

团 体 标 准

T/SPMA 003-2023

化妆品舒缓功效测试方法 基于脂多糖诱导巨噬细胞系炎症细胞模型 的一氧化氮含量测定

Testing method for the soothing function of cosmetics
lipopolysaccharide-induced inflammatory macrophage cell model based
assay of nitric oxide content

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	1
6 主要试剂及耗材	2
7 试验方法	2
8 结果计算	4
9 试验有效性判定	4
10 结果报告	4
11 结果相关性解读	4
附录 A（资料性） RAW264.7 细胞培养结果图片示例	5
附录 B（资料性） 溶液制备	6



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、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、浙江养生堂天然药物研究有限公司、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、上海家化联合股份有限公司、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、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、浙江养生堂天然药物研究有限公司、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、上海家化联合股份有限公司、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：崔文广、陈田、霍倩、陶功华、卢永波、王飞飞、赵玥、任君宇、廖峰、许春晖、钱陈、李竹、周利红、洪新宇、应梦超、张艳云、李晶晶、赵晓、周峰、方国珊、魏春花、常怀龙、田守生、李小林、王银娟、袁登峰、张坤、叶理、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 基于脂多糖诱导巨噬细胞系炎症细胞模型的一氧化氮含量测定

1 范围

本文件规定了细菌脂多糖诱导小鼠单核巨噬细胞白血病细胞系RAW264.7释放一氧化氮(NO)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

一氧化氮 nitric oxide, (NO)

是一种具有多种生物学活性的小分子信使物质，活化的巨噬细胞产生一氧化氮(NO)作为一种免疫调节因子，影响机体免疫功能。

3.2

光密度 optical density (OD)

物质在溶液中吸收特定波长光线强弱的参数，光密度值与光吸收物质在溶液中的浓度成相关性。

4 原理

具有舒缓功效的化妆品有助于改善皮肤刺激状态。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问题。一氧化氮(NO)作为一种免疫调节因子参与皮肤炎症反应的生理过程，通过抑制活化的免疫细胞释放过量一氧化氮(NO)可以减轻皮肤的免疫反应从而改善皮肤的刺激状态。

通过细菌脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)诱导小鼠单核巨噬细胞白血病细胞系RAW264.7释放NO，采用Griess法测定细胞培养上清液中的NO浓度，计算受试物对小鼠巨噬细胞释放NO的抑制率，评价受试物的舒缓功效。

5 仪器和设备

- 5.1 调节移液枪：1000 μL 、200 μL 、50 μL 、10 μL 。
- 5.2 CO_2 培养箱：37 $^\circ\text{C}$ ，饱和湿度、5% CO_2 /空气。
- 5.3 酶标仪：配置 540nm 滤光片。
- 5.4 超净工作台。
- 5.5 分析天平：精度 0.1mg。
- 5.6 细胞计数仪。
- 5.7 倒置显微镜。
- 5.8 低速离心机。

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、耗材均应作无菌处理。

6.1 细胞

选用小鼠单核巨噬细胞白血病细胞系RAW 264.7（见附录A），建议细胞株来源于美国典型物质保藏中心(ATCC)，选用型号为ATCC TIB-71。

6.2 细胞培养涉及试剂及耗材

高糖DMEM培养液、新生牛血清、0.25%胰酶（含0.1% EDTA）、磷酸盐缓冲液（1xPBS）、细胞培养瓶。

6.3 检测涉及试剂及耗材

细菌脂多糖（LPS）、细胞培养板（规格24孔）、一氧化氮（NO）检测试剂盒（内附标准品）。

7 试验方法

7.1 细胞准备

将冷冻保存的细胞培养物以合适的密度接种到培养基，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基中用于试验，细胞接种密度应保证在接种12 h后，融合度达到45%~60%。

7.2 受试物准备

7.2.1 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。

7.2.2 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。

7.2.3 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。

7.2.4 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。

7.3 试验条件

7.3.1 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。

7.3.2 刺激条件

选择合适浓度的LPS是诱导RAW 264.7模型试验关键的因素。LPS推荐暴露剂量为 $1 \mu\text{g}/\text{mL}$ ，具体暴露剂量可根据实验室培养细胞特性进行调整。与空白对照相比，一般要求LPS诱导阴性对照组NO含量上调倍数 ≥ 2 倍。

7.3.3 阳性对照

每一次试验应同步设置阳性对照组。阳性剂推荐使用 $100 \mu\text{g}/\text{mL}$ 地塞米松，具体的暴露剂量可根据各实验室培养细胞特性进行调整，一般要求阳性对照组的NO抑制率 $\geq 25\%$ 。

7.4 试验步骤

7.4.1 细胞消化、接种

7.4.1.1 弃掉培养瓶中的培养基，用PBS清洗2次，加入 0.25% 的胰酶消化细胞，胰酶用量应根据培养瓶面积确定，建议T25培养瓶中加入 1mL 、T75培养瓶中加入 3mL 。 37°C 条件下消化细胞。

7.4.1.2 显微镜下观察至大部分细胞变圆并处于悬浮状态时，加入约胰酶体积2~3倍的含血清的高糖DMEM培养液终止消化，并收集至离心管中， $800\text{ r}/\text{min}$ 离心 6 min ，转速及离心时间应根据实验室细胞特性进行调整。

7.4.1.3 离心结束后，弃掉上清液，向离心管中加入 5 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。

7.4.1.4 用细胞培养液稀释细胞至接种密度（接种 12 h 后融合度达到 $45\% \sim 60\%$ ），接种至细胞培养板中，每孔液量为 2 mL 。建议接种密度为 $4 \times 10^5\text{ cells}/\text{孔}$ ，具体可根据实验室细胞特点进行调整。

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

7.4.2 诱导及受试物处理

7.4.2.1 弃掉细胞培养板中的培养液，受试物组加入含有受试物和LPS的培养液，阴性对照组加入含有LPS的细胞培养基，阳性对照组加入含有阳性对照的工作液，空白对照组加入细胞培养液，每孔 1.8 mL 。每组均应设立3个复孔。

7.4.2.2 受试物处理完毕后将细胞培养板放置于培养箱中（ 37°C 、 $5\% \text{ CO}_2$ 、 $95\% \text{ RH}$ ）培养 $2\text{ h} \pm 10\text{ min}$ 。孵育结束后，受试物组加 $200\text{ }\mu\text{L}$ 含有LPS的受试物工作液，阴性对照组加 $200\text{ }\mu\text{L}$ 的LPS工作液，阳性对照组加 $200\text{ }\mu\text{L}$ 含有阳性剂的LPS工作液，空白对照组加 $200\text{ }\mu\text{L}$ 细胞培养液。补加完毕后，晃动细胞培养板5次，混匀孔内液体，然后将细胞培养板放置在培养箱中（ 37°C 、 $5\% \text{ CO}_2$ 、 $95\% \text{ RH}$ ）继续培养 $22\text{ h} \pm 30\text{ min}$ 。

7.4.3 细胞上清收集

孵育培养结束后，每孔收集 $400\text{ }\mu\text{L}$ 细胞培养上清液于 1.5 mL 无菌离心管中，即时开展NO含量检测。

7.4.4 NO含量检测

按照一氧化氮（NO）检测试剂盒的操作说明书进行检测。

8 结果计算

8.1 NO 含量计算

推荐使用专业曲线制作软件，以一氧化氮（NO）检测试剂盒内附标准品的浓度为纵坐标，以校正后的标准品 OD_{540} 值为横坐标，绘制标准曲线，得出回归方程式，将受试物校正后的 OD_{540} 值代入方程式，计算NO含量，取3个复孔的平均值作为最终的NO含量结果。

8.2 NO 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NO含量的3次平均值；

C—阴性对照组NO含量的3次平均值。

9 试验有效性判定

每批次试验应设置阴性对照组和阳性对照组，每批次阴性对照组与空白对照组相比，NO含量上调倍数应 ≥ 2 倍；阳性对照组与阴性对照组相比，NO含量抑制率应 $\geq 25\%$ ，判定试验体系有效。

10 结果报告

10.1 受试物在某一测试浓度下的NO的含量应表述为：NO含量的平均值 \pm 标准差（SD）。

10.2 评价受试物抑制NO含量的能力，需要受试物组NO含量值低于阴性对照组，并且差异具有统计学意义（ $P < 0.05$ ）。

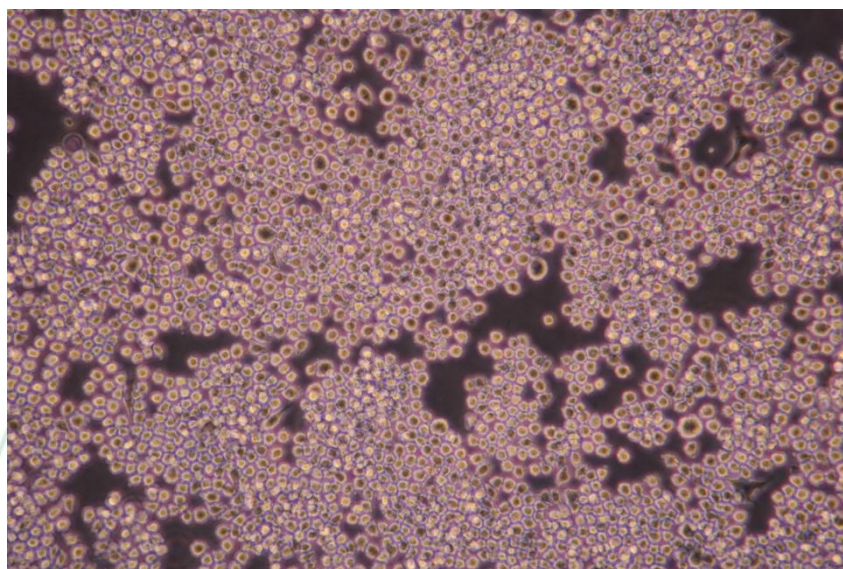
10.3 对于受试物抑制NO含量的表述，应包含受试浓度。

11 结果相关性解读

在试验体系满足有效性判定的基础上，受试物组与阴性对照组相比，NO抑制率为正值，且与阴性对照相比差异具有统计学意义（ $P < 0.05$ ），说明受试物在该受试浓度下具有抑制NO含量的作用，可作为化妆品舒缓功效宣称的证据支持。

附录 A
(资料性)
RAW264.7 细胞培养结果图片示例

下面给出了RAW264.7细胞培养结果图片示例。



图A.1 RAW264.7细胞培养结果图片（20倍物镜）



附录 B
(资料性)
溶液制备

B.1 地塞米松贮备液 (100 mg/mL) 制备

将地塞米松整瓶置于玻璃培养皿中拧开瓶盖,置于烘箱,105℃干燥 2h。干燥后将粉末收集于 1.5 mL 离心管中,称重 (1.5 mL 离心管事先称重),根据重量按照 100 mg 加 1000 μ L DMSO 的量等比例放大,震摇 2 h,充分混匀,按照 20 μ L/支的体积进行分装,保存于-80℃冰箱。

B.2 地塞米松工作液制备

用细胞培养液将 100 mg/mL 的地塞米松贮存液稀释为 100 μ g/mL 地塞米松工作液,现用现配。

B.3 LPS 贮备液制备

5 mg/mL LPS 贮备液配制:在 10 mg 的 LPS 中加入 500 μ L 无菌 PBS,涡旋混匀 5 min,转移至 5 mL 离心管中,再加入 500 μ L 无菌 PBS,涡旋混匀 5 min,重复此步骤 2 次,收集至 5 mL 离心管中,不过滤,分装后保存至-80℃。

B.4 LPS 工作液 (1 μ g/mL) 的制备

按照 1:5000 稀释比例,用高糖 DMEM 进行配制。