

文章编号: 1005-8982(2016)01-0001-04

论著

硬皮病动物模型建模药物最适浓度探讨*

陆晓凤, 罗婧莹

(桂林医学院附属医院 皮肤科, 广西 桂林 541000)

摘要:目的 探讨用博来霉素(BLM)制作硬皮病动物模型的最适浓度。**方法** 将 24 只 BALB/C 小鼠随机平均分为 3 个实验组和 1 个对照组,各实验组小鼠分别皮下注射 200、700 和 1 000 $\mu\text{g/ml}$ 浓度的 BLM,对照组小鼠皮下注射等量的磷酸盐缓冲液(PBS),注射 4 周后处死小鼠,取注射部位皮肤行苏木精-伊红染色法(HE)染色、Masson 染色、真皮羟脯氨酸含量检测及真皮厚度检测。**结果** 700 和 1 000 $\mu\text{g/ml}$ 浓度的 BLM 成功建模,但 1 000 $\mu\text{g/ml}$ 的浓度可导致小鼠皮肤浅表溃疡。**结论** 硬皮病动物模型成功与否与 BLM 药物浓度高低关系密切,700 $\mu\text{g/ml}$ 博来霉素浓度具有较好的建模效果,且不会出现皮肤溃疡的副作用。

关键词: 硬皮病;博来霉素;动物模型;最适浓度

中图分类号: R593.25

文献标识码: A

Optimal drug concentration for scleroderma mouse model*

Xiao-feng Lu, Jing-ying Luo

(Department of Dermatology, the Affiliated Hospital of Guilin
Medical University, Guilin, Guangxi 541000, China)

Abstract: Objective To analyze the optimal concentration of Bleomycin for scleroderma mouse model. **Methods** Twenty-four BALB/c mice were divided into 4 groups including 3 experimental groups and 1 control group. The mice of the experimental groups were injected with 200, 700 and 1,000 $\mu\text{g/ml}$ Bleomycin respectively and those in the control group were injected with PBS. The staining for HE and Masson, and detection for dermis hydroxyproline content and dermis thickness were executed after the extraction of injective-site skin about 4 weeks later. **Results** Scleroderma mouse model was successfully established at the 700 and 1,000 $\mu\text{g/ml}$ concentration of Bleomycin, but the skin ulcer of injective site occurred in the experimental group of 1,000 $\mu\text{g/ml}$ concentration. **Conclusions** There is a close relationship between establishment of scleroderma mouse model and drug concentration. The 700 $\mu\text{g/ml}$ concentration of Bleomycin has a good molding effect, which does not have the side effect like skin ulcer.

Keywords: scleroderma; Bleomycin; animal model; optimal concentration

硬皮病(Scleroderma)是以局限性或弥漫性皮肤及内脏结缔组织纤维化、硬化及萎缩为特点的结缔组织疾病,疾病发展到晚期病情常较重,危及患者生命^[1]。目前硬皮病发病机制仍不清楚,围绕其展开相关研究显得尤为重要。由于直接以硬皮病患者为研究对象有较多的局限性,所以建立稳定的硬皮病动

物模型是硬皮病基础研究的前提条件。目前国内外常以博来霉素(Bleomycin, BLM)皮下注射的方法建模,但关于建模的最适浓度尚无统一认识^[2-4]。本实验采用不同浓度的博来霉素皮下注射于小鼠背部,4周后切取小鼠注射部位皮肤进行相关指标检测,探讨最适宜硬皮病建模的博来霉素浓度。

收稿日期:2015-08-12

* 基金项目:国家自然科学基金(No:81460473);广西自然科学基金(No:2012NSFAA053133)

[通信作者] 罗婧莹, E-mail: luojingying2005@aliyun.com; Tel: 0773-2823796

• 1 •

1 材料与方法

1.1 实验动物

24 只 BALB/c 小鼠,购于桂林医学院动物实验中心,SPF 清洁级,为 6 周龄雌性小鼠,体重 18~22 g,饲养于桂林医学院动物实验中心 SPF 清洁级动物饲养室。

1.2 主要试剂、仪器及耗材

博莱霉素购自北京索来宝生物科技有限公司,生产批号 415A027,磷酸盐缓冲溶液(phosphate buffer saline,PBS)、Masson 染色全套试剂来自于桂林医学院附属医院病理科,羟脯氨酸试剂盒购自南京建成公司,生产批号 20151205,紫外分光光度计。

1.3 实验方法

1.3.1 实验分组 将 24 只 BALB/c 小鼠随机分为 4 组,分别标记为 A、B、C、D 组,每组 6 只。用小动物剃毛器剃去小鼠背部皮肤,范围为 $\geq 3\text{ cm} \times 3\text{ cm}$ 的圆形区域。博来霉素用 PBS 稀释,分别配制成 200、700 和 1 000 $\mu\text{g/ml}$ 浓度。A 组小鼠为对照组,皮下注射 PBS 100 $\mu\text{l/d}$;B 组小鼠皮下注射 200 $\mu\text{g/ml}$ 博来霉素 100 $\mu\text{l/d}$;C 组小鼠皮下注射 700 $\mu\text{g/ml}$ 博来霉素 100 $\mu\text{l/d}$;D 组小鼠皮下注射 1 000 $\mu\text{g/ml}$ 博来霉素 100 $\mu\text{l/d}$ 。每只小鼠皮下注射时,分别以 12、3、6 和 9 点钟方向进针,实行多点注射,注射器针头与小鼠皮肤表面角呈 10 度,每点注射 25 μl ,1 次/d,连续注射 4 周。

1.3.2 实验方法 完成 4 周注射后的次日,颈椎脱臼法处死小鼠,取小鼠注射部位皮肤 2 块。其中一块用福尔马林溶液浸泡,石蜡包埋,行苏木精-伊红染色法(hematoxylin-eosin staining,HE)染色、Masson 染色,并测真皮厚度;另一块置于 -80°C 冰箱冷冻存于管中,用于测量皮肤中羟脯氨酸的含量。

1.4 统计学方法

采用 SPSS 18.0 统计软件进行数据分析,计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,用独立样本 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 肉眼观察各小鼠注射部位皮肤的变化

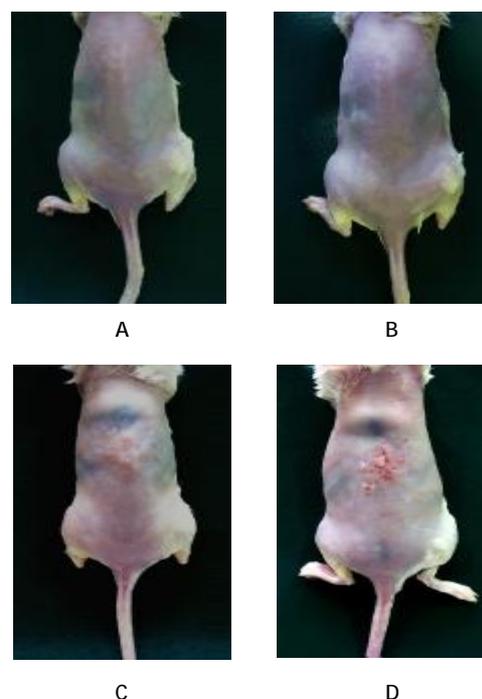
连续注射博来霉素 4 周后,肉眼可以观察到,A 组小鼠注射部位皮肤呈粉红色,触感柔软,弹性好,无异常隆起、凹陷,无溃疡,无出血点;B 组小鼠注射部位皮肤肉眼观及触感与 A 组小鼠无明显差异;C 组小鼠注射部位皮肤明显增厚,硬化,弹性差,粗糙,

无溃疡,无出血点;D 组小鼠注射部位皮肤不仅有增厚、硬化、变粗糙、弹性差等表现,还出现明显的浅表溃疡。见图 1。

2.2 注射部位皮肤组织 HE 染色

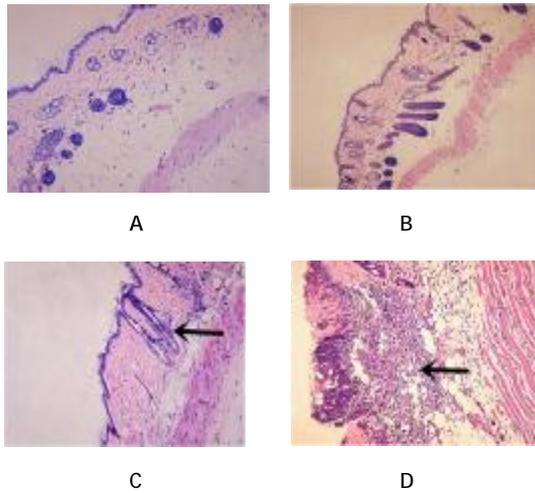
连续注射博来霉素 4 周后,取注射部位的皮肤行 HE 染色,镜下可见 A 组小鼠注射部位皮肤表皮层、真皮层、脂肪层、肌肉层与正常小鼠皮肤病理组织结构相同,未发生变化;B 组小鼠真皮层略增厚,胶原纤维稍变粗,脂肪层未见明显变化;C、D 组小鼠注射部位皮肤真皮层明显增厚,胶原纤维明显增多、增粗,排列变紧密,且皮下脂肪层明显变薄,甚至消失。见图 2。

Masson 染色是用于显示组织中纤维的染色方法之一,可使胶原纤维被亮绿染成绿色,使肌纤维被丽春红染成红色。取小鼠注射部位皮肤行 Masson 染色,可见 C、D 组小鼠皮肤真皮层中,被染成绿色的胶原纤维明显增多(见图 3)。将该组织切片拍成图片,用免疫组织化学法定量分析系统进行分析。每只小鼠切片随机取 5 个视野采集图像,以亮绿色为阳性,计算阳性率,再用 SPSS 18.0 统计软件分别算出 D 各组阳性率的均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$),然后将 A 组分别与 B、C、D 3 组作独立样本 t 检验,计算 t 值、 P 值。结果显示,C、D 组 Masson 染色阳性率高于 A 组,



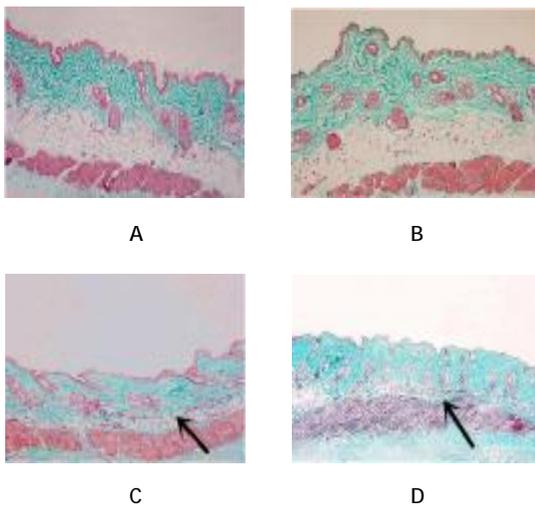
A: 皮下注射 PBS;B: 皮下注射 200 $\mu\text{g/ml}$ 博来霉素;C: 皮下注射 700 $\mu\text{g/ml}$ 博来霉素;D: 皮下注射 1000 $\mu\text{g/ml}$ 博来霉素

图 1 小鼠皮肤肉眼观



A:皮下注射 PBS;B:皮下注射 200 μ.g/ml 博来霉素;C:皮下注射 700 μ.g/ml 博来霉素;D:皮下注射 1000 μ.g/ml 博来霉素

图 2 小鼠皮肤 HE 染色 (HE × 20)



A:皮下注射 PBS;B:皮下注射 200 μ.g/ml 博来霉素;C:皮下注射 700 μ.g/ml 博来霉素;D:皮下注射 1000 μ.g/ml 博来霉素

图 3 小鼠皮肤 Masson 染色 (Masson × 20)

差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表 1。

2.3 注射部位皮肤的真皮厚度

连续注射博来霉素 4 周后,肉眼可见注射部位皮肤厚度发生不同变化,采用彩色病理图像分析系统对小鼠真皮的厚度进行测量,所得数据并用 SPSS 18.0 统计软件算出各组的均值 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)。将 A 组分别与 B、C、D 组进行独立样本 t 检验,可见 C、D 组小鼠皮肤增厚,真皮层厚度明显增加。见表 2。

2.4 注射部位皮肤的胶原含量

羟脯氨酸在胶原蛋白中占 13.4%,在弹性蛋白中含量极少,其他蛋白中不含羟脯氨酸,因此小鼠皮肤中羟脯氨酸的含量可以间接地反映所测部位胶

原蛋白的含量,进而推断该部位纤维化的程度。按羟脯氨酸试剂盒说明书进行操作,测量并计算出各组小鼠注射部位皮肤羟脯氨酸的含量,并且重复上述步骤 3 次,记录 3 次所测数值,所得数据用均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,并分别将 A 组与 B、C、D 3 组进行比较,用 SPSS 18.0 统计软件进行独立样本 t 检验,结果显示,C、D 组小鼠注射部位皮肤的羟脯氨酸含量明显增加。见表 3。

博来霉素浓度过低,建模效果不好,而浓度过高,虽然可以使小鼠注射部位皮肤出现典型硬皮病样改变,但同时也会导致小鼠皮肤出现溃疡,不利于后续研究。

表 1 各组小鼠注射部位皮肤 Masson 染色阳性率 (% , $\bar{x} \pm s$)

| 组别 | 例数 | 阳性率 |
|-----|----|--------------------------|
| A 组 | 6 | 29.4 ± 1.3 |
| B 组 | 6 | 30.3 ± 1.0 ¹⁾ |
| C 组 | 6 | 68.3 ± 2.8 ²⁾ |
| D 组 | 6 | 81.6 ± 2.4 ²⁾ |

注:1)与 A 组比较, $t=1.295, P=0.224$; 2)与 A 组比较 $t=31.339, P=0.000$

表 2 各组小鼠注射部位真皮厚度比较 (μ.m, $\bar{x} \pm s$)

| 组别 | 例数 | 阳性率 |
|-----|----|------------------------------|
| A 组 | 6 | 160.85 |
| B 组 | 6 | 170.80 ± 11.12 ¹⁾ |
| C 组 | 6 | 326.07 ± 13.93 ²⁾ |
| D 组 | 6 | 344.33 ± 25.58 ²⁾ |

注:1)与 A 组比较, $t=1.963, P=0.780$; 2)与 A 组比较, $P=0.000$ ($t_c=27.030, t_D=17.174$)

表 3 各组小鼠注射部位羟脯氨酸含量比较 (μ.g/mg, $\bar{x} \pm s$)

| 组别 | 例数 | 羟脯氨酸含量 |
|-----|----|---------------------------|
| A 组 | 6 | 4.17 ± 0.47 |
| B 组 | 6 | 4.36 ± 0.13 ¹⁾ |
| C 组 | 6 | 7.90 ± 0.73 ²⁾ |
| D 组 | 6 | 7.95 ± 0.19 ²⁾ |

注:1)与 A 组比较, $t=0.941, P=0.385$; 2)与 A 组比较, $P=0.000$ ($t_c=10.544, t_D=18.157$)

3 讨论

硬皮病是皮肤科相关疾病中,临床处理较为棘手

的一种常见病,由于其病因和发病机制不明确,所以尚无有效的治疗措施,针对其展开研究显得尤为重要。良好的动物模型是研究硬皮病的基础,关于硬皮病动物模型的建造,前人做过很多研究,包括用UCD 鸡^[6]或者紧皮鼠等^[6],但由于建模成本较高、动物来源困难等多方面原因,未被推广运用。后来,Toshiyuki 等^[7]发现,博来霉素诱导的硬皮病小鼠模型与临床硬皮病患者的组织病理改变极为相似。但关于建模浓度的问题,文献报道尚未达成共识,这给后来研究硬皮病,且以该方法建立动物模型的研究人员造成很大的困惑。本实验研究显示,200 μ g/ml 博来霉素建立的动物模型无典型硬皮病样改变;700 μ g/ml 博来霉素建立的硬皮病动物模型,肉眼见小鼠皮肤明显变硬,HE 染色可见真皮层胶原纤维明显增多,真皮层明显增厚,皮肤羟脯氨酸含量明显增加,脂肪层变薄,甚至消失,与 Juniantito^[8]、Avouac 等^[9]提到的硬皮病动物模型的组织病理变化相符。虽然 1 000 μ g/ml 博来霉素也能造出该模型,但小鼠浅表皮肤出现溃疡,且溃疡逐日加重,显然不利于以硬皮病小鼠为载体的后续研究。查阅国内文献发现,第四军医大学杨蓉娅教授、北京协和医院王千秋教授、上海交通大学郑捷教授等分别给予 BALB/c 小鼠 300、500 和 600 μ g/ml BLM 皮下注射,连续注射 28 d,成功建立硬皮病动物模型^[10-12]。本研究分析发现 3 者的建模浓度为 200 ~ 1 000 μ g/ml,与本研究结果不谋而合。同时提示,硬皮病动物模型的最适造模浓度并非单一浓度,而是一个适宜的浓度范围,通过上述实验,笔者可初步确定该范围在 200 ~ 1 000 μ g/ml,后续笔者将补充实验,继续精确、缩小该范围。

参 考 文 献:

[1] Young A, Khanna D. Systemic sclerosis: a systematic review on

therapeutic management from 2011 to 2014 [J]. *Curr Opin Rheumatol*, 2015, 27(3): 241-248.

- [2] Koca SS, Ozgen M, Sarikava M, et al. Ghrelin prevents the development of dermal fibrosis in bleomycin-induced scleroderma[J]. *Clin Exp Dermatol*, 2014, 39(2): 176-181.
- [3] Maurer B, Distler A, Suliman YA, et al. Vascular endothelial growth factor aggravates fibrosis and vasculopathy in experimental models of systemic sclerosis[J]. *Ann Rheum Dis*, 2014, 73(10): 1880-1887.
- [4] Demir T, Turkbeyler I, Kaplan DS, et al. Effectiveness of palonosuran in bleomycin-induced experimental scleroderma[J]. *Inflammation*, 2013, 36(1): 75-79.
- [5] Ek WE, Sahlqvist AS, Croo KS, et al. Mapping QLT affecting a systemic sclerosis-like disorder in a cross between UCD-200 and red jungle fowl chicken [J]. *Dev Comp Immunol*, 2012, 38(2): 352-359.
- [6] Gerber EE, Gallo EM, Fontana SC, et al. Integrin-modulating therapy prevents fibrosis and autoimmunity in mouse models of scleroderma[J]. *Nature*, 2013, 503(7474): 126-130.
- [7] Toshiyuki Y, Kiyoshi N. Animal model of sclerotic skin. V: increased expression of alpha-smooth muscle actin in fibroblastic cells in bleomycin-induced scleroderma[J]. *Clin Immunol*, 2002, 102(1): 77-83.
- [8] Juniantito V, Izawa T, Yuasa T, et al. Immunophenotypical characterization of macrophages in rat bleomycin-induced scleroderma[J]. *Vet Pathol*, 2013, 50(1): 76-85.
- [9] Avouac J, Furnrohr BG, Tomcik M, et al. Inactivation of the transcription factor STAT-4 prevents inflammation-driven fibrosis in animal models of systemic sclerosis[J]. *Arthritis Rheum*, 2011, 63(3): 800-809.
- [10] 李海涛, 杨蓉娅, 朱晓丹, 等. UVA1 对硬皮病小鼠模型影响的实验观察[J]. *中国麻风皮肤病学杂志*, 2008, 24(1): 20-22.
- [11] 刘彤云, 王千秋, 崔盘根, 等. MMP-9 和 TIMP-1 在硬皮病模型鼠皮肤硬化过程中的作用[J]. *中国麻风皮肤病学杂志*, 2008, 24(7): 508-510.
- [12] 曹华, 郑捷. 局部注射博来霉素建立硬皮病小鼠模型的实验研究[J]. *中国皮肤性病学杂志*, 2007, 21(8): 469-473.

(申海菊 编辑)