

研究。方法 选用 12 种已知遗传毒性的化学物质对中国仓鼠肺细胞进行染毒,在全自动图像分析系统中观察计算双核、多核细胞的复制指数(RI)和细胞毒性,确定体外微核实验的实验条件;同步进行小鼠骨髓微核实验方法、体外 CHL 细胞染色体实验,采用 SPSS (ver16.0) 统计软件对体外微核试验与小鼠骨髓微核实验、体外 CHL 细胞染色体实验的遗传毒性结果评价分级结果的相关性和一致性、体外微核试验的可靠性以及预测能力。结果 1. 体外微核试验的建立 分别对受试物进行 1, 2, 3, 5 和 12 h 染毒时间的处理,确定 3 h 作为正式试验的受试物处理时间;通过对 5 种染毒剂量浓度的化学物质进行染毒,结果显示体外微核试验存在明显的剂量-效应关系($F=412.407, P<0.001$)。2. 体外微核试验结果及其分析 体外微核试验预测遗传毒性的灵敏度为 100%、特异度为 93.9%;和骨髓微核试验结果比较具有较高的等级相关性(Spearman $R=0.943, P=0.000$; Gamma = 1.000, $P=0.000$)及分级一致性(Kappa = 0.799, $P=0.000$);和体外哺乳动物细胞染色体试验结果比较具有较高的等级相关性(Spearman $R=0.699, P=0.000$; Gamma = 0.893, $P=0.000$)及分级一致性(Kappa = 0.553, $P=0.001$);12 种化学物三次体外微核试验检测显示差别无统计学意义($F=0.439, P=0.646$),说明体外微核试验具有良好的可重复性和稳定性。结论 通过对受试物处理时间、剂量反应关系等试验条件进行探索,在我国率先应用全自动图像分析系统建立了体外微核试验方法。体外微核试验与骨髓微核试验、体外哺乳动物细胞染色体试验结果具有较高的相关性和一致性,体外微核试验对受试物的眼刺激性具有较高的预测能力,试验方法较为稳定,结果可重复性和可靠性良好,是一种比较有潜力的遗传毒性试验方法。

关键词: 体外微核; 遗传毒性

基金项目: 2011 国家卫生标准制订项目(20110501)

T17.33 细胞毒性体外替代方法检测化学物质急性毒性

曾丽海^{1,2}, 赵 敏¹, 杨杏芬¹, 杨 颖¹, 谭剑斌¹, 黄俊明¹

(1. 广东省疾病预防控制中心, 广东 广州 511430; 2. 广东省职业病防治研究院, 广东 广州 510300)

摘要: 目的 评价 HepG2 细胞中性红摄取实验、MTT 实验、总蛋白含量实验预测急性毒性的能力,探讨这三种方法替代急性经口毒性实验的可行性。方法 分别采用 HepG2 细胞中性红摄取实验、MTT 实验、总蛋白含量实验检测 50 种化学物质的细胞毒性,将 IC_{50} 结果与急性经口毒性实验 LD_{50} 值进行分析比较; IC_{50} 值代入 RC 预测模型获得急性毒性 LD_{50} 预测值,并进行 GHS 急性毒性分级,将分级结果与急性经口毒性实验分级结果进行比较。结果 HepG2 细胞中性红摄取实验 IC_{50} 值与急性经口毒性实验 LD_{50} 值存在相关性($r=0.778, P<0.01$);分级结果与急性经口毒性实验分级结果具有等级相关性($r=0.712, P<0.01$; Gamma = 0.928, $P<0.01$)和分级一致性(Kappa = 0.477, $P<0.01$),二者分级一致率为 68.0% (34/50, McNemar-Bowker $W=9.455, P=0.009$);HepG2 细胞 MTT 实验 IC_{50} 值与急性经口毒性实验 LD_{50} 值存在相关性($r=0.768, P<0.01$);分级结果与急性经口毒性实验分级结果具有等级相关性($r=0.636, P<0.01$; Gamma = 0.824, $P<0.01$)和分级一致性(Kappa = 0.444, $P<0.01$),二者分级一致率为 66.0% (33/50, McNemar-Bowker $W=5.267, P=0.153$);HepG2 细胞总蛋白含量实验 IC_{50} 值与急性经口毒性实验 LD_{50} 值存在相关性($r=0.726, P<0.01$);分级结果与急性经口毒性实验分级结果具有等级相关性($r=0.673, P<0.01$; Gamma = 0.828, $P<0.01$)和分级一致性(Kappa = 0.503, $P<0.01$),二者分级一致率为 70.0% (35/50, McNemar-Bowker $W=8.444, P=0.038$)。单独分析 4 级和 5 级化学物质,三种方法的分级一致率分别为 82.5%, 80.0% 和 87.8%。结论 HepG2 细胞中性红摄取实验、MTT 实验、总蛋白含量实验均可较好地预测化学物质的急性毒性,特别是对急性毒性较低的(4 级和 5 级)化学物质预测能力较高,是有效的体外快速筛查急性毒性的方法;可为后续的动物实验的起始剂量提供参考,可望用于化学物质急性毒性分级的初步判断。

关键词: 急性经口毒性实验; 替代方法; 中性红摄取实验; MTT 实验; 总蛋白含量实验

基金项目: 卫生公益性行业科研专项经费资助(200802080)

通讯作者: 杨杏芬, E-mail: yangxingfen @21cn. com

T17.34 BrdU-ELISA 检测皮肤过敏方法的建立及其机制

王智琴, 杨 微, 陈 聪, 王 捷

〔国家(沈阳)新药安全评价中心, 辽宁 沈阳 110021〕

摘要: **目的** 通过 ELISA 法、荧光定量 PCR 法、流式细胞术观察致敏诱导期小鼠血清生化指标、脾脏中致敏基因以及引流淋巴结淋巴细胞中细胞表面分子的变化情况, 探讨在致敏诱导期检测致敏性的机制。**方法** 建立 LLNA:BrdU-ELISA 方法: 根据指导原则, (选择动物类型), 选择丁子香酚与 α -己基肉桂醛作为阳性致敏物, 建立试验方法, 并通过致敏性质已知的化学品验证试验证明该方法的稳定性和可重复性。验证试验分别选择 2,4-二硝基氯苯、2-巯基苯并噻唑、戊二醛作为致敏阳性物, 甘油、氯化钾、乙醇作为致敏阴性物。采用 ELISA 法检测测试动物血清中组胺、IL-2, IL-4 的水平。应用荧光定量 PCR 方法, 检测测试动物脾脏致敏相关基因 T-bet, CTLA4 和 foxp3 的差异表达, 应用流式细胞术, 检测小鼠淋巴细胞悬液中的淋巴细胞亚群以及与致敏相关的细胞表面分子变化情况。**结果** 成功建立了 LLNA:BrdU-ELISA 法, 该方法重复性良好, 可以稳定、快速、敏感的检测化学品致敏性。ELISA 法检测小鼠的血液生化指标结果显示, 各致敏阳性组小鼠血清中的 His 和 IL-4 水平均增加, IL-2 无明显变化, 其中 IL-4 水平显著变化。小鼠脾脏中三种致敏相关基因的差异表达研究结果显示, 致敏阳性组小鼠脾中 T-bet 基因表达量升高, 其中丁子香酚组、 α -己基肉桂醛组、DNFB 组的增加量与溶剂对照组相比差异性显著。但其他两种基因的表达量无明显变化。小鼠淋巴结中 CD4 阳性 T 细胞数量比例与溶剂对照组相比显著增多。CD28 的表达量均增多, 其中戊二醛组与 2-巯基苯并噻唑组与溶剂对照组相比差异性显著。**结论** 成功在本实验室建立 LLNA:BrdU-ELISA 方法, 可以选用 ELISA 试剂盒检测血清中 IL-4 水平为辅助指标。小鼠脾中 T-bet 基因表达量升高、小鼠淋巴结淋巴结中 T 细胞数量与 CD4 阳性 T 细胞数量比例增多, 表明皮肤过敏反应是由 T 细胞介导的迟发型变态反应。

E-mail: wzq7626 @126. com

T17.35 斑马鱼快速检测化学品(药物)类过敏反应方法的建立及其应用

劳乔聪, 俞航萍, 徐懿乔, 夏 波, 李春启

(杭州环特生物科技有限公司, 浙江 杭州 311231)

摘要: **目的** 利用斑马鱼, 建立一种体内类过敏快速检测模型, 并利用此模型, 检测药用辅料 Tween-80 及其杂质(氯乙醇、乙二醇和双氧水)的致敏性。**方法** 选择野生型 AB 品系斑马鱼幼鱼进行实验。优化检测用斑马鱼的发育阶段与数量、检测底物 N-苯甲酰-DL-精氨酸对硝基苯酰胺盐酸盐(BAPNA)的浓度和阳性对照化合物 Compound 48/80 的浓度, 建立基于微孔板分析的斑马鱼类过敏反应快速检测模型。该模型以肥大细胞脱颗粒后释放的代表性物质类胰蛋白酶的诱导产生水平为检测标准, 评价药物是否会诱发类过敏反应。利用此模型, 定量分析 10 个不同批次的 Tween-80 的致敏性。**结果** 通过优化建模条件实验, 成功建立了斑马鱼类过敏反应快速检测模型, 同时用已知的会诱发类过敏反应的化学品验证了该模型检测化学品(药物)是否会诱发类过敏反应的可靠性和特异性。实验数据显示, Tryptase 作为肥大细胞脱颗粒后的代表性产物, 能够作为评价是否出现肥大细胞脱颗粒现象; 而且能够特异性地检测出由类过敏反应诱发的肥大细胞脱颗粒。对 10 个不同批次的 Tween-80 的评价结果显示, 不同批次 Tween-80 的致敏性不同, 其致敏性呈浓度依赖性, 其中 3 个批次的 Tween-80 能诱导斑马鱼类过敏反应, 有明显的致敏性; 其余 7 个批次的 Tween-80 不诱导斑马鱼类过敏反应; 实验结果与在 Beagle 犬上进行的实验结果具有很好的一致性。此外, 利用该模型, 我们还评价了一种中药注射剂及其杂质的致敏性, 结果与预期相符。**结论** 斑马鱼类过敏