

附件

化妆品用化学原料 体外 3T3 中性红摄取光毒性试验方法

一、范围

本方法规定了化妆品用化学原料体外3T3中性红摄取光毒性试验的范围、规范性引用文件、术语和定义、试验原理、试验材料与试剂、试验步骤、结果判定标准。

本方法推荐适用于评价化妆品用化学原料的潜在光毒性。

二、规范性引用文件

下列文件中的条款通过本方法的引用而成为本方法的条款。注明日期的引用文件，其后所有的修改单（不包括勘误的内容）或修订版均不适用于本方法，但是，鼓励使用单位对修订部分的引用进行研究，并提出意见。研究是否可使用这些文件的最新版本。未注明日期的引用文件，其最新版本适用于本方法。

经济合作与发展组织（OECD）guidelines for the testing of chemicals:
3T3 NRU phototoxicity test. NO. 432

三、术语和定义

下列术语和定义适用于本方法。

（一）光毒性（Phototoxicity）

皮肤一次接触化学物质后，继而暴露于长波紫外线照射下所引发的一种皮肤毒性反应。

（二）细胞活性（cell viability）

测量某一细胞群总活性的参数(如细胞溶酶体摄取活性染料中性红),其数值取决于测定的终点和试验所用的设计方案,并与细胞总数和/或细胞活力相关。

（三）相对细胞活性（relative cell viability）

通过与溶剂（阴性）对照组的相关性来表达的细胞活性,对照组除了未经受试化学物质处理外,整个试验过程与试验组一样（或+Irr或-Irr）。

（四）光刺激因子（photo irritation factor; PIF）

受试物分别在无光照(-Irr)和有光照(+Irr, 无细胞毒性的紫外光/可见光(UV/vis)照射)条件下获得两组平行有效的细胞毒性浓度(IC₅₀),通过比较IC₅₀的值得到的因子。

（五）半数抑制浓度（IC₅₀）

使细胞活性下降50%的受试化学物质的浓度。

（六）平均光效应（mean photo effect; MPE）

受试物分别在无光照(-Irr)和有光照(+Irr, 无细胞毒性的UV/vis照射)条件下获得两组浓度反应曲线,通过数学分析导出的数值。

（七）预测模型（prediction model）

将毒性试验结果转换为预测毒性潜力的算法。在本方法中,PIF和MPE可用于把体外3T3中性红摄取光毒性试验的结果转换为对光毒性潜力的预测。

四、试验原理

光毒性是指应用于机体的物质经暴露于光线后诱发或增强(在低剂量水平时明显)的毒性反应,或全身应用一种物质后由皮肤光照引起的反应。中性红是一种弱的阳离子染料,极易以非离子扩散的方式穿透细胞膜并在细胞溶酶体内聚集。某些化学物质和外界条件作用可引起细胞表面或溶酶

体膜敏感性的改变导致溶酶体脆性增高等不可逆的细胞毒性变化，从而导致细胞吸收中性红的能力下降。

本试验方法通过测定3T3成纤维细胞经化学物质和紫外线照射联合作用后细胞吸收中性红的能力或细胞毒性的变化来判断该化学物质是否具有光毒性。

五、试验材料与试剂

（一）光源类型

选择合适的光源必须符合的标准包括：光源发射的光波长能被受试物吸收（吸收光谱），光的剂量（在一个合理的暴露时间内能达到的剂量）能满足已知光毒性化学物质的检测。此外所有的波长和剂量不能有益于试验系统，如（红外区域）热量散发或类似 UVB 波长的高细胞毒性的干扰，因此光源要求能够稳定地释放 UVA 和可见光波长。

由于所有的太阳光模拟器都发射出相当数量的 UVB，应经过适当的过滤使 $UVB < 0.1J/cm^2$ 。透过 96 孔组织培养板盖的光强度建议为 $1.7mW/cm^2$ 光强度（即 $5J/cm^2$ ）剂量。

（二）细胞株

选用永生化小鼠成纤维细胞系—Balb/c 3T3成纤维细胞。要求细胞来源必须是具有公信力的机构且能确保细胞品质稳定。

由于细胞对UVA的敏感性随传代数的增加可能增高，建议用于试验的Balb/c 3T3成纤维细胞传代次数最好少于100次。

测试单位若自行培养细胞株，则须定期检测细胞株对UV光的敏感性，并确保无支原体污染。

（三）培养基

采用DMEM培养基、胎牛血清或小牛血清（10%）、谷氨酰胺

(4mmol/L)、抗生素(青霉素和链霉素,浓度分别为100IU和100 μ g/mL),在36.5℃—37.5℃, 5%—7.5%CO₂条件下培养。

(四) 溶剂的选择

在测定前,应首先评价受试物的溶解度,以选择最佳溶剂体系。溶剂必须不与受试物发生化学反应,不影响细胞活性。

能溶于水且浓度达1000 μ g/mL的受试物可溶于预先加温(37℃)和灭菌的磷酸盐缓冲液(EBSS或PBS)。水中溶解度有限的受试物(<1000 μ g/mL)可用二甲基亚砷(DMSO)或乙醇(ETOH)等溶剂溶解。使用DMSO或ETOH作为溶剂时,其终浓度不得超过总体积的1%(v/v),阴性对照组和受试物组溶剂的体积比例应相同。

(五) 受试物的配制

受试物必须在使用前新鲜配制。建议所有的化学物质操作和细胞处理初期都应避免受试物在光激活或光降解的光线条件下进行。

每次实验应设空白对照、溶剂对照和阳性对照(推荐使用氯丙嗪)。加样示意图见附录B。

(六) 受试物剂量的设置

需通过预实验确定有光照和无光照条件下受试物的浓度范围。用溶剂将受试物原液使用同一常数稀释因子(如 $\sqrt{10} = 3.16$)稀释成8个浓度,相关浓度范围应包括从最大细胞毒性至几乎无细胞毒性浓度(细胞存活率在20%—100%的范围)。

如果预实验结果表明在浓度等于1000 μ g/mL时仍未出现细胞毒性,则建议最高浓度为1000 μ g/mL;若出现细胞毒性的浓度低于1000 μ g/mL时,有细胞毒性的浓度少于三种,则需要重复试验或使用更小的稀释因子,直至出现有细胞毒性的浓度至少三种。如果根据受试物的溶解度,

最高浓度不能达到 1000 μ g/mL，则以最大溶解度时的浓度作为最高浓度，避免受试物在任何浓度出现沉淀。

如果在无光照条件下(-Irr)受试物在最高浓度时仍然不具有细胞毒性，而在有光照条件下(+Irr)出现强烈细胞毒性，则在-Irr试验和+Irr试验中可采用不同的试验浓度。

(七) 中性红 (Neutral Red, NR)

化学名为 3-氨基-7-二甲氨基-2-甲基吩嗪盐酸盐 (3-amino-7-dimethylamino-2-methylphenazine hydrochloride)，CAS 编号:553-24-2；或国家药品标准物质，编号：100460。

(八) 中性红溶液

1. 中性红原液。称取0.4g中性红染料，溶于100mL蒸馏水（室温条件下可保存2个月）

2. 中性红使用液。在79mL DMEM培养液中加入1mL中性红原液，即为使用液。中性红终浓度为50 μ g/mL。

(九) 中性红解吸附溶液

将蒸馏水、乙醇、乙酸按49:50:1比例配制（现用现配，储存不超过1小时）。

六、试验步骤

(一) 加100 μ L培养基于96孔组织培养板的外围孔（空白对照），在其余孔中加入100 μ L密度为 1×10^5 个细胞/mL的细胞悬液（即 1×10^4 细胞/孔）。每次试验制备两个板，包括相同的受试物浓度系列、溶剂对照、空白对照和阳性对照，一个板用于确定细胞毒性（-Irr），另一个板用于确定光毒性（+Irr）。

(二) 培养细胞24小时（5%—7.5%CO₂，37℃）直至它们形成单层

半饱和细胞。该培养过程允许细胞恢复和粘连。

（三）去除培养液，用150 μ L EBSS或PBS轻柔冲洗细胞一次或两次。加入100 μ L含适当浓度受试物或溶剂的缓冲液到孔中。培养细胞1小时（5%—7.5%CO₂，37℃）。

（四）在室温下将其中一个板进行光照（+Irr）暴露，以1.7mW/cm²光强度透过96孔板盖照射细胞50分钟；同时将另一个平板无光照（-Irr）置于暗盒内50分钟。

（五）去除受试溶液，用150 μ L EBSS或PBS仔细冲洗细胞两次。加入100 μ L培养液，培养过夜（18—22小时，5%—7.5%CO₂，37℃）。

（六）在相差显微镜下检查细胞，记录受试物细胞毒性所致细胞形态学的改变，用于排除试验误差。

（七）中性红吸收（NRU）测量。细胞吸收中性红进入溶酶体和活细胞体内空泡，可用作细胞数量和活性的定量指标。

1. 用150 μ L预温的EBSS或PBS冲洗细胞一次或两次。轻柔拍打平板，去除冲洗溶液。加入100 μ L含50 μ g/mL中性红的培养液，在5%—7.5%CO₂，37℃和湿度适宜的环境下培养细胞3小时。

2. 去除中性红培养液，用150 μ L EBSS或PBS冲洗细胞一次或两次。

3. 轻轻倒出并吸干全部EBSS或PBS。

4. 准确加入150 μ L中性红解吸附溶液。

5. 在微量滴定平板振荡器上震荡96孔板10分钟，直至中性红从细胞内被提取出来，并形成均匀溶液。

6. 用分光光度计或酶标仪测定中性红提取物溶液在540nm波长处的光密度。用空白孔作为参考对照。

七、结果评判标准

（一）确定以光刺激因子（PIF值）为基础的预测模型

1. 通过分析在有光照（+Irr）和无光照（-Irr）两种情况下获得的细胞毒性浓度反应曲线，确定能抑制50%细胞活性的受试物浓度（IC₅₀），按下列公式计算光刺激因子（PIF）。

$$PIF = \frac{IC_{50}(-Irr)}{IC_{50}(+Irr)}$$

评判标准：PIF≤2：预测“无光毒性”；PIF≥5：预测“有光毒性”。PIF介于2—5之间，需进行重复试验；如果PIF仍介于2—5之间，预测“有潜在光毒性”。

2. 如果受试物在有光照（+Irr）时有细胞毒性，无光照（-Irr）时无细胞毒性，且细胞毒性试验所使用的浓度已达最高受试浓度（C_{max}）时，可按照下列公式计算 > PIF：

$$> PIF = C_{max}(-Irr) / IC_{50}(+Irr)$$

评判标准为：如果只获得一个“> PIF”，那么任何 > PIF > 1 的值都能提示“有潜在光毒性”。

3. 受试物在最高浓度时仍未显示任何细胞毒性，用“PIF = *1”表示，提示“无潜在光毒性”。

（二）确定以平均光效应（MPE值）为基础的预测模型

通过在浓度网格上比较有光照（+Irr）和无光照（-Irr）两种情况下获得的细胞毒性浓度反应曲线（i = 1, ..., N）可得到平均光效应（MPE），细胞毒性浓度反应曲线的染毒浓度需在有光照（+Irr）和无光照（-Irr）试验共有的浓度范围内选择。浓度C_i的光效应（PE_i）等于浓度效应（CE_i）和反应效应（RE_i）的乘积。使用专门的软件“PHOTO32或更高版本”求得

平均光效应（MPE），建立以平均光效应（MPE）为基础的预测模型。
通过将MPE与临界阈值MPE_c比较，预测化学物潜在光毒性的预测模型。

阈值MPE_c = 0.1

评判标准：

如果MPE ≤ 0.1：预测无潜在光毒性；

如果MPE ≥ 0.15：预测有潜在光毒性。

如果MPE介于0.1—0.15之间，需进行重复实验；如果MPE仍介于0.1—0.15之间，预测有潜在光毒性。

附录 A

NRU PT 试验流程图

时间	步骤
0 小时	接种 96 孔平板：1×10 ⁴ 个细胞/孔培养（37℃、5%—7.5%CO ₂ 、24h）。
24 小时	去除培养液，用 150μL EBSS/PBS 轻柔冲洗细胞一次或两次。
24 小时	分别用 100μL 8 种不同浓度的受试物处理细胞，培养细胞 1h（37℃、5%—7.5%CO ₂ ）。
25 小时	光毒性：室温下暴露于有光照（+Irr）（1.7mW/cm ² ）50 分钟（即 5J/cm ² ） 细胞毒性：室温下将另一个平板置于黑暗环境 50 分钟。
25 小时 50 分钟	去除受试溶液，用 150μL EBSS 或 PBS 仔细冲洗细胞两次，再用培养液培养细胞（37℃、5%—7.5%CO ₂ 、18h—22h 过夜）。
48 小时	显微镜下观察细胞形态学改变；去除培养液，用 150μL EBSS 或 PBS 冲洗细胞一次或两次，加入 100μL 含 50μg/mL 中性红的培养液培养（37℃、5%—7.5%CO ₂ 、3h）。
51 小时	去除中性红培养液，用 150μL EBSS 或 PBS 冲洗细胞一次或两次，加入 150μL 中性红解吸附溶液。
51 小时	震荡平板 10 分钟。
51 小时 10 分钟	检测在 540nm 波长下细胞对中性红的吸收情况（反映细胞活性）。

附录 B

96 孔板加样示意图

- 1. 建议使用如下式样 96 孔板。如使用软件 NRU-PIT 进行数据分析，则必须按以下所示，准确设计 96 孔板的加样。
- 2. 鉴于在平板四周外围孔可能发生蒸发作用，建议将四边这些孔作为空白对照，以纠正可能出现的塑胶材料对中性红吸收所造成的结果干扰。
- 3. 96 孔的加样示例如下：

b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b
b	UC	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	UC	b
b	UC	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	UC	b
b	UC	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	UC	b
b	UC	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	UC	b
b	UC	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	UC	b
b	UC	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	UC	b
b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b

注：1.UC 为未接受处理的对照孔（平均活性设为 100%）；
2.C1—C8 为 8 个浓度梯度的受试化学物（C1—C8 为从低浓度向高浓度依次排列）；
3.b 为空白对照（不含有细胞，但用 NR 培养液和 NR 解吸附溶液处理）。

附录 C

光模拟器的谱能和细胞的敏感性

1 光模拟器谱能分布

图 B.1 显示一个可接受的经滤过的光模拟器的光谱能量分布，资料来源于 3T3 NRU 光毒性验证试验中的光源——金属卤化物灯。图示分别显示了两个不同滤光片和 96 孔培养板盖的滤过效果。在 3T3 NRU 光毒性试验中应使用 H1 滤光片；H2 滤光片仅用于能耐受高剂量 UVB 的试验系统（如皮肤模型试验和红细胞光溶血性试验）；培养板盖的滤过作用主要见于 UVB 区域，辐射光谱中仍残留足够量的 UVB 足以激活类似胺碘酮的化学物质，它们在 UVB 区域具有典型的光吸收作用。

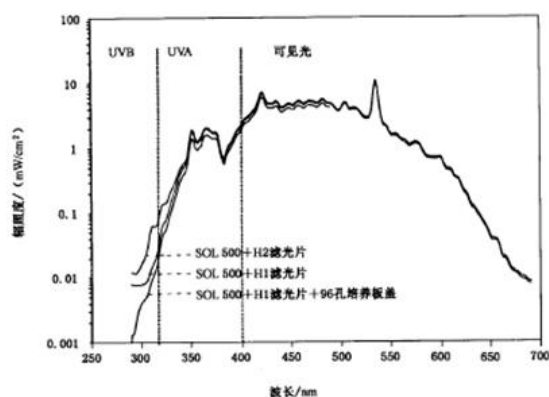


图 B.1 滤过的光模拟器的光谱能量

2 细胞的光照敏感性（UVA 范围内测定）

图 B.2 显示 Balb/c 3T3 细胞对光模拟器发射光线的敏感性，资料来源于 7

个不同的实验室预验证研究中获得的 UVA 范围内测定的 3T3 NRU 光毒性验证试验数据。两条空心标志的曲线来自衰老的细胞（超次数传代），必须更新细胞才能用于试验。标记实心符号的曲线表示可接受的光照耐受水平。从这些数据得出最高的无细胞毒性照射剂量为 $5\text{J}/\text{cm}^2$ （垂直虚线），水平虚线显示最高可接受的照射效应。

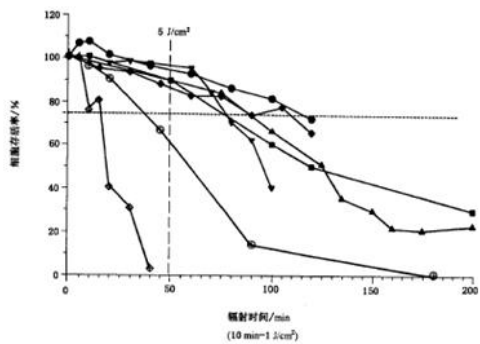


图 B.2 Balb/c 3T3 细胞的光照敏感性(在 UVA 范围内测定)