

BioOcular™ 角膜上皮模型 ET₅₀ 法在化妆品体外眼刺激评价中的应用

张劲松, 桑晶, 匡荣, 洪利娅* (浙江省食品药品检验研究院, 杭州 310052)

摘要: 目的 通过 BioOcular™ 角膜上皮模型 ET₅₀ 法评价不同配方的化妆品在眼刺激性上的强弱。方法 采用三维人源重组角膜上皮模型 BioOcular™ 模型 ET₅₀ 法对不同品牌洗发水和面霜的眼刺激性进行比较研究, 区分不同配方产品的眼刺激性强弱等级。结果 在同样实验条件下, 洗发水和面霜表现出对三维人源重组角膜不同的刺激程度, 不同配方品牌的洗发水的刺激程度也有很大差别。结论 采用三维人源重组角膜上皮模型的 ET₅₀ 法是一种评价不同配方化妆品以及原料的眼刺激性的差异的快速替代检测方案。

关键词: 三维人源重组角膜; ET₅₀; 眼刺激

中图分类号: R965.3

文献标志码: A

文章编号: 1007-7693(2017)06-0846-03

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2017.06.013

引用本文: 张劲松, 桑晶, 匡荣, 等. BioOcular™ 角膜上皮模型 ET₅₀ 法在化妆品体外眼刺激评价中的应用[J]. 中国现代应用药学, 2017, 34(6): 846-848.

Evaluation of Eye Irritation Potential of Cosmetics Using Human Cornea-like Epithelial Tissue Model BioOcular™ ET₅₀ Method *in Vitro*

ZHANG Jinsong, SANG Jing, KUANG Rong, HONG Liya* (Zhejiang Institute for Food and Drug Control, Hangzhou 310052, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To evaluate eye irritation potential of different shampoos and facial creams using human cornea-like epithelial tissue model BioOcular™ ET₅₀ method *in vitro*. **METHODS** Different shampoos and facial creams were tested in eye irritation ET₅₀ test with reconstructed human cornea-like epithelial tissue model BioOcular™ *in vitro*, distinguish eye irritation levels of different formulations. **RESULTS** Under the same condition, shampoos and facial creams showed irritation at various levels in ET₅₀ test with reconstructed cornea-like epithelial tissue model. Also different ingredients and different brand of shampoos showed different degrees of irritation. **CONCLUSION** It is a quick alternative way to use ET₅₀ method to evaluate the irritation of different cosmetics and ingredients with reconstructed human cornea-like epithelial tissue model BioOcular™ *in vitro*.

KEY WORDS: reconstructed human corneal epithelium; ET₅₀; eye irritation

化妆品及其原料作为一种或多种化学品的混合物, 往往对消费者的眼睛存在一定刺激性甚至腐蚀性, 特别是眼霜、洗面奶、洗发水、染发膏, 眼睛暴露的概率更大, 对化妆品及其原料的眼刺激性进行深入的认识和研究具有重要意义。国际上目前用来评价化妆品眼刺激潜在风险的检测手段除了传统的家兔体内眼刺激法^[1], 还出现了一系列优化的新的替代检测方案, 如计算机模拟分析、牛眼混浊通透性实验、离体的兔眼实验、离体的鸡眼实验和鸡胚绒毛尿囊膜实验等^[2-4]。在3R原则(优化, 减少, 替代)的倡导下, 很多方法在面对动物伦理和人种属性差异等方面存在诸多问题的挑战, 真正能解决以上问题的有效方案就是找到模拟实际人角膜组织, 并解决伦理问题的技术, 基于三维的重组人角膜上皮模型的眼刺激性检测方

法给我们提供了一种很好的解决思路。

体外眼刺激机制的研究可以根据 Maurer 和 Jester 损伤理论模型来解释。通过共聚焦显微成像和传统的组化方法发现, 损伤的最初深度主要是在角膜上, 因此根据角膜的损伤变化可以预测整个眼睛的损伤程度和过程。损伤的深度会因组织分层所阻断, 因此微弱到轻度刺激主要涉及角膜上皮组织。中度刺激产生的损伤会从角膜上皮一直到基质上层。当损伤到比基质层更深的部位就是强刺激性了。基于这个理论, 美国 MatTek 公司生产的人重组角膜上皮组织 EpiOcular™ 早在 1996 年起, 就广泛被化妆品企业用来评价化妆品对眼刺激性的强弱^[5]。在 2015 年 7 月基于眼角膜上皮组织 EpiOcular™ 模型的 EIT 眼刺激检查法^[6], 率先通过经济合作与发展组织(OECD)认可, 作为评

作者简介: 张劲松, 男, 主任药师 Tel: 13735466571
13958043638 E-mail: hongliya@zjyj.org.cn

E-mail: zjsonly@hotmail.com

*通信作者: 洪利娅, 女, 主任药师 Tel:

价眼刺激或眼损伤检测的标准化实验。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。本研究意在利用国内的角膜上皮模型 BioOcular™ ET₅₀(引起组织存活率降低 50%所需时间)眼刺激法,作为一种新的替代检测方法,为快速检测化妆品或药品眼刺激性强弱提供新的思路。

1 仪器与材料

1.1 仪器

HERAcell 150i 型号二氧化碳培养箱(美国 Thermo Scientific 公司); SpectraMax 190 型号紫外-可见光连续光谱酶标仪(美国 Molecular Devices Corporation 公司)。

1.2 受试样品与试剂

洗发水: TA01[清扬头皮滋养护理去屑洗发露,有效期: 20181211, 联合利华(中国)有限公司]; TA02(巴黎欧莱雅透明质酸水润去屑洗发露,有效期: 20181014, 苏州尚美国际化妆品有限公司); TA03(海飞丝去屑洗发露丝质柔滑型,有效期: 20190122, 广州宝洁有限公司); TA04(丝润无硅净屑洗发露,有效期: 20190209, 汉高股份有限公司); TA05(欧贝斯去屑洗发露滋养柔顺型,有效期: 20170915, 广州市美驰化妆品有限公司); TA06[霸王乌发固发洗发液,有效期: 20181112, 霸王国际(集团)控股有限公司]; TA07(启初婴儿洗发露,有效期: 20181217, 上海家化联合股份有限公司); TA08[强生婴儿活力清新洗发露,有效期: 20181102, 强生(中国)有限公司]。

面霜: TB01(百雀羚 8 杯水倍润精华霜,有效期: 20190307, 上海百雀羚日用化学有限公司); TA02(大宝美容日霜,有效期: 20181215, 北京大宝化妆品有限公司); TB03(Dior HYDRA LIFE, 法国 Parfums Christian Dior); TA04(Whoo 后拱辰享, 韩国 LG); TA05(郁美净金牌儿童霜,有效期: 20180813, 天津郁美净集团有限公司); TB06[强生清润保湿霜,有效期: 20181229, 强生(中国)有限公司]。

BioOcular™角膜上皮模型(陕西博溪生物科技有限公司); OcuRecovery 维持培养液(陕西博溪生物科技有限公司); 屏障功能测试: 0.3% Triton X-100 (批号: SLBM1897V), MTT(批号: MKBF7873V, 美国 Sigma); DPBS(货号: 14190,

美国 Gibco); 异丙醇(批号: 20150930, 国药集团化学试剂有限公司)。

2 方法

2.1 试验方法

接收并检查组织,将组织转移至每孔 0.9 mL 培养液的 6 孔板中,在标准条件下[(37±1)°C, (5±1)% CO₂, 95%相对湿度]预培养 1 h 后,更换培养液,继续在标准条件下培养 24 h。次日,更换培养液。试验设空白对照组(超纯水)及屏障功能测试组(0.3% Triton X-100),每种受试样品均做 3 个平行组织。采用外置活塞式移液器吸取 80 μL 受试样品滴加于组织表面,在标准条件下进行孵育。根据不同产品初试结果,洗发水接触时间采用 0.5, 1, 2 h, 面霜接触时间采用 3, 6, 16, 24 h, 屏障功能测试接触时间采用 30 和 70 min。孵育好后取出组织,用 DPBS 进行清洗。将清洗好并且干燥的组织,转移至加有 300 μL 的 1 mg·mL⁻¹MTT 溶液的 24 孔板中,在标准条件下孵育 3 h。然后吸干组织培养室底部的 MTT,转移至新的 24 孔板中,加入 2 mL 异丙醇提取甲瓚。吸取 200 μL 的甲瓚溶液到 96 孔板中,采用异丙醇作为溶剂空白对照,在 570 nm 处测定吸光度值。

2.2 试验成立条件(参照皮肤模型使用说明书)

空白对照校正 OD 值应在 0.6~1.5 之间,以保证组织有稳定的活性。

屏障功能测试 ET₅₀ 值应在 30~70 min 之间,以保证组织对试验结果的准确性和可重复性。

2.3 结果评价

活性=(样品 OD 值-溶剂空白 OD 值)/(空白 OD 值-溶剂空白 OD 值)×100%。

ET₅₀ 计算:选取活性<50%和>50%的 2 个时间点进行线性回归,并计算出 ET₅₀。

ET₅₀ 应用:ET₅₀ 值越大,说明受试样品眼刺激越小,产品越温和。

3 结果

空白对照校正 OD 值实测结果在 1.1~1.3 之间,屏障功能测试 ET₅₀ 值实测结果在 40~60 min 之间,试验条件成立。受试样品试验结果显示,洗发水和面霜这 2 类产品,面霜更加温和,几乎无眼刺激。洗发水各品牌间有较大差别,眼刺激从大到小为 TA01>TA03>TA05>TA02>TA04>TA06>TA08>TA07,其中婴儿用洗发水的眼刺激性明显比成人洗发水小。洗发水 ET₅₀ 结果见表 1,

面霜 ET₅₀ 结果见表 2。

表 1 洗发水 ET₅₀ 结果

Tab. 1 ET₅₀ results of shampoos

洗发水	活性/%			ET ₅₀ /min
	0.5 h	1 h	2 h	
屏障功能	/	/	/	48.7
TA01	24.0	11.1	3.1	19.7
TA02	64.8	32.4	8.3	43.7
TA03	32.4	18.9	4.4	22.2
TA04	64.4	37.1	11.6	45.8
TA05	60.0	35.0	13.8	42.0
TA06	70.4	44.4	18.0	53.5
TA07	80.2	65.2	59.7	225.6
TA08	82.7	65.4	40.1	79.9

表 2 面霜 ET₅₀ 结果

Tab. 2 ET₅₀ results of facial creams

洗发水	活性/%			ET ₅₀ /h
	6 h	16 h	24 h	
屏障功能	/	/	/	0.9
TB01	95.9	81.5	60.9	>24
TB02	103.8	90.2	93.3	>24
TB03	88.8	71.8	75.4	>24
TB04	90.9	84.2	88.4	>24
TB05	93.9	83.9	87.7	>24
TB06	80.8	71.8	74.0	>24

4 讨论

目前国内的化妆品或药品生产企业在产品研发过程中,尤其在产品配方筛选方面,往往注重的是配方对成品外观、理化指标和稳定性等方面的影响,而把安全性试验放在最后,此时若安全性不能达到要求,那么就要重新修改配方。因此,在产品配方筛选时就同时将安全性考虑进去是一种很好的选择。在眼刺激试验方面,人角膜上皮模型的眼刺激试验 EIT 法可以快速给出样品是否有眼刺激的结论,ET₅₀ 法则可以将不同的配方按刺激性强弱进行排序,尤其是对比较温和的和轻

度刺激性的配方进行排序,再结合其他方面选出最佳配方。ET₅₀ 法还可以将企业自己的新产品和老产品,或者市售其他企业的同类产品,在眼刺激方面进行比较。

国内化妆品或药品在注册审批中需提供眼刺激数据,目前均采用家兔体内眼刺激试验。该方法试验周期长,最长达 21 d,结果判定标准均为主观判断。该方法只能将受试样品的眼刺激性强度初步定性,对于刺激性相近的样品无法做出刺激性强弱区分。有些强刺激性样品对家兔眼睛伤害较大,并且损伤不可逆。而采用人角膜上皮模型进行体外眼刺激试验,试验周期只要 2~3 d,结果判定不需主观判断,且可以将不同样品眼刺激性强弱进行排序。同时,该方法还符合生物安全性评价要求的 3R 原则,做到了人力物力的减少和优化,是一种评价不同配方化妆品以及原料的眼刺激性的差异的快速替代检测方案。

REFERENCES

- [1] 急性眼刺激性/腐蚀性试验,化妆品卫生规范(2007年版)[S]. 2007.
- [2] 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.
- [3] LI Q, YANG Y, YANG X F, et al. Establishment of layered screen model of eye irritation alternative methods for cosmetic ingredients [J]. *J Environ Health(环境与健康杂志)*, 2015, 32(2): 116-121.
- [4] ZHU S M, XIE Z, QU L J. Research on eye irritation of hair dyes by using bovine corneal opacity permeability test [J]. *Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学)*, 2016, 33(8): 1000-1003.
- [5] YULIA K, HELENA K, LAURENCE A T, 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): 52979.
- [6] Reconstructed human cornea-like epithelium(RhCE) test method for identifying chemicals, OECD guideline for the testing of chemicals, 492 [S]. 2015.

收稿日期: 2016-10-10
(本文责编: 李艳芳)