ICS 71.100.70
CCS Y42

T/GDICST

广东省化妆品科学技术研究会团体标准

T/GDICST XXXX—XXXX

化妆品控油功效测试-基于亚油酸刺激皮脂腺细胞模型的体外检测方法

Oil-Control Efficacy Test of Cosmetics - In Vitro Detection Method Based on Linoleic Acid-Stimulated Sebocyte Model

（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
引言 III
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
4.1　控油功效原理 1
4.2　胞内脂质含量测定原理 1
5　试验材料 2
5.1　细胞系 2
5.2　仪器设备与耗材 2
5.3　试剂 2
5.4　试剂制备 2
6　试验方法 4
6.1　基本要求 4
6.2　细胞制备 4
6.3　脂质合成抑制试验 4
7　结果计算 4
7.1　胞内相对脂质含量 4
7.2　脂质抑制率 5
7.3　试验有效性验证 5
8　结果评价 5
9　试验报告 5
附录A（资料性）　细胞培养基及冻存液配方 6
附录B（规范性）　细胞维护和培养程序 7
附录C（资料性）　人皮脂腺细胞SZ95 8
附录D（资料性）　荧光显微镜法检测皮脂腺细胞脂质积累 9
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。

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。

本文件由广东省化妆品科学技术研究会归口。

本文件起草单位：

本文件主要起草人：

引　言

皮脂是皮肤屏障的重要组成部分，适量的皮脂分泌对维持皮肤健康至关重要。然而，过度的皮脂分泌（油性皮肤）不仅影响美观，更是痤疮、脂溢性皮炎等多种皮肤疾病的核心致病因素。因此，开发安全有效的控油产品已成为化妆品及皮肤药学领域持续关注的热点。

体外功效评价是原料筛选和产品开发的关键环节。传统的动物实验存在伦理问题且与人类生理差异较大，而直接的人体试验虽直观，但周期长、成本高且受个体差异影响显著。因此，建立一种快速、可靠、与人体生理高度相关的体外预测模型至关重要。人皮脂腺细胞（如 SZ95 细胞系）的引入，为在体外研究皮脂腺生物学及脂质代谢提供了理想的工具。然而，目前在我国相关的国标、行标、团标和其他技术文件中尚未收录评估化妆品控油功效的体外测试方法。

基于此，本标准旨在建立并规范一种以亚油酸作为诱导剂，在人皮脂腺细胞中模拟过度皮脂分泌状态的体外方法。通过使用尼罗红荧光染料对细胞内合成的中性脂质进行特异性染色和定量，并结合二乙酸荧光素染色同步评估细胞活性，从而精准、定量地评价受试物抑制脂质合成的能力。本标准的制定，将为化妆品控油原料和产品的筛选、功效宣称提供统一、科学、可靠的体外检测依据，推动行业向标准化和规范化发展。

化妆品控油功效测试-基于亚油酸刺激皮脂腺细胞模型的体外检测方法

1 范围

本文件规定了亚油酸诱导人皮脂腺细胞 SZ95 脂质合成测试方法的原理、材料、试验方法、结果计算、质量控制、结果评价和报告。

本文件适用于具有控油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

《化妆品分类规则和分类目录》（国家药监局公告 2021 年第 49 号）

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

皮脂腺细胞 Sebocytes

皮脂腺细胞是构成皮脂腺的基本单位。皮脂主要通过皮脂腺细胞全浆分泌，其活动受多种激素（如雄激素）调控，生理状态下具有滋润皮肤、抗紫外线损伤等皮肤屏障功能，但皮脂大量、异常合成等皮脂代谢紊乱问题可能导致痤疮、脂溢性皮炎等皮肤疾病的发生。永生化人皮脂腺细胞 SZ95 具有正常皮脂腺细胞的生理病理特征，被认为是皮脂腺、皮脂分泌研究的一种理想细胞工具[1,2]。

3.2

亚油酸 Linoleic acid

亚油酸是一种ω-6 不饱和脂肪酸，作为 PPARγ的天然配体，通过激活 PPARγ信号通路刺激皮脂细胞分化，从而促进皮脂合成，因此常被用作体外诱导皮脂过度合成模型的诱导剂之一[2,3]。

4 试验原理

4.1 控油功效原理

在《化妆品分类规则和分类目录》中，控油功效被定义为“有助于减缓施用部位油脂分泌和沉积，或使施用部位出油现象不明显”。本试验采用了亚油酸诱导人皮脂腺细胞 SZ95 脂质合成这一典型模型进行控油功效评价，其具体原理为：亚油酸作为皮脂天然组分及 PPARγ受体激动剂，可激活脂质合成通路，诱导细胞脂质蓄积。采用亚油酸诱导人皮脂腺细胞 SZ95 脂质合成的经典细胞模型，通过对比模型对照组（仅亚油酸处理）和样品组（亚油酸+样品处理）的胞内脂质水平，以评估样品对皮脂合成的抑制作用，从而评价样品是否具有体外控油功效。

4.2 胞内脂质含量测定原理

试验采用尼罗红和二乙酸荧光素（FDA）染色法来评估胞内相对脂质含量，具体原理是：尼罗红能特异性标记胞内中性脂滴，通过荧光强度定量皮脂合成水平。而无荧光、脂溶性的 FDA 可自由进入细胞，被活细胞内的酯酶分解生成有荧光的荧光素并积累，从而使活细胞发出绿色荧光，荧光强度与细胞活力呈正相关。根据尼罗红和 FDA 染色后的荧光强度可计算得出胞内相对脂质含量。

5 试验材料

5.1 细胞系

人皮脂腺细胞 SZ95（RRID: CVCL_9803）。

5.2 仪器设备与耗材

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 ±0.1℃，二氧化碳浓度精度 ±0.1%；
——生物安全柜或层流洁净工作台；
——恒温水浴箱：温度精度 ±0.1 ℃；
——倒置显微镜；
——多功能酶标仪；
——电子天平：精度 0.00001 g；
——低速离心机；
——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 ℃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 孔黑壁透明底细胞培养板，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；
——胎牛血清；
——0.25%胰蛋白酶-EDTA；
——人表皮生长因子（h-EGF）；
——磷酸盐缓冲液（PBS）；
——青霉素/链霉素；
——二甲基亚砜（DMSO）；
——亚油酸（CAS 号：60-33-3）；
——克拉司酮（CAS 号：19608-29-8）；
——尼罗红（CAS 号：7385-67-3）；
——二乙酸荧光素（FDA，CAS 号：596-09-8）。

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%（v/v）胎牛血清、100 Units/mL 青霉素、100 μg/mL 链霉素的高糖 DMEM 培养基，可添加或不添加 5 ng/mL h-EGF。

5.4.2.4 试验培养基

含 10%（v/v）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 h-EGF 溶液

5.4.3.1 贮备液

称取 100 μg h-EGF 粉末于 100 μL 无菌水中，充分混匀溶解，不可涡旋。随后使用含有载体的无菌缓冲液（如含 5%海藻糖缓冲液）稀释至 5 μg/mL，按照 10 μL/支的规格进行分装，于-80 ℃保存，有效期 12 个月。

5.4.3.2 工作液

用细胞培养基将 5 μg/mL 的 h-EGF 贮备液稀释至 5 ng/mL 工作液，现配现用。

5.4.4 亚油酸溶液

5.4.4.1 贮备液

称取 28.045 mg 亚油酸于离心管中，用 DMSO 补足体积至 1 mL，并充分混匀溶解，即为 100 mM 亚油酸贮备液。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 ℃保存，有效期 6 个月。

5.4.4.2 工作液

用细胞培养基将 100 mM 亚油酸贮备液稀释至 100 μM 亚油酸工作液，现配现用。具体给药浓度可根据各实验室培养细胞特性进行调整。

5.4.5 阳性对照物（克拉司酮溶液）

5.4.5.1 贮备液

称取 4.0252 mg 克拉司酮粉末于 1 mL DMSO 中，充分混匀溶解，即为 10 mM 克拉司酮贮备液。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 ℃保存，有效期 6 个月。

5.4.5.2 工作液

用细胞培养基将 10 mM 克拉司酮贮备液稀释至 10 μM 克拉司酮工作液，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。

5.4.6 尼罗红染色液

5.4.6.1 贮备液

称取 1 mg 尼罗红粉末于 1 mL DMSO 溶剂中，充分混匀溶解，按照 10 μL/支的规格进行分装，于-80 ℃保存，有效期 6 个月。

5.4.6.2 工作液

用细胞培养基将 1 mg/mL 尼罗红贮备液稀释至 10 μg/mL 尼罗红工作液，现配现用。具体染色浓度可根据各试验室培养细胞特性进行调整。

5.4.7 FDA 染色液

5.4.7.1 贮备液

称取 5 mg FDA 粉末于 1 mL DMSO 中，充分混匀溶解，按照 10 μL/支的规格进行分装，于-80 ℃保存，有效期 6 个月。

5.4.7.2 工作液

用细胞培养基将 5 mg/mL FDA 贮备液稀释至 15 μg/mL FDA 工作液，现配现用。具体染色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；选用复苏后第 3 代至第 20 代的细胞用于正式检测。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 40%～60%，正常细胞形态参见附录 C。

6.3 脂质合成抑制试验

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于适当的溶剂（如无水乙醇或 DMSO）中，其在细胞培养液中的终浓度（如 DMSO 体积分数≤0.5%，v/v）应对细胞无明显毒性作用。受试物浓度的选择应避免出现沉淀和浑浊，且无明显细胞毒性（细胞活力≥90%）。

6.3.2 细胞接种

将胰酶消化中止后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。用培养基稀释至细胞密度为 $1\sim2\times10^5$ cells/mL，再接种至黑壁透明底 96 孔细胞培养板中，每孔液量为 100 μL。接种结束后，将培养板置于 37 ℃和 5% CO^2 的二氧化碳培养箱中培养（24±2）h。

6.3.3 诱导及给药

弃掉 96 孔板中的培养基，样品组（TA）每孔加入待测浓度受试物和亚油酸工作液共孵育，每孔总体积为 100 μL。同时设置空白对照组（BC）、模型对照组（NC）和阳性对照组（PC）。其中，空白对照组仅加入试验培养基，模型对照组加入含 100 μM 亚油酸的试验培养基，阳性对照组每孔加入含 10 μM 克拉司酮和 100 μM 亚油酸的试验培养基。每组各 6 个及以上复孔。给药完毕后将 96 孔板置于 37 ℃和 5% CO^2 的二氧化碳培养箱中培养（48±2）h。

6.3.4 荧光染色

弃去培养基，用 PBS 洗涤 2～3 次。将平行复孔分为两组，分别进行尼罗红和 FDA 染色（例如，各取一半平行复孔分别单一染色），并于 CO_2培养箱中避光染色 10 min，再用 PBS 清洗 2～3 次，随后加入 100 μL PBS 覆盖细胞。

6.3.5 荧光检测

使用多功能酶标仪以激发波长 485 nm 发射波长 565 nm 检测尼罗红荧光强度，以激发波长 494 nm 发射波长 523 nm 检测 FDA 荧光强度。

注：尼罗红染色后可采用荧光显微镜或共聚焦显微镜观察的方法进行定性或半定量分析。具体操作见附录 D。

7 结果计算

7.1 胞内相对脂质含量

结果以尼罗红和 FDA 荧光强度的比值表示，并以空白对照组尼罗红和 FDA 的比值为 100%，计算各组的相对脂质含量。根据公式（2）计算胞内相对脂质含量，结果保留一位小数。

$$F = \frac{FI_{尼罗红}}{FI_{FDA}} \times 100\% \cdots\cdots (1)$$

式中：

$FI_{尼罗红}$ ——各实验组的尼罗红荧光强度。

FI_{FDA} ——各实验组的 FDA 荧光强度。

$$RLC(\%) = \frac{F}{F_{CONTROL}} \times 100\% \cdots\cdots (2)$$

式中：

RLC ——各实验组的胞内相对脂质含量；

F ——各实验组的尼罗红和 FDA 荧光强度比值；

$F_{CONTROL}$ ——空白对照组的尼罗红和 FDA 荧光强度比值。

7.2 脂质抑制率

根据公式（3）计算脂质抑制率，结果保留一位小数。

$$IR(\%) = \left(1 - \frac{RLC_{Sample}}{RLC_{Model}}\right) \times 100\% \cdots\cdots (3)$$

式中：

IR ——脂质抑制率，%；

RLC_{Sample} ——样品组的胞内相对脂质含量；

RLC_{Model} ——模型对照组的胞内相对脂质均值。

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；

——空白对照组相比，模型对照组的胞内脂质含量上调≥20%，且差异具有统计学意义（$p<0.05$）；

——阳性对照组的脂质抑制率≥20%，且与模型对照组间的差异具有统计学意义（$p<0.05$）；

——计算并统计测得的各组复孔间胞内脂质含量的标准差（Standard Deviation, SD），并计算变异系数（Coefficient of Variation, C.V），C.V 值≤20%。

8 结果评价

在试验满足有效性验证的基础上，评价受试物对脂质合成的抑制能力。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，若样品组的胞内脂质水平减少，且差异具有统计学意义（$p<0.05$），则提示该受试物在相应浓度下具有抑制皮脂腺细胞脂质合成的潜力，可作为控油功效评价的参考依据之一。

9 试验报告

试验报告应包括以下信息：

——胞内相对脂质水平：应表述为平均值 ± 标准差（SD）；

——受试物（样品）抑制脂质合成的浓度；

——试验日期；

——报告日期；

——样品信息；

——结果评价。

附 录 A
（资料性）
细胞培养基及冻存液配方

表A.1 高糖DMEM培养基配方

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
维生素	氯化胆碱	4
	D-泛酸钙	4
	叶酸	4
	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
其他	无水葡萄糖	4500
	酚红	15
	丙酮酸钠	110

表A.2 细胞冻存液配方

组分名称	规格要求	含量（v/v）	作用说明
DMSO	纯度≥99.9%，无菌	10%	渗透性保护剂
胎牛血清（FBS）	内毒素≤5 EU/mL，无菌	40%	蛋白质保护剂
DMEM基础培养基	无菌	50%	基础液

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 1 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% CO_2 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% CO_2 的二氧化碳培养箱中培养，当细胞达到 80%融合时，用胰酶消化，随后用常规培养基中止反应，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 1:2～1:3 比例传代，将培养瓶/皿置于 37 ℃和 5% CO_2 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（1.0×10^6～5.0×10^6）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）
人皮脂腺细胞 SZ95

C.1　人皮脂腺细胞 SZ95

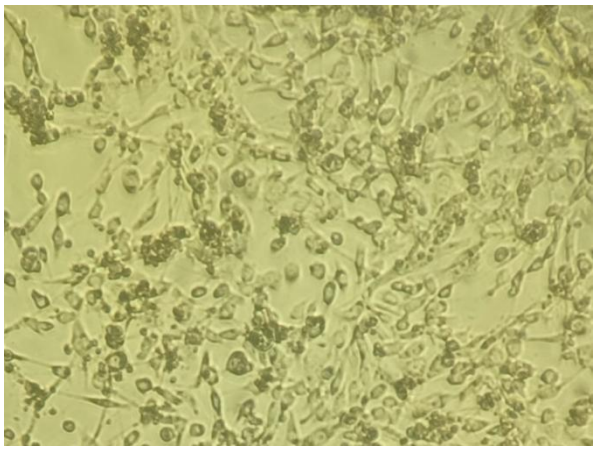

图 C.1 正常人皮脂腺细胞 SZ95 在 10×物镜下的显微图像

附 录 D
（资料性）
荧光显微镜法检测皮脂腺细胞脂质积累

D.1 范围

本附录提供了尼罗红染色后皮脂腺细胞的荧光显微镜观察方法，供参考使用。

D.2 仪器要求

荧光显微镜应配备 TRITC 等红色荧光通道，激发波长约为 540～560 nm，发射波长为≥590 nm。

D.3 操作步骤

使用 PBS 洗涤细胞 1～2 次，并用 4%甲醛在室温下固定 15 min。再用 PBS 洗涤 2～3 次，随后用 1～10 μg/mL 尼罗红工作液染色 15～30 min。用 PBS 洗涤 2～3 次，用 PBS 覆盖或滴加含有抗淬灭剂的封片液。使用荧光显微镜拍照时，需在同一曝光参数下采集各组的荧光图像（保持曝光时间、增益一致），并尽可能降低荧光显微镜的激发光强度，缩短拍照时间。

D.4 结果处理与分析

使用在 ImageJ 或 Image Pro Plus 软件量化荧光强度，并根据细胞数量进行归一化。

参 考 文 献

[1] 张曦,朱明芳,吴淑辉,等. 基于 TRPV1/AMPK 通路探讨石榴皮总多酚对亚油酸诱导的人皮脂腺细胞脂质合成的影响[J]. 中草药, 2023, 54(14):4538-4547.
[2] 沈胡驰,杨莉,陈殿松,等. 茶皂素的脱色及控油功效研究[J]. 日用化学工业, 2022(005):052.
[3] 叶枫,莫小辉,胡婷婷,等. Clascoterone 对 SZ95 人皮脂腺细胞增殖、脂质合成和炎症因子表达的影响[J]. 中国麻风皮肤病杂志, 2022, 38 (06): 349-354.
[4] Dániel Trcsik, Fazekas F, Szilárd Póliska, et al. Epidermal Growth Factor Modulates Palmitic Acid-Induced Inflammatory and Lipid Signaling Pathways in SZ95 Sebocytes [J].Frontiers in Immunology, 2021, 12:600017.
[5] Bisogno S , Gsior U , Ptak G E .Nile Red and BODIPY Staining of Lipid Droplets in Mouse Oocytes and Embryos[J].Methods in molecular biology (Clifton, N.J.), 2023, 2566:205-212.