

# 氯丙嗪和噻洛芬酸在 3 种光毒性测试中致 p38 和 Erk1/2 表达变化研究

吴晓星<sup>1</sup>, 陈舒怀<sup>2</sup>, 刘彦娟<sup>3</sup>, 桑晶<sup>2\*</sup>(1.浙江大学医学院附属第二医院基础和转化研究中心, 杭州 310003; 2.浙江省食品药品检验研究院, 杭州 310052; 3.浙江工业大学绿色制药协同创新中心, 杭州 310032)

**摘要:** 目的 探讨 3 种光毒性条件下细胞内 p38 和 Erk1/2 的表达变化, 同时对 3 种检测方法进行比较, 并深入研究其分子机制。方法 使用 3 种测试方法评估氯丙嗪(chlorpromazine, CPZ)和噻洛芬酸(tiaprofenic acid, TA)的光毒性。随后收集 3 种测试方法所涉及的生物样本的全细胞裂解物, 并利用蛋白质印迹法评估细胞内 p38 和 Erk1/2 的表达变化。结果 这 3 种测试方法均能准确判断 CPZ 和 TA 作为光毒性阳性化合物。在 3T3 NRU 光毒性试验中, 与空白组相比, TA 和 CPZ 在光毒性剂量下显著提高了 p38 的表达水平( $P<0.05$ ), 这一现象在其他测试方法中未观察到。在豚鼠和人工皮肤模型的光毒性试验中, p38 和 Erk1/2 表达模式的变化相似。结论 p38 和 Erk1/2 在 3T3 NRU 光毒性试验中具有明显的剂量依赖性和高度敏感性, 可被视为评估 3T3 NRU 光毒性的潜在分子标志物, 但在豚鼠试验和 EpiKutis 人工皮肤试验中尚未可行。豚鼠和 EpiKutis 人工皮肤表现出更相似的 p38 和 Erk1/2 表达变化, 提示 EpiKutis 人工皮肤模型试验方法可能比 3T3 NRU 方法能更好地替代动物试验。

**关键词:** 光毒性; p38; Erk1/2; 人工皮肤模型

中图分类号: R965.2 文献标志码: A 文章编号: 1007-7693(2024)11-1491-08

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.20233124

引用本文: 吴晓星, 陈舒怀, 刘彦娟, 等. 氯丙嗪和噻洛芬酸在 3 种光毒性测试中致 p38 和 Erk1/2 表达变化研究[J]. 中国现代应用药学, 2024, 41(11): 1491-1498.

## Chlorpromazine and Tiaprofenic Acid-induced p38 and Erk1/2 Expression Change in Three Phototoxicity Test Methods

WU Xiaoxing<sup>1</sup>, CHEN Shuhuai<sup>2</sup>, LIU Yanjuan<sup>3</sup>, SANG Jing<sup>2\*</sup>(1.Center for Basic and Translational Research, The Second Affiliated Hospital, Zhejiang University School of Medicine, Hangzhou 310003, China; 2.Zhejiang Institute for Food and Drug Control, Hangzhou 310052, China; 3.Collaboration Innovation Center of Green Pharmaceuticals, Zhejiang University of Technology, Hangzhou 310032, China)

**ABSTRACT: OBJECTIVE** To explore the intracellular expression changes of p38 and Erk1/2 under three phototoxic conditions, compare three detection methods, and further investigate their molecular mechanisms. **METHODS** The methods involved using three testing approaches to assess the phototoxicity of chlorpromazine(CPZ) and tiaprofenic acid(TA). Subsequently, whole-cell lysates from the biological samples used in the three testing methods were collected, and the changes in the expression levels of intracellular p38 and Erk1/2 were evaluated using Western blotting. **RESULTS** All three testing methods accurately identified CPZ and TA as phototoxic compounds. In the 3T3 NRU phototoxicity assay, compared to the control group, the expression of p38 significantly increased under phototoxic doses of TA and CPZ( $P<0.05$ ), a phenomenon not observed in other testing methods. In phototoxicity assays using guinea pig and artificial skin models, similar expression pattern changes were observed for p38 and Erk1/2. **CONCLUSION** p38 and Erk1/2 have obvious dose dependence and high sensitivity in the 3T3 NRU phototoxicity test, and can be considered as potential molecular markers for evaluating the phototoxicity of 3T3 NRU. However, they have not been feasible in guinea pig tests and EpiKutis artificial skin tests. Guinea pigs and EpiKutis artificial skin exhibit more similar changes in p38 and Erk1/2 expression, suggesting that the EpiKutis artificial skin model test method may be a better alternative to animal testing than the 3T3 NRU method.

**KEYWORDS:** phototoxicity; p38; Erk1/2; artificial skin model

人类皮肤暴露在阳光下时, 光照可能会引起皮肤上涂抹的化妆品的光毒性反应。光毒性反应

的定义: 施用于身体的物质, 在暴露于光后引起(在较低剂量水平时)的毒性反应, 或者是由系统

基金项目: 浙江省药品监管系统科技计划项目(2021025)

作者简介: 吴晓星, 女, 硕士, 助理研究员  
oliver169@163.com

E-mail: 2518123@zju.edu.cn

\*通信作者: 桑晶, 女, 博士, 主管药师

E-mail:

中国现代应用药学 2024 年 6 月第 41 卷第 11 期

Chin J Mod Appl Pharm, 2024 June, Vol.41, No.11

· 1491 ·



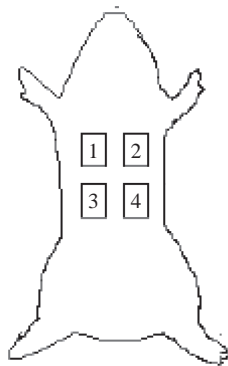


图1 豚鼠去毛示意图<sup>[2]</sup>

Fig. 1 Schematic diagram of guinea pig hair removal<sup>[2]</sup>

表1 皮肤反应评估<sup>[2]</sup>

Tab. 1 Evaluation of skin reactions<sup>[2]</sup>

皮肤反应	积分
红斑和焦痂形成	
无红斑	0
轻微红斑(勉强可见)	1
明显红斑(散在或小块红斑)	2
中度-重度红斑	3
严重红斑(紫红色)至轻微焦痂形成	4
水肿形成	
无水肿	0
轻微水肿(勉强可见)	1
中度水肿(皮肤隆起轮廓清楚)	2
重度水肿(皮肤隆起约1 mm或>1 mm)	3

则表示光毒性为阳性。

## 2.2 3T3 中性红摄取光毒性试验

加 100  $\mu\text{L}$  培养液于 96 孔组织培养板的外围孔(空白对照), 在其余孔中加入 100  $\mu\text{L}$  密度为  $1 \times 10^5$  个  $\cdot \text{mL}^{-1}$  的细胞悬液(即每孔  $1 \times 10^4$  个细胞)。每次实验制备 2 个板, 包括相同的受试样品浓度系列、溶剂对照、空白对照和阳性对照, 一块板用于确定细胞毒性(UVA-), 另一块板用于确定光毒性(UVA+)。培养细胞 24 h 直至它们形成半融合单层细胞, 去除培养液, 用 125  $\mu\text{L}$  HBSS 冲洗 1 次。加入 100  $\mu\text{L}$  含适当浓度受试样品或溶剂的缓冲液到孔中, 培养细胞 1 h。在室温下将其中一块板进行光照(UVA+)暴露, 以  $1.7 \text{ mW} \cdot \text{cm}^{-2}$  光强度(即  $5 \text{ J} \cdot \text{cm}^{-2}$ )透过 96 孔板盖照射细胞 50 min; 同时将另一块平板无光照(UVA-)置于暗盒内 50 min。去除受试溶液, 用 250  $\mu\text{L}$  HBSS 冲洗 1 次, 再加入 100  $\mu\text{L}$  培养液, 培养约 22 h。

显微镜下检查细胞, 记录受试样品细胞毒性所致细胞形态学的改变, 排除实验误差。去除培

养液, 加入 100  $\mu\text{L}$  含  $33 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  中性红的培养液, 继续培养 3 h。去除中性红培养液, 用 250  $\mu\text{L}$  HBSS 冲洗细胞 1 次。准确加入 100  $\mu\text{L}$  中性红解吸附溶液, 并在平板振荡器上快速震荡培养板 20 min, 直至中性红从细胞内被提取出来, 形成均匀溶液, 再用酶标仪测定 540 nm 波长处的光密度。用空白孔作为参考对照。使用专用软件 Phototox(Version 2.0) 进行数据处理, 光刺激因子(photo irritation factor, PIF) 和平均光效应(mean photo effect, MPE) 按表 2 分情况讨论并得出结论。

表2 3T3 中性红摄取光毒性试验评价标准

Tab. 2 Evaluation criteria for 3T3 neutral red uptake phototoxicity experiment

光刺激因子	平均光效应	预测结果
$\leq 2$	$\leq 0.1$	无潜在光毒性
$> 2 \sim 5$	$> 0.1 \sim < 0.15$	再次进行实验, 并重新作出判断
$\geq 5$	$\geq 0.15$	潜在光毒性

## 2.3 EpiKutis 人工皮肤光毒性试验

试验方法按本实验室先前研究进行<sup>[3]</sup>。EpiKutis 人工皮肤模型和培养基来自中国广州博溪生物技术有限公司。将 EpiKutis 放入已加入 0.9 mL 培养液的 6 孔板中。在标准条件 [ $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ 、 $(5 \pm 1)\%$   $\text{CO}_2$ 、95% 相对湿度] 下预培养 1 h, 随后更换培养液, 继续在标准条件下预培养 24 h。次日将 EpiKutis 转移到新的 6 孔板中。在不同光照时间对皮肤模型相对活性的影响试验时, 每个 EpiKutis 给予 50  $\mu\text{L}$  HBSS。在不同浓度盐酸氯丙嗪对皮肤模型光毒性作用试验时, 给予 CPZ 和 TA 乙醇溶液 50  $\mu\text{L}$ , 并使其孵育 12 h。

次日给予 EpiKutis 光照强度为  $(1.7 \pm 0.1) \text{ mW} \cdot \text{cm}^{-2}$  的 UVA 照射。将不同光照处理的皮肤模型放在同一室温的暗处, 光照处理完后的 EpiKutis 转移到新的 6 孔板中, 每孔加 0.9 mL 培养液, 培养过夜(约 21 h)。对部分 EpiKutis 使用 MTT 法进行人工皮肤活性检测, 部分皮肤进行蛋白含量测定。

## 2.4 Western blotting 分析

按“2.1”~“2.3”项下 3 种光毒性检测完成后, 用冷 PBS 洗涤豚鼠皮肤、3T3 细胞和 EpiKutis 人工皮肤模型 2 次, 然后用含 1% 苯基甲基磺酰氟和  $20 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  NaF 的裂解缓冲液裂解。从平板或 EP 管中上取全细胞裂解物, 然后在  $4^\circ\text{C}$  下以  $16\,000 \times g$  离心 10 min。用 BCA 蛋白质测定试剂盒测定蛋白质浓度。将蛋白质样品与负载缓冲液一起煮沸 10 min。

进行 SDS-PAGE 电泳后, 使用半干电印迹系统将凝胶上的蛋白转移到聚偏二氟乙烯膜 (0.45  $\mu\text{m}$ , Millipore) 上。在室温下, 用 TBST 缓冲液 (20  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  Tris、166  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  NaCl 和 0.05% Tween 20, pH 7.5) 配制 5% 脱脂奶粉, 将膜封闭 1 h, 随后一级特异性抗体 (4  $^{\circ}\text{C}$ , TBST 缓冲溶液稀释, 1 : 1 000) 孵育过夜, 随后使用 TBST 缓冲液洗涤 3 次, 每次 5 min。然后在室温下用辣根过氧化物酶偶联的二抗 (4  $^{\circ}\text{C}$ , TBST 缓冲溶液稀释, 1 : 2 000) 孵育 1 h, 随后使用 TBST 缓冲液洗涤 3 次。使用 ECL 化学发光试剂盒在 Amersham Imager 600 超灵敏多功能成像仪上检测蛋白质条带。

### 2.5 豚鼠皮肤组织 HE 染色切片

取双侧光照皮肤组织进行 HE 染色组织病理学切片制作。取下的皮肤组织固定于 10% 福尔马林液中。脱水前组织需在流动水中冲洗 1 h。按组织进行脱水、透明、浸蜡。选择与组织块大小相应的金属包埋框, 向金属包埋框内注入石蜡, 从包埋盒中取出组织块, 包埋面朝下放入包埋框。将蜡块在制冷台或冰箱中冷却, 随后固定于切片固定装置上。安装刀片, 刀口与蜡块角度为  $5^{\circ}$ 。调整刀架与石蜡块的距离, 使蜡块与刀口轻微接触。切片厚度为 2~6  $\mu\text{m}$ , 将切片置于 60  $^{\circ}\text{C}$  烘箱中进行烤片 30~60 min。染色后使用中性树脂进行封片。

### 2.6 数据分析

除非另有说明, 否则所有数据符合正态分布均表示为  $\bar{x} \pm s$ 。采用 SPSS 16.0 进行数据分析, 采用 ANOVA 方法分析, 组间显著性差异采用 Duncan 检验。  $P < 0.05$  表示差异具有统计学意义。

## 3 结果

### 3.1 豚鼠皮肤光毒性试验结果

豚鼠皮肤光毒性试验的最高剂量取决于诱导

物的最大溶解度。因此, CPZ 的浓度分别为 250、125、50  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。TA 的浓度分别为 400、100、25  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。结果显示, 通过豚鼠皮肤光毒性试验发现, CPZ 和 TA 都具有皮肤光毒性, 评分 (水肿形成评分+红斑/焦痂形成评分) 见表 3, 未光照区域得分均为 0+0。皮肤组织学切片结果见图 2。

### 3.2 3T3 NRU 光毒性试验结果

CPZ 的光毒性试验 PIF=27.574, MPE=0.632, 潜在光毒性; TA 的光毒性试验 PIF=6.739, MPE=0.356, 潜在光毒性。CPZ 的光毒性  $\text{IC}_{50}$  值为 0.56  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ , TA 的  $\text{IC}_{50}$  为 1.24  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ , 实验结果表明, CPZ 和 TA 均具有光毒性。因此, 收集给予浓度为 0.5、0.25 和 0.1  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  的 CPZ 并 UVA+ 的细胞, 给予浓度为 1、0.5、0.25  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  的 TA 并 UVA+ 的细胞, 观测 3T3 细胞中 p38 和 Erk1/2 的表达改变。

### 3.3 EpiKutis 人工皮肤光毒性试验结果

使用 12 个 EpiKutis 皮肤模型来测试 CPZ 和 TA 对皮肤的光毒性, 试验结果见表 4。结果表明, 给予 CPZ 和 TA 的 EpiKutis 皮肤模型的相对活性于 UVA+ 后降低, 可检出 CPZ 和 TA 的光毒性。需要说明的是, 在本实验中 UVA- 组给予 0.02  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  CPZ 皮肤模型的相对活性比其他皮肤模型略低, 认为其与皮肤模型质量欠佳有关, 不影响对光毒性的判断。根据相对活性的改变, 本研究选择 0.02、0.01、0.005  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  CPZ 和 2、1、0.5  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  TA 的 UVA+ 细胞进行 p38 和 Erk1/2 的表达检测。

### 3.4 p38 和 Erk1/2 在 3 种光毒性试验方法中的表达

豚鼠皮肤光毒性试验中, TA 和 CPZ 诱导的光毒性对 p38 和 Erk1/2 表达量影响结果见图 3。在 UVA- 条件下, 与空白对照组比较, p38 和 Erk1/2 表达量无显著变化, 推测该 2 种化合物未

表 3 CPZ 和 TA 致豚鼠皮肤光毒性的评分

Tab. 3 Score of phototoxicity on guinea pig skin induced by CPZ and TA

动物编号	CPZ 致皮肤光毒性的得分			TA 致皮肤光毒性的得分		
	250 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$	125 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$	50 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$	400 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$	100 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$	25 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$
1	2+0	2+0	1+0	2+0	0+0	1+0
2	2+1	2+0	2+0	2+1	1+0	2+0
3	3+0	1+0	1+0	2+1	1+0	0+0
4	1+0	2+0	0+0	2+0	0+0	0+0
5	2+0	0+0	1+0	1+0	1+0	1+0
6	1+0	1+0	0+0	2+0	2+0	0+0

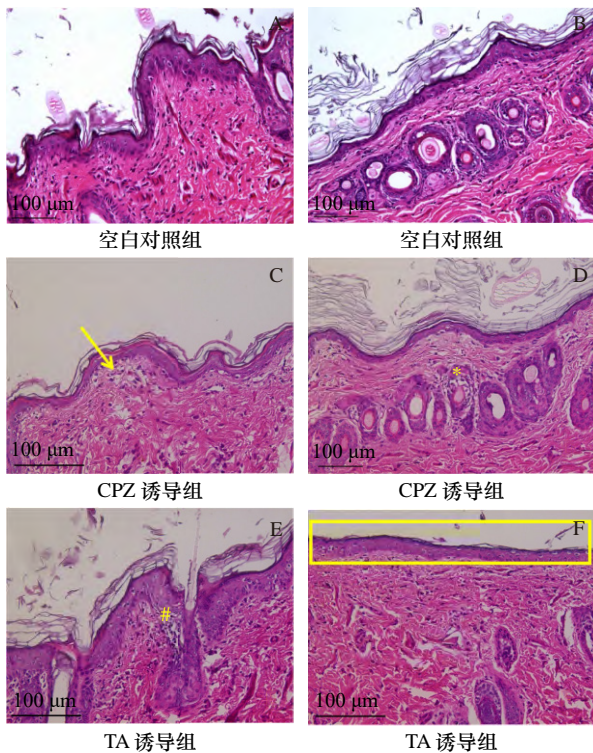


图2 豚鼠皮肤组织病理学图(HE, 100×)

A、B-空白对照组, 皮肤未见明显异常; C、D-CPZ 诱导组, 皮肤真皮层结缔组织细胞水肿、轻度炎性细胞浸润(→), 偶见皮肤附属器官毛囊组织损伤(\*); E、F-TA 诱导组, 表皮下轻度炎性细胞浸润, 轻度皮肤附属器官毛囊处组织损伤(#), 部分豚鼠皮肤表皮角质层变薄(□)。

Fig. 2 Histopathological image of guinea pig skin tissue(HE, 100×)

A, B-blank control group, there was no obvious abnormality in the skin; C, D-CPZ induction group, edema of connective tissue cells in the dermis of the skin, mild inflammatory cell infiltration(→), and occasional damage to hair follicle tissue in skin accessory organs(\*); E, F-TA induction group, mild inflammatory cell infiltration, mild damage to the hair follicles of the skin accessory organs(#), and thinning of the keratinized layer of some guinea pig skin(□).

表4 UVA-/+ CPZ 和 TA 对 EpiKutis 皮肤光毒性相对活性变化

Tab. 4 Relative activity changes of UVA-/+ CPZ and TA on phototoxicity of EpiKutis skin

化合物	浓度/ mg·L <sup>-1</sup>	相对活性/%		活性降低百分数/%
		UVA-	UVA+	
CPZ	0.1	90.2	9.5	80.7
	0.02	76.6	6.1	15.6
	0.002	100.7	83.6	17.1
TA	5.0	88.9	4.9	84.0
	2.0	94.0	62.1	31.9
	1.0	94.6	68.2	26.4

对 p38 和 ERK 信号通路产生影响。在 UVA+条件下, 对于 p38 信号通路, 125、50 mg·mL<sup>-1</sup>CPZ 组和 100、25 mg·mL<sup>-1</sup>TA 组的 p38 表达量与空白对照组比较显著下降, 推测 CPZ 和 TA 所产生的光

毒性均可显著抑制 p38 信号通路; 对于 ERK 信号通路, 给予 CPZ 各个剂量组未见显著的 Erk1/2 表达量的改变, 而给予 TA 各个剂量组均可见 Erk1/2 表达量的显著降低, 推测 CPZ 所产生的光毒性可能不影响 ERK 信号通路, 而 TA 所产生的光毒性可能产生重要影响。

3T3 中性红摄取光毒性试验中, TA 和 CPZ 诱导的光毒性对 p38 和 ERK 信号通路中 p38 和 Erk1/2 表达量影响结果见图 4。在 UVA-条件下, 与空白对照组比较, p38 和 Erk1/2 无显著变化, 推测该 2 种化合物未对 p38 和 ERK 信号通路产生影响。在 UVA+条件下, 与空白对照组比较, CPZ 和 TA 各个剂量组的 p38 表达量显著上升; 对于 ERK 信号通路, 与空白对照组比较, 0.5、0.25 mg·mL<sup>-1</sup>CPZ 和 1.0 mg·mL<sup>-1</sup>TA 组的 Erk1/2 表达量显著降低。结果表明, 在较强光毒性下, p38 信号通路激活, ERK 信号通路发生抑制。

EpiKutis 人工皮肤光毒性试验中, TA 和 CPZ 诱导的光毒性对 p38 和 ERK 信号通路中 p38 和 Erk1/2 表达量影响结果见图 5。在 UVA-条件下, p38 和 Erk1/2 无显著变化, 推测该 2 种化合物未对 p38 和 ERK 信号通路产生影响。在 UVA+条件下, 对于 p38 信号通路, 0.005 mg·L<sup>-1</sup>CPZ 组和 0.5 mg·L<sup>-1</sup>TA 组的 p38 表达量与空白对照组相比明显降低; 对于 ERK 信号通路, 0.02 mg·L<sup>-1</sup>CPZ 组和 TA 各个剂量组的 Erk1/2 表达量与空白对照组相比明显降低。

#### 4 讨论

与欧美等国家不同, 目前在中国没有禁止对化妆品进行动物实验。因此, 动物光毒性试验仍然是大多数化妆品委托方的优先选择, 而不是动物替代方法。并且值得注意的是, 目前对于将 2 种替代试验方法用于药物安评试验, 国内外均处于保守态度。有研究认为, 这 2 种体外方法对药物的特异性要低得多<sup>[11]</sup>。因此, 大多数国家并没有通过使用这些检测方法对验证药物光毒性进行评价<sup>[12]</sup>。

然而, 本课题组先前对较多的化合物进行光毒性的研究, 依然认为这 2 种检测方法仍然有潜力用于药物安全性评估, 希望通过进一步研究 3 种试验方法所用生物样本, 探索其细胞内信号通路的变化, 进而对 3 种光毒性测试方法有着更全面的认知, 同时能指导选择哪种动物替代实验方

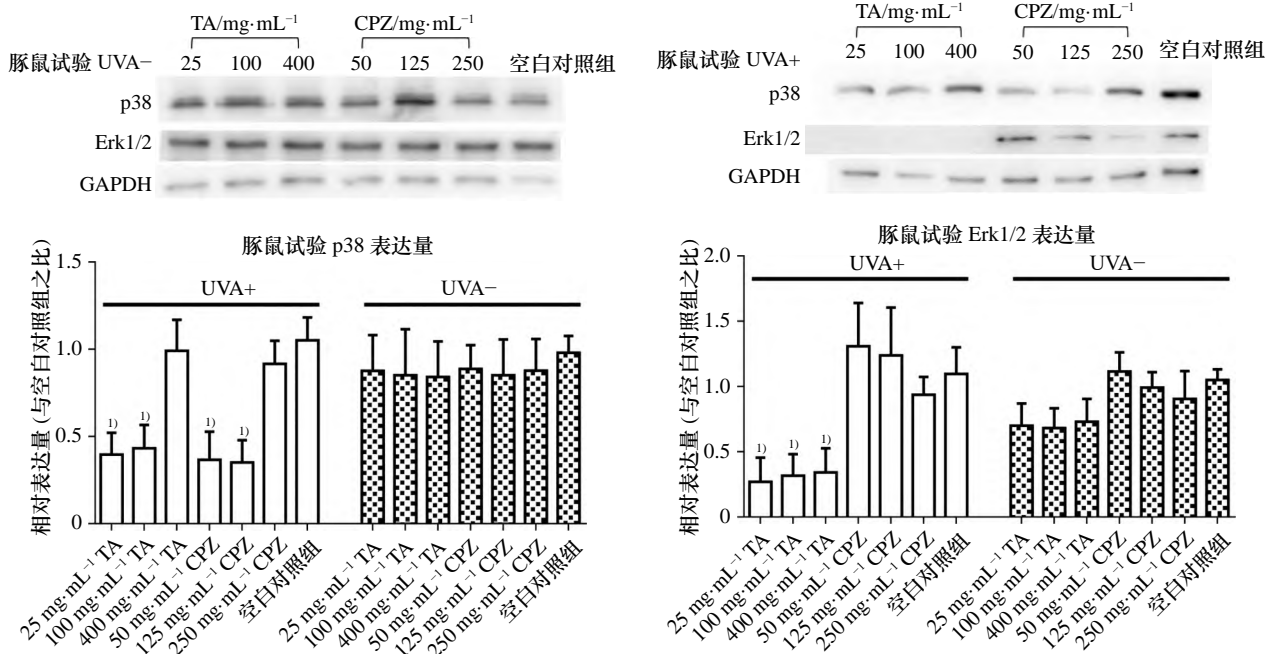


图3 豚鼠皮肤光毒性试验中TA和CPZ诱导的光毒性对p38和ERK信号通路中p38和Erk1/2表达量的影响( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=6$ )与空白对照组比较,  $^{1)}P<0.05$ 。

Fig. 3 Effect of TA and CPZ induced phototoxicity on the expression levels of p38 and Erk1/2 in the p38 and ERK signaling pathways Guinea pig skin phototoxicity experiment( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=6$ ) Compared with blank control group,  $^{1)}P<0.05$ .

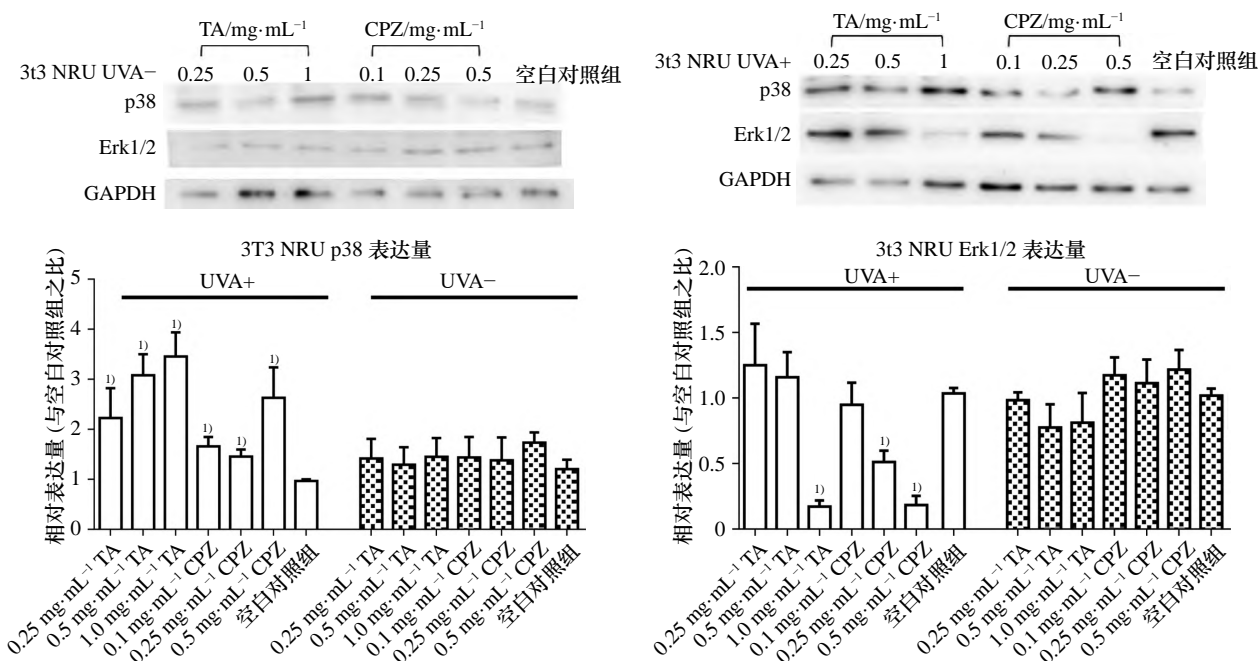


图4 3T3 NRU光毒性试验中TA和CPZ诱导的光毒性对p38和ERK信号通路中p38和Erk1/2表达量的影响( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=6$ )与空白对照组比较,  $^{1)}P<0.05$ 。

Fig. 4 Effect of TA and CPZ induced phototoxicity on the expression levels of p38 and Erk1/2 in the p38 and ERK signaling pathways in 3T3 NRU phototoxicity experiment( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=6$ ) Compared with blank control group,  $^{1)}P<0.05$ .

法更适合每种化合物, 最终达到减少动物数量, 减轻实验动物痛苦的目的。

药物对皮肤的光毒性在“金标准”豚鼠皮肤光毒性试验中表现出的组织病理学特征主要为变

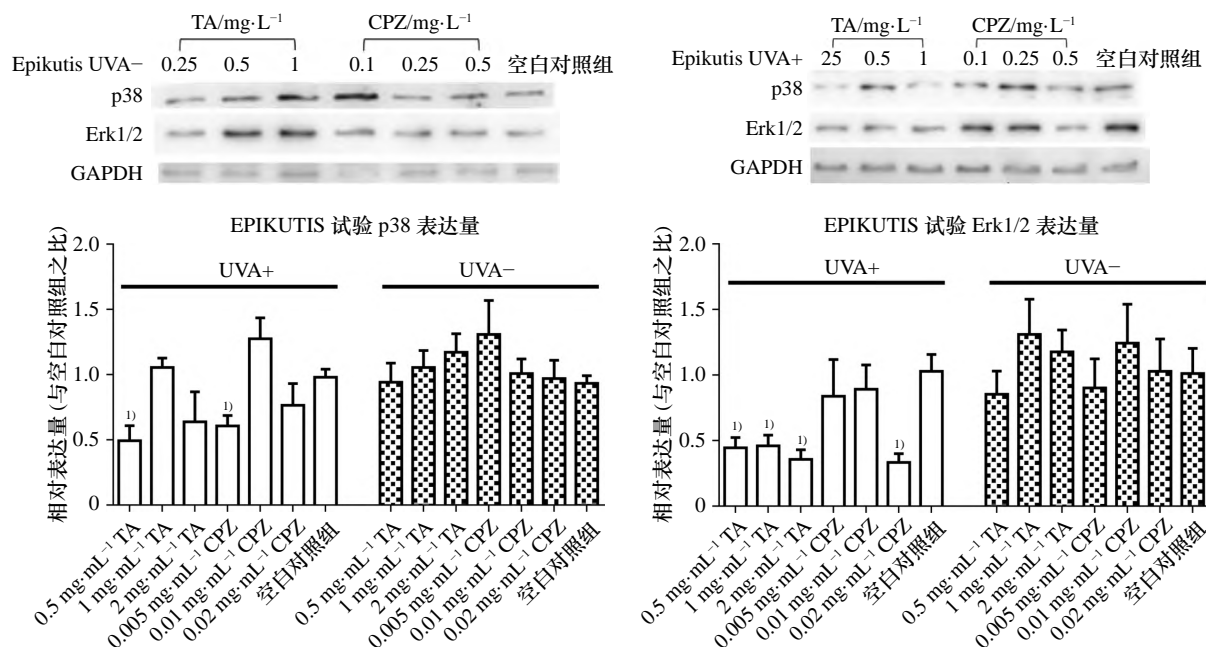


图5 EpiKutis人工皮肤光毒性试验中TA和CPZ诱导的光毒性对p38和ERK信号通路中p38和Erk1/2表达量的影响( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=6$ )  
与空白对照组比较,  $^{1)}P<0.05$ 。

Fig. 5 Effect of TA and CPZ induced phototoxicity on the expression levels of p38 and Erk1/2 in the p38 and ERK signaling pathways in EpKutis artificial skin phototoxicity experiment( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=6$ )  
Compared with blank control group,  $^{1)}P<0.05$ .

质、细胞毒性等炎性反应。许多药物具有光毒性的原因, 主要是由于其结构中普遍存在紫外线吸收苯或杂环作为发色团; TA是芳基丙酸抗炎药, 其皮肤光毒性最早报道见于1993年<sup>[13]</sup>; CPZ是常用的皮肤光毒性试验阳性剂, 亦是吩噻嗪类的代表性药物, 吩噻嗪类是一种中枢多巴胺受体的阻断剂, 不具有抗炎功能<sup>[14]</sup>。因此本课题组希望通过TA和CPZ诱导光毒性反应, 观察皮肤光毒性阳性的抗炎化合物和非抗炎化合物是否会导致不同的细胞内信号通路。

光毒性是指细胞或组织对光的损伤反应, 通常包括光诱导的细胞死亡、DNA损伤等<sup>[15]</sup>。在动物实验中, 会引起炎症样症状; 在细胞水平试验上, 表现出细胞的凋亡与增殖速度减缓。众所周知, ERK信号通路是细胞增殖的关键调节因子; p38信号通路是炎症调节重要通路<sup>[16]</sup>。此外, ERK信号通路与p38信号通路并非完全独立, 如抑制p38时, 可见细胞凋亡的减少, ERK信号通路中Erk1/2表达量增加, 提示存在着p38和干扰ERK信号通路途径的现象<sup>[17]</sup>。同时又因ERK和p38信号通路有时也共享一些上游调控因子, 表现出可同时激活的双向调节现象<sup>[18]</sup>。

在3T3 NRU试验中, p38与Erk1/2表达量在2种不同剂量受试物的光毒性下, 表现出较好的剂量依赖性, 并且p38表达的显著升高似乎影响了Erk1/2表达的降低。3T3 NRU光毒性测试使用单一真皮层成纤维细胞检测细胞的存活情况, 相比另外2种试验方法, 其对p38和Erk1/2的表达变化似乎更敏感。同时, 另有研究报道, 细胞凋亡常与激活ROS依赖性MAPKs介导的胱天蛋白酶依赖性途径相关, 表现出p38的激活和ERK的抑制<sup>[17]</sup>, 故以细胞凋亡为毒性终点, p38和ERK信号通路可作为检测3T3 NRU光毒性的分子标志物。

由于3T3 NRU试验无法解释单一细胞株缺乏组织复杂性问题, 本研究进一步探究了p38和ERK信号通路在光毒性豚鼠试验和EpiKutis人工皮肤的表达改变, 并观察到在此2种方法中, ERK信号通路在TA和CPZ分别刺激下表现出抑制与激活的相反现象; p38信号通路亦未表现出激活, 具有较好的相似性, 但与3T3 NRU试验的结果差异较大。由此, 在更复杂的系统中, 光毒性的p38和ERK信号通路机制仍需要进一步深入研究, 尚不能作为分子标志物。

皮肤中除真皮、表皮以外,还包括皮肤附属器官。对豚鼠皮肤组织进行 p38 和 Erk1/2 表达量检测,是多种复杂细胞的综合结果。替代方法本质上是一种“减法思维”,即 EpiKutis 人工皮肤减去了皮肤附属器官的结果;3T3 NRU 试验减去了表皮结果。考虑到光毒性的研究需尽量还原并模拟人类皮肤光毒性和损伤的真实场景,如表皮上发生的红斑和真皮上发生的水肿<sup>[4]</sup>,故本研究认为减去表皮的 3T3 NRU 试验方法的适用性,仍需进一步讨论。此外,虽然 p38 和 Erk1/2 尚不足以作为豚鼠试验和 EpiKutis 人工皮肤试验的分子标志物,但由于其具有相似的表达改变,与 3T3 NRU 方法相比,减去皮肤附属器官的结果似乎更可被接受。

## REFERENCES

- [1] OECD. Test No. 432: *In vitro* 3T3 NRU Phototoxicity Test[S]. OECD, Paris: OECD Publishing, 2004
- [2] 化妆品安全技术规范[S]. 2015: 500-502
- [3] KANG H, ZHANG J S, SANG J, et al. Establishment of reconstructed human epidermis model for *in vitro* phototoxicity test[J]. *Chin Pharmacol Bull(中国药理学通报)*, 2020, 36(6): 884-887.
- [4] KIM E J, YOUN N H, YI J S, et al. Evaluation of the skin phototoxicity of systemically administered pharmaceuticals in Sprague-Dawley rats[J]. *Toxicol Res*, 2021, 37(4): 435-442.
- [5] REISINGER K, BLATZ V, BRINKMANN J, et al. Validation of the 3D Skin Comet assay using full thickness skin models: Transferability and reproducibility[J]. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen*, 2018(827): 27-41.
- [6] WANG C C, XIA Q S, LI M, et al. Metabolic activation of pyrrolizidine alkaloids leading to phototoxicity and photogenotoxicity in human HaCaT keratinocytes[J]. *J Environ Sci Health C Environ Carcinog Ecotoxicol Rev*, 2014, 32(4): 362-384.
- [7] JING C X, GUO J L, LI Z Z, et al. Screening and research on skin barrier damage protective efficacy of different mannosylerythritol lipids[J]. *Molecules*, 2022, 27(14): 4648.
- [8] AARDEMA M J, BARNETT B B, MUN G C, et al. Evaluation of chemicals requiring metabolic activation in the EpiDerm™ 3D human reconstructed skin micronucleus(RSMN) assay[J]. *Mutat Res*, 2013, 750(1/2): 40-49.
- [9] GASPAR L R, THARMANN J, MAIA CAMPOS P M, et al. Skin phototoxicity of cosmetic formulations containing photounstable and photostable UV-filters and vitamin A palmitate[J]. *Toxicol Vitro*. 2013, 27(1): 418-25.
- [10] LI D, ZHU Y Z, LI H B, et al. Expression analysis of MAPK14 in skin[J]. *J Zhejiang Univ Sci Technol(浙江科技学院学报)*, 2023, 35(3): 219-225.
- [11] ONOUE S, KAWAMURA K, IGARASHI N, et al. Reactive oxygen species assay-based risk assessment of drug-induced phototoxicity: Classification criteria and application to drug candidates[J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2008, 47(4/5): 967-972.
- [12] KIM S Y, SEO S, CHOI K H, et al. Evaluation of phototoxicity of tattoo pigments using the 3T3 neutral red uptake phototoxicity test and a 3D human reconstructed skin model[J]. *Toxicol Vitro*, 2020, 65: 104813.
- [13] SHETH K, FRIEL J, NOLAN B, et al. Inhibition of p38 mitogen activated protein kinase increases lipopolysaccharide induced inhibition of apoptosis in neutrophils by activating extracellular signal-regulated kinase[J]. *Surgery*, 2001, 130(2): 242-248.
- [14] STEELMAN L S, CHAPPELL W H, ABRAMS S L, et al. Roles of the Raf/MEK/ERK and PI3K/PTEN/Akt/mTOR pathways in controlling growth and sensitivity to therapy-implications for cancer and aging[J]. *Aging*, 2011, 3(3): 192-222.
- [15] KIM K, PARK H, LIM K M. Phototoxicity: Its mechanism and animal alternative test methods[J]. *Toxicol Res*, 2015, 31(2): 97-104.
- [16] LÍŠKOVÁ A, LETAŠIOVÁ S, JANTOVÁ S, et al. Evaluation of phototoxic and cytotoxic potential of TiO<sub>2</sub> nanosheets in a 3D reconstructed human skin model[J]. *ALTEX*, 2020, 37(3): 441-450.
- [17] JIANG Y, WANG X Q, HU D D. Furanodienone induces G0/G1 arrest and causes apoptosis via the ROS/MAPKs-mediated caspase-dependent pathway in human colorectal cancer cells: A study *in vitro* and *in vivo*[J]. *Cell Death Dis*, 2017, 8(5): e2815.
- [18] 何旦. Erk 和 p38 MAPKs 信号通路在 mTOR 激活引起的小肠绒毛更新和衰老中的调控作用[D]. 上海交通大学, 2021.  
收稿日期: 2023-10-26  
(本文责编: 陈怡心)