

# 体外皮肤变态反应:人细胞系活化试验

Human Cell Line Activation Test

## (征求意见稿)

### 1 范围

本方法规定了体外皮肤变态反应:人细胞系活化试验的基本原则、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人急性单核白血病细胞表面标记物CD86、CD54的表达,以评价受试物引起皮肤变态反应的可能性。

### 3 定义

#### 3.1 细胞75%存活率浓度值 75% cell viability

用受试物染毒后,细胞存活率为75%时对应的受试物浓度值

#### 3.2 荧光强度均值 Mean Fluorescence Intensity

用流式细胞仪测定的荧光强度几何平均数

#### 3.3 相对荧光强度值 Relative Fluorescence Intensity

扣除同型对照后,100倍的受试物MFI和溶剂对照MFI的比值

#### 3.4 CD86有效作用浓度值 Effective Concentration 150

CD86的相对荧光强度值达到150时对应的受试物浓度值

#### 3.5 CD54有效作用浓度值 Effective Concentration 200

CD54的相对荧光强度值达到200时对应的受试物浓度值

### 4 试验的基本原则

当致敏物接触皮肤后,树突状细胞在移动到淋巴器官的过程中分化成熟,并上调一系列表面分子的表达。体外培养类树突状细胞:人急性单核白血病细胞,并和受试物共暴露24h后,使用荧光抗体染料对细胞表面分子CD86、CD54染色并用流式细胞仪测定,从而判定待测物是否具有致敏性。

### 5 试剂

#### 5.1 细胞

选用人急性单核白血病细胞(The human monocytic leukaemia cell line, THP-1)。细胞使用前应进行稳定性检测。推荐使用ATCC的TIB-202™细胞株。

#### 5.2 培养基

1640基础培养液中加入0.05 mM的 $\beta$ -巯基乙醇、10%胎牛血清、适量抗生素，配制成1640完全培养基。

### 5.3 染色缓冲液

磷酸盐缓冲液中加入0.1%的牛血清白蛋白。

### 5.4 染料和抗体类物质

7-氨基放线素菌-D染料 (7-AAD)

FITC标记的小鼠单克隆CD86抗体 (FITC-CD86)

PE标记的小鼠单克隆CD54抗体 (PE-CD54)

FITC标记的小鼠IgG1 (FITC- IgG1)

PE标记的小鼠IgG1 (PE- IgG1)

Fc段受体阻断剂 (Fc-Blocker)

## 6 试验方法

### 6.1 细胞准备

#### 6.1.1 细胞培养

THP-1悬浮细胞使用1640完全培养基，于37℃、5%CO<sub>2</sub>培养箱内培养，倒置显微镜下观察细胞状态。细胞复苏一周并通过稳定性检测后可开展试验。细胞最大培养浓度不宜超过1×10<sup>6</sup>个/mL，复苏后使用不超过2个月，传代次数不超过30次。

#### 6.1.2 细胞稳定性检测

细胞复苏两周后，选用2,4-二硝基氯苯 (DNCB) 和硫酸镍作为阳性检测物，乳酸作为阴性检测物。当细胞可以准确对阳性物和阴性物进行稳定区分时视为通过稳定性检测。

### 6.2 受试物处理

**受试物储备液：**于实验前一天准备。用生理盐水或1640完全培养基配制100 mg/mL的受试物溶液，2倍倍比稀释，得到8个浓度点的储备液系列。不能溶解于上述溶剂的物质选用DMSO作为溶剂，配制浓度500 mg/mL受试物溶液，2倍倍比稀释配制得到8个浓度点的储备液系列。

**受试物工作液：**实验当天，溶于1640完全培养基（或生理盐水）的受试物储备液系列依次用1640完全培养基稀释50倍得到工作液。溶于DMSO的受试物储备液系列依次用1640完全培养基或生理盐水稀释250倍得到工作液。将工作液等体积加入细胞悬液中进行染毒，所以最终细胞接触浓度是工作液浓度再稀释2倍。

如果以上浓度无法测得受试物的细胞75%存活率浓度值（75% cell viability, CV75），可以进行浓度调整。但溶解于生理盐水或1640完全培养基的受试物最终细胞接触浓度最高不超过1mg/mL；溶解于DMSO的受试物最终细胞接触浓度最高不超过5mg/mL；DMSO最终接触浓度不得超过0.2%。

### 6.3 CV75浓度确认

细胞以2×10<sup>5</sup>个/mL的密度于细胞培养箱内培养48 h后，4℃，300×g离心5 min。加入新鲜的完全培养基调节细胞密度至2×10<sup>6</sup>个/mL。吸取500  $\mu$ L细胞悬液和500  $\mu$ L受试物工作

液1:1混合接种于24孔板上。将24孔板放置于细胞培养箱内染毒24h后，转移至1.5mL离心管中，4℃离心5 min，收集细胞并加入1 mL染色缓冲液清洗2次，清洗后加入7-AAD染色液于室温下染色10min。

染色完成后用1 mL染色缓冲液离心清洗细胞2次，最终加入500 μ L染色缓冲液重悬细胞，移入流式管上机测定。

流式细胞仪一次进样累计收集10000个活细胞。根据流式细胞仪给出的活细胞占总细胞的百分比，得到受试物8个不同浓度下的细胞存活率，用公式法（见公式1）或其他统计软件计算出细胞的CV75值。

$$\text{LogCV75} = \frac{(75-c) \times \text{Log}(b) - (75-a) \times \text{Log}(d)}{a-c}$$

公式1

- a: 超过75%的最低细胞存活率（%）
- b: a对应的受试物浓度（μ g/mL）
- c: 未超过75%的最高细胞存活率（%）
- d: c对应的受试物浓度（μ g/mL）

#### 6.4 CD86、CD54表达检测

根据已经测得的CV75值配制CD86、CD54表达检测的受试物工作液浓度。将最终细胞接触浓度值最高设置为 $1.2 \times \text{CV75}$ ，依次1.2倍稀释得到8个工作液浓度系列。如果受试物不具有细胞毒性，则最终细胞接触浓度最高设置为1mg/mL（溶解于1640完全培养基或生理盐水）或 5mg/mL（溶解于DMSO）。空白对照为1640完全培养基，溶剂对照为受试物溶剂，阳性对照为DNCB或其他可在本试验中稳定表达的致敏物。

以 $2 \times 10^5$ 个/mL的初始密度培养2d后，离心调节细胞密度至 $2 \times 10^6$ 个/mL。取500 μ L细胞悬液和500 μ L受试物工作液1:1混合接种于24孔板上。每次CD86、CD54表达检测试验均设置一个空白对照、一个溶剂对照和一个阳性对照（当使用1640培养基或生理盐水作为溶剂时，溶剂对照与空白对照相同）。将24孔板放置细胞培养箱内染毒24h后转移到1.5 mL离心管，用1 mL染色缓冲液清洗细胞2次后，加入人Fc受体阻断剂对细胞Fc段抗体进行封闭、加入7-AAD染色液对死细胞染色。

染色和封闭完成后，用染色缓冲液清洗细胞2次后进行抗体染色。将每管细胞平均分为两份，一份作为试验组，加入FITC-CD86和PE-CD54，加染色缓冲液至50 μ L染色体系；另一份作为同型对照组，加入FITC-IgG1和PE-IgG1，加染色缓冲液至50 μ L染色体系（染料具体用量可根据所购染料性质和实验室情况确定，推荐用量为6 μ L的FITC和1 μ L的PE加染色缓冲液至50 μ L染色体系）。两组细胞加入染料后轻轻吹打几次使染色均匀，4℃、避光染色30 min。

染色完成后加入染色缓冲液清洗2次。最终用500 μ L染色缓冲液重悬细胞，移至流式管中待用。用流式细胞仪对每组细胞的FITC、PE、7-AAD染料的荧光强度均值（Mean Fluorescence Intensity, MFI）进行测定。用公式2计算出受试物的相对荧光强度值（Relative Fluorescence Intensity, RFI）。

$$\text{RFI} = \frac{(\text{受试组 MFI} - \text{受试组同型对照 MFI}) \times 100}{\text{溶剂对照组 MFI} - \text{溶剂对照组同型对照 MFI}}$$

公式2

## 6.5 流式细胞仪

正式测定前应用空白细胞和每种染料的单染细胞调节流式细胞仪的电压和补偿,确保消除不同测试通道间的相互干扰。调试好测定条件后,每次实验累计收集10 000个活细胞,当细胞存活率低导致活细胞数量不足时,至少累计收集30000个细胞。

## 7 结果评价

### 7.1 试验成立条件

7.1.1 溶剂对照的细胞存活率大于90%;溶剂对照的RFICD86、RFICD54均不可以达到阳性标准;

7.1.2 所有受试物的MFI值与其相对应的同型对照MFI值的比值应当大于105%;

7.1.3 阳性对照需要满足RFICD86  $\geq 150$ 且RFICD54 $\geq 200$ ,同时所对应的细胞存活率大于50%;

7.1.4 每次独立试验至少有一半以上的受试物浓度对应的细胞存活率大于50%,否则应重新测定CV75值;

7.1.5 如果受试物出现阴性结果,受试物最高浓度值所对应的细胞存活率应低于90%。除非受试物最高浓度值已经为本试验可接受的最大浓度或该受试物能达到的最大溶解度,这种情况下即便最高受试物浓度对应的细胞存活率高于90%,仍然接受阴性结果。

### 7.2 致敏性结果判定

每种受试物至少进行两次独立的CD86、CD54表达检测试验。每次表达检测试验,在细胞存活率大于50%的前提下,如果有任一浓度下的受试物RFICD86 $\geq 150$ ,则该次CD86表达判定为阳性;如果有RFICD54 $\geq 200$ ,则该次CD54表达判定为阳性。两次试验中CD86和CD54任一指标两次判定为阳性则判定该物质具有致敏性。如果两次试验CD86和CD54的表达均不具有有一致性,则进行第三次试验。若第三次试验中CD86和CD54表达均为阴性,判定为非致敏物,否则判定该物质具有致敏性。

### 7.3 有效作用浓度计算

对于判定具有致敏性的物质,进一步计算其有效作用浓度值(Effective Concentration, EC)。当所测浓度范围内既有RFICD86 $\geq 150$ 又有RFICD86 $< 150$ 时,选用公式3计算CD86的有效作用浓度值(EC150);当所测浓度范围内既有RFICD54 $\geq 200$ 又有RFICD54 $< 200$ 时,选用公式4计算CD54的RFI的有效作用浓度值(EC200)。

$$EC_{150} = CB + \frac{(150 - RFIB) \times (CA - CB)}{RFIA - RFIB}$$

公式3

$$EC_{200} = CB + \frac{(200 - RFIB) \times (CA - CB)}{RFIA - RFIB}$$

公式4

RFIA: RFI $\geq 150$  (EC150) 或 $\geq 200$  (EC200) 的最低RFI值

RFIB: RFI $< 150$  (EC150) 或 $< 200$  (EC200) 的最高RFI值

CA ( $\mu$ g/mL): RFIA对应的受试物浓度

CB ( $\mu$ g/mL): RFIB对应的受试物浓度

若所测浓度范围内RFI CD86均>150，选用公式5计算EC150；若所测浓度范围内RFI CD54均>200（CD54），选用公式6计算EC200。

$$EC150=2^{[\log_2(CB)+\frac{(150-RFIB)\times[\log_2(CA)-\log_2(CB)]}{RFIA-RFIB}]}$$

公式5

$$EC200=2^{[\log_2(CB)+\frac{(200-RFIB)\times[\log_2(CA)-\log_2(CB)]}{RFIA-RFIB}]}$$

公式6

RFIB: RFI>150（EC150）或>200（EC200）的最低RFI值

RFIA: 比RFIB大至少10的最低RFI值

CA（μg/mL）: RFIA对应的受试物浓度

CB（μg/mL）: RFIB对应的受试物浓度

三次独立平行试验中计算平均值，作为EC150和EC200的最终值；两次独立平行试验中选取较大的值作为EC150和EC200的最终值。

## 8 结果解释

体外试验结果应能得出受试物的致敏性，这些结果只能在很有限的范围内外推到人类。

# 体外皮肤变态反应:人细胞系活化试验方法

## 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,国家药品监督管理局化妆品标准专家委员会秘书处组织开展了体外皮肤变态反应:人细胞系活化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。本标准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

在研究和分析国内外相关标准的基础上,起草了本标准文本及编制说明,形成方法草案。本研究由化妆品标准专家委员会立项并通过结题专家论证,形成如下意见及结论:规范文字说明,完善文本,修改后通过。修改后对外征求意见,根据反馈情况对文本进行修改。

### 三、与我国已有相关标准的关系

2015年版《化妆品安全技术规范》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)。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,未来可以应用在整合策略中,进一步提高替代试验方法的准确性和特异性。

本标准的主要内容是建立皮肤变态反应的替代试验方法,以期与国际标准尽快接轨,与2015年版《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,建立我国自己的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提供技术支持与保证。

### 四、与国际同类标准的关系

2013年,欧盟替代方法验证中心(ECVAM)对该方法进行验证,并通过随后的欧盟替代方法验证中心科学咨询委员会(ESAC)独立同行评议,认为该方法科学有效。2017年,经济合作和发展组织(OECD)正式发布H-CLAT方法的操作指南(OECD-442E),将其用于化学物质皮肤致敏性的安全评价。2018年6月,OECD更新修订版本。

本方法涵盖了OECD 2018年正式修订发布的“皮肤致敏反应有害结局通路中关于树突状细胞活化的关键事件的体外试验方法操作指南:人细胞系活化试验”(OECD GUIDELINE FOR THE TESTING OF CHEMICALS In Vitro Skin Sensitisation assays addressing the Key Event on activation of dendritic cells on the Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation ANNEX I: HUMAN CELL LINE ACTIVATION TEST (H-CLAT))的要求,基本操作和OECD

H-CLAT 方法一致，具体变动包括：

(1) 在 OECD 方法基础上补充了 EC 值的计算方法。

(2) 在标准中对操作方法进行细化，如“用 1mL 染色缓冲液清洗细胞”“轻轻吹打细胞使染色均匀”，以提高标准的可操作性。

各项技术内容的依据来源自 OECD GUIDELINE FOR THE TESTING OF CHEMICALS In Vitro Skin Sensitisation assays addressing the Key Event on activation of dendritic cells on the Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation ANNEX I: HUMAN CELL LINE ACTIVATION TEST (H-CLAT) (OECD 《化学品测试指南》TG 442E, 2018 年)，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。

## 五、实验室验证结果

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 7 种化学物的定性预测结果均一致；4 家实验室对 5 种 OECD 参考物质的定量检测结果（CV75、EC150、EC200）与 OECD TG 442E 附表中规定范围相比，准确率分别为 100%、100%、80%、80%，符合 OECD 要求。实验结果具体见附件：体外皮肤变态反应:人细胞系活化试验研究报告。