

# 化妆品用化学原料兔角膜上皮细胞短时暴露体外 试验(STE)方法 (征求意见稿)

## 1 范围

本方法规定了化妆品用化学原料兔角膜上皮细胞短时暴露体外试验(STE)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。

本方法适用于化妆品用化学原料眼刺激性的检测。

## 2 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: Short Time Exposure In Vitro Test. NO. 491

## 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叫做细胞活性。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SIRC细胞，短时暴露于化合物，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学物引起的眼损伤。

## 5 试验材料与试剂

### 5.1 细胞株

SIRC兔角膜上皮细胞来源于ATCC，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50-100 $\mu$ g/ml）。

### 5.3 溶液的配制

0.5mg/ mL MTT溶液：称取MTT 50mg，溶于100 mL 的磷酸缓冲液(PBS)或无酚红的培养基中，用0.22 $\mu$ m滤膜过滤除菌，放4 $^{\circ}$ C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。

PBS溶液：氯化钠8.0g、氯化钾0.2g、无水磷酸氢二钠1.15g、无水磷酸二氢钾0.2g，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。不能溶于上述三种溶剂的固体物质和高挥发性物质不适用于本方法。

### 5.5 受试物的配制

受试物根据理化特性选择合适的溶剂配置成5%和0.05%浓度的溶液或均匀混悬液直接用于试验。受试物应在使用前新鲜配置，否则就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PBS）作为空白对照，细胞悬液作为培养基对照，0.01%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置成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  $3 \times 10^4$ /mL，按每孔 200 $\mu$ L 细胞悬液接种于 96 孔板（6000 个细胞/孔）中，4 天后染毒；或调整细胞浓度为  $1.5 \times 10^4$ /mL，按 200 $\mu$ L/孔接种于 96 孔板（3000 个细胞/孔）中，5 天后染毒，染毒前一天换液。

6.2.5 上述融合细胞暴露于 200 $\mu$ L 5% 和 0.05% 受试物溶液，染毒 5min，每个样品做 3 个复孔，同时设空白对照、培养基对照、溶剂对照和阳性对照。染毒图示见图 1。

图 1 样品染毒示意图

PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS
PBS	空白对照 <sup>a</sup>	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	S12-0.05	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	S67-0.05	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

注：a MTT 法选用 PBS 作为空白对照，cck8 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

6.3.1 MTT 染色法：染毒结束，用 200 $\mu$ L PBS 冲洗 2-3 次。然后每孔中加入 200 $\mu$ L MTT（0.5mg/mL）溶液，放入 37 $^{\circ}$ C 5%CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 2h，倒出 MTT 溶液，加入 200 $\mu$ L 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 570 nm 吸光度值(OD<sub>570</sub>值)。根据 OD 值计算细胞存活率。每个样品需重复三次。

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

6.3.2 CCK-8 染色法：染毒结束，用 200 $\mu$ L PBS 冲洗 2-3 次。然后在每孔中加入 100 $\mu$ L 培养基和 10 $\mu$ L 增强型 CCK-8 溶液，放入 37 $^{\circ}$ C 5%CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 4h，培养结束在多功能酶标仪中测定 450 nm 吸光度值 (OD<sub>450</sub> 值)。根据 OD 值计算细胞存活率。每个样品需重复三次。

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

#### 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 $\pm$ 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%	轻刺激性或刺激性
$\leq$ 70%	$\leq$ 70%	腐蚀性(不可逆眼损伤)

#### 6.5 系统成立的条件

须同时满足以下三个条件：

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

(2)  $\text{OD}_{\text{溶剂对照}} / \text{OD}_{\text{培养基对照}} \geq 80\%$

(3) 阳性对照细胞存活率应介于实验室历史均值 $\pm$ 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%。

### 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均 $\leq$ 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。

# 化妆品用化学原料兔角膜上皮细胞短时暴露体外

## 试验(STE)方法

### 起草说明

为进一步完善化妆品安全技术法规体系，国家食品药品监督管理总局化妆品标准专家委员会秘书处组织开展了化妆品用化学原料兔角膜上皮细胞短时暴露体外试验(STE)试验方法的制订工作。现就起草工作有关情况说明如下：

#### 一、起草的必要性

自1959年英国Russel和Burch首次提出3R理论以来，3R原则已成为生物医药科学研究及相应法规管理普遍遵循的准则。在化妆品领域，以欧盟为首的全球众多国家和地区率先在化妆品安全性评价中实施了动物实验禁令；化学品领域，欧盟实施的REACH法规明确倡导替代方法，严格限制动物实验的使用。这些法规的变化对全球化学品、化妆品等的立法监督、安全风险评估、产品研发和国际贸易均产生深远影响。另一方面，有害化学物质暴露种类和数量日益增多，亟待进行快速有效的毒性测试和风险评估，传统的依靠动物的毒性测试系统实验周期长、费用高，已不能满足时代发展的需求，随着科技进步，尤其细胞、组织培养、基因组学、蛋白组学、代谢组学以及计算机模拟辅助评价系统的发展，使得体外替代成为可能。特别是我国是化妆品进出口大国，加入世界贸易组织（WTO）后，研究与国际接轨的毒理替代方法对于促进贸易、规避技术壁垒是十分迫切的。迫于动物福利、社会立法的压力，科技进步、时代发展的需求以及加入世界贸易组织（WTO），规避技术壁垒的需求，有必要建立眼刺激试验的体外替代方法作为化妆品安全性评价中用以补充化妆品原料及产品的眼刺激性安全性检测。

#### 二、起草依据及主要参考文献

（一）OECD《化学品测试指南》兔角膜上皮细胞短时间暴露体外试验 (No.491,2015)

（二）Kojima H, et al. (2013). Second-Phase Validation of Short Time Exposure Tests for Assessment of Eye Irritation Potency of Chemicals. *Toxicol. In Vitro* 27, pp.1855-1869.

（三）ICCVAM (2013). Short Time Exposure (STE) Test Method Summary Review Document, NIH. Available at: [[http://www.ntp.niehs.nih.gov/iccvam/docs/ocutox\\_docs/STE-SRD-NICEATM-508.pdf](http://www.ntp.niehs.nih.gov/iccvam/docs/ocutox_docs/STE-SRD-NICEATM-508.pdf)].

### 三、起草原则

本试验方法起草宗旨是采用目前各化妆品检测实验室已具备的试验条件、技术能力，保证方法科学规范的同时，并兼具和国际标准的接轨性、先进性，以及可操作性、便捷性。

### 四、重点说明的问题

#### （一）关于体例

本试验方法的体例主要参照现行《化妆品安全技术规范》（2015年版）毒理学试验方法的体例，便于化妆品检验领域相关检验人员的查阅。

#### （二）关于试验方法的建立

本方法规定了兔角膜上皮细胞短时暴露体外试验(STE)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、结果判定标准等。各项技术内容的依据主要来源于OECD Guidelines for Testing of Chemicals (No.491, 2015) (OECD《化学品测试指南》491号, 2015年), 基本涵盖了OECD491“兔角膜上皮细胞短期暴露试验 (STE试验) 的操作指南”对细胞株、培养基、受试物及对照设置、实验操作和结果分析的技术要求。在此基础上, 本标准还结合我国实验室检测的特点, 对实验操作中的某些条款和控制条件进行了确认。在试验体系成立的判定条件中, OECD要求“每个样品三次重复试验结果的细胞存活率标准差应小于15%”, 但在该方法的建立及测试过程中发现, MTT法很难保证所有样品的三次重复试验结果的SD都小于15%, 考虑到MTT显色中由于其生成物甲瓚为水不溶性结晶, 需要去除培养液加入有机溶剂进行溶解, 操作过程中易产生人为误差, 因而我们又选择了生成物为水溶性物质的cck8法作为显色、测定方法进行了研究, 尽管该方法不需要吸取上清液不需使用溶解液, 稳定性重现性较好, 但在我们本实验室测试及三家验证单位的验证结果亦不能保证所有测试产品三次重复试验的细胞存活率的SD值在15%之内, 因而在方法草案中未写入该项要求。另外, 在方法草案细胞毒性测定的显色、测定中, 除了OECD方法中MTT法外增加了cck8法, 并对cck8法显色、测定方式进行了详细描述和规定。并邀请三家实验室对两种显色方法均进行了验证, 验证结果均一致。

# 《化妆品用化学原料兔角膜上皮细胞短时暴露体外试验(STE)》试验方法

## 编制说明

### 一、编制原则

本方法的编制本着客观、易行、针对性强等原则。编制过程包括：拟定课题研究内容；建立兔角膜上皮细胞短时暴露体外试验(STE)试验方法并优化实验条件；与我国现行的整体动物试验方法比较；对试验方法进行实验室间验证；征求专家意见，修改完善技术方法和完成草案稿起草、修改。

### 二、与国内有关现行法律、法规和强制性国家标准的关系

伴随经济的持续高速发展，我国化妆品市场发展异常迅猛，市场销售量以超过两位百分数的速度递增。为确保化妆品的安全性，我国相关卫生法律法规都要求对这些化妆品成品及其原料进行眼刺激性评价。目前，我国检测化妆品眼睛刺激性/腐蚀性的主要依据《化妆品安全技术规范》中动物眼睛急性刺激性/腐蚀性试验，以此外推对人体健康的可能危害，尚无体外替代试验标准，本研究的主要内容是建立眼睛刺激性体外替代试验方法，与《化妆品安全技术规范》内容不冲突，技术方法上形成互补，以期与有关国际条约尽快接轨，为推进我国体外试验工作的开展，建立我国自己的动物体外替代方法体系，促进我国未来的化妆品贸易提供技术支持与保证。

### 三、采用国外标准的程度以及与国外同类标准水平的比较

随着经济的持续高速发展、科技进步，迫于动物福利、社会立法的压力，以及加入世界贸易组织(WTO)，规避技术壁垒的需求，近年来对于如何减少、优化、替代动物试验成为全世界特别关注的焦点。2015年经济合作和发展组织(OECD)正式发布兔角膜上皮细胞短时暴露体外试验(STE)操作指南，将其用于化学物质眼睛刺激性的安全性评价。

本方法不仅涵盖了OECD 2015年正式发布“兔角膜上皮细胞短时暴露体外试验(STE)操作指南”的要求，而且结合我国实验室特点，对实验操作中的重要质量控制条件进行了确认。本方法草案体现眼睛刺激性体外试验的试验思路，贴近国内实验室实际情况，更具可操作性。

### 四、方法的制修订与起草原则

#### 1. 与国际接轨的原则。

试验的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。

## 2. 结合国情的原则。

根据我国化妆品管理政策、要求和试验承担单位的水平以及化妆品原料的特点，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，充分考虑了更好地发挥各试验承担单位的主观能动性，并从长远发展的观点出发，兼顾了技术发展的前瞻性。

## 3. 科学、合理、协调和有效性原则。

本方法编制过程中，同时注重了科学性、合理性、协调性和有效性，以及通俗性和规范性之间的关系。

## 五、确定各项技术内容

包括技术指标、参数、公式、试验方法、检验规则等在内的各项技术内容的依据来源自OECD Guidelines for Testing of Chemicals (No.491, 2015) (OECD《化学品测试指南》491号, 2015年)基本涵盖了OECD TG 491对对细胞株、培养基、受试物及对照设置、实验操作和结果分析的技术要求。在此基础上，本标准还结合我国实验室检测的特点，对实验操作中的某些条款和判定标准进行了确认。在试验体系成立的判定条件中，OECD要求“每个样品三次重复试验结果的细胞存活率标准差应小于15%”，但我们在该方法的建立及测试过程中发现，MTT法很难保证所有样品的三次重复试验结果的SD值都小于15%，考虑到MTT显色中由于其生成物甲瓚为水不溶性结晶，需要去除培养液加入有机溶剂进行溶解，操作过程中易产生人为误差，因而我们又选择了生成物为水溶性物质的cck8法作为显色、测定方法进行了研究，尽管该方法不需要吸取上清液不需使用溶解液，稳定性重现性较好，但在我们本实验室测试及三家验证单位的验证结果亦不能保证所有测试产品三次重复试验的细胞存活率的SD值在15%之内，因而在方法草案中未写入该项要求。另外，在方法草案细胞毒性测定的显色、测定中，除了OECD方法中MTT法外增加了cck8法，并对cck8法显色、测定方式进行了详细描述和规定。并邀请三家实验室对两种显色方法均进行了验证，验证结果均一致。

## 六、实验室内比对和实验室间预验证情况

在本方法草案建立过程中，我们进行了两次实验室内比对。2017年4月邀请A、B、C 3家实验室参与实验室间验证，3家验证机构对于提供的12种样品（4种眼刺激化学品分类标示为Category 1，3种为化学品分类标示Category 2，5种为化学品分类标示No Category）的检测结果，除8号样品cck8法一家单位由No Category误判成Category 2外（该样品5%浓度的细胞存活率在70%左右），其他均一致。

## 七、重大分歧意见及处理经过

无。



## 八、其他应予说明的事项

### 1. 本方法的选用原则

本方法适用于化妆品原料进行体外眼刺激性测试，测试结果的特异性、再现性和稳定性良好，可有效替代动物实验。

### 2. 本方法的可行性分析

本方法采用的SIRC细胞为来源于白化家兔眼角膜的一种成纤维样上皮细胞，相比于其他通过验证认可的方法中采用的重组组织模型、离体器官等，经济价廉、毒性终点易于测定、方法易于掌握、简单快捷、重复性好、预测价值高且方法易于标准化。本方法操作所需的相关技术、人员、设备等条件易达到。我国开展化妆品检测的机构均具有建立本标准方法检测化妆品原料的条件和能力。

本方法建立过程中，邀请A、B、C 3家不同类型实验室参与了实验室间预验证，除8号样品cck8法一家单位由No Category误判成Category 2外（该样品5%浓度的细胞存活率在70%左右），其他样品三家测试结果和GHS体内眼刺激分类和OECDSTE结果完全吻合，表明本方法在我国实验室建立是可行的，建议有条件实验室尽快开展该项试验。

### 3. 本方法与动物实验的比对结果

由于我国现行的检测化妆品眼刺激试验是整体动物试验，本方法为首次建立的体外测试化妆品原料眼刺激性的方法，为稳妥起见，本实验室按照课题设计研究思路,选择18种化学物质将本方法与经典动物实验进行比对，两种方法经Kappa分析，K值=0.743，结果与动物实验相关性好，可有效替代动物实验。

## 九、附件

附件A：受试化妆品原料目录

附件 A:

### 受试化妆品原料目录

参照 OECD 的数据库, 选择 18 种已知眼刺激性的化妆品原料作为受试物, 其名单见表 1。

表 1 本研究选用的 18 种参照受试化妆品原料

受试化妆品原料		眼刺激性
苯扎溴胺	8001-54-5	Category 1
Triton X-100	9002-93-1	Category 1
酸性红 92	18472-87-2	Category 1
丁内脂	96-48-0	Category 2A
正辛醇	111-87-5	Category 2A/B
环戊醇	96-41-3	Category 2A/B
正十二烷	112-40-3	No Category irritating
甲基异丁基甲酮	108-10-1	No Category irritating
1, 1-二甲基胍硫酸盐	598-65-2	No Category irritating
乙酸乙氧乙酯	111-15-9	No Category irritating
氢氧化钠	-	Category 1
二丙基二硫醚	629-19-6	No Category
胡椒基丁醚	51-03-6	No Category irritating
聚乙二醇 400(PEG-400)	25322-68-3	No Category irritating
二乙基甲苯甲酰胺	134-62-3	Category 2B
四甘醇	17831-71-9	Category 1
2, 5-二甲基-2, 5-乙二醇	110-03-2	Category 1
甘油	-	No Category

注: 各受试物眼刺激性为 OECD 参考物质表中给出的参考眼刺激性。

分类级别: No Category 相当于无/微刺激性; Category 2 相当于 2A (轻刺激性)/2B (刺激性); Category 1 相当于腐蚀性(不可逆眼损伤)。