

T/GDCA

广东省化妆品学会团体标准

T/XXX XXXX—XXXX

唇部产品刺激性的体外评估方法 重建唇部 样上皮模型法

In vitro irritation of lip product: Reconstructed human lip-like epidermis model

(征求意见稿)

在提交反馈意见时，请将您知道的相关专利连同支持性文件一并附上。

XXXX - XX - XX 发布

XXXX - XX - XX 实施

广东省化妆品学会 发布

前 言

本文件按照GB/T 1.1—2020 《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

请注意本文件的某些内容可能涉及到专利，本文件的发布机构不承担识别这些专利的责任。

本文件由广东省化妆品学会提出。

本文件由广东省化妆品学会归口。

本文件起草单位：

本文件主要起草人：



唇部产品刺激性的体外评估方法 重建唇部样上皮模型法

1 范围

本文件规定了一种采用3D重建唇部样上皮模型评价唇部产品及其原料刺激性的方法。
本文件适用于唇部产品及其原料刺激性的评价。
本文件不适用于腐蚀性物质的评价。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；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。

GB/T 16886.23-2023 医疗器械生物学评价第23部分：刺激试验

OECD TG 439 体外皮肤刺激性：重组人表皮模型测试方法

OECD TG 492 重建人角膜样上皮（RhCE）测试方法，用于识别那些无需进行分类、仅标注对眼睛有无刺激性或严重伤害作用的化学物

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

3D 重建唇部样上皮模型 3D reconstructed lip-like epithelium model

采用人原代角质形成细胞，模拟唇部上皮组织结构和生理功能，在仿生支架上经气-液界面培养形成的、具有完整基底层、棘层、颗粒层和极薄角质层的三维唇部上皮模型。

3.2

细胞活力 cell viability

测量细胞群总活性的参数，例如细胞线粒体脱氢酶对活性染料MTT的还原能力，这主要与活细胞的总数和/或活力相关。

4 基本原则

实验室应确保所有从事本文件所述测试活动的人员均经过必要的培训并具备相应的技术知识和经验。本文件并未指出所有可能的安全问题，使用者有责任采取适当的安全和健康措施，并保证符合国家有关法规规定的条件。实验室应满足GB 19489的要求，并确保实验室生物安全。

5 检测原理

5.1 3D 重建唇部样上皮模型构建

3D重建唇部样上皮模型（简称：唇部模型）以人原代角质形成细胞为原料，经体外定向培养形成多层结构，复刻人体皮肤的角质层、颗粒层、棘层等组织，具备与人体皮肤一致的屏障功能、细胞代谢及刺激应答机制，可真实还原受试物与皮肤的接触场景。

5.2 细胞活力检测

将受试物（化妆品或原料）直接作用于唇部模型表面，经规定时间培养后，通过检测细胞相对活力判断刺激程度。受试物的刺激性越强，越易破坏模型细胞的完整性与代谢功能，导致细胞相对活力越低。

5.3 炎症因子检测

将受试物（化妆品或原料）直接作用于唇部模型表面，经规定时间培养后，通过定量检测培养基中白细胞介素-1 α （IL-1 α ）的释放水平判断其诱导细胞免疫应答的潜力。受试物诱发炎症反应的倾向性越高，则越易激活角质形成细胞的固有免疫信号通路，导致模型释放的IL-1 α 水平越高。

5.4 方法选择

在体外皮肤刺激性的评估策略中，常规的细胞活力检测（MTT法）主要反映受试物的细胞毒性潜力。对于并非传统的直接细胞毒性物质（如辣椒素、辣椒碱、薄荷醇等），为更全面、准确地评估此类物质的感官刺激潜力，应增加炎症因子检测（附录B）。

6 材料与试剂

6.1 材料

3D重建唇部样上皮模型：来源于人原代角质形成细胞，经体外定向培养形成的具有完整基底层、棘层、颗粒层和极薄角质层的三维唇部上皮模型。

6.2 试剂

除非另有说明，化学试剂使用符合国家标准的分析纯试剂。

培养液、MTT试剂、十二烷基硫酸钠（SDS）、12N 盐酸、异丙醇、DPBS（Dulbecco's Phosphate Buffered Saline）、生理盐水、消毒的重蒸水、苏木素染色液、伊红染色液、Triton X-100。

7 仪器与设备

超净工作台、通风柜、细胞培养箱（37 °C、5% CO₂、95%湿度）、96 孔酶标仪（检测波长570 nm）、生物显微镜、37 °C水浴锅、4 °C冷藏箱、-20 °C冷冻冰柜、真空泵、分析天平（精度0.1 mg，配10 mg和1 g校正砝码）、震荡器、摇床、移液器、计时器、镊子、空气-液体界面提升器盖。

8 测试方法

8.1 唇部模型构建

8.1.1 基底准备：对支架进行包被或预湿预处理。

8.1.2 细胞接种：将人原代角质形成细胞高密度接种于支架表面。

8.1.3 浸没培养：在角质形成细胞生长培养基中浸没培养，使细胞贴壁铺展形成连续单层。

8.1.4 气-液界面培养：将培养体系提升至气-液界面，基底侧供给表皮分化培养基，顶部暴露于空气培养，诱导细胞分层分化与功能性角质层形成。

8.2 唇部模型质量控制

微生物检测：检测病毒、细菌、真菌和支原体，确认无外源污染。将模型暴露于1% Triton X-100 后测定ET-50值，结果在合格范围判定模型质量合格。

8.3 形态学检测

HE染色组织学检查，模型应具有清晰连续的基底层、棘层、颗粒层和极薄角质层。

8.4 对照选取

选择灭菌重蒸水（ddH₂O）作为阴性对照，0.2%十二烷基硫酸钠（SDS）作为阳性对照。

8.5 样品处理与暴露

8.5.1 液体样品处理

取30 μL 液体样品或对照物质滴加于组织表面，孵育18 h；

8.5.2 固体样品处理

用25 μL无钙镁 DPBS 预湿润组织表面，取约30±1 mg固体粉末均匀铺于组织表面，完全覆盖，孵育18 h。

8.6 MTT 检测细胞活力

配制1.0 mg/mL MTT 溶液，向24孔板每孔加入300 μL MTT 溶液。将处理后的组织放入含MTT溶液的24孔板，37 °C、5% CO₂条件下孵育180±15 min。孵育结束后，将组织转移至加入2 mL/孔异丙醇的24孔板内，避光于水平摇床50 rpm~100 rpm震荡2 h以上，至甲臞结晶完全溶解。用酶标仪在570 nm测定吸光度。

8.7 结果计算与判定

8.7.1 结果计算

根据以下公式计算细胞相对活力：

$$\text{细胞相对活力}(\%) = \frac{\text{测试组 OD 值}}{\text{阴性对照 OD 值}} \times 100\% \dots\dots\dots (1)$$

式中：

测试组OD值——测试组吸光度；

阴性对照OD值——阴性对照吸光度。

8.7.2 结果判定

细胞相对活力≥50%：判定为无刺激性；细胞相对活力<50%：判定为有刺激性。

9 方法验证

9.1 阳性对照采用 0.2% SDS 溶液，阴性对照采用 ddH₂O。

9.2 验证要求：阴性对照组细胞相对活力>80%，阳性对照组细胞相对活力<50%，方法有效。

10 结果解释与应用

本文件测试结果仅反映样品对体外重建3D唇部模型的刺激性，化妆品最终安全性评价应结合其他毒理学数据与临床信息综合判定。

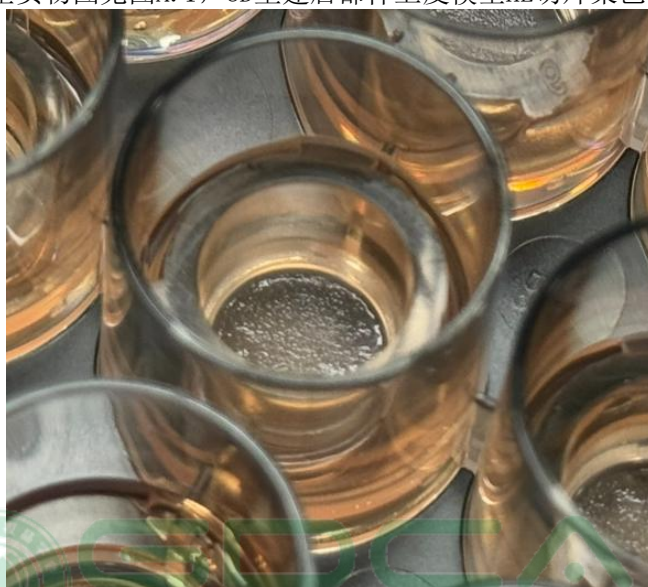
附录 A

(资料性)

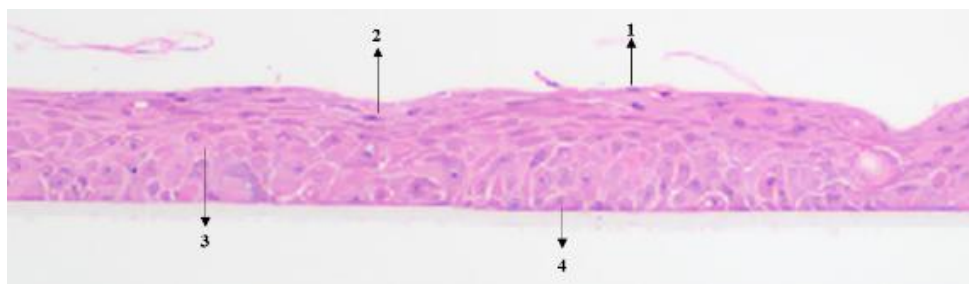
3D 重建唇部样上皮模型图像

A.1 3D 重建唇部样上皮模型图像

3D重建唇部样上皮模型实物图见图A.1，3D重建唇部样上皮模型HE切片染色图见图A.2。



图A.1 3D 重建唇部样上皮模型实物图



图A.2 3D 重建唇部样上皮模型 HE 切片染色图

附录 B
(规范性)
炎症因子检测

B.1 炎症因子检测

B.1.1 试剂和材料

人白介素1 α ELISA 试剂盒。

B.1.2 样品检测

取正文“8.5样品处理与暴露”项下培养基样本，根据人白介素1 α ELISA 试剂盒说明书进行检测，主要步骤如下：

- a) 加样品和标准品，37 °C反应 90 min，不洗。
- b) 加生物素标记抗体，37 °C反应 60 min，1 \times 洗涤缓冲液洗涤 3 次。
- c) 加 ABC，37°C反应 30 min，1 \times 洗涤缓冲液洗涤 5 次。
- d) TMB 37°C反应 15~20min。

B.2 结果计算与评价

计算均值与标准差，与阴性对照组相比，样品组IL-1 α 表达量显著上升 ($p<0.05$)，提示受试物可诱导炎症反应。

