

T/HPCIA

团 体 标 准

T/HPCIA 003—2023

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

2023 - 12 - 15 发布

2023 - 12 - 15 实施

目 次

前言	II
1 范围	1
2 规范性引用文件	1
3 术语和定义	1
4 原理	1
5 仪器设备和试剂	1
6 试剂配制和受试生物准备	2
7 试验方法	3
8 测试有效性验证	5
9 结果报告	5
10 结果相关性解读	5
附录 A（资料性） 鱼胚胎培养液配制方法	6
附录 B（资料性） 受试物准备方法	7
附录 C（资料性） 测试流程图	8
附录 D（资料性） 测试结束时斑马鱼胚胎示例图	9

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。

本文件由水中银（国际）生物科技有限公司提出。

本文件由广州开发区黄埔化妆品产业协会归口。

本文件起草单位：云南贝泰妮生物科技集团股份有限公司、广州环亚化妆品科技股份有限公司、广州医药研究总院有限公司、珀莱雅化妆品股份有限公司、上海上水和肌生物科技有限公司、仁和全域（上海）大健康研究院有限公司、美出莱（杭州）化妆品有限责任公司、广东伊丽汇美容科技有限公司、苏州蜜思肤化妆品股份有限公司、广州鑫滢化妆品有限公司、水中银（国际）生物科技有限公司、广东省保化检测中心有限公司、南方美谷（广州）集团有限公司、广东省人民医院、广东省实验动物监测所、广州质量监督检测研究院、广东药科大学、广州市度普化妆品科学研究院、广州市络捷生物科技有限公司、广州海山生物科技有限公司、清保（广州）生物科技有限公司。

本文件主要起草人：陈雪平、赵海山、王飞飞、陈亮、林兵兵、杨鑫、王晓枫、于海峰、林梦感、韩婕珺、周靖茹、刘敏、岑宗晓、郑伟东、钟洁瑶、李培宁、蔡磊、梅文杰、吴培诚、郑伟军、刘洁、罗欣茹、王雅馨。

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术语和定义、原料、仪器设备和试剂、试剂制备和受试生物准备、试验方法、测试有效性验证、结果报告和结果相关性解读。

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化妆品功效评价。

注:化妆品原料及复配原料的功效测试可参考本文件。

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。

GB/T 6682 分析实验室用水规格和测试方法
GB/T 39649 实验动物 实验鱼质量控制
DB32/T 3979 实验用 斑马鱼 饲养技术条件
T/HPCIA 003 化妆品 斑马鱼实验通用技术规范

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

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

无心跳 lack of heartbeat
一分钟内斑马鱼心脏没有跳动。

4 原理

舒缓是指有助于改善皮肤刺激等状态。皮肤在受到物理、化学或病菌入侵刺激时,会产生免疫反应,出现红肿等不适,表现出敏感肌征兆,此时皮肤中出现免疫白细胞(包括中性粒细胞和巨噬细胞)聚集以吞噬和清除皮肤中的感染、异物或受损细胞等有害物质。抑制白细胞于受刺激部位聚集可以舒缓皮肤刺激状态。斑马鱼胚胎的中性粒细胞(为主要的免疫白细胞)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,建立受刺激斑马鱼模型获得的测试结果对人体皮肤功效具有很好的可推导性。斑马鱼胚胎的中性粒细胞可通过荧光标记中性粒细胞的转基因品系实现活体可视化或苏丹黑染色进行观察。本试验应用硫酸铜诱导斑马鱼胚胎侧线区域神经丘细胞受刺激引起中性粒细胞聚集的模型进行测试,比较受试物组和模型对照组鱼胚胎侧线区域中性粒细胞数量变化,计算中性粒细胞聚集抑制率以评价原料、配方或产品是否有舒缓刺激以起到舒缓效果。

5 仪器设备和试剂

注:A法试验使用下列5.1-5.11仪器设备和试剂,B法试验还需要额外准备5.12-5.18试剂。

5.1 水质监测设备

pH计、溶解氧测定仪、盐度计(电导率测定仪)。

5.2 分析天平

精度0.1mg。

5.3 显微镜

配带照相系统，最大放大倍数应大于80倍。A法中显微镜需配带红色荧光。

5.4 测试容器

玻璃或聚苯乙烯测试容器（如培养皿）。

5.5 恒温箱

精度±1℃。

5.6 其他常规测试仪器和设备

旋涡混合仪、超声水浴锅、离心机、低温冰箱。

5.7 水，

符合GB/T 6682规定。

5.8 助溶剂

甲醇（CAS：67-56-1）、二甲基亚砜（DMSO，CAS：67-68-5）。分析纯级别。

5.9 鱼胚胎培养液

5.10 鱼胚胎培养液

5.11 吲哚美辛（CAS：53-86-1）溶液

5.12 多聚甲醛（CAS：30525-89-4）

5.13 50%和70%酒精（CAS：64-17-5）溶液

5.14 苏丹黑染（CAS：4197-25-5）色液

5.15 PBST

5.16 漂白溶液

5.17 清透液1

5.18 清透液2

6 试剂配制和受试生物准备

注：A法试验需配制6.1-6.4试剂，B法试验还需额外配制6.5-6.11试剂。

6.1 斑马鱼胚胎

斑马鱼品系选择参考GB/T 39649-2020 实验动物 实验鱼质量控制，饲养环境参考T/HPCIA 003-2022 化妆品 斑马鱼实验通用技术规范，斑马鱼胚胎采集及准备参考DB32/T 3979-2021 实验用 斑马鱼 饲养技术条件。挑选健康的受精后48h（2天大）斑马鱼胚胎进行A法试验，72h（3天大）斑马鱼胚胎进行B法试验。

6.2 鱼胚胎培养液

适合斑马鱼胚胎养殖的培养液。配置方法见附录A。

6.3 硫酸铜溶液

用水配制160mg/L 五水硫酸铜（CAS：7758-99-8）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，现配现用。

6.4 吲哚美辛溶液

用二甲基亚砷配制36mg/L吲哚美辛储存液。冷藏。
工作液浓度为0.0036mg/L吲哚美辛，用鱼胚胎培养液稀释，现配现用。

6.5 多聚甲醛

用磷酸缓冲盐溶液(PBS, CAS: 012111-21-6)配制含有4%多聚甲醛和0.8%氢氧化钠(CAS: 1310-73-2)溶液，pH7.2~7.4。冷藏。

6.6 50%和70%酒精溶液

用水配制50%和70%酒精溶液。

6.7 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(CAS: 108-95-2)溶于15mL乙醇溶液，将0.3g十二水磷酸氢二钠(CAS: 10039-32-4)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 μ L 70%酒精溶液，100 μ L苏丹黑储存液和1 μ L苯酚溶液混合而成。现配现用。

6.8 PBST

配制0.04% Triton X-100 (CAS: 9002-93-1)于PBS溶液中。室温储存。

6.9 漂白溶液

用水配制含有3%双氧水(CAS: 7722-84-1)和1%氢氧化钾(CAS: 1310-58-3)的溶液。使用前新鲜配制。

6.10 清透液1

用水配制含有20%甘油(CAS: 56-81-5)和0.25%KOH的溶液。室温保存。

6.11 清透液2

用水配制含有50%甘油和0.25%氢氧化钾的溶液。室温保存。

7 试验方法

测试流程见附录C。

7.1 受试物准备

受试物准备见附录B。

7.2 测试容器

3cm培养皿。

7.3 给药方法

7.3.1 A法(转基因荧光标记法)

测试需设定空白对照组(鱼胚胎培养液)、模型对照组(硫酸铜工作液)、阳性对照组(硫酸铜工作液+吲哚美辛工作液)和受试物组(硫酸铜工作液+受试物)。

7.3.1.1 空白对照组设置

随机挑选24尾转基因鱼胚胎于3cm培养皿中，加入5mL鱼胚胎培养液。

7.3.1.2 模型对照组设置

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

7.3.1.3 阳性对照组设置

随机挑选24尾转基因鱼胚胎于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。

7.3.1.4 受试物组设置

随机挑选24尾转基因鱼胚胎于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40min~45min。

将鱼胚胎用三卡因溶液麻醉,侧身摆放。然后放到显微镜下对鱼胚胎尾部按统一的拍照参数进行拍照后进行7.4(数据分析)及其后面步骤。

7.3.2 B法(苏丹黑染色法)

测试需设定空白对照组(鱼胚胎培养液)、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)。

7.3.2.1 空白对照组设置

随机挑选24尾鱼胚胎于3cm培养皿中,加入5mL鱼胚胎培养液。

7.3.2.2 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。

7.3.2.3 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。

7.3.2.4 受试物组设置

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

放置于28℃±1℃恒温箱中培养40min~45min。

将每测试组鱼胚胎于多聚甲醛中固定至少1h后,用PBST浸洗鱼胚胎3次,每次5min,然后用50%乙醇处理3min。用苏丹黑染色溶液对鱼胚胎进行室温染色1h后,用70%乙醇浸洗4次,每次5min,然后用PBST处理2次,每次5min。用漂白溶液处理鱼胚胎10min,如在试管里处理,则需保持盖子打开。然后用70%乙醇溶液处理5min,PBST处理1min,用清澈液1处理15min,清澈液2处理10min,再用PBST处理3min。于显微镜下对鱼胚胎尾部按统一的拍照参数进行拍照。

7.4 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D)的中性粒细胞数目。

计算中性粒细胞聚集抑制率:

$$\text{抑制率} = \frac{M-S}{M-B} \times 100\% \quad (1)$$

(1)式中:

S—受试物处理组鱼胚胎中性粒细胞数目的平均值,单位为粒每尾(粒/尾);

M—模型对照组鱼胚胎中性粒细胞数目的平均值,单位为粒每尾(粒/尾);

B—空白对照组鱼胚胎中性粒细胞数目的平均值,单位为粒每尾(粒/尾);

计算各试验组的平均值及标准误,统计学处理结果用平均值±标准误表示。使用统计学软件对数据进行方差分析,对受试物组和模型对照组间的中性粒细胞数目进行双尾T检验,取得p值。p<0.05表示有显著性差异。

8 测试有效性验证

8.1 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。

8.2 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 $p < 0.05$ 。

9 结果报告

9.1 中性粒细胞聚集抑制率

受试物在对应测试浓度下对中性粒细胞的聚集抑制率。

9.2 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（ $p < 0.05$ ）。

10 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)
鱼胚胎培养液配制方法

表 A.1 3 种常用鱼胚胎培养液配制方法

鱼胚胎培养液	配制方法
鱼胚胎培养液1	称取2940mg无水氯化钙 (CAS: 10043-52-4), 1233mg七水硫酸镁 (CAS: 10034-99-8), 630mg碳酸氢钠 (CAS: 144-55-8), 55mg氯化钾 (CAS: 7447-40-7) 溶于10L水配制而成。pH值6.5~8.5。化学品均为分析纯级别。
鱼胚胎培养液2	称取 17.2g 氯化钠 (CAS: 7647-14-5), 0.76g 氯化钾, 2.9g 氯化钙 (CAS: 10043-52-4) 和 4.9g 硫酸镁 (CAS: 7487-88-9) 溶于水中定容至1000mL储备液。取16.67mL储备液用水稀释至1000mL而成。化学品均为分析纯级别。
鱼胚胎培养液3	称取 7.000g 氯化钠, 0.400g 碳酸氢钠, 0.100g 氯化钾, 0.235g 氯化钙溶于 2L 水配制而成, 化学品均为分析纯级别。

附录 B
(资料性)
受试物准备方法

表 B.1 受试物准备方法

受试物类型	方法
水溶性	用鱼胚胎培养液直接将受试物溶解配制成测试溶液。
非水溶性	可选常用溶剂如甲醇或二甲基亚砷助溶。如将受试物和有机溶剂按 1: 1 (重量 g: 体积 mL) 混匀, 然后用鱼胚胎培养液稀释配制成所需浓度。取上清液进行测试。

附录 C
(资料性)
测试流程图

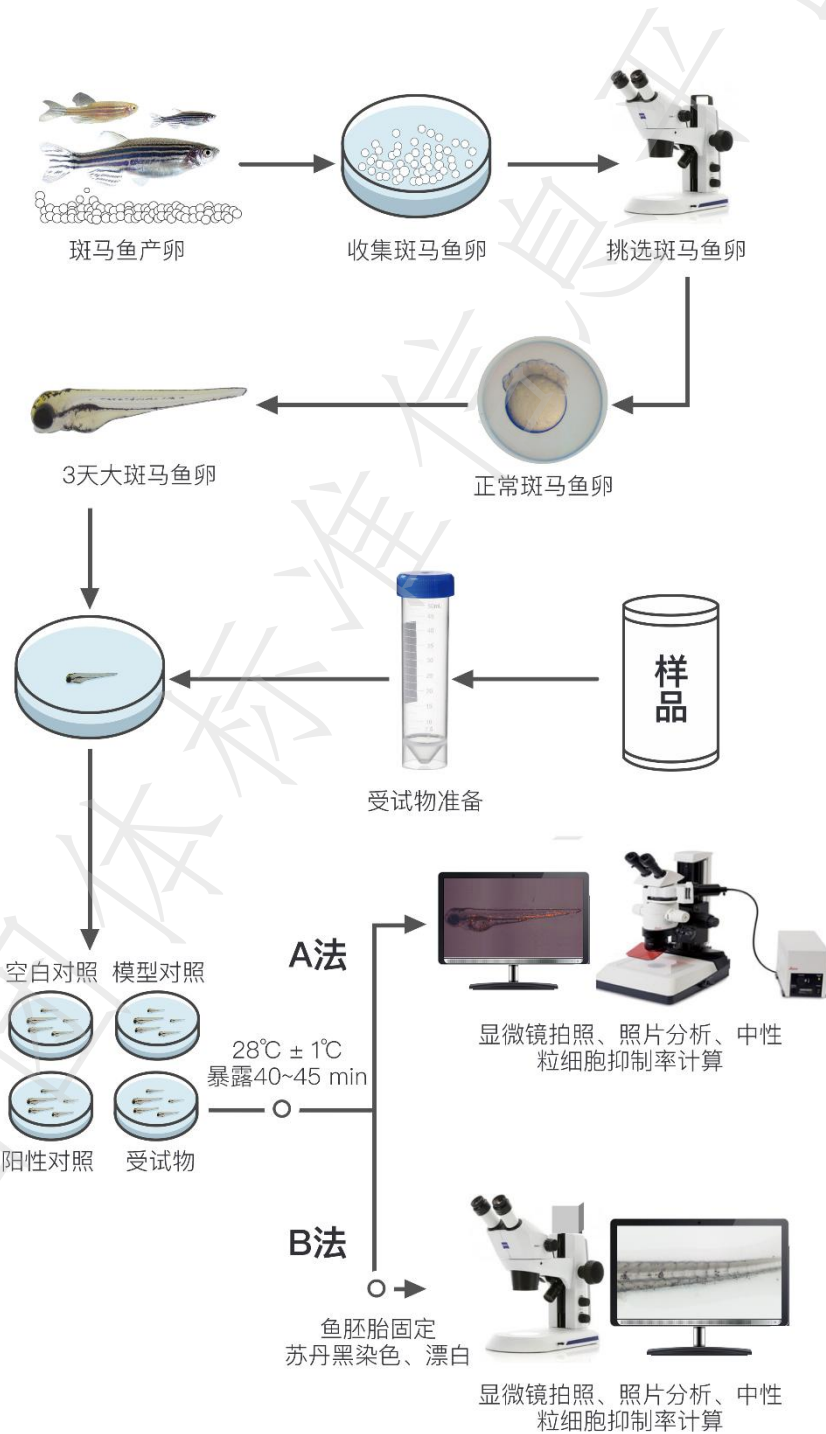
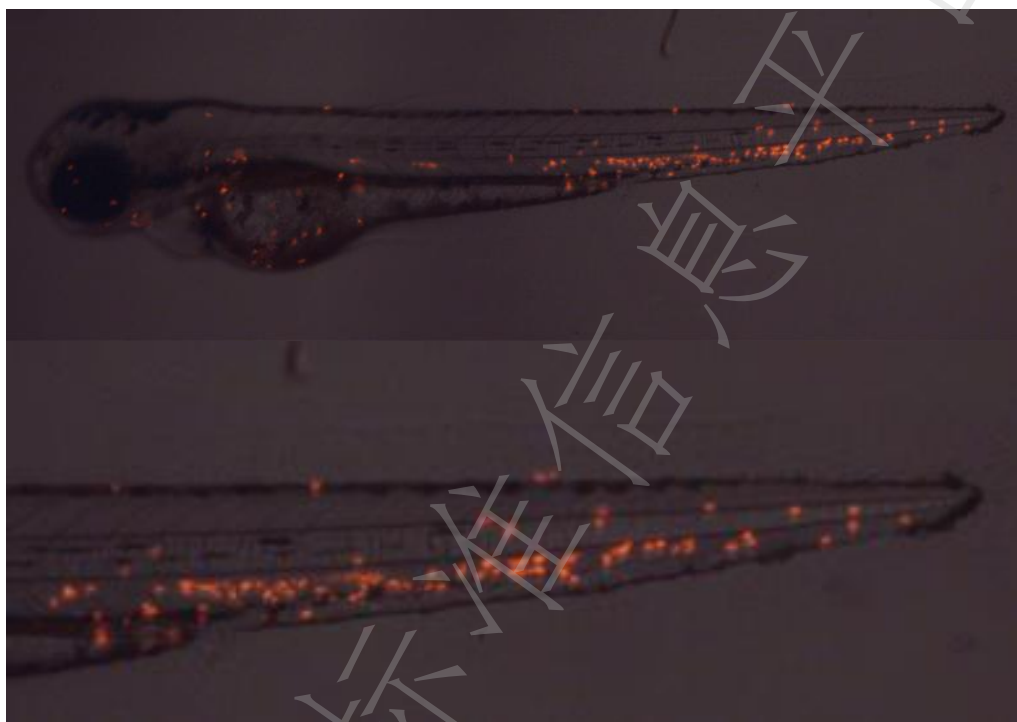


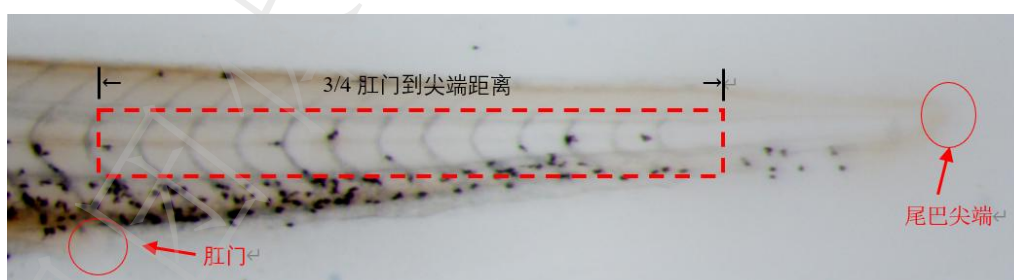
图 C.1 化妆品舒缓功效 斑马鱼胚胎中性粒细胞测试流程图

附录 D
(资料性)
测试结束时斑马鱼胚胎示例图



^a 红色荧光点即为中性粒细胞。

图 D.1 使用 A 法测试结束时斑马鱼胚胎示例图



^a 深色点即为染色的中性粒细胞。

图 D.2 使用 B 法测试结束时斑马鱼胚胎示例图