

ICS 71.100.70

C2682

Y42

上海日用化学品行业协会团体标准

T/SHRH 009-2018

全国团体标准信息平台

化妆品- 3D 皮肤模型彗星实验方法

Cosmetics -3D Skin Comet Assay

全国团体标准信息平台

2018-12-01 发布

2018-12-30 实施

上海日用化学品行业协会 发布

目 次

| | |
|-----------------|---|
| 前言..... | 2 |
| 1. 范围..... | 3 |
| 2. 规范性引用文件..... | 3 |
| 3. 原理..... | 3 |
| 4. 试剂和材料..... | 3 |
| 5. 仪器和设备..... | 4 |
| 6. 实验步骤..... | 5 |
| 7. 结果判定..... | 6 |
| 8. 结果报告..... | 6 |

全国团体标准信息平台

前 言

本标准按照GB/T1.1-2009给出规则起草。

本标准由上海日用化学品行业协会提出和归口。

本标准起草单位：汉高（中国）投资有限公司、上海家化联合股份有限公司、伽蓝（集团）股份有限公司、上海相宜本草化妆品股份有限公司、上海中翊日化有限公司、上海市质量监督检验技术研究院、玫琳凯（中国）有限公司、上海天祥质量技术服务有限公司、上海清轩生物科技有限公司有限公司、广东博溪生物科技有限公司、东阿阿胶股份有限公司、上海日用化学品行业协会。

本标准主要起草人：田丽婷、张萌萌、陈田、吴建铭、吕智、孙培文、林艺青、戴彦韵、万向红、李琼、高宏旗、金坚、陈亦华

全国团体标准信息平台

化妆品-3D 皮肤模型彗星实验方法

1 范围

本标准规定了3D皮肤模型彗星实验的基本技术要求。

本标准适用于评价化妆品、家用洗护用品的研究、生产加工、保存和运输过程中所涉及原料、中间体等的DNA损伤。检验对象包括但不限于上述领域的多种化合物等。

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。

3 原理

为使用彗星试验研究DNA损伤,经过细胞分离、细胞膜与核膜分离、去除蛋白等过程后,在高碱性条件下,使聚缩的DNA解旋。将玻片转移至电泳槽中,在此处,带负电的DNA根据其分子大小在电场中迁移。其后,对DNA染色,在荧光显微镜下观察。完整的DNA(在电泳条件下不能迁移)表现为圆形细胞核。相反,DNA片段(使用供试化合物处理后出现的)能够迁移。这些DNA片段肉眼可见,表现为在彗星头(由未迁移的DNA构成)后面出现的彗星尾。可使用几种参数来测定彗星形成的幅度,进而判断受试物是否为致突变物或致断裂物。

4 试剂和材料

4.1 丙酮

4.2 70%乙醇

4.3 乙醇>96%

4.4 甲磺酸甲酯, MMS; 5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$; Sigma-Aldrich,

4.5 前致变剂阳性对照: 苯并芘 (BaP, 12.5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, 丙酮溶液; Sigma-Aldrich)

4.6 Aphidicolin (APC): 通过稀释制备好的100 \times 二甲亚砜储备液; Sigma-Aldrich

4.7 ToxiLight生物检测试剂盒 (Lonza, Basel, Switzerland)

4.8 TPlite试剂盒 (Perkin Elmer, Waltham, MA)

4.9 嗜热菌蛋白酶溶液 (0.5 mg/mL, 溶于含有10 mM HEPES [pH 7.2-7.5], 33 mM KCL, 50 mM NaCl 和7 mM CaCl_2 的缓冲液中)

4.10 琼脂糖

4.11 裂解缓冲液 (2.5 M NaCl、0.1 M Na_2EDTA 、0.01 M Tris、10% DMSO和1% Triton X-100, 溶解在双蒸水中, pH 10)

4.12 缓冲液 (0.4 M Tris双蒸水溶液, pH 7.5)

4.13 SYBR 黄, 在缓冲液Tris-EDTA (10 mM Tris和1 mM Na_2EDTA , 溶于双蒸水中, pH 7.5) 中稀释10000倍

4.14 Phenion®FT 全厚度3D皮肤模型, 该类组织具有如下特征: 1) 由基于胶原基质(将成纤维细胞培养在重构和天然的基质环境中)的结构稳定的真皮构成。2) 原代角质细胞源自与成纤维细胞相同的人类捐献者, 形成了完全分化的表皮组织; 3) 该表皮组织包含人类天然皮肤中所观察到的所有层, 包括对皮肤屏障功能起关键性调节作用的角质层; 4) Phenion®FT全厚度皮肤模型模拟人类天然皮肤, 具有代谢能力。

5 仪器和设备

细胞培养箱、荧光显微镜、低温冰箱（-80℃）、液氮罐、超净工作台、电泳。

6 实验步骤

6.1 皮肤组织的处理

实验前，皮肤组织的培养基应每隔一天换液一次。通过在37℃和5%CO₂条件下过夜培养，进行平衡后，可将组织用于实验。

按16 μL/cm² (Phenion[®]FT: 25 μL) 的体积，将受试化合物局部应用48小时，以便对受试化合物进行可能的代谢处理。在首次给药后24小时和45小时，将第二和第三小份受试化合物应用于相同的组织上面。拟将后一个时点专门用于捕获可能会立即进行DNA修复的损伤。每天，在临近每次给药前制备新鲜的受试化合物溶液。

6.2 单细胞的分离

暴露48小时后，采取500-μL的培养基，用于测定腺苷酸激酶活性（推荐使用ToxiLight生物检测试剂盒）。使用手术刀，剥取25%的组织，并将其保存在-80℃条件下，以便进行第二次细胞毒性测定。将四分之一的组织用于研究细胞内的ATP浓度（推荐使用ATP-lite试剂盒），将使用细胞内的蛋白浓度对测定结果进行标准化。将余下的组织转移至嗜热菌蛋白酶溶液（0.5 mg/mL，溶于含有10 mM HEPES [pH 7.2-7.5]，33 mM KCL，50 mM NaCl和7 mM CaCl₂的缓冲液中）的顶部，以降解真皮与表皮之间的基底膜。在4℃条件下孵育2小时后，使用剪刀，从真皮上面剥离表皮。

使用剪刀，分别分割各个部分（即表皮和真皮），分离出胶质细胞和成纤维细胞，即所谓的切碎过程。在通过离心收集细胞/细胞核之前，将缓冲液通过细网（孔径40 μm），以去除较大的残余物。将沉淀悬浮在低熔点琼脂糖中，将75 μL 的混合物分布在玻片上（使用之前已用1.0%正常熔点琼脂糖（溶于PBS中）预先包被）。将玻片盖上盖玻片，以使均匀分布的琼脂糖在4℃条件下凝固3-5分钟。按此方法，每个部分制备三张玻片。

6.3 实验参数选择

6.3.1 溶解性研究

旨在找出两种推荐的溶剂的最大溶解浓度，即，丙酮和70%乙醇（v/v，DI溶液）。丙酮是首先推荐的溶剂，而70%乙醇（去离子水溶液，v/v）只有在受试化合物在丙酮中溶解度低于1%（v/v）的情况下才使用，70%乙醇将明显提高受试物质的溶解度。通常，所有溶剂均不得诱导出细胞毒性，或与受试化合物发生相互反应，或改变受试化合物的特点。将目标浓度分别设定为10 mg/100 μL或10%。通过逐渐加入小份溶剂来确定溶解度有限的化合物的最大浓度。然后通过试验结束时导致皮肤组织上出现沉淀的最低剂量来确定最大浓度。可将溶液加热至40℃和/或用超声进行处理来增加溶解度。

6.3.2 剂量范围探索试验

进一步明确溶解度研究中定义的最大浓度的细胞毒性。推荐使用不超过6.1.中规定的最大浓度的对数表。监测受试化合物的细胞毒性影响，如细胞内三磷酸腺苷（ATP）的浓度变化和在细胞受损时从组织中释放进入培养基中的腺苷酸激酶活性。

6.3.3 主实验

根据剂量范围探索试验结果，进一步确认最大的测试浓度。至少设定三种浓度，即低、中、高剂量组。如果在初步试验中，已经缩小了剂量范围，则推荐等距剂量范围（而不是对数剂量范围）。此外，须应用溶剂对照和阳性对照（使用甲磺酸甲酯，MMS；5 μg/cm²）。如果发现溶剂已能充分反映特定实验室未处理组织的低背景DNA损伤，则不应用阴性对照。

给药组和对照组的组织于受试物暴露48小时。在试验开始时首次给药后，在24小时后进行第二次给药，以诱导出外源化合物的代谢酶类。在试验结束前3小时，进行第三次即最后一次给药，以将可能会立即进行修复的DNA损伤考虑在内。

(1) 主实验中明确的阳性结果通常无需验证。

(2) 如果受试化合物出现了阴性结果或非结论性结果，则应使用 Aphidicolin (APC) 再次进行试验，该物质在处理期结束前 4 小时加入 (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，通过稀释制备好的 100 \times 二甲亚砜储备液得到；Sigma-Aldrich)。使用 APC (一种 DNA 修复过程抑制剂) 可通过累积与链断裂有关的切口修复来提高本试验的敏感性。已发现，这种方法可反映出前致突变剂的作用。在添加 APC 的试验中，使用前致突变剂——苯并芘 (BaP; 12.5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ，丙酮溶液) 作为阳性对照来代替 MMS，以证明 APC 的有效性。

(3) 如果 APC 试验得出了不一致的或模棱两可的结果，则建议使用改进的浓度间隔 (通常更严格) 来进行第三次试验。

6.4 彗星实验

操作步骤如下：在低熔点琼脂糖凝固并去除了盖玻片以后，在 4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下，将玻片置于裂解缓冲液 (2.5 M NaCl、0.1 M Na_2EDTA 、0.01 M Tris、10% DMSO 和 1% Triton X-100，溶解在双蒸水中，pH 10) 过夜孵育。然后，将玻片置于冰冷的电泳缓冲液 (0.3 M NaOH 和 0.001 M Na_2EDTA ，溶解在双蒸水中，pH > 13) 中孵育 20 分钟，以使 DNA 解旋，接着在充满电泳缓冲液的电泳槽中电泳 30 分钟 (1 V/cm, 450 \pm 50 mA)。再在缓冲液 (0.4 M Tris 双蒸水溶液，pH 7.5) 中孵育 5 分钟，以便对玻片进行中和，然后在浓度 > 96% 的乙醇中，使玻片脱水 5 分钟。

6.5 玻片的显微分析

分析两张玻片 (即真皮和表皮)。如其中有一部分无法评价，例如，由于细胞太少等原因而无法评价，则分析第三张玻片。对玻片进行编号，以防操作员在玻片分析过程出现差错。临近分析前，使用 SYBR 黄 (在缓冲液 (Tris-EDTA [10 mM Tris 和 1 mM Na_2EDTA ，溶于双蒸水中，pH 7.5]) 中稀释 10,000x) 对玻片进行染色。使用 Comet Assay IV 软件 (Perceptive Instruments, Suffolk, UK)，以半自动方式，随机测定 50 个细胞核/玻片；也可使用其他软件。可得到好几种参数，其中，建议使用慧尾荧光强度 (与彗星头比较)，即 % 慧尾强度。测定每个呈圆形、浓密而均匀着染的彗星头 (如图 1)，从分析中排除重叠的细胞、靠近玻片边缘的细胞，以及未满足上述标准的细胞。这一点同样适用于对于彗星头小、尾部呈弥散型且大的伪影细胞。当发现可分析的细胞数少于 50 时，将玻片废弃。

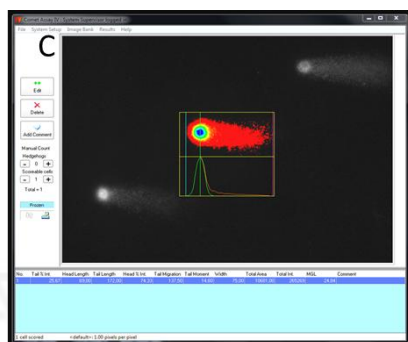


图 1 使用半自动化软件分析、评价玻片

6.6 数据评估

6.6.1 数据处理

评估之前，对数据（即各个荧光强度值）进行方差稳定性转换。将百分率转换为比例（p），然后按公式 $\sin^{-1} \sqrt{p}$ 计算出转换值。再通过中位值总结玻片水平上 50 个细胞核的数据，成为单个总结性指标（即测试的每份组织的%慧尾 DNA）。由于组织为局部应用，因此，组织是试验/统计单元，所有统计学分析均根据这些组织水平上的总结数据进行。

6.6.2 有效性判定标准

6.6.2.1 应按照规定的试验设计进行试验，即，至少完成三种浓度的受试化合物测试，并同时溶剂和阳性对照试验。

6.6.2.2 每个对照组和给药组有三份有效组织代表。

6.6.2.3 如有两张玻片（100 个彗星）可以评价，且满足设置的细胞毒性临界值（即，与溶剂对照相比，AK 酶活性增加 ≥ 2 倍和/或与溶剂对照相比，ATP/蛋白比值降低 $\leq 50\%$ 均未超过），则将组织判定为有效。

6.6.2.4 阳性对照明显不同于溶剂对照。

6.6.3 评价标准

证实试验有效以后，在考虑生物相关性之前，进行统计分析。由于与处理有关的%慧尾DNA增加是本遗传毒性试验的主要关注点，因此，对处理导致的反应增加值进行统计学分析，对溶剂和给药组进行“方差分析”（ANOVA）。如有统计学意义，则使用Dunnett氏检验方法，对每个处理组及其对照组进行配对比较。

7 结果判定

在没有相关细胞毒性影响的情况下，如果至少有一项研究显示，两个或更多（连续的）剂量水平使%慧尾DNA产生了有统计学意义的增高，或最高浓度使%慧尾DNA产生了有统计学意义的增高，且该显著影响在另一项独立研究中可重复，则将受试化合物判定为有遗传毒性。

如发现%慧尾DNA 没有相关性增高，则将受试化合物判定为没有遗传毒性。

8 结果报告

检测报告应总结该研究的所有试验。提供的信息应足够详细，以证实报告关于受试化合物潜在遗传毒性危害的结论。简言之，该报告应总结使用的试验方案，包括当前运行的试验的特殊条件，其次，应详细说明试验设计，即，对照组和给药组的详细说明。此外，还需要说明所研究的化合物（例如，批号、纯度、在使用的溶剂中的稳定性、pH）以及所选择的溶剂（例如，纯度、选择的原因）。

作为分析的基础，应报告所分析的组织 and 彗星数量，应记录阴性对照和阳性对照的历史性结果。接下来，应给出单张玻片的中位值以及给药组或对照组内的玻片均值。

描述试验的最后评价（从得出统计学分析结果前的试验有效性评价开始），说明生物学相关问题。在得出总体结论之前，应当对支持遗传毒性潜能最终结论的各个方面进行讨论。

结果报告应有总体结论。