

豚鼠皮肤光过敏试验方法的建立

杨文祥, 孙凡中, 王成, 侯学文, 樊柏林

(湖北省疾病预防控制中心, 武汉 430079)

【摘要】 目的 探索并建立豚鼠光过敏试验的方法。方法 采用 TBS 作为阳性对照物,同时设立阴性对照组。分别于第 1 天、第 4 天、第 7 天对豚鼠皮肤进行 UV-A 紫外光诱导,诱导剂量紫外光强度为 30 J/cm^2 ;于第一次诱导后 28 d 对豚鼠皮肤采用 UV-A 紫外光激发,激发强度为 9 J/cm^2 。结果 阴性对照组 24 h、48 h、及 72 h 豚鼠光过敏试验阳性率均为 0,阳性对照组为 24 h、48 h、及 72 h 豚鼠光过敏试验阳性率均为 100%。结论 本研究成功建立了豚鼠皮肤光过敏试验模型,TBS 可作为阳性对照物。

【关键词】 豚鼠;光过敏;TBS

【中图分类号】 Q95-336; R332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2011)07-0067-04

doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2011.07.015

Establishment of the Skin Photosensitization Study Method in Guinea Pigs

YANG Wen-xiang, SUN Fan-zhong, WANG Cheng, HOU Xue-wen, FAN Bo-lin
(Hubei Provincial Center for Disease Control and Prevention, Wuhan, 430079, China)

【Abstract】 Objective To explore and establish the method for the skin photosensitization in guinea pigs. **Methods** TBS was used as the positive control, and the Acetone as the negative control. The shaved skin of the guinea pigs was irradiated with UV-A radiation of 30 J/cm^2 repeated every 2 days for 3 consecutive days. After 4 weeks of initial sensitization, the skin of the guinea pigs was irradiated with UV-A radiation of 9 J/cm^2 . **Results** Positive ratio of the negative control 24h, 48h and 72h after irradiating was 0, and the positive control was 100%. **Conclusions** The skin photosensitization model was established successfully, and the TBS used as the positive control was available.

【Key words】 Skin Photosensitization; Guinea Pigs; TBS

光过敏反应为 IV 型过敏反应的特殊类型,是局部给药后,涂布在皮肤中具有感光作用的化学物质与光线产生复合作用,给受试物后皮肤对光线产生的不良反应,主要表现为药疹、接触性皮炎、剥脱性皮炎等。卫生部 2007 年颁布的《化妆品卫生规范》中要求,化妆品新原料如具有紫外线吸收特性,则需进行皮肤光毒性试验及皮肤光过敏试验。关于豚鼠皮肤光过敏试验,国内很少有相关报道,

本研究旨在探讨建立豚鼠皮肤光过敏试验方法,供测试化妆品新原料和新化学物质的皮肤光过敏性时参考。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 试验动物:普通级 Hartley 豚鼠,雄性,12 只 $282.7 \pm 37.0 \text{ g}$,湖北省实验动物研究中心提供

[作者简介]杨文祥,男,硕士,研究方向:食品、药品、化妆品、农药等相关产品毒理学。E-mail: ywx_21@163.com。

[通讯作者]樊柏林,男,主任医师,研究方向:毒理学。E-mail: vanbolin@yahoo.com.cn。

表 1 豚鼠分组及致敏激发剂量
Tab. 1 Group Identification of Guinea Pigs

组别 Group	性别 Sex	动物数 N	致敏 Sensitization		激发 Challenge	
			剂量 (mL/点) Vol. (mL/site)	浓度 (%) Conc. (%)	剂量 (mL/点) Vol. (mL/site)	浓度 (%) Conc. (%)
阴性对照组 Negative group	雄 male	5	0.1	0	0.02	0
阳性对照组 Positive group	雄 male	5	0.1	2	0.02	2

[SCXK(鄂)2008-0005], 实验动物质量合格证号为(00006850)。豚鼠饲养于湖北省实验动物研究中心豚鼠房, 该设施使用许可证号为 SYXK(鄂)2008-0014, 设施使用使用证明编号为(00008933)。环境温度 $23^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$, 相对湿度 $55\% \pm 15\%$, 光照时间 12 h/12 h, 光强度 150 ~ 300 lux。

1.1.2 试剂: 阳性物: 3,5,4'-Tribromosalicylanilide (TBS), 用丙酮配制成 2% 溶液备用(批号 T0356, 东京化工工业株式会社(T. C. I)); 溶剂: 丙酮(批号 20081230, 国药集团化学试剂有限公司)

1.1.3 仪器设备: UV-A 光源: MUA-165 (日本 MEJIRO GENOSSEN 公司); UV-A 紫外辐照计(双通道)(配 UV-365 探头, 北京师范大学光电仪器厂); UV-B 紫外辐照计(双通道)(配 UV-254 探头, 北京师范大学光电仪器厂)。

1.2 方法

1.2.1 动物分组:

动物分为两组, 分别为阴性对照组和阳性对照组。阳性对照为 TBS (2% 浓度, 丙酮作为溶剂)^[1-3], 阴性对照为丙酮。具体分组及剂量见表 1。

1.2.2 诱导和致敏

1.2.2.1 辐照时间的确定: 将豚鼠固定板放置在紫外辐照装置的工作面上, 在紫外光辐照处放置紫外辐照计, 并调整紫外辐照计的测定面高度大概在豚鼠辐照点高度, 测定其中一个透镜的辐照强度, 测定值为 $40.0 \text{ mW}/\text{cm}^2$, 再将辐照计分别放到其余 4 个透镜下方相同高度处, 调整透镜的高度, 使其辐照值为 $40.0 \text{ mW}/\text{cm}^2$ 。按照致敏时辐照强度为 $30 \text{ J}/\text{cm}^2$ 要求^[1], 确定辐照时间为 750.0 s, 设定紫外辐照装置自动时间为 750.0 s。

1.2.2.2 致敏方法: 试验前一天, 对豚鼠颈背部皮肤剃毛, 剃毛范围为 $3.0 \text{ cm} \times 3.0 \text{ cm}$ 。诱导和致敏时采用俯卧式固定豚鼠四肢, 均匀涂抹配置好的供试品、阳性物质或阴性对照品 0.1ml 于剃毛部位, 30min 后置于紫外辐照装置上进行辐照。按照计算的辐照时间照射 750.0 s, 完毕后取下固定的豚鼠,

用 37°C 左右注射用水擦拭供试品。

致敏时间及次数: 致敏分为 3 次, 分别为第 1 天、第 4 天、第 7 天^[4]。致敏方法同上。

1.2.3 激发

1.2.3.1 辐照时间的确定: 按照致敏时的方法计算辐照时间, 设定豚鼠辐照点的辐照强度为 $40.0 \text{ mW}/\text{cm}^2$, 按照致敏时辐照强度为 $9 \text{ J}/\text{cm}^2$ 要求^[1], 确定辐照时间为 225.0 s, 设定紫外辐照装置自动时间为 225.0 s。

1.2.3.2 激发方法: 试验前一天, 对豚鼠尾背部皮肤剃毛, 剃毛范围为 $4.0 \text{ cm} \times 4.0 \text{ cm}$, 在剃毛区域每一侧对称的标记一正方形区域 ($1.5 \text{ cm} \times 1.5 \text{ cm}$), 一共 A、B、C、D 4 个区域供激发用(见图 1)。采用俯卧式固定豚鼠四肢, 均匀涂抹配置好的供试品、阳性物质或阴性对照品 0.02ml 于剃毛部位 A、B 点, C、D 点不涂药, 30 min 后置于紫外辐照装置上进行辐照, 辐照时间照射 225.0 s。

辐照时采用组合的方式进行, 豚鼠左侧 2 个区域辐照(A、C 点), 右侧 2 个区域(B、D 点)用锡纸包裹不辐照, 比较各区域皮肤反应情况。完毕后取下固定的豚鼠, 用 37°C 左右注射用水擦拭供试品。

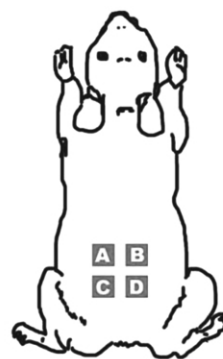


图 1 豚鼠光过敏试验激发示意图

Fig. 1 Challenge sketch map of photosensitization

1.2.3.3 激发时间及次数: 采用一次激发的方式, 于第一次致敏诱导后第 28 天进行激发。

1.2.4 观察指标:

每天观察每只动物的临床表现, 给予光激发后

的 24、48、72 h 观察皮肤反应。每只动物在获取、分组、致敏第一天、致敏期间每周、激发前一天、结束时称取体重记录。于光激发后的第 24、48、72 h,按照表 2(Draize scale) [5] 评价皮肤红斑、焦痂形成和

水肿评分。分值为 1~4 分的动物判定为光致敏阳性,供试品的光致敏阳性率采用下表公式计算。供试品的光致敏潜力根据平均皮肤评分分值和阳性率来判定(见表 3)。

表 2 豚鼠光过敏试验皮肤反应的观察 [5]

Tab. 2 Observation of skin reaction

分值 Score	红斑和焦痂形成 Erythema and eschar formation	水肿 Edema
0	无红斑 No erythema	无 No edema
1	轻微可见红斑 Very slight erythema	轻微水肿 Very slight edema
2	轻度红斑 Well defined erythema	轻度水肿 Slight edema
3	中度到重度红斑 Moderate to severe erythema	中度水肿(凸起约 1mm) Moderate edema (raised approximately 1 mm)
4	严重红斑至焦痂形成 Severe erythema to eschar formation	严重水肿(凸起超过 1mm 且延伸超出暴露区域) Severe edema (raised more than 1 mm and extending beyond area of exposure)

评价分值 = 分值总和 / 动物数

Mean = Sum of scores / No. of animals

表 3 豚鼠光过敏试验皮肤反应的评价 [5]

Tab. 3 Evaluation of skin photo sensitization in guinea pigs

光致敏阳性率(%) Sensitization rate (%)	强度 Intensity	分级 Class
0~8	I	极弱 Very weak
9~28	II	弱 Weak
29~64	III	中度 Moderate
65~80	IV	强度 Strong
81~100	V	非常强 Very strong

致敏率(%) = (阳性动物数 / 动物数) × 100。

Sensitization rate (%) = (No. of positive animals / No. of animals) × 100.

豚鼠均可见紫外线照射后立即出现轻度红斑,包括涂药区域以外紫外照射部位也出现轻度红斑;红斑在照射后 4 d 左右消失。

2.2 激发后皮肤反应评分结果

阳性对照组(TBS)覆盖铝箔侧 B、D 点(UV-A 未照射区域)均为出现红斑及水肿反应;阳性对照组(TBS)未覆盖铝箔侧(UV-A 照射区域)A 点(给药区域)5 只豚鼠均出现轻度至中度红斑,2 只可见皮肤轻度水肿,B 点(未给药区域)5 只豚鼠均未见红斑或水肿反应。

阴性对照组阳性率为 0,阳性对照组阳性率为 100%。评分结果见表 4。

2 结果

2.1 豚鼠致敏期间皮肤反应情况及全身反应

豚鼠致敏期间,阴性对照组和阳性对照组所有

表 4 豚鼠光过敏反应激发评分表

Tab. 4 Skin reactions in photosensitization test in guinea pigs

组别 Group	激发浓度 (%) Conc. of challenge	观察时间 (hr) Observation time(hr)	UV	评分 Score										阳性率(%) Positivity (%)	
				红斑及焦痂 Erythema					水肿 Edema						
				0	1	2	3	4	0	1	2	3	4		
阴性对照组 Negative group	0	24	+	5	0	0	0	0	5	0	0	0	0	0	
			-	5	0	0	0	0	5	0	0	0	0		
		48	+	5	0	0	0	0	5	0	0	0	0		0
			-	5	0	0	0	0	5	0	0	0	0		
		72	+	5	0	0	0	0	5	0	0	0	0		0
			-	5	0	0	0	0	5	0	0	0	0		
阳性对照组 Positive group	2	24	+	0	2	3	0	0	5	0	0	0	0	100	
			-	5	0	0	0	0	5	0	0	0	0		
		48	+	0	2	3	0	0	4	1	0	0	0	100	
			-	5	0	0	0	0	5	0	0	0	0		
		72	+	0	1	4	0	0	3	2	0	0	0	100	
			-	5	0	0	0	0	5	0	0	0	0		

UV +: UV-A 照射区域; UV -: UV-A 未照射区域

Note: UV +: UV-irradiated; UV -: non-irradiated

3 讨论

豚鼠皮肤光过敏试验在国内开展很少,在实验过程中会出现很多问题,本试验将实验过程中出现的问题及解决方法同大家交流。

3.1 阳性物溶剂的问题

TBS 一般采用丙酮溶解,每次配制阳性物时需要现配现用^[1,3]。

3.2 供试品诱导和激发浓度的确定

通过预试确定供试品致敏及激发浓度。将供试品采用倍比稀释的方式,以 0.2 mL/点涂抹于豚鼠皮肤各区域,并用纱布和玻璃纸包裹 4 h 左右,观察 24 h 和 48 h 刺激反应。以最小刺激浓度作为致敏浓度,最大无刺激浓度作为激发浓度^[3,5,6]。

3.3 关于照射部位皮肤处理的问题

国外文献报道一般采用胶带(3 M)将照射部位皮肤角质层充分的粘附,以利于供试品或阳性物的吸收^[1,4]。

3.4 关于照射强度的问题

UV 光源在照射过程中,较为容易产生的问题是皮肤表层发热导致灼伤,因而影响皮肤红斑、水肿反应的评价,因此,实验过程中,建议在保证照射剂量的前提下,尽量采用较高强度的 UV-A 光照,从而缩短照射时间,减少因长时间照射所导致的皮肤灼伤^[1]。

3.5 关于红斑和水肿的评价

豚鼠光过敏试验阳性的判断需要非常细致的观察,观察时,一定要将豚鼠表层被毛剔除干净,同时要避免因剃毛过程中剃刀对皮肤造成的损伤而导致误判。

3.6 关于光过敏试验和光毒性试验皮肤反应的判定问题

豚鼠皮肤光过敏反应和豚鼠皮肤光毒性反应的皮肤反应均表现为红斑、水肿等皮肤反应。光毒性主要是由光直接加强化学物质所致的原发性皮肤反应,而未通过机体免疫机制,一般由皮肤初次接触受试物,并在光能作用下诱发引起;而光过敏反应则不同,一般化学物质单独与皮肤接触无作用,经过激发接触和特定波长光照射后,局部皮肤出现红斑、水肿、甚至全身反应,而未照射部位不出现此反应。

参考文献:

- [1] Kobayashi I, Hosaka K, Maruo H, et al. Skin toxicity of propranolol in guinea pigs[J]. J Toxicol Sci, 1999, 24(2): 103-112.
- [2] Momma J, Kaniwa M, Sekiguchi H, et al. Dermatological evaluation of a flame retardant, hexabromocyclododecane (HBCD) on guinea pig by using the primary irritation, sensitization, phototoxicity and photosensitization of skin[J]. Eisei Shikenjo Hokoku, 1993(111): 18-24.
- [3] Srivastava L P, Misra R B, Joshi P C. Photosensitizing potential of benzantrone[J]. Food Chem Toxicol, 1990, 28(9): 653-658.
- [4] Obara S, Maruyama K, Ichikawa N, et al. Skin sensitization and photosensitization studies of hydrophobically modified hydroxypropyl methylcellulose in guinea pigs[J]. J Toxicol Sci, 1998, 23 Suppl 3: 553-560.
- [5] Draize J, Woodard G, Calvery H. Methods for the study of irritation and toxicity of substances applied topically to the skin and mucous membranes[J]. Journal of Pharmacology And Experimental Therapeutics, 1944(82): 377-390.
- [6] Carraro C, Pathak M A. Studies on the nature of in vitro and in vivo photosensitization reactions by psoralens and porphyrins[J]. J Invest Dermatol, 1988, 90(3): 267-275.

(修回日期)2011-04-06



注:①阴性对照组,24 h 观察结果;②阳性对照组,24 h 观察结果;③阴性对照组,48 h 观察结果;④阳性对照组,48 h 观察结果;⑤阴性对照组,72 h 观察结果;⑥阳性对照组,72 h 观察结果

Note:①Negative group,result of 24 h;②Positive group,result of 24 h;③Negative group,result of 48 h;④Positive group,result of 48 h;⑤Negative group,result of 72 h;⑥Positive group,result of 72 h