

附件 5

体外哺乳动物细胞微核试验

征求意见稿

1 范围

本方法规定了体外哺乳动物细胞微核试验的范围、试验目的、术语和定义、试验原理、试验材料与试剂、试验步骤、结果判定标准。

本方法适用于化妆品原料及其产品的致突变性的检测。

2 试验目的

本试验用于检测体外培养的哺乳动物细胞染色体损伤，以评价受试物致突变的可能性。

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本方法。

3.1 微核 micronuclei

染色单体或染色体的无着丝粒断片，或因纺锤体受损而丢失的整个染色体，在细胞分裂后期，无法迁移至两极而遗留在细胞质中。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。

3.2 着丝粒 centromere

染色体中将两条姐妹染色单体结合起来的 DNA 区域。

3.3 非整倍体 aneuploidy

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。

3.4 非整倍体诱变剂 aneugen

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。

3.5 染色体断裂 chromosome breakage

染色体臂出现长度大于染色体臂宽度的裂隙。

3.6 染色体断裂剂 clastogen

引起染色体发生断裂的物质。

3.7 细胞毒性 cytotoxicity

对细胞结构或功能的有害效应，最终可导致细胞死亡。

3.8 致突变性 mutagenicity

导致基因或染色体结构中产生可遗传的DNA碱基对序列变化的能力。

4 试验原理

体外哺乳动物细胞微核试验是一种用于检测哺乳动物细胞经受试物处理后是否产生微核的致突变性检测方法。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/或诱发非整倍体的能力。如果短期（3 h~6 h）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（用受试物处理细胞1.5~2.0个正常细胞周期）。

试验分为使用和不使用肌动蛋白聚合抑制剂细胞松弛素B（CytochalasinB, 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 试验材料与试剂

5.1 细胞株

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）或原代培养细胞。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。

5.2 培养基

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100IU/mL青霉素和100 μ g/mL链霉素)。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100IU/mL、链霉素100 μ g/mL)。

5.3 溶液的配制

5.3.1 活化系统

通常使用的是S₉混合物（S₉mix）。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的制备同细菌回复突变试验。S₉的使用浓度为1%-10%（终浓度）。S₉mix中所加辅助因子的量由各实验室自行决定，但需确保S₉mix的活性，必须能明显活化阳性对照物。也可使用下述方法配制：

S ₉	0.125 mL
MgCl ₂ (0.4 mol/L)	0.02 mL
KCl (1.65 mol/L)	0.02 mL
葡萄糖-6-磷酸	1.791 mg
辅酶 II (氧化型, NADP)	3.0615 mg

用无血清MEM培养液补足至1mL。

5.3.2 cytoB溶液

用二甲基亚砜(DMSO)配制适当浓度的储备液，避光冷冻保存。cytoB的终浓度通常为3 μ g/mL~6 μ g/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。

5.3.3 0.075 mol/L氯化钾溶液： 5.59g氯化钾加蒸馏水至1000mL。

5.3.4 固定液： 甲醇：冰醋酸为3：1（V/V），临用前配制。

5.3.5 姬姆萨（Giemsa）染液

取姬姆萨染料3.8g，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125mL甘油，放入37 $^{\circ}$ C温箱中保温48h。保温期间振摇数次，使充分溶解。取出过滤，室温保存，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（1/15mol/L，pH 6.8）配制方法如下：

- a) 第一液：取磷酸氢二钠（ Na_2HPO_4 ）9.47g溶于去离子水1000mL中，配成1/15mol/L溶液；
- b) 第二液：取磷酸二氢钾（ KH_2PO_4 ）9.07g溶于去离子水1000mL中，配成1/15mol/L溶液；
- c) 取第一液50mL加于第二液50mL中混匀，即为pH6.8的1/15 mol/L磷酸盐缓冲液。

5.4 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）或磷酸盐缓冲液（PBS）。当受试物不溶于培养液或PBS时，可选用DMSO作为溶剂，但终浓度不应大于0.5%。

5.5 受试物的浓度选择及配制

5.5.1 受试物浓度设置

5.5.1.1 剂量设置

至少应设置3个可供分析的剂量。受试物没有细胞毒性时，从最高剂量往下设至少2个剂量，一般情况间隔系数可为2~3；当受试物有细胞毒性时，其剂量范围应涵盖从55±5%的细胞毒性到几乎无细胞毒性。

5.5.1.2 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值、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5μL/mL、5 mg/mL 或0.01mol/L。

对溶解度较低的物质，当浓度达到最大溶解度时仍无毒性，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。

5.5.1.3 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为细胞总数；T=受试物组，C=阴性对照组

$$\text{细胞毒性} = 100 - RI$$

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

式中：CBPI=1等同于100%细胞生长抑制；500为细胞总数。

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

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)。

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

$$\text{细胞毒性} = 100 - RICC$$

$$RPD = \frac{\text{受试物组细胞倍增数}}{\text{阴性对照组细胞倍增数}} \times 100$$

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

细胞毒性 = 100 - RPD

5.5.2 受试物的配制：固体受试物应溶解或悬浮于适合的溶剂中，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。受试物应无菌，现用现配，否则须确认储存不影响其稳定性。

5.6 对照的选择

5.6.1 阳性对照物

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。

5.6.2 阴性对照物

应设阴性对照（溶剂），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。

6 试验步骤

6.1 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。

6.2 受试物处理

6.2.1 方案一：使用cytoB

吸去培养液，用磷酸盐缓冲液（PBS）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S9mix），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2次以上，加入含

10%血清的新鲜培养液和cytoB, 继续培养至1.5~2.0个正常细胞周期(从加入受试物开始计算)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。

如果短期(3 h~6 h)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1.5~2.0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1.5~2.0个正常细胞周期。

6.2.2 方案二: 不使用cytoB

与6.2.1处理方法相同, 只是不加cytoB。

6.3 收获细胞与制片

每次培养都应单独收获细胞和制片。

6.3.1 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 800r/min~1000r/min 的速度离心5min, 弃去上清液。悬浮细胞不需要消化, 直接离心。

6.3.2 低渗

加入0.075 mol/L氯化钾溶液2mL, 用滴管将细胞轻轻地吹打混匀, 37℃低渗处理1min~5min; 如果细胞混合液的分散度良好则不需要进行低渗处理。

6.3.3 固定

加入2mL固定液, 混匀后固定5min以上, 以800r/min~1000r/min的速度离心5min, 弃去上清液。相同步骤, 重复一次。

6.3.4 滴片

加入数滴固定液, 混匀。用混悬液滴片, 自然干燥。

6.3.5 染色

推荐用姬姆萨染色（5%~10%姬姆萨染液，15min~20min），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。

6.4 阅片

6.4.1 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。

6.4.2 方案一：使用cytoB

每个剂量组至少分析2000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2000，则应采用多次细胞培养或平行培养，以获得足够分析的细胞。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。

6.4.3 方案二：不使用cytoB

每个剂量组至少分析2000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2000，则应采用多次细胞培养或平行培养。

6.5 统计处理：

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。受试物各剂量组与阴性对照组（溶剂对照组）、阳性对照组的微核细胞率用适当的统计学方法（如 χ^2 检验）进行处理。

6.6 结果判定：

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：

6.6.1 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；

6.6.2 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 结果解释

阳性结果表明受试物在该试验条件下可引起所用哺乳动物细胞染色体损伤。阴性结果表明在该试验条

件下受试物不引起所用哺乳动物细胞染色体损伤。

征求意见稿

体外哺乳动物细胞微核试验

起草说明

为加强化妆品的监督管理，进一步提高化妆品使用安全性，国家药品监督管理局化妆品标准专家委员会秘书处组织开展了体外哺乳动物细胞微核试验的起草工作。现就起草工作有关情况说明如下：

一、简要起草过程

由起草单位组建《体外哺乳动物细胞微核试验》标准起草工作专家协作组。在研究和分析国内外相关标准的基础上，包括OECD Guidelines for Testing of Chemicals (In vitro Mammalian cells micronucleus test, No.487, 2016)、GB/T 28646-2012《化学品 体外哺乳动物细胞微核试验方法》等国内外标准，执笔起草了本标准文本及编制说明，形成方法草案。起草工作小组组织召开专家讨论会现场征集专家意见，并通过信函的方式向相关机构和专家广泛征集意见，最后整理、归纳相关的意见和建议形成征求意见稿。

二、与我国有关法律法规和其他标准的关系

随着经济的持续高速发展和社会进步，近年来我国化妆品市场发展异常迅速，市场销售额以超过两位百分数的速度递增，但由于化妆品的化学组成成分复杂，在使用时，有可能会对使用者产生致突变毒性。因此，为确保化妆品的安全性，我国相关卫生法律法规都要求对化妆品及其原料进行遗传毒性效应评价。

《化妆品安全技术规范》中用于检测遗传毒性的方法包括：鼠伤寒沙门氏菌/回复突变试验、体外哺乳动物细胞染色体畸变试验、体外哺乳动物细胞基因突变试验、哺乳动物骨髓细胞染色体畸变试验、体内哺乳动物细胞微核试验、睾丸生殖细胞染色体畸变试验；其中鼠伤寒沙门氏菌/回复突变试验和体外哺乳动物细胞基因突变试验检测终点是基因突变；哺乳动物骨髓细胞染色体畸变试验、体内哺乳动物细胞微核试验、睾丸生殖细胞染色体畸变试验检测终点是染色体畸变，均使用动物（大鼠或小鼠）进行试验；体外哺乳动物细胞染色体畸变试验使用体外细胞株或细胞系进行试验，只能检测染色体结构畸变，无法检测染色体数目畸变。体外哺乳动物细胞微核试验方法不仅可以检测有丝分裂状态（单核，双核，多核）、染色体损伤，还可以检测出断裂剂或非整倍体剂（应用着丝粒免疫化学标记法或FISH荧光原位杂交法等）等多个遗传学终点，并且结果敏感特异准确，操作简便快捷，对阅片经验要求相对低，适用于大量分析，目前已广

泛用于遗传毒性检测。本标准的主要内容是建立体外哺乳动物细胞微核试验方法，以期与有关国际条约尽快接轨，为推进我国体外试验工作的开展，建立我国自己的动物试验替代方法体系，增补、修订和完善现有的标准与规范方法以及促进我国未来的化妆品安全提供技术支持与保证。

三、采用国外标准的程度以及与国外同类标准水平的比较

本标准的主要内容是建立化妆品原料及其产品的体外哺乳动物细胞微核试验方法，其技术部分借鉴了OECD 487“体外哺乳动物细胞微核试验方法操作指南”并结合我国国情编制而成。

本标准以OECD 487“体外哺乳动物细胞微核试验方法操作指南”为基本框架，基本涵盖了OECD 487“体外哺乳动物细胞微核试验方法操作指南”对采用对象、实验操作和结果分析的技术要求。在此基础上，本标准还结合我国实验室检测的特点，对实验操作中的某些条款进行了适当的更新、补充和细化。

具体变动包括：

- 1) 在标准中增加“受试物配制和溶剂选择标准的描述”，提高对化妆品、化妆品原料进行检测时的可操作性。
- 2) 在标准中增加“细胞培养液和体外活化系统S9混合物的具体配制方法”，以提高标准的可操作性。
- 3) 将无细胞毒性或细胞毒性较低时的最高染毒剂量统一设定为 $5\mu\text{L}/\text{mL}$ ， $5\text{ mg}/\text{mL}$ 或 $0.01\text{ mol}/\text{L}$ ，以提高安全系数。
- 4) 在标准中对操作方法进行细化，如“吸去培养液，用磷酸盐缓冲液（PBS）洗细胞两到三次”，以提高标准的可操作性。
- 5) 在标准中增加“微核的判断标准”，以提高标准的可操作性。
- 6) 没有将一些普遍的术语定义（如S9混合物、溶媒对照）写进标准，避免标准过于冗长。

四、标准的制（修）订与起草原则

本标准制定原则，一是科学性，方法应基于科学原理；二是适用性，方法能被大部分检验机构适用；三是可操作性，方法应简便易行。

五、确定相关技术内容

在本标准草案建立过程中，进行了多方面测试，确定相关技术内容如下：

- 1) cytoB可能影响小鼠淋巴瘤细胞株（L5178Y）的生长，因此选用L5178Y细胞株时建议采用不添加cytoB

的方案。当选用人类淋巴细胞时，建议采用添加cytoB的方案，因为不同细胞捐赠者的细胞周期不同，而且不是所有的细胞都对植物血球凝集素（PHA）有反应。

2) 将无细胞毒性或细胞毒性较低时的最高染毒剂量统一设定为 $5\mu\text{L}/\text{mL}$ ， $5\text{ mg}/\text{mL}$ 或 $0.01\text{ mol}/\text{L}$ ，以提高安全系数。

3) 如果短期暴露试验方案在有和没有添加S9条件下都选用断裂剂作为阳性对照，那么长期暴露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，这时阳性对照应该同时使用断裂剂和非整倍体剂。

六、可能带来的经济和社会影响评估

体外哺乳动物细胞微核试验以微核作为遗传毒性检测终点，可用于染色体断裂剂及非整倍体诱变剂的检测，在化学物遗传毒性评价的体外试验系统中占据重要地位，具有很好的准确度、灵敏度、特异度，易于自动化，高效客观，操作简单，目前已广泛应用于遗传毒性检测。

该标准的建立可以完善《化妆品安全技术规范》中遗传毒性的检测方法，为化妆品毒理学安全性评价中遗传毒性检测方法组合提供备选试验方法；并且可以促进我国化妆品毒理学安全性评价方法研究与国际接轨；为推进我国体外试验工作的开展，建立我国自己的动物试验替代方法体系，保障我国的化妆品安全提供技术支持与保证。