

吕书影,曲保全,林文君,等. 咪喹莫特联合慢性温和性不可预知应激建立斑秃样小鼠模型 [J]. 中国实验动物学报, 2023, 31(7): 846–852.

Lyu SY, Qu BQ, Lin WJ, et al. Imiquimod combined with chronic unpredictable mild stress to establish a mouse model of alopecia areata [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2023, 31(7): 846–852.

Doi:10. 3969/j.issn.1005–4847. 2023. 07. 002

咪喹莫特联合慢性温和性不可预知应激建立斑秃样小鼠模型

吕书影¹, 曲保全², 林文君², 杨顶权^{3*}

(1. 首都医科大学附属北京中医医院, 北京 100010; 2. 北京中医药大学, 北京 100029; 3. 中日友好医院, 北京 100029)

【摘要】 目的 通过外用咪喹莫特乳膏联合慢性温和性不可预知应激 (chronic unpredictable mild stress, CUMS) 的方法, 探索建立 C57BL/6J 小鼠的斑秃 (alopecia areata, AA) 动物模型。**方法** 选取 5 ~ 7 周龄 C57BL/6J 雌性小鼠 30 只, 随机分成 3 组: 空白对照组 (Control 组)、咪喹莫特组 (IMQ 组)、联合慢性温和性不可预知应激组 (CUMS 组)。CUMS 组于实验 1 ~ 21 d 给予 CUMS 应激, IMQ 组及 CUMS 组于实验 14 ~ 21 d 予以同部位等量咪喹莫特乳膏外用。实验第 21 天拍摄小鼠宏观表征及皮肤镜照片, 并进行行为学测试, 采集小鼠背部皮损及外周血。通过免疫组化染色观察毛囊 CD4⁺、CD8⁺ T 细胞浸润情况, 流式细胞技术检测外周血 T 淋巴细胞亚群中 Th1/Th2、Th17/Treg 细胞分化情况。**结果** CUMS 组小鼠局部毛发斑片状脱落明显, 毛发镜下可见断发、感叹号样毛发, 旷场实验移动距离、直立次数、进入中央区次数明显减少 ($P < 0.05$), 强迫游泳实验静止不动明显增加 ($P < 0.05$), 提示小鼠处于焦虑抑郁状态; 免疫组化显示 CUMS 组小鼠皮损 CD4⁺、CD8⁺ T 细胞在毛囊周围及毛囊球部表达明显; 流式细胞术结果显示, CUMS 组小鼠 Th1 水平明显升高 ($P < 0.01$)、Th2 水平明显降低 ($P < 0.05$)、Th17 水平明显升高 ($P < 0.05$)、Th1/Th2 细胞比率明显升高 ($P < 0.001$)、Th17/Treg 比例有上升趋势。**结论** 外用咪喹莫特联合 CUMS 应激建立的 C57BL/6J 小鼠模型, 基本模拟了人类 AA 疾病表现, 突出了发病机制中的精神心理因素, 并在一定程度上符合中医肝郁脾虚证候, 提供了一种培育方便、更具性价比的 AA 动物造模方法。

【关键词】 斑秃; 动物模型; 应激; 肝郁脾虚

【中图分类号】 Q95–33 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2023) 07-0846-07

Imiquimod combined with chronic unpredictable mild stress to establish a mouse model of alopecia areata

LYU Shuying¹, QU Baoquan², LIN Wenjun², YANG Dingquan^{3*}

(1. Beijing Hospital of Traditional Chinese Medicine, Capital Medical University, Beijing 100010, China.

2. Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029. 3. China-Japan Friendship Hospital, Beijing 100029)

Corresponding author: YANG Dingquan. E-mail: ydqlx@163.com

【Abstract】 Objective To establish an imiquimod compound chronic unpredictable mild stress (CUMS) C57BL/6J mouse model of alopecia areata (AA). **Methods** Thirty female C57BL/6J mice aged 5 ~ 7 weeks were randomly divided into three groups of 10 mice each: control, IMQ, and CUMS (imiquimod combined with CUMS) groups. CUMS was administered to the CUMS group on days 1 ~ 21, whereas IMQ and CUMS groups were administered equal amounts of imiquimod cream topically at the same site on days 14 ~ 21. On day 21, overall and trichoscopic photographs of

[基金项目] 国家自然科学基金(81973691)。
Funded by the National Natural Science Foundation of China(81973691).
[作者简介] 吕书影(1996—), 女, 在读博士研究生, 研究方向: 中西医结合皮肤病。Email: 914463915@qq.com
[通信作者] 杨顶权(1970—), 男, 硕士, 主任医师, 研究方向: 中西医结合皮肤病。Email: ydqlx@163.com

mice were taken, behavioral tests were performed, and skin lesions and peripheral blood were collected. $CD4^+$ and $CD8^+$ T cell infiltration into hair follicles was observed by immunohistochemical staining. Differentiation of Th1/Th2 and Th17/Treg cells from peripheral blood T lymphocyte subsets was detected by flow cytometry. **Results** Compared with blank and imiquimod groups, C57BL/6J mice in the CUMS group showed significant localized patchy hair loss, and trichoscopic photographs showed broken hair and exclamation mark-like hairs. The distance moved, number of times standing upright, and number of times entering the central area in the open field test were significantly reduced ($P < 0.05$). Moreover, the rest time in the forced swim test was significantly increased ($P < 0.05$). These data suggested that the mice were in an anxious and depressed state. Compared with blank and imiquimod groups, CUMS group mice had significant $CD4^+$ and $CD8^+$ T cells in skin lesions around hair follicles and in the hair follicle bulb. Flow cytometry showed that Th1 levels were significantly higher ($P < 0.01$), Th2 levels were significantly lower ($P < 0.05$), Th17 levels were significantly higher ($P < 0.05$), the Th1/Th2 ratio was significantly higher ($P < 0.001$), and the Th17/Treg ratio showed an upward trend in the CUMS group. **Conclusions** The C57BL/6J mouse model established by topical imiquimod combined with CUMS essentially simulates human AA manifestations. This method highlights the psychosomatic factors in AA pathogenesis, and to some extent, conforms to liver depression and spleen deficiency syndromes in TCM, providing a cultivation-friendly and more cost-effective modeling method for basic research of AA.

[Keywords] alopecia areata; animal model; stress; liver depression and spleen deficiency

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

斑秃 (alopecia areata, AA) 是一种常见的脱发疾病,临床以突发性斑片状脱发为特征,受累处皮肤无炎症及瘢痕。受累部位除头皮毛发外,也可累及身体其他多毛区域,如眉毛、睫毛、胡须、腋毛和阴毛。AA 患者常见的毛发镜特征包括黄点征、短毳毛、黑点征、锥形发、断发及感叹号样发等,其中感叹号样发为 AA 的特异性毛发镜表现,断发是 AA 活动期的标志^[1]。精神心理因素与 AA 的发生发展密切相关,而疾病的临床症状又带给患者巨大的精神心理负担,进一步加剧心理问题,形成恶性循环。

建立有效的动物模型对 AA 疾病的深入研究具有重要意义。目前建立斑秃动物模型的方法主要有以下五种:1994 年 Sundberg 等^[2]发现 C3H/HeJ 雌鼠可出现自发斑秃表现,与人类 AA 具有高度相似性,但其模型周期长、成功率低,5 月龄的 C3H/HeJ 雌鼠成功率仅为 0.25%,经过复杂的育种和长期培育,成功率为 20%,难以满足大多数实验需求;1998 年 McElwee 等^[3]发现通过移植自发 AA 的皮肤损全层皮肤到 10 周龄 C3H/HeJ 雌鼠,可以加速脱发表型的发生;2003 年 McElwee 等^[4]将自发 AA 小鼠的淋巴结细胞在 IL-7 和 IL-15 条件下培养后,通过移植到 C3H/HeJ 幼鼠可诱导 AA 表型,但此移植方法对技术要求高,并依赖于自发的 AA 小鼠,故在大规模应用上存在困难;2005 年 Gilhar 等^[5]发现静脉注射 IFN- γ 于 C3H/HeJ 小鼠可诱导出与人类相似的斑秃动物模型,但鼠源 IFN- γ 价格昂贵,并且有研究发现重复性不佳;2009 年杜佳等^[6]使用局部外

用咪喹莫特乳膏的方法,对四种品系小鼠 (BARB/c 小鼠、129 小鼠、C57BL/6 小鼠、C3H/HeJ 小鼠) 建立了稳定的脱毛模型,成功率近 100%,但未观察到毛囊周围明显炎症细胞浸润。

本研究以雌性 C57BL/6J 小鼠为研究对象,采用外用咪喹莫特模拟斑秃样皮损表现,同时联合慢性温和性不可预知应激 (chronic unpredictable mild stress, CUMS) 模拟不良精神心理因素所产生的应激,共同建立情志失畅、肝郁脾虚型的 AA 小鼠模型。实验以小鼠生物学表征变化、行为学表现、组织病理学改变及生化改变为观测指标,探讨 AA 样小鼠模型的建立。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

5 ~ 7 周龄,体重 16 ~ 20 g 的 SPF 级 C57BL/6J 雌性健康小鼠 30 只,购自北京维通利华实验动物技术有限公司【SCXK(京)2021-0006】,饲养于中日友好医院临床医学研究所 SPF 级别中心实验室【SYXK(京)2023-0001】,室温 22 ~ 25℃,相对湿度 50% ~ 70%,昼夜光照恒定 12 h/12 h,自由进食饮水,本实验获得中日友好医院实验动物福利伦理委员会审批 (zryhy21-21-07-03)。

1.1.2 主要试剂与仪器

咪喹莫特乳膏 (四川明欣药业有限责任公司); 凡士林 (山东利尔康医疗科技股份有限公司); $CD4^+$

T 细胞抗体 (Novus Biologicals, NBP2-46149); CD8⁺ T 细胞抗体 (Abcam, ab17147); Anti-CD4-PE-Cyanine5.5、Anti-IFN γ -FITC、Anti-IL-4-APC、Anti-IL-17A-FITC、Anti-CD25-4E3-PE、Anti-FOXP3-APC (ebioscience, Thermofisher Scientific)。

手持毛发镜 (FotoFinder); 小鼠束缚器、游泳桶、50 cm $\times$ 50 cm $\times$ 25 cm 旷场 (自制); 旷场实验分析仪 (上海欣软信息科技有限公司); 光学显微镜 (OLMPUS, BH-2); 低温高速离心机 (湖南湘仪离心机仪器有限公司, TG16 型); 水平离心机 (长沙英泰仪器有限公司, TD4A 型); 流式细胞仪 (BD, Calibur II 型)。

1.2 方法

1.2.1 实验动物分组及干预

小鼠适应性饲养 7 d 后进行实验。30 只 C57BL/6J 雌鼠随机分为空白对照组 (Control 组)、咪喹莫特组 (IMQ 组)、联合慢性温和性不可预知应激组 (CUMS 组), 每组 10 只。实验 1 ~ 11 d, Control 组及 IMQ 组无特殊处理; 12 d 开始 Control 组小鼠项背部 (不剃毛) 使用凡士林涂抹, IMQ 组和 CUMS 组使用咪喹莫特乳膏涂抹, 面积约 1.5 cm $\times$ 2 cm, 剂量约 0.15 g, 3 组均连续涂抹 7 d; 19 d 后停止涂抹, 观察小鼠脱毛情况。上述实验过程中, CUMS 组还需持续应激 21 d 制备 CUMS 模型, 应激因子包括倾斜鼠笼、潮湿垫子、夹尾、束缚、禁食水、频闪、游泳。实验第 21 天进行取材, 具体实验流程见表 1。

1.2.2 标本采集

于第 21 天对小鼠进行行为学测试, 随后对小鼠进行取材。小鼠麻醉后, 以眼眶静脉丛取血法采集小鼠外周静脉血, 置于 EDTA 抗凝管。选取背部皮肤, 面积约 2 cm $\times$ 2 cm, 置于组织固定液中充分浸泡, 准备石蜡包埋切片。

1.2.3 观测指标

(1) 表观及毛发镜情况

实验期间观察各组小鼠毛发光泽程度、精神状

态、活动情况、摄食情况等体征, 并在实验第 21 天拍摄宏观表征和毛发镜照片。

(2) 行为学改变情况

旷场实验 (OFT): 自制一个白色旷场, 长 $\times$ 宽 $\times$ 高为 50 cm $\times$ 50 cm $\times$ 25 cm, 将旷场底部平均分为 16 个正方形, 中间 4 个正方形作为旷场中心区域, 外周 12 个正方形作为旷场边缘区域。在避光安静环境中, 将小鼠放入旷场实验箱的边缘位置, 保证每只小鼠放入的角度位置相同, 在每只小鼠实验结束后及时清理排泄物, 并用乙醇进行消毒, 以防影响之后小鼠的实验结果。实验过程中使用分析仪记录小鼠 5 min 内的活动情况, 手动计数直立次数^[7]。

强迫游泳实验 (FST): 自制一个直径 20 cm、高 30 cm 的透明圆柱形玻璃桶, 容器内注入 15 cm 常温自来水。在实验过程中保持环境安静, 每只小鼠放入水中后适应 2 min, 用摄像设备记录之后 4 min 内小鼠静止不动的时间, 每只小鼠实验结束后均进行换水, 并擦干水分。

(3) 皮损 CD4⁺、CD8⁺ T 细胞免疫组化染色情况

①制备石蜡切片: 4%多聚甲醛溶液固定后, 将固定好的皮肤组织经梯度乙醇脱水, 在二甲苯中透明后用石蜡浸渍包埋, 注意将皮肤组织的横纵面分别包埋, 然后使用切片机进行 4 μ m 的连续切片, 切好的玻片置于 75 $^{\circ}$ C 烤箱中过夜。

②免疫组化: 二甲苯浸泡脱蜡, 梯度乙醇复水后, 3% H₂O₂ 氧化 15 min, EDTA (pH = 9.0) 95 $^{\circ}$ C 水浴抗原热修复 40 min, 冷却至室温后加入 10% 山羊血清封闭。加入鼠抗 CD4⁺ T 细胞抗体 (1 : 150) 和鼠抗 CD8⁺ T 细胞抗体 (1 : 100), 4 $^{\circ}$ C 过夜后, 加入二抗, 室温孵育 1 ~ 2 h 后用 PBS 冲洗。DAB 溶液显色, 脱水, 封片。

(4) 流式细胞术检测外周血 Th1、Th2、Th17、Treg 细胞分化情况

小鼠全血样本加入 Ficoll 分离液, 2500 r/min

表 1 动物分组及干预方法

Table 1 Animal grouping and intervention methods				
分组 Groups	第 1 ~ 11 天 Day 1 ~ 11	第 12 ~ 18 天 Day 12 ~ 18	第 19 ~ 21 天 Day 19 ~ 21	第 21 天 Day 21
Control 组 Control group	无 None	外用凡士林 Topical vaseline	无 None	
IMQ 组 IMQ group	无 None	外用咪喹莫特 Topical IMQ	无 None	取材 Sampling
CUMS 组 CUMS group	CUMS	外用咪喹莫特 + CUMS Topical IMQ combined with CUMS	CUMS	

离心 15 min 后收集血清层和分离液层,细胞沉淀以 PBS 洗涤后室温反应 6 h,样本分为两管标记为 1 和 2,管 1 加入 5 μ L CD4 抗体,管 2 加入 5 μ L CD4 和 CD25 抗体,室温避光反应 30 min。离心沉淀后,管 1 加入 5 μ L IFN- γ 、IL4 和 IL17A 抗体,管 2 加入 5 μ L FoxP3 抗体,室温避光反应 30 min,使用流式细胞仪上机检测 Th1、Th2、Th17 和 Treg 细胞百分比。

1.3 统计学分析

采用 SPSS 22.0 软件对数据进行统计分析,数据均以平均值 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。两组间比较符合正态分布采用独立 *t* 检验,不符合正态分布则采用秩和检验,多组间比较采用单因素方差 (One-way ANOVA) 分析, *P* < 0.05 表示差异具有统计学意义。

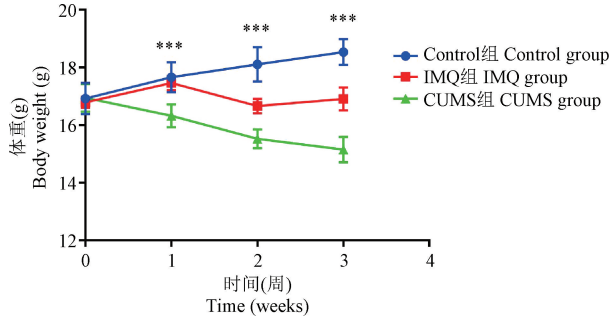
2 结果

2.1 小鼠表现及毛发镜情况

2.1.1 小鼠一般情况变化

实验开始时,3 组小鼠毛发均匀整齐、光泽柔顺,精神状态好,活动正常。实验第 1 周,CUMS 组小鼠毛发光泽柔顺度下降,精神不佳,活动减少。实验第 2 周,咪喹莫特组小鼠毛发逐渐凌乱,CUMS 组小鼠精神状态持续不佳,部分出现大便变稀。第 3 周,IMQ 组小鼠逐渐精神减退、体力状况下降,CUMS 组小鼠精神紧张。Control 组小鼠活动精神均正常。体重方面,Control 组小鼠体重逐渐增加,IMQ 组小鼠第 1 周体重逐渐增加,第 2 周体重有所降低,第 3 周体重较前增加。CUMS 组小鼠体重持续下

降,在第 2 周时体重下降最明显。从实验第 1 周起,各组小鼠体重相比,差异均有统计学意义 (*P* < 0.001) (图 1)。



注:各组间比较, *** *P* < 0.001。

图 1 小鼠体重变化情况

Note. Compared between groups, *** *P* < 0.001.

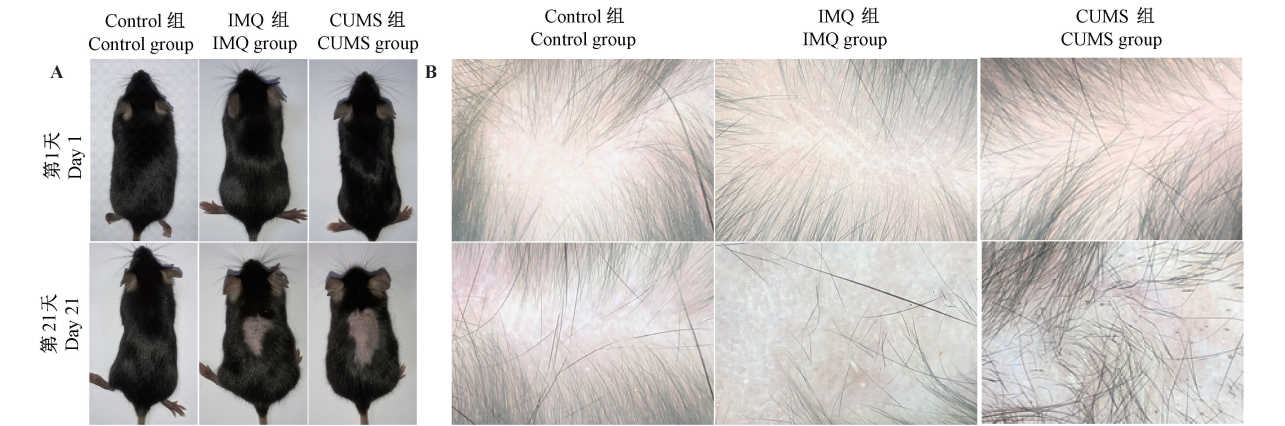
Figure 1 Body weight changes in mice

2.1.2 小鼠脱毛情况

实验第 1 天,3 组小鼠毛发光泽柔顺,肤色正常,无明显脱毛区域,毛发镜下可见生长期毛发。第 21 天,IMQ 组和 CUMS 组小鼠背部咪喹莫特涂抹区域毛发脱落,皮肤呈浅红色,皮肤镜下可见脱毛与正常毛发区域交界处断发,CUMS 组更为明显,更有感叹号样发、黑点征,部分小鼠皮损区域出现少许鳞屑 (图 2)。

2.2 小鼠行为学改变情况

旷场实验结果显示,小鼠移动距离方面,与 IMQ 组相比,Control 组小鼠移动距离无明显差异,CUMS 组小鼠 5 min 内移动距离明显减少,同时与 IMQ 组相比,也具有显著性差异,表明 CUMS 组小鼠自主活动能力降低。小鼠直立次数方面,与 IMQ 组相比,



注:A;毛发宏观改变;B;毛发镜改变。

图 2 各组小鼠毛发情况

Note. A. Hair overall changes. B. Hair trichoscopic changes.

Figure 2 Mice hair in each group

Control 组小鼠直立次数无明显差异,CUMS 组小鼠直立次数明显减少,同时与 IMQ 组相比,也具有显著性差异,表明 CUMS 组小鼠具有严重的焦虑抑郁情绪。小鼠进入中央区域次数方面,与 IMQ 组相比,Control 组小鼠进入中央区域次数较多,但无明显统计学意义,CUMS 组小鼠较 IMQ 组小鼠进入中央区域次数更少,差异具有显著性,表明 CUMS 组小鼠处于严重焦虑恐惧状态,探索能力降低(表 2)。

强迫游泳结果显示,与 IMQ 组相比,Control 组小鼠静止不动时间无明显差异,CUMS 组小鼠静止不动时间明显增加,表明小鼠产生绝望情绪。与

IMQ 组相比,CUMS 组小鼠静止不动时间同样具有显著性差异(表 2)。

2.3 小鼠皮损 CD4⁺、CD8⁺ T 细胞免疫组化染色情况

各组小鼠背部皮损的免疫组化染色结果显示,CUMS 组小鼠 CD4⁺、CD8⁺ T 细胞在毛囊周围及毛囊球部表达,较 Control 组及 IMQ 组染色更为明显,而 IMQ 组小鼠皮损毛囊周围 CD4⁺、CD8⁺ T 细胞表达较 Control 组无明显增加,表明外用咪喹莫特联合 CUMS 的应激方法较单纯外用咪喹莫特干预更促使毛囊周围淋巴细胞浸润,贴近 AA 的组织病理学改变(图 3)。

表 2 各组小鼠行为学改变情况($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 2 Mice behavioral changes in each group ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别 Groups	移动距离(m) Moving distance (m)	直立次数 Upright number	进入中央区域次数 Number of entries into central area	游泳静止时间(s) Swimming immobility time (s)
空白组 Control group	54.22 ± 15.84	22.88 ± 11.56	14.88 ± 6.58	82.96 ± 14.54
IMQ 组 IMQ group	49.49 ± 9.42	23.50 ± 5.76	11.63 ± 5.04	86.11 ± 23.15
CUMS 组 CUMS group	35.29 ± 6.32**	9.38 ± 5.18***	5.88 ± 2.48*	121.43 ± 24.50**

注:与 IMQ 组相比,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$,*** $P < 0.001$ 。(下图同)

Note. Compared with IMQ group,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$,*** $P < 0.001$. (The same in the following figures)

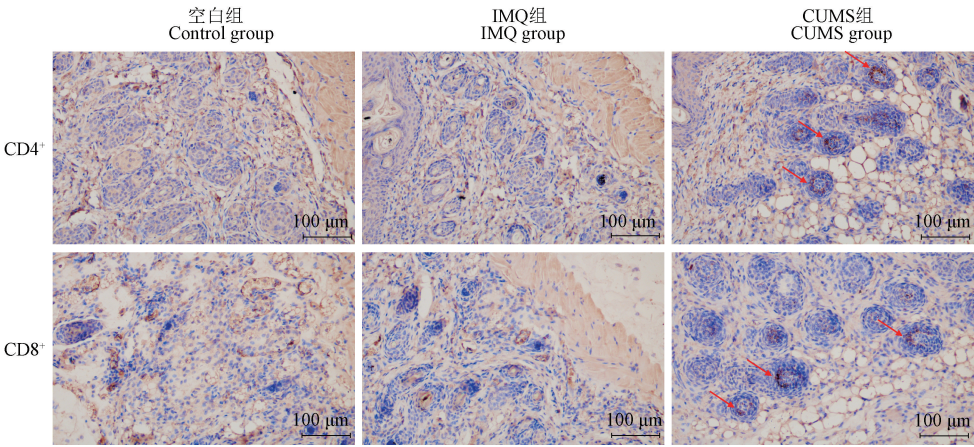


图 3 各组小鼠皮损 CD4⁺、CD8⁺ T 细胞免疫组化染色情况

Figure 3 Immunohistochemical staining of CD4⁺ and CD8⁺ T cells in skin lesions of mice in each group

2.4 小鼠外周血 Th1、Th2、Th17、Treg 细胞分化情况

与 IMQ 组相比,Control 组小鼠 Th1 细胞和 Th1/Th2 细胞比率显著较低。与 IMQ 组相比,CUMS 组小鼠 Th1 细胞显著升高($P < 0.01$),Th2 细胞显著降低($P < 0.05$),Th1/Th2 细胞比率显著

升高($P < 0.001$)(表 3)。

与 IMQ 组相比,Control 组小鼠 Th17 和 Treg 细胞水平,以及 Th17/Treg 细胞比率均显著较低。与 IMQ 组相比,CUMS 组小鼠 Th17 细胞显著升高($P < 0.05$),Treg 细胞有升高趋势,Th17/Treg 细胞比率较高,但无明显差异(表 4)。

表 3 小鼠外周血 Th1、Th2、Th17 和 Treg 细胞分化情况($\bar{x} \pm s$, %, $n = 6$)

Table 3 Differentiation of peripheral blood Th1、Th2、Th17 and Treg cells in mice ($\bar{x} \pm s$, %, $n = 6$)

组别 Groups	Th1	Th2	Th17	Treg	Th1/Th2	Th17/Treg
Control 组 Control group	1.27 ± 0.61 *	4.23 ± 1.07	0.13 ± 0.23 **	1.58 ± 0.61 ***	0.29 ± 0.11 **	0.10 ± 0.17 ***
IMQ 组 IMQ group	8.32 ± 4.48	3.32 ± 1.22	14.14 ± 5.04	6.71 ± 1.37	2.60 ± 1.33	2.15 ± 0.67
CUMS 组 CUMS group	23.30 ± 5.89 **	1.79 ± 0.58 *	20.09 ± 1.34 *	9.51 ± 2.81	13.99 ± 3.94 ***	2.28 ± 0.70

注:与 IMQ 组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。
Note. Compared with IMQ group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

3 讨论

咪喹莫特是一种免疫反应调节剂,可以增强先天性和获得性免疫反应,目前主要被广泛地应用于银屑病动物模型。赵恒光^[8]通过单独外用咪喹莫特建立了稳定高效的 C3H/HeJ 小鼠 AA 动物模型,进一步研究证实在 C57BL/6 等多品系小鼠中也可建立与人类 AA 类似的脱毛小鼠模型,其机制可能与咪喹莫特诱导激活毛囊周围的 TLR7 受体有关^[6]。

CUMS 是一种经典的抑郁症动物模型造模方法,通过各种应激因子模拟人类在日常生活中的不良应激事件,从而导致焦虑抑郁状态。而中医理论中情志异常、肝失疏泄的作用机制与病理性心理应激之间存在着密不可分的联系^[9]。因此,目前这一造模方法不仅应用于抑郁症的动物研究,而且越来越多地联合应用于各类肝郁气滞型疾病的动物模型。相较于其他心理应激造模方法,CUMS 中不同应激因子交替随机出现,可避免动物习惯性适应,更好地达到不可预知效果。

本研究运用咪喹莫特乳膏外用联合 CUMS 的造模方法,通过对比单独外用咪喹莫特乳膏,探讨建立一种更贴近中医理论肝郁脾虚型的 AA 小鼠模型。这种病证结合的动物模型更符合中医辨证论治的治疗理念,对中医药治疗 AA 的深入研究极为重要。

小鼠一般情况方面,CUMS 组出现大便稀溏、体重下降的情况,这与中医肝气乘脾土关系密切,肝气郁结导致脾运化失司,故而大便稀薄不成形。IMQ 与 CUMS 组小鼠体重均有所下降,可能与 IMQ 引起的免疫反应相关,其中 CUMS 应激会导致体重下降地更为明显,推测与应激刺激导致的食欲减退等有关。

动物行为学能够反映其精神心理状态。旷场

实验是一种测试小鼠自发活动行为和探索行为的行为学方法,主要通过观察小鼠运动行为的变化情况来判断认知能力、紧张度和兴趣度等。在实验过程中,对新异环境的恐惧会导致小鼠主要在旷场箱内周边区域活动,而好奇和探索心理会驱使小鼠在旷场中央区域活动^[10]。强迫游泳实验是一种测试小鼠是否处于绝望状态的行为学测试方法。当小鼠被置于圆柱形容容器内被迫游泳时,最初往往表现为挣扎剧烈、向上尝试逃脱容器,当尝试失败后便放弃挣扎,保持头部露出水面而肢体静止不动的状态,即“行为绝望”^[11]。本研究发现联合 CUMS 应激小鼠在 5 min 内在旷场的移动距离、直立次数和进入中央区域次数显著少于空白对照组和咪喹莫特组小鼠,在水中静止不动的时间显著长于另外两组,表明 CUMS 导致小鼠自发活动和探索行为减少,对周围事物好奇心减弱,容易陷入绝望状态,产生了明显的焦虑抑郁情绪,与先前的研究结果一致。

目前 AA 动物模型为病理性模型^[12],对其评价主要通过现代医学指标,包括表观指标、病理指标及生化指标等。宏观表征方面,通过 3 周的 CUMS 应激,发现 CUMS 组小鼠精神状态差,大便稀薄,体重较单独外用咪喹莫特组明显下降,毛发干枯脱落速度快、程度重,表明联合 CUMS 的造模方法促进小鼠出现情志异常、肝郁脾虚的表现。毛发镜表现方面,研究结果显示联合 CUMS 的造模方法较单独外用咪喹莫特乳膏,加速了小鼠毛发脱落,毛发镜下观察到更明显的人类 AA 的特征性改变,如断发、感叹号样发,证明联合 CUMS 的应激方法能够加快疾病的进展。吕晴^[13]的研究也证实了 CUMS 能较好模拟机体应激反应,可加重 AA 模型小鼠毛发脱落。

AA 的发病与免疫调节失衡密切相关,毛囊周围和毛囊内的 CD4⁺和 CD8⁺ T 细胞浸润是 AA 的特征性改变。本研究通过对小鼠皮损进行 CD4⁺、CD8⁺ T 细胞免疫组化染色,结果显示联合 CUMS 组

小鼠毛囊周围及毛囊球部 CD4⁺、CD8⁺ T 细胞浸润明显, 贴近 AA 的组织病理学改变。流式细胞结果显示 CUMS 组小鼠的 Th1 水平明显升高 ($P < 0.01$)、Th2 水平明显降低 ($P < 0.05$)、Th17 水平明显升高 ($P < 0.05$)、Th1/Th2 细胞比率明显升高 ($P < 0.001$)、Th17/Treg 比例有上升趋势, 据此推测 CUMS 的应激方法可加重小鼠的免疫调节紊乱, 进而加重脱毛。

4 结论

通过咪喹莫特乳膏外用联合 CUMS 的造模方法, 小鼠毛发脱落明显, 疾病进展快, 毛发镜下可见断发、感叹号样发, 行为学测试表现出明显的焦虑抑郁状态, 皮损中毛囊周围及毛囊球部 CD4⁺、CD8⁺ T 细胞浸润, 外周血 Th1、Th17 水平及 Th1/Th2 细胞比率明显升高, Th17/Treg 比例有上升趋势, Th2 水平明显降低, 与人类 AA 疾病改变相似。

由此可见, 咪喹莫特乳膏外用联合 CUMS 可诱导 C57BL/6J 小鼠建立 AA 样动物模型, 这种造模方法在先前研究基础上突出了 AA 发病机制中精神心理因素的作用, 一定程度上模拟了中医肝郁脾虚证的临床表现, 同时 C57BL/6J 小鼠较 C3H/HeJ 小鼠价格更低, 培育方便, 为 AA 提供了一种新的更具性价比的动物模型。

参 考 文 献 (References)

- [1] Zhou C, Li X, Wang C, et al. Alopecia areata: an update on etiopathogenesis, diagnosis, and management [J]. Clin Rev Allergy Immunol, 2021, 61(3): 403-423.
- [2] Sundberg JP, Cordy WR, King LE Jr. Alopecia areata in aging C3H/HeJ mice [J]. J Invest Dermatol, 1994, 102(6): 847-856.
- [3] McElwee KJ, Boggess D, King LE Jr, et al. Experimental induction of alopecia areata-like hair loss in C3H/HeJ mice using full-thickness skin grafts [J]. J Invest Dermatol, 1998, 111(5): 797-803.
- [4] McElwee KJ, Niyama S, Freyschmidt-Paul P, et al. Dietary soy oil content and soy-derived phytoestrogen genistein increase resistance to alopecia areata onset in C3H/HeJ mice [J]. Exp Dermatol, 2003, 12(1): 30-36.
- [5] Gilhar A, Kam Y, Assy B, et al. Alopecia areata induced in

- C3H/HeJ mice by interferon-gamma: evidence for loss of immune privilege [J]. J Invest Dermatol, 2005, 124(1): 288-289.
- [6] 杜佳, 赵恒光, 李惠. 咪喹莫特诱导多品系小鼠脱毛动物模型的建立 [J]. 重庆医科大学学报, 2009, 34(3): 307-309. Du J, Zhao HG, Li H. Establishment of alopecia animal model induced by imiquimod in multi-strain mice [J]. J Chongqing Med Univ, 2009, 34(3): 307-309.
- [7] Wang YL, Wang JX, Hu XX, et al. Antidepressant-like effects of albizflorin extracted from *Radix paeoniae alba* [J]. J Ethnopharmacol, 2016, 179: 9-15.
- [8] 赵恒光. 咪喹莫特诱导 C3H/HeJ 小鼠斑秃动物模型的建立及发病机理初步研究 [D]. 重庆: 重庆医科大学; 2007. Zhao HG. The establishment of the alopecia areata animal model induced by imiquimod with C3H/HeJ mice and its pathogenesis [D]. Chongqing: Chongqing Medical University; 2007.
- [9] 徐唱, 张启明, 徐茂青. 基于心理应激探讨肝主疏泄与神经退行性疾病的相关性 [J]. 环球中医药, 2021, 14(2): 230-235. Xu C, Zhang QM, Xu MQ. Study on the relationship between liver controlling dispersion and neurodegenerative diseases based on psychological stress [J]. Glob Tradit Chin Med, 2021, 14(2): 230-235.
- [10] 王泉宇, 宁银霞, 高杰. 情志病证动物模型评价方法综述 [J]. 中医药导报, 2016, 22(9): 92-95. Wang XY, Ning YX, Gao J. A review of model evaluation methods of emotional disease [J]. Guid J Tradit Chin Med Pharm, 2016, 22(9): 92-95.
- [11] 牛晨旭, 郝瀚, 张海林. 啮齿类动物抑郁症模型的行为学检测方法 [J]. 河北医科大学学报, 2015, 36(3): 370-372. Niu CX, Hao H, Zhang HL. Behavioral detection method of rodent depression model [J]. J Hebei Med Univ, 2015, 36(3): 370-372.
- [12] 苗明三, 李欢, 苗艳艳, 等. 斑秃动物模型制备规范(草案) [J]. 中药新药与临床药理, 2018, 29(1): 42-46. Miao MS, Li H, Miao YY, et al. Standard specification for animal models of alopecia areata (draft) [J]. Tradit Chin Drug Res Clin Pharmacol, 2018, 29(1): 42-46.
- [13] 吕晴. 慢性温和非预期应激加重斑秃模型小鼠脱毛及其机制的探讨 [D]. 苏州: 苏州大学; 2015. Lv Q. The mechanism of alopecia areata model mice aggravated by chronic mild unpredictable stress [D]. Suzhou: Soochow University; 2015.

[收稿日期] 2023-03-09