秦珩,程洁,靳苏香,等. 小鼠局部淋巴结实验(BrdU-ELISA)在 25%氰氟草酯乳油皮肤致敏性检测中的应用 [J]. 中国比较医学杂志, 2019, 29(1): 80-83.
Qin H, Cheng J, Jin SX, et al. Application of local lymph node assay (BrdU-ELISA) for the detection of 25% cyhalofop-butyl EC skin sensitization in mice [J]. Chin J Comp Med, 2019, 29(1): 80-83.
doi: 10.3969/j.issn.1671-7856. 2019.01.014

小鼠局部淋巴结实验(BrdU-ELISA)在 25% 氰氟草酯乳油皮肤致敏性检测中的应用

秦　珩[1,2],程　洁[2],靳苏香[1],钱　雯[1],章　婉[1],严　婷[1,2],董　昊[1],
张成香[1,2],张璐璐[1,2],王玉邦[1,2],环　飞[1,2*]

(1. 江苏省医药农药兽药安全性评价与研究中心,南京　211166;2. 南京医科大学公共卫生学院,南京　211166)

【摘要】 **目的**　采用小鼠局部淋巴结实验(BrdU-ELISA)法检测 25%氰氟草酯乳油的致敏性。**方法**　1. 选用雌性 BALB/C 小鼠进行实验,受试样品设为 100%、50%、25%,同时设阴性对照组[丙酮:橄榄油(acetone: olive oil, AOO)= 4∶1]、阴性对照组(橄榄油)及阳性对照组(25%已基肉桂醛),连续双耳背面染毒 3 d,第 6 天腹腔注射 BrdU 溶液(5 mg/只),24 h 后采集耳后淋巴结称重等并通过 BrdU-ELISA 实验方法检测淋巴增殖情况。**结果**　各剂量组的小鼠体重与对照组比较,差异均无显著性(P> 0.05);各剂量组的耳厚度增加和耳重均不超过 25%;溶剂和空白对照组的刺激指数 SI_1 和 SI_2<1.6,阳性对照组(25%已基肉桂醛)的刺激指数 SI_1 和 SI_2>1.6,实验系统可靠;25%氰氟草酯乳油低、中、高剂量组的刺激指数 SI_1 和 SI_2<1.6,无剂量反应关系。**结论**　25%氰氟草酯乳油的小鼠局部淋巴结实验结果为阴性,即 25%氰氟草酯乳油为无致敏性。

【关键词】 BALB/c 小鼠;BrdU;致敏性
【中图分类号】R-33　【文献标识码】A　【文章编号】1671-7856(2019) 01-0080-04

Application of local lymph node assay (BrdU-ELISA) for the detection of 25% cyhalofop-butyl EC skin sensitization in mice

QIN Heng[1,2], CHENG Jie[2], JIN Suxiang[1], QIAN Wen[1], ZHANG Wan[1], YAN Ting[1,2],
DONG Hao[1], ZHANG Chengxiang[1,2], ZHANG Lulu[1,2], WANG Yubang[1,2], HUAN Fei[1,2*]
(1. The Safety Assessment and Research Center for Drugs of Jiangsu Province, Nanjing 211166, China.
2. School of Public Health, Nanjing Medical University, Nanjing 211166)

【**Abstract**】 **Objective**　To detect 25% cyhalofop-butyl emulsifiable concentrate(EC) skin sensitization by a local lymph node assay (BrdU-ELISA) in mice. **Methods**　Female BALB/C mice were tested and the samples were set up to 100%, 50%, and 25%. The negative control group received acetone: olive oil (AOO) = 4∶1, and the positive control group received 25% basal cinnamaldehyde. Test samples were laid on the dorsum of bilateral mouse ears for three consecutive days, then the mice received an intraperitoneal injection of BrdU (5 mg/mouse) on the sixth day. After 24 hours, the lymph nodes were removed, weighed, and mashed into a cell suspension. Lymphocyte proliferation was measured by BrdU-ELISA. **Results**　The body weights of female mice in all treated groups were similar to the control group. The increase of ear thickness and ear weight in each dose group was not more than 25%. The stimulus indexes of solvent and

[基金项目]江苏高校优势学科建设工程资助项目(苏政办发〔2014〕37 号)。
[作者简介]秦珩(1977—),女,硕士,实验师,研究方向:卫生毒理学。E-mail: qh@ njmu.edu.cn
[通信作者]环飞,男,硕士,高级实验师,研究方向:卫生毒理学。E-mail: huanfei@ njmu.edu.cn

blank control groups were SI_1 and $SI_2 < 1.6$, and the stimulation indexes of the positive control group (25% hexyl cinnamaldehyde) were SI_1 and $SI_2 > 1.6$. This indicated the test system was reliable. The stimulation indexes of 25% cyhalofop-butyl EC in the low, medium and high dose groups were SI_1 and $SI_2 < 1.6$, and there was no dose-response relationship. **Conclusions** The results of 25% cyhalofop-butyl EC in mouse local lymph node assays were negative, indicating that 25% cyhalofop-butyl does not cause skin sensitization.

【**Keywords**】 BALB/c mouse; BrdU; skin sensitization

反复接触农药可能导致皮肤致敏反应,皮肤出现红斑、水肿、丘疹、焦痂、瘙痒等体征的变态反应性接触性皮炎(allergic contact dermatitis, ACD)。ACD 是有关农药生产、使用者的健康与职业卫生重要问题。目前评估农药皮肤致敏性的方法是豚鼠实验,主要包括豚鼠局部封闭涂皮实验(Buehler test, BT 法)和豚鼠最大值实验(guinea pig maximisation test, GPMT),但动物使用数量多,时间长达 30 天,结果受主观影响,近年来发展小鼠局部淋巴结分析实验(local lymph node assay, LLNA),LLNA 方法的实现了小动物替代大动物,动物使用量减少,结果更加客观,已被国家标准采纳为标准实验方法[1]。但该方法需要使用^{3}H 或^{125}I 放射性同位素、特殊仪器以及同位素实验室等条件,还可能污染环境和实验人员暴露风险,推广作为农药致敏性常规检测相对困难。通过 BrdU 标记示踪和酶联疫吸附(ELISA)法测定细胞增殖已被广泛应用各种实验[2-4],本次实验方法采用 ELISA 检测技术,提高实验的灵敏性,同时避免放射性同位素掺入法的放射性污染,推广在农药致敏性评价中应用灵敏、短期且无污染的安全性评价方法。

1　材料和方法

1.1　实验动物

清洁级、9 周龄(初始体重 19.8~24.8 g)、30 只雌性 BALB/c 小鼠[5],由扬州大学比较医学中心提供[SCXK (苏) 2017 - 0007],合格证编号:201712819。动物饲养于南京医科大学卫生分析检测中心动物屏障设施中[SYXK (苏) 2015-0009],实验动物使用符合实验动物伦理委员会审查的要求。动物实验符合 3R 原则。

1.2　主要试剂与仪器

AOO(丙酮:橄榄油=4:1,上海凌峰化学试剂有限公司、益海嘉里食品营销有限公司)、超纯水(美国 Millipo 公司密理博纯水仪自制)、BrdU(Sigma 公司)、BrdU-ELISA 试剂盒(Abcam 公司)、pH 7.0 无钙镁磷酸盐缓冲液(PBS, HyClone)。电子天平(T1000 型、常熟市双杰测试仪器厂),酶标仪(SpectraMax/M2e、美谷分子仪器(上海)有限公司),CO_2 培养箱(Heracell-150、德国贺利氏公司),超净工作台(SW-CJ-2FD、苏州净化设备有限公司),倒置显微镜(CK41、日本 Olympus 公司),离心机(DD-5M、上海卢湘仪离心机仪器有限司),游标卡尺(0 ~ 150 mm、上海美耐特实业有限公司)。

1.3　实验方法

1.3.1　分组与染毒

将 30 只 BALB/c 小鼠,随机分为 6 组,每组 5 只。氰氟草酯乳油设 3 个(100%、50%、25%)浓度组,受试样品采用橄榄油稀释,采用同时设阴性对照组(橄榄油)、设阴性对照组(AOO)及阳性对照组(25%已基肉桂醛,采用 AOO 溶解)。小鼠耳背涂抹 25 μL 受试物,每天 1 次给样,连续 3 d,第 6 天给小鼠腹腔注射 BrdU(溶剂 PBS,5 mg/只),24 h 后处死小鼠。

1.3.2　耳厚测定

记录实验开始和结束时的耳厚度。

1.3.3　耳重测定

实验结束采用打孔器取下直径 8 mm 耳片,称重。

1.3.4　淋巴结重量与细胞悬液的制备

取双侧耳后淋巴结并称重;200 目筛网研磨制备单细胞悬液,将细胞转移到 15 mLPBS。

1.3.5　Brdu-ELISA 测定

将 100 μL 细胞悬液加入到平底 96 孔板,每只动物 3 个平行孔。1200 r/min 离心 10 min,弃上清后烘干培养板,每孔加入固定液 200 μL,室温固定 30 min 后离心弃固定液,加入 anti-BrdU 抗体溶液 100 μL,室温孵育 1 h 后离心弃抗体溶液,加入洗涤液 200 μL 清洗抗体溶液,离心弃洗涤液,清洗 3 次,加入 TMB 底物溶液 100 μL,常温、避光孵育 15 min,酶标仪波长 450 nm,测量吸光度。

1.4　统计学方法

计算刺激指数(SI):SI_1 为实验组淋巴结重量平均值与对照组淋巴结重量平均值的比值;SI_2 为实验组发(吸)光值平均值与对照组发(吸)光值平均值的比值。采用统计软件 SPSS 22.0 计算均数与标

准差,小鼠体重采用多组间比较用单因素方差分析,组间比较及多组与对照组比较用 Dunnett-*t* 检验,检验水准 $\alpha=0.05$,$P<0.05$ 为差异有显著性。

2 结果

2.1 体重

结果显示各剂量组各观察点的小鼠体重与对照组比较,差异均无显著性($P>0.05$)(未列图表)。

2.2 耳厚度和耳重

结果显示,各剂量组的耳染毒区未观察到明显红斑、水肿,耳厚度增加和耳重均不超过对照组的 25%。

2.3 淋巴结重量

由表 1 结果显示,实验组、阴性对照组和阳性对照组的淋巴结重量变化情况,溶剂和空白对照组的刺激指数 $SI_1<1.6$,阳性对照组(25%肉桂醛)的刺激指数 $SI_1>1.6$,实验系统可靠;25%氰氟草酯乳油低、中、高剂量组的刺激指数 $SI_1<1.6$,无剂量反应关系。

2.4 BrdU 含量测定

由表 1 结果可见,实验组、阴性对照组和阳性对照组的 BrdU 含量变化情况,溶剂和空白对照组的刺激指数 $SI_2<1.6$,阳性对照组(25%肉桂醛)的刺激指数 $SI_2>1.6$,实验系统可靠;25%氰氟草酯乳油低、中、高剂量组的刺激指数 $SI_2<1.6$,无剂量反应关系。

3 讨论

2009 年刘珍等[6]对实验方法改进,增加刺激指标如耳厚和耳重的检测,2010 年 OECD 增加了 LLNA:BrdU-ELISA(TG442B)通过 ELISA 方法测定淋巴细胞增殖情况替代放射性同素的检测[7]。2013 年阳晓燕等增加了刺激指标(耳厚差、耳重),致敏性指标(淋巴结重量,淋巴细胞计数,ATP 与荧光素反应后的发光强度)[8]。本次实验我们也相应增加刺激指标与致敏性指标,有利于更好判断是农药直接作用造成的刺激反应,还是变态反应。并通过定量测定小鼠引流淋巴结细胞的 BrdU 掺入量,分析小鼠耳部皮肤局部涂抹农药后,相应耳后引流淋巴结的淋巴细胞的增殖情况判定农药致敏性。本方法的 25%氰氟草酯乳油致敏性结果 SI_1 和 SI_2 均小于 1.6,结果为阴性,与本实验室的采用传统方法检测的结果一致。

小鼠局部淋巴结(BrdU 掺入法)实验是用小鼠替代豚鼠的实验方法,每组最少可以使用 4 只小鼠,明显减少了实验动物数量;并以体积小的动物代替体积大的动物;并且实验周期仅 7 d 时间,大量节约动物设施的使用面积、时间、耗能;改进了实验结果的测量方法,酶标仪定量检测使结果更加客观科学,避免传统实验肉眼观察皮肤反应评分带来的主观性,实现了 3R 原则(减少、优化与替代)[9]。2010 年替代方法验证多机构协调委员会(ICCVAM)采纳 LLNA: BrdU-ELISA 作为皮肤致敏性的替代方法[10]。冼静雯[11]等采用 BALB/c 小鼠 LLNA: BrdU-ELISA 对多种化学物研究表明,该法阳性预测率为 90%、阴性预测率为 100%、假阳性率为 17%、假阴性率为 0、灵敏度为 100%、特异度为 83%、准确度为 93%。因此,高灵敏度,省时,省力,费用低的 LLNA:BrdU ELISA 有必要在我国农药致敏性常规检测领域推广。

表 1 淋巴结重量与 BrdU 的测定结果

Table 1 Determination of lymph node weight and BrdU staining

组别 Groups	淋巴结重量(mg) Lymph node weight	SI_1 指数 SI_1 index	BrdU 掺入量检测(OD 值) Determination of BrdU (OD value)	SI_2 指数 SI_2 index
25%受试样品组 25% sample group	6.2±1.9	0.80	0.1757±0.0683	0.76
50%受试样品组 50% sample group	8.9±1.8	1.14	0.2333±0.0583	1.01
100% 受试样品组 100% sample group	9.2±2.0	1.17	0.2209±0.0198	0.96
阴性对照组(橄榄油) Negative control group (olive oil)	7.8±1.2	1.00	0.2302±0.0415	1.00
阴性对照组(AOO) Negative control group (AOO)	9.1±1.8	1.16	0.2186±0.0729	0.95
阳性对照组(25%已基肉桂醛) Positive control group (25% basal cinnamaldehyde)	17.6±0.1	2.26	0.3962±0.0729	1.72

参考文献：

[1] GB 15670.9—2017 农药登记毒理学试验方法 第 9 部分：皮肤变态反应(致敏)试验 [S], 2017.

[2] 罗涛, 王彤敏, 李力燕. EdU 与 BrdU 在检测细胞增殖中的特点及应用进展 [J]. 重庆医学, 2015, 44(32): 4581-4583.

[3] 胡培丽, 张露勇, 单纯, 等. LLNA: BrdU-ELISA 改良法在化学物/化妆品皮肤刺激性和致敏性评价中的应用 [J]. 毒理学杂志, 2015, 29(4): 282-285.

[4] 张大伟, 邢雪, 邓乃梅, 等. 人肝癌细胞培养中 CCK-8 法与 BrdU-ELISA 法检测细胞增殖的比较 [J]. 临床普外科电子杂志, 2013, 1(4): 4-7.

[5] 胡培丽, 张露勇, 李波, 等. 两品系小鼠局部淋巴结试验结果比较 [J]. 中国比较医学杂志, 2015, 25(5): 54-57.

[6] 刘珍, 刘俊平, 万旭英, 等. 化妆品安全性评价中小鼠局部淋巴结试验方法的改进 [J]. 卫生研究, 2009, 38(5): 585-589.

[7] OECD. OECD guideline for the testing of chemicals, skin sensitisation: local lymph node assay: BrdU-ELISA [S]. Paris: OECD, Adopted 22 July, 2010.

[8] 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.

[9] 杨绎雯. 我国推行化妆品动物替代实验的可行性研究 [J]. 当代化工研究, 2018(2): 7-8.

[10] ICCVAM. Test method evaluation report: The murine local lymph node assay: BrdU-ELISA[R]. ICCVAM, 2010.

[11] 冼静雯, 郭煜堂, 陈宁, 等. BALB/c 小鼠 LLNA: BrdU-ELISA 改良法在 15 种化学物皮肤致敏性评价中的应用 [J]. 环境与健康杂志, 2017, 34(5): 438-440.

〔收稿日期〕2018-07-17

(上接第 79 页)

[7] Shi Z, Zhang H, Liu Y, et al. Alterations in gene expression and testosterone synthesis in the testes of male rats exposed to perfluorododecanoic acid [J]. Toxicol Sci, 2007, 98(1): 206-215.

[8] Lau C, Anitole K, Hodes C, et al. Perfluoroalkyl acids: a review of monitoring and toxicological findings [J]. Toxicol Sci, 2007, 99(2): 366-394.

[9] Betts KS. Perfluoroalkyl acids: What is the evidence telling us? [J]. Environ Health Persp, 2007, 115(5): A250-A256.

[10] Buckingham JC. Glucocorticoids: exemplars of multi-tasking [J]. Br J Pharmacol, 2006, 147(Z1): S258-S268.

[11] Michael AE, Hurston LM, Rae MT. Glucocorticoid metabolism and reproduction: a tale of two enzymes [J]. Reproduction (Cambridge, England), 2003, 126(4): 425-441.

[12] Diaz R, Brown RW, Seckl JR. Distinct ontogeny of glucocorticoid and mineralcorticoid receptor and 11β-hydroxysteroid dehydrogenenase type I and II mRNAs in the fetal rat brain suggest a complex control of glucocorticoid actions [J]. J Neurosci, 1998, 18(7): 2570-2580.

[13] 牛夏梦, 史亚利, 张春晖, 等. 全氟辛烷磺酸和全氟辛烷羧酸异构体的高效液相色谱-串联质谱联用分析方法 [J]. 环境化学, 2015, 34(8): 1453-1459.

[14] 王玉, 张倩, 刘威, 等. 胚胎期和哺乳期全氟辛烷磺酸(PFOS)暴露致大鼠学习记忆能力下降 [J]. 生态毒理学报, 2013, 8(5): 671-677.

[15] 肖静, 连玉龙, 马颖, 等. 孕哺期全氟辛烷磺酸暴露对子代大鼠糖代谢的影响 [J]. 生态毒理学报, 2013, 8(5): 678-686.

[16] Naile JE, Khim JS, Hong S, et al. Distributions and bioconcentration characteristics of perfluorinated compounds in environmental samples collected from the west coast of Korea [J]. Chemosphere, 2013, 90(2): 387-394.

[17] Jahnke A, Huber S, Temme C, et al. Development and application of a simplified sampling method for volatile polyfluorinated alkyl substances in indoor and environmental air [J]. J Chromatogr A, 2007, 164(1-2): 1-9.

[18] Fromme H, Tittlemier SA, Volkel W, et al. Perfluorinated compounds exposure assessment for the general population in Western countries [J]. Int J Hyg Environ Health, 2009, 212(3): 239-270.

[19] Luebker DJ, Case MT, York RG, et al. Two-generation reproduction and cross-foster studies of perfluorooctane-sulfonate (PFOS) in rats [J]. Toxicology, 2005, 215(1-2): 126-148.

[20] Lau C, Thibodeaux JR, Hanson RG, et al. Exposure to perfluorooctane sulfonate during pregnancy in rat and mouse. II. Postnatal evaluation [J]. Toxicol Sci, 2003, 74(2): 382-392.

[21] Baumann MU, Schneider H, Malek A, et al. Regulation of human trophoblast GLUT1 glucose transporter by insulin-like growth factor I (IGF-I) [J]. PLoS One, 2014, 9(8): e106037.

[22] Agrogiannis GD, Sifakis S, Patsouris ES, et al. Insulin-like growth factors in embryonic and fetal growth and skeletal development (Review) [J]. Mol Med Rep, 2014, 10(2): 579-584.

〔收稿日期〕2018-05-14