

11 哺乳动物骨髓细胞染色体畸变试验

In Vivo Mammalian Bone Marrow Cell Chromosome Aberration Test

1 范围

本规范规定了哺乳动物骨髓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遗传毒性。

2 试验目的

本试验是一项致突变性试验，检测整体动物骨髓细胞染色体畸变，以评价受试物致突变的可能性。

3 定义

3.1 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的相同位点均出现断裂或断裂重组的改变。

3.2 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。

3.3 染色体数目畸变 numerical-type aberration

哺乳动物细胞染色体数目的改变。

4 试验基本原则

使哺乳动物（如大鼠或小鼠）经口或其他适宜途径染毒，动物处死前用细胞分裂中期阻断剂处理，处死后制备骨髓细胞染色体标本，分析染色体畸变。

本方法特别适用于需考虑体内代谢活化后的染色体畸变分析。

若有证据表明待测物或其代谢产物不能到达骨髓，则不适用于本方法。

5 试验方法

5.1 实验动物和饲养环境：

选用健康成年啮齿类动物，推荐使用大鼠或小鼠，每组每种性别至少 5 只，动物在实验室中至少应适应 5 天，实验开始时每一性别动物的体重差异应控制在 $\pm 20\%$ 内。

实验动物及实验动物房应符合国家相应规定。

5.2 受试物

5.2.1 受试物配制：固体受试物应溶解或悬浮于适合的溶剂中，并稀释至一定浓度。液体受试物可直接使用或予以稀释。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。

5.2.2 溶剂的选择：溶剂在所选用浓度下，不引起毒性效应，不与受试物发生化学反应。水为首选溶剂。

5.2.3 剂量设置：应进行预试验以选择最高剂量。当有毒性时，可以引起死亡或者抑制骨髓细胞有丝分裂指数（50%以上）为指标确定最高剂量。在第一次采集样品时，需设置 3 个可供分析的剂量，在第二次采集样品时，则仅需设置最高剂量组。

如果一次剂量为 2000mg/kg 体重时仍未引起毒性效应,则只设 2000mg/kg 体重剂量组。

如果人类的可能(期望)暴露量过大,可选择 2000mg/kg/BW/d 染毒 14 天,或选择 1000mg/kg/BW/d 染毒大于 14 天进行试验。

5.3 对照:在每项试验中,对每种性别均应设阴性对照组和阳性对照组。除不使用受试物外,其他处理与受试物组一致。

5.3.1 阴性对照:除设溶剂对照(即仅含溶剂)外,如果没有文献资料或历史性资料证实所用溶剂不具有有害作用或致突变作用,还应设空白对照组。

5.3.2 阳性对照:阳性对照物应能引起染色体结构畸变率明显高于背景资料。染毒途径可以不同于受试物。所选用的阳性对照物最好与受试物类别有关。可以使用下述物质:三亚乙基密胺(triethylenemelamine)、甲磺酸乙酯(ethyl methanesulphonate)、乙基亚硝基脲(ethyl nitrosonrea)、丝裂霉素 C(mytomycin C)和环磷酰胺(cyclophosphamide)。

5.4 染毒方式:可采用经口或其他适宜的染毒方式。一般染毒为一次完成,如剂量过大时,一天内染毒数次也是可以的,但每次应间隔数小时。

一般情况下,染毒 1 次,但分两次采集标本,即每组动物分两个亚组,亚组 1 于染毒后 12h—18h 处死并采集第一次标本;亚组 2 于亚组 1 处死后 24h 采集第二次标本。如果采用多次染毒,于末次染毒后 12h—18h 采集标本。于处死动物采集标本前腹腔注射细胞分裂中期阻断剂(如用秋水仙素,于处死前 4h,按 4mg/kg 体重给药。若使用动物为小鼠,适宜的处理时间为 3—5 h,若使用动物为中国仓鼠,适宜的处理时间为 4—5 h。

5.5 试验步骤

5.5.1 用颈椎脱臼法处死动物,取出股骨,剔除肌肉等组织。

5.5.2 剪去股骨两端,用注射器吸取 5mL 生理盐水,从股骨一端注入,用 10mL 离心管,从股骨另一端接取流出的骨髓细胞悬液。

5.5.3 将细胞悬液以 1000r/min 的速度离心 5 min—7 min,去除上清液。

5.5.4 加入 0.075mol/L KCl 溶液 7ml,用滴管将细胞轻轻地混匀,放入 37℃ 水浴中低渗处理 7min,加入 1—2mL 固定液(冰醋酸:甲醇=1:3),混匀,以 1000r/min 速度离心 5 min—7min,弃去上清液。

5.5.5 加入 7mL 固定液,混匀,固定 15min,以 1000r/min 的速度离心 7min,弃去上清液。

5.5.6 用同法再固定 1—2 次,弃去上清液。

5.5.7 加入数滴新鲜固定液,混匀。

5.5.8 用混悬液以空气干燥或火焰干燥法制片。

5.5.9 用姬姆萨染液染色。

5.6 读片和结果处理

5.6.1 确定有丝分裂指数:包括所有处理组、阳性和阴性对照组(每只动物计数 500—1000 个细胞)。

5.6.2 计数畸变细胞:对每只动物至少选择 100 个分散良好的中期分裂相,在显微镜油镜下进行读片。由于低渗等机械作用的破坏,会导致处于中期的染色体发生丢失,所以,观察的中期相染色体数目应控制在 $2n \pm 2$ 内。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野的坐标位置及畸变类型。裂隙(Gap)应单独记录并列出,通常不作为染色体结构畸变计算。所得各组的染色体畸变率用 χ^2 检验等进行统计学处理,以评价试验组和对照组之间是否有显著差异。

5.7 结果评价

每个动物作为一个试验单位,在统计分析时,每个动物的数据应列表进行。可把结构畸变细胞率(%)和每细胞内的染色体畸变数作为评价指标。统计分析的标准有几个,当受试物引起染色体畸变数具有统计学意义,并有与剂量相关的增加或者在一个剂量组、单一时间

点采样的试验中出现染色体畸变细胞数明显增高，则判定具有致突变性。

在评价时应综合考虑生物学意义和统计学意义，不能作出明确结论时，应改变试验条件进一步进行测试。

6 结果解释

阳性结果证明受试物具有引起该种受试动物骨髓细胞染色体畸变的能力。

阴性结果表明在本试验条件下受试物不引起该种受试动物骨髓细胞染色体畸变。