



# 基于树突状细胞激活建立皮肤致敏的体外方法

陈健<sup>1,3</sup>, 柯逸晖<sup>1,3</sup>, 陈或<sup>2</sup>, 谈伟君<sup>3</sup>, 程树军<sup>2\*</sup>

(1. 广州市华代生物科技有限公司, 广州 510623; 2. 广东检验检疫技术中心, 广州 510623;  
3. 广东药科大学, 广州 510006)

**【摘要】** 接触性过敏性皮炎是由外源化合物引起的多种细胞共同参与的IV型迟发变态反应,传统动物实验选用豚鼠或小鼠。随着皮肤致敏有害结局通路(AOP)研究的深入,为基于分子起始事件和关键事件的替代方法开发提供了思路。树突状细胞(DC)激活在AOP通路中起到了承上启下的关键作用,基于DC开发了多项替代方法,有的方法经过验证已被列入测试指南。本文从树突细胞的筛选,检测参数的特征,方法的局限性和适用性进行了讨论,并对树突细胞与其它细胞之间相互作用、共培养体系、人体芯片等方面的进展作了介绍,为进一步优化致敏检测的体外替代方法提供参考。

**【关键词】** 皮肤致敏;树突状细胞;替代方法;有害结局通路

**【中图分类号】** R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2018) 05-0114-05

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2018.05.021

## *In vitro* method for skin sensitization based on dendritic cell activation

CHEN Jian<sup>1,3</sup>, KE Yihui<sup>1,3</sup>, CHEN Yu<sup>2</sup>, TAN Weijun<sup>3</sup>, CHENG Shujun<sup>2\*</sup>

(1. Guangzhou Chn-Alt Biotech. Co., Ltd., Guangzhou 510623, China. 2. Guangdong Inspection and Quarantine Technology Center, Guangzhou 510623. 3. Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006)

**【Abstract】** Allergy contact dermatitis is a type IV delayed type hypersensitivity that is induced by exogenous compounds and involves many cell types. Traditional animal testing uses guinea pigs or mice as a model. With progress of the adverse outcome pathway (AOP) on skin sensitization, a concept for development of alternative methods based on a molecular initiating event and key events is provided. Dendritic cell (DC) activation plays a key role in the AOP. Many alternative methods have been developed, with several methods validated and accepted as guidance for assays. This paper examines DC screening, characteristics of test parameters, and limitations and applicability of DC-derived methods. Progress on interactions between DCs and other cells, co-culture systems, and the human body-on-a-chip will also be introduced. Altogether, this paper will provide information for optimization of *in vitro* alternative methods for sensitization detection.

**【Key words】** skin sensitization; dendritic cells, DCs; alternative methods; adverse outcome pathway, AOP

接触性过敏性皮炎(allergy contact dermatitis, ACD)是由T淋巴细胞介导的抗原特异性皮肤过敏反应,以抗原刺激后局部皮肤出现一系列的皮肤炎

症细胞浸润、炎症介质释放为特征,属于迟发IV型变态反应。临床主要表现为瘙痒、红斑、红肿等症状,对患者的正常生活和工作影响较大。日常生活

[基金项目] 广州经济技术开发区国际科技合作项目(编号:2017GH11)。

[作者简介] 陈健(1990—),男,硕士研究生,研究方向:皮肤致敏替代方法研究。E-mail: chenjian1238@126.com

[通信作者] 程树军(1971—),男,研究员,从事替代方法研发和标准化。E-mail: chengsj@126.com

中能引起 ACD 的物质繁多,如化妆品、香精香料等,因此对这些物质的致敏性检测也显得至关重要。法规认可的皮肤致敏检测的动物实验方法是豚鼠最大值试验(guinea pig maximinativ test, GPMT)和封闭涂皮法(buchler test, BT),后来,开发了小鼠局部淋巴结试验(local lymph node assay, LLNA),这些试验需要大量动物,耗时长、成本高。随着替代方法的兴起,ACD 发生过程与角质细胞、树突状细胞和 T 细胞之间关系逐渐清晰,在有害结局通路(adverse outcome pathway, AOP)理论指导下,皮肤致敏替代方法研究取得了显著的进步<sup>[1]</sup>,其中对于树突状细胞激活这一关键事件的研究最为活跃。

## 1 皮肤致敏的 AOP 理论与树突状细胞的关键作用

基于 AOP 理论,皮肤致敏的 AOP 通路可分为一个起始事件和三个关键事件(key event, KE)。分子起始事件(molecular initiating event, MIE):具有亲电作用的化学物质与表皮蛋白质的亲核位点共价结合,形成半抗原。角质细胞激活(KE1):角质细胞对半抗原-蛋白质复合物的摄取,诱导炎症因子生成。树突状细胞(dendritic cell, DC)激活(KE2),DC 摄取和呈递抗原,未成熟的表皮 DC 识别半抗原蛋白复合物,表面特征性标志物表达上升,同时释放细胞因子,迁移至淋巴结,通过主要组织相容性复合物(major histocompatibility complex, MHC)分子将半抗原-蛋白质复合物呈递给 T 细胞。T 细胞活化/增殖(KE3):T 细胞识别细胞表面的 MHC 呈递的抗原肽被激活形成记忆 T 细胞,当皮肤再次接触致敏原时,这些记忆 T 细胞就会增殖,诱发 ACD。针对这些关键事件开发出不同机制的皮肤致敏的替代方法,其中直接肽链反应分析(direct peptide reaction assay, DPRA)、KeratinSens、U-SENS<sup>TM</sup>和人细胞系活化试验(human cell line activation test, h-CLAT)已经通过验证,被经济合作和开发组织(Organization for Economic Co-operation and Development, OECD)接受为测试指南 442C、442D 和 442E<sup>[2]</sup>。

在 AOP 通路中,DC 作为机体功能最强的专职抗原呈递细胞(antigen presenting cells, APC),向上可以摄取呈递抗原,向下可以活化 T 细胞,激活过敏免疫反应,在 AOP 通路中作为关键事件 2 起到承上启下的作用。其中,表皮和胃肠上皮中的 DC 又称为朗格汉斯细胞(Langerhans cell, LC),LC 在活化成熟时,II 型 MHC、共刺激分子(CD86、CD54、CD80

和 CD40)等表达上调。但由于原代树突状细胞在诱导分化和提纯方面存在很大困难,因此有研究选用具有相同性质的类树突状细胞如 THP-1 细胞、U937 细胞等来开发替代方法。

## 2 基于 KE2 的体外方法

### 2.1 h-CLAT 体外致敏检测方法

THP-1 细胞是一类单核细胞,与 LC 功能相似,实验中不需要诱导分化就能准确判断出化合物的致敏性,大量研究发现 THP-1 细胞相比其他单核细胞更稳定,准确率更高。使用 THP-1 细胞构建的 h-CLAT 方法于 2016 年被 OECD 列为测试指南 442E。实验时先测定受试物的细胞毒性,确定 75% 细胞活率浓度,再将 THP-1 细胞暴露受试物 24 h,通过流式细胞仪检测 CD86 和 CD54 的表达,对受试物致敏性进行判断。陈彧等<sup>[3]</sup>采用 h-CLAT 方法,对 11 种已知成分化学物质和 9 种未知植物样品和日用品进行预测,准确区分了 11 种已知参考物质的皮肤致敏性,对 9 种未知样品的分类结果与动物实验结果一致。Sakaguchi 等<sup>[4]</sup>也使用同样的方法对 8 种防腐剂的皮肤致敏性进行了评价。Parise 等<sup>[5]</sup>在分析 23 种物质致敏性时发现,细胞表面标志物 CD86 表达情况和细胞炎症因子白介素 8(interleukin-8, IL-8)释放量之间存在正相关,说明 IL-8 也可以作为鉴别化学物质致敏性的指标。也有学者发现白介素 1 $\beta$ (interleukin-1 $\beta$ , IL-1 $\beta$ )释放量与受试物致敏性之间存在关联。Ashikaga 等<sup>[6]</sup>研究发现在 THP-1 细胞,能观察到致敏暴露组 CD86 与 MHC II 类分子的表达较非致敏组明显上升,提示 CD86、MHC II 类分子可能是区分致敏物与刺激物的敏感指标。研究表明,h-CLAT 在预测亲脂性物质致敏性时灵敏度和准确度分别为 95% 和 88%<sup>[7]</sup>。

### 2.2 U-SENS<sup>TM</sup> 体外致敏检测方法

U937 细胞是来源于人体骨髓系的单核细胞,在细胞被活化后其表面标志物 CD86 会特异性上升,因此该细胞也可用于模拟 DC 细胞激活引起 T 细胞增殖的关键步骤。U-SENS<sup>TM</sup>就是基于该细胞系建立的体外致敏检测方法,将受试物与 U937 细胞共孵育后,定量检测细胞表面标志物 CD86 表达的变化,从而对受试物致敏性进行判断。Alépée 等<sup>[8]</sup>报道 4 个实验室使用 U-SENS<sup>TM</sup>方法对 24 种物质的检测结果,发现该方法的实验室内可重复性约为 90%,实验室间重复性为 84%。对 24 种受试物进

行预测的敏感性、特异性和准确度均高于 93.8%。Piroird 等<sup>[9]</sup>通过将 175 种物质的 U-SENS<sup>TM</sup> 评价结果与人体数据和 LLNA 试验结果进行对比,发现 U-SENS<sup>TM</sup> 的特异性为 79%,灵敏度为 90%,准确度为 85%。与 h-CLAT 方法相比,检测参数只有 CD86,可以作为组合测试策略的一部分。该方法在 2017 年作为补充方法列入 OECD 测试指南 OECD442E。

### 2.3 外周血单核细胞试验

外周血单核细胞(peripheral blood monocyte-derived cell, PBMD)是从新鲜血沉棕黄层中分离得到的单核细胞,使用粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(granulocyte-macrophage colony stimulating factor, GM-CSF)和白介素 4(interleukin-4, IL-4)诱导分化形成 CD1a<sup>-</sup>/CD14<sup>+</sup> 单核细胞。在暴露于受试物 48 h 后,根据细胞表面 CD86 的表达情况判断受试物致敏性。Karschuk 等<sup>[10]</sup>使用诱导的 CD1a<sup>-</sup>/CD14<sup>+</sup> 单核细胞对受试物的致敏性进行了分析,发现相比于刺激性化学物和非致敏性化学物质,致敏性化学物会特异性使细胞 CD86 表达增加,而 CD83 与人白细胞 DR 抗原(human leukocyte antigen-DR, HLA-DR)则不明显,提示在 PBMD 实验中,同样选择了 CD86 作为评价受试物致敏性的特异性指标。但细胞供体来源不稳定,细胞需要诱导分化。

### 2.4 VITASENS<sup>®</sup> 试验

VITASENS<sup>®</sup> 试验使用来自人脐带血分化的 CD34<sup>+</sup> 祖细胞来对受试物致敏性进行检测,在与受试物共孵育后,通过比较暴露组与溶剂组中趋化因子 2 型受体(chemokine receptor type 2, CCR2)和 cAMP 应答元件调节因子(camp responsive element modulator, CREM)的表达来判断受试物致敏性。将细胞暴露于受试物 24 h 后,使用流式细胞仪测定受试物的 IC<sub>20</sub> 值。然后以测定的 IC<sub>20</sub> 为最低暴露剂量,孵育 6 h 取部分细胞通过 qPCR 分析相关基因的表达,孵育 24 h 后收集全部细胞,使用 qPCR 测定细胞 CCR2 和 CREM 表达情况。Hooyberghs 等<sup>[11]</sup>通过对 10 种致敏物和 11 种非致敏物进行检测,使用 RT-PCR 分析基因表达情况,发现致敏组基因 CREM 和 CCR2 的表达均显著高于非致敏组( $P < 0.05$ )。Lambrechts 等<sup>[12]</sup>使用该方法对 15 种已知致敏性化学物进行预测。实验中需要使用 qPCR 技术,实验成本相对其他体外替代方法较高,且不同来源的 CD34<sup>+</sup> 祖细胞也会影响到实验结果的稳定性。

### 2.5 基因组过敏原快速检测方法

MUTZ-3 是人类急性骨髓单核细胞白血病细胞系,其在免疫反应中具有激活特异性 T 细胞的能力,并且在成熟过程中也其细胞相关表型变化也与 DC 相似,能够表达 CD1a、HLA-DR 和 CD54,同时还能低表达 CD80 和 CD86。利用 MUTZ-3 细胞在免疫反应中的特性建立了体外致敏预测的基因组过敏原快速检测方法(genomic allergen rapid detection, GARD)。Johansson 等<sup>[13]</sup>在研究使用 20 种非致敏物和 20 种致敏物刺激 MUTZ-3,共孵育 24 h 后,通过对 MUTZ-3 细胞的基因表型进行分析,确定了 200 个相关基因的表达与受试物致敏性存在相关性,也提示该方法在有能力对受试物的致敏性进行预测。但该方法与 VITASENS<sup>®</sup> 相似,检测成本比较高。

### 3 以 KE2 为核心建立组合模型和方法

类树突状细胞作为免疫细胞能够单独用来检测化学物质致敏性,但作为体外系统的单细胞体系,在评价化合物致敏性时会因为系统代谢机能不足,对于一些小分子物质或者半抗原类物质还存在缺陷。同时,细胞活率对细胞表面标志物的表达有很大影响,为了改善这种情况,基于单细胞体系的致敏检测系统做出了改良。

#### 3.1 THP-1 细胞与角质细胞共培养模型

角质形成细胞除了构成皮肤的屏障功能,还能通过代谢功能对外源受试物进行处理,并产生和释放炎症因子,同时也可对半抗原或半抗原前体物进行修饰、活化和蛋白结合。在皮肤致敏的 AOP 理论中,角质形成细胞激活是 KE1。基于角质细胞活化的方法可用于筛选致敏物,但由于其并非专职的抗原提呈细胞,因此使用正常角质细胞的测试方法通常预测能力较弱,可以通过对细胞进行基因修饰转染抗氧化元件(如 KeratinoSens 方法)以提高其敏感性,或者与其它方法组合使用。

Hennen 等<sup>[14]</sup>通过将 HaCaT 与 THP-1 细胞联合培养来探讨共培养体系在预测化学物质致敏性中的优势。单独培养 HaCaT 48 h 后,加入受试物和 THP-1 细胞共培养 24 h,分析细胞表面标志物 CD86、CD40 和 CD54 的表达,发现共培养体系中 THP-1 细胞表面标志物的表达量显著增加。并且在实验中发现,使用共培养系统检测化学物质致敏性时,THP-1 细胞表面标志物的表达不受细胞活率影响。使用 CD86 作为生物标志物时,共培养体系还

可以用来区分半抗原物质和半抗原前体物质。这些研究成果对体外致敏评价技术的发展提供了很好的基础。近来, Hennen 等<sup>[15]</sup>使用共培养方法正确区分了 14 种致敏物和 9 种非致敏物, 说明共培养体系能提高致敏检测的灵敏度和特异性。采用静态的两种细胞的共培养模型不仅可用于研究角质细胞与 THP-1 细胞产生致敏反应的机制, 还有助于探讨细胞间的相互作用。

### 3.2 THP-1 细胞与皮肤模型共培养模型

尽管共培养体系能够提升体外致敏检测试验的灵敏度和特异度, 但在处理难溶或不溶性物质时, 仍然存在很大的缺陷。随着组织工程技术的发展, 组织工程皮肤也逐渐被应用到化学品的安全评价中, 如普遍使用的商品化皮肤模型 Episkin<sup>TM</sup>、Epiderm<sup>TM</sup> 和 SkinEthic RHE。皮肤模型经刺激物或变应原处理后会出现细胞活力改变、组织学改变以及细胞因子释放等, 可通过有效手段进行检测, 但是单独皮肤模型不能模拟复杂的生物代谢过程, 并且没有免疫细胞参与, 可能无法对待测物进行有效预测。Cao 等<sup>[16]</sup>使用分离的原代角质形成细胞, 经过培养后分化形成组织工程表皮, 将 THP-1 细胞与组织工程表皮共培养 24 h 后, 将质量浓度 2 g/L DNFB 和 10 g/L SDS 分别取 5  $\mu$ L 均匀涂抹于构建的组织工程表皮表面, 孵育 24 h。孵育完成后使用流式细胞仪分析细胞表面标志物 CD86 和 CD54 的活化情况, 使用 ELISA 试剂盒检测培养液中白细胞介素 1 $\beta$  的水平。结果 DNFB 处理组中, THP-1 细胞表面标志物 CD86 和 CD54 表达量显著增加, 而在 SDS 处理组中则未观察到此现象, 提示该检测模型能用来预测化学物致敏性。

### 3.3 含 LC 的皮肤模型

含免疫细胞的皮肤模型的构建有一定的技术难度, 文献报道了一种含有功能性 LC 细胞的皮肤模型, 采用 MUTZ-3 来源的 LC 细胞, 以模拟人体皮肤的方式局部接触抗原或刺激物, 可以启动固有的免疫应答<sup>[17]</sup>。模型开发的下一步是引入 T 细胞, 用于研究获得性免疫反应。把含 LC 细胞的皮肤模型与 T 细胞共培养, 可以实现把 AOP 通路中三个关键事件的整合成一个实验系统。

### 3.4 皮肤致敏芯片

THP-1 细胞与 HaCaT 细胞, 或者与皮肤模型的共培养模型, 是一种静态水平的研究两种或多种细胞间相互作用的模型。随着微流控技术的发展, 小

型化、高通量的模拟人体皮肤血液流动的动态环境的装置被开发出来, 利用这种皮肤致敏芯片系统, 可实现将 THP-1 细胞与角质细胞或者皮肤模型动态连接起来, 使用计算机进行精确控制、微量加样和实时检测相关参数。对于精确研究低致敏物质的量效关系、模拟生理状态下细胞之间的交叉对话 (cross-talking), 深入了解细胞表面标志物、炎性因子释放和基因组的调控提供了理想的模型。目前, 使用皮肤模型与皮肤附属器或机体其它细胞组合的人体芯片研究已经开始<sup>[18]</sup>。

## 4 结论与展望

随着 ACD 机制的逐渐被阐明, 基于 AOP 通路中 KE2 开展的研究和建立的体外致敏检测方法越来越多, 更多的方法经过验证被用于指导化学品、药品或其它物质皮肤致敏的检测。目前, 基于树突状细胞的方法在研发和使用时应注意以下几个问题: ①选择接近体内树突细胞的细胞系: 目前用于 KE2 检测的细胞种类较多, 要根据研究需要寻找和选用不同的细胞; ②了解检测方法所依赖的细胞系的局限性和适用性: 如 THP-1 与 U-973 的细胞表面标志物类型和强弱不同, 使用时应记录其表型特征, 并建立细胞质量控制档案; ③使用组合方法: 实验室应建立 AOP 通路中的至少 3 个方法, 并根据整合测试策略 (integrated approaches to testing assessment, IATA) 的原则建立整合模型, 以提高致敏预测的准确性; ④建立体外数据库: 皮肤致敏体外方法的开发处于推广和数据积累阶段, 实验室应积累不同化学品原料的测试数据, 反过来对方法进行优化; ⑤合理推广应用范围: 体外方法的开发主要是根据单一化学品的测试建立模型, 实际应用中可能用于医疗器械浸提物、植物提取物、混合物等复杂样品的测试, 应在使用中积累经验, 合理推广替代方法的使用范围, 必要时与其它方法互相验证<sup>[19]</sup>。相信, 在 AOP 通路的指导下, 皮肤致敏的体外方法开发将朝着进一步降低实验成本、提高预测准确性、使用组合模型和提高检测通量的方向发展。成套和标准化替代方法的开发, 在丰富毒性测试检测工具箱的同时, 进一步减少了动物的使用, 也起到了提高消费品安全的作用。

### 参考文献:

- [1] 瞿小婷, 程树军, 秦瑶, 等. 有害结局通路指南及毒性测试应用分析 [J]. 日用化学工业, 2016, 46(8): 473-478.

- [ 2 ] 程树军. 化妆品评价替代方法标准实施指南 [M]. 北京: 中国标准出版社, 2017.
- [ 3 ] 陈彧, 喻欢, 秦瑶, 等. 基于 THP-1 细胞的皮肤致敏体外检测方法 [J]. 中国比较医学杂志, 2017, 27(4): 94 - 102.
- [ 4 ] Sakaguchi H, Miyazawa M, Yoshida Y, et al. Prediction of preservative sensitization potential using surface marker CD86 and/or CD54 expression on human cell line, THP-1 [J]. Arch Dermatol Res, 2007, 298(9): 427 - 437.
- [ 5 ] Parise CB, Sá-Rocha VM, de Moraes JZ. Skin sensitizer identification by IL-8 secretion and CD86 expression on THP-1 cells [J]. Toxicol In Vitro, 2015, 30(1): 318 - 324.
- [ 6 ] Ashikaga T, Hoya M, Itagaki H, et al. Evaluation of CD86 expression and MHC class II molecule internalization in THP-1 human monocyte cells as predictive endpoints for contact sensitizers [J]. Toxicol In Vitro, 2002, 16(6): 711 - 716.
- [ 7 ] Takenouchi O, Miyazawa M, Saito K, et al. Predictive performance of the human Cell Line Activation Test (h-CLAT) for lipophilic chemicals with high octanol-water partition coefficients [J]. J Toxicol Sci, 2013, 38(4): 599 - 609.
- [ 8 ] Alépée N, Piroird C, Aujoulat M, et al. Prospective multicentre study of the U-SENS test method for skin sensitization testing [J]. Toxicol In Vitro, 2015, 30(1): 373 - 382.
- [ 9 ] Piroird C, Ovigne JM, Rousset F, et al. The Myeloid U937 Skin Sensitization Test (U-SENS) addresses the activation of dendritic cell event in the adverse outcome pathway for skin sensitization [J]. Toxicol In Vitro, 2015, 29(5): 901 - 916.
- [ 10 ] Karschuk N, Tepe Y, Gerlach S, et al. A novel *in vitro* method for the detection and characterization of photosensitizers [J]. PLoS One, 2010, 5(12): S58.
- [ 11 ] Hooyberghs J, Schoeters E, Lambrechts N et al. A cell-based *in vitro* alternative to identify skin sensitizers by gene expression [J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2008, 231(1): 103 - 111.
- [ 12 ] Lambrechts N, Nelissen I, Tendeloo VV, et al. Functionality and specificity of gene markers for skin sensitization in dendritic cells [J]. Toxicol Lett, 2011, 203(2): 106 - 110.
- [ 13 ] Johansson H, Albrekt AS, Borrebaeck CA, et al. The GARD assay for assessment of chemical skin sensitizers [J]. Toxicol In Vitro, 2013, 27(3): 1163 - 1169.
- [ 14 ] Hennen J, Aeby P, Goebel C, et al. Cross talk between keratinocytes and dendritic cells: impact on the prediction of sensitization [J]. Toxicol Sci, 2011, 123(2): 501 - 510.
- [ 15 ] Hennen J, Blömeke B. Keratinocytes improve prediction of sensitization potential and potency of chemicals with THP-1 cells [J]. Altex, 2017, 34(2): 279 - 288.
- [ 16 ] Cao YP, Ma PC, Liu WD, et al. Evaluation of the skin sensitization potential of chemicals in THP-1/keratinocyte co-cultures [J]. Immunopharmacol Immunotoxicol, 2012, 34(2): 196 - 204.
- [ 17 ] Kosten IJ, Spiekstra SW, DeGruj TD, et al. MUTZ-3 derived Langerhans cells in human skin equivalents show differential migration and phenotypic plasticity after allergen or irritant exposure [J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2015, 287(1): 35 - 42.
- [ 18 ] Ramadan Q, Ting FC. *In vitro* micro-physiological immune-competent model of the human skin [J]. Lab Chip, 2016, 16(10): 1899 - 1908.
- [ 19 ] Coleman KP, McNamara LR, Grailer TP, et al. Evaluation of an *in vitro* human dermal sensitization test for use with medical device extracts [J]. Appl In Vitro Toxicol, 2015, 1(2): 13.

[ 收稿日期 ] 2017 - 11 - 06