

两种方法建立 SD 大鼠黄褐斑模型的比较实验研究*

邓志博,何施逸,王乾力,李楹韬,胡乔莉,杜永洪[△](重庆医科大学生物医学工程学院省部共建国家重点实验室培育基地-重庆市超声医学工程重点实验室/
重庆市生物医学工程学重点实验室,重庆 400016)

[摘要] **目的** 对比分析黄体酮注射液和紫外线照射两种方法建立 SD 大鼠黄褐斑模型。**方法** 分别采用高低剂量的黄体酮药物注射和紫外线辐照建立黄褐斑大鼠模型。观察斑块面积及光镜下观察皮肤切片,检测与黄褐斑黑色素沉积密切相关的超氧化物歧化酶(SOD)及丙二醛(MDA)水平。**结果** 肉眼观察高剂量黄体酮组大鼠的背部皮肤可见显著色素沉积,低剂量黄体酮组可见散在色素沉积;紫外线组均可见明显色素沉积。与对照组比较,高剂量黄体酮组大鼠 MDA 水平升高、SOD 水平降低,低剂量黄体酮组大鼠血清与皮肤组织中的 SOD 水平降低,差异有统计学意义($P < 0.05$)。高剂量紫外线组大鼠血清和皮肤组织中的 SOD 水平降低、MDA 水平升高,低剂量组紫外线的大鼠皮肤组织中的 SOD 水平降低($P < 0.05$),但两组比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。光镜下可见建模组黑色素颗粒成团堆积成黑色小体,黄体酮组堆积杂乱分布,其中高、低剂量组间有明显区别;紫外线组成线性密集排列,组间无显著差异。**结论** 黄体酮注射液和紫外线照射均能成功建立 SD 大鼠黄褐斑模型,紫外线照射建模效果和稳定性较好。

[关键词] 黄褐斑;紫外线;黄体酮;动物模型;大鼠,sprague-dawley**[中图分类号]** R758.4+2**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2018)15-1993-04**Comparative experiment study of two kinds of methods for establishing SD rat chloasma model***DENG Zhibo, HE Shiyi, WANG Qianli, LI Yuntao, HU Qiaoli, DU Yonghong[△]

(State Key Laboratory Culture Base of Biomedical Engineering Co-built by Chongqing Medical University and Ministry of Science and Technology/Chongqing Key Laboratory of Ultrasound Medicine Engineering/Chongqing Municipal Key Laboratory of Biomedical Engineering, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

[Abstract] **Objective** To comparatively analyze the SD rat chloasma model established by using the two methods of progesterone injection and ultraviolet radiation. **Methods** The rat chloasma model was established by adopting the high and low doses of progesterone injection and ultraviolet irradiation. The plaque area was observed and the skin section was observed by light microscope. The SOD and MDA levels closely related with chloasma melanin deposition were detected. **Results** The significant pigment deposition on the back skin in the high dose progesterone group was seen by naked eye and the scattered pigment deposition was seen in the low dose progesterone group; significant pigment deposition could be found in the ultraviolet group. Compared with the control group, the MDA level of various tissues in the high dose progesterone group was increased, while the SOD level was decreased, serum and skin SOD level in the low dose progesterone group was decreased, the difference was statistically significant($P < 0.05$). Serum and skin SOD level in the high dose ultraviolet group was decreased, while the MDA level was increased, the skin SOD level in the low dose ultraviolet group was decreased($P < 0.05$), but the difference between the two groups was not statistically significant($P > 0.05$). The melanin grains were heaped up as the small black body under light microscope, which in the progesterone group showed the clutter distribution, the difference between the high dose group and low dose group was significant; which in the ultraviolet group showed the linear dense arrangement and the inter-group had no significant difference. **Conclusion** Progesterone injection and ultraviolet irradiation all can successfully establish the SD rat chloasma model, and the constructing model effect and stability of ultraviolet irradiation are better.

[Key words] chloasma; ultraviolet ray; progesterone; animal model; rats, sprague-dawley

* 基金项目:重庆市基础科学与前沿技术研究专项(csct2016jcyjA0098)。 作者简介:邓志博(1995—),本科,主要从事医学影像学研究。

[△] 通信作者, E-mail: duyonghong@yeah.net。

黄褐斑的形成主要是因为黑色素细胞的活性及功能增强和黑色素颗粒的明显增多^[1],其中以基底层和棘层最为明显。黑色素细胞活性增强的原因尚不清楚,推测与内分泌的失调、紫外线辐照、氧自由基、遗传因素、子宫卵巢疾病、血清酮含量及情绪等有关^[2-3]。无疗效确切的中西医治疗方案^[3-5]。目前,黄褐斑动物建模的方法有雌激素全身攻击法、紫外线照射法和微量定点注射辅以紫外线照射法、黄体酮+紫外线+慢性应激抑郁法等^[6-7]。本文根据致黄褐斑的内分泌失调与紫外线照射两个假说,比较分析肌内注射黄体酮和紫外线照射两种方法建立 SD 大鼠黄褐斑模型的优缺点。

1 材料与方法

1.1 实验动物 28 只 SD 大鼠,雌性,体质量(270±30)g,由重庆医科大学实验动物中心提供,SPF 级。

1.2 仪器与试剂 窄谱 311 紫外线灯(深圳市可立士光电设备厂,型号:CLS-UV);黄体酮注射液(1 mL:20 mg,天津金耀药业有限公司,国药准字:H120233);总超氧化物歧化酶(SOD)测定试剂盒(WST-1 法,96T,南京建成生物工程研究所,生产批号:20160630);丙二醛(MDA)测定试剂盒(TBA 法,96T,南京建成生物工程研究所,生产批号:20160628)。

1.3 方法

1.3.1 实验动物分组 将 28 只雌性 SD 大鼠分为 5 组:对照组 6 只、高剂量黄体酮组 6 只、低剂量黄体酮组 6 只、高剂量紫外线组 5 只、低剂量紫外线组 5 只。

1.3.2 建模 高、低剂量黄体酮组于每日 14:00—16:00 分别在 SD 大鼠大腿根部肌内注射黄体酮注射液 25 mg/kg、10 mg/kg,两侧大腿左右交替注射,共 30 d。对照组注射等量的生理盐水。高、低剂量紫外线组于每日 14:00—15:00 分别用 311UVB 紫外线辐照 60、30 min,辐照高度距脱毛后的皮肤表面均为 30 cm,辐照面积为 20×30 cm²,共 14 d。

1.3.3 皮肤、肝脏组织匀浆的制备 紫外线组于第 15 天、黄体酮组于第 30 天处死大鼠,腹主动脉取血,后取皮肤、肝脏组织用预冷生理盐水(4℃)冲洗干净,于实验室配制浓度为 5%的组织匀浆待测。

1.3.4 皮肤斑块形成的计算 采用网格肉眼计数估算。网格大小为每格 1 mm,中间去掉,只余网线,将大鼠麻醉去毛后置于大鼠背部皮肤计数,每组取平均值。

1.3.5 检测组织匀浆中 SOD、MDA 水平 将不同组织上清液稀释成相应的浓度后按试剂盒说明书要求操作。

1.3.6 检测皮肤病理黑色素颗粒沉着 取大鼠病变皮肤固定,常规石蜡包埋切片,HE 染色,光学显微镜观察。

1.4 统计学处理 采用 SPSS17.0 统计软件进行分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 *t* 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 不同时间肉眼观察病变大小情况 在建模第 7 天高、低剂量紫外线组 SD 大鼠背部皮肤已经基本可以看见色素斑块形成,且高剂量组比低剂量组明显,但黄体酮组变化并不明显。在建模的第 14 天高剂量黄体酮组已经基本可以看见少量的色素沉积,但低剂量组几乎无变化,高、低剂量紫外线组色素沉着明显但差异无统计学意义($P > 0.05$)。建模组与未建模组在第 28 天肉眼可见明显区别,见图 1、2。

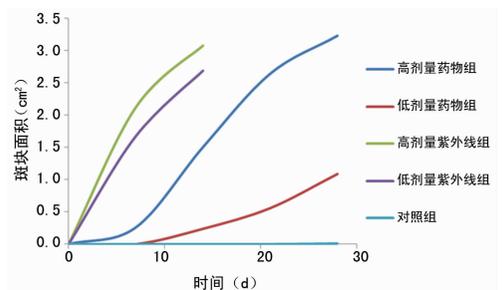


图 1 不同时间斑块面积变化趋势

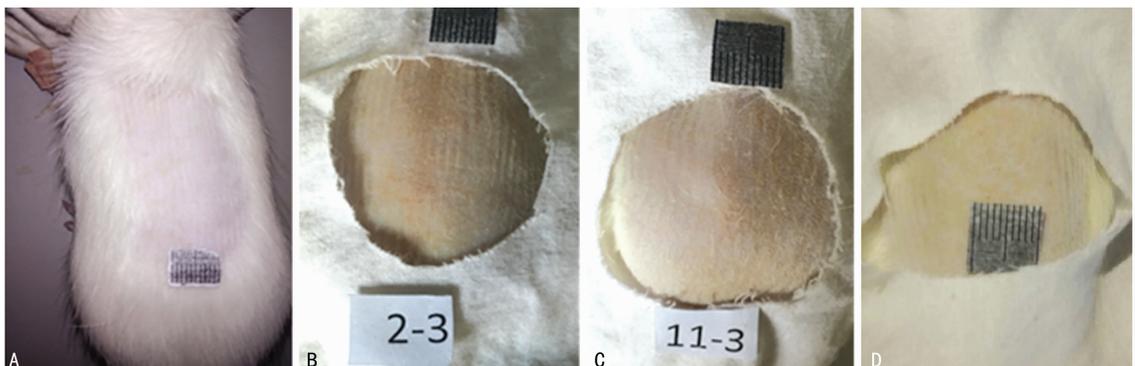


图 2 各组大鼠皮肤变化情况

2.2 血清、肝脏组织、皮肤组织中 SOD 及 MDA 水平与对照组比较,高剂量黄体酮组大鼠 MDA 水平升

高、SOD 水平降低,低剂量黄体酮组大鼠血清与皮肤组织中的 SOD 水平降低,差异有统计学意义($P <$

0.05)。高剂量紫外线组大鼠血清和皮肤组织中的 SOD 水平降低、MDA 水平升高,低剂量组紫外线的大鼠皮肤组织中的 SOD 水平降低($P < 0.05$),但两组比较差异无统计学意义($P > 0.05$),见表 1。

表 1 各组大鼠皮肤组织、肝脏组织、血清中 SOD 及 MDA 水平变化 ($\bar{x} \pm s$)

项目	组别	n	SOD(U)	MDA(nmol)
血清	黄体酮	高剂量	6 196.687±7.062	7.758±1.368
		低剂量	6 209.735±18.149	6.121±1.967
	紫外线	高剂量	5 191.854±3.805	7.406±0.247
		低剂量	5 216.379±10.511	6.196±0.617
	对照组	6	261.323±9.786	2.972±1.572
	肝脏	黄体酮	高剂量	6 83.856±8.691
低剂量			6 79.320±23.327	0.454±0.193
紫外线		高剂量	5 80.999±2.944	0.769±0.110
		低剂量	5 69.336±5.301	0.715±0.077
对照组		6	121.020±2.692	0.360±0.051
皮肤		黄体酮	高剂量	6 12.899±1.616
	低剂量		6 24.301±11.761	0.077±0.028
	紫外线	高剂量	5 16.520±0.501	0.212±0.056
		低剂量	5 26.553±0.365	0.199±0.060
	对照组	6	62.537±3.443	0.034±0.022

著成团堆积形成黑素小体。其中高剂量黄体酮组个体间黑色素颗粒沉着杂乱,多数呈层状密集排列,偶见少量色素呈单线型排列,见图 3;低剂量黄体酮药物组大多呈单线型散在分布,见图 4;高、低剂量紫外线组无明显的差异,呈线性排列,见图 5、6。

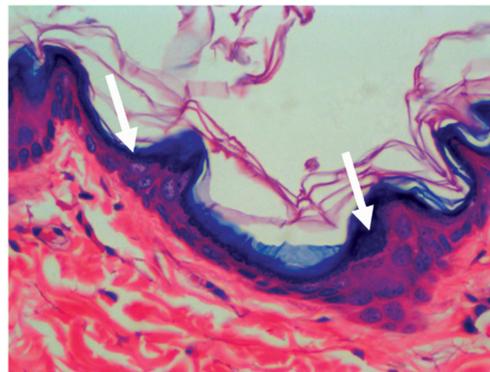


图 5 高剂量紫外线组 HE 染色(×100)

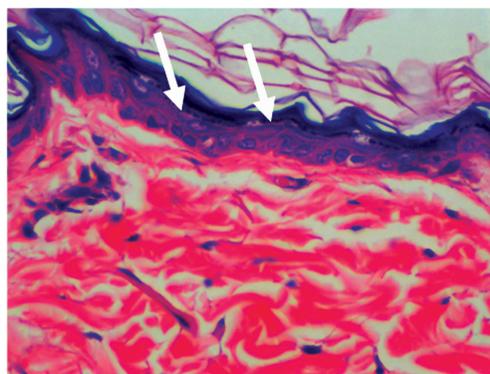


图 6 低剂量紫外线组 HE 染色(×100)

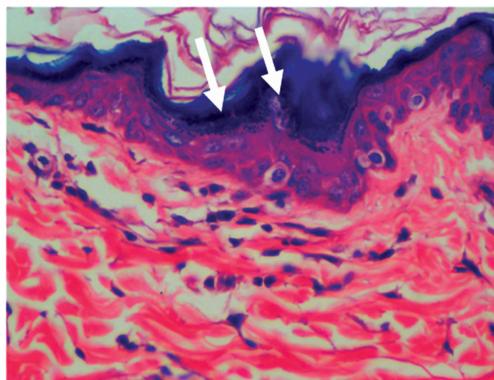


图 3 高剂量黄体酮组 HE 染色(×100)

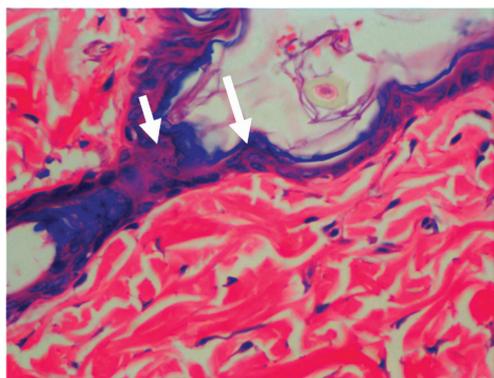


图 4 低剂量黄体酮组 HE 染色(×100)

2.3 皮肤病理学变化观察 光学显微镜下,对照组偶见少量黑色素颗粒沉着,建模组可见黑色素颗粒显

3 讨论

根据黄褐斑的发生与内分泌有关及目前学术界流行的“雌激素和黄体酮增多进而刺激黑色素细胞而致色素沉着”的学说^[8],采用肌内注射黄体酮(孕激素)的方法使大鼠的内分泌失调,间接的测量 SOD 和 MDA 来反映机体的氧化/抗氧化平衡^[9]。本研究采用 25 mg/kg 和 10 mg/kg 的黄体酮肌内注射大鼠,高剂量黄体酮组大鼠 MDA 水平升高、SOD 水平降低,低剂量黄体酮组大鼠血清与皮肤组织中的 SOD 水平降低。肌内注射药物作为一种全身用药,其不稳定性太大,个体差异较大,不可控因素太多。其次,判断黄褐斑形成的最直接、最客观的办法是皮肤病理组织检查黑色素颗粒的沉着,其多位于表皮的基底层与棘层。高剂量黄体酮组的大鼠皮肤病理组织可见位于基底层和棘层的层状密集排列的黑色素颗粒形成黑素小体,而低剂量黄体酮组的黑色素颗粒大多则是散在分布。由此可知,肌内注射高、低剂量的黄体酮建立黄褐斑大鼠模型在生物化学、病理学指标方面都有差异。

第二届理疗和光生物学大会提出^[10-11],UVB 是光谱为 275~320 nm 的紫外线,其生物效应十分活

跃,于紫外线下 20~30 min 可使皮肤晒伤变红,长期暴露局部皮肤,色素沉着明显,加速皮肤老化过程^[12]。中波紫外线使黑素细胞增多进而黑色素生成增多^[13],作为一种外源性刺激作用于大鼠,黑色素颗粒增加,并形成黑色素小体,从而形成黄褐斑^[12]。本实验用中波紫外线刺激从而建立黄褐斑大鼠模型,设置了高低剂量两个组,分别辐照 30 min 和 60 min,结果显示高低剂量组之间无明显差异,建模第 14 天后大鼠背部皮肤均可见色素沉着,血清、肝脏组织、皮肤组织的 SOD 水平降低($P<0.05$),MDA 升高($P<0.05$),变化幅度无明显差异,大鼠皮肤病理组织检查均可见位于基底层和棘层的单线型密集排列的黑色素颗粒。

综上所述,中波紫外线相对于黄体酮建模而言具有快速、高效、个体差异小、操作简单等优点。

参考文献

- [1] CAYCE K A, MCMICHAEL A J, FELDMAN S R. Hyperpigmentation: an overview of the common afflictions [J]. *Dermatol Nurs*, 2004, 16(16): 401-406, 413-417.
- [2] MOIN A, JABERY Z, FALLAH N. Prevalence and awareness of melasma during pregnancy [J]. *Int J Dermatol*, 2006, 45(3): 285-288.
- [3] 汤楠, 吴艳华, 李其林, 等. 黄褐斑病因及发病机制研究现状 [J]. *皮肤性病诊疗学杂志*, 2013, 20(4): 302-304.
- [4] 张国栋, 周需, 黄亦琦. 黄褐斑发病机制及治疗 [J]. *福建医药杂志*, 2015, 37(1): 128-130.
- [5] 李娟, 颜敏, 张媛, 等. 黄褐斑病因、发病机制及治疗进展 [J]. *中国麻风皮肤病杂志*, 2016, 32(2): 123-126.
- [6] 张海燕, 王军. 黄褐斑实验动物模型的应用研究概况 [J]. *中国民族民间医药*, 2009, 18(8): 41-42.
- [7] 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比较研究 [J]. *中国美容医学杂志*, 2013, 22(3): 349-354.
- [8] GRIMES P E, YAMADA N, BHAWAN J. Light microscopic, immunohistochemical, and ultrastructural alterations in patients with melasma [J]. *Am J Dermatopathol*, 2005, 27(2): 96-101.
- [9] 过伟峰, 徐立, 项晓人, 等. 建立小鼠黄褐斑实验动物模型的初步研究 [J]. *中国中医基础医学杂志*, 2001, 7(2): 49-51.
- [10] FOLBERG R, BARON J, REEVES R D, et al. Animal model of conjunctival primary acquired melanosis [J]. *Ophthalmology*, 1989, 96(7): 1006.
- [11] 陈庭仁. 紫外线治疗学 [M]. 重庆: 科学技术出版社重庆分社, 1986: 61.
- [12] 张琳西, 王臻, 郭树忠, 等. 中波紫外线对体外培养的人黑色素细胞的影响 [J]. *中国美容医学*, 2001, 10(3): 180-182.
- [13] KANG H Y, HWANG J S, LEE J Y, et al. The dermal stem cell factor and c-kit are overexpressed in melasma [J]. *Brit J Dermatol*, 2006, 154(6): 1094-1099.

(收稿日期: 2017-11-06 修回日期: 2018-01-14)

(上接第 1992 页)

抗炎镇痛活性部位。实验表明,野棉花具备良好的抗炎镇痛作用,同时,随着增加不同提取物的剂量,其镇痛率、痛阈值、抑制率越高,肿胀度与扭体次数降低,证明高剂量组有较好的镇痛抗炎效果,下一步将对其具体作用机制和有效成分进行深入研究。

参考文献

- [1] 邱德文, 杜江. 中华本草苗药卷 [M]. 贵阳: 贵州科技出版社, 2005: 503-504.
- [2] 王夏茵, 汤海峰, 涂宏海, 等. 打破碗花花根茎化学成分研究 [J]. *中中药学*, 2015, 13(2): 128-132.
- [3] 肖静, 朱梦军, 肖晖. 百眼腾抗炎镇痛作用有效部位的筛选 [J]. *中国医院药学杂志*, 2013, 33(15): 1281-1282.
- [4] 徐叔云, 卞如谦, 陈修. 药理实验方法学 [M]. 3 版. 北京: 人民卫生出版社, 2002: 882-911.
- [5] 冯洁, 周劲帆, 覃富景, 等. 两面针根和茎抗炎镇痛不同部位活性比较研究 [J]. *中药药理与临床*, 2011, 27(6): 60-63.
- [6] 韦锦斌, 周劲帆, 冯洁, 等. 两面针叶不同提取部位的抗炎镇痛作用研究 [J]. *中药新药与临床药理*, 2013, 24(2): 122-125.
- [7] 赵平, 叶志文, 凌玉云, 等. 珍黄丸抗炎镇痛作用的药效学研究 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2009, 15(9): 86-88.
- [8] 夏亚兰, 姚欣凯, 许义红, 等. 水芍药广瓦镇痛抗炎作用的实验研究 [J]. *重庆医学*, 2013, 42(23): 2762-2764.
- [9] 钱海兵, 孙宜春, 黄婕, 等. 芭蕉根不同提取物的抗炎镇痛作用研究 [J]. *时珍国医国药*, 2010, 21(4): 780-781.
- [10] 周志梅, 郭世民, 何静, 等. 镇痛中药的研究进展 [J]. *云南中医中药杂志*, 2007, 28(4): 52-54.
- [11] 张轩萍, 杨彩虹, 王洁, 等. 祛风息痛丸的抗炎作用机制研究 [J]. *中国药物与临床*, 2009, 9(3): 225-228.
- [12] 赵桂芝. 牙痛民间外治法 [J]. *中国民间疗法*, 2004, 12(1): 18-19.
- [13] 姜维龙, 唐勇, 董超. 关节疼痛的中医理论认识 [J]. *四川中医中药杂志*, 2010, 28(3): 11-13.

(收稿日期: 2017-11-02 修回日期: 2018-02-08)