

T/GDICST

广东省化妆品科学技术研究会团体标准

T/GDICST XXXX—2023

化妆品舒缓功效测试-脂多糖诱导巨噬细胞 炎症因子 IL-6 测定方法

Soothing efficacy test of cosmetics—Test method for interleukin-6 (IL-6)
macrophage induced by lipopolysaccharide

(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

广东省化妆品科学技术研究会 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 试验原理 1

5 试验材料 2

6 试验方法 3

7 结果计算 4

8 结果评价 4

9 试验报告 5

附录 A （规范性） 6

附录 B （规范性） 细胞维护和培养程序8

附录 C （资料性） 小鼠单核巨噬细胞 RAW 264.79

参考文献 10

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。

本文件由广东省科学院微生物研究所（广东省微生物分析检测中心）提出。

本文件由××××提出。

本文件由××××归口。

本文件起草单位：

本文件主要起草人：

内部讨论资料，严禁非授权使用

化妆品舒缓功效评价-脂多糖诱导巨噬细胞炎症因子 IL-6 测定方法

1 范围

本文件规定了细菌脂多糖诱导单核巨噬细胞RAW 264.7分泌炎症因子IL-6含量测试方法的原理、材料、试验方法、结果计算、质量控制、结果评价和报告。

本文件适用于具有舒缓功效的化妆品及化妆品原料。

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 2328 化妆品急性毒性的角质细胞试验

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

T/SHRH 034-2021 化妆品舒缓功效测试 - 体外TNF- α 炎症因子含量测定 脂多糖诱导巨噬细胞RAW 264.7测试方法

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1 脂多糖 Lipopolysaccharide, LPS

脂多糖（LPS）是革兰氏阴性菌细胞壁的组成成分，是一种常用的炎症模型刺激物。LPS可被Toll样受体4（TLR4）等受体识别，激活丝裂原活化蛋白激酶（MAPK）和核转录因子 κ B（NF- κ B）等炎症信号通路，进而促进一系列促炎介质的分泌^[1]。

3.2 单核巨噬细胞 Mononuclear macrophages

单核巨噬细胞源自血液中的单核细胞，属于吞噬细胞的一种。巨噬细胞是重要的免疫/炎症细胞，能释放多种细胞因子如一氧化氮（NO）、坏死肿瘤因子 α （TNF- α ）、白细胞介素（IL-6）等，是机体防御系统的一个重要组成部分^[2]。

3.3 白细胞介素 6 Interleukin-6, IL-6

IL-6是一种多效性促炎细胞因子，由单核巨噬细胞、T细胞、纤维母细胞等细胞分泌产生，能诱导炎症细胞释放炎症因子，从而促进炎症反应的发生，其水平与炎症程度呈正相关^[3-4]。

3.4 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^[5]。

[来源：T/SHRH 034-2021,3.2]

3.5 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^[5]。

[来源：T/SHRH 034-2021,3.2]

4 试验原理

4.1 舒缓功效原理

LPS通过TLR4刺激单核巨噬细胞，激活NF- κ B等炎症信号通路，从而诱导IL-6等炎症因子的释放，加重炎症反应。采用LPS诱导小鼠单核巨噬细胞RAW 264.7炎症反应的经典细胞模型，通过对比模型对照组（仅LPS）和样品组（LPS+样品）的IL-6含量的差异，评估样品对IL-6分泌的抑制作用，从而评价样品是否具有舒缓功效。

4.2 IL-6 含量测定原理

IL-6含量的测定采用酶联免疫吸附试验（ELISA）方法，具体原理是：样品中的IL-6与包被在酶标板上的IL-6抗体特异性结合后，再与酶标记的抗IL-6抗体结合，随之加入的底物被酶催化后生成有色产物，其颜色的深浅和IL-6含量呈正相关。根据酶标仪检测450 nm处的吸光度值和标准曲线计算出样品中IL-6含量。

5 试验材料

5.1 细胞系

小鼠单核巨噬细胞系RAW 264.7株。

5.2 仪器设备和耗材

本文件测试所需仪器设备与耗材如下：

- 二氧化碳培养箱：温度精度 $\pm 1^{\circ}\text{C}$ ，二氧化碳浓度精度 $\pm 1\%$ ；
- 生物安全柜或层流洁净工作台；
- 恒温水浴箱：温度精度 $\pm 1^{\circ}\text{C}$ ；
- 倒置显微镜；
- 酶标仪：配备 450 nm 滤光片；
- 电子天平：精度0.001 g；
- 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；
- -80°C 超低温冰箱；
- 25 cm^2 细胞培养瓶和100 mm细胞培养皿，用于常规培养；
- 96孔平底细胞培养板，用于细胞培养及试验；
- 2 mL细胞冻存管，用于细胞冻存；
- 0.22 μm 微孔滤膜，用于试剂过滤除菌。

5.3 试剂

本文件测试所需试剂如下：

- 高糖DMEM培养基（Dulbecco's modified eagle medium）；
- 胎牛血清；
- 磷酸盐缓冲液（PBS）；
- 青霉素/链霉素；
- 二甲基亚砷（DMSO）；
- 细菌脂多糖（Lipopolysaccharide, LPS，大肠杆菌来源）；
- 地塞米松；
- Mouse IL-6 ELISA试剂盒。

5.4 试剂制备

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 培养基

5.4.2.1 高糖 DMEM 培养基 (Dulbecco's modified eagle medium)

高糖DMEM培养基配方详见附录A。

5.4.2.2 磷酸盐缓冲液 (PBS)

磷酸二氢钾 144 mg/L、氯化钠 9000 mg/L、磷酸氢二钠七水合物 795 mg/L、pH为7.4。

5.4.2.3 常规培养基

含10%胎牛血清、100 Units/mL青霉素、100 µg/mL链霉素的高糖DMEM培养基。

5.4.2.4 试验培养基

含2%胎牛血清、100 Units/mL青霉素、100 µg/mL链霉素的高糖DMEM培养基。

5.4.3 LPS 溶液

5.4.3.1 贮备液

称取10 mg LPS粉末于1 mL的PBS中，充分混匀溶解。用0.22 µm过滤器过滤除菌，按照10 µL/支的规格进行分装，于-80 °C保存。

5.4.3.2 工作液

用细胞培养基将10 mg/mL的LPS贮备液稀释至1 µg/mL LPS工作液（推荐使用浓度），现配现用。具体刺激浓度可根据各试验室培养细胞特性和LPS作用效果进行调整。

5.4.4 阳性对照物（地塞米松溶液）

5.4.4.1 贮备液

称取100 mg地塞米松粉末于1 mL二甲基亚砷溶剂中，充分混匀溶解。用0.22 µm过滤器过滤除菌，按照20 µL/支的规格进行分装，于-80 °C保存。

5.4.4.2 工作液

用细胞培养基将100 mg/mL地塞米松贮备液稀释至100 µg/mL地塞米松工作液，现配现用。具体给药浓度可根据各试验室培养细胞特性进行调整。

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 细胞制备

细胞的维护和培养程序参见附录B。取冻存的细胞培养物以合适的密度接种到常规培养基中；用于试验的细胞在检测前至少传代1次。细胞接种密度应保证在接种24 h后，按6.3操作，细胞融合度达到50%~70%，正常细胞形态参见附录C。

6.3 IL-6 抑制试验

6.3.1 细胞和受试物准备

按6.2的要求准备细胞。受试物应在测试当天准备，宜在测试前2 h内准备完毕。非水溶性受试物应溶解在适当的溶剂（如无水乙醇或二甲基亚砷等低细胞毒性溶剂）中。受试物浓度的选择应避免出现沉淀和浑浊，且无细胞毒性（细胞活力 $\geq 90\%$ ）。

6.3.2 细胞接种

将吹打下来的细胞用离心机1000 rpm离心5 min，弃掉上清液，用培养基重悬混匀，用细胞计数仪或血球计数板进行计数。用培养基稀释至合适的细胞密度再接种至96孔板中，每孔液量为200 μL 。接种结束后，将培养板置于37 $^{\circ}\text{C}$ 和5% CO_2 的二氧化碳培养箱中培养24 h $\pm$ 2 h。

6.3.3 诱导及给药

弃掉96孔板中的培养基，每孔加入一定浓度的受试物和LPS工作液，每孔总体积为200 μL 。同时设置空白对照组、模型对照组和阳性对照组。其中，空白对照组仅加入试验培养基，模型对照组加入含1 $\mu\text{g/mL}$ LPS的试验培养基，阳性对照组每孔加入地塞米松和LPS的试验培养基。每组各3个复孔。给药完毕后将96孔板置于37 $^{\circ}\text{C}$ 和5% CO_2 的二氧化碳培养箱中培养24 h $\pm$ 2 h。

6.3.4 细胞上清液收集

培养结束后收集细胞培养上清液，并置于-80 $^{\circ}\text{C}$ 冷冻保存。

6.3.5 ELISA 检测

根据IL-6的ELISA检测试剂盒的操作说明书进行检测。在正式测试前应摸索合适的样品稀释比例，以保证IL-6浓度处于ELISA试剂盒的最佳检测范围。

7 结果计算

7.1 IL-6 含量

下列给出IL-6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，OD450为纵坐标，制作标准曲线，根据样品的OD450值，查出相应IL-6浓度。

——用标准品的浓度与OD450值计算出标准曲线的回归方程式，将样品的OD450值代入方程式，计算样本的IL-6含量。最终取各组3个复孔的平均值作为最终的IL-6含量结果。

7.2 IL-6 抑制率

根据公式（1）计算IL-6抑制率，结果保留一位小数。

$$IR(\%) = \left(1 - \frac{T}{C}\right) \times 100\% \dots\dots\dots (1)$$

式中：

IR—— IL-6 抑制率，%；

T —— 样品组的 IL-6 含量均值，单位为 pg/mL；

C —— 模型对照组的 IL-6 含量均值，单位为 pg/mL。

7.3 试验有效性验证

试验应符合以下条件，否则结果无效：

——每批次试验均须设置空白对照组、模型对照组和阳性对照组；

——与空白对照组相比，模型对照组的IL-6含量上调 ≥ 10 倍；

——阳性对照组的IL-6抑制率 $\geq 20\%$ ；

——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 $\leq 20\%$ 。

8 结果评价

在试验满足有效性验证的基础上，评价受试物对IL-6分泌的抑制能力。采用专业统计学软件进行统计及显著性（差异）分析，与模型对照组相比，若样品组的IL-6含量减少，且具有显著性差异（ $p < 0.05$ ），则说明受试物在该受试浓度下，具有抑制巨噬细胞分泌IL-6的能力，可作为舒缓类化妆品及原料功效宣称的证据支持之一。

9 试验报告

试验报告应包括以下信息：

- IL-6含量：应表述为平均值±标准差（SD）；
- 受试物（样品）抑制IL-6分泌的浓度；
- 试验日期；
- 报告日期；
- 样品信息。

内部讨论资料，严禁非授权使用

附录 A
(规范性)

A.1 高糖 DMEM 培养基（Dulbecco's modified eagle medium）配方

表 A.1 高糖 DMEM 培养基（Dulbecco's modified eagle medium）配方

成分		浓度（mg/L）
氨基酸	甘氨酸	30
	L-精氨酸盐酸盐	84
	L-胱氨酸二盐酸	63
	L-谷氨酰胺	584
	L-盐酸组氨酸一水物	42
	L-异亮氨酸	105
	L-亮氨酸	105
	L-赖氨酸盐酸盐	146
	L-甲硫氨酸	30
	L-苯丙氨酸	66
	L-丝氨酸	42
	L-苏氨酸	95
	L-色氨酸	16
	L-酪氨酸二钠盐二水合物	104
	L-缬氨酸	94
	氯化胆碱	4
	D-泛酸钙	4
	叶酸	4

维生素	烟酰胺	4
	吡哆醇盐酸盐	4
	核黄素	0.4
	硫胺素	4
	肌醇	7.2
无机盐	无水氯化钙	200
	九水硝酸铁	0.1
	无水硫酸镁	97.67
	氯化钾	400
	碳酸氢钠	3700
	氯化钠	6400
	一水磷酸二氢钠	125
其它成分	无水葡萄糖	4500
	酚红	15
	丙酮酸钠	110

附 录 B
(规范性)
细胞维护和培养程序

B.1 细胞复苏

将细胞冻存管放在37℃水浴中，使细胞解冻，时间应控制在2 min内并尽可能短。将细胞转移至含常规培养基的离心管中，用离心机1000 rpm离心5 min后，弃掉上清液，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37℃和5% CO₂的二氧化碳培养箱中培养。

B.2 培养条件

将细胞移入在培养瓶内，置于37℃和5% CO₂的二氧化碳培养箱中培养，当细胞达到80%融合时，用移液枪将细胞从培养瓶/皿中轻轻吹打下来。

注：培养基在使用前，应在水浴槽中将其预热至37℃。

B.3 细胞传代

取B.2中吹打下来的细胞，1000 rpm离心5 min后，弃掉上清液，收集沉淀的细胞；加入常规培养基重悬，按照1:3~1:6比例传代，将培养瓶/皿置于37℃和5% CO₂的二氧化碳培养箱中培养。

B.4 细胞冻存

取B.2中吹打下来的细胞，1000 rpm离心5 min后，弃掉上清液；再加入PBS重悬细胞。将细胞悬液用离心机1000 rpm离心5 min，弃掉上清液，重悬细胞于细胞冻存液中，细胞浓度调整至 $(1.0 \times 10^6 \sim 5.0 \times 10^6)$ cell/mL，每支冻存管分装1 mL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 C
(资料性)
小鼠单核巨噬细胞 RAW 264.7

C.1 小鼠单核巨噬细胞 RAW 264.7 小鼠

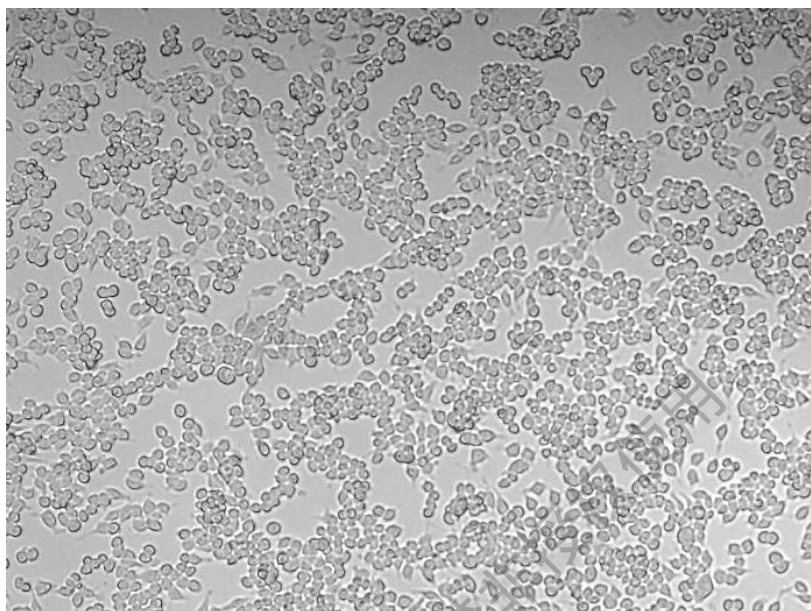


图 C.1 正常小鼠巨噬细胞 RAW 264.7 在 4 倍显微镜下的示图

参 考 文 献

- [1] Ciesielska A , Matyjek M , Kwiatkowska K .TLR4 and CD14 trafficking and its influence on LPS-induced pro-inflammatory signaling[J]. 2021.DOI:10.1007/s00018-020-03656-y.
- [2] 刘燕芳,刘丹,刘兰,等.应用于天然产物抗炎活性研究的主要细胞模型[J].天然产物研究与开发, 2020, 32(5):8.DOI:10.16333/j.1001-6880.2020.5.022.
- [3] 刘显东,毛海峰.白细胞介素-6 的生物学功能及与运动的关系探讨[J].宜春学院学报,2009,31(06):166-168.
- [4] Sun, ShupingZhang, JiahaoLi, HongxingDu, YunyanLi, ShengliLi, AnqiSuo, XiaoguoWang, YangSun, Qi.Anti-inflammatory activity of the water extract of *Chloranthus serratus* roots in LPS-stimulated RAW264.7 cells mediated by the Nrf2/HO-1, MAPK and NF-kappa B signaling pathways[J].Journal of Ethnopharmacology: An Interdisciplinary Journal Devoted to Bioscientific Research on Indigenous Drugs, 2021, 271(1).
- [5] T/SHRH 034-2021, 化妆品舒缓功效测试 - 体外 TNF- α 炎症因子含量测定 脂多糖诱导巨噬细胞 RAW264.7 测试方法[S].
- [6] 朱君, 付立霞, 支青,等. 桑枝乙醇提取物通过 NF- κ B 和 MAPKs 信号通路对 LPS 诱导 RAW264.7 细胞的抗炎作用[J]. 中成药, 2022, 44(11):6.