ICS 71.100.70

Y42

团体标准

T/ZHCA xxx-2023

|  |
| --- |
|  |

|  |
| --- |
| 化妆品舒缓功效测试方法  ——PolyI:C和LPS诱导3D表皮模型的  炎症因子(IL-8)体外测试方法  In vitro test method of inflammatory cytokines (IL-8) based on 3D epidermal model induced by PolyI:C and LPS  （征求意见稿） |

2023-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：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。

本文件主要起草人： 桑晶，匡荣，李乐，杨鑫，冯俊

化妆品舒缓功效测试方法——PolyI:C和LPS诱导3D表皮模型的炎症因子(IL-8)体外测试方法

1 范围

本文件规定了一种化妆品舒缓功效的体外测试方法。

本文件适用于采用于体外重组三维表皮模型炎症因子IL-8体外测试试验评价化妆品及原料的舒缓功效。

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 三维表皮皮肤模型 3D epidermal model

三维表皮皮肤模型是以人皮肤组织分离出的角质形成细胞为种子细胞，使用精细调节的无血清培养基促使细胞在体外发育成复层化结构的三维表皮模型。其具有高度类似于天然皮肤的复层化结构、屏障功能。

3.2 炎症因子IL-8

IL-8属于白介素家族的一种促炎因子，是湿疹发生过程中角质形成细胞释放的特异性促炎因子，角质形成细胞释放IL-8后进一步会激活T细胞介导的特异性免疫反应，从而诱导红斑瘙痒等不适症状的出现。

3.3 酶联免疫吸附测定 enzyme-linked immunosorbent assay， ELISA

一种将抗原、抗体的特异性反应与酶对底物的高效催化作用相结合起来的高灵敏度分析技术。原理是通过酶（如辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶等）标记抗体，该酶标抗体可与待测的抗原或抗体免疫吸附结合，酶所催化的呈色反应可以间接反映抗原的量。

4 试验原理

采用PolyI:C和LPS联合诱导体外重组三维表皮模型，使其释放特异性的炎症因子IL-8，IL-8释放后会进一步激活特异性免疫反应，进而介导炎症的级联放大，最终出现红斑瘙痒等不适症状。而抑制IL-8释放的化妆品可以达到舒缓瘙痒红斑等不适症状的作用。采用IL-8酶标抗体的酶标板测定450nm波长下测定吸光度（OD值）得到IL-8含量，受试物组与阴性对照组比较来计算IL-8抑制率。通过测试受试物对IL-8抑制率情况，来评价样品的舒缓功效。

5 试剂和材料

5.1 体外重组 3D 表皮模型（EpiKutis®）。

5.2 体外重组 3D 表皮模型培养液（EpiGrowth 培养液）。

5.3 IL-8 ELISA检测试剂盒或其他IL-8细胞因子检测试剂。

5.4 PolyI:C（Sigma）。

5.5 LPS（Sigma）。

5.6 地塞米松（Sigma）

5.7 磷酸盐缓冲液（PBS）：pH 7.2~ pH 7.4。

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：37℃±1℃，（5±1）%CO2，95%相对湿度。

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。

6.9 水平振荡仪。

6.10 恒温培养箱

7 试验步骤

7.1 前处理

7.1.1 受试物准备

水溶受试物直接采用培养液作为溶剂。水难溶的受试物使用二甲基亚砜（DMSO）作为溶剂。其余溶剂需在使用溶剂前。必须仔细评估受试物的特殊性质，是否与受试物发生反应。

可以使用涡旋混合/或超声处理和/或加热到适当温度等方法辅助溶解，除非这些操作会影响到受试物的稳定性。

除有稳定性数据证明储备液可接受，受试物均使用前新鲜配置直接使用。

如果受试物无毒，原液表面给药；受试物毒性有毒，则根据毒性预试验选择的无毒剂量浓度进行表面给药。

7.1.2 刺激物准备

采用PolyI:C和LPS联合刺激，其中PolyI:C的推荐使用浓度为60μg/mL，LPS的推荐使用浓度为20μg/mL，二者混合后加到模型培养液中配置成诱导工作液。

试验可接受质量标准为：与空白对照组相比，刺激物作用下阴性/溶剂对照组的IL-8含量显著性增加（具有统计学差异 P<0.05）。

7.1.3 阳性对照

每一次试验都应同时使用阳性对照进行试验。例如地塞米松，给药浓度为100 μg/mL。试验可接受标准为：与阴性对照组相比，阳性对照组IL-8的分泌量显著性降低（具有统计学差异 P<0.05）。

7.2 正式试验

7.2.1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3个模型，根据实验分组准备6孔板并做分组标记。

7.2.2 受试物给药

驻留型配方产品：模型给药量为25μL，采用正压移液器缓慢滴加于模型表面。给药后，用正压枪头辅助受试物在模型表面的铺展。最后一个模型给药结束后，将所有含有模型的6孔板转移到CO2培养箱中孵育24h（37±1℃、5±1% CO2、95%相对湿度）注意：给药时不可按压模型表面。

化妆品原料：根据角质形成细胞MTT操作规程确定其在角质形成细胞上的安全浓度。若为系统给药，推荐使用培养基配制成安全浓度进行给药培养；若为表面给药，应在安全浓度基础上放大一定系数，配制成相应浓度进行表面给药，表面给药量为25μL。

7.2.3诱导刺激

给药孵育完成后，从培养箱中取出六孔板。采用无菌棉签轻轻擦拭模型表面，尽量保证擦拭干净，然后对每组3个平行模型的培养液进行换液（polyI:C与LPS诱导工作液），空白对照组换TA培养液（无氢化可的松），换液后，将所有六孔板转移到CO2培养箱中孵育24h（37±1℃、5±1% CO2、95%相对湿度）。

7.2.4 模型培养液收集

孵育培养结束后，收集200 μL模型培养液于1.5 mL无菌离心管中，置于-80℃超低温冰箱冷冻保存。

7.2.5 ELISA检测

ELISA检测需根据IL-8的 ELISA检测试剂盒的操作说明书进行检测。7.2 正式试验（细胞增殖试验）

7.2.6 IL-8含量计算：

标准品及样品测定的OD450值减去空白孔OD450值后，3个复孔取其平均值计算。采用专业制作曲线软件Curve Expert，以标准品的浓度为纵坐标，OD450值为横坐标，绘出标准曲线，得出回归方程式，将样品组测定的OD450值代入方程式，计算出样品的IL-8含量。

7.2.7 IL-8抑制率计算：

(1)式中：

T—实验组IL-8含量平均值；

C—阴性对照组IL-8含量平均值。

# 8 结果判定

8.1 试验成立的条件

8.1.1 试验系统有效

每批次实验均须设置阴性对照组及阳性对照组，要求每批次测试阴性对照组相较空白对照组，IL-8的分泌量显著性增加（具有统计学差异 P<0.05） 、阳性对照相较阴性对照组检出IL-8含量显著性降低（具有统计学差异 P<0.05），则认为试验系统有效。

8.1.2 试验平行性有效

统计酶标仪测得的各组平行孔间吸光度的标准差（Standard Deviation，SD），并计算变异系数（Coefficient of Variation，C.V），C.V值≤ 20%，则认为实验平行性有效。

# 8.2 结果判定

评价受试物的舒缓功效，需要受试物组与阴性对照组相比， IL-8的含量下降，且检测值具有统计学差异（P<0.05），说明受试物具有抑制IL-8含量的作用。在所有试验浓度下，至少有一个浓度呈现显著的抑制作用 ，该受试物具有舒缓功效。

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。