

团 体 标 准

T/GDCQMA 001-XXXX

化妆品舒缓功效测试 -体外皮肤角质形成细胞炎症因子测试法

(征求意见稿)

20XX-XX-XX 发布

20XX-XX-XX 实施

广东省化妆品质量管理协会 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。

本文件由广东省化妆品质量管理协会提出并归口。

本文件起草单位：南方医科大学、广东悠质检测技术有限公司、广东芭薇生物科技股份有限公司。

本文件主要起草人：杨杏芬，何志妮，廖伟作，郭沈涛，李适炜，尹欣欣，邓俊锋。

化妆品舒缓功效测试

—体外皮肤角质形成细胞炎症因子测试法

1 范围

本标准规定了体外皮肤角质形成细胞炎症因子测试法的应用范围、规范性引用文件、术语和定义、试验基本原则、试验方法、试验结果以及结果报告等。

本标准适用于化妆品原料及产品潜在的舒缓功效的筛选及检测。

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。

GB/T 27578 化妆品名词术语

3 术语与定义

GB/T 27578以及下列术语和定义适用于本文件。

3.1 舒缓 Soothing

有助于改善皮肤刺激等状态。

3.2 酶联免疫吸附剂测定 Enzyme linked immunosorbent assay

将可溶性的抗原或抗体结合到聚苯乙烯等固相载体上,利用抗原抗体特异性结合进行免疫反应的定性和定量检测方法。

3.3 肿瘤坏死因子- α Tumor necrosis factor- α

主要由活化的单核/巨噬细胞产生,能杀伤和抑制肿瘤细胞的细胞因子。促进中性粒细胞吞噬,抗感染,引起发热,诱导肝细胞急性期蛋白合成,促进髓样白血病细胞向巨噬细胞分化,促进细胞增殖和分化,是重要的炎症介质,参与某些自身免疫病的病理损伤。

3.4 白细胞介素-6 Interleukin-6

属于白细胞介素的一种。由纤维母细胞、单核/巨噬细胞、T/B 淋巴细胞、上皮细胞、角质细胞以及多种细胞产生。能够参与免疫反应,刺激免疫细胞增殖、分化并提高其功能。

4 试验原理

舒缓是指有助于改善皮肤刺激等状态。皮肤刺激状态常伴随敏感性皮肤而出现,敏感性皮肤的发生是一种累及皮肤屏障、神经血管、免疫炎症的复杂过程。其中,皮肤免疫炎症反应是引起皮肤刺激状态的重要因素。皮肤免疫炎症反应是在内、外因素的作用下,皮肤屏障功能受损,引起感觉神经传入信号增加,使皮肤对外界刺激的反应性增强所致。在外界环境因素或内部生理因素刺激下,皮肤角质形成细胞分泌 $\text{TNF-}\alpha$, 进而促进细胞氧化应激和炎症反应。 IL-6 作为典型的促炎因子,其主要功能为刺激 T 淋巴细胞及 B 淋巴细胞的生长与分化,诱导细胞毒性 T 淋巴细胞产生急性期反应蛋白,促进炎症反应。因此, IL-6 可直接反映机体炎症情况。

本方法使用 $\text{TNF-}\alpha$ 诱导人永生角质形成细胞建立细胞炎症模型,采用化妆品原料处理细胞炎症模型后,利用酶联免疫吸附剂测定法检测细胞分泌的 IL-6 含量,根据 IL-6 的表达改变判断化妆品原料改善皮肤刺激状态的能力。

5 试验方法

5.1 仪器和设备

移液枪（量程：1000 μL 、200 μL 、20 μL 、10 μL 、2 μL ）；CO₂ 培养箱；酶标仪；超净工作台；微量振荡器；分析天平（精度：0.1 mg）；涡旋振荡器；细胞计数仪或血球计数板；倒置显微镜；低速离心机；超低温冰箱（-80 $^{\circ}\text{C}$ ）。

5.2 主要试剂及耗材

DMEM 高糖培养基；胎牛血清；青链霉素；胰蛋白酶/EDTA 溶液；重组人 TNF- α ；磷酸盐缓冲液（PBS）；细胞培养皿；24 孔细胞培养板；人源 IL-6 ELISA 检测试剂盒。

5.3 细胞及细胞培养条件

5.3.1 细胞

选用人永生角质形成细胞（Human immortal keratinocyte line, HaCaT），建议采用美国 ATCC 细胞资源库或欧洲 ECACC 细胞资源库来源的细胞株。

细胞要求：在 1~15 代内进行本试验，定期检测细胞，确保细胞无支原体污染方可使用。

5.3.2 细胞培养条件

温度：37 $^{\circ}\text{C}$ ；二氧化碳浓度：5%；胎牛血清：浓度10%；培养基：DMEM 高糖培养基；抗生素：青链霉素；胰酶：浓度0.25%。

5.4 试验前准备

5.4.1 细胞准备

冷冻保存的细胞在使用前至少传代一次，细胞以合适的密度（建议 5×10^4 个/孔）接种到 24 孔板中用于试验，细胞接种密度应保证在接种 24 h 后融合度达到 45%~60%。

5.4.2 受试物准备

提供受试物基本信息资料，包括但不限于 CAS 编码（如果已知）、物理性质和纯度等。

建议使用新鲜配置的受试物进行试验。有稳定性数据证明受试物可反复冻融且不影响试验结果者可使用储备液。若使用储备液，建议储备液的浓度为应用液的 1000 倍。

试验开始前评价受试物的溶解度，能溶于水的受试物可使用灭菌的 PBS 进行溶解。水中溶解度受限的受试物应溶解在合适的溶剂中，如二甲基亚砜（DMSO）等，确保溶剂在各试验组中浓度保持一致。可使用涡旋、超声、加热等方法辅助溶解，受试物须完全溶解且无沉淀。

5.5 试验条件

5.5.1 细胞炎症模型的构建

TNF- α 浓度是诱导细胞炎症模型试验的关键因素，诱导浓度可根据实验室条件进行适当调整。建议浓度范围：1~10 ng/mL

模型构建成功的判断标准：TNF- α 诱导下模型组的 IL-6 含量与空白组相比，上调倍数 ≥ 5 倍。

5.5.2 受试物浓度

采用细胞毒性试验确定受试物的染毒浓度范围，选择不影响细胞炎症模型活力的浓度，受试物最高剂量为 100 $\mu\text{g/mL}$ ，每个受试物设立 3~6 个剂量组开展正式试验。

5.6 试验步骤

- (1) 加500 μL 密度为 1×10^6 个细胞/mL的细胞悬液于24孔细胞培养板（即 5×10^5 细胞/孔）。
- (2) 培养细胞24小时（5%~7.5% CO_2 ，37 $^\circ\text{C}$ ）直至它们贴壁且细胞融合度达到 45%~60%。
- (3) 去除培养基，用 200 μL PBS轻柔冲洗细胞一次或两次。受试物孔中加入含有一定浓度受试物和含 $\text{TNF-}\alpha$ 的培养基，模型孔中加入含有 $\text{TNF-}\alpha$ 的细胞培养基，空白/溶剂对照孔中加入细胞培养基，每孔 500 μL ，培养细胞 24 小时（5%~7.5% CO_2 ，37 $^\circ\text{C}$ ）。
- (4) 收集 500 μL 细胞培养上清液到 1.5 mL 无菌离心管中进行 IL-6 含量检测。ELISA 检测按照 IL-6 ELISA 检测试剂盒的操作说明书进行。

6 试验结果

6.1 结果计算

以ELISA 检测所得的 OD_{450} 值为横坐标、标准品浓度为纵坐标绘制标准曲线。根据受试样本的 OD_{450} 值，计算获得相应的 IL-6 浓度，取 3 个受试复孔的平均值作为受试样本 IL-6 表达水平。以对照组为标准，计算各受试组 IL-6 表达变化倍数。

6.2 试验有效性判定

- (1) 每次试验应设置对照组，试验中模型组 IL-6 表达较对照升高 ≥ 5 倍时，试验结果有效。
- (2) 不同批次试验的组间变异系数（Coefficient of Variation, CV） $\leq 20\%$ 时，试验结果有效。

6.3 结果判断

在判定试验有效的基础上，受试组与模型组相比，IL-6 含量下降，且具有显著的统计学差异时（ $P < 0.05$ ），说明受试物具有抑制 IL-6 表达的作用，可作为宣称化妆品原料或产品具有舒缓功效的证据之一。

7 实验报告

7.1 试验报告必须包括以下信息

7.1.1 受试物

- 基本信息、统一名称、CAS编码（如果已知）等；
- 理化性质和纯度；

7.1.2 溶剂

- 溶剂选择的依据；
- 受试物在溶剂中的溶解度；
- 培养基中可接受的溶剂最高浓度；

7.1.3 细胞

- 细胞的来源及传代数；

7.1.4 实验条件

- $\text{TNF-}\alpha$ 的浓度；
- 试验分组；
- 受试物浓度及处理时间；

7.1.5 实验结果

- 细胞炎症模型构建（TNF- α 诱导浓度及模型中 IL-6 变化倍数）；
- 受试物浓度对细胞炎症模型的细胞活力影响；
- 不同浓度受试物处理细胞炎症模型后 IL-6 的表达变化及统计学分析；
- 各组之间的变异系数；

7.2 结论

附录 A 受试物加样图例（24 孔板）

A1	A2	A3	B1	B2	B3
C1-1	C2-1	C3-1	C4-1	C5-1	C6-1
C1-2	C2-2	C3-2	C4-2	C5-2	C6-2
C1-3	C2-3	C3-3	C4-3	C5-3	C6-3

A 表示空白对照

B 表示溶剂对照

C 表示受试物处理组（依据试验设计可分 3-6 组）