附件6

体外皮肤变态反应ARE-Nrf2荧光素酶LuSens试验方法

In Chemico Skin Sensitisation The ARE-Nrf2 Luciferase LuSens Test

1 范围

本方法规定了体外皮肤变态反应ARE-Nrf2荧光素酶LuSens试验的基本原理、试验方法和技术要求。

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

本试验通过检测体外培养的LuSens细胞荧光素酶的表达变化，以评价受试物引起皮肤变态反应的可能性。

3 定义

3.1 75%细胞存活率浓度值 the estimated concentration resulting in 75% cell viability（CV75）

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 抗氧化反应元件 antioxidant response element（ARE）

存在于细胞保护基因的启动子区域，能够响应氧化应激并调控相关基因表达的作用元件。

3.3 荧光素酶活性诱导倍数fold luciferase activity induction（Fold Induction）

扣除空白对照后，受试物和溶剂对照的细胞发光比值。

4 试验的基本原理

致敏物质接触皮肤后，角质形成细胞被激活，诱导炎症反应及特定细胞信号通路相关基因的表达。体外培养含有荧光素酶报告基因的人角质形成细胞（LuSens细胞），暴露于受试物，通过计算细胞相对存活率和荧光素酶活性，从而预测受试物是否具有皮肤致敏性。

5 试验材料与试剂

5.1 细胞

含有ARE荧光素酶报告基因的人角质形成细胞株（LuSens细胞株）。

5.2 培养基

细胞培养液1：DMEM培养液中加入10%胎牛血清，1%抗生素，0.005%的嘌呤霉素盐酸盐。

细胞培养液2：DMEM 培养液中加入10%胎牛血清。

细胞培养液3：DMEM 培养液中加入1%胎牛血清。

5.3 噻唑蓝（MTT）检测液

称取MTT适量，加入不含钙镁的磷酸盐缓冲液（Phosphate-Buffered Saline，PBS），溶解并稀释至5mg/mL的溶液，作为储存液。

工作液：取9 mL细胞培养液3加入1 mL MTT储备液，临用现配。

5.4 细胞裂解液

十二烷基硫酸钠（SDS） 10 g

二甲基亚砜（DMSO） 99.6 mL

冰醋酸（100%） 0.4 mL

6 试验方法

6.1 细胞培养

LuSens细胞使用细胞培养液1，于37℃、5%CO2培养箱内培养，倒置显微镜下观察细胞状态。细胞达80%~90%融合时可用于测试，传代次数不超过15代。

6.2 受试物处理

6.2.1 溶剂：二甲基亚砜（DMSO）和细胞培养液3。

6.2.2 细胞毒性预试验

受试物储备液：采用DMSO为溶剂配制受试物储备液，最大浓度为200 mM，不同剂量间比值为2，一般设12个浓度。

受试物工作液：采用细胞培养液3将储备液稀释100倍，最终测试浓度分别为0.976、1.953、3.906、7.812、15.625、31.25、62.5、125、250、500、1000、2000 μM。若不能得到CV75值，则重复试验降低最大浓度，直到得到CV75值。若2000 μM浓度时仍未观察到细胞毒性，则正式试验中使用2000 μM为最大浓度。

6.2.3 正式试验

受试物储备液：根据预试验结果，用DMSO为溶剂配制受试物储备液，最大浓度为1.2×CV75（或2000 μM），不同剂量间比值为1.2，共设6个浓度。

受试物工作液：采用细胞培养3将储备液稀释100倍，最终测试浓度分别为CV75/2.074、CV75/1.728 、CV75/1.44、CV75/1.2、CV75、CV75×1.2 μM。

6.3 阳性对照溶液配制

 试验前一天，用DMSO配制12 mM阳性对照物乙二醇二甲基丙烯酸酯（EGDMA）的储存液，试验时用细胞培养液3稀释至检测浓度为120 μM。

6.4 阴性对照溶液配制

试验前一天，用DMSO配制500 mM阴性对照物DL-乳酸的储存液，试验时用细胞培养液3稀释至检测浓度为5 mM。

6.5 试验步骤

6.5.1 细胞毒性预试验

6.5.1.1 细胞接种

细胞生长至80%～90%融合后，弃去培养基，用适量PBS洗2遍，胰酶-EDTA消化后加入适量细胞培养液2，收集细胞于离心管中，800～1000转/分钟离心5 min，弃上清液后用细胞培养液2重悬，调整细胞浓度为8.3×104个/mL。96孔板中每孔加入120 μL细胞悬液，37℃，5% CO2继续培养24 h。

6.5.1.2 受试物染毒

试验设置阳性对照组、阴性对照组、受试物组、溶剂对照组、空白对照组（只加细胞培养液3），每组至少3个重复孔。将细胞培养板从培养箱中取出，去除培养基，每孔预先加入 150 μL细胞培养液3，再依次加入50 μL受试物或对照溶液，37℃、5% CO2继续培养48 h。

6.5.1.3 MTT孵育

染毒结束后，去除细胞培养液，每孔加入200 μL MTT工作液，37℃、5% CO2孵育2 h。

6.5.1.4 MTT检测

孵育结束后，去除MTT工作液，每孔加入100 μL细胞裂解液，震摇5 min，采用酶标仪检测，吸收波长为570 nm，参考波长为690 nm。

6.5.1.5 细胞存活率（CV75）计算

由得到的吸光度值，计算与溶剂对照相比细胞存活率为75%的受试物浓度。计算方法如下：

选择两个连续浓度，一个细胞存活率大于75%，一个细胞存活率低于75%，则

$CV75=（Cb−Ca）×\frac{\left(75−Vb\right)}{(Vb−Va)}$+ $Cb$

Ca（μM）：细胞存活率高于75%的最大受试物测试浓度

Cb（μM）：细胞存活率低于75%的最小受试物测试浓度

Va：Ca对应的细胞存活率

Vb：Cb对应的细胞存活率

6.5.2 正式试验

6.5.2.1 细胞接种

细胞生长至80～90%融合后，弃去培养基，用适量PBS洗2遍，胰酶-EDTA消化细胞后加入适量细胞培养液2，收集细胞于离心管中，800～1000转/分钟离心5 min，弃上清液后用细胞培养液2重悬调整细胞浓度为8.3×104个/mL。正式试验中，每个受试物使用一个平底透明的96孔板（用于MTT检测），一个白色不透明的96孔板（用于LuSens检测），96孔板中每孔加入120 μL细胞悬液，37℃、5% CO2继续培养24 h。

6.5.2.2 受试物染毒

试验设置阳性对照组、阴性对照组、受试物组、溶剂对照组、空白对照组（只加细胞培养液3），每组至少3个重复孔。将细胞培养板从培养箱中取出，去除培养基，每孔预先加入 150 μL细胞培养液3，再依次加入50 μL受试物或对照溶液，37℃、5% CO2继续培养48 h。

6.5.2.3 MTT孵育

染毒结束后，透明96孔板中去除培养基，每孔加入200 μL MTT工作液，37℃、5% CO2孵育2 h。

6.5.2.4 MTT检测

孵育结束后，去除培养液，每孔加入100 μL 细胞裂解液，震摇5 min，酶标仪检测，吸收波长为570 nm，参考波长为690 nm。

6.5.2.5 荧光素酶表达检测

染毒48 h后，白色96孔板中去除培养基，每孔加入300 μL PBS（含钙镁）洗涤2遍后，按照荧光素酶报告基因检验检测试剂盒要求检测荧光素酶表达。

6.5.2.6 结果计算

$$诱导倍数=\frac{L\_{sample}−L\_{blank}}{L\_{solvent}−L\_{blank}}$$

Lsample：受试孔的荧光读数

Lblank：不包含细胞和给予受试物的空白孔的荧光读数

Lsolvent：包含细胞和溶剂对照孔的荧光读数

7 结果评价

7.1 试验成立的条件

与溶剂对照相比，阳性对照组诱导倍数（Fold Induction）≥2.5，有统计学差异，且细胞存活率≥70%。

与溶剂对照相比，阴性对照组诱导倍数（Fold Induction）＜1.5。

所有溶剂对照组细胞存活率SD值＜20%。

正式试验中，受试物至少有3个测试浓度细胞存活率＞70%。

7.2 结果判定

与溶剂对照组相比，当受试物至少有一个测试浓度细胞毒性＜70%（或者最大无细胞毒性测试浓度达到2000 μM），且平均诱导倍数＜1.5，则判定结果阴性。

与溶剂对照组相比，当受试物至少三个测试浓度无细胞毒性时，且其中两个连续无毒性浓度诱导倍数≥1.5，有统计学差异，则判定结果阳性。

要进行致敏性判断，需进行满足7.1条件的重复试验，当两次重复试验结果一致时，不需要进行第三次试验；若不一致，则进行第三次试验。当两次试验结果均为阴性/阳性，才可最终判定受试物致敏性阴性/阳性。