

《化妆品修护功效体外测试方法 人源成纤维细胞迁移能力试验》团体标准编制说明

1 工作简况

1.1 任务来源、主要参加单位和工作组成员名单

本标准根据浙江省健康产品化妆品行业协会关于批准《化妆品紧致功效评价：基于成纤维细胞的细胞增殖检测》等 14 项团体标准立项的通知（浙健化协〔2021〕6 号文件的要求），由浙江省食品药品检验研究院负责《化妆品修护功效评价方法-体外人源成纤维细胞迁移能力试验》的起草工作。

主要起草单位有：

主要起草人有：

1.2 工作简要过程

2021 年 1 月 24 日浙江省健康产品化妆品行业协会组织专家对浙江省食品药品检验研究院提出的《化妆品紧致功效评价：基于成纤维细胞的细胞增殖检测》等 14 项团体标准进行立项评审，该立项通过评审，予以批准立项，同时确定由浙江省食品药品检验研究院负责起草工作，成立起草小组。

2021 年 3 月 4 日归口单位浙江省健康产品化妆品行业协会组织起草组召开的标准技术研讨会，讨论标准的技术路线、主要内容和验证方案。

随后，浙江省食品药品检验研究院进行了资料的检索和信息的收集工作，分析比较了大量的国内外文献方法，编写完成《化妆品修护功效评价方法》草稿的初稿，并以邮件方式组织起草组内对标准草稿的初稿进行讨论，经过充分的讨论，对该初稿的内容进行了多次修改，完成草稿，并立即开展验证工作。

2022 年 9 月下旬完成《化妆品修护功效评价方法》的验证工作，形成征求意见稿，并向行业内公开征求意见。

2 标准编制原则和主要内容

2.1 标准编制原则

根据《化妆品监督管理条例》及《化妆品功效宣称评价指导原则》中对于化妆品功效宣称的法规需求，结合我国目前现有标准中只有《QB/T 4256-化妆品保湿功效评价

指南》这一现状，参考了《化妆品安全技术规范》（2015 版）等国内外相关标准，同时秉承团体标准的“开放性”、“科学性”、“先进性”的原则制定了本标准。本标准起草过程中，严格按照 GB/T 1.1—2021 《标准化工作导则 第 1 部分：标准的结构和编写》和 GB/T 20001.4—2015 《标准编写规则 第 4 部分：试验方法标准》的要求进行编写。

2.2 标准主要内容

2.2.1 范围

本文件规定了一种化妆品修护功效的体外测试方法。

本文件适用于采用人源成纤维细胞迁移能力试验评价化妆品及原料的修护功效。

在试验中允许逐级稀释化妆品样品，对于部分非水剂剂型的化妆品，可以在 DMSO 中溶解后再进行稀释，故本标准规定适用具有一定水溶性的化妆品即可。

2.2.2 规范性引用文件

本文件没有规范性文件。

2.2.3 术语及定义

2.2.3.1 成纤维细胞 Fibroblast

普遍存在于疏松结缔组织中的一种中胚层来源的细胞。分泌前胶原、纤连蛋白和胶原酶等细胞外基质，伤口愈合过程中可迁移到伤口进行增殖。

是存在与人类真皮层中的一种重要的具有迁移与修复作用的细胞。

2.2.3.2 细胞迁移 Cell Migration

也称为细胞爬行、细胞移动或细胞运动，是指细胞在接收到迁移信号或感受到某些物质的梯度后而产生的移动。细胞迁移为细胞头部伪足的延伸、新的黏附建立、细胞体尾部收缩在时空上的交替过程。细胞迁移是正常细胞的基本功能之一，是机体正常生长发育的生理过程，也是活细胞普遍存在的一种运动形式。

细胞迁移作用与皮肤伤口愈合过程具有相似性。

2.2.4 原理

细胞迁移能力试验，也可以称为划痕试验、愈合试验，是当细胞长到融合成单层状态时，在单层细胞上人为划出一个空白区域，称为“划痕”，划痕边缘的细胞逐渐进入空白区域使“划痕”愈合，在一定程度上模拟了体内细胞迁移的过程。使用不同的物质处理细胞，对细胞产生影响，可能会产生促进细胞迁移的作用。

细胞迁移在体内的生理活动中包括了对微小伤口的愈合作用，这与化妆品淡化皮肤纹理、促进皮肤损伤愈合的修护功效的目的相似。同时，成纤维细胞是真皮层中疏松结

缔组织的主要细胞成分，人源成纤维细胞模型的结果对体内作用有一定的参考性。故选用人源成纤维细胞进行细胞迁移试验，可以评价化妆品的修护功效。

人源成纤维细胞在体外的迁移作用类似皮肤伤口愈合过程，使用化妆品处理细胞后，产生了促进迁移的作用，则可以说明该化妆品的修护作用。

2.2.5 试剂和材料

2.2.5.1 细胞：人源成纤维细胞（扩增至 P7 代进行试验）

2.2.5.2 磷酸盐缓冲溶液（PBS）：GIBCO；

2.2.5.3 胰酶（0.25%）：GIBCO；

2.2.5.4 新生牛血清（NBS）：浙江天杭生物科技有限公司；

2.2.5.5 细胞培养液（DMEM，低糖）：GIBCO；

2.2.5.6 噻唑蓝（MTT）溶液：取噻唑蓝粉末（阿拉丁，CAS：298-93-1，分析纯）配制成 1mg/ml 的储备液，过滤除菌，避光保存；

2.2.5.7 细胞培养瓶：Corning；

2.2.5.8 血清移液管：Falcon；

2.2.5.9 离心管：Corning；

2.2.5.10 细胞培养板：Corning；

成纤维细胞在体外可以传代，根据经验，在 P7 代进行试验，细胞状态较好。选用试剂与材料均为成熟的标准化产品，为实验室常用品牌，有利于减少因试剂或材料引起的误差。

2.2.6 仪器

2.2.6.1 倒置显微镜：具有拍摄功能；

2.2.6.2 二氧化碳培养箱；

2.2.6.3 电子天平：分度值为 0.1mg；

2.2.6.4 水平低速离心机；

2.2.6.5 移液器：量程包含 100-1000 μ l、20-200 μ l、2-20 μ l；

2.2.6.6 生物安全柜；

2.2.6.7 酶标仪；

2.2.6.8 微孔板振荡器；

2.2.6.9 计算机：能够运行 ImageJ 软件。

倒置显微镜一般需要两台：观察细胞用的简单倒置显微镜，与拍摄用的具有摄像组

件和电脑的倒置显微镜。电子天平用于称量样品重量，计算浓度，所有样品尽量使用同一台天平以减少误差。计算机需要能够运行 ImageJ 软件。对其他仪器没有特殊要求。

2.2.7 测试步骤

2.2.7.1 预试验（细胞毒性试验）（本节以下省略编号中 2.2.7.）

1.1 铺板

预试验选用 MTT 法进行。选用生长良好的 P7 代的人源成纤维细胞，消化后稀释到合适的浓度，加入 96 孔板中。边缘孔使用无菌 PBS 填充，减少蒸发。放入培养箱中孵育 24h 左右。

根据细胞状态的不同，24h 能够铺满板底的细胞浓度需要摸索，一般来说，每孔加入 10^4 个细胞，可以在孵育 24h 后铺满板底。96 孔板中的边缘孔的蒸发效应较严重，尤其是在较长时间的孵育中，所以在边缘孔使用无菌 PBS 填充以较少蒸发效应。

1.2 加样

孵育结束后，检查细胞贴壁情况，铺板率达到 70-80%后即可加入受试物。受试物应当天配制，使用无血清培养液溶解，按照合适的倍数进行逐级稀释，一般设置 7 个或以上的浓度组。无法直接溶于水的样品，可用 DMSO 稀释后进行配制。设置空白对照组，仅加入无血清培养基。对照组与样品组每个浓度设置 6 个复孔。吸出培养液，加入样品后，放入培养箱内孵育 24h 左右。

铺板率指细胞占据板底的面积，目测达到 70-80%即可，以保证最后的吸光度数据在一个合理的范围内。加入样品后，孵育 24h，是前期预实验摸索的比较合理的处理时间——能显示样品的作用，同时避免细胞饥饿时间过长影响其活性。

1.3 测定

在孵育约 20h、测定前 4h 在培养板中加入 MTT 溶液至终浓度为 0.25mg/ml 左右，继续孵育 4h 后，吸除上清，每孔加入 150 μ l DMSO，低速振摇 10 分钟，于酶标仪 570nm 处测定吸光度。

活细胞能将外源性的 MTT 还原为水不溶性的蓝紫色结晶甲贍 (Formazan) 并沉积在细胞中，而死细胞无此功能。二甲基亚砷 (DMSO) 能溶解细胞中的甲贍，用酶联免疫检测仪在 570 nm 波长处测定其光吸收值，可间接测定细胞的存活率，本步骤规定的时间与浓度均为通用试验方法。

1.4 计算

获得吸光度数据后，计算样品组与空白对照组的吸光度之比，得到对应的细胞存活

率。

$$\text{细胞存活率(\%)} = \frac{\text{样品组平均吸光度}}{\text{空白对照组平均吸光度}} \times 100$$

2 正式试验（细胞迁移能力试验）

2.1 浓度选择

预试验后获得细胞存活率数据，应与样品浓度应具有近似的线性关系。正式试验时，应根据样品剂量-细胞存活率梯度选择 2-3 个浓度，按照以下原则进行：

- a) 最高无明显毒性剂量（细胞存活率达到 90%左右时的最高剂量）；
- b) 最低无毒性剂量（细胞存活率达到 100%或更高时的最低剂量）；

所有的样品的最高浓度为其在无血清培养基中的最大溶解度。在获得正式试验阳性结果之前，可以适当调整浓度选择。

在前期预试验中发现，样品的剂量不一定与其促进细胞迁移的作用正相关，同时试验浓度不宜对细胞产生毒性，故制定浓度选择原则为细胞具有较高存活率或完全不显示毒性的样品剂量。

2.2 铺板

准备 6 孔或 24 孔细胞培养板，在背面用记号笔横向划直线进行标记。选用生长良好的 P7 代的人源成纤维细胞，消化后稀释到合适的浓度，加入孔板中，放入培养箱中孵育 24h 左右。

本试验在 6 孔或 24 孔板中均可进行，在 24 孔板中可以使用较少的细胞得到结果，但划痕操作难度较大。

2.2 加样

检查细胞贴壁情况，铺板率达到 80-90%后即可进行加样。吸除原培养液，加入配制好的受试物。受试物应当天配制，使用无血清培养液溶解，按照合适的倍数进行逐级稀释，一般设置 2-3 个浓度组。无法直接溶于水的样品，可用 DMSO 稀释后进行配制（DMSO 终浓度不大于 0.5%）。试验设置空白对照组、阳性对照组与样品组，分别加入无血清培养基、10%血清培养基与无血清培养基配制的样品。加样结束后，将细胞培养板放入培养箱中孵育 24h 左右。

正式试验中，需要更高的细胞铺板率，这样才能获得更好的划痕照片。根据细胞试验的经验值，DMSO 浓度在大于 0.5%时会对细胞产生毒性，影响试验结果，故对 DMSO 终浓度做了限制。使用样品孵育后洗去再进行划痕的方法，能够减少不同的样品性状对

划痕照片拍摄的影响。血清对细胞的迁移有很强的促进作用，所以选用 10%血清作为阳性对照，其余细胞做无血清处理。成纤维细胞对无血清环境有很强的忍耐能力，在此情况下能去除细胞增殖带来的影响，仅观察迁移作用。

2.3 划痕

观察细胞铺板率达到 90%左右，使用 1ml 移液器枪头进行划痕，划痕过程中，枪头略微倾斜于平面，垂直于记号笔标记，均匀用力划过板底。紧贴划痕与记号笔标记的交叉点的上方或下方为观察点，每个孔应有 4 个以上的观察点。划痕结束后，使用 PBS 轻轻清洗 2-3 次，除去漂浮细胞。

经预试验发现，1ml 移液器枪头产生的划痕宽度适宜。

2.4 拍照

划痕结束后立刻进行 0h 拍照，记录原始划痕大小，并记录观察点序号，每个孔拍摄 4 张或更多的照片。应对观察点的顺序做好定义。每次拍照应定位记号笔标记的相对位置，保证标记位于画面边缘的同一位置。拍照结束后，吸除 PBS，每孔加入无血清培养基，放回培养箱内继续孵育 24h 左右。孵育结束后，按照 0h 拍照的观察点，使用同样倍数的物镜进行同一位置的 24h 拍照，记录划痕修复情况。

使用记号笔进行标记的目的是保证每次都能捕捉到同一个位置的划痕。两次拍照间隔 24h，可以保证观察到明显的迁移现象，并避免划痕完全愈合，无法进行比较。

3 图片处理

3.1 图片统一化处理

获得照片后，进行统一化处理。首先根据照片中的记号笔标记，拉平图片。设置适当尺寸的画板（适当尺寸指像素数略小于图片尺寸，但能基本包含所有划痕所在区域），拖入原始划痕图片，以记号笔标记为基准定位到同一位置，裁切划痕图片。经过以上操作，可以保证两个时间点的图片取样位置相同、图片尺寸相同，具有可比性。

3.2 划痕面积计算

使用 ImageJ 软件进行划痕面积的计算。拖入要计算的图片，执行以下命令：

- Image-Type-8-bit 黑白化处理
- Process-Smooth 画面平滑
- Process-Find edges 增强边缘显示
- Process-Filters-Gaussian Blur-（Sigma 值可自行设置，推荐为 4）对图片进行模糊处理

(上述步骤可录制为宏，一键执行)

- Image-Adjust-Threshold 设置图片的阈值，直到能明显区分空白区域与细胞区域，同一批试验图片应使用相同的阈值
- 打开工具栏中的魔棒工具 (Wand)，选择空白区域，删除内部不需要的点，直到选中整个空白区域
- Analyze-Measure 获得区域面积数值

处理不同的划痕图片时，应使用相同的参数，或根据图片特点进行微小的调整，保证面积计算结果的重现性与可比性。

ImageJ 是一款常用的科研图片处理软件，能精准处理实验图片，计算区域面积。上述处理步骤是常用的细胞划痕图片处理方法，具有较好的一致性。

4 数据处理

4.1 计算每个观察点的迁移率，单位为百分比。进行数据筛选，在保留至少三个有效迁移率数值的前提下，删除异常值，判断依据为数据落于 平均值 \pm (3 \times 标准差) 以外，为异常值。

4.2 计算阳性对照组与样品组的迁移率相对于空白对照组平均迁移率的相对迁移率，计算结果为倍数，无单位。计算每组相对迁移率数值的平均值、标准差 (SD)、CV 值，并计算该组迁移率相对于空白对照组的 p 值。

$$\text{迁移率(\%)} = \frac{0\text{h划痕面积} - 24\text{h划痕面积}}{0\text{小时划痕面积}} \times 100$$

$$\text{相对迁移率} = \frac{\text{样品组迁移率} - \text{空白对照组平均迁移率}}{\text{空白对照组平均迁移率}}$$

5 结果判定

5.1 数据判定

通过细胞照片分析，阳性对照组或受试物组与空白对照组相比，细胞划痕面积明显减少，并且在计算得到的试验数据中体现为该组的相对迁移率与空白对照组的相对迁移率相比，具有统计学差异 ($p < 0.05$)，说明该组样品具有促进细胞迁移的作用，表述为在本试验条件下，该浓度的受试物具有促进细胞迁移的作用，可作为化妆品修护功效宣称的证据支持；若受试物组的细胞划痕面积未明显减少，并且其相对迁移率与空白对照组相比不具有统计学差异 ($p \geq 0.05$)，则表明该浓度的受试物在本试验条件下，不具有促进细胞迁移的作用。

以显著性差异作为判定试验组相对于空白对照组是否具有促进细胞迁移的作用的主要依据。

5.2 成立条件

对于阳性对照组与具有促进细胞迁移能力的样品浓度组，CV 值应 $\leq 30\%$ ，可认为试验成立。

对于阴性结果，存在较大的偏差是正常的，故不对 CV 值做要求，对于阳性结果，有更小的偏差值可以增强数据的说服力，故将 CV 值限制为 $\leq 30\%$ 。

5.3 结果报告

在所有试验浓度下，至少有一个浓度呈现阳性，该受试物即报告为促迁移阳性。

6 试验报告

试验报告至少应给出以下几个方面的内容：

6.1 细胞株、培养代数；

6.2 受试物名称、剂型、剂量；

6.3 试验步骤；

6.4 试验数据、结论；

6.5 试验日期；

(本节以上序号省略 2.2.7.) 6.6 试验人签字。

3 方法适用性研究

3.1 概述

依据《化妆品监督管理条例》，由浙江省食品药品检验研究院、浙江省医学科学院、广东博溪生物科技有限公司使用同一批样品共同进行验证（样品信息见表 1）。试验在相同时间段，根据标准验证方案完成验证研究，以确认检验结果的有效性和可靠性。

表 1 联合验证样品信息

样品编号	功效	剂型	规格
1	修护	水剂	100ml
2	修护	乳液	100ml
3	修护	乳液	30ml
4	修护	水剂	120ml
5	修护	膏霜	50g

6	修护	水剂	150ml
7	修护	膏霜	50g
8	修护	水剂	150ml
9	修护	油剂	50ml
10	修护	水剂	120ml

3.2 联合验证结果

浙江省食品药品检验研究院、浙江省医学科学院、广东博溪生物科技有限公司三家单位的试验结论如表 2 所示。（三家单位分别简称为浙江省食药检院、浙江省医科院、博溪生物科技）

表 2 联合验证试验结论

样品序号	试验结论（+代表阳性，-代表阴性，/代表样品无结果）		
	浙江省食药检院	浙江省医科院	博溪生物科技
1	-	-	-
2	-	-	-
3	-	-	-
4	+	+	+
5	+	/	+
6	+	+	+
7	/	/	-
8	+	+	+
9	+	/	+
10	-	-	-

（说明：浙江省食药检院试验中，7 号样品毒性较强，无法进行正式试验；浙江省医科院试验中，5 号样品因质地较粘稠，难以混匀，结论重复性低，7 号、9 号样品细胞存活率低，未进行正式试验）

浙江省食品药品检验研究院、浙江省医学科学院、广东博溪生物科技有限公司三家单位的试验结论经过比较，具有较高的相似性。其中，浙江省食药检院的结论与浙江省医科院的结论比较，有 7 个样品重合，7 个样品结论一致；浙江省食药检院的结论与博溪生物科技的结论比较，有 9 个样品重合，9 个样品结论一致；浙江省医科院的结论与博溪生物科技的结论比较，有 7 个样品重合，7 个样品结论一致。上述数据说明该方法

具有良好的行业适用性。

3.3 联合验证原始数据

见附表 A、B、C。

4 修订标准时应列出与原标准的主要差异和水平对比

该标准属首次起草，无与原标准的主要差异和水平对比。

5 采用国际标准和国外先进标准情况及与国际同类标准水平的对比说明

目前国内外对于化妆品修护功效评价方面的标准较少。在国内，《化妆品功效宣称评价规范》中提到，具有祛斑美白、防晒、防脱发、祛痘、滋养和**修护功效**的化妆品，应当通过人体功效评价试验方式进行功效宣称评价。在国际上，化妆品行业对修护功效的评价方法也主要集中在人体试验中，包括经皮水分流失试验、乳酸刺痛试验、皮肤红斑指数试验等试验方法。本标准提出的体外试验方法具有成本低、通量大等优势，显著提升测试效率，降低伦理风险，试验结果适合作为化妆品研发阶段的重要参考依据。

6 预期达到的效果

随着社会的发展，人类对于年轻与美的追求逐渐强化，对于日常生活中皮肤的损伤、年龄渐长带来的细纹与老化，产生了使用修护功效化妆品来减轻上述现象的需求。目前，国家要求宣称具有修护功效的化妆品进行人体功效评价试验方式进行评价，这一要求在保证了功效宣称的有效性的前提下，也带来了研发成本的提高、伦理风险的增加等不利影响，并且最后体现在产品的价格上，不利于消费者的购买与使用。建立化妆品修护功效评价方法，可以大幅降低研发成本，提高研发速度，并最终体现在终端价格上。本标准通过多家单位的共同验证，证明了试验方法的可操作性，同时不同单位间验证结果具有较高的一致性，说明了本标准的可行性。

7 与现行法律、法规和政策及相关标准的协调性

与有关的现行法律、法规、政策及相关标准没有冲突。

8 重要内容的解释和其他应予说明的事项，如参考资料目录等

无。

附表 A 浙江省食药检院试验数据

空白对照组 平均迁移率	阳性对照组 平均迁移率	样品 序号	样品平均迁移 率 (最高值)	P 值	结论
5.46	27.13	1	7.32	0.30	阴性 (-)
		2	8.54	0.14	阴性 (-)
4.70	42.84	3	11.97	0.10	阴性 (-)
5.46	27.13	4	27.09	0.00	阳性 (+)
		5	12.81	0.00	阳性 (+)
4.70	42.84	6	15.21	0.00	阳性 (+)
		8	16.03	0.00	阳性 (+)
		9	11.83	0.00	阳性 (+)
		10	7.02	0.34	阴性 (-)

(说明: 3 号样品的平均迁移率较高, 但判定为阴性的原因是数据偏差较大, 存在一定偶然性, 且 P 值大于 0.1, 与空白对照组相比没有显著性差异。)

附表 B 浙江省医科院试验数据

空白对照组 平均迁移率	阳性对照组 平均迁移率	样品 序号	样品平均迁移率 (最高值)	P 值	结论
12.93	46.78	1	15.00	0.44	阴性 (-)
		2	27.44	0.07	阴性 (-)
		3	23.23	0.05	阴性 (-)
		4	28.35	0.00	阳性 (+)
		6	37.82	0.00	阳性 (+)
		8	28.98	0.00	阳性 (+)
		10	19.38	0.26	阴性 (-)

附表 C 博溪生物科技实验数据

空白对照组 平均迁移率	阳性对照组 平均迁移率	样品 序号	样品平均迁移 率 (最高值)	P 值	结论
38.49	64.81	1	38.94	0.80	阴性 (-)
		2	40.52	0.41	阴性 (-)
		3	39.32	0.64	阴性 (-)
		4	53.05	0.00	阳性 (+)
		5	53.31	0.00	阳性 (+)
		6	50.68	0.00	阳性 (+)
		7	41.36	0.29	阴性 (-)
		8	44.84	0.01	阳性 (+)
		9	52.27	0.00	阳性 (+)
		10	35.07	0.16	阴性 (-)