



两品系小鼠局部淋巴结试验结果比较

胡培丽,张露勇,李波,邢书霞

(中国食品药品检定研究院,北京 100050)

【摘要】 目的 分析比较 BALB/c 和 CBA 小鼠局部淋巴结试验结果。方法 将已知致敏性的 4 种化学物(2,4-二硝基氯苯、丁子香酚、己基肉桂醛和异丙醇)和未知致敏性的 3 种化妆品对 BALB/c 和 CBA 小鼠连续染毒 3 d,第 5 天腹腔注射示踪剂 BrdU,第 6 天分离颌下淋巴结制取单细胞悬液,用 ELISA 试剂盒检测细胞增殖。结果 2,4-二硝基氯苯、丁子香酚、己基肉桂醛和 3 号烫发剂两品系结果均呈致敏阳性,3 种化学物 EC1.6 值分别为 0.08% (极强)、4.02% (中)、6.68% (中)(BALB/c)和 0.07% (极强)、6.08% (中)、8.89% (中)(CBA);异丙醇、1 和 2 号化妆品两品系结果均为致敏阴性,SI 均小于 1.6。结论 两品系小鼠局部淋巴结试验结果较一致,BALB/c 可替代 CBA 小鼠应用于化学物和化妆品的致敏性评价。

【关键词】 局部淋巴结试验;品系;化妆品

【中图分类号】 R758.22 R332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2015)05-0054-04

doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2015.005.013

The comparative study of two strains on results of Local lymph node assays

HU Pei-li, ZHANG Lu-yong, LI Bo, XING Shu-xia

(National Institutes for food and drug control, Beijing 100050, China)

【Abstract】 Objective To analyze and compare results of local lymph node assays (LLNA) between BALB/c and CBA mice. **Methods** 4 chemicals (2,4-dinitrochlorobenzene, eugenol, hexyl cinnamic aldehyde and isopropanol) and 3 cosmetics were applied to the dorsum of both ears of Balb/c and CBA mice for three consecutive days. BrdU solution was injected inter-peritoneally on day 5. On day 6, the bilateral draining auricular lymph nodes were excised and made into single cell suspension, the lymph cell proliferation was measured by BrdU ELISA kit. **Results** 2,4-dinitrochlorobenzene, eugenol, hexyl cinnamic aldehyde and NO. 3 perm agent pretended positive for both strains, EC1.6 values of three chemicals were found to be 0.08% (very strong), 4.02% (moderate), 6.68% (moderate) and 0.07% (very strong), 6.08% (moderate), 8.89% (moderate) for BALB/c and CBA mice respectively. Isopropanol, NO. 1 and NO. 2 cosmetics pretended to be non-sensitizers with SI < 1.6 for both strains. **Conclusion** This study showed that BALB/c mouse was essentially equal to CBA for LLNA; BrdU-ELISA, which suggested that BALB/c mouse was a good alternative for CBA used in chemicals and cosmetics allergenic evaluation.

【Key words】 Local lymph node assay; Strain; Cosmetics

小鼠局部淋巴结试验(local lymph node assay, LLNA)是皮肤致敏性多种替代方法中应用最为广泛

的全球标准方法^[1-3],但该方法需要使用放射性标记物、特定的设备和实验条件,不利于推广;2010年

[基金项目] 中检院中青年基金项目(2013NC3)。

[作者简介] 胡培丽(1981-),女,硕士,助理研究员,研究方向:食品化妆品安全性评价,E-mail: hupeili-1981@163.com。

OECD 指南公布了基于掺入溴脱氧尿嘧啶核苷和酶联免疫吸附测定的改良方法(LLNA: BrdU-ELISA)^[4],用示踪剂替代放射性标记物,较易推广。该指南中推荐使用 CBA 小鼠,由于该品系小鼠在国内供应量较少,价格昂贵,给国内很多学者开展该试验带来了一定的困难。鉴于国内外有使用 BALB/c、NMRI、ICR、DBA/2、C57BL/6、SJL 等品系的报道^[5-10],而 BALB/c 小鼠是国内应用较多的品系,遗传稳定,本实验尝试分析比较国内 BALB/c 和 CBA 两品系小鼠对 LLNA: BrdU-ELISA 实验结果的影响,从而为 LLNA 实验选择合适的动物品系提供参考。

1 材料和方法

1.1 受试物

溶剂由丙酮/橄榄油(AOO)(4:1 v/v)配制而成,2,4-二硝基氯苯(DNCB)(中国医药总公司北京分公司)与异丙醇(IPA,北京化工厂)分别用 AOO 配成 0.1% (w/v)、0.3% (w/v)、1.0% (w/v) 和 25% (v/v)、50% (v/v)、100% (v/v) 3 个浓度;丁子香酚(EUG)与己基肉桂醛(HCA)均购自 Sigma 公司,均用 AOO 配成 25% (v/v)、50% (v/v) 2 个浓度;3 种化妆品原液直接涂抹于小鼠耳背皮肤。

1.2 实验动物

SPF 级 BALB/c 和 CBA 小鼠,雌性,8~10 周龄,分别由中国食品药品检定研究院实验动物资源中心和北京华阜康生物科技股份有限公司提供,合格证号分别为【SCXK(京)2009-0017】、【SCXK(京)2009-0004】。动物试验环境为中国食品药品检定研究院屏障系统动物房【SYXK(京)2011-0008】。温度(22±2)℃,湿度 50%~70%,动物自由饮食,12 h 人工照明。

1.3 试剂和仪器

BrdU 粉剂与 BrdU-ELISA 试剂盒均购自德国 Roche 公司(编号 10280879001、11647229001)。BrdU 标记液用生理盐水配制成 10 mg/mL。SYNERGY HT 型全自动酶标仪(美国 BIO TEK 公司)、CR22G III 型低温离心机(日本 Hitachi 公司)。

1.4 方法

1.4.1 动物分组和染毒^[4,11]

动物随机分为 4 只/组,4 种化学物(己基肉桂醛、丁子香酚、2,4-二硝基氯苯、异丙醇)分别设为 2~3 个不同剂量组,共用一个 AOO 溶剂对照组;3 种

化妆品(1 号精华霜、2 号防晒霜、3 号烫发剂)分别设一个最高剂量组,共用一个蒸馏水对照组。将受试物 25 μL/耳/d 涂抹于小鼠双耳背部皮肤,连续涂抹 3 d,对照组涂抹 AOO 或蒸馏水,第 4 天不处理,第 5 天腹腔注射 BrdU 标记液 0.5 mL,第 6 天处死动物分离颌下淋巴结。

1.4.2 淋巴细胞制备^[4,11]

BrdU 标记液腹腔注射后 24 h,处死动物,摘取颌下淋巴结,研磨后用不锈钢筛网(200 目)过滤制成单细胞悬液,PBS 洗 2 次(离心 1200 r/min, 8 min),每只小鼠的淋巴细胞定容于 14 mL PBS 中。

1.4.3 ELISA 检测细胞增殖

将细胞悬液 100 μL/孔加至 96 孔板中,离心(1400 r/min, 10 min),弃上清,吹干细胞。经 ELISA 试剂盒处理后用酶标仪检测 BrdU 值(发射波长和参考波长分别为 370 nm, 492 nm),BrdU 标记指数为(A370 - A 空白 370) - (A492 - A 空白 492)。

1.4.4 SI、EC1.6 值计算与致敏性分级

刺激指数(stimulation index, SI) = 受试物组 BrdU 标记指数均值/溶剂对照组 BrdU 标记指数均值;SI ≥ 1.6,并有剂量-效应关系,该受试物为致敏阳性^[4,11]。根据 SI 计算 EC1.6 值和致敏级别,计算公式为^[11]:①EC1.6 = c + [(1.6 - d)/(b - d)] × (a - c)(受试物各浓度组对应 SI 值包括 >1.6 和 <1.6),②EC1.6 = 2^{log₂(c) + [(1.6 - d)/(b - d)] × [log₂(a) - log₂(c)]}(受试物各浓度组对应 SI 值均 >1.6),其中设 a、c 为邻近两点受试物的浓度,b、d 为对应的 SI 值;当 SI = 1.6 时,其对应的受试物浓度即为 EC1.6 值。分级标准为:EC1.6% < 0.1 极强,0.1 ≤ EC1.6% < 1.0 强,1.0 ≤ EC1.6% < 10 中,10 ≤ EC1.6% < 100 弱^[11]。

2 结果

2.1 染毒期间动物状态观察

染毒期间动物正常饮食,体重增长良好。部分组别(1% 2,4-二硝基氯苯)小鼠染毒部位出现水肿、红斑或结痂刺激性或致敏性症状,各脏器未见有任何病变,未观察到明显的其他毒性症状。

2.2 两品系小鼠 BrdU 标记指数和刺激指数 SI 值比较

由表 1 可见,BALB/c 和 CBA 小鼠:AOO 和蒸馏水对照组的 BrdU 标记指数较一致,淋巴结增生

表 1 两品系小鼠对 4 种化学物和 3 种化妆品 LLNA;BrdU-ELISA 测定结果
 Tab. 1 The LLNA; BrdU-ELISA results of 4 chemicals and 3 cosmetics between two strains

品系 Strains	组别 Groups	浓度 Concentration (%)	BrdU 标记指数 BrdU labelling index	刺激指数 Stimulation index	EC1.6 (%)	致敏性分级 Sensitization classification	
BALB/c	AOO	0	0.127 ± 0.015	1.0	—	—	
	2,4-二硝基氯苯(DNCB)	0.1	0.301 ± 0.045	2.37	0.08	VS	
		0.3	0.875 ± 0.127	6.89			
		1.0	1.080 ± 0.154	8.50			
		25	0.573 ± 0.052	4.51	4.02	M	
	己基肉桂醛(HCA)	50	0.711 ± 0.084	5.60			
		25	0.428 ± 0.078	3.37	6.68	M	
	丁子香酚(EUG)	50	0.546 ± 0.063	4.30			
		25	0.109 ± 0.037	0.86	—	—	
	异丙醇(IPA)	50	0.144 ± 0.063	1.13			
		100	0.150 ± 0.043	1.18			
	蒸馏水(Distilled water)	0	0.116 ± 0.027	1.0	—	—	
	1号精华霜(NO.1 Essence cream)	100	0.124 ± 0.026	1.07	—	—	
	2号防晒霜(No.2 Sunscreen)	100	0.165 ± 0.043	1.42	—	—	
	3号烫发剂(No.3 Perm agent)	100	0.389 ± 0.076	3.35	—	—	
	CBA	AOO	0	0.135 ± 0.016	1.0	—	—
		2,4-二硝基氯苯(DNCB)	0.1	0.406 ± 0.037	3.01	0.07	VS
0.3			0.991 ± 0.135	7.34			
1.0			1.322 ± 0.124	9.79			
25			0.706 ± 0.052	5.23	6.08	M	
己基肉桂醛(HCA)		50	0.946 ± 0.095	7.01			
		25	0.466 ± 0.054	3.45	8.89	M	
丁子香酚(EUG)		50	0.633 ± 0.068	4.69			
		25	0.111 ± 0.045	0.82	—	—	
异丙醇(IPA)		50	0.171 ± 0.081	1.27			
		100	0.161 ± 0.053	1.19			
蒸馏水(Distilled water)		0	0.123 ± 0.024	1.0	—	—	
1号精华霜(NO.1 Essence cream)		100	0.143 ± 0.023	1.16	—	—	
2号防晒霜(No.2 Sunscreen)		100	0.165 ± 0.051	1.34	—	—	
3号烫发剂(No.3 Perm agent)		100	0.598 ± 0.085	4.86	—	—	

注:VS: 极强;M:中。

Note: VS: very strong; M: moderate.

程度均较低;3种已知致敏物(2,4-二硝基氯苯,丁子香酚和己基肉桂醛)各浓度 SI 均大于 1.6,且均有明显的剂量-反应关系;非致敏物异丙醇各浓度 SI 均小于 1.6,与有关文献报道一致^[11]。1、2号化妆品 SI 均小于 1.6,判断为无致敏性,3号染发剂 SI 大于 1.6,为致敏阳性。

2.3 两品系小鼠 EC1.6 值与致敏性分级比较

两品系小鼠;2,4-二硝基氯苯 EC1.6 值较相近,为极强致敏物;丁子香酚和己基肉桂醛 EC1.6 值不是很一致,但均在 1~10 范围内,为中等强度致敏物(表 1)。

3 讨论

由于实验动物的种属、性别、年龄等差异影响

实验结果,因此选择合适的实验动物进行相关实验尤为重要。OECD 指南(TG429、TG442)推荐使用 CBA 雌性小鼠,给国内各毒理实验室推广该 LLNA 方法带来了困难。BALB/c 小鼠是国内应用较多的近交系,遗传背景明确、稳定,国内外已有学者将 BALB/c 小鼠应用于 LLNA 研究^[5-10],但目前国内外关于该两品系小鼠 LLNA;BrdU-ELISA 法评价化学物和化妆品致敏性的比较研究还未见相关报道。

本研究将 BALB/c 和 CBA 小鼠分别对不同致敏强度的 4 种化学物和 3 种化妆品进行评价,结果两品系对 AOO 和蒸馏水溶剂对照反应均较低,对 2,4-二硝基氯苯、丁子香酚和己基肉桂醛和 3 号烫发剂反应均呈致敏阳性(SI > 1.6),且 3 种化学物剂量-反应关系显著;对异丙醇和 1、2 号化妆品反应均

呈致敏阴性(SI < 1.6)。

从表 1 中我们可以发现 CBA 小鼠 BrdU 标记指数和刺激指数 SI 值均偏高于 BALB/c, 推断 CBA 小鼠较 BALB/c 表现出更高程度地 BrdU 摄取, 但两品系对 4 种化学物和 3 种化妆品的致敏性判断一致, 虽然 2,4-二硝基氯苯、丁子香酚和己基肉桂醛的 EC1.6 值存在差异, 但致敏强度分级均一致, 表明该两品系小鼠只是反应程度有一定的差异, 对化学物和化妆品致敏性判断及致敏强度分级并无显著影响。国际上也有学者将不同品系小鼠进行了 LLNA 研究^[5-6,12], 其结果与本研究一致。

综上, BALB/c 和 CBA 小鼠 LLNA: BrdU-ELISA 试验结果较一致, 均可较好地评价化学物和化妆品的致敏性, BALB/c 小鼠可替代 CBA 在国内各毒理实验室推广应用于化妆品皮肤致敏性评价。

参考文献:

- [1] OECD. OECD guideline for the testing of chemicals skin sensitization; local lymph node assay 429 [S/OL]. 2002. <http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/immunotox/llnadocs/OECD429.pdf>.
- [2] Boverhof DR, Gollapudi BB, Hotchkiss JA, *et al.* Evaluation of a toxicogenomic approach to the local lymph node assay (LLNA) [J]. *Toxicol Sci*, 2009, 107 (2): 427-439.
- [3] Haseman JK, Strickland J, Allen D, *et al.* Safety assessment of allergic contact dermatitis hazards; an analysis supporting reduced animal use for the murine local lymph node assay [J]. *Regul Toxicol Pharmacol*. 2011, 59 (1):191-196.
- [4] OECD. OECD guideline for the testing of chemicals skin sensitization; local lymph node assay; BrdU-ELISA [S/OL]. 2010. <http://ntp.niehs.nih.gov/iccvam/suppdocs/feddocs/oced/oced-tg442b.pdf>.
- [5] Woolhiser MR, Munson AE, Meade BJ. Comparison of mouse strain using the lymph node assay [J]. *Toxicology*, 2000, 146 (2-3): 221-227.
- [6] Ehling G, Hecht M, Heusene A, *et al.* An European inter-laboratory validation of alternative endpoints of the murine local lymph node assay: First round [J]. *Toxicology*, 2005, 212 (1): 60-68.
- [7] 刘协, 吕中明, 施伟庆, 等. BALB/c 和 ICR 小鼠用于局部淋巴结试验的研究[J]. *江苏预防医学*, 2009, 20(1): 4-6.
- [8] 何国群, 杨杏芬, 郑德生, 等. 溴脱氧尿嘧啶核苷掺入法作为皮肤致敏试验替代方法研究[J]. *中国职业医学*, 2011, 38 (5): 377-380.
- [9] 阳晓燕, 赵康峰, 孔建, 等. 局部淋巴结改良法在化妆品皮肤刺激性和致敏性检测中的应用[J]. *环境与健康杂志*, 2013, 30 (4): 312-316.
- [10] 胡培丽, 罗飞亚, 陈志蓉, 等. LLNA: BrdU-ELISA 改良法的建立及其在化妆品安全性评价中的应用[J]. *中国比较医学杂志*, 2014, 24 (9): 23-27.
- [11] ICCVAM. Test Method Evaluation Report: The Murine Local Lymph Node Assay; BrdU-ELISA, a Nonradioactive Alternative Test Method to Assess the Allergic Contact Dermatitis Potential of Chemicals and Products [R]. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. NIH Publication, 2010. <http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/immunotox/llna-ELISA/TMER.htm>.
- [12] Kimber I, Hilton J, Dearman RJ, *et al.* An international evaluation of the murine local lymph node assay and comparison of modified procedures [J]. *Toxicology*, 1996, 103 (1): 63-73.

[修回日期] 2015-03-31