

以CD54为评价指标的THP-1细胞光致敏体外评价方法的确定和验证

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

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 确定并验证以细胞表面标志物CD54作为评价指标的光致敏体外评价方法。方法 将THP-1细胞与多种光致敏剂、光刺激剂、皮肤致敏剂、皮肤刺激剂和阴性受试物分别孵育, 在光照射或避光处理后, 用流式细胞仪测定细胞表面标志物CD54和CD86的表达水平并统计分析, 进一步确定具体的评价指标, 并对该方法的准确性、特异性、灵敏度、重复性进行验证。结果 19种光致敏剂中有15种引起照射组THP-1细胞表达CD54的平均荧光强度(MFI)较非照射组显著增加($P < 0.05, 0.01$), 且照射组细胞表达CD54的相对荧光强度(RFI)值均在1.5以上。光刺激剂经光照射后也可引起细胞表达CD54的MFI显著增加($P < 0.01$), 但经过预照射处理后, CD54的表达水平较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细胞表达CD54和CD86的MFI比对照组显著增加($P < 0.01$), 光照后CD54的表达反而略有下降。在光照和避光条件下, 皮肤刺激剂、阴性受试物(乳酸)均未引起细胞表达CD54或CD86的显著性变化。以CD54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85.2%、100%和78.9%, 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表面标志物评价指标为CD54, 判定标准为: (1) 光照后THP-1细胞表达CD54的MFI较照射前显著性增加; (2) 光照后THP-1细胞表达CD54的RFI ≥ 1.5 ; (3) 当上述条件均满足时, 对受试物进行预照射处理, 结果仍然满足前2条标准。

关键词: 光致敏; THP-1细胞; CD54; CD86; 平均荧光强度; 相对荧光强度; 方法学验证

中图分类号: R965.1 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376 (2022) 01-0020-10

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2022.01.003

Identification and validation for *in vitro* photoallergy evaluation method of THP-1 cell with CD54 as evaluation index

DONG Jianxin^{1,2}, HUANG Shujia², WANG Yu², JIANG Hua², ZHAO Huachen³, ZHU Qingfen¹, LIU Li², LI Bo^{1,2,3}

1. 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 To identify and validate an *in vitro* photoallergy evaluation method with cell surface markers as research indicators. **Methods** THP-1 cells were incubated with a variety of photoallergy agents, photoirritants, skin sensitizers, skin irritant and negative subject respectively. After solar radiation or non-radiation treatment, the expression changes of cell surface markers CD54 and CD86 were detected by flow cytometry and analysed to confirm the specific evaluation indicators and to validate the accuracy, specificity, sensitivity and repeatability of the method. **Results** Among the 19 photoallergy agents, 15 induced a significant increase in the mean fluorescence intensity (MFI) of CD54 expressed in THP-1 cells in the irradiated groups compared with the non-irradiated groups ($P < 0.05$ and 0.01), and the relative fluorescence intensity (RFI) of CD54 in THP-1 cells in the irradiated groups were all above 1.5. The photoirritants also induced the significant increase in CD54 MFI of THP-1 cells after solar irradiation ($P <$

收稿日期: 2021-05-07

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,研究方向为药品检验和药物安全性评价。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。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。Tel:(010)67872233-8312 E-mail:liuli@nifdc.org.cn

0.01), but the expression level of CD54 was significantly decreased after pre-irradiation treatment compared with direct irradiation group ($P < 0.01$). Without solar radiation, the expression levels of CD54 and CD86 in THP-1 cells incubated with the two skin sensitizers were significantly increased compared with control group ($P < 0.01$), while the expression of CD54 was slightly decreased after irradiation. Both skin irritants and negative subject did not cause the significant change in CD54 and CD86 expression under solar irradiation and in the dark conditions. In this study, the accuracy, specificity and sensitivity of the photoallergy evaluation method using THP-1 cells with CD54 as the evaluation index was 85.2%, 100% and 78.9% respectively, and the method had good repeatability. **Conclusion** The cell surface marker evaluation index of THP-1 cell photoallergy evaluation method was determined as CD54, and the evaluation criteria were as follows: (1) MFI of THP-1 cells expressing CD54 increased significantly after irradiation compared with before irradiation, (2) The RFI of CD54 expression in THP-1 cells after irradiation was ≥ 1.5 , (3) When all the above conditions are met, the test materials are pre-irradiated, and the results still meet the first two standards. **Key words:** photoallergy; THP-1 cell; CD54; CD86; mean fluorescence intensity; relative fluorescence intensity; methodology validation

光致敏是受试物在紫外线照射条件下引起机体产生的一种IV型过敏反应^[1],其临床表现通常为颜面、颈部、手臂、腿部等暴露部位出现红斑、丘疹样改变,经常伴有瘙痒和灼痛感。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^[2]。研究表明,皮肤用药、某些系统给药,药物和化妆品中某些成分可能诱导光致敏反应^[3],因此光致敏性评价是药物安全性评价的重要项目。常见的诱发光致敏反应的药物主要有喹诺酮类、磺胺类、抗真菌药、四环素类、非甾体抗炎药、抗抑郁药和吩噻嗪类抗精神病药、利尿剂等^[4-6]。化妆品中含有的光致敏成分主要有苯酮、对氨基苯甲酸、葵子麝香、6-甲基香豆素等。另外,一些含有维A酸成分的治疗痤疮的药物也可能具有光致敏作用^[7]。

美国食品药品监督管理局(FDA)、国际人用药品注册技术协调会(ICH)和国家药品监督管理局的相关指导原则中都要求对具有潜在光致敏作用的药物进行评价^[8-11]。但目前均采用传统的豚鼠光致敏试验评价受试物的光致敏性,该方法可以直观地观察到受试物引起的皮肤红斑、水肿等反应,但存在一些缺点,例如缺乏客观定量的评价指标、使用动物数多、对动物造成的损伤较大、不符合动物福利和3R原则、试验周期长等。另外,目前欧盟、挪威、新西兰等已全面禁止用动物评价化妆品安全性。因此,开发并验证一种体外评价受试物光致敏性的方法具有十分重要的意义。本实验室前期应用人急性单核白血病细胞(human acute monocytic leukemia cell, THP-1)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分别检测细胞表面标志物CD54和CD86的变化,确定了合适的辐照强度和光照后检测时间点,初步建立了应用细胞

表面标志物进行体外光致敏评价的方法^[12]。为了进一步确定具体的评价指标和光致敏阳性判定标准,并对建立的方法进行验证,本研究增加了光致敏剂的种类和数量,对方法的准确性、特异性、灵敏度和重复性进行验证。

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PBS缓冲液(Hyclone公司); 青链霉素(江苏凯基生物技术股份有限公司); 二甲基亚砜(DMSO, Sigma公司); 细胞表面标志物检测用试剂: Anti-human CD86(B7-2) Alexa Fluor 488, Anti-human CD54(ICAM-1) APC, Mouse IgG2b K Isotype Control Alexa Fluor 488, Mouse IgG1k Isotype control APC, Propidium Iodide Staining Solution(PI)(eBioscience公司)。

光致敏剂: 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)、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)、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(CAS: 50-21-5), 溶剂(无水乙醇、灭菌注射用水、二甲基亚砜), 以上试剂均购于国药集团化学试剂有限公司。

1.2 主要仪器

FACSCalibur 流式细胞仪(BD 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); ST-50 制冰机(圣斯特集团); 紫外辐照计(北京师范大学光电仪器厂); MILLI-Q® A10® 超纯水仪(ADVANTAGE A10); 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(Thermo 公司); PB203-N 电子天平(瑞士梅特勒-托利多仪器公司)。

1.3 细胞培养

THP-1 细胞系来自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 °C 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。置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养, 每日观察细胞的生长情况。

2 方法

2.1 辐照强度、时间和检测时间点的选择

根据本课题组前期研究的结果^[12], 在保证细胞存活率≥75%的前提下, 采用引起 6-MC 细胞模型 CD54 平均荧光强度(mean fluorescence intensity, MFI)显著增加的光照强度和照射时间, 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。

本课题组前期研究^[12]中摸索了照射后细胞表面标志物适宜检测时间点, 与光致敏剂 6-MC 孵育后, 分别用 SOL 500 人工太阳照射装置进行照射, 在光照后即刻、5、10、24、48 h 检测 THP-1 细胞表面 CD54 和 CD86 表达情况。在保证细胞存活率≥75%的前提下, 在照射后 10、24、48 h, THP-1 细胞 CD54 MFI 均显著大于非照射组, 同时考虑到试验操作的方便性和尽量缩短试验时程, 确定光照照射后 24 h 为表面标志物检测时间点。

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, 选择在光致敏剂模型中使细胞存活率在 75% 以上并引起 CD54 表达水平有明显变化的受试物浓度进行正式实验。受试物最终使用浓度见表 1。

表 1 受试物应用浓度

Table 1 Application concentration of tested substance

受试物类别	受试物名称	溶剂	使用终浓度/ (μg·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	1 500、2 000、2 500
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	0.1、0.2、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	乳酸	无水乙醇	500

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 μL, 给药组加入 10 μL 已配制好的受试物溶液, 对照组加入等体积的溶剂, 置于 37 °C、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。

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24 h。

2.7 CD54和CD86的检测

将细胞培养板取出,吸取孔内细胞悬液400 μL 于流式管中,1 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心5 min,弃上清,在各管内加入1 mL的washing buffer(49.5 mL PBS溶液与0.5 mL FBS溶液混合),再次进行离心,弃上清,之后向各管依次加入80 μL 的Pre-staining buffer(9.5 mL PBS溶液与0.5 mL的FBS溶液混合)预染色20 min。预染完成后,将流式管置于冰中静置5 min,静置完成后向各管依次加入配制好的抗CD54、抗CD86荧光标记抗体20 μL (按照说明书要求将CD54和CD86荧光抗体各1.5 μL 和17 μL Pre-staining buffer混合)。实验设同型对照组,给予20 μL 已配制好的同型对照溶液(将CD54和CD86同型对照各1.5 μL 和17 μL Pre-staining buffer混合),轻弹流式管底部混匀后,避光放置40 min。之后各管加入2 μL 的PI溶液,孵育15 min。然后向各管加入1 mL的washing buffer,1 200 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ (4 $^{\circ}\text{C}$)离心5 min,弃上清,重复1次。之后加入300 μL 的PBS缓冲液,轻弹流式管底部重悬和混匀细胞,用FACS calibur流式细胞仪进行检测。收集10 000个左右细胞,计数CD54⁺和CD86⁺细胞个数,用Cellquest软件分析获取CD54⁺和CD86⁺细胞百分比和平均荧光强度(mean fluorescence intensity, MFI)数据。为了每次实验条件统一,减少实验误差,CD54和CD86同型对照的阳性细胞百分比控制在2%以内。

2.8 数据分析

在照射与非照射条件下分别计算细胞表达CD54和CD86的相对荧光强度(relative fluorescence intensity, RFI)值。

$\text{RFI} = (\text{受试物“抗CD54或CD86抗体”MFI} - \text{本组同型对照MFI}) / (\text{对照组“抗CD54或CD86抗体”MFI} - \text{本组同型对照MFI})$

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用Graphpad prism 8中独立样本 t 检验来统计受试物给药组与对照组CD54和CD86的阳性细胞百分比、MFI和RFI的组间差异显著性。

3 结果

3.1 各种类型受试物对THP-1细胞CD54和CD86表达的影响

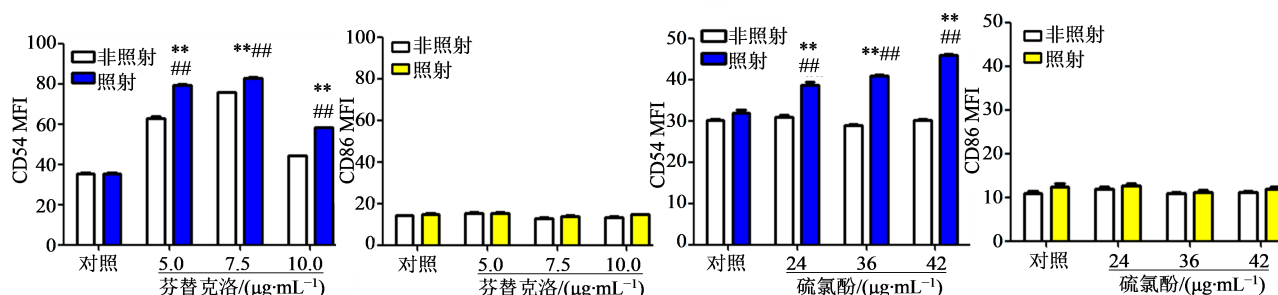
3.1.1 光致敏剂模型THP-1细胞CD54和CD86的表达 有15种光致敏剂可引起光照组THP-1细胞表达CD54的MFI比非照射组显著增加($P < 0.05$ 、 0.01),增加的幅度介于9%~200%,其中有部分光致敏剂引起照射组CD54⁺细胞百分比较非照射组显著增加,增加的幅度介于4%~42%。CD86的表达均未见显著变化。经过预照射处理后,预处理照射组与预处理未照射组比较,CD54的MFI也呈显著升高,并且其水平与前述直接照射组未见显著性差异,即预照射处理对于光致敏剂的CD54表达无影响。强光致敏剂7-甲氧基香豆素、中等强度光致敏剂芬替克洛和弱光致敏剂硫氯酚模型THP-1细胞表达CD54和CD86水平的结果见表2、图1。本研究仅对强光致敏剂进行了预照射处理,因7-甲氧基香豆素70 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 照射组细胞存活率小于75%,未进行预照射处理。

3.1.2 光刺激剂模型THP-1细胞CD54和CD86的表达 吡啶、葱、8-MOP和布洛芬4种光刺激剂照射组与非照射组比较,THP-1细胞表达CD54阳性细胞百分比和CD54的MFI均显著性增加($P < 0.01$),阳性细胞百分比增加20%~30%;MFI增加40%~100%。对上述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比较CD54的MFI虽然仍有显著增加($P < 0.01$),但与前述直接照射组(未经预照射处理)比较CD54的表达均显著下降($P < 0.01$),提示预照射可明显减弱光刺激剂致THP-1细胞CD54表达增加的作用。光刺激剂8-MOP和吡啶对细胞表达CD54和CD86水平影响的结果见表3、图2。

3.1.3 皮肤致敏剂模型THP-1细胞CD54和CD86的表达 在未经照射条件下,皮肤致敏剂DNCB和CHD细胞模型表达CD54和CD86显著高于对照组($P < 0.01$),CD54的MFI分别为对照组的4.3和3.1倍,经光照后其CD54的表达比照射前反而有所下降。未经照射时,DNCB和CHD细胞模型CD86的MFI分别为对照组的2.4和1.8倍,照射后表达情况无明显变化。DNCB结果见图3。

表2 不同浓度7-甲氧基香豆素引起THP-1细胞表达CD54和CD86的变化($\bar{x} \pm s, n=4$)Table 2 Changes of CD54 and CD86 expression in THP-1 cells induced by different concentrations of 7-methoxy-coumarin ($\bar{x} \pm s, n=4$)

组别	质量浓度/ ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	照射条件	活细胞比 例/%	CD54 ⁺ /%	CD86 ⁺ /%	CD54 ⁺ MFI	CD86 ⁺ MFI	CD54 ⁺ RFI	CD86 ⁺ RFI
对照	—	非照射	96.50±0.45	78.21±0.69	5.63±0.45	20.91±0.45	13.82±0.99	—	—
		照射	97.36±0.78	77.90±0.34	4.84±0.56	22.27±0.19	13.34±0.67	—	—
7-甲氧基 香豆素	10	非照射	97.21±0.99	78.53±0.25	5.42±0.87	22.07±0.18	13.58±0.11	1.11	0.91
		照射	94.73±0.45	87.02±0.15***	8.58±0.67	33.68±0.18***	14.33±0.22	1.87	0.67
	20	非照射	96.29±0.33	80.13±0.22	5.88±0.33	21.67±0.36	13.70±0.67	1.08	0.87
		照射	93.67±0.34	88.85±0.35***	9.06±0.67	41.79±0.45***	15.12±0.88	2.53	0.95
	40	非照射	96.30±0.22	83.12±0.22	5.71±0.78	22.47±0.34	14.07±0.33	1.13	0.88
		照射	85.63±0.56	83.00±0.56	8.39±0.34	55.23±0.34***	14.86±0.22	3.60	0.79
	70	非照射	95.60±0.33	84.37±0.55	5.80±0.33	22.88±0.38	13.95±0.53	1.19	1.27
		照射	73.01±0.34	70.04±0.44***	4.77±0.20	54.25±0.41***	13.46±0.56	3.48	1.13
	10	预处理非照射	95.56±0.43	76.30±0.30	5.34±0.29	21.37±0.35	11.28±0.37	1.09	0.87
		预处理照射	92.38±0.78	86.54±0.28***	6.54±0.26	34.37±0.38***	9.83±0.39	1.91	0.81
	20	预处理非照射	95.38±0.19	79.87±0.23	5.47±0.28	20.89±0.48	10.37±0.28	1.09	0.94
		预处理照射	93.47±0.57	87.54±1.04***	6.23±0.21	42.32±0.47***	10.05±0.29	2.52	0.93
	40	预处理非照射	92.83±0.45	82.19±0.48	5.87±0.34	21.38±0.39	11.01±1.03	0.95	0.89
		预处理照射	83.27±0.29	82.37±0.37	6.09±0.23	43.38±0.91***	9.87±0.54	3.57	0.93
	70	预处理非照射	94.29±0.47	85.19±0.45	4.89±0.35	21.39±0.47	10.65±0.38	1.20	0.85

与相同照射条件下对照组比较: ** $P < 0.01$; 与同组非照射比较: *** $P < 0.01$ ** $P < 0.01$ vs control group under same irradiation conditions; *** $P < 0.01$ vs same group without irradiation与相同照射条件下对照组比较: ** $P < 0.01$; 与同组非照射比较: *** $P < 0.01$ ** $P < 0.01$ vs control group under same irradiation conditions; *** $P < 0.01$ vs same group without irradiation图1 不同浓度芬替克洛、硫氯酚引起THP-1细胞表达CD54和CD86的MFI($\bar{x} \pm s, n=4$)Fig. 1 MFI expression of CD54 and CD86 in THP-1 cells induced by different concentrations of fenticrol and thiochlorophenol ($\bar{x} \pm s, n=4$)

3.1.4 皮肤刺激剂模型 THP-1 细胞 CD54 和 CD86 的表达 照射和非照射条件下,皮肤刺激剂 SLS 均未引起 CD54 和 CD86 的 MFI 发生显著性变化。结果见图 4。

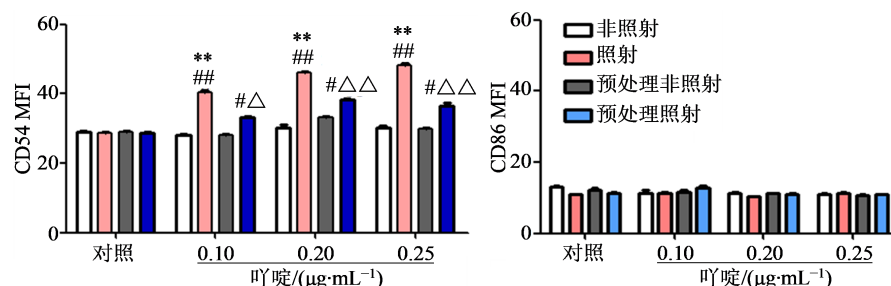
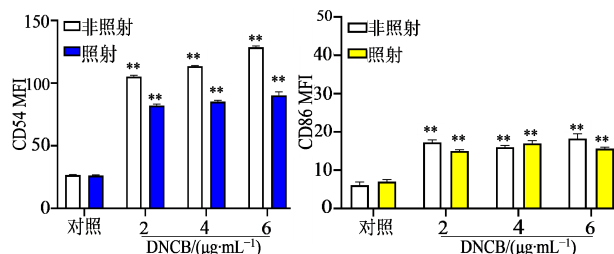
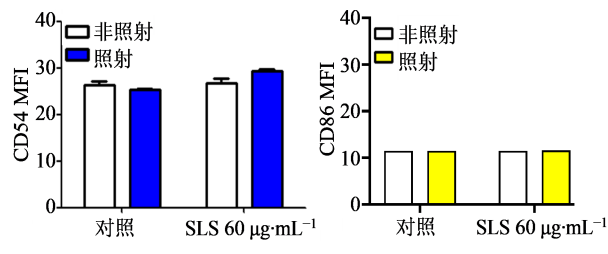
3.1.5 阴性受试物与 THP-1 细胞孵育后 CD54 和 CD86 的表达 照射和非照射条件下,阴性受试物乳酸均未引起 CD54 和 CD86 的 MFI 发生显著性变化。结果见图 5。

3.2 各类受试物模型 THP-1 细胞 CD54 的 RFI

图 6 为各受试物引起照射组细胞表达 CD54 的最大 RFI 值,除了三氯生、吩噻嗪、阿伏苯宗、西诺沙酯这 4 种光致敏剂引起细胞表达 CD54 的 RFI 值在 1.0 左右以外,其余光致敏剂引起细胞表达 CD54 的 RFI 值均在 1.5 以上。2 种皮肤致敏剂未经照射即引起细胞表达 CD54 的 RFI 值高于 1.5,照射后反而下降。皮肤刺激剂、阴性受试物照射组细胞表达

表3 不同浓度8-MOP引起THP-1细胞表达CD54和CD86的变化($\bar{x}\pm s, n=4$)Table 3 Changes of CD54 and CD86 expression in THP-1 cells induced by different concentrations of 8-MOP ($\bar{x}\pm s, n=4$)

组别	质量浓度/ ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	照射条件	活细胞百分比/%	CD54 ⁺ /%	CD86 ⁺ /%	CD54 ⁺ MFI	CD86 ⁺ MFI	CD54 ⁺ RFI	CD86 ⁺ RFI
对照	—	非照射	95.32±0.23	60.23±0.25	8.92±0.92	22.08±0.26	12.02±0.21	—	—
	—	照射	95.62±0.19	60.54±0.67	8.87±0.27	23.29±0.25	11.09±0.24	—	—
8-MOP	30	非照射	86.65±0.26	64.26±0.27	9.98±0.25	22.98±0.26	12.89±0.52	0.92	0.94
		照射	86.25±0.25	75.28±0.76 ^{***}	10.03±0.27	40.27±0.27 ^{***}	11.78±0.27	2.42	0.93
	50	非照射组	84.55±0.26	61.27±0.25	9.87±0.25	21.29±0.28	11.09±0.26	0.96	0.92
		照射	83.27±0.28	76.87±0.56 ^{***}	8.86±0.26	42.37±0.26 ^{***}	12.08±0.24	2.60	0.91
	60	非照射	83.56±0.18	60.98±0.54	9.08±0.26	20.37±0.27	9.76±0.26	0.95	0.89
		照射	78.27±0.28	77.86±0.25 ^{***}	10.02±0.26	45.66±0.27 ^{***}	10.08±0.27	2.87	0.90
	30	预处理非照射	88.65±0.34	62.39±0.28	9.02±0.25	21.28±0.27	13.08±0.24	0.98	0.88
		预处理照射	87.98±0.65	75.67±0.19 ^{***}	9.54±0.23	25.62±0.29 ^{#△△}	12.09±0.25	1.19	0.91
	50	预处理非照射	80.87±0.24	63.27±0.26	7.82±0.56	21.98±0.26	11.08±0.65	0.97	0.90
		预处理照射	84.78±0.19	75.67±0.56 ^{***}	8.09±0.26	26.62±0.27 ^{#△△}	12.38±0.26	1.28	0.89
	60	预处理非照射	82.37±0.24	62.98±0.27	9.02±0.36	19.28±0.26	11.07±0.26	0.90	1.01
		预处理照射	75.45±0.28	76.54±0.22 ^{***}	10.08±0.56	27.08±0.27 ^{#△△}	12.07±0.25	1.32	1.00

与相同照射条件下对照组比较: ** $P<0.01$; 与同组非照射比较: # $P<0.05$ ## $P<0.01$; 与相同剂量直接照射组比较: △△ $P<0.01$ ** $P<0.01$ vs control group under same irradiation conditions; # $P<0.05$ ## $P<0.01$ vs same group without irradiation; △△ $P<0.01$ vs direct exposure group of same dose与相同照射条件下对照组比较: ** $P<0.01$; 与同组非照射比较: # $P<0.05$ ## $P<0.01$; 与相同剂量直接照射组比较: △△ $P<0.01$ ** $P<0.01$ vs control group under same irradiation conditions; # $P<0.05$ ## $P<0.01$ vs same group without irradiation; △△ $P<0.01$ vs direct exposure group of same dose图2 不同浓度吡啶引起细胞表达CD54和CD86的MFI($\bar{x}\pm s, n=4$)Fig. 2 MFI of CD54 and CD86 in THP-1 cells induced by different concentrations of fenticrol and thiochlorophenol ($\bar{x}\pm s, n=4$)与相同照射条件下对照组比较: ** $P<0.01$ ** $P<0.01$ vs control group under same irradiation conditions图3 不同浓度DNCB引起细胞表达CD54和CD86的MFI($\bar{x}\pm s, n=4$)Fig. 3 Different concentrations of DNCB induced MFI of CD54 and CD86 ($\bar{x}\pm s, n=4$)图4 SLS引起细胞表达CD54和CD86的MFI($\bar{x}\pm s, n=4$)Fig. 4 MFI of CD54 and CD86 induced by SLS ($\bar{x}\pm s, n=4$)

CD54的RFI均小于1.5。

图7是4种光刺激剂、4种光致敏剂预照射组和直接照射组细胞表达CD54的RFI。4种光刺激剂直

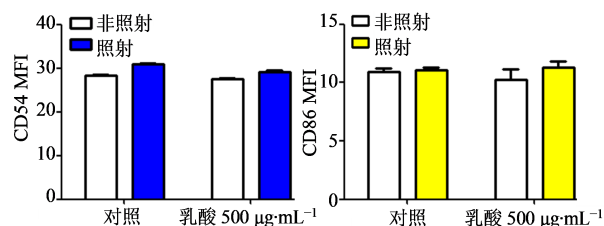


图5 乳酸与THP-1细胞孵育后CD54和CD86的MFI($\bar{x} \pm s, n=4$)

Fig. 5 MFI of CD54 and CD86 after lactic acid incubation with THP-1 cells ($\bar{x} \pm s, n=4$)

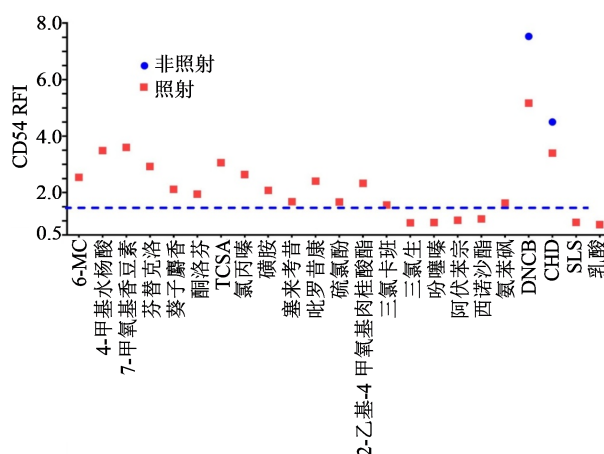


图6 23种受试物引起THP-1细胞表达CD54的RFI值($\bar{x} \pm s, n=4$)

Fig. 6 RFI value of CD54 in THP-1 cells induced by 23 subjects ($\bar{x} \pm s, n=4$)

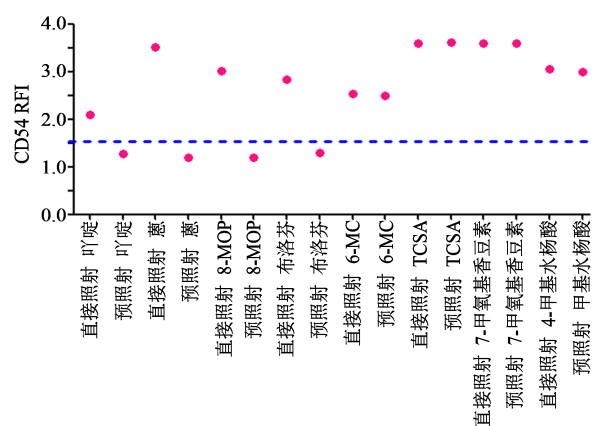


图7 4种光刺激剂和4种光致敏剂直接照射组和预照射组细胞表达CD54的RFI($\bar{x} \pm s, n=4$)

Fig. 7 RFI of CD54 of four kinds of photostimulants and four kinds of photosensitizers in direct irradiation and pre-irradiation group ($\bar{x} \pm s, n=4$)

按照照射组细胞表达RFI也都在1.5以上,但是预照射处理以后,预照射组与直接照射组比较RFI显著性下降,并且均降到1.5以下。预照射处理对4种光致敏剂引起细胞表达CD54的RFI无影响。

3.3 评价指标和判定标准的确定

通过对不同类型的受试物引起照射前后THP-1细胞表达CD54、CD86强度的分析比较,本课题组认为THP-1细胞表面CD54的表达强度(MFI和RFI)可作为体外评价受试物光致敏性的具体指标。将该方法的光致敏阳性判定标准进一步确定为:(1)光照后THP-1细胞表达CD54的MFI比较照射前显著性增加;(2)光照后THP-1细胞表达CD54的RFI ≥ 1.5 ;(3)当上述条件均满足时,对受试物进行预照射处理,结果仍然满足前2条标准。

3.4 以CD54为评价指标的光致敏体外评价方法的验证

分别对该方法的准确性、特异性、灵敏度、重复性进行验证。相关指标的计算方法如表4所示。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,即 $(a+d)/(a+b+c+d)^{[13]}$ 。本研究中该方法的真阳性率为 $15/19=78.9\%$,真阴性率为 $8/8=100\%$,假阳性率为 $0/8=0$,假阴性率为 $4/19=21.1\%$,准确性为 $(15+8)/(19+8)=85.2\%$ 。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。本研究确定的方法能将试验中所有光致敏阴性受试物正确鉴定为阴性,特异性为100%,灵敏度为真阳性率,即78.9%,并且能将中等和弱光致敏剂鉴别为阳性。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。本研究每种受试物均设置3~4个作用浓度,每个浓度在相同试验条件下在不同时间重复测定3次,不同批次间CD54的MFI无显著性

表4 相关指标的计算

Table 4 Calculation of related indicators

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(真阳性)	b(假阳性)	a+b
阴性(-)	c(假阴性)	d(真阴性)	c+d
总计	a+c	b+d	a+c+b+d

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

差异,且3次结果的相对标准偏差均在20%以内,具有良好重复性。

4 讨论

在皮肤光致敏作用有害结局通路(adverse outcome pathway, AOP)中包括4个关键事件^[14]:(1)在紫外照射条件下,透过皮肤角质层或者经循环到达皮肤的光致敏剂吸收光能后成激活状态,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(全抗原);(2)角质细胞活化,提供危险信号,使皮肤内的树突状细胞即朗格汉斯细胞捕获抗原;(3)朗格汉斯细胞活化,识别、加工处理抗原,细胞成熟过程中会有大量表面分子表达(如CD86、CD54、CD40和CD83等)和细胞因子的释放(TNF- α 、IL-8、IL-1 β 和IL-6等);(4)朗格汉斯细胞迁移至局部淋巴结,将抗原呈递给淋巴细胞,抗原特异性T淋巴细胞生成和增殖,并释放到系统循环中,当机体再次接触致敏原时T细胞激活,引起炎症反应^[15]。本研究是基于AOP通路中第3个阶段即朗格汉斯细胞活化而建立的光致敏体外评价方法。

在体外实验中,通过诱导培养得到的树突状细胞数量十分有限,在检测致敏物过程中存在因细胞来源而出现的个体差异性,使得以朗格汉斯细胞建立细胞模型难以标准化和规模化。THP-1细胞是一种人急性单核白血淋病淋巴细胞,属于人外周血的单核细胞系,具有与树突状细胞类似的性质和永生化的特点。因此本研究选择THP-1细胞来构建受试物光致敏细胞模型^[16-17]。CD54也称细胞间黏附分子,属于免疫球蛋白超家族的成员,通过与其受体的特异性结合,使白细胞、肿瘤细胞和炎症细胞与内皮细胞间的黏附作用增强,活化内皮细胞,介导细胞间或细胞与基质间相互接触,从而参与细胞的信号转导与活化、免疫应答、炎症反应、血管生成等生理病理过程^[18]。CD86属于共刺激分子,可高效的协同刺激T细胞增殖、协同淋巴细胞介导的细胞毒作用,还可增强T细胞对抗原的敏感性,促进免疫应答^[19]。

光刺激反应是由活性氧(reactive oxygen species, ROS)介导的非免疫性反应^[20-21]。光刺激剂经过预照射处理后,其生成的ROS会在光照后短时间内失活,当再次与细胞共同孵育照射后,便不会对细胞产生损伤作用,光致敏剂的机制与光刺激剂不同,不是通过ROS对细胞产生影响,所以其诱导CD54增加的作用不会受到预照射处理的影响。因此可用本研究建立的以CD54为评价指标的THP-1

细胞光致敏体外评价方法鉴别光致敏剂和光刺激剂。皮肤致敏剂THP-1细胞模型中,未经光照时,受试物组CD54和CD86的MFI与对照组比较均显著增加,CD86增加的更明显。这与经济合作与发展组织(OECD)指导原则中关于人细胞系激活试验(h-CLAT)结果相一致^[22]。经过光照射后,CD54和CD86的MFI未见显著性升高,与非照射组比较反而有小幅度的下降,说明皮肤致敏剂引起CD54和CD86的表达增加不需要光照的激活,可以直接产生作用,并且光照对这2种标志物的表达还有轻度降低作用,这些结果与光致敏剂有明显不同。皮肤刺激剂SLS和阴性受试物乳酸上述指标在照射前后无显著性差异。本研究建立的评价方法能将以上光致敏阴性受试物准确判定为阴性,具有较好特异性。

本研究建立的以细胞表面标志物CD54为评价指标的THP-1细胞光致敏体外评价方法的准确性是85.2%,准确性较高。应用该评价方法,在保证细胞活率大于75%的条件下,三氯生、吩噻嗪、西诺沙酯、阿伏苯宗4种光致敏剂未被判定为光致敏阳性。这4种光致敏剂的光致敏强度未知,可能是因为其光致敏强度弱而未被检测为阳性,也可能是因为该评价方法仅是基于光致敏AOP通路的一个关键节点,不能覆盖所有的评价终点,因此对于有些光致敏剂可能不能正确评价。这也是其他一些毒理学体外评价方法所面临的问题,因此有必要同时开发其他相关的体外评价方法进行联合评价。

本方法能将19种光致敏剂中的15种判定为光致敏阳性,灵敏度为78.9%。本研究采用了不同强弱程度的光致敏剂进行验证,结果显示该方法能识别并检测出一些中等和弱的光致敏剂。RFI是受试物组CD54或CD86的MFI值与对照组CD54或CD86 MFI的比值(扣除同型对照)。它是在扣除了细胞本身自发荧光强度的基础上计算得来的,比MFI更为精确,是衡量细胞表面标志物表达强度的另一重要指标。TCSA、6-MC、7-甲氧基香豆素、4-甲基水杨酸都是强的光致敏剂,光照后CD54 RFI分别为3.06和2.54、3.60和3.49(最大值);芬替克洛、葵子麝香为中等程度光致敏剂,光照后CD54 RFI分别为2.93和2.12;磺胺、硫氯酚是弱光致敏剂,光照后CD54 RFI分别为2.08和1.67。人体光斑贴试验中,氯丙嗪引起光致敏反应的发生率为44.3%,显著大于磺胺的光致敏率(6.9%),氯丙嗪引起的光致敏皮疹反应(皮肤红斑、水肿)程度也明显

大于磺胺。本研究中氯丙嗪的RFI值明显大于磺胺,与临床人体光斑贴试验的结果一致^[23]。本方法能通过检测光照后THP-1细胞表达CD54的RFI值来评价光致敏强度,RFI的值与光致敏剂的致敏强度可能具有一定的强度-效应关系。

本研究中,每种受试物均设置了8个浓度分别与THP-1细胞作用,并经光照后进行方法的验证。之前已通过预试验进行了孵育浓度的摸索,找到照射后可以引起相关评价指标显著性变化的作用浓度,并同时保证实验中细胞存活率在75%以上,否则死亡细胞过多,会明显影响实验结果,难以保证研究结果的可靠性。有些受试物在较高浓度下会引起细胞的存活率明显下降,因此只能选择部分孵育浓度。最后,根据上述原则,每个受试物采用了3个或4个浓度分别与THP-1细胞作用,观察不同剂量下光致敏剂对THP-1细胞表达CD54的影响,使实验结果更客观,可靠,弥补了应用单一浓度受试物进行评价的不足。本研究发现,多种光致敏剂随给药浓度的增加,细胞CD54的表达也相应增加,提示某些光致敏剂引起细胞表达CD54的强度可能具有剂量相关性。

本研究基于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1种阴性受试物的试验结果,确定以THP-1细胞表面CD54的表达强度(MFI和RFI)作为体外评价受试物光致敏性的具体指标,并确定了该方法的光致敏阳性判定标准。目前根据文献所查到的光致敏剂数量有限,今后可通过研究,进一步扩大光致敏剂模型的数量,并通过联合验证,决定是否需要修正目前的判定标准。评价过程中需要考虑合适的受试物作用浓度、光致敏强弱程度、细胞生长状态等多种因素的影响。

本研究通过对多种光致敏剂和其他类型化合物模型的研究,进一步确定了THP-1细胞光致敏评价方法的细胞表面标志物评价指标和判定标准,验证了以THP-1细胞CD54 MFI和RFI为评价指标的体外光致敏评价方法具有良好的准确性、特异性、灵敏度和重复性。该方法还需进一步在不同实验室间进行联合验证。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Millard T P, Hawk J L. Photosensitivity disorders: Cause, effect and management [J]. Am J Clin Dermatol, 2002, 3 (4): 239-246.
- [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.
- [3] Xu J X, Yang W L. Advancement in the photoallergen of photoallergic contact dermatitis [J]. China Med Abstr Dermatol, 2012, 29(4): 206-208.
- [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, doi: 10.1371/journal.pone.0015221.
- [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.
- [6] 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.
- [7] Onoue S, Seto Y, Sato H, et al. Chemical photoallergy: Photobiochemical mechanisms, classification, and risk assessments [J]. J Dermatol Sci, 2017, 85(1): 4-11.
- [8] Hariya T, Kitamura K, Osawa J, et al. A cross-reaction between piroxicam-photosensitivity and thiosalicylate hypersensitivity in lymphocyte proliferation test [J]. J Dermatol Sci, 1993, 5(3): 165-174.
- [9] Stein K R, Scheinfeld N S. Drug-induced photoallergic and phototoxic reactions [J]. Expert Opin Drug Saf, 2007, 6(4): 431-443.
- [10] 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>.
- [11] 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>.
- [12] Food and Drug Administration (FDA). Guidance for industry: Photosafety testing [S]. 2000.
- [13] ICH guideline S10 Guidance on photosafety evaluation of pharmaceuticals. International Council on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use [S]. 2014.
- [14] ICH M3 (R2) Guidance on nonclinical safety studies for the conduct of human clinical trials and marketing authorization for pharmaceuticals [S]. 2014.
- [15] 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): 24-33.
- 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): 24-33.
- [13] 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 regulation of cosmetics *in vitro* substitution test method: SN/T 3898—2014 [S]. 2014.
- [14] 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.
- [15] Kutlubay Z, Sevim A, Engin B, et al. Photodermatoses, including phototoxic and photoallergic reactions (internal and external) [J]. Clin Dermatol, 2014, 32(1): 73-79.
- [16] 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.
- [17] Lugović-Mihić L, Duvančić T, Ferček I, et al. Drug-induced photosensitivity-a continuing diagnostic challenge [J]. Acta Clin Croat, 2017, 56(2): 277-283.
- [18] 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 In Vitro, 2013, 27(6): 1920-1927.
- [19] Sakaguchi H, Ashikaga T, Miyazawa M, et al. The relationship between CD86/CD54 expression and THP-1 cell viability in an *in vitro* skin sensitization test: Human cell line activation test (h-CLAT) [J]. Cell Biol Toxicol, 2009, 25(2): 109-126.
- [20] 彭双清, 郝卫东. 药物安全性评价关键技术 [M]. 北京: 军事医学科学出版社, 2013: 108-110.
- Peng S Q, Hao W D. *Key Technologies for Drug Safety Evaluation* [M]. Beijing: Military Medical Science Press, 2013: 108-110.
- [21] 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.
- [22] 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.
- [23] 高露娟, 胡跃, 倪春雅, 等. 氯丙嗪和磺胺光斑贴试验分析 [J]. 中国临床医学, 2015, 22(1): 48-50.
- Gao L J, Hu Y, Ni C Y, et al. Analysis of photo-patch testing of chlorpromazine and sulfanilamide [J]. Chin J Clin Med, 2015, 22(1): 48-50.

[责任编辑 兰新新]