

性别对咪喹莫特诱导小鼠银屑病模型建立的影响

罗婷婷 韩陈陈 崔东倩 张雨 刘倩 马旻 魏伟

摘要 建立咪喹莫特(IMQ)诱导的小鼠银屑病模型,对模型进行评价并探究性别对IMQ诱导小鼠银屑病模型建立的影响。BALB/c小鼠,雌雄各半,随机分为正常对照组、模型组1(雄性)、模型组2(雌性),将IMQ涂抹于小鼠背部皮肤建立小鼠银屑病模型。每天对小鼠皮肤进行银屑病皮损面积和严重程度(PASI)评分,HE染色观察皮肤组织病理学改变,计算脾脏指数、胸腺指数,免疫组化法检测增殖细胞核抗原(PCNA)的表达和免疫荧光法检测内皮蛋白的表达情况。与对照组小鼠相比,IMQ诱导的雄性和雌性小鼠皮肤均表现出鳞屑、红斑和增厚现象并持续加重,PASI评分也呈相同的结果。HE染色发现与对照组小鼠相比,IMQ诱导的雄性和雌性小鼠表皮均增厚($P < 0.001$),表皮浅层可见毛细血管扩张、炎症细胞浸润、角质层可见角化不全、颗粒层变薄甚至消失、棘层肥厚、并有表皮突下延。IMQ诱导的小鼠脾脏指数增大($P < 0.001$),雌雄小鼠脾脏指数变化差异无统计学意义。IMQ诱导的雄性和雌性小鼠角质形成细胞表达数量增多($P < 0.05$),且存在异常分化现象,雌雄小鼠PCNA和内皮蛋白的表达差异无统计学意义。IMQ诱导的小鼠银屑病模型与人类银屑病具有许多相似性,且性别对IMQ诱导小鼠银屑病模型的建立几乎没有影响。

关键词 性别;银屑病;咪喹莫特;动物模型

中图分类号 R 965.1

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2020)04-0634-06
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2020.04.029

银屑病是一种自身免疫性疾病,影响全球约1.25亿人口^[1],主要表现为红色斑块上有白色鳞屑。银屑病发病机制极其复杂,涉及遗传、炎症、免疫等多个方面,目前尚未完全明确^[2-3]。建立理想的动物模型可以为发病机制的探究提供基础和保

障,其中咪喹莫特(imiquimod,IMQ)诱导的小鼠银屑病模型运用广泛且操作简便。性激素能够通过多种方式对免疫系统产生影响,因此在一些与自身免疫疾病有关的动物模型中性别差异会对模型的建立产生一定的影响,如类风湿关节炎模型^[4]。银屑病作为一种自身免疫性疾病,其模型的建立是否也会受到性别差异的影响,为了探究这一问题,现通过建立不同性别的IMQ诱导的小鼠银屑病模型,对模型进行评价并探究性别差异对IMQ诱导小鼠银屑病模型建立的影响。

1 材料与方法

1.1 实验动物 8周龄BALB/c小鼠,30只,体重20~22 g,雌雄各半,清洁级环境饲养。由安徽医科大学实验动物中心提供。

1.2 试剂与仪器 IMQ乳膏(珠海联邦制药中山分公司);凡士林乳膏(天津博迪公司);脱毛膏(上海保健品九店公司);乙二胺四乙酸(ethylenediaminetetraacetic acid,EDTA)抗原修复液、Triton X-400和DAPI(上海碧云天公司); H_2O_2 (北京中衫金桥);增殖细胞核抗原(proliferating cell nuclear antigen,PCNA)和内皮蛋白一抗(美国Santa Cruz Biotechnology公司);594山羊抗鼠IgG(H+L)美国(Jackson Immuno Research公司);仪器Olympus显微成像系统(日本Olympus);RM 2135石蜡切片机、激光共聚焦显微镜(德国莱卡公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 分组与模型建立 30只BALB/c小鼠随机均分为正常对照组、模型组1(雄性)、模型组2(雌性)。使用脱毛膏将小鼠背部(2 cm × 3 cm)毛发完全脱去,称取IMQ乳膏62.5 mg均匀涂抹于模型组小鼠背部,对照组小鼠涂抹等量的凡士林乳膏,每天涂抹1次,一共持续5 d。

1.3.2 小鼠背部皮损变化观察 采用银屑病皮损面积和严重程度(psoriasis area and severity index, PASI)对皮损进行评分^[5],用数码相机每天拍照记录皮损变化情况,给予小鼠皮损处红斑、鳞屑、增厚程度0~4的评分,将3者评分相加得到总分。PASI

2019-11-11 接收

基金项目: 国家自然科学基金(编号:81502123、81330081、81673444)

作者单位: 安徽医科大学临床药理研究所、抗炎免疫药物教育部重点实验室、抗炎免疫药物安徽省协同创新中心,合肥230032

作者简介: 罗婷婷,女,硕士研究生;

魏伟,男,博士,教授,博士生导师,责任作者,E-mail: wwei@ahmu.edu.cn;

马旻,女,博士,讲师,责任作者,E-mail: mayang_ahmu@126.com

评分标准如下: 无 = 0 分; 轻度 = 1 分; 中度 = 2 分; 重度 = 3 分; 极重度 = 4 分; 总分 = 鳞屑 + 增厚 + 红斑 (0 ~ 12 分)。

1.3.3 取材与处理 第 6 天上午造模结束采用颈椎脱臼法处死小鼠, 取小鼠脾脏、胸腺、背部皮肤, 取三分之一皮肤置于 4% 的多聚甲醛中常温保存, 其余组织均放置 -80 °C 保存。

1.3.4 小鼠脾脏指数与胸腺指数计算 脾脏指数 = 小鼠脾脏质量 (mg) / 小鼠体质量 (g), 胸腺指数 = 小鼠胸腺质量 (mg) / 小鼠体质量 (g)。

1.3.5 小鼠皮肤组织病理学观察与表皮厚度的检测 将放置于 4% 多聚甲醛中的皮肤组织经脱水、石蜡包埋、切片、HE 染色, 显微镜下观察小鼠皮肤组织病理改变。选取 HE 染色切片显微镜下观察拍照, 在每张切片中随机测量 3 处从表皮角质层到基底的表皮垂直距离, 分析表皮层增厚情况。

1.3.6 免疫组化法检测小鼠皮肤 PCNA 的表达 将石蜡切片脱蜡水化, 封闭, 再加抗原修复液进行冷修复, 一抗 4 °C 孵育过夜, 二抗室温孵育 20 min,

DAB 显色, 苏木精进行复染, 最后在显微镜下观察每组 PCNA 的表达情况。

1.3.7 免疫荧光法检测小鼠皮肤内披蛋白的表达

将石蜡切片脱蜡水化, 抗原修复液进行冷修复, BSA 封闭, 一抗 4 °C 孵育过夜, 二抗室温孵育 1 h, DAPI 染核 10 min, 加抗荧光淬灭剂, 指甲油封片, 最后在荧光显微镜下观察每组内披蛋白的表达情况。

1.4 统计学处理 采用 SPSS 17.0 软件进行统计学分析, 计量数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示。多组间差异的比较采用单因素方差分析 (ANOVA), $P < 0.05$ 为差异有统计学差异。

2 结果

2.1 小鼠皮肤形态观察 由图 1 A 可知对照组小鼠在第 1 ~ 5 天皮肤均细腻光滑。由图 1 B、C 可知与对照组小鼠比较, IMQ 诱导的小鼠在第 1 天就表现出轻微鳞屑, 皮肤微微泛红, 第 2 天鳞屑增多涉及整个皮肤表面, 并且出现增厚现象, 可见较浅的红斑, 第 3 天鳞屑分布更加密集, 增厚现象进一步加

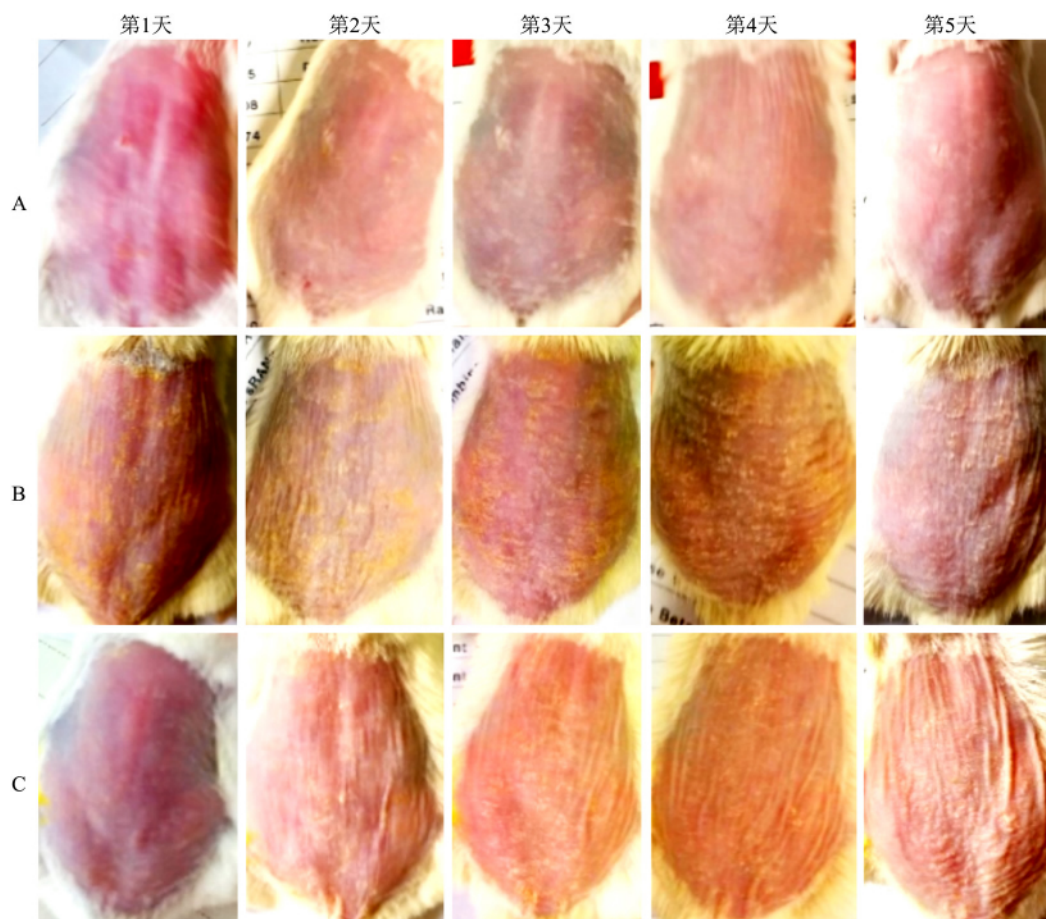


图 1 IMQ 诱导的小鼠第 1 ~ 5 天皮肤形态变化

A: 对照组; B: 模型组 1; C: 模型组 2

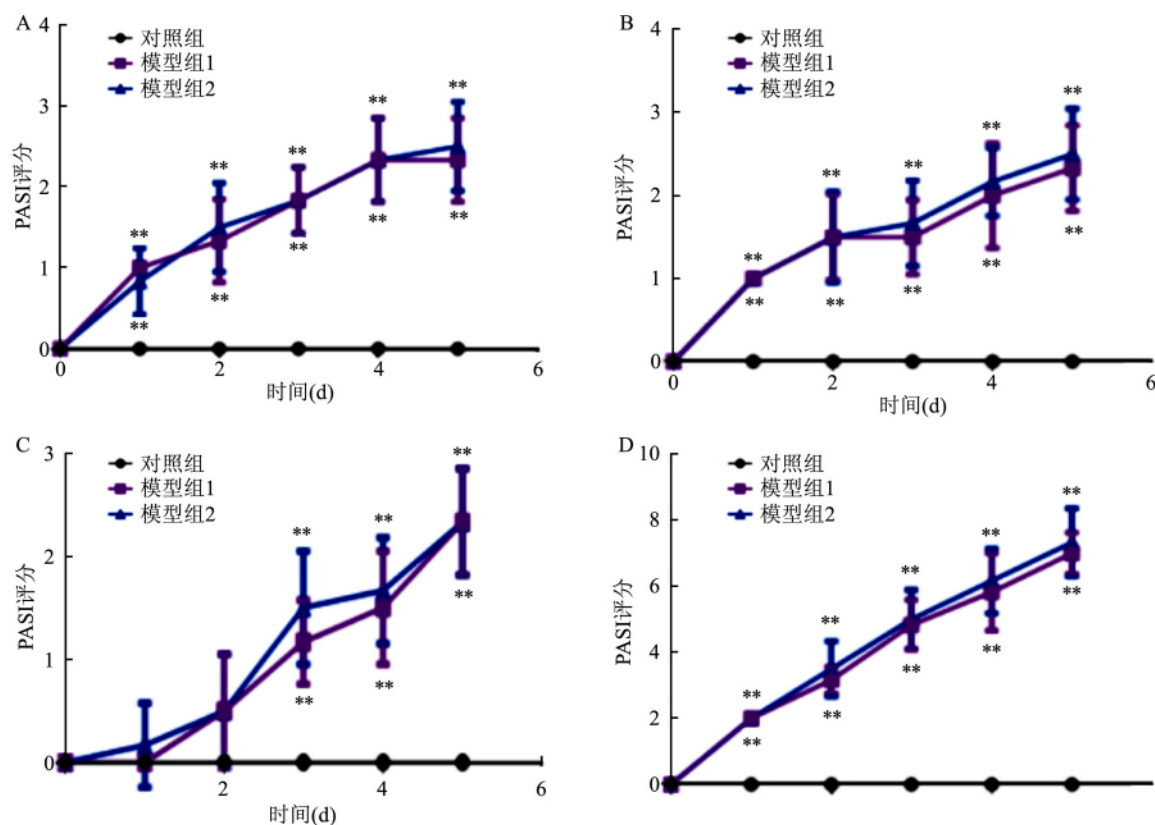


图2 IMQ 诱导的小鼠第1~5天 PASI 评分变化

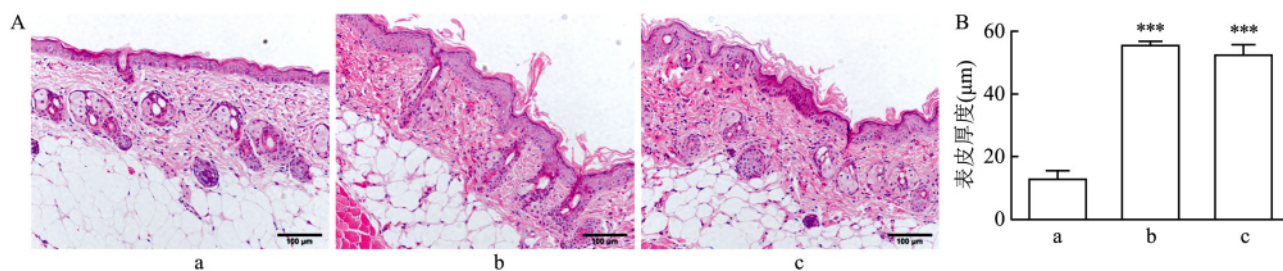
A: 增厚; B: 鳞屑; C: 红斑; D: 总分; 与对照组小鼠比较: ** $P < 0.001$ 

图3 IMQ 诱导的小鼠皮肤组织病理学观察及 HE 染色中表皮厚度的变化

A: 小鼠皮肤组织病理学改变 HE $\times 400$; B: HE 染色下小鼠表皮厚度; a: 对照组; b: 模型组1; c: 模型组2; 与对照组比较: *** $P < 0.001$

重 红斑颜色也进一步加深,第4、5天皮损现象进一步加重。雄性小鼠和雌性小鼠皮损变化相似。

2.2 小鼠皮肤 PASI 评分 依据 PASI 评分标准,每天对小鼠进行拍照、评分,根据其均值和方差绘制曲线图。由图2 A、B可知 IMQ 诱导的雄性和雌性小鼠皮肤增厚和鳞屑评分在第1~5天均持续升高,由图2 C可知 IMQ 诱导的雄性小鼠皮肤红斑评分在第2~5天持续升高,雌性小鼠皮肤红斑评分在第1~5天持续升高。将三者评分相加得到总分,由图2 D可知,IMQ 诱导的雄性和雌性小鼠皮肤总分在第1~5天均持续升高,差异有统计学意义,雄性和雌性小鼠 PASI 评分变化差异无统计学意义。

2.3 小鼠皮肤组织病理学观察及 HE 染色中表皮厚度的变化 从图3 A(a) HE 染色中可以看出对照组小鼠皮肤结构正常,表皮层细胞只有两三层。从图3 A(b、c) HE 染色中可以看出与对照组小鼠比较,IMQ 诱导的小鼠表皮增厚、表皮浅层可见毛细血管扩张、炎症细胞浸润、角质层可见角化不全、颗粒层变薄甚至消失、棘层肥厚并有表皮突下延。雄性和雌性小鼠皮肤组织病理学变化相似。选取 HE 切片 $400\times$ 的视野,使用 photoshop 图片处理软件在每个视野中随机量取3处表皮的垂直距离,取其平均值,分析 IMQ 诱导的雄性和雌性小鼠表皮增厚情况。由图3 B可知,与对照组小鼠表皮厚度(12.5 ± 2.3)

μm 比较, IMQ 诱导的雄性小鼠表皮厚度 (55.4 ± 1.1) μm ($F = 4.757$, $P < 0.001$) 和雌性小鼠表皮厚度 (52.3 ± 2.8) μm ($F = 1.488$, $P < 0.001$) 均增加, 差异有统计学意义。而与 IMQ 诱导的雄性小鼠表皮厚度比较, IMQ 诱导的雌性小鼠表皮厚度增加差异无统计学意义 ($F = 6.805$, $P > 0.05$)。

2.4 小鼠脾脏指数和胸腺指数测定 由图 4 A 可知, 与对照组小鼠脾脏指数比较 (3.6 ± 0.8), IMQ 诱导的雄性小鼠脾脏指数 (10.1 ± 0.9) ($F = 1.350$, $P < 0.001$) 和雌性小鼠脾脏指数 (9.6 ± 1.0) ($F = 1.742$, $P < 0.001$) 均升高, 差异有统计学意义。而与 IMQ 诱导的雄性小鼠脾脏指数比较, IMQ 诱导的雌性小鼠脾脏指数变化差异无统计学意义 ($F = 10.2$, $P > 0.05$)。由图 4 B 可知, 与对照组小鼠胸腺指数比较 (2.5 ± 0.5), IMQ 诱导的雄性小鼠胸腺指数 (2.7 ± 0.3) ($F = 2.564$, $P > 0.05$) 和雌性小鼠胸腺指数 (2.7 ± 0.4) ($F = 1.7$, $P > 0.05$) 变化差异均无统计学意义, 与 IMQ 诱导的雄性小鼠胸腺指数比较, IMQ 诱导的雌性小鼠胸腺指数变化差异也无统计学意义 ($F = 10.2$, $P > 0.05$)。

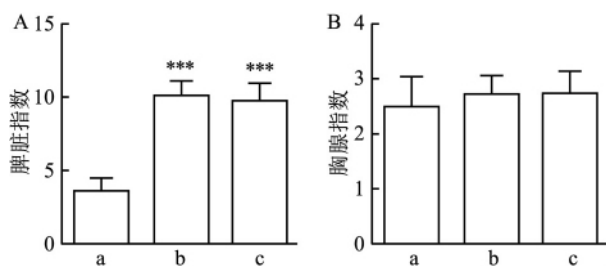


图 4 IMQ 诱导的小鼠脾脏指数和胸腺指数

A: 脾脏指数; B: 胸腺指数; a: 对照组; b: 模型组 1; c: 模型组 2; 与对照组比较: *** $P < 0.001$

2.5 免疫组化法检测小鼠皮肤 PCNA 的表达 PCNA 为增殖细胞核抗原, 可以反映角质形成细胞的增殖程度, 由图 5 A (a) 可知, 对照组小鼠 PCNA

在表皮基底层呈一层线性排列, 由 5 A (b、c) 可知 IMQ 诱导的雄性小鼠和雌性小鼠 PCNA 表达均增多, 呈多层排列。由图 5 B 可知, 与对照组小鼠 PCNA 阳性细胞表达数量 (44.3 ± 4.2) 个比较, IMQ 诱导的雄性小鼠 PCNA 阳性细胞表达数量 (102.3 ± 5.8) 个 ($F = 1.9$, $P < 0.001$) 和 IMQ 诱导的雌性小鼠 PCNA 阳性细胞表达数量 (96 ± 10.0) 个 ($F = 5.7$, $P < 0.05$) 均增加, 差异有统计学意义。而与 IMQ 诱导的雄性小鼠 PCNA 阳性细胞表达数量比较, IMQ 诱导的雌性小鼠 PCNA 阳性细胞表达数量变化差异无统计学意义 ($F = 3.0$, $P > 0.05$)。

2.6 免疫荧光法检测小鼠皮肤内披蛋白的表达 内披蛋白是角质形成细胞分化的标志性蛋白, 阳性表达呈绿色荧光。由图 6 A 可知, 对照组小鼠内披蛋白表达分布在角质层和棘层上方, 由图 6 B、C 可知, IMQ 诱导的雄性小鼠和雌性小鼠内披蛋白表达增强且在表皮各层均有分布。

3 讨论

目前银屑病病理机制的探究和新的抗银屑病治疗药物的开发已经取得了较大的进展, 但仍有待进一步研究。开发与人类银屑病相似的动物模型有利于加速这一进程, 目前银屑病动物模型主要有: 自发型动物模型、诱导型动物模型、转基因动物模型、以及异体种植模型^[6-7]。IMQ 是 toll 样受体激动剂, 主要用于人乳头瘤病毒引起的生殖器和肛周疣的局部治疗。临床发现 IMQ 会加重控制良好的银屑病患者的病情, 这不仅发生在治疗区域, 也发生在之前未受影响的远处皮肤部位。研究^[8-9]发现使用 IMQ 涂抹小鼠皮肤, 可使小鼠产生类似人类银屑病的皮肤表型和组织病理学变化。且 IMQ 诱导的小鼠银屑病模型具有运用广泛、操作简便等优点, 故课题组建立 IMQ 诱导的小鼠银屑病模型并对其进行评价。

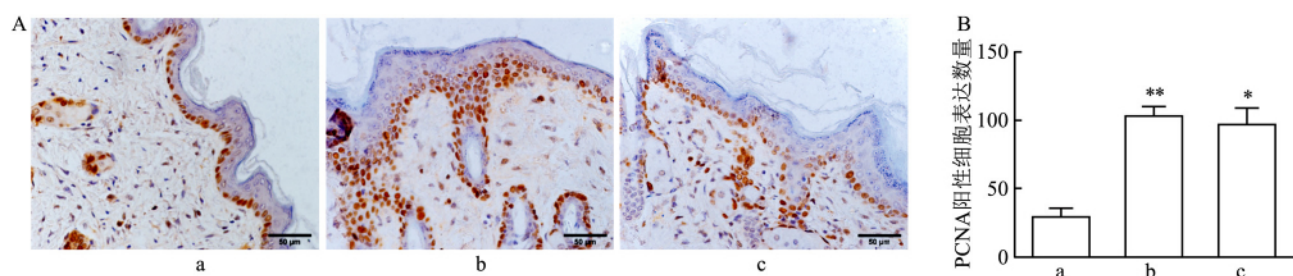


图 5 IMQ 诱导的小鼠皮肤 PCNA 的表达

A: 小鼠皮肤 PCNA 的表达 免疫组化 $\times 400$; B: PCNA 阳性细胞表达数量; a: 对照组; b: 模型组 1; c: 模型组 2; 与对照组比较: ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$

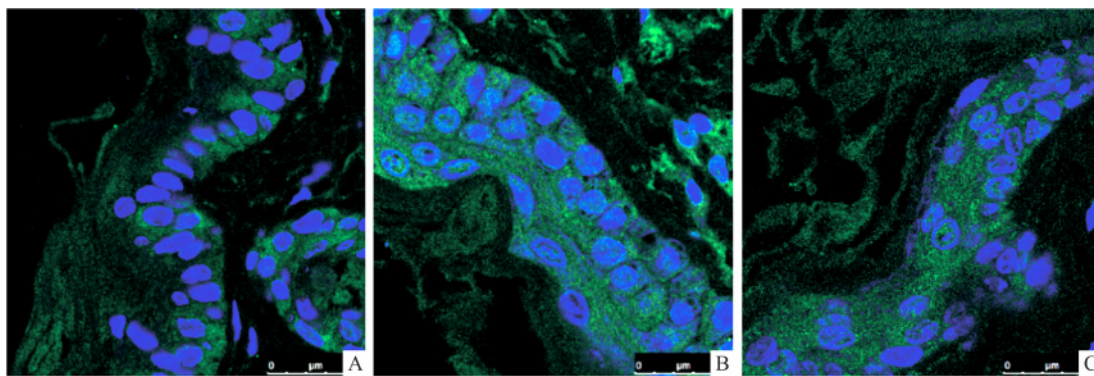


图6 IMQ 诱导的小鼠皮肤内披蛋白的表达 免疫荧光 ×800

A: 对照组; B: 模型组 1; C: 模型组 2

性别差异在免疫反应中的机制复杂,可能涉及性激素对免疫、遗传以及性别特异性行为和暴露等影响。雌激素通过影响 T 细胞和 B 细胞的发育以及自身反应性 T 细胞和 B 细胞的存活等增加自身免疫的风险^[10]。在多种自身免疫疾病如类风湿关节炎、系统系红斑狼疮中女性的发病率均明显高于男性。而在许多与自身免疫疾病有关的动物模型的研究中,性别差异也会对模型的建立造成一定的影响,如在自发性糖尿病 Torii-Lepre 大鼠中,葡萄糖和脂质异常、性功能障碍、微血管病以及骨质疏松症等均存在性别差异的影响^[11-12]。但是在 IMQ 诱导的小鼠银屑病模型中性别差异对模型建立的影响尚未报道。为了探究这一问题,实验分别选用雄性小鼠和雌性小鼠建立银屑病模型,从小鼠皮损改变、皮损 PASI 评分、小鼠皮肤组织病理学改变、脾脏和胸腺指数变化以及角质形成细胞增殖和异常分化等来评价 IMQ 诱导的小鼠银屑病模型,并探究性别差异是否对该模型的建立产生影响。本实验结果显示与对照组小鼠相比,IMQ 诱导的雄性小鼠和雌性小鼠皮肤均表现出红斑、鳞屑、增厚、并在 1~5 d 持续加重,PASI 评分也呈相同结果。从小鼠皮肤组织病理学上观察可知,IMQ 诱导的小鼠表皮增厚、表皮浅层可见毛细血管扩张、炎细胞浸润、角质层可见角化不全、颗粒层变薄甚至消失、棘层肥厚并有表皮突下延,雄性小鼠和雌性小鼠皮肤组织病理学变化相似。同时 IMQ 诱导的小鼠脾脏指数增大,雄性和雌性小鼠脾脏指数变化差异无统计学意义。从 PCNA 和内披蛋白的表达情况可知,IMQ 诱导的小鼠角质形成细胞表达数量增多,且存在异常分化现象,雄性小鼠和雌性小鼠 PCNA 和内披蛋白表达差异无统计学意义。这些结果均显示 IMQ 诱导的小鼠皮肤红斑、增厚、鳞屑、表皮改变(棘皮症,角化不全)方面非常类

似于人类银屑病,且性别差异对 IMQ 诱导的小鼠银屑病模型几乎没有影响。因此 IMQ 诱导的小鼠银屑病模型可以为银屑病机制研究和抗银屑病药物开发提供实验基础,并且在使用 IMQ 诱导小鼠银屑病模型时,可以不用考虑小鼠性别差异对模型建立的影响。

参考文献

- [1] Griffiths C E M, Van Der Walt J M, Ashcroft D M, et al. The global state of psoriasis disease epidemiology: a workshop report [J]. Br J Dermatol 2017, 177(1): e4-e7.
- [2] Boehncke W H, Schön M P. Psoriasis [J]. Lancet 2015, 386(9997): 983-94.
- [3] Harden J L, Krueger J G, Bowcock A M. The immunogenetics of Psoriasis: A comprehensive review [J]. J Autoimmun 2015, 64: 66-73.
- [4] 秦苏萍, 李慧, 李向阳, 等. 性别差异对类风湿性关节炎大鼠模型的影响 [J]. 徐州医学院学报 2014, 34(12): 865-7.
- [5] Xie X J, Di T T, Wang Y, et al. Indirubin ameliorates imiquimod-induced psoriasis-like skin lesions in mice by inhibiting inflammatory responses mediated by IL-17A-producing $\gamma\delta$ T cells [J]. Mol Immunol 2018, 101: 386-95.
- [6] Chuang S Y, Lin C H, Sung C T, et al. Murine models of psoriasis and their usefulness for drug discovery [J]. Expert Opin Drug Discov 2018, 13(6): 551-62.
- [7] Bocheńska K, Smolińska E, Moskot M, et al. Models in the research process of psoriasis [J]. Int J Mol Sci 2017, 18(12): E2514.
- [8] El Malki K, Karbach S H, Huppert J, et al. An alternative pathway of imiquimod-induced psoriasis-like skin inflammation in the absence of interleukin-17 receptor α signaling [J]. J Invest Dermatol 2013, 133(2): 441-51.
- [9] Lowes M A, Suárez-Fariñas M, Krueger J G. Immunology of psoriasis [J]. Annu Rev Immunol 2014, 32: 227-55.
- [10] Gubbels Bupp M R. Sex, the aging immune system, and chronic disease [J]. Cell Immunol 2015, 294(2): 102-10.

- [11] Ohta T ,Katsuda Y ,Miyajima K et al. Gender differences in metabolic disorders and related diseases in spontaneously diabetic torii-leprfa rats[J]. *J Diabetes Res* 2014; 2014: 841957
- [12] Brooks H L ,Pollow D P ,Hoyer P B. The VCD mouse model of menopause and perimenopause for the study of sex differences in cardiovascular disease and the metabolic syndrome[J]. *Physiology (Bethesda)* 2016; 31(4): 250-7.

Effect of gender on the establishment of mouse psoriasis induced by imiquimod

Luo Tingting ,Han Chenchen ,Cui Dongqian et al

(*Institute of Clinical Pharmacology ,Anhui Medical University Key Laboratory of Anti-inflammatory and Immune Medicine Ministry of Education ,Anhui Collaborative Innovation Center of Anti-inflammatory and Immune Medicine Hefei 230032*)

Abstract An imiquimod (IMQ)-induced psoriasis mouse model was established to evaluate the model and explore the effect of gender on IMQ-induced mouse psoriasis model establishment. Half of male and female BALB/c mice were randomly divided into normal control group ,model group 1 (male) and model group 2 (female) ,and IMQ was applied to the back skin of mice to establish a mouse psoriasis model. The psoriasis area and severity index (PASI) was scored daily for mouse skin. The pathological changes of skin were observed by HE staining. The thymus index and spleen index were calculated. The expression of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) was detected by immunohistochemistry and the expression of involucrin was detected by immunofluorescence. Compared with the control mice ,IMQ-induced male and female mice showed scaly ,erythema and thickening and continued to deteriorate , and the PASI score also showed the same results. HE staining found that compared with control mice ,the epidermis of IMQ-induced male and female mice were thickened($P < 0.001$) ,telangiectasia and inflammatory cell infiltration were observed in the superficial epidermis. Parakeratosis was observed in the stratum corneum and the granular layer became thinner or even disappeared. The acanthosis was thick ,and epidermis extended downward. The spleen index of IMQ-induced mice increased($P < 0.001$) and there was no significant difference in spleen index between male and female mice. The expression of keratinocytes in IMQ-induced male and female mice increased($P < 0.05$) and there was abnormal differentiation. There was no significant difference in the expression of PCNA and involucrin between male and female mice. The IMQ-induced mouse psoriasis model has many similarities with human psoriasis ,and gender has little effect on the establishment of IMQ-induced mouse psoriasis model.

Key words gender; psoriasis; imiquimod; animal model

(上接第 633 页)

(P188 group) . Weight and volume were measured after fat tissue was removed at time points 1 , 2 and 4 weeks. The degree of fat inflammatory infiltration after transplantation was observed by HE staining. Finally , the mRNA and protein levels of inflammation-related factors IL-1 α ,IL-1 β ,IL-6 ,TNF- α were detected by RT-PCR and ELISA. After 4 weeks of fat transplantation , there were differences in fat weight and volume between the control group and the experimental group [weight: (0.13 \pm 0.02) g vs (0.19 \pm 0.02) g , $P < 0.01$] , volume: (0.15 \pm 0.03) ml vs (0.19 \pm 0.01) ml , $P < 0.05$]. HE staining results showed that the inflammatory infiltration area of P188 group was lower than that of normal saline group 4 weeks later. RT-PCR and ELISA results showed that 4 weeks after fat transplantation , P188 inhibited the mRNA levels of inflammatory cytokines IL-1 α ,IL-1 β ,IL-6 ,TNF- α and the protein expressions of IL-1 α ,IL-1 β ,IL-6 ,TNF- α . It's proved that P188 can inhibit inflammatory infiltration after autologous fat transplantation in rats.

Key words P188; fat transplant; inflammation