

慢性应激抑郁型黄褐斑小鼠模型的建立

申宇鸿¹, 赵广², 耿龙³, 孟如松², 李菲², 郭广进²

(1.北京市和平里医院皮肤科 北京 100013; 2.解放军空军总医院皮肤病医院皮肤科 北京 100142; 3.中国医科大学附属第一医院皮肤科 辽宁 沈阳 110122)

[摘要]目的:根据黄褐斑主要发病因素,综合作用小鼠建立抑郁型黄褐斑小鼠模型,并与现有方法建立的模型进行比较。**方法:**取小鼠30只,随机分为3组:正常组6只、紫外线组12只、紫外线+黄体酮+抑郁组12只。造模时间第一批21d,第二批28d,然后对每组小鼠皮肤和肝脏SOD、MDA含量,皮肤黑色素细胞个数、数密度和平均光密度值进行统计分析。**结果:**黄体酮+紫外线+慢性应激抑郁模型建立法造模较其他方法更能导致皮肤丙二醛(Malondialdehyde, MDA)升高和超氧化物歧化酶(Superoxide Dismutase, SOD)降低以及皮肤黑色素细胞的增加,差异均有统计学意义($P < 0.01$)。且同时停止紫外线照射后1周,黄体酮+紫外线+抑郁组色素沉着消退慢,黑色素数量仍高于其他模型组。**结论:**黄体酮+紫外线+慢性应激抑郁模型建立的黄褐斑小鼠模型获得成功。

[关键词]黄褐斑; 抑郁型; 小鼠模型; 丙二醛; 超氧化物歧化酶

[中图分类号]R758.4⁺2 **[文献标志码]**A **[文章编号]**1008-6455(2018)02-0094-04

Establishment of Mouse Model of Chronic Stress Depression Chloasma

SHEN Yu-hong¹, ZHAO Guang², GENG Long³, MENG Ru-song², LI Fei², GUO Guang-jin²

(1.Department of Dermatology, Beijing Hepingli Hospital, Beijing 100013, China; 2.Department of Dermatology, Air Force General Hospital of PLA, Beijing 100142, China; 3.Department of Dermatology, the First Hospital of China Medical University, Shenyang 110122, Liaoning, China)

Abstract: Objective To establish and validate mouse model of depressive chloasma according to the main pathogenic factors of melasma, and compared with other methods. **Methods** 30 mice were randomly divided into 3 groups: 6 mice in normal group, 12 mice in ultraviolet group, 12 mice in ultraviolet + progesterone + depression group. The first batch of 21 days, the second batch of 28 days, then the skin and liver SOD, MDA contents, the numbers of melanocytes, the numbers density and the average optical density values of each group of mice were statistically analyzed. **Results** Progesterone and UV + chronic stress depression model modeling method is superior to other methods, it can more effectively lead to skin malondialdehyde (MDA) increased and the activity of superoxide dismutase (SOD) decreased and skin melanocytes increased ($P < 0.01$). After a week and stop after ultraviolet irradiation and UV + progestin depression group pigmentation faded slowly, the number of melanin was still higher than the model group. **Conclusion** Mouse model of chloasma established by progesterone + ultraviolet + chronic stress depression is successful.

Key words: chloasma; depression type; mouse model; malondialdehyde; superoxide dismutase

黄褐斑是一种由多种因素综合作用所致的色素代谢异常性疾病,其发病机理复杂,具体病因尚不十分清楚。国内外研究显示紫外线辐射、内分泌失调、情绪变化、肝病、化妆品使用不当等都是黄褐斑的重要致病因素。长期紫外线照射可使黑素细胞增殖,而黑色素的生成是酪氨酸酶一系列氧化反应的结果,提示体内氧化与抗氧化之间的平衡紊乱。相关实验^[1]证实黄褐斑患者较正常人的脂质过氧化物(Lipid peroxide, LP0)升高、

超氧化物歧化酶(Superoxide dismutase, SOD)下降,故可以通过皮肤黑色素病理形态学,LP0的衍生物丙二醛(Malondialdehyde, MDA)及SOD量的变化证实黄褐斑模型的成功。本课题根据黄褐斑的主要发病因素,拟对小鼠局部行紫外光照射,内用雌激素全身攻击,同时采用慢性应激刺激致小鼠出现抑郁症状,在多重因素综合作用下构建小鼠黄褐斑模型,并与原有模型建立结果^[2-3]相比较。

1 材料和方法

1.1 实验动物: 健康雌性BALB/C小鼠30只, 清洁级, 体重(20±2)g, 由军事医学科学院实验动物中心提供, 合格证号: SCXK-(军) 2002-001。

1.2 试剂和器材: 黄体酮注射液(20mg/ml, 使用前用灭菌注射用水稀释至所需浓度); 超氧化物歧化酶(SOD)试剂盒(南京建成生物工程研究所, 批号: 20060110); 丙二醛(MDA)试剂盒(南京建成生物工程研究所, 批号: 20060116); HMB45(melanoma 黑素瘤)abcam鼠单克隆抗体(购自武汉华美生物工程有限公司)。DuaLight™ UVA/UVB高能紫外光治疗仪。

1.3 实验方法

1.3.1 分组: 取小鼠30只, 随机分为3组: 正常组6只、紫外线组12只、紫外线+黄体酮+抑郁组12只。造模时间第一批21d, 第二批28d。第一批: 正常组6只、紫外线组6只、紫外线+黄体酮+慢性应激抑郁组6只; 第二批: 紫外线组6只、紫外线+黄体酮+慢性应激抑郁组6只。

1.3.2 模型建立

1.3.2.1 正常组: 先在小鼠颈背部涂肥皂水, 以剃须刀片刮去背部毛, 露出约1.5cm×1.5cm的皮肤1块。每周脱毛1~2次, 每天肌肉注射注射用水5ml/kg, 连续观察小鼠脱毛部位的皮肤变化情况。

1.3.2.2 紫外线组: 脱毛步骤同正常组, 先通过预实验得到BALB/C小鼠长波紫外线最小光毒量(Minimal phototoxic dose, MPD)为7J, 中波紫外线最小红斑量(Minimal erythematous dose, MED)为480mJ。第1天以0.7MPD+0.7MED中波紫外线UVA(7J)+UVB(480mJ)每天照射1次, 连续照射6d, 第7天小鼠皮肤出现轻微结痂脱屑, 停止照射2d; 第9天以0.5MPD+0.5MED照射1次, 第10天皮肤出现红斑, 停止照射2d; 第12天以0.5MPD+0.5MED照射1次, 第13天皮肤出现红斑, 停止照射3d; 第16天以0.25MPD+0.25MED照射1次, 第17天皮肤出现红斑, 停止照射2d; 第19天以0.25MPD+0.25MED照射1次, 第20天皮肤出现红斑, 停止照射2d。第一批: 照射21d。第二批: 照射21d后, 停止照射7d。

1.3.2.3 黄体酮+紫外线+抑郁组: 同正常组脱毛处理, 紫外线照射方法同紫外线组。每日8:00~9:00注射黄体酮注射液, 使用前用灭菌注射用水稀释至所需浓度, 每日肌肉注射0.4%黄体酮5ml/kg。慢性轻度不可预见性应激(Chronic unpredictable mild stress, CUMS)抑郁模型制作方案: 按照经典抑郁模型^[3-4]略加改进为2h行为限制、4℃冰水中游泳5min、停水4h、停食24h、夹尾1min、明暗颠倒24h、摇晃5min(160Hz)、笼子倾斜45°、40℃环境5min, 共9种刺激随机安排到21d内, 每天1种刺激, 每种出现2~3

次, 同种刺激不能连续出现避免动物预料刺激的发生。

1.4 检测指标和方法

1.4.1 皮肤黑色素细胞的病理形态学观察: 第一批小鼠当脱毛部位皮肤出现明显的色变(照射21d), 取去毛皮肤1块(1cm×1cm), 10%福尔马林溶液固定, 常规石蜡包埋切片, 经脱蜡至水, 抗原修复, 用HMB45(melanoma黑素瘤)为第一抗体, 二氨基联苯胺(Diaminobenzidine, DAB)显色, 苏木素复染, 用PBS代替一抗做阴性对照。第二批小鼠在实验28d后处死取皮, 余步骤同上。黑色素阳性目标用计算机进行图像分析, 每片观察5个不同视野, 找到阳性目标后应用空军总医院与北京航空航天大学共同研制的CMIAS多功能真彩色病理图像分析系统, 进行病理图像形态学定量分析, 步骤如下: 每张切片在显微镜物镜40倍视野下, 随机选择5个视野进行彩色图像采集与存储, 计算出每个视野的形态学阳性目标(靶目标)中的数密度及光密度参数。光密度反应物体对光的吸收率(透过率), 反应物体颜色的深浅程度。颜色越深, 其对光线的吸收越多, 故光密度越高。积分光密度是物体的平均光密度与物体面积的乘积, 颜色越深, 面积越大, 光密度越高^[5-8]。

1.4.2 MDA和SOD活性测定: 同时取肝脏及脱毛部位皮肤, 用预冷生理盐水(4℃)冲洗, 除尽杂质, 拭干, 切取皮肤0.2g, 肝脏0.5g, 分别放入有9倍于组织块的预冷生理盐水的小试管内, 将剪碎的组织倒入玻璃均浆管中, 上下转动研磨数十次, 充分研碎, 使组织均浆化。均浆后以3500r/min离心8min, 取上清液采用试剂盒检测MDA、SOD活性^[9-12]。

1.4.3 行为学实验

1.4.3.1 旷场实验: 于第22天清晨8:00, 在无噪声的实验环境条件下进行。操作者握住小鼠的尾巴根部1/3处, 轻轻将小鼠放入6cm×9cm×9cm的长方形实验盒内的中央格, 并开始计时。底部均分为6格(3×3), 分别观察并记录3min内小鼠行走的格数和直立的次数。实验要求在单盲的条件下进行, 减少人为误差。观察指标: 穿格次数、理毛次数、直立次数。共进行4次, 每次间隔3min, 取后3次数据计算平均数用于统计分析^[13]。

1.4.3.2 体质量变化测定: 实验开始及结束时分别测量小鼠的体质量。

1.4.3.3 液体消耗试验: 试验前, 在隔噪音、安静的房间内, 训练动物适应含糖饮水, 每笼同时放置2个水瓶, 第一个24h, 两瓶均装有1%蔗糖水, 随后的24h, 一瓶装1%蔗糖水, 一瓶装纯水。23h的禁食禁水后, 进行动物的基础糖水/纯水消耗试验, 同时给予每只小鼠事先定量好的两瓶水: 一瓶1%蔗糖水, 一瓶纯水。24h后, 取走两瓶水并称重。计算动物的总液体消耗量、糖水消耗量、纯水消耗量及糖水

偏爱度(糖水偏爱=糖水消耗/总液体消耗 $\times 100\%$)^[14]。

1.5 统计学分析: 采用统计学软件SPSS 21.0, 用 $(\bar{x} \pm s)$ 表示各组小鼠皮肤和肝脏SOD、MDA含量、皮肤黑色素细胞的个数、数密度和平均光密度值等计量资料, 行 t 检验, 检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 三组小鼠皮肤黑色素细胞的病理形态检测结果: 空白组: 鳞状上皮较菲薄, 由排列整齐的基底细胞和棘细胞组成, 共2~3层, 表面有少量角质; 真皮中可见毛囊, 皮脂腺与表皮相连, 未见汗腺; HMB45标记表皮中几乎未见黑色素细胞, 毛囊、皮脂腺基底细胞中见少量黑色素细胞, 见图1。紫外线组: HMB45标记的黑色素阳性细胞少量增多, 分布于毛囊基底细胞团中, 呈阳性反应, 表皮基底细胞和棘细胞层中亦见单个散在分布的黑色素细胞, 伴细胞核增大及上移, 见图2。黄体酮+紫外线+抑郁组: HMB45标记的黑色素阳性细胞明显增多, 成簇分布于毛囊基底细胞团中, 呈强阳性反应, 表皮基底细胞和棘细胞层中亦见单个散在分布的黑色素细胞, 伴细胞核增大及核上移, 见图3。

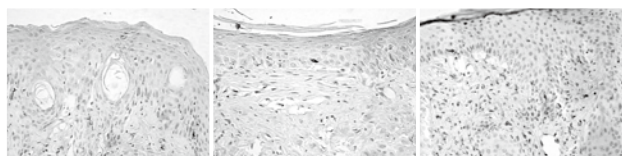


图1 正常组小鼠表皮中未见黑色素细胞, 底细胞和棘细胞层中可见单个散在分布的黑色素细胞(HMB45免疫组织化学反应, 400 \times) 图2 紫外线组表皮基底细胞和棘细胞层中可见单个散在分布的黑色素细胞(HMB45免疫组织化学反应, 400 \times) 图3 黄体酮+紫外线+抑郁组表皮基底细胞和棘细胞层中可见黑色素细胞分布成簇, 表现出强烈的阳性反应(HMB45免疫组织化学反应, 400 \times)

2.2 五组小鼠皮肤黑色素细胞个数检测结果: 由表1可知, 模型组小鼠皮肤黑色素细胞的个数均较正常组有所增加, 其中黄体酮+紫外线+抑郁21d组与正常组比较, 差异有统计学

意义($P < 0.01$)。

表1 五组小鼠皮肤黑色素细胞个数比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	黑色素细胞个数
正常组	6	1.60 \pm 0.81
紫外线组(21d)	6	3.53 \pm 0.83*
紫外线组(28d)	6	1.20 \pm 1.19
黄体酮+紫外线+抑郁组(21d)	6	6.53 \pm 1.59**
黄体酮+紫外线+抑郁组(28d)	6	3.43 \pm 0.87*

注: 与正常组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

2.3 五组小鼠表皮黑色素沉着数量及深浅度: 由表2可知, 模型组数密度明显高于正常组, 尤其是黄体酮+紫外线+抑郁模型组21d组与正常组比较, 差异有统计学意义($P < 0.01$); 模型组小鼠皮肤黑色素阳性目标的平均光密度明显高于正常组, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。

表2 五组小鼠皮肤黑色素细胞的数密度和平均光密度值比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	数密度	平均光密度
正常组	6	0.038 \pm 0.02	0.26 \pm 0.15
紫外线组(21d)	6	0.051 \pm 0.017*	0.36 \pm 0.12*
紫外线组(28d)	6	0.033 \pm 0.02	0.23 \pm 0.13
黄体酮+紫外线+抑郁组(21d)	6	0.136 \pm 0.029**	0.49 \pm 1.56*
黄体酮+紫外线+抑郁组(28d)	6	0.055 \pm 0.016*	0.46 \pm 0.20*

注: 与正常组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

2.4 五组小鼠MDA和SOD活性检测结果: 由表3可知, 模型组肝脏与皮肤中的MDA水平均较正常组升高, SOD较正常组有所下降。其中, 黄体酮+紫外线+抑郁21d组皮肤中SOD含量较正常组显著降低, 差异有统计学意义($P < 0.01$); 黄体酮+紫外线+抑郁28d组皮肤及肝脏中MDA含量与正常组比较, 差异有统计学意义($P < 0.01$)。

2.5 行为学实验检测结果: 慢性应激刺激21d后, 黄体酮+紫外线+抑郁组的穿格次数、直立次数、理毛次数、体质量增加量均较正常组有所减少, 差异有统计学意义($P < 0.01$); 黄体酮+紫外线+抑郁组的糖水消耗显著低于正常组

表3 五组小鼠皮肤和肝脏SOD、MDA含量检测结果

($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	皮肤		肝脏	
		SOD (U/mg)	MDA (nmol/mg)	SOD (U/mg)	MDA (nmol/mg)
正常组	6	115.65 \pm 55.11	4.63 \pm 1.77	95.35 \pm 73.99	3.38 \pm 2.70
紫外线组(21d)	6	86.14 \pm 36.93*	6.37 \pm 3.04*	67.14 \pm 19.31*	4.26 \pm 1.82
紫外线组(28d)	6	94.18 \pm 30.40	5.01 \pm 1.64	63.28 \pm 7.50*	4.03 \pm 1.68*
黄体酮+紫外线+抑郁组(21d)	6	77.00 \pm 49.69**	8.78 \pm 3.18*	45.37 \pm 23.87*	5.15 \pm 2.19*
黄体酮+紫外线+抑郁组(28d)	6	80.39 \pm 25.15*	6.03 \pm 2.33**	54.98 \pm 25.02*	5.09 \pm 1.99**

注: 与正常组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

表4 行为学实验检测结果

($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	穿格次数(次)	直立次数(次)	理毛次数(次)	体质量增加量(g)	糖水消耗量(g)
正常组	6	20.32±3.50	11.66±2.71	5.16±1.95	5.16±0.41	52.2±2.4
紫外线组	12	17.24±3.79	8.92±1.58	6.33±1.11	3.66±1.15	43.3±7.5
黄体酮+紫外线+抑郁组	12	9.82±1.27**	6.41±4.15**	3.17±1.08**	1.24±0.97**	26.5±4.2*

注:与正常组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$

($P < 0.05$)。见表4。

3 讨论

本次研究结果显示,慢性应激刺激后,黄体酮+紫外线+抑郁组的穿格次数、直立次数、理毛次数、体质量增加量均较正常组有所减少,差异有统计学意义($P < 0.01$);黄体酮+紫外线+抑郁组的糖水消耗显著低于正常组($P < 0.05$),各项指标检测结果均符合经典抑郁模型评价标准,说明小鼠已处于抑郁状态。同时模型组肝脏和皮肤中的MDA水平较正常组升高,SOD含量较正常组有所下降。和相关医学研究结果一致^[15],提示这种造模法对于小鼠皮肤、肝脏MDA、SOD的活性影响较大。

本试验结果显示,模型组黑色素着色面积、黑色素细胞数明显大于正常组,黑色素着色深度明显增加,说明造模后豚鼠表皮黑色素着色面积、深度明显加大,具备黄褐斑的主要临床特征。皮肤和肝脏的MDA含量明显升高,SOD含量降低,符合黄褐斑的生物化学改变特征。既往黄褐斑的模型仅单独采用中波紫外线照射法或黄体酮注射法致小鼠皮肤色素加深,未比较在停止刺激后一段时间小鼠皮肤黑色素量的差异,未排除紫外线照射后形成的炎症后色素沉着对实验结果的影响。本实验中比较了紫外线作用相同时间和停止照射后1周小鼠模型皮肤色素的变化,结果显示本次选用方法刺激后,小鼠黑色素沉着面积扩大、着色加深,小鼠皮肤黑色素活性最强,且黑素沉着时间维持最长,适合用作黄褐斑动物模型的建立。

总之,黄体酮+紫外线+抑郁方法建立的模型其色素沉着更接近黄褐斑。临床黄褐斑治疗比较困难,无明显有效治疗药物,本实验为今后黄褐斑发病机制和治疗药物药理作用的研究提供了较为理想的动物模型建立方法。

【参考文献】

[1]杨佩英.火针配合针刺治疗肝郁型黄褐斑的疗效观察[D].广州:广州中医药大学,2016.
[2]卢俊.丹芩消郁合剂对肝斑疗效及其角化套膜成熟度的作用研究[D].上海:上海中医药大学,2014.
[3]杨鹏,杨慧兰,麦跃,等.慢性应激抑郁型黄褐斑动物模型建立与现有模型的比较研究[J].中国美容医学,2013,22(3):349-354.
[4]秦静,白姗姗,边风华,等.黄褐斑中医分型与性激素水平相关性及

中药疗效观察[J].中国中西医结合皮肤性病学杂志,2013,12(5):292-294.
[5]张军英,张金芳,吴娅,等.音乐疗法辅助面部刮痧治疗黄褐斑30例[J].社区医学杂志,2012,10(12):88.
[6]左加成,于娜,赵丹丹,等.高思华教授血府逐瘀汤治验4则[J].世界中医药,2016,11(7):1296-1298.
[7]Hopley RT,Haller E,Rojiani MV,et al.Morphologic and Elemental Analysis of Primary Melanosis of the Dentate Nucleus: Review and Correlation With Neuromelanin[J].J Neuropathol Exp Neurol,2017,76(11):949-956.
[8]Sharma VK,Gupta V,Pahadiya P,et al.Dermoscopy and patch testing in patients with lichen planus pigmentosus on face: A cross-sectional observational study in fifty Indian patients[J].Indian J Dermatol Venereol Leprol,2017,83(6):656-662.
[9]Liu L,Gao H,Yu W,et al.Outcome Analyses of 15,189 Screenings Via Colonoscopy[J].Surg Laparosc Endosc Percutan Tech,2017,27(5):400-403.
[10]Alavi S,Abolhasani E,Asadi S,et al.Combination of Q-Switched Nd:YAG and Fractional Erbium:YAG Lasers in Treatment of Melasma: A Randomized Controlled Clinical Trial[J].J Lasers Med Sci,2017,8(1):1-6.
[11]Tchernev G,Chokoeva AA,Mangarov H.Penile Melanosis Associated with Lichen Sclerosus et Atrophicus: First Description in the Medical Literature[J].Open Access Maced J Med Sci,2017,5(5):692-693.
[12]Goktas SE,Katircioglu Y,Celik T,et al.Surgical amniotic membrane transplantation after conjunctival and limbal tumor excision[J].Arq Bras Oftalmol,2017,80(4):242-246.
[13]Valente SL,Bieniek JM,Kesler SS.Urothelial melanosis of the bladder[J].Can J Urol,2017,24(5):9035-9037.
[14]Huang Y,Chen J,Yang J,et al.Evaluation of depressive symptoms in obese patients with or without acanthosis nigricans[J].Hormones(Athens),2015,14(3):417-424.
[15]Canbaz B.Depressive symptoms in obese patients study[J].Hormones(Athens),2016,15(1):149.

【收稿日期】2017-08-07 【修回日期】2017-11-02

编辑/朱婉蓉