

团 体 标 准

T/ZHCA xxx-2022

化妆品紧致功效体外测试方法 人源成纤维细胞增殖试验

Method for in vitro testing of cosmetic firming efficacy – fibroblast
proliferation assay

(征求意见稿)

2022-xx-xx 发布

2023-xx-xx 实施

浙江省健康产品化妆品行业协会 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。

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：

本文件主要起草人：

化妆品紧致功效体外测试方法 人源成纤维细胞增殖试验

1 范围

本文件规定了一种化妆品紧致功效的体外测试方法。
本文件适用于采用人源成纤维细胞增殖试验评价化妆品及原料的紧致功效。

2 规范性引用文件

本文件没有规范性引用文件。

3 术语及定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

成纤维细胞 fibroblast

普遍存在于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。

3.2

细胞活性检测 cell activity assay

测定活细胞数量和/或细胞总数的方法，如 MTT 法。

4 试验原理

成纤维细胞是皮肤的主要细胞成分，分布在皮肤的真皮层内，是疏松结缔组织中最常见的细胞，可以产生大量的胶原蛋白与弹性纤维，对维持皮肤的结构稳定和皮肤弹性起到重要作用。

成纤维细胞的活力与增殖率决定着皮肤的紧致度进而影响到皮肤的状态。成纤维细胞的活力下降，数量减少，就会导致皮肤衰老。因此，可以通过测试样品对人源成纤维细胞增殖情况的影响，来评价样品的紧致功效。

在体外，细胞增殖情况可以通过MTT法来检测。MTT法，可间接反映活细胞数量，是一种通用的细胞活性检测方法。

5 试剂和材料

- 5.1 DMEM培养液：低糖，葡萄糖含量 1g/L。
- 5.2 胰蛋白酶-EDTA溶液：胰蛋白酶浓度0.25%。
- 5.3 新生牛血清（NBS）。

5.4 细胞培养液：含10%新生牛血清（5.3）的DMEM培养液（5.1）。

5.5 噻唑蓝（MTT）：CAS：298-93-1，分析纯。

5.6 二甲基亚砷（DMSO）：CAS：67-68-5，分析纯。

5.7 磷酸盐缓冲液（PBS）：pH 7.2~pH 7.4。

5.8 MTT溶液：称取MTT（5.1）0.25 g，溶于50 ml的磷酸缓冲液（PBS）中，配制成质量浓度为5 mg/mL MTT溶液，0.22 μm滤膜过滤后，4℃避光保存，有效期：1周。临用前，用DMEM培养液（5.1）稀释至0.5 mg/mL，现用现配。

5.9 细胞：原代人源成纤维细胞（10代以内）。

6 仪器

6.1 分析天平：分度值为0.0001 g。

6.2 二氧化碳培养箱。

6.3 可调节移液器：1000 μL、200 μL、300 μL多道移液器。

6.4 超净工作台。

6.5 离心机。

6.6 倒置显微镜。

6.7 细胞板振荡器。

6.8 酶标仪。

7 试验步骤

7.1 预试验（细胞毒性试验）

7.1.1 细胞接种

选用生长良好的人源成纤维细胞，消化后用细胞培养液制备成约 $1\sim 2\times 10^4$ 个/mL的细胞悬液，接种到96孔板中，每孔200 μL，边缘孔加入200 μL的无菌PBS。放置于二氧化碳培养箱中培养 24 ± 2 h， 24 ± 2 h后细胞融合度应达到20%~30%，若不在20%~30%范围内，需调整细胞接种密度。每一次试验都应同时设置空白对照组，空白对照组不接种细胞，只加相同体积的细胞培养液。

7.1.2 加样

吸掉培养板中的培养液，开展加样操作。预试验设空白对照组、溶剂对照组和受试样品组，空白对照组和溶剂对照组加入含2%新生牛血清的DMEM培养液，受试样品组加入一定浓度的受试样品培养液。每孔加液量均为200 μL。加样完毕后将96孔板放回二氧化碳培养箱中培养。

7.1.3 半换液

孵育24 h和48 h后取出96孔板进行半换液操作，空白对照组和溶剂对照组换含2%新生牛血清的DMEM培养液，受试样品组换含有受试样品的培养液。

7.1.4 MTT检测

孵育72 h后，吸掉培养板中的培养液，每孔加入200 μ L 0.5 mg/mL的MTT溶液，于二氧化碳培养箱中孵育培养4 h $\pm$ 15 min。孵育结束后，吸弃MTT溶液，每孔加入150 μ L DMSO，将96孔板放置于振荡器上，避光震荡10 min。震荡结束后，置于酶标仪，490 nm处读取吸光度值（OD值）。

7.1.5 计算细胞存活率

$$\text{细胞存活率(\%)} = \frac{\text{受试样品组平均OD值} - \text{空白组平均OD值}}{\text{溶剂对照组平均OD值} - \text{空白组平均OD值}} \times 100$$

7.2 正式试验（细胞增殖试验）

7.2.1 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1~3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。

7.2.2 细胞接种

接种4块96孔板，分别为0 h、24 h、48 h和72 h孔板。其余同7.1.1。

7.2.3 加样

0 h 孔板不需要加样，直接进行MTT检测；24 h、48 h、72 h孔板设空白对照组、溶剂对照组、阳性对照组和受试样品组，阳性对照组加入含10%~20%血清的DMEM培养液，其余各组加样同7.1.2。24 h、48 h、72 h孔板加样方法和给样浓度一致，每孔加液量均为200 μ L。加样完毕后将孔板放置在二氧化碳培养箱中分别孵育24 h、48 h、72 h。

7.2.4 半换液

阳性对照组换含有10%~20%血清的DMEM培养液，其余同7.1.3。

7.2.5 MTT检测

分别测定0 h、24 h、48 h和72 h孔板的吸光度值，其余同7.1.4。

7.2.6 计算各时间点相对细胞活力

$$\text{相对细胞活力}(\%) = \frac{\text{孵育各时间点各组平均OD值} - \text{相应空白组平均OD值}}{\text{0h平均OD值} - \text{0h空白组平均OD值}} \times 100$$

7.3 数据处理

7.3.1 数据计算

计算溶剂对照组、阳性对照组与受试样品组相对细胞活力(%)的平均值(Mean)、标准差(SD)、变异系数(Coefficient of Variation, CV), $CV = (SD / \text{Mean}) \times 100\%$ 。相对细胞活力以平均值±标准差表示。

7.3.2 统计分析

采用t检验法进行统计学分析,比较各时间点受试样品组、阳性对照组与溶剂对照组相对细胞活力的差异, $P < 0.05$ 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

- a) 每批次试验溶剂对照组均能检出OD值增高的效果。
- b) 每批次试验应设置阳性对照组,阳性对照组相对细胞活力 $\geq 100\%$ 。

8.1.2 试验平行性有效

各平行孔相对细胞活力的CV值 $\leq 20\%$ 。

8.2 结果判定

评价样品的紧致功效,需要受试样品组相对细胞活力随时间增大,高于溶剂对照组,且检测值在至少2个时间点与溶剂对照组具有统计学差异($P < 0.05$),则可判断在该试验条件下,该浓度的受试样品具有促进成纤维细胞增殖的能力,为阳性;若受试样品组细胞活力只有1个时间点与溶剂对照组具有统计学差异($P < 0.05$),则需要重复试验,若重复结果表明仍具有统计学差异($P < 0.05$),则判断为阳性;若受试样品组细胞活力只有1个时间点与溶剂对照组具有统计学差异($P < 0.05$),且无重复性,或与溶剂对照组比较不具有统计学差异($P \geq 0.05$),则为阴性。

在所有试验浓度下,至少有一个浓度呈现阳性,该样品即可报告为具有促进成纤维细胞增殖能力,具有紧致功效。

9 试验报告

试验报告至少应给出以下几个方面的内容：

- 9.1 试验依据；
 - 9.2 细胞名称、来源、培养代数；
 - 9.3 样品和阳性对照的信息，包括厂家、性状、配制方法、浓度等；
 - 9.4 试验条件和方法，包括试验具体步骤；
 - 9.5 试验结果、结论；
 - 9.6 试验日期；
 - 9.7 试验人签字或单位签章。
-