

【 评价方法学 】

化学脱色法制备白癜风豚鼠模型的比较研究

王峥屹¹, 蒋文燕², 曾菊芳², 张 赟², 吴德美²

1. 四川省医学科学院 四川省人民医院, 四川 成都 610071

2. 四川省医学科学院 四川省人民医院实验动物研究所, 四川 成都 610212

摘要:目的 比较研究过氧化氢和氢醌两种化学脱色法制备白癜风豚鼠模型, 发现存在的问题, 并分析影响因素。方法 豚鼠随机分成模型组和对照组, 每组 12 只, 雌雄各半。采用 3 种方式制备白癜风模型: 5%过氧化氢溶液局部皮肤涂抹、5%过氧化氢溶液局部皮肤封闭透皮、5%氢醌溶液局部皮肤涂抹, 对照组平行给予生理盐水, 连续 40~50 d。肉眼观察皮肤表面局部色素脱失现象; 取白斑区皮肤切片, 硫酸亚铁 Lillie 法染色, 光镜下观察皮肤组织形态和黑色素分布情况; Advanced 3.0 图像分析软件测量表皮黑色素照片的平均积分光密度。**结果** 采用 5%过氧化氢溶液两种方式造模, 豚鼠均未出现皮肤色素脱失, 白癜风模型未成立; 采用 5%氢醌溶液涂抹后, 局部皮肤出现灰白色斑片状色素脱失, 基本达到模型的外观要求; 经组织病理学半定量或定量分析, 与对照组比较, 表皮含黑色素毛囊比例、黑色素分布评分、表皮平均积分光密度均显著降低 ($P < 0.05, 0.01$)。**结论** 过氧化氢通过破坏黑色素结构脱色, 对其生成影响不大, 模型较难成立; 氢醌为酪氨酸酶抑制剂, 可减少黑色素生成, 更易形成白癜风模型。

关键词: 白癜风; 化学脱色法; 豚鼠; 比较研究; 过氧化氢; 氢醌; 酪氨酸酶

中图分类号: R965.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-6376(2017)12-1723-05

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2017.12.009

Comparative study of chemical decolorization method building vitiligo guinea pigs model

WANG Zheng-yi¹, JIANG Wen-yan², ZENG Ju-fang², ZHANG Yun², WU De-mei²

1. Sichuan Academy of Medical Sciences & Sichuan provincial People's Hospital, Chengdu 610071, China

2. Institute of Laboratory Animal of Sichuan Academy of Medical Sciences & Sichuan Provincial People's Hospital, Chengdu 610212, China

Abstract: Objective To compare two chemical decolorization methods building vitiligo guinea pigs model, which were prepared by hydrogen peroxide and hydroquinone, and to discovery some existing problems and analyze the influencing factors. **Methods** Guinea pigs randomly divided into model and control group with 12 in each group, male and female in half. Using three ways to build vitiligo model: 5% hydrogen peroxide topical skin smear, 5% hydrogen peroxide closed treatment and 5% hydroquinone solution topical skin smear. Guinea pigs in the model group were given equal volume of normal saline for consecutive 40 ~ 50 d. Local skin pigment depigmentation phenomenon was observed by naked eye. Skin sections from the white spot area were taken for ferrous sulfate Lillie staining to observe the morphology and distribution of melanin in skin tissue under light microscope. The average integral optical density of melanin photos of epidermis was measured by advanced 3.0 image analysis software. **Results** Using 5% hydrogen peroxide solution of two types building method, experimental animals did not appear skin depigmentation, and vitiligo model was not established; After coating with 5% hydroquinone liquid, local skin appeared gray spots flake, basically meet the requirements of the appearance of the model. In the semi-quantitative or quantitative analysis of histopathology, the melanin distribution in the skin epidermis, melanin score and the mean value of integral optical density of epidermis were significantly decreased compared with the normal control group ($P < 0.01$ or 0.05). **Conclusion** Hydrogen peroxide is a strong oxidizer, which can destroy the structure of melanin, but has little decoloring effect to set up the vitiligo model. Hydroquinone, as a tyrosinase inhibitor, can reduce

收稿日期: 2017-08-02

作者简介: 王峥屹, 研究方向为药理毒理学。E-mail: 983927965@qq.com Tel: 028-67080255

the generation of melanin and are more likely to form the model of vitiligo.

Key word: Vitiligo; chemical decolorization method; guinea pig; comparative study; hydrogen peroxide; hydroquinone; tyrosinase

白癜风是一种原发性的局限性或泛发性皮肤色素脱色症,临床主要表现为皮肤黑色素减少,呈不规则或对称性白斑,目前发病机制尚未阐明,存在化学性色素脱失、黑素细胞自毁、神经体液因子损伤、自身免疫及遗传学说等假说,治疗仍有困难^[1]。该疾病在动物实验研究中常选用化学脱色法造模,现有白癜风动物模型制备方法也仅限于此,包括过氧化氢和氢醌脱色。过氧化氢带有过氧键,容易因过氧键断裂生成过氧自由基,该自由基夺电子能力强,有强氧化性。当过氧化氢等强氧化剂与色素作用时,有色物质的分子被氧化失去原有的颜色,与黑色素结合后可使局部皮肤脱色。

近期,笔者在白癜风豚鼠造模过程中,观察到5%过氧化氢化学脱色法实际应用中的一问题,做如下报道。

1 材料

1.1 动物

英国种花黑色豚鼠,雌雄各半,体质量(200±20)g,由四川省实验动物专委会养殖场提供,实验动物生产许可证号SCXK(川)2013-14。

1.2 主要试剂

30%过氧化氢(分析纯),批号20160918,规格500 mL(约555 g),用生理盐水稀释成5%浓度,现用现配;氢醌(对苯二酚,分析纯),批号20161228,规格250 g,以蒸馏水、甘油(约9:1)配制成5%的氢醌溶液,现配现用;均由成都金山化学试剂有限公司生产。

2 方法与结果

2.1 5%过氧化氢溶液局部涂抹造模

参照文献方法^[2-3],选取检疫合格黑色或黑花毛(黑色皮肤)豚鼠24只,用长剪剪去背部黑色皮肤区长毛,电动剃毛刀剃去背部短毛约4 cm×4 cm,肥皂水、清水依次洗净剃毛部位。随机分成2组:模型组、对照组,每组12只,雌雄各半。模型组脱毛区涂5%过氧化氢溶液1 mL,每天2次,连续50 d;对照组平行涂生理盐水1 mL。每3天同法剃毛1次。

连续造模50 d,模型组豚鼠脱毛区皮肤未见明显色素脱失,与对照组比较外观无明显差异。但在造模过程中,豚鼠有搔抓脱毛区现象,致局部皮肤破损,破损皮肤区有短暂的色素脱失,一般2~3 d

可恢复,恢复后局部色素沉着较明显。整个试验过程中未见与造模相关的色素脱失,判定造模失败。

2.2 5%过氧化氢溶液局部封闭透皮造模

利用“2.1”项造模动物,动物编号不变,维持原有模型组和对照组,雌雄各半,每组12只。5%过氧化氢皮肤给药方法参照国家标准GBZ/T240.6-2011^[4],采用封闭试验,以希最大限度提高过氧化氢皮肤局部浓度,充分暴露其脱色素能力。脱毛方式同“2.1”项,每3天脱毛一次。取5%过氧化氢溶液1.5~2.0 mL直接涂布在皮肤上,并浸透覆盖脱毛区的4层纱布(2.5 cm×2.5 cm),用一层保鲜膜覆盖纱布,再用无刺激性胶布和绷带加以固定,敷用时间为4 h。试验结束后,用温水清除残留。控制室温(20±2)℃,湿度40%~70%。对照组采用生理盐水平行实验,连续造模40 d,每天仔细观察皮肤色素变化,记录皮肤刺激情况。

每天封闭给药4 h后,与皮肤接触的过氧化氢纱布仍然湿润,皮肤潮湿,局部皮肤色素脱失不明显。造模后期,部分动物出现皮肤刺激性表现:皮肤粗糙,弹性下降,少部分动物出现局部皮肤硬结,停药后能自行恢复。造模结束后,肉眼观察,皮肤造模处色素依然均匀,局部也无灰、白斑片状色素脱失。对照组皮肤造模处光洁,无明显刺激反应,色素均匀。未出现文献报道的用过氧化氢后,肉眼可见豚鼠黑色皮肤变苍白,随用药时间延长,有的出现白斑,甚至原有黑毛处长出白毛的现象。因造模过程中无与造模相关的色素脱失,故判断造模失败。两次5%过氧化氢溶液造模后,豚鼠表皮观察见图1。

2.3 5%氢醌溶液局部涂抹造模

参照文献方法^[5],选用“2.2”项造模动物,与上次试验间隔约50 d,观察豚鼠局部皮肤完全恢复正常。动物编号不变,维持原有模型组和对照组,雌雄各半,每组12只。局部脱毛方式同“2.1”项,每3天脱毛一次。模型组脱毛区涂5%氢醌溶液0.5 mL,每天2次,连续42 d;对照组平行涂抹生理盐水。

以水合氯醛麻醉豚鼠,腹主动脉放血处死,取白斑区1 cm×1 cm皮肤,于10%中性缓冲福尔马林溶液中固定72 h,进行常规石蜡包埋、切片(5 μm厚度)、硫酸亚铁Lillie法染色,光镜下观察皮肤组织形态和黑色素分布情况,在4×100倍镜头下随意



图1 5%过氧化氢溶液造模前后豚鼠表皮观察

Fig. 1 Observation of skin surface of guinea pigs before and after modeling with 5% hydrogen peroxide solution

观察 20 个毛囊, 计算其中含黑色素毛囊比例及表皮黑色素分布情况。对表皮黑色素分布进行分级评分: “+++”: 表皮基底层细胞及棘层均有黑色素; “++”: 表皮基底细胞及棘层 1/2 以上有黑色素; “+”: 表皮基底细胞及棘层 1/2~1/3 有黑色素; “±”: 表皮基底细胞及棘层偶见黑色素; “-”: 表皮基底细胞及棘层无黑色素, 分别计为 4、3、2、1 和 0 分。在 4×100 倍镜头下随意拍取 6 张表皮黑色素照片, 用 Advanced 3.0 图像分析软件测量图片的平均积分光密度, 取 6 个值的平均数作为该动物表皮平均积分光密度最终值, 数值越高, 说明表皮黑色素分布越多。

采用 SPSS 20.0 软件对所得数据进行统计分析,

计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 对照组与模型组采用双侧 *t* 检验分析组间差异。

造模 42 d 后, 模型组 12 只豚鼠涂抹氢醌处皮肤出现明显灰白色斑片状色素脱失, 部分呈大片色素脱失, 对照组造模前后无明显变化, 两组肉眼观察有明显的差异, 结果见图 2。通过组织病理学图象分析观察, 对照组背部皮肤表皮基底层细胞和肌层均有黑色素, 模型组背部皮肤表皮基底层细胞及棘层偶见黑色素; 豚鼠表皮含黑色素毛囊比例、表皮黑色素分布评分、皮肤表皮平均积分光密度与对照组比较均显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.01), 造模结果初步达到预期效果。结果见图 3 和表 1。



图2 5%氢醌溶液造模前后豚鼠表皮观察

Fig. 2 Observation of skin surface of guinea pigs before and after modeling with 5% hydroquinone solution

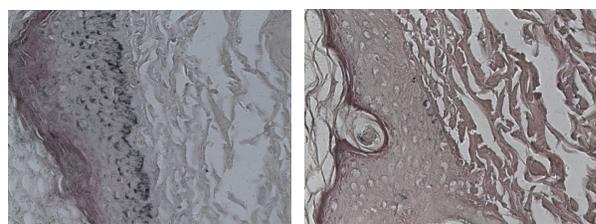


图3 硫酸亚铁 Lillie 法染色观察皮下黑色素

Fig. 3 Observation of subcutaneous melanin by ferrous sulfate Lillie staining

3 讨论

皮肤生物学研究表明, 黑色素细胞存于表皮基底层, 以 1:36 比例与角质形成细胞, 构成一个表皮单位。黑色素是黑色素细胞产物, 黑色素颗粒通

表1 豚鼠表皮含黑色素毛囊数百分比、黑色素分布评分、平均积分光密度 ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

Table 1 Percentage of melanin containing hair follicles, melanin distribution score of skin epidermis and mean integral optical density in epidermis of guinea pigs ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

组别	含黑色素毛囊率/%	表皮黑色素分布评分	表皮积分光密度
对照	55.83±14.63	3.50±0.55	41.17±27.77
模型	32.50±10.84*	1.83±0.75**	11.90±7.29*

与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs control group

过黑色素细胞枝状突起向角质细胞转移, 然后随表皮细胞上行至角质层, 从而影响皮肤的颜色或形成

色斑,最终随角质层脱落而排泄^[6]。黑色素是一种高分子量的蛋白质,它的形成要经过一系列代谢过程:酪氨酸在酪氨酸酶的作用下逐渐变成多巴→多巴醌→无色物质→多巴色素→醌式吲哚,最后形成黑色素^[7],酪氨酸酶是黑色素生物合成途径中的主要限速酶,黑色素异常丢失是造成白癜风疾病的直接原因。

白癜风动物模型在研究白癜风的发病机制和治疗方法上发挥了重要的作用^[8]。目前,白癜风模型常用实验动物有 Smyth line (SL) 鸡^[9]、C57BL/6JLer-vit/vit 小鼠^[10-11]、豚鼠,研究表明,化学脱色法造模用实验动物以豚鼠为优^[12]。选择过氧化氢与氢醌是化学脱色造模常用试剂,两者均有文献报道^[2-3,12],其成模机制有所差异:过氧化氢为强氧化剂,通常认为其溶液中 HO^{\cdot} 离子是漂白的主要成分,破坏色素的共轭双键,达到消色漂白的目的,对酪氨酸酶活性及黑色素生成是否会造成影响尚无定论;而氢醌是酪氨酸酶抑制剂,其与酪氨酸竞争抑制酪氨酸酶,影响黑色素生成^[13-14]。本次试验研究发现,在严格控制过氧化氢给药条件的情况下(控制影响过氧化氢透皮能力的多因素,如角质层的水合度、接触时间、温度、湿度等),并未造成皮肤色素的明显脱失,其中原因尚不明晰。笔者认为可能存在一种黑色素生成与氧化(漂白丢失)间的动态平衡,过氧化氢本身不影响黑色素细胞生成黑色素,仅对已生成黑色素起漂白作用,新生成的黑色素颗粒足以弥补透皮过氧化氢对黑色素的影响,无法引起皮肤明显脱色。而氢醌作用机制不同,透皮后对酪氨酸酶竞争抑制,细胞生成黑色素能力下降,角质细胞通过枝状突起接受黑色素颗粒减少,可在较短的时间内,随角质层脱落而表现出明显的色素丢失,造成白癜风样皮肤改变。当然,造模过程中影响因素众多,如动物品系、质量、年龄、过氧化氢稳定性等,在模型制备过程中应引起重视。

从本次试验结果分析,化学脱色法制备白癜风豚鼠模型,利用氢醌脱色更易成功,其脱色机制也与临床白癜风接近。本次试验报道,目的是为化学脱色法制备豚鼠白癜风动物模型提供参考,探讨模型成立的关键影响因素,为今后摸索解决问题的方

法提供依据。

参考文献

- [1] 赵 辨. 临床皮肤病学 [M]. 南京: 江苏科学技术出版社, 2003.
- [2] 龙子江, 白 玫, 樊 彦, 等. 化学脱色法制备白癜风动物模型 [J]. 安徽中医学院学报, 1997, 16(6): 60-61.
- [3] 盛国荣. 祛白酞对实验性白癜风的治疗作用 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2008, 2(14): 57-59.
- [4] 中华人民共和国卫生部. 中华人民共和国国家职业卫生标准: 化学品毒理学评价程序和试验方法. 第 6 部分: 急性皮肤刺激性/腐蚀性试验, GBZ/T240.6-2011.
- [5] 何 文, 韩瑞玲, 罗顺德, 等. 8-甲氧补骨脂素脂质体凝胶对白癜风模型豚鼠的治疗作用研究 [J]. 中国药房, 2005, 9(2): 93-94.
- [6] 宁 岭. 皮肤的美白 [J]. 日用化学工业, 1998(3): 24-27.
- [7] 李洪武, 朱文元, 夏明玉. 赤芍等 5 种上调酪氨酸酶活性中药乙醇提取液对棕黄色豚鼠背部皮肤的增色作用 [J]. 临床皮肤科杂志, 2001, 30(2): 69-71.
- [8] Ongena K, Van Geel N, Naeyaert J M. Evidence for an autoimmune pathogenesis of vitiligo [J]. Pigment Cell Res, 2003, 16: 90-100.
- [9] Sreekumar G P, Smyth J R Jr, Ponce de Leon F A. Molecular characterization of the Smyth chicken sublines and their parental controls by RFLP and fingerprint analysis [J]. Poult sci, 2001, 80(1): 1-5.
- [10] Peterse E M, Tobin D J, Botchkareva N, et al. Migration of melanoblasts into the developing murine hair follicle is accompanied by Transient Ckit expression [J]. J Histochem Cytochem, 2000, 50(6): 751-766.
- [11] Pal P, Mallick S, Mandal S k, et al. A human placental extract: *in vivo* and *in vitro* assessments of its melanocyte growth and pigment-Indu-cing activities [J]. Int J Dermatol, 2002, 41(11): 760-767.
- [12] 张兰兰, 闫 明, 刘晓东, 等. 两种化学脱色剂对两种动物模拟白癜风作用比较 [J]. 医药导报, 2009, 28(6): 690-692.
- [13] 胡治明. 氢醌及其结构类似物抑制皮肤黑素生成和抗氧化作用研究 [D]. 武汉: 武汉大学, 2011.
- [14] 刘月恒, 宋飞飞, 王 领, 等. 皮肤黑色素形成机理的研究进展及皮肤美白剂的发展现状 [J]. 北京日化, 2009, (1): 24-28.