

检测报告

报告编号: SHA01-22050551-JC-01

样品名称: Olandu

送检单位: 北京中京丰创科技有限公司

样品来源: 送检单位提供



检测报告

报告编号: SHA01-22050551-JC-01

页码: 1/10

样品名称	Olandu		
样品编号	2206001718-1		
样品数量	1	样品规格	/
颜色和物态	/	批号/型号	/
送检单位	北京中京丰创科技有限公司		
送检单位地址	北京市丰台区南四环西路 188 号 3 区 3 号楼 5 层 501 室		
抽样日期	/	样品接收日期	2022-06-17
检测周期	2022-06-17 ~ 2022-07-29		
检测项目	Collagen I (UVA) 合成/含量检测		
检测依据及结果	《芫菁挥发油对紫外线诱导皮肤光老化大鼠的保护作用》《杜仲抗皮肤光老化的作用及机理研究》。 结果见下页		
备注	/		

编制: 王猛

审核: 冯俊

批准: 冯俊

签发日期: 2022.08.30

检测报告

报告编号: SHA01-22050551-JC-01

页码: 2/10

1 实验目的

本测试以成纤维细胞为测试系统, 针对主要类型的 Collagen I 含量变化情况, 评价活性物是否具有抗皱功效。

2 测试项目

Collagen I (UVA) 合成/含量检测。

3 试验材料

3.1 试剂

高糖 DMEM 培养液(Gibco)、胎牛血清(Gibco)、PBS(Gibco)、MTT(Sigma)、DMSO(国药)、胰蛋白酶(Gibco)。

3.2 主要设备

CO₂ 培养箱(Thermo, 160i)、生物安全柜(ESCO, LA2-6A1)、倒置显微镜(徕卡, DMi8)、酶标仪(Tecan, Spark)。

3.3 样品信息

表 1 测试样品信息

样品名称	样品编号	状态	溶解性	保存条件
Olandu	2206001718-1	液体	水溶	常温

本页结束

检测报告

报告编号: SHA01-22050551-JC-01

页码: 3/10

4 实验方法

4.1 细胞毒性检测

- 1) 细胞接种: 按 1×10^4 个/孔的接种密度接种细胞至 96 孔板, 培养箱(37°C 、 $5\% \text{CO}_2$)中孵育过夜。
- 2) 实验分组: 实验设置调零组、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	浓度设置 (% , V/V)							
	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧
Olandu	10	5	2.5	1.25	0.625	0.313	0.156	0.078

- 4) 给药: 待 96 孔板中细胞铺板率达到 $40\% \sim 60\%$ 时进行给药。对照组每孔加入 $200 \mu\text{L}$ 含 $10\% \text{PBS}$ 的培养液; 阳性对照组每孔加入 $200 \mu\text{L}$ 含 $10\% \text{DMSO}$ 的培养液; 样品组每孔加入 $200 \mu\text{L}$ 含有相应浓度样品的培养液; 调零组无细胞接种, 仅加入 $200 \mu\text{L}$ 细胞培养液。给药完成后将 96 孔板放置在培养箱(37°C 、 $5\% \text{CO}_2$)中培养。
- 5) 检测: 细胞孵育培养 24 h 后, 弃掉上清, 加入 MTT 工作液(0.5 mg/mL), 37°C 避光孵育 2 h, 孵育结束后, 弃掉上清, 每孔加 $100 \mu\text{L}$ DMSO, 在 490 nm 处读取 OD 值。
- 6) 细胞相对活力计算: 根据公式计算

$$\text{细胞相对活力} = \frac{\text{样品孔 OD} - \text{调零孔 OD}}{\text{溶剂对照孔 OD} - \text{调零孔 OD}} * 100\%$$

本页结束

检测报告

报告编号: SHA01-22050551-JC-01

页码: 4/10

4.2 Collagen I 含量检测方法

实验分组具体设置如表 3 所示。

表 3 实验设计

样品/分组	样品浓度 (V/V)	检测模型	检测指标	检测方法
空白对照 (BC)	/	/		
阴性对照 (NC)	/			
阳性对照 (PC)	100 µg/mL 维生素 C 和 7 µg/mL 维生素 E		Collagen I	ELISA
	0.078%	UVA 照射 9 J/cm ²		
Olandu	0.156%			
	0.313%			

- 1) 细胞接种: 按适宜的接种密度 (5×10^4 /孔) 接种细胞至 24 孔板, 培养箱 (37°C、5%CO₂) 中孵育过夜。
- 2) 实验分组: 实验设置空白对照组、阴性对照组、阳性对照组与样品组。样品组设置 3 个浓度梯度。
- 3) 配液: 按测试浓度设定表 (表 3) 配制不同浓度的受试物工作液。
- 4) 给药: 待 24 孔板中细胞铺板率达到 40%~60% 时进行给药。空白对照组、阴性对照组每孔加入 1 mL 的细胞培养液; 阳性对照组每孔加入 1 mL 含有 100 µg/mL 维生素 C 和 7 µg/mL 维生素 E 的培养液; 样品组每孔加入 1 mL 含有相应浓度受试物的培养液; 给药完成后将 24 孔板放置在培养箱 (37°C、5%CO₂) 中培养。
- 5) UVA 辐射: 细胞培养 24 h 后, 阴性对照组、阳性对照组及样品组接受总剂量为 9 J/cm² 的 UVA 辐射, 与此同时, 空白对照组放置于相同的环境 (UVA 辐射剂量为 0 J/cm²)。
- 6) 收集细胞上清: 孵育培养 24 h 后, 收集细胞培养上清液于 EP 管中, 置于 -80°C 冰箱冷冻保存。
- 7) 细胞培养上清液 ELISA 检测: 根据 ELISA 检测试剂盒的操作说明书对 Collagen I 的含量进行检测分

检测报告

报告编号: SHA01-22050551-JC-01

页码: 5/10

析。

- 8) 免疫荧光染色: 收集上清后, PBS润洗孔板中细胞3遍。加入100%甲醇固定细胞, 用PBS润洗3遍, 每孔再加1 mL1%BSA封闭1小时。弃掉封闭液, 每孔加5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 一抗, 放入4°C冰箱过夜。弃去一抗, 用PBS润洗3遍。每孔加二抗, 作用2小时。弃去二抗, 用PBS润洗3遍, 然后利用荧光显微镜进行拍照。

5 实验结果

5.1 细胞毒性检测结果

样品设定 8 个给药浓度, 在成纤维细胞上开展细胞毒性检测实验, MTT 检测结果如下(表 4)。

表 4 Olandu MTT 检测结果

细胞活力(%)	浓度梯度(%, V/V)								PC	对照
	10	5	2.5	1.25	0.625	0.3125	0.156	0.0718	10%DMSO	/
Mean	109.06	110.80	110.44	113.79	91.98	137.65	146.27	139.13	43.06	100.00
SD	5.43	6.28	12.60	8.27	3.47	18.76	11.82	6.57	0.36	40.98

本页结束

检测报告

报告编号: SHA01-22050551-JC-01

页码: 6/10

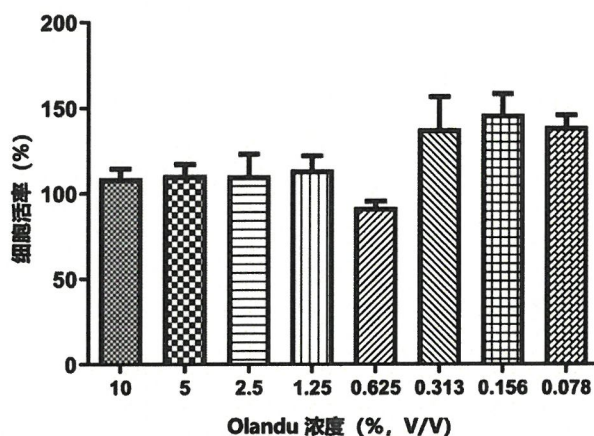


图 1 细胞活力图

以样品所选 8 个浓度为横坐标, 细胞相对活力值为纵坐标, 绘制细胞相对活力图(见图 1)。

故根据 MTT 结果, 样品 Olandu 在 10% (V/V)浓度范围内未表现出成纤维细胞毒性。

5.2 Collagen I 含量检测结果

根据具体实验方法, 进行 Collagen I 含量检测, 检测结果如表 5 所示, 变化趋势如图 2 所示。

表 5 Collagen I 结果汇总表

样品名称	Collagen I 含量 (ng/mL)	SD	p-value
空白对照 (BC)	6.96	1.97	/
阴性对照 (NC)	2.22	0.53	0.0480#
阳性对照 (PC)	5.40	0.15	0.0095**
Olandu-0.078%	4.04	0.76	0.0103*
Olandu -0.156%	3.32	0.43	0.0043**
Olandu -0.313%	6.09	1.79	0.0248*

检测报告

报告编号: SHA01-22050551-JC-01

页码: 7/10

备注:用 *t*-test 进行统计分析时,NC 组与 BC 组相比,显著性以#表示, p -value < 0.05 表示为#, p -value < 0.01 表示为##; PC 组、样品组与 NC 组相比,显著性以*表示, p -value < 0.05 表示为*, p -value < 0.01 表示为**。

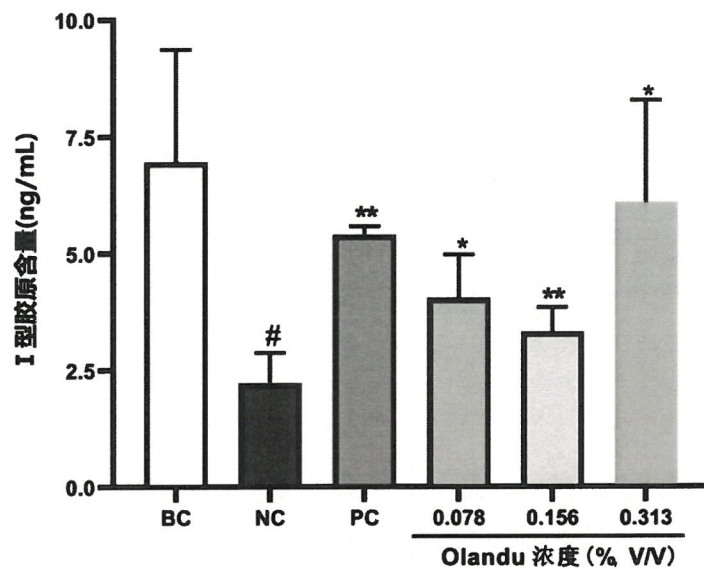


图 2 Collagen I 含量变化趋势图

结果显示,相比较 BC 组,NC 组成纤维细胞接受总剂量为 9 J/cm^2 的 UVA 辐射后, Collagen I 含量水平显著下调($p < 0.05$),说明 UVA 刺激有效。

相比较 NC 组,PC 组的维生素 C 和维生素 E 可以显著升高 Collagen I 的含量水平($p < 0.01$),表明本次阳性对照检测有效。

相比较 NC 组,本次检测样本的三个浓度(0.078%、0.156%和 0.313%)均对 UVA 辐射诱导成纤维细胞 Collagen I 含量表现出显著提升作用($p < 0.05$)。

本页结束

检测报告

报告编号: SHA01-22050551-JC-01

页码: 8/10

Olandu 的一型胶原免疫荧光染色结果如下图 3 所示。

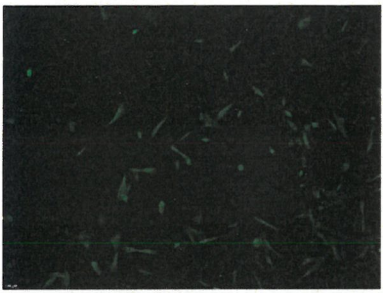
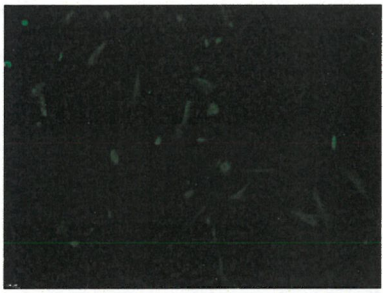

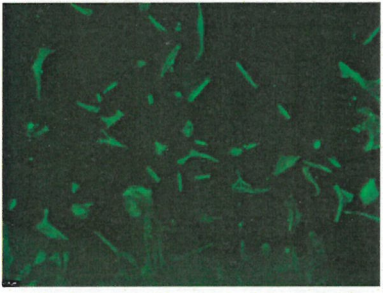
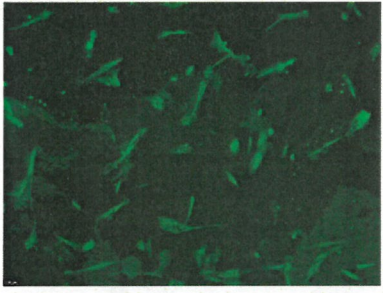
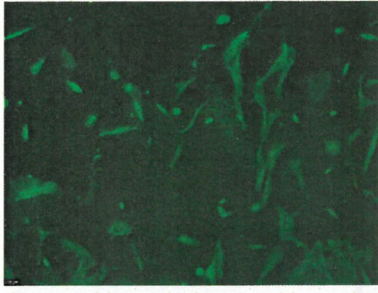
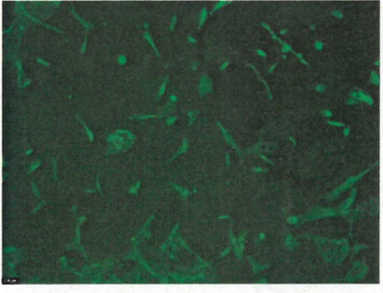
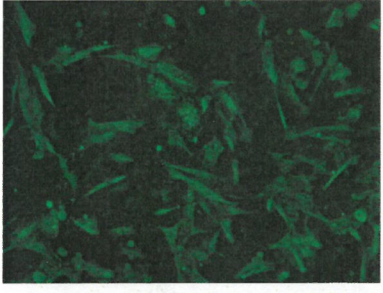
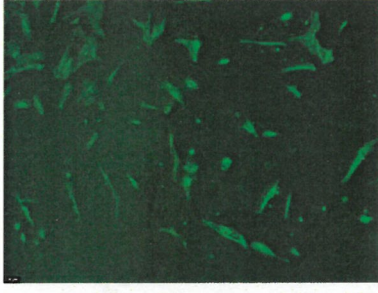
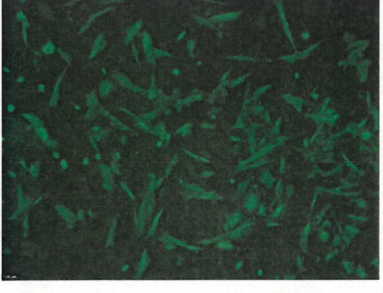
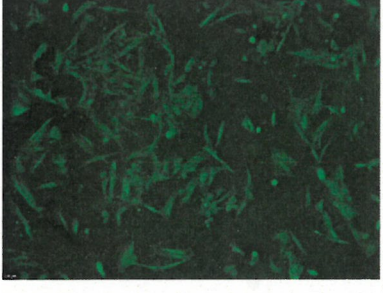

分组	平行 1	平行 2	平行 3
NC			
0.078%-Olandu			
0.156%-Olandu			
0.313%-Olandu			

图 3 一型胶原蛋白免疫荧光染色结果汇总图

检测报告

报告编号: SHA01-22050551-JC-01

页码: 9/10

6 结论

成纤维细胞接受总剂量为 9 J/cm^2 的 UVA 辐射后, Collagen I 含量显著下降。样品 Olandu 在 0.078%、0.156% 和 0.313% (V/V) 浓度下作用细胞 24 h 后, UVA 辐射后成纤维细胞的 I 型胶原蛋白含量表现出显著提高($p < 0.05$), 具有抗皱功效。

样品 Olandu 在 0.313% (V/V) 浓度下作用细胞 24 h 后, UVA 辐射后成纤维细胞的 I 型胶原蛋白含量为 NC 组的 274%。

7 参考文献

[1]李海珍,祁瑛,郭胜存,陈湘宏. 芜菁挥发油对紫外线诱导皮肤光老化大鼠的保护作用[J].西北药学杂志,2021,36(05):745-750.

[2]徐艳明. 杜仲抗皮肤光老化的作用及机理研究[D].黑龙江中医药大学,2011.

报告结束

检测报告

报告编号: SHA01-22050551-JC-01

页码: 10/10

—— 声明 ——

1. 报告若未加盖“检验检测专用章或报告专用章”或编制人、审核人、批准人未全部签字,一律无效。
2. 本报告不得擅自修改、增加或删除,否则一律无效。
3. 报告部分提供或部分复制均视为无效。全复制件未重新加盖“检验检测专用章或报告专用章”视为无效。
4. 如对报告有疑问,请在收到报告后 15 个工作日内提出。
5. 本报告结果仅对本次受测样品负责。未加盖 CMA 标志的报告中全部/部分检测项目未取得资质认定,仅供科研、教学、企业内部质量控制、企业产品功效研究等目的使用。
6. 委托方对样品及其相关信息的真实性负责。
7. 未经本公司同意,委托人不得擅自使用检验检测结果进行不当宣传。
8. 本报告的符合性判定未考虑测量不确定度对结果的影响。

