

T/GDCA

广东省化妆品学会团体标准

T/GDCA 013—2021

化妆品 - 斑马鱼胚胎舒缓功效测试方法

Cosmetics - Evaluation Method of Palliation Effect in Zebrafish Embryos

(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

广东省化妆品学会 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。

本文件由广东省化妆品学会提出。

本文件由广东省化妆品学会归口。

本文件起草单位：

本文件主要起草人：

化妆品-斑马鱼胚胎舒缓功效测试方法

1 范围

本标准规定的方法，属于化妆品原料及产品舒缓功效评价的实验室方法。

本标准规定了斑马鱼胚胎舒缓功效测试的方法。

本标准适用于化妆品原料及产品的舒缓功效的快速检测。

本标准适用于以下特征的受试物：

——受试物能溶解于水、在一定条件下能溶于水或能在水中形成均匀分散的悬浮液。

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。

中华人民共和国国务院令 第727号 《化妆品监督管理条例（2021）》

国家药监局关于发布《化妆品分类规则和分类目录》的公告（2021年第49号）附件：化妆品分类规则和分类目录

国家药品监督管理局关于发布《化妆品功效宣称评价规范》的公告（2021年第50号）附件：化妆品功效宣称评价规范

GB/T603 化学试剂试验方法中所用到试剂及制品的制备

GB/T6682 分析实验室用水规格和实验方法

DB32/T 3979-2021 实验用斑马鱼饲养技术条件

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1 舒缓

有助于改善皮肤刺激等状态。

3.2 hpf

hours post-fertilization (hpf)：受精后小时数

3.3 自旋运动

胚胎在卵膜内呈自发旋转运动，参考附录C。

3.4 无可观察效应浓度

与对照组相比，对实验生物未产生显著性效应的最高受试物浓度，即“no observed effect concentration; NOEC”。

3.5 斑马鱼胚胎

0—5dpf，胚胎靠卵黄提供营养的阶段。

3.6 斑马鱼胚胎死亡

0—48 hpf出现卵凝结，48 hpf无法观察到心跳。

4 评价方法

4.1 斑马鱼行为学分析法

4.1.1 原理

斑马鱼胚胎具有极强的敏感性，利用斑马鱼胚胎进行刺激性评价已在环境毒理学中应用，但在化妆品领域尚无应用。斑马鱼胚胎在发育初期全身透明，胚胎发育至24 hpf (Prim-5 stage) 时会产生自旋运动。当有鱼胚受到化学刺激后，其产生的自旋运动次数会增多；当加入具有舒缓功效的受试样品后，其自旋运动次数与模型组对比有显著性降低，通过比较斑马鱼胚胎的自旋运动次数变化对化妆品原料及产品进行舒缓功效评价。

4.1.2 材料与试剂

4.1.2.1 斑马鱼胚胎：推荐使用野生型 AB 品系斑马鱼的鱼卵；

4.1.2.2 斑马鱼交配盒；

4.1.2.3 96 孔板；

4.1.2.4 EP 管（操作者根据实际情况选用不同规格的 EP 管）；

4.1.2.5 90 mm 的培养皿；

4.1.2.6 助溶剂（如：二甲基亚砜、无水乙醇等）；

4.1.2.7 缓冲水（如：Holt-Buffer, E 3 培养液，配制方法见附录 D）；

4.1.2.8 十二烷基硫酸钠（根据实验室实际情况，配置 200~500 μM 造模剂）：纯度 $\geq 99\%$ ，CAS 号：151-21-3。根据实验室实际情况，配置称取 0.0005~0.0012 g（精确到 0.0001 g）十二烷基硫酸钠于 15 mL EP 管中，加入 8 mL 缓冲水，振荡至粉末完全溶解，配制成 200~500 μM 的十二烷基硫酸钠溶液，常温保存；

4.1.2.9 甘草酸二钾溶液（阳性对照试剂）：纯度 $\geq 98\%$ ，CAS 号：68797-35-3。称取 0.0036g（精确到 0.0001g）甘草酸二钾于 5 mL EP 管中，加入 4mL 缓冲水，振荡至粉末完全溶解，配制成 1mM 的甘草酸二钾溶液，现配现用；

4.1.2.10 十二烷基硫酸钠与甘草酸二钾的混合液：使十二烷基硫酸钠的终浓度与造模剂使用浓度相同为 500 μM ，甘草酸二钾的终浓度为 1000 μM ；

4.1.2.11 1.2.11 实验用水：采用三级水，如去离子水、蒸馏水等。

4.1.3 仪器设备

4.1.3.1 斑马鱼养殖系统；

4.1.3.2 生化培养箱（28.5 \pm 0.5 $^{\circ}\text{C}$ ）；

4.1.3.3 分析天平：精度 0.0001g；

4.1.3.4 移液器（量程覆盖范围：0.5 μL —1000 μL ，操作者根据实际情况选用不同的量程）；

4.1.3.5 光学显微镜：放大倍数不低于 50 倍的光学显微镜（如：连续变焦体式显微镜、荧光显微镜等），需配备成像系统（如 CCD 相机）；

4.1.3.6 实验室一般常规器材。

4.1.4 实验准备

4.1.4.1 样品前处理

受试物储备液的配制：根据受试物的自身特性，配制受试物的母液。用于确定后续实验的NOEC浓度。

水溶性或易在水中分散的样品使用缓冲水溶解并定容，备用；难溶于水或不溶于水的样品使用适当助溶剂助溶后定容，根据受试品自身特性选择相应的助溶剂，推荐使用二甲基亚砜（DMSO）。当使用某种助溶剂时，所有组别中的助溶剂浓度应该保持一致，且浓度 $\leq 1\%$ 。同时，应另设置溶剂对照组，溶剂对照组不得对胚胎产生刺激性或舒缓效果，也不能有其他任何可观察到的不利影响。

4.1.4.2 斑马鱼胚胎的获取

实验前一天下午喂食后1h，选取健康的成年AB系野生型斑马鱼，雌雄各半，置于配种缸中，每缸一对，并用隔板将雌雄隔开。次日早上9:00，抽离隔板，自由交配1h后收集胚胎，挑选发育正常的受精卵于90 mm的培养皿中，加入适量的缓冲水，每皿不超过100枚胚胎，置于 $(28.5 \pm 0.5)^\circ\text{C}$ 生化培养箱中孵育。发育正常的胚胎见附录A，死亡及畸形的胚胎见附录B。

4.1.5 预实验

预实验确定受试物的NOEC浓度，为后续正式实验的浓度设置提供参考。

4.1.5.1 受试物浓度的稀释

受试物溶液：将受试物储备液用缓冲水等比稀释，浓度间稀释的倍数不少于10倍，备用。

4.1.5.2 受试物处理

随机挑选正常发育的24hpf（Prim-5 stage）的AB系野生型斑马鱼于96孔板中，每孔5枚胚胎，每组设置3个复孔，在不伤害胚胎的情况下除去96孔板中的缓冲水，并加入不同浓度受试物溶液200 μL ，空白对照组加入缓冲水，非水溶性样品需设置溶剂对照组。

4.1.5.3 培养孵育

置于 $(28.5 \pm 0.5)^\circ\text{C}$ 生化培养箱中孵育。在1小时内，每隔20min，在光学显微镜下观察斑马鱼胚胎的自旋运动情况。以24hpf的斑马鱼胚胎未出现死亡以及自旋运动的次数与空白对照组对比无显著性差异的浓度组别确定为NOEC浓度。

4.1.6 正式实验

4.1.6.1 实验分组

正式实验按照以下方法进行分组：

- 1) 正常对照组：含斑马鱼胚胎及缓冲水。
- 2) 模型组：含斑马鱼胚胎及造模剂。
- 3) 阳性对照组：含斑马鱼胚胎、造模剂溶液及阳性对照试剂。
- 4) 受试物测试组：含斑马鱼胚胎、造模剂及受试物溶液，受试物溶液根据需要可设置多个不同的浓度组。
- 5) 溶剂对照组：含斑马鱼胚胎和溶剂；如果受试物配制过程中使用了助溶剂，则应设置该组。

4.1.6.2 受试物浓度设置

根据预实验的结果，确定正式实验的受试物浓度范围，实验最高浓度不得高于NOEC值。根据实验要求，受试物浓度等比稀释，浓度间稀释倍数不少于2倍，浓度组别设置不少于3个。

4.1.6.3 受试物处理

根据实验要求，预先筛选好足够数量且正常发育的24 hpf的斑马鱼胚胎，并随机分配到96孔板中，每孔5枚，每组浓度设置3个复孔。在不伤害胚胎的情况下除去96孔板中的缓冲水，然后向空白对照组以及模型组中每孔加入200 μL 缓冲水，阳性对照组中每孔加入200 μL 的阳性对照试剂溶液，其余组别每孔中加入200 μL 相应浓度的受试物溶液，盖上培养板面板，在 $(28.5 \pm 0.5)^\circ\text{C}$ 生化培养箱中孵育60 min。

孵育结束后，在不伤害胚胎的情况下除去96孔板中的溶液，空白对照组中加入200 μL 的缓冲水、模型组中加入200 μL 的造模剂溶液、阳性对照组中加入200 μL 造模剂溶液与阳性对照试剂溶液的混合液、受试物测试组中加入200 μL 造模剂溶液与受试物溶液的混合液，盖上培养板面板，在 $(28.5 \pm 0.5)^\circ\text{C}$ 生化培养箱中孵育15 min。

4.1.6.4 观察和录像

孵育结束后，将96孔板置于光学显微镜下观察并录像，录像时应确保能清晰看到斑马鱼胚胎的卵膜部位。所有斑马鱼胚胎的录像视频需在相同的仪器和环境条件下完成。从初次孵育到完成录像时，应保持时间一致，操作者根据实际情况调整各组给药顺序及时间间隔。

4.1.6.5 视频分析

录像完成后，计算斑马鱼胚胎30 s内自旋运动的次数。自旋运动以胚胎在卵膜内产生的自发旋转运动为标准。计算各组别斑马鱼胚胎的自旋运动次数。

4.1.7 结果评价

4.1.7.1 统计学分析

记录斑马鱼胚胎的自旋运动次数，计算各组实验中每颗胚胎自旋运动次数的平均值（Mean）及标准差（Standard Deviation, SD）统计学分析结果用Mean \pm SD表示。使用统计分析软件（如：GraphPad Prism8）对数据进行统计分析，以模型组作为标准，比较各实验组自旋运动次数， $P < 0.05$ 表示有显著性差异。

4.1.7.2 结果判定及说明

在实验满足有效性的基础上，受试物测试组与模型组对比，胚胎自旋运动次数有显著降低（ $P < 0.05$ ），说明该受试物在该浓度下，具有抗刺激作用，可作为舒缓功效评价的证据支撑之一。

4.1.8 实验有效性的条件

4.1.8.1 预实验中，受试物测试组与空白对照组之间存在统计学上的显著性差异，则视为受试物测试组在该浓度下的实验失败；

4.1.8.2 正式实验中，模型对照组应与正常对照组（如果使用助溶剂，也包括溶剂对照组）相比，统计学上显著性增加，且增加倍数应在1~3倍之间，否则该次实验视为失败。

4.1.8.3 正式实验中，如果使用了助溶剂，则溶剂对照组与正常对照组之间不得存在显著性差异，否则该次实验视为失败。

4.1.8.4 正式实验中，所有组别中的斑马鱼胚胎不能出现死亡情况，否则视为该实验失败。

4.1.8.5 正式实验中，阳性对照组与模型组之间未达到统计学上的显著性减少，否则该次实验视为失败。

4.2 斑马鱼炎症评价法

4.2.1 原理

皮肤炎症会导致皮肤红肿，刺痛，瘙痒等现象，炎症细胞发生免疫应答，炎症细胞增多。在斑马鱼研究中，已有多转基因斑马鱼（如：Tg(mpo:GFP), Tg(lyz:dsRed)等品系）应用于皮肤炎症的研究，利用荧光蛋白对炎症细胞进行标记。加入皮肤炎症诱导剂诱导斑马鱼体内的炎症细胞发生免疫应答，再加入受试样品，在荧光显微镜下分析炎症部位的炎症细胞个数，与模型组对比，从而反映受试样品的舒缓功效。

4.2.2 材料与试剂

4.2.2.1 72 hpf（Protruding-mouth stage）的斑马鱼胚胎：推荐使用荧光蛋白标记炎症细胞（如：中性粒细胞、巨噬细胞等）的转基因斑马鱼；

- 4.2.2.2 24 孔板；
- 4.2.2.3 十二烷基硫酸钠（100 μM 造模剂）；
- 4.2.2.4 4%甲基纤维素：用于拍照时固定斑马鱼，CAS 号：9004-67-5；
- 4.2.2.5 十二烷基硫酸钠与甘草酸二钾的混合液：使十二烷基硫酸钠的终浓度为 100 μM ，甘草酸二钾的终浓度为 1000 μM ；
- 4.2.2.6 斑马鱼交配盒；
- 4.2.2.7 EP 管（操作者根据实际情况选用不同规格的 EP 管）；
- 4.2.2.8 90 mm 的培养皿；
- 4.2.2.9 助溶剂（如：二甲基亚砷、无水乙醇等）；
- 4.2.2.10 缓冲水（如：Holt-Buffer，E3 培养液，配制方法见附录 D）；
- 4.2.2.11 甘草酸二钾溶液（阳性对照试剂）：纯度 $\geq 98\%$ ，CAS 号：68797-35-3。称取 0.0036 g（精确到 0.0001 g）甘草酸二钾于 5 mL EP 管中，加入 4 mL 缓冲水，振荡至粉末完全溶解，配制成 1 mM 的甘草酸二钾溶液，现配现用；
- 4.2.2.12 实验用水：采用三级水，如去离子水、蒸馏水等。

4.2.3 仪器设备

- 4.2.3.1 斑马鱼养殖系统；
- 4.2.3.2 生化培养箱（ $28.5^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ ）；
- 4.2.3.3 分析天平：精度 0.0001 g；
- 4.2.3.4 移液器（量程覆盖范围：0.5 μL —1000 μL ，操作者根据实际情况选用不同的量程）；
- 4.2.3.5 光学显微镜：放大倍数不低于 50 倍的光学显微镜（如：连续变焦体式显微镜、荧光显微镜等），需配备成像系统（如 CDC 相机）；
- 4.2.3.6 实验室一般常规器材。

4.2.4 实验准备

4.2.4.1 样品前处理

受试物储备液的配制：根据受试物的自身特性，配制受试物的母液。用于确定后续实验的 NOEC 浓度。

水溶性或易在水中分散的样品使用缓冲水溶解并定容，备用；难溶于水或不溶于水的样品使用适当助溶剂助溶后定容，根据受试品自身特性选择相应的助溶剂，推荐使用二甲基亚砷（DMSO）。当使用某种助溶剂时，所有组别中的助溶剂浓度应该保持一致，且浓度 $\leq 1\%$ 。同时，应另设置溶剂对照组，溶剂对照组不得对胚胎产生刺激性或舒缓效果，也不能有其他任何可观察到的不利影响。

4.2.4.2 斑马鱼胚胎的获取

实验前一天下午喂食后 1h，选取健康的成年 AB 系野生型斑马鱼，雌雄各半，置于配种缸中，每缸一对，并用隔板将雌雄隔开。次日早上 9:00，抽离隔板，自由交配 1 h 后收集胚胎，挑选发育正常的受精卵于 90 mm 的培养皿中，加入适量的缓冲水，每皿不超过 100 枚胚胎，置于 $(28.5 \pm 0.5)^{\circ}\text{C}$ 生化培养箱中孵育。发育正常的胚胎见附录 A，死亡及畸形的胚胎见附录 B。

4.2.4.3 72 hpf 转基因斑马鱼的获取

每隔24小时更换一次培养皿的缓冲水，将畸形以及死亡的斑马鱼胚胎剔除，其余正常发育的斑马鱼胚胎置于 $(28.5\text{℃}\pm 0.5)$ ℃生化培养箱中孵育。发育至72 hpf，挑选发育正常的胚胎进行实验。发育正常的斑马鱼胚胎见附录A，死亡以及畸形的斑马鱼胚胎见附录B。

4.2.5 预实验

4.2.5.1 受试物浓度的稀释

受试物溶液：将受试物储备液用缓冲水等比稀释成一组适宜浓度的梯度的溶液，每个浓度梯度稀释倍数不少于10倍，备用。

4.2.5.2 受试物处理

随机挑选正常发育的72 hpf的转基因斑马鱼于24孔板中，每孔15条，每组设置3个复孔，在不伤害斑马鱼的情况下除去24孔板中的缓冲水，并加入不同浓度受试物溶液1 mL，空白对照组加入缓冲水，非水溶性样品需设置溶剂对照组。

4.2.5.3 培养孵育

置于 (28.5 ± 0.5) ℃生化培养箱中孵育60 min。在光学显微镜下观察斑马鱼的情况。以72 hpf的斑马鱼未出现死亡或可见畸形的浓度组别确定为NOEC浓度，。

4.2.6 正式试验

4.2.6.1 实验分组

正式实验按照以下方法进行分组：

- 1) 正常对照组：含转基因斑马鱼胚胎及缓冲水。
- 2) 模型组：含转基因斑马鱼胚胎及造模剂溶液。
- 3) 阳性对照组：含转基因斑马鱼胚胎、造模剂溶液及阳性对照试剂溶液。
- 4) 受试物测试组：含转基因斑马鱼胚胎、造模剂溶液及受试物，受试物根据需要可设置3—5个不同的浓度组。
- 5) 溶剂对照组：含转基因斑马鱼胚胎和溶剂；如果受试物配制过程中使用了助溶剂，则应设置该组。

4.2.6.2 受试物浓度设置

根据预实验的结果，确定正式实验的受试物浓度范围，实验最高浓度不得高于NOEC值。根据实验要求，受试物浓度等比稀释，稀释倍数不少于10倍。

4.2.6.3 受试物处理

根据实验要求，预先筛选好足够数量且正常发育的72 hpf (Protruding-mouth stage) 的转基因斑马鱼胚胎，并随机分配到24孔板中，每孔15条，每组浓度设置3个复孔。在不伤害胚胎的情况下除去24孔板中的缓冲水，然后迅速向阳性对照组以及受试物测试组每孔中加入1 mL的造模剂溶液，空白对照组以及模型组加入1 mL 的缓冲水。盖上培养板面板，在 (28.5 ± 0.5) ℃生化培养箱中孵育60 min（由于时间依赖和时间敏感，操作者根据自身条件控制作用时间在60 min，保持各组时间间隔相同）。

孵育60 min后，在不伤害斑马鱼胚胎的情况下除去24孔板中的溶液，迅速向空白组中加入1 mL 的缓冲水，模型组中加入1 mL 的造模剂溶液，阳性对照组中加入1 mL的造模剂溶液与阳性对照试剂溶液的混合液，受试物测试组中加入不同浓度的受试物溶液与造模剂溶液的混合液。盖上培养板面板，在 (28.5 ± 0.5) ℃生化培养箱中孵育60 min。

4.2.6.4 观察和拍照

孵育结束后，从表型和行为正常的斑马鱼中每组随机选取至少5尾，用4%甲基纤维素固定，在荧光显微镜下观察并拍照，拍照时斑马鱼一侧朝下，身体保持水平，所有斑马鱼的拍照结果需在相同的仪器

和环境下完成，且斑马鱼的体位应保持一致。从初次孵育到完成拍照时，应保持时间一致，操作者根据实际情况调整各组给药顺序及时间间隔。

4.2.6.5 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，推荐使用Image J图像分析软件。选取炎症部位（见附录E）通过Image J软件进行绿色荧光面积统计，以此统计炎症细胞数量，每组的有效数据不少于3个。

4.2.7 结果评价

4.2.7.1 统计学分析

统计斑马鱼的炎症细胞数量，计算各组实验的平均值（Mean）及标准差（Standard Deviation, SD）统计学分析结果用Mean±SD表示。使用统计分析软件（如：GraphPad Prism8）对数据进行统计分析，以模型组作为标准，比较各实验组炎症细胞的数量， $P<0.05$ 表示有显著性差异。

4.2.7.2 结果判定及说明

在实验满足有效性的基础上，受试物测试组与模型组对比，炎症细胞数量有显著降低（ $P<0.05$ ），说明该受试物在该浓度下，具有抗炎作用，可作为舒缓功效评价的证据支撑之一。

4.2.8 实验有效性的条件

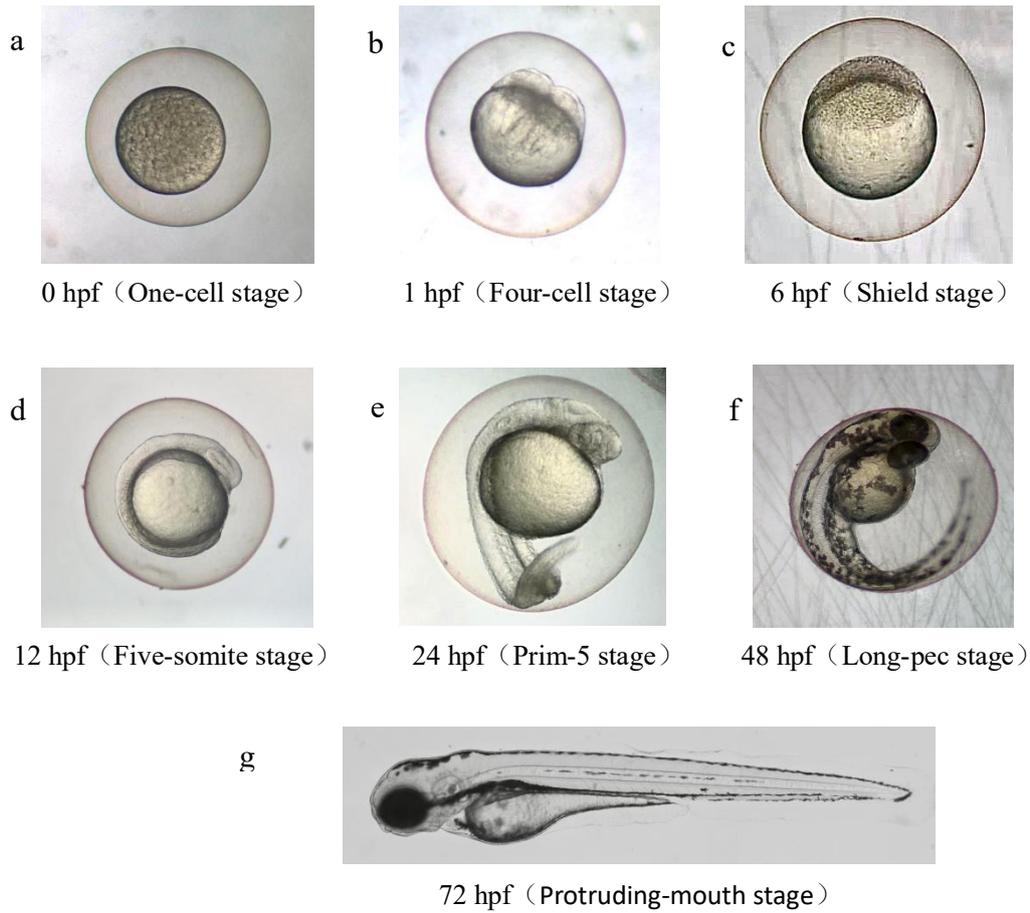
4.2.8.1 正式实验中，模型组与正常对照组（如果使用助溶剂，也包括溶剂对照组）之间存在统计学上的显著性增加，否则该次实验视为失败。

4.2.8.2 正式实验中，如果使用了助溶剂，则溶剂对照组与正常对照组之间不得存在显著性差异，否则该次实验视为失败。

4.2.8.3 正式实验中，所有组别中的斑马鱼不能出现死亡情况或其他可见畸形，否则视为该实验失败。

4.2.8.4 正式实验中，阳性对照组与模型组之间存在统计学上的显著性降低，否则该次实验视为失败。

附录 A
(资料性)
斑马鱼胚胎正常生长阶段图



附录 B
(资料性)
斑马鱼胚胎图

a. 斑马鱼胚胎死亡图

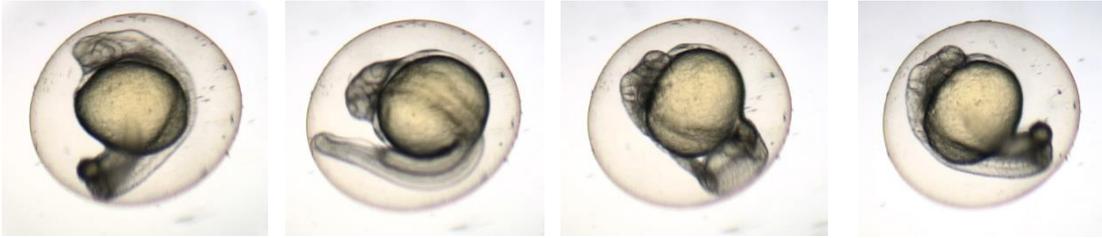


b. 斑马鱼胚胎畸形图



附录 C
(资料性)
斑马鱼胚胎自选运动

斑马鱼胚胎自选运动



附 录 D
(资料性)
缓冲水配制参考配方

一. Holt-Buffer 配制方法:

按照表格中的试剂依次加入 2L 烧杯中, 用超纯水定容至 2000mL

Holt-Buffer 配方	
NaCl	7.000g
NaHCO₃	0.400g
KCl	0.100g
CaCl₂	0.235g

使用真空过滤器 (孔径: 0.2 μ M) 过滤;

使用高压灭菌锅灭菌, 常温保存, 备用。

二. E3 培养液配制方法:

60×母液: 按照表格中的试剂依次加入 2L 烧杯中, 用超纯水定容至 2000mL

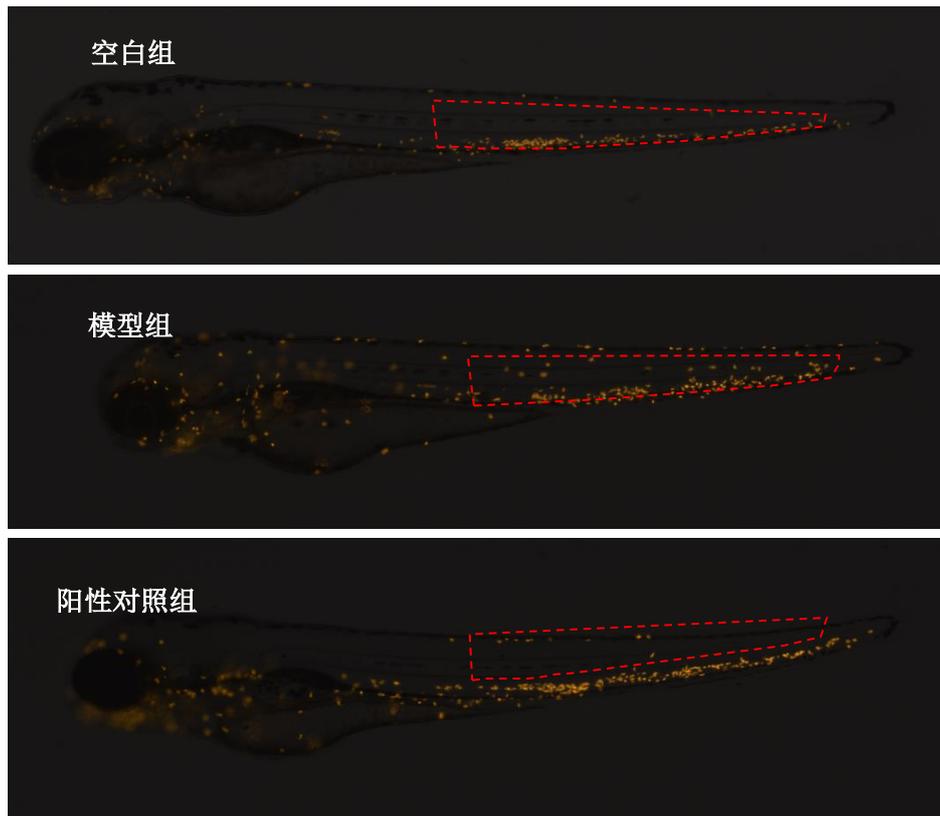
60×E3 培养液配方	
NaCl	34.800g
CaCl₂ · 2H₂O	5.800g
KCl	1.600g
CaCl₂	0.235g

使用氢氧化钠调 pH 至 7.2;

1×E3 培养液: 量取 16.5mL 的 60×培养液, 用水定容至 1L。

附录 E
(资料性)
斑马鱼炎症部位

附录 E
(资料性附录)
斑马鱼炎症部位



附录 G
(资料性)
斑马鱼养殖及维护

1. 温度

水温适宜范围：24~30℃；鱼房室温范围：25~27℃；观察胚胎发育经典温度：28.5℃

2. 光周期和光照强度

光周期：14 h 光照和 10 h 黑暗；光照强度：54~324 lux

3. PH

耐受范围：6.0~9.5；养殖范围：7.0~8.0

4. 电导率

养殖范围：200—1700 μS/cm；最适范围：500—800 μS/cm 左右

5. 饲育饵料

斑马鱼成年饵料一般使用丰年虫幼虫活体(需要孵化)，均可自行购买。饲喂次数一般为2~4次/日。