

团 体 标 准

T/ZHCA 014—2022

化妆品抗皱功效评价 斑马鱼幼鱼尾鳍皱缩抑制率法

Anti-wrinkle effect evaluation of cosmetics—
Method for inhibition rate of caudal fin shrinkage of zebrafish larvae

2022-01-25 发布

2022-03-15 实施

浙江省健康产品化妆品行业协会 发布

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。

本文件由杭州环特生物科技股份有限公司提出。

本文件由浙江省健康产品化妆品行业协会(ZHCA)归口。

本文件主要起草单位：杭州环特生物科技股份有限公司、云南贝泰妮生物科技集团股份有限公司、浙江养生堂天然药物研究所有限公司、华测检测认证集团股份有限公司。

本文件参与起草单位：国珍健康科技(北京)有限公司、杭州百芮生物科技有限公司、杭州睿道医药科技有限公司、杭州希科检测技术有限公司、片仔癀(上海)生物科技研发有限公司、完美(广东)日用品有限公司、浙江雅露生物科技有限公司。

本文件主要起草人：张勇、周示玉、安晓虹、吴瑞雪、孙宇、李颖、蒋水萍、李海龙、方淑红、谢阿贵、李晓敏、张立发。

化妆品抗皱功效评价

斑马鱼幼鱼尾鳍皱缩抑制率法

1 范围

本文件规定了一种用于评价化妆品抗皱功效的方法。
本文件适用于化妆品及其原料抗皱功效的评价。
本文件仅适用于能溶于水或能均匀分散成悬浮水溶液的受试物。

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 21808 化学品 鱼类延长毒性 14 天试验

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

受精后天数 day post-fertilization; dpf

斑马鱼受精卵受精后的天数。

3.2

最大耐受浓度 maximum tolerated concentraion; MTC

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(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 方法原理

人体皮肤出现皱纹、老化的重要原因之一是皮肤结构中胶原蛋白、弹性蛋白的减少。斑马鱼皮肤结构与人体皮肤结构相似,以过量紫外线照射时,可导致皮肤中的胶原蛋白、弹性蛋白减少,表现为尾鳍皮肤皱缩。添加受试物后,通过测量紫外线照射后幼鱼尾鳍面积的变化,计算尾鳍皱缩抑制率,可以分析受试物对斑马鱼尾鳍变形的保护程度,从而评价其抗皱功效。

5 材料和试剂

除非另有说明,所用试剂均为分析纯。实验用水应符合 GB/T 21808 对水质的要求。

5.1 斑马鱼幼鱼:野生型 AB 品系斑马鱼的幼鱼。

5.2 甲基纤维素(Methyl cellulose,CAS:9004-67-5)。

5.3 3%甲基纤维素:称取 3.0 g 甲基纤维素(5.2),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 °C 冰箱保存。

5.4 标准稀释水:按附录 A 中描述的方法配制。

5.5 茶多酚(Polyphenols, CAS:84650-60-2, 纯度 $\geq 98\%$)。

5.6 阳性对照样品(茶多酚 $10 \mu\text{g}/\text{mL}$):称取 0.0010 g 茶多酚(5.5)至 100 mL 容量瓶,用标准稀释水(5.4)溶解并定容后备用。

5.7 助溶剂:二甲亚砜(Dimethyl sulfoxide, DMSO, CAS:67-68-5)。

6 仪器和设备

6.1 生化培养箱:带有温控和进风装置,温度控制范围 $5 \text{ }^\circ\text{C} \sim 50 \text{ }^\circ\text{C}$,精度 $\pm 0.1 \text{ }^\circ\text{C}$ 。

6.2 电子天平:分度值为 0.1 mg 。

6.3 体视显微镜:自带白光光源,最小放大倍数为 20。

6.4 显微镜拍照系统:像素不低于 2 000 万。

6.5 模拟太阳光光源:波长范围 $280 \text{ nm} \sim 400 \text{ nm}$,配有辐照计。

6.6 图像分析软件:Image J 或功能相当者。

6.7 六孔细胞培养板,平底。

6.8 一般实验室常用器皿和设备。

7 试验准备

7.1 受试物储备液制备

7.1.1 根据受试物的自身特性,用标准稀释水(5.4)配制成一定浓度的受试物储备溶液,备用。

7.1.2 水溶性或易在水中分散的受试物:称取适量 $0.01 \text{ g} \sim 0.10 \text{ g}$ 受试物,用标准稀释水(5.4)溶解并定容至 10 mL 。

7.1.3 在水溶液中难于溶解或分散的受试物:称取适量 $0.01 \text{ g} \sim 0.10 \text{ g}$ 受试物,添加 0.1 mL 助溶剂(5.7)助溶,用标准稀释水(5.4)溶解并定容至 10 mL 。所有组别中的助溶剂(5.7)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。

7.2 斑马鱼幼鱼准备

在体视显微镜下挑选发育正常的 2 dpf 的斑马鱼幼鱼,置于有标准稀释水(5.4)的六孔细胞培养板(6.7)中进行孵育,每孔 15 尾,容器的水温控制在 $(28.5 \pm 1.0) \text{ }^\circ\text{C}$ 。

8 试验程序

8.1 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。

8.1.1 受试物稀释液制备

将受试物储备液用标准稀释水(5.4)以 2 倍几何级数稀释至 3~5 个浓度系列,备用。

8.1.2 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(6.7)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(5.4),向每孔中快速加入 3 mL 相应浓度的受试物稀释液(8.1.1)。

首先,用铝箔纸包裹六孔细胞培养板(6.7),于 $(28.5 \pm 1.0) \text{ }^\circ\text{C}$ 生化培养箱中避光孵育 2 h。然后,在紫外线下进行 3 次照射,每次照射时间为 15 min ,间隔 30 min 。每次辐照量为 $(2.07 \pm 0.18) \text{ J}/\text{cm}^2$,总辐

照量为 $(6.21 \pm 0.54) \text{ J/cm}^2$ 。最后,继续在 $(28.5 \pm 1.0)^\circ\text{C}$ 生化培养箱中避光孵育 22 h 用体视显微镜观察。记录斑马鱼的死亡情况和其他毒性效应。

8.1.3 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(心包水肿、躯干弯曲、对机械刺激无反应、肌肉纹理不清晰等)的最高浓度组别确定为 MTC。

8.2 正式试验

8.2.1 试验分组

- 空白对照组:含斑马鱼幼鱼及标准稀释水(5.4),不进行紫外线照射。
- 溶剂对照组:含有助溶剂和斑马鱼幼鱼,不进行紫外线照射。如果受试物配制过程中使用了助溶剂(5.7),则应设置该组。
- 模型对照组:含斑马鱼幼鱼及标准稀释水(5.4)[如果受试物配制过程中使用了助溶剂(5.7),则标准稀释水(5.4)中应该含有相同体积分数的溶剂],进行紫外线照射。
- 阳性对照组:含阳性样品对照和斑马鱼幼鱼,进行紫外线照射,实验可根据需要设置阳性对照组。
- 受试物测试组:含有受试物和斑马鱼幼鱼,进行紫外线照射,受试物根据需要设置多个不同的浓度组。

8.2.2 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(5.4)以 2 倍几何级数稀释至 3~5 个浓度系列。

8.2.3 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(5.4),然后快速向每孔中加入 3 mL 受试物溶液。

首先,充分混匀后盖上培养板面板,避光孵育 2 h。然后,在紫外线下进行 3 次照射,每次照射时间为 15 min,间隔 30 min。每次辐照量为 $(2.07 \pm 0.18) \text{ J/cm}^2$,总辐照量为 $(6.21 \pm 0.54) \text{ J/cm}^2$ 。最后继续在 $(28.5 \pm 1.0)^\circ\text{C}$ 生化培养箱中避光孵育 22 h 用体视显微镜观察。

8.2.4 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(5.3)固定,在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。

8.2.5 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尾鳍(如图 B.1 所示)。将分析参数设置为面积,分析图片得出数据,每组取 10 个尾鳍面积的有效数据。

9 结果评价

9.1 数据处理

9.1.1 统计学分析

计算各组试验的平均值(Mean)及标准误差(Standard Error, SE),统计学处理结果用 $\text{Mean} \pm \text{SE}$ 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,比较各实验组尾鳍面积的大

小, $P < 0.05$ 表示有显著性差异。

9.1.2 尾鳍皱缩抑制率的定量计算

受试物的尾鳍皱缩抑制率按式(1)计算:

$$Q = \frac{A_1 - A_2}{A_3 - A_2} \times 100\% \dots\dots\dots(1)$$

式中:

Q ——受试物测试组与模型对照组相比,斑马鱼尾鳍皱缩抑制率;

A_1 ——受试物组斑马鱼尾鳍面积的平均值;

A_2 ——模型对照组斑马鱼尾鳍面积的平均值;

A_3 ——空白对照组斑马鱼尾鳍面积的平均值。

注: 如果受试物配制过程中使用了助溶剂(5.7), 则式(1)中的空白对照组数值用溶剂对照组数值进行替换。

9.2 结果判定及说明

在试验满足有效性的基础上, 受试物组与模型对照组相比, 尾鳍面积显著增大($P < 0.05$), 说明受试物在该浓度下具有抗皱功效, 可作为抗皱功效评价的证据支撑之一。

10 试验有效性的条件

10.1 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。

10.2 正式试验中, 模型对照组与空白对照组之间的尾鳍面积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标准偏差(SD), 否则该次试验视为失败。

10.3 正式试验中, 阳性对照组与模型对照组之间的尾鳍面积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标准偏差(SD), 否则该次试验视为失败。

10.4 正式试验中, 如果使用了助溶剂, 溶剂对照组与空白对照组之间的尾鳍面积不能存在统计学上的显著性差异, 否则该次试验视为失败。

11 试验报告

试验报告至少应给出以下几个方面内容:

- a) 试验依据;
- b) 试验目的及原理;
- c) 试验项目(包括评价指标和判定标准);
- d) 受试物和阳性对照的信息, 包括与试验操作相关的理化性状;
- e) 斑马鱼来源和品系等相关信息;
- f) 试验条件和方法, 包括试验设计、试验仪器试剂、试验记录等;
- g) 试验开始至完成的日期;
- h) 试验结果, 包括测定数据、计算值、图像数据等;
- i) 数据处理与结果评价方法;
- j) 试验结论;
- k) 适用性与局限性。说明试验的适用性与局限性, 并分析试验结果与试验目的间的相关性。

附 录 A
(规范性)
标准稀释水配制方法

A.1 试剂

除非另有说明,所用试剂均为分析纯。实验用水符合 GB/T 21808 对水质的要求。

A.1.1 碳酸氢钠(NaHCO_3 ,CAS:144-55-8)。

A.1.2 氯化钾(KCl ,CAS:7647-14-5)。

A.1.3 二水合氯化钙($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$,CAS:10035-04-8)。

A.1.4 七水合硫酸镁($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$,CAS:10034-99-8)。

A.2 配制

A.2.1 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.2.2 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。

附 录 B
(资料性)
斑马鱼尾鳍面积表型图

图 B.1 为斑马鱼尾鳍面积表型图,其中:虚线区域为斑马鱼尾鳍定量区域。

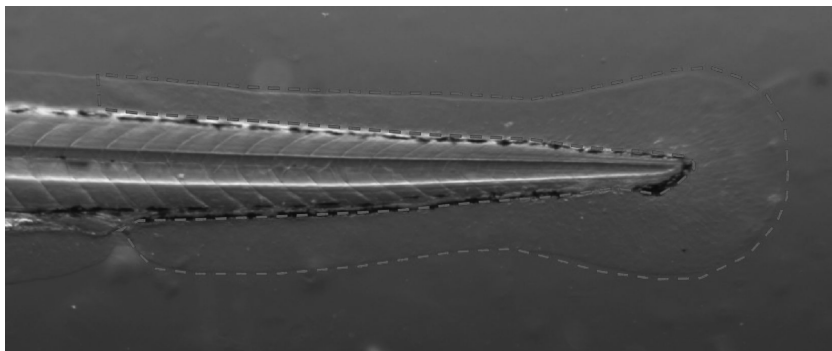


图 B.1 斑马鱼尾鳍面积表型图

参 考 文 献

- [1] Chen YH, Wen CC, Lin CY, et al. UV-induced fin damage in zebrafish as a system for evaluating the chemopreventive potential of broccoli and cauliflower extracts[J]. *Toxicol Mech Methods*. 2011,21(1):63-69.
- [2] Cheng CC, Chou CY, Chang YC, et al. Protective Role of Comfrey Leave Extracts on UV-induced Zebrafish Fin Damage[J]. *J Toxicol Pathol*. 2014,27(2):115-121.
- [3] Tsai I T , Yang Z S , Lin Z Y , et al. Flavone is efficient to protect zebrafish fins from UV-induced damage[J]. *Drug and Chemical Toxicology*, 2012, 35(3):341-346.
-