化妆品紧致功效评价测试-细胞实验

产品名称	化妆品紧致功效评价测试-细胞实验
公司名称	广分检测技术（苏州）有限公司
价格	.00/件
规格参数	服务内容:一站式检测分析测试服务 检测类型:第三方检测公司 服务范围:全国
公司地址	江苏省昆山市陆家镇星圃路12号智汇新城B区7栋
联系电话	0512-65587132 18662248592

产品详情

利用细胞评价供试品紧致功效

项目一：胶原蛋白含量测定

【评价原理】

成纤维细胞既合成和分泌胶原蛋白、弹性蛋白，生成胶原纤维、网状纤维和弹性纤维，也合成和分泌糖胺聚糖和糖蛋白等基质成分。III型胶原蛋白是真皮细胞外基质的主要成分之一，在婴儿和青少年皮肤中，I型胶原蛋白的含量约占70%，而III型胶原蛋白占30%；皮肤皱纹的出现与胶原蛋白的正常合成和表达密切相关。人真皮成纤维细胞可以作为研究化妆品提升I和III型胶原含量的细胞模型，通过测定空白对照和样品给药后，I和III型胶原含量的上调率，评价供试品在促进胶原蛋白合成方面是否具有功效。

【实验步骤】

实验一：MTT法检测样品对人成纤维细胞的细胞毒性实验

1）细胞接种：接种细胞于96孔板内（1 × 10^4个/孔），于37 ℃，5% CO2中培养24 h。

2）给药：样品组加入相应浓度的含样品的培养基，正常对照组更换为新鲜培养基，空白组加入空白培养基，37 ℃，5% CO2孵育24 h。

3）孵育结束后向每孔中加入MTT溶液，继续培养4 h。

4）去培养液，加入DMSO溶液，振荡混匀，测定490 nm处吸光度值。

OD490：490 nm处的吸光度值

实验二：I和III型胶原蛋白表达测定实验

细胞接种：将细胞接种96孔平板， 2×10^4个细胞/孔（37℃、5%CO2、），培养24h。

给药：弃掉96孔板中的培养液，开展给药操作。样品组加入含有样品的培养液，对照组加入不含样品的细胞培养液，每孔200 μL。给药完毕后将96孔板放置在培养箱中（37℃、5%CO2）培养24h±2h。

3）III型胶原蛋白检测：孵育结束之后收集细胞上清，使用人I和III型胶原酶联免疫试剂盒进行I和III型胶原蛋白含量的测定。

【评价指标】

I和III型胶原蛋白含量

【评价结论】

在上述实验条件下，与空白对照相比，样品可以使
I和III型胶原蛋白的含量上调，且具有显著性差异（P<0.05），证明该供试品具有抗皱功效。

【参考文献】

[1] Chiang H M, Chen H C, Chiu H H, et al. Neonauclea reticulata (Havil.) Merr Stimulates Skin Regeneration after UVB Exposure via ROS Scavenging and Modulation of the MAPK/MMPs/Collagen Pathway[J]. Evidence-Based Complementray and Alternative Medicine, 2013(7):324864.

[2] Guo Q, Tian Q, Tian X, et al. Effect of Regulating the Expression of HSP47 on Collagen Metabolism in Scleral Fibroblasts[J]. Current Eye Research, 2020:1-9.

[3] Je Y J, Choi D K, Sohn K C, et al. Inhibitory role of Id1 on TGF- β -induced collagen expression in human dermal fibroblasts - ScienceDirect[J]. Biochemical & Biophysical Research Communications, 2014, 444(1):81-85.

项目二：基质金属蛋白酶及其抑制剂的的表达

【实验原理】

皮肤衰老是个复杂的过程，其伴随着含水量降低，新陈代谢减慢，免疫力下降等多个过程，皮肤衰老的特征是失去弹性、松弛、出现皱纹和粗糙的外观等。已有大量的研究证明，紫外线照射后诱导人类皮肤成纤维细胞产生基质金属蛋白酶 (MMPs) 增多，MMPs
降解胶原和细胞外基质蛋白，在皮肤光老化中起着重要作用。MMPs
是一类含有锌离子、活性依赖于钙离子的蛋白酶，具有广泛的生物学活性。已知的 MMPs 成员有 24
种，主要可分为胶原酶 (MMP-1，8，13) 、基质溶解素(MMP-3，7，10，11) 、明胶酶 (MMP-2，9)
等亚家族，不同的 MMPs
对细胞外基质不同组分降解的特异性有所不同。人基质金属蛋白酶抑制剂（TIMPs）是 MMPs
天然的特异性内源性抑制剂，TIMPs 与 MMPs 的精密平衡在 ECM 的合成和降解中发挥着重要作用，皮肤皱纹的形成是二者动态平衡失调的结果。因此，本研究拟用通过样品作用于皮肤成纤维细胞后，检测MMP-1和TIMP-1的表达来评价样品的抗皱功效。

【实验步骤】

1）细胞接种：将成纤维细胞以2 × 10^5个/孔接种于6孔板，于培养箱（37℃、5%CO2）中培养12

h，分别设置正常对照组（0 mJ/cm2+0 mM样品）、模型对照组（5 J/cm2+0 mM样品）、UVA照射低浓度组（5 J/cm2+A mM样品）、UVA照射中浓度组（5 J/cm2 +B mM样品）、UVA照射高浓度组（5 J/cm2 + C mM样品）。

2）造模：UVA 造模：UVA 辐射前成纤维细胞用 D ’ Hanks 洗 3 遍，在孔中加入 1 ml D ’ Hanks，使之浸没细胞，正常对照组用锡纸包住置暗处。针对试验分组，对需要辐射的组分别进行UVA造模；

3）给药：按照各试验组分组，每次照射完成后进行给药处理培养24 h；

4）收样：培养结束后，进行细胞收样，提取各实验组总RNA，合成cDNA，利用q-PCR检测β-actin和目的基因的基因表达。

5）用β-actin作为基因表达的内参，计算目的基因的RNA相对表达量。

注：本实验方法中的样品的浓度因实验一结果而定。

【评价指标】MMP-1和TIMP-1相对表达量

【评价结论】

与模型对照组相比，实验组中样品对衰老细胞的基质金属蛋白酶相关基因表达（MMP-1）显著性下调、而其抑制基因（TIMP-1）显著性上调（P＜0.05），初步证明样品具有抗皱功效。

【参考文献】

[1]魏丽.柴达木黑果枸杞花青素对UVB辐射体外培养人皮肤成纤维细胞的衰老及p53,p21影响的研究[D].青海大学

[2] Kulms D, Zeise E , P, Ppelmann B , et al. DNA damage, death receptor activation and reactive oxygen species contribute to ultraviolet radiation-induced apoptosis in an essential and independent way.[J]. Oncogene, 2002, 21(38): 5844-5851.

[3] 刘春显,李南.人参皂苷Rb1对人体皮肤成纤维细胞衰老的影响[J].人参研究, 2022, 34(4):4.

[4] 林勇, 刘硕, 朱华伟,等. 红树莓对UVB诱导HaCaT光损伤的抑制作用[J]. 湖南农业大学学报(自科版), 2015, 041(005): 474-479.

[5] 冯丹, 刘婷, 李冠汝,等. 蒿秦化斑方对紫外线B诱导的HaCaT细胞光损伤的影响[J]. 环球中医药, 2020, 13(5): 6.

[6]陈巧云,王业秋,陈景华,等.桃叶珊瑚苷对光老化皮肤成纤维细胞MMP-1和TIMP-1表达的影响[J].中成药, 2014, 36(8):5.