

# 团 体 标 准

T/SPMA 002-2023

## 化妆品舒缓功效测试方法 基于体外肥大细胞的脱颗粒抑制率及组胺 释放量检测

Testing method for the soothing function of cosmetics  
in vitro mast cell based assay of degranulation Inhibition and histamine  
release

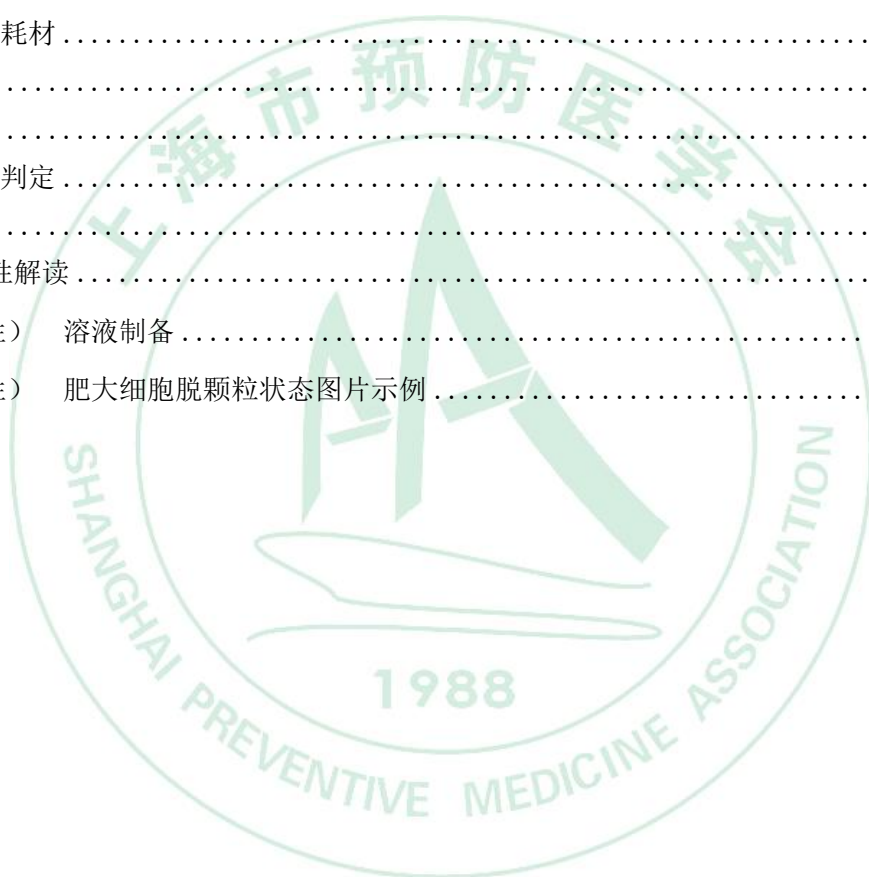
2023-05-05 发布

2023-05-05 实施

上海市预防医学会 发布

## 目 次

前言 .....	II
1 范围 .....	1
2 规范性引用文件 .....	1
3 术语和定义 .....	1
4 原理 .....	1
5 仪器和设备 .....	2
6 主要试剂及耗材 .....	2
7 试验方法 .....	2
8 结果计算 .....	6
9 试验有效性判定 .....	6
10 结果报告 .....	6
11 结果相关性解读 .....	7
附录 A（资料性） 溶液制备 .....	8
附录 B（资料性） 肥大细胞脱颗粒状态图片示例 .....	9



## 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。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

本文件由上海市预防医学会提出并归口。

本文件起草单位：上海市疾病预防控制中心、广东博溪生物科技有限公司、德之馨香精香料（南通）有限公司、浙江养生堂天然药物研究所有限公司、云南贝泰妮生物科技集团股份有限公司、片仔癀（上海）生物科技研发有限公司、时垠（上海）生物科技有限公司、北京鑫金证国际技术服务有限公司、常州谙美生物科技有限公司、东阿阿胶股份有限公司、上海海关技术中心、南方医科大学皮肤病医院、上海家化联合股份有限公司、上海嘉亨日用化学品有限公司、上海测谱检测技术有限公司、上海其然生物科技有限公司、上海永熙信息科技有限公司。

本文件首期承诺执行单位：上海市疾病预防控制中心、广东博溪生物科技有限公司、德之馨香精香料（南通）有限公司、浙江养生堂天然药物研究所有限公司、云南贝泰妮生物科技集团股份有限公司、片仔癀（上海）生物科技研发有限公司、时垠（上海）生物科技有限公司、北京鑫金证国际技术服务有限公司、常州谙美生物科技有限公司、东阿阿胶股份有限公司、上海海关技术中心、南方医科大学皮肤病医院、上海家化联合股份有限公司、上海嘉亨日用化学品有限公司、上海测谱检测技术有限公司、上海其然生物科技有限公司、上海永熙信息科技有限公司。

本文件主要起草人：陶功华、崔文广、陈田、应梦超、卢永波、劳树权、王莎莎、王飞飞、谢阿贵、廖峰、许春晖、钱陈、洪新宇、李竹、周利红、李潇、王银娟、任君宇、张正方、李晶晶、黄燕红、魏春花、袁登峰、常怀龙、李小林、田守生、叶理、张坤、曹平、鲁楠、袁旻嘉、喻竟。

本文件为首次制定。

# 化妆品舒缓功效测试方法 基于体外肥大细胞的脱颗粒抑制率及组胺释放量检测

## 1 范围

本文件规定了小鼠肥大细胞细胞系P815脱颗粒抑制率检测和体外鼠源腹腔肥大细胞组胺含量检测的方法。

本文件适用于化妆品舒缓功效的测试评价。

## 2 规范性引用文件

本文件没有规范性引用文件。

## 3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

### 3.1

**肥大细胞 mast cell**

产生于骨髓造血干细胞，随血流迁移到特定的组织中，并在特定环境下进行局部增殖并分化成熟。

### 3.2

**肥大细胞脱颗粒 mast cell degranulation**

肥大细胞的一种功能状态，是超敏反应发生的基础。

### 3.3

**组胺 histamine**

强效的炎性介质，是动植物体内的一种生物胺，其主要由肥大细胞和嗜碱性粒细胞分泌。

## 4 原理

具有舒缓功效的化妆品有助于改善皮肤刺激等状态。皮肤刺激状态的发生主要涉及皮肤屏障-神经血管-免疫炎症的生理过程，通过舒缓皮肤炎症反应可以改善皮肤刺激等问题。肥大细胞是一种重要的免疫细胞，非免疫性刺激（如C48/80、黄蜂毒素、神经肽P物质等），可以触发肥大细胞脱颗粒，释放组胺、白三烯等生物活性介质。这些炎症介质作用在皮肤上会引起平滑肌收缩和微血管通透性升高，造成组织损伤和变态反应。通过抑制肥大细胞脱颗粒和释放组胺等炎性介质，可以起到改善皮肤刺激状态，达到舒缓的功效。

使用非免疫性刺激物C48/80诱导肥大细胞，触发细胞脱颗粒现象，采用计数法测定脱颗粒细胞数量，计算受试物的脱颗粒抑制率，通过与阴性对照组的比较，评价受试物的舒缓功效。

使用神经肽P物质（substance P, SP）刺激腹腔肥大细胞促使其细胞脱颗粒并释放大量组胺，收集细胞培养上清，采用竞争性酶免疫分析法检测受试物作用细胞后对组胺释放量的抑制作用，评价受试物的舒缓功效。

## 5 仪器和设备

- 5.1 分析天平：精度 0.1mg。
- 5.2 CO<sub>2</sub> 培养箱：37℃，饱和湿度、5% CO<sub>2</sub>/空气。
- 5.3 倒置显微镜。
- 5.4 离心机。
- 5.5 调节移液枪：1000 μL、200 μL、50 μL、10 μL。
- 5.6 细胞计数仪。
- 5.7 酶标仪：配置 450nm 光片。
- 5.8 超净工作台。

## 6 主要试剂及耗材

除另有规定外，所有试剂均为分析纯，与细胞培养相关试剂、耗材均需经过无菌处理。

### 6.1 细胞

脱颗粒抑制率检测选用小鼠肥大细胞瘤细胞P815（建议细胞株来源于美国典型物质保藏中心，ATCC），组胺释放量检测选用小鼠原代分离所获腹腔肥大细胞。如果培养条件能满足细胞的特殊需要，其他肥大细胞也可用于本试验，但应证明其等同性。

### 6.2 细胞培养涉及试剂及耗材

高糖DMEM培养液、新生牛血清、细胞培养瓶、台式液、KM小鼠、重组小鼠干细胞因子、重组小鼠IL-3、RPMI 1640培养基、percoll细胞分离液、甲苯胺蓝染色液。

### 6.3 检测涉及试剂及耗材

色甘酸钠、compound 48/80 (C48/80)、细胞培养板（规格 24 孔）、P 物质、组胺酶联免疫试剂盒（内附标准品）。

## 7 试验方法

### 7.1 脱颗粒抑制率检测

#### 7.1.1 细胞准备

将冷冻保存的细胞培养物以一个合适的密度接种到培养液，并在检测前至少传代一次。细胞应以合适的密度接种到培养液中用于试验，细胞接种密度应保证在接种 12 h 后，融合度达到 45%~ 60%。

#### 7.1.2 受试物准备

7.1.2.1 除非有稳定性数据证明储备液可接受，否则受试物应在使用前新鲜配制并直接使用（见附录A）。

7.1.2.2 水中溶解度受限的受试物应溶解在适当的溶剂中，溶剂体积应在所有培养物中保持一致，即在阴性对照和受试物中保持一致，且无细胞毒性。受试物浓度的选择应避免出现沉淀和溶液呈现云雾状。

7.1.2.3 建议使用二甲基亚砜（DMSO）和无水乙醇作为溶剂。在使用溶剂前，应依据受试物的特殊性质，评估受试物是否与溶剂发生反应。

7.1.2.4 可以使用涡旋混合/或超声处理和/或加热到适当温度等方法辅助溶解，除非这些操作会影响到受试物的稳定性。

### 7.1.3 试验条件

#### 7.1.3.1 受试物浓度

应通过细胞毒性测试确定受试物的浓度范围，选择细胞活力 $\geq 90\%$ 的受试物浓度。

#### 7.1.3.2 刺激条件

Compound 48/80作为外源非免疫性激活剂，可以激活肥大细胞发生脱颗粒现象。Compound 48/80推荐暴露剂量为 $40 \mu\text{g/mL}$ ，具体暴露剂量可根据实验室培养细胞特点及选用细胞系特性进行调整。与空白对照相比，细胞培养板内至少 $30\%$ 的细胞出现脱颗粒现象，说明刺激有效。

#### 7.1.3.3 阳性对照

每一次试验都应同步设置阳性对照组。阳性剂推荐使用色甘酸钠，暴露终浓度为 $1 \text{ mg/mL}$ 。具体的暴露剂量可根据各实验室培养细胞特性进行调整。阳性对照组一般要求脱颗粒抑制率 $\geq 20\%$ 。

### 7.1.4 试验步骤

#### 7.1.4.1 细胞消化、接种

7.1.4.1.1 将T75培养瓶中细胞悬液收集至离心管中， $800 \text{ r/min}$ 离心 $6 \text{ min}$ 。

7.1.4.1.2 弃掉上清液，向离心管中加入 $5 \text{ mL}$ 细胞培养液，弯头吸管吹打混匀细胞，细胞计数仪进行计数。

7.1.4.1.3 用细胞培养液稀释细胞至接种密度。细胞接种密度应保证在接种 $12 \text{ h}$ 后细胞融合度达到 $40\% \sim 60\%$ ，建议接种密度为 $6.5 \times 10^4 \sim 7.5 \times 10^4 \text{ cells/孔}$ ，可根据实验室细胞特点进行调整。

7.1.4.1.4 接种结束后，放置于培养箱（ $37^\circ\text{C}$ 、 $5\% \text{ CO}_2$ 、 $95\% \text{ RH}$ ）中培养 $24 \text{ h} \pm 2 \text{ h}$ 。

#### 7.1.4.2 诱导及受试物处理

7.1.4.2.1 使用移液器枪头从培养液表面吸弃培养板中的培养液，受试物组加入含有受试物和Compound 48/80的无血清高糖DMEM培养液，阴性对照组加入含有Compound 48/80的无血清高糖DMEM培养液，阳性对照组加入含有阳性剂和Compound 48/80的无血清高糖DMEM培养液，空白对照组加入无血清高糖DMEM培养液，每孔 $1 \text{ mL}$ 。每组均应设立3个复孔。

7.1.4.2.2 受试物处理完毕后,将细胞培养板放置于培养箱中(37℃、5% CO<sub>2</sub>、95% RH),每隔10 min观察一次阴性对照组细胞的脱颗粒状态,与空白对照相比,30%~60%范围内的细胞出现脱颗粒现象时,将细胞培养板放置在0℃冰水浴中静置10 min,终止C48/80的诱导刺激。

#### 7.1.4.3 拍照

终止反应后对肥大细胞进行拍照,每组在40倍物镜下从中央向一个方向上,选择融合度相似的3个区域,每个区域拍摄1张照片(见附录B)。

#### 7.1.4.4 脱颗粒细胞数统计

用图像分析软件或人工计数方式分别统计各组40倍物镜下拍摄的3张照片中脱颗粒细胞与所有细胞的数量。细胞形态学辨别分以下两种特征:

未脱颗粒细胞形态为细胞膜光滑、完整、明亮,胞质均匀、几乎无颗粒;

脱颗粒细胞形态为细胞膜粗糙、不规则,细胞质内颗粒光曲折率低,胞质或细胞膜周围可见胞吐颗粒,即脱颗粒现象。

### 7.2 组胺释放量检测

#### 7.2.1 细胞准备

7.2.1.1 小鼠颈椎脱臼处死,75%乙醇腹部消毒,腹腔注入5 mL预冷无Ca<sup>2+</sup> Tyrode液,按摩腹部5 min。

7.2.1.2 沿腹白线切开腹腔,用5 mL无菌注射器吸取腹腔冲洗液至50 mL无菌带盖塑料离心管中,于4℃、1500 r/min离心4 min。

7.2.1.3 弃上清液,加10 mL无Ca<sup>2+</sup> Tyrode液。

7.2.1.4 配制30%:80%的percoll梯度分离液,比例为1:1,30%与80%的percoll各加10 mL,按浓度从高到低加入10 mL离心管中。

7.2.1.5 将“7.2.1.3”中收集的细胞悬液缓慢加入30%:80% Percoll梯度分离液的离心管上层,三者比例为1:1:1。

7.2.1.6 于4℃、4000 r/min离心5 min,收集界面细胞,用无Ca<sup>2+</sup> Tyrode液洗涤2次,4℃、1000 r/min离心10 min。

7.2.1.7 显微镜下计数,使用无Ca<sup>2+</sup> Tyrode液调整细胞密度至5×10<sup>6</sup>~6×10<sup>6</sup> cells/mL。台盼蓝染色检测细胞活力,甲苯胺蓝染色检测细胞纯度。

#### 7.2.2 细胞鉴定

##### 7.2.2.1 细胞活性鉴定

7.2.2.1.1 肥大细胞正常结构呈圆形或卵圆形,取细胞悬液20 μL,加20 μL台盼蓝染液,充分混匀染色2 min,然后加样于细胞计数板加样槽内,分别进行细胞计数和细胞活力的测定。

7.2.2.1.2 细胞活力(活细胞率)=活细胞数 / (活细胞数+死细胞数) ×100%。

##### 7.2.2.2 细胞特性鉴定

7.2.2.2.1 取细胞悬液20  $\mu\text{L}$ ，加20  $\mu\text{L}$ 甲苯胺蓝染液，充分混匀染色2 min，然后加样于细胞计数板加样槽内，进行肥大细胞纯度的检测，肥大细胞被染成红-紫色，其他细胞被染成蓝色。

7.2.2.2.2 计算公式为：肥大细胞纯度=肥大细胞数 / (肥大细胞数+非肥大细胞数)  $\times 100\%$ 。

### 7.2.3 受试物准备

7.2.3.1 受试物应在使用前新鲜配制并直接使用。

7.2.3.2 水中溶解度受限的受试物应当溶解在适当的溶剂中，溶剂体积应当在所有培养物中保持一致，即在阴性对照组和所有试验组保持一致，并且无细胞毒性。受试物浓度的选择应避免出现沉淀或溶液呈现云雾状。

7.2.3.3 建议使用二甲基亚砜(DMSO)和乙醇作为溶剂。在使用溶剂前，应依据受试物的特殊性质，评估受试物是否与溶剂发生反应。

7.2.3.4 在不影响受试物稳定性的条件下，可使用涡旋混合/或超声处理和/或加热到适当温度等方法辅助溶解。

### 7.2.4 试验条件

#### 7.2.4.1 受试物浓度

应当通过细胞毒性测试确定受试物的浓度范围。建议选用来源相同、同一代次的细胞开展细胞毒性测试，以确保试验的一致性。例如选择细胞活力 $\geq 90\%$ ，且细胞形态与对照组无明显差异的浓度。

#### 7.2.4.2 试验分组

实验需设置空白对照组、阴性对照组、阳性对照组和受试物组，每组均设立3个复孔。

#### 7.2.4.3 阳性对照

每一次试验都应同步设置阳性对照。阳性剂推荐使用氯化钙或二氢燕麦酰基邻氨基苯甲酸D（见附录A），暴露终浓度分别为1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和500  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。具体的暴露浓度可根据各实验室培养细胞特性进行调整。阳性对照组一般要求组胺抑制率 $\geq 25\%$ 。

### 7.2.5 试验步骤

#### 7.2.5.1 细胞培养及受试物前处理

将分离所获的细胞用培养液重悬至细胞密度为 $5 \times 10^6 \sim 6 \times 10^6$  cells/mL，各取100  $\mu\text{L}$ 细胞悬液加入细胞培养板中，于37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育4 h。对于阳性对照组和试验组需提前加入特定浓度阳性标准品和样品于37 $^{\circ}\text{C}$ 培养4 h。培养液为含10%胎牛血清(v/v)、50 U/ml青霉素、50 mg/ml链霉素、2 mM L-谷氨酰胺、30 ng/ml重组小鼠干细胞因子、10 ng/ml重组小鼠IL-3的RPMI 1640培养基。阳性对照各剂量组和受试物组均应设立3个复孔。

#### 7.2.5.2 细胞刺激

收集“7.2.5.1”培养后细胞，离心后弃上清，切换为台式液重悬，按试验分组进行分配。空白对照细胞不做处理，阴性对照组、阳性对照组、受试物组的处理液中均添加终浓度为10  $\mu\text{M}$ 的P物质。

#### 7.2.5.3 样品收集



将上述细胞于37℃孵育30 min，收集细胞培养板中所有细胞和处理液，于3000 r/min离心5 min，取上清进行ELISA检测。

#### 7.2.5.4 ELISA检测

ELISA检测按照组胺酶联免疫试剂盒的使用说明书进行。在正式检测前，应设定稀释比例并进行预实验，确定ELISA检测试验组的稀释比例，以保证检测数值落在标准曲线范围内。根据实验室的仪器特点，可选用具有类似功能的检测设备，如荧光酶标仪、荧光分光光度计等。

### 8 结果计算

#### 8.1 脱颗粒率计算

脱颗粒率=照片区域内的脱颗粒细胞数量/照片区域内的细胞总数量×100%。

#### 8.2 组胺含量计算

推荐使用专业曲线制作软件，以组胺酶联免疫试剂盒内附标准品的浓度为纵坐标， $OD_{450}$ 值为横坐标，制作标准曲线，根据受试物组的 $OD_{450}$ 值，查出相应的浓度；或用标准品的浓度与 $OD_{450}$ 值计算出标准曲线的回归方程式，将受试物组的 $OD_{450}$ 值代入方程式，计算组胺含量。取各组3个复孔的平均值作为最终的组胺含量结果。

#### 8.3 脱颗粒/组胺释放抑制率计算

$$\text{抑制率}(\%) = \left(1 - \frac{T}{C}\right) \times 100\% \dots\dots\dots(1)$$

式中：

T—受试物组脱颗粒率/组胺含量的3次平均值；

C—阴性对照组脱颗粒率/组胺含量的3次平均值。

### 9 试验有效性判定

#### 9.1 脱颗粒抑制率检测

每批次试验应设置阳性对照组，要求每批次测试阳性对照组均能检出脱颗粒抑制产生的效果，且与阴性对照组相比，脱颗粒抑制率 $\geq 20\%$ ，判定试验体系有效。

#### 9.2 组胺释放量检测

每批次试验应设置阴性对照组和阳性对照组，要求每批次阴性对照组与空白对照组相比，组胺含量上调 $\geq 20\%$ 且差异具统计学意义( $P < 0.05$ )；阳性对照组每批次均具有组胺抑制作用，且与阴性对照组相比，组胺抑制率 $\geq 20\%$ 且差异具统计学意义( $P < 0.05$ )，判定试验体系有效。

### 10 结果报告

#### 10.1 脱颗粒抑制率检测

受试物在某一测试浓度下的脱颗粒细胞数量百分比（脱颗粒率）应表述为：脱颗粒率平均值±标准差(SD)。评价受试物抑制脱颗粒产生的能力，受试物组与阴性对照组的差异应具有统计学意义( $P<0.05$ )，且有抑制率具体数值。对于受试物脱颗粒抑制率的表述，应包含受试浓度。

## 10.2 组胺释放量检测

受试物在某一测试浓度下的组胺释放量应表述为：组胺含量的平均值±标准差(SD)。评价受试物抑制组胺释放的能力，受试物组与阴性对照组的组胺含量差异应具有统计学意义( $P<0.05$ )。对于受试物抑制组胺释放能力的表述，应包含受试浓度。

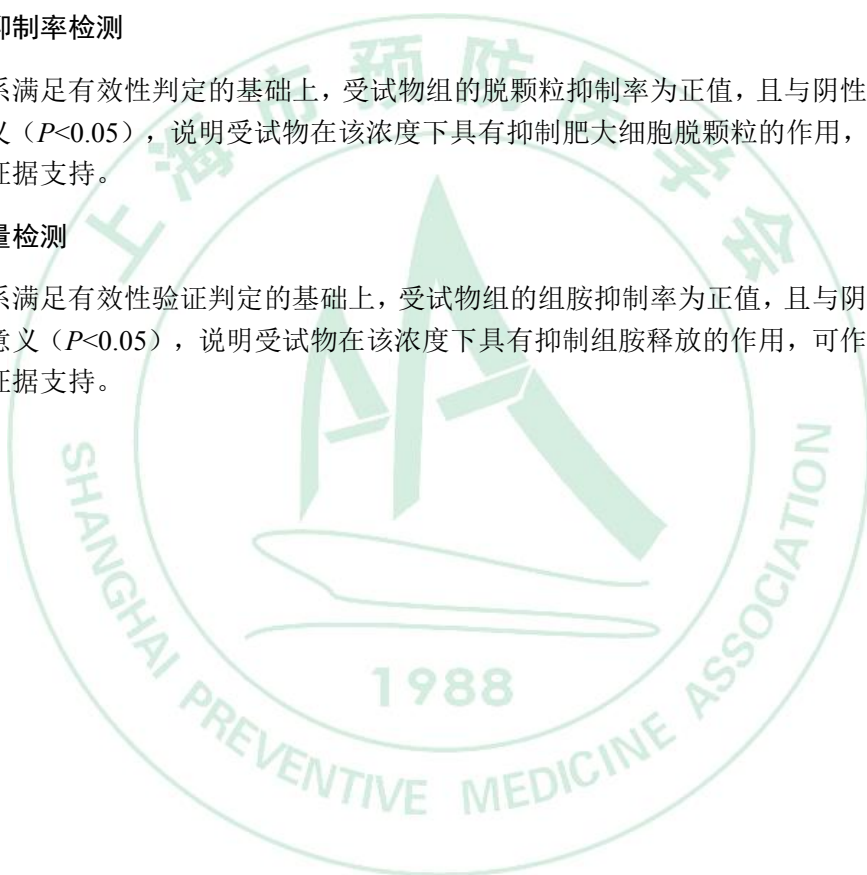
## 11 结果相关性解读

### 11.1 脱颗粒抑制率检测

在试验体系满足有效性判定的基础上，受试物组的脱颗粒抑制率为正值，且与阴性对照组相比差异具有统计学意义( $P<0.05$ )，说明受试物在该浓度下具有抑制肥大细胞脱颗粒的作用，可作为化妆品舒缓功效宣称的证据支持。

### 11.2 组胺含量检测

在试验体系满足有效性验证判定的基础上，受试物组的组胺抑制率为正值，且与阴性对照组相比差异具有统计学意义( $P<0.05$ )，说明受试物在该浓度下具有抑制组胺释放的作用，可作为化妆品原料舒缓功效宣称的证据支持。



附录 A  
(资料性)  
溶液制备

A.1 C48/80 储备液 (50 mg/mL) 制备

分两次总计添加 5 mL 无菌 PBS 至 C48/80 原包装瓶中, 涡旋混匀 15 min, 转移至 10 mL 离心管中, 继续涡旋混匀 15 min, 0.22  $\mu\text{m}$  滤器过滤除菌后, 保存至  $-80^{\circ}\text{C}$ 。工作液采用无血清高糖 DMEM 培养液稀释至 40  $\mu\text{g/mL}$ , 备用。

A.2 色甘酸钠溶液制备

称取 25 mg 色甘酸钠, 加入 25 mL 无血清高糖 DMEM 培养液, 配制成浓度为 1 mg/mL 工作液 (可根据实际称量情况等比例放大)。

A.3 二氢燕麦酰基邻氨基苯甲酸 D (500  $\mu\text{g/mL}$ ) 制备

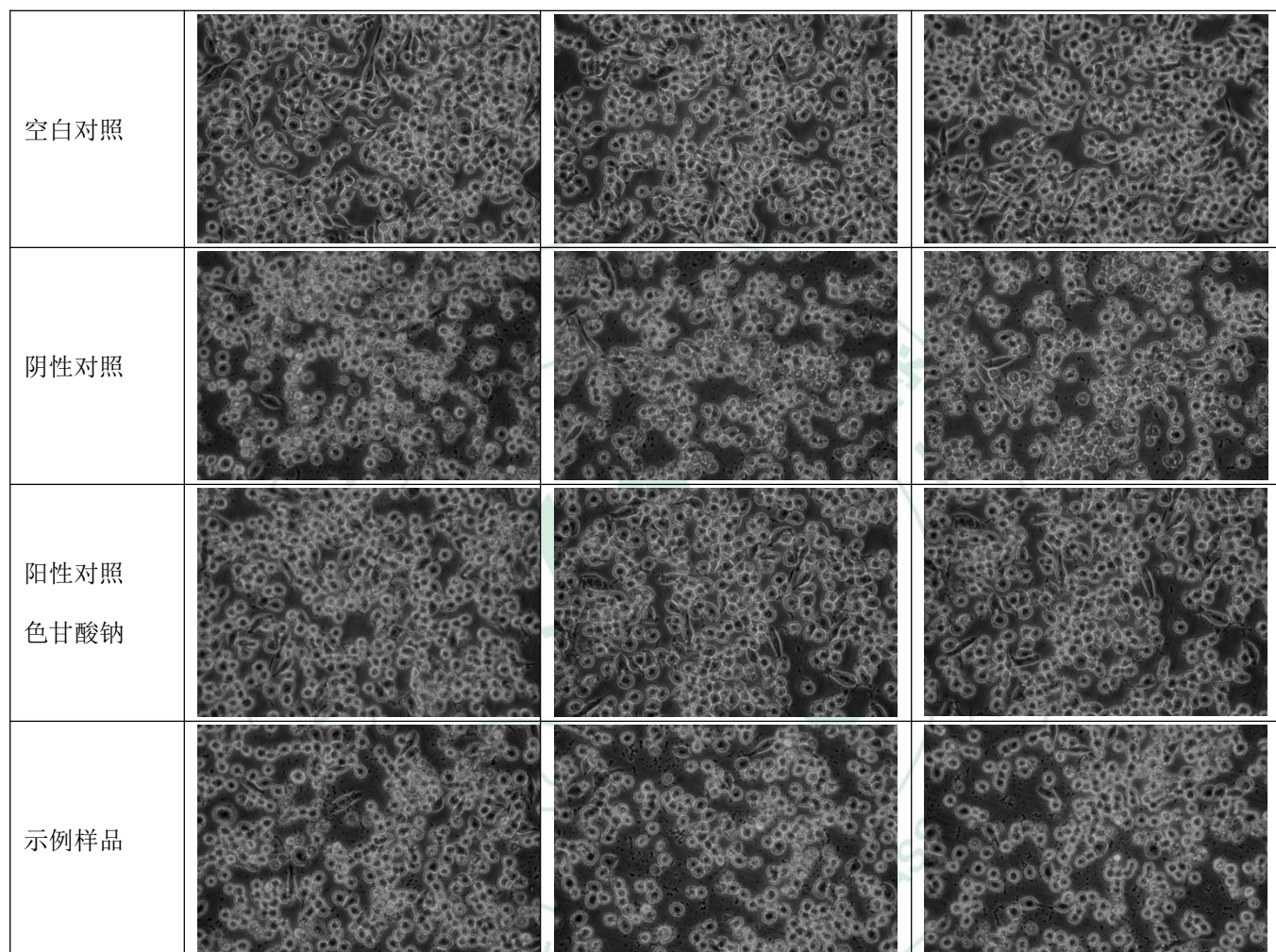
称取 0.5 mg 的二氢燕麦酰基邻氨基苯甲酸 D, 加入乙醇 10 mL, 配制成浓度为 500  $\mu\text{g/mL}$  工作液 (可根据实际称量情况等比例放大)。



附录 B  
(资料性)

## 肥大细胞脱颗粒状态图片示例

下面给出了肥大细胞脱颗粒状态图片示例。



图B.1 肥大细胞脱颗粒状态示意图（40倍物镜）