

目 录

1 测试目的	2
2 测试材料	2
2.1 测试系统	2
2.2 主要试剂	2
2.3 主要设备	2
2.4 样品信息	2
3 细胞毒性测试	2
3.1 测试方法	2
3.2 测试结果	3
4 修护、保湿功效测试	5
4.1 测试方法	5
4.2 测试结果	6
4.2.1 组织形态测试结果	6
4.2.2 丝聚蛋白（FLG）测试结果	8
4.2.3 兜甲蛋白（LOR）测试结果	10
4.2.4 紧密连接蛋白 1（Claudin-1）测试结果	12
4.2.5 谷氨酰胺转移酶 1（TGM1）测试结果	14
5 结论	16

1 测试目的

本测试分为两部分：第一部分基于角质形成细胞，开展细胞毒性检测，确定样品在角质形成细胞上的给药浓度；第二部分采用十二烷基硫酸钠（SLS）刺激 3D 表皮皮肤模型（EpiKutis®），通过检测组织形态、丝聚蛋白（FLG）、兜甲蛋白（LOR）、紧密连接蛋白 1（Claudin-1）和谷氨酰胺转移酶 1（TGM1）含量的变化，评价待测样品的修护、保湿功效。

2 测试材料

2.1 测试系统

本测试所用 3D 表皮皮肤模型（EpiKutis®），批号：ES230503，由广东博溪生物科技有限公司提供。

2.2 主要试剂

KcGrowth 培养液（广东博溪生物）、EpiGrowth 培养液（广东博溪生物）、PBS（索莱宝）、MTT（Sigma）、DMSO（Sigma）、WY14643（Sigma）、二甲苯（国药）、苏木精（碧云天）、伊红（碧云天）、SLS（Sigma）、FLG 抗体（Abcam）、LOR 抗体（Abcam）、Claudin-1 抗体（Proteintech）、TGM1 抗体（Abcam）、多聚甲醛（Biosharp）。

2.3 主要设备

CO₂ 培养箱（Thermo, 150I）、超净工作台（苏州安泰, SW-CJ-1F）、倒置显微镜（Olympus, CKX53）、正置显微镜（Olympus, BX53）、荧光显微镜（Leica, DM2500）。

2.4 样品信息

表 1 样品信息

样品名称	产品类型	数量	规格	颜色和物理状态
丝心蛋白油海绵-白池花籽油 40	原料	1 瓶	10g/瓶	白色乳液
丝心蛋白+白池花籽油混悬液	原料	1 瓶	10g/瓶	浅色分层液体

3 细胞毒性测试

3.1 测试方法

1) 细胞接种：复苏细胞后，待铺板率达到 60%左右时，接种细胞至 96 孔板，CO₂ 培养箱（37℃、5%CO₂）中孵育过夜。

2) 试验分组：试验设置调零组、溶剂对照组、阳性对照组与样品组。样品组中，每个样品设置 8 个浓度梯度，每个浓度梯度下设置 3 个重复孔。

3) 配液：按测试浓度设定表（表 2）配制不同浓度的样品工作液。

表 2 测试浓度设定表

样品名称	浓度梯度（%，v/v）							
	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧
丝心蛋白油海绵-白池花籽油 40	0.0781	0.1563	0.3125	0.625	1.25	2.5	5	10
丝心蛋白+白池花籽油混悬液	0.0781	0.1563	0.3125	0.625	1.25	2.5	5	10

4) 给药：待 96 孔板中细胞铺板率达到 50%~60%时进行给药。溶剂对照组每孔加入 200 μ L 培养液；阳性对照组每孔加入 200 μ L 含 10%DMSO 的培养液；样品组每孔加入 200 μ L 含有相应浓度待测样品的培养液；调零组无细胞接种，仅加入 200 μ L 细胞培养液。给药完成后将 96 孔板放置在 CO₂ 培养箱（37℃、5%CO₂）中培养 24h。

5) 检测：细胞孵育培养 24h 后，弃掉上清，加入 MTT 工作液（0.5mg/mL），37℃避光孵育 4h，孵育结束后，弃掉上清，每孔加 150 μ L DMSO，在 490nm 处读取 OD 值。

6) 细胞相对活力计算：细胞相对活力（%）= $\frac{\text{样品孔 OD}-\text{调零孔 OD}}{\text{溶剂对照孔 OD}-\text{调零孔 OD}} \times 100\%$ 。

3.2 测试结果

表 3 样品丝心蛋白油海绵-白池花籽油40 MTT检测结果

细胞活力	浓度梯度（%，v/v）								PC	Control
	0.0781	0.1563	0.3125	0.625	1.25	2.5	5	10	10%DMSO	/
Mean	100.10%	97.68%	94.79%	91.75%	88.13%	79.39%	60.57%	52.17%	0.82%	100.00%
SD	4.14%	6.59%	6.63%	4.27%	0.60%	2.14%	2.52%	2.57%	0.33%	0.74%

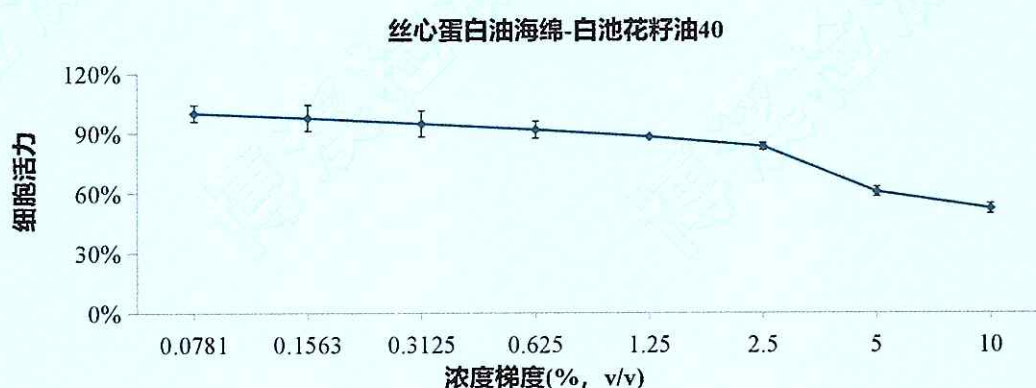


图 1 样品丝心蛋白油海绵-白池花籽油 40 细胞活力曲线图

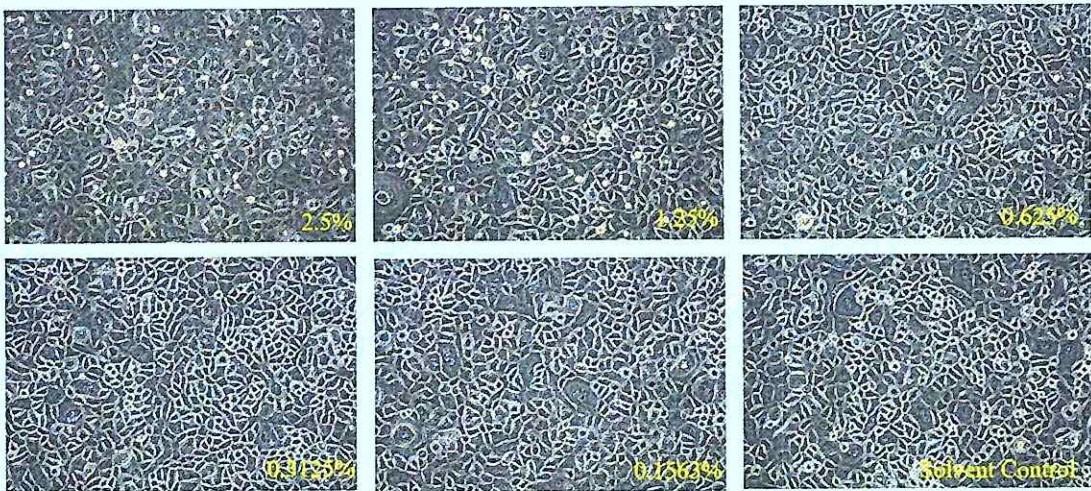


图 2 样品丝心蛋白油海绵-白池花籽油 40 细胞形态学图

根据 MTT 和形态学结果,认为样品丝心蛋白油海绵-白池花籽油 40 基于角质形成细胞,在 0.625% (v/v) 的浓度范围内未表现出明显的细胞毒性。

表 4 样品丝心蛋白+白池花籽油混悬液MTT检测结果

细胞活力	浓度梯度 (% , v/v)								PC	Control
	0.0781	0.1563	0.3125	0.625	1.25	2.5	5	10	10%DMSO	/
Mean	93.15%	91.12%	88.95%	87.07%	84.51%	80.98%	75.29%	62.16%	0.82%	100.00%
SD	1.51%	1.26%	2.13%	1.76%	6.23%	4.67%	2.93%	0.25%	0.33%	0.74%

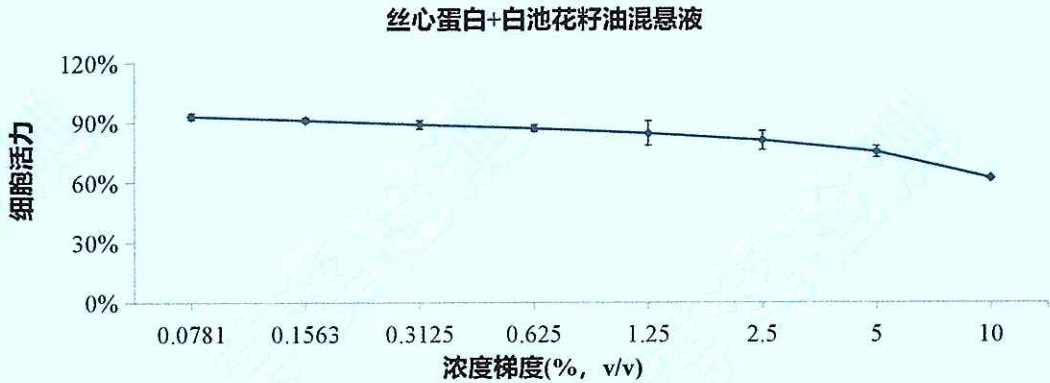


图 3 样品丝心蛋白+白池花籽油混悬液细胞活力曲线图

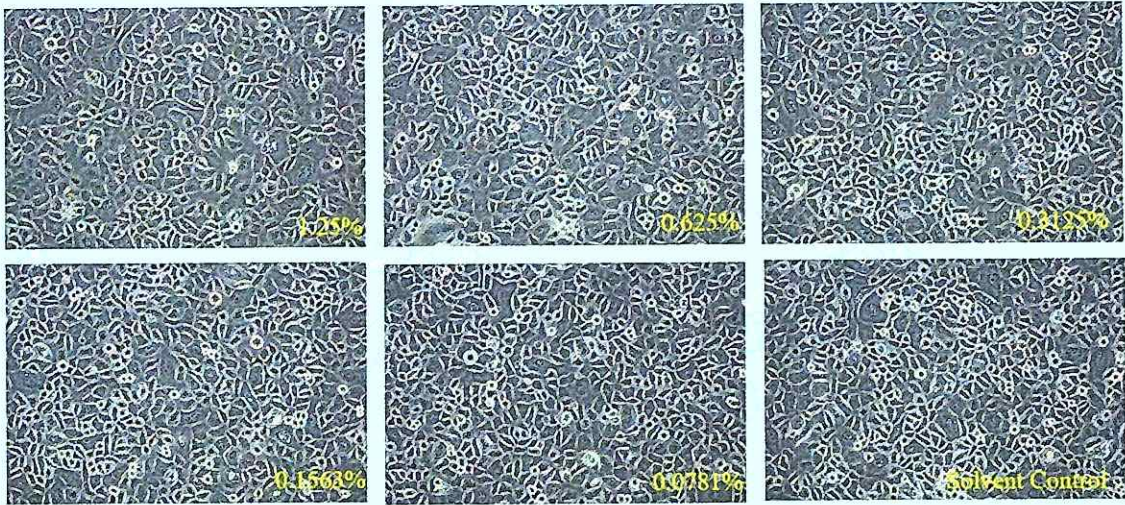


图 4 样品丝心蛋白+白池花籽油混悬液细胞形态学图

根据 MTT 和形态学结果，认为样品丝心蛋白+白池花籽油混悬液基于角质形成细胞，在 0.1563% (v/v) 的浓度范围内未表现出明显的细胞毒性。

4 修护、保湿功效测试

4.1 测试方法

4.1.1 测试分组

表 5 测试分组

组别	样品名称	给药浓度	刺激条件	检测模型	检测指标	检测方法
空白对照 (BC)	/	/	/			
阴性对照 (NC)	/	/			1. 组织形态	
阳性对照 (PC)	WY14643	50μM			2. FLG、LOR、	1. H&E
样品组	丝心蛋白油海绵-	7% (v/v) 、	SLS	EpiKutis®	Claudin-1、	2. 免疫荧光
	白池花籽油 40	20% (v/v)				
	丝心蛋白+白池花	7% (v/v)				
	籽油混悬液				TGM1	

4.1.2 工作液配制

1) 0.1%SLS 工作液配置：称取 0.006g SLS 溶于 6mL PBS 溶液中，0.22μm 过滤，配制成 0.1%SLS 工作液，备用。

2) 阳性对照组 (50μM WY14643) 工作液配置：吸取 10μL 30mM WY14643 母液溶于 6mL 培养液中，配置成 50μM WY14643。

4.1.3 模型给药

1) 根据表 5 测试分组，将模型转移到 6 孔板中（提前添加 0.9mL EpiGrowth 培养液），在 6 孔板

上标注测试组编号。

2) NC 组、PC 组和样品组表面添加 25 μ L 0.1% 的 SLS 溶液，孵育 30min。

3) 孵育结束后，PC 组液下添加相应浓度的工作液，样品组将样品工作液均匀分布于模型表面，置于 CO₂ 培养箱（37℃、5%CO₂）中孵育 24h。

4) 孵育结束后，用无菌 PBS 溶液清洗模型表面残留的受试物，用无菌棉签拭去模型内、外残留液体。

4.1.4 组织形态测试

取用于组织形态检测的模型环切取下，用 4% 的多聚甲醛进行固定处理，固定 24h 后，进行 H&E 染色检测，显微镜下拍照观察，采集图片并分析。

4.1.5 免疫荧光测试

取用于检测的模型环切取下，用 4% 的多聚甲醛进行固定处理，固定 24h 后，进行免疫荧光检测，显微镜下拍照观察，采集图片并分析。

4.1.6 提升率计算

$$\text{提升率}(\%) = \frac{\text{样品组} - \text{阴性对照组}}{\text{阴性对照组}} \times 100\%。$$

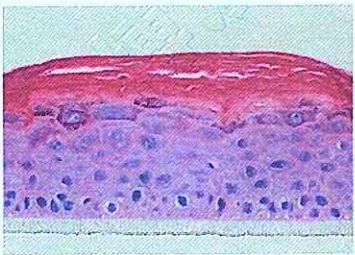
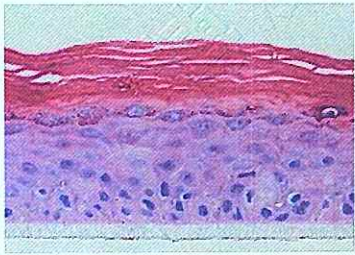
4.1.7 结果统计分析

应用 GraphPad Prism 作图，结果表示为 Mean $\pm$ SD。各组间比较采用 *t*-test 统计分析。统计分析均为双尾。*P*<0.05 认为具有显著差异，*P*<0.01 认为具有极显著差异。

4.2 测试结果

4.2.1 组织形态测试结果

表 6 组织形态结果汇总表

组别	重复 1	重复 2	重复 3
BC			

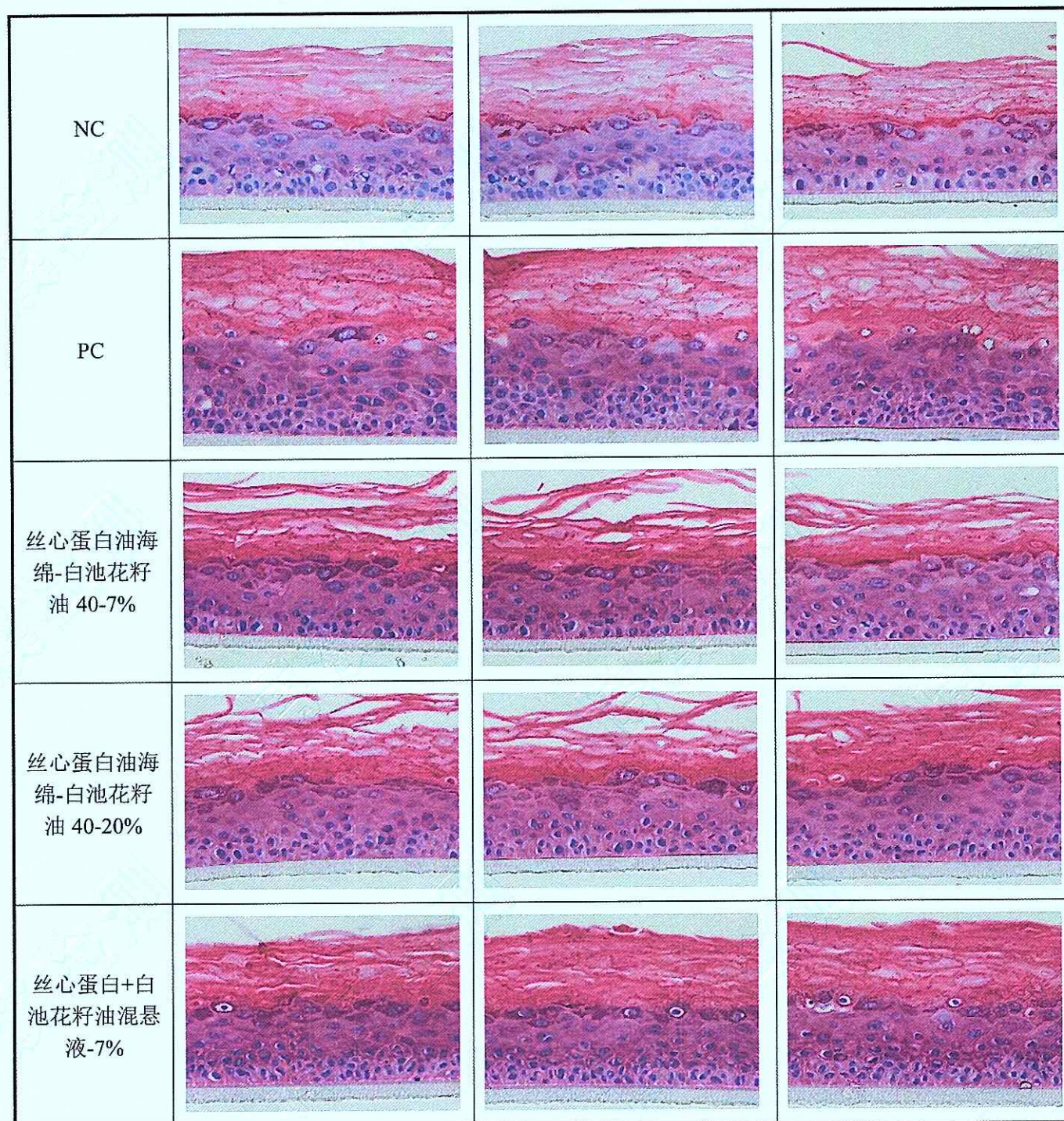


表 7 表皮活细胞层厚度数据结果汇总表

组别	平均厚度 (μm)	SD	P-value	提升率 (vs NC)
BC	101.28	2.46	/	/
NC	74.97	4.60	0.001##	/
PC	93.88	4.68	0.008**	/
丝心蛋白油海绵-白池花籽油 40-7%	84.68	0.38	0.022*	12.95%
丝心蛋白油海绵-白池花籽油	86.98	5.31	0.041*	16.02%

油 40-20%				
丝心蛋白+白池花籽油混悬液-7%	88.03	1.78	0.010*	17.42%

备注：用 *t*-test 方法进行统计分析时，与 BC 组相比，显著性以#表示，*P*-value<0.05 表示为#，*P*-value<0.01 表示为##；与 NC 组相比，显著性以*表示，*P*-value<0.05 表示为*，*P*-value<0.01 表示为**。

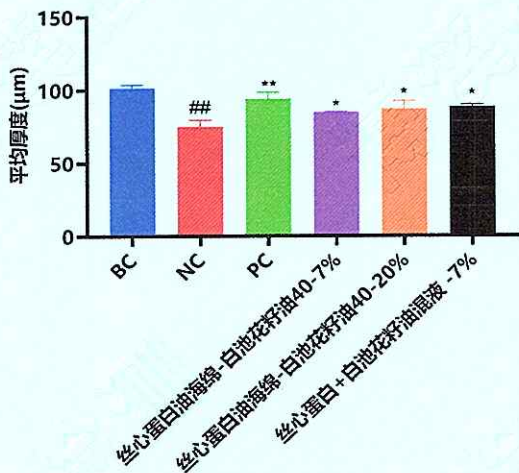


图 5 表皮活细胞层厚度数据结果柱状图

与 BC 组相比，NC 组的表皮活细胞层厚度显著下降，说明本次测试刺激条件有效。

与 NC 组相比，PC 组的表皮活细胞层厚度显著上升，说明本次测试阳性对照有效。

与 NC 组相比，样品丝心蛋白油海绵-白池花籽油 40-7%、丝心蛋白油海绵-白池花籽油 40-20%、丝心蛋白+白池花籽油混悬液-7%的表皮活细胞层厚度均显著上升，提升率分别为 12.95%、16.02%、17.42%。

4.2.2 丝聚蛋白（FLG）测试结果

表 8 FLG免疫荧光结果汇总表

组别	重复 1	重复 2	重复 3
BC			

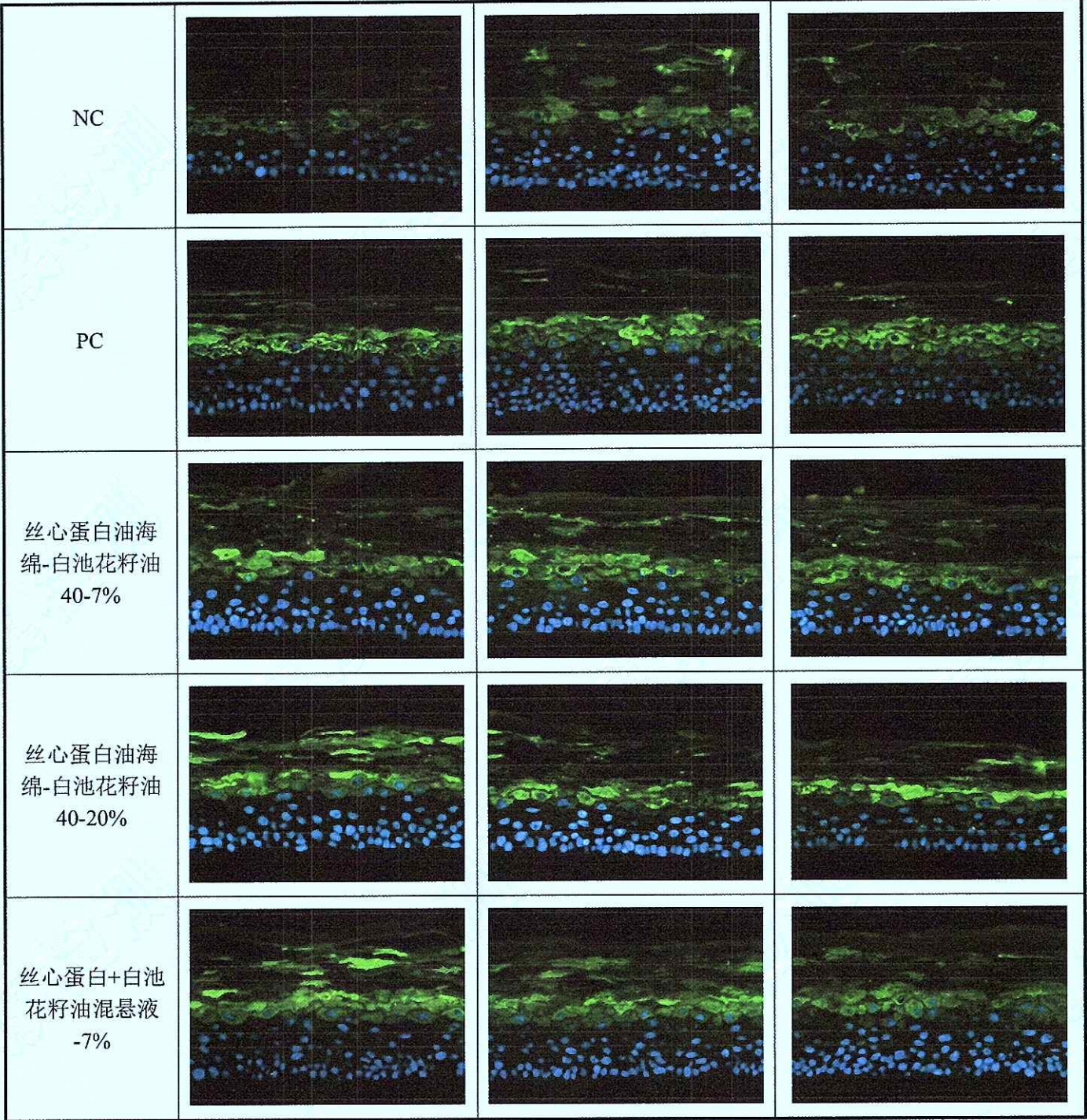


表 9 FLG 免疫荧光分析结果汇总表

组别	相对 IOD 平均值	SD	P-value	提升率 (vs NC)
BC	1.00	0.21	/	/
NC	0.33	0.02	0.005 ##	/
PC	0.98	0.07	0.000 **	/
丝心蛋白油海绵-白池花籽油 40-7%	0.60	0.08	0.005 **	81.82%
丝心蛋白油海绵-白池花籽油混悬液 -7%	0.76	0.12	0.003 **	130.30%

花籽油 40-20%				
丝心蛋白+白池花籽油混悬液-7%	0.71	0.06	0.000 **	115.15%

备注：积分光密度（IOD），其数值反映 FLG 的含量。用 *t*-test 方法进行统计分析时，与 BC 组相比，显著性以#表示，*P*-value<0.05 表示为#，*P*-value<0.01 表示为##；与 NC 组相比，显著性以*表示，*P*-value<0.05 表示为*，*P*-value<0.01 表示为**。

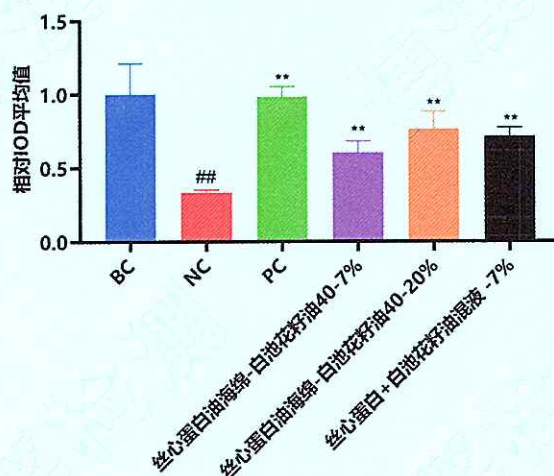


图 6 FLG 相对积分光密度（IOD）值柱状图

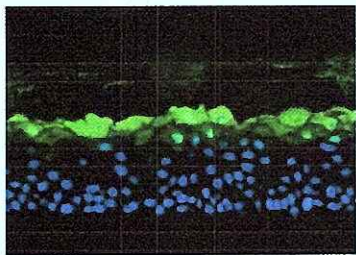
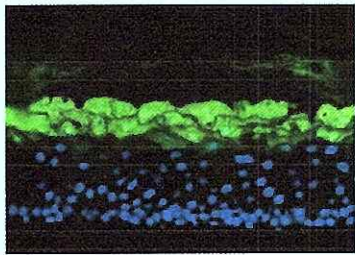
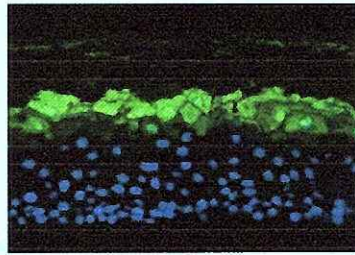
与 BC 组相比，NC 组的 FLG 含量显著下降，说明本次测试刺激条件有效。

与 NC 组相比，PC 组的 FLG 含量显著上升，说明本次测试阳性对照有效。

与 NC 组相比，样品丝心蛋白油海绵-白池花籽油 40-7%、丝心蛋白油海绵-白池花籽油 40-20%、丝心蛋白+白池花籽油混悬液-7%的 FLG 含量均显著上升，提升率分别为 81.82%、130.30%、115.15%。

4.2.3 兜甲蛋白（LOR）测试结果

表 10 LOR免疫荧光结果汇总表

组别	重复 1	重复 2	重复 3
BC			

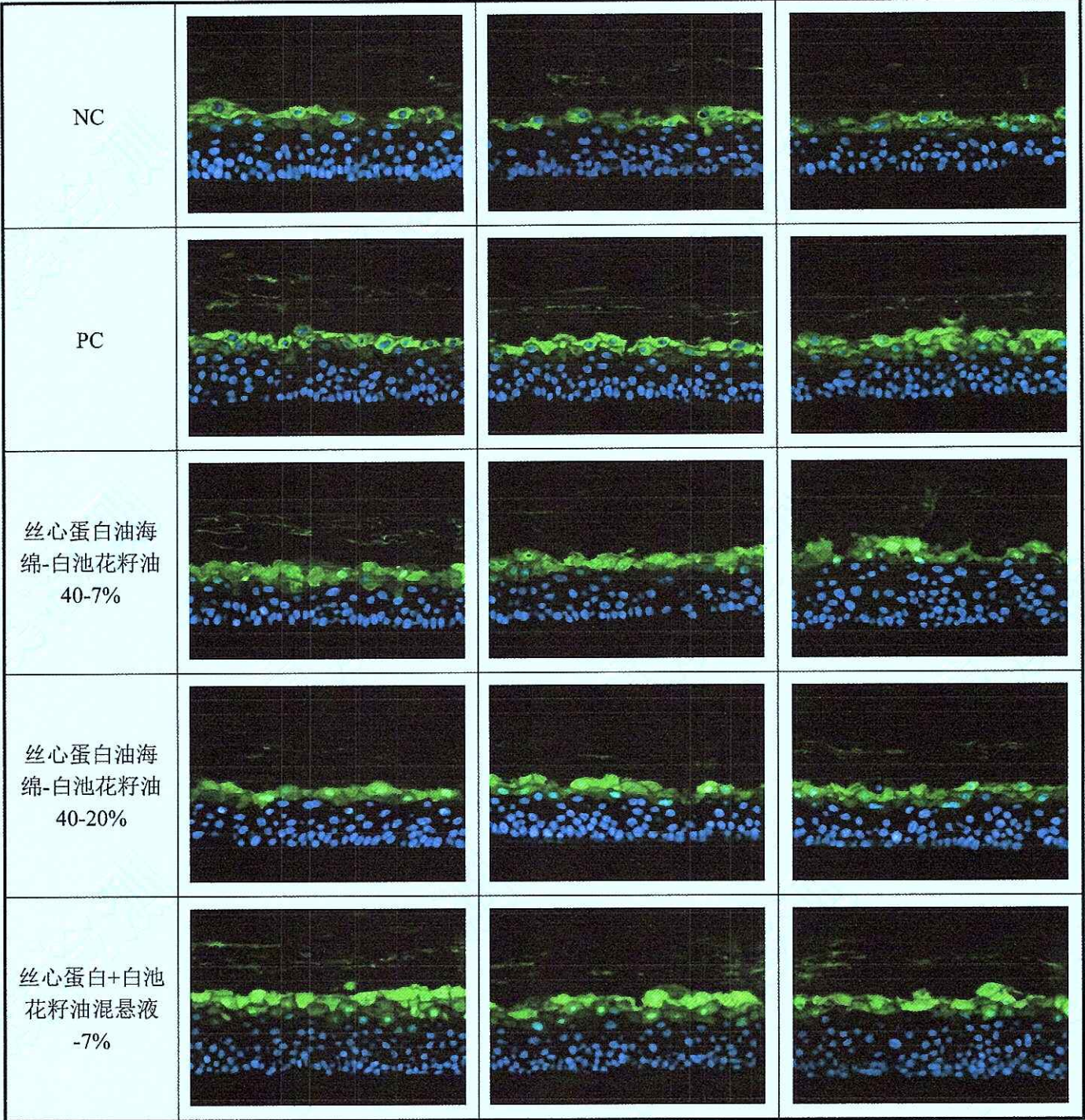


表 11 LOR 免疫荧光分析结果汇总表

组别	相对 IOD 平均值	SD	P-value	提升率 (vs NC)
BC	1.00	0.16	/	/
NC	0.49	0.04	0.006##	/
PC	0.76	0.06	0.004**	/
丝心蛋白油海绵-白池 花籽油 40-7%	0.65	0.02	0.005**	32.65%
丝心蛋白油海绵-白池	0.74	0.07	0.006**	51.02%

花籽油 40-20%				
丝心蛋白+白池花籽				
油混悬液-7%	0.85	0.05	0.001**	73.47%

备注：积分光密度（IOD），其数值反映 LOR 的含量。用 *t*-test 方法进行统计分析时，与 BC 组相比，显著性以#表示，*P*-value<0.05 表示为#，*P*-value<0.01 表示为##；与 NC 组相比，显著性以*表示，*P*-value<0.05 表示为*，*P*-value<0.01 表示为**。

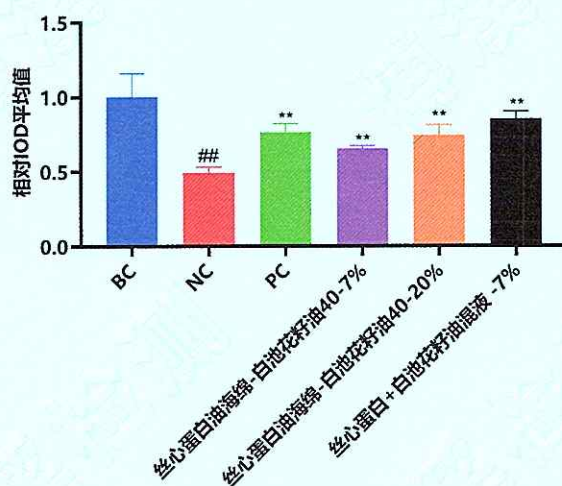


图 7 LOR 相对积分光密度（IOD）值柱状图

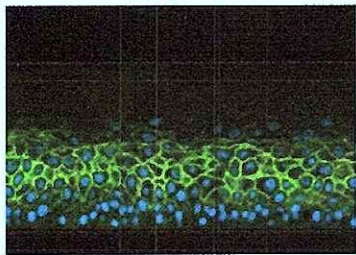
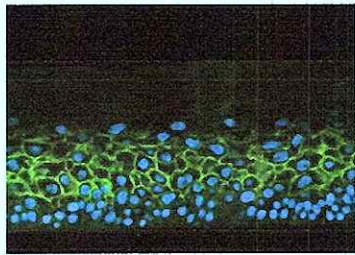
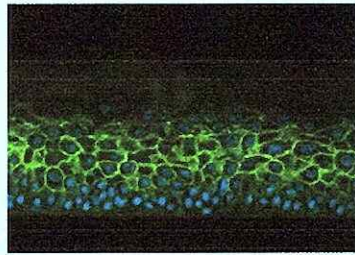
与 BC 组相比，NC 组的 LOR 含量显著下降，说明本次测试刺激条件有效。

与 NC 组相比，PC 组的 LOR 含量显著上升，说明本次测试阳性对照有效。

与 NC 组相比，样品丝心蛋白油海绵-白池花籽油 40-7%、丝心蛋白油海绵-白池花籽油 40-20%、丝心蛋白+白池花籽油混悬液-7%的 LOR 含量均显著上升，提升率分别为 32.65%、51.02%、73.47%。

4.2.4 紧密连接蛋白 1（Claudin-1）测试结果

表 12 Claudin-1 免疫荧光结果汇总表

组别	重复 1	重复 2	重复 3
BC			

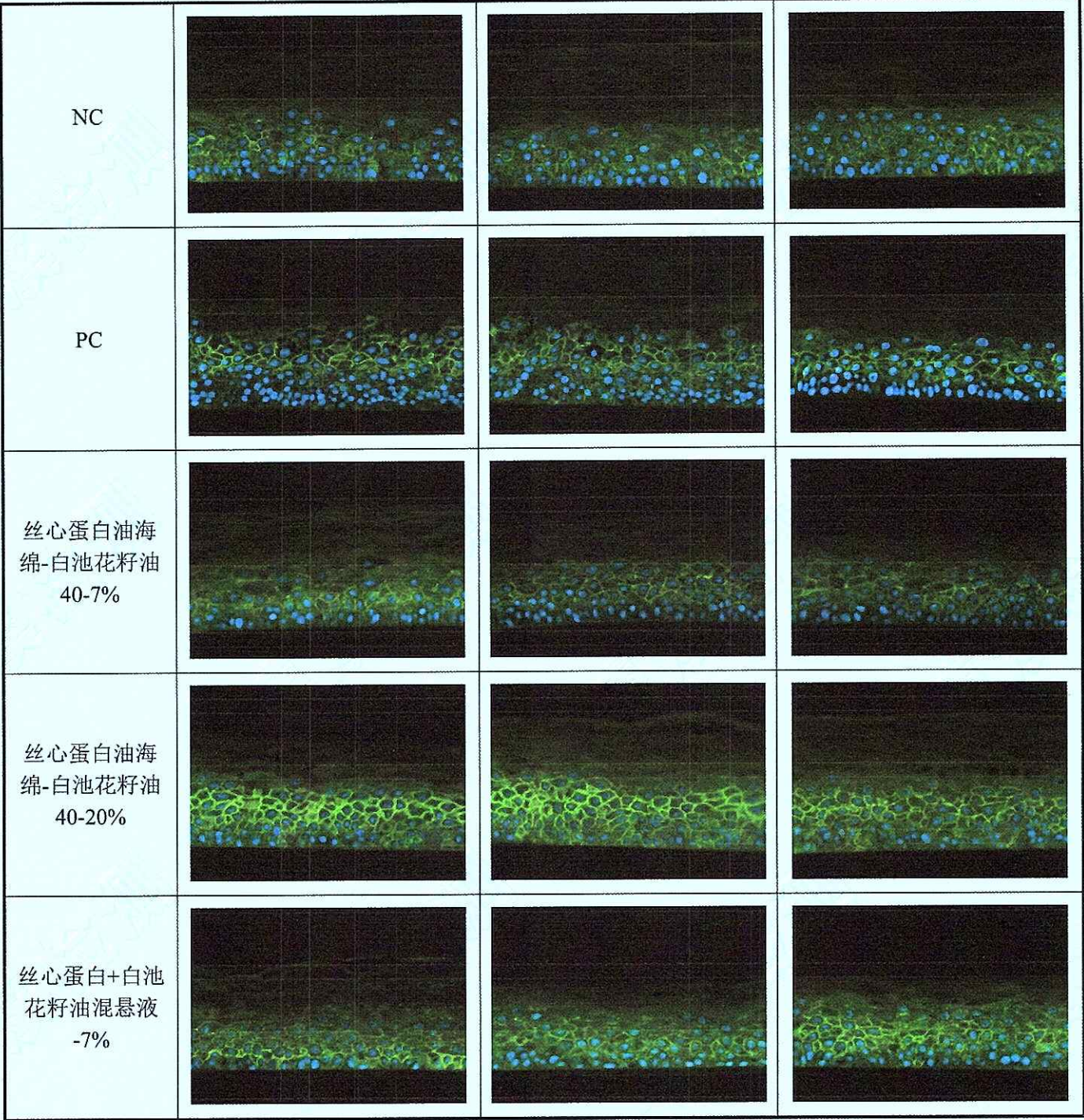


表 13 Claudin-1 免疫荧光分析结果汇总表

组别	相对 IOD 平均值	SD	P-value	提升率 (vs NC)
BC	1.00	0.08	/	/
NC	0.23	0.02	0.000 ##	/
PC	0.54	0.05	0.001 **	/
丝心蛋白油海绵-白池 花籽油 40-7%	0.32	0.03	0.015 *	39.13%
丝心蛋白油海绵-白池	0.76	0.04	0.000 **	230.43%

花籽油 40-20%				
丝心蛋白+白池花籽				
油混悬液-7%	0.55	0.09	0.004 **	139.13%

备注：积分光密度（IOD），其数值反映 Claudin-1 的含量。用 *t*-test 方法进行统计分析时，与 BC 组相比，显著性以#表示，*P*-value<0.05 表示为#，*P*-value<0.01 表示为##；与 NC 组相比，显著性以*表示，*P*-value<0.05 表示为*，*P*-value<0.01 表示为**。

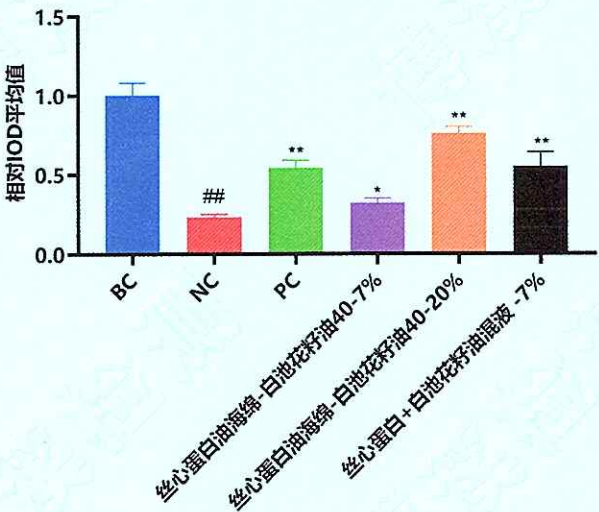


图 8 Claudin-1 相对积分光密度（IOD）值柱状图

与 BC 组相比，NC 组的 Claudin-1 含量显著下降，说明本次测试刺激条件有效。

与 NC 组相比，PC 组的 Claudin-1 含量显著上升，说明本次测试阳性对照有效。

与 NC 组相比，样品丝心蛋白油海绵-白池花籽油 40-7%、丝心蛋白油海绵-白池花籽油 40-20%、丝心蛋白+白池花籽油混悬液-7%的 Claudin-1 含量均显著上升，提升率分别为 39.13%、230.43%、139.13%。

4.2.5 谷氨酰胺转移酶 1（TGM1）测试结果

表 14 TGM1免疫荧光结果汇总表

组别	重复 1	重复 2	重复 3
BC			

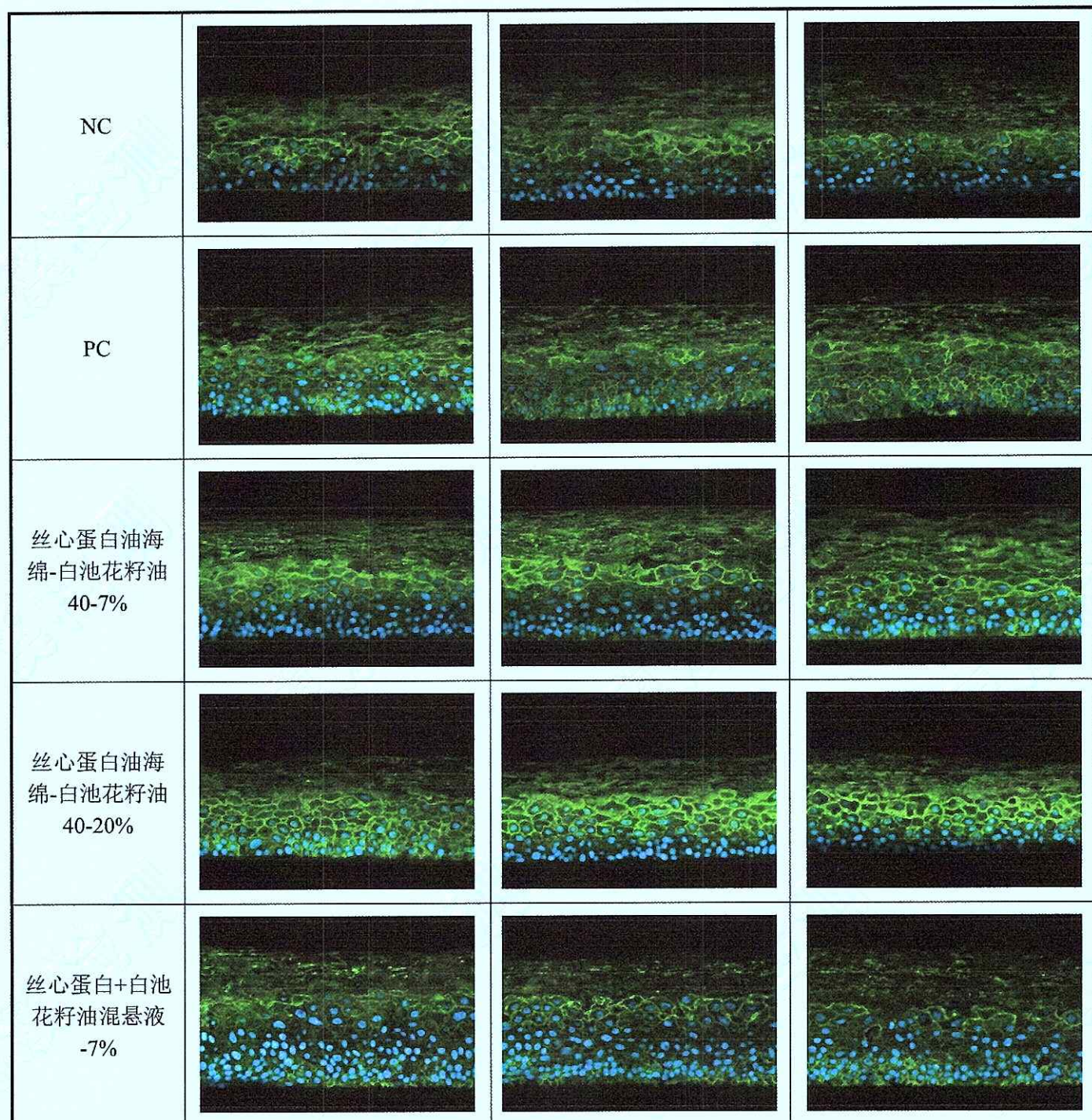


表 15 TGM1 免疫荧光分析结果汇总表

组别	相对 IOD 平均值	SD	P-value	提升率 (vs NC)
BC	1.00	0.05	/	/
NC	0.66	0.07	0.003##	/
PC	0.92	0.02	0.004**	/
丝心蛋白油海绵-白池花 籽油 40-7%	1.15	0.10	0.002**	74.24%
丝心蛋白油海绵-白池花	1.21	0.08	0.001**	83.33%

籽油 40-20%				
丝心蛋白+白池花籽油混悬液-7%	0.66	0.18	0.992	/

备注：积分光密度（IOD），其数值反映 TGM1 的含量。用 *t*-test 方法进行统计分析时，与 BC 组相比，显著性以#表示，*P*-value<0.05 表示为#，*P*-value<0.01 表示为##；与 NC 组相比，显著性以*表示，*P*-value<0.05 表示为*，*P*-value<0.01 表示为**。

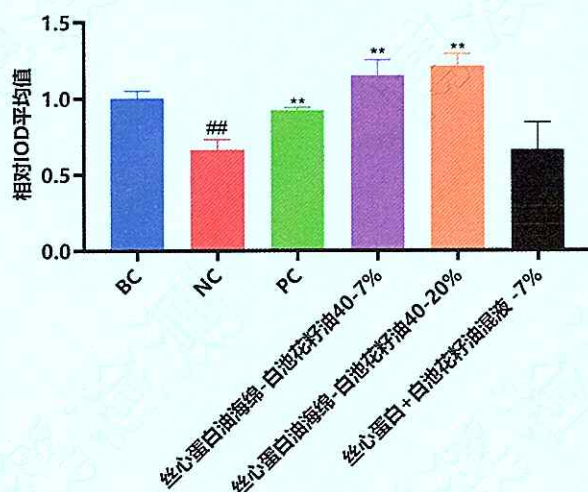


图 9 TGM1 相对积分光密度（IOD）值柱状图

与 BC 组相比，NC 组的 TGM1 含量显著下降，说明本次测试刺激条件有效。

与 NC 组相比，PC 组的 TGM1 含量显著上升，说明本次测试阳性对照有效。

与 NC 组相比，样品丝心蛋白油海绵-白池花籽油 40-7%、丝心蛋白油海绵-白池花籽油 40-20% 的 TGM1 含量均显著上升，提升率分别为 74.24%、83.33%。

5 结论

基于 3D 表皮皮肤模型（FulKutis®），与对照组相比，

样品丝心蛋白油海绵-白池花籽油 40 在 7%（v/v）、20%（v/v）浓度下的表皮活细胞层厚度均显著上升，提升率分别为 12.95%、16.02%，丝聚蛋白（FLG）含量均显著上升，提升率分别为 81.82%、130.30%，兜甲蛋白（LOR）含量均显著上升，提升率分别为 32.65%、51.02%，紧密连接蛋白 1（Claudin-1）含量均显著上升，提升率分别为 39.13%、230.43%，谷氨酰胺转移酶 1（TGM1）含量均显著上升，提升率分别为 74.24%、83.33%，说明样品在相应浓度下，能够改善组织形态，提升 FLG、LOR、Claudin-1 和 TGM1 含量，具有修护、保湿功效。

样品丝心蛋白+白池花籽油混悬液在 7%（v/v）浓度下的表皮活细胞层厚度显著上升，提升率为 17.42%，丝聚蛋白（FLG）、兜甲蛋白（LOR）和紧密连接蛋白 1（Claudin-1）含量均显著上升，提

升率分别为 115.15%、73.47%、139.13%，说明样品在该浓度下，能够改善组织形态，提升 FLG、LOR 和 Claudin-1 含量，具有修护、保湿功效。

(报告结束)

备注：此报告代替原报告 G730-2306226，原报告作废。

编制：

寇艳

审核：

段如艳

批准：

