

YY

中华人民共和国医药行业标准

YY/TXXXX—XXXX

纳米医疗器械生物学评价 遗传毒性试验
体外哺乳动物细胞碱性彗星试验

Biological evaluation of nanomaterial medical devices—Test for
genotoxicity—In vitro mammalian cell alkaline comet assay

XXXX-XX-XX 发布

XXXX-XX-XX 实施

国家药品监督管理局 发布

目 次

前 言	II
引 言	III
1 范围	1
2 规范性引用文件	1
3 术语和定义	1
4 细胞、试剂及主要设备	1
5 受试物及对照的准备	2
6 体外染色体畸变试验	2
7 结果判定、试验数据分析和报告	3
参 考 文 献	5

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。

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纳米医疗器械生物学评价分技术委员会（SAC/TC248/SC1）归口。

本文件起草单位：

本文件主要起草人：

引 言

纳米医疗器械对人体的潜在风险已受到广泛关注。遗传毒性试验主要用于预测受试物的潜在致癌性风险，是纳米医疗器械临床前安全性评价的重要内容。

由于纳米材料自身具有的特殊性质，目前标准化遗传毒性试验用于评价纳米材料的遗传毒性风险时有其局限性。与非纳米尺度的医疗器械产品相比，医疗器械产品中的纳米尺度材料进入细胞的方式有所不同。如，常规的哺乳动物细胞体外染色体畸变试验受试物与细胞接触时间较短，且细胞培养/加样处理体系中含有S9等多种阻碍细胞摄取纳米材料的成分。因此，现行的遗传毒性评价方法无法有效而可靠地评价医疗器械中纳米材料的遗传毒性。经济合作与发展组织（Organization for Economic Co-operation and Development, OECD）纳米材料产品工作组（Working Party on Manufactured Nanomaterials, WPMN）于2014年在《纳米材料产品遗传毒性：OECD专家专题研讨会报告》中指出，开展纳米材料的遗传毒性评价时，应在现有针对非纳米材料的评价方法指南性文件的基础上进行一定调整。中国食品药品检定研究院（中检院）基于前期研究数据，并参考国际相关遗传毒性指导原则及共识文件，经全国纳米技术和遗传毒理研究领域专家、纳米材料及相关产品的研发机构代表讨论，提出国家标准化指导性技术文件GB/Z 42246-2022《纳米技术纳米材料遗传毒性试验方法指南》，该指南为遗传毒性评价方法选择的总则，为含纳米医疗器械产品的研发、安全性评价及监管提供了参考。

体外哺乳动物细胞彗星试验（comet assay），即单细胞凝胶电泳试验（single cell gel electrophoresis, SCGE），可用于评价受试物的潜在致DNA断裂性风险。碱性彗星试验，指在强碱性条件下（ $\text{pH} \geq 13$ ）进行电泳，可同时检出DNA单链和双链断裂。作为GB/Z 42246-2022具体试验方法的补充，本文件在对试验条件进行充分验证的基础上，提出适合纳米材料的哺乳动物细胞碱性彗星试验方法的标准，为合理地开展遗传毒性风险评价提供技术支持。

纳米医疗器械生物学评价 遗传毒性试验 体外哺乳动物细胞碱性彗星试验

1 范围

本文件规定了评价纳米医疗器械或用于医疗器械的纳米材料的体外哺乳动物细胞碱性彗星试验方法，通过分析细胞暴露于纳米医疗器械或用于医疗器械的纳米材料供试液后的DNA损伤指标，评价其是否导致DNA单链及双链断裂，是否具有潜在遗传毒性风险。

本文件适用于采用体外哺乳动物细胞碱性彗星试验方法，评价细胞暴露于纳米医疗器械或用于医疗器械的纳米材料的DNA损伤。

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 16886.3 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

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

YY/T 1897-2023 纳米医疗器械生物学评价 遗传毒性试验 体外哺乳动物细胞微核试验

3 术语和定义

GB/T 16886.3、YY/T 0870.7及YY/T 1897-2023界定的术语和定义适用于本文件。

4 细胞、试剂及主要设备

4.1 细胞

体外彗星试验方法对所用细胞核型无特殊要求。中国仓鼠肺细胞系（CHL）和中国仓鼠卵巢细胞（CHO）核型稳定且已积累大量背景数据，是常规体外遗传试验用细胞系。但啮齿类动物细胞由于p53基因功能存在缺陷，DNA损伤后修复功能降低，可能导致基于CHL和CHO开展的体外遗传毒性试验假阳性率较高。为避免假阳性结果，可使用p53基因功能健全的人淋巴细胞系（TK6）开展体外彗星试验。也可使用与纳米材料体内靶器官或主要暴露组织相关的细胞开展试验。

细胞对纳米材料的摄取能力是考察纳米材料是否充分暴露于细胞试验体系的关键。宜使用适宜的技术验证所使用的细胞系对受试物（所含纳米材料）在本试验条件下具有一定摄取能力。

注：不同性质和理化表征的纳米材料在选择细胞系时建议提供细胞可摄取纳米材料的证据。CHL和TK6细胞已被证实具可摄取纳米银（Ag40）的能力。

宜定期检测所用细胞的倍增时间及是否存在支原体污染，保证所用细胞状态适宜用于试验。

4.2 试剂及其配制

4.2.1 活化系统

通常使用S9混合液作为活化系统。大鼠肝S9可使用市售产品或按YY/T 0870.6-2019附录A的方法制备。经验证，可使用10% S9混合液或3.36% S9混合液开展试验。浓度为10%的S9混合液成分及配制方法可参照YY/T 0870.6-2019中附录A。浓度为3.36%的S9混合液中含有12.5 mM MgCl₂，37.5 mM KCl，12.5 mM CaCl₂，9.375 mM G-6-P，7.5 mM β-NADPN_{a2}，62.5 mM NaH₂PO₄，和3.36% S9。

4.2.2 细胞培养液

细胞培养液及组成如下：

- a) 根据采用的细胞系选择适宜的培养液;
- b) CHL 细胞通常使用含 10 %胎牛血清、1 %青链霉素的 RPMI1640 培养液培养;
- c) TK6 细胞通常使用含 10 %灭活马血清、2 %丙酮酸钠和 1 %青链霉素的 RPMI1640 培养液培养。

4.2.3 其他试剂

主要试剂如下:

- a) 电泳缓冲液;
- b) 中和缓冲液;
- c) 细胞裂解液
- d) SYBR Gold[®]染液;
- e) 酶缓冲液

配制方法见YY/T 0870.2-2019中附录B。

4.3 主要设备

细胞培养主要设备如下:

- a) 超净工作台;
- b) CO₂ 培养箱;
- c) 恒温水浴箱;
- d) 高速离心机;
- e) 压力蒸汽灭菌器;
- f) 荧光显微镜等

5 受试物及对照的准备

受试物及对照的准备如下:

- a) 纳米医疗器械:参考 YY/T 0870.6-2019,并结合纳米医疗器械中纳米材料释放特性及使用方式,进行受试物的制备;

注1:建议同时使用纳米材料原料进行评价,参照5 b) 进行制备。

注2:为保证纳米材料在体外试验系统中生物和物理环境中的状态与体内应用时的状态有可比性,可使用现有的方法对受试物暴露于细胞前(浸提液)和暴露于细胞后的细胞培养基中的纳米材料进行表征,具体参考GB/T39261等进行表征。表征数据可用于试验结果的解释。

- b) 用于医疗器械的纳米材料、阴性对照材料和阳性对照材料:试验所用的纳米材料浓度范围与其细胞毒性和被细胞摄取的情况有关,应结合纳米材料的特性及应用的生物环境选择适宜的介质,确保纳米材料在受试液中保持良好分散状态且稳定;
- c) 介质阴性对照使用配制受试物的介质;常用阳性试剂对照参见 YY/T 0870.6-2019 表 1;
- d) 空白细胞对照:试验用细胞。

6 体外彗星试验

6.1 概述

在适宜的条件下,体外彗星试验可检出纳米材料的DNA断裂风险。在常规试验的基础上加入DNA修复酶—甲酰胺嘧啶DNA糖基化酶(formamidopyrimidine DNA glycosylase, FPG),有助于检出其DNA损伤机制是否与氧化应激作用有关。常规试验步骤包括:预试验、接触处理、收获细胞与制片、结果观察等。

6.2 体外彗星试验步骤

6.2.1 配制浓度

按以下要求进行配制浓度的设定:

- a) 应包含至少三个配制浓度,每个浓度至少包括两个重复。
- b) 最高反应浓度应在培养基中无明显沉淀,且对培养液的 pH 值和渗透压无明显影响。

- c) 根据细胞毒性设置配制浓度范围。细胞毒性使用相对细胞增长数 (relative increase in cell count, RICC) 或相对群体倍增数 (relative population doubling, RPD) 评估。
- d) 如浸提液原液或可以给予的最高浓度条件下未见明显细胞毒性 (与空白细胞对照组比较相对细胞活力不低于 70 %), 通常以 2~3 倍设置浓度间隔; 当供试品存在细胞毒性时, 应以试验样品或浸提原液作为最高浓度进行梯度稀释, 即在收获细胞时, 试验用最高浓度的细胞毒性发生率应控制在 (55±5) %。各处理组以 5~10 倍间距设置。所选择的浓度范围应包括无细胞毒性浓度至产生中度细胞毒性的浓度, 以获得较好的量效关系。如浓度效应曲线较为陡峭, 可减小浓度间隔, 并使用 3 个以上浓度进行试验。

6.2.2 培养体系

细胞培养液中多种成分可影响细胞对纳米材料的摄取能力, 如含牛血清的培养液或人白蛋白可增加纳米颗粒的尺寸、减少其电位, 并改变CHL和TK6细胞摄入纳米材料的能力。因此, 不建议使用经人血清白蛋白包被的纳米材料进行试验。

6.2.3 受试物处理

反应时间可能对纳米材料导致的细胞DNA损伤有一定影响。为保证纳米材料经细胞充分摄取, 需设置3 h~6 h处理组 (无和有代谢活化)、24 h处理组 (无代谢活化) 和48 h处理组 (无代谢活化), 开展体外彗星试验。如纳米材料需更长摄取时间 (结合纳米材料的作用机制及摄取能力检测数据等判定), 可设置72 h处理组 (无代谢活化)。

待纳米材料与细胞反应结束后, 经离心或消化收集细胞并弃去上层培养基。添加适量培养基重悬细胞, 并将细胞密度调整至 5×10^4 个/mL ~ 5×10^5 个/mL, 进行后续制片处理。

6.2.4 标本制备

在试管中预先加入融化的琼脂糖凝胶, 并置于37℃水浴; 取适量细胞悬液加入上述试管中, 迅速混匀后进行铺片, 每个样本至少平行2个复样。铺片结束后迅速将玻片置于4℃、避光冷却不少于15 min。将玻片置于预冷的裂解液中避光, 4℃过夜 (≥14h)。裂解结束后使用预冷的超纯水清洗玻片至少3次, 每次5 min。如使用FPG处理, 此时则添加预冷的酶缓冲液 (含 40 mM HEPES, 0.1 M KCl, 0.5 mM EDTA, 和0.2 mg/mL的BSA, pH=8) 清洗3次, 每次5 min, 之后取出玻片并加入含FPG的缓冲液 (FPG以1:3000稀释), 37℃孵育30~60 min。将玻片平行码放在电泳槽内, 添加预冷的碱性解旋液 (pH>13) 没过玻片, 室温、避光解旋15~30 min。电泳时设置电压为32V, 此时电流约为300 mA ±10mA, 电泳过程中保持电泳液温度不超过10℃, 电泳约15 min ~30 min。电泳结束后, 取出玻片, 轻轻擦拭, 去除多余液体。先用中和液漂洗5 min, 更换新的中和液漂洗15 min。取出玻片, 浸于无水乙醇溶液不少于15 min。将玻片放置通风处, 室温自然干燥。

6.2.5 染色与阅片

染色与阅片步骤同YY/T 0870.7-2023。

7 结果判定、试验数据分析和报告

7.1 结果判定

7.1.1 使用适当的拍照和彗星图像分析系统进行图像采集和分析, 分析指标可包括%Tail DNA、尾长和尾矩等。参照 YY/T 0870.7-2023 进行结果判定。每个浓度处理组至少计数 150 个可评分的彗星细胞, 计算每浓度组的平均值或中位数, 并单独记录“刺猬”状细胞的发生率。同时应结合细胞对纳米材料的摄取能力对结果进行综合评估。

7.1.2 如试验中设定的所有条件下的所有浓度范围内, 细胞可摄取纳米材料, 认为基于上述条件的染色体畸变试验结果可用于评估纳米材料的染色体损伤风险。

7.1.3 如试验中所设定的所有浓度范围内细胞对纳米材料摄取量均低于检测限值且结果为阴性, 则认为细胞的遗传物质未能充分暴露于纳米材料, 当前结果需进一步确认。此种情况下应改变试验条件, 或反应浓度, 或选择其他适宜的方法评价纳米材料的致染色体损伤风险。

7.1.4 如在纳米医疗器械的受试液中的纳米材料含量极低，导致细胞对纳米材料摄取量低于检测限值且结果为阴性，应结合其它遗传毒性试验结果和毒理学数据，以及预期临床用途进行综合评价。

7.2 试验数据分析和报告

试验数据的分析及处理参照 YY/T 0870.7-2023 进行。

试验报告中宜包含以下信息：

- a) 试验样品：
 - 1) 来源、批号；
 - 2) 纳米材料的表征结果；
 - 3) 有效期及受试物在介质中稳定性数据；
 - 4) 受试物在培养基中的 pH、渗透压、沉淀情况等（如果有）。
- b) 介质：
 - 1) 介质选择的合理性说明；
 - 2) 介质占最终细胞培养液体积的百分比。
- c) 细胞：
 - 1) 所用细胞类型、来源、代数；
 - 2) 定期支原体污染检查结果；
 - 3) 细胞培养条件及方法；

注：如完成细胞对纳米材料摄取能力检测，应提供相应数据。
- d) 试验条件：
 - 1) 细胞培养液的组分；
 - 2) 细胞培养温度、CO₂ 体积分数、湿度、培养时间；
 - 3) 接种/加样处理时细胞密度；
 - 4) 试验体系中的受试物/阴性对照/阳性对照的最终浓度范围；
 - 5) 受试物/阴性对照/阳性对照反应时间；
 - 6) FPG 酶的添加条件、终浓度（如果有）；
 - 7) 代谢活化系统类型和组成（S9 来源、S9 混合物制备方法、S9 混合物的终体积等）
 - 8) 裂解时间、解旋时温度、电泳时温度和电压、电流等条件；
 - 9) 染色方法；
 - 10) “刺猬”状细胞数量；
 - 11) 分析指标及每浓度组分析细胞数量；
 - 12) 结果判定标准。
- e) 结果：
 - 1) 试验体系中是否有沉淀、析出等异常情况；
 - 2) 各组“刺猬”状细胞百分比；
 - 3) 各组分析指标中位数或均值及标准差；
 - 4) 是否存在剂量——效应关系；
 - 5) 组间统计结果；
 - 6) 实验室阴性对照和阳性对照的历史背景数据；
 - 7) 结果讨论与分析。
- f) 结论。

参 考 文 献

- [1] GB/T 16886.12-2017 医疗器械生物学评价第12部分：样品制备与参照材料
 - [2] GB/T 39261 纳米技术纳米材料毒理学评价前理化性质表征指南
 - [3] YY/T 0993-2015 医疗器械生物学评价纳米材料体外细胞毒性试验（MTT试验和LDH试验）
 - [4] 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
此文件以PDF电子文件格式存放于网页(WEB)上
([http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=env/jm/mono\(2014\)34&doclanguage=en](http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=env/jm/mono(2014)34&doclanguage=en), 2014.12.3/2018.1.10)
 - [5] OECD Guidelines for the Testing of Chemicals TG489: *In Vivo* Mammalian Alkaline Comet Assay
此文件以PDF电子文件格式存放于网页(WEB)上
(https://read.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-489-in-vivo-mammalian-alkaline-comet-assay_9789264264885-en)
 - [6] Drewes C, Ojea Jimenez I, Mèhn D, et al. Physicochemical characterisation of gold, silica and silver nanoparticles in water and in serum-containing cell culture media.
此文件以PDF电子文件格式存放于网页(WEB)上
(<https://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/handle/JRC110379>).
 - [7] Kirkland D, Pfuhler S, Tweats D, et al. How to reduce false positive results when undertaking in vitro genotoxicity testing and thus avoid unnecessary follow-up animal tests: Report of an ECVAM Workshop. *Mutat Res*, 2007, 628(1):31-55
 - [8] Müller L. *In vitro* genotoxicity tests to detect carcinogenicity: a systematic review. *Hum Exp Toxicol*, 2009, 28(2-3):131-133
 - [9] 文海若, 叶倩, 于敏, et al. 亚硝胺化合物对人源肝癌细胞 HepG2 的 DNA 损伤风险评价. *药物评价研究*, 2022, 45(11): 2200-2207.
 - [10] Speit G, Schütz P, Bonzheim I, et al. Sensitivity of the FPG protein towards alkylation damage in the comet assay. *Toxicol Lett*, 2004, 146(2): 151-158.
-