中图分类号: R135 文献标识码: A 文章编号: 1002 - 3127(2012) 06 - 0450 - 04

·实验研究·

利用 BALB/c 3T3 细胞毒性预测急性经口毒性初试剂量的验证研究

吴智君, 王雅文, 程娟

(中国疾病预防控制中心职业卫生与中毒控制所毒理室, 北京 100050)

【摘要】 目的 依据经济合作与发展组织(OECD) 2010 年 7 月正式发布的导则 No. 129 来验证“利用 BALB/c 3T3 成纤维细胞预测急性经口毒性试验初始剂量”在国内实验室的可行性和适用性, 并为建立细胞毒性试验预测急性经口毒性试验初始剂量试验的操作规程提供方法学上的依据。方法 将 BALB/c 3T3 细胞接种于 96 孔板中, 培养 1 d 后染毒。染毒 2 d 后, 用中性红染色 3 h 后解吸, 于 540 nm 下用酶标仪测定吸光度(A) 值。将原始数据进行处理和拟合分析, 得到 IC_{50}(抑制细胞活性 50% 的化学品浓度) 后, 代入预测模型计算, 得到急性经口毒性的 LD_{50} 推测值。试验所用受试物共 8 种, 分别为二甲基亚砜, 乙醇, 氯化钠、葡萄糖以及 4 种本实验室用于大鼠急性经口毒性评价试验的样品。结果 根据国内现行的毒性分级标准可知, 利用细胞毒性试验得出的受试物的 LD_{50} 值与文献所报道的或本实验进行的急性经口试验得到 LD_{50} 值的毒性分级基本一致。结论 利用 BALB/c 3T3 细胞毒性试验可以较为准确的判断急性经口毒性试验的初始剂量。

【关键词】 细胞实验; 急性经口毒性; 替代实验; LD_{50}; IC_{50}

经典的急性毒性试验多采用霍恩氏法(Horns) , 利用该法测定实验动物的半数致死剂量(LD_{50}) 在化学品毒性分级和毒理学研究中发挥了重要作用, 但动物消耗量大, 一次试验至少需要 30 ~ 50 只动物。为减少动物使用量, 经济合作与发展组织(OECD) 在 1992 年、1996 年和 1998 年分别采用了固定剂量法(fixed dose procedure, FDP) 、急性毒性分级法(acute toxic class method, ATC) 和上下法(up/down method, UDP) 3 种方法以替代 Horns 法测定 LD_{50}, 并于 2001 年发布了这 3 种方法的更新版本[1-3]。由于化学品引起动物中毒和细胞死亡之间存在相似的毒性机制, 大量的国际研究项目致力于建立体外细胞毒性和体内动物致死性之间的关系, 以进一步减少动物的使用量。1996 年, 有研究者提出利用细胞毒性试验数据来推测啮齿类动物急性经口试验的初始剂量, 从而降低化学品分类和分级试验中的动物使用量。1998 年, Halle 通过 347 种化学品的细胞毒性 IC_{50}(抑制细胞活性 50% 的化学品浓度) 和啮齿类急性经口毒性 LD_{50} 的数据, 计算出了 log(IC_{50}) 与 log(LD_{50}) 之间的线性关系, 从而建立了通过细胞毒性来预测动物致死性的模型[4-5]。2000 年, 美国替代方法部门间协调验证中心(ICCVAM) 召开“利用体外试验评价急性系统毒性”的国际研讨会上, 进一步提出对此方法进行评价[6]。随后, 美国毒理学替代方法评价中心(NICEATM) 与欧洲替代方法验证中心(ECVAM) 对 72 种物质在 3 个实验室进行了验证试验。结果表明, 利用 BALB/c 小鼠 3T3 成纤维细胞和人上皮细胞(NHK 细胞) 的细胞毒性中性红试验可预测大小鼠的急性经口毒性试验的初始剂量。在 2010 年 7 月, OECD 正式发布了“利用细胞毒性试验预测急性经口毒性试验的初始剂量”的导则 NO. 129[7]。

目前, 国内还未见对此替代方法的可行性和适用性的报道。为推动体外细胞毒性试验在国内化学品毒性分级试验中的应用, 减少动物的使用量, 本项研究依据 NO. 129 来验证“利用 BALB/c 3T3 成纤维细胞预测急性经口毒性试验初始剂量”在国内实验室的可行性和适用性, 并希望为今后建立细胞毒性试验预测急性经口毒性试验初始剂量的试验操作规程提供方法学依据。

1 材料与方法

1.1 细胞株 BALB/c 3T3 成纤维细胞, 购自中国协和医科大学基础所细胞资源中心。培养条件: 温度为 (37 ± 1) ℃; 湿度为 90% ± 5%; 二氧化碳浓度为 5.0% ± 1.0%; 高糖 DMEM(协和医科大学基础所细胞资源中心) ; 10% 胎牛血清(美国 Gibco 公司) ; 4 mmol/L的 L-谷氨酸盐(美国 Sigma 公司) ; 100 IU/ml 青链霉素(北京索莱宝公司) 。

1.2 试剂和受试物 阳性对照十二烷基硫酸钠

作者简介: 吴智君, 硕士, 研究实习员, 研究方向: 毒理学。

通讯作者: 程娟, 博士, 副研究员, 研究方向: 工业毒理学。

© 1994-2013 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

(SLS) 和中性红染料购自美国 Sigma 公司。中性红溶解于含有 5% 的胎牛血清、4 mmol/L 的 L-谷氨酸盐和 100 IU/ml 的青链霉素的高糖 DMEM 中。采用 8 种化学品作为受试物,分别编号为 A ~ H。A、B、C、D 分别为二甲基亚砜、乙醇、氯化钠和葡萄糖。E、F、G、H 为 4 种本实验室用于大鼠急性经口毒性评价试验的样品(E 为无色透明液体; F 为淡黄色透明液体; G 为白色固体,易溶于水; H 为黄色固体,易溶于水)。用含 4 mmol/L的 L-谷氨酰胺和 200 IU/ml 青链霉素的高糖 DMEM 去溶解受试物。受试物在室温下溶解,用之前新鲜配制。溶液清澈无沉淀,每一种浓度受试物配制至少 1 ~2 ml。

1.3 主要仪器 Bio-rad 全波长酶标仪(美国 bio-rad 公司,型号 benchmark plus)。

1.4 试验方法 进行 BALB/c 3T3 细胞中性红试验前,新复苏的 3T3 细胞至少传代 2 次,当细胞长到 50% ~80% 时,通过胰蛋白酶将细胞从培养瓶中消化接种到 96 孔板中。3T3 细胞的传代次数(冻存复苏后)限制在 18 代以内,来避免表型和基因型的变化。具体的试验过程如下[7]。

1.4.1 接种: 将 BALB/c 3T3 细胞均匀接种于 96 孔培养板中,接种细胞孔加入 100 μl 的细胞悬浮液(2 ~ 3×10^3细胞/孔),空白对照孔加 100 μl 培养液。

1.4.2 染毒: 培养 24 h 后,吸走 96 孔板中的培养液。加入 50 μl 的 37 ℃预热的培养液和 50 μl 新配制的受试物(8 个浓度组)到染毒孔和试剂对照孔中(不含细胞孔)中,空白对照加 100 μl 培养液。

1.4.3 中性红试验: 染毒 48 h 后,用预热过的 D-PBS (250 μl/孔)冲洗 96 孔板。加入 25 μg/ml 的中性红染料到所有孔中(250 μl/孔),培养(3.0 ±0.1) h 后,用预热过的 D-PBS(250 μl/孔)冲洗。每孔再加入 100 μl新配制的中性红解吸液(49 份水 +50 份乙醇 + 1 份冰醋酸),以解吸活细胞中的中性红染料。避光震荡 20 ~45 min 后,于 540 nm 下用酶标仪测定吸光度 (*A*) 值。由于中性红是一种阳离子染料,它可以通过细胞膜扩散以及静电作用与细胞溶酶体中的阴离子物质结合,在溶酶体中聚集。而有毒化学品对细胞表面或溶酶体膜造成损伤,抑制细胞增长或导致细胞死亡,从而降低中性红在细胞中的聚集量,通过测定解吸后的染毒细胞与未染毒细胞的中性红吸光度差值来计算细胞活性的降低程度。

1.5 数据处理

1.5.1 函数的拟合: 根据 OECD 导则 NO. 129,对原始数据进行处理,并用 Hill 函数对数据进行拟合,得到参数 IC_{50}和相关系数 R^2 [7]。

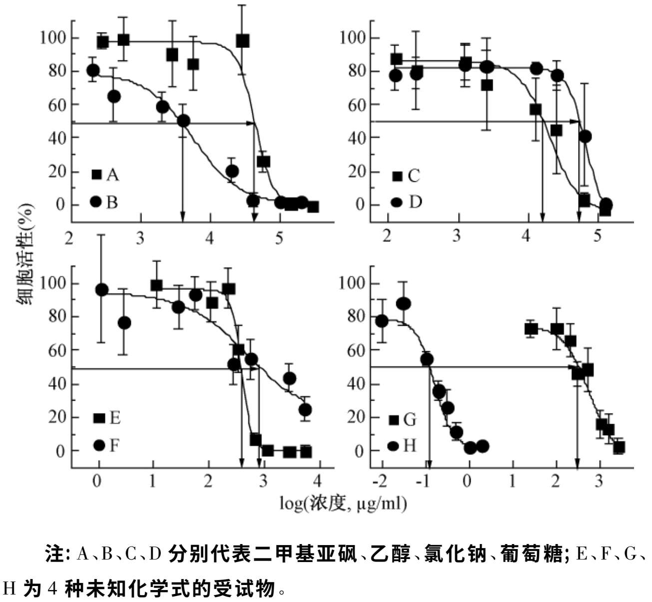
1.5.2 计算 LD_{50}: 将 IC_{50}代入以下公式进行计算,得到急性经口毒性的 LD_{50}推测值。公式(1)适用于利用 IC_{50}预测大鼠和小鼠的急性经口 LD_{50},公式(2)适用于未知分子式的化学品,通过 IC_{50} 推测大鼠急性经口 LD_{50}。公式(1)和(2)的相关系数 R^2 分别为 0.452 (n =347) 和 0.325(n =282)。

$$y = 0.435x + 0.625 \quad x = \log(IC_{50},\ mmol/L),\ y = \log(LD_{50},\ mmol/kg) \quad (1)$$

$$y = 0.372x + 2.024 \quad x = \log(IC_{50},\ \mu g/ml),\ y = \log(LD_{50},\ mg/kg) \quad (2)$$

2 结果

BALB/c 3T3 成纤维细胞的细胞系从正规的国内细胞培养库中得到。试验中所用细胞在复苏后的 4 ~ 7 代之间,符合 OECD 规定的“3T3 细胞传代应限制在 18 代以内”的规定[7]。染毒试验在细胞呈指数生长期间进行。阳性对照(SLS)的试验的剂量-效应关系的 R^2为 0.92 ~0.99,符合 OECD 规定的阳性对照的试验接受准则(R^2 >0.85);本试验 SLS 的 IC_{50} 平均值为 45.62 μg/ml,符合 OECD 中阳性对照的预期 IC_{50}值范围 36.7 ~46.3 μg/ml。8 种受试物 A ~ H 的细胞毒性试验具有良好的剂量-效应关系,如图 1 所示,各受试物的 8 个染毒剂量组(浓度用对数值表示)对应的细胞活性(cell viability)跨越了没有影响到完全抑制,符合 OECD 标准的结果接受准则。



注:A、B、C、D 分别代表二甲基亚砜、乙醇、氯化钠、葡萄糖;E、F、G、H 为 4 种未知化学式的受试物。

图 1 8 种化学品的浓度对数值与细胞活性的 Hill 函数拟合图

© 1994-2013 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

8 种受试物 A ~ H 的 IC_{50} 值、推测 LD_{50} 值、实际 LD_{50} 值以及急性经口毒性试验(UDP，ATC，FDP 和 Horns)的初始剂量推测值，见表 1。表 1 结果表明，利用公式(1)推测出受试物 A ~ D 的大鼠或小鼠的 LD_{50} 值均大于 2000 mg/kg，根据《新化学物质危害评估导则》[8] 的毒性分级标准可知，受试物 A ~ D 为实际无毒物质，与 NIH 发布的结果一致[9]。对于化学品分子式未知的受试物 G 和 H，利用细胞毒性试验得出的 LD_{50} 值推测 G 和 H 分别为低毒和中毒物质，与本实验进行的急性经口试验得到的结果一致。然而，对于分子式未知的受试物 E 和 F，利用细胞试验得出的急性经口 LD_{50} 值与本实验室进行试验得到的 LD_{50} 值有一定的差异，细胞试验得到的毒性明显高于实际的毒性。这些差异可能与中性红试验本身的局限性有关。

表 1　细胞试验结果与参考值的比较

受试物	R^2	IC_{50} (mmol/L)	推测值 LD_{50} (mg/kg)	推测值 毒性分级	实际值[9] LD_{50} (mg/kg)	实际值[9] 毒性分级	大/小鼠急性经口初始剂量(mg/kg) UDP	ATC	FDP	Horns
A	0.99	271.9	8 683	无毒	>5 000	无毒	5 000	5 000	5 000	4 640
B	0.97	415.9	2 708	无毒	>5 000	无毒	2 000	2 000	2 000	2 150
C	0.99	343.8	3 126	无毒	2 998	无毒	2 000	2 000	2 000	2 150
D	0.99	331.5	9 471	无毒	>5 000	无毒	5 000	5 000	5 000	4 640
受试物	R^2	IC_{50} (μg/ml)	推测值 LD_{50} (mg/kg)	推测值 毒性分级	实际值[9] LD_{50} (mg/kg)	实际值[9] 毒性分级	UDP	ATC	FDP	Horns
E	0.99	367.8	951.5	低毒	>5 000	无毒	550	300	300	464
F	0.81	816.9	1 280	低毒	>5 000	无毒	550	300	300	1 000
G	0.97	699.6	1 200	低毒	600	低毒	550	300	300	1 000
H	0.95	0.352 5	71.62	中毒	191.2	中毒	17.5	50	50	46.4

注：A ~ D 的 LD_{50} 实际值来源于文献[9]，E ~ F 的 LD_{50} 实际值来源于本实验室进行的试验。

3　讨论

应用细胞毒性的数据来推测化学品的急性毒性作用，已经成为毒理学替代试验研究的热点之一。细胞毒性是化学物质对细胞的生长、繁殖和代谢等功能导致的负面影响。作为急性经口动物试验的体外替代方法，BALB/c 3T3 成纤维细胞中性红毒性试验具有操作简单、费用较低、耗时较短等特点，并且能大量的节约动物的使用数量。然而，细胞培养和整体动物之间的系统差异导致本实验依然有一定的局限性。具体表现为化学品或有毒物质在细胞内部和动物体内的吸收、分布、代谢和排出的差异。因此，在实际工作中，应结合体外试验数据和化学品的相关信息(例如化学品的结构信息以及相似化学品的 LD_{50})来预测急性经口毒性试验的初始剂量[7]。

此外，中性红细胞试验的稳定性还受到很多因素的影响，主要包括细胞的状态、染毒剂量的设计和受试物的理化性质。具体来说，应注意以下问题：(1)在细胞试验的染毒期间，应在细胞处于指数生长期时，将细胞均匀接种到 96 孔板，在试验操作时尽量避免污染；(2)依据预试验的结果来设计正式试验的 8 个染毒剂量，其原则是正式试验中分别至少有 1 个染毒剂量使细胞活性处于 0% ~50% 和 50% ~100%，并且能得到良好的剂量-效应关系；(3)本试验主要选择的是溶解性高、毒性较低、化学结构相对简单的受试物。对于挥发性高、水溶性低、具有吸光度的受试物，需要根据其不同理化特征对试验进行相应的改进和调整。

本研究通过 3T3 成纤维细胞中性红试验对已知 LD_{50} 的 8 种受试物进行验证，试验结果表明，细胞毒性可以较为准确的判断急性经口毒性试验的初始剂量。将体外细胞试验结合到化学品急性毒性评价试验中已经是国际毒理学替代试验的发展趋势，为进一步推动中性红细胞试验在我国的发展，减少动物的使用数量，保护动物权益，还需更多的国内实验室参与本试验的验证。

参考文献

[1]　张天亮. 急性经口毒性试验替代测试方法进展[J]. 预防医学论坛，2008，14(12)：1225-1226.

[2]　肖经纬，崔涛，孟会林，等. 3 种急性经口毒性试验方法的比较[J]. 毒理学杂志，2007，21(2)：135-136.

[3]　周宗灿. 毒理学教程[M]. 北京：北京大学医学出版社，2006：137-151.

(下转第 453 页)

© 1994-2013 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

中图分类号: R114, R994.6 文献标识码: A 文章编号: 1002 - 3127(2012) 06 - 0453 - 05

·实验研究·

饮水中 DBA 对小鼠免疫功能的影响

张洋婷，高淑英，周晓蓉
(哈尔滨医科大学公共卫生学院卫生毒理学教研室，黑龙江 哈尔滨 150086)

【摘要】 目的 探讨水的氯化消毒副产物二溴乙酸(DBA)对 BALB/c 小鼠免疫功能的影响。方法 BALB/c 小鼠按体重随机分为 5 组，每组 10 只，雌雄各半。分别为去离子水(阴性对照组)、环磷酰胺 10 mg/kg(阳性对照组)和 DBA 5、20 和 50 mg/kg，采用等体积灌胃法(0.1 ml/10g·BW)，连续灌胃 28 d。观察小鼠体重变化，胸腺和脾脏的病理学改变，检测巨噬细胞的吞噬功能以及 NK 细胞杀伤活性、T 和 B 淋巴细胞体外增殖功能以及血清 IgG 的含量。结果 与阴性对照组比较，DBA 灌胃组小鼠体重差异无统计学意义；脾脏脏器系数增加，胸腺脏器系数降低，差异均具有统计学意义($P<0.05$)；脾和胸腺均发生明显的病理学改变；随着 DBA 染毒剂量的增加，小鼠巨噬细胞吞噬能力、NK 细胞的杀伤活性、T、B 淋巴细胞的体外增殖能力和血清中 IgG 抗体浓度逐渐降低，并存在剂量-反应关系，差异具有统计学意义($P<0.05$)。结论 DBA 对小鼠的免疫功能具有明显的抑制作用。

【关键词】 DBA；免疫毒性；细胞免疫；体液免疫；非特异性免疫

饮用水的质量与人体健康息息相关，目前饮用水的消毒方法很多，如氯、氯胺和臭氧等。然而，这些消毒剂在杀灭病原微生物的同时，也产生了对人体有潜在危害的消毒副产物，包括三卤甲烷和卤乙酸等。流行病学研究表明[1]：卤乙酸的致癌风险占消毒副产物总致癌风险的 91.9% 以上。二溴乙酸(dibromoacetic acid，DBA)属于卤乙酸类，是溴化卤乙酸中含量最多的一种，它的毒性资料较少，NTP 发起了对其毒性的研究。目前，对 DBA 的毒性研究较多的是生殖毒性、神经毒性和遗传毒性以及肝脏毒性等[2-7]，其免疫毒性的研究较少，国内尚未报道。本文通过动物实验探讨 DBA 对小鼠免疫功能的影响，确认其对免疫系统的损伤作用，为丰富 DBA 的毒性资料提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 动物 健康清洁级 BALB/c(H-2[b])小鼠，体重 18 ~ 22 g，雌雄各半，由黑龙江省肿瘤研究所提供，许可证号为 SCXK(黑) 2006-010。动物饲养在哈尔滨医科大学清洁级动物室内，许可证号为 SYXK(黑) 2011007，温度 21℃ ~ 23℃，湿度 55% ~ 58%。

基金项目：国家自然科学基金项目(30901206)；哈尔滨市科技创新人才专项资金项目(2009RFQXS025)
作者简介：张洋婷，硕士研究生，研究方向：免疫毒理学。
通讯作者：周晓蓉，教授，研究方向：纳米毒理学。
高淑英，副教授，研究方向：免疫毒理学。

(上接第 452 页)

[4] Halle W. Toxizitätsprüfungen in Zellkultu n für eine Vorhesasge der akuten Toxizität(LD_{50}) zur Einsparung von Tierversuchen [J]. Life Sciences/Lebenswissenschaften，1998(1).
[5] Halle W. The Registry of Cytotoxicity: Toxicity testing in cell cultures to predict acute toxicity(LD_{50}) and to reduce testing in animals [J]. Alta-altern Lab Anim，2003，31: 89-198.
[6] ICCVAM，NIH Publication No. 01-4499. Report of the International Workshop on In vitro Methods for Assessing Acute Systemic Toxicity [R]. Research Triangle Park，NC: National Institute for Environmental Health Sciences. 2001.
[7] OECD. OECD Environment，Health and Safety Publication Series on Testing and Assessment No. 129，Guidance document on using cytotoxicity tests to estimate starting doses for acute oral systemic toxicity tests [S]. Paris: OECD Publishing，2010.
[8] 国家环境保护总局. HJ/T 154-2004 新化学物质危害评估导则 [S]. 北京：中国环境科学出版社，2004.
[9] NIH. NIH Publication No. 01 - 4500，Guidance document on using in vitro data to estimate in vivo starting doses for acute toxicity [S]. Research Triangle Park，NC: National Institute for Environmental Health Sciences. 2001.

(收稿日期：2012 - 05 - 02)

© 1994-2013 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net