

皮肤变态反应：局部淋巴结试验:BrdU-ELISA **Skin Sensitization: Local Lymph Node** **Assay: BrdU-ELISA (LLNA:BrdU-ELISA)**

1 范围

本方法规定了小鼠局部淋巴结试验(LLNA:BrdU-ELISA)的基本原则和试验要求。

本方法适用于化妆品用化学原料皮肤变态反应的检测。

2 试验目的

确定重复接触化妆品用化学原料对哺乳动物皮肤局部是否可引起变态反应及其程度。

3 定义

3.1 皮肤变态反应(过敏性接触性皮炎)skin sensitization, allergic contact dermatitis

皮肤对一种物质产生的免疫源性皮肤反应。在人类这种反应可能以瘙痒、红斑、丘疹、水疱、融合水疱为特征。动物的反应不同，可能只见到皮肤红斑和水肿。

3.2 皮肤刺激性 dermal irritation

皮肤涂抹受试物后局部产生的原发可逆性炎性变化。

3.3 刺激指数 stimulation index

评价受试物皮肤致敏能力的值，是受试物组与溶剂对照组增殖率的比值。

4 试验原理

过敏原引起染毒部位回流淋巴结内淋巴细胞增殖，其增殖程度与过敏原的剂量和效力成比例。BrdU是一种胸腺嘧啶核苷类似物，可代替胸腺嘧啶掺入增殖细胞新合成的DNA链中，其含量反映回流淋巴结内细胞增殖程度。用ELISA方法测定淋巴细胞中BrdU含量，通过计算受试物组与溶剂对照组BrdU含量比值即刺激指数评价受试物的皮肤致敏性。

5 试验的基本原则

5.1 实验动物和饲养环境

选用SPF级BALB/c或CBA/JN小鼠，8~12周龄，雌性，未孕或未曾产仔的。体重差异应不超过平均体重的20%。其他品系或雄性小鼠如经验证LLNA:BrdU-ELISA反应不存在明显品系或性别间差异亦可使用。实验动物及实验动物房应符合国家相应规定，选用标准配合饲料，饮水不限制。

5.2 动物试验前准备

试验前动物应在实验动物房环境中至少适应5d。将动物随机分组标记（不要做任何形式的耳朵标记），检查皮肤应健康无损伤。试验开始和结束时应记录动物体重。

5.3 可靠性检查

每次试验均需设置阳性对照组，阳性物一般采用25%己基肉桂醛(CAS号101-86-0)或25%丁子香酚(CAS号97-53-0)，溶剂为丙酮：橄榄油(AOO, 4:1, v/v)。当阳性物与受试物的溶剂不同时，需另单独设置阳性物的溶剂对照组。

5.4 试验期间每天观察动物临床症状及耳朵局部刺激症

状，并做完整记录。

6 试验方法

进行本试验前，需通过预试验（每组1~2只动物）排除受试物引起全身毒性和（或）局部皮肤中度刺激性。筛选最大剂量水平要求：液体受试物达到100%浓度，固体或悬浮液达到最大可能浓度。

6.1 动物与分组

动物随机分为阴性（溶剂）对照组、阳性对照组和受试物组（至少3个浓度），每组至少4只动物。

6.2 受试物配制

固体受试物应溶于或悬浮于适当溶剂中并稀释，液体受试物可以直接或稀释用。受试物应每天现用现配。

6.3 溶剂的选择

常用溶剂为丙酮：橄榄油（AOO，4:1，v/v）、N,N-二甲基甲酰胺（DMF）、甲乙酮（MEK）、丙烯乙二醇、二甲基亚砷（DMSO）等。

6.4 剂量水平

受试物最高浓度应不引起动物全身毒性和（或）局部皮肤中度刺激性，通过预试验按合适浓度梯度如100%、50%、25%、10%、5%、2.5%、1%、0.5%等选择三个连续的试验浓度。

6.5 试验步骤

6.5.1 第1d

动物随机分组并标记、称重、记录临床症状。将受试物

或对照均匀涂抹到小鼠双侧耳朵背部皮肤，25μL/耳。

6.5.2 第2d、第3d

操作同第1d，重复受试物或对照涂抹。

6.5.3 第4d

不做任何处理。

6.5.4 第5d

每只小鼠腹腔注射0.5mL BrdU标记液（10mg/mL，无菌生理盐水配制，现用现配或提前配好置于-20℃，避光保存）。

6.5.5 第6d

腹腔注射BrdU标记液后24h，记录小鼠体重和出现的任何临床症状，人道处死动物摘取双侧颌下淋巴结，同时分离双侧耳廓打孔称重。

试验期间每天观察小鼠临床症状及耳朵局部刺激症状并按表1进行评分，任何时候局部刺激红斑评分≥3和（或）耳廓厚度（耳廓增重）≥25%，判断受试物为中度皮肤刺激性。在整个实验过程中，不应出现中度皮肤刺激性反应。

表 1 红斑评分

症状	分值
无红斑	0
轻微红斑（勉强可见）	1
明显红斑	2
中度-重度红斑	3
严重红斑（紫红色）至轻微焦痂形成	4

6.5.6 淋巴细胞悬液制备

将每只小鼠分离的淋巴结放在磷酸盐缓冲液（PBS）中研磨，用200目不锈钢筛网过滤（也可用一次性的70μM尼龙膜过滤），制成单细胞悬液。调整每只小鼠的淋巴细胞悬液终体积（约15mL），以保证阴性对照组的平均吸光度值在0.1～0.2范围内。

6.5.7 细胞增殖测定(淋巴细胞DNA中BrdU含量的测定)

用ELISA试剂盒测定BrdU含量。将淋巴细胞悬液100μL加到96孔平底板中，每只小鼠3个复孔，空白对照每孔加100μL PBS。孔板以300g离心10min，每孔吸出75μL液体，吹干孔板。加入变性液使淋巴细胞变性后，再加入抗BrdU抗体孵育、洗去未结合的抗体，加底物显色液反应，测定370nm处吸光度值(参考波长为492nm)。试验过程中应注意避光。

7 数据处理

BrdU标记指数计算公式如下：

$$\text{BrdU标记指数} = (\text{ABS}_{\text{em}} - \text{ABS}_{\text{空白}_{\text{em}}}) - (\text{ABS}_{\text{ref}} - \text{ABS}_{\text{空白}_{\text{ref}}})$$

注：em=emission wavelength，发射波长；ref=reference wavelength，参考波长。

刺激指数（stimulation index，SI）为受试物组或阳性对照组BrdU标记指数均值与溶剂对照组BrdU标记指数均值比值，计算公式如下：

$$\text{刺激指数 (SI)} = \frac{\text{受试物组或阳性对照组BrdU标记指数均值}}{\text{溶剂对照组BrdU标记指数均值}}$$

EC1.6(estimated concentration needed to produce SI=1.6) 为SI=1.6时受试物的浓度。当受试物3个浓度分别为SI>1.6

和 $SI < 1.6$ 时，计算公式如下：

$$EC1.6 = c + \left[\frac{(1.6 - d)}{(b - d)} \times (a - c) \right]$$

当受试物3个浓度均为 $SI \geq 1.6$ 时，计算公式如下：

$$EC1.6_{ex} = 2^{\left\{ \log_2(c) + \frac{(1.6-d)}{(b-d)} \times [\log_2(a) - \log_2(c)] \right\}}$$

注：a、c为相邻两点受试物的浓度，b、d为相应SI值。

数据应以表格形式显示每只小鼠的BrdU标记指数、每组的BrdU标记指数均值与标准差、每个受试物各剂量组的平均SI值。计算每个受试物的EC1.6值并判定致敏强度。对所有数据应采用SPSS软件或其他适当合理的统计学方法进行评价。

8 结果判定

刺激指数 $SI \geq 1.6$ ，受试物为致敏阳性。对于 $1.6 \leq SI \leq 1.9$ 临界值是否判断为阳性，应结合考虑剂量-效应关系、统计显著性、系统毒性或皮肤刺激性、溶剂对照与阳性对照反应一致性、与已知致敏物的结构关系等。按表2对受试物进行致敏强度分级。

表2 皮肤致敏强度分级

EC1.6(%)值范围	致敏强度
$EC1.6(\%) < 0.1$	极强
$0.1 \leq EC1.6(\%) < 1$	强
$1 \leq EC1.6(\%) < 10$	中
$10 \leq EC1.6(\%) < 100$	弱

9 试验结果的解释

试验结果应能得出受试物的致敏能力和强度。这些结果只能在很有限的范围内外推到人类。