



鸡胚尿囊膜(HET-CAM)眼刺激替代试验对产品及原料评价的比较

邱璐¹ 李小林¹ 卞俐娜¹ 山口能宏²

(1. 上海出入境检验检疫局, 上海 200135; 2. 日本小林制药株式会社, 大阪)

【摘要】 目的 比较鸡胚尿囊膜试验(HET-CAM)作为一种眼刺激替代方法对产品或原料的评价。方法 采用HET-CAM和兔眼Draize试验方法,对19种原料和23种化妆品及家用洗涤产品眼刺激性进行检测,对体内体外试验的结果进行统计比较。结果 比较体内体外试验,原料和产品的kappa系数分别为0.826、0.531;灵敏度分别为100%、81.8%;特异度分别为85.7%、77.8%。结论 HET-CAM可作为Draize试验的替代试验,HET-CAM系统更适合对单纯化学品原料进行眼刺激试验。

【关键词】 鸡胚尿囊膜试验; Draize眼刺激试验; 替代试验

【中图分类号】R185 R332 **【文献标识码】**A **【文章编号】**1671-7856(2011)03-0027-04

doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2011.03.007

Comparison of HET-CAM Eye Irritation Test for Products and Ingredients

QIU Lu¹, LI Xiao-lin¹, BIAN Li-na¹, YOSHIHIRO Yamaguchi.²

(1. Shanghai Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau of the P. R. C, Shanghai 200135, China; 2. KOBAYASHI Pharmaceutical Co., Ltd., Osaka 567-0057, Japan)

【Abstract】 Objective To compare the adaptability of HET-CAM eye irritation test for products and ingredients. **Methods** Test 19 ingredients and 23 products by HET-CAM and Draize eye irritation protocol. Compare the data from in vitro and in vivo test. **Result** Compare in vitro data and in vivo data, The Kappa coefficient, sensitivity, specificity are 0.826, 100%, 85.75 for ingredient. 0.531, 81.8%, 77.8% for cosmetics as well. **Conclusion** HET-CAM eye irritation test can be used to be alternative test of Draize test. HET-CAM system is more suitable for ingredients test.

【Key words】 HET-CAM test; Draize eye irritation test; Alternatives

眼刺激试验是化妆品安全性评价的重要指标,一般采用Draize^[1]眼刺激试验进行评价,经济合作和发展组织(OECD)将这个方法纳入了指南^[2]。我国化妆品卫生规范^[3]中眼刺激试验基本参照了OECD指南的方法。2009年3月,欧盟已禁止使用动物进行安全性试验的化妆品及原料的销售,虽然美国、日本等发达国家还没有颁布类似的法规,但都已设立了相关的替代试验验证中心,鼓励并开展毒理替代法的研究和验证。我国是化妆品生产和进出口大国,从顺应国际趋势和应对贸易壁垒的角

度,加紧研究和实施替代试验工作是迫在眉睫的。目前国际上对眼刺激替代方法的研究非常多,近20年间完成的替代验证评估也较多,这些方法主要基于以下几个方面,以细胞系为对象的试验,以离体眼为对象的试验,体外人工组织学模型,HET-CAM试验,计算机模拟(QSAR)试验,减量眼刺激(LVET)试验等,迄今,牛眼角膜通透性试验(BCOP)和离体鸡眼试验(ICE)已被OECD接受为指南^[4,5],欧洲替代验证中心(ECVAM)对包括HET-CAM试验在内的较多的眼刺激替代方法完成

[作者简介] 邱璐(1967-),女,高级兽医师。研究方向:毒理学替代试验。

了验证评估,此方法在国外已较多采用。鸡胚尿囊膜表面血管丰富,可以看作一个完整的生物体,不像单纯在细胞系上进行的试验,在作为眼刺激替代方法上有较好的潜力。本研究选用了一定数量的原料和产品,参照 ECVAM 推荐的 HET-CAM 方法^[6,7]进行测试,比较此方法对产品和原料眼刺激评估的优劣。

1 材料

1.1 受试产品及原料

受试产品 23 份,大部分为化妆品,9 份来源于本室进口化妆品检验样余,14 份购自上海家乐福超市(包括 5 份家用洗涤产品)。受试化学物 19 份,大部分为化妆品原料,均购自日本,其中 14 份购自日本 WAKO 公司,3 份购自日本 MPBio 公司,2 份购自日本 TCI 公司。

1.2 SPF 受精鸡胚

种蛋购自北京梅里亚维通公司。重量 50 g ~ 60 g,在本室孵化,于第 9 天龄开始试验。

1.3 孵化箱

美国 KUHL AZYSS-600-220,孵化温度 37.5℃ ± 0.5℃,相对湿度 55% ~ 70%,翻蛋频率 3 ~ 6 次/h。体式显微镜(德国蔡司 ZEISS Discovery V20),采用冷光源。

1.4 其他

照蛋器(自制),眼科弯头小镊,微量加样器,计时器,无菌生理盐水。

2 方法

2.1 鸡胚准备

在试验开始前一天,照蛋检查,弃死蛋,选取血管发育良好的鸡胚,在蛋壳表面标记气室位置。试验开始时,用镊子在气室表面轻磕一小孔,然后小心剥去带标记的蛋壳部分,保证白色蛋膜的完整。在蛋膜表面滴几滴生理盐水湿润,顷出,用镊子仔细将蛋膜取下,保证暴露的尿囊膜完整不受任何损伤。每处理好一只鸡胚即开始试验,完成后再处理下一只鸡胚。尽量缩短鸡胚在非孵化条件下存留的时间。每个试验组使用鸡胚 6 只。

2.2 样品干预

无论样本物理性状如何,均无需前处理直接进行干预。如果为透明液体物质,则取 0.3 mL 直接滴加在尿囊膜上,尽量覆盖表面并开始记时,观察膜

反应情况,并记录。最长观察时间 5 min(时间评价法)。如果样本为固体微粒(较大颗粒物在干预前尽量研磨成粉末状)、膏状或浑浊液体,直接称取约 0.3 g 用于尿囊膜,尽量涂布开,至少覆盖 50% 膜表面,开始计时,至 3 min 停止,用生理盐水轻轻冲洗膜表面,顷出液体,然后在显微镜下进行观察(终点评价法)。

2.3 刺激效应

2.3.1 出血:血液从血管或毛细血管流出。根据无出血、轻度出血、中度出血、重度出血分别判予 0、1、2、3 分。

2.3.2 凝血:血管内外蛋白变性,可表现为血栓、管壁肿胀、血管内外的凝血点出现、管外乳浊样浑浊等状况。根据无凝血、轻度凝血、中度凝血、重度凝血分别判予 0、1、2、3 分。

2.3.3 血管融解:膜上血管消融。根据无血管融解、轻度血管融解、中度血管融解、重度血管融解分别判予 0、1、2、3 分。

2.4 结果观察

观察并记录试验开始到每一种刺激效应出现的时间,精确到秒(时间评价法)。

观察并记录试验开始到每一种刺激效应发生的程度(终点评价法)。

2.5 结果评估

2.5.1 时间评价法:应用公式计算刺激评分(IS)

$$IS = \frac{(301 - \text{secH}) \times 5}{300} + \frac{(301 - \text{secL}) \times 7}{300} + \frac{(301 - \text{secC}) \times 9}{300}$$

secH:观察到的出血效应发生的时间(s)

secL:观察到的血管融解效应发生的时间(s)

secC:观察到的凝血效应发生的时间(s)

表 1 时间评估法结果评价

Tab.1 Evaluation by reaction time method

评分(Score)	分类(Classification)
IS < 5	无/轻刺激性(non/ slight irritation)
5 ≤ IS < 9	中等刺激性(moderate irritation)
IS ≥ 10	强刺激性/腐蚀性(severe irritation)

2.5.2 终点评价法:计算终点评分(ES)

ES = 6 只鸡胚观察到出血、凝血和血管融解的时间总和

2.5.3 试验参照物:每次试验应带 0.9% 生理盐水作为阴性对照,IS 值应为 0;使用 1% SDS 和 0.1 mol/L NaOH 作为阳性对照,IS 值应在 10 ~ 19 之间。

表 2 终点评估法结果评价

Tab.2 Evaluation by end-point assessment

评分 (Score)	分类 (Classification)
ES ≤ 12	无/轻刺激性 (non/slight irritation)
12 < ES < 16	中度刺激性 (moderate irritation)
ES ≥ 16	强刺激性/腐蚀性 (severe irritation)

2.6 Draize 兔眼刺激试验

原料刺激试验采用《化妆品卫生规范》(2007 版)^[3]进行,产品的动物试验结果采用我室历史数据。

2.7 统计

将兔眼刺激试验和 HET-CAM 眼刺激试验的分级结果用 SPSS 11.0 软件进行相关性分析,得到 Kappa 系数,判断两种试验结果的一致性情况。

3 结果

3.1 产品兔眼 Draize 试验和 HET-CAM 试验比较

在进行的 23 种不同种类产品(表 3)的测试中,将 Draize 试验结果作为标准进行比较,两者的一致性达 73.9%,灵敏度和特异度分别为 85.7% 和 77.8%(表 4)。用 SPSS 统计软件分析 Kappa 系数为 0.531,显示一致性为一般。

表 3 产品 Draize 和 HET-CAM 试验结果

Tab.3 The result of Draize and HET-CAM for Products

编号 (Code)	类别 (Sort)	Draize 结果 (Result)	HET-CAM 结果 (Result)
2007006	眼霜 (eye cream)	无/轻 (non/slight)	无/轻 (non/slight)
2007020	润发乳 (conditioner)	无/轻 (non/slight)	无/轻 (non/slight)
2007021	洗发露 (shampoo)	重度 (severe)	中度 (moderate)
2007025	眼霜 (eye cream)	无/轻 (non/slight)	无/轻 (non/slight)
2007026	眼霜 (eye cream)	无/轻 (non/slight)	无/轻 (non/slight)
2007030	洁面乳 (face cleaner)	重度 (severe)	强/腐蚀性 (severe)
2007036	染发剂 (hair dye)	中度-重度 (moderate-severe)	强/腐蚀性 (severe)
2007042	眼唇霜 (eye cream)	无/轻 (non/slight)	无/轻 (non/slight)
2007043	遮瑕疵霜 (concealer)	中度 (moderate)	强/腐蚀性 (severe)
2007045	洗发露 (shampoo)	重度 (severe)	无/轻 (non/slight)
2007047	洗发露 (shampoo)	重度 (severe)	强/腐蚀性 (severe)
2007048	洗发露 (shampoo)	重度 (severe)	强/腐蚀性 (severe)
2007049	洁面乳 (face cleaner)	重度 (severe)	强/腐蚀性 (severe)
2007052	洁肤露 (body wash)	中度 (moderate)	强/腐蚀性 (severe)
2007053	沐浴露 (body wash)	重度 (severe)	强/腐蚀性 (severe)
2007054	花露水 (toilet water)	无/轻 (non/slight)	强/腐蚀性 (severe)
2007056	矿泉水喷雾 (spray)	无/轻 (non/slight)	无/轻 (non/slight)
2007057	洗面膜泥 (face wash)	无/轻 (non/slight)	无/轻 (non/slight)
2007059	餐具净 (dishware cleaner)	重度 (severe)	强/腐蚀性 (severe)
2007060	洗洁精 (detergent)	重度 (severe)	强/腐蚀性 (severe)
2007061	洗洁精 (detergent)	重度 (severe)	强/腐蚀性 (severe)
2007062	玻璃清洁剂 (glass cleaner)	无/轻 (non/slight)	强/腐蚀性 (severe)
2007063	强清洁剂 (powerful detergent)	重度 (severe)	强/腐蚀性 (severe)

表 4 产品 Draize 试验和 HET-CAM 试验分级结果

Tab.4 The result of classification of two tests for products

Draize 分级 (Draize classification)	HET-CAM 分级 (HET-CAM classification)			合计 (Sum)
	强/腐蚀性 (Severe)	中度 (Moderate)	无/轻度 (Non/Slight)	
重度 (Severe)	10	2	0	12
中度 (Moderate)	2	0	0	2
无/轻 (Non/Slight)	2	0	7	9
合计 (Sum)	14	2	7	23

注:与 Draize 试验相比,一致率 = 73.9%;HET-CAM 灵敏度 = 85.7%;特异度 = 77.8%;McNemar 检验, P = 0.003, Kappa = 0.531;假阳性率 = 22.2%;假阴性率 = 14.3%

Note: Compared with Draize test, Concordance rate = 73.9%; HET-CAM test, Sensitivity = 85.7%, Specificity = 77.8%; McNemar test, P = 0.003, Kappa = 0.531; False positive rate = 22.2%; False negative rate = 14.3%

3.2 原料兔眼 Draize 试验和 HET-CAM 试验比较

在对 19 种化妆品原料的检测中,同样与 Draize 结果比较,两者的一致性达 89.5%,灵敏度和特异度分别为 100% 和 81.8%(表 5)。用 SPSS 统计软件分析的 Kappa 系数为 0.826,显示一致性为优秀。

表 5 原料 Draize 和 HET-CAM 试验结果

Tab.5 The result of Draize and HET-CAM for ingredients

名称 (Name)	Draize 结果 (Result)	HET-CAM 结果 (Result)
Ethanol	重度 (severe)	强/腐蚀性 (severe)
Tween80	无/轻 (non/slight)	无/轻 (non/slight)
Isopropyl Myristate	无/轻 (non/slight)	无/轻 (non/slight)
Tween20	无/轻 (non/slight)	无/轻 (non/slight)
Polyoxyethylene (10)	无/轻 (non/slight)	无/轻 (non/slight)
Hydrogenated Caster Oil	无/轻 (non/slight)	无/轻 (non/slight)
Butanol	重度 (severe)	强/腐蚀性 (severe)
Glycerol	无/轻 (non/slight)	无/轻 (non/slight)
Benzalkonium Chloride	重度 (severe)	强/腐蚀性 (severe)
SDS	重度 (severe)	强/腐蚀性 (severe)
Ca Mercaptoacetate Trihydrate	中度 (moderate)	中度 (moderate)
Na N-Dodecanoylsarcosinate	重度 (severe)	强/腐蚀性 (severe)
Sucrose Fatty Acid Ester	无/轻 (non/slight)	无/轻 (non/slight)
Polyethylene Glycol Monolaurate (10E. O.)	无/轻 (non/slight)	无/轻 (non/slight)
4-Dimethylaminobenzoic Acid	无/轻 (non/slight)	无/轻 (non/slight)
2-Ethylhexyl Ester	无/轻 (non/slight)	无/轻 (non/slight)
Cyclopentane	无/轻 (non/slight)	无/轻 (non/slight)
Toluene	无/轻 (non/slight)	中度 (moderate)
1-Octanol	无/轻 (non/slight)	中度 (moderate)
n-Hexanol	中度 (moderate)	中度 (moderate)
Acetone	重度 (severe)	强/腐蚀性 (severe)

4 讨论

在对产品和化学品(原料)的安全性的评估中,长期以来眼刺激试验都是采用使用实验动物的 Draize 试验进行,由于兔子没有泪腺,所以选用兔子为受试对象,一些具有强刺激性的样品会给动物造成了极大的痛苦。由于近年来动物保护呼声的高

表 6 原料 Draize 试验和 HET-CAM 试验分级结果

Tab. 6 The result of classification of two tests for ingredients

Draize 分级 (Draize classification)	HET-CAM 分级 (HET-CAM classification)			合计 (Sum)
	强/腐蚀性 (Severe)	中度 (Moderate)	无/轻度 (Non/Slight)	
重度 (Severe)	6	0	0	6
中度 (Moderate)	0	2	0	2
无/轻 (Non/Slight)	0	2	9	11
合计 (Sum)	6	4	9	19

注: 与 Draize 试验相比, 一致率 = 89.5%; HET-CAM 灵敏度 = 100%; 特异度 = 81.8%; McNemar 检验, $P = 0.000$, $Kappa = 0.826$; 假阳性率 = 28.2%; 假阴性率 = 0%

Note: Compared with Draize test, Concordance rate = 89.5%; HET-CAM test, Sensitivity = 100%, Specificity = 81.8%; McNemar test, $P = 0.000$, $Kappa = 0.826$; False positive rate = 28.2%; False negative rate = 0%

涨以及 3R 概念在国家社会被广泛接受, 世界各国对毒理试验动物替代方法的研究日益重视, 毒理学试验乃至一些基础医学研究中动物试验被替代将成为一种趋势。欧盟出台的禁止动物试验的化妆品指令已在 2009 年 3 月开始实施, 虽然生殖毒性、慢性毒性、毒代动力学试验替代试验的实施相应会延长, 但眼刺激试验已被禁止在动物身上进行。目前, 欧洲替代法验证中心 (ECVAM) 的数据库中大约有近 70 种眼刺激替代方法, 并提供了 30 余种方法的操作步骤, 大约有 10 多种方法已完成了验证研究的步骤, 评估审核报告对每一种方法的适应性、使用前景及存在的问题进行了概括。HET-CAM 鉴别强刺激物和测试眼腐蚀性能力试验的验证研究在 2003 ~ 2006 年之间由 ICCVAM-NICEATM (美国替代方法验证统筹委员会-美国国家毒理替代评估项目中心) 与 ECVAM 合作完成, 同时进行的还有 BCOP、ICE 以及 IRE (离体兔眼) 试验, 2006 年 11 月, NICEATM 发布了对这四种方法鉴别强刺激物或进行腐蚀性试验的推荐, 2009 年 9 月, BCOP 和 ICE 试验被 OECD 正式接收为 TG437 和 TG438, 允许其单独作为检测眼腐蚀性和鉴别强刺激物的试验, 而无需进行其他的动物试验。2009 年 5 月, ICCVAM 还评估了以上四个以器官特征为对象的替代方法在检测温和或非刺激性物质试验中的可行性, ICCVAM Ocular Peer Review Panel (ICCVAM 眼刺激同行评议专家小组) 仍推荐 BCOP 作为这个目的试验的方法 (还未正式发布), 对 HET-CAM 试验, 专家小组认为, 由于选取的温和到中等刺激范围的受试物数量偏低, 虽然对 EU (欧盟) 和 GHS (全球化学品统一分类和标签制度) 系统中化学物的分类情况较好, 但还需要更多数量不同物理化学特性的、分级覆盖面更广的样本数据支持才可以推荐其作为鉴

别无或温和刺激物的试验^[8]。虽然目前 BCOP 和 ICE 已成为 OECD 标准指南试验, 但离体眼球在有些地区来源渠道存在问题, 需要的特殊装置生产厂家很少, 在中国较难购置, 所以使用受到一定的限制。另外的一些眼刺激替代方法, 相当数量是以细胞系的毒性反应为基础进行的, 这类方法重复性好, 敏感性高、通量大, 简便易行, 但由于缺乏代谢体系, 与体内试验的一致性还不高, 只适用于某些类型的样本^[9], 也可以作为系列试验中作为筛选试验使用, 不适合作为单独的眼刺激评价方法。HET-CAM 试验在鸡胚上进行, 鸡胚可以看成是一个独立的生物体, 所以 HET-CAM 试验可以认为是一个是整体试验, 同时符合 3R 替代原则。另外, 此试验条件简单, 材料易于获取, 方法易于掌握, 虽然目前在国际上作为独立的标准替代方法还需要完善一定的验证试验, 但前景很好。为了探索 HET-CAM 试验系统是否适合原料和产品的眼刺激评估, 我们选取了一定有代表性的产品和原料进行测试。结果表明, 该系统非常适合于评价化学品原料的刺激反应, 从 Kappa 系数和一致率均表明与动物试验的一致性非常优良, 并且敏感性相当高, 假阴性率为 0%。结果亦表明该试验敏感于动物试验。在对产品的测试中, 体内体外试验的一致性表现得相对较低, 为 73.9%, 但 Kappa 检验结果仍表明有相当的一致性。同时, 对产品的结果表现出 14.3% 的假阴性率, 而原料的假阴性率为 0%, 这可能源于产品内成分产生的叠加或削减效应。另外, 图 1 和图 2 显示在 HET-CAM 试验中, 样本对鸡胚尿囊膜表现出的明显损伤, 但在相应的动物试验中, 刺激性表现的较小, 这表明 HET-CAM 试验对刺激的判断强于动物试验, 所以该试验应该可以较好地鉴别强刺激物, 与 NICEATM 推荐一致。在对 Draize 试验中等刺激物的试验中, 产品检测结果 HET-CAM 试验强于动物试验, 而原料的检测结果显示与动物试验一致。总体上, 本试验的结果预示了 HET-CAM 与其他体外试验一样, 其敏感性高于动物试验, 这与杨光宇^[10]等人的结果不一, 在他们的结果中, HET-CAM 试验将动物试验判定为强刺激的 12 种产品中的 5 份样品检测为中等强度刺激物, 本试验中动物试验判断为强刺激物的 12 种样品, HET-CAM 试验结果也均为强刺激。张宏伟^[11]和廖艳^[12]等人利用 HET-CAM 试验进行了化妆品和化学品的检测, 均得

(下转第 35 页)

- the Cynomolgus Monkey (*Macaca fascicularis*): A practical guide for routine morphological staging [J]. Toxicologic Pathology, 2007, 35(3): 395-404.
- [7] Jahnukainen K, Ehmcke J, Schlatt S. Testicular xenografts: A novel approach to study cytotoxic damage in juvenile primate testis [J]. cancer research 2006 66(7):3813-3818.
- [8] Clermont Y. The cycle of the seminiferous epithelium in man [J]. American Journal of Anatomy, 1963, 112: 35-51.
- [9] Tegelenbosch RA, De Rooij DG. A quantitative study of spermatogonial multiplication and stem cell renewal in the C3H/101 F1 hybrid mouse. Mutation Research, 1993, 290:193-200.
- [10] 何红媛, 夏冬. 精原干细胞的研究进展 [J]. 国外医学遗传学分册 2003 26 (3): 144-147.

(修回日期)2010-08-06

(上接第 30 页)

出 HET-CAM 可以作为 Draize 替代试验的结论, 与本试验的结论一致, 他们得到的产品和原料的体内外试验的相关系数均非常高, 而本试验的统计结果说明, HET-CAM 试验可能更适用于对化学品原料进行眼刺激评估。

HET-CM 图例见彩插 3 图 1 和图 2。

参考文献:

- [1] Draize JH, Woodard G, Calvery HO, et al. Method for the study of irritation and toxicity of substances applied topically to the skin and mucous membranes [J]. Pharmacol Exp Ther, 1944, 82: 377-390.
- [2] OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Test No. 405: Acute Eye irritation/Corrosion
- [3] 中华人民共和国卫生部. 化妆品卫生规范 2007:112-115.
- [4] OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Test No. 437: Bovine Corneal Opacity and Permeability Test Method for Identifying Ocular Corrosive and Severe Irritants.
- [5] OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Test No. 438: Isolated Chicken Eye Test method for Identifying Ocular Corrosive and Severe Irritants.
- [6] ECVAM DB-ALM: INVITTOX protocol n°96.
- [7] ECVAM DB-ALM: INVITTOX protocol n°47.
- [8] <http://iccvam.niehs.nih.gov>
- [9] 邱璐, 李小林, 刘俊平, 等. 化妆品 SIRC 细胞短时暴露法试验 [J]. 毒理学杂志 2008 22(6):473-476.
- [10] 杨光宇, 杨颖, 杨杏芬, 等. 鸡胚尿囊膜绒毛膜试验替代兔眼刺激试验的研究 [J]. 毒理学杂志 2006 20(6):402-405.
- [11] 廖艳, 王雪, 张立实, 等. 受精鸡卵尿囊膜试验作为眼刺激试验替代方法的研究 [J]. 卫生研究 2004 33(3):279-283.
- [12] 张宏伟, 阮鸿洁, 赵月朝. 鸡胚尿囊膜试验检测化妆品的刺激性 [J]. 中国公共卫生 2004 20(10):1213-1214.

(修回日期)2010-08-10