

团 体 标 准

T/ZHCA ###-2021

化妆品舒缓功效评价——斑马鱼幼鱼
中性粒细胞迁移量检测方法

Evaluation of soothing effect of cosmetics—detection
method of neutrophil migration in zebrafish larvae
(征求意见稿)

2021-##-##发布

2021-##-##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》给出的规则起草。

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。

本文件牵头单位：杭州环特生物科技股份有限公司

本文件主要起草单位：

本文件起草单位：

本文件主要起草人：

化妆品舒缓功效评价

斑马鱼幼鱼中性粒细胞迁移量检测方法

1 范围

本文件规定了一种用于评价化妆品舒缓功效的检测方法。

本文件适用于化妆品及其原料舒缓功效的检测。

有以下特征的受试物不适用于本文件方法：受试物不能溶解于水或不能制备成能在水中均匀分散的悬浮液。

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。凡是注日期的引用文件，仅所注日期的版本适用于本文件。凡是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 术语及定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

最大耐受浓度 maximum tolerated concentration ; MTC

以3dpf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）的浓度。

3.2

受精后天数 day post-fertilization ; dpf

是指斑马鱼受精卵受精后的天数。

4 方法原理

十二烷基磺酸钠（SLS）是人体皮肤刺激物模型斑贴试验常见的阳性对照物，SLS刺激后能诱发表皮炎症细胞浸润，可导致水肿、红斑、瘙痒、疼痛等症状。对皮肤的刺激表型主要表现为皮肤炎症，炎症早期主要表现为毛细血管扩张、通透性亢进和水肿。刺激物进入斑马鱼体内，诱导炎症反应，中性粒细胞发生免疫应答，向皮肤表皮迁移并聚集。

利用转基因中性粒细胞绿色荧光品系斑马鱼（MPX）处理前后皮肤中性粒细胞数量变化来检测样品是否具有舒缓功效。

5 材料和试剂

除非另有说明，所用试剂均为分析纯。水为新制蒸馏水或去离子水，pH为6.5~8.5，电导率≤10μS/cm。

- 5.1 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。
- 5.2 甲基纤维素（Methyl cellulose，CAS号：9004-67-5）。
- 5.3 3%甲基纤维素：称取3.0g甲基纤维素，缓慢加入到97.0g沸水中，边加边搅拌，待甲基纤维素完全溶解后，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。
- 5.4 标准稀释水，按附录A中描述的方法配制。
- 5.5 造模剂：60 μg/mL十二烷基磺酸钠（Sodium laurylsulfonate，CAS号：2386-53-0）。
- 5.6 阳性对照样品：0.0625%甘草酸二钾（Dipotassium glycyrrhizinate，CAS号：68797-35-3）。
- 5.7 助溶剂：甲醇（Methyl alcohol，CAS号,67-56-1，分析纯试剂）。

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℃~50℃，精度±0.1℃。
- 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倍。
- 6.4 荧光体视显微镜：同时带有显微拍照系统。
- 6.5 图像分析软件：Image J 或相当者。
- 6.6 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

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。

- 7.1.1 水溶性或易在水中分散的受试物：称取适量（0.01g~0.1g）受试物，用标准稀释水溶解并定容至10ml；
- 7.1.2 在水溶液中难于溶解或分散的受试物：称取适量（0.01g~0.1g）受试物，添加0.1ml助溶剂助溶，用标准稀释水溶解并定容至10ml。所有组别中的助溶剂浓度应该保持一致，且浓度（质量浓度或体积分数）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它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足够数量的发育正常的斑马鱼幼鱼，置于标准稀释水中进行孵育，容器的水温控制在（28.5±1.0）℃。

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2dpf的斑马鱼幼鱼，放入六孔板中，每孔15尾，在不伤害幼鱼的情况下除去6孔板中的标准稀释水，然后迅速向每孔中加入3ml含60 µg/mL造模剂的受试物溶液。

盖上培养板面板并用铝箔纸包裹，在 (28.5 ± 1.0) °C生化培养箱中避光孵育，孵育后18小时后进行观察，对斑马鱼的死亡和其它毒性效应进行记录。

8.1.3 MTC的确定

以3dpf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）的浓度组别确定为MTC。

8.2 正式试验

8.2.1 试验分组

按照以下方法进行分组：

- 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：含有助溶剂和斑马鱼幼鱼；如果受试物配制过程中使用了助溶剂，则应设置该组。
- c) 模型对照组：含斑马鱼幼鱼及造模剂。
- d) 阳性对照组：含有造模剂、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：含有造模剂、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。

8.2.2 受试物处理

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。

选取发育正常的2dpf斑马鱼幼鱼，并随机分配到六孔板中，每孔15尾，在不伤害幼鱼的情况下除去6孔板中的标准稀释水，然后迅速向每孔中加入3ml含60 µg/mL造模剂的受试物溶液。

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

8.2.3 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，在荧光显微镜下观察并拍照，拍照时斑马鱼应头朝左、尾部朝右、身体保持侧躺，在2x1.6倍下找到最清晰的焦距进行拍照。所有斑马鱼的拍照结果须在相同的仪器和环境条件下完成，且斑马鱼体位应该保持一致。

8.2.4 图像分析

拍照完成后，使用图像分析软件对获取到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（如附录A的图1所示）。将软件的分析参数设置为中性粒细胞数量，每组取10个有效数据。

9 结果评价

9.1 数据处理

9.1.1 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）及标准误差（Standard Error, SE）统计学处理结果用Mean ± SE表示。采用Dunnett's T-检验进行统计学处理，以模型对照组作为标准，比较各实验组中性粒细胞个数，p < 0.05为有显著性差异。

9.1.2 舒缓功效的定量计算

根据中性粒细胞个数N，计算受试物的舒缓功效（以中性粒细胞减少率表示），公式如下：

$$\text{舒缓功效 (\%)} = \frac{N(\text{模型对照组}) - N(\text{受试物组})}{N(\text{模型对照组}) - N(\text{空白对照组})} \times 100\%$$

如果受试物配制过程中使用了助溶剂，则公式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迁移，可作为舒缓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，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。

11 试验报告

试验报告至少应给出以下几个方面的内容：

a) 检验依据；

b) 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；

- c) 斑马鱼来源和品系等相关信息；
- d) 试验条件和方法，包括试验具体步骤；
- e) 试验开始至完成的日期；
- f) 试验结果，包括测定数据、计算值、图像数据等；
- g) 数据处理与结果评价方法；
- h) 结论。

征求意见稿

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。水为新制蒸馏水或去离子水，pH为6.5~8.5，电导率 $\leq 10\mu\text{S}/\text{cm}$ 。

A.1.1 碳酸氢钠 NaHCO_3 ，CAS号：144-55-8）。

A.1.2 氯化钾（ KCl ，CAS号：7647-14-5）。

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

A.1.4 硫酸镁（ $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ，CAS号：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1L容量瓶，备用

A.2.2 标准稀释水的配制

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

附录 B

(资料性)

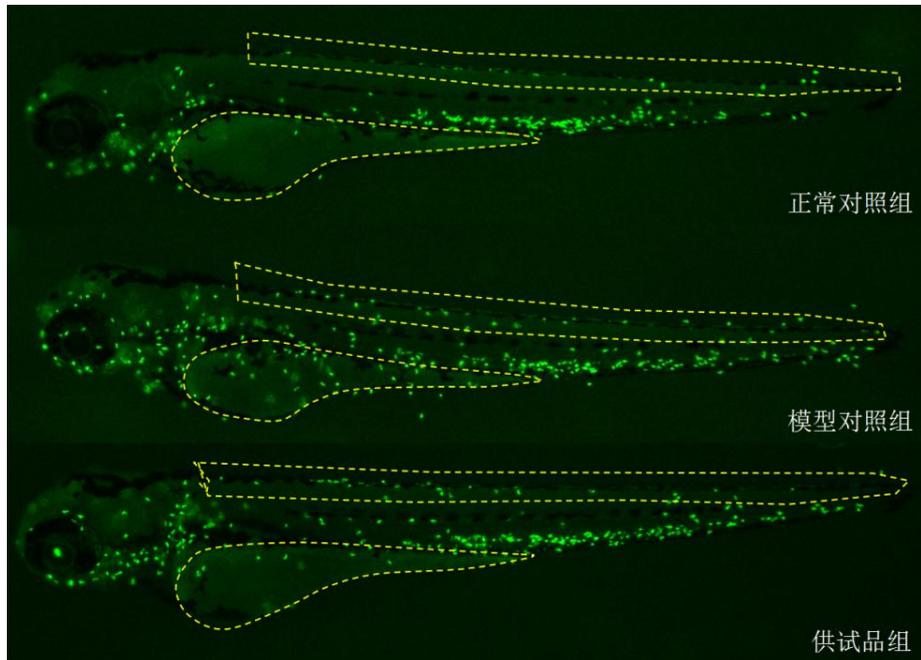


图 B.1 斑马鱼皮肤中性粒细胞表型图

黄色虚线区域为计算区域，绿色荧光点为中性粒细胞

参 考 文 献

- [1] Zhou H, Cao H, Zheng Y, et al. Liang-Ge-San, a classic traditional Chinese medicine formula, attenuates acute inflammation in zebrafish and RAW 264.7 cells[J]. Journal of Ethnopharmacology, 2020, 249:112427.
- [2] Mohammad. A.M. Wadaan, Mohammad Mubarak. Skin Lesions Induced by Sodium Lauryl Sulfate (SLS) in Rabbits[J]. Journal of Medical Sciences, 2005, 5(4):320-323.
-

征 文 普 通 刊 物