

水中银鱼胚胎测试技术相关说明

1. 水中银鱼胚胎测试技术资质：

- 水中银的鱼胚胎测试实验室自 2013 年获得以 ISO17025 为标准的 HKAS 认证，该认证获 100 多个国家和经济体认可，等同 CNAS 认证。
- 水中银的科研团队拥有 12 年多的毒理学经验，其中首席技术官陈雪平博士是英国和欧盟注册毒理学家，皇家生物学会特许生物学家，公司拥有 20 多项发明专利且全部都成功转化为商业应用。
- 水中银的科学顾问团队由来自美国、德国、瑞士、瑞典、比利时、日本、新加坡和中国香港等 12 位科学家组成。他们是毒理学范畴的领军人物，参与评选、制定及推广了多个国际标准，总共发布了 2000 多篇高影响学术论文。
- 测试方法是参照 OECD 标准及相关标准建立，结果阐述和风险评估遵照 WHO 指引，由水中银科学家团队和科学顾问团共同完成。
 - 水中银的急性毒测试：参照 OECD TG 236 标准方法。OECD TG 236 标准方法是应用斑马鱼胚胎测试化学品及物质（substance）的急性毒性，即半致死浓度。欧盟 REACH 根据 OECD TG 236 测试结果对化学品进行毒性分级。
 - 水中银的雌激素当量测试：是参照 OECD TG 236，OCED TG 457 和 OECD 第 34 指引，遵循“有害结局路径”（Adverse Outcome Pathway）“毒理学风险评估概念所建立。测试结果参照国际粮农组织 / 世界卫生组织之食品添加剂专家委员会（FAO/WHO JECFA）关于雌激素的安全指引，已及欧盟消费者安全科学委员会（SCCS）及食品安全局（ESFA）关于化妆品和食品安全风险评估指引进行分析评判。

2. 水中银鱼胚胎测试技术方法标准化进程：

水中银的技术获得多个国内外政府部门与专家的认可，在进行一系列的方法标准化工作，包括 AOAC 国际标准，深圳疾控中心已经在深圳立项的地方标准，中国毒理学会团标，广东省疾控中心的地方标准等。

3. 为何采用鱼胚胎测试技术？

根据联合国数据，我们被超过 100,000 种化学物质包围^[1]。我们现有的法规所检测的理化物质则基于行业经验或重大安全事件发生以后的总结而列入标准，检测覆盖的化学物质具有局限性。根据世界卫生组织与联合国联合报道，这些可能出现在我们日用品的有害物质可以导致癌症、不育、性早熟、肥胖、神经系统紊乱等疾病^[2]。很不幸的是，消费者没有足够的信息去做出正确的安全选择。

现有的法规主要依赖化学测试，化学测试精准，但在毒性评估应用上应该以生物学数据为基础的。而现有的生物学数据主要是针对纯化学品的，而现有的毒理学知识是难以评估化学品的混合物/鸡尾酒效应的。水中银的生物测试数据库显示，很多化学品在法规浓度范围内单独存在时毒性不显著，但多种混合在一起，其混合效应造成的毒性远高于我们的认知。我们的消费品正是由许多不同的化学品混合而成。因此，**生物测试是更直接可靠的毒性测试方式。**

当然，安全是个相对的概念。**通过生物毒性测试不代表产品一定绝对安全；但毒性水平超出建议值的产品，从生物毒理学角度来讲，的确代表潜在生物风险相对更高。**

急性毒测试结果演示：



发育正常鱼胚胎



异常鱼胚胎

当遇到急性毒物质时，鱼胚胎发育会受到影响（如尾巴弯曲，心脏水肿和肿瘤等）甚至死亡。

雌激素当量测试结果演示：



正常鱼胚胎



异常鱼胚胎

当遇到慢性毒物（类雌激素）时，鱼胚胎会发出荧光，光的强度能够量化毒物的含量

生物测试可以反应产品的整体生物学数据。老鼠可以说是很多毒理测试的金标准。然而根据 2017 年 Bioscience Reports 报道^[3]，根据 Ensembl 2014 科学数据^[4]，老鼠和人的总体基因相似度为 75%，比斑马鱼（70%）只高 5%（见图 1）。由于饲养成本高而繁殖能力低等因素，限制了老鼠于高通量快销产品测试领域的应用。有鉴于此，水中银建立了全球领先的鱼胚胎生物测试平台。水中银的斑马鱼胚胎急性毒性测试会反应出产品的整体急性毒水平以及毒性特征如导致心脏水肿，骨骼畸形等，已经有很多科研数据证明鱼胚胎的这些反应和人类高度一致^[6]。

而水中银的转基因鲮鱼胚胎慢性毒测试则很明确测出的是类雌激素类物质，且换算成雌二醇当量值，参照世界卫生组织关于雌激素日摄入量指引可以直接产品的雌激素安全性进行评估。雌激素当量测试把样本的雌激素活性量化为当量值，起量化与风险评估思路而二噁英类物质的检测及毒性当量值计算（TCDD）可以说是异曲同工。

	Zebrafish	Primate	Mouse	Chick
Handling	Easy	Hard	Hard	Moderate
Genetic homology	70%	96-98%	75%	62%
Rapid development	Yes	No	No	Yes
Transparency	Yes	No	No	No
No. of embryos	100-600	1-2	~10	1-2
Transgenic models	Many	A few	Many	A few
Husbandry cost	Cheap	Very expensive	Expensive	Cheap

图 1.（摘自 Bioscience Report 2017 年的一篇文章^[3]）

所有的毒性测试技术，应该都是本着帮助行业，帮助生产商把关和提升产品安全性能服务的。根据水中银的过往数据和经验，生物测试和化学分析可以很好的结合以对有毒成分进行有效溯源，帮助改善和提升产品安全。

斑马鱼胚胎急性毒性测试的科学基础

- 斑马鱼在基因^[4]，器官组织^[4]和生理上^[5]和人类高度相似。
- 斑马鱼胚胎测试早已成为美国 FDA 认可的药物毒性测试和功效评估方法^[6]
- 美国国立卫生研究院在 2003 年已经把斑马鱼评定为及大鼠和小鼠之后第三重要模式生物^[6]
- 斑马鱼胚胎测试已成为 OECD 标准方法来评估化学品及物质的急性毒水平^[7]，欧盟化学品法规 REACH 则会根据该测试结果对测试物进行毒性分级^[8]。
- 水中银的斑马鱼胚胎急性毒测试采用了 OECD 测试标准并进行优化。

- 除此之外，斑马鱼的以下优点使其能够成为高通量快消产品毒性测试的最佳选择：

斑马鱼个体小，成鱼大概 3 厘米——节省饲养和测试空间；

斑马鱼体外受精，体外发育——不受母体影响，便于测试；

斑马鱼胚胎时期不需要进食，依靠卵黄提供发展所需的能量——避免了喂食对测试造成的干扰；

斑马鱼发育速度快，从受精卵到孵化变成小鱼只需要 3 天时间（其胚胎 1 天发育相当于人类胚胎的 12 周（约 4 个月）），到成鱼只需 3-4 个月时间；

斑马鱼胚胎通体透明，显微镜下各器官组织清晰可见——便于毒理反应观察；

斑马鱼繁殖力强，一对斑马鱼一周可产 200-300 粒鱼卵——确保科学数据的统计正确性，且使得高通量测试成为可能。

按照欧盟动物保护法^[9] 鱼胚胎不属于动物，被国际科学家大力推荐用于替代动物测试。

转基因鲳鲈鱼胚胎雌激素当量测试 (EEQ test)

水中银将一个获得诺贝尔奖的荧光蛋白基因转入到鲳鲈鱼胚胎中，对雌激素受体的一个下游基因 choriogenin H 进行了标记（这点从技术原理上避免了假阳性测试结果的出现），并经过超过 10 年时间将其稳定超过十代，测试的稳定性与准确性已经获得国际认可。

水中银独家拥有应用转基因鲳鲈鱼胚胎测试的专利技术，可以识别包括但不限于农药、兽药、抗生素、激素、塑化剂、有机持续污染物等在内的类雌激素化学物质。

这类化学物质（包括农药、兽药、抗生素、激素、塑化剂、有机持续污染物等）可以扰乱雌激素内分泌系统，已证实与癌症、不育、儿童性早熟、智商降低，神经系统紊乱、糖尿病有关。根据欧盟报道，这类污染物在欧盟造成的健康问题和不孕不育问题的医疗成本到达 1630 亿欧元每年^[10]。

转基因鱼胚胎进行测试技术应用了 OECD 近年大力推崇的“有害结局路径” (Adverse Outcome Pathway, AOP) 毒性评估策略^[11]来测试类雌激素这一大类有害物质。其原理是基于类雌激素作用于生物体的毒理机制而建立的。目的是通过转基因标记技术来测量类雌激素目标基因表达量的变化来量化类雌激素的多少，参照粮农组织和世界卫生组织 (FAO/WHO, 2000) 关于雌激素最高日摄取量^[12]来评估测试物的安全性。

4. 鱼胚胎测试的特异性：

水中银的鱼胚胎生物测试和传统的化学分析之间不具备可比性。化学分析精准，但对于不在靶标范围的物质（未知有毒物质），或者不同物质间的“鸡尾酒效应”无法表现。而水中银的鱼胚胎测试则能有效反应样品的整体生物学毒性，特别是现有毒理学知识缺乏却非常重要的化学品混合效应。

基于现有文献报道和水中银团队 10 多年的研究积累，这里简单归纳了大众可能关注的且水中银鱼胚胎测试能够覆盖的有毒物质。本列表只是举例，没有覆盖到所有测试目标毒物。

雌激素当量测试 (EEQ test)

可以量化的雌激素：乙二烯雌酚 (Dienoestrol)，己烷雌酚 (hexoestrol)，雌二醇 (oestradiol)。(ppb 水平)

- **该测试覆盖所有具有雌激素活性的化学品**，目标毒物包括但不限于下列化学品：
- **动物源雌激素类**（如雌酮，雌二醇，雌三醇），（ppb）
- **合成雌激素类**（如炔雌醇 (Ethinylstradiol)，乙烯雌酚 (Diethylstilbestrol)，乙二烯雌酚 (Dienoestrol)，（ppb）
- **防腐剂**（如 paraben 类防腐剂），（ppm for mixtures）
- **植物源雌激素类**（如异黄酮，玉米赤霉烯醇，橙皮苷，苦参碱），（ppm）
- **工业污染物**（如双酚 A，壬基酚，辛基酚），
- **塑料原料**（如塑化剂 DEP, DPrP, DBP, DPeP, DHXP, BBP, DCHP, DEHP, DIOP, DOP, DINP 等），（ppm for mixtures）
- **某些农药和兽药**（如甲氰菊酯、氰戊菊酯），（ppm）
- **某些医药类化学品**（如他莫昔芬，辛弗林），（ppm）
- **化学防晒化学品**（如 BP-3 等超过 30 种），(obvious mixture effect)
- **某些色素**（食品&化妆品添加剂）

- 某些香精（食品&化妆品添加剂）

斑马鱼胚胎急性毒物测试 (ATT Test)

已验证可测试超过 1,000 种有毒化学物质，目标毒物包括但不限于下列化学品：

- **农药：**吡啶类（如芬普尼 Fipronil，啮螨酯 fenpyroximate 等），酰胺类（如甲草胺 alachlor，甲霜林 metalaxyl 等），二甲酰亚胺类（如免克宁 vinclozolin 等），氨基甲酸酯类（如氯苯胺灵 chlorpropham，抗蚜威 pirimicarb 等），有机磷类（如毒死蜱 chlorpyrifos，二嗪磷 Diazinon，殺蟲畏 tetrachlorvinphos，灭蚜蜱 mecarbam 等），苯基醚类（如啮氧灵 quinoxifen，），苯基脲类（异丙隆 isoproturon，杀虫脲 Triflumuron 等），吡啶类（如啮螨酯 fenpyroximate 等），除虫菊酯类（如联苯菊酯 bifenthrin，苜味菊脂 resmethrin 等），嘧啶类（乙嘧酚磺酸酯 bupirimate，氟苯嘧啶醇 Nuarimol 等），脲菌脂类（嘧菌酯 Azoxystrobin 等），磺酰胺类（如对甲抑菌灵 tolylfluanid，氰霜唑 cyazofamid 等），敌菌灵类（阿托拉辛 atrazin，莠灭净 ametryn，去草净 terbutryn 等）；三唑类（如啮 triticonazole，雙苯三唑醇 bitertanol 等），其它（如啮斑脲 pyrifenoxy，氟菌唑 Triflumizole 等），已知几百种不同类型的农药。（ppb-ppm 级别不等）
- **兽药：**杀虫药（如氨丙啉 amprolium，氯苯胍 robenidone），磺胺类药物（如磺胺吡啶 sulfapyridine，磺胺噻唑 sulfathiazole，磺胺甲基噻唑 sulfamethoxazole，磺胺甲噻唑 sulfametoxazole 等），氨苯砒 dapsone，西洛多辛 sladoxin 等），大环内酯类（如泰微素 tylosin，替米考星 tilmicosin，），安定类（如普马嗪 promazine，卡拉洛尔 carazolol，阿扎哌隆 azaperone，瘦肉精 beta-agonists 等），抗生素（如 penicillin G，红霉素 erythromycin，等），荷尔蒙类（如乙烯雌酚 Diethylstilbestrol），其它（如泰妙菌素 tiamulin，卡巴氧 carbodox，灰黄霉素 griseofulvin，三氯仿 trichlorfon，三唑仑 Triazolam 等）（ppb-ppm 级别不等）

- **防腐剂**：如对羟基苯甲酸酯（如 methyl paraben, ethyl paraben, isopropyl paraben, propyl paraben, isobutyl paraben, butyl paraben）类，硝酸盐类等。（ppm 水平）
- **抗氧化剂**：如 benzyl 4-hydroxybenzoate, 4-hexylresorcinol, propyl gallate, octyl gallate, nordihydroguaiaretic acid, thiabendazole, dehydro acetic acid 等。（ppm 水平）
- **塑化剂**（如 DEP, DPrP, DBP, DPeP, DHXP, BBP, DCHP, DEHP, DIOP, DOP, DINP 等）（ppm 水平）
- **三聚氰胺**（melamine）（ppm 水平）
- **黄曲霉素**（如 aflatoxin M1, M2, B1, B2, G1 and G2）（ppb 水平）
- **食品添加剂**（如色素，香精，防腐剂，乳化剂，抗氧化剂等）（ppm 水平）
- **化妆品添加剂**（如防腐剂，香精，色素，化学防晒剂，抗氧化剂，渗透增强剂，乳化剂，植物或动物提取成分等）（ppm 水平）

5. 鱼胚胎毒性测试和个别有毒物质剂量的不一致性（方法局限性）：

每种测试各有优缺点。

每种测试因侧重点不同，都有其优缺点，鱼胚胎测试也不例外。

鱼胚胎测试的最大优点是反映产品的整体生物学毒性，而不是单独某个有毒化学成分的毒性。斑马鱼胚胎急性毒测试对反应样本的整体急性毒水平在准确性和时间上都很有优势，雌激素当量测试对反应产品的整体雌激素活性上则有着快速，准确等优点。

然而这 2 个测试对于产品中分子量大于 3000kDa 的成分，以及非极性有机物不能为鱼胚胎所摄取，而不在测试范围内。且对含有某些大家非常关注却未必会对生物体造成急性毒或雌激素活性高的成分（如某些重金属 - 但重金属在大部分法规检测已经包含）的产品，鱼胚胎测试测试结果未必会和传统理化指标表现出明显的一致性。因为鱼胚胎测试的是整体生物学毒性，而法规关注的有毒物质未必是该产品的主要有毒物质，所以生物数据与理化数据相辅相成，相互补充。

以食用油为例，台湾 2014 年地沟油事件证明“劣质油”通过现有法规常用理化指标的测试，然而水中银的生物测试却发现“地沟油”具有显著的生物毒性，且后续研究发

现毒性高的油品中含有会造成生物毒性的成分。水中银目前正和台湾食品工业研究所（FIRDI）、香港大学和卡罗琳医学院专家将相关研究成果于科学杂志发表，而该项目也获得香港创新科技署的大力资助（S/E035/15）。

这只是其中一个例子。

我们有相关数据证明，如果水中银世界领先的生物技术被更大规模的采用，很多安全事件，包括三聚氰胺毒奶粉，毒鸡蛋，毒饺子，劣质油，塑化剂等，其实很有可能提前得到警示（鱼胚胎死亡或者发出强绿色荧光），有防患于未然的机会。

所以，鱼胚胎毒性数据是对于现行法规以理化数据为主的产品数据的有效补充，是消费者在选择更安全产品所需要的重要信息。

参考文献

- 【1】 UNEP, Chemicals & Waste. <http://web.unep.org/chemicalsandwaste/who-we-are/overview>
- 【2】 WHO/UNEP, State of the Science of Endocrine Disrupting Chemicals-2012. <http://www.who.int/ceh/publications/endocrine/en/>
- 【3】 Bioscience Reports (2017) 37 BSR20170199. DOI: 10.1042/BSR20170199.
- 【4】 Nucleic Acids Res. 2014 Jan 1; 42(Database issue): D749 - D755.
- 【5】 Nat Rev Drug Discov. 2015 Oct;14(10):721-31. doi: 10.1038/nrd4627.
- 【6】 Zebrafish Make a Splash in FDA Research. <https://www.fda.gov/ForConsumers/ConsumerUpdates/ucm343940.htm>
- 【7】 OECD (2013), Test No. 236: Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test, OECD Publishing, Paris. <http://dx.doi.org/10.1787/9789264203709-en>
- 【8】 Integrated Environmental Assessment and Management. 6(3): 484 - 491.
- 【9】 Offic J Eur Commun L358:1 - 29.
- 【10】 European Commission's revised proposal limits ability to protect public from endocrine-disrupting chemicals. <https://www.endocrine.org/news-room/current-press-releases/european-commissions-revised-proposal-limits-ability-to-protect-public-from-edcs>
- 【11】 Adverse Outcome Pathways, Molecular Screening and Toxicogenomics. <http://www.oecd.org/chemicalsafety/testing/adverse-outcome-pathways-molecular-screening-and-toxicogenomics.htm>
- 【12】 Evaluations of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA). ESTRADIOL-17BETA. <http://apps.who.int/food-additives-contaminants-jecfa-database/chemical.aspx?chemID=1835>