ICS 71.100.70
C2682
Y42

# T/SHRH

# 团　体　标　准

T/SHRH 031-2020

# 化妆品紧致、抗皱功效测试-体外成纤维细胞Ⅰ型胶原蛋白含量测定

Anti-wrinkly and Firming Lifting Efficacy Test of Cosmetics - In vitro test Method of Collagen I Contents with fibroblasts

2020-12-30 发布　　2021-01-30 实施

上海日用化学品行业协会 发布

全国团体标准信息平台

# 目 次

前言 ..... II
1 范围 ..... 1
2 规范性引用文件 ..... 1
3 术语、定义 ..... 1
4 原理 ..... 1
5 仪器及设备 ..... 2
6 主要试剂及耗材 ..... 2
7 试验方法 ..... 2
8 试验条件 ..... 3
9 试验步骤 ..... 3
10 结果计算 ..... 3
11 试验有效性验证 ..... 4
12 结果报告 ..... 4
13 结果相关性解读 ..... 4
附录 A ..... 5
附录 B ..... 6
参考文献 ..... 7

全国团体标准信息平台

# 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。

本文件由上海日用化学品行业协会提出和归口。

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。

本文件起草单位：广东博溪生物科技有限公司、启迪禾美生物科技（嘉兴）有限公司、上海珈凯生物科技有限公司、上海家化联合股份有限公司、上海新高姿化妆品有限公司、上海辉文生物技术股份有限公司、上海晓创检测技术有限公司、上海创元化妆品有限公司、片仔癀（上海）生物科技研发有限公司 、东阿阿胶股份有限公司、沛滢生物科技（上海）有限公司、云南贝泰妮生物科技集团股份有限公司、上海林清轩生物科技有限公司、上海中翊日化有限公司、上海绿瑞生物科技有限公司、上海日用化学品行业协会。

本文件主要起草人：张艳云、张钰、李钧翔、徐明、卢伊娜、张恒、贾海东、陈田、李雪竹、唐嘉雯、费维成、马冬月、曾四立、吴梅芳、王莹、谢阿贵、赵玥、廖峰、樊雨梅、周俊旭、邵子豪、马骁、王飞飞、高宏旗、朱翠翠、胡新成、陶侃、姜春鹏、王文扬、金坚、陈亦华。

本文件 2020 年 12 月首次发布。

全国团体标准信息平台

# 化妆品紧致、抗皱功效测试-体外成纤维细胞Ⅰ型胶原蛋白含量测定

## 1 范围

本文件规定了人真皮成纤维细胞分泌的Ⅰ型胶原蛋白含量测定试验的基本技术要求。

本文件提供一种人真皮成纤维细胞中Ⅰ型胶原蛋白含量的检测方法，本文件可作为化妆品原料及成品紧致、抗皱功效称谓的证据支持之一。

## 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—2008 分析实验室用水规格和试验方法。

SN/T 3899—2014 化妆品体外替代试验 良好细胞培养和样品制备规范。

## 3 术语、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 光密度 optical density，OD

物质在溶液中吸收特定波长光线强弱的参数。光密度值与光吸收物质在溶液中的浓度成相关性(采用竞争法原理的 ELISA 试剂盒，光密度值与光吸收物质在溶液中的浓度呈负相关性，采用夹心法原理的 ELISA 试剂盒，光密度值与光吸收物质在溶液中的浓度呈正相关性）。

### 3.3 酶联免疫吸附测定 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

Ⅰ型胶原蛋白是真皮细胞外基质的主要成分之一，由真皮成纤维细胞在胞内合成Ⅰ型前胶原，分泌至胞外，在末端前胶原肽酶的作用下，端肽分离后，聚合形成胶原纤维。人真皮成纤维细胞可以作为研究化妆品提升Ⅰ型胶原含量的细胞模型，通过测定受试物给药后，空白对照与受试物给药后，Ⅰ型胶原蛋白含量的上调率，评价受试物在促进胶原蛋白合成方面是否具有功效。Ⅰ型胶原蛋白含量的测定采用酶联免疫方法（ELISA），具体原理为：Ⅰ型胶原与包被在酶标板上的胶原蛋白抗体特异性结合后，与带有底物标记的抗Ⅰ型胶原抗体结合，底物被酶催化后，生成有色产物，Ⅰ型胶原蛋白含量与有色产物颜色的深浅呈正相关。用酶标仪 450 nm 波长下测定光密度（OD 值），计算Ⅰ型胶原蛋白含量。

## 5 仪器及设备

5.1

调节移液枪：1000 μL、200 μL、50 μL、10 μL。

5.2

$CO_2$培养箱：37 ℃，湿化、5%$CO_2$/空气。

5.3

酶标仪：配置450 nm滤光片。

5.4

超净工作台。

5.5

微量振荡器。

5.6

分析天平：精度0.1 mg。

5.7

恒温培养箱。

5.8

细胞计数仪或血球计数板。

5.9

超低温冰箱（-80℃）。

5.10

倒置显微镜。

5.11

低速离心机。

## 6 主要试剂及耗材

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。

### 6.1 细胞

6.1.1 宜选用人真皮成纤维细胞；若培养条件能满足细胞的特殊需要，其他成纤维细胞或细胞系也可用于本试验；但应证明其等同性。

6.1.2 应定期检测细胞，确保细胞无支原体污染，只有无污染才能被使用。

### 6.2 细胞培养涉及试剂及耗材

低糖 DMEM 培养基（首选商品化的液体培养基或干粉，也可自行配置），10%胎牛血清（FBS），也可选择新生牛血清，胰蛋白酶/EDTA 溶液（0.25%胰酶溶液与 0.02 mol/L EDTA 溶液 1:1 混匀），磷酸盐缓冲液（PBS），细胞培养瓶。

### 6.3 检测

96 孔细胞培养板，人Ⅰ型胶原酶联免疫试剂盒。

## 7 试验方法

### 7.1 细胞准备

来自冷冻保存的细胞培养物以一个合适的密度接种到培养基，并在检测前至少传代一次，例如选用 P7 代细胞，具体使用代次，可根据实验室实际进行调整。细胞应以合适的密度接种到培养基中用于试验，细胞接种密度应保证在接种 24 h 后，融合度达到 45%～60%。

7.2 受试物准备

7.2.1 除非有稳定性数据证明储备液可接受，否则受试物必须在使用前新鲜配置直接使用。

7.2.2 水中溶解度受限的受试物应当溶解在适当的溶剂中，溶剂体积应当在所有培养物中保持一致，即在空白对照和受试物中保持一致，并且无细胞毒性。受试物浓度的选择应避免出现沉淀和溶液呈现云雾状。

7.2.3 宜使用二甲基亚砜（DMSO）和无水乙醇为溶剂，其他低细胞毒性的溶剂也可使用。在使用溶剂前，应仔细评估它们的特殊性质，例如：是否与受试物发生反应，或溶液中的化学稳定性。

7.2.4 可使用涡旋混合/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。

## 8 试验条件

### 8.3.1 受试物浓度

应通过细胞毒性检测确定受试物的浓度范围。例如选择细胞活力≥90%，且细胞形态与对照组无明显差异的浓度。

### 8.3.2 阳性对照

每一次试验都应同时使用阳性对照进行试验。推荐阳性对照物，如 100 ng/mL TGFβ1，参考文献，配置方法见附录 B。具体给药浓度可根据试验室培养细胞特性进行调整。据历史资料，试验可接受的标准为：阳性对照 I 型胶原蛋白含量上调率≥20%。

## 9 试验步骤

### 9.4.1 细胞消化、接种

人真皮成纤维细胞采用胰蛋白酶/EDTA，具体消化浓度及用量需根据实验室细胞特性确定，建议：浓度为 0.25%，T25 培养瓶用量为 1 mL， T75 培养瓶，用量 3 mL。倒置显微镜下观察，至大部分细胞变圆并处于悬浮状态时，加入约胰酶体积 2～3 倍的含血清的 DMEM 培养基终止消化，并收集至离心管中，800 r/min 离心 6 min，转速及离心时间可根据实验室细胞特性进行确定。离心结束后，弃掉上清液，向离心管中加入一定体积的细胞培养基，弯头吸管吹打混匀细胞，细胞计数仪或血球计数板进行计数。用细胞培养基稀释细胞至接种密度后（接种后 24 h 融合度达到 45%～60%），接种至 96 孔板中，每孔液量为 200 μL。接种结束后，放置于 $CO_2$ 培养箱中培养 24 h±2 h。

### 9.4.2 给药

弃掉 96 孔板中的培养基，开展给药操作。受试物孔中加入含有受试物的培养基，阳性对照孔中加入含有阳性对照的培养基，空白/溶剂对照孔中加入正常的细胞培养基，每孔 200 μL。给药完毕后将 96 孔板放置在 $CO_2$ 培养箱中培养 24 h±2 h。给药培养时间也可根据细胞特性，自行摸索 I 型胶原分泌的峰值时间进行调整。

### 9.4.3 细胞上清收集

孵育培养结束后，每孔收集 200 μL 细胞培养上清液于 1.5 mL 无菌离心管中，置于-80 ℃超低温冰箱冷冻保存。

### 9.4.4 ELISA 检测

ELISA 检测需根据人 I 型胶原酶联免疫试剂盒的使用说明书进行检测。在正式检测前，需设定稀释比例，进行预实验，摸索确定 ELISA 检测实验组的稀释比例，以保证检测数值落在标准曲线范围内。

## 10 结果计算

### 10.1 I型胶原蛋白含量计算

推荐使用专业制作曲线软件，以标准品的浓度为纵坐标，$OD_{450}$ 值为横坐标，制作标准曲线，根据样本的 $OD_{450}$ 值，查出相应的浓度。或用标准品的浓度与 $OD_{450}$ 值计算出标准曲线的回归方程式，

将样本的 $OD_{450}$ 值代入方程式，计算样本的 I 型胶原蛋白含量。最终取各组 3 个复孔的平均值作为最终的 I 型胶原蛋白结果。

### 10.2 I型胶原蛋白上调率计算公式

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

式中：

T—受试物 I 型胶原蛋白含量平均值；

C—空白/溶剂对照 I 型胶原蛋白含量平均值。

## 11 试验有效性验证

11.1

每批次试验均须设置阳性对照，要求每批次试验，阳性对照均能检出I型胶原蛋白含量上调的效果，且与空白/溶剂对照相比，阳性对照I型胶原蛋白含量上调率需≥20%，则认为试验系统有效。

11.2

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*），*C.V*值≤ 20%，则认为试验平行性有效。

## 12 结果报告

12.1

Ⅰ型胶原蛋白的含量应表述为：平均值±标准差（SD）。

12.2

评价受试物促进Ⅰ型胶原蛋白合成的能力，需受试物与空白/溶剂对照的I型胶原蛋白含量具有显著性差异（$P<0.05$）。

12.3

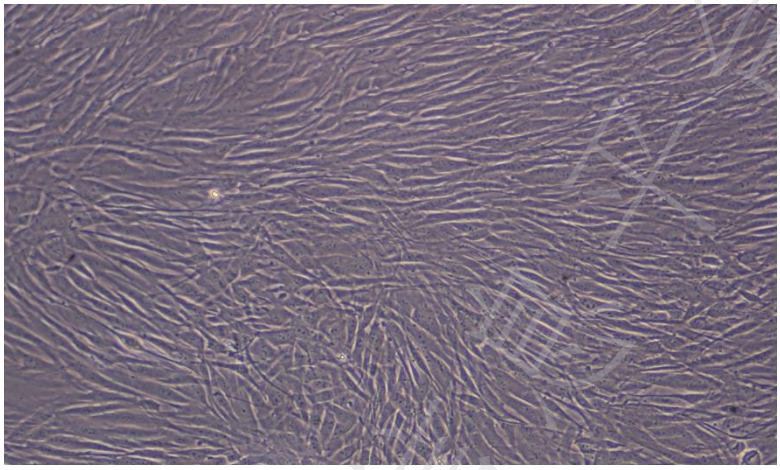
对于受试物促进Ⅰ型胶原蛋白合成的表述，应包含受试浓度。

## 13 结果相关性解读

在试验满足有效性验证的基础上，受试物与空白/溶剂对照相比，Ⅰ型胶原蛋白的含量上调，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Ⅰ型胶原蛋白合成的能力，可作为紧致、抗皱类化妆品原料称谓的证据支持之一。

# 附录 A
（资料性附录）

## 正常人真皮成纤维细胞



20X 物镜下照片

图 A.1 正常人真皮成纤维细胞典型培养图片

全国团体标准信息平台

## 附录 B

（资料性）

B.1 培养基

需含有下列成分（在 DMEM 中的最终浓度）

——10% FBS/NBCS

——1～4 mmol/L L-谷氨酰胺

——100 IU/mL 青霉素

——100 μg/mL 链霉素

B.2 50 μg/mL TGFβ1 贮备液

——2 μg TGFβ 1

——40 μL 10 mM 柠檬酸

0.22 μm 滤器过滤除菌，-20 ℃保存，避免反复冻存。

B.3 100 ng/mL TGFβ1 工作液

——2 μL TGFβ1 贮存液

——998 μL 培养基

B.4 操作方法

现用现配。

全国团体标准信息平台

## 参考文献

[1] K.Gelse, E.Poschl, T. Aigner. Collagens—structure, function, and biosynthesis. Advanced Drug Delivery Reviews 55 (2003) 1531–1546.

[2] Young-Jin Je, Dae-Kyoung Choi, Kyung-Cheol Sohn .Inhibitory role of Id1 on TGF-b-induced collagen expression in human dermal fibroblasts. Biochemical and Biophysical Research Communications 444 (2014) 81–85.

[3]Coecke,S Ballla,M Bowe,G, Guidance on good cell culture practice, A report of the second ECVAM task force on good cell practice,2005.

全国团体标准信息平台