

中华人民共和国国家职业卫生标准

GBZ/T 240.10—2011

化学品毒理学评价程序和试验方法 第 10 部分：体外哺乳动物细胞 基因突变试验

Procedures and tests for toxicological evaluations of chemicals—
Part 10: In vitro mammalian cell forward gene mutation 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 10 部分。

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:陈晓琴、孙金秀、常兵、许建宁、林铮。

化学品毒理学评价程序和试验方法

第 10 部分:体外哺乳动物细胞

基因突变试验

1 范围

GBZ/T 240 的本部分规定了体外哺乳动物细胞基因突变试验的目的、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引起的体外哺乳动物细胞基因突变。

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

突变频率 mutant frequency

所观察到的突变细胞集落数与存活细胞数之比。

4 试验目的

通过检测受试化学品诱发体外培养的哺乳动物细胞基因突变(包括碱基对置换、移码突变和缺失等)的能力,从而评价受试化学品的致突变性及其强度。

5 试验概述

在加入或不加入肝微粒体酶的条件下,使细胞暴露于受试样品一定时间,然后将细胞传代培养,突变细胞在含有 6-巯基鸟嘌呤(6-thioguanine, 6-TG)或三氟胸苷(trifluorothymidine, TFT)的选择性培养液中能继续分裂并形成集落。根据突变集落数可计算突变频率,从而评价受试样品的致突变性。

6 试验方法

6.1 受试样品配制

选定受试样品的合适溶剂,首选无菌双蒸水作为溶剂,如果不溶于水的或水溶性低的化学品,首选

二甲基亚砜。固体受试样品需溶解或悬浮于溶剂中,用前稀释至适合浓度;液体受试样品可以直接加入试验系统/或用前稀释至适合浓度。受试样品一般应在使用前新鲜配制。

6.2 剂量水平

至少应设置4个可供分析的剂量。对有细胞毒性的受试样品,高剂量组的细胞存活率可为10%~20%,低剂量组的细胞存活率应>80%。无细胞毒性的受试样品,高剂量应达到5 $\mu\text{L}/\text{mL}$,5 mg/mL 或0.01 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。

6.3 对照

6.3.1 阳性对照

6.3.1.1 不需 S_0 代谢活化的阳性对照物

- 甲磺酸乙酯(ethyl methanesulphonate, CAS号62-50-0);
- 甲磺酸甲酯(methyl methanesulphonate, CAS号66-27-3);
- 乙基亚硝基脲(ethyl nitrosourea, CAS号759-73-9)等。

6.3.1.2 需要 S_0 代谢活化的阳性对照物

- 3-甲基胆蒎(3-methylcholanthrene, CAS号56-49-5);
- 环磷酰胺(cyclophosphamide, CAS号50-18-0);
- N*-亚硝基胍(*N*-nitroso-dimethylamine, CAS号62-75-9);
- 7,12-二甲基苯蒎(7,12-dimethylbenzanthracene, CAS号57-97-6);
- 苯并(α)芘(benzo(α)pyrene, CAS号50-32-8)等。

6.3.2 阴性对照

6.3.2.1 溶剂对照

溶剂应为非致突变物,不与受试样品发生化学反应,不影响细胞存活和 S_0 活性。首选溶剂是水或水溶性溶剂,亦可使用二甲基亚砜(DMSO),但浓度不应大于0.5%。

6.3.2.2 空白对照

如果没有文献资料或历史资料证实所用溶剂无致突变作用时应设空白对照。

6.4 细胞株

用于本试验的细胞株对化学致突变物应具有明确的敏感性,高度的繁殖能力以及稳定的自发突变率。应检测细胞是否被支原体感染,若已被感染则不能使用。

*HPRT*位点突变分析常使用中国仓鼠肺细胞株(V_{79})和中国仓鼠卵巢细胞株(CHO),*TK*位点突变分析常用小鼠淋巴细胞株(L5178Y)和人类淋巴细胞细胞株(TK6, WTK1等)。

6.5 试剂配制

6.5.1 完全培养液

应根据试验所用系统和细胞类型来选择适宜的培养基。对于L5178Y或TK6细胞,常用PRMI 1640培养基加入10%马血清和适量抗菌素(青霉素100 IU/mL、链霉素100 $\mu\text{g}/\text{mL}$)。对于 V_{79} 或

CHO 细胞,常用 MEM(Eagle)培养基加入 10%胎牛血清和适量抗菌素。

6.5.2 血清处理

将过滤除菌后的小牛血清或马血清放入 56 °C 水浴中,保温 30 min 以灭活补体,然后分装,保存于 -20 °C 备用。

6.5.3 代谢活化系统

肝微粒体酶(S₉ 混合液)。

6.5.4 无钙镁的磷酸盐缓冲液(无钙镁 PBS, pH 为 7.2~7.4)成分

磷酸二氢钾(KH ₂ PO ₄)	0.20 g
磷酸氢二钠(Na ₂ HPO ₄ · 12H ₂ O)	2.89 g
氯化钾(KCl)	0.20 g
氯化钠(NaCl)	8.00 g
双蒸水(压力蒸气灭菌)	1 000 mL

6.5.5 胰蛋白酶-EDTA 溶液

分别用无钙镁 PBS 配制胰蛋白酶与 EDTA 钠盐溶液,胰蛋白酶溶液浓度为 0.05%,EDTA 钠盐溶液浓度为 0.02%,两溶液按 1:1 混合,存放于 -20 °C 冰箱备用。

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 °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。

6.5.7 选择剂

6-巯基鸟嘌呤(6-TG)建议使用最终浓度为 5 μg/mL; 三氟胸苷(TFT)建议使用最终浓度为 3 μg/mL。

6.6 试验步骤

6.6.1 HPRT 位点突变分析(V₇₉)

6.6.1.1 细胞准备

将 5×10⁵ 个细胞接种于含完全培养液的直径为 100 mm 的平皿中,除未处理对照组外,每组 3 个平皿。于 37 °C CO₂ 培养箱中培养 24 h。

6.6.1.2 接触受试样品

吸去上述供试培养皿中的培养液,用无钙镁 PBS 洗 2 次。将含有细胞的培养皿分为两大组,一组加 S₉ 混合液,另一组不加 S₉ 混合液。加 S₉ 混合液组,在培养皿中加入 2 mL S₉ 混合液,对不加 S₉ 混合液组,则用 2 mL 无血清培养液代替,再加不同剂量受试样品的供试液,最后不含血清的培养液补足至 10 mL,并将培养皿置 CO₂ 培养箱中培养 3 h~6 h。处理结束后,吸去培养皿中液体部分,用无钙镁 PBS 洗涤细胞 2 次,再加入完全培养液 10 mL,在 CO₂ 培养箱中培养 19 h~22 h。阳性和阴性对照组也分为加与不加 S₉ 混合液两个组,操作方法同上。

6.6.1.3 表达

将培养物用胰蛋白酶-EDTA 消化,待细胞脱落后,加入完全培养液,终止消化。混匀、计数并进行表达和细胞毒性测定。表达时,以 5×10^5 个细胞接种于直径为 100 mm 的平皿中。培养 6 d~8 d 后,分传一次,仍接种 5×10^5 个细胞,培养 3 d 后再进行突变体的选择及集落形成效率(CFE)的测定。

6.6.1.4 细胞毒性测定

将上述消化计数后的细胞,每个平皿接种 200 个,每组 5 个平皿,于 37 °C CO₂ 培养箱内培养 7 d。取出样本,固定并进行姬姆萨染色后,计数各平皿的细胞集落数。以相对 CFE 值表示细胞的毒性。

6.6.1.5 突变体的选择及集落形成率的测定

表达结束后,消化细胞,分别接种,每组 5 个平皿,每个平皿接种 2×10^5 个细胞。待细胞贴壁后加入 6-TG,终浓度为 5 μg/mL。放入 CO₂ 培养箱培养 7 d~10 d。固定后进行姬姆萨染色,计数平皿内集落数,并计算其突变频率(MF)。

6.6.2 TK 位点突变分析

6.6.2.1 取生长良好的细胞,调整密度为 5×10^5 /mL,按 1% 体积加入受试样品,37 °C 震荡处理 3 h。离心,弃上清液,用 PBS 或不含血清的培养基洗涤细胞 2 遍,重新悬细胞于含 10% 马血清的 PRMI 1640 培养液中,并调整细胞密度 2×10^5 /mL。

6.6.2.2 PE₀(0 天的平板接种效率)测定 取适量细胞悬液,作梯度稀释至 8 个细胞/mL,接种 96 孔板(每孔加 0.2 mL,即平均 1.6 个细胞/孔),每个剂量作 1 块~2 块板,37 °C,5% CO₂,饱和湿度条件下培养 12 d,计数每块平板的集落生长的孔数。

6.6.2.3 表达 对步骤 6.6.2.1 所得细胞悬液作 2 d 表达培养,每天计数细胞密度并保持密度在 10^6 /mL 以下。

6.6.2.4 PE₂(第 2 d 的平板接种效率)测定 第 2 天表达培养结束后,取适量细胞悬液,按步骤 6.6.2.2 作稀释梯度并接种 96 孔板,培养 12 d 后计数每块平板有集落生长的孔数。

6.6.2.5 TFT 抗性突变频率(MF)测定 第 2 天表达培养结束后,取适量细胞悬液,调整细胞密度为 1×10^4 /mL,加入 TFT(三氟胸苷,终浓度为 3 μg/mL),混匀,接种 96 孔板(每孔加 0.2 mL,即平均 2 000 个细胞/孔),每个剂量作 2 块~4 块板,37 °C,5% CO₂,饱和湿度条件下培养 12 d,计数有突变集落生长的孔数。

7 数据处理与结果评价

7.1 HPRT 位点突变分析按下列公式计算有关指标

- 绝对 CFE=形成集落数/接种细胞数;
- 相对 CFE=(试验组绝对 CFE/溶剂对照组绝对 CFE)×100%;
- 突变频率(MF)=(突变集落数/接种细胞数)×(1/绝对 CFE);
- 试验结果用 X² 检验进行统计学处理。

7.2 TK 位点突变分析按下列公式计算有关指标

7.2.1 平板效率(PE₀ 和 PE₂)

平板效率计算见公式(1)。

$$PE = \frac{-\ln(EW/TW)}{1.6} \dots\dots\dots(1)$$

式中:

EW——无集落生长的孔数;

TW——总孔数;

1.6——每孔接种细胞。

7.2.2 相对存活率

相对存活率计算见公式(2)。

$$\text{相对存活率(RSR, \%)} = \frac{PE_0(\text{处理})}{PE_0(\text{对照})} \times 100\% \dots\dots\dots(2)$$

7.2.3 突变频率(MF)

突变频率计算见公式(3)。

$$MF(\times 10^6) = \frac{-\ln(EW/TW)/n}{1.6} \dots\dots\dots(3)$$

式中:

EW——无集落生长的孔数;

TW——总孔数;

n——每孔接种细胞数(2 000)。

7.3 评价原则

7.3.1 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:

——受试样品引起突变频率的增加具有统计学意义、并有剂量-效应关系。

——受试样品在任何一个剂量条件下,引起具有统计学意义,并有可重复性的阳性反应。

7.3.2 阴性结果的判定需在相对存活率(relative survival rate, RSR) < 20%(即已产生明显细胞毒性)的情况下未见突变频率显著增加时方可作出。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:

a) 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);

b) 细胞株名称;

c) 试验条件和方法:

——阳性对照物名称和使用浓度、S₉ 混合液的制备与配方;

——所用培养液名称、血清类别和使用浓度;

——接种时的细胞密度以及所用培养瓶的规格;

——受试样品与试验系统的接触时间;

——表达时间;

——结果评价方法。

d) 结果:

——受试样品高剂量的确定及结果,包括细胞毒性的测定、溶解情况、对 pH 的影响(如果有影响);

——剂量组和对照组的突变频率及统计结果;

- 阳性对照组和阴性对照组(包括常用溶剂,如 DMSO)在本实验室历史上突变频率范围,均值和标准差(说明样品数);
- 结论。

9 结果解释

阳性结果表明在本试验条件下受试样品可引起所用哺乳动物细胞的基因突变。阴性结果表明在本试验条件下受试样品不引起所用哺乳动物细胞的基因突变。
