ICS 71.100.70

Y42

团体标准

T/ZHCA xxx-2023

|  |
| --- |
|  |

|  |
| --- |
| 化妆品舒缓功效测试方法——基于PolyI:C+LPS诱导角质形成细胞的炎症因子(IL-8)体外测试方法 In vitro test method of inflammatory cytokines (IL-8) based on keratinocytes 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、上海微谱检测科技集团股份有限公司、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，冯俊，杨鑫

化妆品舒缓功效测试方法——

基于PolyI:C+LPS诱导角质形成细胞的炎症因子(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。

本文件适用于采用人源角质细胞炎症因子IL-8检测的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 角质形成细胞 keratinocyte

存在于皮肤、毛发、指甲等中的一种可合成角蛋白的细胞。

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。原理是用酶（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

本方法采用PolyI:C和LPS联合诱导体外角质形成细胞，使其释放湿疹（一种典型的炎性皮肤病）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。通过采用IL-8酶标抗体的酶标板进行测定，通过测定酶标仪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 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 磷酸盐缓冲液（PBS）：pH 7.2~ pH 7.4。

5.6 IL-8 ELISA检测试剂盒。

5.7 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HaCaT 。如果培养条件能满足细胞的特殊需要，其他表皮细胞或表皮细胞系也可用于本试验，但必须证明其等同性。

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。

6.9 CO2 培养箱。

6.8 恒温培养箱。

6.9 倒置显微镜。

7 试验步骤

7.1 实验前准备

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。

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。

受试物毒性有毒，则根据毒性预试验选择的无毒剂量（即活性大于90%）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100μg/mL，二者混合后添加到模型培养液中配置成诱导工作液，具体诱导剂量可根据试验室培养细胞特性进行调整。

试验可接受标准为：与阴性对照组相比，刺激物作用下阴性对照组的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。具体给药浓度也可根据各试验室培养细胞特性进行调整。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 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，消化后用细胞培养液制备成约1~2🞨104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 h±2 h，24 h±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。

7.2.2 加样

吸取培养板中的培养液，加样。预试验设空白对照组、溶剂对照组和受试物组，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，受试物组加入一定浓度的受试物培养液。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。

7.2.3 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，受试物组换含有受试物的培养液。

7.2.4 MTT检测

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

7.2.5 计算细胞存活率

$$细胞存活率\left（\%\right）=\frac{受试物组平均OD值-空白组平均OD值}{溶剂对照组平均OD值-空白组平均OD值}×100$$

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1~3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

接种4块24孔板，培养24小时。其余同7.2.1。

7.3.3 给药

弃去培养板中的培养液，给药。受试物给药组加入诱导液和一定浓度的受试物培养液的混合液，阴性对照组加入诱导液，空白对照组和裸细胞组加入细胞培养液，阳性对照组先只加诱导液，四小时后加入相应浓度的含有阳性对照的培养液。每孔加液量为1mL。给药完毕后将孔板放置在培养箱中（37℃、5%CO2、95%RH）培养（24±2）h。

7.3.3 细胞上清收集

孵育培养结束后，收集全部细胞培养上清液于1.5 mL无菌离心管中，离心后去上清液于1.5ml无菌离心管终，置于-80℃超低温冰箱冷冻保存。

7.3.4 ELISA检测

ELISA检测需根据IL-8 ELISA检测试剂盒的操作说明书进行检测。

7.3.5 IL-8 含量计算：

标准品及受试物测定的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，将受试物组测定的OD450值代入方程式，计算出受试物的IL-8含量。

7.4 IL-8 抑制率计算：

 $抑制率\left（\%\right）=（1-\frac{T}{C}）×100\%…………………………………………………………………(1)$

(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。

7.5 数据计算

计算溶剂对照组、阳性对照组与受试物组相对细胞活力（%）的平均值（Mean）、标准差（SD）、变异系数（Coefficient of Variation，CV），CV =（ SD / Mean）× 100%。相对细胞活力以平均值±标准差表示。

7.6 统计分析

采用t检验法进行统计学分析，比较各时间点受试物组、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

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

各平行孔相对细胞活力的CV值≤30%。

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 ，该受试物即可报告为具有促进成纤维细胞增殖能力，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 受试物和阳性对照的信息，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。