

附件 6

体外皮肤变态反应 U937 细胞激活试验方法

U937 Cell Line Activation Test

1 范围

本方法规定了体外皮肤变态反应 U937 细胞激活试验的基本原则、要求和方法。

本方法适用于化妆品用化学原料潜在致敏性的评价。

2 试验目的

本试验用于检测体外培养的人组织细胞淋巴瘤细胞表面标记物 CD86 的表达变化，以评价受试物引起皮肤变态反应的可能性。

3 定义

3.1 70%细胞存活率浓度值 70% cell viability (CV70)

受试物染毒后，细胞存活率为 70%时对应的受试物浓度值。

3.2 刺激指数 stimulation index (S.I.)

与溶剂对照相比，扣除同型对照后流式细胞仪测定的受试物阳性细胞相对强度值。

3.3 CD86 有效作用浓度值 Effective Concentration 150 (EC150)

CD86 的相对荧光强度值达到 150 时对应的受试物浓度值。

4 试验的基本原则

当致敏物质接触皮肤后，树突状细胞在移动到淋巴器官的过程中分化成熟，并上调一系列表面分子的表达。体外培养类树突状细胞：人组织细胞淋巴瘤细胞，并和受试物共暴露 48 h 后，使用荧光抗体染料对细胞表面分子 CD86 染色并用流式细胞仪测定，从而评价受试物是否具有致敏性。

5 试剂

5.1 细胞

选用人组织细胞淋巴瘤细胞 (The human histiocytic lymphoma cell line, U937 细胞)。细胞使用前应进行稳定性检测。推荐使用 clone CRL1593.2 细胞株。

5.2 培养基

RPMI 1640 基础培养液中加入 10%胎牛血清、适量抗生素，配制成 1640 完全培养基。

5.3 染色缓冲液

磷酸盐缓冲液中加入 5%的胎牛血清。

5.4 染料和抗体类物质

7-氨基放线素菌-D 染料 (7-AAD) 或碘化丙啶 (propidium iodide, PI)

FITC 标记的小鼠单克隆 CD86 抗体 (FITC-CD86)

FITC 标记的小鼠 IgG1 (FITC-IgG1)

6 试验方法

6.1 细胞准备

6.1.1 细胞培养

U937 悬浮细胞使用 1640 完全培养基, 于 37℃、5%CO₂ 培养箱内培养, 倒置显微镜下观察细胞状态。细胞复苏一周并通过稳定性检测后可开展试验。细胞最大培养浓度不超过 2×10⁶ 个/mL, 复苏后使用不超过 6 周, 传代次数不超过 21 代。

6.1.2 细胞稳定性检测

细胞复苏两周后, 选用松香酸 (AA) 或 2,4,6-三硝基苯磺酸作为阳性对照, 乳酸 (LA) 作为阴性对照。当细胞可以准确对阳性物质和阴性物质进行稳定区分时视为通过稳定性检测。

6.2 受试物处理

溶剂: 完全培养基 (优先选择) 或二甲基亚砜 (DMSO)

受试物储备液: 第一次运行至少选择 6 个浓度。于试验前一天制备, 应用 1640 完全培养基配制 0.4 mg/mL 的受试物溶液, 或者应用 DMSO 配制 50 mg/mL 的受试物溶液。由于没有进行剂量测定, 因此在第一次运行时, 应在相应的溶剂中配制 6 种系列浓度储备液 (最终浓度为 1、10、20、50、100 和 200 µg/mL)。

受试物工作液: 于试验当天制备, 用完全培养基配制的受试物溶液可以直接使用, 用 DMSO 配制的受试物溶液需用完全培养基稀释 125 倍得到工作溶液。将工作液等体积加入细胞悬液中进行染毒, 即最终细胞接触浓度是工作液浓度再稀释 2 倍。

连续运行的浓度选择: 基于第一次运行的结果选择至少 4 个第二次运行的浓度, 任何后续运行的浓度都是基于之前所有运行的单个结果来选择。由于浓度间隔设置较小会影响浓度效应, 所以建议以下推荐使用的最终浓度 (单位: µg/mL) 进行试验: 1、2、3、4、5、7.5、10、12.5、15、20、25、30、35、40、45、50、60、70、80、90、100、120、140、160、180、200。

如果以上浓度无法测得受试物的 70% 细胞存活率浓度值 (70% cell viability, CV70), 可以进行浓度调整。但受试物最终细胞接触浓度最高不超过 200 µg/mL; 如果 CD86 的阳性值在 1 µg/mL, 则对 0.1 µg/mL 进行评估, 以确认不会导致 CD86 超过阳性阈值的受试物的浓度; DMSO 最终接触浓度不得超过 0.4%。

选择标准: 至少 2 个浓度与前一次试验相同; 确认非细胞毒性下的最高 CD86 阴性浓度; 确认所有非细胞毒性 CD86 阳性浓度; 确认最低细胞毒性浓度; 在 EC150 (或最高阴性非细胞毒性浓度) 和 CV70 (或溶解度评估允许的最高浓度) 之间均匀选择其他所需浓度; 若前两次运行有差异, 尽可能选择多的共同浓度; 若存在干扰, 需重新选择阳性浓度。

6.3 对照物处理

培养基对照、溶剂对照 (与受试物同法稀释)、阳性对照松香酸 (DMSO 溶解, 最终浓度 50 µg/mL)、阴性对照 LA (完全培养基溶解, 最终浓度 200 µg/mL), 每种对照需要准备三对复孔。

6.4 细胞铺板及染毒

以 3×10^5 个/mL 细胞传代培养 2 天或以 1.5×10^5 个/mL 传代培养 3 天后, 调整细胞浓度为 5×10^5 个/mL, 取 100 μ L/孔受试物工作液和 100 μ L/孔细胞悬液 1:1 混合接种于 96 孔无菌平板中, 每种条件下一对复孔, 一孔用于 CD86 染色, 一孔用于 IgG1 同型对照染色。每次 CD86 表达检测均需设置培养基对照、溶剂对照、阳性对照、阴性对照各三对复孔 (当使用培养基作为溶剂时, 溶剂对照与培养基相同), 用密封带盖住板, 在 $37 \pm 2^\circ\text{C}$, $5 \pm 1\% \text{CO}_2$, $\geq 95\%$ 湿度下培养孵育 $45 \text{ h} \pm 3 \text{ h}$ 。

6.5 CD86 表达检测

孵育结束后, 检查并确定溶解度 (若在显微镜下观察到晶体或液滴, 则会产生干扰)。

用排枪将细胞吹两下从 96 孔平板对应移至 V 型板中, 离心弃上清;

用 100 μ L 冰冷染色缓冲液清洗一次, 然后在 100 μ L 染色缓冲液中重悬细胞;

用 7-AAD 染色细胞 (5 μ L/孔, 10 min 室温, 避光);

用 100 μ L 冰冷染色缓冲液清洗一次, 然后在 100 μ L 染色缓冲液中重新悬浮细胞;

用 FITC 标记的抗 CD86 或小鼠 IgG1 (5 μ L/孔, 30 min, 4°C , 避光) 染色细胞;

用 100 μ L 冰冷染色缓冲液清洗两次;

用 100 μ L 冰冷 PBS 清洗一次;

在冰冷 PBS 中再悬浮细胞 (96 孔板中 100 μ L 或流式管中 200 μ L)。

注意: 整个染色操作应在冰上进行, 在每一个洗涤步骤中, 不要通过反复的移液来重悬细胞, 而是在弃去上清液后通过短暂的涡旋来分散细胞即可。

用流式细胞仪对每组细胞的细胞存活率及 CD86 阳性细胞百分比进行测定。 分别用以下公式计算出受试物的细胞存活率 (CV70) 和受试物的细胞刺激指数 (S.I.)。

$$\text{CV70} = \text{C1} + \frac{\text{V1} - 70}{(\text{V1} - \text{V2}) \times (\text{C2} - \text{C1})}$$

V1: 大于 70% 最小细胞活性值

V2: 小于 70% 最大细胞活性值

C1 ($\mu\text{g/mL}$): V1 对应的受试物浓度

C2 ($\mu\text{g/mL}$): V2 对应的受试物浓度

$$\text{S.I.} = \frac{(\text{受试组 CD86}^+ \% - \text{受试组同型对照 CD86}^+ \%) \times 100}{\text{溶剂对照组 CD86}^+ \% - \text{溶剂对照组同型对照 CD86}^+ \%}$$

CD86⁺%: CD86 阳性细胞百分比

6.6 流式细胞仪检测

绘制 SSC/FSC 散点图, 调节仪器电压, 圈出 U937 细胞群 P1 门; 绘制 7-AAD 直方图, 圈出活细胞 P2 门; 绘制 FITC/SSC 散点图, 放置十字门, 分析细胞表面标记物 CD86 的表达。通过获取完全培养基/ IgG1 孔表达值, 设置 FITC/SSC 十字门分析标记, 以便在可能的情况下, 所有三个或至少两个完全培养基对照的 IgG1 位于 0.6 至 0.9% 区域内; 如果这无法实现, 则设置分析标记, 使一个完全培养基对照的 IgG1 在 0.6 至 0.9%, 另一个完全培养基对照的 IgG1 在 0.9% 至 1.5%; 如果这仍然无法实现, 则 IgG1 数据分布太广, 必须放弃运行。之后在不移动分析标记的情况下, 测量每个孔中 IgG1 阳性细胞或 CD86 阳性细胞的百分比。

细胞显示在大小(FSC)和粒度(SSC)的散点图中, 设置为对数比例 (Log), 以便清楚地识别第一门R1门中的 (population) 细胞群和消除碎片。

设置流式细胞仪, 每孔获得P1门细胞10000个或包括死亡细胞在内的多达20,000个细胞, 或在分析开始后1 min内获取数据。

7 结果评价

7.1 试验成立条件

7.1.1 完全培养基对照细胞平均存活率>90%; 至少两个完全培养基对照的IgG1 ≥ 0.6 且<1.5%; 若丢弃一个完全培养基对照的离群值后, 剩下的两个完全培养基对照的校正后的CD86表达值应高于或低于其平均值的25%; 完全培养基对照校正后的CD86基础表达值 $\geq 2\%$ 且 $\leq 25\%$ 。

7.1.2 DMSO溶剂对照的平均存活率>90%; 若丢弃一个DMSO对照的异常值后, 剩下的两个DMSO对照的校正后的CD86表达值应高于或低于其平均值的25%; 丢弃异常值后, DMSO溶剂对照CD86 S.I.的平均值小于250%。

7.1.3 阳性对照三对复孔中至少两个为阳性 (CD86 S.I. ≥ 150), 必要时配制阳性对照系列浓度, 应存在剂量反应。

7.1.4 阴性对照三对复孔中至少有两个为阴性 (CD86 S.I. <150%), 且细胞活性 $\geq 70\%$ 。

7.1.5 溶解度干扰: 受试物处理后 45 ± 3 h(细胞染色前)在显微镜下观察到晶体或滴状, 则提示测试受到受试物溶解度干扰。

7.1.6 颜色干扰: 受试物FITC标记IgG1散点图如发生位置偏移, 则提示测试受到受试物颜色干扰 (IgG1荧光通道几何平均数S.I. $\geq 150\%$)。

7.2 致敏性结果判定

每种受试物至少进行两次独立的CD86表达检测试验。每种受试物表达检测试验, 如果CD86 S.I.仅在最高非细胞毒性浓度下高于150%, 则在第一次试验中无法判定。每次表达检测试验, 如果CD86 S.I.在所有非细胞毒性浓度下低于150%, 且无干扰 (溶解度、颜色、细胞毒性), 则该次CD86表达判定为阴性; 如果CD86 S.I.高于150%, 不论有无剂量反应和/或干扰, 则该次CD86表达均判定为阳性。如果两次试验CD86表达结果一致, 则可判定该受试物是否具有致敏性; 如果两次试验CD86表达不具有一致性, 则需进行第三次试验。如果第一次试验无法判定, 第二次与第三次结果不一致, 则需进行第四次试验。最终的预测将基于三次或四次单独运行的结果来综合判定。

7.3 有效作用浓度计算

对于判定具有致敏性的物质, 进一步计算其有效作用浓度值 (Effective Concentration, EC), 选用以下公式计算CD86的有效作用浓度值 (EC150)。

$$EC150 = C1 + \frac{150 - S.I.1}{(S.I.2 - S.I.1) \times (C2 - C1)}$$

S.I.1: S.I.<150 (EC150) 最低刺激指数值

S.I.2: S.I. ≥ 150 (EC150) 最低刺激指数值

C1 ($\mu\text{g/mL}$): S.I.1对应的受试物浓度

C2 (μg/mL) : S.I.2对应的受试物浓度

8 结果解释

本试验结果能预测受试物的致敏性，可作为皮肤致敏性整合测试和评估方法（IATA）中的检测方法之一，这些结果在有限的范围内外推到人类。