

DOI:10.12174/j.issn.2096-9600.2026.03.04

# 季节变化对 CUMS 模型动物肝脏 BSEP 基因 mRNA 表达的影响\*

倪祥惠<sup>1</sup>, 吴菁<sup>2</sup>, 郭正阳<sup>3</sup>, 林川烘<sup>4</sup>

1 山东省第二人民医院/山东省耳鼻喉医院, 山东 济南 250000;

2 宁德市紧急救援中心, 福建 宁德 352000; 3 长葛市人民医院, 河南 长葛 461500;

4 万宁市中医院, 海南 万宁 571500

**[摘要]** 目的: 观察季节变化对慢性轻度不可预见性应激(chronic unpredictable mild stress, CUMS)模型动物肝脏胆酸盐输出泵(bile salt export pump, BSEP)基因 mRNA 表达的影响。方法: 选用健康雄性 SD 大鼠, 分别于春分、夏至、秋分、冬至前 1 周购入, 随机分为正常组与 CUMS 模型组; 采用 CUMS 法构建肝失疏泄动物模型, 通过实时荧光定量 TaqMan 检测肝脏组织中 BSEP 基因 mRNA 表达水平, 分析其变化规律。结果: 与同一季节正常组比较, CUMS 组大鼠肝脏 BSEP 基因 mRNA 表达水平均显著增高; 秋季各组大鼠肝脏 BSEP 基因 mRNA 表达水平均较春季组明显降低。结论: BSEP 基因表达存在季节性变化特征, 且该变化可能与肝主疏泄功能存在相关性。

**[关键词]** 肝主疏泄; 慢性轻度不可预见性应激; 四时五脏阴阳; 胆酸盐输出泵基因

**[中图分类号]** R223 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 2096-9600(2026)03-0018-04

## Influences of Seasonal Changes on BSEP Gene mRNA Expressions in the Liver of CUMS Animal Models

NI Xianghui<sup>1</sup>, WU Jing<sup>2</sup>, GUO Zhengyang<sup>3</sup>, LIN Chuanhong<sup>4</sup>

1 Shandong Second Provincial General Hospital/Shandong Provincial ENT Hospital, Jinan 250000, China;

2 Ningde Emergency Center, Ningde 352000, China; 3 Changge People's Hospital, Changge 461500, China;

4 Wanning Hospital of TCM, Wanning 571500, China

**Abstract** Objective: To observe the influences of seasonal changes on bile salt export pump (BSEP) gene mRNA expressions in the liver of CUMS animal models. Methods: Healthy male Sprague-Dawley (SD) rats were purchased one week before the vernal equinox, summer solstice, autumnal equinox, and winter solstice, respectively, and they were randomized into the normal group and CUMS model group. CUMS method was adopted to construct animal models of liver failing to govern free coursing, TaqMan real-time quantitative PCR was applied to detect the levels of BSEP gene mRNA in liver, and to analyze the trends. Results: Compared with the normal group in the same season, CUMS group exhibits the elevated expressions of BSEP gene mRNA in liver; BSEP gene mRNA expressions in liver of the rats from all groups in autumn were lower than these in spring remarkably. Conclusion: The expressions of BSEP gene reveal seasonal changes, and the changes may be related to liver governing free coursing.

**Keywords** liver governs free coursing; CUMS; four seasons, five viscera, Yin and Yang; BSEP

藏象理论是中医学理论体系的核心组成部分, 而“四时五脏阴阳”理论则是藏象理论的重要组成部分之一。

“四时五脏阴阳”理论最早由程士德教授提出, 是在中医学“天人相应”的整体观念指导下, 将人体以五脏为中心的五大活动功能体系与自然界的四时阴阳变化统一起来, 探讨外界环境对人体生理、病理的影响及其规律性的理论体系, 从而进一步认识藏象理论的实质, 是研究藏象理论的重

要途径<sup>[1]</sup>。肝是中医学藏象理论中的五脏之一, 在五行中属木, 应春季。肝脏的生理功能与春季的气候变化之间存在密切联系, 主要体现在对肝疏泄功能的影响方面, 即春季肝气的生发、疏泄之力增强, 处于主导地位, 在其他季节, 肝则处于相对从属的地位, 协助或抑制其他四脏以维持机体应时而变, 使得机体始终保持在一个相对稳定的状态<sup>[2]</sup>。

本研究以孤养结合慢性轻度不可预见性应激

(chronic unpredictable mild stress, CUMS)为造模方法,模拟肝失疏泄的动物模型,观察生理和病理条件下季节变化对肝脏胆酸盐输出泵(bile salt export pump, BSEP)基因 mRNA 表达量的影响,探讨 BSEP 基因表达的季节性节律,以期进一步明确季节变化对肝主疏泄功能的影响。

### 1 材料与方法

**1.1 动物** 分别于春分、夏至、秋分、冬至前1周购入6周龄 SPF 级雄性 SD 大鼠各20只,总计80只,体质量170~190 g,购于解放军第三军医大学实验动物中心,许可证号:SCXK-(军)2012-0003,SCXK-(军)2012-0011,SCXK-(渝)2012-0005。其中夏至批次购于湖南省长沙市天勤生物技术有限公司,许可证号:SCXK(湘)2009-0012。

**1.2 试剂** 动物组织总 RNA 提取试剂盒(批号: CW0581),由北京康为世纪生物科技有限公司提供;逆转录试剂盒(批号:4368814),TaqMan® Universal Master Mix II, no UNG, 2X(批号:4428174),BSEP 基因(批号:1065502)及管家基因 Gapdh(批号:1239726)均由 Applied Biosystems 公司提供。

**1.3 仪器** ABI 7500 型实时荧光 PCR 仪(美国应用生物系统公司),5810R 型 Eppendorf 台式高速冷冻离心机(德国艾本德公司),NanoDrop 2000 型微量核酸蛋白检测仪(美国 Thermo Scientific),T10 型电动微量匀浆机(德国 IKA),HH-2 型恒温水浴锅(浙江金坛亿通电子有限公司),88000 型-80 °C 冰箱(美国 Thermo Forma)。

**1.4 动物分组** 每季实验大鼠适应性喂养1周,按随机数字表法抽出8只大鼠进入 CUMS 组,其余大鼠进入正常组,但可以随时因 CUMS 组实验大鼠意外死亡补入,实验过程保证 CUMS 组不少于8只。本实验共购入80只大鼠,但最终完成取材的实验大鼠有64只,有16只大鼠意外死亡,死亡大鼠均发生在 CUMS 组,不足8只则由正常组补入。

**1.5 孤养结合 CUMS 模型的制备** 每只 CUMS 组大鼠均进行单笼孤养。CUMS 模型的制备在金光亮等<sup>[3]</sup>提出的造模方法的基础上根据自身实际情况进行操作,将7种刺激[1)45 min 无规则水平摇晃;2)45 °C 热刺激5 min;3)12 h 禁水;4)24 h 禁食;5)行为限制;6)12 h 昼夜颠倒;7)4 °C 冷水游泳5 min]随机安排到21天内,每天随机2种,并且保证相邻两天不重复同一种刺激。

**1.6 环境的控制** 实验地点在贵阳中医学院,实验室温度控制在春季11~20 °C,夏季19~26 °C,秋季13~21 °C,冬季5~12 °C,湿度不控

制,光照时间除昼夜颠倒组严格按昼夜12小时颠倒外,其余按自然光照室内放置不予干预。

**1.7 标本采集** 所有动物于造模后第22天,用10%水合氯醛按照0.3 mL/100 g 进行腹腔麻醉,将麻醉好的大鼠固定于鼠板上,沿腹正中线切开,剑突下方找到肝脏,取适量样本在0.9%氯化钠溶液中漂洗去除血污,分装放入冻存管内并加入适量 RNA 保存液,然后将所取的样本放于-80 °C 冰箱中保存待测。

**1.8 实时荧光定量 TaqMan 探针法检测肝脏 BSEP 基因 mRNA 表达** 取30~50 mg 肝脏组织,严格按照试剂盒说明提取总 RNA。在微量核酸蛋白检测仪上检测样品 RNA 含量并进行逆转录合成 cDNA。PCR 扩增:TaqMan® Universal Master Mix II 10 μL, TaqMan® Assay 1 μL, 样本 cDNA 1 μL, RNase-Free water 8 μL。扩增条件:1)95 °C 10 min;2)95 °C 10 s, 60 °C 1 min, 40 个循环,反应结束后以  $2^{-\Delta\Delta CT}$  值计算 BSEP 基因 mRNA 的表达量。

**1.9 统计学方法** 各组数据用  $\bar{x} \pm s$  表示,运用 SPSS 17.0 统计软件进行分析,组间比较采用单因素方差分析,以  $P < 0.05$  为差异具有统计学意义,以  $P < 0.01$  为差异具有显著统计学意义。

## 2 结果

与同一季节正常组比较,CUMS 组 BSEP 基因 mRNA 的表达量均有所增加,且冬季 CUMS 组与冬季正常组之间比较,差异有显著统计学意义( $P < 0.01$ );夏季 CUMS 组与夏季正常组之间比较,差异有显著统计学意义( $P < 0.01$ );冬季正常组 BSEP 基因 mRNA 的表达量明显高于其他三季,差异均具有显著统计学意义( $P < 0.01$ );冬季 CUMS 组 BSEP 基因 mRNA 的表达量也明显高于其他三季,差异均有显著统计学意义( $P < 0.01$ );夏季正常组较春季正常组 BSEP 基因 mRNA 的表达量减少,且差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。见表1、图1。

表1 不同季节正常组、CUMS 组 BSEP 基因 mRNA 表达量比较( $\bar{x} \pm s$ )

季节	正常组		CUMS 组	
	例数	$2^{-\Delta\Delta CT}$ 值	例数	$2^{-\Delta\Delta CT}$ 值
春季	8	1.5721 ± 0.9173 <sup>△</sup>	8	1.7602 ± 0.8154 <sup>△</sup>
夏季	7	0.0587 ± 0.0368 <sup>△▲</sup>	8	0.8053 ± 0.3593 <sup>△○</sup>
秋季	10	1.0148 ± 0.5094 <sup>△</sup>	8	1.7569 ± 1.2332 <sup>△</sup>
冬季	7	4.5772 ± 2.9346	8	20.7096 ± 19.8501 <sup>○</sup>

注:与冬季组比较,△表示  $P < 0.01$ ;与春季组比较,▲表示  $P < 0.05$ ;与同一季节正常组比较,○表示  $P < 0.01$ 。

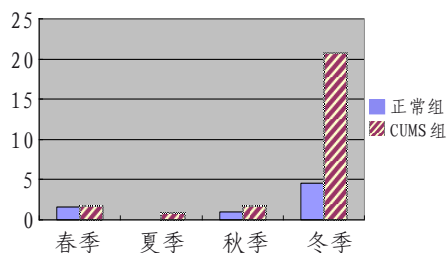


图1 不同季节正常组、CUMS组BSEP基因mRNA表达量

### 3 讨论

本实验共有80只大鼠,最终完成取材的实验大鼠有64只,有16只CUMS组大鼠意外死亡,由正常组补入,补入大鼠虽有时间延迟但不长,未对实验结果产生影响。

本实验采用样本纵横双向比较设计:纵向时序比较聚焦于四季正常组与CUMS组的BSEP基因mRNA表达水平,结果显示:1)正常组与CUMS组的BSEP基因mRNA表达水平均呈现夏季最低、冬季最高的趋势,由此提示,肝脏BSEP基因mRNA表达水平与季节存在直接相关性,但该相关性可能并非直接关联四季本身,而是与不同季节的气温变化相关;2)正常组中,冬季肝脏BSEP基因mRNA表达水平最高,与其他季节相比差异均有显著统计学意义;夏季表达水平最低,且与春季相比差异具有显著统计学意义,提示正常组实验动物肝脏BSEP基因mRNA表达具有一定的季节性节律;3)CUMS组中,冬季肝脏BSEP基因mRNA表达水平最高,与其他季节相比差异均具有显著统计学意义;春、夏、秋三季间差异无统计学意义,提示CUMS组仍存在季节性节律,但春、夏、秋三季因实验干预导致的表达变化差异无统计学意义。

横向样本比较聚焦于同一时段正常组与CUMS组的BSEP基因mRNA表达水平,结果显示:春、夏、秋、冬各季节CUMS组BSEP基因mRNA表达水平均较正常组呈增加趋势,且夏季、冬季两组间的表达水平差异有显著统计学意义,提示实验干预对动物肝脏BSEP基因mRNA表达的影响存在季节性差异;但该季节性差异在四季中的表现并不一致,提示相同实验干预在不同季节条件下的作用效果存在差异——实验动物对实验干预的表达差异反应以冬季最为明显,夏季次之,进一步提示季节因素可能影响实验干预的结果。

“四时五脏阴阳”理论首见于《素问·六节藏象论篇》:“心者,生之本,神之变也……此至阴之类也,通于土气。”《素问·脏气法时论篇》亦言:“肝主春,足厥阴少阳主治……心主夏,手少阳太阳主治……脾主长夏,足太阴阳明主治……肺主秋,手太阴阳明主治……肾主冬,足少阴太阳主治”。两篇

均强调自然界四时节气与人体五脏的对应关系:肝、心、脾、肺、肾五脏系统分别与四时相应,主导相应季节中各脏腑系统的协调与调控,维系人体正常生命活动。其中“肝应春”的核心体现为季节对肝疏泄功能的影响——若肝疏泄功能未能顺应自然气候节律,出现疏泄太过或不及,则易引发相关病理变化。正如《素问·四气调神大论篇》所言:“故阴阳四时者,万物之终始也,死生之本也,逆之则灾害生,从之则苛疾不起,是谓得道。”

“肝主疏泄”理论有着悠久的源流演变。“疏泄”一词最早见于《素问·五常政大论篇》:“发生之纪,是谓启陈,土疏泄,苍气达。”此处“疏泄”与后世“肝主疏泄”的内涵差异显著,核心关乎“脾土”与“肝木”的密切关联,属土与木关系的统摄性论述。至金元四大家之一朱丹溪在《格致余论·阳有余阴不足论》中提出“主闭藏者肾也,司疏泄者肝也”,后文又载:“二者皆有相火,而其系上皆属于心。心君火也,为物所感则易动,心动则相火亦动,动则精自走,相火翕然而起,虽不交会,亦暗流而疏泄矣。”可见朱丹溪“相火论”对“肝主疏泄”内涵发展影响深远,但核心围绕精液藏泄展开。结合明代戴思恭、赵献可两位医家均认为“肝主疏泄”针对精液藏泄而言,更印证了朱丹溪“司疏泄者肝也”的论述核心为精液藏泄功能。

此后医家不断补充完善该理论:清代陈梦雷在《古今图书集成医部全录》中首次明确提出“肝主疏泄”,使该理论既涵盖肝的条达之性,又明确其疏泄之能;唐容川从生理、病理双层面论述肝之疏泄与脾胃水谷运化的关系;近代医家张锡纯则将“肝主疏泄”拓展至全身气机疏泄,进一步拓展其理论外延。新中国成立后,随着中医药教材的整理编撰,至上世纪80年代中期,“肝主疏泄”被统一界定为肝的核心生理功能之一并载入教材<sup>[4]</sup>,其内涵多表述为:肝气具有疏通、畅达全身气机的作用。该功能与情志活动密切相关:疏泄太过易致烦躁易怒,疏泄不及则易引发情志抑郁;反之,情志异常亦会影响肝的疏泄功能。

抑郁症属中医“肝郁证”范畴,其核心病机为肝失疏泄、气机郁滞。肝疏泄功能失常可致气机不畅,进而表现为情志抑郁、心烦易怒、时作太息等症状,这与抑郁症“快感缺乏”的核心特征具有相似性。如金光亮等<sup>[5]</sup>提出,肝郁证临床表现虽复杂多样,但核心症状为情志抑郁、多愁善感,其本质是兴趣与愉悦感减退,与抑郁症核心症状高度契合。这为肝主疏泄与抑郁症的关联搭建了理论桥梁,使通过CUMS造模法研究肝疏泄功能成为

可能,因此现代中医研究肝郁证相关疾病多采用CUMS模型。

CUMS模型起源于20世纪60年代后期,Katz采用电击法成功构建人类抑郁症首个应激模型——慢性可变应激模型(CVS)。20世纪80年代后期,Willner在该模型基础上进行两方面优化:一是降低CVS模型中应激刺激的强度,二是将“快感缺乏”作为造模成功的核心评价标准,正式命名为慢性轻度不可预见性应激模型,即CUMS模型<sup>[6]</sup>。其理论基础与抑郁症的发病机制高度契合,即慢性、低水平应激源可诱发并加速疾病进展。CUMS通过对动物施加长期、温和、多样且不可预见的刺激,模拟人类社会生活中的各类应激状态,可复现重度抑郁症的核心症状(如运动能力、社会交往能力及探索能力下降、快感缺乏等)。该模型具有制备简便、稳定性强、可持续性好等优势,是目前国内外研究抑郁症的常用动物模型,亦是筛选抗抑郁药物、研究抑郁症病理生理机制的理想模型。因此,本研究采用CUMS模型与正常组对照,探究不同季节大鼠肝脏BSEP基因mRNA的表达特征。

中医学“肝藏象”理论所指的“肝”,与解剖学上的肝脏并非同一概念,但中医学中“肝”具有促进胆汁分泌、调节脾胃运化的功能,且肝与胆互为表里,胆汁为“肝之余气”所化生。若肝疏泄功能失常、气机逆乱,则会导致胆汁分泌与排泄异常。因此,选取解剖学肝脏中与胆汁代谢相关的指标,可间接反映中医学肝藏象的功能状态。

BSEP主要表达于肝脏,具有底物特异性,负责介导胆汁酸盐从毛细胆管分泌,是胆汁生成的核心驱动力。WANG等<sup>[7]</sup>的研究表明,BSEP基因失活可导致肝脏胆汁酸盐分泌减少,胆固醇与磷脂含量相对升高,其中胆固醇分泌增加尤为显著。上述改变会显著提高胆汁中胆固醇饱和度,使其达到易形成结石的过饱和状态。

前期研究发现,实验干预可影响模型动物胆汁中胆固醇浓度<sup>[8]</sup>;季节变化可影响模型动物与正常动物中枢神经递质5-羟色胺的浓度<sup>[9]</sup>,且亦会影响模型动物胆汁中胆固醇浓度<sup>[10]</sup>;此外,肝疏泄功能变化还可影响模型动物SRBI基因mRNA的表达<sup>[11]</sup>。基于上述研究,我们推测季节变化可能影响肝脏BSEP基因mRNA的表达水平,后续数据处理结果亦提示,季节、肝功能状态与BSEP基因mRNA表达水平之间存在关联。

本实验结果显示,与同季节正常组相比,春、夏、秋、冬四季CUMS组大鼠肝脏BSEP基因mRNA表达水平均显著升高,其中冬季CUMS组升高尤为显著,提示CUMS模拟的肝失疏泄状态可上调BSEP基

因mRNA的表达水平;无论正常组还是CUMS组,BSEP基因mRNA表达水平均呈现“冬季最高、春季次之、夏季最低”的规律:正常组冬季表达水平与春、夏、秋季比较,差异均具有极显著统计学意义,春季与夏季比较差异具有统计学意义;CUMS组冬季表达水平与春、夏、秋季比较,差异亦均具有极显著统计学意义。上述结果表明,季节变化可影响肝脏BSEP基因mRNA的表达水平,且该影响不受机体生理或病理状态的干扰,但该变化规律与中医学“肝应春、肝旺于春”的理论不完全契合。

正常组中,春季BSEP基因mRNA表达水平高于夏、秋季。结合CUMS组的四季变化特征,可得出结论:BSEP基因表达具有季节性变化特点,且该变化与肝疏泄功能存在相关性。但该季节性变化的影响因素及具体调控机制尚未明确,仍需进一步深入探究。此外,本研究亦提示,CUMS造模效果可能受季节环境的影响。

#### 参考文献

- [1] 程士德. 四时五藏阴阳整体论思想[J]. 北京中医学院学报, 1982,5(4):1-3.
- [2] 陈玉萍,马淑然,王庆国,等. 中医“肝应春”理论内涵的探讨[J]. 中华中医药杂志,2011(5):1172-1175.
- [3] 金光亮,南睿,郭霞珍. 慢性应激肝郁大鼠模型的建立[J]. 北京中医药大学学报,2003,26(2):18-21.
- [4] 赵迪,任杰,安海燕. 肝主疏泄源流研究[J]. 西部中医药, 2016,29(7):58-60.
- [5] 金光亮,王胜兰. 关于建立肝郁证动物模型的思考[J]. 山东中医药大学学报,2004,28(6):408-409.
- [6] WILLNER P, TOWELL A, SAMPSON D, et al. Reduciton of glucose preference by chronic unpredictable mild stress and its restoration by a tricyclic antidepressant[J]. *Phychopharmacy*, 1987,93(3):358-364.
- [7] WANG R, SALEM M, YOUSEF I M, et al. Targeted inactivation of sister of P-glycoprotein gene (spgp) in mice results in nonprogressive but persistent intrahepatic cholestasis[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001,98(4):2011-2016.
- [8] 倪祥惠,赵博,曹峰,等. 肝主疏泄对模型动物胆固醇浓度的影响[J]. 江西中医药,2014,45(11):21-22.
- [9] 吴菁,倪祥惠,赵博,等. 从“肝应春”理论探讨肝主疏泄对中枢神经递质5-羟色胺浓度的影响[J]. 中华中医药杂志, 2015,30(2):513-515.
- [10] 林川烘,倪祥惠,吴菁,等. 春夏季节变化对模型动物胆汁中胆固醇浓度的影响[J]. 中医学报,2015,43(6):13-15.
- [11] 郭正阳,倪祥惠,赵博,等. 肝主疏泄功能对模型动物SRBI基因mRNA表达的影响[J]. 中国中医基础医学杂志,2016, 22(7):904-905.

收稿日期:2025-08-30

\*基金项目:国家自然科学基金(81160418)。

作者简介:倪祥惠(1968—),男,硕士学位,硕士研究生导师,教授。研究方向:中医教学、科研与临床工作。Email:p1kmnxh@163.com。