



# 中华人民共和国医药行业标准

YY/T 0870.2—2013

---

## 医疗器械遗传毒性试验 第2部分：体外哺乳动物细胞 染色体畸变试验

Test for genotoxicity of medical devices—  
Part 2: In vitro mammalian chromosome aberration test

2013-10-21 发布

2014-10-01 实施

---



国家食品药品监督管理总局 发布



## 前 言

YY/T 0870 的总标题是《医疗器械遗传毒性试验》，包括以下部分：

- 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体外哺乳动物细胞基因突变试验；
- 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。

有关其他方面的遗传毒性试验将有其他部分的标准。

本部分为 YY/T 0870 的第 2 部分。

本部分按 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

YY/T 0870 的本部分是参考 OECD No. 473(1997)《体外哺乳动物细胞染色体畸变试验》并结合医疗器械/材料自身特点制定的。

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这些专利的责任。

本部分由国家食品药品监督管理总局提出。

本部分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。

本部分主要起草单位：国家食品药品监督管理局济南医疗器械质量监督检验中心。

本部分参加起草单位：四川医疗器械生物材料和制品检验中心、国家食品药品监督管理局天津医疗器械质量监督检验中心。

本部分起草人：王昕、尹玉霞、刘成虎、梁洁、张鹏。

## 引 言

GB/T 16886.3 中给出的检测潜在遗传毒性物质的试验方法均为经济合作与发展组织(OECD)《化学品测试指南》中规定的方法,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。YY/T 0870 参照 OECD 试验方法基本原则,并根据医疗器械/材料的特性对试验方法进行了适当的修改,规定了详细的试验步骤,可作为 GB/T 16886.3 中遗传毒性试验的补充方法标准。

YY/T 0870 的本部分参照 OECD No. 473(1997)方法,在有或无代谢活化系统的情况下,将培养细胞与医疗器械/材料接触后再用中期分裂相阻断剂(如秋水仙素)进行处理,通过对处于有丝分裂中期的动物细胞的染色体畸变情况进行分析,来评价试验样品潜在的致畸变性。

YY/T 0870 的本部分的目的是为了筛选医疗器械/材料中具有导致哺乳动物细胞中染色体结构畸变潜能的物质。染色体结构畸变可能有两种类型,即染色体型和染色单体型。对于医疗器械/材料内含有的有毒化学物来说,多为诱导染色单体型畸变,但有时也可导致染色体型畸变。多倍体数目的增加可预示毒性物质可能诱导染色体数目畸变。然而,YY/T 0870 的本部分不适用于检测染色体数目畸变。YY/T 0870 的本部分需要使用体外代谢活化系统。但是,这种体外系统不能完全模拟哺乳动物的体内情况。宜注意由 pH、渗透压的改变或高水平细胞毒性可能导致的假阳性结果。

# 医疗器械遗传毒性试验

## 第 2 部分:体外哺乳动物细胞 染色体畸变试验

### 1 范围

YY/T 0870 的本部分规定了医疗器械/材料体外哺乳动物细胞染色体畸变试验方法。

注:口腔材料的体外哺乳动物细胞染色体畸变试验见 YY/T 0127.16。

### 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/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 16886.3 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 16886.5 医疗器械生物学评价 第 5 部分:体外细胞毒性试验

GB/T 16886.12 医疗器械生物学评价 第 12 部分:样品制备与参照样品

### 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

**染色单体型畸变 chromatid-type aberration**

染色体结构损伤,表现为一条染色单体断裂或染色单体间的断裂和重接。

#### 3.2

**染色体型畸变 chromosome-type aberration**

染色体结构损伤,表现为断裂或两条染色单体同一位点的断裂和重接。

#### 3.3

**核内复制 endoreduplication**

DNA 复制的 S 期后的一个过程,核没有进入有丝分裂,但进入下一个 S 期。结果是染色体具有 4、8、16 等倍单体。

#### 3.4

**裂隙 gap**

显示为小于染色单体宽度的不着色的损伤,并伴有染色单体极小的错位。

#### 3.5

**有丝分裂指数 mitotic index**

有丝分裂中期的细胞数除以观察细胞总数,表明细胞增殖的程度。

#### 3.6

**染色体数目畸变 numerical aberration**

染色体数目改变,不同于所用细胞染色体的正常数目。

### 3.7

#### 多倍体 polyploidy

所含染色体数目是单倍体染色体数( $n$ )的倍数,二倍体除外(如, $3n,4n$ 等)。

### 3.8

#### 染色体结构畸变 structural aberration

细胞分裂中期显微镜下观察到的染色体结构的改变,如缺失、断片、内交换或互换。

## 4 主要设备

超净工作台、CO<sub>2</sub> 培养箱、恒温水浴箱、倒置显微镜、光学显微镜、压力蒸汽灭菌器等。

## 5 活化系统、培养基和试剂

试验用活化系统(S9 和 S9 混合液)、培养液和试剂按附录 A 和附录 B 的规定制备或购买市售商品。

## 6 细胞株

可选用中国仓鼠肺细胞(CHL)或中国仓鼠卵巢细胞(CHO),推荐首选 CHL。需定期检查试验所用细胞核型和有无支原体污染。细胞应置于-80℃或液氮中冷冻保存。

## 7 试验前准备

### 7.1 器具灭菌

与试验和对照样品接触的所有器具应采用可靠方法灭菌,置压力蒸汽灭菌器内 121℃ 30 min,或置电热干燥箱内 160℃ 2 h。

### 7.2 试验环境要求

试验应在无菌操作台或超净工作台中进行。

## 8 样品制备

宜根据 GB/T 16886.12 的原则制备试验液。可采用生理盐水和/或其他适宜溶剂作为浸提介质。浸提介质不应与试验样品发生化学反应,且应对细胞的存活和 S9 的活性无影响。如怀疑试验样品可能对本试验细胞株产生毒性作用时,应进行预试验来确定适宜的试验液浓度。

注 1: ISO 10993.3 正在修订,当新的样品制备方法在未来标准中得到确认后即可采用。

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,可考虑单剂量组试验(即试验样品原液或 100% 的浸提原液),但宜对试验所采用的剂量范围提供相应的支持性数据。

注 3: 高浓度的 DMSO 具有细胞毒性作用。因此,如采用 DMSO 为浸提介质,使用时浓度应不大于 1.0% (体积分数)。

## 9 对照样品制备

### 9.1 阴性对照

同批号试验样品浸提介质,不加试验样品并在同条件下制备。

### 9.2 阳性对照

见表 1。也可采用其他适宜的阳性对照品。

表 1 阳性对照物质举例

代谢活化条件	阳性对照物
无外源性代谢活化系统	甲磺酸甲酯(methyl methanesulphonate, MMS) [CAS No. 66-27-3]
	甲磺酸乙酯(ethyl methanesulphonate, EMS) [CAS No. 62-50-0]
	乙基亚硝基脲(ethyl nitrosourea) [CAS No. 759-73-9]
	丝裂霉素 C(mitomycin C) [CAS No. 50-07-7]
	4-硝基喹啉-N-氧化物(4-nitroquinoline-N-oxide) [CAS No. 56-57-5]
有外源性代谢活化系统	苯并(a)芘 (benzo (a)pyrene) [CAS No. 50-32-8]
	环磷酰胺 (cyclophosphamide) [CAS No. 50-18-0 (CAS no. 6055-19-2)]

### 9.3 空白对照

如不能证实所用浸提介质不具有致突变性,还应设空白对照。

## 10 试验步骤

### 10.1 预试验

对怀疑有细胞毒性反应的试验样品应进行预试验。取试验细胞株按 GB/T 16886.5 中步骤进行。如对试验细胞株产生毒性作用,应对试验样品或浸提液进行梯度稀释,所选的剂量浓度范围宜包括细胞毒性从最大到小或无细胞毒性,一般至少包括 5 个试验浓度梯度,并以小或无细胞毒性的浓度进行试验。

### 10.2 接触处理

10.2.1 试验分别在加入或不加入 S9 的条件下进行。按 10.2.2~10.2.4 步骤操作。

10.2.2 试验前一天,将一定数量的细胞接种于培养皿(瓶)内,置于 CO<sub>2</sub> 培养箱内培养。

10.2.3 吸去培养皿(瓶)中的培养液,加入试验或对照样品、S9 混合液(不加 S9 混合液时,需用培养液补足)和细胞培养液,置于培养箱中。有或无代谢活化系统接触 3 h~6 h,吸去培养皿(瓶)中的液体,用 Hanks 液洗细胞 3 次,加入新鲜细胞培养液继续培养,并在接触开始后约 1.5 倍的正常细胞周期时采样。若两者均为阴性结果,宜再延长无代谢活化的试验至 1.5 倍的正常细胞周期采样。

10.2.4 于收获前 2 h~4 h 加入细胞分裂中期阻断剂(如秋水仙素,终浓度为 0.1 μg/mL~1 μg/mL)。

### 10.3 收获细胞与制片

10.3.1 消化:用胰蛋白酶液消化细胞,待细胞脱落后加入含血清的细胞培养液终止胰蛋白酶作用,混匀,放入离心管内以 1 000 r/min~1 200 r/min 离心 5 min~7 min,弃去上清液。

10.3.2 低渗:加入 0.075 mol/L 氯化钾溶液 5 mL~7 mL,用滴管将细胞轻轻地吹打混匀,放入 37 °C 水浴中低渗处理 10 min~20 min,加入 1 mL~2 mL 固定液(甲醇:冰醋酸,3:1)混匀。以 1 500 r/min 离心 5 min~7 min,弃去上清液。

10.3.3 固定:加入 5 mL~7 mL 固定液,混匀后固定 10 min~20 min,以 1 500 r/min 离心 5 min~7 min,弃去上清液。同法再固定 1~2 次,弃去上清液。

10.3.4 滴片:加入数滴新鲜固定液,混匀。将混悬液滴于冰水预冷的载玻片上,自然干燥。

10.3.5 染色:将滴片用姬姆萨染液染色,晾干备用。

### 10.4 结果观察

在光学显微镜下每一试验组至少选择 200 个分散良好的中期分裂相(染色体数为  $2n \pm 2$ )进行染色体畸变观察。应记录每一观察细胞的染色体数目,对于畸变细胞还应记录畸变类型。

### 10.5 推荐的观察项目

#### 10.5.1 染色体数目的改变

10.5.1.1 非整倍体:亚二倍体或超二倍体。

10.5.1.2 多倍体:染色体成倍增加。

10.5.1.3 核内复制:包膜内的特殊形式的多倍化现象。

#### 10.5.2 染色体结构的改变

10.5.2.1 断裂:损伤长度大于染色体的宽度。

10.5.2.2 裂隙:损伤的长度小于染色单体的宽度。

10.5.2.3 微小体:较断片小而呈圆形。

10.5.2.4 有着丝点环:带着丝点部分,两端形成环状结构并伴有一双无着丝点断片。

10.5.2.5 无着丝点环:成环状结构。

10.5.2.6 单体互换:形成三辐体、四辐体或多种形状的图像。

10.5.2.7 双微小体:成对的染色质小体。

10.5.2.8 非特定性型变化:如粉碎化、着丝点细长化、粘着等。

## 11 数据处理

结果数据宜包括细胞毒性(如细胞融合程度、细胞计数、有丝分裂指数等)、畸变细胞数、染色体畸变细胞的百分率、各剂量组及对照组不同类型染色体畸变数与频率等。应分别记录裂隙,但报告时,一般

不包括在总畸变频率中。采用  $\chi^2$  检验对结果进行统计学处理,以评价试验样品的致畸变性。

## 12 结果判定

阴性对照组染色体畸变率在正常范围内(通常小于 4.9%),否则应重新试验。

出现以下两种情况之一时,可判定试验样品在本试验条件下具有致染色体畸变性:

- a) 试验样品引起染色体结构畸变数的增加具有统计学意义,并有与剂量相关的增加。
- b) 试验样品在任何一个剂量条件下引起具有统计学意义并有可重复性的阳性反应。

阴性结果表明,在本试验条件下,试验样品不具有致染色体畸变性。

## 13 试验报告

试验报告中应包含下列信息:

- a) 试验样品名称、规格型号和批号;
- b) 试验和对照样品制备方法;
- c) 试验用细胞株来源及质量控制信息;
- d) 试验条件和试验步骤;
- e) 试验结果;
- f) 结果评价;
- g) 结论。



附录 A  
(资料性附录)  
S9 和 S9 混合液制备

A.1 大鼠肝 S9 液

A.1.1 选健康雄性成年 SD 或 Wistar 大白鼠,体重 150 g 左右,约 5~6 周龄。将多氯联苯(Aroclor 1254)或苯巴比妥钠溶于玉米油中,浓度为 200 mg/mL,按 500 mg/kg(体重)无菌操作一次腹腔注射。

注:也可采用苯巴比妥和  $\beta$ -萘黄酮联合诱导。

A.1.2 第 6 天用颈动脉放血法处死动物,打开腹腔,用 20 mL 新鲜冷至 4 °C 的 0.15 mol/L 氯化钾溶液进行肝门静脉灌注后,小心分离并将肝脏完整取出。取出肝脏称重后,用 0.15 mol/L 氯化钾溶液连续冲洗数次,以便除去能抑制微粒体酶活性的血红蛋白。每克肝(湿重)加 0.1 mol/L 氯化钾溶液 3 mL,连同烧杯移入冰浴中,用灭菌剪刀剪碎肝脏,在玻璃匀浆器(低于 4 000 r/min,往复 1 min~2 min),或组织匀浆器(20 000 r/min,1 min)中制成肝匀浆。以上操作需注意无菌和局部冷环境(4 °C)。

A.1.3 将制成的肝匀浆在低温(0~4 °C)高速离心机上,以 9 000g 离心 10 min,吸出上清液为肝 S9 液。

A.1.4 S9 制成后,经无菌检查,测定蛋白含量(Lowry 法),每毫升蛋白含量宜不超过 40 mg,并经间接致癌物(诱变剂)鉴定其生物活性合格后,分装于无菌冷冻管或安瓿中,每安瓿 2 mL 左右,用液氮或干冰速冻后置 -80 °C 低温保存,保存期不超过一年。

A.2 S9 混合液辅助因子

A.2.1 0.4 mol/L 氯化镁( $MgCl_2$ )溶液:称取 3.8 g,加蒸馏水稀释至 100 mL。灭菌或滤菌。4 °C 保存。

A.2.2 1.65 mol/L 氯化钾(KCl)溶液:称取 12.3 g,加蒸馏水稀释至 100 mL。灭菌或滤菌。4 °C 保存。

A.2.3 0.2 mol/L 磷酸盐缓冲液(pH7.4),每 500 mL 由以下成分组成:

磷酸氢二钠( $Na_2HPO_4$ )(14.2 g/500 mL) 440 mL

磷酸二氢钠( $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$ )(13.8 g/500 mL) 60 mL

调 pH 为 7.4,0.103 MPa,20 min 灭菌或滤菌。4 °C 保存。

A.2.4 辅酶-II(氧化型)溶液:准确称取辅酶-II,用无菌蒸馏水溶解配制成 0.025 mol/L 溶液,低温保存(-20 °C 以下)。

A.2.5 葡萄糖-6-磷酸钠盐溶液:称取葡萄糖-6-磷酸钠盐,用无菌蒸馏水溶解配制成 0.05 mol/L,低温保存(-20 °C 以下)。

A.3 10% S9 混合液

每 10 mL 由以下成分组成:

磷酸盐缓冲液(0.2 mol/L,pH7.4) 6.0 mL

氯化钾溶液(1.65 mol/L) 0.2 mL

氯化镁溶液(0.4 mol/L)	0.2 mL
葡萄糖-6-磷酸盐溶液(0.05 mol/L)	1.0 mL
辅酶-II溶液(0.025 mol/L)	1.6 mL
肝 S9 液	1.0 mL

临用时新鲜无菌配制,或滤过除菌。混匀,置冰浴中待用。



**附 录 B**  
(资料性附录)  
**试剂和培养液制备**

**B.1 磷酸盐缓冲液**

NaCl	8.5 g
KCl	0.2 g
磷酸氢二钠( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ )	2.85 g
磷酸二氢钾( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )	0.27 g

溶于1 000 mL蒸馏水中,调pH为6.8,0.103 MPa 20 min 灭菌或滤菌。4 ℃保存。

**B.2 D-Hanks 液**

NaCl	8.0 g
KCl	0.4 g
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0.06 g
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	0.06 g
$\text{NaHCO}_3$	0.35 g
酚红	0.02 g

溶于1 000 mL蒸馏水中,0.103 MPa 20 min 灭菌或滤菌。4 ℃保存。

**B.3 Giemsa 储备液**

取Giemsa染料3.8 g,置研钵中,加少量甲醇研磨,逐渐加甲醇至375 mL,溶解后再加125 mL纯甘油,于37 ℃温箱保温48 h,在此期间摇动数次,放置1周~2周过滤备用。

**B.4 Giemsa 应用液**

取1 mL储备液加入10 mL pH 7.4磷酸缓冲液,临用时现配。

**B.5 固定液**

甲醇(分析纯):冰乙酸(分析纯)以3:1混合,临用时现配。

**B.6 二甲基亚砜(DMSO)**

光谱纯,0.103 MPa,20 min 灭菌。

参 考 文 献

- [1] YY/T 0127.16—2009 口腔医疗器械生物学评价 第2单元:试验方法 哺乳动物细胞体外染色体畸变试验
-





中华人民共和国医药  
行业标准  
医疗器械遗传毒性试验  
第2部分:体外哺乳动物细胞  
染色体畸变试验  
YY/T 0870.2—2013

\*

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(100013)  
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)64275323 发行中心:(010)51780235

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

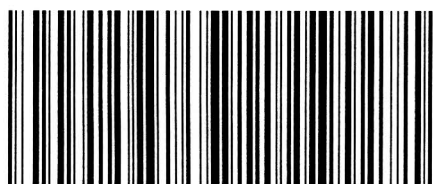
\*

开本 880×1230 1/16 印张 1 字数 20 千字  
2014年1月第一版 2014年1月第一次印刷

\*

书号: 155066·2-26375 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 0870.2—2013