中图分类号：R965；R971　　文献标志码：A　　文章编号：1006－4931(2024)19－0045－06
doi:10.3969/j.issn.1006－4931.2024.19.011

阿托伐他汀对人肝癌细胞株 HepG2 生物钟基因震荡性的影响*

赵昌睿，刘　畅△

（中国药科大学，江苏 南京　211198）

摘要：目的　探讨阿托伐他汀(AT)对人肝癌细胞株 HepG2(简称 HepG2)生物钟基因与蛋白表达节律的影响。**方法**　基于 MOE 软件设计 AT 与生物钟蛋白的分子对接虚拟实验；在 HepG2 与人骨肉瘤细胞 *BMAL1::LUC*－U2OS(简称 U2OS)中分别设置实验组(加入 10^1，10^2，10^3，10^4 nmol/L AT)，对照组(加入 0 nmol/L AT)，空白组(加入 0.1% 二甲基亚砜)，给药 24 h 后采用 CCK－8 法检测细胞在不同浓度 AT 处理后的活力；在不影响正常细胞活力的浓度下，采用免疫印迹(Western blot)法检测脑和肌肉芳香烃受体核转运样蛋白 1(BMAL1)、昼夜节律蛋白 2(PER2)、视黄酸受体相关孤儿受体 γ(RORγ)、核受体亚家族 1 组 D 成员(NR1D1)的蛋白表达水平；采用 LumiCycle 实验检测细胞生物节律基因 *BMAL1* 的震荡情况；通过血清休克实验确定生物钟基因 *BMAL1*，*PER2*，*NR1D1* 及隐花色素 2(*CRY2*)的节律表达。**结果**　高于 100 nmol/L 的 AT 会对 HepG2 产生细胞毒性。在避免 AT 对正常细胞活性影响的背景下，选择 AT 100 nmol/L 浓度进行后续实验。给予 AT 刺激后，BMAL1 和 PER2 蛋白表达量减少($P<0.05$)；LumiCycle 实验结果显示，实验组(AT 100 nmol/L)的相位较对照组(0 nmol/L)滞后 2.696 h($P<0.01$)。血清休克实验结果显示，实验组 *PER2* 基因的表达较对照组显著下调($P<0.05$)。**结论**　AT 能调节外周生物钟蛋白与基因的表达，使生物钟核心基因 *BMAL1* 表达滞后，*PER2* 基因与蛋白表达均显著下调，具有治疗生物钟紊乱相关疾病、睡眠障碍等的应用前景。

关键词：阿托伐他汀；肝癌细胞株；脑和肌肉芳香烃受体核转运样蛋白 1；昼夜节律蛋白 2；基因震荡性

Effect of Atorvastatin on the Rhythmicity of Circadian Clock Genes in Human Hepatocarcinoma Cell Line HepG2

ZHAO Changrui, LIU Chang

(China Pharmaceutical University, Nanjing, Jiangsu, China　211198)

Abstract: Objective　To investigate the effect of atorvastatin (AT) on the expression rhythm of circadian clock genes and proteins in human hepatocarcinoma cell line HepG2. **Methods**　The virtual experiment for molecular docking between AT and circadian clock proteins was designed based on MOE software. The experimental groups (added with 10^1, 10^2, 10^3, 10^4 nmol/L of AT), the control group (added with 0 nmol/L of AT), and the blank group (added with 0.1% dimethyl sulfoxide) were set in HepG2 and human osteosarcoma *BMAL1::LUC*－U2OS cells (hereinafter refferred to as U2OS). After 24 h of administration, CCK－8 assay was used to detect the changes of cell viability after different doses of AT treatment. The expression levels of brain and muscle ARNT－like protein 1, aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator－like protein 1 (BMAL1), period circadian protein 2 (PER2), retinoic acid receptor－related orphan receptor γ (RORγ), and nuclear receptor subfamily 1 member D (NR1D1) protein were detected by the Western blot at concentrations that did not affect normal cell viability. The oscillations of the cellular circadian gene *BMAL1* were detected by the LumiCycle experiment, and the rhythmic expression of other circadian genes *BMAL1*, *PER2*, *NR1D1* and *CRY2* was determined through serum shock assay. **Results**　AT higher than 100 nmol/L induced cytotoxicity to HepG2 cells. In the context of avoiding the influence of AT on the activity of normal cells, a concentration of AT 100 nmol/L was selected for the follow－up experiment. After the stimulation of AT, the expression level of BMAL1 and PER2 protein decreased ($P<0.05$). The LumiCycle experiment results showed that the phase in the experimental group (100 nmol/L of AT) lagged behind that in the control group (10 nmol/L) by 2.696 h ($P<0.01$). The serum shock experiment showed that the expression of *PER2* gene in the experimental group was significantly down－regulated compared to that in the control group ($P<0.05$). **Conclusion**　AT can regulate the expression of peripheral circadian clock proteins and genes, resulting in delayed expression of the core circadian clock gene *BMAL1* and significant down－regulation of *PER2* gene and protein expression. It has potential applications in the treatment of circadian clock disorders, sleep disorders, and other related diseases.

Key words: atorvastatin; hepatocarcinoma cell line; BMAL1; PER2; gene oscillation

在昼夜交替的可预测、节律性变化的环境中，生物　体不断进化，形成了一套完整、精确及有内源性的昼夜

*基金项目：国家自然科学基金[92057112]。

第一作者：赵昌睿，男，硕士研究生，研究方向为抗肿瘤药物的分子机制，(电子信箱)3221030926@stu.cpu.edu.cn。

△通信作者：刘畅，男，博士研究生，教授，研究方向为代谢调控与代谢紊乱的分子发病机制，(电子信箱)changliu@cpu.edu.cn。

节律系统[1-3]。在核心环路中，时钟节律调节因子（CLOCK）与脑和肌肉芳香烃受体核转运样蛋白1（BMAL1）转录激活因子形成异二聚体，促进并激活3个周期蛋白[昼夜节律蛋白1（PER1）、昼夜节律蛋白2（PER2）、昼夜节律蛋白3（PER3）]和2个隐花色素（CRY）蛋白（CRY1和CRY2）的表达。当PER和CRY的蛋白复合物易位到细胞核中时，对BMAL1/CLOCK复合物激活的转录作用进行抑制[4]，从而形成重要的负反馈抑制，该反馈环路在生物钟调节过程中扮演着重要角色。生物钟新药开发成本高、周期长、存在安全性问题等，老药新用受到重视，药物被挖掘出其潜在的功效。计算机辅助药物设计技术给研究人员带来了更高效、更科学和更实用的药物筛选途径。阿托伐他汀（AT）属第3代亲脂类他汀类药物，通过竞争性抑制酶羟甲基戊二酰辅酶A还原酶（HMG-CoA）[5]而抑制肝脏内源性胆固醇的产生，调节异常的胆固醇和血脂水平，最终减少心血管疾病的发病风险[6]。本研究中利用MOE软件[7]进行蛋白-药物虚拟对接，以生物钟蛋白为配体与小分子药物AT对接，基于骨肉瘤细胞、肝癌细胞检测AT对生物钟基因表达的震荡情况，以验证AT调控生物钟的分子机制[8]。现报道如下。

1 材料与方法

1.1 仪器、试药与细胞

仪器：Lightcycler480 Ⅱ型荧光实时定量聚合酶链反应（PCR）系统（美国Roche公司）；HEPA Class 100型CO_2恒温细胞培养箱（美国Thermo Fisher Scientific公司）；Spark型全波长酶标仪（瑞士Tecan公司）；LumiCycle32型通道监测系统（美国Actimetrics公司）；Tanon 5200 Multi型全自动化学发光分析系统（上海天能科技有限公司）；1736R型高速冷冻型落地式离心机（基因科技<上海>股份有限公司）。

试药：DMEM培养基（武汉普诺赛公司）；胎牛血清（兰州荣畔公司）；PCR引物（北京擎科公司）；SYBR Green qPCR Master Mix（南京诺唯赞公司）；Anti-β-Actin抗体（武汉赛维尔公司）；Anti-BMAL1抗体、Anti-PER2抗体、抗核受体亚家族1组D成员（Anti-NR1D1）抗体、抗视黄酸受体相关孤儿受体γ（Anti-RORγ）抗体（美国Proteintech公司）；30%Acr-bis（北京雷根公司）；地塞米松（美国Sigma公司）；蛋白酶抑制剂Cocktail（美国Roche公司）；Goat anti-rabbit抗体、Goat anti-mouse抗体（CST公司）；磷酸盐缓冲液（PBS）、0.25%胰蛋白酶-EDTA（美国Gibco公司）；Trizol裂解液（美国Ambion公司）；增强化学发光（ECL）显色液（美国Millpore公司）；培养皿（美国Corning公司）；AT（上海阿拉丁生化科技股份有限公司）；CCK-8试剂盒（南京建成公司）；荧光素Luciferin（美国Promega公司）。

细胞：人肝癌细胞株HepG2（简称HepG2）购自ATCC；人骨肉瘤细胞*BMAL1::LUC*-U2OS（简称U2OS）由国家生物科学研究所Eric Zhang博士赠送。

1.2 方法

计算机辅助药物设计分子对接：通过PDB数据库（http://www.rcsb.org/）获得BMAL1，PER，NR1D1的三维蛋白结构，通过Uniprot数据库（https://www.uniprot.org/）获得RORγ蛋白的三维结构，作为受体；通过ZINC数据库（https://zinc.docking.org/）获得小分子药物AT，作为配体。采用MOE Version 2019.0102软件进行小分子药物与蛋白间的虚拟对接。

细胞培养：将HepG2和U2OS置细胞培养箱中，恒定温度为37 ℃、CO_2浓度为5%，培养基为含10%胎牛血清的DMEM培养基、1%青霉素-链霉素溶液（×100），每48 h传代1次，多次传代后进行实验。

CCK-8法检测药物细胞毒性与分组：将HepG2与U2OS按5×10^4个/孔接种至96孔板，当细胞密度达到60%～70%时，分别加入浓度为0，10^1，10^2，10^3，10^4 nmol/L的AT处理液（设AT 0 nmol/L为对照组，其余浓度AT处理液为实验组），另设置空白组（加0.1%二甲基亚砜），培养24 h，避光条件下每孔加入100 μL含10% CCK-8的DMEM培养基，避光处理1 h，采用酶标仪在450 nm波长处测定吸光度（*OD*）值，并计算细胞存活率。细胞存活率（%）=（$OD_{实验组}-OD_{对照组}$）/（$OD_{对照组}-OD_{空白组}$）×100%。

免疫印迹（Western blot）法检测蛋白表达：将HepG2置10 cm培养皿，消化后传代至3.5 cm培养皿，置培养箱中正常培养至细胞融合度达90%左右后更换为DMEM培养基饥饿培养12 h，更换为含浓度为200 nmol/L地塞米松的DMEM培养基同步培养2 h，分别加入含0，1，5，10，25，50，100 nmol/L AT的DMEM培养基，置培养箱中处理24 h，之后用PBS清洗3次，加入含Cocktail与PMSF的RIPA蛋白裂解液，置4 ℃冰箱中裂解5 min，用细胞刮板刮下细胞，反复冻融3次，用低温离心机离心（温度为4 ℃，转速为13 000 r/min）10 min，定量后加入样品缓冲液，100 ℃恒温干浴锅处理7 min，取总蛋白样品在10%十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳（SDS-PAGE）中分离，转膜，用5%脱脂牛奶封闭1 h，加入一抗，4 ℃孵育过夜。次日，用PBST清洗3次，每次10 min，加入二抗，室温孵育1 h，用PBST清洗3次，每次10 min，加入ECL显色液，曝光显影，用Image J图像分析软件测量条带灰度值。条带灰度值（%）=目的蛋白灰度值/β-Actin蛋白灰度值×100%。

LumiCycle实验：将U2OS细胞传代接种至3.5 cm培养皿，置培养箱中常规培养1～2 d，待细胞长满后再放置1 d，让其完全长满，弃培养基，用PBS清洗2次，更换

为 DMEM 培养基饥饿培养过夜，用 PBS 清洗掉细胞碎片，加入含 200 nmol / L 地塞米松的 DMEM 培养基 1 mL，同步培养 2 h，配制 LumiCycle 工作液（含 25 mmol / L HEPES 缓冲液和 0. 1 mmol / L Luciferin 的无酚红 DMEM 培养基），弃含地塞米松的培养基，避光加入 3 mL 工作液，用封口膜封口，避光置 LumiCycle 仪器中，记录细胞生物钟基因的表达节律，用 LumiCycle Analysis 软件进行一阶多项式基准化，选择指数衰减形式的正（余）弦函数进行曲线拟合（Sin fit damped）分析。

血清休克实验：HepG2 经胰酶消化后，以每皿 50 000 个细胞传代接种至 3. 5 cm 培养皿中，在恒温培养箱中正常培养至完全长满，弃培养基，更换为 DMEM 培养基饥饿培养 6 h，将培养基更换为含 50% 马血清的培养基，同步培养 2 h，弃培养基，用 PBS 清洗掉细胞碎片，加入含或不含 100 nmol / L AT 的 DMEM 培养基。以更换培养基时间为 0 h（ZT0），之后每 4 h 收取 1 次样品，直至 36 h（ZT36），上述 10 组样品用 Trizol 试剂提取总 RNA，再以 RNA 为模板反转录成 cDNA，通过逆转录定量聚合酶链反应（RT - qPCR）法检测生物钟基因 *BMAL1*，*PER2*，*NR1D1*，*CRY2* 的 mRNA 表达水平。以基因 *36B4* 为内参，各基因的 qPCR 引物序列见表 1。

表 1　生物钟基因的 RT - qPCR 引物序列

Tab. 1　RT - qPCR primer sequence of circadian clock genes

基因	引物序列
BMAL1	正向：5′ - AGAGGTGCCACCAATCCATAC - 3′
	反向：5′ - CCTCGGTCACATCCTACGACA - 3′
PER2	正向：5′ - CGTGCCAAGCAGTTGACTTA - 3′
	反向：5′ - CAGCAAGGCTCAACAAATCA - 3′
CRY2	正向：5′- CCAAGAGGGAAGGGCAGGGTAGAG -3′
	反向：5′- AGGATTTGAGGCACTGTTCCGAGG -3′
NR1D1	正向：5′ - GACATGACGACCCTGGACTC - 3′
	反向：5′ - GCTGCCATTGGAGTTGTCAC - 3′
36B4	正向：5′ - TTGCCCTAGACTTCGAGCAA - 3′
	反向：5′ - CAGGAAGGAAGGCTGGAAGA - 3′

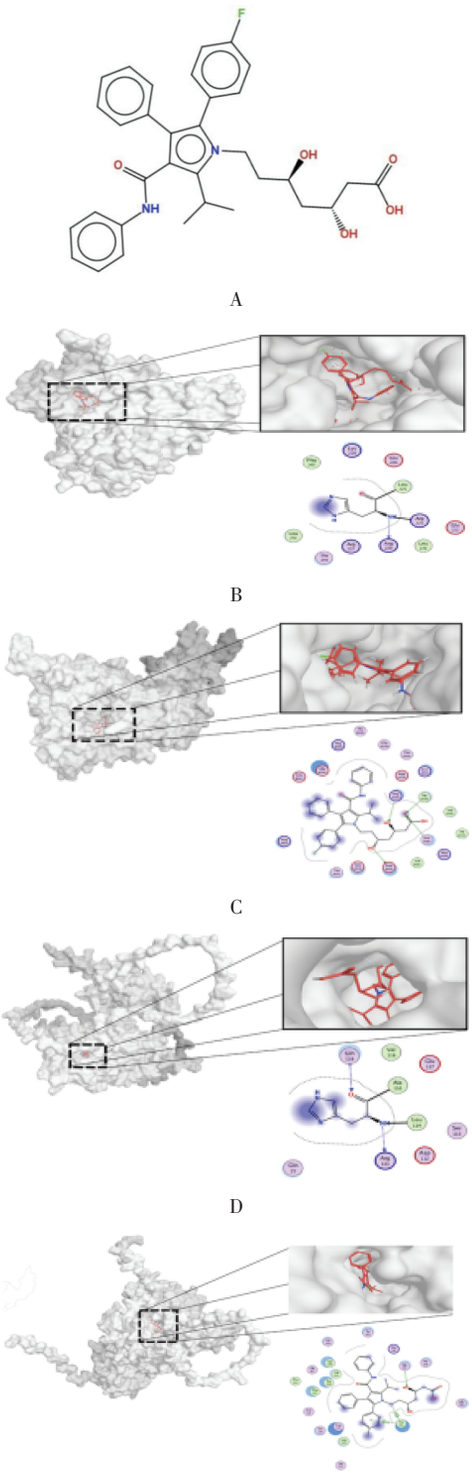
1. 3　统计学处理

实验数据采用 Excel 和 Graphpad Prism version 9. 0 软件处理。计量资料以 $\overline{X} \pm s$ 表示，行单因素方差分析和 Fisher′s LSD 检验。$P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2　结果

2. 1　分子对接实验

根据 MOE 软件分析生物钟蛋白与 AT 的结合能，结果见图 1。可见，结合构象紧密，BMAL1，PER2，NR1D1，RORγ 蛋白与 AT 虚拟对接得分（*S* 值）分别为 - 7. 755 9，- 8. 272 8，- 8. 070 4，- 9. 192 0，亲和能分别为 - 1. 5，- 0. 5，- 8. 3，- 2. 8 kcal / mol，表明 AT 与生物钟蛋白的结合构象紧密，具有可能性。



A. AT 的三维结构　B - E. PER2，BMAL1，RORγ，NR1D1 与 AT 的对接构象（白色为生物钟蛋白的结构，红色为 AT 的结构及与氨基酸的对接位点）

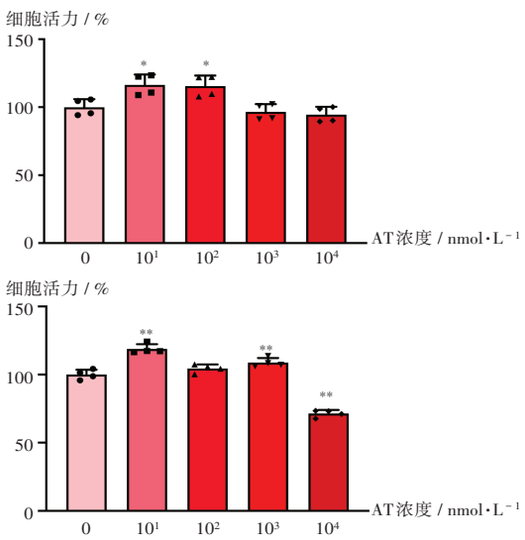
图 1　MOE 分子对接实验结果

A. The three - dimensional structure of AT　B - E. Docking conformation of PER2, BMAL1, RORγ, NR1D1 and AT (white refers to the structure of the biological clock protein, and red refers to the structure of AT and its docking site with amino acids)

Fig. 1　Results of the MOE molecular docking

2.2 药物细胞毒性

为确定 AT 在 U2OS 和 HepG2 中的最大安全浓度，通过 CCK－8 法检测了不同 AT 浓度下的细胞活力，结果见图 2。可见，当 AT 浓度为 0，10^1，10^2，10^3，10^4 nmol / L 时，对应 HepG2 的细胞活力分别为 100.00%，116.44%，115.53%，96.57%，94.62%，对应 U2OS 的细胞活力分别为 100.00%，118.79%，104.45%，108.82%，71.39%。对于 HepG2 和 U2OS，AT 最大安全浓度为 100 nmol / L。



注：与 AT 0 nmol / L 比较，$^*P < 0.05$，$^{**}P < 0.01$。图 3 至图 5 同。

A. HepG2　B. U2OS

图 2　细胞活力检测结果（$\bar{X} \pm s$，$n = 4$）

Note: Compared with 0 nmol / L of AT, $^*P < 0.05$, $^{**}P < 0.001$ (for Fig. 2 – 5).

A. HepG2　B. U2OS

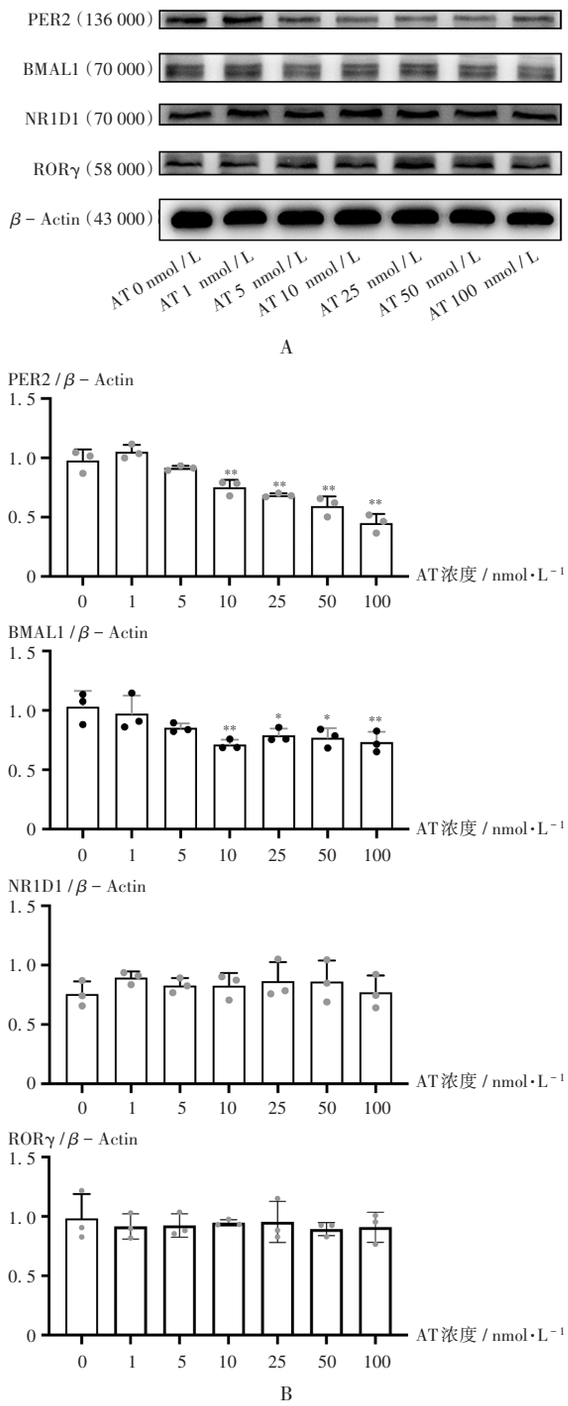
Fig. 2　Detection results of the cell viability ($\bar{X} \pm s$, $n = 4$)

2.3 蛋白表达

用浓度为 0，1，5，10，25，50，100 nmol / L 的 AT 处理 HepG2 24 h 后，PER2 蛋白相对表达量分别为 100.00%，107.53%，93.58%，76.96%，70.09%，60.74%，45.99%，BMAL1 蛋白相对表达量分别为 100.00%，97.13%，85.26%，71.10%，78.96%，76.97%，73.13%，NR1D1 蛋白与 RORγ 蛋白相对表达量无显著变化。详见图 3。

2.4 生物节律

LumiCycle 系统能检测荧光信号，对 U2OS 转入荧光素酶基因后，能实时检测 U2OS 发出的绿色荧光信号振荡节律。由图 4 A 可知，在 U2OS 中，*BMAL1* 基因的启动子活性随时间的延长而减弱，实验组（AT 100 nmol / L）的振幅较对照组（AT 0 nmol / L）有降低趋势。其次，利用 LumiCycle 系统的自带分析软件进一步计算 U2OS 振荡节律的周期、振幅、相位、阻尼系数。由图 4 B 可知，对照组的细胞周期为 24.766 7 h，振幅为 2 716.19 Counts / s，相位为 －11.773 h，，阻尼系数为 4.10；实验组的细胞周期为 25.066 7 h，振幅为 2 568.47 Counts / s，相位为 －9.077 h，阻尼系数为 3.04。可见，实验组的相位较对照组滞后了 2.696 h（$P < 0.01$）。



A. 电泳图　B. 蛋白表达柱状图

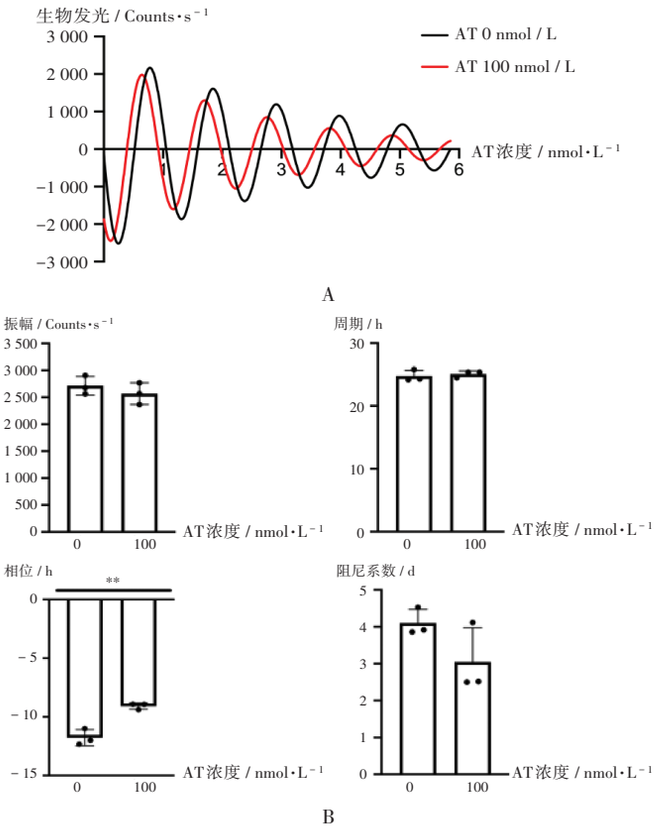
图 3　不同浓度阿托伐他汀对生物钟蛋白表达的影响（$\bar{X} \pm s$，$n = 3$）

A. Electropherogram　B. Bar chart of the protein expression

Fig. 3　Effects of atorvastatin at different concentrations on the expression of circadian clock proteins ($\bar{X} \pm s$, $n = 3$)

2.5 mRNA 表达

血清休克实验能激发生物钟核心基因的周期性震荡，HepG2 中的生物钟核心基因 *BMAL1*，*PER2*，*CRY2*，*NR1D1* 呈规律的周期震荡表达。由图 5 可知，*BMAL1* 基



A. AT 对 U2OS 节律的影响　B. AT 对 U2OS 振幅、周期、相位和阻尼系数的影响

图 4　LumiCycle 实验生物节律测定结果（$\bar{X} \pm s$，$n = 3$）

A. Effect of AT on the rhythm of U2OS　B. Effect of AT on the amplitude, period, phase, and damping coefficient of U2OS

Fig. 4　Biological rhythm measurement results of the LumiCycle experiment（$\bar{X} \pm s$, $n = 3$）

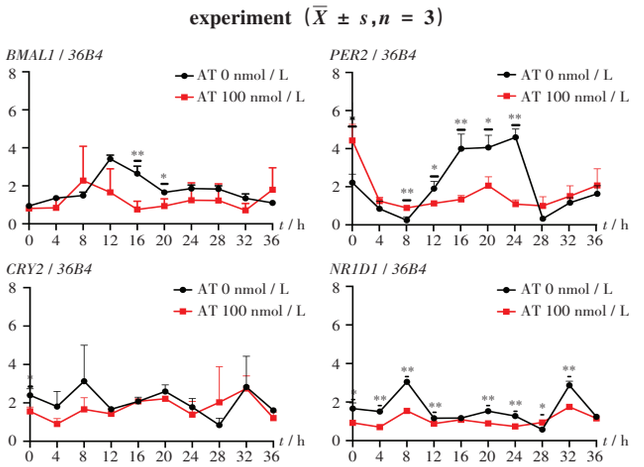


图 5　血清休克实验结果

Fig. 5　Results of the serum shock experiment

因的表达震荡在 ZT8 – ZT32 时，对照组（AT 0 nmol / L）在 ZT12 时达到表达量峰值，但实验组（AT 100 nmol / L）峰值出现在 ZT8 时的整体趋势略低于对照组；实验组 *PER2* 基因的表达在 AT 处理后显著低于对照组，于 ZT4 后逐渐平稳，峰值出现在 ZT20 时，且 ZT24 时对照组的表达量约为实验组的 4. 21 倍；*NR1D1* 基因的表达振幅稍低于对照组，但相位和周期无显著差异；对于 *CRY2* 和 *NR1D1* 基因，实验组与对照组的振幅、相位、周期等无显著差异，且峰值均在 ZT8 与 ZT32 时。

3　讨论

当生物体的昼夜节律因夜班[9]、城市光污染[10]、出差旅行[11]及其他因素与外部时间线索不一致而使生物钟受到干扰或紊乱时，对睡眠质量、代谢稳态等会产生负面影响，也会使神经退行性疾病[12]、心血管疾病[13]、糖尿病或癌症[14]等的发病率升高。在胃癌组织中，生物钟核心蛋白 BMAL1 的表达与胃癌的侵袭和迁移呈正相关[15]；在恶性胸膜间皮瘤中，BMAL1 的表达水平较正常组织偏高[16]；生物钟核心基因 *PER2* 在胃癌组织中也显著上调[17]。在睡眠剥夺模型小鼠中，*PER2* 基因保持持续的高表达状态[18]。另一方面，存在睡眠问题的注意力缺陷多动症患者的 *PER2* 基因表达昼夜节律出现紊乱[19]。动脉粥样硬化[20]、高血压[21]、癫痫[22]等疾病的发作均与昼夜节律的震荡密不可分。尽管昼夜节律异常的负面影响现已得到充分证实，但如何影响、改变、使用生物钟改善和治疗机体状态或利用生物钟达到更好的药物治疗效果未展开大规模研究，且已上市的以生物钟为靶点的相关药物稀少。

老药新用是将市面已存在的药物通过再次筛选作为另一疾病的治疗手段，再次定位药物治疗的病症，这种开发的药物新途径具有有效、便宜、安全的特点，更科学的基因组学、蛋白质组学、生物信息学和更高计算能力的计算机生物技术加快了药物再利用的过程。本研究中的计算机辅助药物设计在药物筛选的前期工作中进行了基于药物与蛋白质间的三维结构虚拟对接，这种方式在药物设计和药物筛选中节约了大量的人力、物力，提高了挖掘 AT 治疗潜力的准确率及效率[23]。AT 作为公认的第 3 代无需前体活化的心血管疾病治疗药物，既能作为 HMG – CoA 抑制剂，又能发挥独立于心血管保护作用外的生物钟调控功能。由图 3 可知，用 AT 处理 HepG2 后，生物钟核心蛋白 BMAL1 和 PER2 的表达量呈梯度浓度降低，其中 PER2 蛋白显著降低，而 NR1D1 与 RORγ 蛋白在给药刺激后无规律性变化。

为深入研究 AT 调控生物钟基因表达是否具有器官特异性，本研究中用 U2OS 进行了验证。由图 4 可知，在生物钟节律光度测定分析系统 LumiCycle 中，U2OS 与 HepG2 经 AT 处理后的生物钟核心基因 *BMAL1* 的震荡结果相印证。还发现了 *BMAL1* 基因的相位变化，可作为调节生物钟相位变化的现存药物，以改善跨时区飞行或睡眠紊乱导致的生物钟震荡失调。在 HepG2 的血清休克实验中，*PER2* 基因在 ZT12 时的表达量降低，在 ZT24 时达差异峰值，*CRY2*，*RORγ*，*NR1D1* 基因表达量均无较大差异。值得注意的是，尽管本研究中的分子对

接结果显示AT与PER2的结合相比其他生物钟蛋白的可能性稍弱，但Western blot法检测结果表明AT对PER2蛋白的表达有显著抑制作用。这一差异可能源于分子对接是一种理论预测方法，其预测结果受限于计算模型和参数设置，实际生物系统的复杂性可能导致实验结果与预测不完全一致。分子对接模拟主要评估药物与靶点蛋白的直接结合可能性，而Western blot法检测结果反映了药物在细胞内的实际生物效应。AT可能通过间接途径或影响后转录调控等方式作用于PER2蛋白，导致其表达下调。故分子对接模拟结果虽重要，但不能完全预测药物的细胞内效应，需结合细胞实验结果综合分析。在药物作用机制的研究中，需理论预测和实验观测相互验证和补充。目前尚无针对*PER2*基因的特异性抑制剂，老药新用中的AT可弥补这一空缺。

综上所述，AT作为一种已广泛应用于临床的药物，不仅具有心血管保护作用，还展现出了调控生物钟的潜力。本研究结果表明，AT能影响关键生物钟基因的相位和振幅，特别是在*BMAL1*和*PER2*基因的表达上表现出了显著调控作用。这一发现为其治疗生物钟紊乱相关疾病、睡眠障碍等提供了新的应用前景。

参考文献

[1] BARGIELLO TA, JACKSON FR, YOUNG MW. Restoration of circadian behavioural rhythms by gene transfer in Drosophila[J]. Nature, 1984, 312(5996): 752 - 754.
[2] HARDIN PE, HALL JC, ROSBASH M. Feedback of the Drosophila period gene product on circadian cycling of its messenger RNA levels[J]. Nature, 1990, 343(6258): 536 - 540.
[3] SIWICKI KK, EASTMAN C, PETERSEN G, et al. Antibodies to the period gene product of Drosophila reveal diverse tissue distribution and rhythmic changes in the visual system[J]. Neuron, 1988, 1(2): 141 - 150.
[4] PANDA S. Circadian physiology of metabolism [J]. Science (New York, N. Y.), 2016, 354(6315): 1008 - 1015.
[5] MOGHADASIAN MH. Clinical pharmacology of 3 - hydroxy - 3 - methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors [J]. Life Sciences, 1999, 65(13): 1329 - 1337.
[6] RAY SK, REGE NN. Atorvastatin: in the management of hyperlipidaemia[J]. Journal of Postgraduate Medicine, 2000, 46(3): 242 - 243.
[7] VILAR S, COZZA G, MORO S. Medicinal chemistry and the molecular operating environment (MOE): application of QSAR and molecular docking to drug discovery[J]. Current Topics in Medicinal Chemistry, 2008, 8(18): 1555 - 1572.
[8] CHEN Z, YOO SH, PARK YS, et al. Identification of diverse modulators of central and peripheral circadian clocks by high - throughput chemical screening[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2012, 109(1): 101 - 106.
[9] ALAASAM VJ, LIU X, NIU Y, et al. Effects of dim artificial light at night on locomotor activity, cardiovascular physiology, and circadian clock genes in a diurnal songbird[J]. Environ Pollut, 2021, 282: 117036.
[10] WALKER WH, BUMGARNER JR, BECKER - KRAIL DD, et al. Light at night disrupts biological clocks, calendars, and immune function[J]. Seminars In Immunopathology, 2022, 44(2): 165 - 173.
[11] WATERHOUSE J, REILLY T. Managing jet lag[J]. Sleep Medicine Reviews, 2009, 13(4): 247 - 248.
[12] OHASHI Y, OKAMOTO N, UCHIDA K, et al. Daily rhythm of serum melatonin levels and effect of light exposure in patients with dementia of the Alzheimer's type[J]. Biological Psychiatry, 1999, 45(12): 1646 - 1652.
[13] VAN LAAKE LW, LÜSCHER TF, YOUNG ME. The circadian clock in cardiovascular regulation and disease: Lessons from the Nobel Prize in Physiology or Medicine 2017[J]. European Heart Journal, 2018, 39(24): 2326 - 2329.
[14] CHELLAPPA SL, QIAN JY, VUJOVIC N, et al. Daytime eating prevents internal circadian misalignment and glucose intolerance in night work[J]. Sci Adv, 2021, 7(49): eabg9910.
[15] 程 玉，刘海旺，郝美玲，等. 胃癌组织中BMAL1、GLI1的表达及意义[J]. 临床与实验病理学杂志，2020，36(2)：186 - 188.
[16] ELSHAZLEY M, SATO M, HASE T, et al. The circadian clock gene BMAL1 is a novel therapeutic target for malignant pleural mesothelioma [J]. International Journal of Cancer, 2012, 131(12): 2820 - 2831.
[17] KIM M, DE LA PEÑA JB, CHEONG JH, et al. Neurobiological Functions of the Period Circadian Clock 2 Gene, Per2[J]. Biomolecules & Therapeutics, 2018, 26(4): 358 - 367.
[18] FRANKEN P, THOMASON R, HELLER HC, et al. A non - circadian role for clock - genes in sleep homeostasis: a strain comparison[J]. BMC Neurosci, 2007, 8: 87.
[19] BAIRD AL, COOGAN AN, SIDDIQUI A, et al. Adult attention - deficit hyperactivity disorder is associated with alterations in circadian rhythms at the behavioural, endocrine and molecular levels[J]. Molecular Psychiatry, 2012, 17(10): 988 - 995.
[20] POURCET B, DUEZ H. Nuclear Receptors and Clock Components in Cardiovascular Diseases [J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(18): 9721.
[21] SCHMIDT MI, HADJI - GEORGOPOULOS A, RENDELL M, et al. The dawn phenomenon, an early morning glucose rise: implications for diabetic intraday blood glucose variation[J]. Diabetes Care, 1981, 4(6): 579 - 585.
[22] KHAN S, NOBILI L, KHATAMI R, et al. Circadian rhythm and epilepsy[J]. Lancet Neurology, 2018, 17(12): 1098 - 1108.
[23] PUSHPAKOM S, IORIO F, EYERS PA, et al. Drug repurposing: progress, challenges and recommendations [J]. Nat Rev Drug Discov, 2019, 18(1): 41 - 58.

（收稿日期：2023 - 10 - 09；修回日期：2024 - 04 - 02）