



中华人民共和国医药行业标准

YY/T 0127.17—2014

口腔医疗器械生物学评价 第 17 部分： 小鼠淋巴瘤细胞(TK)基因突变试验

Biological evaluation of medical devices used in dentistry—
Part 17: Mouse lymphoma cells (TK) gene mutation test

2014-06-17 发布

2015-07-01 实施

前 言

本部分是《口腔医疗器械生物学评价》系列标准中的一部分标准。

《口腔医疗器械生物学评价系列标准》中的 YY/T 0268《牙科学 口腔医疗器械生物学评价 第1单元:评价与试验》是口腔医疗器械生物学评价与试验项目的选择,为指南性标准。

——YY/T 0127 是口腔医疗器械具体生物试验方法标准,其中 YY/T 0127 共分为以下部分:

——YY/T 0127.1 口腔材料生物试验方法 溶血试验;

——YY/T 0127.2 口腔医疗器械生物学评价 第2单元:试验方法 急性全身毒性试验:静脉途径;

——YY/T 0127.3 口腔医疗器械生物学评价 第3部分:根管内应用试验;

——YY/T 0127.4 口腔医疗器械生物学评价 第2单元:口腔材料生物试验方法 骨埋植试验;

——YY/T 0127.5 口腔医疗器械生物学评价 第5部分:吸入毒性试验;

——YY/T 0127.6 口腔材料生物学评价 第2单元:口腔材料生物试验方法 显性致死试验;

——YY/T 0127.7 口腔材料生物学评价 第2单元:口腔材料生物试验方法 牙髓牙本质应用试验;

——YY/T 0127.8 口腔材料生物学评价 第2单元:口腔材料生物试验方法 皮下植入试验;

——YY/T 0127.9 口腔材料生物学评价 第2单元:口腔材料生物试验方法 细胞毒性试验:琼脂覆盖法及分子滤过法;

——YY/T 0127.10 口腔医疗器械生物学评价 第2单元:试验方法 鼠伤寒沙门氏杆菌回复突变试验(Ames 试验);

——YY/T 0127.11 牙科学 用于口腔的医疗器械生物相容性临床前评价 第2单元:口腔材料试验方法 盖髓试验;

——YY/T 0127.12 牙科学 口腔医疗器械生物学评价 第2单元:试验方法 微核试验;

——YY/T 0127.13 口腔医疗器械生物学评价 第2单元:试验方法 口腔黏膜刺激试验;

——YY/T 0127.14 口腔医疗器械生物学评价 第2单元:试验方法 急性经口全身毒性试验;

——YY/T 0127.15 口腔医疗器械生物学评价 第2单元:试验方法 亚急性和亚慢性全身毒性试验:经口途径;

——YY/T 0127.16 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;

——YY/T 0127.17 口腔医疗器械生物学评价 第17部分:小鼠淋巴瘤细胞(TK)基因突变试验。

本部分为 YY/T 0127 的第17部分。

本部分按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

请注意本标准的某些内容可能涉及专利。本标准的发布机构不应承担识别这些专利的责任。

本部分主要参照 GB/T 16886.3—2008(ISO 10993.3:2003)中推荐的 OECD GUIDELINE FOR THE TESTING OF CHEMICALS “In Vitro Mammalian Cell Gene Mutation Test” 476:1997 方法制定。

本部分由国家食品药品监督管理总局提出。

本部分由全国口腔材料和器械设备标准化技术委员会(SAC/TC 99)归口。

YY/T 0127.17—2014

本部分起草单位：四川医疗器械生物材料和制品检验中心(四川大学)、国家食品药品监督管理局北大医疗器械质量监督检验中心、上海生物材料研究测试中心、深圳市医疗器械检测中心。

本部分主要起草人：梁洁、袁瞰、张金、孙姣、曹苹、林红、李秋、朱蔚精、陆华、刘尧。

口腔医疗器械生物学评价
第 17 部分：
小鼠淋巴瘤细胞(TK)基因突变试验

1 范围

YY/T 0127 的本部分规定了口腔医疗器械小鼠淋巴瘤细胞(TK)基因突变试验方法,包括操作步骤、数据处理和结果判定。

本部分适用于测定口腔医疗器械的致突变性。

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/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 16886.12 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

突变频率 mutant frequency

观察到的突变细胞数除以存活细胞数。

3.2

相对总生长 relative total growth

处理组随时间延长细胞的生长与阴性对照组的细胞增长数之比,计算为相对悬浮生长与相对存活率的乘积。

3.3

相对悬浮生长 relative suspension growth

表达期末处理组与阴性对照组的细胞增长数之比。

3.4

活力 viability

表达期后平板培养时处理组细胞集落形成效率。

3.5

相对存活率 relative survival; RS

处理期末平板培养时处理细胞的集落形成效率。通常用处理组与阴性对照组细胞活力的相对数表示。

YY/T 0127.17—2014

4 仪器及试剂

4.1 实验室常用设备

倒置相差显微镜,细胞计数器,洁净工作台,CO₂ 恒温培养箱,恒温水浴箱,移液器,低温高速离心机,低温冰箱(低于-80℃)或液氮罐等。

4.2 培养基、试剂及耗材

4.2.1 生长培养基:DMEM、RPMI 1640 培养基或其他合适的培养基,加 10%灭活马血清、100 U/mL 青霉素及 100 μg/mL 链霉素。

4.2.2 THMG 培养基:RPMI 1640 培养基,加 10%马血清、3 μg/mL 的胸苷、5 μg/mL 的次黄嘌呤、0.1 μg/mL 的氨甲蝶呤和 7.5 μg/mL 的甘氨酸。

4.2.3 THG 培养基:不含氨甲蝶呤的 THMG 培养基。

4.2.4 集落培养基:RPMI 1640 培养基,加青霉素 100 U/mL、链霉素 100 μg/mL、加 20%灭活马血清。

4.2.5 阳性对照物:甲基磺酸甲酯(MMS,以含 1%DMSO 的无血清培养基配制)、环磷酰胺(CPA,以无血清培养基配制)、苯并[a]芘、3-甲基胆蒎、三氟胸苷(TFT)。

4.2.6 pH 7.2 磷酸盐缓冲液:称取 NaCl 8.5 g、KCl 0.2 g、Na₂HPO₄ · 12H₂O 2.85 g(或 Na₂HPO₄ · 2H₂O 1.13 g)、KH₂PO₄ 0.27 g,溶于 1 000 mL 蒸馏水中,用 pH 计测定并调节至 pH 7.2。高压灭菌,冷却后冷藏保存。

4.2.7 细胞培养皿,96 孔细胞培养板,离心管等。

5 样品制备

5.1 试样制备

5.1.1 按产品说明书制备试样。按 GB/T 16886.12 的原则制备试验液或浸提液。

注:固化类材料应考虑固化后放置时间对试验结果的影响。

5.1.2 溶剂或浸提介质可选用水、生理盐水、无血清培养基等。

5.1.3 适当时,应使用两种适宜的浸提介质,一种是极性溶剂,另一种是非极性溶剂或适合于医疗器械性质和使用的液体,两种溶剂均应与试验系统相容。

注:常用的非极性溶剂,如浓度不大于 1%的 DMSO 等。

5.2 对照

5.2.1 阴性对照:同批号受试物的溶剂或浸提介质。

5.2.2 阳性对照:无活化系统可选择甲基磺酸甲酯(MMS,以含 1%DMSO 的无血清培养基配制)、甲磺酸乙酯(EMS)、丝裂霉素 C(MMC);有活化系统可选择环磷酰胺(CPA,以无血清培养基配制)、苯并[a]芘、3-甲基胆蒎等。

注 1:阴性和阳性对照都应受试物相同的试验条件下制备。

注 2:必要时还应设置空白对照。

6 试验方法

6.1 细胞系

6.1.1 细胞系

本部分使用 L5178Y tk^{+/+} 3.7.2C 小鼠淋巴瘤细胞。

6.1.2 细胞自发突变清除

每次试验前应适时检查细胞的自发突变频率。当细胞突变频率偏高时,按下列步骤对自发突变细胞进行清除:

- a) 将对数生长的细胞配制成 2×10^5 个/mL,加入 100 倍的 THMG 液,加入量为总体积的 1%。置 CO_2 培养箱(含体积分数 5% CO_2 ,下同)培养 24 h;
- b) 培养 24 h 后以 200 g 离心 5 min,除去上清液,加入新鲜 RPMI 1640 培养液,细胞密度调整为 2×10^5 个/mL。加入 100 倍的 THG 液,加入量为总体积的 1%。培养 45 h~48 h,注意避免过度培养;
- c) 将培养后的细胞以 200 g 离心 5 min,弃去上清液,加入新鲜培养基配制成 5×10^4 个/mL~ 10×10^4 个/mL 的细胞悬液,培养 24 h 后,取少量细胞,测定 PE 和 SMF;
- d) 将清除自发突变的细胞扩增后分装于冻存管中冻存。

6.2 体外代谢活化系统

小鼠淋巴瘤基因突变试验应在有和无代谢活化系统的条件下,使细胞与试验物质接触。本部分使用的代谢活化系统为大鼠肝 S9 加辅助因子(制备方法参见 YY/T 0127.10)。

6.3 染毒剂量(细胞与受试物接触)

6.3.1 在细胞与受试物接触时,应考虑受试物对细胞毒性的影响。宜根据细胞毒性与预试验的相对存活率进行剂量设计,一般在相对存活率为阴性对照组的 20%~80% 范围内设高、中、低三个剂量组。组距可选择 $2 \sim \sqrt{10}$ 之间的一个值,按等比级数分组。低剂量组应无细胞毒性或略有细胞毒性。或者,对于有毒性的材料,最高剂量可选择 10%~20% 相对悬浮生长(RSG)的剂量。

6.3.2 对于无细胞毒性的受试物,可采用单剂量组试验(即限度试验),受试物的浓度为最大耐受剂量;使用浸提液试验时,为浸提原液。

6.4 试验步骤

6.4.1 细胞培养

取冻存的细胞,接种于生长培养基内,在 37 °C,5% CO_2 饱和湿度的培养箱中作常规悬浮培养,使细胞生长至对数生长期。取对数生长期的 L5178Y tk^{+/+} 3.7.2C 小鼠淋巴瘤细胞,调整细胞浓度至 10^6 个/mL。

6.4.2 处理(受试物与细胞接触)

取对数生长期且细胞浓度为 10^6 个/mL 的细胞,分别加入含有不同剂量受试物或其浸提液的新鲜集落培养基中,在有或无代谢活化系统条件下,置 37 °C,5% CO_2 饱和湿度培养箱继续培养,通常为 3 h~6 h,(可延长到 1 个或多个细胞周期)。离心,弃上清液,用 PBS 或无血清培养基洗涤细胞 1 次,重新悬浮细胞于含 20% 马血清的 RPMI 1640 培养基中,并调整细胞密度为 2×10^5 个/mL。

细胞与受试物接触 3 h~6 h,若试验结果为阴性时,还应在不加 S9 条件下进行细胞与受试物接触 24 h 的试验。

6.4.3 PE₀(0 天的平板接种效率)测定

取 6.4.2 中获得的适量细胞悬液,梯度稀释至 8 个/mL,接种于 96 孔板(每孔 0.2 mL,即平均 1.6 个/孔),每个剂量做一块 96 孔板,于 37 °C,5% CO_2 饱和湿度下培养 12 d,计数每块平板中有集落

YY/T 0127.17—2014

生长的孔数,计算 0 d 的平板接种效率(PE_0)。

6.4.4 表达

步骤 6.4.2 所得的细胞悬液继续培养 2 d,每天计数细胞密度并保持密度在 10^6 个/mL 以下。计算相对悬浮生长(Relative Suspension Growth,RSG)。

6.4.5 PE_2 (2 d 的平板接种效率)测定

步骤 6.4.4 的第 2 天表达培养结束后,取适量细胞悬液,按步骤 6.4.3 作梯度稀释并接种于 96 孔板,培养 12 d,计数每块平板有集落生长的孔数,计算 2 d 的平板接种效率(PE_2)。

6.4.6 TFT 抗性突变频率(MF)测定

步骤 6.4.4 的第 2 天表达培养结束后,取适量细胞悬液,调整细胞密度为 1×10^4 个/mL,加入三氟胸苷,终浓度为 $3 \mu\text{g/mL}$ 。混匀,接种于 96 孔板(每孔加 0.2 mL,即平均 2 000 个/孔),每个剂量组作 2 块平板, 37°C ,5% CO_2 饱和湿度下培养 12 d,计数有突变集落生长的孔数。突变集落按大集落(LC:直径 $\geq 1/4$ 孔径,密度低)和小集落(SC:直径 $< 1/4$ 孔径,密度高)分别计数,极小集落可再继续培养 3 d 后计数,计算 TFT 抗性突变频率(MF)。

7 数据处理

7.1 平板效率(PE_0 和 PE_2)

$$PE = \frac{-\ln(EW/TW)}{n} \times 100\% \quad \dots\dots\dots(1)$$

式中:
 PE ——平板效率, PE_0 或 PE_2 ;
 EW ——无集落生长的孔数;
 TW ——总孔数;
 n ——每孔接种细胞数,此式中 n 取 1.6。

7.2 相对存活率(RS)

$$RS = \frac{PE_s}{PE_c} \times 100\% \quad \dots\dots\dots(2)$$

式中:
 RS ——相对存活率, RS_0 或 RS_2 ;
 PE ——平板效率, PE_{0s} 、 PE_{0c} 或 PE_{2s} 、 PE_{2c} ;
 s ——剂量组;
 c ——阴性对照组。

7.3 TFT 抗性突变频率(MF)

$$MF = \frac{-\ln(EW/TW)/n}{PE_2} \quad \dots\dots\dots(3)$$

应分别计算大集落突变频率(L-MF),小集落突变频率(S-MF)和总突变频率(T-MF)。
式中:
 MF ——TFT 抗性突变频率(通常以 10^{-6} 表示);

- PE_2 ——第二天的平板效率;
- EW ——无集落生长的孔数;
- TW ——总孔数;
- n ——每孔接种细胞数,此式中 n 取 2 000。

7.4 相对悬浮生长(RSG)

$$RSG = \frac{H_s}{H_c} \dots\dots\dots(4)$$

- 式中:
- RSG ——相对悬浮生长;
 - H_s ——处理组表达期末(第 2 天)细胞增殖倍数;
 - H_c ——对照组表达期末(第 2 天)细胞增殖倍数。

7.5 相对总生长(RTG)

$$RTG = RSG \times RS_2 \times 100\% \dots\dots\dots(5)$$

- 式中:
- RTG ——相对总生长;
 - RSG ——相对悬浮生长;
 - RS_2 ——第 2 天的相对存活率。

7.6 小集落突变百分率(SCM)

$$SCM = \frac{S-MF}{T-MF} \times 100\% \dots\dots\dots(6)$$

- 式中:
- SCM ——小集落突变百分率;
 - $S-MF$ ——小集落突变频率;
 - $T-MF$ ——总突变频率。

8 结果判定

8.1 试验成立的条件

- 8.1.1 阴性对照或溶剂对照在加与不加 S9 混合物时,短时间处理(3 h~6 h):阴性对照和溶剂对照的 PE_0 和 PE_2 应为 60%~120%;MF 值应在 $50 \times 10^{-6} \sim 170 \times 10^{-6}$;悬浮生长(SG)应在 8~32;长时间处理(24 h):悬浮生长(SG)应在 32~180 范围,其余的 PE_0 和 PE_2 , MF 值与短时间处理相同。否则,试验数据不可用。
- 8.1.2 阳性对照的总突变频率(阳性的 MF 值减去阴性对照的 MF 值)应 $\geq 300 \times 10^{-6}$ 。其中,小集落的 MF 值至少应为 40%,即 MF 值至少应 $\geq 120 \times 10^{-6}$;或阳性对照的 MF 值与受试物的浓度存在剂量相关关系。
- 8.1.3 满足以上条件,试验结果成立。

8.2 数据统计分析

选择适当的统计方法,如 X^2 检验,对数据进行统计学分析,显著性水平 $\alpha=0.05$ 。必要时进行线型趋势分析。

YY/T 0127.17—2014

8.3 结果的判定

8.3.1 受试物 MF 值出现剂量依赖性增高趋势,各剂量组中任意一组剂量的 MF 值 \geq 阴性对照值 MF 值加 100×10^{-6} (总体评价因子),则判定为阳性。

8.3.2 当受试物的 MF 值 \geq 阴性对照的 MF 值再加 100×10^{-6} 时(相当于阴性对照 MF 值的 2 倍),则判定为阳性。

8.3.3 各剂量组的 MF 值若出现剂量依赖性增高趋势,若各剂量组的 MF 值或高或低,各剂量组的数据相差较大时,应重复试验。

8.3.4 仅高剂量组的 MF 值出现明显增高,则试验结果可疑。

8.3.5 若试验条件成立,试验各剂量组均未见 MF 值明显增高,即可判定为阴性。

8.3.6 若任意一剂量组统计学结果有显著性差异,即判断为阳性。若统计学结果无显著性差异,即判断为阴性。

参 考 文 献

- [1] GB/T 16886.1—2001 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
 - [2] GB/T 16886.3—2008 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
 - [3] GB/T 16886.12—2005 医疗器械生物学评价 第12部分:样品制备与参照样品
 - [4] YY/T 0127.10—2009 口腔医疗器械生物学评价 第2单元:试验方法 鼠伤寒沙门氏杆菌回复突变试验(Ames 试验)
 - [5] GB 15193.20—2003 TK 基因突变试验
 - [6] 卫生部.保健食品安全性毒理学评价规范.2003.
 - [7] 王欣,王雪,张旻,等.小鼠淋巴瘤细胞 tk 基因突变试验的结果判定.中国新药杂志.2010,16:1399-1401
 - [8] Guidance on genotoxicity testing and data interpretation for pharmaceuticals intended for human use (current step 2 version); International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use.2008
-

中 华 人 民 共 和 国 医 药
行 业 标 准
口腔医疗器械生物学评价
第 17 部分：
小鼠淋巴瘤细胞(TK)基因突变试验
YY/T 0127.17—2014

*

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

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 0.75 字数 13 千字
2014 年 9 月第一版 2014 年 9 月第一次印刷

*

书号: 155066 • 2-27336 定价 18.00 元



YY/T 0127.17-2014