

T/GDCA

广东省化妆品学会团体标准

T/GDCA 001—2022

化妆品 抗氧化活性的评价 秀丽线虫法

Cosmetics-Determination of antioxidant-Caenorhabditis elegans

（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

目 次

前言 III

1 范围 1

2 规范性引用文件 1

3 术语和定义 1

4 检测原理 1

5 材料与试剂 2

6 实验仪器与设备 2

7 实验步骤 2

8 实验方法 3

9 结果评价 4

10 实验有效性的条件 4

11 参数限定说明 4

参考文献 12

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这些专利的责任。

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 抗氧化活性的评价 秀丽线虫法

1 范围

本文件规定了运用秀丽线虫（以下简称线虫）评价化妆品抗氧化活性的方法原理及操作。
本文件适用于化妆品原料及化妆品（精华、乳液、膏霜等）的抗氧化活性的功效评价。
本文件不适用于完全抑制大肠杆菌生长的物质。

2 规范性引用文件

本文件没有规范性引用文件。

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

线虫生命周期 Life Cycle of *C. elegans*

20℃标准实验室条件下，线虫的从受精卵发育为成虫仅需3.5天，途中经历14h的胚胎发育期，而后分别在受精后第26、33、41、51 h进行连续的几次蜕皮，经过L1期、L2期、L3期、L4期四个幼虫阶段发育为成虫。在L4蜕皮后约12小时，进入产卵生殖期。在生殖期之后，线虫可以再存活2-3个星期^[1]。见附录A。

3.2

生存曲线 Survival Curves

个体从幼体到死亡所能存活的比率所做出的统计曲线。一般以存活率为纵坐标，以虫龄为横坐标作图。见附录B。

3.3

同期化 Synchronized

将处于生殖期的线虫用裂解液裂解，使虫卵保留下来而成虫被裂解死亡。将裂解后的虫卵20℃培养48h左右，孵化得到L4期线虫。在所有实验开始前需将线虫进行同期化处理，以便在线虫相同发育阶段进行对比实验。

4 检测原理

氧化应激指机体内活性氧ROS产生过多，导致氧化和抗氧化系统失衡，引起细胞或组织氧化损伤的一种病理状态。氧化应激被认为是线虫衰老的关键因素，线虫的抗氧化应激能力和寿命有较好的相关性，寿命会随着抗氧化应激能力的提高而延长^[2]。过氧化氢（H₂O₂）是一种氧化作用较强的活性氧，是机体自由基产生的重要环节，H₂O₂能有效地模拟自由基诱导细胞凋亡的生物过程，已成为细胞氧化损伤模型制备的重要工具^[3]。线粒体超氧自由基制造者百草枯（Paraquat, PQ, 1, 1'-二甲基-4, 4'-联吡啶二氯化物）在以秀丽线虫为模型探究线粒体氧化损伤的实验中有非常广泛的应用。PQ可诱导细胞内的氧化应激，从而产生过量ROS，造成线粒体功能障碍。在PQ诱导的氧化应激环境下，线虫机体受到损伤，主要体现在其运动能力的下降及寿命的缩短^[4]。利用不同化妆品/原料对线虫进行处理，将其暴露在H₂O₂或PQ诱导的氧化应激环境下，并对其生存状态进行记录。与空白组比较线虫平均寿命或生存曲线，从而反映受试样品的抗氧化活性。本文件提供两种不同机制通路下的氧化应激诱导模型检测方法，可供化妆品及原料测试进行选择。

5 材料与试剂

5.1 材料

5.1.1 野生型秀丽线虫 (*Caenorhabditis elegans*, the Bridtol strain N2) 和尿嘧啶合成缺陷菌株大肠杆菌 (*Escherichia coli*, 0P50) 购自秀丽线虫遗传学中心 (*Caenorhabditis* Genetics Center, USA)

5.1.2 60 mm 培养皿

5.1.3 挑虫器 worm picker

5.2 试剂

除非另有说明, 化学试剂使用符合国家标准的分析纯试剂。配制方法见附录C。

氯化钠 (NaCl)、硫酸镁 (MgSO₄)、氯化钙 (CaCl₂)、氢氧化钠 (NaOH)、磷酸二氢钾 (KH₂PO₄)、磷酸氢二钾 (K₂HPO₄)、磷酸氢二钠 (Na₂HPO₄·12H₂O)、技术琼脂粉、LB肉汤、胰蛋白胨、硫酸链霉素、胆固醇、百草枯 CAS:75365-73-0、次氯酸钠 (NaClO)、无水乙醇、二甲基亚砜 (DMSO)、30%过氧化氢 (H₂O₂)

5.3 阳性对照品

虾青素标准品, 纯度 ≥ 97%, PubChem CID: 2246。

虾青素标准溶液 (3 mM): 称取0.001 g (精确到0.0001g) 虾青素于2 mL离心管中, 加入558 μL 二甲基亚砜 (DMSO)。将离心管超声30 min后置于80 °C水浴锅中加热30 s至完全溶解, 现配现用, 全程避光。

6 实验仪器与设备

6.1 连续变倍体视显微镜: 物镜变倍范围 0.7X-4.5X

6.2 震荡培养箱: 精度 ±1°C

6.3 生化培养箱: 精度 ±1°C

6.4 超净工作台

6.5 分析天平: 精度 0.1 mg

6.6 高压灭菌锅

6.7 电热恒温水浴锅

6.8 低速离心机: ×2 mL 转子

7 实验步骤

7.1 实验准备

繁殖期 (3-5天龄) 野生型秀丽线虫用于同期化。线虫的培养及维护见附录D。

7.2 受试物

受试物包含化妆品原料及产品。配制受试物测试溶液时, 首选溶剂是M9缓冲液或无菌水, 如需用到有机溶剂助溶, 可选用二甲基亚砜, 溶剂于测试溶液中的浓度要 ≤ 2%。针对不同受试物, 需结合其特性调整前处理方法, 具体可参照附录E。

7.3 线虫 NGM 的配制

7.3.1 含样品 NGM 的配制

① 水溶性样品：

样品组：将样品溶解在M9缓冲液或无菌水中配制成一定浓度的母液，取*E. coli* OP50菌液和样品按（90-98）：（10-2）比例混合均匀。样品最终上样有效浓度可以根据预实验确定（见8.2）。空白组：取*E. coli* OP50菌液轻缓的打在NGM平板上中央，避光晾干后封膜，4℃保存备用。用移液枪吸取150 μL菌液轻缓的打在每个NGM平板上中央。

② 非水溶性样品：

样品组：将样品溶解在二甲基亚砷（DMSO）溶液中配制成一定浓度的母液，取*E. coli* OP50菌液和样品按98：2比例混合均匀，样品最终上样有效浓度可以根据预实验确定（见8.2）。空白组：取*E. coli* OP50菌液和DMSO按98：2比例混合均匀进行涂布。将涂布好细菌的NGM平板避光晾干后封膜，4℃保存备用。用移液枪吸取150 μL菌液轻缓的打在每个NGM平板上中央。

7.3.2 H₂O₂ 诱导培养基的配制

NGM培养基灭菌后，待培养基冷却至50-60℃。将30% H₂O₂溶液稀释至10%-20%，再以体积分数为0.1%加入NGM培养基中。为保证过氧化氢活性，诱导板限制在一周内使用。

7.3.3 PQ 诱导培养基的配制

NGM培养基灭菌后，待培养基冷却至50-60℃。称取一定量的PQ粉末，溶于适量M9缓冲液中，再将PQ溶液于无菌环境加入NGM培养基中，得到含有8 mM-10 mM PQ的NGM培养基（例：10 mM即为0.257 g PQ / 100 mL NGM培养基）。为保证百草枯活性，诱导板限制在一周内使用。

7.3.4 阳性对照组

阳性对照虾青素组：取*E. coli* OP50菌液和虾青素母液按98：2比例混合均匀，用移液枪吸取150 μL菌液轻缓的打在每个NGM平板上中央。NGM平板避光晾干后封膜，4℃保存备用。为保证样品活性，各样品板限制在一周内使用。

8 实验方法

8.1 线虫同期化

用1 mL M9缓冲溶液将NGM平板上的年轻成虫反复冲洗两次再转移至无菌2 mL离心管中，加入1 mL现配的裂解液，充分振荡3-5 min后，在3000 rpm转速下离心1 min，弃上清。再用1 mL M9缓冲液冲洗线虫及以同样条件离心2次，弃上清，余下0.3-0.4 mL的含虫卵缓冲液。然后用移液枪轻轻吹打混匀虫卵，吸取100 μL左右含虫卵的缓冲液滴于NGM平板上靠近OP50的无菌区域。待线虫受精卵基本发育成L4期幼虫，完成同期化。挑取L4期幼虫转移至药物板用于寿命实验。

8.2 预测试

受试物在进行正式测试之前，如不确定安全浓度范围，建议进行预测试，可选择倍数稀释间隔如0.1 mg/L，1 mg/L，10 mg/L受试物浓度，按照标准测试程序，确定安全浓度范围。如受试物在该测试浓度

8.3 氧化应激寿命实验

8.3.1 H₂O₂ 诱导法

线虫同期化后，挑取L4期幼虫转移至空白组和样品组培养基中，经药物作用3天后（为避免子代影响及食物不足，建议两天将线虫挑至新的样品NGM板），每个培养基再挑取30-50只线虫暴露于含H₂O₂ NGM培养基上，进行氧化应激诱导干预（考虑到线虫逃逸情况，保证每个板的有效样本量不少于30只线虫）。实验设置3个平行板，每隔30 min记录线虫生存、逃逸、死亡数，直至线虫全部死亡，得到线虫在H₂O₂氧化应激环境下生存曲线。

8.3.2 PQ 诱导法

线虫同期化后，挑取L4期幼虫转移至空白组和样品组培养基中，经药物作用3天后（为避免子代影响及食物不足，建议两天将线虫挑至新的样品NGM板），每个培养基再挑取50-60只的线虫暴露于含PQ NGM

培养基上,进行氧化应激诱导干预。实验设置3个平行板,每隔12 h左右,记录线虫生存、逃逸、死亡数,直至线虫全部死亡,得到线虫在PQ氧化应激环境下生存曲线。

8.4 线虫生存状态判断标准

线虫死亡判断标准:用worm picker(挑虫针)轻触虫体,线虫无移动及吞咽动作等任何反应。

线虫样本剔除标准:①逃离至皿壁或盖上而干死;②虫卵在体内孵化而成袋样虫;③钻入琼脂中;④剔除意外死亡、逃逸和囊样线虫。

9 结果评价

9.1 统计学分析

采用Graph Pad Prism 8软件绘制survival生存曲线图(数字0代表线虫逃逸,1代表线虫死亡),log-rank检验分析生存曲线显著性, $p < 0.05$ 表示有显著性差异。各组平均寿命数据以均值 $\pm$ 标准差($\bar{X} \pm SD$)表示, t -test分析组间差异, $p < 0.05$ 具有统计学意义。

$$AL = \frac{1}{n} \sum_j \frac{x_j + x_{j+1}}{2} d_j \dots\dots\dots (1)$$

式中:

AL——线虫平均寿命(Average Lifespan);

j——生存时间,单位为天(d);

d_j ——在年龄间隔(x_j, x_{j+1})内死亡的线虫数量;

n——线虫总数。

$$RLE = (AL_1/AL_0 - 1) \times 100\% \dots\dots\dots (2)$$

式中:

RLE——寿命延长率(Rate of longevity extension);

AL_1 ——样品组平均寿命;

AL_0 ——空白组平均寿命。

9.2 结果判定及说明

在实验满足有效性的基础上,受试物测试组与空白组对比,生存曲线有显著右移($p < 0.05$)或平均寿命显著大于空白组线虫($p < 0.05$),说明该受试物在该浓度下,能保护线虫免受氧化应激损伤,可作为抗氧化活性评价的证据支撑。在同一批次实验中,可通过比较寿命延长率来判定不同受试物测试组之间的抗氧化活性强弱。

10 实验有效性的条件

10.1 样本量要求: H_2O_2 诱导氧化应激寿命实验线虫数量不少于90只, PQ诱导氧化应激寿命实验线虫数量不少于150只。

10.2 同期化实验质量控制:同期化实验得到受精卵后26小时左右孵化为L1期的幼虫。若同期化后1-2天没有观察到幼虫孵化,则同期化实验失败。

10.3 若空白组与受试物组之间不存在统计学上的显著性差异,则该受试物不具有抗氧化活性。

10.4 若受试物组寿命显著短于空白组,则该受试物在该浓度下对线虫有毒,需降低至无毒安全浓度再进行测试。

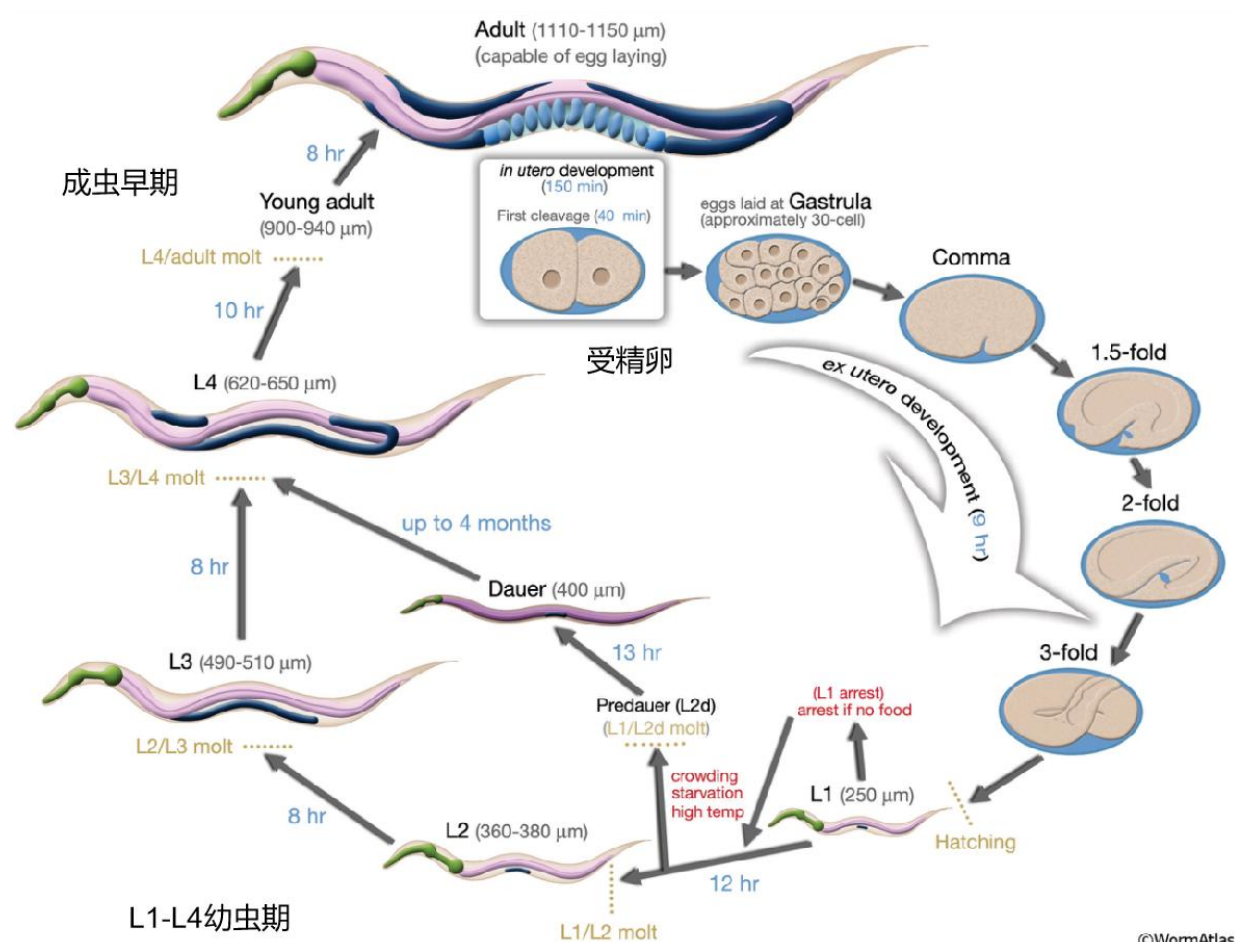
10.5 每批测试需要做空白组。建议每隔2-3个月做一次阳性对照测试,以确定模型的稳定性。

11 参数限定说明

- 由于生物实验受不同环境和操作员影响，本文中的诱导剂浓度可根据实际实验室条件进行调整。建议 H_2O_2 浓度范围在 10%–20%，线虫生命周期为 4–5 h 左右；建议 PQ 浓度范围在 8 mM–10 mM，线虫生命周期为 2–3 天左右，实验时长合理可行。此外，线虫生存曲线需呈阶梯式，能科学地反应出受试物和对照组的差异显著性，避免因浓度过高导致中期死亡速率过快，生存曲线骤降会掩盖真实的差异。
- 由于线虫在不同环境下逃逸情况不一，若线虫在诱导剂 NGM 培养基上逃逸率超过 30%，为避免过度损失样本量影响实验真实性，建议各实验室在诱导剂 NGM 培养基上涂 50–150 μL OP50 菌液防控线虫逃逸，OP50 菌液的量由线虫逃逸率和线虫合适的生命周期确定。

附录 A
(资料性)
线虫生命周期 Life Cycle of *C. elegans*

成虫

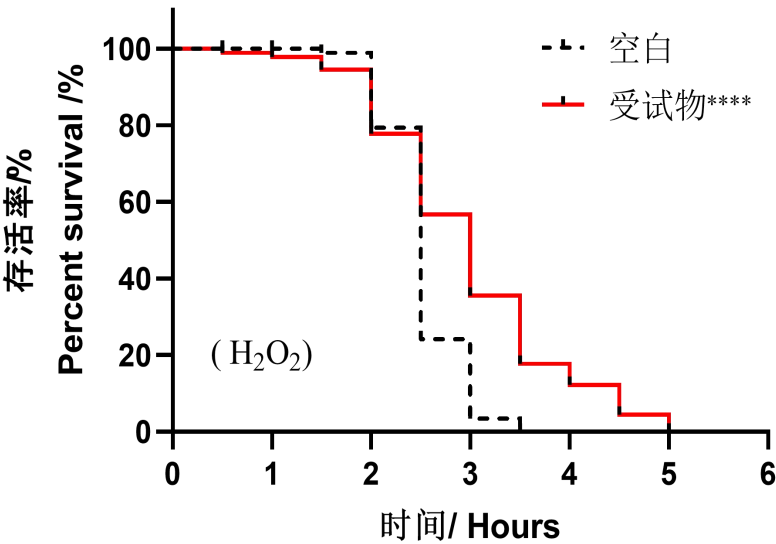


附 录 B
(资料性)
生存曲线 Survival Curves

附表1 H₂O₂氧化应激条件下线虫生存情况记录表

处理条件	平均寿命 (Hours)	寿命延长率 (%)	有效样本量 (条)
空白组 (H ₂ O ₂)			
受试物 (H ₂ O ₂)			

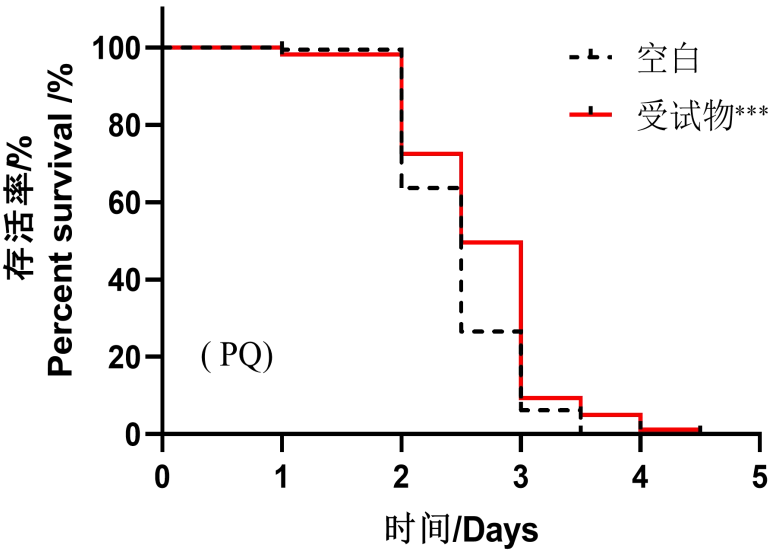
附图 1 H₂O₂ 氧化应激条件下线虫生存曲线 (示例)



附表 2 PQ 氧化应激条件下线虫生存情况记录表

处理条件	平均寿命 (Days/Hours)	寿命延长率 (%)	有效样本量 (条)
空白组 (PQ)			
受试物 (PQ)			

附图 2 PQ 氧化应激条件下线虫生存曲线 (示例)



附录 C

(资料性)

培养基、试剂配制方法

C1. 培养基、试剂配置

① 1 M 磷酸钾缓冲液

KH_2PO_4 108.39 g

K_2HPO_4 35.69 g

加水至1 L, 调pH值至6.0。

② M9 缓冲液

Na_2HPO_4 6 g或 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 15.12 g

KH_2PO_4 3 g

NaCl 5 g

$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.25 g

加水至1 L, 121℃灭菌15分钟, 宜现用现配。

③ LB液体培养基

LB肉汤 20 g/ L

蒸馏水配制, 用1 M的氢氧化钠溶液调至pH 7.0, 121℃灭菌15分钟。

④ 线虫生长固体培养基(Nematode Growth Medium, NGM), 按1 L计

NaCl 3 g

Agar (琼脂) 17 g

TryPtone (胰蛋白胨) 2.5 g

Streptomycin (链霉素) 0.2 g

蒸馏水 975 mL

摇匀后, 121℃灭菌30分钟, 80℃恒温15分钟, 然后加入下列溶液(胆固醇过滤除菌, 其余高温灭菌)。

1 M CaCl_2 1 mL

1 M MgSO_4 1 mL

5 mg/mL溶解于无水乙醇的胆固醇 1 mL

1 M的磷酸钾 25 mL

⑤ 裂解液

用4 mL蒸馏水溶解0.1g NaOH后和1.4 mL NaClO混合均匀(现配现用)。

C2. 线虫基本操作方法

(1) 大肠杆菌OP50的培养

取OP50的菌种于LB平板划线, 挑取单菌落于在10 mL LB液体培养基中, 37℃、200 rpm, 振荡培养12 h, 至OD600等于0.4-0.6, 用于接种NGM喂养正常组线虫。

(2) *E. coli* OP50的涂布

在每个NGM平板上加适量的菌液(一般直径60 mm平板加150 μL), 注意菌液边缘应距离平板边缘 0.5 cm左右。涂布好细菌的NGM平板在室温(21-25℃)下过夜后即可使用, 如果不是立即使用则应将其置于冷室或4℃冰箱中待用。

附录 D

(资料性) 线虫培养及维护

1. 线虫培养环境

培养温度：20℃；培养湿度：50%

2. 线虫维护

① Dauer现象抵御恶劣环境（短期保存）

线虫在缺少食物或生存环境不适宜的条件下，会由L1-L2期进入一种称之为 dauer 的时期(停育期)，出于该状态的线虫可以存活两三个月之久，当又遇到食物充足或环境适宜的时候，dauer期线虫立即恢复发育，跳过L3期直接进入L4期，继续生长以完成整个生命周期。该特点可用于线虫的短暂保存，定期每2个月将Dauer期线虫转移至食物充足的NGM中的方式进行线虫维护。

② 线虫冻存（长期保存）

线虫冻存缓冲液（100 mL）配置：

NaCl	0.585 g
K ₂ HPO ₄	0.68 g
Glycerol（甘油）	30 mL
NaOH（1 M）	0.56 mL
Water	70 mL

121 ℃，30 min灭菌后使用，室温保存。

将大量的处于L1-L2期的幼虫（将健康成虫饥饿2-4 d可得）用M9缓冲液冲下，定容于1 mL M9缓冲液中，加入等体积的线虫冻存液，轻轻混匀，分装到500 μL冻存管中，然后放到泡沫聚苯乙烯盒（保持温度下降速度不会过快）转到-80 ℃过夜，后期可转到液氮中长期保存。线虫在-80 ℃放置48 h后取出1管来复苏检测冻存效果。

复苏线虫时，将线虫冻存管握于手中或37 ℃水浴使冻存液迅速融化。1500 rpm 离心 1 min，让线虫幼虫沉淀到冻存管底部，弃去上清的冻存液至约50 μL左右（尽可能使线虫富集到少量冻存液中），沉淀全部转移到铺有*E. coli* OP50的NGM培养基的菌苔外缘。将培养基盖子稍微打开，待溶液吸干，关盖。复苏过来的线虫就已经能够开始蠕动并最终爬到菌苔中。

附 录 E

化妆品前处理参考方法

化妆品有精华、乳液、膏霜、啫喱等不同剂型，对于众多产品而言，因质地复杂需要进行样本前处理，具体可参考下列方法。将受试物与二甲基亚砜按 1: 3 (g: mL; 如 0.4 g: 1.2 mL) 混匀、超声波处理后 $15000\times g$ 离心，取上清液，将上清液用大肠杆菌稀释到相应的测试浓度进行测试。二甲基亚砜在实验溶液中的最终浓度 $\leq 2\%$ 。

参 考 文 献

- [1] <https://www.wormatlas.org/hermaphrodite/introduction/Introframeset.html>
- [2] Murphy C T, McCarroll S A, Bargmann C I, et al. Genes that act downstream of DAF-16 to influence the lifespan of *Caenorhabditis elegans*[J]. *Nature*, 2003, 424(6946): 277-284.
- [3] Sies H. Oxidative stress: a concept in redox biology and medicine[J]. *Redox Biology*, 2015, 4: 180-183.
- [4] Castello P R, Drechsel D A and Patel M. Mitochondria are a major source of paraquat-induced reactive oxygen species production in the brain[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2007, 282(19): 14186-14193.
- [5] 化妆品安全技术规范（2015年版）[Z].
- [6] 国家药监局关于发布《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. [Z].