

动物实验替代技术研究进展

程树军

广东出入境检验检疫局技术中心, 广州 510623

摘要 综述了动物实验替代技术的发展及法规接受情况。介绍了替代动物实验的历史, 阐述了在 21 世纪毒性测试新观念 (TT21C)、有害结局通路 (AOP)、整合测试等理论的指导下, 组织重建和多器官人体芯片技术、干细胞技术、组学技术、非生物测试技术、高通量和高内涵技术等新技术对动物实验替代方法的促进分析了标准化的替代方法和个性化的体外方法在化学品、化妆品、药品和生物制品等健康相关产品评估中的应用。分析表明, 替代技术不仅是实验动物学科的重要分支, 也是一类研发和实验用的创新性工具, 同时具有产业化的前景。

关键词 动物实验; 实验动物替代技术; 实验动物学

实验动物在医学和生物学发展中做出了重要的贡献。但无法否认的是, 虽然人类通过动物实验获得了科学研究或实验数据, 然而实验动物却不可避免地受到了生理或心理上残酷的伤害甚至死亡。早在 20 世纪 50 年代, 实验动物学科兴起之初, 就有学者提出了这样的疑问: 无限制的动物使用是否必要? 仁慈的动物实验需要建立什么原则? 之后, Russell 和 Burch 系统地提出了减少 (reduce)、优化 (refine) 和代替 (replace) 动物实验的 3R 理论, 成为实验动物学发展的基础。特别是进入 21 世纪以来, 替代技术在毒理学与药物开发中取得的进步, 使其逐渐成为研究热点和新兴的学科分支。3R 理论提出近 60 年来, 简单可区分为 3 个阶段用。

1 起步和积累阶段 (1959—1990)

实验动物替代技术源于 19 世纪初在西方国家兴起的动物保护和动物福利运动, 以 1822 年英国政府发布的《马丁反残酷法案》为起点。西方动物保护和试验用动物福利研究逐渐得到重视, 英国动物福利大学联盟 (UFAW) 于 1954 年启动了实验室仁慈技术研究的项目, 项目结束之后的 1959 年, (Russell) 和 (Burch) 在总结调研报告的基础上出版了著名的《The principles of humane experimental technique》(《仁慈实验技术原理》)。系统提出了 3R 原则, 即通过使用无知觉的材料代替 (replace) 有意识的活体高等动物, 在确保获取一定数量和精度的信息前提下尽量减少 (reduction) 动物使用量, 采取优化措施 (refinement) 减轻动物痛苦的发生和严重程

度。提出了相对代替和绝对代替的概念, 指出可利用低等动物、高等植物、微生物方法和生化检测的方法代替动物测试, 并极具远见性地提出充分开发组织培养的观念^[1]。1978 年, David Symth 在《Alternatives to animal experimentation》(《替代动物试验》) 一书将 3R 统称为替代 (Alternatives), 这个定义已被人们广泛接受。

3R 理论提出以来, 开拓了人们理性投入生命科学研究的思路, 使得仁慈科学成为良好科学的前提, 并激励科学家投入替代技术开发。3R 原则一直影响着世界各国有关实验动物法规。目前, 西方大多数国家的《实验动物福利法》均引入了 3R 原则。中国科学技术部 2006 年发布了《关于善待实验动物的指导性意见》。3R 原则还影响到一些部门规章或行业法规的制定以及为数众多的生物医学研究中科研计划与实验程序的论证和实施程序等。例如欧盟《86/609/EEC 保护用于科学目的的动物的欧盟议会和理事会指令》、中国的《GB/T27416—2014 实验动物机构质量和能力的通用要求》等。科研人员必须在动物福利法规的框架范围内享有学术自由和最优地使用动物。

1969 年, 英国成立了医学试验用动物中替代法基金会 (FRAME) 成为全球最早的替代方法研究机构, 1981 年, 美国霍普金斯大学公共卫生学院成立了动物实验替代方法研究中心 (CAAT); 除了政府投入之外, 化工、医疗、生物等行业协会和企业也投入大量人力和经费研发替代方法。在化妆品局部毒性测试领域, 最早出现了利用离体大鼠皮肤、牛和猪

收稿日期: 2017-10-10; 修回日期: 2017-11-27

基金项目: 广东省科技计划项目 (2015A030402005)

作者简介: 程树军, 研究员, 研究方向为动物实验替代方法研发及标准化, 电子邮箱: chengsj@126.com

引用格式: 程树军. 动物实验替代技术研究进展[J]. 科技导报, 2017, 35(24): 40-47; doi: 10.3981/j.issn.1000-7857.2017.24.004

的角膜、兔和鸡的眼球、血细胞进行皮肤刺激、眼刺激的技术和方法。20世纪80年代,体外细胞分离培养技术已趋于成熟,无血清培养技术也开始出现,利用细胞进行检测和实验的方法被开发出来,如在生物制品动物实验中,发明了组织培养技术代替非人灵长类测试脊髓灰质炎疫苗的技术。1989年,斯堪的那维亚细胞毒理学会启动了评价急性毒性体外方法的项目,通过上千种化学物质的测试,发现啮齿类动物的急性经口毒性与细胞毒性之间存在线性关系,提出了用细胞毒性预测急性经口毒性的方法^[2]。有的学者尝试优化动物实验程序,达到减少动物实验的目的,如开发了急性经口毒性的上下程序法、分类法和固定剂量法;德国学者发明了利用细胞毒性检测光毒性的方法,还开发了利用废弃的动物材料(牛角膜)进行眼刺激毒性测试的牛角膜混浊和渗透性方法(BCOP)^[3-4];也有学者开始尝试体外三维构建人工皮肤替代物,用于化学品的皮肤刺激性测试^[5]。这些新颖的体外方法首先在开发机构和行业内得到应用,但面临标准化、验证和法规接受等难题。

2 法规接受阶段(1991—2012)

2.1 验证认可机制

1991年,欧洲替代方法验证中心(European Center for Validation of Alternative Methods, ECVAM)成立(2011年更名为替代动物实验欧盟联合参考实验室, EURL-ECVAM)。1993年,美国成立了由17个部委参与的替代方法验证部门间协调委员会(Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods, ICCVAM),ICCVAM依据美国国会发布的《ICCVAM授权法案》行使职责,主要是技术协调和评估新研发的和修订的替代方法。1994年世界经济合作和发展组织(OECD)开始编制替代方法的验证指南。2005年,日本替代方法验证中心(Japanese Center for the Validation of Alternative Methods, JaCVAM)成立。近年来,韩国、印度和巴

西的替代方法中心也相继成立。这些官方机构的成立旨在从国家和国家联盟的层面推动替代技术的进步,并协调和加快替代方法法规接受的步伐。随着ECVAM的成立,一些成熟方法开始进入验证和法规认可过程。1992年,ECVAM开始验证3T3细胞中性摄取光毒性测试方法,1994年,开始验证皮肤模型代替皮肤刺激性动物实验的体外方法。验证机构的成立,使得大量研发投入产生的新技术、新方法和新产品有了被法规认可的渠道,推动了替代技术的进步^[2]。

2.2 全球法规趋势

替代技术的兴起和取得的进步,推动着立法禁止化妆品动物实验走向议事日程。化妆品的动物实验禁令起始于20世纪90年代,早期发展缓慢,近10年来呈现井喷势头(表1)^[2]。欧盟早在1993年就开始了禁令的讨论,到1998年只有英国率先实施了化妆品动物产品测试禁令。2003年欧盟通过了2003/15/EC指令提出逐步淘汰动物试验的时间表;2004年3月,欧盟禁止了化妆品成品的动物试验;2007年,以色列实施了产品测试禁令;2009年3月,欧盟禁止了化妆品成分的动物实验,仅限于一些最为复杂的人类健康效应可进行动物试验(如重复剂量系统毒性、皮肤致敏、致癌、生殖毒性和毒代动力学);2013年3月11日起,欧盟完成了化妆品及成分的动物试验禁令和销售禁令的实施。

欧盟的立法和令行禁止对全球法规和替代方法的研究带来深远的影响。紧随其后,挪威、巴西2014年通过了70/2014法案,并于2017年3月进行了修订。澳大利亚于2014年及2016年先后提出两套终止残忍化妆品的相关法案,从2017年7月起实施化妆品动物试验及销售禁令。新西兰于2015年通过《动物福利法》修订案,禁止在化妆品及成分研发、制造、测试和教学中使用动物实验。以色列继2007年实施化妆品试验禁令之后,于2013年1月起,实施销售禁令。印度自2014年5月和11月,分两步实施了禁止化妆品动物检测和禁止进口经动物检测的化妆品。土耳其规定从2016年1月开

表1 世界各国实施化妆品动物实验禁令/限令的时间

Table 1 Global schedule of regulation on animal testing ban/restrictions

时期	1990—1999	2000—2010	2011—2017
国家	英国(1998-测试禁令)	以色列(2007-测试禁令) 欧盟(2009-测试禁令)	以色列(2013-销售禁令) 欧盟国家(2013-销售禁令) 挪威(2013-测试及销售禁令) 巴西圣保罗(2014-测试禁令) 印度(2014-测试及销售禁令) 韩国(2015-有条件的销售禁令) 新西兰(2015-测试禁令) 土耳其(2015-有条件的测试及销售禁令) 澳大利亚(2016-测试及销售禁令) 中国台湾省(2016-测试禁令) 瑞士(2016-测试及销售禁令) 危地马拉(2017-测试禁令)

始禁止化妆品成品和原料的动物实验。俄罗斯在2015年8月提交了提案,计划2020年实施,目前这个议案发回修改。中国台湾省于2016年通过,自2019年起禁止化妆品成品及原料动物实验。韩国则在2017年2月起实施了禁止化妆品动物实验的新法规,但提出了很多豁免条件。瑞士2016年宣布与欧盟采取一致原则。危地马拉在2017年2月国会上通过了化妆品动物实验禁令。

全球还有十几个国家目前正在立法的讨论进程中。例如美国于2015年提出人道化妆品法案,目前有155个席位的支持。2015年,加拿大参议院提出零残忍化妆品法案议案S-234,2016年改为S-214,计划在加拿大境内禁止进行化妆品动物实验,并禁止销售经动物实验测试的化妆品原料和成品。此外,阿根廷、智利都有相关提案提出。全球目前有38个国家/地区已经正式实施了化妆品动物试验禁令。相信不久的将来,化妆品动物实验禁令会是全球重要经济体的一个共同原则^[6]。

化学品方面,欧盟2006年发布的REACH法规(化学品注册、评估、许可和限制制度)明确提出采用经验证的替代法来

避免动物实验,鼓励研究新的非动物实验方法并在将来的法规中进行修改。2013年1月1日,欧盟27国开始实施新的保护试验用动物指令2010/63/EU,指令提出最终目的是完全替代科研和教学中的动物实验。新指令明确和重申了3R原则,呼吁委员会和成员国推广替代方法,鼓励成员国参与替代方法的验证等。

2.3 方法接受情况

科技进步始终是动物实验替代方法得以快速发展的驱动力,表2列举了近15年来已获认可或已向OECD提交草案的毒性测试替代方法,这些方法包括皮肤腐蚀试验、皮肤刺激试验、经皮肤吸收试验、眼刺激试验、皮肤过敏试验、光毒性试验、内分泌干扰试验、胚胎毒性试验、血液毒性试验、遗传毒性等毒理学测试^[7-10]。此外,动物实验替代方法还包括应用于热源试验、疫苗生产、生物制品测试等医疗领域的方法。这些方法被欧洲药典、人用药品注册技术要求国际协调委员会(ICH)等法规接受。例如脊髓灰质炎疫苗的毒力测试废除了猴子实验,改用体外培养的细胞。生物制品的热源实验废除了兔子实验,改用血细胞测试等。

表2 验证和法规接受的替代方法
Table 2 Alternative methods of validation and acceptance

毒理学终点	替代方法简称	验证或认可情况	首次认可时间,最近更新时间	3R相关性
急性经口毒性	固定剂量法	EU B.1bls, OECD TG420	1992, 2002	减少
	急性毒性分类法	EU B.1tris, OECD TG423	1996, 2002	减少
	上下法程序法	OECD TG425	1998, 2008	减少
	正常人角质细胞或 Balb/c 3T3 细胞中性红摄取试验(NHK NRU, 3T3 NRU)	OECD DG129, EURL-ECVAM 推荐	2010	减少和替代
急性吸入毒性	急性毒性分类法	OECD TG426	2007	减少和优化
皮肤刺激/腐蚀	人工皮肤模型腐蚀实验	B.40 OECD 430	2004, 2015	替代
	大鼠经皮肤电阻实验	B.40 OECD 431	2004, 2016	减少、替代
	皮肤刺激的重组人表皮模型试验	OECD 439	2010, 2015	替代
	皮肤腐蚀的体外膜屏障试验方法	OECD 435	2006, 2015	替代
眼刺激性/腐蚀性	牛角膜混浊和渗透性试验(BCOP)	B.47, OECD437	2009, 2017	替代
	离体鸡眼试验(ICE)	B.48, OECD438	2009, 2017	减少, 替代
	荧光素漏出试验(FL)	OECD460	2012, 2017	替代
	短期暴露试验(STE))	OECD491	2015, 2017	替代
	重组人角膜上皮模型试验(RhCE)	OECD492	2015, 2017	替代
	微生理仪细胞传感器试验(CM)	OECD 草案	2010	替代
皮肤致敏	局部淋巴结检测(LLNA)	B.42, OECD429	2002	减少和优化
	LLNA-DA	OECD 442-A	2010	减少和优化
	LLNA-BrdU	OECD 442-B	2010	减少和优化
	直接多肽结合试验(DPRA)	OECD 442-C	2015	替代
	基于 ARE-Nrf2 通路的荧光酶试验(KeratinoSens™)	OECD 442-D	2015	替代
	AOP 树突细胞活化关键事件试验	OECD 442-E	2016, 2017	替代
经皮肤吸收	体外皮肤吸收试验	OECD428	2006	替代
光毒性	3T3 中性红摄取光毒性试验(3T3 NRU-PT)	EU B.41, OECD432	2004	替代

表2 验证和法规接受的替代方法(续)

Table 2 Alternative methods of validation and acceptance (Continued)

毒理学终点	替代方法简称	验证或认可情况	首次认可时间, 最近更新时间	3R 相关性
遗传毒性	Ames 试验	B.13-14, OECD471	1983	替代
	大肠杆菌恢复突变试验	OECD 472	1983	替代
	酿酒酵母有丝分裂重组试验	B.16 OECD 481	1983	替代
	体外哺乳动物染色体畸变试验	B.10, OECD473	1983, 2016	替代
	体外哺乳动物细胞微核试验	OECD 487	2010, 2016	替代
	体外哺乳动物细胞 <i>Hprt</i> 和 <i>xprt</i> 基因突变实验	OECD TG476	2016	替代
	体外哺乳动物细胞 <i>TK</i> 基因突变	OECD490	2015	替代
致癌试验	转基因动物细胞基因突变试验	OECD 488	2011	减少优化
内分泌干扰	雌激素受体拮抗剂和激动剂体外转染细胞试验	OECD 455	2009, 2016	替代
	雄激素受体拮抗剂和激动剂体外转染细胞试验	458	2016	替代
	重组人雌激素受体结合亲和力试验	493	2015	替代
	H295R 类固醇生成试验	OECD 456	2015	—
生殖和发育	延长一代生殖毒性研究	OECD 443	2011	优化

注:截至2017年10月10日。

以 ECVAM 的成立为标志,监管机构接受替代方法的速度明显加快,但总体但仍不能满足工业界和科学界风险评估的需要。欧洲消费者保护委员会(SCCS)2015年发布的第9版指南中明确指出:除了经验证的替代法,对于个案,SCCS 可以接受一些科学有效的方法和新方法用于化妆品成分的安全评估。化妆品的应用情况表明,生物医药研究和产品评价对于替代方法的使用存在巨大需要,开发进度仍需加快。

中国在替代方法的标准认可方面也跟随了国际标准的发展趋势,例如化学品安全评价国家标准(表3)已等同采

用了替代方法,如《GB/T 21769—2008 化学品 体外3T3中性红摄取光毒性试验方法》和《GB/T 27830—2011 化学品 体外皮肤腐蚀人体皮肤模型试验方法》等。国家质检总局作为进出口商品的专职检验检疫监管机构,于2005年率先启动了替代方法系列标准的研制工作,为此,国家认证认可监督管理委员会成立了化妆品行业标准专家委员会,目前已发布相关替代方法标准共18项(表3),这批标准填补了国内相关标准的空白,并在检验检测工作中得到广泛应用。

表3 中国已发布的替代方法国家标准和行业标准

Table 3 Standards issued by China's regulatory authorities

标准号	标准名称
GB/T 21757—2008	化学品 急性经口毒性试验 急性毒性分类法
GB/T 21769—2008	化学品 急性毒性的3T3成纤维细胞中性红摄取试验
GB/T 21793—2008	化学品 体外哺乳动物细胞基因突变试验方法
GB/T 21794—2008	化学品 体外哺乳动物细胞染色体畸变试验方法
GB/T 27818—2011	化学品 皮肤吸收体外试验方法
GB/T 27824—2011	化学品 急性吸入毒性 固定浓度试验方法
GB/T 27828—2011	化学品 体外皮肤腐蚀 经皮电阻试验方法
GB/T 27829—2011	化学品 体外皮肤腐蚀 膜屏障试验方法
GB/T 27830—2011	化学品 体外皮肤腐蚀人体皮肤模型试验方法
GB/T 27831—2011	化学品 遗传毒性 酿酒酵母菌基因突变试验方法
GB/T 27832—2011	化学品 遗传毒性 酿酒酵母菌有丝分裂重组试验方法
GB/T 28646—2012	化学品 体外哺乳动物细胞微核试验方法
GB/T 28648—2012	化学品 急性吸入毒性试验 急性毒性分类法
SN/T 2245—2009	化学品体外皮肤腐蚀人体皮肤模型试验

表3 中国已发布的替代方法国家标准和行业标准(续)
Table 3 Standards issued by China's regulatory authorities (Continued)

标准号	标准名称
SN/T 2285—2009	化妆品体外替代试验实验室规范
SN/T 2328—2009	化妆品急性毒性的角质细胞试验
SN/T 2329—2009	化妆品眼刺激性/腐蚀性的鸡胚绒毛尿囊膜试验
SN/T 2330—2009	化妆品胚胎和发育毒性的小鼠胚胎干细胞试验
SN/T 3084.1—2012	进出口化妆品眼刺激性试验体外中性红吸收法
SN/T 3084.2—2012	进出口化妆品眼刺激性试验红细胞溶血法
SN/T 3527—2013	化学品 胚胎毒性测试 植入后大鼠全胚胎培养法
SN/T 3715—2013	化妆品发育毒性的大鼠全胚胎培养法
SN/T 3824—2014	化妆品光毒性的联合红细胞毒性测试
SN/T 3882—2014	化学品皮肤致敏试验局部淋巴结法(BrdU-ELISA)
SN/T 3898—2013	化妆品体外替代试验方法验证规程
SN/T 3899—2013	化妆品体外替代试验良好细胞培养和样品制备规范
SN/T 3948—2014	化学品体外皮肤刺激:重组人表皮试验
SN/T 4150—2015	化学品分离鸡眼试验方法
SN/T 4153—2015	化学品牛角膜混浊和通透性试验
SN/T 4154—2015	化学品皮肤致敏局部淋巴结试验:DA法
SN/T 4577—2016	化妆品皮肤刺激性检测重建人体表皮模型体外测试方法

注:不包括遗传毒性部分。

3 快速发展阶段(2013—)

3.1 新理论提出

动物实验替代技术在现代科学技术的推动下不断发展,特别是在毒理学领域,面临工业化带来的全球化学品评估的问题,制药工业发展带来的新药临床前安全评价问题,健康相关产业发展带来的环境和生态评价的问题等。2007年,美国国立研究院(NRC)提出了《Toxicity testing in the 21st century: A vision and a strategy》(《21世纪毒性测试—远景和策略》)的报告(简称TT21C),提出毒性测试应当由原来的体内动物研究向体外试验转变^[11]。TT21C发布的近10年来,各种策略和模式被提出,以实现报告提出的愿景。其中,有害结局通路(adverse outcome pathway, AOP)概念是实现TT21C预期目标的有效策略^[12]。

AOP是一个概念框架,用于描述已有的关于一个直接的分子起始事件与生物体不同组织结构层次(如细胞、器官、机体、群体)所出现的与危险度评定相关的“有害结局”之间的相互联系。2013年以后,OECD相继发布了指南文件和用户手册,用于指导AOP的开发^[13]。2014年9月发布了“AOP知识库”,用于促进对AOP研究的统一协调、优势互补和信息共享,发布了和AOP Wiki、Effectopedia和AOPXplorer,借助互联网技术为AOP的开发提供可以高效共享和协调互补的平台^[12]。在AOP指导下,目前已成功建立了测试皮肤致敏的替代方法^[14]。截至2017年10月,AOP Wiki发布的有害结局达232个,提出关键事件1734个,成为替代方法开发的源泉。

3.2 新战略推进

TT21C理念提出10年来,累计已投入资金超过数百亿美

元。2008年,由NTP联合NIH化学物基因组中心(NCGC)和EPA成立了21世纪毒理学(Tox21)协作计划,协调各方在实验毒理学、体外试验和计算毒理学方面的优势,达到快速践行TT21C观念的目的。在新理论的带领下,欧美政府、工业界(药物、化学、化妆品和消费品)、基金会等相关机构发布了多项庞大的计划,如欧盟框架计划(FP)、创新药物计划(Innovative Medicine Initiative, IMI)、美国关键路径计划(Critical Path Institute, CPI)、21世纪毒理学(Tox21)、地平线2020计划等。迎接毒理学新时代的到来。

3.3 标准方法的改进和组合

目前,国内外发布的替代方法标准已基本能满足化妆品安全性评价的需要,对于工业化学品的部分毒性评价也能提供基本的测试数据。但在实际应用中仍需要积累数据,进行必要的优化和调整,以适合不同行业和企业的需要。例如,鸡胚尿囊膜血管方法(CAMVA)、BCOP方法和Episkin皮肤刺激方法等几项经典的替代方法可用于化学品分类和标识^[2,8]。但这些方法在具体使用中如何用于个人护理产品的评估,以及满足护肤品、彩妆、婴童、家居护理(清洗剂、清新剂)、消毒产品等多样化的消费品的测试,常常出现标准化的方法不能满足产品的差异化、产品温和的宣称以及特殊人群的需求。使用者可以通过增加检测参数、改变暴露方式、修改预测模型和组合等不同方法提高方法的特殊性^[15-19]。而且,需要分析每个替代方法的适用性和局限性,建立整合策略^[7,18],在应用中不断创新替代方法的应用水平。

3.4 新技术应用

传统的替代技术,主要体现为动物实验系统向体外实验

系统的转换而建立的方法,如利用体外培养的细胞和组织、离体的材料和重建的组织/器官,建立“一对一”的替代方法(表2)。现代研发中的替代方法,体现在充分利用先进技术的精华并加以整合,如标志技术、分子生物学、组学技术(基因组、蛋白组、代谢组、细胞组)、组织工程技术、干细胞技术、图像分析、高通量试验、计算机模拟技术等,替代方法更复杂化、多元化,也更有逻辑性和更接近人作为整体的实际情况。

3.4.1 非生物测试方法

非测试方法(non-testing methods)通常是指任何基于计算机开发的预测方法。主要包括定量构效关系(structure-activity relationship)、分类法(grouping approaches)、交叉参照(read-across)、毒理学阈值(threshold of toxicological concern, TTC)和专家系统(expert systems)等。这些方法在OECD、欧盟、美国和日本等国家和地区发展较快,已经有不少QSAR模型和工具应用到毒理学安全性评估中,例如,OECD QSAR Toolbox、Toxtree、CAESAR、TEST及HESS等,毒性终点涉及经皮吸收、皮肤刺激、眼刺激、皮肤致敏、急性毒性、重复剂量染毒、生殖发育、遗传和致癌等^[7]。在工业化学品领域,交叉参照已被多个国家的管理机构接受^[20]。总的来说,中国化妆品非测试方法的认识刚起步,开发和应用与国外还存在一定差距,需要更多的经验积累和借鉴。

3.4.2 组学技术

2003年,人类基因组计划(Human Genome Project, HGP)的所有目标全部实现,这标志着后基因组时代正式开始。随着基因组学(DNA序列)、转录组学(基因表达描述)的蛋白质组学(基因表达产物)、代谢组学(代谢产物识别)、细胞组学等技术的飞速发展,并结合不断发展的生物信息学,为毒理学替代方法的快速发展创造了一个难得的机会。组学技术应用于替代方法的开发主要有以下优势:1)充分利用人源细胞或干细胞进行体外试验,与人的相关性更高,有助于推动建立更有效的安全性评估策略和毒性预测技术;2)将基因表达作为了解生物学过程的指标,有可能在亚临床水平或低剂量下进行体外测定,发现不同与以往病理学或临床效应的指标,可能更相关和更适宜;3)如果不同的试验系统具有相同的基因表达,那么,动物试验就会减少,体外试验增加,而且后者更易标准化和广泛应用。

3.4.3 新型体外试验系统

实验用组织工程皮肤的构建技术始于20世纪90年代,从2D原代细胞培养起步,到生物材料的开发,再发展到三维皮肤模型重建,经历了30多年的历史。体外重建皮肤技术的成熟直接推动了替代方法发展,如现有法规可认可的眼刺激的重建角膜方法、皮肤腐蚀的皮肤模型方法等。目前商品化和实验室自行构建的皮肤模型,基本可满足科学研究、产品开发和检验检测的需要。

今后,替代技术将向更复杂的系统性毒性和靶器官毒性深入,很大程度上依赖于先进体外试验系统的建立。因此,重点关注的领域是如何在体外构建复杂器官,发挥3D打印

在硬件和微量精确控制方面的优势,加上多细胞培养技术的起步,可以在体外重建含有多种细胞类型的3D器官,如肝脏、肾脏、中枢神经和心脏系统。随着微流控技术、组织微织造技术和精准实验体系构建技术的发展,基于多器官人体芯片的技术,为系统毒理学的替代方法建立提供了条件。目前,循环、内分泌、胃肠、免疫、表皮系统、肌肉骨骼、神经、生殖、呼吸和泌尿系统的器官芯片已有商业化产品。人体芯片技术的开发,可以实现在人体组织中检测新药安全性和功效,阐明组织对化合物的反应机制,更好地模拟器官的生理特性和细胞之间的相互作用,更好的开发疫苗、生物产品和新药,实现更精准的代替传统动物实验。2017年4月美国食品药品监督管理局(FDA)已经测试了波士顿生物技术公司Emulate制造的同型肝脏芯片。尝试采取芯片器官代替动物测试用于新药研发,为法规接受人体芯片技术进行了尝试。

3.4.4 干细胞研究

利用干细胞研究取得的巨大进步,以及体细胞重编程产生多能干细胞(诱导的多能干细胞,iPSCs)的技术,为替代方法的研究提供了稳定的人类干细胞衍生细胞的来源,有望解决物种间外推的需要。无论是胚胎干细胞(ESC或iPSCs),还是神经干细胞都有开发用于毒性测试的替代方法。早在1997年,德国动物试验替代方法评价中心(ZEBET)就建立了利用两种小鼠细胞系(成纤维细胞3T3和胚胎干细胞D3)进行胚胎毒性测试的替代方法(EST方法),2003年,EST方法通过了ECVAM的验证,用于胚胎和发育毒性的预测。近年来,传统的EST方法已取得重要进展,例如采用iPS技术解决了人胚胎干细胞来源困难的问题;基于心肌分化蛋白的流式细胞分析方法提高了检测的效率^[21]。这些技术上的改进提高了EST方法的适用范围。同时,也为干细胞技术应用于其他毒性测试替代方法的研发提供了参考。

3.4.5 高内涵和高通量技术

替代方法的开发与检测技术的进步密不可分,特别是随着测试系统的复杂化,毒性效应参数的增多和检测样品多样化。可利用高通量(high throughput screening, HTS)和高内涵筛查(high content screening, HTC)技术,是基于分子水平和细胞水平的活性评价方法(模型),以微板形式作为实验工具载体,通过自动化操作系统执行试验过程,以灵敏快速的检测仪器采集实验结果数据,以计算机分析处理实验数据,实现在短时间内对数千种样品进行生物活性等检测的技术体系。HTS的最大优势是实质性地减少昂贵的动物使用和花费。此外,还可以检测化学物在不同的体外实验系统中暴露的生物学反应。

4 结论

3R原则提出50多年来,实验动物替代技术在科学、社会和法规的多重推动下取得了重要进步。其中科学技术起到了驱动作用,正是得益于现代科技技术的飞速发展,再加上立法的约束力,使得替代动物实验不再只是空洞的口号,而

成为实验动物学科的重要发展方向之一。近30年来,现代科技的发展推动了包括实验动物科学、毒理学和药学等在内的一切生命学科的变革,替代技术呈现多学科交叉渗透的趋势。诸如计算机预测、仿生材料、人类基因组、蛋白组学、人工器官、干细胞技术、人体芯片、高通量技术等人们已耳熟能详的词汇和技术,深刻地影响着人们的生活以及人们对动物的方式。可以说现代科技赋予了动物福利新的内涵,为动物实验替代找到了得以实践的途径。促使近10年来,实验动物替代的规模和技术体系得以不断发展和完善。替代技术已影响到人们的日常生活,包括药品、疫苗、生物制品、医疗器械等医疗领域,以及化妆品、化学品和农药的安全测试。这些方法的使用不仅取代了实验动物的使用,使人类自身获益,也极大地促进了体外科学技术的蓬勃发展和应用,实现科技进步与伦理进步并行。

中国在动物替代技术研究和方法推行方面起步较晚,但近年来已取得了可喜的进步。例如国家质检总局、疾控机构和行业主管机构如起草和发布了一些检测标准,开展一些跟踪研究,部分官方检测机构和第三方机构已具备提供技术服务的能力。2007年替代方法研究评价中心(CCARE)建立了中国首个网络数据共享平台。2013年首个按照国际标准执行的替代方法验证研究也顺利完成。替代方法的学术交流和实验室培训也持续开展,中国正在逐步缩小与发达国家的差距。

参考文献(References)

- [1] Michael Balls. 3R和仁慈准则[M]. 程树军,译. 北京:科学出版社, 2014: 32-87.
Balls M. The three Rs and the humanity criterion[M]. Cheng Shujun, trans. Beijing: Science Press, 2014: 32-87.
- [2] 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: 285-304.
Cheng Shujun, Jiao Hong. The principle and application of experimental animal substitution method[M]. Beijing: Science Press, 2010: 285-304.
- [3] Scott L, Eskes C, Hoffmann S, et al. A proposed eye irritation testing strategy to reduce and replace in vivo studies using Bottom-Up and Top-Down approaches[J]. Toxicol in Vitro, 2010, 24(1): 1-9.
- [4] 黄健聪,秦瑶,程树军,等. 牛角膜浑浊渗透试验方法预测眼刺激性的研究[J]. 中国卫生检验杂志, 2014, 24(14): 1980-1983.
Huang Jiancong, Qin Yao, Cheng Shujun, et al. Eye irritation prediction using bovine corneal opacity and permeability alternative method[J]. Chinese Journal of Health Laboratory Technology, 2014, 24(14): 1980-1983.
- [5] OECD. OECD new guidance document on an integrated approach on testing and assessment (IATA) for skin corrosion and irritation[S]. Paris: OECD, 2013.
- [6] 瞿小婷,程树军,刘超,等. 国际化学品安全评价动物替代测试法规趋势[J]. 日用化学品科学, 2016, 39(2): 11-16.
Qu Xiaoting, Cheng Shujun, Liu Chao, et al. Global regulation trend of alternative methods for chemical safety evaluation on animals[J]. Detergent & Cosmetics, 2016, 39(2): 11-16.
- [7] 程树军. 化妆品评价替代方法标准实施指南[M]. 北京:中国标准出版社, 2017: 75-207.
Cheng Shujun. Guides of alternative methods standards for cosmetics assessment[M]. Beijing: China Standards Press, 2017: 75-207.
- [8] OECD. OECD guideline for testing of chemicals No.437: Bovine corneal opacity and permeability test method for identifying i) Chemicals inducing serious eye damage and ii) Chemicals not requiring classification for eye irritation or serious eye damage[S]. Paris: OECD, 2013: 1-27.
- [9] 秦瑶,程树军,黄健聪,等. 整合CAMVA和BCOP方法检测化妆品的眼刺激[J]. 中国比较医学杂志, 2014, 24(6): 78-82.
Qin Yao, Cheng Shujun, Huang Jiancong, et al. Integrated CAMVA and BCOP methods to predict eye irritation caused by cosmetics[J]. Chinese Comparative Medicine, 2014, 24(6): 78-82.
- [10] 柯逸晖,陈彧,程树军,等. 直接多肽结合试验组人细胞系活化试验预测皮肤致敏物的探讨[J]. 中国实验动物学报, 2016, 24(6): 611-617.
Ke Yihui, Chen Yu, Cheng Shujun, et al. Preliminary study for integrating DPRA with h-CLAT to predict skin sensitizers[J]. Acta Laboratorium Animal Sinica, 2016, 24(6): 611-617.
- [11] National Research Council (NRC). Toxicity Testing in the twenty-first century: A vision and a strategy[R]. Washington, DC: National Academy of Sciences, 2007.
- [12] 瞿小婷,程树军,秦瑶,等. 有害结局通路指南及毒性测试应用分析[J]. 中国日用化学工业, 2016, 46(8): 473-478.
Qu Xiaoting, Cheng Shujun, Qin Yao, et al. Adverse outcome pathways guide and toxicity test applications[J]. China Surfactant Detergent & Cosmetics, 2016, 46(8): 473-478.
- [13] OECD. Guidance document on developing and assessing adverse outcome pathways[S]. Paris: OECD, 2013.
- [14] 陈彧,喻欢,程树军,等. 基于有害结局通路原理的皮肤致敏测试替代方法进展[J]. 日用化学品科学, 2016, 39(4): 4-9.
Chen Yu, Yu Huan, Cheng Shujun, et al. Development of alternative test strategy for the AOP-Based skin sensitization[J]. Detergent & Cosmetics, 2016, 39(4): 4-9.
- [15] 陈彧,喻欢,程树军,等. 结合组织学评分的牛角膜浑浊和渗透性方法研究[J]. 日用化学品科学, 2016, 46(2): 107-110.
Chen Yu, Yu Huan, Cheng Shujun, et al. Research on bovine corneal opacity and permeability test integrating with histopathological evaluation[J]. China Surfactant Detergent & Cosmetics, 2016, 46(2): 107-110.
- [16] 秦瑶,柯逸晖,程树军,等. 牛角膜浑浊和渗透性实验应用于个人护理产品评价的案例研究[J]. 日用化学品科学, 2017, 40(3): 13-18.
Qin Yao, Ke Yihui, Cheng Shujun, et al. Case analysis of BCOP in evaluation of personal care products[J]. Detergent & Cosmetics, 2017, 40(3): 13-18.
- [17] 秦瑶,柯逸晖,徐宏景,等. 鸡胚尿囊膜模型在化妆品毒性和功效评估中的应用[J]. 日用化学品科学, 2016, 39(7): 15-18.
Qin Yao, Ke Yihui, Xu Hongjing, et al. Application of chicken chorio-allantoic membrane model in toxicity and efficacy assessment of cosmetics[J]. Detergent & Cosmetics, 2016, 39(7): 15-18.
- [18] Jaworska J S, Natsch A, Ryan C, et al. Bayesian integrated testing strategy (ITS) for skin sensitization potency assessment: A decision support system for quantitative weight of evidence and adaptive testing strategy[J]. Arch Toxicol, 2015, 89(12): 2355-2383.
- [19] Walters R M, Gandolfi L, Mack C M, et al. In vitro assessment of skin

- irritation potential of surfactant-based formulations by using a 3-D skin reconstructed tissue model and cytokine response[J]. *Altern Lab Anim*, 2016, 44(6): 523-532.
- [20] Patlewicz G, Ball N, Booth E D, et al. Use of category approaches, read-across and (Q) SAR: General considerations[J]. *Regul Toxicol Pharmacol*, 2013, 67(1): 1-12.
- [21] 程树军, 秦瑶, 喻欢, 等. 胚胎干细胞试验预测胚胎毒性替代方法进展[J]. *中国比较医学杂志*, 2016, 26(1): 81-85.
- Cheng Shujun, Qin Yao, Yu Huan, et al. Progress for alternatives methods predict the embryotoxicity by embryonic stem cell test[J]. *Chinese Comparative Medicine*, 2016, 26(1): 81-85.

Technology progress of alternative to animal testing

CHENG Shujun

Guangdong Inspection and Quarantine Technology Center, Guangzhou 510623, China

Abstract This paper reviews the technological progress and the regulatory acceptance of alternative methods, including the development of the concept of alternative to the animal test, which can be divided into three phases as the starting accumulation, the regulation acceptance and the accelerated development. The focus is on the theories of the Toxicity Testing in the Twenty-First Century (TT21C), the Adverse Outcome Pathway(AOP) and the integrated testing strategy, The new technologies include the reconstructed tissues and the multi-organs-on-chip, the stem cells, the "omics-" technology, and the non-testing approaches, and the high throughput and the high content screening are integrated into the alternative methods, with obvious interdisciplinary features. The standardized alternative methods and the personalized in vitro methods are applied in the assessment of health related products of chemicals, cosmetics, medicals and other biological products. It is concluded that the technology of the alternative to the animal testing is not only an important part of lab animal science, but also an innovative tool for scientific progress and with the prospect of industrialization.

Keywords animal testing; alternative to animal testing; laboratory animal

(责任编辑 刘志远)