

DOI:10.13288/j.11-2166/r.2025.18.013

疏泄方对昼夜节律紊乱模型小鼠肝脏脂质堆积及生物钟基因 *Bmal1* 表达的影响

张梦婷¹, 黄婷¹, 刘欣妍¹, 李婧¹, 吴晚虹², 黄草心²,
蔡腾², 王梦缘², 赵能江², 刘素嫒², 杨叔禹²✉

1. 福建中医药大学中医学院, 福建省福州市闽侯县上街镇邱阳路1号, 350122; 2. 厦门大学附属第一医院

[摘要] **目的** 探讨疏泄方改善昼夜节律紊乱引起肝脂质堆积的可能作用机制。**方法** 240只C57BL/6小鼠随机分为对照组、模型组、疏泄方低剂量组、疏泄方高剂量组和阿戈美拉汀组, 每组48只。除对照组外, 其余各组小鼠采用光剥夺方式建立昼夜节律紊乱模型小鼠。造模2周后疏泄方低、高剂量组小鼠每10g体质量分别给予疏泄方0.15、0.31g/d灌胃, 阿戈美拉汀组小鼠每10g体质量给予阿戈美拉汀片0.03mg/d灌胃, 对照组和模型组小鼠每10g体质量给予0.1ml/d蒸馏水灌胃, 各组均每天灌胃1次, 共灌胃2周。最后一次给药次日, 采用跑轮实验观察小鼠日间(8:00—20:00)和夜间(20:01—8:00⁺¹)转数总和; 采用代谢笼记录小鼠24h不同时间[北京时间11:00(ZT3)、15:00(ZT7)、19:00(ZT11)、23:00(ZT15)、3:00⁺¹(ZT19)、7:00⁺¹(ZT23)]摄食量; 比色法检测不同时间各组小鼠肝脏甘油三酯(TG)水平; HE染色法观察肝组织病理形态; 免疫荧光法检测围脂滴蛋白1(perilipin1)免疫荧光密度; RT-qPCR和Western Blot法分别检测脑和肌肉芳香烃受体核转运蛋白样蛋白1(*Bmal1*)、过氧化物酶体增殖物激活受体 γ 共激活因子1a(*PGC-1a*) mRNA表达和蛋白水平。**结果** 对照组、疏泄方低剂量组和阿戈美拉汀组夜间跑轮转数总和较本组日间显著升高($P<0.01$); 与对照组同时间比较, 模型组小鼠日间跑轮转数总和显著增加($P<0.01$); 与模型组同时间比较, 疏泄方低剂量组和阿戈美拉汀组日间跑轮转数总和显著降低, 疏泄方低剂量组在ZT7时摄食量显著减少($P<0.05$)。肝脏病理结果显示, 对照组、阿戈美拉汀组及疏泄方低、高剂量组小鼠肝细胞形态规则, 而模型组小鼠肝细胞排列紊乱、少量空泡状细胞。与对照组同时间比较, 模型组ZT11和ZT15时TG含量显著升高, ZT15时肝脏组织perilipin1蛋白免疫荧光密度增强, *Bmal1* mRNA表达量在ZT3、ZT7显著升高, *Bmal1*蛋白及其mRNA在ZT15时显著降低, ZT11时*PGC-1a* mRNA表达及其蛋白水平降低, ZT15时*PGC-1a* mRNA表达及其蛋白水平升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。与模型组同时间比较, ZT15时疏泄方低剂量组及阿戈美拉汀组TG含量降低; 疏泄方低、高剂量组perilipin1蛋白免疫荧光密度减弱; 疏泄方低剂量组在ZT7时*Bmal1* mRNA表达量降低, *Bmal1*蛋白水平在ZT3、ZT11和ZT15时均升高, ZT11时*PGC-1a* mRNA表达及其蛋白水平升高, ZT15时*PGC-1a* mRNA表达及其蛋白水平降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。**结论** 低剂量疏泄方可调控昼夜节律紊乱, 改善肝脏脂质堆积, 其机制可能通过有效调节肝脏*Bmal1*、*PGC-1a* mRNA表达及蛋白水平发挥降低肝TG的作用有关。

[关键词] 昼夜节律; 肝脏; 脂质堆积; 生物钟基因; 脑和肌肉芳香烃受体核转运蛋白样蛋白1; 过氧化物酶体增殖物激活受体 γ 共激活因子1a; 疏泄方

基金项目: 国家自然科学基金(82474415, 82305075); 福建省自然科学基金(2024J01778); 福建省中青年教师教育科研项目(JAT220151)

✉ 通讯作者: xmyangshuyu@xmu.edu.cn

24 小时睡眠-觉醒周期是昼夜节律的主要表现之一,经常性的不规律作息将影响生物钟负反馈环的相互作用,进而造成昼夜节律紊乱^[1]。研究显示,肝脏的代谢活动与昼夜节律密切相关^[2],肝脏中参与脂质积累的大多数途径都受昼夜节律的控制^[3-4]。因此,调控生物钟负反馈环机制或可成为控制肝脏脂质堆积及继发肝脏疾病的重要机制之一。肝生物钟基因脑和肌肉芳香烃受体核转运蛋白样蛋白 1 (Bmal1) 是调控肝脏脂质代谢的核心蛋白^[5]。肝内缺乏 Bmal1 的小鼠会引起脂肪肝^[6]和肝纤维化^[7]等肝损伤性疾病。既往研究^[8]显示,持续黑暗中饲养 2 周的小鼠肝脏 Bmal1 和过氧化物酶体增殖物激活受体 γ 共激活因子 1 α (PGC-1 α) mRNA 节律表达紊乱且表达量降低,最终导致脂代谢异常。当肝内甘油三酯 (TG) 升高,围脂滴蛋白 1 (perilipin 1) 定位于脂滴表面,防止脂肪分解^[9]。因此,肝内生物钟基因 Bmal1 可能是肝脏脂质堆积的关键靶点。

中医学对于人体时间节律的认识源于《黄帝内经》。《灵枢·岁露论》曰:“人与天地相参也,与日月相应也”,《素问·生气通天论篇》曰:“平旦人气生,日中而阳气隆,日西而阳气已虚,气门乃闭”,论述了人体阴阳消长与自然节律同步。因此,人体正常睡眠和觉醒也应符合自然日节律的“昼精夜瞑”规律。若昼夜节律紊乱,肝藏血不足影响其疏泄功能,从而导致气滞津停成痰、脾胃受损生湿。疏泄方是本团队临床工作中总结出的经验方,由酸枣仁汤化裁而来,具有调肝养血、安神和中的功效。前期研究^[10-11]显示,疏泄方治疗失眠和非酒精性单纯性脂肪肝患者均能收效显著。因此,本研究观察疏泄方对昼夜节律紊乱诱导的小鼠肝脏脂质紊乱的影响,并从肝生物钟基因 Bmal1 调节肝脏脂质代谢角度探讨疏泄方作用的可能分子机制,为其临床应用提供依据。本试验经厦门大学实验动物伦理委员会批准 (批准号: XMULAC20200142)。

1 材料与方法

1.1 动物

SPF 级雄性 C57BL/6 小鼠 240 只,体质量 23~24 g, 6~8 周龄,上海斯莱克实验动物有限公司,实验动物生产许可证号: SCXK (沪) 2017-0005。所有小鼠饲养在恒温 (24 $\pm$ 1) $^{\circ}$ C,相对湿度 40%~70%, 12 h 光暗循环环境中,自由获得食物和水。

1.2 药物

疏泄方组成:炒酸枣仁 15 g,知母 10 g,茯苓 15 g,川芎 10 g,白芍 15 g,五味子 10 g,姜半夏 10 g,枳实 10 g,黄芩 15 g,竹茹 10 g。中药饮片购自厦门南普陀中医院,经浸泡、煎煮 2 次得到煎剂,使用旋转蒸发仪将煎剂浓缩至 1.54、3.09 g/ml 溶液。阿戈美拉汀片 (江苏豪森药业集团有限公司,批号: 155200102) 碾成粉末,溶于蒸馏水中,制备成浓度为 0.32 mg/ml 的溶液。

1.3 主要试剂及仪器

磷酸盐缓冲盐水 (货号: B310KJ),上海源培生物科技股份有限公司;吐温 20 (货号: P9416)、Triton (货号: X-100)、4',6-二脒基-2-苯基吡啶 (DAPI,货号: P9542)、RIPA 裂解液 (货号: 20-188),德国 Merck 公司;4% 多聚甲醛 (货号: G1101),武汉赛维尔生物科技有限公司;TG 检测试剂盒 (货号: Ab65336),英国 Abcam 公司;总 RNA 提取试剂盒 (货号: DP419)、逆转录试剂盒 (货号: KR116-02)、SYBR Green PCR Master Mix (货号: FP205-02),北京天根生化科技有限公司;蛋白酶抑制剂和磷酸酶抑制剂 (货号: A32961)、BCA 试剂盒 (货号: 23225),美国 Thermo 公司;PAGE 凝胶快速制备试剂盒 (货号: PG112),上海雅酶生物医药科技有限公司;牛血清白蛋白 (货号: 4240GR500),德国 Biofroxx 公司;ECL 化学发光底物 (货号: K-12045-D50),美国 Advansta 公司;perilipin 1 抗体 (货号: 9349S)、Bmal1 抗体 (货号: 14020S)、 β 肌动蛋白 (β -actin) 抗体 (货号: 3700S),美国 Cell Signaling Technology 公司;PGC-1 α 抗体 (货号: NBP1-04676),美国 Novusbio 公司;羊抗鼠 IgG (H+L) 二抗 (货号: 31430)、羊抗兔 IgG (H+L) 二抗 (货号: 31460),美国 PIERCE 公司。

小鼠自主活动转轮系统 (型号: Ugo 1800),意大利 Ugo Basile 公司;TSE 能量代谢控制系统 (型号: TSE-Phenomaster),德国 TSE 公司;石蜡切片机 (型号: Mt1),深圳市达科为生物技术股份有限公司;离心机 (型号: 5424R, 5810R),德国 Eppendorf 公司;分光光度计 (型号: NanoDrop2000),美国 Thermo 公司;酶标仪 (型号: iMark 1681130)、电泳仪 (型号: 1658033),美国 Bio-Rad 公司;正置显微镜 (型号: BX51),日本 Olympus 公司;荧光定量 PCR 仪 (货号: LightCycler 480II),美国 ROCHE 公司;化学发光成像分析系统 (型号: GenoSens 2000),上海秦翔科学仪器有限公司。

1.4 动物分组及造模方法

小鼠适应性饲养 1 周后, 按随机数字表法分为对照组、模型组、疏泄方低剂量组、疏泄方高剂量组和阿戈美拉汀组, 每组 48 只。除对照组外, 其余各组小鼠采用光剥夺方式建立昼夜节律紊乱小鼠模型^[12]: 将小鼠饲养在 24 h 完全黑暗的 SPF 环境中 2 周, 在此期间小鼠自由饮食、饮水。通过跑轮实验^[13]判断模型是否成功, 采集小鼠每小时在跑轮上的平均转数, 连续监测 24 h, 当小鼠出现日间活动量增加, 夜间活动量减少均超过 30% 时, 代表造模成功。

1.5 给药方法

造模成功后, 按照成人与小鼠体重剂量折算系数等效剂量^[14], 以成人 70 kg 计算, 疏泄方低剂量(临床等效剂量)、高剂量组小鼠每 10 g 体质量分别给予疏泄方 0.15、0.31 g/d 灌胃, 阿戈美拉汀组小鼠每 10 g 体质量给予阿戈美拉汀片 0.03 mg/d 灌胃, 对照组和模型组小鼠每 10 g 体质量给予 0.1 ml/d 蒸馏水灌胃, 均每天灌胃 1 次, 共 2 周。试验中所有操作均在红光下进行。

1.6 观察指标及方法

1.6.1 跑轮实验观察小鼠活动量 最后一次灌胃后次日观察。跑轮装置共 16 个通道, 每个通道只能放置 1 只小鼠, 故每次实验将每组 3 或 4 只小鼠一起上 16 通道小鼠自主活动转轮装置中, 为了增加样本量, 重复实验 1 次。采用随机数字表法每组选取小鼠 3 或 4 只小鼠, 进入装置适应 24 h, 随后开始记录每只小鼠每小时在跑轮上的平均转数, 连续监测 24 h。在此期间, 小鼠处于 12 h 昼夜循环的环境中, 且自由饮食、饮水。

1.6.2 小鼠 24 h 内不同时间摄食量 跑轮实验适应当日, 采用代谢笼观察小鼠摄食量。代谢笼是 8 通道, 每个通道只能放置 1 只小鼠, 故在各组剩余小鼠中采用随机数字表法选取 1 或 2 只小鼠置于代谢笼中, 小鼠进笼后适应 48 h, 随后开始记录摄食量, 连续监测 24 h, 将开始检测时的食物重量减去 4 h 后的食物重量即为一个时间点的摄食量, 以此类推。在此期间, 小鼠处于 12 h 昼夜循环的环境中, 且自由饮食、饮水。为了增加样本量, 重复实验 2 次。

1.6.3 比色法检测不同时间肝组织中 TG 含量 于代谢笼检测结束当日检测。采用随机数字表法依次于北京时间 11: 00(ZT3)、15: 00(ZT7)、19: 00(ZT11)、23: 00(ZT15)、3: 00⁺¹(ZT19)、7: 00⁺¹

(ZT23) 共 6 个时间点对各组小鼠采取颈椎脱臼法处死小鼠, 并立即打开腹腔, 完整切下肝脏, 每个时间点 8 只, ZT 为授时时间。肝大叶右下边缘立即用 4% 多聚甲醛固定, 其余部分冻存。取 50 mg 冻存肝组织使用 TG 检测试剂盒检测小鼠肝脏中的 TG 含量, 根据说明书步骤进行操作。

1.6.4 HE 染色法观察肝脏组织病理形态 选择各组小鼠肝脏 TG 含量差异显著的时间点, 对小鼠肝组织进行病理学观察及 perilipin1 水平检测。经 4% 多聚甲醛固定的肝大叶右下边缘组织进行常规石蜡包埋, 制备 5 μ m 切片。切片脱蜡, 随后进行 HE 染色, 经脱水、透化后封片, 显微镜下观察肝脏组织的病理形态。

1.6.5 免疫荧光法检测肝脏组织中 perilipin1 水平 经 4% 多聚甲醛固定的肝大叶右下边缘组织进行常规石蜡包埋, 制备 5 μ m 切片, 每组 6 只。切片脱蜡, 用 0.5% TritonX-100 渗透 20 min, 用 PBS 洗涤。山羊血清封闭, 然后用 perilipin1 一抗(稀释比例为 1: 200)孵育 4 $^{\circ}$ C 过夜。用磷酸盐吐温缓冲液(PBST)洗涤后, 切片与荧光二抗在 20~37 $^{\circ}$ C 条件下孵育 1 h, 加入 DAPI 5 min, 然后使用 PBST 洗涤。封片后, 在荧光显微镜下观察并拍照, 图片用 Image J 软件(V1.6.0.20)分析荧光密度值。

1.6.6 RT-qPCR 法检测 *Bmal1*、*PGC-1 α* mRNA 表达水平 使用总 RNA 提取试剂盒从冻存肝脏组织中提取总 RNA, 用分光光度计进行质控并测定样品浓度。使用逆转录试剂盒从总 RNA(2 μ g)合成 cDNA。使用 SYBR Green PCR Master Mix 和表 1 中的引物进行实时定量 PCR 反应, 以 β -actin 为内参, 采用 2^{- $\Delta\Delta$ C_t} 法计算肝脏组织中 *Bmal1*、*PGC-1 α* mRNA 表达水平。

表 1 肝脏组织中 *Bmal1*、*PGC-1 α* 、 β -actin 基因的 RT-qPCR 引物序列

Table 1 RT-qPCR primer sequences of *Bmal1*, *PGC-1 α* and β -actin in liver tissues

基因	序列 (5'->3')	产物长度/bp
<i>Bmal1</i>	上游: TGCCACTGACTACCAAGAAAGT	201
	下游: AACTTCCGGGACATCGCATT	
<i>PGC-1α</i>	上游: CATACACAACCGCAGTCGCAACAT	77
	下游: TTTGGTGACTCTGGGCTCAGAGGAAG	
β -actin	上游: CCCACTCCTAAGAGGAGGATGGT	159
	下游: CAGACCTGGGCCATTGAGAAA	

注: *Bmal1*, 脑和肌肉芳香烃受体核转运蛋白样蛋白 1; *PGC-1 α* , 过氧化物酶体增殖物激活受体 γ 共激活因子 1 α ; β -actin, β -肌动蛋白。

1.6.7 Western Blot 法检测 Bmal1、PGC-1a 蛋白水平 提取 50 mg 冻存肝组织总蛋白并测定浓度。取 20 μg 蛋白进行 10% 的 SDS-PAGE 凝胶电泳。随后转膜、封闭，Bmal1、PGC-1a 一抗（稀释比例分别为 1：800、1：1000）孵育过夜。次日清洗一抗，经 HRP 标记的二抗（稀释比例为 1：10 000）孵育 2 h 后用 ECL 化学发光液显色，在化学发光成像仪器上进行图像采集并扫描分析条带，以目的蛋白灰度与内参蛋白 β-actin 灰度的比值代表蛋白相对表达量。

1.7 统计学方法

使用 SPSS 25.0 软件进行统计分析，计量资料均符合正态分布以均值±标准差 ($\bar{x}\pm s$) 表示，两个独立样本的数据比较，采用双尾单样本 *t* 检验；3 组及以上的组间数据比较，方差齐时采用单因素方差分析，组间两两比较采用 LSD 法，方差不齐时选择 Kruskal Wallis 检验，两两比较采用 Games-Howell 法；对同一样本不同时间点的比较采用重复测量方差分析。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组小鼠跑轮实验结果比较

图 1 示，对照组小鼠日间静止、夜间活跃，符合正常作息。其余 4 组日间活动量增加，模型组和阿戈美拉汀组夜间活动量减少，疏泄方低、高剂量组小鼠夜间活动量增加。表 2 示，与对照组同时间比较，模型组小鼠日间跑轮实验转数总和显著升高 ($P<0.01$)。与模型组同时间比较，疏泄方低剂量组和阿戈美拉汀组日间跑轮实验转数总和显著降低 ($P<0.05$)。各组小鼠夜间跑轮实验转数总和差异均无统计学意义 ($P>0.05$)。与本组日间比较，对照组、疏泄方低剂量组和阿戈美拉汀组夜间跑轮实验转数总和显著升高 ($P<0.01$)。

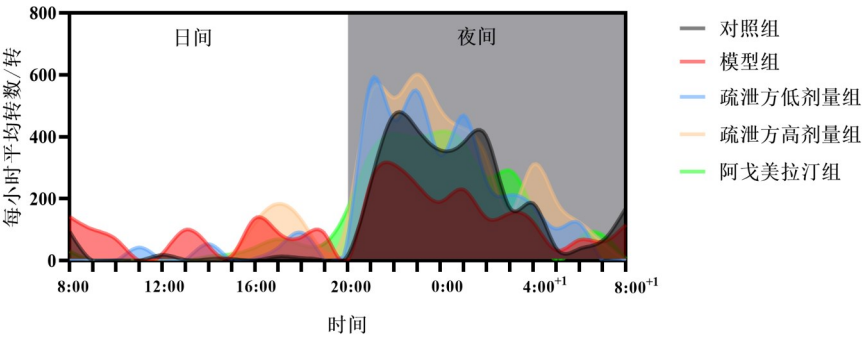


图 1 各组小鼠跑轮实验 24 h 内每小时平均转数情况
 Figure 1 The average number of wheel rotations per hour within 24 hours in the running wheel experiment of mice in each group

表 2 各组小鼠跑轮实验日间和夜间转数总和比较
 Table 2 Comparison of the total number of wheel revolutions during daytime and nighttime in the running wheel experiment for each group of mice (转, $\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	日间转数	夜间转数
对照组	6	169.50±148.62	2959.00±1194.49 ^{c)}
模型组	6	1019.17±843.54 ^{a)}	2215.33±1519.35
疏泄方低剂量组	4	225.25±306.59 ^{b)}	3962.25±1901.81 ^{c)}
疏泄方高剂量组	4	790.75±580.76	3762.00±2387.29
阿戈美拉汀组	6	393.50±322.13 ^{b)}	2768.50±2226.58 ^{c)}

注：a) 与对照组同时间比较， $P<0.01$ ；b) 与模型组同时间比较， $P<0.05$ ；c) 与本组日间比较， $P<0.01$ 。

2.2 各组小鼠 24 h 内不同时间摄食量比较

图 2 示，对照组小鼠日间进食少，夜间进食多，摄食高峰在 ZT19。其余各组小鼠日间进食增加，夜间进食减少，模型组摄食高峰提前至 ZT15。表 3 示，与模型组同时间比较，疏泄方低剂量组在 ZT7 时摄食量减少 ($P<0.05$)。其余各时间点各组小鼠摄食量差异均无统计学意义 ($P>0.05$)。

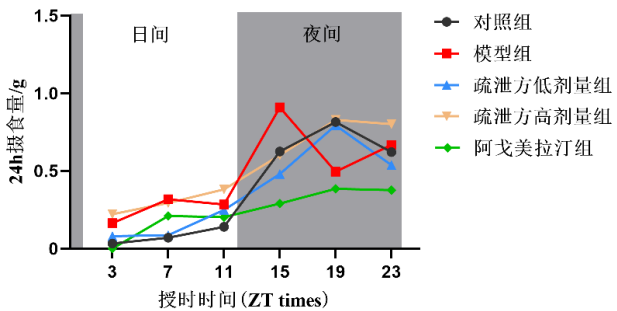


图 2 各组小鼠不同时间摄食量趋势图
 Figure 2 Trend chart of 24 h food intake of mice in each group at different time points

2.3 各组小鼠不同时间肝脏 TG 含量比较

图 3 示，对照组小鼠肝脏 TG 含量呈昼夜节律，ZT11–ZT15 为低值。模型组 TG 节律消失，6 个时间点含量相近。疏泄方干预后，TG 节律趋于对照组，

表 3 各组小鼠不同时间摄食量比较

Table 3 Comparison of food intake of mice in each group at different time points

(g, $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	ZT3	ZT7	ZT11	ZT15	ZT19	ZT23
对照组	4	0.03±0.07	0.07±0.08	0.14±0.02	0.63±0.21	0.82±0.18	0.62±0.34
模型组	5	0.16±0.22	0.32±0.30	0.28±0.27	0.91±0.66	0.50±0.48	0.67±0.46
疏泄方低剂量组	6	0.08±0.16	0.09±0.08 ^{a)}	0.25±0.08	0.48±0.14	0.80±0.20	0.54±0.09
疏泄方高剂量组	5	0.22±0.19	0.29±0.10	0.38±0.17	0.60±0.10	0.83±0.16	0.80±0.25
阿戈美拉汀组	4	0.00±0.00	0.21±0.23	0.20±0.15	0.29±0.28	0.39±0.34	0.38±0.29

注: ZT3, 11: 00; ZT7, 15: 00; ZT11, 19: 00; ZT15, 23: 00; ZT19, 3: 00⁺; ZT23, 7: 00⁺。

a) 与模型组同时间比较, $P < 0.05$ 。

阿戈美拉汀组 TG 节律振荡较大。表 4 示, ZT3、ZT7、ZT19 和 ZT23 时各组小鼠肝脏 TG 含量差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。与对照组同时间比较, ZT11 和 ZT15 时模型组 TG 含量显著升高 ($P < 0.01$)。ZT11 时, 阿戈美拉汀组 TG 含量显著高于模型组及疏泄方低、高剂量组 ($P < 0.01$)。ZT15 时, 疏泄方低剂量组及阿戈美拉汀组 TG 含量显著低于模型组, 疏泄方高剂量组 TG 含量显著高于模型组及疏泄方低剂量组, 阿戈美拉汀组 TG 含量显著低于疏泄方低、高剂量组 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。

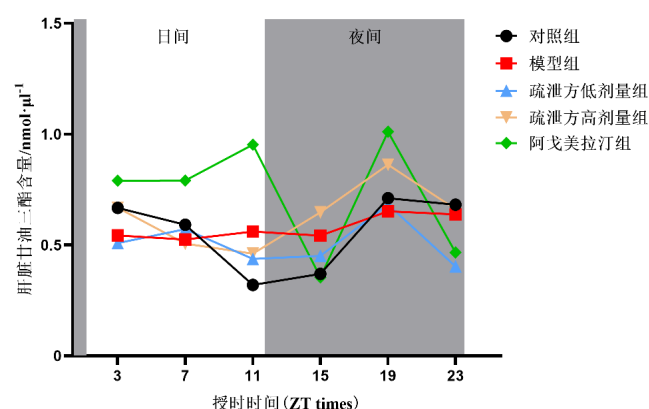


图 3 各组小鼠不同时间肝脏甘油三酯含量比较

Figure 3 Comparison of liver triglyceride content in mice of each group at the same time point

表 4 各组小鼠不同时间肝脏 TG 含量比较

Table 4 Comparison of liver TG content in mice of each group at different time points

(nmol· μl^{-1} , $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	ZT3	ZT7	ZT11	ZT15	ZT19	ZT23
对照组	8	0.67±0.19	0.59±0.28	0.32±0.10	0.37±0.05	0.71±0.35	0.68±0.36
模型组	8	0.54±0.20	0.52±0.19	0.56±0.11 ^{a)}	0.54±0.06 ^{a)}	0.65±0.38	0.64±0.38
疏泄方低剂量组	8	0.51±0.23	0.57±0.26	0.44±0.24	0.45±0.08 ^{b)}	0.68±0.38	0.40±0.41
疏泄方高剂量组	8	0.67±0.19	0.51±0.30	0.46±0.27	0.65±0.11 ^{b) d)}	0.86±0.52	0.66±0.36
阿戈美拉汀组	8	0.79±0.20	0.79±0.19	0.95±0.15 ^{c) e) g)}	0.35±0.10 ^{c) d) f)}	1.01±0.23	0.47±0.24

注: TG, 甘油三酯; ZT3, 11: 00; ZT7, 15: 00; ZT11, 19: 00; ZT15, 23: 00; ZT19, 3: 00⁺; ZT23, 7: 00⁺。

a) 与对照组同时间比较, $P < 0.01$; b) 与模型组同时间比较, $P < 0.05$; c) 与模型组同时间比较, $P < 0.01$; d) 与疏泄方低剂量组同时间比较, $P < 0.05$; e) 与疏泄方低剂量组同时间比较, $P < 0.01$; f) 与疏泄方高剂量组同时间比较, $P < 0.05$; g) 与疏泄方高剂量组同时间比较, $P < 0.01$ 。

2.4 各组小鼠在 ZT15 (23: 00) 时肝脏组织病理形态结果比较

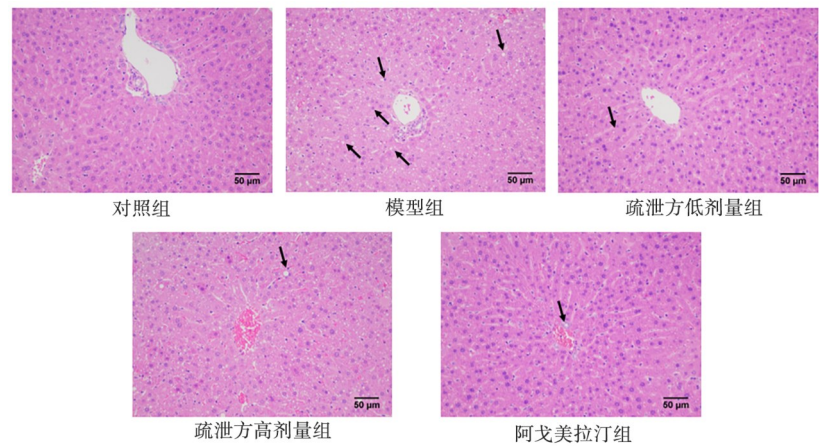
肝脏 TG 含量提示各组小鼠在 ZT15 时间点差异显著, 故选择 ZT15 进行 HE 染色。图 4 示, 对照组小鼠肝细胞以中央静脉为中心向周围放射状排列, 呈条索状, 细胞形态规则, 肝细胞内蓝色为细胞核, 细胞核大而圆, 居中, 细胞质为紫红色。模型组小鼠肝细胞排列紊乱, 少量空泡状细胞, 细胞核形状不规则, 细胞质内可见较多圆形脂滴; 疏泄方低、高剂量组和阿戈美拉汀组肝细胞排列规则, 细胞核圆, 细胞质内可见少量脂滴。

2.5 各组小鼠在 ZT15 (23: 00) 时肝脏组织中 perilipin1 蛋白免疫荧光密度比较

表 5 示, 与对照组比较, 模型组小鼠肝脏组织 perilipin1 蛋白免疫荧光密度显著增强 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 疏泄方低、高剂量组 perilipin1 蛋白免疫荧光密度显著减弱 ($P < 0.01$); 疏泄方低剂量组 perilipin1 蛋白免疫荧光密度低于阿戈美拉汀组 ($P < 0.05$)。各组小鼠肝脏组织中 perilipin1 蛋白免疫荧光图见图 5。

2.6 各组小鼠不同时间肝脏 Bmal1 mRNA 表达及蛋白水平比较

表 6 示, 与对照同时间比较, 模型组小鼠 Bmal1



注：黑色箭头指示为脂滴。
图4 各组小鼠在ZT15（23：00）时肝脏组织病理形态结果比较（HE染色，×200）

Figure 4 Hepatic histopathology of each group of mice at ZT15（23：00）（HE staining，×200）

表5 各组小鼠在ZT15（23：00）时肝脏组织中perilipin1蛋白免疫荧光密度比较

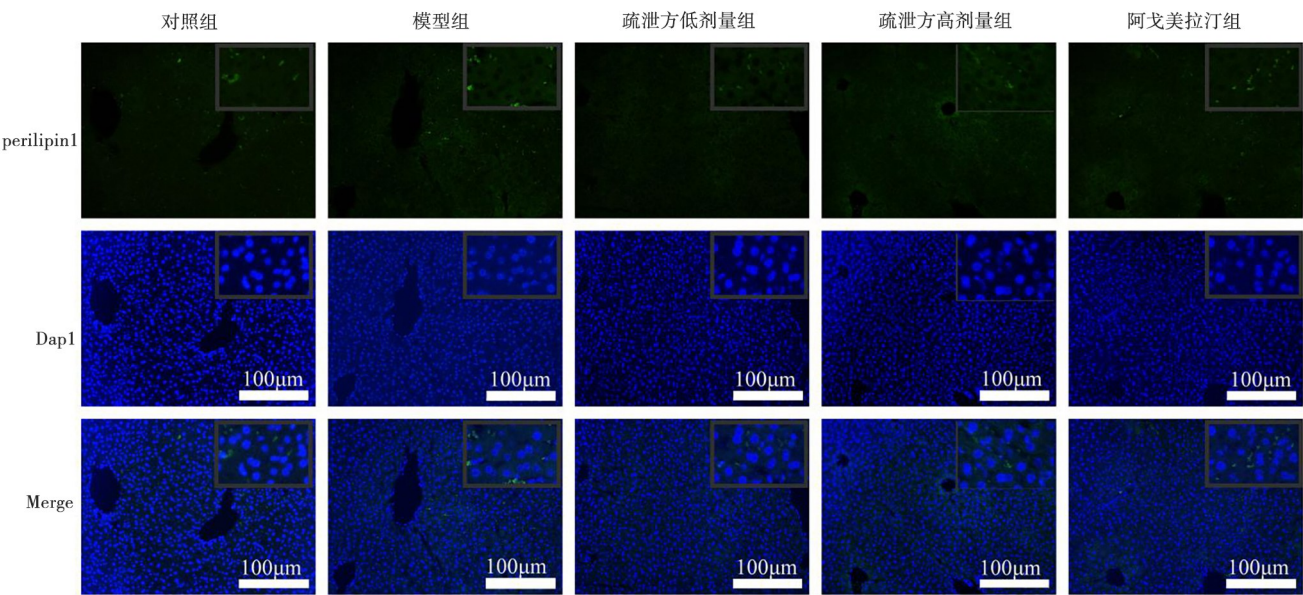
Table 5 Comparison of the total intensity of perilipin1 protein immunofluorescence in liver tissues of mice among different groups at ZT15（23：00）（ $\bar{x}\pm s$ ）

组别	鼠数	perilipin1 蛋白免疫荧光总密度
对照组	6	102 716. 83±176 867. 12
模型组	6	637 074. 17±413 111. 50 ^{a)}
疏泄方低剂量组	6	89 239. 00±57 356. 30 ^{b)}
疏泄方高剂量组	6	214 235. 83±178 984. 76 ^{b)}
阿戈美拉汀组	6	427 891. 17±285 833. 73 ^{c)}

注：perilipin 1，围脂滴蛋白1。
a) 与对照组比较， $P<0.01$ ；b) 与模型组比较， $P<0.01$ ；c) 与疏泄方低剂量组比较， $P<0.05$ 。

mRNA 表达在 ZT3、ZT7 时显著升高，在 ZT15 和 ZT23 时显著降低（ $P<0.05$ 或 $P<0.01$ ）。与模型组同时时间比较，疏泄方低剂量组 *Bmal1* mRNA 表达在 ZT7 时降低，疏泄方高剂量组在 ZT3 及 ZT15 时降低，阿伐美拉汀组在 ZT7 时亦降低（ $P<0.05$ 或 $P<0.01$ ）。与疏泄方低剂量组比较，疏泄方高剂量组 *Bmal1* mRNA 表达在 ZT19 时降低（ $P<0.01$ ）。

表7 示，与对照组同时间比较，其余各组小鼠 *Bmal1* 蛋白水平在 ZT3 时均显著升高，模型组在 ZT11 和 ZT15 时显著降低，疏泄方低剂量组在 ZT15 时升高，疏泄方高剂量组和阿伐美拉汀组在 ZT23 时显著升高（ $P<0.05$ 或 $P<0.01$ ）。与模型组同时



注：perilipin1，围脂滴蛋白1。
图5 各组小鼠在ZT15（23：00）时肝脏组织perilipin1免疫荧光图（×400）

Figure 5 Immunofluorescence images of perilipin1 in liver tissues of each group of mice at ZT15（23：00）（×400）

表 6 各组小鼠不同时间肝脏 *Bmal1* mRNA 表达水平比较Table 6 Comparison of *Bmal1* mRNA expression levels in the liver of mice from different groups at various time points ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	ZT3	ZT7	ZT11	ZT15	ZT19	ZT23
对照组	6	0.013±0.004	0.005±0.004	0.007±0.005	0.024±0.001	0.024±0.004	0.033±0.006
模型组	6	0.018±0.006 ^{a)}	0.024±0.016 ^{b)}	0.004±0.002	0.017±0.004 ^{a)}	0.025±0.007	0.027±0.003 ^{a)}
疏泄方低剂量组	6	0.015±0.004	0.008±0.007 ^{c)}	0.010±0.011	0.023±0.011	0.023±0.001	0.027±0.004
疏泄方高剂量组	6	0.011±0.003 ^{c)}	0.014±0.012	0.022±0.013	0.006±0.003 ^{d)}	0.016±0.001 ^{e)}	0.031±0.007
阿戈美拉汀组	6	0.015±0.004	0.009±0.007 ^{c)}	0.012±0.013	0.019±0.008	0.015±0.005	0.029±0.003

注：*Bmal1*，脑和肌肉芳香烃受体核转运蛋白样蛋白 1；ZT3，11：00；ZT7，15：00；ZT11，19：00；ZT15，23：00；ZT19，3：00[†]；ZT23，7：00[†]。

a) 与对照组同时间比较， $P<0.05$ ；b) 与对照组同时间比较， $P<0.01$ ；c) 与模型组同时间比较， $P<0.05$ ；d) 与模型组同时间比较， $P<0.01$ ；e) 与疏泄方低剂量组同时间比较， $P<0.01$ 。

表 7 各组小鼠不同时间肝脏 *Bmal1* 蛋白水平比较Table 7 Comparison of *Bmal1* protein levels in the liver of mice from different groups at various time points ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	ZT3	ZT7	ZT11	ZT15	ZT19	ZT23
对照组	6	0.61±0.23	0.53±0.08	1.66±0.44	0.78±0.18	0.69±0.22	0.74±0.08
模型组	6	0.97±0.13 ^{a)}	0.70±0.38	0.40±0.02 ^{b)}	0.25±0.10 ^{b)}	1.26±0.64	1.16±0.44
疏泄方低剂量组	6	1.39±0.46 ^{b)} c)	0.85±0.28	1.28±0.36 ^{c)}	1.18±0.29 ^{b)} d)	0.79±0.07	0.98±0.18
疏泄方高剂量组	6	0.92±0.15 ^{a)} e)	0.63±0.22	0.87±0.22 ^{c)}	0.82±0.06 ^{d)} f)	0.74±0.11	1.15±0.23 ^{b)}
阿戈美拉汀组	6	1.03±0.29 ^{a)} e)	0.83±0.09	0.63±0.11 ^{c)} e)	0.76±0.06 ^{d)} f)	0.64±0.04 ^{e)}	1.45±0.30 ^{b)}

注：*Bmal1*，脑和肌肉芳香烃受体核转运蛋白样蛋白 1；ZT3，11：00；ZT7，15：00；ZT11，19：00；ZT15，23：00；ZT19，3：00[†]；ZT23，7：00[†]。

a) 与对照组同时间比较， $P<0.05$ ；b) 与对照组同时间比较， $P<0.01$ ；c) 与模型组同时间比较， $P<0.05$ ；d) 与模型组同时间比较， $P<0.01$ ；e) 与疏泄方低剂量组同时间比较， $P<0.05$ ；f) 与疏泄方低剂量组同时间比较， $P<0.01$ 。

间比较，疏泄方低剂量组 *Bmal1* 蛋白水平在 ZT3、ZT11 和 ZT15 时均升高，疏泄方高剂量组和阿戈美拉汀组在 ZT11 和 ZT15 时亦升高 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。与疏泄方低剂量组同时间比较，疏泄方高剂量组 *Bmal1* 蛋白水平在 ZT3、ZT15 时降低，阿戈美拉汀组在 ZT3、ZT11、ZT15 和 ZT19 时均降低 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。

2.7 各组小鼠在 ZT11 (19:00) 和 ZT15 (23:00) 时肝脏组织 *PGC-1a* mRNA 表达及蛋白水平比较

肝脏 TG 含量、*Bmal1* mRNA 表达和蛋白水平提示各组小鼠在 ZT11 和 ZT15 时间点差异显著，故

选择 ZT11 和 ZT15 进行 *PGC-1a* mRNA 表达及其蛋白水平比较。表 8 示，与对照组同时间比较，模型组 *PGC-1a* mRNA 表达及其蛋白水平在 ZT11 时降低，在 ZT15 时升高 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。与模型组同时间比较，疏泄方低剂量组 *PGC-1a* mRNA 表达及其蛋白水平在 ZT11 时升高，在 ZT15 时降低；疏泄方高剂量组 *PGC-1a* mRNA 表达及其蛋白水平仅在 ZT15 时降低 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。阿戈美拉汀组在 ZT15 时 *PGC-1a* mRNA 表达高于模型组及疏泄方低、高剂量组，*PGC-1a* 蛋白水平低于模型组 ($P<0.01$)。

表 8 各组小鼠在 ZT11 (19:00) 和 ZT15 (23:00) 时肝脏组织 *PGC-1a* mRNA 表达及其蛋白水平比较Table 8 Comparison of *PGC-1a* mRNA expression and protein levels in liver tissue at ZT11 (19:00) and ZT15 (23:00) among the groups of mice ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	<i>PGC-1a</i> mRNA		<i>PGC-1a</i> 蛋白	
		ZT11	ZT15	ZT11	ZT15
对照组	6	1.32±0.46	0.79±0.11	0.68±0.09	0.52±0.06
模型组	6	0.45±0.16 ^{a)}	1.04±0.19 ^{a)}	0.40±0.09 ^{b)}	1.38±0.09 ^{b)}
疏泄方低剂量组	6	1.14±1.02 ^{c)}	0.62±0.12 ^{d)}	0.69±0.11 ^{d)}	0.77±0.15 ^{d)}
疏泄方高剂量组	6	0.65±0.34	0.76±0.26 ^{c)}	0.78±0.33	0.76±0.12 ^{d)}
阿戈美拉汀组	6	0.67±0.34	1.23±0.27 ^{d)} e) f)	0.89±0.34	0.85±0.07 ^{d)}

注：*PGC-1a*，过氧化物酶体增殖物激活受体 γ 共激活因子 1a；ZT11，19：00；ZT15，23：00。

a) 与对照组同时间比较， $P<0.05$ ；b) 与对照组同时间比较， $P<0.01$ ；c) 与模型组同时间比较， $P<0.05$ ；d) 与模型组同时间比较， $P<0.01$ ；e) 与疏泄方低剂量组同时间比较， $P<0.01$ ；f) 与疏泄方高剂量组同时间比较， $P<0.01$ 。

3 讨论

昼夜节律紊乱是当代社会人群出现睡眠障碍的主要原因之一。熬夜、久视必将损伤肝阴（血）^[15]，若肝阴（血）不足，肝失濡养，疏泄失常，阳不入阴，则魂不守舍而致不寐。肝失疏泄使气血津液输布异常，气滞而无力推动津液正常运行，津液聚而成痰致病。疏泄方由酸枣仁汤去甘草，加白芍、五味子、姜半夏、枳实、黄芩、竹茹组成。方中重用炒酸枣仁为君，补血养肝、宁心安神；白芍养血敛阴、柔肝缓急，五味子益气安神、敛汗除烦，二者共为臣药；半夏燥湿化痰、和胃止呕，枳实降气导滞、消痰除痞，黄芩清热燥湿，茯苓健脾安神，知母泻火滋阴，竹茹清热化痰、除烦止呕，六药共为佐药，具健脾和中、化痰除烦之效；使以川芎调肝血、疏肝气，与诸药配伍，辛散酸收、降逆并用。全方共奏调肝养血、安神和中之功。阿戈美拉汀是一种褪黑素受体激动剂，在临床上被广泛应用于睡眠障碍、抑郁症等疾病的治疗^[16]，故在本研究中作为阳性对照药。

本试验以光剥夺方式干预小鼠，其在恒定黑暗环境中处于自由活动状态^[17]，因失去光带来的睡眠-觉醒信号，小鼠基础节律逐渐改变，如日间活动增加^[18]。此外，夜间进食也会影响肝脏时钟^[19]。Bmal1 是昼夜节律中生物钟负反馈环的核心转录因子，同时参与调节肝脏脂质代谢^[20]。Bmal1 敲除小鼠表现出肝脏和肌肉中异位脂肪形成增加以及肝脏 TG 积累^[21]。PGC-1α 作为转录共激活因子参与脂肪酸氧化过程中，Bmal1 与时钟蛋白形成异二聚体后，与 PGC-1α 基因的启动子结合，通过促进复合物形成诱导转录^[22]。当 Bmal1 转录水平降低时，将抑制 PGC-1α 转录，从而导致肝脏 TG 积累^[23]。

本研究结果表明，对照组 TG 水平的低值在 ZT11，Bmal1 mRNA 和其蛋白水平最低值在 ZT7，提示 Bmal1 基因改变引起 TG 变化。同时间点组间比较发现，与对照组比较，ZT11 和 ZT15 时模型组 Bmal1 mRNA 及其蛋白水平和 ZT11 时 PGC-1α mRNA 及其蛋白水平降低，TG 水平升高，ZT15 时肝脏病理脂滴增多，perilipin1 荧光密度增强；低剂量疏泄方干预后，可显著增加 ZT11 和 ZT15 时 Bmal1 蛋白水平和 ZT11 时 PGC-1α mRNA 和蛋白水平，并降低肝内 TG 水平，减少脂滴，提示低剂量疏泄方通过上调 Bmal1、PGC-1α 蛋白水平发挥降低肝 TG 的作用。与对照组比较，ZT15 时模型组 PGC-1α mRNA

和蛋白水平显著升高，低剂量疏泄方干预后，其水平显著下降，这一结果与现有结果矛盾，提示除 PGC-1α 外，还有其他脂代基因受 Bmal1 调控，这一观点符合中药复方通过多靶点、多通路发挥作用的机制。另外，低剂量疏泄方和阿戈美拉汀能够显著减少模型小鼠日间活动量，显著增加夜间活动量，减少各时间点摄食量，显著降低 ZT15 时模型小鼠肝内 TG 水平和 perilipin1 荧光密度，改善病理形态。同时，低剂量疏泄方抑制肝内脂滴的效果强于阿戈美拉汀。低剂量疏泄方可恢复 Bmal1 mRNA 表达及蛋白水平的节律表达，并显著增加 ZT11 和 ZT15 时 Bmal1 蛋白水平，显著增加 ZT11 时 PGC-1α mRNA 表达及蛋白水平，显著减少 ZT15 时 PGC-1α mRNA 表达和蛋白水平，提示低剂量疏泄方通过 Bmal1 与 PGC-1α 改善脂代谢紊乱的作用存在时间效应。阿戈美拉汀组小鼠肝脏中 TG 表达波动较大，且在 ZT15 时间点阿戈美拉汀组上调 PGC-1α mRNA 表达的能力大于疏泄方低剂量和高剂量组，这提示阿戈美拉汀可能通过不同的机制影响 PGC-1α 的表达，进而对 TG 代谢产生作用。

综上所述，昼夜节律紊乱小鼠日间活动量较对照组显著增加，其摄食量也相应增加，肝组织 Bmal1 mRNA 和蛋白水平紊乱。而低剂量疏泄方和阿戈美拉汀可恢复昼夜节律紊乱小鼠的活动量、摄食量以及肝脏 Bmal1 mRNA 和蛋白表达节律趋势，提示低剂量疏泄方和阿戈美拉汀具有调控昼夜节律紊乱的作用，而高剂量疏泄方恢复的作用较弱。本研究尚存在一定局限性，对 Bmal1/PGC-1α/TG 代谢机制的探讨还不充分，未来考虑增加更多脂肪酸氧化相关指标，以更深入地阐释疏泄方调控昼夜节律紊乱脂代谢异常的作用机制。

参考文献

- [1]SARAN AR, DAVE S, ZARRINPAR A. Circadian rhythms in the pathogenesis and treatment of fatty liver disease [J]. Gastroenterology, 2020, 158(7): 1948-1966.
- [2]FERRELL JM, CHIANG JYL. Circadian rhythms in liver metabolism and disease [J]. Acta Pharm Sin B, 2015, 5(2): 113-122.
- [3]MATSUMOTO E, ISHIHARA A, TAMAI S, et al. Time of day and nutrients in feeding govern daily expression rhythms of the gene for sterol regulatory element-binding protein (SREBP)-1 in the mouse liver [J]. J Biol Chem, 2010, 285(43): 33028-33036.
- [4]SU Y, FOPPEN E, MANSUR MACHADO FS, et al. The

- role of the daily feeding rhythm in the regulation of the day/night rhythm in triglyceride secretion in rats [J]. *Chronobiol Int*, 2018, 35(7): 885–895.
- [5] PAN X, HUSSAIN MM. Bmal1 regulates production of larger lipoproteins by modulating cAMP-responsive element-binding protein H and apolipoprotein AIV [J]. *Hepatology*, 2022, 76(1): 78–93.
- [6] ZHANG D, TONG X, NELSON BB, et al. The hepatic BMAL1/AKT/lipogenesis axis protects against alcoholic liver disease in mice via promoting PPAR α pathway [J]. *Hepatology*, 2018, 68(3): 883–896.
- [7] XU L, YANG TY, ZHOU YW, et al. Bmal1 inhibits phenotypic transformation of hepatic stellate cells in liver fibrosis via IDH1/ α -KG-mediated glycolysis [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2022, 43(2): 316–329.
- [8] QI G, MI Y, LIU Z, et al. Dietary tea polyphenols ameliorate metabolic syndrome and memory impairment via circadian clock related mechanisms [J]. *J Funct Foods*, 2017, 34: 168–180. doi:org/10.1016/j.jff.2017.04.031.
- [9] KIMMEL AR, SZTALRYD C. The perilipins: major cytosolic lipid droplet-associated proteins and their roles in cellular lipid storage, mobilization, and systemic homeostasis [J]. *Annu Rev Nutr*, 2016, 36(1): 471–509.
- [10] 李乐. 杨叔禹从肝脾论治失眠经验 [J]. *中医杂志*, 2022, 63(23): 2218–2222.
- [11] 李乐. 从中医“疏泄”角度观察心身共治慢性失眠症的临床疗效 [D]. 厦门: 厦门大学, 2020.
- [12] ECKEL-MAHAN K, SASSONE-CORSI P. Phenotyping circadian rhythms in mice [J]. *Current Protoc Mouse Biol*, 2015, 5(3): 271–281.
- [13] VERWEY M, ROBINSON B, AMIR S. Recording and analysis of circadian rhythms in running-wheel activity in rodents [J]. *J Vis Exp*, 2013, 71: 50186. doi: 10.3791/50186.
- [14] 刘玉林, 张琰, 胡玉珍. 基础医学动物实验技术 [M]. 西安: 第四军医大学出版社, 2008: 116.
- [15] 孙宏睿, 亢泽峰, 曹珂儿, 等. 基于“久视伤血”理论探讨近视 [J]. *中国中医眼科杂志*, 2023, 33(10): 951–954.
- [16] 王子旋, 刘三川, 陈忠智. 阿戈美拉汀改善快速动眼睡眠剥夺介导的大鼠认知功能障碍 [J]. *神经解剖学杂志*, 2024, 40(4): 459–463.
- [17] ZHANG J, KAASIK K, BLACKBURN MR, et al. Constant darkness is a circadian metabolic signal in mammals [J]. *Nature*, 2006, 439(7074): 340–343.
- [18] UCHIDA H, NAKAMURA TJ, TAKASU NN, et al. Cryptochrome-dependent circadian periods in the arcuate nucleus [J]. *Neurosci Lett*, 2016, 610: 123–128. doi: 10.1016/j.neulet.2015.10.071.
- [19] CHALLET E. The circadian regulation of food intake [J]. *Nat Rev Endocrinol*, 2019, 15(7): 393–405.
- [20] PATKE A, YOUNG MW, AXELROD S. Molecular mechanisms and physiological importance of circadian rhythms [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2020, 21(2): 67–84.
- [21] LANDGRAF D, NEUMANN AM, OSTER H. Circadian clock-gastrointestinal peptide interaction in peripheral tissues and the brain [J]. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, 2017, 31(6): 561–571.
- [22] GU W, LI T, HUANG Y, et al. Metabolic profile and lipid metabolism phenotype in mice with conditional deletion of hepatic BMAL1 [J]. *Int J Mol Sci*, 2024, 25(11): 6070.
- [23] LIU C, LI S, LIU T, et al. Transcriptional coactivator PGC-1 α integrates the mammalian clock and energy metabolism [J]. *Nature*, 2007, 447(7143): 477–481.

Effect of *Shuxie Decoction* (疏泄方) on Hepatic Lipid Accumulation and Bmal1 Clock Gene Expression Circadian Rhythm Disorders Model Mice

ZHANG Mengting¹, HUANG Ting¹, LIU Xinyan¹, LI Jing¹, WU Wanhong², HUANG Caoxin², CAI Teng², WANG Mengyuan², ZHAO Nengjiang², LIU Suhuan², YANG Shuyu²

1. College of Traditional Chinese Medicine, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou, 350122; 2. The First Affiliated Hospital of Xiamen University

ABSTRACT Objective To explore the potential mechanism of *Shuxie Decoction* (疏泄方) in alleviating hepatic lipid accumulation caused by circadian rhythm disorders (CRD). **Methods** Totally 240 C57BL/6 mice were randomly divided into control group, model group, low-dose *Shuxie Decoction* group, high-dose *Shuxie Decoction* group, and agomelatine (Ago) group, with 48 mice in each group. Except for the control group, mice models of CRD were established by light deprivation. Two weeks after modeling, mice in low- and high-dose *Shuxie Decoction* groups were treated with 0.15 and 0.31 g/day of *Shuxie Decoction* per 10 g of body weight via oral gavage, respectively; mice in Ago group were given 0.03 mg/day of agomelatine tablets per 10 g of body weight via oral gavage; while mice in the control group and the model group were given 0.1 ml/day of distilled water per 10 g of body weight by intra-

gastric administration. All groups were administered once daily for a total of 2 weeks. On the day after the last administration, the total number of wheel rotations during the daytime (8:00–20:00) and nighttime (20:01–8:00⁺¹) was observed using a running wheel experiment; metabolic cages were used to record food intake at 11:00 (ZT3), 15:00 (ZT7), 19:00 (ZT11), 23:00 (ZT15), 3:00⁺¹ (ZT19), and 7:00⁺¹ (ZT23) Beijing Time; colorimetric assay was used to measure triglyceride (TG) levels in liver tissue at different time points across groups; Hematoxylin & Eosin (H&E) Staining was used to examine liver tissue pathology; immunofluorescence assay was used to measure the immunofluorescence density of perilipin 1 (PLIN1); RT-qPCR and Western Blot assays was used to measure the mRNA expression and protein levels of brain and muscle aromatic hydrocarbon receptor nuclear translocator-like protein 1 (Bmal1) and peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1a (PGC-1 α) in brain and muscle tissues.

Results The total number of nighttime wheel rotations in the control group, the low-dose *Shuxie Decoction* group and Ago group were significantly higher than that in the daytime of the same group ($P < 0.01$); compared with the control group at the same time point, the total number of daytime wheel rotations in the model group was significantly increased ($P < 0.01$); compared with the model group at the same time point, the total number of daytime wheel rotations in low-dose *Shuxie Decoction* group and Ago group significantly reduced, and low-dose *Shuxie Decoction* group showed a significant decrease in food intake at ZT7 ($P < 0.05$). The liver pathology results showed that the liver cells of mice in control group, Ago group, low- and high-dose *Shuxie Decoction* groups had regular morphology, while the model group had disordered liver cell arrangement and a small number of vacuolar cells. Compared with the control group at the same time points, TG levels in the model group significantly elevated at ZT11 and ZT15, the immunofluorescence density of perilipin1 protein in liver tissue enhanced at ZT15, *Bmal1* mRNA expression significantly elevated at ZT3 and ZT7, Bmal1 protein and its mRNA levels significantly reduced at ZT15, and *PGC-1 α* mRNA expression and its protein levels decreased at ZT11 but increased at ZT15 ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Compared with the model group at the same time point, TG levels were reduced in low-dose *Shuxie Decoction* group and Ago group at ZT15; the immunofluorescence density of perilipin1 protein was weakened in low- and high-dose *Shuxie Decoction* groups; in low-dose *Shuxie Decoction* group, *Bmal1* mRNA expression decreased at ZT7, while Bmal1 protein levels increased at ZT3, ZT11, and ZT15, while *PGC-1 α* mRNA expression and its protein levels increased at ZT11, and *PGC-1 α* mRNA expression and its protein levels decreased at ZT15 ($P < 0.05$ or $P < 0.01$).

Conclusion Low-dose *Shuxie Decoction* can regulate circadian rhythm disorders and improve hepatic lipid accumulation. The mechanism may be related to the reduction of hepatic triglycerides through the upregulation of hepatic Bmal1 and PGC-1a levels.

Keywords circadian rhythm; liver; lipid accumulation; circadian clock gene; brain and muscle aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator-like protein 1; peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator 1a; *Shuxie Decoction* (疏泄方)

(收稿日期: 2025-04-17; 修回日期: 2025-07-15)

[编辑: 邓 媛]