

豚鼠皮肤瘙痒动物模型的建立及评价

米本中[#], 杨武斌[#], 罗晓玲, 王旖, 胡娟, 徐嘉红, 樵星芳^{*}

(重庆市中药研究院实验动物研究所, 重庆 400065)

【摘要】 目的 通过星点设计-效应平面法优化组胺和4-氨基吡啶(4-AP)联用建模的剂量,旨在建立一种新型的豚鼠瘙痒动物模型。**方法** 用星点设计安排实验,各组分别在脱毛部位皮下注射0.5 mL不同致痒剂,记录豚鼠30 min内的搔抓潜伏期和搔抓次数,用综合评分法筛选最佳致痒组方。通过观察豚鼠的行为学变化和测定血液中的组胺和白介素-6(interleukin-6, IL-6)的含量对豚鼠模型进行评价。**结果** 行为学实验发现,联合组在30 min内搔抓次数比组胺组和4-AP组均显著增多($P < 0.01$),搔抓潜伏期显著缩短($P < 0.01$)。4-AP组在30 min内搔抓次数比组胺组显著增多($P < 0.01$)。与对照组相比,联合组、组胺组豚鼠血清的组胺浓度均明显升高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),但联合组升高程度低于组胺组($P < 0.05$);与对照组相比,组胺组、4-AP组和联合组的血清IL-6浓度均有显著的升高($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$),且联合组明显高于组胺组和4-AP组。病理学检查显示,各模型组均出现不同程度的炎细胞增殖,其中联合组的反应更为明显。**结论** 本试验中优化组方(联合组)模型容易实现并且有良好的重复性。

【关键词】 组胺;4-氨基吡啶;豚鼠;瘙痒模型

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2017) 05-0528-06

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2017.05.011

Establishment and evaluation of a guinea pig model of itching

MI Ben-zhong[#], YANG Wu-bin[#], LUO Xiao-ling, WANG Yi, HU Juan, XU Jia-hong, QIAO Xing-fang^{*}

(Chongqing Academy of Chinese Materia Medica, Experimental Animal Institute, Chongqing 400065, China)

【Abstract】 Objective To optimize the optimal doses of histamine and 4-aminopyridine (4-AP) in the establishment of guinea pigs models of itching, and to establish a new guinea pig model of itching. **Methods** The central composite design-response surface method was used to arrange the experiment. In the experiment different pruritus agents were hypodermically injection of 0.5 mL in the depilated area, and the scratching incubation period and scratching number in 30 minutes were counted after the injection. The guinea pig itching model was evaluated by observing the behavioral changes of guinea pigs and measuring the levels of histamine and interleukin-6 in the blood. **Results** The behavioral experiments found that the scratching frequency in the the combination group was significantly higher than the histamine group and 4-AP group ($P < 0.01$). The itching latency of the combination group was significantly shorter than that of the histamine group and 4-AP group ($P < 0.01$). Compared with the control group, the histamine concentrations of the combination group and histamine group were significantly increased ($P < 0.05$ or $P < 0.01$), and the level of the combination group was lower than that of the histamine group ($P < 0.05$). Compared with the control group, the serum IL-6 concentrations of histamine group, 4-AP group and combination group were significantly higher ($P < 0.01$ or $P < 0.05$), and those in the combination group were significantly higher than the histamine and 4-AP groups. Compared with the control group, pathologic examination showed proliferation of inflammatory cells in all model groups, and the reaction of the combination group was more obvious. **Conclusions** The optimal conditions used in this experiment are easy to achieve and have good reproducibility in

【基金项目】 重庆市科技项目(No. 2015cstc-jbky-01907, cstc2015shmszx10010)。

【作者简介】 米本中(1987-),男,助理研究员,专业:动物医学。Email: 858885377@qq.com;杨武斌(1986-),男,硕士,研究方向:中药药理学。Email: yangwubinhome@163.com。#共同第一作者

【通讯作者】 樵星芳(1980-),女,副研究员,研究方向:实验动物学。Email: 745647159@qq.com

the establishment of a guinea pig model of itching.

[Key words] Histamine; 4-aminopyridine; Guinea pig; Itching model
Corresponding author: QIAO Xing-fang. E-mail: Email: 745647159@qq.com

瘙痒是皮肤科最常见的症状之一,见于多种皮肤病、胆道疾病、甲状腺疾病、肾脏疾病以及恶性肿瘤等多种临床疾病。目前瘙痒的病理生理学机制尚不完全清楚,临床治疗过程中也缺少理想的止痒药物^[1,2]。在瘙痒药物筛选和基础研究的过程中,适当的瘙痒动物模型是评估药效的必要条件。目前瘙痒动物模型多以单一致痒因素建立,如组胺法、4-氨基吡啶法、5-羟色胺法、右旋糖酐法等^[3-5]。现有的瘙痒动物模型的方法虽多,但多为单一致痒因素,与临床实际发生瘙痒的多因素性与复杂性区别较大,且批间重复性差,使得药物筛选与基础研究的准确性存在较大的问题。因此建立重复性良好的瘙痒模型成为当前外用止痒药物评估过程中的一大亟待解决的问题。本文拟尝试通过星点设计-效应面法优化组胺和 4-氨基吡啶(4-AP)两种致痒物质剂量,通过观察模型搔抓行为学、局部组织变化,ELISA 方法检测血清瘙痒相关细胞因子,与传统的单因素致瘙痒模型进行比较,旨在建立一种新型同一性较高的豚鼠瘙痒模型,以满足研究瘙痒发生机制和开发止痒药物的需要。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

4 周龄普通级豚鼠 112 只,体重 200~250 g,雌雄各半,由重庆市中药研究院实验动物研究所提供【SCXK(渝)2012-0006】。实验动物将饲养在普通级环境中,饲养设施符合普通级实验动物的饲养要求。饲养期间给予豚鼠标准湿颗粒饲料,每天喂一次干草或青饲料。温度:20~26℃。湿度:50%~70%。实验豚鼠饲养及组织取材均于重庆市中药研究院实验动物研究所实验设备内进行【SYXK(渝)2012-0003】。本实验所有操作均符合中华人民共和国《实验动物管理条例》。实验方案已通过伦理审查,重庆市中药研究院实验动物福利伦理审查【渝中药院(2014)71 号】。

1.1.2 主要试剂

组胺(histamine),分子式:C₅H₉N₃,分子量:111.15 g/mol,含量≥97%,产品编号 101646111,购

自美国 Sigma 公司;4-氨基吡啶(4-aminopyridine, 4-AP),分子式:C₅H₆N₂,分子量:94.11 g/mol,含量≥99%,产品编号 1002408342,购自美国 Sigma 公司;豚鼠组胺和 IL-6 检测试剂盒,购自上海笃玛生物科技有限公司;其他试剂均为分析纯。

1.2 方法

1.2.1 豚鼠瘙痒模型的制备

适应性饲养 5 d 后,全部豚鼠颈背部脱毛,暴露约 2 cm × 2 cm 皮肤,按体重随机分组。分别在豚鼠的脱毛部位皮下注射致痒剂,给药体积每只 0.5 mL。以豚鼠嘴或后肢搔抓注射部位至停止记作 1 次搔抓(连续搔抓记作 1 次)。

1.2.2 星点设计-效应面法优化致痒剂的剂量

(1)设计试验

在预试验基础上,以致痒剂组胺(X₁)、4-AP(X₂)的百分浓度为考察因素。根据星点设计原理,每因素设五水平,用代码值-α,-1,0,1,α表示,因素水平见表 1。以 30 min 内的搔抓潜伏期(注射结束至第 1 次搔抓开始的时间)和搔抓次数作评价指标,试验安排见表 2,每组豚鼠 8 只。

按公式(a-b)×X=(c-b)×10 进行计算(a:最优值;b:最劣值;c:待求组值;X:待求组得分)^[6],将所有指标综合为一个能反映总体效应结果的值,对于搔抓潜伏期,9 号试验时间最短,排第一,给 10 分;7 号试验时间最长,排最后,给 1 分。对于搔抓次数,9~13 号试验次数最多,排第一,给 10 分;7 号试验次数最少,排最后,给 1 分;其他号试验各指标值则由公式(a-b)×X=(c-b)×10 进行计算。最后对每号试验的所有指标分数相加得综合评分 A 值。

表 1 星点设计因素与水平

Tab.1 Variables and levels of the central composite design		
水平 Levels	因素 Factors	
	X ₁ /%	X ₂ /%
-1.414	0	0
-1	0.014	0.012
0	0.050	0.040
1	0.085	0.068
1.414	0.100	0.080

表 2 星点试验设计

Tab. 2 Experimental designs by central composite design-response surface methodology (CCD-RSM)

No.	X ₁ /%	X ₂ /%
1	1.000	1.000
2	-1.000	-1.000
3	1.000	-1.000
4	-1.414	0.000
5	0.000	1.414
6	0.000	-1.414
7	1.414	0.000
8	-1.000	1.000
9~13	0.000	0.000

注: No. 9~13 为重复试验。
Note. No. 9~13: repeated experiment.

(2)模型拟合与效应面优化

以总评 A 值为因变量,使用 Design-Expert 8.0.6.1 对各因素进行多元线性回归和二项式拟合,并进行方差分析。根据回归方程以及拟合的响应曲面形状,分析磷酸组胺和 4-AP 浓度(w/v)对豚鼠瘙痒模型中搔抓潜伏期及和搔抓次数的影响,并对最佳造模条件进行预测。

(3)最优条件的验证

根据确定的致痒剂最优造模剂量,分别建立 8 只动物模型,进行验证实验,并将测定的平均结果与拟合方程的预测值进行比较,并计算其相对偏差。验证本实验得到的拟合方程是否具有较好的描述因素。

1.2.3 最佳组方模型的评价

将豚鼠随机分为对照组(生理盐水)、最佳联合组(0.03%组胺+0.07%4-AP)、组胺组(0.03%组胺)和 4-AP 组(0.07%4-AP),每组各 10 只,给药体积见“1.2.1”。

记录各组豚鼠 30 min 内的搔抓潜伏期和搔抓次数,行为学变化记录结束后立即心脏采血约每只 5 mL,静置至血液分层后离心分离血清。按 ELISA 试剂盒要求操作检测豚鼠血清中组胺、白介素-6(IL-6)的含量。采血完成后,取各组试验动物注射部位周围皮肤切成小块置于甲醛溶液。将所取注射部皮肤小块进行病理切片并做 HE 染色,观察皮

肤组织有无急性炎症反应,毛细血管通透性是否增加、水肿以及炎症成分的渗出。

2 结果

2.1 星点设计试验结果

根据“1.2.2”项下的表 2 进行试验,试验结果见表 3。以总评 A 值为因变量,使用 Design-Expert 对各因素进行多元线性回归和二项式拟合,拟合模型如下:多元线性回归方程

$$Y = 18.32470 - 122.53134X_1 + 51.45559X_2;$$

$$\text{二项式拟合方程 } Y = 11.22890 + 225.89505X_1 + 130.98160X_2 - 148.39520X_1X_2 - 3459.50086X_1^2 - 902.25555X_2^2.$$

多元线性回归拟合方程方差分析发现拟合方程概率 $P > 0.05$,表明建立的模型不具显著性, $r = 0.4337$ 较低,表示自变量与因变量之间的线性相关性较差,拟合度和预测性不佳,因此该数学模型不适合。对二项式拟合方程进行方差分析可知(见表 4),因素 X_1, X_2 中一次项和二次项均具有显著性差异,说明各具体试验因子对响应值的影响不是简单的线性关系,模型组具有高度的显著性($r = 0.9048$),说明方程拟合度和可信度均良好,可用此模型对豚鼠的造模工艺进行分析和预测。

表 3 星点试验设计与结果

Tab. 3 Experimental designs by CCD-RSM and scoring results

No.	Y ₁ 搔抓潜伏期(s) Y ₁ Scratching incubation period	Y ₂ 搔抓次数 Y ₂ Scratching frequency	A
1	50	10	11.268
2	62	26	14.941
3	130	12	8.914
4	99	34	15.666
5	38	32	17.339
6	75	20	12.936
7	300	1	0
8	80	40	17.885
9~13	21	30	17.436

注:每组豚鼠 8 只,潜伏期和搔抓次数求平均值。
Note. n = 8 in each group. The values are averages of latency and scratching frequency.

表 4 二项式拟合方程的方差分析

Tab. 4 Results of variance analysis of quadratic model

方差来源 Source	平方和 Sum of squares	自由度 df	均方 Mean square	F 值 F value	P 值 P value
模型 Model	300.43	5	60.09	23.82	0.0003
X ₁	151.37	1	151.37	60.01	0.0001
X ₂	16.61	1	16.61	6.58	0.0372
X ₁ X ₂	0.087	1	0.087	0.035	0.8579
X ₁ ²	132.23	1	132.23	52.42	0.0002
X ₂ ²	3.48	1	3.48	1.38	0.2785
残差 Residual	17.66	7	2.52		
总差 Cor Total	318.09	12			

2.2 效应面优化及预测验证

根据回归方程,作响应曲面图(图1),根据所拟合的响应曲面形状和已建立的数学模型,分析得到致痒剂最佳剂量为:组胺 0.03%,4-AP 0.07%。按最佳条件对 6 只豚鼠进行造模验证,结果潜伏期平均值为 23 s,搔抓次数平均值 35 次,总评 A 值 18.646,预测值 19.329,偏差率-3.66%,说明本实验得到的拟合方程具有较好的描述因素,数学模型可靠,具有良好的预测性。

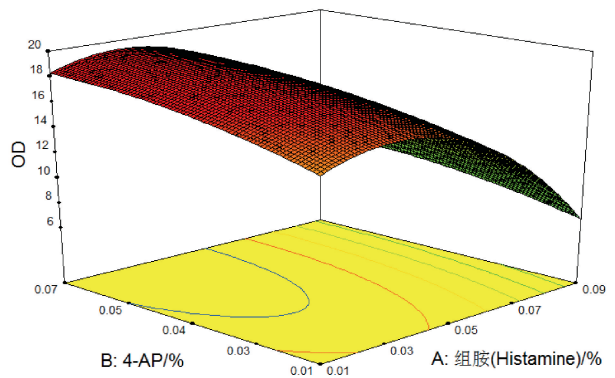


图1 因素 A 和 B 对 A 值的三维效应面及等高线的影响

Fig.1 Effects of factors A and B on 3-D-response surface and contour map of OD values

2.3 行为学实验结果

实验结果用 SPSS 19.0 软件进行分析,结果如表 5。与组胺组和 4-AP 组相比,联合组在 30 min 内搔抓次数显著增多($P < 0.01$),搔抓潜伏期显著缩短($P < 0.01$)。4-AP 组在 30 min 内搔抓次数比组胺组显著增多($P < 0.01$)。

表 5 不同建立方法对豚鼠瘙痒模型搔抓行为学的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Tab.5 Effect of different modeling methods on the guinea pig itching models

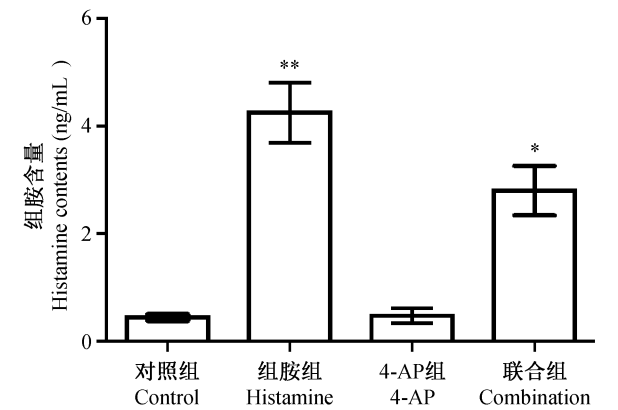
组别	搔抓潜伏期 Scratching incubation period (s)	搔抓次数 Scratching frequency (n)
对照组 Control group	—	—
组胺组 Histamine group	66 ± 20.1	5 ± 2.1
4-AP 组 4-AP group	55 ± 12	21 ± 8.1 [#]
联合组 Combination group	26 ± 10.2 ^{**}	40 ± 9.3 ^{**}

注:与组胺组和 4-AP 组比较,^{**} $P < 0.01$;与 4-AP 组比较,[#] $P < 0.01$ 。
Note. Compared with the histamine group and 4-AP group: ^{**} $P < 0.01$; Compared with the 4-AP group: [#] $P < 0.01$.

2.4 血清指标检测

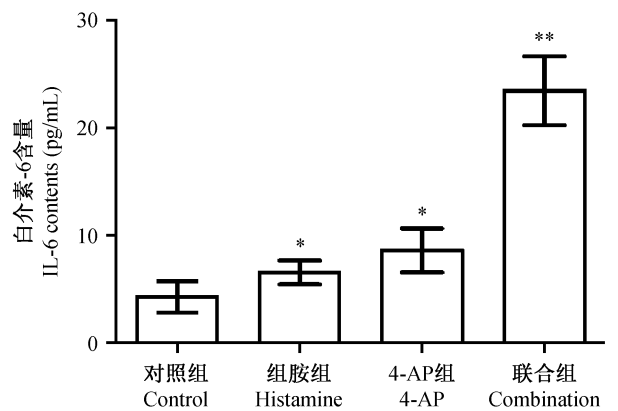
血清检测结果用 SPSS 19.0 软件分析发现:与对照组相比,联合组、组胺组豚鼠血清的组胺浓度均明显升高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),但联合组升高程

度低于组胺组($P < 0.05$),见图 2;与对照组相比,组胺组、4-AP 组和联合组的血清 IL-6 浓度均有显著的升高($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$),且联合组明显高于组胺组和 4-AP 组,见图 3。



注:与对照组比较,^{**} $P < 0.01$,^{*} $P < 0.05$ 。
图 2 组胺豚鼠瘙痒模型血液中组胺的浓度 ($\bar{x} \pm s$)
Note. Compared with the control group: ^{**} $P < 0.01$, ^{*} $P < 0.05$.

Fig.2 Concentration of histamine in the blood of itching model guinea pigs

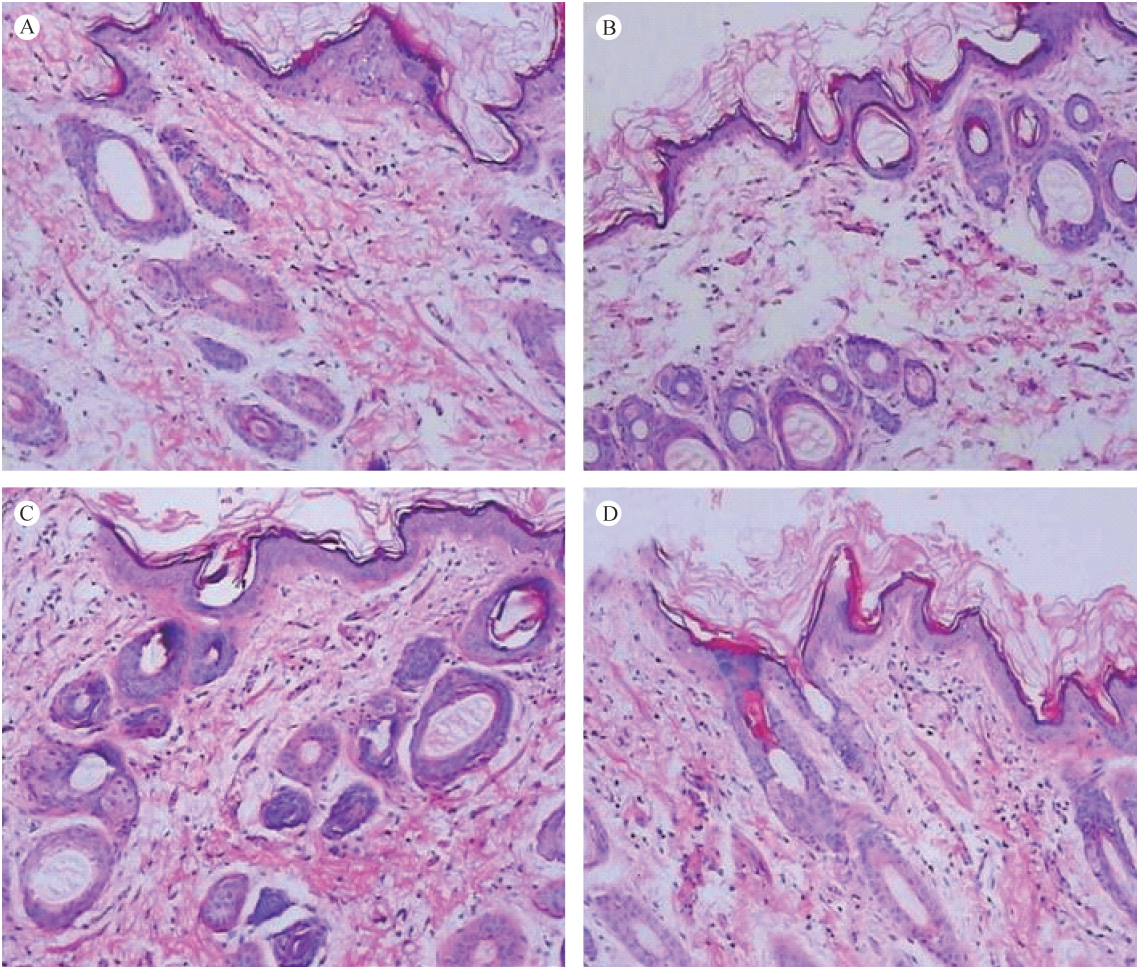


注:与对照组比较,^{**} $P < 0.01$,^{*} $P < 0.05$ 。
图 3 各组豚鼠瘙痒模型血液中白介素-6 的浓度 ($\bar{x} \pm s$)
Note. Compared with the control group: ^{**} $P < 0.01$, ^{*} $P < 0.01$.

Fig.3 Concentration of IL-6 in the blood of itching model guinea pigs

2.5 病理学检查

HE 染色镜下观察结果病理检查显示,与对照组相比,联合组出现轻度急性炎症反应,真皮中有少量炎细胞,出现轻度毛细血管扩张、水肿和炎性渗出;组胺组和 4-AP 组出现轻微急性炎症反应,真皮中偶见炎细胞,轻度毛细血管扩张。综合分析认为联合组致瘙痒模型出现了较明显的急性炎症反应,见图 4。



注: A. 对照组; B. 组胺组; C. 4 - AP 组; D. 联合组。

图 4 各组动物炎症变化情况 (HE 染色, $\times 10$)

Note. A. Control group; B. Histamine group; C. 4 - AP group; D. Combination group.

Fig. 4 Inflammatory reaction in each group

3 讨论

瘙痒模型的建立方法主要有直接使用特定种系动物法、炎症介质刺激法和化学物质刺激法等,其中较为常用的主要是炎症介质刺激法和化学物质刺激法,如组胺致刮伤豚鼠瘙痒模型、组胺致小鼠瘙痒模型、4 - AP 致小鼠瘙痒模型等^[7]。组胺是较早发现的瘙痒介导物质之一,只存在于肥大细胞和嗜碱性粒细胞内,随着这两种细胞的激活,它被释放到细胞外发挥生物学效应,是肥大细胞和嗜碱性粒细胞脱颗粒的标志。在许多过敏性疾病的动物模型建立中组胺被广泛应用^[8-10]。由于豚鼠具有自身易致敏的特性被广泛用于皮肤过敏动物模型的建立,其对组胺的敏感性,成为组胺致痒模型的首选动物。4 - AP 是一种钾通道阻滞剂,其作用机制是加入钾通道阻断剂后,促进血管平滑肌细胞去极化,从而激活

电压依赖性钙通道开放,导致跨膜内流增加,引起血管收缩。同时它也具有促肥大细胞释放组胺的作用^[11]。目前豚鼠皮肤瘙痒动物模型中最常用的是表皮擦伤,滴加磷酸组织胺及 5 - 羟基色胺建模的方法,本实验通过对刮伤瘙痒模型进行改进,采用组胺和 4 - AP 联合进行皮下注射造模,建立有多种介导因子共同参与瘙痒模型。

星点设计 - 效应面优化法是一种多因素五水平的实验设计,常用来进行非线性拟合的优化。通常在最佳条件附近,指标与影响因素之间的关系为非线性,此时不宜用线性方程进行拟合,应选用二次多项式或更高次的多项式进行拟合,可以提高优化效果,其具有精密度高、预测性好、简便等优点,逐渐替代了均匀设计和正交设计在处方优化中的应用^[12]。本文采用星点设计法综合考虑组胺、4 - AP 两因素间的交互作用,并通过效应面法分析得出致痒剂的

最佳剂量为 0.03% 组胺、0.07% 4-AP。研究发现,联合应用组胺和 4-AP 建立瘙痒模型与对照以及单一因素致瘙痒模型相比,实验豚鼠在 30 min 内搔抓次数增多,搔抓潜伏期缩短;血清检测的结果显示联合致瘙痒模型组的血清组胺、白介素-6 的浓度与对照组相比均有显著变化,表明该模型是一种较好的瘙痒动物模型,有望在外用止痒药物的筛选中推广应用。

参 考 文 献

[1] 冯雨苗,王洪生,王淼森,等. 瘙痒神经生理机制的研究进展[J]. 国际皮肤性病学杂志, 2009, 35(2): 124-126.

[2] 丁媛,普雄明. 瘙痒的发生机制,相关疾病和治疗[J]. 中国麻风皮肤病杂志, 2006, 22(6): 492-495.

[3] Thomsen JS, Petersen MB, Benfeldt E, et al. Scratch induction in the rat by intradermal serotonin; a model for pruritus [J]. Acta Derm-Venereol, 2001, 81(4): 250-254.

[4] 王彦礼,包旭宏,王怡薇,等. 青鹏膏剂对豚鼠瘙痒及湿疹模型的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(14): 233-236.

[5] 王晖,沈非沉,陈昱,等. 组胺和 4-氨基吡啶联用建立瘙

痒模型 [J]. 中国病理生理杂志, 2009, 25(7): 1454-1456.

[6] 陈月葵,王晖,梁庆,等. 复合物质致小鼠瘙痒模型的建立[J]. 中国药理学通报, 2009, 25(1): 133-135.

[7] 吴娜,方厚华. 实验动物瘙痒的评价 [J]. 中国比较医学杂志, 2003, 13(2): 115-116.

[8] 彭华,李添应. 组胺 H4 受体在变态反应性炎症中的作用[J]. 中华临床免疫和变态反应杂志, 2008, 2(3): 208-211.

[9] Minami K, Kamei C. A chronic model for evaluating the itching associated with allergic conjunctivitis in rats [J]. Int Immunopharmacol, 2004, 4(1): 101-108.

[10] Rosa AC, Fantozzi R. The role of histamine in neurogenic inflammation [J]. B J Pharmacol, 2013, 170(1): 38-45.

[11] 王凯,向翠英,张琼. 4-氨基吡啶致小鼠舔体反应与瘙痒关系的初步探讨 [J]. 中国新药杂志, 2011, 20(2): 170-172.

[12] 吴琳,彭欣,孙芳,等. 星点设计-效应面优化法与中药学实验研究 [J]. 山东中医药大学学报, 2014, 38(6): 582-585.

[收稿日期] 2017-03-28

·简讯·

《中国实验动物学报》《中国比较医学杂志》
入选《中国学术期刊(网络版)》网络首发首批示范期刊

为了更好地宣传学术期刊转型对促进国家“创新驱动发展”战略的重要意义,并积极推动学术评价机制改革,整体推进学术期刊数字化、网络化转型升级,根据国家新闻出版广电总局关于“首批连续型网络出版物规范化试点”与“国家数字复合出版系统工程试点”工作要求,基于前不久发布的《中国学术期刊(网络版)》(CAJ-N)的出版传播平台(CAJ-NP),本着试点先行、扎实推进的原则,《中国学术期刊(光盘版)》电子杂志社将启动“学术期刊网络版示范工程”,组织、支持一批数字出版工作基础较好的重要期刊率先以录用定稿网络首发方式在 CAJ-N 正式出版期刊网络版。以网络首发方式发表单篇论文是出版学术期刊网络版的实质意义所在,其对作者研究成果首发权、学术竞争力和影响力,以及读者获取科研情报与知识的及时性具有无可争议的重要性。CAJ-N 作为学术期刊网络版的正式出版平台,与以往没有正式刊号的优先数字出版不同,已经解决了论文网络首发的规范性问题,可以得到国家出版管理、科研与人事管理等相关部门的认可。