

综 述

生物钟节律与肝脏代谢稳态

陈亚琼, 刘雅欣, 王 蕾, 周玲芹, 刘 浥*

复旦大学基础医学院生物化学与分子生物学系, 代谢分子医学教育部重点实验室, 上海 200032

摘 要: 生物钟(circadian clock)是机体内在的自主性计时系统, 包括视交叉上核(suprachiasmatic nucleus, SCN)中枢生物钟与各组织外周生物钟。分子生物钟的核心机制包括CLOCK/BMAL1二聚体诱导抑制因子CRYs和PERs的转录, CRYs/PERs复合物反馈抑制前者转录活性, 进而使这些生物钟核心因子以及节律输出基因的转录水平呈24 h振荡的反馈调节核心环路, 以及REV-ERB α 和ROR α 调控BMAL1转录的补充环路。机体大约80%的蛋白编码基因表达呈现明显的昼夜节律性特征, 生物钟系统使生物能够适应地球自转所产生的昼夜节律(近日节律), 使机体的代谢平衡与能量相互协同。生物钟与代谢稳态相互依存、互为基础, 使机体能够高效利用能量, 协同机体不同组织, 快速适应内外环境变化。肝脏作为机体代谢的中枢器官, 其进行的各种生理活动几乎都受到生物钟的控制。生物钟与肝脏代谢调控之间存在多重交互调控机制, 两者的交互平衡失调是代谢性疾病的高风险因素。本文主要就肝脏的糖、脂和蛋白质代谢的节律性调控进行了综述, 并强调了线粒体功能的振荡, 讨论了肝脏代谢对生物钟的反馈调节, 并对生物钟研究方法和应用进行展望。

关键词: 生物钟; 代谢稳态; 肝脏; 昼夜节律**中图分类号:** Q4; R3

Internal circadian clock and liver metabolism

CHEN Ya-Qiong, LIU Ya-Xin, WANG Lei, ZHOU Ling-Qin, LIU Yi*

Key Laboratory of Metabolism and Molecular Medicine, Ministry of Education, Department of Biochemistry and Molecular Biology, School of Basic Medicine, Fudan University, Shanghai 200032, China

Abstract: Circadian clock is an internal autonomous time-keeping system, including central clocks located in the suprachiasmatic nucleus (SCN) and peripheral clocks. The molecular circadian clock consists of a set of interlocking transcriptional-translational feedback loops that take the clock-controlled genes 24 h to oscillate. The core mechanism of molecular circadian clock is that CLOCK/BMAL1 dimer activates the transcription of cryptochromes (CRYs) and Periods (PERs), which act as transcriptional repressors of further CLOCK/BMAL1-mediated transcription. In addition to this basic clock, there is an additional sub-loop of REV-ERB α and ROR α regulating the transcription of BMAL1. Approximately 80% protein-coding genes demonstrate significant rhythmicity. The earth rotation is responsible for the generation of the daily circadian rhythms. To coordinate metabolic balance and energy availability, almost all organisms adapt to the rhythm. Studies have shown that circadian clock integrating with metabolic homeostasis increases the efficiency of energy usage and coordinates with different organs in order to adapt to internal physiology and external environment soon. As the central organ of metabolism, the liver performs various physiological activities nearly all controlled by the circadian clock. There are multiple interactive regulation mechanisms between the circadian clock and the regulation of liver metabolism. The misalignment of metabolism with tissue circadian is identified as a high-risk factor of metabolic diseases. This article reviews the recent studies on circadian physiological regulation of liver glucose, lipid and protein metabolism and emphasizes oscillation of mitochondrial function. We also take an outlook for new methods and application of circadian clock research in the future.

Key words: circadian clock; metabolic homeostasis; liver; circadian rhythm

Received 2020-11-29 Accepted 2021-06-04

Research from the corresponding author's laboratory was supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 31671218).

*Corresponding author. E-mail: liuyee@fudan.edu.cn

地球上绝大多数地区具有接近 24 h 的光 - 暗周期。阳光几乎是地球上所有能量的来源。生命体的有序结构和生理活动的维持都需要持续、高效的能量输入。在长期的进化中, 地球生物形成了与光周期同步的生物节律, 即以 24 h 为周期的一系列生命过程。生物节律表现在: (1) 机体的生理、行为等方面重复出现的规律特性, 例如睡眠 - 觉醒, 进食 - 禁食; (2) 以 24 h 为周期, 例如细胞分裂、光合作用速率变化等, 从而保证机体适应环境并高效利用能量; (3) 具有温度补偿的特征, 这种特性使得机体能在恶劣的环境下也保持稳态。而多年的研究证明, 生物节律的产生和调节来源于内源性自主计时内在系统——生物钟 (circadian clock)。从 1729 年记录含羞草生物节律的现象到 1984 年克隆第一个生物钟基因 *Period1* (果蝇), 再到 20 世纪 60 年代解析生物钟负反馈转录调节机制, 生物钟的发现历时 300 多年^[1-3]。前期的研究已经证明, 人体生物钟由中枢生物钟 (central clocks) 和外周生物钟 (peripheral clocks) 组成。中枢生物钟存在于视交叉上核 (suprachiasmatic nucleus, SCN), 与光感受器联系, 直接感受外界输入的光信号, 是整体生物钟系统的“起搏器”^[4]。外周组织具有组织特异性的外周生物钟, 外周生物钟既受到中枢生物钟的调控, 又受局部微环境的牵引, 这使它们的节律性具有一定的组织特异性, 因此外周生物钟与中枢生物钟节律有一定的相位差, 比如灵长目的 SCN 与胰腺组织节律性表达谱的相位差约为 7 h^[5]。在分子水平上, 生物钟是个由正负调控转录环整合而成的自动调节反馈基因表达网络。分子生物钟的核心机制即为转录激活因子 CLOCK 和 BMAL1 形成二聚体, 结合于 E-box 元件诱导抑制因子隐花色素基因 (*Cryptochrome*, 包括 2 种亚型, *Cry1* 和 *Cry2*) 和周期基因 (*Period*, 包括 3 种亚型, *Per1*、*Per2* 和 *Per3*) 的转录, CRYs 和 PERs 蛋白质成熟后形成二聚体入核, 结合并抑制 BMAL1/CLOCK 转录活性, 使自身和节律输出基因转录水平呈现约 24 h 周期振荡的负反馈转录调节环路。除了这个主要的分子反馈环外, 分子生物钟的机制还包括 REV-ERB α/β (也称为 NR1D1 和 NR1D2, nuclear receptor subfamily 1, 2) 和 ROR α/β (retinoid-related orphan receptor α/β) 调控 *Bmal1* 转录的分支环路 (图 1)^[1, 2, 6]。这一基因表达网络能使机体生理活动周期与光周期吻合, 并通过预测和协同使代谢过程满足机体生理的需要。

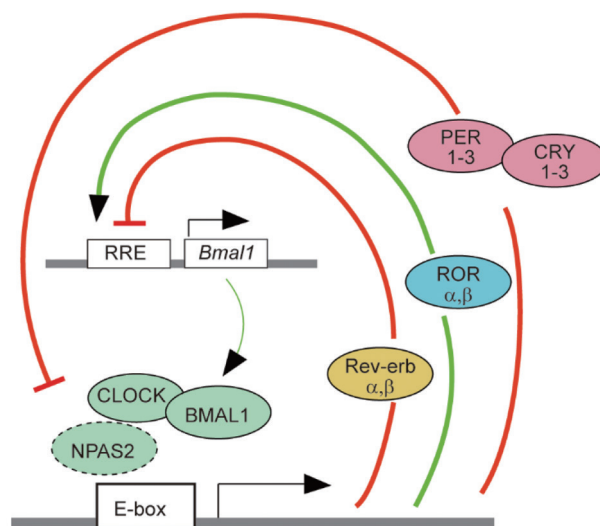


图 1. 分子生物钟转录调控反馈环机制

Fig. 1. Mechanism of transcriptional regulatory feedback loop of molecular circadian clock. The main arm of negative regulatory feedback loop of molecular circadian clock is as follows. BMAL1/CLOCK or BMAL1/NPAS2 (neuronal PAS domain protein 2, a functional analog of CLOCK) dimer activates the transcription of cryptochromes (CRYs) and Periods (PERs), which act as transcriptional repressors of further CLOCK/BMAL1-mediated transcription. In addition to this basic feedback regulation, there is an additional sub-loop of REV-ERB α/β (NP1D1/2, nuclear receptor subfamily 1/2) and ROR α/β (retinoid-related orphan receptor α/β) regulating the transcription of BMAL1. Based on the transcription level of the circadian, clock gene itself and the rhythm output gene present approximately 24 h periodic oscillations. RRE, Rev-erb/ROR response elements.

肝脏既是最大的外周组织器官, 又是机体物质代谢的核心。肝脏在各个营养物质代谢中都起着枢纽的作用: (1) 肝脏是维持血糖水平相对稳定的重要器官; 糖代谢众多关键代谢酶中, 肝内生成的葡萄糖-6-磷酸是糖代谢的枢纽。此外, 肝是糖异生最活跃的器官。长时间禁食后, 肝通过糖异生将氨基酸、乳酸、甘油等非糖物质转变为葡萄糖, 补充血糖。(2) 肝在脂质代谢中占据中心地位; 肝细胞合成并分泌胆汁酸, 进行物质的消化吸收。内源性甘油三酯、胆固醇、血浆磷脂的合成都离不开肝脏。(3) 肝脏具有活跃的蛋白质合成与分解代谢; 血浆蛋白质合成、氨基酸代谢、解“氨毒”等功能都在肝脏中执行。近年来研究证实, 肝脏内进行的各种生理活动几乎都受到生物钟的控制, 特别在进食 - 禁食、白天 - 夜晚周期最为显著。而生物节律的紊

乱则会引起肝脏新陈代谢及相应功能的紊乱, 严重时可为代谢疾病, 包括肥胖、糖尿病、心血管疾病等。

随着 2017 年的诺贝尔生物学奖授予生物钟研究领域的三位杰出科学家, 生物钟研究成为了一个高度活跃并关联广泛的领域, 其研究成果涉及代谢、睡眠、行为、免疫、营养和内分泌等多个领域。目前生物节律领域的研究重点也逐渐从理解核心生物钟的分子机制过渡到生物钟系统对转录后功能以及生物钟对信号网络间交互调控等方面。本文结合近几年的相关研究, 就肝脏的糖类、脂类和蛋白质代谢的节律性调控进行综述, 讨论肝脏代谢对生物钟的反馈调节, 并对生物钟研究方法和应用进行展望。

1 生物钟与代谢稳态相互维持、互为基础

能量代谢稳态从建立到衰退的过程伴随机体发育的整个过程。各阶段能量代谢稳态的精确调控与生物钟持续、自主的运行紧密联系。首先, 生物钟节律的形成与代谢稳态的建立具有时间同步性。随着机体的生长、成熟以及衰老, 代谢稳态逐渐形成、稳定然后失调; 与此同时, 分子生物钟振荡也逐渐建立、衰减、错位直至消失。其次, 生物钟调控各组织的代谢呈现节律性振荡, 并使各个组织器官相互协同。生物钟因子时序性地调节代谢通路限速酶的转录、翻译以及修饰等环节, 使能量物质合成或分解水平峰值重复而稳定地出现在特定时间, 在时间和空间上隔离对立的生理过程, 同时满足机体在各阶段的需要, 实现“同则合, 异则分”的基本原则。第三, 生物钟系统输出的代谢中间产物对自身进行牵引和修正, 使生物钟根据代谢需要进行自我反馈调整。例如代谢过程产生的营养物质、能量和氧化还原水平等信号(如 ATP、葡萄糖、NADPH 等)以不同的路径反馈到特定组织外周生物钟系统, 使不同组织生理过程适应特定时期的需求, 以加强/削弱振荡的节律性, 使该组织的生物钟节律的相位、振幅等参数具有组织特异性^[7, 8]。

代谢稳态的节律特征依赖于生物钟。人类的睡眠、心率、体温、激素、记忆、血压等生理指标都具有显著节律性。古人日出而作, 日落而息对应着机体褪黑素分泌的日节律振荡。人体多个生理指标具有周期性日节律, 如体温, 清晨 2~6 时体温最低, 黎明后开始上升, 下午 6 时达到高峰; 又如血压,

白天清醒时血压水平较高, 夜晚睡觉时血压水平较低。机体在每天的不同时期, 对能量的消耗和需求具有很大的不同。这种复杂的生命体征的维系需要精准的能量供给, 因此人类的能量代谢系统需要生物钟系统的精确调控^[9]。人类能量完全来源于食物, 进食行为以及禁食-进食节律都显示昼夜节律, 因此, 在一天的不同时间摄入热量相同的食物可能导致不同的代谢结果。不断涌现的研究结果证实生物钟与代谢稳态之间存在着紧密的交互调控^[7, 8]。在饥饿早期, 肝糖异生为机体提供葡萄糖维持基础代谢, 饥饿后期生物钟负调控因子 CRY1 通过抑制环磷酸腺苷(cyclic adenosine monophosphate, cAMP)水平进而降低肝糖异生效率, 减少机体能耗, 为机体直接使用食物中的能量做准备^[10]。进食时期, 机体从食物获得能量并进行合成和储存。肝脏 BMAL1 响应 mTORC1-核糖体 S6 信号通路(mechanistic target of rapamycin-ribosomal S6 kinase pathway, mTORC1-S6K), 增强核糖体蛋白质翻译, BMAL1 介导了肝脏生物钟与 mTOR 通路之间的信息交流^[11]。进食后血糖升高, BMAL1/CLOCK 增强胰岛 β 细胞内胰岛素表达, 促进胰岛素快速向胞外分泌, 以保证血液中胰岛素水平快速升高, 加快机体葡萄糖消耗, 从而降低血糖浓度^[12]。相应的, 机体代谢状态也能反馈调节生物钟节律。低能量的代谢状态下, 腺嘌呤核糖核苷酸(adenosine 5'-monophosphate, AMP)升高诱导 AMP 蛋白激酶(AMP-activated protein kinase, AMPK)的活性, 降低 CRY1 的稳定性, 进而缩短肝脏生物钟节律周期, 因此低代谢状态通过 AMPK 牵引着肝脏的生物钟节律^[13, 14]。另外, 进食行为也影响肝脏的外周生物钟。进食启动胰岛素信号通路, 激活蛋白激酶 B (AKT), 促进 BMAL1 的磷酸化, 使自身由细胞核向胞质迁移并降解, 导致 BMAL1 转录活性降低, 进而改变该阶段肝脏生物钟节律^[15]。该机制揭示了夜间进食或熬夜干扰肝脏生物钟节律的分子机制。人群研究结果表明, 光照周期的延长、熬夜、夜晚进食、轮班等影响人体生物钟节律的行为因素是诱发肥胖、糖尿病的高风险要素^[16-19]。越来越多的研究也表明熬夜和夜晚进食对生物节律有较强的干扰, 是现代生活方式扰乱内在生物钟、诱发代谢性疾病的一种机制。从细胞、组织到整体水平, 生物钟与代谢调控之间存在多重交互调控机制, 因此机体的生物钟节律是人类生理平衡的重要组成部分之一。

2 肝脏代谢功能具有显著节律性

肝脏是人体最大的组织, 约占体重的 1.5%~2%。肝脏在维持代谢稳态、解毒、药物代谢等生理过程中具有重要的作用。肝脏器官大小、核糖体的数量以及蛋白质的含量皆具有日节律性^[20]。与之适应, 肝脏代谢功能也具有节律性特征。从机体能耗来说, 基因的节律性表达相比持续性表达更加节省能量。小鼠长期饥饿 (24 h) 后节律性转录本的数量减少 80%。转录活跃度降低的主要形式是峰值的降低, 而并非提高基准转录水平。在时序上, 肝脏代谢的节律性能整合底物的获得性和产物的需求性。肝脏转录组、蛋白质组、代谢组和功能注释分析共同表明, 肝脏富集了大量的代谢调控因子^[21-23]。研究者应用多组学手段对小鼠肝脏组织时序性变化特征进行了研究和描绘, 包括染色质免疫沉淀测序 (chromatin immunoprecipitation-sequencing, ChIP-seq)、转录组测序技术 (RNA-sequencing)、核糖体印迹测序技术 (Ribo-sequencing)、蛋白质组学 (proteomics) 和代谢组学 (metabolomics)^[24-26]。蛋白质组学结果显示小鼠肝脏组织从转录、翻译到修饰水平具有显著的近 24 h 节律振荡特征^[21, 22]。代谢组学分析表明, 肝脏组织中的代谢产物 (包括氨基酸、碳水化合物、脂类、核苷酸) 浓度具有显著的节律性。另一方面, 生物钟紊乱与代谢平衡的破坏密切相关。生物钟因子 CLOCK 敲除 (*Clock*^{-/-}) 小鼠在 ZT9 时 (zeitgeber, 开灯后 9 h) NAD⁺ 水平显著降低, 该特征与 *Clock*^{-/-} 小鼠脂类代谢紊乱显著正相关^[27]。值得注意的是, 这些组学大多使用了常规饲料 (脂肪 <18%, 蛋白质约 25%, 碳水化合物约 60%)、12 h 光照、自由进食、周龄小于 20 周的雄性小鼠肝脏。由于自由进食 (*ad libitum* fed) 小鼠在不活跃的光照周期中仍然有 >15% 的进食量, 所以小鼠的睡眠期并不等同于人类睡眠期 (有长期禁食)。即使在这种情况下, 多组学研究仍然检测到小鼠约 20% 的编码基因的成熟 RNA、蛋白质水平具有节律性。因此, 人类肝脏的节律性可能会更加显著。2018 年 Mure 等首次对灵长目动物进行了多组织生物钟节律分析。灵长目狒狒的 64 种组织、22 个脑区的转录本全面分析结果显示, 灵长目 >80% 的蛋白质编码基因在 mRNA 水平上具有节律性特征, 多种具备保守功能的蛋白质如分泌、DNA 修复、自噬等通路的成分也具有转录水平的节律性。其中狒狒肝脏中具有显著节律性的基因数量约 529 个, 远少于小鼠肝脏节

律性基因 3 700 个。狒狒和小鼠肝脏组织中共有的节律基因约 150 个, 狒狒肝脏节律与 SCN 节律相位差约为 1 h^[5]。因此, 人类肝脏的节律性基因的具体核心机制需要进一步进行研究, 目前小鼠肝脏转录组研究结果还不足以完全反映人类肝脏节律性。

3 葡萄糖的节律性调控

生物钟节律因子能够直接参与糖代谢过程, 进而使机体葡萄糖代谢具有生物节律性, 以进一步适应组织器官生理需要。糖代谢是人体各组织中进行的最活跃的代谢过程。肝脏是糖原储存和肝糖异生的主要器官。葡萄糖以磷酸化形式进入肝脏后有 3 条代谢途径, 通过糖酵解直接消耗, 转化为糖原储存, 或是用于磷酸戊糖途径。葡萄糖磷酸化反应过程中, 催化酶葡萄糖磷酸化酶以及肝脏葡萄糖转运蛋白 2 的蛋白质水平具有昼夜节律振荡特性, 其峰值与进食期重合。糖原合成酶激酶 3 (glycogen synthase kinase-3, GSK3) 是胰岛素信号通路的底物, 其表达受进食诱导。研究显示, 不但 GSK3 的磷酸化水平具有节律性, 而且 GSK3 能够调控 REV-ERB 的稳定性, 因此 GSK3 又被认为是生物钟系统的成分之一^[28, 29]。另一方面, GSK3 通过调控 O-乙酰氨基葡萄糖 (O-linked N-acetylglucosamine, O-GlcNAc) 的活性, 使肝脏组织中多个生物钟蛋白质因子的 O-GlcNAc 乙酰化水平呈现显著的节律性, 如核心因子 PER2、CLOCK、BMAL1 等^[30]。研究表明, PER2 的乙酰化修饰介导其磷酸化以及稳定性^[31], BMAL1 与 CLOCK 的乙酰化可拮抗泛素化, 抑制其降解, 增加自身的稳定性^[32]。因此葡萄糖代谢一方面受到生物钟因子的直接调控, 另一方面以乙酰辅酶 A 和 ATP 等中间产物反馈调控生物钟因子的稳定性和功能, 对肝脏的生物钟节律进行调节, 以进一步适应肝脏糖代谢的需要。

磷酸戊糖途径也整合了葡萄糖利用与生物钟系统。核糖是核苷酸的基本组分, 体内的核糖并不依赖食物摄取, 而是通过磷酸戊糖途径合成。磷酸戊糖途径不但对于合成核苷酸至关重要, 而且对于细胞质中 NADPH 的补充也有重要作用, 同时磷酸戊糖途径还受 NADPH/NADP⁺ 比值的负反馈调节。NADPH/NADP⁺ 比值升高时该途径被抑制, 比值降低时被激活, 同时葡萄糖-6-磷酸脱氢酶的活性提高。由于低水平的 NADPH 能够激活转录因子 NF-E2 相关因子 2 (nuclear factor erythroid 2-related

factor 2, NRF2), 而生物钟转录阻遏物 (nuclear receptor subfamily 1 group D member 1, NR1D1) 是 NRF2 靶标之一, 这就表明, NRF2 依赖于磷酸戊糖途径的激活可以通过 NRF2 调控 NR1D1 而延伸到生物钟网络, 进而使生物钟节律与糖代谢节律同步化^[33]。

糖代谢关键酶的节律性表达在进食 - 饥饿、白天 - 黑夜循环周期过程中尤为显著, 使机体生理状态与环境变化同步。胰高血糖素受体 (glucagon receptor, GCGR) 属于 B 类 GPCR 家族, 主要通过激活 Gs α -PKA 信号通路行使其功能, 对于维持人体血糖稳态发挥关键作用, 是治疗 2 型糖尿病药物的重要靶点。在夜间 / 白天过渡阶段, 生物钟因子 CRY1 表达升高, CRY1 结合 Gs α 并抑制 GCGR 的活性, 降低 cAMP 水平以及 PKA 活性, 进而降低 cAMP 反应元件结合蛋白 (cyclic-AMP response binding protein, CREB) 的磷酸化和转录活性, 因此 CRY1/2 在傍晚时通过 cAMP-CREB 信号通路降低多个糖异生的靶基因转录水平^[10]。由于 *Per1* 也是 CREB 的靶基因, 因此能量状态可通过 GCGR 通路调节 PER1 的功能以及生物钟节律。在饥饿初期, 胰高血糖素信号通路被激活, *Per1* 转录增强, 再通过负反馈转录调节环路, CRY1 表达升高, 并通过抑制 GCGR 降低 cAMP 水平, *Per1* 的转录因此逐渐被抑制^[34]。随着饥饿的持续, ATP 消耗, AMP/ATP 比值上升、AMPK 激活并使 CRY1 因磷酸化而降解^[13], CRY1/2 抑制肝糖异生的作用被解除, 肝糖异生水平被提高, 保证机体的血糖处于正常水平。由此可见, 在进食 - 饥饿周期交替过程中, CRY1 等多个生物钟因子通过直接参与肝糖异生的转录调控, 使肝脏的葡萄糖代谢具有节律性特征。

4 脂肪代谢的节律性

脂质是脂肪和类脂的总称, 是一类种类繁多, 结构复杂, 功能多样的生物大分子。脂肪即甘油三酯, 储存在脂肪组织, 既是隔热保温、缓冲机械损伤的物理屏障, 也是重要的供能和储能物质。类脂包括固醇、磷脂、糖脂等, 它们是机体的基本组成部分。磷脂、胆固醇是细胞膜的基本结构成分, 胆固醇还是肾上腺皮质激素、胆汁酸、维生素 D 的前体。肝脏在脂质代谢中占据中心地位, 表现为: (1) 肝细胞合成和分泌的胆汁酸, 是脂质消化吸收必不可少的物质; (2) 肝是甘油三酯和脂肪酸代谢的中枢器官, 能有效协调肝脂肪酸氧化供能和酯化

合成甘油三酯两条途径; (3) 肝是维持机体胆固醇平衡的主要器官。肝脏组织中甘油酯类、左旋肉碱和必需脂肪酸等代谢物 (大于总数的 50%) 具显著节律性, 它们通常在 ZT9 时达到峰值^[28]。脂肪代谢的节律性特征在多个方面体现。脂肪代谢关键酶, 包括乙酰辅酶 A 羧化酶 (acetyl CoA carboxylase, ACC)、肉碱棕榈酰转移酶 1 (carnitine palmitoyl transferase 1, CPT1)、ATP 柠檬酸裂解酶 (ATP citrate lyase, ACLY), 其编码基因转录具有显著日节律特征, 在进食期达到转录水平峰值^[28], 这些酶的蛋白质水平峰值与转录峰值相比, 后移约 4 h。与之相吻合, 脂代谢中间产物, 如 CoA、乙酰辅酶 A、NAD⁺、NADP⁺ 也呈现显著的 24 h 周期性。线粒体生成的乙酰辅酶 A 利用柠檬酸 / 棕榈酸穿梭机制向胞质输出, ACLY 是此过程的关键限速酶, 其转录节律峰值与小鼠进食期吻合^[28]。ACC 以乙酰辅酶 A 为底物缩合形成丙二酰辅酶 A 是脂肪酸合成的第一步反应, ACC (79、1 200 及 1 215 位丝氨酸残基) 被 AMPK 磷酸化后而失活。饥饿时, 胰高血糖素增加, 激活 AMPK 蛋白激酶, 抑制 ACC 活性; 进食后, 胰岛素发挥作用, 胰岛素能通过蛋白磷酸酶的去磷酸化作用, 使磷酸化的 ACC 去磷酸而恢复酶活, 启动脂肪酸合成。因此, 随着饥饿 - 进食周期的更替, AMPK 介导的 ACC 酶活呈现日节律性^[35]。CPT1、CPT2 先后介导脂肪酰 CoA 进入线粒体内膜腔, 使脂肪酸被 β 氧化。线粒体中的 L-型肉毒碱、CPT1、CPT2 水平具有明显日节律性。进食期间, 当脂肪酸合成时产生的高水平丙二酰辅酶 A 到达峰值后, CPTs 的酶活性被抑制。这些反馈抑制和节律使脂肪酸合成与分解过程分别在进食和饥饿时达到峰值。因此, 脂肪的生成与分解这两种相互对立的生理过程在时间上得到分离, 同时也使肝脏中多种脂质水平呈现出日节律^[36]。同样, 昼夜节律振荡有助于在夜间喂食时使用短链和中链脂肪酸, 而在白天 (睡眠) 则有助于存储长链脂肪酸。这种暂时的编排可以优化对养分的利用, 在进食过程中以产生和储存能量为主, 在禁食期间则切换到储存和替代能源。研究显示, 多个生物钟基因的突变或缺失后都出现糖脂代谢的异常 (表 1)。纯合 *Clock-KO* 突变小鼠的昼夜进食节奏大大减弱, 出现肥大 (细胞、组织或器官体积的增大) 和肥胖 (体内脂肪组织积蓄过剩) 等表型。组织学分析显示, 肝组织中的脂肪细胞肥大和脂质充盈, 糖原积累增加, 并发展出

表1. 生物钟基因突变小鼠的代谢缺陷
Table 1. Metabolic defects in biological clock gene mutant mice

生物钟基因 突变类型及代谢缺陷	
<i>Clock</i>	<i>Clock</i> ^{Δ19} : 19号外显子缺失(代谢综合征) ^[38] <i>Clock</i> ^{-/-} : 进食节律减弱、肥胖、高脂血症, 肝脂肪变性, 高血糖症和低胰岛素血症的代谢综合征 ^[37]
<i>Bmal1</i>	全身敲除: <i>Bmal1</i> ^{-/-} 小鼠失去昼夜节律性, 早衰肌腱钙化, 活动、体重和寿命降低, 过氧化物水平ROS提高 ^[39] 肝脏组织敲除(<i>L-Bmal1</i> ^{-/-}): 体重降低, 血糖清除能力提高, 胰岛素敏感性提高 ^[40] 胰腺组织敲除: <i>PdxCreER-Bmal1</i> ^{fllox/fllox} 成年小鼠诱导性缺失BMAL1, 高血糖症, 低胰岛素症, 血糖不耐受症 ^[12] 肝脏特异表达BMAL1 [<i>Afp-Cre cross Bmal1-stop-FL(KO)</i>]: 肝脏中约300多个代谢相关基因与BMAL1有显著相关性 ^[41] 肌肉组织敲除: 成熟肌肉组织胰岛素敏感性降低, 血糖吸收减少 ^[42]
<i>Per1</i>	RNA沉默显著下调αENaC mRNA表达, 升高尿排钠水平 ^[43]
<i>Per2</i>	<i>Per2</i> ko: 谷氨酸吸收障碍, 脑中谷氨酸升高, 酒精摄入升高 ^[44] <i>Per2</i> ^{-/-} 小鼠: 抑制PPAR _γ 结合启动子, 抑制其转录活性, 降低甘油三酯水平、游离脂肪酸的合成 ^[45]
<i>Cry1/2</i>	<i>Cry1</i> ^{-/-} / <i>Cry2</i> ^{-/-} 小鼠: 胰岛素分泌减少、高血糖症、氧耗和体温节律消失 ^[46]
<i>Rev-erb</i>	<i>Rev-erba</i> ^{-/-} / <i>β</i> ^{-/-} : 血浆甘油三酯水平、血糖降低, 游离脂肪酸提高, 整体活跃期呼吸交换率降低 ^[23]
<i>Rora</i>	<i>Rora</i> ^{-/-} : 血浆甘油三酯降低, 高密度脂蛋白水平降低, 动脉硬化风险提高 ^[47]

ROS: reactive oxygen species; αENaC, α subunit of the epithelial sodium channel.

高瘦素血症、高血脂症、肝脂肪变性, 以及高血糖症和低胰岛素血症的代谢综合征, 且与能量平衡相关的下丘脑肽水平显著降低^[37]。这种昼夜节律系统与脂质新陈代谢之间的双向交互作用机制提示, 利用特定的进食方法改变人体的昼夜节律可能是预防或治疗肥胖症的一种新颖而有趣的方法。了解限时进食和改善健康之间的关系, 有助于改善肥胖患者的生活。

REV-ERBα、REV-ERBβ 作为生物钟系统的抑制因子, 富集在代谢相关基因的启动子上。功能缺失实验数据表明 REV-ERBs 在机体脂质代谢和转运过程中有重要的作用。*Rev-erb* 两种亚型双敲除小鼠不但在生物节律上出现异常, 如生物钟因子振幅降低、整体节律的周期缩短到约 21 h; 同时其表型上出现糖脂代谢稳态受损, 表现出血糖升高、呼吸代谢率降低、脂肪酸水平降低、甘油三酯升高等表型^[23]。机制研究表明, 生物钟因子 REV-ERBα 招募组蛋白去乙酰化酶 3 (histone deacetylase 3, HDAC3), 并与之同定位于脂肪代谢关键酶基因附近, 使肝脏中脂类代谢相关基因组的组蛋白乙酰化水平呈现节律性, 并使脂肪代谢过程呈现节律性^[23]。机制分析结果显示, 生物钟因子 REV-ERBα 节律性地抑制包括脂肪酸合成组分在内的多个基因的转录, 因此 *Rev-erba* KO 小鼠具有脂肪肝表型^[23, 36]。由于脂肪酸合成的关键酶, 如 ACLY、脂肪酸合成酶 (fatty acid synthase, FASN)、ACC 等, 都在进食期进入表

达峰值, 并且响应过氧化物酶体增殖物激活受体 (peroxisome proliferators-activated receptors, PPARs) 的诱导, 因此使用靶向 PPARα 的降脂药物时, 考虑 *Rev-erba* 和脂肪酸合成关键酶的表达节律性, 设计和调整药物的动力学, 更有利于发挥药物的降脂作用^[48]。药物进入体内后主要在肝脏中以细胞色素 P450 为核心的单加氧酶系的作用下进行氧化、还原、水解、结合等反应, 将药物代谢并转化为极性化合物, 最终排出体外。其中细胞色素 P450 单加氧酶的表达具有强烈的节律特征^[49-51]。根据降脂药的节律表达峰图, 选择合理的给药时间, 可减少药物引起的患者不良反应。长期疗法可能增加药物最大耐受剂量, 以最大程度发挥降脂作用。以上这些研究结果提示, 肝脏脂类代谢的节律性机制研究将为改善高血脂或脂肪肝的时辰治疗方法提供理论基础。

5 蛋白质代谢节律性调控

肝脏是多种重要分泌蛋白质的组织来源, 如白蛋白、视黄醇结合蛋白 4 (retinol binding protein 4, RBP4)、甲状腺运载蛋白 (transthyretin, TTR)、成纤维细胞生长因子 21 (fibroblast growth factor 21, FGF21) 等。分子生物钟在转录和翻译水平上同时对蛋白质合成进行调控, 实现蛋白质合成代谢的节律性。体内高糖或进食时, BMAL1 响应胰岛素 -AKT-mTOR-S6K 激酶通路的信号, BMAL1 的 S42 位氨基酸残基被 S6K 磷酸化, 随后与多个翻译起始因子 [如真

核翻译起始因子 4E (eukaryotic translation initiation factor 4E, eIF4E)、eIF4A 和 eIF4G] 结合, 促进 5'-末端嘧啶 (5'-TOP) mRNA 的翻译, 表明生物钟因子 BMAL1 能介导 mTORC1 信号通路, 并直接参与蛋白质的翻译过程^[11]。由于 BMAL1 也是 AKT 的直接磷酸化底物, 被 AKT 磷酸化的 BMAL1-S42 离开细胞核进入细胞质进而被降解, 因此进食后胰岛素加速 BMAL1 降解进而降低蛋白质翻译效率, 减少蛋白质合成, 蛋白质合成的降低与进食后组织生理状态协同, 使能耗比达到最佳^[15]。相应的, 翻译延长因子也具有节律性, eIF4E 被磷酸化主要发生在白天, 光照期结束时达到峰值 (ZT6-12), 而 eIF4G、eIF4B、4E-BP1 和核糖体蛋白 S6 (ribosomal protein S6, RPS6) 的磷酸化主要发生在夜间。生物钟核心分子 BMAL1 整合了肝脏多核糖体 RNA 发生的节律, 这些基因大多数属于 5'-TOP 家族, 也受 eIF4E 的水平和磷酸化状态调控^[52, 53], 因此, BMAL1 介导的蛋白质合成不但能够与生物钟节律同步化协同, 而且还能够对复杂环境进行应答。此外, 生物钟核心分子也直接调节核糖体蛋白 mRNA 的转录以及核糖体的装配, 进而使核糖体的数量具有节律性^[52]。因此, 生物钟在协调核糖体的生物发生基础、转录和翻译过程中都发挥重要作用。最近, 另一项研究显示, 细胞质中的分子钟因子 PER2 也发挥着调控蛋白质合成的作用。PER2 可以通过招募结节性硬化症复合物 1 (tuberous sclerosis complex 1, TSC1), 抑制 mTORC1 复合体和 S6K 激酶的活性, 进而抑制蛋白质合成^[54]。理解生物钟因子 PER2 节律性靶向抑制 mTORC1 的机制有利于设计全新的 mTORC1 靶向调控方法。在禁食期间, 肌肉和肝脏组织中锌指蛋白转录因子 15 (Krüppel like factor 15, KLF15) 节律性高表达, 其相关途径包括脂质合成和 BMAL1-CLOCK, 随后节律性介导了下游的多个作用于肌肉中氨基酸代谢相关酶, 这些氨基酸的含碳部分在肝脏作为糖异生的底物合成葡萄糖重新进入碳循环, 含氮部分则生成尿素^[55]。人体的血浆中总氨基酸、分支氨基酸, 以及尿素的水平变化具有显著节律性, 一般在夜晚达到峰值。肝脏是机体合成尿素的特异器官, 在尿素循环中, 鸟氨酸氨基甲酰转移酶 (ornithine transcarbamylase, OCT) 利用线粒体 L-鸟氨酸清除 CO₂。OCT 的节律性表达依赖于 KLF15 调控。当 *Klf15*-KO 小鼠被喂食高蛋白质饲料后, 表现出低血糖、高氨基酸、尿素生成受损而致死,

这表明由 OCT 所介导的 *Klf15* 调控氨基酸代谢节律被损坏^[55]。另外, 微量元素 (如 Ca²⁺、Mg²⁺ 等) 的水平变化也具有明显的节律性。金属离子主要作为酶的辅助因子, 通过影响酶的活性而调节蛋白质代谢。研究统计, 约 600 多种肝代谢酶活性受到 ATP-Mg²⁺ 的调控^[56]。肝脏蛋白质代谢的节律性在多个水平已经被证实, 但是调控蛋白质代谢节律性的机制还需要进一步探索。

6 线粒体的节律性调控

线粒体既是重要的能量工厂, 也参与多种重要的生理过程, 如脂类氧化、钙动态平衡以及细胞凋亡。线粒体在个体发育以及代谢中具有广泛而重要的作用, 肝脏细胞内含有大量的线粒体, 以满足代谢活动的高能量需求。多种肝代谢性疾病, 如肝硬化、肝纤维化、非酒精性脂肪肝炎等, 其发病机理都与线粒体功能失调有着密切的关系。除此之外, 线粒体功能紊乱还会导致肌肉、神经或心血管组织的多种疾病^[57]。目前研究已证实, 线粒体的数量、功能 (呼吸效率以及 ATP 生成) 也具有普遍节律性。基因敲除研究表明生物钟基因能够直接调控多种线粒体的活动。研究显示, 生物钟因子缺失, 包括肝脏特异性敲除 *L-Bmal1*、*Bmal1*-KO 以及 *Per1/Per2* 双敲, 可导致肝脏组织线粒体氧气消耗速率 (oxygen consumption rates, OCRs) 降低^[40, 58–60]。肝脏线粒体功能具有暗周期强光周期弱的节律特点, 在 ZT12 *Bmal1*-KO 小鼠肝脏组织中甘油三酯水平与野生型相比增加了 2.2 倍, 提示肝脏线粒体功能可能直接受到 BMAL1 的调控^[58]。在表型上, 肝脏 BMAL1 特异敲除的线粒体具有更大、更圆的形态, 同时失去形态变化的节律性, 其他组织 (如骨骼肌、心脏) 线粒体也有类似的现象; 并且线粒体形态的节律性紊乱与这些器官的疾病发生有显著相关性^[59]。研究显示, 小鼠肝脏线粒体中约三分之一的组成蛋白质和脂类都具有节律特征, 蛋白质表达和脂类合成的峰值都出现在暗周期向光周期过渡的黎明。对比分析表明, 线粒体蛋白质的转录和翻译的节律振荡的振幅小于转录后修饰节律性振幅^[35, 61]。组学研究结果显示, 线粒体蛋白质的乙酰化水平具有更显著的节律性, 这些线粒体蛋白质的功能大多富集在三羧酸循环和谷胱甘肽代谢途径^[62, 63], 这也与糖、蛋白质关键代谢途径的节律性特点相吻合。热量限制性饮食方式改善整体胰岛素的敏感性, 与

提高代谢节律振幅以及蛋白质乙酰化水平呈正相关^[64]。因此，生物钟系统可能通过节律性调控线粒体蛋白组的磷酸化、泛素化以及糖基化修饰，对线粒体功能进行调节。

7 靶向生物钟的调节剂研究

基于分子生物钟的作用机制，有理由推测通过调控 CRY1、PER1 等生物钟因子蛋白质的稳定性将能够调整生物钟节律。通过分子设计和筛选，研究者发现了首个直接靶向生物钟因子的小分子 KL001，KL001 能够与 CRY1 蛋白质结合，并增强 CRY1 的稳定性，延长生物钟节律的周期^[65]。这一结果表明通过小分子可以对机体的生物钟系统进行直接的调控。2020 年，Ju 等从 10 000 多个小分子化合物库中进行筛选，发现小分子虫草素 (Cordycepin) 能快速逆转生物节律的相位，证明了 Cordycepin 能直接作用于 RuvB 样 ATP 酶 2 (RuvB-like ATPase 2, RUVBL2)，由于 RUVBL2 参与 BMAL1/CLOCK/CRY1/PER1 转录复合体，结合 Cordycepin 的 RUVBL2 竞争性抑制并清除复合体中抑制成分 CRY1，进而使 BMAL1/CLOCK 的转录活性极大增强^[66]。这些研究结果表明，通过药物调整时差，以及治疗急性时差导致的代谢紊乱是有可能的，甚至可以设想利用小分子调整生物钟节律参数，以帮助治疗相关的慢性代谢性疾病。

8 展望

生物钟与肝脏代谢稳态是器官 ↔ 组织 ↔ 细胞 ↔ 蛋白质 ↔ RNA ↔ DNA 的调控网络。可以肯定，生物钟系统是保持机体代谢昼夜节律性的重要组分，任何一个改变都有可能打破平衡。对肝脏节律的研究不仅为研究其他组织器官提供了新思路，而且以肝脏节律为研究靶点或许能为临床研究与治疗提供新希望。多项基础研究已逐步揭示了核心生物钟基因与代谢中间产物以及与不同信号通路之间的相互交流。通过确定代谢物和人体生物钟之间的关系，我们能更加了解营养成分如何与新陈代谢互动，从而确定从食物和治疗药物中能获得最大好处的最佳时间。伴随着对生物钟机制的深入了解，生物钟的重要性逐步得到重视。数据库 Clinical Trials 现有记录中，包含“circadian”的队列已经完成 357 个、终止的 19 个、正在招募的 170 个。包含“circadian”和“diabetes”关键词的搜索结果有 5 项，其中有 4

项已经完成。这说明生物钟研究正逐步与健康、医疗等人口健康领域结合。但是，真正应用到临床上还需要更全面的研究，以深入了解生物钟对肝脏代谢调控的分子机制。而且，检测个体自主生物钟并不容易。睡眠-觉醒周期最具有节律性，但并不是真正意义上的生物钟节律。目前人体生物钟检测的金标准是检测无干扰条件下的血浆褪黑素水平曲线，此法要求研究对象长时间坐在暗室，间隔一小时采集一次血液样本，该方法耗时长，容易受到干扰。更简易的替代方法是通过唾液中的 Cortisol 水平的曲线反映个体的生物钟^[67]。最近，研究者利用外周血 CD14⁺ 单核细胞转录组数据以及皮肤转录组数据进行个体化生物钟系统检测，结合生物信息学算法和机器学习，建立了多种适用于生物钟分析的方法，如 TimeSignature, TimeTrial^[68, 69]。借助这些方法，研究者希望在随机 1 次性采血的样本中或者皮肤样品中检测人体内在生物钟相位。这也是生物钟机制应用的新方向，这些生物钟检测方法将有更广泛的用途，比如可用于检测人们头一天晚上是否熬夜，准确率目前已超过 90%。这可让警察在处理交通事故时快速认定司机是否睡眠不足，或者帮助排查飞行员等对安全要求较高岗位的工作人员是否适合上岗^[68, 70]。

针对生物钟的临床检测将是个体精准医疗的一个新的切入点。生物钟节律特征包括周期、相位、振幅和迁移速率等相关指标^[67]，具有多维参数的特点。多参数的系统将会有更复杂的变化模式。由于生物钟系统与代谢稳态的密切联系，个体间生物钟系统参数的差异很大程度上会导致同样代谢性治疗方案的效果并不一致。因此，未来个体化精准医疗的实施需要将个体生物钟参数纳入综合考虑，并个性化地指导代谢性疾病治疗。

参考文献

- 1 Darlington TK, Wager-Smith K, Ceriani MF, Staknis D, Gekakis N, Steeves TD, Weitz CJ, Takahashi JS, Kay SA. Closing the circadian loop: CLOCK-induced transcription of its own inhibitors *per* and *tim*. Science 1998; 280(5369): 1599-1603.
- 2 Gekakis N, Staknis D, Nguyen HB, Davis FC, Wilsbacher LD, King DP, Takahashi JS, Weitz CJ. Role of the CLOCK protein in the mammalian circadian mechanism. Science 1998; 280(5369): 1564-1569.
- 3 Takahashi JS, Zatz M. Regulation of circadian rhythmicity.

- Science 1982; 217(4565): 1104–1111.
- 4 Bae K, Jin X, Maywood ES, Hastings MH, Reppert SM, Weaver DR. Differential functions of mPer1, mPer2, and mPer3 in the SCN circadian clock. *Neuron* 2001; 30(2): 525–536.
 - 5 Mure LS, Le HD, Benegiamo G, Chang MW, Rios L, Jillani N, Ngotho M, Kariuki T, Dkhisssi-Benyahya O, Cooper HM, Panda S. Diurnal transcriptome atlas of a primate across major neural and peripheral tissues. *Science* 2018; 359(6381): eaao0318.
 - 6 van der Horst GT, Muijtjens M, Kobayashi K, Takano R, Kanno S, Takao M, de Wit J, Verkerk A, Eker AP, van Leenen D, Buijs R, Bootsma D, Hoeijmakers JH, Yasui A. Mammalian Cry1 and Cry2 are essential for maintenance of circadian rhythms. *Nature* 1999; 398(6728): 627–630.
 - 7 Sahar S, Sassone-Corsi P. Regulation of metabolism: the circadian clock dictates the time. *Trends Endocrinol Metab* 2012; 23(1): 1–8.
 - 8 Panda S. Circadian physiology of metabolism. *Science* 2016; 354(6315): 1008–1015.
 - 9 Kovac J, Husse J, Oster H. A time to fast, a time to feast: the crosstalk between metabolism and the circadian clock. *Mol Cells* 2009; 28(2): 75–80.
 - 10 Zhang EE, Liu Y, Dentin R, Pongsawakul PY, Liu AC, Hirota T, Nusinow DA, Sun X, Landais S, Kodama Y, Brenner DA, Montminy M, Kay SA. Cryptochrome mediates circadian regulation of cAMP signaling and hepatic gluconeogenesis. *Nat Med* 2010; 16(10): 1152–1156.
 - 11 Lipton JO, Yuan ED, Boyle LM, Ebrahimi-Fakhari D, Kwiatkowski E, Nathan A, Guttler T, Davis F, Asara JM, Sahin M. The circadian protein BMAL1 regulates translation in response to S6K1-mediated phosphorylation. *Cell* 2015; 161(5): 1138–1151.
 - 12 Perelis M, Marcheva B, Ramsey KM, Schipma MJ, Hutchinson AL, Taguchi A, Peek CB, Hong H, Huang W, Omura C, Allred AL, Bradfield CA, Dinner AR, Barish GD, Bass J. Pancreatic beta cell enhancers regulate rhythmic transcription of genes controlling insulin secretion. *Science* 2015; 350(6261): aac4250.
 - 13 Lamia KA, Sachdeva UM, DiTacchio L, Williams EC, Alvarez JG, Egan DF, Vasquez DS, Juguilon H, Panda S, Shaw RJ, Thompson CB, Evans RM. AMPK regulates the circadian clock by cryptochrome phosphorylation and degradation. *Science* 2009; 326(5951): 437–440.
 - 14 Lee Y, Kim EK. AMP-activated protein kinase as a key molecular link between metabolism and clockwork. *Exp Mol Med* 2013; 45: e33.
 - 15 Dang F, Sun X, Ma X, Wu R, Zhang D, Chen Y, Xu Q, Wu Y, Liu Y. Insulin post-transcriptionally modulates Bmal1 protein to affect the hepatic circadian clock. *Nat Commun* 2016; 7: 12696.
 - 16 Burman D. Sleep disorders: Circadian rhythm sleep-wake disorders. *FP Essent* 2017; 460: 33–36.
 - 17 Kim TW, Jeong JH, Hong SC. The impact of sleep and circadian disturbance on hormones and metabolism. *Int J Endocrinol* 2015; 2015: 591729.
 - 18 Morris CJ, Purvis TE, Mistretta J, Scheer FA. Effects of the internal circadian system and circadian misalignment on glucose tolerance in chronic shift workers. *J Clin Endocrinol Metab* 2016; 101(3): 1066–1074.
 - 19 Sridhar GR, Sanjana NS. Sleep, circadian dysrhythmia, obesity and diabetes. *World J Diabetes* 2016; 7(19): 515–522.
 - 20 Sinturel F, Gerber A, Mauvoisin D, Wang J, Gatifield D, Stubblefield JJ, Green CB, Gachon F, Schibler U. Diurnal oscillations in liver mass and cell size accompany ribosome assembly cycles. *Cell* 2017; 169(4): 651–663.e14.
 - 21 Wang J, Mauvoisin D, Martin E, Atger F, Galindo AN, Dayon L, Sizzano F, Palini A, Kussmann M, Waridel P, Quadroni M, Dulic V, Naef F, Gachon F. Nuclear proteomics uncovers diurnal regulatory landscapes in mouse liver. *Cell Metab* 2017; 25(1): 102–117.
 - 22 Wang Y, Song L, Liu M, Ge R, Zhou Q, Liu W, Li R, Qie J, Zhen B, Wang Y, He F, Qin J, Ding C. A proteomics landscape of circadian clock in mouse liver. *Nat Commun* 2018; 9(1): 1553.
 - 23 Cho H, Zhao X, Hatori M, Yu RT, Barish GD, Lam MT, Chong LW, DiTacchio L, Atkins AR, Glass CK, Liddle C, Auwerx J, Downes M, Panda S, Evans RM. Regulation of circadian behaviour and metabolism by REV-ERB- α and REV-ERB- β . *Nature* 2012; 485(7396): 123–127.
 - 24 Storch KF, Lipan O, Leykin I, Viswanathan N, Davis FC, Wong WH, Weitz CJ. Extensive and divergent circadian gene expression in liver and heart. *Nature* 2002; 417(6884): 78–83.
 - 25 Koike N, Yoo SH, Huang HC, Kumar V, Lee C, Kim TK, Takahashi JS. Transcriptional architecture and chromatin landscape of the core circadian clock in mammals. *Science* 2012; 338(6105): 349–354.
 - 26 Mauvoisin D, Wang J, Jouffe C, Martin E, Atger F, Waridel P, Quadroni M, Gachon F, Naef F. Circadian clock-dependent and -independent rhythmic proteomes implement distinct diurnal functions in mouse liver. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2014; 111(1): 167–172.
 - 27 Eckel-Mahan KL, Patel VR, Mohny RP, Vignola KS, Baldi P, Sassone-Corsi P. Coordination of the transcriptome and metabolome by the circadian clock. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012; 109(14): 5541–5546.

- 28 Vollmers C, Gill S, DiTacchio L, Pulivarthy SR, Le HD, Panda S. Time of feeding and the intrinsic circadian clock drive rhythms in hepatic gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009; 106(50): 21453–21458.
- 29 Yin L, Wang J, Klein PS, Lazar MA. Nuclear receptor Rev-erb α is a critical lithium-sensitive component of the circadian clock. *Science* 2006; 311(5763): 1002–1005.
- 30 Robles MS, Cox J, Mann M. In-vivo quantitative proteomics reveals a key contribution of post-transcriptional mechanisms to the circadian regulation of liver metabolism. *PLoS Genet* 2014; 10(1): e1004047.
- 31 Kaasik K, Kivimae S, Allen JJ, Chalkley RJ, Huang Y, Baer K, Kissel H, Burlingame AL, Shokat KM, Ptacek LJ, Fu YH. Glucose sensor O-GlcNAcylation coordinates with phosphorylation to regulate circadian clock. *Cell Metab* 2013; 17(2): 291–302.
- 32 Li MD, Ruan HB, Hughes ME, Lee JS, Singh JP, Jones SP, Nitabach MN, Yang X. O-GlcNAc signaling entrains the circadian clock by inhibiting BMAL1/CLOCK ubiquitination. *Cell Metab* 2013; 17(2): 303–310.
- 33 Rey G, Valekunja UK, Feeney KA, Wulund L, Milev NB, Stangherlin A, Ansel-Bollepalli L, Velagapudi V, O'Neill JS, Reddy AB. The pentose phosphate pathway regulates the circadian clock. *Cell Metab* 2016; 24(3): 462–473.
- 34 Travnickova-Bendova Z, Cermakian N, Reppert SM, Sassone-Corsi P. Bimodal regulation of mPeriod promoters by CREB-dependent signaling and CLOCK/BMAL1 activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99(11): 7728–7733.
- 35 Neufeld-Cohen A, Robles MS, Aviram R, Manella G, Adamovich Y, Ladeux B, Nir D, Rouso-Noori L, Kuperman Y, Golik M, Mann M, Asher G. Circadian control of oscillations in mitochondrial rate-limiting enzymes and nutrient utilization by PERIOD proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2016; 113(12): E1673–E1682.
- 36 Adamovich Y, Rouso-Noori L, Zwihaft Z, Neufeld-Cohen A, Golik M, Kraut-Cohen J, Wang M, Han X, Asher G. Circadian clocks and feeding time regulate the oscillations and levels of hepatic triglycerides. *Cell Metab* 2014; 19(2): 319–330.
- 37 Turek FW, Joshu C, Kohsaka A, Lin E, Ivanova G, McDearmon E, Laposky A, Losee-Olson S, Easton A, Jensen DR, Eckel RH, Takahashi JS, Bass J. Obesity and metabolic syndrome in circadian Clock mutant mice. *Science* 2005; 308(5724): 1043–1045.
- 38 Yuan G, Hua B, Cai T, Xu L, Li E, Huang Y, Sun N, Yan Z, Lu C, Qian R. Clock mediates liver senescence by controlling ER stress. *Aging* 2017; 9(12): 2647–2665.
- 39 McDearmon EL, Patel KN, Ko CH, Walisser JA, Schook AC, Chong JL, Wilsbacher LD, Song EJ, Hong HK, Bradfield CA, Takahashi JS. Dissecting the functions of the mammalian clock protein BMAL1 by tissue-specific rescue in mice. *Science* 2006; 314(5803): 1304–1308.
- 40 Lamia KA, Storch KF, Weitz CJ. Physiological significance of a peripheral tissue circadian clock. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; 105(39): 15172–15177.
- 41 Koronowski KB, Kinouchi K, Welz PS, Smith JG, Zinna VM, Shi J, Samad M, Chen S, Magnan CN, Kinchen JM, Li W, Baldi P, Benitah SA, Sassone-Corsi P. Defining the independence of the liver circadian clock. *Cell* 2019; 177(6): 1448–1462.e14.
- 42 Schiaffino S, Blaauw B, Dyar KA. The functional significance of the skeletal muscle clock: lessons from Bmal1 knockout models. *Skelet Muscle* 2016; 6: 33.
- 43 Gumz ML, Stow LR, Lynch IJ, Greenlee MM, Rudin A, Cain BD, Weaver DR, Wingo CS. The circadian clock protein Period 1 regulates expression of the renal epithelial sodium channel in mice. *J Clin Invest* 2009; 119(8): 2423–2434.
- 44 Spanagel R, Pendyala G, Abarca C, Zghoul T, Sanchis-Segura C, Magnone MC, Lascorz J, Depner M, Holzberg D, Soyka M, Schreiber S, Matsuda F, Lathrop M, Schumann G, Albrecht U. The clock gene Per2 influences the glutamatergic system and modulates alcohol consumption. *Nat Med* 2005; 11(1): 35–42.
- 45 Grimaldi B, Bellet MM, Katada S, Astarita G, Hirayama J, Amin RH, Granneman JG, Piomelli D, Leff T, Sassone-Corsi P. PER2 controls lipid metabolism by direct regulation of PPAR γ . *Cell Metab* 2010; 12(5): 509–520.
- 46 Ikeda H, Yong Q, Kurose T, Todo T, Mizunoya W, Fushiki T, Seino Y, Yamada Y. Clock gene defect disrupts light-dependency of autonomic nerve activity. *Biochem Biophys Res Commun* 2007; 364(3): 457–463.
- 47 Mamontova A, Seguret-Mace S, Esposito B, Chanial C, Bouly M, Delhay-Bouchaud N, Luc G, Staels B, Duverger N, Mariani J, Tedgui A. Severe atherosclerosis and hypoalbuminemia in the staggerer mouse, a mutant of the nuclear receptor ROR α . *Circulation* 1998; 98(24): 2738–2743.
- 48 Guan D, Xiong Y, Borck PC, Jang C, Doulias PT, Papazyan R, Fang B, Jiang C, Zhang Y, Briggs ER, Hu W, Steger D, Ischiropoulos H, Rabinowitz JD, Lazar MA. Diet-induced circadian enhancer remodeling synchronizes opposing hepatic lipid metabolic processes. *Cell* 2018; 174(4): 831–842.e12.
- 49 Brownie AC, Kramer RE, Gallant S. The cholesterol side chain cleavage system of the rat adrenal cortex and its relationship to the circadian rhythm. *Endocrinology* 1979; 104(5): 1266–1269.
- 50 Fink CS, Gallant S, Brownie AC. Peripheral serum cortico-

- steroid concentrations in relation to the rat adrenal cortical circadian rhythm in androgen-induced hypertension. *Hypertension* 1980; 2(5): 617–622.
- 51 Birt DF, Hines LA. Modification of circadian rhythms of drug metabolism in the Syrian hamster. *Drug Nutr Interact* 1982; 1(2): 143–151.
 - 52 Jouffe C, Cretenet G, Symul L, Martin E, Atger F, Naef F, Gachon F. The circadian clock coordinates ribosome biogenesis. *PLoS Biol* 2013; 11(1): e1001455.
 - 53 Atger F, Gobet C, Marquis J, Martin E, Wang J, Weger B, Lefebvre G, Descombes P, Naef F, Gachon F. Circadian and feeding rhythms differentially affect rhythmic mRNA transcription and translation in mouse liver. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2015; 112(47): E6579–E6588.
 - 54 Wu R, Dang F, Li P, Wang P, Xu Q, Liu Z, Li Y, Wu Y, Chen Y, Liu Y. The circadian protein Period2 suppresses mTORC1 activity via recruiting Tsc1 to mTORC1 COMplex. *Cell Metab* 2019; 29(3): 653–667.e6.
 - 55 Jeyaraj D, Scheer FA, Ripperger JA, Haldar SM, Lu Y, Prosdocimo DA, Eapen SJ, Eapen BL, Cui Y, Mahabeleshwar GH, Lee HG, Smith MA, Casadesus G, Mintz EM, Sun H, Wang Y, Ramsey KM, Bass J, Shea SA, Albrecht U, Jain MK. Klf15 orchestrates circadian nitrogen homeostasis. *Cell Metab* 2012; 15(3): 311–323.
 - 56 Feeney KA, Hansen LL, Putker M, Olivares-Yanez C, Day J, Eades LJ, Larrondo LF, Hoyle NP, O'Neill JS, van Ooijen G. Daily magnesium fluxes regulate cellular timekeeping and energy balance. *Nature* 2016; 532(7599): 375–379.
 - 57 Nunnari J, Suomalainen A. Mitochondria: in sickness and in health. *Cell* 2012; 148(6): 1145–1159.
 - 58 Peek CB, Affinati AH, Ramsey KM, Kuo HY, Yu W, Sena LA, Ilkayeva O, Marcheva B, Kobayashi Y, Omura C, Levine DC, Bacsik DJ, Gius D, Newgard CB, Goetzman E, Chandel NS, Denu JM, Mrksich M, Bass J. Circadian clock NAD⁺ cycle drives mitochondrial oxidative metabolism in mice. *Science* 2013; 342(6158): 1243417.
 - 59 Jacobi D, Liu S, Burkewitz K, Kory N, Knudsen NH, Alexander RK, Unluturk U, Li X, Kong X, Hyde AL, Gangl MR, Mair WB, Lee CH. Hepatic Bmal1 regulates rhythmic mitochondrial dynamics and promotes metabolic fitness. *Cell Metab* 2015; 22(4): 709–720.
 - 60 Wai T, Langer T. Mitochondrial dynamics and metabolic regulation. *Trends Endocrinol Metab* 2016; 27(2): 105–117.
 - 61 Masri S, Patel VR, Eckel-Mahan KL, Peleg S, Forne I, Ladurner AG, Baldi P, Imhof A, Sassone-Corsi P. Circadian acetylome reveals regulation of mitochondrial metabolic pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013; 110(9): 3339–3344.
 - 62 Cela O, Scrima R, Pazienza V, Merla G, Benegiamo G, Augello B, Fugetto S, Menga M, Rubino R, Fuhr L, Relogio A, Piccoli C, Mazzocchi G, Capitanio N. Clock genes-dependent acetylation of complex I sets rhythmic activity of mitochondrial OxPhos. *Biochim Biophys Acta* 2016; 1863(4): 596–606.
 - 63 Mauvoisin D, Atger F, Dayon L, Nunez Galindo A, Wang J, Martin E, Da Silva L, Montoliu I, Collino S, Martin FP, Ratajczak J, Canto C, Kussmann M, Naef F, Gachon F. Circadian and feeding rhythms orchestrate the diurnal liver acetylome. *Cell Rep* 2017; 20(7): 1729–1743.
 - 64 Sato S, Solanas G, Peixoto FO, Bee L, Symeonidi A, Schmidt MS, Brenner C, Masri S, Benitah SA, Sassone-Corsi P. Circadian reprogramming in the liver identifies metabolic pathways of aging. *Cell* 2017; 170(4): 664–677.e11.
 - 65 Hirota T, Lee JW, St John PC, Sawa M, Iwasako K, Noguchi T, Pongsawakul PY, Sonntag T, Welsh DK, Brenner DA, Doyle FJ 3rd, Schultz PG, Kay SA. Identification of small molecule activators of cryptochrome. *Science* 2012; 337(6098): 1094–1097.
 - 66 Ju D, Zhang W, Yan J, Zhao H, Li W, Wang J, Liao M, Xu Z, Wang Z, Zhou G, Mei L, Hou N, Ying S, Cai T, Chen S, Xie X, Lai L, Tang C, Park N, Takahashi JS, Huang N, Qi X, Zhang EE. Chemical perturbations reveal that RUVBL2 regulates the circadian phase in mammals. *Sci Transl Med* 2020; 12(542): eaba0769.
 - 67 Wirz-Justice A. How to measure circadian rhythms. *Mediographia* 2007; 29(1): 84–90.
 - 68 Wittenbrink N, Ananthasubramaniam B, Munch M, Koller B, Maier B, Weschke C, Bes F, de Zeeuw J, Nowozin C, Wahn-schaffe A, Wisniewski S, Zaleska M, Bartok O, Ashwal-Fluss R, Lammert H, Herzel H, Hummel M, Kadener S, Kunz D, Kramer A. High-accuracy determination of internal circadian time from a single blood sample. *J Clin Invest* 2018; 128(9): 3826–3839.
 - 69 Braun R, Kath WL, Iwanaszko M, Kula-Eversole E, Abbott SM, Reid KJ, Zee PC, Allada R. Universal method for robust detection of circadian state from gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2018; 115(39): E9247–E9256.
 - 70 Wu G, Ruben MD, Schmidt RE, Francey LJ, Smith DF, Anafi RC, Hughey JJ, Tasseff R, Sherrill JD, Oblong JE, Mills KJ, Hogenesch JB. Population-level rhythms in human skin with implications for circadian medicine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2018; 115(48): 12313–12318.