

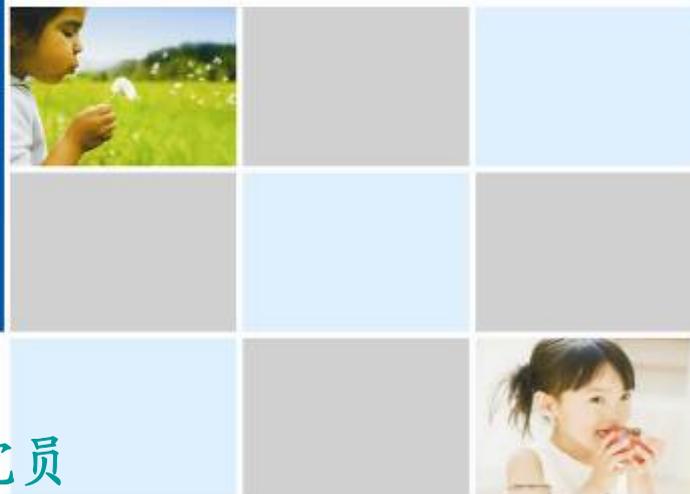
彩妆品的安全评价与功效保证

---整合仁慈的研究策略

For a safer world

**Color Cosmetics Safety Assessment
and Efficacy Assurance**

--- integrated and humane testing strategy



程树军 博士 研究员

Dr. Prof. Cheng Shujun

广东检验检疫技术中心

Guangdong CIQ Technology Center



广东检验检疫技术中心

Guangdong Inspection and Quarantine Technology Center

2012.6 上海

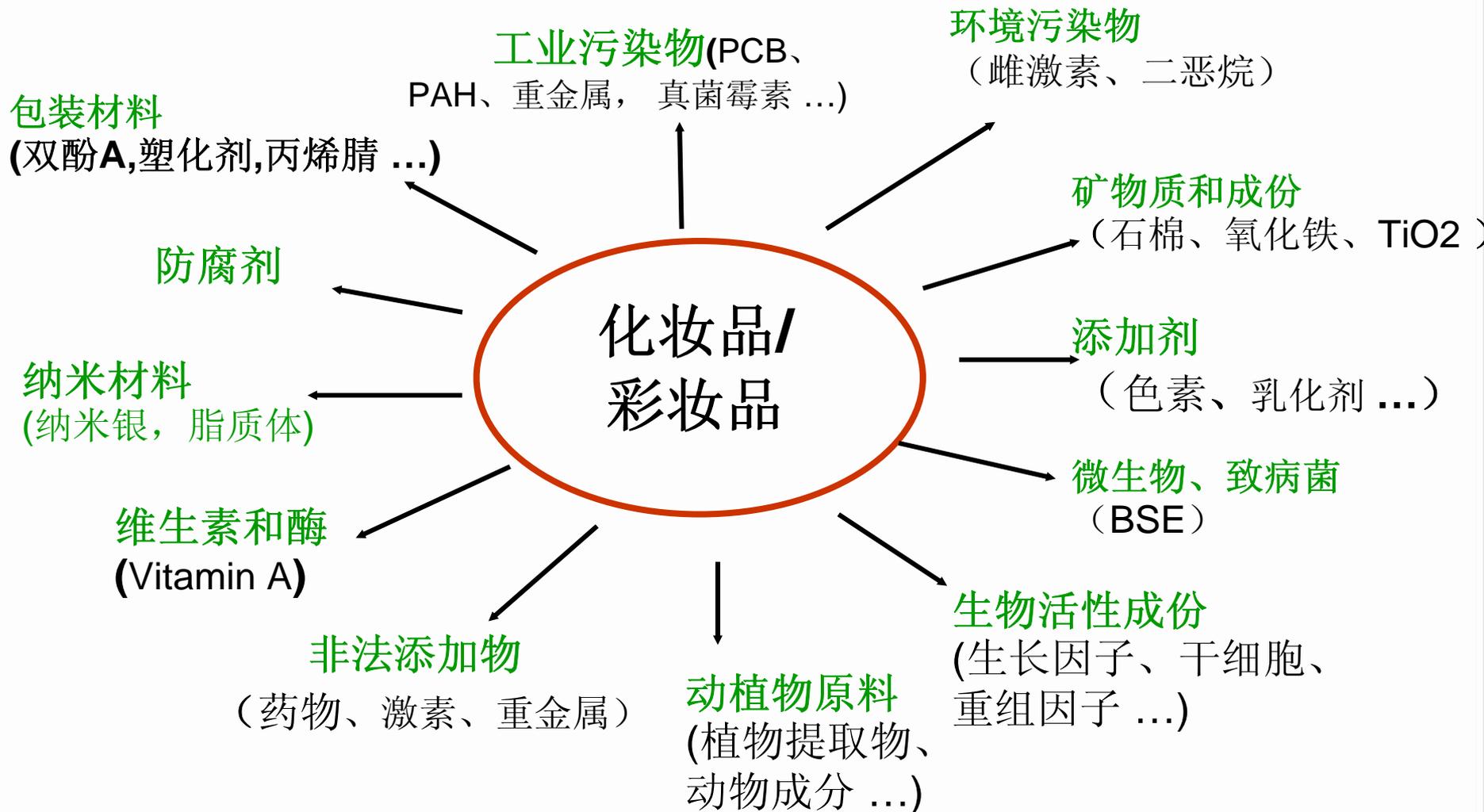
www.iqtc.cn

Outline 内容

- 一、彩妆品的安全风险分析
- 二、安全评价的动物替代试验
- 三、彩妆品的功效宣称
- 四、小结

一、彩妆的安全风险分析

1.1 彩妆危害物来源



1.1 彩妆危害物来源

粉底

石棉（滑石粉）：2009年婴儿爽身粉和粉底、腮红检出含石棉的滑石粉；

重金属：铅、汞、砷等，如中药材黄丹（痱子粉），颜料。

防腐剂：皮肤过敏

抗氧化剂：皮肤过敏

防晒剂：羟苯甲酮和对甲氧基肉桂酸辛酯内分泌干扰作用。

眼部产品

特点：眼部皮肤更薄、更敏感；
靠近眼睛安全性要求更高；

过敏：色素、珠光粒子、树脂等，

感染：

1.1 彩妆危害物来源

唇用

蜡质、着色剂、矿物质、润肤和防晒成分；

随食物或唾液进入体内。

唇部致敏，如口唇干裂、烧灼、肿胀、瘙痒、表皮剥脱、轻微疼痛等。

二次污染。

重金属超标

不当使用习惯，增加安全风险。

甲用

危害来源：成膜剂（硝化纤维素）、粘和剂（甲苯磺胺甲基树脂）、增塑剂、溶剂（甲苯）、着色剂和防尘剂等。

塑化剂危害：

2.2 彩妆危害物评估举例

酞酸酯暴露评估

- 被评估成份在终产品中的含量 (%)
- 产品每日使用量 (g)
- 产品使用频率
- 使用 (涂抹) 皮肤厚度 (如护肤品、清洁用品) (cm)
- 使用时的产品浓度 (洗手液) (%)
- 消费者体重
- % 皮肤残留量 (滞留/洗掉)
- % 皮肤渗透量 (如果可知)
- 消费者体表面积
- 面部/头皮/头部表面积 (cm²)
- 手或前臂表面积 (cm²)

暴露计算

以含有效成份的个人清洁用品直接皮肤暴露为例

$$\frac{Cp (\mu\text{g/g}) \times AP (\text{g}) \times F (\text{/day}) \times \% (\text{RS}/100) \times \% (\text{Ab}/100)}{\text{目标皮肤表面积 (cm}^2\text{)}}$$

= 皮肤暴露 ($\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{day}$)

Cp = 产品中有效物浓度

RS = 皮肤表面残留

AP = 产品使用量

F = 使用频率

Ab = 经过皮肤吸收的有效成份的量

酞酸酯暴露评估

1. 理化性质和用途

指甲油、香水、头发喷雾剂、香皂和洗发液等产品。

2. 基本毒性信息

途径：食物与饮水，酞酸酯经口主要以水解产生的单酯形式被吸收，单酯被认为是产生毒性的主要化合物。酞酸酯被吸收后，主要以蛋白结合体形式通过血液分布于全身各器官。体内蓄积最多的是肝脏与肾脏，其次为血液、脾和脂肪组织。酞酸酯在肠、肝脏、肾脏、肺、胰腺以及血浆中均可水解为单酯，这种水解作用在肠内较易发生，所以肠道中接触这类物质比起静脉注射危险更大。

3. 危害识别

急性毒性：无皮肤刺激性、无眼刺激性和皮肤致敏性，Ames试验呈阴性，急性经口毒性较低。

长期毒性：存活率下降、肝功能下降，肾功能下降，引起明显的雄性生殖毒性，具有干扰生殖内分泌激素水平的作用，胚胎毒性和致畸效应较为明显。

流行病学：与哮喘病发生率的升高同时发生。

4. 暴露评估

香料香精中塑化剂含量 (ppm) × 使用剂量 (%) = 香料香精所含塑化剂在终产品中的残留量。

5种塑化剂TDI (即每天人体每公斤体重的塑化剂耐受量)，DEHP为0.05 mg，DBP为0.01 mg，DINP及DIDP为0.15 mg，BBP为0.5 mg，以体重60公斤成人为例，上述塑化剂每天不得摄入的量分别为3 mg、0.6mg、0.9mg、0.9mg和30mg以上。

2.2 彩妆危害物评估举例

黑色海娜的不良反应

海娜（**Henna**）来自 灌木散沫花或指甲花（*Lawsonia inermis*），有褐色、橙褐色和红色

美国**FDA**批准用于染发色素（21 CFR 73.2190）

但不能用于皮肤着色

警示：含有海娜的皮肤着色剂产品



黑色海娜

- 添加着色剂/色素成分
 - 更黑、更强烈和更持久
- 添加对苯二胺 (**PPD**)染发剂
 - 未被允许直接用于皮肤
- PPD接触过敏
 - 皮肤致敏源
 - 过敏性接触性皮炎
 - 与氨基苯酸 (**PABA**) 苯坐卡因 (benzocaine)
、靛青交叉反应

禁用成份

- 硫氯酚 Bithionol, 卤化水杨酰苯胺 Halogenated salicylanilides
 - 光接触过敏物
- 氯仿 Chloroform, 亚甲基氯 Methylene chloride, 乙基氯 Vinyl chloride
 - 致癌性
- 含锆复合物 Zirconium-containing complexes
 - 肺毒性
- 禁用牛材料
 - Bovine spongiform encephalopathy (BSE)
- 氟氯化碳喷射剂 Chlorofluorocarbon propellants
 - 破坏臭氧层(EPA禁用)

限用成份

六氯酚 **Hexachlorophene**

Toxic,
penetrates skin.

Use only when an alternative preservative is not as effective.

NTE 0.1 percent;

not on mucous membranes (e.g., lips)

汞化合物 **Mercury compounds**

Absorbed through the skin;
allergic reactions,
skin irritation,
neurotoxic.

Eye area only,

NTE 65 parts per million,

only if no other effective and safe preservative is available.

限用成份

果酸 (AHAs):

- ❖ 是一种由alpha-氨基酸所共同组成的一种羧酸的总称
- ❖ 以乳酸(lactic acid)和甘醇酸(glycolic acid)是目前果酸的主要成份
- ❖ 在低浓度<10%时可以当成一种保湿剂, 可以增加角质细胞的含水量, 提高角质的延展性, 因而有除皱抗老的功效, 用来组成各种保养品
- ❖ 在高浓度>15%, 则会造成角质细胞的坏死, , 加速表皮细胞的剥落, 加速细胞的再生与代谢, 并能增加皮肤真皮层的纤维组织与基底物质之更新
- ❖ 用於果酸换肤
- ❖ 增加晒伤的易感性;
- ❖ 标识警示

永久化妆（微色素沉着术）

微色素沉着手术（pigmentation procedures）是将永久化妆（permanent makeup）用于唇线、眼线或眉着色的一种文身方法。

主要用于眼线、眉毛、唇线、唇部和腮红

FDA认为微色素沉着手术（pigmentation procedures）也属于化妆品。

危害来源：

皮内注射的安全性不明；

可出现不良反应；

可能具有光敏性；

难以去除；

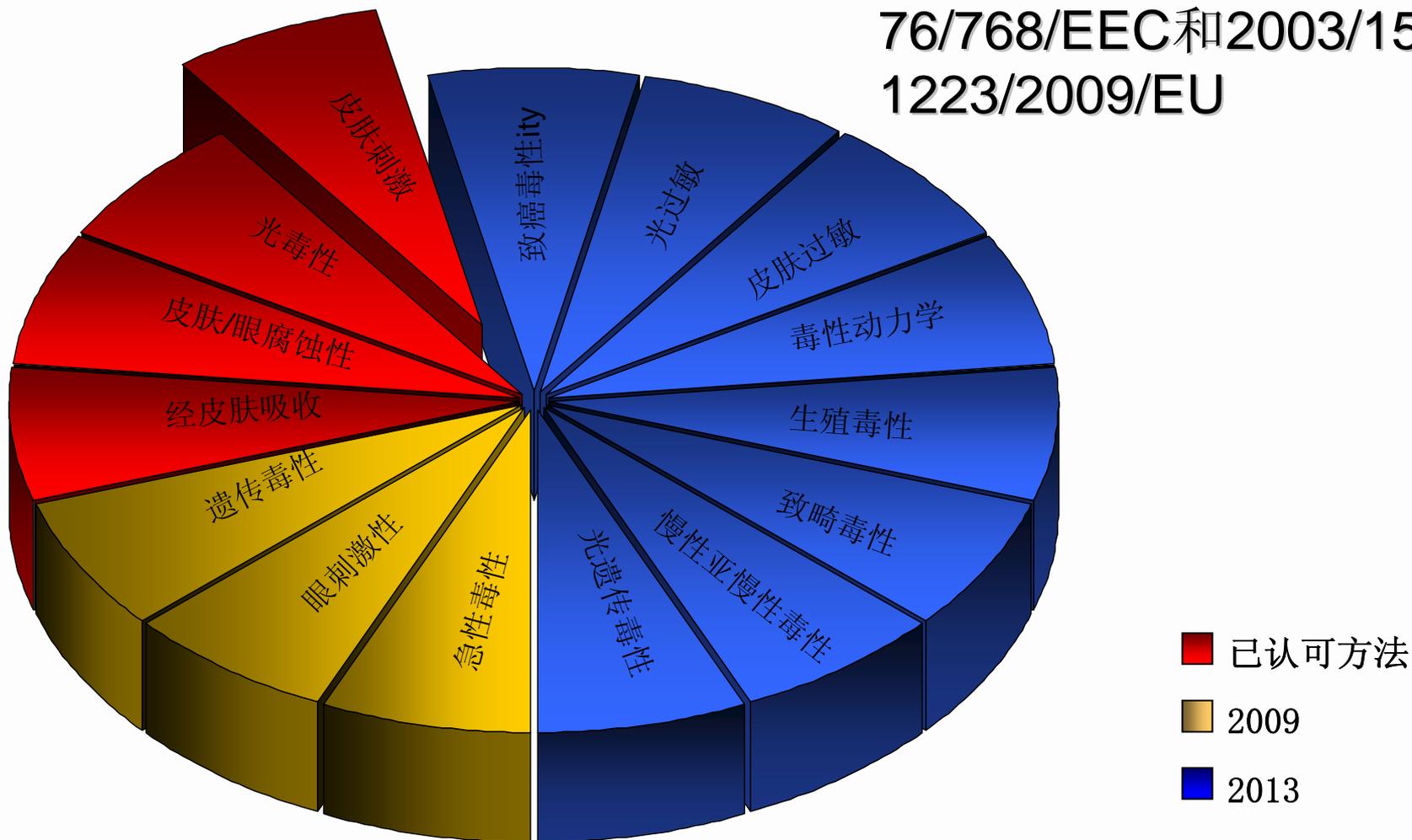
皮肤其它疾病：感染



二、安全评价的动物替代试验

2.1 多重压力驱动下的化妆品仁慈测试技术

76/768/EEC和2003/15/EC
1223/2009/EU



2.1 多重压力驱动下的化妆品仁慈测试技术

----毒理学的现代化

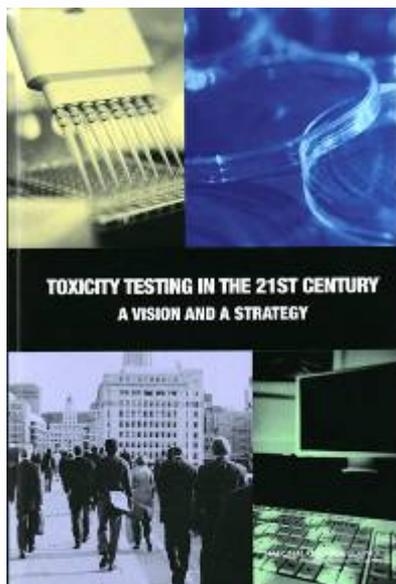
美国科学院报告 (NAS Report)
 21世纪毒性试验: 观念和策略
*Toxicity Testing in the 21st Century: A
 Vision and Strategy*

2012 Global Summit on Regulatory Science (GSRS-2012)

- *Modernizing Toxicology*

May 9 - 11, 2012

Hangzhou, China



- 传统毒理学方法从1930建立
- 低通量，高成本
- 很少使用现代生物学技术
- 很少关注毒物作用模式
- 外推不确定性
- 与人群实际风险的相关性受
- 大量使用动物

使用人源细胞培养物
 系统生物学和通路的机制研究



2.1 多重压力驱动下的化妆品仁慈测试技术

EU REACH 法规

Article 13.1: Information on intrinsic properties of substances may be generated by means other than tests, in particular through the use of **qualitative or quantitative structure-activity relationship models** or from information from structurally related substances (grouping or read-across)...

Article 13
General requirements for generation of information on intrinsic properties of substances

Article 25.1:.. **Testing on vertebrate animals** for the purpose of REACH shall be undertaken only as a **last resort**. It is also necessary to take measures limiting duplication of other tests.

TITLE III
DATA SHARING AND
AVOIDANCE OF UNNECESSARY TESTING

Chapter 1
Objectives and general rules

Article 25
Objectives and general rules

2.1 多重压力驱动下的化妆品仁慈测试技术

2007年美国EPA启动ToxCast项目

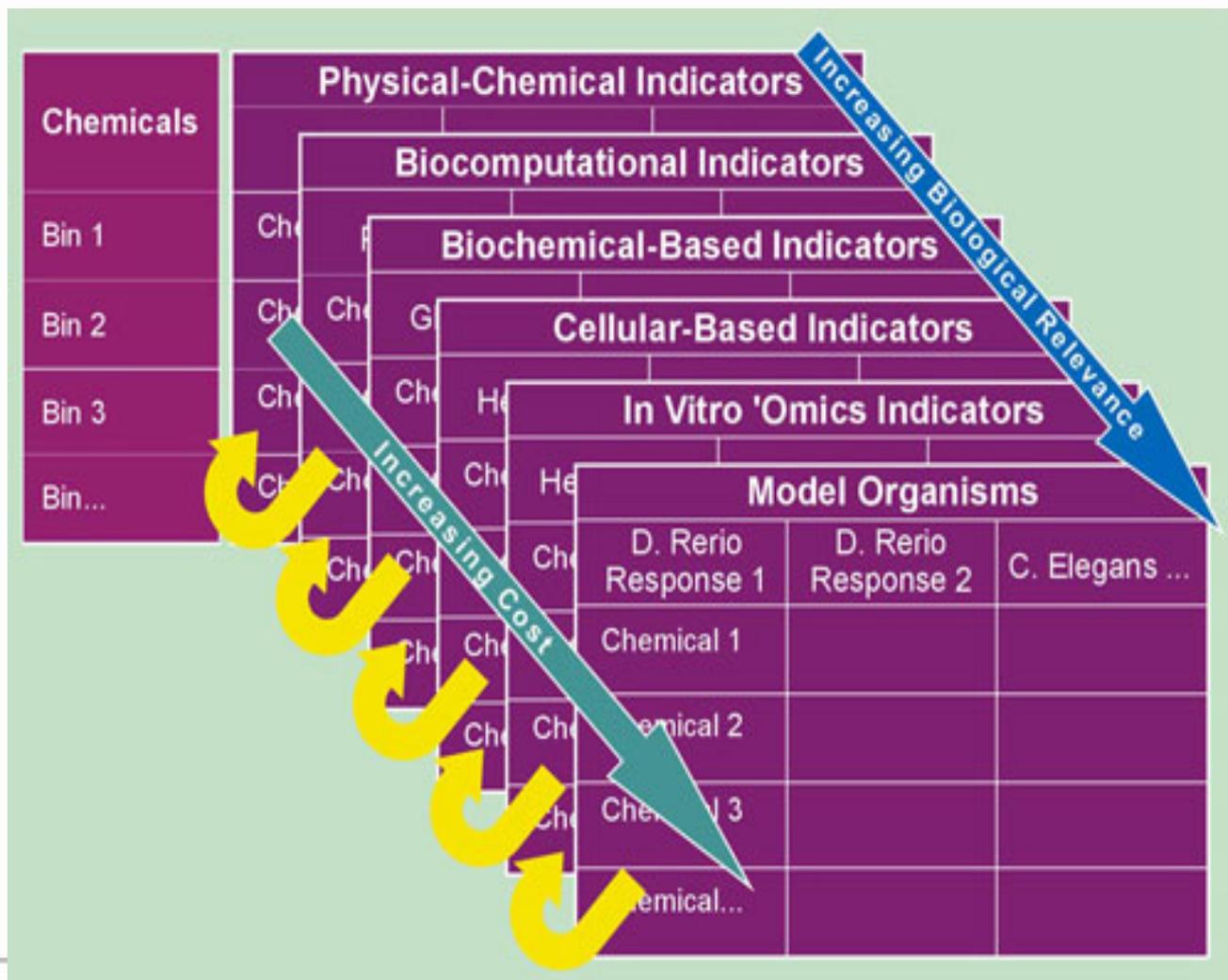
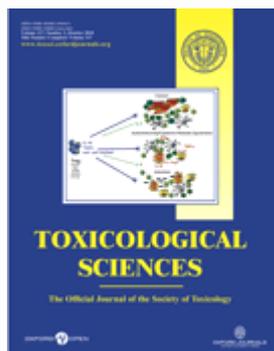
ToxCast: 指导环境化学物毒性试验的优先顺序研究

计算化学

(Computational Chemistry)

高通量筛查 (High Throughput Screening)

毒性基因组学技术 (Toxicogenomic Technologies)



二、安全评价的动物替代试验

2.2 安全检测技术标准与规范 Standards and Guideline

国家标准（等同采用 OECD 指南）

- 化学品体外3T3中性红摄取光毒性试验方法GB/T 21769-2008
Chemical—In vitro 3T3 NRU phototoxicity test method
- 化学品 急性经口毒性试验 急性毒性分类法Chemicals acute oral toxicity-toxic class method GB/T 21757-2008
- 化学品急性毒性试验-固定剂量法acute Oral Toxicity-Fixed Dosed Method for chemicals
- 化学品急性毒性试验-上下增减剂量法Acute Oral Toxicity – Up and Down Procedure
- • • • •



二、安全评价的动物替代试验

2.2 安全检测技术标准与规范 Standards and Guideline

Industry Standard of AQSIQ 行业标准 From 2006

Good Laboratory Practice for Cosmetics Alternative Testing *In vitro* (SN/T 2285-2009) 化妆品体外替代试验实验室规范

Cosmetics Acute Toxicity of Keratinocyte Cytotoxicity Test (SN/T 2328-2009) 化妆品急性毒性的角质细胞试验

Cosmetics Ocular Irritant and Corrosive HET-CAM Test (SN/T 2329-2009) 化妆品眼刺激性/腐蚀性的鸡胚绒毛尿囊膜试验

Cosmetics Embryotoxicity and Developmental Toxicity of Mice Embryonic Stem Cell Test (SN/T 2330—2009) 化妆品生殖和发育毒性的小鼠胚胎干细胞试验

NRU test for eye irritation 化妆品眼刺激试验的中性红吸收法

LLNA 化妆品皮肤过敏和光过敏的局部淋巴结试验

二、安全评价的动物替代试验

2.2 安全检测技术标准与规范 Standards and Guideline

- **Cosmetics guideline for risk assessment strategy and decision-tree** 化妆品风险分析策略和决策树判定规程 (No.2010B072)
- **cosmetics phototoxicity test for combined RBC methods** 化妆品光毒性的联合红细胞试验法 (No. 2010B074)
- **cosmetics testing in vitro for good cell culture practices and sample preparation principles** 化妆品体外替代实验室的良好细胞培养规范和样品制备方法 (No. 2010B075)
- **cosmetics guideline for alternative methods validation and acceptance** 化妆品体外替代试验的验证规程 (No. 2010B076)
- **cosmetics skin irritation test for isolated skin** 化妆品皮肤刺激性的离体皮肤试验 (No. 2010B079)
- **cosmetics developmental toxicity test for whole embryo culture** 化妆品体外发育毒性试验 大鼠全胚胎试验法 (No. 2010B269k)

... ..

二、安全评价的动物替代试验

2.2 安全检测技术标准与规范 Standards and Guideline

安全评价标准比较

序号 No.	OECD	名称 testing methods	发布日期	替代类型
1	433	延长一代生殖毒性研究Extended One-Generation Reproductive Toxicity Study	2011.7.28	优化
2	456	甾体形成试验H295R Steroidogenesis Assay	2011.7.28	体外
3	488:	转基因动物体细胞和生殖细胞基因突变试验Transgenic Rodent Somatic and Germ Cell Gene Mutation Assays	2011.7.28	优化
4	429	皮肤致敏局部淋巴结试验Skin Sensitisation-LLNA	2010.7.23	优化
5	439	体外皮肤刺激的人工皮肤模型试验In Vitro Skin Irritation	2010.7.23	体外
6	442A	皮肤致敏局部淋巴结试验-LLNA-DA法Skin Sensitization LLNA-DA	2010.7.23	优化
7	442B	皮肤致敏局部淋巴结试验-LLNA-ELISA法Skin Sensitization LLNA-ELISA	2010.7.23	优化
8	436	急性吸入毒性-ATC法Acute Inhalation Toxicity – Acute Toxic Class Method	2009.9.8	优化
9	437	眼腐蚀和严重刺激的牛角膜混浊和通透试验Bovine Corneal Opacity and Permeability Test Method for Identifying Ocular Corrosives and Severe Irritants	2009.9.8	体外
10	438	眼腐蚀和严重刺激的离体鸡眼试验Isolated Chicken Eye Test Method for Identifying Ocular Corrosives and Severe Irritants	2009.9.8	体外

二、安全评价的动物替代试验

2.2 安全检测技术标准与规范 Standards and Guideline

安全评价标准比较

11	455	雌激素受体转录活化测试 The Stably Transfected Human Estrogen Receptor-alpha Transcriptional Activation Assay for Detection of Estrogenic Agonist-Activity of Chemicals	2009.9.8	体外
12	425	急性经口毒性—上下程序法 Acute Oral Toxicity: Up-and-Down Procedure	2008.10.16	减少
13	435	皮肤腐蚀性的体外膜屏障试验 In Vitro Membrane Barrier Test Method for Skin Corrosion	2006.8.17	体外
14	430:	体外皮肤的经皮肤电阻试验 In Vitro Skin Corrosion: Transcutaneous Electrical Resistance Test (TER)	2004.11.23	体外
15	431	体外皮肤腐蚀的人工皮肤模型试验 In Vitro Skin Corrosion: Human Skin Model Test	2004.11.23	体外
16	432	体外3T3光毒性试验 In Vitro 3T3 NRU Phototoxicity Test	2004.11.23	体外
17	420	急性毒性试验—固定剂量程序 Acute Oral Toxicity - Fixed Dose Procedure	2002.2.8	减少
18	423	急性经口毒性---ATC法 Acute Oral toxicity - Acute Toxic Class Method	2002.2.8	减少

不包括遗传毒性和动物方法的3R修订

安全评价标准比较

重视建立生态与环境毒性方法

ecology and environmental endpoint

传统动物试验的减少和优化

traditional animal testing—refine, reduce

229 鱼类短期生殖试验 Fish Short Term Reproduction Assay

230 21天鱼类试验：雌激素、雄激素活性和芳香化酶抑制短期筛选试验

231 两栖动物变形试验

232 土壤跳虫繁殖试验 Collembolan Reproduction Test in Soil

126 鱼类急性毒性试验的阈值方法指南

403 Acute Inhalation Toxicity

412 Subacute Inhalation Toxicity: 28-Day Study

413 Subchronic Inhalation Toxicity: 90-Day Study

451 Carcinogenicity Studies

452 Chronic Toxicity Studies

453 Combined Chronic Toxicity/Carcinogenicity Studies

毒理学终点 toxicity endpoint

- 急性经口毒性
- 皮肤刺激性和腐蚀性
- 眼腐蚀和刺激
- 皮肤敏感性
- 皮肤/经皮吸收
- 致突变性/遗传毒性
- 光毒性
- 生殖发育毒性
- 致癌试验
- 急性吸入毒性

生态与环境毒性方法

ectology and environmental endpoint

我们愿意接受新发布的动物方法或修订的动物方法，
但不愿意接受替代方法，??

2.3.1 安全和功效测试策略 testing strategy for cosmetics safety and efficacy

安全毒性实验
safety/toxicity test

Eye irritation 眼刺激: HET-CAM+BCOP+RBC
 Skin irritation 皮肤刺激: TER+皮肤模型
 phototoxicity 光毒性: 3T3 NRU
 Skin Sensitization 皮肤过敏: LLNA-BRDU
 Percutaneous absorption 皮肤吸收: in vitro 扩散池
 Genotoxicity testing 遗传试验:
 Oral toxicity 经口毒性: cytotoxicity screen 细胞筛选试验
 embryotoxicity 胚胎和发育毒性: EST
 Endocrine disrupt 内分泌干扰作用: ?

功能功效实验
Efficacy test

whitening 美白作用
 nutrition 营养细胞作用
 Anti-oxidant 抗氧化作用
 Anti-ageing 抗衰老作用
 Anti-inflammation 抗炎作用
 vascularization 促进血管生成
 Hair growing 生发育发
 Basic cytomics 基本细胞作用



应用的系统与工具

In vitro system and AAT tools

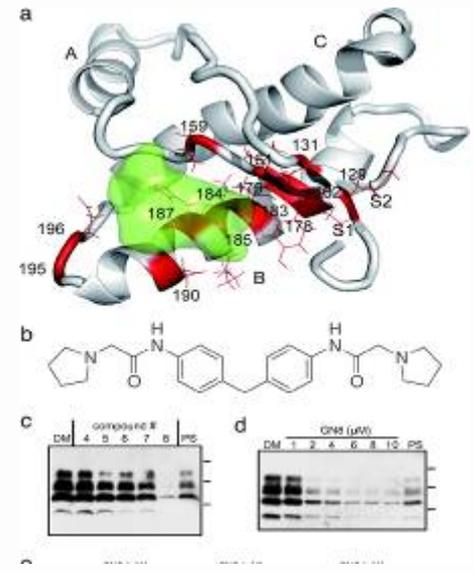
体外试验系统 *in vitro* test system

数学模式 *In silico*
computer simulations, mathematical models, QSAR

细胞模式 **Cell culture**
肝细胞 **hepatocyte**、成纤维细胞 **fibroblast**、KC、MC、LC、ES

器官模式 **Isolated organs**
鸡胚、兔眼、猪耳、牛眼、胚胎等

人工器官模式 **Reconstructed organs** 人工皮肤 **skin equivalent**、人工角膜 **corneal**

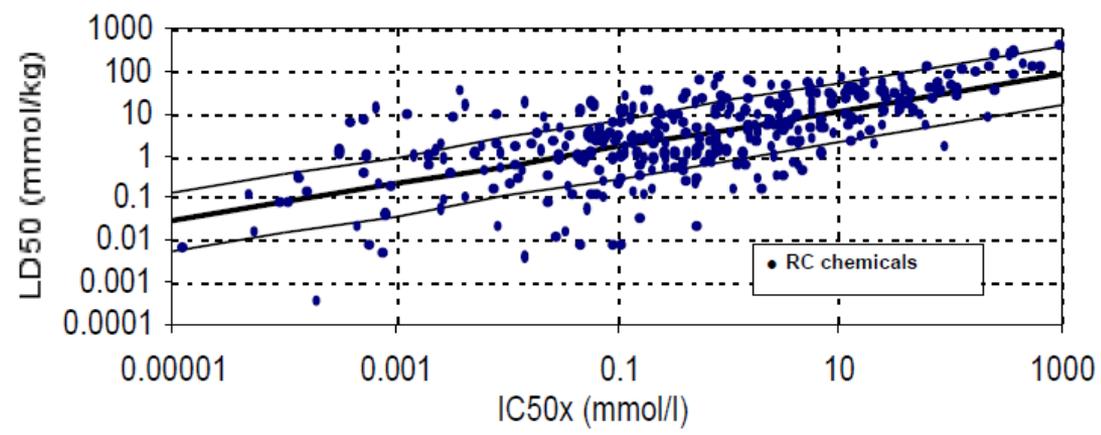


2.3.2 急性毒性/细胞毒性预测 acute toxicity/cytotoxicity testing



Cosmetics Acute Toxicity of Keratinocyte Cytotoxicity Test 化妆品急性毒性的角质细胞试验 SN/T 2328—2009

- Chemicals acute oral toxicity-toxic class method 化学品急性经口毒性试验 急性毒性分类法 GB/T 21757-2008
- acute Oral Toxicity-Fixed Dosed Method for chemicals 化学品急性毒性试验-固定剂量法
- Acute Oral Toxicity – Up and Down Procedure 化学品急性毒性试验-上下增减剂量法



2.3.2 急性毒性/细胞毒性预测 acute toxicity/cytotoxicity testing

多细胞毒性预测/cytotoxicity testing



角质细胞

成纤维细胞

人黑色素细胞

功效评价

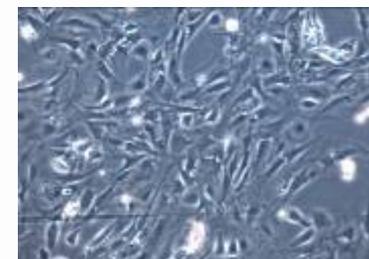
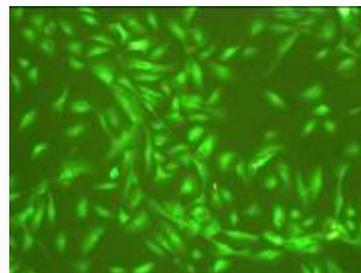
SIRC 兔角膜上皮细胞

肝细胞 肾细胞 神经细胞等

- A. 急性经口毒性预测;
- B. 功效研究: 抗体氧化、美白
- C. 皮肤重建
- D. 3T3 NRU PT 成纤维细胞光毒性
- E. 细胞毒性ISO 10993.5
- F. 眼刺激性
- G. 靶器官毒性预测

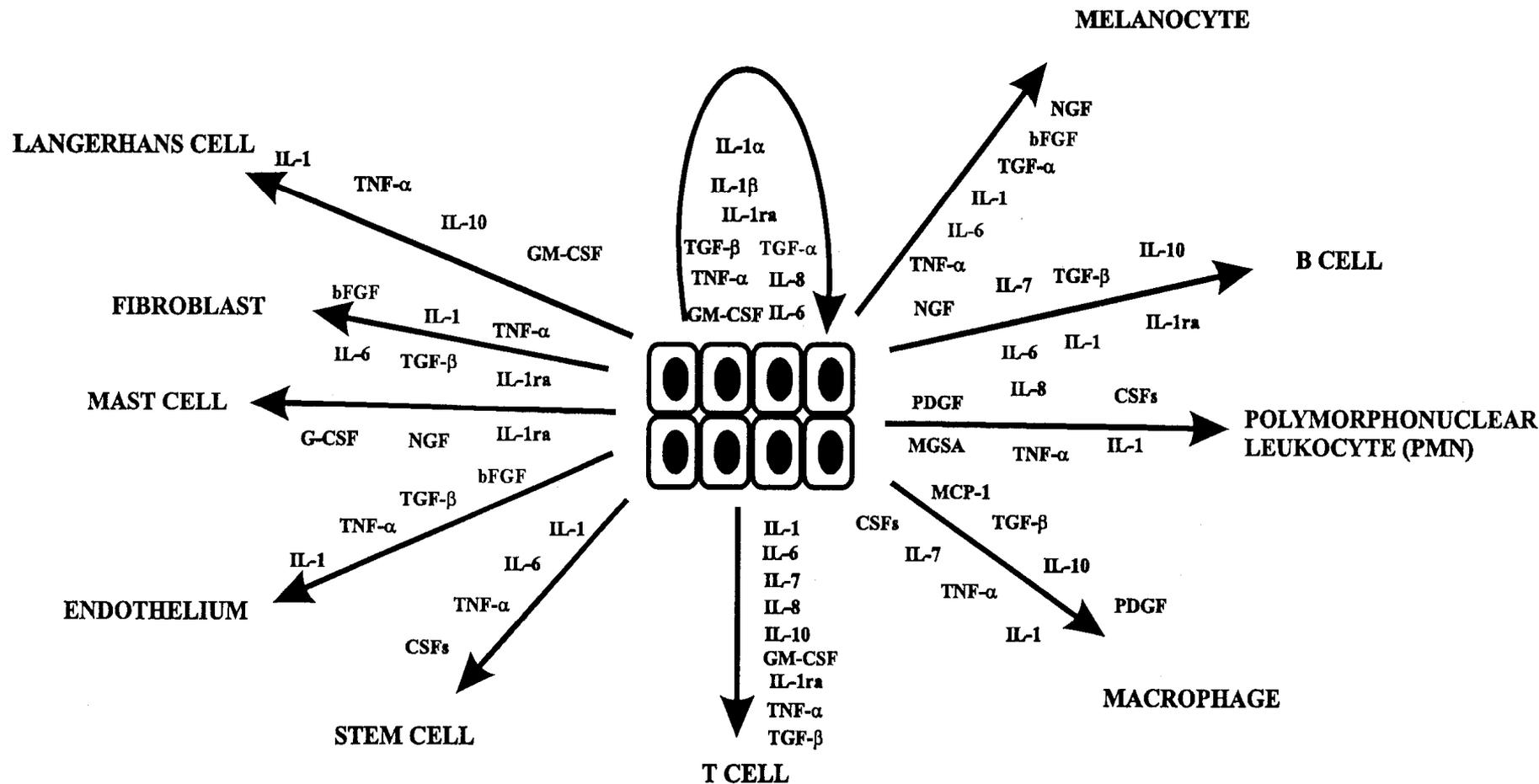
优点:

了解预测毒性大小
发现可能的作用靶器官
可直接使用人的细胞
高通量
低成本



2.3.2 急性毒性/细胞毒性预测 acute toxicity/cytotoxicity testing

角质细胞的细胞因子网络



2.3.2 急性毒性/细胞毒性预测 acute toxicity/cytotoxicity testing

细胞毒性的检测方法

细胞增殖：蛋白质含量或DNA含量、活细胞计数、结晶紫试验、中性红试验。

细胞膜完整性或通透性：染料（中性红）摄取、染料（台盼蓝）排除、细胞内酶（LDH）释放、⁵¹Cr预负荷、核苷释放、尿苷摄取等。

亚细胞器损伤：MTT试验和WST-1试验（线粒体）

细胞代谢活性：

① 细胞能量代谢：ATP含量、乳酸/丙酮酸比值。

② 氧化还原状态：还原型谷胱甘肽（GSH）含量、脂质过氧化产物生成量。

形态学改变：脂质小滴、细胞膜膨出（鼓泡）、细胞核染色质变化及细胞器（如线粒体、溶酶体等）的变化、细胞脱壁和贴壁等。

细胞毒性组合：反映不同损害靶点，如WST-1试验和中性红试验结合，可对同一细胞样本先后进行检测，以分别检测细胞的线粒体损伤和溶酶体损伤。

酶测定：ATP，酪氨酸酶

受体结合检测：雌激素受、雄激素受体

组织培养检测：组织粘附能力，细胞外基质水平

G耦合受体和离子：信号通路

多种报告基因：

2.3.2 急性毒性/细胞毒性预测 acute toxicity/cytotoxicity testing

细胞毒性的用途

预测全身毒性：

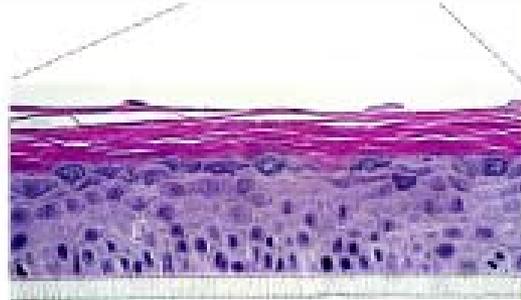
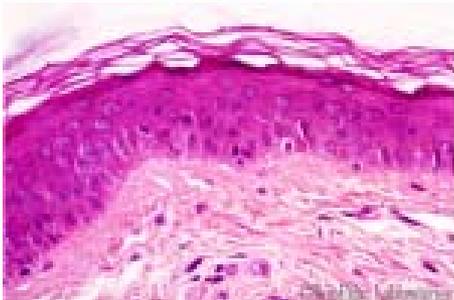
3T3细胞

毒性作用的早期标志：① 毒物暴露后产生的亲电子反应：如谷胱甘肽（GSH）的丢失、活性氧簇（ROS）的数量和敏感性增加、细胞内钙水平升高、脂质过氧化、ATP减少和线粒体/内质网膜受体减少等；② 细胞对应激的反应：如热休克蛋白（Hsp）合成增加、应激活化蛋白激酶（SAPKs）和葡萄糖调节蛋白（Grps）的诱导等；③ 关键酶水平变化，如解毒 I 相和 II 相代谢酶；④ 金属蛋白诱导：如金属硫蛋白（MTs）；⑤ 细胞膜的紊乱、缝隙连接和细胞间通讯的抑制等（包括连接蛋白Cx43、Cx32和Cx26）；⑥ 细胞增殖的诱导：如TNF- α 、TNF- β 、纤溶酶原激活剂抑制因子-2（PAI-2）；肿瘤增殖标志物Ki-67抗原和增殖细胞核抗原（PCNA）等。⑦ 与关键细胞大分子结合，DNA损伤和修复机制等。

适应性、保护性和功能性研究：

2.3.3 Alternatives for skin irritation/corrosion tests

人重组皮肤模型 from EpiSkin™、J-TEC、中国?



CIQ



Topical application

Incubation
→



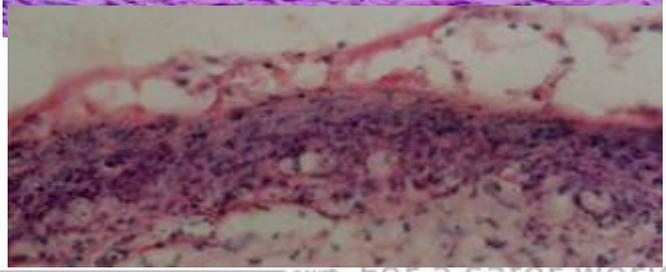
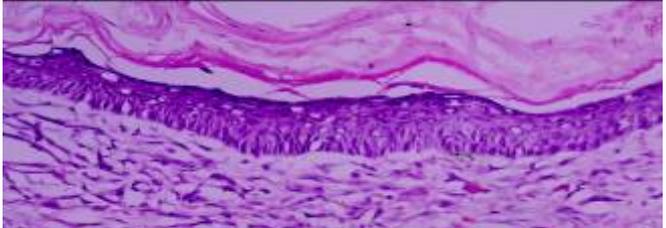
Washing



MTT Assay



Inspectskin Altskin



皮肤刺激的体外皮肤模型试验

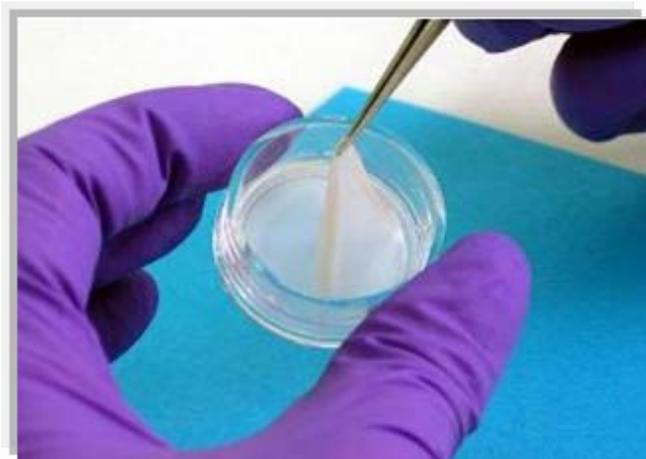


平均组织活性 $\leq 50\%$ \longrightarrow 刺激性 (I) R38

平均组织活性 $> 50\%$ 且 IL-1 α is > 50 pg/mL

平均组织活性 $> 50\%$ \longrightarrow 无刺激性 (NI)

平均组织活性 $> 50\%$ 且 IL-1 α is < 50 pg/mL



	<i>EpiSkin</i>	Limits*
敏感性	85.0%	$> 60\%$
特异性	78.6%	$> 60\%$
精确性	81.3%	$> 60\%$
阳性预测率	73.9%	nd
阴性预测率	88.0%	nd
假阳性	26.1%	$< 40\%$
假阴性	12.0%	$< 40\%$

2.3.4 眼刺激的分层/成套试验策略 tiered/battery Integrated strategy

细胞毒性实验

Cytotoxicity test

原理：用细胞膜的完整性反映角膜损伤。
MDCK, SIRC, 3T3

红细胞溶血实验

RBC Haemolysis

原理：用红细胞膜的完整性和血红蛋白变性反映眼角膜损伤。

鸡胚绒毛膜尿膜实验

HET-CAM/CAM-TB/CAMVA

原理：鸡胚毛细血管变化反映眼角膜和虹膜的损伤。

离体/重建角膜实验

BCOP/ICE/IRE/Epicultural

原理：用离体眼球或角膜或构建角膜模拟体外眼角膜的损伤。

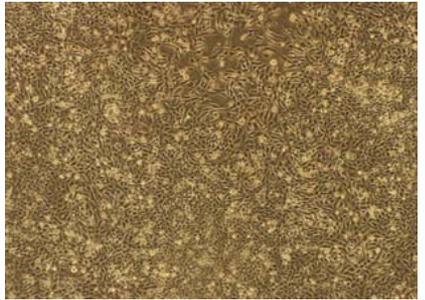
替代实验方法组合
battery and tiered AAT



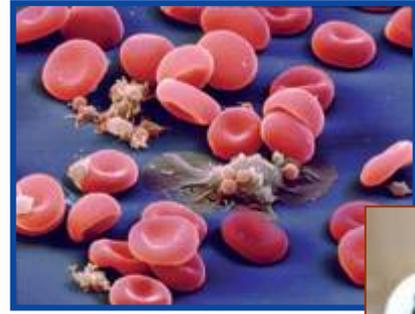
2.3.4 眼刺激的分层/成套试验策略 Tiered/battery testing strategy



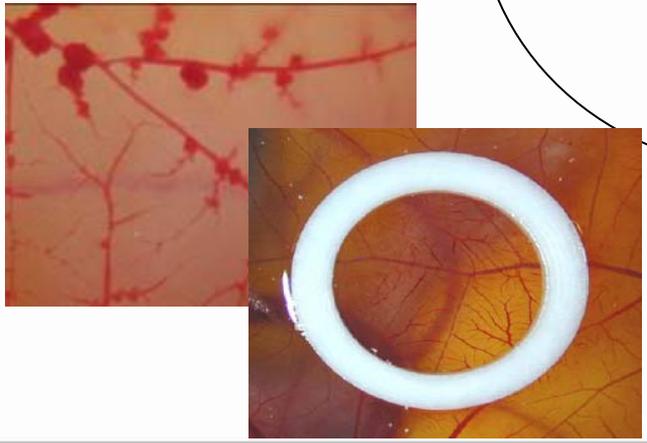
Short Time Exposure test (STE)



mini-pig RBC haemolysis and protein denaturation test



分层/成组的
整合策略
tiered/battery
Integrated
strategy



SIRC细胞短时暴露实验

The Short Time Exposure test (STE)

- SIRC短时暴露的评分条件：
 - 浓度时5%
 - 细胞活性 (Viability) $>70\%$, 评分 (Score) =0;
 - 细胞活性 (Viability) $\leq 70\%$, 评分 (Score) =1;
 - 浓度0.05%
 - 细胞活性 (Viability) $>70\%$, 评分 (Score) =1,
 - 细胞活性 (Viability) $\leq 70\%$, 评分 (Score) =2;
- 结果等级划分：
 - 1=弱刺激性 (Minimal irritant)
 - 2=温和刺激 (Moderate irritant)
 - 3=严重刺激性 (Severe irritant)

Integrated/tiered testing—different sensitivity continuity 整合/分层实验策略----不同敏感方法的连续性

理化特性	预期用途/目的	不同敏感程度的组合
水溶液体	婴儿/眼部用/机制	RBC+FL(MDCK)/L929 NRU RBC+HET-CAM+SIRC
水溶液体	普通/肤用	RBC+BCOP+HET-CAM
非水溶液体		BCOP+CAMVA
固体/器械	浸提液extraction	L929 NRU+RBC
	原样品	L929 琼脂法+HET-CAM

注: 代谢? +人工角膜模型

可逆性? +离体角膜模型+细胞传感器 (cytosensor microphysiometer)

水溶性液体: 原料、部分化妆品、农药、消毒产品、化学品\药品

非水溶性液体: 化妆品、农药、消毒产品、农药、化学品

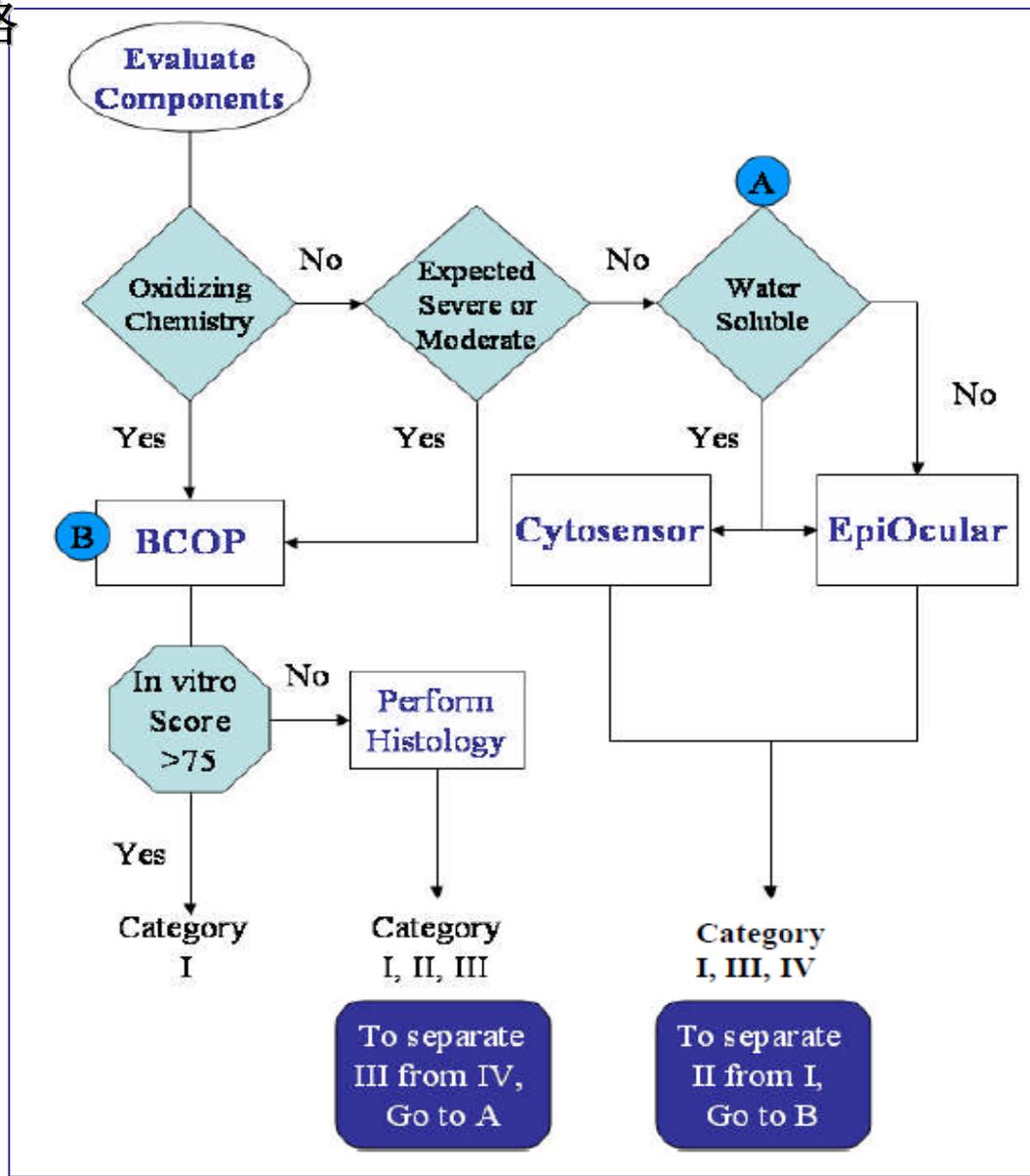
医疗器械遵循ISO10993.5-2009,ISO10993.10-2010,IAO10993.12

化妆品动物试验替代方法研讨会 广州 2012.6.3~6



2.3.4 眼刺激的分层/成套试验策略

替代方法的分层组合结构
AAT tiered/battery structure



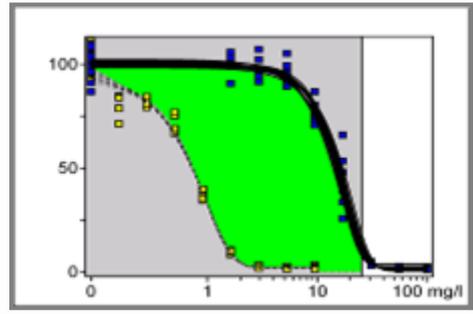
EPA toxicity category for Antimicrobial cleaning products

2.3.5 光毒性替代试验 phototoxicity tests

皮肤光毒性体外试验

3T3 NRU PT B.42, OECD 432, GB/T 21769-2008

- 体外实验室的质量控制
- 细胞来源鉴定
- 紫外光源鉴定
- 适用范围
- 液体溶解性物质



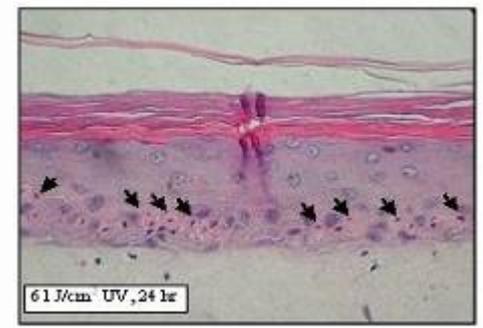
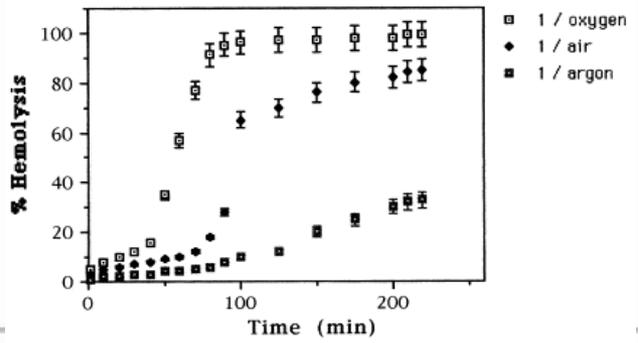
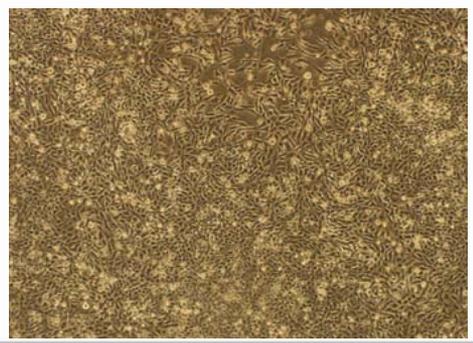
3T3 NRU PT

+

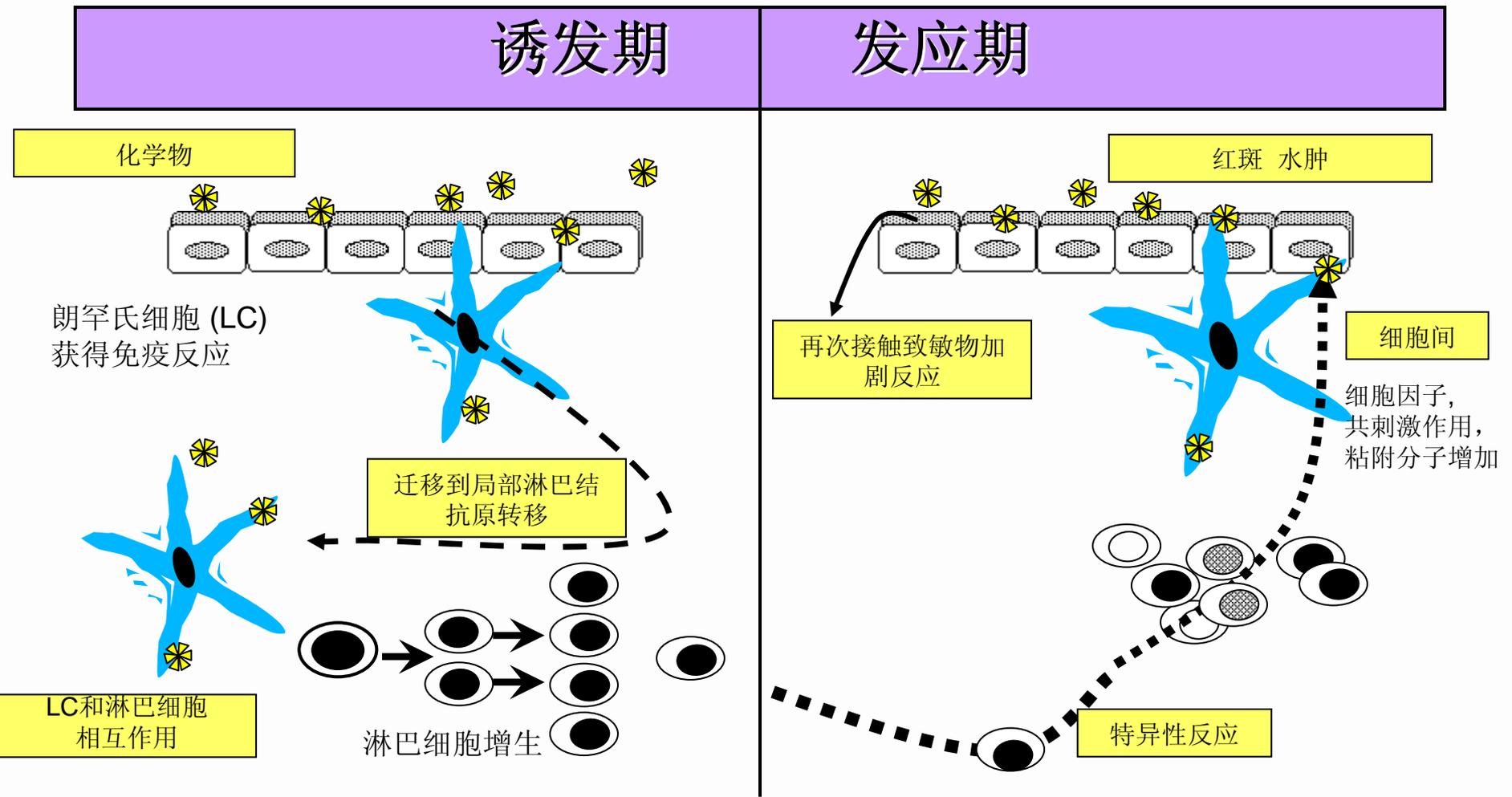
红细胞溶血
RBC haemolysis

+

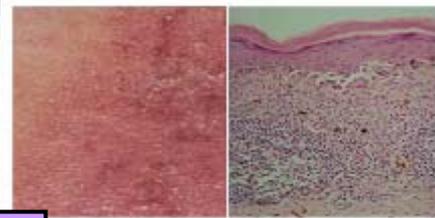
皮肤模型
3Dskin model



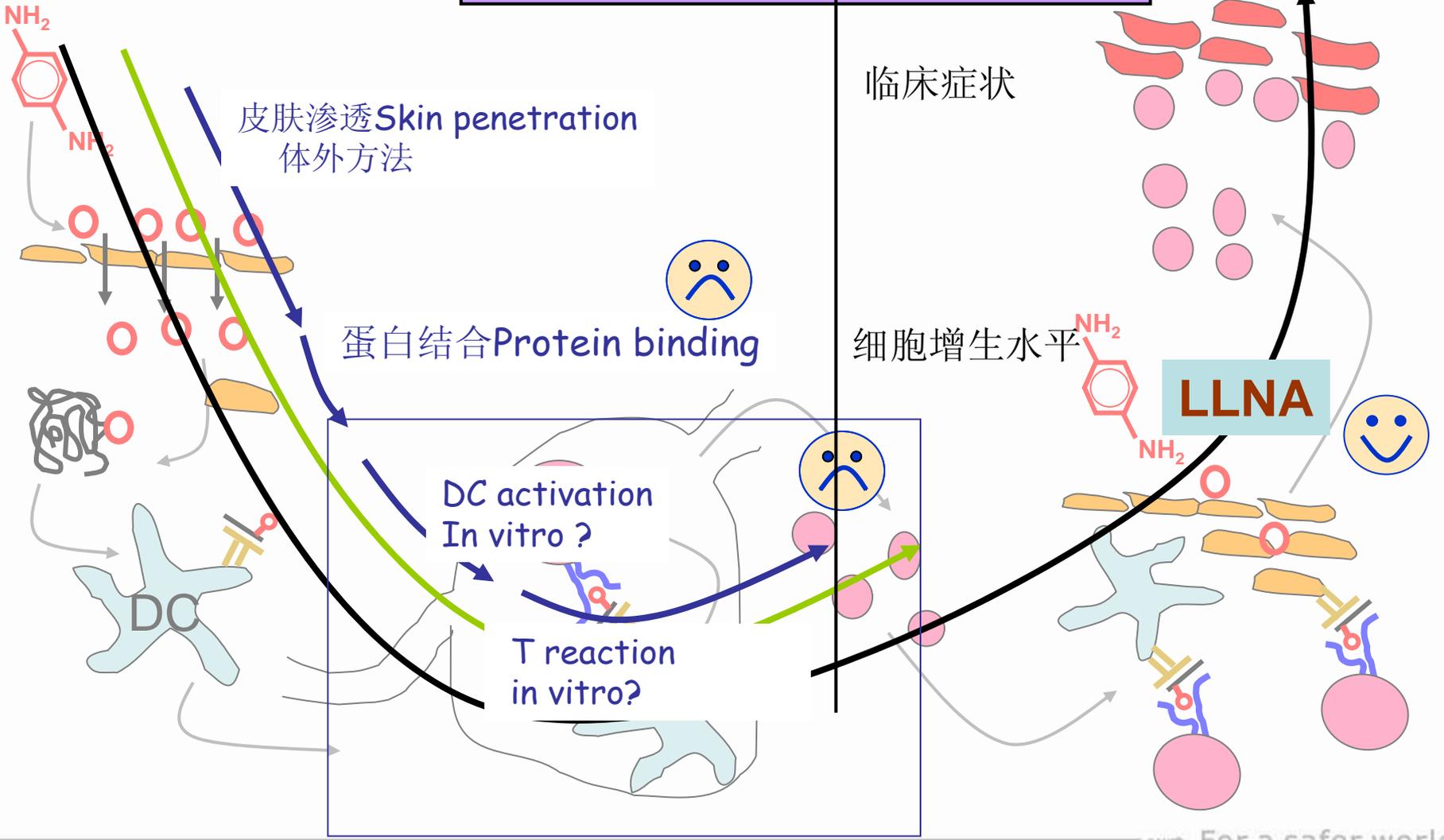
2.3.6 皮肤过敏实验替代方法



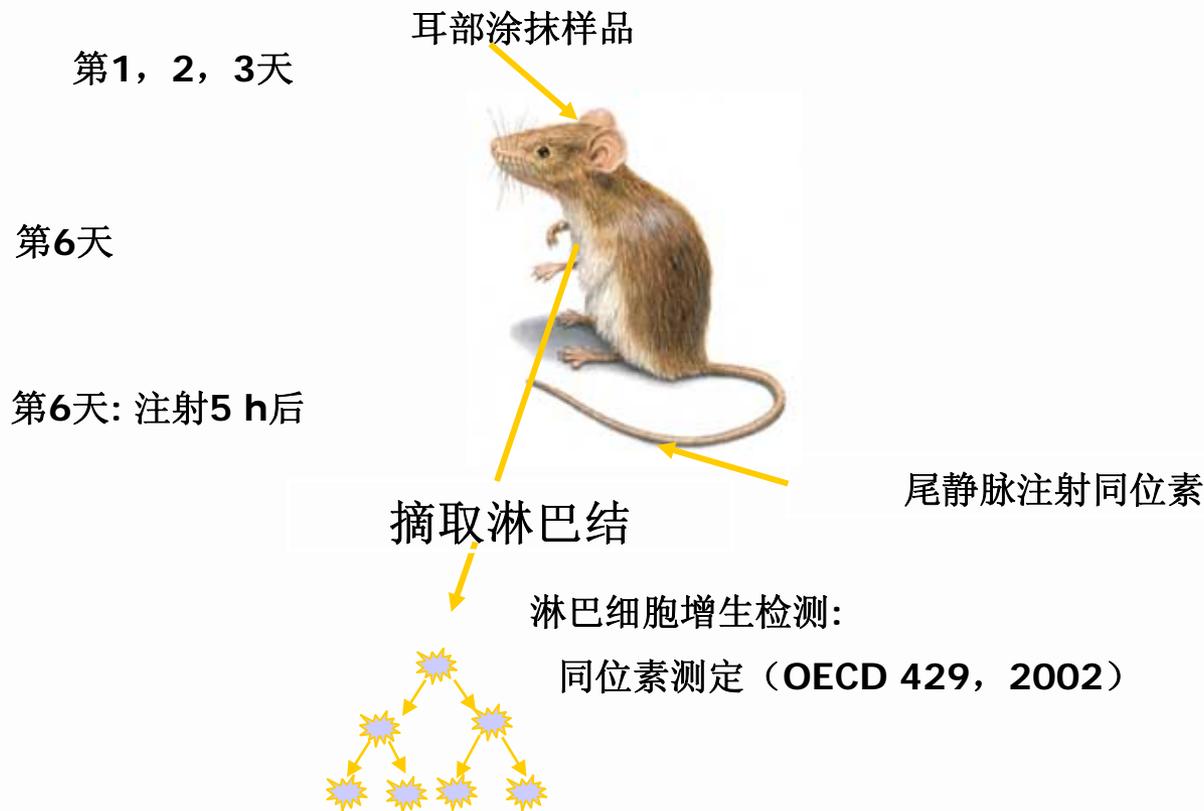
2.3.6 皮肤过敏实验替代方法



诱发期 | 发应期

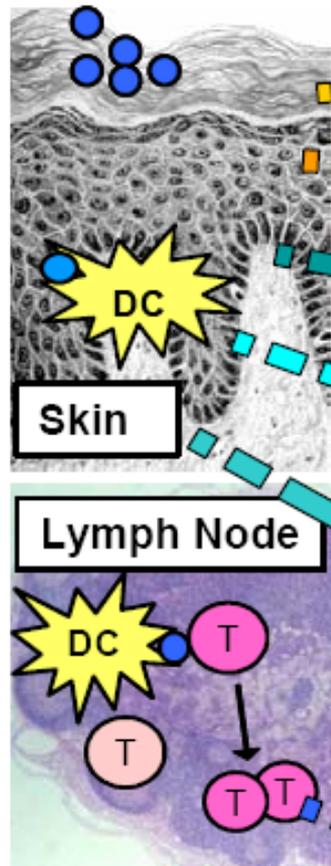


动物实验优化(过渡)方法---局部淋巴结试验 (LLNA)



- 2002 OECD 429 LLNA (放射性同位素标记的胸腺嘧啶或碘)
- 2009 OECD 429 rLLNA (减少和优化)
- 2010 OECD 442A LLNA-DA (ATP 荧光法)
- 2010 OECD 442B LLNA-BrdU-ELISA

2.3.6 皮肤过敏实验替代方法



• 致敏原表皮生物利用:皮肤吸收

• 预测蛋白结合:直接多肽结合反应 (DPRA)

• 致敏原在皮肤内的代谢

• DC细胞激活: 细胞间信号传导和基因表达

• DC细胞系活化预测:

人细胞活化实验(h-CLAT)

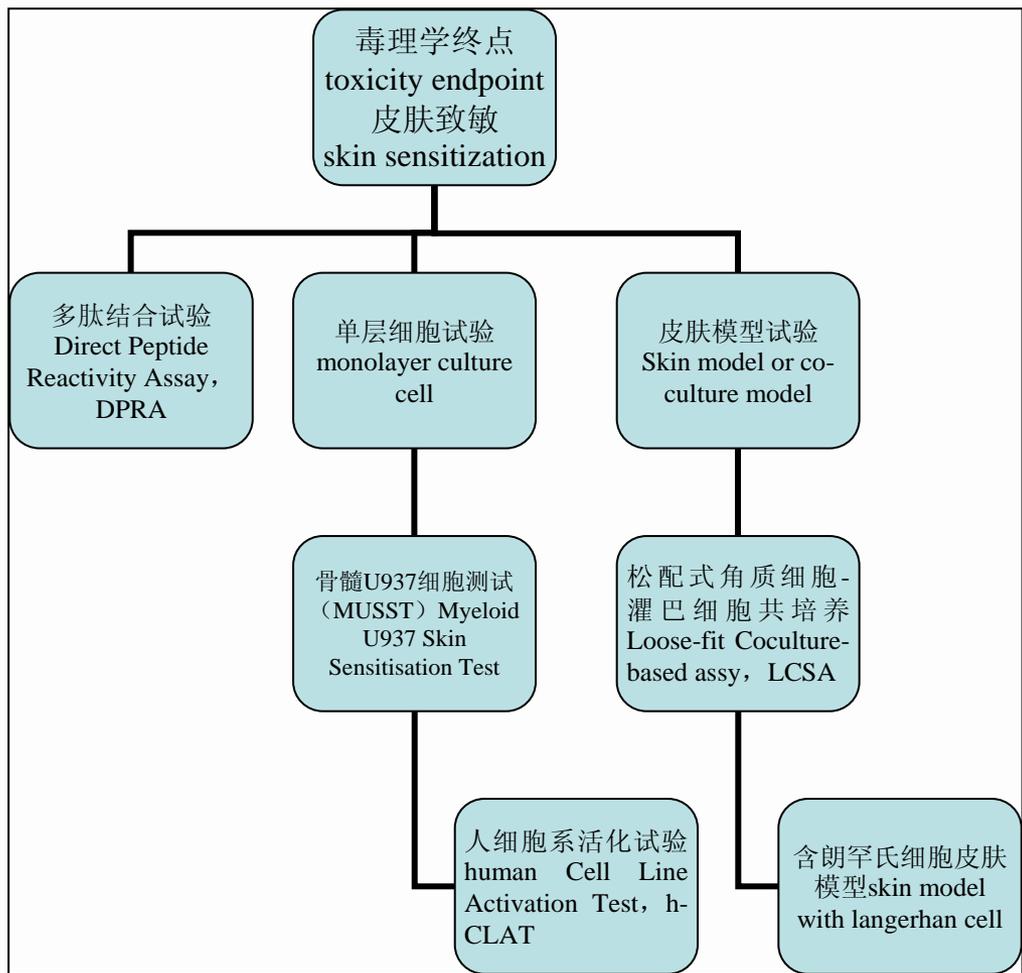
骨髓细胞皮肤致敏实验(MUSST)

KC-DC松配式共培养模型

• T细胞活化实验

2.3.6 皮肤过敏实验替代方法

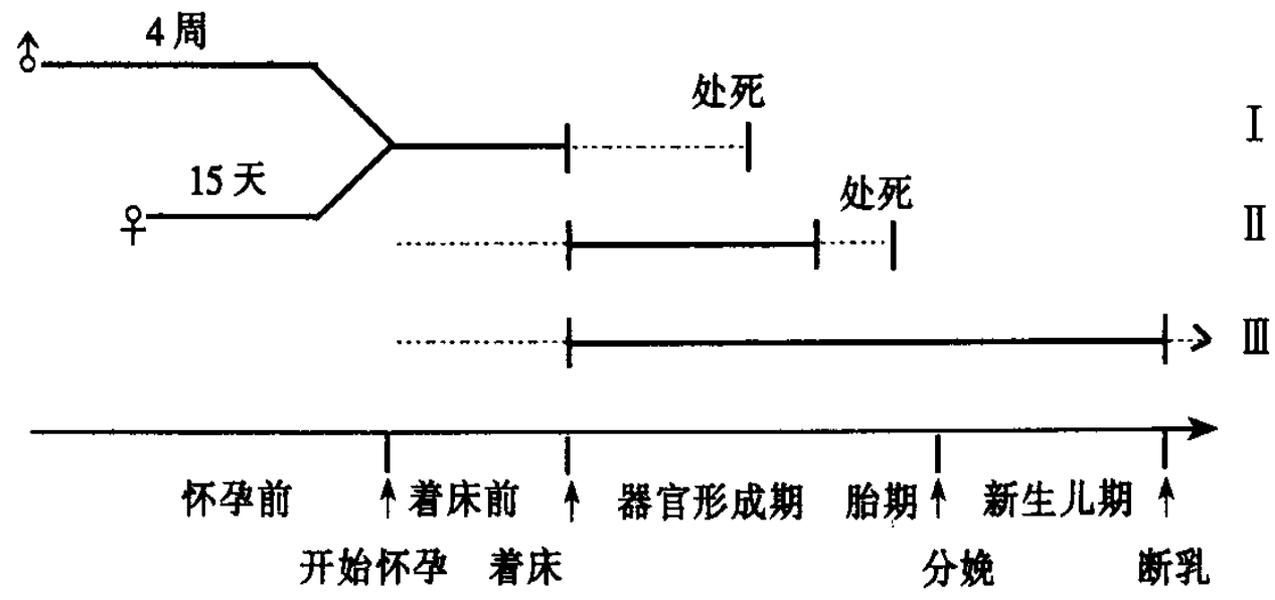
替代方法的分层组合结构 AAT tiered/battery structure



皮肤致敏的AAT解决方案

2.3.7 生殖和发育毒性

传统动物试验：三段生殖毒性试验由生育力和早期胚胎发育毒性试验，胚体—胎体毒性试验（致畸试验）和出生前后发育毒性试验（围产期毒性试验）三部分组成。OECD TG 411, 414, 415, 416, 421, 422, 426



2.3.7 生殖和发育毒性

How to alternative?

A 对雄性生殖的影响

- 1 计算机辅助精子检测(CASA)
- 2 体外精子DNA损伤检测
- 3 精子彗星试验(ReProComet)
- 4 睾丸支持细胞富集培养
- 5 生精小管培养
- 6 体外受精试验

... ..

B 雌性生殖的影响

- 12 滤泡培养试验 (滤泡生物检测, FBA)
- 13 未成熟培养生殖细胞测试
- 14 颗粒细胞的膜细胞培养系统
- 15 卵子体外成熟试验
- 16 人子宫内膜内皮细胞试验
- 17 人子宫移植植物培养
- 18 转染雌激素受体的细胞试验 

... ..

C 发育毒性

- 20 胚胎瘤细胞试验
- 21 微团试验 
- 22 聚集培养系统
- 23 胎儿唾液腺培养
- 23 胚腭培养试验
- 24 全胚胎培养(WEC) 
- 25 胚胎干细胞试验(小鼠和人) 
- 26 转基因胚胎干细胞试验(ReProGlo)
- 27 胎盘灌注
- 28 鸡胚试验
- 29 斑马鱼胚胎试验
- 30 果蝇试验
- 31 海胆试验
- 32 蛙胚试验FETAX
- 33 水螅试验
- 34 涡虫再生试验

... ..

胚胎毒性预测模型

化妆品胚胎毒性的胚胎干细胞试验

- 线性判别函数

$$\text{I: } 5.916 \lg(\text{IC50 3T3}) + 3.500 \lg(\text{IC50 E14}) - 5.307 \\ [(\text{IC503T3-ID50}) / \text{IC503T3}] - 15.27$$

$$\text{II: } 3.651 \lg(\text{IC503T3}) + 2.394 \lg(\text{IC50E14}) - 2.033 \\ [(\text{IC503T3-ID50}) / \text{IC503T3}] - 6.85$$

$$\text{III: } 0.125 \lg(\text{IC503T3}) - 1.917 \lg(\text{IC50E14}) + 1.500 \\ [(\text{IC503T3-ID50}) / \text{IC503T3}] - 2.67$$

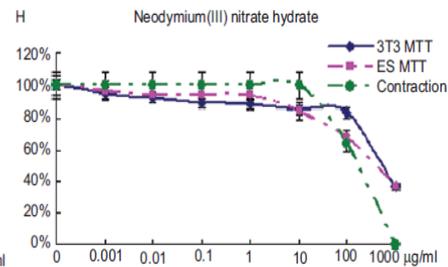
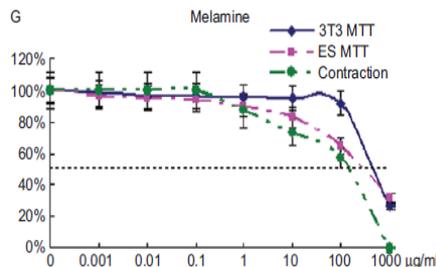
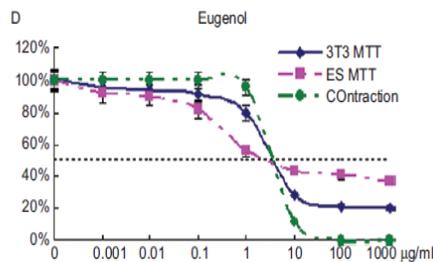
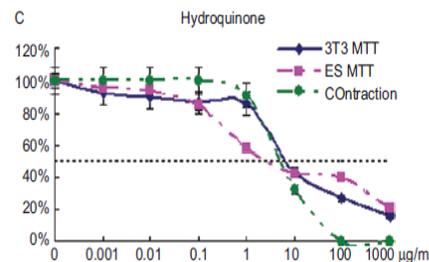
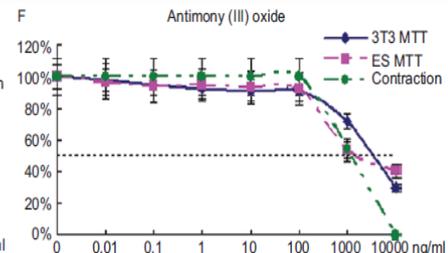
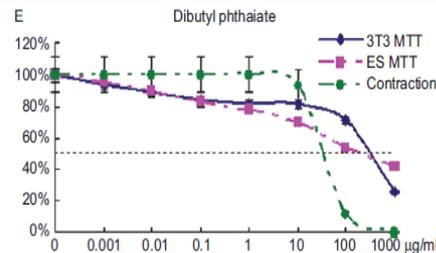
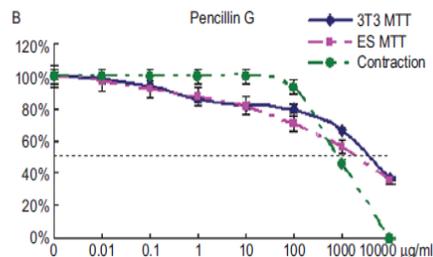
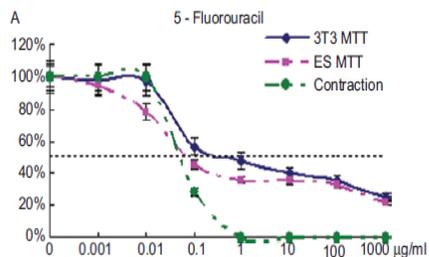
- 分类标准

1类：无胚胎毒性 如 I>II 且 I>III;

2类：弱胚胎毒性 如 II>I 且 II>III

3类：强胚胎毒性 如 III>I 且 III>II

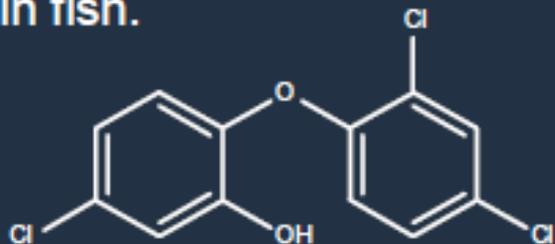
5FU、氢醌、丁子香酚、三氧化二锑；邻苯二甲酸二丁酯、三聚氢胺和硝酸钕；



2.3.8 内分泌干扰物 Endocrine Disruptors

内分泌干扰物筛选方案

- Triclosan, the common antiseptic, was found in 57.6% of the United States water resources surveyed (USGS).
- A broad-spectrum antibacterial - antimicrobial agent classified as a Class III drug by the FDA.
- Bacteriostatic activity against a wide range of bacteria has lead to popular use in:
 - Personal care products, cosmetics, anti- microbial creams, acne treatment, lotions and hand soaps, plastics, polymers and textiles.
- Linked to estrogenic effects in fish.



初步分类



优先排序



第一层筛查



第二次试验

初步分类 - 87,000 chemicals

- 900 杀虫剂活性成份
- 2,500 其它农药配方成份
- 75,500 工业化学品
- 8,000 化妆品、食品添加剂和膳食补充剂

优先排序

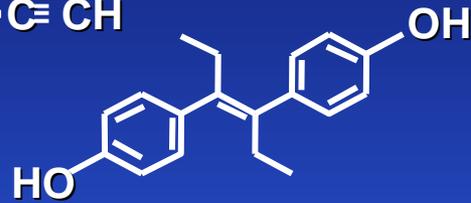
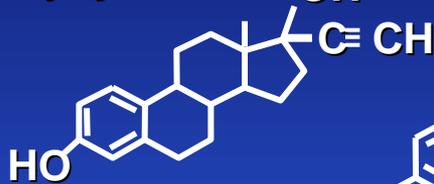
- 基于:

- 产量, 环境残留, 暴露
- 定量构效关系(QSARs)
- 高通量预筛查试验结果
 - : 竞争性配体结合
 - : 报告基因诱发

雌激素内分泌干扰物的结构多样性

Pharmaceuticals

Ethynyl Estradiol

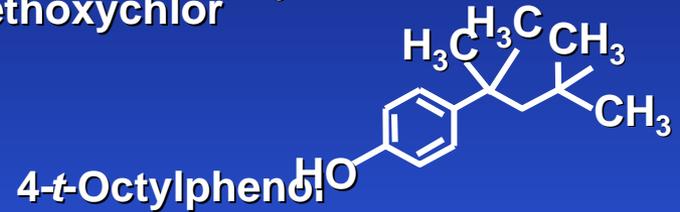


Diethylstilbestrol (DES)

Industrial Chemicals



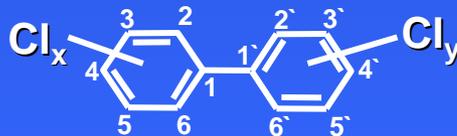
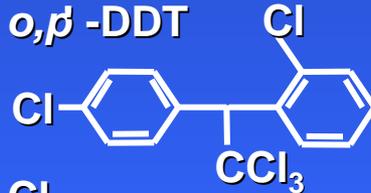
Methoxychlor



4-t-Octylphenol

Environmental Pollutants

o,p-DDT

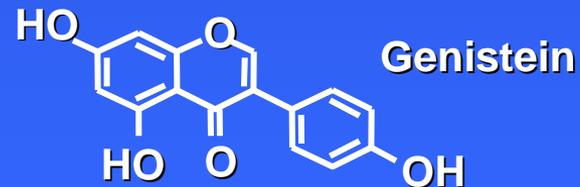


Polychlorinated Biphenyl (PCB)

Phytoestrogens/Natural Products



Zearalenone



Genistein

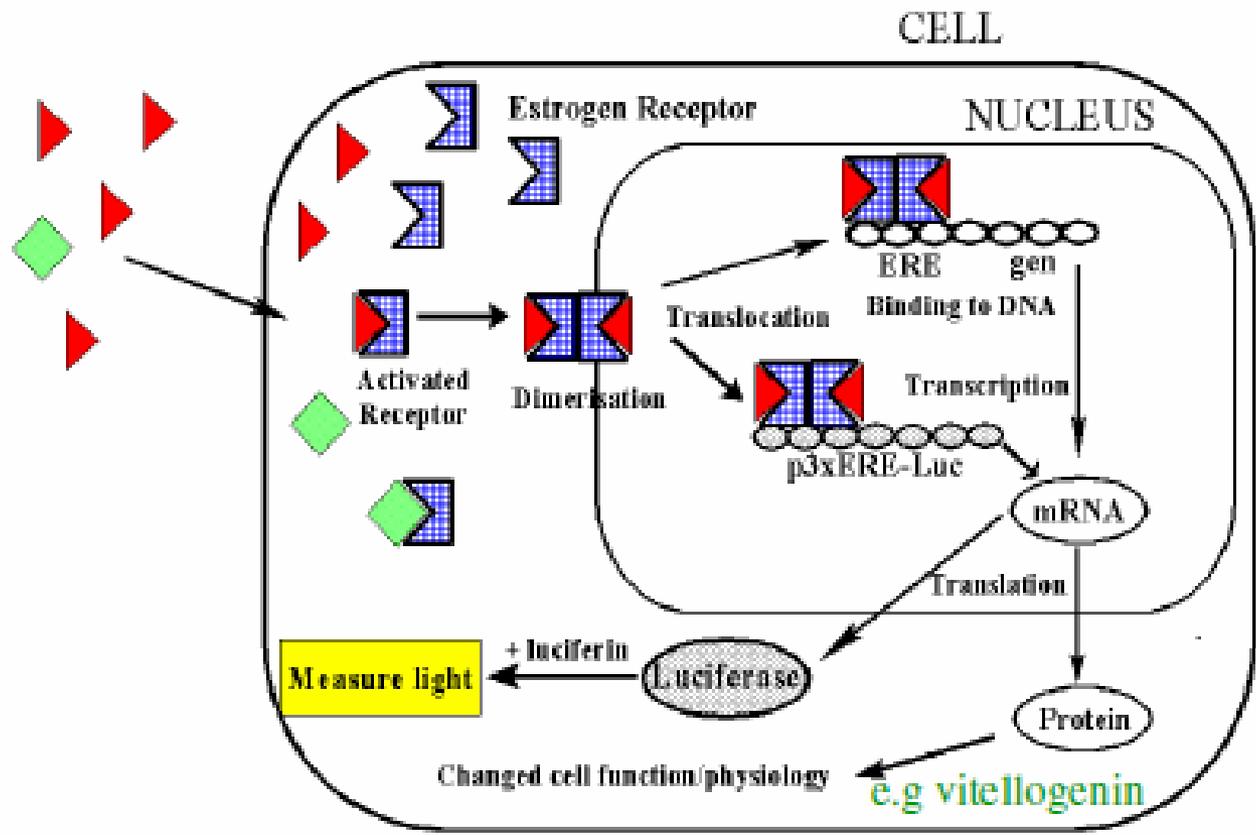
2.3.8 内分泌干扰物 Endocrine Disruptors

ED screening testing on properties and possibly adverse effects.

- **Amphibian metamorphosis**
- **Androgen receptor binding**
- **Aromatase**
- **Estrogen receptor binding (alpha and beta)**
- **Thyroid receptor binding**
- **The most sensitive in vitro hormone-sensitive cells tests**
- **Testing levels of neuropeptides (pituitary gland)**
- **Pancreas test**
- **Fish screen**
- **Hersberger**
- **Male pubertal**
- **Female pubertal**
- **Steroidogenesis sliced-testes**
- **Steroidogenesis Cell-based H295R**
- **Uterotrophic**

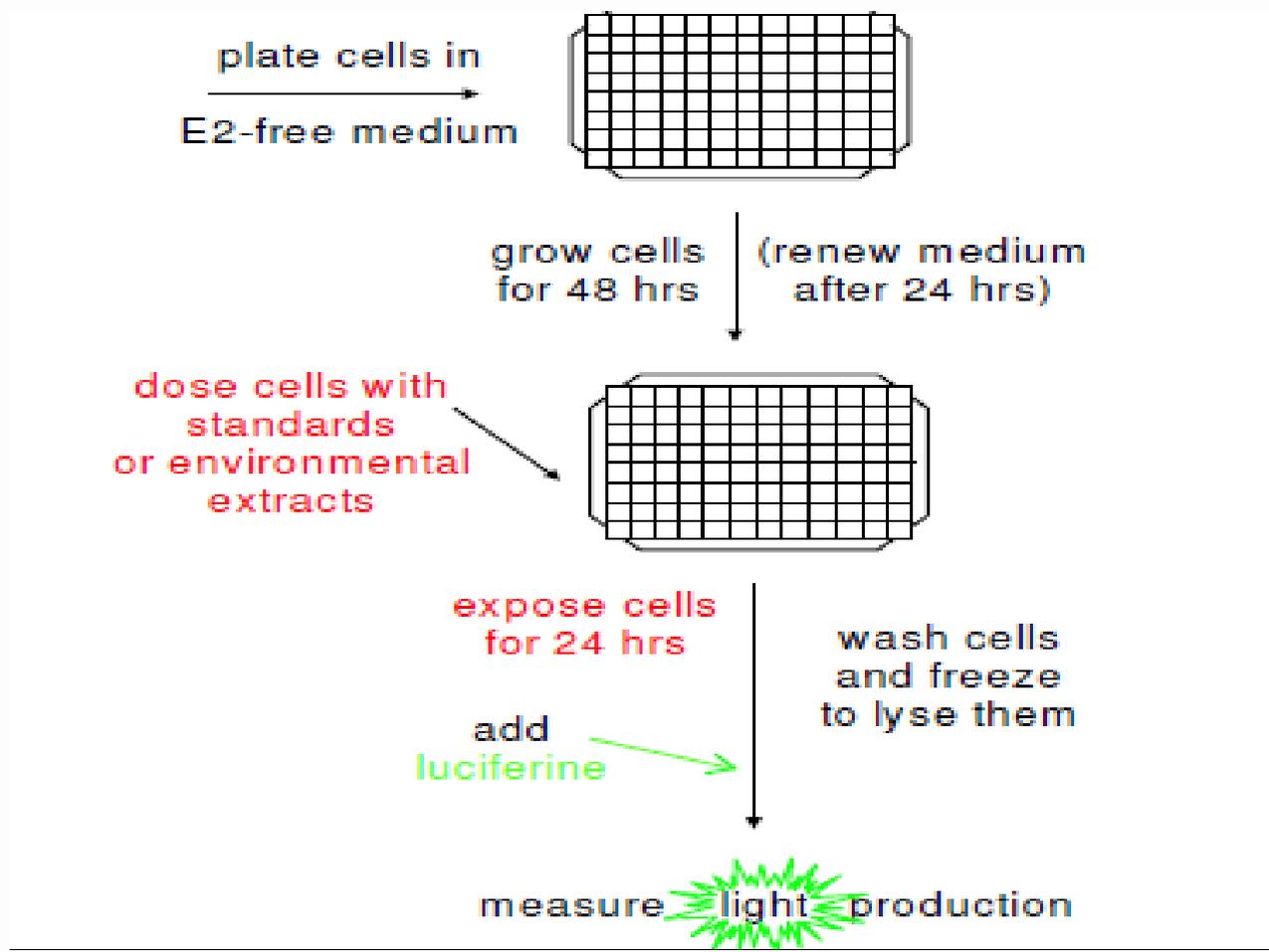
2.3.8 内分泌干扰物 Endocrine Disruptors

复杂混合物的报告基因检测



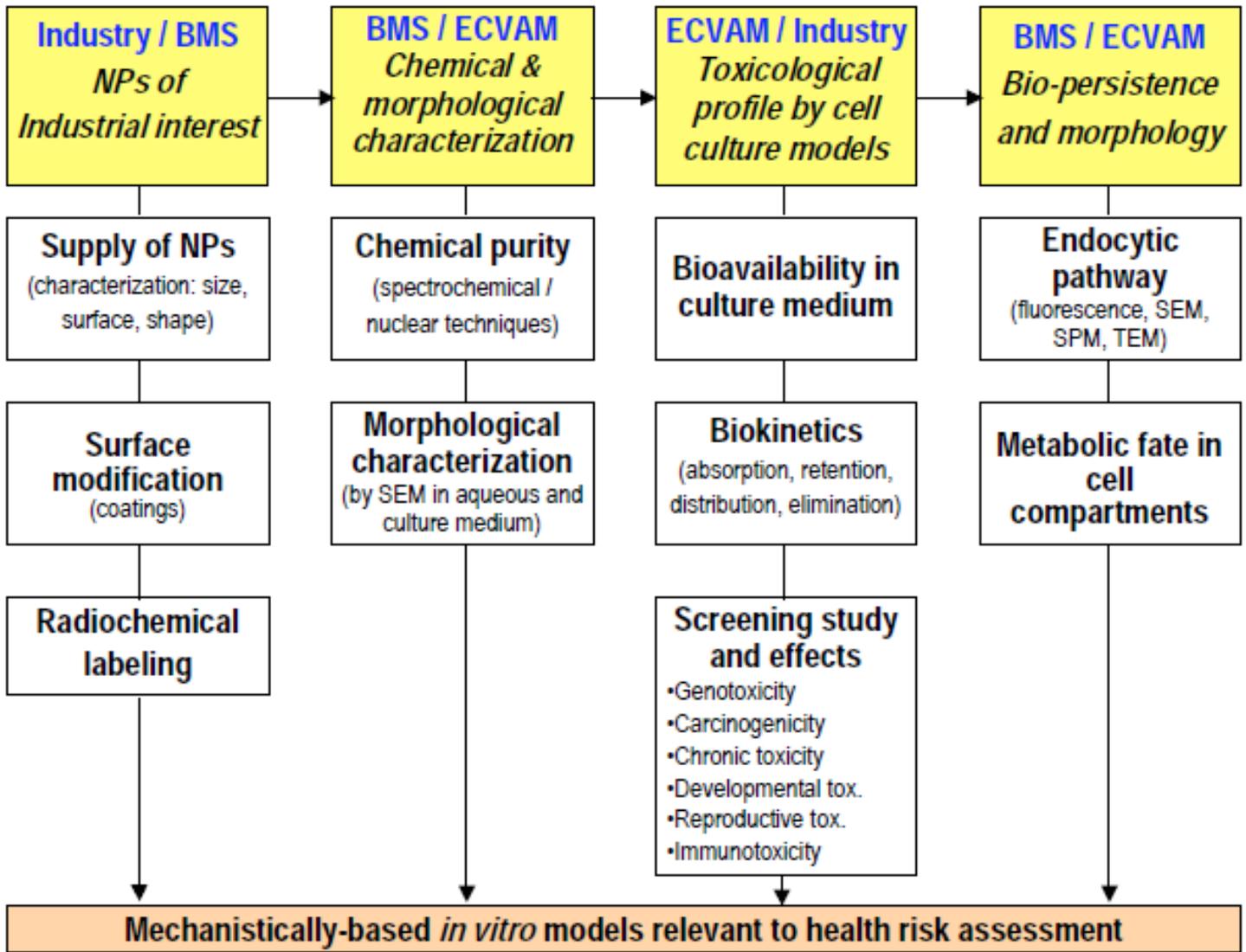
ER-Luc assay

2.3.8 内分泌干扰物 Endocrine Disruptors



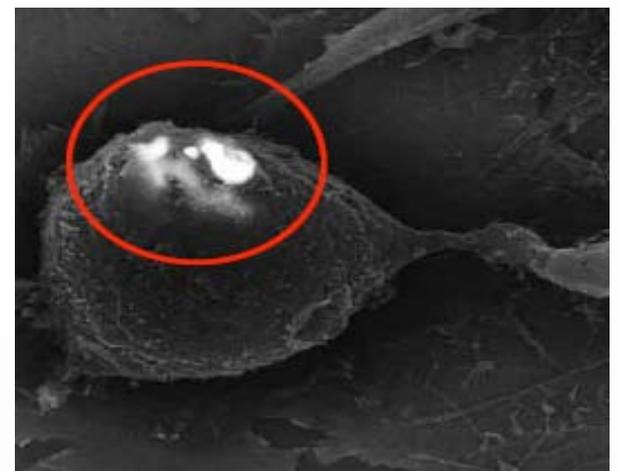
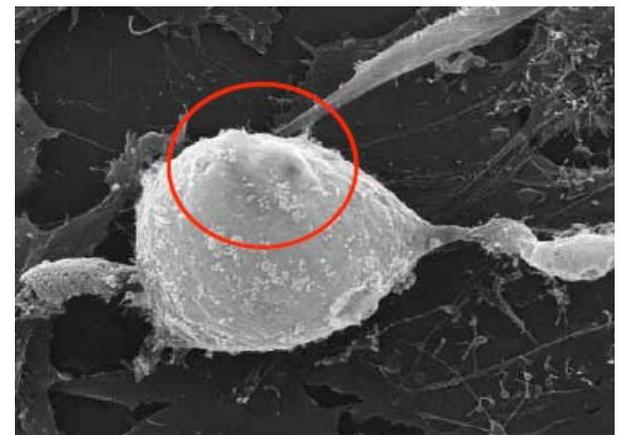
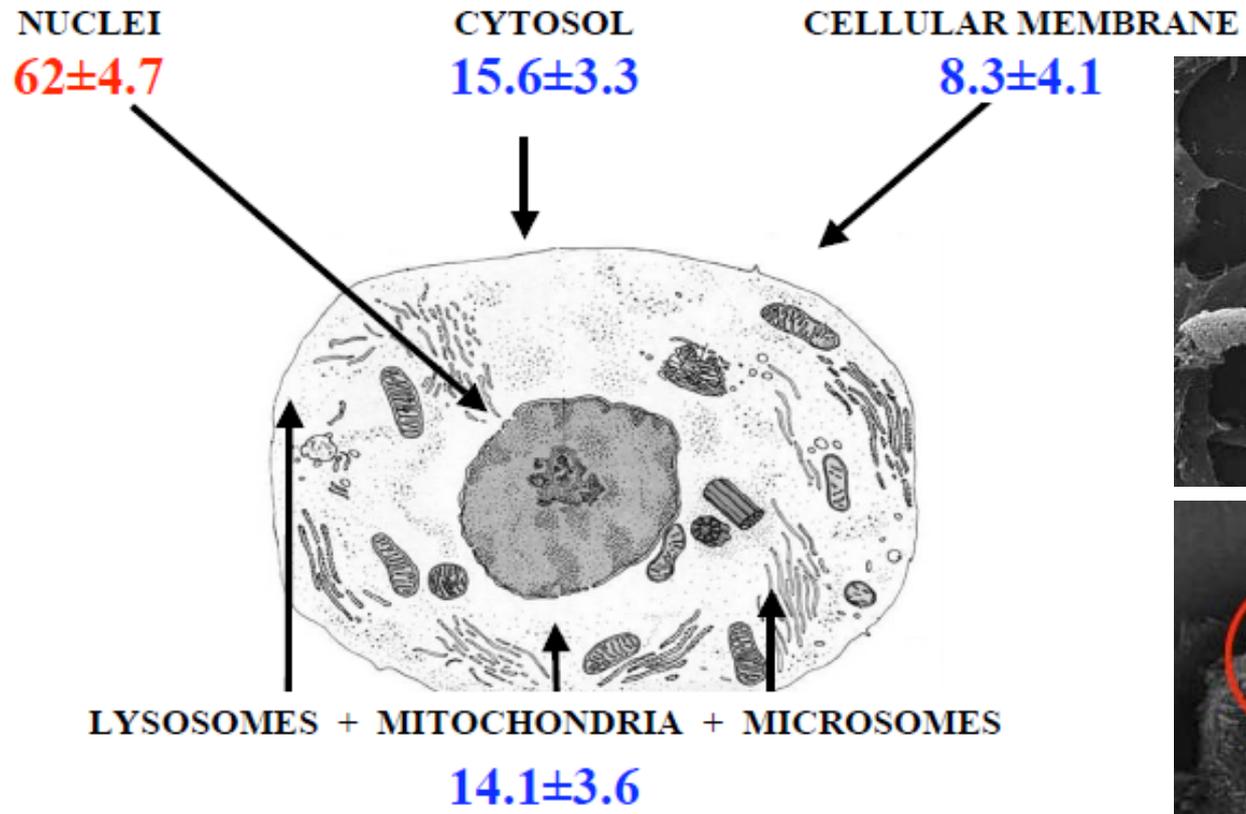
2.3.9 纳米材料

In vitro NAnoTOXicology research (INATOX) project



2.3.9 纳米材料

Balb/3T3细胞暴露100uM 纳米Co 4h后细胞内纳米微粒的分布 (%)



2.4 建立替代方法研究评价中心网络

Chinese Center for Alternatives Research & Evaluation (CCARE)

<http://www.vitrotox.com>

CCARE Purpose

- 推动动物福利和替代在中国的认知 promote the knowledge and acceptance of the 3Rs alternatives at public
- 建立和维护数据库 Establish and maintain a database on alternative resource
- 推动替代方法的应用和标准化 standardization of alternatives
- 提供信息交流平台 Provide the communication platform between scientists, legislators and public



CCARE 通讯

2010年第2卷第1期

Semi-annual Newsletter of CCARE



2.5 科学普及与传播

1. 学术专著

实验动物替代方法原理与应用.科学出版社,2010

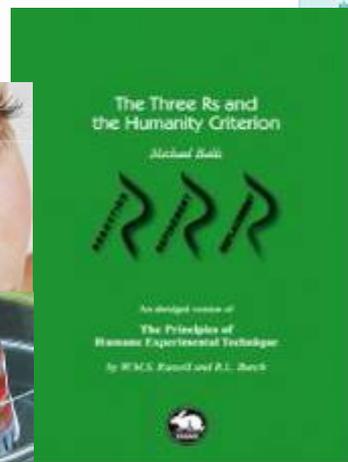
Alternatives Laboratory Animal Methods principle and Application, Science Press, 2010

动物试验替代方法指南,科学出版社, 2012

Guideline for Alternative Animal Testing Methods, Science press, 2012

2. 译著《3R和仁慈准则》 The Three Rs and the Humanity Criterion

3. 科普读物



三、化妆品的功效宣称 -----功效评价体外方法应用

体外系统如何用于功效评价？

- 常规方法：基于染料的检测（MTT、NRU）
- 生物发光检测GFP、BRDU、ATP）
- 新技术应用
- 凋亡和坏死
- 流式细胞分析
- ATP/ADP比率检测
- 氧化生物传感器系统

生物学活性

抗自由基

溶脂作用

神经鞘胺醇代谢

细胞外基因调节作用

三、化妆品的功效宣称 功效评价体外方法应用

防晒功效 **sun screening**

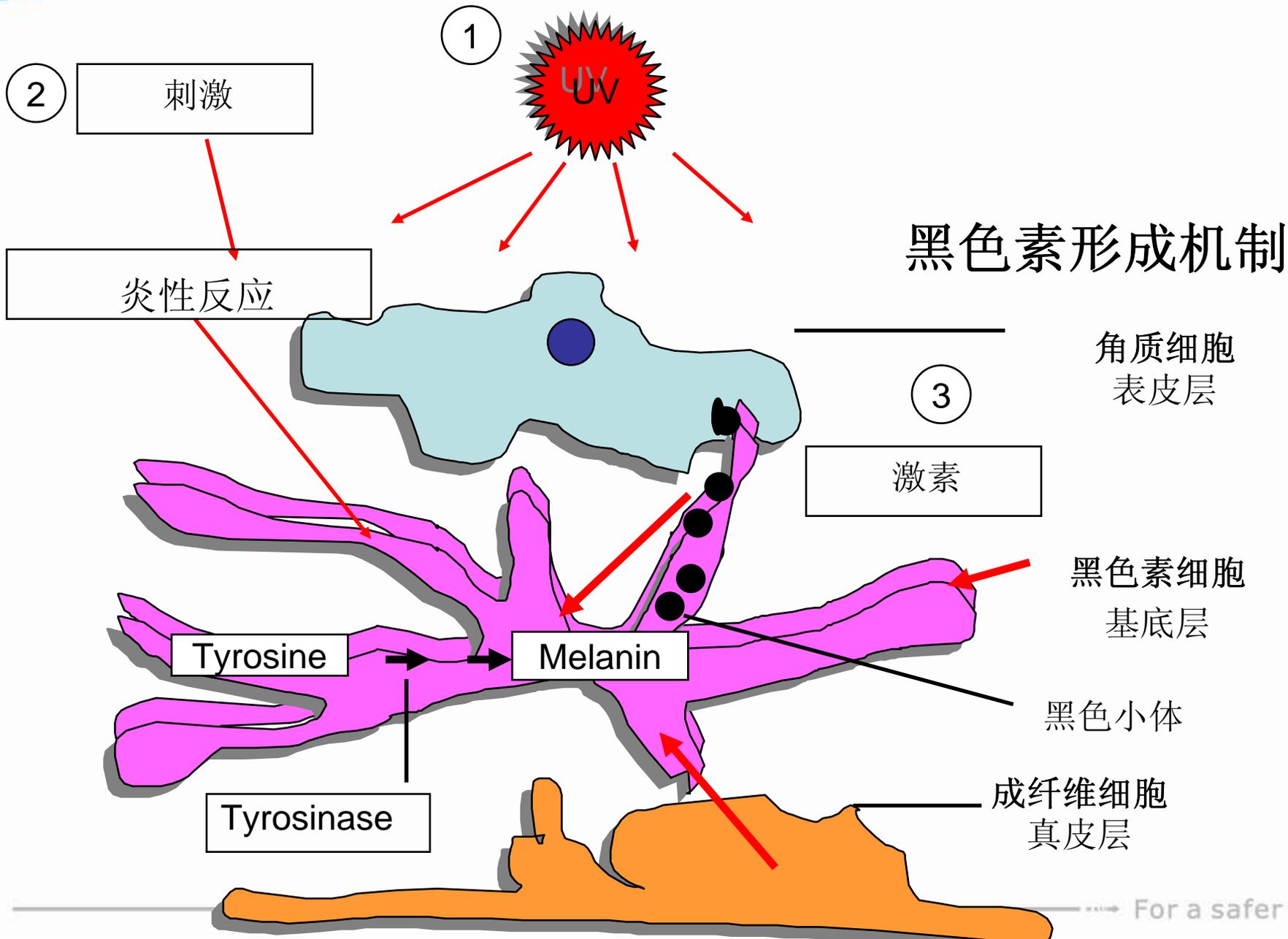
试验系统 **test system:**

离体皮肤、重建表皮、皮肤成纤维细胞和角质细胞 **isolated skin, skin equivalent, primary fibroblast and keratinocyte**

检测指标 **assessment endpoint:** 急性阳光暴露后早期和后期生物学过程的多项指标，如DNA损伤（CPDs, 8-oxo-dG）、应激反应（p53, HSPs）、凋亡（caspase-3, 晒伤细胞, DNA片断）和炎症（LC细胞迁移、细胞因子）



三、化妆品功效评价体外方法应用



三、化妆品功效评价体外方法应用

AAT methods for efficacy

美白和色素沉着 whitening and pigmentation

传统试验系统 traditional methods:

animal model

非细胞酪氨酸酶测试系统 non cell tyrosinase system;

B16黑色素瘤细胞 mice melanoma cell line

辅助途径 by side way: 促进皮肤新生 skin proliferate

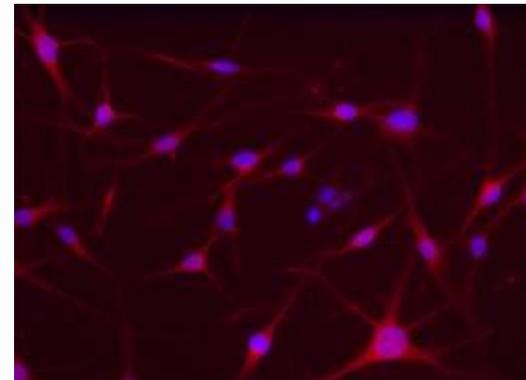
缓解炎症 (IL-2) release inflammation

检测指标 endpoint:

黑素小体定量 melanosome quantitative;

酪氨酸酶活性检测 tyrosinase active;

黑色素组织化学染色和电镜观察 histochemical;



新试验系统new methods:

原代人黑色素细胞normal human skin primary melanocyte

含黑色素的人体重建表皮3Dskin model with melamocyte

离体皮肤 isolated minipig skin

黑色素细胞与角质细胞共培养melanocyte and keraninocyte co-culture

抑制炎症介质inhibition inflammatory mediators: IL-1 α



新靶点new endpoint:

抑制黑色素从黑色素细胞向角质细胞转运inhibition melanin transfer from melanocyte to keratinocyte

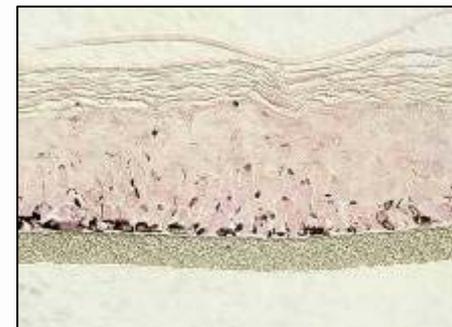
抑制黑色素突起形成Inhibition of melanocyte dendrite formation

角质层护理Stratum corneum care

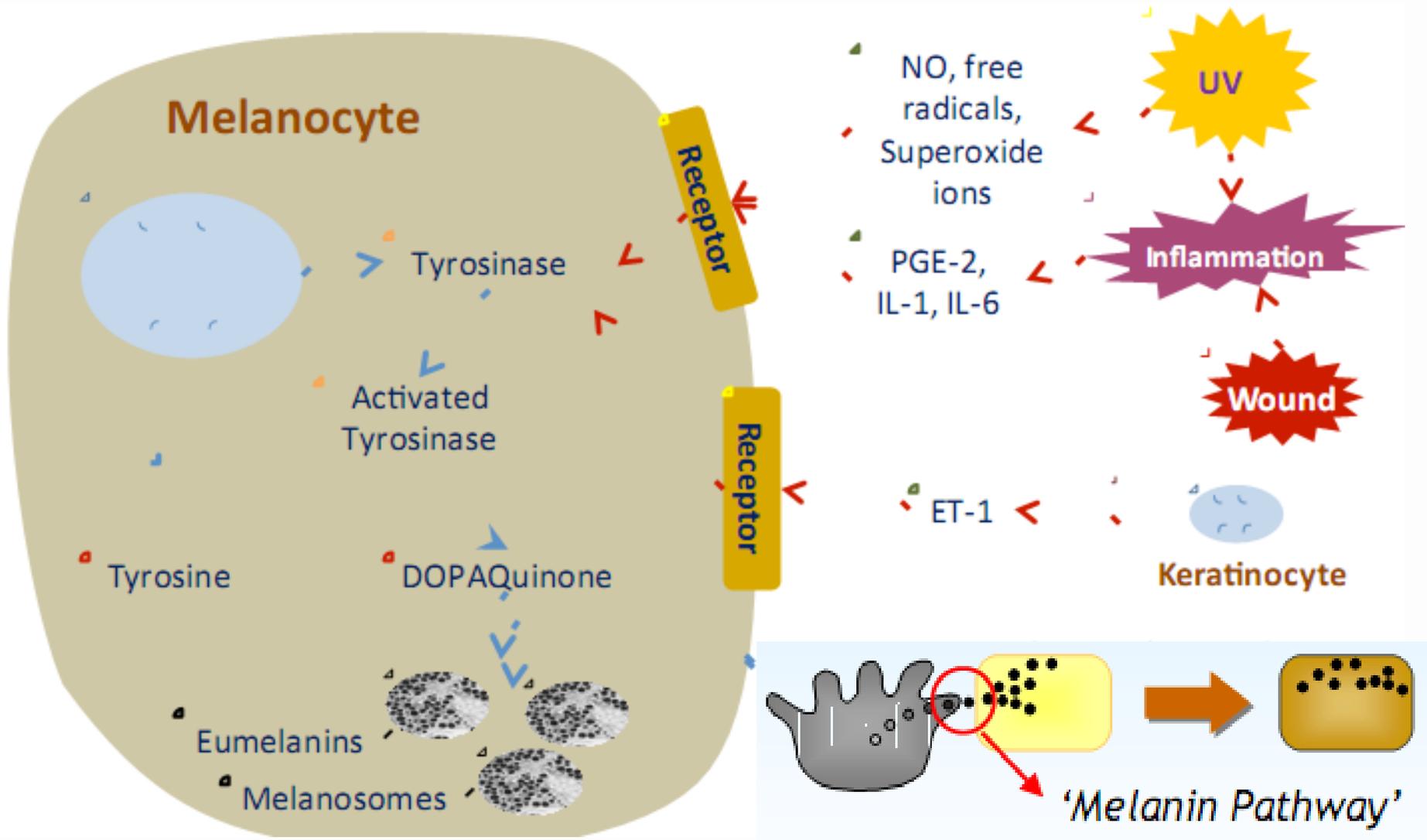
抑制角质细胞摄取黑色素颗粒inhibition keratinocyte absorption

降低通路关键因子reduce the pathway key factor MITF, TRP-1, TRP-2

RT-PCR检测 mRNA 水平



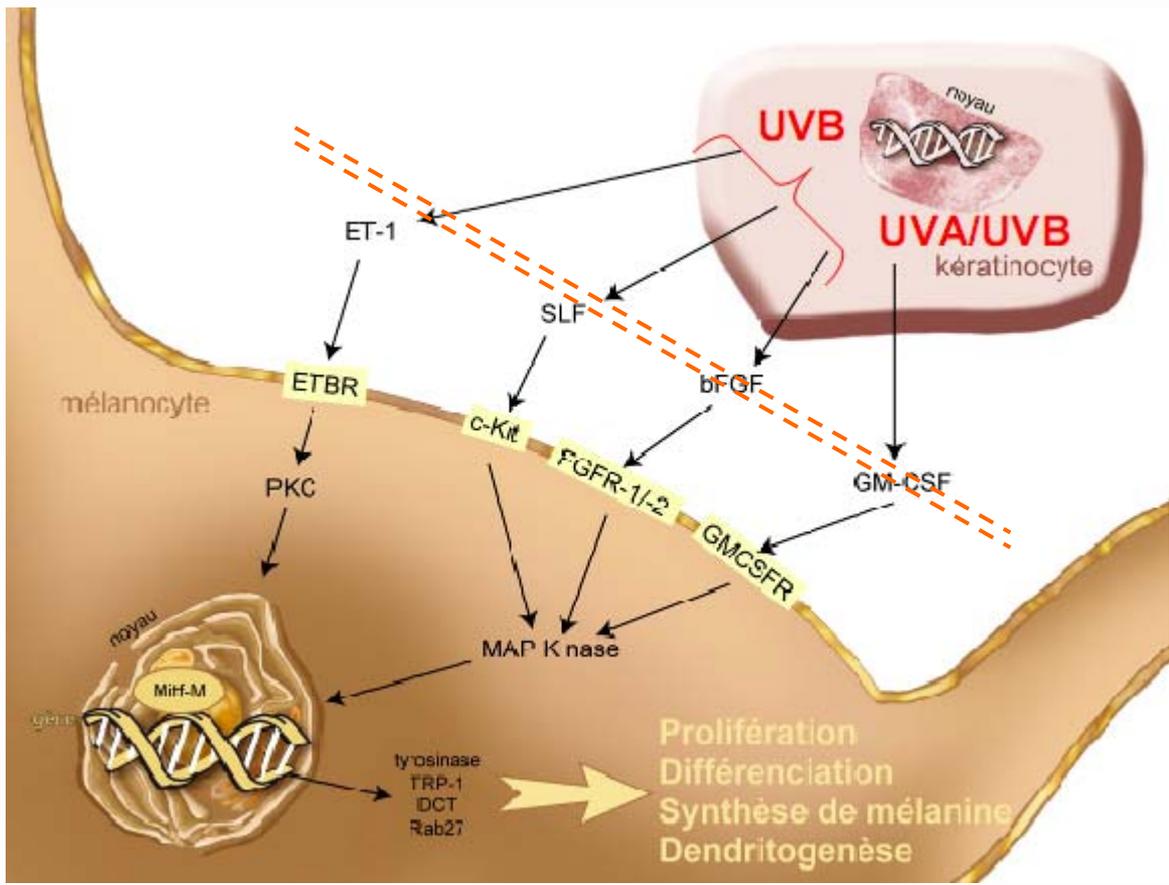
基于黑色素形成通路的美白机制



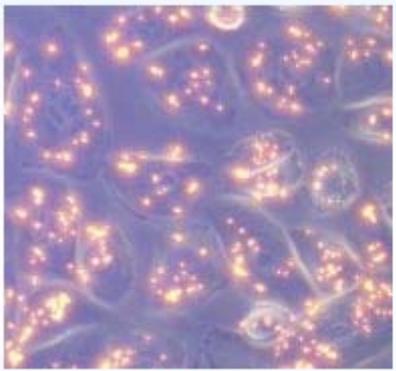
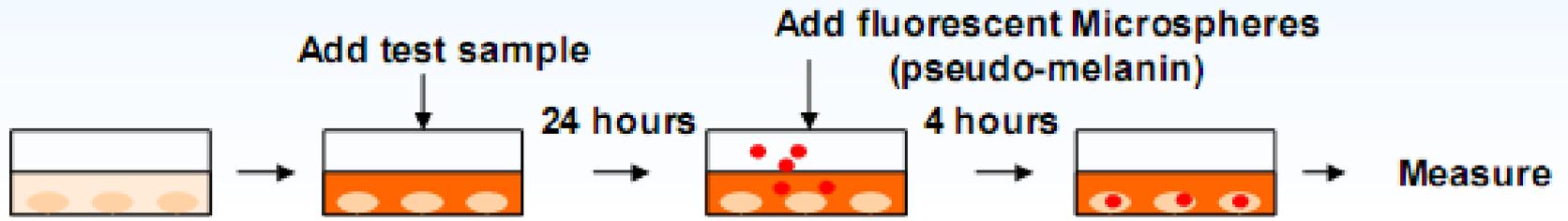
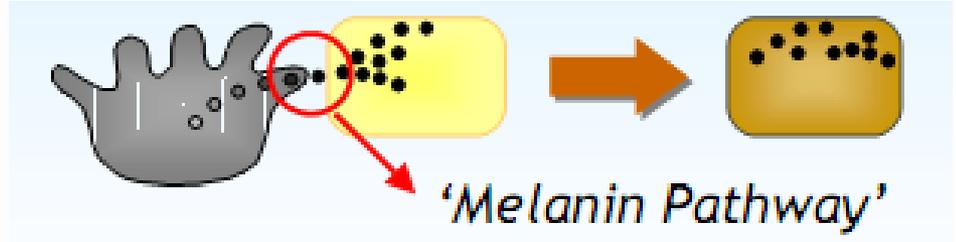
角质层护理 Stratum corneum care

细胞保护

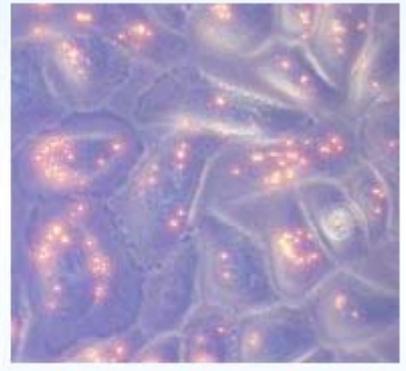
抑制/中和化学介质：GM-CSF、BFGF、SLF、ET-1



抑制角质细胞摄取黑色素颗粒 显微镜观察和荧光定量



Control



40 µg/mL of A.C. Ex. Solid
(0.67% as product)

四、小结

- 1、企业应配备毒理学风险评估师
或者具备相关背景的法规分析师。
- 2、企业是产品安全质量的第一责任人
 - 完善产品的毒理学资料
 - 采用更敏感的方法/体外方法提高产品安全性
- 3、建立仁慈高效的测试策略
 - 建立并实施这一理念
 - 委托或自建部分项目
 - 应用体外方法于产品配方研发过程
 - 降低测试成本，提升安全品质
- 4、尝试做一些功效宣称的资料和档案
 - 新原料的体外效果测试
 - 机制分析提高企业研发水平
- 5、技术跟紧一步，产品领先一程**

谢谢!



程树军 博士 研究员

广东出入境检验检疫局技术中心

网站: <http://www.vitrotox.com>

中国替代方法研究评价中心

Email: chengciq@sohu.com; chengciq@gmail.com;

电话: 020-38290670; 13602811627

地址: 广州市珠江新城花城大道66号检验检疫大厦B1206