

团体标准

T/GDCDC 02X—2022

化妆品紧致功效测试 体外成纤维细胞弹性 蛋白含量测定

Firming lifting efficacy test of cosmetics - In vitro test method of elastin content with
fibroblast

(征求意见稿)

在提交反馈意见时，请将您知道的相关专利连同支持性文件一并附上。

XXXX - XX - XX 发布

XXXX - XX - XX 实施

广东省日化商会 发布

目 次

前言	II
1 范围	1
2 规范性引用文件	1
3 术语和定义	1
4 原理	1
5 材料	1
6 试验方法	3
7 结果计算	4
8 质量控制	5
9 结果评价	5
10 结论	5
附录 A（规范性） 细胞维护和培养程序	6
附录 B（资料性） 正常人皮肤成纤维细胞	7
附录 C（规范性） 受试物溶解度预测试流程	8
附录 D（资料性） 十进制几何浓度序列	9
附录 E（规范性） 细胞毒性试验和弹性蛋白含量测试步骤	10
参考文献	11

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。

本文件由广东省日化商会提出。

本文件由广东省日化商会归口。

本文件起草单位：

本文件主要起草人：

本文件为首次发布。

化妆品紧致功效测试-体外成纤维细胞弹性蛋白含量测定

1 范围

本文件规定了化妆品紧致功效测试-体外成纤维细胞弹性蛋白含量测定的原理、材料、试验方法、结果计算、质量控制、结果评价和结论。

本文件适用于应用人皮肤成纤维细胞测试化妆品及原料促进弹性蛋白合成的能力,为化妆品及原料紧致功效宣称提供科学支持。

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

SN/T 3899 化妆品体外替代试验 良好细胞培养和样品制备规范

SN/T 2328 化妆品急性毒性的角质细胞试验

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

光密度 optical density, OD

入射光和透射光的透过率之比值的常用对数值。

3.2

酶联免疫吸附试验 Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA

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。基本设计是用酶(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,酶催化的呈色反应可以间接反映抗原的量。

4 原理

4.1 弹性蛋白合成原理

人皮肤成纤维细胞能在体内合成 I 型前胶原和原弹性蛋白并分泌至胞外,原弹性蛋白在赖氨酰氧化酶等的催化氧化下形成其特有的交联结构而形成弹性蛋白。弹性纤维由弹性蛋白和微原纤维构成,分布于真皮及皮下组织,使皮肤具有弹性。人皮肤成纤维细胞可以作为研究化妆品提升弹性蛋白含量的细胞模型,通过测定受试物给药后,细胞弹性蛋白含量的上调率,评价受试物是否存在促进弹性蛋白合成的能力。

4.2 弹性蛋白测试原理

弹性蛋白与包被在酶标板上的弹性蛋白抗体特异性结合后,与带有底物标记的抗弹性蛋白抗体结合,底物被酶催化后,生成有色产物,弹性蛋白含量与有色产物颜色的深浅呈正相关。用酶标仪在450nm波长下测定光密度(OD)值,计算弹性蛋白含量。

5 材料

5.1 细胞系

人皮肤成纤维细胞HFF-1株。

5.2 仪器及设备

本文件测试所需仪器如下：

- 二氧化碳培养箱（ $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ ，湿化， $5\% \pm 1\%$ CO_2 ）；
- 生物安全柜或层流洁净工作台；
- 水浴槽（ $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ ）；
- 倒置相差显微镜；
- 酶标仪：配备 540nm、570nm、630nm 滤光片；
- 电子天平（精确到 0.001g）；
- 低速离心机；
- 细胞板振荡器；
- 漩涡混匀仪；
- 移液器：1000 μL 、200 μL 、50 μL 、10 μL ；
- 细胞计数仪或血球计数板。

5.3 试剂

本文件测试所需试剂如下：

- DMEM 培养基（dulbecco's modified eagle medium）；
- DMEM/F12 无酚红培养基；
- 牛血清；
- 胰蛋白酶/EDTA 溶液；
- 磷酸盐缓冲液（PBS）；
- 青霉素/链霉素；
- 噻唑蓝（MTT）；
- 二甲基亚砷（DMSO）；
- 无水乙醇；
- 转化生长因子- β （TGF- β ）；
- 弹性蛋白 ELISA 试剂盒。

5.4 试剂准备

5.4.1 基本要求

除另有规定外，所有试剂应为分析纯，试验用水应按GB/T 6682三级用水的要求进行制备。与细胞培养相关试剂、耗材应作无菌处理。

5.4.2 牛血清

解冻后 56°C 加热灭活30min。

5.4.3 磷酸盐缓冲液（PBS）

取磷酸二氢钾27.22g，加1000mL水使其溶解，取50mL，加0.2mol/L氢氧化钠溶液42.4mL，再加水稀释至200mL，使其pH为7.6，即得。

5.4.4 培养基

5.4.4.1 常规培养基

含10%牛血清，50U/mL青霉素，50 $\mu\text{g/mL}$ 链霉素的DMEM培养基。

5.4.4.2 试验培养基

含2%牛血清，50U/mL青霉素，50 $\mu\text{g/mL}$ 链霉素的DMEM培养基。

5.4.4.3 冻存培养基

含20%牛血清，10% DMSO，50U/mL青霉素，50 μg/mL链霉素的DMEM培养基。

5.4.5 噻唑蓝（MTT）

5.4.5.1 贮备液

用PBS配制成5mg/mL，过滤（0.22 μm微孔滤膜），2℃~8℃避光保存。

5.4.5.2 工作液

用DMEM/F12无酚红培养基将MTT贮备液稀释成1mg/mL，使用时现配现用。

5.4.6 转化生长因子-β（TGF-β），阳性对照物

5.4.6.1 贮备液

用PBS或纯水配制成10 μg/mL，-15℃以下保存。

5.4.6.2 工作液

用试验培养基将TGF-β贮备液稀释成100ng/mL，使用时现配现用。

5.5 耗材

本文件测试所需耗材如下：

- 25cm²和75cm²细胞培养瓶，用于常规培养。
- 96孔，平底细胞培养板，用于细胞培养及试验。
- 2mL细胞冻存管，用于细胞冻存。
- 0.22 μm水系微孔滤膜，用于试剂过滤除菌。

6 试验方法

6.1 基本要求

除了除菌前试剂的准备外，所有溶液、玻璃器皿、吸头等都应无菌，所有操作应在无菌条件和无菌环境下进行。

6.2 细胞准备

细胞的维护和培养程序参见附录A。取冷冻保存的细胞培养物以一个合适的密度接种到常规培养基中用于试验；用于试验的细胞在检测前至少传代一次，在试验前一天接种于96孔板中，每孔接种量为100 μL。

注：细胞接种密度应保证在接种24h后，6.3和6.4条中细胞融合度达到50%~70%，正常细胞形态参见附录B。

6.3 细胞毒性测试

6.3.1 受试物准备

受试物所用溶剂及最大试验浓度选择参见附录C，浓度级数的设计参见附录D。受试物应在测试当天准备，宜在测试前4h内准备完毕；溶剂终浓度应保持一致，无细胞毒性，不应影响细胞增殖及样品产生任何其他影响。

6.3.2 MTT 测试

弃掉96孔板中的培养基，根据图1加入不同浓度的受试物溶液，同时设置空白对照组（NC）和阳性对照组（PC），100 μL/孔，每个浓度6个复孔进行加样，结束后，盖上细胞板盖，封边，置于二氧化碳培养箱中培养20h~48h。培养结束后，观察并记录细胞状态，弃去培养液，用PBS洗1至2次，加入MTT工作液，50 μL/孔，继续置于二氧化碳培养箱培养2h~6h，弃去培养液，每孔加入150 μL的DMSO，震荡5min~10min，用酶标仪测定570nm处吸光度值，采用630nm作为参考波长，根据结果计算细胞存活率，当样品在96孔板中对应浓度的细胞存活率≥85%，且样品组的细胞与空白组细胞的形态无明显差异时，则说明样品在该浓度下无明显细胞毒性，选用该浓度进行下一步试验。试验流程参见附录E。

图 1 96 孔细胞板加样示意图（细胞毒性测定）

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS
B	PBS	NC	C8	C7	C6	C5	C4	C3	C2	C1	PC	PBS
C	PBS	NC	C8	C7	C6	C5	C4	C3	C2	C1	PC	PBS
D	PBS	NC	C8	C7	C6	C5	C4	C3	C2	C1	PC	PBS
E	PBS	NC	C8	C7	C6	C5	C4	C3	C2	C1	PC	PBS
F	PBS	NC	C8	C7	C6	C5	C4	C3	C2	C1	PC	PBS
G	PBS	NC	C8	C7	C6	C5	C4	C3	C2	C1	PC	PBS
H	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS

注：PBS —— 只加PBS，无细胞；

NC —— 试验培养基，正常细胞；

C1~C8 —— 含8个不同浓度受试物溶液的试验培养基，有细胞（C1为最高浓度，C8为最低浓度）；

PC —— 含0.1mg/mL的SDS溶液的试验培养基，有细胞。

6.4 细胞弹性蛋白含量试验

6.4.1 细胞及受试物准备

按 6.2 项重新准备细胞。根据 6.3 项细胞毒性测试结果，配制无细胞毒性的受试物溶液，所用溶剂应与细胞毒性测试一致。受试物应在测试当天准备，宜在测试前 2h 内准备完毕。

6.4.2 加样

弃掉 96 孔板中的培养基，每孔加入 100 μ L 的受试物溶液，同时设阳性对照组和空白对照组。阳性对照组每孔加入 100 μ L 的 TGF- β 工作液，空白对照组中加入试验培养基。每组 6 个复孔。加样完毕后将 96 孔板置二氧化碳培养箱中孵育培养 24h \pm 2h。采用 30 代内的细胞较佳。

6.4.3 ELISA 检测

孵育培养结束后，每孔收集细胞培养上清液，每组6个复孔两两混合为3个孔用于ELISA检测。ELISA检测需根据人弹性蛋白酶联免疫试剂盒的说明书进行。在正式检测前，根据ELISA试剂盒的说明进行预试验，确定稀释比例，以保证检测数值落在标准曲线范围内。如样品无法及时测试，可将上清液收集于 1.5 mL 无菌离心管中，置于-80 $^{\circ}$ C 超低温冰箱冷冻保存备用。试验流程参见附录E。

7 结果计算

7.1 细胞存活率

细胞存活率按公式（1）计算。

$$\text{细胞存活率(\%)} = \frac{\text{OD}_{\text{样品}}}{\text{OD}_{\text{空白}}} \times 100\% \quad (1)$$

式中：

OD_{样品} —— 样品组的 OD 值均值；

OD_{空白} —— 空白对照组的 OD 值均值。

7.2 弹性蛋白含量

下列给出弹性蛋白含量计算方法：

- 宜使用专业制作曲线软件，以标准品的浓度为横坐标，OD450nm 值为纵坐标，制作标准曲线，根据样品的 OD450nm 值，查出相应的浓度。
- 用标准品的浓度与 OD450nm 值计算出标准曲线的回归方程式，将样品的 OD450nm 值代入方程式，计算样本的弹性蛋白含量。最终取各组 3 个复孔的平均值作为最终的弹性蛋白结果。弹性蛋白上调率按公式（2）计算。

$$\text{上调率 (\%)} = (\text{T/C} - 1) \times 100\% \quad (1)$$

式中：

T——样品组弹性蛋白含量平均值；

C——空白对照组弹性蛋白含量平均值。

8 质量控制

8.1 细胞毒性试验

进行MTT试验时，在96孔板第11列加入0.1mg/mL的SDS溶液作为对照，作为质量控制。测试值应在表1置信范围内。

表1 测定吸光度的置信区间

组别	95%置信区间 (OD _{570nm} 值, 参考波长 630nm)
溶剂对照孔	0.300~0.900
SDS 对照孔	0.010~0.100

8.2 可接受标准（阳性对照）

8.2.1 每批次试验均须设置阳性对照组，要求每批次试验中阳性对照组均能检出弹性蛋白含量上调的效果，且与空白对照组相比，阳性对照组弹性蛋白含量上调率需 $\geq 20\%$ ，则认为试验体系有效。

8.2.2 统计酶标仪测得的各组复孔间光密度的标准差（Standard Deviation, SD），并计算变异系数（Coefficient of Variation, C.V），若 C.V 值 $\leq 20\%$ ，则认为试验平行性有效。

9 结果评价

9.1 弹性蛋白相对含量应表述为：平均值 \pm 标准差（SD）。

9.2 采用专业统计学软件进行统计及显著性分析。评价受试物促进弹性蛋白合成的能力，需受试物的弹性蛋白含量高于空白对照组，且受试物与空白对照的弹性蛋白含量具有显著性差异（ $P < 0.05$ ）。

9.3 报告中对于受试物促进弹性蛋白合成的表述，应包含受试物浓度。

10 结论

在试验满足有效性验证的基础上，受试物组与空白对照相比，弹性蛋白的含量上调，且具有显著性差异（ $P < 0.05$ ），说明受试物在该受试浓度下，具有促进弹性蛋白合成的能力，可作为紧致类化妆品及原料功效宣称的证据支持之一。

附录 A (规范性) 细胞维护和培养程序

A.1 细胞复苏

将安瓶放在37℃的水浴中，使细胞解冻，时间应控制在2min内并尽可能短。使细胞在常规培养基中重新悬浮，用离心机1000rpm离心5min后，轻轻倒出上层清液，收集沉淀的细胞；加入新的常规培养基，使细胞团块在培养基中重新悬浮，转入细胞培养瓶中，置于在二氧化碳培养箱中培养。

A.2 培养条件

将小鼠巨噬细胞移入在培养瓶内，置于温度37℃和5% CO₂的潮湿空气中长成单细胞层。应每天在相差显微镜下检查细胞，注意形态或其贴壁特性的变化，当细胞达到80%融合时，用细胞刮或其他工具将细胞从培养瓶中分散下来。

注：常规培养基在使用前，应在水浴槽中将其预热至37℃。

A.3 细胞消化

在单细胞层中添加1mL~2mL预热的胰蛋白酶/EDTA溶液，保持几秒钟，去除多余的胰蛋白酶/EDTA溶液，在37℃下培养细胞，2min到3min后，轻敲培养瓶，使细胞分离为单个细胞悬液。

A.4 细胞传代

取A.3中消化后的细胞，加入常规培养基，将细胞从瓶壁上冲洗下来。吸取100 μL细胞悬液进行细胞计数，用常规培养基调整细胞浓度为 $(5.0 \times 10^4 \sim 7.0 \times 10^4)$ cell/mL，转入新的细胞瓶或96孔板中，置于二氧化碳培养箱中培养。

A.5 细胞冻存

取消化后的细胞，加入常规培养基，将细胞从瓶壁上冲洗下来。将细胞悬液用离心机1000rpm离心5min，弃去上清液，重悬细胞于冻存培养基中，细胞浓度调整至 $(0.5 \times 10^6 \sim 2.0 \times 10^6)$ cell/mL，每支冻存管分装1mL细胞悬液，以1℃/min的冷冻速率冷冻细胞直到达到-70℃~-80℃，可通过不同的技术实现。将冻存管放入液氮进行储存。

附 录 B
(资料性)
正常人皮肤成纤维细胞

图B.1给出了正常人皮肤成纤维细胞10倍显微镜下的示图。

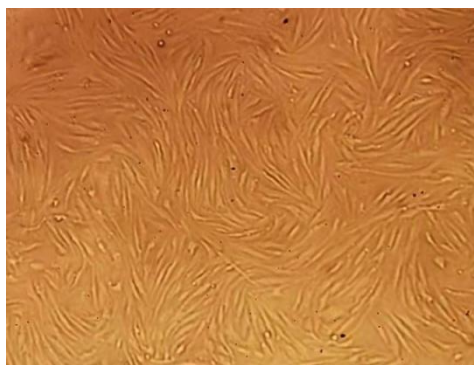
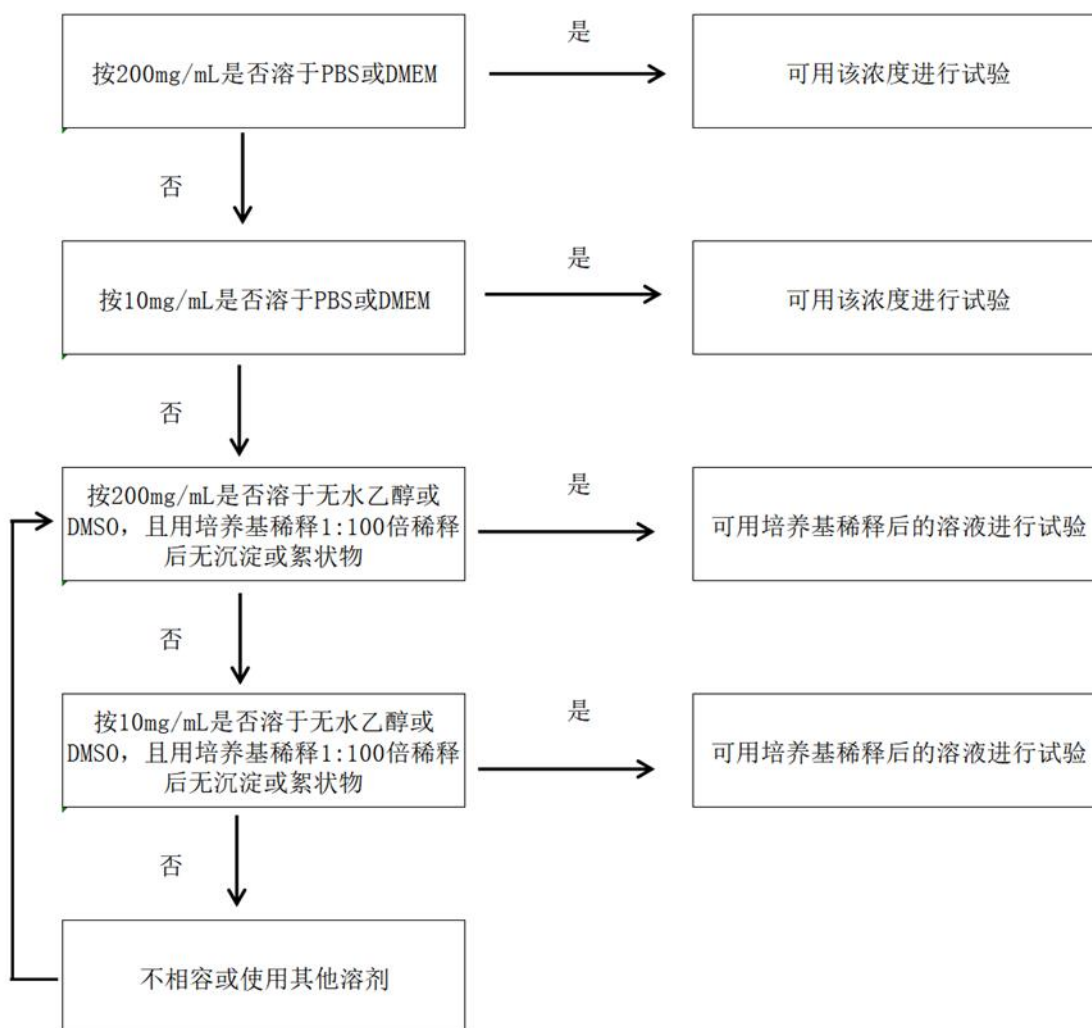


图 B.1 正常人皮肤成纤维细胞典型培养 10 倍显微镜下的示图

附录 C
(规范性)
受试物溶解度预测试流程

图 C.1 给出了受试化学品溶解度的预测试流程。



注：DMEM ——无添加培养基；

培养基 ——完全培养基；

细胞毒性试验中要使用的溶剂最高终浓度应为：PBS 或 DMEM，100%；无水乙醇或 DMSO，1%。

细胞毒性试验中样品的最高终浓度应为：PBS 或 DMEM 稀释，20%；无水乙醇或 DMSO 稀释，0.2%。

图 C.1 受试化学品溶解度预测试流程图

附录 D
(资料性)
十进制几何浓度序列

图D.1给出十进制几何浓度的稀释设计示例图。稀释因子3.16 ($=\sqrt[2]{10}$) 将一个log单位分为等距离的2个间隔, 稀释因子2.15 ($=\sqrt[3]{10}$) 将一个log单位分为等距离的3个间隔, 稀释因子1.47 ($=\sqrt[6]{10}$) 将一个log单位分为等距离的6个间隔, 稀释因子1.21 ($=\sqrt[12]{10}$) 将一个log单位分为等距离的12个间隔

10						31.6						100
10				21.5				46.6				100
10		14.7		21.5		31.6		46.6		68.1		100
10	12.1	14.7	17.8	21.5	26.1	31.6	38.2	46.6	56.1	68.1	82.2	100

图 D. 1 十进制几何序列设计示例图

示例: 样品稀释到 20%浓度, 并以 2.15 ($=\sqrt[3]{10}$) 为稀释因子稀释 8 个浓度为例, 由图 D. 2 表示:

吸取样品 1mL, 加入 4mL 的试验培养基中, 用振荡器漩涡混匀, 即得 20%浓度样品溶液, 记为 C1。从 C1 中取 1mL, 加入 1.15mL 试验培养基中, 记为 C2, 以此方法依次稀释成 8 个不同浓度。

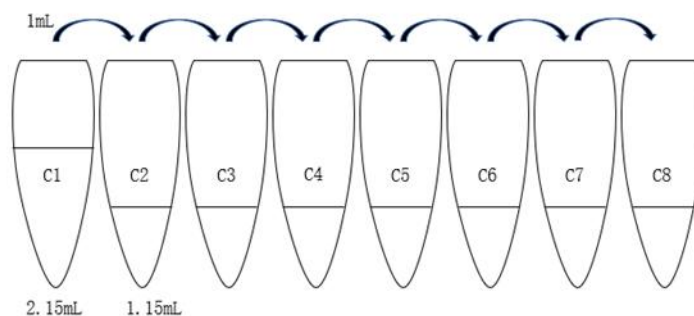


图 D. 2 样品稀释示意图

附录 E
(规范性)
细胞毒性试验和弹性蛋白含量测试步骤

图E. 1~E. 2规定了细胞毒性试验和弹性蛋白含量测试步骤。



图 E. 1 细胞毒性试验步骤

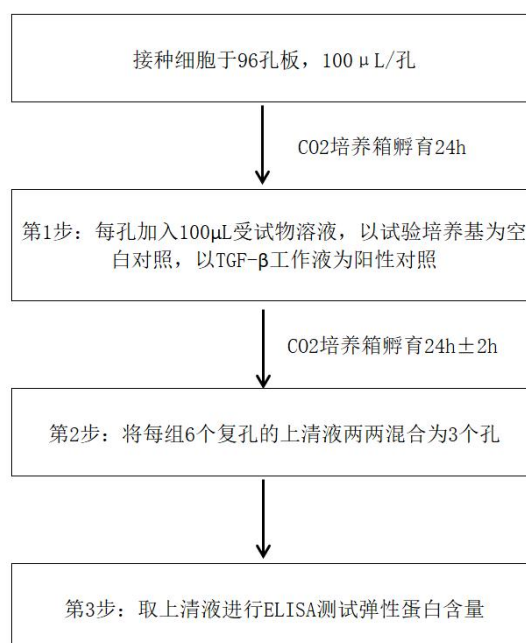


图 E. 2 NO 弹性蛋白试验测试步骤

参 考 文 献

- [1] Qingyun Wen, Suzanne M, Mithieux, et al. Elastin Biomaterials in Dermal Repair [J]. Trends in biotechnology (Regular ed.), 2020, 38(3):280-291.
- [2] Chandrasekhar R. Kothapalli, et al. Transforming Growth Factor Beta 1 and Hyaluronan Oligomers Synergistically Enhance Elastin Matrix Regeneration by Vascular Smooth Muscle Cells [J], Tissue Eng Part A. 2009 Mar; 15(3): 501-511.
- [3] Kelsey E. Derricks, Celeste B. Rich, et al. Ascorbate Enhances Elastin Synthesis in 3D Tissue-Engineered Pulmonary Fibroblasts Constructs[J]. Tissue Cell. 2013 Aug; 45(4): 253-260.
- [4] Suleyman Aydin. A short history, principles, and types of ELISA, and our laboratory experience with peptide/protein analyses using ELISA[J]. Peptides 72(2015):4-15.
- [5] 彭勤纪, 王璧人. 波谱分析在精细化工中的应用[M]. 北京: 中国石化出版社, 2001.
-