

湿疹动物模型制备规范(草案)

中华中医药学会 中药实验药理专业委员会

[摘要] 湿疹是一种临床常见的过敏性、炎症性皮肤病,是由各种原因引起的慢性复发性疾病,常反复发作。因目前湿疹的发病机制尚不确定,现动物模型只是反映湿疹的某些特点,多为急性湿疹动物模型。基于对湿疹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,形成如下湿疹动物模型制备规范(草案),以期为该模型的相关研究提供参考。

[关键词] 湿疹;动物模型;规范;起草说明;评价指标

[中图分类号] R758.23;TU202;R285 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2017)24-0006-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2017240006

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20170706.1013.004.html>

[网络出版时间] 2017-07-06 10:13

Specifications for Preparation of Eczema Models (Draft)

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

[Abstract] Eczema is a common type of allergic and inflammatory skin disease, which is caused by various causes and recurrent attacks. Because the pathogenesis of eczema is uncertain, the present animal model only reflects some characteristics of eczema, and most of these models are acute eczema. Based on the analysis of the characteristics of clinical symptoms of Chinese and western medicine in eczema and the large number of experimental studies on the existing animal models, this article forms the following specifications (draft) for the preparation of animal models of eczema.

[Key words] eczema; animal models; specifications; drafting; evaluation index

1 造模动物

现可用于制备湿疹模型的动物有小鼠、大鼠、豚鼠、家兔、小型猪、灵长类动物,其中以小鼠、大鼠、豚鼠、家兔为常用。一般用成年动物,雌雄各半或单一雄性。

2 造模方法

2.1 2,4-二硝基氯苯(DNCB)诱发制备小鼠急性湿疹模型

2.1.1 原理 应用容易引起变态反应的化学物质如 DNCB,对敏感个体致敏,再经激发后引起局部皮肤炎症反应,为Ⅳ型变态反应。

2.1.2 方法 实验前 1 d 小鼠腹部去毛,面积 3 cm × 3 cm, DNCB 以丙酮-橄榄油(4:1)为基质配制,每天用 25 μL 涂抹于小鼠腹部致敏 1 次,连续 2 d。末次致敏后第 5 天,小鼠右耳背面涂抹 0.25%

DNCB 20 μL 以诱发皮炎,左耳涂等量丙酮-橄榄油(4:1)基质作对照。2 h 可出现明显炎症,说明制备模型成功。

2.2 DNCB 诱发制备豚鼠(大鼠)湿疹模型

2.2.1 原理 以致敏物质如 DNCB 激发,制备湿疹动物模型,为Ⅳ型变态反应。

2.2.2 方法 豚鼠模型为给豚鼠颈背部剪毛,面积 2 cm × 2 cm,用 5% DNCB 溶液 25 μL 外涂致敏。2 周后每只豚鼠右耳内侧涂 0.1% (1 mg · L⁻¹) DNCB 溶液 100 μL 作为激发,每周 1 次,连续 4 次。激发 48 h 后有局部肿胀反应,72 h 后皮肤病理可见过度增生、角化过度及单核细胞浸润,说明制备模型成功。该模型皮损的病理改变与人类湿疹接近,该模型持续不少于 9 d。

大鼠模型为给大鼠背部皮肤 A, B 两处脱毛,

[收稿日期] 20170620(010)

[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)

A 处面积 2 cm × 2 cm, B 处面积 4 cm × 4 cm。大鼠于 A 处皮肤用移液枪涂 7% DNCB 丙酮溶液 100 μL 致敏, 致敏后可见大鼠瘙痒剧烈, 频繁出现搔抓、打滚行为, 持续约 2 h。1 周后在 B 处涂敷 7% DNCB 丙酮溶液 200 μL 激发。每 5 d 激发 1 次, 每次激发均可见大鼠瘙痒剧烈, 频繁出现搔抓、打滚行为。B 处皮肤逐渐出现红斑、丘疹、水肿、抓痕、脱屑, 每次激发后记录皮损情况并评分, 至激发 6 次后, 各鼠背部皮损均出现红斑、丘疹、结痂、渗出, 停止激发, 说明制备模型成功。该模型持续不少于 9 d。

2.3 卵清蛋白(OVA)加氢氧化铝[Al(OH)₃]反复激发制备豚鼠急性湿疹模型

2.3.1 原理 抗原激发反应, 制备豚鼠湿疹模型。

2.3.2 方法 给豚鼠背部两侧去毛 4 处, 面积均为 2 cm × 3 cm。在剃毛处皮内注射 OVA 10 μg + Al(OH)₃ 0.5 mg + 灭菌注射用水 0.2 mL, 每个点注射 0.05 mL 致敏; 2 周后同样的方法加强 1 次。首次致敏后第 3 周, 用 2 cm × 2 cm 牛皮纸, 涂 10% OVA + 10% 十二烷基硫酸钠(SDS) + 30% 凡士林 + 50% 灭菌注射用水(实验前配成乳剂), 贴于剃毛处, 用纱布覆盖, 固定并保持 24 h。24 h 后再用 10% OVA + 5% SDS + 37% 凡士林 + 48% 灭菌注射用水, 贴于剃毛处, 用纱布覆盖, 固定并保持 24 h。24 h 后再用 10% OVA + 70% 凡士林 + 20% 灭菌注射用水, 贴于剃毛处, 用纱布覆盖, 固定并保持 24 h, 进行抗原激发反应。末次激发后 48 h 出现湿疹样反应, 所有豚鼠表现为不同程度的弥漫性红斑、水肿、抓痕伴血痂, 边界不清, 其上可见有少许粟粒状丘疹, 部分有渗出, 说明制备豚鼠急性湿疹模型成功。本模型可持续不少于 14 d。

2.4 生漆激发制备家兔急性湿疹模型

2.4.1 原理 采用刺激性物质如生漆刺激家兔皮肤, 使家兔产生非免疫性皮肤炎症反应。

2.4.2 方法 在兔背两侧对称区去毛 4 处(2 处作空白对照区, 2 处作造模区), 先剪去长毛, 再剃净短毛, 使造模区和空白对照区皮肤完全裸露, 每处面积 2 cm × 2 cm; 除空白对照区外, 造模各区均进行生漆

激发, 即在脱毛区中心喷涂一薄层生漆, 范围设定为 1 cm × 1 cm, 保留 5 min; 待生漆干后用松节水洗去生漆, 48 h 后家兔背部出现不同程度水肿型鲜红斑, 边界不清, 明显有抓痕血痂, 说明制备家兔急性湿疹模型成功。该模型持续不少于 14 d。也有采用 2% 巴豆油按 50 μL/次外涂制备家兔湿疹模型的。

3 模型指标

3.1 表观指标 湿疹动物模型制备成功后, 动物出现不同程度的瘙痒、皮损、红斑, 皮毛的光泽度降低、活动减少等。①瘙痒情况: 湿疹常伴有瘙痒发生, 可观察动物的瘙痒反应。如观察 10 min 内小鼠舔痒部位次数及每次瘙痒持续的时间等; ②皮损局部: 皮损形态、皮损面积大小、皮肤的渗出以及水肿程度等; ③皮毛光泽度。表观指标在湿疹临床诊断中占有重要地位, 也是动物模型成功与否的直接指标, 权重系数 0.5。

3.2 病理指标 病理指标包括观察模型局部皮肤组织的病理变化, 测定耳部厚度、质量等。湿疹模型制备成功后病理指标变化: 光镜下可见表皮角化过度及角化不全, 细胞内水肿及水疱, 棘层增厚, 皮突延长, 无水疱; 真皮浅层毛细血管扩张或者周围以淋巴细胞为主的炎症细胞浸润, 真皮上部胶原稍增加。湿疹模型制备成功后耳部厚度及质量增加。病理指标是湿疹模型成功与否的直接证据, 耳部厚度及质量是湿疹局部变化的直接指标, 权重系数 0.3。

3.3 生化指标 多数湿疹动物模型制备成功后体内生化指标也会有变化, 如白细胞介素 4(IL-4), 白三烯 B₄(LTB₄), 白三烯 C₄(LTC₄), 半胱氨酰白三烯受体 1(CysLTR1) 和 CysLTR2 水平升高。生化指标是湿疹动物模型发生、发展、恢复过程的机体反映, 有一定价值。但特异性不高, 权重系数 0.2。

4 备注

湿疹的造模方法较多, 本规范介绍的是与湿疹中西医临床病症特点吻合度较高且应用较多的动物模型。还有一些湿疹模型, 因与临床病症特点的吻合度较低(如细胞模型)或应用少(转基因小鼠)等问题, 故未纳入本制备规范(草案)。

湿疹动物模型制备规范(草案)起草说明

1 造模动物

目前可用于制备湿疹模型的动物有小鼠、豚鼠、大鼠、小型猪、灵长类动物、家兔、转基因小鼠等。但

小型猪、猴成本高, 应用受限; 小鼠、大鼠、豚鼠免疫系统和皮肤组织与人类相似度高, 皮损病理改变接近人类, 且价廉易得, 应用多; 家兔在生物医学的研

究中多用来做皮肤刺激实验,因此湿疹动物模型也常选用家兔。以小鼠、大鼠、豚鼠、家兔为常用,一般选用成年动物,雌雄各半。

2 饲养环境^[1-2]

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

目前湿疹的病因病机尚不完全清晰,与过敏体质、外在物理(化学)性刺激及精神因素等有关。现湿疹模型多采用易诱发变态反应的化学物质或刺激性物质、抗原物质对敏感性个体进行致敏、激发等来制备湿疹模型。现有模型多为急性湿疹动物模型。

本模型主要体现的是西医临床指标,动物模型的评价也以西医标准为主,中医标准为参考,评价湿疹模型西医标准依据的是中华医学会皮肤性病学分会免疫组编写的 2011 年中国湿疹诊疗指南、吴少桢主编《常见疾病的诊断与疗效判断(标准)》^[3]和孙传兴主编《临床疾病诊断依据治愈好转标准》^[4],西医标准包括(1)急性湿疹:①皮损形态多形性、弥漫性;②皮肤上出现红斑、水肿基础上粟粒大丘疹、丘疱疹、水疱、糜烂;③易有渗出液,病变中心往往较重,而逐渐向周围蔓延,外围又有散在丘疹、丘疱疹,故境界不清;④瘙痒剧烈、反复发作;⑤合并感染可显现脓疱、脓液渗出、痂屑等。(2)亚急性湿疹:①由于初发皮疹治疗失误迁延而成,起病缓慢,皮损可呈红色丘疹、斑丘疹、鳞屑或者结痂,中间有较少的丘疱疹、水疱;②糜烂渗出,皮损可发生在任何位置,对称分布,好发于双耳、双手、乳房、肛门、生殖器和下肢胫前等;③自觉瘙痒难忍,夜间加重,严重可影响睡眠;④病程不规律,常反复发生,绵延难愈。(3)慢性湿疹:①多对称发病,患部皮肤红斑、浸润,可见丘疹、鳞屑、抓痕;②部分局部皮肤肥厚、色素沉着、表面粗糙,苔藓样变;③瘙痒明显,呈阵发性;④疾病发展时轻时重,病程较长,迁延数月或更久。

评价湿疹模型中医标准依据的是 2012 年国家中医药管理局颁布的《中医病证诊断疗效标准》中对湿疹的诊断、李日庆主编《中医外科学》^[5],参照陈达灿等主编《皮肤性病科专病中医临床诊治》^[6]和喻文球主编《中医皮肤性病学》^[7],中医湿疹的临床诊断标准的指标分为核心指标和间接指标,其中核心指标为①皮损,并伴有颜色的改变;②有炎性渗

出;③瘙痒发作。间接指标为①口干;②身热:低热,烦热,手足心热;③小便清长,大便便溏;④食少,乏力,纳差,腹胀;⑤耳鸣、头晕,腰膝酸软。

3.1 2,4-二硝基氯苯(DNCB)诱发制备小鼠急性湿疹模型^[8-11]

3.1.1 原理 机体经皮肤接受抗原 DNCB 刺激后,当再次接触相同抗原时发生以皮肤损害为特征的 IV 型变态反应。多次激发会产生类似湿疹的临床表现。

3.1.2 与临床指标吻合情况 符合西医指标急性湿疹①,②,③,④,吻合度 $\geq 80\%$;符合湿疹中医指标主症①,②,③,吻合度 $\geq 70\%$ 。

3.1.3 注意事项 DNCB 对皮肤有损伤作用,在配制时应注意个人防护;动物脱毛时应防止皮肤结构受损,剪毛应剪净,以免影响药物与皮肤的接触,每次给药前均应去毛,以确保与动物皮肤有好的接触;本模型激发点可选择动物耳部皮肤,也可以选择背部皮肤。本模型也可用 2,4-二硝基氟苯(DNFB)作为致敏剂,但 DNFB 对皮肤的刺激性小于 DNCB。本模型常用,在应用过程中应注意 DNCB 的浓度和用量。

3.2 DNCB 诱发制备豚鼠(大鼠)湿疹模型^[12-13]

3.2.1 原理 机体经皮肤接受抗原 DNCB 刺激后,当再次接触相同抗原时发生以皮肤损害为特征的 IV 型变态反应。多次激发会产生类似湿疹的临床表现。

3.2.2 与临床指标吻合情况 符合西医指标急性湿疹①,②,③,④,吻合度 $\geq 80\%$;符合湿疹中医指标主症①,②,③,吻合度 $\geq 70\%$ 。

3.2.3 注意事项 本模型也可用 DNFB 作致敏剂,但是 DNFB 对皮肤的刺激性小于 DNCB;使用致敏剂时应注意其浓度、用量。DNCB 对皮肤有损伤作用,在配制时应注意个人防护。

3.3 卵清蛋白(OVA)加氢氧化铝[Al(OH)₃]反复激发制备豚鼠湿疹模型^[14]

3.3.1 原理 OVA 作为抗原作用于机体,当机体再次接触相同抗原时发生发皮肤损害为特征的 IV 型变态反应。Al(OH)₃ 在此是免疫辅佐剂。

3.3.2 与临床指标吻合情况 符合西医指标急性湿疹①,②,③,④,吻合度 $\geq 80\%$;符合湿疹中医主症①,②,③,吻合度 $\geq 70\%$ 。

3.3.3 注意事项 在动物模型的制作过程中要注意致敏剂的用量、致敏时长、致敏源的给药方式。抗原激发反应时,应保证激发剂与皮肤的接触

时间。

3.4 生漆激发制备家兔急性湿疹模型^[15]

3.4.1 原理 采用刺激性物质如生漆外用,对家兔产生非免疫性的皮肤炎症性反应,形成湿疹。

3.4.2 与临床指标吻合情况 符合西医指标急性湿疹①,②,③,④,吻合度 $\geq 80\%$;符合湿疹中医指标主症①,②,③,吻合度 $\geq 70\%$ 。

3.4.3 注意事项 动物脱毛时应防止皮肤结构受损;剪毛应注意要剪干净,以免影响药物与皮肤的接触;每次给药前均应去毛,以保障药物与皮肤有良好接触。

4 观测指标

4.1 表观指标——I类指标(核心指标) 临床上湿疹以外观变化为诊断标准,动物模型建立后,皮损面积的改变(皮损的面积也可通过图像分析系统测定其面积大小)是最直接的观察指标。其他表观指标如局部瘙痒情况、皮毛光泽度、皮肤反应的强度(如皮肤的红斑、水肿等的反应)是重要的评判依据。湿疹常伴有局部瘙痒发生,可计算每组动物的平均致痒阈及瘙痒反应抑制率,也可通过观察 10 min 内小鼠舔、抓瘙痒部位的次数及每次瘙痒持续的时间来评价。可根据皮肤的反应症状进行评分,无反应者为 0 分,轻度红斑为 1 分,显著红斑为 2 分。湿疹最直接判定标准是表观指标的变化,是临床诊断的依据,也应是判断模型成功与否的核心指标,权重系数 0.5。见表 1。

表 1 湿疹动物模型的主要表观指标及其分级

Table 1 Main apparent indexes of eczema animal models and its classification

指标	分级		
瘙痒	无	轻度	重度
糜烂	无	轻度	重度
渗出	无	轻度	重度
水肿	无	轻度	重度
皮损面积	小	大	较大
皮毛光泽度	基本正常	无光泽	无光泽且竖毛

4.2 病理指标——II类指标(直接相关指标) 湿疹模型局部皮肤病理变化是实验研究常采用的观察指标,模型制备成功后局部皮肤组织光镜可见:表皮角化过度及角化不全、细胞内水肿及水疱、棘层增厚、皮突延长、无水疱;真皮层毛细血管扩展、充血或者周围以淋巴细胞为主的炎症细胞浸润、真皮上部胶原稍增加。

湿疹局部皮肤病理改变是评判皮损程度的可靠指标,其病理半定量分级参考标准为“-”表示皮肤组织正常,组织结构完整;“+”表示表皮无明显变化,真皮上部少量炎症细胞浸润;“++”表示表皮灶性细胞水肿,真皮上部大量炎症细胞浸润;“+++”表示表皮网状性病变,真皮上部有众多炎症细胞浸润。如能直接量化观察更好,如真皮有核细胞计数,模型局部皮肤病理切片,光镜高倍镜下每个标本在真皮浅层随机选 5 个视野,对真皮附属器官以外的有核细胞计数。此指标也较可靠反映了炎症的严重程度。

慢性湿疹的主要指标是皮肤增厚,常选择耳部作为激发点,可通过耳壳的质量、厚度评价其反应。该指标是湿疹模型较为直接的指标。湿疹局部皮肤病理变化和耳部厚度、质量可直接反映湿疹动物模型局部病变特点,是直接相关指标,权重系数 0.3。

4.3 生化指标——III类指标(间接相关指标) 湿疹动物模型制备成功后生化指标也会有变化,IL-4, LTB₄, LTC₄, CysLTR1 和 CysLTR2 水平升高等。白三烯类物质是湿疹发病过程中重要的炎症介质,其作用于 CysLTR,引起多种变态反应的发生。有研究表明湿疹患者外周血中 LTB₄ 和 LTC₄ 水平升高,皮肤组织中白三烯受体升高。生化指标是湿疹动物模型发生、发展、恢复过程的机体反映,有一定价值,但特异性不高,是间接相关指标,权重系数 0.2。

4.4 指标分类 将以上湿疹动物模型各类指标进行分类并确定各级权重系数,结果见表 2。

表 2 湿疹动物模型各类指标的分类及权重系数

Table 2 Classification and weight coefficient of various indicators of eczema animal models

指标	级别	分类	权重系数
I类	核心指标	外观表现	0.5
II类	直接相关指标	病理指标	0.3
III类	间接相关指标	生化指标	0.2

湿疹动物模型 I, II, III 类指标可参照文献 [16] 的方法,均按整体为 1 进行各自的量化积分,同一类的指标如表观指标(I)是由瘙痒、糜烂、渗出、水肿、皮损面积、皮毛光泽度等多项指标组成的,目前是按同一贡献度计算的;如观察的表观指标有 6 项,积分时各项小指标均为 1/6,该指标最高分值为 1/6。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。同此计算 II, III 类指标。

每一类指标造模成功后的总积分,乘以相应指标的权重,将 3 类指标积分相加,即湿疹动物模型制备成功时的总积分。按上述方法计算,DNCB 诱发制备小鼠急性湿疹模型总积分约 0.71,DNCB 诱发制备豚鼠(大鼠)湿疹模型总积分约 0.88,OVA + Al(OH)₃ 反复激发制备豚鼠湿疹模型总积分约 0.92,生漆激发制备家兔急性湿疹模型总积分约 0.88。湿疹动物模型成功率相对高,每次造模可能会出现不同的总积分,为保证每次所造湿疹动物模型的基本一致,建议总积分可以有 20% 左右的偏差,以此作为评价湿疹动物模型成功与否的标准。所得总积分 > 0.58,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所观测指标另行计算、适当调整。

4.5 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湿疹模型制备及判定中的重要性,不是绝对的。研究者可根据具体湿疹模型防治的实验,适当进行调整。表观指标、病理指标所采用的分类方法,可能因在不同的湿疹模型中采用标准不一致,分类也会有所差异;所列生化指标也可能未全面涵盖湿疹相关的所有指标。上述标准及指标重点是给研究者提示,应根据各类指标对湿疹模型的贡献度不同进行分类,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;所列的具体分类、指标等是供参考的,可根据具体湿疹实验研究的特点,增加、减少或另行设定。

[起草人] 苗明三, 田硕, 白明

[参考文献]

[1] 国家质量监督检验检疫总局,中国国家标准化管理委员会. 实验动物环境与设施(GB 14925-2010) [S]. 北京:中国标准出版社,2010.
[2] 国家科学技术委员会. 实验动物管理条例 [EB/OL]. http://www.gov.cn/gongbao/content/2017/content_

5219148.htm,2017-03-01.

[3] 吴少祯,吴敏. 常见疾病的诊断与疗效判断(标准) [M]. 北京:中国中医药出版社,1999:810-839.
[4] 孙传兴. 临床疾病诊断依据治愈好转标准 [M]. 2 版. 北京:人民军医出版社,1998:290.
[5] 李日庆. 中医外科学 [M]. 北京:人民卫生出版社,2006:43.
[6] 陈达灿,禩国维. 皮肤性病科专病中医临床诊治 [M]. 北京:人民卫生出版社,2000:62-92.
[7] 喻文球. 中医皮肤性病学 [M]. 北京:中国医药科技出版社,2000:214-221.
[8] 李瑞奇,白明,缪君娴,等. 蛤壳油糊外用对小鼠湿疹模型及豚鼠瘙痒模型的影响 [J]. 中华中医药杂志,2013,28(6):1699-1702.
[9] 刘丹,梓纲,焦泽龙,等. 慢性湿疹小鼠模型的建立 [J]. 军事医学,2011,35(4):290-292.
[10] 苗明三,张雪侠,吴巍. 益母草对瘙痒、湿疹动物模型的影响 [J]. 中药新药与临床药理,2013,24(6):540-543.
[11] 苗明三,于舒雁. 首乌藤外用对动物迟发超敏反应的影响 [J]. 中药药理与临床,2014,30(3):101-104.
[12] 苗明三,于舒雁,魏荣瑞. 锦灯笼外用对湿疹模型的影响 [J]. 中药药理与临床,2014,30(5):108-111.
[13] 陈奇,张伯礼. 中药药效研究方法学 [M]. 北京:人民卫生出版社,2016:756-762.
[14] Fukuda S, Midoro K, Kamei T, et al. Inhibition of allergic dermal inflammation by the novel imidazopyridazine derivative TAK-427 in a guinea pig experimental model of eczema [J]. J Pharmacol Exp Ther, 2002, 303(3): 1283-1290.
[15] 符东耿,陈求芳,黄嗣航,等. 醇提蛋黄油与蛋黄馏油对家兔过敏性皮炎湿疹疗效比较 [J]. 广东药学院学报,2015,31(4):483-485.
[16] 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.

[责任编辑 刘德文]