



整合 CAMVA 和 BCOP 方法检测化妆品的眼刺激性

秦 瑶¹, 程树军¹, 黄健聪¹, 黄 玲², 陈 或¹

- (1. 广东出入境检验检疫技术中心, 广州 510623;
2. 新疆出入境检验检疫局技术中心, 乌鲁木齐 830063)

【摘要】 目的 组合两种体外替代方法评价化妆品的眼刺激。**方法** 分别采用鸡胚尿囊膜血管试验 (CAMVA)、牛角膜浑浊通透试验 (BCOP) 和 Draize 兔眼试验对 60 种化妆品进行测试, 并预测眼刺激分类。**结果** 采用 CAMVA 法可以区分 41 种无刺激性样品和 18 种有刺激性样品; 采用 BCOP 法可预测 35 种无刺激性、21 种轻-中刺激性和 4 种严重刺激性样品; 组合 CAMVA-BCOP 方法可明显提高刺激程度的区分能力, 与体内实验分类一致性达 98.3%。**结论** 组合 CAMVA-BCOP 的整合试验策略可用于化妆品的眼刺激评价, 其预测范围可覆盖无刺激性到严重刺激性。

【关键词】 化妆品, 眼刺激性, 替代方法, 组合策略

【中图分类号】 R33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2014) 06-0078-05

doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2014.006.017

Integrated CAMVA and BCOP methods to predict eye irritation caused by cosmetics

QIN Yao¹, CHENG Shu-jun¹, HUANG Jian-cong¹, HUANG Lin², CHEN Yu¹

- (1. Guangdong Inspection and Quarantine Technology Center. Guangzhou 510623, China;
2. Technical Center of Xinjiang Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Urumqi 830063)

【Abstract】 Objective To explore the use of integrated two methods in vitro in prediction of eye irritation caused by cosmetics. **Method** Chorioallantoic membrane vascular assay (CAMVA), bovine corneal opacity and permeability (BCOP) and Draize rabbit eye irritation test were used to determine the predictive potential of eye irritation of 60 kinds of cosmetics. **Results** CAMVA method was able to distinguish 41 non-irritant samples and 18 irritant samples. BCOP method was able to predict 35 non-irritant samples, 21 mild-moderate irritant samples and 4 severe irritant samples. Combination of CAMVA and BCOP methods could obviously improve the identification ability of irritation, and the classification consistency with Draize rabbit eye irritation testing reached 98.3%. **Conclusions** The integrated test strategy combined BCOP with CAMVA can be used to appropriately predict ocular irritation of cosmetics, with a prediction range covering non-irritant to severe irritant samples.

【Key words】 Cosmetics; Eye irritation; Alternative methods; Integrated strategy

欧盟化妆品动物实验禁令的发布和实施, 为检测机构在产品安全性评价中建立科学合理的体外

替代方法提出了要求。既然化妆品眼刺激评价的 Draize 兔眼试验已被法规禁止, 那么在多种有效的

[基金项目] 国家质检总局科研项目(2012IK194)。

[作者简介] 秦瑶(1979-), 女, 工程师, 从事动物实验替代方法研究, E-mail: chnalt@sohu.com。

[通讯作者] 程树军(1971-), 男, 博士, 研究员, E-mail: chengciq@sohu.com。

体外方法中选择建立整合应用策略是比较理想的模式,这些方法包括离体鸡眼试验(ICE)、鸡胚绒毛膜尿囊膜试验(HET-CAM、CAMVA、CAMTB)、牛角膜浑浊及通透度试验(BCOP)、短时间暴露试验(STE)、荧光素漏出试验(FL)等^[1-3]。本实验研究组合两种有效的眼刺激体外方法——鸡胚绒毛膜尿囊膜血管试验(CAMVA)和BCOP试验,对60种个人护理产品眼刺激性进行评价,并与动物实验进行比对,建立CAMVA-BCOP组合策略,为个人护理用品的眼刺激性的体外评价提供数据支持。

1 材料和方法

1.1 样品

市售化妆品合计60种,分为3类,清洁沐浴类产品(沐浴露、洗发水、清洁液等)22种,眼部用产品(粉底、眼线、眼霜、睫毛膏、眉笔等)17种和护肤类产品(防晒霜、防皱霜、祛斑、植物精油等)21种。

1.2 主要材料、试剂及仪器

SPF级白莱杭鸡受精鸡胚(购于新兴大华农禽蛋有限公司,实验动物生产许可证:SCXK(粤)2008-0019,牛眼球取自广州地区屠宰场,普通级实验兔购自广东省医学实验动物中心(实验动物生产许可证:SCXK(粤)2008-0002。含酚红及不含酚红MEN培养基(含1% FBS和L-谷氨酰胺)、HBSS、荧光素钠均购自Sigma公司,含 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 的DPBS,10%氢氧化钠(广州化学试剂厂)、“O”形特富龙环(孔径0.8 mm),角膜浊度仪(德国BASF-OP3.0),全波长酶标仪(美国Thermo),培养箱(德国Mettler)等。

1.3 CAMVA方法及眼刺激性分类

将1 d龄鸡胚置于培养箱37℃孵育,于第4天在鸡胚窄端钻一小孔,抽取约3 mL蛋清后用火胶棉封住小孔。在鸡胚位置的上方开约5 mm × 10 mm的矩形小窗并移除蛋壳,暴露鸡胚,以保鲜膜覆盖。随后放回培养箱继续孵育。第14天,取出鸡胚,扩大观察窗,于绒毛尿囊膜上放置“O”形特富龙环,取40 μL(固体40 mg)不同浓度受试物加入环内,37℃孵育。30 min后,观察血管变化,计数阳性反应(出现溶血、血管消失、血管凝固等)鸡胚个数,最后计算RC50,即引起一半鸡胚出现阳性反应的受试物浓度。如果样品RC50 > 3%,判定为无刺激性,≤3%,则为有刺激性^[4]。

1.4 BCOP方法及眼刺激性分类

参考OECD指南437,取新鲜牛眼球切取角膜,将其装配于专用支架中。前后室均填满无酚红MEM,于(32 ± 1)℃培养箱平衡1 h后用浊度仪读数角膜浊度本底值。移除前室培养基后加入750 μL未稀释液体受试物(固体为20%悬液),孵育10 min(固体为4 h),用含酚红MEM冲洗至样品无残留。前室重新填满无酚红MEM后返回培养箱孵育2 h(固体无需后孵育)后读取终末浊度值。去除前室培养基,加入1 mL 0.4%(固体为0.5%)由含 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} DPBS配制的荧光素钠溶液,孵育90 min。收集后室全部液体,混匀后取360 μL在490 nm波长下读取吸光度值。根据公式计算体外刺激评分值(in vitro irritancy score, IVIS):IVIS = 浊度值 + 15 × 吸光度。每个样品重复3个角膜。IVIS ≤ 3,预测无刺激性,3 ~ 55 预测刺激性(包括2A和2B类),>55 预测严重刺激性^[5]。

1.5 Draize 兔眼试验

成年健康家兔,在其中一只眼睛结膜囊滴入0.1 mL受试物,另一只眼睛作为对照,于染毒后24 h、48 h、72 h、4 d、7 d观察眼睛结膜、角膜、虹膜反应。根据改良最大平均得分MMAS(modified maximum average score)进行分类:MMAS ≤ 2.5 为无刺激性,2.5 ~ 25 为轻刺激性,25 ~ 50 为中度刺激性,>50 为严重刺激性/腐蚀性。

1.6 统计学方法

比较不同方法结果对物质分类是否具有一致性,采用Kappa一致性检验(Kappa ≥ 0.75 一致性好;0.75 < Kappa < 0.4 一致性一般;0.4 ≥ Kappa 一致性差)。P < 0.05 为差异有显著性意义。

2 结果

60种产品的体外测试和动物测试结果见表1。经Draize试验的样品,结果为42种无刺激性,11种微弱刺激性、5种中等刺激性和2种严重刺激性。CAMVA试验结果为41种无刺激性,19种为有刺激性;BCOP试验结果为35种无刺激性,21种轻-中刺激性,4种严重刺激性。

以体内实验为判断标准,参考替代方法验证的准则^[2]。CAMVA方法可以区分41种无刺激性样品,特异性为97.6%(41/42),可区分全部18种有刺激性的样品,敏感性为100%(18/18),但对刺激程度的预测效果不理想,总的分类一致性达到

98.3% (59/60), Kappa = 0.890。阳性预测性为 94.7% (18/19), 阴性预测率为 100% (41/41), 假阳性率为 2.4% (1/42), 假阴性率为 0% (0/18)。

BCOP 方法对于阳性结果的预测, 总敏感性为 100% (18/18), 其中严重/腐蚀性刺激性预测, 敏感性为 100% (2/2), 对于中度-轻度刺激性的区分, 敏感性为 95.8% (14/16)。BCOP 可以区分 35 种无刺激性样品, 特异性为 83.3% (35/42)。总的分类一致性达到 85% (51/60), 其中阳性预测性(含轻度, 中度和严重刺激性)为 72% (18/25), 阴性预测性为 100% (35/35)。假阳性率为 20.0% (7/35), 假阴性率为 0% (0/18)。分类不一致的情况是将 1 种轻度和 1 种中度刺激性误分类为严重刺激性, 7 种无刺激性误分类为轻-中度刺激严重刺激性。

试验结果表明, CAMVA 区分了 41 种无刺激性

样品, 18 种有刺激性样品, 与兔眼试验一致性达到 98.3% (59/60), 但对于有刺激性样品并无确切的程度对应区分。BCOP 鉴别了 35 种无刺激性样品和 25 种有刺激性样品, 总的分类一致性为 85%, 一致性检测 Kappa = 0.743, 低于 CAMVA 法, 主是原因是 BCOP 方法将较多的无刺激类归为不可预测类。采用 CAMVA-BCOP 的组合方法(表 2); 对于阳性结果的预测总敏感性为 100% (18/18), 其中严重刺激性预测敏感性为 100% (2/2), 对于中度-轻度刺激性的区分, 敏感性为 100% (15/15), 对于无刺激性样品预测的特异性为 97.6% (41/42)。总的分类一致性达到 98.3% (59/60), 其中阳性预测性为 100% (18/18), 阴性预测性为 100% (35/35)。假阳性率为 2.4% (1/42), 假阴性率为 0% (0/18)。

表 1 体内和体外实验结果
Tab.1 Results of tests in vitro and in vivo

体外试验分类结果 Tests in vitro		体内试验分类结果 Tests in vivo				总计 Total
		严重刺激性 Severe irritation	中度刺激性 Moderate irritation	轻度刺激性 Mild irritation	无刺激性 No irritation	
BCOP	严重刺激性 Severe irritation	2	1	1	0	4
	轻-中度刺激性 Mild-moderate irritation	0	4	10	7	21
	无刺激性 No irritation	0	0	0	35	35
	合计 Total	2	5	11	42	60
CAMVA	有刺激性 Irritation	2	5	11	1	19
	无刺激性 No irritation	0	0	0	41	41
合计 Total		2	5	11	42	60

注: 将无刺激性定为阴性, 有刺激性定为阳性。

表 2 组合方法实验结果
Tab.2 Results of tests by combination method

体外试验分类结果 Tests in vitro		体内试验分类结果 In vivo tests				合计 Total
		严重刺激性 Severe irritation	中度刺激性 Moderate irritation	轻度刺激性 Mild irritation	无刺激性 No irritation	
CAMVA- BCOP 组合 Combination	严重刺激性 Severe irritation	2	0	1	0	3
	轻-中度刺激性 Mild-moderate irritation	0	5	10	1	16
	无刺激性 No irritation	0	0	0	41	41
	合计	2	5	11	42	60

注: 将无刺激性定为阴性, 有刺激性定为阳性。

Note: No irritation is considered as negative, presence of irritation is regarded as positive.

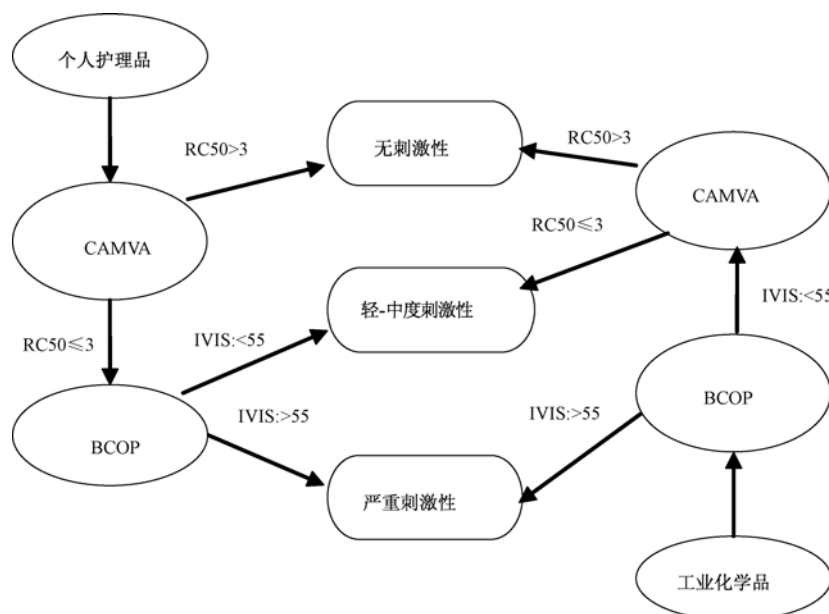


图 1 组合 CAMVA-BCOP 方法的眼刺激试验策略

Fig. 1 Strategy of irritation testing by CAMVA-BCOP combination

3 讨论

传统 Draize 兔眼试验存在评分主观性、重复性差、耗时、方法残忍等不足,无法满足产品精确定量评价的要求。近 20 多年来,已开发了多种体外方法用于替代兔眼试验,不仅可以减少体内试验的不足,而且遵循了动物实验减少优化和替代的 3R 原则。但是,鉴于体内眼刺激反应尚包括眼睑、结膜和角膜的反应,仅使用单一体外方法无法完全模拟体内反应,不同方法适用范围也存在差异,体外方法还不能很好地检测损伤后的修复作用。因此考虑组合两个或两个以上体外方法建立整合测试策略,以覆盖眼刺激性反应累及的范围和程度。

鸡胚绒毛膜毛尿囊膜结构与眼结膜相似, CAMVA 方法通过观察受试物对血管的作用评价潜在的眼刺激性,具有较高的敏感性^[6]。对于检测中度以下的眼刺激性效果较好,尤其是能有效区分无刺激性物质^[7],但对轻度刺激性以上的物质无法精确区分。其不足之处还表现在对含聚氧乙烯配方的检测中容易导致假阳性结果^[6],实验持续时间较长,对不溶物质的操作要求较高等。该方法适合作为化妆品和个人护理用品配方、醇类物质和表面活性剂的刺激性筛查^[2,5]。

BCOP 以离体牛眼角膜模拟人角膜进行受试物暴露,通过测量角膜浑浊度及渗透性的改变评价受试物眼物刺激性^[8]。其优点在于不受样品理化性

质和溶解性的限制,可用于化学品眼刺激标识和分类,还可以延长角膜培养时间和增加角膜组织学检查以评估刺激损伤后的恢复作用和机制分析。缺点是只评估了角膜损伤,没有考虑受试物对虹膜和结膜的刺激作用^[9]。BCOP 法于 2009 年被 OECD 认可发布为试验指南(TG 437),用于严重刺激性和腐蚀性的鉴别,2013 年重复修订的版本,确定了其在鉴别无刺激性中的作用^[4]。

本研究结果表明,采用 CAMVA-BCOP 的组合方法可明显提高眼刺激性预测的一致性和敏感性,弥补单一方法的不足,达到替代体内实验的目的。如果了解产品成分或配方结构,替代方法的组合应用特别具有优势。如何选择方法组合及其顺序应综合考虑评估目的和样品特性等因素,例如美国 EPA 推荐采用 BCOP 法、细胞传感器法和重建角膜模型(EpiOcular)的组合策略,用于抗菌剂眼刺激性的检测^[3]。Donahue 等人建立了基于化妆品配方优化的 CAMVA 和 BCOP 的组合方法^[10]。日本学者建立了 STE 与 BCOP 方法的组合评价化合物的眼刺激性^[11]。本研究建立 CAMVA-BCOP 整合方案适用于个人护理用品的测试,主要考虑到大部分样品眼刺激性较温和,而且剂型多样,配方多变的特点,实验顺序采用先 CAMVA 后 BCOP 的组合。如果是工业化学品,关注的是化学物刺激性的准确标识和分类,眼刺激性波动范围可能较大,可在预判的基础上,选择 BCOP 单一方法测试或选择先 BCOP 后

CAMVA 的组合^[12]。根据新版的 OECD 指南,BCOP 可以有效鉴别刺激谱两端的样品,配合敏感性高的 CAMVA,这一组合可解决大部分样品眼刺激性检测的需要,建议的测试程序如图 1。相信随着更多标准化的眼刺激替代方法的研发,以及针对不同测试目的建立组合方案的探索和验证,有希望进一步提高眼刺激性预测的科学性。

参考文献:

- [1] 敖华英,程树军,谈伟君. 不同哺乳动物红细胞溶血替代眼刺激实验的比较[J]. 中国组织工程研究, 2012, 16(12): 2163-2166.
- [2] 程树军,焦红. 实验动物替代方法原理与应用[M]. 北京: 科学出版社. 2010:285-304.
- [3] EPA BRD-Final Report. Background review document of an in vitro approach for EPA toxicity labeling of anti-microbial cleaning products; EPA toxicity labeling background review document [R]. USA: EPA, 2009.
- [4] Bagley DM, Waters D, Kong BM. Development of a 10-day chorioallantoic membrane vascular assay as an alternative to the Draize rabbit eye irritation test [J]. Food Chem Toxicol, 1994, 32(12):1155-1160.
- [5] OECD. OECD guideline for testing of chemicals No. 437: Bovine corneal opacity and permeability test method for identifying i) Chemicals inducing serious eye damage and ii) Chemicals not requiring classification for eye irritation or serious eye damage [S]. OECD Paris, 2013, 1-27
- [6] Bagley DM, Cerven D, Harbell J. Assessment of the chorioallantoic membrane vascular assay (CAMVA) in the COLIPA in vitro eye irritation validation study [J]. Toxicol In Vitro, 1999, 13(2):285-293.
- [7] Daniel MB, Perveen YR, Betty MK, et al. Evaluation of the vascular components of the chorioallantoic membrane assay as a model for eye irritation potential: II [J]. Cutan Ocular Toxicol, 1991, 10(1-2):105-113.
- [8] Cameron DM, Donahue DA, Costion GE, et al. Confirmation of in vitro and clinical safety assessment of behentrimonium chloride-containing leave-on body lotions using post-marketing adverse event data [J]. Toxicol In Vitro, 2013, 27(8):2203-2212.
- [9] ICCVAM. Test Method Evaluation Report: In Vitro Ocular Toxicity Test Methods for Identifying Ocular Severe Irritants and Corrosives. Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program (NTP) Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM) [R]. NIH Publication: 2007.
- [10] Donahue DA, Kaufman LE, Avalos J, et al. Survey of ocular irritation predictive capacity using chorioallantoic membrane vascular assay (CAMVA) and bovine corneal opacity and permeability (BCOP) test historical data for 319 personal care products over fourteen years [J]. Toxicol In Vitro, 2011, 25(2):563-572.
- [11] Hayashi K, Mori T, Abo T, et al. A tiered approach combining the short time exposure (STE) test and the bovine corneal opacity and permeability (BCOP) assay for predicting eye irritation potential of chemicals[J] Toxicol Sci. 2012, 37(2): 269-280.
- [12] 敖华英,程树军,潘芳,等. 化妆品眼刺激试验替代方法标准化与展望[J],中国比较医学杂志,2012,22(1):79-83.

[修回日期]2014-03-05