



中华人民共和国国家标准

GB/T 35520—2017

化学品 胚胎毒性 胚胎干细胞试验

Chemicals—Embryotoxicity—Embryonic stem cell test

2017-12-29 发布

2018-07-01 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

前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

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:中国检验检疫科学研究院、中国化工经济技术发展中心、常州进出口工业及消费品安全检测中心、宁波出入境检验检疫局。

本标准主要起草人:李海山、陈会明、韩辉、崔媛、王晓兵、刘君峰、陈小青、程艳、艾文超、谢文平。

引 言

小鼠胚胎干细胞(Embryonic stem cells, ES)在不同的培养条件下会分化为不同的胚胎组织。因此,一些研究小组使用小鼠 ES 细胞进行体外胚胎毒性试验。Laschinski 等^[1]比较了 ES 细胞和小鼠纤维母细胞的细胞毒性,以评估致畸物的潜在胚胎毒性。Heuer 等^[2-3]比较了 ES 细胞的细胞毒性和分化抑制。Newall 和 Beedles^[4]测定了培养 7 d 后,致畸物对 ES 细胞的细胞毒性和集落形成能力的影响,这适用于常规测试,因为集落形成这一终点可自动化完成。在所有这些试验中,只有一些胚胎毒性物能够被正确分类。这可能是由于在 ES 试验中选择 2 个终点不足以评估胚胎毒性。

为克服上述 ES 细胞试验的限制,Spielmann 等^[5]确定了 3 个不同的试验终点(半数分化抑制浓度、D3 细胞半数生长抑制浓度和 3T3 细胞半数生长抑制浓度)。根据这些终点可导出 3 个变量。所得的 3 个变量作为受试物分为 3 个体内胚胎毒性等级的依据。这种方法有利于给出胚胎组织与成体组织之间对化合物细胞毒性损伤的敏感性差异。事实上,利用判别分析已将 16 种受试化学品正确归入已知的 3 种体内胚胎毒性等级^[5-6]。这是第一个不处死妊娠动物而获得体外培养所需胚胎组织的体外胚胎毒性测试。

在本标准中为验证研究制定的标准操作程序克服了实验室中 ES 状态维持的问题,ES 细胞通常倾向于自发分化。

此外,根据制定的性能标准,欧盟替代方法验证中心(European Centre for the Validation of Alternative Methods, ECVAM)验证研究表明体外数据和体内数据之间具有较好的相关性(准确性 78%)。据报道,强胚胎毒性化学品的预测性(100%)极好、精确度(81%)良好。据报道,无胚胎毒性物质和胚胎毒性弱的物质的预测性(分别为 72%和 70%)和无胚胎毒性物质的精确度(70%)较高($\geq 65\%$)^[7]。

然而,一个特例出现于强胚胎毒性化学品氯化甲基汞的错误分类,在 8 个试验中的 4 个试验里,被预测为无胚胎毒性的化学品,而不是强胚胎毒性的化学品。这种误分类出现的原因可能是用于建立预测模型的训练集未包括具有类似细胞毒性模式的化学品^[6]。

化学品 胚胎毒性 胚胎干细胞试验

1 范围

本标准规定了化学品胚胎毒性胚胎干细胞试验的术语和定义、试验原理、试验方法、质量控制和结果评价。

本标准适用于应用胚胎干细胞试验测试化学品的胚胎毒性。

2 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

2.1

半数分化抑制浓度 median inhibition of differentiation

ID_{50}

化学品抑制 50% ES 细胞分化为心肌细胞的浓度。

2.2

D3 细胞半数生长抑制浓度 median inhibition of growth of D3

$IC_{50 D3}$

化学品抑制 50% ES 细胞系 D3 生长和活性的浓度。

2.3

3T3 细胞半数生长抑制浓度 median inhibition of growth of 3T3

$IC_{50 3T3}$

化学品抑制 50% 3T3 细胞生长和活性的浓度。

3 试验原理

胚胎毒性测试或用妊娠动物进行体内试验,或用培养的胚胎以及取自妊娠动物的胚胎组织、细胞进行体外试验。不管体内还是体外测试,都得处死妊娠动物^[8]。利用胚胎干细胞体外培养无限增殖与分化的潜能,提出了一种利用小鼠永生化细胞系的体外胚胎毒性测试,即胚胎干细胞试验^[9]。

本试验是基于胚胎毒性作用中最重要指标,即受试物对胚胎组织和成体组织的毒性损伤存在敏感性差异,这种差异与胚胎分化抑制密切相关。使用两个永生化小鼠细胞系,ES 细胞(D3)和纤维母细胞(3T3 细胞)分别表示胚胎组织和成体组织。只有在添加小鼠白血病抑制因子(mLIF)的培养条件下,ES 细胞保持在未分化阶段才可进行该试验。去除未分化状态,ES 细胞会形成拟胚体(EB),并在适当条件下分化为主要胚胎组织。

细胞毒性数据表明,ES 细胞比成体细胞对毒性药剂更敏感^[1]。ES 细胞分化抑制和 ES 细胞与 3T3 细胞生长抑制是 EST 中用于预测化学品潜在胚胎毒性的 3 个选用的终点。