

中华人民共和国国家职业卫生标准

GBZ/T 240.13—2011

化学品毒理学评价程序和试验方法 第 13 部分：哺乳动物精原细胞/初级精母细胞染色体畸变试验

Procedures and tests for toxicological evaluations of chemicals—
Part 13: Mammalian spermatogonium/primary spermatocyte
chromosome aberration test

2011-08-19 发布

2012-03-01 实施

中华人民共和国卫生部 发布

前 言

根据《中华人民共和国职业病防治法》制定本部分。

GBZ/T 240《化学品毒理学评价程序和试验方法》现分为以下四十四部分：

- 第1部分：总则；
- 第2部分：急性经口毒性试验；
- 第3部分：急性经皮毒性试验；
- 第4部分：急性吸入毒性试验；
- 第5部分：急性眼刺激性/腐蚀性试验；
- 第6部分：急性皮肤刺激性/腐蚀性试验；
- 第7部分：皮肤致敏试验；
- 第8部分：鼠伤寒沙门氏菌回复突变试验；
- 第9部分：体外哺乳动物细胞染色体畸变试验；
- 第10部分：体外哺乳动物细胞基因突变试验；
- 第11部分：体内哺乳动物骨髓嗜多染红细胞微核试验；
- 第12部分：体内哺乳动物骨髓细胞染色体畸变试验；
- 第13部分：哺乳动物精原细胞/初级精母细胞染色体畸变试验；
- 第14部分：啮齿类动物显性致死试验；
- 第15部分：亚急性经口毒性试验；
- 第16部分：亚急性经皮毒性试验；
- 第17部分：亚急性吸入毒性试验；
- 第18部分：亚慢性经口毒性试验；
- 第19部分：亚慢性经皮毒性试验；
- 第20部分：亚慢性吸入毒性试验；
- 第21部分：致畸试验；
- 第22部分：两代繁殖毒性试验；
- 第23部分：迟发性神经毒性试验；
- 第24部分：慢性经口毒性试验；
- 第25部分：慢性经皮毒性试验；
- 第26部分：慢性吸入毒性试验；
- 第27部分：致癌试验；
- 第28部分：慢性毒性/致癌性联合试验；
- 第29部分：毒物代谢动力学试验；
- 第30部分：皮肤变态反应试验-局部淋巴结法；
- 第31部分：大肠杆菌回复突变试验；
- 第32部分：酵母菌基因突变试验；
- 第33部分：果蝇伴性隐性致死试验；
- 第34部分：枯草杆菌基因重组试验；
- 第35部分：体外哺乳动物细胞程序外DNA合成(UDS)试验；
- 第36部分：体内哺乳动物外周血细胞微核试验；

- 第 37 部分:体外哺乳动物细胞姊妹染色单体交换试验;
- 第 38 部分:体内哺乳动物骨髓细胞姊妹染色体交换试验;
- 第 39 部分:精子畸形试验;
- 第 40 部分:繁殖/生长发育毒性筛选试验;
- 第 41 部分:亚急性毒性合并繁殖/发育毒性筛选试验;
- 第 42 部分:一代繁殖试验;
- 第 43 部分:神经毒性筛选组合试验;
- 第 44 部分:免疫毒性试验。

.....

本部分为 GBZ/T 240 的第 13 部分。

本部分由卫生部职业卫生标准专业委员会提出。

本部分由中华人民共和国卫生部批准。

本部分起草单位:湖南省劳动卫生职业病防治所、中国疾病预防控制中心职业卫生与中毒控制所。

本部分主要起草人:陆丹、许建宁、孙金秀、史晓祎。

化学品毒理学评价程序和试验方法

第 13 部分：哺乳动物精原细胞/初级精母细胞染色体畸变试验

1 范围

GBZ/T 240 的本部分规定了哺乳动物精原细胞/初级精母细胞染色体畸变试验的目的、概述、试验方法、数据处理与结果评价、评价报告和结果解释。

本部分适用于检测化学品对整体哺乳动物精原细胞/初级精母细胞染色体的损伤。

2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件，仅所注日期的版本适用于本文件。凡是不注日期的引用文件，其最新版本(包括所有的修改单)适用于本文件。

GBZ/T 224 职业卫生名词术语

GBZ/T 240.1 化学品毒理学评价程序和试验方法 第 1 部分：总则

3 术语和定义

GBZ/T 240.1 确立的术语和定义适用于本文件。

3.1

精原细胞 spermatogonium

雄性性腺生殖细胞减数分裂后的单倍体配子。

3.2

初级精母细胞 primary spermatocyte

精母细胞；精细胞的亲代细胞。精母细胞有丝分裂产生的并能进入减数分裂细胞。

3.3

染色单体型畸变 chromatid-type aberration

染色体染色单体断裂或染色单体断裂重组等改变的结构损伤。

3.4

染色体型畸变 chromosome-type aberration

在两个染色单体的相同位点均出现断裂或断裂重组等改变的结构性损伤。

3.5

裂隙 gap

染色体或染色单体损伤的长度小于一个染色单体的宽度，为染色单体的最小的错误排列。

3.6

染色体数目畸变 chromosomal numerical aberration

染色体数目发生改变，不同于正常核型。

3.7

多倍体 polyploidy

哺乳动物染色体数目正常是二倍体，在化学诱变剂的作用下，染色体数目成倍地增加成三倍体、四

倍体等。

3.8

染色体结构的畸变 chromosomal structure aberration

通过显微镜可以直接观察到的发生在细胞有丝分裂中期的染色体结构变化。如染色体中间缺失和断片,染色体互换和内交换等。

4 试验目的

本试验是一项检测生殖细胞染色体畸变效应试验,利用细胞遗传学方法,检测整体哺乳动物精原细胞/初级精母细胞染色体畸变,以评价受试样品引起生殖细胞遗传突变的可能性。

5 试验概述

动物通过适当的途径接触受试样品,一定时间后处死动物。观察睾丸精原细胞或初级精母细胞染色体畸变情况,以评价受试样品对雄性生殖细胞的致突变性。

动物处死前,用细胞分裂中期阻断剂处理,处死后取出两侧睾丸,经低渗、固定、软化及染色后制备精原细胞/初级精母细胞染色体标本,在显微镜下观察中期分裂相细胞,分析精原细胞/初级精母细胞染色体畸变。

6 试验方法

6.1 试剂

6.1.1 0.1%秋水仙素:置于棕色瓶中,冰箱保存。

6.1.2 1%柠檬酸三钠溶液。

6.1.3 60%冰乙酸。

6.1.4 固定液:甲醇与冰醋酸以3:1混合,临用时现配。

6.1.5 姬姆萨(Giemsa)染液:

Giemsa 染料	3.8 g
甲醇	375 mL
甘油	125 mL

配制:将 Giemsa 染料和少量甲醇于乳钵里仔细研磨,再加入甲醇至 375 mL,待完全溶解后,再加入 125 mL 甘油,混合均匀。置 37 °C 恒温箱中保温 48 h。保温期间振摇数次,促使染料的充分溶解。取出过滤,两周后使用。

6.1.6 磷酸盐缓冲液(pH 6.8):

1/15 mol/L 磷酸氢二钠溶液:磷酸氢二钠(Na_2HPO_4)9.47 g 溶于 1 000 mL 蒸馏水中。

1/15 mol/L 磷酸二氢钾溶液:磷酸二氢钾(KH_2PO_4)49.07 g 溶于 1 000 mL 蒸馏水中。

取 1/15 mol/L 磷酸氢二钠溶液 50 mL 与 1/15 mol/L 磷酸二氢钾溶液 50 mL 混合。

6.1.7 Giemsa 应用液:取 1 份 Giemsa 染液与 9 份 1/15 mol/L 磷酸盐缓冲液混合而成。临用时配制。全部试剂除注明外,均为分析纯,试验用水为蒸馏水。

6.2 受试样品处理

受试样品一般应新鲜配制。如溶液贮存稳定,可以不必新鲜配制。固体受试样品应溶于或悬于适

当的溶剂或载体中,并进行稀释。液体受试样品可直接使用或稀释后使用。根据受试样品的理化性质[水溶性和(或)脂溶性]确定受试样品所用的溶剂或载体。但所用溶剂或载体在使用剂量水平对实验动物应不产生毒作用,且不与受试样品发生任何化学反应。通常用蒸馏水、等渗盐水、植物油、食用淀粉、羧甲基纤维素钠等。如非常用的溶剂或载体,应有参考资料说明其成分。

6.3 对照

6.3.1 每次试验都应设置相应的阳性和阴性对照(溶剂或载体)。阴性对照组除不使用受试样品外,其他处理与受试样品组一致。阴性对照由溶剂或载体组成。是否在每个采样时间点均设置阴性对照,可依据动物间的变异和历史对照资料中的精原细胞/初级精母细胞染色体畸变频率判断。如果采用一个采样时间点作阴性对照,最适采样时间点是第一采样时间点。另外,如果没有历史对照资料证明所用溶剂或载体无诱导染色体缺失等效应,还应设空白对照。

6.3.2 阳性对照组动物体内应能形成可被检测的高于背景的精原细胞/初级精母细胞染色体结构畸变。阳性对照组剂量设置应使致染色体畸变效应明显,但不能使看片者一看即知编码玻片底细。可只取一个采样时间点来证明阳性对照。最好使用与受试样品化学分类相关的阳性对照化合物。常用的阳性对照物有:

- 环磷酰胺(cyclophosphamide,CAS号 50-18-0);
- 单水环磷酰胺(cyclophosphamide monohydrate,CAS号 6055-19-2);
- 丝裂霉素 C(mitomycin C,CAS号 50-07-7);
- 丙烯酰胺单体(monomeric acrylamide,CAS号 79-06-1);
- 三亚乙基胍胺(triethylenemelamine,CAS号 51-18-3)。

由于本试验中动物个体之间可能出现反应的变异较大,提倡试验时阳性对照组不应只设一个剂量水平。

6.4 实验动物和饲养环境

6.4.1 实验动物

雄性小鼠和中国仓鼠是精原细胞/初级精母细胞染色体畸变试验常规使用动物,其他合适的雄性哺乳动物也可选用。应使用健康年轻的性成熟动物,如使用小鼠,周龄7周~12周为最好。所用动物体重变化按性别不能超过平均体重的20%。动物应随机分组,每个处理组和对照组都必须有至少5只能用于分析的动物。如试验设有几个采样时间点,则要求每组每个采样时间点都有5只能用于分析的动物。动物购回后应适应实验室新环境至少3d~5d。

6.4.2 饲养环境

动物应按组分笼饲养,每笼动物数以不干扰动物活动和观察反应为度。动物实验室、实验动物和动物饲料应符合国家相应规定。

6.5 剂量设计

6.5.1 精原细胞

应进行预试验以选择高剂量,只要在试验中能证明有阳性效应,则剂量范围偏大也可接受。如果受试样品具有毒性,应在第一个采样时间点设置三个可供分析的剂量,这些剂量应包括从最大毒性至低毒性或无毒性的范围;第二次采样时间点仅需设置高剂量。高剂量应是能使动物出现严重中毒反应的剂量,即最大耐受剂量。而有特异生物学活性的物质,如毒性很低(如激素和丝裂源)可另循其他剂量设置标准。高剂量也可是使精原细胞产生明显毒性的剂量(如精原细胞有丝分裂中期相与第一次和第二次

减数分裂中期相的比率降低,但这种比率的降低不应超过 50%)。一般可选急性经口 1/2 LD₅₀ 为高剂量组。按等比级数 2 向下设置中、低剂量组。

6.5.2 初级精母细胞

应进行预试验以选择高剂量,只要在试验中能证明有阳性效应,则剂量范围偏大也可接受。如果受试样品具有毒性,应设置三个可供分析的剂量,这些剂量应包括从最大毒性至无毒性的范围。高剂量是指能使动物出现严重中毒反应的剂量,即最大耐受剂量。按等比级数 2 向下设置中、低剂量组。

6.5.3 限量试验

如果试验在不低于 2 000 mg/kg 体重剂量水平,用同一日内进行一次或两次染毒时没有产生可观察到的毒性效应,并且根据结构相似物质的资料也不能推断受试样品有遗传毒性,则可不考虑在整个试验中设置三个剂量水平。若受试样品毒性很低,应以 5 000 mg/kg 体重剂量水平进行限度试验,外推到人群暴露的阈剂量试验可能需要采用更高的剂量水平。

6.6 试验步骤

6.6.1 实验动物的处理和采样时点

6.6.1.1 根据试验目的或受试样品的性质选择染毒途径,首选经口灌胃染毒。也可选择腹腔注射等方式染毒。

6.6.1.2 受试样品溶液一次给予的最大容量不应超过 20 mL/kg。

6.6.1.3 一般情况下染毒一次,其剂量应引起明显毒性。为便于大容量给药,也可分散剂量染毒,即同一日染毒 2 次,其间隔时间不超过几小时。

6.6.1.4 精原细胞采集 高剂量组动物分为 A、B 两个亚组,分两次采集样品,A 组于末次染毒后 24 h 采集样品。B 组于末次染毒后 48 h 采集样品;中、低剂量组均于末次染毒后 24 h 采集样品。

6.6.1.5 初级精母细胞采集 连续染毒 5 d,每天一次,于第一次染毒后的第 12 天~第 14 天采集样品。

6.6.1.6 于处死动物采集样品前 3 h~6 h 腹腔注射秋水仙素(4 mg/kg~6 mg/kg)。

6.6.2 精原细胞/初级精母细胞染色体标本制备

6.6.2.1 取材

用颈椎脱臼法处死动物,打开腹腔,迅速取出两侧睾丸,去除脂肪,称重,置于盛有适量 1%柠檬酸三钠溶液的小平皿中,洗去毛和血污,转入另一小平皿中。

6.6.2.2 低渗

6.6.2.2.1 精原细胞。取出睾丸,去除被膜,分离曲细精管。加入预温(37 ℃)的 1%柠檬酸三钠溶液(低渗液)5 mL。倒入 10 mL 试管,加低渗液至 10 mL,用滴管吹打混悬曲细精管,静止 2 min,使曲细精管下沉。将含有许多精子和减数分裂的上清液仔细吸去,留下的曲细精管,重新用 10 mL 低渗液处理 10 min~20 min。

6.6.2.2.2 初级精母细胞。取出睾丸,去除被膜,分离曲细精管。加入 4 ℃冰箱保存的 1%柠檬酸三钠溶液 10 mL。用滴管吹打混悬曲细精管,静置 20 min。

6.6.2.3 固定

用滴管尽量吸去上清液,加入 10 mL 固定液混匀,固定 30 min,如在冰箱(0 ℃~4 ℃)过夜固定则更好。

6.6.2.4 离心

以 1 000 r/min 速度离心 10 min。

6.6.2.5 软化

用滴管吸尽上清液。加入 60%冰乙酸 2 mL,滴管吹打至不透光。

加入 2 mL 新鲜固定液,用细口滴管充分混匀。

6.6.2.6 制片

在洁净的冷冻玻片上滴 3 滴~4 滴细胞悬液,轻吹细胞悬液扩散平铺于玻片上。将玻片在酒精灯上微热烘干。每个睾丸制片 2 张~3 张。

6.6.2.7 染色

将制备好的标本片放入 Giemsa 应用液中染色 10 min~20 min,用蒸馏水冲洗、晾干。

6.7 阅片

6.7.1 标本片编号

所有玻片,包括阳性对照和阴性对照,在镜检前要分别编号。

6.7.2 标本片阅检

在低倍镜下寻找背景清晰、分散良好、染色体收缩适中的中期分裂相,在油镜下注意选取细胞膜形态完整、邻近无游离染色体或中期相的细胞进行观察。

6.7.3 有丝分裂指数(仅限于精原细胞)

对各处理组、阴性对照组和阳性对照组,每只动物计数 1 000 个细胞测定有丝分裂指数,以确定细胞毒性。

6.7.4 计数畸变细胞

用双盲法阅片。每只动物做两侧睾丸,每侧睾丸至少分析 50 个精原细胞/初级精母细胞中期分裂相,即每个剂量组至少观察 500 个中期分裂相。当观察到的畸变细胞数量较多时,可以减少观察的细胞数。在阅片时应记录每一观察细胞染色体畸变的数目和类型以及显微镜视野的坐标位置。

6.7.5 观察项目

6.7.5.1 精原细胞

6.7.5.1.1 染色体数目的改变:多倍体。正常精原细胞中期分裂相中常可见到多倍体,这是因为精原细胞至少两次有丝分裂和它们子细胞的减数分裂常同步进行。可以有两个或四个中期分裂相彼此极靠近,看来像一个中期相。因此阐明生殖细胞多倍体的意义时应很慎重,仅在第一次减数分裂中,四倍体生殖细胞有一个被确认为四价体时才有意义。

6.7.5.1.2 染色体结构的改变:断裂、断片、微小体、无着丝点环、环状染色体、双或多着丝点染色体、单体互换等。

6.7.5.2 初级精母细胞

除观察裂隙、断片、断裂、微小体外,还应观察相互易位、X-Y 和常染色体的单价体和多倍体。

7 数据处理与结果评价

7.1 数据处理

每一实验动物作为一个观察单位。精原细胞试验每组动物分别计算染色体结构畸变细胞百分率。一般用 χ^2 检验方法进行统计学分析。初级精母细胞受试样品组与对照组的断片、易位、畸变细胞率、常染色体单价体、性染色体单价体等分别按 χ^2 检验进行统计分析。两种细胞染色体畸变的裂隙都应分别记录和报告,但一般不计入总的畸变率。

7.2 结果评价

受试样品组细胞染色体畸变率与阴性对照组相比,统计学意义上有显著性差异,并有明确的剂量-反应关系或在一个受试样品组出现染色体细胞畸变数明显增高时,即可认为精原细胞/初级精母细胞染色体畸变试验阳性。若统计学上差异有显著性,但无剂量-效应关系,则须进行重复试验,结果能重复者可确定为精原细胞/初级精母细胞染色体畸变试验阳性。

多倍体的增加提示受试样品具有潜在的诱导精原细胞染色体数目畸变的作用。

8 评价报告

除 GBZ/T 240.1 规定的一般项目外,评价报告还应包括以下方面:

- a) 剂量分组及选择剂量的基本原则,阳性和阴性对照资料(包括当前和历史的资料)、染毒途径和方式,采样时间点;
- b) 细胞分裂中期阻断剂名称、使用浓度及处理时间;
- c) 试验方法:简述操作步骤,所用统计学方法,结果判定标准;
- d) 结果:中毒症状、每只动物染色体畸变类型和畸变细胞数、每组动物细胞畸变总数、均数和标准差、每组每细胞各类型畸变数、剂量-反应关系、阴性对照的参考资料、历史资料及范围、均值和标准差、阳性对照的参考资料等。精原细胞还应包括:有丝分裂指数、精原细胞有丝分裂中期相与第一次和第二次减数分裂中期相的比率。以列表方式报告受试样品组、溶剂对照组和阳性对照组动物精原细胞/初级精母细胞染色体畸变类型和数量及畸变率;
- e) 结论。

9 结果解释

阳性结果表明在本试验条件下受试样品具有引起受试动物精原细胞/初级精母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样品不引起受试动物精原细胞/初级精母细胞染色体畸变。哺乳动物精原细胞/初级精母细胞染色体畸变试验能够提供受试样品对雄性生殖细胞遗传学的毒性作用资料,其试验结果仅能有限地外推到人。