

MARUBI 丸美®PQQ 胶原蛋白肽饮

改善熬夜肝损伤功效检测报告

由环特生物——AAALAC 国际实验动物认证的 CRO 机构权威出具



环特生物创新实验中心 | 杭州

本中心实验动物生产许可证编号 SCXK(浙)2022-0003

实验动物使用许可证编号 SYXK(浙)2022-0004

项目编号: 9732

委托单位: 广东丸美生物技术有限公司

报告日期: 2024 年 10 月 16 日

声 明

尊敬的客户：

感谢您对环特生物的信任。我单位基于“严谨、真实、保密”的科研服务原则，特对持续信赖我们的广大客户做出以下声明：

- 实验流程的质控声明

本单位对实验流程始终履行严格的质控体系要求。实验人员拥有专业的背景，且经过系统的培训考核，取得上岗资格。在实验室制度和标准操作规程的约束下，开展相关实验。实验过程采用多种内外部的监督手段，确保实验动物、人员、仪器、试剂及环境符合要求，将实验操作的随机误差和操作误差降到最低。

- 实验数据的真实声明

本单位保证实验的公正性、独立性和诚实性，实验结论对接收的委托样品负责，其样品所代表性、真实性和准确性由委托方负责。本单位保证实验数据的真实性、客观性，并提供原始的分析数据及图文素材供您查阅。同时，我们明令禁止对任何实验数据，进行无科学依据的凭空捏造或人为修改。

- 实验结果的保密声明

尊重客户知识产权、全力以赴创造价值，是所有环特人开展对外服务的纯粹信仰。我们保证严格遵守契约精神，不在客户未知的情况下，随意对实验的具体细节和结论进行曝光和传播。对委托方所提供的样品及在提供试验服务的活动中所获的国家秘密、商业秘密、技术秘密保密。

本报告未盖本单位公章无效，涂改、缺页、复印无效，复制报告未重新加盖本单位公章无效。委托方如对本报告有异议，须在收到本报告之日起 15 日内向本单位提出。

环特生物

目 录

样品信息.....	1
判定标准.....	1
检测结论.....	1
检测项目 1：改善熬夜肝损伤功效.....	2
1. 检测材料.....	2
1.1. 样品配制信息.....	2
1.2. 实验动物.....	2
1.3. 仪器、耗材与试剂.....	2
2. 检测方法.....	3
2.1. 最大检测浓度（MTC）测定.....	3
2.2. 改善熬夜肝损伤功效评价（表型）.....	3
2.3. 改善熬夜肝损伤功效评价（基因）.....	3
3. 检测结果.....	4
3.1. MTC 测定.....	4
3.2. 改善熬夜肝损伤功效评价（表型）.....	4
3.3. RNA 提取结果及引物序列信息.....	6
3.4. 改善熬夜肝损伤功效评价（基因）.....	7
检测人员及分工.....	10
检测单位信息.....	10
委托单位信息.....	10

样品信息

样品名称	MARUBI 丸美®PQQ 胶原蛋白肽饮	颜色和物态	固体
样品规格及数量	9 g/袋 × 1 袋	收样日期	2024.07.15
生产日期或批号	/	储存条件	阴凉、干燥

判定标准

在统计学上， $p < 0.05$ 表明差异具有统计学意义，即具有功效。

检测结论

在本实验条件下，由广东丸美生物技术有限公司提供的 MARUBI 丸美®PQQ 胶原蛋白肽饮具有改善熬夜肝损伤功效，具体表现为增加肝脏荧光强度；上调 *fabp10a* 基因相对表达量和 *rbp2b* 基因相对表达量。

（本检测报告仅对接收样品的测试结果负责）

检测项目 1：改善熬夜肝损伤功效

1. 检测材料

1.1. 样品配制信息

MARUBI 丸美®PQQ 胶原蛋白肽饮，溶剂为标准稀释水。

阳性对照：姜黄素，黄色粉末，批号 A2211406，上海阿拉丁生化科技股份有限公司，溶剂为 DMSO。

阳性对照：L-还原型谷胱甘肽（以下简称谷胱甘肽），白色粉末，批号 SLCG8572, Sigma，溶剂为标准稀释水。

1.2. 实验动物

斑马鱼均饲养于 28 °C 的养鱼用水中（水质：每 1 L 反渗透水中加入 200 mg 速溶海盐，电导率为 450~550 $\mu\text{S}/\text{cm}$ ；pH 为 6.5~8.5；硬度为 50~100 mg/L CaCO_3 ），由本公司养鱼中心繁殖提供，实验动物使用许可证号为：SYXK（浙）2022-0004，饲养管理符合国际 AAALAC 认证（认证编号：001458）的要求，IACUC 伦理审查号：IACUC-2024-9732-01。

1.3. 仪器、耗材与试剂

解剖显微镜（SZX7, OLYMPUS, Japan）；CCD 相机（VertA1, 上海土森视觉科技有限公司, China）；精密电子天平（CP214, OHAUS, USA）；九联磁力搅拌器（MMS9Pro, JOANLAB, China）；电动聚焦连续变倍荧光显微镜（AZ100, Nikon, Japan）；全自动样品快速研磨仪（JXFSTPRP-24L, 上海净信实验设备科技部, China）；全自动核酸提取仪（Auto-Pure32A, 杭州奥盛仪器有限公司, China）；普通 PCR 扩增仪（T100, BIO-RAD, Singapore）；荧光定量 PCR 仪（CFX Connect, BIO-RAD, Singapore）；高速冷冻离心机（Heraeus Fresco17, ThermoFisher, Germany）；紫外-可见分光光度计（Nanodrop2000, Thermo, USA）；微孔板迷你离心机（BE-6100, 海门市其林贝尔仪器制造有限公司, China）；光学粘性封膜 B（MSB1001, Bio-rad, USA）；低位裙边 96 孔板（透明）（HSP9601, Bio-rad, USA）。

二甲基亚砜（DMSO, 批号 I2229063, 上海阿拉丁生化科技股份有限公司, China）；甲基纤维素（批号 C2004046, 上海阿拉丁生化科技股份有限公司, China）；ChamQ Universal

SYBR qPCR Master Mix（批号 027E2201CD，Vazyme，China）；FastKing cDNA 第一链合成试剂盒（去基因组）（批号 X1213，天根生化科技（北京）有限公司，China）；Universal RNA Extraction TL Kit C（货号 TL2204001643C，佛山奥维生物科技有限公司，China）。

2. 检测方法

2.1. 最大检测浓度（MTC）测定

随机选取受精后 3 天（3 dpf）野生型 AB 品系斑马鱼于 100 mL 烧杯中，每烧杯（实验组）均处理 30 尾斑马鱼。水溶给予样品（浓度见表 1-1），同时设置正常对照组和模型对照组，每烧杯容量为 40 mL。除正常对照组外，其余各实验组使用九联磁力搅拌器，1500 rpm 诱导斑马鱼肝损伤模型。28 °C 光周期为 14: 10（光照 14 h，黑暗 10 h）处理 3 天后，测定样品对模型斑马鱼的 MTC。

2.2. 改善熬夜肝损伤功效评价（表型）

随机选取 3 dpf 转基因肝脏绿色荧光品系斑马鱼于 100 mL 烧杯中，每烧杯（实验组）均处理 30 尾斑马鱼。水溶给予样品（浓度见表 1-2），阳性对照姜黄素 0.500 $\mu\text{g/mL}$ 浓度、谷胱甘肽 250 $\mu\text{g/mL}$ 浓度，同时设置正常对照组和模型对照组，每烧杯容量为 40 mL。除正常对照组外，其余各实验组使用九联磁力搅拌器，1500 rpm 诱导斑马鱼肝损伤模型。28 °C 光周期为 14: 10（光照 14 h，黑暗 10 h）处理 3 天后，每个实验组随机选取 10 尾斑马鱼置于荧光显微镜下拍照，使用 NIS-Elements D 3.20 高级图像处理软件采集数据，分析肝脏荧光强度，以该指标的统计学分析结果评价样品改善熬夜肝损伤功效。统计学处理结果采用 $\text{mean} \pm \text{SE}$ 表示。用 SPSS26.0 软件进行统计学分析， $p < 0.05$ 表明差异具有统计学意义。

2.3. 改善熬夜肝损伤功效评价（基因）

随机选取 3 dpf 野生型 AB 品系斑马鱼于 100 mL 烧杯中，每烧杯（实验组）均处理 30 尾斑马鱼。水溶给予样品（浓度见表 1-5），阳性对照姜黄素 0.500 $\mu\text{g/mL}$ 浓度、谷胱甘肽 250 $\mu\text{g/mL}$ 浓度，同时设置正常对照组和模型对照组，每烧杯容量为 40 mL，设置三次平行实验。其余各实验组使用九联磁力搅拌器，1500 rpm 诱导斑马鱼肝损伤模型。28 °C 光周期为 14: 10（光照 14 h，黑暗 10 h）处理 3 天后，使用全自动核酸提取仪提取各组斑马鱼总 RNA，利用紫外-可见光分光光度计对总 RNA 浓度和纯度进行测定。取 2.00 μg 斑马鱼样品总 RNA，按照 cDNA 第一

链合成试剂盒说明操作，合成 20.0 μL cDNA，通过 q-PCR 检测 $\beta\text{-actin}$ 、 fabp10a 、 rbp2b 和 acox1 基因的表达。用 $\beta\text{-actin}$ 作为基因表达的内参，计算 fabp10a 、 rbp2b 和 acox1 基因的 RNA 相对表达量。统计学处理结果采用 $\text{mean} \pm \text{SE}$ 表示。用 SPSS26.0 软件进行统计学分析， $p < 0.05$ 表明差异具有统计学意义。

3. 检测结果

3.1. MTC 测定

在本实验条件下，MARUBI 丸美®PQQ 胶原蛋白肽饮改善熬夜肝损伤功效 MTC 为 125 $\mu\text{g/mL}$ 。详见表 1-1。

表 1-1. 样品改善熬夜肝损伤功效浓度摸索实验结果 (n = 30)

组别	浓度	死亡数	死亡率 (%)	表型
正常对照组	-	0	0	未见明显异常
模型对照组	-	0	0	对外界刺激不敏感
MARUBI 丸美®PQQ	125	0	0	与模型对照组状态相似
胶原蛋白肽饮	250	30	100	-
	500	30	100	-

3.2. 改善熬夜肝损伤功效评价（表型）

在本实验条件下，MARUBI 丸美®PQQ 胶原蛋白肽饮具有改善熬夜肝损伤功效，具体表现为增加肝脏荧光强度，提示肝脏荧光强度值越高改善熬夜肝损伤功效越好。模型对照组斑马鱼肝脏荧光强度值较正常对照组斑马鱼明显降低，表明其肝脏受损；阳性对照组和样品组的肝脏荧光强度值较模型对照组明显增加，因此具有改善熬夜肝损伤功效。详见表 1-2、图 1-1、图 1-2 和图 1-3。

表 1-2. 样品改善熬夜肝损伤功效评价（表型）实验结果 (n = 10)

组别	浓度 ($\mu\text{g/mL}$)	肝脏荧光强度 (像素, $\text{mean} \pm \text{SE}$)
正常对照组	-	1822107 $\pm$ 101399***
模型对照组	-	1160868 $\pm$ 67344
姜黄素	0.500	1391142 $\pm$ 55487*
谷胱甘肽	250	1377794 $\pm$ 72697*
MARUBI 丸美®PQQ 胶原蛋白	31.2	1170701 $\pm$ 50581

组别	浓度 (μg/mL)	肝脏荧光强度 (像素, mean ± SE)
肽饮	62.5	1189089 ± 54105
	125	1454264 ± 89621*

与模型对照组比较, * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$



图 1-1. 肝脏荧光强度分析部位示意图

注: 黄色虚线框为分析部位斑马鱼肝脏

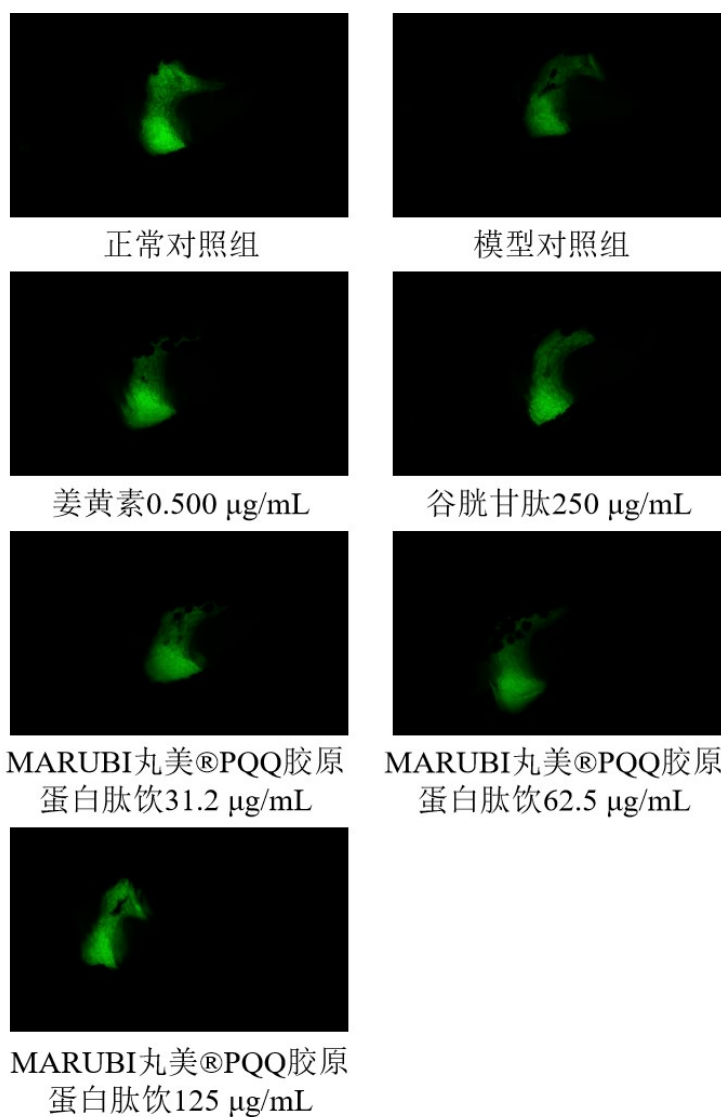


图 1-2. 样品处理后斑马鱼肝脏荧光强度典型图

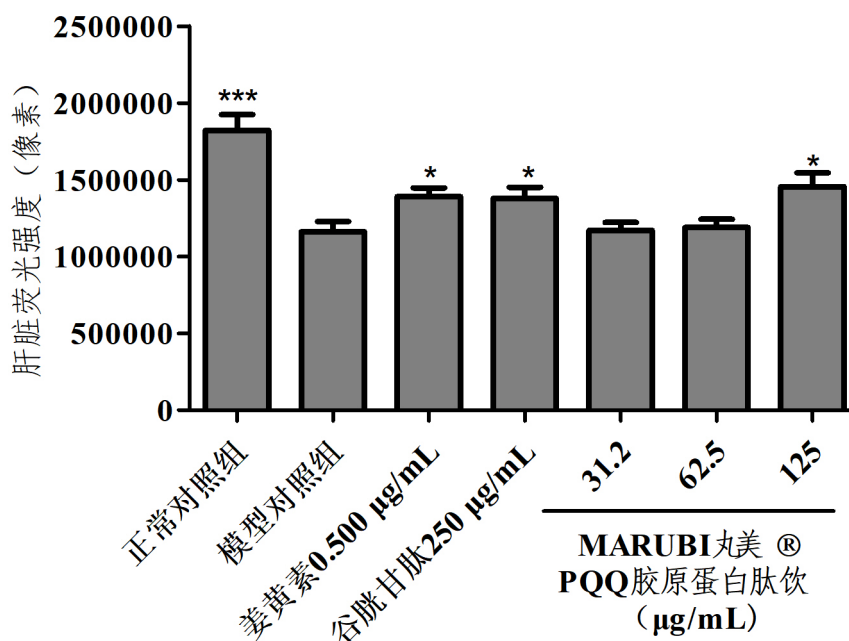


图 1-3. 样品处理后斑马鱼肝脏荧光强度

与模型对照组比较, * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$

3.3. RNA 提取结果及引物序列信息

在实验终点,提取斑马鱼总 RNA,用紫外-可见光分光光度计测定 RNA 的浓度及 A260/A280 比值 (表 1-3), A260/A280 比值均在 1.8-2.2 之间,表明提取得到斑马鱼总 RNA 质量较好,可用于后续 q-PCR 实验。引物序列见表 1-4。

表 1-3. 总 RNA 的浓度及 A260/A280 比值 (n = 3)

组别	浓度 (μg/mL)	RNA 浓度 (μg/μL)			A260/A280		
		样本一	样本二	样本三	样本一	样本二	样本三
正常对照组	-	0.463	0.471	0.600	1.97	1.96	1.97
模型对照组	-	0.392	0.498	0.503	1.96	1.94	1.95
姜黄素	0.500	0.227	0.272	0.327	1.95	1.96	1.95
谷胱甘肽	250	0.415	0.419	0.553	1.95	1.95	1.97
MARUBI 丸美®PQQ 胶原蛋白肽饮	31.2	0.386	0.296	0.335	1.95	1.93	1.94
	62.5	0.243	0.334	0.455	1.96	1.97	1.95
	125	0.293	0.257	0.261	1.95	1.95	1.97

表 1-4. 引物序列信息

基因		引物序列
<i>β-actin</i>	Forward	5'-TCGAGCAGGAGATGGGAACC-3'
	Reverse	5'-CTCGTGGATACCGCAAGATTC-3'
<i>fabp10a</i>	Forward	5'-CCAGTGACAGAAATCCAGCA-3'
	Reverse	5'-GTTCTGCAGACCAGCTTTCC-3'
<i>rbp2b</i>	Forward	5'-CAACAGGGCATTGAAGACTCTGG-3'
	Reverse	5'-TCCCCGATTGGCTTTCTCACCC-3'
<i>acox1</i>	Forward	5'-ACAGCAGAGCAAGAGTAACG-3'
	Reverse	5'-TGAAGGGCATAAAGCAGAGC-3'

3.4. 改善熬夜肝损伤功效评价（基因）

哺乳动物肝脏脂肪酸结合蛋白（*fabp10a*）是一种存在于肝脏、小肠和肾脏等组织细胞中，被认为在细胞内脂肪酸摄取、转运和代谢中起关键作用。*acox1* 负责脂质分解代谢的酶，在过氧化物酶体-β 氧化过程中分解脂肪酸和活性氧。在肝脏和脂肪组织中，它是这种代谢氧化途径中的第一个酶。*rbp2b* 主要表达于肠道和肝脏，主要参与脂肪酸转运。

在本实验条件下，MARUBI 丸美®PQQ 胶原蛋白肽饮具有改善熬夜肝损伤功效，具体表现为可上调 *fabp10a* 基因相对表达量和 *rbp2b* 基因相对表达量，提示 *fabp10a* 和 *rbp2b* 基因相对表达量越高改善熬夜肝损伤功效越好。模型对照组斑马鱼 *fabp10a* 和 *rbp2b* 基因相对表达量较正常对照组斑马鱼明显降低，表明其肝脏受损；阳性对照组和样品组的 *fabp10a* 和 *rbp2b* 基因相对表达量较模型对照组明显增加，因此具有改善熬夜肝损伤功效。上调 *acox1* 基因相对表达量不明显。详见表 1-5、图 1-4、图 1-5、图 1-6。

表 1-5. 样品改善熬夜肝损伤功效评价（基因）实验结果（n = 3）

组别	浓度 (μg/mL)	<i>fabp10a</i> 基因相对表达量 (mean ± SE)	<i>rbp2b</i> 基因相对表达量 (mean ± SE)	<i>acox1</i> 基因相对表达量
正常对照组	-	3.24 ± 0.278**	1.80 ± 0.087**	1.46 ± 0.073**
模型对照组	-	1.00 ± 0.030	1.00 ± 0.054	1.00 ± 0.053
姜黄素	0.500	3.09 ± 0.069***	3.24 ± 0.348**	2.20 ± 0.045***
谷胱甘肽	250	1.84 ± 0.153**	2.31 ± 0.231**	1.25 ± 0.018*
MARUBI	31.2	1.45 ± 0.051***	1.36 ± 0.201	1.09 ± 0.029
丸美®PQQ	62.5	1.52 ± 0.035***	1.55 ± 0.122	1.04 ± 0.103
胶原蛋白肽饮	125	1.52 ± 0.016***	2.12 ± 0.154**	1.12 ± 0.045

与模型对照组比较，*p < 0.05，**p < 0.01，***p < 0.001

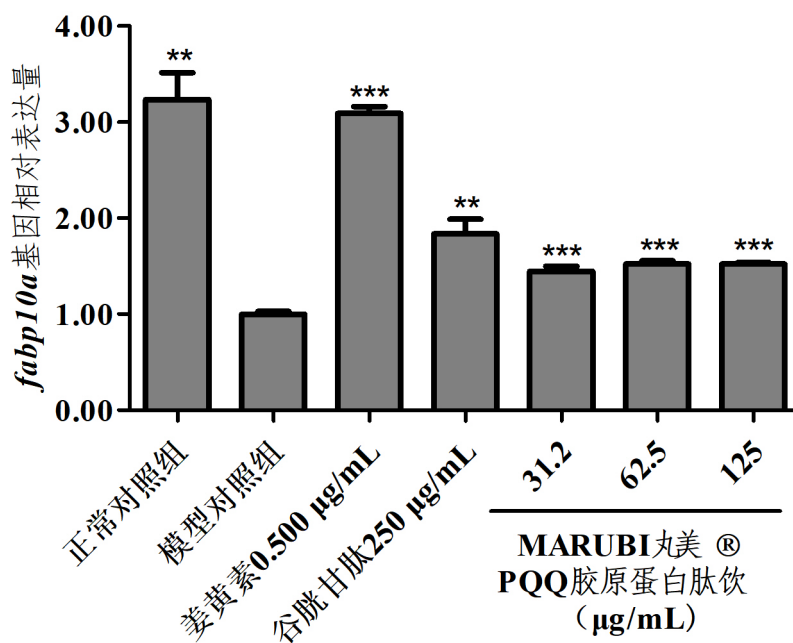


图 1-4. *fabp10a* 基因相对表达量

与模型对照组比较, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

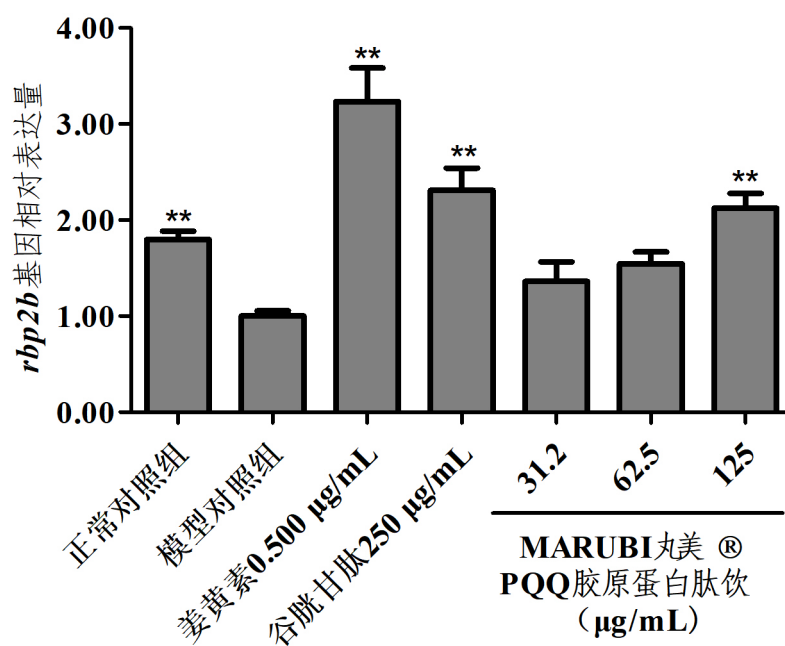


图 1-5. *rbp2b* 基因相对表达量

与模型对照组比较, ** $p < 0.01$

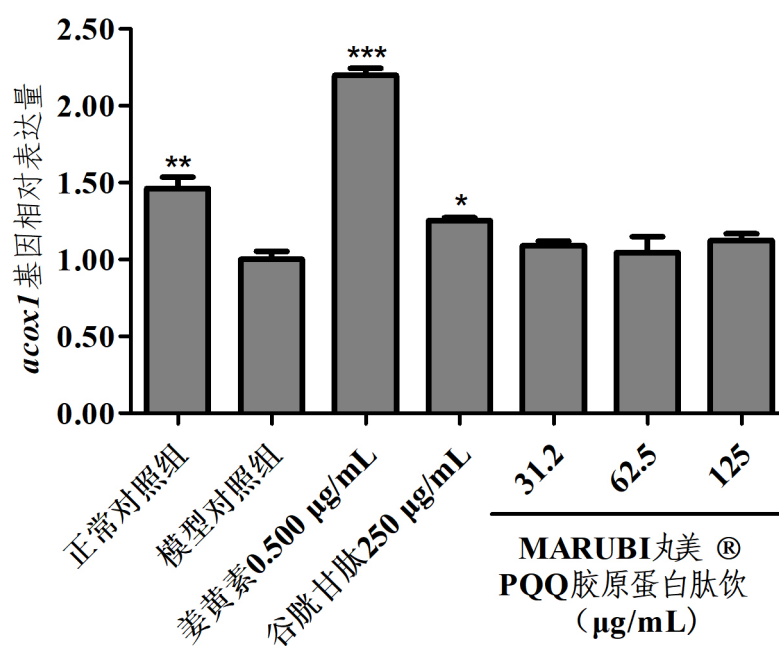


图 1-6. *acox1* 基因相对表达量
 与模型对照组比较, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

检测人员及分工

项目负责人：戴明珠（实验设计）

项目参与人员：王钦文（实验操作、数据分析、实验报告撰写）、朱西敏（实验操作、数据复核）

质量管理人员：张露娜

检测单位信息

单位名称：杭州环特生物科技股份有限公司

单位地址：浙江省杭州市滨江区江陵路 88 号 5 幢 A 区 1-2 楼

联系人：孙士杰

电话：18305065272

E-mail：ssj@zhunter.com

委托单位信息

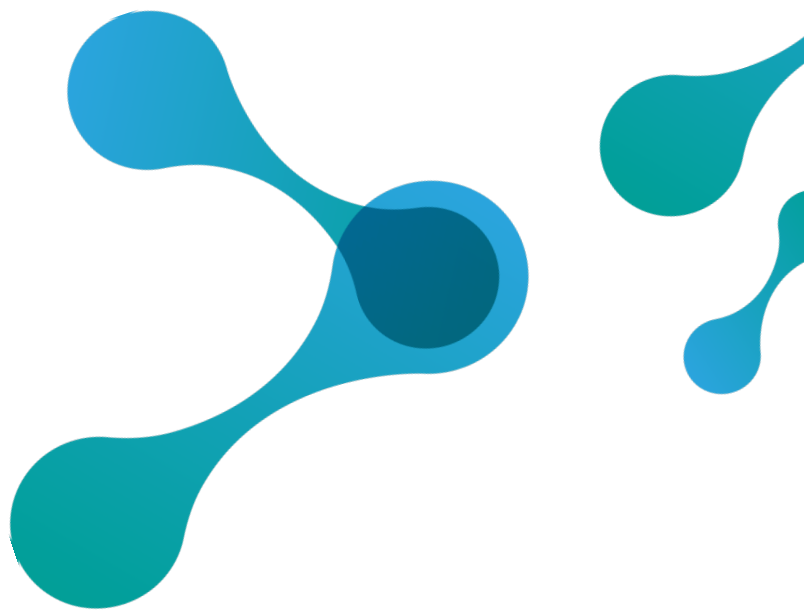
单位名称：广东丸美生物技术有限公司

单位地址：广州市黄埔区伴河路 92 号

联系人：李开莹

电话：13751750253

E-mail： /



健康美丽产业 CRO 服务开拓者与引领者



Web: www.zhunter.com

Email: info@zhunter.com

六大创新实验中心

杭 州: 浙江省杭州市滨江区江陵路 88 号 5 幢 2 楼

南 京: 江苏省南京市江宁区生命科技小镇

广 州: 广州市白云区嘉禾街广云路 408 号 410 室

北 京: 北京市北京经济技术开发区科创六街 2 号院 9 号楼 1 层 101 室

上 海: 上海市奉贤区临港南桥科技绿洲 35 号楼一楼

Boston: 16192 Coastal Highway, Lewes, Delaware 19958, County of Sussex.