附件1

纳米材料遗传毒性试验选择指南(草案)

纳米材料独特的物理化学性质及其与生物体相互作用特性为其在食品加工、抗菌产品生产、药物载体开发、肿瘤诊疗、体内示踪等领域的应用提供了广泛的前景。新型纳米材料的诞生为人类带来机遇的同时也带来了挑战。大量纳米材料的涌现，极大程度上增加了人体与纳米材料接触的机会，纳米材料的安全性评价成为关注的热点。如何合理评价纳米材料对人体的潜在毒性，特别是慢性或者长期毒性，预测其潜在毒性风险是目前全科学界及各相关监管部门亟需解决的问题。

国际标准（ISO / TS 80004-2：2015）[1] 对纳米粒子（nanoparticle）的定义为：微小的纳米物体（长度范围约1 nm至100 nm），所有外部尺寸在纳米级，其中纳米物体最长和最短轴的长度没有显著差异。如果尺寸差异显著（通常超过三倍），则为纳米纤维或纳米板。纳米粒子的尺寸效应和表面活性高等特点使它极易透过细胞膜，可在表面活性和蓄积性的共同作用下，对细胞遗传物质产生直接或间接的相互作用。尤其是携带金属离子的纳米粒子进入体内后有可能通过氧化应激等作用机制诱发染色体或DNA断裂[2-5]。此外，纳米材料进入人体后可能在脏器蓄积并长期存在。纳米材料的遗传毒性，现已发展成一个专门的亚分支研究领域—纳米遗传毒理学[6-7]。对纳米材料的潜在致癌和致畸作用评估，是对纳米材料对人体安全性评价中极为重要的一环。

纳米材料与生物体作用方面存在一定特殊性，与大多数化学品和环境诱变剂有所差异，导致现行常规使用的遗传毒性标准化评价组合可能无法有效而可靠地进行评价。美国FDA医疗器械和辐射健康中心（Center for Devices and Radiological Health, FDA）在2010年9月指出，有必要对标准遗传毒性试验方法进行评价，并分析传统方法是否适用于纳米材料的毒性评价[8]。经合组织（The Organization for Economic Cooperation and Development， OECD）纳米材料产品工作组（Working Party on Manufactured Nanomaterials， WPMN）于2013年11月18-19日在加拿大渥太华召开纳米材料产品遗传毒性专题研讨会，就是否需要在现有OECD遗传毒性试验指导原则范畴内对纳米材料遗传毒性测试方法进行特别调整，以及/或需要制定新的试验指导原则或指导性文件进行讨论。由于当前缺乏数据支持，与会专家建议继续对纳米材料遗传毒性相关研究数据进行深入挖掘，以确定是否需要在可能的范围内对遗传毒性试验指导原则进行相应的调整。会议期间专家就纳米材料遗传毒性评价中的共性问题达成七项共识并发布《纳米材料产品遗传毒性：OECD专家专题研讨会报告 纳米材料产品安全性系列文件N0.43》[9]。本指南参考上述文件及OECD相关遗传毒性指导原则制定，以期为纳米材料的遗传毒性评价提供参考。

1. 适用范围

本指南介绍了纳米材料体内及体外遗传毒性试验选择的基本原则，可选择的遗传毒性试验方法以及推荐使用的试验组合方案。本标准适用于纳米材料及含纳米材料产品的潜在遗传毒性评价。

二、术语和定义

遗传毒性试验 (genotoxicity test）：使用哺乳动物或非哺乳动物细胞、细菌、酵母或真菌等来检测受试物诱导的基因突变、染色体结构改变或其它DNA或基因改变的方法。[GB/T 16886.3-2011,3.3][10]

纳米材料 (nanomaterial)：材料的基本结构单元至少有一维处于纳米尺度范围(一般在1 ~ 100 nm)，并由此具有某些新特性的材料。[《材料科学技术名词》第一版] [11]

纳米粒子 (nanoparticle)：微小的纳米物体，所有外部尺寸在纳米级，其中纳米物体最长和最短轴的长度没有显著差异。如果尺寸差异显著（通常超过三倍），则为纳米纤维或纳米板。[ISO / TS 80004-2：2015，4.4][1]

受试物 (test sample)：要经过生物或化学测试或评估的材料。[GB/T 16886.5-2011,3.3][12]

聚集(agglomerate)：弱结合材料的集合或者聚集或两者的混合物，其中所得到的外表面积类似于各个组分的表面积的总和。[ISO/ TS 80004-2：2015，3.4][1]

沉降(sedimentation)：由于与连续相相比分散颗粒的密度较高，分散相产生的沉降（分离）。[ISO / TR 13097：2013，2.13，经修改] [13]

1. 遗传毒性试验

（一） 总则

遗传毒性试验是非临床安全性评价的重要内容，可用于评价体细胞诱变剂、生殖细胞诱变剂和潜在致癌物的潜在遗传毒性。其目的是通过一系列试验预测受试物是否有遗传毒性，从而对受试物的致癌性进行预测，降低人群的危害风险。纳米材料的遗传毒性试验是为了评价人体接触纳米材料的潜在遗传毒性风险。遗传毒性试验方法众多，根据试验系统不同可分为体外和体内试验；根据检测方法针对与肿瘤相关的遗传终点，可大致分为三大类，即基因突变、染色体损伤和DNA断裂。

目前没有任何单一的试验方法可同时涵盖所有遗传终点。为全面考察受试物的潜在遗传毒性风险，通常需开展一系列机制上互相补充的试验，即标准化试验组合，来进行综合性评价[10,14]。参考ICH S2(R1)，标准试验组合的选择应针对不同的遗传终点，包括体外和体内研究[14]。

纳米材料的独特理化性质及与生物相互作用的特性，使其在生物医药、食品加工、化妆品等与人体密切接触的领域具有广泛的应用前景。然而，大量文献研究显示某些纳米材料存在遗传毒性，且遗传毒性可能与纳米尺度有关。如，非纳米尺度的二氧化钛（TiO2）和氧化铜（CuO）等遗传毒性为阴性，而成为纳米尺度的纳米材料时遗传毒性试验结果可为阳性。纳米材料缓慢进入细胞又缓慢从释放，以及体内脏器分布、蓄积性和缓释效应这些特点，与普通化合物和小分子生物制品有所区别，现行经典的遗传毒性评价方法可能无法有效而可靠地进行评价。比如，与啮齿类动物肿瘤相关度最高的传统Ames试验无法有效检出纳米粒子的潜在致突变性，而体外微核试验、染色体畸变试验及彗星试验却通常可以得到阳性结果[15]。纳米材料进入体内后，长期存在并蓄积于某些脏器无法排出，是否会对细胞的增殖产生影响进而诱发肿瘤也是需要考虑的重要因素之一。研究显示大鼠静脉注射纳米粒子后血液中纳米粒子短时间内快速清除，大量纳米粒子由循环系统进入组织[16]。而主要针对化学药物设计的体内遗传毒性研究通常使用外周血作为监测窗，采样时间较短，容易对纳米粒子的遗传毒性进行误判。在开展体内毒性研究时，需要结合其体内代谢和分布研究结果来进行毒性评价，并重点关注其靶器官遗传毒性。欧洲的NANOGENOTOX联合行动就16种代表性纳米材料（包括5种纳米二氧化钛，4种合成无定形二氧化硅，6种多壁碳纳米管和1种氧化锌）开展试验研究，OECD也对文献进行了大量数据回顾工作并于2014年12月发布了关于纳米材料遗传毒性试验的建议[9]，本指南主要根据上述内容制定。

当含纳米材料的受试物需要进行遗传毒性评价时，考虑到动物实验3R原则[替代(replacement)、减少(reduction)和优化(refinement)]，首先选择体外遗传毒性试验。纳米材料的毒性特点主要表现为其体内吸收、分布、代谢和排泄过程的特殊性，体内试验能够考虑到上述影响遗传毒性的因素，针对纳米材料的体内分布和蓄积特点开展的靶器官遗传毒性研究具有重要意义。体内研究通常在体外研究基础上开展，并强调靶器官相关毒性研究。目前认为其可能的遗传毒作用机制主要包括两方面[17]，一是通过诱导活性氧大量生成从而间接导致遗传物质损伤；二是通过扩散、穿越核孔复合体和在细胞有丝分裂或减数分裂过程中被核膜包裹三种途径进入细胞核，直接作用于DNA导致遗传物质损伤。氧化应激是纳米材料诱导遗传物质损伤的最常见的作用机制之一[17]，开展遗传毒性评价时可针对氧化应激机制展开。

（二）样品制备和表征

1. 纳米材料的物理化学性质是其毒性强弱和毒性特点的重要影响因素。相同组分的材料成为纳米材料时，其生物体内代谢动力学、长期体内分布及蓄积的特征可发生明显改变[18]，其毒性与其粒径，表面修饰和分布密切相关[19]。纳米材料在理化性质上的微弱差异可直接导致其安全窗和毒性靶器官的不同。因此安全性评价需强调纳米材料的理化性质鉴定。

2. 在开展毒性评价之前，需参考ISO/TR 13014：2012、OECD ENV/JM/MONO (2016)2、ISO/TC229等相关标准，充分考察其物理化学性能和稳定性[20-22]。对于理化性质和稳定性不同的相同纳米材料，需要分别评价。如果拟评价受试物为医用纳米材料或者含纳米材料产品，应为可充分代表临床试验或上市后人拟用产品质量和安全性的样品。

3. 受试物制备的总体原则是最大程度上模拟受试物与人体实际接触的方式。分散介质可影响聚集体的大小，从而影响受试物的沉降、聚集、细胞暴露、细胞毒性、剂量选择和遗传毒性试验结果。单纯的纳米材料受试物,需充分考虑其分散性,选择合适的介质，确保分散均匀，减少团聚。含纳米材料产品（含纳米材料的基质类固体产品），如医疗器械，可参考GB/T 16886.3和GB/T 16886.12选择含纳米材料产品的浸提液[10, 23]。需根据纳米材料的释放特征选择合适的浸提介质。在合理情况下，含纳米材料固体产品的表面积/质量和浸提液体积之比（以cm2/mL或mg/mL表示）应尽可能高。浸提液中的纳米材料应进行必要的表征，如颗粒物尺寸、分散性、表面电荷等。必要时测定浸提液中纳米材料的浓度，以便对结果进行量-效关系的分析。应选择不易吸附纳米材料的浸提容器。其他，如浸提温度、时间等可参照GB/T 16886.3（样品准备条款）[10]。

4. 当特殊金属纳米材料可能会释放金属离子的情况时，需考虑所释放的金属离子与分散介质中离子的反应，可能会影响结果的判断。如：纳米银会释放带正电荷的银离子，在分散介质，如氯化钠（NaCl）中，当银离子的浓度足够高时可与介质中的氯离子形成氯化银颗粒物。此时，应采取相应措施避免颗粒物形成，并充分评价非纳米材料颗粒物对试验体系和结果的影响。

5. 由于有些纳米材料具有极强的吸附特性，特别是对蛋白成分的吸附。因此，在样品制备时如采用含有机成分的生理介质，应充分评价纳米材料对介质中有机成分的吸附，及其对试验体系和试验结果解释的影响。

（三） 试验方法的选择

1. 体外遗传毒性

（1）体外遗传毒性试验纳米材料评价的适用性见附录A。

（2） 传统的Ames试验使用固态培养基，培养基为碱性环境，加之革兰氏阴性菌的菌壁较厚等因素，可导致纳米材料不易穿透胞壁，与细菌接触不充分。另外，有些纳米材料具有一定的灭菌作用，如：纳米银等。因此，Ames试验（TG 471）[24]不是研究纳米材料遗传毒性的推荐方法。研究显示与传统的Ames试验相比，“改良的Ames波动试验”更适合用于纳米材料的遗传毒性评价[25]。后者采用96孔板将纳米二氧化钛与菌液在酸化处理后的液态培养基中混合后共同培养，可有效提高阳性检出率。

（3）体外纳米材料遗传毒性试验可根据ICH S2(R1)细胞增殖和细胞毒性试验结果，选择最高受试物处理浓度[14]。某些情况下可考虑增加浓度设置间隔，设置大于标准范围（10倍）并在无细胞毒的情况下开展试验，以保证获得较好的浓度-效应关系。

（4）为保证纳米材料在体外实验系统的生物和物理环境中的状态与体内应用时的状态的检测结果有可比性，应使用现有的方法对给药处理开始和给药处理结束的细胞培养基中纳米材料的表征进行鉴定。

（5） 纳米材料细胞摄取程度是解释检测结果的关键因素，因此建议开展体外遗传毒性试验时同时对细胞摄取能力进行分析。通常从直接遗传毒性的角度分析，如哺乳动物对纳米材料摄取能力有限，可提示为较低的内在风险。

（6）纳米材料进入细胞发挥作用的时间较久，建议体外哺乳动物细胞试验受试物处理时间至少为24 小时，以保证纳米材料与遗传物质（直接或间接）充分地接触。

（7） 胞质分裂阻断法微核试验添加细胞松弛素B（cytochalasin B, CytoB）可干扰细胞骨架的形成，从而影响细胞对纳米粒子的内吞作用。cyto B的给药方法可采用后处理或延迟的共同处理的方法，从而保证纳米材料可与细胞培养系统在无cyto B的情况下充分暴露。

（8） 体外研究建议使用可摄取纳米材料且p53功能完整的细胞系开展。

2. 体内遗传毒性

（1）体内遗传毒性试验纳米材料评价的适用性见附录B。

（2）开展体内遗传毒性研究前，需进行一些毒代动力学研究以确定纳米材料是否到达遗传毒性非接触部位靶组织。在缺乏相关数据的情况下，如纳米材料没有到达靶组织，则相应试验方法不适用于检测初级遗传毒性。

（3）体内研究中，当前没有足够的数据支持某种给药方式优于另一种给药方式。试验给药方式需根据人最常见的暴露途径选择。

3. 遗传毒性试验优化组合的考虑

（1） 对啮齿类动物肿瘤发生率预测效果最好的传统Ames试验当前认为并不适用于检测纳米粒子，而改良的Ames波动试验并未经过大量验证，同为检测基因突变的Pig-a基因突变试验作为新兴的检测方法应用上的数据不足。因此建议考虑选用体外小鼠淋巴瘤tk基因突变试验（MLA, OECD TG 490[26]）,作为纳米材料潜在致突变能力检测方法。基于靶器官/组织细胞系的体外微核试验(OECD TG 487 [27]）或体外中期分裂相染色体畸变试验（OECD TG 473[28]）可针对致断裂剂在检测终点上与MLA互补。在一定研究基础之上，可开展改良的Ames波动试验或体外Pig-a基因突变试验。

（2）如上述体外试验所有结果均为阴性，且根据受试物毒性作用机制分析不存在潜在致遗传毒性的风险，则判断受试物遗传毒性结果为阴性，无需进一步评价其遗传毒性。

（3） 如在上述试验中至少一项体外研究结果为阳性，可进一步开展与检出阳性结果的检测终点一致的体内试验（即致突变剂可通过Pig-a基因突变检测、致断裂剂可通过微核和/或染色体畸变和/或彗星试验检测），并针对靶器官（组织）进行研究（以受试物蓄积在肝脏为例，需开展肝脏微核和彗星试验）。

（4） 如体内试验结果均为阴性且受试物在靶器官/组织充分暴露，则判断受试物遗传毒性结果为阴性。如与体外试验中检出阳性结果的检测终点一致的体内试验结果亦为阳性，毒性与靶器官/组织暴露量有关，且排除试验体系的干扰因素（如饲养环境引起的微核率异常升高）则考虑受试物存在遗传毒性风险[14]。

附录A

（资料性附录）

体外遗传毒性试验纳米材料评价的适用性

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| **遗传毒性终点** | **现有评价方法** | **是否推荐用于 检测纳米材料** | **适用或不适用的理由** | **参考文献** |
| 基因突变 | 细菌回复性突变（Ames）试验 | 否 | a.菌壁与哺乳动物细胞壁有差异，限制粒子摄取。b.固态且带大量负电荷的培养条件限制细菌与纳米粒子充分接触。c.部分纳米材料有抑菌性[15]。 | OECD TG471[24] |
| 体外哺乳动物基因突变试验（HPRT或TK） | 是 | 多用于安全性评价，文献数据较少。 | OECD TG 476[29];OECD TG 490[26] |
| 体外哺乳动物细胞基因突变试验 | 正在研发 | 文献数据缺乏。 | Kimoto et al.,2016[30] |
| 染色体 损伤　 | 体外哺乳动物染色体畸变试验 | 是 | 纳米级颗粒物可沉积在细胞表面，对镜检细胞核结构产生干扰。采用荧光试剂（如，吖啶橙）染色效果可能优于吉姆萨染色。 | 　OECD TG 473[28] |
| 体外哺乳动物细胞微核试验 | 是（需作调整） | a.        建议使用与体内靶组织关联度高的细胞系；b.        建议延长纳米粒子与细胞作用时间（至24h），保证粒子充分暴露；c.        细胞松弛素B可干扰细胞骨架形成，影响粒子内吞，建议与给药处理分别开展。d.        添加血清可能影响细胞对粒子的摄取能力[15]。 | OECD TG 487[27] |
| DNA损伤及修复　 | 体外彗星试验 | 是 | 建议开展针对检测与氧化损伤导致的DNA断裂（与8-羟基鸟嘌呤有关）的体内彗星试验(样本裂解后经细菌细菌甲酰嘧啶DNA糖基化酶（FGP）预处理) [31] 。 | Dusinska and Collins, 1996[32]; El Yamani et al., 2017[33] |
| γ-H2AX试验 | 是 | 　 | Ismail et al., 2007[34] |

附录B

（资料性附录）

体内遗传毒性试验纳米材料评价的适用性

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| **遗传毒性终点** | **现有评价方法** | **是否推荐用于 检测纳米材料** | **适用或不适用的理由** | **参考文献** |
| 基因突变 | 体内Pig-a基因突变试验 | 正在研发 | 文献数据缺乏。 | Krüger et al.,2015[35]; Piberger et al., 2017[36]　 |
| 染色体 损伤 | 体内哺乳动物红细胞微核试验 | 是 | 纳米级颗粒物可沉积在细胞表面，对镜检细胞核结构产生干扰。采用荧光试剂（如，吖啶橙）染色效果可能优于吉姆萨染色。 | OECD TG 474[37] |
|
| 哺乳动物骨髓染色体畸变试验 | 是 | 同上 | OECD TG 475[38] |
| DNA损伤及修复 | 体内彗星试验 | 是 | 建议开展针对检测与氧化损伤导致的DNA断裂（与8-羟基鸟嘌呤有关）的体内彗星试验(样本裂解后经细菌细菌甲酰嘧啶DNA糖基化酶（FGP）预处理) [31] 。 | OECD TG 489[39] |
| γ-H2AX试验 | 是 | 　 | Ismail et al., 2007[34] |
| 体内哺乳动物肝细胞非程序性DNA合成试验 | 有局限性 | 使用放射性试剂3H-TdR标记。 | OECD 486[40] |

1. fulu

**参 考 文 献**

[1] ISO/TS 80004-2:2015  Nanotechnologies -- Vocabulary -- Part 2: Nano-objects [S].

[2] Asharani P V, Low K M G, Hande M P, et al. Cytotoxicity and genotoxicity of silver nanoparticles in human cells[J]. Archives of Toxicology, 2009, 3(2):279.

[3] Ahamed M, Karns M, Goodson M, et al. DNA damage response to different surface chemistry of silver nanoparticles in mammalian cells[J]. Toxicology & Applied Pharmacology, 2008, 233(3):404-410.

[4] Karlsson H L, Gustafsson J, Cronholm P, et al. Size-dependent toxicity of metal oxide particles—A comparison between nano- and micrometer size[J]. Toxicology Letters, 2009, 188(2):112-118.

[5] Könczöl M, Ebeling S, Goldenberg E, et al. Cytotoxicity and genotoxicity of size-fractionated iron oxide (magnetite) in A549 human lung epithelial cells: role of ROS, JNK, and NF-κB[J]. Chemical Research in Toxicology, 2011, 24(9):1460-1475.

[6] Doak S H, Dusinska M. NanoGenotoxicology: present and the future[J]. Mutagenesis, 2017, 32(1):1-4.

[7] Singh N, Manshian B, Jenkins G J, et al. NanoGenotoxicology: The DNA damaging potential of engineered nanomaterials[J]. Biomater, 2009, 30(23-24):3891-3914.

[8] Kevin Lorick. CDRH Review of Medical Devices Containing Nanoscale Materials. https://www.nano.gov//sites/default/files/lorick\_nano\_presentation\_nni\_presentation.pdf, 2010.9.23/2017.8.23.

[9] OECD ENV/JM/MONO (2014)34. Series on the Safety of Manufactured Nanomaterials No. 43. Genotoxicity of Manufactured Nanomaterials : Report of the OECD expert meeting. http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=env/jm/mono(2014)34&doclanguage=en, 2014.12.3/2018.1.10.

[10] GB/T 16886.3:2011, Biological evaluation of medical devices—Part 3: Tests for genotoxicity,carcinogenicity, and reproductive toxicity [S].

[11] 材料科学技术名词审定委员会. 材料科学技术名词[M]. 科学出版社, 2016.

[12] ISO 10993-5:2015 Biological evaluation of medical devices -- Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity [S].

[13] PD ISO/TR 13097: 2013 Guidelines for the characterization of dispersion stability[S].

[14] International Conference on Harmonization（ICH）．Guidance on genotoxicity testing and data interpretation for pharmaceuticals intended for human use S2（R1）（Step 4 version）［EB/OL］, 2016.

[15] Doak S H, Manshian B, Jenkins G J, et al. In vitro genotoxicity testing strategy for nanomaterials and the adaptation of current OECD guidelines[J]. Mutation Research, 2012, 745(1–2):104-111.

[16] Jong W H D, Hagens W I, Krystek P, et al. Particle size-dependent organ distribution of gold nanoparticles after intravenous administration[J]. Biomaterials, 2008, 29(12):1912-1919.

[17] Magdolenova Z, Collins A, Kumar A, et al. Mechanisms of genotoxicity. A review of in vitro and in vivo studies with engineered nanoparticles.[J]. Nanotoxicology, 2014, 8(3):233-278.

[18] Doak S H, Manshian B, Jenkins G J, et al. In vitro genotoxicity testing strategy for nanomaterials and the adaptation of current OECD guidelines[J]. Mutation Research, 2012, 745(1–2):104-111.

[19] Gosens I, Cassee F R, Zanella M, et al. Organ burden and pulmonary toxicity of nano-sized copper (II) oxide particles after short-term inhalation exposure[J]. Nanotoxicology, 2016, 10(8):1084-1095.

[20] ISO/TR 13014:2012 Nanotechnologies -- Guidance on physico-chemical characterization of engineered nanoscale materials for toxicologic assessment [S].

[21] OECD ENV/JM/MONO (2016)2. Series on the Safety of Manufactured Nanomaterials No.63. Physical-chemical parameters: measurements and methods relevant for the regulation of nanomaterials. http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=env/jm/mono(2016)2&doclanguage=en, 2016.1.21/2018.1.10

[22] ISO/TC 229:2005 Nanotechnologies [S].

[23] GB/T 16886.12:2005   Biological evaluation of medical devices-Part 12:Sample preparation and reference materials [S].

[24]OECD Guidelines for the Testing of Chemicals TG 471: Bacterial ReverseMutation Test ［EB/OL］, 1997．

[25] Jomini S, Labille J, Bauda P, et al. Modifications of the bacterial reverse mutation test reveals mutagenicity of TiO(2) nanoparticles and byproducts from a sunscreen TiO(2)-based nanocomposite.[J]. Toxicology Letters, 2012, 215(1):54-61.

[26] OECD Guidelines for the Testing of Chemicals TG 490: In Vitro Mammalian Cell Gene Mutation Tests Using the Thymidine Kinase Gene［EB/OL］, 2015．

[27] OECD Guidelines for the Testing of Chemicals TG 487: In vitro mammalian cell micronucleus test［EB/OL］, 2014．

[28] OECD Guidelines for the Testing of Chemicals TG 473: In vitro mammalian chromosomal aberration test［EB/OL］, 2014．

[29] OECD Guidelines for the Testing of Chemicals TG 476: In Vitro Mammalian Cell Gene Mutation Tests using the Hprt and xprt genes［EB/OL］, 1997

[30] Kimoto T, Horibata K, Miura D, et al. The PIGRET assay, a method for measuring Pig-a gene mutation in reticulocytes, is reliable as a short-term in vivo genotoxicity test: Summary of the MMS/JEMS-collaborative study across 16 laboratories using 24 chemicals.[J]. Mutat Res, 2016, 811:3-15.

[31] Møller P, Jensen DM, Wils RS， et al. Assessment of evidence for nanosized titanium dioxide-generated DNA strand breaks and oxidatively damaged DNA in cells and animal models. Nanotoxicology., 2017, 11(9-10):1237-1256.

[32] Dušinská M, Collins A R. Detection of Oxidized Purines and UV-Induced Photoproducts in DNA of Single Cells, by Inclusion of Lesion-Specific Enzymes in the Comet Assay[J]. Alternatives to Laboratory Animals Atla, 1996, 24(3):405-411.

[33] El Yamani N, Collins A R, Rundénpran E, et al. In vitro genotoxicity testing of four reference metal nanomaterials, titanium dioxide, zinc oxide, cerium oxide and silver: towards reliable hazard assessment[J]. Mutagenesis, 2017, 32(1):117-126.

[34] Ismail I H, Wadhra T I, Hammarsten O. An optimized method for detecting gamma-H2AX in blood cells reveals a significant interindividual variation in the gamma-H2AX response among humans[J]. Nucleic Acids Research, 2007, 35(5):e36.

[35] Krüger C T, Hofmann M, Hartwig A. The in vitro PIG-A gene mutation assay: mutagenicity testing via flow cytometry based on the glycosylphosphatidylinositol (GPI) status of TK6 cells[J]. Archives of Toxicology, 2015, 89(12):2429-2443.

[36] [Piberger AL](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Piberger%20AL%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=28593498), [Krüger CT](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Kr%C3%BCger%20CT%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=28593498), [Strauch BM](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Strauch%20BM%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=28593498), et al. BPDE-induced genotoxicity: relationship between DNA adducts, mutagenicity in the in vitro PIG-A assay, and the transcriptional response to DNA damage in TK6 cells [J]. [Arch Toxicol.](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=BPDE%E2%80%91induced+genotoxicity%3A+relationship+between+DNA+adducts%2C+mutagenicity+in+the+in+vitro+PIG%E2%80%91A+assay%2C+and+the+transcriptional+response+to+DNA+damage+in+TK6+cells) 2017. doi: 10.1007/s00204-017-2003-0.

[37] OECD Guideline for the Testing of Chemicals TG 474，Mammalian erythrocyte micronucleus Test［EB/OL］,2014.

[38] OECD Guideline for the Testing of Chemicals TG 475，Mammalian bone marrow chromosomal aberration test［EB/OL］,2014.

[39] OECD Guideline for the Testing of Chemicals TG 489，In vivo mammalian alkaline comet assay［EB/OL］,2014.

[40] OECD Guideline for the Testing of Chemicals TG 486，In vivo mammalian alkaline comet assay［EB/OL］,2014.