

【综述】

三维重组皮肤模型在体外替代遗传毒性评价中的应用

王曼虹^{1,2}, 黄芝瑛², 汪 祺^{1*}, 文海若^{1*}

1. 中国食品药品检定研究院, 北京 100050

2. 中山大学药学院, 广东 广州 510006

摘要: 三维(3D)重组皮肤模型已证实在模拟体内代谢条件、给药浓度及反应靶器官毒性特点方面具有突出优势。近年来已有多家公司构建3D重组人工皮肤模型,且一些制药公司已将3D细胞模型应用于药物的早期毒性筛选。我国动物实验替代方法的研究仍处于起步阶段,利用3D重组皮肤模型进行体外安全性评价成为目前替代方法的研究热点之一。综述人3D重组皮肤模型在遗传毒性评价中体外微核试验和彗星试验的研究进展,并对该模型在外用药物体外替代遗传毒性评价中的应用前景进行探讨。

关键词: 三维(3D)重组皮肤模型;体外遗传毒性;微核试验;彗星试验

中图分类号: R965.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-6376(2020)12-2550-07

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2020.12.037

Application of three dimensions reconstructed human epidermis in evaluation of *in vitro* alternative genotoxicity

WANG Manhong^{1,2}, HUANG Zhiying², WANG Qi¹, WEN Hairuo¹

1. National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 100050, China

2. School of Pharmaceutical Sciences, Sun Yat-sen University, Guangdong Province, Guangzhou 510006, China

Abstract: The three-dimensional (3D) reconstructed human skin model has been proved to have promising advantages in simulating the metabolic conditions *in vivo*, the concentration of administration and the toxicity characteristics on the targeted organs. In recent years, the 3D reconstructed skin models have been developed by many companies, and some pharmaceutical companies have launched research on the application of 3D cell model in the early toxicity screening of drugs. However, the research on alternative methods of animal test in China is still in its infancy, and *in vitro* safety evaluation using 3D reconstructed epidermis has become one of the research hotspots. In this article, the research progress of 3D reconstructed human epidermis *in vitro* micronucleus test and comet assay in genotoxicity evaluation was reviewed, and its application prospect in *in vitro* alternative genotoxicity evaluation of drugs was discussed.

Key words: three-dimensions reconstructed human skin model; *in vitro* genotoxicity; micronucleus test; comet assay

遗传毒性是重要的毒理学终点,可对药物的致突变性及致癌性提供早期预测。随着国际社会对实验动物福利伦理和动物实验3R原则(reduction, replacement, refinement)日益重视,各国相继加入发展体外替代模型的行列。尽管人用药品注册技术要求国际协调会议(ICH)S2(R1)中提高了体内动

物实验在结果决策中的权重,在标准评价组合中体外实验仍占据重要位置。然而,体外试验系统与人体组织相比,在受试物靶组织作用浓度、代谢等方面存在较大差异。仅基于现有体外遗传毒性实验模型的评价结果的特异性和灵敏性受到了质疑。如Kirkland等^[1]报道肿瘤抑制蛋白p53的缺乏是各

收稿日期: 2020-07-08

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81503347,81503068);国家“十三五”重大新药创制专项(2018ZX09201017)

第一作者: 王曼虹(1995—),硕士研究生,研究方向为药理毒理。E-mail: wangmanhong2014@163.com

*通信作者: 文海若(1981—),研究员,研究方向为药理毒理。E-mail: wenhairuo@nifdc.org.cn

汪 祺(1982—),副研究员,研究方向为中药毒理。E-mail: sansan8251@sina.com

体外细胞遗传毒性实验产生假阳性结果的基础,而常用细胞中除人淋巴细胞外都不具有功能性p53,导致目前基于常用哺乳动物细胞(CHL、CHO、V79等)的体外细胞遗传实验的假阳性率较高。此外,一些在体外哺乳动物微核试验及染色体畸变实验中检测结果为阳性化学物质,在相同检测终点的体内实验中发现并不具有遗传毒性或致癌性;如,芳香胺类物质易于在体外研究中得到假阳性结果^[2],其原因与体外实验系统缺乏体内代谢补偿机制有关,具有氧化作用机制的化合物在体外评价体系中容易产生假阳性结果。Greenwood等^[3]提出细胞毒性是造成体外细胞致裂性试验假阳性结果的另一主要因素,且高浓度检测被认为是导致体外细胞遗传实验假阳性的重要来源。尽管ICH S2(R1)已经降低了体外细胞实验的最高浓度要求,但是这些体外细胞实验无法提供毒代动力学数据。与此同时,体内实验方法也存在一些短板。如体内遗传毒性实验通常以骨髓或外周血为检测对象,并对上述组织中的遗传毒性生物标志物的变化进行评估。放射影像剂、抗酸铝合剂、某些吸入用药、皮肤或其他局部用药在骨髓或外周血中的暴露量很低,在传统体内遗传毒性中很可能得到假阴性结果。以皮肤外用药物为例,其体内吸收和全身分布较少。如对苯二胺人体经皮吸收率仅为0.18%,试验应用的受试物浓度远高于实际应用的浓度,与人体没有很好的生物相关性,无法预测受试物靶器官的遗传毒性^[4]。当改变给药途径也无法提供足够的靶组织暴露时,或在暴露水平较高的组织无法取材进行遗传毒性评价的情况下,可考虑仅开展体外实验。目前的体外遗传毒性实验研究重点在于如何提高体外遗传毒性实验的准确性,并找到更加合适且有效的体外替代模型进行遗传毒性评价。

皮肤是阻挡化学物质的有效屏障且具有一定代谢活性。伴随替代毒理学的兴起和组织工程技术在毒理学中的大量应用,三维(3 dimensions, 3D)重组人工皮肤模型已成为体外毒性评价中的热点。3D重组皮肤模型使用人来源的皮肤组织构建,试验结果与人体毒性结果比较更具可比性和针对性,且符合动物伦理3R原则,试验周期短,日益受到企业与科研机构的关注。当前已有商品化的皮肤模型,如EpiDerm™等,已被用于体外微核试验及彗星试验。本文将综述人3D重组皮肤模型在遗传毒性评价中的研究进展,探讨其作为新型体外遗传毒性替代模型的发展状况及其在药物安全性评价领域的

应用前景。

1 3D重组人工皮肤模型

皮肤作为人类最大的器官,包含多种类型的细胞,这些细胞相互影响,协同作用,构成阻挡有害物质进入机体的第一道天然屏障。体外皮肤模型的研发的初衷是解决临床患者大面积皮肤损伤与缺失修复的难题。首个表皮模型于20世纪70年代成功构建,自90年代开始应用于体外化妆品安全性评价^[5]。3D重组人工皮肤模型是将人健康皮肤细胞培养于特殊的插入式培养皿后而得到多层立体培养的皮肤组织模型,可从功能和结构上高度模拟人体皮肤,预计具有正常的DNA修复和细胞周期控制功能,与目前在标准体外遗传毒性试验中使用的体外哺乳动物细胞代谢酶相比,其代谢能力与人体代谢更为接近,在毒性评价中具有重要价值^[6]。与此同时,体外人工皮肤模型可以考察皮肤吸收与毒性效应之间的关联,可通过制备皮肤组织切片并对代谢产物进行分析,对受试物安全性提供更多指标的信息。

皮肤模型多由人初代细胞构成,经验证其在基因表达、组织结构、细胞活性、细胞因子分泌等方面与人体皮肤均达到高度一致^[7]。以SkinEthic™ 3D全厚皮模型为例,其与健康人面部皮肤有一定的组织相似性^[8]。然而,因当前3D重组皮肤模型尚不包含毛囊、汗腺、皮脂腺等皮肤附属结构,在组织结构和功能上存在缺陷,部分特异性标志物存在异常表达,且模型中的皮肤屏障功能低于真实皮肤,3D模型试验中的经皮吸收率通常高于真实人群使用情况,且商业化模型供应商有限、售价较高限制其推广应用^[9]。进一步研发与人体接近的、适合不同类产品评价需求的、稳定的、可长期重复给药的皮肤模型将是今后研发的重点。

在商品化模型中,EpiSkin™、ZEBET的EpiDerm™和Skin Ethic™分别于1998年、2000年和2006年通过实验室间联合验证证实其可根据OECD TG 431有效检出腐蚀性和非腐蚀性化合物,上述模型可作为皮肤腐蚀性检测的动物试验替代方法。欧洲替代方法验证中心(European Centre for the Validation of Alternative Methods, ECVAM)2007年宣布EpiSkin™可作为Draize皮肤刺激试验使用的替代模型。当前正在开展遗传毒性试验研究的皮肤模型分别为EpiDerm™和EpiSkin™,两者特性见表1,其中表皮模型主要用于微核试验,而全皮模型则更适用于灵敏度较高的彗星试验^[10]。且有研

表1 用于遗传毒性评价3D重组皮肤模型特性

Table 1 Characteristics of 3D reconstructed human epidermis for genotoxicity evaluation

名称	制造商	生产国	3D重组皮肤模型特性
EpiSkin™	欧莱雅	法国	以乳房整形术去除皮肤组织的表皮角质形成细胞为种子细胞,采用胶原介质培养而成的表皮重建模型
EpiSkin™	欧莱雅	中国	以中国成年人阴茎包皮组织的表皮角质形成细胞为种子细胞,采用胶原介质培养而成的表皮重建模型
EpiDerm™	MatTek	美国	以包皮组织的表皮角质形成细胞为种子细胞,采用无血清培养基培养而成的表皮重建模型
Phenion® FT	Henkel	德国	新生儿包皮原代角质细胞培养于胶原支架成纤维细胞,形成结缔组织作为多层上皮细胞层的基础,采用气液面培养

究报道,在EpiSkin™和EpiDerm™中有类似人皮肤的外源性代谢基因表达^[11-12],且芳香胺、对苯二胺和对氨基苯酚能通过N-乙酰化以类似于人皮肤的方式被代谢。

2 体外替代遗传毒性试验

体外替代遗传毒性试验已被证实可作为检出体内的基因毒性物质和啮齿类致癌物的手段之一。因涉及遗传毒性的机制的多样性,单一的体外遗传毒性试验结果并不可靠,欧盟消费者安全科学委员(SCCS)推荐使用一组体外遗传毒性试验来鉴别化合物的遗传毒性风险。然而由于高细胞毒性或继发性的遗传毒性作用等因素,现有的体外遗传毒性试验组合特异性较低,且有较高的假阳性率。对于膏药状的、性状黏稠的外用药物,3D皮肤模型比二维(2D)细胞模型在给药方法上可以更好地模拟实际情况。为解决高假阳性率的问题,下述3个项目亟待推动:优化出现假阳性的体外哺乳动物细胞的试验方法;选择更多相关细胞和更敏感的毒性试验方法;开发“3D皮肤模型”项目,验证结合微核和彗星分析的人类重建皮肤(reconstructed skin, RS)模型的应用^[13]。

2.1 微核试验

微核(micronucleus, MN)是一种独立于主核之外的核小体,存在于细胞质中,其形成与基因组的不稳定性和染色体的损伤有关。微核试验作为一种快速、简便、经济的基因毒性检测方法,已成为遗传毒性检测的常规检测手段。欧洲化妆品协会(European Cosmetic Toiletry and Perfumery Association, COLIPA)组织欧盟、美国及日本多家实验室开展基于EpiDerm™的国际实验室间联合验证,通过试验方法标准化、已知毒性受试物小范围验证(首先由美国宝洁公司、美国体外科学研究院及MatTek 3家实验室分别对丝裂霉素C和硫酸长春碱进行评价,之后在德国汉高公司和法国欧莱雅公司再次对试验结果的可重复性和可转移性进行

验证)和大量受试物实验室间联合验证逐步确认试验方法及其复现性^[14]。当前已完成29个受试物的大规模验证,结果发现EpiDerm™的特异性达到88.1%,灵敏性达62.5%,而一致性达到81%^[15]。Yuki等^[16]比较EpiDerm™和正常人表皮角化细胞对多种已知体内非遗传毒性及遗传毒性化合物的试验结果,发现受试物不经S₉作用即可得到接近体内的研究结果,与此同时EpiDerm™也可较好地排除因毒性引起的体外培养细胞假阳性结果。Hu等^[17]使用EpiDerm™对包括代谢激活的促突变剂和DNA交联剂等8种化合物开展验证并指出该模型可实现接近体内研究的暴露条件,有效对染色体损伤风险作出预测。人工合成的纳米颗粒与血清蛋白结合后其体内毒代动力学特征发生严重改变,因此Wills等^[18]使用3D皮肤模型EpiDerm™对人工合成纳米颗粒进行了在体外微核试验基础上的遗传毒性评估,有助于对体内-体外结果的差异进行解读。该课题组成功开发了3D“纳米-重组皮肤微核试验”的方法,研究结果提示3D体外皮肤模型可能在弥合纳米毒理学中体外和体内结果之间的差距中发挥重要作用。

近年来,EpiSkin™皮肤模型也陆续开展微核试验的验证工作,一项就17种化合物的胞质分裂阻断法微核试验研究发现其用于评估化合物遗传毒性的特异性、准确性及一致性分别达到60%~75%、83%~85%和76%~82%,且72 h长时间暴露于受试物的方式可有效提高遗传毒性物质的检出率^[19]。中国EpiSkin™皮肤模型微核试验方法已于我国完成初步验证^[20],结果显示该模型的稳定性和细胞增殖活力可满足试验需求,并可将阳性物质长春新碱、N-乙基-N-亚硝基脲、3-丁内酯、2-乙酰氨基苄(2-AAF)和阴性物质环己酮、2,4-二氯苯酚的遗传毒性进行归类,证明其具备一定预测能力。由于人表皮不仅具备屏障功能,同时也是具备代谢能力的器官,受试物必须通过皮肤酶的代谢才能表现出遗传

毒性,在上述6种物质初步验证的基础上,Chen等^[21]使用需要通过代谢激活才能显现出遗传毒性的物质2-AAF证明了EpiSkin™的代谢活性,提示未来研究中还需验证其他经代谢活化的遗传毒性物质。

2.2 彗星试验

3D皮肤彗星试验的原理是断裂后的DNA片段通过琼脂糖凝胶电泳进行迁移,从而形成完整的DNA“头部”及片段化的DNA“尾巴”,用结合了DNA的荧光剂染色后通过荧光显微镜对单个细胞进行分析,并将彗星尾巴中的DNA占比作为DNA损伤的量度。3D皮肤彗星试验能够同时检测可能引起基因突变的染色体损伤和DNA损伤,从而补充了仅检测染色体损伤的重组皮肤微核试验。且彗星试验因不依赖增殖细胞,能用于研究可进行单细胞分离的细胞培养或组织中的DNA损伤,更适合应用于皮肤组织。

目前3D皮肤彗星试验被应用于EpiDerm™和Phenion®两个重组全皮人皮肤模型中,特定组织的单个细胞分离试验及常规彗星试验已被转移至欧洲和美国的实验室,试验建立后,试验方案使用适当的细胞毒测定方法和DNA修复抑制剂阿非迪霉素提高该方法的敏感性。Reisinger等^[22]使用EpiDerm™陆续开展分阶段的体外彗星试验实验室间联合验证工作。在第1阶段和第2验证的工作中分别使用甲磺酸甲酯、4-硝基喹啉、乙酰基亚硝基脲、2,4-二氨基甲苯、硝基苯酚、环己酮等对模型进行验证,发现该模型的复现性较好。然而溶剂组背景值过高(高于30%)成为进一步大规模验证的瓶颈。

也有研究提示尚未发育完全的细胞模型要提前4 d运输,然后在进行测试的实验室中进一步培养,使用不发达的EPI-201可减少运输时长对皮肤模型质量的影响,从而降低背景值^[23]。Reus等^[23]基于3D皮肤模型微核试验的方法,在EpiDerm™皮肤模型上对彗星试验进行了优化,并通过3家实验室验证了在EpiDerm™皮肤模型上通过皮肤暴露途径对化合物进行彗星试验分析的可行性。Kaluzhny等^[24]使用MatTek高度分化的EpiDerm™皮肤模型开展了重组皮肤模型的微核和彗星试验,并成功验证了遗传毒性物质的作用。化妆品欧洲遗传毒性专项组(Cosmetics Europe Genotoxicity Task Force)和德国联邦教育与研究部正在使用全皮模型如EpiDerm FT或Phenion® FT研究使用其开展彗星试

验的重复性和预测效力^[23]。在Reisinger等^[22]进行的验证研究中,第1阶段中3个实验室均使用丝裂霉素C、氯化镉、N-乙基-N-硝基脲、7,12-二甲基苯并蒽、没食子酸丙酯、丁香酚、邻苯二甲酸二(2-乙基己基)酯、环己酮等8种化学品在Phenion®全层皮肤模型上进行验证,最终3D皮肤彗星测定法显示出较高的预测能力以及良好的实验室内和实验室间可重复性,4个实验室达到了100%的可预测性,第5个实验室达到了70%的可预测性。

3 在药物体外替代遗传毒性评价中的应用

基于3D重组皮肤模型的体外替代遗传毒性评价方法的开发始于2006年启动的国际验证工作,从最初在EpiDerm™上对遗传毒性阳性剂丝裂霉素C及硫酸长春碱完成了体外替代遗传毒性评价的可重复性及可转移性验证,到后来陆续进行对市售模型EpiDermFT™及PhenionFT®的验证。使用EpiDerm™皮肤模型对体外微核试验进行的多年验证工作已经完成;同时,使用3D重组皮肤模型对体外彗星试验的验证工作的前两个阶段也已完成,其数据表明3D皮肤体外彗星试验可作为Ames试验阳性结果的追踪试验。基于在东京举办的遗传毒性测试研讨会(IWGT)上提出的多年国际验证工作数据,3D重组皮肤模型的体外微核及彗星试验在实验室内和实验室间具有良好的可重复性,56种编码化学品的验证已经证明二者的组合试验可预测体内预期的遗传毒性,工作组认为现在已经充分验证了3D皮肤微核和彗星试验,可以朝着制定单独的OECD测试指南的方向发展^[25]。

在国际验证工作进行的同时,大量将3D重组皮肤模型应用于药物体外遗传毒性评价的研究也在同步展开,已有Will等^[18]将3D皮肤模型EpiDerm™的体外微核试验应用于人工合成纳米颗粒的遗传毒性评估;另有研究在Episkin LM™上通过微核试验对依托泊苷、顺铂及紫杉醇等17种药物进行体外遗传毒性评价^[26],从而进行对其体内遗传毒性的预测,证实了该皮肤模型能够识别不同致突变作用(如致断裂及诱发多倍体)以及需S⁹代谢激活的药物的遗传毒性。

4 药物光毒性和光遗传毒性领域的应用前景

人体皮肤吸收某些化合物后,该类化合物可经可透过玻璃和云层的长波紫外线(UVA,波长320~400 nm)和直接日照中的中波紫外线(UVB,波长290~320 nm)照射后激活,并对皮肤细胞及组织产生一定影响。这些影响严重时可表现为红斑、水

肿、色素沉着、皮疹、皮肤痛痒、视力障碍甚至皮肤肿瘤^[27]。当前国外新药申报时普遍参照ICH S10《药物的光安全性评价指导原则》开展相关研究,将光毒性评价纳入药物毒性评价项目中是国内今后的发展趋势。光毒性和光遗传毒性评价针对可被可见光活化的化学物质的潜在毒性和致癌性风险进行预测,是光安全性评价的核心组成部分。然而,由于当前体外遗传毒性评价体系的缺陷,体外光毒性和光遗传毒性评价结果假阳性过高且与体内研究结果缺乏相关性,基于传统细胞培养系统的光遗传毒性评价甚至不再作为常规光安全性评价的一部分。如,大量数据回顾结果显示,超过3/4的光遗传毒性评价结果呈阳性的化合物在光毒性测试3T3小鼠成纤维细胞摄取光毒性试验(3T3 mouse fibroblast neutral red uptake phototoxicity test, 3T3 NRU)的试验结果中呈阴性^[28]。

然而,因3D重组皮肤模型具有与人体皮肤组织相当的组织结构、细胞因子分泌及代谢能力,其毒性预测结果与体内研究关联度较高。如,使用EpiDerm™检测50种在3T3 NRU试验中获得阳性结果的化合物的光毒性,结果发现仅14%化合物再次呈阳性结果^[29],提示使用3D RS开展光毒性评价可有效降低3T3 NRU的假阳性结果,可作为体外光毒性评价的备选方案。Flamand等^[4]使用EpiSkin™研究氟喹诺酮类化合物洛美沙星的光遗传毒性,即模型涂抹洛美沙星后经紫外照射后再取皮肤组织开展彗星试验,验证只有洛美沙星涂抹与紫外照射同时存在时组织细胞的尾DNA百分率显著性升高,提示其存在光遗传毒性。该结果与人体皮肤试验结果一致^[30],提示模型具有较好的代谢功能。受到Flamand等的启发,康桦等^[31]在我国研发的人源重建皮肤模型EpiKutis上,选取盐酸氯丙嗪、盐酸异丙嗪、8-甲氧基补骨脂为已知的光毒性化学物,十二烷基硫酸钠为已知的光毒性阴性化学物,建立了国产人源重建皮肤模型的体外光毒性试验方法,为皮肤光毒性替代检测方法提供了新补充。

5 结语

3D重组皮肤模型是当前替代毒理学研究的热点模型之一,其已被证实模拟体内代谢条件、给药浓度及反应靶器官毒性特点方面具有突出优势。虽然目前3D重组皮肤模型的主要模型验证及毒性试验主要在化妆品领域进行,但由于其具有与人类皮肤高度类似的特点,可作为经皮给药类药物或需高浓度直接作用于组织表面类药物的遗传毒性给

药模型;且作为体外模型,其实验条件精确可控,使得毒性试验数据有较好的重复性,试验周期短,相对于动物模型和临床试验更为经济,也符合3R原则,同时也弥补了目前大部分体外试验与人体关联性不高且假阳性过高的问题。

因此,3D重组皮肤模型可能在今后成为毒理学检测的重要工具之一,在药物安全性评价领域(尤其是皮肤局部用药和存在光遗传毒性药物风险的评价方面)将有良好的前景。药物的遗传毒性风险应根据化学物质本身的性质、结构和功能类似物的信息、代谢物等的现有数据或预测结果,以证据权重(weight of evidence, WoE)的方式作出评估。基于3D皮肤模型的微核试验和彗星试验为骨髓和外周血暴露量较低的化合物的遗传毒性评价,提供了有价值的评价方法。对于局部涂抹类药物而言,如在标准遗传毒性试验组合中体外微核/染色体畸变试验中获得阳性结果,可考虑以3D皮肤微核/彗星试验作为后续试验选择。应用3D皮肤模型开展体外微核试验和彗星试验获得的数据与2D培养条件下获得的结果相比,假阳性率更低,准确性更高。COLIPA联合验证的结果证明了重组皮肤微核试验在实验室内部和实验室之间的可重复性,比重组皮肤彗星试验在遗传毒性的分析上更有优势。但彗星试验作为对微核试验的重要补充,后续需进一步攻克并优化其实验条件。在遗传毒性评价领域陆续将以体外评价方法(如体外微核试验和彗星试验)替代体内评价方法的大趋势下,如何相应地优化体外遗传毒性评价试验条件及策略、如果选用合适的对照品,研究3D模型的代谢酶与人体代谢体系的异同并验证其代谢能力、广泛开展联合验证确证该模型的可靠性,将是现阶段需着力攻克的重点。

参考文献

- [1] Kirkland D, Reeve L, Gatehouse D, et al. A core *in vitro* genotoxicity battery comprising the Ames test plus the *in vitro* micronucleus test is sufficient to detect rodent carcinogens and *in vivo* genotoxins [J]. *Mut Res Gen Toxicol Environ Mutagen*, 2011, 721(1): 27-73.
- [2] Ashby J, Tennant R W. Definitive relationships among chemical structure, carcinogenicity and mutagenicity for 301 chemicals tested by the U. S. NTP [J]. *Mutat Res*, 1991, 257(3): 229-306.
- [3] Greenwood S K, Hill R B, Sun J T, et al. Population doubling: A simple and more accurate estimation of cell growth suppression in the *in vitro* assay for chromosomal

- aberrations that reduces irrelevant positive results [J]. Environ Mol Mutag, 2004, 43(1): 36-44.
- [4] Flamand N, Marrot L, Belaidi J-P, et al. Development of genotoxicity test procedures with EpiSkin (R), a reconstructed human skin model: Towards new tools for in vitro risk assessment of dermally applied compounds? [J]. Mut Res Gen Toxicol Environ Mutag, 2006, 606(1/2): 39-51.
- [5] 安子扬. 皮肤模型的构建及在检测药物化妆品中的应用 [D]. 石家庄: 河北农业大学, 2013.
- [6] 张春晓, 杜镇建, 张兴民, 等. 3D人造皮肤模型在化妆品安全性、功效性评价中的应用 [J]. 中国化妆品, 2014, 2: 38-40.
- [7] Gordon S, Daneshian M, Bouwstra J, et al. Non-animal models of epithelial barriers (skin, intestine and lung) in research, industrial applications and regulatory toxicology [J]. Altex-Altern Animal Exper, 2015, 32(4): 327-378.
- [8] Zöllner N N, Kippenberger S, Thaçi D, et al. Evaluation of beneficial and adverse effects of glucocorticoids on a newly developed full-thickness skin model [J]. Toxicol Vitro Int J Pub Assoc Bibra, 2008, 22(3): 747-759.
- [9] Bernard F X, Pedretti N, Rosdy M, et al. Comparison of gene expression profiles in human keratinocyte monolayer cultures, reconstituted epidermis and normal human skin; transcriptional effects of retinoid treatments in reconstituted human epidermis [J]. Exp Dermatol, 2010, 11(1): 59-74.
- [10] 王晓娜, 王晓梅, 杨素珍. EpiSkin皮肤模型应用概述 [J]. 生物技术世界, 2015(4): 15-16.
- [11] Luu-The V, Duche D, Ferraris C, et al. Expression profiles of phases 1 and 2 metabolizing enzymes in human skin and the reconstructed skin models EpiSkin™ and full thickness model from EpiSkin™ [J]. J Steroid Biochem Mo Biol, 2009, 116(3/5): 178-186.
- [12] Hu T, Bailey R E, Morrall S W, et al. Dermal penetration and metabolism of p-aminophenol and p-phenylenediamine: application of the EpiDerm human reconstructed epidermis model [J]. Toxicol Lett, 2009, 188(2): 119-129.
- [13] Pfuhler S, Fautz R, Ouedraogo G, et al. The Cosmetics Europe strategy for animal-free genotoxicity testing: project status up-date [J]. Toxicol In Vitro, 2014, 28(1): 18-23.
- [14] 韩天娇, 周长慧, 常艳. 3D模型用于体外遗传毒性试验的研究进展 [J]. 中国新药杂志, 2014, (23): 2725-2728.
- [15] Fautz R, Curren R, Krul C, et al. Pre-validation of the Reconstructed 3D Human Skin Micronucleus and Comet Assay [M/OL]. EPAA Annual Conference. 2012. (2012-11-16) [2020-06-18]. http://www.cosmostox.eu/docs/posters/EPAA2012_poster-book.pdf.
- [16] Yuki K, Ikeda N, Nishiyama N, et al. The reconstructed skin micronucleus assay in EpiDerm: Reduction of false-positive results — a mechanistic study with epigallocatechin gallate [J]. Mutat Res, 2013, 757(2): 148-157.
- [17] Hu T, Kaluzhny Y, Mun G C, et al. Intralaboratory and interlaboratory evaluation of the EpiDerm 3D human reconstructed skin micronucleus (RSMN) assay [J]. Mutat Res, 2009, 673(2): 100-108.
- [18] Wills J W, Hondow N, Thomas A D, et al. Genetic toxicity assessment of engineered nanoparticles using a 3D in vitro skin model (EpiDerm) [J]. Part Fibr Toxicol, 2015, 13(1): 50.
- [19] Barcham R, Orsini N, Andres E, et al. Successful proof of concept of a micronucleus genotoxicity assay on reconstructed epidermis exhibiting intrinsic metabolic activity [J]. Mutat Res Gen Toxicol Environ Mutag, 2018, S138357181730356X.
- [20] 陈励藻, 刘砚枫, 钟凌燕, 等. EpiSkin™微核测试: 基于3D皮肤模型的化妆品原料基因毒性体外评估方法[A]//中国毒理学会. 2017(第三届)毒性测试替代方法与转化毒理学(国际)学术研讨会 [C]. 南京: 中国毒理学会, 2017.
- [21] Chen L Z, Li N, Liu Y F, et al. A new 3D model for genotoxicity assessment: EpiSkin™ micronucleus assay [J]. Mutagenesis, 2020, doi: 10.1093/mutage/geaa003.
- [22] Reisinger K, Blatz V, Brinkmann J, et al. Validation of the 3D skin comet assay using full thickness skin models: transferability and reproducibility [J]. Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen, 2018, 827, 27-41.
- [23] Reus A A, Reisinger K, Downs T R, et al. Comet assay in reconstructed 3D human epidermal skin models--investigation of intra- and inter-laboratory reproducibility with coded chemicals [J]. Mutagenesis, 2013, 28(6): 709-720.
- [24] Kaluzhny Y, Hayden P, Kandarova H, et al. Genotoxicity testing using the micronucleus and comet assays in normal human cell based 3D epithelial models [J]. Toxicol Lett, 2011, 205(suppl-S): S163-S164.
- [25] Pfuhler S, Benthem J V, Curren R, et al. Use of in vitro 3D tissue models in genotoxicity testing: Strategic fit, validation status and way forward. Report of the working group from the 7th International Workshop on Genotoxicity Testing (IWGT) [J/OL]. Mut Res Gen Toxicol Environ Mutag, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2020.503135>.
- [26] Barcham R, Orsini N, Andres E, et al. Successful proof of concept of a micronucleus genotoxicity assay performed

- on reconstructed epidermis exhibiting intrinsic metabolic activity [J]. Toxicol Lett, 2018, 829(2): 75-86.
- [27] Epstein J H. Phototoxicity and photoallergy [J]. Semin Cutan Med Surgery, 2000, 18(4): 274-284.
- [28] Lynch A M, Wilcox P. Review of the performance of the 3T3 NRU *in vitro* phototoxicity assay in the pharmaceutical industry [J]. Exper Toxicol Pathol, 2011, 63(3): 209-214.
- [29] Lynch A M, Guzzie P J, Bauer D, et al. Considerations on photochemical genotoxicity. II: Report of the 2009 International Workshop on Genotoxicity Testing Working Group [J]. Mut Res Gen Toxicol Environ Mutag, 2011, 723(2): 91-100.
- [30] Young A R, Fakouhi T D, Harrison G I, et al. The UVR wavelength dependence for lomefloxacin photosensitization of human skin [J]. J Photochem Photobiol B Biol, 1996, 32(3): 165-170.
- [31] 康 桦, 张劲松, 桑 晶, 等. 人源重建皮肤模型的体外光毒性试验方法建立 [J]. 中国药理学通报, 2020, 36(6): 884-887.