

三维重组眼角膜上皮模型法与兔眼刺激法对洗发水眼刺激性的比较与评价

桑晶, 张劲松, 徐玲燕, 张文婷, 匡荣, 李杨* (浙江省食品药品检验研究院, 杭州 310004)

摘要: 目的 采用三维人重组角膜模型 BioOcular™和现行的兔眼刺激 Draize 法, 对市面常见的不同配方洗发水的刺激性进行评价与比较。方法 体外眼刺激实验(OECD 指导原则 492)采用人重组眼角膜上皮模型和兔眼刺激法对 8 种不同品牌洗发水的刺激性进行评价研究。结果 采用皮肤模型的眼刺激法对 8 种洗发水有无刺激性的区分结果与兔眼刺激法基本一致。2 种方法相关系数 r 绝对值达到 0.955, 具有很好的相关性。结论 与兔眼刺激法相比, 人重组眼角膜上皮模型实验所需的周期短、试验步骤相对简便、检测结果相对更加客观, 人源重组组织与人眼角膜上皮更为接近, 是一种值得推荐的眼刺激替代检测方法。

关键词: 三维重组人角膜; 眼刺激法; 洗发水; 替代方法

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1007-7693(2017)05-0662-04

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2017.05.006

引用本文: 桑晶, 张劲松, 徐玲燕, 等. 三维重组眼角膜上皮模型法与兔眼刺激法对洗发水眼刺激性的比较与评价[J]. 中国现代应用药学, 2017, 34(5): 662-665.

Evaluation of Eye Irritation Potential of Different Shampoos Using Draize Assay and Human Cornea-like Epithelial Tissue Model

SANG Jing, ZHANG Jinsong, XU Lingyan, ZHANG Wenting, KUANG Rong, LI Yang* (Zhejiang Institute for Food and Drug Control, Hangzhou 310004, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To evaluate eye irritation potential of different shampoos using Draize assay *in vivo* and eye irritation test with human cornea-like epithelial tissue model BioOcular™ *in vitro* respectively. **METHODS** In terms of OECD Guide Line 492, 8 kinds of different shampoos were tested both in Draize assay *in vivo* and eye irritation test with reconstructed human cornea-like epithelial tissue model BioOcular™ *in vitro*. **RESULTS** There was a good relativity of eye irritation potential for these two methods. And correlation coefficient score for these two methods was 0.955. **CONCLUSION** Compared with Draize assay *in vivo* human cornea-like epithelial tissue model BioOcular™ *in vitro* needs short period, simple steps, and the results are relatively objective. It is workable to use 3D human cornea-like epithelial tissue model BioOcular™ *in vitro* for eye irritation test partly instead of Draize assay.

KEY WORDS: reconstructed human corneal epithelium; eye irritation; shampoos; alternative methods

化妆品的眼刺激评价一直是化妆品安全性评价中的一个重要环节。在过去的几十年里, 检测化妆品及其原料的眼刺激性及腐蚀性实验一直是由 Draize 等提出的兔眼实验, 这也是当前许多国家毒理学安全性评价的常规测试手段^[1-2]。然而, 传统的体内检测法由于其存在的受试动物使用量较多, 强眼刺激物质给受试动物带来较大的伤害和痛苦, 评判系统主观性大, 试验周期长, 实验室间差异大, 以及由动物外推至人的种属差异性, 在科学上和伦理上不断受到质疑^[2-3]。随着欧盟对化妆品动物实验禁令的发布, 全球化妆品领域用于替代兔眼刺激实验的体外方法被广

泛关注并得到了快速的发展。尤其是近年来, 在动物福利的压力下, 国际上 3R 原则(优化、减少、替代)的提出, 国际组织新出台了一系列的措施, 优化的体外替代检测手段不断被提出, 并陆续被国际性机构验证和认可^[4-5]。在评价眼刺激和腐蚀性方面, 2009 年起牛角膜浑浊渗透性实验作为检测角膜腐蚀性和强刺激性物质被 OECD 认可, 可以用来鉴别强刺激物质而不需要进行动物实验; 2013 年该方法被进一步修订为可以区分无刺激性物质或强刺激性物质^[3,6]。2015 年 7 月由 MAKTAK 公司生产的人重组角膜上皮组织率先通过 OECD 认可作为眼刺激或强度眼损伤检测

基金项目: 浙江省药品接触材料质量控制研究重点实验室(2014E10006)

作者简介: 桑晶, 女, 博士, 主管药师 Tel: (0571)86457970 E-mail: oliver169@163.com *通信作者: 李杨, 女, 主任药师 Tel: 13906529056 E-mail: liyang@zjyj.org.cn

的模型^[4,7]。陕西西安博溪公司生产的人重组角膜模型 BioOcular™是国内第一家自主研发并标准化生产的人重组角膜的厂家,目前也在积极参与 OECD 的标准物质的测试和验证。本实验比较了国内的角膜模型 BioOcular™作为一种新的替代检测方法与眼刺激性传统兔眼刺激法的优劣,为洗发水及未来化妆品眼刺激领域提供新的评价思路。

1 仪器与材料

1.1 仪器

HERAcell150i 型号二氧化碳培养箱 (Thermo Scientific 公司); SpectraMax190 型号紫外-可见光连续光谱酶标仪(Molecular Devices Corporation 公司); XDS-1B 型号倒置显微镜(重庆光电公司)。

1.2 受试物

市售洗发水合计 8 种,分为 2 类,#1~#6 是来自国内外不同公司不同配方的成人洗发水,#7 和 #8 为国内外的婴儿洗发水。

1.3 试剂

人重组眼角膜上皮模型 BioOcular™ (陕西博溪公司); 3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5-二苯基四氮唑溴盐(MTT,美国 Sigma 公司,批号: MKBF7873V); 培养液 OcuRecovery(陕西博溪公司); 异丙醇(国药集团化学试剂有限公司,批号: 20150930); 荧光素钠(国药集团化学试剂有限公司),临用时用水配成 2%溶液。

1.4 受试动物

健康成年白色新西兰家兔,普通级,动物饲养条件:温度 20 °C,湿度 60%,体质量 1.8~2.1 kg,余姚市泗门镇建飞实验兔养殖场,生产动物许可证号: SCXK(浙)2012-0050。

2 方法

2.1 重组眼角膜上皮模型眼刺激法

接收组织后,先将组织放入每孔 0.9 mL 培养液的 6 孔板中,在标准条件下[(37±1)°C,(5±1)% CO₂,95% RH]预培养 1 h 后,检查组织是否良好,更换培养液后继续在标准条件下,预培养 24 h。次日,每孔组织表面先加入磷酸盐缓冲液(DPBS) 20 μL 预处理 15 min 后,每孔组织表面加入液体受试物 42 μL 接触暴露 5 min。DPBS 清洗 10 次后,再放入新鲜培养液中后孵育 60 min。然后将组织转移至已加入 300 μL 的 1 mg·mL⁻¹ MTT 溶液的

24 孔板中,标准条件培养 3 h。转移至新的 24 孔板中,再加入 2 mL 异丙醇到每个培养小室中,溶解甲瓚。吸取 200 μL 的紫色甲瓚溶液到 96 孔板中,采用异丙醇作为空白对照。测定 570 nm 处的吸光度值。

结果判定:相对于阴性对照组织,活性<60% 的被认为是刺激物(UN GHS 分类 2 或分类 1),活性>60%的被认为是无刺激物(未分类/UN GHS 不分类)。

2.2 兔眼刺激法

参照《化妆品安全规范》2015 版所示方法^[1],健康成年白色新西兰家兔,每个受试物选用 3 只家兔,性别不限,体质量约 1.8~2.1 kg。试验前动物经检疫程序在动物房环境中至少适应 3 d。试验开始前 24 h 内对受试动物的 2 只眼睛进行检查(包括使用荧光素钠检查)。如有眼睛刺激性症状、角膜缺陷和结膜损伤的动物不能用于试验。受试物前处理与接触方式液体受试物不需稀释,直接使用原液,受试物接触剂量为 0.1 mL;将受试物滴入(或涂入)结膜囊中,使上、下眼睑被动闭合 1 s。另一侧眼睛不处理用作自身对照。30 s 后,用足量、流速较快但又不会引起动物眼损伤的水流冲洗 30 min。

指标观察与结果评定:在滴入受试物后 1, 24, 48 和 72 h 以及第 4 天和第 7 天对动物眼睛进行检查,每次检查中均应按眼损害的评分标准记录眼刺激反应的积分,见表 1。如果 72 h 未出现刺激反应,即可终止试验。如果发现累及角膜或有其他眼刺激作用,7 d 内不恢复者,为确定该损害的可逆性或不可逆性,需延长观察时间,一般不超过 21 d。根据给受试物后动物角膜、虹膜或结膜各自在 24, 48 或 72 h 观察时点的刺激反应的最高积分和恢复时间,按眼刺激反应分级判定受试物对眼的刺激强度,见表 2。

2.3 统计

将兔眼刺激试验和 BioOcular™模型眼刺激试验的分级结果用 SPSS 19 软件进行相关性分析,判断 2 种方法的相关性。

3 结果

3.1 BioOcular™模型眼刺激试验

采用人重组角膜模型 BioOcular™对 8 种不同配方的洗发水进行眼刺激法测定其吸光度值,并计

表 1 眼损害的评分标准

Tab. 1 Evaluation standard of eye damage

眼损害	积分
角膜: 混浊(以最致密部位为准)	
无溃疡形成或混浊	0
散在或弥漫性混浊, 虹膜清晰可见	1
半透明区易分辨, 虹膜模糊不清	2
出现灰白色半透明区, 虹膜细节不清, 瞳孔大小勉强可见	3
角膜混浊, 虹膜无法辨认	4
虹膜: 正常	0
褶皱明显加深, 充血、肿胀、角膜周围有中度充血, 角膜对光仍有反应	1
出血、肉眼可见破坏, 对光无反应(或出现其中之一反应)	2
结膜: 充血(指睑结膜、球结膜部位)	
血管正常	0
血管充血呈鲜红色	1
血管充血呈深红色, 血管不易分辨	2
弥漫性充血呈紫红色	3
水肿	
无	0
轻微水肿(包括瞬膜)	1
明显水肿, 伴有部分眼睑外翻	2
水肿至眼睑近半闭合	3
水肿至眼睑大半闭合	4

表 2 原料眼刺激反应分级

Tab. 2 Eye irritation reaction grade for ingredients

可逆眼损伤	微刺激性	动物的角膜、虹膜积分=0; 结膜充血和/或结膜水肿积分≤2 且积分在<7 d 降至 0
	轻刺激性	动物的角膜、虹膜、结膜积分在≤7 d 降至 0
	中度刺激性	动物的角膜、虹膜、结膜积分在 8~21 d 内降至 0
不可逆眼损伤	腐蚀性	①动物的角膜、虹膜和/或结膜积分在第 21 天时>0 ②2/3 动物的眼刺激反应积分: 角膜浑浊≥3 和/或虹膜=2

注: 当角膜、虹膜、结膜积分为 0 时, 可判为无刺激性。

Note: when the cornea, iris and conjunctiva scored 0, it could be judged as non-irritating.

表 4 兔眼刺激检查法对 8 种洗发水剂积分均值及评价结果

Tab. 4 Integral mean value and evaluation results of 8 kinds of shampoo in rabbit eye irritation test

处理组	1 h	1 d	2 d	3 d	7 d	14 d	21 d	Draize 分级
NC	0	0	0	0	0	0	0	无刺激
#1	2	4	2	3	2	0	0	中度刺激
#2	1	2	1	0	0	0	0	轻度刺激
#3	2	4	2	2	2	0	0	中度刺激
#4	1	3	1	0	0	0	0	轻度刺激
#5	1	2	1	0	0	0	0	轻度刺激
#6	0	0	0	0	0	0	0	无刺激
#7	0	0	0	0	0	0	0	无刺激
#8	0	0	0	0	0	0	0	无刺激

算 3 次试验的均值及其标准偏差。结果 8 种洗发水表现出不同的眼刺激的程度, 其中 3 种洗发水(包括 2 种婴儿洗发水)#6, #7 和#8 的组织活性平均值都>60%, 按评价标准分为无刺激性, 而其余 5 种洗发水的活力平均值都<60%, 认为是有刺激性。这里不同的组织活力值反应在刺激程度上的差别, 结果见表 3。

表 3 8 种洗发水眼刺激法刺激等级评价和比较(n=3, $\bar{x} \pm s$)

Tab. 3 Evaluation and comparison of 8 shampoos in eye irritation test(n=3, $\bar{x} \pm s$)

受试物	物化性质	活性平均值/%	分级
阴性	半黏稠液体	100.00±7.84	无刺激
#1	半黏稠液体	5.31±0.14	刺激性
#2	半黏稠液体	59.49±4.28	刺激性
#3	半黏稠液体	12.00±0.02	刺激性
#4	半黏稠液体	47.36±3.29	刺激性
#5	半黏稠液体	58.89±1.97	刺激性
#6	半黏稠液体	72.55±5.09	无刺激
#7	半黏稠液体	97.02±5.67	无刺激
#8	半黏稠液体	87.78±3.27	无刺激

3.2 家兔眼刺激试验

在 8 种洗发水中, 3 种洗发水(包括 2 种婴儿洗发水)#6, #7 和#8 的受试家兔角膜、虹膜、结膜积分均为 0, 因此 3 种洗发水不具有眼刺激性。其余 5 种成人洗发水, 眼损伤均为可逆性眼刺激性, 其中#1 和#3 号角膜有损伤, 结膜有充血或水肿。但动物的角膜、虹膜、结膜积分在 8~14 d 内降至 0, 分级均为中度刺激性。而#2, #4, #5 在给予受试物后角膜轻微损伤, 结膜的有轻微充血或水肿, 但均在 7 d 内降至积分均值 0, 分级均为轻刺激性, 结果见表 4。

3.3 统计学分析

用统计学 SPSS 19 版软件, 比较眼刺激法的各组模型活性平均值和 Draize 法中最高积分进行相关性分析, SPSS 分析 2 种不同的检验方法的 Pearson 相关系数 r 为-0.955, 在 $P<0.01$ 时, 说明 2 种评价分级方法具有显著的相关性。

4 讨论

本试验同时采用体外三维的人重组眼角膜上皮模型眼刺激法和 Draize 兔眼刺激法, 将 8 种不同配方的洗发水作为受试物来进行眼刺激性的评价, 区分不同洗发水眼刺激的等级。2 种方法评价结果通过统计学分析表明, 对于不同原料的洗发水眼刺激性的评级显示很好的相关性($|r|$ 为 0.955, $P<0.01$)。

基于眼角膜上皮模型的眼刺激法的原理是基于 Maurer 和 Jester 损伤理论模型^[8], 采用人源的角膜上皮模型与受试物相接触, 根据角膜的损伤程度来判断受试物眼刺激性程度。测试采用 MTT 法检测受试物作用后的模型活性, 从而定量测定组织的存活比例。最终依据测试数值分类受试物, 相对于阴性对照组织, 活性 $<60\%$ 的被认为是刺激物(UN GHS Category 1/2), 活性 $>60\%$ 的被认为是无刺激物(Not Classified/UN GHS No Category)。

虽然 2 种方法在原理上是相同的, 都是根据 Maurer 和 Jester 损伤理论模型^[8-9], 通过受试物与角膜直接接触产生的损伤情况进行评价测定, 计算分级。区别是在于, 常规兔眼检测标准方法是受试物与兔眼直接接触, 然后后续观察眼睛在 21 d 内的损伤修复情况, 主观判断评分分级; 而基于人角膜上皮模型的眼刺激法是与受试物的接触培养, 最后通过组织上四唑盐的颜色反应后的吸光度值进行计算, 客观地根据计算结果来分级。2 种方法比较, 虽然现行标准的兔眼能更完整显示整个眼睛受到损伤的变化, 但是由于人和兔种属差异大, 兔眼无泪腺, 本身构造与人眼构造有诸多不同, 不同批次间兔眼, 不同实验室间兔眼刺

激结果重复性差, 实验周期长; 而基于人角膜上皮模型的眼刺激法实验本身采用人的角膜上皮, 周期仅需 2 d, 相对偏差更小, 准确性更好, 结果更加客观。因此, 和标准方法相比, 基于眼角膜模型的眼刺激法因为其耗时耗材少, 结果评定更加客观, 体现了生物安全性评价的要求的 3R 原则, 做到了人力物力的减少和优化。因此, 认为基于角膜上皮的眼刺激检查法是评价化妆品眼刺激安全性的一种简便快速灵敏的替代检测方法。

REFERENCES

- [1] 化妆品安全技术规范 2015 版[S]. 2015: 493-495
- [2] Acute Eye Irritation/Corrosion, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4 *Health Effects* No.405 [S]. 2012
- [3] ZHU S M, XIE Z, QU L J. Research on eye irritation of hair jies by using bovine corneal opacity permeability test [J]. *Chin J Mod Appl Pharm*(中国现代应用药理学), 2016, 33(8): 1000-1003.
- [4] Reconstructed human Cornea-like Epithelium (RhCE) test method for identifying chemicals not requiring classification and labelling for eye irritation or serious eye damage, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4 *Health Effects* No.492 [S]. 2015.
- [5] SUSANNE N K, URSULA G S, MARIA C R. Eye irritation testing of nanomaterials using the EpiOcular™ eye irritation test and the bovine corneal opacity and permeability assay [J]. *Part Fibre Toxicol*, 2016, 13(1): 18. Doi: 10.1186/s12989-016-0128-6.
- [6] LOTZ C, SCHMID F F, ROSSI A, et al. Alternative methods for the replacement of eye irritation testing [J]. *Altex*, 2016, 33(1): 55-67.
- [7] KALUZHNY Y, KANDÁROVÁ H, D'ARGEMBEAU-THORNTON L, et al. Eye irritation test (EIT) for Hazard identification of eye irritating chemicals using reconstructed human cornea-like Epithelial (RhCE) tissue model [J]. *J Vis Exp*, 2015 (102): 2063-2070.
- [8] FURUKAWA M, SAKAKIBARA T, ITOH K, et al. Histopathological evaluation of the ocular-irritation potential of shampoos, make-up removers and cleansing foams in the bovine corneal opacity and permeability assay [J]. *J Toxicol Pathol*, 2015, 28(4): 243-248.
- [9] JESTER J V, LI L, MOLAI A, et al. Extent of initial corneal injury as a basis for alternative eye irritation tests [J]. *Toxicol in Vitro*, 2001, 15(2): 115-130.

收稿日期: 2016-12-21

(本文责编: 曹粤锋)