



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 106546723 A

(43) 申请公布日 2017. 03. 29

(21) 申请号 201510604540. 5

(22) 申请日 2015. 09. 22

(71) 申请人 咎秀芳

地址 741000 甘肃省天水市秦州区莲亭路
68 号

(72) 发明人 咎秀芳

(51) Int. Cl.

G01N 33/53(2006. 01)

权利要求书1页 说明书3页

(54) 发明名称

一种不同证候的雄激素性脱发患者的诊断方法

(57) 摘要

一种不同证候的雄激素性脱发患者的诊断方法,用免疫组织化学法检测和对比其秃发区与正常非秃发区 AR 水平,测定方法每张切片在 Leica 图像分析仪系统上,采用光学显微镜观察,并以 HE 染色切片作对照。

1. 一种不同证候的雄激素性脱发患者的诊断方法,用免疫组织化学法检测和对比其秃发区与正常非秃发区 AR 水平,测定方法每张切片在 Leica 图像分析仪系统上,采用光学显微镜观察,并以 HE 染色切片作对照;阳性结果判定:细胞浆或细胞核出现棕黄色颗粒为阳性,与阴性对照片染色一致的为阴性;采用百分数法计数:每个皮肤结构如表皮、汗腺等随机取 4 ~ 66 个高倍镜视野,每张涂片记数 500 个以上同类细胞,计算选取视野中组化染色阳性细胞的百分比。

一种不同证候的雄激素性脱发患者的诊断方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种不同证候的雄激素性脱发患者的诊断方法,具体地说是一种不同证候的雄激素性脱发患者的诊断方法。

背景技术

[0002] 目前公知的雄激素性脱发 (androgenetic alopecia, AA), 又称男性型脱发、脂溢性脱发、弥散型秃发。迄今, AA 的病因及发病机理已证明与雄激素及其受体有关。但对于大部分 AA 患者, 其血液中的雄激素水平并无异常。因此, 目前对受损头皮局部雄激素受体 (androgen receptor, AR) 数量的检测已引起研究者的关注。AR 属于甾体激素受体超家族, 它是一种转录因子, 只有 AR 存在的靶组织细胞才能使雄激素发挥其生物功能。

发明内容

[0003] 诊断标准:

1. 研究对象:A. 一般资料;病例共 80 例,皮肤科诊断为 AA 的患者,均为男性;年龄 21~49 岁,平均 31.33 岁;病程 1~20 年,平均 6.75 年。对照组 32 例,来源于本院神经外科的手术患者和头部瘢痕植发患者的正常头皮组织,共 32 例,均为男性;年龄 20~48 岁,平均 30.88 岁。80 例 AA 患者中医辨证分为两型,脾胃湿热组 47 例,平均年龄 29.19 岁,病程平均 5.86 年;肝肾不足组 33 例,平均年龄 34.36 岁,病程平均 8.13 年。B. 诊断标准;参照《临床皮肤病学》和《中药新药临床研究指导原则》(第三辑)进行诊断和中医辨证分型。纳入标准;秃发组:(1)符合上述诊断标准;(2)年龄在 18~50 岁,男性;(3)近 3 个月未用性激素避孕药物者;(4)近 1 个月未经任何脱发治疗;(5)依从性好者。对照组:(1)年龄在 18~50 岁,男性;(2)近 3 个月未用性激素避孕药物者;(3)本人和家族均无 AA;(4)依从性好者。排除标准:(1)头部有其他皮肤疾患者;(2)有其他明显内分泌功能失调性疾病者;(3)其他疾病、药物、理化因素等引起的脱发者;(4)不合作或资料不全者。取材部位;秃发组取秃发区及后枕非秃发区全层头皮,部分患者取前额及头顶两个稀疏程度不同的脱发区。对照组取后枕手术切口头皮全层,标本经苏木素伊红 (HE) 染色证实为正常头皮组织,其他条件同秃发组。试剂来源 AR 的抗体(为即用型单克隆鼠抗人型 AR 抗体)、链霉菌抗生物素蛋白-过氧化物酶 (SP) 试剂盒和联苯二胺 (DAB) 显色试剂盒均为美国 DAKO 公司产品。C. 免疫组化方法;标本经 40g/L 的甲醛固定,石蜡包埋,切成 3 μ m 厚,经脱蜡、水化后,依次加入一抗 (AR 抗体)、生物素化的二抗、链亲和素-过氧化物酶溶液,以上各步骤间均以 0.01mol/L 磷酸盐生理盐水缓冲液 (PBS) (pH=7.2) 清洗 3 次。用新鲜配制的 DAB-H₂O₂ 显色,中性树脂封片。分别用已知阳性片作阳性对照,以 PBS 缓冲液代替一抗作阴性对照。E. 测定方法每张切片在 Leica 图像分析仪系统上,采用光学显微镜观察,并以 HE 染色切片作对照。阳性结果判定:细胞浆或细胞核出现棕黄色颗粒为阳性,与阴性对照片染色一致的为阴性。采用百分数法计数:每个皮肤结构如表皮、汗腺等随机取 4~66 个高倍镜视野,每张涂片记数 500 个以上同类细胞,计算选取视野中组化染色阳性细胞的百分比。统计学处

理方法 采用 SPSS 100 建立数据库及统计分析,显著性水平 $\alpha=0.05$ 。 2. 结果: AR 在表皮分布;角质层 AR 表达为阴性。颗粒细胞层、棘层、基底层 AR 表达均为阳性,AR 阳性细胞率从颗粒层至基底层逐渐增多,在颗粒层与棘层 AR 以细胞核阳性为主,基底层 AR 则以细胞浆阳性为主。AR 在真皮的分布 纤维母细胞、血管内皮细胞、神经组织、立毛肌 AR 呈阳性表达,皮下脂肪 AR 阴性。AR 在汗腺的分布 汗腺的排泄部、分泌部细胞核均有 AR 的分布,且排泄部 AR 阳性百分率高于分泌部。AR 在皮脂腺的分布 皮脂腺的基底细胞和腺细胞都有高水平的 AR 表达,且以核阳性为主。同一标本中,两种中医证型比较,脾胃湿热型 AA 患者的皮脂腺在形态上分叶增多、体积增大。AR 在毛囊的分布外毛根鞘基层和棘层 AR 染色均为阳性。以毛囊纵切面观察:毛囊漏斗部 AR 阳性表达与表皮分布和含量基本一致。峡部以下至毛小球部,外毛根鞘 AR 阳性百分率逐渐减少。毛乳头上有较高水平的 AR 表达,而内毛根鞘、毛干细胞和毛母质细胞染色均为阴性。秃发区毛乳头体积较非秃发区小,但细胞形态无明显变化。在秃发区和非秃发区,无论是缩小化的生长末期毛囊还是休止期毛囊,AR 的分布均一致。AR 阳性百分率的比较结果秃发区总体以及秃发区表皮、汗腺、皮脂腺、毛根鞘、毛乳头五个皮肤结构的 AR 阳性百分率均高于非秃发区和正常人对照组(均 $P < 0.01$),非秃发区总体以及上述部位 AR 阳性百分率与正常人对照组比较,差异无统计学意义(均 $P > 0.05$)。秃发区稀稠程度与 AR 关系 80 例秃发组中有 38 例在前额与头顶两个秃发程度不同区域各取了标本;经配对 t 检验,结果显示稀疏秃发区的总体 AR 阳性百分率、表皮与皮脂腺的 AR 阳性百分率与稠密秃发区比较,差异均有统计学意义。经相关性检验,各皮肤结构 AR 值高低与秃发区毛发稀稠程度存在相关性,即头发相对稠密的秃发区 AR 值低,头发相对稀疏的秃发区 AR 值高。脾胃湿热型患者秃发区 AR 阳性百分率在汗腺和皮脂腺比肝肾不足型高,差异有统计学意义(分别为 $t=2358, P=0.021$; $t=2878, P=0.005$),但在表皮、毛根鞘和毛乳头中的 AR 阳性百分率两种证型差异均无统计学意义($P > 0.05$),而在非秃发区,五个皮肤结构两种证型间 AR 阳性百分率的差异均无统计学意义($P > 0.05$)。

[0004] 发明目的:AA 是一种雄激素依赖的常染色体显性多基因遗传性秃发,雄激素(睾酮,特别是游离活性睾酮以及二氢睾酮)、毛囊单位的 AR、酶的活性、遗传易感性的秃发区头皮在 AA 发病中起着重要的作用。雄激素与受体结合,形成雄激素-受体复合物,后者进入细胞核,结合到基因位点特异的激素反应元件上,从而刺激或介导毛发生长的细胞内过程。对 AA 患者和正常人的血清睾酮水平进行了测定,发现两组间差异无统计学意义。通过研究也发现局部皮肤受体量与血清雄激素水平无相关性。因此,AA 患者毛囊单位的雄激素及其受体水平比血清更能反映 AA 本质。本研究通过对 80 例 AA 患者头皮秃发区 AR 检测并与自体、异体对比研究发现。秃发区、非秃发区以及正常人对照组头皮的表皮颗粒细胞层、棘层、基底层、汗腺、皮脂腺、毛根鞘、毛乳头均有 AR 的阳性表达,表明这些细胞是雄激素在皮肤的靶细胞。表皮角质层、真皮胶原纤维、皮下脂肪、内毛根鞘、毛干细胞和毛母质细胞染色则均呈阴性。

[0005] 技术方案:方法 将 80 例中医证型属脾胃湿热或肝肾不足两型的 AA 患者作为研究对象,用免疫组织化学法检测和对比其秃发区与正常非秃发区 AR 水平,并与 32 例正常人头皮组织的 AR 水平进行异体对照研究。测定方法每张切片在 Leica 图像分析仪系统上,采用光学显微镜观察,并以 HE 染色切片作对照。阳性结果判定:细胞浆或细胞核出现棕黄色颗粒为阳性,与阴性对照片染色一致的为阴性。采用百分数法计数:每个皮肤结构如表皮、

汗腺等随机取 4 ~ 66 个高倍镜视野,每张涂片记数 500 个以上同类细胞,计算选取视野中组化染色阳性细胞的百分比。

[0006] 发明有益效果:表皮颗粒细胞层、棘层、基底层、真皮纤维母细胞、血管内皮细胞、神经组织、立毛肌、汗腺、皮脂腺、毛根鞘、毛乳头 AR 表达均为阳性。而表皮角质层、皮下脂肪、内毛根鞘、毛干细胞和毛母质细胞染色均为阴性。AA 患者秃发区头皮总 AR 阳性细胞百分率以及表皮、汗腺、皮脂腺、毛根鞘、毛乳头五个皮肤结构中的 AR 阳性细胞百分率均高于非秃发区及正常人 ($P < 0.01$)。且各皮肤结构 AR 值高低与秃发区毛发稀稠程度存在相关性。脾胃湿热组患者秃发区汗腺、皮脂腺中以及总体 AR 阳性细胞百分率高于肝肾不足组 ($P < 0.05$),而表皮、毛根鞘、毛乳头上的 AR 表达在两组间差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。AR 与 AA 发病有关,局部 AR 含量的异常是 AA 的病因之一;不同中医证候的秃发患者秃发区的病理特征以及 AR 的数量也不同,脾胃湿热型患者头皮秃发区的 AR 表达总的要比肝肾不足的患者高。

[0007] 最佳实施方式:对患者进行干预治疗。

[0008] 创新之处:本项新型发明专利涉及一种不同证候的雄激素性脱发患者的诊断方法,祖国医学认为 AA 属于“发蛀脱发”、“蛀发癣”范畴。中医学认为本病的主要病因病机为:平素血热之体,复感风邪,郁久转年化燥,进而耗血伤阴,毛根失养,故发焦脱落;或脾胃运化失常,水湿内聚化热,致使湿热上蒸巅顶,侵蚀发根白浆,引起头发粘腻而脱落;或禀赋不足,思虑过度,劳伤肝肾,而致精血亏虚、肝肾不足,则发无生长之源,失于濡养而脱落。以上病因病机,近年来临床研究逐渐趋向主张把本病分为 3 型:血热生风型、脾胃湿热型和肝肾不足型。脾胃湿热型患者的头发光泽发亮,皮脂溢出较其他两证型多,我们的实验结果显示脾胃湿热型患者的皮脂腺分叶增多、丰满,体积增大;同时该型患者秃发区汗腺、皮脂腺的 AR 阳性细胞百分率较肝肾不足型患者高。脾胃湿热型 AA 患者秃发区的汗腺和皮脂腺细胞对雄激素比肝肾不足型更为敏感。这在一定程度上提示了中医辨证分型有其病理解剖结构变化的基础。

专利名称(译)	一种不同证候的雄激素性脱发患者的诊断方法		
公开(公告)号	CN106546723A	公开(公告)日	2017-03-29
申请号	CN201510604540.5	申请日	2015-09-22
[标]申请(专利权)人(译)	管秀芳		
申请(专利权)人(译)	管秀芳		
当前申请(专利权)人(译)	管秀芳		
[标]发明人	管秀芳		
发明人	管秀芳		
IPC分类号	G01N33/53		
CPC分类号	G01N33/53		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

一种不同证候的雄激素性脱发患者的诊断方法，用免疫组织化学法检测
和对比其秃发区与正常非秃发区AR水平，测定方法每张切片在Leica图像
分析仪系统上，采用光学显微镜观察，并以HE染色切片作对照。