



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 116004755 A

(43) 申请公布日 2023.04.25

(21) 申请号 202310005376.0

(22) 申请日 2023.01.04

(71) 申请人 广州市华代生物科技有限公司

地址 510530 广东省广州市黄埔区开源大道11号B3座906

(72) 发明人 程树军 宁雪萍 冯鉴鸿

(74) 专利代理机构 广州知友专利商标代理有限公司 44104

专利代理师 侯莉

(51) Int. Cl.

C12Q 1/02 (2006.01)

C12N 5/073 (2010.01)

C12N 5/0787 (2010.01)

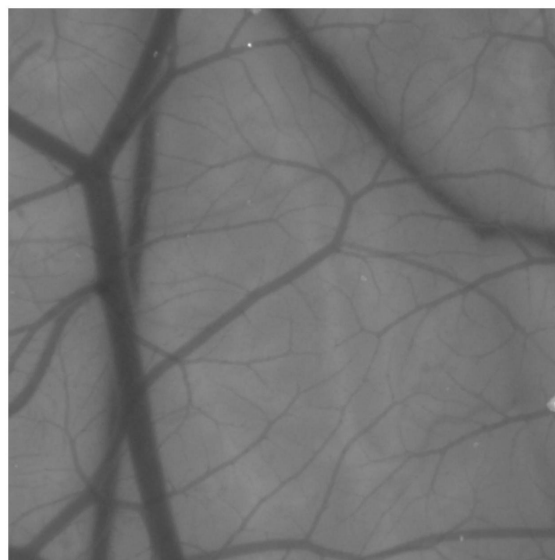
权利要求书2页 说明书8页 附图6页

(54) 发明名称

基于细胞因子刺激鸡胚血管生成的祛红评价模型构建方法

(57) 摘要

本发明公开了一种基于细胞因子刺激鸡胚血管生成的祛红评价模型构建方法:确定受试物安全浓度;细胞培养分为模型对照组、阴性对照组、阳性对照组和受试物组,孵育结束后收集上清液;对上清液进行细胞因子检测;选取血管快速生长期受精鸡胚,分为受试物组、阴性对照组、阳性对照组和模型对照组,记录绒毛尿囊膜血管分布情况;在绒毛尿囊膜中加入相应组别收集的上清液,孵育后,记录绒毛尿囊膜血管分布情况;血管分叉计数,计算血管生成率和血管抑制率,评价受试物祛红效果。本发明受试物条件限制低,使用细胞作为实验体系,灵敏度高;实验周期短,可快速检测大量样品。使用细胞和鸡胚作为实验模型,操作简单,结果直观,是预测祛红效果的理想模型。



1. 一种基于细胞因子刺激鸡胚血管生成的祛红评价模型构建方法,其特征包括以下步骤:

S1、进行细胞培养,对受试物进行细胞毒性检测,确定受试物的安全浓度;

S2、进行细胞培养,分为模型对照组、阴性对照组、阳性对照组和受试物组,受试物组是加入激活剂及安全浓度的受试物的无血清培养基,模型对照组是加入激活剂的无血清培养基,阴性对照组是没有加入激活剂的无血清培养基,阳性对照组是加入激活剂及阳性物质的无血清培养基,构建细胞脱颗粒模型,其中,受试物组是先加入安全浓度的受试物进行前孵育,再去除受试物,使用激活剂刺激活化细胞,并加入安全浓度的受试物共同孵育;各组孵育结束后分别收集上清液;

S3、对各组收集的上清液进行细胞因子检测,确定是否成功构建细胞脱颗粒模型:

若否,转入步骤S1,直至成功构建细胞脱颗粒模型;

若是,转入步骤S4;

S4、选取血管快速生长期授精鸡胚,分为受试物组、阴性对照组、阳性对照组和模型对照组,暴露各组鸡胚的绒毛尿囊膜,拍照并记录各组鸡胚的绒毛尿囊膜血管分布情况;

S5、在模型对照组鸡胚的绒毛尿囊膜中加入步骤S2中模型对照组收集的上清液,在阳性对照组鸡胚的绒毛尿囊膜中加入步骤S2中阳性对照组收集的上清液,在阴性对照组鸡胚的绒毛尿囊膜中加入步骤S2中阴性对照组收集的上清液,在受试物组鸡胚的绒毛尿囊膜中加入在步骤S2中受试物组收集的上清液,各组继续孵育,孵育完成后,拍照并记录各组鸡胚的绒毛尿囊膜血管分布情况;

S6、根据步骤S4和S5中各组分别记录鸡胚的绒毛尿囊膜血管分布情况进行血管分叉计数,计算各组的血管生成率,并计算血管抑制率,评价受试物的祛红效果。

2. 根据权利要求1所述的基于细胞因子刺激鸡胚血管生成的祛红评价模型构建方法,其特征包括:在所述步骤S3中,所检测的细胞因子是炎症因子TNF- α 或IL-6,当模型对照组的炎症因子含量显著高于阴性对照组的炎症因子含量,且阳性对照组的炎症因子含量显著低于模型对照组的炎症因子含量,表明成功构建细胞脱颗粒模型。

3. 根据权利要求2所述的基于细胞因子刺激鸡胚血管生成的祛红评价模型构建方法,其特征包括:所述阳性物质是富马酸酮替芬或地塞米松。

4. 根据权利要求3所述的基于细胞因子刺激鸡胚血管生成的祛红评价模型构建方法,其特征包括:在所述步骤S6中,由步骤S4记录鸡胚的绒毛尿囊膜血管分布情况得到的血管分叉计数是V前,由步骤S5记录鸡胚的绒毛尿囊膜血管分布情况得到的血管分叉计数是V后,血管生成率和血管抑制率IR的计算公式是:

血管生成率 = $V_{后}/V_{前}$ 公式(1)

$$IR = \frac{\text{模型对照组血管生成率} - \text{受试物组血管生成率}}{\text{模型对照组血管生成率}} \times 100\% \quad \text{公式(2)}$$

若 $IR < 0$, 表明受试物不具有祛红功效;

若 $0 \leq IR < 10$, 表明受试物具有轻微祛红功效;

若 $IR \geq 10$, 表明受试物具有祛红功效。

5. 根据权利要求4所述的基于细胞因子刺激鸡胚血管生成的祛红评价模型构建方法,

其特征在于:在所述步骤S1中,以空白对照组的细胞活性为100%,计算各组细胞的相对细胞活性,选择相对细胞活性大于或等于95%的受试物浓度,此为受试物的安全浓度。

6.根据权利要求5所述的基于细胞因子刺激鸡胚血管生成的祛红评价模型构建方法,其特征在于:在所述步骤S1中,所述细胞是角质细胞、成纤维细胞、肥大细胞、巨噬细胞、嗜酸性粒细胞或者嗜碱性粒细胞。

7.根据权利要求6所述的基于细胞因子刺激鸡胚血管生成的祛红评价模型构建方法,其特征在于:在所述步骤S2中,所述细胞是角质细胞、成纤维细胞、肥大细胞、巨噬细胞、嗜酸性粒细胞和嗜碱性粒细胞中的一种或者两种组成的共培养细胞。

8.根据权利要求7所述的基于细胞因子刺激鸡胚血管生成的祛红评价模型构建方法,其特征在于:在所述步骤S2中,前孵育1~3小时,共同孵育0.5~2小时。

9.根据权利要求8所述的基于细胞因子刺激鸡胚血管生成的祛红评价模型构建方法,其特征在于:在所述步骤S5中,在各组鸡胚的绒毛尿囊膜中滴加上清液50~200 μ L,继续孵育48~72小时。

10.根据权利要求9所述的基于细胞因子刺激鸡胚血管生成的祛红评价模型构建方法,其特征在于:在所述步骤S4中,鸡胚是SPF级受精鸡胚,生长期为5~9日龄。

基于细胞因子刺激鸡胚血管生成的祛红评价模型构建方法

技术领域

[0001] 本发明属于功效评价技术,尤其涉及一种基于细胞因子刺激鸡胚血管生成的祛红评价模型构建方法。

背景技术

[0002] 有相关研究表明约有50%的人群受到皮肤敏感的困扰,包括皮肤容易紧绷有刺痛感、泛红、红肿丘疹等。日常的化妆、熬夜、紫外线都可能导致皮肤不适和耐受程度下降,皮肤呈现敏感状态,导致敏感肌。敏感肌在护肤品领域一直有着较高的话题度,但敏感肌普遍意义上不属于疾病,没有可广泛使用的评价模型。

[0003] 敏感肌人群中约有43%的人深受皮肤泛红的困扰,是占比最多的皮肤问题。皮肤泛红主要是毛细血管扩张导致的,毛细血管主要位于皮肤的真皮层,管径细,相互连接成网状,且血管壁薄,血流慢,通透性很大。受到外界刺激,如紫外线强烈时,被活化的自由基攻击皮肤,破坏毛细血管壁;温度骤变时,毛细血管通过收缩和扩张应对外界温度的变化等都有可能引起毛细血管的扩张,导致泛红。此外,皮肤屏障受损,皮肤受到刺激产生炎症反应,是导致皮肤泛红的间接原因。外界刺激可导致皮肤多种细胞产生炎症反应,这种反应是持续性的、相互影响的和级联性的,这也是导致皮肤泛红问题的复杂之处。

[0004] 肥大细胞主要位于血管和感觉神经附近,也会被趋化因子招募聚集到特异性反应、伤口愈合等相关的炎症部位。肥大细胞是过敏反应和类过敏反应的重要介质和效应物,细胞内充满很多特异性颗粒,颗粒中含有大量的组胺、肝素、多种水解酶和其他炎症介质,它们会增加内皮细胞的通透性,使血管舒张、充血和渗出,引起皮肤红斑水肿。肥大细胞被活化后,通过一系列信号转导机制介导细胞脱颗粒,释放炎症因子是引起速发型过敏反应的关键效应细胞。在健康组织中,肥大细胞的数量保持不变,而在慢性过敏组织中,肥大细胞的数量显著增加,因此,肥大细胞常用于评价抗炎药物的体外效应。此外,嗜碱性粒细胞也有类似的作用,嗜碱性粒细胞与肥大细胞有着许多相同的特性,如胞浆内含有丰富的嗜碱性颗粒,细胞表面表达IgE受体Fc ϵ RI,与抗原结合后可使细胞活化,释放颗粒和炎症介质,是IgE介导型炎症的主要效应细胞,也被广泛用于抗过敏药物的筛选。虽然,单独的细胞模型可以预测炎症效应,但是无法直观的反映祛红效果,具有一定局限性。

[0005] 目前,关于祛红或者面部红血丝的评价方法以临床试验为主,试验周期长,检测通量不足,且以成品检测为主,无法检测化妆品原料,对于研发初期原料筛选效果不理想,因此,现有的祛红评价检测方法无法满足目前市场需求。

发明内容

[0006] 本发明的目的在于提供一种操作简单、实验结果直观、评价祛红结果准确、实验周期短、可检测化妆品原料的基于细胞因子刺激鸡胚血管生成的祛红评价模型构建方法。

[0007] 本发明的上述目的通过如下的技术方案来实现:一种基于细胞因子刺激鸡胚血管生成的祛红评价模型构建方法,其特征在于包括以下步骤:

[0008] S1、进行细胞培养,对受试物进行细胞毒性检测,确定受试物的安全浓度;

[0009] S2、进行细胞培养,分为模型对照组、阴性对照组、阳性对照组和受试物组,受试物组是加入激活剂及安全浓度的受试物的无血清培养基,模型对照组是加入激活剂的无血清培养基,阴性对照组是没有加入激活剂的无血清培养基,阳性对照组是加入激活剂及阳性物质的无血清培养基,构建细胞脱颗粒模型,其中,受试物组是先加入安全浓度的受试物进行前孵育,再去除受试物,使用激活剂刺激活化细胞,并加入安全浓度的受试物共同孵育;各组孵育结束后分别收集上清液;

[0010] S3、对各组收集的上清液进行细胞因子检测,确定是否成功构建细胞脱颗粒模型:

[0011] 若否,转入步骤S1,直至成功构建细胞脱颗粒模型;

[0012] 若是,转入步骤S4;

[0013] S4、选取血管快速生长期受精鸡胚,分为受试物组、阴性对照组、阳性对照组和模型对照组,暴露各组鸡胚的绒毛尿囊膜,拍照并记录各组鸡胚的绒毛尿囊膜血管分布情况;

[0014] S5、在模型对照组鸡胚的绒毛尿囊膜中加入步骤S2中模型对照组收集的上清液,在阳性对照组鸡胚的绒毛尿囊膜中加入步骤S2中阳性对照组收集的上清液,在阴性对照组鸡胚的绒毛尿囊膜中加入步骤S2中阴性对照组收集的上清液,在受试物组鸡胚的绒毛尿囊膜中加入在步骤S2中受试物组收集的上清液,各组继续孵育,孵育完成后,拍照并记录各组鸡胚的绒毛尿囊膜血管分布情况;

[0015] S6、根据步骤S4和S5中各组分别记录鸡胚的绒毛尿囊膜血管分布情况进行血管分叉计数,计算各组的血管生成率,并计算血管抑制率,评价受试物的祛红效果。

[0016] 本发明利用含细胞因子的培养液上清与鸡胚血管生成实验结合,可以检测受试物的祛红效果,填补了目前筛选祛红药物没有合适实验模型的空白,而且本发明的受试物条件限制低,可以是化妆品产品,也可以是化妆品原料;本发明使用细胞作为实验体系,灵敏度高,可以检测微量的样品,且本发明实验周期短,测试通量高,可快速检测大量样品。另外,本发明使用细胞和鸡胚作为实验模型,操作简单,结果直观,是预测祛红效果的理想模型,可广泛用于评价受试物对皮肤泛红的抑制作用。

[0017] 本发明在所述步骤S3中,所检测的细胞因子是炎症因子TNF- α 或IL-6,当模型对照组的炎症因子含量显著高于阴性对照组的炎症因子含量,且阳性对照组的炎症因子含量显著低于模型对照组的炎症因子含量,表明成功构建细胞脱颗粒模型。上述的“显著高于”和“显著低于”均是通过SPSS软件,统计分析差异是否具有统计学意义。

[0018] 本发明所述阳性物质是富马酸酮替芬或地塞米松。

[0019] 本发明在所述步骤S6中,由步骤S4记录鸡胚的绒毛尿囊膜血管分布情况得到的血管分叉计数是V前,由步骤S5记录鸡胚的绒毛尿囊膜血管分布情况得到的血管分叉计数是V后,血管生成率和血管抑制率IR的计算公式是:

[0020] 血管生成率=V后/V前公式(1)

$$\frac{\text{模型对照组血管生成率}-\text{受试物组血管生成率}}{\text{模型对照组血管生成率}}$$

[0021] IR= $\frac{\text{模型对照组血管生成率}-\text{受试物组血管生成率}}{\text{模型对照组血管生成率}}$ $\times 100\%$ 公式(2)

模型对照组血管生成率

[0022] 若IR<0,表明受试物不具有祛红功效;

[0023] 若0 \leq IR<10,表明受试物具有轻微祛红功效;

[0024] 若 $IR \geq 10$,表明受试物具有祛红功效。

[0025] 本发明在所述步骤S1中,以空白对照组的细胞活性为100%,计算各组细胞的相对细胞活性,选择相对细胞活性大于或等于95%的受试物浓度,此为受试物的安全浓度。

[0026] 本发明在所述步骤S1中,所述细胞是刺激产生细胞因子的炎症性细胞,具体可以是角质细胞、成纤维细胞、肥大细胞、巨噬细胞、嗜酸性粒细胞或者嗜碱性粒细胞,优选肥大细胞。

[0027] 本发明在所述步骤S2中,所述细胞是角质细胞、成纤维细胞、肥大细胞、巨噬细胞、嗜酸性粒细胞和嗜碱性粒细胞中的一种或者两种组成的共培养细胞。

[0028] 本发明在所述步骤S2中,前孵育1~3小时,共同孵育0.5~2小时。

[0029] 本发明在所述步骤S5中,在各组鸡胚的绒毛尿囊膜中滴加上清液50~200 μ L,继续孵育48~72小时。

[0030] 本发明在所述步骤S4中,鸡胚是SPF级受精鸡胚,生长期为5~9日龄。

[0031] 与现有技术相比,本发明具有如下显著的效果:

[0032] (1)本发明利用含细胞因子的培养液上清与鸡胚血管生成实验结合,可以检测受试物的祛红效果,填补了目前筛选祛红药物没有合适实验模型的空白。

[0033] (2)本发明的受试物条件限制低,可以是化妆品产品,也可以是化妆品原料。

[0034] (3)本发明使用细胞作为实验体系,灵敏度高,可以检测微量的样品。

[0035] (4)本发明实验周期短,测试通量高,可快速检测大量样品。

附图说明

[0036] 下面结合附图和具体实施例对本发明作进一步的详细说明。

[0037] 图1是本发明实施例1阴性对照组0小时的图像;

[0038] 图2是本发明实施例1阴性对照组添加测试物孵育48小时后的图像;

[0039] 图3是本发明实施例1模型对照组0小时的图像;

[0040] 图4是本发明实施例1模型对照组添加测试物孵育48小时后的图像;

[0041] 图5是本发明实施例1受试物组0小时的图像;

[0042] 图6是本发明实施例1受试物组添加测试物孵育48小时后的图像。

具体实施方式

[0043] 绒毛膜尿囊膜(CAM)是一种作为气体交换表面的胚胎外膜,其呼吸功能由广泛的毛细血管网络提供。CAM的发育开始于胚胎孵化的第4天,由绒毛膜和尿囊上皮以及血管化的间质共同形成。未分化血管生长到第8天之前非常迅速,从而形成一个毛细血管网络。毛细血管快速增殖持续到第11天;此后,内皮细胞有丝分裂指数迅速下降,血管系统在第18天完成最终网状排列。CAM发育过程中的广泛的血管化,与人皮肤浅表层毛细血管网非常相似,是用于评价血管生成和抗血管生成分子的理想模型。在化妆品评价中,CAM膜也广泛用于眼结膜刺激性的检测。结膜刺激性反应可使用受试物滴于鸡胚绒毛尿囊膜上,观察血管出血反应作为是否具有刺激性的检测依据。但结膜刺激性与皮肤敏感泛红具有较明显的差别,皮肤敏感是一个持续性的过程,皮肤的毛细胞血管网并不与外界刺激物直接接触,而是通过刺激物引起皮肤主要细胞的反应,通过细胞因子(如角质细胞产生的炎性因子,成纤维

细胞产生的生长因子)、细胞内容物(如肥大细胞释放的组胺或酶)等间接作用累积形成,单纯的滴加受试物不是适宜的检测方法。因此,本发明使用可以刺激产生细胞因子的炎症性细胞与样品共培养一段时间,通过抑制炎症性细胞的脱颗粒和抑制炎症反应,再使用共培养的培养液上清滴加于鸡胚绒毛尿囊膜上,观察鸡胚毛细血管的生成抑制作用,用以评价受试物的祛红效果。

[0044] 实施例1

[0045] 本发明是一种基于细胞因子刺激鸡胚血管生成的祛红评价模型构建方法,本实施例是基于嗜碱性粒细胞培养液与鸡胚血管生成评价祛红效果模型建立。

[0046] S1、进行细胞培养,对受试物进行细胞毒性检测,确定受试物的安全浓度;

[0047] 本步骤是细胞毒性测试,所用的细胞可以是刺激产生细胞因子的炎症性细胞,包括角质细胞、成纤维细胞、肥大细胞、巨噬细胞、嗜酸性粒细胞和嗜碱性粒细胞,优选肥大细胞。使用的检测方法为MTT细胞活性测试法。水溶性受试物使用维持培养基配制,水难溶物质使用DMSO溶解后稀释1000倍加入培养基中。

[0048] 本步骤具体包括:制备密度为 1.0×10^5 个/mL的RBL 2H3细胞悬液,将细胞悬液接种于96孔细胞培养板,每孔100 μ L,培养18h。将地塞米松(受试物)使用无血清DMEM培养基配制成10%的储备液,再稀释成系列测试浓度,每孔加入含不同浓度受试物的培养液100 μ L,暴露24小时。取出细胞培养板,PBS清洗一次,每孔加入100 μ L MTT溶液,培养箱孵育3小时。去除孔中液体,每孔加入100 μ L DMSO,置于振荡器振荡10-15分钟后,在酶标仪570nm波长处测定吸光度,并计算细胞活性,确定后续测试浓度为20 μ g/mL(受试物的安全浓度)。

[0049] S2、进行细胞培养,分为模型对照组、阴性对照组、阳性对照组和受试物组,受试物组是加入激活剂及安全浓度的受试物的无血清培养基,模型对照组是加入激活剂的无血清培养基,阴性对照组是没有加入激活剂的无血清培养基,阳性对照组是加入激活剂及阳性物质的无血清培养基,构建细胞脱颗粒模型,其中,受试物组是先加入安全浓度的受试物进行前孵育,再去除受试物,使用激活剂刺激活化细胞,并加入安全浓度的受试物共同孵育;各组孵育结束后分别收集上清液;

[0050] 本步骤是炎症因子制备,使用的细胞可以是步骤S1所述细胞中的一种或两种组成的共培养细胞。优选地,使用24孔板培养,细胞密度为 $0.8-1.0 \times 10^5$ 个/mL,每孔500 μ L,培养条件为 $37 \pm 0.5^\circ\text{C}$ 、 CO_2 含量为5%的培养箱。优选地,受试物使用无血清培养基配制。优选地,前孵育时间为2小时,后孵育时间为1小时。优选地,构建模型使用C48/80的浓度为10 μ g/mL,构建条件如下表所示的实验分组:

[0051]	阴性对照组	不含C48/80的无血清培养基
	模型对照组	含C48/80的无血清培养基
	阳性对照组	含C48/80及阳性物质的无血清培养基
	受试物组	含C48/80及受试物的无血清培养基

[0052] (表1)

[0053] 其中,阳性物质可以是富马酸酮替芬或地塞米松。

[0054] 本步骤具体包括:制备密度为 8×10^5 个/mL的RBL 2H3细胞悬液,将细胞悬液接种24孔细胞培养板,每孔500 μ L,培养18小时。弃去原培养液,用0.5mL HBSS清洗细胞两次,受试物组(即为阳性对照组)分别加入含20 μ g/mL地塞米松的无血清培养液,每孔加入0.5mL,

放入培养箱前孵育2小时。

[0055] 再弃去原培养液,用0.5mL HBSS清洗细胞两次。按表2添加,放入培养箱孵育1小时,孵育结束后立即冰浴,在冰冷条件下收集上清液于EP管中,3000转/分钟,离心10分钟后,收集上清液,-80℃保存。

[0056]	组别	培养条件
	阴性对照组	1mL无血清DMEM
	模型对照组	0.5mL无血清DMEM+0.5mL 20ug/mL C48/80
	受试物组	0.5mL 40μg/mL地塞米松+0.5mL 20ug/mL C48/80

[0057] (表2)

[0058] S3、对各组收集的上清液进行细胞因子检测,确定是否成功构建细胞脱颗粒模型:

[0059] 若否,转入步骤S1,直至成功构建细胞脱颗粒模型;

[0060] 若是,转入步骤S4;

[0061] 所检测的炎症因子可为TNF-α或IL-6。当模型对照组的炎症因子含量显著性高于阴性对照组,且阳性对照组的炎症因子含量显著低于模型对照组,说明实验模型构建成功。

[0062] 本步骤具体是:使用ELISA试剂盒测定上清液中TNF-α的含量。如表3所示不同组别TNF-α含量,模型对照组与阴性对照组相比,TNF-α相对含量明显升高($p < 0.05$);受试物组与模型对照组相比,TNF-α相对含量明显降低($p < 0.05$),提示造模成功,差异具有统计学意义($p < 0.05$)。

组别		TNF-α 含量 (pg/mL)	相对含量 (%)	
[0063]	阴性对照组	-C48/80	223.67±27.12	72.08±8.74
	模型对照组	+C48/80	310.33±23.42	100.00±7.55
	受试物组	+C48/80+地塞米松	61.38±3.96	19.78±1.28

[0064] (表3)

[0065] S4、选取血管快速生长期授精鸡胚,分为受试物组、阴性对照组和模型对照组,暴露各组鸡胚的绒毛尿囊膜,拍照并记录各组鸡胚的绒毛尿囊膜血管分布情况;

[0066] 本步骤是鸡胚血管生成实验,鸡胚是SPF级受精鸡胚,优选5-9日龄的鸡胚,更优选地使用8日龄鸡胚。优选地,孵育条件为温度 $37.5 \pm 0.5^\circ\text{C}$ 、湿度55-70%,更优选地孵育温度为 37.5°C ,湿度为60%。

[0067] 本步骤具体包括:选取8日龄的授精鸡胚进行分组,分为阴性对照组、模型对照组和受试物组,每组6个鸡胚。用马克笔画出气室位置,并使用镊子将蛋壳沿气室剥离,暴露绒毛尿囊膜,使用体式显微镜拍照并记录添加受试物前的血管分布情况。

[0068] S5、在模型对照组鸡胚的绒毛尿囊膜中加入步骤S2中模型对照组收集的上清液,在阴性对照组鸡胚的绒毛尿囊膜中加入步骤S2中阴性对照组收集的上清液,在受试物组鸡胚的绒毛尿囊膜中加入在步骤S2中受试物组收集的上清液,各组继续孵育,孵育完成后,拍照并记录各组鸡胚的绒毛尿囊膜血管分布情况;

[0069] 拍照完成后,按组分别滴加100μL培养液上清,培养箱中继续孵育48小时。48小时后使用体式显微镜拍照并记录添加受试物前的血管分布情况。

[0070] S6、根据步骤S4和S5中各组分别记录鸡胚的绒毛尿囊膜血管分布情况进行血管分叉计数,计算各组的血管生成率,并计算血管抑制率,评价受试物的祛红效果。

[0071] 所计血管分叉数为连续观察相同的2-3个矩阵视野内血管分支点,优选地,观察实验前后的变化,并与对照组比较,对血管分支完整的2-3支血管进行计数。

[0072] 所计血管分叉数计数可选择印度墨水着色观察。

[0073] 具体将图片前后对比,并对血管分叉进行计数。

[0074] 如图1~4所示,模型对照组的血管分叉明显高于阴性对照组的血管分叉,如图3~6所示,受试物组的血管分叉明显低于模型对照组的血管分叉,说明20 μ g/mL地塞米松对鸡胚血管生成有明显的抑制效果。

[0075] 实施例2

[0076] 本实施例是基于嗜碱性粒细胞培养液与鸡胚血管生成模型评价某活性物质的祛红效果。

[0077] (1)细胞毒性测试

[0078] 制备密度为 1.0×10^5 个/mL的RBL 2H3细胞悬液,将细胞悬液接种于96孔细胞培养板,每孔100 μ L,培养18h。将某活性物质使用无血清DMEM培养基配制成10%的储备液,再稀释成系列测试浓度,每孔加入含不同浓度受试物的培养液100 μ L,暴露24小时。取出细胞培养板,PBS清洗一次,每孔加入100 μ LMTT溶液,培养箱孵育3小时。去除孔中液体,每孔加入100 μ L DMSO,置于振荡器振荡10-15分钟后,在酶标仪570nm波长处测定吸光度,并计算细胞活性,如表4所示各浓度某活性物质细胞相对活性,确定后续测试浓度为1.0%、0.5%、0.25%。

Group (%)	Viability (%)
Control	100.00 \pm 7.35
10.0000	23.38 \pm 0.53
5.0000	69.35 \pm 2.85
2.5000	92.12 \pm 2.81
1.2500	97.55 \pm 1.26
0.6250	95.32 \pm 3.79
0.3125	100.43 \pm 5.70
0.1563	96.91 \pm 4.55
0.0781	97.85 \pm 3.32

[0080] (表4)

[0081] (2)炎性因子制备

[0082] 制备密度为 8×10^5 个/mL的RBL 2H3细胞悬液,将细胞悬液接种24孔细胞培养板,每孔500 μ L,培养18小时。弃去原培养液,用0.5mL HBSS清洗细胞两次,实验组分别加入含1.0%、0.5%、0.25%某活性物质的无血清培养液,每孔加入0.5mL,放入培养箱前孵育2小时。

[0083] 再弃去原培养液,用0.5mL HBSS清洗细胞两次。按表5实验分组添加,放入培养箱孵育1小时。孵育结束后立即冰浴,在冰冷条件下收集上清液于EP管中,3000转/分钟,离心10分钟后,收集上清液,-80 $^{\circ}$ C保存。

[0084]	组别	培养条件
	阴性对照组	1mL无血清DMEM
	模型对照组	0.5mL无血清DMEM+0.5mL 20ug/mL C48/80
	阳性对照组	0.5mL 40μg/mL地塞米松+0.5mL 20ug/mL C48/80
	受试物组	0.5mL 2.0%、1%、0.5%某活性物质+0.5mL 20ug/mL C48/80

[0085] (表5)

[0086] 使用ELISA试剂盒测定上清液中TNF-α的含量。结果如表6所示不同组别TNF-α含量,模型对照组与阴性对照组相比,TNF-α相对含量明显升高($p < 0.05$);阳性对照组与模型对照组相比,TNF-α相对含量明显降低($p < 0.05$),提示造模成功。受试物“某活性物质”在1.0%、0.50%、0.25%测试浓度下,TNF-α相对含量与模型对照组相比均明显降低,差异具有统计学意义($p < 0.05$)。

	组别	TNF-α 含量 (pg/mL)	相对含量 (%)
	阴性对照组	71.08±9.44	38.95±5.17
	模型对照组	182.49±15.66	100.00±8.58
[0087]	阳性对照组	105.29±8.54	57.70±4.68
	样品组	+C48/80+1.0%	136.79±10.65
		+C48/80+0.50%	152.23±8.89
		+C48/80+0.25%	158.11±2.58

[0088] (表6)

[0089] (3) 鸡胚血管生成实验

[0090] 选取8日龄的授精鸡胚进行分组,分为受试物组、模型对照组、阴性对照组和阳性对照组,每组6个鸡胚。用马克笔画出气室位置,并使用镊子将蛋壳沿气室剥离,暴露绒毛尿囊膜,使用体式显微镜拍照并记录添加受试物前的血管分布情况。

[0091] 拍照完成后,按组分别滴加100μL培养液上清,培养箱中继续孵育48小时。48小时后使用体式显微镜拍照并记录添加受试物前的血管分布情况。将图片前后对比,选取3个长势良好的鸡胚对血管分叉进行计数。

[0092] 血管生成抑制率如下表所示:

	组别	血管生成率			平均抑制率
	阴性对照组	1.008	0.921	0.940	-
	模型对照组	2.107	1.985	1.674	-
[0093]	阳性对照组	0.565	0.866	1.013	46%
	1%受试物	0.707	0.929	1.245	36%
	0.5%受试物	1.722	1.697	1.833	-7%
	0.25%受试物	1.510	1.905	1.413	-9%

[0094] (表7)

[0095] 结果表明1%浓度的某活性物质对鸡胚血管生成有明显的抑制作用,抑制率为

36%、0.5%、0.25%浓度的某活性物质对鸡胚血管生成没有抑制作用。

[0096] 实施例3

[0097] 本实施例是基于肥大细胞培养液与鸡胚血管生成模型评价某皮肤护理液祛红效果。

[0098] (1) 细胞毒性测试

[0099] 制备密度为 1.0×10^5 个/mL的P815细胞悬液,将细胞悬液接种于96孔细胞培养板,每孔100 μ L,培养18h。将某皮肤护理液使用无血清DMEM培养基配制成10%的储备液,再稀释成系列测试浓度,每孔加入含不同浓度受试物的培养液100 μ L,暴露24小时。取出细胞培养板,PBS清洗一次,每孔加入100 μ L MTT溶液,培养箱孵育3小时。去除孔中液体,每孔加入100 μ L DMSO,置于振荡器振荡10-15分钟后,在酶标仪570nm波长处测定吸光度,并计算细胞活性,确定后续测试浓度为1.0%、0.5%、0.25%。

[0100] (2) 炎性因子制备

[0101] 制备密度为 1×10^5 个/mL的P815细胞悬液,将细胞悬液接种24孔细胞培养板,每孔500 μ L,培养18小时。弃去原培养液,用0.5mL HBSS清洗细胞两次,实验组分别加入含1.0%、0.5%、0.25%某活性物质的无血清培养液,每孔加入0.5mL,放入培养箱前孵育2小时。

[0102] 再弃去原培养液,用0.5mL HBSS清洗细胞两次。按分组添加,其中阳性样品为富马酸酮替芬。放入培养箱孵育1小时。孵育结束后立即冰浴,在冰冷条件下收集上清液于EP管中,3000转/分钟,离心10分钟后,收集上清液,-80 $^{\circ}$ C保存。

[0103] 使用ELISA试剂盒测定上清液中TNF- α 的含量。模型对照组与阴性对照组相比,TNF- α 相对含量明显升高($p < 0.05$);阳性对照组与模型对照组相比,TNF- α 相对含量明显降低($p < 0.05$),提示造模成功。受试物“某皮肤护理液”在1.0%、0.50%、0.25%测试浓度下,TNF- α 相对含量与模型对照组相比均明显降低,差异具有统计学意义($p < 0.05$)。

[0104] (3) 鸡胚血管生成实验

[0105] 选取8日龄的授精鸡胚进行分组,分为受试物组、模型对照组、阴性对照组和阳性对照组,每组6个蛋。用马克笔画出气室位置,并使用镊子将蛋壳沿气室剥离,暴露绒毛尿囊膜,使用体式显微镜拍照并记录添加受试物前的血管分布情况。

[0106] 拍照完成后,按组分别滴加150 μ L培养液上清,培养箱中继续孵育48小时。48小时后使用体式显微镜拍照并记录添加受试物前的血管分布情况。将图片前后对比,选取3个长势良好的鸡胚对血管分叉进行计数,每个鸡胚数3次,取平均值,结果如表8所示。

组别	血管生成率			平均抑制率
阴性对照组	2.679	2.296	2.974	-
模型对照组	2.867	3.563	2.803	-
阳性对照组	1.578	1.590	1.851	46%
1%受试物	2.333	2.228	1.837	31%
0.5%受试物	2.155	2.456	2.688	21%
0.25%受试物	2.679	3.199	2.251	12%

[0107] (表8)

[0109] 结果表明1%、0.5%、0.25%浓度的皮肤护理液均对鸡胚血管生成分别有抑制作用,抑制率分别为31%、21%、12%。

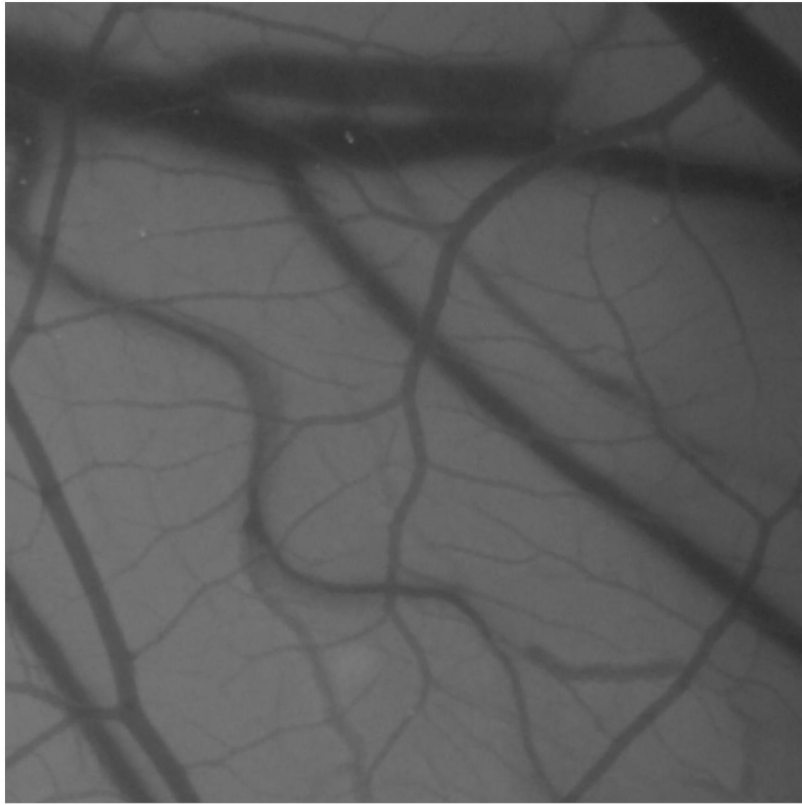


图1

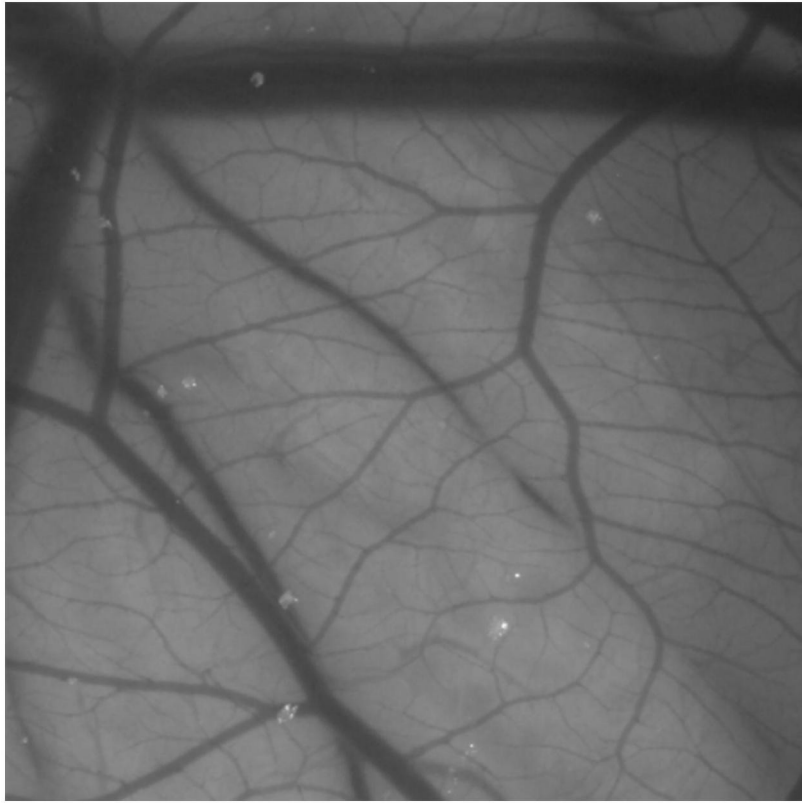


图2

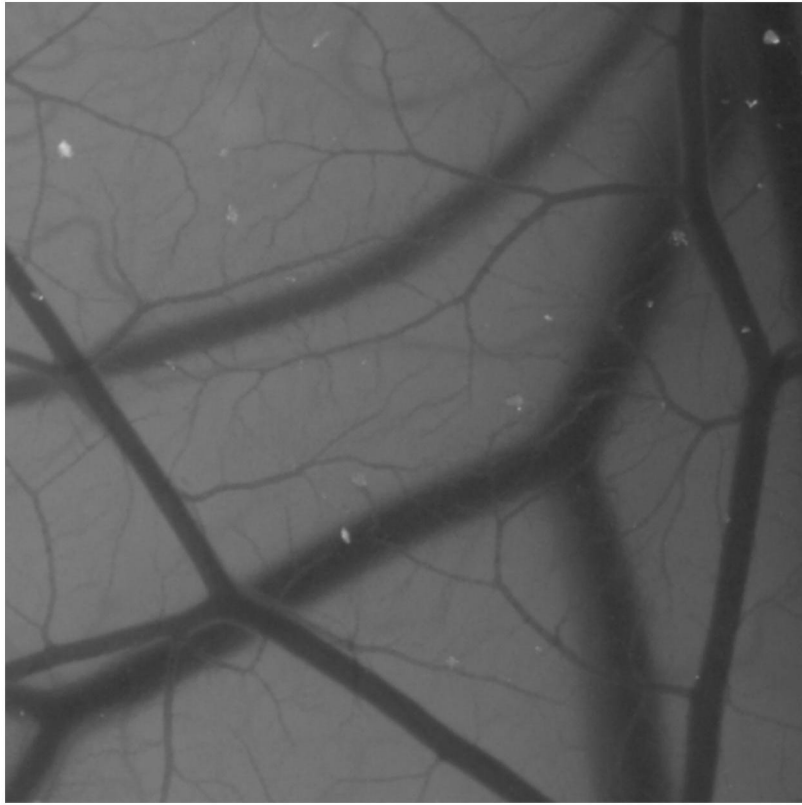


图3

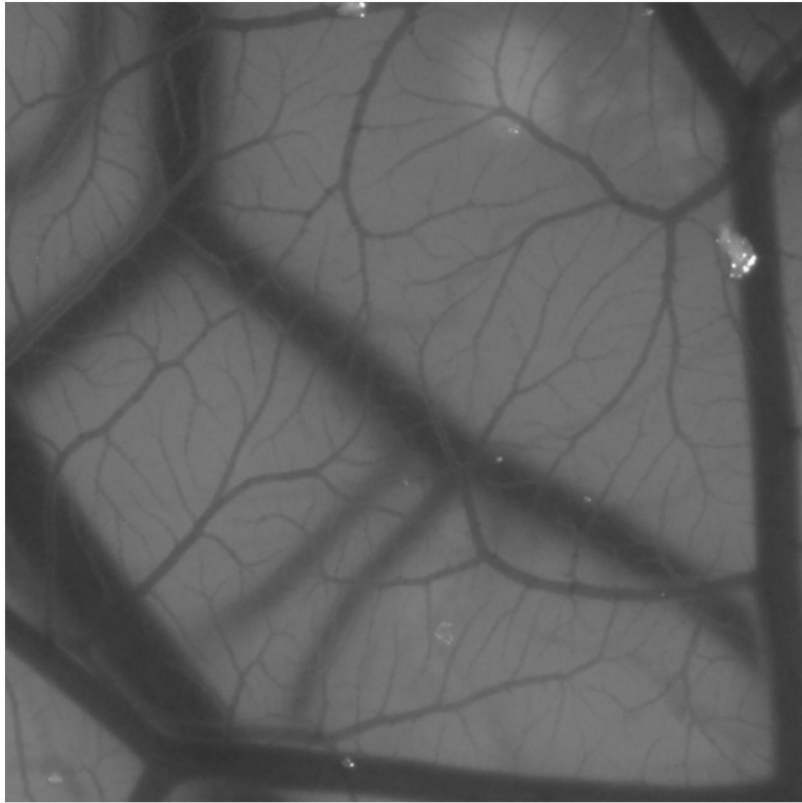


图4

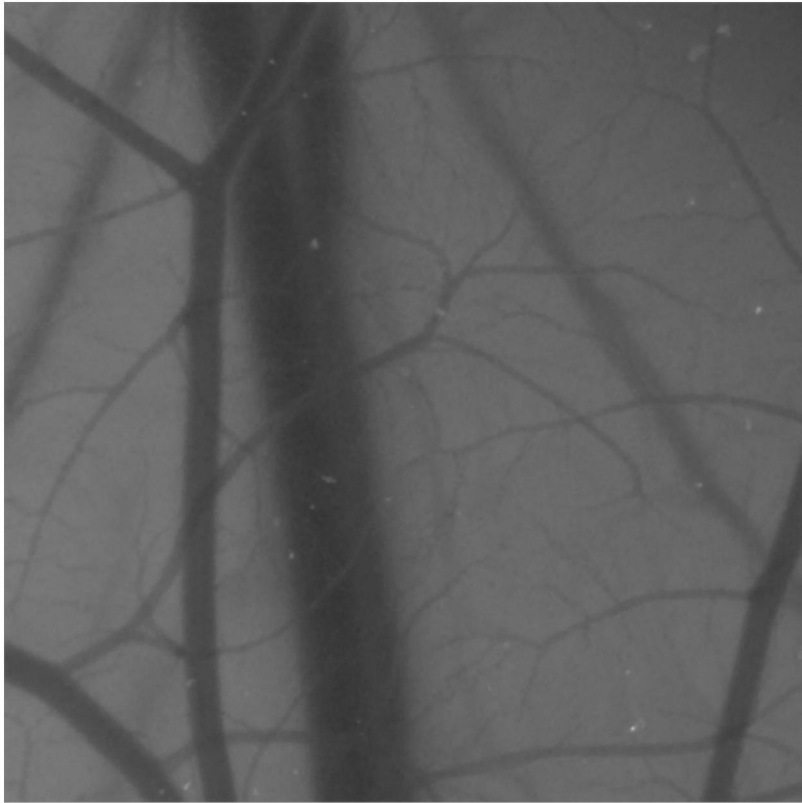


图5

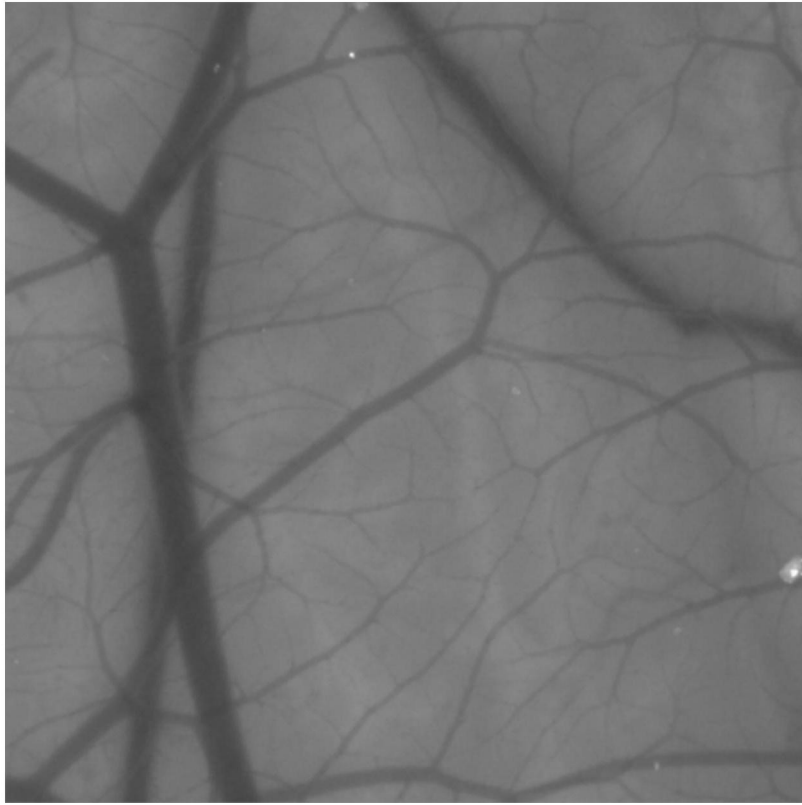


图6