

化妆品用化学原料体外兔角膜上皮细胞短时暴露试验

Short Time Exposure In Vitro Test Method (STE)

1 范围

本方法规定了化妆品用化学原料体外兔角膜上皮细胞短时暴露试验的范围、试验目的、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。

本方法适用于化妆品用化学原料眼刺激性的检测。

2 试验目的

预测和评价化妆品用化学原料对眼睛是否具有刺激作用或腐蚀作用。

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本方法。

3.1 眼睛刺激性 eye irritation

眼球表面接触受试物后所产生的可逆性炎性变化。

3.2 眼睛腐蚀性 eye corrosion

眼球表面接触受试物后引起的不可逆性组织损伤。

3.3 细胞活性 cell viability

在细胞群体中总有一些因各种原因而死亡的细胞，活细胞所占细胞总数的百分比称为细胞活性。参数的选择及其数值取决于测定的终点和试验所用的设计方案。

3.4 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。

4 试验原理

化合物直接作用于角膜引起的刺激作用类似于细胞毒性损伤作用，通过检测细胞毒性指标，可反映角膜损伤的程度。试验采用体外培养的兔角膜上皮细胞（SIRC），短时暴露于化妆品用化学原料，模拟急性角膜刺激作用，通过计算细胞相对存活率来预测化妆品用化学原料引起的眼睛损伤。

5 试验材料与试剂

5.1 细胞株

采用SIRC兔角膜上皮细胞，该细胞为贴壁生长。要求：来源清晰，代数明确（<25代）。

5.2 培养基

采用MEM培养基，加入10%胎牛血清、2mmol/L谷氨酰胺和适量抗生素（终浓度为青霉素50~100IU/mL，链霉素50~100μg/mL）。

5.3 溶液的配制

0.5mg/mL噻唑蓝（MTT）溶液：称取MTT 50mg，溶于100 mL的磷酸盐缓冲液或无酚红的培养基中，用0.22μm滤膜过滤除菌，放4℃避光保存，最好现用现配。在配制和保存的过程中，容器最好用铝箔纸包住。

0.04N酸化异丙醇：异丙醇中加入HCl使其最终达0.04mol/L。

磷酸盐缓冲液(PBS)：氯化钠9.00g、七水磷酸氢二钠0.73g、无水磷酸二氢钾0.21g，去离子水定容至1000 mL，调pH=7.2~7.4，高压灭菌。

5.4 溶剂的选择

如果受试物为水溶性物质首选生理盐水作为溶剂，若受试物不能溶解或均匀混悬于生理盐水中则可首先考虑5%的DMSO/生理盐水溶液，其次可选用矿物油作为溶剂。不能溶于或均匀混悬于上述三种溶剂的物质不适用于本方法。

5.5 受试物的浓度选择及配制

受试物选择0.05%和5%两个浓度进行检测。根据受试物理化特性选择合适的溶剂，首先配制成5%浓度的溶液或均匀混悬液，然后用5%浓度的溶液或均匀混悬液依次10倍稀释配制0.05%浓度的溶液或均匀混悬液，二者直接用于试验。受试物应在使用前新鲜配制，否则必须证实储存不影响其稳定性。

5.6 对照的选择

实验应同时设空白对照、培养基对照、溶剂对照和阳性对照。完全培养基（或不含钙镁的PBS）作为空白对照，细胞悬液作为培养基对照，0.01%十二烷基硫酸钠（SLS）生理盐水溶液作为阳性对照，溶剂对照根据不同的受试物选择合适的溶剂对照。必要时增做样品对照。

6 试验步骤

6.1 受试物分组

试验时，受试物组根据其理化特性选择合适的溶剂配制成5%和0.05%浓度直接用于试验，同时设0.01%SLS生理盐水溶液阳性对照组、空白对照、培养基对照和溶剂对照组。必要时增做样品对照。

6.2 细胞染毒

6.2.1 复苏细胞。

6.2.2 接种细胞于含10%胎牛血清的MEM完全培养基中，每天观察细胞生长状态，一般5~6天细胞生长至融合状态。

6.2.3 用胰酶-EDTA消化细胞，收集细胞于离心管中，800 ~ 1000 转/分钟离心5min，重新悬浮细胞于培养液中。

6.2.4 调整细胞浓度为 $3 \times 10^4/\text{mL}$ ，按每孔200 μL 细胞悬液接种于96孔板(6000个细胞/孔)中，约4天后染毒；或调整细胞浓度为 $1.5 \times 10^4/\text{mL}$ ，按200 μL /孔接种于96孔板（3000个细胞/孔）中，约5天后染毒，染毒前一天换液。

6.2.5 上述培养的细胞融合度达80%以上时暴露于200 μL 5%和0.05%受试物溶液，染毒5min，每个样品做3个复孔，同时空白对照、培养基对照、溶剂对照和阳性对照做相应的处理。染毒图示见图1。

PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS
PBS	空白对照	溶剂对照	S1-0.05	S2-0.05	S3-0.05	S4-0.05	S5-0.05	S6-0.05	S7-0.05	PBS
PBS	空白对照	溶剂对照	S1-0.05	S2-0.05	S3-0.05	S4-0.05	S5-0.05	S6-0.05	S7-0.05	PBS
PBS	空白对照	溶剂对照	S1-0.05	S2-0.05	S3-0.05	S4-0.05	S5-0.05	S6-0.05	S7-0.05	PBS
PBS	培养基对照	阳性对照	S1-5	S2-5	S3-5	S4-5	S5-5	S6-5	S7-5	PBS
PBS	培养基对照	阳性对照	S1-5	S2-5	S3-5	S4-5	S5-5	S6-5	S7-5	PBS
PBS	培养基对照	阳性对照	S1-5	S2-5	S3-5	S4-5	S5-5	S6-5	S7-5	PBS
PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS

图 1 样品染毒示意图

注：a MTT 法选用 PBS 作为空白对照，CCK-8 法选择完全培养基作为空白对照

b 96 孔板周围一圈加相同量的 PBS，并将 96 孔板置于靠近培养箱内水源的地方，以缓解蒸发。

6.3显色、测定

首选MTT染色法。

6.3.1 MTT染色法：染毒结束，用200μL磷酸盐缓冲液冲洗2次。然后每孔中加入200μLMTT（0.5mg/mL）溶液，放入37℃ 5%CO₂培养箱中培养2h，倒出MTT溶液，加入200μL 0.04N酸化异丙醇作用60min提取MTT甲瓚（室温暗室中操作），然后在多功能酶标仪中测定570nm处吸光度值(OD₅₇₀值)。根据OD值计算细胞存活率。每个样品需重复三次试验。

$$\text{细胞存活率(\%)} = \frac{\text{OD}_{570 \text{ 样品}} - \text{OD}_{570 \text{ 空白}}}{\text{OD}_{570 \text{ 溶剂对照}} - \text{OD}_{570 \text{ 空白}}} \times 100$$

6.3.2 CCK-8染色法：染毒结束，用200μL磷酸盐缓冲液冲洗2~3次。然后在每孔中加入100μL培养基和10μL增强型CCK-8溶液，放入37℃ 5%CO₂培养箱中培养4h，培养结束在多功能酶标仪中测定450nm处吸光度值(OD₄₅₀值)。根据OD值计算细胞存活率。每个样品需重复三次试验。

$$\text{细胞存活率(\%)} = \frac{\text{OD}_{450 \text{ 样品}} - \text{OD}_{450 \text{ 空白}}}{\text{OD}_{450 \text{ 溶剂对照}} - \text{OD}_{450 \text{ 空白}}} \times 100$$

6.4 结果判定

根据受试物三次试验结果计算每个样品的平均细胞存活率±标准差，按表1判定标准进行刺激等级判定。

表1 STE刺激反应分级

细胞存活率		结果
5%	0.05%	
> 70%	> 70%	无刺激性或微刺激性

$\leq 70\%$	$> 70\%$	结果无法判定
$\leq 70\%$	$\leq 70\%$	腐蚀性(不可逆眼损伤)

6.5 系统成立的条件

须同时满足以下四个条件：

(1) $OD_{\text{培养基对照}} - OD_{\text{空白对照}} \geq 0.3$

(2) 溶剂对照的细胞存活率应该达到培养基对照的80%或以上。

(3) 阳性对照细胞存活率应介于实验室历史均值 ± 2 标准差之间，上下限值应经常更新，无历史数据可以默认该方法创立者实验室的历史数据21.1%~62.3% ($41.7 \pm 2 \times 10.3\%$)。

(4) 每个样品三次重复试验结果两个浓度的细胞存活率标准差均应小于15%。

7 结果解释

当5%和0.05%浓度的受试物的细胞存活率均大于70%时，则判断该受试物眼刺激强度为无刺激性或微刺激性；当5%和0.05%浓度的受试物的细胞存活率均 $\leq 70\%$ 时，则判断该受试物眼刺激强度为腐蚀性(不可逆眼损伤)；若受试物0.05%浓度溶液的细胞存活率大于70%，而5%浓度溶液的细胞存活率 $\leq 70\%$ 时，则需加做其他试验加以判定。细胞存活率在70%左右的样品在结果判定中易出现偏差，建议增加试验次数或采用其他方法加以判定。在该实验中当高挥发性物质和非表面活性剂类固体物质结果判定为无刺激性或微刺激性时，需加做其他试验加以判定。

