

T030090 不同浓度的丁香油小鼠局部淋巴结试验-BrdU-ELISA法

任 雁, 陈 聪, 邢立国, 胡翠清

(沈阳化工研究院有限公司安全评价中心, 沈阳 110021)

摘要: 【目的】当致敏性的外源化合物刺激机体时, 可引起局部引流淋巴结淋巴细胞增殖, 可以通过局部引流淋巴结淋巴细胞增殖情况来判断外源性化合物致敏性强弱程度。通过选用已知的阳性药丁香油建立小鼠局部淋巴结试验, 取代传统的豚鼠致敏试验。【材料和方法】选用 10%、25%、50%浓度的丁香油(溶剂均为丙酮:橄榄油=4:1)作为阳性对照物, 在试验开始的第 1 天、第 2 天、第 3 天, 试验组在小鼠双耳耳部涂抹 25 μ l 阳性对照物, 阴性对照组涂抹 25 μ l 溶剂。试验第 6 天小鼠腹腔注射 0.5ml 10mg/ml BrdU 溶液(溶剂为磷酸盐缓冲液), 24h 后处死动物, 记录动物体重, 测量双耳厚度, 摘取小鼠双侧耳后淋巴结, 制备单细胞悬液, ELISA 法检测 BrdU 含量。【结果】受试物致敏性用刺激指数(SI)表示。SI 为试验组(阳性对照组) BrdU 标记指数与溶剂对照组 BrdU 标记指数的比值。试验结果表明 10%、25%和 50%浓度的丁香油刺激指数(SI)分别为 1.3、1.6、1.7, 并且测量各组耳厚度增加均不超过 25%。【结论】25%、50%浓度的丁香油均能引起小鼠局部引流淋巴结淋巴细胞增殖, 且呈现剂量-反应关系, 随着浓度的增加, 刺激指数(SI)增加, 阳性对照组(25%、50%浓度)满足 $SI \geq 1.6$, 且不能引起明显的系统毒性或局部刺激($SI \geq 14$), 耳厚度增加不应超过 25%的条件。

关键词: 局部淋巴结试验, 小鼠, 丁香油, BrdU-ELISA法

基金资助: “重大新药创制” 科技重大专项(2013ZX09302304)

第一作者: renyan.29@sinochem.com

T030091 人胚胎干细胞诱导心肌细胞的毒性测试模型建立

贾远源¹, 邢立国*, 陈 聪, 于雪骊, 李兆强

(沈阳化工研究院有限公司安全评价中心 国家沈阳新药安全评价中心, 沈阳 110021)

摘要: 【目的】建立人胚胎干细胞向心肌细胞诱导分化的方法, 应用诱导分化的心肌细胞检测化合物的心肌细胞毒性。【材料和方法】采用贴壁培养诱导法: 按无饲养层培养法培养的人胚胎干细胞培养至临界分化状态, 用传代工作液将其消化成单细胞, 离心后接种于 96 孔板中, 再次培养至临界分化状态, 使用**人心肌分化试剂盒(北京赛贝生物技术有限公司)**进行心肌细胞诱导分化, 待绝大部分分化细胞出现自发性搏动后, 采用单克隆鼠抗人横纹肌辅肌动蛋白 α (sm Actinin- α) 和单克隆鼠抗人心肌肌钙蛋白 I (cardiac troponin I, cTnI) 为一抗的免疫细胞化学方法对分化成的心肌细胞进行鉴定。心肌细胞鉴定成功后, 进行化合物毒性检测。设立对照组、DMSO 组(体积分数: 0.1%)、烯啶虫胺(以体积分数为 0.1%的 DMSO 溶解) 5 mg/mL、2.5 mg/mL、1.25 mg/mL、0.625 mg/mL、0.3125 mg/mL 和 0.15625 mg/mL 组, 染毒 24 h 后, 进行如下检测: ① 免疫细胞化学染色, 观察细胞胞质阳性染色情况。随机选取视野中的 100 个细胞, 计算胞质棕色染色细胞数占此 100 个细胞的比例, 计为心肌细胞分化率; ② 同批次培养的另一块 96 孔板进行相同处理后, MTT 法检测细胞存活率。以上试验均重复三次。【结果】心肌细胞免疫细胞化学染色结果: ① 鼠抗人横纹肌辅肌动蛋白 α 为一抗的心肌细胞分化率为 $95.2\% \pm 4.8\%$, 鼠抗人心肌肌钙蛋白 I 为一抗的心肌细胞分化率为 $96.1\% \pm 3.6\%$; ② 化合物毒性检测结果: 烯啶虫胺 5 mg/mL、2.5 mg/mL、1.25 mg/mL、0.625 mg/mL、0.3125 mg/mL 和 0.15625 mg/mL 染毒心肌细胞 24 h, 免疫细胞化学法检测结果显示胞质棕色染色细胞数明显减少, MTT 法检测心肌细胞存活率(以对照组为 100%) 分别为: DMSO

组: $98.5\% \pm 2.8\%$; 烯啶虫胺 5 mg/mL、2.5 mg/mL、1.25 mg/mL、0.625 mg/mL、0.3125 mg/mL 和 0.15625 mg/mL 组分别为 $10.3\% \pm 1.9\%$ 、 $12.2\% \pm 2.5\%$ 、 $13.1\% \pm 3.8\%$ 、 $24.3\% \pm 5.1\%$ 、 $28.5\% \pm 4.2\%$ 和 $29.1\% \pm 6.8\%$, 与对照组相比, 均显著减小 ($p < 0.01$)。【结论】① 本试验诱导分化的心肌细胞鉴定合格, 成活率高。② 烯啶虫胺 5 mg/mL、2.5 mg/mL、1.25 mg/mL、0.625 mg/mL、0.3125 mg/mL 和 0.15625 mg/mL 染毒心肌细胞 24 h, 产生明显的人心肌细胞毒性。其机制有待进一步分析。

关键词: 人胚胎干细胞, 人心肌细胞, 诱导分化, 烯啶虫胺

基金项目: 国家新药创制科技重大专项 (2013ZX09302304)

* 通讯作者: liguo-xing@163.com

责任作者: jiayuan@sinocem.com;

T030092 肾脏离体实验技术在药物毒理研究中的应用

徐婷婷¹, 金若敏*, 姚广涛

(上海中医药大学药物安全评价中心, 上海)

摘要: 肾脏是药物及其代谢产物排泄的重要器官, 其结构和生理功能的特殊性、复杂性, 使肾脏易受到药物的影响。离体实验具有可以精确控制试验条件、排除某些干扰和快速检测等优点, 已被广泛用于药物对肾脏毒性作用等方面的研究。近年来, 研究人员采用离体肾灌注、离体肾切片、肾细胞培养等体外技术, 从器官、组织、细胞水平上深入研究药物在肾脏中发生的变化以及对肾脏的效应。下面就几种体外肾脏技术的特点以及在毒理学的应用进行介绍。1. 离体肾灌注技术是一种与整体肾脏可比性较高, 在离体器官水平下进行实验的技术, 主要涉及药物在肾脏内的排泄过程、药物毒性作用及其机制。2. 离体肾切片技术是一种介于器官与细胞水平之间的体外培养技术; 主要涉及药物间相互作用以及毒性作用机制方面的研究。3. 离体肾细胞培养是一种细胞水平的体外培养技术, 通过给予药物后, 观察细胞形态学、细胞活力变化, 研究药物是否会引起肾损伤, 以及损伤特点和程度。4. 肾微透析技术是一种将灌注取样和透析技术结合起来在肾脏部位进行动态微量取样的技术。肾微透析技术可通过直接测定透析液中药物浓度, 得到浓度-时间关系, 研究药物的药代动力学; 也可通过测定透析液中生化指标结合血压、心率及其他生理指标, 得到药效-浓度关系, 用于研究药物的药效与毒理。离体肾灌注、离体肾切片、肾细胞培养等这些生物技术的出现不仅为研究药物在肾脏中发生的变化以及对肾脏的效应及毒性提供了一种新的技术体系, 更提供了一种从“终点”出发开展系统生物学研究的可能。随着这些技术在肾脏研究中的广泛应用, 必将为深入理解药物的排泄过程、作用及毒性机制; 考察药物间的相互作用; 各类肾脏病的病理、生理机制; 新的高效的生物学标志物以及有效或毒性靶点等研究提供极大的帮助。

关键词: 离体肾灌注, 离体肾切片, 肾细胞, 微透析, 药物

第一作者: louyeguigen1988@163.com; * 责任作者: rmj801@126.com