



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101955908 B

(45) 授权公告日 2013. 01. 23

(21) 申请号 201010233797. 1

CN 101392237 A, 2009. 03. 25, 全文.

(22) 申请日 2010. 07. 22

T. Uchino et al. Reconstruction of three-dimensional human skin model composed of dendritic cells, keratinocytes and fibroblasts utilizing a handy scaffold of collagen vitrigel membrane. 《Toxicology in Vitro》. 2009, (第 23 期), 333-337.

(73) 专利权人 中国医学科学院皮肤病研究所
地址 210042 江苏省南京市玄武区蒋王庙街 12 号

曹玉萍等. 皮肤致敏性动物替代模型的研究进展. 《中国美容医学》. 2009, 第 18 卷 (第 2 期), 268-271.

(72) 发明人 马鹏程 刘维达 曹玉萍 周武庆

(74) 专利代理机构 南京众联专利代理有限公司
32206

代理人 卢霞

审查员 孙婷婷

(51) Int. Cl.

C12N 5/071 (2010. 01)

C12N 5/0786 (2010. 01)

C12Q 1/02 (2006. 01)

G01N 15/10 (2006. 01)

G01N 33/53 (2006. 01)

(56) 对比文件

WO 03/095630 A2, 2003. 11. 20, 全文.

CN 1634598 A, 2005. 07. 06, 全文.

权利要求书 1 页 说明书 5 页

(54) 发明名称

用于检测物质致敏性和药物筛选的人工表皮体外模型

(57) 摘要

本发明提供了一种用于检测物质致敏性以及用于皮肤外用免疫调节药物的筛选或药效学评价的人工表皮体外模型,所说的模型是由人工表皮与单核细胞系细胞共培养而得。本发明的人工表皮体外模型具有如下技术效果:1、通过检测模型中相关细胞因子及细胞表面标记物的变化,可评价各种化合物、皮肤外用制剂及化妆品的致敏性;在判断物质致敏性时,具有很高的敏感度、特异性和准确性,检测方法简单,应用范围广;2、可以用于皮肤外用免疫调节药物的筛选或药效学评价;3、模型构建成本低,批间差异小,质量容易控制;4、模型所用的材料易得,便于规模化生产。

CN 101955908 B

1. 一种用于检测物质致敏性和药物筛选的人工表皮体外模型的构建方法,其特征在于,所说的体外模型的构建方法包括如下步骤:

1) 取人角质形成细胞悬液,接种到插入式培养皿的上室内,接种前预先在插入式培养皿的下室内种满人成纤维细胞,接种后在 37℃、含 5% CO₂ 的培养箱中培养 1-5 天,待细胞生长至汇合状态后,转至气液界面培养 10-20 天,得到人工表皮;

2) 将单核细胞系细胞以 $(2-8) \times 10^5$ 个/ml 的密度接种于孔板内,将步骤 1) 中得到的人工表皮连同插入式培养皿的上室一起转移至培养有单核细胞系细胞的孔内,共培养 12-48 小时至稳定状态,得到含有人工表皮和单核细胞系细胞的体外模型,其中所说的单核细胞系细胞选自 THP-1、MUTZ-3、KG-1 或 U937 细胞系。

用于检测物质致敏性和药物筛选的人工表皮体外模型

技术领域

[0001] 本发明涉及一种人工表皮体外模型,具体地说,涉及一种用于检测物质致敏性以及用于皮肤外用免疫调节药物的筛选或药效学评价的人工表皮体外模型,属于生物医学技术领域。

背景技术

[0002] 近年来,随着环境污染加重,化学品滥用,外界有害物质刺激增多,皮肤过敏的发生率呈逐年上升趋势。对于物质致敏性的评价越来越引起人们的注意,传统的评价方法主要是以动物试验为主,但在全球动物保护运动的影响下,发达国家普遍开展了以替代、减少和优化为核心的“3R”运动,体外替代试验将逐步取代动物试验。目前,许多国家都在对动物替代评价体系进行研究,基于细胞的动物替代试验方法是研究的热点。

[0003] 现阶段基于细胞的动物替代实验方法包括细胞的二维或三维培养。细胞的二维培养检测体系缺乏角质层的屏障结构,与在体情况不符,而且对难溶性物质或制剂无法检测;细胞的三维培养,即构建人工表皮,包括两种模式:角质形成细胞构建的人工表皮,以及角质形成细胞与 Langerhans 前体细胞构建的人工表皮。其中,角质形成细胞构建的人工表皮由于缺乏 Langerhans 相关功能的细胞,导致物质致敏性判断的敏感度和特异性差。另一方面,目前使用的 Langerhans 前体细胞包括 CD34⁺ 造血干细胞和外周血单核细胞。经过诱导得到 Langerhans 细胞后,与角质形成细胞一起构建出人工表皮,用于检测物质的致敏性。但是,由于 Langerhans 前体细胞来源有限且存在明显的个体差异,容易对结果的判断产生干扰,同时前体细胞诱导分化效率低,同时存在批次间差异,因此导致的试验周期长,难以商品化等问题。

[0004] 对于物质致敏性终末指标的判断,有两种方法,即流式细胞法分析细胞表面标记分子的变化和 ELISA 法检测相关细胞因子的分泌。大量研究表明各种替代 Langerhans 细胞的免疫细胞,其表面的 CD86、CD54,细胞培养液中 IL-1 β 的表达水平与物质致敏性有很强的相关性,三者联合作为判断终点具有很高的敏感度、特异性和准确性。

[0005] 单核细胞系是建系的单核细胞,研究表明在致敏物作用下单核细胞系可以表现出 Langerhans 细胞的功能,细胞表面高表达 CD86 和 CD54,同时分泌大量的 IL-1 β ,且具有获取容易、培养简单、便于大规模扩增的优点,是理想的 Langerhans 替代细胞,可用于检测物质的致敏性。

[0006] 另外单核细胞系的细胞经过诱导培养可得到树突状细胞,作为一种专业的抗原递呈细胞,它能够表达各种炎症相关因子,如 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 及 IL-8 等,在各种免疫调节药物的作用下,这些细胞因子的表达水平会发生相应改变,可以根据这些改变来进行免疫调节药物的筛选以及药效学评价。

[0007] 但是,目前用单核细胞系细胞建立的模型均为单细胞二维培养模型,缺乏角质层屏障,因此只能用来检测可溶性物质的致敏性,不能用来检测不溶性物质及外用制剂的致敏性,也不能反映外用免疫调节药物的透皮性能。

发明内容

[0008] 本发明的目的是克服现有技术的不足之处,提供一种能够用于检测物质致敏性以及用于皮肤外用免疫调节药物的筛选或药效学评价的人工表皮体外模型。

[0009] 本发明的用于检测物质致敏性和药物筛选的人工表皮体外模型,是由人工表皮和单核细胞系细胞共培养而得。

[0010] 优选地,

[0011] 所说的单核细胞系选自 THP-1、MUTZ-3、KG-1 或 U937 细胞系。

[0012] 本发明的用于检测物质致敏性和药物筛选的人工表皮体外模型的构建方法,包括下列步骤:

[0013] 1) 用人角质形成细胞构建人工表皮;

[0014] 2) 将单核细胞系细胞与步骤 1) 中得到的人工表皮进行共培养,获得人工表皮体外模型。

[0015] 优选地,

[0016] 本发明的用于检测物质致敏性和药物筛选的人工表皮体外模型的构建方法,包括下列步骤:

[0017] 1) 取人角质形成细胞悬液,接种到插入式培养皿的上室内,接种前预先在插入式培养皿的下室内种满人成纤维细胞,接种后在 37℃、含 5% CO₂ 的培养箱中培养 1-5 天,待细胞生长至汇合状态后,转至气液界面培养 10-20 天,得到人工表皮;

[0018] 2) 将单核细胞系细胞以 $(2-8) \times 10^5$ 个 /ml 的密度接种于孔板内,将步骤 1) 中得到的人工表皮连同插入式培养皿的上室一起转移至培养有单核细胞系细胞的孔内,共培养 12-48 小时至稳定状态,得到人工表皮体外模型。

[0019] 所说的单核细胞系选自 THP-1、MUTZ-3、KG-1 或 U937 细胞系。

[0020] 本发明的用于检测物质致敏性和药物筛选的人工表皮体外模型,不仅能够用于检测物质的致敏性,而且能够用于皮肤外用免疫调节药物的筛选或药效学评价,应用范围广泛,具有如下技术效果:

[0021] 1、本发明将人工表皮与单核细胞系的细胞共培养,建成稳定的体外模型,能克服现有的二维或三维试验方法的弱点。由于模型中存在角质层的屏障结构,更接近在体情况,可以用于各种化合物或外用制剂致敏性的检测;同时由于采用的是单核细胞系的细胞,能大大提高物质致敏性判断的敏感度、特异性和准确性,也克服了 Langerhans 前体细胞来源有限而不易产业化的问题;在检测物质的致敏性时,通过检测模型中相关细胞因子及细胞表面标记物的变化,可评价各种化合物、皮肤外用制剂及化妆品的致敏性,检测方法简单、灵敏度高,应用范围广;

[0022] 2、本发明的人工表皮与单核细胞系的细胞共培养体外模型,在各种皮肤外用免疫调节药物的作用下,体外模型中的相关细胞因子会发生变化,通过对细胞因子的变化情况进行检测,可以对皮肤外用免疫调节药物进行筛选或药效学评价;

[0023] 3、本发明的人工表皮体外模型构建成本低,批间差异小,质量容易控制;

[0024] 4、本发明的人工表皮体外模型所用的材料易得,便于规模化生产。

具体实施方式

[0025] 下面结合具体实施方式来对本发明作进一步地详细说明。

[0026] 实施例中所用的 THP-1、MUTZ-3、KG-1 和 U937 细胞系均购买自 ATCC。

[0027] 人角质形成细胞的制备参照下列文献中的方法:Boyce ST, Ham RG. Calcium-regulated differentiation of normal human epidermal keratinocytes in chemically defined clonal culture and serum-free serial culture. *J Invest Dermatol*, 1983, 81(1Suppl) :33s-40s.。

[0028] 人成纤维细胞的制备参照下列文献中的方法:Gray BA, Gollin SM. Rapid cell culture procedure for tissue samples. *Am J Med Genet*, 1987, 28(2) :521-6.。

[0029] 实施例 1

[0030] 1、本实施例中的用于检测物质致敏性和药物筛选的人工表皮体外模型,是由人工表皮和 THP-1 细胞系细胞共培养而得。

[0031] 2、本实施例中,人工表皮体外模型的构建方法包括下列步骤:

[0032] 1) 取人角质形成细胞悬液,以 $5 \times 10^5/\text{ml}$ 的密度接种到插入式培养皿的上室内,接种前预先在插入式培养皿的下室内种满人成纤维细胞,接种后在 37°C 、含 5% CO_2 的培养箱中培养 3 天,待细胞生长至汇合状态后,转至气液界面培养 14 天,得到人工表皮;

[0033] 2) 将 THP-1 细胞系细胞以 $5 \times 10^5/\text{ml}$ 的密度接种于孔板内,将得到的人工表皮连同插入式培养皿的上室一起转移至培养有 THP-1 细胞系细胞的孔内,共培养 24 小时达到稳定状态,即得到人工表皮体外模型。

[0034] 3、利用本实施例的人工表皮体外模型来检测物质 DNFB(2,4-二硝基氟苯)的致敏性

[0035] 实验组:将 3mg DNFB 均匀置于人工表皮体外模型表面,在 37°C 、含 5% CO_2 的培养箱中培养 24 小时,收集 THP-1 细胞及其培养液,培养液用于检测或冷冻保存。

[0036] 对照组:人工表皮体外模型上不使用 DNFB,直接收集 THP-1 细胞及其培养液,培养液用于检测或冷冻保存。

[0037] 对照组和实验组平行进行。

[0038] 对实验组和对照组收集的细胞和细胞液进行分析,用流式细胞仪检测实验组的 THP-1 细胞表面 CD86 和 CD54 分子的变化,用 ELISA 试剂盒检测实验组和对照组所获得的培养液中 IL-1 β 的含量。

[0039] 检测结果:

[0040] (1) 流式检测实验组的 THP-1 细胞表面 CD86 的 RFI 值为 191, CD54 的 RFI 值为 329;

[0041] (2) 实验组中 IL-1 β 的含量为 $248.8108 \pm 1.998\text{ng/L}$,空白对照组中 IL-1 β 的含量为 $155.0082 \pm 1.268\text{ng/L}$,有统计学意义 ($P < 0.05$)。

[0042] 判断标准为:细胞表面 CD86 或 CD54 的 RFI(相对荧光强度)值 ≥ 120 ,并且细胞培养液中 IL-1 β 的含量高于对照组 IL-1 β 的含量,且有统计学意义时,以上指标联合判断物质具有致敏性;否则判断物质不具有致敏性。

[0043] 检测结果表明 DNFB 具有致敏性。

[0044] 实施例 2

[0045] 1、本实施例中的用于检测物质致敏性和药物筛选的人工表皮体外模型,是由人工表皮和 MUTZ-3 细胞系细胞共培养而得。

[0046] 2、本实施例中,人工表皮体外模型的构建方法包括下列步骤:

[0047] 1) 取人角质形成细胞悬液,以 $2 \times 10^5/\text{ml}$ 的密度接种到插入式培养皿的上室内,接种前预先在插入式培养皿的下室内种满人成纤维细胞,接种后在 37°C 、含 5% CO_2 的培养箱中培养 5 天,待细胞生长至汇合状态后,转至气液界面培养 14 天,得到人工表皮;

[0048] 2) 将 MUTZ-3 细胞系细胞以 $2 \times 10^5/\text{ml}$ 的密度接种于孔板内,所用的培养基是含 20% FBS 和 10% 饲养层 5637 细胞条件培养基的 MEM 培养基。其中饲养层 5637 细胞条件培养基的制备方法为:用含 10% 胎牛血清 (FBS) 的 RPMI1640 培养该细胞至汇合状态后,换液,继续培养 48 小时,收集培养液上清,过滤,冻存储用。

[0049] 将构建的人工表皮连同插入式培养皿的上室一起转移至培养有 MUTZ-3 细胞系细胞的孔内,共培养 24 小时达到稳定状态,即得到人工表皮体外模型。

[0050] 3、利用本实施例的人工表皮体外模型来检测物质 DNCB (2,4-二硝基氯苯) 的致敏性

[0051] 实验组:将 3mg DNCB 均匀置于得到的人工表皮体外模型表面,于 37°C 、含 5% CO_2 的培养箱中培养 24 小时,收集 MUTZ-3 细胞及其培养液,培养液用于检测或冷冻保存。

[0052] 对照组:人工表皮体外模型上不使用 DNCB,收集 MUTZ-3 细胞及其培养液,培养液用于检测或冷冻保存。

[0053] 对照组和实验组平行进行。

[0054] 对实验组和对照组收集的细胞和细胞液进行分析,用流式细胞仪检测实验组的 MUTZ-3 细胞表面 CD86 和 CD54 分子的变化,用 ELISA 试剂盒检测实验组和对照组所获得的培养液中 IL-1 β 的含量。

[0055] 检测结果:

[0056] (1) 流式检测实验组的结果是:CD86 的 RFI 值 180, CD54 的 RFI 值为 128。

[0057] (2) 实验组中 IL-1 β 的含量为 $158.0572 \pm 0.6632\text{ng/L}$,空白对照组中 IL-1 β 的含量为 $110.5537 \pm 0.7758\text{ng/L}$,有统计学意义 ($P < 0.05$)。

[0058] 判断标准同实施例 1,检测结果表明 DNCB 具有致敏性。

[0059] 实施例 3

[0060] 1、本实施例中的用于检测物质致敏性和药物筛选的人工表皮体外模型,是由人工表皮和 KG-1 细胞系细胞共培养而得。

[0061] 2、本实施例中,人工表皮体外模型的构建方法包括下列步骤:

[0062] 1) 取人角质形成细胞悬液,以 $8 \times 10^5/\text{ml}$ 的密度接种到插入式培养皿的上室内,接种前预先在插入式培养皿的下室内种满人成纤维细胞,接种后在 37°C 、含 5% CO_2 的培养箱中培养 1 天,待细胞生长至汇合状态后,转至气液界面培养 14 天,得到人工表皮;

[0063] 2) 将 KG-1 细胞系细胞以 $5 \times 10^5/\text{ml}$ 的密度接种于孔板内,用含 10% FBS、10ng/ml GM-CSF、50pg/ml IL-4 和 40ng/ml TNF- α 的 1640 培养基诱导培养 3 天。将得到的人工表皮连同插入式培养皿的上室一起转移至培养有 KG-1 细胞系细胞的孔内,共培养 24 小时达到稳定状态,建立人工表皮体外模型。

[0064] 3、利用本实施例的人工表皮体外模型来检测物质 DNCB (2,4-二硝基氯苯) 的致敏

性

[0065] 实验组 :将 3mg DNCB 均匀置于构建的人工表皮体外模型表面,于 37℃、含 5% CO₂ 的培养箱中培养 24 小时,收集 KG-1 细胞及其培养液,培养液用于检测或冷冻保存。

[0066] 对照组 :人工表皮体外模型上不使用 DNCB,收集 KG-1 细胞及其培养液,培养液用于检测或冷冻保存。

[0067] 对照组和实验组平行进行。

[0068] 对实验组和对照组收集的细胞和细胞液进行分析,用流式细胞仪检测实验组的 KG-1 细胞表面 CD86 和 CD54 分子的变化,用 ELISA 试剂盒检测实验组和对照组所获得的培养液中 IL-1 β 的含量。

[0069] 检测结果 :

[0070] (1) 流式检测实验组的结果是 :CD86 的 RFI 值 139, CD54 的 RFI 值为 148 ;

[0071] (2) 实验组中 IL-1 β 的含量为 203.2301 \pm 0.876ng/L,空白对照组中 IL-1 β 的含量为 120.5532 \pm 0.6852ng/L,有统计学意义 (P < 0.05)。

[0072] 判断标准与实施例 1 中相同,检测结果表明 DNCB 具有致敏性。

[0073] 实施例 4

[0074] 1、本实施例中的用于检测物质致敏性和药物筛选的人工表皮体外模型,是由人工表皮和 U937 细胞系细胞共培养而得。

[0075] 2、本实施例中,人工表皮体外模型的构建方法包括下列步骤 :

[0076] 1) 取人角质形成细胞悬液,以 5 \times 10⁵/ml 的密度接种到插入式培养皿的上室内,接种前预先在插入式培养皿的下室内种满人成纤维细胞,接种后在 37℃、含 5% CO₂ 的培养箱中培养 3 天,待细胞生长至汇合状态后,转至气液界面培养 14 天,得到人工表皮 ;

[0077] 2) 将 U937 细胞系细胞以 8 \times 10⁵/ml 的密度接种于孔板内,用含 10% FBS 和 50pg/ml IL-4 的 RPMI1640 培养基培养,将构建的人工表皮连同插入式培养皿的上室一起转移至培养有 U937 细胞系细胞的孔内,共培养 12 小时达到稳定状态,即得到人工表皮体外模型。

[0078] 3、利用本实施例的人工表皮体外模型来检测物质 DNCB(2,4-二硝基氯苯)的致敏性

[0079] 实验组 :将 3mg DNCB 均匀置于构建的人工表皮体外模型表面,于 37℃、含 5% CO₂ 的培养箱中培养 24 小时,收集 U937 细胞及其培养液,培养液检测或冷冻保存。

[0080] 对照组 :人工表皮体外模型上不使用 DNCB,收集 U937 细胞及其培养液,培养液用于检测或冷冻保存。

[0081] 对照组和实验组平行进行。

[0082] 对实验组和对照组收集的细胞和细胞液进行分析,用流式细胞仪检测实验组的 U937 细胞表面 CD86 和 CD54 分子的变化,用 ELISA 试剂盒检测实验组和对照组所获得的培养液中 IL-1 β 的含量。

[0083] 检测结果 :

[0084] (1) 流式检测实验组的结果是 :CD86 的 RFI 值 273, CD54 的 RFI 值为 236 ;

[0085] (2) 实验组中 IL-1 β 的含量为 197.562 \pm 0.749ng/L,空白对照组中 IL-1 β 的含量为 106.112 \pm 0.7958ng/L,有统计学意义 (P < 0.05)。

[0086] 判断标准与实施例 1 中相同,检测结果表明 DNCB 具有致敏性。

专利名称(译)	用于检测物质致敏性和药物筛选的人工表皮体外模型		
公开(公告)号	CN101955908B	公开(公告)日	2013-01-23
申请号	CN201010233797.1	申请日	2010-07-22
[标]申请(专利权)人(译)	中国医学科学院皮肤病研究所		
申请(专利权)人(译)	中国医学科学院皮肤病研究所		
当前申请(专利权)人(译)	中国医学科学院皮肤病研究所		
[标]发明人	马鹏程 刘维达 曹玉萍 周武庆		
发明人	马鹏程 刘维达 曹玉萍 周武庆		
IPC分类号	C12N5/071 C12N5/0786 C12Q1/02 G01N15/10 G01N33/53		
代理人(译)	卢霞		
审查员(译)	孙婷婷		
其他公开文献	CN101955908A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供了一种用于检测物质致敏性以及用于皮肤外用免疫调节药物的筛选或药效学评价的人工表皮体外模型，所说的模型是由人工表皮与单核细胞系细胞共培养而得。本发明的人工表皮体外模型具有如下技术效果：1、通过检测模型中相关细胞因子及细胞表面标记物的变化，可评价各种化合物、皮肤外用制剂及化妆品的致敏性；在判断物质致敏性时，具有很高的敏感度、特异性和准确性，检测方法简单，应用范围广；2、可以用于皮肤外用免疫调节药物的筛选或药效学评价；3、模型构建成本低，批间差异小，质量容易控制；4、模型所用的材料易得，便于规模化生产。