



直接多肽结合试验组合人细胞系活化 试验预测皮肤致敏物的探讨

柯逸晖^{1,2}, 陈彧^{2,3}, 程树军², 徐嘉婷³, 谈伟君^{1*}

(1. 广东药科大学, 广州 510006; 2. 广东出入境检验检疫局技术中心, 广州 510623;
3. 广州市华代生物科技有限公司, 广州 510535)

【摘要】 **目的** 建立直接多肽结合试验(DPRA)和人细胞系活化试验(h-CLAT)的皮肤致敏组合检测方法,对化学品及植物提取物的致敏性进行初筛。**方法** 选择12种化学品和7种植物提取物为受试物,把不同受试物分别与两种肽(半胱氨酸肽和赖氨酸肽)共孵育24 h,采用高效液相色谱法分析反应后多肽消耗。同时将不同浓度的受试物与体外培养的人急性单核细胞白血病细胞(THP-1)共孵育24 h,通过流式细胞仪检测暴露后细胞表面标志物CD86和CD54的变化。再进一步比较DPRA和h-CLAT预测结果的一致性。**结果** DPRA方法和h-CLAT方法准确区分了12种化学品的皮肤致敏性,其中2种判定为阴性,10种判定为阳性,两种方法检测结果一致。DPRA对植物提取物致敏性的预测中,除绿茶提取物无法判定外,其余6种均为皮肤致敏疑似物质。h-CLAT预测中,除绿茶提取物、马齿苋提取物和人参果提取物为非致敏物,其余4种植物提取物为致敏物。DPRA与h-CLAT预测的一致性为0.57。**结论** DPRA与h-CLAT的简单组合可以实现对单一化合物的准确预测,对于复杂混合物可实现初步预测,确认需要进一步组合其他方法。

【关键词】 直接多肽结合试验;人细胞系活化试验;皮肤致敏;替代方法

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2016)06-0611-07

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2016.06.011

Preliminary study for integrating DPRA with h-CLAT to predict skin sensitizers

KE Yi-hui^{1,2}, CHEN Yu^{2,3}, CHENG Shu-jun², XU Jia-ting³, TAN Wei-jun^{1*}

(1. Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China; 2. Guangdong Inspection and Quarantine Technology Center, Guangzhou 510623; 3. Guangzhou Chn-Alt Biotech. Ltd., Guangzhou 510535)

【Abstract】 **Objective** To establish a detection method integrating DPRA (direct peptide reactivity assay) with h-CLAT (human cell line activation test) to screen the skin sensitization potency of chemicals and plant extracts. **Methods** 12 chemicals and 7 plant extracts were chosen as the test substances. Firstly, the test substances were incubated together with two different peptides (cysteine and lysine) respectively for reaction for 24 h. The peptide consumptions were analyzed by HPLC. Simultaneously, THP-1 cells were cultured in vitro and then exposed to different concentrations of test substances for 24 h to examine the cell viability, cell surface markers CD54 and CD86 were assessed by flow cytometry. The predicting results were compared further between DPRA and h-CLAT. **Results** 12 chemicals were distinguished correctly by DPRA classified as 2 non-sensitizers and 10 sensitizers. The results of DPRA were in accordance with h-CLAT. Predicting the sensitization potency of plant extracts by DPRA showed that 6 plant extracts were determined as suspected sensitizers except for green tea extract. But using the method of h-CLAT, 4 plant extracts were examined as suspected sensitizers

[基金项目] 广东省科技计划项目(编号:2012B020316003,2015A030402005)。

[作者简介] 柯逸晖(1991-),女,硕士研究生,研究方向:皮肤致敏替代方法研究与验证。

[通讯作者] 谈伟君,教授,硕士生导师。E-mail: weijunt0726@163.com

except for green tea extract, herba portulacae extract and ginseng fruit extract. The coherence of DPRA and h-CLAT was 0.57. **Conclusion** This detection method integrating DPRA with h-CLAT can predict single compound accurately. As for complex compound, it can achieve preliminary prediction and need other integrating methods to make a further identification.

【Key words】 Direct peptide reactivity assay, DPRA; Human cell line activation test, h-CLAT; Skin sensitization; Alternative method

Corresponding author: Tan Wei-jun. E-mail: weijunt0726@163.com

过敏性接触性皮炎 (allergic contact dermatitis, ACD) 是皮肤重复接触某种外源物质产生的免疫介导的皮肤反应。ACD 通常引起局部皮肤的红肿、肿胀和瘙痒,严重影响生活质量^[1]。因此,有必要进行皮肤致敏测试,以满足化学品、日化产品和其他皮肤接触产品风险评估和毒性评价的需求^[2]。评估化学物皮肤致敏的传统方法是豚鼠试验和小鼠局部淋巴结试验 (local lymph node assay, LLNA)。由于欧盟等国家已经禁止化妆品及化妆品组份的动物试验,因此非动物实验方法的研发和应用显得尤其重要^[3]。另一方面,21 世纪毒性测试 (Toxicity Testing in the 21st Century, TT21C) 呼吁采用人来源的组织或细胞进行毒理学效应的研究,进而提出基于有害结局通路 (adverse outcome pathway, AOP) 的概念^[4,5]。皮肤致敏的 AOP 通路,其分子起始事件是外源物质与皮肤蛋白共价结合形成半抗原,随后触发 2 个细胞水平的关键事件,即角质细胞炎症反应和树突状细胞的激活。其后,活化的树突状细胞迁移至局部淋巴结,将部分半抗原化学物转至初始型 T 淋巴细胞,最终导致记忆 T 细胞的增殖和分化这一组织水平关键事件的发生。当皮肤再次接触致敏物时进入激发阶段,导致 ACD 的有害结局。基于该 AOP 框架建立的直接多肽结合试验 (direct peptide reactivity assay, DPRA),角质细胞 ARE-Nrf2 荧光素酶检测方法 (KeratinSens™) 和人细胞系活化试验 (human cell line activation test, h-CLAT) 已于近两年被 OECD 认可为标准方法^[6-9]。

皮肤致敏的替代方法主要针对 AOP 通路中的不同关键事件点建立评估方式,单一方法存在局限性,且预测精确度可能低于体内 LLNA 法。因此,尝试建立多种替代方法的组合模型以减少单一方法的不足是下一步研究的热点,虽然有研究初步建立了预测单一化合物致敏的组合方法,但还没有用于混合物致敏筛查的报道^[5]。植物提取物由于原料获取多样、提取工艺和组份复杂不可避免地具有致敏性,采用组合模型能提高预测的准确性。本研究尝

试建立 DPRA 和 h-CLAT 两种方法的简单组合,用于单一化学品和复杂物质的致敏能力预测。探索替代方法组合应用的模型,并对植物原料的安全评价提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试剂

人工合成多肽半胱氨酸肽 (Ac-RFAACAA-COOH) (纯度为 90% ~ 95%) 和赖氨酸肽 (Ac-RFAAKAA-COOH) (纯度为 90% ~ 95%),购自广州市华代生物科技有限公司。乙腈为色谱纯,三氟乙酸 (TFA)、磷酸二氢钠 ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$)、磷酸氢二钠 ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)、乙酸铵、氨水为分析纯。

RPMH1640 培养基、胎牛血清 (FBS)、 β -巯基乙醇、4-羟乙基哌嗪乙磺酸、青霉素、链霉素、二甲亚砜 (DMSO) 和牛血清白蛋白 (BSA) 均购自 Sigma 公司;校准珠、球蛋白阻断剂、7-氨基放线菌素-D (7AAD)、FITC 标记的小鼠单克隆 CD86 抗体、PE 标记的小鼠单克隆 CD54 抗体、FITC 标记的小鼠 IgG1、PE 标记的小鼠 IgG1 均购自 BD 公司。

1.1.2 标准物质和测试样品

十二烷基硫酸钠 (SLS)、乳酸、丁香酚、柠檬醛、肉桂醛、苯乙醛、没食子酸丙酯、马来酸酐、苯醌、2,4-二硝基氯苯、甲醛、2,3-丁二酮,均购买自 Sigma 公司;测试样品:当归提取物、黄芩提取物、人参果提取物、积雪草提取物、金缕梅提取物、马齿苋提取物和绿茶提取物来自某生物公司馈赠。

1.1.3 仪器

高效液相色谱仪 (Waters Alliance 2695)、色谱柱 (Agilent Zorbax SB-C18 2.1 mm \times 100 mm \times 3.5 micron)、保护柱 Phenomenex C18 2.0 mm \times 100 mm \times 3 micron)、全波长酶标仪 (Thermo Scientific)、流式细胞仪 (美国 BD)。

1.2 方法

1.2.1 DPRA 方法

(1) 受试物处理

受试物溶解首选乙腈。若不溶解,可尝试溶于水、1:1水和乙腈混合液、异丙醇、丙酮、1:1丙酮和乙腈混合液,或者溶于 300 μL 二甲亚砜,2700 μL 乙腈稀释,或者溶于 1500 μL 二甲亚砜,1500 μL 乙腈稀释。样品不完全溶解时可采用超声处理,时间 ≤ 1 min。

(2) 溶液配制

配制 100 mmol/L pH 7.5 的磷酸缓冲溶液;配制 100 mmol/L pH 10.2 的乙酸铵溶液;HPLC 流动相 A 相(1.0 mL TFA 加入 1 L 色谱级水相中)和 B 相(0.85 mL TFA 加入 1 L 色谱级乙腈中)。

(3) 多肽处理

配制 0.667 mmol/L 的赖氨酸肽溶液:称取 15 mg 赖氨酸肽溶于 28.96 mL 上述乙酸铵溶液中;配

制 0.667 mmol/L 的半胱氨酸肽溶液:称取 15 mg 半胱氨酸肽溶于 29.90 mL 上述磷酸缓冲溶液中。

(4) 标准品处理

稀释液配制:8 mL 乙酸铵缓冲液和 8 mL 磷酸盐缓冲液,再各加入 2 mL 乙腈,充分混匀,配制 10 mL 稀释缓冲液。标准母液配制:取 1600 mL 0.667 mmol/L 多肽溶液加入 400 μL 乙腈;用上述对应的稀释溶液将标准母液配制成 0, 0.0167、0.0334、0.0667、0.1335、0.267、0.534 mmol/L 的标准溶液用于绘制标准曲线。

(5) 空白对照、共洗脱体系及样品体系

取 1 mL 进样瓶若干,按表 1 加入试剂,轻轻混匀,记录时间。盖紧瓶盖,置于 HPLC 进样器,避光,25 $^{\circ}\text{C}$ 放置 24 h。样品于反应 24 h 后开始 HPLC 分析。

表 1 空白对照、共洗脱体系及样品体系配制表

Tab.1 Preparation of reference control, co-elution and samples

1:10 比例 半胱氨酸肽 1:10 ratio, Cysteine peptide 0.5 mmol/L 多肽,5 mmol/L 受试物 0.5 mmol/L peptide, 5 mmol/L test chemical	1:50 比例 赖氨酸肽 1:50 ratio, Lysine peptide 0.5 mmol/L 多肽,25 mmol/L 受试物 0.5 mmol/L peptide, 25 mmol/L test chemical
750 μL 半胱氨酸溶液(共洗脱对照用 pH 7.5 磷酸盐缓冲液) 750 μL Cysteine peptide solution (or pH 7.5 phosphate buffer for co-elution controls) 200 μL 乙腈 200 μL Acetonitrile 50 μL 受试物溶液(空白对照为溶剂) 50 μL Test chemical solution (or solvent for reference controls)	750 μL 赖氨酸溶液(共洗脱对照用 pH 10.2 乙酸铵缓冲液) 750 μL Lysine peptide solution (or pH10.2 ammonium acetate buffer for co-elution controls) 250 μL 受试物溶液(空白对照为溶剂) 250 μL Test chemical solution (or solvent for reference controls)

(6) HPLC 条件

用 50% 流动相 A 和 50% 流动相 B 平衡色谱柱至少 2 h,柱温 30 $^{\circ}\text{C}$,流速 0.35 mL/min。梯度洗脱条件为:流量为 0.35 mL/min,乙腈梯度在 10 min 内从 10% 上升到 25%,在 11 min 时上升至 90%,13.5 min 时下降至 10%;相反,水梯度在 10 min 内从 90% 下降至 75%,在 11 min 时下降至 10%,13.5 min 时上升至 90%,在 20 min 时结束。

(7) 数据处理

利用 HPLC 得到的反应前后的峰面积差,计算多肽的消除率。消除率 = $[1 - (\text{多肽反应的峰面积} / \text{空白对照 C 的多肽峰面积})] \times 100\%$

(8) 预测模型

DPRA 预测模型如下:当受试物不与两种肽发生共洗脱时,则计算两种肽消除率的均值,0% \leq 平均值 $\leq 6.38\%$,反应程度为无或较弱,为非致敏物;6.38% $<$ 平均值 $\leq 22.62\%$ 、22.62% $<$ 平均值 $\leq 42.47\%$ 、42.47% $<$ 平均值 $\leq 100\%$,均为致敏物,反应程度分别为低、中、高。当受试物仅与赖氨酸肽发

生共洗脱,则用半胱氨酸的消除率进行判断,0% \leq 平均值 $\leq 13.89\%$,反应程度为无或较弱,为非致敏物;13.89% $<$ 平均值 $\leq 23.09\%$ 、23.09% $<$ 平均值 $\leq 98.24\%$ 、98.24% $<$ 平均值 $\leq 100\%$,均为致敏物,反应程度分别为低、中、高。当受试物与赖氨酸、半胱氨酸均发生共洗脱,则该物质无法判断。

1.2.2 h-CLAT 方法

(1) 细胞培养

用含 10% FBS 的 RPMI-1640 细胞培养液常规培养 THP-1 细胞,保持细胞悬浮状态,一次复苏细胞最多使用 2 个月,且传代次数不能超过 30 次。细胞密度维持在 $(0.1 \sim 0.8) \times 10^6 / \text{mL}$ 。

(2) 受试物主要溶解体系为 DMSO 和生理盐水。

(3) 流式细胞术检测细胞毒性

将培养的 THP-1 细胞离心和去上清,用新鲜完全培养基重悬细胞,浓度为 $2 \times 10^6 / \text{mL}$,吸取 500 μL 重悬液接种至 24 孔细胞培养板中。每种受试物测试 8 个浓度,每个浓度相差的倍数为 2,每孔添加 500 μL ,每种物质设 3 个平行。置于培养箱中孵育

24 h,然后将受试物连同细胞从 24 孔板分别转移至对应 EP 管中,离心沉淀细胞,弃上清液后用 FACS 缓冲液(PBS + 0.1% BSA)清洗细胞一次,再次离心收集细胞。将 FACS 缓冲液配制相应浓度的染料(5 μ L 7AAD + 95 μ L FACS 缓冲液),每支 EP 管添加 100 μ L,常温、暗室下作用 10 min。将 EP 管中的细胞使用 FACS 缓冲液清洗 2 次,再用 500 μ L FACS 缓冲液重悬细胞移入 5 mL 流式管中。一次流式进样 10 000 个细胞,流式仪检测并计算 IC50(使 50% 细胞活性抑制的受试物浓度)和 CV75(使 75% 细胞存活受试物浓度)。

(4) CD86/CD54 表达检测

用上述方法接种细胞至 24 孔板。受试物暴露时以引起 CV75 为最高浓度,1:1.2 为稀释比往后添加 5 个浓度。每次实验设置 3 组对照,分别为 DMSO 对照组、培养基对照组和 DNCB 阳性对照组。将配好的受试物吸取 500 μ L 加到 24 孔板,置于培养箱孵育 24 h。将受试物连同细胞从 24 孔板分别转移至对应 EP 管中,离心收集细胞。再用 FACS 缓冲液(PBS + 0.1% BSA)清洗一次,离心收集细胞。随后使用 FcR 阻断剂,将离心获得的细胞进行阻断。将得到的细胞平均分配至 3 个 1 mL EP 管中,每管大约 3×10^5 个细胞。FITC-CD86 抗体、PE-CD54 抗体、同行对照 FITC-IgG1 和 PE-IgG1、7AAD 分别根据试剂盒标明的浓度进行配制。每个 EP 管加入 50 μ L 含有抗体的 FACS 缓冲液,2 ~ 8 $^{\circ}$ C 环境、暗室染色 30 min。再用 FACS 缓冲液清洗 2 次,再用 500 μ L FACS 缓冲液重悬细胞并移入 5 mL 流式管,使用流式细胞仪检测蛋白标志物。

(5) 结果处理

利用流式细胞术检测到的相对荧光强度值(RFI)计算有效作用浓度(EC),FITC-CD86 用 EC150,PE-CD54 用 EC200。分两种情况处理:

首先,当阳性值出现时,从最低浓度开始计算,满足阳性标准的第一个浓度设置为 A 浓度,随后根据下述原则选择下一个浓度为 B 浓度:第二个浓度的 RFI 值比第一个浓度的 RFI 值至少高 10%,否则用第三个浓度的 RFI 值,直到符合大于 10% 的标准。

1)若 A 浓度的 RFI 大于 150 或 200,B 浓度的 RFI 小于 150 或 200,则:

$$EC150 = B_{\text{剂量}} + \left[\frac{150 - BRFI}{(A_{RFI} - B_{RFI}) \times (A_{\text{剂量}} - B_{\text{剂量}})} \right]$$

$$EC200 = B_{\text{剂量}} + \left[\frac{200 - BRFI}{(A_{RFI} - B_{RFI}) \times (A_{\text{剂量}} - B_{\text{剂量}})} \right]$$

2)若 A 浓度和 B 浓度的 RFI 均大于 150 或 200,则:

$$EC150 = 2^{\left\{ \log_2(B_{\text{剂量}}) + \frac{150 - B_{RFI}}{A_{RFI} - B_{RFI}} \times [\log_2(A_{\text{剂量}}) - \log_2(B_{\text{剂量}})] \right\}}$$

$$EC200 = 2^{\left\{ \log_2(B_{\text{剂量}}) + \frac{200 - B_{RFI}}{A_{RFI} - B_{RFI}} \times [\log_2(A_{\text{剂量}}) - \log_2(B_{\text{剂量}})] \right\}}$$

(6) 预测模型

受试物浓度 > IC₅₀ 前提下,至少 2 次实验结果中,对于 FITC-CD86,若 RFI_{CD86} \geq 150,该物质为阳性致敏物;对于 PE-CD54,若 RFI_{CD54} \geq 200,该物质为阳性致敏物。即 RFI_{CD86} \geq 150 和(或)RFI_{CD54} \geq 200,该物质都为阳性致敏物。

1.3 统计方法

数据采用均数 \pm 标准差表示,采用 SAS 9.4 统计软件比较两种方法结果的一致性,即 Kappa 值。

2 结果

2.1 化学品对两种肽的消除结果

表 3 数据显示,12 种化学品中,乳酸和十二烷基硫酸钠对两种多肽的消除率均值均小于 6.38%,可判定为非致敏物;其他 10 种化学品对多肽消除率均值均大于 6.38%,可判定为致敏物,反应等级不同。

2.2 DPRA 与 LLNA 分类比较

根据替代方法的验证原则,把化学物质的 DPRA 分类与 LLNA 分类进行比较见表 2,结果显示,物质被分为非致敏物的灵敏度、特异度和准确度均达到 100%,其次是被分类为高致敏性物质,灵敏度、特异度和准确度分别为 60%、40% 和 60%。经统计分析,一致性检验结果显示, $P > 0.05$,Kappa = 0.57,说明 DPRA 分类与 LLNA 分类基本一致。

2.3 DPRA 与 h-CLAT 比较

h-CLAT 实验中 10 种物质 CD54 和 CD86 表达学科建设显示,乳酸和十二烷基硫酸钠的 RFI 值中,CD86 小于 150,CD54 小于 200;马来酸酐 RFI 值中,CD86 小于 150,CD54 大于 200;其他物质 RFI 值的 CD86 和 CD54 均大于 150 和 200。DPRA 结果显示,乳酸和十二烷基硫酸钠对两种肽的消除率均值均小于 6.38%,其他物质均大于 6.38%。h-CLAT 与 DPRA 化学品致敏性数据比较见表 3。经统计分析,一致性检验结果显示, $P > 0.05$,Kappa = 1,说明 h-CLAT 和 DPRA 判断的结果完全一致。

表 2 DPRA 预测模型与 LLNA 分类比较

Tab. 2 Comparison of DPRA prediction model and LLNA class

方法 Method	非致敏物 (无/弱) Non-sensitizer (No or minimal)	致敏物(低) Sensitizer (Low)	致敏物(中) Sensitizer (Moderate)	致敏物(高) Sensitizer (High)	灵敏度/% Sensitivity	特异度/% Specificity	准确度/% Accuracy
无 Non-sensitizer	2	0	0	0	100	100	100
致敏物(低) Sensitizer (weak)	0	1	0	1	50	50	50
致敏物(中等) Sensitizer (moderate)	0	1	0	2	0	0	0
致敏物(强、极强) Sensitizer (strong, extreme)	0	0	2	3	60	40	60

表 3 h-CLAT 和 DPRA 数据比较

Tab. 3 Comparison of h-CLAT and DPRA

化学品 Chemicals	h-CLAT/ $\mu\text{g}/\text{mL}$				结果 Results	DPRA/%			结果 Results
	IC ₅₀	CV ₇₅	EC150	EC200		半胱氨酸 消除率 Cysteine depletion	赖氨酸 消除率 Lysine depletion	消除 率均值 Average depletion	
乳酸 Lactic acid	4001.10 ± 120.34	3010.08 ± 120.29	<150	<200	N	1.92 ± 0.13	0.23 ± 0.15	1.07 ± 0.13	N
十二烷基硫酸钠 Sodium lauryl sulfate (SLS)	78.15 ± 2.49	60.55 ± 3.49	<150	<200	N	6.61 ± 1.5	5.17 ± 1.15	5.90 ± 1.31	N
肉桂醛 Cinnamaldehyde	487.59 ± 10.29	384 ± 15.93	19.56 ± 8.79	12.22 ± 5.78	P	82.95 ± 12.42	56.64 ± 9.71	69.7 ± 11.02	P
柠檬醛 Citral	39.46 ± 1.09	27.2 ± 3.49	22.30 ± 1.28	12.56 ± 3.49	P	24.46 ± 4.28	12.92 ± 2.64	18.69 ± 0.87	P
丁香酚 Eugenol	429.09 ± 12.98	310.11 ± 10.21	160.75 ± 5.99	140.11 ± 15.89	P	31.98 ± 2.89	9.99 ± 1.26	20.99 ± 1.52	P
苯乙醛 Phenylacetaldehyde	39.00 ± 2.09	20.2 ± 4.56	12.4 ± 0.34	21.08 ± 1.28	P	96.97 ± 3.37	52.88 ± 9.11	74.93 ± 5.19	P
没食子酸丙酯 Propyl gallate	378.22 ± 17.65	131.09 ± 8.78	108.67 ± 12.11	109.02 ± 17.22	P	30.34 ± 1.70	34.88 ± 8.08	32.61 ± 2.27	P
马来酸酐 Maleic anhydride	875.34 ± 29.09	702.12 ± 14.09	—	280.40 ± 13.33	P	96.77 ± 3.42	55.81 ± 5.52	74.81 ± 4.73	P
苯醌 Benzoquinone	4.33 ± 0.98	6.37 ± 0.91	5.5 ± 1.67	3.78 ± 0.98	P	84.44 ± 3.88	93.71 ± 3.76	89.08 ± 3.41	P
2,4-二硝基氯苯 2,4-Dinitrochlorobenzene	9.89 ± 0.87	6.54 ± 1.23	2.89 ± 1.15	2.12 ± 0.94	P	100.00 ± 0.00	21.33 ± 1.93	60.67 ± 0.96	P

注:—,结果无法计算。N:阴性;P:阳性。

Note. — the result cannot be calculated. N: negative; P: positive

2.4 DPRA 和 h-CLAT 检测植物提取物

DPRA 联合 h-CLAT 对 7 种植物提取物的致敏性检测结果见表 4。DPRA 实验结果表明,绿茶提取物由于与半胱氨酸肽发生共洗脱,因此无法对其消除率均值进行计算和判断。其余 6 种植物提取物对两种肽的消除率均值均大于 6.38%,可判定为致敏

物,其中,黄芩提取物对两种肽消除率均值达 96.29%,致敏性最强。h-CLAT 实验结果表明,除绿茶提取物、马齿苋提取物和人参果提取物为非致敏物,其余 4 种植物提取物为致敏物。经统计分析,一致性检验结果显示, $P > 0.05$, Kappa = 0.57,说明 h-CLAT 和 DPRA 判断的结果基本一致。

表 4 植物提取物 DPRA 和 h-CLAT 检测结果

Tab. 4 DPRA and h-CLAT detection results of the plant extracts

植物提取物 Plant extracts	h-CLAT/ $\mu\text{g/mL}$				结果 Result	DPRA/%			结果 Result
	IC ₅₀	CV ₇₅	EC150	EC200		半胱氨酸 消除率 Cysteine depletion	赖氨酸 消除率 Lysine depletion	消除率 均值 Average depletion	
马齿苋提取物 Herba portulacae extract	97.08 ± 23.45	78.98 ± 19.09	<150	<200	N	2.23 ± 0.11	9.94 ± 0.85	6.09 ± 0.23	N
人参果提取物 Ginseng fruit extract	30.12 ± 4.55	14.33 ± 3.98	<150	<200	N	14.47 ± 4.54	41.18 ± 0.88	27.83 ± 0.44	P
金缕梅提取物 Hamamelis mollis Oliver extract	189.34 ± 39.33	160.22 ± 30.28	89.63 ± 14.54	57.11 ± 16.39	P	90.34 ± 12.33	7.08 ± 2.34	48.81 ± 9.68	P
当归提取物 Angelica sinensis extract	40.18 ± 3.54	38.77 ± 8.19	19.40 ± 5.55	—	P	64.91 ± 5.09	83.67 ± 11.88	74.29 ± 8.21	P
黄芩提取物 Scutellaria baicalensis Georgi extract	9.13 ± 0.98	8.19 ± 1.12	—	4.04 ± 0.11	P	96.11 ± 7.99	96.47 ± 9.09	96.29 ± 8.96	P
积雪草提取物 Centella extract	90.09 ± 10.23	45.55 ± 2.33	35.69 ± 12.34	55.54 ± 15.07	P	99.96 ± 2.90	37.88 ± 1.43	68.92 ± 3.04	P
绿茶提取物 Green tea extract	109.01 ± 11.20	99.45 ± 14.43	<150	<200	N	* *	71.55 ± 1.09	—	/

注: ** : 提取物与多肽发生共洗脱, — : 结果无法计算, / : 无法判断。N: 阴性; P: 阳性。

Note: ** : Plant extract co-elute with peptide. — : Result cannot be calculated. / : Cannot be judged. N: Negative; P: Positive

3 讨论

皮肤致敏的 AOP 通路是从分子起始事件、关键事件到有害结局的连续发生过程。DPRA 主要针对 AOP 通路的第一步,即物质渗透皮肤后与皮肤蛋白的结合反应^[8,10]。研究表明大多数化学致敏原(半抗原)都是亲电性的,能与氨基酸的亲核中心结合反应。据此原理,设计了半胱氨酸肽和赖氨酸肽两种多肽,通过化学物质与多肽共孵育,采用高效液相色谱法检测多肽的消耗。验证研究表明,与 LLNA 结果相比,DPRA 的预测敏感性为 80%,特异性为 77%^[8],因此可用于化学物的初筛。本研究检测了指南推荐的 12 种参考化学物质,对 2 种非致敏物和 10 种致敏物实现正确区分,首次在国内建立了 DPRA 方法。

h-CLAT 方法主要针对 AOP 通路的第二步,即外源致敏物引起树突状细胞反应的关键细胞事件,表现为细胞表面特征标志物的上调。验证研究表明,与 LLNA 结果相比,h-CLAT 其敏感性为 93%,特异性为 66%^[9],因此可用于化学物的初筛。本研究检测了 12 种参考化学物质,对 2 种非致敏物和 10 种致敏物实现正确区分,进一步建立了应用两种体外方法预测复杂物质的能力。

在植物提取物的开发过程中,潜在的致敏原是

不可忽视的危害因素。如何把用于单一化合物预测的替代方法用于复杂体系的预测是替代方法应用亟需解决的问题。许多学者尝试建立组合模型,如 h-CLAT-DPRA-DEREK 整合试验策略^[11], DPRA-hCLAT 组合、皮肤模型-hCLAT 组合、计算机定量结构活性关系(quantitative structure-activity relationship, QSAR)-DPRA 组合、贝叶氏模型等。对于单一化合物,REACH 法规认为如果 AOP 通路中已有 1-2 个关键事件数据足以进行致敏风险评估,则不需要再进行其他关键事件的实验^[5]。

本研究尝试建立 DPRA 和 h-CLAT 组合的简单筛查体系,分别对 7 种植物提取物的致敏性进行检测,DPRA 结果显示,除了绿茶提取物无法得到判定之外,其他的植物提取物均有不同程度的致敏性。h-CLAT 结果显示除绿茶提取物、马齿苋提取物和人参果提取物为非致敏物,其余 4 种植物提取物为致敏物。进一步分析表明,黄芩提取物的主要成分为黄芩苷,是一种黄酮类化合物,具有致敏作用^[12]。当归提取物主要活性成分为阿魏酸、藁本内脂、正丁烯酰内脂和烟酸等^[13],可能存在人群皮肤致敏性。

研究结果初步表明组合方法对于植物提取物出现阳性结果的证据较充分,本研究所选提取物排除了原料处理、提取工艺、溶剂选择和质量控制等方面的非特征性因素,因此推测原料本身组分导致的致

敏感可能性较充分。如果两种体外方法的测试结果均为阴性,则不能得出真阴性的结论,因为可能存在物质浓度过低无法达到检测阈值的情况,因此,针对假阴性比较高的情况,可通过浓缩或单相分离的方式,提高组份的含量进一步测试。

本研究建立了简单的筛查体系,初步可用于以下三种情形的预测:①经两种替代方法测试均为阴性的植物提取物,可预测为无致敏性,可进入下一阶段开发;②经两种替代方法测试均为阳性的植物提取物,初步判定具有致敏性,可根据实际情况决定是否进一步致敏成份分析,或改善提取工艺进一步测试,或开发价值不高而终止投入;③如果两种替代方法结果不一致,可联合第三种替代方法或进行经典动物实验,确认是否为致敏物。总之,组合 DPRA 和 h-CLAT 两种替代方法可弥补单一方法对于混合物检测的局限性,同时也为植物原料安全评价提供了皮肤致敏的初筛方法。

参 考 文 献

- [1] Kimber I, Basketter DA, Gerberick GF, et al. Chemical allergy: Translating biology into hazard characterization [J]. *Toxicology*. 2011, 120: 238 - 268.
- [2] Strickland J, Zang Q, Kleinstreuer N, et al. Integrated decision strategies for skin sensitization hazard [J]. *Toxicology*. 2015, 36 (9): 1150 - 1162.
- [3] 程树军, 焦红. 实验动物替代方法原理与应用 [M], 北京: 科学出版社, 2010.
- [4] Villeneuve DL, Crump D, Garcia-Reyero N, et al. Adverse outcome pathway (AOP) development I: strategies and principles [J]. *Toxicol Sci*, 2014, 142(2): 312 - 320.
- [5] 瞿小婷, 程树军, 秦瑶, 等. 有害结局通路指南及毒性测试应用分析 [J]. *日用化学品工业*, 2016, 46(8): 473 - 478.
- [6] OECD. The Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation Initiated by Covalent Binding to Proteins. Part 2: Use of the AOP to Develop Chemical Categories and Integrated Assessment and Testing Approaches. Series on Testing and Assessment No. 168 [R]. Paris, 2012.
- [7] 陈或, 喻欢, 程树军, 等. 基于有害结局通路原理的皮肤致敏测试替代方法进展 [J]. *日用化学品科学*, 2016, 39(4): 4 - 9.
- [8] OECD. Test No. 442C: In Chemico Skin Sensitization: Direct Peptide Reactivity Assay (DPRA) [S]. Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris. 2015.
- [9] OECD. Test. No. 442E: In Vitro Skin Sensitization. Human cell line Activity (h-CLAT) [S]. Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris. 2016.
- [10] Gerberick G, Vassallo J, Foertsch L, et al. Quantification of chemical peptide reactivity for screening contact allergens: a classification tree model approach [J]. *Toxicology*. 2007, 97(2): 417 - 427.
- [11] Natsch A, Ryan CA, Foertsch L, et al. A dataset on 145 chemicals tested in alternative assays for skin sensitization undergoing prevalidation [J]. *Toxicology*. 2013, 33: 1337 - 1352.
- [12] 田锋奇. 黄芩苷的致过敏作用机制 [D]. 郑州: 郑州大学, 2007.
- [13] 高向东, 吴梧桐. 当归及其成分阿魏酸对小鼠免疫功能的影响 [J]. *中国生化药物杂志*, 1994, 15(2): 107 - 110.

[收稿日期] 2016 - 10 - 09