

T/GDCA

广东省化妆品学会团体标准

T/XXX XXXX—XXXX

化妆品 抗热老化活性的评价 秀丽线虫法

Cosmetics-Evaluation of anti thermal aging 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 抗热老化活性的评价 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）评价化妆品抗热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、结果评价与实验有效性的条件。

本文件适用于化妆品（精华、乳液、膏霜等）的抗热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

T/GDCA 033—2023 化妆品 抗糖基化活性的评价 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

热老化 Anti thermal aging activity

热老化是指由于内部和外部产生的热量致使皮肤温度升高，从而导致皮肤加速老化。在高温刺激下，基质金属蛋白酶过度降解细胞基质，造成胶原蛋白和弹性蛋白变性，降低皮肤弹性，增加皱纹。

3.2

热休克蛋白 Heat Shock Proteins

热休克蛋白（HSPs）是内质网应激反应因子，作为一种压力应激蛋白在热应激过程中起着重要的作用。当机体受到高温等恶劣环境袭击时，就会被大量合成，从而维持细胞正常的生理活动，清除变性损伤蛋白，对衰老引起的一系列病理改变起到了保护作用。

4 检测原理

HSP-16.2蛋白是分子量为16 kd 的小分子热休克蛋白（sHSPs），能赋予细胞以耐热性抵抗高温，并且可以作为分子伴侣以防止蛋白聚集，从而调节细胞的生存和死亡的平衡。当线虫处于热激环境下会诱导HSP16.2表达，HSP16.2被用作是热应激研究的经典标志物。线虫生存适宜温度为20℃，活性物质可通过调控热应激蛋白HSP16.2提高线虫在35℃环境下的抗热应激能力。本文件运用TJ375转基因虫株（含绿色荧光蛋白报告基因（GFP）偶联的hsp16.2启动子，具有与HSP16.2相同的表达模式），测定化妆品/原料对35℃热激后的线虫荧光强度变化，体现其抗热老化功效。

5 材料与试剂

5.1 材料

5.1.1 线虫株：TJ375（gpIs1 [hsp-16.2p::GFP]）品系线虫由福建上源生物科技有限公司赠与。

5.1.2 60 mm 培养皿。

5.1.3 挑虫器。

5.2 试剂

5.2.1 除非另有说明，化学试剂使用符合国家标准的分析纯试剂。

5.2.2 培养基与试剂配制按 T/GDCA 033—2023 的规定进行实验。

5.2.3 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、二甲基亚砷、左旋咪唑、琼脂糖、PBS (1×)。

5.3 阳性对照品

虾青素 PubChem CID: 2246。

6 实验仪器与设备

按T/GDCA 013—2022的规定进行。

7 实验步骤

7.1 实验准备

繁殖期 (3 d~5 d龄) TJ375线虫用于同期化。

线虫基本操作方法按T/GDCA 033—2023的规定进行。

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, 可选用二甲基亚砷 (DMSO), 溶剂于测试溶液中的浓度要≤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

称取0.001 g虾青素于2 mL离心管中, 加入558 μL二甲基亚砷。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。

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菌液轻缓地打在每个NGM平板上中央。NGM平板避光晾干后封膜, 4 °C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

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 线虫抗热老化测定

收集繁殖期TJ375线虫用于同期化。将同期化的幼虫转移到含/不含药物的NGM上作用48 h后暴露于35 °C 2 h, 然后再将线虫置于20 °C环境下恢复2 h。吸取少量 6 mmol/L左旋咪唑滴在3%琼脂糖垫载玻片上, 每个处理组挑选至少30条线虫转移至左旋咪唑液滴中以麻醉线虫至无任何反应, 拍摄在激发/发射波长为360/420 nm处线虫的荧光图像。

9 结果评价

9.1 统计学分析

采用ImageJ软件对图像中线虫荧光强度进行相对定量分析，得到各组荧光强度值。采用Graph Pad Prism 软件绘制柱状图， t -test分析组间差异， $p < 0.05$ 表示有显著性差异。数据呈现形式可参考附录B。

9.2 结果判定及说明

在实验满足有效性的基础上，样品组荧光强度值显著低于空白组（ $p < 0.05$ ），说明该受试物在该浓度下，能下调热应激线虫的HSP16.2蛋白表达，保护线虫免受热应激损伤，可作为抗热老化活性评价的证据支撑。

10 实验有效性的条件

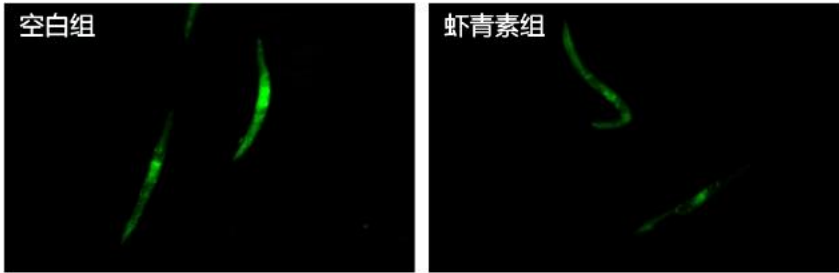
按T/GDCA 033—2023的规定进行。

每次测试需要设置空白组和虾青素阳性对照组。初次按本文件进行抗热老化活性评价前，宜先使用虾青素得到稳定的数据，以确保实验模型的成功，再进行样品的抗热老化活性的测定。

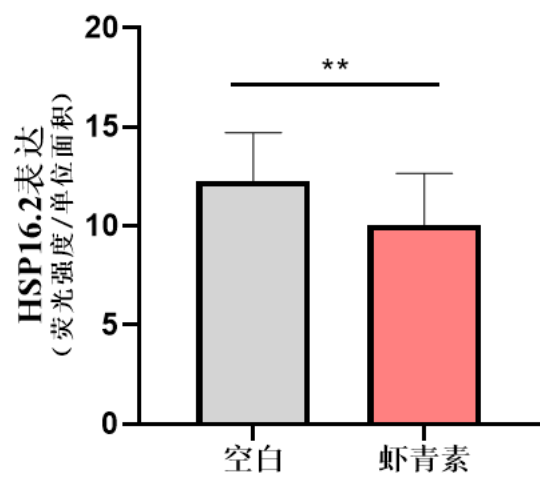
若阳性对照组的线虫荧光强度值未显著低于空白组，则该次实验视为失败。

附 录 A
(规范性)
实验数据图表

35℃条件下TJ375线虫荧光图像见A. 1，TJ375线虫荧光强度的相对定量分析见图A. 2和表A. 1。



图A. 1 TJ375 线虫荧光图



图A. 2 TJ375 线虫荧光相对定量分析图

表A. 1 线虫荧光强度值记录表

组别	荧光强度
空白	12.27±2.45
虾青素	9.96±2.63

参 考 文 献

- [1]Jin Young Seo, Jin Ho Chung. Thermal aging: A new concept of skin aging, *Journal of Dermatological Science Supplement*, 2006, 1(2): S13-S22.
- [2]Xiaojuan Liu, Han Liu, Zhiqing Chen ,et al. DAF-16 acts as the “hub” of astaxanthin’s anti-aging mechanism to improve aging-related physiological functions in *Caenorhabditis elegans*, *Food & Fuction*, 2021,12: 9098-9110.
- [3]Strayer, A., Wu, Z., Christen, Y., Link, C. D., & Luo, Y. (2003). Expression of the small heat-shock protein Hspl6-2 in *Caenorhabditis elegans* is suppressed by Ginkgo biloba extract EGb 761. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 17(15): 2305-2307.
- [4]Haslbeck M, Weinkauff S, Buchner J. Small heat shock proteins: Simplicity meets complexity. *J Biol Chem*. 2019, 294(6): 2121-2132.
- [5]Sumino Yanasel, Yuan Luo, Hiroshi Maruta, HSP16.2 gene and extends lifespan in *Caenorhabditis elegans*. *Drug Discoveries & Therapeutics*. 2013; 7(1): 29-35
- [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].
-