



# 中华人民共和国国家标准

GB/T 28646—2012

GB/T 28646—2012

## 化学品 体外哺乳动物细胞微核试验方法

Chemicals—Test method of mammalian cell micronucleus in vitro

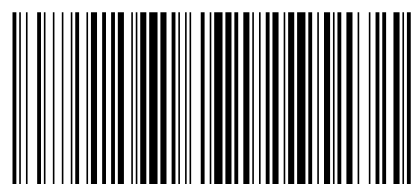
中华人民共和国  
国家标准  
化学品  
体外哺乳动物细胞微核试验方法  
GB/T 28646—2012

\*  
中国标准出版社出版发行  
北京市朝阳区和平里西街甲2号(100013)  
北京市西城区三里河北街16号(100045)  
网址 www.spc.net.cn  
总编室:(010)64275323 发行中心:(010)51780235  
读者服务部:(010)68523946  
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 1.5 字数 39 千字  
2012年11月第一版 2012年11月第一次印刷

\*  
书号: 155066·1-45821 定价 24.00 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)68510107



GB/T 28646-2012

2012-07-31 发布

2012-12-01 实施

中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局  
中国国家标准化管理委员会 发布

[55] Phelps, J. B., Garriott, M. L., and Hoffman, W. P. A protocol for the in vitro micronucleus test. II. Contributions to the validation of a protocol suitable for regulatory submissions from an examination of 10 chemicals with different mechanisms of action and different levels of activity. *Mutation Res.*, 2002,521:103-112

[56] Kirsch-Volders, M., Sofuni, T., Aardema, M., Albertini, S., Eastmond, D., Fenech, M., Ishidate, M. Jr., Kirchner, S., Lorge, E., Morita, T., Norppa, H., Surralles, J., Vanhauwaert, A. and Wakata, A. Corrigendum to “Report from the in vitro micronucleus assay working group”. *Mutation Res.*, 2004,564:97-100

[57] Pincu, M., Bass, D. and Norman, A. An improved micronuclear assay in lymphocytes. *Mutation Res.*, 1984,139:61-65

[58] Lorge, E., Hayashi, M., Albertini, S. and Kirkland, D. Comparison of different methods for an accurate assessment of cytotoxicity in the in vitro micronucleus test. I. Theoretical aspects. *Mutation Res.*, 2008,655:1-3

[59] Surralles, J., Xamena, N., Creus, A., Catalan, J., Norppa, H. and Marcos, R. Induction of micronuclei by five pyrethroid insecticides in whole-blood and isolated human lymphocyte cultures. *Mutation Res.*, 1995,341:169-184

[60] Galloway, S. Cytotoxicity and chromosome aberrations in vitro: Experience in industry and the case for an upper limit on toxicity in the aberration assay. *Environ. Molec. Mutagenesis* 2000,35:191-201

[61] Hayashi, M., Sofuni, T., and Ishidate, M. Jr. An Application of Acridine Orange Fluorescent Staining to the Micronucleus Test. *Mutation Res.*, 1983,120:241-247

[62] MacGregor, J. T., Wehr, C. M., and Langlois, R. G. A Simple Fluorescent Staining Procedure for Micronuclei and RNA in Erythrocytes Using Hoechst 33258 and Pyronin Y. *Mutation Res.*, 1983,120:269-275

[63] Hayashi, M., Sofuni, T. and Ishidate, M. Jr. An application of acridine orange fluorescent staining to the micronucleus test. *Mutation Res.*, 1983,120:241-247

[64] Fenech, M., Chang, W. P., Kirsch-Volders, M., Holland, N., Bonassi, S. and Zeiger, E. HUMN project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures. *Mutation Res.*, 2003,534:65-75

[65] Hoffman, W. P., Garriott, M. L. and Lee, C. In vitro micronucleus test. In: *Encyclopedia of Biopharmaceutical Statistics*, Second edition. S. Chow (ed.), Marcel Dekker, Inc. New York, NY, 2003:463-467

## 前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准同经济合作与发展组织(OECD)化学品测试导则 No. 487(2010)《体外哺乳动物细胞微核试验》(英文版)技术性内容一致。

本标准做了下列结构和编辑性修改：

——将 OECD487 原文中的“简介”和“初步考虑”部分内容作为本标准的“引言”；

——将 OECD487 原文中“附录：定义”中的部分内容作为本标准中的“2 术语和定义”；

——增加了范围一章。

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。

本标准起草单位：中国疾病预防控制中心职业卫生与中毒控制所、辽宁省职业病防治院、中国化工经济技术发展中心、中国检验检疫科学研究院。

本标准主要起草人：孙金秀、曲波、林铮、李雪飞、白羽、王晓兵、李晞。

## 引 言

本试验的目的是通过检测处于间期细胞的胞质中微核(micronuclei, MN)形成的频率,评价受试物的遗传毒性。微核可来源于无着丝粒的染色体断片或在细胞有丝分裂后期不能迁往细胞两极的整条染色体。该试验用于检测在细胞暴露受试物期间或暴露后受试物对经历过分裂的细胞诱发断裂和非整倍体作用的活性<sup>[1-2]</sup>。本标准规定在制定的操作规范中允许使用和不使用细胞胞浆移动阻断剂——松胞素 B(cytochalasin B, cyto B)两种方式进行试验。在细胞有丝分裂期前加入 cyto B,可阻断细胞质分裂,使细胞为双核细胞<sup>[3-4]</sup>,从而可在完成了一次细胞分裂的细胞中进行微核的识别以及微核发生率的选择性分析。如能提供所分析的细胞群发生了有丝分裂的证据时,可按不使用 cyto B 进行试验操作。

另外,使用本方法除了可以鉴定化学物诱发微核外,还可应用胞浆移动阻断剂、着丝点免疫标记、和着丝粒/末端着丝粒探针杂交技术(原位免疫荧光杂交技术, fluorescence in situ hybridisation, FISH),提供染色体损伤和微核形成机制的信息<sup>[5-16]</sup>。在观察到微核形成增加,并希望确定这种增加是断裂作用还是诱发非整倍体作用,可应用标记和杂交的技术进行操作。

微核损伤是可以传递到子细胞的,而分裂中期细胞出现的染色体畸变是不能传递到下一代细胞;由于所检测到的间期细胞微核是比较客观的,因此试验人员只需要测定细胞是否经过了分裂,以及含微核的细胞有多少。所以,标本的制备、分析记录相对比较迅速,而且也能实现自动化分析;这使原来只能对每个处理组计数分析数百个细胞增加到数千个细胞,从而增加了试验方法的检测效力。最后,如果微核来源于滞后的整条染色体,本方法可对使用传统的染色体畸变分析(OECD 473)存在困难的诱发非整倍体作用的化学物进行检测分析<sup>[17]</sup>。但是,如果不使用 FISH 等特异性技术,体外微核试验是不能鉴别化学物是诱发多倍体剂还是断裂剂。

体外微核试验是在试管内外条件下使用培养的人体或啮齿类细胞进行的试验。由于本试验同时能检测到非整倍体剂作用和断裂剂作用,因此可为探讨体外条件下染色体的潜在损伤作用提供综合基础。

体外试验通常需要使用外源性代谢活化系统。外源性代谢活化系统不能完全模拟体内代谢条件。应注意避免存在影响化学物固有的致突变活性的因素,如 pH 值、或渗透压的明显改变、或者是在高浓度下引起严重细胞毒性的条件进行试验,以免发生假阳性结果。

为了分析诱发微核作用,最关键的是处理组和对照组培养物的细胞核必需已经经历过或完成了核分裂。计数微核最有利的时期是受试物处理期间或处理后细胞已经完成一个有丝分裂的阶段。

体外微核试验应用多种细胞类型进行试验都是非常有效的,无论是在用或不用 cyto B 处理的情况下;如已经有大量的研究资料表明体外微核试验应用各种啮齿类细胞株(CHO、V79、CHL/IU 和 L5178Y)和人体淋巴细胞都被确认是非常有效的<sup>[8,19-31]</sup>。其中包括,特别是由遗传毒性技术科学委员会(Société Française de Toxicologie Génétique, SFTG)主持的国际有效性合作研究<sup>[8,19-22]</sup>和国际遗传毒性试验工作组的报告。

已有欧盟替代方法有效性<sup>[4,16]</sup>的欧洲中心(European Centre for the Validation of Alternative Methods, ECVAM)一项权重证据回顾性的有效性研究所作的再评价的资料<sup>[2,33-34]</sup>,并且该组织的专家顾问委员会(ECVAM Scientific Advisory Committee, ESAC)认为体外微核试验是科学有效的。已经有使用 TK6 类成淋巴细胞系<sup>[5]</sup>、HepG2 细胞株<sup>[36-37]</sup>和叙利亚地鼠胚胎细胞的报告<sup>[38]</sup>,尽管这些细胞尚未进行有效性研究。

[41] Brusick, D. Genotoxic effects in cultured mammalian cells produced by low pH treatment conditions and increased ion concentrations. *Environ. Mutagen.*, 1986,8:789-886

[42] Fenech, M. and Morley, A. A. Measurement of micronuclei in lymphocytes. *Mutation Res.*, 1985,147:29-36

[43] Fenech, M. The advantages and disadvantages of cytokinesis-blood micronucleus method. *Mutation Res.*, 1997,392:11-18

[44] Bonassi, S., Fenech, M., Lando, C., Lin, Y. P., Ceppi, M., Chang, W. P., Holland, N., Kirsch-Volders, M., Zeiger, E., Ban, S., Barale, R., Bigatti, M. P., Bolognesi, C., Jia, C., Di Giorgio, M., Ferguson, L. R., Fucic, A., Lima, O. G., Hrelia, P., Krishnaja, A. P., Lee, T. K., Migliore, L., Mikhalevich, L., Mirkova, E., Mosesso, P., Muller, W. U., Odagiri, Y., Scarffi, M. R., Szabova, E., Vorobtsova, I., Vral, A. and Zijno, A. HUMAN MicroNucleus Project: international database comparison for results with the cytokinesis-block micronucleus assay in human lymphocytes. I. Effect of laboratory protocol, scoring criteria and host factors on the frequency of micronuclei. *Environ. Mol. Mutagen.* 2001,37:31-45

[45] Maron, D. M. and Ames, B. N. Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. *Mutation Res.*, 1983,113:173-215

[46] Ong, T.-m., Mukhtar, M., Wolf, C. R. and Zeiger, E. Differential effects of cytochrome P450-inducers on promutagen activation capabilities and enzymatic activities of S-9 from rat liver. *J. Environ. Pathol. Toxicol.*, 1980,4:55-65

[47] Elliott, B. M., Combes, R. D., Elcombe, C. R., Gatehouse, D. G., Gibson, G. G., Mackay, J. M. and Wolf, R. C. Alternatives to Aroclor 1254-induced S9 in in-vitro genotoxicity assays. *Mutagenesis*, 1992,7:175-177

[48] Matsushima, T., Sawamura, M., Hara, K. and Sugimura, T. A safe substitute for Polychlorinated Biphenyls as an Inducer of Metabolic Activation Systems. In: de Serres, F. J., Fouts, J. R., Bend, J. R. and Philpot, R. M. (eds). *In Vitro Metabolic Activation in Mutagenesis Testing*, Elsevier, North-Holland, 1976:85-88

[49] Johnson, T. E., Umbenhauer, D. R. and Galloway, S. M. Human liver S-9 metabolic activation: proficiency in cytogenetic assays and comparison with phenobarbital/beta-naphthoflavone or Aroclor 1254 induced rat S-9. *Environ. Mol. Mutagen.*, 1996,28:51-59

[50] UNEP (2001). Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants, United Nations Environment Programme (UNEP). Available: [<http://www.pops.int/>]

[51] Doherty, A. T., Ellard, S., Parry, E. M. and Parry, J. M. An investigation into the activation and deactivation of chlorinated hydrocarbons to genotoxins in metabolically competent human cells. *Mutagenesis*, 1996,11:247-274

[52] Krahn, D. F., Barsky, F. C. and McCooey, K. T. CHO/HGPRT Mutation Assay: Evaluation of Gases and Volatile Liquids. In: Tice, R. R., Costa, D. L. and Schaich, K. M. (eds). *Genotoxic Effects of Airborne Agents*. New York, Plenum, 1982:91-103

[53] Zamora, P. O., Benson, J. M., Li, A. P. and Brooks, A. L. Evaluation of an exposure system using cells grown on collagen gels for detecting highly volatile mutagens in the CHO/HGPRT mutation assay. *Environ. Mutagenesis* 1983,5:795-801

[54] Fenech, M. The cytokinesis-block micronucleus technique: a detailed description of the method and its application to genotoxicity studies in human populations. *Mutation Res.*, 1993,285:35-44