

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2015.01.038

皮肤刺激实验替代模型的研究新进展*

葛善珍^{1,2} 牛云彤² 卢涛^{2△}

(1 河北联合大学 河北 唐山 063000; 2 中国武装警察部队后勤学院附属医院 天津 300162)

摘要:皮肤刺激性是日常使用化妆品最常见的不良反应之一。人类健康相关产品危险性评价常做皮肤刺激性实验,皮肤刺激性试验是化妆品原料及产品安全性评价的主要项目。传统皮肤刺激试验采用实验动物进行,2013年3月11日欧盟已经禁止销售基于动物实验研发的化妆品原料及产品。随着组织工程技术和现代生物技术的发展,多种替代动物试验的体外模型被开发和应用,新的皮肤刺激物陆续被发现。欧盟多采纳重组人表皮实验方法作为新体外皮肤实验指南(包括模型 Episkin 和模型 Epiderm),随着体外模型重建技术的不断改善,不仅拓展了皮肤模型的临床应用范围,也必然推动新的敏感而特异的皮肤标志物的发现和应用。

关键词:皮肤刺激实验;替代模型;组织工程;永生化细胞;丝素蛋白

中图分类号:R318.08 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2015)01-167-04

Progress of Research on the Skin Irritation Test Alternative Models*

GE Shan-zhen^{1,2}, NIU Yun-tong², LU Tao^{2△}

(1 Hebei United University, Tangshan, Hebei, 063000, China

2 The Armed Police Hospital Dermatology of Tianjin, Tianjing, 300162, China)

ABSTRACT: Skin irritation is one of the most common adverse reactions in daily using cosmetics. Risk assessment of Human health related products often do skin irritation test, irritation test is the major projects to aspects of cosmetic of raw materials and product safety assessment. Traditional skin irritation tests use experimental animals. EU ban on animal-tested cosmetics goes into force on 11 March 2013. With the development of the tissue engineering and modern biotechnology, number of alternative animal testing in vitro models have been developed and applied, and new skin irritants were successively found. The EU adoption of experimental methods of recombinant human epidermal skin in vitro experiments as a new guide, such as Episkin and Epiderm. With the improving of vitro model reconstruction technology continues, the scope of the clinical application of skin model has been expanded, and it is bound to promote the discovery and application of new skin sensitive and specific markers.

Key words: Skin Irritation Test; Alternative Model; Tissue Engineering; Immortized Cell; Silk Fibroin

Chinese Library Classification(CLC): R318.08 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2015)01-167-04

1 皮肤刺激实验

随着组织工程和现代生物技术的不断进步,采用体外细胞、组织培养以及重建人皮肤模型代替整体动物进行皮肤安全性的研究越来越受到关注,如体外皮肤模型用于药品、化妆品和皮肤刺激试验等^[1,2]。皮肤刺激试验是人类健康相关产品危险性评价的常见项目^[3]。皮肤刺激性是指皮肤接触某些特定物资后产生的局部可逆性损伤,皮肤腐蚀性指的是指皮肤接触某些特定物资后产生的不可逆损伤。体外试验的方法主要通过检测刺激物对培养细胞活性与代谢的变化,来测试皮肤模型的敏感性和特异性,从而模拟正常人体皮肤。

2 传统皮肤刺激试验

传统检测物资是否对人体皮肤造成刺激反应的方法是 Draize 实验^[4]。急性皮肤刺激试验一般用兔进行;多次皮肤刺激试验是要在 14 天内对实验动物进行重复皮肤染毒。但上述方法存在着一些缺陷:(1)兔和人存在种属间差异。(2)对实验动物种类、品系、质量和动物试验环境要求严格,成本高、试验周期长。(3)观察指标主要为表观的定性判别,难以量化。(4)牺牲大量实验动物为代价,不符合减少(Reduction)、替代(Replacement)、优化(Refinement)原则,简称 3R 原则。早在 2002 年 11 月 7 日欧盟达成协议,欧盟范围内从 2009 年起在禁止使用动物进行皮肤刺激实验^[5],2013 年 3 月 11 日欧盟已禁止使用动物进行化妆品原料的安全性评价,并列入 WTO 双边协议条款。这意味着任何人如果想在欧盟地区销售新的化妆品及原料,都不得在全球任何地区拿动物做实验。

* 基金项目:国家自然科学基金项目(81072964)

作者简介:葛善珍(1988-),女,硕士研究生,主要研究方向:皮肤性病学与组织工程学,

电话:18822041722, E-mail: shanghanyixue@163.com

△ 通讯作者:卢涛,主任医师,医学博士,硕士生导师,主要研究方向:白癜风与组织工程学,

电话:022-60578764, 13102201120, E-mail:48144051@qq.com

(收稿日期:2014-06-30 接受日期:2014-07-24)

3 皮肤刺激试验替代方法

皮肤刺激试验的替代方法,主要有以下几种:体外细胞培养、皮肤组织培养和重建人皮肤替代物等,如成纤维细胞培养,离体动物(大鼠、猪、兔)皮肤组织培养,重建人皮肤(表皮、真皮

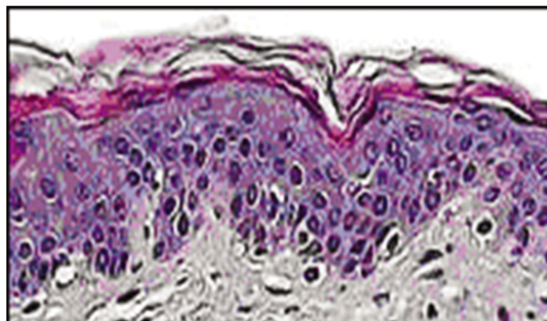


图1 正常人皮肤表皮结构图

Fig. 1 Normal skin epidermis

或全层皮肤)模型等^[67]。近20年来,国内外陆续开发和应用了多种体外模型来替代动物试验^[8],模拟正常人皮肤表皮结构(见图1/ Fig. 1),体外重组人皮肤表皮结构(见图2/ Fig.2),必须具有足够厚的角质层,能够耐受刺激物和腐蚀物一定的时间。

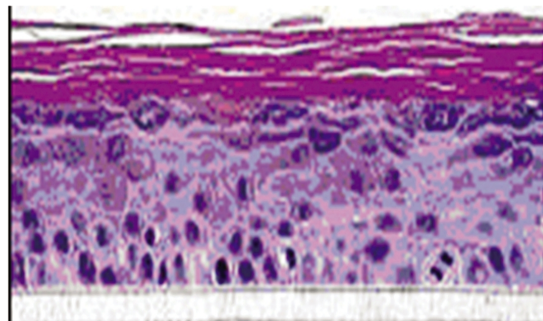


图2 体外重组人皮肤表皮结构

Fig. 2 Recombinant human epidermal structure in vitro

3.1 体外细胞培养

有研究者以聚碳酸酯膜为支架,以人皮肤角质形成细胞作为细胞的来源,构建组织工程表皮模型。构建的组织工程表皮模型分化良好,具有与正常表皮相似的结构,结果表明:组织工程表皮模型与正常表皮有相似的组织结构,并且具有一定的屏障功能^[9]。程树军等^[10]分离正常人原代角质形成细胞(简称NHK细胞)和成纤维细胞,采用筏式培养法,先将成纤维细胞与复合胶原凝胶支架共培养,构建真皮,再于其表面放置NHK细胞,无血清培养基-液界面培养完成皮肤重建,成纤维细胞可在复合胶原凝胶支架内粘附和增殖形成真皮结构,NHK细胞可在支架表面分化增殖形成含基底层、棘层和角化层的复层表皮结构,免疫组化表明角质层细胞呈CK10阳性,基底膜呈波形蛋白和层粘连蛋白阳性。目前细胞培养多采用人角朊细胞,但因其来源有限,选择由人角质形成细胞经诱导形成的HaCaT细胞,具有永生性和与正常角质形成细胞相似的增殖分化的特性,更适合作为体外培养组织工程皮肤的种子细胞^[11]。

3.2 皮肤组织培养

陈灿等^[12]将表皮细胞与少量成纤维细胞混合接种在异种猪脱细胞真皮的真皮面,发现表皮细胞在脱细胞真皮上黏附增殖,能促进基底膜充分形成,提示脱细胞真皮适合皮肤替代物的真皮支架。曹玉萍等^[13]用永生化的角质形成细胞(HaCaT细胞)和黑素细胞在鼠尾胶原表面进行气液界面共培养,构建出更接近人体天然的皮肤结构。有研究者将鼠胚胎成纤维细胞(mouse embryonic fibroblasts,MEFs)和普通成纤维细胞(fibroblasts,FBs),复合鼠尾胶原采用三维培养模式,将MEFs、普通鼠FBs、空白三维构建分别覆盖于制作后的大鼠全层皮肤缺损模型,结果表明:以MEFs和鼠尾胶原制备的三维结构具有良好的生物相容性和降解特性,加速创面的愈合^[14]。

3.3 重建人皮肤替代物

Ghassemifar R^[15]等将丝素蛋白基质接种人耳鼓膜细胞后发现,丝素蛋白比组织培养塑料膜更利于细胞接触、粘附和增殖,可用于组织工程鼓膜的制备材料。Levin B^[16]研究制备丝素

蛋白膜,接种人耳鼓膜角质形成细胞,其结果表明丝素蛋白作为支架具有良好的生物相容性及可降解性,可运用于鼓膜修补手术。Katoh M^[17]研究通过体外皮肤刺激试验,构建出EPI-MODEL人表皮细胞模型,通过检验得出本模型符合ECVAM(欧洲替代方法验证中心)性能标准。Min BM^[18]研究在超细纤维、纳米纤维和薄膜的丝素蛋白基质上,分别培养人口腔角质形成细胞,比较三种材质的特性,结果表明纳米纤维优于其他两种材质,可作为伤口敷料和组织工程支架,运用于医学领域。

4 替代模型的验证

科学验证是替代试验方法从开发到接受之间的必然过程,近年来,用于代替体内皮肤刺激或腐蚀试验的体外重建皮肤替代物的技术发展很快,出现了各种不同的皮肤模型和检测方法^[19]。欧洲替代方法验证中心发布的ECVAM,在遵循验证的基础上,结合皮肤模型及预期毒性终点的特点,建立统一的验证标准,以规范皮肤模型和体外方法的开发、标准化和比对验证。皮肤刺激实验模型验证主要分三个连续的步骤实施:(1)形成标准化的实验操作程序;(2)对替代模型进行预验证;(3)严格按照OECD制订的替代方法验证程序,采用双盲法验证正式验证。在实验室内、实验室间各自用三种方法测试58种编码的化学物,每种方法循环测试3次。评估该模型的可重复性和可预见性具体方法:阳性对照和阴性对照必须符合测试标准要求(包括OD值或是存活率),对不符合要求的测试可以用重复测试结果来代替,允许重复两次。实验室内重复性应该 $\geq 85\%$,实验室间重复性应该 $\geq 80\%$,可预见率(因测试方法的目的不同而不同,如果是完全代替则要求假阴性、假阳性 $\leq 30\%$),确保获得足够的分析数据,应该完成85%以上的测试次数。

5 OECD指南推荐皮肤刺激性实验模型^[20]

目前几种重组人皮肤替代模型有EpiskinTM、EpiDerTM和SkinEthicTM,因其具有很好的实验重复性,已被ECVAM【European Center for the Validation of Alternative Methods, EC-

VAM 即 " 人皮肤模型用于体外皮肤刺激试验的技术标准 "]所采纳现已进入正式验证研究^[20]。

5.1 EpiSkinTM 模型试验(EPISKIN SNC, Lyon, France)

2007 年 4 月, ECVAM 已将其作为经验证的体外刺激试验模型。主要方法是先将人类 IV 型胶原覆盖于一层 I 型胶原凝胶上, 形成类似真皮结构, 然后再将人角朊细胞接种于此结构上形成真皮类似物。通过 MTT 代谢实验和细胞因子 (如白介素-1a) 释放测试其活性, 可用于检验不同物质形态的刺激性及非刺激性化学物, 该试验模型现已经制成标准试剂盒。

5.2 EpiDermTM 模型(MatTek Corporation, Ashland, MA, USA)

主要方法是将人皮肤的角朊细胞种植于特殊制备的 Millicell 细胞嵌入培养板中, 形成多层分化的人皮肤表皮模型, 接近正常人体内皮肤结构。已经制成标准试剂盒, 试剂盒内包括维持培养基和 MTT 检测成分。用 EpiDermTM 模型试验评价受试物皮肤刺激性大, 和 EpiSkin 的方案类似, 该模型已商业化, 广泛运用于皮肤刺激实验。

5.3 SkinEthicTM 模型(Laboratoire Skinethic, Nice, France)

主要方法是先从人包皮中提取出来正常的成人角朊细胞, 再将其培养在聚碳酸酯滤器上, 构建的一种重组人表皮模型。此模型现已商品化。ECVAM 在 2008 年 11 月已通过作为皮肤刺激试验经验证的替代模型。

6 国内外研究

国内外目前大多采用胶原凝胶作为组织工程皮肤检测模型的支架, 但是存在着不足, 主要表现在胶原凝胶 / 细胞复合物在培养过程中易收缩, 细胞密度发生较大变化, 所构建的组织工程表皮面积也发生变化, 这些不足导致了应用此类组织工程表皮作检测使用时存在较大不可避免的误差。丝素蛋白生物相容性良好, 与目前被认为是生物相容性最好的物质—胶原蛋白效果相当, 而且比聚乳酸等一些组织工程常用支架材料效果要好^[22], 设想如果用永生生化皮肤细胞株复合丝素蛋白支架构建皮肤模型, 所构建的皮肤模型其特异性、敏感度和准确度可能会更高, 与正常人体皮肤会更相似, 更加适合作为皮肤刺激实验的替代模型。

7 展望

综上所述, 动物保护组织呼声的提高以及 3R 原则的提出, 动物替代实验已经成为一种趋势, 皮肤刺激实验替代模型的发展越来越受到人们的关注。近 10 多年来, 组织工程研究不断深入, 对皮肤刺激实验的探索不仅仅局限于开发出新的体外替代模型, 而是加快已有的经验证的皮肤刺激替代模型与方法的改善, 提高试验的准确度、可重复性和灵敏度。目前, 更加值得关注的重点是寻找能鉴别更加温和刺激物的替代模型。相信随着生物技术的不断发展, 皮肤刺激体外替代模型技术会更加成熟, 体外替代模型会越来越接近正常人体皮肤的结构和功能, 进一步扩大皮肤替代模型的应用范围, 提高在生物领域与医学临床实践中的实用价值, 促进新的敏感而特异的皮肤标志物的开发, 也必然推动皮肤刺激实验的进一步发展。

参考文献(References)

[1] Coquette A, Berna N, Vandenbosch A, et al. Analysis of inter-

leukin-1alpha (L-1alpha) and interleukin-8 (L-8) expression and release in in vitro reconstructed human epidermis for the prediction of in vivo skin irritation and/or sensitization [J]. Toxicol in Vitro, 2005, 17(3): 311-321

[2] Schafer-Korting M, Bock U, Diembeck W, et al. The use of reconstructed human epidermis for skin absorption testing: results of the validation study [J]. ALTA, 2008, 36 (2): 161-187

[3] 程树军, 潘芳. 体外皮肤刺激模型生物标志研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2010, 03: 64-68

Cheng Shu-jun, Pan Fang. In vitro skin irritation model biomarker research [J]. Chinese Journal of Comparative Medicine, 2010, 03: 64-68

[4] 谭小华, 杨杏芬. 皮肤刺激动物实验替代物研究的现状与发展 [J]. 毒理学杂志, 2008, 01: 56-60

Tan Xiao-hua, Yang Xing-fen. Skin irritation study alternatives to animal experiments Situation and Development [J]. Journal of Toxicology, 2008, 01: 56-60

[5] 程树军, 邹志飞, 黄韧. 化妆品毒性检验壁垒替代技术的研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2006, 16: 3792381

Cheng Shu-jun, Zou Zhi-fei, Huang Ren. Toxicity testing of cosmetics barriers Progress of alternative technologies [J]. Chinese Journal of Comparative Medicine, 2006, 16: 3792381

[6] Schafer Korting M, Bock U, Diembeck W, et al. The use of reconstructed human epidermis for skin absorption testing: results of the validation study [J]. ALTA, 2008, 36 (2): 161-187

[7] 程树军, 黄锦桃, 李海标, 等. 体外构建的皮肤模型 Inspectskin I 修复裸鼠全层皮肤缺损 [J]. 中山大学学报(医学科学版), 2009, 30(2): 132-135

Cheng Shu-jun, Huang Jin-tao, Li Hai-biao, et al. Vitro skin model Inspectskin I repair of full-thickness skin defects in nude mice [J]. Journal of Sun Yat-sen University (Medical Sciences), 2009, 30(2): 132-135

[8] 程树军, 潘芳. 揭秘化妆品安全性评价技术(六)—化妆品的皮肤刺激 / 腐蚀性及其实验方法 [J]. 中国化妆品(行业) 2011, 06: 95-101

Cheng Shu-jun, Pan Fang. Secret cosmetic safety evaluation techniques (six) - cosmetic skin irritation / corrosion and test methods [J]. China Cosmetics Review, 2011, 06: 95-101

[9] 李中良, 伍津津, 杨桂红, 等. 用于替代皮肤刺激试验的组织工程表皮模型的构建研究 [J]. 中国修复重建外科杂志, 2011, 25(2): 129-132

Li Zhong-liang, Wu Jin-jin, Yang Gui-hong, et al. Skin irritation test used to replace tissue engineering Construction of epidermal model [J]. Chinese Journal of Reparative and Reconstructive Surgery, 2011, 25(2): 129-132

[10] 程树军, 焦红, 秦瑶. 体外构建新型化妆品检测用皮肤 Inspectskin I 的初步研究 [J]. 毒理学杂志, 2008, 22(6): 428-431

Cheng Shu-jun, Jiao Hong, Qin Yao. Vitro detection of new cosmetic skin Inspectskin I preliminary study [J]. Journal of Toxicology, 2008, 22(6): 428-431

[11] 朱崇涛, 彭代智, 周新, 等. 以 HaCaT 细胞为种子细胞构建新型人组织工程皮肤 [J]. 现代生物医学进展, 2007, 7(6): 817-829

Zhu Chong-tao, Peng Dai-zhi, Zhou Xin, et al. HaCaT cells as seed cells to build a new human tissue-engineered skin [J]. Progress in Modern Biomedicine, 2007, 7(6): 817-829

- [12] 陈灿,李高峰,刘伟,等.混合接种法构建组织工程皮肤[J].中华整形外科杂志,2010,26(5): 365-368
Chen Can, Li Gao-feng, Liu Wei, et al. Mixed inoculation method to construct tissue-engineered skin[J]. Chin J Plast Surg, 2010, 26(5): 365-368
- [13] 曹玉萍,周武庆,马鹏程,等.用 HaCaT 细胞和正常人黑素细胞构建组织工程皮肤[J].毒理学杂志, 2009, 23(5): 341-344
Cao Yu-ping, Zhou Wu-qing, Ma Peng-cheng, et al. Using HaCaT cells and normal human melanocyte skin tissue engineering[J]. Journal of Toxicology, 2009, 23(5): 341-344
- [14] 刘柳,李武德,蔡国斌.含鼠胚胎成纤维细胞的组织工程皮肤体外构建及大鼠移植研究[J]. 中华整形外科杂志,2011, 27(4): 284-289
Liu Liu, Li Wu-de, Cao Guo-bin. Containing mouse embryonic fibroblasts in vitro and tissue-engineered skin transplantation in rats[J]. Chin J Plast Surg, 2011, 27(4): 284-289
- [15] Ghassemifar R, Redmond S, Zainuddin, Chirila TV. Advancing towards a tissue-engineered tympanic membrane: silk fibroin as a substratum for growing human eardrum keratinocytes [J]. J Biomater Appl, 2010,24(7):591-606
- [16] Levin B, Redmond SL, Rajkhowa R, et al. Utilising silk fibroin membranes as scaffolds for the growth of tympanic membrane keratinocytes, and application to myringoplasty surgery[J]. J Laryngol, 2013, 127(Suppl 1): S13-20
- [17] Katoh M, Hamajima F, Ogasawara T, et al. Assessment of human epidermal model LabCyte EPI-MODEL for in vitro skin irritation Testing according to European Centre for the Validation of Alternative Methods (ECVAM)-validated protocol[J]. J Toxicol Sci, 2009,34(3):327-334
- [18] Min BM, Jeong L, Nam YS, et al. Formation of silk fibroin matrices with different texture and its cellular response to normal human keratinocytes[J]. Int J Biol Macromol, 2004,34(5):281-288
- [19] 程树军,秦瑶,步犁.体外重建人体皮肤模型刺激试验的验证[J].实验动物与比较医学, 2012,32(3): 243-246
Cheng Shu-jun, Qin Yao, Bu Li. In vitro model of human skin irritation test reconstruction validation[J]. Laboratory Animal and Comparative Medicine, 2012,32(3): 243-246
- [20] 曾璨,杨婷,肖颖.替代模型在皮肤刺激实验中的应用及新进展[J].医学信息(中旬刊),2011,15(06):2483-2484
Ceng Can, Yang Ting, Xiao Ying. Alternative models in skin irritation test Application and Progress [J]. Medical Information, 2011,15(06):2483-2484
- [21] Kandarova H, Liebsch M, Schmidt E, et al. Assessment of the skin irritation potential of chemicals by using the SkinEthic reconstructed human epidermal model and the common skin irritation protocol evaluated in the ECVAM skin irritation validation study[J]. Altern Lab Anim, 2006,34: 393-406
- [22] 陈玲,竺亚斌,李媛媛,等.丝素蛋白在电纺丝法构建组织工程支架中的应用进展[J].生物工程学报, 2011, 27(6): 831-837
Chen Ling, Zhu Ya-bin, Li Yuan-yuan, et al. Silk fibroin was constructed in electrospinning tissue engineering scaffolds Application Progress[J]. Biological Engineering, 2011, 27(6): 831-837
- (上接第 144 页)
- [13] Jesse Stricker, Scott Cookson, Matthew R. Bennett, et al. A fast, robust and tunable synthetic gene oscillator[J]. Nature, 2008, (456): 516-519
- [14] 熊燕,陈大明,杨琛,等.合成生物学发展现状与前景[J].生命科学, 2011, 23(9): 826-835
Xiong Yan, Chen Da-ming, Yang Shen, et al. Progress and perspective of synthetic biology [J]. Chinese Bulletin of Life Sciences, 2011, 23(9): 826-835
- [15] Stephen F. Altschul, Warren Gish, Webb Miller, et al. Basic Local Alignment Search Tool[J]. Journal of Molecular Biology, 1990(215): 403-410
- [16] Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, et al. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs [J]. Nucleic Acids Research, 1997, 25(17): 3389-402
- [17] Joseph Sambrook, David W. Russell. Molecular Cloning: A Laboratory Manual [M]. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989: 1-23
- [18] 关正君,裴蕾,马库斯·施密特,等.合成生物学生物安全风险评价与管理[J].生物多样性, 2012, 20(2): 138-150
Guan Zheng-jun, Pei Lei, Markus Schmidt, et al. Assessment and management of biosafety in synthetic biology [J]. Biodiversity Science, 2012, 20(2): 138-150
- [19] 艾瑞婷,于振行.合成生物学研究进展 [J].中国医药生物技术, 2012, 2(7): 59-61
Ai Rui-ting, Yu Zhen-xing. The research progress of synthetic biology [J]. Chinese Medicinal Biotechnology, 2012, 2(7): 59-61
- [20] 凌焱,李玉霞,刘刚,等.合成生物学的特征及应用[J].中国医药生物技术, 2011, 6(3): 209-213
Ling Yan, Li Yu-xia, Liu Gang, et al. The characteristics and application of synthetic biology [J]. Chinese Medicinal Biotechnology, 2011, 6(3): 209-213
- [21] 邢玉华,谭俊杰,李玉霞,等.合成生物学的关键技术及应用进展[J].中国医药生物技术, 2012, 7(5): 357-363
Xing Yu-hua, Tan Jun-jie, Li Yu-xia, et al. The key technology and application progress of synthetic biology [J]. Chinese Medicinal Biotechnology, 2012, 7(5): 357-363