

ICS: 71.100.70

Y40

团 体 标 准

T/HPCIA 00X-2022

化妆品抗皱、紧致功效 - 斑马鱼胶原蛋白/弹性 蛋白基因表达测试方法

Anti-Wrinkle and Elasticity Efficacy of Cosmetics - Zebrafish
Collagen/Elastin Gene Expression Test Methods

(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 录

| | |
|-------------|----|
| 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 | 5 |
| 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 | 8 |
| 12. 结果相关性解读 | 9 |
| 13. 结果报告 | 9 |
| 附录 A（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：



化妆品抗皱、紧致功效—斑马鱼胶原蛋白/弹性蛋白基因表达测试方法

1 范围

本文件规定了斑马鱼胶原蛋白和弹性蛋白基因表达测试方法的基本要求。

本文件提供一种化妆品抗皱、紧致功效的斑马鱼生物评估方法，适用于测试通过促进胶原蛋白和/或弹性蛋白再生而达到抗皱、紧致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

化妆品功效宣称评价规范

GB/T 39469-2020 实验动物 实验鱼质量控制

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

胶原蛋白是人体的细胞外基质蛋白中含量最高的，其中 I 型胶原蛋白是皮肤中最丰富的蛋白质。斑马鱼的 I 型胶原蛋白分布与人体相同，且显示出与人类的高度保守性，它们的先天表达在受精后 6 天大时显著下降。测试斑马鱼 I 型胶原蛋白基因（*coll1a1*、*coll1a1b* 和 *coll1a2*）表达，比较处理组和空白对照组斑马鱼 I 型胶原蛋白基因相对表达量变化，计算 I 型胶原蛋白基因表达促进率可以评价原料或产品的抗皱和紧致功效。

弹性蛋白是人体皮肤中一种让体内许多组织在拉伸和收缩后维持原有形状，让皮肤在被挤压后恢复到本来形状的蛋白质。随着年龄增长，皮肤中的弹性蛋白纤维会逐渐断裂流失而令皮肤产生皱纹且

失去弹性。弹性蛋白基因高度保守，人体内的弹性蛋白由 *Eln* 基因合成，该基因在斑马鱼体内的对应基因为 *Eln1*。通过测试样本是否促进斑马鱼体内 *Eln1* 基因的表达，可以评判样本是否有促进弹性蛋白再生，实现抗皱、紧致功效。

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。

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 紫外分光光度计

测量RNA浓度和纯度。

5.10 PCR仪

进行cDNA合成。

5.11 实时PCR仪及相应多孔板及贴膜

进行基因扩增。

5.12 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、可控温离心机、

低温冰箱、可调节移液器和吸头等。

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0.25~0.5‰，电导率为500~800 μ S/cm，溶解氧 \geq 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。

6.6 胶原蛋白溶液

胶原蛋白储存液：称取0.5g胶原蛋白粉末溶于50mL水中。冷藏。1个月内有效。
工作液浓度为0.2g/L胶原蛋白，用鱼培养液稀释，使用前新鲜配制。

6.7 无DNase/RNase 超纯蒸馏水

6.8 磷酸缓冲盐溶液 (PBS)

用900mL水稀释100mL PBS (10x)。

6.9 RNA later 溶液

6.10 RNA提取试剂

如TRIzol试剂或RNA提取试剂盒。

6.11 三氯甲烷和异丙醇

分析纯级别。

6.12 75%乙醇

取37.5mL乙醇溶于12.5mL超纯蒸馏水，冷冻储存。

6.13 含gDNA Eraser的PrimerScript反转录试剂盒

6.14 实时PCR试剂盒

如SYBR Premix Ex Taq

6.15 胶原蛋白和弹性蛋白基因引物

| 基因 | 引物序列 | |
|----------------|------|-------------------------|
| 管家基因 | | |
| <i>β-actin</i> | 上游引物 | GCTGACAGGATGCAGAAGGA |
| | 下游引物 | TAGAAGCATTGCGGTGGAC |
| I 型胶原蛋白基因 | | |
| <i>Colla1a</i> | 上游引物 | TAGCCCCTATGGACGTTGGT |
| | 下游引物 | CGCAGGTCTAAGCAAGTGGA |
| <i>Colla1b</i> | 上游引物 | TGGCATGACCGGCCCTATTG |
| | 下游引物 | CTCTCCTTTAGCACCAGGCTGT |
| <i>Colla2</i> | 上游引物 | GAGGCCAGCCTGGTAACATT |
| | 下游引物 | GTTACCATCAGGACCAGGGC |
| 弹性蛋白基因 | | |
| <i>Eln1</i> | 上游引物 | AAAACCAGGTTACGGCTCTGT |
| | 下游引物 | TCCTCCTGGATAAGCTCCGTATC |

7 实验方法

7.1 受试生物

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℃，室内温度建议控制在 20~25℃。

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 200μL 鱼胚胎培养液中不超过 1 尾鱼胚胎的密度于 28±1℃ 培养

至受精后 5 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。如有颗粒物质存在，则于 $6500\times g$ 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。如有颗粒物质存在，则于 $6500\times g$ 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 24-孔板测试指引。测试流程可参见附录 A 图 A。如应用更大的测试容器（如 6-孔板），测试指引需做相应调整。

挑选健康的受精后 5 天大的斑马鱼。

9.1 测试分组

测试需设定空白对照组（鱼胚胎培养液）、阳性对照组（胶原蛋白溶液）和受试物组（受试物溶液）。

9.2 空白对照组设置

随机挑选 36 尾斑马鱼，转移至 24-孔板的 3 个孔中，每孔含 12 尾鱼和 2.4 mL 鱼胚胎培养液。

9.3 阳性对照组设置

随机挑选 36 尾斑马鱼，转移至 24-孔板的 3 个孔中，每孔含 12 尾鱼和 2.4 mL 胶原蛋白工作液。

9.4 受试物处理

随机挑选 36 尾斑马鱼，转移至 24-孔板的 3 个孔中，每孔含 12 尾鱼和 2.4 mL 受试物溶液放置于 $28\pm 1^\circ\text{C}$ 恒温箱中培养 $24\pm 1\text{h}$ 。

9.5 斑马鱼收集

将每孔的 12 尾鱼分别转移至 1.5 mL 管，除去溶液，加入 0.5 mL RNA later 溶液，冷冻储存。

9.6 mRNA 提取（如采用试剂盒则根据试剂盒技术说明书进行 mRNA 提取，下面是以 TRIzol 试剂提取为例）

除去 RNA later 溶液，用 PBS 溶液冲洗 3 次，在冰浴中加入 500 μL TRIzol 试剂，对斑马鱼进行匀浆，置

于冰浴10min。加入100 μL 三氯甲烷，涡旋1min，置于冰浴5min。于4℃中15,000×g离心样本20min，转移上层溶液至1.5mL离心管，加入250 μL异丙醇，涡旋1min，置于冰浴10min，离心样本20min。

除去所有上清液，加入500 μL乙醇，涡旋1min，于4℃中15,000×g离心样本5min，置于冰浴10min。重复此步骤3次。除去乙醇，于4℃中15,000×g离心样本5min，在通风橱中打开盖子风干样品10min。加入10 μL无DNase/RNase超纯蒸馏水，55℃加热15min。RNA样本于-80℃储存。

应用紫外分光光度计读取RNA样本在260nm（反应RNA浓度）下的吸光度，260nm/280nm吸光度比值和260nm/230nm吸光度比值（反应RNA样本纯度）。相对纯净的RNA样本的260/280吸光度比值>1.8；260/230吸光度比值在2.0-2.2间。

9.7 cDNA合成（以PrimerScript RT试剂盒为例）

用无DNase/RNase超纯蒸馏水将1 μg RNA样本稀释至7 μL。加入2 μL 5×gDNA Eraser缓冲液和1 μL gDNA Eraser，混匀后于PCR仪中加热42℃ 5min以除去样本中的gDNA。然后加入4 μL 5×PrimerScript缓冲液2，1 μL PrimerScript反转录酶混合液1，1 μL反转录引物混合液和4 μL纯净水，混合均匀后于PCR仪中37℃ 15min，85℃ 5s，然后冷却到4℃。cDNA样本冷冻储存。

9.8 进行实时PCR（以SYBR Premix Ex Taq为例）

对每个cDNA样本分别进行各个基因表达测试，每个基因测试设置3个重复。以10 μL反应量为例，每个重复设置包括5 μL 2×TB green premix Ex Taq，1nM上游引物，1nM下游引物，2 μL 20×无DNase/RNase超纯蒸馏水稀释后的cDNA溶液，然后加入无DNase/RNase超纯蒸馏水至10 μL。

用光学胶膜密封实时PCR板，于4℃以1000×g离心5min。然后于实时PCR仪中进行扩增。扩增条件为95℃ 30s，然后是对95℃ 5s和60℃ 30s进行40个循环，最后是95℃ 15s，60℃ 1min和95℃ 15s。收集每个反应的循环阈值（Ct值）。

9.9 数据

每个cDNA样本，每个基因的3个重复设置的Ct平均值作为扩增结果，以β-actin基因扩增量作为管家基因，计算基因的循环阈值 $\Delta Ct = Ct_{\text{基因}} - Ct_{\beta\text{-actin}}$ ，基因相对（和空白组比）循环阈值 $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{受试物}} - \Delta Ct_{\text{空白对照组}}$ ，基因相对表达量为 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 。

10 结果计算

计算胶原蛋白/弹性蛋白基因表达促进率：

$$\text{胶原蛋白/弹性蛋白基因表达促进率} = \frac{2^{-\Delta\Delta Ct_{\text{受试物}}} - 2^{-\Delta\Delta Ct_{\text{空白对照组}}}}{2^{-\Delta\Delta Ct_{\text{空白对照组}}}}$$

(1) 式中：

$2^{-\Delta\Delta Ct_{\text{受试物}}}$ —受试物处理组斑马鱼胶原蛋白/弹性蛋白基因相对表达量；

$2^{-\Delta\Delta Ct_{\text{空白对照组}}}$ —空白对照组斑马鱼胶原蛋白/弹性蛋白基因相对表达量。

对受试物处理组斑马鱼胶原蛋白/弹性蛋白基因相对表达量和空白对照组斑马鱼胶原蛋白/弹性蛋白基因相对表达量进行双尾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，阳性对照组斑马鱼胶原蛋白/弹性蛋白基因表达促进率为正数且 $p < 0.05$ 。

12 结果报告

12.1 弹性蛋白基因表达促进率

受试物在对应测试浓度下对胶原蛋白/弹性蛋白基因表达促进率。

12.2 评价

评价受试物促进胶原蛋白/弹性蛋白基因表达的能力，分析受试物处理组与空白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

在胶原蛋白/弹性蛋白基因表达促进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抗皱、紧致功效的支持证据。



附录 A

(资料性附录)

图 A. 测试流程图

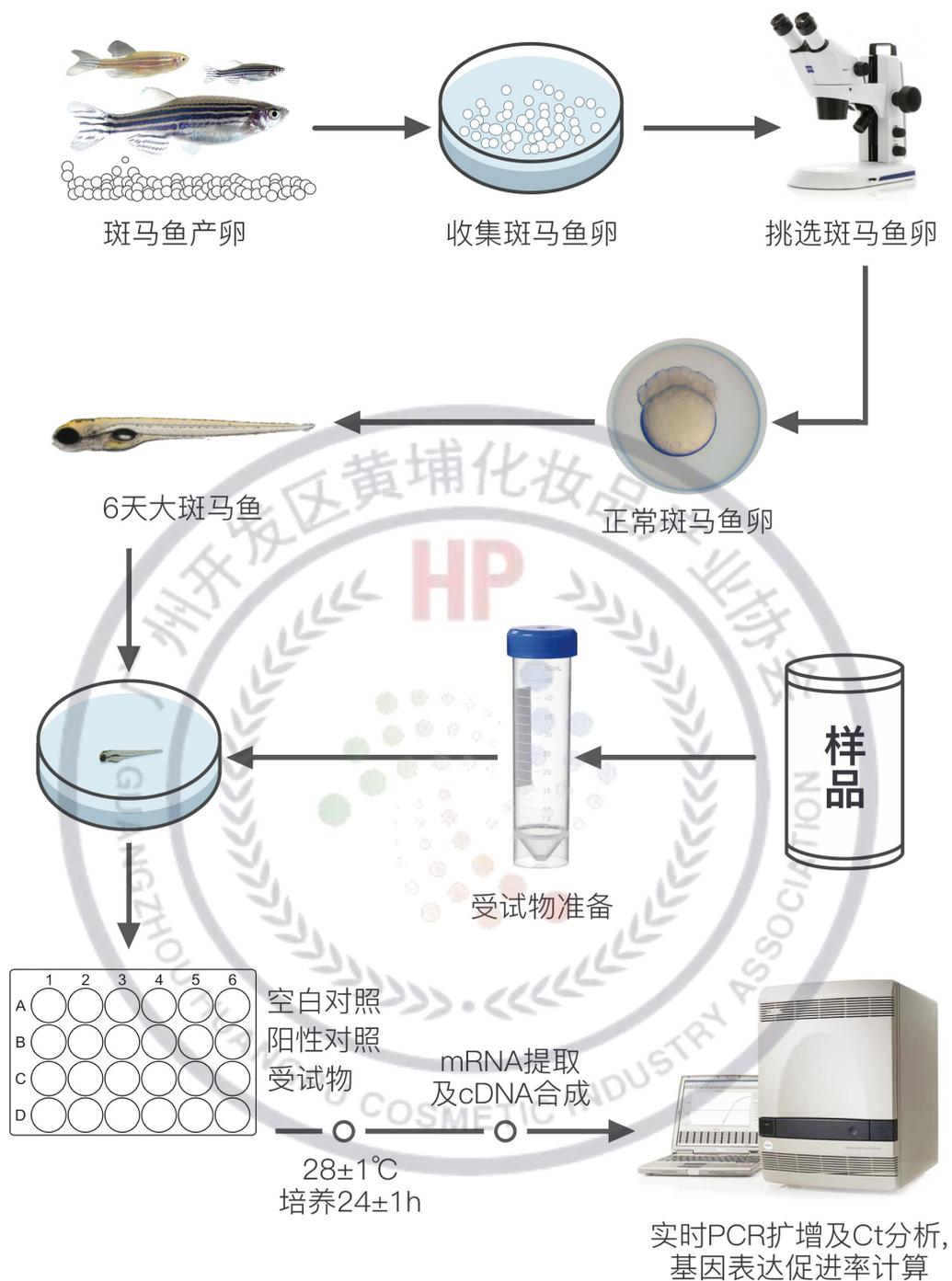


图 A.化妆品抗皱、紧致功效斑马鱼胶原蛋白/弹性蛋白基因表达测试流程图

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] Gistelink C , Gioia R , Gagliardi A , Tonelli F , Marchese L , Bianchi L , Landi C , Bini L , Huysseune A , Witten P E , Staes A , Gevaert K , De Rocker N , Menten B , Malfait F , Leikin S , Carra S , Tenni R , Rossi A , De Paepe A , Coucke P , Willaert A , Forlino A . Zebrafish Collagen Type I: Molecular and Biochemical Characterization of the Major Structural Protein in Bone and Skin. *Scientific Reports*[J]. 2016, 6:21540.
- [5] Morvan-Dubois G , Le Guellec D , Garrone R , Zylberberg L , Bonnaud L . Phylogenetic Analysis of Vertebrate Fibrillar Collagen Locates the Position of Zebrafish $\alpha 3(I)$ and Suggests an Evolutionary Link Between Collagen α Chains and Hox Clusters[J]. *Journal of Molecular Evolution*. 2003, 57:510-514.
- [6] Shin J W , Kwon S H , Choi J Y , Na J I , Huh C H , Choi H R , Park K C . Molecular mechanisms of dermal aging and anti-aging approaches[J]. *International Journal of Molecular Science*. 2019, 20(9): 2126.
- [7] Miao M , Bruce A E E , Bhanji T , Davis E C , Keeley F W . Differential expression of two tropoelastin genes in zebrafish[J]. *Matrix Biology*, 2007, 26:115-124.
- [8] Moriyama Y , Ito F , Takeda H , Yano T , Okabe M , Kuraku S , Keeley F W , Koshiba-Takeuchi K. Evolution of the fish heart by sub/neofunctionalization of an elastin gene[J]. *Nature Communication*, 2016, 7:10397.

