



· 论 著 ·

# 丙酸氯倍他索对咪喹莫特诱导银屑病小鼠的活性研究

刘 青 王俊杰\* 赵 敏 ( 湘南学院 湖南郴州 423000 )

**摘要：**目的 本研究通过建立咪喹莫特 (Imiquimod, IMQ) 诱导的银屑病小鼠模型研究丙酸氯倍他索 (clobetasol propionate, CLO) 的抗银屑病活性研究。**方法** BALB/c 雌性小鼠 50 只, 随机分为正常对照组 (Normal control 组)、IMQ 组、IMQ + CLO (55mg/只) 组, 每组 10 只, 耳朵和背部涂抹给药 9 天。采用药物诱导的方法激发小鼠皮肤出现银屑病样的变化。通过小鼠皮肤病损的 (PASI) 评分来观察银屑病样小鼠模型皮损的变化情况, 剪取小鼠背部皮肤组织制作 H&E 染色病理切片并观察, 密切监测小鼠体重及整个试验中小鼠的一般状况。**结果** 咪喹莫特诱导的动物模型小鼠耳朵和背部皮肤出现红斑、表皮肥厚、鳞屑成层等现象; CLO 处理组银屑病模型的症状得到明显改善, 银屑病样皮损减轻, PASI 评分降低, 角化不全现象得到改善, 表皮厚度明显薄于模型组。体重结果显示 CLO 对小鼠体重无明显影响。**结论** 丙酸氯倍他索对咪喹莫特诱导小鼠银屑病样皮损有较好的治疗作用。

**关键词：**丙酸氯倍他索 银屑病 咪喹莫特

**中图分类号：**R758.63 **文献标识码：**A **文章编号：**1009-5187 (2018) 09-004-03

**基金项目：**湘南学院校级科研课题 (2015XB22), 郴州市科技计划项目 (czkj 2016022)

## The study of clobetasol propionate on Imiquimod - Induced Psoriasis mice

**Abstract :** **Objective** In our study, we established an Imiquimod (IMQ)- Induced Psoriasis mice to examined the effect of clobetasol propionate (CLO) in psoriasis. **Methods** Female BALB/c mice (n = 30) were randomly separated into three groups (n = 10), such as Normal control group, IMQ group, IMQ + CLO (55 mg/ singleton) group. These mice were either treated with IMQ or CLO on ears as well as the back skin for 9 consecutive days. The lesions were evaluated according to the psoriasis area and severity index (PASI). The back histology was analyzed by hematoxylin and eosin staining. Meanwhile, the body weight of the mice was measured every day, and changes in body weight were monitored. **Results** The ears and the back skin of the Imiquimod-induced mouse model appear symptom of erythema, skin thickening, scaly layering, etc. After the administration of CLO, the psoriasis symptoms and psoriasis-like lesions is significantly alleviated. PASI score was decreased, parakeratosis phenomenon is improved, and the epidermal thickness was significantly thinner than the IMQ group. Our results also indicated that CLO did not affect the body weight of the mice. **Conclusion** CLO manifested therapeutic effect on psoriasis like lesions as well as improve the symptoms.

**Key words :** clobetasol propionate, psoriasis, Imiquimod

银屑病, 俗称牛皮癣, 是一种慢性免疫性皮肤病普遍症状是伴有红色、有鳞的斑块, 银屑病易反复, 病程长, 关节型还可累及大小关节, 给患者带来极大的痛苦<sup>[1]</sup>。

银屑病的治疗主要包括药物治疗, 物理疗法, 生物制剂<sup>[2]</sup>。外用药物主要为糖皮质激素、维 A 酸、维生素 D3 衍生物、角质促成剂、角质松解剂、钙调磷酸酶抑制剂、氟尿嘧啶等<sup>[3]</sup>。目前银屑病尚无有效的根治方法, 因此银屑病的长期治疗需要寻找更科学、更安全、更经济的方法<sup>[4]</sup>。

丙酸氯倍他索软膏是一种较好的治疗银屑病的糖皮质激素, 作用机制属非特异性。对于不同病因引起及不同阶段的炎症都有卓越的抑制作用。抑制表皮角质形成细胞和 T 细胞增殖以及白细胞趋化, 还有免疫抑制作用<sup>[5]</sup>。起效快, 患者依从性好, 治疗银屑病疗效显著<sup>[6]</sup>。但此类糖皮质激素类药物使用时间较长, 容易产生副作用。如长期使用可能会抑制免疫, 降低机体防御功能, 诱发或加重感染等一系列不良反应<sup>[7,8]</sup>。目前国内外关于丙酸氯倍他索对于 IMQ 诱导的银屑病小鼠的活性以及作用机制并无详细的报道, 因此我们用该模型研究丙酸氯倍他索对于银屑病小鼠活性, 为今后继续研究 CLO 的具体作用机制以及临床合理应用提供依据。

### 1 材料与方法

#### 1.1 实验动物

SPF 级 BALB/c 小鼠, 雌性, 6-7 周龄, 体重 (18±2)g, 购自湖南斯莱克实验动物有限公司, 许可证号 SCXK (湘) 2016-0002。动物饲养于 23-25℃ 恒温动物房, 每天明暗交替 12h, 自由饮食。适应性饲养一周后进行实验。

#### 1.2 实验仪器及试剂

小鼠饲养笼; 饲养水瓶; 动物剃毛器; 电子秤; 显微镜; 玻片; 手术器械; 相机; 移液枪。咪喹莫特 (IMQ, 四川明欣药业有限公司); 丙酸氯倍他索 (CLO, 福元药业股份有限公司) 水合氯醛, 乌拉坦 (国药集团化学试剂有限公司, 分析纯; 多聚甲醛 (美国 Sigma 公司, 纯

度 98%)。

#### 1.3 动物模型的建立以及分组及给药

根据参考文献利用咪喹莫特建立动物模型<sup>[9]</sup>。模型制备方法: 选取小鼠背部中央皮肤 2cm×3cm 的面积用剃毛器小心剃毛, 脱毛。两天后每日给小鼠选中背部皮肤及耳朵涂抹咪喹莫特 65mg/只, (其中背部 55mg, 双耳 10mg), 持续造模 9 天。造模第一天开始, 将小鼠随机分为三组: Normal control 组、IMQ 组、IMQ + CLO (55 mg/只, 其中背部 45 mg, 双耳 10 mg) 组。其中 IMQ 组、IMQ + CLO (55 mg/只) 组每天上午给咪喹莫特, 四小时后 IMQ + CLO (55 mg/只) 组给 CLO 55mg 每只小鼠, IMQ 组不做任何处理, Normal control 组一直不做任何处理为正常对照组, 整个实验持续 9 天, 期间每日监测小鼠体重变化。

1.4 小鼠银屑病样皮损面积和疾病严重程度 (psoriasis area and severity index, PASI) 评分

固定一个同学专门依据 PASI 评分标准给予小鼠皮损处红斑 (erythema)、鳞屑 (scales) 及浸润增厚程度 (thickness) 0~4 的积分, 将三者积分相加得到总分, 对小鼠进行记录打分 (此学生对于分组情况并不知情)。PASI 评分标准如下: 0 无; 1 皮肤红, 鳞; 2 轻度红斑, 屑; 3 显著红斑, 屑; 4 极重度。对每组小鼠积分取平均值后绘制趋势线, 观察各组小鼠皮损的变化情况。

#### 1.5 取材与形态学检测

用 IMQ 和 CLO 处理小鼠 9 天后, 于第 9 天晚上给小鼠断食但不断水。第 10 天给银屑病小鼠称重并且进行 PASI 打分, 10% 水合氯醛腹腔注射麻醉小鼠, 麻醉后给小鼠耳部和背部皮肤拍照, 迅速解剖小鼠, 剪取各组小鼠耳朵及背部皮肤用于苏木精-伊红 (H&E) 染色观察皮肤组织学改变。所检皮肤于 4% 多聚甲醛固定后取材, 接着经梯度酒精脱水石蜡包埋, 切片 4-5 微米, 苏木精-伊红染色, 用 NIKON Eclipse Ci 光学显微镜拍照观察, 照片为 100 倍、200 倍。

#### 1.6 统计学处理



实验数据采用 Excel 和 GraphPad Prism 5.0 软件分析, 实验结果采用 Mean $\pm$ SD 值表示。对于多组之间的比较, 采用 student's T test (双尾) 进行统计学分析,  $P<0.05$  认为有显著性差异,  $P<0.01$  认为有非常显著性差异。

## 2 结果

### 2.1 体重变化结果

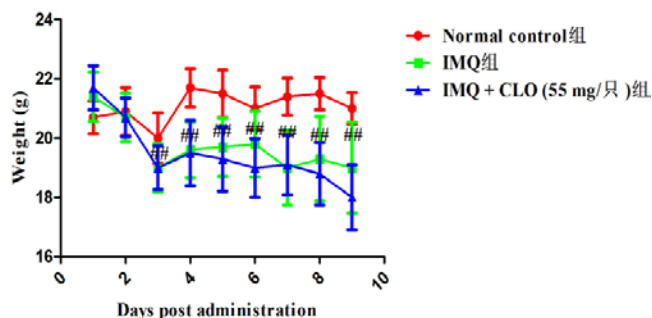
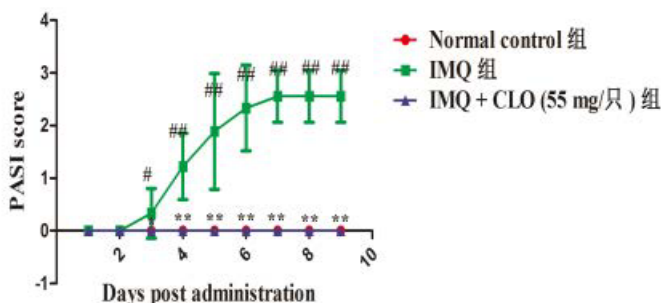


图1: 小鼠体重变化

A



B



图2: 小鼠背部皮损表现

注: # 指模型组与正常对照组比较, # 为  $P<0.05$ , ## 为  $P<0.01$ , \* 指 IMQ+CLO 组与模型组相比, \* 为  $P<0.05$ , \*\* 为  $P<0.01$ 。

### 2.3 H&E 结果观察

H&E 染色切片显示, 正常对照组小鼠皮肤表皮细胞仅 2~3 层、排列规则, 表皮嵴和乳头平坦; 咪喹莫特诱导小鼠银屑病样模型组表皮增厚, 角质层增厚见角化不全, 颗粒层变薄, 棘层肥厚表皮嵴延长, 并且在表皮层出现大量炎症细胞浸润呈现明显银屑病样改变。CLO 处理组小鼠相对于模型组小鼠, 在病理改变方面有显著性差异, 使表皮变薄, 其处理后小鼠皮肤表皮没有明显病理变化以及炎症反应见图3。

## 3 讨论

银屑病是一种常见的以表皮过度增殖和炎症为特征的红斑鳞屑性皮肤病, 病程较长, 易复发, 严重者可发生一系列并发症, 如累及心血管和肝脏等<sup>[1,10]</sup>。银屑病的发病机制复杂, 外用药物疗法是主要疗法, 最常用是糖皮质激素, 具有抗炎和抑制细胞增殖的作用, 丙酸氯倍他索软膏是应用最广的药物。但是糖皮质激素类药物的有效剂量一般较大, 易产生副作用。长期使用可能会发生毛细血管扩张、停药“反跳”以及激素依赖性皮炎等不良反应<sup>[3,7]</sup>。

注: # 指模型组与正常对照组比较, # 为  $P<0.05$ , ## 为  $P<0.01$ 。

实验过程中对动物体重进行监测, 实验结果如图1示, 造模前3天小鼠可能由于随机分组还没有熟悉周边环境和同伴, 所有组别小鼠体重均有轻微下降, 但在造模第四天空白组小鼠体重回升, 与空白组相比 IMQ 组小鼠体重明显下降,  $P<0.01$ , 有非常显著性差异, 表明 IMQ 能使小鼠体重明显降低。与 IMQ 组相比, CLO 处理组小鼠体重波动非常小,  $P>0.05$  无显著性差异。

### 2.2 CLO 对 IMQ 诱导的银屑病小鼠皮肤损伤的影响

PASI 评分结果显示: 各组小鼠皮损积分的变化如图2A, 与对照组相比, 涂抹 IMQ 后模型组皮肤即出现红斑鳞屑类似银屑病样皮损, 随着 IMQ 作用积蓄, 模型组皮损日益严重。CLO 处理组小鼠皮损与模型组相比皮损症状明显减轻, 皮肤较光滑, 几乎没有鳞屑, 红斑, 浸润增厚较轻。

小鼠背部皮肤和耳朵照片显示, 正常对照组小鼠皮肤光滑, 与对照组相比 IMQ 组背部皮损处见红斑, 上覆片状银白色鳞屑, 耳朵厚度增加, 红斑以及鳞屑明显, CLO 处理组皮损与模型组相比皮损症状明显减轻, 鳞屑稀少, 浸润增厚较轻, 见图2B。

咪喹莫特诱导的小鼠银屑病样模型是近年广泛被采用的一种动物模型<sup>[11]</sup>, 我们利用此小鼠模型研究丙酸氯倍他索抗银屑病活性, 并进行后续研究<sup>[12,13]</sup>。本研究表明: (1) 与正常对照组小鼠比较使用 IMQ 外涂小鼠背部皮肤和耳朵, 皮肤出现红斑鳞屑等银屑病症状, 并且导致小鼠体重明显降低, 而丙酸氯倍他索对小鼠体重几乎没有影响, 并且使得咪喹莫特银屑病模型的皮损得到明显改善, 银屑病样皮损状态显著减轻甚至无, PASI 评分明显降低, 角化不全现象得到良好改善。

综上所述, 丙酸氯倍他索在治疗银屑病小鼠时, 具有显著抗银屑病活性, 给药方便, 且治疗活性较高, 疗效显著。但是丙酸氯倍他索是糖皮质激素类药物, 会抑制免疫系统, 且长期使用可能导致其他不良反应。因此, 为了更加安全, 有效, 合理地使用糖皮质激素治疗银屑病, 探究丙酸氯倍他索软膏治疗银屑病的药理活性是十分必要的。我们后续将在现有的研究基础上做更为深入的研究, 进一步研究丙酸氯倍他索抗银屑病作用机制以及其不良反应机制, 为其临床合理应用提供切实依据与指导。



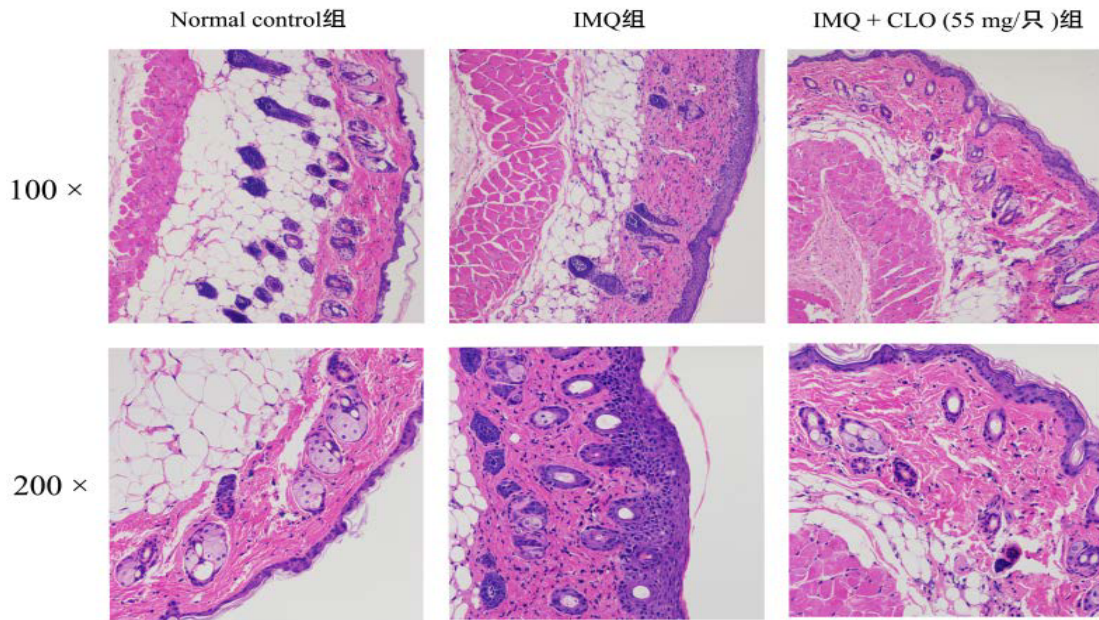


图 3: 病理检测结果 (100×, 200×H&amp;E)

### 参考文献

- [1] 张建中. 银屑病的流行病学与危险因素[J]. 实用医院临床杂志, 2013, (01):4-6.
- [2] 杨益平. 银屑病治疗用抗体药物研发近况[J]. 药学进展, 2017, (01):71-76.
- [3] 陈卓, 杨洁, 毕廷民, et al. 银屑病治疗的研究进展[J]. 中国煤炭工业医学杂志, 2017, (05):612-616.
- [4] 徐嵩森. 寻常型银屑病治疗现状评价[J]. 中国卫生产业, 2015, (27):69-71.
- [5] 张培, 单葵. 银屑病外用药物治疗进展[J]. 中国药房, 2015, (17):2446-2448.
- [6] 王建国, 顾艳丽, 王欣. 复方丙酸氯倍他索软膏治疗寻常型银屑病临床疗效观察[J]. 中国卫生标准管理, 2015, (05):247-248.
- [7] 黄俊俊, 王洁. 寻常型银屑病滥用激素后致脓疱型银屑病 1

例[J]. 中国医药科学, 2012, (04):179, 183.

[8] 李俊丽. 银屑病治疗现状及进展[D]. 重庆医科大学, 2013.

[9] 孙敏, 宋向凤, 胡华, et al. 熊果酸对咪喹莫特诱导的小鼠银屑病样皮损的影响[J]. 中国皮肤性病学杂志, 2016, (12):1233-1237.

[10] Lowes M A, Bowcock A M, Krueger J G. Pathogenesis and therapy of psoriasis[J]. Nature, 2007, 445(7130): 866-873.

[11] 周兆坤, 周广明. 银屑病的治疗进展[J]. 医学综述, 2014, (02):291-294.

[12] 赵京霞, 鹿婷婷, 王燕, et al. 5 种常用药物对咪喹莫特诱导小鼠银屑病样皮损模型形成的影响[J]. 中国皮肤性病学杂志, 2014, (03):234-238, 259.

[13] 钟淇滨, 祝曙光, 陆少君, et al. 和厚朴酚对咪喹莫特诱导小鼠银屑病的干预作用[J]. 中国药理学通报, 2018, (05):626-631.

(上接第 3 页)

心力衰竭不仅给人们的生活质量带来巨大影响, 而且严重地威胁着人们的生命, 慢性心力衰竭是大多数心血管疾病的最终归宿, 也是其主要死亡原因。研究表明<sup>[4]</sup>: 心肌重构是导致心衰发生发展的基本机制。而细胞因子系统(主要包括交感-肾上腺素能系统和肾素-血管紧张素系统即 SAS 和 RAS、神经内分泌系统的激活是影响心室重构的主要因素<sup>[5]</sup>。随着循证医学发展, 慢性心衰的治疗目标在 20 世纪 90 年代以来发生了变化, 不仅仅为改善症状、提高生活质量, 而更重要的是防止和延缓心肌重构的发展<sup>[9]</sup>, 针对心肌重构的机制进行治疗, 以有效降低心衰的死亡率和住院率。因此也产生了新的治疗模式, 即神经内分泌综合调控模式。

持续的交感神经激活是促使心力衰竭进展以及恶化的重要因素,  $\beta$  受体阻滞剂是一类常用于心衰治疗的药物, 其可以显著抑制交感神经的激活, 其中比索洛尔属于高度选择性  $\beta_1$  受体阻断剂, 其无内源性拟交感活性, 在一般剂量范围也无膜稳定作用, 与阿替洛尔和美托洛尔比较具有更强的选择  $\beta_1$  受体阻断作用, 其能抑制交感神经兴奋, 降低儿茶酚胺浓度, 降低心衰患者的心率和血压, 改善左心室功能、逆转心脏重构, 且能降低 34% 的死亡率以及 44% 的猝死率<sup>[6]</sup>。

本次研究表明, 联合用药组的心脏功能复常时间、心电图表现复常时间及临床用药方案实施时间明显少于对照组和单独用药组, 在出

院时及出院六个月后, 三组的左心功能比较, 联合用药组患者的左心功能情况明显优于单独用药组与对照组, 且联合组显效、有效及总有效率显著高于单独用药组, 差别有统计学意义。综上所述, 芪苈强心胶囊联合比索洛尔应用于心力衰竭患者的疗效显著, 对患者左心功能有明显改善, 促进患者康复, 值得临床进一步推广和研究。

### 参考文献

[1] 施青山. 中老年人慢性心衰 143 例临床分析[J]. 中国健康月刊, 2010(11):108-110.

[2] 刘飞. 厄贝沙坦氢氯噻嗪联合美托洛尔治疗老年重症心力衰竭的临床效果[J]. 中外医疗, 2013, 32(14):113.

[3] 陈志刚, 张永莉, 刘辉等. 厄贝沙坦氢氯噻嗪早期联合美托洛尔治疗老年心力衰竭 76 例[J]. 中国老年学杂志, 2013, 33(2):399-400.

[4] Owcar K J, Jasinska M, Drood J, et al. Concomitant administration of simvastatin with invadradine in contrast slowing of heart rate in normocholesterolemic rats[J]. Arch Med Sci, 2012, 8(3):549-545.

[5] 黄瑛, 张代富. 大剂量螺内酯对老年慢性心力衰竭患者心功能和血浆脑钠肽的影响[J]. 中华老年医学杂志, 2011, 30(10):827-829.

[6] 任丽萍. 老年重症心力衰竭急诊内科治疗效果分析[J]. 中国医药导刊, 2011, 13(12):2143.