

DOI:

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1365.R.20121018.1452.008.html>

体外 MTT 法评价化妆品光毒性试验的建立与应用

徐薇, 蒋中仁, 李天舒, 贾红慧, 刘科亮, 金伟, 郑华, 周静

(四川省疾病预防控制中心毒理所, 成都, 610041)

摘要: **目的** 应用体外 MTT 法评价化妆品光毒性。**方法** 分别以 MTT 法、中性红试验评价 5 种物质的体外 3T3 细胞光毒性, 并与动物试验结果相比较。**结果** MTT 法与中性红法均能正确判断光毒阳性物与光毒阴性物, 对 3 种育发液的检测结果一致。上述结果与动物实验结果相符。**结论** 体外 MTT 法可作为光毒性动物试验的替代方法。

关键词: 光毒性; 3T3 细胞; 化妆品; MTT 光毒性试验; 中性红光毒性试验

中图分类号: R994 文献标识码: A 文章编号: 201203440

Establishment and Assessment In vitro MTT Phototoxicity Test on Cosmetics

XU Wei, JIANG Zhong-ren, LI Tian-shu, et al.

The Center of Disease control of Sichuan Province, Chengdu, Sichuan, 610041

Abstract: **OBJECTIVE** To assess phototoxicity of cosmetics by 3T3 MTT phototoxicity test. **METHODS** Detected five substances by MTT PT, NRU PT and skin PT respectively, and compared the test results. **RESULTS** The results of these three methods were consistent. Both MTT PT and NRU PT could judge five substances correctly. **CONCLUSION** In vitro 3T3 MTT PT could be an alternative method for animal phototoxicity test.

Key words: Phototoxicity; 3T3 cell; Cosmetics; MTT PT; NRU PT

前言

随着社会的发展, 动物福利日益受到公众的关注, 在动物试验中提倡"3R"原则以保护试验动物的福利。目前研究的较多且相对成熟的光毒体外替代试验是 3T3 中性红试验, 并成为化学品光毒性检测的推荐国标^[1], 但是 MTT 法检测物质光毒性却鲜有报道。本研究试着建立体外 MTT 光毒性试验和体外中性红光毒性试验, 探讨这两种方法的优劣, 并与动物试验进行比较。

1 材料与方法

1.1 受试物

8-甲氧基补骨脂(8-MOP, AR 级, Sigma), 实验时用无水乙醇配制所需浓度; 十二烷基磺酸钠(SDS, AR 级, 成都市科龙化工试剂厂), 试验时用蒸馏水配制; 3 种育发液为四川省疾控 2011 年受理的检验样品。

1.2 细胞

NIH 小鼠 3T3 成纤维细胞(华西细胞所提供, ATCC 第 10 代)。

1.3 动物、饲料及动物房条件

由四川省实验动物专委会养殖场提供白化豚鼠 30 只, 许可证号及级别: SCXK(川)2011-14, 普通级。饲料来源于四川省医学科学院实验动物研究所。动物房使用许可证号及级别: 动物房为开放系统, 使用许可证为 SYXK(川)2011-043。

1.4 主要仪器与试剂

HOPE-MED 8130A 型皮肤光毒性实验仪(天津开发区合普工贸有限公司)、紫外辐照仪(北京师范大学光电仪器)、MTT(Sigma 公司)、中性红(Sigma 公司)。

1.5 方法

1.5.1 细胞培养

高糖 DMEM 培养基+10%胎牛血清+青链霉素 (100U/mL)+2.5%HEPES, 细胞消化采用 0.125%胰酶, 以上试剂均为 GIBCO 公司生产。细胞培养在 37℃, 5% CO₂ 培养箱中培养。

1.5.2 3T3 细胞 MTT 光毒性检测法试验方法

取对数生长期细胞, 调节细胞浓度为 105/mL 接种于 96 孔板(外周一圈不接种), 每孔接种 100 μ L。培养 24 小时后, 每孔加 150 μ L 的 PBS 清洗细胞后, 将配制好的 8 个浓度(C1~C8)的待测物质处理细胞, 1h 后将光照板置于 UVA(2.39mW/cm²)下照射 35 分钟, 对照板用锡箔纸包好避光 35 分钟。然后用 PBS 洗两遍, 加 180 μ L 培养基培养 24h。加 20 μ L 新鲜配制的 MTT 孵育 4 小时, 弃上清, 每孔加 150 μ L DMSO, 震荡 10 分钟, 使结晶充分溶解, 490nm 检测吸光度。用 PHOTO32 软件计算光刺激因子(PIF)和平均光效应(MPE)及 EC50。

1.5.3 3T3 细胞中性红光毒性试验方法

细胞接种、染毒、照射同 MTT 法。UVA 照射后(对照板不照射)加 100 μ L 培养基培养 24 小时, 然后加 150 μ L 中性红(NR)培养 3 小时, 弃 NR, 150 μ L PBS 洗涤细胞两遍, 加 150 μ L 中性红解吸液(1%冰醋酸+50%乙醇+49%水), 震荡 10 分钟, 540nm 检测吸光度。用 PHOTO32 软件计算光刺激因子(PIF)和平均光效应(MPE)及 EC50。

1.5.4 PIF 与 MPE 的结果判定

基金项目: 2009 年四川省卫生厅课题: 090405

作者简介: 徐薇 (1981-), 女, 硕士研究生, 公卫医师, 卫生毒理, 18981958655, freefresh2000@163.com

PIF<2, MPE<0.1, 预测无光毒性; PIF>5, MPE>0.15, 预测有光毒性; 2 ≤ PIF ≤ 5, 0.1 ≤ MPE ≤ 0.15 预测可能有光毒性^[4];

1.5.4.1 动物试验

按照《化妆品卫生规范》(2007年版)中的光毒试验方法结合本实验室的具体条件进行试验^[4]。试验前 24h 在动物脊柱两侧备 4 块 2cm×2cm 的皮肤完好的去毛区, 在动物去毛区 1 和 2 涂敷 0.2ml 受试物, 30min 后用铝箔纸覆盖左侧(去毛区 1 和 3), 右侧用 UVA 进行照射。试验结束后 1h、24h、48h、72h 观察皮肤是否出现红斑、焦痂、水肿及其程度, 根据《化妆品卫生规范》(2007年版)中《皮肤光毒性试验》中的表 2 对每只动物进行评分^[4], 单纯涂受试物而未经照射区域未出现皮肤反应, 而涂受试物后经照射区域出现皮肤反应分值之和为 2 或 2 以上的动物数为 1 只或 1 只以上时, 判为受试物具有光毒性。

2 结果

2.1 MTT 法试验结果

预测 8-MOP 有光毒性, SDS 无光毒性; 预测育发液 A、B 无光毒性, 育发液 C 有光毒性。(见表 1)

2.3 动物试验结果

8-MOP 有光毒性, SDS 无光毒性; 育发液 A、B 无光毒性, 育

表 1 MTT 法试验结果

	+UVA EC50(mg/L)	-UVA EC50(mg/L)	PIF	MPE	有无光毒性
8-MOP	20.30	211.44	10.60	0.22	+
SDS	22.52	25.24	1.13	0.015	-
育发液 A	>10ml/L	>10ml/L	1.0	-0.076	-
育发液 B	>1000	>1000	1.0	-0.014	-
育发液 C	0.53ml/L	9.08ml/L	17.37	0.559	+

2.2 中性红法试验结果

预测 8-MOP 有光毒性, SDS 无光毒性; 预测育发液 A、B 无光毒性, 育发液 C 有光毒性。(见表 2)

表 2 中性红法试验结果

	+UVA EC50(mg/L)	-UVA EC50(mg/L)	PIF	MPE	有无光毒性
8-MOP	16.02	216.18	13.65	0.168	+
SDS	27.19	28.78	1.125	0.0	-
育发液 A	>10ml/L	>10ml/L	1.0	0.0	-
育发液 B	>1000	>1000	1.0	0.0	-
育发液 C	0.86ml/L	>10ml/L	>11.54	0.263	+

发液 C 有光毒性。(见表 3)

表 3 动物试验结果

动物种属	动物数(只)	性别	阳性动物数(只)	有无光毒性	1h	24h	48h	72h
8-MOP	6	雌	6	+	0.00±0.00	5.00±0.00	4.00±1.10	3.50±0.55
SDS	6	雄	0	-	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
育发液 A	6	雌	0	-	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
育发液 B	6	雌	0	-	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
育发液 C	6	雄	5	+	0.00±0.00	2.17±1.47	1.83±1.17	0.83±0.98

2.4 三种方法结果比较

三种方法的检测结果一致, 三种方法均能正确的判定光毒阳性物质和光毒阴性物质。(见表 4)

表 4 三种光毒试验结果比较

	3T3 MTT 试验	3T3 NRU 试验	豚鼠光毒试验
8-MOP	+	+	+
SDS	-	-	-
育发液 A	-	-	-
育发液 B	-	-	-
育发液 C	+	+	+

3 讨论

本研究采用三种不同的方法检测 5 种物质的光毒性, 其中含一种已知光毒阳性物质 (8-MOP), 一种已知光毒阴性物质 (SDS), 还有 3 种未知光毒性物质。结果表明三种方法均能正确的判定光毒阳性物质和阴性物质, 说明试验系统可靠。对剩余三种未知物质的检测结果一致, 说明三种方法有较好的一致性, 即体外试验在一定程度上可以替代动物体内试验。但国内有研究表明 3T3 NRU 试验与动物试验的结果有一定的出入^[5]。考虑本研究检测样本数量较小, 故体外试验完全替代动物试验还需要更大样本量更多试验中的测试数据的支持。

MTT 与中性红都是检测细胞存活的方法, MTT 法的原理是活细胞线粒体中的琥珀酸脱氢酶能使外源性 MTT 还原为水不溶性的蓝紫色结晶甲瓚并沉积在细胞中, 且 MTT 结晶形成的量与细胞数成正比; 中性红比色法的原理是中性红能与活细胞胞浆中的阴离子结合而浓缩于活细胞中并不被细胞洗涤液洗脱, 渗入活细胞的中性红量与活细胞数量呈正比。有研究表明中性红法比 MTT 法检测细胞活性更灵敏^[6], 也有学者建议 MTT 法做 NRU 法的补充^[7]。笔者认为 MTT 与中性红法的灵敏度相近, 但是 MTT 法的操作更简单些, 特别是与细胞共培养后只需弃去培养液加 DMSO 显色即可, 而中性红法因中性红可能被 96 孔板吸附而需要洗涤 2 遍, 增加了结晶的损失而造成误差。

MTT PT 与 NRU PT 都是体外细胞培养检测光毒性的方法, 样品需以溶液的形式加入细胞培养液中, 所以需要注意样品的处理, 特别是不溶于水的样品的处理。比如本实验中育发液 B 是凝胶, 笔者尝试水、乙醇、丙酮和 DMSO 进行溶解, 结果乙醇溶解的最好。在实际检测工作中遇到的样品种类繁多, 最好能根据样品的配方有选择性的选取溶剂进行实验。

(致谢: 在此感谢广东省疾病预防控制中心杨颖提供的帮助!)

参考文献:

[1] GB/T 21769-2008, 化学品体外 3T3 中性红摄取光毒性试验方法 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2008.

- [2] OECD GUIDELINE FOR TESTING OF CHEMICALS, In Vitro 3T3 NRU phototoxicity test[S]. 2004, 432.
- [3] 徐薇,蒋中仁,金伟.皮肤光毒性试验方法研究.预防医学情报杂志[J],2010,26(11):925-927.
- [4] 中华人民共和国卫生部.化妆品卫生规范(2007年版)[M].北京:出版社,115-117.
- [5] 杨颖,熊习昆,杨杏芬.3T3 细胞光毒替代实验的建立及在化妆品评价中的应用.中华预防医学杂志[J],2007,41(6):479-482.
- [6] 闻平,何艳,叶庆林.中性红比色法检测细胞增殖活性.镇江医学院学报[J],2000,10(1):161-163.
- [7] 杨晓冉,郑洪艳,董益阳.两种 3T3 光毒性试验方法在防晒化妆品光毒性评价中的应用.中国组织工程研究与临床康复[J],2009,19(34):6765-6768.

收稿日期:2012-03

