

# 改良型银屑病小鼠模型的建立<sup>△</sup>

修媛娟\*, 向翠英, 邵振俊<sup>#</sup>(重庆华邦制药有限公司研发中心, 重庆 401121)

中图分类号 R965.1 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2019)09-1187-05

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2019.09.08

**摘要** 目的:对咪喹莫特诱导建立小鼠银屑病模型进行改良,建立银屑病持续时间更长、特征更典型的银屑病动物模型。方法:将小鼠随机分为正常组(涂抹凡士林)、模型组[涂抹咪喹莫特乳膏 60 mg/(2×3 cm<sup>2</sup>·d)]和改良组[涂抹咪喹莫特乳膏 60 mg/(2×3 cm<sup>2</sup>·d)+皮下注射重组小鼠白细胞介素 12(rmIL-12)和脂多糖(每周 1 次)],连续 21 d,每组 10 只。从造模第 1 天起每日观察小鼠造模部位皮肤,对类似银屑病样皮损的红斑、鳞屑、增厚等症状进行银屑病面积与严重性指数(PASI)评分;造模 21 d 后处死小鼠,取皮损部位进行组织病理学检查,计算脾指数,酶联免疫吸附实验(ELISA)法检测皮肤中 IL-17A、IL-12 的含量。结果:自给药第 3、2 天起,模型组和改良组小鼠皮肤分别出现红斑、鳞屑、增厚等类似银屑病样皮损,均在第 12 天 PASI 总分达到峰值;改良组从第 11 天起,小鼠皮肤红斑、鳞屑、厚度较模型组更明显,且连续 9 d PASI 总评分显著高于模型组( $P<0.05$ );皮肤组织病理学观察到模型组和改良组小鼠均出现 Munro 微脓肿、棘层肥厚及真皮层炎症细胞浸润;与模型组比较,改良组小鼠脾指数更高( $P<0.05$ );与正常组比较,模型组和改良组小鼠皮肤中 IL-17A、IL-12 含量均升高,且改良组升高差异有统计学意义( $P<0.05$ )。结论:建立的改良模型银屑病典型特征维持时间更长。

**关键词** 银屑病模型;咪喹莫特;小鼠;银屑病面积与严重性指数评分;白细胞介素 12;白细胞介素 17A

## Establishment of Modified Model of Psoriasis Mice

XIU Yuanjuan, XIANG Cuiying, SHAO Zhenjun (Dept. of Research&Development, Huapont Pharm Co., Ltd., Chongqing 401121, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To establish psoriasis animal model with a longer duration and more typical psoriatic characteristics by modifying psoriasis model induced by imiquimod. METHODS: Mice were randomly divided into normal group (treated with vaseline), model group [treated with Imiquimod cream 60 mg/(2×3 cm<sup>2</sup>·d)] and modified group [treated with Imiquimod cream 60 mg/(2×3 cm<sup>2</sup>·d)+subcutaneous injection of rmIL-12 and LPS once a week], for consecutive 21 d, with 10 mice in each group. The skin of the model site was observed daily from the first day of modeling. Psoriasis area and severity index (PASI) score was conducted for skin lesions such as erythema, scales and thickening. 21 d after modeling, mice were sacrificed, and histopathological examination of the skin lesions was performed. The spleen index was calculated, and the contents of IL-17A and IL-12 in the skin were detected by ELISA. RESULTS: From the third and second day of medication, erythema, scales and thickening were both observed in model group and modified group respectively. The PASI score reached peak on the 12th day. From the 11th day, erythema, scales and thickening of the modified group were more serious than that in model group. PASI scores of modified group was significantly higher than that of model group for 9 consecutive days ( $P<0.05$ ). Histopathological observation showed that Munro microabscess, acanthosis and dermal inflammatory cell infiltration occurred in both model group and modified group. Compared with model group, spleen indexes of modified group were higher ( $P<0.05$ ). Compared with normal group, the contents of IL-17A and IL-12 in mice skin of model group and modified group were both increased, and there was statistical significance in modified group ( $P<0.05$ ). CONCLUSIONS: The established modified model has the longer duration of typical characteristics of psoriasis.

**KEYWORDS** Psoriasis model; Imiquimod; Mice; Psoriasis area and severity index score; IL-12; IL-17A

银屑病是一种常见并易复发的慢性炎症性皮肤病,典型的临床表现为皮损处红色丘疹或斑块,上覆厚层鳞屑,病理特征以皮肤角质形成细胞角化不全、角化过度、异常增生、血管形成和炎症细胞浸润为主,严重影响患

<sup>△</sup> 基金项目:重庆市社会事业与民生保障科技创新专项(No. cstc2016shmszx130055)

\* 高级工程师,硕士。研究方向:药理毒理。E-mail:xiuyuanjuan@163.com

# 通信作者:高级工程师,博士。研究方向:药理毒理。E-mail:shaozhenjun2006@163.com

者的生活质量,目前的治疗措施虽然有效,但并不能达到长期缓解的目的<sup>[1-2]</sup>。因此,银屑病是当前皮肤科领域内重点研究的疾病之一,用于治疗银屑病的药物是当前新药开发的热点。银屑病动物模型是用于评价药物疗效的重要工具。目前用于研究银屑病的模型有咪喹莫特诱导的小鼠银屑病模型、鼠尾鳞片模型、雌鼠阴道上皮模型、基因工程小鼠模型和异体移植模型等<sup>[3]</sup>,虽然模型众多,但各有优缺点,目前并无可同时用于银屑病发病机制、药物疗效和作用机制评价的理想的动物模型。

咪喹莫特的临床不良反应之一为诱导银屑病发作<sup>[4-5]</sup>,利用咪喹莫特诱导的小鼠银屑病模型操作简单、易于实现,且皮肤表型、病理特征具有组织间复杂相互作用并与临床银屑病类似的优点<sup>[6]</sup>,因此目前研究较多<sup>[7-9]</sup>,并普遍应用于药物疗效评价中;但该模型产生的炎症持续时间较短,一般在1周左右达到皮损高峰后逐渐减轻,与人类银屑病多数表现为迁延反复甚至终生不愈的慢性病程不相符<sup>[2,10]</sup>,症状的快速消退不利于药物疗效的评价,因此有必要进行改良使之达到较为稳定的状态。由于活化的T细胞、树突细胞和固有免疫系统细胞分泌的细胞因子可驱动银屑病的发病<sup>[11]</sup>,因此本实验拟在给予咪喹莫特乳膏涂抹之后,加用细胞因子白细胞介素12(IL-12)刺激小鼠免疫系统,以延长皮损持续时间,使银屑病的特征更典型,以更好地用于银屑病治疗药物的疗效评价。

## 1 材料

### 1.1 仪器

ASP300自动脱水机、RM2215RTS石蜡切片机、EG1150 HC石蜡包埋机(德国Leica Biosystems Inc.);BX41显微镜(日本Olympus公司);Rayto RT-6100酶标仪(深圳雷杜生命科学股份有限公司)。

### 1.2 药品与试剂

咪喹莫特乳膏(四川明欣药业有限责任公司,批号:18030140,规格:3 g);医用凡士林(天津市大茂化学试剂厂,批号:20151210);IL-12注射液(使用产品为重组小鼠白介素-12 p70, rmIL-12 p70, BD Pharmingen Inc,批号:6278771,规格:5 μg);脂多糖(LPS)冻干粉(美国Sigma公司,批号:045M4087V,规格:10 mg);IL-17A、IL-12酶联免疫吸附实验(ELISA)试剂盒(上海将来实业股份有限公司,批号:JL20171、JL20166)。

### 1.3 动物

BALB/c小鼠,SPF级,♀♂各半,6~8周龄,体质量18~22 g,30只,购自斯贝福(北京)生物技术有限公司。实验动物生产许可证号:SCXK(京)2016-0002,实验动物合格证号:11401500037928。小鼠饲养期间自由摄食饮水,控制环境温度为18~24℃、相对湿度为40%~70%,明暗交替12 h。

## 2 方法

### 2.1 分组

小鼠适应性饲养后分为3组:正常组、模型组、改良组,每组10只。

### 2.2 模型建立

小鼠背部脱毛后,正常组每日在小鼠背部涂抹凡士林;模型组每日在小鼠背部涂抹咪喹莫特乳膏,60 mg/(2×3 cm<sup>2</sup>·d);改良组在小鼠背部涂抹咪喹莫特乳膏的第1天起,每周1次皮下注射rmIL-12 10 ng(5 μL)和LPS 20 μg(5 μL)<sup>[12]</sup>。小鼠持续造模21 d。

## 2.3 检测指标

2.3.1 皮损评分 参考临床银屑病面积与严重性指数(PASI)评分标准<sup>[13]</sup>,造模第1天开始,每日对皮损处红斑、鳞屑、厚度按0~4评分,并将3项得分相加得到总分。PASI评分标准<sup>[14]</sup>:(1)红斑。0分为无红斑,1分为红斑呈淡红色,2分为红斑呈红色,3分为红斑呈深红色,4分为红斑极深;(2)鳞屑。0分为表面无鳞屑,1分为部分皮损表面上覆有鳞屑,2分为大多数皮损表面覆盖有鳞屑,3分为皮损部位几乎全部被鳞屑覆盖,鳞屑呈层,4分为皮损部位全部被鳞屑覆盖;(3)厚度。0分为皮损与正常皮肤齐平,1分为皮损较正常皮肤表面稍高,2分为皮损中等度隆起,3分为皮损肥厚,隆起明显,4分为皮损高度肥厚,明显凸起。对各组总分取平均值绘制曲线。

2.3.2 皮损组织病理学观察 于造模给药第22天处死小鼠,并剪取背部部分皮损固定于10%甲醛缓冲液中,标本脱水、石蜡包埋、切片、苏木精-伊红(HE)染色。显微镜下观察组织病理形态并照相。

2.3.3 脾指数 于造模给药第22天小鼠称体质量后处死并取脾称质量,按以下公式计算脾指数:脾指数=脾质量(g)/体质量(g)。

2.3.4 皮肤中细胞因子含量测定 于造模给药第22天处死小鼠,取0.1 g背部皮损皮肤加入1 mL磷酸盐缓冲液(PBS)后匀浆,以3 000 r/min离心20 min,取上清液检测IL-17A、IL-12含量。具体操作步骤严格按照ELISA试剂盒说明书进行。

### 2.4 统计学方法

应用统计学软件SPSS 16.0(SPSS Inc.)进行数据处理,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用单因素方差分析进行统计学分析。当 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

## 3 结果

### 3.1 小鼠皮损评分

与正常组比较,模型组和改良组小鼠分别从造模第3天和造模第2天开始陆续出现红斑和鳞屑,皮肤增厚均都在第7天观察到;模型组小鼠红斑PASI评分在第5天接近峰值,持续至第12天后开始下降;鳞屑PASI评分在第7天接近峰值,持续至第9天后开始下降,皮肤厚度在第11天PASI评分达峰后下降;改良组各观察指标在前期与模型组表现相似,中期表现更为明显,后期下降更缓慢。根据PASI总分,模型组和改良组均在造模第12天达到PASI总分峰值,造模第1~10天,模型组和改良组的PASI总分均数无明显差异( $P > 0.05$ ),但从第11天起,连续9 d改良组PASI总分高于模型组( $P < 0.05$ )。各组小鼠造模第13天时背部皮损肉眼观察结果见图1,不同时间点背部皮损PASI评分结果图2(注:正常组有2份标本在实验中遗失,故 $n=8$ )。

### 3.2 小鼠皮肤组织病理

实验结束时,正常组小鼠表皮层较薄,仅见1~2层



图1 各组小鼠背部皮损肉眼观察结果

Fig 1 Gross observation of back skin lesion in mice of each group

形态正常的细胞;模型组和改良组小鼠均出现表皮明显增厚,部分位置的Munro微脓肿,棘层细胞数量增加,真皮层有大量炎症细胞浸润,与人类银屑病皮损病理改变<sup>[1-2]</sup>基本相同。各组小鼠皮损的组织病理图见图3。

### 3.3 脾指数

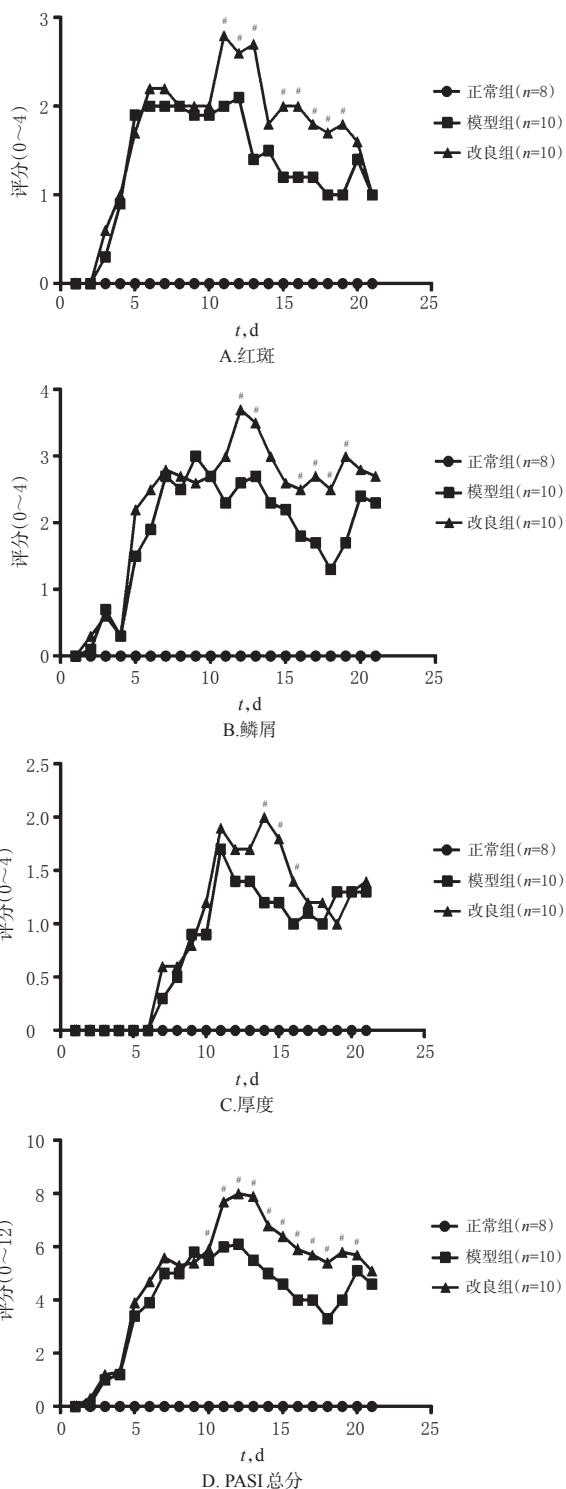
实验结束时,与正常组比较,模型组与改良组小鼠脾指数均升高,差异有统计学意义( $P < 0.05$ );与模型组比较,改良组小鼠脾指数升高,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),详见表1。

### 3.4 小鼠皮肤中细胞因子的含量

实验结束时,与正常组比较,模型组和改良组小鼠皮肤中IL-17A和IL-12的含量均升高,但仅改良组的升高差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),详见图4。

## 4 讨论

近年来的研究认为,银屑病的发病与IL-23/Th17轴和Th1/Th2平衡有关,且细胞因子[IL-17、IL-12、IL-1、肿瘤坏死因子(TNF)- $\alpha$ 等]之间的相互作用可以解释银屑病的大多数临床特征,如角质形成细胞的过度增殖、新生血管和炎症的增加<sup>[11]</sup>。咪喹莫特可激活真皮树突细胞分泌产生IL-23,后者与Th17细胞上的IL-23受体结合,激活信号传导及转录活化因子3(STAT3)分子引起IL-17A表达上调,激活角质细胞上的IL-17A和IL-17R同源二聚体而诱导核转录因子 $\kappa$ B(NF- $\kappa$ B)信号活化产生炎症反应<sup>[15]</sup>。IL-17A是驱动银屑病发病的已知的6种IL-17亚型中最重要的一种,是活化



注:与模型组比较,\* $P < 0.05$

Note: vs. model group, \* $P < 0.05$

图2 各组小鼠不同时间点背部皮损 PASI 评分结果 ( $n=8$  或  $n=10$ )

Fig 2 PASI scores of back skin lesions at different time points in mice of each group ( $n=8$  or  $n=10$ )

的记忆性T细胞的产物,可刺激角质细胞产生抗菌肽、促炎症细胞因子及趋化因子,利于树突细胞和T细胞在皮肤募集<sup>[16-18]</sup>。目前已研发出多种IL-17A拮抗药,如

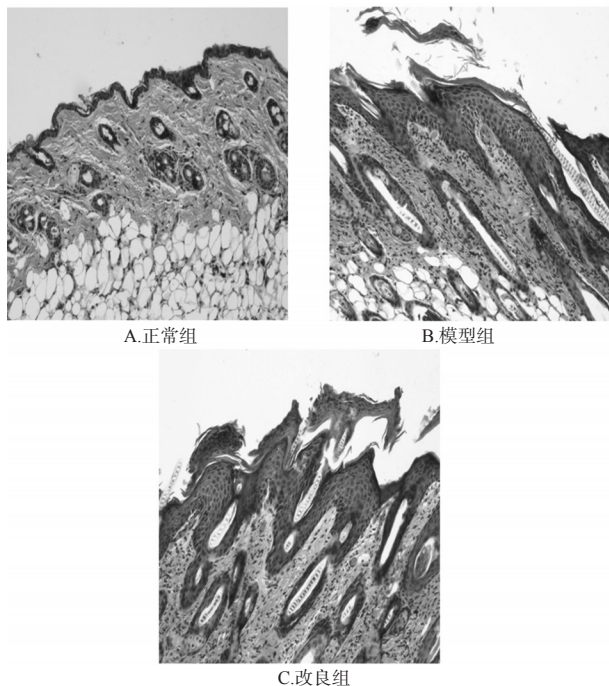


图3 各组小鼠皮损的组织病理图(HE, ×100)

Fig 3 Histological changes of skin lesions in mice of each group (HE, ×100)

表1 各组小鼠脾质量及脾指数( $\bar{x} \pm s$ )

Tab1 Spleen weight and spleen index in mice of each group( $\bar{x} \pm s$ )

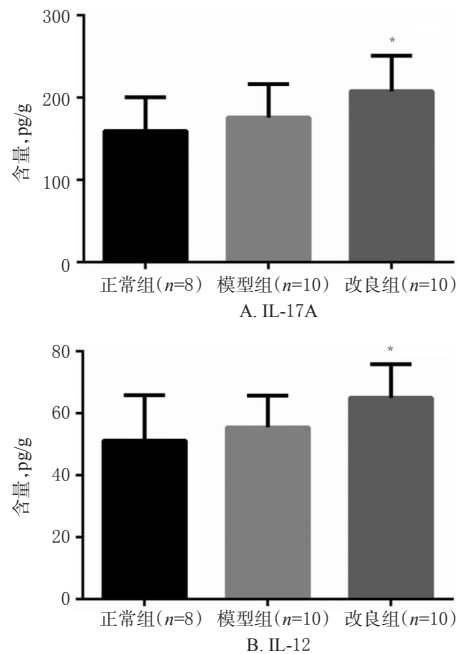
组别	n	脾质量,g	脾指数,g/g
正常组	8	0.104 ± 0.030	0.004 ± 0.001
模型组	10	0.342 ± 0.042*	0.017 ± 0.004*
改良组	10	0.471 ± 0.090**	0.023 ± 0.007**

注:与正常组比较,\* $P < 0.05$ ;与模型组比较,\*\* $P < 0.05$

Note: vs. normal group, \* $P < 0.05$ ; vs. model group, \*\* $P < 0.05$

苏金单抗、Ixekizumab,已用于治疗中、重度斑块型银屑病<sup>[19]</sup>。树突细胞生成的IL-12与T细胞上的IL-12受体结合后能促进分化的CD4<sup>+</sup>的Th1增殖,导致Th1/Th2平衡紊乱,引起银屑病的发生<sup>[20-21]</sup>。有研究表明,银屑病患者体内的IL-12水平显著高于健康人IL-12的水平<sup>[22]</sup>。LPS可直接刺激TNF- $\alpha$ 、IL-6,并在较小程度上刺激小鼠皮肤来源的树突细胞产生IL-12,可能涉及自身反应性T细胞的促炎状态<sup>[12]</sup>。鉴于咪喹莫特与IL-12各自对IL-23/Th17轴和Th1/Th2平衡的影响,采用咪喹莫特联合IL-12及LPS,既能刺激小鼠的IL-23/Th17轴,又能影响Th1/Th2平衡,更符合银屑病复杂的发病机制,达到改良模型的目的。

本研究希望通过改进咪喹莫特诱导的银屑病动物模型,达到模型更持久、特征更典型的目的,从而有利于银屑病治疗药物的疗效评价。目前临床上银屑病严重程度指标主要为PASI评分<sup>[23-24]</sup>,银屑病动物模型多用PASI评分结合病理作为判断标准,因此肉眼观察结果和PASI评分为模型建立的主要评价指标。目前许多文



注:与正常组比较,\* $P < 0.05$

Note: vs. normal group, \* $P < 0.05$

图4 各组小鼠皮肤中IL-17A、IL-12的含量(n=8或n=10)

Fig 4 Contents of IL-17A and IL-12 of skin in mice of each group (n=8 or n=10)

献<sup>[7-9]</sup>已开展了咪喹莫特诱导的银屑病模型机制的研究,本研究在机制方面仅选择了有代表性的、与造模剂相关的指标。IL-17A和IL-12分别为IL-23/Th17轴和Th1/Th2平衡这两条银屑病致病途径中的重要细胞因子,且目前也有许多靶向这两种细胞因子的生物制剂用于治疗银屑病<sup>[25]</sup>。鉴于细胞因子水平的改变可间接反映皮损的变化趋势,因此本实验仅选择IL-17A和IL-12这两个细胞因子用于反映改良组的效果。

在已有的咪喹莫特诱导的小鼠银屑病常规模型中,皮损在5~8 d达到峰值后,皮损会逐渐消退<sup>[26-28]</sup>,皮损中的IL-17A mRNA的水平也呈先升高后明显降低的动态变化过程<sup>[29]</sup>。在本实验中,改良组BALB/c小鼠每日涂抹咪喹莫特乳膏后每周皮下注射IL-12和LPS,造模周期延长至21 d,该操作方法目前尚未见文献报道。在本实验中,银屑病模型在达到皮损峰值后,模型组与改良组皮损均开始消退,但改良组小鼠皮损的消退较慢,皮损程度也较为严重。皮损的组织病理检查仍可见典型的银屑病样改变。改良组小鼠脾指数明显高于模型组,提示改良方法可引起小鼠免疫系统亢进加重。模型组小鼠皮损中的IL-17A和IL-12的含量虽然较正常组稍高,但差异已无统计学意义,但改良组小鼠的IL-17A和IL-12含量仍处于较高水平,较正常组差异仍有统计学意义。

本研究从肉眼观察、PASI评分、脏器指数和细胞因子几个方面进行评价,结果均表明改良组造模效果优于

模型组。综上所述,改良的小鼠银屑病典型特征维持时间更长,是一种效果较好的模型。

## 参考文献

- [1] 张学军. 皮肤性病学[M]. 8版. 北京:人民卫生出版社, 2013:139-142.
- [2] 赵辨. 中国临床皮肤病学[M]. 南京:江苏科学技术出版社, 2010:1008-1025.
- [3] 热比姑丽·伊斯拉木,阿瓦姑力·伊斯拉木,斯拉甫·艾白. 银屑病动物模型研究概况[J]. 中国药房, 2015, 26(19): 2726-2729.
- [4] FANTI PA, DIKA E, VACCARI S, et al. Generalized psoriasis induced by topical treatment of actinic keratosis with imiquimod[J]. *Int J Dermatol*, 2006, 45(12): 1464-1465.
- [5] WU JK, SILLER G, STRUTTON G. Psoriasis induced by topical imiquimod[J]. *Australas J Dermatol*, 2004, 45(1): 47-50.
- [6] 刘爱民,李伟玲,吴盘红,等. 咪喹莫特诱导银屑病小鼠模型的研究进展[J]. 中国中西医结合皮肤性病学杂志, 2018, 17(4):380-382.
- [7] 吴剑平,谢倩,陈林,等. 咪喹莫特对 BALB/c 和 C57BL/6 小鼠银屑病样皮损诱导作用的比较[J]. 中国比较医学杂志, 2018, 28(9):1-6.
- [8] SWINDELL WR, MICHAELS KA, SUTTER AJ, et al. Imiquimod has strain-dependent effects in mice and does not uniquely model human psoriasis[J]. *Genome Med*, 2017. DOI:10.1186/s13073-017-0415-3.
- [9] LIU Q, YIN W, HAN L, et al. Diarylheptanoid from rhizomes of *Curcuma kwangsiensis* (DCK) inhibited imiquimod-induced dendritic cells activation and Th1/Th17 differentiation[J]. *Int Immunopharmacol*, 2018. DOI:10.1016/j.intimp.2018.01.044.
- [10] 赖奇伟. 咪喹莫特诱发银屑病的机制研究新进展[J]. 中国当代医药, 2013, 20(20):25-27.
- [11] BALIWAG J, BARNES DH, JOHNSTON A. Cytokines in psoriasis[J]. *Cytokine*, 2014, 73(2):342-350.
- [12] HONG K, CHU A, LUDVIKSSON BR, et al. IL-12, independently of IFN- $\gamma$ , plays a crucial role in the pathogenesis of a murine psoriasis-like skin disorder[J]. *J Immunol*, 1999, 162(12):7480-7491.
- [13] BOZEK A, REICH A. The reliability of three psoriasis assessment tools: psoriasis area and severity index, body surface area and physician global assessment[J]. *Adv Clin Exp Med*, 2017, 26(5):851-856.
- [14] 李晓睿,李咏梅,高尚璞,等. 青黛膏联合加热封包疗法治疗斑块型银屑病[J]. 吉林中医药, 2018, 38(11):1295-1298.
- [15] MAHIL SK, CAPON F, BARKER JN, et al. Update on psoriasis immunopathogenesis and targeted immunotherapy[J]. *Semin Immunopathol*, 2016, 38(1):11-27.
- [16] HAWKES JE, CHAN TC, KRUEGER JG. Psoriasis pathogenesis and the development of novel targeted immune therapies[J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2017, 140(3):645-653.
- [17] OGAWA E, SATO Y, MINAGAWA A, et al. Pathogenesis of psoriasis and development of treatment[J]. *J Dermatol*, 2017, 10(10):1-9.
- [18] LYNDE CW, POULIN Y, VENDER R, et al. Interleukin 17A: toward a new understanding of psoriasis pathogenesis[J]. *J Am Acad Dermatol*, 2014, 71(1):141-150.
- [19] 臧箫,孙青. 白细胞介素 17 拮抗剂在银屑病治疗中的应用[J]. 皮肤科学通报, 2018, 35(1):43-50.
- [20] 张弛. IL-12 与银屑病[J]. 中国麻风皮肤病杂志, 2009, 25(5):369-371.
- [21] 刘丽娟,宋适恒,李鑫,等. 外周血树突细胞功能与银屑病发病的关系[J]. 中国老年学杂志, 2013, 33(18):4411-4412.
- [22] 陆琪. 银屑病患者血液学检验指标特点及临床意义[J]. 中国现代医生, 2017, 55(12):21-24.
- [23] 陈慧姮,梁晓冬,邓婕,等. 阿维 A 与甲氨蝶呤联合治疗难治性中重度银屑病疗效观察[J]. 中国皮肤性病学杂志, 2018, 32(5):610-614.
- [24] LIAN C, RONGFEN C, SMRITI S, et al. Efficacy and safety of biologics targeting IL-17 and IL-23 in the treatment of moderate-to-severe plaque psoriasis: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials [J]. *Int Immunopharmacol*, 2018. DOI:10.1016/j.intimp.2018.06.020.
- [25] 陈明,钟杰敏,刘冠萍,等. 银屑病治疗靶点及其药物研发进展[J]. 中国医院药学杂志, 2015, 35(9):846-850.
- [26] BAI S, ZHANG Z, HOU S, et al. Influence of different types of contact hypersensitivity on imiquimod-induced psoriasis-like inflammation in mice[J]. *Mol Med Rep*, 2016, 14(1):671-680.
- [27] NA TM, WONGNOPPAVICH A, PANTHONG A, et al. Antipsoriatic effects of wannachawee recipe on imiquimod-induced psoriasis-like dermatitis in BALB/c mice[J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2018. DOI:10.1155/2018/7931031.
- [28] POHIN M, GUESDON W, MEKOUO AA, et al. Oncostatin M overexpression induces skin inflammation but is not required in the mouse model of imiquimod-induced psoriasis-like inflammation[J]. *Eur J Immunol*, 2016, 46(7):1737-1751.
- [29] 赵京霞,底婷婷,王燕,等. IL-23/IL-17 炎症轴在咪喹莫特诱导的小鼠银屑病样皮肤损害中的作用[J]. 中国病理生理杂志, 2013, 29(6):1086-1094.

(收稿日期:2018-11-20 修回日期:2019-01-04)

(编辑:刘萍)