

中华人民共和国国家职业卫生标准

GBZ/T 240.9—2011

化学品毒理学评价程序和试验方法 第9部分：体外哺乳动物细胞 染色体畸变试验

Procedures and tests for toxicological evaluations of chemicals—
Part 9: In vitro mammalian chromosome aberration test

2011-08-19 发布

2012-03-01 实施



中华人民共和国卫生部 发布

前 言

根据《中华人民共和国职业病防治法》制定本部分。

GBZ/T 240《化学品毒理学评价程序和试验方法》现分为以下四十四部分：

- 第1部分：总则；
- 第2部分：急性经口毒性试验；
- 第3部分：急性经皮毒性试验；
- 第4部分：急性吸入毒性试验；
- 第5部分：急性眼刺激性/腐蚀性试验；
- 第6部分：急性皮肤刺激性/腐蚀性试验；
- 第7部分：皮肤致敏试验；
- 第8部分：鼠伤寒沙门氏菌回复突变试验；
- 第9部分：体外哺乳动物细胞染色体畸变试验；
- 第10部分：体外哺乳动物细胞基因突变试验；
- 第11部分：体内哺乳动物骨髓嗜多染红细胞微核试验；
- 第12部分：体内哺乳动物骨髓细胞染色体畸变试验；
- 第13部分：哺乳动物精原细胞/初级精母细胞染色体畸变试验；
- 第14部分：啮齿类动物显性致死试验；
- 第15部分：亚急性经口毒性试验；
- 第16部分：亚急性经皮毒性试验；
- 第17部分：亚急性吸入毒性试验；
- 第18部分：亚慢性经口毒性试验；
- 第19部分：亚慢性经皮毒性试验；
- 第20部分：亚慢性吸入毒性试验；
- 第21部分：致畸试验；
- 第22部分：两代繁殖毒性试验；
- 第23部分：迟发性神经毒性试验；
- 第24部分：慢性经口毒性试验；
- 第25部分：慢性经皮毒性试验；
- 第26部分：慢性吸入毒性试验；
- 第27部分：致癌试验；
- 第28部分：慢性毒性/致癌性联合试验；
- 第29部分：毒物代谢动力学试验；
- 第30部分：皮肤变态反应试验-局部淋巴结法；
- 第31部分：大肠杆菌回复突变试验；
- 第32部分：酵母菌基因突变试验；
- 第33部分：果蝇伴性隐性致死试验；
- 第34部分：枯草杆菌基因重组试验；
- 第35部分：体外哺乳动物细胞程序外DNA合成(UDS)试验；
- 第36部分：体内哺乳动物外周血细胞微核试验；

- 第 37 部分:体外哺乳动物细胞姊妹染色单体交换试验;
- 第 38 部分:体内哺乳动物骨髓细胞姊妹染色体交换试验;
- 第 39 部分:精子畸形试验;
- 第 40 部分:繁殖/生长发育毒性筛选试验;
- 第 41 部分:亚急性毒性合并繁殖/发育毒性筛选试验;
- 第 42 部分:一代繁殖试验;
- 第 43 部分:神经毒性筛选组合试验;
- 第 44 部分:免疫毒性试验。

.....

本部分为 GBZ/T 240 的第 9 部分。

本部分的附录 A 是资料性附录。

本部分由卫生部职业卫生标准专业委员会提出。

本部分由中华人民共和国卫生部批准。

本部分起草单位:广西职业病防治研究所、中国疾病预防控制中心职业卫生与中毒控制所。

本部分主要起草人:葛宪民、孙金秀、常兵、林铮。

化学品毒理学评价程序和试验方法

第9部分:体外哺乳动物细胞

染色体畸变试验

1 范围

GBZ/T 240 的本部分规定了体外哺乳动物细胞染色体畸变试验目的、试验概述、试验方法、数据处理与结果评价、评价报告和结果解释。

本部分适用于检测化学品可能引起的细胞遗传学毒性。

2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件,仅所注日期的版本适用于本文件。凡是不注日期的引用文件,其最新版本(包括所有的修改单)适用于本文件。

GBZ/T 224 职业卫生名词术语

GBZ/T 240.1 化学品毒理学评价程序和试验方法 第1部分:总则

3 术语和定义

GBZ/T 240.1 界定的术语和定义适用于本文件。

3.1

染色体型畸变 chromosome-type aberration

在两个染色单体的相同位点均出现断裂或断裂重组的结构改变。

3.2

染色单体型畸变 chromatid-type aberration

染色单体断裂或染色单体断裂重组的结构损伤改变。

3.3

染色体数目畸变 chromosomal numerical aberration

染色体数目发生改变,不同于正常核型。

3.4

染色体结构畸变 chromosomal structure aberration

通过显微镜可以直接观察到的发生在细胞有丝分裂中期的染色体的结构变化。如染色体中间缺失和断片,染色体互换和内交换等。

3.5

有丝分裂指数 mitotic index

中期相细胞数与所观察的细胞总数之比值,是一项反映细胞增殖程度的指标。

4 试验目的

通过检测受试样品诱发体外培养的哺乳动物细胞染色体畸变的能力,从而评价受试样品的致突变性。

5 试验概述

在加或不加入代谢活化系统的条件下,使培养的哺乳动物细胞暴露于受试样品中。用中期分裂相阻断剂(如秋水仙素)处理,使细胞停止在中期分裂相,随后收获细胞、制片、染色、分析染色体畸变。

6 试验方法

6.1 受试样品处理

受试样品一般应新鲜配制。如果溶液贮存稳定,可以不必新鲜配制。固体受试样品应溶解或悬浮于适合的溶剂中,并稀释至一定浓度。液体受试样品可直接使用或予以稀释。

6.2 剂量水平

受试样品至少应取 3 个检测剂量,检测范围建议覆盖两个 10 倍稀释系列。对有细胞毒性的受试样品,其剂量范围应包括从最大毒性至几乎无毒性;当收获细胞时,高剂量应能明显减少细胞计数或有丝分裂指数(均应大于 50%);对无细胞毒性或细胞毒性很小的化合物,高剂量应达到 $5\ \mu\text{L/mL}$ 、 $5\ \text{mg/mL}$ 或 $0.01\ \text{mol/L}$ 。应在预试验中确定细胞毒性和溶解度。测定细胞毒性可使用指示细胞完整性和生长情况的指标,如相对集落形成率或相对细胞生长率等。应在 S_0 系统存在或不存在的条件下测定细胞毒性。对于相对不溶解的物质,当达到不溶解浓度时仍无毒性,则高剂量应采用最终培养液中溶解度限值以上的一个浓度。在某些情况下,应使用一个以上可见沉淀的浓度,溶解性可用肉眼鉴别,但沉淀不能影响观察。

6.3 对照组

6.3.1 阳性对照

可根据受试样品的性质和结构选择适宜的阳性对照物,应是已知的断裂剂,能引起可检出的、并可重复的阳性结果。

当不存在外源性代谢活化系统时,可使用的阳性对照物有:

- 甲磺酸甲酯(methyl methanesulphonate);
- 甲磺酸乙酯(ethyl methanesulphonate);
- 丝裂霉素 C(mytomycin C);
- 乙基亚硝基脲(ethyl nitrosourea);
- 4-硝基喹啉-N-氧化物(4-nitroquinoline-N-oxide)等。

当存在外源性活化系统时,可使用的阳性对照物有:

- 苯并(a)芘(benzo(a)pyrene);
- 环磷酰胺(cyclophosphamide)等。

6.3.2 阴性对照

- a) 介质对照:介质应为非致突变物,不与受试样品发生化学反应,不影响细胞存活和 S_0 活性。首选介质是水或水溶性溶剂,亦可使用二甲基亚砜(DMSO),但浓度不应大于 0.5%。
- b) 空白对照:如果没有文献资料或历史资料证实所用介质无致突变作用时应设空白对照。

6.4 细胞株

可选用中国地鼠肺(CHL)细胞株或卵巢(CHO)细胞株、人或其他哺乳动物外周血淋巴细胞(lym-

phocyte)。一般推荐使用中国地鼠肺(CHL)细胞株。

6.5 试剂配制

6.5.1 培养液 MEM (Eagle)

加入非必需氨基酸和抗菌素(青霉素按 100 IU/mL、链霉素 100 μ g/mL),胎牛血清或小牛血清按 10%加入。也可选用其他合适的培养液。

6.5.2 代谢活化系统

大鼠肝微粒体酶 S_9 ,其诱导和制备方法见附录 A。

6.5.3 0.04%秋水仙素溶液

取 40 mg 秋水仙素溶解于 100 mL 无菌 0.85%氯化钠溶液中,过滤除菌。

6.5.4 0.075 mol/L 氯化钾溶液

6.5.5 固定液

甲醇:冰醋酸=3:1,临用前配制。

6.5.6 姬姆萨染液

取姬姆萨染料 3.8 g,置玛瑙乳钵中,加少量甲醇研磨。逐渐加甲醇至 375 mL,待完全溶解后,再加 125 mL 甘油,放入 37 $^{\circ}$ C 温箱中保温 48 h。保温期间振摇数次,使充分溶解。取出过滤,2 周后使用,作为姬姆萨染液原液。使用时,取 1 份姬姆萨染液原液,与 9 份 1/15 mol/L 磷酸盐缓冲液(pH6.8)混合,配成其应用液。

磷酸盐缓冲液(1/15 mol/L, pH6.8)配制方法如下:

——第一液:取磷酸氢二钠 9.47 g 溶于蒸馏水 1 000 mL 中,配成 1/15 mol/L 溶液。

——第二液:取磷酸二氢钾 49.07 g 溶于蒸馏水 1 000 mL 中,配成 1/15 mol/L 溶液。

取第一液 49.5 mL 加于第二液 50.5 mL 中混匀,即为 pH6.8 的 1/15 mol/L 缓冲液。

6.6 试验步骤

6.6.1 细胞培养与染毒

试验需在加入和不加入 S_9 的条件下进行。试验前一天,将一定数量的细胞接种于培养皿(瓶)中,放 CO_2 培养箱内培养。试验时吸去培养皿(瓶)中的培养液,加入一定浓度的受试样品、 S_9 混合液(不加 S_9 混合液时,需用培养液补足)以及一定量不含血清的培养液,放培养箱中,根据细胞周期决定处理 2 h~6 h。结束后,吸去含受试样品的培养液,用 Hanks 液洗细胞 3 次,加入含 10%胎牛血清的培养液,放回培养箱,于 24 h 或 48 h 内收获细胞。收获前 2 h~4 h,加入细胞分裂中期阻断剂(如用秋水仙素,作用时间为 4 h,终浓度为 1 μ g/mL)。

如果在上述加入和不加入 S_9 混合液的条件下均获得阴性结果,则需加做长时间处理的试验,即在无 S_9 混合液的条件下,使受试样品与试验系统的接触时间延长至 24 h。当难以得出明确结论时,应更换试验条件,如改变代谢活化条件、受试样品与试验系统接触时间等重复试验。

6.6.2 收获细胞与制片

6.6.2.1 消化:用 0.25%胰蛋白酶溶液消化细胞,待细胞脱落后,加入含 10% 胎牛或小牛血清的培养液终止胰蛋白酶的作用,混匀,放入离心管以 1 000 r/min~1 200 r/min 的速度离心 5 min~7 min,弃去

上清液。

6.6.2.2 低渗:加入 0.075 mol/L KCl 溶液 7 mL,用滴管将细胞轻轻地混匀,放入 37℃ 水浴中低渗处理 10 min~15 min,加入 2 mL 固定液(甲醇:冰醋酸 3:1)混匀,以 1 500 r/min 速度离心 5 min~7 min,弃去上清液。

6.6.2.3 固定:加入 7 mL 固定液,混匀后固定 7 min,以 1 500 r/min 速度离心 7 min,弃去上清液。用同法再固定 1 次~2 次,弃去上清液。

6.6.2.4 滴片:加入数滴新鲜固定液,混匀。用混悬液滴片,自然干燥。

6.6.2.5 染色:用姬姆萨染液染色。

6.6.3 镜检

每一剂量组选择 200 个分散良好的中期分裂相,在显微镜油镜下进行读片。在读片时应记录每一观察细胞的染色体数目,对于畸变细胞还应记录显微镜视标位置及畸变类型。所有处理组、阳性和阴性对照组均需测定有丝分裂指数。每一剂量组应分析不少于 1 000 个分散良好的中期分裂相。

7 数据处理与结果评价

7.1 数据处理

结果数据的计算指标包括每个细胞染色体畸变数、染色体结构异常百分率、各剂量组及对照组不同类型染色体异常数与频率等。分裂细胞数应另计,一般不包括在总异常频率中。所得各组的染色体畸变率用 χ^2 检验进行统计学处理,以评价剂量组和对照组之间是否有显著性差异。

7.2 结果评价

在下列两种情况下可判定受试样品在本试验系统中为阳性结果:

- 受试样品引起染色体结构畸变数的增加具有统计学意义,并有与剂量相关的增加;
- 受试样品在任何一个剂量条件下,引起染色体结构畸变数的增加具有统计学意义,并有可重复性。评价时应综合考虑生物学和统计学意义。

8 评价报告

除 GBZ/T 240.1 规定的一般项目外,评价报告还应包括以下内容:

- 所用溶剂及其配制、剂量选择(应说明受试样品的细胞毒性测定方法、溶解情况等);
- 细胞株名称;
- 试验条件和方法;
 - 代谢活化系统所用酶诱导剂、来源及 S_9 混合液配方;
 - 培养液名称与血清类别和使用溶解情况;
 - 阳性对照物名称和选用浓度,阴性(溶剂)对照物名称及使用浓度;
 - 接种的细胞密度以及所用培养皿(瓶)的规格;
 - 中期分裂阻断剂名称、所用浓度和作用时间;
 - 受试样品与试验系统的接触时间。
- 简述制片方法;
- 毒性特征、细胞周期资料、分裂指数、受试样品的 pH 值、畸变(包括裂隙分析)、各试验组(剂量组、阳性组、阴性组)染色体畸变数目及畸变类型、畸变范围、剂量-反应关系、统计处理方法、本实验室历史上的染色体畸变率范围、均值和标准差(说明样品数);

f) 结论。

9 结果解释

阳性结果表明受试样品在该试验条件下可引起所用哺乳动物细胞染色体畸变。阴性结果表明在该试验条件下受试样品不引起所用哺乳动物细胞染色体畸变。

附 录 A

(资料性附录)

大鼠肝微粒体酶的诱导和 S_9 的制备

A.1 诱导

应用最广泛的大鼠肝微粒体酶的诱导剂是多氯联苯(PCB)混合物,选择健康雄性大鼠体重 200 g 左右,一次腹腔注射诱导剂 500 mg/kg。诱导剂溶于玉米油中,浓度为 200 mg/mL。

A.2 S_9 制备

动物诱导后第五日断头处死。处死前 12 h 停止饮食,但可自由饮水。首先,用 75%酒精消毒动物皮肤,剖开腹部。在无菌条件下,取出肝脏,去除肝脏的结缔组织,用冰浴的 0.15 mol/L 氯化钾淋洗肝脏,放入盛有 0.15 mol/L 氯化钾溶液的烧杯里。按每克肝脏加入 0.15 mol/L 氯化钾溶液 3 mL。用电动匀浆器制成肝匀浆,再在低温高速离心机上,在 4℃条件下,以 9 000 g 离心 10 min,取其上清液分装于塑料管中。每管装 2 mL~3 mL。储存于液氮生物容器中或-80℃冰箱中备用。

上述全部操作均在冰水浴中和无菌条件下进行。制备肝 S_9 所用一切手术器械、器皿等,均经灭菌消毒。 S_9 制备后,其活力需经诊断性诱变剂进行鉴定。
