

【THP-1 细胞光致敏评价方法的建立】

以细胞因子为研究指标的光致敏体外评价方法的建立

赵华琛^{1#}, 王 宇^{2#}, 黄舒佳², 姜 华², 董建欣³, 王庆利¹, 刘 丽^{2*}, 李 波^{2*}

1. 国家药品监督管理局 药品审评中心, 北京 100022

2. 中国食品药品检定研究院 国家药物安全评价监测中心, 北京 102629

3. 山东省食品药品检验研究院, 山东 济南 250201

摘 要: 目的 研究和建立以细胞因子水平变化作为评价指标的光致敏体外评价方法。方法 THP-1 细胞分别与光致敏剂 6-甲基香豆素 (6-MC) 和对氨基苯甲酸 (PABA)、光致敏剂兼光刺激剂硫氯酚 (bithionol)、光致敏兼皮肤致敏剂对苯二胺 (PPD) 和二苯甲酮 (BP)、单纯皮肤致敏剂盐酸双氯苯双胍己烷 (CHD) 和二硝基氯苯 (DNCB)、光刺激剂蒽 (anthracene) 和吖啶 (acridine)、皮肤刺激剂月桂基磺酸钠 (SDS)、阴性对照乳酸 (LA) 孵育 24 h, 与相应溶剂孵育作为对照组, 经光照射 ($1.7 \text{ mW} \cdot \text{cm}^{-2}$, 50 min) 或避光处理后, 细胞换液放入培养箱内继续培养 5 h。光刺激剂需在正式光照射前进行预照射 (在 SOL 500 人工太阳照射装置中照射 30 min, 然后避光放置 15 min) 处理。采用 Luminex 分析仪及多因子检测试剂盒分别检测细胞因子白细胞介素 (IL) -12/P40、IL-12/P70、IL-1 β 、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、IL-8、IL-18、IL-4 和 IL-13 水平的改变, 确定光致敏相关特异性细胞因子, 建立相应的光致敏体外评价方法。结果 光致敏剂与 THP-1 细胞孵育并经光照后, 与未照射组比较, 细胞裂解液+上清液中 IL-8 和 TNF- α 的含量均显著增加 ($P < 0.01$), 其中 IL-8 的增加幅度最大, 光致敏剂 6-MC、PABA、PPD 和硫氯酚照射与未照射组的 IL-8 水平比值均大于 10, TNF- α 水平比值均大于 1.5。光刺激剂吖啶和蒽细胞模型经过光直接照射后, IL-8 水平是未照射组的 10 倍以上, TNF- α 水平是未照射组的 1.5 倍以上; 经过预照射处理后, 其照射组与未照射组 IL-8 比值均下降到 10 以下, TNF- α 比值均下降到 1.5 以下。皮肤致敏剂 DNCB 和 CHD、皮肤刺激剂 SDS、阴性对照 LA 和对照组, 光照射与未照射组 IL-8 比值均小于 10, TNF- α 比值均小于 1.5。结论 在 THP-1 细胞模型中, IL-8 和 TNF- α 对于评价化合物光致敏性具有较好的特异性和灵敏度, IL-8 更优。

关键词: 光致敏; 体外评价方法; THP-1 细胞; 细胞因子; 白细胞介素-8; 肿瘤坏死因子- α

中图分类号: R965.1 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376 (2022) 01-0001-09

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2022.01.001

Establishment of an *in vitro* photosensitization evaluation method using cytokines evaluation indexZHAO Huachen¹, WANG Yu², HUANG Shujia², JIANG Hua², DONG Jianxin³, WANG Qingli¹, LIU Li², LI Bo²

1. Center for Drug Evaluation, National Medical Products Administration, Beijing 100022, China

2. National Drug Safety Evaluation and Monitoring Center, National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 102629, China

3. Shandong Institutes for Food and Drug Control, Jinan 250201, China

Abstract: Objective To establish an *in vitro* photosensitization evaluation method using cytokines as evaluation index. **Methods** THP-1 cells were treated with photosensitizers 6-methylcoumarin (6-MC) and P-aminobenzoic acid (PABA), photosensitizers and photostimulants Bithionol, photosensitizers and skin sensitizers p-phenylenediamine (PPD) and diphenylketone (BP), and pure skin sensitizers dichlorobenzidine hydrochloride (CHD) and dinitrochlorobenzene (DNCB), photostimulant anthracene and acridine, skin irritant sodium lauryl sulfonate (SDS), and negative control lactic acid (LA) were incubated for 24 h, and the corresponding solvent

收稿日期: 2021-06-04

基金项目: 国家“重大新药创制”科技重大专项(2018ZX09201017)

共同第一作者: 赵华琛, 男, 硕士, 研究方向为药品非临床有效性及安全性评价。E-mail: zhc0427@126.com

王 宇, 男, 学士, 研究方向为非临床药理学研究。E-mail: Wangyu@nifdc.org.cn

*共同通信作者: 刘 丽, 女, 博士, 主任药师, 研究方向为药物非临床安全性评价。E-mail: liuli@nifdc.org.cn

李 波, 男, 教授, 博士生导师, 研究方向为药物非临床安全性评价。E-mail: libo@nifdc.org.cn

group was used as the control group. After light irradiation ($1.7 \text{ mW} \cdot \text{cm}^{-2}$, 50 min) or light protection treatment, cells were placed into the incubator for further culture for 5 h. Photostimulant should be pre-irradiated before formal light exposure (30 min in SOL 500 artificial solar irradiation device, and then placed in dark for 15 min). Luminex analyzer and multifactor detection kit were used to detect the changes of cytokines interleukin (IL)-12/P40, IL-12/P70, IL-1 β , tumor necrosis factor- α (TNF- α), IL-8, IL-18, IL-4 and IL-13, respectively, to determine the photosensitization related specific cytokines. To establish an *in vitro* evaluation method for photosensitization. **Results** After incubation with the photosensitizers and exposure to light, the contents of IL-8 and TNF- α in the cell lysate and supernatant of THP-1 cells were significantly increased ($P < 0.01$), with the largest increase magnitude in IL-8. For the four photosensitizers, the ratios of IL-8 level in irradiation and non-irradiation groups were all greater than 10, and the ratios of TNF- α level in irradiation and non-irradiation groups were all greater than 1.5. The levels of IL-8 and TNF- α in acridine and anthracene cell models exposed to light were more than 10 times and 1.5 times higher than those in the unirradiated group. After pre-irradiation, the IL-8 ratio of the irradiated group and the unirradiated group decreased to less than 10, and the TNF- α ratio decreased to less than 1.5. Skin sensitizers DNCB and CHD, skin irritant SDS, negative control LA and control group, IL-8 ratio was less than 10 and TNF- α ratio was less than 1.5 in light irradiation and non-irradiation groups. Skin irritants and negative test substances did not cause significant changes in the levels of these two cytokines. **Conclusion** In the THP-1 cell model, IL-8 and TNF- α have good specificity and sensitivity for evaluating the photosensitivity of compounds, and IL-8 is better.

Key words: photoallergy; *in vitro* evaluation method; THP-1 cells; cytokines; interleukin-8; tumor necrosis factor- α

光致敏性是化合物在光照条件下引发的由免疫细胞介导的特殊皮肤过敏反应,属于迟发性IV型超敏反应。光照条件下,光致敏物能够诱发机体产生特异性免疫应答,进而刺激免疫细胞释放细胞因子、炎症因子,激活巨噬细胞和自然杀伤细胞等,同时引起以单核细胞浸润和组织损伤为主要特征的炎症反应。

一直以来,国内外主要采用传统的豚鼠光致敏试验^[1]进行药品和化妆品的光致敏性评价,随着动物福利和3R原则日益受到重视,国内外很多学者正在研究开发光致敏的体外评价方法^[2-4]。有研究显示,在光致敏反应中,白细胞介素(IL)-8、肿瘤坏死因子(TNF)- α 、IL-18、IL-1 β 等细胞因子表达发生变化^[5-7],并且细胞因子作为机体多种细胞经刺激合成、分泌的一类具有广泛生物学活性的小分子蛋白质,能够调节细胞生长、分化和效应,在调控免疫应答中发挥重要的功能^[8]。因此,本研究通过检测光照前后细胞因子的变化来探索建立以细胞因子为研究指标的光致敏体外评价方法。

1 材料

1.1 细胞

人急性单核白血病细胞 THP-1 (human acute monocytic leukemia cell line, 编号 3111C0001CCC00 0057),购自于国家试验细胞资源共享平台。

1.2 药物与主要试剂

受试物:光致敏剂 6-甲基香豆素(6-MC)、光致敏剂兼光刺激剂硫氯酚(bithionol)、单纯皮肤致敏剂盐酸双氯苯双胍己烷(CHD)和二硝基氯苯(DNCB)、光刺激剂蒽(anthracene)、皮肤刺激剂

月桂基磺酸钠(SDS)均购于美国 Sigma 公司;光致敏剂对氨基苯甲酸(PABA)、光致敏兼皮肤致敏剂对苯二胺(PPD)、阴性对照品乳酸(LA)均购于国药集团;光刺激剂吖啶(acridine)、光致敏兼皮肤致敏剂二苯甲酮(BP)均购于美国 Alfa 公司;无水乙醇和无菌注射用水由国家药物安全评价中心提供。

RPMI 1640 培养基和 PBS 缓冲液均购于美国 Hyclone 公司;胎牛血清(FBS)购于美国 Thermo Fisher 公司;青链霉素购于江苏凯基生物技术股份有限公司;二甲基亚砜(DMSO)购于美国 Sigma 公司。细胞因子检测用试剂:多因子检测试剂盒[预试验:粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)、 γ -干扰素(IFN- γ)、IL-12/P70、IL-1 α 、IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-8 和 TNF- α ;正式实验:IL-12/P40、IL-12/P70、IL-1 β 、TNF- α 、IL-8、IL-18、IL-4 和 IL-13]购于美国 Milliplex Catalog Merck Millipore 公司;细胞 RIPA 裂解液购于上海碧云天生物技术有限公司。

1.3 主要仪器

3740型离心机(日本KUBOTA公司);移液器(德国 Eppendorf 公司);HERAce II 型 CO₂ 细胞培养箱(美国 Thermo Fisher 公司);PB203-N 型电子天平(瑞士 METTLER 公司);SOL 500 人工太阳照射装置(日本国际协力机构);紫外辐照计(北京师范大学光电仪器厂);多功能液相芯片分析系统(美国 Luminex 公司);手持磁力架(美国 Millipore 公司)。

2 方法

2.1 细胞培养

复苏 THP-1 细胞转入 75 cm² 培养瓶中,加完全

培养基至 12 mL, 置 37 °C、5% CO₂ 培养箱中静置培养, 观察细胞的生长情况。

2.2 受试物浓度的选择

取对数生长期的 THP-1 细胞接种于 24 孔板, 调整铺板密度为 $1 \times 10^6 \cdot \text{mL}^{-1}$, 每孔 990 μL 。需要 2 块 24 孔板, 即 UVA 照射板及做避光处理的未照射对照板, 每块 24 孔板中应设不加任何受试物的单纯细胞孔作为对照组。将不同浓度的受试物与 THP-1 细胞共同孵育 24 h 后, 经光照射 $1.7 \text{ mW} \cdot \text{cm}^{-2}$ 50 min, 将细胞重新换液放入培养箱内继续培养。24 h 后用流式细胞术测定不同受试物浓度下的细胞存活率, 应用多因子检测试剂盒(预试验)检测细胞因子变化情况, 在保证细胞存活率 $\geq 75\%$ 的前提下, 最终选定与细胞作用的受试物浓度见表 1。

表 1 各受试物最终应用浓度

Table 1 Final application concentration of each test substance

类型	受试物	溶剂	应用终质量浓度/ ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)
光致敏	6-MC	无水乙醇	80
	PABA	无水乙醇	1 333
光刺激	吡啶	无水乙醇	0.1
	蒽	无水乙醇	0.04
单纯皮肤致敏	CHD	无水乙醇	4
	DNCB	无水乙醇	2.5
皮肤刺激	SDS	无菌注射用水	60
阴性对照	LA	无水乙醇	500
光致敏兼光刺激	硫氯酚	无水乙醇	8
光致敏兼皮肤致敏	PPD	无菌注射用水	2.5
	BP	无水乙醇	13

2.3 辐照强度的选择

取 3 块 24 孔板, 分别在每块板内加入 6-MC ($8 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, 10 μL) 与 THP-1 细胞 ($1 \times 10^6 \cdot \text{mL}^{-1}$, 每孔 990 μL), 每块板另设不加任何受试物的对照组, 放入培养箱内共同孵育 24 h。将 3 块板依次从培养箱内取出, 放到 SOL 500 人工太阳照射装置(波长范围 280~800 nm)中照射, 通过改变 24 孔板与光源的距离控制辐照强度, 用紫外辐照计确定 UVA 0.85、1.70、3.40 $\text{mW} \cdot \text{cm}^{-2}$ 3 种辐照强度, 分别照射 50 min, 照射完毕后将细胞进行换液, 重新放入 24 孔板内并放入培养箱内继续培养 24 h。将细胞从培养箱内取出, 进行流式检测。在保证细胞存活率 $\geq 75\%$ 的前提下, 选择了 $5 \text{ J} \cdot \text{cm}^{-2}$ 作为光照剂量, 即 UVA 辐照强度为 $1.7 \text{ mW} \cdot \text{cm}^{-2}$, 照射 50 min。

2.4 检测时间点的选择

在 24 孔板内加入受试物 6-MC ($80 \mu\text{g}/\text{mL}$) 与 THP-1 细胞 (每孔 1×10^6 , 每孔 990 μL), 放入培养箱内孵育 24 h。随后将 24 孔板从培养箱内取出, $1.7 \text{ mW} \cdot \text{cm}^{-2}$ 照射 50 min, 细胞换液后放入培养箱内继续培养。分别在光照后 2、5、10、24 h 采用 Luminex 分析仪及多因子检测试剂盒(预试验)进行多种细胞因子的检测。确定细胞因子出现显著表达的时间作为最佳检测时间点。

2.5 光致敏剂及其他受试物对 THP-1 细胞细胞因子表达影响的检测

在正式实验中对光致敏剂模型和其他多种化合物模型进行了细胞因子检测, 包括 Th1 型的细胞因子 IL-12/P40、IL-12/P70、IL-1 β 、TNF- α 、IL-8 和 IL-18, Th2 型的细胞因子 IL-4 和 IL-13, 以筛选出光致敏相关的特异性细胞因子。

2.5.1 受试物孵育 取对数生长期的 THP-1 细胞接种于 24 孔板, 调整铺板密度为 $1 \times 10^6 \cdot \text{mL}^{-1}$, 每孔 990 μL 。平行铺 2 块 24 孔板, 即 UVA 照射板及未照射板, 每块板均设不加任何受试物的单纯细胞孔。取出培养板, 加入已经配制好的受试物溶液(表 1), 每孔 10 μL (控制溶剂终浓度为 1%), 在 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养 24 h。在单纯细胞孔内加入等体积的溶剂(无水乙醇或注射用水)作为对照组。

2.5.2 预照射处理 光刺激剂与 THP-1 细胞孵育后, 经过光照同样会引起检测指标的升高, 为了将光致敏剂和光刺激剂进行鉴别, 需在正式光照前将光刺激剂溶液进行预照射处理, 具体操作为: 在 24 孔板内加入 990 μL 完全培养基和 10 μL 的光刺激剂, 混合后溶液浓度与最终应用浓度相同, 在 SOL 500 人工太阳照射装置中照射 30 min, 然后避光放置 15 min。取每孔 1×10^6 个 THP-1 细胞放入离心管中离心, 离心后去掉上清液, 将细胞沉淀与经过光照的光刺激剂溶液混合均匀, 接种到 24 孔板内。后续操作与其他受试物相同。

2.5.3 光照或避光处理 受试物与 THP-1 细胞在培养箱内孵育 24 h 后将培养板取出, 将照射组与未照射组细胞培养板分别进行光照或避光处理。光照结束后将细胞悬液混匀并转移至无菌 1.5 mL 的 EP 管中, $1\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min, 弃掉含有受试物的细胞上清液后, 加入 1 mL 细胞完全培养基重悬, 转移至 24 孔板内, 放入培养箱中继续培养 5 h。

2.5.4 样品裂解及预处理 将 24 孔板从培养箱内

取出,将各孔细胞依次转移至1.5 mL的EP管中并离心,然后将上清液分别转移至标记后的EP管内并放入-80 °C冰箱冷冻保存。将细胞沉淀用PBS打散并再次离心,弃掉PBS上清液后加入100 μ L细胞裂解液反复吹打,将细胞进行裂解,待充分裂解后,12 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心5 min,取细胞裂解后的上清液放入标记后的EP管内,于-80 °C冰箱冷冻保存,避免在测定前样品反复冻融。

2.5.5 细胞因子检测 分别取细胞上清及裂解液,采用luminex分析仪及多因子检测试剂盒(正式实验)细胞因子进行检测。

2.5.6 数据分析 培养液体积是1 mL,细胞裂解液体积是100 μ L,上清液和裂解液中细胞因子总量=裂解液中质量浓度 $\times$ 裂解液体积+培养液中质量浓度 $\times$ 培养液体积。

2.6 数据处理及统计方法

采用Luminex的MILLIPLEX Analyst分析软件对原始数据进行处理,采用IBM SPSS Statistics 20

软件,通过独立样本 t 检验对组间显著性差异进行统计,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用GraphPad Prism 6制作数据结果图。

3 结果

3.1 光照后适宜检测时间点的选择

预试验中,THP-1细胞与光致敏剂6-MC孵育24 h,并经光照,在照射后2、5、10、24 h时进行了10种细胞因子(GM-CSF、IFN- γ 、IL-12/P70、IL-1 α 、IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-8、TNF- α)的检测。结果显示,除IL-8、TNF- α 外,其他细胞因子表达水平很低或光照前后未见明显改变。

6-MC光致敏模型IL-8检测结果显示,在2、5、10、24 h时,未照射组的IL-8表达水平都很低,均低于12 $\text{pg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。与未照射组比较,照射组细胞上清液的IL-8水平显著性升高($P<0.01$),以5、10、24 h 3个时间点最为明显。在各时间点中,与未照射组比较,照射组细胞裂解液中IL-8水平均显著升高($P<0.01$),以2、5 h最为明显。结果见图1。

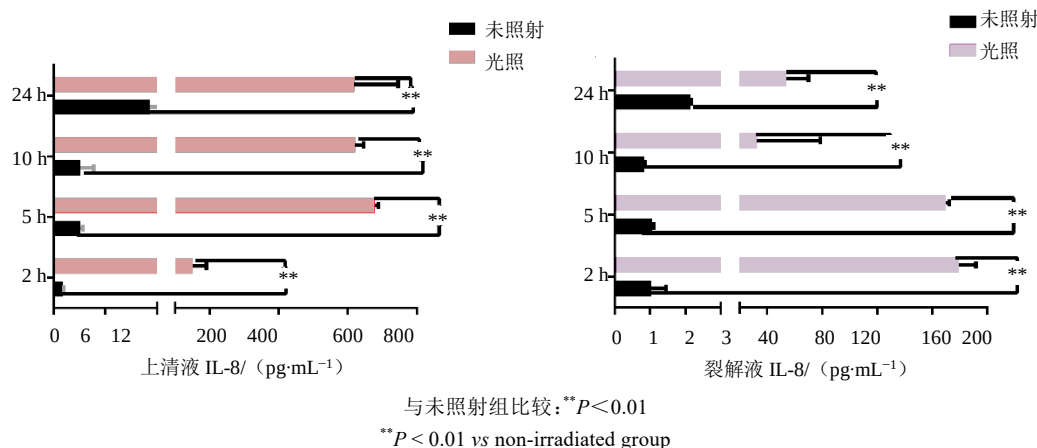


图1 6-MC细胞模型中不同检测时间点IL-8的测定结果($\bar{x} \pm s, n=4$)

Fig. 1 IL-8 determination results at different detection time points in 6-MC cell model($\bar{x} \pm s, n=4$)

6-MC光致敏模型TNF- α 的检测结果显示,在2、5 h时,照射组与未照射组比较,细胞上清液和细胞裂解液中TNF- α 水平均显著性升高($P<0.01$),5 h时更为明显。选定经光照后5 h作为细胞因子的检测时间点。结果见图2。

3.2 光致敏剂6-MC模型中多种细胞因子的测定

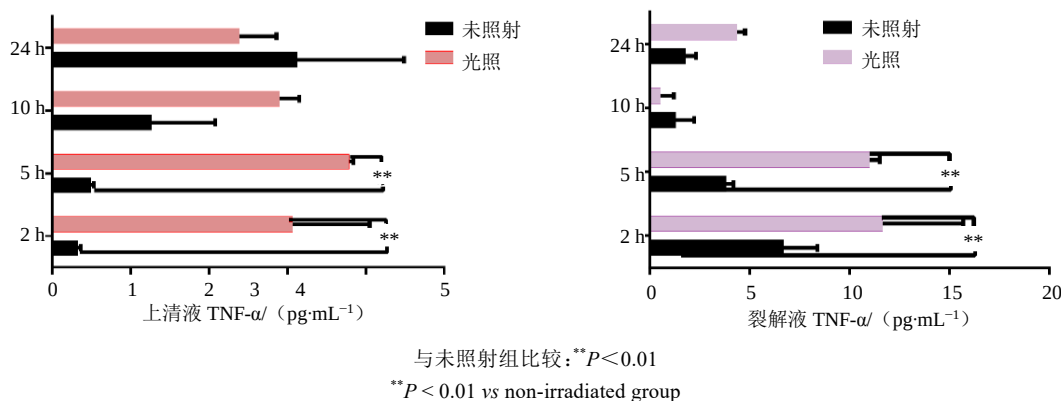
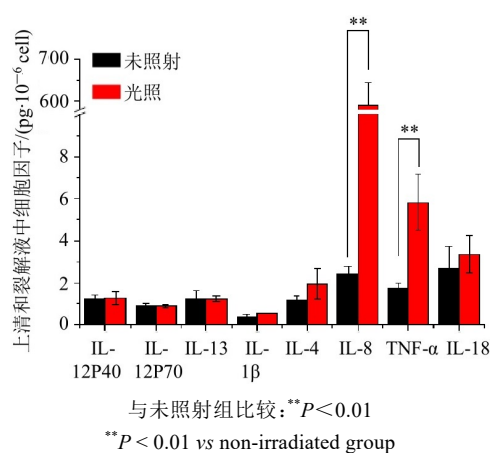
6-MC光致敏剂模型细胞裂解液与上清液中多种细胞因子的测定结果如图3所示,与6-MC孵育的THP-1细胞经过光照射后,IL-8、TNF- α 水平较未照射组显著性增高,分别是未照射组的243倍和3.3倍,其他6种细胞因子在照射前后的水平都很低。

3.3 光致敏剂及其他类型受试物对THP-1细胞IL-8表达的影响

各个模型照射组与未照射组、预处理照射组与预处理未照射组中IL-8水平测定结果见表2。

3.3.1 对照组IL-8水平 对照组光照射后IL-8水平与照射前相比增加,虽然在统计学上具有显著差异,但是升高的幅度不大(从4.37 $\text{pg}10^{-6}$ cell增加到12.49 $\text{pg}10^{-6}$ cell),说明THP-1细胞在接受一定剂量的光照射后产生IL-8水平增加,但变化程度较小。

3.3.2 光致敏剂6-MC和PABA细胞模型中IL-8的测定结果 THP-1细胞与光致敏剂6-MC孵育24 h后,与未照射组比较,照射组IL-8表达水平显著增

图2 6-MC细胞模型不同检测时间点TNF-α的测定结果($\bar{x} \pm s, n=4$)Fig. 2 TNF- α determination results at different detection time points in 6-MC cell model ($\bar{x} \pm s, n=4$)图3 6-MC细胞模型中多种细胞因子的测定结果($\bar{x} \pm s, n=4$)Fig. 3 Determination results of multiple cytokines in 6-MC cell model ($\bar{x} \pm s, n=4$)

加($P < 0.01$),从 $2.44 \text{ pg} \cdot 10^{-6} \text{ cell}$ 增加到 $591.99 \text{ pg} \cdot 10^{-6} \text{ cell}$,约为未照射组的243倍。在未照射条件下,6-MC组IL-8水平和对照组接近。

光致敏剂PABA细胞模型和6-MC具有一致的变化规律,照射组与未照射组比较IL-8整体表达水平显著增加($P < 0.01$),从 $2.45 \text{ pg} \cdot 10^{-6} \text{ cell}$ 增加到 $109.27 \text{ pg} \cdot 10^{-6} \text{ cell}$,增加的幅度小于6-MC,约为未照射组的45倍。在未照射条件下,PABA组IL-8水平和对照组接近。

3.3.3 光刺激剂吡啶和葱细胞模型中IL-8的测定结果 THP-1细胞分别与光刺激剂吡啶和葱孵育后,与未照射组比较,照射组IL-8表达水平均显著增加($P < 0.01$),分别约为未照射组的19和25倍。同时,本实验对2种光刺激剂分别进行了预照射处理,预处理照射组与直接照射组相比IL-8水平显著降低($P < 0.01$),虽然仍显著高于预处理未照射组($P < 0.01$),但增加幅度显著减小,并且接近对照组照射条件下的IL-8水平。

表2 细胞因子IL-8测定结果($\bar{x} \pm s, n=4$)Table 2 Determination results of cytokine IL-8 ($\bar{x} \pm s, n=4$)

组别	质量浓度/ ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	裂解液+上清液中IL-8水平/ ($\text{pg} \cdot 10^{-6} \text{ cell}$)	
		未照射	照射
对照	—	4.37 ± 0.15	$12.49 \pm 0.26^{##}$
6-MC	80	$2.44 \pm 0.34^{**}$	$591.99 \pm 52.09^{**\#\#}$
PABA	1 333	$2.45 \pm 0.56^{**}$	$109.27 \pm 10.81^{**\#\#}$
SDS	60	4.10 ± 1.10	$17.14 \pm 1.23^{***}$
LA	500	1.86 ± 0.06	$8.30 \pm 0.12^{##}$
DNCB	2.5	$57.91 \pm 3.16^{**}$	$419.77 \pm 29.99^{**\#\#}$
CHD	4	$11.74 \pm 2.39^{**}$	$49.32 \pm 7.14^{**\#\#}$
直接照射 硫氯酚	8	$2.49 \pm 0.44^{**}$	$70.42 \pm 5.48^{***}$
预照射 硫氯酚	8	3.15 ± 0.47	$56.42 \pm 8.65^{##\Delta}$
直接照射 吡啶	0.1	$2.65 \pm 0.32^{**}$	$49.50 \pm 6.02^{***}$
预照射 吡啶	0.1	2.64 ± 0.14	$25.78 \pm 2.17^{##\Delta\Delta}$
直接照射 葱	0.04	$2.43 \pm 0.50^{**}$	$61.26 \pm 8.12^{***}$
预照射 葱	0.04	3.14 ± 0.38	$16.63 \pm 2.29^{##\Delta\Delta}$
BP	13	4.13 ± 0.51	$32.95 \pm 4.79^{***}$
PPD	2.5	3.46 ± 0.73	$58.14 \pm 5.73^{***}$

与相同照射条件下对照组比较: $^{**}P < 0.01$;与同组未照射比较: $^{##}P < 0.01$;与同组直接照射比较: $^{\Delta\Delta}P < 0.01$

$^{**}P < 0.01$ vs control group under same irradiation conditions;
 $^{##}P < 0.01$ vs same group without irradiation; $^{\Delta\Delta}P < 0.01$ vs same group of direct irradiation

3.3.4 皮肤致敏剂DNCB和CHD细胞模型中IL-8的测定结果 皮肤致敏剂模型与其他模型不同,在未经光照射条件下,皮肤致敏剂DNCB模型IL-8水平即显著高于对照组($P < 0.01$),约为对照组的13倍;经光照射后,IL-8水平虽有上升,但仅为未照射组的7倍,远远低于6-MC光致敏模型的变化幅度。

致敏剂CHD模型具有和DNCB模型一致的变化趋势,未照射组IL-8水平是对照组的2.7倍,经过

光照射后 IL-8 水平为未照射组的 4.2 倍。CHD 模型在引起 IL-8 增加的幅度要低于 DNCB 模型。

3.3.5 皮肤刺激剂 SDS 和阴性对照 LA 组 IL-8 的测定结果 皮肤刺激剂 SDS 模型、阴性对照 LA 在未照射和照射条件下的结果均与对照组相近。

3.3.6 兼有光致敏和光刺激作用的硫氯酚细胞模型中 IL-8 的测定结果 受试物硫氯酚同时具有光致敏和光刺激作用,经过光直接照射后,与未照射组比较,IL-8 水平显著增加($P < 0.01$),约为未照射组的 28 倍。经过预处理后,预处理照射组 IL-8 水平仍显著高于预处理未照射组 IL-8 水平($P < 0.01$),但二者比值降低为 18,并且显著低于直接照射组($P < 0.05$)。

3.3.7 兼有光致敏和皮肤致敏作用的 BP、PPD 细胞模型中 IL-8 的测定结果 受试物 BP 和 PPD 同时具有光致敏和皮肤致敏作用。与未照射组比较,经过光直接照射后的 THP-1 细胞 IL-8 水平均显著增加($P < 0.01$),BP 约增加为未照射组的 8 倍,PPD 约为 17 倍。但二者在未经光照射时,IL-8 水平与对照组相比均未见明显差异。

3.4 光致敏剂及其他化合物细胞模型 TNF- α 的测定结果

各个模型的照射组与未照射组、预处理照射组与预处理未照射组中 TNF- α 水平测定结果见表 3。

3.4.1 对照组 TNF- α 的测定结果 对照组在经光照射后,TNF- α 水平与照射前比较增加,虽然有统计学上的显著性差异($P < 0.01$),但是升高的幅度不大(从 $3.55 \text{ pg} \cdot 10^{-6} \text{ cell}$ 增至 $4.63 \text{ pg} \cdot 10^{-6} \text{ cell}$),说明 THP-1 细胞在接受一定剂量的光照后 TNF- α 水平会发生一定的变化,但变化程度很小。

3.4.2 光致敏剂 6-MC 和 PABA 细胞模型中 TNF- α 的测定结果 THP-1 细胞与 6-MC 孵育 24 h 后,经过光直接照射,与未照射组比较,TNF- α 整体表达量显著增加($P < 0.01$),约为未照射组的 3.3 倍。PABA 和 6-MC 具有一致的变化规律,照射组相比未照射组 TNF- α 整体表达水平显著增加($P < 0.01$),约为未照射组的 3.8 倍。

3.4.3 光刺激剂吡啶和葱细胞模型中 TNF- α 的测定结果 THP-1 细胞分别与光刺激剂吡啶、葱孵育后,与未照射组相比,经过光直接照射后,THP-1 细胞的 TNF- α 整体表达水平均显著增加($P < 0.01$),分别为未照射组的 1.8 倍和 2.0 倍。对 2 种光刺激剂分别进行了预照射处理,发现预处理照射组与直接照射组相比 TNF- α 的整体水平显著降低($P <$

表 3 细胞因子 TNF- α 测定结果 ($\bar{x} \pm s, n=4$)

Table 3 Determination results of cytokine TNF- α ($\bar{x} \pm s, n=4$)

组别	质量浓度/ ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	裂解液+上清液中 TNF- α 水平/ ($\text{pg} \cdot 10^{-6} \text{ cell}$)	
		未照射	照射
对照	—	3.55 ± 0.10	$4.63 \pm 0.48^{##}$
6-MC	80	1.75 ± 0.25	$5.81 \pm 1.34^{##}$
PABA	1 333	1.53 ± 0.01	$5.86 \pm 0.22^{##}$
SDS	60	3.80 ± 0.45	$1.74 \pm 0.55^{##}$
LA	500	1.80 ± 0.99	2.52 ± 0.36
DNCB	2.5	2.78 ± 0.16	2.34 ± 0.19
CHD	4	2.65 ± 0.29	2.96 ± 0.33
硫氯酚	8	3.26 ± 0.50	$9.49 \pm 0.49^{##}$
预照射 硫氯酚	8	4.02 ± 0.14	$7.86 \pm 0.63^{##\Delta}$
吡啶	0.1	3.62 ± 0.39	$6.67 \pm 0.88^{##}$
预照射 吡啶	0.1	3.43 ± 0.14	$4.16 \pm 0.17^{\Delta\Delta}$
葱	0.04	2.65 ± 0.14	$5.44 \pm 0.79^{##}$
预照射 葱	0.04	3.51 ± 0.42	$3.88 \pm 0.22^{\Delta\Delta}$
BP	13	3.56 ± 0.75	3.80 ± 0.53
PPD	2.5	3.45 ± 0.26	$10.34 \pm 1.46^{##}$

与同组未照射比较: $^{##}P < 0.05$ $^{###}P < 0.01$; 与同组直接照射比较: $\Delta P < 0.05$ $\Delta\Delta P < 0.01$

$^{#}P < 0.05$ $^{##}P < 0.01$ vs same group without irradiation; $\Delta P < 0.05$ $\Delta\Delta P < 0.01$ vs same group of direct irradiation

0.01),与预处理未照射组和对照组相比则无显著性差异。

3.4.4 皮肤致敏剂 DNCB 和 CHD 细胞模型中 TNF- α 的测定结果 DNCB、CHD 模型在光照射和未照射条件下,THP-1 细胞 TNF- α 水平的表达并无明显差异,且与对照组水平接近。

3.4.5 阴性对照 LA 和皮肤刺激剂 SDS 细胞模型中 TNF- α 的测定结果 皮肤刺激剂 SDS 模型、阴性对照 LA 在未照射和照射条件下,细胞因子 TNF- α 的结果均与对照组接近。

3.4.6 兼有光致敏和光刺激作用的硫氯酚细胞模型中 TNF- α 的测定结果 受试物硫氯酚同时具有光致敏和光刺激作用,经光直接照射后,与未照射组相比,TNF- α 水平显著增加($P < 0.01$),约为未照射组的 2.9 倍,经过预处理后,预处理照射组 TNF- α 水平仍显著高于预处理未照射组,但二者比值降低为 1.96 倍,并且显著低于直接照射组水平($P < 0.05$)。

3.4.7 兼有光致敏和皮肤致敏作用的 BP、PPD 细胞模型中 TNF- α 的测定结果 受试物 BP、PPD 同时具

有光致敏和皮肤致敏作用,经光直接照射后,与未照射组相比,PPD模型TNF- α 水平显著增加($P < 0.01$),BP未有显著性差异。二者在未经光照射时,TNF- α 水平与对照组相比均无明显差异。

3.5 THP-1 细胞模型照射与非照射细胞因子表达水平的比值

不同受试物的THP-1细胞模型经光照射后,照射组与未照射组的IL-8比值见图4,TNF- α 比值见图5。

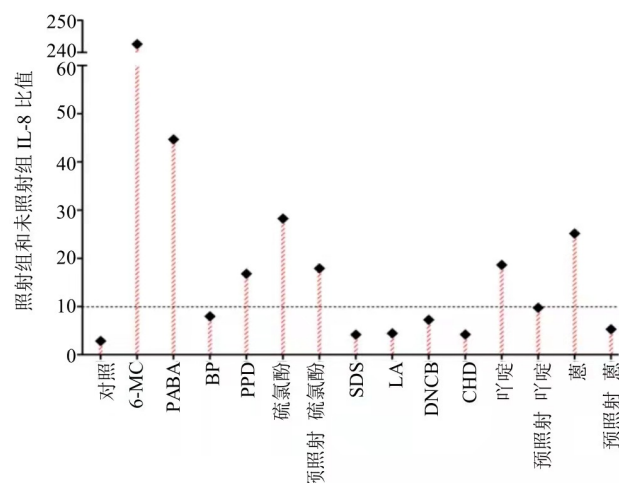


图4 与不同类别化合物孵育后THP-1细胞在照射组和未照射组中IL-8比值结果

Fig. 4 IL-8 ratio of THP-1 cells incubated with different compounds in irradiated and non-irradiated group

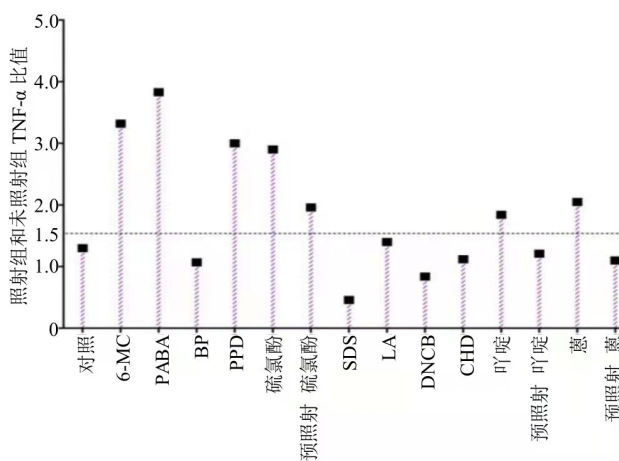


图5 与不同类别化合物孵育后THP-1细胞照射组和未照射组TNF- α 比值

Fig. 5 TNF- α ratio of THP-1 cells incubated with different compounds in irradiated and non-irradiated group

除光致敏剂BP外,光致敏剂6-MC、PABA、PPD和硫氯酚细胞模型光照射与未照射组IL-8比值均在10以上。光刺激剂吡啶和葱细胞模型经过光直接照射后,IL-8水平是未照射组的10倍以上,经过

预照射处理后,其照射组与未照射组IL-8比值均下降到10以下。皮肤致敏剂DNCB和CHD、皮肤刺激剂SDS、阴性对照LA和对照,照射组与未照射组IL-8比值均小于10。

除光致敏剂BP外,光致敏剂6-MC、PABA、PPD和硫氯酚细胞模型照射组与未照射组TNF- α 比值均大于1.5。光刺激剂吡啶和葱细胞模型经过光直接照射后,TNF- α 水平是未照射组的1.5倍以上,经过预照射处理后,其照射组与未照射组TNF- α 比值均下降到1.5以下。皮肤致敏剂DNCB和CHD、皮肤刺激剂SDS、阴性对照LA和细胞对照,照射组与未照射组TNF- α 比值均小于1.5。

4 讨论

细胞因子是由免疫细胞(如单核细胞、巨噬细胞等)和某些非免疫细胞(内皮细胞、表皮细胞、纤维母细胞等)经刺激而合成、分泌的一类具有广泛生物学活性的小分子蛋白质。细胞因子通过结合相应受体调节细胞生长、分化和效应,调控免疫应答。THP-1是一种单核白血病细胞株,具有与树突状细胞相类似的一般性质,THP-1细胞能分泌的细胞因子包括IL-1 β 、IL-6、IL-8、IL-12、TNF- α 、IFN- γ 、GM-CSF等。目前在皮肤致敏相关研究发现,皮肤致敏剂可以引起THP-1细胞培养上清中IL-8、IL-1 β 、IL-6、TNF- α 、IL-4分泌显著增加^[9-13]。有研究显示,当接触性致敏物诱导朗格汉斯细胞(LC)活化后,不仅会上调其细胞表面标志物的表达,同时也会促进某些细胞因子表达增加,如TNF- α 、IL-1 β 、IL-8^[14-16]。在光照后检测时间点的探索试验中,在光致敏剂6-MC模型检测了包含IL-8、TNF- α 等在内的10种细胞因子,发现经过光照射后IL-8的变化最为显著,因此在该模型中进行了光照后2、5、10、24 h多个时间点IL-8的变化检测。6-MC模型在照射后5 h时上清和裂解液中IL-8均有非常显著的变化,因此,最后确定在各模型中光照后5 h进行细胞因子的检测。在正式实验中,选择了IL-12P40、IL-12P70、IL-1 β 、TNF- α 、IL-8、IL-18、IL-4和IL-13共8种细胞因子来进行光致敏特异性细胞因子的筛选。通过检测,只有IL-8和TNF- α 在各个光致敏剂模型中有明显变化。其他细胞因子表达均较低或在照射前后没有显著性变化,因此在本研究中,仅报告和讨论对IL-8和TNF- α 在多种类型化合物中进行初步验证的结果。

IL-8是一种作用广泛的趋化因子,它与多种炎症疾病的发生发展密切相关,能够活化T淋巴细胞、

嗜酸性粒细胞、嗜碱性粒细胞和单核细胞^[17]。许多研究证实化学致敏物能够引起肿瘤细胞培养上清中IL-8水平的显著增加^[18-19]。本研究在光致敏剂模型中发现THP-1细胞中IL-8的含量显著增加,与之前的许多致敏性研究结果相类似^[20-21]。本研究中,未给予任何受试物的对照组在进行光照射后,IL-8水平与照射前相比增加,但升高的幅度很小,说明THP-1细胞在接受一定剂量的光照射后也会出现IL-8水平小幅度的增加。因此在研究中除了考察照射后IL-8水平比照射前是否有显著性增加,也引入另一个重要评价指标,即光照后与未照射组IL-8水平的比值。

光刺激剂模型在直接照射组中IL-8水平升高,可能是其诱导活性氧(reactive oxygen species, ROS)生成对THP-1细胞作用的结果,在预处理照射组中IL-8水平显著降低,是通过预照射处理消除了ROS的影响。在光致敏剂兼光刺激剂硫氯酚模型中,经光照射后IL-8水平与未照射组相比显著增加,这是受试物光致敏性和光刺激性共同作用的结果。而经过预照射处理后的预处理照射组与原直接照射组相比,IL-8水平有所下降,但仍显著大于预处理未照射组,并且比值大于10,这是经过预处理照射后,消除了光刺激性对细胞的作用,但其本身的光致敏作用未受影响。这个模型的结果验证了前述单独光致敏剂和单独光刺激剂的结果。另外对于同时具有光致敏性和光刺激性的化合物,也可以用本实验的方法进行评价和鉴别。

对于皮肤致敏剂DNCB、CHD模型,在未经光照射条件下,THP-1细胞IL-8的表达即比对照组显著增加。经过光照射后,皮肤致敏剂模型IL-8水平继续升高,但增加的幅度远远低于6-MC和PABA光致敏模型的变化幅度,照射与未照射组的IL-8比值均小于10。因此可以通过进行未照射和照射条件下的检测以及光照射后IL-8增加的幅度对光致敏剂和皮肤致敏剂进行鉴别。

综合不同类型化合物细胞模型的结果,暂将照射前后IL-8表达量比值大于10作为受试物光致敏性阳性的判定标准。本实验中化合物模型数量有限,因此需要在将来的研究中扩大模型进行进一步验证。

TNF- α 同样是一类重要的促炎因子,在LC细胞成熟和迁移的过程中发挥了重要的作用^[22],能够增强单核细胞、巨噬细胞、NK细胞以及T细胞的细胞毒性效应,许多研究发现TNF- α 在过敏性接触性皮

炎患者中显著高表达。在本研究中,发现TNF- α 在各类化合物模型中具有和IL-8相似的变化规律,但其在光致敏剂照射组与未照射组的表达比值明显小于IL-8。因此在受试物光致敏性的判定上,TNF- α 的灵敏度相对较低,需要在后续的研究中进一步验证。

本研究建立了以细胞因子为研究指标的THP-1细胞光致敏体外评价方法。在本实验系统中,发现照射条件下IL-8表达水平变化是评价化合物光致敏性的较好指标,具有较好的灵敏度和特异性。本研究中建立的化合物光致敏体外评价方法需要进一步在更多化合物中进行验证。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 杨文祥, 孙凡中, 王 成, 等. 豚鼠皮肤光过敏试验方法的建立 [J]. 中国比较医学杂志, 2011, 21(7): 67-70.
Yang W X, Sun F Z, Wang C, et al. Establishment of the skin photosensitization study method in Guinea pigs [J]. Chin J Comp Med, 2011, 21(7): 67-70.
- [2] Chipinda I, Ruwona T B, Templeton S P, et al. Use of the human monocytic leukemia THP-1 cell line and co-incubation with microsomes to identify and differentiate hapten and prohaptens sensitizers [J]. Toxicology, 2011, 280(3): 135-143.
- [3] 赵华琛, 淡 墨, 刘 丽, 等. 光敏性评价体外替代方法的研究进展 [J]. 中国新药杂志, 2017, 26(21): 2510-2515.
Zhao H C, Dan M, Liu L, et al. Evaluation method of photosensitivity and the research progress on *in vitro* alternative methods [J]. Chin J New Drugs, 2017, 26(21): 2510-2515.
- [4] Karschuk N, Tepe Y, Gerlach S, et al. A novel *in vitro* method for the detection and characterization of photosensitizers [J]. PLoS One, 2010, 5(12): e15221.
- [5] Galbiati V, Martínez V, Bianchi S, et al. Establishment of an *in vitro* photoallergy test using NCTC2544 cells and IL-18 production [J]. Toxicol Vitro, 2013, 27(1): 103-110.
- [6] Martínez V, Galbiati V, Corsini E, et al. Establishment of an *in vitro* photoassay using THP-1 cells and IL-8 to discriminate photoirritants from photoallergens [J]. Toxicol Vitro, 2013, 27(6): 1920-1927.
- [7] Ulrich P, Homey B, Vohr H W. A modified murine local lymph node assay for the differentiation of contact photoallergy from phototoxicity by analysis of cytokine expression in skin-draining lymph node cells [J]. Toxicology, 1998, 125(2/3): 149-168.
- [8] 张 力, 吕凤林. 树突状细胞与趋化因子激活免疫应答

- 的分子机制 [J]. 中国实用医药, 2007, 2(6): 38.
- Zhang L, Lü F L. The molecular mechanism of dendritic cells and chemokines activating immune response [J]. China Pract Med, 2007, 2(6): 38.
- [9] Takahashi T, Kimura Y, Saito R, et al. An *in vitro* test to screen skin sensitizers using a stable THP-1-derived IL-8 reporter cell line, THP-G8 [J]. Toxicol Sci, 2011, 124(2): 359-369.
- [10] Mitjans M, Galbiati V, Lucchi L, et al. Use of IL-8 release and p38 MAPK activation in THP-1 cells to identify allergens and to assess their potency *in vitro* [J]. Toxicol Vitro, 2010, 24(6): 1803-1809.
- [11] Takahashi T, Kimura Y, Saito R, et al. An *in vitro* test to screen skin sensitizers using a stable THP-1-derived IL-8 reporter cell line, THP-G8 [J]. Toxicol Sci, 2011, 124(2): 359-369.
- [12] Murayama T, Ohara Y, Obuchi M, et al. Human Cytomegalovirus induces interleukin-8 production by a human monocytic cell line, THP-1, through acting concurrently on AP-1 and NF-kappaB-binding sites of the interleukin-8 gene [J]. J Virol, 1997, 71(7): 5692-5695.
- [13] Coquette A, Berna N, Vandenbosch A, et al. Analysis of interleukin-1 α (IL-1 α) and interleukin-8 (IL-8) expression and release in *in vitro* reconstructed human epidermis for the prediction of *in vivo* skin irritation and/or sensitization [J]. Toxicol Vitro, 2003, 17(3): 311-321.
- [14] Migdal C, Tailhardat M, Courtellemont P, et al. Responsiveness of human monocyte-derived dendritic cells to thimerosal and mercury derivatives [J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2010, 246(1/2): 66-73.
- [15] de Smedt A C A, van den Heuvel R L, van Tendeloo V F I, et al. Phenotypic alterations and IL-1 β production in CD34⁺ progenitor- and monocyte-derived dendritic cells after exposure to allergens: a comparative analysis [J]. Arch Dermatol Res, 2002, 294(3): 109-116.
- [16] Tuschl H, Kovac R. Langerhans cells and immature dendritic cells as model systems for screening of skin sensitizers [J]. Toxicol Vitro, 2001, 15(4/5): 327-331.
- [17] 李 瑶, 吕德官, 陈临溪. IL-8 及其受体药物与疾病的研究进展 [J]. 中国药理学通报, 2014, 30(3): 310-314.
- Li Y, Lv D G, Chen L X. Research progress of IL-8 and its receptor drugs in diseases [J]. Chin Pharmacol Bull, 2014, 30(3): 310-314.
- [18] Suzuki M, Hirota M, Hagino S, et al. Evaluation of changes of cell-surface thiols as a new biomarker for *in vitro* sensitization test [J]. Toxicol Vitro, 2009, 23(4): 687-696.
- [19] Miyazawa M, Ito Y, Kosaka N, et al. Role of TNF- α and extracellular ATP in THP-1 cell activation following allergen exposure [J]. J Toxicol Sci, 2008, 33(1): 71-83.
- [20] Ouwehand K, Spiekstra S W, Waaijman T, et al. Technical advance: Langerhans cells derived from a human cell line in a full-thickness skin equivalent undergo allergen-induced maturation and migration [J]. J Leukoc Biol, 2011, 90(5): 1027-1033.
- [21] Nelissen I, Selderslaghs I, van den Heuvel R, et al. MUTZ-3-derived dendritic cells as an *in vitro* alternative model to CD34⁺ progenitor-derived dendritic cells for testing of chemical sensitizers [J]. Toxicol Vitro, 2009, 23(8): 1477-1481.
- [22] Beutler B, Cerami A. The biology of cachectin/TNF: A primary mediator of the host response [J]. Annu Rev Immunol, 1989, 7: 625-655.

[责任编辑 兰新新]