

附件 7

体外皮肤变态反应 ARE-Nrf2 荧光素酶 LuSens 试验方法

（征求意见稿）

The ARE-Nrf2 Luciferase LuSens Test

1 范围

本方法规定了体外皮肤变态反应 ARE-Nrf2 荧光素酶 LuSens 试验的基本原则、要求和方法。

本方法适用于化妆品用化学原料潜在致敏性的评价。

2 试验目的

本试验用于检测体外培养的 LuSens 细胞荧光素酶的表达变化，以评价受试物引起皮肤变态反应的可能性。

3 定义

3.1 75%细胞存活率浓度值 75% Cell viability (CV75)

受试物染毒后，细胞存活率为 75%时对应的受试物浓度值。

3.2 抗氧化反应元件 Antioxidant response element (ARE)

指存在于细胞保护基因的启动子区域，能够响应氧化应激并调控相关基因表达的作用元件。

3.3 荧光素酶活性诱导倍数 Fold luciferase activity induction (Fold induction)

扣除空白对照后，受试物和溶剂对照的细胞发光比值。

4 试验的基本原则

当致敏物质接触皮肤后，角质形成细胞被激活，诱导炎症反应及特定细胞信号通路相关基因的表达。体外培养含有荧光素酶报告基因的人角质形成细胞系（LuSens 细胞），暴露于受试物，通过计算细胞相对存活率和荧光素酶活性，从而预测受试物是否具有皮肤致敏性。

5 试剂和材料

5.1 细胞

选用含有 ARE 荧光素酶报告基因的人角质形成细胞株（LuSens 细胞株）。

5.2 培养基

细胞培养液 1 (Medium No.1): DMEM 培养液中加入 10%胎牛血清, 1%抗生素, 0.005% 的嘌呤霉素盐酸盐。

细胞培养液 2 (Medium No.2): DMEM 培养液中加入 10%胎牛血清。

细胞培养液 3 (Medium No.3): DMEM 培养液中加入 1%胎牛血清。

5.3 MTT 检测液

储存液: 称取 MTT 50 mg, 加入适量 PBS (不含钙镁), 溶解定容至 10 mL。

工作液: 取 9 mL 细胞培养液 3 加入 1 mL MTT 储备液, 临用现配。

5.4 细胞裂解液

十二烷基硫酸钠 (SDS) 10 g

二甲基亚砷 (DMSO) 99.6 mL

冰醋酸 0.4 mL

6 试验方法

6.1 细胞培养

LuSens细胞使用细胞培养液1, 于37°C、5%CO₂培养箱内培养, 倒置显微镜下观察细胞状态。细胞达80-90%融合时可用于测试, 传代次数不超过20代。

6.2 受试物处理

6.2.1 溶剂: 二甲基亚砷 (DMSO) 和细胞培养液3。

6.2.2 细胞毒性预实验

受试物储备液: 采用DMSO为溶剂配制受试物储备液, 最大浓度为200 mM, 不同剂量间比值为2, 共设12个浓度。

受试物工作液: 采用细胞培养液3将储备液稀释100倍, 最终测试浓度分别为0.976、1.953、3.906、7.812、15.625、31.25、62.5、125、250、500、1000、2000 μ M。若不能得到CV75值, 则重复试验降低最大浓度, 直到得到CV75值。若2000 μ M浓度时仍未观察到细胞毒性, 则正式试验中使用2000 μ M为最大浓度。

6.2.3 正式试验

受试物储备液: 根据预实验结果, 用DMSO为溶剂配制受试物储备液, 最大浓度为1.2×CV75 (或2000 μ M), 不同剂量间比值为1.2, 共设6个浓度。

受试物工作液: 采用细胞培养液3将储备液稀释100倍, 最终测试浓度分别为CV75/2.074、CV75/1.728、CV75/1.44、CV75/1.2、CV75、CV75×1.2 μ M。

6.3 阳性对照溶液

试验前一天,用 DMSO 配制 12 mM 阳性对照乙二醇二甲基丙烯酸酯 (EGDMA) 的储存液,试验时用细胞培养液 3 稀释至检测浓度为 120 μ M。

6.4 阴性对照溶液的配制

试验前一天,用 DMSO 配制 500 mM 阴性对照物 DL-乳酸的储存液,试验时用细胞培养液 3 稀释至检测浓度为 5 mM。

6.5 试验步骤

6.5.1 细胞毒性预实验

6.5.1.1 细胞接种

细胞生长至融合率 80~90%后,弃去培养基,用 10 mL PBS 洗 2 遍,加入 1 mL 含 EDTA 的胰酶将细胞消化下来(37°C 6~7 min),用 9 mL 细胞培养液 2 重悬,调整细胞浓度为 8.3×10^4 个/mL。96 孔板中每孔加入 120 μ L 细胞液,37°C,5%CO₂ 继续培养 24 h。

6.5.1.2 受试物染毒

试验设置阳性对照组、阴性对照组、受试物组、溶剂对照组、空白对照组(只加细胞培养液 3),每组至少 3 个重复孔。将细胞培养板从培养箱中取出,去除培养基,每孔预先加入 150 μ L 细胞培养液 3,再依次加入 50 μ L 受试物或对照溶液,37°C,5%CO₂ 继续培养 48 h。

6.5.1.3 MTT 孵育

染毒结束后,去除细胞培养液,每孔加入 200 μ L MTT 工作液,37°C、5%CO₂ 孵育 2 h。

6.5.1.4 MTT 检测

孵育结束后,去除 MTT 工作液,每孔加入 100 μ L 细胞裂解液,震荡 5 min,设置吸收波长为 570 nm,参考波长为 690 nm,酶标仪检测。

6.5.1.5 细胞存活率(CV75)计算

由得到的吸光度值,计算与溶剂对照相比细胞存活率为 75%的受试物浓度。计算方法如下:

选择两个连续浓度,一个细胞存活率大于 75%,一个细胞存活率低于 75%,则

$$CV75 = (Ca - Cb) \times \frac{(75 - Vb)}{(Vb - Va)} + Cb$$

Ca (μ M): 细胞存活率高于 75%的最大受试物测试浓度

Cb (μ M): 细胞存活率低于 75%的最小受试物测试浓度

Va: Ca 对应的细胞存活率

Vb: Cb 对应的细胞存活率

6.5.2 正式试验

6.5.2.1 细胞接种

细胞生长至融合率 80~90%后,弃去培养基,用 10 mL PBS 洗 2 遍,加入 1 mL 含 EDTA 的胰酶将细胞消化下来(37°C 6~7 min),用 9 mL 细胞培养液 2 重悬,调整细胞浓度为 8.3×10^4

个/mL。正式试验中，每个受试物使用一个平底透明的 96 孔板（用于 MTT 检测），一个白色不透明的 96 孔板（用于 LuSens 检测），96 孔板中每孔加入 120 μ L 细胞液，37°C，5%CO₂ 继续培养 24 h。

6.5.2.2 受试物染毒

试验设置阳性对照组、阴性对照组、受试物组、溶剂对照组、空白对照组（只加细胞培养液 3），每组至少 3 个重复孔。将细胞培养板从培养箱中取出，去除培养基，每孔预先加入 150 μ L 细胞培养液 3，再依次加入 50 μ L 受试物或对照溶液，37°C，5%CO₂ 继续培养 48 h。

6.5.2.3 MTT 孵育

染毒结束后，透明 96 孔板中去除培养基，每孔加入 200 μ L MTT 工作液，37°C、5%CO₂ 孵育 2 h。

6.5.2.4 MTT 检测

孵育结束后，去除培养液，每孔加入 100 μ L 细胞裂解液，震荡 5 min，酶标仪检测，设置吸收波长为 570 nm，参考波长为 690 nm。

6.5.2.5 荧光素酶表达检测

染毒 48 h 后，白色 96 孔板中去除培养基，每孔加入 300 μ L PBS(含钙镁)洗涤 2 遍后，按照荧光素酶报告基因检验检测试剂盒要求检测荧光素酶表达。

6.5.2.6 结果计算

$$\text{诱导倍数} = \frac{L_{\text{sample}} - L_{\text{blank}}}{L_{\text{solvent}} - L_{\text{blank}}}$$

L_{sample}: 受试孔的荧光读数

L_{blank}: 不包含细胞和给药的空白孔的荧光读数

L_{solvent}: 包含细胞和溶剂对照孔的荧光读数

7 结果评价

7.1 试验成立的条件

与溶剂对照相比，阳性对照组表达倍数（Fold induction） ≥ 2.5 ，有统计学差异，且细胞存活率 $\geq 70\%$ 。

与溶剂对照相比，阴性对照组表达倍数（Fold induction） < 1.5 。

所有溶剂对照组细胞存活率 SD 值 $< 20\%$ 。

正式试验中，受试物至少有 3 个测试浓度细胞存活率 $> 70\%$ 。

7.2 结果判定

与溶剂对照组相比，当受试物至少有一个测试浓度细胞毒性 $< 70\%$ （或者最大无细胞毒性测试浓度达到 2000 μ M），且平均表达倍数 < 1.5 ，则判定结果阴性。

与溶剂对照组相比，当受试物至少三个测试浓度无细胞毒性时，且其中两个连续无毒性浓度表达倍数 ≥ 1.5 ，有统计学差异，则判定结果阳性。

要进行致敏性判断，需进行满足 7.1 条件的重复试验，当两次重复试验结果一致时，不需要进行第三次试验；若不一致，则进行第三次试验。当两次试验结果均为阴性/阳性，才可最终判定受试物致敏性阴性/阳性。

体外皮肤变态反应 ARE-Nrf2 荧光素酶 LuSens 试验方法

（征求意见稿）起草说明

为加强化妆品的监督管理，进一步提高化妆品使用安全性，中国食品药品检定研究院组织开展了体外皮肤变态反应 ARE-Nrf2 荧光素酶 LuSens 试验方法的起草工作。现就起草工作有关情况说明如下：

一、起草原则

试验要求和规定逐步与国际接轨，对于已经比较成熟的、被多数国家和组织认可的方法，原则上予以接受。对某些内容进行具体化和明确化，在尽量提高可操作性的同时，兼顾了技术发展的前瞻性。本方法制定过程中还注意了科学性和合理性、协调性和有效性，以及通俗性和规范性之间的关系。

二、起草过程

本研究由化妆品标准专家委员立项，课题组在研究和分析国内外相关研究的基础上，对 8 种推荐物质进行了方法验证，并委托三家实验室进行实验室间验证，根据实验室验证过程和结果起草了试验方法文本。

三、与我国已有相关标准的关系

目前未见该方法的国家标准或行业标准。

四、与《化妆品安全技术规范》（2015 年版）（以下简称《规范》）中原方法的对比情况

《规范》中用于检测皮肤变态反应的方法包括：皮肤变态反应试验、皮肤变态反应：局部淋巴结试验:DA（LLNA:DA）、皮肤变态反应：局部淋巴结试验:BrdU-ELISA(LLNA:BrdU-ELISA)、化妆品用化学原料体外皮肤变态反应：直接多肽反应试验(DPRA)、体外皮肤变态反应 人细胞系活化试验、体外皮肤变态反应 氨基酸衍生化反应试验方法。其中皮肤变态反应试验、LLNA:DA、LLNA: BrdU-ELISA 均使用动物（豚鼠、小鼠）进行试验；DPRA 方法和氨基酸衍生化反应试验方法针对皮肤变态反应 AOP 中的第一个关键分子事件进行检测；人细胞系活化试验针对皮肤变态反应 AOP 中的第三个关键分子事件进行检测。ARE-Nrf2 荧光素酶 LuSens 试验是针对皮肤变态反应 AOP 中的第二个关键分子事件进行检测。未来该方法可以应用在皮肤致敏评价的整合策略中，进一步提高替代试验方法的准确性和特异性。

本研究建立了皮肤变态反应的替代试验方法，以期与国际标准接轨，与《化妆品安全技术规范》中皮肤变态反应检测方法在技术上形成互补，建立我国动物实验替代方法体系，增补、修订和完善现有的标准与规范方法以及促进我国未来的化妆品安全评价体系提供技术支持。

五、国际相关标准情况

2018 年，经济合作和发展组织（OECD）正式发布方法的操作指南（OECD-442D），

将其用于化学物质皮肤致敏性的安全评价。本方法涵盖了 OECD 2018 年正式发布的“皮肤致敏反应有害结局通路中关于角质形成细胞活化关键事件的体外试验方法操作指南：ARE-Nrf2 荧光素酶 LuSens 试验”(OECD GUIDELINE FOR THE TESTING OF CHEMICALS In Vitro Skin Sensitisation assays addressing the AOP Key Event on keratinocyte activation Appendix IB: The ARE-Nrf2 Luciferase LuSens Test Method)的要求，并结合我国实验室特点，基本操作与 OECD 发布的方法一致，基本涵盖了其对采用对象、实验操作和结果分析的技术要求，并通过试验确认。

六、实验室验证情况

本方法实验室内验证结果和 OECD 参考值范围均一致；委托 3 家单位对方法进行实验室间验证。所有单位对 8 种化学物的定性预测结果均一致。