

团 体 标 准

T/ZHCA 015—2022

化妆品紧致功效评价 斑马鱼幼鱼弹性蛋白基因相对表达量法

Firmness efficacy evaluation of cosmetics—
Method for relative expression of elastin gene 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、广东立创检测技术服务有限公司。

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、浙江雅露生物科技有限公司。

本文件主要起草人：沈佳琪、周示玉、安晓虹、丁雪盈、罗志焕、万洁、李海龙、厉昌海、刘涛、权琰、赵玥、高业成、张立发。

化妆品紧致功效评价

斑马鱼幼鱼弹性蛋白基因相对表达量法

1 范围

本文件规定了一种用于评价化妆品紧致功效的方法。

本文件适用于化妆品及其原料紧致功效的评价。

本文件仅适用于能溶解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

5 dpf 的斑马鱼幼鱼未出现死亡(无心跳)和其他毒性效应(心包水肿、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。

4 方法原理

弹性蛋白是皮肤组织中弹性纤维的主要成分,能为肌肤提供结构性支撑,与皮肤的紧致和弹性密切相关。弹性蛋白的两种肽段分别由基因 *eln1*、*eln2* 编码,这两种基因的表达水平将影响皮肤紧致程度。斑马鱼具有与人类相似的弹性蛋白基因(*eln1*、*eln2*),用荧光定量 PCR 法检测斑马鱼体内的 *eln1*、*eln2* 基因表达量,采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法比较受试物测试组与空白对照组的弹性蛋白基因表达变化,从而评价受试物的紧致功效。

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:野生型 AB 品系斑马鱼的幼鱼。

5.2 标准稀释水:按附录 A 中描述的方法配制。

- 5.3 肌肽(L-Carnosine,CAS:305-84-0,纯度 $\geq 98\%$)。
- 5.4 阳性对照样品(20 mg/mL的肌肽):称取0.200 g肌肽(5.3),加入10 mL标准稀释水(5.2)溶解,必要时进行超声处理,完全溶解后备用。
- 5.5 助溶剂:二甲亚砜(Dimethyl sulfoxide,DMSO,CAS:67-68-5)。
- 5.6 SYBR Green 荧光染料试剂盒。
- 5.7 反转录试剂盒。
- 5.8 RNA 快速提取试剂盒。
- 5.9 引物序列(10 $\mu\text{mol/L}$):
- $\beta\text{-actin}$:上游5'-TCGAGCAGGAGATGGGAACC-3',
下游5'-CTCGTGGATACCGCAAGATTC-3';
- $eln1$:上游5'-AAAACCAGGTTACGGCTCTGT,
下游5'-TCCTCCTGGATAAGCTCCGTATC;
- $eln2$:上游5'-CGGAACAGGAAGTGGCATTAGG,
下游5'-ACCACCAGGCCCAATTCC。

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 $^{\circ}\text{C}$ ~50 $^{\circ}\text{C}$,精度 ± 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 高速冷冻离心机:相对离心力 $\geq 17\ 000$ g,转速 $\geq 13\ 300$ r/min。
- 6.5 超微量紫外分光光度计:波长范围包含260 nm和280 nm。
- 6.6 PCR 扩增仪。
- 6.7 荧光定量PCR仪。
- 6.8 六孔细胞培养板,平底。
- 6.9 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(5.2)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(5.2)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(5.5)助溶,用标准稀释水(5.2)溶解并定容至10 mL。所有组别中的助溶剂(5.5)浓度应保持一致,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4 dpf斑马鱼幼鱼,置于盛有标准稀释水(5.2)的六孔细胞培养板(6.8)中进行孵育,每孔30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(5.2)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 4 dpf 斑马鱼幼鱼,放入六孔细胞培养板(6.8)中,每孔 30 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,向每孔中迅速加入 3 mL 相应浓度的受试物稀释液(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至 5 dpf(孵育时长 24 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 5 dpf 的斑马鱼幼鱼未出现死亡(无心跳)和其他毒性效应(心包水肿、躯干弯曲、肌肉纹理不清晰、对机械刺激无反应等)的最高浓度作为 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(5.2),每次试验设置一个空白对照组即可。
- b) 阳性对照组:含有阳性对照样品和斑马鱼幼鱼,根据需要,每次试验设置一个阳性对照组即可。
- c) 受试物测试组:含有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。
- d) 溶剂对照组:含有助溶剂(5.5)和斑马鱼幼鱼,如果受试物配制过程中使用了助溶剂,则应设置该组。

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(5.2)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 4 dpf 斑马鱼幼鱼,并随机分配到六孔细胞培养板(6.8)中,每孔 30 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,然后迅速向每孔中加入 3 mL 相应浓度(8.2.2)的受试物稀释液。每组试验重复 3 次。

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(即 5 dpf,孵育时间共计 24 h)。

8.2.4 样品收集

孵育结束后,将斑马鱼清洗干净转移至 1.5 mL 离心管,用吸水纸吸干水分并保存在 -80°C 条件下,备用。

8.2.5 样品制备

按照 RNA 快速提取试剂盒(5.8)操作说明书提取各组斑马鱼总 RNA,利用超微量紫外分光光度计(6.5)对总 RNA 浓度进行测定,要求各试验组在 260 nm 和 280 nm 处的吸光度比值位于 1.90~2.20 之间。

根据 RNA 浓度计算结果,取 2 μg 的 RNA 建立反应体系。按照反转录试剂盒(5.7)说明书合成 cDNA,并稀释 10 倍,备用。

8.2.6 荧光 PCR 检测

利用 SYBR Green 荧光染料试剂盒(5.6)进行点板,配制 10 μL 反应液,包含 SYBR Green 试剂 5 μL 、上下游引物序列(5.9)各 0.25 μL 及稀释后的 cDNA 4.5 μL 。将反应液分装到每个反应孔中,然后将反应板放在荧光定量 qPCR 仪(6.7)上运行 qPCR 反应程序。

qPCR 运行具体参数如下:95 $^{\circ}\text{C}$, 2 min;95 $^{\circ}\text{C}$, 5 s;60 $^{\circ}\text{C}$, 30 s,40 个循环。

记录各实验组内参基因($\beta\text{-actin}$)和目的基因($eln1$ 、 $eln2$)qPCR 检测的 $C(t)$ 值。

注:以上参数可根据不同型号实时荧光 PCR 仪和所选 PCR 扩增体系不同做适当调整。

9 结果评价

9.1 数据处理

9.1.1 统计学分析

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 Mean \pm SE 表示。使用 SPSS 软件对数据进行方差分析,以空白对照组(或溶剂对照组)作为标准,比较各实验组目的基因相对表达量, $P<0.05$ 表示有显著性差异。

9.1.2 基因相对表达量的定量计算

根据各实验组 $\beta\text{-actin}$ 和 $eln1$ 、 $eln2$ 的 $C(t)$ 值,按式(1)~式(3)计算受试物 $eln1$ 、 $eln2$ 的相对表达量:

$$A = C(t) - C(t)_0 \quad \dots\dots\dots(1)$$

$$B = A_0 - A_1 \quad \dots\dots\dots(2)$$

$$Q = 2^B \quad \dots\dots\dots(3)$$

式中:

A ——目的基因与内参循环数之差;

$C(t)$ ——目的基因荧光信号达到设定的阈值时所经历的循环数;

$C(t)_0$ ——内参荧光信号达到设定的阈值时所经历的循环数;

B ——空白对照组 A 值的平均值与受试物 A 值之差;

A_0 ——空白对照组目的基因与内参循环数之差的均值;

A_1 ——受试物组目的基因与内参循环数之差;

Q ——受试物测试组相对于空白对照组目的基因的相对表达量。

注:如果受试物配制过程中使用了助溶剂(5.5),则公式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,受试物与空白/溶剂对照相比,如果 $eln1$ 、 $eln2$ 的相对表达量显著增

加($P < 0.05$),说明受试物在该浓度下具有增加弹性蛋白基因(*eln1*、*eln2*)相对表达量的能力,可作为紧致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,阳性对照组与空白对照组之间的基因相对表达量应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,如果使用了助溶剂,溶剂对照组与空白对照组之间的基因相对表达量就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(NaHCO_3 ,CAS:144-55-8)。

A.1.2 氯化钾(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。

参 考 文 献

- [1] Miao M, Bruce A E E, Bhanji T, et al. Differential expression of two tropoelastin genes in zebrafish[J]. *Matrix Biology*, 2007, 26(2): 115-124.
-