

12 体内哺乳动物细胞微核试验

Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test

1 范围

本规范规定了哺乳动物红细胞微核试验的基本原则、要求和方法。
本规范适用于化妆品原料的染色体畸变检测。

2 定义

微核 micronucleus

染色单体或染色体的无着丝点断片，或因纺锤体受损而丢失的整个染色体，在细胞分裂后期，仍然遗留在细胞质中。末期之后，单独形成一个或几个规则的次核，被包含在子细胞的胞质内，因比主核小，故称为微核。

3 原理

凡能使染色体发生断裂或使染色体和纺锤体联结损伤的化学物，都可用微核试验来检测。各种类型的骨髓细胞都可形成微核，但有核细胞的胞质少，微核与正常核叶及核的突起难以鉴别。嗜多染红细胞是分裂后期的红细胞由幼年发展为成熟红细胞的一个阶段，此时红细胞的主核已排出，因胞质内含有核糖体，姬姆萨染色呈灰蓝色，成熟红细胞的核糖体已消失，被染成淡桔红色。骨髓中嗜多染红细胞数量充足，微核容易辨认，而且微核自发率低，因此，骨髓中嗜多染红细胞成为微核试验的首选细胞群。

若动物染毒的时间达 4 周以上，也可选同一终点的外周血正染红细胞进行微核试验。

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。

4 试验的基本原则

通过适当的途径使动物接触受试物，一定时间后处死动物，取出骨髓，制备涂片，经固定、染色，在显微镜下计数含微核的嗜多染红细胞。

5 仪器和器械

生物显微镜、解剖剪、镊子、止血钳、注射器、灌胃针头、载玻片、盖玻片（24mm×50mm）、塑料吸瓶、纱布、滤纸等。

6 试剂

6.1 小牛血清（灭活）

将滤菌的小牛血清置于 56℃ 恒温水浴保温 30min 灭活。灭活的小牛血清通常保存于冰箱冷冻室里。

6.2 姬姆萨（Giemsa）染液

成分：Giemsa 染料	3.8g
甲醇	375mL
甘油	125mL

配制：将染料和少量甲醇于乳钵里仔细研磨，再加入甲醇至 375mL 和甘油，混合均匀，放置 37℃ 恒温箱中保温 48h。保温期间，振摇数次，促使染料的充分溶解，取出过滤，两周后用。

6.3 1/15mol/L 磷酸盐缓冲液 (pH6.8)

磷酸二氢钾 (KH_2PO_4)	4.50 g
磷酸氢二钠 ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)	11.81 g
加蒸馏水至	1000mL

6.4 Giemsa 应用液

取一份 Giemsa 染液与 6 份 1/15mol/L 磷酸盐缓冲液混合而成。现用现配。

7 实验动物和饲养环境

适宜的哺乳动物均适用于本实验，推荐使用小鼠或大鼠。小鼠是微核试验的常规动物。体重为 25g —30g。也可选用成年大鼠，体重为 150g —200g。动物在实验室中至少应适应 3-5 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。

8 剂量分组

一般取受试物 LD_{50} 的 1/2、1/5、1/10、1/20 等剂量，以求获得微核的剂量-反应关系曲线。当受试物的 LD_{50} 大于 5g/kg 体重时，可取 5g/kg 体重为最高剂量，一般至少设 3 个剂量。每个剂量组 10 只动物，雌、雄性各半。另外，还应设溶剂对照和阳性物对照组。常用环磷酰胺作为阳性物对照，剂量可为 40mg/kg 体重。

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。

根据受试物的理化性质（水溶性和/或脂溶性）确定受试物所用的溶剂，通常用水、植物油或食用淀粉等。

9 染毒途径和方式

染毒途径视实验目的而定，建议采用经口灌胃方式。采用 30h 两次给药法，即两次给受试物间隔 24h，第二次给受试物后 6h 取材。

10 试验方法

10.1 样本的制取

动物颈椎脱臼处死后，打开胸腔，沿着胸骨柄与肋骨交界处剪断，剥掉附着其上的肌肉，擦净血污，横向剪开胸骨，暴露骨髓腔，然后用止血钳挤出骨髓液。

长时间染毒的外周血样本从尾或耳静脉采血，一般应在末次染毒的 18—24h、36—48h 之间分两次进行。

10.2 涂片

将骨髓液滴在载玻片一端的小牛血清液滴里，仔细混匀。一般来讲，两节胸骨髓液涂一张片子为宜。然后，按血常规涂片法涂片，长度约 2cm —3cm。在空气中晾干。若立即染色，需在酒精灯火焰上方，稍微烘烤一下。

10.3 固定

将干燥的涂片放入甲醇液中固定 5min。即使当日不染色，也应固定后保存。

10.4 染色

将固定过的涂片放入 Giemsa 应用液中，染色 10min—15min，然后立即用 1/15mol/L 磷酸盐缓冲液冲洗。

10.5 封片

用滤纸及时擦干染片背面的水滴，再用双层滤纸轻轻按压染片，以吸附染片上残留的水分，再在空气中晃动数次，以促其尽快晾干，然后放入二甲苯中透明 5min，取出滴上适量光学树脂胶，盖上盖玻片，写好标签。

10.6 观察与计数

先用低倍镜，后用高倍镜粗略检查，选择细胞分布均匀，细胞无损，着色适当的区域，再在油浸镜下计数。虽然不计数含微核的有核细胞，但需用有核细胞形态染色完好做好判断制片优劣的标准。

本法观察含微核的嗜多染红细胞。嗜多染红细胞呈灰蓝色，成熟红细胞呈淡桔红色。微核大多数呈单个圆形，边缘光滑整齐，嗜色性与核质相一致，呈紫红色或蓝紫色。

每只动物至少计数 2000 个嗜多染红细胞。微核率指含有微核的嗜多染红细胞数，以千分率(‰)表示之。若一个嗜多染红细胞中出现两个或两个以上微核，仍按一个有微核细胞计数。

经过化妆品标准委员会验证或证实的图像自动分析系统与流式细胞仪进行的微核试验，可接受为本方法的替代试验。

11 数据处理和结果判断

11.1 数据处理

报告各组微核细胞率的均数和标准差，利用适当的统计学方法如 Poisson 分布 u 检验比较受试物各剂量组与溶剂对照组的微核率。

若无证据表明所得的数据有性别间的差异，则可将两性别的数据合并进行统计分析。

11.2 结果判定

在评价时应综合考虑生物学意义和统计学意义。如果受试物试验组与溶剂对照组相比，单一剂量法微核率有明显增高；多剂量法的剂量组在统计学上有显著性差异，并有剂量—反应关系则可认为微核试验阳性。