



皮肤致敏试验替代方法的研究进展

陈 宁¹, 王 平¹, 冼静雯¹, 谢天柱¹, 秦美容¹, 李俊鹏¹, 鲁 艺¹,
王晓炜¹, 石海宁², 龙绍蓉³

(1. 深圳市药品检验研究院, 深圳 518057; 2. 哈佛大学医学院麻省总医院, 波士顿 02114;
3. 郑州大学基础医学院, 郑州 450000)

【摘要】 皮肤致敏(过敏性接触性皮炎)是皮肤接触某些小分子化合物而引起的迟发性超敏反应。经典的检测化学物接触致敏性的方法是通过动物试验来检测, 鉴于欧盟于2013年颁布全面禁止化妆品动物试验的规定, 替代试验将来是化学品/化妆品致敏研究的主要趋势, 本文综合近年的国内外文献, 对现行的通过OECD认证的和正在开展研究的皮肤致敏替代试验, 如LLNA、DPRA、KeratinoSens™、h-CLAT试验等进行综合论述和评估, 为未来体外替代试验能够客观、公正的对致敏结果评估提供参考。

【关键词】 皮肤致敏; 过敏性接触性皮炎; 体外替代

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2016) 12-0085-06

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2016.12.017

Research progress of alternative in vitro methods to evaluate skin sensitization

CHEN Ning¹, WANG Ping¹, XIAN Jing-wen¹, XIE Tian-zhu¹, Qin Mei-rong¹,
LI Jun-peng¹, LU Yi¹, WANG Xiao-wei¹, SHI Hai-ning², LONG Shao-rong³

(1. Shenzhen Institute for Drug Control, Shenzhen, 518057, China; 2. Massachusetts General Hospital and Harvard Medical School, Boston, 02114, USA; School of Basic Medical Sciences, Zhengzhou University, Zhengzhou, 450000, China)

【Abstract】 Skin sensitization (allergic contact dermatitis, ACD), is a serious condition caused by small reactive molecules and is characterized by a delayed-type hypersensitivity. Animal tests were usually used in the evaluation of sensitizing potential of chemical substances in the past. However, there is an increasing interest from the public for reducing and ultimately replacing animal tests. The European Union (EU) has posed a ban on animal testing of cosmetic ingredients that includes skin sensitization since 2013. Therefore, alternative in vitro tests are the main tendency in chemical substances and cosmetic sensitizing potential research in the future. In this study, different kinds of in vitro test methods that were adopted by OECD or on research (LLNA, DPRA, KeratinoSens™, h-CLAT) were reviewed through recent years literature, comprehensive introduction and evaluation were made to obtain reliable hazard and potency information on potential skin sensitizers.

【Key words】 Skin sensitization; Allergic contact dermatitis; Alternative in vitro testing; Cosmetics

【基金项目】 深圳市药品检验研究院重点学科团队建设项目。

【作者简介】 陈宁(1982-), 主管药师, 博士, 研究方向: 药理毒理学, E-mail: cn82cn@163.com。

【通讯作者】 王平(1972-), 主任药师, 博士, 研究方向: 药理毒理学, E-mail: wangping662@sina.com。

皮肤致敏 (skin sensitization) (过敏性接触性皮炎 allergic contact dermatitis, ACD) 是皮肤对外源物质产生的免疫原性皮肤反应, 对于人类这种反应以瘙痒、红斑、丘疹、水疱、融合水疱为特征。动物反应可能为皮肤红斑和水肿^[1]。经典的检测化学物接触致敏性的方法是豚鼠最大值试验 (guinea pig maximization test, GPMT) 及局部封闭涂皮试验 (Buehler test, BT)^[2], 但这些试验需要大量的动物。目前国际上对动物福利的呼声越来越高, 欧盟现行化妆品法规 1223/2009/EC 于 2009 年颁布, 2013 年 7 月全面生效, 取代 1976 年颁布的 76/768/EC 指令, 成为欧洲化妆品行业的统一法规, 新法规继续保留了禁止动物试验的规定^[3], 加强替代方法的研发投入与支持, 鼓励替代方法的运用, 将成为未来药品化妆品安全性评价的主要趋势。

1 皮肤致敏体内替代试验

1.1 小鼠局部淋巴结试验 (local lymph node assay, LLNA)

LLNA 是用小鼠代替豚鼠对化学物致敏性进行检测, 它是最早通过认证的皮肤致敏替代方法, 2002 年世界经合组织 (Organization for Economic Cooperation and Development, OECD) 将其作为化学物致敏性检测的标准方法, 即 OECD TG-429^[4]。相比传统的豚鼠法 LLNA 优势更加明显, 在于它周期短, 减少了动物的使用量, 优化了受试物给药方法, 减少了动物的痛苦, 只需要建立诱导阶段, 灵敏度高, 能辨别低分子量的致敏化学物^[5]。

由于 LLNA 不能很好地区分致敏物和刺激物, 在某些皮肤致敏物质试验中会出现假阴性或者假阳性结果, 如氯化镍、硫酸镍、十二烷基硫酸钠等, 且需使用放射性核素, 易造成环境污染^[6]。国内外不少学者对试验方法改进, 如增加刺激性指标如耳缘厚度和耳重的检测^[7]; 分析免疫表型 B220⁺^[8], CD69⁺^[9]等; 将淋巴结增殖情况 (称重和计数) 纳入致敏性指标^[10]。2010 年, OECD 又增加了两种新的方法, 即 LLNA: DA 方法 (TG442A)^[11] 和 LLNA: Brdu-ELISA 方法 (TG442B)^[12]。这两种方法弥补了 TG429 方法放射性物质的污染的缺陷, 但仍有一定制约性, 如 LLNA: DA 的试验结果受检测时间影响较大, OECD 标准要求: 从取淋巴结到检测过程须在 20 min 内完成, 且每只动物的检测时间要保持一致, 从处死到 ATP 检测约在 30 min 内完成^[11]。

LLNA: Brdu-ELISA 法难免存在由于皮肤刺激剂或者呼吸道致敏剂引发的假阳性对检测的干扰^[12]。

2.2 正在研究和验证的 LLNA 改良法

近几年, 研究者们继续对 LLNA 改良法进行不断改进和探索^[13-16], Ulker^[13] 对 LLNA: Brdu 方法进行改良, 增加淋巴结细胞的 Th1 型和 Th2 型细胞因子的指标测定, 对三种不同的致敏物质, 结果表明改良 LLNA: Brdu 和放射性 LLNA 方法的致敏检测结果一致性良好。阳晓燕^[14] 用 LLNA: DA 改良法对 4 种化妆品原料和 6 种化妆品产品进行致敏检测, 增选耳厚差、耳重为刺激指标, 淋巴结重量、淋巴细胞数和 ATP 发光值为致敏指标, 将刺激指标和致敏指标结合对化妆品刺激性和致敏性做出综合评价。

Yamashita 等^[15] 用一种包含激发阶段的改良法—LLNA: DAE 法区分 LLNA: DA 检测中出现的边界阳性化合物, 并进行交叉致敏测试。该方法对实验动物右耳背部进行 4 次化学物质接触诱导, 最后对左耳背部进行激发反应, 通过测试发现包括边界阳性的 24 种化学物质中, 23 种化学物质的检测结果与 LLNA 方法一致。Yamashita^[16] 等对 LLNA: DAE 法进行进一步探索试将其作为一种独立的皮肤致敏检测方法来评估不同之间的相对皮肤致敏效力, 他对 3 种化学物 (己基肉桂醛、异丁子香酚和 2,4-二硝基氯苯) 进行初步剂量研究, 发现 32 种化合物的左耳淋巴结激发反应程度和致敏效力之间存在一定的定性关系。

目前, 利用流式细胞术对 LLNA 改良方法 (flow cytometry-based LLNA, FC-LLNA) 包括: (1) 流式细胞术检测细胞增殖: 流式细胞术 (flow cytometry, FCM) 能通过测定淋巴结细胞中的 BrdU 快速、灵敏地检测细胞增殖^[17]; (2) 流式细胞术检测细胞亚群及致敏相关标志物: 如 CD40L, CD62L 等^[18]; (3) 流式细胞术进行致敏相关细胞因子检测: IL-2、IL-4、IL-6、IFN- γ 和 TNF α ^[19]。该方法在敏感度和准确率方面展示出较好的前景, 但仍未通过 OECD 的方法学认证^[20]。

2 皮肤致敏体外替代试验

2.1 直接肽反应试验 Direct Peptide Reactivity Assay (DPRA)

化学物穿透皮肤后, 大多数化学物可与皮肤蛋白质结合形成稳定的免疫复合物启动免疫反应。

由于这些化学致敏原大多是亲电性的,因此可以与氨基酸的亲核中心共价结合。DPRA 实验的设计是通过量化包含半胱氨酸和赖氨酸的合成肽模型的化学物质的活性,来模拟亲电子化学物质和亲核中心的共价结合过程。该试验研究肽反应动力学,将受试物孵育 24 小时后,用高效液相 HPLC 测肽的残留量来评价化学物质的致敏性,它能将化合物按照不同致敏程度进行分类^[21]。

该方法由 Gerberick 和他的同事在 2004 年开发^[22],2007 年进行改良^[23]。为了拓宽该方法的使用范围,2009 年 Gerberick 又进一步改良,在致敏物与半胱氨酸的酶促反应中加入了辣根过氧化物酶—过氧化氢(HRP/P),使该方法也能用于抗原前体物的检测^[24]。2013 年,欧洲替代方法研究中心(European Union Reference Laboratory for Alternatives to Animal Testing (EURL-ECVAM) 将其作为皮肤致敏替代试验的推荐方法^[25],2015 年 2 月,OECD 公布 DPRA 试验方案(TG442C)^[21]。

2.2 树突状细胞检测法

树突状细胞 DC 能将抗原递呈给初级免疫 T 细胞,调节 T 细胞、B 细胞介导的免疫应答,皮肤朗格罕细胞(Langerhans cell, LC)是主要位于表皮的未成熟树突状细胞(iDC)。在抗原递呈的过程中,iDC 捕获和处理抗原,刺激 T 淋巴细胞活化并引起多种生物学变化,通过检测 DC 生物学指标的变化,可评价化学物的致敏性。目前,检测比较成熟的细胞因子是 IL-1 β , TGF 和 TNF- α , 膜表面分子主要有 CD86, CD54, 和 MHC II^[26, 27]。

LC 样树突状细胞模型来源主要是诱导培养 CD34⁺ 造血干细胞和外周血获得的树突状细胞,但此类细胞模型存在着不足:实验室之间、来源个体间差异性、费用昂贵等。为克服这些限制,目前一些来源广泛,活力较强的各类单核细胞系(THP1、U937 和 MUTZ-3 等)成为目前研究的热点内容^[29]。

2.3 人细胞系激活实验(human cell line activation test, h-CLAT)

由于人单核白血病细胞 THP-1 (human monocytic leukaemia cell line) 能表现出与树突细胞类似的性质,并在细胞因子的作用下分化为树突样细胞。当与致敏物接触时,THP-1 细胞表面的 CD86 和 CD54 表达增强,从而使其成为有效的评价皮肤致敏的体外研究方法^[30]。h-CLAT 试验采用 THP-1 进行体外皮肤致敏研究,通过检测细胞表面标志物

CD86 和 CD54 的变化来反映化学物的致敏性。THP-1 细胞不需要细胞因子诱导,即可被致敏物激活,目前细胞已商品化,对常用致敏物检测特异性高。h-CLAT 法已经初步获得认可,通过不同国家实验室间的合作研究验证,欧洲替代方法研究中心(EURL-ECVAM)已完成了对它的可行性验证^[31],2015 年 12 月,OECD 已经公布了 h-CLAT 的方法草案^[32]。

Ashikaga 等^[33]通过检测细胞 CD86 和 CD54 的表达水平对 100 种化学物致敏性的进行判定,h-CLAT 与 LLNA 结果的一致性仍然高达 84%, h-CLAT 不仅能分辨出极度致敏和强致敏,而且能分辨出中度致敏和弱致敏。Parise 等^[34]发现给药暴露 48 h 后,可以用 h-CLAT 法通过分析 THP-1 的 CD86 的表达水平将 23 种致敏物质的 22 种鉴定出来,结合 CD86 和 IL-8 的分析对致敏物做综合判断。

2.4 ARE-Nrf2 荧光素酶检测法(KeratinoSensTM)

Nrf2 是携带有亮氨酸拉链结构的转录因子,几乎能在所有细胞中表达,它含 6 个功能区,分别被命名为 Neh1~6。正常情况下,其在胞质中通过 Neh2 与阻遏蛋白 Keap1 蛋白结合而被降解。当机体处于氧化应激状态或体内的氧化磷酸化作用可以促使 Nrf2 与 Keap1 解体,随后 Nrf2 转位进入细胞核,在各个功能区的密切配合下与抗氧化/亲电反应元件(antioxidant/electrophile response element, ARE)结合,启动 Nrf2-ARE 信号通路并促使下游 II 相解毒酶和抗氧化酶基因的表达^[35]。

HaCaT(human keratinocytes)是人类永生化角质细胞,包含有 ARE 元件的荧光素酶报告基因,Nrf2-ARE 检测就是利用 HaCaT 细胞检测荧光素酶的活力水平来判断细胞是否有致敏反应。EURL ECVAM 公布的数据显示,该方法在不同实验室间的可重复率达到 85%,准确性和 LLNA 相比达到 77%,特异性达到 76%,并于 2014 年 2 月推荐该方法的试验方案^[36],2015 年 2 月 OECD 公布了该方法的指导原则(TG442D)^[37]。

2.5 人工皮肤/重建表皮模型

现在主要有两种类型的体外三维培养人皮肤模型:表皮类似物或皮肤类似物。

已经商品化并被欧盟推荐使用的重组人皮肤模型有 EpiskinTM、EpidermTM和 SkinEthic RHE^[38]等,张广静^[39]等研究表明永生化细胞组织工程皮肤模型检测的敏感性和特异性均高于原代培养细胞构

建的皮肤模型。Ramadan 等^[40]2016 年模拟皮肤内环境,利用动态灌流微培养系统构建人永生化细胞 HaCaT 和人白血病单核淋巴细胞(U937)共培养的三维模型。曹玉萍^[41]等将 THP-1 细胞分别与 KC 和色素性组织工程表皮共培养三维模型,通过检测 THP-1 细胞表面的标记物变化及培养液中细胞因子的变化来判断待检物质的致敏性。

2.6 结构活性关系分析

化合物的生物学特性与其化学结构密切相关,有许多理论电脑模型能利用与未知化学物结构近似的已知化学物的现有理化资料预测该未知化学物的理化特性。如结构活性关系分析(structural activity relationship, SAR)和定量结构活性分析(quantitative structural activity relationship, QSAR)。Gould^[42]将 LLNA 实验中存在潜在致敏力的 28 种化合物(EC3 < 1%)用计算机进一步 DEREK 分析,从结构、理化性质方面,如分子量,LogP 等参数,结合结构性预警分析和理化分析对 LLNA 结果进行综合判断,结构性分析显示其中 13 种化合物阴性,15 种化合物阳性,所有化合物的分子量均小于 550 Da,对其中 21 种化合物进行 EC3 值分析,8 种是 EC3 值的数量级是正确的,8 种不正确,5 种不能判定。通过结合计算机结构及理化分析能对 LLNA 结果做出更准确的判断。Urbisch^[43]等用 QSAR Toolbox 方法和 DPRA 方法相比在致敏性判断结果上有 84% 的一致性。其中非致敏物质判断一致性 83% ~ 100%,致敏物质判断一致性 55% ~ 61%。Dimitrov 等^[44]在 2015 年建立一种对体内、体外测试试验(DPRA vs. LLNA)结果转换时进行数据整合和统计学的统计学方法,这套方法的分级和筛选方式不仅用于皮肤试验评估,还能用于化学物体内、外毒理和健康评价及 QSAR 模型的建立。

目前还没有一种体外测试方法的结果能完全代替动物试验单独用于化学物皮肤致敏性评估,每一种体外方法只能反应皮肤致敏不良反应结局路径(AOP)中的一部分关键信息,不能完整的反应整个皮肤致敏机制过程。一种新的替代方法的建立首先必须具备能体现 3R 原则、科学、有效及可操作性等优势,经欧盟验证实验室(EU-NETVAL)验证其数据可重复性,与体内动物试验方法要有相关性和一致性,其结果能够较好地预测受试物的毒理学及生物学效应。然后国际和各国权威部门组织同行评议和方法学验证,如 ECVAM、ICCVAM (NICEATM)等。再后,

根据专家的评估意见提交相关管理部门,如欧盟委员会评估同意接受可成为欧盟方法纳入法规管理的轨道。如要成为 OECD 的标准,还需更广泛机构的验证和反复修改,还要听取社会评论,才能发布为 OECD 的试验指南。^[45, 46]近年来,研究人员采用组合测试策略(ITS)将 DPRA、h-CLAT、KeratinoSensTM结合 LLNA 和计算机模拟的数据组合分析,已涵盖皮肤致敏的各阶段的生化反应数据,构建皮肤致敏性评价的框架。Urbisch^[47]等结合 DPRA、KeratinoSensTM和 h-CLAT 三种检测方式,将 27 种抗原前体物中的 22 种检测出来,阳性致敏率达到 81%。Strickland 等结合了 LLNA、DPRA、h-CLAT 和 ARE-Nrf2 荧光素酶检测法建立一种整体评估策略,利用计算机 QSAR Toolbox 分析影响皮肤渗透力的 6 种相关理化性质参数,建立 54 种不同的 QSAR Toolbox 计算机模型。

经过 20 多年的不断研究和探索,致敏免疫反应分子研究的逐渐清晰,为体外构建可靠的化学物致敏性评价体系奠定了理论基础,随着欧盟相关法规禁止使用动物实验进行化妆品安全性评价的推进,致敏体外替代实验的研究进程也在不断加快,更多的经过欧洲替代方法验证中心(ECVAM)确认的方法正在得到认可,替代实验的研究具有广阔的前景,我国在替代实验研究方面刚刚起步,应加快替代实验在国内实验室的普及和开展,推动替代实验的不断发展。

参考文献:

- [1] 彭双清,郝卫东,伍一军.毒理学替代法[M].北京:军事医学科学出版社,2009:63-84.
- [2] OECD. OECD guideline for the testing of chemicals, skin sensitization [S]. Paris: OECD, 1992. http://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-406-skin-sensitisation_9789264070660-en.
- [3] Zuang V, Barroso J, Bremer S, et al. ECVAM technical report on the status of alternative methods for cosmetics testing (2008 - 2009) [R]. European Union, 2010. http://staging-ecvam.jrc.it/publication/JRC58991_2010_05_30-ecvam%20technical%20report%202008-2009%20final%20_3.doc [1]. pdf.
- [4] OECD. OECD guideline for the testing of chemicals, skin sensitization: local lymph node assay [S]. Paris: OECD, 2010. http://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-429-skin-sensitisation_9789264071100-en.
- [5] 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,2010:227-250.

- [6] Kimber I, Dearman RJ, Basketter DA, et al. The local lymph node assay: past, present and future [J]. *Contact Dermatitis*, 2002, 47(6): 315–28.
- [7] 刘珍,刘俊平,万旭英,等. 化妆品安全性评价中小鼠局部淋巴结试验方法的改进 [J]. *卫生研究*, 2009, 38(5): 585–589.
- [8] Gerberick FG, Cruse LW, Ryan CA, et al. Use of a B cell marker (B220) to discriminate between allergens and irritants in the local lymph node assay [J]. *Toxicol Sci*, 2002, 68: 420–428.
- [9] Lee JK, Park SH, Byun JA, et al. Evaluation of lymphocyte subpopulations in draining lymph node cells following allergen and irritant [J]. *Environ Toxicol Pharm*, 2004 (17): 95–102.
- [10] Ehling G, Hecht M, Heusener A, et al. An European inter-laboratory validation of alternative endpoints of the murine local lymph node assay: First round [J]. *Toxicol*, 2005 (212): 60–68.
- [11] OECD. OECD guideline for the testing of chemicals, skin sensitization; local lymph node assay: DA [S]. Paris: OECD, 2010. <http://iccvam.niehs.nih.gov/SuppDocs/FedDocs/OECD/OECD-TG442A.pdf>.
- [12] OECD. OECD guideline for the testing of chemicals, skin sensitisation; local lymph node assay: BrdU-ELISA [S]. Paris: OECD, 2010. <http://iccvam.niehs.nih.gov/SuppDocs/FedDocs/OECD/OECD-TG442B.pdf>.
- [13] Ulker OC, Ates I, Atak A, et al. Evaluation of non-radioactive endpoints of ex vivo local lymph node assay-BrdU to investigate select contact sensitizers [J]. *J Immunotoxicol*, 2013, 10(1): 1–8.
- [14] 阳晓燕,赵康峰,孔建,等. 局部淋巴结改良法在化妆品皮肤刺激性和致敏性检测中的应用 [J]. *环境与健康杂志*, 2013, 30(4): 312–316.
- [15] Yamashita K, Shinoda S, Hagiwara S, et al. Development of LLNA: DAE: a new local lymph node assay that includes the elicitation phase, discriminates borderline-positive chemicals, and is useful for cross-sensitization testing [J]. *J Toxicol Sci*, 2014, 39(1): 147–161.
- [16] Yamashita K, Shinoda S, Hagiwara S, et al. Further development of LLNA: DAE method as stand-alone skin-sensitization testing method and applied for evaluation of relative skin-sensitizing potency between chemicals [J]. *J Sci*, 2015, 40(2): 137–150.
- [17] Kim DE, Yang H, Jang WH, et al. Predictive capacity of a non-radioisotopic local lymph node assay using flow cytometry, LLNA: BrdU-FCM: Comparison of a cutoff approach and inferential statistics [J]. *J Pharmacol Toxicol Methods*, 2016, 78: 76–84.
- [18] Zhu X, Cole SH, Kawabata TT, et al. Characterization of the draining lymph node response in the mouse drug allergy model: A model for drug hypersensitivity reactions [J]. *J Immunotoxicol*, 2015, 12(4): 376–384.
- [19] Jung KM, Jang WH, Lee YK, et al. B cell increases and ex vivo IL-2 production as secondary endpoints for the detection of sensitizers in non-radioisotopic local lymph node assay using flow cytometry [J]. *Toxicol Lett*, 2012, 209(3): 255–263.
- [20] ICCVAM. The murine local lymph node assay: A test method for assessing the allergic contact dermatitis potential of chemicals/compounds: The results of an Independent Peer Review Evaluation Coordinated by the ICCVAM and the NICEATM [S]. 2013. https://ntp.niehs.nih.gov/iccvam/docs/immunotox_docs/llna/llnarep.pdf
- [21] OECD. OECD guideline for the testing of chemicals, In: *Chemico Skin Sensitisation Direct Peptide Reactivity Assay (DPRA)* [S]. Paris: OECD, 2010. <http://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-442c-in-chemico-skin-sensitisation-9789264229709-en>.
- [22] Gerberick GF, Vassallo JD, Bailey RE, et al. Development of a peptide reactivity assay for screening contact allergens [J]. *Toxicol Sci*, 2004, 81(2): 332–343.
- [23] Gerberick GF, Vassallo JD, Foertsch LM, et al. Quantification of chemical peptide reactivity for screening contact allergens: A classification tree model approach [J]. *Toxicol Sci*, 2007, 97(2): 417–427.
- [24] Gerberick GF, Troutman JA, Foertsch LM, et al. Investigation of peptide reactivity of pro-hapten skin sensitizers using a prooxidase-peroxide oxidation system [J]. *Toxicol Sci*, 2009, 112: 164–174.
- [25] EURL ECVAM. Direct peptide reactivity assay (DPRA) validation study report [S], 2012. <https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/eurl-ecvam-recommendations/EURL-ECVAM-REC-DPRA-DRAFT-ver02August2013.pdf/view>.
- [26] Boislève F, Kerdine-Römer S, Pallardy M. Implication of the MAPK pathways in the maturation of human dendritic cells induced by nickel and TNF-alpha [J]. *Toxicol*, 2005, 206(2): 233–244.
- [27] Ryan CA, Kimber I, Basketter DA, et al. Dendritic cells and skin sensitization: Biological roles and uses in hazard identification [J]. *Toxicol Appl Pharm*, 2007, (221): 384–394.
- [28] Jung YS, Kato R, Tsuchiya T. Biodegradable polymers Induce CD54 on THP-1 Cells in skin sensitization test [J]. *Int J Biomater*, 2011; 424571.
- [29] Peiffer JL, Leon F, Tissier MH. Comparison of MUTZ-3, THP-1 and U-937 cell lines as in vitro predictive models for contact sensitization [J]. *Toxicol Lett*, 2007, 172: 89–90
- [30] Ashikaga T, Yoshida Y, Hirota M, et al. Development of an in vitro skin sensitization test using human cell lines; the human Cell Line Activation Test (h-CLAT). I. Optimization of the h-CLAT protocol [J]. *Toxicol in Vitro*, 2006, 20(5): 767–773.
- [31] EURL ECVAM, Recommendation on the human Cell Line Activation Test (h-CLAT) for skin sensitisation testing [S]. 2015. <https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/eurl-ecvam-recommendations/eurl-ecvam-recommendation-on-the-human-cell-line-activation-test-h-clat-for-skin-sensitisation-testing>.

- [32] OECD. OECD Guideline for the testing of chemicals draft proposal for a new test guideline, In vitro skin sensitization; human cell line activation test (h-CLAT) [S]. Paris: OECD, 2015. [https://www.oecd.org/env/ehs/testing/151216-Draft-h-CLAT-IG-After-Expert-Meeting-\(clean\)-Final.pdf](https://www.oecd.org/env/ehs/testing/151216-Draft-h-CLAT-IG-After-Expert-Meeting-(clean)-Final.pdf)
- [33] Ashikaga T, Sakaguchi H, Sono S, et al. A comparative evaluation of in vitro skin sensitisation tests: the human cell-line activation test (h-CLAT) versus the local lymph node assay (LLNA) [J]. *Altern Lab Anim*, 2010, 38(4): 275 - 284.
- [34] Parise CB, S4-Rocha VM, Moraes JZ. Skin sensitizer identification by IL-8 secretion and CD86 expression on THP-1 cells [J]. *Toxicol in Vitro*, 2015, 30(1 Pt B): 318 - 324.
- [35] 董渠龙, 王华, 侯海燕, 等. Nrf2-ARE 信号通路功能的研究进展 [J]. *国际妇产科学杂志*, 2015, 42(4): 425 - 428.
- [36] EURL-ECVAM. Recommendation on the KeratinoSens™ assay for skin sensitization testing [S]. 2014. http://ihcp.jrc.ec.europa.eu/our_labs/eurl-ecvam/eurl-ecvam-recommendations/recommendation-keratinsens-skin-sensitisation.
- [37] OECD. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, In Vitro Skin Sensitisation: ARE-Nrf2 Luciferase Test Method [S]. Paris: OECD, 2015. <http://www.oecd.org/env/test-no-442d-in-vitro-skin-sensitisation-9789264229822-en.htm>.
- [38] McKim JM Jr, Keller DJ 3rd, Gorski JR. An in vitro method for detecting chemical sensitization using human reconstructed skin models and its applicability to cosmetic, pharmaceutical, and medical device safety testing [J]. *Cutan Ocul Toxicol*, 2012, 31(4): 292 - 305.
- [39] 张广静, 卓金士, 金岩, 等. 人的原代上皮角质形成细胞和永生化的上皮角质形成细胞 HaCaT 的增殖能力的比较 [J]. *现代生物医学进展*, 2011, 11(1): 68 - 70.
- [40] Ramadan Q, Ting FC. In vitro micro-physiological immune-competent model of the human skin [J]. *Lab Chip*, 2016, 16(10): 1899 - 1908.
- [41] 曹玉萍. 体外化学物质致敏性检测模型和组织工程皮肤真菌感染模型的构建 [D]. 北京协和医院博士论文. 2011, 5.
- [42] Gould JC, Taylor S. Hazard identification of strong dermal sensitizers [J]. *Toxicol Mech Methods*, 2011, 21(2): 86 - 92.
- [43] Urbisch D, Honarvar N, Kolle SN, et al. Peptide reactivity associated with skin sensitization: The QSAR Toolbox and TIMES compared to the DPRA [J]. *Toxicol in Vitro*, 2016, 14(34): 194 - 203.
- [44] Dimitrov S, Detroyer A, Piroird C, et al. Accounting for data variability, a key factor in in vivo/in vitro relationships: application to the skin sensitization potency (in vivo LLNA versus inDPRA) example [J]. *J Appl Toxicol*, 2016, [Epub ahead of print].
- [45] 程树军, 徐崇辉, 潘芳, 等. 欧洲化学品新法规下危险评价的动物试验及其替代方法 [J]. *中国卫生检验杂志*, 2008, 18(12): 2846 - 2848. [46] OECD. OECD Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment [S]. OECD Paris, 2004, 34: 1267.
- [47] Urbisch D, Becker M, Honarvar N, et al. Assessment of pre- and pro-haptens using nonanimal test methods for skin sensitization [J]. *Chem Res Toxicol*, 2016, 29(5): 901 - 913

[修回日期]2016-06-14

(上接第 69 页)

- [6] Mutaf M. Venous changes in expanded flap: a microangiographical and histological study in rabbit [J]. *Ann Plast Surg*, 1996, 37(1): 75 - 83.
- [7] Van der wey LP, Polder TW, Hoogbergen MM. A model for monitoring nerve blood flow during expansion by laser Doppler flowmetry in the rabbit [J]. *J Neurol Sci*, 1993, 117(1-2): 79 - 82.
- [8] Maitz PK, Pribaz JJ, Herqueter CA. Impact of tissue expansion on flap prefabrication: an experimental study in rabbits [J]. *Micosurgery*, 1996, 17(1): 35 - 40.
- [9] Ercocen AR, Yitmaz S, Can Z. The effects of tissue expansion on skin lymph flow and lymphatics: an experimental study in rabbits [J]. *Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg*. 1998, 32(4): 353 - 358.
- [10] Sasaki GH, Pang CY. Pathophysiology of skin flaps raised on expanded pig skin [J]. *Plast Reconstr Surg*, 1984, 74(1): 59 - 67.
- [11] Timmenga EJ, Shoorl R, Bos JD. An improved model for tissue expansion and flap research in the rabbit [J]. *Br J Plast Surg*, 1989, 42(3): 301 - 305.
- [12] 曹春艳, 薛斌. 兔皮肤和肉膜之间放置扩张器的研究 [J]. *中华实验外科杂志*, 2013, 30(2): 404.
- [13] 赵作钧, 于丽, 赵丽, 等. 改进的组织扩张术兔模型的建立 [J]. *中华实验外科杂志*, 2005, 22(9): 1147.
- [14] Pasyk KA, Austad ED, McClatchey KD. Electron microscopic evaluation of guinea pig skin and soft tissues "expanded" with a self-inflating silicone implant [J]. *Plastic Reconstr Surg*, 1982, 70: 37 - 45.

[修回日期]2016-05-11