

2 种光源对体外 3T3 细胞光毒性试验结果的比较

孙叶丹, 桑晶, 张劲松, 匡荣, 李杨^{*}(浙江省食品药品检验研究院, 杭州 310052)

摘要: 目的 比较 2 种光源对体外 3T3 细胞光毒性试验结果的影响。方法 参照化学品体外 3T3 中性红摄取光毒性试验指导原则(OECD 432), 采用模拟阳光光源和紫外光源对 6 种参考物质进行试验。结果 6 种参考物质在 2 种光源照射后其光刺激因子和平均光效应均接近 OECD 432 中的参考值, 各个物质在无光和有光下的 IC₅₀ 值也相近。结论 2 种光源对体外 3T3 细胞光毒性试验结果基本无影响。

关键词: 3T3 细胞; 光源; 光刺激因子; 平均光效应; IC₅₀

中图分类号: R991

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2017)01-0034-03

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2017.01.009

Comparison of the Results of *in Vitro* 3T3 NRU Phototoxicity Test Between Different Light Sources

SUN Yedan, SANG Jing, ZHANG Jingsong, KUANG Rong, LI Yang^{*} (Zhejiang Institute for Food and Drug Control, Hangzhou 310052, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To compare the results of six kinds of reference materials under two different light sources irradiation *in vitro* 3T3 phototoxicity test. **METHODS** According to the guideline of OECD 432, carried out the *in vitro* 3T3 NRU phototoxicity test irradiated by simulated sunlight and ultraviolet light source separately. **RESULTS** The results of the photo irritation factor(PIF) and the mean photo effect(MPE) of six kinds of reference materials under different light sources were close to the reference value listed in the OECD 432, and the IC₅₀ values for each substance were also similar. **CONCLUSION** After two light sources irradiation, there is no difference among six kinds of reference materials on *in vitro* 3T3 phototoxicity test results.

KEY WORDS: 3T3; light sources; photo irritation factor(PIF); mean photo effect(MPE); IC₅₀

皮肤光毒性反应是指某些化学物质经适当波长和一定时间光照后, 在氧参与下生成自由基, 与靶分子反应或者其激发态与靶分子直接作用而无免疫系统参与的一种皮肤型反应。传统光毒性评价以动物试验为主, 背部去毛涂抹受试物后暴露于 UVA 光线下, 观察判断受试物是否有光毒性。由于化妆品终端产品的动物实验在欧洲被禁止, 因此很多动物实验方法被一些新方法替代, 体外 3T3 细胞光毒性试验就是替代方法之一, 并收录在经济合作与发展组织(OECD)发布的化学品测试指导原则 432 中^[1]。该指导原则中要求光源为模拟太阳光, 而国内目前采用的是波长为 365 nm 左右的紫外光源, 与指导原则不符。为了考察 2 种不同光源对相同物质光毒性预测是否存在差别, 本实验选取了 OECD 指导原则中给出的 6 种参考物质, 用体外 3T3 细胞光毒性试验进行了比较^[2-3]。

1 仪器与材料

1.1 仪器

SOL 500 RF2 型模拟日光光源(德国 Honle);

HOPE-MED 8130G 型细胞光毒性实验检测仪(天津合普); SPECTRA MAX 190 型酶标仪(美国 Molecular Devices); 4625-1CECN 型二氧化碳培养箱(美国 Thermo)。

1.2 试剂

盐酸氯丙嗪(东京化成工业株式会社, 批号: E7X5M); 盐酸胺碘酮(东京化成工业株式会社, 批号: BKKII-IP); 葱[梯希爱(上海)化成工业发展有限公司, 批号: WDFNJ-AR]; 诺氟沙星(浙江新东港药业股份有限公司, 批号: 201502009); 十二烷基硫酸钠(美国 Sigma 公司, 批号: SLBJ7382V); L-组氨酸(美国 Sigma 公司, 批号: SLBK0726V)。

DMEM(美国 GIBCO 公司, 货号: 11995 系列); HBSS(美国 GIBCO 公司, 货号: 14025 系列); 新生牛血清(浙江天杭生物科技有限公司, 批号: 140717); 中性红(美国 Sigma 公司, 批号: MKBP6756V)。

1.3 细胞株

BALB/3T3 clone A31(美国 Institute for In

作者简介: 孙叶丹, 女, 药师
E-mail: liyang@zjyj.org.cn

Tel: 15858207708

E-mail: 569628368@qq.com

^{*}通信作者: 李杨, 女, 主任药师

Tel: 13906529056

Vitro Science)。本实验室采用 80 代以下的传代细胞进行光毒性试验。

2 方法

2.1 实验操作

取 96 孔组织培养板,每孔加入 100 μL 密度为每毫升 1×10^5 个 3T3 细胞的细胞悬液。每个样品制备 2 块板,一块板用于确定细胞毒性(-Irr),另一块板用于确定光毒性(+Irr)。标准条件培养(37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2)24 h。弃去培养液,加入 100 μL 含适当浓度受试物质(根据各受试物初试结果,分别调整正式试验受试物浓度,使其涵盖细胞毒性和光毒性浓度范围),标准培养 1 h。在室温下将其中一个板进行光照(+Irr)暴露,以 $1.7 \text{ mW} \cdot \text{cm}^{-2}$ 光强度(即 $5 \text{ J} \cdot \text{cm}^{-2}$)透过 96 孔板盖照射细胞 50 min;同时将另一个平板无光照(-Irr)置于暗盒内 50 min。洗板,加入 100 μL 培养液,标准条件培养过夜(约 22 h)。洗板,加入 100 μL 含 $33 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 中性红的培养液,标准条件培养 3 h。去除中性红培养液,加入 150 μL 中性红解吸附溶液,在平板振荡器上震荡培养板 10 min。用酶标仪在 540 nm 处测定光密度。

表 1 Honle 光源测定结果

Tab. 1 Results after irradiation of Honle's

化学物质	PIF	MPE	$\text{IC}_{50}(-\text{Irr})/\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	$\text{IC}_{50}(+\text{Irr})/\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	细胞毒性	潜在光毒性
盐酸氯丙嗪	33.3~81.4	0.44~0.94	28.8~55.6	0.39~1.35	有	有
盐酸胺碘酮	6.1~6.75	0.51~0.57	27.8~29.1	4.32~4.52	有	有
葱	no PIF	0.74~0.80	未测得	0.016~0.032	无	有
诺佛沙星	39.2	0.45	2083	53.2	有	有
十二烷基硫酸钠	1.1~1.2	0.04~0.05	35.0~38.6	29.5~34.1	有	无
L-组氨酸	no PIF	0~0.04	未测得	未测得	无	无

表 2 合普光源测定结果

Tab. 2 Results after irradiation of Hepu's

化学物质	PIF	MPE	$\text{IC}_{50}(-\text{Irr})/\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	$\text{IC}_{50}(+\text{Irr})/\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	细胞毒性	潜在光毒性
盐酸氯丙嗪	21.6~62.4	0.46~0.89	28.8~55.6	0.68~1.80	有	有
盐酸胺碘酮	5.38~7.93	0.49~0.58	27.8~29.1	3.67~5.16	有	有
葱	no PIF	0.64~0.80	未测得	0.016~0.035	无	有
诺佛沙星	24.4~48.8	0.37~0.52	1374~2229	45.7~85.4	有	有
十二烷基硫酸钠	1.0~1.1	0~0.01	35.0~38.6	32.9~39.0	有	无
L-组氨酸	no PIF	0~0.03	未测得	未测得	无	无

每种参考物质在 2 个光源下各平行测定 3 次,得到原始光密度数据^[4]。

2.2 数据处理

使用 OECD 官方提供的专用软件 Phototox (Version 2.0)进行数据处理^[5-6]。

2.3 结果判断

光刺激因子(photo irritation factor, PIF)值预测模型(适用于有光照和无光照条件下均能获得 IC_{50})。

评判标准: $\text{PIF} \leq 2$, 预测“无光毒性”; $\text{PIF} \geq 5$, 预测“有光毒性”。PIF 介于 2~5 之间,需重新进行实验再行判定。

平均光效应(mean photo effect, MPE)值预测模型(适用于有光照和无光照条件下不能获得 IC_{50})。

评判标准: $\text{MPE} \leq 0.1$, 预测无潜在光毒性; $\text{MPE} \geq 0.15$, 预测有潜在光毒性。MPE 介于 0.1~0.15 之间,需重新进行实验再行判定^[1]。

3 结果

2 种光源下 6 种参考物质的测定结果基本一致,与 OECD 指南中的结果也一致。2 种光源试验结果见表 1 和表 2。

阳性对照盐酸氯丙嗪 PIF 值历史数据情况见图 1。

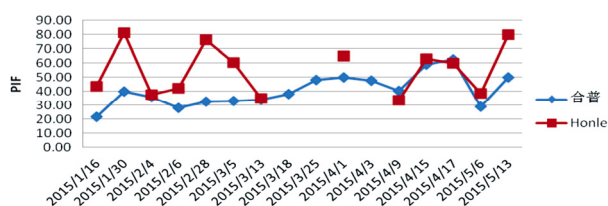


图 1 盐酸氯丙嗪 PIF 值历史数据图

Fig. 1 The historic data of chlorpromazine HCl

4 讨论

OECD 指南中对光源有一定的要求，推荐的是更接近实际的模拟日光。Honle 光源符合要求，光谱是连续的，波长范围是 315~800 nm，包含可见光、UVA 和 UVB，并使用 H1 滤波片过滤掉 UVB。缺点是需散热，而且发现不同批次的灯管在相同高度下照度值有较大偏差。由于该产品只应用于研究，生产厂家少，国内无生产厂家，价格昂贵。

合普光源使用的是飞利浦的紫外灯管，波长范围是 320~400 nm，仪器对 UVB 有实时监控，不存在散热问题，且照射距离仪器可根据设定值自动调节。缺点是无可见光部分，不能满足 OECD 指南要求。

由于目前所选的 6 种参考物质在波长>400 nm 时均无吸收，2 种光源测定结果也无差别，可认为合普的仪器可在波长<400 nm 进行光毒性检测。虽然理论上认为引起光毒性主要是 UVA 部分，但无法排除某些物质在可见光下也可能有光毒性，因此对于合普仪器还应该找一些紫外无吸收而可见光有吸收的物质进行进一步验证。

REFERENCES

- [1] OECD Guidelines for Testing of Chemicals. No. 432: *In vitro* 3T3 NRU Phototoxicity [S]. 2004.
- [2] TU H G, HUANG P C, OU H M, et al. Establishment and validation of 3T3 neutral red uptake phototoxicity test [J]. World Clin Drugs(世界临床药物), 2015, 36(8): 525-528.
- [3] RAI V, DAYAN N, MICHNIAK-KOHN B. A comparative evaluation of photo-toxic effect of fractionated melanin and chlorpromazine hydrochloride on human (dermal fibroblasts and epidermal keratinocytes) and mouse cell line/s (fibroblast Balb/c 3T3) [J]. Toxicol In Vitro, 2011, 25(2): 538-544.
- [4] QIN M R, XIAN J W, WANG P. Verification study for 3T3 neutral red uptake phototoxicity test [J]. Pharm Today(今日药), 2012, 2(11): 687-689.
- [5] SPIELMANN H, BALLS M, DUPUIS J, et al. The international EU/COLIPA *in vitro* phototoxicity validation study: results of phase II(blind trial), part 1: the 3T3 NRU phototoxicity test [J]. Toxicol In Vitro, 1998(12): 305-327.
- [6] HOLZHUTTER H G, QUEDENAU J. Mathematical modeling of cellular responses to external signals [J]. J Biol Systems, 1995, 3(1): 127-138.

收稿日期: 2016-06-29