

DOI:10.13288/j.11-2166/r.2023.04.013

实验研究

二至丸不同时间给药对衰老性肝损伤模型小鼠肝组织生物钟相关因子 Bmal1、Cry1 表达的影响

马湘宇, 宫宇晴, 卫心怡, 冯梦林, 李三强, 段冷昕✉

河南科技大学基础医学院, 河南省洛阳市开元大道 263 号, 471000

[摘要] 目的 探讨不同时间给予二至丸对衰老性肝损伤的影响及可能作用机制。方法 60 只 C57 雄性小鼠随机分为正常对照组、模型组、二至丸 1:00 组、二至丸 7:00 组、二至丸 13:00 组、二至丸 19:00 组, 每组 10 只。除正常对照组外其余各组小鼠每日皮下注射 300 mg/kg D-半乳糖诱导衰老性肝损伤模型, 共 56 天。于造模第 11 天开始, 二至丸 1:00 组、二至丸 7:00 组、二至丸 13:00 组、二至丸 19:00 组分别于 1:00、7:00、13:00 和 19:00 给予二至丸 2.5 g/kg 灌胃, 正常对照组和模型组小鼠灌胃给予 0.01 ml/g 生理盐水, 连续 46 天。检测血清中丙氨酸氨基转移酶 (ALT)、门冬氨酸氨基转移酶 (AST) 和过氧化氢酶 (CAT)、超氧化物歧化酶 (SOD)、丙二醛 (MDA) 水平; HE 染色观察肝组织病理形态变化, Western blot 检测小鼠肝组织生物钟相关因子脑和肌肉芳香烃受体核转样蛋白 1 (Bmal1) 和隐花色素 1 (Cry1) 蛋白表达水平。结果 与正常对照组相比, 模型组小鼠肝组织出现广泛水肿样变, 细胞核固缩深染, 肝索排列紊乱等, 血清 ALT、AST、MDA 水平显著升高, 血清 SOD、CAT 及肝组织 Bmal1、Cry1 蛋白水平显著降低 ($P<0.01$); 与模型组相比, 二至丸 1:00 组和二至丸 7:00 组小鼠肝组织病理学变化均有明显的改善, 血清中的 ALT、AST、MDA 水平显著降低, 血清 SOD、CAT 及肝组织 Bmal1、Cry1 蛋白水平显著降低 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$), 二至丸 13:00 组和二至丸 19:00 组小鼠肝组织则表现出严重的病理性损伤, 血清 ALT、AST、SOD、CAT 和 MDA 水平, 肝组织 Cry1 蛋白水平差异无统计学意义 ($P>0.05$), 二至丸 19:00 组小鼠肝组织 Bmal1 蛋白水平明显升高 ($P<0.05$); 与二至丸 1:00 组比较, 二至丸 7:00 组小鼠血清 ALT 和 AST 水平显著升高, 肝组织 Bmal1、Cry1 蛋白水平, 二至丸 19:00 组肝组织 Bmal1 蛋白水平均明显降低 ($P<0.01$)。结论 二至丸对 D-半乳糖诱导的小鼠衰老性肝损伤具有显著的保护作用, 且其药理作用具有明显的时间差异性, 其中于 1:00 给予二至丸的改善作用更好, 作用机制可能与抗氧化应激、改善生物钟紊乱有关。

[关键词] 衰老; 肝损伤; 二至丸; 生物钟; 氧化应激

肝脏是人体最主要的代谢器官, 对维持体内环境稳定至关重要, 衰老是诱发肝脏疾病的重要因素^[1]。虽然目前尚无有效途径阻止或逆转衰老过程, 但仍然可以通过改变生活方式或药物来实现“健康老龄化”^[2]。最新研究表明, 生物钟与衰老相关疾病的发生发展具有密切的联系^[3-5], 且生物钟在药物的代谢和疗效中发挥重要作用^[6]。因此, 利用人体生物节律特点, 于合理的时间给予药物治疗, 或可充分发挥药物的抗衰老性肝损伤作用, 降

低药物的不良反应, 提高用药安全性和有效性。

二至丸由女贞子、墨旱莲组成, 是滋阴补血、补益肝肾的经典方剂。研究表明, 二至丸具有良好的抗衰老和护肝作用^[7-8]。时辰药理学是研究与时间相关的机体对药物的生理反应, 包括药理效应与毒性、药动学和生物利用度等随给药时间不同而发生变化的规律的学科。人体的生理功能、疾病的发生发展、药物的治疗作用都与生物钟具有密切的关系^[9]。肝脏作为重要的生物钟节律性器官, 其本身的生物节律会影响治疗药物的药理作用^[10]。本研究拟采用 D-半乳糖诱导衰老性肝损伤小鼠模型, 通过不同时间点给予二至丸干预, 对二至丸抗衰老

基金项目: 国家自然科学基金 (82170606); 河南省科技攻关计划 (21A360001)

✉ 通讯作者: lengxinduan@163.com

性肝损伤的机制及其时辰药理作用特点进行探讨。本研究通过河南科技大学第一附属医院医学伦理委员会审查。

1 材料与方法

1.1 动物

清洁级健康雄性 C57BL/6 小鼠 60 只, 8 周龄, 体质量 (22 ± 2) g, 购于河南斯克贝斯生物科技股份有限公司, 实验动物合格证号: SCXK (鄂) 2020-0005。常规饲喂, 自由进食、饮水, 期间保持通气良好, 温度 $21 \sim 26^{\circ}\text{C}$, 湿度 $50\% \sim 70\%$, 12 h 光/暗循环, 实验开始前适应性喂养 1 周。

1.2 药物、试剂与仪器

二至丸(江西药都樟树制药, 批号: Z36021716); D-半乳糖(上海麦克林生化科技有限公司, 批号: C10588756); 丙氨酸氨基转移酶 (ALT, 批号: 20210426)、门冬氨酸氨基转移酶 (AST, 批号: 202101013)、过氧化氢酶 (CAT, 批号: 20210428)、超氧化物歧化酶 (SOD, 批号: 20210426) 和丙二醛 (MDA, 批号: 20210428) 试剂盒, 南京建成生物工程研究所; 脑和肌肉芳香烃受体核转运样蛋白 1 (Bmal1) 抗体 (美国 Abcam 公司, 批号: GR3340956-5); 隐花色素 1 (Cry1) 抗体 (批号: 00091739)、 β -actin 抗体 (批号: 10004413), 中国武汉三鹰生物技术有限公司; 苏木素 (批号: JX194603)、伊红 (批号: ZH203004), 塞维尔生物科技有限公司; RIPA 裂解液 (Biosharp 公司, 批号: 70110001); BCA 试剂盒 (索莱宝生物科技有限公司, 批号: 20210608); 增强型化学发光试剂 (上海碧云天生物技术有限公司, 批号: 082020210120)。

全波长酶标仪 (美国 Bio-Tek 公司, 型号: Epoch); 倒置显微镜 (德国 Leica 公司, 型号: DMI 4000B); ChemiDoc XRS+ 化学发光成像系统 (上海天能科技有限公司, 型号: Tanon 5200multi); 离心机 (美国赛默飞世尔科技有限公司, 型号: Fresco17)。

1.3 动物分组及处理

将 60 只小鼠采用随机数字表法分为正常对照组、模型组、二至丸 1: 00 组、二至丸 7: 00 组、二至丸 13: 00 组、二至丸 19: 00 组, 每组 10 只。除正常对照组外其余各组小鼠每日皮下注射 300 mg/kg D-半乳糖诱导衰老性肝损伤模型^[11], 正常对照组小鼠皮下注射 0.01 ml/g 生理盐水, 共 56 天。模型组小鼠出现动作迟钝, 皮毛黯淡松弛、大量脱落等衰老表现, 且模型组血清肝损伤相关指标 ALT、AST 水平与正常对照组相比明显升高, 差异

有统计学意义 ($P < 0.05$), 即为造模成功^[12-14]。于造模第 11 天开始, 二至丸 1: 00 组、二至丸 7: 00 组、二至丸 13: 00 组、二至丸 19: 00 组分别于 1: 00、7: 00、13: 00 和 19: 00 给予二至丸 2.5 g/kg 灌胃, 正常对照组和模型组小鼠灌胃给予 0.01 ml/g 生理盐水, 连续 46 天。

1.4 观察指标及方法

末次给药后次日 16: 00 时将各组小鼠摘眼球取血, 4°C 、 $12\,000 \text{ r/min}$ (离心半径 8 cm) 离心 20 min , 取血清。脱臼处死, 取肝脏。

1.4.1 血清生化指标 根据试剂盒检测说明, 测定小鼠血清中 ALT、AST 活性水平, 以及 CAT、SOD、MDA 的含量。

1.4.2 HE 染色观察小鼠肝组织病理 将肝脏组织置于 4% 多聚甲醛溶液中固定 72 h 后, 进行脱水、蜡浸、石蜡包埋、切片, 常规 HE 染色, 显微镜下观察各组小鼠肝组织病理学变化。

1.4.3 免疫印迹法 (Western blot) 检测小鼠肝组织生物钟相关因子 Bmal1 和 Cry1 蛋白表达 采用随机数字表法, 每组选取 6 只小鼠, 各取肝脏组织 0.1 g 于冰上使用 RIPA 裂解液提取小鼠肝脏组织总蛋白, 检测蛋白浓度, 进行 SDS-PAGE 凝胶电泳 (120 V , 1.5 h), 转膜 (200 mA , 2 h), 5% 脱脂奶粉封闭 1 h , 加入一抗 (Bmal1 $1:1000$, Cry1 $1:2000$, β -actin $1:10\,000$), 4°C 孵育过夜, 加入二抗 (过氧化物辣根酶标记, $1:4000$), 室温下孵育 1 h 。加入增强型化学发光试剂, 并于化学发光成像系统中曝光显影, 记录印记信号, 通过 Image J 1.48 软件对蛋白条带进行灰度值定量分析。

1.5 统计学方法

采用 SPSS 22.0 软件对数据进行分析, 计量资料均符合正态分布及方差齐性, 以均值 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 多重比较采用单因素方差分析, 采用 LSD 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 各组小鼠血清生化指标比较

表 1 示, 与正常对照组相比, 模型组小鼠血清 ALT、AST、MDA 水平显著升高, SOD 和 CAT 水平显著降低 ($P < 0.01$); 与模型组相比, 二至丸 1: 00 组和二至丸 7: 00 组小鼠血清 ALT、AST、MDA 水平显著降低, SOD 和 CAT 水平显著升高 ($P < 0.01$), 二至丸 13: 00 组和二至丸 19: 00 组血清 ALT、AST、SOD、CAT 和 MDA 水平差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 与二至丸 1: 00 组相比, 二至丸

表 1 各组小鼠血清生化指标水平比较 (x̄±s)

组别	鼠数	ALT/U·L ⁻¹	AST/U·L ⁻¹	SOD/U·ml ⁻¹	CAT/U·ml ⁻¹	MDA/nmol·ml ⁻¹
正常对照组	10	52.84 ± 5.55	43.53 ± 8.76	144.44 ± 13.63	9.68 ± 0.99	5.77 ± 1.21
模型组	10	212.07 ± 12.53 ^{a)}	380.56 ± 36.93 ^{a)}	112.44 ± 11.59 ^{a)}	6.21 ± 1.21 ^{a)}	9.98 ± 2.12 ^{a)}
二至丸 1: 00 组	10	84.16 ± 6.24 ^{b)}	90.36 ± 9.00 ^{b)}	135.41 ± 10.93 ^{b)}	8.68 ± 1.25 ^{b)}	6.09 ± 1.00 ^{b)}
二至丸 7: 00 组	10	144.16 ± 12.91 ^{b) c)}	178.87 ± 12.07 ^{b) c)}	136.22 ± 13.24 ^{b)}	8.32 ± 1.11 ^{b)}	6.55 ± 0.81 ^{b)}
二至丸 13: 00 组	10	204.79 ± 13.48	369.25 ± 29.86	119.33 ± 13.11	6.32 ± 1.11	9.15 ± 1.38
二至丸 19: 00 组	10	203.53 ± 12.90	353.50 ± 22.33	122.59 ± 15.19	6.66 ± 0.74	8.64 ± 1.73

注: ALT, 丙氨酸氨基转移酶; AST, 门冬氨酸氨基转移酶; SOD, 超氧化物歧化酶; CAT, 过氧化氢酶; MDA, 丙二醛。
a) 与正常对照组比较, $P<0.01$; b) 与模型组比较, $P<0.01$; c) 与二至丸 1: 00 组比较, $P<0.01$ 。

7: 00 组小鼠血清 ALT 和 AST 水平显著升高 ($P<0.01$), SOD、CAT、MDA 水平差异无统计学意义 ($P>0.05$)。

2.2 各组小鼠肝组织病理情况

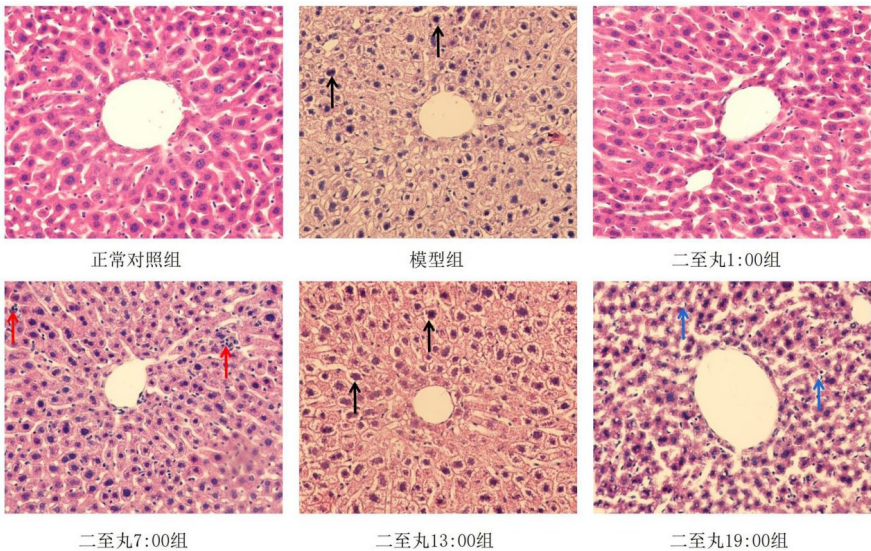
HE 染色结果显示, 正常对照组小鼠肝组织肝索排列整齐, 肝细胞形态正常。与正常对照组相比, 模型组肝小叶结构破坏, 肝索排列紊乱, 肝细胞出现广泛水肿现象, 胞质疏松浅染, 细胞体积增大, 区域界线不清, 细胞核深染, 核质边界不清; 与模型组相比, 二至丸 1: 00 组小鼠的肝组织肝索排列整齐清晰, 肝细胞核质形态显著改善, 二至丸 7: 00 组小鼠肝小叶结构相对完整, 肝索排列整齐, 肝细胞形态明显改善, 但改善效果不如二至丸 1: 00 组, 存在少量炎细胞聚集的现象。二至丸 13: 00 组和二至丸 19: 00 组小鼠肝组织则表现出严重的病理性损伤, 肝小叶结构损伤, 肝索排列紊乱, 肝细胞核深染, 核质边界不清晰, 其中二至丸 13: 00 组表现为肝细胞水肿样变, 二至丸 19: 00 组表现为空泡样变, 见图 1。

2.3 各组小鼠肝组织生物钟相关因子蛋白表达比较

表 2 示, 与正常对照组相比, 模型组小鼠肝组织生物钟相关因子 Bmal1 和 Cry1 蛋白表达显著下降 ($P<0.01$); 与模型组相比, 二至丸 1: 00 组、二至丸 7: 00 组和二至丸 19: 00 组小鼠肝组织 Bmal1 蛋白表达, 二至丸 1: 00 组、二至丸 7: 00 组 Cry1 蛋白表达均明显升高 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$); 与二至丸 1: 00 组比较, 二至丸 7: 00 组 Bmal1 和 Cry1 蛋白表达, 二至丸 19: 00 组 Bmal1 蛋白表达均明显降低 ($P<0.01$)。各组小鼠肝组织生物钟因子 Bmal1 和 Cry1 蛋白电泳图见图 2。

3 讨论

“天人合一”的整体观念是中医的核心理论之一, 其强调人体生理病理活动与外在环境具有整体性^[15]。在《黄帝内经》、《中藏经》和《四时用药例》等著作中, 均提到了人体生理功能、药物和疾病三者间的相互影响、疾病转归与服药昼夜变化的关系, 且中医药中“择时给药”与“因时制宜”的



注: 图中黑色箭头表示肝细胞水肿, 红色箭头表示炎细胞聚集, 蓝色箭头表示肝细胞空泡样变。
图 1 各组小鼠肝脏组织病理表现 (HE 染色, ×200)

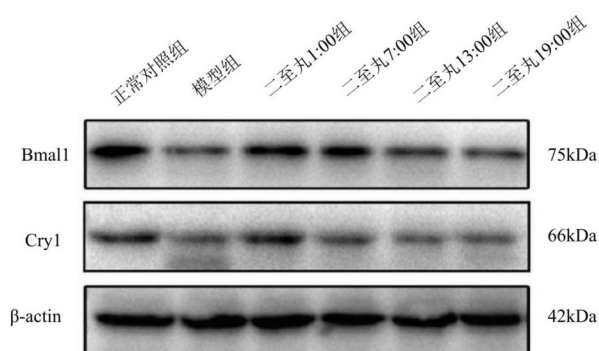
表2 各组小鼠肝组织 Bmal1 和 Cry1 蛋白相对

表达水平比较 ($/\beta$ -actin, $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	Bmal1	Cry1
正常对照组	6	0.91 ± 0.04	0.83 ± 0.08
模型组	6	0.49 ± 0.05 ^{a)}	0.36 ± 0.11 ^{a)}
二至丸 1:00 组	6	0.88 ± 0.02 ^{b)}	0.78 ± 0.04 ^{b)}
二至丸 7:00 组	6	0.70 ± 0.06 ^{b) d)}	0.59 ± 0.11 ^{c) d)}
二至丸 13:00 组	6	0.58 ± 0.06	0.45 ± 0.11
二至丸 19:00 组	6	0.62 ± 0.08 ^{c) d)}	0.52 ± 0.10

注: Bmal1, 脑和肌肉芳香烃受体核转样蛋白 1; Cry1, 隐花色素 1。

a) 与正常对照组比较, $P < 0.01$; b) 与模型组比较, $P < 0.01$; c) 与模型组比较, $P < 0.05$; d) 与二至丸 1:00 组比较, $P < 0.01$ 。



注: Bmal1, 脑和肌肉芳香烃受体核转样蛋白 1; Cry1, 隐花色素 1。

图2 各组小鼠肝组织生物钟因子 Bmal1 和 Cry1 蛋白电泳图

思想与现代时辰药理学一致^[16]。近年来, 时辰药理学研究发现生物钟可影响药物的吸收、分布、代谢、排泄, 进而影响药物的浓度和药效^[17-18], 因此, 通过结合人体生物钟特点, 选择合理时间给予药物治疗, 或可达到增加药物疗效、减少不良反应的效果。

衰老是一个复杂的病理生理过程, 人至老年气血逐渐衰竭, 脏腑功能减退, 阴阳失衡, 出现白发增多、体力下降、智力减退等表现, 易出现中风、眩晕、震颤等老年病。中医理论认为, 五脏虚损与衰老相关, 《灵枢·天年》中记载: “五十岁, 肝气始衰, 肝叶始薄, 胆汁始减, 目始不明”, 说明古代医家早已经认识到肝脏损伤与衰老有密切的联系。二至丸以女贞子为君, 以墨旱莲为臣, 女贞子味甘苦, 性平, 入肝肾经, 《本草备要》中指出, 其具有“益肝肾, 安五脏, 强腰膝, 明耳目, 乌须发, 补风虚, 疗百病”之功, 主治肝肾不足之头晕、耳鸣、腰膝酸软、须发早白等。墨旱莲味甘酸性寒, 入肝肾经, 可补肝肾阴, 凉血止血, 治疗肝肾阴虚之头昏目眩、须发早白等。两药配伍, 被广泛用于肝肾阴虚所致的口苦咽干、失眠、健忘、多

梦易醒、头昏头痛、腰膝酸软、须发早白等症状^[19]。现代医学理论认为, 肝脏是人体最主要的药物代谢器官, 且其具有独立的昼夜节律, 随着衰老的进展, 肝脏功能下降, 最终导致肝损伤的产生^[20]。因此, 本研究旨在以肝脏生物节律特点为基础, 通过不同时间给予衰老肝损伤小鼠以二至丸治疗, 以探究二至丸在衰老性肝损伤中的时辰药理特点, 为二至丸的临床用药提供一定的指导和理论依据。

D-半乳糖可通过引起肝脏代谢紊乱, 而诱发肝损伤, 常用于构建化学性肝损伤模型^[21], 其可以通过氧化应激和细胞凋亡途径诱导机体的衰老, 且症状类似于自然衰老过程^[22]。因此, 本研究通过 D-半乳糖诱导小鼠衰老性肝损伤。氧化应激假说是衰老机制中的经典学说, 其认为在衰老过程中, 人体的抗氧化成分减少, 导致清除自由基的能力减弱, 进而导致体内生物大分子结构损伤的增龄性累积^[23], 其中 SOD、CAT 和 MDA 是用于评估氧化应激状态的重要生化指标, 在本研究中用以反映氧化应激水平, 间接提示衰老的程度^[24]。ALT 和 AST 则用于评估肝脏功能或肝损伤情况^[25]。

本研究结果显示, 模型组小鼠出现动作迟钝、皮毛黯淡松弛、大量脱落等衰老表现, 肝损伤相关指标 ALT 和 AST 及氧化应激相关指标 MDA 水平显著提高, SOD, CAT 水平下降; HE 染色结果显示模型组小鼠肝脏表现出严重的病理损伤, 具有明显的水肿样变、空泡样变、炎症浸润和凋亡现象, 这与已报道的衰老性肝损伤的结果^[26-28]一致, 说明衰老性肝损伤模型构建成功。而在不同时间给予二至丸治疗后, 各给药组小鼠出现了明显的疗效差异。于 1:00 和 7:00 给予二至丸后, 血清 ALT 和 AST 水平显著下降, 其中 1:00 给药血清 ALT 和 AST 水平下降较 7:00 更为明显, 说明于 1:00 给予二至丸治疗可更好地发挥二至丸的抗衰老性肝损伤的药理作用。在氧化应激指标的检测结果中, 于 1:00 和 7:00 给予二至丸后, 衰老性肝损伤小鼠体内 SOD 和 CAT 水平均上升, MDA 水平下降, 提示此时段给予二至丸有效提高了小鼠机体的抗氧化能力, 降低了脂质过氧化水平。在肝组织 HE 染色结果中, 1:00 和 7:00 给予二至丸后, 小鼠肝组织及肝细胞结构均有改善, 但 7:00 给予二至丸治疗后, 小鼠肝组织中仍具有炎细胞聚集的现象, 而 1:00 给予药物治疗后, 却未出现此现象, 说明于 1:00 给予药物治疗更能有效抑制 D-半乳糖对小鼠肝脏造成的损伤作用。以上结果从整体上反映了

二至丸抗衰老性肝损伤药理作用具有显著的时间差异性,于 1:00 给予二至丸或能够更好地发挥二至丸的抗衰老性肝损伤药理作用。

Bmal1 和 Cry1 作为生物钟核心因子,参与机体节律的调控^[29]。研究发现,Bmal1 参与调控细胞周期的同步性和节律性以及肝再生过程中脂质的积累,促进肝细胞的再生过程^[30]。Cry1 是一种新的葡萄糖代谢调节剂,参与肝脏生物钟和机体代谢的调节^[31]。本研究结果显示,与正常对照组相比,模型组小鼠 Bmal1 和 Cry1 蛋白表达量均明显降低,提示衰老小鼠生物钟发生紊乱,于 1:00 和 7:00 给予二至丸后,Bmal1、Cry1 蛋白表达量均表现出不同程度的升高,其中于 1:00 给予二至丸时 Bmal1、Cry1 蛋白表达升高趋势更为明显,这与前述结果具有一致性,提示二至丸或能通过增加生物钟相关因子的表达,改善衰老所致生物钟紊乱发挥治疗作用。

综上,二至丸对 D-半乳糖所致小鼠衰老性肝损伤具有显著保护作用,且其药理作用具有明显的时间差异性,其中于 1:00 给予二至丸防治的效果最佳,机制可能与二至丸的抗氧化应激和改善生物节律紊乱作用相关。由于本研究中以小鼠为动物模型,其生物节律特点与人类具有较大差异,因此仍需作进一步的临床验证,为二至丸抗衰老性肝损伤的时辰药理作用提供依据。

参考文献

- [1] PAPTAEODORIDI AM, CHRYSAGVIS L, KOUTSILIERIS M, et al. The role of senescence in the development of nonalcoholic fatty liver disease and progression to nonalcoholic steatohepatitis [J]. *Hepatology*, 2020, 71 (1): 363-374.
- [2] ZIA A, FARKHONDEH T, POURBAGHER-SHAHRI AM, et al. The role of curcumin in aging and senescence: molecular mechanisms [J]. *Biomed Pharmacother*, 2021, 134:111119. doi: 10.1016/j.biopha. 2020. 111119.
- [3] FERNANDES J, GOMES CDS, GUERRA RO, et al. Frailty syndrome and risk of cardiovascular disease: analysis from the international mobility in aging study [J]. *Arch Gerontol Geriatr*, 2021, 92: 104279. doi: 10.1016/j.archger. 2020. 104279.
- [4] JAGUST WJ, LANDAU SM, Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative. Temporal dynamics of β -amyloid accumulation in aging and Alzheimer disease [J]. *Neurology*, 2021, 96(9):e1347-e1357.
- [5] BERBEN L, FLORIS G, WILDIERS H, et al. Cancer and aging: two tightly interconnected biological processes [J].

- Cancers (Basel)*, 2021, 13(6):1400.
- [6] LIN Y, WANG S, ZHOU Z, et al. Bmal1 regulates circadian expression of cytochrome P450 3a11 and drug metabolism in mice [J]. *Commun Biol*, 2019, 2: 378. doi: 10.1038/s42003-019-0607-z.
- [7] 方哲, 陈素红, 方慧, 等. 草还丹、人参固本丸和二至丸对 D-半乳糖致衰老模型小鼠抗衰老作用的研究 [J]. *浙江中西医结合杂志*, 2019, 29(7):543-547.
- [8] 段冷昕, 高杨, 胡举, 等. 二至丸对四氯化碳致小鼠急性肝损伤的防护作用及机制 [J]. *中国药理学与毒理学杂志*, 2018, 32(6):462-468.
- [9] ZHAO P, XU P, WAN C, et al. Evening versus morning dosing regimen drug therapy for hypertension [J]. *Cochrane Database Syst Rev*, 2011, 2011(10):CD004184. doi: 10.1002/14651858.
- [10] KAPSE S, ANDO H, FUJIWARA Y, et al. Effect of a dosing-time on quetiapine-induced acute hyperglycemia in mice [J]. *J Pharmacol Sci*, 2017, 133(3):139-145.
- [11] AZMAN KF, SAFDAR A, ZAKARIA R. D-galactose-induced liver aging model: Its underlying mechanisms and potential therapeutic interventions [J]. *Exp Gerontol*, 2021, 150:111372. doi: 10.1016/j.exger. 2021. 111372.
- [12] CHEN P, LEI J, CHEN F, et al. Ameliorative effect of urolithin A on d-gal-induced liver and kidney damage in aging mice via its antioxidative, anti-inflammatory and antiapoptotic properties [J]. *RSC Adv*, 2020, 10 (14): 8027-8038.
- [13] HOSOKAWA M, KASAI R, HIGUCHI K, et al. Grading score system: a method for evaluation of the degree of senescence in senescence accelerated mouse (SAM) [J]. *Mech Ageing Dev*, 1984, 26(1):91-102.
- [14] 雷玮, 王丹丹, 葛广波, 等. 肝损伤血清标志物研究进展 [J]. *实用肝脏病杂志*, 2017, 20(2):252-256.
- [15] 姜青松, 王庆其. 论以中医理论指导中药研究 [J]. *中医杂志*, 2017, 58(14):1175-1179.
- [16] 柴天川, 王红英. 浅谈中医择时用药 [J]. *中医杂志*, 2011, 52(02):177-179.
- [17] LU D, ZHAO M, CHEN M, et al. Circadian clock-controlled drug metabolism: implications for chronotherapeutics [J]. *Drug Metab Dispos*, 2020, 48(5):395-406.
- [18] GACHON F, FIRSOV D. The role of circadian timing system on drug metabolism and detoxification [J]. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*, 2011, 7(2):147-158.
- [19] 王浩, 庄威, 薛晓鸥. 中药复方二至丸考源、沿革及现代药理研究进展 [J]. *辽宁中医药大学学报*, 2017, 19 (12):93-97.
- [20] PINTO C, NINOLE E, GAGGIANO L, et al. Aging and the biological response to liver injury [J]. *Semin Liver Dis*, 2020, 40(3):225-232.

- [21]彭芳,翟培红,王雷达. 实验性肝损伤动物模型制备及指标测定的评价[J]. 大理医学院学报, 2001, 10(3): 74-77.
- [22]MIN F, SUN H, WANG B, et al. Hepatoprotective effects of hydroxysafflor yellow a in D-galactose-treated aging mice [J]. Eur J Pharmacol, 2020, 881: 173214. doi: 10.1016/j.ejphar.2020.173214.
- [23]原慧萍,杨泽. 氧化应激与衰老研究进展[J]. 中国老年保健医学, 2015, 13(5): 14-17.
- [24]GIL P, FARIÑAS F, CASADO A, et al. Malondialdehyde: a possible marker of ageing [J]. Gerontology, 2002, 48(4): 209-214.
- [25]黎明高. 肝脏疾病诊断中采取血清 ALT、AST、GGT 检测的临床应用[J]. 中外医学研究, 2018, 16(11): 179-181.
- [26]ARAVINTHAN A, VERMA S, COLEMAN N, et al. Vacuolation in hepatocyte nuclei is a marker of senescence [J]. J Clin Pathol, 2012, 65(6): 557-560.
- [27]LI H, ZHAI B, SUN J, et al. Antioxidant, anti-aging and organ protective effects of total saponins from aralia taibaiensis [J]. Drug Des Devel Ther, 2021, 15: 4025-4042. doi: 10.2147/DDDT.S330222.
- [28]赵凡凡,李肖,高丽,等. 甘草水提取物干预 D-半乳糖致衰老大鼠的肝脏代谢组学研究[J]. 中草药, 2017, 48(17): 3545-3553.
- [29]PARICO GCG, PEREZ I, FRIBOURGH JL, et al. The human CRY1 tail controls circadian timing by regulating its association with CLOCK; BMAL1 [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2020, 117(45): 27971-27979.
- [30]JIANG H, GARCIA V, YANUM JA, et al. Circadian clock core component Bmal1 dictates cell cycle rhythm of proliferating hepatocytes during liver regeneration [J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2021, 321(4): G389-G399.
- [31]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): 268-281.

Effect of *Erzhi Pill* (二至丸) of Different Dosing Time on the Expression of Biological Clock-related Factors *Bmal1* and *Cry1* in the Liver Tissue of Aging Liver Injury Model Mice

MA Xiangyu, GONG Yuqing, WEI Xinyi, FENG Menglin, LI Sanqiang, DUAN Lengxin

School of Basic Medicine, Henan University of Science and Technology, Luoyang, 471000

ABSTRACT Objective To explore the effect and related mechanism of *Erzhi Pill* (二至丸) given at different times on the liver injury of aging mice. **Methods** Sixty C57 male mice were randomly divided into normal control group, model group and four *Erzhi Pill* groups of 1:00, 7:00, 13:00 and 19:00, with ten mice in each group. Except for the normal control group, mice were given subcutaneous injected of D-galactose (D-gal) at a dose of $300 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ for 56 consecutive days to establish the aging liver injury model. The *Erzhi Pill* groups were given $2.5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ *Erzhi pill* at different time (1:00, 7:00, 13:00, 19:00) from the 11th day of modelling and lasted for 46 days. Meanwhile, the mice in the normal control group and model group were given $0.01 \text{ ml} \cdot \text{g}^{-1}$ of normal saline by gavage. The serum levels of alanine transaminase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD), and malonic dialdehyde (MDA) were detected. The HE staining was used to assess the pathological changes of liver tissue. The protein expression of *Bmal1* and *Cry1* in liver were detected by Western blot. **Results** Compared to those in the normal control group, the liver tissue of the mice in the model group showed extensive edema-like changes, nuclear pyknosis and deep staining, and disorderly arranged hepatic cords; the serum levels of ALT, AST and MDA in the model group increased significantly ($P < 0.01$), while serum SOD and CAT levels decreased, as well as the protein expression of *Bmal1* and *Cry1* in the liver tissue ($P < 0.01$). Compared to those in the model group, the liver histopathological changes were significantly improved in the *Erzhi Pill* 1:00 group and 7:00 group, with significantly decreased ALT, AST and MDA levels and increased SOD, CAT levels and protein expression of *Bmal1* and *Cry1* ($P < 0.05$ or $P < 0.01$); there were severe pathological damage in the liver tissue in the *Erzhi Pill* 13:00 group and 19:00 group, both having no significant differences in serum ALT, AST, SOD, CAT and MDA levels and *Cry1* protein expression compared to the model group ($P > 0.05$); the *Erzhi Pill* 19:00 group had higher *Bmal1* protein expression than the model group ($P < 0.05$). Compared to those in the *Erzhi Pill* 1:00 group, the serum ALT and AST levels in the *Erzhi Pill* 7:00 group significantly increased, while the *Bmal1* and *Cry1* protein levels in the *Erzhi Pill* 7:00 group, and the *Bmal1* protein level in the *Erzhi Pill* 19:00 group significantly decreased ($P < 0.01$). **Conclusion** *Erzhi Pill* shows significant protective effect against aging liver injury induced by D-gal in mice, with obvious difference in the pharmacological effect when given at different times, among which administration at 1:00 works best. The mechanism may be related to oxidative stress and improvement of biological clock disorder.

Keywords aging; liver injury; *Erzhi Pill* (二至丸); biological clock; oxidative stress

(收稿日期: 2022-04-28; 修回日期: 2022-09-30)

[编辑: 王利芬]