

· 中医药研究动物模型制备规范专题 ·

[编者按] 动物模型是现代医药研究的重要基石,也是开展中医药现代研究的重要手段。动物模型的应用对中医病因病机的探讨、中药疗效与毒性的特点及机制研究、中医药理论的发展等都是至关重要的。如何建立与临床更相似的动物模型是开展相关研究的关键所在。一个好的动物模型除了应满足“三性”特征,即发病机理的同源性、行为表象的一致性、药物治疗的可预见性,同时也应具有较好的可操作性、重现性、稳定性、经济性与可比性。为更好开展中医药现代研究,有必要对已有的中医药研究相关动物模型进行规范。

本专题相关动物模型制备规范(草案)以中医药外用研究相关动物模型为主,基于疾病中西医临床病症特点对现有动物模型进行系统分析,在大量实验研究基础上,形成了相应实验动物模型制备规范(草案)。同时,对动物模型的表征指标、生化指标、病理指标等进行量化分级,以利于模型成功与否及模型变化的判断,以期使中医药研究相关动物模型的制备及评价方法更趋客观化、规范化。

白癜风动物模型制备规范(草案)

中华中医药学会 中药实验药理专业委员会

[摘要] 白癜风是一种获得性色素脱失皮肤病,发病率 0.5% ~ 1%^[1]。发病人群以年轻人偏多,易诊难治,影响美观^[2]。目前白癜风的发病机制尚不明确,可能与遗传因素、自身免疫、精神创伤、神经化学因子、黑素细胞自身破坏等因素有关。现白癜风动物模型为病理性动物模型,以西医指标为主。基于对白癜风中西医临床病症特点分析及对现有动物模型大量实验研究,形成如下白癜风动物模型制备规范(草案),以为为该模型的相关研究提供参考。

[关键词] 白癜风; 动物模型; 规范

[中图分类号] R758.4+1;TU202;R285 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2017)24-0001-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2017240001

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20170706.1012.002.html>

[网络出版时间] 2017-07-06 10:12

Specifications for Preparation of Vitiligo Models (Draft)

Traditional Chinese Medicine Experimental Pharmacology Professional Committee,
China Association of Chinese Medicine

[Abstract] Vitiligo is an acquired depigmentation of the skin, incidences of which is 0.5% to 1%. The incidences of vitiligo in young people tend to be more, easy to diagnose and difficult to treat, which affects the appearance. At present, the pathogenesis of vitiligo is not clear, relating to genetic factors, autoimmune, trauma, neurochemical factors, destruction of melanocytes and so on. Now, the animal model of vitiligo is a pathological animal model with western medicine as the main index. Based on the analysis of the clinical characteristics of vitiligo in Chinese and western medicine and a large number of experimental studies on existing animal models, this article forms the following specifications (draft) for the preparation of animal models of vitiligo.

[Key words] vitiligo; animal models; specifications

[收稿日期] 20170620(011)

[基金项目] 国家“十一五”科技支撑计划项目(2008BAI53B09);河南省中原学者项目(162101510003);国家国际合作基地项目(国科外函(2016)65号)

1 造模动物

可用于制备白癜风模型的动物有豚鼠(黑、灰、棕、黄色)^[3], C57BL 小鼠, Smyth line (SL) 鸡, 狗和猫等, 以豚鼠应用最多。常采用成年动物, 雌雄各半。

2 造模方法

2.1 氢醌脱色法制备豚鼠白癜风模型

2.1.1 原理 氢醌抑制酪氨酸酶(TYR)催化酪氨酸转化为黑色素, TYR 是黑色素合成的限速酶。也有认为氢醌脱色实质上是一种 TYR 介导的细胞毒作用, 氢醌分子易扩散进入黑素细胞的黑素体, 阻断黑色素生成途径的一个或多个步骤。

2.1.2 方法 体重 200 g 左右, 花黑色豚鼠, 雌雄各半, 背部脱毛, 脱毛面积约 4 cm × 4 cm, 脱毛后用生理盐水清洗脱毛局部, 局部脱毛区均无损伤。每日在豚鼠脱毛区均涂 3% 氢醌甘油液 1 mL, 每天 2 次, 上午和下午各 1 次(每次 0.5 mL, 每次先涂 0.25 mL, 10 min 后再同量涂 1 次), 连续 50 d, 可制备豚鼠白癜风模型。在此期间, 各组豚鼠每 3 d 脱毛 1 次。本模型可持续 50 ~ 60 d。

2.2 过氧化氢脱色法制备豚鼠白癜风模型

2.2.1 原理 根据黑色素不稳定, 易受强氧化剂过氧化氢破坏的特性, 破坏皮肤黑色素, 使皮肤脱色, 建立白癜风模型。

2.2.2 方法 体重 200 g 左右, 花黑色豚鼠, 雌雄各半, 背部脱毛, 脱毛面积约 4 cm × 4 cm。脱毛后用生理盐水清洗脱毛局部, 局部脱毛区均无损伤。在脱毛区涂 5% 过氧化氢溶液 1 mL, 每天 2 次, 上午和下午各 1 次(每次 0.5 mL, 每次先涂 0.25 mL, 10 min 后再同量涂 1 次), 连续 50 d, 可制备豚鼠白癜风模型。在此期间, 各组豚鼠每 3 d 脱毛 1 次。本模型可持续 50 ~ 60 d。

2.3 莫诺苯宗乳膏脱色法制备小鼠白癜风模型^[4]

2.3.1 原理 通过 TYR 与活性氧自由基(ROS)的相互作用, 引起系统性的自身免疫反应, 并作用于黑素细胞, 从而导致色素脱失, 与职业暴露性的白癜风无明显差异。

2.3.2 方法 C57BL/6 小鼠, 雄性(雌性), 体重 20 g 左右, 脱去背部黑色毛, 脱毛面积约 2 cm × 2 cm, 脱毛后用生理盐水清洗脱毛局部, 局部脱毛区均无损伤。每天用刮勺稍用力涂抹 40% 莫诺苯宗乳膏 50 mg, 每天 1 次; 连续 50 d, 可制备小鼠白癜风模型。本模型可持续 50 ~ 65 d。

3 模型指标

3.1 表观指标 色素多少、色素面积大小、干燥脱屑情况等为白癜风的主要表观指标, 可对这些表观指标进行量化积分或半量化分级。白癜风动物模型制备成功后, 病变局部无色素, 皮肤呈苍白或白斑状, 干燥伴明显脱屑等。表观指标是临床白癜风的主要诊断依据, 也应是模型判定的依据, 权重系数 0.5。

3.2 病理指标 局部组织病理指标是高倍镜下观察含黑色素毛囊数、含黑素颗粒的细胞个数^[5]。白癜风动物模型制备成功后局部组织形态观察, 可见棘层明显增厚, 角质层增生明显^[6]; 按 Lillie 硫酸亚铁染色法黑色素染色试剂盒说明书进行黑色素染色, 黑色素毛囊数显著降低; 高倍镜下随意观察基底细胞和棘层细胞颗粒, 可见有黑素颗粒的细胞个数显著减少。病理指标是白癜风动物模型病理变化的直接依据, 为直接相关指标, 权重系数 0.3。

3.3 生化指标 白癜风的发生与体内血清 TYR 活性密切相关, 与胆碱酯酶(CHE)^[7], 单胺氧化酶(MAO)活性, 丙二醛(MDA), 白细胞介素-6(IL-6)及肿瘤坏死因子- α (TNF- α)含量等有一定关系。白癜风动物模型制备成功后, TYR 活性明显下降, CHE 和 MAO 活性升高, MDA, IL-6 和 TNF- α 的含量均增加。生化指标是白癜风动物模型发生、发展、康复过程的机体反映, 有一定价值, 但特异性不高, 权重系数 0.2。

4 备注

白癜风造模方法较多, 本规范介绍的是与白癜风中西医临床病症特点吻合度较高且应用较多的动物模型^[8]。还有直接使用白癜风动物, 例如 SL 鸡、白癜风狗和猫等, 因存在价格昂贵、应用不便等问题, 致使应用不多, 故未纳入本标准草案。

白癜风动物模型制备规范(草案)起草说明

1 造模动物

常用于制备白癜风模型的动物有豚鼠(黑、灰、

棕、黄色), C57BL 小鼠, SL 鸡^[9], 大鼠, 白癜风狗和猫等, 以豚鼠应用最多。一般为成年动物, 雌雄

各半。

2 饲养环境

动物饲养环境应符合 GB 14925-2010 实验动物环境与设施,《实验动物管理条例》,《实验动物国家标准》,《关于善待实验动物的指导性意见》,《中华人民共和国动物保护法》等要求,符合相应标准及等级动物饲养环境的要求。

3 造模原理及评价依据

白癜风主要临床表现为皮损处色素脱失,呈乳白色;大小、形态不一,边缘境界清楚。白癜风的现代发病机制至今尚无定论,但与遗传因素、自身免疫、精神创伤、神经化学因子、黑素细胞自身破坏等密切相关。现白癜风动物模型为病理模型,多采用化学脱色法(氢醌、过氧化氢法和莫诺苯宗乳膏脱色法)造模。

白癜风模型主要体现的是西医指标特点,参照 2002 年东南大学出版社朱文元主编的《白癜风与黄褐斑》制定的白癜风标准^[10]:①后天性色素脱失斑或色素减退斑;②皮损界限清楚且形态不规则;③皮损边缘色素加深;④皮损内毛发可变白或可见毛囊口周围复色现象;⑤ W00d 灯下白斑呈瓷白色。上述条件①为必要条件,有 3 项成立可确诊为白癜风。

3.1 氢醌脱色法制备豚鼠白癜风模型^[11]

3.1.1 原理 氢醌又名对苯二酚,其是由苯胺氧化成苯醌,再经还原而成。氢醌对皮肤具有脱色素作用,其机制是阻断 TYR,使酪氨酸不能转化为多巴和多巴醌,从而抑制黑色素合成,造成在形态上与白癜风相似。也有学者认为,氢醌脱色实质上是一种 TYR 介导的细胞毒作用,氢醌分子易扩散进入黑素细胞的黑素体,阻断黑色素生成途径的一个或多个步骤,同时氢醌在 TYR 作用下被氧化生成有毒性的半醌基物质,后者使细胞膜发生脂质过氧化,破坏细胞膜性结构,最终导致细胞死亡。

3.1.2 与临床指标吻合情况 符合西医指标①,②,④,⑤,吻合度 $\geq 70\%$ 。

3.1.3 注意事项 应注意氢醌的质量直接影响模型。根据研究目的不同,使用氢醌脱色法造模所选取的动物亦有不同,如 C57BL 小鼠主要用于毛囊黑素细胞增殖与分化的调节与白癜风复色的研究;豚鼠常用于研究紫外线诱导的色素沉着和白癜风治疗中的补骨脂素光化学疗法以及用于 TYR 抑制剂和防晒剂的药效学研究。

3.2 过氧化氢脱色法制备豚鼠白癜风模型^[12]

3.2.1 原理 根据黑色素不稳定,易受强氧化剂过

氧化氢破坏的特性,采用 5% 过氧化氢外用,使豚鼠黑色皮肤脱色。

3.2.2 与临床指标吻合情况 符合西医指标①,②,④,⑤,吻合度 $\geq 70\%$ 。

3.2.3 注意事项 使用化学脱色剂 5% 过氧化氢氧化脱色时,所用涂抹的工具要柔软,应用中要反复涂抹,促进药物的渗透,以保证皮肤脱色效果。5% 过氧化氢最好现配现用,以防其氧化效果减弱而影响脱色效果。

3.3 莫诺苯宗乳膏脱色法制备小鼠白癜风模型

3.3.1 原理 通过 TYR 与 ROS 的相互作用,引起系统性的自身免疫反应并作用于黑素细胞,从而导致色素脱失,与职业暴露性的白癜风相似。

3.3.2 与临床指标吻合情况 符合西医指标①,②,④,吻合度 $\geq 50\%$ 。

3.3.3 注意事项 所用涂抹工具要柔软,涂抹动作应轻柔;应用中要反复涂抹,促进药物的渗透,保证皮肤脱色效果。外用莫诺苯宗乳膏后,可能通过溶解莫诺苯宗暴露细胞和释放因子,首先在用药部位出现斑点状脱色,在非用药部位出现明显脱色,如耳朵和尾巴等。区别于其他化学脱色剂诱导的白癜风模型。

4 观测指标

4.1 表观指标——I 类指标(核心指标) 白癜风最直接判定标准是表观指标的变化,这是临床诊断的依据,也应是判断模型成功与否的核心指标。临床上以外观变化为诊断标准,模型建立后,色素减少、色素面积变小、皮肤严重干燥脱屑。根据表观指标的特点,可对表观指标进行 4 个分级,有利于模型的判断。表观指标权重系数 0.5。可根据色素面积进行评分(也可通过图像分析系统测定面积),可对白癜风动物模型的表观指标进行 4 个分级:无变化者为 0 分,色素面积 $> 50\%$ 为 1 分,色素面积 $< 50\%$ 为 2 分,皮肤呈苍白或白斑状为 3 分。见表 1。

表 1 白癜风动物模型表观指标分级

Table 1 Classification of apparent indexes of vitiligo animal models

分级	色素减少情况	色素面积大小	干燥脱屑程度
1	无减少	基本正常	无干燥脱屑
2	轻度减少	色素面积 $> 50\%$	轻度干燥不脱屑
3	中度减少	色素面积 $< 50\%$	干燥伴轻度脱屑
4	重度减少	皮肤呈苍白或白斑状	干燥伴明显脱屑

4.2 病理指标——Ⅱ类指标(直接相关指标) 白癜风动物模型局部皮肤病理变化是模型成功与否的直接证据,模型制备成功后,取各组动物脱毛区中央约 1 cm × 1 cm 皮肤,固定、切片,高倍镜可见棘层明显增厚、角质层增生明显;按 Lillie 硫酸亚铁反应法黑色素染色试剂盒说明书进行黑色素染色,高倍镜下随机观察可见基底细胞和棘层细胞颗粒有黑素颗粒的细胞个数显著减少。

白癜风动物模型局部病理观察分级参考标准为“-”表示皮肤表皮黑色素颗粒正常,真皮浅层未见单核细胞浸润;“+”表示皮肤表皮黑色素颗粒少量缺乏,真皮浅层可见少量单核细胞浸润;“++”表示皮肤表皮黑色素颗粒明显缺乏,真皮浅层可见较多单核细胞浸润;“+++”表示皮肤表皮黑色素颗粒显著缺乏,真皮浅层可见大量单核细胞浸润。病理学观察可以更准确、更直接地说明白癜风的组织的组织微观情况,权重系数 0.3。

4.3 生化指标——Ⅲ类(间接相关指标) TYR 是酪氨酸转变成黑色素的关键酶,TYR 的活性直接影响黑色素的多少。酪氨酸在 TYR 的催化下氧化成多巴,继续氧化为多巴醌,再与半胱氨酸结合后,氧化聚合为黑色素。黑素细胞及角质形成细胞分泌的多巴胺也可氧化成多巴醌。MAO 在黑素细胞黑色素合成过程中具有重要作用,多巴胺在细胞内及细胞外自身氧化产生活性氧簇,在 MAO 催化下产生过氧化氢,过氧化氢聚集导致黑色素合成减少。

氧化应激已被作为诱发黑素细胞减少导致白癜风的因素之一。MDA 是脂质过氧化反应的终产物和作为氧化应激的具体指标。CHE 活性增强时,乙酰胆碱代谢增加,在突触间隙内含量减少,致使副交感神经功能减弱而交感神经功能增强,导致黑色素合成减少。MDA 水平和 CHE 活性的异常变化将减少黑素合成,诱发白癜风的发生。

模型制备成功后,相应指标也出现变化,TYR 活性明显下降;CHE 活性升高;MAO 活性明显增加;MDA 含量增加;IL-6 和 TNF- α 含量增加。生化指标变化是白癜风发生、发展、康复过程的机体反映,也是模型成功与否的指征,但特异性稍低,权重系数 0.2。

4.5 指标分类 将以上指标进行分类并确定各类指标权重系数,结果见表 2。

白癜风动物模型 I, II, III 类指标均按整体为 1 进行各自的量化积分^[13-14],如白癜风动物模型同一类的表现指标(I)是由色素多少、色素面积大小、

表 2 白癜风动物模型各类指标权重系数

Table 2 Weight index of various indexes of vitiligo animal models

指标	级别	分类	权重系数
I 类	核心指标	表现指标	0.5
II 类	直接相关指标	局部皮肤病理指标	0.3
III 类	间接相关指标	生化指标	0.2

干燥脱屑程度等指标组成的,目前是按同一贡献度计算的;如表现指标有 3 项,积分时各项小指标均为 1/3,该指标最高分值为 1/3。如具体每一类指标中有特殊重要的指标,可参照指标分类时的权重,再对同一类指标中的小指标进行不同的权重分类。II, III 类指标的计算同此。

每一类指标造模成功之后的总积分,乘以相应指标的权重,将 3 类指标再相加,即为白癜风动物模型复制成功时的总积分。按照上述方法计算后,其中氢醌脱色法制备豚鼠白癜风模型总积分约 0.85,过氧化氢脱色法制备豚鼠白癜风模型总积分约 0.80,莫诺苯宗乳膏脱色法制备小鼠白癜风模型总积分约 0.77。白癜风动物模型制备成功率相对较高,每次造模可能会出现不同的总积分,为保证每次制备该模型基本一致,建议总积分可以有 20% 左右的偏差,以此作为评价白癜风动物模型成功与否的标准。所得总积分 > 0.60,则可认为该模型制备成功。本草案所采用的计算方法及所得总积分仅供参考,研究者可根据不同制备模型方法及所观测指标的不同另行计算并作适当调整。

4.6 说明 本草案及起草说明中的权重系数提示的仅是该类指标在白癜风模型制备及判定中的重要性,不是绝对的。研究者可根据具体白癜风模型防治的实验,适当进行调整。表现指标、病理指标所采用的分级方法,可能因在不同的白癜风模型中采用标准不一致,分级也会有所差异;所列生化指标也可能未全面涵盖白癜风相关的所有指标。上述标准及指标重点是给研究者提示,应根据各类指标对白癜风模型的贡献度不同进行分级,尽量将单纯的定性描述转变成可量化或半量化的指标,提高判定的可控性;所列的具体分级、指标等是供参考的,可根据具体白癜风实验研究的特点,增加、减少或另行设定。

[起草人] 苗明三, 闫晓丽, 乔靖怡, 曹利华

[参考文献]

[1] Nicolaidou E, Antoniou C, Miniati A, et al. Childhood and later onset vitiligo have diverse epidemiologic and

- clinical characteristics[J]. J Am Acad Dermatol, 2012, 66(6):954-958.
- [2] Jalel A, Yassine M, Hamdaoui M H. Oxidative stress in experimental vitiligo C57BL/6 mice [J]. Indian J Dermatol, 2009, 57(4):221-224.
- [3] MIAO M S, LIU D D, QIAO J Y. Effect of psoraleae gel on vitiligo animal pathological pattern [J]. Adv Mater Res, 2013, 850/851:1263-1266.
- [4] 祝逸平, 王遂泉, 卢良君, 等. 卤米松、黄芩提取物联合用药对白癜风小鼠模型的影响 [J]. 中国药理学通报, 2014, 30(4):554-558.
- [5] 朱小兰, 盛国荣, 杨永美. 补骨脂酊对实验性白癜风模型的影响 [J]. 中药药理与临床, 2014, 30(6):115-117.
- [6] 江雪, 钱思宇, 郑文豪. 不同中药复方治疗豚鼠白癜风模型疗效比较 [J]. 国际检验医学杂志, 2015, 36(18):2672-2673, 2676.
- [7] 盛国荣. 退白汤对实验性白癜风动物模型的治疗作用 [J]. 中药药理与临床, 2011, 27(6):88-90.
- [8] 尹海明, 符梦思, 李胜存, 等. 中西医对白癜风病因的对比分析 [J]. 辽宁中医杂志, 2017, 44(1):20-23.
- [9] 路建伟, 路风琴, 路世忠, 等. 白癜风动物模型研究进展与思考 [J]. 湖南中医杂志, 2014, 30(4):188-190.
- [10] 朱文元. 白瘫风与黄褐斑 [M]. 南京:东南大学出版社, 2002:124-125.
- [11] 高莉, 霍仕霞, 彭晓明, 等. 高良姜素对氢醌诱导的白癜风小鼠模型的影响 [J]. 中草药, 2014, 45(16):2358-2363.
- [12] 艾瑛, 喻国华. 抗白汤对实验性白癜风豚鼠的治疗作用 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(13):152-156.
- [13] 马瑞雪, 苗明三. 一种中药药效的多指标评价新方法——综合权重法 [J]. 中药新药与临床药理, 2011, 22(5):569-572.
- [14] 苗明三, 白明. 中药外用药理实验技术规范(草案) [J]. 中药药理与临床, 2014, 30(4):128-130.

[责任编辑 刘德文]