



中华人民共和国国家标准

GB/T 21769—2008

化学品 体外 3T3 中性红摄取 光毒性试验方法

Chemical—In vitro 3T3 NRU phototoxicity test method



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
中国国家标准化管理委员会

发布

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. 432(2004 年)《体外 3T3 中性红摄取光毒性试验》(英文版)。

本标准作了下列编辑性修改：

- 增加了范围部分和规范性引用文件部分；
- 将 OECD 简介部分与试验方法原则合并；
- 将 OECD 的试验前须知与试验方法合并；
- 删除了 OECD 的参考文献部分；
- 试验结果评价参考了欧盟的试验方法。

本标准的附录 A 和附录 B 为资料性附录。

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：广东出入境检验检疫局。

本标准主要起草人：程树军、许崇辉、焦红、温巧玲、潘芳、陈强、秦瑶、黎庆翔。

化学品 体外 3T3 中性红摄取 光毒性试验方法

1 范围

本标准规定了化学品体外 3T3 中性红摄取光毒性试验的范围、规范性引用文件、术语和定义、缩略语、试验基本原则、试验方法、试验结果和试验报告。

本标准适用于化学品潜在光毒性的筛选和检测。本标准可作为化学品光毒性动物试验的替代方法之一。

2 规范性引用文件

下列文件中的条款通过本标准的引用而成为本标准的条款。凡是注日期的引用文件，其随后所有的修改单(不包括勘误的内容)或修订版均不适用于本标准，然而，鼓励根据本标准达成协议的各方研究是否可使用这些文件的最新版本。凡是不注日期的引用文件，其最新版本适用于本标准。

经济合作与发展组织(OECD)化学品测试指南 No. 101(1981 年)《化学品紫外可见吸收光谱》(英文版)。

欧盟指令 EU 67/548/EEC 附录 V B. 41(2000 年)《光毒性 体外中性红摄取光毒性试验》(英文版)。

3 术语和定义、缩略语

3.1 术语和定义

下列术语和定义适用于本标准。

3.1.1

辐照度 irradiance

入射到某一表面的紫外线(UV)或可见光(Vis)的强度，单位为瓦每平方米(W/m^2)或毫瓦每平方厘米(mW/cm^2)。

3.1.2

光剂量 dose of light

入射到某一表面的紫外线或可见光的量(强度 $\times$ 时间)，单位为焦耳每平方米(J/m^2)或焦耳每平方厘米(J/cm^2)。

3.1.3

紫外线波长 UV light wavebands

国际照明委员会(CIE, Commission Internationale de L'Eclairage)推荐的定义为：UVA(315 nm~400 nm)、UVB(280 nm~315 nm)和 UVC (100 nm~280 nm)。其他一些定义也可采用；UVB 和 UVA 的分界线通常在 320 nm，UVA 可在 340 nm 处分为 UV-A1 和 UV-A2。

3.1.4

细胞活性 cell viability

测量某一细胞群总活性的参数(如细胞溶酶体摄取活性染料中性红)，其数值取决于测定的终点和试验所用的设计方案，并与细胞总数和/或细胞活力相关。

3.1.5

相对细胞活性 **relative cell viability**

通过与溶剂(阴性)对照组的相关性来表达的细胞活性,对照组除了未经受试化学物质处理外,整个试验过程与试验组一样(或+Irr 或-Irr)。

3.1.6

光刺激因子 **photo irritation factor; PIF**

在无细胞毒性的 UV/vis 照射下,受试物分别在无光照(-Irr)和有光照(+Irr)条件下获得两组平行有效的细胞毒性浓度(IC₅₀),通过比较 IC₅₀ 的值得到的因子。

3.1.7

半数抑制浓度 **IC₅₀**

使细胞活性下降 50% 的受试化学物质的浓度。

3.1.8

平均光效应 **mean photo effect; MPE**

在无细胞毒性的 UV/vis 照射下,受试物分别在无光照(-Irr)和有光照(+Irr)条件下获得两组浓度反应曲线,通过数学分析导出的数值。

3.1.9

光毒性 **phototoxicity**

皮肤第一次接触某种化学物质继而暴露于光下所引发的一种急性毒性反应,或者全身应用一种化学物质后,暴露于光下所发生的类似皮肤照射的反应。

3.1.10

预测模型 **prediction model**

将毒性试验结果转换为预测毒性潜力的算法。在本标准中,PIF 和 MPE 可用于把体外 3T3 中性红摄取光毒性试验的结果转换为对光毒性潜力的预测。

3.1.11

光刺激性 **photoirritation**

光毒性的亚分类,仅用于描述那些皮肤暴露于化学物质(局部或口服)时产生的光毒性反应。这些光毒性反应常常导致细胞非特异性损伤(如阳光灼伤)。

3.1.12

光过敏 **photoallergy**

一种获得性免疫反应,皮肤第一次接触化学物质和光线时不产生,要需经过一周或两周的诱导期才能观察到皮肤反应。

3.1.13

光遗传毒性 **photogenotoxicity**

一种在遗传学水平发生的基因毒性反应,细胞暴露于无遗传毒性剂量的紫外线/可见光和无遗传毒性的化学物质时诱发的反应。

3.1.14

光致癌性 **photocarcinogenicity**

由于重复使用光线照射和某一化学物质而诱发的致癌性。如果某一化学物具有增强紫外线诱发肿瘤形成的作用,可用术语“光协同致癌作用(photo co-carcinogenesis)”。

3.2 缩略语

下列缩略语适用于本标准。

3.2.1 IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry): 国际纯粹与应用化学联合会。

3.2.2 NR (Neutral Red) 中性红[化学名为 3-氨基-7-二甲氨基-2-甲基吩嗪盐酸盐(3-amino-7-dime-

thyl amino-2-methylphenazine hydrochloride)],CAS 编号:553-24-2。

4 试验基本原则

光毒性是指应用于机体的物质经暴露于光线后诱发或增强(在低剂量水平时明显)的毒性反应,或者全身应用一种物质后由皮肤光照引发的反应。体外 3T3 中性红摄取光毒性试验可以用于鉴定受试物暴露于光照后由活性化学物质诱导产生的潜在光毒性。本试验通过比较暴露于化学物质的细胞在有光照和无光照条件下细胞活性相对降低的值评价光细胞毒性,由本试验鉴定的物质很可能具有体内光毒性,这种作用或者由于全身应用后分布于皮肤产生,或者经局部应用后产生。

本试验方法建立的基础是比较有或无非细胞毒性剂量的刺激性光照射情况下化学品的细胞毒性。细胞毒性是以受试物在光照射处理 24 h 后,与受试物浓度相关的细胞摄取活体染料中性红的还原量来表示的。中性红是一种弱的阳离子染料,极易以非离子扩散的方式穿透细胞膜并在细胞溶酶体内聚集。细胞表面的改变或溶酶体膜敏感性的改变导致溶酶体脆性增高等变化,并逐渐不可逆。这种变化由外来物质的作用引起,导致细胞吸收和连接 NR 的能力下降。这样就有可能区分活的、损伤的或死亡的细胞。这是本试验的基础。

Balb/c 3T3 细胞(见 5.2.1)经 24 h 培养形成单层。每种受试物用两块 96 孔培养板,将 8 个不同浓度的受试化学物质预培养 1 h。接着将其中一块培养板暴露于无细胞毒性的最高光照剂量下,另一块培养板置于暗处。然后两块培养板都用细胞培养基代替处理培养基再培养 24 h,中性红摄取测定细胞活性。以占未处理阴性对照组的百分比表示细胞活性,分别计算每一个试验浓度的值。通过比较有光照和无光照下获得的浓度反应来预测潜在光毒性,通常用 IC_{50} 表示,即与未处理对照相比细胞活性抑制 50% 的浓度。

5 试验方法

5.1 试验前须知

5.1.1 光化学特性

许多种类的化学物质能诱导产生光毒性效应,它们的共同特点是在光的波长范围内能够吸收光能量。按照光化学第一定律(Grotthus-Draper 定律),只有吸收足够的光量子才能发生光化学反应。因此,在考虑进行生物学试验前,应该按 OECD 试验指南 101 的方法先测定受试化学物质的 UV/可见光吸收光谱。如果摩尔消光/吸收系数小于 $10\text{ L}\times\text{mol}^{-1}\times\text{cm}^{-1}$,则该化学物质不可能具有光反应性。该化学物质不必进行本项光毒性试验,或任何其他测定负光化学效应的生物学试验,见附录 A。

5.1.2 预测范围

对体外 3T3 中性红摄取光毒性试验的可靠性和相关性的历史评价结果表明,本试验方法能预测动物和人的体内急性光毒性效应。本试验不能用于预测化学物质与光线联合作用可能产生的其他副效应,如光基因毒性、光过敏性或光致癌性,也不能用于评价光毒性的毒力大小。此外,本试验也不能阐明光毒性的间接机制、受试物质的代谢作用或混合作用。

5.1.3 新陈代谢系统

尽管新陈代谢系统的使用是所有预测潜在遗传毒性和致癌性体外试验的普遍要求,但迄今为止,在光毒理学中,无论在体内还是在体外,极少存在化学物质产生光毒素作用需要代谢活动转化的情况。因此,无需考虑也无科学证据表明本试验方法需要使用新陈代谢活化系统。

5.2 试验准备

5.2.1 细胞

选用永生化小鼠成纤维细胞系 Balb/c 3T3,建议细胞株来源于美国典型物质保藏中心(ATCC)或欧洲细胞培养物保藏中心(ECACC)。如果培养条件能满足细胞的特殊需要,其他细胞或细胞系也可用于本试验,但必须证明其等同性。

应该定期检查细胞确保无支原体污染,只有无污染才能被使用。

按本标准规定的质量控制步骤定期检查 Balb/c 3T3 细胞的 UV 敏感性非常重要。由于细胞对 UVA 的敏感性随传代数的增多可能增高,因此,应使用可获得的最少传代数的细胞,传代次数最好少于 100 次,见 5.2.4 和附录 B。

5.2.2 培养基和培养条件

常规细胞传代和试验过程应使用合适的培养基和培养条件。对于 Balb/c 3T3 细胞,用二甲基醚培养基(DMEM)补充 10%新生小牛血清、4 mM 谷氨酰胺、青霉素(100IU)和链霉素(100 $\mu\text{g}/\text{mL}$),在 37℃,5%~7.5% CO_2 (视缓冲液不同而定,见 5.2.4),湿润条件下培养。尤其重要的是细胞培养条件应确保细胞或细胞系的细胞周期在正常的历史记录范围内。

5.2.3 培养物制备

来自冷冻保存的细胞培养物以一个合适的密度接种到培养基,并在用于光毒性试验前至少传代一次。细胞应以适当的密度接种到培养基中用于试验,细胞接种密度应保证在试验结束时,也即在接种 48 h 后测定细胞活性时,仍未达到完全融合。对生长在 96 孔培养板中的 Balb/c 3T3 细胞,建议细胞接种密度为 1×10^4 个细胞/孔。

对每种受试化学物质,细胞同时接种在 2 个 96 孔培养板上,整个试验过程中按相同的培养条件培养,区别在于一块培养板被照射(+Irr),而另一块培养板置于暗处(-Irr)。

5.2.4 受试化学物质制备

除非有稳定性数据证明储存液可接受,否则受试物必须在使用前新鲜配制直接使用。建议所有的化学物质操作和细胞处理初期都应避免受试物在光激活或光降解的光线条件下进行。

受试物应溶解在缓冲盐溶液中,例如 Earl's 平衡盐溶液(EBSS)或其他生理平衡盐溶液,缓冲盐溶液应不含蛋白质成分和光吸收成分(如 pH 指示剂色素和维生素),以避免照射时产生干扰。照射期间,细胞要在 CO_2 培养箱外维持约 50 min,因此,应小心避免培养基的碱性变化。如果选用类似 EBSS 的弱性缓冲液,则应使细胞在 7.5%的 CO_2 培养条件下尽快恢复,如果细胞只在 5%的 CO_2 条件下培养,则应选用更强缓冲作用的缓冲盐溶液。

水中溶解度有限的受试化学品应当溶解在适当的溶剂中,溶剂的体积应当在所有培养物中保持一致,即在阴性(溶剂)对照组和所有受试物浓度组保持一致,并且无细胞毒性。受试物浓度的选择应避免出现沉淀和溶液呈现云雾状。

建议使用二甲基亚砜(DMSO)和乙醇为溶剂,其他低细胞毒性的溶剂(例如丙酮)也可使用。在使用溶剂前,必须仔细评估它们的特殊性质,例如,是否与受试物反应,是否使光毒性效应猝灭,原子团捕获特性和/或溶液中的化学稳定性。

可以使用涡旋混合和/或超声处理和/或加热到适当温度等方法辅助溶解,除非这些操作会影响到受试物的稳定性。

5.2.5 照射条件

5.2.5.1 光源

选择合适的光源和滤光片是光毒性试验关键的因素。体内光毒性反应通常与 UVA 和可见光区域相关,而与 UVB 相关性小,但 UVB 却具有较高的细胞毒性。随着波长从 313 nm 到 280 nm 变化,细胞毒性增加约 1 000 倍。选择合适光源必须符合的标准应包括:光源发射的光波长能被受试物吸收(吸收光谱),光的剂量(在一个合理的暴露时间内能达到的剂量)能满足已知光毒性化学物质的检测。此外,所用的波长和剂量不能有益于试验系统,如(红外区域)热量散发。

用太阳光模拟器模拟太阳光是一种理想的人造光源。经滤过的太阳光模拟器发出的光能分布应接近于室外自然光。氙弧灯和(掺杂)汞金属的卤化物灯常被用作太阳光模拟器。后者具有散热少和价格便宜的优点,但与太阳光的匹配程度不如氙弧灯。由于所有太阳光模拟器都发射出相当数量的 UVB,因此,它们应经过适当的过滤以削弱 UVB 波长的高细胞毒性。

由于所有细胞培养塑料材料都含有 UV 稳定剂,因此透过同类型 96 孔板盖的光谱都应被检测。不必过于考虑因滤光片或设备不可避免的滤过效应而导致的光谱削弱,因为即使去除这些滤过作用,其光谱分布也不会与标准的室外日光范围有太大偏离。经滤过的太阳光模拟器光谱分布资料见附录 B。

5.2.5.2 剂量

每次进行光毒性试验前应用一个合适的宽波段紫外线-照度计(UV 照度计)对光的强度(辐照度)做常规检测,透过 96 孔板盖的光线强度也应检测。UV 照度计必须经过校准,并检查其性能,推荐使用同一类型和同样校准的二支 UV-照度计互为参考,以达到检查仪器性能的目的。理想的情况下,在更长的时间间隔后,应使用分光照度计(spectroradiometer)测定过滤光源的光谱辐射度,并校准宽波段 UV-照度计的刻度。

剂量为 5 J/cm² 的光线(UVA 范围内测定)证实对 Balb/c 3T3 细胞无毒性作用,但足以有效地激发化学物质产生光毒性反应。例如在 50 min 内达到 5 J/cm² 剂量,辐照度调到 1.7 mW/cm²,见附录 B 图 B.2。如果使用另外的细胞系或不同的光源,照射剂量必须校准,以使剂量的选择对细胞无害并足以对标准光学毒性物质产生激发作用。光照射暴露时间按式(1)计算:

$$t = \frac{H \times 1\,000}{E \times 60} \dots\dots\dots(1)$$

式中:

- t——照射时间,单位为分(min);
- H——照射剂量,单位为焦耳每平方米(J/cm²);
- E——光强度,单位为毫瓦特每平方米(mW/cm²)。

5.3 试验条件

5.3.1 受试物浓度

应当通过剂量范围试验(预试验)确定有光照(+Irr)和无光照(-Irr)条件下受试物的浓度范围,预试验对于评估受试物在试验开始时和 60 min 内(或其他任何处理时间)的溶解性很有用,因为溶解性可能在试验期间或暴露过程中发生变化。为避免不适当的培养条件,以及强酸性或强碱性化合物产生的毒性,加有受试物细胞培养基的 pH 值范围应为 6.5~7.8。

受试物最高浓度应在生理试验条件下确定,例如应避免出现渗透性和极端的 pH 值。视受试物性质不同,有必要考虑限制受试物最高试验浓度的其他物理化学因素。溶解性低的化学物质,如果在其最高溶解饱和点不具有毒性,则应当用该物质所能达到的最高溶解浓度进行试验。总之,应避免受试物在任何浓度出现沉淀。受试物的最高浓度不应超过 1 000 μg/mL,1 kg 溶剂中所溶解的有渗透作用的微粒的量(同渗重摩)不应超过 10 mmolar。8 个受试物浓度的几何稀释序列应采用同一稀释因子。

如果有资料表明(如范围确定试验)在暗试验条件下(-Irr)受试物在达到临界浓度时无细胞毒性,但是在光线照射下(+Irr)具有较高的细胞毒性,这时,有光照试验(+Irr)浓度范围的选择应不同于无光照试验(-Irr)浓度范围的选择,以符合质量控制的要求。

5.4 质量控制

5.4.1 细胞光敏感性,建立历史数据

应该通过暴露于越来越高剂量的光线评估细胞活性,以定期(约每传代 15 次)检查细胞对光线的敏感性。包括远高于体外 3T3 NRU 光毒性试验使用剂量在内的多个剂量的照射水平都可用于这一检测。通过测定光源的 UV 部分可以容易的对这些照射剂量水平加以定量。细胞按本标准描述的密度接种,次日进行照射,一天后采用中性红摄取检测确定细胞活性。检测结果应当表明最高无细胞毒性剂量(如 5 J/cm² UVA),并足以对参考化学物质(见表 1)进行正确分类。

5.4.2 光线敏感性,检查当前试验

试验应符合的质量标准为:光线照射下(+Irr)阴性/溶剂对照组的细胞活性与无光线照射下(-Irr)阴性/溶剂对照组的细胞活性相比大于 80%。

5.4.3 溶剂对照的活性

阴性对照组中性红提取物测得的绝对光密度 ($OD_{540 \text{ NRU}}$)表明在试验的两天内以 1×10^4 个细胞/孔密度接种的细胞是否以正常的倍增时间生长。试验应符合质量标准:未处理对照组平均 $OD_{540 \text{ NRU}} \geq 0.4$, 即约 20 倍于背景溶剂吸光值。

5.4.4 阳性对照

每一次光毒性试验都应同时用某个已知的光毒性化学物质进行试验。推荐使用氯丙嗪(CPZ)。据历史资料,试验可接受标准为:

CPZ 有光照(+Irr): $IC_{50} = 0.1 \mu\text{g/mL} \sim 2.0 \mu\text{g/mL}$,

CPZ 无光照(-Irr): $IC_{50} = 7.0 \mu\text{g/mL} \sim 90.0 \mu\text{g/mL}$,

光刺激因子(PIF): $PIF > 6$ 。

阳性对照物的历史数据应当记录。

其他光毒性化学物质,若其化学分类或溶解性已被评估过,亦可用于同步阳性对照物替代 CPZ。

5.5 试验步骤

5.5.1 第一天

加 100 μL 培养基于 96 孔组织培养板的外围孔(空白对照),在其余孔中加入 100 μL 密度为 1×10^5 个细胞/mL 的细胞悬液($= 1 \times 10^4$ 个细胞/孔)。每次试验都应制备两个板,包括相同的受试物浓度序列、溶剂对照和阳性对照。

细胞培养 24 h 直至形成半融合单层。在此培养期间细胞恢复活力、贴附和指数增长。

5.5.2 第二天

去除培养液,用 150 μL 孵育缓冲液轻洗两次。加 100 μL 含适当浓度受试物或溶剂(溶剂对照)的缓冲液到孔中,受试物设置 8 个不同浓度,在暗处孵育含受试物的细胞 60 min。

两块培养板随机选择,其中一块用于检测细胞毒性(-Irr),即对照板;另一块用于检测光细胞毒性(+Irr),即处理板。

处理板进行+Irr 暴露,以无细胞毒性的最高光线剂量(见附录 B)透过 96 孔板盖室温下照射约 50 min,在室温下将对照板(-Irr)置于暗盒内 50 min(=光线暴露时间)。

去除试验溶液,用 150 μL 孵育用不含受试物的缓冲液小心洗两次。用培养基代替缓冲液孵育过夜(18 h~22 h)。

5.5.3 第三天

5.5.3.1 显微镜观察

相差显微镜察细胞生长情况、形态和细胞单层的完整性。记录细胞形态和生长的变化。

5.5.3.2 中性红摄取试验

用 150 μL 预温的缓冲液冲洗细胞,轻轻敲打去除清洗溶液。加 100 μL 含 50 $\mu\text{g/mL}$ 中性红无血清的培养基,按照 5.2.2 孵育 3 h。

孵育后,吸除中性红培养基,用 150 μL 缓冲液清洗细胞。以吸干或离心方式倾倒和去除多余缓冲液。

准确加 150 μL 中性红洗脱液(用水、乙醇、乙酸按 49 : 50 : 1 的比例现配)。

将 96 孔板置于微量滴定板振荡器快速震荡 10 min,直到中性红从细胞中提取出来并形成均匀溶液。

用分光光度计在 540 nm 下以空白试剂为参照测量中性红提取物的光密度。试验数据用电子格式保存,便于随后分析。

6 试验结果

6.1 试验数据的质量和数量

如果受试化学物质的浓度范围内细胞活性下降到 50% (IC_{50}),那么无论在有光照还是在无光照下

得到的试验数据都应进行有意义的浓度-反应分析。如果发现细胞毒性,不管是整个浓度范围和还是其中任何一个浓度,两者都应符合一条由试验数据拟合成的曲线。

对于明显阳性和明显阴性的结果,除此主试验外,再加上一个或多个范围确定试验支撑就足够了,无需做重复试验进行确认。

模棱两可的、临界范围附近的和不清楚的结果需要进一步试验进行澄清,在这种情况下,应该考虑改变试验条件。试验条件的改变可能包括浓度范围或间距、预孵育时间、照射暴露时间等。对于水不稳定性化学物缩短暴露时间或许比较合适。

6.2 试验结果处理

6.2.1 为评价试验数据,可计算光刺激因子(PIF)或平均光效应(MPE)。

6.2.2 为计算光细胞毒性的数值,必须通过适当的连续剂量-反应曲线(模型)对离散的剂量反应值进行约算。对数据进行曲线拟合通常采用非线性的回归方法,为评估数据变异性对拟合曲线的影响,推荐采用共益程序(或靴带程序 bootstrap procedure)进行分析。

6.2.3 预测模型 1:光刺激因子(PIF)

参考欧盟指令 EU 67/548/EEC 附录 V B. 41“体外 3T3 中性红摄取光毒性试验方法”,计算 PIF 值:

- a) 如果在有光照(+Irr)和无光照(-Irr)两种情况下都得到完整的浓度响应曲线,通过式(2)计算 PIF 值:

$$PIF = \frac{IC_{50}(-Irr)}{IC_{50}(+Irr)} \dots\dots\dots (2)$$

- b) 如果一个化合物只有在有光照(+Irr)时有细胞毒性,而在无光照(-Irr)时无细胞毒性,即使试验结果表明其可能具有潜在光毒性,也无法计算 PIF。在这种情况下,如果用受试物最高浓度(C_{max})进行无光照(-Irr)下的细胞毒性试验,则可利用 C_{max}通过式(3)计算“>PIF”值:

$$> PIF = \frac{C_{max}(+Irr)}{IC_{50}(-Irr)} \dots\dots\dots (3)$$

- c) 如果受试物在达到允许的最高浓度值也不表现细胞毒性而使得 IC₅₀(+Irr)和 IC₅₀(-Irr)的值无法计算,这就表明该受试物无潜在光毒性。这时,用“PIF = * 1”描述结果,即式(4):

$$PIF = * 1 \frac{C_{max}(-Irr)}{C_{max}(+Irr)} \dots\dots\dots (4)$$

在利用式(3)和式(4)计算的情况下,预测受试物的潜在光毒性时应仔细考虑受试物在试验中所达到的浓度。

6.2.4 预测模型 2:平均光效应(MPE)

平均光效应(MPE)是一种基于比较完全浓度反应曲线的计算方法,它的定义是指全部具有代表性的光效应数值的加权平均数。MPE 的值通过式(5)计算:

$$MPE = \frac{\sum_{i=1}^n w_i PE_G}{\sum_{i=1}^n w_i} \dots\dots\dots (5)$$

任何一个浓度(C)的光效应(PE_C)是指反应效应(RE_C)和剂量效应(DE_C)的乘积,即 PE_C = RE_C × DE_C。反应效应(RE_C)是指无光照和有光照观察到的反应之间的差别,即 RE_C = R_C(-Irr) - R_C(+Irr)。剂量反应由式(6)得出:

$$DE_C = \left| \frac{C/C^* - 1}{C/C^* + 1} \right| \dots\dots\dots (6)$$

其中 C* 代表等值浓度,即浓度为 C 的 -Irr 反应相当于 +Irr 时反应的浓度,如果由于 +Irr 曲线中

的反应值整体高于或低于 $R_c(-Irr)$ 而使 C^* 不能得出,则剂量效应定为 1。加权因子 W_i 由最高反应值得出,即 $W_i = \text{MAX} \{R_i(+Irr), R_i(-Irr)\}$ 。格子浓度 C_i 指选择落在由试验浓度的值确定的每个浓度间隔内的相同数量的点。MPE 的计算严格局限于最高浓度下的两条曲线中,至少有一条曲线的反应值仍出现至少 10% 的情况。如果这一最高浓度高于 +Irr 试验中的最高浓度,则 +Irr 的残余部分设定为反应值“0”。依据 MPE 的值是否大于正常选择设定的临界值 ($MPE_c = 0.15$),对化学物质进行光毒性分类。

6.2.5 计算 PIF 和 MPE 的软件包可从 OECD 官方网站获得。

6.3 结果解释

6.3.1 由预测模型得出的数值,如果:

- 受试物 $PIF < 2$, 或受试物 $MPE < 0.1$, 预测“无光毒性”;
 - $2 < \text{受试物 } PIF < 5$, 或 $0.1 < \text{受试物 } MPE < 0.15$, 预测“可能具有光毒性”;
 - 受试物 $PIF \geq 5$, 或受试物 $MPE > 0.15$, 预测“光毒性”。
- 但是在利用预测模型 PIF 的情况下:
- 如果仅得到一个“ $>PIF$ ”,那么任何大于 1 的值均表明受试物具有潜在光毒性;
 - 如果仅得到一个“ $PIF = *1$ ”,则受试物无潜在光毒性。

6.3.2 对于任何一间实验室最初建立这一检测方法,应在进行受试物光毒性检测前应先列于表 1 的参考物质进行试验。试验得到的 PIF 值和 MPE 值应接近于表 1 中所列数值。

表 1 参考物质的光毒性测定数据

化学物名称和 CAS 编号	PIF	MPE	吸收峰	溶 剂
盐酸胺碘酮 Amiodarone HCL [19774-82-4]	>3.25	$0.27 \sim 0.54$	242 nm 300 nm(肩峰)	乙醇
盐酸氯丙嗪 Chlorpromazine HCL [69-09-0]	>14.4	$0.33 \sim 0.63$	309 nm	乙醇
诺氟沙星 Norfloxacin [70458-96-7]	>71.6	$0.34 \sim 0.90$	316 nm	乙腈
蒽 Anthracene [120-12-7]	>18.5	$0.19 \sim 0.81$	356 nm	乙腈
原卟啉 Protoporphyrin IX, Disodium [50865-01-5]	>45.3	$0.54 \sim 0.74$	402 nm	乙醇
组氨酸 L - Histidine [7006-35-1]	no PIF	$0.05 \sim 0.10$	211 nm	水
六氯酚 Hexachlorophene [70-30-4]	$1.1 \sim 1.7$	$0.00 \sim 0.05$	299 nm 317 nm(肩峰)	乙醇
十二烷基硫酸钠 Sodium lauryl sulfate [151-21-3]	$1.0 \sim 1.9$	$0.00 \sim 0.05$	无吸收	水

6.3.3 数据说明

如果光毒性效应只在最高试验浓度(特别是水溶性受试物)时获得,要评价此受试物的危害性可能还需做进一步考虑,包括受试物皮肤吸收性和累积的可能性,或进行其他试验,如化学物质的体外动物皮肤、人类皮肤或皮肤模型的检测。

体外 3T3 中性红摄取光毒性试验得到的阴性结果 ($PIF < 5$ 或 $MPE < 0.1$) 表明受试物在试验所用的培养条件下对培养的哺乳动物细胞无光毒性。

如果没有毒性被证实 (+Irr 和 -Irr),或者由于受试物的低溶解性使受试物的试验浓度受到限制,那么受试物与检测方法的兼容性可能值得怀疑,应采用其他模型进行确认试验。

7 试验报告

7.1 试验报告必须包含以下信息

7.1.1 受试物

- 证明材料,统一名称,IUPAC 和 CAS 编码(如果已知);
- 物理性质和纯度;
- 与试验相关的物理化学特性;
- UV/vis 吸收光谱;
- 稳定性和光稳定性(如果已知)。

7.1.2 溶剂

- 溶剂选择的理由;
- 受试物在溶剂中的溶解性;
- 处理培养基中溶剂的百分比。

7.1.3 细胞

- 细胞类型和来源;
- 无支原体资料;
- 细胞传代数(如果已知);
- 细胞的光线敏感度,用光毒性试验中相同的光照设备测定。

7.1.4 试验条件(1):处理前后的孵育

- 培养基的类型和组成;
- 孵育条件(CO_2 浓度,温度,湿度);
- 孵育时间(处理前,处理后)。

7.1.5 试验条件(2):用受试物处理

- 有光照和无光照条件下,选择受试物浓度的理由;
- 受试物溶解度有限而且无细胞毒性的情况下,最高浓度试验的理由;
- 处理培养基的类型和组成(缓冲盐溶液);
- 化学物处理持续时间。

7.1.6 试验条件(3):光照

- 所用光源选择的理由;
- 光源和照度计的制造商和类型;
- 光源的发光光谱特性;
- 所用的滤光器的发射和吸收特性;
- 照度计的特性及其校准的详细资料;
- 光源与试验系统的距离;
- 在此距离内的 UVA 辐照度,以 mW/cm^2 表示;
- 暴露于 UV/vis 下的持续时间;
- UVA 剂量(辐照度 $\times$ 时间),以 J/cm^2 表示;
- 光照期间细胞培养的温度和同时放置在暗处的细胞培养温度。

7.1.7 试验条件(4):中性红活性试验

- 中性红处理培养基的组成;
- 中性红孵育时间;
- 培养条件(CO_2 ,温度,湿度);
- 中性红提取的条件(提取剂,时间);

- 用于读取中性红光密度的分光光度计的波长；
- 第二波长(参考),如果使用；
- 分光光度计空白的容量,如果使用。

7.1.8 结果

- 每个受试物浓度得到的细胞活性,以平均活性百分率表示,同时测定溶剂对照；
- 同时进行的+Irr 和 -Irr 试验中获得的浓度反应曲线(受试物浓度对相对细胞活性)；
- 浓度-反应曲线的数据分析,可能的话,列出电脑或人工计算 $IC_{50}(+Irr)$ 和 $IC_{50}(-Irr)$ 的方法；
- 比较在有光照和无光照下获得的两个浓度反应曲线,通过 PIF 或通过 MPE 计算；
- 试验接受标准:同时进行溶剂对照；
 - 有光照和无光照条件下细胞绝对活性(NR 提取物的光密度)；
 - 阴性和溶剂对照的历史数据,平均值和标准偏差；
- 试验接受标准:同时进行的阳性对照；
 - 阳性对照化学物的 $IC_{50}(+Irr)$ 和 $IC_{50}(-Irr)$, PIF 或 MPE；
 - 阳性对照化学物的历史实验数据: $IC_{50}(+Irr)$ 、 $IC_{50}(-Irr)$ 、PIF 和 MPE,平均值和标准偏差。

7.2 结果讨论

7.3 结论

附 录 A
(资料性附录)

3T3 NRU 光毒性试验在化学品光毒性连续试验中的作用

A.1 3T3 NRU 光毒性试验在化学品光毒性连续试验中的作用,见图 A.1。

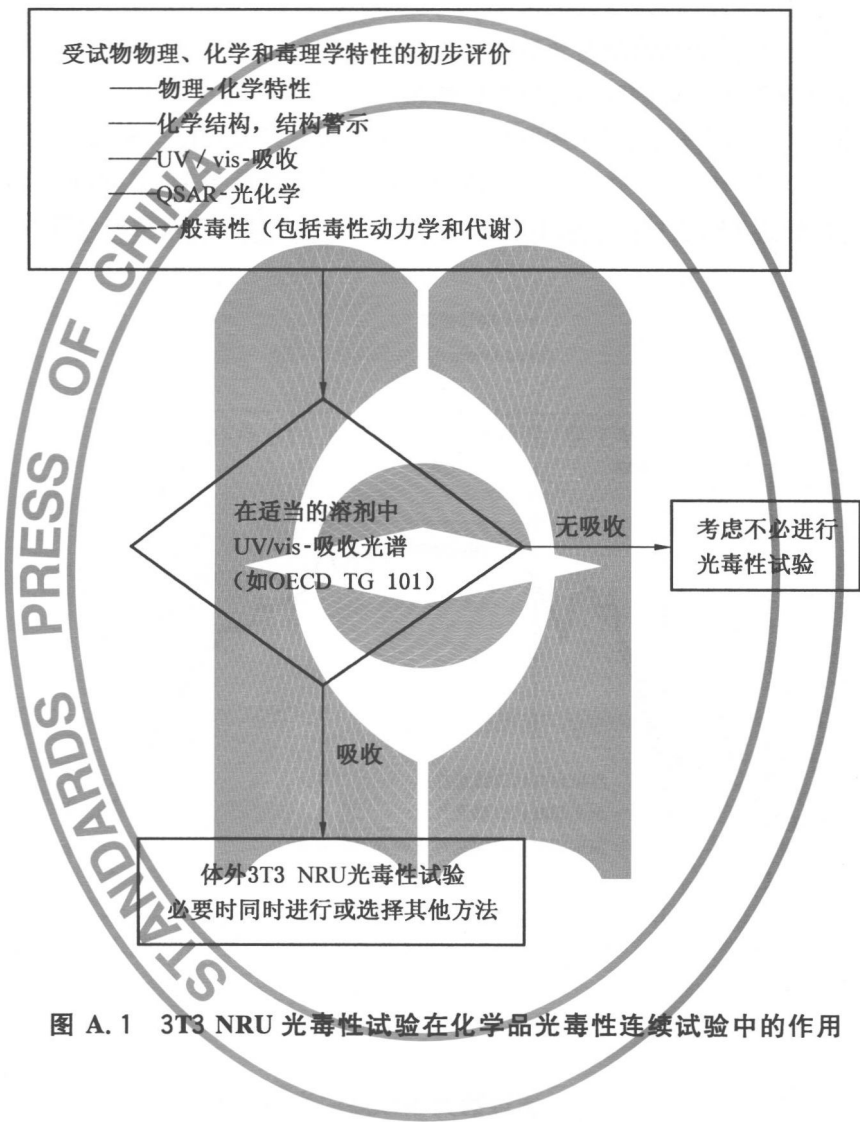


图 A.1 3T3 NRU 光毒性试验在化学品光毒性连续试验中的作用

附 录 B
(资料性附录)
光模拟器的谱能和细胞的敏感性

B.1 光模拟器谱能分布

图 B.1 显示一个可接受的经滤过的光模拟器的光谱能量分布,资料来源于 3T3 NRU 光毒性验证试验中(掺杂)金属卤化物灯。分别显示两个不同滤光片和 96 孔培养板盖的滤过效果。H2 滤光片仅用于能耐受高剂量 UVB 的试验系统(如皮肤模型试验和红细胞光溶血性试验)。在 3T3 NRU 光毒性试验中应使用 H1 滤光片。图 B.1 显示培养板盖的滤过作用主要见于 UVB 区域,辐射光谱中仍残留足够量的 UVB 足以激活类似胺碘酮的化学物质,它们在 UVB 区域具有典型的光吸收作用。

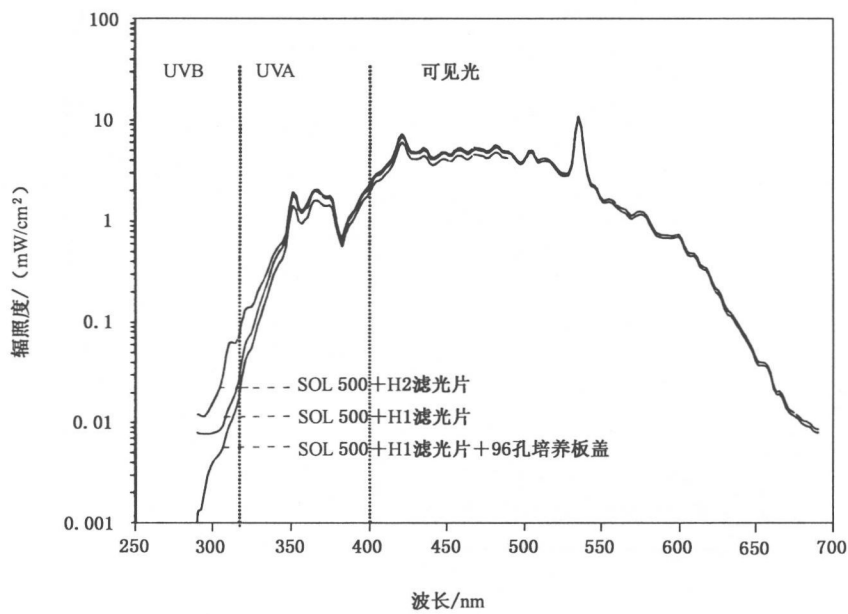


图 B.1 滤过的光模拟器的光谱能量

B.2 细胞的光照敏感性(UVA 范围内测定)

图 B.2 显示 Balb/c 3T3 细胞对光模拟器发射光线的敏感性,资料来源于 3T3 NRU 光毒性验证试验,数据在 UVA 范围内测定。图示在预验证研究中 7 个不同的实验室得到的数据。两条空心标志的曲线来自衰老的细胞(超次数传代),必须更新细胞才能用于试验。标记实心符号的曲线表示可接受的光照耐受水平。从这些数据得出最高的无细胞毒性照射剂量为 5 J/cm²(垂直虚线),水平虚线显示最高可接受的照射效应,见 5.4.2。

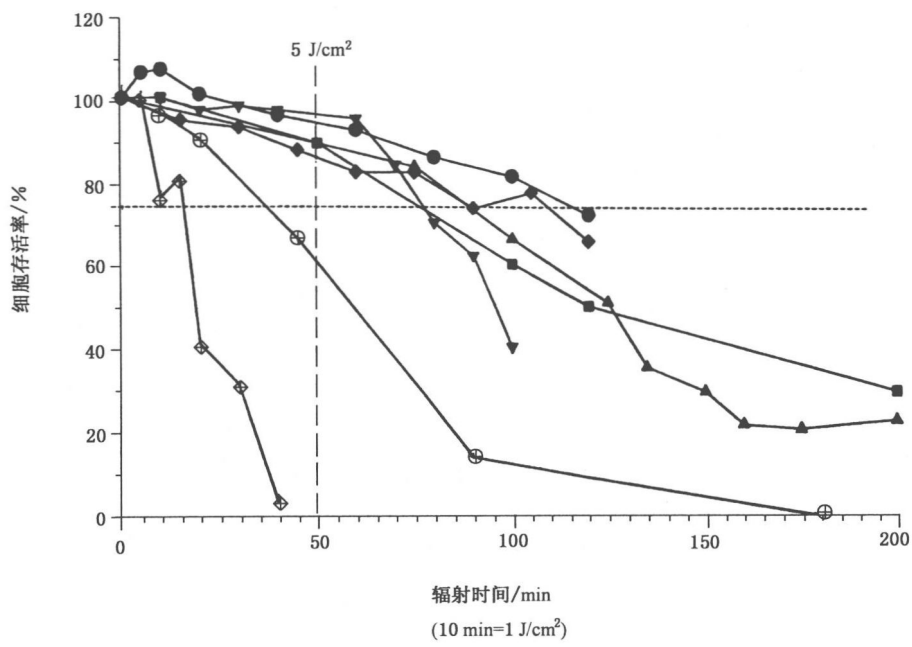


图 B.2 Balb/c 3T3 细胞的光照敏感性(在 UVA 范围内测定)

中 华 人 民 共 和 国
国 家 标 准
化学品 体外 3T3 中性红摄取
光毒性试验方法
GB/T 21769—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

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 1.25 字数 25 千字
2008 年 7 月第一版 2008 年 7 月第一次印刷

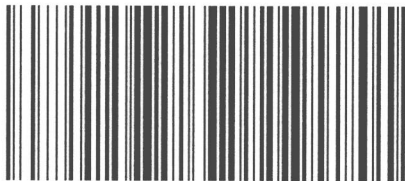
*

书号: 155066 · 1-32202 定价 18.00 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 21769-2008