



中国化妆品行业 斑马鱼技术应用白皮书

/ 定制版 /



保密条约

本报告由青眼情报和环特生物共同撰写、出品。

本报告所有权和知识产权系出品方环特生物拥有，出品方对该报告拥有唯一著作权；我公司没有通过任何第三方进行代理销售，使用报告请直接与出品方联系。

未经出品方同意，不得以任何形式将本报告出借、销售、出租或在网上发布。凡使用本报告者均受本条款及本报告一切有关保密之条约约束。

如未获得出品方书面允许，不得用任何方式抄袭或翻印本报告任何部分之文字及图片，否则引起的一切法律后果由违反上述要求的个人或企业自行承担，同时出品方亦认为其行为侵犯了著作权，出品方有权依法追究其法律责任。

凡有侵权行为的个人、法人或其它组织，必须立即停止侵权并对其因侵权造成的一切后果承担全部责任和相应赔偿。否则出品方将依据中华人民共和国《著作权法》、《计算机软件保护条例》等相关法律、法规追究其经济和法律责任。



前言

化妆品已成为人们生活中的必需品，安全性和功效性评价是化妆品开发过程中非常重要的一个环节。化妆品的特性包括安全性、稳定性、使用性和功效性。化妆品是直接作用于人体皮肤，其安全性对消费人群的健康紧密相关。此外，化妆品作为高度依赖产品宣称的行业，其功效宣称与产品销量密切相关，直接影响到消费者权益和企业效益^[1]。原料的安全性是化妆品产品安全的前提条件，活性原料的功效性是产品功效性的根本来源^[2]。为保障《化妆品监督管理条例》的实施而制定的《化妆品安全评估技术导则》和《化妆品功效宣称评价规范》均规定，在注册备案化妆品新原料和成品前，必须开展安全评估；化妆品的功效宣称应当有充分的科学依据，企业对功效宣称负责，并应当将有关研究数据或功效验证材料在指定网站公开，接受社会监督^[3]。密集出台的法规和管理办法，充分展示了政府对整顿化妆品功效宣称混乱现象的决心，也对化妆品企业提出了严峻的考验。

随着消费者消费观念的逐渐理性化，市场对化妆品的安全性和功效性的要求越来越

高，使得产品安全性和功效性的评价显得尤其重要^[4]。目前化妆品的评价模型主要有两大类：以细胞、组织为对象的体外评价模型以及动物和人体在体评价模型。其中，动物评价是以实验动物为研究对象进行科学试验，是细胞与人体评价之间的过渡，具有重要的意义。通常使用的实验动物有小鼠、大鼠和家兔等，但哺乳动物存在生长周期长、繁殖慢、费用高及操作复杂等问题^[5]，并且随着国际上《动物实验保护法》在化妆品行业的逐渐推进，哺乳动物用于化妆品测评工作已经越来越少。斑马鱼是一种常用的脊椎模式生物，具有传代时间短、饲养方便、成本较低以及便于大规模筛选等优势，是一种有效、可靠、高通量的模式生物，在化妆品评价方面有很高的科研价值和广泛的应用前景。

参考文献

- [1]丁梅华, 程琳, 赵华《化妆品监督管理条例》颁布背景下化妆品功效宣称的科学支持[J]. 轻工学报, 2021, 36(5): 102-109, 117.
- [2]王敏, 张晓娜, 徐鹤然, 等. 《化妆品监督管理条例》对化妆品原料行业发展的影响[J]. 轻工学报, 2021, 36(5): 92-101.
- [3]唐颖, 张兆伦, 曹力化, 等. 《化妆品监督管理条例》背景下《化妆品安全评估技术导则》的解读刍议[J]. 轻工学报, 2021, 36(5): 84-91.
- [4]阎世翔. 中国化妆品功效性评价及安全质量管理展望[J]. 日用化学品科学, 2005, 28 (6): 37-40.
- [5]王凯. 生命科学研究中常用模式生物[J]. 生命科学研究, 2010, 14 (2): 156-165.

CONTENTS

目 录

第一章 化妆品功效检测现状	P01
1.1 市场规模	P02
1.2 检测机构数量以及案例	P03
第二章 斑马鱼技术用于化妆品评价的优势及科学基础	P09
2.1 斑马鱼技术的优势	P10
2.2 斑马鱼技术的科学基础	P11
第三章 斑马鱼技术的相关标准	P13
3.1 世界各国及地区的相关标准	P14
3.2 我国对斑马鱼评价技术认可度及相关标准	P15
第四章 斑马鱼技术用于化妆品评价的专利申报统计	P17
第五章 斑马鱼技术用于化妆品研究的成果发表	P21
5.1 斑马鱼技术在国际化妆品研究的现状	P23
5.1.1 祛斑美白功效评价	P23
5.1.2 抗氧化功效评价	P28
5.1.3 抗光老化功效评价	P30
5.1.4 抗炎舒缓功效评价	P34
5.1.5 安全性评价	P35
5.2 斑马鱼技术在国内化妆品研究的现状	P38
5.2.1 祛斑美白功效评价	P38
5.2.2 抗氧化功效评价	P43
5.2.3 补水保湿功效评价	P45
5.2.4 抗炎舒缓功效评价	P47
5.2.5 皮肤修复功效评价	P49
5.2.6 改善微循环	P51
5.2.7 安全性评价	P51
第六章 斑马鱼技术在化妆品行业的应用情况	P53
6.1 国内科研单位斑马鱼技术应用	P54
6.2 国内企业单位斑马鱼技术应用	P54



第七章 斑马鱼技术在化妆品行业的应用价值	P59
第八章 斑马鱼技术用于化妆品评价常见技术方案	P61
8.1 美白功效评价	P62
8.2 抗氧化功效评价	P64
8.3 补水保湿功效评价	P65
8.4 抗炎舒缓功效评价	P67
8.5 皮肤修复功效评价	P70
8.6 抗光老化功效评价	P71
8.7 紧致功效评价	P73
8.8 抗皱功效评价	P74
8.9 提亮肤色功效评价	P76
8.10 温和功效评价	P77
第九章 斑马鱼技术应用于化妆品评价的应用案例	P79
9.1 山东福瑞达生物股份有限公司产品功效研究	P80
9.1.1 益生菌发酵褐藻滤液	P80
9.1.2 瓊尔博士酵萃精研肌律御时面霜	P83
9.1.3 瓊尔博士酵萃精研肌律微晶水	P86
9.2 西安绿天生物技术有限公司原料功效研究	P89
9.2.1 抗炎舒缓功效检测	P89
9.2.2 神经舒缓功效检测	P92
第十章 斑马鱼技术在化妆品行业应用中面临的挑战和机遇	P95
10.1 斑马鱼技术在化妆品行业应用中面临的挑战	P96
10.2 斑马鱼技术在化妆品行业应用中面临的机遇	P97
第十一章 斑马鱼技术在化妆品行业应用的展望	P99

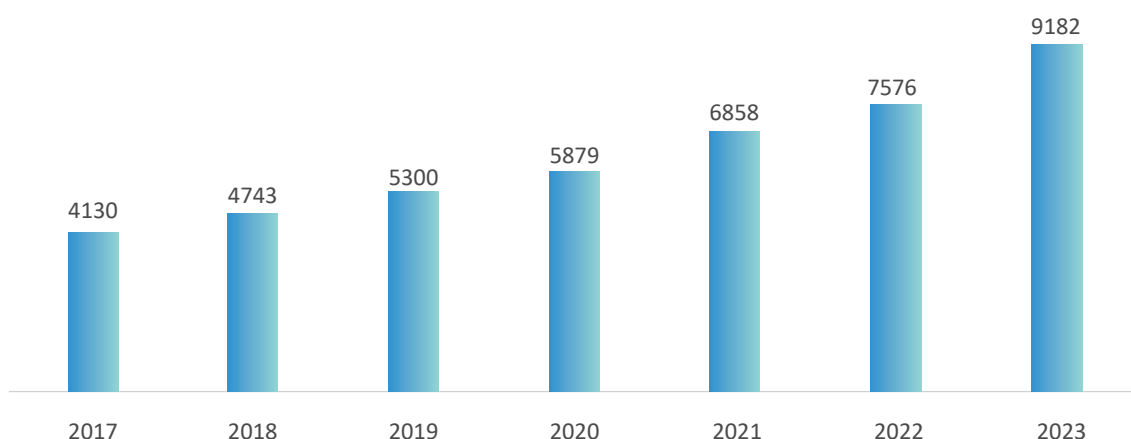
第一章

化妆品功效检测现状

1.1 市场规模

2016~2022年中国化妆品市场规模呈现持续增长态势，预测2023年将达到9182亿元，其中，护肤品市场份额为4230亿元，是彩妆市场的近三倍。

2017-2023年中国化妆品市场规模（单位：亿元/人民币）



数据来源：青眼情报

化妆品市场规模的增长，对于化妆品检测行业的发展起到至关重要的促进作用。新规规定，除清洁、卸妆、美容修饰、芳香等仅具物理作用的功效宣称外，其它功效宣称的化妆品必须对宣称的功效进行评价，并提交相应证据，这催生出规模庞大的功效检测市场。

青眼情报根据2021年注册/备案数据，以及一些检测机构目前对于功效检测的报价，估算出2021年化妆品功效检测的市场规模为28.77亿元。近5年中国化妆品市场规模的复合增长率为11.6%，因此可以预估2023年化妆品功效检测的市场规模约为40亿元。

1.2 检测机构数量以及案例

1. 国家政策对检测机构的认定愈发严格

2022年8月，国家药监局发布《化妆品检验机构资质认定条件（征求意见稿）》规定了检验机构在组织机构、管理体系、检验能力、人员、设施和环境、仪器设备等方面应当达到的条件要求。

组织机构

检验机构应与其人员建立劳动、聘用或录用关系，不得雇用已在其他化妆品检验机构从业的人员，不得雇用法律法规规定限制从事化妆品检验工作的人员。

管理体系

开展人体安全性与功效学评价检验的检验机构应当建立受试者知情管理制度和志愿者管理体系，并具备相应的处置化妆品不良反应的能力。

检验能力

检验机构应当依据现行有效的国家标准、技术规范、补充检验方法等开展检验活动，并具有对检验检测方法进行确认或预评价的能力。

人员

从事化妆品检验活动的人员应当持证上岗。检验人员中具有中级以上（含中级）专业技术职称或同等能力人员的比例应当不小于20%。

设施环境

检验机构应当根据实际需要设置独立的理化检验、生物学检验、毒理学试验、人体安全性和功效学评价检验等实验室。

仪器设备

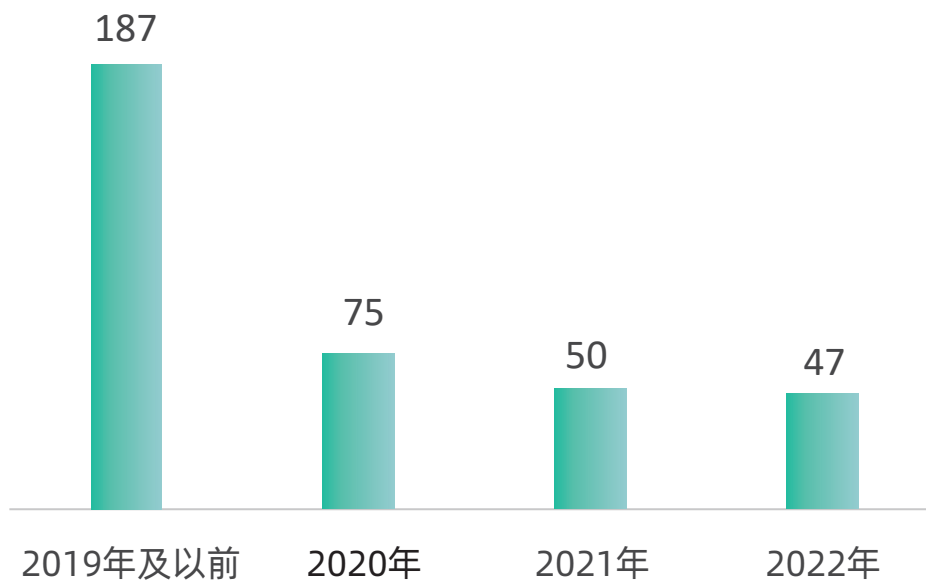
检验机构应当具备开展化妆品检验活动所需的仪器设备（包括软件）、标准物质（含参考物质）或标准菌（毒）种等，其配置应当满足相关规定。检验机构应当对其拥有独立支配权和使用权。

2.检测机构的数量平稳增长

虽然政策对检测机构的认定要求严格，但新规落地，行业内普遍认为是对检测机构的利好，药监局官方数据显示注册备案的机构数量呈增长趋势。

从时间分布来看，截至**2022**年底，[国家药监局官网公示的化妆品注册和备案检验检测机构](#)合计**359**家，**2022**年新增**47**家，机构数量增长放缓。

化妆品注册备案检验检测机构增加数量（家）



数据来源：国家药品监督管理局

从地域分布来看，目前官方机构主要集中在北京、上海、广东、重庆、四川等地。广东省最多，位居全国第一，广东又集中于广州和深圳两地。因此可以看出，检测机构其分布与化妆品行业的分布和当地经济发展水平有关。

3.产业链各端纷纷入局，满足更多功效检测需求

自新规出台，市场对功效检测的需求急剧增加，订单量爆发式增长。彼时，相较于市场需求而言，功效检测机构的增长速度是偏慢的。但如今，不少有实力的工厂、品牌、平台纷纷自建实验室，或投资成立化妆品检测公司，打通研发、生产、功效评价的闭环。

第三方检测机构：环特生物

环特生物是一家以斑马鱼生物技术应用为核心的国家高新生物科技企业。作为国内唯一获得国家CNAS、CMA、AAALAC国际认证、实验动物生产和使用许可证的斑马鱼公司，多项技术成果先后荣获德国纽伦堡国际发明金奖、英国国际发明展金奖及杰出创新奖和中国发明协会发明创业奖项目奖金奖等多项发明类国内外大奖。

机构名称	环特生物	
成立时间	2010年	
优势	● 国内唯一获得国家CNAS、CMA、AAALAC国际认证、实验动物生产和使用许可证的斑马鱼公司 ● 已申请国家发明专利57项，已获授权27项，发表国内外论文150余篇 ● 创始人为国际知名斑马鱼应用研究及药物研发科学家 ● 技术核心团队由50多名具有丰富斑马鱼研究经验的专家组成，学历全部为硕士及博士 ● 基于对研究的斑马鱼生物技术，形成“一轴两翼”的创新检测平台	

科研机构端：白云美湾检测

2018年国家决策建设粤港澳大湾区，白云区规划构建了白云美业大湾区。白云区政府设立白云美湾产业发展领导小组，下设“白云美湾产业发展办公室”，统筹管理全产业链集群白云美湾项目工程。“白云美湾国际化妆品研究院集群”是白云美湾大项目中子项目之一，2020年由白云区政府牵头，引入国内1（江南大学）+19家（国内其他）高校及科研院所，在白云区设立各自研究院，拎包入住。研究院人员薪酬，研发设备，研究院装修等成本由区政府承担，研究院任务从事化妆品新原料和新产品研究及科技成果转化。

成果转化具体工作由白云区属国企牵头、联合区内化妆品数十家头部企业：娇联实业、阿道夫、阿芙、卡姿兰、诗妃等共同投资成立的“广州白云美湾科技发展有限公司”承担。广州白云美湾检测有限公司为广州白云美湾科技发展有限公司的全资子公司。

机构名称	广州白云美湾检测有限公司
成立时间	2021年
优势	● 美湾检测场地位于白云娇兰大厦，检验场地共约1500平方米，人员30人，中级职称6人 ● 覆盖功效评价，理化分析以及微生物检测三个板块 ● 与环特生物科技有限公司共同打造的斑马鱼实验室，配备了顶尖的高通量斑马鱼检测实验室。通过对斑马鱼技术应用场景的充分深度挖掘，承接“白云美湾国际化妆品研究院集群”从原料至配方研发的全部检验检测及数据验证服务

品牌端：欧诗漫功效测试中心

在化妆品新规之下，许多国内品牌都通过自主组建或合作方式建立实验室和检测中心。2013年建立的欧诗漫生物股份有限公司化妆品品质与功效测试中心，下设微生物实验室、功效实验室和理化实验室，也是品牌立足行业的底气。

品牌拥有自己的检验检测技术手段，意味着能最真实地掌握产品的实际数据，稳住产品质量。从整个行业来看，这也将成为提高品牌竞争力的重要部分。

机构名称	欧诗漫生物股份有限公司化妆品品质与功效测试中心
成立时间	2013年
优势	● 已累计拥有各项专利146项，主导或参与制定标准33项 ● CNAS国家实验室认可，是浙江省最早获得CNAS国家实验室认可的化妆品生产企业 ● 覆盖化妆品理化检测、微生物检测、防腐功效测试、功效和安全性评价等业务

第二章

斑马鱼技术用于化妆品评价的优势
及科学基础

2.1 斑马鱼技术的优势

斑马鱼作为模式生物用于评价实验的主要优势如下^[1-2]:

①与人类基因相关性高。斑马鱼是继人和小鼠之后第三个完成全基因组测序的脊椎动物，与人的基因组同源性高达87%，在斑马鱼上做试验所得到的实验数据及结论在多数情况下对人体也有积极和重要的参考价值。与哺乳类动物生物结构和功能及信号传导通路高度相似，作为细胞体外模型与人体临床评价之间的重要过渡，可以为化妆品的安全和功效评估提供重要的依据。

②实验周期短、费用低、样品用量少。大部分斑马鱼实验可以在2小时到72小时内完成，样品用量为mg级别。大大节省了化妆品及原料样品的制备时间和成本，克服了常规的哺乳类动物体内实验周期较长、样品用量大、成本高等缺点。

③结果直观。斑马鱼幼鱼通体透明，皮肤生理变化，如炎症反应、黑色素生成、氧化应激作用等能够在显微镜下被直接观察，或者应用荧光图像等表型分析方法，对功效与安全性进行直观展示。

④可实现高通量筛选。斑马鱼幼鱼体长约1-4mm，是目前唯一适合微孔板高内涵、高通量和全自动化分析的脊椎动物模型，非常适合于进行早期和大规模的化妆品原料及配方组合的高通量筛选。

⑤方法简便。常用的胚胎实验可直接在细胞培养板上完成，方法简便，并可用显微镜直接观测；大多数样品的暴露方式可以选择直接溶解于培养水体系中。

⑥符合3R原则。欧盟关于动物实验的相关指令《Council Directive 2010/63/EU》规定自主进食之前的鱼类可不受动物实验限制，因此，使用受精后5天以内不自主进食的斑马鱼进行化妆品评价实验符合国际化妆品动物实验禁令的相关要求。

2.2 斑马鱼技术的科学基础

①**皮肤结构的相似性**。已经有大量的研究成果证实了斑马鱼与人类的皮肤结构和功能具有高度的相似性。斑马鱼的皮肤结构与人类具有相似的三个层级，即表皮层和基底膜区、真皮层、皮下组织，且每一个层级都具有与人类皮肤相似的功能和结构^[3]。

②**皮肤相关生物信号传导的相似性**。斑马鱼皮肤结构中多种生物传导信号通路与人类皮肤中是相似的，例如，斑马鱼皮肤结构中的黑色素在合成、转运、表达、代谢等各个方面都与人体皮肤中的黑色素非常相似^[4]。事实上，斑马鱼身上的条纹外观就是其皮肤中黑色素的表达结果。2013年，环特生物与上海交大附属新华医院合作，用斑马鱼研究人体遗传性皮肤色素异常沉着疾病发病机制的文章在人类遗传学顶级期刊发表^[5]。

②**受试物的暴露和吸收方式的相似性**。化妆品功效评价中使用的是受精后5天以前的斑马鱼胚胎或幼鱼，这一阶段的斑马鱼尚未开口进食，受试物添加到培养环境的水中主要经皮吸收，这一过程与化妆品在人体皮肤上的涂抹经皮吸收过程非常相似。

参考文献

- [1]彭冠杰, 郭清泉. 美白化妆品的功效评价—动物试验法[J]. 日用化学品科学, 2019, 42(12): 5.
- [2]CHOI T Y, KIM J H, KO D H, et al. Zebrafish as a new model for phenotype-based screening of melanogenic regulatory compounds[J]. Pigment Cell Research, 2007, 20(2): 120-127.
- [3]Chang WJ, Hwang PP. Development of zebrafish epidermis. Birth Defects Res C Embryo Today. 2011 Sep; 93(3): 205-14.
- [4]Cooper CD. Insights from zebrafish on human pigment cell disease and treatment. Dev Dyn.2017 Nov;246(11): 889-896.
- [5]Li M, Cheng R, Liang J, et al. Mutations in POFUT1, encoding protein O-fucosyltransferase 1, cause generalized Dowling-Degos disease. Am J Hum Genet. 2013 Jun 6;92(6): 895-903.

第三章

斑马鱼技术的相关标准



3.1 世界各国及地区的相关标准

斑马鱼在国际上已经应用于生命科学、医药、保健食品、化妆品、环境监测等行业，也得到了相关政府部门的认可。随着测序技术、基因编辑等技术的日臻完善，使得斑马鱼在更多领域得到了更加广泛的应用。

2003年，美国国立卫生研究院（NIH）将斑马鱼列为继小鼠和大鼠之后的第三大脊椎类模式生物。美国环境保护署（EPA）在2007年启动化学品毒性研究项目（ToxCast）将斑马鱼作为首选的脊椎类动物模型，并已公布了相关研究的进展和成果。2009年，斑马鱼安全和毒理学评价方法通过了美国食品药品监督管理局（FDA）和欧洲药品监督管理局（EMA）的GLP认证，标志着斑马鱼安全性评价数据正式被欧美监管部门认可。美国FDA建立了自己的斑马鱼实验室，用于进行药品、食品及化妆品的安全性研究和评价，并于2013年在其官网发表文章介绍了斑马鱼在药物安全性评价方面的价值。

在标准方面，经济合作与发展组织（OECD）和国际标准化组织（ISO）已经发布10余项用斑马鱼进行毒理测试的标准，涵盖了斑马鱼急性毒性、长期毒性、胚胎毒性、生殖毒性、纳米材料毒性等方面。对应国际标准，我国也已经发布了13项相关的毒理学标准。详见表1。

表1.国内外部分斑马鱼技术相关标准方法

国际标准	国内对应标准	标准名称
OECD 250（2021）	-	内分泌活性物质 斑马鱼胚胎测试法
ISO/TS 22082（2020）	征求意见中	纳米技术 基于斑马鱼胚胎模型的纳米材料毒性评价
OECD 236（2013）	-	化学品 鱼类胚胎急性毒性试验
OECD 234（2011）	-	化学品 鱼类性发育试验
ISO 15088（2007）	HJ 1609-2019	水质 急性毒性 斑马鱼卵法
OECD 229（2009）	GB/T35517-2017	化学品 鱼类生殖毒性短期试验方法
OECD 230（2009）	GB/T35515-2017	化学品 鱼类雌激素、雄激素和芳香酶抑制活性试验方法

国际标准	国内对应标准	标准名称
OECD 203 (2019)	GB/T 31270.12-2014 GB/T27861-2011	化学农药环境安全评价试验准则 第12部分：鱼类急性毒性试验 化学品 鱼类急性毒性试验
OECD 305 (2012)	GB/T21800-2008 GB/T21858-2008	化学品 生物富集流水式鱼类试验 化学品 生物富集半静态式鱼类试验
OECD 215 (2000)	GB/T21806-2008	化学品 鱼类幼体生长试验
OECD 212 (1998)	GB/T21807-2008	化学品 鱼类胚胎和卵黄囊仔鱼阶段的短期毒性试验
JISK 0102-71:1998	GB/T 21814-2008	工业废水的试验方法 鱼类急性毒性试验
OECD 210 (2013)	GB/T21854-2008	化学品 鱼类早期生活阶段毒性试验
OECD 204 (1984) *	GB/T21808-2008	化学品 鱼类延长毒性14天试验
ST/SG/AC.10/C.4/2002/16	GB/T 21281-2007	危险化学品鱼类急性毒性分级试验方法

3.2 我国对斑马鱼评价技术认可度及相关标准

在我国，自上世纪90年代开始有研究学者采用斑马鱼为模式动物开展有关研究工作。2021年中国发表的斑马鱼相关研究成果占比已经成为全球第一。2011年我国科技部将斑马鱼安全性评价技术列入国家“十二五重大新药创制”科技重大专项2012新增课题的关键技术开发子课题并在后续多年给予持续资助。2020年12月，中国发布了《GB/T 39649-2020实验动物 实验鱼质量控制》，对斑马鱼作为实验动物的要求及质量控制进行了明确规定，为斑马鱼在更多产业的应用奠定了扎实的基础。

随着《化妆品监督管理条例》的颁布和实施，斑马鱼在化妆品产品和原料开发中的应用得到了快速推广和普及。首先，在华南、华东和华北三个化妆品产业最主要的核心区域都有多家斑马鱼技术服务公司服务于化妆品相关研究；其次，云南贝泰妮、广州娇兰、养生堂、雅兰（国际）等化妆品行业头部企业纷纷建立了自己的斑马鱼实验室；第三是斑马鱼技术评价方法的标准建设工作快速推进，目前正式发布的化妆品功效测试斑马鱼实验方法团标已经有10项之多，还有一系列方法标准正在制订之中。表2是目前斑马鱼技术在化妆品领域应用中已发布的团体标准。

表2. 基于斑马鱼技术在化妆品领域的团体标准

序号	团体名称	标准编号	标准名称	状态
1	浙江省健康产品化妆品行业协会	T/ZHCA 012—2021	化妆品美白功效测试 斑马鱼胚胎黑色素抑制功效测试方法	现行
2	广东省毒理学会	T/GDST 1—2021	斑马鱼胚胎急性毒性测试 A法和B法	现行
3	上海日用化学品行业协会	T/SHRH 036—2021	化妆品黑色素抑制测试-斑马鱼胚胎测试方法	现行
4	浙江省健康产品化妆品行业协会	T/ZHCA 014—2022	化妆品抗皱功效评价 斑马鱼幼鱼尾鳍皱缩抑制率法	现行
5	浙江省健康产品化妆品行业协会	T/ZHCA 015—2022	化妆品紧致功效评价 斑马鱼弹性蛋白基因相对表达量法	现行
6	浙江省健康产品化妆品行业协会	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	现行
7	浙江省健康产品化妆品行业协会	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	现行
8	广州开发区黄埔化妆品产业协会	T/HPCIA 007—2022	化妆品 舒敏的测定 斑马鱼胚法	现行
9	广州开发区黄埔化妆品产业协会	T/HPCIA 006—2022	化妆品 温和刺激性的测定 斑马鱼胚法	现行
10	广州开发区黄埔化妆品产业协会	T/HPCIA 005—2022	化妆品 美白功效的测定 斑马鱼胚法	现行
11	广州开发区黄埔化妆品产业协会	T/HPCIA 004—2022	化妆品 急性毒性的测定 斑马鱼胚法	现行

数据来源：全国团体标准信息平台

第四章

斑马鱼技术用于化妆品评价的专利申请统计

以“斑马鱼”为关键词，经过对Patenthub数据库的专利进行统计，结果显示自2003年至2022年5月，斑马鱼相关的专利申报呈持续明显增长的趋势。2003年仅13项，至2021年相关专利申报总数为292项，数量增长了约22倍，由于受疫情影响严重，2022年相关专利申报总数仅为151项。以“斑马鱼 化妆品”为关键词，经过对Patenthub数据库的专利进行统计，结果显示目前国内斑马鱼技术用于化妆品评价的专利有效件数为26例，其中数量占比最多的申请人为南京新环检测科技有限公司，共有6件，其余申请人均为1-2件，详见表3。

表3. 基于斑马鱼技术在化妆品领域的专利申报

序号	名称	申请号	申请人	法律状态
1	利用斑马鱼评价婴童化妆品眼刺激的方法	CN202111180369.1	青蛙王子(福建)婴童护理用品有限公司、华东理工大学	实质审查
2	一种应用斑马鱼鱼胚进行化妆品温和刺激性评价的方法	CN202110135362.1	广州鲁比生物科技有限公司	实质审查
3	利用斑马鱼评价化妆品基础原料对婴幼儿发育毒性的方法	CN202210470208.4	华东理工大学、青蛙王子(福建)婴童护理用品有限公司	实质审查
4	在整体斑马鱼上进行酶联免疫吸附检测的方法及其应用	CN201010547814.9	杭州环特生物科技有限公司	专利转让
5	斑马鱼胚胎在刺激性评价中的应用以及刺激性评价方法	CN202110461701.5	广州山海生物科技有限公司	实质审查
6	一种利用斑马鱼模型评价抗氧化和淡斑亮肤功效的方法	CN202010872184.6	南京新环检测科技有限公司	实质审查
7	一种评价化妆品补水保湿功效的方法	CN202010886966.5	南京新环检测科技有限公司	实质审查
8	一种评价化妆品原料舒缓功效的方法	CN202110486358.X	广州山海生物科技有限公司	实质审查
9	一种评价化妆品对皮肤刺激性的方法	CN202010875617.3	南京新环检测科技有限公司	实质审查

序号	名称	申请号	申请人	法律状态
10	一种评价化妆品抗衰老功效的方法	CN202010898303.5	南京新环检测科技有限公司	实质审查
11	一种评价化妆品和保健食品抗光老化、糖基化功效的方法	CN202010922266.7	南京新环检测科技有限公司	实质审查
12	一种评价化妆品对皮肤炎症舒缓或修复功效的方法	CN202010874695.1	南京新环检测科技有限公司	实质审查
13	瓜蒌、苦杏仁或其复方提取物在制备用于修复光老化损伤的化妆品中的用途	CN202111527704.0	上海小方制药股份有限公司	公开
14	螺旋藻 γ -亚麻酸的新用途	CN201910215558.4	中国科学院水生生物研究所	公开
15	3-(5-噁唑基)苯酚在美白方面的应用及其制备方法	CN201710404071.1	深圳碳希生物科技有限公司、 深圳市聚华太科技有限公司、 深圳百奥捷生物科技有限公司	授权
16	一株产透明质酸的鼠李糖乳杆菌E2及其应用	CN202210394834.X	佛山市朗芯生物科技有限公司、 广东南芯医疗科技有限公司	实质审查
17	一株短双歧杆菌NX-5及其在抗氧化中的应用	CN202110372822.2	广东南芯医疗科技有限公司、 广州悦芯科技有限公司、佛山 市朗芯生物科技有限公司	实质审查
18	化合物Terphenyllin在制备抑制黑色素生成的产品中的应用	CN202011503336.1	厦门大学、自然资源部第三海洋研究所	实质审查
19	一株长双歧杆菌NX-8及其在制备抗衰老药物中的应用	CN202111129046.X	广东一元兰欣生物科技有限公司、 佛山市朗芯生物科技有限公司	实质审查
20	一株产透明质酸的格氏乳杆菌LS03在制备保湿抗皱产品中的应用	CN202210394808.7	佛山市朗芯生物科技有限公司、 广东南芯医疗科技有限公司	实质审查

序号	名称	申请号	申请人	法律状态
21	一种神秘果叶复合物及在抗黑色素形成产品中的应用	CN201911066745.7	中国热带农业科学院南亚热带作物研究所	有权专利
22	一种小檗碱衍生的碳量子点及其制备方法与应用	CN202210573155.9	苏州伊瑞斯科技有限公司	实质审查
23	一种羧甲基壳聚糖衍生碳量子点及其合成方法与应用	CN202210573249.6	苏州伊瑞斯科技有限公司	实质审查
24	银耳修护补水面膜	CN202010438931.5	广东创美抗衰老研究有限公司	实质审查
25	一种基于小型鱼类胚胎的美白效果评价方法	CN201811511740.6	广东工业大学	实质审查
26	用于化妆产品的毒物试验	CN201710427804.3	水中银(国际)生物科技有限公司	实质审查

第五章

斑马鱼技术用于化妆品研究的成果发表

目前，国内外关于斑马鱼在化妆品中应用的报道主要集中在化妆品成分安全性评价和防晒美白原料的功效评价。文献中利用斑马鱼模型建立的化妆品常见评价方法见表4。

表4. 利用斑马鱼模型建立的化妆品常见评价方法

项目评价	评价类型	评价模型	代表性评价指标
安全性	急性胚胎毒性	胚胎	死亡率、孵化率、畸形率、畸形种类
	光毒性	胚胎	死亡率、卵凝结、体节异常等
功效性	美白	胚胎	黑色素含量
	抗炎（祛痘）	胚胎	需对胚胎染色，检测体内ROS
	改善微循环	胚胎	节间血管直径
	祛斑	胚胎	黑色素
	抗氧化	胚胎	ROS生成率，细胞死亡率
	抗光老化	成鱼	尾鳍面积
		原肠早期胚胎	胚胎死亡率，存活率，畸形率
	抗过敏	胚胎	类胰蛋白含量
		幼鱼	断尾处中性粒细胞和巨噬细胞数量
		胚胎	炎症细胞数量
	抗炎舒缓	胚胎	中性粒细胞数量
		胚胎	炎症细胞数量
		胚胎	巨噬细胞数量
		胚胎	存活率，卵黄囊大小
	促进伤口愈合	成鱼	尾鳍生长情况，PCR
		成鱼	中性粒细胞数量
	促进斑痕淡化	成鱼	色素减少量
	促进组织再生	成鱼	尾鳍修复状态：黑色素，新生血管，凋亡细胞
		成鱼	巨噬细胞，坏死细胞
	补水保湿	成鱼	鱼尾皱缩情况
	防晒/晒后修复	成鱼	鱼鳍表型损伤程度

5.1 斑马鱼技术在国际化妆品研究的现状

5.1.1 祛斑美白功效评价

随着美白逐渐成为人们的审美标准，美白产品市场发展十分迅速，此类产品已经成为护肤产品的主流，同时人们也越来越青睐天然温和、安全有效的美白产品。目前对于美白活性物质的研究多用豚鼠皮肤或小鼠黑色素瘤细胞等作为模型，而这些模型均存在不同程度的缺点，例如，豚鼠皮肤成本较高，测试周期长，而小鼠黑色素瘤细胞操作复杂，重现性较低等。

斑马鱼身体的色素表型来源于神经嵴（NeC）衍生的干细胞，通过中间祖细胞分化而成的黑色素细胞（Melanophores）、黄色素细胞（Xanthophores）和虹色细胞（Iridophores）（图1）^[1]。与人类黑色素合成的基因相似，斑马鱼也是几个特定的基因控制着黑色素生成、相关细胞的发育调节。例如SOX10控制小眼相关转录因子（MITF）的转录，MITF是黑色素生成相关酶的表达调节因子，包括酪氨酸酶、TRP-1、TRP-2和Pmel。黑素的形成、转运和代谢是美白祛斑化妆品研究开发的重点，斑马鱼胚胎模型身体表面本身有黑素沉淀，可直接用于黑素抑制效应的评价，可大大简化美白活性成分和美白产品的功效评价实验过程。

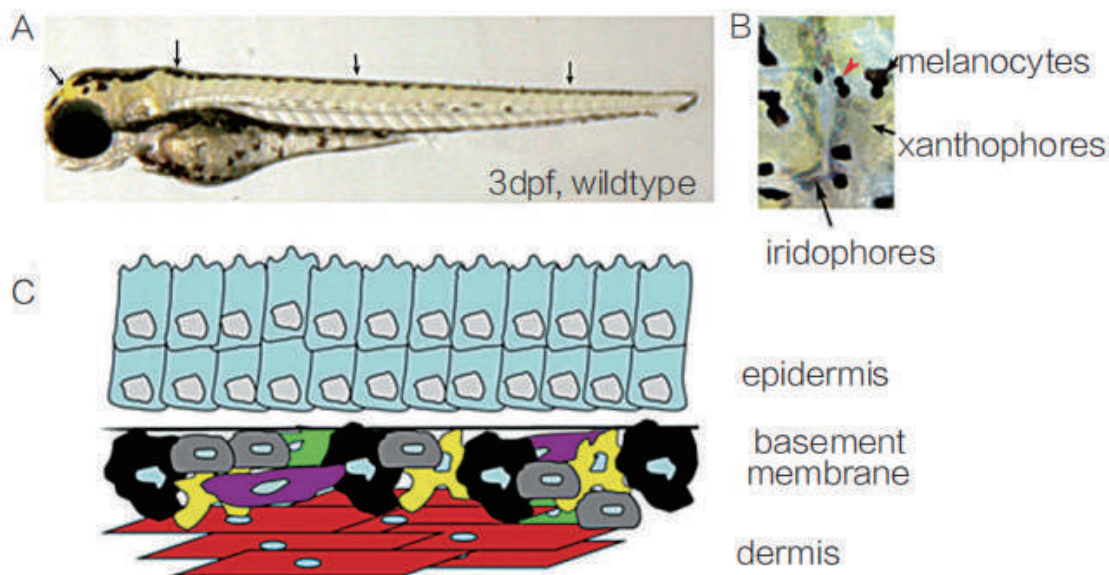


图1 斑马鱼胚胎是研究黑色素细胞发育和美白功效评价的理想模型（A）
3 dpf幼体的侧向图像（放大3倍）；（B）5 dpf斑马鱼头部的背面图像（放
大20倍）；（C）斑马鱼皮肤的层状结构

目前已经有多种美白剂的活性通过其对斑马鱼胚胎中黑素和酪氨酸酶的抑制作用得到证实，例如维A酸、腺苷、曲酸、没食子酸、熊果苷、烟酰胺等。1-苯基-2-硫脲（PTU）是一种含硫的酪氨酸酶抑制剂，常用于抑制黑素的生成，0.2 mmol/L的PTU能够让斑马鱼胚胎保持透明不形成色素，在斑马鱼实验中被广泛应用。Jae Kyoung Chae等^[2]采用斑马鱼模型研究一种木脂素衍生物Gomisin N调节黑素合成的作用，结果显示Gomisin N可有效抑制斑马鱼体内的黑素生成，PTU（1, 10, 100 μmol/L）为阳性对照组（图2）。用浓度为1, 10, 20和30 μmol/L的Gomisin N处理斑马鱼胚胎72 h，然后测量黑素生成的水平，可观察到Gomisin N处理的胚胎以浓度依赖性方式降低黑素含量。

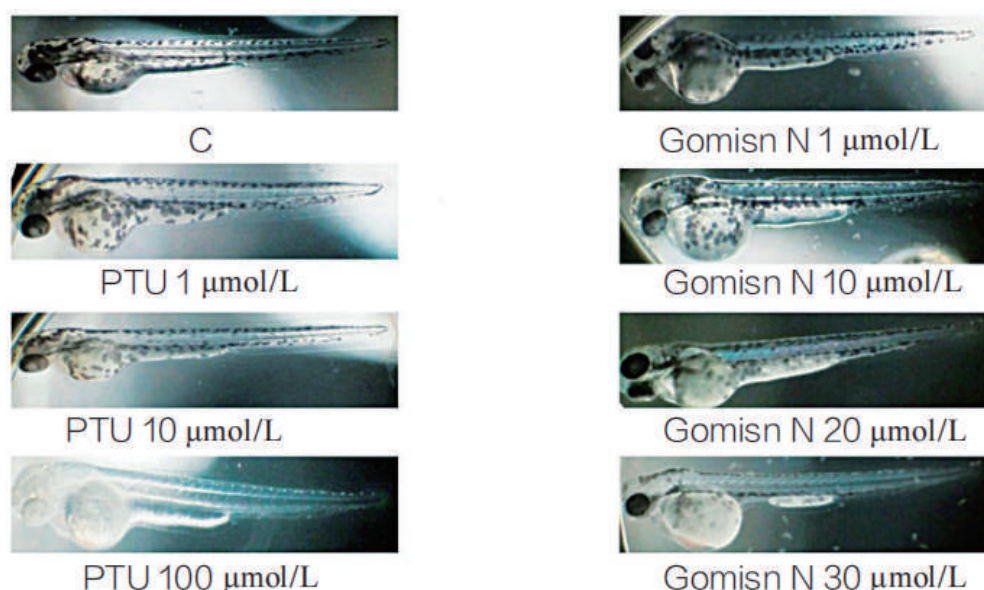


图2 Gomisin N抑制斑马鱼的黑素生成

斑马鱼皮肤中的黑色素调控机制与人类高度一致，且生成速度快，肉眼能在显微镜下清晰观察，配合图像处理技术即可对化妆品减少黑色素的程度和体内酪氨酸酶活性进行定量分析，实现对美白功效的评价。Cha等^[3]通过斑马鱼模型研究发现两种海藻植物腔昆布（EC）和裂叶马尾藻（SS）的提取物有抑制酪氨酸酶活性的作用，有望作为化妆品的美白剂。Lin等^[4]选用斑马鱼体系评价红车轴草中提取出的鹰嘴豆素A的体内安全性和黑色素抑制效应，证实88mol/L鹰嘴豆素A不具有毒性，且其黑素抑制和酪氨酸酶抑制效应较为明显。

CHEN等^[5]选择了莽草酸途径中的8种化合物：苯甲酸、对香豆酸、香草酸、丁香酸、奎宁酸、莽草酸、一水合橙酚和苯基丙酮酸，以斑马鱼为动物模型，验证了莽草酸途径中合成化合物的美白能力。实验结果表明，与熊果苷相比，这些化合物能够减少斑马鱼胚胎的色素沉着面积。在较高浓度（

500 μ mol/L) 下, 莽草酸对酪氨酸酶的抑制作用达到78.1 $\pm$ 5.0%。说明在本研究中使用的8种莽草酸途径化合物中, 莽草酸是最有效的酪氨酸酶抑制剂, 也是最有效的作为皮肤美白活性成分的化合物。

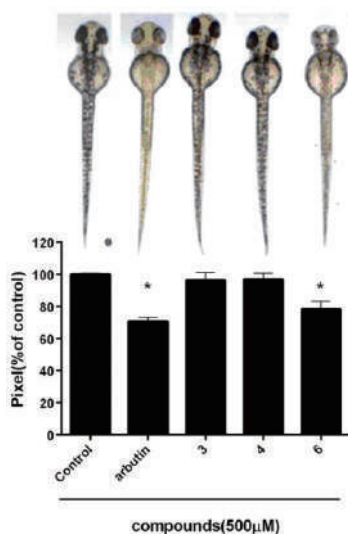


图3. 8种莽草酸途径化合物对500 μ M时斑马鱼色素沉着的影响。以熊果苷为对照组。

化合物1、2、5、7、8均无明显影响。

Chen等^[6]合成了具有潜在抑制酪氨酸酶能力的新型曲酸衍生物(KADs), 并通过评估B16F10细胞和斑马鱼模型中黑色素含量和细胞内酪氨酸酶活性的抑制, 进一步证实了KAD2的抗黑色素生成活性。结果表明, KAD2可以抑制斑马鱼体内的色素沉着。

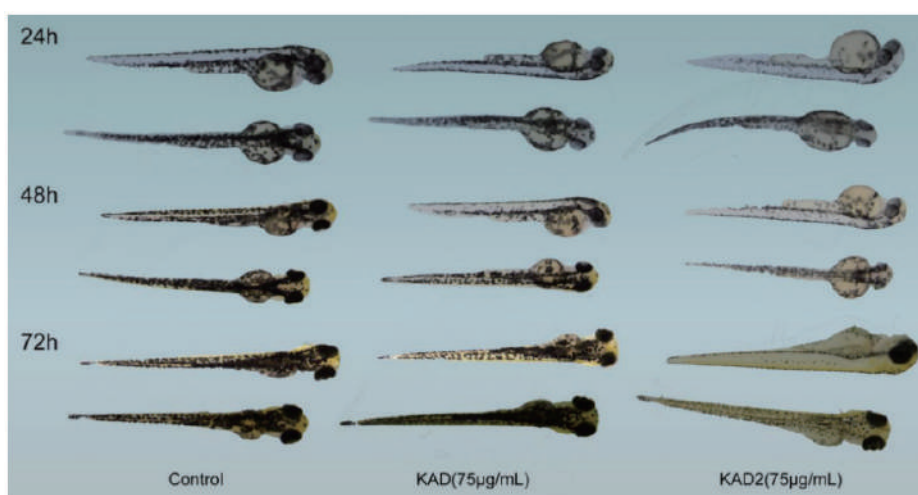


图4. KAD2对斑马鱼色素沉着的影响

Baek等^[7]研究了从芝麻中分离的芝麻酚在黑素细胞及斑马鱼中的抗黑色素形成作用。结果发现，芝麻酚通过减少环磷酸腺苷（cAMP）的积累，强烈抑制黑色素的生物合成和细胞内酪氨酸酶的活性。芝麻醇显著降低了黑素生成相关基因的表达，如酪氨酸酶、酪氨酸酶相关蛋白1、2（TRP-1、2）、小眼症相关转录因子（MITF）和黑素皮质激素1受体（MC1R）。此外，芝麻醇还能诱导p38丝裂原活化蛋白激酶（p38MAPK）和c-JunN端激酶（JNK）的磷酸化。此外，芝麻酚剂量依赖性地减少斑马鱼色素形成、酪氨酸酶活性和黑素生成相关基因的表达。这些发现表明，芝麻酚通过调节MITF调节黑素生成相关蛋白的基因表达来下调酪氨酸酶活性和黑素生成，从而抑制黑素合成其促进了melan-a细胞中p38和JNK的磷酸化。

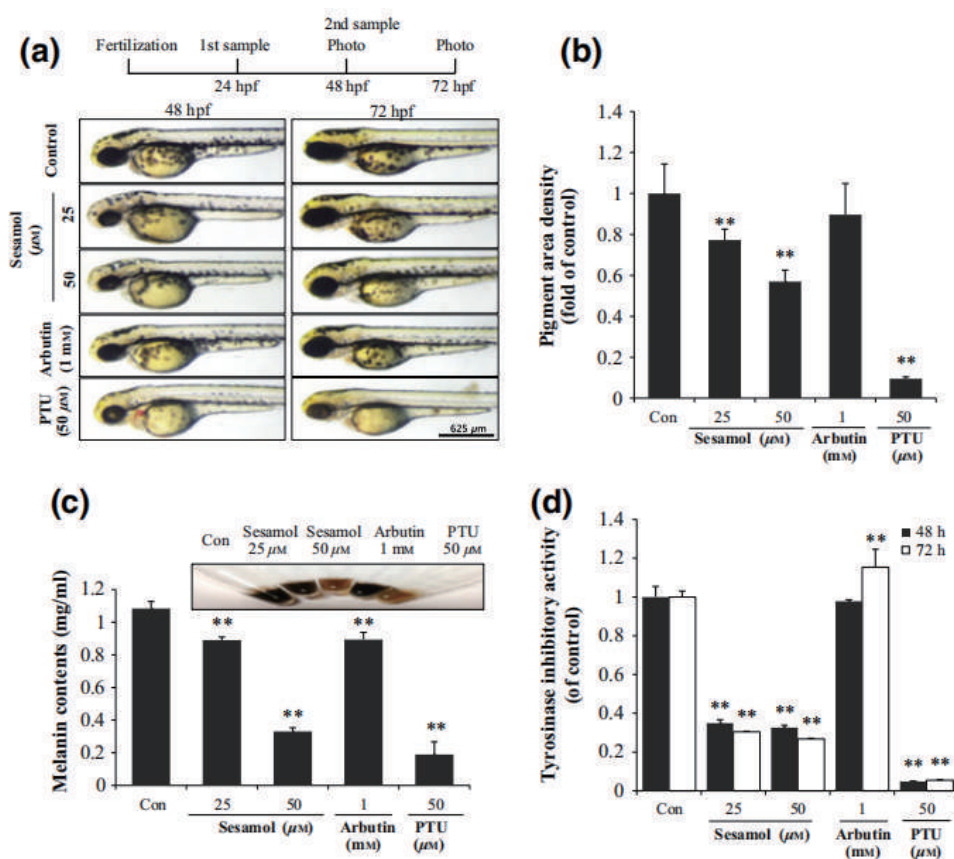


图4. 芝麻醇对斑马鱼黑素生成的影响。(a) 观察受精后48和72小时胚胎对斑马鱼色素沉着的影响。(b) 使用ImageJ软件将色素面积密度归一化为对照胚胎。(c) 收集约200个胚胎，并在裂解缓冲液中溶解。离心后，用1N氢氧化钠溶解黑色素。总黑色素含量采用合成黑色素进行定量。(d) 为了测定酪氨酸酶活性，将250 lg总蛋白与L-3,4-二羟基苯丙氨酸（最终浓度为5 mM）在37°C下孵育1小时，并使用(d). 光谱仪进行定量数值用三次重复测定的平均标准差表示。**P<与对照组相比为0.01。

参考文献

- [1] COOPER C D. Insights from zebrafish on human pigment cell disease and treatment[J]. *Developmental Dynamics*, 2017, 246(11): 889-896.
- [2] CHAE J, SUBEDI L, JEONG M, et al. Gomisins N inhibits melanogenesis through regulating the PI3K/Akt and MAPK/ERK signaling pathways in melanocytes[J]. *International journal of molecular sciences*, 2017, 18(2): 471.
- [3] CHA S H, KO S C, KIM D, et al. Screening of marine algae for potential tyrosinase inhibitor: those inhibitors reduced tyrosinase activity and melanin synthesis in zebrafish[J]. *J Dermatol*, 2011, 38(4):354-363.
- [4] LIN VC, DING HY, TSAI PC, et al. In vitro and in vivo melano-genesis inhibition by biochanin A from *Trifolium pratense*[J]. *Biosci Biotech Biochem*, 2010, 75(5): 914-918.
- [5] Chen YH, Huang L, Wen ZH, Zhang C, Liang CH, Lai ST, Luo LZ, Wang YY, Wang GH. Skin whitening capability of shikimic acid pathway compound. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2016;20(6):1214-20. PMID: 27049279.
- [6] Chen YM, Su WC, Li C, Shi Y, Chen QX, Zheng J, Tang DL, Chen SM, Wang Q. Anti-melanogenesis of novel kojic acid derivatives in B16F10 cells and zebrafish. *Int J Biol Macromol*. 2019 Feb 15;123:723-731. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2018.11.031. Epub 2018 Nov 7. PMID: 30414415.
- [7] Baek SH, Lee SH. Sesamol decreases melanin biosynthesis in melanocyte cells and zebrafish: Possible involvement of MITF via the intracellular cAMP and p38/JNK signalling pathways. *Exp Dermatol*. 2015 Oct;24(10):761-6. doi: 10.1111/exd.12765. Epub 2015 Jul 14. PMID: 26010596; PMCID: PMC4744993.

5.1.2 抗氧化功效评价

氧化应激是氧化剂和抗氧化剂之间的失衡，主要由ROS引起，可能导致细胞损伤^[8]。细胞氧化损伤的累积会导致各种疾病，如炎症、心血管疾病、糖尿病、肥胖症和异常衰老^[9]。因此，抑制氧化应激被认为是预防这些疾病以及对抗衰老的策略。

从海藻中制备的硫酸多糖是营养食品、制药和化妆品工业中的潜在成分。**Wang等**^[10]使用斑马鱼模型研究了硫酸多糖的体内抗氧化活性。结果显示，硫酸多糖有效地改善了AAPH引起的热跳动障碍，并且显著抑制了AAPH刺激的斑马鱼的ROS生成、细胞死亡和脂质过氧化，所有效应均呈剂量依赖性。这些结果表明，硫酸多糖具有强大的体外和体内抗氧化活性，并表明硫酸多糖具有抗衰老的潜力。

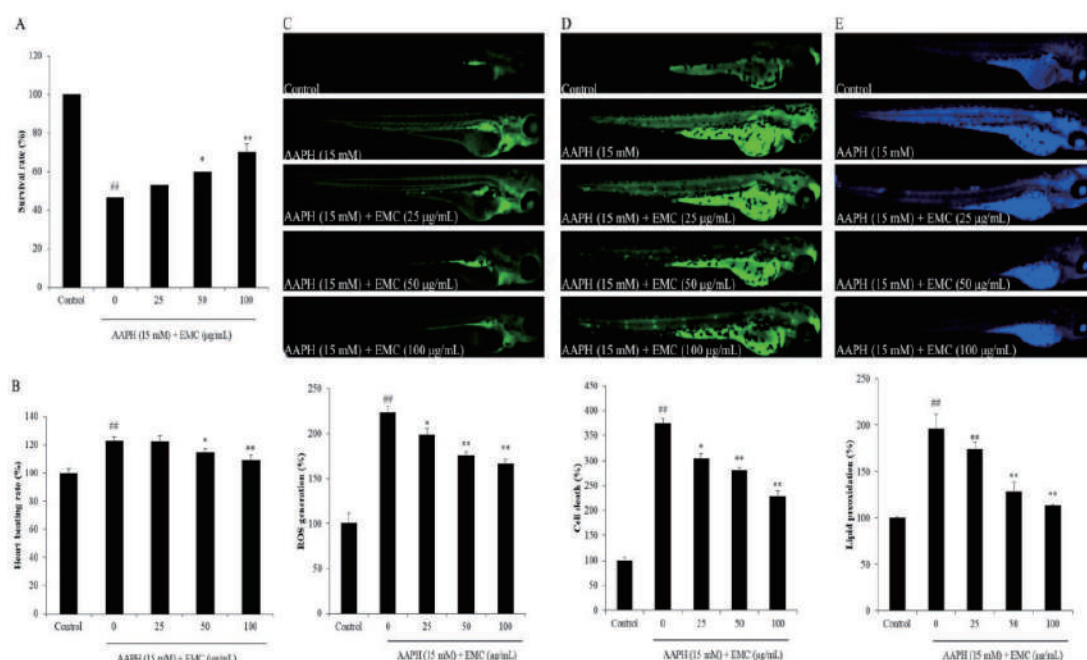


图3. EMC减轻斑马鱼体内AAPH诱导的氧化损伤。(A) 斑马鱼存活率；(B) 斑马鱼心率；(C) AAPH刺激斑马鱼的细胞内ROS生成；(D) AAPH刺激斑马鱼细胞死亡；(E) AAPH刺激的脂质过氧化斑马鱼。使用IMAGE J软件测定整个斑马鱼体的相对荧光强度。实验分三次进行，数据表示为平均值±SE。*与AAPH治疗组相比， $P<0.05$ ，** $P<0.01$ ，与对照组相比。

Kang等^[11]研究了从马尾藻中分离的硫酸多糖（PS-4）对细胞和斑马鱼氧化应激的保护作用。首先，采用了多种酶提取方法，包括5种酶和四种蛋白酶。在酶提取物中，红葡萄球菌辅助提取物（STC）对过氧化氢（H₂O₂）的清除活性最强。从STC中分离出5个多糖（PS-1~5），采用离子交换柱层析纯化。然后评价了这些组分的抗氧化活性。PS-4具有最强的清除自由基和抗氧化活性。PS-4的硫酸盐多糖含量高于STC。因此，硫酸盐多糖比例的增加可能是由于在细胞系和斑马鱼中对H₂O₂介导的细胞损伤和氧化应激的保护作用。这些结果表明，PS-4可能是功能性食品和化妆品中的一种有效的抗氧化剂。

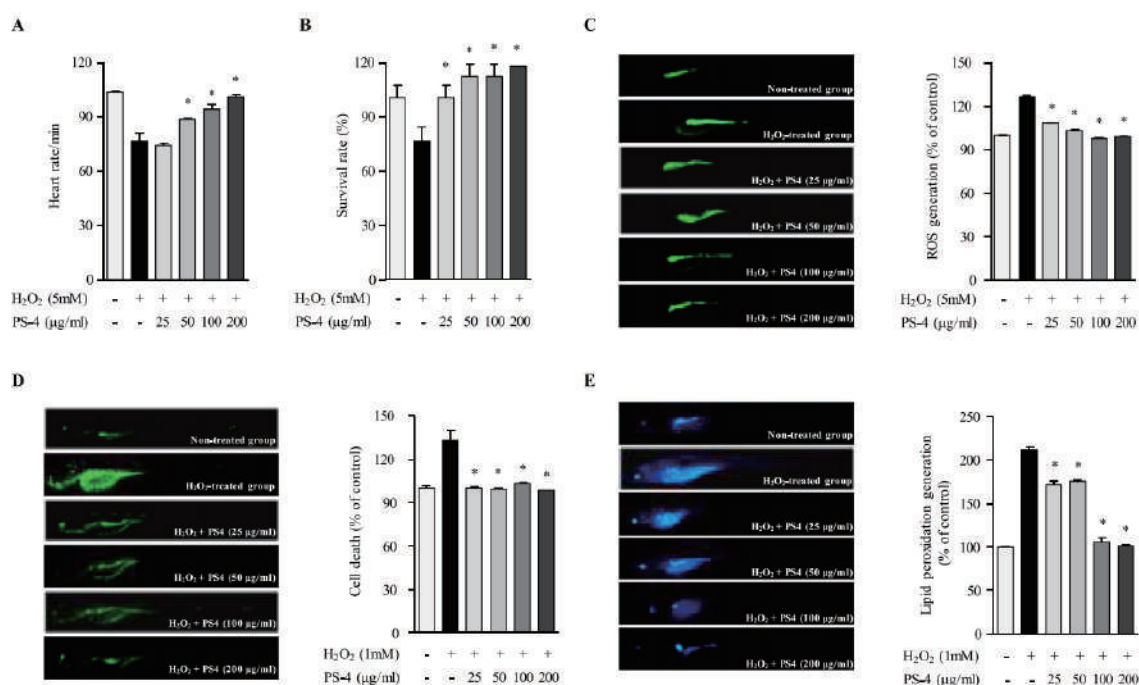


图4. PS-4对H₂O₂诱导的斑马鱼心率(A)和存活率(B)改变的影响。PS-4对H₂O₂诱导的斑马鱼ROS生成(C)、细胞死亡(D)和脂质过氧化(E)的抑制作用。使用荧光分光光度计定量分析ROS、细胞死亡和脂质过氧化水平。实验重复进行了3次，数据用平均±SE表示。

*P < 0.05.

参考文献

- [8] D'Angelo, G.; Chimenz, R.; Reiter, R.J.; Gitto, E. Use of Melatonin in Oxidative Stress Related Neonatal Diseases. *Antioxidants* 2020, 9, 477.
- [9] Wang, L.; Oh, J.Y.; Kim, H.S.; Lee, W.; Cui, Y.; Lee, H.G.; Kim, Y.-T.; Jeon, Y.-J.; Ko, J.Y. Protective effect of polysaccharides from Celluclast-assisted extract of *Hizikia fusiforme* against hydrogen peroxide-induced oxidative stress in vitro in Vero cells and in vivo in zebrafish. *Int. J. Biol. Macromol.* 2018, 112, 483–489.
- [10] Wang L, Jayawardena TU, Yang HW, Lee HG, Jeon YJ. The Potential of Sulfated Polysaccharides Isolated from the Brown Seaweed *Ecklonia maxima* in Cosmetics: Antioxidant, Anti-melanogenesis, and Photoprotective Activities. *Antioxidants (Basel)*. 2020 Aug 9;9(8):724. doi: 10.3390/antiox9080724. PMID: 32784879; PMCID: PMC7465393.
- [11] Kang MC, Lee H, Choi HD, Jeon YJ. Antioxidant properties of a sulfated polysaccharide isolated from an enzymatic digest of *Sargassum thunbergii*. *Int J Biol Macromol.* 2019 Jul 1;132:142-149. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2019.03.178. Epub 2019 Mar 26. PMID: 30926508.

5.1.3 抗光老化功效评价

紫外线照射被认为是导致皮肤损伤的主要因素。过度暴露于紫外线会导致晒伤、红斑、皱纹、色素沉着和皮肤癌^[12,13]。紫外线B（UVB）是紫外线的一种亚型，被认为比其他亚型紫外线对皮肤造成更大的压力。UVB通过刺激细胞内ROS生成，导致表皮和皮肤损伤^[14,15]。UVB辐射导致活性氧（ROS）的过度积累，进而促进炎症、细胞外基质的降解和皮肤中的光老化。此外，紫外线也是导致面部色素沉着的主要外部因素，而UVB是影响黑素细胞中黑色素合成和运输的主要途径。

Cheng等^[16]等利用斑马鱼模型评估了紫草树叶提取物对UV引起皮肤损伤的化学防护能力，证实紫草提取物具有降低吸收紫外线和降低ROS浓度的能力，从而减少UV介导的细胞凋亡，并据此认为紫草树叶提取物有开发作为UV保护剂的潜力。

Wang等^[17]为了研究EMC的光保护作用，在斑马鱼模型中研究了硫酸多糖对UVB诱导的皮肤损伤的影响。结果显示，UVB照射显著诱导斑马鱼的细胞内ROS生成、细胞死亡、NO生成和脂质过氧化。然而，硫酸多糖显著降低了UVB照射斑马鱼的细胞内ROS水平，降低了细胞死亡水平，抑制了NO生成，并减轻了脂质过氧化，且所有实验均呈现剂量依赖性。结果表明，硫酸多糖在斑马鱼体内具有强烈的光保护作用。

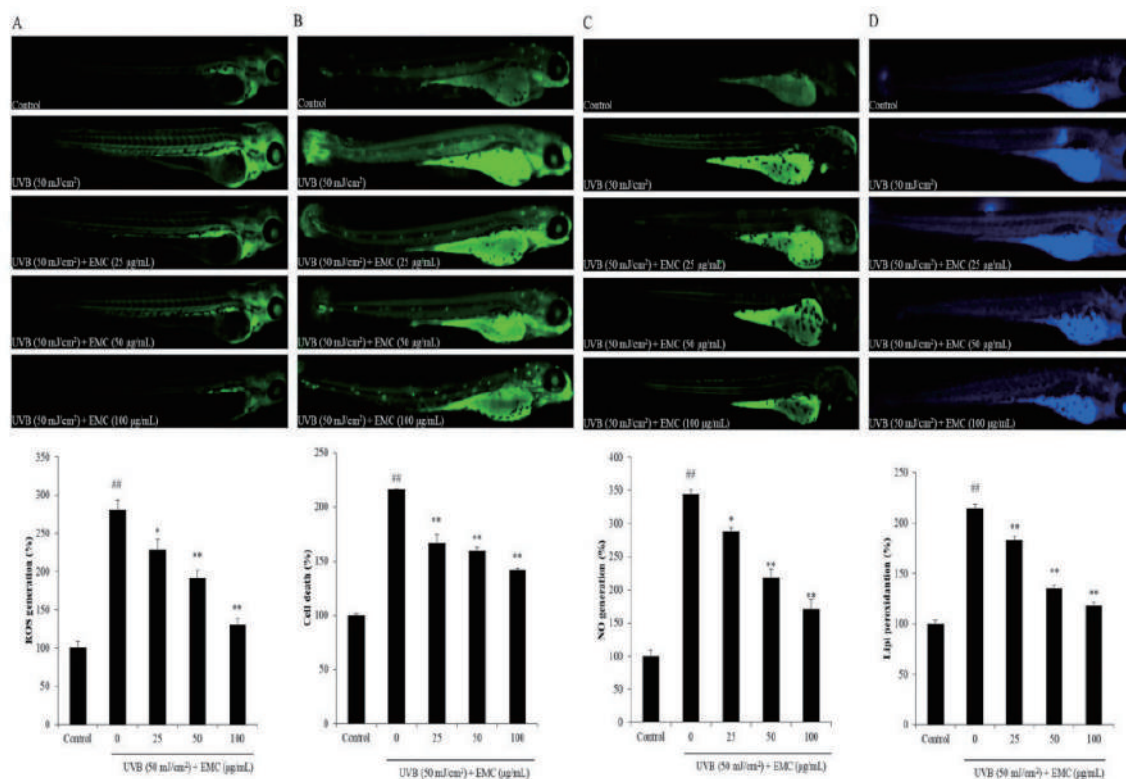


图8. EMC保护斑马鱼免受UVB引起的损害。(A) UVB照射斑马鱼产生ROS；(B) 细胞死亡；(C) NO产生；和(D) 脂质过氧化。使用Image J软件测定整个斑马鱼体的相对荧光强度。实验分三次进行，数据表示为平均值±SE。与UVB照射组相比，*P<0.05，**P<0.01，与对照组相比，#P<0.01。

Dai等^[18]筛选了从三种人参（白、红、黑人参）中分离的21个组分，研究了目标组分在斑马鱼模型中对紫外线介导的细胞凋亡的保护作用和酪氨酸酶的抑制活性。在所有组分中，白人参中的F10具有最强的抗紫外线和抗黑素生成活性，其对斑马鱼的色素沉着具有良好的抑制作用，这可能是由于其潜在的酪氨酸酶抑制活性所致。这些研究结果表明，F10可以作为美白化妆品的一种成分，并在未来被视为一种抗紫外线过滤器。

海洋鱼类衍生的生物活性肽由于其潜在的皮肤效益，已成为化妆品和功能性食品工业的一种趋势。Chen等^[19]研究了鲟鱼皮肤胶原蛋白水解物对斑马鱼UVB照射诱导的光损伤的影响。结果发现，鲟鱼皮肤胶原蛋白水解物可减轻UVB辐射引起的氧化损伤，在斑马鱼UVB辐射模型中，鲟鱼皮肤胶原蛋白水解物能够修复UVB照射引起的斑马鱼皮肤损伤，具体表现为UVB修复活性、ROS清除活性、DNA损伤保护活性和凋亡抑制活性。

灵芝多糖（GLP）是一种无毒副作用的天然抗氧化剂，可拮抗UVB诱导的成纤维细胞光老化。Hu等^[20]探讨了灵芝多糖在抑制UVB诱导的黑素生成中的作用及其可能的机制。结果表明，灵芝多糖可以下调UVB诱导的黑素生成相关基因的表达，抑制UVB活化蛋白激酶A（PKA）和丝裂原活化蛋白激酶（MAPK）的信号通路。此外，灵芝多糖可以保护线粒体免受UVB损伤，并抑制活性氧（ROS）的产生。此外，UVB诱导的环磷酸腺苷（cAMP）也可以被抑制。

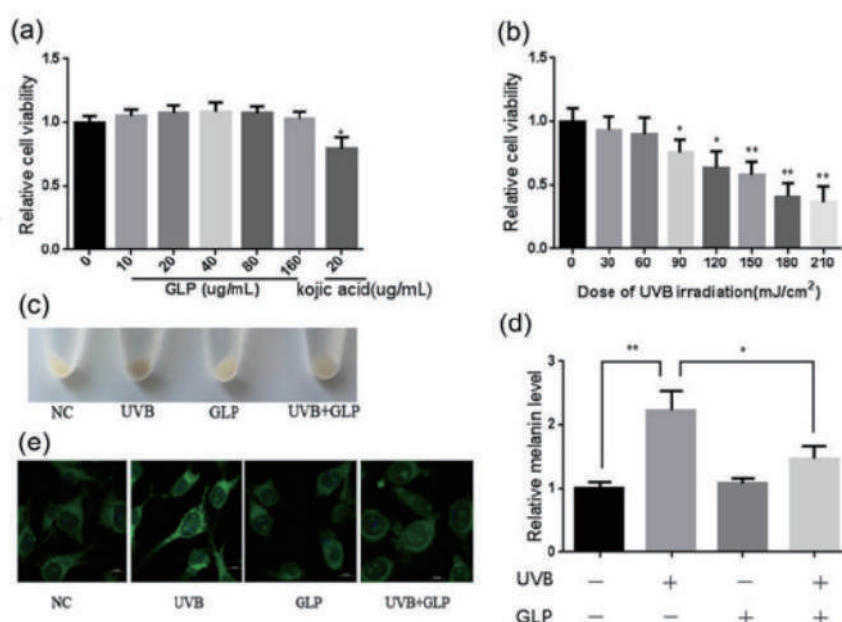


图1 GLP拮抗uvb诱导的黑素生成。GLP和焦酸对B16F10细胞(a) 的毒性作用MTT法检测

24小时照射后不同剂量UVB对细胞的毒性作用用20mJ/cm2UVB×3d（总剂量为60 mJ/ cm2）、40 MG/ML GLP或UVB + GLP处理B16F10细胞。(c)离心后观察细胞颜色，氢氧化钠法测定黑色素含量用NK1-beteb抗体标记黑素小体，用免疫荧光法观察黑素小体的分布(e)。GLP：灵芝多糖；

MTT：甲基噻唑基四唑；UVB：紫外光B

参考文献

- [12] Wang, L.; Ryu, B.; Kim, W.-S.; Kim, G.H.; Jeon, Y.-J. Protective effect of gallic acid derivatives from the freshwater green alga *Spirogyra* sp. against ultraviolet B-Induced apoptosis through reactive oxygen species clearance in human keratinocytes and zebrafish. *Algae* 2017, 32, 379–388.
- [13] Wang, L.; Kim, H.S.; Oh, J.Y.; Je, J.G.; Jeon, Y.-J.; Ryu, B. Protective effect of diphlorethohydroxycarmalol isolated from *Ishige okamurae* against UVB-induced damage in vitro in human dermal fibroblasts and in vivo in zebrafish. *Food Chem. Toxicol.* 2020, 136, 110963.
- [14] Wang, L.; Oh, J.Y.; Yang, H.-W.; Kim, H.S.; Jeon, Y.-J. Protective effect of sulfated polysaccharides from a Celluclast-assisted extract of *Hizikia fusiforme* against ultraviolet B-Induced photoaging in vitro in human keratinocytes and in vivo in zebrafish. *Mar. Life Sci. Technol.* 2019, 1, 104–111.
- [15] Wang, L.; Lee, W.W.; Oh, J.-Y.; Cui, Y.R.; Ryu, B.; Jeon, Y.-J. Protective Effect of Sulfated Polysaccharides from Celluclast-Assisted Extract of *Hizikia fusiforme* Against Ultraviolet B-Induced Skin Damage by Regulating NF- κ B, AP-1, and MAPKs Signaling Pathways In Vitro in Human Dermal Fibroblasts. *Mar. Drugs* 2018, 16, 239.
- [16] CHENG CC, CHOU CY, CHANG YC, et al. Protective role of comfrey leave extracts on UV induced zebrafish fin damage[J]. *J Toxicol Pathol*, 2014, 27(2): 115-121.
- [17] Wang L, Jayawardena TU, Yang HW, Lee HG, Jeon YJ. The Potential of Sulfated Polysaccharides Isolated from the Brown Seaweed *Ecklonia maxima* in Cosmetics: Antioxidant, Anti-melanogenesis, and Photoprotective Activities. *Antioxidants (Basel)*. 2020 Aug 9;9(8):724. doi: 10.3390/antiox9080724. PMID: 32784879; PMCID: PMC7465393.
- [18] Dai YL, Yang D, Song LH, Yang HM, Yu JB, Zheng F, Yue H, Chen CB, Wang EP. Low Molecular Weight Oligosaccharide from *Panax ginseng* C.A. Meyer against UV-Mediated Apoptosis and Inhibits Tyrosinase Activity In Vitro and In Vivo. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2021 Feb 26;2021:8879836.

- [19]Chen B, Yu L, Wu J, Qiao K, Cui L, Qu H, Su Y, Cai S, Liu Z, Wang Q. Effects of Collagen Hydrolysate From Large Hybrid Sturgeon on Mitigating Ultraviolet B-Induced Photodamage. *Front Bioeng Biotechnol.* 2022 Jun 27; 10:908033. doi: 10.3389/fbioe.2022.908033. PMID: 35832410; PMCID: PMC9271680.
- [20] Hu S, Huang J, Pei S, Ouyang Y, Ding Y, Jiang L, Lu J, Kang L, Huang L, Xiang H, Xiao R, Zeng Q, Chen J. Ganoderma lucidum polysaccharide inhibits UVB-induced melanogenesis by antagonizing cAMP/PKA and ROS/MAPK signaling pathways. *J Cell Physiol.* 2019 May;234(5):7330-7340.

5.1.4 抗炎舒缓功效评价

炎症是一种复杂的宿主对刺激和毒性条件的保护反应，被认为是一把双刃剑。**Wang等**^[21]研究了硫酸化日本糖多糖的抗炎作用。硫酸化日本糖多糖对脂多糖（LPS）诱导的RAW 264.7巨噬细胞和斑马鱼的炎症具有显著的抑制作用。体外实验表明，硫酸化日本糖多糖通过下调诱导型一氧化氮合酶（iNOS）和环氧合酶-2（COX-2）的表达，显著抑制一氧化氮（NO）和前列腺素E2（PGE2）的生成，并通过核因子κB（NF-κB）和LPS诱导的RAW 264.7细胞中丝裂原活化蛋白激酶（MAPK）信号通路。此外，硫酸化日本糖多糖对LPS诱导的斑马鱼炎症反应表现出强烈的保护作用，提高了存活率，降低了心率和卵黄囊水肿的大小，并抑制了细胞死亡和细胞内活性氧（ROS）和NO的产生。其大规模生产的便利性和显著的抗炎活性表明了硫酸化日本糖多糖在功能性食品、化妆品和制药行业的潜在应用。

参考文献

- [21]Wang S, Ni L, Fu X, Duan D, Xu J, Gao X. A Sulfated Polysaccharide from Saccharina japonica Suppresses LPS-Induced Inflammation Both in a Macrophage Cell Model via Blocking MAPK/NF-κB Signal Pathways In Vitro and a Zebrafish Model of Embryos and Larvae In Vivo. *Mar Drugs.* 2020 Nov 26;18(12):593. doi: 10.3390/md18120593. PMID: 33255947; PMCID: PMC7760670.

5.1.5 安全性评价

化妆品中添加的成分越来越复杂，其对皮肤可能产生的安全风险也在不断升高，如接触性皮炎、皮肤色素异常、痤疮及毛发损害等。在美白原料研究开发阶段，需要对测试物质进行安全性和毒理性评价。斑马鱼的胚胎透明、柔软，可直接活体观察；外源物质的吸收容易，暴露方式简单，通常情况下都是将药物溶解到培养水体或注射至胚胎中；斑马鱼胚胎具有较强的生物敏感性，毒性物质易使其致畸或死亡，且不同致畸部位的敏感性不同，在胚胎期，可观察化合物作用下的卵凝结、体节形成、尾部延展、心跳、色素沉着、孵化率、畸形率等。因此，斑马鱼以其独特的优势已经越来越多地用于新原料开发，功效成分、动植物提取物、防腐抗菌剂、防晒剂等化妆品成分安全性的评价中。

(1) 急性胚胎毒性评价

在化妆品的安全性评估方面，可以用斑马鱼的胚胎来验证化妆品的急性胚胎毒性。将斑马鱼胚胎暴露于不同剂量的化妆品中，观察死亡率、畸形率、畸形形态以及胚胎的孵化率，通过计算半数致死浓度（LC50）、半数致畸浓度（EC50）、致畸指数（TI）等指标来探讨其对斑马鱼胚胎和幼鱼的急性毒性^[23]。Liu等^[24]利用斑马鱼体内模型检测球形红细菌提取物（LycogenTM）的生物毒性，结果显示浓度高达100 $\mu\text{mol/L}$ 的LycogenTM不会对斑马鱼产生毒性。也可以对斑马鱼整体观察评价，观察斑马鱼各器官如心脏、脑部、鳍、身体水肿、出血、着色等毒性反应情况，统计毒性发生率，验证供试品对斑马鱼的胚胎毒性情况^[25]。

参考文献

-
- [23] FORSBY A, NORMAN K G, ANDALOUSSI-LILJA J E, et al. Using novel in vitro nociceptive assay based on TRPV1 channel activation for prediction of eye sting potential of baby shampoos[J]. Toxicol Sci, 2012, 129 (1): 325-331.
- [24] LIU WS, KUANG YD, CHIU KH, et al. The extract of Rhodospirillum rubrum inhibits melanogenesis through the MEK/ERK signaling pathway[J]. Mar Drugs, 2013, 11(6): 1899-1908.
- [25] BABU MA, SHAKYA N, PRATHIPATI P, et al. Development of 3D-QSAR models for 5-lipoxygenase antagonists: chalcones[J]. Bioorgan Med Chem, 2002, 10(12): 4035-4041.

（2）刺激性评价

刺激性物质作用于机体后可能引发机体产生刺激、过敏等一系列的生理、生化反应，其中最主要的是刺激反应^[1]，可导致水肿、红斑、瘙痒、疼痛等症状。刺激性成分对皮肤的刺激性作用主要是通过诱发炎症反应的通路来实现的，炎症反应的产生将使机体产生免疫应答，各种免疫细胞在趋化因子的作用下向表皮炎症发生的部位迁移、聚集，其中中性粒细胞的敏感性和特异性最强。

斑马鱼的先天免疫系统与哺乳动物非常相似，与大多数人类免疫细胞类型相对应。斑马鱼的先天免疫系统在受精后24小时（hpf）就开始发育，然后在32-48 hpf出现中性粒细胞^[2]。斑马鱼胚胎的中性粒细胞和人体中性粒细胞在形态、生化和生理功能上高度相似。受到外界刺激后，免疫反应的发生将导致中性粒细胞致免疫细胞的迁移和聚集^[3,4]。利用转基因荧光标记技术将斑马鱼体内中性粒细胞进行荧光标记，当刺激性物质接触到斑马鱼皮肤时，诱导炎症反应，中性粒细胞发生免疫应答，向皮肤表皮迁移并聚集。通过观察中性粒细胞的迁移、聚集数量可以反应其刺激性作用的强弱。

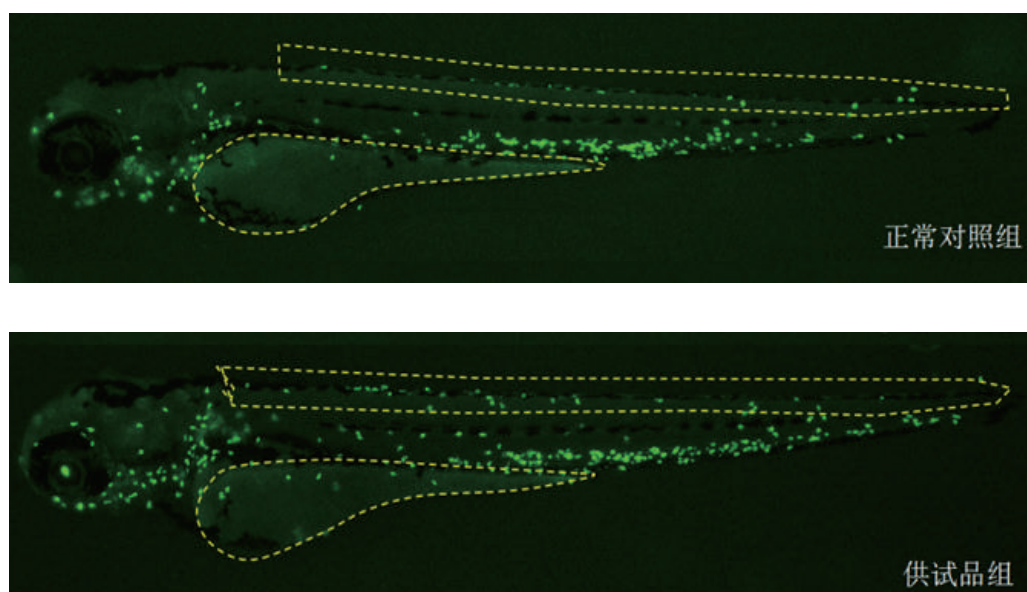


图1. 斑马鱼皮肤中性粒细胞表型图

黄色虚线区域为计算区域

参考文献

- [1] Welss T, Basketter D A, Schroder K R. In vitro skin irritation: facts and future. State of the art review of mechanisms and models[J]. Toxicology In Vitro, 2004, 18(3): 231-243.
- [2] Novoa B, Figueras A. Zebrafish: Model for the study of inflammation and the innate immune response to infectious diseases[J]. Oxygen Transport to Tissue XXXIII, 2012, 946(946): 253-275.
- [3] Hasegawa T, Hall C J, Crosier P S, et al. Transient inflammatory response mediated by interleukin-1 β is required for proper regeneration in zebrafish fin fold[J]. eLife, 2017, 6, e22716.
- [4] Oliveira S D, Reyes-Aldasoro C C, Candel S, et al. Cxcl8 (IL-8) Mediates Neutrophil Recruitment and Behavior in the Zebrafish Inflammatory Response[J]. Journal of Immunology, 2013, 190(8):4349-4359.

5.2 斑马鱼技术在国内化妆品研究的现状

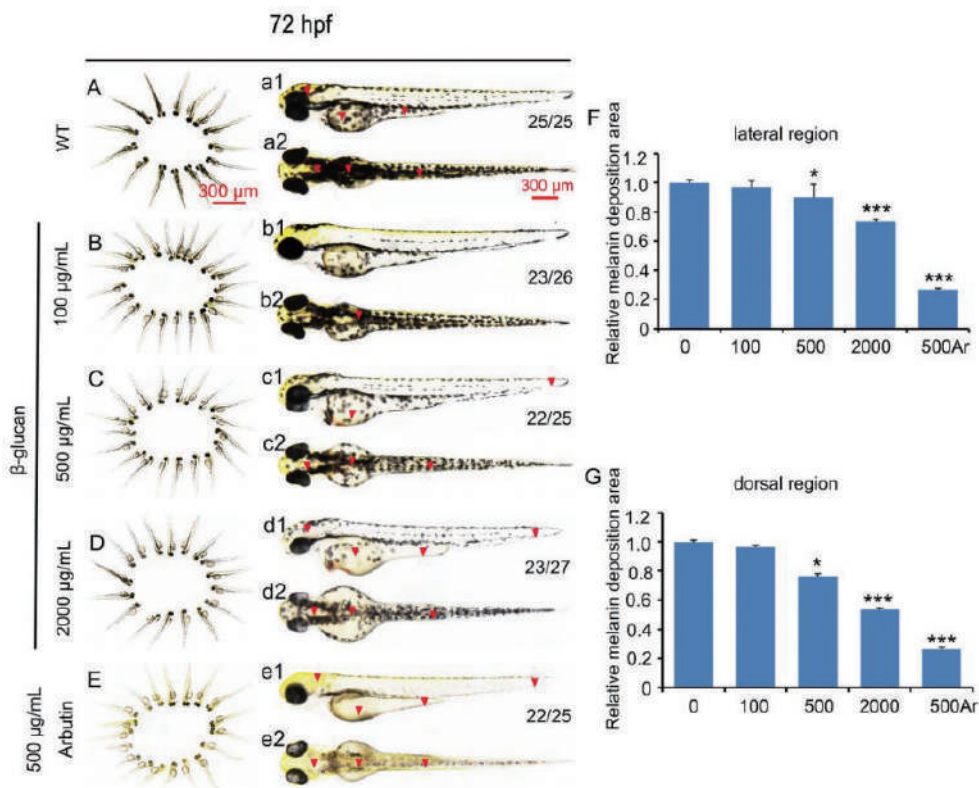
5.2.1 祛斑美白功效评价

斑马鱼体表具有色素，其色素是由来源于神经嵴的三种类型的色素细胞产生的。这些细胞包括载黑素细胞、黄色素细胞和虹细胞。黄色素细胞和虹细胞结合形成了微黄色的条纹，载黑素细胞最终形成了表皮上的纵向黑色条纹^[1-3]。斑马鱼的黑色素形成首先开始于视网膜色素上皮细胞，随后黑色素细胞在背部外侧沉着；皮肤上的黑色素大约在24h就可以观察到，而酪氨酸酶基因的转录和翻译发生在早期，在视网膜色素上皮细胞形成可见色素之前7 h就可以检测酪氨酸酶mRNA的表达，在皮肤上形成可见色素之前的3h就可以检测其酪氨酸酶的酶活性^[4-6]。鉴于斑马鱼黑色素生成较快，小分子能渗透且具有操作较容易等特点，许多研究用斑马鱼作为模型进行筛选和研究影响黑色素生成的化合物。

熊果苷作为从杜鹃花科植物熊果叶中分离出来的天然活性美白物质，在化妆品中有广泛的应用^[7-8]。陆彬等^[9]以斑马鱼胚胎为模型，采用半静态暴露的方式，探讨了美白化学品熊果苷对黑色素合成的抑制效果。定性观察表明，随着熊果苷浓度的增加，其对黑色素生成的抑制明显增强。基因表达分析表明，熊果苷通过对眼皮肤白化病II型(OCA2)、酪氨酸酶(TYR)和银色毛发(SILV)等黑色素合成相关基因的抑制，进而抑制了黑色素的合成。实验结果解释了熊果苷在黑色素抑制过程中的作用机理，为斑马鱼胚胎模型在美白物质筛选中的应用提供了基础。

李春启等^[10]发现舒洛地尔可以有效地抑制黑色素形成，并能彻底分解黑色素使之不可恢复，具有诱导黑色素细胞凋亡的能力，有可能起到彻底的祛斑美白效果。实验使用斑马鱼对不同浓度舒洛地尔的黑色素抑制效应进行评价，发现舒洛地尔对斑马鱼黑色素的抑制效应呈现浓度梯度变化，其中10μM舒洛地尔能有效地抑制斑马鱼黑色素的形成。进一步研究表明，舒洛地尔可以与赋形剂按照不同的比例混合制成不同类型的祛斑化妆品。

许璟瑾^[11]以斑马鱼为动物模型，对双孢蘑菇来源的β-葡聚糖在抑制黑色素形成的作用机制进行了探究。本研究证明β-葡聚糖处理可以明显抑制斑马鱼幼鱼以及成鱼体表黑色素的沉积；且β-葡聚糖处理可以抑制tyr、tyrp1b、dct和silv mRNA水平；此外，Western Blot和酶活性检测结果表明β-葡聚糖能够抑制酪氨酸酶(TYR)、酪氨酸酶相关蛋白2(TRP2)和银色毛发(SILV)等关键蛋白的表达。并且能通过抑制酪氨酸酶活性从而抑制黑色素形成。为β-葡聚糖在美白产品领域的开发和应用方面提供了有力支撑。

图. 检测 β -glucan对72 H斑马鱼体表黑色素沉积的影响

A~E 为群拍图, a1~e1 为侧视图, a2~e2 为俯视图; F 为侧面观黑色素相对面积, G 为背面观黑色素相对面积; 图中比例数值为统计数据; 比例尺如图中所示。

许璟瑾等^[12]利用斑马鱼筛选金线莲具有抑制黑色素形成的活性组分，克服了体外细胞模型和哺乳动物模型的不足。实验结果表明，加入金线莲醇提物组与加入其他两种组分（醇沉物组和总提取物组）的斑马鱼相比较，黑色素和黄色素沉着明显减少，初步筛选出金线莲醇提物在斑马鱼黑色素形成过程中具有最佳的抑制效果；另外对金线莲醇提物如何抑制黑色素形成进行了初步的机理研究，结果显示：金线莲醇提物通过抑制黑色素相关基因的mRNA表达，进而抑制酪氨酸酶活性，减少黑色素的合成，从而发挥美白功效；此外，金线莲醇提物在斑马鱼黑色素已经大量形成的情况下其抑制效果依旧显著，并且这种抑制效果具有可逆性。

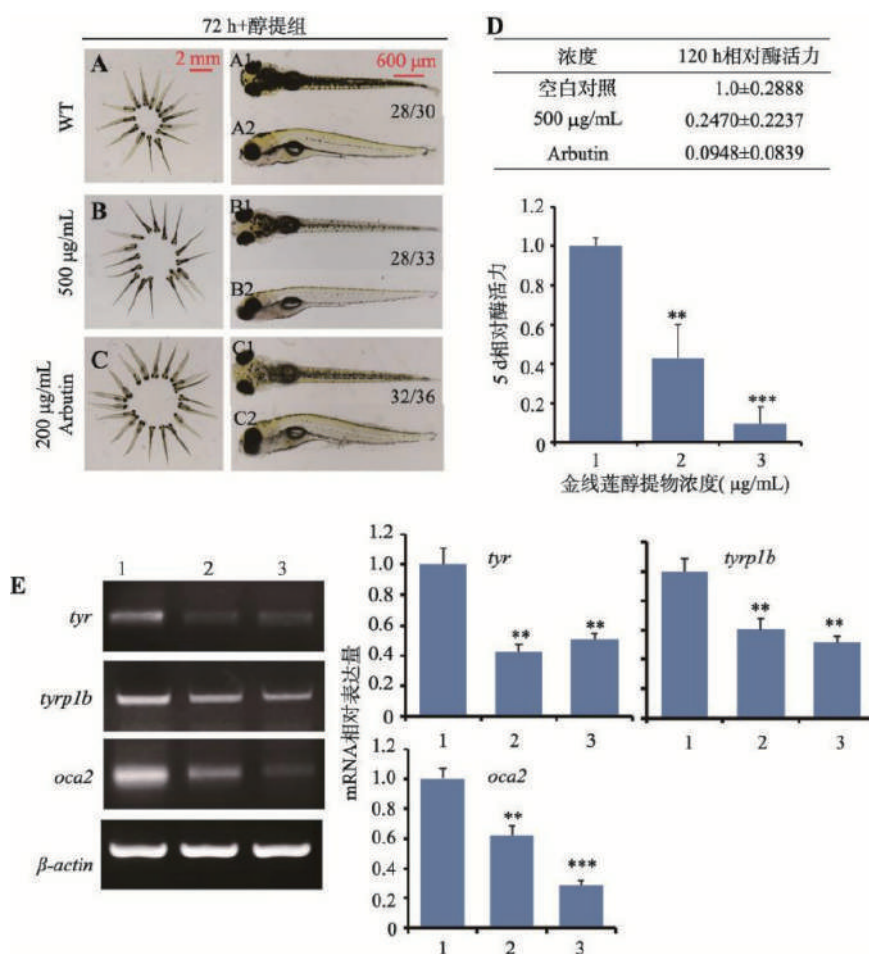


图 6 金线莲醇提物对斑马鱼幼鱼黑色素的抑制作用

Fig. 6 The inhibitory effect of *Anoectochilus roxburghii* alcohol extracts

on melanogenesis in zebrafish larvae A~C: 表观图; D: 酪氨酸相对酶活力;

E: 基因扩增电泳图。1: 空白对照; 2: 500 µg/mL; 3: 200 µg/mL Arbutin。

图中斑马鱼为5 d的幼鱼。

张文娟等^[13]采用斑马鱼作为实验模型评价水仙花提取物对黑色素合成的抑制效果。实验结果表明，水仙花提取物能够通过抑制酪氨酸酶活性以及黑色素合成相关基因的表达，来有效抑制斑马鱼胚胎黑色素的合成。在一定的浓度范围内，药物浓度越高，抑制效果越明显。通过实验得出，能够有效抑制斑马鱼黑色素合成且对其生长发育无影响的最适合浓度为500 µg /mL。实验检测出水仙花提取物处理后斑马鱼体内酪氨酸酶活力的降低，且通过半定量PCR进一步检测出黑色素合成相关基因的mRNA的表达都下调，还通过原位杂交检测了相关基因在时空上的表达，结果都显示各个基因表达减少。

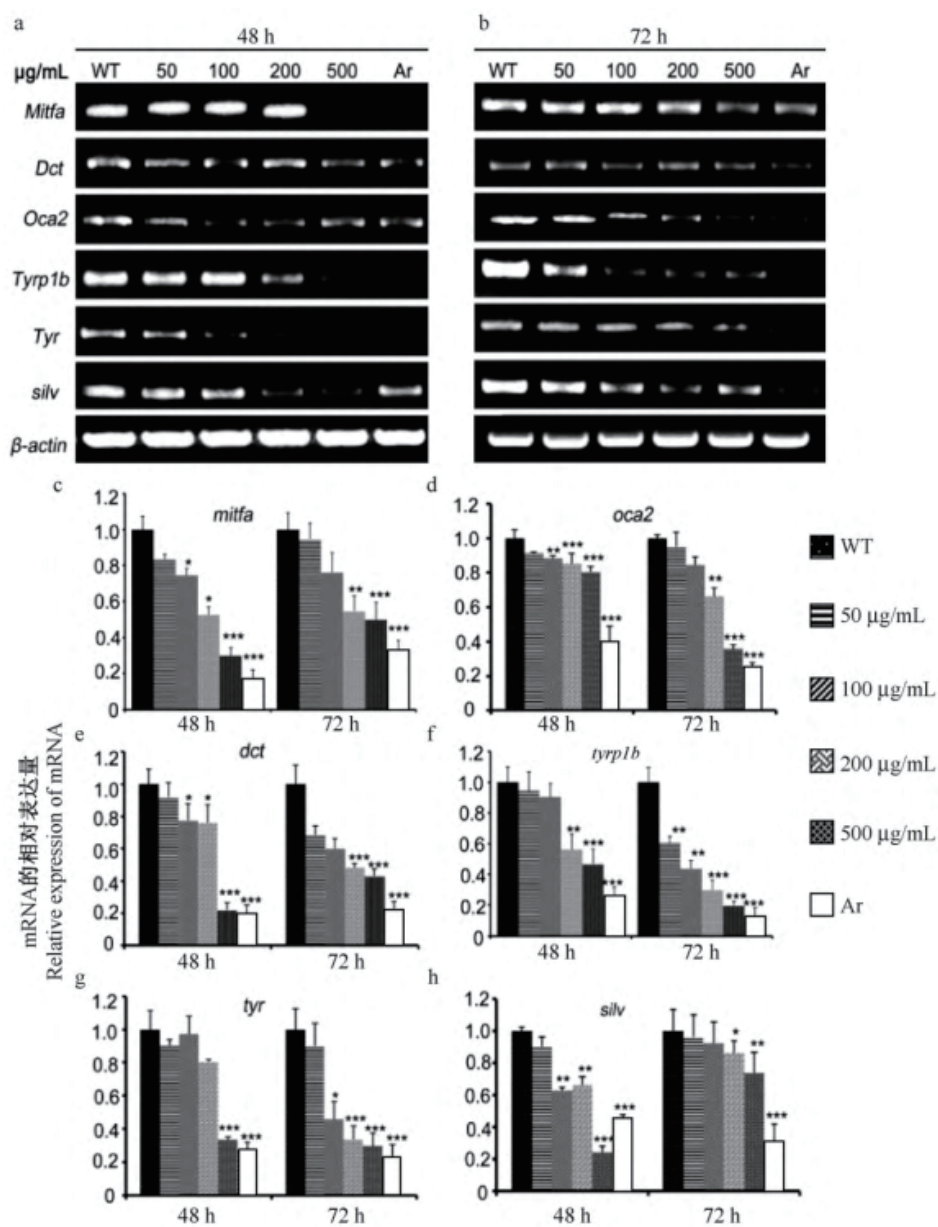


图 4 水仙醇提取物抑制斑马鱼胚胎黑色素相关基因的表达

注：差异显著性分析均是和对照组 (WT) 相比较，* $P < 0.05$ ，** $P < 0.01$ ，*** $P < 0.001$ 。

参考文献

- [1]Jin EJ, Thibaut G. Effects of lithium on pigmentation in the embryonic zebrafish (*Brachydanio rerio*). *Biochim Biophys Acta*, 1999, 1449(1): 93-99.
- [2]Hirata M, Nakamura K, Kondo S, et al. Pigment cell distributions in different tissues of the zebrafish, with special reference to the striped pigment pattern. *Dev Dyn*, 2005, 234(2): 293-300.
- [3]Kelsh RN, Brand M, Jiang YJ, et al. Zebrafish pigmentation mutations and the processes of neural crest development. *Development*, 1996, 123(3): 310-312.
- [4]Choi TY, Kim JH, Ko DH, et al. Zebrafish as a new model for phenotype-based screening of melanogenic regulatory compounds. *Pigment Cell Res*, 2007, 20(2): 120-127.
- [5]Camp E, Lardelli M. Tyrosinase gene expression in zebrafish embryos. *Dev Genes Evol*, 2001, 211(3): 150-153.
- [6]Zon LI, Peterson RT. In vivo drug discovery in the zebrafish. *Nat Rev Drug Discov*, 2005, 4(1): 35-44.
- [7]房军, 杜顺晶, 金银龙. 熊果苷在化妆品中应用的研究进展. *卫生研究*, 2009, 38(1): 111-113.
- [8]王慧琛, 王丽琴. 熊果苷的应用及检测研究进展. *天津药学*, 2012, 24(4): 71-74.
- [9]陆彬, 楼鸳鸯, 陈楚楚, 等. 熊果苷抑制斑马鱼胚胎黑色素合成的研究[J]. *湖南科技大学学报: 自然科学版*, 2015, 30(1): 5.
- [10]李春启, 朱晓宇, 朱凤. 舒洛地尔在制备化妆品或药物中的应用: CN, 103181860A[P]. 2013-07-03.
- [11]许璟瑾. β -葡聚糖抑制斑马鱼黑色素形成的作用机理研究[D]. 闽南师范大学. 2018.
- [12]许璟瑾, 张文娟, 王静怡, 等. 金线莲抑制斑马鱼黑色素形成的活性组分筛选及机理研究[J]. *遗传*, 2017(12): 10.
- [13]张文娟, 许璟瑾, 陈晓莹, 等. 水仙醇提取物对斑马鱼胚胎黑色素合成的抑制作用[J]. *中国实验动物学报*, 2017, 25(4): 8.

5.2.2 抗氧化功效评价

氧化应激是指机体在遭受各种有害刺激时，体内的氧化系统与抗氧化系统平衡被打破，致使高活性分子如活性氧簇（**Reactive Oxygen Species, ROS**）产生过多，氧化程度超出氧化物的清除能力，从而导致细胞损伤的状态^[14]。所以可以通过检测机体内的**ROS**水平来反映化合物诱导是否引起机体的氧化应激反应。**ROS**是斑马鱼体内正常的代谢产物，能被特异性的染料所检测，加上斑马鱼鱼胚透明的特点使得检测结果更加明显，用斑马鱼体内**ROS**检测模型检测**ROS**水平具有可靠、快速、高效、经济、高通量等优点^[15]，因此选择斑马鱼作为该试验的试验模型。

研究表明，大麻二酚（**CBD**）是一种很好的抗氧化剂，在抑菌性、抗氧化性和防晒功能上效果显著^[16]。利用工业大麻提取物中特有的抗氧化活性成分，研制具有抗氧化、祛皱、祛斑等效果的新一代护肤品。万庆家等^[17]通过观察大麻叶提取物对斑马鱼鱼胚体内活性氧（**ROS**）水平的影响，研究大麻叶提取物的抗氧化功效。研究结果表明，不同浓度的大麻叶提取物对脂多糖（**LPS**）刺激产生的**ROS**分泌量均具有一定水平的抑制作用，且在质量浓度为**2.0 mg/mL**时表现出显著的抑制效果。研究证明大麻叶提取物在化妆品中的应用中具有潜在的抗氧化功效。

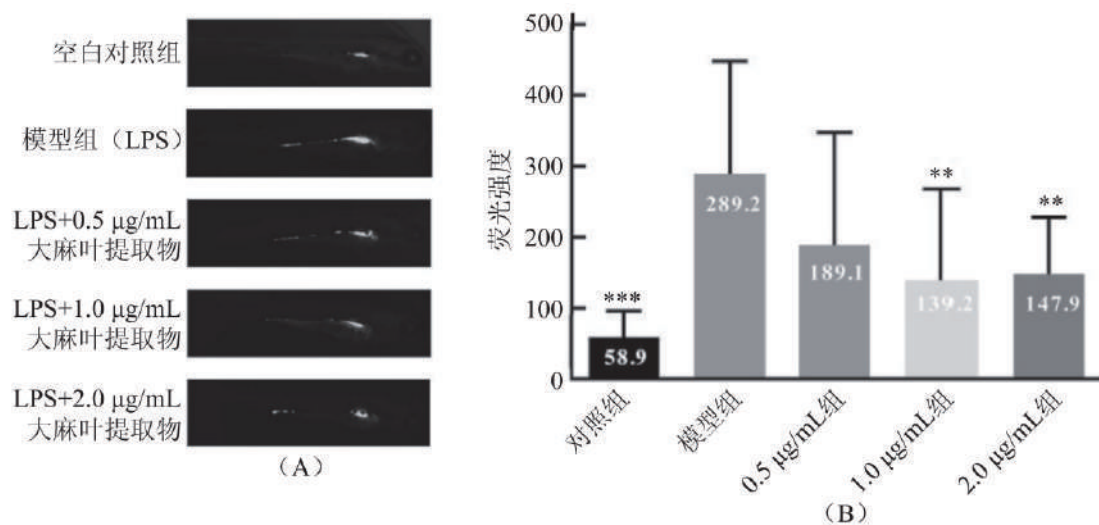


图. 大麻叶提取物对斑马鱼体内**ROS**水平的影响

万庆家等^[18]通过观察研究库拉索芦荟花提取物对斑马鱼体内ROS水平影响，测试库拉索芦荟花提取物的抗氧化功效，实验结果表明，芦荟花提取物在低浓度下对LPS刺激产生的ROS分泌量均具有显著的抑制作用，证明芦荟花提取物在化妆品应用中具备显著的抗氧化功效。

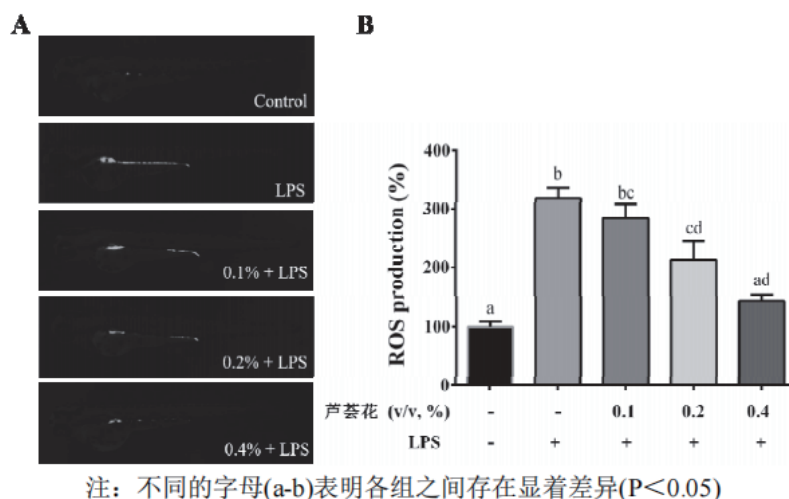
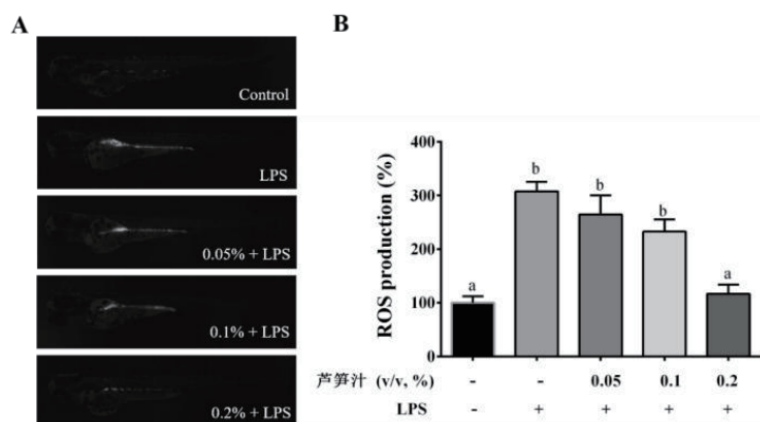


图1. 芦荟花提取物对LPS诱导斑马鱼体内活性氧(ROS)分泌的抑制作用

芦笋已被收录于《已使用化妆品原料名称目录INCN》2015版中，作为化妆品原料，目前对芦笋的护肤功效研究主要集中在抗氧化方面。活性氧簇(ROS)存在于斑马鱼体内，是斑马鱼体内正常的代谢产物，能被特异性的染料检测出来，斑马鱼体内ROS检测模型检测ROS水平具有可靠、快速、高效、经济、高通量等优点，因此本研究选择该方法验证芦笋汁的抗氧化活性。万庆家等^[19]通过观察芦笋汁对斑马鱼体内ROS水平影响，测试芦笋汁的抗氧化功效，实验结果表明，芦笋汁在低浓度下对LPS刺激产生的ROS分泌量均具有显著的抑制作用，研究证明芦笋汁在化妆品应用中具备显著的抗氧化功效。



不同的字母(A-B)表明各组之间存在显著差异(P<0.05)。

图1. 芦笋汁对LPS诱导斑马鱼体内活性氧(ROS)分泌的抑制作用

参考文献

- [14]苏杉, 刘飞, 任敏, 等. 复方当归美肤面膜皮肤刺激性与过敏性试验研究[J]. 甘肃医药, 2018, 37(7): 644-645, 653.
- [15]阮鸿洁, 石莹, 王超, 等. 基于试验条件优化的100种化妆品光毒性检测[J]. 环境与健康杂志, 2018, 35(8): 719-721.
- [16]中华人民共和国卫生部. 化妆品卫生规范[S]. 2007版. 北京: 军事医学科学出版社, 2007: 108-111.
- [17]万庆家, 廖海慧, 曾庆敏, 等. 大麻叶提取物的抗氧化功效研究[J]. 2021.
- [18]万庆家, 于晓霞, 钱绍祥, 等. 库拉索芦荟花的抗氧化功效研究[J]. 广东化工, 2020, 47(9):2.
- [19]万庆家, 黄云祥, 张浩, 等. 芦笋的抗氧化功效研究[J]. 广东化工, 2020, 47(4): 2.

5.2.3 补水保湿功效评价

斑马鱼模型在补水保湿功效评价方面也有重要的用途。一般传统保湿功效评价方法为用皮肤角质仪测量面部不同部位皮肤含水率、用水分仪测量经皮失水率及用皮脂仪测量评估皮脂分泌量。仪器依赖性强, 对志愿者要求高。在这方面, 斑马鱼表皮就表现出优良的性能, 超出鱼皮的渗透压耐受范围将会使斑马鱼产生脱水现象, 尾部面积也会变小, 因此通过高渗透溶液建立斑马鱼补水保湿诱导模型后, 可以用来评估化妆品的保湿功效。用荧光PCR手段检测相关基因如AQP3等的表达量可以评估化妆品的补水保湿功效^[20]。

斑马鱼皮肤结构与人皮肤结构相似, 具有表皮层、真皮层和皮下组织^[21]。补水保湿的功效评价通常需要用干燥或失水的皮肤进行试验, 斑马鱼虽为水生生物, 但有文献资料^[22]表明, 斑马鱼表皮具有一定的渗透压耐受范围, 超过耐受范围将产生脱水现象, 因此使用高渗透溶液可以建立斑马鱼补水保湿的诱导模型。

王志华等^[23]首先对斑马鱼胚胎进行高渗透压溶液处理诱导其失水收缩, 建立保湿功效评价模型, 探究了糙米发酵滤液的补水保湿功效。结果显示, 与空白对照组相比, 模型对照组斑马鱼尾部面积明显减小, 表明斑马鱼补水保湿功效评价模型造模成功。样品处理组斑马鱼胚胎尾巴面积明显大于模型组, 其收缩抑制率为 $72 \pm 4\%$ ($P=0.043$), 这说明糙米发酵滤液可以防止因高渗透压引起的失水, 具有显著的补水保湿效果。

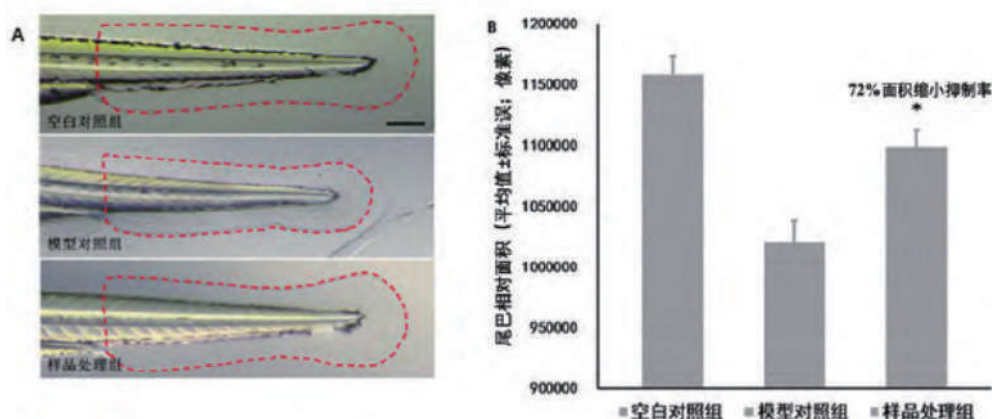


图1 BioyouthTM-Brice 糙米发酵滤液对斑马鱼尾部失水收缩的抑制效果。**A**: 测试结束时斑马鱼胚胎尾部面积表型图。**B**: 斑马鱼尾巴面积及面积缩小抑制率柱状图。比例尺: 1mm。

周示玉等^[24]用氯化钠溶液处理斑马鱼, 使其皮肤表面失水皱缩, 建立补水保湿模型。结果显示, 与空白对照组相比, 模型对照组斑马鱼尾部面积明显较少, 提示斑马鱼补水保湿功效评价模型造模成功。甘油葡糖苷的浓度为0.5、1.0和2.0mg.mL⁻¹时, 斑马鱼尾部面积分别为186279, 181855和193931像素, 与模型对照组(167353像素)比较, $P < 0.001$, 对斑马鱼尾部的补水保湿功效分别为91%, 70%和128%。说明甘油葡糖苷具有补水保湿作用。

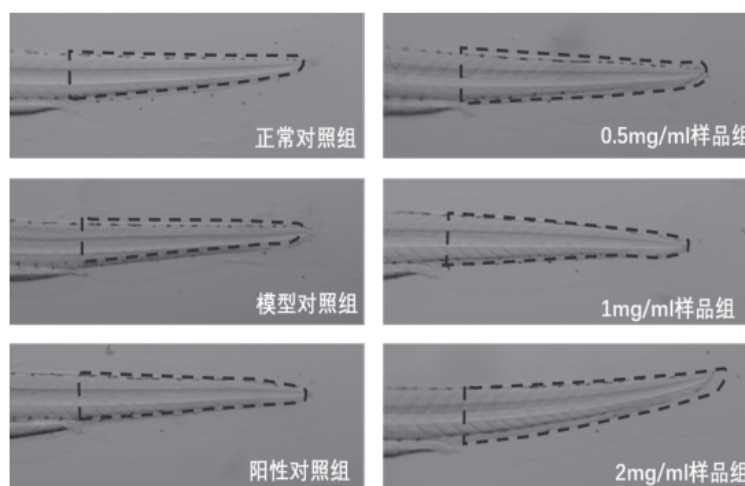


图. 甘油葡糖苷促进补水保湿功效

参考文献

- [20]王领. 植物活性成分在化妆品护肤领域的应用和发展[J]. 中国化妆品, 2021(8): 18-21.
- [21]Cline, Abigail Feldman, Steven R. Zebrafish for modeling skin disorders [J]. Dermatology Online Journal, 2016, 22(8).
- [22]Michelle H Connolly, Estefania Paredes, Peter Mazur. A preliminary study of osmotic dehydration in zebrafish embryos: Implications for vitrification and ultra-fast laser warming[J]. Cryobiology, 2017, 78(10): 106-109.
- [23]王志华, 陈雪平, 任姝静, 等. 糙米发酵滤液的护肤功效研究[J]. 中国化妆品, 2022(8): 5.
- [24]周示玉, 范嘉莹, 沈佳琪, 等. 甘油葡糖苷的护肤功效评价[J]. 广东化工, 2021(023): 048.

5.2.4 抗炎舒缓功效评价

根据《化妆品分类规则和分类目录》^[25]中的释义和说明, 舒缓是指有助于改善皮肤刺激等状态的一种功效。对于舒缓功效的评价, 目前尚缺乏标准、统一的方法, 目前实验室的舒缓功效评价方法多以炎症为指标, 如有研究^[26]利用脂多糖诱导产生巨噬细胞RAW264.7, 通过测定相关炎症因子的含量评价化妆品原料的舒缓功效。目前应用广泛的斑马鱼炎症模型, 是在荧光显微镜下观察皮肤炎症部位的中性粒细胞或巨噬细胞的分布情况, 采用图像处理软件统计其数量, 进而评估舒缓功效^[27]。

何健华等^[28]以斑马鱼胚胎的自旋运动频率为指标, 利用SDS作为造模剂构建斑马鱼刺激模型; 分别采用该模型和传统斑马鱼炎症模型对甘草酸二钾和黄芩素的舒缓功效和抗炎作用进行评价, 以验证斑马鱼刺激模型的可行性。同时利用斑马鱼刺激模型对 α -红没药醇、丹皮酚、积雪草苷、原花青素和4-叔丁基环己醇5种原料进行舒缓功效的评价筛选。结果表明, SDS浓度500 $\mu\text{mol/L}$ 对24 hpf斑马鱼胚胎作用时间15 min的斑马鱼刺激模型, 刺激性最强且重复性较好; 应用该模型评价甘草酸二钾和黄芩素的舒缓功效, 与斑马鱼炎症模型的评价结果基本一致; α -红没药醇、丹皮酚、积雪草苷及原花青素在斑马鱼刺激模型中表现出一定的舒缓功效。

周示玉等^[30]利用SLS (十二烷基磺酸钠) 刺激诱导斑马鱼产生皮肤表面炎症反应, 建立舒缓功效模型。结果发现, 与空白对照组相比, 模型对照组斑马鱼皮肤表面中性粒细胞数量明显增多, 提示斑

马鱼舒缓模型建立成功。甘油葡糖苷浓度为1 mg·mL⁻¹时，斑马鱼皮肤表面中性粒细胞数量与模型对照组比较 $P < 0.01$ ，其对斑马鱼炎症消退率为58%。说明甘油葡糖苷具有舒缓作用。

王志华等^[31]对斑马鱼胚胎进行CuSO₄暴露诱导侧线区域神经丘细胞损伤导致中性粒细胞聚集，建立舒缓功效评价模型，探究了糙米发酵滤液的舒缓功效。结果显示，经硫酸铜溶液处理后，模型组的斑马鱼胚胎侧线区域具有较多的中性粒细胞聚集，而添加5g/L的糙米发酵滤液的试验组，侧线区域中性粒细胞数目明显减少，抑制率为48±8% ($P=0.00035$)，这说明糙米发酵滤液在该测试浓度下可以显著抑制斑马鱼胚胎中性粒细胞聚集，具有显著的舒缓功效。

参考文献

- [25]国家药品监督管理局. 国家药监局关于发布《化妆品分类规则和分类目录》的公告(2021年第49号)[EB/OL]. (2021-04-08) [2021-12-18]. <https://www.nmpa.gov.cn/xxgk/ggtg/qtggtg/20210409160151122.html>.
- [26]张晓娥, 李潇, 卢永波. “LPS——巨噬细胞”典型炎症模型评价化妆品抗炎舒缓功效的研究[C] // 中国毒理学会. 2017(第三届)毒性测试替代方法与转化毒理学(国际)学术研讨会会议论文集. 2017:193-194.
- [27]南京新环检测科技有限公司. 一种评价化妆品对皮肤炎症舒缓或修复功效的方法: CN202010874695.1[P]. 2020-12-11.
- [28]何健华, 郭清泉, 王雅馨, 等. 斑马鱼胚胎行为学在化妆品原料舒缓功效评价中的应用[J]. 轻工学报, 2022(003): 037.
- [29]何林燕, 包萝艳, 曾庆敏, 等. 大麻叶提取物的抗炎功效研究[J]. 香料香精化妆品, 2021.
- [30]周示玉, 范嘉莹, 沈佳琪, 等. 甘油葡糖苷的护肤功效评价[J]. 广东化工, 2021(023): 048.
- [31]王志华, 陈雪平, 任姝静, 等. 糙米发酵滤液的护肤功效研究[J]. 中国化妆品, 2022(8): 5.

5.2.5 皮肤修复功效评价

在化妆品修复功效评价方面，斑马鱼成体组织、器官和鱼鳍均有可再生性，切断荧光标记斑马鱼的尾鳍后，斑马鱼炎症模型在几个小时内即可建立，且尾鳍面积大易操作与观测，因此斑马鱼成体尾鳍组织被广泛运用检测护肤品的修复功效^[29]。

人参具有显著延缓衰老的作用，对皮肤老化、损伤以及皮肤病有一定的修复和治疗作用。许多国际知名品牌都采用将人参皂苷中的固有人参皂苷转化为稀有人参皂苷的方法来提升产品效果，如韩国雪花秀等。对护肤产品的皮肤修复作用进行评价分析，目前斑马鱼方法已经被证明是一种相对成熟可靠的评价方法^[32]。赵文婷等^[33]采用植物乳杆菌对人参进行发酵，然后通过测定MTC值以及建立斑马鱼组织再生模型评价适宜浓度下人参发酵滤液的修复作用。结果表明人参发酵滤液对斑马鱼尾鳍具有显著的修复作用，证明其有潜在的皮肤修复功效，这一结果为人参发酵滤液在化妆品中的应用提供了支撑。但人参发酵滤液的修复机理还需进一步展开研究。

王志华等^[34]将斑马鱼尾鳍进行手术切除处理，建立修复功效评价模型。结果发现，与空白对照组相比，样品处理组斑马鱼尾鳍长度（红色虚线与实线间距离）明显增大，糙米发酵滤液在该测试浓度下对斑马鱼胚胎尾鳍修复促进率为 $17 \pm 2.4\%$ （ $P=0.0023$ ），说明该样品具有一定的皮肤修复功效。

周示玉等^[35]将斑马鱼尾鳍进行手术切断处理，建立修复模型。结果显示，与空白对照组相比，模型对照组斑马鱼尾鳍面积明显较少，提示斑马鱼修复功效评价模型造模成功。甘油葡糖苷的浓度为0.5、1.0和2.0mg/mL时，斑马鱼尾鳍面积分别为62899、63680和67308像素，与模型对照组（57894像素）比较， $P < 0.05$ ，修复功效分别为20%、23%和37%。说明甘油葡糖苷具有修复作用。

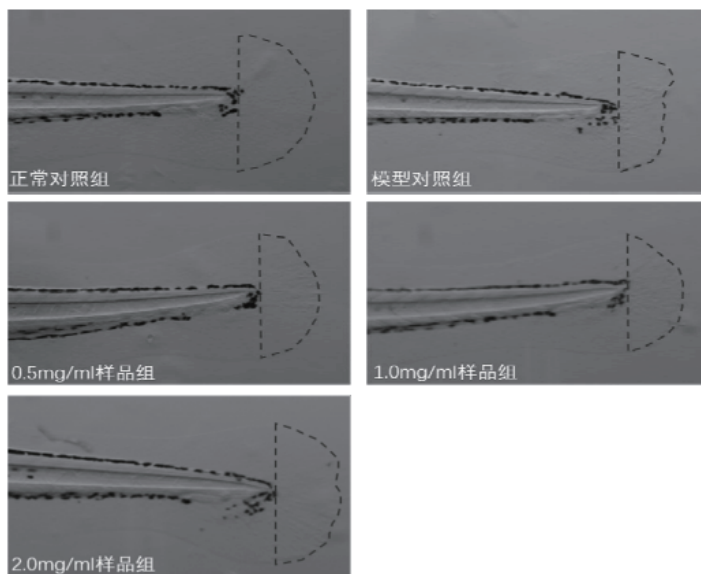


图. 甘油葡糖苷促进修复功效

参考文献

- [29] 陈娇娇, 王涛, 王成蹊, 等. 姜黄素对斑马鱼胚胎及幼鱼急性毒性的研究[J]. 深圳中西医结合杂志, 2017, 27(19): 194-199.
- [32] 付子昂, 李科斌. 斑马鱼尾鳍——理想的再生研究模型[J]. 生物技术世界, 2015(4): 154-154.
- [33] 赵文婷, 彭宁, 王欢, 等. 人参发酵滤液的皮肤修复作用[J]. 香料香精化妆品, 2021(6): 4.
- [34] 王志华, 陈雪平, 任姝静, 等. 糙米发酵滤液的护肤功效研究[J]. 中国化妆品, 2022(8): 5.
- [35] 周示玉, 范嘉莹, 沈佳琪, 等. 甘油葡糖苷的护肤功效评价[J]. 广东化工, 2021(023): 048.

5.2.6 改善微循环

周示玉等^[36]通过斑马鱼节间血管直径的扩张程度以及血流速度评价甘油葡糖苷促进微循环的功效。甘油葡糖苷的浓度为1.0和2.0 mg.mL⁻¹时，斑马鱼节间血管直径分别为8.36和8.86 μm 与空白对照组比较， P 均 <0.01 ，其改善微循环的功效分别为8%和14%。甘油葡糖苷的浓度为1.0 mg.mL⁻¹和2.0 mg.mL⁻¹时，斑马鱼节间血液流速分别为454 $\mu\text{m/s}$ 和499 $\mu\text{m/s}$ ，与空白对照组比较， $P<0.05$ ，其改善微循环的功效分别为31%和44%。

参考文献

[35]周示玉，范嘉莹，沈佳琪，等. 甘油葡糖苷的护肤功效评价[J]. 广东化工, 2021(023): 048.

5.2.7 安全性评价

化妆品已成为人们生活中的必需品，安全性评价是化妆品开发过程中非常重要的一个环节。斑马鱼具有传代时间短、饲养方便、价格低廉以及便于大规模筛选等优势，是一种有效、可靠、高通量的模式生物。目前，对斑马鱼致死和致畸的统计结果可用于化妆品原料的安全性评价，呈现出良好的发展优势和应用前景。

钟怡洲等^[1]建立了斑马鱼胚胎急性毒性测试方法，与GB15193.3-2014 食品安全国家标准急性经口毒性试验进行相关性验证，以及OECD TG 236斑马鱼胚胎急性毒性测试方法的验证报告数据进行可比性分析。结果发现，斑马鱼胚胎急性毒性和小鼠急性经口毒性的测试结果相似度为67.9%，且另外有28.6%的样品在斑马鱼胚胎急性毒性测试中更加灵敏。此外，斑马鱼胚胎急性毒性测试方法测得的28种化学试剂的LC50值和GB15193.3-2014霍恩氏法小鼠急性经口毒性试验测得的小鼠经口LD50值呈正相关，并且斑马鱼胚胎急性毒性测试方法还可测得其中18种保健食品和食品的LC50值。该研究建立的斑马鱼胚胎急性毒性测试方法对18个化学品的测试结果的急性毒性分级和OECD TG 236验证报告中的结果基本一致，且对6个化学品进行5个实验室平行试验结果显示方法重复性和重现性不亚于OECD TG 236验证报告中的数据。结果表明，该研究斑马鱼胚胎急性毒性测试结果和国家标准GB15193.3-2014小鼠急性经口毒性试验测得的结果显著正相关，和OECD TG 236标准方法具有很好的可比性。

陈纪韬^[2]以一款市面热销的磨砂洗面奶为研究对象，从中提取出微塑料颗粒，并确认它是聚乙烯材料。结果发现，100目、500目的聚乙烯微塑料颗粒以及吸附了洗面奶的100目聚乙烯微塑料颗粒均对斑马鱼产生氧化应激损伤。当聚乙烯微塑料颗粒混入饲料中共同投喂时会对斑马鱼造成更大的

伤害。当移除水体中的污染物，经过3天的自净，斑马鱼体内的抗氧化能力能够很好地恢复，但鳃丝细胞的损伤需要更长的时间来恢复。暴露于聚乙烯微塑料环境下的斑马鱼鳃、肠、肝的干重会稍稍高于对照组。解剖以及傅里叶红外测试都发现斑马鱼鳃肠中有不同程度的残留聚乙烯微塑料颗粒。

王晓微等^[3]以斑马鱼为模式生物，研究了不同浓度纳米二氧化硅和常规二氧化硅的水溶悬浮液对斑马鱼胚胎发育的毒性效应。结果表明，常规二氧化硅对斑马鱼胚胎发育无明显毒性效应，而纳米二氧化硅对斑马鱼胚胎发育具有剂量依赖性的抑制作用，可导致胚胎孵化率显著下降，死亡率显著上升，以及幼鱼的多种畸形现象如脊柱弯曲、围心囊水肿、无胸鳍和短体长等。韩利^[4]研究了3种不同粒径（30 nm、80 nm~150 nm和2 μm）纳米ZnO颗粒对斑马鱼胚胎孵化率和致畸性的影响。结果表明3种大小的纳米ZnO颗粒对斑马鱼胚胎都具有明显的毒性，具体表现为导致斑马鱼胚胎产生畸形、死亡并影响孵化率，且这种影响随着粒径的减小而增大。

参考文献

[1]林莉，徐世三，钟怡洲，等. 斑马鱼胚胎急性毒性和小鼠急性经口毒性测试方法的相关性研究[J]. 毒理学杂志, 2021, 35(2): 5.

[2]陈纪韬. 化妆品中微塑料颗粒对斑马鱼毒性的研究[D]. 南京理工大学.

[3] 王晓微，赵占克，韩冰，等. 纳米二氧化硅对斑马鱼胚胎发育毒性的初步研究[J]. 生态毒理学报, 2009, 4(5): 675-681.

[4] 韩利. 人工纳米氧化锌颗粒对牙鲆 FG 细胞和斑马鱼胚胎的毒性及其毒性作用机制[D]. 青岛：中国海洋大学, 2012.

第六章

斑马鱼技术在化妆品行业的应用情况

6.1 国内科研单位斑马鱼技术应用

在我国，自上世纪90年代开始有研究者采用斑马鱼为模式动物开展有关研究工作，中国斑马鱼实验室不仅在数量上增加迅速，其研究方向的发展也和国际同步，涉及斑马鱼研究的方方面面，目前国内以斑马鱼为工具进行研究和应用的各种实验室和企业超过2000家，科研院所主要有清华大学、北京大学、浙江大学、上海交通大学、复旦大学、同济大学、南开大学、南方医科大学、中国科学院水生生物研究所、中科院海洋生物研究所、中国科学院生物化学与细胞生物化学研究所、中国检验检疫科学研究院、中国科学院生物发育研究所、中国环境科学研究院、环境保护部南京环境科学研究所、广东省微生物研究所等，学术研究占比较多的有药物筛选、疾病模型、毒性评价、遗传学、发育生物学、神经生物学、水产性状改良、环境水质监测、毒理学等方面。

6.2 国内企业单位斑马鱼技术应用

利用斑马鱼技术进行化妆品评价的企业单位主要有杭州环特生物科技股份有限公司、水中银（国际）生物科技有限公司、山东省科学院、广州鲁比生物科技有限公司、广州山海生物科技有限公司等。

（1）杭州环特生物科技股份有限公司

杭州环特生物科技股份有限公司（Hunter，简称环特生物）成立于2010年，一直聚焦于斑马鱼技术的相关研究工作，有着深厚的技术积累和丰富的项目经验。目前，环特生物已经自主开发了50余项化妆品功效和安全性测试方法，常规实验模型见表5，服务化妆品企业超过300家，其中包括行业的众多知名品牌，如华熙生物、诺斯贝尔、贝泰妮、珀莱雅、欧诗漫、丸美、御泥坊等，在过去的2021年累计接收测试样品达到900个，样品类型覆盖原料、配方及各种剂型的成品，为客户在原料研究、配方筛查、功效验证等各个方面提供了有力的技术支持。

表5.环特生物斑马鱼技术在化妆品中的应用

序号	类别	实验模型	作用肌理	诱导剂	评价指标
1	功效	抗皱	胶原蛋白的表达	/	col1a1a、col1a1b
2	评价	紧致	弹性蛋白的表达	/	eln1、eln2
3		舒缓	神经信号的传导	冰乙酸	总运动距离
4			炎症细胞的增值	SLS	中性粒细胞数量
5			炎症因子的表达	/	IL-1a、IL-6、 IL-8、TNFa
6			过敏反应标志物的监测	C48/80	类胰蛋白酶含量
7		补水保湿	皮肤表面水合作用	氯化钠	局部皮肤面积
8			水通道蛋白AQP3的表达	/	AQP3基因表达量
9			透明质酸合成酶的表达	/	HAS3基因表达量
10		温和无刺激	炎症细胞的增值	/	中性粒细胞数量
11		美白祛斑	黑色素的抑制	/	皮肤白度
12			酪氨酸酶的活性	/	酪氨酸酶活性
13			黑色素蛋白含量	/	黑色素蛋白含量
14		提亮肤色	氧化应激诱导的色素沉着	甲萘醌	皮肤亮度
15		抗氧化	氧化应激诱导的ROS	甲萘醌	ROS的荧光强度
16		抗光老化	紫外线诱导的皮肤损伤	UVB	晒伤部位恢复
17		修护	组织再生能力	断尾	损伤部位恢复
18		抗衰老	衰老相关酶的活性表达	/	β -半乳糖苷酶、端粒酶、 SOD、GSH

序号	类别	实验模型	作用肌理	诱导剂	评价指标
19	安全性 评价	急性毒性	胚胎存活率	/	LC ₅₀ 值
20		刺激性	炎症细胞的增值	/	皮肤炎症细胞数量
21		致敏性	过敏反应标志物的监测	/	类胰蛋白酶含量
22		雌激素检测	雌激素受体的表达	/	荧光强度

环特生物子公司广州环特智鱼优检生物科技有限公司将斑马鱼生物评价技术和基因编辑技术，在化妆品的配方研发、原料筛选、生产质控、营销背书等多方面深入拓展技术应用场景，构筑优质平台，有效提升粤港澳大湾区斑马鱼技术应用领域的专业服务质量，助力化妆品企业升级转型，赋能产业链、创新链的高质量发展。

（2）水中银（国际）生物科技有限公司

水中银（国际）生物科技有限公司（**Vitargent**，简称水中银），主要是利用鲭鲙鱼和斑马鱼胚胎来进行日用品安全毒理测试，客户包括全球大型化妆及护肤品牌、食品企业、先进检测化验所及政府部门。水中银将斑马鱼技术用于化妆品评价主要有美白祛斑功效检测、抗氧化及抗衰老功效测试、抗炎、抗敏、祛痘功效测试、皮肤修复功效测试四大类。

（3）山东省科学院

山东省科学院是省政府直属的事业单位，是山东省最大的综合性自然科学研究机构，属于省级公益二类事业单位。山东省科学院生物研究所已形成生物传感器、斑马鱼药物筛选、微生物代谢分析、酶工程、天然产物、微生物药物合成生物学、功能食品与特医食品等方向和专业化的研究团队，涉及生物智能制造、工业发酵、健康医疗、食品加工、环境监测、药用微生物、生物肥料等多个产业领域。

山东省科学院斑马鱼药物筛选平台主要利用斑马鱼评价化妆品的补水保湿功效、祛斑美白功效、抗皱功效。

（4）广州鲁比生物科技有限公司

广州鲁比生物科技有限公司成立于2016年，是一家集研发、技术服务于一体，专注生命科学研究和生物技术开发。鲁比生物以自主开发的斑马鱼模型作为核心支撑点，面向化妆品产业，针对性地开发了十余种斑马鱼胚胎实验模型。涵盖抗炎舒缓、美白淡斑、修复、温和刺激性、抗氧化、舒缓、防晒（晒后修复）、保湿、急性毒性等功效与安全评价，能够满足化妆品及其原料的检测需求，为企业的新原料开发、配方设计和产品质量控制提供可靠的检测技术与服务。

(5) 广州山海生物科技有限公司

广州山海生物科技有限公司总部位于广州科学城国家级科技企业孵化器园区。是一家专注于斑马鱼核心技术在大健康领域的推广与应用的科技服务企业。公司拥有受过专业严格训练的技术与分析人员，核心团队具有十年的斑马鱼实验技术研发经验，致力于向包括生物医药、食品保健品、功能性化妆品等领域提供全面的技术解决方案、专业的技术培训及技术服务。广州山海生物科技有限公司主要利用斑马鱼评价化妆品的防断发功效、控油功效、补水保湿功效、祛斑美白功效、抗皱功效。

第七章

斑马鱼技术在化妆品行业的应用价值

随着化妆品新法规的落地，创新成了中国化妆品行业发展的核心驱动力。在这种大的行业背景下，斑马鱼技术在化妆品行业中的应用价值主要体现在研发和检测两个维度。

从检测维度来说，斑马鱼技术提供了一种较为快速、高效且低成本的检测方法。斑马鱼技术可以满足普通化妆品部分功效检测的需求，在人体功效实验的前期进行筛选，降低后期实验成本和压力，缩短试验周期，保证特殊化妆品的人体功效实验需求可以得到较充分的满足，也有助于行业在法规过渡期的平稳发展。

从研发维度来说，斑马鱼技术可提供功效机制或机理方面的技术支持，完善了现有的化妆品研发技术体系，可与细胞模型、动物模型等进行配合和互补。产品研发环节充满了不确定性和失败风险，化妆品研发机构需要根据产品定位、产品特点和研发阶段有针对性地选择合适的评价方法以达到最佳的投入产出比。斑马鱼和细胞、离体组织、3D皮肤模型等技术方法在化妆品原料筛选、作用机理研究、配方组合优化等方面能够发挥重要作用，而人体实验则在产品最终的安全性和功效测试上具有不可替代性。

每一种测评方法都有自身的特质和优点，斑马鱼技术与其它各种检测评价技术的关系是协同和互补的，一款优秀的产品也应该在研发的不同阶段采用了不同的测试评价方法才能开发出来，因此，未来化妆品的检测评价应该是多种方法的统一和协作，各自发挥其在研发阶段的价值，而斑马鱼技术的优点和特色对于激发行业的研发活力将产生积极的作用。

第八章

斑马鱼技术用于化妆品评价常见技术方案

8.1 美白功效评价

护肤产品的美白功效最主要的作用通路是通过抑制酪氨酸酶的活性，从而减少黑色素的生成来实现的。斑马鱼皮肤中的黑色素调控机制与人类高度保守，并且黑色素的生成速度快，在显微镜下能被肉眼清晰的观察到，通过图像处理技术可以对护肤产品对黑色素减少的程度进行定量，从而实现美白功效的评价。

【实验方案】

将斑马鱼分成若干组，含正常对照组和供试品组。正常对照组不做处理，供试品组使用受试化妆品，孵育一段时间后，对斑马鱼头部进行拍照，利用高级图像处理软件分析斑马鱼头部的黑色素信号强度；将斑马鱼进行匀浆处理，分别提取其中的酪氨酸酶和黑色素蛋白，进行OD值测定，通过皮肤黑色素信号强度、酪氨酸酶活性和黑色素蛋白的含量反映供试品的美白功效。

【评价指标】

- 1、皮肤黑色素信号强度
- 2、酪氨酸酶活性
- 3、黑色素蛋白含量

【结果展示】

- 1、斑马鱼头部黑色素：提供表型图

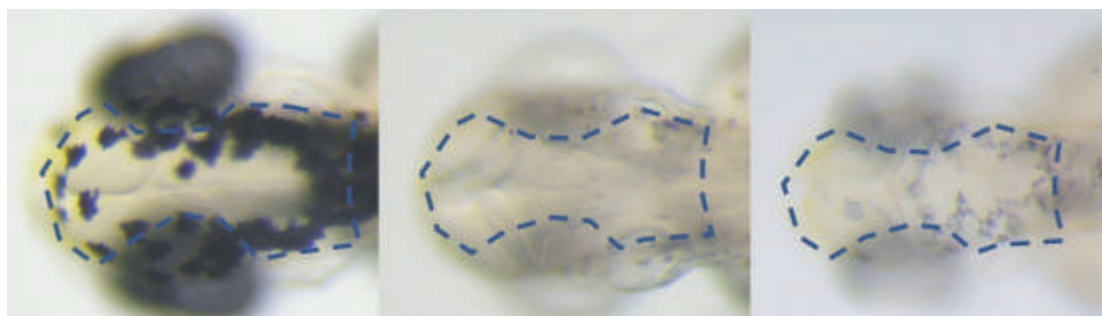


图1. 斑马鱼头部黑色素表型图

蓝色为分析区域

2、酪氨酸酶活性：提供柱状图

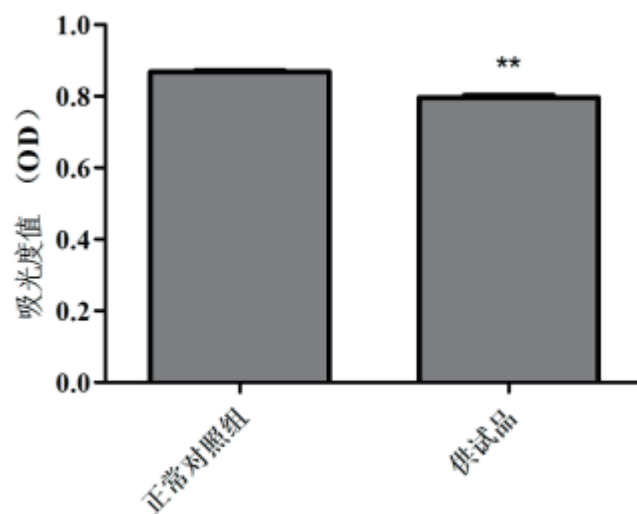


图2. 斑马鱼酪氨酸酶活力

3、黑色素蛋白含量：提供柱状图

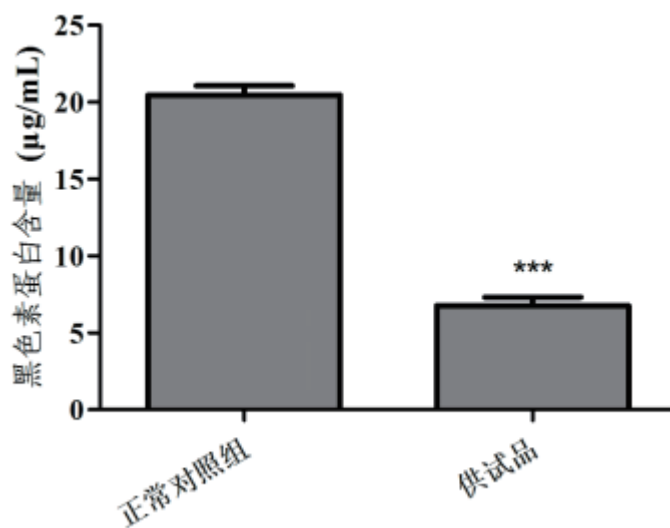


图3. 斑马鱼黑色素蛋白含量

8.2 抗氧化功效评价

活性氧（ROS）是含氧的化学反应性化学物质。包括过氧化物，超氧化物，羟基自由基等。ROS形成为氧的正常代谢的天然副产物，并且在细胞信号传导和体内平衡中具有重要作用。然而在紫外线暴露期间，ROS水平会急剧增加。这可能会对细胞结构造成严重损害，这被称为氧化应激。甲萘醌能产生活性氧自由基，当自由基产生量大于机体清除能力时就发生氧化应激反应，氧化应激时超氧化物歧化酶（Superoxide dismutase, SOD）活性降低。通过斑马鱼卵黄囊荧光强度、SOD活性评价供试品抗氧化作用。

【实验方案】

1、将受测试斑马鱼分成若干组，含正常对照组、模型对照组和供试品组。其中正常对照组未经任何处理，模型对照组和供试品组都加入等量的甲萘醌。供试品组在加入甲萘醌的同时加入一定浓度的供试品。使用供试品一段时间后，对斑马鱼整体进行特异性荧光染色，观察斑马鱼卵黄囊活性氧自由基产生情况。

2、将受测试斑马鱼分成若干组，含正常对照组、模型对照组和化妆品组。其中正常对照组未经任何处理，模型对照组和化妆品组都加入等量的过氧化氢。化妆品组在加入过氧化氢的同时加入一定浓度的化妆品。将斑马鱼匀浆取上清，用SOD ELISA试剂盒进行反应，应用多功能酶标仪分别测定各实验组SOD含量。

【评价指标】

- 1、卵黄囊ROS荧光强度
- 2、SOD活性

【结果展示】

1、斑马鱼卵黄囊荧光表型

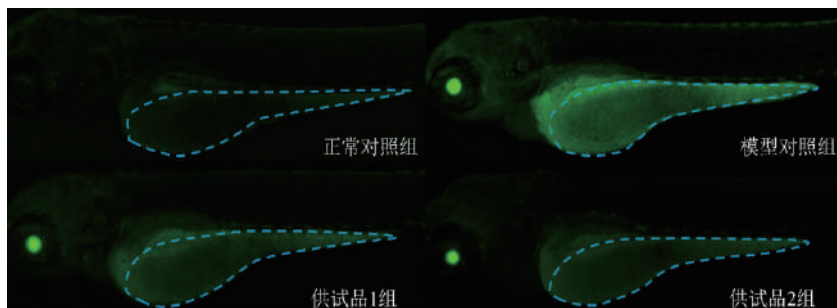


图1. 斑马鱼卵黄囊荧光表型图

蓝色为分析区域，绿色荧光代表氧自由基

2、SOD活性柱状图（略）

8.3 补水保湿功效评价

斑马鱼表皮具有一定的渗透压耐受范围，超过耐受范围将产生脱水现象，尾部面积也会变小，因此使用高渗透溶液可以建立斑马鱼补水保湿的诱导模型。水通道蛋白（Aquaporin, AQP）广泛存在于生物体的各组织部位，影响着生物体水代谢的过程。**AQP3**在表皮基底及棘突层的角质形成细胞质膜中高度表达，并在这些质膜中作为水、甘油运输蛋白，促进皮肤水合作用。人类透明质酸合成酶（**HAS**）是一类在透明质酸（**HA**）合成过程中发挥重要作用的酶，**HAS3**在表皮透明质酸的合成中起主要作用。分析斑马鱼尾部面积，检测**HAS3**、**AQP3**基因表达量，在一定程度上可以评价供试品保湿作用。

【实验方案】

将斑马鱼分成三组，分别是正常对照组、模型对照组和供试品组。正常对照组不做处理，模型对照组用氯化钠溶液处理，供试品组在用氯化钠处理的同时定量加入受试的化妆品。孵育一段时间后，对斑马鱼进行拍照分析斑马鱼尾部面积，q-PCR试剂盒检测HAS3基因表达量、AQP3基因表达量，评价供试品的保湿功效。

【评价指标】

- 1、斑马鱼尾部面积
- 2、HAS3基因表达量
- 3、AQP3基因表达量

【结果展示】

- 1、斑马鱼尾部面积（表型图）

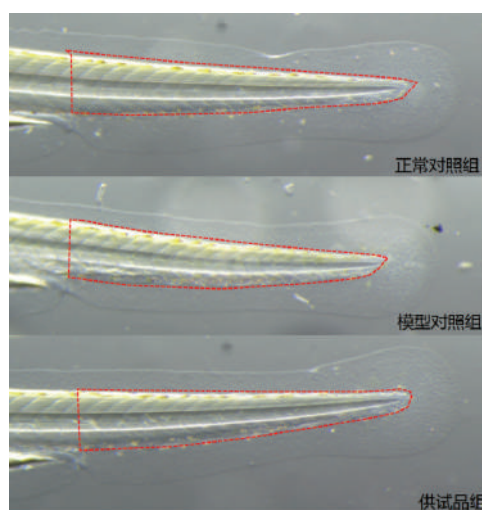


图1. 斑马鱼尾部面积（红色区域为尾部面积）

- 2、HAS3基因表达量、AQP3基因表达量为柱状图（略）

8.4 抗炎舒缓功效评价

暴露于生活环境中的皮肤，接触到有毒有害物质后可能引起一定程度的皮肤炎症，出现皮肤红肿、瘙痒等现象。一些医美类化妆品除具有常规护肤功效外还能起到舒缓作用。通过斑马鱼技术能有效评价供试品舒缓功效。

1、化妆品对皮肤的刺激表型主要表现为皮肤炎症，炎症早期主要表现为毛细血管扩张、通透性亢进和水肿。十二烷基磺酸钠（SLS）是人体皮肤刺激物模型斑贴试验常见的阳性对照物，SLS刺激后能诱发表皮炎症细胞浸润，刺激物进入斑马鱼体内，诱导炎症反应，中性粒细胞发生免疫应答，向皮肤表皮迁移并聚集。

2、TNF- α 在机体受到刺激时会大量产生，主要来自于活化的巨噬细胞、自然杀伤细胞和T淋巴细胞；IL-6能够促进中性粒细胞功能上调，促进和调节细胞因子、黏附分子以及一氧化氮等炎症介质分泌；IL-8由单核细胞和血管内皮细胞分泌生成，炎症发生时其水平迅速升高。IL-1在炎症反应中传递信息、激活以及调节免疫细胞、增殖与分化炎症其关键作用。若供试品具有能够降低TNF- α 、IL-1、IL-6、IL-8等炎症因子水平的作用，则说明其具有舒缓的功效。

3、肥大细胞是类过敏反应的主要效应细胞，激活的肥大细胞数量与过敏程度相关，激活的肥大细胞越多，过敏程度越严重。类胰蛋白酶(Trypsin)是肥大细胞内预先合成的中性蛋白酶，是含量最多的介质，在肥大细胞中的储存和表达有高度的选择性。肥大细胞脱颗粒后，类胰蛋白酶会转化成具有活性的构象并被释放到细胞外，Trypsin可作为肥大细胞脱颗粒的标志。

4、斑马鱼受到疼痛时会产生运动轨迹上的变化。通过测定斑马鱼运动轨迹作为伤害性感受阈的测量指标。

【实验方案】

将受测试斑马鱼分成三组，分别是正常对照组、模型对照组和供试品组。正常对照组不做处理，模型对照组用SLS或C48/80处理，供试品组在用造模剂的同时添加受试化妆品。孵育一段时间后：

- 1、将斑马鱼整体放到荧光显微镜下拍照，统计皮肤表面中性粒细胞数量
- 2、利用q-PCR检测IL-6等基因相对表达量
- 3、利用酶标仪检测各组吸光度值（OD值），以OD值分析类胰蛋白酶含量
- 4、利用斑马鱼行为分析仪检测斑马鱼的运动距离，定量评价供试品的神经舒缓的效果

【评价指标】

- 1、皮肤中性粒细胞数量
- 2、炎症因子IL-1 α 、IL-6、IL-8、TNF α 基因表达量
- 3、过敏反应标志物（类胰蛋白酶）含量
- 4、神经舒缓-总运动距离

【结果展示】

- 1、皮肤中性粒细胞数量

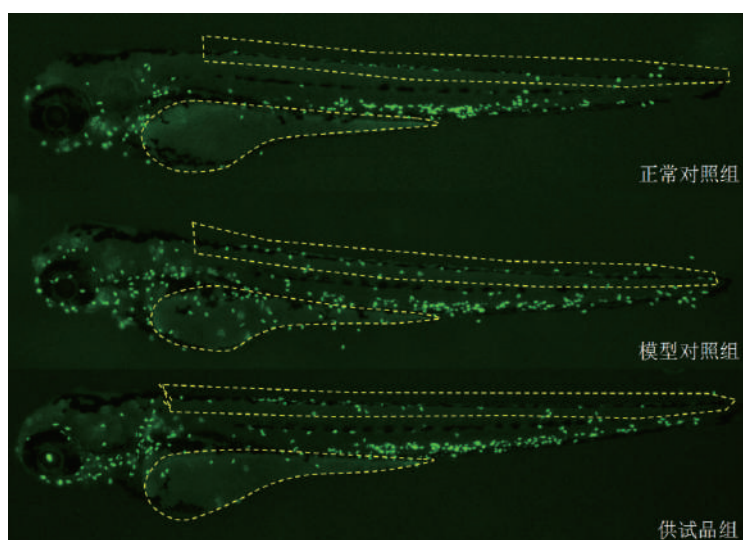


图1. 皮肤中性粒细胞表型图

黄色虚线区域为计算区域，绿色荧光点为中性粒细胞

2、炎症因子表达水平：提供柱状图

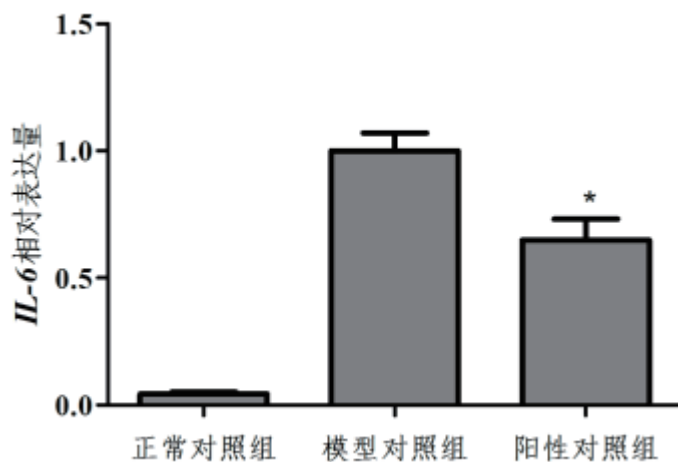


图2. 斑马鱼IL-6基因相对表达量

3、类胰蛋白酶含量：提供柱状图

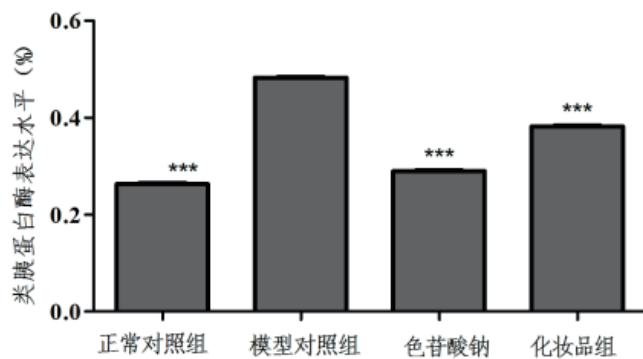


图3. 类胰蛋白含量柱形图

4、神经舒缓（镇痛）-总运动距离（轨迹图、柱状图略）

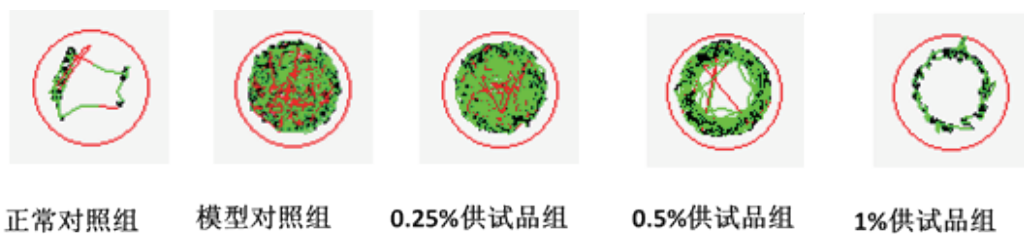


图4. 斑马鱼运动轨迹图

8.5 皮肤修复功效评价

机械损伤将产生皮肤组织的结构性破坏，斑马鱼尾鳍具有强大的自我再生功能。切断尾鳍后，伤口立即紧缩、上皮细胞覆盖，数小时内出现炎症反应，伤口处中性粒细胞的数量增多，转基因中性粒细胞荧光斑马鱼的中性粒细胞可在荧光显微镜下被明显观察。因此可以通过尾鳍再生速度、伤口附近的中性粒细胞数量评价供试品修复功效。

【实验方案】

将斑马鱼分成三组，分别是正常对照组、模型对照组和供试品组。正常对照组不做处理，模型对照组和供试品组均采用手术方法定量切断尾鳍，从而完成造模处理，供试品组中添加一定浓度的受试化妆品。避光孵育一段时间后，将各组斑马鱼在体视显微镜下拍照并保存图片，用高级图像分析软件对斑马鱼尾鳍面积进行定量分析；用高级图像分析软件对斑马鱼尾鳍损伤部位的中性粒细胞进行计数。

【评价指标】

- 1、组织再生-损伤部位修复
- 2、伤口愈合-损伤部位炎症细胞数量

【结果展示】

1、斑马鱼尾鳍面积

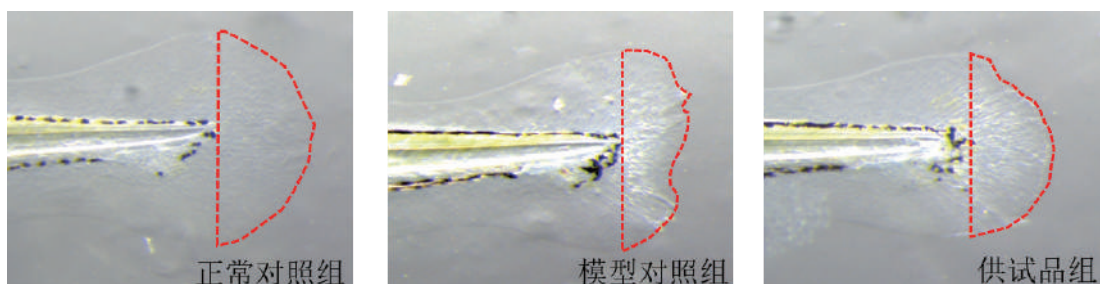


图1. 斑马鱼尾鳍面积表型图

红色为分析区域

2、尾鳍损伤部位中性粒细胞、炎症因子的表达量（提供柱状图）

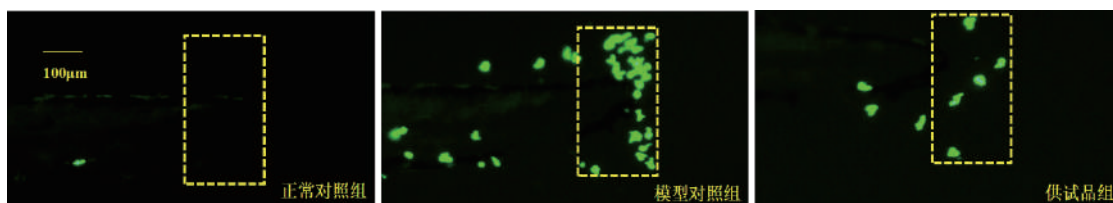


图2. 斑马鱼尾鳍中性粒细胞表型图

黄色虚线区域为计算区域，绿色荧光点为中性粒细胞

8.6 抗光老化功效评价

紫外线辐射是导致皮肤损伤和老化最主要的外源性环境因素，容易诱导诸如炎症反应、氧化应激（当自由基产生量大于机体清除能力时就发生氧化应激反应，可能会对细胞结构造成严重损害）、DNA损伤等生理作用，甚至破坏胶原蛋白、弹性蛋白的活性结构，外观上表现为肌肤的红肿、色素沉着、松弛和细纹等。斑马鱼尾鳍类似于人类的四肢，皮肤结构与人类相似，紫外线对斑马鱼的损伤将导致一系列的有害生理作用，外观上表现为尾鳍的萎缩、面积减少。护肤产品在皮肤表面对紫外线的有效吸收，将防止紫外线对皮肤造成损伤。

【实验方案】

将斑马鱼分成三组，分别是正常对照组、模型对照组、化妆品组。正常对照组不做处理，模型对照组和化妆品组分别进行紫外光多次照射，孵育一段时间后，三组斑马鱼分别进行尾鳍拍照处理，分析斑马鱼尾鳍面积；对斑马鱼整体进行特异性荧光染色，观察斑马鱼卵黄囊活性氧自由基清除情况；将斑马鱼整体放到荧光显微镜下拍照，统计皮肤表面中性粒细胞数量。通过斑马鱼尾鳍面积、卵黄囊活性氧自由基清除情况、皮肤表面中性粒细胞数量来评价抗光老化功效。

【评价指标】

- 1、晒伤部位恢复（尾鳍面积）
- 2、ROS清除率
- 3、皮肤表面中性粒细胞数量

【结果展示】

1、斑马鱼尾鳍面积

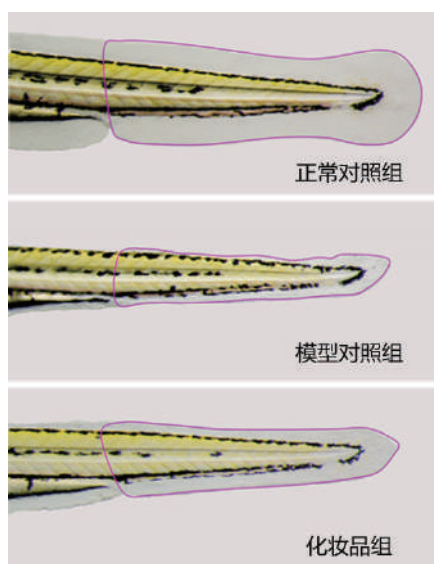


图1. 斑马鱼尾鳍损伤面积表型图
红色为分析区域

2、斑马鱼卵黄囊荧光强度

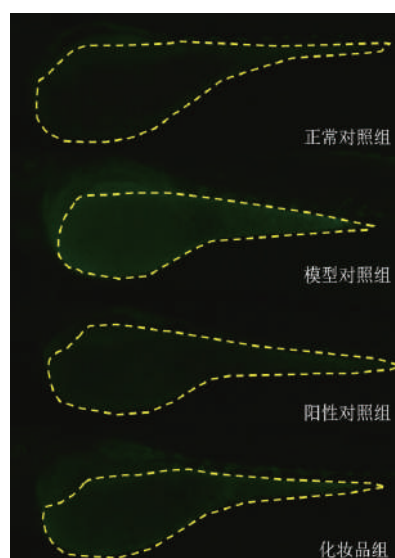


图2. 斑马鱼卵黄囊荧光表型图
黄色为分析区域，绿色荧光代表氧自由基

3、皮肤中性粒细胞数量（提供表形图，略）

8.7 紧致功效评价

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，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，评价受试物是否具有紧致功效。

【实验方案】

将斑马鱼分成若干组，含正常对照组和供试品组。正常对照组不做处理，供试品组使用受试化妆品，孵育一定时间后，对每组斑马鱼进行收样，使用试剂盒提取RNA，使用q-PCR检测目的基因的转录水平，通过斑马鱼皮肤弹性蛋白基因相对表达量评价供试品紧致功效。

【评价指标】

弹性蛋白基因相对表达量

【结果展示】

基因相对表达量：提供柱状图

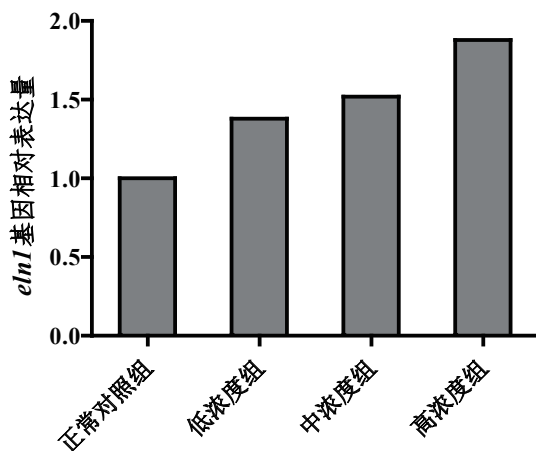


图1. 斑马鱼体内`elne`基因相对表达量

8.8 抗皱功效评价

1、胶原蛋白是人体皮肤中主要的胞外基质，其中Ⅰ型胶原蛋白的含量最多。皮肤皱纹的出现与胶原蛋白的正常合成和表达密切相关。斑马鱼具有与人高度保守的调控胶原蛋白的相关基因，通过检测斑马鱼胶原蛋白基因**RNA**的相对表达量可以反映供试品的抗皱功效。

2、斑马鱼皮肤结构与人体皮肤结构相似，紫外线照射后，皮肤结构中的胶原蛋白、弹性蛋白等将发生变化，使尾鳍皮肤产生皱缩。因此，可以利用斑马鱼评价化妆品对于因紫外线照射引起的皮肤皱纹的缓解作用。添加受试物后，在一定强度紫外线照射下，通过尾鳍面积的抑制率来分析受试物保护斑马鱼尾鳍变形的程度，从而评价其抗皱功效。

【实验方案】

1、将斑马鱼分成若干组，含正常对照组和供试品组。正常对照组不做处理，供试品组使用受试化妆品，孵育一定时间后，对每组斑马鱼进行收样，使用试剂盒提取RNA，使用q-PCR检测目的基因的转录水平，通过斑马鱼胶原蛋白基因相对表达量评价供试品抗皱功效。

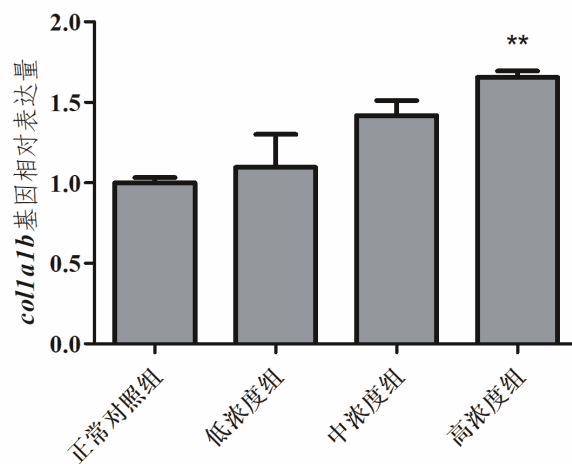
2、将斑马鱼分成三组，分别是正常对照组、模型对照组、化妆品组。正常对照组不做处理，模型对照组和化妆品组分别进行紫外光多次照射，孵育一段时间后，三组斑马鱼分别进行尾鳍拍照处理，分析斑马鱼尾鳍面积。通过斑马鱼尾鳍面积来评价抗皱功效。

【评价指标】

- 1、Ⅰ型胶原蛋白基因相对表达量
- 2、尾鳍皱缩抑制率

【结果展示】

1、基因相对表达量：提供柱状图

图1. 斑马鱼体内*colla1b*基因相对表达量

2、尾鳍面积表型（提供表型图，略）

8.9 提亮肤色功效评价

肤色暗沉是体内多种因素共同作用的结果，其中重要的一种因素是由活性氧自由基引起的氧化应激反应，导致皮肤色素沉着，看上去黯淡无光。甲萘醌是一种苯醌化合物，能产生活性氧自由基，当自由基产生量大于机体清除能力时就发生氧化应激反应，表观上导致皮肤色素沉着。用甲萘醌处理后的斑马鱼，加入供试品，在白光条件下分析皮肤局部亮度，通过亮度的增加程度反映供试品提亮肤色的功效。

【实验方案】

将斑马鱼分成三组，分别是正常对照组、模型对照组和供试品组。正常对照组不做处理，模型对照组用甲萘醌处理，供试品组用甲萘醌处理后再用供试品处理，孵育一定时间后，对斑马鱼进行拍照，利用高级图像处理软件分析斑马鱼卵黄囊部分的色素信号强度，从而评价其提亮肤色功效。

【评价指标】

卵黄囊色素信号强度

【结果展示】

斑马鱼卵黄囊色素表型

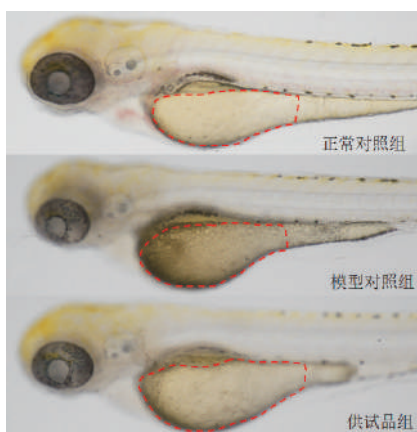


图1. 斑马鱼卵黄囊色素表型图

红色为分析区域

8.10 温和功效评价

化妆品中刺激性物质作用于机体后可能引发机体产生刺激、过敏等一系列的生理、生化反应，其中最主要的是刺激反应，可导致水肿、红斑、瘙痒、疼痛等症状。刺激性成分对皮肤的刺激性作用主要是通过诱发炎症反应的通路来实现的，炎症反应的产生将使机体产生免疫应答，各种免疫细胞在趋化因子的作用下向表皮炎症发生的部位迁移、聚集，其中中性粒细胞的敏感性和特异性最强。斑马鱼与人类具有非常相似的免疫系统，利用转基因荧光标记技术将斑马鱼体内中性粒细胞进行荧光标记，当供试品接触到斑马鱼皮肤时，通过观察中性粒细胞的迁移、聚集数量可以反应其是否温和。

【实验方案】

将斑马鱼分成两组，分别是正常对照组和供试品组。正常对照组不做处理，供试品组添加受试化妆品。孵育一段时间后，将斑马鱼整体放到荧光显微镜下拍照，以皮肤表面中性粒细胞数量评价供试品是否温和。

【评价指标】

皮肤表面中性粒细胞数量

【结果展示】

皮肤中性粒细胞数量

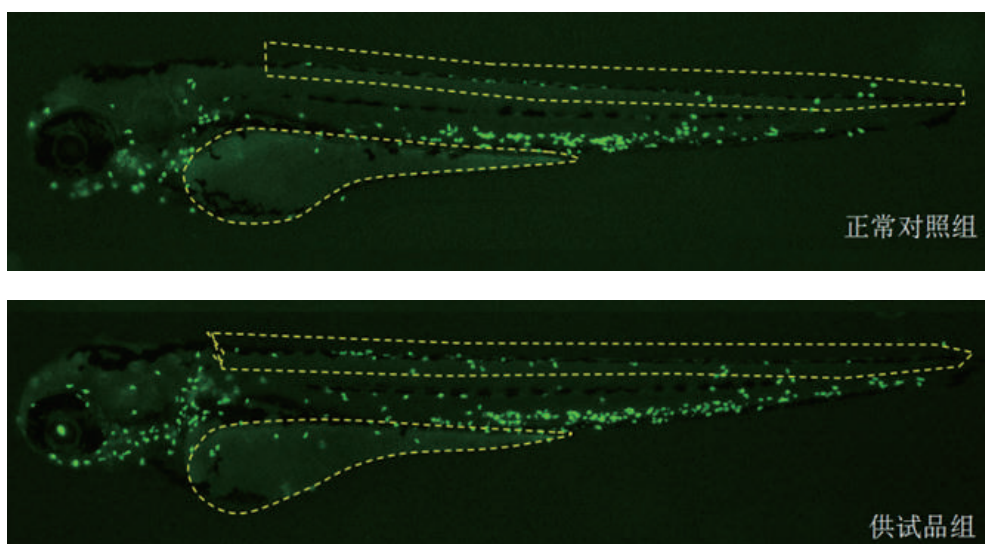


图1. 斑马鱼皮肤中性粒细胞数量

第九章

斑马鱼技术应用于化妆品评价的应用案例

9.1 山东福瑞达生物股份有限公司产品功效研究

【企业简介】：

山东福瑞达生物股份有限公司（简称“福瑞达生物股份”）是福瑞达医药集团下属企业，成立于1998年，是山东省化妆品行业龙头企业、专精特新企业、及高新技术企业。

瑗尔博士（DR.ALVA）2018年创立，并致力于微生态科学护肤，通过精准科学的护肤方式解决因皮肤菌群失衡引发的皮肤问题。瑗尔博士坚持科研为本，以山东省药学科学院为技术依托，成立联合化妆品研究所，并在上海应用技术大学设立独立研究室皮肤微生态研究室，联合山东大学成立益生菌协调创新中心，同时与来自全球国际顶尖的专业研发机构开展科研合作，在海外也设立了实验室及研发中心。

9.1.1 益生菌发酵褐藻滤液

【原料信息】：

益生菌发酵褐藻是瑗尔博士和齐鲁工业大学共同联合开发的专利成分，创新利用两种益生菌的生物转化技术，将褐藻的活性成分转化为更易于吸收的小分子形式，同时保留益生菌的有益代谢产物，提高褐藻生物转化效率和成分含量，使其具有较好的抗氧化效果；在全皮细胞模型上，能够促进V型胶原蛋白合成，修复基底膜，起到显著的修复、抗衰老功效；同时，其能够促进表皮葡萄球菌的生长，抑制金黄色葡萄球菌的生长，保持皮肤微生态动态平衡。益生菌发酵得谋采用双重益生菌对褐藻进行两次发酵，是基于皮肤微生态的，抗衰老、修复、抗氧化等多功效的创新原料，此项技术属于国内首创技术，真正实现了从0到1的跨越。

【检测项目】：

抗皱功效

【检测方法】：

《斑马鱼抗皱功效评价实验标准操作规程》

【方法原理】：

皮肤的生长、修复、营养以及弹性、张力都与胶原蛋白有关，它的流失会使皮肤光滑度下降，产生皱纹。在四足动物中，I型胶原蛋白是一个三聚体，主要由两个 $\alpha 1$ 链和一个 $\alpha 2$ 链组成，分别由col1a1a和col1a2基因编码，在结缔组织和骨中执行胶原蛋白相关生物功能。在斑马鱼中存在三种I型胶原基因，分别编码 $\alpha 1$ (I)、 $\alpha 2$ (I)和 $\alpha 3$ (I)链的col1a1a、col1a1b和col1a2。因此，通过检测col1a1a或（和）col1a1b或（和）col1a2基因相对表达量可表明样品是否具有抗皱功效。

【实验体系】：

①试验体系：野生型AB品系斑马鱼。

②斑马鱼鱼龄：受精后4天（4 dpf）。

③每组实验样本量：30尾（三次生物学重复，N=3）。

④成鱼饲养及繁殖方法：按照本公司实验室标准饲养和繁殖方法，符合国际AAALAC认证（认证编号：001458）的要求。

【实验步骤】：

1. 随机选取斑马鱼于6孔板中，每孔30尾。
2. 水溶给予样品，同时设置正常对照组，每孔容量为3 mL。三次生物学重复。
3. 28 °C条件下避光孵育24 h。
4. 提取各实验组斑马鱼总RNA，合成cDNA，利用q-PCR检测 β -actin和目的基因的基因表达。
5. 用 β -actin作为基因表达的内参，计算目的基因的RNA相对表达量。

$$\text{RNA相对表达量} = 2^{\Delta\Delta C(t)}$$

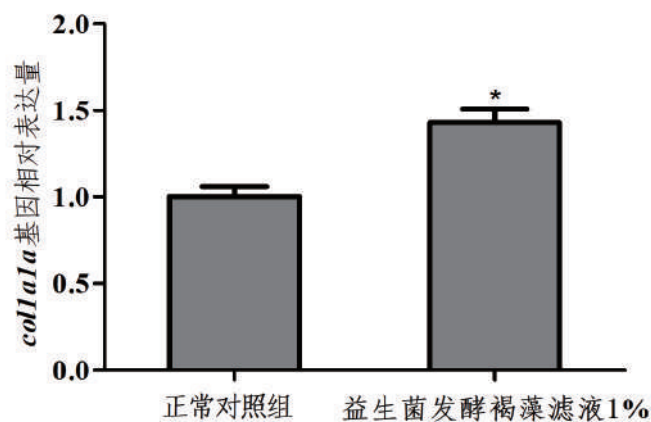
$$\Delta\Delta C(t) = \overline{\Delta C(t)}_{\text{正常对照组}} - \Delta C(t)_{\text{样品组}}$$

$$\Delta C(t) = C(t)_{\text{目的基因}} - C(t)_{\beta\text{-actin}}$$

【检测结果】：

检测项目	检测浓度 (%)	COL1A1A基因 相对表达量	基因表达 促进率 (%)	P值	检测结果
抗皱功效	正常对照组	1.00	-	-	-
	益生菌发酵褐藻 滤液 1%	1.43	43	< 0.05	显著

该样品功效实验柱形图，如下图a所示：



图a. *COL1A1A*基因相对表达量柱形图与正常对照组比较，* $P < 0.05$

观察发现，样品益生菌发酵褐藻滤液的*COL1A1A*基因相对表达量与正常对照组相比，明显增加，揭示了该样品具有抗皱功效。

【检测结论】：

在本次实验条件下，样品益生菌发酵褐藻滤液，具有抗皱功效。

9.1.2 瓊尔博士酵萃精研肌律御时面霜

【产品信息】：

瓊尔博士酵萃精研肌律御时面霜5%独家抗氧成分褐藻酵萃搭配抗老黄金玻色因，由表及里紧致松弛肌肤，改善肌肤老化问题，抗老的同时兼具独家专利成分褐藻的卓越抗氧力，改善因年纪增长带来的急速氧化暗黄问题，最后配合6胜肽-1及其他6重胜肽成分打造纯功效型抗老面霜。独家的功效液晶促渗技术用功效成分代替传统乳化，实现油脂乳化同时更加强肌肤补水力，减少肌肤负担，促进有效成分吸收。75度水溶蒸馏技术，融入水溶性经典抗氧活性成分，减少胶原流失。一瓶实现抗氧、抗皱、紧致三重效果。

【检测项目】：紧致功效

【检测方法】：

《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》

【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，让肌肤免受老化、松弛的困扰。弹性蛋白由两种类型的短肽段交替排列构成，**eln1**、**eln2**负责编码弹力蛋白不同的肽段，两个基因共同负责调控弹力蛋白的表达水平，使皮肤紧致，具有弹性。斑马鱼具有与人相似的弹性蛋白（**eln1**、**eln2**）基因。因此，通过检测**eln1**或（和）**eln2**基因相对表达量可表明样品是否具有紧致功效。

【实验体系】：

①试验体系：野生型**AB** 品系斑马鱼。

②斑马鱼鱼龄：受精后4天（4 dpf）。

③每组实验样本量：30尾（三次生物学重复，**N=3**）。

④成鱼饲养及繁殖方法：按照本公司实验室标准饲养和繁殖方法，符合国际**AAALAC**认证（认证编号：**001458**）的要求。

【实验步骤】：

1. 随机选取斑马鱼于6孔板中，每孔30尾。
2. 水浴给予样品，同时设置正常对照组，每孔容量为3 mL。三次生物学重复。
3. 28 °C条件下避光孵育24 h。
4. 提取各实验组斑马鱼总RNA，合成cDNA，利用q-PCR检测β-actin和目的基因的基因表达。
5. 用β-actin作为基因表达的内参，计算目的基因的RNA相对表达量。

$$\text{RNA相对表达量} = 2^{\Delta\Delta C(t)}$$

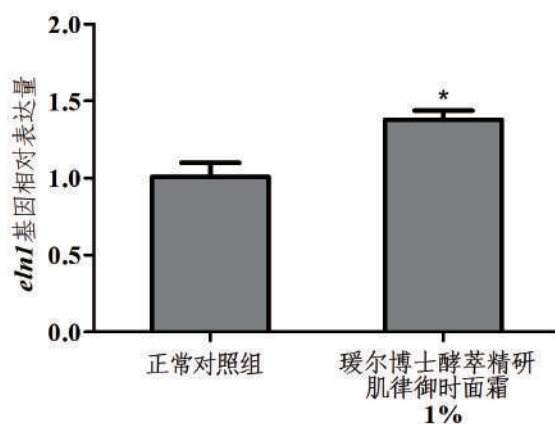
$$\Delta\Delta C(t) = \overline{\Delta C(t)}_{\text{正常对照组}} - \Delta C(t)_{\text{样品组}}$$

$$\Delta C(t) = C(t)_{\text{目的基因}} - C(t)_{\beta\text{-actin}}$$

【检测结果】：

检测项目	检测浓度（%）	eln1基因相对表达量	基因表达促进率（%）	P值	检测结果
紧致功效	正常对照组	1.01	-	-	-
	瑗尔博士醇萃精研肌律御时面霜 1%	1.38	37	< 0.05	显著

该样品功效实验柱形图，如下图b所示：



图b. *eln1*基因相对表达量柱形图与正常对照组比较, * $P < 0.05$

观察发现, 样品爱尔兰博士酵萃精研肌律御时面霜的*eln1*基因相对表达量与正常对照组相比, 明显增加, 揭示了该样品具有紧致功效。

【检测结论】：

在本次实验条件下, 样品爱尔兰博士酵萃精研肌律御时面霜, 具有紧致功效。

9.1.3 瓊尔博士酵萃精研肌律微晶水

【产品或原料信息】：

以外抗内养为研发逻辑，对外抵御外源性刺激，对内滋养修护内源性衰老。添加瓊尔博士独家专利成分——褐藻发酵精粹，当家双菌发酵工艺提取活性有效小分子成分，形成多通路抗衰，修护肌肤屏障的同时对抗自由基，改善皮肤氧化产生暗黄问题。专利硅烷化玻尿酸+六重修护肽+肌肽，补充肌肤硅元素，协同肌肽保护胶原蛋白，紧实纤维，平滑纹路。时钟节律因子+奥婷敏+益生元，调节肌表菌群平衡，顺应肌肤“生物钟”减少熬夜和紫外线损伤。同时微晶水采用微囊包裹悬浮技术，一瓶包含20000颗抗老老微囊精华颗粒，泵头压破微囊，瞬间释放精华活性。

【检测项目】：

抗氧化功效

【检测方法】：

斑马鱼抗氧化功效试验方法

【方法原理】：

CellROX®试剂是一种DNA染料，本身荧光较弱，可被细胞内的氧自由基（ROS）氧化，氧化产物与DNA结合，产生明亮的绿色荧光。CellROX®可溶于有机溶剂（如二甲基亚砜），而斑马鱼卵黄囊的主要成分为脂肪，因此，CellROX®在卵黄囊的通透性较强，该部位染色明显。甲萘醌能产生活性氧自由基，当自由基产生量大于机体清除能力时就发生氧化应激反应，通过斑马鱼卵黄囊荧光强度评价样品是否具有抗氧化功效。

【实验体系】：

- ①试验体系：黑色素等位基因突变半透明Albino品系斑马鱼。
- ②斑马鱼鱼龄：受精后2天（2 dpf）。
- ③每组实验样本量：15尾（N=10）。
- ④成鱼饲养及繁殖方法：按照本公司实验室标准饲养和繁殖方法，符合国际AAALAC认证（认证编号：001458）的要求。

【实验步骤】：

1. 随机选取斑马鱼于6孔板中，每孔15尾。
2. 水溶给予甲萘醌建立斑马鱼氧化应激模型。
3. 水溶给予样品，同时设置正常对照组和模型对照组，每孔容量为3 mL。
4. 28 °C条件下避光孵育22 h。

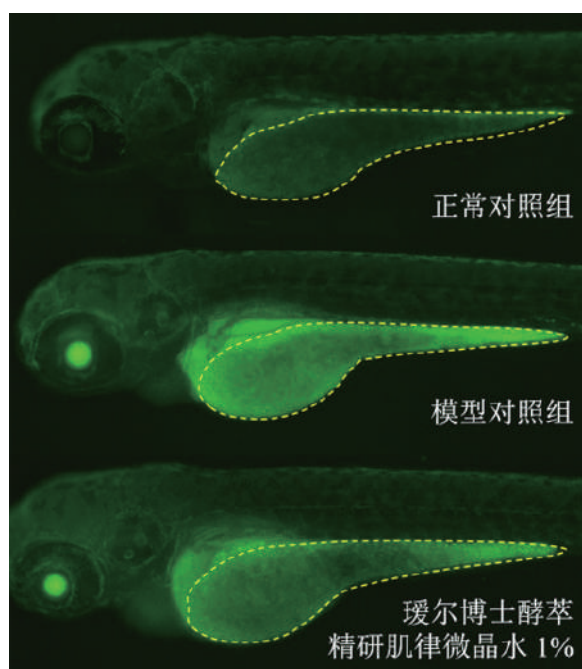
5. 用特异性ROS荧光试剂对斑马鱼进行染色处理，染色结束后，每个实验组随机选取10尾斑马鱼置于荧光显微镜下拍照，用高级图像处理软件分析并采集数据，分析斑马鱼卵黄囊荧光强度（S），根据公式计算样品的抗氧化功效，判断其是否具有抗氧化功效。

$$\text{抗氧化功效 (\%)} = \frac{S(\text{模型对照组}) - S(\text{样品组})}{S(\text{模型对照组}) - S(\text{正常对照组})} \times 100\%$$

【检测结果】：

检测项目	组别	诱导条件	卵黄囊荧光强度 (像素, MEAN ± SE)	功效 (%)	P值	检测结果
抗氧化功效	正常对照组	1.00	521015 ± 9449	-	< 0.001	-
	模型对照组	1.5 μM甲 萘醌溶液	1233961 ± 13074	-	-	-
	瓊尔博士醇萃精研 肌律微晶水 1%		1079595 ± 9629	22	< 0.001	显著

该样品功效实验柱形图，如下图c所示：



图C. 抗氧化典型图（黄色虚线部位为定量区域）

观察发现，样品瓊尔博士醇萃精研肌律微晶水的卵黄囊荧光强度与模型对照组相比，明显减弱，揭示了该样品具有抗氧化功效。

【检测结论】：

在本次实验条件下，样品瓊尔博士醇萃精研肌律微晶水，具有抗氧化功效。

9.2 西安绿天生物技术有限公司原料功效研究

【企业简介】：

西安绿天生物技术有限公司成立于2013年，聚焦于敏感肌天然原料领域。西安绿天目前处于高速发展的阶段，拥有510m²的研发室，成立了专业的硕士研发团队，并和西北工业大学生命学院建立了稳固的战略合作关系。2018年绿天建立了6900m²的生产车间，形成了多条提取生产线以及植提精品生产线。公司秉承“成为敏感肌天然原料的引领者”的企业愿景，不断创新，相继开发出多款业内经典的原料。

【原料信息】：

1.DCR®520：急性神经舒缓类原料。对TRPV1的抑制率接近4-叔丁基环己醇，且细胞毒安全性更高。

2.DCR®560：长效舒缓类原料。抑制炎症效果接近红没药醇，且细胞毒安全性更高。

3.PCR®黄芩根提取物：长效舒缓类原料。市面上水溶性和稳定性领先的黄芩提取物。

4、DCR®410：油敏肌适用的舒缓原料，控油能力和安全性远高于市面主流产品，且具有优异的舒缓皮肤炎症功效。

5、PCR®缬草提取物：芬芳型舒缓原料。其芳香味为一种青草和泥土的田园芬芳，是百余种芳香类型中最独特的存在，同时拥有极佳的舒缓作用。

9.2.1 抗炎舒缓功效检测

【检测项目】：

抗炎舒缓功效

【检测方法】：

《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》

【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，同样能诱导炎症反应，导致中性粒细胞发生免疫应答，向皮肤表面增值和迁移，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以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。

【实验体系】：

①试验体系：转基因中性粒细胞绿色荧光斑马鱼（MPX）。

②斑马鱼鱼龄：受精后2天（2 dpf）。

③每组实验样本量：15尾（N=10）。

④成鱼饲养及繁殖方法：按照本公司实验室标准饲养和繁殖方法，符合国际AAALAC认证（认证编号：001458）的要求。

【实验步骤】：

1. 随机选取斑马鱼于6孔板中，每孔15尾。

2. 水溶给予SLS建立斑马鱼皮肤炎症模型。

3. 水溶给予样品，同时设置正常对照组和模型对照组，每孔容量为3 mL。

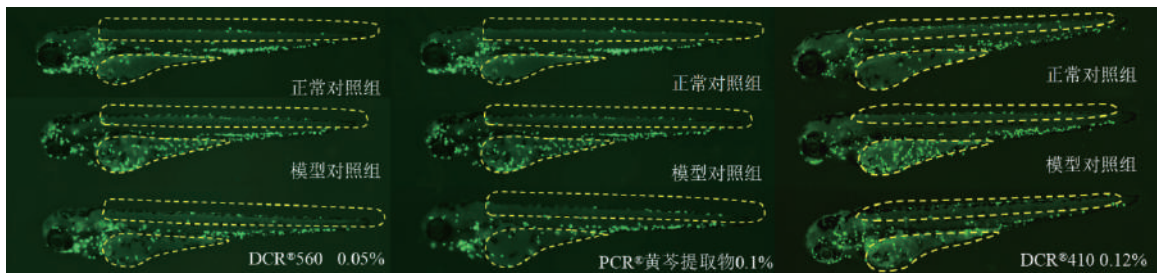
4. 28 °C条件下避光孵育18 h。

5. 每个实验组随机选取10尾斑马鱼置于荧光显微镜下拍照，用高级图像处理软件分析并采集数据，分析斑马鱼皮肤中性粒细胞数量（N），根据公式计算样品的舒缓功效，判断其是否具有舒缓功效。

$$\text{舒缓功效 (\%)} = \frac{N(\text{模型对照组}) - N(\text{样品组})}{N(\text{模型对照组}) - N(\text{正常对照组})} \times 100\%$$

【检测结果】：

检测项目	样品名称	检测浓度 (%)	功效 (%)	P值	检测结果
抗炎舒缓功效	DCR®560	0.05	82	<0.001	显著
	PCR®黄芩提取物	0.1	87	<0.001	显著
	DCR®410	0.12	74	<0.001	显著



【检测结论】：

在本次实验条件下，样品DCR®560、PCR®黄芩提取物、DCR®410，具有抗炎舒缓功效。

9.2.2 神经舒缓功效检测

【检测项目】：神经舒缓功效

【检测方法】：《斑马鱼舒缓功效评价实验标准操作规程》

【方法原理】：

皮肤接触冰醋酸会有刺痛和灼伤的感觉。选择游泳能力尚未发育完全的斑马鱼，利用冰乙酸刺激斑马鱼引起较大面积和较长时间的炎性疼痛，导致运动轨迹越多，疼痛越严重。可以应用行为分析仪检测斑马鱼的总运动距离，从而评价受试物的舒缓功效。

【实验体系】：

①试验体系：野生型AB品系斑马鱼。

②斑马鱼鱼龄：受精后2天（2 dpf）。

③每组实验样本量：15尾（N=10）。

④成鱼饲养及繁殖方法：按照本公司实验室标准饲养和繁殖方法，符合国际AAALAC认证（认证编号：001458）的要求。。

【实验步骤】：

1. 随机选取斑马鱼于6孔板中，每孔15尾。

2. 水溶给予样品，同时设置正常对照组和模型对照组，每孔容量为3 mL。

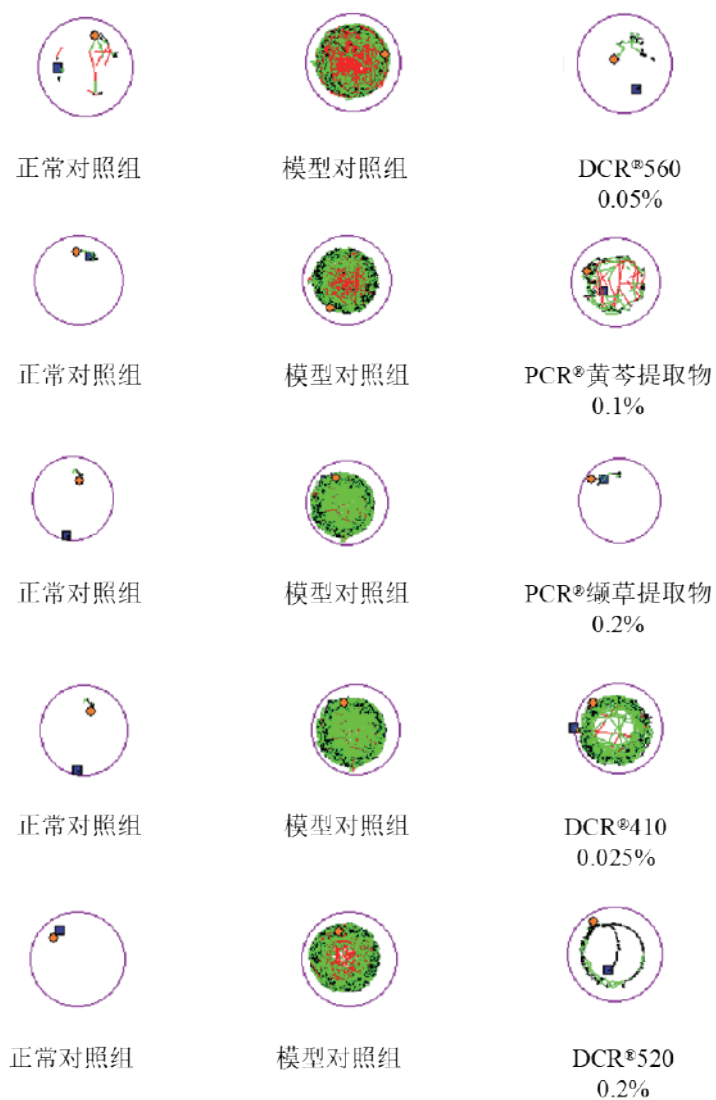
3. 28 °C条件下避光孵育24 h。

4. 每个实验组随机选取10尾斑马鱼转移至96孔板，水溶给予冰醋酸建立斑马鱼疼痛模型。立即利用行为分析仪测定斑马鱼的运动轨迹，分析并采集斑马鱼的总运动距离（D），根据公式计算样品的舒缓功效，判断其是否具有舒缓功效。

$$\text{舒缓功效 (\%)} = \frac{\text{D (模型对照组)} - \text{D (样品组)}}{\text{D (模型对照组)} - \text{D (正常对照组)}} \times 100\%$$

【检测结果】：

检测项目	样品名称	检测浓度 (%)	功效 (%)	P值	检测结果
神经舒缓功效	DCR®560	0.05	99	<0.001	显著
	PCR®黄芩提取物	0.1	92	<0.001	显著
	PCR®缬草提取物	0.2	100	<0.001	显著
	DCR®410	0.025	66	<0.001	显著
	DCR®520	0.2	90	<0.001	显著



【检测结论】：

在本次实验条件下，样品DCR®560、PCR®黄芩提取物、PCR®缬草提取物、DCR®410、DCR®520，均具有神经舒缓功效。

第十章

斑马鱼技术在化妆品行业应用中面临的
挑战和机遇

10.1 斑马鱼技术在化妆品行业应用中面临的挑战

斑马鱼因其广泛的优势将成为化妆品安全性和功效性评价的一个重要体内模型，同时也是对现有化妆品评价体系的一个很好的完善。但由于与人物种间的差异，化妆品安全性和功效性评价是化妆品开发中的一项重要内容。斑马鱼因其自身的优势将成为化妆品评价的一个重要体内模型，特别是在安全性以及防晒及美白功效评价等研究领域有着很好的应用前景，同时也是对现有化妆品评价体系的补充和完善。当然，由于某些基因的功能与人类存在明显差异，斑马鱼还不能完全取代经典实验模型，同时作为化妆品评价的相关政策和法规，实验方法也未标准化。这些都值得进一步的研究和探讨。斑马鱼技术在化妆品行业的大范围应用历史并不很长，还面临着一些挑战，这些挑战也是斑马鱼技术在后续的发展中需要重点去攻克。主要包括以下两点。

（1）斑马鱼技术方法标准的统一

虽然当前已经有10项技术方法的团体标准发布，且陆续还会有标准发布，但仍然缺少全国范围内具有权威性的标准。不同团体制订的同一个功效的评价方法标准还存在着一定的差异，比如对于实验样本数量的要求、结果判定标准、实验周期等。技术方法的不统一必然会造成评价结果的差异，这就会影响不同实验室之间实验结果的可比性，也会给化妆品企业对实验结果科学性、合理性、可靠性的判断造成障碍，甚至会影响行业对斑马鱼技术的认可度。

（2）部分样品的前处理问题

斑马鱼由其水生生物的特点决定了实验样品的暴露方式都是直接分散在饲养用水中，经皮吸收。因此，需要样品能够溶解或在水中均匀分散。目前大部分化妆品及其原料通过一定的前处理能够溶解或均匀分散在水溶液中，但像不溶性粉体（如爽身粉、散粉等）等样品目前尚未建立合适的前处理方法，不适合应用斑马鱼进行评价。

10.2 斑马鱼技术在化妆品行业应用中面临的机遇

（1）植物资源开发

作为世界上植物资源最丰富的地区之一，我国拥有数以万计的化妆品可用植物资源有待开发^[35]。以现代新技术，高效进行化妆品新原料开发，是化妆品企业在新形势下抢占市场制高点的重要战略手段。斑马鱼模型等在药物研发领域已经被证实是强有力的工具手段，将其导入化妆品功效原料的开发过程已经引起了充分重视。随着这些生物技术手段在开发化妆品功效原料中的应用越来越广泛，传统化妆品行业内研发周期冗长、目标原料不明确、产品功效难以理解等问题有望得到解决，我国植物源化妆品的安全和功效评价体系将进一步完善。利用现代生物技术方法，建立统一的化妆品功效评价体系，建立完善的植物源化妆品安全与功效评价体系，这对净化国内化妆品市场、维护我国化妆品行业的健康发展，具有极为重要的意义。

参考文献

[35]罗飞亚，王钢力，邢书霞，等. 化妆品安全性评价替代试验的研究进展及思考[J]. 中国医药生物技术, 2016, 11(5):470-476.

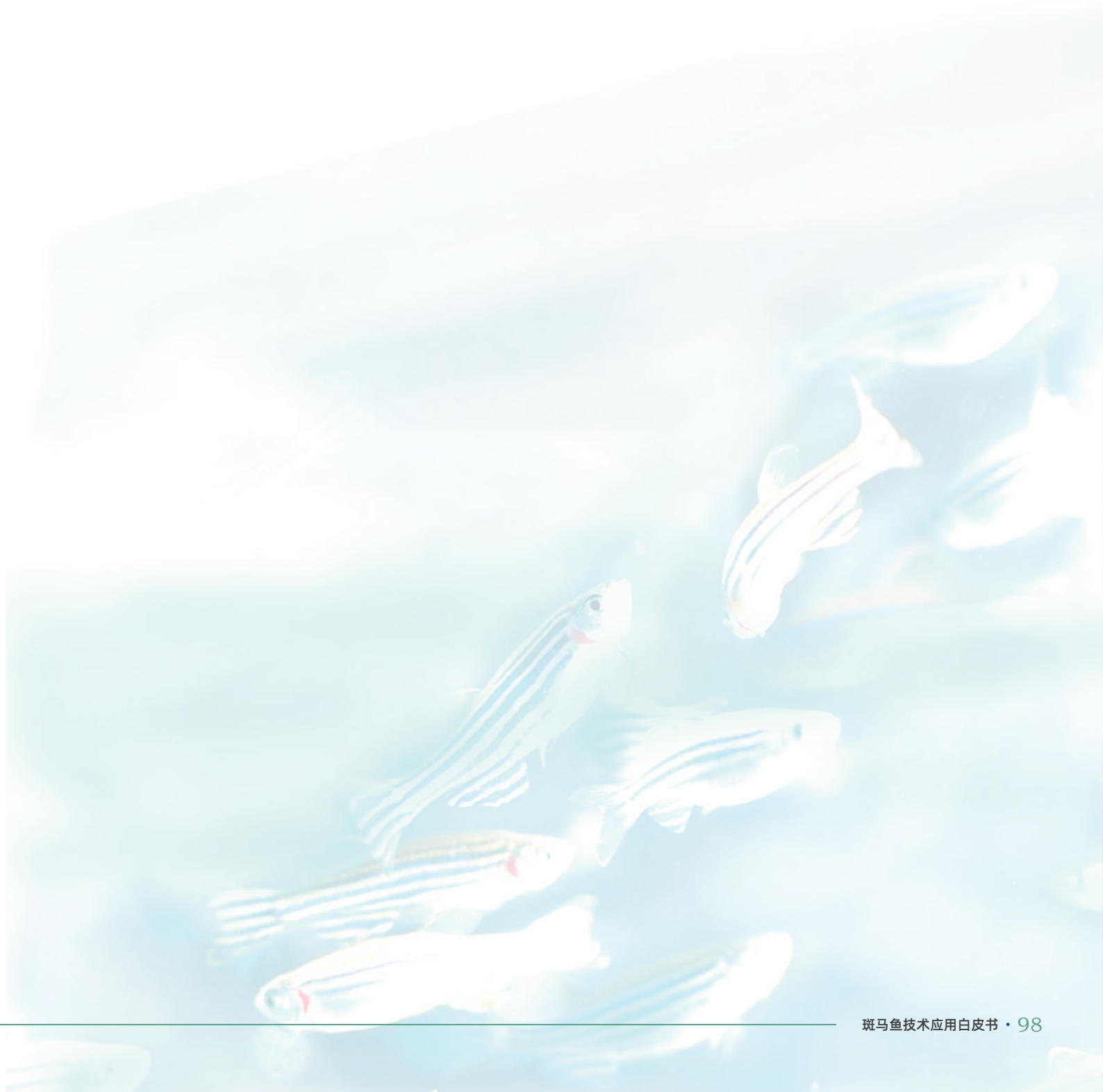
（2）产品应用方面

斑马鱼用于化妆品产品的评价目前还局限于普通化妆品的功效与安全性评价。由于在溶解性及模型指标方面的局限性，斑马鱼技术还无法用于彩妆类化妆品评价中。

对化妆品安全性和功效性的评价是化妆品开发中的一项重要内容，只有通过合理又严谨的评价才能保证提供给消费者更加安全、有效的产品。斑马鱼因其广泛的优势将成为化妆品安全性和功效性评价的一个重要体内模型，同时也是对现有化妆品评价体系的一个很好的完善。但由于与人物种间的差异，化妆品安全性和功效性评价是化妆品开发中的一项重要内容。

斑马鱼因其自身的优势将成为化妆品评价的一个重要体内模型，特别是在安全性以及防晒及美白功效评价等研究领域有着很好的应用前景，同时也是对现有化妆品评价体系的补充和完善。

当然，由于某些基因的功能与人类存在明显差异，斑马鱼还不能完全取代经典实验模型，同时作为化妆品评价的相关政策和法规，实验方法也未标准化。这些都值得进一步的研究和探讨。



第十一章

斑马鱼技术在化妆品行业应用的展望

目前，斑马鱼技术在化妆品行业的应用已经覆盖了产品开发过程的各个层级，并且正逐渐成为主流的功效和安全性评价方法之一。未来斑马鱼技术将进一步结合转基因技术、AI自动化技术等前沿技术为化妆品评价工作提供更加科学、准确、省时省力的研发工具。同时，在新的法规背景下，我国化妆品事业必将走向以科学实验为基础的健康发展道路，而在监管部门的引领下，斑马鱼技术将携手人体实验、体外实验等多种测评技术共同推动行业的进步和发展。

1、产业基础

从斑马鱼行业本身发展来看，国内已有数百家斑马鱼实验室，分布于各大高校、科研院所、医院、地方疾病预防控制中心、海关、保健食品企业、化妆品企业和药物研发企业等。随着斑马鱼技术应用广度和深度进一步拓展，斑马鱼实验室内相关专用仪器设备与应用软件产业正蓬勃发展中。国内斑马鱼养殖系统的生产厂家在十年内已经扩增近3倍，其他斑马鱼智能化设备的开发与应用也逐渐开展起来，如斑马鱼胚胎分选装置，斑马鱼自动限位与3D成像系统、斑马鱼高通量拍照系统与斑马鱼图像自动分析系统等，均为国内斑马鱼技术的科研与应用提供了全新的解决方案，实现高通量、高一致性、低成本与智能成像分析。依据目前发展进度，未来将有更多的斑马鱼实验室涌出，在化妆品检测领域发挥着重要的角色。

2、竞争优势

①高快好省

作为研发工具的斑马鱼技术，在化妆品的原料筛选和配方验证方面优势明显。在原料筛选阶段，利用斑马鱼高通量筛选技术可单次评价20个以上的样品，大幅度提升对于活性成分的检测效率。针对不同配方的功效与安全评价，斑马鱼依然延续其高通量和高效的优势。加之其实验周期短、速度快、性价比高，成本友好，能够为企业节省大量研发资源，缩短研发周期。

②推优选优

目前用斑马鱼技术来验证评价化妆品功效和安全性的企业，还呈现出对斑马鱼助力产品卖点打造方面的浓厚兴趣。其原因，主要源于斑马鱼实验过程的可观测性强、可视化程度高的优势。因此，斑马鱼作为一种科学且直观的生物检测工具，在产品的推优选优方面的价值愈加有想象力。不少企业将实验过程中斑马鱼的皮肤生理变化以视频和图文的形式生动地展示，强化了产品差异化功效的卖点证言，降低了消费者的理解成本，提升其对产品宣称功效的科学性与可信度。

随着斑马鱼技术在化妆品行业内不断推广，其应用在广度、深度两方面都将得到更大再次释放。

规模化效应的加持下，斑马鱼的技术优势将为化妆品企业的竞争带来更多新变量。

③质控体系

技术推进和应用拓展正在改变传统的认知。斑马鱼生物检测会成为理化检测的有益补充。依托斑马鱼技术建立企业内部化妆品原料生物安全预警筛查技术体系，对化妆品原料作出更全面的安全风险预警，深化安全评价的能见度，提升品质管理的颗粒度。将斑马鱼纳入到内部质量控制管理体系中，加固了质量安全管理阀门，企业质量管理水平也实现了二次跃升。

④生物大数据库构建

斑马鱼技术的产业应用过程，也是一场生物数据的原始积累过程。有机构已将原始数据进行数据化改造，构建了斑马鱼生物大数据库。通过结构化队列、自然语言分析和知识图谱，丰富原料的信息维度，对大量数据开展以应用为目的的技术开发而形成斑马鱼生物大数据工具，为行业的研发和产品创新赋能。

综合产业基础、竞争优势和应用范围等三个维度，同时在“消费端+政策端+产业端”协同驱动下，我们有理由相信斑马鱼技术作为领先的化妆品功效和安全评价工具，将呈现出多元化、快速的市场发展趋势。斑马鱼技术在营养保健食品、功能食品，药物和化妆品领域的广泛应用，也使其成为了现代生命科学、健康科学等领域最重要的模式动物之一。

青眼情报定制版

数据说明

- ◆本报告内的数指均是通过事实调研、公开资料及与第三方合作的方式数据说明提取。
- ◆为了保护被调研对象或商家机密，本报告的部分数据将脱敏处理。
- ◆凡本报告涉及到的调研结果，均指本次调研人数/范围内的结果，且只针对该问题的结果，不代表市场规模、排名等观点。

版权声明

- ◆本报告的页面内容、页面设计的所有内容(包括但不限于文字、图片、图表、标识、标志、商标、商号等)版权归出品方所有。
- ◆凡未经出品方书面授权,任何单位或者个人不得复制、转载、重制、修改、展示或以任何形式提供给第三方使用本报告的局部或全部内容。
- ◆任何单位或者个人违反上述规定的，均属于侵犯出品方版权的行为，出品方将追究其法律责任，并根据实际情况追究侵权者赔偿责任。

关于我们

- ◆青眼情报由知名化妆品行业媒体【青眼】出品，定位为美妆行业情报专家，专注于美妆行业的新市场、新渠道、新品类的洞察，致力于为全球的美妆公司和经理人提供客观、有前瞻性、有启发的洞察报告。



/美妆行业情报专家/

出品方

青眼
情报



环特生物
Hunter Biotech



环特生物
Hunter Biotech

青眼
情报

