



团 体 标 准

T/ZHCA 030—2024

化妆品舒缓功效测试
重建表皮模型白介素-8 生成抑制法

Test of soothing efficacy for cosmetics—
Method for inhibiting interleukin-8 production of reconstructed epidermal model

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

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、杭州优玛达生物科技有限公司、杭州捷诺飞生物科技股份有限公司、高浪控股股份有限公司。

本文件主要起草人：桑晶、谢珍、李潇、杨鑫、颜贵卉、欧阳杨、徐行行。

化妆品舒缓功效测试

重建表皮模型白介素-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。

本文件适用于护肤类化妆品及原料舒缓功效的测试。

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

重建表皮模型 **reconstructed epidermal model**

分离人组织表皮细胞作为种子细胞,经过体外培养,制备成与人表皮组织具有相似结构及功能的三维组织模型。

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

重建表皮模型白介素-8 生成抑制法(以下简称“本方法”)利用微生物引起表皮组织发生刺激反应的原理,即通过脂多糖诱导表皮细胞表面 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 重建表皮模型试剂盒:EpiKutis 重建表皮模型及其培养液或其他经验证的等效模型及其培养液。
- 5.2 磷酸盐缓冲液(DPBS):pH 7.0 ~ 7.3,不含钙、镁离子。
- 5.3 二甲基亚砜(DMSO)。
- 5.4 聚肌胞苷酸(Polyriboinosinic polyribocytidylic acid, PolyI:C),纯度 $\geq 90\%$,水配成 10 mg/mL 储备液,终浓度为 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的溶液。
- 5.5 脂多糖(lipopolysaccharide, LPS),纯度 $\geq 99\%$,水配成 25 mg/mL 储备液,使用时终浓度为 60 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的溶液。
- 5.6 阳性对照物:地塞米松,纯度 $\geq 98\%$,用 DMSO 配成 100 mg/mL 储备液,使用时再用培养基稀释到终浓度为 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的溶液。
- 5.7 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。

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 体积分数范围为 $(5 \pm 1)\%$,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 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 超低温冰箱。
- 6.7 细胞培养板振荡器。
- 6.8 酶标仪。

7 试验步骤

7.1 试验分组

试验需设置空白对照组、阴性对照组、阳性对照组和受试物组,每组至少 3 个表皮模型。每组具体操作如下。

- a) 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 $\mu\text{g}/\text{mL}$,脂多糖的终浓度为 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。
- b) 阳性对照组:聚肌胞苷酸和脂多糖诱导液外,还要同步加入终浓度为 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 地塞米松溶液。
- c) 受试物组:聚肌胞苷酸和脂多糖诱导液外,还要同步加入相应浓度的受试物溶液。
- d) 空白对照组:加不含聚肌胞苷酸和脂多糖诱导液的培养基,其余操作与阴性对照组一致。

7.2 诱导刺激

取复苏好的表皮模型除空白对照组外,表皮模型下的培养液全部更换为 PolyI:C 与 LPS 诱导液,换液后将所有模型转移到二氧化碳培养箱中培养 24 h [$37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$, CO_2 体积分数范围为 $(5 \pm$

1)%,相对湿度 $\geq 95\%$]

7.3 受试物加样

从培养箱取出诱导好的表皮模型,每个表皮模型表面加样 25 μL ,受试物直接加原液,使受试物在模型表面均匀铺展。转移到二氧化碳培养箱中培养 24 h [$37\text{ }^\circ\text{C} \pm 1\text{ }^\circ\text{C}$, CO_2 体积分数范围为 $(5 \pm 1)\%$,相对湿度 $\geq 95\%$]。

7.4 模型培养液收集

培养结束后,收集 200 μL 表皮模型培养液于 1.5 mL 无菌离心管中,置于 $-80\text{ }^\circ\text{C}$ 超低温冰箱保存。

7.5 IL-8 含量检测和计算

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 吸光度值为横坐标,绘出标准曲线,得到回归方程式,将受试物和对照组的 450 nm 吸光度测定值代入方程式,计算每孔上清液的 IL-8 含量。

7.6 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。

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

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。

7.7 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 数据有效

每次实验各组平行孔间吸光度的变异系数 CV 值 $\leq 30\%$,则数据有效。

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几个方面内容:

- a) 试验依据;
- b) 重建表皮模型来源、质检报告等相关信息;
- 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) 数据处理与结果评价方法;
- f) 试验结果、结论;
- g) 试验人签字或单位签章。

参 考 文 献

- [1] GB 3103—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(国家药监局发布 2021 年第 49 号公告)
-

中国团体标准出版社