

昼夜节律紊乱与2型糖尿病关系的研究进展

陈筵明¹ 龚维坤² 孙英芬² 朱琼² 蔡婕³ 蒋静⁴ 季林丹^{5,6*} 徐进^{1*}

(¹宁波大学医学院预防医学系, 宁波 315211; ²宁波大学医学院附属鄞州医院, 宁波 315040; ³宁波市妇女儿童医院, 宁波 315012; ⁴宁波大学医学院临床医学系, 宁波 315211; ⁵宁波大学医学院生物化学与分子生物学系, 宁波 315211; ⁶浙江省病理生理学技术研究重点实验室, 宁波 315211)

摘要 昼夜节律是生物体内部普遍存在的固有生物节律之一, 有利于机体适应外部明/暗环境。近年来研究发现, 血糖代谢及相关激素分泌等生理过程具有昼夜节律, 正常时与睡眠周期、光线模式、摄食及日常锻炼同步; 而当机体长期处于夜班轮班、跨时区旅行等状态造成昼夜节律紊乱, 可引起血糖紊乱等一系列问题, 显著增加2型糖尿病发病风险。相关机制可能涉及血糖代谢、激素调控、生活方式、节律基因多态性及药物代谢等的昼夜节律变化和相关的病理生理过程。该文将依据当前流行病学调查、病理生理学及遗传学研究来系统阐述昼夜节律紊乱在2型糖尿病发生、发展中的作用, 为今后2型糖尿病的综合防治提供新思路。

关键词 昼夜节律; 2型糖尿病; 糖代谢; 轮班

Progress in the Study of the Relationship between Circadian Rhythm Disruption and Type 2 Diabetes Mellitus

CHEN Yanming¹, GONG Weikun², SUN Yingfen², ZHU Qiong², CAI Jie³, JIANG Jing⁴, JI Lindan^{5,6*}, XU Jin^{1*}

(¹Department of Preventive Medicine, Ningbo University School of Medicine, Ningbo 315211, China; ²Yinzhou Hospital, Ningbo University Medicine, Ningbo 315040, China; ³Ningbo Women and Children Hospital, Ningbo 315012, China; ⁴Department of Clinical Medicine, Ningbo University School of Medicine, Ningbo 315211, China; ⁵Department of Biochemistry and Molecular Biology, Ningbo University School of Medicine, Ningbo 315211, China; ⁶Zhejiang Key Laboratory of Pathophysiology Technology Research, Ningbo 315211, China)

Abstract Circadian rhythm as an important inherent biological rhythm exists in all living organisms, facilitating them to adapt to the external light/dark environment. Recent studies reveal that both glucose metabolism and associated hormone secretion demonstrate obvious circadian rhythm patterns. Normally, it is synchronized with, sleep cycle, light pattern, food intake and daily exercise models. However, when there is a circadian rhythm disorder due to night shift work or jet lag caused by cross-time zone travel, *etc.*, it may result in a series of healthy problems especially glucose metabolism disorder which can significantly increase the risk of type 2 diabetes mellitus. The mechanisms probably involve circadian variation and pathophysiological processes of glucose metabolism, hormone regulation, lifestyle, rhythm gene polymorphisms, drug metabolism, *etc.* This paper will systematically review the role of circadian rhythm in the occurrence and development of type 2 diabetes mellitus based on the cur-

收稿日期: 2020-03-12 接受日期: 2020-05-27

浙江省公益技术应用研究计划(批准号: LGF20H260009、LGF20H040005)、浙江省医药卫生科技计划(批准号: 2019KY648)和宁波市公益类科技计划(批准号: 2019C50097)资助的课题

*通讯作者。Tel: 0574-87609951, E-mail: jilindan@nbu.edu.cn; Tel: 0574-87609603, E-mail: xujin1@nbu.edu.cn

Received: March 12, 2020 Accepted: May 27, 2020

This work was supported by Zhejiang Public Welfare Technology Application Research Program (Grant No.LGF20H260009, LGF20H040005), Zhejiang Medical and Health Science and Technology Program (Grant No.2019KY648), and Ningbo Nonprofit Science and Technology Project (Grant No.2019C50097)

*Corresponding authors. Tel: +86-574-87609951, E-mail: jilindan@nbu.edu.cn; Tel: +86-574-87609603, E-mail: xujin1@nbu.edu.cn

URL: <http://www.cjcb.org/arts.asp?id=5348>

rent knowledge of associated epidemiological, pathophysiological and genetical studies, providing new ideas for future comprehensive prevention and treatment of type 2 diabetes mellitus.

Keywords circadian rhythm; type 2 diabetes mellitus; glucose metabolism; shift work

糖尿病是由于胰岛素分泌不足和/或胰岛素抵抗导致的以高血糖为主要特征的代谢性疾病。据国际糖尿病联盟(International Diabetes Federation, IDF) 2019年报告, 全球成人糖尿病患病率为8.3%, 意味着约4.63亿成人患有该病; 此外, 还有约3.74亿成人患有糖耐量受损(impaired glucose tolerance, IGT), 他们在未来患糖尿病的风险更高^[1]。近年来, 由于生活方式等因素的改变, 我国糖尿病患病率显著增加, 最新慢性病监测结果显示, 我国成人糖尿病患病率为10.9%, 显著高于全球平均水平^[2]。糖尿病中2型糖尿病(type 2 diabetes mellitus, T2DM)最为常见, 占所有糖尿病病例的90%以上^[3]。T2DM病因复杂, 受遗传和环境因素共同作用, 但其具体病因及发病机制尚未完全明确^[4]。该病发病后进展缓慢, 通常不会出现急性代谢紊乱, 多是由于高血糖引发的并发症(如糖尿病视网膜病变、神经病变和肾病等)就医而被发现, 此时疾病已对机体造成了严重的危害。因此, 全面探索和阐释T2DM风险因素和相关发病机制, 进行针对性的早期预防和诊断就显得尤为重要。

有趣的是, 现有流行病学调查显示, 轮班工作和跨时区旅行等行为扰乱人体固有的、规律性的昼夜节律, 显著增加T2DM的发病风险^[5-6], 提示生物节律干预可能是一种有效的策略。昼夜节律作为最普遍存在的生物节律形式, 是指生命活动以24 h左右为周期的变动, 以确保机体生理功能在一天中的正确时间发生^[7]。人体昼夜节律系统由下丘脑视交叉上核(suprachiasmatic nucleus, SCN)的生物钟主钟以及大脑其他区域和外周组织(包括肝脏、骨骼肌、脂肪组织、胰腺等)的生物钟子钟组成。SCN通过接收来自视网膜的直接光照反应, 使机体内部与外环境的24 h节律同步, 并通过神经、激素、体温及行为信息等将其固有的定时信号发送至外周组织子钟, 以协调全身所有器官和细胞的分子节律^[8]。就糖尿病而言, 越来越多的证据表明, 昼夜节律系统在机体中调节着一系列与血糖、血脂及氨基酸代谢有关的生理过程。而昼夜节律紊乱会升高血液中葡萄糖及甘油三酯水平, 改变氨基酸代谢, 降低能量消耗, 显著增加糖尿病患病风险^[9]。因此, 了解昼夜节

律系统在机体内对血糖的调节机制, 阐明昼夜节律紊乱如何影响T2DM的发病就显得尤为重要。本文就当前昼夜节律在T2DM发生、发展中的作用进行系统综述, 为今后T2DM的综合防治提供新的思路。

1 血糖代谢的昼夜节律

在健康成人中, 与血糖代谢及其调控相关的性状或过程, 如葡萄糖耐量、糖原储存、胰岛素分泌、胰岛素敏感性及 β 细胞反应性等均表现出一定的昼夜节律。T2DM发生可能与这些糖代谢相关生理节律的减弱及相位延迟有关。自然代谢状态下, 健康成人在早中晚餐进食相同的食物, 餐后血糖在早餐后最低, 而在晚餐后最高; 晚上8点的餐后血糖比早晨8点高17%, 这表明, 相比于早晨, 晚上的葡萄糖耐量更低^[10]。相反, T2DM患者在早上肝葡萄糖生成异常增加, 糖耐量的昼夜节律被破坏, 出现早晨高血糖现象^[11]。而且, 血糖波动的正常调控有赖于葡萄糖及时储存为肝糖原和肌糖原。研究表明, 健康成人的糖原浓度在餐后升高, 晚上达到峰值, 后降至空腹水平^[12]。与之相关的胰岛素分泌和胰岛素的敏感性在夜间最低, 在早晨达到峰值, 呈现出代谢的黎明现象^[13]。相反, T2DM患者外周胰岛素敏感性及肌糖原储存的昼夜节律消失, 肝胰岛素敏感性及肝糖原储存的昼夜节律发生异常改变, 表现为早晨最低, 而晚上7点左右出现峰值, 该结果也解释了T2DM患者早晨空腹血糖较高的现象^[14]。此外, SAAD等^[15]通过使用三重示踪剂技术研究了20名血糖正常的成人在一天中 β 细胞反应性、胰岛素作用及葡萄糖摄取的昼夜变化, 发现早餐时 β 细胞对葡萄糖的反应性显著高于午餐和晚餐, 肝脏胰岛素摄取量在早餐显著低于晚餐。而昼夜节律紊乱可使胰岛 β 细胞生物钟及其功能发生破坏, 导致氧化应激、线粒体功能障碍及 β 细胞中的囊泡运输受损, 最终使葡萄糖刺激的胰岛素分泌下降, 促进糖尿病的发生^[16]。

上述研究证实, 血糖代谢存在昼夜节律, 但其结果在一定程度上还可受到环境和行为等因素的影响。因此, 研究者尝试将昼夜节律系统对糖代谢的影响从机体所处环境和行为中分离出来单独分析,

如通过睡眠-觉醒周期逆转方法(睡眠时间保持清醒)、恒定程序方法(连续24 h不睡,外部因素如光线、温度等保持恒定)以及强迫去同步方法(昏暗光线20或28 h以上,持续1~2周)等,均发现健康受试者血糖浓度在习惯性睡眠期间明显升高,夜间0:45~3:50范围内出现峰值,高于白天最低值32%左右^[1],表明人体血糖水平的内源性昼夜节律是稳定存在的。另外,24 h葡萄糖输注试验发现,T2DM患者血糖在早晨最高,在晚上8:30左右最低,出现了明显的相位延迟^[14]。上述结果表明,T2DM的发生确实与糖代谢的内在昼夜节律紊乱有关。

2 生理激素分泌节律紊乱对T2DM的影响

昼夜节律系统主生物钟SCN可通过作用于室旁核及脑垂体,调节褪黑激素、皮质醇、生长激素等的分泌,从而发挥对葡萄糖代谢的调控作用^[7]。而昼夜节律紊乱相关行为如夜班轮班,也可通过调节上述参与能量代谢的激素影响机体能量消耗模式,导

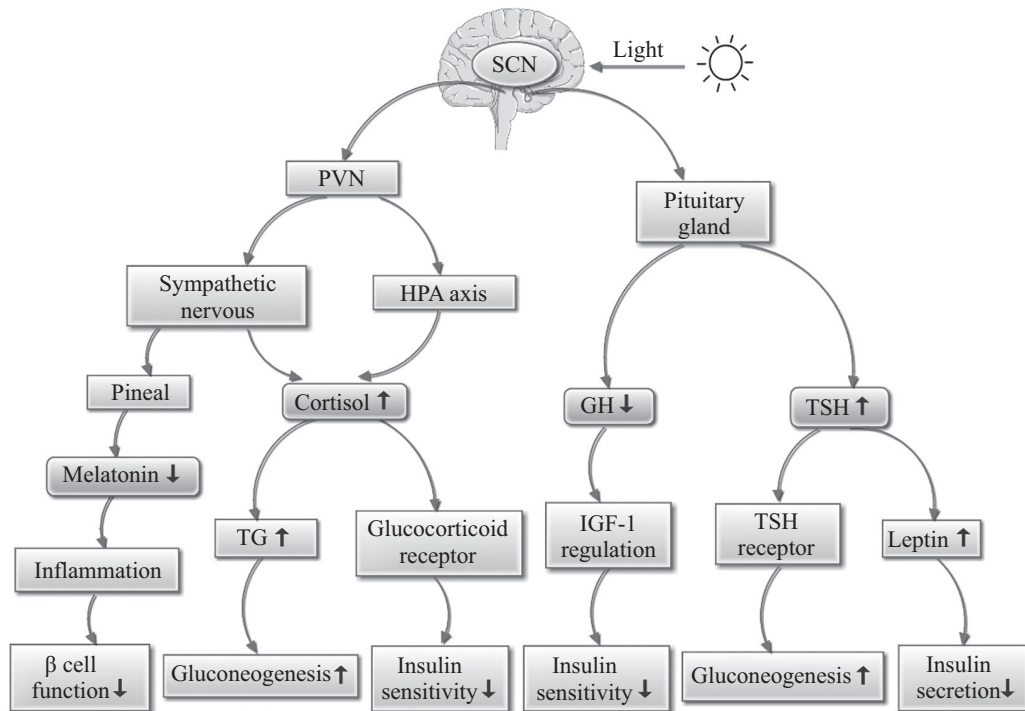
致胰岛素抵抗和葡萄糖调节功能受损。现将生理激素分泌节律紊乱对T2DM的影响简述如下(图1)。

2.1 褪黑激素分泌节律与T2DM

褪黑激素(melatonin, MT)在生物体中广泛存在,在哺乳动物中由松果体合成,受到SCN的调节,使其分泌与明暗周期同步,即在黑暗开始后的3~5 h内血浆MT浓度达到最大,而在光照下其含量很低甚至检测不到^[7]。研究表明,MT不仅可以显著抑制炎症细胞因子(如IL-1 β 、IL-2、IL-6、IFN- γ 、TNF- α 等)的转录^[18],还可减少由高血糖引起的线粒体电子传递链中超氧自由基的产生及其在体内的积累,具有增强内皮功能并减轻炎症的作用,可维持胰岛 β 细胞正常的氧化还原状态,从而实现抑制 β 细胞损伤、调控葡萄糖代谢和胰岛素分泌的功能^[19]。而夜间光线暴露引起的机体节律紊乱可导致MT分泌显著降低,增加胰岛素抵抗及T2DM发病的风险^[20]。

2.2 皮质醇分泌节律与T2DM

皮质醇(cortisol)是从肾上腺皮质中提取出的



主生物钟SCN对褪黑激素、皮质醇、生长激素及促甲状腺激素分泌具有调节作用,这些激素分泌节律紊乱可通过能量代谢、相关受体结合等途径影响糖异生、胰岛素分泌及其敏感性等糖代谢性状,从而调控机体血糖水平。SCN: 下丘脑视交叉上核; PVN: 下丘脑室旁核; HPA: 下丘脑-垂体-肾上腺轴; GH: 生长激素; TSH: 促甲状腺激素; IGF-1: 胰岛素样生长因子-1; TG: 甘油三酯。

SCN can regulate the secretions of melatonin, cortisol, growth hormone and thyrotropin, where disturbances of these hormone secretions can significantly affect glucose metabolism traits including gluconeogenesis, insulin secretion and sensitivity possibly through energy metabolism and related receptor binding processes, thus can regulate the level of blood glucose accordingly. SCN: suprachiasmatic nucleus; HPA: hypothalamic-pituitary-adrenal axis; GH: growth hormone; TSH: thyroid-stimulating hormone; IGF-1: insulin-like growth factor-1; TG: triglyceride.

图1 生理激素分泌节律对葡萄糖代谢的影响

Fig.1 Effect of physiological hormone secretion rhythm upon glucose metabolism

对糖代谢作用最强的肾上腺皮质激素,其分泌主要由下丘脑-垂体-肾上腺轴(hypothalamic-pituitary-adrenal axis, HPA)调节。研究表明,皮质醇受到SCN 的调控,通常在午夜前后升高,早上8点达到峰值,并在上午9点左右开始降低^[21]。LEDERBOGEN等^[22]通过比较糖尿病患者和健康人群唾液皮质醇含量的昼夜节律,发现T2DM患者唾液皮质醇的昼夜节律明显改变,表现为早上皮质醇水平较低,而下午和晚上较高。HACKETT等^[23]开展的社区人群唾液皮质醇测量的前瞻性队列研究也显示,夜间皮质醇水平异常升高可显著增加T2DM发病风险。就其机制而言,皮质醇可诱导脂肪分解,促进游离脂肪酸入血,使甘油三酯水平升高,进而通过糖异生过程升高血糖;此外,它还可与胰岛β细胞上的糖皮质激素受体结合,从而减少胰岛素分泌,降低胰岛素敏感性。

2.3 生长激素分泌节律与T2DM

生长激素(growth hormone, GH)作为一类肽类激素,对蛋白质合成、糖代谢具有重要作用。GH分泌水平在睡眠开始后达到峰值,在睡眠期间尤其是慢波睡眠时显著增加。睡眠期间GH呈间歇性分泌特点,这可能与慢波睡眠的周期性有关^[24]。研究显示,机体GH及其调节因子胰岛素样生长因子-1(insulin-like growth factor-1, IGF-1)水平降低可引起肝脏中游离脂肪酸含量增加,导致脂肪在肝脏中的异位聚积从而强烈促进肝脏胰岛素抵抗的发展。另外, GH的缺乏还会减弱IGF-1对胰岛素的调节作用,抑制脂肪分解,从而增加腹部肥胖和胰岛素抵抗的风险^[25]。此外,睡眠节律紊乱也会减弱GH对糖代谢的调节作用,导致高血糖及胰岛素抵抗的发生。

2.4 促甲状腺激素分泌节律与T2DM

促甲状腺激素(thyroid-stimulating hormone, TSH)分泌呈现昼夜节律,其分泌水平通常在夜间逐渐增加,早上5~8点达到峰值,随后逐渐降低^[26]。队列研究表明,健康人群TSH水平与胰岛素抵抗呈显著正相关,TSH每增加1 μIU/mL, T2DM发病风险增加13%。就其机制而言, TSH可通过与促甲状腺激素受体结合,从而加速肝脏中胆固醇合成及糖异生过程,引起血糖水平升高^[27]。另外, TSH还可以刺激人体脂肪组织中瘦素的分泌。在自然状态下,人体基础血浆瘦素水平在黑暗期达到峰值;而长期光周期紊乱会导致瘦素信号发生改变,减少能量消耗并损害血糖调控作用^[28]。研究表明,瘦素很可能是通过

作用于弓状核、下丘脑腹内侧核及背侧核,调节脂肪和能量储存,使胰岛β细胞中胰岛素的合成及分泌下降,导致血糖水平的急剧升高。

3 生活方式昼夜节律紊乱对T2DM的影响

夜班轮班工作、跨时区旅行等引起的昼夜颠倒和睡眠-觉醒节律失衡将直接破坏昼夜节律,短时间内对机体代谢可能不会造成显著的影响,机体内部各系统在节律紊乱结束后会重新建立24 h昼夜节律;而长时间频繁发生的昼夜节律紊乱将导致睡眠障碍、血糖代谢紊乱等一系列问题,显著增加T2DM的发病风险。

3.1 睡眠模式昼夜节律紊乱与T2DM

越来越多的证据表明,昼夜节律受夜班轮班工作和熬夜等不健康工作/生活方式的影响极大,其中轮班工作的类型、年限和频率均与T2DM发病风险显著相关。一项美国护士的多中心大型队列研究表明,轮班工作是T2DM的独立危险因素,与无夜班轮班相比,夜班轮班、混合轮班型工人患T2DM的风险增加40%以上;夜班轮班每增加5年,患T2DM的风险增加31%。而与轮班工作相关的因素中,夜班频率与T2DM的相关性最强,随着每月夜班次数的增加, T2DM的患病趋势显著上升^[29]。这可能是由于夜班轮班工人在不正确的时间启动睡眠和觉醒行为,在生理代谢处于未准备状态时摄食以及夜间睡眠时间相对减少等;而这些行为改变通常会增加额外的能量摄入,减少能量消耗,损害血糖调控,从而增加T2DM发病的风险^[30]。

除轮班所致的睡眠启动及终止时间因素外,过短/长的睡眠时长、睡眠质量和睡眠类型对T2DM的发病也具有重要作用。首先, MOKHLESI等^[31]开展的多中心横断面研究表明,每晚睡眠时长<5 h或>8 h的人群糖化血红蛋白及空腹血糖水平明显升高,控制血糖的最佳睡眠时长为6~8 h。相关的机制可能如下:睡眠时长不足可使交感神经兴奋,导致胰岛素敏感性降低;而睡眠时间过长可能反映出一种久坐以及零食摄入较多的生活方式,从而增加高血糖的不利影响。其次,睡眠障碍如入睡困难、睡眠呼吸暂停、早醒等,会严重影响睡眠质量。研究表明,睡眠障碍可通过引发低氧血症、炎症、交感神经和下丘脑-垂体-肾上腺轴的激活,从而增强胰岛素抵抗,破坏胰岛β细胞功能^[32]。此外,睡眠类型是区分个体

昼夜节律表达差异的指标,根据睡眠习惯可将其分为:清晨型、中间型和夜晚型。对于成人,夜晚型通常与不健康的饮食习惯、吸烟、饮酒等行为有关;研究表明,夜晚型比清晨型更易罹患睡眠障碍及糖尿病^[33]。然而,睡眠类型与轮班工作之间的相互作用分析结果显示,在夜班轮班工人中,夜晚型相较于清晨型受昼夜节律和睡眠紊乱影响罹患T2DM的风险反而更小^[34]。相比于中间型,清晨型的人随着夜班轮班时间的延长,罹患T2DM的风险显著增加^[35]。这提示,个体自身的睡眠类型与生活节律如轮班的交互作用共同对T2DM的发生起作用,夜晚型人群可能可以更好地应对夜班轮班工作带来的昼夜节律紊乱,从而减弱夜间轮班引发糖尿病的不利效应。

3.2 光线模式昼夜节律紊乱与T2DM

T2DM受到昼夜暴露的光线强度及波长差异的影响。实际上,对光敏感的视网膜神经节细胞可以将周围环境光强信息传递至SCN主生物钟区域,通过控制自主神经和激素分泌调节葡萄糖代谢。VERSTEEG等^[9]的研究发现,夜间强光(4 000勒克斯)暴露与肥胖、空腹甘油三酯增加及糖尿病发生有关。在健康男性中,夜间强光暴露会显著增加空腹和餐后的甘油三酯水平;而在T2DM患者中,夜间强光暴露则增加了空腹及餐后血糖、餐后甘油三酯水平以及食欲评分,这可能是由于强光照射引起内源性葡萄糖生成增加或组织对葡萄糖摄取减少所致。另有研究表明,与早晚昏暗光线(<20勒克斯)相比,暴露于富含蓝光的明亮光线(260勒克斯)会增加胰岛素抵抗^[36]。此外,这种外环境光输入还与体内骨骼肌胰岛素反应性的日变化同步,当机体感光功能减弱或丧失时,可导致骨骼肌胰岛素抵抗的发生^[37],从而显著增加T2DM的发病风险。

3.3 饮食模式昼夜节律紊乱与T2DM

主生物钟SCN对食物摄入具有调控作用,产生的摄食信号与其他组织或器官的局部外周时钟同步,从而影响机体糖脂代谢,如:肝脏时钟调节糖原合成和脂肪代谢;肠道时钟调节葡萄糖吸收;肌肉时钟调节胰岛素敏感性;脂肪组织时钟调节葡萄糖摄取、脂肪合成及分解;胰腺时钟调节胰岛素及胰高血糖素的分泌^[7,38]。而不健康的饮食模式如过量摄食、饮食时间不当等与T2DM发病密切相关。其中,摄食过量导致的超重/肥胖是T2DM最主要的影响因素之一,据估计,该人群患T2DM的风险比体重正常

组高8倍左右^[39]。进一步研究显示,其衡量指标体质指数(body mass index, BMI)的升高与社会时差(即机体内部时钟与社会时钟之间的差异)呈显著正相关^[4],这表明,社会时差可能通过昼夜节律影响超重/肥胖从而间接增加患T2DM的风险。

一项成人糖尿病的干预性研究显示,相较于白天同等食物的摄入,参与者改为晚间摄食模式时,他们在白天的胰岛素分泌显著降低,而夜间胰岛素分泌无明显变化^[14],即晚间摄食更易导致日间血糖升高。KAHLEOVA等^[40]开展的随机交叉实验研究也发现,相比于同样热量限制的一日多餐,只吃早餐和午餐可以降低体重、肝脏脂肪含量、胰高血糖素和空腹血糖水平,并增强胰岛素敏感性。上述结果表明,摄食时间因素对糖尿病的发生也具有重要作用,合理控制能量摄入、尽早摄食和过夜禁食可能是T2DM的保护因素。

3.4 体力活动昼夜节律紊乱与T2DM

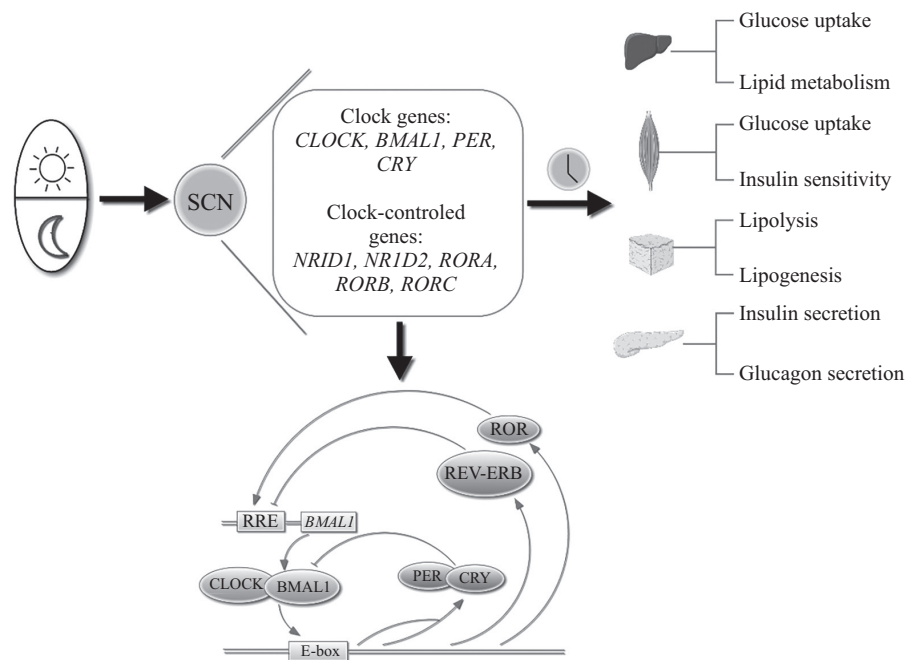
现有研究明确了定时定期的体育锻炼有利于降低胰岛素抵抗及糖化血红蛋白水平^[41]。相较于早晨,机体在下午和晚上的运动表现明显提高,这可能与神经肌肉以及激素代谢、营养状况、骨骼肌分子钟的昼夜节律调节有关^[42]。其中,体力活动是机体骨骼肌分子钟的授时因子。SATO等^[43]利用代谢组学方法研究了机体不同时间的代谢振荡反应,结果表明,早上体力活动的代谢振荡反应相比晚上更显著:早上运动增强了糖酵解及脂肪酸氧化,且更有利于支链氨基酸如亮氨酸、异亮氨酸和缬氨酸等的分解代谢。研究表明,亮氨酸、异亮氨酸等支链氨基酸可抑制葡萄糖氧化的营养感受型丙酮酸脱氢酶复合体活性,从而导致有毒中间体的积累,并通过线粒体功能障碍引起胰岛β细胞功能异常^[44]。而早上运动引发的支链氨基酸分解则可以通过上述机制维护胰岛β细胞功能。因此,规律的体育锻炼对血糖的有益代谢效应与昼夜节律系统密切相关,优化体育锻炼的时间可能有利于T2DM等代谢性疾病的预防和管理,但具体的锻炼时间、类型、强度及其交互作用仍有待研究。

4 节律相关基因对T2DM的影响

生物钟主钟及外周子钟之间的分子机制主要是基于转录-翻译反馈环路(transcriptional-translational feedback loop, TTFL),该环路几乎存在于机

体的每个细胞中。目前, 在人体有核细胞中已识别出了4个核心生物钟基因家族, 包括时钟昼夜调节器(clock circadian regulator, *CLOCK*)、芳烃受体核转位因子样(aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator-like, *ARNTL*, 又被称为*BMAL1*)、period生物钟(period circadian clock, *PER*, 包括*PER1*、*PER2*和*PER3*)以及隐花色素(cryptochrome, *CRY*, 包括*CRY1*和*CRY2*)基因^[45]。除生物钟基因外, 核心节律基因还包括白蛋白启动子D位点结合蛋白(D site of albumin promoter binding protein, *DBP*)、促甲状腺胚因子(thyrotrophic embryonic factor, *TEF*)、肝白血病因子(hepatic leukemia factor, *HLF*)基因以及编码核受体REV-ERB和受体酪氨酸激酶样孤儿受体(receptor tyrosine kinase-like orphan receptor, *ROR*)的基因(分别为*NR1D1*、*NR1D2*和*RORA*、*RORB*、*RORC*)等钟控基因^[7,46]。这些基因及其家族成员之间形成基于转录-翻译的正向或负向反馈环路, 共同调节昼夜节律的稳定(图2)。

研究表明, 生物钟基因的多态性和表达量改变与血糖调节及T2DM发生相关。在转录-翻译反馈环路中, *CLOCK*和*BMAL1*编码的转录因子形成的*CLOCK/BMAL1*异二聚体是分子钟的重要组成部分, 可诱导*PER/CRY*、*ROR/REV-ERB*等参与胰岛素生物合成、转运以及葡萄糖刺激的胰岛素分泌相关转录因子的激活, 从而影响糖代谢过程^[47]。*CORELLA*等^[48]对7 098名参与者的随访研究观察到人类*CLOCK*基因多态性位点rs1464490、rs4580704、rs18012602和rs3749474与T2DM发病风险有关。其中, rs4580704 G等位基因携带者空腹胰岛素和血糖水平更低。另外, *JAGANNATH*等^[49]的研究表明, 人类时钟基因*BMAL1*和*PER2*多态性与空腹血糖升高有关, 且*BMAL1*多态性位点rs7947951 G携带者T2DM患病风险显著增加。一项荟萃分析显示, *CRY2*多态性位点rs11605924 A可诱导胰岛β细胞功能受损, 抑制胰岛素分泌, 导致血糖水平显著升高^[16,50]。除序列多



转录-翻译反馈环路以*CLOCK/BMAL1*异二聚体为中心, 其与编码自身抑制因子(*PER*、*CRY*、*REV-ERB*)和激活因子(*ROR*)的基因上顺式作用元件E-box结合, 从而启动节律基因的转录翻译。而形成的*PER/CRY*复合体会破坏*CLOCK/BMAL1*来抑制自身表达; *REV-ERB*和*ROR*通过与*BMAL1*启动子上的RRE元件结合分别抑制和激活*BMAL1*的表达。这些节律基因的转录及表达可调控外周组织、器官的葡萄糖摄取、脂肪代谢、胰岛素分泌及其敏感性等T2DM相关血糖性状。

The transcription-translation feedback loop centers on the heterodimer of *CLOCK/BMAL1*, and binds to the cis-acting element E-box which locates on the genes encoding *CLOCK/BMAL1* self-suppressors (*PER*, *CRY*, *REV-ERB*) and activator (*ROR*) to initiate the transcription and translation of rhythm genes. The formed *PER/CRY* complex destroys *CLOCK/BMAL1* to inhibit its own expression; *REV-ERB* and *ROR* respectively inhibit and activate the expression of *BMAL1* by binding to the RRE element on the *BMAL1* promoter. The transcription and translation of these rhythmic genes can regulate multiple T2DM-related glucose metabolism traits including glucose uptake, fat metabolism, insulin secretion and sensitivity in peripheral tissues and organs.

图2 昼夜节律分子钟及其编码基因对T2DM的影响

Fig.2 Effects of circadian molecular clock and coding genes on T2DM

态性外, 基因表达谱研究也显示, 相较于健康对照组, 糖尿病患者核心时钟基因 $PER1$ 、 $PER2$ 、 $PER3$ 及 $CRY1$ 的表达水平均显著下调^[51], 表明这些生物钟基因表达谱改变也与血糖性状及糖尿病发生密切相关。

除生物钟基因外, 褪黑素信号通路可与睡眠等生理过程相互作用, 将外部时间信息编码到大脑和外周器官中以同步昼夜节律。该通路主要涉及褪黑素受体1A(melatonin receptor 1A, $MTNR1A$)、褪黑素受体1B(melatonin receptor 1B, $MTNR1B$)、NAD(P)H脱氢酶, 醌2[NAD(P)H dehydrogenase, quinone 2, $NQO2$]、 $RORA$ 和 $RORB$ 等基因。其中, 核受体基因 $RORA$ 和 $RORB$ 也是重要的核心节律基因, 其参与编码 $ROR\alpha1$ 、 $ROR\alpha2$ 、 $ROR\beta$ 等视黄酸受体家族相关核受体, 而MT作为重要介质与这些核受体结合, 将外部昼夜循环转化为体内昼夜节律和其他生物节律^[52]。此外, MT还可与胰岛 β 细胞表面 $MTNR1B$ 基因编码的G蛋白偶联受体 MT_2 结合, 通过抑制腺苷酸环化酶降低ATP向cAMP的转化, 导致刺激性蛋白激酶A活化受到抑制, 从而使应对葡萄糖代谢的胰岛素分泌降低。PERSAUD等^[53]的研究表明, 当 $MTNR1B$ 基因发生序列变异时, 会使其编码的 MT_2 受体表达上调, 对胰岛素分泌产生更强的抑制作用。人类全基因组关联性研究进一步显示, $MTNR1B$ 基因多态性rs10830963 G/C与空腹血糖、 β 细胞功能、糖化血红蛋白及T2DM显著相关^[54], GG基因型携带者的T2DM风险比CC携带者高19%^[55]。因此, $MTNR1B$ 的易感位点变异可显著增强MT降低胰岛素分泌的作用, 从而增加T2DM的发病风险。

目前, 在人类中进行的节律基因与T2DM相关的机制性研究还很少, 主要通过动物基因敲除模型及转基因模型的方法进行。其中, 节律基因的靶向干扰可导致显著的糖代谢紊乱, 突出了节律基因调控血糖的重要作用。这一结果在相关组织(胰腺、肝脏、肌肉和脂肪组织)特异性的基因敲除模型和转基因模型中也得到了进一步的证实。具体而言, $Bmal1$ 作为重要的节律基因之一, 可调节不同组织中的各种代谢途径, 包括肝脏中脂肪代谢和糖异生、胰岛中胰岛素的分泌节律以及脂肪组织中生脂级联反应等^[56]。研究表明, $Bmal1$ 敲除($Bmal1^{-/-}$)小鼠相较于野生型, 在光照阶段其胰岛素和胰高血糖素水平更低; 在黑暗期, $Bmal1^{-/-}$ 小鼠胰岛素仍显示出抑

制趋势, 而胰高血糖素水平保持不变^[57]。此外, 核心时钟基因 $Clock$ 和 $Bmal1$ 缺陷的小鼠在胰岛素诱导的低血糖症后显示正常血糖恢复受损及肝糖异生障碍^[58]。这可能是由于 $Bmal1$ 缺陷损害了葡萄糖代谢途径的转录调控, 使葡萄糖、脂肪酸等代谢底物之间的转化受到阻碍, 从而导致对葡萄糖的利用减弱, 脂肪酸氧化通路激活, 引起空腹血糖升高^[56]。CARROLL等^[59]的研究发现, $Cry1^{-/-}$ 、 $Cry2^{-/-}$ 以及 $Rev-erba^{-/-}$ 转基因小鼠表现为糖耐量下降和循环血糖水平增加, 而 $Per2^{-/-}$ 转基因小鼠表现出葡萄糖耐量增加和循环血糖下降。其中, $Cry1$ 和 $Cry2$ 的缺陷消除了其编码蛋白Cry对糖异生的抑制作用, 导致肝脏中葡萄糖生成及血糖水平增加^[60]; $Clock$ 缺陷可导致糖耐量减低、胰岛素信号传导延迟及体重增加^[61]。而与 $Clock$ 、 $Bmal1$ 和 Cry 基因敲除小鼠相反的是, $Per2^{-/-}$ 小鼠中 $Per2$ 功能的丧失促进葡萄糖刺激的胰岛素分泌, 引发胰岛素清除障碍, 损害了糖异生过程^[62], 因此循环血糖水平显著下降。上述动物实验均证明, 生物钟基因在葡萄糖稳态中发挥着重要作用, 但其结果仍需在人群中进行探索和验证。

5 药物代谢的昼夜节律对T2DM的影响

昼夜节律可通过影响糖尿病相关治疗药物在机体中的代谢来调节血糖水平, 从而影响T2DM的发展与转归。二甲双胍是治疗T2DM的常见药物, 小鼠研究表明, 在一天中不同时间服用二甲双胍, 降血糖作用存在明显差异。通过ZT(Zeitgeber Time, 给予光照时刻记为ZT0)可以反映服用二甲双胍后血糖水平的昼夜变化, 小鼠接受二甲双胍处理后在ZT15和ZT19时血糖降低幅度最大, 该时间对应人类上午的晚些时候, 表明二甲双胍在机体的代谢及其降血糖作用可能存在时间依赖性^[63]。LIANG等^[64]的研究表明, 多巴胺活性存在昼夜节律, 在清晨T2DM患者多巴胺活性显著下降, 可引起代谢受损、血脂异常和胰岛素抵抗。而早上服用多巴胺激动剂速释溴隐亭可降低T2DM患者HbA1c和空腹血糖水平, 改善能量代谢。此外, 甘精胰岛素是用于T2DM治疗的一种长效胰岛素类似物, 研究表明, 其药效与给药时间有关。在早上注射时, 前0~12 h胰岛素活性更高, 而在晚上注射时, 给药后12~24 h活性更高。研究表明, 早晨和晚上的甘精胰岛素给药对脂肪分解和血浆胰高血糖素浓度存在不同的影响, 相比于早晨, 晚

上注射甘精胰岛素可更有效地抑制脂肪分解、生酮作用及降低血浆胰高血糖素浓度^[65]。上述研究提示, 降糖药物对血糖水平影响存在时间效应, 但目前还没有人体试验评估在不同时间给予这些降糖药物对T2DM相关临床转归的效果。

6 结论与展望

随着轮班和跨时区工作需求的不断增加, 昼夜节律紊乱已经成为现代生活方式的重要组成部分。目前, 越来越多的证据表明, 昼夜节律紊乱对T2DM的发生、发展具有重要作用; 而生活方式、生理和遗传等因素可影响昼夜节律, 并通过睡眠-觉醒、食物摄入、激素分泌和能量消耗等形式调控机体葡萄糖代谢、胰岛素敏感性和胰岛β细胞功能等T2DM发生、发展中重要的病理生理过程。现有研究表明, 影响机体昼夜节律的诸多行为因素(包括睡眠-觉醒行为、摄食时间和光照时间等)也可能对T2DM的预防和治疗起重要作用, 如定期体育锻炼可改善睡眠持续时间及睡眠质量, 降低HbA1c水平; 遵循规律的摄食时间、早摄食和过夜禁食有利于降低胰岛素抵抗等。上述措施的效果均提示, 对T2DM患者的生物节律干预可能有利于疾病的综合防治。因此, 在今后工作中, 在广泛的流行病学、临床医学和动物实验研究的基础上, 结合时间生物学研究将昼夜节律与T2DM的病理生理学系统地联系在一起, 以更加全面地阐述T2DM发病的病理生理及分子机制, 可为T2DM的综合防治提供更加全面和行之有效的策略。

参考文献 (References)

- [1] WILLIAMS R, COLAGIURI S, ALMUTAIRI R, et al. IDF Diabetes Atlas 9th edition poster update 2019 [EB/OL]. <https://diabetesatlas.org>.
- [2] WANG L, GAO P, ZHANG M, et al. Prevalence and ethnic pattern of diabetes and prediabetes in China in 2013 [J]. *JAMA*, 2017, 317(24): 2515-23.
- [3] MENG Q, QI X, FU Y, et al. Flavonoids extracted from mulberry (*Morus alba* L.) leaf improve skeletal muscle mitochondrial function by activating AMPK in type 2 diabetes [J]. *J Ethno-pharmacol*, 2019, 2019: 112326.
- [4] PARSONS M J, MOFFITT T E, GREGORY A M, et al. Social jetlag, obesity and metabolic disorder: investigation in a cohort study [J]. *Int J Obes (Lond)*, 2015, 39(5): 842-8.
- [5] KECKLUND G, AXELSSON J. Health consequences of shift work and insufficient sleep [J]. *BMJ*, 2016, 355: i5210.
- [6] ZOTO E, CENKO F, DOCI P, et al. Effect of night shift work on risk of diabetes in healthy nurses in Albania [J]. *Acta Diabetol*, 2019, 56(7): 811-3.
- [7] STENVERS D J, SCHEER F, SCHRAUWEN P, et al. Circadian clocks and insulin resistance [J]. *Nat Rev Endocrinol*, 2019, 15(2): 75-89.
- [8] CHEN Z, YOO S H, TAKAHASHI J S. Development and therapeutic potential of small-molecule modulators of circadian systems [J]. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2018, 58: 231-52.
- [9] VERSTEEG R I, STENVERS D J, VISINTAINER D, et al. Acute effects of morning light on plasma glucose and triglycerides in healthy men and men with type 2 diabetes [J]. *J Biol Rhythms*, 2017, 32(2): 130-42.
- [10] PANDA S. Circadian physiology of metabolism [J]. *Science*, 2016, 354(6315): 1008-15.
- [11] QIAN J, SCHEER F. Circadian system and glucose metabolism: implications for physiology and disease [J]. *Trends Endocrinol Metab*, 2016, 27(5): 282-93.
- [12] MACAULEY M, SMITH F E, THELWALL P E, et al. Diurnal variation in skeletal muscle and liver glycogen in humans with normal health and type 2 diabetes [J]. *Clin Sci (Lond)*, 2015, 128(10): 707-13.
- [13] SERIN Y, ACAR TEK N. Effect of circadian rhythm on metabolic processes and the regulation of energy balance [J]. *Ann Nutr Metab*, 2019, 74(4): 322-30.
- [14] POGGIOGALLE E, JAMSHED H, PETERSON C M. Circadian regulation of glucose, lipid, and energy metabolism in humans [J]. *Metabolism*, 2018, 84: 11-27.
- [15] SAAD A, DALLA MAN C, NANDY D K, et al. Diurnal pattern to insulin secretion and insulin action in healthy individuals [J]. *Diabetes*, 2012, 61(11): 2691-700.
- [16] LEE J, MA K, MOULIK M, et al. Untimely oxidative stress in beta-cells leads to diabetes-role of circadian clock in beta-cell function [J]. *Free Radic Biol Med*, 2018, 119: 69-74.
- [17] AMARAL F G D, CIPOLLA-NETO J. A brief review about melatonin, a pineal hormone [J]. *Arch Endocrinol Metab*, 2018, 62(4): 472-9.
- [18] MAURIZ J L, COLLADO P S, VENEROSO C, et al. A review of the molecular aspects of melatonin's anti-inflammatory actions: recent insights and new perspectives [J]. *J Pineal Res*, 2013, 54(1): 1-14.
- [19] ZEPHY D, AHMAD J. Type 2 diabetes mellitus: role of melatonin and oxidative stress [J]. *Diabetes Metab Syndr*, 2015, 9(2): 127-31.
- [20] TAN E, SCOTT E M. Circadian rhythms, insulin action, and glucose homeostasis [J]. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, 2014, 17(4): 343-8.
- [21] WEST A S, SENNELS H P, SIMONSEN S A, et al. The effects of naturalistic light on diurnal plasma melatonin and serum cortisol levels in stroke patients during admission for rehabilitation: A randomized controlled trial [J]. *Int J Med Sci*, 2019, 16(1): 125-34.
- [22] LEDERBOGEN F, HUMMEL J, FADEMRECHT C, et al. Flattened circadian cortisol rhythm in type 2 diabetes [J]. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*, 2011, 119(9): 573-5.
- [23] HACKETT R A, KIVIMAKI M, KUMARI M, et al. Diurnal cortisol patterns, future diabetes, and impaired glucose metabolism in the Whitehall II cohort study [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2016, 101(2): 619-25.

- [24] KIM T W, JEONG J H, HONG S C. The impact of sleep and circadian disturbance on hormones and metabolism [J]. *Int J Endocrinol*, 2015, 2015: 1-9.
- [25] KIM S H, PARK M J. Effects of growth hormone on glucose metabolism and insulin resistance in human [J]. *Ann Pediatr Endocrinol Metab*, 2017, 22(3): 145-52.
- [26] EHRENKRANZ J, BACH P R, SNOW G L, et al. Circadian and circannual rhythms in thyroid hormones: determining the TSH and free T4 reference intervals based upon time of day, age, and sex [J]. *Thyroid*, 2015, 25(8): 954-61.
- [27] JUN J E, JIN S M, JEE J H, et al. TSH increment and the risk of incident type 2 diabetes mellitus in euthyroid subjects [J]. *Endocrine*, 2017, 55(3): 944-53.
- [28] SKINNER N J, RIZWAN M Z, GRATTAN D R, et al. Chronic light cycle disruption alters central insulin and leptin signaling as well as metabolic markers in male mice [J]. *Endocrinology*, 2019, 160(10): 2257-70.
- [29] VETTER C, SCHEER F. A healthy lifestyle: reducing T2DM risk in shift workers [J]. *Nat Rev Endocrinol*, 2019, 15(4): 194-6.
- [30] MCHILL A W, WRIGHT K P. Role of sleep and circadian disruption on energy expenditure and in metabolic predisposition to human obesity and metabolic disease [J]. *Obes Rev*, 2017, 18: 15-24.
- [31] MOKHLESI B, TEMPLE K A, TJADEN A H, et al. Association of self-reported sleep and circadian measures with glycemia in adults with prediabetes or recently diagnosed untreated type 2 diabetes [J]. *Diabetes Care*, 2019, 42(7): 1326-32.
- [32] SUBRAMANIAN A, ADDERLEY N J, TRACY A, et al. Risk of incident obstructive sleep apnea among patients with type 2 diabetes [J]. *Diabetes Care*, 2019, 42(5): 954-63.
- [33] MANFREDINI R, CAPPADONA R, FABBIAN F. Nurses, shift work, and diabetes: should late chronotype be considered as a risk factor [J]? *BMJ*, 2019, 364: 1178.
- [34] JUDA M, VETTER C, ROENNEBERG T. Chronotype modulates sleep duration, sleep quality, and social jet lag in shift-workers [J]. *J Biol Rhythms*, 2013, 28(2): 141-51.
- [35] VETTER C, DEVORE E E, RAMIN C A, et al. Mismatch of sleep and work timing and risk of type 2 diabetes [J]. *Diabetes Care*, 2015, 38(9): 1707-13.
- [36] CHEUNG I N, ZEE P C, SHALMAN D, et al. Morning and evening blue-enriched light exposure alters metabolic function in normal weight adults [J]. *PLoS One*, 2016, 11(5): e0155601.
- [37] ARAS E, RAMADORI G, KINOUCI K, et al. Light entrains diurnal changes in insulin sensitivity of skeletal muscle via ventromedial hypothalamic neurons [J]. *Cell Rep*, 2019, 27(8): 2385-98, e3.
- [38] JAVEED N, MATVEYENKO A V. Circadian etiology of type 2 diabetes mellitus [J]. *Physiology (Bethesda)*, 2018, 33(2): 138-50.
- [39] SHAN Z, LI Y, ZONG G, et al. Rotating night shift work and adherence to unhealthy lifestyle in predicting risk of type 2 diabetes: results from two large US cohorts of female nurses [J]. *BMJ*, 2018, 363: k4641.
- [40] KAHLEOVA H, BELINOVA L, MALINSKA H, et al. Eating two larger meals a day (breakfast and lunch) is more effective than six smaller meals in a reduced-energy regimen for patients with type 2 diabetes: a randomised crossover study [J]. *Diabetologia*, 2014, 57(8): 1552-60.
- [41] COLBERG S R, SIGAL R J, YARDLEY J E, et al. Physical activity/exercise and diabetes: a position statement of the american diabetes association [J]. *Diabetes Care*, 2016, 39(11): 2065-79.
- [42] GABRIEL B M, ZIERATH J R. Circadian rhythms and exercise: re-setting the clock in metabolic disease [J]. *Nat Rev Endocrinol*, 2019, 15(4): 197-206.
- [43] SATO S, BASSE A L, SCHONKE M, et al. Time of exercise specifies the impact on muscle metabolic pathways and systemic energy homeostasis [J]. *Cell Metab*, 2019, 30(1): 92-110, e4.
- [44] ZENG Y, MTINTSILANA A, GOEDECKE J H, et al. Alterations in the metabolism of phospholipids, bile acids and branched-chain amino acids predicts development of type 2 diabetes in black South African women: a prospective cohort study [J]. *Metabolism*, 2019, 95: 57-64.
- [45] TAKAHASHI J S. Molecular components of the circadian clock in mammals [J]. *Diabetes Obes Metab*, 2015, 17: 6-11.
- [46] 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(14): 2217-22.
- [47] PERELIS M, MARCHEVA B, RAMSEY K M, et al. Pancreatic beta cell enhancers regulate rhythmic transcription of genes controlling insulin secretion [J]. *Science*, 2015, 350(6261): aac4250.
- [48] CORELLA D, ASENSIO E M, COLTELL O, et al. CLOCK gene variation is associated with incidence of type-2 diabetes and cardiovascular diseases in type-2 diabetic subjects: dietary modulation in the PREDIMED randomized trial [J]. *Cardiovasc Diabetol*, 2016, 15: 4.
- [49] JAGANNATH A, TAYLOR L, WAKAF Z, et al. The genetics of circadian rhythms, sleep and health [J]. *Hum Mol Genet*, 2017, 26(R2): R128-38.
- [50] DUPUIS J, LANGENBERG C, PROKOPENKO I, et al. New genetic loci implicated in fasting glucose homeostasis and their impact on type 2 diabetes risk [J]. *Nat Genet*, 2010, 42(2): 105-16.
- [51] KIM P, OSTER H, LEHNERT H, et al. Coupling the circadian clock to homeostasis: the role of period in timing physiology [J]. *Endocr Rev*, 2019, 40(1): 66-95.
- [52] JI L D, XU J, WU D D, et al. Association of disease-predisposition polymorphisms of the melatonin receptors and sunshine duration in the global human populations [J]. *J Pineal Res*, 2010, 48(2): 133-41.
- [53] PERSAUD S J, JONES P M. A wake-up call for type 2 diabetes [J]? *N Engl J Med*, 2016, 375(11): 1090-2.
- [54] MAURY E. Off the clock: from circadian disruption to metabolic disease [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(7): 1597.
- [55] TAN X, CIUCULETE D M, SCHIOTH H B, et al. Associations between chronotype, MTNR1B genotype and risk of type 2 diabetes in UK Biobank [J]. *J Intern Med*, 2019, 287(2): 189-96.
- [56] YIN H, LI W, CHATTERJEE S, et al. Metabolic-sensing of the skeletal muscle clock coordinates fuel oxidation [J]. *FASEB J*, 2020, 34(5): 6613-27.
- [57] PETRENKO V, SAINI C, GIOVANNONI L, et al. Pancreatic alpha- and beta-cellular clocks have distinct molecular properties and impact on islet hormone secretion and gene expression [J]. *Genes Dev*, 2017, 31(4): 383-98.
- [58] HE B, NOHARA K, PARK N, et al. The small molecule nobiletin

- targets the molecular oscillator to enhance circadian rhythms and protect against metabolic syndrome [J]. *Cell Metab*, 2016, 23(4): 610-21.
- [59] CARROLL R G, TIMMONS G A, CERVANTES-SILVA M P, et al. Immunometabolism around the clock [J]. *Trends Mol Med*, 2019, 25(7): 612-25.
- [60] TOLEDO M, BATISTA-GONZALEZ A, MERHEB E, et al. Autophagy regulates the liver clock and glucose metabolism by degrading CRY1 [J]. *Cell Metab*, 2018, 28(2): 268-81, e4.
- [61] FATIMA N, RANA S. Metabolic implications of circadian disruption [J]. *Pflugers Arch*, 2020: 1-14.
- [62] ZHAO Y, ZHANG Y, ZHOU M, et al. Loss of mPer2 increases plasma insulin levels by enhanced glucose-stimulated insulin secretion and impaired insulin clearance in mice [J]. *FEBS Lett*, 2012, 586(9): 1306-11.
- [63] HENRIKSSON E, HUBER A L, SOTO E K, et al. The liver circadian clock modulates biochemical and physiological responses to metformin [J]. *J Biol Rhythms*, 2017, 32(4): 345-58.
- [64] LIANG W, GAO L, LI N, et al. Efficacy and safety of bromocriptine-QR in type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis [J]. *Horm Metab Res*, 2015, 47(11): 805-12.
- [65] PORCELLATI F, LUCIDI P, CIOLI P, et al. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of insulin glargine given in the evening as compared with in the morning in type 2 diabetes [J]. *Diabetes Care*, 2015, 38(3): 503-12.