

黄褐斑动物模型的研究现状

刘逍遙¹, 王停^{1,2}, 朱佩轩¹, 胡语杰¹, 刘珊¹, 赵睿学³, 范琼尹¹, 苏泽琦^{1,2*}
(1. 北京中医药大学, 北京 100029; 2. 国家中医药管理局名医名方重点实验室, 北京 100029;
3. 北京中医药大学东直门医院, 北京 100700)

[摘要] 黄褐斑作为一种黑色素沉着症,好发于中青年女性的面部,严重影响患者的身心健康。目前研究认为黄褐斑的发生与紫外线照射、体内性激素水平变化等多种因素有关,但其确切发病机制尚不清楚,其临床疗效多不理想,开展黄褐斑疾病相关的基础研究具有重要的临床意义和社会价值。其中,黄褐斑动物模型作为研究黄褐斑的重要工具,对于明确黄褐斑疾病发生、发展的病理生理学机制尤为重要,目前常用的造模方法有紫外线造模法、黄体酮造模法以及紫外线联合黄体酮造模法,但因黄褐斑动物模型在制备过程中的影响因素较多,且至今尚无较为完善且公认的模式制备方案,导致黄褐斑动物模型在实际应用过程中仍然存在一系列问题,降低了模型制备的成功率,在一定程度上影响和限制了模型的应用和推广。针对黄褐斑动物模型建立及应用过程中存在的关键性问题,通过查阅和整理近年来国内外的相关文献,从实验动物、建模方法、模型评价等方面综合概述该模型的研究现状,探讨不同造模方法以及动物品系、动物周龄等因素对黄褐斑动物模型的影响,以期制备更科学合理、经济便捷的黄褐斑动物模型提供参考,为深入研究黄褐斑的发病机制、预防与治疗黄褐斑奠定基础,也为其他动物模型的研究提供借鉴和参考。

[关键词] 黄褐斑; 动物模型; 动物选择; 建模方法; 模型评价

[中图分类号] R22;R242;R2-031;R287;R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2020)23-0200-09

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20202220

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20200903.0809.003.html>

[网络出版日期] 2020-9-3 11:01

Research Status on Animal Models for Melasma

LIU Xiao-yao¹, WANG Ting^{1,2}, ZHU Pei-xuan¹, HU Yu-jie¹, LIU Shan¹, ZHAO Rui-xue³,
FAN Qiong-yin¹, SU Ze-qi^{1,2*}
(1. Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China; 2. Key Laboratory of Famous Doctors and Famous Prescriptions Under State Administration of Traditional Chinese Medicine, Beijing 100029, China; 3. Dongzhimen Hospital, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100700, China)

[Abstract] Melasma, as a kind of melanosis, often occurs over the face of young and middle-aged women, which seriously affects the physical and mental health of patients. At present, it is believed that the occurrence of melasma is related to various factors such as ultraviolet radiation and changes in sex hormone levels in the body. However, the exact pathogenesis of melasma is still unclear and its clinical efficacy is not ideal. Therefore, it is of great clinical significance and social value to carry out basic researches on melasma diseases. Among them, the animal model of melasma acts as an important tool for studying melasma, and it is particularly important to clarify the pathophysiological mechanism of the occurrence and development of melasma. The common modeling methods include ultraviolet modeling, progesterone modeling and ultraviolet combined with progesterone modeling. However, there are still some problems in the practical application of

[收稿日期] 20200717(006)

[基金项目] 北京中医药大学横向课题项目(2019110031001241)

[第一作者] 刘逍遙,在读硕士,从事体病相关与慢病防控研究,E-mail:20180931082@bucm.edu.cn

[通信作者] * 苏泽琦,博士,助理研究员,从事中西医结合基础与临床研究,E-mail:suzeqi@aliyun.com

animal models of melasma due to many influencing factors in the preparation of such animal models, and there is still a lack of a more complete and recognized model preparation scheme to this day, which reduces the success rate of model preparation and limits its application and popularization to some extent. In view of the key problems in the establishment and application of animal models of melasma, we comprehensively summarized the research status of the models from such aspects as experimental animals, modeling methods and model evaluation, and discussed the effects of different modeling methods and animal species, animal age and other factors on animal model of melasma by referring to and sorting out the recent literatures at home and abroad in recent years. This is to provide references for the preparation of more scientific, reasonable, economic and convenient animal models of melasma, lay a foundation for in-depth researches on the pathogenesis, prevention and treatment of melasma, and also provide reference for other animal model research.

[Key words] melasma; animal model; animal selection; modeling methods; model evaluation

黄褐斑(melasma)是一种获得性黑色素沉着性皮肤病,多发于肌体易受阳光照射的部位,临床主要表现为面部形状不规则的淡褐色至深褐色界限清楚的斑片,以中青年女性多见^[1-3]。因黄褐斑主要发生在面部,严重影响患者美观,对患者的身心健康和日常生活造成影响^[4-6],因而备受关注。目前认为,黄褐斑可能与紫外线照射、口服避孕药以及女性性激素水平等因素有关^[7-9],但其确切发病机制尚不清楚,临床疗效多不理想,所以明确黄褐斑的发病机制、开发高效安全的美白祛斑制剂已成为目前皮肤科领域的研究热点之一。而黄褐斑动物模型作为研究黄褐斑的重要工具,对于明确黄褐斑疾病发生、发展的病理生理学机制尤为重要,所以建立客观、公认、稳定的黄褐斑动物模型是确保其发病机制以及治疗黄褐斑的新药开发等研究得以顺利进行的关键环节,但至今尚无较为完善且公认的模型制备方案,导致在黄褐斑动物模型的实际制备和应用过程中仍然存在一些问题,降低了模型复制的成功率,在一定程度上限制了模型的应用和推广,影响了对黄褐斑疾病的研究。本文通过综述国内外黄褐斑动物模型的制备方法,结合黄褐斑临床症状特点,对现有黄褐斑动物模型进行比较分析,以期深入研究黄褐斑的发病机制以及预防与治疗黄褐斑奠定模型基础。

1 实验动物

1.1 品系 黄褐斑属于黑色素沉着性皮肤病,黑色素来源于黑色素细胞中的黑色素小体,是一种经黑色素细胞合成的内源性色素分子^[10-11],由于不同品系的动物对同一致病刺激物和病因的反应不同,在建立动物模型时,应尽可能选择对造模因素敏感,且病理特征稳定的动物品系,故在建立黄褐斑动物模型时选用含有活跃黑色素细胞的动物对成功

模拟黄褐斑的病理过程尤为重要。

目前,在研究黄褐斑的动物实验中,鼠是最常见的实验动物,常用的动物品系有HRM-2无毛鼠^[12-13],HR-1×HR/De小鼠^[14-15],C57BL/6J小鼠^[16-17],DBA/2小鼠^[18-19]和棕黄色豚鼠^[20-21]等。其中,HRM-2无毛鼠,HR-1×HR/De小鼠等无毛小鼠的皮肤较有毛小鼠的皮肤更接近于人类的皮肤,其含有活跃的黑色素细胞,能合成黑色素,且实验过程中减少了去毛的流程,一定程度上可以减少去毛带来的皮肤损伤对实验结果的影响,是国外学者在研究黑色素沉着性皮肤病时常用的动物品系^[22-25]。但因其价格昂贵,目前还没有在我国广泛流行使用,适用于对课题要求高、研究经费充足、有获取途径的科研团队或实验室。C57BL/6J小鼠,DBA/2小鼠和棕黄色豚鼠也能够产生色素沉着,相较HRM-2无毛鼠和HR-1×HR/De小鼠而言,这些品系的动物价格相对便宜。其中,C57BL/6J小鼠和DBA/2小鼠耳部皮肤较躯干皮肤含有更多的黑色素细胞,实验中多以其耳部皮肤作为观测部位研究黑色素^[16-17,26],因耳部皮肤面积有限,故要求实验人员熟练掌握实验技能,实验中能够利用有限的组织样本得出真实客观的实验结果。而与C57BL/6J小鼠和DBA/2小鼠相比,豚鼠形体较大,具有足够的皮肤组织可供研究,且豚鼠棕黄色皮肤表皮内黑色素细胞、黑色素小体的数量以及在表皮的分布情况类似于人体,紫外线照射后黑色素细胞、黑色素小体有类似于人类皮肤色素沉着的反应,因此常用于研究黄褐斑^[27],但豚鼠发达的听觉、特殊的口腔结构和体型对实验环境以及实验者的灌胃技术提出了更高的要求,适用于具备较高级别动物饲养环境以及能够顺利完成豚鼠灌胃给药的实验室。

此外,有部分实验室使用SD大鼠,KM小鼠,

BALB/C小鼠以及ICR小鼠等研究黑色素,但这些品系的动物均属于白化病鼠,现今使用这些动物品系建立黄褐斑模型的文献因病理数据缺失或病理图片质量不高,而存在病理诊断证据不充分的问题。有相关文献报道,白化鼠没有活跃的黑色素细胞,不能用来研究色素斑、老年痣等色素沉着性疾病,但还需要进一步研究证实^[28]。

由此可见,C57BL/6J小鼠,棕黄色豚鼠,DBA/2小鼠等非白化病鼠是建立黄褐斑动物模型经济、可行、易获取的动物品系,而对于科研经费充足、对课题要求高的实验室可以优先选择HRM-2,HR-1×HR/De等无毛鼠进行实验。

1.2 性别 性别差异存在于许多人类疾病中,一些疾病的患病率、临床表现、严重程度和治疗结果会因性别而异^[29]。动物实验雄性和雌性啮齿动物的测试参数和对治疗的敏感性存在明显性别差异^[30]。

印度一项多中心临床流行病学的横断面研究结果表明,黄褐斑疾病的男女患病率之比约为1:4,因黄褐斑多发于女性,所以在动物水平研究黄褐斑疾病时常常选用雌性动物作为实验对象^[31]。另外,有研究表明人体的氧化应激水平存在性别差异,健康的年轻男性与同龄的女性相比具有更高的氧化应激水平,更容易受到氧化应激的影响、男性较女性更容易受到紫外线的影响,而黄褐斑与氧化应激密切相关,紫外线在黄褐斑的发病中具有重要作用^[32-34],所以有部分学者选择雄性动物研究黄褐斑。此外,还有研究表明氨甲环酸对紫外线诱导色素沉着的抑制作用存在性别差异,氨甲环酸对雌性的抑制作用更强,并认为性激素和β-内啡肽在性别差异

中发挥着重要的作用^[34]。

因此,在选择动物性别时,要综合考虑实验目的、黄褐斑的临床发病特点、雌雄动物对受试药物以及造模因素的敏感性是否存在性别差异等因素。在新药研究中,根据其药物的受众多为女性而选择雌性动物作为实验对象;在利用紫外线造模进行机制研究时,除受试药物的作用机制与性激素有明显关系时选择雌性动物外,多选择雄性动物;而在用黄体酮造模进行研究时多选择雌性动物。

1.3 周龄 机体的代谢特点、生理功能随年龄变化,某些疾病的发生与特定年龄阶段的身体生理状态有关,在动物实验中,幼年鼠的身体各项机能尚未成熟,而老年鼠自发疾病的概率较高^[35],所以实验中一般选用成年动物。但在黄褐斑的动物实验中,除选择4~8周龄的成年动物作为实验对象外,也有学者选择12周龄的棕黄色豚鼠作为实验对象^[36],相关研究表明紫外线照射能否诱导皮肤色素沉着与年龄无关,但年龄会影响色素斑的维持时间,即老年动物与成年动物相比,色素沉着的维持时间更长^[37]。而老年动物自发色素沉着的可能性也较大,故实验中正常组的皮肤中也会观察到明显的黑色素沉着。因此,在动物周龄方面,研究老年人的色素沉着时可以选择老年动物,在没有特殊实验要求的情况下可以选择4~8周龄的成年动物进行实验研究。

综上,黄褐斑动物模型建立时实验动物的选择受到动物品系、性别及周龄的影响,应当根据实验目的进行选择,实验动物各项选择因素适用范围见表1。

表1 实验动物的选择

Table 1 Selection of experimental animals

动物因素	动物选择	适用范围	参考文献
品系	C57BL/6J小鼠,棕黄色豚鼠, DBA/2小鼠	能够产生色素沉着,是建立黄褐斑动物模型时较为经济、可行、易获取的动物品系	[16,34,38]
	HRM-2,HR-1×HR/De等无毛鼠	皮肤更接近于人类皮肤,但价格昂贵,适用于科研经费充足,对课题要求高的实验室	[24-25,28]
	KM小鼠,ICR小鼠,BALB/C小鼠以及SD大鼠等白化鼠	不含有活跃的黑色素细胞,不适合用于研究色素斑、老年痣等色素沉着性疾病	[28]
性别	雌性	适用于新药开发、利用黄体酮造模进行机制研究以及受试药物的作用机制与性激素有关的研究	[34,36]
	雄性	适用于利用紫外线造模的机制研究	[39-40]
周龄	成年	适用于对动物周龄没有特殊要求的研究	[16,41]
	老年	适用于给药周期较长或研究老年人色素沉着的实验	[37,42]

2 造模方法

目前,黄褐斑动物模型的制备原理主要是通过模拟临床发病因素诱导皮肤的色素沉着,根据其可能的发病因素,常用的造模方法有紫外线造模法、黄体酮造模法以及紫外线联合黄体酮造模法。

2.1 紫外线造模法 因黄褐斑常发于面部,且在阳光照射后易加重,所以目前多认为日光照射在黄褐斑发展中起主要作用,日光中的紫外线可以直接作用于黑色素细胞或通过刺激角质形成细胞释放黑色素生成因子促进黑色素的合成^[43]。根据“日光照射是黄褐斑发生发展的主要因素”^[3],国内外多位学者采用紫外线照射的方法成功建立了黄褐斑动物模型,主要通过模拟日光中的紫外线进行紫外光源照射^[20, 44]。由于引起皮肤色素沉着的紫外线主要是中波紫外线(UVB,波长275~320 nm)^[45],所以实验中大多采用单纯UVB光源建模。

实验中紫外线的照射剂量是影响紫外线模型的重要因素,而紫外线的照射剂量又受紫外光源的辐照强度、照射时间、照射方式等因素的影响。在紫外光源的选择上,一部分学者不考虑紫外光源的照射强度,选用普通UVB灯管进行实验^[46],但因这种类型的灯管不能准确计算照射剂量,所以不利于模型的重复;另有学者选择临床用于治疗黑色素生成障碍的手持型UVB光疗仪^[20, 38],因其具有体积小、辐照强度确定等特点,所以实验中可以手持灯管进行照射,能够统一照射部位,最大限度保证模型的一致性,还能准确计算照射剂量,有利于模型的重复,但在实验中需要实验者逐个固定照射,所以仅适用于样品量较少的实验,对于样本量较大的实验可以通过增加UVB光疗仪以及固定器数量自制照射装置。在照射方式上,以笼为单位进行整体照射可以减少工作量,但因照射过程中存在动物的移动,所以很难保证病理变化的一致性;而在固定动物的情况下对单只动物进行照射的方法,可以保证病变的一致性,也可以减少实验中对动物的伤害,但存在工作量大的问题。在照射时间方面,因普通紫外灯管辐照强度低,所以实验中多采用30~60 min/次/d,连续照射30 d的方法造模^[46-47];而对于有明确辐照强度的紫外线灯管要根据灯管的辐照强度以及不同动物的最小红斑量计算单次照射时间,每天照射1次,连续照射2~4周^[38, 48]。另外,也有学者采用初始小剂量UVB逐渐递增的方法,即先用小剂量UVB照射一段时间后逐渐增加照射剂量,最后按照最大剂量进行照射^[49],但目前还缺少对两种

方法的比较研究。

紫外线照射法从黄褐斑病因和症状两个方面来模拟,是目前常用的造模方法,但实验中因UVB灯管的辐照强度、实验动物的最小红斑量、照射方式等方面存在的差异,所需的照射剂量以及照射时间也不同。实验中应尽量选择辐照强度确定的UVB光源,通过实验动物的最小红斑量确定照射剂量,计算照射时间,目前研究较为成熟的是棕黄色豚鼠模型,多使用每次900 mJ·cm⁻²的照射剂量,1周/次,连续3周建模^[20, 38, 50]。

2.2 黄体酮造模法 根据“雌激素和黄体酮增多进而刺激黑色素细胞而致色素沉着”的发病假说^[3],部分学者采用肌注黄体酮的方法建立黄褐斑动物模型。

对于黄褐斑动物模型而言,黄体酮的注射剂量是影响其模型成功与否的重要因素,而造模所需黄体酮的剂量与动物种属有关,不同种属的动物在注射剂量上存在明显差异。目前建立的黄褐斑动物模型中,小鼠的注射剂量多为20 mg·kg⁻¹·d⁻¹(相当于人临床剂量的8倍)^[51-52],豚鼠的注射剂量多为7.5 mg·kg⁻¹·d⁻¹(相当于人临床剂量的3倍)^[53],而在大鼠注射剂量上存在一定争议(7.5 mg·kg⁻¹·d⁻¹^[54], 20 mg·kg⁻¹·d⁻¹^[55]),也有学者对大鼠模型黄体酮注射剂量进行了梯度考察(10, 25 mg·kg⁻¹·d⁻¹),结果表明高剂量建模更稳定^[56]。黄体酮的注射部位为动物后腿根部,为确保动物对黄体酮的更好吸收以及减少对动物注射部位的伤害,实验中可采取两腿交替注射的方法。在建模周期上,多为30 d^[56-57],也有少数研究建模周期为14 d^[18],但考虑到肌肉注射是一种全身性给药方式,存在稳定性差及个体差异大等问题,因此实验中可以使用30 d进行造模。此外,也有研究结果显示性激素与黄褐斑无关,甚至能预防黄褐斑的发生^[58-59],这可能是因为体内激素分泌受机体正负反馈机制的调节,激素分泌的适量是维持机体正常功能的一个重要因素,所以在利用黄体酮诱导黄褐斑模型时不能通过盲目加大或者减少剂量来复制或优化模型。

黄体酮造模法从黄褐斑的病因角度模拟临床黄褐斑的特点,其优点是能够根据体质量准确计算注射剂量,且操作简便,但存在稳定性差以及个体间差异大等问题。另外,关于黄体酮的注射剂量、建模周期等因素,还需要设计相关实验进一步考查其对模型的影响,以优化模型。

2.3 紫外线联合黄体酮造模法 一项全球性的调

查结果表明,尽管怀孕、口服避孕药、家族史和日晒等因素的单独触发均会影响黄褐斑,但是临床出现的黄褐斑往往是多个因素综合作用的结果^[60]。

紫外线联合黄体酮造模法通过模拟日光中紫外线和调节动物体内的激素水平,满足了黄褐斑发病与日光照射以及女性激素水平有关的两大临床发病特点,能够在一定程度上缩小模型表现与疾病表现之间的差距。贾晓敏等^[21]选用棕黄色豚鼠,每天进行60 min的UVB照射,同时肌注黄体酮注射液 $20\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$,连续造模30 d,与对照组相比局部皮肤明显变黑、病理苏木素-伊红(HE)染色示鳞状上皮细胞增生明显,HMB45免疫组化可见黑色素细胞明显增多,生化结果示超氧化物歧化酶(SOD)明显下降,丙二醛(MDA)显著升高,说明紫外线联合黄体酮造模法能够在临床表型、病理学表现、生化

改变等方面与疾病的临床特点保持一致。

紫外线联合黄体酮造模法模拟了临床黄褐斑发病的多因性,相比其他方法更符合临床特点,但同时模拟两个发病因素在增加工作量的同时也增加了实验的影响因素。

总之,在实际应用过程中3种方法各有其优缺点,实验中应根据具体情况选择合适的造模方法,见表2。此外,也有学者采用苯甲酸雌二醇联合紫外线照射的方法建立黄褐斑动物模型,李倩等^[61]采用肌注苯甲酸雌二醇 $0.5\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$,连续30 d,雌激素注射一周后开始进行紫外线照射 $900\text{ mJ}\cdot\text{cm}^{-2}$,1周1次,连续照射3周建立棕黄色豚鼠模型。建模后模型组与对照组相比,局部皮肤色素沉着明显、黑色素颗粒和黑色素细胞数量明显增多,差异有统计学意义。

表2 常用造模方法优缺点比较

Table 2 Comparison of advantages and disadvantages among common modeling methods

方法	优点	缺点	参考文献
紫外线造模	从黄褐斑病因和症状两个方面来模拟,是目前较为公认的造模方法	实验结果受UVB灯管的辐照强度、实验动物的最小红斑量、照射方式等因素影响	[20,38,44]
黄体酮造模	从黄褐斑的病因角度模拟临床黄褐斑的特点,能够根据体质量准确计算注射剂量,且操作简便	肌注黄体酮是一种全身性给药方式,存在稳定性差及个体差异大等问题,且关于黄体酮造模法的原理以及造模时的注射剂量也有待进一步研究	[51-55]
紫外线联合黄体酮造模	模拟了临床黄褐斑发病的多因性,相比其他方法更符合临床特点	增加工作量的同时也增加了对实验影响因素	[21,62]

3 模型评价

在模型评价方面,评价黄褐斑动物模型成功与否的主要方法是病变皮肤表观观察和病变皮肤组织病理变化。其中,黄褐斑模型最直观的表现是病变皮肤有灰褐色斑状物,但表观评价带有一定的主观性,且易受外界因素的干扰,如观察室的灯光、摄像机的像素以及动物活动过程中造成的皮肤表面污染等。比色计是一种测量材料彩色特征的仪器,可对材料的颜色、色调、色值进行测定及分析,常用于测定皮肤的颜色,但因目前所用的自动化比色计多为进口,因此价格较昂贵,很难推广使用。在表观观察受限的情况下病理评价显得尤为重要,是评价黄褐斑动物模型成功与否的金标准,局部皮肤组织病理结果显示黑色素沉积可作为模型成功与否的直接证据。

目前,黄褐斑动物模型的病理评价方法常用HE^[63],Masson-Fontana染色法^[40-41],多巴(Dopa)氧化酶法^[28],表皮分离的多巴染色法^[12,40],硫酸亚铁

吸收法^[48],亚铁氰化钾法^[64]以及HMB45免疫组织化学染色法^[65-66]等。

HE染色法用于研究皮肤的一般组织病理学变化,能看到表皮层增厚,但表皮层增厚并不是黄褐斑模型的特异性表现,如皮肤损伤或光老化的动物模型也表现为表皮层增厚^[67],另有研究显示90%的黄褐斑患者皮肤HE染色结果显示皮肤萎缩^[68]。出现以上矛盾现象可能是因为黄褐斑是一种慢性光损伤性疾病,而在动物实验中出现的皮肤增厚属于急性应激反应。此外,有文献报道HE染色很难用于研究黑色素细胞^[68],在HE染色时镜下见黑色素通常不呈黑色,而呈黄棕色或棕褐色,不易与其他色素区分^[69],因此,HE染色并不适宜作为判定黄褐斑动物模型的病理评价方法。Masson-Fontana染色法是利用黑色素具有还原性,能将银氨溶液中的银离子还原为金属银(即嗜银反应)的原理显示黑色素^[70],其优点在于镜下可以清楚的看到黑色素呈黑色、方法简单、操作时间短,但其缺点在于区分

黑色素细胞的特异性不强。硫酸亚铁吸收法和亚铁氰化钾法利用化学的氧化还原法和吸附法使黑色素产生反应,但其只能说明黑色素细胞存在,不能与其他细胞区分,不具有特异性^[71]。多巴氧化酶,又称酪氨酸酶,可催化酪氨酸氧化为多巴,然后被氧化成黑色素,黑色素细胞是皮肤组织中惟一的多巴阳性细胞。Dopa氧化酶法在镜下观察时只有黑色素细胞呈黑棕色,其他组织和细胞不着色,特异性较强,运用Dopa氧化酶法检测皮肤组织中的黑色素细胞较其他方法可靠^[71],但其看不到黑色素细

胞的全貌,且用时较长、操作较繁琐。而另一种方法表皮分离的多巴染色法,可弥补Dopa氧化酶法的缺陷,其可观察黑色素细胞全貌,但却存在动物取材时需要特殊处理、实验时间长等问题。另外,国内诸多文献采用HMB45免疫组化染色法评价黄褐斑动物模型^[38,46],免疫组织化学方法是检测人体皮肤黑色素细胞特异性抗原一种非常敏感的方法,因其依赖于特异性抗原保存的完整性,所以不稳定性较大^[72]。黄褐斑动物模型病理评价方法优缺点比较见表3。

表3 常用病理方法优缺点比较

Table 3 Comparison of advantages and disadvantages among common pathological methods

方法	优点	缺点	参考文献
HE染色	用于研究皮肤的一般组织病理学变化,可以看到黑色素呈棕褐色或棕黄色	很难研究黑色素细胞,镜下不易与其他色素区分	[63,68-69]
Masson-Fontana染色	光镜下可以清楚的看到黑色素呈黑色,且易于操作	不能特异性区分黑色素细胞	[12,20,41,73]
硫酸亚铁吸收法	操作简单,时间短	其他成分也同样被染上,没有特异性	[71,73]
亚铁氰化钾法	操作简单,时间短	其他成分也同样被染上,没有特异性	[71]
Dopa氧化酶反应法	只有黑色素细胞呈黑棕色,其他组织和细胞不着色,具有特异性	看不到黑色素细胞的全貌,用时较长、操作较繁琐	[71]
表皮分离的多巴染色法	能看到黑色素细胞的全貌	动物取材时需要特殊处理,操作时间长	[19,74]
HMB45免疫组化染色	是检测皮肤黑色素细胞相关抗原一种非常敏感的方法	因依赖于抗原保存的完整性,结果不太稳定	[38,46]

4 总结和展望

黄褐斑是一种损容性疾病,其发病率逐年增多,但因黄褐斑的确切发病机制尚不清楚,所以临床疗效多不理想。建立符合临床特点、稳定的黄褐斑动物模型是研究黄褐斑疾病的重要工具,对于深入研究黄褐斑的发病机制、进行中药新药研发以及有效预防和治疗黄褐斑具有重要意义。

近年来,大量科研工作者致力于模仿人类黄褐斑来建立黄褐斑动物模型,我国也出台了相应的黄褐斑动物模型制备草案^[3],但在实际应用过程中还存在一些问题,如草案中未注明动物的品系、紫外线的照射剂量以及具体照射方式等,增加了科研人员的负担,导致实验中因实验动物选择不当或紫外线照射剂量等问题而影响实验结果。

针对目前黄褐斑动物模型建立及应用过程中存在的模型复制率低、模型表现与疾病临床表现差距大等问题,相关科研工作者可从影响黄褐斑动物模型的因素出发,开展不同模型制备方法的对比研究,探讨动物品系、动物性别、动物周龄等因素对模型的影响,以进一步优化模型。另外,还应进一步

规范学术论著的书写,在涉及黄褐斑动物模型制备的文章中要详细介绍模型制备的过程,并应注明实验动物(品系、性别、周龄),所用药物及器械(规格、使用方法),建模周期及药物干预方式等信息,以便于模型的重复以及对相关方法进行整理和归纳,最终制定黄褐斑动物模型的详细制备方案。此外,随着基因编辑技术的发展,运用基因编辑技术建立动物模型也越加普遍,黄褐斑动物模型的建立也有望采用此项技术,以达到模型建立更佳的稳定性。

[参考文献]

[1] LEE B W, SCHWARTZ R A, JANNIGER C K. Melasma [J]. G Ital Dermatol Venereol, 2017, 152 (1):36-45.

[2] WERLINGER K D, GUEVARA I L, GONZALEZ C M, et al. Prevalence of self-diagnosed melasma among premenopausal Latino women in Dallas and Fort Worth, Tex [J]. Arch Dermatol, 2007, 143 (3): 424-425.

[3] 苗明三, 付珍娜, 曹利华. 黄褐斑动物模型制备规范(草案)[J]. 中药新药与临床药理, 2017, 28(5):

- 649-653.
- [4] DESHPANDE S S, KHATU S S, PARDESHI G S, et al. Cross-sectional study of psychiatric morbidity in patients with melasma[J]. *Indian J Psychiatry*, 2018, 60(3):324-328.
- [5] FREITAG F M, CESTARI T F, LEOPOLDO L R, et al. Effect of melasma on quality of life in a sample of women living in southern Brazil [J]. *J Eur Acad Dermatol Venereol*, 2008, 22(6):655-662.
- [6] 付珍娜, 白明, 翟凤霞, 等. 基于中西医临床病症特点的黄褐斑动物模型分析[J]. *中药药理与临床*, 2017, 33(5):208-211.
- [7] HSIEH P W, HUNG C F, LIN C H, et al. Anti-melasma codrug of retinoic acid assists cutaneous absorption with attenuated skin irritation. [J]. *Eur J Pharm Biopharm*, 2017, 114:154-163.
- [8] OGBECHIE-GODEC O A, ELBULUK N. Melasma; an up-to-date comprehensive review [J]. *Dermatol Ther (Heidelb)*, 2017, 7(3):305-318.
- [9] LEE A Y. Recent progress in melasma pathogenesis [J]. *Pigment Cell Melanoma Res*, 2015, 28 (6) : 648-660.
- [10] PILLAIYAR T, MANICKAM M, JUNG S H. Downregulation of melanogenesis; drug discovery and therapeutic options[J]. *Drug Discov Today*, 2017, 22 (2):282-298.
- [11] D'MELLO S N, FINLAY G J, BAGULEY B C, et al. Signaling pathways in melanogenesis [J]. *Int J Mol Sci*, 2016, 17(7):1144.
- [12] JEON B J, KIM D W, KIM M S, et al. Protective effects of adipose-derived stem cells against UVB-induced skin pigmentation [J]. *J Plast Surg Hand Surg*, 2016, 50(6):336-342.
- [13] CHUNG K W, JEONG H O, JANG E J, et al. Characterization of a small molecule inhibitor of melanogenesis that inhibits tyrosinase activity and scavenges nitric oxide (NO) [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2013, 1830(10):4752-4761.
- [14] YAMADA T, HASEGAWA S, INOUE Y, et al. Accelerated differentiation of melanocyte stem cells contributes to the formation of hyperpigmented maculae[J]. *Exp Dermatol*, 2014, 23(9):652-658.
- [15] FURUYA R, YOSHIDA Y, MORO O, et al. Immunohistochemical survey of the distribution of epidermal melanoblasts and melanocytes during the development of UVB-induced pigmented spots [J]. *J Dermatol Sci*, 2009, 55(2):99-107.
- [16] YOU Y J, WU P Y, LIU Y J, et al. Sesamol inhibited ultraviolet radiation-induced hyperpigmentation and damage in C57BL/6 mouse skin [J]. *Antioxidants (Basel)*, 2019, 8(7):207.
- [17] YAMATE Y, HIRAMOTO K, SATO E F. The preventive effect of coffee compounds on dermatitis and epidermal pigmentation after ultraviolet irradiation in mice [J]. *Skin Pharmacol Physiol*, 2017, 30 (1) : 24-35.
- [18] NORIMOTO H, YOMODA S, FUJITA N, et al. Effects of keishibukuryoganryokayokuinin (gui-zhi-fu-ling-wanliao-jia-yiyiren) on the epidermal pigment cells from DBA/2 mice exposed to ultraviolet B (UVB) and/or progesterone [J]. *Yakugaku Zasshi*, 2011, 131(11):1613-1619.
- [19] LEE K J, PARK K H, HAHN J H. Alleviation of ultraviolet-b radiation-induced photoaging by a TNFR antagonistic Peptide, TNFR2-SKE [J]. *Mol Cells*, 2019, 42(2):151-160.
- [20] AHN H Y, CHOO Y M, CHO Y S. Anti-pigmentation effects of eight phellinus linteus-fermented traditional crude herbal extracts on brown guinea pigs of ultraviolet b-induced hyperpigmentation [J]. *J Microbiol Biotechnol*, 2018, 28(3):375-380.
- [21] 贾晓敏, 陈伟, 谭文, 等. 果酸联合调q激光治疗UVB诱导黄褐斑鼠模型的实验研究[J]. *中国现代医学杂志*, 2020, 30(11):16-21.
- [22] 高爱莉, 江娜, 刘清, 等. 探讨姜黄素和茶多酚对不同时间UVB致无毛鼠急性光损伤的防御作用[J]. *中国比较医学杂志*, 2015, 25(5):9-12.
- [23] YUN C Y, YOU S T, KIM J H, et al. p21-activated kinase 4 critically regulates melanogenesis via activation of the CREB/MITF and beta-catenin/MITF pathways [J]. *J Invest Dermatol*, 2015, 135(5):1385-1394.
- [24] 徐宏彬. 无毛小鼠及其在皮肤病学研究中的应用 [J]. *上海实验动物科学*, 1993, 13(2):118-121.
- [25] PARK J W, HA Y M, KIM D H, et al. 4-(6, 7-Dihydro-5H-indeno[5, 6-d] thiazol-2-yl)benzene-1, 3-diol prevents UV-induced melanogenesis and wrinkle formation in HRM-2 hairless mice [J]. *J Dermatol Sci*, 2016, 84(2):213-216.
- [26] KUMAR K J, VANI M G, WANG S Y, et al. *In vitro* and *in vivo* studies disclosed the depigmenting effects of gallic acid; a novel skin lightening agent for hyperpigmentary skin diseases [J]. *Bio Factors (Oxford, England)*, 2013, 39(3):259-270.
- [27] IMOKAWA G, KAWAI M, MISHIMA Y, et al. Differential analysis of experimental hypermelanosis

- induced by UVB, PUVA, and allergic contact dermatitis using a brownish guinea pig model [J]. Arch Dermatol Res, 1986,278(5):352-362.
- [28] NAGANUMAA M, YAGI E, FUKUDA M. Delayed induction of pigmented spots on UVB-irradiated hairless mice[J]. J Dermatol Sci, 2001,25(1):29-35.
- [29] KANDER M C, CUI Y, LIU Z. Gender difference in oxidative stress: a new look at the mechanisms for cardiovascular diseases[J]. J Cell Mol Med, 2017,21(5):1024-1032.
- [30] KOKRAS N, DALLA C. Sex differences in animal models of psychiatric disorders [J]. Br J Pharmacol, 2014,171(20):4595-4619.
- [31] KRUPASHANKAR D S, SOMANI V K, KOHLI M, et al. A cross-sectional, multicentric clinico-epidemiological study of melasma in India[J]. Dermatol Ther (Heidelb), 2014,4(1):71-81.
- [32] CHOUBEY V, SARKAR R, GARG V, et al. Role of oxidative stress in melasma: a prospective study on serum and blood markers of oxidative stress in melasma patients [J]. Int J Dermatol, 2017, 56(9) : 939-943.
- [33] IDE T, TSUTSUI H, OHASHI N, et al. Greater oxidative stress in healthy young men compared with premenopausal women [J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2002,22(3):438-442.
- [34] HIRAMOTO K, YAMATE Y, SUGIYAMA D, et al. The gender differences in the inhibitory action of UVB-induced melanocyte activation by the administration of tranexamic acid [J]. Photodermatol Photoimmunol Photomed, 2016,32(3):136-145.
- [35] 李恒华, 施汀兰, 王天文, 等. 不同周龄、性别、环境下SD大鼠自发病变的病理学研究[J]. 实验动物科学, 2019,36(2):47-54.
- [36] FENG L, SHI N, CAI S, et al. De novo molecular design of a novel octapeptide that inhibits *in vivo* melanogenesis and has great transdermal ability [J]. J Med Chem, 2018,61(15):6846-6857.
- [37] TOBIISHI M, HARATAKE A, KAMINAGA H, et al. Changes in responses of UVB irradiated skin of brownish guinea pigs with aging [J]. Pigment Cell Res, 2005,18(4):278-284.
- [38] 杨晓霞. 氨甲环酸不同给药途径对UVB诱导豚鼠色素沉着的抑制作用[D]. 石家庄: 河北医科大学, 2016.
- [39] HAN J H, BANG J S, CHOI Y J, et al. Anti-melanogenic effects of oyster hydrolysate in UVB-irradiated C57BL/6J mice and B16F10 melanoma cells via downregulation of cAMP signaling pathway [J]. J Ethnopharmacol, 2019,229:137-144.
- [40] SHIN H, HONG S D, ROH E, et al. cAMP-dependent activation of protein kinase A as a therapeutic target of skin hyperpigmentation by diphenylmethyle hydrazinecarbothioamide [J]. Br J Pharmacol, 2015,172(13):3434-3445.
- [41] OH C T, LEE D, KOO K, et al. Superoxide dismutase 1 inhibits alpha-melanocyte stimulating hormone and ultraviolet B-induced melanogenesis in murine skin [J]. Ann Dermatol, 2014, 26 (6) : 681-687.
- [42] LEE C S, PARK M, HAN J, et al. Liver X receptor activation inhibits melanogenesis through the acceleration of ERK-mediated MITF degradation [J]. J Invest Dermatol, 2013,133(4):1063-1071.
- [43] WANITPHAKDEEDECHA R, KEOPRASOM N, EIMPUNTH S, et al. The efficacy in melasma treatment using a 1410 nm fractional photothermolysis laser [J]. J Eur Acad Dermatol Venereol, 2014, 28(3):293-297.
- [44] HWANG G Y, CHOUNG S Y. Anti-melanogenic effects of Aster spathulifolius extract in UVB-exposed C57BL/6J mice and B16F10 melanoma cells through the regulation of MAPK/ERK and Akt/GSK3beta signalling [J]. J Pharm Pharmacol, 2016, 68 (4) : 503-513.
- [45] 妥亚楠, 李承新. 中波紫外线致皮肤色素沉着及其相关机制的研究进展 [J]. 解放军医学院学报, 2016, 37(9):1008-1010.
- [46] 应为红, 张理梅, 李嫦嫦. 中药祛斑霜对黄褐斑豚鼠模型皮肤中SOD、MDA和黑素颗粒的影响 [J]. 上海中医药杂志, 2017,51(1):97-101.
- [47] 冯沛. 针药结合治疗对色素沉着小鼠酪氨酸酶的含量和皮肤组织结构的影响 [D]. 南京: 南京中医药大学, 2014.
- [48] 宋为民, 胡玲玲, 潘红, 等. 大光斑低能量Q开关Nd:YAG激光治疗黄褐斑的临床及动物研究 [J]. 中国中西医结合皮肤性病杂志, 2011,10(3):137-140.
- [49] NAM J H, MIN J H, KIM W K, et al. Melanogenesis inhibition in mice using a low-fluence 1064-nm Q-switched neodymium-doped yttrium aluminum garnet laser: a pilot study [J]. Lasers Med Sci, 2017,32(5):1063-1069.
- [50] 解萌. Q开关红宝石点阵激光联合氨甲环酸对UVB诱导豚鼠色素沉着的抑制作用 [D]. 石家庄: 河北医科大学, 2014.

- [51] 秦健, 李炜弘, 黄勤挽, 等. 加味圣愈膏滋对黄体酮所致黄褐斑模型小鼠肝脏和皮肤中SOD活力的影响[J]. 临床医药文献电子杂志, 2015, 2(11):2047.
- [52] 覃永健, 冷文婷. 白玉散局部外敷治疗黄褐斑机理的实验研究[J]. 中药药理与临床, 2010, 26(5): 128-129.
- [53] 何盾, 吴芳兰, 徐晓芃, 等. 熊果苷对黄褐斑鼠模型治疗效果及机制研究[J]. 中国现代医学杂志, 2018, 28(34):6-10.
- [54] 蒲春霞, 何海蓉. 大鼠黄褐斑动物模型的建立[J]. 河北科技师范学院学报, 2013, 27(2):66-69.
- [55] 王萍. 本草养颜膏治疗黄褐斑的实验研究[J]. 中医研究, 2008, 21(7):9-11.
- [56] 邓志博, 何施逸, 王乾力, 等. 两种方法建立SD大鼠黄褐斑模型比较实验研究[J]. 重庆医学, 2018, 47(15):1993-1996.
- [57] 刘邦民, 张涓, 陶春蓉, 等. 祛斑汤防治黄褐斑的实验研究[J]. 中药药理与临床, 2008, 24(1):67-69.
- [58] JANG Y H, LEE J Y, KANG H Y, et al. Oestrogen and progesterone receptor expression in melasma: an immunohistochemical analysis [J]. J Eur Acad Dermatol Venereol, 2010, 24(11):1312-1316.
- [59] TAMEGA A A, MIOT H A, MOCO N P, et al. Gene and protein expression of oestrogen-beta and progesterone receptors in facial melasma and adjacent healthy skin in women[J]. Int J Cosmet Sci, 2015, 37(2):222-228.
- [60] ORTONNE J P, ARELLANO I, BERNEBURG M, et al. A global survey of the role of ultraviolet radiation and hormonal influences in the development of melasma[J]. J Eur Acad Dermatol Venereol, 2009, 23(11):1254-1262.
- [61] 李倩, 曹莫. 外用氨甲环酸联合红宝石点阵激光对雌激素及紫外线诱导下豚鼠黑色素的抑制作用[J]. 中国美容整形外科杂志, 2018, 29(3):141-144, 152.
- [62] 康金森, 王雪飞, 刘发, 等. 红玉祛斑胶囊对黄褐斑模型小鼠的影响[J]. 中药药理与临床, 2013, 29(4): 134-136.
- [63] HWANG E, LEE T H, LEE W, et al. A novel synthetic Piper amide derivative NED-180 inhibits hyperpigmentation by activating the PI3K and ERK pathways and by regulating Ca^{2+} influx via TRPM1 channels[J]. Pigment Cell Melanoma Res, 2016, 29(1):81-91.
- [64] 赵洁, 任炜, 于普燕, 等. 特殊染色及组织化学技术在病理诊断及科研中的应用[J]. 齐鲁医学杂志, 2013, 28(5):468-470.
- [65] 王莹. 美肤汤对黄褐斑小鼠模型酪氨酸酶、SOD及病理形态学影响的实验研究[D]. 沈阳: 辽宁中医药大学, 2011.
- [66] 左立. 活血法对色素沉着小鼠酪氨酸酶含量和皮肤形态的影响[D]. 南京: 南京中医药大学, 2014.
- [67] WU P Y, LIN T Y, HOU C W, et al. 1, 2-bis[(3-methoxyphenyl) methyl] ethane-1, 2-dicarboxylic acid reduces uvb-induced photodamage *in vitro* and *in vivo* [J]. Antioxidants (Basel), 2019, 8(10):452.
- [68] GAUTAM M, PATIL S, NADKARNI N, et al. Histopathological comparison of lesional and perilesional skin in melasma: a cross-sectional analysis [J]. Indian J Dermatol Venereol Leprol, 2019, 85(4): 367-373.
- [69] 刘雪峰, 张威, 骆新兰, 等. 三种不同条件黑色素硫酸亚铁染色的比较[J]. 临床与实验病理学杂志, 2013, 29(8):924-925.
- [70] 刘智明, 杨辉, 周艳, 等. 850nm微激光美白效应的光谱法研究[J]. 激光生物学报, 2015, 24(1):60-67.
- [71] 董妙珠, 肖萍, 洪新宇, 等. 不同染色法检测豚鼠皮肤黑色素的比较研究[J]. 环境与职业医学, 2006, 23(5):423-425.
- [72] JOLY-TONETTI N, WIBAWA J I, BELL M, et al. Melanin fate in the human epidermis: a reassessment of how best to detect and analyse histologically [J]. Exp Dermatol, 2016, 25(7):501-504.
- [73] 张冰娜, 张丹桂, 叶丹彦, 等. 硫酸亚铁法和Fontana法显示黑色素的比较研究[J]. 汕头大学医学院学报, 2020, 33(1):46-48.
- [74] 许岩. 微等离子体射频技术对NB-UVB诱导豚鼠皮肤色素沉着的影响[D]. 石家庄: 河北医科大学, 2016.

[责任编辑 张丰丰]