ICS 71.100.70

CCS Y42

发布

中国香料香精化妆品工业协会

202×-××-××实施

202×-××-××发布

化妆品舒缓功效体外测试方法

Evaluation soothing efficacy of cosmetics

In vitro test method

（征求意见稿）

T/CAFFCI XXXX—202X

团体标准

1. 前 言

本文件按照 GB/T 1.1-2020《标准化工作导则 第一部分：标准化文件的结构和起草规则》的规则起草。

本文件由中国香料香精化妆品工业协会提出并归口。

本文件起草单位：。

本文件主要起草人：。

本文件为首次发布。

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。

化妆品舒缓功效体外测试方法

* 1. 范围

本文件根据舒缓机理，构建4种不同刺激诱导模型，对化妆品及其原料进行舒缓功效评价。

本文件规定了4种基于不同生物学模型开展化妆品舒缓功效测试的方法及技术要求。

本文件适用于化妆品及其原料采用体外试验方法进行舒缓功效评价。

* 1. 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期的版本适用于本文件；不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本文件。

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

GB/T 21808 化学品 鱼类延长毒性14天试验

* 1. 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

* + 1. 舒缓 soothing efficacy

有助于改善皮肤刺激等状态。

[来源：《化妆品分类规则和分类目录》，附表1功效宣称分类目录]

* + 1. 体外重组表皮皮肤模型 reconstructed human epidermis model

采用角质形成细胞，通过组织工程技术在体外重组的皮肤组织，具有与正常皮肤表皮层高度相似的复层化结构、生理及代谢功能。

* + 1. 积分光密度值 integral optical density

图像分析的常用参数，用于量化图像中特定区域的各个像素点光密度之和，可反映所测结构的光密度与面积的综合变化，其与物质的质量成正比，其数值反映目标物质（组织或细胞中某种成分如目标蛋白）的相对含量。

* + 1. 受精后天数 day post-fertilization

斑马鱼卵细胞受精后发育的天数。

* + 1. 最大耐受浓度 maximum tolerated concentration

卵细胞受精后3天的斑马鱼幼鱼未出现任何死亡（无心跳）和其他毒性效应（心包水肿、躯干弯曲、对机械刺激无反应、肌肉纹理不清晰等）的最高浓度。

4　缩略语

下列缩略语适用于本文件。

CAP：辣椒素（capsaicin）

C.V：变异系数（coefficient of variation）

DMSO：二甲基亚砜（dimethyl sulfoxide）

dpf：受精后天数（day post-fertilization）

IL-1α：白细胞介素1α（interleukin 1α）

IL-1β：白细胞介素-1β（Interleukin-1 beta）

IL-6：白细胞介素6（Interleukin-6）

iNOS：诱导型一氧化氮合成酶（inducible nitric oxide synthase）

LPS：细菌脂多糖（lipopolysaccharide）

MTC：最大耐受浓度（maximum tolerated concentration）

NO：一氧化氮（nitric oxide）

PBS：磷酸盐缓冲盐溶液（phosphate buffer saline）

PGE2：前列腺素E2（prostaglandin E2）

SD：标准差（standard deviation）

SE：标准误（standard error）

SLS：十二烷基硫酸钠（sodium lauryl sulfate）

TNF-α：肿瘤坏死因子-α（Tumor Necrosis Factor）

TRPV1：瞬时受体电位香草酸亚型1（transient receptor potential vanilloid type 1）

5　基本原则

舒缓，有助于改善皮肤刺激等状态。皮肤刺激主要指外源性物质直接作用于皮肤，引起非特异性免疫、特异性免疫反应。其机理可以概括为：①损伤皮肤屏障：外源性物质如表面活性剂能够破坏皮肤屏障的砖墙结构，导致细胞间脂质流失和屏障功能受损。②细胞损伤与炎症介质释放：屏障受损后，刺激物更容易渗透至表皮深层，直接接触角质形成细胞和免疫细胞，破坏细胞膜结构，干扰细胞代谢过程，诱导细胞凋亡或坏死。受损细胞会释放组胺、前列腺素等炎症介质，引发血管扩张和通透性增加，表现为红斑、水肿等典型症状。③炎症级联反应：炎症介质激活免疫细胞（如巨噬细胞、T细胞），释放多种促炎因子（如IL-6、TNF-α等），形成正反馈循环，加剧炎症反应。④神经传导：外源性物质通过激活皮肤感觉神经末梢，传递疼痛信号，导致刺痛、烧灼感等不适感觉。⑤免疫反应：在特殊情况下，也可能触发免疫系统的参与，导致更复杂的皮肤反应。

本文件基于皮肤刺激引起皮肤非免疫性应答的机理，采用整合测试策略的思想，整合用于体外舒缓功效评估的四种刺激模型：SLS-体外重组表皮皮肤模型屏障损伤模型，CAP-角质形成细胞TRPV1模型，LPS-巨噬细胞炎症模型，斑马鱼幼鱼中性粒模型，从不同维度选用多项指标进行机理探究性评估，为舒缓化妆品及原料的功效评价提供科学合理的体外方法。

6　方法

6.1 SLS-体外重组表皮皮肤模型屏障损伤模型炎症因子、炎症介质含量测定方法

6.1.1 原理

皮肤刺激指外源性物质直接作用于皮肤，引起皮肤出现免疫性、非免疫性反应，表现出红、肿、热、痛、痒等临床症状。表面活性剂是日常能接触到的刺激源之一，其中SLS作为表面活性剂的代表，研究比较广泛。SLS具有双亲性（亲水性和亲脂性）特征，较高浓度的SLS接触皮肤后，通过溶解角质层脂质，进入活细胞层，损伤活细胞层细胞膜，释放大量的炎症因IL-1α，激活核因子κB导致炎症反应级联放大。同时，SLS刺激会引起花生四烯酸代谢产物PGE2的释放，引起血管扩张，导致发红，疼痛等临床症状。

本方法中采用浓度为0.1%（m/v）的SLS作用体外重组表皮皮肤模型，构建体外皮肤刺激性模型，诱导细胞因子IL-1α、PGE2的分泌。基于该屏障损伤模型，将受试物作用一定时间，通过作用前后，IL-1α、PGE2含量的变化，评价受试物是否通过降低炎症含量达到舒缓的目的。

6.1.2 仪器及设备

a）移液器：规格1000 µL、100 µL、2.5 µL；

b）二氧化碳培养箱：37 ℃，5% CO2；

c）酶标仪；

d）超净工作台或生物安全柜；

e）分析天平：精度0.1 mg；

f）正压移液器：规格100 µL。

6.1.3 试剂及耗材

除另有规定外，所有试剂均为分析纯，试验用水参照GB/T 6682规定的一级水。体外重组表皮皮肤模型培养涉及试剂与耗材必须无菌。

6.1.3.1 体外重组表皮皮肤模型培养相关的试剂及耗材

a）体外重组表皮皮肤模型；

b）商品化表皮皮肤模型培养液；

c）无菌六孔细胞培养板；

d）尼龙膜（无菌）。

6.1.3.2 其他试剂及耗材

a）SLS：CAS号2386-53-0；

b）0.1%（m/v）SLS：配置方法见附录A；

c）地塞米松：CAS号50-02-2；

d）地塞米松储备液：配置方法见附录A；

e）PBS：配置方法见附录A；

f）IL-1αELISA试剂盒；

g）PGE2 ELISA试剂盒；

h）无菌尼龙膜。

6.1.4试验步骤

6.1.4.1 试验环境

试验须在超净台或生物安全柜提供的无菌环境下开展。

6.1.4.2 试验分组

试验需设置空白对照组、阴性对照组、阳性对照组和受试物组，每组设置3个生物学重复。

a）空白对照组：体外重组表皮皮肤模型；

b）阴性对照组：体外重组表皮皮肤模型表面涂抹浓度为0.1%（m/v）SLS；

c）阳性对照组：体外重组表皮皮肤模型表面涂抹浓度为0.1%（m/v）SLS，皮肤模型培养液中添加地塞米松储备液；

d）受试物组：体外重组表皮皮肤模型表面涂抹0.1%（m/v）SLS和一定剂量的受试物。

6.1.4.3 体外重组表皮皮肤模型准备

准备无菌六孔细胞培养板，在孔中添加0.9 mL体外表皮皮肤模型培养液，放置体外重组表皮皮肤模型。

6.1.4.4 SLS刺激

除空白对照组外，阴性对照组、阳性对照组及受试物组使用移液器将25 µL，0.1%（m/v）SLS添加于体外重组表皮皮肤模型表面，并在模型表面覆盖尼龙膜。为保证试验条件一致性，空白对照组模型表面也需要覆盖尼龙膜。操作结束后，将模型放入二氧化碳培养箱孵育30min。

6.1.4.5 给药

孵育结束后，将阳性对照组及受试物组对应的表皮皮肤模型从二氧化碳培养箱中取出，阳性对照组需在培养液中滴加0.9 µL地塞米松储备液，吹打混匀。受试物组揭开尼龙膜后，在其表面用移液器添加12.5 µL受试物，继续覆盖无菌尼龙膜。给药结束后，将模型放至二氧化碳培养箱中孵育24h。

6.1.4.6 收样

孵育结束后，分别收集各组孔中的培养液。

6.1.4.7 检测

根据ELISA试剂盒说明书开展IL-1α、PGE2含量测定。

6.1.5 结果计算

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

式中：

T—受试物组或阳性对照组IL-1α、PGE2含量平均值；

C—阴性对照组IL-1α、PGE2含量平均值。

6.1.6 试验有效性验证

每批次试验阴性对照组与空白对照组相比，IL-1α含量上调倍数≥1.5倍，阳性对照组与阴性对照组相比，IL-1α抑制率≥25%，则认为试验系统有效。

每批次试验阴性对照组与空白对照组相比，PGE2含量上调倍数≥2倍，阳性对照组与阴性对照组相比，PGE2抑制率≥25%，则认为试验系统有效。

分别统计各组重复孔间IL-1α、PGE2含量的标准差，并计算C.V，C.V值≤30%，则认为试验平行性有效。

6.1.7 结果报告

a）含量应表述为：含量平均值±SD。

b）评价受试物抑制IL-1α、PGE2含量，需要受试物组IL-1α、PGE2的含量与阴性对照组相比，存在显著差异（*P*＜0.05）。

c）对于受试物抑制IL-1α、PGE2含量的表述，应包含受试物的具体浓度、检测指标名称及对应的抑制率。

6.1.8 结果相关性解读

受试物组与阴性对照组相比，IL-1α含量降低，且具有显著差异（*P*＜0.05），说明受试物通过抑制IL-1α生成，达到舒缓功效。

受试物组与阴性对照组相比，PGE2含量降低，且具有显著差异（*P*＜0.05），说明受试物通过抑制PGE2生成，达到舒缓功效。

6.2 CAP-角质形成细胞模型TRPV1含量测定方法

6.2.1 原理

TRPV1作为非选择性配体门控阳离子通道受体，在角质形成细胞和周围感觉神经纤维均有表达，可被多种外源性或内源性炎症介质激活（如CAP等）,引起神经肽释放和神经源性炎症反应发生。TRPV1被激活后，引起细胞外Ca2+等阳离子内流，打破细胞增殖分化的动态平衡，促进细胞分化、凋亡。此外，TRPV1的活化，也会直接导致环氧酶-2的释放，参与炎症反应等过程，临床表现为疼痛、烧灼及瘙痒等症状。因此，通过受试物作用后，阻断或抑制TRPV1蛋白表达，有助于缓解上述症状，达到舒缓的目的。

6.2.2 仪器和设备

a）移液器：规格1000 µL、200 µL、10 µL；

b）二氧化碳培养箱：37 ℃，5% CO2；

c）正置荧光显微镜；

d）超净工作台或生物安全柜；

e）分析天平：精度 0.1 mg；

f）细胞计数仪。

6.2.3 试剂及耗材

除另有规定外，所有试剂均为分析纯，试验用水参照GB/T 6682规定的一级水。细胞培养涉及试剂与耗材必须无菌。

6.2.3.1 细胞

角质形成细胞，在试验前应至少传代一次。

6.2.3.2 细胞培养涉及试剂及耗材

a）角质形成细胞培养液；

b）细胞培养瓶。

6.2.3.3 试验涉及试剂及耗材

a）CAP：CAS号404-86-4；

b）CAP工作液：配置方法见附录A，具体使用浓度可根据培养细胞特性进行调整；

c）反-4-叔丁基环己醇：CAS号21862-63-5；

d）15.6 µg/mL反-4-叔丁基环己醇工作液，配置方法见附录A，具体使用浓度可根据培养细胞特性进行调整；

e）无菌24孔细胞培养板；

f）细胞爬片（直径14 mm）；

g）PBS：配置方法见附录A；

h）4%多聚甲醛组织固定液；

i）山羊血清；

j）Anti-TRPV1抗体；

k）FITC荧光二抗；

l）Hoechst33342；

m）抗荧光淬灭封片液；

n）吸水纸；

o）载玻片；

p）镊子。

6.2.4 试验步骤

6.2.4.1 试验环境

试验须在超净台或生物安全柜提供的无菌环境下开展。

6.2.4.2 细胞准备

取液氮保存的角质形成细胞，复苏并以合适的密度接种到培养瓶（推荐接种密度为1.8×104个/cm2-2.1×104个/cm2）。

6.2.4.3 试验分组

试验需设置空白对照组、阴性对照组、阳性对照组和受试物组，每组设置3个生物学重复。

a）空白对照组：角质形成细胞及角质形成细胞培养液；

b）阴性对照组：角质形成细胞及CAP工作液；

c）阳性对照组：角质形成细胞及反-4-叔丁基环己醇工作液；

d）受试物组：角质形成细胞及含有一定浓度受试物的CAP工作液。受试物浓度应当通过细胞毒性检测，确定受试物的浓度范围。

6.2.4.4 受试物准备

受试物应在使用前配制完成并直接使用。角质形成细胞培养液中溶解度受限的受试物应当溶解在适当的溶剂中，并确保溶剂的浓度在所有测试组的角质形成细胞培养液中保持一致，即在阴性对照组和其它试验组中保持一致，并且无细胞毒性。受试物浓度的选择应避免出现沉淀。

对于角质形成细胞培养液中溶解受限的受试物，可使用DMSO或乙醇作为溶剂。在使用溶剂前应评估受试物的特殊性质，避免受试物与溶剂发生化学反应。

可使用涡旋混合、超声处理或加热到适当温度等方法辅助溶解。

6.2.4.5 细胞接种

在24孔细胞培养板内放置无菌细胞爬片，按合适的细胞接种密度接种角质形成细胞至爬片表面（推荐接种密度为2.1×104个/cm2 -2.3×104个/cm2）。接种完毕后，将24孔细胞培养板放置于二氧化碳培养箱孵育培养24h。

6.2.4.6 诱导及给药

培养结束后，弃液。根据试验分组，更换液体，每孔液量为1 mL。空白对照组进行换液，阳性对照组更换反-4-叔丁基环己醇工作液，受试物组更换含有一定浓度受试物的CAP工作液。换液结束后，将24孔板放入二氧化碳培养箱孵育24h。

6.2.4.7 细胞固定及清洗

孵育结束后，弃液，PBS溶液清洗三次，每孔加入1 mL 4%多聚甲醛组织固定液，固定30min，PBS溶液清洗三次。

6.2.4.8 免疫荧光检测

每孔加入山羊血清，常温下封闭1h，吸净细胞爬片上附着的血清。每孔添加Anti-TRPV1抗体（稀释比例参考说明书），常温孵育2h或4 ℃过夜。孵育结束后，PBS溶液清洗三次，每孔滴加FITC荧光二抗（稀释比例参考说明书），常温孵育1h。孵育结束后，PBS溶液清洗三次。每孔滴加Hoechst 33342（稀释比例参考说明书），常温孵育10 min。孵育结束后，弃液，PBS溶液清洗三次，吸水纸吸干细胞爬片表面附着的液体。镊子夹取细胞爬片，细胞面朝下，贴于滴加有抗荧光淬灭封片液的载玻片表面，正置荧光显微镜物镜20倍镜下进行拍照（拍照视野至少选择3个）。

6.2.4.9 数据分析

使用图像处理软件计算每张照片视野内的积分光密度值及细胞总数。

6.2.4.10 结果统计分析

对数据进行统计并作图，结果表示为平均值±SD。各组间比较采用合适的统计方法进行统计分析，P＜0.05认为具有显著差异。

6.2.5结果计算

6.2.5.1 TRPV1含量计算

采用相对平均积分光密度值对TRPV1进行定量。

计算公式：

$$单个细胞的积分光密度值=A/B$$

式中：

A—图像视野内TRPV1着色区域的积分光密度值；

B—图像视野内的总细胞数量。

$$相对积分光密度值=C/D$$

式中：

C—受试物组单个细胞的积分光密度值平均值；

D—空白对照组单个细胞的积分光密度值平均值。

6.2.5.2 抑制率

$$ 抑制率\left（\%\right）=\left（1-\frac{F}{E}\right）×100\%$$

式中：

F—受试物的相对积分光密度值；

E—阴性对照组的相对积分光密度值。

6.2.6 试验有效性验证

要求每批次试验阴性对照组相较空白对照组，TRPV1相对平均积分光密度值上调≥1.2倍，阳性对照相较阴性对照组，TRPV1抑制率≥25%，则认为试验系统有效。

统计各组平行孔间TRPV1相对平均积分光密度值的标准差，并计算C.V，C.V值≤30%，则认为试验平行性有效。

6.2.7 结果报告

a）TRPV1含量应表述为：相对平均积分光密度值±SD。

b）评价受试物抑制TRPV1表达的能力，需要受试物与阴性对照组相比，TRPV1相对平均积分光密度值具有统计学差异（*P*＜0.05）。

c）对于受试物抑制TRPV1含量的表述，应包含具体的浓度及对应的抑制率。

6.2.8 结果相关性解读

受试物与阴性对照组相比，TRPV1相对积分光密度值下降，且数值具有统计学差异（*P*＜0.05），说明受试物在该浓度下具有抑制TRPV1表达的作用，具有舒缓功效。

6.3 LPS-巨噬细胞炎症模型炎症因子、炎症介质含量测定方法

6.3.1 原理

炎症是机体受到外界物质入侵后的一种保护性反应。LPS诱导小鼠单核巨噬细胞白血病细胞系RAW264.7是研究炎症因子的经典细胞模型。LPS与巨噬细胞表面抗原识别受体相结合，诱导巨噬细胞分泌一系列细胞因子，包括促炎细胞因子、抗炎细胞因子和趋化因子等。LPS诱导巨噬细胞分泌TNF-α、IL-6、IL-1β、iNOS等，iNOS进一步促进NO的释放。同时，LPS也会诱导巨噬细胞分泌PGE2，参与急性炎症反应。因此，本试验构建LPS诱导巨噬细胞活化细胞模型，通过受试物作用细胞模型一定时间后，TNF-α、IL-6、IL-1β、NO、PGE2的抑制率，评价受试物是否具有舒缓功效。

6.3.2 仪器和设备

a）移液器：规格1000 µL、200 µL、2.5 µL、10 µL；

b）二氧化碳培养箱：37 ℃，5% CO2；

c）酶标仪；

d）超净工作台或生物安全柜；

e）分析天平：精度0.1 mg；

f）细胞计数仪。

6.3.3 主要试剂及耗材

除另有规定外，所有试剂均为分析纯，试验用水参照GB/T 6682规定的一级水。细胞培养涉及试剂与耗材必须无菌。

6.3.3.1 细胞

小鼠单核巨噬细胞白血病细胞系RAW264.7，在试验前应至少传代一次。

6.3.3.2 细胞培养涉及试剂及耗材

a）高糖DMEM培养液；

b）细胞培养瓶。

6.3.3.3 试验涉及试剂及耗材

a）LPS：CAS号93572-42-0；

b）1 µg/mL LPS工作液：配置方法见附录A，具体使用浓度可根据培养细胞特性进行调整；

c）6孔细胞培养板；

d）小鼠IL-1β ELISA检测试剂盒；

e）小鼠TNF-α ELISA检测试剂盒；

f）小鼠IL-6 ELISA检测试剂盒；

g）NO含量检测试剂盒；

h）PGE2 ELISA检测试剂盒；

i）地塞米松：CAS号50-02-2；

j）100 µg/mL地塞米松工作液：配置方法见附录A，具体使用浓度可根据培养细胞特性进行调整。

6.3.4 试验步骤

6.3.4.1 试验环境

试验须在超净台或生物安全柜提供的无菌环境下开展。

6.3.4.2 细胞准备

取液氮保存的小鼠单核巨噬细胞白血病细胞系RAW264.7细胞，复苏并以合适的密度接种到培养瓶（推荐接种密度为1.8×104 个/cm2-2.1×104 个/cm2）。

6.3.4.3 受试物准备

受试物应在使用前配制完成并直接使用。高糖DMEM培养液中溶解度受限的受试物应当溶解在适当的溶剂中，并确保溶剂的浓度在所有测试组的高糖DMEM培养液中保持一致，即在阴性对照组和其它试验组中保持一致，并且无细胞毒性。受试物浓度的选择应避免出现沉淀。

对于细胞培养液中溶解受限的受试物，可使用DMSO或乙醇作为溶剂。在使用溶剂前应评估受试物的特殊性质，避免受试物与溶剂发生化学反应。

可使用涡旋混合、超声处理或加热到适当温度等方法辅助溶解。

6.3.4.4 试验条件

试验需设置空白对照组、阴性对照组、阳性对照组和受试物组，每组设置3个生物学重复。

a） 空白对照组：巨噬细胞及高糖DMEM培养液；

b） 阴性对照组：巨噬细胞及1 µg/mL LPS工作液；

c） 阳性对照组：巨噬细胞及100 µg/mL地塞米松工作液；

d） 受试物组：巨噬细胞及含有一定浓度受试物的1 µg/mL LPS工作液。受试物浓度应当通过细胞毒性检测，确定受试物的浓度范围。

6.3.4.5 细胞接种

按合适的细胞接种密度接种细胞至6孔细胞培养板（推荐接种密度为6.5×104 个/cm2-6.9×104 个/cm2），将孔板放置于二氧化碳培养箱孵育24h。

6.3.4.6 诱导及给药

培养结束后，弃液。根据试验分组，更换液体，每孔液量为2 mL。空白对照组进行换液，阳性对照组更换100 µg/mL地塞米松工作液，受试物组更换含有一定浓度受试物的1 µg/mL LPS工作液。结束后，将6孔板放入二氧化碳培养箱孵育24h。

6.3.4.7 收样

孵育结束后，分别收集各组孔中的培养液。

6.3.4.8 检测

根据ELISA试剂盒说明书开展IL-1β、TNF-α、IL-6、NO、PGE2含量测定。

6.3.5 结果计算

$抑制率\left（\%\right）=（1-\frac{T}{G}）×100\%$

式中：

T—受试物炎症因子、炎症介质含量平均值；

G—阴性对照组炎症因子、炎症介质含量平均值。

6.3.6 试验有效性验证

每批次试验均须设置阴性对照组及阳性对照组，要求每批次试验阴性对照组相较空白对照组，炎症因子、炎症介质含量上调≥2倍、阳性对照相较阴性对照组，炎症因子、炎症介质抑制率≥20%，则认为试验系统有效。

统计各组平行孔间炎症因子、炎症介质含量的标准差，并计算C.V，C.V值≤30%，则认为试验平行性有效。

6.3.7 结果报告

a）炎症因子、炎症介质含量应表述为：含量平均值±标准差。

b）评价受试物抑制炎症因子、炎症介质，需受试物与阴性对照组相比炎症因子、炎症介质含量存在差异显著性（*P*＜0.05）。

c）对于受试物抑制炎症因子、炎症介质含量的表述，应包含受试物的具体浓度、炎症因子或炎症介质名称及对应的抑制率。

6.3.8 结果相关性解读

受试物与阴性对照组相比，IL-1β含量降低，且具有显著差异（*P*＜0.05），说明受试物通过抑制IL-1β生成，达到舒缓功效。

受试物与阴性对照组相比，TNF-α含量降低，且具有显著差异（*P*＜0.05），说明受试物通过抑制TNF-α生成，达到舒缓功效。

受试物与阴性对照组相比，IL-6含量降低，且具有显著差异（*P*＜0.05），说明受试物通过抑制IL-6生成，达到舒缓功效。

受试物与阴性对照组相比，PGE2含量降低，且具有显著差异（*P*＜0.05），说明受试物通过抑制PGE2生成，达到舒缓功效。

受试物与阴性对照组相比，NO含量降低，且具有显著差异（*P*＜0.05），说明受试物通过抑制NO生成，达到舒缓功效。

6.4 斑马鱼幼鱼中性粒模型细胞抑制率法

6.4.1 原理

SLS能诱发表皮炎症细胞浸润，导致皮肤出现红斑、瘙痒、疼痛等症状。SLS暴露于斑马鱼幼鱼皮肤表面，能同样诱导炎症反应，导致中性粒细胞发生免疫应答，向皮肤表面增殖和迁移。使用转基因中性粒细胞绿色荧光品系斑马鱼幼鱼进行试验，通过图像分析方法可对中性粒细胞进行计数。将受试物暴露于斑马鱼幼鱼皮肤表面后，与对照组相比，计算受试物对斑马鱼中性粒细胞的抑制率，从而评价其舒缓功效。

6.4.2 材料和试剂

除非另有说明，所用试剂均为分析纯。试验用水应参照GB/T 6682规定的三级水。

6.4.2.1 斑马鱼幼鱼

使用转基因中性粒细胞绿色荧光品系斑马鱼的幼鱼Tg（mpx：egfp）。

6.4.2.2 试剂及耗材

a）甲基纤维素：CAS号9004-67-5；

b）SLS：CAS号2386-53-0；

c）60 mg/mL SLS：配置方法见附录A；

d）甘草酸二钾：CAS号68797-35-3；

e）0.625 mg/mL甘草酸二钾：配置方法见附录A；

f）甲基纤维素；

g）3%甲基纤维素（m/m），配置方法见附录A；

h）碳酸氢钠：NaHCO3，CAS号144-55-8；

i）氯化钾：KC1，CAS号7647-14-5；

j）氯化钙二水合物：CaCl2•2H2O，CAS号10035-04-8；

k）硫酸镁七水合物：MgSO4•7H2O，CAS号10034-99-8；

l）标准稀释水：配置方法见附录A；

m）DMSO：CAS号67-68-5；

n）铝箔纸；

o）去离子水：pH为6.5-8.5,电导率＜10 μS/cm。

6.4.3 仪器和设备

a）生化培养箱：带有温控和进风装置，温度控制范围5℃-50℃，精度±0.1℃；

b）电子天平：精度 0.1 mg；

c）体视显微镜：自带白光光源，最小放大倍数为20；

d）荧光体视显微镜：同时带有显微拍照系；

e）平底六孔细胞培养板；

f）容量瓶：规格10 mL、1000 mL。

6.4.4 试验准备

6.4.4.1 受试物储备液制备

根据受试物的自身特性，用标准稀释水配制成一定浓度的受试物储备溶液，备用。水溶性或易在水中分散的受试物：称取适量0.01 g- 0.10 g受试物，用标准稀释水溶解并定容至10 mL。在水溶液中难于溶解或分散的受试物：称取适量0.01 g- 0.10 g受试物，添加0.1 mL DMSO助溶，用标准稀释水溶解并定容至10 mL。所有组别中的DMSO浓度应该保持一致，且浓度（体积分数）不大于1%。同时，应加设溶剂对照组试验，溶剂对照组不能对斑马鱼的存活有明显或其他任何可观察到的不利影响，也不能对试验结果有显著性影响。

6.4.4.2 斑马鱼幼鱼准备

在体视显微镜下挑选发育正常的2 dpf斑马鱼幼鱼，置于盛有标准稀释水的六孔细胞培养板中进行孵育，每孔15尾，容器的水温控制在（28.5±1.0）℃。

6.4.5 预试验

预试验用于确定受试物的MTC，为正式试验的浓度设置提供参考。

6.4.5.1 受试物稀释液制备

将受试物储备液用标准稀释水以2倍几何级数稀释至3-5个浓度系列，备用。

6.4.5.2 受试物处理

选取发育正常的2 dpf的斑马鱼幼鱼，放入六孔细胞培养板中，每孔15尾，在不伤害幼鱼的情况下除去六孔细胞培养板中的标准稀释水,然后迅速向每孔中加入3 mL含60 mg/mL SLS的受试物稀释液。

盖上培养板面板并用铝箔纸包裹，在（28.5±1.0）℃生化培养箱中避光孵育，孵育至3 dpf后（孵育时长18h）用体视显微镜进行观察，对斑马鱼的死亡和其他毒性效应进行记录。

6.4.5.3 MTC 的确定

以3 dpf的斑马鱼幼鱼未出现任何死亡（无心跳）和其他毒性效应（水肿、躯干弯曲、肌肉纹理不清晰、对机械刺激无反应等）的最高浓度组别确定为MTC。

6.4.6 正式试验

6.4.6.1 试验分组

a）空白对照组：含斑马鱼幼鱼及标准稀释水，每次试验设置一个空白对照组即可；

b）溶剂对照组：含有DMSO和斑马鱼幼鱼。如果受试物配制过程中使用了助溶剂，应设置该组；

c）模型对照组：含斑马鱼幼鱼及60 mg/mL SLS；

d）阳性对照组：含有60 mg/mL SLS、阳性对照和斑马鱼幼鱼。根据需要，每次试验设置一个阳性对照组即可；

e）受试物测试组：含有60 mg/mL SLS、受试物和斑马鱼幼鱼，受试物根据需要设置多个不同的浓度组。

6.4.6.2 受试物浓度设置

根据预试验的结果，确定正式试验的受试物浓度范围，试验最高浓度组不得高于MTC。根据测试需要，将受试物储备液用标准稀释水以2倍几何级数稀释至3-5个浓度系列。

6.4.6.3 受试物处理

选取发育正常的2 dpf的斑马鱼幼鱼，并随机分配到六孔细胞培养板中，每孔15尾，在不伤害幼鱼的情况下除去六孔细胞培养板中的标准稀释水，然后迅速向每孔中加入3 mL含60 mg/mL SLS的受试物溶液。

充分混匀后，盖上培养板面板并用铝箔纸包裹，在（28.5±1.0）℃生化培养箱中避光孵育至终点（孵育时间共计18h）。

6.4.6.4 观察和拍照

孵育结束后，从表型和行为正常的斑马鱼中随机选取至少12尾斑马鱼，用3%甲基纤维素固定，在荧光体视显微镜下观察并拍照，拍照时斑马鱼体位应保持一致，头朝左、侧面朝下、身体保持水平。所有斑马鱼的拍照应在相同的仪器和环境条件下2 h内完成。

6.4.6.5 图像分析

拍照完成后，使用图像分析软件对获取到的斑马鱼图片进行分析，选取定量区域为斑马鱼侧面皮肤表面区域（附录B规范性附录B.1所示）。将软件的分析参数设置为中性粒细胞数量，每组设置10个试验有效数据。

6.4.7 结果计算

6.4.7.1 统计学分析

将中性粒细胞个数记为N，计算各组试验的平均值（Mean）及SE，统计学处理结果用Mean士SE表示。使用SPSS软件对数据进行方差分析，以模型对照组作为标准，比较各试验组中性粒细胞个数，*P*＜0.05为有显著性差异。

6.4.7.2 舒缓功效的定量计算

$$Q=\frac{N1-N2}{N1-N3}\*100\%$$

式中：

Q—受试物测试组与模型对照组相比，中性粒细胞的抑制率;

N1——模型对照组斑马鱼皮肤表面中性粒细胞数量；

N2—受试物组斑马鱼皮肤表面中性粒细胞数量；

N3—空白对照组斑马鱼皮肤表面中性粒细胞数量。

注：如果受试物配制过程中使用了助溶剂，则式中的空白对照组数值用溶剂对照组数值进行替换。

6.4.8 试验有效性验证

预试验或正式试验中，空白对照组（如果使用了助溶剂，也包括溶剂对照组）斑马鱼的死亡率或异常率不得超过10%，超过10%则该次试验视为失败。

正式试验中，空白对照组与模型对照组的之间的中性粒细胞个数存在统计学上的显著性差异，且平均值之差必须大于2倍的空白对照组组内SD，否则该次试验视为失败。

正式试验中，阳性对照组与模型对照组之间的中性粒细胞个数存在统计学上的显著性差异，且平均值之差必须大于2倍的模型对照组组内SD，否则该次试验视为失败。

正式试验中，如果使用了DMSO，溶剂对照组与空白对照组之间的中性粒细胞个数不能存在统计学上的显著性差异，否则该次试验视为失败。

6.4.9 结果报告

a）各组中性粒细胞数量应表述为：中性粒细胞数量±SE。

b）评价受试物抑制中性粒细胞的能力，需要受试物较阴性对照组，中性粒细胞数量存在差异显著性（*P*＜0.05）。

c）对于受试物抑制中性粒细胞数量的表述，应包含具体的浓度及对应的抑制率。

6.4.10 结果相关性解读

在试验满足有效性的基础上，受试物中性粒细胞个数N与模型对照组相比有统计学上的显著性差异，即*P*＜0.05，说明受试物在该浓度下能够抑制中性粒细胞的增殖和迁移，具有舒缓功效。

附 录 A

（规范性附录）

试剂配制

A.1 0.1%（m/v）SLS的配制

称取6 mg SLS，溶于6 mL PBS，配制成0.1% SLS工作液，使用前需用0.22 µm滤膜过滤。

A.2 地塞米松储备液的配制

100℃烘箱烘干2 h，称取100 mg地塞米松，溶于1 mL DMSO中，配制成浓度为100 mg/mL的地塞米松储备液，保存至-80℃，有效期6个月。

### A.3 CAP储备液的配制

称取17.6 mg辣椒素粉末（分子量293.4 g/mol），溶于0.5 mL DMSO中，涡旋混匀，配制成浓度为120 mmol/L的储备液, 分装后避光保存，有效期6个月。

### A.4 15 μmol/L CAP工作液的配制

吸取3 μL CAP储备液溶于24 mL细胞培养基，稀释为15 μmol/L辣椒素工作液。现用现配。

### A.5反-4-叔丁基环己醇储备液的配制

### 称取7.8 mg反-4-叔丁基环己醇溶于0.5 mL DMSO中，配制成浓度为15.6 mg/mL的储备液，分装-20℃保存，有效期6个月。

### A.6 15.6 μg/mL反-4-叔丁基环己醇工作液的配制

吸取20 μL反-4-叔丁基环己醇储备液，溶于20 mL CAP工作液，现用现配。

A.7 PBS溶液的配制

称取22.4 g磷酸盐缓冲液干粉，用去离子水溶解，定容至2 L，调节pH至7.2-7.4范围内，4℃保存。

### A.8 LPS储备液的配制

称取5 mg LPS，加入5 mL无菌PBS，涡旋混匀，配制成1 mg/mL的 LPS的储备液，分装后保存至-80 ℃,有效期3个月。

### A.9 1 μg/mL LPS工作液的配制

采用高糖DMEM培养液按照体积比1：1000稀释至1 μg/mL，现用现配。

A.10 100 µg/mL地塞米松工作液的配制

采用LPS工作液，按照体积比1：1000将地塞米松储备液稀释至100 μg/mL，现用现配。

### A.11 标准稀释水储备液的配制

分别称取2.59 g碳酸氢钠，0.23 g氯化钾，11.76 g二水合氯化钙，4.93 g七水合硫酸镁用水溶解，定容至1 L容量瓶，备用。

### A.12标准稀释水的配制

吸取2.5 mL标准稀释水储备液于100 mL容量瓶，用水定容至刻度，摇匀备用。

### A.13 60 mg/mL十二烷基硫酸钠的配制

称取0.06 g SLS，加入1 mL助溶剂溶解后，用标准稀释水定容成10 mL，得到6 mg/mL的储备液，再吸取0.1 mL储备液，用标准稀释水定容至10 mL，备用。

### A.14 0.625 mg/mL甘草酸二钾的配制

称取6.25 g甘草酸二钾，用标准稀释水溶解后定容成100 mL，得到62.5 mg/mL的储备液，再吸取0.1 mL储备液，用标准稀释水定容成10 mL，备用。

### A.15 3%甲基纤维素的配制

称取3.0 g甲基纤维素，缓慢加入到97.0 g沸水中，边加边搅拌，完全溶解后，停止加热，继续搅拌冷却至室温,用铝箔纸密封烧杯口，放在4℃冰箱保存。

附 录 B

（规范性附录）

斑马鱼中性粒细胞定量区域

图B.1为斑马鱼皮肤表面中性粒细胞定量区域图，其中：虚线区域为计算区域；荧光点为中性粒细胞。



图B.1斑马鱼皮肤表面中性粒细胞定量区域

参考文献

[1]《化妆品安全技术规范》（2015年版）（国家食品药品监督管理总局公告 2015 年第 268 号）

[2]《化妆品分类规则和分类目录》

[3]黄瑾,王建,袁芳,胡文娟.皮肤角质形成细胞中TRPV1受体激活后的蛋白质组差异分析[J].药学实践与服务, 2013, 31（5）: 334-337.

[4]谭淇丹,毕永贤,刘蕾,胡雪情.化妆品舒缓功效评价的研究现状[J].日用化学工业.2023,53（2）:193-201.

\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_