

• 研究论文 •

PXR、PPAR α 激动所致小鼠肝增大的昼夜节律研究洗 图¹, 田佳宁¹, 李 宣², 范仕成², 蔡承晖¹, 赵鹏飞¹, 黄 民^{1*}, 毕惠嫦^{1,2*}

(1. 中山大学药学院, 广东 广州 510006; 2. 南方医科大学药学院, 广东 广州 510515)

摘要: 肝脏大小受生物钟控制并具有昼夜节律。孕烷X受体 (pregnane X receptor, PXR) 和过氧化物酶体增殖物激活受体 α (peroxisome proliferator-activated receptor α , PPAR α) 是核受体超家族的重要成员。本课题组前期发现, 鼠源激动剂孕烯醇酮 16 α -腈 (pregnenolone 16 α -carbonitrile, PCN) 激动 PXR、匹立尼酸 (pirinixic acid, WY-14643) 激动 PPAR α 后均显著促进小鼠生理性肝增大及部分肝切除术后肝再生。但是, PXR、PPAR α 激动所致肝增大的昼夜变化尚不清楚。因此, 本研究考察连续3天不同时辰给予雄性 C57BL/6 小鼠玉米油、PCN 或 WY-14643 后肝脏大小及生物钟相关基因等的变化。本动物实验方案经中山大学实验动物伦理委员会审核批准 (批准号: SYSU-IACUC-2023-001613、SYSU-IACUC-2023-001783)。结果表明, 连续3天不同时辰给予 PXR、PPAR α 激动剂均显著促进小鼠肝增大, 其所致肝增大与肝脏大小本身的昼夜节律基本一致, 且基本不影响生物钟相关基因的表达, 提示 PXR、PPAR α 激动可能不影响肝脏大小本身的昼夜节律。本研究阐明了 PXR、PPAR α 激动所致肝增大的昼夜节律, 为核受体促进肝增大及肝脏大小昼夜节律的研究提供新数据和参考。

关键词: 孕烷X受体; 过氧化物酶体增殖物激活受体 α ; 核受体; 肝增大; 昼夜节律

中图分类号: R966 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2024)12-3251-10

Diurnal rhythm of PXR or PPAR α activation-induced liver enlargement

XIAN Tu¹, TIAN Jia-ning¹, LI Xuan², FAN Shi-cheng², CAI Cheng-hui¹, ZHAO Peng-fei¹, HUANG Min^{1*}, BI Hui-chang^{1,2*}

(1. School of Pharmaceutical Sciences, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510006, China; 2. School of Pharmaceutical Sciences, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China)

Abstract: Liver size is regulated by circadian clock and exhibits a diurnal rhythm. Pregnane X receptor (PXR) and peroxisome proliferator-activated receptor α (PPAR α), members of nuclear receptor superfamily, are important regulators of liver size. We previously demonstrated that mPXR agonist pregnenolone 16 α -carbonitrile (PCN) and mPPAR α agonist pirinixic acid (WY-14643) promoted liver enlargement and liver regeneration after partial hepatectomy. However, whether PXR or PPAR α activation-induced liver enlargement exhibits diurnal rhythm with normal liver diurnal oscillations remains unclear. The aim of this study was to investigate the diurnal rhythm of PXR or PPAR α activation-induced liver enlargement. Male C57BL/6 mice were intraperitoneally injected with corn oil, PCN or WY-14643 for three days, and liver samples were weighed and collected at various time points for analysis. The animal experiment protocol was reviewed and approved by Institutional Animal Care and Use Committee of Sun Yat-sen University (approval No. SYSU-IACUC-2023-001613, SYSU-IACUC-2023-001783). The results showed that PXR or PPAR α activation at various time points significantly induced liver enlargement,

收稿日期: 2024-07-29; 修回日期: 2024-09-20.

基金项目: 广东省药品监督管理局科技创新项目 (2023ZDZ06).

*通讯作者 Tel: 86-20-61648530, E-mail: bihchang@smu.edu.cn;

Tel: 86-20-39943011, E-mail: huangmin@mail.sysu.edu.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2024-0730

and liver size maintained normal diurnal oscillations during PXR or PPAR α activation-induced hepatomegaly, without significant effects on the expression of core clock genes. This study reveals PXR or PPAR α activation-induced liver enlargement exhibits diurnal rhythm with normal liver diurnal oscillations, and provides novel data for nuclear receptor-induced liver enlargement and liver diurnal rhythm.

Key words: pregnane X receptor; peroxisome proliferator-activated receptor α ; nuclear receptor; liver enlargement; diurnal rhythm

哺乳动物体内生物钟系统控制着机体内的昼夜节律,以适应地球自转产生的昼夜交替。外界存在使生物钟周期与环境周期同步的时间信息,称为授时因子(zeitgeber),其中光照是最重要的授时因子。授时因子参与调控的时间称为授时因子时间(zeitgeber time, ZT),在光照-黑暗循环中,ZT0是光照开始的时间,ZT12是黑暗开始的时间^[1]。生物钟从结构上分为中枢生物钟和外周生物钟,中枢生物钟位于下丘脑视交叉上核,外周生物钟存在于大部分器官与组织中^[2]。其中,肝脏是昼夜节律基因表达最为丰富的器官^[3]。早在20世纪50年代,先后有研究发现鸟类^[4,5]、小鼠^[6-9]、大鼠^[10-15]、家兔^[16]、人类^[17]等的肝脏大小在一天当中具有波动性,肝脏大小曲线的峰谷值均出现在光照-黑暗交替时辰附近。以雄性C57BL/6小鼠为例,在12 h:12 h光照-黑暗、自由饮食条件下,小鼠肝脏大小峰值出现在ZT0附近,谷值出现在ZT12附近,肝脏大小在一天中呈现先下降后上升的趋势,说明肝脏大小具有昼夜节律^[6,8]。尽管目前有较多肝脏昼夜节律的研究,但关注肝脏大小昼夜节律的研究较少,且不同生理/病理条件下肝脏大小的昼夜节律变化尚不清楚。

肝增大(liver enlargement)又称为肝肥大(liver hypertrophy)、肝肿大(hepatomegaly)或肝增生(liver hyperplasia),根据是否具有肝损伤分为生理性肝增大和病理性肝增大^[18]。核受体超家族是一类配体激活的转录因子,调节代谢、增殖、炎症、昼夜节律等生理过程^[19]。研究发现,孕烷X受体(pregnane X receptor, PXR)、过氧化物酶体增殖物激活受体 α (peroxisome proliferator-activated receptor α , PPAR α)、组成型雄甾烷受体(constitutive androstane receptor, CAR)等激动后均可诱导小鼠肝脏显著增大^[20]。本课题组前期研究发现,激动剂孕烯醇酮16 α -腈(pregnenolone 16 α -carbonitrile, PCN)激动鼠源PXR、匹立尼酸(pirinixic acid, WY-14643)激动鼠源PPAR α 后,均显著促进小鼠生理性肝增大和部分肝切除术后肝再生^[21,22]。但是,在PXR、PPAR α 激动所致生理性肝增大过程中,肝脏大小的昼夜节律尚不清楚,PXR、PPAR α 激动是否影响生物钟基因的表达也有待探究。

综上,本研究旨在阐明PXR、PPAR α 激动所致肝增大过程中,肝脏大小的昼夜节律及生物钟基因的表达,为PXR、PPAR α 激动所致肝增大及肝脏大小昼夜节律的基础研究提供科学数据。

材料与方法

药品与试剂 PCN、WY-14643(美国APExBio公司,货号:C3884、A4305);玉米油(上海阿拉丁公司,货号:C116025);RIPA裂解液、PMSF溶液(上海博彩生物科技有限公司,货号:R0127、R0092);BCA蛋白定量试剂盒、预染蛋白分子marker(美国Thermo Fisher Scientific公司,货号:23225、26616);5 \times 双色蛋白上样缓冲液(杭州弗德生物科技有限公司,货号:FD006);30% Acr-Bis制胶液、1 mol \cdot L⁻¹ Tris-HCl缓冲液(pH=6.8)、1.5 mol \cdot L⁻¹ Tris-HCl缓冲液(pH=8.8)、甘氨酸、三羟甲基氨基甲烷(深圳迈科斯生物科技有限公司,货号:DB240、DB241、DB242、TC285、TC302);四甲基乙二胺(上海麦克林生化科技有限公司,货号:T6023);PAGE胶凝固剂(青岛生物科技公司,货号:A012);10%十二烷基硫酸钠溶液(美国Bio-Rad Laboratories公司,货号:1610416);十二烷基硫酸钠、脱脂奶粉(德国Biofroxx公司,货号:3250GR500、1172GR500);通用型抗体稀释液(苏州新赛美生物科技有限公司,货号:WB500D);anti-cytochrome P450 2B10(细胞色素P450 2B10, CYP2B10)一抗、anti-cytochrome P450 3A11(细胞色素P450 3A11, CYP3A11)一抗(武汉艾博泰克生物科技有限公司,货号:A1463、A2544);anti-cytochrome P450 4A(细胞色素P450 4A, CYP4A)一抗(美国Santa Cruz Biotechnology公司,货号:sc-271983);anti-acyl-coenzyme A oxidase 1(酰基辅酶A氧化酶1, ACOX1)一抗(上海生工生物工程股份有限公司,货号:D121471);anti- β -actin(ACTB)一抗、anti-rabbit IgG-HRP-linked二抗、anti-mouse IgG-HRP-linked二抗(美国Cell Signaling Technology公司,货号:4970S、7074S、7076S);ECL发光液(美国Merck Millipore公司,货号:WBKLS0500);硝酸纤维素膜(美国Pall公司,货号:66485);AG RNAex Pro RNA提取试剂、Evo

M-MLV 反转录预混型试剂盒、SYBR Green Pro Taq HS 预混型 qPCR 试剂盒 (湖南艾科瑞生物工程有限公司, 货号: AG21102、AG11718、AG11728); Tris-EDTA 缓冲液 (上海碧云天生物技术有限公司, 货号: ST725)。

仪器 冷冻离心机、微量移液器、梯度 qPCR 仪 (德国 Eppendorf 公司, 型号: 5427R、Research plus、Mastercycler ep gradient); 十万分之一分析天平 (瑞士 Mettler Toledo 公司, 型号: XS105); 超声波清洗器 (昆山市超声仪器有限公司, 型号: KQ-800E); 实时荧光定量 PCR 仪、Nanodrop 超微量紫外分光光度计 (美国 Thermo Fisher Scientific 公司, 型号: ABI7500、2000c); 电泳仪 (美国 Bio-Rad Laboratories 公司, 型号: 1658040); 化学发光成像仪 (上海天能科技有限公司, 型号: 5200); 4 °C、-20 °C、超低温冰箱 (安徽中科美菱低温科技股份有限公司, 型号: YC-968L、DW-YL270、DW-HL828); 生物样本匀浆器 (法国 Bertin Technologies 公司, 型号: Precellys 24); 涡旋振荡器 (美国 Scientific Industries 公司, 型号: G560E)。

实验动物 SPF 级 C57BL/6 雄性小鼠, 6~8 周龄, 购买于广东省医学实验动物中心, 动物生产许可证号为 SCXK (粤) 2022-0002。饲养于中山大学 (东校园) 实验动物中心, 动物使用许可证号为 SYXK (粤) 2023-0112。饲养条件: 小鼠自由饮水和摄食, 室内 12 h:12 h 光照-黑暗模拟昼夜交替, 温度 20~26 °C, 相对湿度 40%~70%, 每小时换气次数 10~20 次。动物实验经中山大学实验动物伦理委员会审核通过, 批准编号为 SYSU-IACUC-2023-001613、SYSU-IACUC-2023-001783。

动物分组与给药 精密称定 PCN 或 WY-14643 400 mg, 加玉米油 40 mL, 充分涡旋后超声处理 30 min 使其混悬, 制备成 10 mg·mL⁻¹ 浓度的 PCN 或 WY-14643 溶液, 储存于 4 °C 冰箱, 每次使用前均涡旋混匀并超声处理。

连续 3 天不同时辰给予 PXR 或 PPAR α 激动剂的动物实验分两次完成。动物实验中心早上 8:00 (ZT0) 开灯, 晚上 20:00 (ZT12) 关灯, 将一天 24 h 等分为 6 个时辰, 分别为 9:00 (ZT1)、13:00 (ZT5)、17:00 (ZT9)、21:00 (ZT13)、次日 1:00 (ZT17)、次日 5:00 (ZT21), 各个时辰均设置对照组和给药组, 两次实验各 12 组, 按每组 5~6 只随机分配 C57BL/6 小鼠。处理前称量小鼠体重, 给药组每天腹腔注射 (*i.p.*) PCN 溶液或 WY-14643 溶液, 剂量均为 100 mg·kg⁻¹·d⁻¹, 对照组每天腹腔注射玉米油, 注射体积为 0.01 mL·g⁻¹, 共连续给药 3 天。各时辰组分别在最后一次给药 24 h 后处死并收集肝脏, 称重后冻存于 -80 °C 冰箱。

Western blot 检测 称取适量小鼠肝脏样本, 按说明书加入相应量的 RIPA 裂解液和 PMSF 溶液, 匀浆后离心 30 min (温度 4 °C, 转速 16 000 ×g), 取上清经 BCA 蛋白定量试剂盒定量后, 配成 2 g·L⁻¹ 蛋白上样液。配制 10% SDS-PAGE 凝胶, 每孔上样 15 μL, 经电泳分离后转印至硝酸纤维素膜上, 用 5% 脱脂牛奶封闭, 孵育一抗及二抗后显影。

实时荧光定量 PCR 检测 按说明书使用 RNA 提取试剂提取小鼠肝脏组织的总 RNA 后, 根据反转录和 qPCR 试剂盒说明书得到 cDNA 并检测目的基因的 mRNA 表达水平, 内参基因为 *Rn18s*。引物序列如表 1 所示。

Table 1 Primer sequence of core clock genes

Gene	Species	Primer sequence
<i>Bmal1</i>	Mouse	Forward 5'-CTCCAGGAGGCAAGAAGATTC-3'
		Reverse 5'-ATAGTCCAGTGAAGGAATG-3'
<i>Clock</i>	Mouse	Forward 5'-CACTCTCACAGCCCCACTGTAC-3'
		Reverse 5'-CCCCACAAGCTACAGGAGCAGT-3'
<i>Per1</i>	Mouse	Forward 5'-AACGGATGTGTTTCGGGGTGC-3'
		Reverse 5'-AGGACCTCCTCTGATTCGGCAG-3'
<i>Per2</i>	Mouse	Forward 5'-CCACACTGCTCCGAAATA-3'
		Reverse 5'-ACTGCCTCTGACTGGAAGA-3'
<i>Cry1</i>	Mouse	Forward 5'-CCCAGGCTTTTCAAGGAATGGAAC-3'
		Reverse 5'-GCAGGGAGTTGCATTCATTCGAG-3'
<i>Cry2</i>	Mouse	Forward 5'-TGGGCATCAACCGATGGAG-3'
		Reverse 5'-CCCATTCTTGAACAGCCTTG-3'
<i>Rev-erba</i>	Mouse	Forward 5'-TTTTTCGCGGAGCATCCAA-3'
		Reverse 5'-ATCTCGGCAAGCATCCGTTG-3'
<i>Rev-erbb</i>	Mouse	Forward 5'-CGCACATTGCCGATATAGGAGG-3'
		Reverse 5'-GAGACTGCCACCACCACGTACT-3'
<i>Rora</i>	Mouse	Forward 5'-CCAACCGTGTCCATGCCAGAAC-3'
		Reverse 5'-GCACACAGCTGCCACATCACCT-3'
<i>Rory</i>	Mouse	Forward 5'-CGCGGAGCAGACACTTA-3'
		Reverse 5'-CCCTGGACCTCTGTTTTGGC-3'
<i>Rn18s</i>	Mouse	Forward 5'-CCTGGATACCGCAGCTAGGA-3'
		Reverse 5'-GCGGCGCAATACGAATGCC-3'

统计学分析 本研究中数据均采用平均值 ± 标准差 (mean ± SD) 表示。采用 Image J 软件对 Western blot 检测结果进行定量, 使用 GraphPad Prism 8.0.1 软件制图。采用 unpaired student's *t*-test 检验 (two-tailed) 比较同一时辰两组间差异; 采用 one-way ANOVA 检验比较不同时辰多组间差异, 当组内样本数相同时, 采用 Tukey 法进行两两比较; 当组内样本数不相同, 采用 Bonferroni 法进行两两比较; 当 $P < 0.05$ 具有统计学意义。

结果

1 PXR、PPAR α 激动所致肝增大与肝脏大小本身的昼夜节律基本一致

为了考察激动 PXR、PPAR α 所致肝增大的昼夜节律变化, 本研究连续 3 天在不同时辰 (ZT1、ZT5、ZT9、

ZT13、ZT17 和 ZT21) 给予雄性 C57BL/6 小鼠 PXR 鼠源激动剂 PCN 或 PPAR α 鼠源激动剂 WY-14643 (图 1A)。结果显示, 给予 PCN 3 天后, 与各自对照组相比, 不同时辰组的小鼠肝重比均显著上升 (图 1B), ZT1、ZT5、ZT9、ZT13、ZT17 和 ZT21 小鼠肝重比分别由 5.18%、5.19%、4.56%、4.40%、4.50% 和 5.28% 上升至 7.14%、6.76%、6.65%、6.06%、6.61% 和 6.81%, 增幅分别为 37.7%、30.1%、45.8%、37.6%、46.8% 和 29.0% (图 1C)。其中, PCN 给药组及其对照组的肝重比在一昼夜内呈现先下降后上升的趋势, ZT21 和 ZT13 分别是对照组肝重比的峰值 (5.28%) 和谷值 (4.40%), 而 ZT1 和 ZT13 分别是 PCN 给药组肝重比的峰值 (7.14%) 和谷值 (6.06%), 肝重比曲线的峰谷值基本都出现在光照-黑暗交替时辰附近, 与正常肝脏的昼夜节律基本一致^[6,8]。然而增幅却呈现 ZT9 (45.8%) 和 ZT17 (46.8%) 两个峰值、ZT5 (30.1%) 和 ZT21 (29.0%) 两个谷值, 增幅趋势与文献^[23]报道 PXR 的 mRNA 昼夜表达类似, 两

个峰值与两个谷值之间分别有显著性差异。

与给予 PCN 类似, 给予 WY-14643 3 天后, 与各自对照组相比, 不同时辰组的小鼠肝重比亦均显著上升 (图 1D), ZT1、ZT5、ZT9、ZT13、ZT17 和 ZT21 小鼠肝重比分别由 5.26%、5.15%、4.64%、4.46%、4.98% 和 5.13% 上升至 6.89%、6.79%、6.08%、5.95%、6.68% 和 6.65%, 增幅分别为 31.0%、31.7%、31.1%、33.4%、34.2% 和 29.6% (图 1E)。其中, WY-14643 给药组及其对照组的肝重比在一昼夜内均呈现先下降后上升的趋势, ZT1 和 ZT13 分别是对照组肝重比峰值 (5.26%) 和谷值 (4.46%), 也分别是 WY-14643 给药组肝重比峰值 (6.89%) 和谷值 (5.95%), 肝重比曲线的峰谷值都出现在光照-黑暗交替时辰附近, 与正常肝脏的昼夜节律基本一致^[6,8]。增幅呈现先上升后下降的趋势, 趋势与文献^[24]报道 PPAR α 的 mRNA 昼夜节律基本一致, 其中 ZT17 为增幅峰值 (34.2%), 但 6 个时辰间比较无统计学差异。

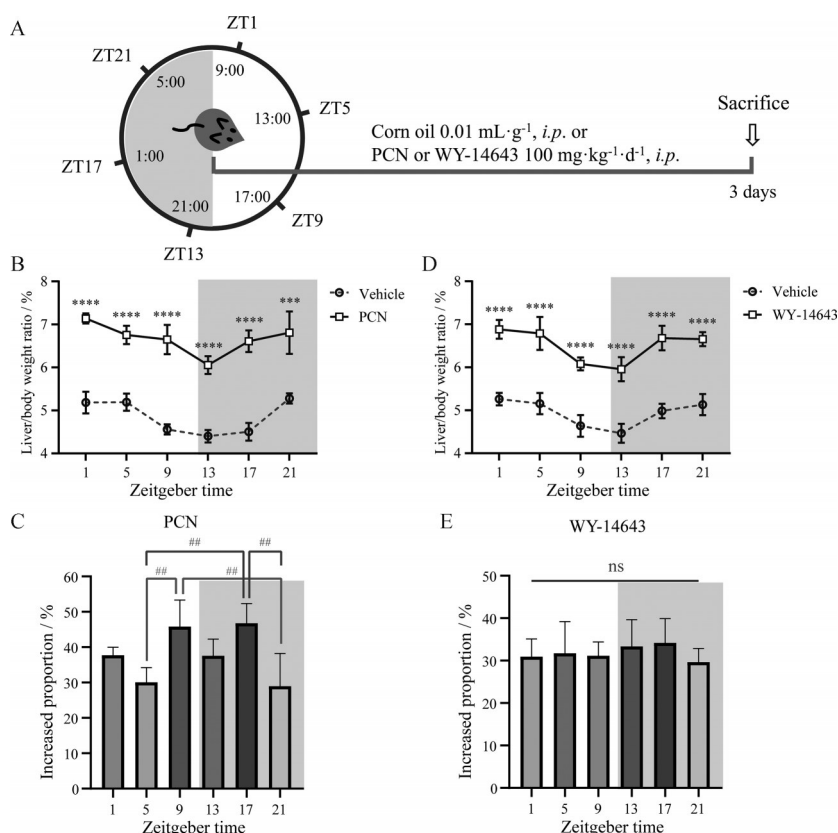


Figure 1 Liver size maintained normal diurnal oscillations during pregnane X receptor (PXR) or peroxisome proliferator-activated receptor α (PPAR α) activation-induced liver enlargement. A: Male C57BL/6 mice were treated with vehicle, pregnenolone 16 α -carbonitrile (PCN, 100 mg·kg⁻¹·d⁻¹) or pirinixic acid (WY-14643, 100 mg·kg⁻¹·d⁻¹) at different zeitgeber time for 3 days; B: Liver-to-body weight ratios of the vehicle or PCN-treated mice ($n = 4-5$); C: Increased proportion of liver-to-body weight ratios of PCN-treated mice compared with the corresponding vehicle group at different zeitgeber time; D: Liver-to-body weight ratios of the vehicle or WY-14643-treated mice ($n = 4-6$); E: Increased proportion of liver-to-body weight ratios of WY-14643-treated mice compared with the corresponding vehicle group at different zeitgeber time. Mean \pm SD. *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$ vs the corresponding vehicle group at different zeitgeber time; ## $P < 0.01$ compared between the two groups; ns: No significant difference between any pair of groups; ZT: Zeitgeber time

以上结果提示,在一昼夜内不同时辰给予PXR或PPAR α 激动剂均能显著诱导小鼠肝脏增大;PXR或PPAR α 激动剂所致肝增大过程中,肝脏大小本身的昼夜节律不受影响。

2 连续3天不同时辰给予PXR或PPAR α 激动剂均能显著上调PXR或PPAR α 下游蛋白

为了考察不同时辰给予PXR或PPAR α 激动剂对PXR或PPAR α 下游蛋白的影响,本研究检测了PXR下游蛋白CYP3A11、CYP2B10以及PPAR α 下游蛋白CYP4A、ACOX1的表达。Western blot结果显示,在不同时辰给予PXR激动剂PCN后,与各时辰相应对照组比较,PXR下游蛋白CYP3A11和CYP2B10均显著上调(图2A),提示不同时辰给予PCN均能激动PXR。其中,PCN给药组的CYP3A11表达峰值出现在ZT1,对照组出现在ZT21(图2B);ZT1、ZT5、ZT9、ZT13、ZT17和ZT21各时辰CYP3A11分别上调了5.0、4.4、4.7、4.7、4.7和3.6倍(图2C),ZT1和ZT21分别为上调倍数的峰值(5.0倍)和谷值(3.6倍),但各时辰上调倍数相比无统计学差异。PCN给药组的CYP2B10表达峰值出现在ZT21,对照组出现在ZT17(图2D),ZT1、ZT5、ZT9、ZT13、ZT17和ZT21各时辰CYP2B10分别上调了4.9、

3.0、4.2、4.0、2.4和3.0倍(图2E),ZT1和ZT17分别为上调倍数的峰值(4.9倍)和谷值(2.4倍),但各时辰上调倍数相比无统计学差异。

在不同时辰给予PPAR α 激动剂WY-14643后,与各时辰相应对照组比较,PPAR α 的下游蛋白CYP4A和ACOX1也显著上调(图3A),提示不同时辰给予WY-14643均能激动PPAR α 。其中,WY-14643给药组及其对照组的CYP4A表达峰值均出现在ZT21(图3B);ZT1、ZT5、ZT9、ZT13、ZT17和ZT21各时辰CYP4A分别上调了2.7、3.0、3.0、2.3、2.1和2.1倍(图3C),ZT5和ZT17分别为上调倍数的峰值(3.0倍)和谷值(2.1倍),两者相比有统计学差异。WY-14643给药组的ACOX1表达峰值出现在ZT17,对照组出现在ZT13(图3D),ZT1、ZT5、ZT9、ZT13、ZT17和ZT21各时辰ACOX1分别上调了6.3、5.0、6.2、4.0、5.7和5.2倍(图3E),ZT1和ZT13分别为上调倍数的峰值(6.3倍)和谷值(4.0倍),但各时辰上调倍数相比无统计学差异。

3 连续3天不同时辰给予PXR或PPAR α 激动剂基本不影响生物钟相关基因的表达

为了进一步明确不同时辰给予PXR或PPAR α 激动剂后,生物钟相关基因的表达变化,本研究通过RT-

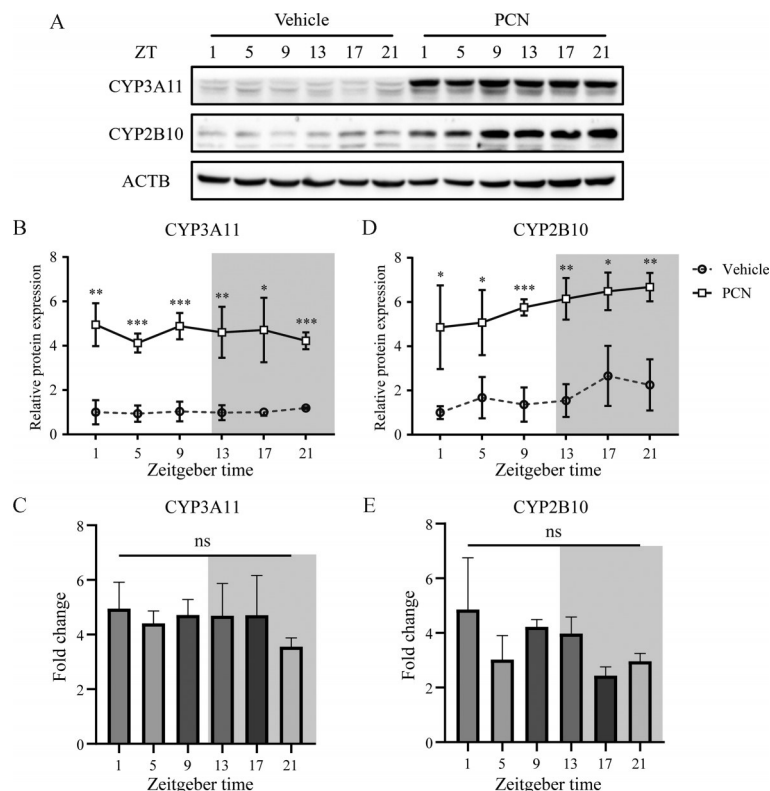


Figure 2 Expression of PXR downstream target proteins at different zeitgeber time was increased in the PCN-treated mice. A: Western blot analysis of CYP3A11 and CYP2B10; B, C: Quantification and fold change of CYP3A11 protein expression; D, E: Quantification and fold change of CYP2B10 protein expression. $n = 3$, mean \pm SD. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs the corresponding vehicle group at different zeitgeber time. CYP3A11: Cytochrome P450 3A11; CYP2B10: Cytochrome P450 2B10; ACTB: β -Actin

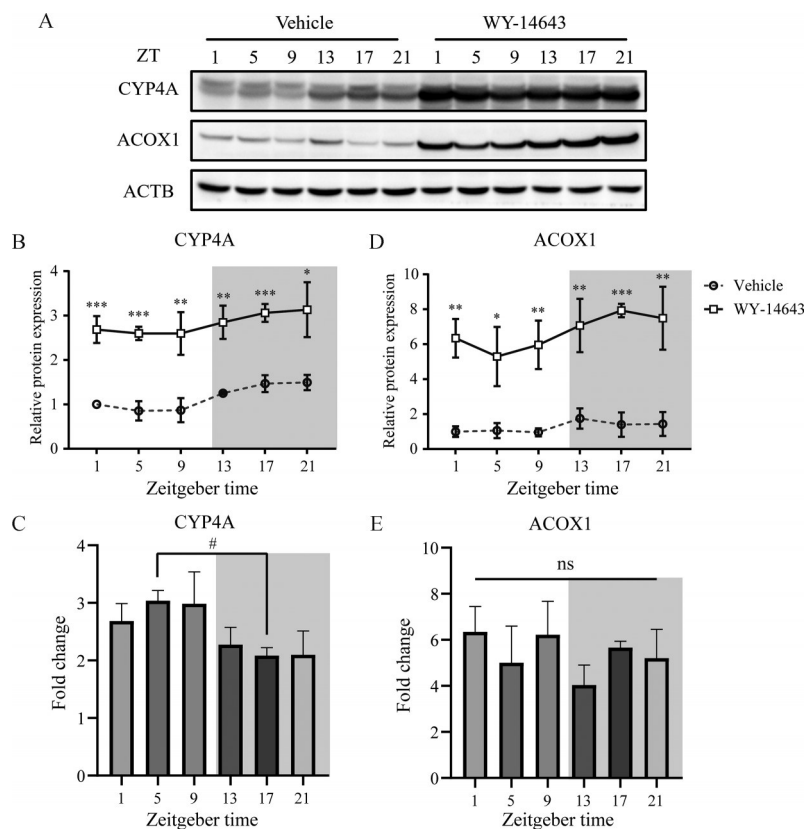


Figure 3 Expression of PPAR α downstream target proteins at different zeitgeber time was increased in the WY-14643-treated mice. A: Western blot analysis of CYP4A and ACOX1; B, C: Quantification and fold change of CYP4A protein expression; D, E: Quantification and fold change of ACOX1 protein expression. $n = 3$, mean \pm SD. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs the corresponding vehicle group at different zeitgeber time; # $P < 0.05$ compared between the two groups. CYP4A: Cytochrome P450 4A; ACOX1: Acyl-coenzyme A oxidase 1

qPCR 检测了肝脏中脑和肌肉芳香烃受体核转位因子样蛋白 1 (brain and muscle ARNT-like protein 1, *Bmal1*) 基因、昼夜运动输出周期 (circadian locomotor output cycles kaput, *Clock*) 基因、周期 1/2 (period 1/2, *Per1/2*) 基因、隐花色素 1/2 (cryptochrome 1/2, *Cry1/2*) 基因、甲状腺激素受体的反向链 α/β (reverse strand of ERB α/β , *Rev-erba/\beta*) 基因、视黄酸受体相关孤儿核受体 α/γ (retinoic acid receptor-related orphan receptor α/γ , *Rora/\gamma*) 基因的 mRNA 表达水平。结果显示, 各组生物钟相关基因的表达趋势基本符合文献^[6,25-27]报道的正常节律趋势。在不同时辰给予 PXR 激动剂 PCN 后, 与各个时辰相应对照组比较, PCN 给药组的 *Clock*、*Per2*、*Cry2*、*Rev-erb β* 、*Rory* 在所有时辰均无显著性差异 (图 4B、D、F、H 和 J), 而 *Bmal1* 在 ZT13 (图 4A)、*Per1* 在 ZT13 和 ZT17 (图 4C)、*Cry1* 在 ZT9 (图 4E)、*Rev-erba* 在 ZT13 和 ZT17 (图 4G)、*Rora* 在 ZT17 (图 4I) 的 mRNA 表达水平下降。在不同时辰给予 PPAR α 激动剂 WY-14643 后, 与各个时辰相应对照组比较, WY-14643 给药组的 *Clock*、*Per1*、*Cry1*、*Cry2*、*Rev-erba* 在所有时辰均无显著性差异 (图 5B、C、E、F 和 G), 而 *Bmal1* 在

ZT21 (图 5A)、*Per2* 在 ZT13 和 ZT21 (图 5D)、*Rev-erb β* 在 ZT13 (图 5H)、*Rora* 在 ZT13 和 ZT21 (图 5I)、*Rory* 在 ZT13 和 ZT21 (图 5J) 的 mRNA 表达水平下降。鉴于大部分基因的表达趋势基本符合文献^[6,25-27]报道的正常节律趋势, 且与相应对照组比较表达水平没有显著差异, 以上结果提示, PXR、PPAR α 激动所致肝增大过程中, 生物钟相关基因的表达基本不受影响。

讨论

PCN 和 WY-14643 是公认的鼠源 PXR 和 PPAR α 特异性激动剂, 是小鼠实验中常用于激动 PXR 和 PPAR α 的经典工具药^[28,29]。本课题组前期在 PXR、PPAR α 促进肝增大的相关研究中, 给药时辰均为上午 9:00 (即 ZT1), 证明了 PXR、PPAR α 激动后促进肝增大的作用^[21,22]。另外, 还评估了 PXR、PPAR α 激动 1、2、3、5、7、10 天致肝增大的动态变化特点, 给予 PXR 或 PPAR α 激动剂 3 天后肝重比增幅较大, 此后趋于平缓, 进入平台期^[30,31]。本研究在前期基础上, 继续沿用前期研究中使用的激动剂及相应剂量, 重点探讨不同时辰给予 PXR 或 PPAR α 激动剂对肝增大的作用是否有

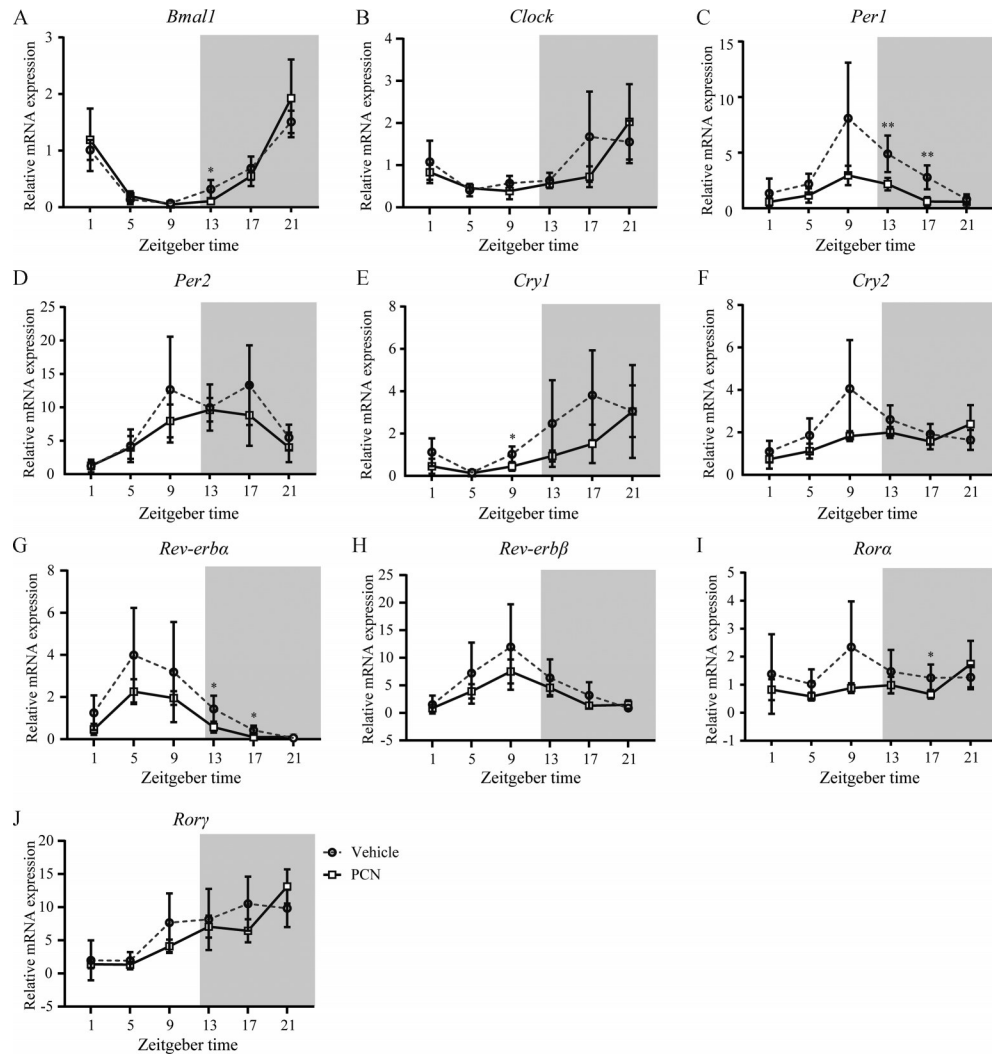


Figure 4 Minimal effects on the expression of core clock genes during PXR activation-induced liver enlargement. A–J: RT-qPCR analysis of core clock genes including *Bmal1*, *Clock*, *Per1*, *Per2*, *Cry1*, *Cry2*, *Rev-erba*, *Rev-erb β* , *Rora* and *Rora γ* in PCN-treated mice. $n = 4-5$, mean \pm SD. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs the corresponding vehicle group at different zeitgeber time. *Bmal1*: Brain and muscle ARNT-like protein 1; *Clock*: Circadian locomotor output cycles kaput; *Per1/2*: Period 1/2; *Cry1/2*: Cryptochrome 1/2; *Rev-erba β* : Reverse strand of ERB α/β ; *Rora γ* : Retinoic acid receptor-related orphan receptor α/γ

影响,且在PXR、PPAR α 激动条件下是否影响肝脏大小的昼夜节律。因此,本研究选择ZT1作为起点给药时辰,按照昼夜节律相关研究的惯例,每隔4h设置一个给药时辰^[4,6-8,12,23,24],评估连续3天给予PXR或PPAR α 激动剂所致肝增大的昼夜节律。

生物钟会受到光暗周期、摄食、压力、运动等环境因素影响^[1]。肝脏是昼夜节律基因表达最为丰富的器官,在正常光照和自由饮食条件下,其大小本身具有昼夜节律。研究表明,将摄食时间限制在黑暗(活动)阶段的小鼠,肝脏大小的节律会更显著和稳定;而将摄食时间限制在光照(休息)阶段的小鼠,却会消除肝脏大小的昼夜节律^[8]。本研究在正常光照和自由饮食条件下,给予小鼠PXR或PPAR α 激动剂,以促进小鼠生理

性肝增大。结果表明,对照组和给药组小鼠的肝重比均显示出相对平稳的昼夜节律,整体呈现先下降后上升的趋势,峰值出现在ZT1或ZT21,谷值出现在ZT13,均在光照-黑暗交替时辰(ZT0和ZT12)附近,与正常肝脏的昼夜节律基本一致^[6,8],这提示PXR或PPAR α 激动剂可能不影响肝脏大小的昼夜节律。先前研究表明,肝脏大小昼夜节律性变化可能是由于脂质、糖原及相关代谢酶含量^[4,9]、肝细胞的细胞器结构和数量发生改变^[32]。2017年有研究发现,肝脏总RNA和总蛋白水平的节律性变化导致肝脏大小的昼夜改变,进一步研究发现肝脏总蛋白水平的昼夜变化可能与核糖体数量有关;核糖体RNA在细胞核中发生节律性降解,导致核糖体数量的昼夜变化,进而影响肝脏总

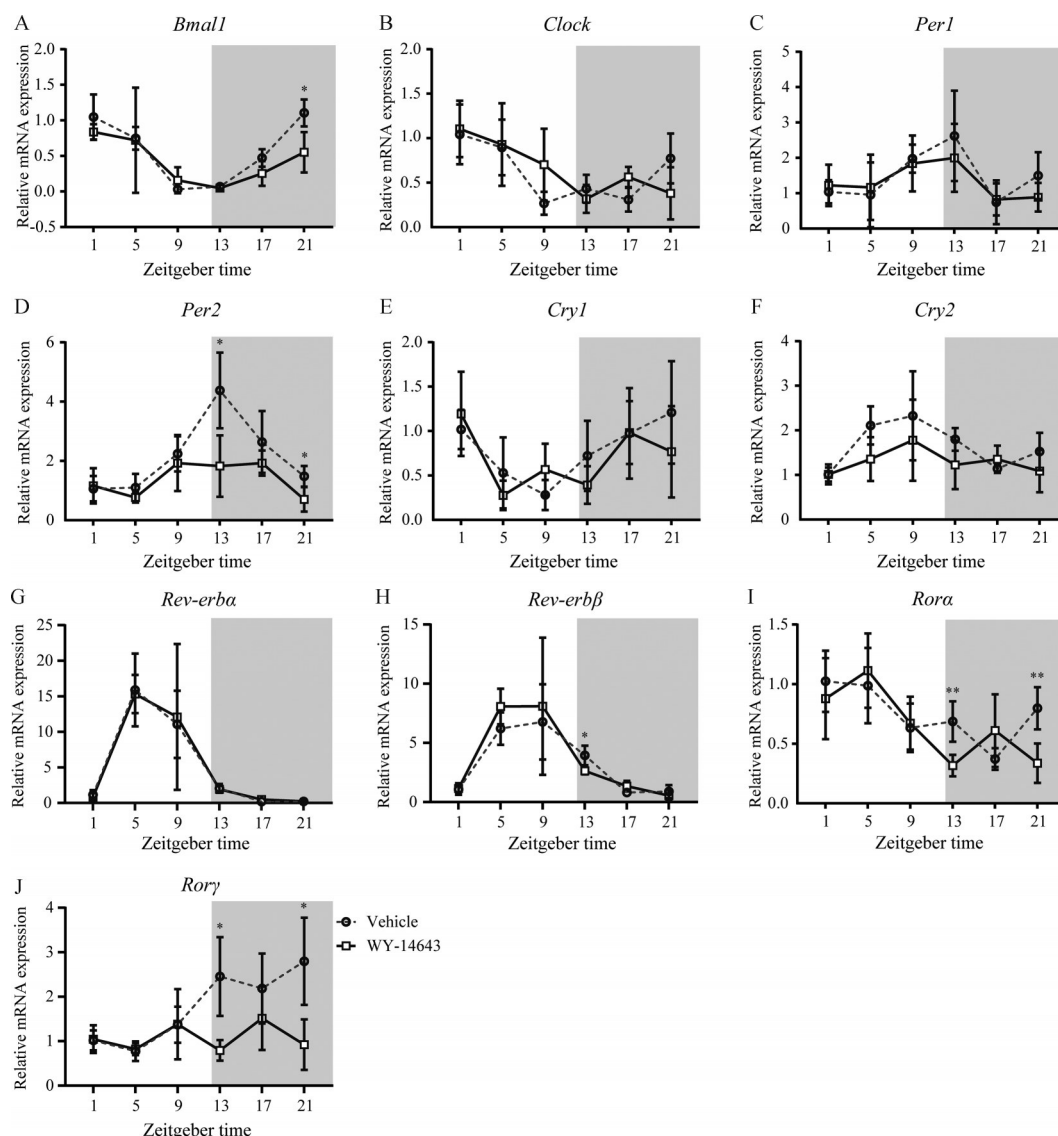


Figure 5 Minimal effects on the expression of core clock genes during PPAR α activation-induced liver enlargement. A–J: RT-qPCR analysis of core clock genes including *Bmal1*, *Clock*, *Per1*, *Per2*, *Cry1*, *Cry2*, *Rev-erba*, *Rev-erb β* , *Rora* and *Ror γ* in WY-14643-treated mice. $n = 4$, mean \pm SD. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs the corresponding vehicle group at different zeitgeber time

蛋白质的昼夜合成^[8]。

本研究检测了 PXR 下游蛋白 CYP3A11 和 CYP2B10、PPAR α 下游蛋白 CYP4A 和 ACOX1 的昼夜表达情况,以证明不同时辰给予 PCN 均能激动 PXR、不同时辰给予 WY-14643 均能激动 PPAR α 。细胞色素 P450 (cytochrome P450, CYP) 酶是最重要的药物 I 相代谢酶,作为处置外源性物质的关键酶系,普遍认为在啮齿类动物活动和进食时表达最高^[33]。本研究检测的 CYP 酶的表达峰值基本出现在黑暗后期 (ZT17 和 ZT21),而 PCN 给药组的 CYP3A11 表达峰值出现在 ZT1。尽管 ZT1 处于光照期,但该时辰是由黑暗期刚转变为光照期,啮齿类动物尚未完全进入静息状态,因此该蛋白表达也符合规律。ACOX1 是脂肪酸 β -氧化

途径中的一个关键代谢酶,受到 PPAR α 的直接调控,PPAR α 表达是在接近黑暗期开始时达到峰值^[34],本研究中 ACOX1 表达峰值出现在黑暗前期 (ZT13 和 ZT17),基本符合 PPAR α 和 ACOX1 的表达规律。此外,本研究观察到不同时辰 PXR、PPAR α 下游蛋白上调倍数有差异,但具体原因还需要进一步研究。

哺乳动物的生物钟分子机制由转录和翻译负反馈环路构成,其中两条最主要的环路如下:核心生物时钟因子 BMAL1 和 CLOCK 相互结合形成异二聚体后进入细胞核,启动 *Per* 和 *Cry* 的转录。当 PER 和 CRY 蛋白水平累积到一定程度时,该环路受到负反馈抑制。另一个环路涉及两个核受体,分别是 REV-ERB 和 ROR。其中 ROR 蛋白激活 BMAL1 转录,而 REV-ERB

蛋白抑制 BMAL1 转录, 由此形成第二个负反馈环路^[35-39]。本研究检测了连续 3 天不同时辰给予 PXR 或 PPAR α 激动剂后核心生物钟基因的 mRNA 表达水平, 部分基因表达水平在个别时辰给药后有所下降, PXR 激动引起 *Bmal1*、*Per1*、*Cry1*、*Rev-erba*、*Rora* 的 mRNA 水平下降出现在 ZT9、ZT13、ZT17, 即在光照期转变为黑暗期附近, 但未见 PXR 与变化基因相互作用的报道, 具体原因需要进一步探究; PPAR α 激动引起 *Bmal1*、*Per2*、*Rev-erb β* 、*Rora*、*Rory* 的 mRNA 水平下降则出现在 ZT13 或 ZT21, 即在光照-黑暗的两次转变附近, 有研究报道 PPAR α 与部分变化基因有一定程度的相互作用^[40-42], 但为何在本研究中仅在 ZT13 或 ZT21 发生 mRNA 水平下降, 未见相关报道, 具体原因也需要进一步探究。然而, 上述基因的变化仅局限于单一或某些时辰, 且多数基因的变化幅度较小。因此, 从整体节律基因表达水平分析, 本课题组推断 PXR、PPAR α 激动所致肝增大过程中, 生物钟相关基因的表达基本不受影响。

核受体占人类药物靶点的 3%, 据统计目前 FDA 批准的新药有 16% 靶向核受体, 主要适应症包括过敏、自身免疫性疾病、高脂血症、避孕、激素治疗和癌症等^[43]。临床使用的许多药物具有 PXR 或 PPAR α 的激动活性, 如利福平、地塞米松、米非司酮、五酯片的活性成分五味子醇乙^[44-46]具有 PXR 激动活性, 非诺贝特、苯扎贝特、吉非贝齐等则可激动 PPAR α 从而改善脂质代谢^[28]。核受体作为广泛的药物靶点, 了解其昼夜节律模式, 有助于时间疗法的发展^[23]。研究表明, 饮食诱导肥胖的小鼠模型中肝脏的 PPAR α 节律表达被放大, 研究人员分别在 PPAR α 表达峰值和谷值时辰灌胃给予 WY-14643; 结果发现, 相比谷值时辰, 在峰值时辰给药可最大限度降低肝脏和血清甘油三酯^[47]。因此, 通过与核受体峰值水平相匹配的给药时间来提高药物疗效, 可能是未来精准个体化用药的发展方向。

综上所述, 本研究证明 PXR、PPAR α 激动所致肝增大的节律与肝脏大小本身的昼夜节律基本一致, 连续 3 天不同时辰给予 PXR 或 PPAR α 激动剂基本不影响生物钟相关基因的表达, 为核受体促进肝增大及肝脏大小昼夜节律的基础研究提供数据和参考。

作者贡献: 洗图负责实验设计与实施、结果统计与分析、撰写论文; 田佳宁负责部分实验设计与实施、结果统计与分析; 李宣、蔡承晖、赵鹏飞负责部分实验的实施; 范仕成负责部分实验的设计与指导、修订论文; 黄民和毕惠娟负责思路的提出、实验设计与指导、修订论文。

利益冲突: 本文所有作者之间均不存在利益冲突。

References

- [1] Tahara Y, Aoyama S, Shibata S. The mammalian circadian clock and its entrainment by stress and exercise [J]. *J Physiol Sci*, 2017, 67: 1-10.
- [2] Dibner C, Schibler U, Albrecht U. The mammalian circadian timing system: organization and coordination of central and peripheral clocks [J]. *Annu Rev Physiol*, 2010, 72: 517-549.
- [3] Zhang R, Lahens NF, Ballance HI, et al. A circadian gene expression atlas in mammals: implications for biology and medicine [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2014, 111: 16219-16224.
- [4] Wilson WO, Mcfarland LZ. Diurnal changes in livers and digestive systems of coturnix as related to three photoperiodic regimens [J]. *Poult Sci*, 1969, 48: 477-482.
- [5] Fisher HI, Bartlett LM. Diurnal cycles in liver weights in birds [J]. *Condor*, 1957, 59: 364-372.
- [6] Li R, Wang YX, Chen RC, et al. Ambient fine particulate matter disrupts hepatic circadian oscillation and lipid metabolism in a mouse model [J]. *Environ Pollut*, 2020, 262: 114179.
- [7] White BP, Davies MH, Schnell RC. Circadian variations in hepatic glutathione content, gamma-glutamylcysteine synthetase and gamma-glutamyl transferase activities in mice [J]. *Toxicol Lett*, 1987, 35: 217-223.
- [8] Sinturel F, Gerber A, Mauvoisin D, et al. Diurnal oscillations in liver mass and cell size accompany ribosome assembly cycles [J]. *Cell*, 2017, 169: 651-663.e14.
- [9] Wang JK, Mauvoisin D, Martin E, et al. Nuclear proteomics uncovers diurnal regulatory landscapes in mouse liver [J]. *Cell Metab*, 2017, 25: 102-117.
- [10] Tongiani R, Chieli E, Malvaldi G. Circadian rhythm of dry mass and weight-class-pattern of the rat hepatocytes--effects of light-dark and feeding regimens [J]. *Acta Histochem*, 1982, 70: 78-88.
- [11] Leveille GA, Chakrabarty K. Diurnal variations in tissue glycogen and liver weight of meal-fed rats [J]. *J Nutr*, 1967, 93: 546-554.
- [12] Kast A, Nishikawa J, Yabe T, et al. Circadian rhythm of liver parameters (cellular structures, mitotic activity, glycogen and lipids in liver and serum) during three consecutive cycles in phenobarbital-treated rats [J]. *Chronobiol Int*, 1988, 5: 363-385.
- [13] Nishikawa J, Kast A, Albert H. Circadian rhythm of the liver of male rats dosed with phenobarbital--I. organ weight, cellular structures, glycogen contents and mitotic activity [J]. *Chronobiol Int*, 1987, 4: 161-173.
- [14] Philippens KM. The manipulation of circadian rhythms [J]. *Arch Toxicol*, 1976, 36: 277-303.
- [15] Kast A, Nishikawa J. Circadian rhythm of hepatocellular structures in rats dosed phenobarbital [J]. *Exp Pathol (Jena)*, 1979, 17: 546-560.
- [16] Montufar-Chaveznavar R, Trejo-Munoz L, Hernandez-Campos O, et al. Maternal olfactory cues synchronize the circadian system of artificially raised newborn rabbits [J]. *PLoS One*, 2013, 8: e74048.
- [17] Leung NW, Farrant P, Peters TJ. Liver volume measurement by

- ultrasonography in normal subjects and alcoholic patients [J]. *J Hepatol*, 1986, 2: 157-164.
- [18] Hall AP, Elcombe CR, Foster JR, et al. Liver hypertrophy: a review of adaptive (adverse and non-adverse) changes--conclusions from the 3rd International ESTP Expert Workshop [J]. *Toxicol Pathol*, 2012, 40: 971-994.
- [19] Weikum ER, Liu X, Ortlund EA. The nuclear receptor superfamily: a structural perspective [J]. *Protein Sci*, 2018, 27: 1876-1892.
- [20] Zhao PF, Fan SC, Gao Y, et al. Nuclear receptor-mediated hepatomegaly and liver regeneration: an update [J]. *Drug Metab Dispos*, 2022, 50: 636-645.
- [21] Jiang YM, Feng DC, Ma XC, et al. Pregnane X receptor regulates liver size and liver cell fate by Yes-associated protein activation in mice [J]. *Hepatology*, 2019, 69: 343-358.
- [22] Fan SC, Gao Y, Qu AJ, et al. YAP-TEAD mediates PPAR alpha-induced hepatomegaly and liver regeneration in mice [J]. *Hepatology*, 2022, 75: 74-88.
- [23] Yang XY, Downes M, Yu RT, et al. Nuclear receptor expression links the circadian clock to metabolism [J]. *Cell*, 2006, 126: 801-810.
- [24] Mukherji A, Kobiita A, Chambon P. Shifting the feeding of mice to the rest phase creates metabolic alterations, which, on their own, shift the peripheral circadian clocks by 12 hours [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2015, 112: E6683-E6690.
- [25] Cho H, Zhao X, Hatori M, et al. Regulation of circadian behaviour and metabolism by REV-ERB-alpha and REV-ERB-beta [J]. *Nature*, 2012, 485: 123-127.
- [26] Koronowski KB, Kinouchi K, Welz PS, et al. Defining the independence of the liver circadian clock [J]. *Cell*, 2019, 177: 1448-1462.e14.
- [27] Guan DY, Xiong Y, Trinh TM, et al. The hepatocyte clock and feeding control chronophysiology of multiple liver cell types [J]. *Science*, 2020, 369: 1388-1394.
- [28] Bougarne N, Weyers B, Desmet SJ, et al. Molecular actions of PPARalpha in lipid metabolism and inflammation [J]. *Endocr Rev*, 2018, 39: 760-802.
- [29] Cai X, Young GM, Xie W. The xenobiotic receptors PXR and CAR in liver physiology, an update [J]. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 2021, 1867: 166101.
- [30] Yang J, Yang X, Zhang YF, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha agonist induces mouse hepatomegaly through the spatial hepatocyte enlargement and proliferation [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2023, 44: 2037-2047.
- [31] Tian JN, Wang RM, Yang X, et al. Dynamic change of hepatocyte during PXR-induced liver enlargement [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2021, 56: 1360-1368.
- [32] Uchiyama Y. Rhythms in morphology and function of hepatocytes [J]. *J Gastroenterol Hepatol*, 1990, 5: 321-333.
- [33] Zmrzljak UP, Rozman D. Circadian regulation of the hepatic endobiotic and xenobiotic detoxification pathways: the time matters [J]. *Chem Res Toxicol*, 2012, 25: 811-824.
- [34] Gooley JJ, Chua EC. Diurnal regulation of lipid metabolism and applications of circadian lipidomics [J]. *J Genet Genomics*, 2014, 41: 231-250.
- [35] Reppert SM, Weaver DR. Coordination of circadian timing in mammals [J]. *Nature*, 2002, 418: 935-941.
- [36] Ikegami K, Refetoff S, Cauter EV, et al. Interconnection between circadian clocks and thyroid function [J]. *Nat Rev Endocrinol*, 2019, 15: 590-600.
- [37] Takahashi JS. Transcriptional architecture of the mammalian circadian clock [J]. *Nat Rev Genet*, 2017, 18: 164-179.
- [38] Partch CL, Green CB, Takahashi JS. Molecular architecture of the mammalian circadian clock [J]. *Trends Cell Biol*, 2014, 24: 90-99.
- [39] Patke A, Young MW, Axelrod S. Molecular mechanisms and physiological importance of circadian rhythms [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2020, 21: 67-84.
- [40] Liu HY, Hu P, Li YW, et al. Targeted inhibition of PPARalpha ameliorates CLA-induced hypercholesterolemia *via* hepatic cholesterol biosynthesis reprogramming [J]. *Liver Int*, 2022, 42: 1449-1466.
- [41] Schmutz I, Ripperger JA, Baeriswyl-Aebischer S, et al. The mammalian clock component PERIOD2 coordinates circadian output by interaction with nuclear receptors [J]. *Genes Dev*, 2010, 24: 345-357.
- [42] Canaple L, Rambaud J, Dkhissi-Benyahya O, et al. Reciprocal regulation of brain and muscle Arnt-like protein 1 and peroxisome proliferator-activated receptor alpha defines a novel positive feedback loop in the rodent liver circadian clock [J]. *Mol Endocrinol*, 2006, 20: 1715-1727.
- [43] Bosscher KD, Desmet SJ, Clarrise D, et al. Nuclear receptor crosstalk-defining the mechanisms for therapeutic innovation [J]. *Nat Rev Endocrinol*, 2020, 16: 363-377.
- [44] Jiao T, Yao X, Zhao Y, et al. Dexamethasone-induced liver enlargement is related to PXR/YAP activation and lipid accumulation but not hepatocyte proliferation [J]. *Drug Metab Dispos*, 2020, 48: 830-839.
- [45] Zhao YY, Yao XP, Jiao TY, et al. Schisandrol B promotes liver enlargement *via* activation of PXR and YAP pathways in mice [J]. *Phytomedicine*, 2021, 84: 153520.
- [46] Yao XP, Jiao TY, Jiang YM, et al. PXR mediates mifepristone-induced hepatomegaly in mice [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2022, 43: 146-156.
- [47] Guan DY, Xiong Y, Borck PC, et al. Diet-induced circadian enhancer remodeling synchronizes opposing hepatic lipid metabolic processes [J]. *Cell*, 2018, 174: 831-842.e12.