

· 实验技术及其应用 ·

应用动力学直接多肽反应试验检测化学物皮肤致敏性

何国群, 赵敏, 王晶, 李庆, 蒋关清, 黄志彪
广东省疾病预防控制中心卫生毒理所, 广东 广州 511430

摘要:目的 评估动力学直接多肽反应试验(kinetic direct peptide reactivity assay,kDPRA)对化学物皮肤致敏性的鉴别能力。方法 选用已知皮肤致敏强度的 31 种化学物,将化学物用磷酸盐缓冲液或乙腈配制成 1.25、2.5、5.0、10.0 和 20.0 mmol/L 溶液,分别取 40 μ l 上述溶液与 120 μ l 的 0.667 mmol/L 半胱氨酸肽混合,同时设空白对照、溶剂对照、测试物对照和阳性对照(肉桂醛),在 25 $^{\circ}$ C 条件下孵育 10、30、90、150、210 和 1 440 min,作用相应时间后,每孔加入 40 μ l 3 mmol/L 的单溴二胺作用 5 min,在酶标仪上以 390 nm 的激发光和 480 nm 的发射光测定荧光强度;计算半胱氨酸肽的消耗率和速率常数,取 6 个时间点中最大对数速率常数(log kmax)作为评价指标,评价各种化学物的皮肤致敏性。结果 应用 2,4-二硝基氯苯的 3 次测试获得 log kmax 分别为 -0.39、-0.28、-0.31,结果均判定为 1A 类致敏物;对 10 种化学物的 3 次重复测试均能获得一致的致敏性分类;扩展对 20 种化学物测试的结果,6 种化学物判为 1A 类,14 种判为非 1A 类,所测 31 种化学物皮肤致敏性分类结果均与欧洲化学品管理局(European Chemicals Agency,ECHA)数据库一致。结论 该方法对化学物皮肤致敏性具有较好的鉴别能力。

关键词:动力学直接多肽反应试验;化学物;皮肤致敏性

中图分类号:R994.6 文献标志码:A 文章编号:1003-8507(2025)05-911-06

DOI:10.20043/j.cnki.MPM.202411400

Kinetic direct peptide reactivity assay for detecting skin sensitization of chemicals

HE Guo-qun, ZHAO Min, WANG Jing, LI Qing, JIANG Guan-qing, HUANG Zhi-biao

Guangdong Provincial Center for Disease Control and Prevention, Institute of Health Toxicology; Guangzhou, Guangdong 511430, China

Abstract: Objective To evaluate the discriminative ability of the Kinetic Direct Peptide Reactivity Assay (kDPRA) for identifying the skin sensitization potential of chemicals. **Methods** A total of 31 chemicals with known skin sensitization strengths were selected. These chemicals were prepared in phosphate-buffered saline or acetonitrile to create solutions at concentrations of 1.25, 2.5, 5.0, 10.0, and 20.0 mmol/L. A mixture of 40 μ l of the above solutions with 120 μ l of a 0.667 mmol/L cysteine peptide was prepared, alongside blank controls, solvent controls, test substance controls, and a positive control (cinnamaldehyde). The mixtures were incubated at 25 $^{\circ}$ C for 10, 30, 90, 150, 210, and 1 440 minutes. After the respective incubation times, 40 μ l of 3 mmol/L monobromination was added for 5 minutes, and fluorescence intensity was measured using an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) reader with excitation at 390 nm and emission at 480 nm. The consumption rate and rate constant of the cysteine peptide were calculated, with the maximum logarithmic rate constant (log kmax) from the six time points serving as the evaluation metric for the skin sensitization potential of various chemicals. **Results** Testing 2,4-dinitrochlorobenzene yielded log kmax values of -0.39, -0.28, and -0.31 across three tests, all classified as Category 1A sensitizers. Consistent sensitization classifications were obtained from three repeated tests on 10 chemicals. Expanding to 20 additional chemicals, 6 were classified as Category 1A and 14 as non-1A. The skin sensitization classifications for all 31 tested chemicals were consistent with the European Chemicals Agency (ECHA) database. **Conclusion** This method demonstrates good discriminative ability for assessing the skin sensitization potential of chemicals.

Keywords: Kinetic direct peptide reactivity assay; Chemicals; Skin sensitization

皮肤过敏是日常生活与职业中较常见的健康问题,是皮肤经过反复接触致敏物后引起的皮肤变应性

反应。根据联合国全球化学物统一分类和标签制度(United Nations Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals, UNGHS)的规定,经过准确的评估可将皮肤致敏物分类为 1 类,其子分类为 1A 类(相当于强致敏物)和 1B 类(相对较弱致敏物)^[1]。皮肤致敏性及致敏强度的鉴定是化学

基金项目:国家药品监督管理局化妆品风险评估重点实验室开放课题(KF2021013)

作者简介:何国群(1970—),女,硕士,主任医师,研究方向:环境毒理工作

物健康风险评估的步骤之一,以往用于鉴定致敏物的证据主要来自于人类资料和动物实验,由于人类能确证的数据不易获得,研究人员以往通常采用动物试验方法检测化学物的皮肤变应性反应^[2-3],然而动物试验存在周期长、动物伦理等问题,随着“3R”原则[即替代(Replacement)、减少(Reduction)和优化(Refinement)]的提出和科学技术的发展,基于人源细胞的体外测试、化学反应性测试、计算机模型分析等多种非动物试验方法被开发用于皮肤致敏性评估^[4-6],其中动力学直接多肽反应性试验(kinetic Direct Peptide Reactivity Assay, kDPRA)是反映外源化学物与皮肤蛋白质共价结合的皮肤致敏反应机制中的分子启动事件,该方法灵敏而且快速,作为致敏性化学物筛选方法有着很大的优势,目前已通过多个国际间实验室验证,并被欧洲美国等权威机构采纳^[7-9],且已作为一种新技术方法应用于下一代风险评估策略中^[10],而 kDPRA 在国内研究应用的相关资料极少。

本研究主要参照欧洲替代方法验证中心发布的实验方案^[11],建立 kDPRA 方法,并转化应用于已知致敏性的化学物检测,评估该方法在本实验室应用的灵敏度、特异度和一致性。旨在接轨国际化学物健康危害评估技术,为我国化学品健康风险评估和监管提供科学技术支持。

1 材料与方法

1.1 检测的化学物

选择 31 种在欧洲化学品管理局(European Chemicals Agency, ECHA)数据库可查皮肤致敏性及致敏性分类的化学物,其中包括 OECD TG 442C 推荐的 6 种参考化学物^[8],31 种化学物含 1A、1B 类致敏物和非致敏物,主要购于美国 Sigma 公司和上海麦克林公司;先应用 1A 类致敏物 2,4-二硝基氯苯(CAS No.97-00-7)测试以建立方法,再用 10 种化学物作 3 次重复的实验,以确认试验方法在本实验室的可重现性,然后扩展到另外的 20 种化学物。

1.2 主要试剂与仪器

包括半胱氨酸多肽 Ac-RFAACAA-COOH(美国 GenScript 公司)、单溴二胺(mBrB, CAS No.74235-78-2, 麦克林公司)、电子天平(日本 A&D 公司)、酶标仪(美国 Thermo Fisher 公司)、恒温孵育箱(上海一恒公司)。

1.3 对照组设置

包括测试物对照组,用来计算化学物或阳性对照荧光校正值以确定受试物是否引起强自发荧光和荧光淬灭;空白对照组,用作计算溶剂对照荧光校正值;溶剂对照组,水溶性化学物溶剂为磷酸盐缓冲液,非水溶性化学物溶剂为乙腈,溶剂对照荧光校正值用于计算多肽消耗率;阳性对照组,用

于检验试验系统是否成立,阳性物为肉桂醛 CAS No. 104-55-2,购于美国 Sigma 公司。

1.4 试验步骤

根据化学物溶解性用乙腈或磷酸盐缓冲液配制 10.00、5.00、2.50 和 1.25 mmol/L 浓度的化学物和阳性物,同时取 6 个黑色 96 孔分析板分别标记用于 10、30、90、150 和 210 min 以及 24 h 暴露时间的测试,每个孔板设置空白对照、溶剂对照、阳性物对照和测试物对照和受试物孔,受试物每浓度设 3 个复孔;每孔加入相应试剂,其中空白对照每孔加 40 μ l 溶剂和 120 μ l 磷酸盐缓冲液,溶剂对照每孔加 40 μ l 溶剂和 120 μ l 多肽溶液,测试物对照每孔加 40 μ l 相应浓度的待测化学物或阳性物和 120 μ l 磷酸盐缓冲液,化学物/阳性物测试孔每孔加 40 μ l 相应浓度的化学物/阳性物和 120 μ l 多肽溶液,阳性对照每孔加 40 μ l 相应浓度的阳性物和 120 μ l 多肽溶液。加液完成后,在(25 \pm 2.5) $^{\circ}$ C 下分别孵育 10、30、90、150 和 210 min 以及 24 h,当达到相应的暴露时间时,在黑暗中将新鲜制备的 3 mmol/L mBrB 溶液加到分析板中,40 μ l/孔,以 200 r/min 的转速摇晃 5 min,然后用酶标仪以 390 nm 的激发光和 480 nm 的发射光测定荧光强度。

1.5 统计学分析

用 EXCEL 电子表格录入数据并分析,计算空白对照、溶剂对照荧光值的算术平均值,用溶剂对照荧光平均值减去空白对照荧光平均值获得溶剂对照校正值;将各个浓度的化学物或阳性物荧光值,减去各自的测试物对照荧光值,获得化学物校正值;按照公式(1)计算每个暴露时间内各化学物浓度多肽消耗率;绘制每个时间点各浓度化学物对应的未消耗肽浓度的自然对数图,按照公式(2)计算单位浓度(每 mol)和单位暴露时间(每秒)肽消耗的反应动力学常数(k_t)。取 6 个时间点中最大速率常数对数 logk_{max} 作为致敏性判定指标。

$$\text{化学物肽消耗率}(\%) = [1 - (\text{化学物校正值} / \text{溶剂对照校正值})] \times 100\% \quad \text{公式(1)}$$

$$K_{[L/(S \cdot \text{mol})]} = K \times [1000 / (60 \times t)] \quad \text{公式(2)}$$

公式(2)中,t 为暴露时间的分钟数,K 为相应暴露时间所得的反应速率常数。

1.6 结果评价

参照 OECD TG442C 附录 3^[8],如果在给定时间的最高测试化学物浓度(5mmol/L)下观察到肽消耗率 $\geq 13.89\%$,且与溶剂对照比有统计学差异,则认为该化学物具有肽反应性,再进一步确定反应动力学速率常数,若 $\log k_{\text{max}} \geq -2.0$,则判定为 1A 类致敏物;若 $\log k_{\text{max}} < -2.0$,则判定为非 1A 类致敏物。如肽消耗率 $< 13.89\%$,则该化学物为无反应性,即属于非致敏物。皮肤致敏性分类方法见表 1。kDPRA 对化学物皮肤致敏性判定能力评价时,化学物皮肤致敏

性分类资料来源于 ECHA 分类标签和包装数据库 (Classification Labelling & Packaging, CLP)^[12]。

2 结果

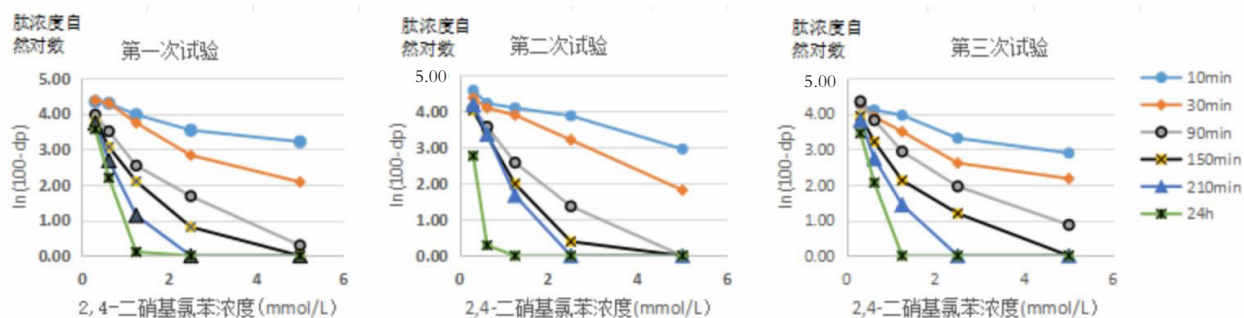
2.1 应用 2,4-二硝基氯苯进行 kDPRA 检测, 结果见表 2。比较每次试验各暴露时间点速率常数对数值取最大值 (即 $\log K_{max}$), 得到三次试验的 $\log K_{max}$ 分别为 -0.39、-0.28、-0.31。根据表 1 判定标准, 可判定该物质为 1A 类致敏物, 符合 ECHA 数据库分类, 表

明本实验室应用 kDPRA 方法对该物质致敏性测试是成立的。绘制 2,4-二硝基氯苯的肽消耗浓度曲线, 可观察到三次试验中 5 个浓度该物质在 6 个暴露时间点的肽消耗速率常数线性趋势是相似的, 见图 1。

表 1 kDPRA 方法化学物皮肤致敏性分类

Table 1 Classification of skin sensitization of chemical in kDPRA

$\log k_{max}$	致敏性分类
$\log k_{max} \geq -2.0$	UN GHS 1A 类 (1A 类)
无反应性或 $\log k_{max} < -2.0$	未分类为 UN GHS 1A 类 (非 1A 类)



注: dp 为消耗的肽浓度; 100-dp 为剩余的肽浓度。

图 1 2,4-二硝基氯苯肽消耗浓度的自然对数图

Figure 1 Natural logarithm diagram of peptide concentrations consumed by 2,4-dinitrochlorobenzene

表 2 2,4-二硝基氯苯的肽消耗率 (%) 与速率常数

Table 2 Peptide consumption rate (%) and rate constant of 2,4-dinitrochlorobenzene

实验 次序	暴露时间(min)	肽消耗率 (%)					速率常数 K L/(s*mol)	Logk
		0.312 5 mmol/L	0.625 mmol/L	1.25 mmol/L	2.5 mmol/L	5.0 mmol/L		
第一次	10	23.67	27.14	47.07	65.77	75.28	0.411 9	-0.39
	30	20.31	26.97	57.93	83.11	92.03	0.281 7	-0.55
	90	47.11	66.80	87.35	94.65	98.66	0.139 6	-0.86
	150	55.80	78.59	91.90	96.55	99.00	0.146 1	-0.91
	210	58.25	84.96	93.13	98.03	99.00	0.216 4	-0.99
	1 440	64.76	82.02	94.26	98.78	99.00	0.042 1	-1.76
第二次	10	3.58	32.52	40.52	52.22	80.91	0.522 4	-0.28
	30	21.32	40.65	51.29	75.42	93.88	0.297 2	-0.53
	90	41.45	64.68	86.88	96.07	99.00	0.226 2	-0.65
	150	44.30	72.44	92.72	98.52	99.00	0.181 7	-0.74
	210	35.13	71.24	94.71	99.00	99.00	0.149 6	-0.83
	1 440	84.17	98.67	99.00	99.00	99.00	0.091 6	-1.04
第三次	10	29.55	39.43	47.69	72.62	82.00	0.494 1	-0.31
	30	28.29	50.07	67.09	86.40	91.23	0.243 2	-0.61
	90	22.71	54.55	81.21	92.94	97.61	0.131 6	-0.88
	150	49.12	75.19	91.66	96.71	98.91	0.134 0	-0.87
	210	54.83	84.57	95.80	99.00	99.00	0.196 0	-0.71
	1 440	68.55	92.15	99.00	99.00	99.00	0.041 9	-1.38

注: *t* 检验, 5 个浓度的 2,4-二硝基氯苯在 6 个时间点的肽消耗与溶剂对照相比均具有统计学意义 ($P < 0.05$)。

2.2 对 10 种化学物进行 3 次重复试验的结果表明, 根据 kDPRA 判定标准, 每种化学物 3 次重复均能获得一致的致敏性分类, 其中 3 种化学物皮肤致敏性被判为 1A 类, 其余 7 种化学物被判为非 1A 类, 此 7 种

化学物中有 4 种是 1B 类致敏物, 另 3 种是非致敏性物质, 均属于非 1A 类。10 种化学物皮肤致敏性 kDPRA 判定结果与 ECHA 数据库是一致的, 试验的结果见表 3。

表 3 10 种化学物 3 次重复试验的结果
Table 3 Results of 3 repeated tests of 10 chemicals

样品名称	CAS No.	性状	log _{k_{max}} 值					kDPRA 分类	UN GHS 分类
			第 1 次	第 2 次	第 3 次	均值	标准差		
异丁香酚*	97-54-1	液体	-0.99	-1.15	-1.09	-1.08	0.08	1A	1A
辛酸甲酯*	111-12-6	液体	-1.64	-1.61	-1.28	-1.51	0.20	1A	1A
异噻唑啉酮*	2682-20-4	固体	-0.58	-0.52	-0.55	-0.55	0.03	1A	1A
香叶醇	106-24-1	液体	-2.18	-3.33	-3.93	-3.15	0.89	非 1A	1B
己基肉桂醛	101-86-0	液体	无反应性	无反应性	无反应性	—	—	非 1A	1B
羟基香茅醛	107-75-5	液体	-3.25	无反应性	无反应性	—	—	非 1A	1B
丁二酮*	431-03-8	液体	-2.21	-2.22	-2.14	-2.19	0.04	非 1A	1B
对甲氧基苯乙酮*	100-06-1	固体	无反应性	无反应性	无反应性	—	—	非 1A	非致敏物
正丁醇	71-36-3	液体	无反应性	无反应性	无反应性	—	—	非 1A	非致敏物
羟基苯甲酸丙酯	94-13-3	固体	无反应性	无反应性	无反应性	—	—	非 1A	非致敏物

注:* 为 OECD TG442C 推荐使用的代表性化学物;当肽消耗<13.89%时,称为无反应性。

2.3 将 kDPRA 试验方法扩展应用于 20 种化学物中,结果表明,有 6 种化学物被 kDPRA 判定为 1A 类,分类结果与 ECHA 一致;其余 14 种化学物被 kDPRA 判定为为非 1A 类,此 14 种化学物在 ECHA

数据库或相关文献中获得的 UN GHS 分类有 9 种为 1B 类致敏物,5 种为非致敏物,均属于非 1A 类,结果见表 4。

表 4 20 种化学物 kDPRA 试验结果
Table 4 The kDPRA test results of 20 chemicals

样品名称	CAS No.	性状	log _{k_{max}} 值	kDPRA 分类	UN GHS 分类
甲醛	50-00-0	液体	-0.70	1A	1A
苯叉丙酮	122-57-6	固体	-1.66	1A	1A
没食子酸丙酯	121-79-9	固体	-1.59	1A	1A
丙烯酸羟乙酯	818-61-1	液体	-0.71	1A	1A
苯醌	106-51-4	固体	0.54	1A	1A
新铃兰醛	31906-04-4	液体	-1.43	1A	1A
1,4- 苯二酚	123-31-9	固体	-2.06	非 1A	1B
丁香酚	97-53-0	液体	-2.21	非 1A	1B
苯乙醛	122-78-1	液体	无反应性	非 1A	1B
苯甲醇	100-51-6	液体	无反应性	非 1A	1B
柠檬醛	5392-40-5	液体	-3.21	非 1A	1B
芳樟醇	78-70-6	液体	无反应性	非 1A	1B
金合欢醇	4602-84-0	液体	-3.40	非 1A	1B
β- 香茅醇	106-22-9	液体	无反应性	非 1A	1B
柠檬烯	5989-27-5	液体	无反应性	非 1A	1B
对氨基苯甲酸	150-13-0	固体	-2.20	非 1A	非致敏物
2,5- 二甲基 -2,5- 己二醇	110-03-2	固体	无反应性	非 1A	非致敏物
乳酸	50-21-5	液体	无反应性	非 1A	非致敏物
蒎烯	79-92-5	固体	无反应性	非 1A	非致敏物
2- 庚酮	110-43-0	液体	无反应性	非 1A	非致敏物

2.4 评价 kDPRA 对化学物皮肤致敏性判定能力,共检测 31 种化学物(包括 2,4- 二硝基氯苯),化学物致敏性分类以 ECHA 的 CLP 分类结果作为参考,kDPRA 可准确的评估 10 种 GHS 1A 类化学物,对 13

种 GHS 1B 类化学物和 8 种非致敏物均判为非 1A 类致敏物,因此,在本实验条件下根据此 31 种化学物 kDPRA 检测结果进行皮肤致敏性分类,其灵敏度、特异度和符合率均是 100%。见表 5。

表 5 kDPRA 对 31 种化学物皮肤致敏性评估能力
Table 5 Ability of kDPRA to evaluate skin sensitization of 31 chemicals

致敏性分类		CLP(ECHA)			合计
		1A	1B	非致敏物	
kDPRA	1A	10	0	0	10
	非 1A	0	13	8	21
	合计	10	13	8	31

3 讨论

根据 UN GHS 定义, 化学物致敏性可分为 3 类, 1A 指物质在人类中发生率高, 和 / 或在动物中呈高致敏性, 可以假定有可能在人类中造成严重过敏; 1B 指物质在人类中发生率低至中, 和 / 或在动物中呈低至中致敏性, 可以假定有可能在人类中造成过敏; 未满足 1A 和 1B 条件的物质为非致敏性物质。随着对化学物皮肤致敏生物学机制研究的不断深入, 人们对化学物皮肤致敏的关键事件达成了普遍共识, 认为有四个关键事件连续发生形成了皮肤致敏的不良反应结局, 分别包括化学物与皮肤蛋白质共价结合、角质细胞活化、树突状细胞活化、T 细胞增殖^[13]。化学物与皮肤蛋白质共价结合作为皮肤致敏的分子起始事件, 是皮肤致敏后续发生机制的基础, 基于此, 研究人员将化学物与合成多肽共价结合来模拟化学物与皮肤蛋白结合, 研发出几种化学反应的方法来筛选致敏性化学物, 目前成熟的主要有三种, 包括直接多肽反应试验 (direct peptide reactivity assay, DPRA)、氨基酸衍生物反应试验 (amino acid derivative reactivity assay, ADRA) 和动力学直接多肽反应试验 (kDPRA)^[14]。这三种方法不需要繁琐的细胞培养, 不存在动物伦理问题, 实验周期短, 操作简便快捷而且灵敏, 其中 DPRA 和 ADRA 已在我国通过验证并纳入化妆品安全性评价方法中^[15], 但 kDPRA 在国内应用的资料很少。

kDPRA 是 DPRA 的改良方法, DPRA 使用半胱氨酸和赖氨酸两种合成肽, 通过一个暴露时间和一种浓度的测试结果判定致敏性, 而 kDPRA 只使用半胱氨酸合成肽, 通过 6 个暴露时间和 5 种浓度测试获得动力学结果, 得到更丰富的致敏性反应信息, 能区分化学物 UN GHS 分类对应的皮肤致敏性子类别 1A 类 (相当于强致敏物) 和非 1A 类化学物 (含 1B 类致敏物和非致敏物), 而 DPRA 和 ADRA 均只能区分致敏性和非致敏性化学物, 不能区分致敏性化学物的子类别。不过, 任何测试方法都有一定的局限性, kDPRA 也不例外, 金属、无机化合物和具有荧光淬灭或高自发荧光的物质均不适宜采用 kDPRA 检测其皮肤致敏性^[16], 且 kDPRA 尚不能将非 1A 类中的 1B 类物质和非致敏物进行区分。尽管如此, 对于适用该

方法的化学物, 由于 kDPRA 产生的化学反应动力学速率与致敏效力有很强的相关性, 能有效提高化学物致敏性类别的鉴别能力, 多种方法的组合使用可克服 kDPRA 单独使用的局限性, 已有研究人员将 kDPRA 的结果与细胞体外试验结果以及计算机毒理信息结合, 应用于皮肤致敏限定性方法或综合评价方法中, 通过一套数据整合程序, 将新技术方法的数据信息有效地应用于下一代风险评估中^[17-19], 既提高了鉴定结果的准确性, 又避免了动物试验, 并加快了致敏性物质的筛选效率。

本研究应用已知致敏物 2,4-二硝基氯苯建立 kDPRA 方法, 然后用 10 种化学物作 3 次重复的实验, 再将方法扩展应用到另外的 20 种化学物, 最后将实验结果与欧洲化学品管理局数据库或相关文献化学物致敏性结果相比较, 评价 kDPRA 方法对化学物的皮肤致敏性鉴定能力, 获得的灵敏度、特异度和一致性结果均是 100%, 实现了该方法在本实验室的应用转化。kDPRA 作为一种新技术方法 (NAMs), 在化学物适用范围内, 可有效应用于化学污染物、工业原料、药物等化学物的皮肤致敏性筛选。

志谢 感谢广东省公共卫生研究院陈祥麟、暨南大学研究生孙婷婷参与部分实验和资料整理工作

利益冲突声明 本研究不存在任何利益冲突

参考文献

- [1] United Nations. Globally harmonized system of classification and labelling of chemicals (GHS)[EB/OL]. [2025-01-26]. https://unece.org/sites/default/files/2021-09/GHS_Rev9E_0.pdf.
- [2] OECD. Guidelines for the testing of chemicals, section 4: health effects. Test No. 406: Skin Sensitisation [EB/OL]. [2025-01-26]. https://www.oecd.org/en/publications/test-no-406-skin-sensitisation_9789264070660-en.html.
- [3] OECD. Guidelines for the testing of chemicals, section 4: health effects. Test No.429: Skin sensitisation: Local lymph node assay [EB/OL]. [2025-01-26]. https://www.oecd.org/en/publications/test-no-429-skin-sensitisation_9789264071100-en.html.
- [4] Strickland J, Truax J, Corvaro M, et al. Application of defined approaches for skin sensitization to agrochemical products [J]. *Front Toxicol*, 2022, 4: 852856.
- [5] Gilmour N, Reynolds J, Przybylak K, et al. Next Generation risk assessment for skin allergy: Decision making using new approach methodologies [J]. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 2022, 131: 105159.
- [6] Silva RJ, Tamburic S. A State-of-the-Art review on the alternatives to animal testing for the safety assessment of cosmetics[J]. *Cosmetics*, 2022, 9(5): 90.
- [7] Wareing B, Kolle SN, Birk B, et al. The kinetic direct peptide reactivity assay (kDPRA): Intra- and inter-laboratory reproducibility in a seven-laboratory ring trial[J]. *Altex*, 2020, 37(4): 639-651.
- [8] OECD. Guidelines for the testing of chemicals, section 4: health effects. Test No.442C. In chemico skin sensitization: assays

(下转第 930 页)

- 2021, 589(7840): 82–87.
- [98] Chinazzi M, Davis JT, Ajelli M, et al. The effect of travel restrictions on the spread of the 2019 novel coronavirus (COVID–19) outbreak [J]. *Science*, 2020, 368(6489): 395–400.
- [99] Takko T, Bhattacharya K, Kaski K. Modelling exposure between populations using networks of mobility during COVID–19 [J]. *Front Phys–Lausanne*, 2023, 11: 63.
- [100] Mepparambath RM, Huynh HN, Oon J, et al. The impact of COVID–19 pandemic on the fundamental urban mobility theories using Transit data from Singapore[J]. *Transp Res Interdisc*, 2023, 21: 100883.
- [101] Viboud C, Bjornstad ON, Smith DL, et al. Synchrony, waves, and spatial hierarchies in the spread of influenza [J]. *Science*, 2006, 312(5772): 447–451.
- [102] Engebretsen S, Eng?–Monsen K, Aleem MA, et al. Time–aggregated Mobile phone mobility data are sufficient for modelling influenza spread: the case of Bangladesh [J]. *Journal of the Royal Society, Interface / the Royal Society*, 2020, 17(167): 20190809.
- [103] Bharti N, Xia YC, Bjornstad ON, et al. Measles on the edge: coastal heterogeneities and infection dynamics [J]. *PLOS One*, 2008, 3(4): e1941.
- [104] Tomori DV, R ü bsamen N, Berger T, et al. Individual social contact data and population mobility data as early markers of SARS–CoV–2 transmission dynamics during the first wave in Germany—an analysis based on the COVIMOD study[J]. *BMC Medicine*, 2021, 19(1): 271.
- [105] Nagpal S, Kumar R, Noronha RF, et al. Seasonal variations in social contact patterns in a rural population in North India: Implications for pandemic control[J]. *PLOS One*, 2024, 19(2): e0296483.
- [106] Chen SC, You ZS. Social contact patterns of school–age children in Taiwan: comparison of the term time and holiday periods [J]. *Epidemiology and Infection*, 2015, 143(6): 1139–1147.
- [107] Geenen C, Thibaut J, Laenen L, et al. Unravelling the effect of New Year’s Eve celebrations on SARS–CoV–2 transmission[J]. *Scientific Reports*, 2023, 13(1): 22195.

收稿日期:2024–11–28

(上接第 915 页)

- addressing the adverse outcome pathway key event on covalent binding to proteins [EB/OL]. [2025–01–26]. https://www.oecd.org/en/publications/test-no-442c-in-chemico-skin-sensitisation_9789264229709-en.html.
- [9] National Institutes of Health. Alternative methods accepted by US agencies [EB/OL]. [2025–01–30]. <https://ntp.niehs.nih.gov/whatwestudy/niceatm/accept-methods>.
- [10] Lee I, Na M, Lavelle M, et al. Predicting points of departure and potency categories for fragrance ingredients by integrating OECD in vitro models[J]. *Food and Chemical Toxicology*, 2024, 193: 114998.
- [11] EURL ECVAM. DB–ALM protocol n° 217: Kinetic Direct Peptide Reactivity Assay (kDPRA) [EB/OL]. [2025–01–26]. http://cidportal.jrc.ec.europa.eu/ftp/jrc-opendata/EURL-ECVAM/datasets/DBALM/LATEST/online/DBALM_docs/217_P_kDPRA_final_27Oct20.pdf.
- [12] European Chemicals Agency. Search for chemicals/ regulated substances[EB/OL]. [2025–01–30]. <https://echa.europa.eu/>.
- [13] 彭双清. 21 世纪毒性测试策略[M]. 北京: 军事医学出版社, 2016.
Peng SQ. Toxicity testing strategy in the 21st century toxicity testing strategy in the 21st century [M]. Beijing: Military Medical Press, 2016.(In Chinese)
- [14] Alépée N, Tourneix F, Singh A, et al. Off to a good start? Review of the predictivity of reactivity methods modelling the molecular initiating event of skin sensitization[J]. *Altex*, 2023, 40(4): 606–618.
- [15] 国家药品监督管理局. 国家药监局关于将油包水类化妆品的 pH 值测定方法等 21 项制修订项目纳入化妆品安全技术规范 (2015 年版) 的通告 (2023 年第 41 号) [EB/OL]. [2025–01–30]. <https://www.nmpa.gov.cn/xxgk/ggtg/hzhpggtg/jmhzhtg/20230828170520159.html>.
National Medical Products Administration. Notice of national medical products administration on the inclusion of 21 revision items such as the determination method of pH value of water–in–oil cosmetics into the Cosmetic Safety Technical Specification (2015 edition) (No. 41 of 2023) [EB/OL]. [2025–01–30]. <https://www.nmpa.gov.cn/xxgk/ggtg/hzhpggtg/jmhzhtg/20230828170520159.html>. (In Chinese)
- [16] Roberts DW. A critical review of the kinetic direct peptide reactivity assay (kDPRA) for skin sensitizer potency assessment – taking it forward[J]. *Critical Reviews in Toxicology*, 2021, 51(10): 805–819.
- [17] Natsch A, Gerberick GF. Integrated skin sensitization assessment based on OECD methods (I): Deriving a point of departure for risk assessment[J]. *Altex*, 2022, 39(4): 636–646.
- [18] Mohoric T, Wilm A, Onken S, et al. Increasing accessibility of bayesian Network–Based defined approaches for skin sensitization potency assessment[J]. *Toxics*, 2024, 12(9): 666.
- [19] Natsch A, Gerberick GF. Integrated skin sensitization assessment based on OECD methods (II): Hazard and potency by combining kinetic peptide reactivity and the “2 out of 3” Defined Approach[J]. *Altex*, 2022, 39(4): 647–655.

收稿日期:2024–11–25