

团 体 标 准

T/ZHCA 011—2020

祛斑美白类化妆品皮肤变态反应体外 测试方法 人源细胞系激活试验法

Method of skin sensitization test in vitro for freckle removing and whitening
cosmetic products—Human cell line activation test

2020-10-09 发布

2021-01-09 实施

浙江省保健品化妆品行业协会 发布



前 言

本文件按照 GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第 1 部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

本文件由浙江省食品药品检验研究院提出。

本文件由浙江省保健品化妆品行业协会(ZHCA)归口。

本文件起草单位：浙江省食品药品检验研究院、安利(中国)研发中心有限公司、珀莱雅化妆品股份有限公司、杭州希科检测技术有限公司、玫琳凯(中国)有限公司、广东博溪生物科技有限公司、强生(中国)有限公司、浙江养生堂天然药物研究所有限公司、杭州环特生物科技股份有限公司。

本文件主要起草人：桑晶、陈舒怀、刘斯语、李茈苈、厉昌海、江以竑、张晓娥、胡莉萍、周峰、张勇。

祛斑美白类化妆品皮肤变态反应体外 测试方法 人源细胞系激活试验法

1 范围

本文件规定了祛斑美白类化妆品皮肤变态反应的一种体外人源细胞系激活测试方法。
本文件适用于祛斑美白类化妆品的皮肤变态反应测试。

2 规范性引用文件

本文件没有规范性引用文件。

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

祛斑美白类化妆品 **freckle removing cosmetic and whitening cosmetic products**
用于减轻皮肤表皮色素沉着或有助于皮肤美白增白的化妆品。

3.2

皮肤变态反应 **skin sensitization**
皮肤对一种物质产生的免疫源性皮肤反应。

3.3

人源细胞系激活试验 **human cell line activation test; H-CLAT**
受试样品暴露于树突状细胞一段时间后,通过流式细胞仪技术测定细胞上特异性的表面抗原标志物 CD86 和 CD54 变化,评价受试样品潜在的致敏风险的试验。

4 试剂和材料

除另有规定外,所有试剂均为分析纯。

4.1 抗体:

FITC 标记鼠源单克隆抗人 CD86 抗体。

FITC 标记小鼠源 IgG1 抗体。

FITC 标记鼠源单克隆抗人 CD54 抗体。

FITC 标记小鼠源 IgG1 抗体。

4.2 新生小牛血清。使用前经过 56 ℃ 灭活。

4.3 培养液;RPMI-1640 培养液。

4.4 无钙镁的磷酸盐缓冲液。

4.5 流式上样缓冲液;含有 0.1% 牛血清的磷酸盐缓冲液。

4.6 封闭液;含有 0.01% 球蛋白的流式上样缓冲液。

4.7 青链霉素。

4.8 完全培养基:含有 10%血清的 RPMI-1640 培养基,内含 0.05 mmol/L 的 2-巯基乙醇和 1:100 的青链霉素。

4.9 细胞株:THP-1(TIB-202™)细胞系,试验前需确认细胞增殖进入指数生长期,且特异性表面标志物 CD86 和 CD54 可以稳定表达。

4.10 溶剂:用 RPMI-1640 培养液或二甲基亚砜作为溶剂,通过超声震荡等方式制成均一的混悬液,临用现配。

4.11 阳性对照:2,4-二硝基氯苯(2,4-Dinitrochlorobenzene),DNCB。

4.12 阴性对照:乳酸。

4.13 空白对照:完全培养基。

5 仪器

5.1 电子天平:精度 0.01 g。

5.2 离心机。

5.3 流式细胞仪。

5.4 净化工作台。

5.5 二氧化碳恒温培养箱。

6 测试步骤

6.1 测试依据

参考 OECD No.442e 进行。

6.2 毒性剂量选择试验

可根据实验室具体条件选择 PI 染色法、CCK8 法或 MTT 法进行毒性筛选。

6.2.1 样品准备

按样品使用说明书准备受试样品,直接使用的样品,直接取样作为受试样品。

6.2.2 剂量设置

至少应设置 3 个可供分析的浓度。当有细胞毒性时,其浓度范围应包括从最大毒性至几乎无毒性。若受试样品无毒性则采用原液作为试验的高剂量。

6.2.3 细胞接种

准备浓度为 2×10^6 个/mL 细胞悬液,接种 96 孔板每孔 100 μ L,即细胞数量为 2×10^5 个/孔。

6.2.4 加样

加受试样品到 96 孔板中,混匀后在 37 $^{\circ}$ C 二氧化碳培养箱中孵育 24 h。

6.2.5 清洗

孵育结束后,用流式上样缓冲液重悬并反复洗 2 次。

6.2.6 CCK8 染色

每孔加 100 μL 磷酸盐缓冲液重悬后,加 10 μL 的 CCK8 溶液于 37 $^{\circ}\text{C}$ 二氧化碳培养箱孵育 1 h。

6.2.7 测定

在 450 nm 下,用酶标仪测定每孔吸光度值。细胞成活率(以 % 表示)计算如下:

$$\text{细胞成活率} = \frac{\text{受试物处理组吸光度值}}{\text{阴性对照组吸光度值}} \dots\dots\dots (1)$$

6.3 正式试验

6.3.1 细胞接种

准备密度为 2×10^6 个/mL 细胞悬液,接种于 24 孔板中,每孔 500 μL 即每孔 1×10^6 个细胞。

6.3.2 剂量选择

按照 6.2.7 得到细胞成活率来确定高浓度、中浓度和低浓度作为正式剂量。将使得细胞成活率达到 50% \pm 10% 的剂量作为最高剂量,依次向下取 2 个浓度作为正式试验的中剂量和低剂量,使得浓度范围包括从最高毒性至几乎无毒性。

6.3.3 加样及孵育

分别加入阴性对照,阳性对照和高剂量、中剂量、低剂量组于 24 孔板的细胞中,37 $^{\circ}\text{C}$ 二氧化碳培养箱中孵育 24 h。

6.3.4 清洗

孵育结束后,用流式上样缓冲液洗两次。

6.3.5 封闭

离心后,加封闭液 800 μL 重悬并于 4 $^{\circ}\text{C}$ 封闭 15 min。

6.3.6 抗体孵育

封闭完成后,每组细胞分成四管,离心后分别加入 FITC 标记的 CD86、CD54 抗体稀释液,以及对应抗体的同型对照小鼠 IgG 抗体稀释液重悬,在 4 $^{\circ}\text{C}$ 暗处孵育 30 min。

6.3.7 PI 染色

抗体孵育后,上样缓冲液洗两次并重悬在 400 μL 上样缓冲液中。在流式上样前,加入 20 μL 的 PI 染液(12.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$)得到 PI 终浓度为 0.625 $\mu\text{g}/\text{L}$ 的细胞悬液。

6.3.8 流式上样的准备

流式细胞仪选择激发光源 488 nm,检测细胞表面抗原标记物。FITC 通道(FL-1)需要优化到能够检测出 FITC 信号;而 PI 通道(FL-3)优化到能够检测出 PI 荧光信号。死细胞用 PI 染色设门排除。

6.3.9 设门

准备空白对照管、阴性对照管和阳性对照管的细胞来设门。在 FL-3 直方图中,阳性对照组中 PI 阴

性部分和阳性部分的分界点设定 R1 门,使得阴性部分对应活细胞,并用于接下来的分析。

6.3.10 数据收集

总共收集 10 000 个活细胞,活细胞的荧光强度的几何均值(MFI)最终用于分析。

6.3.11 数据分析

相对荧光强度(RFI)作为 CD86 和 CD54 表达的相对值,根据流式分析得到的 MFI 按照公式(2)计算:

$$RFI = \frac{N_1 - N_2}{B_1 - B_2} \dots\dots\dots(2)$$

式中:

- RFI —— 相对荧光强度,以 % 表示;
- N_1 —— 样品组标记抗体的 MFI;
- N_2 —— 样品组标记抗体同型对照 IgG 的 MFI;
- B_1 —— 空白对照组标记抗体的 MFI;
- B_2 —— 空白对照组标记抗体同型对照 IgG 的 MFI。

7 结果判定

7.1 试验成立条件

阴性对照组细胞的成活率要大于 90%;阳性对照组 CD54 的 RFI 大于 200%且 CD86 的 RFI 大于 150%,阴性对照组需要满足 CD54 的 RFI 小于 200%且 CD86 的 RFI 小于 150%,试验成立。

7.2 结果评价

受试样品在至少 2 次独立试验中,高、中、低任一剂量下的 CD86 的 RFI 等于或大于 150%,或者 CD54 的 RFI 大于或等于 200%,则该受试样品有潜在的致敏风险。受试样品在高、中、低任一剂量下的 CD86 的 RFI 均小于 150% 且 CD54 的 RFI 均小于 200%,则该受试样品在本实验条件下无致敏风险。

8 试验报告

试验报告至少应给出以下几个方面的内容:

- a) 检验依据;
- b) 细胞来源、培养代数;
- c) 受试物、阴性对照和阳性对照的信息,包括与试验操作相关的理化性状、样品和阳性对照物的预处理;
- d) 试验条件和方法,包括试验具体步骤;
- e) 试验结果;
- f) 试验日期;
- g) 试验结论;
- h) 检验者、校核者和技术负责人签字以及检验单位公章或检验专用章。

参 考 文 献

- [1] OECD No.442e 化学品测试准则(Guideline for the testing of chemicals)
-





浙江省保健品化妆品行业协会
团 体 标 准
祛斑美白类化妆品皮肤变态反应体外
测试方法 人源细胞系激活试验法
T/ZHCA 011—2020

*

中国标准出版社出版发行
北京市朝阳区和平里西街甲2号(100029)
北京市西城区三里河北街16号(100045)
网址 www.spc.net.cn
总编室:(010)68533533 发行中心:(010)51780238
读者服务部:(010)68523946
中国标准出版社秦皇岛印刷厂印刷
各地新华书店经销

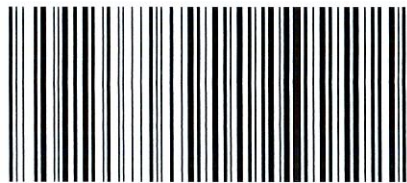
*

开本 880×1230 1/16 印张 0.75 字数 14 千字
2021年3月第一版 2021年3月第一次印刷

*

书号: 155066·5-2934 定价 16.00 元

如有印装差错 由本社发行中心调换
版权专有 侵权必究
举报电话:(010)68510107



T/ZHCA 011-2020



码上扫一扫 正版服务到