

9 体外哺乳动物细胞染色体畸变试验

In Vitro Mammalian Cells Chromosome Aberration Test

1 范围

本规范规定了体外哺乳动物细胞染色体畸变试验的基本原则、要求和方法。
本规范适用于检测化妆品原料及其产品的致突变性。

2 试验目的

本试验是用于检测培养的哺乳动物细胞染色体畸变，以评价受试物致突变的可能性。

3 定义

3.1 结构畸变 structural aberration

在细胞分裂的中期相阶段，用显微镜检出的染色体结构改变，表现为缺失、断片、互换等。结构畸变可分为以下两类。

3.1.1 染色体型畸变 chromosome-type aberration

染色体结构损伤，表现为在两个染色单体相同位点均出现断裂或断裂重组的改变。

3.1.2 染色单体型畸变 chromatid-type aberration

染色体结构损伤，表现为染色单体断裂或染色单体断裂重组的损伤。

3.2 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 试验基本原则

在加入和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物中。用中期分裂相阻断剂（如秋水仙素或秋水仙胺）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。

大部分的致突变剂导致染色单体型畸变，偶有染色体型畸变发生。虽然多倍体的增加可能预示着有染色体数目畸变的可能，但本方法并不适合用于测定染色体的数目畸变。

5 试验方法

5.1 试剂和受试物制备

5.1.1 阳性对照物：可根据受试物的性质和结构选择适宜的阳性对照物，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。当外源性活化系统不存在时，可使用甲磺酸甲酯（methyl methanesulphonate (MMS)）、甲磺酸乙酯（ethyl methanesulphonate(EMS)）、乙基亚硝基脲(ethyl nitrosourea)、丝裂霉素 C(mitomycin C)、4-硝基喹啉-N-氧化物（4-nitroquinoline-N-oxide）。当外源性活化系统存在时，可使用苯并（a）芘[benzo(a)pyrene]、环磷酰胺(cyclophosphamide)。

5.1.2 阴性对照物：应设阴性对照，即仅含和受试物组相同的溶剂，不含受试物，其他处理和受试物组完全相同。此外，如未能证实所选溶剂不具有致突变性，溶剂对照与本实验室空白对照背景资料有明显差异，还应设空白对照。

5.1.3 受试物

5.1.3.1 受试物的配制：固体受试物需溶解或悬浮于溶剂中，用前稀释至适合浓度；液体受试物可以直接加入试验系统和/或用前稀释至适合浓度。受试物应在使用前新鲜配制，否则就必须证实贮存不影响其稳定性。

5.1.3.2 溶剂的选择：溶剂必须是非致突变物，不与受试物发生化学反应，不影响细胞存活和 S₉ 活性。首选溶剂是培养液（不含血清）或水。二甲基亚砜（DMSO）也是常用溶剂，使用时浓度不应大于 0.5%。

5.1.3.3 受试物浓度设置

（1）最高浓度的选择：

决定最高浓度的因素是细胞毒性、受试物在试验系统中的溶解度以及 pH 或渗透分子浓度(osmolality)的改变。

（2）细胞毒性的确定：

应使用指示细胞完整性和生长情况的指标，在活化系统存在或不存在的两种条件下确定细胞毒性，例如细胞覆盖程度（degree of confluency）、存活细胞计数(viable cell counts)或有丝分裂指数(mitotic index)。应在预试验中确定细胞毒性和溶解度。

（3）剂量设置：

①至少应设置 3 个可供分析的浓度。当有细胞毒性时，其浓度范围应包括从最大毒性至几乎无毒性；通常浓度间隔系数不大于 $2 - \sqrt{10}$ 。

②在收获细胞时，最高浓度应能明显降低细胞覆盖程度、细胞计数或有丝分裂指数（均应大于 50%）。

③对于那些相对无细胞毒性的化合物，最高浓度应是 5μl/mL，5mg/mL 或 0.01mol/L。

④对于相对不溶解的物质，当浓度低于不溶解浓度时仍无毒性，则最高剂量应是，当处理期结束时，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（即仅当高于最低不溶解浓度时才发生细胞毒性），应使用一个以上可看见沉淀的浓度。最好在试验处理开始和结束时均评价溶解度，因为由于细胞、S₉ 等的存在，在试验系统内在暴露过程中溶解度可能变化。不溶解性可用肉眼鉴别，但沉淀不能影响观察。

5.1.4 培养液：采用 MEM(Eagle)，并加入非必需氨基酸和抗菌素（青、链霉素，按 100IU/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。

5.1.5 活化系统

通常使用的是 S₉ 混合物（S₉ mix）。S₉ 是从经酶诱导剂（Aroclor 1254 或苯巴比妥钠和 β-萘黄酮联合使用）处理的啮齿动物肝脏获得的。S₉ 的制备同 Ames 试验。S₉ 的使用浓度为 1%—10%（终浓度）。S₉ mix 中所加辅助因子的量由各实验室自行决定，但需对 S₉ mix 的活性进行鉴定，必须能明显活化阳性对照物。也可使用下述

S ₉	0.125ml
MgCl ₂ (0.4 mol/L)	0.02 ml
KCl (1.65mol/L)	0.02 ml
葡萄糖-6-磷酸	1.791mg
辅酶 II（氧化型，NADP）	3.0615mg
用无血清 MEM 培养液补足至 1mL.	

5.2 试验步骤

5.2.1 细胞：可使用已建立的细胞株或细胞系，也可使用原代培养细胞。所使用的细胞应该在生长性能、染色体数目和核型、自发的染色体畸变率等方面有一定的稳定性。推荐使用中国地鼠卵巢（CHO）细胞株或中国地鼠肺（CHL）细胞株。

5.2.2 试验时, 应同时设阳性对照物, 阴性对照物和至少 3 个可供分析的受试物浓度组。

5.2.3 试验前一天, 将一定数量的细胞接种于培养皿(瓶)中, 放 CO₂ 培养箱内培养。

5.2.4 试验需在加入和不加入 S₉ mix 的条件下进行。试验时, 吸去培养皿(瓶)中的培养液, 加入一定浓度的受试物、S₉ mix (不加 S₉ mix 时, 需用培养液补足) 以及一定量不含血清的培养液, 放培养箱中处理 3h—6h。结束后, 吸去含受试物的培养液, 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 24h 内收获细胞。于收获前 2h—4h, 加入细胞分裂中期阻断剂(如用秋水仙素, 作用时间为 4h, 终浓度为 1μg/mL)。

当受试物为原料时, 如果在上述加入和不加入 S₉ mix 的条件下均获得阴性结果, 则尚需补加另外的试验, 即在不加 S₉ mix 的条件下, 使受试物与试验系统的接触时间延长至 24h。

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、受试物与试验系统接触时间等重复试验。

5.2.5 收获细胞时, 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 1000r/min—1200r/min 的速度离心 5min—7min, 弃去上清液, 加入 0.075mol/L KC1 溶液低渗处理, 继而以新配制的甲醇和冰醋酸液(容积比为 3:1)进行固定。空气干燥或火焰干燥法制片常规制片, 用姬姆萨染液染色。

5.2.6 作染色体分析时, 对化妆品终产品, 每一处理组选择 100 个分散良好的中期分裂相(染色体数为 $2n \pm 2$) 进行染色体畸变分析。对化妆品原料, 则每一处理组选 200 个(阳性对照可选 100 个)。在分析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野的坐标位置及畸变类型。

5.3 统计处理: 对染色体畸变细胞率用 χ^2 检验, 以评价受试物的致突变性。

5.4 结果评价: 在下列两种情况下可判定受试物在本试验系统中具有致突变性:

- (1) 受试物引起染色体结构畸变数具有统计学意义, 并有剂量相关性。
- (2) 受试物在任何一个剂量条件下, 引起具有统计学意义的增加, 并有可重复性。

在评价时应把生物学和统计学意义结合考虑。

6 结果解释

阳性结果表明受试物引起培养的哺乳动物体细胞染色体结构畸变。

阴性结果表明在本试验条件下, 受试物不引起培养的哺乳动物体细胞染色体结构畸变。