



中华人民共和国国家标准

GB/T 35526—2017

化学品 (抗)雄性性征短期筛选试验 大鼠 Hershberger 生物检测法

Chemicals—A short-term screening assay for (anti) androgenic properties—
Hershberger bioassay in rats

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

中 华 人 民 共 和 国
国 家 标 准
化 学 品 （ 抗 ） 雄 性 性 征 短 期 筛 选 试 验
大 鼠 **Hershberger** 生 物 检 测 法
GB/T 35526—2017

*

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 (100029)
北 京 市 西 城 区 三 里 河 北 街 16 号 (100045)

网 址 : www.spc.org.cn

服 务 热 线 : 400-168-0010

2018 年 1 月 第 一 版

*

书 号 : 155066 · 1-58303

版 权 专 有 侵 权 必 究

前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准与经济合作与发展组织(OECD)化学品测试方法 NO.441《大鼠 Hershberger 生物检测：(抗)雄性性征短期筛选试验》[Hershberger bioassay in rats: A short-term screening assay for(anti) androgenic propertiest](2009)技术内容一致。

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：中华人民共和国上海出入境检验检疫局、中国检验检疫科学研究院、复旦大学。

本标准主要起草人：姚丽芳、陈俊水、蒋伟、陈相、陈会明、张静、李蔚、缪文彬、赵颐晴、郑华、邬春华。

引 言

1998年,OECD开始修订并发展检测和筛选内分泌干扰物的试验方法。上述活动之一就是发展了大鼠 Hershberger 生物筛选试验方法。通过在医药工业使用几十年后,1962年,该方法首次被官方专业委员会作为一种雄性激素化学品的标准筛选工具。2001年—2007年,Hershberger 生物筛选试验进行了大量的验证项目:包括方法背景资料研究、具体试验方法汇总、解剖技术的发展以及实验室内部和实验室之间试验方法可靠性和重现性的验证研究。上述验证研究使用雄性激素参照物(丙酸睾酮)、两种合成的雄性激素(醋酸去甲雄三烯醇酮和甲基睾酮)、抗雄性激素药物(氟他胺)、天然雄性激素合成抑制剂(非那雄胺)、几种弱抗雄性激素农药(利谷隆、乙烯菌核利、速克灵和 p,p'-DDE)和 5 α -还原酶抑制剂(非那雄胺)和两种阴性对照物(二硝基苯酚和壬基苯酚)。本标准是长期生物鉴定试验和验证试验的经验总结。

Hershberger 生物筛选试验是一种使用雄性生殖系统中有关组织的短期在体筛选方法。试验始于 20 世纪 30 年代,40 年代的时候增加了雄性生殖系统中的雄性激素反应肌。20 世纪 60 年代,使用标准方法对 700 多种可能的雄性激素进行了评估。本标准是基于检测去势后的雄性大鼠体内五种雄性激素依赖组织质量改变的一种筛选方法。本方法用于评估化学品类似雄性激素激动剂、雄性激素拮抗剂或者 5 α -还原酶抑制剂的生物活性。五种雄性激素依赖组织为腹侧前列腺(VP)、精囊(SV)(包括液体和凝固腺)、提肛肌-球海绵体肌复合体(LABC 肌)、成对的尿道球腺(COW)和龟头(GP)。在去势的雄性大鼠中,受雄性激素的影响,上述五种组织的质量会发生相应增加。同一受试动物,使用雄性激素参照物后五种组织的质量均发生增长,再使用雄性激素拮抗剂能使五种组织的质量均发生下降。三个阶段的验证试验证实,Hershberger 生物筛选试验的首选动物模型是去势的青春期的雄性大鼠。

Hershberger 生物筛选试验是一种雄性激素受体激动剂、雄性激素拮抗剂和 5 α -还原酶抑制剂的筛选方法。作为提供单一的内分泌机理数据的体内筛选试验方法被包括在 OECD 内分泌干扰化学品的测试和评估框架第 3 级中。本试验包含在内分泌干扰物体内和体外系列试验中,用于判断受试物是否对内分泌系统产生潜在干扰作用,从而导致人类健康和环境的危害。

考虑到动物福利,未经去势的刚断奶的雄性大鼠也可以作为 Hershberger 生物筛选的替代动物模型。这种方法也通过验证,但是,微量的抗雄性激素验证研究中未经去势的刚断奶的雄性大鼠不能够产生一致的响应。因此,本标准中并不包括这项试验的内容。

作为雄性激素受体的配体,雄性激素受体激动剂和拮抗剂可分别激活或抑制受体控制的基因转录。此外,在一些雄性激素的靶组织中,某些化学品会抑制睾酮转化为更有活性的二氢睾酮(5 α -还原酶抑制剂)。这些物质有可能对生殖和发育产生不利影响。因此,需要迅速评估并评价化学品是否是雄性激素受体激动剂、拮抗剂或 5 α -还原酶抑制剂。虽然通过受体结合、体外报告基因的转录激活效应检测到的雄性激素配体对受体的亲和力与其产生危害有一定关系,但并不是潜在危害的决定性因素。其他因素还包括进入体内之后的代谢活化、灭活、靶器官中的分布情况和体内的清除情况。这就需要在筛选化学品的时候在相关的条件和暴露下进行。如果化学品的吸收—分布—代谢—清除(ADME)已知,则体内的评估就相对不重要一些。在雄性激素刺激下,去势的青春期的雄性大鼠体内雄性激素依赖组织生长迅速、明显。啮齿类动物,特别是大鼠,广泛用于毒性危害研究。因此,本试验中,使用去势的青春期的雄性大鼠和五种靶组织筛选雄性激素受体激动剂、拮抗剂和 5 α -还原酶抑制剂。

本标准的可信性和重现性是通过 OECD 实验室内部和实验室间的比对验证了的。所有的雄性激素和雄性激素拮抗剂的操作步骤均在本标准中体现。

虽然在检测抗雄性激素的验证试验中,不同实验室使用的丙酸睾酮剂量有所区别,分别为

0.2 mg/(kg·d)或 0.4 mg/(kg·d) (皮下注射),但强抗雄性激素物质和弱抗雄性激素物质的检测结果表示不同剂量的丙酸睾酮试验结果没有差别。但是,应明确丙酸睾酮的剂量不应该太高,以免影响弱雄激素受体拮抗剂的作用,也不能太低,否则,即使没有雄性激素拮抗剂的情况下,雄性激素依赖组织也不发生质量变化。

单个雄性激素依赖组织的生长反应并不完全是由雄性激素引起的。即雄性激素激动剂之外的化合物可能改变特定组织的质量。然而,几个组织同时发生反应,则证明雄性激素的特定反应机理。例如:高剂量的雌激素可以增加精囊的质量,但不会增加其他雄性激素依赖组织的质量。抗雄性激素化学品既可以是雄性激素受体拮抗剂,也可以是 5 α -还原酶抑制剂。不同组织转化成二氢睾酮不同,因此 5 α -还原酶抑制剂对不同组织具有不同的效应。与雄性激素拮抗剂氟他胺相比,抑制 5 α -还原酶的抗雄性激素非那雄胺对腹侧前列腺作用更大。这种差异可用于区别是由于雄性激素受体介导的反应还是 5 α -还原酶的介导的反应。此外,在生物进化上,雄性激素受体与类固醇激素和其他激素有关,如加强类固醇的代谢、降低血清睾酮含量,也可能抑制雄性激素依赖组织的生长,因此,Hershberger 生物筛选试验的任何阳性结果均应结合雄性激素受体和雌性激素受体结合试验、转录活化分析等体外试验或者检测类似雄性激素靶器官的体内试验,如雄性动物发育试验、15 天成年雄性动物试验、28 天或 90 天重复剂量试验进行综合评价。

经验表明,雄性激素比抗雄性激素更加罕见。因此,Hershberger 生物筛选试验更广泛应用于抗雄性激素的筛选。然而,雄性激素检测方法可用于甾体类或类固醇类化学品或者框架文件第 1 级或第 2 级试验结果显示具有疑似雄性激素作用的化学品的检测。类似的,与(抗)雄性激素相关的危害可以在第 5 级试验中观察得到,用于评估化学物的危害是否与内分泌有关。

所有的动物相关的程序应该符合地方动物保护标准,本标准中描述的动物保护和使用标准都是最低标准,可被地方性法规代替。

化学品 (抗)雄性性征短期筛选试验 大鼠 Hershberger 生物检测法

1 范围

本标准规定了化学品(抗)雄性性征短期筛选试验大鼠 Hershberger 生物检测法的术语和定义、试验原理、试验方法与步骤、数据与报告。

本标准适用于评估化学品类似雄性激素激动剂、雄性激素拮抗剂或 5 α -还原酶抑制剂的生物活性。

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。

GB 14925 实验动物 环境及设施

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

雄性激素效应 androgenicity

化学品对雄性激素依赖组织的促进作用。

3.2

抗雄性激素效应 antiandrogenicity

化学品抑制哺乳动物体内丙酸睾酮(TP,CAS 号 57-82-5)活性的作用。

3.3

剂量 dose

给予受试物的量。用每天单位体重动物给予受试物的质量来表示,即 mg/(kg·d)。

3.4

用量 dosage

包括剂量、染毒频率和染毒时间。

4 试验原理

4.1 通过检测五种雄性激素依赖组织在染毒前后质量的改变来评估化学品是否是雄性激素激动剂、雄性激素拮抗剂或者 5 α -还原酶抑制剂。五种雄性激素依赖组织包括腹侧前列腺(VP)、精囊(SV)(包括液体和凝固腺)、提肛肌-球海绵体肌复合体(LABC)、成对的尿道球腺(COW)和龟头(GP)。

4.2 单个雄性激素依赖组织的生长反应并不完全是由雄性激素引起的,然而,几个组织同时发生生长反应,则可证明为雄性激素效应。为了达到其灵敏度,本标准采用去势雄性大鼠,这是因为去势雄性大鼠血液循环中内源性雄性激素水平低,使得下丘脑-垂体-性腺轴无法通过代偿机制进行补偿,从而使得组织对化学品的反应最大化,而且去势后能使其靶组织质量达到最小,从而使得组织初始质量的差异最