

化学品刺激性组织工程皮肤检测模型的构建

张兆清¹, 金岩^{2*}, 余春艳¹, 张勇杰², 雷娟²

(1. 第四军医大学唐都医院皮肤科, 陕西 西安 710038; 2. 第四军医大学口腔医学院组织病理学教研室, 陕西 西安 710032)

摘要: 目的 构建检测化学品刺激性的组织工程皮肤模型。方法 利用组织工程学方法, 以牛胶原为支架, 以人皮肤角质形成细胞和成纤维细胞为细胞来源, 构建检测用组织工程皮肤模型。选用 10 种化学品为检测物质。在刺激性检测实验中, 10 种化学品(固体 10 mg、液体 10 μ L)局部接触检测模型表面 15 min, 用 MTT 方法测定细胞活力。结果以相对细胞活力值为判定刺激性的依据, 在 10 种化学品中, 构建的检测模型能够分辨 7 种化学品的刺激性。结论构建的组织工程皮肤模型能判定化学品的刺激性, 可以尝试用于化学品刺激性的检测。

关键词: 组织工程皮肤; 模型; 刺激性; 化学品; 替代

中图分类号: R329.29 文献标识码: A 文章编号: 1002-221X(2006)02-0081-03

Construction of the tissue engineering skin model for assessing the dermal irritation potential of chemicals

ZHANG Zhao-qing¹, JIN Yan^{2*}, YU Chun-yan¹, ZHANG Yong-jie², LEI Juan²

(1. Department of Dermatology, Tangdu Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an 710038, China; 2. Department of Oral Histopathology, Stomatological College, Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China)

Abstract: Objective To construct the model of human skin cultures for assessing the potential dermal irritation of chemicals.

Method Using the method of tissue engineering, calf collagen matrix as supporter, upon which stratified differentiated epidermis derived from human keratinocytes and fibroblasts has been laid. Ten chemicals were selected for the assessment of irritation of chemicals to human skin as test materials. During test, the test chemicals (solids: 10mg; liquids: 10 μ L) were directly exposed to stratum corneum for 15 min, that mimicked the route of human exposure. The cell viability was taken as the measured endpoint, which was assessed by mitochondrial activity measurement using MTT (3-[4, 5-dimethylthiazol-2-yl] 2, 5-diphenyltetrazolium bromide) assay. **Result** Seven chemicals among tested 10 chemicals were showed defined irritation to skin by the cultured tissue engineering skin, which consisted of a reconstructed epidermis and a functional stratum corneum. **Conclusion** This cultured tissue engineering skin model has been well established, which may apply as a primary test for the irritation of chemicals to the skin.

Key words: Tissue engineering skin; Model; Irritation; Chemical; Replacement

一种化学品或其组分在生产、分类、标记、包装、运输、使用前必须进行皮肤的刺激性安全性检测。传统上, 对皮肤刺激性的判定依据来源于兔皮肤刺激实验。刺激性实验不仅给动物造成了痛苦, 而且由于不同种属之间皮肤结构和功能存在着很大的差异, 难以保证其结果应用于人体的安全性。近 20 年来, 随着动物保护组织呼声的提高, 促使各国相继立法, 保护实验动物福利, 动物实验领域里“3R”(减少、优化、替代)运动广泛兴起。动物实验替代方法在国际贸易中也以技术壁垒的形式直接影响着经济发展。比如, 2002 年 11 月欧盟做出明确决定, 从 2009 年起禁止利用动物进行化妆品的测试, 并列入 WTO 双边协议的条款。我国目前各类产品的安全性评价仍

主要沿用传统的动物实验, 与有关国际条约没有接轨。为适应欧盟发达国家部分产品安全性评价将要禁用动物的国际形势, 我国建立与国际接轨的动物福利保障制度, 开展动物实验替代方法研究十分必要。本实验尝试构建一种新型的组织工程皮肤作为检测化学品刺激性的工具, 为工业化学品及其废料、药品、化妆品、除草剂、杀虫剂、食品添加剂、日用品(如清洗剂)、植物毒素等对皮肤刺激性的检测奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

人包皮环切术后组织、DMEM 培养基、0.25%胰酶、谷氨酰胺、胎牛血清、胶原酶、牛 I 型胶原、K-SFM (keratinocyte-serum free medium), 1, 1, 1-三氯乙烷 (Fluka 公司)、庚醛 (Acros 公司)、甲基棕榈酸盐 (Fluka 公司)、1-溴戊烷 (Fluka 公司)、外消旋香茅醇 (Acros 公司)、右旋柠檬烯 (Acros 公司)、羟基香茅醛 (Acros 公司)、3,3-二硫代二丙酸 (Aldrich 公司)、3-氯硝基苯 (Riedel-de Haen 公司)、月桂硫酸钠 (西安化学试剂

收稿日期: 2005-11-11

基金项目: 国家高技术发展计划(863 计划)组织工程皮肤重大专项资助项目(2002AA205041)

作者简介: 张兆清(1970-), 男, 主治医师, 在读硕士, 研究方向: 组织工程皮肤。

*: 通讯作者, E-mail: yanjin@fmmu.edu.cn

厂)、异丙醇(汕头光华化学厂)。以上化学品是从 IC-CVAM (the Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods) 评价 EpiDerm 检测性能的 20 种化学品中选取的^[1], 均为化学纯试剂。

1.2 方法

1.2.1 皮肤细胞的分离培养 方法见参考文献 [2]。

1.2.2 组织工程皮肤检测模型的构建 (1) 将生长状态良好的人成纤维细胞与小牛 I 型胶原混合, 37℃ 孵育 0.5 h 凝固后, 加入培养液连续培养 10 d, 真空冷冻干燥、消毒, 保存备用。(2) 取上述真皮基质放入 96 孔培养孔内, 在其表面以 1×10^6 /ml 接种表皮细胞培养 7 d, 再进行气液面器官培养 4 d, 即获得检测用的组织工程皮肤。

1.2.3 检测方法 参考 EpiDerm 和 Episkin 的检测评价方法^[1,3]。(1) 化学品 10 μ l (固体 10 mg 研成粉末, 同时加蒸馏水 10 μ l) 局部接触面积约 0.32 cm² 的组织工程皮肤表面 15 min。(2) 阴性对照加 10 μ l

蒸馏水、阳性对照加 10 μ l 的 5% 月桂硫酸钠。(3) 与化学品接触 15 min 后用 1×PBS 冲洗活性皮肤 20 次 (尽可能冲净残留化学物质)。(4) 继续在饱和湿度、5% CO₂、37℃ 的条件下孵育 42 h。(5) 浸入 1.0 ml 浓度 0.3 mg/ml 的 MTT 溶液内, 在饱和湿度、5% CO₂、37℃ 孵化 3 h。(6) 用 1×PBS 冲洗 2 次, 放进内有 2.0 ml 酸化异丙醇的玻璃管内, 用振荡混合仪混匀, 在室温、避光的条件下过夜。(7) 振荡混合仪混匀每个玻璃管, 闲置 1~2 min 后, 每管中取 200 μ l 标本加入 96 孔微量比色池中, 在 570 nm 用全自动定量绘图酶标仪读取 A 值, 以酸化异丙醇溶液作为空白对照。

2 结果

2.1 构建的组织工程皮肤检测模型组织学观察

所构建的组织工程皮肤检测模型含有表皮层和真皮层。表皮层中含有基底层、棘层、颗粒层和角质层。见图 1。

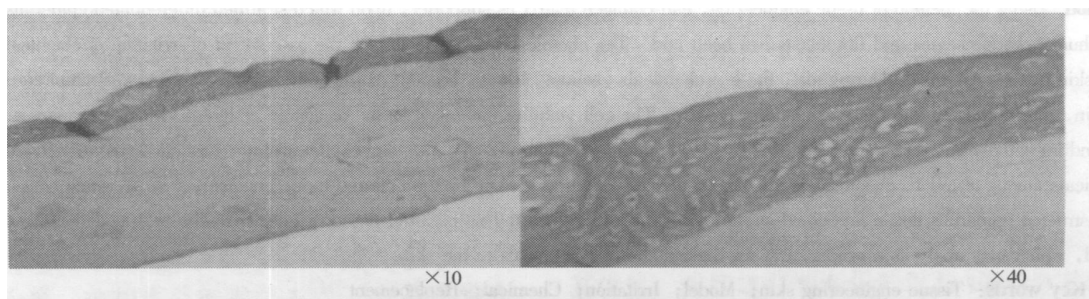


图 1 组织工程皮肤检测模型

2.2 相对细胞活力百分比 (见表 1)

表 1 相对细胞活力百分比结果 ($n=9$, $\bar{x} \pm s$) %

化学品名称	相对细胞活力
50%月桂硫酸钠	10.8±2.4
1, 1, 1-三氯乙烷	13.2±2.8
庚醛	9.2±3.9
外消旋香茅醇	8.5±2.3
右旋柠檬烯	13.4±2.9
羟基香茅醛	46.4±3.9
3, 3-二硫代二丙酸	81.1±2.1
3-氯硝基苯	87.9±3.8
甲基棕榈酸盐	48.6±2.4
1-溴戊烷	46.2±3.3

计算细胞相对活力值方法参照 EpiDerm 的标准。相对细胞活力百分数 = $100 \times (\text{某化学物的 } A \text{ 值} / \text{阴性对照的平均 } A \text{ 值})$ 。3 个阴性对照的平均 A 值相当于 100% 的细胞活力。阴性对照平均 A 值的最大值不应 > 0.4, 最小值不应 < 0.115。3 个阳性对照的相对 A 值, 范围应在 0~20% 之间。同时测定的标本 A 值与其平均 A 值差异 < 15%。评判化学品刺激性的标

准: 相对细胞活力 < 50% 判断为有刺激性, $\geq 50\%$ 为无刺激性。

3 讨论

动物实验在研究疾病、开发检测医药和疫苗、评价化学物质的危险性等诸多方面, 有着不可或缺的重要作用。但动物实验也有实验周期长、耗时费力、动物间存在个体差异及动物外推到人的种族差异等缺点。随着各国有关动物福利法律的完善, 寻找替代动物实验的科学方法得到了各国政府和科学工作者的关注。许多发达国家广泛开展了体外替代方法的研究和验证工作, 已涉及到皮肤刺激和腐蚀性实验、眼刺激和腐蚀性实验、光毒性实验、皮肤致敏性实验以及热原检验等^[4~6]。EpiDerm (MafTek Corporation, Ashland, MA, USA) 和 Episkin (EPISKIN SNC, Lyon, France) 已被正式授权在欧盟范围内成为皮肤腐蚀性检测的工具^[4], 美国也批准 EpiDerm 成为皮肤腐蚀性检测的工具, 刺激性检测的评价也进入了最后的论证阶段^[1]。我国于近年来开展了动物实验替代方法的研究^[7~9]。

皮肤刺激性检测是化学品安全性评价的一项重要内容。皮肤对化学物质的屏障部位主要在角质层, 其次是皮肤表面的氢离子浓度对酸、碱的缓冲能力。化学品接触皮肤表面后穿透皮肤的角质层到达深层组织, 对皮肤结构的破坏产生了对皮肤的刺激作用。本实验室构建的检测模型是利用组织工程学方法, 以牛胶原为支架, 人体正常皮肤作为细胞来源而构建的三维立体皮肤替代物。光镜下观察含有基底层、棘层、颗粒层和角质层。透射电镜观察结果显示, 生物活性皮肤表皮层中, 棘层细胞之间以桥粒连接, 并具有天然皮肤中的板层体、张力纤维和脂滴等结构, 具有与天然皮肤类似的各种超微结构^[10]。如化学品具有刺激性, 则能在一定的接触时间和面积范围内通过扩散穿过皮肤的角质层到达深层组织, 影响细胞的活性, 测定细胞活力便可以界定它的刺激性。本实验设计的检测用组织工程皮肤模型应用 MTT 实验定量细胞活力, 以相对细胞活力值为标准, 能判定所选 10 种化学品中 7 种的刺激性。有 3 种非刺激性的化学品羟基香茅醛、甲基棕榈酸盐、1-溴戊烷错判为刺激性物质。与 EpiDerm 和 Episkin 评价结果相比, 我们的检测模型敏感性较低, 准确性也与上述两种产品有差距, 考虑与我们测试的化学品种类较少和不同批次的检测结果差异较大有关, 其构建工艺的稳定性还有待改进。

组织工程皮肤作为检测模型具有构建工艺固定、性质稳定、应用范围广、一致性强的优点, 且组织工程皮肤中含有来源于人体、能够代谢的活细胞, 因而能够更加真实地模拟人皮肤受到各种刺激后的反应, 其检测结果应更具有说服力。与传统的检测方法相比成本低、可信度高、更符合伦理学要求。下一步拟扩大化学品的检测范围, 稳定构建工艺, 同时进行实验

室内评价、实验室间评价、实验数据库开发、实验方法评价四个阶段的研究, 以进一步验证该组织工程皮肤用于化学品刺激性检测的可靠性。

参考文献:

- [1] Kandarova H, Liebsch M, Genschow E et al. Optimisation of the EpiDerm test protocol for the upcoming ECVAM validation study on in vitro skin irritation tests [J]. ALTEX, 2004, 21 (3): 107-114.
- [2] 金岩, 吕红兵, 刘源, 等. 人全层组织工程皮肤的研制 [J]. 实用口腔医学杂志, 2002, 18 (2): 163-166.
- [3] Portes P, Granddier MH, Cohen C, et al. Refinement of the Episkin protocol for the assessment of acute skin irritation of chemicals: follow-up to the ECVAM prevalidation study [J]. Toxicol In Vitro, 2002, 16 (6): 765-770.
- [4] Liebsch M, Spielmann H. Currently available in vitro methods used in the regulatory toxicology [J]. Toxicol Lett, 2002, 127 (1-3): 127-134.
- [5] Portes P, Pygnafion MJ, Popovic E, et al. Use of human reconstituted epidermis Episkin for assessment of weak phototoxic potential of chemical compounds [J]. Photodermatol Photoimmunol Photomed, 2002, 18 (2): 96-102.
- [6] Jirova D, Kejova K, Brabec M, et al. The benefits of the 3T3 NRU test in the safety assessment of cosmetics: long-term experience from pre-marketing testing in the Czech Republic [J]. Toxicol In Vitro, 2003, 17 (5-6): 791-796.
- [7] 李继平, 贺争鸣, 李冠民, 等. 我国开展动物实验替代方法工作的前景研究 (一) ——我国动物实验替代方法研究的现状 [J]. 中国实验动物学杂志, 2002, 12 (4): 236-238.
- [8] 贺争鸣, 李冠民, 岳秉飞, 等. 我国开展动物实验替代方法工作的前景研究 (二) ——我国动物实验替代方法研究的问题 [J]. 中国实验动物学杂志, 2002, 12 (6): 362-363.
- [9] 贺争鸣, 李冠民, 岳秉飞, 等. 我国开展动物实验替代方法工作的前景研究 (三) ——我国开展动物实验替代方法研究的思路及对策 [J]. 中国比较医学杂志, 2003, 13 (1): 42-44.
- [10] 吕红兵, 金岩, 刘源, 等. 生物活性皮肤替代物的超微结构观察 [J]. 实用口腔医学杂志, 2003, 19 (5): 424-427.
- [11] tri chloroethylene exposure [J]. J Immunopathol Pharmacol, 2002, 15: 30-32.
- [12] Nakajima T, Yamanoshita O, Kanijima M, et al. Generalized skin reactions in relation to tri chloroethylene exposure: a review from the viewpoint of drug-metabolizing enzymes [J]. J Occup Health, 2003, 45(1): 8-14.
- [13] 邹志方, 李伯灵, 杨翠婷, 等. 低剂量三氯乙烯对作业工人脂质过氧化作用的影响 [J]. 华南预防医学, 2002, 28(3): 23-24.
- [14] Zhu Qi-Xing, Shen Tong, Ding Rui, et al. Cytotoxicity of trichloroethylene on normal human epidermal keratinocytes and protective role of vitamin E [J]. Toxicology, 2005, 209: 55-67.
- [15] Shvedova AA, Kinsin E, Murray A, et al. Enhanced oxidative stress in the skin of vitamin E deficient mice exposed to semisynthetic metal working fluids [J]. J Toxicology, 2002, 176: 135-143.
- [16] Kligman AM, Kligman LH. A hairless mouse model for assessing the chronic toxicity of topically applied chemicals [J]. Food and Chemical Toxicology, 1998, 36: 867-878.