

ICS: 71.100.70

Y40

团 体 标 准

T/HPCIA 00X-2022

化妆品舒缓功效 - 斑马鱼胚胎中性粒细胞测试 方法

Soothing Efficacy of Cosmetics - Zebrafish Neutrophil Test

Method

(征求意见稿)

2023-XX-XX 发布

2023-XX-XX 实施

广州开发区黄埔化妆品产业协会 发布

目 次

前言	2
1. 范围	3
2. 规范性引用文件	3
3. 术语和定义	3
4. 原理	3
5. 仪器设备	3
6. 主要试剂及耗材	4
7. 实验方法	5
8. 受试物准备	6
9. 测试步骤	6
10. 结果计算	7
11. 测试有效性验证	7
12. 结果相关性解读	7
13. 结果报告	7
附录 A（资料性附录）	9
附录 B（资料性附录）	10
参考文献	11

前 言

本文件按照GB/T1.1-2020《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》规则起草。

本文件由广东省开发区黄埔化妆品产业协会提出。

本标准由广州开发区黄埔化妆品产业协会归口。

本标准起草单位：

本标准主要起草人：



化妆品舒缓功效—斑马鱼胚胎中性粒细胞测试方法

1 范围

本文件规定了斑马鱼胚胎中性粒细胞测试方法的基本要求。

本文件提供一种化妆品舒缓功效的斑马鱼生物评估方法,适用于测试通过有效抑制中性粒细胞聚集而达到舒缓效果的原料及配方的功效评价。

2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注明日期的引用文件,仅注日期的版本适用于本文件,凡未注明日期的引用文件,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测试方法

DB32/T 3979-2021 实验用 斑马鱼 饲养技术条件

OECD TG 236-2013 化学品测试规范 斑马鱼胚胎急性毒性测试

ISO 15088-2017 污水对斑马鱼胚胎的急性毒性测试

3 术语和定义

下列术语及定义适合于本文件。

3.1 斑马鱼胚胎 Zebrafish embryo

处在依靠卵黄提供能量发育阶段的斑马鱼胚胎。

3.2 没有心跳 Lack of heartbeat

一分钟内心脏没有跳动的鱼胚胎。

3.3 10%致死浓度 10% Lethal concentration, LC₁₀

受试物导致 10%受试鱼胚胎死亡的浓度。鱼胚胎没有心跳则判定为死亡。

4 原理

皮肤在收到刺激或病菌入侵时,会产生免疫反应,会出现红肿、瘙痒等不适,表现出敏感肌征兆。其中,中性粒细胞是最主要的免疫白细胞,作用于吞噬和清除皮肤中的感染或有害物质。而斑马鱼胚胎的中性粒细胞和人体中性粒细胞在形态、生化和生理功能上高度相似,因此斑马鱼测试结果对人体皮肤功效具有很好的可推导性。应用硫酸铜诱导斑马鱼胚胎侧线区域神经丘细胞损伤而引起中性粒细胞聚集的模型进行测试,比较受试物处理组和模型对照组的鱼胚胎侧线区域的中性粒细胞的数量变化,计算中性粒细胞抑制率以评价原料、配方或产品的舒缓功效。

5 仪器和设备

5.1 斑马鱼养殖设备

设备需配有温控装置，水循环和过滤装置，养殖容器用玻璃或常见食品级PC材质制成。可采用通用斑马鱼养殖设备或按实验室需求配备鱼缸（如长宽高45cm×45cm×30cm）。

5.2 产卵盒/缸

由玻璃、不锈钢或其它惰性材料制成，配备网筛（网格大小为2mm×2mm，由不锈钢或塑料材料组成用来保护鱼卵）。

5.3 水质监测设备

pH计、溶解氧测定仪、盐度计（电导率测定仪）。

5.4 分析天平

精度0.1mg。

5.5 显微镜

配带照相系统，最大放大倍数应大于80倍的体式显微镜。方法A中显微镜需配带绿色荧光。

5.6 测试容器

测试容器：玻璃或聚苯乙烯测试容器（如96-孔板，培养皿）。如测试物可能吸附于聚苯乙烯容器时（如非极性化学品），应选用惰性材料（如玻璃）来减少吸附。

5.7 恒温箱

精度±1℃。

5.8 丰年虾孵化器

设备需配有孵化桶，气管，气量调节阀，气泵截止开关和止逆阀装置。

5.9 其他常规测试仪器和设备

移液管、离心管、玻璃容器（如烧杯、容量瓶等）、旋涡混合仪、超声水浴锅、离心机、低温冰箱、可调节移液器和吸头。

6 主要试剂与耗材

6.1 水

符合GB/T 6682规定。

6.2 甲醇、二甲基亚砜、乙醇等助溶剂

分析纯级别。

6.3 亲鱼养殖用水

称取4g海盐溶于10L水配制而成，盐度为0.25~0.50‰，电导率为500~800μS/cm，溶解氧≥80%饱和度，pH值6.5~8.5，硬度30~300mg/L（以碳酸钙计）。

6.4 丰年虾（*Artemia salina*）卵

丰年虾休眠卵需干燥避光冷藏。称取约15g海盐溶于1L水配制丰年虾卵孵化水，密度以不超过4g/L丰年虾卵为宜。

6.5 鱼胚胎培养液

称取2940mg无水氯化钙，1233mg七水硫酸镁，630mg碳酸氢钠，55mg氯化钾溶于10L水配制而成。pH值6.5~8.5。化学品均为分析纯级别。

采用B法测试需要准备下列6.6-6.14试剂。

6.6 硫酸铜溶液

用水配制160mg/L五水硫酸铜（ $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ）储存液。室温储存。
工作液浓度为0.16mg/L，用鱼胚胎培养液稀释，使用前新鲜配制。

6.7 吡啶美辛溶液

用二甲基亚砜配制36mg/L吡啶美辛储存液。冷藏。
工作液浓度为0.0036mg/L吡啶美辛，用鱼胚胎培养液稀释，使用前新鲜配制。

6.8 多聚甲醛

用磷酸缓冲盐溶液（PBS）配制含有4%多聚甲醛和0.8%氢氧化钠（ NaOH ），pH为7.2~7.4的溶液。冷藏。

6.9 50%和70%酒精溶液

用水配制50%和70%酒精溶液。

6.10 苏丹黑染色液

苏丹黑储存液：用70%酒精配制0.4%苏丹黑储存液。冷藏。

苯酚溶液：将8g苯酚溶于15mL乙醇溶液，将0.3g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 溶解于50mL水中，然后将二种溶液混合配制成苯酚溶液。室温储存，半年内有效。

苏丹黑染色液是将900 μL 70%酒精溶液，100 μL 苏丹黑储存液和1 μL 苯酚溶液混合而成。用前新鲜配制。

6.11 PBST

配制0.04% Triton X-100于PBS溶液中。室温储存。

6.12 漂白溶液

用水配制含有3% H_2O_2 和1% KOH 的溶液。使用前新鲜配制。

6.13 清透液1

用水配制含有20%甘油和0.25% KOH 的溶液。室温保存。

6.14 清透液2

用水配制含有50%甘油和0.25% KOH 的溶液。室温保存。

7 实验方法

7.1 受试生物

A 法应用中性粒细胞荧光标记斑马鱼 (*Danio rerio*) (如: mpo, lyz, mpeg1 等品系) 产卵测试。B 法应用中性粒细胞荧光标记斑马鱼 (*Danio rerio*) , 也可以应用来源可靠 (如中国国家斑马鱼资源中心) 的野生型 AB 品系斑马鱼 (*Danio rerio*) 产卵测试。亲鱼应具有较好的繁殖能力-鱼龄以 6~12 月最佳。传代尽量使用侧交以保持遗传多样性, 纯品系亲鱼繁殖 5 代后需更换新一批亲鱼。亲鱼不应该有明显可见的感染和疾病特征, 且在 2 个月内没有经历过药物治疗。在繁殖产卵测试前, 亲鱼应在引入实验室后驯养 14 天以上。

7.2 养殖要求

7.2.1 养殖水温宜控制在 26~28.5°C, 室内温度建议控制在 20~25°C。

7.2.2 养殖密度宜控制在每升水 1~2 条鱼, 以及每日固定的 12~16h 光照, 且需保持良好的过滤系统。

7.2.3 每天至少喂食 2 次, 包括至少 1 次丰年虾 (*Artemia salina*) 幼虫, 喂食间隔在 3 小时以上, 避免过量喂食影响水质和清洁度。

7.3 产卵要求

7.3.1 如用产卵缸收集鱼卵, 将雄鱼和雌鱼以 2:1 的比率为宜在产卵前一天关灯前 1~2h 放进产卵缸中。由于斑马鱼偶尔不产卵, 建议同时准备多个产卵缸备用。

7.3.2 为避免基因偏差, 将最少 3 个产卵缸中收集的鱼卵混合再进行挑选备用。若用养殖鱼缸收集鱼卵, 收卵盒在产卵前一天关灯前或产卵当天开灯前放进要收集鱼卵的养殖鱼缸中。

7.3.3 为避免鱼卵被成鱼所食, 收卵盒用惰性网覆盖。

7.3.4 交配、产卵和受精在开灯后大约 30min 内完成, 届时可把收卵盒移出鱼缸。

7.3.5 鱼卵从收卵盒取出后, 建议用鱼胚胎培养液清洁鱼胚胎。

7.3.6 挑选健康的斑马鱼胚胎, 并以 200 μ L 鱼胚胎培养液中不超过 1 尾鱼胚胎的密度于 28 \pm 1°C 培养至受精后 2 天。

8 受试物准备

8.1 化妆品原料

8.1.1 水溶性原料: 可用鱼胚胎培养液直接将受试物溶解配制成测试溶液。

8.1.2 非水溶性原料: 可选常用溶剂如甲醇、二甲基亚砷、乙醇等助溶。如将受试物和有机溶剂按 1:1 (重量 g: 体积 mL) 混匀, 超声处理 10min, 然后加入鱼胚胎培养液配制成所需浓度, 震荡 30s 后于 6500 \times g 离心 10min。取上清液进行测试。

8.2 化妆品产品

8.2.1 水溶性产品: 可用鱼胚胎培养液直接将受试物溶解配制成测试溶液。建议最高测试浓度为 5g/L。

8.2.2 非水溶性产品: 可选常用溶剂如甲醇、二甲基亚砷、乙醇等助溶。如将受试物和有机溶剂按 1:1 (重量 g: 体积 mL) 混匀, 超声处理 10min, 然后加入鱼胚胎培养液配制成所需浓度, 震荡 30s 后于 6500 \times g 离心 10min。取上清液进行测试。

8.3 注意事项

受试物测试溶液需测试前新鲜配制。测试浓度需保证对斑马鱼的死亡率 \leq 10% (没有心跳特征的胚胎界定为死亡)。测试时可根据需要设置多个浓度组。

9 测试步骤

以下测试步骤是3cm培养皿测试指引。测试流程可参见附录A图A。
挑选健康的受精后3天大的斑马鱼。

9.1 测试分组

测试需设定模型对照组（硫酸铜工作液）、阳性对照组（硫酸铜工作液+吡喹酮工作液）和受试物组（硫酸铜工作液+受试物）。

9.2 模型对照组设置

随机挑选24尾鱼胚胎于3cm培养皿中，加入5mL含0.16mg/L五水硫酸铜的鱼胚胎培养液。

9.3 阳性对照组设置

随机挑选24尾鱼胚胎于3cm培养皿中，加入5mL含0.16mg/L五水硫酸铜和0.0036mg/L吡喹酮的鱼胚胎培养液。

9.4 受试物处理

随机挑选24尾鱼胚胎于3cm培养皿中，加入5mL含0.16mg/L五水硫酸铜和受试物的鱼胚胎培养液。
放置于28±1℃恒温箱中培养40~45min。
应用中性粒细胞荧光标记斑马鱼

9.5 样本的显微分析

将鱼胚胎使用三卡因溶液麻醉，侧身摆放。然后放到荧光显微镜下对鱼胚胎尾部镜下按统一的拍照参数进行拍照。

9.6 数据分析

计数每尾鱼胚胎从肛门起四分之三尾部侧线区域（见附录B图B）的中性粒细胞数目。

10 结果计算

计算中性粒细胞聚集抑制率：

$$\text{抑制率} = \frac{C - T}{C} \times 100\% \quad (1)$$

(1) 式中：

T—受试物处理组鱼胚胎中性粒细胞数目的平均值；

C—模型对照组鱼胚胎中性粒细胞数目的平均值。

对受试物处理组中性粒细胞数目和空白对照组中性粒细胞数目进行双尾T检验，取得*p*值。

11 测试有效性验证

11.1 测试判定

各测试组暴露完成后至少90%鱼胚胎存活，否则对应测试组结果无效。

11.2 测试要求

每批次测试须设置阳性对照组，阳性对照组鱼胚胎中性粒细胞聚集抑制率为正数且 $p < 0.05$ 。

12 结果报告

12.1 ROS清除率

受试物在对应测试浓度下对中性粒细胞的聚集抑制率。

12.2 评价

评价受试物抑制中性粒细胞聚集的能力，分析受试物处理组与模型对照组的检测值是否具有统计学差异（ $p < 0.05$ ）。

13 结果相关性解读

在中性粒细胞聚集抑制率为正数且具有统计学差异（ $p < 0.05$ ）情况下，测试结果可作为受试物具有舒缓功效的支持证据，支持舒缓功效宣称。



附录 A

(资料性附录)

图 A. 测试流程图

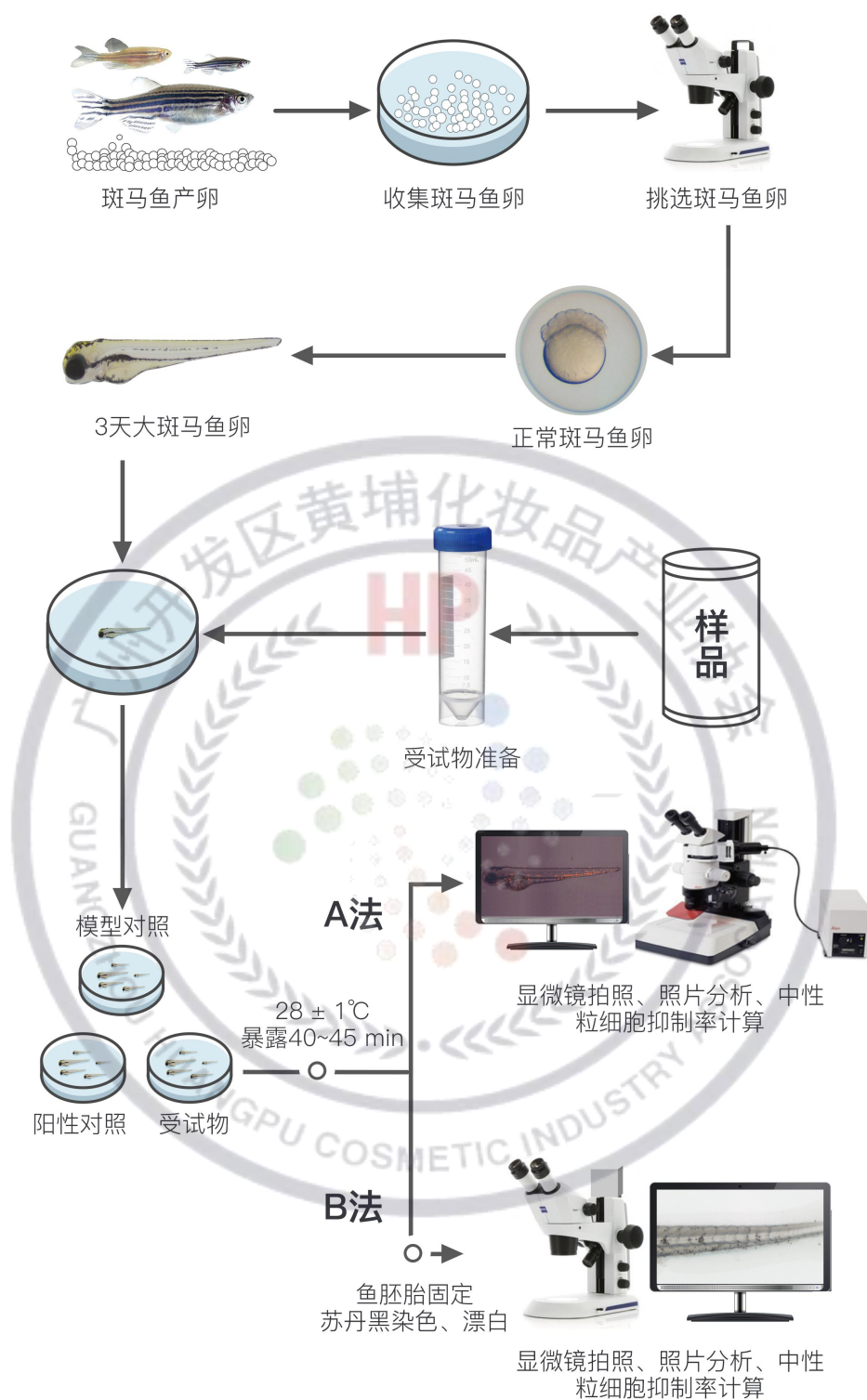
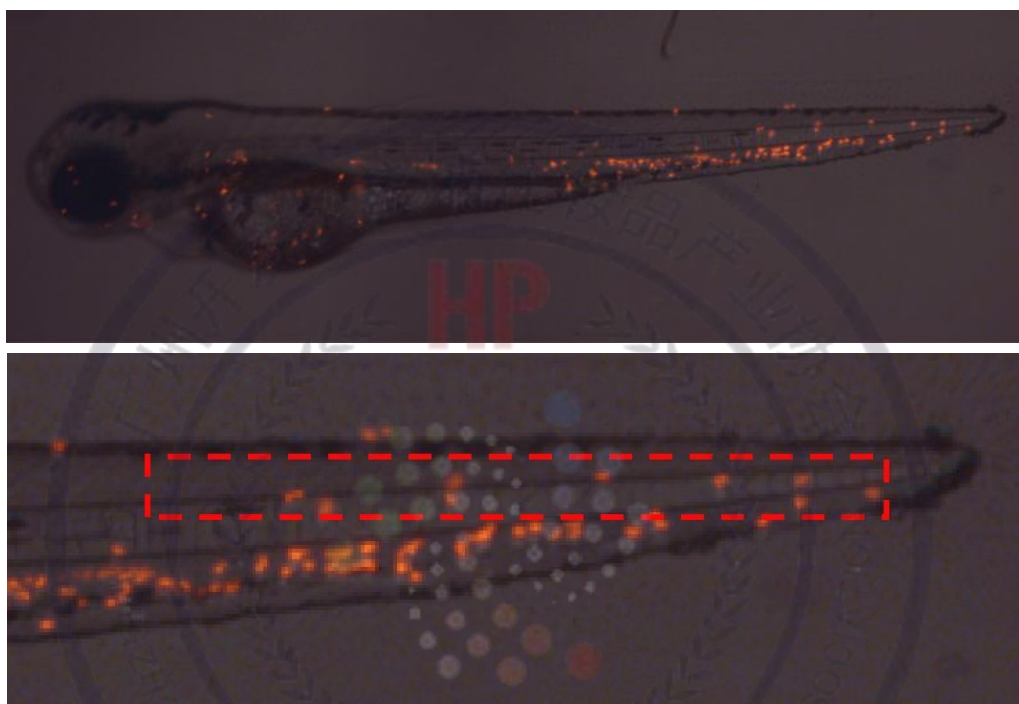


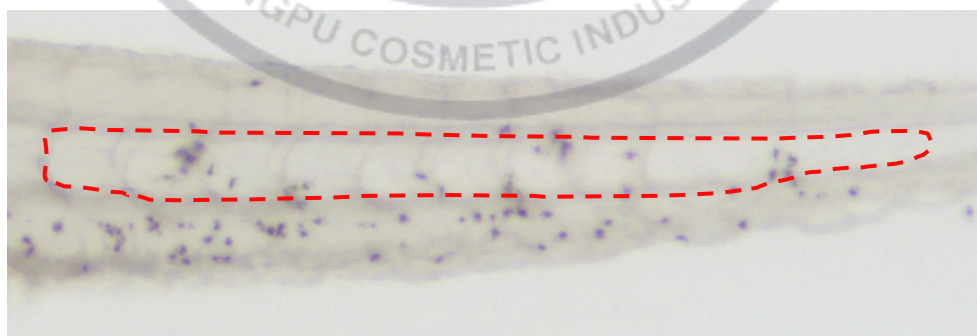
图 A. 化妆品舒缓功效 斑马鱼胚胎中性粒细胞聚集抑制测试流程图

附录 B
(资料性附录)

图B. 测试结束时斑马鱼胚胎拍照图示



*红色荧光点即为中性粒细胞（A 法）。



*深色点即为染色的中性粒细胞（B 法）。

图 B：斑马鱼胚胎尾部中性粒细胞计数区域。

参考文献

- [1] OECD. Test No. 236: Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test[S], OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2, OECD Publishing, Paris, 2003.
- [2] T/SHRH 036-2021 化妆品黑色素抑制-斑马鱼胚胎测试方法[S]。
- [3] T/GDST 1-2021 斑马鱼胚胎急性毒性测试 A 法和 B 法[S]。
- [4] de Oliveira S, Reyes-Aldasoro CC, Candel S, Renshaw SA, Mulero V, & Calado Â. Cxcl8 (IL-8) mediates neutrophil recruitment and behavior in the zebrafish inflammatory response[J]. J Immunol. 2013, 190(8): 4349-4359.
- [5] Hasegawa T, Hall CJ, Crosier PS, Abe G, Kawakami K, Kudo A, & Kawakami A. Transient inflammatory response mediated by interleukin-1 β is required for proper regeneration in zebrafish fin fold[J]. Elife. 2017, 6: e22716.
- [6] Henry KM, Loynes CA, Whyte MK, & Renshaw SA. Zebrafish as a model for the study of neutrophil biology[J]. J Leukocyte Biol. 2013, 94(4): 633-642.
- [7] Hillegass JM, Villano CM, Cooper KR, & White LA. Matrix metalloproteinase-13 is required for zebra fish (*Danio rerio*) development and is a target for glucocorticoids[J]. Tox Sci. 2007, 100(1): 168-179.
- [8] Yang LL, Wang GQ, Yang L M, Huang ZB, Zhang WQ, & Yu LZ. Endotoxin molecule lipopolysaccharide-induced zebrafish inflammation model: a novel screening method for anti-inflammatory drugs[J]. Molecules. 2014, 19(2): 2390-2409.
- [9] D'Alencon CA, Pena OA, Wittmann C, Gallardo VE, Jones RA, Loosli F, Liebel U, Grabher C, Allende ML. A high-throughput chemically induced inflammation assay in zebrafish[J]. BMC Biol. 2010, 8:151.