



中华人民共和国国家标准

GB 15193.28—2020

食品安全国家标准 体外哺乳类细胞微核试验

2020-09-11 发布

2021-03-11 实施

中华人民共和国国家卫生健康委员会
国家市场监督管理总局 发布

食品安全国家标准

体外哺乳类细胞微核试验

1 范围

本标准规定了体外哺乳类细胞微核试验的基本试验方法和技术要求。
本标准适用于评价受试物的遗传毒性作用。

2 术语和定义

2.1 微核

细胞有丝分裂后期染色体有规律地进入子细胞形成细胞核时,仍留在细胞质中的整条染色单体或染色体的无着丝断片或环。在末期单独形成一个或几个规则的次核,被包含在细胞的胞质内而形成。

2.2 着丝粒

在细胞分裂期染色体与纺锤体纤维连接的区域,以使子染色体有序移动到子细胞两极。

2.3 非整倍体

二倍体染色体组中缺少或额外增加一条或若干条完整的染色体的变异类型。

2.4 非整倍体诱变剂

作用于细胞有丝分裂或者减数分裂周期,导致细胞分裂异常,诱发非整倍体的物质。

2.5 染色体断裂

染色体臂出现长度大于染色体臂宽度的裂隙。

2.6 染色体断裂剂

引起染色体发生断裂的物质。

2.7 细胞毒性

对细胞结构或功能的有害效应,最终可导致细胞死亡。

3 试验目的和原理

体外哺乳类细胞微核试验是一种用于检测哺乳类细胞在受试物处理后是否产生微核的遗传毒性检测方法。本方法适用于检测有丝分裂细胞暴露于受试物期间或之后致染色体断裂和诱发非整倍体的能力。如果3 h~6 h短期处理的试验结果为阴性或不明确时,需要进行无代谢活化系统的长期处理试验,相当于用受试物处理细胞1.5个~2.0个正常细胞周期。

4 仪器和试剂

4.1 仪器

细胞培养箱、倒置显微镜、正置显微镜、超净台、离心机。

4.2 培养液

根据细胞类型来选择适宜的培养基。对于 V79、CHL 或 CHO 细胞,常用 MEM(Eagle)培养液加入 10%胎牛血清和适量抗菌素(可用青霉素 100 IU/mL、链霉素 100 μg /mL)。对于 L5178Y 或 TK6 细胞,常用 RPMI 1640 培养液加入 10%马血清和适量抗菌素(可用青霉素 100 IU/mL、链霉素 100 μg /mL)。

4.3 代谢活化系统

4.3.1 S9 辅助因子的配制

4.3.1.1 镁钾溶液

氯化镁 1.9 g 和氯化钾 6.15 g 加蒸馏水溶解至 100 mL。

4.3.1.2 0.2 mol/L 磷酸盐缓冲液(pH 7.4)

磷酸氢二钠(Na_2HPO_4 , 28.4 g/L)440 mL,磷酸二氢钠($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 27.6 g/L)60 mL,调 pH 至 7.4,0.103 MPa 20 min 灭菌或滤菌。

4.3.1.3 辅酶-Ⅱ(氧化型)溶液

无菌条件下称取辅酶-Ⅱ,用无菌蒸馏水溶解配制成 0.025 mol/L 溶液,现用现配。

4.3.1.4 葡萄糖-6-磷酸钠盐溶液

称取葡萄糖-6-磷酸钠盐,用蒸馏水溶解配制成 0.05 mol/L 溶液,过滤灭菌。现用现配。

4.3.2 大鼠肝 S9 组分的诱导和配制

选健康雄性成年 SD 或 Wistar 大鼠,体重 150 g~200 g,约 5 周龄~6 周龄。将多氯联苯(Aroclor 1254)溶于玉米油中,浓度为 200 g/L,按 500 mg/kg 体重无菌操作一次腹腔注射,5 d 后处死动物,处死前禁食 12 h。

也可采用苯巴比妥钠和 β -萘黄酮联合诱导的方法进行制备,经口灌胃给予大鼠苯巴比妥钠和 β -萘黄酮,剂量均为 80 mg/kg 体重,连续 3 d,禁食 16 h 后断头处死动物。其他操作同多氯联苯诱导。

处死动物后取出肝脏,称重后用新鲜冰冷的 0.15 mol/L 氯化钾溶液连续冲洗肝脏数次,以便除去能抑制微粒体酶活性的血红蛋白。每克肝(湿重)加 0.1 mol/L 氯化钾溶液 3 mL,连同烧杯移入冰浴中,用消毒剪刀剪碎肝脏,在玻璃匀浆器(低于 4 000 r/min,1 min~2 min)或组织匀浆器(低于 20 000 r/min,1 min)中制成肝匀浆。以上操作需注意无菌和局部冷环境。

将制成的肝匀浆在低温(0 $^{\circ}\text{C}$ ~4 $^{\circ}\text{C}$)高速离心机上以 9 000 g 离心 10 min,吸出上清液为 S9 组分,分装于无菌冷冻管中,每管 2 mL 左右,最好用液氮或干冰速冻后置 -80 $^{\circ}\text{C}$ 低温保存。

S9 组分制成后,经无菌检查,测定蛋白含量(Lowry 法),每毫升蛋白含量不超过 40 mg 为宜,并间接致突变剂鉴定其生物活性合格后贮存于 -80 $^{\circ}\text{C}$ 低温或冰冻干燥,保存期不超过 1 年。

4.3.3 S9 混合液的制备

S9 混合液浓度一般为 1%~10%，实际使用浓度可由各实验室决定，但需对其活性进行鉴定，必须能明显活化阳性对照物，且对细胞无明显毒性。

一般由 S9 组分和辅助因子按 1:9 组成 10% 的 S9 混合液，无菌现用现配。10% S9 混合液 10 mL 配制方法如下：取上述磷酸盐缓冲液 6.0 mL、镁钾溶液 0.4 mL、葡萄糖-6-磷酸钠盐溶液 1.0 mL、辅酶-II 溶液 1.6 mL、肝 S9 组分 1.0 mL，混匀，置冰浴中待用。

4.4 肌动蛋白聚合抑制剂细胞松弛素 B(CytochalasinB, cytoB) 溶液

用二甲基亚砜(DMSO)配制适当浓度的储备液，避光冷藏保存。cytoB 的终浓度通常为 3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ~ 6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，实验室应根据各种细胞系选择 cytoB 的适当终浓度，以达到理想的双核细胞出现频率。

4.5 0.075 mol/L 氯化钾溶液

5.59 g 氯化钾加蒸馏水至 1 000 mL。

4.6 固定液

甲醇：冰醋酸为 3：1，临用前配制。

4.7 姬姆萨(Giemsa)染液

取姬姆萨染料 3.8 g，置乳钵中，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 $^{\circ}\text{C}$ 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(pH 6.8)混合，配成其应用液，现配现用。

磷酸盐缓冲液(1/15 mol/L, pH 6.8)配制方法如下：

- 第一液：取磷酸氢二钠(Na_2HPO_4)9.47 g 溶于 1 000 mL 去离子水中，配成 1/15 mol/L 溶液；
- 第二液：取磷酸二氢钾(KH_2PO_4)9.07 g 溶于 1 000 mL 去离子水中，配成 1/15 mol/L 溶液；
- 取第一液 50 mL 加于第二液 50 mL 中混匀，即为 pH 6.8 的 1/15 mol/L 磷酸盐缓冲液。

5 试验方法

5.1 受试物

固体受试物应溶解于适合的溶媒中，并稀释至适当浓度。液体受试物可直接使用或稀释至适当浓度使用。受试物应无菌现用现配，否则须确认储存不影响其稳定性。

5.2 细胞

可选用中国仓鼠肺细胞株(V79、CHL)或卵巢细胞株(CHO)、小鼠淋巴瘤细胞株(L5178Y)、人外周血淋巴细胞株(如 TK6)和原代培养细胞。推荐使用 CHL 或 L5178Y 细胞株。细胞在使用前应进行染色体数目稳定性和有无支原体污染的检查。

5.3 试验方案选择

试验分为使用和不使用 cytoB 两种方案。方案一：在细胞经过受试物处理，有丝分裂前使用 cytoB，然后观察分析已完成一次有丝分裂的细胞(双核细胞)微核率。当选用人类淋巴细胞时，建议采用方案一，因为不同来源的细胞周期不同，而且不是所有的细胞都对植物血球凝集素(PHA)有反应。方案二：

不使用 cytoB, 细胞经过受试物处理后观察分析细胞微核率。如果有证据表明受试物干扰 cytoB 的活性, 或 cytoB 可能影响细胞的生长(如小鼠淋巴瘤细胞株), 建议采用方案二。

5.4 剂量

5.4.1 剂量设置

至少应设置 3 个检测剂量。受试物没有细胞毒性时, 从最高剂量往下设至少 2 个剂量, 一般情况下间隔系数可为 2~3; 有细胞毒性时, 其剂量范围应涵盖从 55%±5% 的细胞毒性到几乎无细胞毒性。

5.4.2 最高剂量的选择

决定最高剂量的因素是细胞毒性、受试物的溶解度以及 pH、渗透压。

受试物有细胞毒性时, 最高剂量应能引起 55%±5% 的细胞毒性; 如果没有细胞毒性或沉淀, 最高剂量应是 5 μL/mL、5 mg/mL 或 10 mmol/L。

对溶解度较低的物质, 当达到最大溶解浓度时仍无毒性, 则最高剂量应是在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。

5.4.3 细胞毒性的确定

在 S9 存在和不存在两种条件下依据细胞完整性和生长情况的指标来确定细胞毒性。

方案一, 使用 cytoB, 细胞毒性的确定可依据复制指数 (Replication Index, RI) 或胞质分裂阻断增殖指数 (Cytokinesis Block Proliferation Index, CBPI)。

$$RI = \frac{(\text{双核细胞数}_T + 2 \times \text{多核细胞数}_T) / 500}{(\text{双核细胞数}_C + 2 \times \text{多核细胞数}_C) / 500} \times 100$$

式中:

500——细胞总数;

T ——受试物组;

C ——阴性对照组。

细胞毒性 = 100 - RI

$$CBPI = \frac{\text{单核细胞数} + 2 \times \text{双核细胞数} + 3 \times \text{多核细胞数}}{500}$$

式中:

CBPI=1 时等同于 100% 细胞生长抑制;

500——细胞总数。

$$\text{细胞毒性} = 100 - \frac{CBPI_T - 1}{CBPI_C - 1} \times 100$$

式中:

T ——受试物组;

C ——阴性对照组。

方案二, 不使用 cytoB, 细胞毒性的确定可依据相对细胞增长数 (Relative Increase in Cell Counts, RICC) 或相对增殖倍数 (Relative Population Doubling, RPD)。

$$RICC = \frac{\text{受试物组细胞数的增加(试验后-试验前)}}{\text{阴性对照组细胞数的增加(试验后-试验前)}} \times 100$$

细胞毒性 = 100 - RICC

$$\text{RPD} = \frac{\text{受试物组双倍数量}}{\text{阴性对照组双倍数量}} \times 100$$

式中：

$$\text{双倍数量} = \frac{\log(\text{试验后细胞数}/\text{试验前细胞数})}{\log 2}$$

$$\text{细胞毒性} = 100 - \text{RPD}$$

5.4.4 阳性对照

阳性对照物包括染色体断裂剂和非整倍体剂。加 S9 时,断裂剂可以选用环磷酰胺和苯并(a)芘;不加 S9 时,断裂剂可以选用阿糖胞苷、丝裂霉素 C、甲磺酸甲酯和 4-硝基喹啉;非整倍体剂只用于不加 S9 时,可以选用秋水仙素和长春新碱。

如果短期处理试验方案在 S9 存在和不存在两种条件下都选用断裂剂作为阳性对照,那么长期处理试验方案应该选用非整倍体剂作为阳性对照。如果选用的细胞本身具有代谢能力,则不需要另外添加 S9,阳性对照应该同时使用断裂剂和非整倍体剂。

5.4.5 阴性对照

溶媒必须是非致突变物,不与受试物发生化学反应,不影响细胞存活和 S9 活性。首选溶媒是培养液(不含血清)或水。使用水作为溶媒时其体积不应大于总体积的 10%。DMSO 也是常用溶媒,但终浓度不应大于 1%。

5.4.6 空白对照

如果没有文献资料或历史资料证实所用溶媒无致突变作用时应设空白对照。

5.5 试验步骤

5.5.1 细胞准备

将一定数量的细胞接种于培养皿(瓶)中,以收获细胞时,培养皿(瓶)的细胞未长满为标准,贴壁细胞一般以长到 85%左右为佳。

5.5.2 受试物处理

5.5.2.1 应用方案一,吸去培养液,用磷酸盐缓冲液洗细胞,加入无血清培养液及一定浓度的受试物(需代谢活化者同时加入 S9 mix),置于培养箱中 3 h~6 h;结束后吸去含受试物的培养液,用 PBS 洗细胞,加入含 10%血清的新鲜培养液和 cytoB,继续培养 1.5 个~2.0 个正常细胞周期后收集细胞。

对于淋巴细胞,最有效的方法是在有丝分裂原(如 PHA)刺激后 44 h~48 h 开始受试物处理,这时细胞开始进入分裂周期。

如果 3 h~6 h 短期处理的试验结果为阴性或不明确时,需要进行无 S9 的长期处理试验,用 cytoB 和受试物处理细胞 1.5 个~2.0 个正常细胞周期,在处理结束后收集细胞。

如果已知或怀疑受试物(如核苷类物质)可能影响细胞周期(特别是 P53 活性细胞),则细胞收获时间应该再延长 1.5 个~2.0 个正常细胞周期。

5.5.2.2 应用方案二,与 5.5.2.1 处理方法相同,只是不加 cytoB。

5.5.3 收获细胞与制片

每次培养都应单独收获细胞和制片,如果细胞混合液的分散度良好则不需要进行低渗处理。

5.5.3.1 消化

贴壁细胞用 0.25%胰蛋白酶溶液消化,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 800 r/min~1 000 r/min 的速度离心 5 min,弃去上清液。悬浮细胞不需要消化,直接离心。

5.5.3.2 低渗

加入 0.075 mol/L 氯化钾溶液 2 mL,用滴管将细胞轻轻地混匀,放入 37 °C 细胞培养箱中低渗处理 1 min~5 min。

5.5.3.3 固定

加入 2 mL 固定液,混匀后固定 5 min 以上,以 800 r/min~1 000 r/min 的速度离心 5 min,弃去上清液。重复一次,弃去上清液。

5.5.3.4 滴片

加入数滴新鲜固定液,混匀。用混悬液滴片,自然干燥。

5.5.3.5 染色

推荐用姬姆萨染色(5%~10%姬姆萨染液,15 min~20 min),也可用 DNA 特异性荧光染料(如:吖啶橙或 Hoechst 33258)。

如果需要区分染色体断裂剂和非整倍体诱变剂,可用荧光原位杂交(FISH)或引物原位标记等方法。

5.5.4 阅片

5.5.4.1 微核的判断标准:微核一般为圆形或椭圆形;直径不超过主核的 1/3;与主核在一个焦点平面上,与主核的颜色、结构特征及折光性一致;与主核之间没有核物质相连,可以和主核有边界的重叠,但能看清各自的核膜。

5.5.4.2 应用方案一,每个剂量组至少分析 2 000 个双核细胞,计算微核细胞率(一个双核细胞不论含有几个微核,都只算作一个含微核细胞)。如果单次培养可供计数的双核细胞数少于 2 000,则应采用多次细胞培养或平行培养。对不规则的双核细胞(如两个核大小相差悬殊)和多于两个核的细胞不进行分析。

5.5.4.3 应用方案二,每个剂量组至少分析 2 000 个细胞,计算微核细胞率。如果单次培养可供计数的细胞数少于 2 000,则应采用多次细胞培养或平行培养。

6 数据处理和结果判定

6.1 数据处理

数据按不同剂量列表,指标包括细胞毒性、观察细胞数、含微核细胞数及微核细胞率。受试物各剂量组与空白对照组、阴性对照组(溶媒对照组)、阳性对照组的微核细胞率用适当的统计学方法(如 X^2 检验)进行处理。

6.2 结果判定

下列两种情况可判定受试物在本试验系统中为阳性结果:

- a) 受试物引起微核细胞率的增加具有统计学意义,并与剂量相关;
- b) 受试物在任何一个剂量条件下,引起的微核细胞率增加具有统计学意义,并有可重复性。

7 试验报告

- 7.1 试验名称、试验单位名称和联系方式、报告编号。
- 7.2 试验委托单位名称和联系方式、样品受理日期。
- 7.3 试验开始和结束日期、试验项目负责人、试验单位技术负责人、签发日期。
- 7.4 试验摘要。
- 7.5 受试物:名称、鉴定资料、CAS号(如已知)、纯度、与本试验有关的受试物的物理和化学性质及稳定性等。
- 7.6 溶媒。
- 7.7 细胞株:细胞株的来源、名称。
- 7.8 试验条件:剂量、代谢活化系统、标准诱变剂、操作步骤等。
 - 7.8.1 代谢活化系统:制备 S9 所用酶的诱导剂、选用的动物品种和来源、S9 混合液的配方。如 S9 是通过购买获得应注明生产单位和批号。
 - 7.8.2 对照物:阳性对照物的名称、生产厂家、批号和选用浓度。
 - 7.8.3 培养液:所用培养液的名称、血清类别和使用浓度。
 - 7.8.4 接种的细胞密度以及所用培养皿(瓶)的规格。
 - 7.8.5 有无使用 cytoB,如果使用,注明 cytoB 的浓度、作用时间。
 - 7.8.6 处理时间:受试物与试验系统的接触时间。
 - 7.8.7 制片方法。
 - 7.8.8 结果评价方法。
- 7.9 结果。
 - 7.9.1 试验结果应包括细胞毒性的测定、加受试物后的溶解情况及对 pH 和渗透压的影响(如果有影响)。
 - 7.9.2 试验结果:受试物各剂量组及各对照组的微核细胞率及统计结果。
 - 7.9.3 本实验室的阳性对照组和阴性对照组(常用溶媒,如水、DMSO)微核细胞率历史范围(说明样品数)。
- 7.10 试验结论:给出受试物在本试验条件下的体外微核试验的结论,必要时对有关问题进行讨论。

8 试验的解释

阳性结果表明受试物在该试验条件下可引起所用哺乳类细胞染色体损伤,微核细胞率增加。阴性结果表明在该试验条件下受试物不引起所用哺乳类细胞染色体损伤。评价时应综合考虑生物学和统计学意义。