ICS 71.100.70
CCS Y42

T/GDICST

广东省化妆品科学技术研究会团体标准

T/GDICST XXXX—XXXX

化妆品敏感肌修护功效测试-基于辣椒素刺激皮肤角质形成细胞钙离子内流模型的TRPV1 活性检测方法

Efficacy Test of Cosmetics for Sensitive Skin Repair - TRPV1 Activity Detection Method Based on Capsaicin-Stimulated Calcium Ion Influx Model in Human Keratinocytes

（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

广东省化妆品科学技术研究会　　发 布

目　　次

前言 II
引言 III
1　范围 1
2　规范性引用文件 1
3　术语和定义 1
4　试验原理 1
4.1　敏感肌修护功效原理 1
4.2　钙离子浓度测定原理 2
5　试验材料 2
5.1　细胞系 2
5.2　仪器设备与耗材 2
5.3　试剂 2
5.4　试剂制备 2
6　试验方法 3
6.1　基本要求 3
6.2　细胞制备 3
6.3　细胞毒性试验 3
6.4　钙离子内流试验 4
7　结果计算 4
7.1　细胞活力 4
7.2　相对荧光强度 5
7.3　钙离子内流抑制率 5
7.4　试验有效性验证 5
8　结果评价 5
9　试验报告 5
附录 A（资料性）　高糖 DMEM 培养基配方 6
附录 B（资料性）　Hanks’平衡盐溶液（HBSS）配方 7
附录 C（规范性）　细胞维护和培养程序 8
C.1　细胞复苏 8
C.2　培养条件 8
C.3　细胞传代 8
C.4　细胞冻存 8
附录 D（资料性）　人永生化角质形成细胞 HaCaT 9
D.1　人永生化角质形成细胞 HaCaT 9
参考文献 10

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。

本文件由广东省科学院微生物研究所（广东省微生物分析检测中心）提出。

本文件由广东省化妆品科学技术研究会归口。

本文件起草单位：

本文件主要起草人：

引　言

随着环境污染、生活压力增大及化妆品使用频繁，敏感性皮肤已成为全球范围内普遍存在的皮肤问题，其特征为皮肤在接触物理、化学或精神刺激后，更易出现灼热、刺痛、瘙痒及紧绷感等主观症状，但通常伴无明显客观皮损。敏感性皮肤的发生机制复杂，其中皮肤神经高反应性被认为是核心环节。瞬时受体电位香草酸亚型 1（Transient Receptor Potential Vanilloid 1，TRPV1）作为一种非选择性阳离子通道，在此过程中扮演了至关重要的“分子传感器”角色。TRPV1 可被多种内源性及外源性刺激（如热、酸、辣椒素等）激活，导致钙离子内流，进而触发神经末梢释放 P 物质等神经肽，引发神经源性炎症和不适感觉。在皮肤中，TRPV1 不仅表达于感觉神经末梢，同样高表达于角质形成细胞。角质形成细胞作为表皮最主要的细胞成分，其上的 TRPV1 通道被激活后，同样会引起细胞内钙离子浓度的急剧升高，并释放促炎细胞因子，从而放大炎症信号，直接参与皮肤屏障功能紊乱和敏感反应的形成。因此，靶向抑制敏感肌“疼痛开关”TRPV1 的过度活化，已成为开发舒缓、修护敏感性皮肤化妆品的重要策略。

传统的化妆品功效评价多依赖于人体试验，虽然结果直观，但存在周期长、成本高、受试者个体差异大以及主观性强等局限性。因此，建立快速、客观、可量化的体外检测模型对于化妆品原料及配方的早期筛选与功效评价具有重要意义。辣椒素作为 TRPV1 的经典特异性激动剂，能够高效、可控地激活该通道。基于此，本研究旨在构建一种基于辣椒素刺激皮肤角质形成细胞 TRPV1 的钙离子内流模型。通过使用钙离子荧光探针实时监测细胞内钙离子浓度的变化，可以精确、定量地评估受试化妆品原料或配方对 TRPV1 活性的抑制能力。该模型为客观评价化妆品针对敏感性皮肤的即时舒缓与长期修护功效提供了一个强有力的体外研究工具。

化妆品敏感肌修护功效测试-基于辣椒素刺激皮肤角质形成细胞钙离子内流模型的 TRPV1 活性检测方法

1 范围

本文件规定了辣椒素刺激皮肤角质形成细胞钙离子内流测试方法的原理、材料、试验方法、结果计算、质量控制、结果评价和报告。

本文件适用于具有敏感肌修护功效的化妆品及化妆品原料。

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 2328 化妆品急性毒性的角质细胞试验

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

《化妆品分类规则和分类目录》（国家药监局公告 2021 年第 49 号）

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

角质形成细胞 Keratinocyte

角质形成细胞是构成皮肤表皮层的最主要细胞，通过增殖、分化并最终角化形成皮肤物理屏障，能表达并激活 TRPV1[1]。

3.2

瞬时受体电位香草酸亚型 1 Transient Receptor Potential Vanilloid 1，TRPV1

瞬时感受器电位香草酸受体 1（TRPV1），又称辣椒素受体，隶属于 TRP 家族，是一种非特异性离子通道，广泛存在于皮肤感觉神经以及包括角质形成细胞在内的皮肤细胞中。TRPV1 能被高温（＞43 ℃）、低 pH、辣椒素等激活，继而引发钙离子内流，导致皮肤炎症和神经兴奋，从而产生疼痛、灼热及瘙痒感。TRPV1 的过度激活直接参与皮肤屏障功能紊乱和敏感性反应的发生[2,3]。

3.3

敏感肌 Sensitive skin，SS

敏感肌特指皮肤在生理或病理条件下发生的一种高反应状态，主要发生于面部，临床表现为受到物理、化学、精神等因素刺激时皮肤易出现灼热、刺痛、瘙痒及紧绷感等主观症状，伴或不伴红斑、鳞屑、毛细血管扩张等客观体征。敏感肌的机制成因较为复杂，目前普遍认为其发生是一种累及皮肤屏障、神经血管、免疫炎症的复杂过程[2]。

4 试验原理

4.1 敏感肌修护功效原理

化妆品分类目录对修护功效宣称的释义是有助于维护施用部位保持正常状态。敏感肌修护，旨在修复受损的皮肤屏障、抑制神经源性炎症或调节皮肤微生态平衡，并降低血管和免疫系统的高反应性，从而从根本上改善皮肤的敏感状态，使其恢复至稳定、强韧的健康状态。本试验采用了辣椒素刺激人永生化角质形成细胞 HaCaT 钙离子内流这一典型模型进行敏感肌修护功效评价，其具体原理为：辣椒素能

通过激活皮肤角质形成细胞 TRPV1 来引发钙离子内流。采用辣椒素刺激皮肤角质形成细胞钙离子内流的细胞模型，通过对比阴性对照组（仅辣椒素处理）和样品组（辣椒素+样品处理）的胞内钙离子浓度，以评估样品对 TRPV1 活性的抑制作用，从而评价样品是否具有敏感肌修护功效。

4.2 钙离子浓度测定原理

试验采用荧光探针法检测胞内钙离子浓度。钙离子荧光探针 Fluo-3 AM 本身荧光很弱，进入细胞后可以被胞内的酯酶剪切形成 Fluo-3 滞留在胞内，Fluo-3 和钙离子结合后可以发出较强的绿色荧光。根据荧光强度可观察各组钙离子内流情况，从而评估样品对 TRPV1 活性的抑制效果。

5 试验材料

5.1 细胞系

人永生化角质形成细胞 HaCaT。

5.2 仪器设备与耗材

本文件测试所需仪器设备与耗材如下：
——二氧化碳培养箱：温度精度 ±0.1 ℃，二氧化碳浓度精度 ±0.1%；
——生物安全柜或层流洁净工作台；
——恒温水浴箱：温度精度 ±0.1 ℃；
——倒置显微镜；
——多功能酶标仪；
——电子天平：精度 0.00001 g；
——低速离心机；
——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；
——-80 ℃超低温冰箱；
——25 cm^2 细胞培养瓶和 100 mm 细胞培养皿，用于常规培养；
——96 孔黑壁透明底细胞培养板，用于细胞培养及试验；
——2 mL 细胞冻存管，用于细胞冻存；
——0.22 μm 微孔滤膜，用于试剂过滤除菌。

5.3 试剂

本文件测试所需试剂如下：
——DMEM 培养基；
——胎牛血清；
——磷酸盐缓冲液（PBS）；
——青霉素/链霉素；
——二甲基亚砜（DMSO）；
——无水乙醇；
——辣椒素（Capsaicin，CAS 号：404-86-4）；
——辣椒平（Capsazepine，CAS 号:：138977-28-3）；
——CCK-8 试剂；
——Fluo-3 AM。

5.4 试剂制备

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 培养基

5.4.2.1 高糖 DMEM 培养基

高糖 DMEM 培养基配方见附录 A。

5.4.2.2 Hanks’平衡盐溶液（HBSS），含钙、镁

Hanks' 平衡盐溶液（HBSS）配方见附录 B。

5.4.2.3 常规培养基

含 10%胎牛血清、100 Units/mL 青霉素、100 μg/mL 链霉素的 DMEM 培养基。

5.4.3 辣椒素溶液

5.4.3.1 贮备液

称取 30.54 mg 辣椒素于 5 mL DMSO 中，充分混匀溶解，即为 20 mM 辣椒素贮备液。用 0.22 μm 过滤器过滤除菌，按照 10 μL/支的规格进行分装，于-80 ℃保存，有效期 6 个月。

5.4.3.2 工作液

用细胞培养基将 20 mM 辣椒素贮备液稀释至 100 μM 辣椒素工作液，现配现用。具体给药浓度可根据各试验室培养细胞特性进行调整。

5.4.4 辣椒平溶液

5.4.4.1 贮备液

称取 37.69 mg 辣椒平于 5 mL DMSO 中，充分混匀溶解，即为 20 mM 辣椒平贮备液。用 0.22 μm 过滤器过滤除菌，按照 10 μL/支的规格进行分装，于-80 ℃保存，有效期 6 个月。

5.4.4.2 工作液

用细胞培养基将 20 mM 辣椒平贮备液稀释至 50 μM 辣椒平工作液，现配现用。具体给药浓度可根据各试验室培养细胞特性进行调整。

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 细胞制备

细胞的维护和培养程序参见附录 C。取冻存的细胞培养物以合适的密度接种到常规培养基中；选用复苏后第 3 代至第 20 代的细胞用于正式检测。细胞接种密度应保证在接种 24 h 后，按 6.3 操作，细胞融合度达到 70%～80%，正常细胞形态参见附录 D。

6.3 细胞毒性试验

6.3.1 细胞和受试物准备

按 6.2 的要求准备细胞。受试物应在测试当天准备，宜在测试前 2 h 内准备完毕。非水溶性受试物应溶解在适当的溶剂（如无水乙醇或 DMSO 等溶剂）中。受试物浓度的选择应避免出现沉淀和浑浊。

6.3.2 细胞接种

将胰酶消化中止后吹打下来的细胞用离心机 1000 rpm离心 5 min，弃掉上清液，用培养基重悬混匀，用细胞计数仪或血球计数板进行计数。用培养基稀释至合适的细胞密度再接种至 96 孔细胞培养板中，每孔液量为 100 μL。接种结束后，将培养板置于 37 ℃和 5% CO^2 的二氧化碳培养箱中培养（24±2）h。

6.3.3 诱导及给药

设置空白对照组（BC）和样品组（TA）。每孔加入待测浓度受试物，每孔总体积为 100 μL。其中，空白对照组仅加入 HBSS 缓冲液，样品组加入含待测浓度样品的 HBSS 缓冲液。每组各 3 个及以上复孔。给药完毕后将 96 孔板置于 37 ℃和 5% CO^2 的二氧化碳培养箱中继续孵育 30 min。

6.3.4 细胞活力检测

孵育结束后，用 HBSS 洗涤 1~2 次，随后加入含 10%（v/v）CCK-8 的 DMEM 培养基继续孵育 0.5~2 h。孵育结束后使用酶标仪在 450 nm 处测定吸光度。最终选择细胞活力≥90%的测试浓度用于钙离子内流试验。

6.4 钙离子内流试验

6.4.1 细胞和受试物准备

按 6.2 的要求准备细胞。受试物应在测试当天准备，宜在测试前 2 h 内准备完毕。非水溶性受试物应溶解在适当的溶剂（如无水乙醇或 DMSO 等溶剂）中。受试物浓度的选择应避免出现沉淀和浑浊，且无细胞毒性（细胞活力≥90%）。

6.4.2 细胞接种

将胰酶消化中止后吹打下来的细胞用离心机 1000 rpm 离心 5 min，弃掉上清液，用培养基重悬混匀，用细胞计数仪或血球计数板进行计数。用培养基稀释至合适的细胞密度再接种至 96 孔黑壁透明底细胞培养板中（接种 24 h 后细胞融合度达到 70%～80%），每孔液量为 100 μL。接种结束后，将培养板置于 37 ℃和 5% CO^2 的二氧化碳培养箱中培养（24±2）h。

6.4.3 探针孵育

吸掉旧培养基，用 HBSS 清洗 2-3 次后，加入 100 μL 含 1 μM Fluo-3AM 的 DMEM 培养基，置于 37℃的 CO^2 培养箱孵育 30 min，再用 HBSS 清洗 2-3 次，随后进行分组处理。

6.4.4 诱导及给药

设置空白对照组（BC）、模型对照组（NC）、阳性对照组（PC）和样品组（TA）。空白对照组仅加入 HBSS 缓冲液，模型对照组加入含辣椒素的 HBSS 缓冲液，阳性对照组每孔加入含辣椒平和辣椒素的 HBSS 缓冲液，样品组加入含待测浓度样品和辣椒素的 HBSS 缓冲液，每孔总体积为 100 μL。每组各 6 个及以上复孔。给药完毕后将 96 孔板置于 37 ℃和 5% CO^2 的二氧化碳培养箱中继续孵育 30 min。

6.4.5 荧光强度检测

孵育结束后使用多功能酶标仪以激发波长 488 nm 发射波长 525 nm 检测荧光强度。

7 结果计算

7.1 细胞活力

根据公式（1）计算细胞活力，结果保留一位小数。

$$CV(\%) = \frac{OD_{TA} - OD_{BG}}{OD_{BC} - OD_{BG}} \times 100\% \quad (1)$$

式中：

CV ——细胞活力；

OD_{TA} ——含样品组细胞、CCK-8 溶液的 OD 值；

OD_{BC} ——含空白对照组细胞、CCK-8 溶液的 OD 值；

OD_{BG} ——含 CCK-8 溶液的 OD 值。

7.2 相对荧光强度

根据公式（2）计算相对荧光强度，结果保留一位小数。

$$RFI(\%) = \frac{F}{F_{CONTROL}} \times 100\% \quad (2)$$

式中：

RFI ——各实验组的相对荧光强度，%；

F ——各实验组的荧光强度；

$F_{CONTROL}$ ——空白对照组的荧光强度。

7.3 钙离子内流抑制率

根据公式（3）计算钙离子内流抑制率，结果保留一位小数。

$$IR(\%) = \left(1 - \frac{RFI_{Test}}{RFI_{Model}}\right) \times 100\% \quad (3)$$

式中：

IR ——各实验组的钙离子内流抑制率，%；

RFI_{TEST} ——各实验组的相对荧光强度；

RFI_{MODEL} ——模型对照组的相对荧光强度。

7.4 试验有效性验证

试验应符合以下条件，否则结果无效：

——每批次试验均须设置空白对照组、模型对照组和阳性对照组；

——与空白对照组相比，模型对照组的 RFI 上调≥20%，且差异有统计学意义（p<0.05）；

——阳性对照组的 IR≥20%，且与模型对照组间的差异有统计学意义（p<0.05）；

——统计测得的各组复孔间荧光强度的标准差（Standard Deviation，SD），并计算变异系数（Coefficient of Variation，C.V），C.V 值≤20%。

8 结果评价

在试验满足有效性验证的基础上，评价受试物对 TRPV1 活性的抑制能力。采用专业统计学软件进行统计及显著性（差异）分析，与模型对照组相比，若样品组的荧光强度减少，且差异具有统计学意义（p＜0.05），则提示该受试物在相应浓度下具有抑制 TRPV1 诱导钙离子内流的潜力，可作为敏感肌修护功效评价的参考依据之一。

9 试验报告

试验报告应包括以下信息：

——相对荧光强度：应表述为平均值 ± 标准差（SD）；

——受试物（样品）抑制钙离子内流的浓度；

——试验日期；

——报告日期；

——样品信息；

——结果评价。

附 录 A
（资料性）
高糖 DMEM 培养基配方

表 A.1 高糖 DMEM 培养基配方

成分（1 L）		含量 / mg
氨基酸	甘氨酸	30
	L-精氨酸盐酸盐	84
	L-胱氨酸二盐酸	63
	L-谷氨酰胺	584
	L-盐酸组氨酸一水物	42
	L-异亮氨酸	105
	L-亮氨酸	105
	L-赖氨酸盐酸盐	146
	L-甲硫氨酸	30
	L-苯丙氨酸	66
	L-丝氨酸	42
	L-苏氨酸	95
	L-色氨酸	16
	L-酪氨酸二钠盐二水合物	104
	L-缬氨酸	94
维生素	氯化胆碱	4
	D-泛酸钙	4
	叶酸	4
	烟酰胺	4
	吡哆醇盐酸盐	4
	核黄素	0.4
	硫胺素	4
	肌醇	7.2
无机盐	无水氯化钙	200
	九水硝酸铁	0.1
	无水硫酸镁	97.67
	氯化钾	400
	碳酸氢钠	3700
	氯化钠	6400
	一水磷酸二氢钠	125
其他	无水葡萄糖	4500
	酚红	15
	水	1 L

附 录 B
（资料性）
Hanks'平衡盐溶液（HBSS）配方

表 B.1 Hanks' 平衡盐溶液（HBSS）配方

成分（1 L）		含量 / mg
无机盐	氯化钙	140
	六水合氯化镁	100
	七水合硫酸镁	100
	氯化钾	400
	磷酸二氢钾	60
	碳酸氢钠	350
其他	氯化钠	8000
	水	1 L

附 录 C
（规范性）
细胞维护和培养程序

C.1 细胞复苏

将细胞冻存管放在 37 ℃水浴中，使细胞解冻，时间应控制在 2 min 内并尽可能短。将细胞转移至含常规培养基的离心管中，用离心机 1000 rpm 离心 5 min 后，弃掉上清液，收集沉淀的细胞，随后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 37 ℃和 5% CO^2 的二氧化碳培养箱中培养。

C.2 培养条件

将细胞移入培养瓶内，置于 37 ℃和 5% CO^2 的二氧化碳培养箱中培养，当细胞达到 80%融合时，用胰酶消化，随后用常规培养基中止反应，用移液枪将细胞从培养瓶/皿中轻轻吹打下来。

注：培养基在使用前，应在水浴槽中将其预热至 37℃。

C.3 细胞传代

取 C.2 中吹打下来的细胞，1000 rpm 离心 5 min 后，弃掉上清液，收集沉淀的细胞，随后加入常规培养基后，用移液器轻柔吹打以重悬细胞，按照 1:3～1:6 比例传代，将培养瓶/皿置于 37 ℃和 5% CO^2 的二氧化碳培养箱中培养。

C.4 细胞冻存

取 C.2 中吹打下来的细胞，1000 rpm 离心 5 min 后，弃掉上清液；再加入 PBS 重新悬浮细胞。将细胞悬液用离心机 1000 rpm 离心 5 min，弃掉上清液，重悬细胞于细胞冻存液中，细胞浓度调整至（1.0×10^6～5.0×10^6）cell/mL，每支冻存管分装 1 mL 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　D
（资料性）
人永生化角质形成细胞 HaCaT

D.1　人永生化角质形成细胞 HaCaT

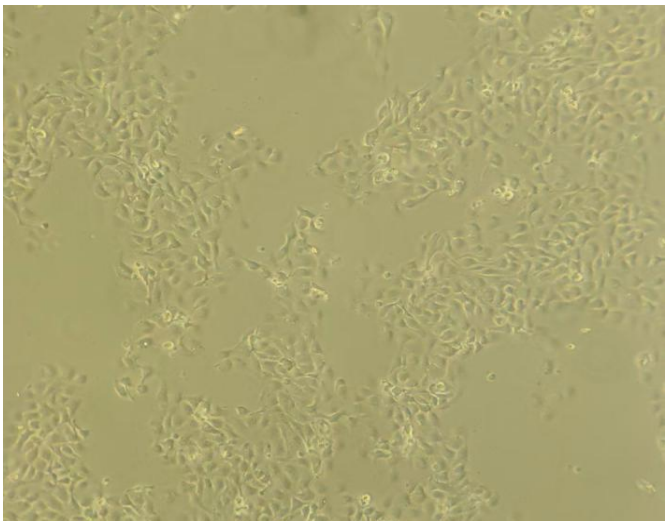

图 C.1 人永生化角质形成细胞 HaCaT 在 10×物镜下的显微图像

参 考 文 献

[1] Martin L S, Fraillon E, Chevalier F P, et al.Hot on the Trail of Skin Inflammation: Focus on TRPV1/TRPV3 Channels in Psoriasis[J]. Biochemistry, 2022.DOI:10.5772/intechopen.103792.

[2] NOH Youngji,曹婷,叶城斌,等.敏感性皮肤的发病机制及治疗进展[J].皮肤性病诊疗学杂志, 2025, 32(2): 140-148. DOI:10.3969/j.issn. 1674-8468.2025.02.011.

[3] Bagood M D, Isseroff R R. TRPV1: Role in Skin and Skin Diseases and Potential Target for Improving Wound Healing[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2021, 22(11):6135.

[4] A J H, B L Q, B L D, et al. Ginsenoside Rb1 and paeoniflorin inhibit transient receptor potential vanilloid-1-activated IL-8 and PGE 2 production in a human keratinocyte cell line HaCaT[J]. International Immunopharmacology, 2010, 10(10):1279-1283.