



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107446993 A

(43)申请公布日 2017.12.08

(21)申请号 201710439870.2

(22)申请日 2017.06.12

(71)申请人 程树军

地址 510623 广东省广州市珠江新城华明路39号C1座

申请人 广州市华代生物科技有限公司

(72)发明人 程树军 秦瑶 陈彧 柯逸晖

(74)专利代理机构 广州知友专利商标代理有限公司 44104

代理人 周克佑

(51)Int.Cl.

C12Q 1/68(2006.01)

G01N 33/50(2006.01)

G01N 33/53(2006.01)

G01N 15/14(2006.01)

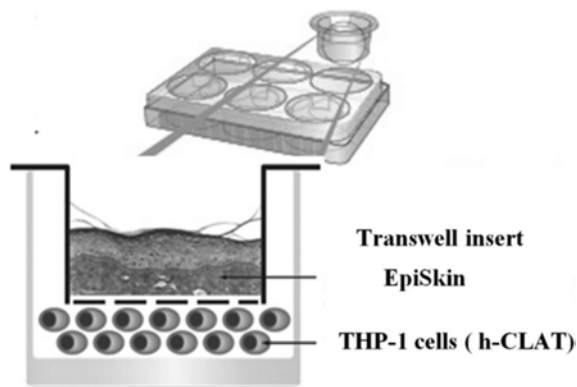
权利要求书10页 说明书21页 附图2页

(54)发明名称

一种基于三维皮肤模型和树突状细胞共培养模式的皮肤致敏检测方法

(57)摘要

本发明公开了一种基于三维皮肤模型和树突状细胞共培养模式的皮肤致敏检测方法,包括以下步骤:1.皮肤模型前期制备;2.树突状细胞的制备与培养;3.皮肤模型与树突状细胞共培养构建和受试物暴露;4.皮肤模型活性测试;5.皮肤模型基因组检测;6.共培养模型下层细胞分泌物检测;7.树突状细胞表面标志物表达检测;8.统计方法和结果预测。本发明把具有屏障和代谢功能的体外重建的3D皮肤与具有免疫功能的树突状细胞组合在一起,建立了共培养的新型实验系统,与体内具有相似的功能和致敏感反应;本发明可以从定性和定量两方面评价待测物质的皮肤致敏作用;本发明方法可代替活体动物和人体,直接预测化学品、化妆品、药品等可能导致的皮肤致敏。



1. 一种基于三维皮肤模型和树突状细胞共培养模式的皮肤致敏检测方法,其特征是包括以下步骤:

步骤1. 皮肤模型前期制备;

步骤2. 树突状细胞的制备与培养;

步骤3. 皮肤模型与树突状细胞共培养构建和受试物暴露:

将购置或自制的皮肤模型孵育在一个与之大小匹配的6孔、12孔或24孔培养皿中:如果皮肤模型为吊篮式,将其直接悬挂于培养皿壁;如果皮肤模型为插入式,直接将其置于培养皿内;

培养皿中已经添加2mL含酚红的MEM培养基,但无细胞;

孵育在温度为 $37.5 \pm 0.5^\circ\text{C}$ 、湿度 $90 \pm 8\%$ 和 $5 \pm 1\% \text{CO}_2$ 的培养箱环境中,时间为12-24h,备用;

孵育结束后,将皮肤模型转移至与之大小匹配的6孔、12孔或24孔培养皿中,培养皿中已培养有树突状细胞,形成共培养体系;

在皮肤模型表面直接进行受试物的处理,处理剂量为15-50 $\mu\text{L}$ ,处理时间为15-60min;

随后清洗皮肤模型表面受试物,并将皮肤模型与铺有细胞的培养皿一同孵育 $6 \pm 1\text{h}$ ,每种受试物分别设置50%,10%,1%和0.1%四个浓度,每个浓度设置3组平行模型;

待 $6 \pm 1\text{h}$ 孵育结束后,将三组平行的皮肤模型,取其中一组进行细胞活性测试,另外二组进行基因组表达测试;培养下层的树突状细胞进行表面标志物检测和细胞分泌物检测;

实验设置对照组,包括溶剂对照和阳性对照;必要时增加基准物质对照;

必要时,选择仅含皮肤模型或仅含树突状细胞的单一培养模型作为对照,用于比较共培养系统与单一培养系统在致敏预测能力方面的差异;

步骤4. 皮肤模型活性测试;

步骤5. 皮肤模型基因组检测:

将皮肤模型从固定支架取下,并将细胞层与支架层简易剥离,随后将两者放入准备好的TRIzol试剂中分离获取总RNA;将1 $\mu\text{g}$ 总RNA加入含有随机引物的20 $\mu\text{l}$ 总积液体中,其中含有SuperScript反转录酶III,根据反转录仪器操作说明进行相关RNA的反转录;接着,利用寡核苷酸引物进行PCR扩增,最后通过电泳法检定基因的成分;

鉴别皮肤刺激和皮肤致敏的候选基因组来源于下述表1中的基因群,具体的表面标志物分类为a组、b组和另外c-j组中任意至少1组:

a) 刺激基因组;

b) 凋亡基因组;

c) 减毒/解毒基因组;

d) 细胞死亡基因组;

e) 细胞应激基因组;

f) 热休克蛋白基因组;

g) 炎性基因组;

h) MHC代谢基因组;

i) 蛋白酶体基因组;

j) 组织修复基因组;

表1 皮肤模型中用于判断皮肤致敏情况的基因群

基因组别		基因代号
皮肤刺激基因组	a) 刺激组	HAS1
		IL-8
		IL-1A
		PLAUR
		IL-7R
		JUN
		TNFA
		RELT
		IER3
		IL-4R
		COL7A1
		ICAM2
		CCL20
		COX2
		MMP10
		MKP1
GM-CSF		
IL-23		

		IL-24
		ICAM1
		CXCL1
		MMP3
		MMP9
		EGR1
减毒/解毒基因组	c) 减毒/解毒组	AKR1C2
		GSTP1
		FABP4
		TXN
		NQ01
		AHR
		ING1
		SOD1
		HMOX1
		SLC7A11
		UTG1A6
		TXNRD1
		NQ02
		S100A8
		FTH1P
		AKR1B10
		GCLC
		PRDX6
		GSR
		GSS
UGT1A1		
CYP1B1		
CYP1A1		

		G6PD
皮肤致敏相关组	b) 凋亡	BCL2
		CASP8
	d) 细胞死亡	IGFBP2
	e) 细胞应激	DDIT3
	f) 热休克	HSP90AA1
		HSPB1
	g) 炎症	DUSP1
		TNFSF9
		SERPINB3
		SERPINB4
		CD44
		CCL27
		TLR8
		IL18
		HDCA
		CXCR3
		MMP8
		DEFB1
		TPSAB1
		CXCL14
		CCR1
		OSM
		CD86
		LCN2
	PI3	
	IL8	
	LFA-1	
h) MHC 代谢	CTSS	

	i) 蛋白酶体	PSMD12
	j) 组织修复	GLB1
		IGFBP6
		STOML2
		PIR
		CTGF
		KIF2C
		NRG1
		MELANA
		VEGE
		FLG
		KRT4
		MMP10
		KRT2
		KRT10

步骤6. 共培养模型下层细胞分泌物检测；

步骤7. 共培养模型下层细胞表面标志物表达检测：

取共培养下层细胞采用流式细胞仪进行细胞表面标志物检测，在流式细胞术之前，使用蛋白阻断剂对细胞的表面抗原进行非特异性阻断，试剂保持在2~8℃，细胞所处的环境在暗室及温度在2~8℃；

收集受试物作用后下层培养皿中的细胞，每孔分别移入相应的1mLEP管中，使用离心机离心收集细胞；并用缓冲液清洗一次，同样的条件下离心收集细胞；

FcR阻断：使用FcR阻断剂附带说明书标明的浓度进行配制，随后将离心获得的细胞进行阻断，以消除非特异性结合对后期抗体表达量化检测的影响；

抗体染色：将上述细胞根据细胞数量和抗体荧光标记选择特定的同型对照，随后根据试剂盒上的浓度提示进行抗体染色；

流式细胞术或荧光酶标仪检测器检测抗体染色后的荧光强度；

首先，对本批次细胞建立1组文件夹，包括实验组、同型对照组、溶剂对照组；

然后，通过无处理的空白对照组细胞调节实验FSC vs SSC的实验电压，以确保本批次细胞后续实验的结果计算；

再者，绘制FSC vs SSC和各组荧光组合的图，调节阳性组别的单染抗体下的电压补偿；

最后，通过得到的图谱，分组获取相对荧光强度 (RFI) 值；计算公式如下：

荧光强度均值 (MFI) = 荧光强度几何平均数；

$$\text{相对荧光强度 (RFI)} = \frac{\text{化学物质处理组MFI} - \text{化学物质处理组同型对照MFI}}{\text{溶剂对照组MFI} - \text{化学物质处理组同型对照MFI}} ;$$

步骤8. 统计方法和结果预测:

将上述步骤获得的各组实验数据,以均数±标准差( $\bar{X} \pm S$ )表示,采用SPSS22.0统计软件进行分析,多组之间差异的比较用单因素方差分析,组间两两比较采用SNK检验法,显著性水平 $\alpha=0.05$ , $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义,使用FlowJo 7.6对荧光强度进行统计分析;

根据不同检测参数的意义,从统计结果分析,作出如下皮肤致敏预测:

A. 皮肤模型基因表达情况:

实验组基因表达相对空白组增加2-7倍,即认为该物质在该浓度下可以引起该基因的显著性表达;

实验组与空白组相比,刺激基因组别24个基因超过20个有显著性表达,可以认为该物质只具有皮肤刺激性,可不作后续致敏相关基因表达测试;

另外的基因表达如果超过95%的基因呈现大于2-7倍的显著性增高,则可认为该物质在该浓度下有皮肤致敏潜能;

B. 共培养系统下层细胞分泌物检测情况:

使用试剂盒进行检测期间,如有标准曲线,则标准曲线 $R^2$ 需要至少大于0.999,没有标准曲线情况下,阳性参照物组别相对空白组别,目的分泌物的减少或增加至少具有显著性的统计学差异;阴性参照物组别相对空白组别,目的分泌物的减少或增加至少具有显著性的统计学差异;待测物质处理后的细胞组别,根据实验情况,与空白组别进行统计学比较,根据统计学推断对结果的符合性进行判断;

C. 树突状细胞表面标志物预测:

在细胞活率大于50%前提下,对于多数树突状细胞均具有的表面标志物中,CD86的相对荧光强度的均数与空白组相比增加大于1.5倍,CD54的相对荧光强度的均数与空白组相比增加大于2倍,该物质致敏性判断为阳性;其他情况下判断为阴性物质。

2. 根据权利要求1所述的基于三维皮肤模型和树突状细胞共培养模式的皮肤致敏检测方法,其特征是:所述的步骤1皮肤模型前期制备包括以下子步骤:

(1) 对商业化三维皮肤模型:表皮模型、全层皮肤模型和含黑色素皮肤模型,根据商业化皮肤模型的操作程序对皮肤模型孵育,培养过程参考购置试剂盒时提供的培养程序;

(2) 对非商业化皮肤模型:实验室利用获取的来源于儿童包皮组织的原代角质细胞体外构建的三维重建表皮模型;使用包皮组织来源于5-11岁男童,分离培养角质细胞和成纤维细胞,构建的细胞应在3代以内;角质细胞接种于插入式培养皿中,培养皿底部是具有生物活性的支架材料,或是构建的含有成纤维细胞的人工真皮;角质细胞经12-14天液液界面培养生长成为多层的三维表皮或全层皮肤模型;要求符合体外重建三维皮肤模型的结构特征和功能特征,即分层的角质结构和屏障功能。

3. 根据权利要求1所述的基于三维皮肤模型和树突状细胞共培养模式的皮肤致敏检测方法,其特征是:所述的步骤2树突状细胞的培养包括以下子步骤:

(1) 人源树突状细胞系和类树突细胞系

选择人来源的连续传代的树突状细胞或类树突状细胞,包括U937、THP-1、MUTZ-3、KG-1、HL-60、Mono Mac6、K-562和AML-193,细胞系细胞代数应为小于50代;从液氮罐中取出冻存细胞,溶解,加入培养基,吹匀,离心;移除上清,加入培养基混匀,转入25cm<sup>2</sup>培养瓶中,

24h后观察细胞状态,查看细胞密度;

如是悬浮细胞,至少1个星期通过离心去除残留废弃物并且计数;

悬浮细胞密度在 $0.8-1.2 \times 10^6$ /ml时需要传代;贴壁细胞以贴壁生长情况而定,于2-5天内进行一次传代;

(2) 外周血单核细胞分离和诱导的树突样细胞

采集新鲜抗凝健康人外周血,肝素抗凝后,用Ficoll密度梯度离心法分离外周血单核细胞;PBS洗去血小板,于37℃贴壁3h-4h后把上清移出到另一培养瓶中,以37℃预温的RPMI 1640轻洗去除非贴壁的细胞,贴壁的粘附细胞即为单核细胞,再次37℃孵育3h,收取培养瓶中的细胞获得单核细胞;

台盼蓝染色,于显微镜下计数活细胞数,细胞活率须 $>95\%$ ;

调整细胞浓度为 $1 \times 10^6$ 个/L,接种于6孔培养板,每孔0.2mL,加入经重组人粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(rhGM-CSF) 100ug/L、重组人白介素-4(rhIL-4) 100ug/L,然后置37℃,5%CO<sub>2</sub>培养箱内培养;

每2天更换培养液并补充细胞因子,培养第5天加入重组人肿瘤坏死因子- $\alpha$ (rhTNF- $\alpha$ ) 100ug/L,继续培养2d,以促进DC成熟并维持细胞活性;

培养第10天,收集贴壁细胞,采用倒置显微镜观察细胞形态;

收集的细胞用PBS制成单细胞悬液,调整细胞密度至 $1 \times 10^6$ /L,各测量管加入细胞悬液500ul,再分别加入用PE或FITC标记的HLA-DR、CD80、CD54、CD40和CD86抗体,置4℃避光孵育标记40min,PBS洗2次;

最后用400ul的PBS悬浮细胞,流式细胞仪分析DC的表型;

来源为人外周血分离单核细胞并定向诱导的树突状细胞不能传代;

(3) 细胞的冻存:预先将胎牛血清、DMSO和配制好的培养基按照2:1:7的比例混匀,随后将培养瓶中的细胞吸入离心管中,计数,确定每毫升培养基中的细胞数量,确定冻存的细胞密度;冻存液程序降温方式为:4℃放置30-60min、-20℃放置1-2h、-70℃低温冰箱过夜以及次日放入液氮罐中保存;

(4) 受试物储备液配制

根据受试物的溶解性质选择溶解体系,溶解体系共三种:DPBS、玉米油、橄榄油丙酮混合液,按4:1体积比配制;

首先尝试溶解受试物于DPBS缓冲液中,如果不能溶于DPBS缓冲液,将该受试物溶解于玉米油,或溶解于橄榄油丙酮混合液中;

将受试物配制为50%、10%、1%和0.1%四个固定浓度进行后续测试。

4. 根据权利要求1所述的基于三维皮肤模型和树突状细胞共培养模式的皮肤致敏检测方法,其特征是:所述的步骤4皮肤模型活性测试包括以下子步骤:

将清除完受试物的皮肤模型放入预先准备好的铺设好MTT的多孔培养板中,MTT浓度为1-5mg/ml,孵育2-5h后,使用皮肤模型打孔器将皮肤模型从插入皿支架装置中取下,放入预先准备好的MTT提取液,4℃冰箱静置过夜(18h-72h)或室温条件下为12-18h,然后使用酶标仪读取数值计算皮肤模型活性。

5. 根据权利要求1所述的基于三维皮肤模型和树突状细胞共培养模式的皮肤致敏检测方法,所述的步骤5皮肤模型基因组检测,其特征是:

所述的皮肤模型基因组检测是指通过RT-PCR对规定的基因组进行检测；

所述的规定的基因组来源于表1中的基因群，具体的表面标志物分类为a组、b组和另外c-j组中任意至少1组；

所述的基因组，从基因组a)到基因组j)所涉及的基因检测指标可以任意组合方式进行分析，如表1中的刺激基因组+凋亡基因组+减毒/解毒基因组+CD54；

所述包括测量编码一种或多种生物标记的核酸分子的表达，所指核酸分子是cDNA分子或mRNA分子；其中使用选自Southern杂交、Northern杂交、聚合酶链式反应(PCR)、逆转录酶PCR(RT-PCR)、定量实时PCR(qRT-PCR)、纳阵列、微阵列、大阵列、放射自显影法和原位杂交的方法进行其中一种或多种生物标记表达的测量；使用DNA微阵列测定了其中一种或多种生物标记物的表达量；

所述的方法中，使用一种或多种结合部分进行其中一种或多种生物标记表达的测量，每个结合部分能够选择性地结合编码表1中鉴定的生物标记之一的核酸分子；其中一种或多种被结合的部分各自包括核酸分子或由核酸分子组成；各自包含DNA、RNA、PNA、LNA、GNA、TNA或PMO或由DNA、RNA、PNA、LNA、GNA、TNA或PMO组成；

所述的方法中，一种或多种结合部分各自包含DNA或由DNA组成；其中一种或多种结合部分是5至100个核苷酸长；

所述的方法中，结合部分包含可检测部分，可检测部分选自：荧光部分；发光部分；化学发光部分；放射性部分；或酶部分；

所述的方法中，其中结合部分的可检测部分是荧光部分，包括测量一种或多种生物标记的蛋白的表达，使用一种或多种结合部分进行了其中一种或多种生物标记表达的测量，各个结合部分能够选择性地结合表1中鉴定的生物标记之一；

所述的方法中，一种或多种结合部分包含抗体或其抗原结合片段或由抗体或其抗原结合片段组成，其中抗体或其片段是单克隆抗体或其片段，包含一种或多种结合部分和可检测部分。

6. 根据权利要求1所述的基于三维皮肤模型和树突状细胞共培养模式的皮肤致敏检测方法，所述的步骤6共培养模型下层细胞分泌物检测，包括以下子步骤：

将下层细胞和培养基收集并分离，需要检测细胞内分泌物含量则对细胞进行破碎；

共培养模型下层细胞分泌物是指受试物处理上层皮肤模型后影响下层细胞分泌的特异性物质，包括炎性细胞因子：IL-1 $\alpha$ ，IL-1 $\beta$ ，IL-6，IL-7，IL-10，IL-12，IL-12，IL-15，MIP-1 $\alpha$ ，MIP-1 $\beta$ ，MIP-2，TNF- $\alpha$ 、PGE2、趋化因子：MCP-1、GRO；酶：LDH；

利用商业化的试剂盒，包括流式细胞术、ELISA和免疫组化方法，对收集的细胞和相应的培养基进行含量测定，与试验对照组比较，检测目标分泌物的产生情况，并通过统计分析受试物是否对细胞中某些分泌物的增加起着促进作用。

7. 根据权利要求1所述的基于三维皮肤模型和树突状细胞共培养模式的皮肤致敏检测方法，所述的步骤7共培养模型下层细胞表面标志物表达检测，其特征是：

所述的方法中，共培养模型下层细胞表面标志物表达是指通过受试物处理上层皮肤模型后引起的下层树突状细胞表面特定蛋白质或脂质类物质发生表达的过程；

所述的方法中，共培养模型下层细胞表面标志物表达检测是指，通过流式细胞术、ELISA和免疫组化等方法进行定量检测；

所述的方法中,不同来源的树突状细胞表面标志物有多种,其中与致敏相关的标志物包括HLA-DR,CD40,CD54,CD80,CD86,B7-H1,B7-H2,B7-DC等;

所述的方法中,树突状细胞表面标志物,其中必须包含至少一种下列细胞表面标志物:

A) ICAM1也称之为CD54,细胞间黏附分子-1;

B) CD86分子;

C) CD80分子;

D) 组蛋白簇1,H1e (HIST1H1E);

所述其中权利要求1至少包含ICAM1(也称之为CD54,细胞间黏附分子-1),其中至少包含CD86分子,或至少包含CD80分子,或至少包含组蛋白簇1,H1e (HIST1H1E),或至少包含两种细胞表面标志物。

8. 根据权利要求1所述的基于三维皮肤模型和树突状细胞共培养模式的皮肤致敏检测方法,所述的步骤8统计方法和结果预测,其特征是:

所述的方法中,实验预测模型涉及三方面的指标,包括皮肤模型基因组变化、树突状细胞表面标志物变化和下层培养液中分泌物的变化,对上述三方面指标数据的综合分析,对受试物皮肤致敏结果进行定性判断;三组参数的权重大小依次为:皮肤模型基因组变化>树突状细胞表面标志物变化>培养液中分泌物的变化;

所述的方法中,受试物组与空白组相比,如果超过95%的基因表达呈现大于2-7倍的显著性增高,则可认为该物质在该浓度下有皮肤致敏潜能;

所述的方法中,共培养系统下层树突状细胞分泌物检测结果差异需要统计学推断,并且纳入预测模型,作为评估皮肤致敏结果指标之一;

所述的方法中,关于共培养系统下层细胞表面标志物预测需要结合细胞活性,标志物表达率和受试物质浓度大小进行综合性分析;

所述的方法中,引起皮肤致敏结果的多种参数存在差异的情况下,使用多元统计方法:T2检验、多元方差分析或因子分析。

9. 根据权利要求1所述的基于三维皮肤模型和树突状细胞共培养模式的皮肤致敏检测方法,所述的步骤1-9任意一项,其特征是:

所述的共培养体系是使用三维皮肤模型与树突状细胞构建空间层次的上下层共培养模式,承接皮肤模型的固定支架是吊篮式或插入式培养皿;皮肤模型为具有屏障功能的表皮模型、含表皮与真皮的全皮模型、含黑色素细胞的模型,不包括不具备屏障功能的真皮模型;所使用的多孔培养版是6孔、12孔或24孔培养板,培养板的孔径应与皮肤模型大小匹配;

所述的MTT提取液是提DMSO或异丙醇;

所述的实验对照应包括溶剂对照;必要时增加参考物质对照和基准物质对照;参考物质是指致敏程度已知并明确的阳性致敏物,基准物质是指某一致敏特征(如对某一类基因组,对某一类细胞表面标志物)确切的物质,或与测试物质结构相似的已知致敏物;

所述的受试物包括可能与皮肤接触的产品和外源物质,包括化学品、化妆品原料及产品、石油润滑剂、植物提取物、家用洗涤产品、皮肤科及相关药品、生物活性原料、灰尘颗粒和空气污染物、纺织品及浸提液,以及其它皮肤接触产品;

所述对照还包括流式细胞仪检测树突细胞表面标志物时的同型对照和空白对照;

所述的共培养体系对照,是指必要时,可根据研究与检测目的,选择仅含皮肤模型或仅

含树突状细胞的单一培养模型作为对照,用于比较共培养系统与单一培养系统在致敏预测能力方面的差异。

## 一种基于三维皮肤模型和树突状细胞共培养模式的皮肤致敏检测方法

### 技术领域

[0001] 本发明属于皮肤致敏物质毒性检测和研究技术领域,具体涉及一种基于三维皮肤模型和树突状细胞共培养模式的皮肤致敏检测方法。

### 背景技术

[0002] 皮肤致敏,亦称之为接触性过敏性皮炎(Allergy Contact Dermatitis,ACD),是皮肤对外源性物质产生的免疫原性皮肤反应。皮肤致敏的临床表现有瘙痒、红斑、丘疹和水肿等症状。对于大量生产的工业化学品,法规要求对其可能导致的皮肤致敏性进行检测;同样,对于可能皮肤接触的产品,包括化妆品、消毒类产品、卫生用品和医疗器械等,也应当对其可能引起的皮肤致敏进行评估检测。传统的方法采用豚鼠实验,通过诱导和激发两个阶段在动物皮肤涂抹受试物质,观察引起的皮肤症状进行判定,不仅需要大量标准化的实验动物,而且实验周期长,带给动物极大的痛苦。随着3R原则的推行,2004年OECD发布了小鼠局部淋巴结实验(LLNA),以致敏发生后淋巴结内T细胞数量增殖变化代替动物临床症状观察,虽然减轻了动物痛苦,但仍然需要使用大量动物。近年来,在有害结局通路(Adverse Outcome Pathway,AOP)毒性测试理念的指导下,快速高效的体外检测方法得到开发。其中皮肤致敏的体外预测方法开发最受关注。

[0003] 接触性过敏性皮炎属于人类的IV型超敏反应,基于有害结局通路(AOP)反应原理的皮肤致敏过程可分为:(1)外源物质渗透进入皮肤;(2)化学物质与表皮中的蛋白质结合,形成半抗原-蛋白复合物;(3)角质细胞氧化反应通路启动;(4)皮肤中的树突状细胞识别复合物,启动特异性反应;(5)成熟树突状细胞传递信号激活T淋巴细胞,产生记忆T细胞;(6)再次接触同类物质,淋巴结中的记忆T细胞快速增殖,产生特异性反应,皮肤出现相关症状。

[0004] 外源物质引起人体皮肤致敏的发生需要诱导和激发两个阶段,传统动物实验完整地模拟了这一现象。基于目前对于致敏发生机制的深入了解,可以针对上述过程的第(1)-(3)步建立检测方法。例如,针对第(2)步外源化学物质与表皮蛋白结合,建立了直接多肽结合反应(DPRA方法),针对表皮细胞的第(3)步,有学者利用Episkin™完成了皮肤致敏体外方法的建立(Francoise C,Elodie B,Claude A,et al.Genes specifically modulated in sensitized skins allow the detection of sensitizers in a reconstructed human skin model.Development of the Sens-IS assay.Toxicology in Vitro,2015,29:787-802),针对第(4)步致敏物激活树突状细胞,建立了人免疫细胞活化实验(h-CLAT方法)。针对第(5)步体外T细胞检测,2013年6月26日M.林德斯泰特等人申请了有关专利(中国专利申请号201180062886.7),该发明包括基于MUTZ-3细胞和基因阵列的皮肤致敏检测方法等。但是,这些方法仅仅只是针对皮肤致敏AOP过程中某一关键步骤建立的单一检测方法。然而人体皮肤并非简单地分解为各种细胞的组合,需要整合各个独立的细胞事件,最大化的利用检测过程中产生的所有毒理信息,获得完整的评估。所以,基于三维结构皮肤模型和树突状细胞的方法可用简单的系统,提供更全面和更科学准确的皮肤致敏反应信息。

## 发明内容

[0005] 本发明所要解决的技术问题,就是提供一种基于三维皮肤模型和树突状细胞共培养预测皮肤致敏的方法,利用体外的检测技术,完全不需要动物进行测试,更具代表性的使用了人源细胞,可以更接近人体的检测系统,高效和快速的进行毒性检验。

[0006] 解决上述技术问题,本发明所采用的技术方案如下:

[0007] 一种基于三维皮肤模型和树突状细胞共培养模式的皮肤致敏检测方法,其特征是包括以下步骤:

[0008] 步骤1.皮肤模型前期制备;

[0009] 步骤2.树突状细胞的制备与培养;

[0010] 步骤3.皮肤模型与树突状细胞共培养构建和受试物暴露:

[0011] 将购置或自制的皮肤模型孵育在一个与之大小匹配的6孔、12孔或24孔培养皿中:如果皮肤模型为吊篮式,将其直接悬挂于培养皿壁;如果皮肤模型为插入式,直接将其置于培养皿内;

[0012] 培养皿中已经添加2mL含酚红的MEM培养基,但无细胞;

[0013] 孵育在温度为 $37.5 \pm 0.5^\circ\text{C}$ 、湿度 $90 \pm 8\%$ 和 $5 \pm 1\% \text{CO}_2$ 的培养箱环境中,时间为12-24h,备用;

[0014] 孵育结束后,将皮肤模型转移至与之大小匹配的6孔、12孔或24孔培养皿中,培养皿中已培养有树突状细胞,形成共培养体系;

[0015] 在皮肤模型表面直接进行受试物的处理,处理剂量为15-50 $\mu\text{L}$ ,处理时间为15-60min;

[0016] 随后清洗皮肤模型表面受试物,并将皮肤模型与铺有细胞的培养皿一同孵育 $6 \pm 1\text{h}$ ,每种受试物分别设置50%,10%,1%和0.1%四个浓度,每个浓度设置3组平行模型;

[0017] 待 $6 \pm 1\text{h}$ 孵育结束后,将三组平行的皮肤模型按1:2的比例分别进行细胞活性测试和细胞基因组表达测试;共培养下层细胞进行细胞表面标志物检测和细胞分泌物检测;

[0018] 步骤4.皮肤模型活性测试;

[0019] 步骤5.皮肤模型基因组检测:

[0020] 将皮肤模型从固定支架取下,并将细胞层与支架层简易剥离,随后将两者放入准备好的TRIzol试剂中分离获取总RNA;将1 $\mu\text{g}$ 总RNA加入含有随机引物的20 $\mu\text{l}$ 总体积液体中,其中含有SuperScript反转录酶III,根据反转录仪器操作说明进行相关RNA的反转录;接着,利用寡核苷酸引物进行PCR扩增,最后通过电泳法检定基因的成分;

[0021] 鉴别皮肤刺激和皮肤致敏的候选基因组来源于下述表1中的基因群,具体的表面标志物分类为a组、b组和另外c-j组中任意至少1组:

[0022] a) 刺激基因组;

[0023] b) 凋亡基因组;

[0024] c) 减毒/解毒基因组;

[0025] d) 细胞死亡基因组;

[0026] e) 细胞应激基因组;

[0027] f) 热休克蛋白基因组;

- [0028] g) 炎性基因组；
- [0029] h) MHC代谢基因组；
- [0030] i) 蛋白酶体基因组；
- [0031] j) 组织修复基因组；
- [0032] 表1皮肤模型中用于判断皮肤致敏情况的基因群

基因组别		基因代号
[0033] 皮肤刺激基因组	a) 刺激组	HAS1
		IL-8
		IL-1A
		PLAUR
		IL-7R
		JUN
		TNFA
		RELT
		IER3
		IL-4R
		COL7A1
		ICAM2
		CCL20

[0034]

		COX2
		MMP10
		MKP1
		GM-CSF
		IL-23
		IL-24
		ICAM1
		CXCL1
		MMP3
		MMP9
		EGR1
减毒/解毒基因组	c) 减毒/解毒组	AKR1C2
		GSTP1
		FABP4
		TXN
		NQO1
		AHR
		ING1
		SOD1
		HMOX1
		SLC7A11
		UTG1A6
		TXNRD1
		NQO2
		S100A8
		FTH1P
AKR1B10		
GCLC		

[0035]

皮肤致敏相关组		PRDX6
		GSR
		GSS
		UGT1A1
		CYP1B1
		CYP1A1
		G6PD
	b) 凋亡	BCL2
		CASP8
	d) 细胞死亡	IGFBP2
	e) 细胞应激	DDIT3
	f) 热休克	HSP90AA1
		HSPB1
	g) 炎症	DUSP1
		TNFSF9
		SERPINB3
		SERPINB4
		CD44
		CCL27
		TLR8
IL18		
HDCA		
CXCR3		
MMP8		
DEFB1		
TPSAB1		
CXCL14		
CCR1		

[0036]			OSM
			CD86
			LCN2
			PI3
			IL8
			LFA-1
		h)MHC 代谢	CTSS
		i)蛋白酶体	PSMD12
		j)组织修复	GLB1
			IGFBP6
			STOML2
			PIR
			CTGF
			KIF2C
			NRG1
			MELANA
			VEGE
			FLG
			KRT4
			MMP10
KRT2			
KRT10			

[0037] 步骤6.共培养模型下层细胞分泌物检测；

[0038] 步骤7.共培养模型下层细胞表面标志物表达检测；

[0039] 取共培养下层细胞采用流式细胞仪进行细胞表面标志物检测，在流式细胞术之前，使用蛋白阻断剂对细胞的表面抗原进行非特异性阻断，以免干扰检测和结果，试剂保持在2~8℃，细胞所处的环境在暗室及温度在2~8℃；

[0040] 收集受试物作用后下层培养皿中的细胞，每孔分别移入相应的1mLEP管中，使用离心机离心收集细胞；并用缓冲液清洗一次，同样的条件下离心收集细胞；

[0041] FcR阻断：使用FcR阻断剂附带说明书标明的浓度进行配制，随后将离心获得的细胞进行阻断，以消除非特异性结合对后期抗体表达量化检测的影响；

[0042] 抗体染色：将上述细胞根据细胞数量和抗体荧光标记选择特定的同型对照，随后

根据试剂盒上的浓度提示进行抗体染色；

[0043] 流式细胞术或荧光酶标仪检测器检测抗体染色后的荧光强度；

[0044] 首先,对本批次细胞建立1组文件夹,包括实验组、同型对照组、溶剂对照组；

[0045] 然后,通过无处理的空白对照组细胞调节实验FSC vs SSC的实验电压,以确保本批次细胞后续实验的结果计算；

[0046] 再者,绘制FSC vs SSC和各组荧光组合的图,调节阳性组别的单染抗体下的电压补偿；

[0047] 最后,通过得到的图谱,分组获取相对荧光强度(RFI)值,计算公式如下：

[0048] 流式细胞术结果指标:荧光强度均值(MFI) = 荧光强度几何平均数；

[0049] 相对荧光强度(RFI) = 
$$\frac{\text{化学物质处理组MFI} - \text{化学物质处理组同型对照MFI}}{\text{溶剂对照组MFI} - \text{化学物质处理组同型对照MFI}} ;$$

[0050] 步骤8. 统计方法和结果预测：

[0051] 将上述步骤获得的各组实验数据,以均数±标准差( $\bar{X} \pm S$ )表示,采用SPSS22.0统计软件进行分析,多组之间差异的比较用单因素方差分析,组间两两比较采用SNK检验法,显著性水平 $\alpha=0.05$ , $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义,使用FlowJo 7.6对荧光强度进行统计分析；

[0052] 根据不同检测参数的意义,从统计结果分析,作出如下皮肤致敏预测：

[0053] A. 皮肤模型基因表达情况：

[0054] 实验组基因表达相对空白组增加2-7倍,即认为该物质在该浓度下可以引起该基因的显著性表达；

[0055] 实验组与空白组相比,刺激基因组别24个基因超过20个有显著性表达,可以认为该物质只具有皮肤刺激性,可不作后续致敏相关基因表达测试；

[0056] 另外的基因表达如果超过95%的基因呈现大于2-7倍的显著性增高,则可认为该物质在该浓度下有皮肤致敏潜能；

[0057] B. 共培养系统下层细胞分泌物检测情况：

[0058] 使用试剂盒进行检测期间,如有标准曲线,则标准曲线 $R^2$ 需要至少大于0.999,没有标准曲线情况下,阳性参照物组别相对空白组别,目的分泌物的减少或增加至少具有显著性的统计学差异;阴性参照物组别相对空白组别,目的分泌物的减少或增加至少具有显著性的统计学差异;待测物质处理后的细胞组别,根据实验情况,与空白组别进行统计学比较,根据统计学推断对结果的符合性进行判断；

[0059] C. 树突状细胞表面标志物预测：

[0060] 在细胞活率大于50%前提下,对于多数树突状细胞均具有的表面标志物中,CD86的相对荧光强度(RFI)的均数与空白组相比增加大于1.5倍,CD54的RFI的均数与空白组相比增加大于2倍,该物质致敏性判断为阳性;其他情况下判断为阴性物质。

[0061] 优选地,所述的步骤1皮肤模型前期制备包括以下子步骤：

[0062] (1) 对商业化三维皮肤模型:表皮模型、全层皮肤模型和含黑色素皮肤模型,根据商业化皮肤模型的操作程序对皮肤模型孵育,培养过程参考购置试剂盒时提供的培养程序；

[0063] (2) 对非商业化皮肤模型:实验室利用获取的来源于儿童包皮组织的原代角质细

胞体外构建的三维重建表皮模型；使用包皮组织来源于5-11岁男童，分离培养角质细胞和成纤维细胞，构建的细胞应在3代以内；角质细胞接种于插入式培养皿中，培养皿底部可以是具有生物活性的支架材料，也可以是构建的含有成纤维细胞的人工真皮；角质细胞经12-14天气液界面培养生长成为多层的三维表皮或全层皮肤模型；要求符合体外重建三维皮肤模型的结构特征和功能特征，即分层的角质结构和屏障功能。

[0064] 优选地，所述的步骤2树突状细胞的培养包括以下子步骤：

[0065] (1) 人源树突状细胞系和类树突细胞系

[0066] 选择人来源的连续传代的树突状细胞或类树突状细胞，包括U937、THP-1、MUTZ-3、KG-1、HL-60、Mono Mac6、K-562和AML-193，细胞系细胞代数应为小于50代；从液氮罐中取出冻存细胞，溶解，加入培养基，吹匀，离心；移除上清，加入培养基混匀，转入25cm<sup>2</sup>培养瓶中，24h后观察细胞状态，查看细胞密度；

[0067] 如是悬浮细胞，至少1个星期通过离心去除残留废弃物并且计数；

[0068] 悬浮细胞密度在 $0.8-1.2 \times 10^6$ /ml时需要传代，次；贴壁细胞以贴壁生长情况而定，于2-5天内进行一次传代；

[0069] (2) 外周血单核细胞分离和诱导的树突样细胞

[0070] 采集新鲜抗凝健康人外周血，肝素抗凝后，用Ficoll密度梯度离心法分离外周血单核细胞；PBS洗去血小板，于37℃贴壁3h后把上清移出到另一培养瓶中，以37℃预温的RPMI 1640轻洗去除非贴壁的细胞，贴壁的粘附细胞即为单核细胞，再次37℃孵育3h，收取培养瓶中的细胞获得单核细胞；

[0071] 台盼蓝染色，于显微镜下计数活细胞数，细胞活率须>95%；

[0072] 调整细胞浓度为 $1 \times 10^6$ 个/L，接种于6孔培养板，0.002L/孔，加入经重组人粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(rhGM-CSF) 100ug/L、重组人白介素-4(rhIL-4) 100ug/L，然后置37℃，5%CO<sub>2</sub>培养箱内培养；

[0073] 每2天更换培养液并补充细胞因子，培养第5天加入重组人肿瘤坏死因子- $\alpha$ (rhTNF- $\alpha$ ) 100ug/L，继续培养2d，以促进DC成熟并维持细胞活性；

[0074] 培养第10天，收集贴壁细胞，采用倒置显微镜观察细胞形态；

[0075] 同时收集树突状细胞，并用PBS制成单细胞悬液，调整细胞密度至 $1 \times 10^6$ /L，各测量管加入细胞悬液500ul，再分别加入用PE或FITC标记的HLA-DR、CD80、CD54、CD40和CD86抗体，置4℃避光孵育标记40min，PBS洗2次；

[0076] 最后用400ul的PBS悬浮细胞，流式细胞仪分析DC的表型；

[0077] 来源为人外周血分离单核细胞并定向诱导的树突状细胞不能传代；

[0078] (3) 细胞的冻存：预先将胎牛血清、DMSO和配制好的培养基按照2:1:7的比例混匀，随后将培养瓶中的细胞吸入离心管中，计数，确定每毫升培养基中的细胞数量，确定冻存的细胞密度；冻存液程序降温方式为：4℃放置30-60min、-20℃放置1-2h、-70℃低温冰箱过夜以及次日放入液氮罐中保存；

[0079] (4) 受试物储备液配制

[0080] 根据受试物的溶解性质选择溶解体系，可使用溶解体系有以下3种：DPBS、玉米油、橄榄油丙酮混合液(按4:1体积比配制)；

[0081] 首先尝试溶解受试物于DPBS缓冲液中，如果不能溶于DPBS缓冲液，将该受试物溶

解于玉米油,或溶解于橄榄油丙酮混合液中;

[0082] 将受试物配制为50%、10%、1%和0.1%四个固定浓度进行后续测试。

[0083] 优选地,所述的步骤4皮肤模型活性测试包括以下子步骤:将清除完受试物的皮肤模型放入预先准备好的铺设好MTT的多孔培养板中,孵育2-5h后,使用皮肤模型打孔器将皮肤模型从插入皿支架装置中取下,放入预先准备好的MTT提取液,4℃冰箱静置过夜,然后使用酶标仪读取数值计算皮肤模型活性。

[0084] 优选地,所述的步骤6共培养模型下层细胞分泌物检测包括以下子步骤:将下层细胞和培养基收集并分离,需要检测细胞内分泌物含量,则用超声波破碎仪对细胞进行破碎;利用商业化的试剂盒对收集的细胞和相应的培养基进行含量测定,与试验对照组比较,检测目标分泌物的产生情况,以此判断受试物是否对细胞中某些分泌物的增加起着促进作用。

[0085] 优选地,所述的基于三维皮肤模型和树突状细胞共培养模式的皮肤致敏检测方法,所述的步骤5皮肤模型基因组检测,其特征是:

[0086] 所述的皮肤模型基因组检测是指通过RT-PCR对规定的基因组进行检测;

[0087] 所述的规定的基因组来源于表1中的基因群,具体的表面标志物分类为a

[0088] 组、b组和另外c-j组中任意至少1组;

[0089] 所述的基因组,从基因组a)到基因组j)所涉及的基因检测指标可以任意组合方式进行分析,如表1中的刺激基因组+凋亡基因组+减毒/解毒基因组+CD54;

[0090] 所述包括测量编码一种或多种生物标记的核酸分子的表达,所指核酸分子是cDNA分子或mRNA分子;其中使用选自Southern杂交、Northern杂交、聚合酶链式反应(PCR)、逆转录酶PCR(RT-PCR)、定量实时PCR(qRT-PCR)、纳阵列、微阵列、大阵列、放射自显影法和原位杂交的方法进行其中一种或多种生物标记表达的测量;使用DNA微阵列测定了其中一种或多种生物标记表达的测量;

[0091] 所述的方法中,使用一种或多种结合部分进行其中一种或多种生物标记表达的测量,每个结合部分能够选择性地结合编码表1中鉴定的生物标记之一的核酸分子;其中一种或多种被结合的部分各自包括核酸分子或由核酸分子组成;各自包含DNA、RNA、PNA、LNA、GNA、TNA或PMO或由DNA、RNA、PNA、LNA、GNA、TNA或PMO组成;

[0092] 所述的方法中,一种或多种结合部分各自包含DNA或由DNA组成;其中一种或多种结合部分是5至100个核苷酸长;

[0093] 所述的方法中,结合部分包含可检测部分,可检测部分选自:荧光部分;发光部分;化学发光部分;放射性部分;或酶部分;

[0094] 所述的方法中,其中结合部分的可检测部分是荧光部分,包括测量一种或多种生物标记的蛋白的表达,使用一种或多种结合部分进行了其中一种或多种生物标记表达的测量,各个结合部分能够选择性地结合表1中鉴定的生物标记之一;

[0095] 所述的方法中,一种或多种结合部分包含抗体或其抗原结合片段或由抗体或其抗原结合片段组成,其中抗体或其片段是单克隆抗体或其片段,包含一种或多种结合部分和可检测部分;

[0096] 优选地,所述的基于三维皮肤模型和树突状细胞共培养模式的皮肤致敏检测方法,所述步骤6共培养模型下层细胞分泌物检测,其特征是:

[0097] 所述的方法中,共培养模型下层细胞分泌物是指受试物处理上层皮肤模型后影响下层细胞分泌的特异性物质,包括白介素、氨基酸、肽类物质、小分子蛋白质、大分子蛋白质(酶和抗体)和非蛋白质类激素等物质;

[0098] 所述的方法中,分泌物的测试使用商业化试剂盒,包括流式细胞术、ELISA和免疫组化方法;分泌物增加或者减少是相对空白对照组而言,通过统计推断;

[0099] 优选地,所述的基于三维皮肤模型和树突状细胞共培养模式的皮肤致敏检测方法,所述的步骤7共培养模型下层细胞表面标志物表达检测,其特征是:

[0100] 所述的方法中,共培养模型下层细胞表面标志物表达是指通过受试物处理上层皮肤模型后引起的下层树突状细胞表面特定蛋白质或脂质类物质发生表达的过程;

[0101] 所述的方法中,共培养模型下层细胞表面标志物表达检测是指,通过流式细胞术、ELISA和免疫组化等方法进行定量检测;

[0102] 所述的方法中,不同来源的树突状细胞表面标志物有多种,其中与致敏相关的标志物包括HLA-DR,CD40,CD54,CD80,CD86,B7-H1,B7-H2,B7-DC等;

[0103] 所述的方法中,树突状细胞表面标志物,其中必须包含至少一种下列细胞表面标志物:

[0104] A) ICAM1也称之为CD54,细胞间黏附分子-1;

[0105] B) CD86分子;

[0106] C) CD80分子;

[0107] D) 组蛋白簇1,H1e (HIST1H1E);

[0108] 所述其中权利要求1至少包含CD54,或至少包含CD86分子,或至少包含CD80分子,或至少包含组蛋白簇1,H1e (HIST1H1E),或至少包含两种及以上细胞表面标志物;

[0109] 优选地,所述的基于三维皮肤模型和树突状细胞共培养模式的皮肤致敏检测方法,所述的步骤8统计方法和结果预测,其特征是:

[0110] 所述的方法中,实验预测模型涉及三方面的指标,包括皮肤模型基因组变化、树突状细胞表面标志物变化和下层培养液中分泌物的变化,对上述三方面指标数据的综合分析,对受试物皮肤致敏结果进行定性判断;三组参数的权重大小依次为:皮肤模型基因组变化>树突状细胞表面标志物变化>培养液中分泌物的变化;

[0111] 所述的方法中,受试物组与空白组相比,如果超过95%的基因表达呈现大于2-7倍的显著性增高,则可认为该物质在该浓度下有皮肤致敏潜能;

[0112] 所述的方法中,共培养系统下层细胞分泌物检测结果差异需要统计学推断,并且纳入预测模型,作为评估皮肤致敏结果指标之一;

[0113] 所述的方法中,关于共培养系统下层细胞表面标志物预测需要结合细胞活性,标志物表达率和物质浓度大小进行综合性分析;

[0114] 所述的方法中,引起皮肤致敏的多种检测参数,当存在差异的情况下,使用多元统计方法:T2检验、多元方差分析或因子分析;

[0115] 优选地,1-9任意一项

[0116] 所述的共培养体系是使用三维皮肤模型与树突状细胞构建空间层次的上下层共培养模式,承接皮肤模型的固定支架是吊篮式或插入式培养皿;皮肤模型为具有屏障功能的表皮模型、含表皮与真皮的全皮模型、含黑色素细胞的模型,不包括不具备屏障功能的真

皮模型;所使用的多孔培养版是6孔、12孔或24孔培养板,培养板的孔径应与皮肤模型大小匹配;

[0117] 所述的实验对照应包括溶剂对照;必要时增加参考物质对照和基准物质对照;参考物质是指致敏程度已知并明确的阳性致敏物,基准物质是指某一致敏特征(如对某一类基因组,对某一类细胞表面标志物)确切的物质,或与测试物质结构相似的已知致敏物;

[0118] 所述的受试物包括可能与皮肤接触的产品和外源物质,包括化学品、化妆品原料及产品、石油润滑剂、植物提取物、家用洗涤产品、皮肤科及相关药品、生物活性原料、灰尘颗粒和空气污染物、纺织品及浸提液、紫外线,以及其它皮肤接触产品;

[0119] 所述对照还包括流式细胞仪检测树突细胞表面标志时的同型对照和空白对照;

[0120] 所述的共培养体系对照,是指必要时,可根据研究与检测目的,选择仅含皮肤模型或仅含树突状细胞的单一培养模型作为对照,用于比较共培养系统与单一培养系统在致敏预测能力方面的差异。

[0121] 有益效果:本发明可以用于替代活体动物(或人体)预测化学品或化妆品可能导致的皮肤致敏。与现有技术相比,本发明具有如下优点:

[0122] (1) 本发明使用的皮肤模型,是技术相对稳定、标准化程度较高,具有屏障功能和代谢功能的三维模拟人体皮肤,可直接接触样品,适用于任何原料、混合物、配方和产品的测试,且不受样品溶解性、颜色等物理性状的影响,更接近人体实际情况;

[0123] (2) 本发明使用的树突状细胞,是一类具有共同特征性的细胞表面标志物的免疫细胞,受致敏物质作用后特征性地产生表面标志的变化;

[0124] (3) 本发明使用共培养系统,组合了三维结构的角质细胞(皮肤模型)和免疫细胞,避免了重建一体化模型的技术难题,完整地模拟了体内皮肤致敏反应发生的过程;

[0125] (4) 本发明使用共培养体系,综合检测了皮肤模型中致敏相关基因组的变化、树突状细胞的表面标志变化和细胞分泌物质的变化,检测参数全面,方法灵敏,特异性高,预测模型准确;

[0126] (5) 本发明皮肤模型为载体的共培养体系,解决了二维角质细胞和树突状细胞只能检测可溶解原料而不能检测不溶解原料、产品和有色物质的局限性;还可以通过皮肤模型的代谢作用,检测可能存在代谢产物的致敏样品;

[0127] (6) 本发明建立的方法可以代替活体动物和人类皮肤,提供定量和定性的皮肤致敏检测数据,直接用于化学品、化妆品、药品、空气污染物等产品和样品的皮肤致敏性的预测;

## 附图说明

[0128] 图1为三维皮肤模型与树突状细胞共培养模式图;

[0129] 图2a为皮肤模型的三维结构之一(某批次皮肤模型的质控切片图);

[0130] 图2b为皮肤模型的三维结构之二(经过受试物暴露后的皮肤模型切片图);

[0131] 图3a为1%体积分数浓度下肉桂醛CD54表达情况和细胞活率情况示意图;

[0132] 图3b为1%体积分数浓度下肉桂醛CD86表达情况和细胞活率情况示意图;

[0133] 图4为减毒/解毒基因组别与皮肤致敏相关的基因表达图。

## 具体实施方式

[0134] 实施例1基于Episkin皮肤模型和THP-1细胞共培养的化学品肉桂醛皮肤致敏测试

[0135] 依次包括以下几个步骤:

[0136] 1、皮肤模型孵育

[0137] 购置商业化三维皮肤模型Episkin,该批模型型号为12孔板。皮肤模型由快递公司负责运输至实验室,运输温度为10-25℃。皮肤模型到达实验室后检查外包装是否完好,查看随箱温度监控条以确保皮肤模型运输温度处于允许波动范围内。皮肤模型外包装使用酒精消毒后打开,使用镊子小心将皮肤模型吊篮移入已经添加2mL含酚红的MEM培养基的12孔培养板中,于37℃,5%CO<sub>2</sub>和95%湿度的培养条件下孵育24h,待皮肤模型活性稳定后进行实验。

[0138] 2、THP-1细胞培养

[0139] 液氮罐中取出装有THP-1细胞的EP管,置于37℃水浴锅中快速解冻。超净台中,将细胞转移至离心管随后离心获得细胞。加入4mL培养基混匀,转入25cm<sup>2</sup>培养瓶中,24h后观察细胞。传代次数不超过30代。显微镜下观察细胞状态,该细胞为悬浮状态,细胞密度在0.8×10<sup>6</sup>个/mL,正常培养密度不超过1×10<sup>6</sup>个/mL。常规换液传代为2天进行一次。

[0140] 3、受试化学物质配制

[0141] 选择对皮肤无特殊反应的玉米油(试剂级)作为稀释液,把肉桂醛分别稀释成50%,10%,1%和0.1%4个浓度。

[0142] 4、皮肤模型与THP-1细胞共培养实验

[0143] Episkin皮肤模型孵育结束后,与THP-1细胞共同培养并在皮肤模型表面进行受试物的处理,处理剂量为15±0.5μL,处理时间为15min,随后清洗去除皮肤模型表面受试物,并将皮肤模型与铺有细胞的12孔培养皿一同孵育6h,每个浓度设置3组平行模型。待6h孵育结束后,将三组平行的皮肤模型按1:2的比例分别进行细胞活性测试和细胞基因组表达测试前期处理。共培养下层细胞进行细胞表面标志物检测和/或细胞分泌物检测。

[0144] 5、皮肤模型活性测试

[0145] 将清除完受试物的Episkin皮肤模型放入预先准备好的铺设好MTT的多孔培养板中,孵育3h后,使用皮肤模型打孔器将皮肤模型从固定支架中取下放入预先准备好的MTT提取液,4℃冰箱静置过夜,后使用酶标仪读取数值计算皮肤模型活率。

[0146] 6、皮肤模型基因组检测

[0147] 将皮肤模型从固定支架取下,并将细胞层与支架层简易剥离,随后将两者放入准备好的TRIzol试剂中分离获取总RNA。将1μg总RNA加入含有随机引物的20μl总体积液体中,其中含有SuperScript反转录酶III,根据反转录仪器操作说明进行相关RNA的反转录。接着,利用oligonucleotide引物进行PCR扩增,最后通过电泳法检定基因的成分。

[0148] 7、CD86/CD54表达检测

[0149] 检测前对流式细胞仪进行校准和使用蛋白阻断剂对细胞的表面抗原进行非特异性阻断。从12孔细胞培养板中收集暴露后的细胞,将每孔对应浓度受试物作用下的细胞分别移入相应的1mLEP管中,离心机离心(1400转,5min,4℃)收集细胞。并用FACS缓冲液(PBS+0.1%的BSA)清洗一次,同样的条件下离心收集细胞。

[0150] FcR阻断:使用FcR阻断剂附带说明书标明的浓度进行配制,随后将离心获得的细胞进行阻断。

[0151] CD54/CD86抗体染色:将上述细胞平均分配至3根1mL的EP管中,即每管中有大约 $3 \times 10^5$ 个细胞;FITC-CD86抗体、PE-CD54抗体、FITC标记的小鼠同行对照IgG1、PE标记的小鼠同行对照IgG1和7AAD分别根据试剂盒上标明的浓度进行配制,必要时可以根据实验具体情况对抗体进行梯度稀释,以免抗体浓度过高影响实验结果。

[0152] 将事先配制好的含有抗体的FACS缓冲液加入EP管,每支EP管添加50uL,也就是 $3 \times 10^5$ 个细胞添加50uL,2-8℃环境和暗室条件下染色30min;使用FACS缓冲液清洗2次;再用500uLFACS缓冲液重悬细胞并移入5mL流式管中待检测。同时,每次实验条件下需要进行7AAD的染色,即将已经染有上述抗体的液体分别再添加7AAD染料,步骤同上述,以便确定该浓度下细胞活率与相应抗体染色的情况。

[0153] 8、统计方法和结果预测

[0154] 各实验数据均以均数±标准差( $\bar{X} \pm S$ )表示,采用SPSS22.0统计软件进行分析。多组之间差异的比较用单因素方差分析,组间两两比较采用SNK检验法,显著性水平 $\alpha=0.05$ , $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。使用FlowJo 7.6对荧光强度进行统计分析。

[0155] A. 皮肤模型基因表达情况

[0156] 基因表达相对空白组增加1.3倍,即认为该物质在该浓度下可以引起该基因的显著性表达;检测的刺激基因组别24个基因超过20个有显著性表达可以认为该物质具有皮肤刺激性,可不作后续基因表达测试;另外的基因表达如果超过95%的基因呈现大于1.3倍的显著性增高,则可认为该物质在该浓度下有皮肤致敏潜能。

[0157] B. 共培养系统下层细胞表面标志物预测

[0158] 每组化学物质至少需要三组平行实验。在细胞活率大于50%前提下,对于THP-1细胞而言,如CD86的RFI的均数相对空白组增加大于1.5倍(即 $RFI > 150$ ),CD54的RFI的均数相对空白组增加大于2倍(即 $RFI > 200$ )该物质致敏性判断为阳性;不满足上述的阳性结果判断,则可判断为皮肤致敏阴性。

[0159] 9、实验结果

[0160] A. 皮肤模型基因表达情况

[0161] 肉桂醛测试浓度为50%、10%、1%和0.1%。在10%和50%体积分数浓度条件下,检测的刺激基因组别24个基因表达小于20,后续另外两组基因群抗氧化基因群和皮肤致敏基因群超过95%的基因相对空白对照组表达超过1.3倍;而1%和0.1%浓度下皮肤模型的抗氧化基因群和皮肤致敏基因群未达到阳性判断标准。

[0162] B. THP-1细胞表面标志物预测

[0163] 同样的,Episkin皮肤模型和THP-1共培养系统中,10%和50%体积分数浓度条件下的THP-1细胞表面CD54和CD86表达相对于对照组显著增高;而1%和0.1%浓度下的共培养系统的THP-1细胞表面CD54和CD86表达则未超过阳性阈值。

[0164] 详细结果见表1。

[0165] 表1 Episkin皮肤模型与THP-1共培系统实验结果

受试物		皮肤刺激基因组反应情况	皮肤致敏基因组和氧化应激基因组反应情况	CD54	CD86
[0166] 肉桂醛	50%	基因反应数<20	基因反应数>95%	341	201
	10%	基因反应数<20	基因反应数>95%	240	160
	1%	基因反应数<20	基因反应数<95%	154	100
	0.10%	基因反应数<20	基因反应数<95%	122	94

## [0167] 10、结论

[0168] 本实验采用了表皮模型Episkin和树突状细胞THP-1的共培养体系,检测肉桂醛的皮肤致敏性。从皮肤模型活性和基因组表达分析,结合共培养体系下层THP-1细胞表面标志物CD86和CD54表达水平的分析,结果表明肉桂醛四个浓度作用于皮肤模型产生了皮肤刺激基因组、皮肤致敏基因组和氧化应激基因组的致敏阳性反应,THP-1细胞对肉桂醛的致敏特性呈现表面标志物表达的阳性变化,综合判定可预测肉桂醛为皮肤致敏物质。

[0169] 实施例2基于Altskin皮肤模型和U937细胞共培养的植物提取物皮肤致敏测试

[0170] 依次包括以下几个步骤:

### [0171] 1、皮肤模型孵育

[0172] 使用本实验室自制的三维皮肤模型Altskin,该模型24孔板全层皮肤模型。由生产部负责运送至实验室,皮肤模型到达实验室后检查外包装是否完好。皮肤模型外包装使用酒精消毒后打开,使用镊子小心将皮肤模型插入皿移入已经添加2mL含酚红的MEM培养基的24孔培养板中,于37℃,5%CO<sub>2</sub>和95%湿度的培养条件下孵育24h,待皮肤模型活性稳定后进行实验。

### [0173] 2、U937细胞培养:

[0174] 从液氮罐中取出装有U937细胞的EP管,置于37℃水浴锅中快速解冻。超净台中,将细胞转移至离心管随后离心获得细胞。加入4mL培养基混匀,转入25cm<sup>2</sup>培养瓶中,24h后观察细胞。显微镜观察U937细胞为悬浮状态,细胞密度在0.8×10<sup>6</sup>个/mL,正常培养密度不超过1×10<sup>6</sup>个/mL。常规换液传代为2天进行一次。单次复苏的细胞使用时间不超过2个月,传代次数不超过30代。正式实验前对U937细胞进行了细胞倍增时间监测,过程为接种0.2×10<sup>6</sup>个/mL密度细胞于24孔细胞培养板中,37℃,5%CO<sub>2</sub>和95%湿度的培养条件下,分别记录第24h、48h和72h的细胞数量,确定细胞倍增时间。利用下列公式计算细胞的倍增时间:

$$[0175] \quad \text{倍增时间} = 24 \times \frac{\log_{10}(2)}{\log_{10}(\text{conc}_{\text{high}}) - \log_{10}(\text{conc}_{\text{low}})}$$

[0176] conc<sub>high</sub>: 第t小时的细胞浓度; conc<sub>low</sub>: 第t-24小时的细胞浓度

### [0177] 3、受试植物提取物配制

[0178] 本实验受试物为当归提取液,购自商业化公司。选择溶解体系为DPBS缓冲液,把当归提取液分别稀释成50%,10%,1%和0.1%4个浓度。

### [0179] 4、皮肤模型与U937细胞共培养实验

[0180] Altskin全层皮肤模型孵育结束后,与U937细胞共同培养并在皮肤模型表面进行受试物的处理,处理剂量为15±0.5μL,处理时间为15min,随后清洗皮肤模型表面受试物,并将皮肤模型与铺有细胞的24孔培养皿一同孵育6h,每种受试物分别设置50%,10%,1%和0.1%四个浓度,每个浓度设置3组平行模型。待6h孵育结束后,将三组平行的皮肤模型按1:2的比例分别进行细胞活性测试和细胞基因组表达测试前期处理。U937细胞进行细胞表

面标志物检测。

#### [0181] 5、皮肤模型活性测试

[0182] 将清除完受试物的Altskin皮肤模型放入预先准备好的铺设好MTT的多孔培养板中,孵育3h后,使用皮肤模型提取器将皮肤模型从特异装置中扣除放入预先准备好的MTT提取液,4℃冰箱静置过夜,后使用酶标仪读取数值计算皮肤模型活率。

#### [0183] 6、皮肤模型基因组检测

[0184] 将Altskin全层皮肤模型从特有的固定支架扣取下,并将细胞层与支架层简易剥离,随后将两者放入准备好的TRIzol试剂中分离获取总RNA。将1μg总RNA加入含有随机引物的20μl总体积液体中,其中含有SuperScript反转录酶III,根据反转录仪器操作说明进行相关RNA的反转录。接着,利用oligonucleotide引物进行PCR扩增,最后通过电泳法检定基因的成分。

#### [0185] 7、CD86表达检测

[0186] 实验前对流式细胞仪进行校准和使用蛋白阻断剂对细胞的表面抗原进行非特异性阻断。从24孔细胞培养板中收集受试物暴露后的细胞,将每孔对应浓度受试物作用下的细胞分别移入相应的1mLEP管中,离心机离心(1400转,5min,4℃)收集细胞。并用FACS缓冲液(PBS+0.1%的BSA)清洗一次,同样的条件下离心收集细胞。

[0187] FcR阻断:使用FcR阻断剂附带说明书标明的浓度进行配制,随后将离心获得的细胞进行阻断。

[0188] CD86抗体染色:将上述细胞平均分配至3根1mL的EP管中,即每管中有大约 $3 \times 10^5$ 个细胞;FITC-CD86抗体、FITC标记的小鼠同行对照IgG1和7AAD分别根据试剂盒上标明的浓度进行配制,必要时根据具体情况对抗体进行梯度稀释,以免抗体浓度过高影响实验结果。

[0189] 将事先配制好的抗体以每根EP管添加50uL的量,也就是 $3 \times 10^5$ 个细胞添加50uL含有抗体的FACS缓冲液,4℃环境和暗室条件下染色30min;使用FACS缓冲液清洗2次;再用500uLFACS缓冲液重悬细胞并移入5mL流式管中待检测。需要说明的是,每次实验条件下需要同时进行7AAD的染色,即将已经染有上述抗体的液体分别再添加7AAD染料,步骤同上述,以便确定该浓度下细胞活率与相应抗体染色的情况。

#### [0190] 8、培养液中细胞分泌物检测

[0191] 将下层细胞和培养基收集并分离,对细胞进行破碎;用ELISA试剂盒检测IL-1a和IL-8的水平;

#### [0192] 9、统计方法和结果预测

[0193] 各实验数据均以均数±标准差( $\bar{X} \pm S$ )表示,采用SPSS22.0统计软件进行分析。多组之间差异的比较用单因素方差分析,组间两两比较采用SNK检验法,显著性水平 $\alpha = 0.05$ , $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。使用FlowJo 7.6对荧光强度进行统计分析。

#### [0194] A. 皮肤模型基因表达情况

[0195] 基因表达相对空白组增加1.3倍,即认为该物质在该浓度下可以引起该基因的显著性表达;检测的刺激基因组别24个基因超过20个有显著性表达可以认为该物质具有皮肤刺激性,可不作后续基因表达测试;另外的基因表达如果超过95%的基因呈现大于1.3倍的显著性增高,则可认为该物质在该浓度下有皮肤致敏潜能。

#### [0196] B. 共培养系统下层细胞表面标志物预测

[0197] 本实验每组提取物至少需要三组平行实验。对于CD86特定标志物而言,如RFI的均数相对空白组增加大于1.5倍(即RFI > 150),该物质致敏性判断为阳性;其他情况下可以判断为阴性物质。

[0198] 10、实验结果

[0199] A. 皮肤模型基因表达情况

[0200] 本次测试中受试物为当归提取物,浓度为50%、10%、1%和0.1%。在50%体积分数浓度条件下,检测的刺激基因组别24个基因表达小于20,后续另外两组基因群抗氧化基因群和皮肤致敏基因群超过95%的基因相对空白对照组表达超过1.3倍;而10%、1%和0.1%浓度下皮肤模型的抗氧化基因群和皮肤致敏基因群未达到阳性判断标准。

[0201] B. 共培养系统下层细胞表面标志物预测:

[0202] 同样的,Altskin皮肤模型和U937细胞共培养系统中,50%体积分数浓度条件下的U937细胞表面CD86表达相对于对照组显著增高;而10%、1%和0.1%浓度下的共培养系统的U937细胞表面CD86表达则未超过阳性阈值。

[0203] C. 培养液中细胞分泌物检测

[0204] 检测了IL-1a和IL-8两种细胞因子。

[0205] 详细结果见表2。

[0206] 表2 Altskin皮肤模型与U937共培系统实验结果

受试物		皮肤刺激基因组反应情况	皮肤致敏基因组和氧化应激基因组反应情况	CD86	IL-1a (pg/ml)	IL-8 (pg/ml)
[0207] 当归提取物	50%	基因反应数 < 20	基因反应数 > 95%	311	41	270
	10%	基因反应数 < 20	基因反应数 < 95%	102	32	229
	1%	基因反应数 < 20	基因反应数 < 95%	111	21	205
	0.10%	基因反应数 < 20	基因反应数 < 95%	78	23	187

[0208] 11、结论

[0209] 本实验采用了全层皮肤模型Altskin和树突状细胞U037的共培养体系,检测当归提取物的皮肤致敏性。从皮肤模型活性和基因组表达分析,结合共培养体系下层U937细胞表面标志物CD86表达水平的分析和细胞分泌产物的分析,结果表明当归提取物四个浓度作用于皮肤模型未对皮肤刺激基因组、皮肤致敏基因组和氧化应激基因组产生致敏阳性反应,U937细胞对当归提取液的致敏特性未呈现出表面标志物表达的变化,综合预测当归提取物为非皮肤致敏物质。

[0210] 实施例3基于Epiderm皮肤模型和THP-1细胞共培养的石油类产品润滑剂皮肤致敏测试

[0211] 1、皮肤模型孵育

[0212] 购置商业化三维皮肤模型Epiderm,该批模型为12孔板表皮模型。皮肤模型由快递公司负责运输至实验室,运输温度为10-25℃。皮肤模型到达实验室后检查外包装是否完好,查看随箱电子记温仪以确保皮肤模型运输温度处于允许波动范围内。皮肤模型外包装使用酒精消毒后打开,使用镊子小心将皮肤模型吊篮移入已经添加2mL含酚红的MEM培养基的12孔培养板中,于37℃,5%CO<sub>2</sub>和95%湿度的培养条件下孵育24h,待皮肤模型活性稳定后进行实验。

[0213] 2、THP-1细胞培养

[0214] 液氮罐中取出装有THP-1细胞的EP管,置于37℃水浴锅中快速解冻。超净台中,将细胞转移至离心管随后离心获得细胞。加入4mL培养基混匀,转入25cm<sup>2</sup>培养瓶中,24h后观察细胞。单次复苏的细胞使用时间不超过2个月,传代次数不超过30代。显微镜下观察细胞状态,该细胞为悬浮状态,细胞密度在 $0.8 \times 10^6$ 个/mL,正常培养密度不超过 $1 \times 10^6$ 个/mL。常规换液传代为2天进行一次。

### [0215] 3、受试物配制

[0216] 本实验受试物为石油润滑剂,溶解体系选择玉米油(试剂级),以玉米油作为稀释液将受试物稀释成50%,10%,1%和0.1%4个浓度。

### [0217] 4、皮肤模型与THP-1细胞共培养实验

[0218] Epiderm皮肤模型孵育结束后,与THP-1细胞共同培养并在皮肤模型表面进行受试物的处理,处理剂量为 $15 \pm 0.5 \mu\text{L}$ ,处理时间为15min,随后清洗去除皮肤模型表面受试物,并将皮肤模型与铺有细胞的12孔培养皿一同孵育6h,每个浓度设置3组平行模型。待6h孵育结束后,将三组平行的皮肤模型按1:2的比例分别进行细胞活性测试和细胞基因组表达测试前期处理。共培养下层细胞进行细胞表面标志物检测和/或细胞分泌物检测。

### [0219] 5、皮肤模型活性测试

[0220] 将清除完受试物的Epiderm皮肤模型放入预先准备好的铺设好MTT的多孔培养板中,孵育3h后,使用皮肤模型打孔器将皮肤模型从固定支架中取下放入预先准备好的MTT提取液,4℃冰箱静置过夜,后使用酶标仪读取数值计算皮肤模型活率。

### [0221] 6、皮肤模型基因组检测

[0222] 将皮肤模型从特殊固定支架取下,并将细胞层与支架层简易剥离,随后将两者放入准备好的TRIzol试剂中分离获取总RNA。将1 $\mu\text{g}$ 总RNA加入含有随机引物的20 $\mu\text{l}$ 总体积液体中,其中含有SuperScript反转录酶III,根据反转录仪器操作说明进行相关RNA的反转录。接着,利用oligonucleotide引物进行PCR扩增,最后通过电泳法检定基因的成分。

### [0223] 7、CD86/CD54表达检测

[0224] 检测前对流式细胞仪进行校准和使用蛋白阻断剂对细胞的表面抗原进行非特异性阻断。从12孔细胞培养板中收集暴露后的细胞,将每孔对应浓度受试物作用下的细胞分别移入相应的1mLEP管中,离心机离心(1400转,5min,4℃)收集细胞。并用FACS缓冲液(PBS+0.1%的BSA)清洗一次,同样的条件下离心收集细胞。

[0225] FcR阻断:使用FcR阻断剂附带说明书标明的浓度进行配制,随后将离心获得的细胞进行阻断。

[0226] CD54/CD86抗体染色:将上述细胞平均分配至3根1mL的EP管中,即每管中有大约 $3 \times 10^5$ 个细胞;FITC-CD86抗体、PE-CD54抗体、FITC标记的小鼠同行对照IgG1、PE标记的小鼠同行对照IgG1和7AAD分别根据试剂盒上标明的浓度进行配制,必要时可以根据实验具体情况对抗体进行梯度稀释,以免抗体浓度过高影响实验结果。

[0227] 将事先配制好的含有抗体的FACS缓冲液加入EP管,每支EP管添加50 $\mu\text{L}$ ,也就是 $3 \times 10^5$ 个细胞添加50 $\mu\text{L}$ ,2-8℃环境和暗室条件下染色30min;使用FACS缓冲液清洗2次;再用500 $\mu\text{L}$ FACS缓冲液重悬细胞并移入5mL流式管中待检测。同时,每次实验条件下需要进行7AAD的染色,即将已经染有上述抗体的液体分别再添加7AAD染料,步骤同上述,以便确定该浓度下细胞活率与相应抗体染色的情况。

## [0228] 8、统计方法和结果预测

[0229] 各实验数据均以均数±标准差( $\bar{X} \pm S$ )表示,采用SPSS22.0统计软件进行分析。多组之间差异的比较用单因素方差分析,组间两两比较采用SNK检验法,显著性水平 $\alpha = 0.05$ , $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。使用FlowJo 7.6对荧光强度进行统计分析。

## [0230] A. 皮肤模型基因表达情况

[0231] 基因表达相对空白组增加1.3倍,即认为该物质在该浓度下可以引起该基因的显著性表达;检测的刺激基因组别24个基因超过20个有显著性表达可以认为该物质具有皮肤刺激性,可不做后续基因表达测试;另外的基因表达如果超过95%的基因呈现大于1.3倍的显著性增高,则可认为该物质在该浓度下有皮肤致敏潜能。

## [0232] B. THP-1细胞表面标志物预测

[0233] 每组化学物质至少需要三组平行实验。在细胞活率大于50%前提下,对于特定标志物而言,如CD86的RFI的均数相对空白组增加大于1.5倍(即 $RFI > 150$ ),CD54的RFI的均数相对空白组增加大于2倍(即 $RFI > 200$ )该物质致敏性判断为阳性;不满足上述的阳性结果判断,则可判断为皮肤致敏阴性。

## [0234] 9、实验结果

## [0235] A. 皮肤模型基因表达情况:

[0236] 受试物为石油类产品润滑剂,浓度为50%、10%、1%和0.1%。在1%、10%和50%体积分数浓度条件下,检测的刺激基因组别24个基因表达小于20,后续另外两组基因群抗氧化基因群和皮肤致敏基因群超过95%的基因相对空白对照组表达超过1.3倍;而0.1%浓度下皮肤模型的抗氧化基因群和皮肤致敏基因群未达到阳性判断标准。

## [0237] B. THP-1细胞表面标志物预测

[0238] 同样的,Epiderm皮肤模型和THP-1共培养系统中,1%、10%和50%体积分数浓度条件下的THP-1细胞表面CD54和CD86表达相对于对照组显著增高;而0.1%浓度下的共培养系统的THP-1细胞表面CD54和CD86表达则未超过阳性阈值。

[0239] 详细结果见表3。

## [0240] 表3 Epiderm皮肤模型与THP-1共培系统实验结果

受试物		皮肤刺激基因组反应情况	皮肤致敏基因组和氧化应激基因组反应情况	CD54	CD86
[0241] 润滑剂	50%	基因反应数<20	基因反应数>95%	401	331
	10%	基因反应数<20	基因反应数>95%	270	199
	1%	基因反应数<20	基因反应数>95%	266	170
	0.10%	基因反应数<20	基因反应数<95%	101	77

## [0242] 10、结论

[0243] 本实验采用了表皮模型Epiderm和THP-1细胞的共培养体系,检测石油润滑剂的皮肤致敏性。从皮肤模型活性和基因组表达分析,结合共培养体系下层THP-1细胞表面标志物CD86和CD54表达水平的分析,结果表明润滑剂4个浓度组作用于皮肤模型均未产生皮肤刺激基因组的阳性反应,但3个高浓度组产生了皮肤致敏基因组和氧化应激基因组的致敏阳性反应,同时,THP-1细胞对主浓度润滑剂的致敏特性呈现表面标志物表达的阳性变化。综合预测浓度>1%的润滑剂可能具有皮肤致敏性,浓度<0.1%的润滑剂可能不具有皮肤致

敏性。

[0244] 实施例4基于Altskin皮肤模型和外周血单核细胞共培养的化妆品皮肤致敏测试

[0245] 依次包括以下几个步骤:

[0246] 1、皮肤模型孵育

[0247] 使用这自制的三维皮肤模型Altskin,该模型为12孔板表皮模型。由生产部负责运送至实验室,皮肤模型到达实验室后检查外包装是否完好。皮肤模型外包装使用酒精消毒后打开,使用镊子小心将皮肤模型插入皿移入已经添加2mL含酚红的MEM培养基的12孔培养板中,于37℃,5%CO<sub>2</sub>和95%湿度的培养条件下孵育24h,待皮肤模型活性稳定后进行实验。

[0248] 2、外周血单核细胞制备树突状细胞

[0249] 采集健康男性新鲜肝素抗凝的外周血,用Ficoll密度梯度离心分离外周血单核细胞(PBMC)。PBS洗去血小板,于37℃贴壁3h后把上清移出到另一培养瓶中,以37℃预温的RPMI 1640轻洗去除非贴壁的细胞并倒入培养瓶中,刮取贴壁的粘附细胞即为单核细胞,再次37℃孵育3h,收取培养瓶中的细胞悬液获得单核细胞。调整细胞浓度为 $1 \times 10^6$ 个/L,接种于6孔培养板,0.002L/孔,加入rhGM-CSF(100ug/L)、rhIL-4(100ug/L),然后置37℃,5%CO<sub>2</sub>培养箱内培养。每2天更换培养液并补充细胞因子。培养第5天加入rhTNF- $\alpha$ 100ug/L,以促进DC成熟并维持细胞活性。培养10天,收集树突状细胞,并用PBS制成单细胞悬液,调整细胞密度至 $1 \times 10^6$ /L,各测量管加入细胞悬液500u1,再分别加入用PE或FITC标记的CD54和CD86抗体,置4℃避光孵育标记40min,PBS洗2次。最后用400u1的PBS悬浮细胞,流式细胞仪分析定向诱导的DC的表型为CD65和CD86,成功诱导为树突状细胞(PMBC-DC)。

[0250] 3、受试物配制

[0251] 本实验受试物为市售护肤品。选择溶解体系选择玉米油(试剂级),以玉米油作为稀释液将受试物稀释成50%,10%,1%和0.1%4个浓度。

[0252] 4、皮肤模型与PMBC-DC细胞共培养实验

[0253] Altskin表皮模型孵育结束后,与PMBC-DC细胞共同培养并在皮肤模型表面进行受试物的处理,处理剂量为 $15 \pm 0.5 \mu\text{L}$ ,处理时间为15min,随后清洗皮肤模型表面受试物,并将皮肤模型与铺有细胞的24孔培养皿一同孵育6h,每种受试物分别设置50%,10%,1%和0.1%四个浓度,每个浓度设置3组平行模型。待6h孵育结束后,将三组平行的皮肤模型按1:2的比例分别进行细胞活性测试和细胞基因组表达测试前期处理。共培养下层细胞进行细胞表面标志物检测。

[0254] 5、皮肤模型活性测试

[0255] 将清除完受试物的Altskin皮肤模型放入预先准备好的铺设好MTT的多孔培养板中,孵育3h后,使用皮肤模型提取器将皮肤模型从特异装置中扣除放入预先准备好的MTT提取液,4℃冰箱静置过夜,后使用酶标仪读取数值计算皮肤模型活率。

[0256] 6、皮肤模型基因组检测

[0257] 将Altskin全层皮肤模型从特有的固定支架扣取下,并将细胞层与支架层简易剥离,随后将两者放入准备好的TRIzol试剂中分离获取总RNA。将1 $\mu\text{g}$ 总RNA加入含有随机引物的20 $\mu\text{l}$ 总体积液体中,其中含有SuperScript反转录酶III,根据反转录仪器操作说明进行相关RNA的反转录。接着,利用oligonucleotide引物进行PCR扩增,最后通过电泳法检定基因的成分。

### [0258] 7、CD86/CD54表达检测

[0259] 检测前对流式细胞仪进行校准和使用蛋白阻断剂对细胞的表面抗原进行非特异性阻断。从12孔细胞培养板中收集暴露后的细胞,将每孔对应浓度受试物作用下的细胞分别移入相应的1mLEP管中,离心机离心(1400转,5min,4℃)收集细胞。并用FACS缓冲液(PBS+0.1%的BSA)清洗一次,同样的条件下离心收集细胞。

[0260] FcR阻断:使用FcR阻断剂附带说明书标明的浓度进行配制,随后将离心获得的细胞进行阻断。

[0261] CD54/CD86抗体染色:将上述细胞平均分配至3根1mL的EP管中,即每管中有大约 $3 \times 10^5$ 个细胞;FITC-CD86抗体、PE-CD54抗体、FITC标记的小鼠同行对照IgG1、PE标记的小鼠同行对照IgG1和7AAD分别根据试剂盒上标明的浓度进行配制,必要时可以根据实验具体情况对抗体进行梯度稀释,以免抗体浓度过高影响实验结果。

[0262] 将事先配制好的含有抗体的FACS缓冲液加入EP管,每支EP管添加50uL,也就是 $3 \times 10^5$ 个细胞添加50uL,2-8℃环境和暗室条件下染色30min;使用FACS缓冲液清洗2次;再用500uLFACS缓冲液重悬细胞并移入5mL流式管中待检测。同时,每次实验条件下需要进行7AAD的染色,即将已经染有上述抗体的液体分别再添加7AAD染料,步骤同上述,以便确定该浓度下细胞活率与相应抗体染色的情况。

### [0263] 8、统计方法和结果预测

[0264] 各实验数据均以均数±标准差( $\bar{X} \pm S$ )表示,采用SPSS22.0统计软件进行分析。多组之间差异的比较用单因素方差分析,组间两两比较采用SNK检验法,显著性水平 $\alpha = 0.05$ , $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。使用FlowJo 7.6对荧光强度进行统计分析。

#### [0265] A. 皮肤模型基因表达情况

[0266] 基因表达相对空白组增加1.3倍,即认为该物质在该浓度下可以引起该基因的显著性表达;检测的刺激基因组别24个基因超过20个有显著性表达可以认为该物质具有皮肤刺激性,可不作后续基因表达测试;另外的基因表达如果超过95%的基因呈现大于1.3倍的显著性增高,则可认为该物质在该浓度下有皮肤致敏潜能。

#### [0267] B. 共培养系统下层细胞表面标志物预测

[0268] 每组化学物质至少需要三组平行实验。在细胞活率大于50%前提下,对于特定标志物而言,如CD86的RFI的均数相对空白组增加大于1.5倍(即 $RFI > 150$ ),CD54的RFI的均数相对空白组增加大于2倍(即 $RFI > 200$ )该物质致敏性判断为阳性;其他情况下可以判断为阴性物质。

### [0269] 9、实验结果

#### [0270] A. 皮肤模型基因表达情况

[0271] 本次测试中受试物为护肤品,浓度为50%、10%、1%和0.1%。在4个体积分数浓度条件下,检测的刺激基因组别24个基因表达小于20,后续另外两组基因群抗氧化基因群和皮肤致敏基因群超过95%的基因相对空白对照组表达未超过1.3倍。

#### [0272] B. 共培养系统下层细胞表面标志物预测:

[0273] 同样的,Altskin皮肤模型和PMBC-DC细胞共培养系统中,4个体积分数浓度条件下的PMBC-DC细胞表面CD86和CD54表达相对于对照组均未超过阳性阈值。

[0274] 详细结果见表4。

[0275] 表4 Altskin皮肤模型与PMBC-DC共培系统实验结果

受试物		皮肤刺激基因组 反应情况	皮肤致敏基因组和氧化应激 基因组反应情况	CD54	CD86
[0276] 化妆品	50%	基因反应数<20	基因反应数<95%	201	213
	10%	基因反应数<20	基因反应数<95%	127	139
	1%	基因反应数<20	基因反应数<95%	106	102
[0277]	0.10%	基因反应数<20	基因反应数<95%	97	68

## [0278] 11、结论

[0279] 本实验采用了全层皮肤模型Altskin和树突状细胞PMBC-DC的共培养体系,检测护肤品的皮肤致敏性。从皮肤模型活性和基因组表达分析,结合共培养体系下层PMBC-DC细胞表面标志物CD86和CD54表达水平的分析,结果表明护肤品四个浓度作用于皮肤模型未对皮肤刺激基因组、皮肤致敏基因组和氧化应激基因组产生致敏阳性反应,PMBC-DC细胞对护肤品的致敏特性未呈现出表面标志物表达的变化,综合预测该护肤品为非皮肤致敏物质。

[0280] 上述实施例为本发明较佳的实施方式,但本发明的实施方式并不受上述实施例的限制,其他的任何未背离本发明的精神实质与原理下所作的改变、修饰、替代、组合、简化,均应为等效的置换方式,都包含在本发明的保护范围。例如本发明虽然仅列举了部分化学品、化妆品原料及产品、石油润滑剂、植物提取物为皮肤致敏的样品。但本发明中提到的其他物质如化学品(肉桂醇、丁香酚和柠檬醛等)、个人护理产品(洗发香波、护发素、染发剂、护肤类、防晒类、粉底、BB霜、CC爽、眼影、唇彩、油、沐浴乳、身体乳等)、家用洗涤产品(洗衣液、洗衣粉、肥皂、洗洁精、漂白剂、消毒液、柔顺剂等)、药品(青霉素、磺胺类药物等)、植物提取物(粗提取物、精提取物及其混合物)、生物活性原料(多肽、聚合物、基因工程产品)、灰尘和空气污染物、紫外线,以及其它皮肤接触产品(衣服、内衣等纺织品浸提物和可穿戴产品)等也可以用本发明所述方法进行皮肤致敏检测。此处不再一一列举。

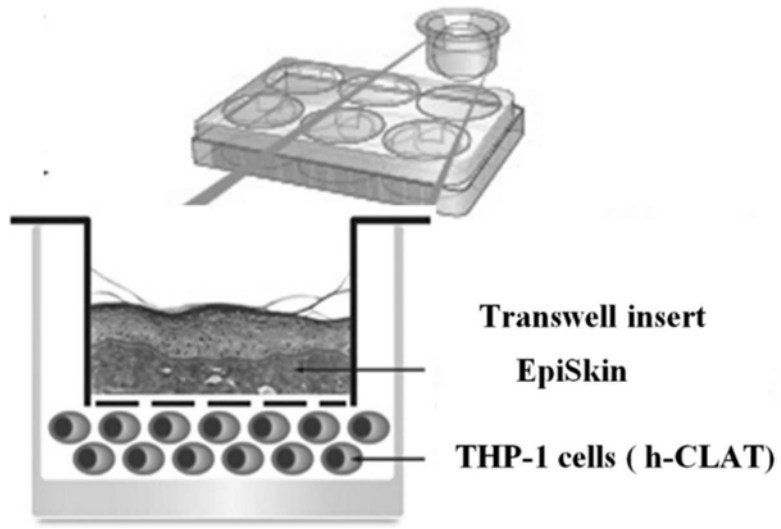


图1

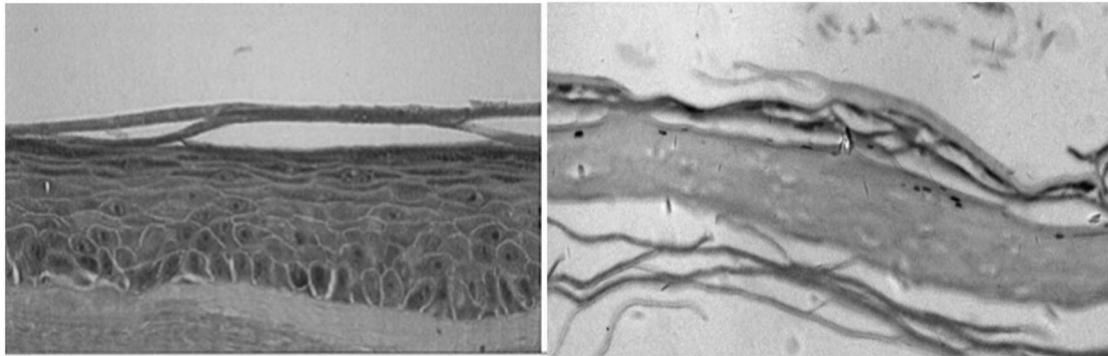


图 2a

图 2b

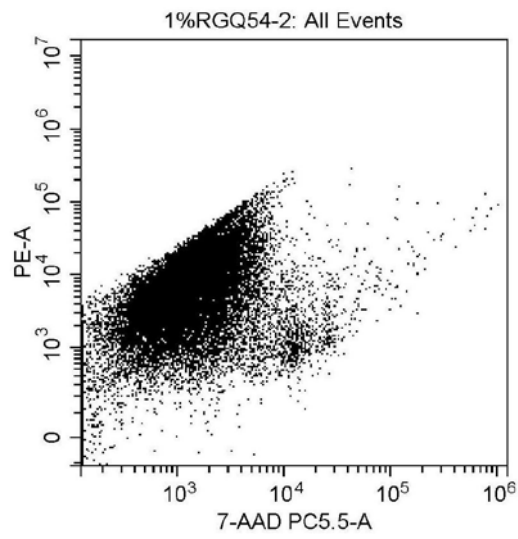


图3a

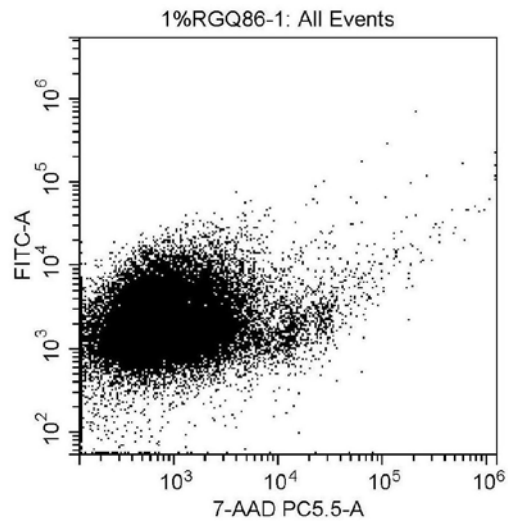


图3b

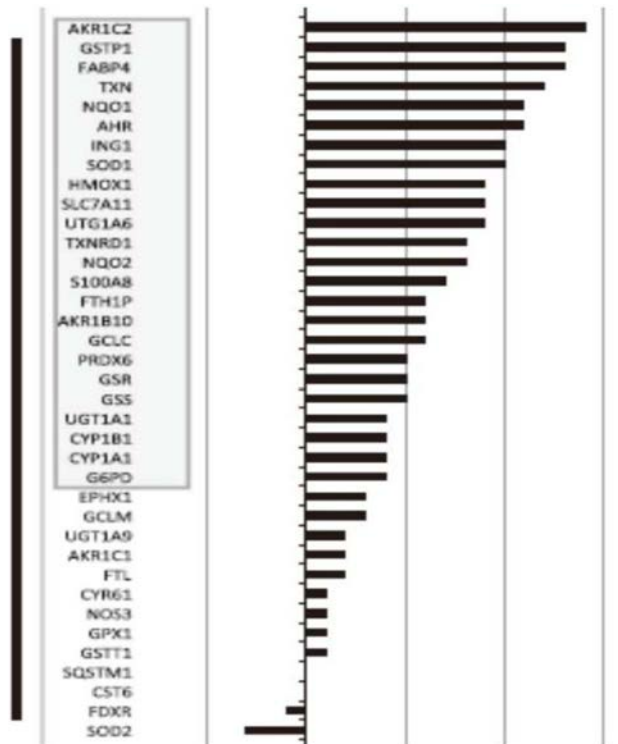


图4

专利名称(译)	一种基于三维皮肤模型和树突状细胞共培养模式的皮肤致敏检测方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN107446993A</a>	公开(公告)日	2017-12-08
申请号	CN2017110439870.2	申请日	2017-06-12
[标]申请(专利权)人(译)	程书俊		
申请(专利权)人(译)	程树军		
当前申请(专利权)人(译)	程树军		
[标]发明人	程树军 秦瑶 陈彧 柯逸晖		
发明人	程树军 秦瑶 陈彧 柯逸晖		
IPC分类号	C12Q1/68 G01N33/50 G01N33/53 G01N15/14		
CPC分类号	C12Q1/6876 C12Q2600/158 G01N15/14 G01N33/5014 G01N33/5044 G01N33/53		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明公开了一种基于三维皮肤模型和树突状细胞共培养模式的皮肤致敏检测方法，包括以下步骤：1.皮肤模型前期制备；2.树突状细胞的制备与培养；3.皮肤模型与树突状细胞共培养构建和受试物暴露；4.皮肤模型活性测试；5.皮肤模型基因组检测；6.共培养模型下层细胞分泌物检测；7.树突状细胞表面标志物表达检测；8.统计方法和结果预测。本发明把具有屏障和代谢功能的体外重建的3D皮肤与具有免疫功能的树突状细胞组合在一起，建立了共培养的新型实验系统，与体内具有相似的功能和致敏反应；本发明可以从定性和定量两方面评价待测物质的皮肤致敏作用；本发明方法可代替活体动物和人体，直接预测化学品、化妆品、药品等可能导致的皮肤致敏。

