

生物钟系统调控机体代谢的分子机制及中药干预研究进展

陈振山¹, 张耀文¹, 王小明^{2,3,4}, 田振华^{2,3,4}, 蒋海强^{2,3,4*}, 齐冬梅^{2,3,4}

(1. 山东中医药大学药学院, 山东 济南 250355; 2. 山东中医药大学实验中心, 山东 济南 250355; 3. 山东省中医药基础研究重点实验室, 山东 济南 250355; 4. 山东中医药大学, 教育部中医药经典理论重点实验室, 山东 济南 250355)

摘要: 昼夜节律是生物体适应外界环境的昼夜周期性变化的一种内在调控机制, 在机体的代谢过程中具有重要作用, 通过参与机体内多个器官的代谢途径来达到调控机体稳态的作用。当饮食时间、作息颠倒、睡眠障碍等外源性因素引起机体的昼夜节律发生紊乱时, 机体发生代谢综合征的风险明显提高。本文旨在阐述昼夜节律与机体代谢之间的关系, 并总结消化系统、肝脏系统、肾脏系统和胆汁酸的昼夜节律调节分子机制, 综述中药干预昼夜节律的研究进展, 为后续昼夜节律的中药研究和分子机制研究提供合理的、有价值的参考依据。

关键词: 生物钟; 代谢; 分子机制; 中药

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2020)12-2818-09

The molecular mechanism by which the circadian rhythm regulates body metabolism and research progress on intervention in the circadian rhythm by traditional Chinese medicine

CHEN Zhen-shan¹, ZHANG Yao-wen¹, WANG Xiao-ming^{2,3,4}, TIAN Zhen-hua^{2,3,4},
JIANG Hai-qiang^{2,3,4*}, QI Dong-mei^{2,3,4}

(1. School of Pharmaceutical Sciences, Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250355, China; 2. Experimental Center, Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250355, China; 3. Shandong Provincial Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine for Basic Research, Jinan 250355, China; 4. Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine Classical Theory, Ministry of Education, Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250355, China)

Abstract: Circadian rhythm is an internal regulatory mechanism that allows organisms to adapt to circadian changes in the external environment, and can regulate the body's steady state by affecting the metabolic pathways of multiple organs. When exogenous factors such as eating time, worktime changes, and sleep disturbances cause the body's circadian rhythm to be disrupted, the risk of developing metabolic syndrome is significantly increased. This article explores the relationship between circadian rhythm and body metabolism and summarizes the molecular mechanisms by which circadian rhythm regulates the digestive system, liver and bile acid production, and kidney function. We review research progress on intervention in the circadian rhythm by traditional Chinese medicine and provide a reasonable and valuable basis for follow-up studies on the role of traditional Chinese medicine in research on the molecular mechanisms of regulation of circadian rhythm.

Key words: biological clock; metabolism; molecular mechanism; traditional Chinese medicine

收稿日期: 2020-06-05; 修回日期: 2020-08-11.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81774173); 2019 年山东省高等学校“青创科技计划”立项 (2019KJM005); 2018 年山东省自然科学基金重大基础研究项目 (ZR2018ZC1157).

*通讯作者 Tel: 86-531-89628192, E-mail: jhq12723@163.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2020-0690

地球的自转和公转会引起环境的恒变性和暂变性变化: 恒变包括昼夜交替、季节交替和年份变化; 暂变是由于环境的突发性变化导致的包括阳光、湿度和温度等在内的变化。为了适应环境的这种变化, 绝大多数生物包括植物、动物和真菌等都进化出了昼夜节律生物系统。该生物系统通过在细胞、生理和生化水平上产生例如哺乳动物的睡眠和觉醒、体温、细胞代谢和激素的释放等生物行为对环境的变化进行自适应的调节。昼夜节律一词来源于拉丁语“circadian”, 意思是“大约一天”。昼夜节律对生物体维持自身系统的稳态和健康具有重要的作用, 昼夜节律的慢性破坏和失衡会导致生物体的中枢系统、肝脏系统和消化系统的失调, 进而诱发各种代谢综合征、炎症、肝脏代谢异常和癌症等疾病。因此, 昼夜节律对生物体的健康和稳态有着内在不可忽视的调节作用。

1 昼夜节律的产生和维持机制

昼夜节律的产生依赖于生物体自身的生物钟系统以及钟控基因组建的复杂的调控网络, 在该网络的调控下生物体产生周期约为24 h的节律性震荡。这种震荡的表现形式即生物钟系统自身核心节律性基因的转录和表达呈现节律性活动, 同时也使生物钟调节和控制的下游基因的表达以及一些重要功能的蛋白的合成呈现节律性的变化, 从而达到调控机体整体代谢系统的作用。这种节律性变化的维持, 主要依靠生物体生物钟系统的循环运转。中枢生物钟系统位于前下丘脑的视交叉上核 (suprachiasmatic nucleus, SCN), 而外周生物钟系统存在于心、肝、脾、肺和肾等外周器官组织中。输入信号由视网膜下丘脑束 (retinal hypothalamus tract, RHT) 传递至SCN, 在SCN通过调控生物钟基因

的周期性节律震荡表达, 产生节律信号^[1-4]。

目前对于昼夜节律分子水平上的产生和维持机制已经基本达到共识, 如图1所示。普遍观点认为, 哺乳动物昼夜节律的驱动主要依赖一系列复杂的正负反馈调节机制, 该机制的运行主要包括三个重要的核心反馈回路E反应元件 (E-box)、D反应元件 (D-box) 和ROR应答元件 (RORE)。涉及到的节律基因主要有有时钟昼夜节律调节器 (circadian locomotor output cycles kaput, CLOCK)、肌肉芳香烃受体核转运体样蛋白1 (brain and muscle ARNT-like 1, Bmal1)、时钟控制基因 (clock-control genes, CCGs)、维甲酸相关孤儿受体 (retinoic acid-related orphan receptors, RORs)、孤儿核受体REV-erbs、D-box结合蛋白 (D-box binding protein, Dbp)、腺病毒E4启动子结合蛋白4 (E4-binding protein 4, E4BP4) 等^[5,6]。其中回路一: CLOCK和Bmal1形成异源二聚体通过E-box回路激活CCGs的转录, 诱导钟控基因昼夜节律蛋白 (period circadian protein, per) 和隐花色素 (cryptochrome, cry) 的转录, 该反馈通路的诱导物和被诱导基因的表达呈现负反馈调节, 即随着per和cry在细胞质中的表达并通过磷酸化后向细胞核的转移增多, cry和per蛋白会抑制CLOCK和Bmal1复合物的活性而下调CCGs的表达; 回路二: ROR α 、 β 、 γ 和REV-erb α/β 作为CLOCK和Bmal1异二聚体的靶点^[7], CLOCK和Bmal1异二聚体激活RORs转录, 而REV-erbs通过与RORE结合负反馈调节Bmal1的转录; 回路三: Dbp和E4BP4蛋白通过D-box调节包括Per在内的基因的表达。昼夜节律正是在这些复杂的生物钟基因和钟控基因的形成网络的精密调控下, 产生节律性的震荡, 进而调节机体的代谢稳态。

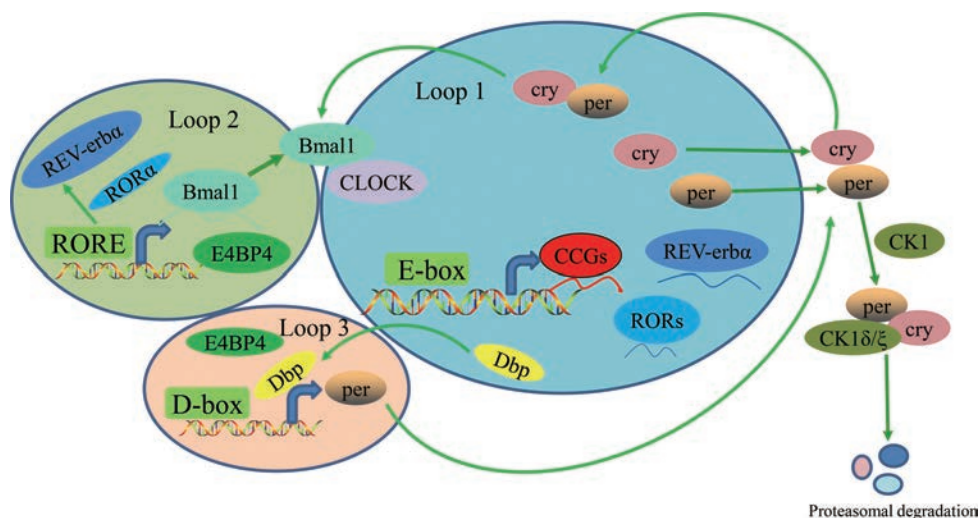


Figure 1 Molecular mechanism of circadian rhythm. CLOCK: Clock circadian regulator; Bmal1: Brain and muscle ARNT-like 1; Dbp: D-box binding protein; E4BP4: E4 binding protein 4; per: Period circadian protein; cry: Cryptochrome; RORs: Retinoic acid-related orphan receptors; CK1: Casein kinases

2 昼夜节律对代谢的调控

研究表明,昼夜节律及生物钟系统参与机体各个系统的代谢调控过程。2012年, Eckel-Mahan等^[8]发现超过600种肝脏代谢产物与节律存在协调性,表明生物钟系统与代谢之间存在着非常紧密的关系。二者之间可能通过一系列的代谢感受器相连接,这些感受器可能包括:氧化还原感受器、AMP/ATP比感受器、胆汁酸感受器、糖代谢和脂代谢的感受器。Krüppel样因子10(Krüppel-like factor 10, KLF-10)、过氧化物酶体增殖物激活受体(peroxisome proliferator-activated receptor, PPAR)和Rev-erb通过Bmal1启动子中的相应识别序列结合来调节Bmal1表达。NAD⁺的水平会影响沉默信息调节因子1(silent mating type information regulation 1 homolog 1, SIRT1)的活性,使Bmal1、per2和过氧化物酶体增殖物受体共激活因子1 α (peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator-1 α , PGC-1 α)蛋白脱乙酰,这导致PGC-1 α 介导的Bmal1表达与ROR的共激活。脱乙酰化的per2以 β -转导重复相容蛋白(β -transducin repeat containing protein, β -TrCP)形式降解,脱乙酰化的Bmal1与E-box的结合能力降低,节律调节因子PPAR1受到未知因素的调节,通过核糖基化调节CLOCK。当AMP/ATP比例增加时,肝激酶B(liver kinase B, LKB)使AMP活化蛋白激酶(AMP-activated protein kinase, AMPK)磷酸化,磷酸化后的AMPK使cry1磷酸化并靶向降解F-box富含亮氨酸重复蛋白3(F-box and leucine rich repeat protein 3, FBXL3)^[9]。全基因转录组分析的结果证明了这一观点。根据全基因转录分析表明大约有15%的基因表现出节律性振荡,而这些基因中的绝大多数是编码碳水化合物、脂质和胆固醇代谢的重要调节剂,以及解毒机制的调节剂。这些基因中,已证明作为生物钟输出调节的转录因子主要有:Dbp、E4BP4、转录增强因子(transcriptional enhancer factor, TEF)、肝白血因子(hepatic leukemia factor, HLF)、KLF10和KLF15等^[10]。当生物的节律发生变化时,会引起机体代谢发生相应的变化。研究显示,饮食时间、睡眠障碍、作息颠倒等外源因素引起的昼夜节律失调是诱发代谢综合征的危险因素。睡眠时间缩短、倒班等引起的昼夜节律紊乱与肥胖存在正相关性。在睡眠时间缩短与代谢性疾病的相关性研究方面,一项以785例儿童为研究对象的研究发现,睡眠时间缩短与超重之间具有相关性;多项流行病学研究结果也显示睡眠缺乏与肥胖之间存在正性关联^[11,12]。睡眠时间减少可损害胰岛素细胞的敏感性,降低瘦素水平和促进胃饥饿素分泌,从而影响糖代谢过程,促进肥胖发生。

在哺乳动物中,机体的昼夜节律存在多个时钟系统,这些时钟的同步调节依赖于SCN,SCN位于生物钟节律系统层次的顶端,充当其他时钟的中心导体,对机体节律性激素的分泌和机体正常的运动有非常重要的作用。一般认为,昼夜节律系统通过SCN发出的系统指示或者周围组织中的部分节律振荡器来影响机体新陈代谢变化。Kornmann等^[13]利用核孤儿受体Rev-erba能够特异性的抑制Bmal1的表达,基于Rev-erba的四环素依赖性构建无肝脏生物钟功能的小鼠模型模型。通过肝脏全基因组谱分析显示,350个具有稳定昼夜节律积累的基因,其中只有不到10%表现出节律积累且振幅较高。这点表明这些节律基因依赖于肝细胞中的本地振荡器,而不是依赖于SCN系统的信号。其余单振荡mRNA转录物每日持续震荡,相位、振幅均无明显波动,这些基因可能受SCN区的调控,将节律信号传递至肝细胞的核心钟控基因,并参与肝脏的节律性代谢。尽管SCN作为整个生物钟系统的主同步器,但食物的摄入可使外周时钟脱离SCN的控制。通过改变进食时间表、营养成分(氨基酸、葡萄糖等)可改变SCN的中心时钟与肝、心、肺等外周器官以及大脑皮质、海马体和纹状体等脑组织中的时钟之间的相位关系,形成由食物引起的独立的外周生物节律,实现重置生物钟时相。这表明由进食节律的变化引起的代谢变化会影响到生物钟昼夜节律。以上说明代谢变化会影响生物节律系统内关键节律基因和调节因子的变化,这种变化通过生物钟核心主调控器SCN处理反馈给机体的代谢感受器对相应的变化做出调节。除此之外,外周生物系统中存在着本地振荡器自主调控本地的生物代谢节律。

2.1 昼夜节律对糖代谢调控的分子机制 在人类和啮齿动物中,无论是整体水平还是器官/细胞水平,均可以观察到糖代谢的周期性震荡。禁食性大鼠血糖水平的自发性昼夜节律说明机体内存在内源性葡萄糖代谢节律。这与睡眠/觉醒、进食/禁食、运动等外源性变化引起的葡萄糖摄取、利用变化相区分。并且研究发现,手术损伤SCN区或通过基因操作生物钟基因会引起葡萄糖代谢的紊乱;CLOCK突变小鼠中肝糖原水平、糖原合成活性以及合成量的周期性节律显著减弱^[14];在SCN损伤、CLOCK突变和Bmal1缺陷小鼠中葡萄糖的耐受和胰岛素敏感性均受损^[15]。此外,不同的外周器官中存在本地生物振荡器,这些本地节律振荡器对葡萄糖稳态有独立的调控作用。例如,胰腺生物钟通过调控胰岛素的释放影响葡萄糖稳态,而肝生物钟通过调控肝糖异生过程影响葡萄糖耐受。脂肪细胞生物钟不直接影响葡萄糖稳态,但可能通过影响下

丘脑部位的食欲调节中心发挥间接调控作用。

目前关于生物钟对糖代谢的调控机制研究主要集中于糖原水平和糖代谢关键酶的节律性表达上。在CLOCK敲除的小鼠模型中,催化糖异生的关键限速酶—磷酸烯醇丙酮酸羧激酶(phosphoenolpyruvate carboxykinase, PEPCK)的表达在肝脏和主动脉中呈现昼夜节律性,在肾脏中的表达与主动脉和肝脏节律呈现反相位^[16],这一结果表明PEPCK的表达受到生物钟节律基因的控制且具有一定的组织特异性。随后,在肝细胞特异性的Bmal1敲除的小鼠中进一步得到证实。Zhang等^[17]通过评估禁食条件下肝脏cAMP反应原件结合蛋白(cAMP response element binding protein, Creb)活性的节律性结果表明,时钟通过调节Creb和Crtc2活性来抑制糖异生过程中的关键基因,如葡萄糖-6-磷酸酶(glucose-6-phosphatase, G6Pase)的表达来部分调节空腹糖异生,且Creb的体内磷酸化具有节律性。此外,Creb磷酸化表达与时钟控制基因CCGs具有明显的相关性。

2.2 昼夜节律对脂质代谢调控的分子机制 昼夜节律生物钟通过调节脂质代谢的关键步骤(合成、分解)发挥其调节作用。脂质代谢中有很多关键性的调节因子,包括Rev-erb、ROR蛋白、睾丸受体(testicular receptor, TR)、PPAR α 、PPAR γ 和PPAR δ 等以及这些因子参与的调控脂质合成和代谢的关键调节原件,例如:固醇调节元件结合蛋白(sterol regulatory element binding protein, SREBP)、乙酰辅酶A羧酶 α (acetyl-CoA carboxylase alpha, ACC α)等。这些调节因子和调节原件广泛存在于肝脏、身体脂肪组织中,受到生物钟系统的调节并呈现节律性表达。其中Rev-erb和ROR是直接参与调控体内脂质代谢过程的核心生物钟成分,其他例如per2、cry、肝X受体(liver X receptor, LXR)和法尼醇X受体(farnesoid X receptor, FXR)在这个过程中通过刺激或抑制分子配体的产生起到协助作用。既可以调节脂蛋白代谢和脂肪细胞的分化来维持脂代谢的稳态,又可以抑制载脂蛋白C的表达来降低血液中超低密度脂蛋白的水平。Rev-erb α 通过介导脂合成过程中的关键调节原件,包括SREBP及其靶基因脂肪酸合酶、ACC α 等来调节脂质的合成。在对脂分解代谢过程的调控方面,与脂肪水解相关的甘油三酯脂肪酶(adipose triglyceride lipase, ATGL)和激素敏感脂肪酶(hormone-sensitive lipase, HSL)、与脂肪酸 β -氧化有关的肉碱棕榈酰转移酶1(carnitine palmitoyltransferase 1, CPT1)和中链酰基辅酶A脱氢酶(medium-chain acyl-CoA dehydrogenase, MCAD)在多种组织中的基因表达水平呈现昼夜节律振荡^[18,19]。在Bmal1敲除小鼠的白色脂肪中,ATGL和

HSL的节律性缺失表达表明脂质的水解受控于生物钟系统核心节律基因^[20]。这些研究表明脂质的合成节律和代谢节律受到核心节律Bmal1的调节,并且主要由Rev-erb、PPAR和ROR所介导的一系列钟控基因的转录和调节原件来完成。但针对脂质代谢节律的具体分子机制及生物钟系统控制下的转录因子和控制的调节原件以及他们之间存在的相互作用情况仍较为模糊,需要大量的分子生物学实验来证明。

3 昼夜节律在肝脏、肾脏、消化系统和胆汁酸中调控的分子机制

3.1 昼夜节律对消化系统的调控 生物钟通过对关键能量代谢步骤和参与者的调控实现对机体能量代谢的调控,这种调控的实现依赖于限速酶、核受体、营养传感器等蛋白质和生物钟的结合。SIRT1是在哺乳动物中最早发现的沉默信息调节因子2相关酶(silent mating type information regulation 2 homolog 2, SIRT2)的同源蛋白^[21],在协调细胞框架功能代谢中占据优势地位,并控制着关键的代谢和生理过程。SIRT1通过使节律基因的启动子处的组蛋白H3第9位赖氨酸残基乙酰化(his H3 Lys 9 acetylation, H3K9ac)和组蛋白H3第14位赖氨酸残基乙酰化(his H3 Lys 14 acetylation, H3K14ac)和非组蛋白生物钟节律核心蛋白Bmal1和per2去乙酰化来调节昼夜节律。CLOCK和Bmal1复合物与SIRT1相互作用并将其集中到节律基因的启动子中,并能影响钟基因转录。在NAD⁺的影响下,SIRT1能调控组蛋白H3和Bmal1乙酰化。AMPK作为机体的能量感受器,AMPK受AMP/ATP的影响,例如缺血缺氧、氧化应激等可导致AMP/ATP升高,并激活AMPK,AMPK的激活用以调控ATP的分解代谢产能,关闭ATP的消耗过程^[22]。研究发现,AMPK的激活会导致NAD⁺水平的升高。由此可以推断出AMPK和SIRT1的表达具有关联机制,机体能量代谢的过程受生物钟系统的调控。

研究表明,生物钟系统及钟控基因可以精细的调控机体营养物质的代谢,昼夜节律的变化对机体消化系统的代谢具有一定的影响。例如:禁食大鼠血糖水平的自发性昼夜节律现象表明,机体内存在内源性葡萄糖昼夜节律调控基因^[23,24]。消化系统主要由口腔、胃、胰腺、小肠、大肠等组织器官构成,消化营养物质的功能依赖于消化系统分泌大量的酶。健康的哺乳动物在清晨和进食后的肠道蠕动最为频繁而在夜晚和休息时肠蠕动频率处于低谷,这就说明消化系统消化功能的实现与昼夜节律存在相关性。Maouyo等^[25]研究发现,大鼠的胰腺分泌物与小肠的蠕动存在昼夜节律性,且两者的节律存在相关性^[26]。小肠上皮细胞转运载体寡

肽转运蛋白 1 (peptide transporter 1, PEPT1) 的 mRNA 表达即使在非进食状态下也具有一定的节律性, 其氨基酸和多肽的吸收推测也受到昼夜节律的调控。随后, 进一步的研究中发现, 大鼠肠道中葡萄糖转运蛋白 2 (glucose transporter 2, GLUT2) 和葡萄糖转运蛋白 5 (glucose transporter 2, GLUT5) mRNA 的表达具有明显的节律性。葡萄糖转运蛋白节律性的发现, 为糖尿病的治疗提供了新的思路和靶点。研究还发现大鼠盲肠黏膜钠泵、 γ 上皮钠通道 (γ epithelial sodium channel, γ ENAC)、转运蛋白和钠氢交换调节因子 (Na^+/H^+ exchanger regulating factor 1, NHERF1) mRNA 的表达呈现昼夜节律变化^[27,28]。

研究表明, 口服药物的生物利用度也受到昼夜节律的调控。1981 年 Clench 等^[29]首次证明了昼夜节律变化对吡啶美辛生物利用度和药物作用具有一定的影响。P 糖蛋白 (P-glycoprotein, P-gp) 是一种转运蛋白并由多药耐药 (multi-drug resistance, Mdr) 基因编码。Ando 和 Murakami 等^[30,31]研究发现 Mdr1a mRNA 和 P-gp 蛋白在小鼠肠道中的表达呈现昼夜波动, 且 P-gp 的表达有助于剂量依赖性吸收地高辛。机制研究表明, P-gp 的表达通过生物钟系统输出基因 HLF 和 E4BP4 由 Bmal1 调控产生。综上, 生物钟系统通过 AMPK 和 SIRT1 的关联表达, 调节 Dbp、葡萄糖转运蛋白、PEPT1 等节律功能蛋白的合成进而调节消化系统能量代谢和口服药物的吸收。

3.2 昼夜节律对肝脏系统的调控作用 肝脏作为体内最重要的代谢器官, 承担着维持生命的重要功能。在体内氧化、储存糖原和分泌性蛋白的合成中扮演着重要角色。Radzialowski 等^[32]在 1968 年首次报道了大鼠和小鼠肝脏药物代谢的昼夜节律变化, 指出氨基比林、对硝基苯甲醚和己酸巴比妥在肝脏中的代谢随着时间的变化而变化, 最大代谢时间为凌晨 2:00, 最小代谢时间为下午 2:00。证实了肝脏的代谢受到节律基因的控制, 并指出最大代谢节点。早期的研究表明, 昼夜节律变化可影响肝脏的正常代谢, 但并未探索昼夜节律调控的分子机制。

生物钟调控系统中的 D-box 产生的抑制钟控基因表达的 Dbp 蛋白与肝脏系统昼夜节律性的表达具有非常紧密的关系。早在 1999 年 Lavery 等^[33]提出了 Dbp 是控制细胞色素 P450 2A4 (Cytochrome P450 2A4, Cyp2a4) 和 Cyp2a5 (Cytochrome P450 2A45, Cyp2a5) 基因在小鼠肝脏中昼夜节律表达的主要因素, 基因 Cyp2a4 和 Cyp2a5 的启动子均含有与 Dbp 的高亲和力结合位点, 并且发现了 Dbp 基因的敲除会导致小鼠肝脏对节律的敏感性。随后 Gachon 等^[10]的研究证实了这一观点。Zhao

等^[34]研究发现 Dbp 对 Cyp2a4/5 的转录具有抑制作用, 已知 Dbp 和 E4BP4 在 D-box 调节回路中是竞争性拮抗的关系, 即 E4BP4 的作用与 Dbp 相反。同时 Zhao 等^[35]研究发现 CLOCK 蛋白通过启动子区域的 E-box 元素特异性控制 Cyp2a4/5 的昼夜表达。Zhao 等^[36]研究发现肝脏中受体互作蛋白 (receptor-interacting protein 140, RIP140) 与 Cyp2b10 的表达呈现负相关调控, 且具有昼夜节律性。同时发现 D-box 和 RORE 起作用的时钟组件, 例如 Dbp、E4BP4、Rev-erb α/β 和 ROR α 的转录调节 RIP140。最新研究还发现转录因子 KLF9 在肝脏中具有节律性震荡, 并由转录-翻译反馈回路负反馈调节 Dbp 的表达, 通过基因组分析还表明 KLF9 与 per1、per3、Dbp、Tef、一种碱性-螺旋-环-碱性的转录因子 (basic-helix-loop-helix transcriptional factor E40/41, Bhlhe40/41) 和 Rev-erb 具有相关性, 说明 KLF9 为 CLOCK 和 Bmal1 的潜在结合靶点^[37]。同时, 转录因子 KLF13 对 CLOCK 和 Bmal1 异二聚体转录 Dbp 具有抑制作用^[38], 说明 KLF13 与 Dbp 之间存在负反馈调节机制。综上, 肝脏系统代谢节律的实现 (图 2) 依赖于关键酶 Cyp2a4/5 和 Cyp2b10 的节律性表达, 而 Cyp2a4/5 和 Cyp2b10 的表达受到 Dbp、E4BP4、RIP140 和 KLF9/13 等结合蛋白和转录因子通过 D-box 和 E-box 回路的调节。可能还存在其他关键酶的调控作用, 这点需要更多的研究来验证。

3.3 昼夜节律对肾脏系统的调控作用 越来越多的研究表明, 昼夜节律对肾脏系统的代谢具有调控作用, 肾脏在药物的代谢、清除和代谢产物的排泄过程中发挥着重要的作用, 主要通过肾小球过滤、肾小管分泌及肾小管重吸收等途径完成体内物质的清除。研究发现, 动物的尿液 pH 值、尿蛋白含量、肾小球滤过率和肾血浆流量均呈现昼夜节律性^[39,40], 上述生理功能的节律性变化表明肾脏功能受生物钟系统的调控。1995 年, White 等^[41]发现氨基青霉素在大鼠肾小管排泄呈现昼夜节律性, 暗期给药的肾脏清除率是亮期给药的两倍, 表明肾脏在夜晚的代谢清除率大于白天。肾脏存在的节律基因主要有 per1/2/3、Bmal1、Dbp、P-gp、有机阳/阴离子转运蛋白及多种溶质载体蛋白, 这些功能性蛋白在肾脏中均呈现节律性表达。近年来, 研究发现溶质载体 (solute carrier, Slc) 家族中的 Slc9a3 和 Na^+/H^+ 交换子 (Na^+/H^+ exchanger 3, Nhe3) 在啮齿动物中表现出昼夜节律性, 在 Bmal1 基因敲除小鼠中失去节律性^[42]。在人和动物中剂量依赖性的顺铂的肾毒性可能依赖于 Slc22a2 和 OCT2 (recombinant octamer binding transcription factor 2) 在肾脏中的昼夜表达^[43,44]。Oda 等^[45]研究发现, 昼夜节律控制的核受体 PPAR α 调节 Slc22a2 的转

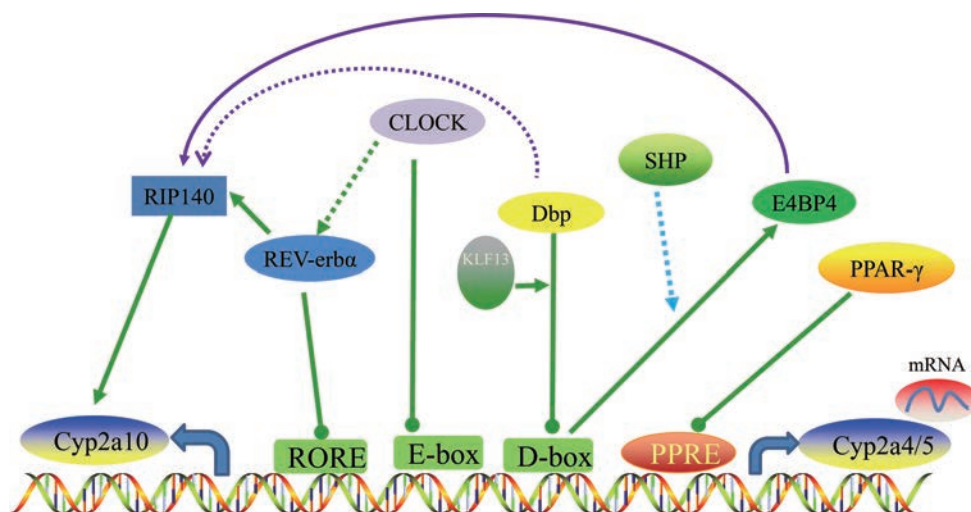


Figure 2 The molecular mechanism of circadian rhythm regulating the liver system; RIP140: Coregulator, receptor-interacting protein 140; KLF13: Krüppel-like factor 13; PPAR- γ : Peroxisome proliferator-activated receptor- γ ; SHP: Small heterodimer partner gene; Cyp2a4/5/10: Cytochrome P450 2A4/5/10; PPAR: Peroxisome proliferator-activated receptor; PPRE: Peroxisome proliferator response element

录,从而实现昼夜节律的调控。早期研究发现,在 PAR bZip 缺陷的小鼠中, Mrp4 和 Slc22a7 的肾脏表达明显降低。因此,昼夜节律对肾脏系统的调控可能通过 E-box 和 D-box 回路调节核受体 PPAR α 对 Slc22a2 的转录、Slc9a3 和 Slc22a7 等其他功能性蛋白的转录合成调节肾脏的代谢节律。

3.4 昼夜节律对胆汁酸代谢的影响 胆汁酸是胆汁的重要成分,在体内参与多种代谢途径。人类和啮齿类动物的胆汁酸调节具有昼夜节律性这一点已为人熟知,核受体 (nuclear receptors, NRs) 是一组在胆汁酸代谢中起重要作用的配体激活转录因子,例如孕烷 X 受体 (pregnane X receptor, PXR) 和维生素 D 受体 (Vitamin D receptor, VDR)^[46]。其中 FXR 在胆汁酸稳态的调控中具有非常重要的地位。胆汁酸水平的 24 小时节律性变化和关键酶 Cyp7a1 的表达在人和啮齿类动物中不同^[47]。Kovář 等^[48]研究了 Cyp7a1 活性的昼夜变化, Cyp7a1 的替代标志物 C4 的浓度在健康受试者中出现明显的昼夜变化。Falvey 等^[49]研究发现 Cyp7a1 在啮齿类动物中的表达不同于人类,说明胆汁酸的昼夜节律表达存在物种间的差异。FGF15/19 对胆汁酸合成的调节作用有关^[50],与 Cyp7a1 mRNA 表达相比,微小异源二聚体伙伴基因 (small heterodimer partner gene, SHP) mRNA 与 FXR/SHP 途径对 Cyp7a1 的负调控相一致。最新研究^[51]发现,食物摄入后共轭胆汁酸达到峰值,随后出现成纤维细胞生长因子 (fibroblast growth factor 19, FGF19) 升高、胆汁酸分泌减少。然而在非共轭胆汁酸未观察到与 FGF19 的相关性。这一现象表明 FXR 在胆汁酸的合成和运输方面起到至关重要的

作用,而高脂饮食会显著引起 FXR mRNA 的表达水平表明 FXR 与胆汁酸之间可能存在负反馈调节机制^[52]。此外 KLF15 最新研究^[53]确认其为 FGF19 的内源性负调控因子调节胆汁酸的昼夜分泌节律。综上,胆汁酸的节律代谢可能通过两方面来调节,一方面由 FXR mRNA 通过调节 FGF19 的表达负反馈调节胆汁酸的合成,另一方面 SHP mRNA 通过 FXR/SHP 途径负调控 Cyp7a1 的表达调控胆汁酸的代谢节律。

4 中医药干预昼夜节律研究

传统中医药理论对节律有着较早的认识,《黄帝内经》中就提及年、月、日节律,《灵枢·顺气一日分为四时》云:“春生、夏长、秋收、冬藏,是气之常也,人亦应之。以一日分为四时,朝则为春,日中为夏,日入为秋,夜半为冬”。《伤寒论》中“太阳病,头痛至七日以上而自愈者,以行其经尽故也”,指出了疾病的 7 日节律,又云:“太阳病,欲解时,从巳至未上”、“阳明病欲解时,从申至戌上”,体现了昼夜节律和时间治疗的概念。后代医家认为人体功能活动、病理变化受自然界气候变化、时日等影响而呈现一定的规律,根据这种规律,选择适当时间治疗疾病,可以获得较佳疗效,因此提出“因时施治”、“按时给药”等理论。代谢组学之父 Nicholson 教授认为,人体应该作为一个完整的系统来研究,应该用代谢组学和全面性系统策略来理解生物体的疾病过程。Langley 等^[54]分析预测脓毒症生存与死亡患者血清代谢组的差异,发现二者在脂肪酸运输和氧化、糖质新生、柠檬酸循环通路有着明显的不同,从而指导患者的个性化治疗。Kinross 和 Nicholson 等^[55,56]采用代谢组学的方法发现了外科手术患者的代谢表型 (meta-

bolic phenotyping), 实现实时个性化诊断, 从而提高诊断和选择性的。代谢表型以及个性化诊断的研究都是从系统生物学整体的思维出发, 与中医证候的整体观念和辨证论治思维方式非常相似。

中药中含有多种结构类型的化合物, 可为节律基因和功能蛋白提供大量潜在作用靶点的筛选。近年来, 针对中药成分对代谢节律的干预做了大量的研究。Chen等^[57]通过基因表达分析发现葛根中的葛根素是 *Rev-erba* 的拮抗剂, 以昼夜节律的方式缓解小鼠高同型半胱氨酸血症。但具体作用机制有待深入研究。Yang等^[58]发现附子的心脏毒性具有昼夜节律性, 其中以乌头碱、次乌头碱和乌头原碱的毒性最大, 通过 *Bmal1* 的消融会废除附子在肝脏代谢中的节律性。Bian^[59]通过研究发现褪黑素能有效改善因昼夜节律导致大鼠的睡眠模式和能量代谢的变化, 从而提高睡眠质量。Wen^[60]研究发现, 小鼠在明期摄食海参皂苷条件下节律基因 *cry1*、*cry2*、*PPAR α* 和 *per2* 的表达水平明显上调, 并同时上调肝脏脂肪酸合成氧化、胆固醇合成、转化逆转运相关基因在整个周期的表达水平。这项研究表明了海参皂苷能够调节生物钟钟控基因的表达, 但具体分子作用机制还有待深入研究。Sun^[61]研究发现白藜芦醇可以通过激活 *SIRT1* 的节律性表达, 改善 *CLOCK*、*Bmal1* 的表达, 改善脂代谢的昼夜节律规律。Zhu^[62]利用复方贞术调脂方干预昼夜节律失调所致糖脂代谢紊乱小鼠模型发现, 复方贞术调脂方能够改善模型小鼠的血脂水平, 增加胰岛素的敏感性, 并调节肝脏 *cry1*、*PPAR α* 基因的表达节律性。Zhang等^[63]发现参芪复方通过上调钟基因 *cry1*、*Dbp* 的表达调控昼夜节律以调节胰岛素的分泌, 维持体内糖代谢稳态防治 2 型糖尿病。Han等^[64]利用加载活血潜阳祛痰方治疗肥胖高血压患者, 治疗组的动态血压和收缩压昼夜节律分布优于西药治疗组。但具体调节治疗方式仍未阐明。Meng等^[65]探讨了茯苓极性提取物对慢性温和和不可预知性应激 (CUMS) 模型大鼠神经递质和昼夜节律代谢途径的调节作用, 结果发现茯苓提取物可增强 5-羟色胺 (5-hydroxytryptamine, 5-HT) 代谢途径, 调节乙酰胆碱-去甲肾上腺素信号的相互作用以及氨基酸神经递质比例的平衡, 回调节律基因 *Arntl*、*per1*、*per2*、*per3*、*Nr1d1* 的表达水平, 从而改善 CUMS 大鼠神经递质及昼夜节律紊乱。Zhang^[66]发现生慧汤改善阿尔茨海默症的作用机制可能是通过上调 *Bmal1* 基因的表达, 改善昼夜节律紊乱。

5 展望

昼夜节律与机体代谢功能密切相关, 参与体内多个器官的代谢活动。近些年对生物钟系统的作用机制

进行了深入探讨, 发现了 *CLOCK*、*Bmal1*、*Rev-erba* 等多个节律基因及钟控基因和功能蛋白。昼夜节律的紊乱与高血压、高血脂、糖尿病、肥胖症等代谢性疾病的发生有关, 生物钟系统的研究为这些疾病的治疗提供了全新的视角, 分子机制的研究可为其治疗提供潜在的作用靶点。但分子机制的探索仍处在浅显阶段, 许多问题亟待解决。例如, *AMPK* 与 *SIRT1* 联合调控肠道代谢节律的具体机制如何。肝脏系统中 *Cyp* 系列酶是否有其他酶参与肝脏代谢节律的调控及其作用机制如何。肾脏中 *Slc* 系列功能蛋白的相互作用机制等等。中药具有数千年的历史, 其底蕴十分丰富。在现代药理学的发展过程中具有非常重要的地位。中药以及中药复方中含有大量的活性物质, 为节律机制的阐明提供了大量候选靶点。但由于中药多成分以及成分间的相互协调作用也为节律分子机制的探索带来了困难。相信在未来的研究中, 这些问题都会逐步得到解决。

作者贡献: 陈振山负责文献的检索与整理以及论文初稿的撰写、按照编辑的修改意见进行核修; 张耀文参与资料分析与解释、论文格式修改; 王小明、田振华修改论文中关键性理论和其他主要内容; 齐东梅、蒋海强参与获得基金、论文选题和设计, 对修改稿的学术问题进行解答, 并最终同意论文的发表。除负责本人的研究贡献外, 同意对研究工作各方面的诚信问题负责。

利益冲突: 所有作者均声明不存在利益冲突。

References

- [1] Hastings MH, Reddy AB, Maywood ES. A clockwork web: circadian timing in brain and periphery, in health and disease [J]. *Nat Rev Neurosci*, 2003, 4: 649-661.
- [2] Panda S. Multiple photopigments entrain the mammalian circadian oscillator [J]. *Neuron*, 2007, 53: 619-621.
- [3] Albrecht U. Timing to perfection: the biology of central and peripheral circadian clocks [J]. *Neuron*, 2012, 74: 246-260.
- [4] Mohawk JA, Green CB, Takahashi JS. Central and peripheral circadian clocks in mammals [J]. *Annu Rev Neurosci*, 2012, 35: 445-462.
- [5] Cermakian N, Sassone-Corsi P. Multilevel regulation of the circadian clock [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2000, 1: 59-67.
- [6] Preitner N, Damiola F, Lopez-Molina L, et al. The orphan nuclear receptor *Rev-erba* controls circadian transcription within the positive limb of the mammalian circadian oscillator [J]. *Cell*, 2002, 110: 251-260.
- [7] Yamajuku D, Shibata Y, Kitazawa M, et al. Cellular *Dbp* and *E4BP4* proteins are critical for determining the period length of the circadian oscillator [J]. *FEBS Lett*, 2011, 585: 2217-2222.
- [8] Eckel-Mahan KL, Patel VR, Mohny RP, et al. Coordination of the transcriptome and metabolome by the circadian clock [J].

- Proc Natl Acad U S A, 2012, 109: 5541-5546.
- [9] Gad A, Ueli S. Crosstalk between components of circadian and metabolic cycles in mammals [J]. *Cell Metab*, 2011, 13: 125-137.
- [10] Gachon F, Olela FF, Schaad O, et al. The circadian PAR-domain basic leucine zipper transcription factors Dbp, Tef, and HLF modulate basal and inducible xenobiotic detoxification [J]. *Cell Metab*, 2006, 4: 25-36.
- [11] Lumeng JC, Somashekar D, Appugliese D, et al. Shorter sleep duration is associated with increased risk for being overweight at ages 9 to 12 years [J]. *Pediatrics*, 2007, 120: 1020-1029.
- [12] Cappuccio FP, Taggart FM, Ngianga-Bakwin K, et al. Meta-analysis of short sleep duration and obesity in children and adults [J]. *Sleep*, 2008, 5: 619-626.
- [13] Kornmann B, Schaad O, Bujard H, et al. System-driven and oscillator-dependent circadian transcription in mice with a conditionally active liver clock [J]. *PLoS Biol*, 2007, 5: e34.
- [14] Fleur SEL, Kalsbeek A, Wortel J. A daily rhythm in glucose tolerance a role for the suprachiasmatic nucleus [J]. *Diabetes*, 2001, 50: 1237-1243.
- [15] Kalsbeek A, La FS, Fliers E. Circadian control of glucose metabolism [J]. *Mol Metab*, 2014, 3: 372-383.
- [16] Rudic RD, McNamara P, Curtis AM, et al. Bmal1 and CLOCK, two essential components of the circadian clock, are involved in glucose homeostasis [J]. *PLoS Biol*, 2004, 2: e377.
- [17] Zhang EE, Liu Y, Dentin R, et al. Cryptochrome mediates circadian regulation of cAMP signaling and hepatic gluconeogenesis [J]. *Nat Med*, 2010, 16: 1152-1156.
- [18] Filiano AN, Telisha MS, Russell J, et al. Chronic ethanol consumption disrupts the core molecular clock and diurnal rhythms of metabolic genes in the liver without affecting the suprachiasmatic nucleus [J]. *PLoS One*, 2013, 8: e71684.
- [19] Clara BP, Alison HA, Kathryn MR, et al. Circadian clock NAD⁺ cycle drives mitochondrial oxidative metabolism in mice [J]. *Science*, 2013, 342: 1243417.
- [20] Fontaine C, Dubois G, Duguay Y, et al. The orphan nuclear receptor Rev-erb α is a peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) γ target gene and promotes PPAR γ -induced adipocyte differentiation [J]. *J Biol Chem*, 2003, 278: 37672-37680.
- [21] Cheng HL, Mostoslavsky R, Saito S, et al. Developmental defects and p53 hyperacetylation in Sir2 homolog (SIRT1)-deficient mice [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003, 100: 10794-10799.
- [22] Hardie DG. AMP-activated/SNF1 protein kinases: conserved guardians of cellular energy [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2007, 8: 774-785.
- [23] Calvo JA, Daniels TG, Wang X, et al. Muscle-specific expression of PPAR γ coactivator-1 α improves exercise performance and increases peak oxygen uptake [J]. *J Appl Physiol*, 2008, 104: 1304-1312.
- [24] La FSE, Kalsbeek A, Wortel J, et al. A daily rhythm in glucose tolerance: a role for the suprachiasmatic nucleus [J]. *Diabetes*, 2001, 50: 1237-1243.
- [25] Maouyo D, Sarfati P, Guan D, et al. Circadian rhythm of exocrine pancreatic secretion in rats: major and minor cycles [J]. *Am J Physiol*, 1993, 264: G792-G800.
- [26] Saito H, Terada T, Shimakura J, et al. Regulatory mechanism governing the diurnal rhythm of intestinal H⁺/peptide cotransporter 1 (PEPT1) [J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2008, 295: G395-G402.
- [27] Pan XY, Terada T, Irie M, et al. Diurnal rhythm of H⁺-peptide cotransporter in rat small intestine [J]. *Am J Physiol: Gastroenterol Liver Physiol*, 2002, 283: G57-G64.
- [28] Sot KM, Polidarov L, Muslkov J, et al. Circadian regulation of electrolyte absorption in the rat colon [J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2011, 301: G1066-G1074.
- [29] Clench J, Reinberg A, Dzierwanowska Z, et al. Circadian changes in the bioavailability and effects of indomethacin in healthy subjects [J]. *Eur J Clin Pharmacol*, 1981, 20: 359-369.
- [30] Ando H, Yanagihara H, Sugimoto K, et al. Daily rhythms of P-glycoprotein expression in mice [J]. *Chronobiol Int*, 2005, 22: 655-665.
- [31] Murakami Y, Higashi Y, Matsunaga N, et al. Circadian clock-controlled intestinal expression of the multidrug-resistance gene *mdr1a* in mice [J]. *Gastroenterol*, 2008, 135: 1636-1644.
- [32] Radzialowski, FM, Bousquet WF. Daily rhythmic variation in hepatic drug metabolism in the rat and mouse [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 1968, 163: 229-238.
- [33] Lavery DJ, Lopez-Molina L, Margueron R, et al. Circadian expression of the steroid 15 α -hydroxylase (Cyp2a4) and coumarin 7-hydroxylase (Cyp2a5) genes in mouse liver is regulated by the PAR leucine zipper transcription factor Dbp [J]. *Mol Cell Biol*, 1999, 19: 6488-6499.
- [34] Zhao M, Zhang T, Yu F, et al. E4bp4 regulates carboxylesterase 2 enzymes through repression of the nuclear receptor Rev-erb α in mice [J]. *Biochem Pharmacol*, 2018, 152: 293-301.
- [35] Zhao M, Zhao H, Deng J, et al. Role of the CLOCK protein in liver detoxification [J]. *Br J Pharmacol*, 2019, 176: 4639-4652.
- [36] Zhao M, Zhao H, Lin LM, et al. Nuclear receptor co-repressor RIP140 regulates diurnal expression of cytochrome P450 2b10 in mouse liver [J]. *Xenobiotica*, 2020. DOI: 10.1080/00498254.2020.1751342.
- [37] Knoedler JR, Jose VM, Subramani A, et al. The paralogous Krüppel-like factors 9 and 13 regulate the mammalian cellular circadian clock output gene Dbp [J]. *J Biol Rhythms*, 2020, 35: 257-274.
- [38] Zhang T, Guo L, Yu F, et al. The nuclear receptor Rev-erb α participates in circadian regulation of Ugt2b enzymes in mice [J]. *Biochem Pharmacol*, 2019, 161: 89-97.
- [39] Pons M, Forpomès O, Espagnet S, et al. Relationship between circadian changes in renal hemodynamics and circadian changes

- in urinary glycosaminoglycan excretion in normal rats [J]. *Chronobiol Int*, 1996, 13: 349-358.
- [40] Rackley RJ, Meyer MC, Straughn AB. Circadian rhythms in theophylline disposition: simulations and observations in the dog [J]. *J Pharm Sci*, 1991, 80: 824-829.
- [41] White CA, Pardue R, Huang C, et al. Chronobiological evaluation of the active biliary and renal secretion of ampicillin [J]. *Chronobiol Int*, 1995, 12: 410-418.
- [42] Rohman MS, Emoto N, Nonaka H, et al. Circadian clock genes directly regulate expression of the Na⁺/H⁺ exchanger NHE3 in the kidney [J]. *Kidney Int*, 2005, 67: 1410-1419.
- [43] Boughattas NA, Levi F, Fournier C, et al. Stable circadian mechanisms of toxicity of two platinum analogs (cisplatin and carboplatin) despite repeated dosages in mice [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 1990, 255: 672-679.
- [44] Lévi F, Benavides M, Chevelle C, et al. Chemotherapy of advanced ovarian cancer with 4'-*O*-tetrahydropyranyl doxorubicin and cisplatin: a randomized phase II trial with an evaluation of circadian timing and dose-intensity [J]. *J Clin Oncol*, 1990, 8: 705-714.
- [45] Oda M, Koyanagi S, Tsurudome Y, et al. Renal circadian clock regulates the dosing-time dependency of cisplatin-induced nephrotoxicity in mice [J]. *Mol Pharmacol*, 2014, 85: 715-722.
- [46] Li T, Chiang JYL. Bile acid signaling in metabolic disease and drug therapy [J]. *Pharmacolo Rev*, 2014, 66: 948-983.
- [47] Stanimirov B, Stankov K, Mikov M. Bile acid signaling through farnesoid X and TGR5 receptors in hepatobiliary and intestinal diseases [J]. *Hepatobiliary Pancreatic Dis Int*, 2015, 14: 18-33.
- [48] Kovár J, Leníček M, Zimolová M, et al. Regulation of diurnal variation of cholesterol 7 α -hydroxylase (Cyp7a1) activity in healthy subjects [J]. *Physiol Res*, 2009, 59: 233-238.
- [49] Falvey E, Fleury-Olela F, Schibler U. The rat hepatic leukemia factor (HLF) gene encodes two transcriptional activators with distinct circadian rhythms, tissue distributions and target preferences [J]. *EMBO J*, 1995, 14: 4307-4317.
- [50] Amani AK, Sara S, Veronika V, et al. Asynchronous rhythms of circulating conjugated and unconjugated bile acids in the modulation of human metabolism [J]. *J Int Med*, 2018, 284: 546-559.
- [51] Jennifer YK, Guo GL, Klaassen CD, et al. Diurnal variations of mouse plasma and hepatic bile acid concentrations as well as expression of biosynthetic enzymes and transporters [J]. *PLoS One*, 2011, 6: e16683.
- [52] Han S, Zhang R, Jain R, et al. Circadian control of bile acid synthesis by a KLF15-Fgf15 axis [J]. *Nat Commun*, 2015, 6: 7231.
- [53] Jeyaraj D, Scheer FJL, Ripperger JA, et al. Klf15 orchestrates circadian nitrogen homeostasis [J]. *Cell Metab*, 2012, 15: 311-323.
- [54] Langley RJ, Tsalik EL, Velkinburgh JCV, et al. An integrated clinico-metabolomic model improves prediction of death in sepsis [J]. *Sci Transl Med*, 2013, 5: 700-708.
- [55] Kinross JM, Holmes E. Metabolic phenotyping for monitoring surgical patients [J]. *Lancet*, 2011, 377: 1817-1819.
- [56] Nicholson JK, Elaine H, Kinross JM, et al. Metabolic phenotyping in clinical and surgical environments [J]. *Nature*, 2012, 491: 384-392.
- [57] Chen M, Zhou C, Xu HM, et al. Chronopharmacological targeting of Rev-erba by puerarin alleviates hyperhomocysteinemia in mice [J]. *Biomed Pharmacother*, 2020, 125: 109936.
- [58] Yang ZM, Lin YK, Gao L, et al. Circadian clock regulates metabolism and toxicity of Fuzi (lateral root of *Aconitum carmichaeli* Debx) in mice [J]. *Phytomedicine*, 2020, 67: 153161.
- [59] Bian HS. Study on the Effect of Circadian Rhythm on Sleep Pattern and Energy Metabolism in Rats and the Intervention Effect of Melatonin (昼夜节律对大鼠的睡眠模式和能量代谢的影响及褪黑素的干预作用研究) [D]. Harbin: Heilongjiang University of Traditional Chinese Medicine, 2015.
- [60] Wen M. Effects of Sea Cucumber Saponins on Mouse Biological Clock and Lipid Metabolism Gene Rhythm (海参皂苷对小鼠生物钟及脂质代谢基因节律的影响) [D]. Qingdao: Ocean University of China, 2014.
- [61] Sun LJ. Resveratrol Regulates Biological Rhythm and Intervenes Lipid Metabolism in Mice with High Fat Diet (白藜芦醇调节生物节律干预高脂膳食小鼠脂代谢的研究) [D]. Zhenjiang: Jiangnan University, 2015.
- [62] Zhu CS. Study on the Intervention Effect and Mechanism of Fufang Zhenzhu Tiaozhi Decoction on Mouse Model of Glucose and Lipid Metabolism Disturbance Caused by Circadian Rhythm (复方贞术调脂方对昼夜节律失调所致糖脂代谢紊乱小鼠模型的干预作用及机制研究) [D]. Guangzhou: Guangdong Pharmaceutical University, 2016.
- [63] Zhang XY, Chao J, Wang HT, et al. Effect of Shenqi Fufang on circadian rhythm of type 2 diabetic GK rats [J]. *J Pract Med (实用医学杂志)*, 2020, 36: 874-879.
- [64] Han YN, Lu B, Long M, et al. Effects of Huoxue Qianyang Qutan recipe on ambulatory blood pressure, blood pressure variability and blood pressure circadian rhythm in obese hypertensive patients [J]. *Chin J Integr Med Cardio-Cerebrovasc Dis (中西医结合心脑血管病杂志)*, 2020, 18: 41-44.
- [65] Meng MD, Feng Y, Wang P, et al. Regulatory effect of polar extract of *Poria cocos* on neurotransmitter and circadian rhythm disorder in CUMS rats [J]. *Chin Tradit Herb Drugs (中草药)*, 2020, 51: 118-126.
- [66] Zhang MY. Based on the Regulation of Circadian Clock Genes on Inflammatory Factors, the Intervention Effect of Huitang on Alzheimer's Disease (基于生物钟基因对炎症因子的调控研究生慧汤对阿尔茨海默病的干预作用) [D]. Wuhan: Hubei University of Traditional Chinese Medicine, 2019.