

以IL-8为评价指标的THP-1细胞光致敏评价方法的确定和验证

董建欣^{1, 2#}, 黄舒佳^{2#}, 王宇², 孙旭², 赵华琛³, 祝清芬¹, 刘丽^{2*}, 李波^{2*}

1. 山东省食品药品检验研究院 国家药品监督管理局仿制药研究与评价重点实验室, 山东 济南 250101

2. 中国食品药品检定研究院国家药物安全评价监测中心 药物非临床安全评价研究北京市重点实验室, 北京 100176

3. 国家药品监督管理局 药品审评中心, 北京 100022

摘要: 目的 确定并验证以白细胞介素-8(IL-8)作为评价指标的THP-1细胞光致敏体外评价方法。方法 将THP-1细胞与19种光致敏剂、4种光刺激剂、2种皮肤致敏剂、1种皮肤刺激剂和阴性受试物分别孵育24 h, 在光照射(1.7 mW·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(光照30 min, 然后避光15 min)处理。用Luminex液相芯片检测技术测定细胞培养上清和细胞裂解液中IL-8和肿瘤坏死因子- α (TNF- α)的含量并统计分析, 进一步确定评价光致敏的细胞因子指标, 并进行方法验证。**结果** 与非照射组比较, 13种光致敏剂均引起照射组THP-1细胞IL-8总含量显著增加($P < 0.01$), 阿伏苯宗为非照射组的1 148~2 269倍, 其余12种为非照射组的6.7~195.1倍; 光刺激剂经光照射后也可引起细胞分泌IL-8显著增加($P < 0.01$), 但经过预照射处理后, IL-8的含量相比直接照射组显著下降($P < 0.01$)。未经光照射条件下, 皮肤致敏剂即可引起THP-1细胞分泌IL-8比对照组显著增加($P < 0.01$), 光照后IL-8含量虽也较非照射组显著增加($P < 0.01$), 但增加的幅度小于皮肤致敏剂本身引起IL-8变化的幅度。在光照条件下, 皮肤刺激剂、阴性受试物均可引起细胞分泌IL-8较非照射组显著性增加($P < 0.05$), 但增加的幅度较小, 与对照组相似。以上受试物引起光照前后细胞TNF- α 变化的幅度均与对照组相近。以IL-8为评价指标的THP-1细胞光致敏评价方法检测光致敏剂的准确性、特异性和灵敏度分别是77.8%、100.0%、68.4%, 并且该方法具有良好的重复性。**结论** 确定了THP-1细胞光致敏评价方法的细胞因子标志物评价指标为IL-8, 判定标准为: ①UVA照射后THP-1细胞中IL-8含量比非照射组显著增加; ②UVA照射组与非照射组IL-8含量比值 ≥ 6.5 ; ③当上述两条均满足时, 对受试物进行UVA预照射处理, 预处理照射组IL-8的含量与直接照射组(未经预照射)相比无显著性差异, 且预处理照射组与预处理非照射组IL-8含量比值 ≥ 6.5 。

关键词: 光致敏; THP-1细胞; 白细胞介素; 肿瘤坏死因子- α ; 方法验证

中图分类号: R965.1 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2022)01-0010-10

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2022.01.002

Identification and validation of THP-1 cell photoallergy evaluation method with IL-8 as evaluation index

DONG Jianxin^{1, 2}, HUANG Shujia², WANG Yu², SUN Xu², ZHAO Huachen³, ZHU Qingfen¹, LIU Li², LI Bo²

1. Key Laboratory of Generic Drug Research and Evaluation, Shandong Institute for Food and Drug Control, Jinan 250101, China

2. Key Laboratory of Beijing for Nonclinical Safety Evaluation Research of Drugs, National Center for Safety Evaluation of Drugs, National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 100176, China

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

Abstract: Objective An *in vitro* evaluation method for photosensitization of THP-1 cells using interleukin (IL) -8 was established and validated. **Methods** THP-1 cells were treated with 19 photosensitizers, four photoirritants, two skin sensitizers, one skin irritant and one negative subject respectively. After solar radiation (1.7 mW·cm⁻², 50 min) or non-radiation treatment, cells were placed into the incubator for further culture for 5 h. Photostimulant should be pre-irradiated (30 min of light, then 15 min of avoid light) before formal light exposure. The contents of cytokines IL-8 and tumor necrosis factor- α (TNF- α) in cell culture supernatant and cell lysis fluid were determined by Luminex liquid chip detection technology and statistically analyzed, to further determine the cytokine

收稿日期: 2021-11-26

基金项目: 国家“重大新药创制”科技重大专项资助项目“创新药物非临床安全性评价研究关键技术”(2018ZX09201017)

#共同第一作者: 董建欣(1995—), 女, 主要从事药品检验和药物安全性评价研究。Tel: (0531)81216550 E-mail: 18363827781@163.com
黄舒佳, 研究方向为药物非临床安全性评价。E-mail: 1561454679@qq.com

*共同通信作者: 李波(1963—), 男, 博士生导师, 研究方向为药物非临床安全性评价研究。Tel: (010)53851706 E-mail: libo@nifdc.org.cn

刘丽(1976—), 女, 主任药师, 研究方向为药物非临床安全性评价研究。Tel: (010)67872233-8312 E-mail: liuli@nifdc.org.cn

indexes for evaluating photosensitization and verify the method. **Results** Twelve photosensitizers caused significant increases in IL-8 content in THP-1 cells in the irradiation group ($P < 0.01$), which was 6.7 to 195.1 times of that in the non-irradiation group. Avobenzone was 1 148 to 2 269 times higher than that of the non-irradiated group. The four photoirritants also induced significant increases in IL-8 secretion after light irradiation ($P < 0.01$), but after pre-irradiation, the IL-8 contents were significantly decreased compared with that in the direct irradiation group ($P < 0.01$). The two skin sensitizers induced THP-1 cells to secrete significantly more IL-8 than the control group without light irradiation ($P < 0.01$). Although the content of IL-8 after light irradiation was also significantly increased compared with that before irradiation ($P < 0.01$), the amplitude of increase was smaller than that caused by skin sensitizer itself without light exposure. The skin irritant and negative subject could significantly increase the secretion of IL-8 compared with non irradiation group, but the increase amplitude were small, and were lower than the minimum change amplitude of IL-8 content induced by photoallergy agents. The change amplitudes of TNF- α level between irradiation and non irradiation groups of the above test articles were similar to that of the cell control. In this study, the accuracy, specificity and sensitivity of the photoallergy evaluation method using THP-1 cells with IL-8 as the evaluation index was 77.8%, 100.0% and 68.4%, respectively, and the method had good repeatability. **Conclusion** In this study, a photoallergy evaluation method using THP-1 cells with IL-8 as the evaluation index was further determined and was verified to have good accuracy, specificity, sensitivity and repeatability.

Key words: photoallergy; THP-1 cell; interleukin-8; tumor necrosis factor- α (TNF- α); method validation

光致敏反应是一种迟发性变态反应,也称光变态反应,与药物和过敏体质等多种因素有关,皮肤用药、某些系统给药的药物和化妆品中某些成分可能诱导此类反应^[1-2]。光致敏反应首次发病一般有24~48 h的潜伏期,潜伏期过后皮肤曝光部位会出现红斑、丘疹、水疱或渗出等症状,还可以迁延至非曝光部位。除局部皮疹外,严重情况下还可引起全身性的症状,包括发热、心悸、乏力等^[3]。传统的评价受试物光致敏的方法主要是依靠豚鼠进行光致敏试验,该法通过肉眼观察受试物是否引起皮肤红斑、水肿等反应,并且通过对反应程度进行评分,判定受试物光致敏强弱程度,目前是各国公认的光致敏评价方法^[4]。但该法缺乏客观定量的评价指标,并且长时间的紫外线照射对动物损伤较大,不符合动物保护3R原则^[5]。因此亟需开发并验证体外评价受试物光致敏性的方法。

本实验室前期应用人急性单核白血病细胞THP-1(human acute monocytic leukemia cell)分别与光致敏剂、光刺激剂、皮肤致敏剂、皮肤刺激剂、阴性受试物等10余种受试物进行孵育,光照和非照射条件下利用Luminex多功能液相芯片分析系统分别检测干扰素- γ (IFN- γ)、粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)、白细胞介素(IL)-1 α 、IL-12/P40、IL-12/P70、IL-4、IL-1 β 、IL-6、IL-2、IL-5、IL-8、肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、IL-18、IL-12、IL-13等多种细胞因子的含量,初步筛选出IL-8和TNF- α 两种细胞因子水平有特异性的升高,可作为潜在的评价指标^[6-7]。本研究通过增加光致敏剂的种类和数量,进一步确定应用THP-1细胞评价受试物光致敏性的细胞因

子指标,并对相应的光致敏体外评价方法进行验证。

1 材料

1.1 药物和主要试剂

细胞培养试剂:Gibco胎牛血清(FBS, Thermo Fisher公司);RPMI 1640培养基和磷酸缓冲液(PBS, Hyclone公司);青链霉素(江苏凯基生物技术股份有限公司);二甲基亚砷(DMSO, Sigma公司);细胞RIPA裂解液(碧云天生物技术公司);碘化丙啶染色溶液(eBioscience公司)。

细胞因子检测用试剂:IL-8和TNF- α 试剂盒(默克密理博,货号hcytomag-60k-02)。

19种光致敏剂^[8]:6-甲基香豆素(6-MC, CAS: 92-48-8)、7-甲氧基香豆素(CAS: 531-59-9)、四氯水杨酰苯胺(TCSA, CAS: 420230050)、4-甲基水杨酸(CAS: 50-58-1)、芬替克洛(CAS: 97-24-5)、葵子麝香(CAS: 83-66-9)、磺胺(CAS: 63-74-1)、硫氯酚(CAS: 70-30-4)、氯丙嗪(CAS: C2481)、酮洛芬(CAS: 22071-15-4)、氨苯砜(CAS: 80-08-0)、2-乙基-4-甲氧基肉桂酸酯(CAS: 5466-77-3)、吡洛昔康(CAS: 36322-90-4)、阿伏苯宗(CAS: 70356-09-1)、三氯卡班(CAS: 101-20-2)、塞来考昔(CAS: 169590-42-5)、吩噻嗪(CAS: 92-84-2)、三氯生(CAS: 3380-34-5)、西诺沙酯(CAS: 104-28-9);4种光刺激剂:蒽(CAS: 120-12-7)、吡啶(CAS: 260-94-6)、8-甲氧基补骨脂素(CAS: 298-81-7)、布洛芬(CAS: 15687-27-1);2种皮肤致敏剂:二硝基氯苯(DNCB, CAS: 606-21-3)、盐酸双氯苯双胍己烷(CHD, CAS: 55-56-1);皮肤刺激剂:月桂基磺酸钠(SLS, CAS: 151-21-3);阴性受试物:乳

酸(LA,CAS:50-21-5);溶剂(无水乙醇、灭菌注射用水、二甲亚砜);均购于国药集团化学试剂有限公司。

1.2 主要仪器

多功能液相芯片分析系统(美国Luminex公司);SOL 500人工太阳照射装置(波长范围280~800 nm,日本国际协力机构);紫外辐照计(北京师范大学光电仪器厂);FACSCalibur流式细胞仪(美国BD公司);MILLI-Q® ADVANTAGE A10超纯水仪(默克密理博);H500FRS离心机(日本国际协力机构);Eppendorf移液器(德国艾本德公司);HERAce II CO₂细胞培养箱(美国Thermo公司);PB203-N电子天平(瑞士梅特勒-托利多仪器公司);手持磁力架、摇床等。

1.3 细胞

THP-1细胞(国家试验细胞资源共享平台,批号3111C0001CCC000057)。将装有THP-1细胞的冻存管放入37℃水浴锅中,待细胞液融化后转移到75 cm²培养瓶中,补足完全培养基至12 mL左右。置于37℃、5% CO₂培养箱中培养,每日观察细胞的生长情况,选用7~10代的细胞进行试验。

2 方法

2.1 辐照强度、时间和检测时间点

根据本实验室前期研究结果^[7],引起6-MC细胞模型IL-8、TNF- α 照射后显著增加的光照强度和时间为1.7 mW·cm⁻²光照强度下照射50 min,即光照剂量为5 J·cm⁻²,并确定了在光照射后5 h作为细胞因子检测时间点。

2.2 受试物浓度

本研究对不同的受试物摸索一系列浓度,分别与THP-1细胞孵育后进行光照,通过流式细胞术测定细胞存活率,选择使细胞存活率在75%以上的受试物浓度进行正式试验。受试物最终使用浓度见表1。

2.3 受试物与THP-1细胞共同孵育

取处于对数生长期的THP-1细胞,调整细胞液浓度为1×10⁶·mL⁻¹,取2块24孔细胞培养板,分别标记为照射组和非照射组。各孔均加入细胞悬液990 μ L,给药组加入10 μ L已配制好的受试物溶液,对照组加入等体积的溶剂,置于37℃、5% CO₂培养箱中孵育24 h。

2.4 光照或避光处理

将标记为照射组的细胞培养板进行紫外线照射(紫外辐照计测定光照强度为1.7 mW·cm⁻²),另一块标记为非照射组的细胞培养板置于避光环境中,时间均为50 min。

表1 受试物应用浓度

Table 1 Applied concentration of tested substance

受试物类别	受试物名称	溶剂	浓度/(μ g·mL ⁻¹)
光致敏剂(强)	6-MC	无水乙醇	80、150、200
光致敏剂(强)	TCSA	无水乙醇	1.25、2.50、5.00
光致敏剂(强)	7-甲氧基香豆素	无水乙醇	10、20、40、70
光致敏剂(强)	4-甲基水杨酸	无水乙醇	500、600、780
光致敏剂(中等)	氯丙嗪	无水乙醇	0.75、1.50、3.00
光致敏剂	酮洛芬	无水乙醇	80、90、100
光致敏剂	氨苯砜	无水乙醇	180、200、220
光致敏剂(弱)	硫氯酚	无水乙醇	24、36、42
光致敏剂(中等)	芬替克洛	无水乙醇	5.0、7.5、10.0
光致敏剂	2-乙基-4-甲氧基肉桂酸酯	无水乙醇	1.60、3.26、6.50 mmol·L ⁻¹
光致敏剂	吡咯昔康	DMSO	137、220、258
光致敏剂	阿伏苯宗	无水乙醇	24、36、42
光致敏剂(弱)	磺胺	无水乙醇	1500、2000、2500
光致敏剂	三氯卡班	无水乙醇	2、4、6
光致敏剂(中等)	葵子麝香	无水乙醇	6、8、15
光致敏剂	塞来考昔	无水乙醇	30、40、50、60
光致敏剂	吩噻嗪	无水乙醇	0.75、1.50、3.00
光致敏剂	西诺沙酯	无水乙醇	2、4、6
光致敏剂	三氯生	无水乙醇	45、60、80、100
光刺激剂	吡啶	无水乙醇	0.10、0.20、0.25
光刺激剂	8-MOP	无水乙醇	30、50、60
光刺激剂	布洛芬	无水乙醇	300、400、450
光刺激剂	葱	无水乙醇	0.03、0.04、0.05
皮肤致敏剂	CHD	无水乙醇	4、8、15
皮肤致敏剂	DNCB	无水乙醇	2、4、6
皮肤刺激剂	SLS	无水乙醇	60
阴性受试物	LA	无水乙醇	500

2.5 预照射处理

为了将光刺激剂与光致敏剂进行鉴别,采用预照射的方法,即将受试物溶液和单纯细胞培养基放入细胞培养板内,光照30 min,然后避光15 min,之后将上述预照射后的受试物溶液与细胞沉淀(将THP-1细胞离心,弃上清)混合均匀,接种到细胞培养板内,置于培养箱中孵育24 h。继续进行“2.4”项光照或避光处理。

2.6 光照后细胞换液培养

光照结束后,将细胞悬液转移到EP管中离心,弃上清,再加入1 mL培养基反复吹打,转移到细胞培养板内,置于培养箱中继续培养5 h。

2.7 细胞上清液和裂解液的制备

从细胞培养箱内取出2块24孔板,用移液

枪吸取各孔细胞液转移至1.5 mL的无菌EP管中,1 000 r·min⁻¹离心5 min,离心完成后吸取细胞上清液转移到EP管内,做好标记放入-80 °C冰箱保存。然后再向管内加入1 mL PBS反复吹打,将细胞沉淀打散后再次离心,离心完成后弃去上清液,加入100 μL细胞裂解液于细胞沉淀中反复吹打多次,充分裂解细胞,12 000 r·min⁻¹离心5 min。随后吸取细胞上清液转移到EP管内,并做好标记于-80 °C冰箱冷冻保存。

2.8 细胞因子的检测

应用IL-8和TNF-α试剂盒检测细胞上清及裂解液中IL-8和TNF-α水平。

2.9 数据处理及统计方法

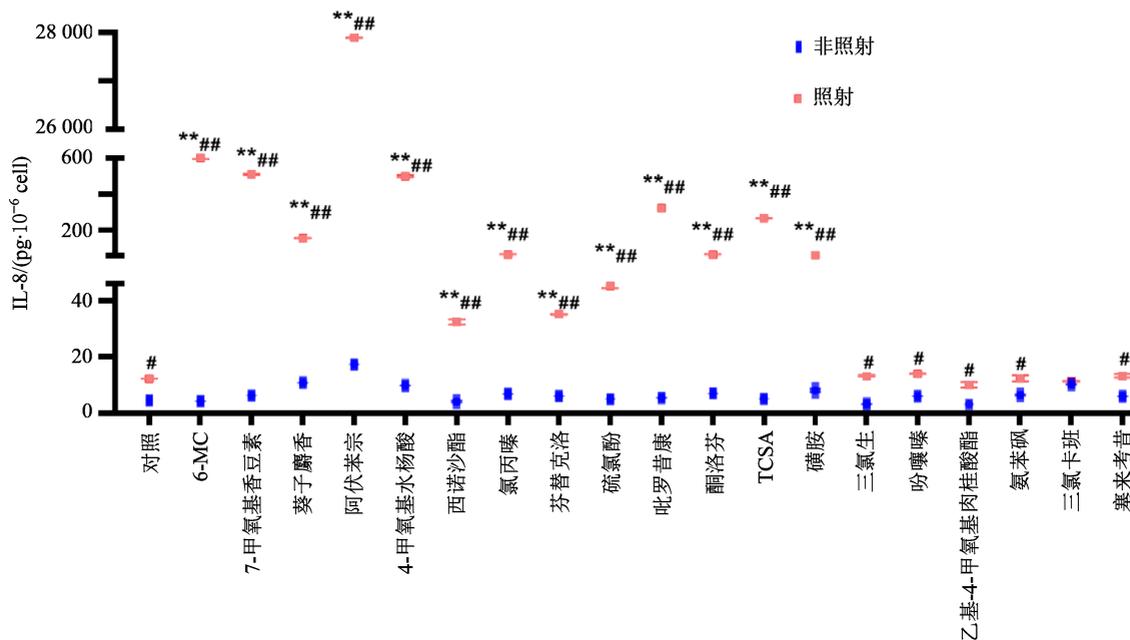
细胞上清液体积是1 mL,细胞裂解液体积是100 μL。细胞上清液和裂解液中所含细胞因子总量(pg·10⁻⁶ cells)=细胞上清液浓度(pg·mL⁻¹)×细胞上清液体积(mL)+细胞裂解液浓度(pg·mL⁻¹)×细胞裂解液体积(mL)。利用Luminex的MILLIPLEX Analyst软件处理原始数据,计算 $\bar{x} \pm s$,采用Graphpad Prism 8中的独立样本t检验来统计组间有无显著性差异。

3 结果

3.1 受试物引起THP-1细胞光照前后分泌IL-8、TNF-α的测定结果

3.1.1 光致敏剂引起THP-1细胞光照前后分泌

IL-8、TNF-α的测定结果 本研究对不同的受试物摸索一系列浓度,分别与THP-1细胞孵育后进行光照,通过流式细胞术测定细胞存活率,选择使细胞存活率在75%以上的受试物浓度进行正式试验。每个受试物均摸索出了3~4个作用浓度,因受试物不同浓度引起细胞分泌IL-8、TNF-α含量变化趋势一致,因此仅展示受试物中间孵育浓度所对应的THP-1细胞分泌IL-8、TNF-α的测定结果。如图1所示,13种光致敏剂(6-MC、阿伏苯宗、7-甲氧基香豆素、4-甲基水杨酸、葵子麝香、西诺沙酯、氯丙嗪、芬替克洛、硫氯酚、吡罗昔康、酮洛芬、TCSA、磺胺)与THP-1细胞孵育24 h后,经UVA照射,照射组比非照射组分泌IL-8的量(细胞上清和裂解液中的IL-8总量)显著增加($P < 0.01$)。3个浓度的阿伏苯宗引起照射组THP-1细胞中IL-8含量增加为非照射组的1 148~2 269倍,具有浓度-效应关系。其余12种光致敏剂引起照射组THP-1细胞中IL-8含量增加为非照射组的6.7~195.1倍。照射条件下,以上受试物组比对照组IL-8含量也显著增加($P < 0.01$),在3~47倍范围内。对照组在进行UVA照射后,IL-8水平与照射前相比增加,虽然有统计学上的显著差异,但是升高的幅度不大,约为照射前的3.5倍。光致敏剂三氯生、吩噻嗪、2-乙基-4-甲氧基肉桂酸酯、氨苯砞、三氯卡班和塞来考昔引起THP-1细胞光照前后IL-8的变化与对照组结果相近。



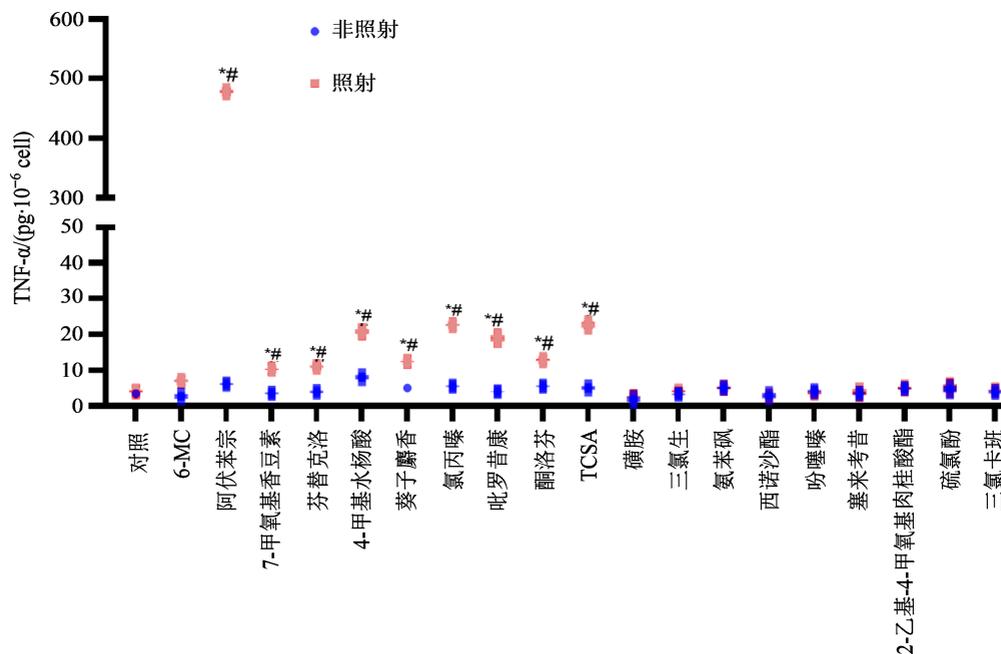
与相同照射条件下对照组比较:** $P < 0.01$;与非照射组比较:## $P < 0.01$
 ** $P < 0.01$ vs control group under same irradiation conditions; ## $P < 0.01$ vs non-irradiated group

图1 光致敏剂引起THP-1细胞光照前后分泌IL-8测定结果($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 1 Determination of IL-8 secretion of THP-1 cells before and after illumination induced by photosensitizer ($\bar{x} \pm s, n=3$)

如图2所示,本研究19种光致敏剂中有9种可引起照射组THP-1细胞分泌TNF- α 比非照射组显著性增加($P < 0.05$),除阿伏苯宗可引起照射组THP-1细胞分泌TNF- α 比非照射组有非常显著性增

加($P < 0.01$)、并且增加的幅度较大(照射组TNF- α 含量约是非照射组的78倍)以外,其余8种光致敏剂照射组与非照射组TNF- α 含量的比值为0.9~6.8,与对照组相近。



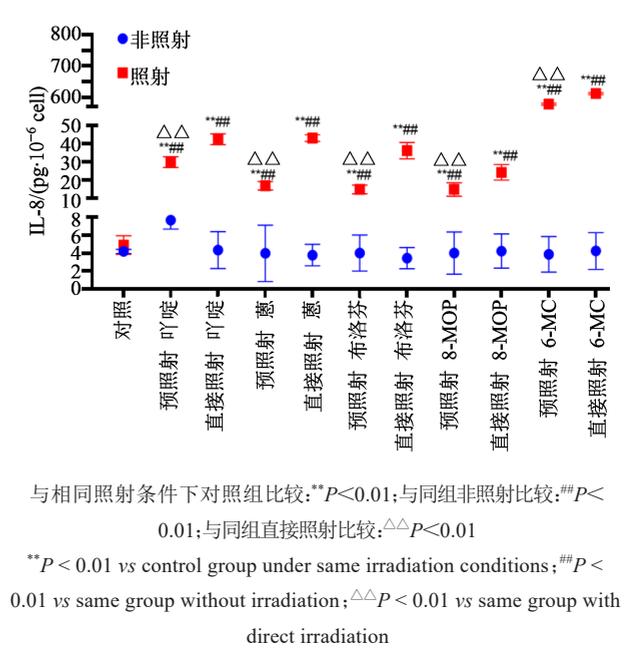
与相同照射条件下对照组比较: $*P < 0.01$;与非照射组比较: $\#P < 0.01$
 $*P < 0.01$ vs control group under same irradiation conditions; $\#P < 0.01$ vs non-irradiated group

图2 光致敏剂引起THP-1细胞光照前后分泌TNF- α 测定结果($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 2 Determination of TNF- α secretion of THP-1 cells before and after illumination induced by photosensitizer ($\bar{x} \pm s, n=3$)

3.1.2 光刺激剂引起THP-1细胞光照前后分泌IL-8、TNF- α 的测定结果 如图3所示,光刺激剂吡啶、葱、8-MOP、布洛芬也引起光照后细胞分泌IL-8显著增加($P < 0.01$),照射组IL-8含量为非照射的5.7~13.2倍。本研究对4种光刺激剂都进行了预照射处理,预处理照射组与预处理非照射组相比IL-8含量虽有显著性增加($P < 0.01$),但增加的幅度明显降低(两组IL-8含量比值为2.1~4.2),并且与直接照射组(未经预照射处理)相比细胞分泌IL-8的量显著降低($P < 0.01$),提示UVA预照射处理可明显减弱光刺激剂引起IL-8增加的作用。为了进行对比,对光致敏剂6-MC也进行了同样的UVA预照射处理,发现其预处理照射组与直接照射组相比细胞分泌IL-8无显著性差异,说明预照射处理对光致敏剂6-MC致IL-8增加的作用无影响。

如图4所示,吡啶、葱、8-MOP、布洛芬4种光刺激剂没有引起THP-1细胞光照后TNF- α 含量的显著性变化。照射或者非照射条件下,光刺激剂组与相应的对照组相比TNF- α 含量也无显著性差异。



与相同照射条件下对照组比较: $**P < 0.01$;与同组非照射比较: $\#P < 0.01$;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 with direct irradiation

图3 光刺激剂引起THP-1细胞光照前后分泌IL-8测定结果($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 3 Determination of IL-8 secretion of THP-1 cells before and after irradiation induced by photostimulants ($\bar{x} \pm s, n=3$)

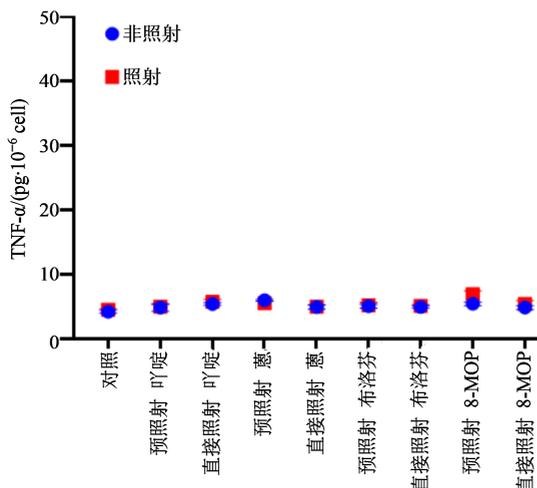
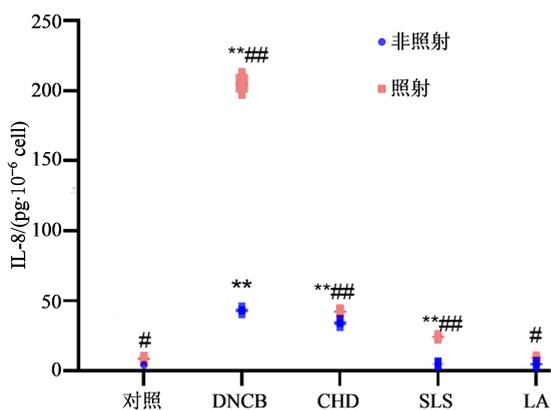


图4 光刺激剂与THP-1细胞孵育后光照前后TNF- α 的测定结果($\bar{x}\pm s, n=3$)

Fig. 4 Determination of TNF- α secretion of THP-1 cells before and after irradiation induced by photostimulants ($\bar{x}\pm s, n=3$)

预照射处理组与直接照射组相比TNF- α 含量也无显著性差异。

3.1.3 皮肤致敏剂、皮肤刺激剂、阴性受试物引起THP-1细胞光照前后分泌IL-8、TNF- α 的测定结果如图5所示,在未经UVA照射条件下,皮肤致敏剂与DNCB具有相同的特点,在未经UVA照射条件下,即引起THP-1细胞分泌IL-8显著增加($P < 0.01$),为对照组的3.9~6.5倍。CHD照射组相比非照射组IL-8表达也显著增加($P < 0.01$),为非照射组



与相同照射条件下对照组比较:** $P < 0.01$;与非照射组比较:# $P < 0.05$ ## $P < 0.01$

** $P < 0.01$ vs control group under same irradiation conditions; # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ vs non-irradiated group

图5 皮肤致敏剂、SLS、LA引起THP-1细胞光照前后分泌IL-8的测定结果($\bar{x}\pm s, n=3$)

Fig. 5 Determination of IL-8 secretion of THP-1 cells before and after illumination induced by skin sensitizer, SLS and LA ($\bar{x}\pm s, n=3$)

的1.8倍,低于DNCB引起THP-1细胞IL-8含量变化的幅度。照射条件下,皮肤刺激剂SLS会引起THP-1细胞分泌IL-8显著增加($P < 0.01$),为对照组的1.6倍。SLS照射组比其非照射组IL-8含量也显著性增加($P < 0.01$),为非照射组的4.6倍。阴性受试物LA组和对照组光照前后IL-8含量的变化程度相近。

如图6所示,皮肤致敏剂DNCB和CHD、皮肤刺激剂SLS、阴性受试物LA没有引起THP-1细胞光照前后TNF- α 含量的显著性变化。照射或者非照射条件下,上述受试物组与相应的细胞对照组相比TNF- α 含量也无显著性差异。

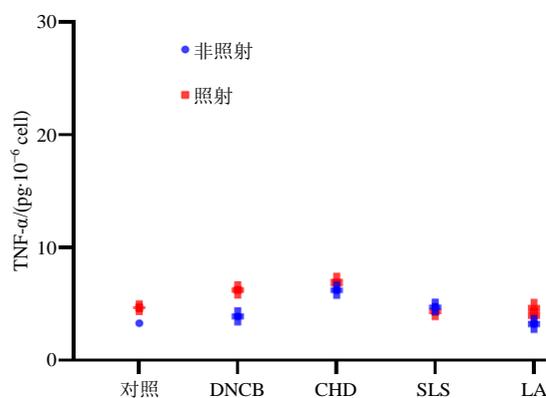


图6 皮肤致敏剂、SLS及LA与THP-1细胞孵育后光照前后TNF- α 的测定结果($\bar{x}\pm s, n=3$)

Fig. 6 TNF- α determination of thP-1 cells after incubation with skin sensitizer, SLS, LA and THP-1 cells before and after light ($\bar{x}\pm s, n=3$)

3.2 THP-1细胞光致敏评价方法细胞因子评价指标的确定

大部分光致敏剂THP-1细胞模型经UVA照射后,与非照射组相比,细胞分泌IL-8水平显著性增加,并且增加的幅度较大,以阿伏苯宗最为明显。除阿伏苯宗外,只有8种光致敏剂可引起照射组THP-1细胞分泌TNF- α 比非照射组显著性增加($P < 0.05$),但增加幅度小,结果与对照组照射前后结果相近,因此TNF- α 不可作为评价受试物光致敏性的指标,将IL-8作为THP-1细胞光致敏性评价方法的重要指标。

3.3 以IL-8为评价指标的THP-1细胞光致敏评价方法受试物阳性判定标准的确定

不同类型的受试物引起THP-1细胞照射组与非照射组IL-8比值见图7、8。除了三氯生、吩噻嗪、西诺沙酯等6种光致敏剂引起细胞分泌IL-8结果与对照组结果相近、照射组IL-8水平/非照射组IL-8水

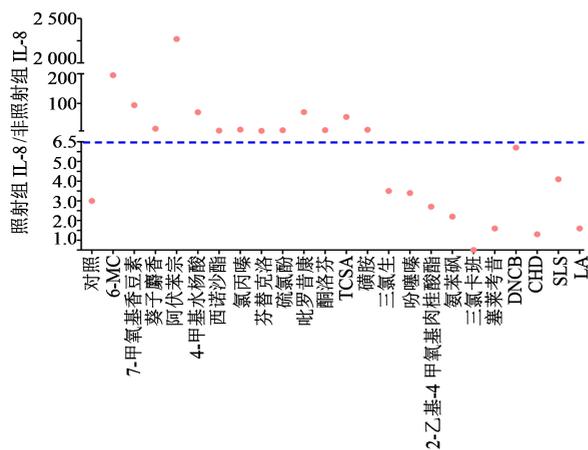


图7 不同类型的受试物引起THP-1细胞照射组与非照射组IL-8含量比值

Fig. 7 Ratio of IL-8 content in irradiated THP-1 cell group to that in non-irradiated THP-1 cell group induced by different types of subjects

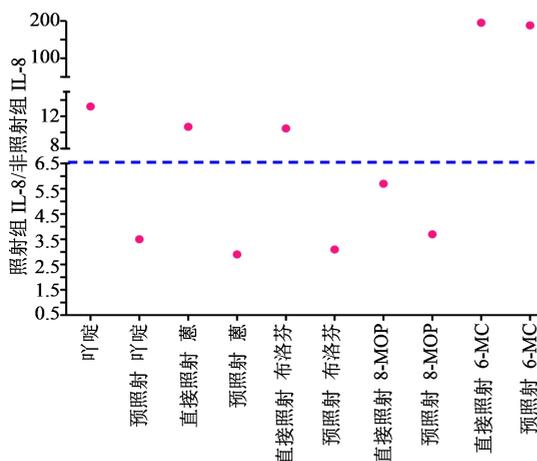


图8 光刺激剂预照射组、直接照射组与非照射组IL-8比值
Fig. 8 Ratio of IL-8 content of photostimulant in pre-irradiation group and direct irradiation group to that of non-irradiation group

平小于6.5以外,其余光致敏剂照射组IL-8含量与非照射组比较均有显著性增加($P < 0.01$),并且照射组与非照射组IL-8比值均大于6.5。

4种光刺激剂直接照射组与非照射组IL-8比值均在6.5以上,但经预处理以后,照射组与非照射组IL-8比值均小于6.5。皮肤致敏剂DNCB和CHD、皮肤刺激剂SLS和阴性受试物LA照射组与非照射组IL-8比值也在6.5以下。因此,暂将THP-1细胞照射组与非照射组IL-8比值 > 6.5 作为评价受试物光致敏性的标准之一。

在本研究中,初步确定该方法中受试物光致敏阳性的判定标准如下:①UVA照射后THP-1细胞中IL-8含量比非照射组显著增加;②UVA照射组与非

照射组IL-8比值 ≥ 6.5 ;③当上述两条均满足时,对受试物进行UVA预照射处理,预处理照射组IL-8的与直接照射组(未经预照射)相比无显著性差异,且预处理照射组与预处理非照射组IL-8比值 ≥ 6.5 。同时满足以上条件则可判定受试物为光致敏阳性。

3.4 光致敏体外评价方法评价指标的验证^[9]

3.4.1 方法准确性验证 方法准确性是所有被检测的受试物能正确的分类为阳性或阴性结果所占的比例,本研究一共选取了19种光致敏剂,对以IL-8为评价指标的THP-1细胞光致敏体外评价方法的准确性进行了验证。其中有13种可引起照射后细胞分泌IL-8显著性增加并被判定为光致敏阳性,其余6种通过该方法判定为光致敏阴性。结果见表2。

表2 试验方法相关指标的计算

Table 2 Calculation of related indexes of test methods

试验结果	光致敏阳性 受试物	光致敏阴性 受试物	总计
阳性(+)	a=13	b=0	a+b=13
阴性(-)	c=6	d=8	c+d=14
总计	a+c=19	b+d=8	a+c+b+d=27

a-阳性受试物判定为阳性的数量;b-阴性受试物判定为假阳性的数量;c-阳性受试物判定为假阴性的数量;d-阴性受试物判定为阴性的数量;a+c-检测的阳性受试物总数;b+d-检测的阴性受试物总数;a+b-检测结果为阳性的数量;c+d-检测结果为阴性的数量;a+b+c+d-所有受试物数量

a-number of positive subjects judged to be positive; b-number of negative subjects judged to be false positives; c-number of positive subjects judged to be false negative; d-number of negative subjects judged to be negative; a+c-total number of positive subjects tested; b+d-total number of negative subjects tested; a+b-number of positive test results; c+d-number of negative test results; a+b+c+d-number of all subjects

本部分方法的准确度是 $(a+d)/(a+b+c+d) = 21/27 = 77.8\%$;真阳性率为 $a/(a+c) = 13/19 = 68.4\%$;真阴性率为 $d/(b+d) = 8/8 = 100\%$;假阳性率为 $b/(b+d) = 0/8 = 0$;假阴性率为 $c/(a+c) = 6/19 = 31.6\%$ 。

3.4.2 方法特异性的验证 方法特异性是指在一个试验方法中,所有阴性受试物被正确鉴别为阴性的比例。本研究中方法特异性是指该方法能将光致敏阴性受试物正确鉴别为阴性的比例。试验结果发现,阴性受试物、皮肤刺激剂、皮肤致敏剂照射组与非照射组IL-8含量比值均在6.5以下,可以与光致敏剂进行鉴别。在未经照射的条件下,皮肤致敏剂即可引起THP-1细胞分泌IL-8比对照组显著

性增加,光致敏剂组未引起THP-1细胞分泌IL-8比对照组显著性增加,可以与光致敏剂进行鉴别。

光刺激剂THP-1细胞模型经过UVA照射后,照射组IL-8的分泌量也会显著性增加,且照射组与非照射组IL-8的含量比值大于6.5,因此会出现假阳性结果。为了与光致敏剂进行鉴别,本部分方法建立了在照射组与非照射组IL-8含量大于6.5的情况下,对受试物进行预照射处理的方法。对4种光刺激剂和具有代表性的光致敏剂6-MC同时进行了预照射处理,发现光刺激剂THP-1细胞模型预照射处理组分泌IL-8的含量与直接照射组(未经预处理)相比均显著降低。而光致敏剂细胞模型中预处理照射组分泌IL-8的含量与直接照射组相比无显著性差异,照射组IL-8含量/非照射组IL-8含量大于6.5,从而可以将光致敏剂与光刺激剂进行鉴别。

该方法能将8种光致敏阴性受试物均正确鉴别为阴性,特异性为100%。

3.4.3 方法灵敏度的验证 方法的灵敏度一方面是指将所有阳性受试物判定为阳性的比率,另一方面是指该方法能识别并检测弱阳性受试物的能力,是方法学验证中非常重要的一个方面。本部分方法灵敏度为 $13/19=68.4\%$ 。为了检测该方法的灵敏度,本研究中选取了2种弱致敏剂、2种中等强度和4种强的光致敏剂进行方法灵敏度的验证。结果显示,弱光致敏剂磺胺、硫氯酚和中等强度光致敏剂葵子麝香、芬替克洛也能引起照射后THP-1细胞分泌IL-8含量显著增加,并且符合受试物光致敏阳性判定标准。

3.4.4 方法重复性的验证 重复性是指在相同的试验条件下,按照规定的方法多次重复试验获得结果的一致性。本研究中对每种受试物均采用了3~4个作用浓度,每个作用浓度在相同试验条件下均重复测定3次,相对标准偏差(RSD)均小于20%,表明此方法具有较好的可重复性。

4 讨论

本课题组前期研究中,在对THP-1细胞给予有限数量的光致敏剂和其他类型化合物后,检测了多种Th1和Th2型细胞因子^[10],结果发现IL-8和TNF- α 2种细胞因子水平有特异性的升高,可作为潜在的评价指标。因此本研究应用19种光致敏剂及其他多种类型的化合物与THP-1细胞分别作用,检测光照前后IL-8和TNF- α 的表达水平,进一步确定适宜的指标,并对此光致敏体外评价方法进行验证。有研究者推测光致敏与皮肤致敏可能具有类似的反

应机制,光致敏剂也会诱导IL-8蛋白水平和mRNA水平上调^[11]。IL-8是Th2细胞分泌的细胞因子,参与细胞免疫及迟发型超敏反应的发生。当受试物引发光致敏反应时,IL-8会介导细胞毒和局部炎症相关的免疫应答,趋化并激活中性粒细胞,促进中性粒细胞的吞噬作用和溶酶体酶活性,对T细胞和嗜碱性粒细胞也有一定的趋化作用^[12-13]。中性粒细胞接触IL-8后发生形态变化,定向游走到反应部位,释放活性产物,上述作用可导致机体出现局部炎症反应,达到损伤细胞和杀菌的目的^[11]。TNF- α 是Th1细胞分泌的细胞因子,可以促进T细胞产生各种炎症因子,介导细胞免疫反应,进而促进炎症反应的发生^[7]。

本研究发现,未给予任何受试物的对照组在进行UVA照射后,IL-8水平与照射前相比增加,虽然有统计学上的显著差异,但是升高的幅度不大,约为照射前的3.5倍,说明THP-1细胞在接受一定剂量的UVA照射后会引发IL-8分泌增加,但增加程度较小。大部分光致敏剂引起照射组与非照射组IL-8比值增加的倍数为6.7~195.1,阿伏苯宗引起照射组IL-8含量增加的幅度可达2269倍。三氯生等6种光致敏剂引起THP-1细胞照射前后IL-8的变化与对照组结果相近。光刺激剂也会引起光照前后细胞分泌IL-8显著增加,但增加的幅度不大,远远小于光致敏剂,且对光刺激剂进行预照射处理后与直接照射组相比细胞分泌IL-8的量显著降低,而光致敏剂6-MC不受预照射处理的影响,由此可对二者进行鉴别。在未经照射时,皮肤致敏剂即可引起THP-1细胞表达IL-8显著增加,经过UVA照射后,IL-8增加幅度小于大部分光致敏剂。皮肤刺激剂和阴性受试物引起THP-1细胞分泌IL-8含量的变化与对照组相近。以上结果说明,在本方法中IL-8对于评价光致敏具有较好的准确性、特异性和灵敏度。只有少数光致敏剂引起照射组THP-1细胞分泌TNF- α 比非照射组增加,且增加幅度小。因此本研究确定IL-8为受试物光致敏的评价指标。

本研究基于以IL-8为评价指标的THP-1细胞光致敏评价方法对包括19种光致敏剂在内的27种化合物进行检测,初步确定了该方法中受试物光致敏阳性的判定标准。研究结果说明该方法对于一些弱的和中等强度的光致敏剂也能够进行正确的评价,具有一定的灵敏度,同时,方法验证的结果显示该方法具有较好的准确性、特异性和重复性。进行试验时需要考虑合适的受试物作用浓度、光致敏

强弱程度、细胞状态等多种因素,该标准仍需在更多的光致敏阳性化合物和其它类型化合物中做深入验证。另外本研究是在同一实验室内、同一人员对光致敏体外评价方法的验证研究,未来还应在不同实验室间、由不同人员联合进行验证。

皮肤光致敏有害结局通路(adverse outcome pathway, AOP)包括4个关键事件,分别是:(1)透过皮肤角质层或者经循环到达皮肤的受试物与皮肤内蛋白结合,形成具有免疫原性的半抗原-蛋白结合物;(2)角质细胞活化,提供危险信号,使皮肤内的朗格汉斯细胞捕获抗原;(3)树突状细胞活化,识别、加工处理抗原,树突状细胞成熟过程中会有大量细胞表面分子(如CD86、CD54、CD40、CD83等)表达和细胞因子(IL-8、TNF- α 、IL-1 β 和IL-6等)的释放;(4)T细胞识别树突状细胞表面的抗原后被激活形成记忆T细胞,记忆T细胞增殖以后诱发光致敏反应^[14]。本研究方法是基于AOP通路中第3个阶段,即树突状细胞活化而建立的光致敏体外评价方法。由于光致敏机制的复杂性^[15],单一体外测试方法不能完整模拟整个光致敏过程^[16],因此可能在评价受试物光致敏性时具有一定的局限性。未来应考虑进一步开发针对光致敏AOP通路上不同关键事件的体外评价方法,并进行方法组合评价研究,以更好对受试物进行光致敏性评价。

本研究完善了以细胞因子为评价指标的THP-1细胞光致敏体外评价方法,确定了该方法的评价指标和判定标准,并验证了该方法具有较好的准确性、特异性、灵敏度和重复性。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Hoya M, Hirota M, Suzuki M, et al. Development of an *in vitro* photosensitization assay using human monocyte-derived cells [J]. Toxicol Vitro, 2009, 23(5): 911-918.
- [2] 许教雄, 杨文林. 光变应性接触性皮炎的光变应原研究进展 [J]. 中国医学文摘: 皮肤科学, 2012, 29(4): 206-208.
Xu J X, Yang W L. Advancement in the photoallergen of photoallergic contact dermatitis [J]. China Med Abstr Dermatol, 2012, 29(4): 206-208.
- [3] 王广进, 张福仁. 药物诱发的光敏反应 [J]. 中国中西医结合皮肤性病学杂志, 2009, 8(2): 131-133.
Wang G J, Zhang F R. Drug induced photosensitivity [J]. Chin J Dermatovenereol Integr Tradit West Med, 2009, 8(2): 131-133.
- [4] 国家药品监督管理局. 总局关于将化妆品用化学原料离体皮肤腐蚀性大鼠经皮电阻和皮肤光变态反应2个试验方法纳入化妆品安全技术规范(2015年版)的通告 [EB/OL]. (2017-08-21) [2021-04-17]. <https://www.nmpa.gov.cn/yaopin/ypggtg/ypqtgg/20170821171601525.html>.
State Administration of Drug Administration. Notice of the General Administration of China on the inclusion of the two test methods of *in vitro* skin corrosive rat transdermal resistance and skin photoallergy of chemical materials used in cosmetics into the Cosmetic Safety Technical Specification (2015 edition) [EB/OL]. (2017-08-21) [2021-04-17]. <https://www.nmpa.gov.cn/yaopin/ypggtg/ypqtgg/20170821171601525.html>.
- [5] 阮鸿洁, 石莹, 宋瑞霞, 等. 两种光接触性变态反应试验方法的比较 [J]. 预防医学情报杂志, 2010, 26(9): 756-758.
Ruan H J, Shi Y, Song R X, et al. Comparison of two animal test methods of photo-contact allergy [J]. J Prev Med Inf, 2010, 26(9): 756-758.
- [6] 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.
- [7] 赵华琛, 王宇, 黄舒佳, 等. 以细胞因子为研究指标的光致敏体外评价方法的建立 [J]. 药物评价研究, 2022, 45(1): 1-9.
Zhao H C, Wang Y, Huang S J, et al. Establishment of an *in vitro* photosensitization evaluation method using cytokines evaluation index [J]. Drug Eva Res, 2022, 45(1): 1-9.
- [8] Onoue S, Ohtake H, Suzuki G, et al. Comparative study on prediction performance of photosafety testing tools on photoallergens [J]. Toxicol Vitro, 2016, 33: 147-152.
- [9] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局. 化妆品体外替代试验方法验证规程: SN/T 3898—2014 [S]. 2014.
General Administration of Quality Supervision, Inspection and Quarantine of the People's Republic of China. Verification procedure of cosmetic substitution test method *in vitro*: SN/T 3898 — 2014 [S]. 2014.
- [10] 赵华琛, 刘丽, 李波. 以细胞表面标志物为研究指标的光致敏体外评价方法 [J]. 中国新药杂志, 2019, 28(4): 408-417.
Zhao H C, Liu L, Li B. Establishment of *in vitro* photosensitization evaluation method using cell surface markers as evaluation index [J]. Chin J New Drugs, 2019,

- 28(4): 408-417.
- [11] 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.
- [12] Kerstein R L, Lister T, Cole R. Laser therapy and photosensitive medication: A review of the evidence [J]. *Lasers Med Sci*, 2014, 29(4): 1449-1452.
- [13] Reuter H, Gerlach S, Spieker J, et al. Evaluation of an optimized protocol using human peripheral blood monocyte derived dendritic cells for the *in vitro* detection of sensitizers: Results of a ring study in five laboratories [J]. *Toxicol Vitro*, 2015, 29(5): 976-986.
- [14] 陈健, 柯逸晖, 陈彧, 等. 基于树突状细胞激活建立皮肤致敏的体外方法 [J]. *中国比较医学杂志*, 2018, 28(5): 114-118.
- Chen J, Ke Y H, Chen Y, et al. *In vitro* method for skin sensitization based on dendritic cell activation [J]. *Chin J Comp Med*, 2018, 28(5): 114-118.
- [15] Yoshida Y, Sakaguchi H, Ito Y, et al. Evaluation of the skin sensitization potential of chemicals using expression of co-stimulatory molecules, CD54 and CD86, on the naive THP-1 cell line [J]. *Toxicol Vitro*, 2003, 17(2): 221-228.
- [16] Schwarz T, Schwarz A. Molecular mechanisms of ultraviolet radiation-induced immunosuppression [J]. *Eur J Cell Biol*, 2011, 90(6/7): 560-564.

[责任编辑 兰新新]