

基于 BioOcular™ 角膜上皮模型 EIT 法对眼用制剂包装材料眼刺激性的再研究*

谢珍¹, 张劲松¹, 沈琴², 桑晶¹, 刘璐¹, 匡荣¹, 李杨^{1**}

(1. 浙江省食品药品检验研究院, 杭州 310052;

2. 绍兴市现代医药公共服务中心, 绍兴 312073)

摘要 目的:探讨用 BioOcular™ 角膜上皮模型 EIT 法评价眼用制剂包装材料眼刺激性的可行性。方法:在眼用制剂包装材料的浸提液中加入不同浓度的阳性物质,同时进行 BioOcular™ 角膜上皮模型 EIT 试验和 Draize 试验,比较两种方法所得结果的一致性。结果:与 Draize 法比较,BioOcular™ 角膜上皮模型 EIT 法对含不同浓度阳性物质浸提液的眼刺激性分级与体内试验的一致程度为 100%。结论:BioOcular™ 角膜上皮模型 EIT 法有潜力作为眼用制剂包装材料眼刺激性试验的替代方法。

关键词: Bio Ocular™; 眼刺激; Draize 试验; 包装材料

中图分类号: R 921.2 文献标识码: A 文章编号: 1009-3656(2019)-6-0000-0

doi: 10.19778/j.chp.2019.06.00?

Re-evaluation on eye irritation of containers for the ophthalmic preparation with Bio Ocular™ corneal epithelium model EIT Method*

XIE Zhen¹, ZHANG Jinsong¹, SHEN Qin², SANG Jing¹, LIU Lu¹,
KUANG Rong¹, LI Yang^{1**}

(1. Zhejiang Institute for Food and Drug Control, Hangzhou 310052, China;

2. Shaoxing Modern Medicine Public Service Center, Shaoxing 312073, China)

Abstract Objective: To explore the possibility to evaluate eye irritation of containers for the ophthalmic preparation with BioOcular™ corneal epithelial model EIT method. **Methods:** The different concentrations of positive control substance were added into the extracts of containers for the ophthalmic preparation, then they were tested by BioOcular™ corneal epithelial model EIT method and Draize method. The consistency of the results obtained with two methods was compared. **Results:** Compared with Draize test, the consistency of eye irritation classification of the extracts with different positive control substance concentration between BioOcular™ corneal epithelial model EIT method and in vivo test was 100%. **Conclusion:** BioOcular™ corneal epithelial model EIT method has the potential to be an alternative method for eye irritation evaluation of containers for the ophthalmic preparation.

* 基金项目:浙江省药品接触材料质量控制研究重点实验室(2014E10006)

第一作者简介:谢珍,硕士,主管药师,研究方向:药理毒理学。Tel:0571-86457970, Email:cheerxie@163.com

** 通讯作者简介:李杨,主任药师,研究方向:药理毒理学。Tel:13906529056 E-mail:liyong@zjyj.org.cn

Key words: BioOcular™; eye irritation; Draize test; containers for ophthalmic preparation

眼刺激试验是对材料在试验条件下产生眼刺激反应的潜在性做出评价,是安全性评价的重要项目。在国家药包材标准 2015 年版中,“YBB00072002-2015 聚丙烯药用滴眼剂瓶”和“YBB00062002-2015 低密度聚乙烯药用滴眼剂瓶”2 个品种将眼刺激试验作为重要的生物性能评价指标。许多研究显示,Draize 试验是检测眼刺激性的传统试验,存在较多缺点,评分系统主观性强、实验室间差异大及动物外推至人的种属差异,以及动物福利的问题。根据实验室多年的检测经验,聚乙烯、聚丙烯、聚酯等眼用制剂包装材料,属于低毒性或无刺激性高分子化合物,眼刺激性很低,有必要寻找合适的体外测试方法。本研究利用 BioOcular™ 角膜上皮模型 EIT 法,一种体外测试的新方法,试图取代 Draize 试验。在眼用制剂包装材料的浸提液中加入不同浓度的阳性物质,依据《医疗器械生物学评价标准》中眼刺激试验的方法判断其是否为眼刺激物,比较体内外所得结果的一致性,探讨 BioOcular™ 角膜上皮模型 EIT 法替代 Draize 试验的可行性。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

System DE-90 型灭菌器(德国 System GmbH);手持裂隙灯显微镜(苏州康捷医疗股份有限公司);HERAcell 150i 型二氧化碳培养箱(Thermo Scientific 公司);MILLI-Q A10 纯水仪(密理博);Spectra-Max190 型紫外-可见光连续光谱酶标仪(Molecular Devices Corporation 公司);4625-1CECN 型微孔板振荡器(Thermo SCIENTIFIC)。人重组眼角膜上皮模型 BioOcular™ (陕西博溪公司);培养液 OcuRecovery (陕西博溪公司);乙酸甲酯(Sigma,批号:BCBR1040V);3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5-二苯基四氮唑溴盐(MTT, Aladdin,批号:L1402131);异丙醇(国药集团化学试剂有限公司,批号:20160108);磷酸盐缓冲液(DPBS,不含 Ca^{2+} 、 Mg^{2+})(GIBCO,批号:1896964);氯化钠注射液(浙江国镜药业有限公司,批号:C18040302);荧光素钠(国药集团化学试剂有限公司,批号:20091020),临用时用氯化钠注射液配成 2% 溶液。

1.2 测试物质

滴眼剂瓶共 3 批,聚丙烯(PP)药用滴眼剂瓶(慈溪市观城塑料包装容器厂)、低密度聚乙烯

(PE)药用滴眼剂瓶(浙江华诺医药包装有限公司)、聚酯(PET)药用滴眼剂瓶(抚州贝尔药品包装有限公司)。选择十二烷基苯磺酸(SDS, Sigma,批号:SLBJ7382V)作为阳性物质。

1.3 动物

家兔(新西兰),普通级,♂ ♀ 皆用,体质量:2~3 kg,购自桐乡市银海牧业专业合作社,实验动物生产许可证号:SCXK(浙)2018-0002,实验动物使用许可证号:SYXK(浙)2016-0009。

1.4 样品处理

取样品内表面积 120 cm^2 ,剪成长度适宜,宽 0.3 cm 的小块,用注射用水荡洗两次,每次 50 mL,低温烘干。移至玻璃容器内,加入氯化钠注射液 20 mL,密封后,置高压蒸汽灭菌器内,在 $110 \text{ }^\circ\text{C}$ 保持 30 min 后,放冷至室温,作供试液。以同批氯化钠注射液作为空白溶液。

1.5 实验液的配制

1.5.1 氯化钠注射液 + 不同浓度 SDS

氯化钠注射液中加入 SDS,配制成含 SDS 0.1%、1%、3%、5%、10% 的溶液,同时进行 Draize 试验和 BioOcular™ 角膜上皮模型 EIT 试验。

1.5.2 滴眼剂瓶浸提液 + 不同浓度 SDS

取浸提液作为原液,再分别加入 SDS,配制成含 SDS 0.1%、1%、3%、5% 的溶液,同时进行 Draize 试验和 BioOcular™ 角膜上皮模型 EIT 试验。

1.6 BioOcular™ 角膜上皮模型 EIT 法

取出培养小室,肉眼检查,吸去外部杂物,棉签吸干组织表面水分。6 孔板中每孔加入培养液 0.9 mL,将组织放入,不可产生气泡。标准培养条件[$(37 \pm 1) \text{ }^\circ\text{C}$, $(5 \pm 1)\% \text{ CO}_2$, 95% RH]培养 $(60 \pm 5) \text{ min}$ 。更换培养液继续培养 $(24 \pm 3) \text{ h}$ 。每个组织表面加 $20 \text{ } \mu\text{L}$ DPBS 预处理 $(15 \pm 2) \text{ min}$,模拟人眼潮湿状态。在组织表面滴加受试物或对照物 $42 \text{ } \mu\text{L}$,阴性对照(NC)为超纯水,阳性对照(PC)为乙酸甲酯,然后轻摇小室,促进液体受试物在组织表面的铺展,室温培养 $(30 \pm 1) \text{ min}$,DPBS 清洗 10 次后,吸干里外水分,标准培养条件下,新鲜培养基培养组织 $(120 \pm 5) \text{ min}$ 。吸干培养小室底部的液体,将组织转移至加有 $300 \text{ } \mu\text{L}$ 的 $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ MTT 溶液的 24 孔板中,标准培养条件孵育 $3 \text{ h} \pm 5 \text{ min}$ 。转移至新的 24 孔板中,在每个组织小室中加入 2mL 异丙醇,封口膜封闭,溶解甲瓩。吸取 $200 \text{ } \mu\text{L}$ 的甲瓩

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。结果判定:活性 = (样品 OD 值-溶剂空白 OD 值)/(空白对照 OD 值-溶剂空白 OD 值) × 100%。活性 < 60% 的被认为是刺激物(UN GHS 分类 2 或分类 1),活性 > 60% 的被认为是无刺激物(未分类/UN GHS 不分类)。

1.7 Draize 试验

因在国家药包材标准 2015 年版中,对上述 2 个品种的眼刺激反应即阳性反应没有进行明确的定义,在本文中参照《医疗器械生物学评价标准》^[1]中的眼损伤记分系统,对观察到的反应记分并记录。实验前 24 h 内检查每只家兔的双眼是否有异常现象,如发现异常应淘汰该兔。检眼时可用 2% 荧光素钠及裂隙灯检查角膜损伤。每个样品取未做过眼刺激试验和没有眼病的健康家兔 3 只,将 0.1 mL 的实验液滴入动物 1 只眼的结膜囊内,闭眼约 1 s,每只动物的对侧眼作为对照滴入空白溶液。滴注后约 1、24、48 和 72h 检查每只动物的双眼,如有持续性

损伤存在,应延长观察时间,以确定损伤的进展性和可逆性,但延期最多为 21d。对有严重损伤的动物延期观察则没有意义。如有 1 只以上动物试验眼在任何观察阶段呈阳性反应(表 1 中打“者”),即认为该材料为眼刺激物。仅 1 只动物出现严重反应已足以证实该材料为眼刺激物。

2 结果

2.1 不同浓度 SDS 溶液(溶剂:氯化钠注射液)对 BioOcular™ 角膜上皮模型的刺激性

SDS 浓度为 0.01%、0.1%、1%、3%、5%、10% 溶液的 BioOcular™ 角膜上皮模型 EIT 试验结果见表 1。SDS 的浓度与角膜上皮模型的活性具有相当的关联性,SDS 浓度越高,角膜上皮模型的活性越低。同时,将角膜上皮模型 EIT 试验所得的刺激性结果与 Draize 试验相比较,结果为 SDS 浓度为 0.01%、0.1%、1% 的溶液均为无刺激物,SDS 浓度为 3%、5%、10% 的溶液均为刺激物,一致性 100%。

表 1 两种方法对不同浓度 SDS 的分级结果

Tab. 1 The classification results of SDS solutions of different concentrations with BioOcular™ EIT method and Draize test

受试物 (test materials)	Bio Ocular™ 角膜上皮模型 EIT 试验 (BioOcular™ EIT test)		Draize 试验 (Draize test)	
	角膜上皮模型活性比率 (ratio of corneal epithelial tissue model activity) / %	刺激性分类 (irritation classification) (I/NI)	刺激性分类 (irritation classification) (I/NI)	刺激性分类 (irritation classification) (I/NI)
0.01% SDS	102.69 ± 1.63	NI	NI	NI
0.1% SDS	98.78 ± 1.38	NI	NI	NI
1% SDS	68.47 ± 1.05	NI	NI	NI
3% SDS	27.47 ± 0.18	I	I	I
5% SDS	11.99 ± 0.24	I	I	I
10% SDS	2.27 ± 0.09	I	I	I
NC	100.00 ± 0.22	NI	/	/
PC	21.07 ± 0.03	I	/	/

2.2 不同浓度 SDS 溶液(溶剂:滴眼剂瓶浸提液)两种试验方法结果的比较

对含 SDS 0.1%、1%、3%、5% 的溶液,同时进行 Draize 试验和 BioOcular™ 角膜上皮模型 EIT 试验,结果见表 2。结果为 SDS 浓度为 0.1%、1% 的溶液均为无刺激物,SDS 浓度为 3%、5% 的溶液均为刺激物,一致性 100%。

3 讨论

目前,替代方法用于眼刺激性的研究主要集中在化妆品、化妆品原料及农药检测方面,药品包装材料的相关报道却很少。自 2013 年 3 月起,欧盟委员

会禁止使用动物进行化妆品原料的毒理学安全性评价,逐步不允许成员国从外国进口和销售进行过动物试验的化妆品。在药品包装材料的生物安全性评价领域减少动物的使用,甚至完全替代动物试验也将是一种趋势。因此,开发和研究适用于药品包装材料生物安全性评价的体外替代方法意义重大。

由于目前没有合适的眼刺激性包装材料作为阳性对照,本研究选择 SDS 作为阳性物质,因为 SDS 是眼刺激性分级已知的化学物质,并且容易获得,无其它不良作用^[2]。在不同材料的滴眼剂瓶浸提液中加入不同浓度的 SDS,采用 BioOcular™ 角膜上皮模型和 Draize 试验对其进行眼刺激性评价,并比较

两种方法所得结果的一致性,结果显示 SDS 的浓度与角膜上皮模型的活性具有相当的关联性,两种试验方法所得结果的一致性为 100%,更为关键的是,两种方法在判定受试物是否为刺激物的剂量也是一致的,在本试验中,均为浓度是 3% 的 SDS 溶液,表明体外试验与体内试验相比一致性较好。相比较于笔者所在研究组前期的研究结果^[3],依据

BioOcular™角膜上皮模型 EIT 法 SOP 和国家药包材标准 2015 年版中滴眼剂瓶眼刺激试验,采用 BioOcular™角膜上皮模型 EIT 法和 Draize 试验对 6 批结果均为无刺激性的滴眼剂瓶浸提液进行检测。本文从增加阳性物质(SDS)的角度再次论证 BioOcular™角膜上皮模型 EIT 法作为眼用制剂包装材料眼刺激性试验替代方法的可行性。

表 2 两种方法对含不同浓度 SDS 浸提液的分级结果

Tab. 2 The classification results of the extracts added SDS solutions of different concentrations with Bio Ocular™ EIT method and Draizetest

受试物 (test materials)	Bio Ocular™角膜上皮模型 EIT 试验(BioOcular™EIT test)		Draize 试验(Draize test)
	角膜上皮模型活性比率 (ratio of corneal epithelial tissue modelsactivity)/%	刺激性分类 (irritation classification) (L/NI)	刺激性分类 (irritation classification) (L/NI)
	0.1% SDS + PP 浸提液(0.1% SDS + maceration extract of PP)	109.70 ± 1.88	NI
1% SDS + PP 浸提液(1% SDS + extract of PP)	67.75 ± 0.99	NI	NI
3% SDS + PP 浸提液(3% SDS + extract of PP)	38.02 ± 0.49	I	I
5% SDS + PP 浸提液(5% SDS + extract of PP)	13.57 ± 0.08	I	I
0.1% SDS + PE 浸提液(0.1% SDS + extract of PE)	96.08 ± 0.67	NI	NI
1% SDS + PE 浸提液(1% SDS + extract of PE)	67.11 ± 0.34	NI	NI
3% SDS + PE 浸提液(3% SDS + extract of PE)	34.74 ± 0.55	I	I
5% SDS + PE 浸提液(5% SDS + extract of PE)	16.70 ± 0.19	I	I
0.1% SDS + PET 浸提液(0.1% SDS + extract of PET)	92.81 ± 0.16	NI	NI
1% SDS + PET 浸提液(1% SDS + extract of PET)	66.17 ± 0.29	NI	NI
3% SDS + PET 浸提液(3% SDS + extract of PET)	29.07 ± 0.51	I	I
5% SDS + PET 浸提液(5% SDS + extract of PET)	17.60 ± 0.14	I	I
NC	100.00 ± 2.69	NI	/
PC	28.92 ± 0.11	I	/

以往的动物试验研究表明,受试物的眼刺激性与角膜的受损深度或急性细胞凋亡直接相关^[4],而受试物自身的细胞毒性是造成角膜损伤的最主要原因^[5],因此可应用细胞毒性试验来评估受试物潜在的眼刺激性。BioOcular™角膜上皮模型是以人角膜上皮细胞作为种子细胞,经体外重组,通过精细调节培养液成分,使细胞在体外分化形成的活细胞组织,可与受试物直接接触培养,最后通过 MTT 法检测经受试物暴露后的组织存活比例来判断其是否为刺激物^[3],即相当于评价受试物对细胞组织的细胞毒性,将刺激性的程度量化,结果评定更加客观,更体现了生物安全性评价中要求的 3R 原则^[6]。因此,认为 BioOcular™角膜上皮模型 EIT 法是评价眼用制剂包装材料眼刺激性的一种替代检测方法。

参考文献

- [1] GB/T 16886.10-2005/ISO 10993-10:2002 医疗器械生物学评价第 10 部分:刺激与迟发型超敏反应试验[S]. 2002
GB/T 16886.10-2005/ISO 10993-10:2002 Biological evaluation of medical devices-Part 10:Tests for irritation and delayed-type hypersensitivity[S]. 2002
- [2] 李向辉,邱璐,邱知红. 兔角膜上皮细胞短期暴露实验替代兔眼刺激实验的可行性研究[J]. 药学服务与研究, 2009, 9(3):182
LI XH, QIU L, QIU ZH. Study on short time exposure test of rabbit corneal epithelial cells; an alternative to rabbit eye irritation test [J]. Pharm Care Res, 2009, 9(3):182
- [3] 谢珍,张劲松,沈琴,等. Bio Ocular™角膜上皮模型 EIT 法评价眼用制剂包装材料的眼刺激性研究[J]. 中国药品标准, 2018, 19(3):187
XIE Z, ZHANG JS, SHEN Q, et al. Eye irritation evaluation of containers for the ophthalmic preparation by Bio Ocular™ corneal epithelial model EIT method [J]. Drug Stand China, 2018, 19

- (3):187
- [4] PASTOR-CLERIGUES A, SERRANO A, MILARA J, *et al.* Evaluation of the Ocular Tolerance of Three Tacrolimus Topical Pharmaceutical Preparations by Bovine Corneal Opacity and Permeability Test [J]. *Current Eye Res*, 2016, 41(7):890
- [5] 田胜慧, 柯军, 林美琼, 颜林. 浅谈适用于医疗器械眼刺激试验的体外替代方法[J]. *中国医疗器械信息*, 2015, 21(6):37
TIAN SH, KE J, LIN MQ, *et al.* Introduction of the alternative methods available to Draize eye irritancy test of medical devices [J]. *China Med Device Inf*, 2015, 21(6):37
- [6] 桑晶, 张劲松, 徐玲燕, 张文婷, 匡荣, 李杨. 三维重组眼角膜上皮模型法与兔眼刺激法对洗发水眼刺激性的比较与评价[J]. *中国现代应用药学*, 2017, 34(5):662
SANG J, ZHANG JS, XU LY, *et al.* Evaluation of eye irritation potential of different shampoos using Draize assay and human cornea-like epithelial tissue model [J]. *Chin J Mod Appl Pharm*, 2017, 34(5):662

(收稿日期:2019-01-23)