

团体标准

T/GDCDC 02X—2022

化妆品舒缓功效测试 体外巨噬细胞一氧化氮（NO）释放抑制测定

Soothing efficacy test of cosmetics—In vitro test method for the inhibition of nitric oxide (NO) released from lipopolysaccharide-induced macrophage

（征求意见稿）

在提交反馈意见时，请将您知道的相关专利连同支持性文件一并附上。

XXXX—XX—XX 发布

XXXX—XX—XX 实施

广东省日化商会 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 材料	2
6 试验方法	3
7 结果计算	5
8 质量控制	5
9 结果评价	6
10 结论	6
附录 A（规范性） 细胞维护和培养程序	7
附录 B（资料性） 正常小鼠巨噬细胞 RAW264.7 株示例	8
附录 C（规范性） 受试物溶解度预测试流程	9
附录 D（资料性） 十进制几何浓度序列	10
附录 E（规范性） 细胞毒性试验和 NO 释放抑制试验测试步骤	11
参考文献	12

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。

本文件由广东省日化商会提出。

本文件由广东省日化商会归口。

本文件起草单位：

本文件主要起草人：

本文件为首次发布。

化妆品舒缓功效测试 体外巨噬细胞一氧化氮（NO）释放抑制测定

1 范围

本文件规定了体外巨噬细胞一氧化氮（NO）释放抑制测定的原理、材料、试验方法、结果计算、质量控制、结果评价和结论。

本文件提供了一种化妆品及原料抑制LPS诱导体外巨噬细胞释放一氧化氮（NO）的测试方法，为化妆品及原料舒缓功效宣称提供科学支持。

本文件适用于通过由外部刺激引起的炎症反应通路而达到舒缓效果的样品，不适用于通过其他通路作用、无法在水溶液中均匀分散、无法透过皮肤屏障、或因细胞毒性较大导致测试浓度偏低的样品。

2 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，仅该日期对应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

SN/T 3899 化妆品体外替代试验 良好细胞培养和样品制备规范

SN/T 2328 化妆品急性毒性的角质细胞试验

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

格里斯试剂 griess reagent

对氨基苯磺酸和 α -萘胺醋酸性的混合溶液。

3.2

格里斯试验 griess experiment

在醋酸介质条件下，用格里斯试剂与亚硝酸根离子（ NO_2^- ）反应，生成红色偶氮化合物，用于鉴定亚硝酸根离子（ NO_2^- ）

3.3

光密度 optical density, OD

入射光和透射光的透过率之比值的常用对数值。

4 原理

4.1 NO 抑制与舒缓功效原理

细菌脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)与巨噬细胞表面抗原识别受体相结合，诱导巨噬细胞释放炎症介质NO，过多的NO可以促进巨噬细胞释放IL-6、TNF- α 等炎症因子，而这些炎症因子又可以促进细胞分泌更多的NO，形成恶性循环，加重炎症反应。通过测定给药后样品组的NO抑制率，评价样品对NO释放的抑制作用，从而评价样品是否具有舒缓功效。

4.2 NO 相对含量测试原理

NO在体内或水溶液中极易氧化成 NO_2^- ，在酸性条件下， NO_2^- 与重氮盐磺胺发生重氮反应，并生成重氮化合物，后者进一步与萘基乙烯基二胺发生耦合反应，该反应生成的产物浓度与NO浓度具有线性关系，在540nm处有最大吸收峰。用酶标仪测定540nm处光密度（OD）值，计算NO的相对含量。

5 材料

5.1 细胞系

小鼠单核巨噬细胞白血病细胞系RAW264.7株。

5.2 仪器及设备

本文件测试所需仪器如下：

- 二氧化碳培养箱（ $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ ，湿化， $5\% \pm 1\% \text{CO}_2$ ）；
- 生物安全柜或层流洁净工作台；
- 水浴槽（ $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ ）；
- 倒置相差显微镜；
- 酶标仪：配备 540nm、570nm、630nm 滤光片；
- 电子天平（精确到 0.001g）；
- 低速离心机；
- 细胞板振荡器；
- 漩涡混匀仪；
- 移液器：1000 μL 、200 μL 、50 μL 、10 μL ；
- 细胞计数仪或血球计数板。

5.3 试剂

本文件测试所需试剂如下：

- DMEM 培养基（dulbecco's modified eagle medium）；
- DMEM/F12 无酚红培养基；
- 牛血清；
- 胰蛋白酶/EDTA 溶液；
- 磷酸盐缓冲液（PBS）；
- 青霉素/链霉素；
- 噻唑蓝（MTT）；
- 二甲基亚砜（DMSO）；
- 无水乙醇；
- 细菌脂多糖（lipopolysaccharide, LPS, 大肠杆菌来源）；
- 地塞米松磷酸钠；
- 格里斯试剂。

5.4 试剂准备

5.4.1 基本要求

除另有规定外，所有试剂应为分析纯，试验用水应按 GB/T 6682 三级用水的要求进行制备。与细胞培养相关试剂、耗材应作无菌处理。

5.4.2 牛血清

解冻后 56°C 加热灭活30min。

5.4.3 磷酸盐缓冲液（PBS）

取磷酸二氢钾27.22g，加1000mL水使其溶解，取50mL，加0.2mol/L氢氧化钠溶液42.4mL，再加水稀释至200mL，使其pH为7.6，即得。

5.4.4 培养基

5.4.4.1 常规培养基

含10%牛血清，50U/mL青霉素，50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 链霉素的DMEM培养基。

5.4.4.2 试验培养基

含2%牛血清，50U/mL青霉素，50 μg/mL链霉素的DMEM培养基。

5.4.4.3 冻存培养基

含20%牛血清，10% DMSO，50U/mL青霉素，50 μg/mL链霉素的DMEM培养基。

5.4.5 噻唑蓝 (MTT)

5.4.5.1 贮备液

用PBS配制成5mg/mL，过滤(0.22 μm微孔滤膜)，2℃~8℃避光保存。

5.4.5.2 工作液

用DMEM/F12无酚红培养基将MTT贮备液稀释成1mg/mL，使用时现配现用。

5.4.6 细菌脂多糖 (LPS)

5.4.6.1 贮备液

用纯水配制成1mg/mL，过滤后分装于棕色玻璃瓶中，-15℃以下保存。

5.4.6.2 工作液

用试验培养基将LPS贮备液稀释成2.5 μg/mL，使其终浓度为1.25 μg/mL，使用时现配现用。

5.4.7 地塞米松磷酸钠，阳性对照物

5.4.7.1 贮备液：

用PBS配制成10mg/mL，过滤(0.22 μm微孔滤膜)，-15℃以下保存。

5.4.7.2 工作液：

用试验培养基将地塞米松磷酸钠贮备液稀释成4mg/mL，再与LPS工作液1:1混合，使用时现配现用。

5.4.8 格里斯溶液

用纯水配制成1%浓度，室温避光保存，溶液应当澄清透明，如发生颜色变化或沉淀等现象则不可使用。

5.5 耗材

本文件测试所需耗材如下：

- 25cm²和75cm²细胞培养瓶，用于常规培养；
- 96孔，平底细胞培养板，用于细胞培养及试验；
- 2mL细胞冻存管，用于细胞冻存；
- 0.22 μm水系微孔滤膜，用于试剂过滤除菌。

6 试验方法

6.1 基本要求

除了除菌前试剂的准备外，所有溶液、玻璃器皿、吸头等都应无菌，所有操作应在无菌条件和无菌环境下进行。

6.2 细胞准备

细胞的维护和培养程序参见附录A。取冷冻保存的细胞培养物以一个合适的密度接种1到常规培养基中用于试验；用于试验的细胞在检测前至少传代一次，在试验前一天接种于96孔板中，每孔接种量为100 μL。

注：细胞接种密度应保证在接种24h后，6.3条中细胞融合度达到50%~70%，6.4条中细胞融合度达到80%~90%，

正常细胞形态参见附录B。

6.3 细胞毒性测试

6.3.1 受试物准备

受试物所用溶剂及最大试验浓度选择参见附录C，浓度级数的设计参见附录D。受试物应在测试当天准备，宜在测试前4h内准备完毕；溶剂终浓度应保持一致，无细胞毒性，不对细胞增殖及样品产生任何其他影响。

6.3.2 MTT 测试

弃掉96孔板中的培养基，根据图1加入不同浓度的受试物溶液，同时设置空白对照组（NC）和阳性对照组（PC），100 μL/孔，每个浓度6个复孔进行加样，结束后，盖上细胞板盖，封边，置于二氧化碳培养箱中培养20h~48h。培养结束后，观察并记录细胞状态，弃去培养液，用PBS洗1至2次，加入MTT工作液，50 μL/孔，继续置于二氧化碳培养箱培养2h~6h，弃去培养液，每孔加入150 μL的DMSO，震荡5min~10min，用酶标仪测定570nm处吸光度值，采用630nm作为参考波长，根据结果计算细胞存活率，当样品在96孔板中对应浓度的细胞存活率≥90%，且样品组的细胞与空白组细胞的形态无明显差异时，则说明样品在该浓度下无明显细胞毒性，选用该浓度进行下一步试验。试验流程参见附录E。

图1 96孔细胞板加样示意图（细胞毒性测定）

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS
B	PBS	NC	C8	C7	C6	C5	C4	C3	C2	C1	PC	PBS
C	PBS	NC	C8	C7	C6	C5	C4	C3	C2	C1	PC	PBS
D	PBS	NC	C8	C7	C6	C5	C4	C3	C2	C1	PC	PBS
E	PBS	NC	C8	C7	C6	C5	C4	C3	C2	C1	PC	PBS
F	PBS	NC	C8	C7	C6	C5	C4	C3	C2	C1	PC	PBS
G	PBS	NC	C8	C7	C6	C5	C4	C3	C2	C1	PC	PBS
H	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS

注：PBS —— 只加PBS，无细胞；

NC —— 试验培养基，有细胞；

C1~C8 —— 含8个不同浓度受试物溶液的试验培养基，有细胞（C1为最高浓度，C8为最低浓度）；

PC —— 含0.1mg/mL的SDS溶液的试验培养基，有细胞。

6.4 NO 释放抑制试验

6.4.1 细胞及受试物准备

按6.2条规定重新准备细胞，根据6.3条中细胞毒性测试结果，配制2倍的无细胞毒性的受试物溶液，如受试物的无细胞毒性浓度为1%，则将受试物浓度配制成2%。所用溶剂应与细胞毒性测试一致，受试物应在测试当天准备，建议在测试前2h内准备完毕。

6.4.2 加样

弃掉96孔板中的培养基，每孔加入50μL的受试物溶液，再加入50μL的LPS工作液，每孔总体积为100μL。同时还应设阳性对照组、模型对照组、空白对照组。阳性对照组每孔加入100μL的地塞米松磷酸钠工作液，模型对照组每孔加入50μL的试验培养基和50μL的LPS工作液，空白对照组每孔加入100μL的试验培养基。每组各6个复孔。加样完毕后将96孔板置二氧化碳培养箱中孵育培养24h±2h。

6.4.3 格里斯试验

孵育培养结束后，每孔收集50 μL的细胞培养上清液放入一个新的96孔板中，每孔加入50 μL的格里斯溶液，混匀后避光反应10min，用酶标仪在540nm处检测OD值。试验流程参见附录E。

7 结果计算

7.1 细胞存活率

细胞存活率按公式（1）计算。

$$\text{细胞存活率(\%)} = \frac{\text{OD}_{\text{样品}}}{\text{OD}_{\text{空白}}} \times 100\% \quad (1)$$

式中：

OD_{样品}——样品组的 OD 值均值；

OD_{空白}——空白对照组的 OD 值均值。

7.2 NO 含量及抑制率计算

7.2.1 NO 相对含量

NO相对含量按公式（2）计算。

$$\text{NO 相对含量(\%)} = \frac{\text{OD}_{\text{样品}}}{\text{OD}_{\text{模型组}}} \times 100\% \quad (1)$$

式中：

OD_{样品}——样品组的 OD 值均值；

OD_{模型组}——模型对照组的 OD 值均值。

7.2.2 NO 相对抑制率

NO相对抑制率按公式（3）计算。

$$\text{NO 相对抑制率(\%)} = \frac{\text{OD}_{\text{模型组}} - \text{OD}_{\text{样品}}}{\text{OD}_{\text{模型组}}} \times 100\% \quad (1)$$

式中：

OD_{样品}——指样品组的 OD 值均值；

OD_{模型组}——模型对照组的 OD 值均值。

8 质量控制

8.1 细胞毒性试验

进行MTT试验时，在96孔板第11列加入0.1mg/mL的SDS溶液作为对照，作为质量控制。测试值应在表1置信范围内。

表1 测定吸光度的置信区间

组别	95%置信区间 (OD _{570nm} 值, 参考波长 630nm)
溶剂对照孔	1.000~2.500
SDS 对照孔	0.010~0.100

8.2 可接受标准（阳性对照）

8.2.1 每批次试验均须设置阳性对照组、模型对照组和空白对照组，要求每批次试验，与模型对照组相比，空白对照组 NO 相对含量应≤50%，阳性对照组 NO 相对抑制率应≥20%，则认为试验体系有效。

8.2.2 统计酶标仪测得的各组复孔间光密度的标准差 (Standard Deviation, SD), 并计算变异系数 (Coefficient of Variation, C.V), 若 C.V 值 \leq 20%, 则认为试验平行性有效。

9 结果评价

9.1 NO 相对含量应表述为: 平均值 \pm 标准差 (SD)。

9.2 评价受试物 NO 释放的抑制能力, 需要样品组的 NO 相对抑制率 \geq 10%, 且样品组的 NO 相对含量与模型对照组相比, 具有显著性差异 ($P < 0.05$)。

9.3 报告中对于受试物抑制 NO 释放的表述, 应包含受试物浓度。

10 结论

在试验满足有效性验证的基础上, 样品组与模型对照组相比, NO 相对抑制率 \geq 10%, 且样品组的 NO 相对含量与模型对照组相比, 具有显著性差异 ($P < 0.05$), 说明受试物在该受试浓度下, 具有抑制巨噬细胞释放 NO 的能力, 可作为舒缓类化妆品及原料功效宣称的证据支持之一。

附 录 A
(规范性)
细胞维护和培养程序

A. 1 细胞复苏

将安瓶放在37℃的水浴中，使细胞解冻，时间应控制在2min内并尽可能短。使细胞在常规培养基中重新悬浮，用离心机1000rpm离心5min后，轻轻倒出上层清液，收集沉淀的细胞；加入新的常规培养基，使细胞团块在培养基中重新悬浮，转入细胞培养瓶中，置于在二氧化碳培养箱中培养。

A. 2 培养条件

将小鼠巨噬细胞移入在培养瓶内，置于温度37℃和5% CO₂的潮湿空气中长成单细胞层。应每天在相差显微镜下检查细胞，注意形态或其贴壁特性的变化，当细胞达到80%融合时，用细胞刮或其他工具将细胞从培养瓶中分散下来。

注：常规培养基在使用前，应在水浴槽中将其预热至37℃。

A. 3 细胞传代

取A. 2中刮落后的细胞，加入常规培养基，吹散细胞。吸取100 μL细胞悬液进行细胞计数，用常规培养基调整细胞浓度为(5.0×10⁴~2.0×10⁵) cell/mL，转入新的细胞瓶或96孔板中，置二氧化碳培养箱中培养。

A. 4 细胞冻存

取刮落或消化后的细胞，加入常规培养基，吹散细胞。将细胞悬液用离心机1000rpm离心5min，弃去上清液，重悬细胞于冻存培养基中，细胞浓度调整至(1.0×10⁶~5.0×10⁶) cell/mL，每支冻存管分装1mL细胞悬液，以1℃/min的冷冻速率冷冻细胞直到达到-70℃~-80℃，可通过不同的技术实现。将冻存管放入液氮进行储存。

附 录 B

(资料性)

正常小鼠巨噬细胞 RAW264.7 株示例

图B.1给出了正常小鼠巨噬细胞RAW264.7株10倍显微镜下的示图。

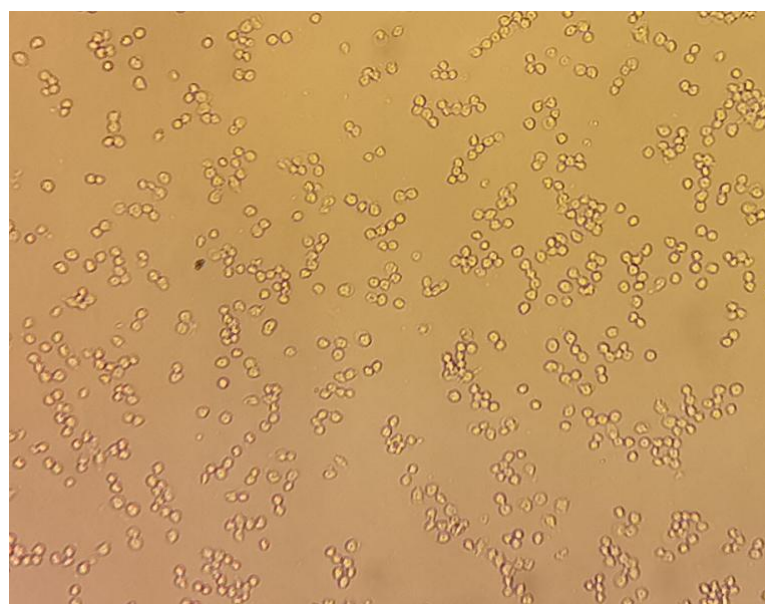
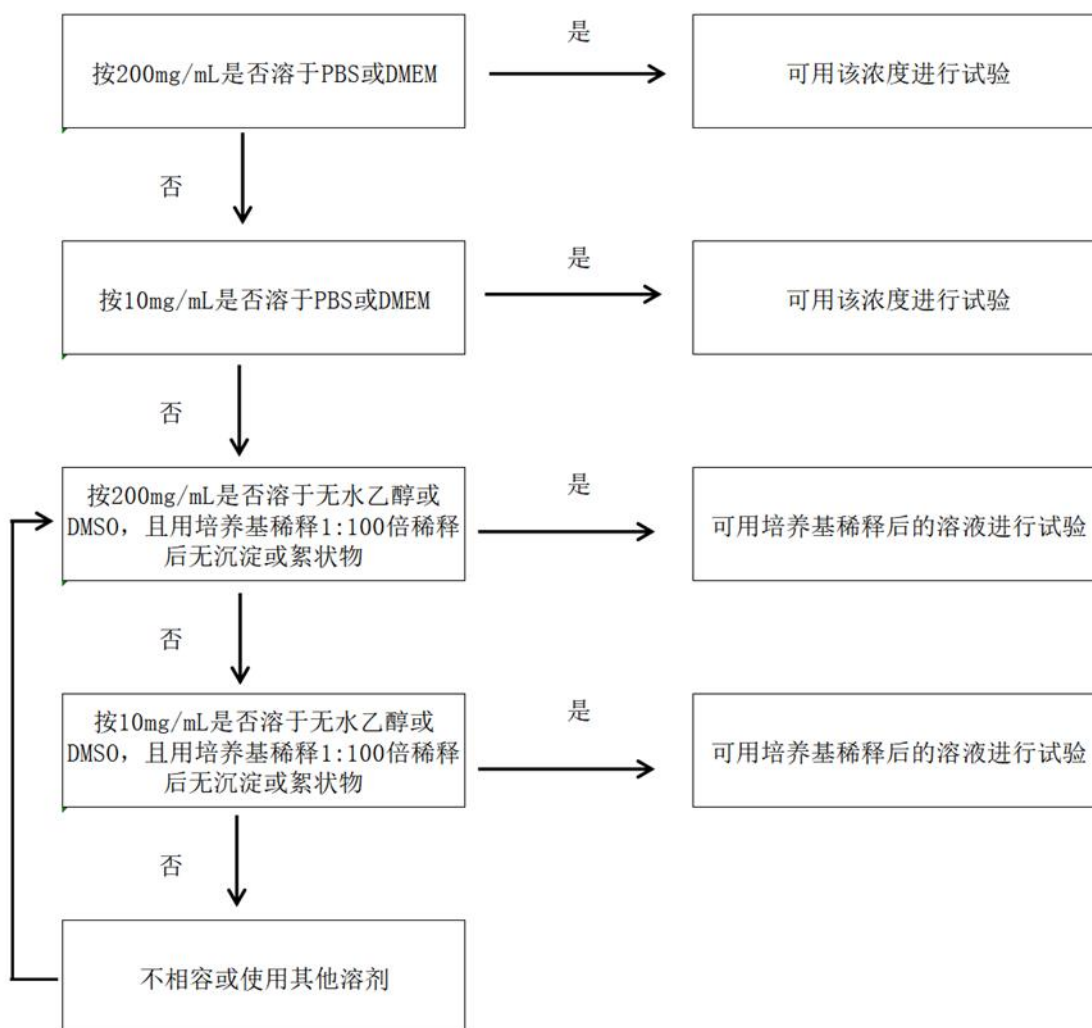


图 B.1 正常小鼠巨噬细胞 RAW264.7 株典型培养 10 倍显微镜下的示图

附录 C
(规范性)
受试物溶解度预测试流程

图 C.1 给出了受试化学品溶解度的预测试流程。



注：DMEM ——无添加培养基；

培养基 ——完全培养基；

细胞毒性试验中要使用的溶剂最高终浓度应为：PBS 或 DMEM，100%；无水乙醇或 DMSO，1%。

细胞毒性试验中样品的最高终浓度应为：PBS 或 DMEM 稀释，20%；无水乙醇或 DMSO 稀释，0.2%。

图 C.1 受试化学品溶解度预测试流程图

附录 D
(资料性)
十进制几何浓度序列

图D.1给出十进制几何浓度的稀释设计示例图。稀释因子 $3.16 (= \sqrt[2]{10})$ 将一个log单位分为等距离的2个间隔，稀释因子 $2.15 (= \sqrt[3]{10})$ 将一个log单位分为等距离的3个间隔，稀释因子 $1.47 (= \sqrt[6]{10})$ 将一个log单位分为等距离的6个间隔，稀释因子 $1.21 (= \sqrt[12]{10})$ 将一个log单位分为等距离的12个间隔

10						31.6						100
10				21.5					46.6			100
10		14.7		21.5		31.6		46.6		68.1		100
10	12.1	14.7	17.8	21.5	26.1	31.6	38.2	46.6	56.1	68.1	82.2	100

图 D. 1 十进制几何序列设计示例图

示例：样品稀释到 20%浓度，并以 $2.15 (= \sqrt[3]{10})$ 为稀释因子稀释 8 个浓度为例，由图 D. 2 表示：

吸取样品 1mL，加入 4mL 的试验培养基中，用振荡器漩涡混匀，即得 20% 浓度样品溶液，记为 C1。从 C1 中取 1mL，加入 1.15mL 试验培养基中，记为 C2，以此方法依次稀释成 8 个不同浓度。

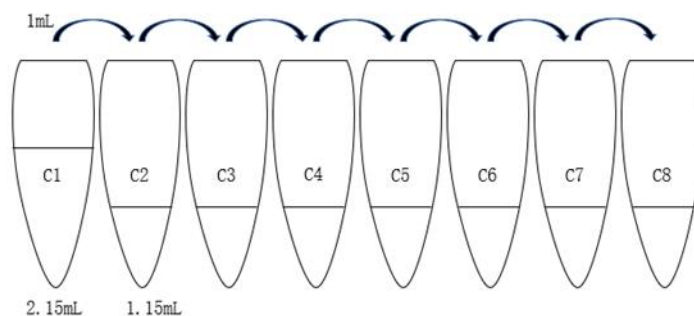


图 D. 2 样品稀释示意图

附录 E
(规范性)
细胞毒性试验和 NO 释放抑制试验测试步骤

图E. 1~E. 2规定了细胞毒性试验和NO释放抑制试验测试步骤。

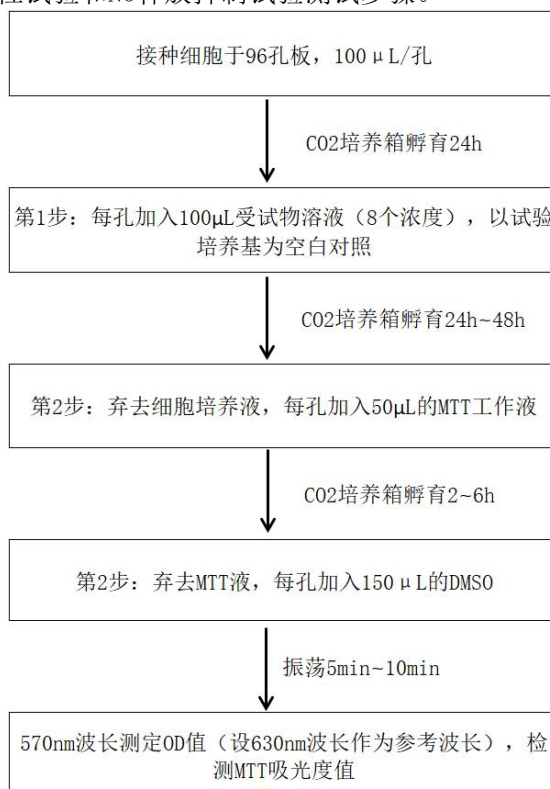


图 E. 1 细胞毒性试验步骤

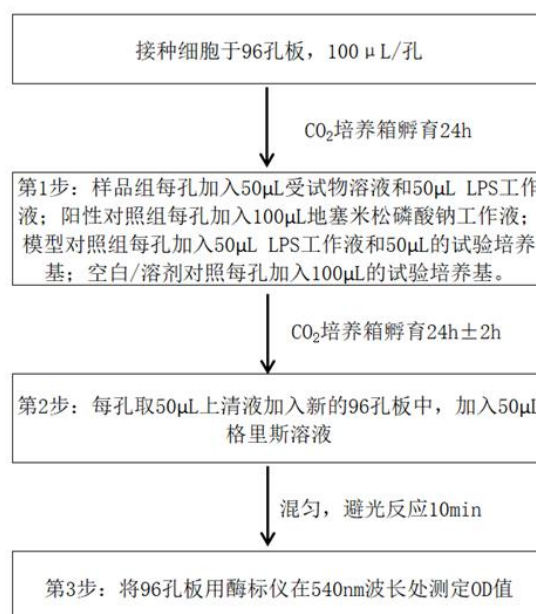


图 E. 2 NO 释放抑制试验测试步骤

参 考 文 献

- [1] Stone W L, Yang H, Min Q. Assays for nitric oxide expression. [J]. Methods in Molecular Biology, 2006, 315(315):245.
- [2] 彭勤纪, 王璧人. 波谱分析在精细化工中的应用[M]. 北京: 中国石化出版社, 2001.
- [3] Jingzhou Hou, Huixiang Wu et al. Phenosafranin-Based Colorimetric-Sensing Platform for Nitrite Detection Enabled by Griess Assay[J]. Sensors, 2020, 20, 1501.
-