

附件 11

化妆品用化学原料荧光素渗漏试验方法

Fluorescein Leakage In Vitro Test Method

1 范围

本方法规定了体外荧光素渗漏试验的要求和方法。

本方法适用于化妆品用水溶性化学原料安全性毒理学检测。

2 试验目的

预测和评价化妆品用水溶性化学原料对眼睛是否具有强刺激性或腐蚀性。

3 定义

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 荧光素渗漏 fluorescein leakage (FL)

暴露于受试物后的MDCK细胞模型，一定时间内（30min）对荧光素钠溶液的渗漏。试验以不加细胞的嵌入型细胞培养皿（transwell）对荧光素钠溶液的渗漏作为最大荧光素渗漏；以阴性对照组MDCK细胞模型对荧光素钠溶液的渗漏作为最小渗漏（0%渗漏）。

以受试物引起20%荧光素钠溶液渗漏时的浓度FL₂₀（mg/mL）作为判定受试物眼刺激/腐蚀性的标准。

4 试验原理

以在嵌入型细胞培养皿（transwell）内单层培养的致密犬肾细胞（MDCK）来模拟眼角膜上皮细胞的屏障结构，通过检测暴露于受试物后的MDCK细胞模型对荧光素钠的渗漏率，来判断MDCK细胞模型的屏障破坏程度，进而预测和评估受试物的眼刺激/腐蚀性。

5 试验方法

5.1 试验材料与试剂

5.1.1 细胞株

采用犬肾细胞MDCK，该细胞为贴壁生长。要求：来源清晰，代数明确（<30代）。

5.1.2 培养基

本方法采用不含酚红的DMEM-F12(1:1)混合培养液,培养液钙离子浓度为1.0~1.8 mM,培养液加入10%胎牛血清(FBS)和适量抗生素(终浓度为青霉素50~100 IU/mL,链霉素50~100 µg/mL)。

5.1.3 溶液的配制

0.01% (w/v) 荧光素钠溶液: 称取50 mg荧光素钠, 溶解于500 mL不含酚红的HBSS溶液中, 室温避光保存。

100 mg/mL聚氧乙烯十二烷基醚(Brij-35, CAS 9002-92-0)溶液: 称取100 mg Brij-35, 溶解于1 mL不含酚红的HBSS溶液中, 可以37 °C水浴或超声10 min以内的方式助溶。

5.1.4 溶剂的选择

本方法溶剂为不含酚红的HBSS缓冲液, 受试物应在HBSS中以 ≥ 250 mg/mL的浓度溶解(至少满足一个剂量 ≥ 100 mg/mL); 若受试物在HBSS中的溶解度 < 100 mg/mL, 且测出FL₂₀ < 100 mg/mL时, 试验条件仍成立。当受试物无法满足上述溶解条件时, 不适用于本方法。

5.1.5 受试物的浓度选择及配制

受试物浓度梯度首选1、25、100、250 mg/mL、原液或饱和溶液五个浓度作为浓度梯度进行检测, 若受试物为固体, 最高浓度首选750 mg/mL。如果细胞毒性出现在浓度25~100 mg/mL之间, 则需要追加浓度梯度为: 1、25、50、75、100 mg/mL的测试。受试物应在染毒前30 min内新鲜配制, 否则必须证实储存不影响其稳定性。可采用升温或超声助溶, 超声时间为10 min以内, 如升温助溶, 需注意室温下所有浓度的受试物溶液需保持溶液或混悬液状态。

5.1.6 对照的选择

实验应同时设空白对照、阴性对照和阳性对照。以不种细胞的transwell模型加溶剂(不含酚红的HBSS)作为空白对照; MDCK细胞模型以溶剂(不含酚红的HBSS)作为阴性对照, 以100 mg/mL Brij-35溶液作为阳性对照。

5.2 试验步骤

5.2.1 细胞建模

5.2.1.1 细胞复苏

5.2.1.2 接种细胞于含10%胎牛血清且不含酚红的DMEM-F12 (1: 1) 混合培养液中, 每天观察细胞生长状态, 稳定传2代后准备建模。

5.2.1.3 用胰酶-EDTA (0.05% w/v胰酶, 0.02% w/v EDTA) 消化细胞, 收集细胞于离心管中, 800~1000 rpm/min离心5 min, 重新悬浮细胞于培养液中, 调整细胞浓度为 4×10^5 个/mL。

5.2.1.4 取无菌24孔板每孔加入400 µL新鲜培养基, 将嵌入型细胞培养皿transwell (嵌入型细胞培养皿厚度为80~150 µm, 孔径约0.45µm) 放入24孔板中, 注意避免气泡。其中21个transwell内室中加入400µL 细胞悬液(终浓度约 1.6×10^5 个/transwell), 剩余3个transwell

中加入同体积的培养液。将24孔板放入37℃ 5%CO₂培养箱中培养96 h后，检测前一天transwell内外换新鲜培养液。

5.2.2 染毒和清洗

以400 μL/孔预热至37℃的HBSS（无酚红）清洗transwell内室2遍。以200 μL/孔的受试物浓度梯度溶液进行染毒，染毒时间为1 min，每个浓度做3个复孔，染毒后以400 μL/孔预热至37℃的HBSS（无酚红）清洗transwell内室2遍。同时空白对照、阴性对照和阳性对照做相应的处理。染毒图示见图1。

	1	2	3	4	5	6
A	M	M	M	B	B	B
B	P	P	P	T1	T1	T1
C	T2	T2	T2	T3	T3	T3
D	T4	T4	T4	T5	T5	T5

图 1 样品染毒示意图

注：M：仅有 transwell，不加细胞
B：种了细胞的 transwell，加阴性对照（不含酚红的 HBSS）
P：种了细胞的 transwell，加阳性对照（100 mg/mL Brij-35 溶液）
T1-T5：种了细胞的 transwell，加配制好的受试物浓度梯度工作液，T1 代表最低浓度，T5 代表最高浓度

5.2.3 荧光素渗漏率测定及计算

5.2.3.1 荧光素渗漏率测定：取新的24孔板，每孔中加入400 μL HBSS（无酚红）溶液，将上述清洗后的transwell对应放入新的24孔板中，transwell内室加入400 μL 0.01%荧光素钠溶液，注意避免荧光素钠溶液直接进入transwell室外的孔中，室温避光静置30 min，然后从24孔板中移除transwell，移除时需避免transwell内室中多余的荧光素钠溶液进入24孔板。在多功能酶标仪中测定荧光强度(激发波长485 nm，发射波长530 nm)。根据荧光强度计算荧光素渗漏率FL（%）。

$$\text{荧光素渗漏率 FL(\%)} = \frac{m-y}{x-y} \times 100\%$$

其中：m：三个重复测量的平均荧光强度；
x：最大荧光素渗漏的平均荧光强度（M组）；
y：0%荧光素渗漏的平均荧光强度（B组）。

5.2.3.2 FL₂₀计算：根据受试物各浓度FL的结果，计算FL₂₀。

$$FL_{20}(\%) = \frac{20 - B}{C - B} \times (M_C - M_B) + M_B$$

其中：B：荧光素渗漏率<20%；

C：荧光素渗漏率 > 20%；

M_C：C对应的浓度(mg/mL)；

M_B：B对应的浓度(mg/mL)。

5.2.4 结果判定

当受试物FL₂₀ (mg/mL) ≤ 100 mg/mL时，判定受试物具有眼腐蚀性或强刺激性。

5.2.5 系统成立的条件

需同时满足以下条件，否则应重复试验：

（1）建模成功后，细胞与transwell具有一定的结合度：0%荧光素渗漏的平均荧光强度（B组）应小于等于最大荧光素渗漏平均荧光强度（M组）的6%；

（2）阳性对照组荧光素渗漏率应介于20%~40%之间。

6 结果解释

当受试物FL₂₀ (mg/mL) > 100 mg/mL时，需采用其他试验进一步研究确证受试物的眼刺激性。本试验适用于水溶性的化学原料，不适用于强酸、强碱、具有细胞固定作用的物质、高度挥发性物质。本试验可作为眼刺激/腐蚀性测试组合策略的备选方法。