

SN

中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 3084.2—2014

进出口化妆品眼刺激性试验 第 2 部分：角膜细胞试验方法

Cosmetics eye irritation test—
Part 2: Corneal cell line method

2014-11-19 发布

2015-05-01 实施

中 华 人 民 共 和 国
国家质量监督检验检疫总局 发布

前 言

SN/T 3084《进出口化妆品眼刺激性试验》分为 2 个部分：

——第 1 部分：体外中性红吸收法；

——第 2 部分：角膜细胞试验方法。

本部分为 SN/T 3084 的第 2 部分。

本部分按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本部分由国家认证认可监督管理委员会提出并归口。

本部分起草单位：中华人民共和国上海出入境检验检疫局，中华人民共和国广东出入境检验检疫局。

本部分主要起草人：邱璐、李小林、王艳、程树军、蒋静、潘芳、刘俊平。

进出口化妆品眼刺激性试验

第 2 部分:角膜细胞试验方法

1 范围

SN/T 3084 的本部分规定了化妆品眼刺激性角膜细胞试验方法。

本部分适用于化妆品原料和成品眼刺激性体外筛选试验。

本部分适用于部分化妆品使用的表面活性剂的筛选测试。

本部分可作为眼刺激性动物试验的替代方法之一。可以结合其他眼刺激替代试验,对眼刺激效应进行综合评价。

本部分可作为其他领域眼刺激体外测试的参考方法。

2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件,仅注日期的版本适用于本文件。凡是不注日期的引用文件,其最新版本(包括所有的修改单)适用于本文件。

SN/T 2285 化妆品体外替代试验实验室规范

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

眼刺激性 eye irritation

眼球表面接触受试样品后产生的可逆性炎性变化。

3.2

SIRC 细胞系 statens seruminstitut rabbit cornea cell line

来源于兔眼角膜组织的成纤维细胞系。

3.3

STE 试验 short time exposure test

采用 SIRC 细胞进行的短时间暴露试验,本部分指 5 min 暴露试验。

4 原理

本试验采用来源于眼刺激靶器官的 SIRC 细胞系,将样本干预细胞 5 min,然后去除。采用 CCK-8 细胞毒性测试法(cell counting kit-8 cytotoxicity test),使干预后的细胞与 CCK-8 试剂反应,活细胞线粒体中的脱氢酶会将 CCK-8 试剂还原成橙黄色的甲臞染料,活细胞越多,被还原成的染料越多,颜色深浅与细胞数目呈线性关系。通过测定波长 450 nm 时的吸光度值,计算细胞的生存率,判断样品的眼刺激性。本部分为 STE 短时暴露试验,适用于不同溶解性状的样本。

5 仪器与试剂耗材

5.1 仪器

- 5.1.1 II级生物安全柜。
- 5.1.2 二氧化碳培养箱:温度 $37\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$,湿度 $90\%\pm 5\%$, $5\%\pm 1\%$ CO_2 浓度。
- 5.1.3 恒温水浴箱:温度 $37\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。
- 5.1.4 倒置显微镜。
- 5.1.5 酶标仪。
- 5.1.6 电子天平:0.1 mg 量程。
- 5.1.7 细胞计数仪或血球计数器。
- 5.1.8 离心机。
- 5.1.9 混悬仪。
- 5.1.10 真空吸液泵。
- 5.1.11 程序降温仪。
- 5.1.12 液氮罐。
- 5.1.13 $5\text{ }\mu\text{L}\sim 50\text{ }\mu\text{L}$, $10\text{ }\mu\text{L}\sim 100\text{ }\mu\text{L}$, $20\text{ }\mu\text{L}\sim 200\text{ }\mu\text{L}$ 量程排枪。
- 5.1.14 细胞冻存盒。

5.2 试剂耗材

- 5.2.1 MEM 培养基(minimum essential medium)。
- 5.2.2 胎牛血清(FBS): $56\text{ }^{\circ}\text{C}$ 加热灭活 30 min。
- 5.2.3 0.25%胰酶/EDTA 溶液(Trypsin/EDTA):0.25%胰酶溶液与 0.02 mol/L EDTA 溶液 1:1 混均。
- 5.2.4 青霉素/链霉素双抗:工作溶液青霉素(100 U/mL)、链霉素(100 $\mu\text{g}/\text{mL}$)。
- 5.2.5 MEM 完全培养基:含 10%FBS、100 U/mL 青霉素、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 链霉素。
- 5.2.6 二甲基亚砜(DMSO)。
- 5.2.7 细胞冻存培养基:含 20% FBS、10% DMSO 的 MEM 培养基。
- 5.2.8 磷酸盐缓冲液(PBS)。
- 5.2.9 矿物油:细胞培养级。
- 5.2.10 0.1%十二烷基硫酸钠(SDS):称取 0.01 g SDS 于 10 mL 无菌试管中,加入 PBS 至 10 mL。
- 5.2.11 5%吐温 20(TWEEN 20):称取 0.5 g TWEEN 20 于 10 mL 无菌试管中,加入 PBS 至 10 mL。
- 5.2.12 CCK-8 试剂。
- 5.2.13 50 mL 无菌离心管。
- 5.2.14 无菌吸管(5 mL,10 mL)。
- 5.2.15 10 mL 无菌试管。
- 5.2.16 细胞培养瓶及培养板: 25 cm^2 、 75 cm^2 培养瓶;96 孔平底细胞培养板。

6 试验方法

6.1 基本要求

试验过程应符合 SN/T 2285 的要求。为保证溯源性,SIRC 细胞应由有资质的细胞库提供,选择

40代之内的细胞进行试验。所有细胞培养相关操作步骤都应在Ⅱ级生物安全柜里进行,确保无菌操作。

6.2 细胞培养

6.2.1 SIRC 细胞培养

购置的 SIRC 细胞,更换 MEM 完全培养基,在 $37\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$,湿度 $90\%\pm 5\%$, CO_2 浓度 $5.0\%\pm 1\%$ 条件下进行培养(后续试验细胞培养均按此条件)。

6.2.2 SIRC 细胞培养传代

SIRC 细胞培养 3 d~4 d 按 1:3 或者 1:4 的比例进行盲传。弃培养基,加适量 PBS 洗涤细胞 1 次,加入 0.25%胰酶/EDTA 溶液(25 cm^2 培养瓶 0.5 mL, 75 cm^2 培养瓶 1 mL)进行消化,尽量使胰酶覆盖培养瓶的整个底面,在显微镜下观察,1 min 左右可见细胞变圆脱壁,立刻加入 2 mL~3 mL MEM 完全培养基终止消化,用无菌吸管轻轻上下吹打使细胞分散均匀,加入一定量 MEM 完全培养基,将细胞分到 3~4 个新细胞培养瓶中,放入二氧化碳培养箱培养,待细胞完全贴壁后,更换培养基继续培养。正式干预试验开始前,至少需要盲传 2~3 代,至细胞达到稳定生长状态后才可以开始下一步试验。

6.2.3 SIRC 细胞冻存

选择对数生长期细胞,用 0.25%胰酶/EDTA 溶液消化细胞,将细胞转移到 50 mL 无菌离心管中,200g,离心 10 min,弃上清液,重悬细胞于冻存培养液调整细胞浓度为 $1\times 10^6/\text{mL}\sim 5\times 10^6/\text{mL}$ 。用吸管轻轻吹打使细胞分散均匀,分装至无菌冻存管,每管 1 mL。可以使用程序降温仪进行细胞冻存,也可以将细胞冻存管放入细胞冻存盒中 $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件下放置 3 h 后,将细胞冻存管放到液氮罐支架上,从液氮罐口慢慢移至液氮液面上(未触及液氮)停留 1 h 左右,将其没入液氮中。

6.2.4 SIRC 细胞复苏

从液氮罐中取出冻存管,迅速置于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 恒温水浴箱中,轻轻摇动使其尽快融化。从水浴锅中取出冻存管,表面用 75%乙醇消毒,用 5 mL 无菌吸管吸出细胞悬液,转到 50 mL 无菌离心管中,加入 20 mL MEM 完全培养基,用 10 mL 吸管轻轻打匀,200g 离心 5 min~10 min,弃上清液、重悬细胞于 7 mL~10 mL MEM 完全培养基中,转到 25 cm^2 细胞培养瓶中,于二氧化碳培养箱中进行培养。

6.3 SIRC STE 眼刺激性试验

6.3.1 96 孔板分布

本试验所使用的 96 孔板加样结构图见图 1。

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS
B	PBS	B	VC1	C1	C2	C3	C4	C5	C6	NC	PC	PBS
C	PBS	B	VC1	C1	C2	C3	C4	C5	C6	NC	PC	PBS
D	PBS	B	VC1	C1	C2	C3	C4	C5	C6	NC	PC	PBS
E	PBS	B	VC1	C1	C2	C3	C4	C5	C6	NC	PC	PBS
F	PBS	B	VC1	C1	C2	C3	C4	C5	C6	NC	PC	PBS
G	PBS	B	VC1	C1	C2	C3	C4	C5	C6	NC	PC	PBS
H	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS

说明:

PBS —— 磷酸盐缓冲液;

B —— 空白对照(无受试物,无细胞,加样时以 PBS 代替);

VC1 —— 溶剂对照(无受试物,有细胞,加样时以溶剂代替);

C1~C6 —— 样品;

NC —— 阴性对照(5% TWEEN);

PC —— 阳性对照(0.1% SDS)。

图 1 96 孔板分布图

6.3.2 96 孔板接种

取 6.2.1 中稳定生长状态的细胞,调整细胞浓度至 1×10^5 个/mL,以每孔 $100 \mu\text{L}$ 接种到 96 孔细胞培养板中(除最外周孔及空白对照孔)。在细胞培养板的最外周孔中加入 $200 \mu\text{L}$ PBS,以减少培养基的蒸发。置二氧化碳培养箱中,在 $37 \text{ }^\circ\text{C} \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$,湿度 $90\% \pm 5\%$, CO_2 浓度 $5.0\% \pm 1\%$ 条件下进行培养。3 d 后,观察细胞,如果细胞融合达到孔底面积的 90% 以上,状态良好,可进行下一步实验。

6.3.3 样品制备

样品在试验前需要预先测试其溶解性。可选择的溶剂为:PBS、含 5% DMSO 的 PBS、含 5% 乙醇的 PBS、细胞培养级矿物油,经测试后,确定受试样品溶剂。如受试样品为化妆品或化妆品原料,则称取 0.05 g 样品于无菌试管中,加入相应的溶剂定容至 10 mL,样品终浓度为 0.5%;如受试样品为表面活性剂,则称取 0.05 g 样品于无菌试管中,加入相应的溶剂定容至 10 mL,再稀释 10 倍,样品终浓度为 0.05%。

6.3.4 样品干预

将细胞融合达到底面积 90% 以上的细胞(接种于 96 孔细胞培养板)从二氧化碳培养箱中取出,置于生物安全柜中,用真空吸液泵或排枪将孔中的培养基去除,每个受试物做 1 列 6 个复孔,用排枪由 96 孔板的第 2 列开始加样,分别加入 PBS(空白对照)、溶剂对照、制备好的样品(C1~C6)、阴性对照、阳性对照,每孔 $100 \mu\text{L}$ 。开始加 PBS(空白对照)时立即计时,保持每两列加样时间间隔一致,保证每个受试物对细胞的干预时间是 5 min,5 min 后,依次吸去受试物,每孔加入 $200 \mu\text{L}$ PBS,清洗受试物,清洗 2 次。用真空吸液泵或排枪吸去孔中液体时,小心操作,以免吸去存活细胞而影响实验结果。

6.3.5 细胞生存率测试

清洗完成后,吸去 PBS。在每孔中分别加入 $100 \mu\text{L}$ MEM 完全培养基和 $10 \mu\text{L}$ CCK-8 溶液,置于

二氧化碳培养箱中,培养 3 h 左右。在 450 nm 波长,测定吸光度(OD)值。CCK-8 试剂可以用 MTT 代替。MTT 工作溶液配制时应保证 MTT 结晶的完全溶解。

6.3.6 结果计算

按照式(1)计算细胞生存率。

$$CSR = \frac{OD_s - OD_b}{OD_c - OD_b} \times 100\% \quad \dots\dots\dots(1)$$

式中:

- CSR —— 细胞生存率, %;
- OD_s —— 受试物平均 OD 值;
- OD_c —— 溶剂对照 OD 值;
- OD_b —— 空白对照 OD 值。

6.4 结果判断

结果判断如下:

- 阴性对照生存率 $>85\%$, 阳性对照生存率 $<15\%$ 时, 试验结果为有效;
- 如果细胞的生存率 $>70\%$ 时, 证明样品为无刺激或具有轻微刺激性物;
- 如果细胞的生存率 $\leq 70\%$ 时, 进行下一轮刺激性确认试验;
- 如果作为筛选试验用, 当细胞的生存率 $\leq 70\%$ 时, 除了可以进行 6.5 的刺激性确认试验外, 也可以进行相关的动物试验。

6.5 刺激性确认试验

试验步骤按 6.3.1~6.3.5 进行。但是样品制备时, 溶剂的选择采用 MEM 完全培养基代替 PBS, 配制浓度不变。阴性和阳性对照仍然用 PBS 配制。读取 OD 值后, 按式(1)计算细胞生存率:

- 阴性对照生存率 $>85\%$, 阳性对照生存率 $<15\%$ 时, 试验结果为有效;
- 如果细胞的生存率 $>30\%$ 时, 证明样品为中等眼刺激物;
- 如果细胞的生存率 $\leq 30\%$ 时, 证明样品为强眼刺激物。

6.6 废弃物处置

试验结束后废弃的细胞和相关耗材收集在生物安全袋中, 封存后放在指定的安全场所, 由专人高压消毒后集中处理。