

皮肤毒理学检验中的替代方法和整合测试评估方法

王飞强, 张子琪, 冯庆媛, 白杨, 刘悠云, 岳芸芸*, 尚靖* (中国药科大学中药学院, 国家药品监督管理局化妆品研究和评价重点实验室, 南京 210098)

摘要: 近些年, 随着实验动物“3R”原则的兴起, 动物替代实验的研究越来越重要。为了使国产化妆品的开发和国际标准接轨, 中国加快了替代实验方法在化妆品“安全性”检验中的应用。针对化妆品对皮肤可能造成的刺激性、致敏性和光毒性等不良反应, 本文分别对化妆品皮肤毒理学检验中的替代实验方法及毒理学终点相应的整合测试评估方法(IATA)进行概述。同时, 本文也为三维重组皮肤模型和模式生物斑马鱼在化妆品皮肤毒性检验中的应用提供重要依据。

关键词: 刺激性替代实验; 致敏性替代实验; 光毒性替代实验; 整合测试评估方法

中图分类号: R99 文献标志码: A 文章编号: 1007-7693(2021)24-3091-06

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2021.24.007

引用本文: 王飞强, 张子琪, 冯庆媛, 等. 皮肤毒理学检验中的替代方法和整合测试评估方法[J]. 中国现代应用药学, 2021, 38(24): 3091-3096.

Alternative Methods and Integrated Approaches to Testing and Assessment of Testing Skin Toxicology

WANG Feiqiang, ZHANG Ziqi, FENG Qingyuan, BAI Yang, LIU Youyun, YUE Yunyun*, SHANG Jing* (Traditional Chinese Medicine College, China Pharmaceutical University, NMPA Key Laboratory for Research and Evaluation of Cosmetics, Nanjing 210098, China)

ABSTRACT: In recent years, with the rise of the 3R principle of experimental animals, the research of animal replacement experiments has become more and more significant. In order to keep the development of domestic cosmetics in line with international standards, China has accelerated the application of alternative experimental methods in the safety testing of cosmetics. In view of the possible irritation, sensitization, phototoxicity and other adverse reactions of cosmetics to the skin, this paper summarizes the alternative methods and integrated approaches to testing and assessment(IATA) for the toxicological end point of cosmetic skin toxicology. At the same time, this paper also provides an important basis for the application of three-dimensional reconstituted skin model and model biological zebrafish in dermal toxicity test of cosmetics.

KEYWORDS: alternative experimental methods of irritation; alternative experimental methods of allergy; alternative experimental methods of phototoxicity; integrated approaches to testing and assessment

随着实验动物“3R”原则的兴起, 动物替代实验的研究越来越火热。欧盟化妆品规程第7次修正案提到将逐步禁止化妆品成品动物试验, 2009年起将禁止化妆品原料的动物试验, 2013年后将禁止用动物试验检测的化妆品原料或是成品进入欧盟市场, 并将此列入WTO双边协议的条款中^[1]。动物实验替代方法是指: 减少科学研究中使用的动物数量; 探索能够达到相同目的或获得相同结果的动物实验替代方法; 采用一切可行的技术手段, 使动物免受实验所造成的痛苦、不安和改善它们生活环境, 提高动物生存质量的优化方法。概括起来就是以减少(reduction)、替代(replacement)、优化(refinement)为核心的“3R原则”。为了尽快与国际标准接轨, 中国加快了替代方法研究和验证的步伐, 同时加强了对化妆品“安

全性”的监督与管理。中国在最新发布实施的《化妆品安全技术规范》和《化妆品新原料注册和备案资料管理规定》中对于动物替代方法的规定为“使用动物替代方法进行毒理学安全性评价时, 应当根据原料的结构特点、特定的毒理学终点选择合适的整合测试评估方法(integrated approaches to testing and assessment, IATA)评价新原料的毒性”^[2-3]。本文结合当前毒理学替代试验热点与研究进展, 对替代试验方法和“IATA策略”在化妆品皮肤毒理学检测中的应用进行概述。

1 皮肤腐蚀性、刺激性替代试验

皮肤腐蚀性是指皮肤涂敷受试物后局部引起的不可逆的组织损伤。皮肤刺激性是指皮肤涂敷受试物后局部产生可逆性炎性变化。皮肤腐蚀性可以理解为皮肤刺激毒性的加深。刺激性的物质

作者简介: 王飞强, 男, 硕士生 Tel: 15601583362 E-mail: wangfeiqiang2020@163.com *通信作者: 尚靖, 女, 博士, 教授 Tel: 13813881587 E-mail: Shangjing21cn@163.com 岳芸芸, 女, 博士, 助理研究员 Tel: 18205187820 E-mail: 1620184488@cpu.edu.cn

作用机体后引起一系列生理和生化改变,最主要的是产生刺激反应。刺激反应可以导致水肿、红斑等客观表现,以及瘙痒、疼痛等主观感觉^[4]。如果机体受刺激物单次、重复或者持续的作用则会导致刺激性接触性皮炎,刺激性接触性皮炎是皮肤对直接损伤产生炎症反应的结果。引起刺激性反应的多数都是化学物质,化妆品是人们日常生活中最常接触的化学物质之一。

最新的《化妆品注册备案检验工作规范》中除去染发类和脱毛类产品暂时未做出明确规定外,所有的非特类和特殊类化妆品都需要按要求进行急性皮肤刺激试验或者多次皮肤刺激性试验^[5]。传统的皮肤刺激性多采用动物斑贴/涂皮试验,腐蚀性试验和刺激性试验采用同一试验程序。只规定在下列4种情况下,可以不考虑进行皮肤腐蚀性试验:①根据结构和活性关系或理化特性可推断具有腐蚀性的物质,如强酸和强碱类, $\text{pH} \leq 2.0$ 或 $\text{pH} \geq 11.5$;②经急性经皮毒性试验显示具有很强系统毒性的物质;③经腐蚀性替代试验的其中任一种证明具有腐蚀性的物质;④急性经皮毒性试验中染毒剂量达到 $2\ 000\ \text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 时仍未产生刺激性的物质。

目前已经得到认可的替代方法,皮肤腐蚀性替代试验:大鼠皮肤经皮电阻试验(transcutaneous electrical resistance test, TER) (OECD TG430)、体外重建皮肤模型 Episkin、EpiDerm(OECD TG431)、CORROSITEXTM 皮肤腐蚀性试验(OECD TG435)^[6-8]。皮肤刺激性替代试验则主要是重建人表皮皮肤(OECD TG439)^[9],包括 Episkin 模型试验、Epiderm 模型试验、SkinEthic 模型试验,三者都是通过测定给予受试物后的皮肤细胞活性来确定受试物的刺激性程度。因为结构和功能与人体皮肤十分相似,人造皮肤广泛用于预测特定物质对皮肤的刺激性和腐蚀性。但现有的皮肤模型用于刺激性皮炎研究时,只能研究部分反应刺激发生机制,对于刺激产生后续的反应,比如:促炎症因子的释放,免疫系统的激活和炎症反应引起的浸润不能进一步研究。因而构建新的具有炎症活性的皮肤模型,将会是未来的发展方向^[10]。通过采用类似 IATA 的逐层筛选的策略可以很大程度上提高对化妆品皮肤刺激性和腐蚀性危害识别(或分类和标识)^[11]。

第一层通过定量构效关系模型和专家系统性预测皮肤的刺激性、腐蚀性或基于 pH 测试与现有的皮肤吸收和急性毒性的数据进行判断;第二层是采用已经被验证和收录的替代试验(大鼠皮肤 TER 检测、人体皮肤模型试验、CORROSITEX)或者其他的体外方法进行检测,其结果可以作为判定依据。第一层和第二层检测出来呈现阴性的物质,必要时可以进行 4 h 人体皮肤斑贴试验。因此,现有的体外方法完全可以替代动物测试,不仅可用于企业化妆品研发中的原料和成品的安全性评估,同时适用于法规监管。

2 皮肤变态/致敏性替代试验

皮肤变态反应也称过敏性接触性皮炎(allergic contact dermatitis, ACD),是皮肤对一种物质产生的免疫源性皮肤反应。人类皮肤的这种反应可能以瘙痒、红斑、丘疹、水疱、融合水疱为特征。动物的反应不同,可能只能观测到皮肤红斑和水肿。

ACD 是一种细胞介导的超敏反应。接触物作为抗原在皮肤接触部位启动免疫反应,表皮朗格汉斯细胞(Langerhans cell, LCs, 分布于皮肤表皮基底层和棘细胞之间的树突状细胞)在发病中起关键作用。ACD 的免疫反应包括传入和传出两部分。传入部分为半抗原进入表皮,几乎所有的半抗原都是亲电分子,因为其体积小和亲脂性强的特点可以渗入皮肤并与皮肤蛋白的亲核残基共价结合。半抗原的特点是自身不具有免疫原性,但是通过和蛋白质的结合获得免疫原性^[12]。然后在刺激作用下角质形成细胞释放炎性细胞因子和趋化因子。后者激活抗原提呈细胞包括 LCs、其他树突状细胞和内皮细胞,从而在抗原接触部位积聚更多的树突细胞和内皮细胞。LCs 主要存在表皮细胞中,并且是占皮肤数量中最多的树突状细胞。LCs 一直以来被认为是最有效的抗原提呈细胞。

LCs 在捕获抗原之后迁移到局部淋巴结,将抗原提呈给初始的 T 细胞^[13-14],半抗原的物理特点造成抗原提呈细胞对其处理和提呈的通路不同。一种半抗原和胞外细胞表面蛋白结合并且内化至细胞内,然后被内含体处理为多肽段最终提呈给 II 型主要组织相容性复合体(major histocompatibility complex, MHC)分子,活化 CD4+ 细胞^[15],活化之后的 CD4+ 细胞一部分可以继续分化为调节性 T 细胞为后续的应激阶段做准备,另一部分则可以协助 B 细胞的分化和增殖;另一种

抗原是脂溶性较好的, 可以被动扩散进入细胞中然后和胞内蛋白结合。通过内生途径的处理, 结合上 I 型的 MHC 分子并且提呈给 CD8⁺细胞^[16]。LCs 和其他树突状细胞的重要性在于既可将外来抗原提呈给组织相容性的 I 类分子 MHC-I 也可将其提呈给 II 类分子 MHC-II。这种交叉激活可以导致半抗原特性的 CD4⁺和 CD8⁺细胞同时激活, 由半抗原引起的接触性皮炎主要由 Th1 激活的 CD8⁺细胞介导, 也就是 Tc 细胞介导。当皮肤再次接触到半抗原, 即应激阶段时, 其他抗原提呈细胞包括巨噬细胞和真皮树突状细胞可以激发记忆 T 细胞, 导致 CD4⁺/CD8⁺细胞短期内大量增殖, 促成局部炎症反应的启动。致敏 T 细胞趋化至半抗原激发的皮肤部位, 释放炎性介质, 导致过敏, 再次接触时潜伏期将会更短。

在《化妆品注册备案检验工作规范》中规定“宣称具有育发、染发、烫发、脱毛、美乳、健美、除臭、祛斑、美白功效的化妆品都需要进行皮肤变态反应检测”。检测致敏物质的传统方法包括豚鼠局部封闭涂皮试验和豚鼠最大值试验。为了进一步贯彻落实“动物福利”和“3R 原则”, 2012 年 OECD 发布了关于蛋白质共价结合引起的皮肤致敏有害结局通路(adverse outcome pathway, AOP)和基于该致敏通路研发的替代试验相关文件^[17]。

皮肤致敏的 AOP 事件总共包含 4 个“关键事件”。关键事件 1(key events 1, KE1)分子启动事件是亲电物质与皮肤中的亲核中心共价结合, 为分子层面的表达。针对 KE1 事件开发出了以直接反应肽试验(direct peptide reactivity assay, DPRA)和氨基酸衍生化反应为代表的 2 个替代试验^[18]。其实验原理是通过检测与化合物共孵化后多肽的消耗量来判断受试物的致敏性, 多肽消耗量越大表示受试物的致敏性越强。国家药品监督管理局已经在 2019 年 3 月将 DPRA 纳入《化妆品安全技术规范》。KE2 事件是角质细胞的活化, 为细胞水平的表达。针对 KE2 事件中核因子 E2 相关因子 2/抗氧化反应元件信号通路[antioxidant response elements-nuclear factor(erythroid-derived 2)-like 2, ARE-Nrf2]开发出以角质细胞荧光素酶检测试验 KeratinoSensTM 和 LuSens 试验为代表的替代方法^[19]。ARE-Nrf2 通路: 核因子 E2 相关因子 Nrf2, 是机体抗氧化应激的中枢调节者。正常情况下, Nrf2 在细胞质中被降解, 不发挥生理作用。当其

在体内被有毒有害物质激活后转位进入细胞核能与抗氧化反应元件 ARE 结合形成 ARE-Nrf2 信号通路, 从而使下游的一系列具有保护性的 II 相解毒酶和抗氧化酶基因蛋白得以表达, 主要包括过氧化物酶、超氧化物歧化酶、醌氧化还原酶 1 以及血红素加氧酶 1。这些被激活的保护性酶类能够参与体内的广泛调节作用, 对人体进行多方面的保护^[20-21]。KeratinoSensTM 和 LuSens 试验原理: 致敏物质可以使得角质细胞 ARE-Nrf2 通路激活, 从而使事先结合上荧光素酶基因的相关保护性蛋白基因表达量增加, 借助“荧光素酶报告基因系统”检测荧光强度即可判断受试物是否具有致敏性和强弱。KE3 是树突状细胞的活化, 为细胞水平的表达。针对 KE3 开发出的替代方案包括人细胞系活化试验(human cell line activation test, h-CLAT)、人组织淋巴瘤细胞激活试验 U-SENSTM 和白细胞介素-8 报告基因测定试验 IL-8Luc^[22]。其中前两者的原理是通过流式细胞术检测暴露于受试物后细胞表面标记物 CD86 或者 CD54 含量变化, 以此来区分致敏和非致敏物质。IL-8Luc 则是通过检测暴露后荧光素酶标记的基因表达情况来判断是否具有致敏性。KE4 是 T 细胞活化和增殖, 为组织器官层面的表达检测。针对 KE4 开发出的替代方法为小鼠局部淋巴结实验和其改进试验^[23-24], 原理是通过检测受试物染毒部位引流淋巴结内淋巴细胞的增殖情况来判断是否具有致敏性和致敏性的强弱, 该方法已在 2019 年 3 月被国家药品监督管理局收录在《化妆品安全技术规范》中。

基于 AOP 原理研发的皮肤致敏替代试验具有操作简单、重复性好等优点, 但由于单一的试验替代方案无法模拟整个 AOP 致敏过程, 所以 OECD 于 2016 年发布了应用 IATA^[25]评价受试物致敏性的指导文件。文件中 12 种“IATA”方法见表 1。

本文就最常使用的, 同时也是可操作性较强的“2 out of 3 ITS”和“STS”2 个试验进行简单的阐述。

“2 out of 3 ITS”试验^[26]是指从 DPRA、KeratinoSensTM、LuSens 和 h-CLAT 活化/U-SENSTM 3 种关键事件试验中任意选取 ≥2 个关键事件, 3 种关键事件测试方法有 ≥2 种试验的结果呈现阳性, 则可以大概率判断这种物质是致敏物质。预测结果的准确性为 88%~91%, 结果优于小鼠局部淋巴结试验的 82%。

表 1 12 种皮肤致敏整合测试与评估策略

Tab. 1 Integrated approaches to testing and assessment of 12 skin sensitization

序号	12 种“IATA”方法	特点
I	2 out of 3 ITS	预测准确度高, 无法致敏效力分级
II	RIVM STS	试验成本低, 无法致敏效力分级
III	IATA-SS	整合了数据库已有信息, 无法致敏效力分级
IV	Stacking Meta-model	降低了单一试验局限性, 无法致敏效力分级
V	ICCVAM	预测准确度高, 无法致敏效力分级
VI	CCT	适用已知结构的受试物检测, 无法致敏效力分级
VII	ITS-1	可以进行致敏效力分级
VIII	ANN-EC3	可以进行致敏效力分级
IX	BN-ITS-3	可以进行致敏效力分级
X	STS	方法简单, 可以进行致敏效力分级
XI	ITS-2	可以进行致敏效力分级
XII	SARA	已纳入 AOPKE4, 建立了诱导 T 细胞增殖性动力学模型

“STS”模型是只采取 KE1 事件中的 DPRA 和 KE3 事件中 h-CLAT 2 个试验来进行物质危害的识别和致敏效力的分级判断^[27]。具体的试验步骤: 首先进行 h-CLAT 试验, 如果反应的结果是阳性, 则根据受试物使用的最低浓度量将受试物分为“强”或“弱”, 无须进一步; 如果反应的结果是阴性, 则进行 DPRA, 若 DPRA 结果为阳性, 则该物质判定为“弱”, 否则判定为“非致敏”物质。这种整合测试的结果和小鼠局部淋巴结试验相比, 其危害识别准确率能达到 81%, 且危害效力分级的准确率可以达到 69%。

“IATA”中涉及 AOP 的关键事件越多, 数据越全面, 其预测的准确度越高, 但同时也会出现成本增加等问题。此外整合策略的整体测试效果仍然会受到组内单个检测方法的检测能力和局限性影响。在指导文件中, OECD 也说明上述实例仅提供如何应用 IATA 模式, 实际应用中还需要根据化合物的结构特点、不同地区监管需求和预测目的而选择合适的整合策略。

3 皮肤光毒性替代试验

光毒性是指“皮肤一次接触到化学物质后, 继而暴露于紫外线照射下所引发的一种皮肤毒性反应, 或者全身应用化学物质后, 暴露在紫外线照射下发生的类似反应”。光毒性反应是一种非免疫性反应, 由活性氧特别是单线态氧介导。某些化学物质经光能(280~320 nm 紫外线)作用, 与氧反应生成自由基, 通过靶分子反应或者其激发态与靶分子直接作用导致皮肤毒性反应。类似于原发

性反应, 首次接触即可发生。光毒性反应具有剂量依赖性, 临床上表现为严重的晒伤, 一旦发生, 反应迅速, 短时间内即可形成红斑、瘙痒和水肿, 严重的情况下可以发生色素沉着等不良反应^[28]。

在 2019 年通过的最新的《化妆品注册和备案检验工作规范》中规定: 宣称具有包括“育发、祛斑、防晒”等功效的化妆品都需要进行皮肤光毒性试验。此外, 化学防晒剂的含量 $\geq 0.5\%$ 的产品(香水类、指甲油类除外)也应该进行皮肤光毒性的试验。

传统的光毒性测试用啮齿类动物作为受试对象, 包括白色家兔或者白化豚鼠模型以及小鼠耳部肿胀试验。其中豚鼠皮肤光毒性试验因方法灵敏度高, 可检测出中等强度和较弱的光刺激, 先后于 2014 和 2015 年被列入原国家食品药品监督管理总局指导原则和《化妆品安全技术规范》(2015 年版)^[29]。近年来光毒性的体外替代试验得到了极大的发展, 方法包括体外 3T3 成纤维细胞中性红摄取试验(3T3 mouse fibroblast neutral red uptake-phototoxicity test, 3T3-NRU-PT)、红细胞光毒性试验(red blood cell-phototoxicity test, RBC-PT)、重建人体皮肤模型(human three dimensional skin-phototoxicity test, H3D-PT)等。其中的 3T3-NRU-PT 试验是目前唯一被 OECD 以及欧洲替代方法验证中心接受的替代方案, 2004 年作为 OECD 指南 TG432^[30]发布。中国也于 2016 年 11 月正式将该方案纳入《化妆品安全技术规范》(2015 年版)。3T3-NRU-PT 的原理是化合物在 UVA 光照下直接或间接地对细胞产生毒性。当正常的细胞受到损伤后, 吸收生物活性染料的能力下降。利用其对中性红的摄取量变化, 评价物质的光毒性。此外重组人皮肤模拟试验因为与细胞相比具有可模拟皮肤局部用药的特点, 且光照后它的分子吸收更加接近体内情形。即与动物实验模型相比较可以更准确地预测某些化合物是否会引起人类个体产生光毒性反应。

重建人体皮肤模型试验无法检测那些不能通过局部途径进入皮肤, 只能通过系统途径(如口服或者注射)分布到皮肤的光毒性物质, 因此 H3D-PT 试验不能作为评估化学物质光毒性的独立方法, 但它可以和 3T3-NRU-PT 联合一起互为补充。另一种组合策略是 3T3-NRU-PT 联合 RBC-PT 进行光毒性测试^[31]。

传统检测方法和现在替代方法对皮肤毒性终点的检测方法汇总见表 2。

表 2 皮肤毒性终点的传统检测方法和现有替代方法对照

Tab. 2 Comparison of traditional detection methods and existing alternative methods for skin toxicity endpoint

皮肤毒性终点	传统检测方法	替代方法
皮肤腐蚀性/刺激性	动物斑贴/涂皮试验	①大鼠经皮电阻试验(TER) ②体外重建皮肤模型(Episkin、EpiDerm) ③CORROSITEXTM 皮肤腐蚀性试验 ④重建人表皮皮肤(OECD TG439) ^[9] 包括 Episkin 模型试验、Epiderm 模型试验、SkinEthic 模型试验
皮肤变态/致敏性	①豚鼠局部封闭涂皮试验 ②豚鼠最大值试验	①直接反应肽试验(DPRA)氨基酸衍生生化反应 ②KeratinoSens™ 和 LuSens 试验 ③h-CLAT 活化、U-SENS™ 激活和 IL-8Luc 报告基因测定试验 ④小鼠局部淋巴结试验和其改进试验
皮肤光毒性	豚鼠皮肤光毒性试验	①3T3 成纤维细胞中性红摄取试验(3T3-NRU-PT) ②红细胞光毒性试验(RBC-PT) ③重建人体皮肤模型(H3D-PT)

4 展望

欧盟是禁止化妆品动物实验的倡导者和坚决的执行人。自 2003 年禁令颁布以来, 欧盟就致力于其他优选方案的开发, 尤其是在皮肤毒性替代试验开发方面, 开发了包括皮肤腐蚀性、皮肤刺激性、光毒性和经皮吸收等被广泛认可的替代试验。中国也十分关注化妆品动物替代试验的开发和研究, 尤其是在化妆品皮肤毒性方面开展了大量建设性的研究工作。国家药品监督管理局正在研究或是已经通过的替代实验中有 60%关于皮肤毒性。截至目前已经纳入《化妆品安全技术规范》中的皮肤毒性替代实验有皮肤光毒性的为体外 3T3 中性红光毒性试验、皮肤光变态反应, 有皮肤腐蚀性/刺激性的为大鼠经皮电阻试验以及和皮肤变态反应有关的直接反应肽试验。目前国际上关于化妆品皮肤毒性的替代实验研究更多地聚焦在三维重组皮肤模型的使用方面。这种皮肤模型因为在基因表达、组织结构、细胞因子和代谢活力等方面高度模拟真人皮肤, 现已经被广泛应用在包括化妆品在内的化学品安全性评价中^[32]。

同时, 斑马鱼等小型硬骨鱼类在化妆品的研发中也显现出无可比拟的优势^[33]。斑马鱼作为一种脊椎动物, 其基因与人类基因组相比同源性达 70%, 人类疾病相关基因有 82%能在斑马鱼中找到同源基因, 全基因组的相似性达 87%^[34]。相对于常规的动物实验, 斑马鱼生长发育的周期比啮齿动物短, 缩短了动物实验的时间。动物实验中实验动物数目往往会受到经费和人力资源等影响, 进而限制了实验中的独立基因的数目, 不利于发现许多基因依赖性的受试物不良反应。成年的斑马鱼 1 次可以产出 200~300 枚卵, 在 96 孔板或者是 384 孔板中培养, 因而在较小的实验室即可达到成千上万的培养规模。此外在受精后的 72 h 内,

斑马鱼的胚胎具有光学透明性, 具有在不处死动物的情况下对器官的形态功能进行连续检测的优势。与细胞实验相比中, 斑马鱼一方面可以达到和细胞试验相近的数量规模, 又能作为一个完整的有机体对受试化合物进行吸收、代谢、分布、排泄, 可以用于研究器官间的相互作用以及免疫反应。在完成了斑马鱼基因组计划后, 斑马鱼的 cDNA 文库还可以被免费使用, 从而提供大量的可供分析数据, 该方法尤其适用于高通量筛选作用靶点和受试化合物毒性成分。综合来看, 斑马鱼由于其在色素研究方面的优势, 目前主要运用于美白防晒等化妆品的功效评价, 技术也较为成熟; 在安全性评价方面, 通过斑马鱼胚胎的死亡率、畸形率可以初步筛选化合物的毒性。但由于斑马鱼试验不能准确模拟人体化妆品施用方式, 无法具体到皮肤毒理学终点(如: 皮肤刺激性、致敏性、光毒性)的限制, 因而之后还需要进一步开展相关方向的研究。

REFERENCES

- [1] EU. Directive 2003/15/EC of the European Parliament and of the Council of 27 February 2003 amending Council Directive 76/768/EEC on the approximation of the laws of the Member states relating to cosmetics products[S]. Off J Eur Union L66, 26-35.
- [2] 国家药品监督管理局. 化妆品新原料注册备案资料管理规定(2021 版)[S]. 2021-02-26.
- [3] 原国家食品药品监督管理局. 化妆品安全技术规范(2015 版)[S]. 2015-12-23.
- [4] WELSS T, BASKETTER D A, SCHRÖDER K R. *In vitro* skin irritation: Facts and future. State of the art review of mechanisms and models[J]. Toxicol In Vitro, 2004, 18(3): 231-243.
- [5] 国家药品监督管理局. 化妆品注册和备案检验工作规范(2019 版)[S]. 2019-09-03.
- [6] OECD. OECD guideline for testing of chemicals No. 430: *In*

- in vitro* skin corrosion: transcutaneous electrical resistance test (TER)[R]. Paris: Organisation for Economic Cooperation and Development, 2004: 1-12.
- [7] OECD. OECD guideline for testing of chemicals No. 431: *In vitro* skin corrosion: human skin model test[R]. Paris, France.
- [8] OECD. OECD guideline for testing of chemicals No. 435: *In vitro* membrane barrier test method for skin corrosion[R]. Paris, France.
- [9] OECD. OECD guideline for testing of chemicals No. 439: *In vitro* skin irritation: reconstructed human epidermis test method[R]. Paris, France.
- [10] 樊国彪, 王学民. 皮肤刺激体外模型在化妆品安全性评价中的应用[J]. 毒理学杂志, 2011, 25(1): 64-67.
- [11] 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/腐蚀性及其试验方法[J]. 中国化妆品: 行业, 2011: 95-101.
- [12] MARTIN S F, DUDDA J C, BACHTANIAN E, et al. Toll-like receptor and IL-12 signaling control susceptibility to contact hypersensitivity[J]. *J Exp Med*, 2008, 205(9): 2151-2162.
- [13] WATANABE H, UNGER M, TUVEL B, et al. Contact hypersensitivity: The mechanism of immune responses and T cell balance[J]. *J Interferon Cytokine Res*, 2002, 22(4): 407-412.
- [14] DUDDA J C, LEMBO A, BACHTANIAN E, et al. Dendritic cells govern induction and reprogramming of polarized tissue-selective homing receptor patterns of T cells: Important roles for soluble factors and tissue microenvironments[J]. *Eur J Immunol*, 2005, 35(4): 1056-1065.
- [15] TAKESHITA K, YAMASAKI T, AKIRA S, et al. Essential role of MHC II-independent CD4⁺ T cells, IL-4 and STAT6 in contact hypersensitivity induced by fluorescein isothiocyanate in the mouse[J]. *Int Immunol*, 2004, 16(5): 685-695.
- [16] KALISH R S, WOOD J A, LAPORTE A. Processing of urushiol (poison ivy) hapten by both endogenous and exogenous pathways for presentation to T cells *in vitro*[J]. *J Clin Invest*, 1994, 93(5): 2039-2047.
- [17] OECD. The adverse outcome pathway for skin sensitization initiated by covalent binding to proteins. Part 2: Use of the AOP to develop chemical categories and integrated assessment and testing approaches. Series on testing and assessment NO.168[R]. Paris: OECD, 2012.
- [18] OECD. *In chemico* skin sensitisation: Assays addressing the adverse outcome pathway key event on covalent binding to proteins: Test Guideline No. 442C[S]. Paris: OECD, 2018.
- [19] OECD. *In vitro* skin sensitisation: ARE-Nrf2 luciferase test method: Test Guideline No. 442D[S]. Paris: OECD, 2015.
- [20] KEUM Y S, CHOI B Y. Molecular and chemical regulation of the Keap1-Nrf2 signaling pathway[J]. *Mol Basel Switz*, 2014, 19(7): 10074-10089.
- [21] SAW C L, GUO Y, YANG A Y, et al. The berry constituents quercetin, kaempferol, and pterostilbene synergistically attenuate reactive oxygen species: Involvement of the Nrf2-ARE signaling pathway[J]. *Food Chem Toxicol*, 2014(72): 303-311.
- [22] OECD. *In Vitro* skin sensitisation: *In vitro* skin sensitisation assays addressing the key event on activation of dendritic cells on the adverse outcome pathway for skin sensitisation: Test guideline No. 442E[S]. Paris: OECD, 2016.
- [23] OECD. Skin sensitisation: Local lymph node assay: Organisation for economic cooperation and development: Test guideline No. 442A[S]. Paris: OECD, 2010.
- [24] OECD. Skin sensitisation: Local lymph node assay: BrdU-ELISA or -FCM: Test guideline No. 442B[S]. Paris: OECD, 2018.
- [25] OECD. Guidance document on the reporting of defined approaches to be used within integrated approaches to testing and assessment (IATA) for skin sensitisation. Series on testing and assessment No. 256[S]. Paris: OECD, 2016.
- [26] URBISCH D, MEHLING A, GUTH K, et al. Assessing skin sensitization hazard in mice and men using non-animal test methods[J]. *Regul Toxicol Pharmacol*, 2015, 71(2): 337-351.
- [27] TAKENOUCHI O, FUKUI S, OKAMOTO K, et al. Test battery with the human cell line activation test, direct peptide reactivity assay and DEREK based on a 139 chemical data set for predicting skin sensitizing potential and potency of chemicals[J]. *J Appl Toxicol*, 2015, 35(11): 1318-1332.
- [28] SCHEINFELD N S, CHERNOFF K, DEREK HO M K, et al. RETRACTED: Drug-induced photoallergic and phototoxic reactions—an update[J]. *Expert Opin Drug Saf*, 2014, 13(3): 321-340.
- [29] 原国家食品药品监督管理总局. 药物刺激性、过敏性和溶血性研究技术指导原则[S]. 2014-05-13.
- [30] OECD. Organization for economic cooperation and development guidelines for the testing of chemicals/section 4: Health effects test No. 432[S]. *In vitro* 3T3 NRU phototoxicity test, 2004.
- [31] 陈彧, 秦瑶, 喻欢, 等. 眼刺激和光毒性测试中组合替代方法的应用[C]//中国毒理学会第七次全国毒理学大会暨第八届湖北科技论坛论文集. 武汉, 2015: 355-356.
- [32] KONG X, ZHAO H, TANG Y. Progress in field of research work for application of human-skin models in efficacy evaluation of cosmetics[J]. *China Surfactant Deterg Cosmet(日用化学工业)*, 2017, 47(4): 228-231, 236.
- [33] KARI G, RODECK U, DICKER A P. Zebrafish: an emerging model system for human disease and drug discovery[J]. *Clin Pharmacol Ther*, 2007, 82(1): 70-80.
- [34] HOWE K, CLARK M D, TORROJA C F, et al. The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome[J]. *Nature*, 2013, 496(7446): 498-503.

收稿日期: 2021-08-27
(本文责编: 蔡珊珊)