

EpiSkinTM和Epikutis[®]模型在体外皮肤刺激性和腐蚀性检测应用中的比较

张劲松, 何立成, 桑晶, 康桦, 匡荣, 李杨^{*} (浙江省食品药品检验研究院, 杭州 310052)

摘要: 目的 对 EpiSkinTM 和 Epikutis[®] 模型在体外皮肤刺激性和腐蚀性检测各方面进行对比。方法 参考体外皮肤刺激实验(OECD 指导原则 439)和体外皮肤腐蚀实验(OECD 指导原则 431), 对 2 种模型在质量控制、检测方法、结果判断、运输等方面进行探讨。结果 2 种模型在质量控制、检测方法、结果判断等方面存在差异, 在实验操作性和成本上也各有优缺点, 但 2 种模型均能满足体外皮肤刺激性和腐蚀性实验要求。结论 2 种模型均能很好地用于体外皮肤刺激性和腐蚀性检测。

关键词: 皮肤刺激; 皮肤腐蚀; EpiSkinTM 模型; Epikutis[®] 模型

中图分类号: R965.3

文献标志码: A

文章编号: 1007-7693(2017)04-0524-03

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2017.04.010

Application Comparison of EpiSkinTM and Epikutis[®] Skin Model in Evaluating Skin Irritation and Skin Corrosion

ZHANG Jinsong, HE Licheng, SANG Jing, KANG Hua, KUANG Rong, LI Yang^{*} (Zhejiang Institute for Food and Drug Control, Hangzhou 310052, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To compare two different skin model of EpiSkinTM and Epikutis[®] in evaluating skin irritation and skin corrosion. **METHODS** According to OECD Guide Line 439 and OECD Guide Line 431, two skin tissue models were compared considering of quality control, test method, interpretation of outcome and transportation respectively. **RESULTS** There were differences in quality control, test method, and result judgement between two models. Both two models could meet requirement for skin irritation and corrosion test, while each had their own merits in experimental operability and cost. **CONCLUSION** EpikutisTM and EpikutisTM are good skin tissue models for skin irritation and skin corrosion assays *in vitro*.

KEY WORDS: skin irritation; skin corrosion; EpiSkinTM model; Epikutis[®] model

化妆品终端产品的动物实验在欧洲被禁止, 很多动物实验方法被一些新方法替代, 其中体外皮肤刺激性试验和体外皮肤腐蚀性试验分别收录在 OECD 指导原则 439 和 431 中^[1-3]。2 个指导原则中均收录了经过多方验证过的几种皮肤模型被认可用于体外皮肤刺激性试验和体外皮肤腐蚀性试验。由于这些皮肤模型在运输和使用时间上有严格要求, 国内对这类产品进口也有相关的管理规定, 因此国内研究机构很难及时地通过正常渠道获得这些皮肤模型。目前国内出现了 2 家皮肤模型的生产企业, 笔者对这 2 家生产的 EpiSkinTM 模型和 Epikutis[®] 模型在质量控制和使用情况等方面进行了比较。

1 2 种皮肤模型简介

1.1 生产企业

EpiSkinTM: 上海斯安肤诺生物科技有限公司, 企业技术背景为法国 EPISKIN 公司。目前国内仅供应皮肤刺激和皮肤腐蚀实验使用的 2 款模型,

产品生产和质量控制完全移植 EPISKIN 公司的 EpiSkinTM(SM)模型技术, 该模型收载于 OECD 指导原则中。EPISKIN 公司还开发了眼角膜、黑素皮肤、口腔黏膜、牙龈组织和阴道黏膜等模型。

Epikutis[®]: 陕西博溪生物科技有限公司, 企业技术背景为第四军医大学。目前可以供应表皮、全层皮肤、黑素皮肤和眼角膜等模型。该企业产品在国内小范围内进行过验证。

1.2 模型来源

2 种模型均以正常人的角质形成细胞为种子细胞, 在体外发育成复层化结构的表皮模型。在组织学结构上与人皮肤结构高度相似, 含有角质层、颗粒层、棘层和基底层, 见图 1。

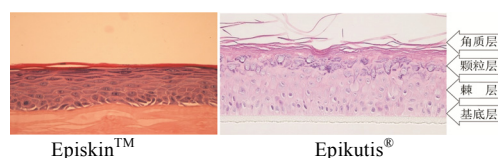


图 1 2 种模型组织学评价

Fig. 1 Histological results of two tissue models

作者简介: 张劲松, 男, 主任药师 Tel: 13735466571 E-mail: zjonly@hotmail.com

^{*}通信作者: 李杨, 女, 主任药师 Tel: 13906529056 E-mail: liyang@zjyj.org.cn

1.3 质量控制

为保证实验结果的准确性和可重复性，皮肤模型的质量很重要，尤其是屏障功能指标，Episkin™采用 18 h 给予 SDS 的 IC₅₀(组织活力为 50%时的 SDS 浓度)，Epikutis®采用给予 1% Triton X-100 的 ET₅₀(组织活力为 50%的时间)。另一重要指标为组织活力，虽然 Episkin™质检报告中没有组织活力项目，但 OECD 指导原则中给出了该模型对组织活力的要求，组织活力应在 0.6≤OD₅₇₀≤1.5。2 款皮肤模型质量控制指标见表 1。

表 1 2 种模型质量控制指标

Tab. 1 Quality control indexes of two models

Episkin™	Epikutis®
①组织学结构检测(HE 染色): 含典型 4 层表皮复层化结构。	①外观评价: 未见潮湿、未收缩、无气泡。
②组织学评分: ≥18.5	②组织学结构检测(HE 染色): 含典型 4 层表皮复层化结构。
③IC ₅₀ 浓度(表皮细胞 50%抑制率时的 SDS 浓度): ≥1 mg·mL ⁻¹	③组织活力检测: 1.0≤OD ₅₇₀ ≤2.5
	④皮肤屏障功能检测(Triton X-100 ET ₅₀ 检测): 2 h≤ET ₅₀ ≤6 h。

2 皮肤刺激性试验

2.1 方法

2 种模型在实验过程中的差别见表 2。

2.2 部分参考物质验证情况

参考 OECD 439(2013 版和 2015 版)中提供的参考物质，选取了 8 种进行了验证。Episkin™模型 7 种物质结论与 OECD 要求一致，1 种物质(1-溴己烷)实验结果有出入。OECD 指导原则中该物质结果应为阳性，在浙江省食品药品检验研究院实验结果为阴性，而在上海斯安肤诺生物科技有限公司实验室结果为阳性。造成这种结果差异的原因可能有多方面，由于 1-溴己烷为易挥发物质，而 Episkin™模型加样量仅为 10 μL，并且需涂抹 20 s，环境温度和净化操作台的风向可能对实验结果影响较大。Epikutis®模型 7 种物质结论与 OECD 要求一致，1 种物质(苯氧乙酸烯丙酯)实验结果与 OECD 不符，属于误判，但该物质收录在 OECD 439(2013 版)中，OECD 439(2015 版)中未收录。结合 2 家企业内部验证情况，2 种模型均能达到 OECD 指导原则中敏感性>80%、特异性>75%和准确度>75%的要求，可用于体外皮肤刺激的检测。2 款皮肤模型部分参考物质验证情况见表 3。

3 皮肤腐蚀性试验

3.1 方法

2 种模型在实验过程中的差别见表 4。

表 2 2 种模型在体外皮肤刺激性试验过程中的差别

Tab. 2 Differences between two models in the course of skin irritation assay *in vitro*

项目	Episkin™	Epikutis®
面积	0.38 cm ²	0.64 cm ²
运输条件	常温(<37 ℃)	冷藏(4~8 ℃)
实验周期	星期一发货，星期二收货并预培养，星期三正式试验，星期六或下星期一出结果。	星期一发货，星期二收货并预培养，星期三正式试验，星期五或星期六出结果。
预培养	(24±3)h	60 min，换液培养(18±3)h
培养液	12 孔板，每孔 2 mL	6 孔板，每孔 0.9 mL
加样量	液体: 10 μL; 固体: 10 mg	液体: 25 μL; 固体: 25 mg
尼龙膜	不使用	如需要可使用
接触时间	15 min	30 min
后孵育	42 h	(24±2)h，换液，(18±2)h
阳性对照	5% SDS	5% SDS
判定标准	皮肤活性≤50%，有刺激性 皮肤活性>50%，无刺激性	皮肤活性≤50%，有刺激性 皮肤活性>50%，无刺激性

表 3 2 种模型体外皮肤刺激性试验部分参考物质验证结果

Tab. 3 Part of validation results of bench marks in skin irritation test for two models

名称(CAS 号)	Episkin™	Epikutis®	OECD 参考
邻苯二甲酸二乙酯(84-66-2)	无	无	无
苯氧乙酸烯丙酯(7493-74-5)	无	有	无
异丙醇(67-63-0)	无	无	无
硬脂酸甲酯(112-61-8)	无	无	无
1-溴己烷(111-25-1)	无/有	有	有
2-氯甲基-3,5-二甲苯-4-甲氧基吡啶盐酸盐(86604-75-3)	有	有	有
5-叔丁基-2-甲基苯硫酚(7340-90-1)	有	有	有
四氯乙烯(127-18-4)	有	有	有

表 4 2 种模型在体外皮肤腐蚀性试验过程中的差别

Tab. 4 Differences between two models in the course of skin corrosion assay *in vitro*

项目	Episkin™	Epikutis®
面积	0.38 cm ²	0.64 cm ²
运输条件	常温(<37 ℃)	冷藏(4~8 ℃)
实验周期	星期三发货，星期四收货并预培养，星期五正式试验，星期六或下星期一出结果。	星期一发货，星期二收货并预培养，星期三正式试验，星期三或星期四出结果。
预培养	(24±3)h	60 min，换液培养(18±3)h
培养液	12 孔板，每孔 2 mL	6 孔板，每孔 0.9 mL
加样量	液体: 50 μL; 固体: 20 mg，加 100 μL 生理盐水	液体: 40 μL; 固体: 20 μL 生理盐水: 20 mg 样品; 胶状物质: 20 mg
尼龙膜	不使用	仅胶状物质使用
接触时间	3 min、60 min、4 h	3 min、60 min
后孵育	无	无
阳性对照	乙酸	8 mol·L ⁻¹ 氢氧化钾
判定标准	有腐蚀性: 1 A: 3 min 皮肤活性<35%; 1 B: 3 min 皮肤活性≥35%, 且 60 min 皮肤活性<35%; 1 C: 60 min 皮肤活性≥35%, 且 4 h 皮肤活性<35%。 无腐蚀性: 4 h 皮肤活性≥35%	有腐蚀性: ①3 min 皮肤活性<50%; ②3 min 皮肤活性≥50%, 且 60 min 皮肤活性<15%。 无腐蚀性: 3 min 皮肤活性≥50%, 且 60 min 皮肤活性≥15%

3.2 部分参考物质验证情况

参考 OECD 431(2015 版)中提供的参考物质, 选取 6 种进行验证。2 种皮肤模型对这 6 种参考物质是否有腐蚀性均有良好的判定结果, 其中 Episkin™ 模型对于腐蚀性的强弱还可以进行进一步分类。2 款皮肤模型部分参考物质验证情况见表 5。

4 航空运输验证

由于 2 种模型对运输要求较高, 运输后模型边缘及表面要求无潮湿、收缩现象, 模型底面与凝胶之间应无气泡, 尤其是 Epikutis®模型还需要冷藏运输, 因此对 Epikutis®模型运输情况进行了验证。验证方法为采用 OECD 439(2015 版)中收录的 10 种参考物质, 分 2 次每次用同一批次皮肤模型, 分别在浙江省食品药品检验研究院和陕西博溪生物科技有限公司同时进行试验, 比对 2 个实验室之间的数据显示, 未发现运输条件对实验结果的影响。Epikutis®模型 2 次航空运输主要验证指标为给予样品后的组织活性, 结果见表 6。

表 5 2 种模型体外皮肤腐蚀性试验部分参考物质验证结果
Tab. 5 Part of validation results of bench marks in skin corrosion assay for two models

名称(CAS 号)	Episkin™	Epikutis®	OECD 参考
十二烷酸(143-07-7)	无	无	无
乙醛酸-水合物(563-96-2)	有(1 B)	有	有(1 B 和 1 C)
2-羟基丁酸(594-61-6)	有(1 B)	有	有(1 B 和 1 C)
盐酸 14.4%(7647-01-0)	有(1 B)	有	有(1 B 和 1 C)
硫酸(7664-93-9)	有(1 A)	有	有(1 A)
丙酸(79-09-4)	有(1 A)	有	有(1 A)

表 6 Epikutis®模型运输验证结果($n=3$, $\bar{x} \pm s$)
Tab. 6 Validation results of transportation for Epikutis® ($n=3$, $\bar{x} \pm s$)

名称 (CAS 号)	第 1 次/%		第 2 次/%	
	浙江药检院	陕西博溪	浙江药检院	陕西博溪
阴性 (DPBS)	100.0±7.4 (无刺激)	100.0±8.6 (无刺激)	100.0±7.1 (无刺激)	100.0±3.1 (无刺激)
阳性 (5% SDS)	2.9±0.4 (有刺激)	1.7±1.2 (有刺激)	1.2±0.1 (有刺激)	1.9±1.0 (有刺激)
1-萘乙酸 (86-87-3)	102.0±4.1 (无刺激)	108.7±8.1 (无刺激)	92.4±3.6 (无刺激)	89.1±3.7 (无刺激)
庚醛 (111-71-7)	3.0±0.2 (有刺激)	2.0±0.4 (有刺激)	1.3±0.1 (有刺激)	1.8±0.1 (有刺激)
兔耳草醛 (103-95-7)	5.0±1.6 (有刺激)	6.4±4.6 (有刺激)	2.1±1.4 (有刺激)	2.7±0.5 (有刺激)
氢氧化钾 (1310-58-3)	8.1±1.9 (有刺激)	1.1±0.2 (有刺激)	1.9±1.2 (有刺激)	0.9±0.2 (有刺激)
异丙醇 (67-63-0)	107.8±1.8 (无刺激)	108.7±5.5 (无刺激)	98.4±5.5 (无刺激)	85.9±3.3 (无刺激)
硬脂酸甲酯 (112-61-8)	107.5±7.1 (无刺激)	119.0±6.6 (无刺激)	102.2±1.3 (无刺激)	89.9±4.3 (无刺激)
丁酸庚酯 (5870-93-9)	99.0±1.2 (无刺激)	94.6±3.2 (无刺激)	97.9±9.3 (无刺激)	79.9±8.7 (无刺激)
水杨酸己酯 (6259-76-3)	107.1±3.7 (无刺激)	103.9±5.3 (无刺激)	92.4±9.9 (无刺激)	81.1±5.1 (无刺激)
1-溴己烷 (111-25-1)	10.1±2.3 (有刺激)	2.5±1.4 (有刺激)	6.0±1.9 (有刺激)	15.3±8.9 (有刺激)
1-甲基-3 苯基哌嗪 (5271-27-2)	3.6±2.0 (有刺激)	5.5±2.2 (有刺激)	6.0±1.1 (有刺激)	12.0±2.0 (有刺激)

5 讨论

Episkin™ 和 Epikutis®模型在形态和生物特性上存在一些差异, 从验证结果来看, 虽然 2 种模型在皮肤刺激性实验中均存在误判的物质, 但在敏感性、特异性和准确性上还是能很好地符合 OECD 指导原则的要求, 完全可以用于体外皮肤刺激性和腐蚀性检测。

在皮肤腐蚀性实验中, Episkin™ 模型可以对有皮肤腐蚀性物质的强弱进一步分类, 且分类与 UN GHS 的分类一致。而 Epikutis®模型目前只能判断物质是否具有皮肤腐蚀性, 无法做到进一步分类, 在分类方面该企业还在标准制订中。

在操作方面, Episkin™ 和 Epikutis®模型在体外皮肤刺激性和腐蚀性实验中各有自己特色。Episkin™ 模型特有的小室结构有利于给予样品后的冲洗过程, 既方便冲洗, 又能减少冲洗水流对组织表面可能造成的损伤。但在皮肤刺激性实验中由于该模型因给予样品的量较少, 因此对于易挥发性物质的操作要求较严格, 而 Epikutis®模型由于给予样品的量较多, 对于易挥发性物质的操作要求没有那么严格。

在使用成本上, Episkin™ 模型略高, 尤其是皮肤腐蚀实验中多了一个时间点, 材料成本及工作量有所增加。在降低使用成本上往往考虑共用阴性和阳性对照, 尽量多做样品。在皮肤刺激性实验中, 由于 2 种模型给予受试物的时间不同, 实验操作在时间上一次试验可以安排的待测样品数量也不同, Episkin™ 模型一般建议一次做 3 个样品, Epikutis®模型一次最多可以做 8 个样品。

Episkin™ 模型已经过多个国家的实验室验证, 并被收录在 OECD 指导原则中, 是国际上认可的模型。Epikutis®模型目前只在企业和国内实验室小范围内进行过验证, 虽然结果可以达到 OECD 指导原则的要求, 但以后如果要获得国家标准或国际标准层次上的认可, 可能还需进行大范围有组织的验证。

REFERENCES

- [1] *In Vitro Skin Irritation: Reconstructed Human Epidermis Test Method*, OECD Guideline for the Testing of Chemicals, 439 [S]. 2013.
- [2] *In Vitro Skin Irritation: Reconstructed Human Epidermis Test Method*, OECD Guideline for the Testing of Chemicals, 439 [S]. 2015.
- [3] *In Vitro Skin Corrosion: Reconstructed Human Epidermis (RHE) Test Method*, OECD Guideline for the Testing of Chemicals, 431 [S]. 2015.

收稿日期: 2016-08-30
(本文责编: 蔡珊珊)