

T/GDCA

广东省化妆品学会团体标准

T/XXX XXXX—XXXX

化妆品 抗光老化活性的评价 秀丽线虫法

Cosmetics-Evaluation of anti-photoaging activity-Caenorhabditis elegans assay

（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。

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 抗光老化活性的评价 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）评价化妆品抗光老化活性的术语和定义、检测原理、材料与试剂、实验仪器与设备、实验步骤、实验方法、结果评价、实验有效性的条件与参数限定说明。

本文件适用于化妆品（精华、乳液、膏霜等）的抗光老化活性的功效评价，化妆品原料可参考本方法。

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。

T/GDCA 013—2022 化妆品 抗氧化活性的评价 秀丽线虫法

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

光老化 Photoaging

光老化是指皮肤由于反复暴露于紫外线，而引起皮肤的结构和功能特征的改变，例如皮肤纹理不均匀、皱纹形成，弹性下降和皮肤色素沉着等。

4 检测原理

UVB长期暴露是导致光老化的主要外源性因素之一，UVB辐射能够直接穿透大气并与皮肤中的细胞相互作用，产生大量的自由基和活性氧分子，引起细胞内氧化应激，加速皮肤老化过程。秀丽线虫中的辐射生物效应信号在哺乳动物中非常保守，被广泛应用于UV暴露期间生物系统的生理和分子变化的研究。紫外线照射能明显诱导线虫形态学改变，影响线虫的生长和正常发育，加速线虫死亡使其寿命缩短，线虫在紫外辐照下的存活能力可反映其抗紫外辐射应激的能力。

本方法利用不同化妆品/原料对线虫进行处理，记录其暴露在UVB辐照环境后各组线虫的存活率，从而反映受试样品的抗光老化活性。

5 材料与试剂

5.1 材料

5.1.1 秀丽线虫（以下简称线虫）：N2 野生型秀丽线虫（*Caenorhabditis elegans*, the Bridtol strain N2）购自秀丽线虫遗传学中心。

5.1.2 60 mm 培养皿。

5.1.3 挑虫器。

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A。

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）、磷酸氢二钠十二水（Na₂HPO₄•12H₂O）、技术琼脂粉、LB肉汤、胰蛋白胨、硫酸链霉素、胆固醇、次氯酸钠（NaClO）、无水乙醇、5-氟-2'-脱氧尿嘧啶核苷（FUDR）。

5.3 阳性对照品

茶多酚 CAS#84650-60-2。

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 $0.7\times\sim 4.5\times$ 。
- 6.2 震荡培养箱：精度 $\pm 1^{\circ}\text{C}$ 。
- 6.3 生化培养箱：精度 $\pm 1^{\circ}\text{C}$ 。
- 6.4 超净工作台。
- 6.5 万分之一天平：精度 0.1 mg。
- 6.6 高压灭菌锅。
- 6.7 电热恒温水浴锅。
- 6.8 紫外交联仪（配有 UVB 辐照计）。
- 6.9 低速离心机，适配 2 mL 离心管。

7 实验步骤

7.1 实验准备

繁殖期（3 d~5 d龄）野生型线虫用于同期化。

7.2 样品

样品包含化妆品原料及产品。配制样品测试溶液时，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（DMSO），溶剂于测试溶液中的浓度要 $\leq 2\%$ 。针对不同样品，需结合其特性调整前处理方法，具体按T/GDCA 013—2022进行实验。

7.3 线虫 NGM 的配制

7.3.1 处理组 NGM 的配制

按T/GDCA 013—2022的规定进行实验。

7.3.2 阳性对照组 NGM 的配制

阳性对照茶多酚组：用蒸馏水配制1 mg/mL母液，取*E. coli* OP50菌液和茶多酚母液按95：5比例混合均匀，用移液枪吸取150 μL 菌液轻缓地打在每个NGM平板上中央。NGM平板避光晾干后封膜，4 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。为保证样品活性，样品板限制在一周内使用。

8 实验方法

8.1 线虫同期化

按T/GDCA 013—2022的规定进行实验。

8.2 预测试

按T/GDCA 013—2022的规定进行实验。

8.3 线虫抗光老化测定

收集繁殖期（3 d~5 d龄）野生型秀丽线虫用于同期化。线虫同期化后，转移到含/不含药物的NGM上作用3天。收集各组线虫，用M9缓冲液清洗3遍后，转移至不含OP50的NGM上。将带有线虫的NGM板放置在辐照仪UVB灯管正下方，每次一个皿，设置辐照剂量为250 mJ/cm^2 进行紫外辐照。辐照后将各组线虫转移至含FUDR的OP50 NGM上，继续置于20 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中，每12 h将死亡的线虫挑出，并记录线虫死亡数和存活数，有效样本数为总活虫数。

9 结果评价

9.1 统计学分析

各组线虫的存活率以均值±标准差 ($\bar{X} \pm SD$) 表示, t -test分析组间差异, $p < 0.05$ 表示有显著性差异。线虫存活率 (Viability) 计算见式 (1)。

$$V_t = \frac{A_t}{N} \times 100\% \dots\dots\dots (1)$$

式中:

V_t ——在第 t 小时线虫存活率;

A_t ——在第 t 小时累计活虫数;

N ——有效样本数。

9.2 结果判定及说明

在实验满足有效性的基础上, 受试物测试组的线虫存活率显著大于空白组 ($p < 0.05$), 说明该受试物在该浓度下, 能保护线虫免受紫外辐照应激损伤, 可作为抗光老化活性评价的证据支撑。

在同一批次实验中, 可通过受试组与空白组线虫存活率比值来判定不同受试物测试组之间的抗光老化活性强弱, 比值越大则说明抗光老化活性越强。

10 实验有效性的条件

10.1 样本量要求

实验设置3个平行, 每个处理组线虫数量不少于120条。

10.2 批次稳定性

按T/GDCA 013—2022的规定进行。

每次测试需要设置空白组和茶多酚阳性对照组。初次按本文件进行抗光老化活性评价前, 宜先使用茶多酚得到稳定的数据, 以确保实验模型的成功, 再进行样品的抗光老化活性的测定。

若阳性对照组的线虫存活率未显著大于空白组, 则该次实验视为失败。

11 参数限定说明

辐照剂量过高会导致中期死亡速率过快掩盖组间真实的差异。由于生物实验受不同环境和设备功率影响, 本文中的辐照剂量可根据实际进行调整, 空白组线虫的半数存活率在72 h左右的辐照剂量设置较为合理。

附 录 A
(规范性)
培养基、试剂配制方法

A.1 培养基、试剂配置

按T/GDCA 013—2022的规定进行实验。

含FUDR的NGM配置：称取0.0195g FUDR 溶于1.0 mL M9 缓冲液，过膜除菌后，加入1.0 L NGM培养基中。

A.2 线虫基本操作方法

按T/GDCA 013—2022的规定进行实验。

附录 B
(规范性)
实验数据图表

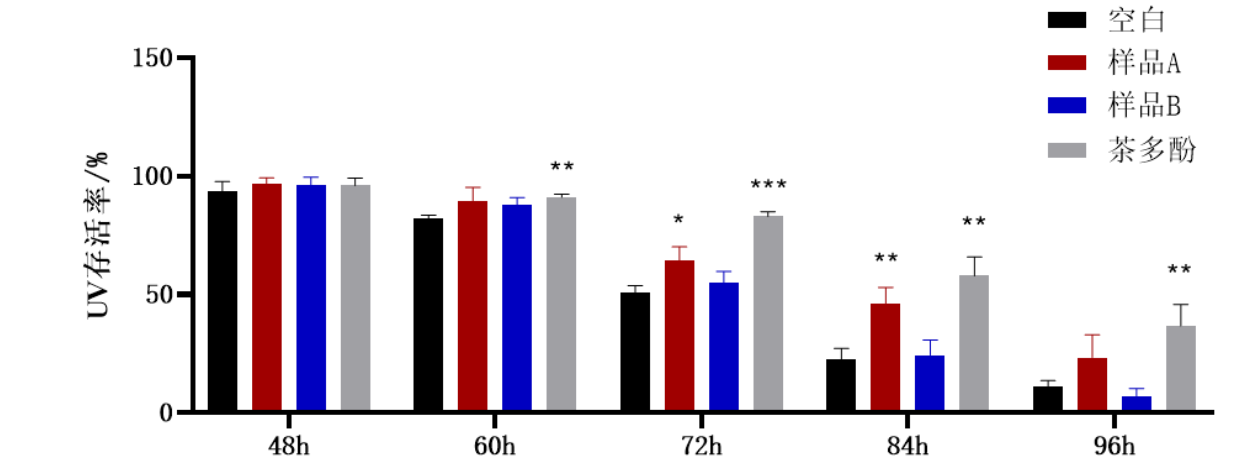
各组样品对线虫辐照后存活率的影响见图B. 1；辐照后各组线虫存活率数据见表B. 1；辐照后各组线虫存活率与空白组比值数据见表B. 2。

表B. 1 各组线虫辐照后存活率/%时间

	空白组	样品A	样品B	茶多酚
*h				
*h				

表B. 2 各组样品对线虫辐照后存活率的提高情况/倍

时间	样品A	样品B	茶多酚
*h			
*h			



图B. 1 各组样品对线虫辐照后存活率的影响（示例）

注：*** $p < 0.001$ (vs. 对照)；** $p < 0.01$ (vs. 对照)； * $p < 0.05$ (vs. 对照)

参 考 文 献

- [1]Guan LL, Lim HW, Mohammad TF. Sunscreens and Photoaging: A Review of Current Literature[J]. Am J Clin Dermatol. 2021, 22(6): 819-828.
- [2]Poon, Flora; Kang, Sewon; Chien, Anna L. Mechanisms and treatments of photoaging[J]. Photodermatology, Photoimmunology & Photomedicine, 2015, 31(2): 65-74.
- [3]Yue,Z. ; Liu,H. ; Liu,M. ; Wang,N. ; Ye,L. ; Guo,C. ; Zheng,B. Cornus officinalis Extract Enriched with Ursolic Acid Ameliorates UVB-Induced Photoaging in *Caenorhabditis elegans*[J]. Molecules 2024, 29, 2718.
- [4]蔡金玲,杜丽,崔玉芳,等. 紫外线照射对秀丽隐杆线虫形态、寿命和ROS含量的影响[J]. 中国体视学与图像分析, 2012, 3(17): 273-277.
- [5] Drabikowski K. Ubiquitin and SUMO Modifications in *Caenorhabditis elegans* Stress Response[J]. Curr Issues Mol Biol, 2020, 35: 145-158.
- [6] 化妆品安全技术规范(2015年版)[Z].
- [7] 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].
-