



化妆品眼刺激试验替代方法标准化与展望

敖华英^{1,2}, 程树军¹, 潘芳¹, 谈伟君²

(1. 广东出入境检验检疫技术中心, 广州 510623; 2. 广东药学院, 广州 510310)

【摘要】 眼刺激试验是化妆品安全评价的主要测试项目,目前正尝试建立代替传统动物实验的体外方法,这些方法处于研发、验证和认可的不同阶段。尽管还没有单一体外试验能完全替代兔眼实验,但系统分析替代方法建立的原理、科学相关性和标准化程度的不同,有助于合理选择运用体外方法指导化妆品眼刺激的标识分类、质量检验、产品开发和机制研究。

【关键词】 眼刺激; 替代方法; 化妆品; 评估

【中图分类号】 R394.34; R332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2012)01-0074-05

doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2012.01.017

Standardization and Prospect of Alternative Methods to Cosmetics Eye Irritation

AO Hua-ying^{1,2}, CHENG Shu-jun¹, PAN Fang¹, TAN Wei-jun²

(1. Guangdong Entry-exit Inspection and Quarantine Technology Center., Guangzhou 510623, China;

2. Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510623, China)

【Abstract】 Eye irritation test is a major field for cosmetics safety assessment. Many different in vitro methods were designed to replace traditional animal testing, these methods are in the process of development, validation and acceptance with different stages. It is no single in vitro methods can completely replace the rabbit eye test, but with reasonable evaluation the scientific principle, relevance and standardization of alternative methods, which will contribute to select and guide the application of alternative methods including mechanism study, classification and labeling, quality control and product development for cosmetics.

【Key words】 Eye irritation; Alternative methods; Cosmetics; Evaluation

化妆品引起的局部眼刺激通常包括结膜、角膜、虹膜和泪腺的作用,其中角膜的影响排在首位,基于体内眼刺激作用发生的机制,目前已开发了多种替代方法,而单一体外实验仅能模拟复杂眼损伤作用中的某个方面。因此,有必要根据角膜损伤的发生机制,结合体外方法的原理和标准化应用程度,对目前眼刺激试验的诸多替代方法进行科学相

关性分析与适用性综述,为建立分层组合的替代方法策略奠定基础,以满足实际工作的需要。

1 眼刺激实验替代方法的原理和分类

眼刺激作用的发生是结膜、角膜、虹膜和泪腺等眼球结构共同参与的过程,其受累范围反映了眼

[基金项目] 广东省科技计划项目(2009B060300013)。

[作者简介] 敖华英(1986-),女,硕士生。E-mail: squeen900@163.com。

[通讯作者] 程树军(1971-),男,研究员,研究方向:动物试验替代方法研究及标准化。E-mail: chengciq@sohu.com。

刺激作用的严重程度。化学物对结膜的轻微刺激作用很少累及角膜,而继发于角膜损伤引起的结膜反应通常是中等程度以上的刺激性。基于大量化学物质体内眼刺激的实验观察表明,受试物暴露后最初几小时内(一般 3 h)角膜的损伤程度决定了眼睛损伤的持续时间和最终损害程度。一般来说,轻度刺激物只影响表层角膜上皮,轻度和中度刺激物主要影响上皮和表层基质,严重刺激物能穿透更深的基质发挥作用,甚至可能是损伤基质全部。有些迟发性化学物质(例如漂白剂)有可能在暴露 1 天后才造成深度损伤。角膜损伤程度与大体组织评分结果基本一致,而且损伤的可逆性和最初的损伤程度相关。体内眼刺激评分同样是按照角膜、结膜和虹膜损伤权重依次降低的关系建立评价方案,这一原理是开发和验证眼刺激替代方法的基础。根据实验体系的不同,目前建立的眼刺激作用替代模型可概括为细胞功能模型、类器官模型、重建人角膜模型和离体器官模型 4 类^[1]。

2 眼刺激实验替代方法的标准化

2.1 离体器官替代方法

牛角膜混浊和渗透性实验 (bovine corneal opacity and permeability, BCOP) 是 2009 年被 OECD 指南 437 认可的一种离体器官方法。牛角膜取自屠宰场废弃牛眼,将角膜固定于特制挟持器提供的正常生理环境中,角膜分隔夹持器为前后两室,将被测物作用于前室角膜上皮表面一段时间后,通过光浊度仪检测角膜混浊度及渗透性,评价被测物的眼刺激作用,结合角膜组织病理检测结果判断更准确。基于相同的原理,利用离体猪角膜开发了 PCOP (porcine corneal opacity and permeability) 方法^[2]。目前认为 BCOP 低估了受试物对虹膜和结膜的刺激作用,因而适于区分中等到重度眼刺激性物质,对于轻度及以下刺激物区分不够敏感(表 1)。BCOP 适用于不同物理性状和溶解性差异较大的液体和固体受试物,如表面活性剂原料和配方、个人护理用品和其它化妆品,也适用于化学品、药品和农药的眼刺激分类^[3]。

离体鸡眼实验 (isolated chicken eye test, ICE) 是 2009 年被 OECD 指南 438 认可的一种替代方法,利用短期离体培养的鸡眼球进行眼刺激检测。取鸡眼球固定于夹持器,暴露受试物,通过肉眼检查、测

量角膜厚度、表面灌流和荧光素渗透评价角膜损伤程度。以角膜水肿、透光值和荧光素滞留的数值作为毒理学终点,以平均最大分值计算刺激指数,对眼刺激物的严重程度进行分类,结合组织病理检测有助于结果的准确判断。ICE 实验的阳性结果可直接用于眼腐蚀性和严重刺激性分类,阴性结果不能作为区分刺激物和非刺激物的确认试验,需补充其它体外方法。适用于 ICE 检测的化学物多为可溶性液体,如表面活性剂和凝胶,对固体物质的测试效果不理想^[1]。

离体兔眼实验 (isolated rabbit eye test, IRE) 是从人道处死的实验兔分离完整眼球,固定于特定容器中,保持温湿度的同时,通过受试物与离体兔眼球的直接作用,检测角膜透光值(角膜通透性)和厚度(角膜肿胀)程度评价受试物眼刺激性。通过不同暴露时间和观察指标的组合分析可对受试物的总体损伤做出评估。通常导致角膜水肿超过 15% 的化学物可认为具有严重眼刺激性。目前认为 IRE 实验主要用于预测角膜损伤,不能用于评估受试物对结膜的作用或角膜损伤后的恢复作用。适用检测中等到严重程度的刺激性物质,结合角膜组织学检查可提高预测能力。该方法对碱性物质、阴离子和阳离子表面活性剂、化妆品成分和化学物质较敏感,对固体物质不敏感^[4]。

2.2 类器官替代方法

鸡胚绒毛膜尿囊膜实验 (HET-CAM) 是利用鸡胚绒毛膜尿囊膜结构与人结膜相似的特点开发的替代方法,HET-CAM 试验主要测定 3 种反应,即出血、血管溶解和凝血,受试物直接接触 CAM 膜,于 5 min 内评价上述三种指标的发生情况。预测模型可采用反应时间法(即测定每一种反应终点出现的时间)或刺激阈值法(即测定导致上述毒性终点发生的受试物浓度)。HET-CAM 实验的结果观察易受操作者主观因素影响,难以量化,改进后的绒毛膜尿囊膜苔盼蓝染色试验 (chicken chorioallantoic membrane-trypan blue staining, CAM-TB) 通过测定 CAM 吸收台盼蓝的量来检测受试物损伤作用,提高了实验的重复性。HET-CAM 主要适用于无刺激到轻度刺激物的预测或筛选,对中度以上的刺激物应补充其它实验确认。适合 HET-CAM 检测的化合物包括多种类型液体原料和产品,特别适用于表面活性剂和表面活性剂配方。对固体、不溶性或粘稠物质的测试重复性较差,色素和染料测试应慎重^[5]。

绒毛膜尿囊膜血管试验 (chorioallantoic membrane vascular assay, CAMVA) 试验是简化了的 HET-CAM 方法,只观察受试物暴露 CAM 30 min 后血管的变化(出血、血管溶解和凝血),计算使 50% 的鸡胚出现上述损伤的受试物浓度。CAMVA 法适用于轻度到中度眼刺激性化合物的检测,也可正确区分刺激物和非刺激物,但不能用于严重刺激性物质的分类。适于检测物质的类型同 HET-CAM 法^[1]。

蛞蝓粘膜刺激实验 (slug mucosal irritation, SMI) 以低等生物蛞蝓作为受试材料,利用其体表粘膜受到刺激后会释放粘液和分泌物的特点模拟眼球结膜和角膜的功能,通过对分泌的粘液量、乳酸脱氢酶、蛋白质和碱性磷酸盐的测定评估被测物的刺激性。该方法可以区分无刺激和刺激性物质,适用于检测表面活性剂、酯、醇、酮及混合物,以及黏性粉状配方的安全评价。

2.3 重组人角膜组织模型 (human corneal epithelium models, HCE)

EpiOcular 模型是美国 MatTek 公司生产,由来源于正常人的表皮角质细胞生长于嵌入式细胞培养板以无血清培养基制备而成,细胞分化形成的多层结构与角膜上皮相似。EpiOcular 试验的测试终点主要是 MTT 检测得到 ET_{50} (组织活性降低 50% 的有效暴露时间) 还包括 IL-1 α 、PGE₂、LDH 和钠荧光素渗透性检测。SkinEthic™ HCE 模型由法国 SkinEthic 实验室开发,在聚碳酸酯膜上接种人角膜上皮细胞 (HCT 细胞系),气-液界面培养形成由多层上皮细胞组成的与人眼角膜粘膜类似的重建组织。角膜上皮短时接触被测物后,采用 MTT 法或 LDH 释放测定组织活性,或测定细胞因子 (例如,IL-1 α 、IL-6、IL-8、PGE₂) 定量释放和基因表达,标准化测试指标是 ET_{50} 。这两种角膜模型已商品化供应^[6-7]。

HCE 模型适用于检测轻微到中度范围内的眼刺激物,还可用于区分高中度和严重刺激物。适用于各类物理性质的化合物测试,在化妆品工业中,用于确定受试物的毒性限量 (如测定轻微作用水平剂量),或用于产品配方阶段的临床前安全性试验,以及用于配方比较和优化等 (表 1)。

2.4 基于细胞功能的替代方法

中性红摄取 (NRU) 或释放 (NRR) 试验:利用活细胞能摄取中性红染料特性,可开发基于中性红染料摄取或释放的检测方法,前者是先将细胞与受

试物作用,通过定量测定染料的摄取量反应细胞的活性;后者是先将活细胞用染料负载后再与受试物作用,通过死亡细胞释放出的染料间接反应细胞的活性。多种原代细胞和细胞系均可用于实验,如中国仓鼠 V79、CHO、3T3 Balb/c 和兔角膜细胞 (SIRC 系)。NRU 在 549nm 下测定终溶液的光密度值,通过剂量-反应曲线得到 IC_{50} (使细胞中性红摄取能力下降 50% 的受试物浓度)。NRR 在 540nm 处测定终溶液的光密度,通过剂量反应曲线计算 NRR_{50} (使细胞中性红释放下降 50% 的受试物浓度)。两个实验的终点均容易测量,操作简单、快速、重复性好,可以定量评估化合物潜在的角膜损伤能力。适用于温和眼刺激性物质的筛查,适用于大多数液体溶解性物质,特别是表面活性剂。但不合适微溶、高挥发性、有色物质或固体物质的测试^[1]。

红细胞溶血实验 (red blood cell haemolysis test, RBC) 采用化合物与哺乳动物红细胞直接接触,通过定量检测红细胞溶血,以及释放出细胞外的血红蛋白变性程度,模拟角膜的损伤作用。与其他细胞实验和商品化角膜模型相比,RBC 实验成本低廉且快速,与 HET-CAM 实验相关性良好,适用于区分极轻度和非轻度刺激物,特别是潜在急性眼刺激性物质的快速筛查。检测物质类型包括表面活性剂及相关产品^[8]。

荧光素漏出实验 (fluorescein leakage, FL) 采用单层上皮细胞培养形成的紧密连接模拟角膜上皮细胞的屏障功能,通过检测紧密连接和桥粒受损后发生的荧光素漏出量,判断化合物是否具有眼刺激性。被测物浓度引起 20% 的荧光素漏出 (FL_{20}) 的值可用于评估被测物潜在眼刺激性。FL 实验适用检测轻度到中等眼刺激性物质,适合于表面活性剂及相关物质、醇的检测^[1]。

细胞传感器实验 (silicon Microphysiometer, SM) 是基于细胞代谢活性改变的实验。培养的细胞会释放酸性代谢物,使培养基 pH 值下降,进而引发硅膜感受器表面电位改变,试验前先检测细胞基础代谢率,然后不断逐渐增加被测物浓度,通过间接测量细胞外 pH 值的变化检测代谢率的改变。计算 MRD_{50} (使细胞代谢率减少 50% 的受试物剂量) 判断被测物的潜在眼刺激性。SM 已通过 ECVAM 的三期验证,常用于至上而下的眼刺激组合策略的一部分,用于检测腐蚀性和严重眼刺激性化合物。适用于水溶性化合物的测试 (表 1)。

表 1 眼刺激替代方法
Tab. 1 Alternative methods to eye irritation

替代模型 Alternative model	科学性 Scientific		适用性 Availability	
	模拟损伤部位 Modeling ocular effect	评估终点 Measured endpoints	检测物质类型 Chemical class	检测刺激物范围 Irritancy range
牛角膜混浊和渗透性实验 BCOP	角膜 Corneal	角膜混浊、肿胀和渗透性, 组织学检查 Corneal opacity, swelling, permeability; Histopathology examination	①②③	中度到严重刺激性 Moderate to severe irritants
离体鸡眼实验 ICE	角膜 Corneal	角膜混浊、肿胀及荧光素滞留、肉眼和组织学检查 Corneal opacity, swelling, fluorescein retention, gross and histological examination	①②	腐蚀性和严重刺激性 Very severe to corrosives irritants
离体兔眼实验 IRE	角膜 Corneal	角膜混浊、肿胀和屏障功能受损, 组织学检查 Corneal opacity, swelling and impaired barrier function, histological examination	①②	中度到严重刺激性 Moderate to severe irritants
鸡胚绒毛膜尿囊膜实验 HET-CAM	结膜 Conjunctival	血管变化(出血、凝血和溶解) Vascular changes (hemorrhage, blood coagulation and dissolution)	①②③ 有色固体除外	无刺激性到中度刺激性 Non-irritants to moderate irritants
绒毛膜尿囊膜血管实验 CAMVA	结膜 Conjunctival	血管变化(出血、凝血和血管溶解) Vascular changes (hemorrhage, blood coagulation and dissolution)	①②③ 有色固体除外	轻度到中度刺激性 Mild to moderate irritants
蛞蝓粘膜刺激实验 SMI	眼球 ocular	粘液分泌量、乳酸脱氢酶、蛋白质和碱性磷酸盐 Mucus secretion, LDH, protein and AKP	①②③	无刺激性和刺激性物质 Non-irritants to irritant irritants
SkinEthic 体外重组人角膜上皮模型 HCE	角膜 Corneal	组织活性(%) 或 ET ₅₀ tissue activity (%) or ET ₅₀	①②③	无刺激性到中度刺激性 Non-irritants to moderate irritants
EpiOcular 模型	角膜 Corneal	组织活性(%) 或 ET ₅₀ tissue activity (%) or ET ₅₀	①②③	无刺激性到中度刺激性 Non-irritants to moderate irritants
中性红释放实验 NRR	角膜 Corneal	渗透膜损伤、溶酶体释放、细胞活性 Permeable membrane damage, lysosomal release, cells activity	①②	轻度到中度刺激性 Mild to moderate irritants
中性红摄取实验 NRU	角膜 Corneal	使细胞摄取中性红抑制 50% 的被测物浓度 (NR ₅₀) The concentration of test article which inhibits the uptake of neutral red by 50% (NR ₅₀)	①②	轻度眼刺激性物质 Mild irritants
红细胞溶血实验 RBC	角膜 Corneal	红细胞溶血、血红蛋白变性 Red blood cell hemolysis, hemoglobin denaturation	①	轻度到中度刺激性 Mild to moderate irritants
荧光素漏出实验 FL	角膜 Corneal	被测物浓度引起 20% 的荧光素漏出 (FL ₂₀) Concentration of test chemical causing 20% fluorescein leakage	①	轻度到中度刺激性 Mild to moderate irritants
硅生理仪实验 SM	眼球 ocular	代谢率减少 50% 的剂量 (MRD ₅₀) The concentration of test material to reduce the acidification rate to 50%	①	腐蚀性和严重刺激性物质 Very severe to corrosives irritants

注: ① 表面活性剂; ② 除表面活性剂以外的其它可溶性化合物; ③ 固体和粘性难溶化合物
Note: ① surfactant; ② water-soluble chemicals, except surfactant; ③ poorly water-soluble chemicals

3 眼刺激实验替代方法展望

3.1 现有方法的优化和标准化

除了法规认可的 4 项标准化替代方法外, 多数方法处于前验证研究阶段, 其中重建人工角膜模型是最具前景的替代方法。基于体外皮肤模型已于 2010 年被 OECD 认可为替代皮肤刺激试验的标准检测方法, 角膜模型有望 2 年内通过验证。现有的 2 种模型分别是来自欧洲 SkinEthic 公司和美国

MatTek 公司, 两者所用细胞来源不同, 因此需要优化方法和统一 SOP, 还需要增加检测终点以提高预测能力, 如对屏障功能的影响有助于区分非刺激性和轻微刺激性物质^[6-7]。

3.2 新替代方法的研发

现有体外方法不能预测化合物对组织修复能力的损伤, 也无法检测组织损伤后的修复能力, 新方法的研发基于以下几点: ① 离体角膜维持培养模型, 观察化学物暴露后角膜的损伤及修复, 研究离体角膜生理动力学功能改变和损伤后信号的释放

用于预测化学物眼损伤及修复机制^[9]; ②建立含上皮、基质和内皮的多层角膜模型,以了解化合物对角膜损伤程度和修复质量的预测,体外重建结膜模型也是重要方向; ③运用基因组学技术,采用模式识别等方法建立反映角膜损伤和修复的新终点。

3.3 非生物预测模型

由于眼刺激生物学机制的复杂性,建立计算机模型非常困难,现有模型多数是对眼刺激生理学作用的模拟,如渗透作用或腐蚀性。这些模型包括:经典的定量模型;分类模型;分子-膜相互作用模型;采用非线性 QSAR 技术的神经网络模型和专家系统(如 TOPKAT、BfR 的风险决策树)。其中德国风险评估研究所开发的决策支持系统已进入 ECVAM 的验证程序^[10]。另外一项可用于眼刺激替代方法研究的是毒理学相关阈值法(TTC),它建立在在对现有大量化学物质毒性资料分析的基础上,利用大多数已知化学物的暴露阈值,评估类似新物质的危害,但用于眼刺激的研究还不多见。

4 体外方法分层组合策略

将现有的不同预测能力和适用范围的体外方法组合建立整合策略,是替代眼刺激动物实验的理想模式^[11-12],即使今后有新的方法开发和通过验证,也只能是减少组合的方法数量和提高整合方法的预测能力。不同方法的组合应建立在对现有方法的技术原理和适用范围科学分析的基础上,并应考虑: ①建立科学合理的化妆品眼刺激替代的整合策略; ②整合方法如何用于风险评估和安全评价; ③整合方法的科学性如何验证; ④对不同剂型的化妆品原料和产品进行逐类分析,如乳液类、彩妆类、粉饼类、膏霜类等; ⑤考虑化妆品以外的其它化合物或新物质的评价,如农药、纳米材料、医疗器械等^[12-13]。

参考文献:

[1] 程树军,焦红. 实验动物替代方法原理与应用[M],北京:科学出版社 2010:282-307.
[2] Van den Berghe C, Guillet MC, Compan D. Performance of porcine corneal opacity and permeability assay to predict eye irritation for water-soluble cosmetic ingredients[J]. Toxicol In Vitro. 2005,19(6):823-30.

[3] Creton S, Dewhurst IC, Earl LK, et al. Acute toxicity testing of chemicals—Opportunities to avoid redundant testing and use alternative approaches[J]. Crit Rev Toxicol,2010,40(1):50-83.
[4] Jester JV, Ling J, Harbell J, et al. Measuring depth of injury (DOI) in an isolated rabbit eye irritation test (IRE) using biomarkers of cell death and viability[J]. Toxicol In Vitro,2010,24(2):597-604.
[5] Budai P, Lehel J, Tavaszi J, et al. HET-CAM test for determining the possible eye irritancy of pesticides[J]. Acta Vet Hung,2010,58(3):369-77.
[6] José C, Marie HG, Damien L, et al. In vitro assessment of eye irritancy using the Reconstructed Human Corneal Epithelial SkinEthic? HCE model: Application to 435 substances from consumer products industry[J]. Toxicology in Vitro Volume,2010,24,(2):523-537
[7] Kaluzny Y, Argebeau-Thornton L, Kandarova H, et al. Expanded utilization of the EpiOcular™ human corneal tissue model for ocular irritation testing. Poster presentation SOT,2008. USA.
[8] Alves EN, Presgrave Rde F, Presgrave OA, et al. A reassessment of the in vitro RBC haemolysis assay with defibrinated sheep blood for the determination of the ocular irritation potential of cosmetic products: comparison with the in vivo Draize rabbit test[J]. Altern Lab Anim,2008,36(3):275-84.
[9] Seaman CW, Whittingham A, Guest R, et al. An evaluation of a cultured human corneal epithelial tissue model for the determination of the ocular irritation potential of pharmaceutical process materials[J]. Toxicol In Vitro,2010,24(6):1862-70.
[10] Tsakovska I, Saliner AG, Netzeva T, et al. Evaluation of SARs for the prediction of eye irritation/corrosion potential: structural inclusion rules in the BfR decision support system. SAR QSAR. Environ. Res. 2007,18(3C4):221-235.
[11] McNamee P, Hibatallah J, Costabel-Farkas M, et al. A tiered approach to the use of alternatives to animal testing for the safety assessment of cosmetics: eye irritation [J]. Regul Toxicol Pharmacol,2009,54(2):197-209.
[12] Grindon C, Combes R, Cronin MT, et al. An integrated decision-tree testing strategy for eye irritation with respect to the requirements of the EU REACH legislation [J]. Altern Lab Anim. 2008,36, Suppl:111-22.
[13] Kishore AS, Surekha P, Murthy PB, et al. Assessment of the dermal and ocular irritation potential of multi-walled carbon nanotubes by using in vitro and in vivo methods [J]. Toxicol Lett,2009,191(2-3):268-74.

(修回日期)2011-10-14