

# 团 体 标 准

T/ZHCA 016—2022

---

## 化妆品舒缓功效评价 斑马鱼幼鱼中性粒细胞抑制率法

Soothing effect evaluation of cosmetics—  
Method for inhibition rate of neutrophil in zebrafish larvae

2022-01-25 发布

2022-03-15 实施

---

浙江省健康产品化妆品行业协会 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。

本文件由杭州环特生物科技股份有限公司提出。

本文件由浙江省健康产品化妆品行业协会(ZHCA)归口。

本文件主要起草单位：杭州环特生物科技股份有限公司、云南贝泰妮生物科技集团股份有限公司、浙江养生堂天然药物研究所有限公司。

本文件参与起草单位：国珍健康科技(北京)有限公司、杭州百芮生物科技有限公司、杭州睿道医药科技有限公司、杭州希科检测技术有限公司、华测检测认证集团股份有限公司、纳爱斯集团有限公司、片仔癀(上海)生物科技研发有限公司、完美(广东)日用品有限公司、浙江方圆检测集团股份有限公司、浙江雅露生物科技有限公司。

本文件主要起草人：周示玉、程紫莹、王飞飞、呼谧允、刘晶、朱智杰、李海龙、徐美芬、陶竞越、蔡国强、赵晓、石飞、胡丹、张立发。

# 化妆品舒缓功效评价 斑马鱼幼鱼中性粒细胞抑制率法

## 1 范围

本文件规定了一种用于评价化妆品舒缓功效的方法。

本文件适用于化妆品及其原料舒缓功效的评价。

本文件仅适用于能溶于水或能均匀分散成悬浮水溶液的受试物。

## 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 21808 化学品 鱼类延长毒性 14 天试验

## 3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

### 3.1

**受精后天数** day post-fertilization; dpf

斑马鱼受精卵受精后的天数。

### 3.2

**最大耐受浓度** maximum tolerated concentration; MTC

3 dpf 的斑马鱼幼鱼未出现任何死亡(无心跳)和其他毒性效应(心包水肿、躯干弯曲、对机械刺激无反应、肌肉纹理不清晰等)的最高浓度。

## 4 方法原理

十二烷基磺酸钠(SLS)能诱发表皮炎症细胞浸润,导致皮肤出现红斑、瘙痒、疼痛等症状。SLS 暴露于斑马鱼皮肤表面,能同样诱导炎症反应,导致中性粒细胞发生免疫应答,向皮肤表面增殖和迁移。使用转基因中性粒细胞绿色荧光品系斑马鱼进行实验,通过图像分析方法可对中性粒细胞进行计数。将受试物暴露于斑马鱼皮肤表面后,与对照组相比,计算受试物对斑马鱼中性粒细胞的抑制率,从而评价其舒缓功效。

## 5 材料和试剂

除非另有说明,所用试剂均为分析纯。实验用水应符合 GB/T 21808 对水质的要求。

5.1 斑马鱼幼鱼:使用转基因中性粒细胞绿色荧光品系斑马鱼的幼鱼[Tg(mpx:EGFP)]。

5.2 甲基纤维素(methyl cellulose, CAS:9004-67-5)。

5.3 3%甲基纤维素:称取 3.0 g 甲基纤维素(5.2),缓慢加入到 97.0 g 沸水中,边加边搅拌,完全溶解后,停止加热,继续搅拌冷却至室温,用铝箔纸密封烧杯口,放在 4℃冰箱保存。

5.4 标准稀释水:按附录 A 中描述的方法配制。

5.5 十二烷基磺酸钠(sodium laurylsulfonate, SLS, CAS:2386-53-0,纯度 $\geq 98\%$ )。

5.6 甘草酸二钾(dipotassium glycyrrhizinate, CAS:68797-35-3,纯度 $\geq 95\%$ )。

5.7 造模剂(60  $\mu\text{g/mL}$  十二烷基磺酸钠):称取 0.060 g SLS(5.5),加入 1 mL 助溶剂溶解后,用标准稀释水(5.4)定容成 10 mL,得到 6 mg/mL 的储备液,再吸取 0.1 mL 储备液,用标准稀释水(5.4)定容成 10 mL,备用。

5.8 阳性对照样品(0.625 mg/mL 甘草酸二钾):称取 6.250 g 甘草酸二钾(5.6),用标准稀释水(5.4)溶解后定容成 100 mL,得到 62.5 mg/mL 的储备液,再吸取 0.1 mL 储备液,用标准稀释水(5.4)定容成 10 mL,备用。

5.9 助溶剂:二甲亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO, CAS:67-68-5)。

## 6 仪器和设备

6.1 生化培养箱:带有温控和进风装置,温度控制范围 5℃~50℃,精度 $\pm 0.1^\circ\text{C}$ 。

6.2 电子天平:分度值为 0.1 mg。

6.3 体视显微镜:自带白光光源,最小放大倍数为 20。

6.4 荧光体视显微镜,同时带有显微拍照系统。

6.5 图像分析软件:Image J 或功能相当者。

6.6 六孔细胞培养板,平底。

6.7 一般实验室常用器皿和设备。

## 7 试验准备

### 7.1 受试物储备液制备

7.1.1 根据受试物的自身特性,用标准稀释水(5.4)配制成一定浓度的受试物储备溶液,备用。

7.1.2 水溶性或易在水中分散的受试物:称取适量 0.01 g~0.10 g 受试物,用标准稀释水(5.4)溶解并定容至 10 mL。

7.1.3 在水溶液中难于溶解或分散的受试物:称取适量 0.01 g~0.10 g 受试物,添加 0.1 mL 助溶剂(5.9)助溶,用标准稀释水(5.4)溶解并定容至 10 mL。所有组别中的助溶剂(5.9)浓度应该保持一致,且浓度(体积分数)不大于 1%。同时,应加设溶剂对照组试验,溶剂对照组不能对斑马鱼的存活有明显或其他任何可观察到的不利影响,也不能对试验结果有显著性影响。

### 7.2 斑马鱼幼鱼准备

在体视显微镜下挑选发育正常的 2 dpf 斑马鱼幼鱼,置于盛有标准稀释水(5.4)的六孔细胞培养板(6.6)中进行孵育,每孔 15 尾,容器的水温控制在 $(28.5\pm 1.0)^\circ\text{C}$ 。

## 8 试验程序

### 8.1 预试验

预试验用于确定受试物的 MTC,为正式试验的浓度设置提供参考。

### 8.1.1 受试物稀释液制备

将受试物储备液用标准稀释水(5.4)以 2 倍几何级数稀释至 3~5 个浓度系列,备用。

### 8.1.2 受试物处理

选取发育正常的 2 dpf 的斑马鱼幼鱼,放入六孔细胞培养板(6.6)中,每孔 15 尾,在不伤害幼鱼的情况下除去六孔细胞培养板中的标准稀释水(5.4),然后迅速向每孔中加入 3 mL 含 60  $\mu\text{g/mL}$  造模剂的受试物稀释液(8.1.1)。

盖上培养板面板并用铝箔纸包裹,在 $(28.5 \pm 1.0)^\circ\text{C}$ 生化培养箱中避光孵育,孵育至 3 dpf 后(孵育时长 18 h)用体视显微镜进行观察,对斑马鱼的死亡和其他毒性效应进行记录。

### 8.1.3 MTC 的确定

以 3 dpf 的斑马鱼幼鱼未出现任何死亡(无心跳)和其他毒性效应(水肿、躯干弯曲、肌肉纹理不清晰、对机械刺激无反应等)的最高浓度组别确定为 MTC。

## 8.2 正式试验

### 8.2.1 试验分组

- a) 空白对照组:含斑马鱼幼鱼及标准稀释水(5.4),每次试验设置一个空白对照组即可。
- b) 溶剂对照组:含有助溶剂和斑马鱼幼鱼;如果受试物配制过程中使用了助溶剂(5.9),应设置该组。
- c) 模型对照组:含斑马鱼幼鱼及造模剂。
- d) 阳性对照组:含有造模剂、阳性对照和斑马鱼幼鱼,根据需要,每次试验设置一个阳性对照组即可。
- e) 受试物测试组:含有造模剂、受试物和斑马鱼幼鱼,受试物根据需要设置多个不同的浓度组。

### 8.2.2 受试物浓度设置

根据预试验的结果,确定正式试验的受试物浓度范围,试验最高浓度组不得高于 MTC。根据测试需要,将受试物储备液用标准稀释水(5.4)以 2 倍几何级数稀释至 3~5 个浓度系列。

### 8.2.3 受试物处理

选取发育正常的 2 dpf 的斑马鱼幼鱼,并随机分配到六孔细胞培养板(6.6)中,每孔 15 尾,在不伤害幼鱼的情况下除去六孔细胞培养板中的标准稀释水(5.4),然后迅速向每孔中加入 3 mL 含 60  $\mu\text{g/mL}$  造模剂的受试物溶液。

充分混匀后,盖上培养板面板并用铝箔纸包裹,在 $(28.5 \pm 1.0)^\circ\text{C}$ 生化培养箱中避光孵育至终点(孵育时间共计 18 h)。

### 8.2.4 观察和拍照

孵育结束后,从表型和行为正常的斑马鱼中随机选取至少 12 尾斑马鱼,用 3%甲基纤维素(5.3)固定,在荧光体视显微镜(6.4)下观察并拍照,拍照时斑马鱼体位应保持一致,头朝左、侧面朝下、身体保持水平。所有斑马鱼的拍照应在相同的仪器和环境条件下 2 h 内完成。

### 8.2.5 图像分析

拍照完成后,使用图像分析软件对获取到的斑马鱼图片进行分析,选取定量区域为斑马鱼侧面皮肤

表面区域(如图 B.1 所示)。将软件的分析参数设置为中性粒细胞数量,每组设置 10 个实验有效数据。

## 9 结果评价

### 9.1 数据处理

#### 9.1.1 统计学分析

将中性粒细胞个数记为  $N$ , 计算各组试验的平均值(Mean)及标准误差(Standard Error, SE), 统计学处理结果用  $\text{Mean} \pm \text{SE}$  表示。使用 SPSS 软件对数据进行方差分析, 以模型对照组作为标准, 比较各实验组中性粒细胞个数,  $P < 0.05$  为有显著性差异。

#### 9.1.2 舒缓功效的定量计算

受试物中性粒细胞抑制率按式(1)计算:

$$Q = \frac{N_1 - N_2}{N_1 - N_3} \times 100\% \quad \dots\dots\dots (1)$$

式中:

$Q$  ——受试物测试组与模型对照组相比, 中性粒细胞的抑制率;

$N_1$  ——模型对照组斑马鱼皮肤表面中性粒细胞数量;

$N_2$  ——受试物组斑马鱼皮肤表面中性粒细胞数量;

$N_3$  ——空白对照组斑马鱼皮肤表面中性粒细胞数量。

注: 如果受试物配制过程中使用了助溶剂, 则式(1)中的空白对照组数值用溶剂对照组数值进行替换。

### 9.2 结果判定及说明

在试验满足有效性的基础上, 受试物中性粒细胞个数  $N$  与模型对照组相比有统计学上的显著性差异, 即  $P < 0.05$ , 说明受试物在该浓度下能够抑制中性粒细胞的增殖和迁移, 可作为舒缓功效评价的证据支撑之一。

## 10 试验有效性的条件

10.1 预试验或正式试验中, 空白对照组(如果使用了助溶剂, 也包括溶剂对照组)斑马鱼的死亡率或异常率不得超过 10%, 超过 10% 则该次试验视为失败。

10.2 正式试验中, 空白对照组与模型对照组的之间的中性粒细胞个数存在统计学上的显著性差异, 且平均值之差必须大于 2 倍的空白对照组组内标准偏差(SD), 否则该次试验视为失败。

10.3 正式试验中, 阳性对照组与模型对照组之间的中性粒细胞个数存在统计学上的显著性差异, 且平均值之差必须大于 2 倍的模型对照组组内标准偏差(SD), 否则该次试验视为失败。

10.4 正式试验中, 如果使用了助溶剂, 溶剂对照组与空白对照组之间的中性粒细胞个数不能存在统计学上的显著性差异, 否则该次试验视为失败。

## 11 试验报告

试验报告至少应给出以下几个方面的内容:

- a) 试验依据;
- b) 试验目的及原理;

- c) 试验项目(包括评价指标和判定标准);
- d) 受试物和阳性对照的信息,包括与试验操作相关的理化性状;
- e) 斑马鱼来源和品系等相关信息;
- f) 试验条件和方法,包括试验设计、试验仪器试剂、试验记录等;
- g) 试验开始至完成的日期;
- h) 试验结果,包括测定数据、计算值、图像数据等;
- i) 数据处理与结果评价方法;
- j) 试验结论;
- k) 适用性与局限性。说明试验的适用性与局限性,并分析试验结果与试验目的间的相关性。

附 录 A  
(规范性)  
标准稀释水配制方法

A.1 试剂

除非另有说明,所用试剂均为分析纯。水为新制蒸馏水或去离子水,pH 为 6.5~8.5,电导率 $\leq 10 \mu\text{S}/\text{cm}$ 。

A.1.1 碳酸氢钠( $\text{NaHCO}_3$ ,CAS:144-55-8)。

A.1.2 氯化钾( $\text{KCl}$ ,CAS:7647-14-5)。

A.1.3 二水合氯化钙( $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ,CAS:10035-04-8)。

A.1.4 七水合硫酸镁( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,CAS:10034-99-8)。

A.2 配制

A.2.1 标准稀释水储备液的配制

分别称取 2.59 g 碳酸氢钠,0.23 g 氯化钾,11.76 g 二水合氯化钙,4.93 g 七水合硫酸镁用水溶解,定容至 1 L 容量瓶,备用。

A.2.2 标准稀释水的配制

吸取 2.5 mL 标准稀释水储备液于 100 mL 容量瓶,用水定容至刻度,摇匀备用。



## 附 录 B

(资料性)

## 斑马鱼中性粒细胞定量区域

图 B.1 为斑马鱼皮肤表面中性粒细胞定量区域图,其中:虚线区域为计算区域;荧光点为中性粒细胞。

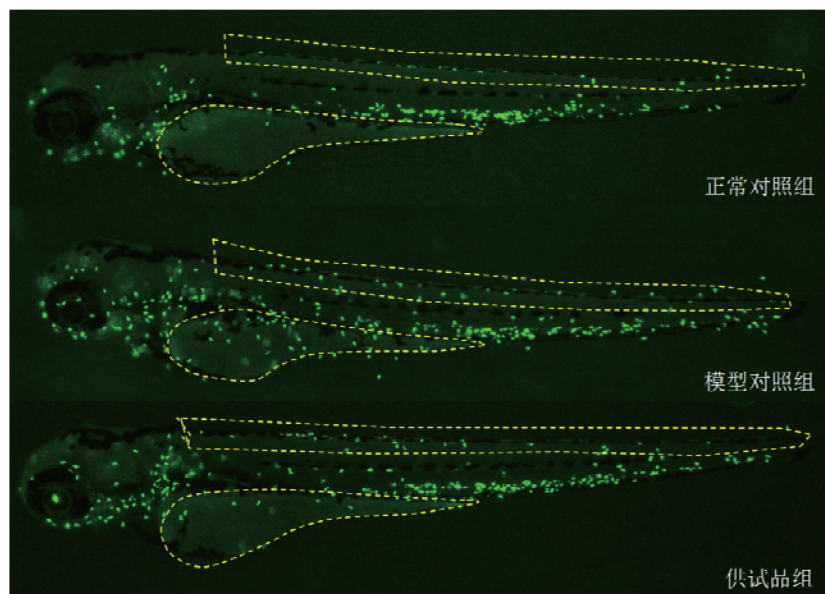


图 B.1 斑马鱼皮肤表面中性粒细胞定量区域

### 参 考 文 献

- [1] Zhou H, Cao H, Zheng Y, et al. Liang-Ge-San, a classic traditional Chinese medicine formula, attenuates acute inflammation in zebrafish and RAW 264.7 cells [J]. Journal of Ethnopharmacology, 2020, 249:112427.
- [2] Mohammad. A. M. Wadaan, Mohammad Mubarak. Skin Lesions Induced by Sodium Lauryl Sulfate (SLS) in Rabbits [J]. Journal of Medical Sciences, 2005, 5(4):320-323.
-