

中国营养保健食品协会团体标准

T/CNHFA 131—2023

斑马鱼模型用于保健食品辅助降血脂功能的 筛查方法

Screening Method for Auxiliary Lipid-lowering Function
of Health Food with Zebrafish Model

2023-05-30 发布

2023-06-01 实施

中国营养保健食品协会 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。

本文件由杭州环特生物科技股份有限公司提出。

本文件由中国营养保健食品协会归口。

本文件起草单位：杭州环特生物科技股份有限公司、北京东方红航天生物技术股份有限公司、东阿阿胶保健品有限公司、漳州片仔癀药业股份有限公司、广西壮族自治区亚热带作物研究所、浙江养生堂天然药物研究所有限公司、广东太阳神集团有限公司、国珍健康科技（北京）有限公司、云南云科特色植物提取实验室有限公司、广东青云山药业有限公司、浙江方格药业有限公司、健合（中国）有限公司、华熙生物科技股份有限公司、黑龙江飞鹤乳业有限公司、完美（广东）日用品有限公司、云南贝泰妮生物科技集团股份有限公司、中食都庆（山东）生物有限公司、首都医科大学附属北京中医医院、北京市药品检验研究院、上海疾控中心。

本文件主要起草人：朱晓宇、徐懿乔、谢瑶、孙阳恩、陈志亮、檀小辉、唐秀观、张正方、刘婷婷、史琄、杨怡雯、缪着、徐霄龙、范妙璇、杨文良、洪新宇。

斑马鱼模型用于保健食品辅助降血脂功能的筛查方法

1 范围

本文件规定了采用斑马鱼模型对保健食品降血脂功能的筛查方法。

本文件不适用于筛查不能溶解、乳化或制备成均匀分散的悬浮液的受试样品。

2 规范性引用文件

GB/T 39649 实验动物 实验鱼质量控制

GB/T 21807 化学品 鱼类胚胎和卵黄囊仔鱼阶段的短期毒性试验 术语和定义 试验溶液

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1 斑马鱼 Zebrafish

脊椎动物，生物分类学上属于脊椎动物门、硬骨鱼纲、鲤鱼目、鲤科、斑马鱼属、斑马鱼种，可用于教学和科研的模式动物。

3.2 受精后天数 Day(s) Post-fertilization, dpf

受精卵受精后的天数。

3.3 无可观察效应浓度 No Observed Toxic Effect Concentration, NOEC

与模型对照相比，对试验生物未产生显著毒性效应的最高受试样品浓度。

4 原理

通过饲喂斑马鱼高糖高脂饲料（葡萄糖和蛋黄粉）可形成脂代谢紊乱斑马鱼模型，同时给予斑马鱼受试样品，可检测受试样品对高甘油三酯血症和高胆固醇血症的影响，并可判定受试样品对脂质的吸收、脂蛋白的形成、脂质的降解或排泄产生的影响。本试验用油红O对斑马鱼甘油三酯进行染色，用体视显微镜拍摄斑马鱼尾静脉并用图像处理软件计算光密度总和，光密度总和与斑马鱼体内的甘油三酯含量呈正相关，甘油三酯含量越高，光密度总和越大；用胆固醇荧光探针对斑马鱼胆固醇进行染色，用荧光显微镜拍摄斑马鱼尾静脉并用图像处理软件计算荧光强度总和，荧光强度总和与斑马鱼体内胆固醇的含量呈正相关，胆固醇含量越高，荧光越强。根据斑马鱼体内甘油三酯、胆固醇的含量来判定受试样品是否具有辅助降甘油三酯或辅助降胆固醇功能。

5 试剂和材料

5.1 胆固醇荧光探针

胆固醇荧光探针用二甲基亚砷配制成1 mg/mL母液，-20℃储存。推荐斑马鱼静脉注射剂量为2 ng/尾（每尾斑马鱼注射2 nL浓度为1 mg/mL的胆固醇荧光探针）。

5.2 油红O

油红O用丙二醇配制成浓度为5 mg/mL染液备用，常温储存。

5.3 高脂饲料（蛋黄粉溶液）

蛋黄粉用标准稀释水配制15%溶液，超声10 min，使用时用标准稀释水进行稀释，终浓度为0.15%。

5.4 高糖饲料（葡萄糖溶液）

葡萄糖用标准稀释水配制30%溶液，使用时用标准稀释水进行稀释，终浓度为3%。

5.5 3-氨基苯甲酸乙酯甲基磺酸盐（C₉H₁₁NO₂·CH₄O₃S，MESAB）

将MESAB与Na₂HPO₄·12H₂O以1:5的总质量比混合，配制成4 mg/mL溶液，放置在4℃储存。使用时用标准稀释水进行稀释，终浓度为0.16 mg/mL。

5.6 甲基纤维素

甲基纤维素用超纯水配制成体积分数为3%的液体胶状物：将甲基纤维素缓慢加入沸水中，边加边搅拌，甲基纤维素完全溶解后，继续搅拌至冷却到室温；用锡箔纸密封烧杯口，放置在4℃储存。

5.7 标准稀释水

配制方法见附录A。

5.8 阳性对照药

阿托伐他汀钙用二甲基亚砷配成11.6 mg/mL溶液，超声10 min后，12000 g，10 min离心取上清，-20℃分装储存。使用时终浓度为11.6 μg/mL。

5.9 漂白液

甲酰胺 200 μL，柠檬酸钠缓冲液（20×）200 μL，30%H₂O₂ 1.3 mL，加入2.3 mL超纯水，常温储存。

5.10 柠檬酸钠缓冲液（20×）（pH 7.0）

NaCl 175 g，柠檬酸钠 88 g，加入1 L超纯水，常温储存。

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±0.1℃。

6.2 电子天平

分度值为0.0001 g。

6.3 水质检测设备

盐度计（电导率测定仪）、硬度计、pH计、溶解氧测定仪。

6.4 体视显微镜

6.5 体视荧光显微镜

需配有红色荧光通道。

7 试验准备

7.1 斑马鱼胚胎准备

按照GB/T 39649的规定执行斑马鱼质量控制。

使用野生型AB品系斑马鱼。

在体视显微镜下挑选每孔30尾发育正常的5 dpf斑马鱼胚胎，置于50 mL烧杯中进行孵育，水温控制在26-28.5℃。

7.2 受试样品储备液制备

按照表1的方法对不同类型受试样品进行前处理。受试样品储备液宜用标准稀释水配制，受试样品难以用水溶解时可考虑使用助溶剂或分散剂。推荐的溶剂：丙酮、乙醇、甲醇、二甲基亚砜、二甲基甲酰胺、三甘醇。适合的分散剂：聚氧乙烯化脂肪酸甘油酯、吐温80、0.01%的纤维素甲醚、聚氧乙烯化氢化蓖麻油。

表 1 不同类型受试样品前处理方法

样品类型	前处理方法	
原料类	依次经过粉碎、提取、超声、均质等步骤制得受试样品	
固体类	颗粒剂	依次经过粉碎、溶解、超声、均质制得受试样品
	片剂	依次经过去除包衣、内容物粉碎、溶解、超声、均质制得受试样品
	硬胶囊	依次经过去除胶囊壳、内容物粉碎、溶解、超声、均质制得受试样品
	粉剂	依次经过溶解、超声、均质制得受试样品
	硬糖/软糖	依次经过粉碎、提取、溶解、超声、均质制得受试样品
袋泡茶	依次经过加热水、提取、溶解制得受试样品	
液体类	直接稀释的方式溶解得到受试样品	

8 试验程序

8.1 暴露条件

8.1.1 造模

选取发育正常的5 dpf 斑马鱼，置于50 mL烧杯中，每烧杯30尾斑马鱼，用标准稀释水定容至25 mL。5 dpf早上9:30给予斑马鱼高脂饲料，下午17:00在标准稀释水中用筛网将高脂饲料洗脱3次，更换为高糖饲料，孵育过夜。在斑马鱼6 dpf早上9:30，在标准稀释水中用筛网将高糖饲料洗脱3次。重复5 dpf相同的方式，给予斑马鱼高脂、高糖饲料处理。在斑马鱼7 dpf早上9:30，在标准稀释水中用筛网将高糖饲料洗脱3次，将烧杯中的斑马鱼转移至6孔板，结束暴露。

8.1.2 给药

在斑马鱼5 dpf早上9:30在给予高脂饲料的同时给予受试样品，下午17:00在高脂饲料洗脱后给予高糖饲料的同时给予受试样品，孵育过夜。在斑马鱼6 dpf，重复5 dpf 相同的方式，给予斑马鱼受试样品处理。在斑马鱼7 dpf 早上9:30，在标准稀释水中用筛网将高糖饲料洗脱3次，将烧杯中的斑马鱼转移至6孔板，结束暴露。给药持续时间为48 h。如果受试样品富含营养物质，试验溶液容易腐败变质，可考虑在高脂饲料处理过程中进行换液，换液频率可根据水质情况调整。必要时，受试样品给予时间可延长至96 h（造模时间对应地延长至96 h）。

8.1.3 光照

暴露期间避光处理，避免光照对受试样品稳定性的影响。

8.1.4 温度

26~28.5 °C。

8.1.5 溶解氧

6 mg/L饱和溶解氧。

8.1.6 pH

6.8~7.5。

8.2 预实验

8.2.1 试验分组

- a) 正常对照组：用标准稀释水处理的未饲喂高糖高脂饲料的正常斑马鱼。
- b) 模型对照组：用标准稀释水处理的喂食高糖高脂饲料的斑马鱼。

c) 受试样品处理组：含有受试样品和喂食高糖高脂饲料的斑马鱼，受试样品根据需要设置多个不同浓度组。

d) 溶剂对照组：含有溶剂和喂食高糖高脂饲料的斑马鱼。如果受试样品配制过程中使用了本文件以外的助溶剂或分散剂，则应设置该组。

8.2.2 受试样品组别设置

将受试样品储备液用标准稀释水以几何级数稀释成一组适宜的浓度系列，备用。宜设置3~5个浓度组，以几何级数浓度系列设置受试样品浓度梯度，浓度的间隔系数 ≤ 3.2 ，宜设为2。

8.2.3 确定NOEC

a) 死亡判断标准：静止不动、无心脏跳动、躯干呈不透明颜色、对机械刺激无反应。

b) 异常表型：心包水肿、静脉瘀血、血流缺失/减少、出血、脑变性/萎缩/水肿、下颌畸形、眼畸形/水肿、肝脏变性/肿大/萎缩、卵黄囊吸收延迟、肠道发育异常、躯干弯曲/缩短/水肿、肌肉变性、鳔未充气。异常表型的典型图见附录B。

c) 异常行为学指标：身体侧翻、游动不协调、游动剧烈和反常的静止。

8.3 正式试验

8.3.1 试验分组

a) 正常对照组：用标准稀释水处理的未饲喂高糖高脂饲料的正常斑马鱼。

b) 模型对照组：用标准稀释水处理的喂食高糖高脂饲料的斑马鱼。

c) 阳性对照组：含有阳性对照样品和喂食高糖高脂饲料的斑马鱼，每次试验设置一个阳性对照组即可。

d) 受试样品处理组：含有受试样品和喂食高糖高脂饲料的斑马鱼，受试样品根据需要设置多个不同浓度组。

e) 溶剂对照组：含有溶剂和喂食高糖高脂饲料的斑马鱼。如果受试样品配制过程中使用了本文件以外的助溶剂或分散剂，则应设置该组。

8.3.2 受试样品浓度设置

根据预试验的结果，确定正式试验的浓度范围，试验最高浓度组不得高于NOEC值或该类受试样品的最大溶解度。以几何级数浓度系列设置至少3个不同的受试样品浓度组，浓度的间隔系数不大于3.2。浓度设置少于3个时需说明理由。

8.3.3 结果观察

a) 静脉全血甘油三酯含量检测

结束暴露，将6孔板中的斑马鱼置于体视显微镜下观察，剔除表型和行为异常的斑马鱼

（见附录B）。表型观察结束后，用移液枪移除液体，每孔加入2-3 mL的4%组织细胞固定液，将6孔板用铝箔纸包裹，在4℃冰箱中避光放置过夜。次日，用油红O进行染色脱色。染色结束后，每孔随机选取至少10尾斑马鱼用甲基纤维素固定，在体视显微镜下观察拍照，拍照部位为从斑马鱼泄殖孔至尾部，通常需要采集完整的全身明场图片用于制作示意图。拍照时斑马鱼应头朝左、腹部朝下、完全侧躺，所有斑马鱼的体位应该保持一致。油红O染色脱色方法（见附录C）。

b) 静脉全血胆固醇含量检测

在斑马鱼 6 dpf 下午17:00需换高糖饲料前，除正常对照组外，其余各组每尾斑马鱼在麻醉状态下静脉注射2 ng胆固醇荧光探针。注射结束，在标准稀释水中用筛网将斑马鱼清洗3次至恢复自由游动，然后继续暴露。结束暴露，将6孔板中的斑马鱼置于体视显微镜下观察，剔除表型和行为异常的斑马鱼（见附录B）。表型观察结束后，用MESAB麻醉斑马鱼，每孔随机选取至少10尾斑马鱼用甲基纤维素固定（甲基纤维素要提前在室温放置至少30 min）。在荧光显微镜的红色荧光通道下观察并拍照，拍照部位为从斑马鱼泄殖孔至尾部，通常需要采集完整的全身荧光图片和明场图片用于制作示意图。拍照时斑马鱼应头朝左、腹部朝下、完全侧躺，所有斑马鱼的体位应该保持一致。

8.3.4 图像分析

a) 静脉全血甘油三酯含量分析

拍照完成后，使用IPP软件对获取到的斑马鱼图片进行分析，计算斑马鱼尾静脉甘油三酯光密度总和作为静脉全血甘油三酯含量。每组的有效数据量不少于10个。

b) 静脉全血胆固醇含量分析

拍照完成后，使用NIS-Elements D3.1高级图像处理软件对图像进行分析，计算斑马鱼尾静脉内胆固醇荧光强度总和作为静脉全血胆固醇含量。每组的有效数据量不少于10个。

9 数据处理与结果判定

9.1 统计分析

利用统计分析软件进行相关图表制作与统计学分析。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 $\text{Mean} \pm \text{SE}$ 表示。宜采用方差分析，按方差分析的程序先进行正态性检验（P值）和方差齐性检验（F值）。当 $F < 0.05$, $P < 0.05$ 时，各组均数间组间至少有一组有显著性差异，宜采用非参数检验。当 $F \geq 0.05$, $P \geq 0.05$ 时，采用单因素方差分析，选择事后两两比较的结果进行统计。对非正态或方差不齐的数据进行适当的变量转换，待满足正态或方差齐要求后，用转换后的数据进行统计。若变量转换后仍未达到正态或方差齐的目的，改用秩和检验进行统计。

9.2 结果判定

9.2.1 试验有效性

a) 正常对照组（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。

b) 正式试验中，阳性对照组与模型对照组之间存在统计学上的显著性差异，且平均值之差必须大于2倍的模型对照组内标准偏差（SD）；或阳性对照组与模型对照组之间存在统计学上的显著性差异，且平均值之差大于模型对照组平均值的20%，否则该次试验结果视为无效。

c) 正式试验中，如果使用了助溶剂，溶剂对照组与模型对照组之间不能存在统计学上的显著性差异，如果溶剂对照组与模型对照组之间存在统计学上的显著性差异，则该次试验视为无效。

9.2.2 辅助降甘油三酯功能

模型对照组与正常对照组之间的尾静脉光密度总和差异有显著性，阳性对照组与模型对照组之间的尾静脉光密度总和差异有显著性，判定模型成立。受试样品各浓度组与模型对照组比较，任一浓度组尾静脉光密度总和降低，差异有显著性，可判定该受试样品具有辅助降甘油三酯功能。

9.2.3 辅助降胆固醇功能

模型对照组与正常对照组之间的尾静脉荧光强度总和差异有显著性，阳性对照组与模型对照组之间的尾静脉荧光强度总和差异有显著性，判定模型成立。受试样品各浓度组与模型对照组比较，任一浓度组尾静脉荧光强度总和降低，差异有显著性，可判定该受试样品具有辅助降胆固醇功能。

注1：由于受试样品在标准稀释水中的溶解度受限，可能导致结果判定为不具有辅助降甘油三酯或辅助降胆固醇功能。

注2：由于斑马鱼毒性敏感性，导致受试样品浓度设置受限，可能导致结果判定为不具有辅助降甘油三酯或辅助降胆固醇功能。

10 试验报告

试验报告至少应给出以下几个方面的内容：

- a) 检验依据；
- b) 样品和阳性对照的信息，包括与试验操作相关的理化性状；
- c) 斑马鱼来源和品系等相关信息；
- d) 试验条件和方法，包括试验具体步骤；
- e) 数据处理与结果评价方法；

f) 试验的日期；

g) 结论。

附录 A

(规范性)

标准稀释水配制方法

A.1 分别称取以下试剂

- a) 碳酸氢钠：称取2.52 g NaHCO_3 ；
- b) 氯化钾：称取0.22 g KCl ；
- c) 氯化钙：称取11.76 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ；
- d) 硫酸镁：称取4.932 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 。

A.2 定容

将A.1称取的试剂混合后用去离子水定容至1 L。用于配制标准稀释水的试剂均为分析纯试剂，去离子水电导率应小于或等于 $10 \mu\text{S}/\text{cm}$ 。

A.3 将A.2用去离子水稀释40倍得到标准稀释水。

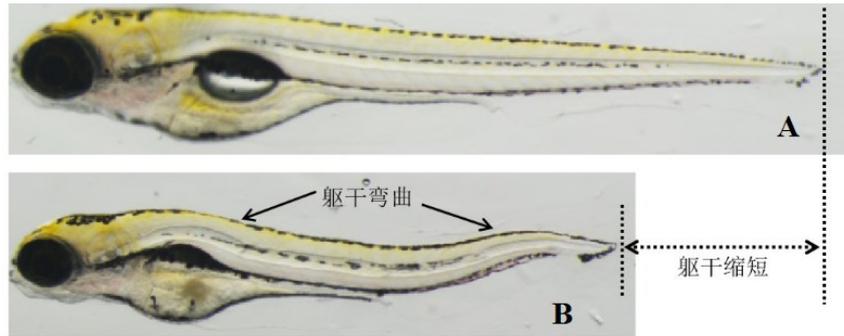
最终浓度为：63.0 mg/L NaHCO_3 ，5.5 mg/L KCl ，294.0 mg/L $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ，123.3 mg/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 。

附录 B

(规范性)

斑马鱼典型图

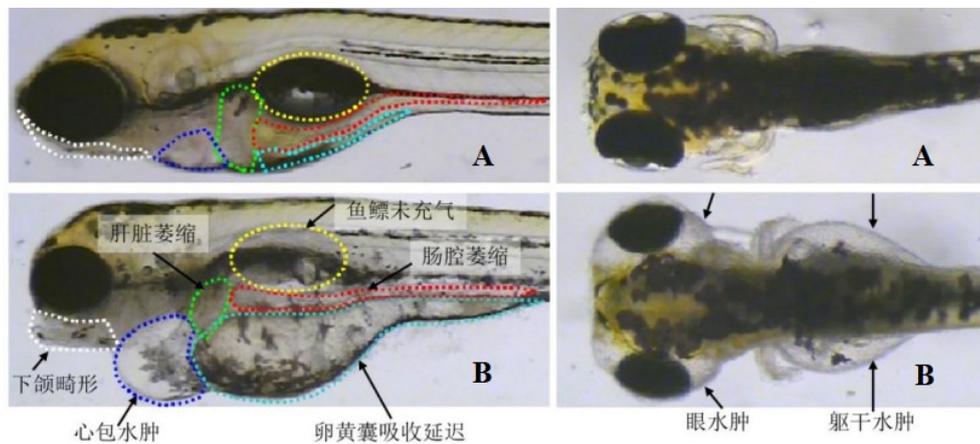
B.1 斑马鱼整体特征见图B.1。



图B.1 斑马鱼整体图

注：图A为正常斑马鱼，图B的斑马鱼出现躯干缩短和弯曲。

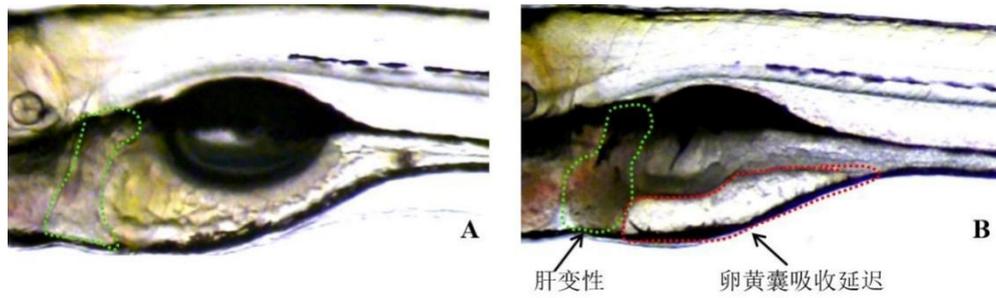
B.2 斑马鱼主要器官特征见图B.2。



图B.2 斑马鱼主要组织器官示意图

图A为正常斑马鱼，图B为表型异常斑马鱼。白色虚线所示为下颌，蓝色虚线所示为心脏，浅绿色虚线所示为肝脏，深绿色虚线所示为卵黄囊，红色虚线所示为肠道，黄色虚线所示为鱼鳔。

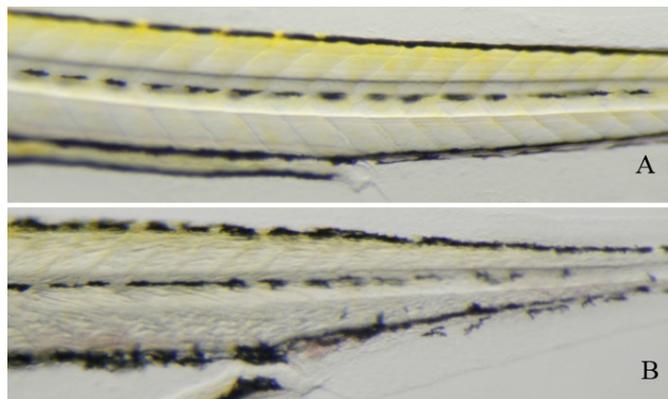
B.3 斑马鱼肝脏特征见图B.3。



图B.3 斑马鱼肝脏局部图

图A为正常斑马鱼，图B斑马鱼出现肝脏发黑（变性）和卵黄囊吸收延迟。绿色虚线所示为肝脏，红色虚线所示为卵黄囊。

B.4 斑马鱼肌肉特征见图B.4。



图B.4 斑马鱼肌肉变性典型图

图A为正常斑马鱼，图B斑马鱼出现肌肉变性（肌肉纹理不清晰、表面不平整、颜色偏暗）

附录 C

(规范性)

油红O染色脱色步骤

C.1 染色

1. 将6孔板中的药液吸干，用4%组织细胞固定液固定，4°C过夜；
2. 吸干，加入3 mL的1×PBS，放置在水平脱色摇床上，转速50 rpm，在室温下洗脱5 min；
3. 吸干PBS，加入3 mL的50%PBS和50%丙二醇，放置在水平脱色摇床上，转速50 rpm，室温洗脱5 min；
4. 吸干，加入3 mL的丙二醇，放置在水平脱色摇床上，转速50 rpm，室温洗脱5 min；
5. 吸干，加入3 mL的油红O，显微镜下观察，调整斑马鱼的位置，保证斑马鱼完全浸没在油红O染液中，不能贴壁与浮起，铝箔纸包好，放入28°C生化培养箱中24 h。

C.2 脱色

1. 取出6孔培养板，吸干油红O染液，加入3 mL的丙二醇，放置在水平脱色摇床上，转速80 rpm，在室温下洗脱15 min，重复操作2次；在显微镜下观察洗脱情况，需至尾鳍透明，肠道和肝脏区分明显；
2. 如果使用野生型AB品系斑马鱼，则需要吸干丙二醇，加入3 mL漂白水，避光漂白15 min，避免黑色素的影响；如果使用黑色素等位基因突变Albino品系，可直接进行下一步操作；
3. 吸干，加入3 mL的50%PBS和50%丙二醇，放置在水平脱色摇床上，转速80 rpm，室温下洗脱15 min；
4. 吸干，加入3 mL的50%PBS-50%丙二醇。样本可在4°C冰箱中保存1-2天。