

基于D-最优设计的SD大鼠皮肤化学脱毛参数优化

许雅琦¹, 徐德峰^{1,2,3*}, 赵子建¹, 马忠华², 赵谋明³, 张婷², 苏国万³, 段军毅⁴

(1. 广东海洋大学食品科技学院, 广东省水产品加工与安全重点实验室, 广东省海洋食品工程技术研究中心, 水产品深加工广东普通高等学校重点实验室, 广东湛江 524088; 2. 华南理工大学轻工与食品学院, 广州 510640; 3. 无限极(中国)有限公司技术中心, 广州 510665; 4. 西藏大学农牧学院动物科学学院, 林芝 西藏 860000)

【摘要】 目的 对SD大鼠皮肤进行脱毛参数研究, 为建立皮肤光老化动物模型提供基本实验条件。方法 以毛发残存量和皮损面积为评价指标, 分别考察Na₂S作用浓度及时间对脱毛效果的影响, 在此基础上进一步通过D-最优设计优化Na₂S脱毛参数。结果 Na₂S浓度是影响脱毛能力的关键因素, 5%以下几乎无脱毛效果, 7%以上则开始出现皮损并逐步加重, 6%为脱毛基础浓度; 在6% Na₂S浓度下作用5 min开始脱毛, 10 min时皮肤表面较光滑, 15 min时非常光滑, 15 min之后皮损显现, 20 min时皮损加重, 25 min时肉眼可见皮肤灼烧样外观, D-最优设计表明7% Na₂S作用10 min效果最好, 未见皮损且无残余毛发。结论 基于D-最优设计的SD大鼠皮肤化学脱毛可实现高效脱毛。

【关键词】 SD大鼠; 皮肤脱毛; D-最优设计

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2017) 09-0036-05

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2017.09.007

Optimization of chemical hair removal in SD rats by D-optimal design

XU Ya-qi¹, XU De-feng^{1,2,3*}, Zhao Zi-jian¹, MA Zhong-hua², ZHAO Mou-ming³, ZHANG Ting², SU Guo-wan³, Duan Jun-yi⁴

(1. College of Food Science and Technology, Guangdong Ocean University, Key Laboratory of Aquatic Product Processing and Safety in Guangdong Province, Research Center of Marine Food Engineering Technology in Guangdong Province, Key Laboratory of Aquatic Product Advanced Processing of Colleges in Guangdong Province, Zhanjiang 524088, China; 2. School of Light Industry and Food, South China University of Technology, Guangzhou 510640; 3. Technology Center of Infinitus (China) Co., Ltd., Guangzhou 510665; 4. College of Agriculture and Animal Husbandry, Tibet University, Linzhi, Tibet 860000, China)

【Abstract】 **Objective** To screen the optimal parameters for depilation in SD rats, and to provide an experimental prerequisite for the establishment of animal models of skin photoaging. **Methods** The effects of concentrations and time of the chemical depilatory Na₂S treatment on the hair removal efficiency were evaluated by the number of residual hair per millimeter square and the damaged area of the skin in rats, and the parameters for hair removal were further optimized by D-optimal design. **Results** Working concentration of Na₂S was the critical factor affecting its capability of hair removal. No depilation was observed when the concentration of Na₂S was lower than 5%, while skin damage began to appear and became severe gradually when the concentration of Na₂S was above 7%. Therefore, 6% Na₂S was taken as the basic concentration for depilation. Hair removal was observed with 6% Na₂S treatment for 5 min. After 10 min of treatment, the surface of the skin turned to be smooth, and this tendency continued until 15 min. After 15 min, skin damage occurred and turned

【基金项目】 中国博士后科学基金项目(编号:2014M52203); 中央高校基本科研业务费专项资金资助(编号:20152M062); 国家级大学生创新课题(编号:20161056601)。

【作者简介】 许雅琦(1997-), 女, 广东海洋大学在读本科生。

【通讯作者】 徐德峰(1978-), 男, 博士, 副教授, 研究方向: 食源性活性肽制备与抗衰老机制解析。E-mail: stone_xdf@163.com

more severe after 20 min. When treated for over 25 min, skin damage similar to skin burns was observed with naked eyes. Overall, our study with the D-optimal design showed that the effect of hair removal in the SD rats was optimal when treated with 7% Na_2S for 10 min, causing no skin damage and residual hair left. **Conclusions** Highly efficient hair removal in SD rats can be achieved with chemical depilatory optimized by D-optimal design.

【Key words】 SD rats; Hair removal; D-optimal design

衰老与抗衰老是当今生命科学的研究热点,皮肤衰老又称为皮肤老化,分为内源性老化与外源性老化,内源性衰老指皮肤结构和功能随时间发生增龄性退化,而外源性衰老主要指由紫外辐照、环境污染、有毒有害气体等外界不利环境诱发和加重的皮肤老化,其中尤以紫外线辐射引起的皮肤光老化是皮肤外源性衰老的主要原因^[1-5]。目前,临床皮肤光老化的发病机制尚不明确,建立光老化动物模型对研究光老化机制和治疗光老化疾病有着重要意义。迄今为止,光老化动物模型研究多选用小鼠、大鼠、无毛鼠、裸鼠和豚鼠作为实验材料,各有优缺点。小鼠虽然饲养方便,可快速、简便建立动物模型,但存在皮肤薄、与人类皮肤厚度差异较大、可采皮肤量小的缺陷^[6-8]。无毛鼠和裸鼠因体表裸露在表观上与人类皮肤较为接近,在研究中也常见报道,但无毛鼠与裸鼠缺乏免疫系统,与人类皮肤差别较大,较适合免疫相关研究^[9]。豚鼠因体型较大、价格较高、饲养繁琐而仅有少量报道^[10, 11]。相比而言,SD 大鼠由于价格低廉、适用性广、可取材面积大,被广泛选为光老化造模动物^[12-15],但大鼠皮肤体毛密布,必须良好去除被覆体毛后才可真实模拟皮肤光老化。因此,选择恰当脱毛方法不仅有利于减少脱毛本身造成的皮肤损伤,使皮肤表面光滑,而且可减少动物感染的机会和对实验结果造成的干扰。

目前,实验动物脱毛多采用人工剪除及化学脱毛剂脱毛。人工剪除脱毛操作方便但不易剃除干净,尤其是残余较短毛发根部及少量绒毛对光老化造模过程有较大干扰,同时操作不当易造成机械伤害^[12, 15]。化学脱毛主要是基于强碱性化学试剂的腐蚀性对毛发进行剥除,脱毛彻底,但化学脱毛对浓度和时间有严格要求,掌握不当容易造成毛发残余多或脱除过度,损伤皮肤。实验室常用的 Na_2S 作为一种无机脱毛剂广泛用于各种实验动物,浓度大都为 8% ~ 10%^[16, 17]。大鼠皮肤较嫩,实验过程中易出现皮肤充血,甚至烧伤皮肤,影响对实验结果的观察。因此,为减轻 Na_2S 对皮肤的刺激作用,控制 Na_2S 浓度及时间至关重要。D-最优设计是一种基于统计学理论工具的优化方法,便于科学试验中

数学模型的建立和最佳工艺条件的获得,可显著减少试验次数,提高试验精度,目前已在农业、食品工业等多领域广泛应用。本文在单因素考察 Na_2S 浓度及时间对脱毛效果的基础上,鉴于 D-最优设计在关键参数优化方面的独特价值,以毛发残存量和皮损面积为指标评价脱毛效果,进一步采用 D-最优设计考察 Na_2S 浓度及时间二者交互作用对脱毛效果的影响,从而筛选最佳脱毛参数,为建立 SD 大鼠皮肤光老化模型奠定实验基础。

1 材料和方法

1.1 实验动物

雌性 SPF 级 SD 大鼠,60 只,购自广州中医药大学实验动物中心[SCXK(粤)2011-0029],体重 180 ~ 200 g,周龄 10 周。新鲜基础鼠粮及清洁刨花垫料购自广州市花都区实验动物养殖场。SD 大鼠饲养在专用鼠笼中,环境设施符合试验动物 SPF 级等级要求,室温 20℃ ~ 25℃,湿度 40% ~ 70%,自然昼夜明暗交替[SYXK(粤)2015-0147]。动物实验遵守实验动物伦理学要求,按实验动物使用的 3R 原则给予人道主义关怀。大鼠经适应性喂养一周进行脱毛。

1.2 主要试剂与仪器

大鼠实验笼购自苏州市苏杭科技器材有限公司。HC1099 电推剪购自飞利浦公司。硫化钠购自济宁宏明化学试剂有限公司。

1.3 SD 大鼠脱毛

参考文献^[12-15],首先用动物电推剪在 SD 大鼠脊柱两侧各 5 cm × 5 cm 区域逆被毛方向剃除毛发,然后用灭菌医用棉签分别蘸取不同浓度的硫化钠乙醇溶液适量均匀涂在脱毛部位,一定时间后用镊子刮拭涂药部位的鼠毛直到鼠毛完全脱光为止,然后用干净纱布将脱毛部位擦干,肉眼观察脱毛部位皮肤上毛发残余和充血情况,脱毛效果评价依据单位面积毛发残存量及皮损面积,以毛发残存量和皮损面积较小为适宜参数,观察结束后将大鼠放回鼠笼饲养。毛发残余量分为两个级别,当每平方厘米残留数量小于 50 根时以实际数量表示,当大于 50 根时定为密不可计。皮损面积为直尺实际测量

计算值,单位 mm^2 。

1.4 脱毛参数优化

在单因素考察 Na_2S 浓度、时间对脱毛效果的基础上,进一步采用 D-最优设计考察二者交互作用对脱毛效果的影响,D-最优设计参照文献^[18-20]进行。采用 Design Expert (V. 8.0.b) 中的 D-最优混料设计,按照软件设计的试验组合进行浓度和时间复配,以毛发残存量和皮损面积为考察指标通过软件分析筛选最佳脱毛参数。

2 结果

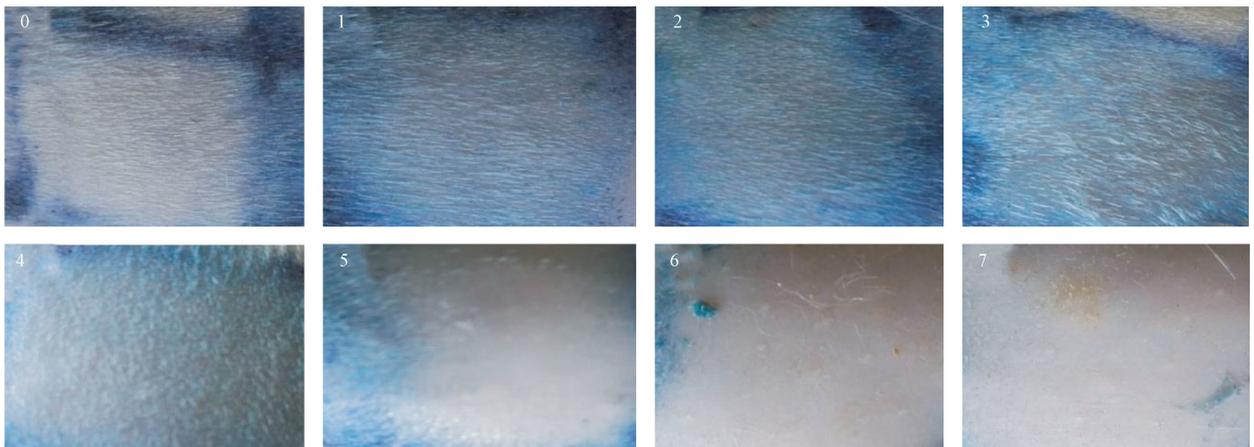
2.1 Na_2S 浓度对脱毛效果的影响

由图 1 可以看出,当不使用 Na_2S 时仅靠电动推毛剪根本无法去除根部毛发, Na_2S 浓度对脱毛效果影响显著,在 Na_2S 浓度 1%~7%、时间 5 min 内,脱毛

能力随 Na_2S 浓度增加而增强,当浓度小于 4% 时,脱毛能力微弱,当达到 5% 时脱毛能力明显上升,而当达到 7% 时由于局部浓度过高造成了明显的皮损,因此当脱毛时间维持在 5 min 时 Na_2S 以在 6% 脱毛效果较好。潘建英等人^[21]对比研究了上蜡法、化学法、剃须刀刮除法及电动推毛剪对豚鼠毛发脱除效果,结果表明电推剪法的病理损伤最轻,耗时最短,但脱毛后大量毛茬残留,毛发再生迅速,脱毛效果最差,而 Na_2S 脱毛后,皮肤光洁、脱毛效果好,与本研究结果相符。因此,本研究在电动脱毛的基础上采用化学脱毛可进一步提高脱毛效果,且以 6% 为基础浓度进一步考察脱毛时间对脱毛效果的影响。

2.2 Na_2S 作用时间对脱毛效果的影响

在基本浓度确定的基础上,进一步考察脱毛时间对脱毛效果的影响,结果见图 2。

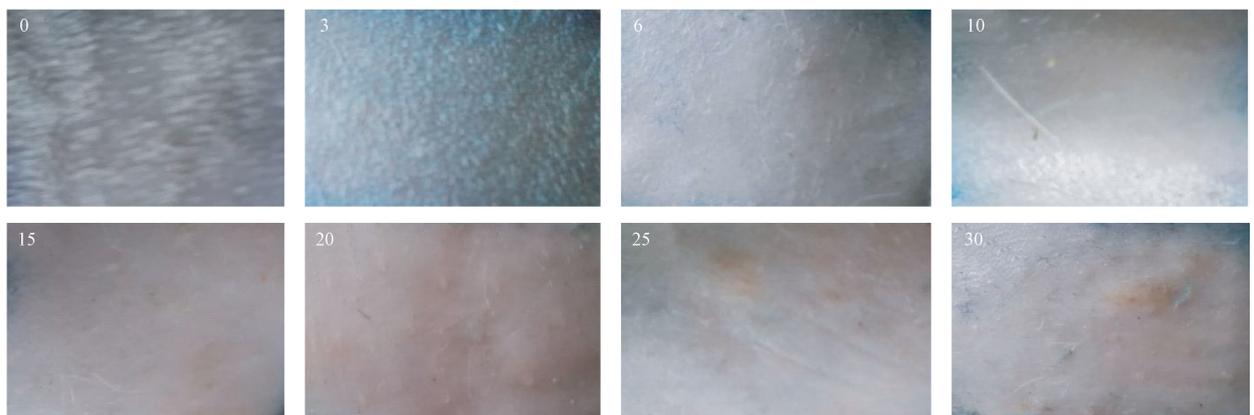


注:0~7 为 Na_2S 质量百分比浓度。

图 1 Na_2S 浓度对脱毛效果的影响

Note. Numbers 0 to 7 indicate the concentration of Na_2S as percentage of mass.

Fig. 1 Effect of Na_2S concentration on hair removal in SD rats



注:0~30 为脱毛时间, min。

图 2 Na_2S 作用时间对脱毛效果的影响

Note. Numbers 0 to 30 indicate the time of Na_2S treatment in minutes.

Fig. 2 Effect of the time of Na_2S treatment on hair-removal in rats

由图 2 可以看出,除 Na₂S 浓度对脱毛能力影响显著外,脱毛时间对脱毛效果影响也至关重要,Na₂S 脱毛能力随时间延长而明显加强。以 5 min 为分界线,5 min 之前不明显,5 min 之后开始显现,10 min 时皮肤表面比较光滑,15 min 时已非常光滑,15 min 之后皮损开始显现,20 min 时皮损明显加重,25 min 时肉眼可见皮肤灼烧样外观,表示此时已超出皮肤正常脱毛范围。因此,脱毛时间宜设定在 10 ~ 15 min。已有的大鼠皮肤光老化动物模型的建立多采用电动推毛剃毛后直接紫外辐照,虽然操作简单,但残余的毛发显然会减少皮肤对紫外光能量的吸收,从而干扰实验结果。因此,本研究在剃毛的基础上采用化学脱毛进一步剥除残余根部毛发,可减少实验误差。在脱毛时间上,余建强等人^[22]以小鼠为实验对象,以脱毛时间为考察指标,在优化脱毛剂配方时表明从开始脱毛到基本脱毛完全,历时基本在 50 min 以上,而本研究脱毛时间显著低于文献报道,可能一方面在于物种不同,另一方面,本实

验中所要处理的仅是残余少量毛发,而余建强等人的研究对象是所有体表毛发,因此时间差异较大。

2.3 Na₂S 浓度及时间交互作用对脱毛效果的影响

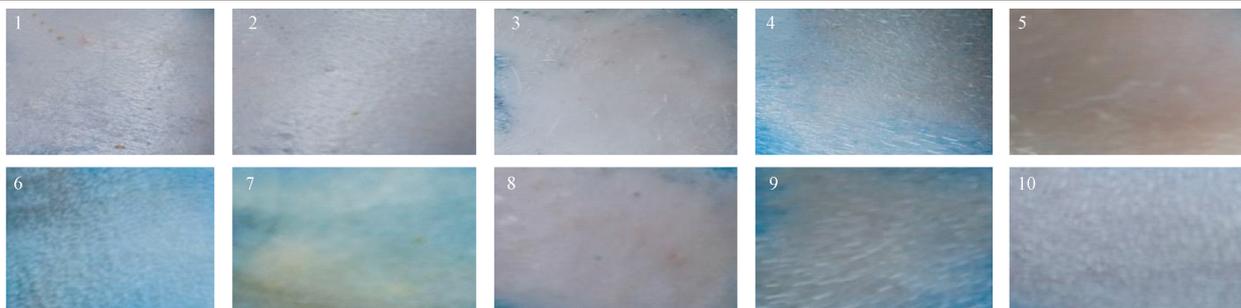
为综合比较 Na₂S 浓度和时间对脱毛效果和皮损情况的影响,本实验在单因素实验基础上,采用 D-最优设计对 Na₂S 设置 3%、5%、7% 三个浓度,10 min、15 min、20 min 三个作用时间进行脱毛处理,实验设计及结果见表 1,各序号对应的直观结果见图 3。

由表 1 及图 3 可知,在软件给定不同浓度与时间搭配产生不同的脱毛效果,其中以浓度影响最大,当浓度小于 5% 时皮肤残余毛发数量密不可计,在 5% ~ 7% 时不仅残余毛发少,而且基本未见皮损,表明浓度合适,毛发剥除过程较为温和,脱毛效果较好。且由表 1 得知,在此浓度范围内,时间对毛发残余量和皮损面积影响也较为明显,低浓度下可适当延长至 15 ~ 20 min,而高浓度下则处理时间宜在 10 ~ 15 min 之内,综合考虑 7% Na₂S 作用 10 min 效果最好,未见皮损且无残余毛发。

表 1 Na₂S 浓度及时间对 SD 大鼠皮肤脱毛效果影响的 D-最优设计

Tab. 1 D-optimal design for screening the best concentration and time of Na₂S treatment in SD rats for best results of depilation

序号 No.	因素 Factors		效果 Effects	
	Na ₂ S 浓度/% Concentration of Na ₂ S	作用时间/min Depilation time	毛残存率/根数/cm ² Residual hairs per cm ²	皮损面积/mm ² Area of skin damage
1	7	15	0	0.9
2	5	15	5	未见皮损 No skin damage observed
3	5	20	2	0.1
4	3	15	密不可计 Countless	未见皮损 No skin damage observed
5	7	10	1	未见皮损 No skin damage observed
6	3	20	密不可计 Countless	未见皮损 No skin damage observed
7	5	10	46	未见皮损 No skin damage observed
8	7	20	0	10
9	3	10	密不可计 Countless	未见皮损 No skin damage observed
10	0	20	密不可计 Countless	未见皮损 No skin damage observed



注:1 ~ 10 为实验序号。

图 3 Na₂S 浓度及时间交互作用对脱毛效果的影响

Note. Numbers 1 to 10 indicate the order of experiments.

Fig. 3 Interacting effects of concentration and time of Na₂S treatment on depilation results in the rats

3 讨论

皮肤光老化不仅可引起皮肤粗糙、皱纹、色素沉积等各种损美性表现,而且可诱发皮肤癌等医学问题,是当今皮肤科学基础研究和应用开发的热点

所在^[23, 24],建立光老化动物模型对研究光老化机制和治疗光老化疾病有着重要的意义。鉴于 SD 大鼠具有价格低廉、适用性广、可取材面积大等诸多优点,目前被广泛选为光老化造模动物^[12-15],但 SD

大鼠皮肤体毛密布,必须有效去除被覆体毛后才可真实模拟皮肤光老化。因此,选择恰当脱毛方法不仅有利于减少脱毛本身造成的皮肤损伤,使皮肤表面光滑,而且可减少动物感染的机会和对实验结果造成的干扰。目前,在皮肤脱毛途径上目前多采用物理和化学方法,物理法以电动推毛剪为代表,虽然推毛剪操作简单、剃毛效率高,但毛发残余量大,从而干扰实验结果;而化学法主要基于药剂的腐蚀性从而非选择性去除毛发,但直接使用因存在大量较长毛发不易涂抹均匀、操作不当容易产生脱毛效果差和皮损严重。因此,在脱毛措施上,本研究在机械脱毛的基础上进一步采用化学脱毛剂脱除残余根部毛发更为可行,且化学脱毛剂的选择及其浓度和时间对脱毛效果影响甚大。

在目前所用的化学脱毛剂中,以 Na_2S 和 BaS 较为常见,从脱毛效果和经济性来讲 Na_2S 最为常用,除大鼠、小鼠应用外,在家兔、狗、豚鼠等动物脱毛上也见报道^[17, 20-22],因此本研究选择 Na_2S 对 SD 大鼠进行皮肤脱毛。鉴于 Na_2S 浓度和作用时间对脱毛效果影响甚大,本文重点研究了 Na_2S 浓度、时间对脱毛效果的影响,并应用 D-最优设计筛选最佳作用参数,为建立高效稳定的皮肤光老化实验动物模型奠定实验基础。研究结果表明, Na_2S 浓度是脱毛的关键因素,SD 大鼠适宜的使用浓度为 5% ~ 7%,5% 以下几乎没有效果,这可能与毛发结构有关,而 7% 以上则因腐蚀性太强而造成较严重皮损,这与报道的常用浓度 8% ~ 10% 有明显不同,可能与物种、动物日龄、被毛状况、使用温度、溶液组成有关。除浓度外, Na_2S 作用时间也显著影响脱毛效果,在 6% 的基础浓度上,10 min 以下几乎没有效果,而 15 min 以上开始逐步显现皮损,且 25 min 已非常明显,比之前报道的所用时间短,可能与动物日龄、被毛状况、使用温度、溶液组成有关。鉴于 Na_2S 浓度和时间对脱毛效果的交互影响,本研究采用 D-最优设计优化二者的合适组合,结果证明 7% Na_2S 作用 10 min 效果最好,未见皮损且无残余毛发,从而为建立高效实用的 SD 大鼠皮肤光老化动物模型提供了基本前提条件。

参考文献:

[1] 谷崇高,张永红,白若雨,等. 地鳖多肽提取物的抗氧化衰老机制 [J]. 中国实验动物学报, 2014, 22(6): 66-74.

[2] Nisticò SP, Bottoni U, Gliozzi M, et al. Bergamot polyphenolic fraction counteracts photoaging in human keratinocytes [J]. *PharmaNutrition*, 2016, 4(Suppl): S32-S34.

[3] Takeuchi H, Gomi T, Shishido M, et al. Neutrophil elastase contributes to extracellular matrix damage induced by chronic low-dose UV irradiation in a hairless mouse photoaging [J]. *J Dermatol Sci*, 2010, 60(3): 151-158.

[4] Lee SJ, Ko MS, Yang YH, et al. Long- and short-term effects of vitamin E administration along with stress on skin tissues of mice [J]. *J Korean Soc Appl Biol*, 2012, 55(1): 105-109.

[5] 徐德峰,赵谋明,马忠华,等. 基于胞外基质代谢调控网络的皮肤老化机制的研究进展 [J]. *皮肤病与性病*, 2016, 38(2): 112-115.

[6] 易清玲,曾维惠,刘彦婷,等. 黑木耳多糖对 ICR 小鼠皮肤光老化的保护作用 [J]. *中国美容医学*, 2012, 21(5): 759-761.

[7] 邵琼琼,王平,任金平,等. 乳香提取物改善小鼠皮肤光老化的初筛实验研究 [J]. *中国中西医结合皮肤性病学期刊*, 2014, 13(1): 13-16.

[8] 张璃,梁虹. 小白鼠皮肤光老化模型的建立 [J]. *广东医学*, 2005, 26(12): 1642-1643.

[9] Takauji Y, Morino K, Miki K, et al. Chyawanprash, a formulation of traditional Ayurvedic medicine, shows a protective effect on skin photoaging in hairless mice [J]. *J Integr Med*, 2016, 14(6): 473-479.

[10] 张雯雯,刘雅娟,李云,等. B 段紫外线对豚鼠皮肤的损伤作用 [J]. *吉林大学学报(医学版)*, 2008, 34(1): 46-48.

[11] 雷旭光,张永玉,董岩,等. 真皮多能干细胞移植对大鼠光老化皮肤组织的修复作用 [J]. *中国美容医学*, 2014, 23(9): 726-729.

[12] 张小卿,陶冶,田国伟,等. 针刺对光老化大鼠皮肤组织 CAT、GSH-Px 和 H_2O_2 影响的实验研究 [J]. *中国美容医学*, 2012, 21(6): 958-959.

[13] 楼彩霞,高擎,孙侠,等. 维生素 C 对紫外线诱导的光老化大鼠皮肤结构的影响 [J]. *中国比较医学杂志*, 2015, 25(6): 23-27.

[14] 杨汝斌,万屏,刘玲,等. SD 大鼠皮肤光老化动物模型建立方法的探索 [J]. *中国皮肤性病学期刊*, 2011, 25(3): 199-202.

[15] 曹迪,陈瑾,黄琨,等. 皮肤光老化 SD 大鼠模型的构建及评价标准的探讨 [J]. *重庆医科大学学报*, 2016, 41(4): 379-383.

[16] 陈红云,思德智,李涛,等. 脱毛剂对实验动物损伤的初步研究 [J]. *教育教学论坛*, 2016, (47): 279-280.

[17] 朱彦君,冯光珍,孟宇宏,等. 皮肤光老化动物模型的建立 [J]. *中国体视学与图像分析*, 2004, 9(1): 51-54.

[18] 邹宇,胡立明,胡文忠,等. D-最优混料设计优化菊花枸杞饮料配方及其抗氧化活性的研究 [J]. *食品工业科技*, 2014, 35(14): 241-244.

[19] 黄光建,徐学锋,郭梅君,等. D-最优混料设计在豉香型白酒香醅优化中的应用 [J]. *华南农业大学学报*, 2013, 34(3): 427-430.

[20] 郭亚丽,李芳,洪媛,等. D-最优混料试验设计优化模拟米制品的配方 [J]. *食品科技*, 2015, 40(9): 164-168.

[21] 潘建英,严淑贤,洪新宇,等. 豚鼠皮肤试验 4 种脱毛方法的比较 [J]. *环境与职业医学*, 2004, 21(6): 461-463.

[22] 余建强,闫琳,郑萍,等. 实验动物脱毛剂的改良与应用 [J]. *宁夏医科大学学报*, 2001, 23(4): 296-297.

[23] Ribero S, Mangino M, Bataille V. Skin phenotypes can offer some insight about the association between telomere length and cancer susceptibility [J]. *Med Hypotheses*, 2016, 97: 7-10.

[24] Svoboda M, Bílková Z, Muthný T. Could tight junctions regulate the barrier function of the aged skin? [J]. *J Dermatol Sci*, 2016, 81(3): 147-152.