



团 体 标 准

T/ZHCA 029—2024

化妆品舒缓功效测试
角质形成细胞白介素-8 生成抑制法

Test of soothing efficacy for cosmetics—
Method for inhibiting interleukin-8 production of keratinocytes

2024-01-15 发布

2024-04-15 实施

浙江省健康产品化妆品行业协会 发布
中国标准出版社 出版

全国团体标准信息平台
中国标准出版社

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专利。本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

本文件由浙江省食品药品检验研究院提出。

本文件由浙江省健康产品化妆品行业协会(ZHCA)归口。

本文件起草单位：浙江省食品药品检验研究院、广东博溪生物科技有限公司、珀莱雅化妆品股份有限公司、爱茉莉太平洋(上海)研发有限公司、高浪控股股份有限公司。

本文件主要起草人：桑晶、何立成、卢永波、冯潇、田超凡、徐行行。

化妆品舒缓功效测试

角质形成细胞白介素-8 生成抑制法

1 范围

本文件描述了化妆品舒缓功效的一种体外测试方法。

本文件适用于可均匀分散在溶液中的化妆品及原料的舒缓功效的测试。

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 6682 分析实验室用水规格和试验方法

3 术语及定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

角质形成细胞 **keratinocyte**

构成表皮基底层至角质层的主要细胞。

3.2

白介素-8 **interleukin-8; IL-8**

巨噬细胞和上皮细胞等分泌的细胞因子。

注 1: 白介素是白细胞及其他特殊细胞产生并在这些细胞间发挥调节作用的细胞因子。

注 2: 白介素-8 是白介素的一种亚型。

3.3

舒缓 **soothing**

有助于改善皮肤刺激等状态的功效。

4 试验原理

角质形成细胞白介素-8 生成抑制法(以下简称“本方法”)利用微生物引起角质形成细胞发生刺激反应的原理,即通过脂多糖诱导角质形成细胞表面 TLR 跨膜受体,激活 NF- κ B 炎症信号传导通路,从而下游释放系列炎症因子,如 IL-8 等,引发皮肤出现红斑、瘙痒等症状的过程。通过计算受试物抑制 IL-8 释放的水平来反应受试物的舒缓功效。

5 试剂和材料

除非另有说明,本方法所用试剂均为分析纯,水为 GB/T 6682 规定的三级水。

- 5.1 细胞:原代人源角质形成细胞(10代以内)或人永生化表皮角质形成细胞株(如 HaCaT)。
- 5.2 与角质形成细胞相适应的培养基及血清。
- 5.3 胰蛋白酶-EDTA 溶液。
- 5.4 磷酸盐缓冲液(PBS):pH 7.2~7.4。
- 5.5 水,符合 GB/T 6682 规定的三级水。
- 5.6 脂多糖(Lipopolysaccharide, LPS),纯度 $\geq 99\%$,用水配成 25 mg/mL 储备液,使用终浓度为 60 $\mu\text{g/mL}$ 的溶液。
- 5.7 聚肌胞苷酸(Polyriboinosinic polyribocytidylic acid, PolyI:C),纯度 $\geq 90\%$,用水配成 10 mg/mL 储备液,使用终浓度为 100 $\mu\text{g/mL}$ 的溶液。
- 5.8 噻唑蓝(MTT),纯度 $\geq 98\%$,临用新配成 0.5 mg/mL 的 MTT 溶液。
- 5.9 二甲基亚砷(DMSO)。
- 5.10 人 IL-8 ELISA 检测试剂盒(采用双抗体夹心酶联免疫吸附测定法)或其他 IL-8 检测试剂。
- 5.11 阳性对照物:地塞米松,纯度 $\geq 98\%$,用二甲基亚砷配成 100 mg/mL 储备液,使用终浓度为 100 $\mu\text{g/mL}$ 的溶液。
- 5.12 阴性对照组:分别加入聚肌胞苷酸和脂多糖于培养基中,聚肌胞苷酸的终浓度为 60 $\mu\text{g/mL}$,脂多糖的终浓度为 100 $\mu\text{g/mL}$,作为阴性对照溶液。
- 5.13 阳性对照组:聚肌胞苷酸和脂多糖诱导液处理 4 h 后再加入终浓度为 100 $\mu\text{g/mL}$ 地塞米松溶液。
- 5.14 空白对照组:不加聚肌胞苷酸和脂多糖诱导的培养基,其余操作与阴性对照组一致。

6 仪器

- 6.1 天平:分度值为 0.000 1 g。
- 6.2 二氧化碳培养箱: $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$, CO_2 体积分数范围内(5 ± 1)%,相对湿度 $\geq 95\%$ 。
- 6.3 可调节移液器:最大量程为 1 000 μL 、200 μL 、20 μL 。
- 6.4 超净工作台。
- 6.5 水平低速离心机:转速大于或等于 1 000 r/min。
- 6.6 倒置显微镜:放大倍数至少为 400 或以上。
- 6.7 细胞培养板振荡器。
- 6.8 酶标仪。

7 试验步骤

7.1 实验前准备

7.1.1 受试物准备

受试物制备需要满足以下条件:

- a) 水溶性受试物直接采用培养基作为溶剂,水难溶的受试物采用二甲基亚砷(DMSO)作为溶剂;
- b) 使用涡旋混合、超声处理或加热等方法辅助溶解,配成溶液或均匀混悬液;
- c) 无法配成溶液或均匀混悬液的受试物不适用于本试验;
- d) 受试物应临用新配。

7.1.2 刺激物准备

分别加入聚肌胞苷酸和脂多糖于细胞培养基中,聚肌胞苷酸的终浓度为 60 $\mu\text{g}/\text{mL}$,脂多糖的终浓度为 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$,诱导剂量可根据不同实验室细胞特性适当进行调整。

7.2 预试验(细胞毒性试验)

7.2.1 细胞接种

选用生长良好的角质形成细胞,以 1×10^5 个/ mL ~ 2×10^5 个/ mL 的细胞悬液接种,每孔 100 μL 接种到 96 孔板中。培养箱中培养 $24 \text{ h} \pm 2 \text{ h}$,细胞融合度应在 60%~80% 时进行试验。

7.2.2 分组加样

受试物以原液作为最高剂量,2 倍稀释多个浓度至几乎无毒性,用于预试验细胞毒性筛选。预试验设受试物组和阴性对照组,每组至少 3 个复孔。先吸去 96 孔板中的培养液,分别加入受试物组溶液和阴性对照组溶液。每孔加样量均为 100 μL ,再放入二氧化碳培养箱中培养 24 h。

7.2.3 细胞存活率测定和计算

以 MTT 法为例,细胞培养 24 h 后,每孔加入 100 μL 0.5 mg/mL 的 MTT 溶液,于培养箱中培养 $4 \text{ h} \pm 15 \text{ min}$ 。孵育结束后,吸取 MTT 溶液,每孔加入 150 μL DMSO,将 96 孔板放置于振荡器上,避光振摇 10 min。酶标仪 490 nm 处读取吸光度值(OD 值)。

7.2.4 计算细胞存活率

计算各组平均吸光度值,并用平均吸光度值来计算各受试物组细胞存活率,见公式(1)。

$$\text{细胞存活率} = \frac{\text{受试物组平均吸光度值}}{\text{阴性对照组平均吸光度值}} \times 100\% \quad \dots\dots\dots(1)$$

7.3 正式试验

7.3.1 试验浓度选择

选择细胞存活率达到 90% 左右的浓度作为起始浓度,下设 1 个~3 个浓度,作为正式试验的浓度。具体浓度选择可根据试验情况做出适当调整。

7.3.2 细胞接种

选用生长良好的角质形成细胞,以 1×10^5 个/ mL ~ 2×10^5 个/ mL 的细胞悬液接种,每孔 1 mL 到 24 孔板中,培养 $24 \text{ h} \pm 2 \text{ h}$ 。

7.3.3 加样

正式试验设受试物组、阴性对照组、阳性对照组和空白对照组,每组至少 3 个复孔。弃去培养板中的培养液,受试物组和阴性对照组分别加入受试物组溶液和阴性对照组溶液;阳性对照组先加诱导液处理 4 h 后再加入阳性对照液;空白对照组加入细胞培养液。每孔加样量为 1 mL。加样后放回培养箱中培养 $24 \text{ h} \pm 2 \text{ h}$ 。

7.3.4 细胞上清收集

培养结束后,分别收集每孔细胞的上清液于 1.5 mL 离心管中,放入-80 °C 超低温冰箱冷冻保存。

7.3.5 IL-8 检测和计算

对每组上清液进行 IL-8 含量测定。具体根据 IL-8 ELISA 检测试剂盒或其他检测试剂盒操作说明进行。以 IL-8 ELISA 检测为例,以标准品的浓度为纵坐标,450 nm 处吸光度值为横坐标,绘制标准曲线,得出回归方程式。将每孔测定的 450 nm 吸光度值代入标准曲线中,计算每孔上清液 IL-8 含量。

7.4 IL-8 抑制率计算:

计算每组 IL-8 含量均值,用每组 IL-8 含量均值进行抑制率计算,见公式(2)。

$$\text{抑制率} = \left(1 - \frac{T}{C}\right) \times 100\% \quad \dots\dots\dots(2)$$

式中:

T —— 受试物组或阳性对照组 IL-8 含量均值;

C —— 阴性对照组 IL-8 含量均值。

7.5 统计分析

比较各受试物组、阳性对照组与空白对照组 IL-8 含量,采用方差检验进行统计学分析, $p < 0.05$ 表明统计学上有显著性差异。

8 结果判定

8.1 试验成立的条件

8.1.1 试验系统有效

每次试验均须设置阴性对照组、阳性对照组以及空白对照组。阴性对照组相较空白对照组 IL-8 的含量显著性增加(具有统计学差异 $p < 0.05$),则试验模型有效。阳性对照组相较阴性对照组 IL-8 含量显著性降低(具有统计学差异 $p < 0.05$),则试验系统有效。

8.1.2 试验平行性有效

每次试验各组平行孔间吸光度的变异系数 CV 值 $\leq 30\%$,则数据有效。每次试验至少要重复 1 次,结果一致,则该试验有效。

8.2 结果判定

受试物组与阴性对照组相比,IL-8 的含量下降,且具有显著性差异($p < 0.05$),说明受试物在该剂量下有抑制 IL-8 含量的作用。受试物任何一个剂量条件下呈现显著的抑制作用并有可重复性,则该受试物判定为有舒缓功效。评价结果为无舒缓功效,则需用结合其他试验方法进一步确认。

9 试验报告

试验报告至少应给出以下方面的内容:

- a) 试验依据；
- b) 细胞名称、来源、培养代数；
- c) 受试物和阳性对照的信息,包括厂家、配制方法、浓度等；
- d) 试验条件和方法,包括试验具体步骤；
- e) 试验结果、结论；
- f) 试验日期；
- g) 试验人签字或单位签章。

中国团体标准出版社

参 考 文 献

- [1] GB 3101—1993 有关量、单位和符号的一般原则
 - [2] 化妆品分类规则和分类目录(国家药监局 2021 年第 49 号公告)
-