



# 中华人民共和国国家标准

GB/T 21793—2008

## 化学品 体外哺乳动物细胞 基因突变试验方法

Chemicals—Test method of in vitro mammalian  
cell gene mutation

2008-05-12 发布

2008-09-01 实施



中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局 发布  
中国国家标准化管理委员会

## 前 言

本标准等同采用经济合作与发展组织(OECD)化学品测试指南 No. 476(1997 年)《体外哺乳动物细胞基因突变试验》(英文版)。

本标准作了以下编辑性修改:

- 增加了范围部分;
- 计量单位改成我国法定计量单位;
- 删除了 OECD 的参考文献部分。

本标准由全国危险化学品管理标准化技术委员会(SAC/TC 251)提出并归口。

本标准负责起草单位:中国疾病预防控制中心职业卫生与中毒控制所。

本标准参加起草单位:北京市疾病预防控制中心、天津市检验检疫科学技术研究院。

本标准主要起草人:吴维皑、穆啸群、李朝林、林铮、张园、李宁涛。

## OECD 引言

1. 体外哺乳动物基因突变试验可用于检测化学品诱发的基因突变。可选用的细胞株包括 L5178Y 小鼠淋巴瘤细胞, CHO, 中国仓鼠细胞的 AS52 和 V79 株, TK6 人淋巴样母细胞。在这些细胞株中, 最常用的遗传学终点是检测胸苷激酶(TK)和次黄嘌呤-鸟嘌呤磷酸核糖基转移酶(HPRT)突变, 以及黄嘌呤-鸟嘌呤磷酸核糖基转移酶(XPRT)的基因突变。TK、HPRT 和 XPRT 突变试验检测不同的遗传事件谱。TK 和 XPRT 位于常染色体, 可检测 HPRT(位于 X 染色体)不能检测的遗传学事件, 如大片段缺失。

2. 在体外哺乳动物细胞基因突变试验中, 可使用已建立的细胞系或细胞株培养物。要根据在培养基中的生长能力和自发突变率是否稳定选择细胞。体外进行的试验通常都需要用外源性代谢活化系统。但外源性代谢活化系统不能完全模拟哺乳动物体内的代谢条件, 因此应采取措施避免出现无法反映体内基因突变的情况。pH 值和重量渗透压浓度的改变或受试样品的细胞毒性较高等可致假阳性结果, 从而使试验结果无法反映体内基因突变的真实情况。

3. 本试验可用于哺乳动物致突变剂和致癌剂的筛查。本试验中阳性的很多化合物都是哺乳动物致癌剂, 然而本试验与致癌性之间并不存在良好的相关性。相关性取决于化学品的种类。越来越多的证据表明, 很多致癌物因通过其他的、非遗传毒性机制发挥作用或因其致癌机制在这些细胞中不容易被检测出而无法在本试验中获得阳性结果。

# 化学品 体外哺乳动物细胞 基因突变试验方法

## 1 范围

本标准规定了化学品体外哺乳动物细胞基因突变试验的范围、术语和定义、试验基本原则、试验方法、试验数据和报告。

本标准适用于检测体外哺乳动物细胞基因突变。

## 2 术语和定义

下列术语和定义适用于本标准。

### 2.1

**正向突变 forward mutation**

从原型(野生型)转变至突变型的基因突变,可引起酶活性和编码蛋白的改变和丢失。

### 2.2

**碱基对置换突变剂 base pair substitution mutagens**

能够引起 DNA 中一个或几个碱基对置换的物质。

### 2.3

**移码突变剂 frameshift mutagens**

能够引起 DNA 分子中单个或多个碱基对增加或缺失的物质。

### 2.4

**表型表达时间 phenotypic expression time**

新的突变细胞耗尽未改变的基因产物所需的时间。

### 2.5

**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。

### 2.6

**相对总生长数 relative total growth**

与阴性对照组细胞数相比,整个过程中所增加的细胞数,等于悬浮生长数乘以相对集落形成效率之积。

### 2.7

**相对悬浮生长 relative suspension growth**

与阴性对照组相比,整个表达期细胞增加的数量。

### 2.8

**细胞活性 viability**

表达期结束后,接种在选择性培养基中细胞形成集落的效力。

### 2.9

**细胞存活率 survival**

处理结束后,接种的处理细胞形成集落的效力,通常以与对照组细胞数的存活率比值表示。

## 3 试验基本原则

3.1 由于 TK<sup>+/+</sup> 突变为 TK<sup>-/-</sup> 细胞缺乏 TK,突变体对嘧啶类似物三氟胸苷(TFT)细胞毒性效应产



生抗性。而含 TK 丰富的细胞则对 TFT 敏感,从而引起细胞代谢抑制和细胞进一步分化。因此突变细胞能在 TFT 存在条件下迅速增长,而正常细胞由于含 TK 而无法生长增殖。同样地,缺乏 HPRT 或 XPR1 的细胞分别因其对 6-巯基鸟嘌呤(6-TG)和 8-氮鸟嘌呤(8-AG)具有抗性可被挑选出来。如受试的是碱基类似物或与选择剂在结构上相关的化合物,则在进行任一哺乳动物细胞基因突变试验时,应仔细考虑受试物的特性,判断是否适合进行本试验,例如,应研究受试样品对突变细胞和非突变细胞可能存在的选择性毒性。也就是说,在检测与选择剂结构相关的化合物时,必须核实选择系统/选择剂特性。

3.2 在加入或不加入代谢活化系统的条件下,悬浮或单层培养的细胞暴露于受试物一定时间,然后将细胞传代培养,测定细胞毒性,并在选择突变细胞前使其表型得到表达。细胞毒性一般通过检测细胞处理后的相对集落形成效率(生存能力)或集落的相对总生长数。处理后的细胞在培养液中保持足够时间后,根据所选细胞和突变位点的特性,使诱发的突变表型表达至临近可观察到的水平。突变率则通过在含选择剂的培养基中接种已知数目的细胞检测突变细胞数,或在不含选择剂的培养基中检测集落形成效率(生存能力)。孵育适当时间后,计数细胞集落。根据选择性培养液中突变集落数和非选择性培养液中集落数利用公式计算出突变率。

## 4 试验方法

### 4.1 试验准备

#### 4.1.1 细胞

4.1.1.1 本试验有多种细胞类型可供选择,包括 L5178Y 亚群、CHO、AS52、V79 或 TK6 细胞。用于本试验的细胞类型对化学性致突变物应具有明确的敏感性,高的集落形成效率以及稳定的自发突变率。应检测细胞是否被支原体感染,若已被感染则不能使用。

4.1.1.2 试验设计时应预先确定敏感性和检测能力(power)。所用细胞数,培养皿/瓶数和所设受试物剂量组应能反映这些特定的参数。经处理后仍存活的最小细胞数以及每一试验阶段所用的最小细胞数应根据自发突变率确定。总的原则是所用细胞数至少是自发突变率倒数的 10 倍。但推荐应用的细胞数量是至少  $10^6$  个细胞。实验室对所用的细胞体系应有合适的历史数据,以用于对试验结果的稳定性和可靠性进行评价。

#### 4.1.2 培养基和培养条件

本试验宜选用适宜的培养基和孵育条件(培养皿、温度、 $\text{CO}_2$  体积分数和湿度)。应根据试验所用的选择系统和细胞类型选择适宜的培养基。特别重要的是所选的培养条件,应确保在表达期细胞呈最佳生长状态且突变细胞和非突变细胞有形成集落的能力。

#### 4.1.3 培养准备

从菌种培养基得到的细胞经繁殖后接种于培养基中,在  $37^\circ\text{C}$  培养。需预先清除受试细胞中的已突变的细胞。

#### 4.1.4 代谢活化

细胞株应在有或无外源性哺乳动物代谢活化系统的条件下与受试样品接触。最常用的活化系统是经酶诱导剂处理的,从啮齿类动物肝脏制备的加有辅助因子的后线粒体组分( $\text{S}_9$ )。所用的酶诱导剂包括 Aroclor 1254 或苯巴比妥和  $\beta$ -萘黄酮的联合诱导。 $\text{S}_9$  通常用在培养基中应用的终体积分数范围为 1%~10%。应根据受试样品的特点选择代谢活化系统及其应用条件。在某些情况下,可能使用一个以上的  $\text{S}_9$  浓度。随着代谢活化系统的不断发展,目前已构建了含有能表达特殊活性酶的基因工程细胞系,可以为细胞提供内源性代谢活化能力。但应按科学的方法选择所用的细胞系(例如分析细胞色素 P450 同功酶与受试物代谢之间的相关性)。

#### 4.1.5 受试物/准备

固体受试样品应该溶解或混悬于合适的溶剂或赋形剂中,在处理细胞前如需要可进行适度稀释。液体受试样品可直接加入测定体系或在处理前适度稀释。应使用新鲜制备的受试物,否则应有资料证明溶液贮存是稳定的。



## 4.2 试验条件

### 4.2.1 溶剂/赋形剂

溶剂/赋形剂不应与受试样品发生化学反应,且对细胞的存活和  $S_0$  的活性无影响。若选用的不是常用的溶剂或赋形剂,应有资料支持其适用性。建议尽可能用水作溶剂或赋形剂。如受试样品对水不稳定,应首先考虑不含水的有机溶剂或赋形剂,水可用分子筛除去。

### 4.2.2 接触浓度

4.2.2.1 在确定最高浓度时应考虑受试物的细胞毒性、在试验系统中的溶解性和 pH 值或渗透性的变化。

4.2.2.2 在正式试验中,细胞的毒性需在有或无代谢活化系统存在的条件下分别测定,可用细胞完整性和生长程度作为指标,例如细胞集落形成效率(存活能力)或相对总生长数。在预试验中先测定细胞毒性和溶解性有利于正式试验的设计。

4.2.2.3 至少应选用 4 个可供分析的试验浓度。如有细胞毒性,浓度设计应涵盖产生最大毒性到产生最小或不产生毒性的范围,通常浓度间距应在  $2 \sim \sqrt{10}$  之间。如最高浓度可产生细胞毒性,那么细胞存活能力(相对集落形成效率)或相对总生长数应控制在 10%~20% 范围内(但不应低于 10%)。而无细胞毒性或细胞毒性较小的受试样品,最高浓度至少应达到 5 mg/mL、5  $\mu$ L/mL。

4.2.2.4 相对不溶的受试样品应尽量使其在培养条件下达到溶解度的限值。应观察细胞染毒时终处理液中不溶的证据。在处理开始和结束时评价其溶解度可获得有价值的资料,因为在试验体系中有细胞、 $S_0$  和血清等成分存在,受试样品的溶解度在染毒过程中可能发生改变。不溶现象可通过肉眼观察。沉淀物不应干扰计数。

### 4.2.3 对照

4.2.3.1 每次试验均应在有和无代谢活化系统的条件下同时设置的阳性和阴性(溶剂或赋形剂)对照。在使用代谢活化系统时,选用的阳性物应是需要活化才具有致突变作用的间接致突变物。

4.2.3.2 可用作阳性对照的化学品有以下几种,见表 1。

表 1 可用作阳性对照的化学品

代谢活化条件	位点	化学品及其 CAS 编号
不需外源代谢活化系统	HPRT	甲基磺酸乙酯 ethylmethanesulfonate [CAS No. 62-50-0] 乙基亚硝基脒 ethylnitrosourea [CAS No. 759-73-9]
	TK (小和大的集落)	甲基磺酸甲酯 methylmethanesulfonate [CAS No. 66-27-3]
	XPRT	甲基磺酸乙酯 ethylmethanesulfonate [CAS No. 62-50-0] 乙基亚硝基脒 ethylnitrosourea [CAS No. 759-73-9]
需外源代谢活化系统	HPRT	3-甲基胆蒎 3-methylcholanthrene [CAS No. 56-49-5] N-亚硝基二甲胺 N-nitrosodimethylamine [CAS No. 62-75-9] 7,12-二甲苯并蒎 7,12-dimethylbenzanthracene [CAS No. 57-97-6]
	TK (小和大的集落)	环磷酰胺(一水合物) cyclophosphamide (monohydrate) [CAS No. 50-18-0 (6055-19-2)] 苯(a)并芘 benzo(a)pyrene [CAS No. 50-32-8] 3-甲基胆蒎 3-methylcholanthrene [CAS No. 56-49-5]
	XPRT	N-亚硝基二甲胺 N-nitrosodimethylamine (高浓度 $S_0$ 条件下)[CAS No. 62-75-9] 苯(a)并芘 benzo(a)pyrene [CAS No. 50-32-8]



4.2.3.3 也可以使用其他适合的阳性对照参比物。如某试验室有 5-溴 2'-脱氧尿苷[CAS No. 59-14-3]的历史性数据,则也可以将其作为阳性对照参比物。如可能,也可考虑使用与受试物在化学结构上相关的化合物作为阳性对照。

4.2.3.4 在每次试验时,阴性对照除在试验培养基中只加入溶剂或赋形剂外,其余处理应与各处理组相同。另外,如果没有历史数据证明所用溶剂或赋形剂无毒性作用或致突变作用,还应设不做任何处理的空白对照组。

### 4.3 试验步骤

#### 4.3.1 受试样品处理

4.3.1.1 在有或无代谢活化系统存在的情况下,分别使增殖细胞与受试样品接触适当时间(通常 3 h~6 h即有效)。接触时间也可延长至一个或多个细胞周期。

4.3.1.2 受试样品的每个浓度可只用一个培养皿/瓶,也可做平行样。如只用一个培养皿/瓶,浓度组数量应增加以确保有足够数量的培养皿/瓶用于分析(如至少设 8 个可供分析的浓度)。还应设置阴性对照(溶剂)的平行样。

4.3.1.3 气态或挥发性物质应采用适当方式测试,例如在封闭的培养皿中进行。

#### 4.3.2 存活能力、生存能力和突变率的检测

4.3.2.1 在受试物染毒末期,细胞经洗涤、培养,以检测存活能力,并使突变体的表型获得表达。细胞毒性的检测通常以染毒后开始测定的相对集落形成效率(存活能力)或相对总生长数来表示。

4.3.2.2 每个突变位点的新诱发突变体,其最佳表型表达需要经过(有)最短时间(HPRT 和 XPRT 位点突变需要至少 6 d~8 d,TK 至少 2 d)。细胞在含选择剂和不含选择剂的培养液中生长,以分别测定突变体数目和集落形成效率。生存能力的检测(用于计算突变效率)可以从表达期结束时开始,通过检测接种在非选择性培养基中的细胞来实施。

4.3.2.3 如果受试物在 L5178Y TK<sup>+/−</sup> 试验中为阳性,至少应测定一个受试样品浓度(最高的阳性浓度)以及阴性和阳性对照中的集落大小。如受试样品在 L5178Y TK<sup>+/−</sup> 试验结果为阴性,应测定阴性和阳性对照的集落大小。在使用 TK6 细胞株的 TK<sup>+/−</sup> 试验中,也应测定集落大小。

## 5 试验数据及报告

### 5.1 结果的处理

5.1.1 数据应包括处理组和对照组的细胞毒性和生存能力,集落计数和突变率。如 L5178Y TK<sup>+/−</sup> 试验结果为阳性,应分别计数至少一个受试样品浓度(最高阳性浓度)以及阴性和阳性对照的大集落和小集落数。大突变集落和小突变集落的分子和细胞遗传特性已有详细研究。在 TK<sup>+/−</sup> 试验中,集落计数标准为正常生长集落(大集落)和慢生长集落(小集落)。小集落的成因是突变细胞受到严重的遗传损伤,导致倍增期延长,细胞数量增加缓慢,典型的此类损伤范围包括从整个基因的缺失至细胞核内可见的典型染色体畸变。小的突变集落的诱发与化学品诱发显著的染色体畸变有关。损伤较轻的突变细胞生长速率与亲代细胞相似,可形成较大的集落。

5.1.2 应提供存活能力(相对集落形成效率)或相对总的生长率数据。突变率可以用存活细胞数中突变细胞数所占比例来表示。

5.1.3 应提供每次培养的试验数据。此外,所有数据应以表格形式列出。

5.1.4 对明确的阳性结果无需进行验证试验。意义不明确的结果最好通过改进试验条件进一步试验来澄清。

阴性结果需视具体情况决定。如认为阴性结果无需进行验证试验,应提供依据。对可疑或阴性结果,在以后的试验中应改进试验参数以扩大试验条件范围,可改进的参数包括浓度间隔、代谢活化条件等。



## 5.2 结果评价和解释

5.2.1 阳性结果判定有多个标准。如有剂量反应关系,或突变率增加,且结果可重复。应首先考虑结果的生物学意义。统计学方法可用于帮助试验结果评价,但统计学意义不能作为阳性反应判定的唯一因素。

5.2.2 不符合以上标准的受试样品则被认为在本试验体系中无致突变性。

5.2.3 尽管大多数试验都能给出明确的阳性或阴性的结果,但也不排除极少数情况不能对受试物活性做出明确判断,例如,无论重复试验多少次,结果仍模棱两可或可疑。

5.2.4 体外哺乳动物细胞基因突变试验阳性结果,表明受试样品可引起所用哺乳动物细胞基因突变。有可重复的浓度-反应关系意义较大。阴性结果表明在本试验条件下,受试样品不引起所用哺乳动物细胞的基因突变。

## 5.3 试验报告

试验报告应包括以下信息:

### 5.3.1 样品

- a) 名称和识别码如 CAS 编号(如已知);
- b) 物理性质和纯度;
- c) 与试验实施相关的物理化学特性;
- d) 受试样品稳定性。

### 5.3.2 赋形剂

- a) 选择溶剂/赋形剂的理由;
- b) 受试样品在溶剂/赋形剂中的溶解性和稳定性(如已知)。

### 5.3.3 细胞

- a) 细胞类型和来源;
- b) 细胞培养皿/瓶数量;
- c) 细胞传代的次数(如适用);
- d) 细胞培养的维护方法(如适用);
- e) 没有支原体的证据。

### 5.3.4 条件

- a) 细胞浓度和细胞培养数量选择的理由,包括细胞毒性数据和溶解度限值等(如可能);
- b) 培养基成分、CO<sub>2</sub> 体积分数;
- c) 受试样品浓度;
- d) 所加入的赋形剂和受试样品的体积;
- e) 孵育温度;
- f) 孵育时间;
- g) 处理持续的时间;
- h) 细胞处理时的密度;
- i) 代谢活化系统的类型和成分,包括可接受的标准;
- j) 阳性和阴性对照;
- k) 表达时间长短(包括细胞接种数,传代和接种程序及所加培养液,如适用);
- l) 选择剂;
- m) 认定试验阳性、阴性或可疑的标准;
- n) 计数存活细胞和突变细胞的方法;
- o) 集落大小和类型认定的定义(包括所谓小集落和大集落的标准,如适用)。



5.3.5 结果

- a) 细胞毒性表现；
- b) 沉淀现象；
- c) 受试样品接触过程中的 pH 值和渗透性数据(如可确定)；
- d) 集落大小(至少包括阴性和阳性对照组的数据)；
- e) 实验室具备检测 L5178Y TK<sup>+/−</sup> 体系小突变集落能力的说明(如适用)；
- f) 剂量-反应关系(如可能)；
- g) 统计学分析(如有)；
- h) 同期的阴性(溶剂/赋形剂)和阳性对照数据；
- i) 历史性的阴性(溶剂/赋形剂)和阳性对照资料,包括范围、均数、标准差；
- j) 突变率。

5.3.6 结果讨论

5.3.7 结论

---

中 华 人 民 共 和 国  
国 家 标 准  
化 学 品 体 外 哺 乳 动 物 细 胞  
基 因 突 变 试 验 方 法  
GB/T 21793—2008

\*

中国标准出版社出版发行  
北京复兴门外三里河北街16号  
邮政编码:100045

网址 [www.spc.net.cn](http://www.spc.net.cn)

电话:68523946 68517548

中国标准出版社秦皇岛印刷厂印刷  
各地新华书店经销

\*

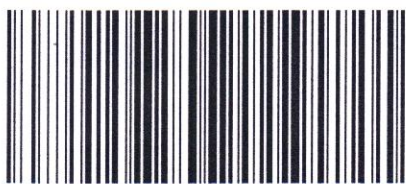
开本 880×1230 1/16 印张 0.75 字数 14 千字  
2008年7月第一版 2008年7月第一次印刷

\*

书号: 155066·1-32190 定价 14.00 元

如有印装差错 由本社发行中心调换  
版权专有 侵权必究

举报电话:(010)68533533



GB/T 21793-2008