



# 中华人民共和国医药行业标准

YY/T 0870.7—2023

## 医疗器械遗传毒性试验 第7部分：哺乳动物体内碱性彗星试验

Test for genotoxicity of medical devices—  
Part 7: In vivo mammalian alkaline comet assay

2023-01-13 发布

2024-01-15 实施



国家药品监督管理局 发布

## 前 言

本文件按照 GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第 1 部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

本文件是 YY/T 0870《医疗器械遗传毒性试验》的第 7 部分。YY/T 0870 已经发布了以下部分：

- 第 1 部分：细菌回复突变试验；
- 第 2 部分：体外哺乳动物细胞染色体畸变试验；
- 第 3 部分：用小鼠淋巴瘤细胞进行的 TK 基因突变试验；
- 第 4 部分：哺乳动物骨髓红细胞微核试验；
- 第 5 部分：哺乳动物骨髓染色体畸变试验；
- 第 6 部分：体外哺乳动物细胞微核试验；
- 第 7 部分：哺乳动物体内碱性彗星试验。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

本文件由国家药品监督管理局提出。

本文件由全国医疗器械生物学评价标准化技术委员会(SAC/TC 248)归口。

本文件起草单位：山东省医疗器械和药品包装检验研究院、四川大学(四川医疗器械生物材料和制品检验中心)、北京市医疗器械检验所。

本文件主要起草人：孙令骁、刘增祥、贾莉芳、戴政宁、王国伟、李秋、贺学英、范春光。

## 引 言

哺乳动物体内碱性彗星试验是 GB/T 16886.3 规定的遗传毒性试验策略的后续评价步骤中推荐的一种体内试验方法。GB/T 16886.3 中推荐的检测潜在遗传毒性的试验方法均已在经济合作与发展组织(OECD)《化学品测试指南》中给出,但这些方法是针对化学品的特性制定而成,同时未给出详细的试验步骤,因此不适宜直接用于医疗器械/材料的检测。本文件在 GB/T 16886.3 给出的检测潜在遗传毒性基本原则的基础上,根据医疗器械/材料的特性规定了详细的试验步骤,可作为 GB/T 16886.3 中遗传毒性试验方法的补充。

YY/T 0870 旨在建立医疗器械遗传毒性的具体试验方法,拟由 7 个部分构成。

- 第 1 部分:细菌回复突变试验。目的在于给出医疗器械/材料细菌回复突变试验的详细试验方法。
- 第 2 部分:体外哺乳动物细胞染色体畸变试验。目的在于给出医疗器械/材料体外哺乳动物细胞染色体畸变试验的详细试验方法。
- 第 3 部分:用小鼠淋巴瘤细胞进行的 TK 基因突变试验。目的在于给出医疗器械/材料用小鼠淋巴瘤细胞进行的 TK 基因突变试验的详细试验方法。
- 第 4 部分:哺乳动物骨髓红细胞微核试验。目的在于给出医疗器械/材料哺乳动物骨髓红细胞微核试验的详细试验方法。
- 第 5 部分:哺乳动物骨髓染色体畸变试验。目的在于给出医疗器械/材料哺乳动物骨髓染色体畸变试验的详细试验方法。
- 第 6 部分:体外哺乳动物细胞微核试验。目的在于给出医疗器械/材料体外哺乳动物细胞微核试验的详细试验方法。
- 第 7 部分:哺乳动物体内碱性彗星试验。目的在于给出医疗器械/材料哺乳动物体内碱性彗星试验的详细试验方法。

# 医疗器械遗传毒性试验

## 第7部分：哺乳动物体内碱性彗星试验

### 1 范围

本文件规定了医疗器械/材料遗传毒性试验中的哺乳动物体内碱性彗星试验方法。

本文件适用于通过测定医疗器械/材料引起的哺乳动物体内细胞核 DNA 链的断裂,筛选医疗器械/材料是否具有潜在遗传毒性作用。

注:对纳米材料和交联剂进行哺乳动物体内碱性彗星试验时,可能需要对本文件中的方法进行特定的修订,但本文件未给予描述。

### 2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中,注日期的引用文件,仅该日期对应的版本适用于本文件;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/T 16886.1 医疗器械生物学评价 第1部分:风险管理过程中的评价与试验
- GB/T 16886.2 医疗器械生物学评价 第2部分:动物福利要求
- GB/T 16886.3 医疗器械生物学评价 第3部分:遗传毒性、致癌性和生殖毒性试验
- GB/T 16886.12 医疗器械生物学评价 第12部分:样品制备与参照材料

### 3 术语和定义

GB/T 16886.1、GB/T 16886.3 和 GB/T 16886.12 界定的以及下列术语和定义适用于本文件。

#### 3.1

##### **彗星 comet**

受损 DNA 片段受到电场作用后产生的拖尾现象。

注:在显微图像下,“彗星”头部是细胞核 DNA,尾部是由在电场中迁移出核的受损 DNA 片段组成。

#### 3.2

##### **关键变量 critical variable**

小的改变会对试验结果产生较大影响的试验参数。

注:关键变量可能是组织特异性的。在一次试验中,更改关键变量会导致试验结果发生改变,例如:阳性对照和阴性对照的剂量和种类。

#### 3.3

##### **尾部 DNA 百分比 % tail DNA**

彗星尾部 DNA 含量相对于总 DNA 含量(头部、尾部 DNA 含量之和)的比值。

注:尾部 DNA 百分比反映了 DNA 损伤的相对程度,以百分比表示。

#### 3.4

##### **“刺猬”状细胞 hedgehog cells**

显微图像下由小或模糊不清的头部以及大的弥漫性尾部组成的细胞。

### 3.5

#### 可评分细胞 scorable cells

有清晰轮廓的彗星头部、尾部,且未受邻近细胞干扰的细胞。

## 4 试验原理

本文件描述的方法是一项可以直接检测核 DNA 损伤的敏感试验方法,是评价医疗器械/材料是否具有潜在遗传毒性的有效手段。可用于检测强碱性条件下( $\text{pH} \geq 13$ )DNA 单链和双链的断裂,包括医疗器械/材料直接作用引起的 DNA 链断裂、碱性不稳定性位点引起的 DNA 链断裂和 DNA 切割修复所引起的瞬时 DNA 链断裂。动物通过适当的途径接触试验样品,在试验终点解剖分离靶器官/组织,制备单细胞/细胞核悬浮液,对核 DNA 进行碱性单细胞凝胶电泳,根据试验结果来评价试验样品/材料潜在的致突变性。

## 5 主要设备

压力蒸汽灭菌器、电子天平、磨砂玻片、电泳仪、水平电泳槽、荧光显微镜、离心机、解剖器械等。

## 6 试剂

琼脂糖凝胶、裂解液、电泳缓冲液( $\text{pH} \geq 13$ )、染色液、二甲基亚砜(分析纯)、氢氧化钠(分析纯)、乙二胺四乙酸二钠(分析纯)、磷酸盐缓冲液( $\text{pH}$ 一般为 7.2~7.4,不含  $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$ )等。

注:推荐使用市售的彗星试验试剂盒进行试验,试剂盒中一般包括琼脂糖凝胶、裂解液、电泳缓冲液、染色液等试剂。若使用市售的彗星试验试剂盒进行试验,试剂盒说明书一般会给出 10.5~10.9 试验步骤。

## 7 实验动物

### 7.1 总则

所有的动物研究均应在经国家认可机构认可的实验室内进行,并应遵守与实验动物福利有关的全部适用法规,以符合 GB/T 16886.2 的要求,这些研究应在良好实验室质量管理规范或其他经批准的质量保证体系的控制下进行。

### 7.2 动物选择

选用 SPF 级健康初成年啮齿类动物,推荐使用大鼠(6 周龄~12 周龄)。如果试验样品在两种性别动物的全身毒性、代谢、生物利用度等方面没有明显差异,则可使用单一性别动物进行试验,否则使用两种性别动物进行试验。每组可用于分析的动物数量不少于 5 只,若试验设有几个采样时间点,则要求每个采样时间点至少获取 5 只动物的数据用于分析。试验开始时,动物体重差异应不超过同种性别平均体重的  $\pm 20\%$ 。

## 8 样品制备

宜根据 GB/T 16886.12 的原则制备试验液,使用适宜的极性和/或非极性溶剂作为浸提介质。若使用未经充分确认的浸提介质,应提供相应的数据支持资料来表明它们与试验样品和试验系统之间的相容性,并排除浸提介质自身的遗传毒性。如怀疑试验样品可能对实验动物产生毒性作用时,应进行预

试验(见 10.1)来确定适宜的试验液浓度。

注 1: GB/T 16886.3—2019 中附录 A 针对不同的医疗器械提供了 A、B、C 3 种样品制备方法。

注 2: 与经典的化学物全身毒性试验不同,医用材料一般得不到 LD<sub>50</sub>的剂量值。若采用浸提液进行试验,一般考虑单剂量组试验(即试验样品原液或 100%的浸提原液),并对试验所采用的剂量范围提供相应的支持性数据。

## 9 对照制备

### 9.1 阴性对照

阴性对照是一个关键变量。取与样品制备同批号浸提介质,不加试验样品与样品制备同条件制备阴性对照。

### 9.2 阳性对照

阳性对照是一个关键变量。阳性对照物应能诱导试验样品的靶器官/组织 DNA 链断裂(试验样品靶器官/组织的选择见 10.4)。阳性对照物的处理方式不一定与试验样品相同。常用的阳性对照物及其相应靶器官/组织(啮齿类动物)见表 1。

表 1 推荐的阳性对照物及其相应靶器官/组织(啮齿类动物)

阳性对照物	靶器官/组织
甲基磺酸乙酯(Ethyl methanesulfonate, CAS RN 62-50-0)	任一组织
乙基亚硝基脲(Ethyl nitrosourea, CAS RN 759-73-9)	肝脏、胃、十二指肠、空肠
甲基磺酸甲酯(Methyl methanesulfonate, CAS RN 66-27-3)	肝脏、胃、十二指肠、空肠、肾脏、膀胱、肺脏、睾丸、骨髓、血液
N-甲基-N'-硝基-N-亚硝基脲(N-Methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine, CAS RN 70-25-7)	胃、十二指肠、空肠
1,2-二甲基胍二盐酸盐(1,2-Dimethylhydrazine 2HCl, CAS RN 306-37-6)	肝脏、肠
N-甲基-N-亚硝基脲(N-methyl-N-nitrosourea, CAS RN 684-93-5)	肝脏、骨髓、肾脏、胃、十二指肠、脑

## 10 试验步骤

### 10.1 预实验

如怀疑试验样品可能对实验动物产生毒性时,应进行预试验来确定适宜的试验液浓度。宜至少设置 3 个剂量水平(间隔最好小于 $\sqrt{10}$ 倍),覆盖毒性从最大到最小或无毒性。高剂量组应达到不产生动物死亡的最大剂量,高于该剂量即有可能引起动物死亡。由于医用材料一般得不到 LD<sub>50</sub>的剂量值,因此一般采用试验液原液(即试验样品原液或 100%的浸提原液)和试验设计的最大接触剂量体积设置高剂量组。用于确定剂量范围的预实验,步骤应与正式试验相同。

### 10.2 接触

根据试验样品预期的人体接触途径来设计接触途径,如静脉注射、腹腔注射、灌胃、皮下注射等,选

择合适的接触途径以确保靶器官/组织能充分接触。宜根据实验动物的大小来确定一次性最大接触剂量体积。接触剂量体积一般不超过 10 mL/kg 体重。

在没有毒代动力学数据的情况下,常用接触次数为两次,间隔 24 h。

### 10.3 取材时间

取材时间是一个关键变量,最佳取材时间取决于试验样品本身或试验样品的接触方式。取材时间要选在 DNA 链被诱导断裂之后,且在断裂被去除/修复之前,或在细胞死亡之前。常用取材时间:

- a) 对于两次或多次的接触方式,在最后一次接触后的 2 h~6 h 取材;
- b) 在单次接触 2 h~6 h 和 16 h~26 h 后进行两次取材。

通过碱性彗星试验检测到的一些导致 DNA 链断裂的损伤持续时间可能非常短。如果怀疑存在这种瞬时 DNA 损伤,应尽早取材以减少 DNA 损伤的漏检。

### 10.4 靶器官/组织的选择

基于现有试验样品的吸收、分布、代谢、排泄(ADME)以及遗传毒性、致癌性或其他毒性数据,明确靶器官/组织。肝脏组织是物质代谢中最活跃的组织,同时也是高频致癌靶器官/组织,因此在没有明确靶器官/组织的情况下,首选肝脏组织。不推荐选择性腺作为靶器官/组织。

### 10.5 制备标本

将动物安乐死后迅速摘取、分离的靶器官/组织在低温条件下尽快制备单细胞/细胞核悬浮液。

取一部分靶器官/组织用于碱性彗星试验,取样大小应尽量一致,将靶器官/组织用预冷的磷酸盐缓冲液(不含  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ )充分清洗以清除残留的血液,肝、肾等也可采用原位灌注的方法去除血液,剪碎靶器官/组织后放入预冷的磷酸盐缓冲液(不含  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ )中,放置 5 min 后去掉组织碎片进行离心,离心后收集细胞制备单细胞/核悬浮液,在低温条件下保存待用。也可采用刮除胃肠道黏膜表面、均质化和酶消化等方法制备单细胞/细胞核悬浮液。

另取一部分靶器官/组织置于甲醛溶液或适当的固定剂中用于可能的组织病理学分析。

### 10.6 制片

单细胞/核悬浮液制备后宜在低温条件下尽快制备玻片(最好在 1 h 内完成),取洁净载玻片,在玻片一侧滴加琼脂糖,常规涂片,凝固后备用。根据所选择的彗星成像和图像分析系统确定最佳细胞密度,可将单细胞/核悬浮液与琼脂糖按 1:10(体积比)比例混匀,混匀后琼脂糖浓度宜不低于 0.45%(质量体积比),然后滴加在制备好的琼脂糖凝胶层上。应严格控制从动物死亡到制备玻片之间的温度和时间,并在实验室条件下进行验证。

### 10.7 裂解

裂解条件是一个关键变量,同一试验的所有玻片裂解条件宜尽可能保持一致。将玻片浸入预冷的裂解液(pH 一般为 10)中,在 2 °C~8 °C 条件下裂解至少 1 h(或过夜),裂解应在暗光环境(例如:黄光或避光)下进行,避免暴露在可能含有紫外线成分的白光下。裂解后可使用纯水、磷酸盐缓冲液或电泳缓冲液漂洗玻片以除去残留的洗涤剂和盐类物质。

### 10.8 解旋与电泳

将玻片放置在水平电泳槽上至少 20 min 进行解旋,电泳缓冲液应没过玻片,每次电泳时电泳缓冲液的覆盖深度应保持一致,平衡设计玻片在电泳槽中的位置以减轻边缘效应的影响,使批次间的差异最小。在每次电泳时样品的不同剂量组、阴性和阳性对照应有相同数量的玻片。

电泳时间是一个关键变量, DNA 迁移程度与电泳时间和电势(V/cm)呈线性相关, 试验中电压应保持恒定, 同一试验的其他电泳条件宜尽可能保持一致。采用电势为 1 V/cm, 起动电流为 300 mA, 电泳时间不少于 20 min 的电泳条件进行电泳。在整个试验过程中保持电泳缓冲液的深度, 记录电泳开始和结束时的电流。

解旋与电泳应在低温(例如: 2 °C ~ 10 °C)条件下进行, 并记录电泳缓冲液在开始解旋、开始电泳、电泳结束时的温度。在电泳结束后将玻片取出, 充分漂洗后完全干燥。

## 10.9 染色与阅片

使用适当的 DNA 链荧光染料染色。在配有合适的检测仪器或数字相机的荧光显微镜下, 用适当的放大倍数阅片。

彗星显微图像中的细胞可分为 3 类, 即可评分细胞、不可评分细胞(如彗星头部、彗星尾部不清晰的或重叠的细胞等)和“刺猬”状细胞, 宜只对可评分细胞进行尾部 DNA 百分比分析。宜观察玻片同一密度的几个区域, 以确保没有重叠的尾部, 避免在玻片的边缘进行评分。

## 11 数据处理和结果评价

### 11.1 数据处理

碱性彗星试验中的 DNA 链断裂可使用适当的彗星成像和图像分析系统检测, 分析指标包括尾部 DNA 百分比、尾长和尾矩等。推荐采用尾部 DNA 百分比用于结果的评价和解释。宜至少对每只动物、每种靶器官/组织的 150 个可评分细胞进行尾部 DNA 百分比分析, 并单独记录“刺猬”状细胞的发生频率。计算每只动物各靶器官/组织、每个玻片可评分细胞尾部 DNA 百分比的中位数的平均数, 得出每只动物各靶器官/组织可评分细胞的尾部 DNA 百分比, 计算每组动物靶器官/组织可评分细胞的尾部 DNA 百分比和“刺猬”状细胞发生频率的均数和标准差, 利用适当的统计学方法(如方差分析等)进行分析。

### 11.2 结果评价与解释

当满足以下准则时即认为试验成立:

- 阴性对照组数值在实验室预先建立的历史对照数据范围内, 且阴性对照组尾部 DNA 含量百分比值应  $< 6\%$ ;
- 阳性对照组数值在实验室预先建立的历史对照数据范围内, 且与阴性对照组数值有统计学差异;
- 有足够数量的细胞和剂量组(若有剂量组)进行分析。

试验组与阴性对照组相比, 如果尾部 DNA 含量百分比值有统计学意义的显著增加、超过历史阴性对照数据范围且有明显的剂量-反应关系(若有剂量组), 则认为试验结果为阳性, 即在本试验体系中试验样品试验液能够诱导靶器官/组织细胞 DNA 链断裂; 如果尾部 DNA 含量百分比值无统计学意义的显著增加、结果在历史阴性对照数据范围内、无明显的剂量-反应关系(若有剂量组)且有证据表明试验样品试验液能接触到靶器官/组织, 则认为试验结果为阴性。如果试验结果既不是明确的阳性也不是明确的阴性, 可使用优化试验条件(例如: 剂量间隔、其他给药途径、其他取样时间或其他靶器官/组织)进行重复试验或者对额外的细胞进行评分以建立生物学相关性。

试验的阳性结果可能不仅仅是由于试验样品的遗传毒性, 对靶器官/组织的细胞毒性也可能导致 DNA 迁移程度增加。已知的遗传毒性物质也会存在低等或中等的细胞毒性。在单独碱性彗星试验中, 不能区分遗传毒性导致的 DNA 迁移与细胞毒性导致的 DNA 迁移。因此, 当观察到 DNA 迁移程度增

加时,应对靶器官进行组织病理学检查,如果观察到炎症细胞浸润、凋亡或坏死变化都与 DNA 迁移程度增加有关,存在明显细胞毒性证据的情况下,应谨慎解释 DNA 迁移程度增加的原因。

一般认为,“刺猬”状细胞是严重损伤的细胞,但目前成因尚不明确。如出现“刺猬”状细胞显著增加情况,宜考虑是否由试验样品导致并慎重解释阳性结果。

## 12 试验报告

试验报告中应包含下列信息:

- 样品名称、规格型号和批号;
- 试验和对照样品制备方法;
- 实验动物的品系、年龄和体重;
- 试验条件和试验步骤;
- 试验结果;
- 结果评价;
- 结论。

参 考 文 献

- [1] OECD 489(2016) In vivo mammalian alkaline comet assay
- [2] Nakajima, M.(2012), Tissue sample preparation for in vivo rodent alkaline comet assay, Genes and Environment, Vol.34/1, pp.50-4.
-

中华人民共和国医药  
行业标准  
医疗器械遗传毒性试验  
第7部分：哺乳动物体内碱性彗星试验  
YY/T 0870.7—2023

\*

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.net.cn](http://www.spc.net.cn)  
总编室:(010)68533533 发行中心:(010)51780238  
读者服务部:(010)68523946  
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 0.75 字数 17 千字  
2023年2月第一版 2023年2月第一次印刷

\*

书号：155066·2-36836 定价 24.00 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)68510107



YY/T 0870.7-2023



码上扫一扫 正版服务到