



化妆品皮肤过敏的分子机制与评价方法介绍

Introduction of molecular mechanism and evaluation methods for cosmetic induced skin sensitization



北京化工大学

Beijing University of Chemical Technology



演示内容

1. 化妆品皮肤过敏的发生过程
2. 化妆品皮肤过敏的分子机制
3. 化妆品皮肤过敏体内评价方法介绍
4. 化妆品皮肤过敏体外评价方法介绍
5. 化学物皮肤致敏特性的集成式测试方法



致敏期

1. 过敏原与皮肤组分结合

过敏原透过皮肤屏障与皮肤组分结合，这些组分包括主要组织相容性复合物（**MHC**），表皮树突状的抗原提呈细胞（朗格罕细胞）里含有大量的此类组分。



2. 半抗原诱导活化过敏原提呈细胞

携带过敏原的朗格罕细胞被激活变成熟后经由输入淋巴管迁移至局部淋巴结，在副皮质T-细胞区域定居为并指状细胞（IDC）。



3. 特异性T细胞识别经过敏原修饰的朗格罕细胞

在副皮质区域内，并指状细胞（IDC）容易遇到初始T细胞以特异性识别过敏原-MHC分子。过敏原提呈细胞的树突状形貌很容易接触多个细胞，致使过敏原特异性T细胞结合活化。



4. 特异性T细胞在引流淋巴结内的增殖

在抗原提呈细胞所释放的白介素IL-1的支持下，活化的T细胞开始分泌几种生长因子，其中包括白介素IL-2，IL-2受体在细胞内被上调，一系列自分泌开始发生，数日内细胞迅速形成并增殖。



5. 特异性T细胞后代的系统扩散

特异性T细胞后代通过输出淋巴管释放到血液里开始再循环，此时效应记忆T细胞出现频率高达千分之一（正常个体此值一般小于百万分之一），若无过敏原进一步接触，所述频率将慢慢减低，但仍不会低至原初水平。



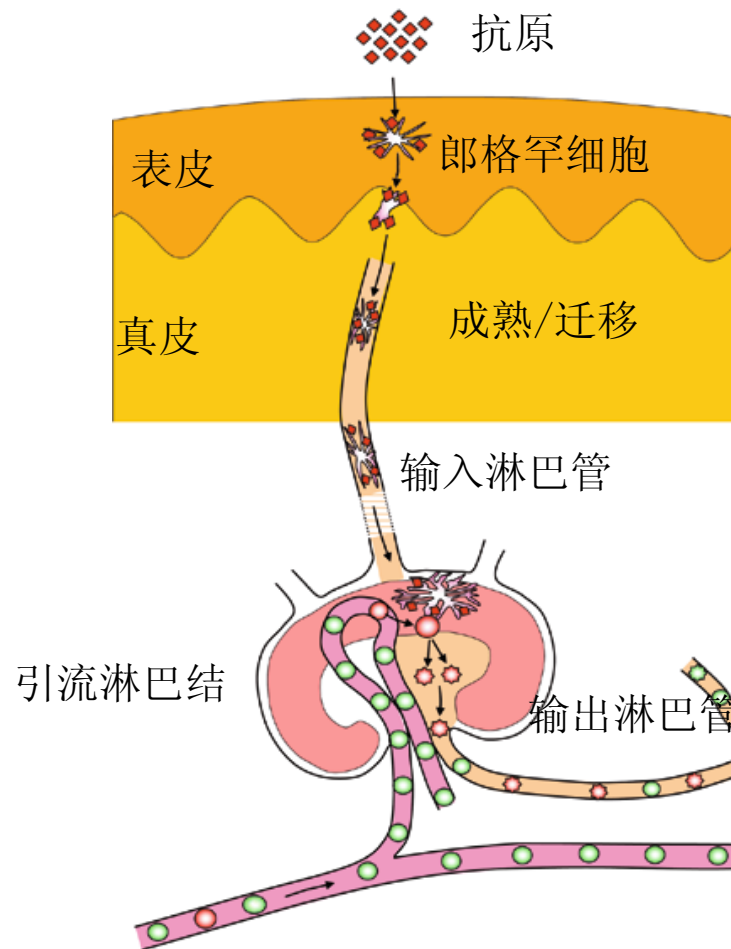
效应期

6. 效应期

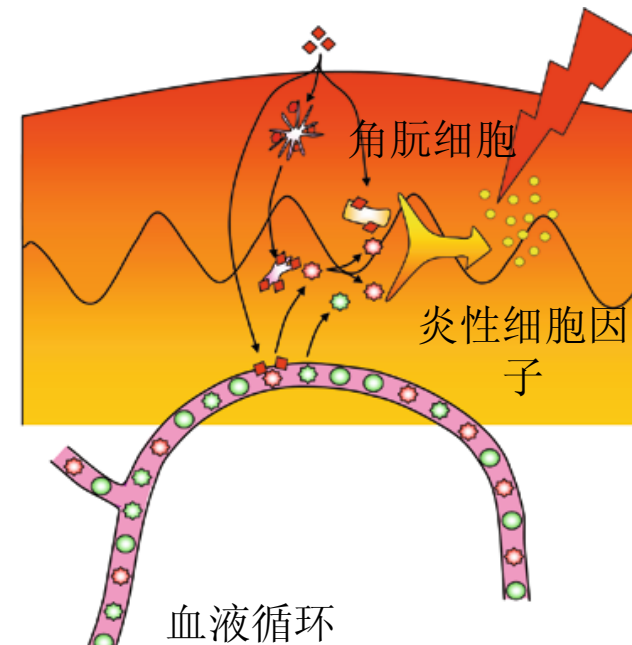
再次接触过敏原将引发过敏效应，此效应不仅取决于特异性T细胞出现频率的增高及其迁移量变，还取决于其低活化阈值。在皮肤内，抗原提呈细胞与特异性T细胞相遇，局部释放大量促炎性细胞因子和趋化因子，故导致更多炎症细胞的聚集进而释放更多局部介质，表现为进行性湿疹样反应，此反应通常在**18-72**小时内达到最大然后慢慢消退。



致敏期

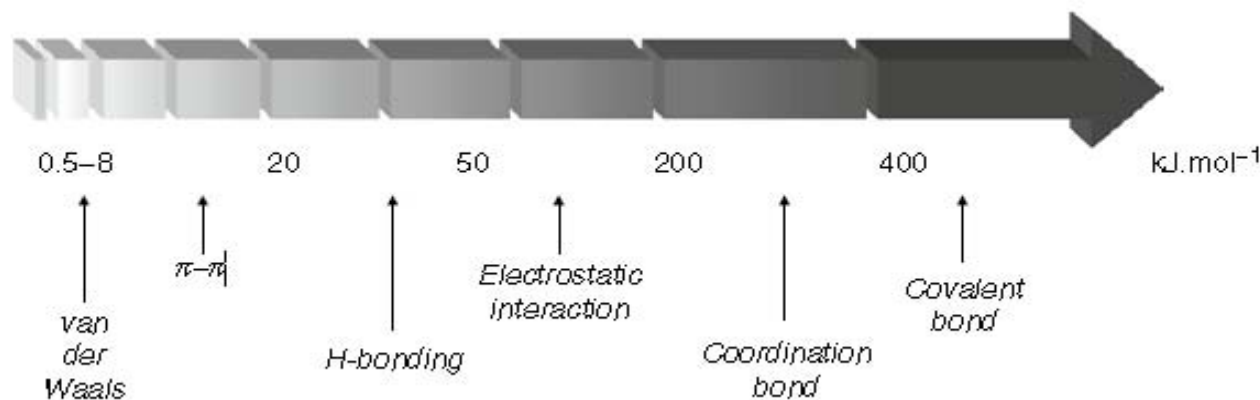


效应期





从分子机制上看，化妆品皮肤过敏首先源自化学物之间的电子相互作用，这种作用的大小可用能量单位来表征，较弱作用的能量范围从数焦耳/摩尔至50千焦/摩尔，如范德瓦耳力、 π - π 作用和氢键作用等；较强作用的能量范围可从200千焦/摩尔至400千焦/摩尔，如配位和共价作用等。

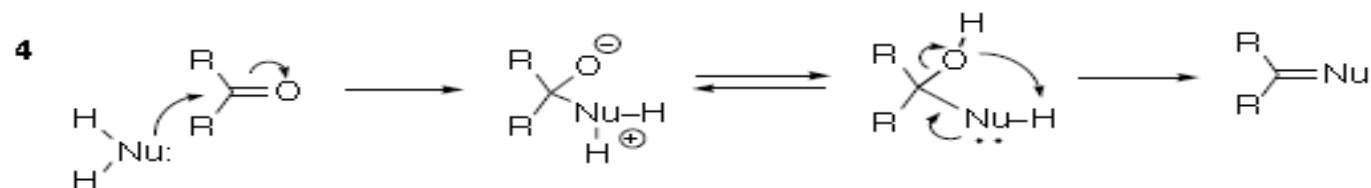
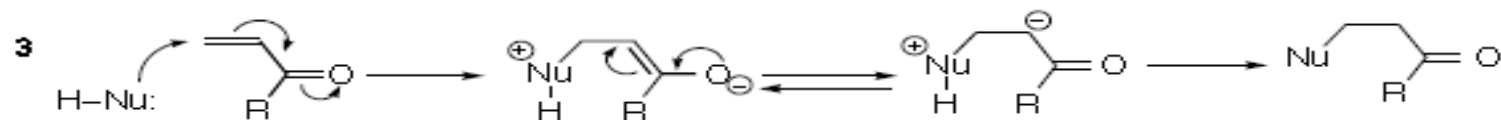
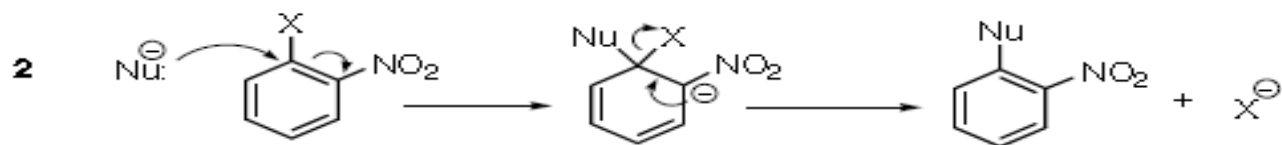
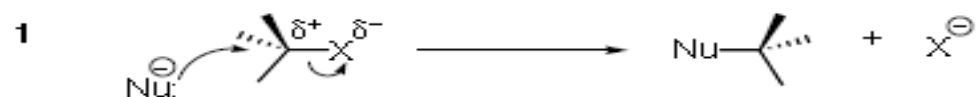




- 疏水作用、偶极作用和离子键代表了原子间的较弱作用且这些作用常可逆，根据现代化妆品皮肤科学理论，（非免疫性）刺激性皮炎（ICD）的发生机制里所述这些作用可能扮演了重要角色。
- 通过形成共享电子对的共价作用是化学物间较强作用的主要代表，这种作用常不可逆，故形成的复合物也较稳定，现代化妆品皮肤科学理论认为，半抗原主要是通过这种作用来修饰蛋白，故（免疫性）过敏性接触皮炎（ACD）的发生机制里共价作用扮演了重要角色。
- 共价作用可表现在异裂（亲核亲电）反应和均裂（自由基）反应中。

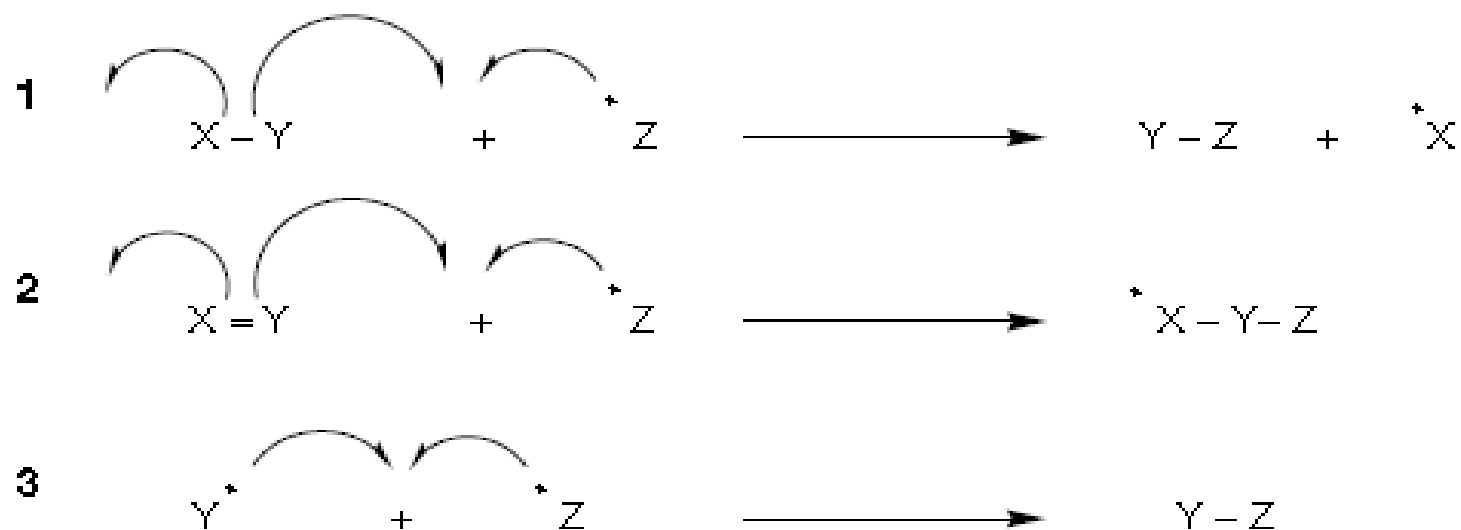


ACD相关亲核反应机理



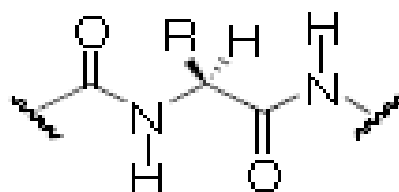


相关自由基反应机理

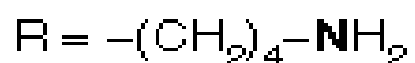




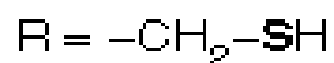
不同氨基酸的亲核性能



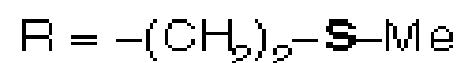
Lysine



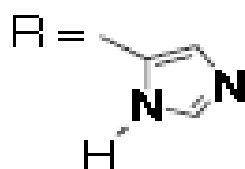
Cysteine



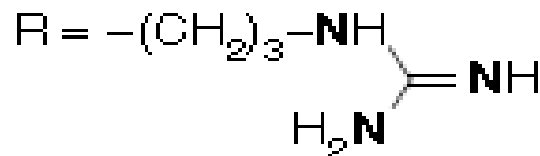
Methionine



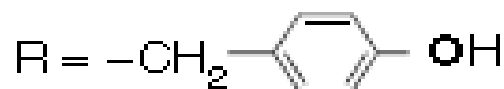
Histidine



Arginine



Tyrosine



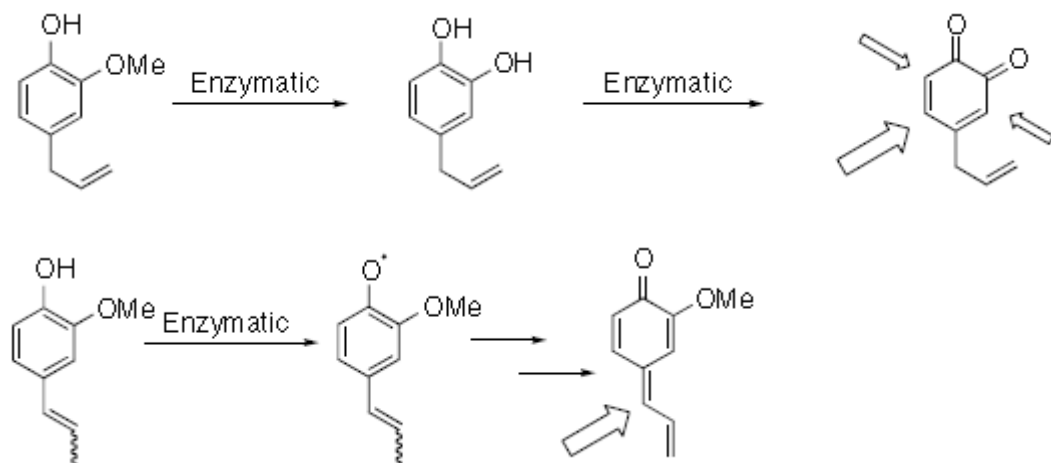


半抗原和人血清白蛋白加合物例示

Haptens	Main adducts formed	
	HSA-His-CH ₃	

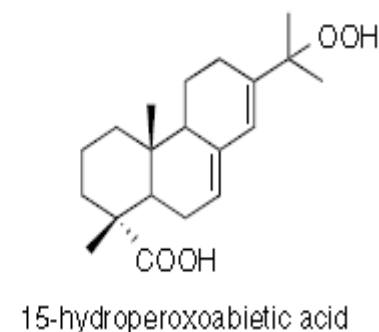
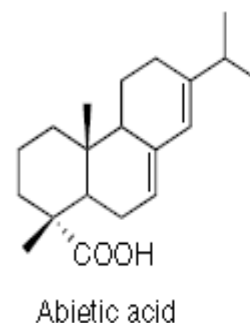
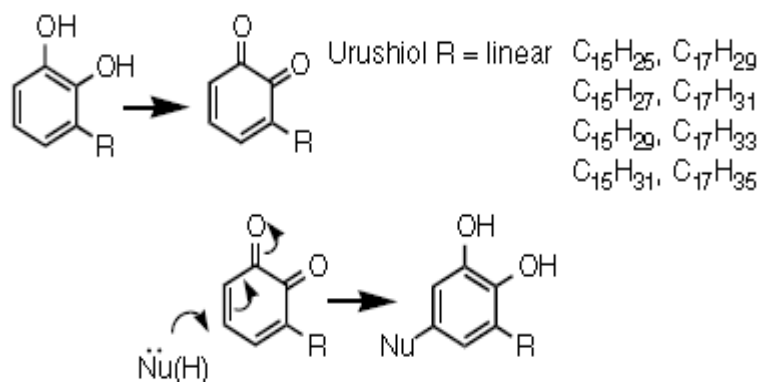


- 结构类似的半抗原可通过不同的化学作用机理与蛋白质或氨基酸反应。
- 例如，在体内酶的作用下，致敏性较弱的丁子香酚（**Eugenol**）可通过去甲基化代谢为亲电的邻醌物质，；而异丁子香酚(**Isoeugenol**)可被直接氧化为烷醌类化合物，致敏性很强。





- 皮肤是人体多种代谢活动的场所，一些本不具有或具有较弱致敏性质的异生物质，可通过酶或非酶过程（光照、加热、氧化等）转化为较强的皮肤致敏原，此时半抗原相应地被称为prohaptten和prehaptten。
- 示例：漆酚（prohaptten）；松香酸（prehaptten）





化妆品皮肤过敏的体内评价方法

1. 豚鼠最大化试验 Guinea pig maximization test
2. 豚鼠封闭式斑贴试验 Buehler Test
3. 小鼠淋巴结试验 Murine LLNA
4. 改良的小鼠淋巴结试验 rLLNA
5. 人体最大化试验 Human maximization test
人体(连续)斑贴测试 Human (repeated insult) patch test



- 1.豚鼠先通过皮内注射含佐剂的接触受试物，经**6-8**天诱导后让皮肤接触受试物，再经过**10-14**天休止期以引发免疫反应，然后让豚鼠接触激发剂量。
- 2.比较剂量组和对照组豚鼠皮肤对受试物的反应程度。豚鼠最大化试验每次测试推荐至少使用**30**只豚鼠，其中剂量组可使用**10**只，对照组可使用**5**只。



- 1.豚鼠封闭式斑贴试验不用佐剂，豚鼠先局部皮肤封闭式给药6小时，第6-8天及13-15天于相同位置重复同样操作作为初始接触，第27-29天使用激活剂量封闭式斑贴于此此前未处理区域6小时让豚鼠接触激发剂量。
- 2.比较剂量组和对照组豚鼠皮肤对受试物的反应程度。豚鼠封闭式斑贴试验方法中剂量组推荐至少使用20只豚鼠，而对照组可使用10只。



1. 在小鼠淋巴结试验中，在小鼠耳朵背面涂敷受试物并作连续三天的重复，然后经两天不作任何处理，通过鼠尾静脉注射含氚标记胸苷或碘¹²⁵标记的碘苷或氟脱氧尿苷的磷酸缓冲液，5小时后处死小鼠取下引流淋巴结制备淋巴结细胞悬液测量细胞内氚或碘¹²⁵的放射性。
2. 小鼠淋巴结试验剂量组或对照组推荐至少使用4只小鼠，每次测试至少需要16只小鼠。



3. LLNA同样也不需佐剂，测试只需更少数目的动物，与豚鼠最大化试验以及豚鼠封闭式斑贴试验相比侵入性也较低，且可藉以获得剂量-效应曲线以评估受试物的致敏效力。
4. 根据LLNA试验结果，可进行皮肤致敏物的分类：1.极端致敏物；2.强致敏物；3.一般致敏物；4.弱致敏物；5.非致敏物。
5. 人体皮肤斑贴试验一般是可用来确证化学物致敏性动物试验的阴性结果。



OECD 检测指南

- (OECD) TG 406
- (OECD) TG 429





Method	Developed by	Assay type
1. Toxicokinetic	J. Kasting, Uni of Cincinnati, USA	<i>In silico</i>
2. DPRA	P & G	In chemico
3. MUSST	L'Oreal	DC <i>in vitro</i>
4. h-CLAT	KAO&Shiseido	DC <i>in vitro</i>
5. NCTC IL-18 test	Sens-it-iv	KC <i>in vitro</i>
6. Tiered approach	Sens-it-iv	KC and epidermal equivalent
7. AREc32	CXR Biosciences	AREc32 cells <i>in vitro</i> reporter gene activity
8. MUTZ-3 Gene signature	Sens-it-iv	DC <i>in vitro</i> gene expression
9. Peptide reactivity	Unilever	In chemico
10. DPRA next generation	P & G Univ. Strasbourg	In chemico
11. KeratinoSens	Givaudan	KC <i>in vitro</i> , reporter gene activation
12. VITOSens™	CARDAM-VITO	DC <i>in vitro</i> Gene expression
13. PBMDc	Beiersdorf	moDC <i>in vitro</i>
14. SenCeeTox™	CeeTox	GSH depletion & KC <i>in vitro</i> gene expression
15. Multi parameter biosensor	Univ. of Toledo, Ohio, USA	DC <i>in vitro</i> , reporter gene activation
16. DC migration	Imperial College London	DC <i>in vitro</i> , reporter gene activation
17. T cell proliferation	Univ. Freiburg	PBMC <i>in vitro</i>
18. T cell proliferation	Univ. Lyon	PBMC <i>in vitro</i>



In Silico 方法

1. SAR和QSAR知识
2. 基于（定量）构效关系的专家预测系统
(Derek, TOPCAT, MultiCASE, OECD Toolbox etc.)
2. 高通量，低成本，可预测多个毒理学终点甚至器官毒性，但仍需结合体内测试数据来进行化妆品过敏相关风险评估。



1. 早在1869年，Crum-Brown/ Fraser 就提出化合物生物活性是其化学结构的函数的理论。
2. 1936年，Landsteiner/Jacobs率先报道了皮肤致敏与化学反应性之间的关联。
 - 确证了卤代硝基苯衍生物与豚鼠变态反应之间的关联。
 - 提出半抗原-蛋白复合物的形成是接触性皮炎的必要条件。
3. 1982年，Dupuis/Benezra 发现致敏相关半抗原化学结构的高度特异性。
4. SAR研究至多为半定量性质。



1. 1982年，Roberts/Williams第一个提出烷基化试剂皮肤致敏的QSAR模型。
2. QSAR 分为机制（局域） QSAR 和经验（全域） QSAR等二类模型，小鼠淋巴结试验法促进了QSAR研究方法的建立，OECD制定了一系列QSAR相关规则。
3. 皮肤过敏QSAR机制模型的建立大多基于相对烷基化指数，其是用以定量抗原化程度的，是给药剂量、化学反应性（与模式亲核剂如正丁胺反应时的相对速率常数）和疏水性（ $\text{Log}P$ ）的函数。

$$\text{RAI} = \log D + a \log k + b \log P$$



- 使用**RAI**来预测皮肤致敏的局限性在于其只较好适用于具有同类反应机理的物质，而且**RAI**只考虑了施予的剂量却并没有考虑皮肤穿透因素，即在皮肤内真正到达靶标并与靶标结合的化合物的量的多少。
- **QSAR**模型的建立不仅应考虑化学结构上的多样性，还应考虑机制上的多样性。
- **TOPS-MODE**(Topological substructrual molecular descriptors), **4D fingerprint categorical QSAR** 模型考虑了更为全面的因素，因此，对皮肤致敏的预测更为合理。

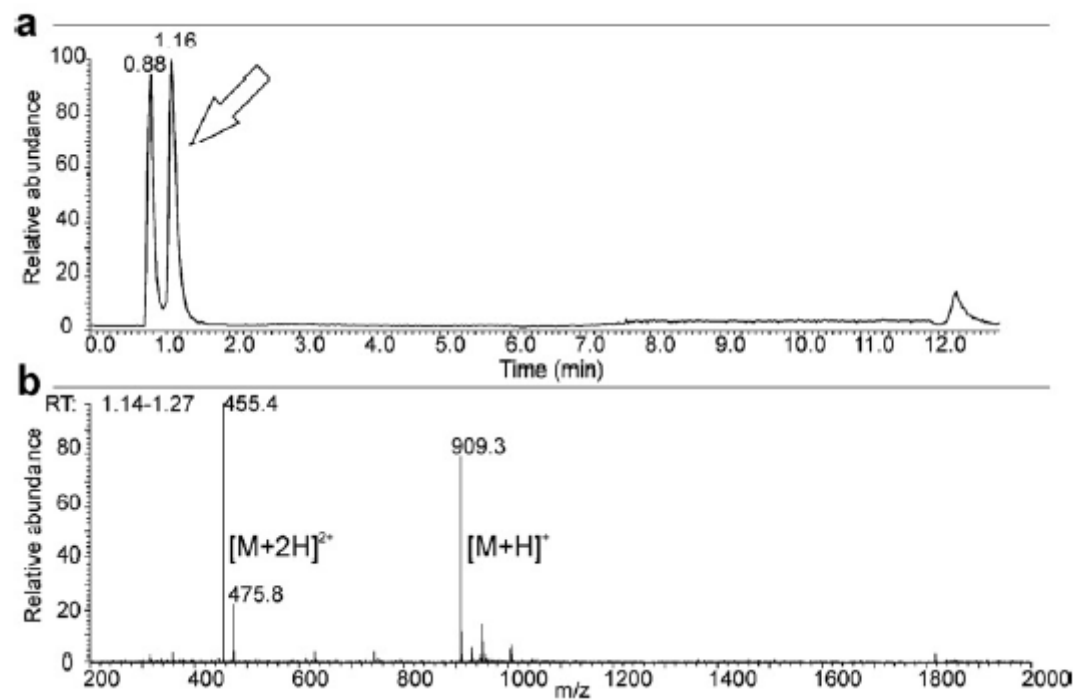


1. Derek for Windows (Deductive Estimation of Risk from Existing Knowledge)
2. TOPKAT (Toxicity Prediction by Komputer Assisted Technology)
3. CASE/MultiCASE (Computer Automated Structure Evaluation)

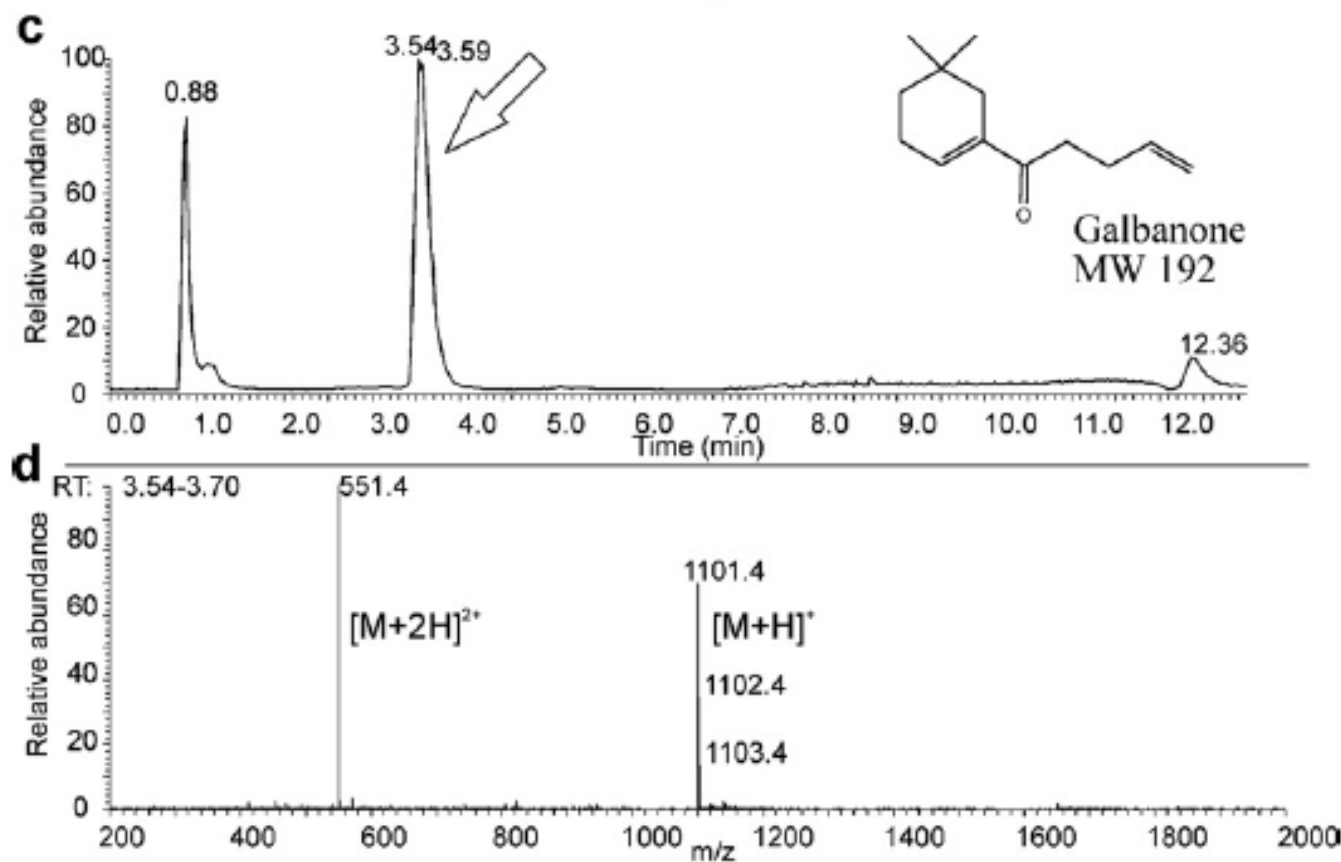


In Chemico 多肽反应性试验

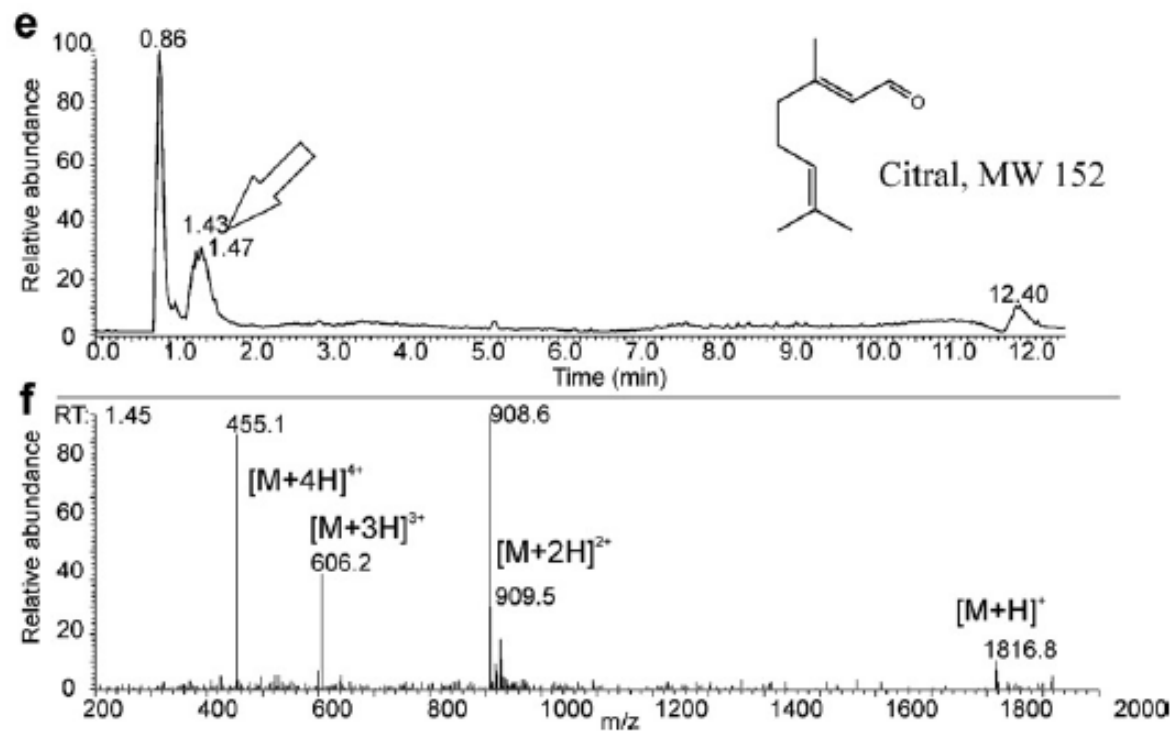
如前所述，在人体皮肤致敏过程中，初始的重要步骤之一是人体皮肤蛋白或多肽和半抗原分子通过共价作用形成某种加合物，故而造成蛋白或多肽的反应损耗，因此，通过在体外测试这种多肽或蛋白的半抗原反应性或损耗率，就可间接表征半抗原的皮肤致敏性质，现在最流行的方法就是使用液相色谱-质谱手段。



反应前测试多肽的总离子流色谱图



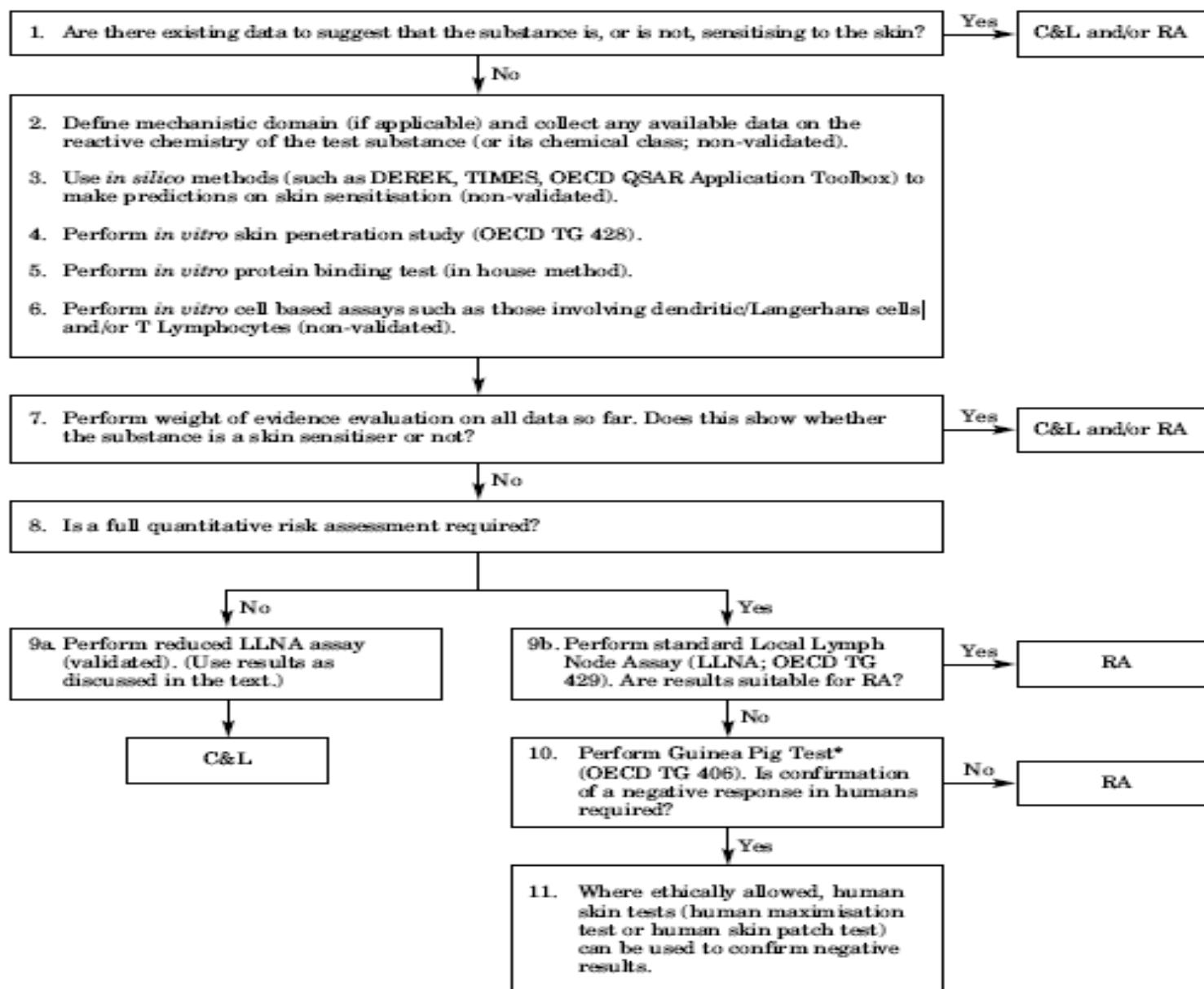
王朝酮的多肽反应性情况



柠檬醛的多肽反应性情况



		depletion by LC-MS (%) (n = 3)	
	LLNA EC 3	Avg.	Stdev.
Extreme senistizers			
Diphenylcyclopropenone	0.003	97.9	3.6
Oxazolone	0.003	>98	
5-Chloro-2-methyl-4-isothiazolin-3-one	0.009	>98	0.0
p-Benzoquinone	0.01	98.4	2.8
DNCB	0.04	>98	
4-nitrobenzylbromide	0.05	>98	
Strong sensitizers			
Glutaraldehyde	0.1	>98	
Fluorescein-5-isothiocyanate	0.14	>98	
Phthalic anhydride	0.16	>98	
1,4-Phenylenediamine	0.16	>98	
Moderate sensitizers			
Methyldibromo glutaronitrile	1.3	>98	
Glyoxal	1.4	>98	
2-Hydroxy-ethyl-acrylate	1.4	98.4	2.9
4-vinyl-pyridine	1.6	>98	
Pomarose	1.6	98.0	





谢谢各位！

