研究报告

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

吴剑平,谢　倩,陈　林,张军峰,史丽云,詹　臻*

(南京中医药大学,南京　210023)

【摘要】　目的　观察咪喹莫特对不同品系小鼠银屑病样皮损诱导作用的差异及其作用机理。**方法**　选用 BALB/c 和 C57BL/6 两种小鼠品系,分别在其背部涂抹 62.5 mg 含 5% 咪喹莫特的明欣利迪乳膏,在涂抹 2,4,6 d 后,采用 PAIS 评分观察小鼠背部皮肤形态学变化;HE 染色观察涂药局部皮肤病理组织学变化,显微镜下测量表皮厚度;实时荧光定量 PCR 法测定 IL-23/IL-17 轴相关细胞因子的相对表达量。**结果**　随咪喹莫特涂抹天数的增加,BALB/c 小鼠和 C57BL/6 小鼠背部皮肤均逐渐出现鳞屑、红斑、表皮增厚等银屑病样表现。与同时间段 C57BL/6 小鼠银屑病样皮损比较,BALB/c 小鼠皮损 PAIS 评分更高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),病理组织学改变及表皮增厚均更显著($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。涂抹咪喹莫特 2 d 后,两种小鼠 IL-23、IL-17A 和 IL-17F mRNA 相对表达量均显著升高,且均呈现先高后低的动态变化。其中 BALB/c 小鼠表达峰值出现于涂药后 2 d,C57BL/6 小鼠表达峰值出现于涂药后 4 d。**结论**　咪喹莫特均可诱导 BALB/c 和 C57BL/6 小鼠出现人类银屑病样皮损,其中 BALB/c 小鼠银屑病样皮损更典型,可能更适用于人类银屑病研究,IL-23/IL-17 轴的激活是皮损出现的重要诱导因素之一。

【关键词】　银屑病小鼠模型;咪喹莫特;BALB/c 小鼠;C57BL/6 小鼠;IL-23/IL-17 轴

【中图分类号】R-33　　**【文献标识码】**A　　**【文章编号】**1671-7856(2018) 09-0001-06

doi: 10.3969/j.issn.1671 -7856. 2018.09.001

Comparison of imiquimod-induced psoriatic lesions in BALB/c and C57BL/6 mice

WU Jianping, XIE Qian, CHEN Lin, ZHANG Junfeng, SHI Liyun, ZHAN Zhen*

(Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China)

【Abstract】　Objective　To determine the effect of imiquimod on psoriasis-like lesions in different strains of mice and the mechanism involved. **Methods**　Two mouse strains, BALB/c and C57BL/6, were chosen, onto the back of which 62.5 mg of 5% imiquimod cream was applied. PAIS score was used to determine the morphological changes of mouse back skin. The histopathological changes of skin were observed by HE staining, the thickness of the epidermis was measured under a microscope, and the relative expression of cytokines related to the IL-23/IL-17Axis was measured by real-time PCR. **Results**　With the passage of time, psoriasis-like skin lesions gradually formed on the back skin of both BALB/c and C57BL/6 mice. Compared with those in C57BL/6 mice, the PAIS score of BALB/c mice was higher, and histopathological changes and epidermal thickening ($P < 0.05$ or $P < 0.01$) were also more significant. Two days after the application of imiquimod, the relative expression of IL-23, IL-17A, and IL-17F mRNA in the two mouse groups all

[**基金项目**]国家自然科学基金项目(编号:81473593,81473458)。

[**作者简介**]吴剑平(1986—　),女,实验师,博士研究生在读,研究方向:实验动物与比较医学。E-mail: wjp4411544@163.com

[**通信作者**]詹臻,教授,博导,研究方向:中西医结合基础。E-mail: zhanzhan5607@163.com

increased significantly, and both groups showed a dynamic change of an initial increase and then a decrease. The peak of expression in BALB/c mice appeared 2 days after the application, and in C57BL/6 mice it appeared at 4 days. **Conclusions** Imiquimod can induce psoriasis-like lesions in both BALB/c mice and C57BL/6 mice, but the lesions in BALB/c mice appeared to be more typical, potentially making them more suitable for human psoriasis research. The activation of the IL-23/IL-17Axis is one of the most important inducers of skin lesions.

【**Keywords**】 psoriasis mouse model; imiquimod; BALB/c mice; C57BL/6 mice; IL-23/IL-17 Axis

银屑病是以皮肤反复出现炎性增生为典型表现的自身免疫性疾病,目前其发病机制尚未完全阐明[1-2]。咪喹莫特作为 Toll 样受体激动剂,可通过与 TLR-7/8 结合,诱导皮肤出现表皮增厚、棘层肥厚、角化不全、嗜中性粒细胞聚集等银屑病样表现,目前常被用于银屑病动物模型的诱导剂[3]。BALB/c 和 C57BL/6 小鼠是目前最常用于该类动物模型研究的两种小鼠品系,但这两种模型有无差异,哪种模型更适用于人类银屑病研究则鲜见报道。本研究即采用 BALB/c 和 C57BL/6 两种小鼠品系,比较不同时间点咪喹莫特诱导的两种模型小鼠皮肤形态学、病理组织学等方面的差异,并探讨 IL-23/IL-17 炎症轴在模型进展中的作用。

1 材料和方法

1.1 实验动物

SPF 级 BALB/c 小鼠和 C57BL/6 小鼠各 24 只,均为雌性,体重 20 ~ 22 g, 7 ~ 8 周龄,由北京维通利华实验动物技术有限公司南京分公司提供[SCXK(苏) 2016 - 0003]。实验期间小鼠均饲养在屏障环境[SYXK (苏) 2014 - 0001]中,按照国标 GB 14925 - 2010[4]的有关要求控制环境参数。实验前先给予 3 d 健康适应期,饲养和实验期间动物自由饮食。

1.2 主要试剂与仪器

明欣利迪乳膏(5% 咪喹莫特)购自四川明欣药业有限责任公司; SuperScript™ III First-Strand Synthesis SuperMix 购自 Invitrogen 公司;实时荧光定量 PCR 引物购自生工生物工程(上海)股份有限公司; Power SYBR® Green PCR Master Mix 购自 Applied Biosystems 公司。Olympus 显微镜购自日本;CFX384 多重实时荧光定量 PCR 仪购自美国 Bio-Rad 公司。

1.3 实验方法

1.3.1 分组处理

咪喹莫特诱导的小鼠银屑病模型观察期多为 4 ~ 6 d[3,5-6],故本研究选择 6 d 作为模型观察终点。BALB/c 小鼠和 C57BL/6 小鼠均随机分为 4 组,每组 6 只,分别为涂药 0 d 组(即正常对照组)、涂药 2 d 组、涂药 4 d 组和涂药 6 d 组。

各组处理如下:动物于涂药前一天背部剃毛,形成约 2 cm × 3 cm 大小的皮肤暴露区。涂药组小鼠每天涂抹 5% 咪喹莫特乳膏 62.5 mg,并分别于涂药后 2 d(涂药 2 d 组)、4 d(涂药 4 d 组)、6 d(涂药 6 d 组)采样。涂药 0 d 组小鼠背部剃毛后,不做任何处理,第 2 天直接采样。采样时小鼠先颈椎脱臼处死,剪下背部涂药部位皮肤,分成两块,一块放入 10% 甲醛中固定,另一块放入 - 80℃ 冻存。本实验研究的 IACUC 号为 ACU170704,实验过程中严格按照实验动物使用的 3R 原则给予人道主义关怀。

1.3.2 皮损严重程度(psoriasis area and severity index, PASI)评分

PAIS 评分标准如下:0,无;1,轻度;2,中度;3,重度;4,极重度。采用相机每天拍照记录小鼠皮损情况,同时按 PAIS 标准对皮肤红斑(erythema)、鳞屑(scales)及浸润增厚程度(thickness)进行 0 ~ 4 的评分,将 3 种积分累计得到总积分。绘制各组小鼠积分变化趋势图,观察各组小鼠皮损的变化情况。

1.3.3 皮损病理组织学检测

HE 染色观察小鼠皮肤有无变性、坏死、溃疡、痂皮形成,上皮层有无增厚、表面角化不全或角化过度、真皮或皮下组织内有无充血、水肿、炎细胞浸润等病变。之后在 200 倍光镜下,采用计算机图像分析系统(DP2-BSW)测量每只动物的表皮层厚度。

1.3.4 实时荧光定量 PCR 检测

采用实时荧光定量 PCR(RT-PCR)法测定各组小鼠皮肤组织 IL-23/IL-17 轴相关免疫因子 IL-23、IL-17A 和 IL-17F mRNA 的相对表达量。以 β-actin 为内参,实验结果采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法进行相对定量。各引物序列如下: IL-23 (上游): 5'-AACAACAGCTCGGATTTGGTAT-3'; IL-23 (下游): 5'-ATGACCAGGACATTCAGCAGT-3'; IL-17A (上游): 5'-TCAGCGTGTCCAAACACTGAG-3'; IL-17A (下游): 5'-CGCCAAGGGAGTTAAAGACTT-3'; IL-

17F（上游）：5’-TGCTACTGTTGATGTTGGGAC-3’；IL-17F（下游）：5’-CAGAAATGCCCTGGTTTTGGT-3’；β-actin（上游）：5’-CTGAGAGGGAAATCGTGCGTGAC-3’；β-actin（下游）：5’-GAACCGCTCGTTGCCAATAGTGAT-3’。

1.4　统计学方法

应用统计学软件 SPSS 15.0 进行数据处理，计量资料以平均数 ± 标准差（$\bar{x} \pm s$）表示，两组之间比较均采用 t 检验，$P < 0.05$ 为差异有显著性。

2　结果

2.1　各组背部皮肤形态学变化

如图 1 可见，正常对照组（0 d 组）小鼠皮肤均光滑，无鳞屑、皱褶、红斑等。涂药 2 d 后，BALB/c 小鼠背部即开始出现细小鳞屑和点状红斑。第 3 天开始出现少量皱褶。涂药 4 d 后，背部皮肤明显增厚，鳞屑变为小块状、红斑连成片状，皱褶呈条状隆起。涂药 6 d 后，鳞屑开始部分脱落，脱落部位可见点状出血。与 BALB/c 小鼠比较，C57BL/6 小鼠于涂药 3 d 后才出现少量鳞屑及点状红斑，之后症状缓慢加重。同一时间段比较，C57BL/6 小鼠鳞屑、皱褶、红斑、皮肤增厚等症状均较轻，至涂药第 6 天鳞屑未见脱落。见图 1。

2.2　各组背部皮损 PAIS 评分变化

按 PAIS 评分标准绘制病变积分趋势线，随涂药天数增加，病变积分逐渐增高，与形态学观察结果一致，且同一时间段 BALB/c 小鼠的积分均高于 C57BL/6 小鼠，差异有显著性（$P < 0.05$ 或 $P < 0.01$）。见图 2。

2.3　背部皮损病理组织学变化

HE 染色结果可见，正常组皮肤较薄，表面有少量角化，无充血、出血及炎症细胞浸润。涂药 2 d 后表皮开始出现增厚，皮肤表面出现痂皮及少量角化。真皮可见轻度充血及少量炎细胞浸润，以中性粒细胞和单核巨噬细胞浸润为主。与同时间段 C57BL/6 小鼠比较，BALB/c 小鼠皮肤增厚及角化不全较重。涂药 4 d 后，BALB/c 小鼠鳞状上皮和表皮增厚、角化不全、炎症浸润等情况均较 C57BL/6 小鼠严重。涂药 6 d 后，BALB/c 小鼠被覆厚层鳞状上皮，表皮进一步增厚，角化不全严重，真皮层有轻度充血、出血，炎症细胞浸润增多。与 BALB/c 小鼠比较，C57BL/6 小鼠表皮增厚、角化不全等病变程度明显较轻。通过表皮厚度测量可见，2 d 组、4 d 组和 6 d 组 BALB/c 小鼠表皮厚度均大于同时间段 C57BL/6 小鼠，差异均有显著性（$P < 0.05$ 或 $P < 0.01$）。见图 3。

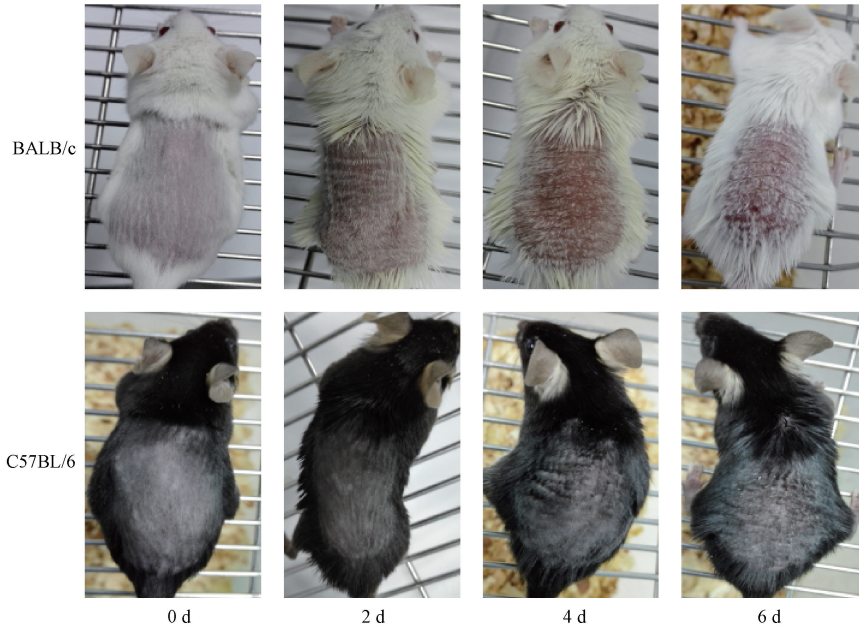
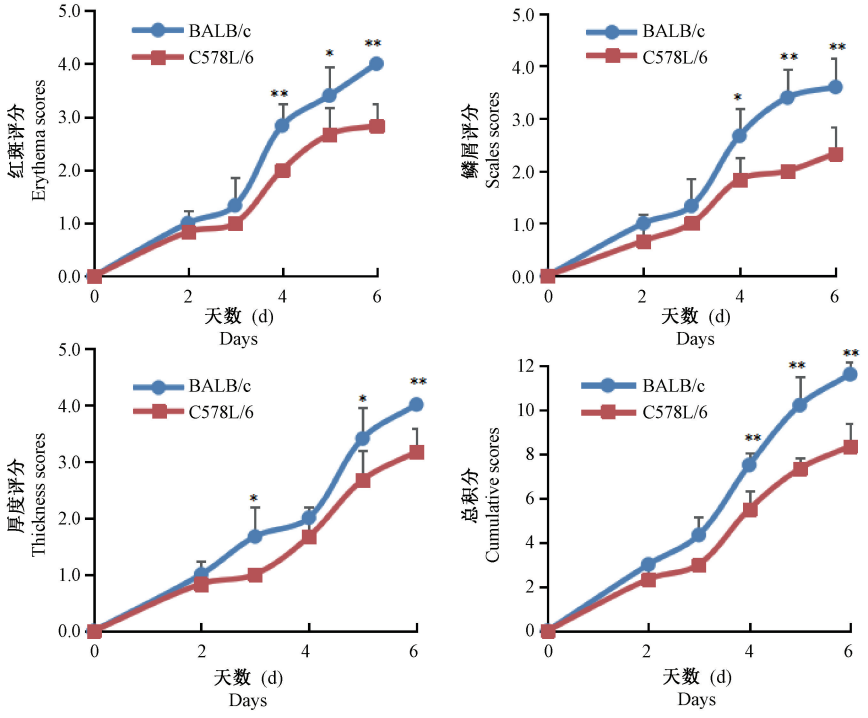


图 1　不同品系小鼠背部皮肤形态学变化

Figure 1　Morphological changes of mouse back skin in different strains



注:同一时间点,BALB/c 小鼠与 C57BL/6 小鼠比较,$^{*}P < 0.05$,$^{**}P < 0.01$。

图 2 小鼠背部皮损 PASI 评分变化趋势图

Note. BALB/c mice compared with C57BL/6 mice at the same time, $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$.

Figure 2 The PASI scores of skin lesions in the mouse

2.4 IL-23/IL-17 轴相关细胞因子 mRNA 的表达

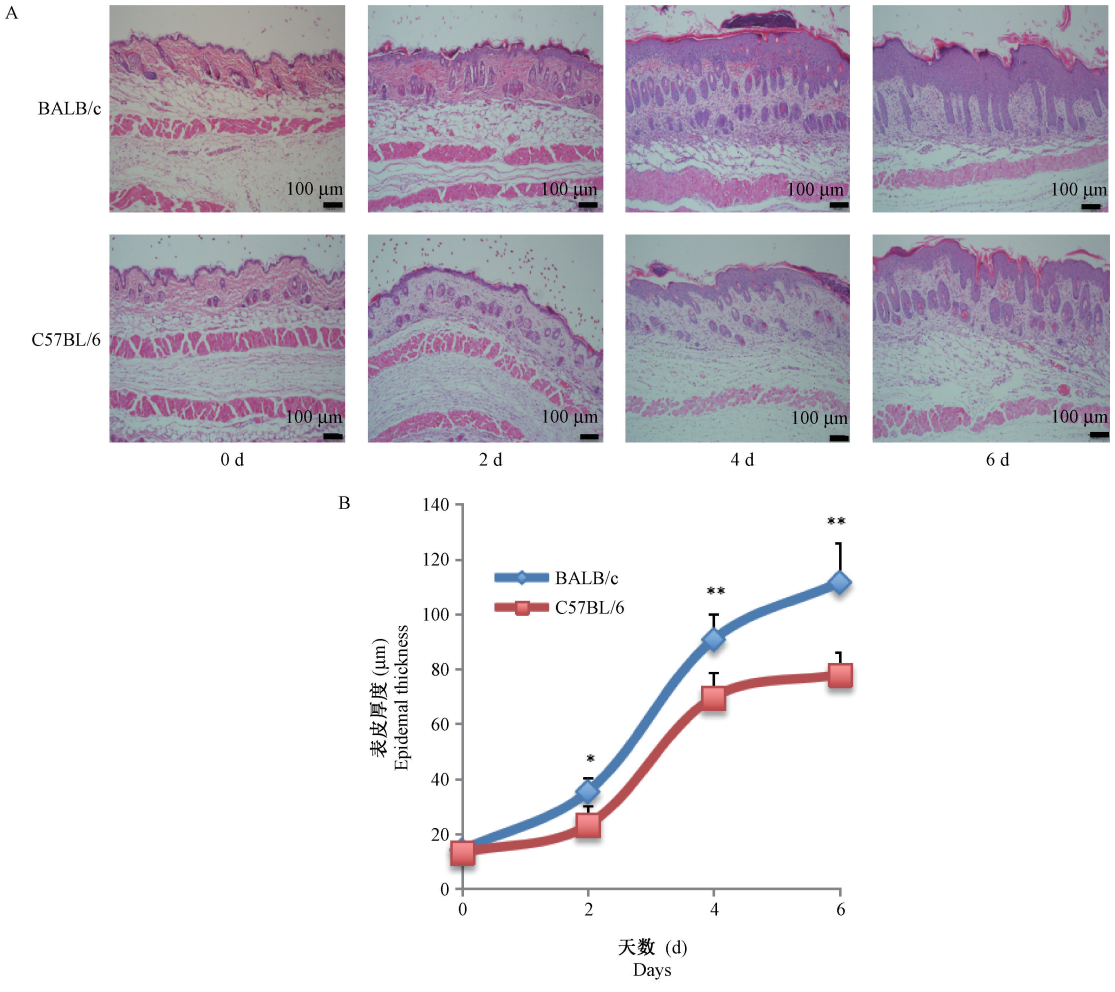
BALB/c 和 C57BL/6 小鼠在造模后,其 IL-23、IL-17A、IL-17F 的 mRNA 相对表达量均呈抛物线样变化。与 0 d 组比较,两种小鼠在造模 2,4,6 d 后,IL-23、IL-17A、IL-17F 均有明显升高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。其中,BALB/c 小鼠 IL-23、IL-17A、IL-17F的 mRNA 表达水平在用药 2 d 后即达到峰值,之后逐渐降低。C57BL/6 小鼠 IL-23、IL-17A、IL-17F 的 mRNA 表达水平在用药 4 d 后达到峰值,之后逐渐降低。见图 4。

3 讨论

银屑病是目前最常见的自身免疫性疾病之一,发病率高达 2% 左右[7-8]。其病因及发病机制尚未完全阐明,且尚无有效的治愈方法[9]。银屑病的临床特点主要为反复发作的皮肤过度角化、鳞屑、红斑形成,并伴有炎细胞浸润、新生血管形成、IL-6、TNF-α 等细胞因子的分泌。银屑病的动物模型有多种,如药物诱导型模型、阴道上皮模型、基因突变及转基因模型等[10-12]。咪喹莫特诱导的小鼠模型,因其制作方法简单、致病机制与人类银屑病类似等原因,近年来被广泛用于人类银屑病研究[3, 13-14]。据文献报道及本实验室以往的研究经验发现,该方法诱导的模型,一般于造模第 6 天银屑病样症状达高峰,之后症状逐渐减弱直至完全缓解,因此模型观察期一般以 6 d 为宜[3, 15-16]。

本研究显示,通过背部连续 6 d 涂抹 62.5 mg 的 5% 咪喹莫特乳膏(明欣利迪)后,可诱导 BALB/c 小鼠和 C57BL/6 小鼠逐渐出现鳞屑、红斑、皮肤增厚及皱褶等典型银屑病样皮损,病理组织学鳞状上皮与表皮增厚、角化不全、角化过度、真皮充血、出血、炎症细胞浸润等改变均类似人类银屑病表现。但同时间段两种模型动物比较,BALB/c 小鼠银屑病样症状出现更早、进展更迅速,且症状更严重,银屑病样皮损更典型。于涂药 2 ~ 3 d 后,BALB/c 小鼠即开始出现细小鳞屑、红斑等症状,4 d 后鳞屑、皮肤增厚、红斑等症状逐渐加重,到第 6 天达高峰。PAIS 评分各项指标比较,BALB/c 小鼠也均高于 C57BL/6 小鼠。HE 染色发现,随着涂药天数的增加,两种动物模型表皮增厚、皮肤表面痂皮、角化不全、真皮充血、出血、炎症细胞浸润等表现均逐渐加重。但与形态学改变一致,BALB/c 小鼠的各项病理指标变化均更显著且典型。

相关文献报道,咪喹莫特作为 Toll 样受体

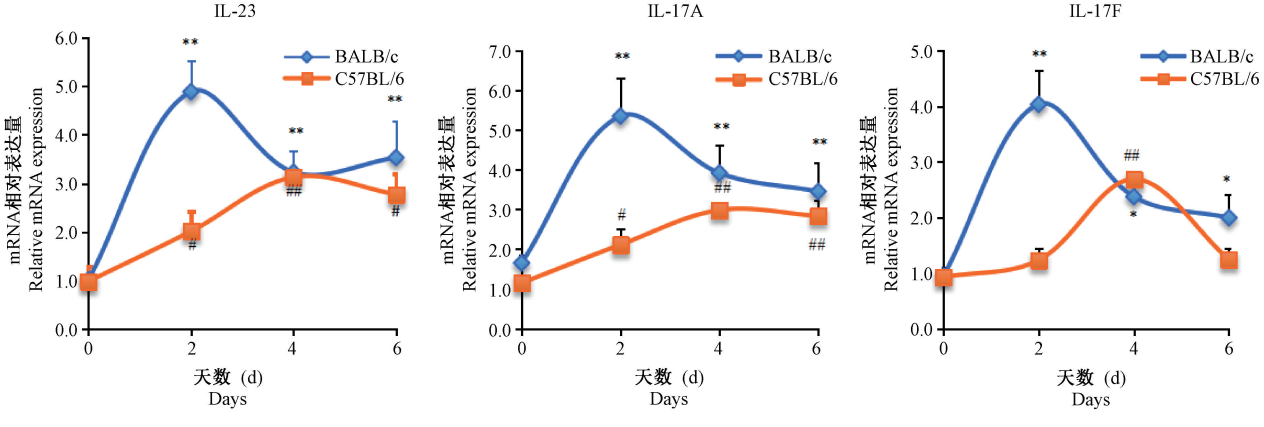


注：A：涂药局部皮肤病理组织学变化（HE 染色，× 100）；B：表皮厚度变化。同一时间点，BALB/c 小鼠与 C57BL/6 小鼠比较，$^{*}P < 0.05$，$^{**}P < 0.01$。

图 3　各组小鼠皮损病理组织学的变化

Note. A: Histopathological changes of the local skin after drug was applied. HE staining (× 100). B: Changes of epidermal thickness. BALB/c mice compared with C57BL/6 mice at the same time, $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$.

Figure 3　The histological changes of mouse skin lesions



注：与 BALB/c 小鼠 0 d 组比较，$^{*}P < 0.05$，$^{**}P < 0.01$；与 C57BL/6 小鼠 0 d 组比较，$^{\#}P < 0.05$，$^{\#\#}P < 0.01$。

图 4　不同品系小鼠皮损组织 IL-23、IL-17A、IL-17F mRNA 的相对表达量

Note. Compared with BALB/c mice of the 0 d group, $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$. Compared with C57BL/6 mice of the 0 d group, $^{\#}P < 0.05$, $^{\#\#}P < 0.01$.

Figure 4　The relative expression of IL-23, IL-17A, and IL-17F mRNA in skin lesions of different strains of mice

(TLR-7/8)激动剂,其诱导小鼠银屑病样皮损的机制与 IL-23/IL-17 轴的激活有关[3, 17]。本研究同时测定了 IL-23/IL-17 轴相关细胞因子的表达。结果发现,BALB/c 小鼠的 IL-23、IL-17A 和 IL-17F 等细胞因子的表达在涂药 2 d 后即达高峰,之后逐渐回落,而 C57BL/6 小鼠在涂药 4 d 后各项细胞因子才达高峰,之后逐渐回落,该结果与 van der Fits 等人[3]的结果趋势一致,提示在咪喹莫特诱导的银屑病模型中,IL-23/IL-17 轴的激活要先于银屑病样皮损的出现,也进一步揭示 IL-23/IL-17 轴的激活是皮损出现的诱导因素。同时 BALB/c 小鼠 IL-23/IL-17 轴的激活要先于 C57BL/6 小鼠,提示 IL-23/IL-17 轴的优先激活是 BALB/c 小鼠模型进展更加迅速的主要原因之一。

综上可见,咪喹莫特可诱导 BALB/c 小鼠和 C57BL/6 小鼠皮肤均出现银屑病样皮损表现,其中 BALB/c 小鼠症状出现更早,进展更迅速,鳞屑、皮肤增厚、角化过度及不全、炎症细胞浸润等皮损改变更典型。鉴于该模型病程短,且具有自限性等特点,BALB/c 小鼠可能更适合用于人类银屑病研究。此外,本研究表明 IL-23/IL-17 轴的激活可能是诱发小鼠银屑病样皮损的关键因素之一。

参考文献:

[1] Griffiths CE, Barker JN. Pathogenesis and clinical features of psoriasis [J]. Lancet, 2007, 370(9583): 263 – 271.

[2] 王明星, 王燕, 赵京霞, 等. 银屑病发病机制研究进展 [J]. 辽宁中医杂志, 2017, 44(6): 1334 – 1338.

[3] van der Fits L, Mourits S, Voerman JS, et al. Imiquimod-induced psoriasis-like skin inflammation in mice is mediated via the IL-23/IL-17Axis [J]. J Immunol, 2009, 182(9): 5836 – 5845.

[4] GB 14925 – 2010, 实验动物设施与环境 [S]. 2010.

[5] Ueyama A, Yamamoto M, Tsujii K, et al. Mechanism of pathogenesis of imiquimod-induced skin inflammation in the mouse: a role for interferon-alpha in dendritic cell activation by imiquimod [J]. J Dermatol, 2014, 41(2): 135 – 143.

[6] Klebow S, Hahn M, Nikoalev A, et al. IL-6 signaling in myelomonocytic cells is not crucial for the development of IMQ-induced psoriasis [J]. PLoS One, 2016, 11(3): e0151913.

[7] National Psoriasis Foundation. Psoriasis overview and psoriasis statistics [Z]. 2015. https://www.psoriasis.org/

[8] Declercq SD, Pouliot R. Promising new treatments for psoriasis [J]. Scientific World J, 2013, 2013: 980419.

[9] 王凯, 曾嘉琦, 王笑然, 等. 银屑病的临床治疗进展 [J]. 医学综述, 2017, 23(23): 4659 – 4664.

[10] 底婷婷, 赵京霞, 李萍. 银屑病样模型的研究进展 [J]. 首都医科大学学报, 2012, 33(2): 275 – 279.

[11] 王莲, 夏登梅, 李薇. 银屑病样动物模型的研究进展 [J]. 中国皮肤性病学杂志, 2015, 29(9): 970 – 973.

[12] 杨素清, 李东东, 闫景东. 银屑病动物模型的研究进展 [J]. 长春中医药大学学报, 2017, 33(6): 1029 – 1032.

[13] 赵京霞, 王燕, 底婷婷, 等. IL-23/IL-17 轴在银屑病免疫发病机制中的作用 [J]. 基础医学与临床, 2012, 32(4): 453 – 456.

[14] 吴丽兴, 陈长镜, 罗军敏. Th17 细胞及其相关因子在银屑病发病中的作用及其分子机制 [J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2015, 31(2): 282 – 284.

[15] Hau CS, Kanda N, Noda S, et al. Visfatin enhances the production of cathelicidin antimicrobial peptide, human β-defensin-2, human β-defensin-3, and S100A7 in human keratinocytes and their orthologs in murine imiquimod-induced psoriatic skin [J]. Am J Pathol, 2013, 182(5): 1705 – 1717.

[16] Hau CS, Kanda N, Tada Y, et al. Prolactin induces the production of Th17 and Th1 cytokines/chemokines in murine Imiquimod-induced psoriasiform skin [J]. J Eur Acad Dermatol Venereol, 2014, 28(10): 1370 – 1379.

[17] Flutter B, Nestle FO. TLRs to cytokines: mechanistic insights from the imiquimod mouse model of psoriasis [J]. Eur J Immunol, 2013, 43(12): 3138 – 3146.

〔收稿日期〕2018 – 04 – 12