

团 体 标 准

T/ZHCA 010—2020

染发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

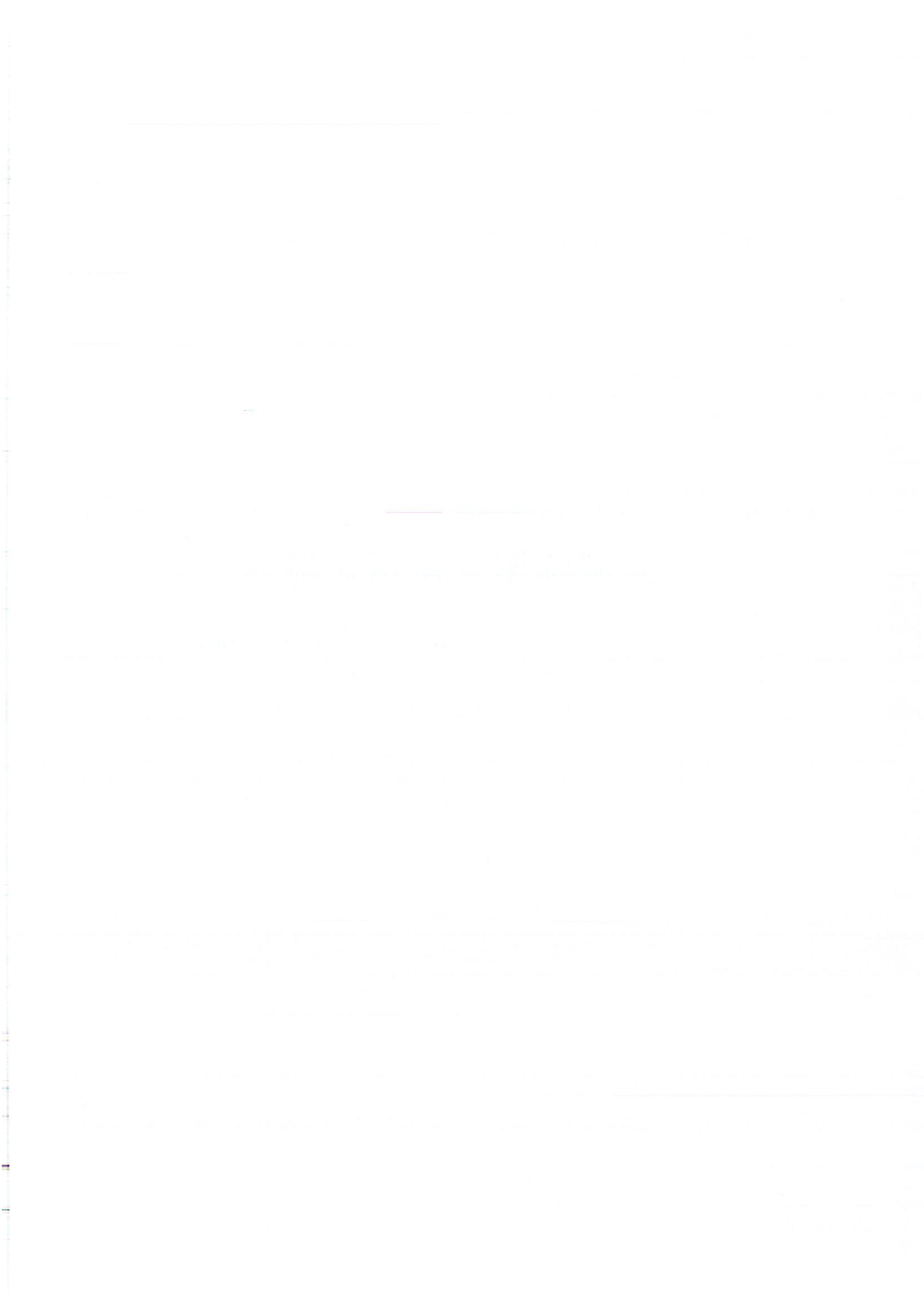
Method of skin sensitization test in vitro for hair dye cosmetic products—
Human cell line activation test

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、珀莱雅化妆品股份有限公司、安利(中国)研发中心有限公司、玫琳凯(中国)有限公司、杭州希科检测技术有限公司、浙江养生堂天然药物研究所有限公司、广东博溪生物科技有限公司、杭州环特生物科技股份有限公司。

本文件主要起草人：匡荣、桑晶、徐晓明、刘斯语、江以竑、徐美芬、周峰、李潇、周示玉。



染发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

本文件规定了染发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。
本文件适用于染发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

染发类化妆品 hair dye cosmetic products

具有改变头发颜色作用的化妆品。

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 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 DPBS 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 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 毒性试验

6.2.1 样品制备

按染发类化妆品使用说明书准备受试样品,直接使用的样品,直接取样品作为受试样品最大剂量,并向下稀释数个浓度,需配制后使用的样品,按样品使用说明书提供的方法配制后作为受试样品最大剂量,并向下稀释数个浓度,样品需临用现配。

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。

6.2.3 细胞接种

准备浓度为 2×10^6 个/mL 细胞悬液接种于 24 孔板,每孔 500 μ L,即细胞数量为 1×10^5 个/孔。

6.2.4 加样

加入不同浓度的受试样品各 500 μ L 到 24 孔板中,混匀后在 37 $^{\circ}$ C 二氧化碳培养箱孵育 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两次。

6.2.6 PI 染色

每管细胞用 400 μ L 上样缓冲液重悬后加入 20 μ L 的 PI 染液(12.5 μ g/mL)得到终浓度 0.625 μ g/mL

的 PI 染色的细胞悬液。

6.2.7 数据收集和分析

流式细胞仪选择激发光源 488 nm,死细胞用 PI 染色,总共分析 10 000 个细胞,分析 PI 未染细胞数,计算细胞的成活率用于正式试验剂量选择。细胞成活率(以%表示)按照式(1)计算:

$$\text{细胞成活率} = \frac{\text{PI 未染色细胞数}}{10\ 000} \dots\dots\dots (1)$$

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的高浓度、中浓度和低浓度作为正式剂量。将使得细胞成活率达到 $50\% \pm 10\%$ 的剂量作为最高毒性剂量,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、低剂量的受试样品于 24 孔板的细胞中,在 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 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 $4\text{ }^\circ\text{C}$ 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 $4\text{ }^\circ\text{C}$ 暗处孵育 30 min。

6.3.7 PI 染色

抗体孵育后,细胞用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 ($12.5\text{ }\mu\text{g}/\text{mL}$) 得到终浓度 $0.625\text{ }\mu\text{g}/\text{mL}$ 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) 需要优化到能够检测出 DNCEB 染色的 PI 荧光信号。死细胞用 PI 染色设门进行排除。

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用来设门。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)计算得到:

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

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大于 90%;阳性对照组的 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 等于或大于 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%,则该受试样品在本试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] OECDNo.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
染发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 010—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

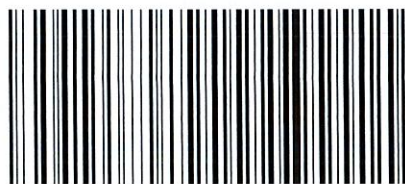
*

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: 155066·5-2892 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 010-2020



码上扫一扫 正版服务到