

10 体外哺乳动物细胞基因突变试验

In Vitro Mammalian Cell Gene Mutation Test

1 范围

本规范规定了体外哺乳类细胞基因突变试验的基本原则、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

该测试系统用于检测化妆品原料及其产品引起的突变，包括碱基对突变、移码突变和缺失等，从而评价受试物引起突变的可能性。

3 定义

3.1 正向突变 forward mutation

从原型至突变子型的基因突变，这种突变可引起酶和功能蛋白的改变。

3.2 突变频率 mutant frequency

所观察到的突变细胞数与存活细胞数之比值。

4 试验原理

在加入和不加入代谢活化系统的条件下，使细胞暴露于受试物一定时间，然后将细胞再传代培养。胸苷激酶正常水平的细胞对三氟胸苷（trifluorothymidine, TFT）等敏感，因而在培养液中不能生长分裂，突变细胞则不敏感，在含有 6-硫代鸟嘌呤（6-thioguanine, 6-TG）、8-azaguanine (AG)或 TFT 的选择性培养液中能继续分裂并形成集落。基于突变集落数，计算突变频率以评价受试物的致突变性。

5 试验方法

5.1 试剂和受试物制备

5.1.1 受试物

5.1.1.1 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/或用前稀释至适合浓度。受试物应在使用前新鲜配制，否则就必须证实储存不影响其稳定性。

5.1.1.2 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。首选溶剂是水或水溶性溶剂。二甲基亚砜（DMSO）也是常用溶剂，但使用时浓度不应大于 0.5%。

5.1.1.3 受试物浓度设置

5.1.1.3.1 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 或渗透压分子浓度（osmolality）的改变。

5.1.1.3.2 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两种条件下确定细胞毒性，例如相对集落形成率或相对细胞总生长情况（total growth）。应在预试验中确定细胞毒性和溶解度。

5.1.1.3.3 剂量设置

至少应设置 4 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。通常浓度间隔系数在 $2-\sqrt{10}$ 之间。

对于那些细胞毒性很低的化合物,最高浓度应是 5 μ L/mL, 5mg/mL 或 0.01mol/L。

如最高浓度是基于细胞毒性,那么该浓度组的细胞相对存活率(相对集落形成率)或相对细胞总生长情况应为 10%—20% (不低于 10%)。

对于相对不溶解的物质,其最高浓度应达到或超过在细胞培养状态下的溶解度限值。最好在试验处理开始和结束时均评价溶解度,因为由于 S_9 等的存在,试验系统内在暴露过程中溶解度可能发生变化。不溶解性可用肉眼鉴别,但沉淀不应影响观察。

5.1.2 对照:在每一项试验中,在代谢活化系统存在和不存在的条件下均应设阳性对照和阴性(溶剂)对照。

5.1.2.1 阳性对照:当使用代谢活化系统时,阳性对照物必须是要求代谢活化、并能引起突变的物质。在没有代谢活化系统时,阳性对照物可使用甲磺酸乙酯(ethyl methanesulfonate-EMS, HPRT 试验)、甲磺酸甲酯(methyl methanesulphonate, MMS, TK 试验),乙基亚硝基脲(ethyl nitrosourea-ENU, HPRT 试验)等。在有代谢活化系统时,可以使用 3-甲基胆蒎(3-methylcholanthrene, HPRT 试验; TK 试验)、环磷酰胺(cyclophosphamide, TK 试验) N-亚硝基胍(N-nitroso-dimethylamine, HPRT 试验)、7,12-二甲基苯蒎(HPRT 试验)等。也可使用其他适宜的阳性对照物。

5.1.2.2 阴性对照物:阴性对照(包括溶剂对照)除不含受试物外,其他处理应与受试物相同。此外,当不具有实验室历史资料证实所用溶剂无致突变作用和无其他有害作用时,还应设空白对照。

5.1.3 细胞:HPRT 位点突变分析常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瘤细胞株(L5178Y)和人类淋巴瘤细胞株(TK6)。细胞在使用前应进行有无支原体污染的检查。

5.1.4 培养液:应根据实验所用系统和细胞类型来选择适宜的培养基。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。对于 L5178Y 或 TK6 细胞,常用 RPMI 1640 培养基加入 10%马血清和适量抗菌素。

5.1.5 活化系统:同体外哺乳类细胞染色体畸变试验。

5.1.6 选择剂:6-硫代鸟嘌呤(6-TG):建议使用终浓度为 5 μ g/mL—10 μ g/mL,用碳酸氢钠溶液配制(0.5%)。三氟胸苷(TFT):建议使用终浓度为 3 μ g/mL。

5.1.7 预处理培养基:THMG/ THG

为减少细胞的自发突变率,在试验前,先将细胞加在含 THMG 的培养液中培养 24h,杀灭自发的突变细胞,然后将细胞再接种于 THG (不含氨甲喋呤的 THMG 培养液)中培养 1—3d。

THMG 含除培养液成份外的各物质终末浓度如下:

胸苷	5 $\times 10^{-6}$ mol/L
次黄嘌呤	5 $\times 10^{-5}$ mol/L
氨甲喋呤	4 $\times 10^{-7}$ mol/L
甘氨酸	1 $\times 10^{-4}$ mol/L

5.2 试验步骤

5.2.1 HPRT 位点突变分析

5.2.1.1 试验前 1d,接种细胞于培养瓶中,置于 37 $^{\circ}$ C 孵箱培养。

5.2.1.2 试验时吸去培养瓶中的培养液,加入一定浓度的受试物、 S_9 -mix (不加入 S_9 -mix 的

样品,用培养液补足)及一定量的不含血清培养液,置孵箱中处理 3h—6h 后,吸去培养液,用 Hank's 液洗细胞三次,加入含胎牛血清的培养液。

5.2.1.3 在受试物与细胞作用后当天和第 3d 将细胞按低密度分种,在第 7d 接种细胞,每个剂量 3 瓶。7d 后染色以测定细胞存活率。另将一定数量细胞接种于每个培养瓶中,每个剂量 8 瓶,3h 后加入 6-TG (终浓度为 5 μ g/mL),10d 后染色,计数突变细胞集落。

5.2.1.4 试验结果用 χ^2 检验进行统计分析。

5.2.2 TK 位点突变分析 (L5178Y 细胞, 96 孔板法)

5.2.2.1 处理:取生长良好的细胞,调整密度为 5 $\times 10^5$ /mL,按 1%体积加入受试物,37 $^{\circ}$ C 震荡处理 3 小时。离心,弃上清液,用 PBS 或不含血清的培养基洗涤细胞 2 遍,重新悬浮细胞于含 10%马血清的 RPMI 1640 培养液中,并调整细胞密度为 2 $\times 10^5$ /mL。

5.2.2.2 PE_0 (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—2 块板,37 $^{\circ}$ C, 5% CO_2 ,

饱和湿度条件下培养 12d,计数每块平板有集落生长的孔数。

5.2.2.3 表达:步骤 6.2.2.1 所得细胞悬液作 2d 表达培养,每天计数细胞密度并保持密度在 10⁶/ml 以下。

5.2.2.4 PE_2 (第 2d 的平板接种效率)测定:第 2d 表达培养结束后,取适量细胞悬液,按步骤 6.2.2.2 作梯度稀释并接种 96 孔板,培养 12d 后计数每块平板有集落生长的孔数。

5.2.2.5 TFT 抗性突变频率 (MF)测定:第 2d 表达培养结束后,取适量细胞悬液,调整细胞密度为 1 $\times 10^4$ /mL,加入 TFT (三氟胸苷,终浓度为 3 μ g/mL),混匀,接种 96 孔板 (每孔加 0.2 mL,即平均 2000 个细胞/孔),每个剂量作 2—4 块板,37 $^{\circ}$ C, 5% CO_2 ,饱和湿度条件下培养 12d,计数有突变集落生长的孔数。

5.2.2.6 计算

5.2.2.6.1 平板效率 (PE_0 和 PE_2)

$$PE = \frac{-\ln(EW/TW)}{1.6} \quad \text{式中: } EW \text{ 为无集落生长的孔数; } TW \text{ 为总孔数; } 1.6 \text{ 为每孔接种细胞数}$$

5.2.2.6.2 相对存活率 (RS%)

$$\text{相对存活率 (RS\%)} = \frac{PE_0(\text{处理})}{PE_0(\text{对照})} \times 100\%$$

5.2.2.6.3 突变频率 (MF)

$$MF(\times 10^{-6}) = \frac{-\ln(EW/TW)/n}{PE_2} \quad \text{式中: } EW \text{ 为无集落生长的孔数; } TW \text{ 为总孔数; } n \text{ 为每孔接种细胞数 (2000)}$$

6 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为阳性结果:

(1) 受试物引起突变频率具有统计学意义、并与剂量相关的增加。

(2) 受试物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。

阳性结果表明受试物可引起所用哺乳类细胞的基因突变。可重复的阳性剂量—反应关系意义更大。阴性结果表明在本试验条件下,受试物不引起所用哺乳类细胞的基因突变。