技术方法 文章编号:0253-3626(2009)01-0307-03

咪喹莫特诱导多品系小鼠脱毛动物模型的建立

杜 佳,赵恒光,李 惠
(重庆医科大学附属第一医院皮肤科,重庆 400016)

【摘 要】目的:研究咪喹莫特外用建立多品系小鼠脱毛动物模型的可行性及其初步机理。方法:BARB/c、129、C3H/HeJ、C57 4 种品系小鼠各 30 只,各品系鼠均随机分成两组,实验组 4 组 *15 只,背部外用咪喹莫特每周 3 次;对照组 4 组 *15 只,外用不含药物的空白基质,随访一定时间后观察脱毛结果,并用免疫组化法检测毛囊周围 TLR7 受体的分布。结果:四种品系小鼠在给药 7 ~ 10 d 后均出现脱毛现象,形成斑片状脱毛区,成功率 100%。TLR7 受体在各品系小鼠的毛囊及其周围均有强阳性表达。结论:咪喹莫特外用能稳定地诱导 BARB/c、129、C3H/HeJ、C57 品系小鼠建立脱毛动物模型,是一种非疤痕性、非炎症性脱发,其机理可能与咪喹莫特诱导激活毛囊周围的 TLR7 受体有关。

【关键词】咪喹莫特;Toll 样受体 7;脱毛
【中国图书分类法分类号】R758.71 【文献标识码】A 【收稿日期】2008-07-16

Establishment of alopecia animal model induced by imiquimod in multi-strain mice

DU Jia, et al
(Department of Dermoto-venereology, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University)

【Abstract】*Objectives*: To establish a novel alopecia animal model in multi-strain mice. *Methods*: BARB/c mice, 129 mice, C57mice and C3H/HeJ mice were purchased at the age of 6 to 8 weeks. 30 mice of each kind were divided into control and experimental groups randomly. The control group were treated with vehicle alone. The experimental groups were treated with imiquimod cream with cotton swaps for back skin 3 times a week. The existence of TLR7 on skin was examined by immunohistochemistry(IHC). *Results*: Alopecia lesions were observed in all the mice in experimental group, but mice in control group could not induce by imiquimod. The aggregation of TLR7 were observed in hair follicle. *Conclusions:* Imiquimod can stably induce non-inflammatory alopecia in BARB/c mice, 129 mice, C57mice and C3H/HeJ mice by activating TLR7.

【Key word】Imiquimod; Toll-like receptor 7; Alopecia

作者介绍:杜 佳(1983-),女,硕士,
研究方向:皮肤变态反应性疾病。
通讯作者:李 惠,女,教授,E-mail:lihui131128@vip.163.com。
基金项目:重庆市科委基金资助项目(2007BB5296)。

参 考 文 献

[1] Scallet A C, Schmued L C, Slikker W, et al. Developmental neurotoxicity of ketamine: Morphometric confirmation, exposure parameters, and multiple fluorescent labeling of apoptotic neurons[J]. Toxicological Sciences, 2004, 81(2):364-370.

[2] Kitamura A, Marszalec W, Yeh J Z, et al. Effects of halothane and propofol on excitatory and inhibitory synaptic transmission in rat cortical neurons[J]. J Pharmacol Exp Ther, 2003, 304(1):162-171.

[3] Irifune M, Takarada T, Shimizu Y, et al. Propofol-induced anesthesia in mice is mediated by γ-aminobutyric acid-A and excitatory amino acid recepors[J]. Anesth Analg, 2003, 97(2):424-429.

[4] Loepke A W, McCann J C, Dean Kurth C, et al. The physiologic effects of isoflurane anesthesia in neonatal mice[J]. Anesth Analg, 2006, 102(1):75-80.

[5] Ma D Q, Williamson P, Januszewski A, et al. Xenon mitigates isoflurane-induced neuronal apoptosis in the developing rodent brain[J]. Anesthesiology, 2007, 106(4):746-753.

[6] Young C, Jevtovic-Todorovic V, Qin Y Q, et al. Potential of ketamine and midazolam, individually or in combination, to induce apoptotic neurodegeneration in the infant mouse brain[J]. Br J Pharmacol, 2005, 146(2):189-197.

[7] Jevtovic-Todorovic V, Hartman R E, Izumi Y, et al. Early exposure to common anesthetic agents causes widespread neurodegeneration in the developing rat brain and persistent learning deficits[J]. J Neurosci, 2003, 23(3):876-882.

[8] Arvidsson A, Kokaia Z, Lindvall O. N-methyl-D-aspartate receptor-mediated increase of neurogenesis in adult rat dentate gyrus following stroke[J]. Eur J Neurosci, 2001, 14(1):10-18.

[9] 曹江北,张黎明,米卫东,等.丙泊酚对体外培养海马神经前体细胞增殖的影响[J].军医进修学院学报,2007,28(1):56-58.

[10] 王显望,杨天德,孙正清,等.异丙酚复合成低温对大鼠脑创伤后神经细胞凋亡的影响[J].重庆医学,2005,34(9):1363-1364.

(责任编辑:冉明会)

脱发是严重困扰患者容貌和心理的疾病，由于其发病率近年前逐渐升高，已成为当前皮肤和美容学科最常见的疾病之一。但目前关于脱发疾病的病因不清，治疗方法有限，研究进展亦不大，其中最重要的原因之一就是缺乏理想的脱毛动物模型。咪喹莫特是一种新型免疫调节剂，属咪唑喹啉胺家族，化学名 1-(2-甲基丙基)-1H-咪唑(4,5-C)喹啉-4胺，有研究表明其主要通过细胞表面的 TLR7 受体(Toll-like receptor 7，TLR7)发挥作用，从而调节多种细胞因子的分泌[1,2]。为探索咪喹莫特对人或动物毛囊生长发育的影响，我们将其外用 BARB/c、129、C3H/HeJ 和 C57 品系小鼠，证实了其对多品系小鼠的脱毛诱导作用。

1 材料和方法

1.1 材料和试剂

6～8 周龄清洁级 BARB/c 小鼠、129 小鼠、C57 小鼠各 30 只购自四川大学华西实验动物中心，C3H/HeJ 小鼠 30 只购自中国科学院上海实验动物中心，雌雄各半，平均体重 15.5 g，无明显遗传性或系统性疾病，实验前各鼠外观良好，饲养于四川大学实验动物中心。各品系小鼠随机分为两组，实验组 15 只 *4 组，对照组 15 只 *4 组。咪喹莫特乳膏购自四川明欣药业有限公司(商品名明欣利迪，批号 060410)，5%浓度。对照组用空白试剂由相同厂家提供的不含咪喹莫特的赋形剂基质。抗 TLR7 一抗购自 Santa cruz 公司，二抗购自 DAKO 公司。

1.2 给药方法

给药方法参照文献[3]进行。实验组每次取出小鼠，用清洁医用棉签蘸取咪喹莫特膏体约 0.3 g，均匀涂抹至背部皮肤，面积约 1.5 cm × 2 cm。每次给药前用生理盐水小心清洁局部，去除前次残留药物。操作中动作尽量轻柔，涂抹均匀即可，避免反复摩擦导致皮肤划伤或毛发机械性脱落。实验期间，给药部位形成面积大于 1 cm × 1 cm 斑片状脱毛反应提示造模成功，停止给药。最长连续用药不超过 4 周。对照组用空白赋形剂按相同方法给药，连续 6 周后停止。各组观察期均为 2 个月。

1.3 皮肤组织学

实验组进入脱毛稳定期后取小鼠脱毛区皮肤全层，同时期取对照组用药处皮肤全层，经 10%福尔马林固定，石蜡包埋切片，常规 HE 染色。

1.4 TLR7 免疫组化染色

取材、固定及切片同 HE 染色。二甲苯脱蜡，3%H_2O_2 封闭 15 min，EDTA(PH=9.0)95℃水浴抗原热修复 40 min，加一抗 4℃过夜，二抗 30 min，DAB 显色，苏木素复染。阴性对照用 PBS 代替一抗。结果判定：细胞膜或细胞质有棕黄色颗粒为阳性。

2 结 果

2.1 各组诱导脱毛情况

BARB/c 小鼠、129 小鼠、C3H/HeJ 小鼠、C57 小鼠实验组均在外用咪喹莫特后 7~10 d 开始出现毛发脱落，初为局部毛发排列紊乱、零散，继之松动而在给药时随棉签摩擦脱落，再经约 5~7 d 后开始表现为在鼠的生活过程中自发脱落，面积逐渐扩大而在原给药部位形成斑片状脱毛区。在脱落前后观察局部皮肤外观正常，未见明显红肿、硬结、瘢痕及皮肤异色等现象(图 1)。脱毛前未发现毛发质地的明显异常。连续用药 6 周后对照组均未观察到脱毛现象。



图 1 用药 15 d 后出现非炎症性斑片状脱毛区

2.2 皮肤组织学变化

进入脱毛期后的实验组皮肤组织学显示，脱毛区皮肤的毛囊数目明显较正常皮肤减少，毛囊萎缩，处于退行期及休止期的毛囊增多，毛球、毛母质及毛乳头缩小，毛乳头上移，但部份区域可见明显的皮肤表皮增生现象，颗粒层和棘层肥厚，伴角化过度，部份毛囊口可见角质栓伸入，但未见明显的炎性细胞侵润，也未见明显的纤维增生及细胞异形性(图 2)。

2.3 TLR7 免疫组化染色

免疫组化染色结果示，TLR7 受体在各品系小鼠的毛囊基底部均呈强阳性表达，尤以毛乳头、毛基质最显著，表明该处具有较多的 TLR7 受体分布(图 3)。

3 讨 论

缺乏有效的脱毛动物模型是当前严重阻碍毛

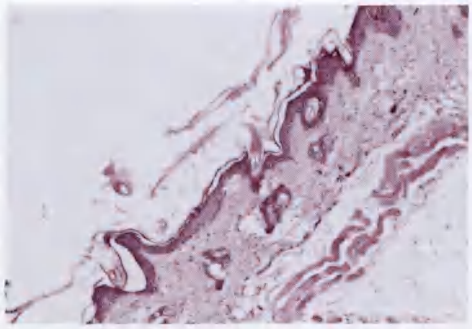


图 2　用药 7 d 后，给药处出现了毛囊的萎缩、退化和数目减少（HE 染色，×20）

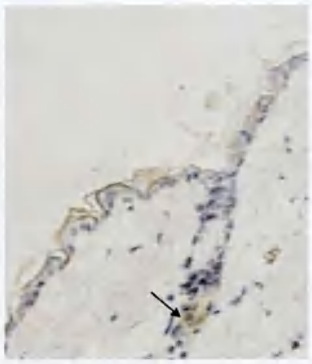


图 3　TLR7 在毛囊毛基质处呈明显阳性表达（免疫组化染色，×20）

发疾病深入研究的重要原因之一。赵恒光等[3]曾报道外用咪喹莫特可成功诱导出 C3H/HeJ 小鼠的脱毛模型，并具有与人类斑秃较大的相似性。但由于其实验仅采用一种品系小鼠，为进一步验证该结果与小鼠种属的相关性，我们在本实验中将其扩大至 BARB/c 小鼠、129 小鼠、C57 小鼠、C3H/HeJ 小鼠四种品系得到相同结果，即四种品系小鼠均可稳定地建立脱毛模型，成功率近 100%，初步证明咪喹莫特对小鼠脱毛模型的建立可能与小鼠的品系和遗传背景无关。同时组织病理也再次证实其与人类脱毛的相似性，脱发区皮肤的毛囊数目明显较正常皮肤减少，毛囊萎缩，处于退行期和休止的毛囊增多，毛球、毛母质和毛乳头缩小，是一种非炎症、非疤痕性脱毛，表明该方法应是一种较可靠且简单易行的脱毛动物模型诱导方法。但与文献[3]报道有所差异的是，在本次实验中我们未能观察到脱毛后的毛囊周围伴发的明显炎性细胞（包括淋巴细胞）侵润现象。

而目前有关咪喹莫特的研究主要局限于皮肤肿瘤及病毒疣的治疗方面，对人或动物毛囊作用机制的研究国内外尚未见报道[4,5]。TLR7 受体是咪喹莫特的特异激活受体，为探讨其中可能的机理，我们检测了四种品系小鼠脱毛前后皮肤内 TLR7 受体的分布，发现 TLR7 受体在各品系小鼠的毛囊基底部均呈强阳性表达，尤以毛乳头、毛基质处最显著，因而推测 TLR7 受体的激活可能仍是咪喹莫特诱导毛发脱落的关键环节。结合当前咪喹莫特的基础研究，我们已知咪喹莫特在与 TLR-7 结合后，可通过配体接头蛋白分子髓样分化蛋白 88（MyD88）和 NF-κB 等途径改变多种细胞因子（如 IFN-γ、IFN-α、TNF-α、IL-1、6、10、12 等）的基因表达而影响其分泌[6]。因此推测咪喹莫特导致的毛发脱落可能与其改变了毛囊周围细胞因子的分泌格局（如 INF-γ 等 Th1 型细胞因子的分泌增加等）而致生长期毛囊失免疫赫免，毛囊受免疫攻击而发生生长期毛囊的退化和萎缩有关[7]。但本次实验中我们未能观察到脱毛后的毛囊周围有明显的炎性细胞（包括淋巴细胞）的侵润现象，因此对于淋巴细胞或细胞因子等免疫因素在其中的重要性尚无法得出更详细的结论，需要进一步探索。因此，咪喹莫特诱导的 BARB/c 小鼠、129 小鼠、C57 小鼠、C3H/HeJ 小鼠等多品系小鼠脱毛现象模型可在一定程度上用于人类脱毛疾病的研究，具有进一步深入研究和推广应用的基础。

参 考 文 献

[1] Dockrell D H, Kinghorn G R. Imiquimod and resiquimod as novel immunomodulators[J]. J Antimicrob Chemother, 2001, 48(6): 751-755.

[2] Barnetson R S, Satchell A L, Zhuang H B, et al. Imiquimod induced regression of clinically diagnosed superficial basal cell carcinoma is associated with early infiltration by CD4 T cells and dendritic cells[J]. Clin Exp Dermatol, 2004, 29(6): 639-643.

[3] 赵恒光，李　惠. 咪喹莫特诱导 C3H/HeJ 小鼠脱毛实验动物模型的建立[J]. 中华皮肤科杂志, 2008, 41(1): 25-28.

[4] Arany I, Tyring S K, Brysk M M, et al. Correlation between pretreatment levels of interferon response genes and clinical responses to an immune response modifier (imiquimod) in genital warts[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2000, 44(7): 1869-1873.

[5] Marks R, Gebauer K, Shumack S, et al. Imiquimod 5% cream in the treatment of superficial basal cell carcinoma: results of a multicenter 6-week dose-response trial[J]. J Am Acad Dermatol, 2001, 44: 807-813.

[6] Hemmi H, Kaisho T, Takeuchi O, et al. Small anti-viral compounds activateimmune cells via the TLR7 MyD88-dependent signaling pathway [J]. Nat. Immunol, 2002, 3: 196-200.

[7] Christoph T, Malle R S, Audring H, et al. The human hair follicle immune system: cellular composition and immune privilege[J]. Br J Dermatol, 2000, 142(5): 862-873.

（责任编辑：冉明会）