nakahata Y, Sahar S, Astarita G, et al. Circadian control of the NAD^+ salvage pathway by CLOCK-SIRT1 [J]. Science, 2009, 324 (5927): 654-657

[26] He B, Nohara K, Park N, et al. The Small Molecule Nobiletin Targets the Molecular Oscillator to Enhance Circadian Rhythms and Protect against Metabolic Syndrome[J]. Cell Metab, 2016, 23(4): 610-621

[27] Canto C, Houtkooper RH, Pirinen E, et al. The NAD^+ precursor nicotinamide riboside enhances oxidative metabolism and protects against high-fat diet-induced obesity [J]. Cell Metab, 2012, 15 (6): 838-847

（上接第 132 页）

[21] Ge X, Tian H, Ding C, et al. Fecal Microbiota Transplantation in Combination with Soluble Dietary Fiber for Treatment of Slow Transit Constipation: A Pilot Study [J]. Arch Med Res，2016，47(3): 236-242

[22] Huang Y, Wang X, Li X, et al. Successful Fecal Bacteria Transplantation and Nurse Management for a Patient With Intractable Functional Constipation: A Case Study[J]. Holist Nurs Pract, 2016, 30 (2): 116-121

[23] Tian H, Ding C, Gong J, et al. Treatment of Slow Transit Constipation with Fecal Microbiota Transplantation: A Pilot Study[J]. J Clin Gastroenterol, 2016, 50(10): 865-870

[24] Ding C, Fan W, Gu L, et al. Outcomes and prognostic factors of fecal microbiota transplantation in patients with slow transit constipation: results from a prospective study with long-term follow-up [J]. Gastroenterol Rep (Oxf), 2018, 6(2): 101-107

[25] Ge X, Zhao W, Ding C, et al. Potential role of fecal microbiota from patients with slow transit constipation in the regulation of gastrointestinal motility[J]. Sci Rep, 2017, 7(1): 441

[26] Tian H, Ge X, Nie Y, et al. Fecal microbiota transplantation in patients with slow-transit constipation: A randomized, clinical trial[J]. PLoS One, 2017, 12(2): e0171308

[27] 杨波,顾立立,张雪莹,等.粪菌移植治疗顽固性便秘合并抑郁 18 例的临床疗效[J].中华消化杂志, 2018, 38(3): 197-199
Yang Bo, Gu Li-li, Zhang Xue-ying, et al. Clinical observation of 18 cases of refractory constipation combined with depression treated by fecal bacteria transplantation [J]. Chinese Journal of Digestion, 2018, 38(3): 197-199

[28] Rossen NG, MacDonald JK, de Vries EM, et al. Fecal microbiota transplantation as novel therapy in gastroenterology: A systematic review[J]. World J Gastroenterol, 2015, 21(17): 5359-5371

[29] Ng J, Ford K, Dalton S, et al. Transanal irrigation for intractable faecal incontinence and constipation: outcomes, quality of life and predicting non-adopters[J]. Pediatr Surg Int, 2015, 31(8): 729-734

[30] Tian H, Ding C, Gong J, et al. Treatment of Slow Transit Constipation With Fecal Microbiota Transplantation: A Pilot Study [J]. J Clin Gastroenterol, 2016, 50(10): 865-870