

体内彗星试验

In Vivo Mammalian Alkaline Comet Assay

（征求意见稿）

1 范围

本规范确定了体内彗星试验的基本原则、要求和方法。

本规范适用于化妆品原料的遗传毒性检测。

2 规范性引用文件

OECD Guideline for the testing of chemicals (TG 489, Adopted: 26 September 2014)

OECD No. 195: Report of the JACVAM Initiative International Pre-validation Studies of the in vivo Rodent Alkaline Comet Assay for the Detection of Genotoxic Carcinogens. Jul. 15, 2014.

OECD No. 196: Report of the JACVAM Initiative International Validation Studies of the in vivo Rodent Alkaline Comet Assay for the Detection of Genotoxic Carcinogens. Jul. 15, 2014.

ICH S2 (R1): Guidance on genotoxicity testing and data interpretation for pharmaceuticals intended for human use, Nov. 9, 2011.

3 定义

3.1 碱性单细胞凝胶电泳：在单个细胞或细胞核水平检测 DNA 损伤的一种敏感技术。

3.2 彗星：经过电泳后细胞核的形状，形似彗星。细胞核部分形成彗星头部，在电场力的作用下脱离细胞核的 DNA 片断形成彗尾。

3.3 “刺猬状”细胞：显微图像下由小或模糊不清的头以及大的弥漫性尾组成的细胞。

3.4 尾部 DNA 含量：反应总强度（彗头与彗尾之和）中彗星的强度。可反应 DNA 片断的数量，用百分比表示。

3.5 最大耐受剂量：试验期内引起动物产生轻微毒性效应的最高剂量，在这个剂量下，动物产生明显的临床体征，如异常行为或反应，轻微的体重下降或靶组织细胞毒性，但是并不会引起死亡或痛苦。

4 原理

DNA 双螺旋结构在强碱性溶液中（pH>13）会松弛，在电场力的作用下，正常的 DNA

保留在原位不动，而单链或双链 DNA 断裂所形成的 DNA 片断会向阳极移动，形成彗星状。DNA 片断所形成的彗星状拖尾的长度及强度可以反应 DNA 片断的大小和数量。通过检测尾部 DNA 含量 (%) 等终点指标可以评价 DNA 损伤程度。

5 试验基本原则

动物染毒一定时间后处死并解剖动物，获取靶器官，制备单细胞悬液。单细胞悬液与琼脂糖混合后经过裂解过程去除细胞膜，并暴露于强碱性溶液 (pH>13) 中进行 DNA 解旋，经过电泳、固定、染色，在荧光显微镜下观察，通过分析软件对彗星状细胞进行分析，判定 DNA 损伤程度。每个样品需分析足够数量的细胞进行最终结果评价。

6 溶液的配制 (所有溶液均现用现配)

6.1 0.5 % (w/v) 低熔点凝胶

低熔点胶以 0.5 % (w/v) 的浓度溶于 D-PBS (无 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 和酚红) 溶液中，并利用微波炉加热。配好的胶保存在 $37^{\circ}\text{C}\sim 45^{\circ}\text{C}$ ，用后弃去。

6.2 1.0%~1.5% (w/v) 基底层标准琼脂糖凝胶

常规熔点琼脂糖经微波炉加热溶于磷酸盐缓冲液中 (pH7.0~7.4，不含 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 和酚红)，制成 1.0%~1.5% (w/v) 标准琼脂糖凝胶。

6.3 裂解液

将 100 mM EDTA-2Na、10 mM tris-base、2.5 M NaCl 溶于纯水中，用 5 mol/L NaOH 或 6 mol/L HCl 将溶液 pH 调至 10，保存于 $4^{\circ}\text{C}\sim 8^{\circ}\text{C}$ 冰箱中。试验前，向裂解液中加入 1 % (v/v) triton-X100 和 10 % (v/v) DMSO，保存于 $4^{\circ}\text{C}\sim 8^{\circ}\text{C}$ 冰箱至少 30min。

6.4 碱性解旋液和电泳液

1 mM EDTA-2Na 和 300 mM NaOH 溶于纯水中，pH \geq 13，用前保存于 $4\sim 8^{\circ}\text{C}$ 冰箱中，并测定其 pH 值。

6.5 中和液

0.4 M tris-base 溶于纯水中 (用 5 mol/L NaOH 或 6 mol/L HCl 调节 pH 7.5)，保存于 $4^{\circ}\text{C}\sim 8^{\circ}\text{C}$ 冰箱中。

6.6 组织匀浆缓冲液

将 20 mM EDTA-2Na 溶于 HBSS (无 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 和酚红) 中，用 5 mol/L NaOH 或 6 mol/L HCl 将其 pH 调至 7.5，保存于 $4^{\circ}\text{C}\sim 8^{\circ}\text{C}$ 冰箱中，使用前加入 10% DMSO。

6.7 染液

DNA 荧光染料（如 SYBR Gold、SYBR Green I、Gelred、碘化丙啶或溴化乙锭等），制备和使用按照产品要求。

7 实验动物和饲养环境

7.1 动物的选择

动物的选择应符合 GB14922.1 和 GB14922.2 的有关规定，选用 SPF 级健康成年啮齿类动物。常用 6 周龄以上雄性大鼠。实验开始时，动物体重的差异应不超过 $\pm 20\%$ 。

7.2 动物饲养

动物饲养条件应符合 GB14925、饮用水应符合 GB5749、饲料应符合 GB14924 的有关规定。可分笼群饲（每笼通常不超过 5 只），也可单笼饲养。室内的温度应控制在 $22^{\circ}\text{C}(\pm 3^{\circ}\text{C})$ 。相对湿度应控制在 $50\% \sim 60\%$ ，不低于 30% ，最高不超过 70% （清洁时例外）。照明应控制为 12 小时光照、12 个小时黑暗。常规饮食，自由饮水。

7.3 动物分组

首先应确定实验分组，动物随机分配为对照组和试验组。试验开始前，实验动物至少适应 5 天。一般实验设计需要三个剂量组以及阴性和阳性对照组，每组动物至少 5 只。编号应使用创伤较小的方法，包括：耳孔法、标签法、烙印法、染色法。

8 试验条件

8.1 溶剂

溶剂不应该产生毒性作用，并且不应当与受试物产生化学反应。如果使用不常用的溶剂，应有数据支持该溶剂在受试动物的应用、暴露途径及检测终点等方面是可行的。应根据受试物的理化性质（水溶性或脂溶性）确定受试物所用的溶剂，通常用水、植物油等。应当注意的是，某些溶剂（特别是粘稠的溶剂）多次使用后，能诱导炎症反应及在接触部位可能增加 DNA 链断裂的背景水平。

8.2 样品的制备

固体受试物应溶于适当的溶剂中或混合在饮食或饮水中。液体受试物可直接或稀释后染毒。用吸入暴露时，根据受试物的物理化学性质，将其处理为气体、蒸汽或气溶胶。受试物应现用现配。

8.3 对照

阳性对照。每次试验都应设置阳性对照，每种性别至少有 3 只可供分析的动物。如需进行多次采样（例如，用单一的染毒方案），不仅需要在每一个采样点设置阳性对照，而且要确保平行性。阳性对照的暴露途径可以与受试物不同。阳性对照物质应该能够引起靶器官产

生 DNA 链断裂，可以选择甲磺酸乙酯（EMS）作为阳性对照，其已经被证实能够诱发多种组织器官产生 DNA 链断裂效应。阳性对照应选择能够产生中等毒性效应的剂量，同时能够评估试验的可行性和灵敏度，可以根据实验室建立的阳性物剂量-反应曲线进行选择。阳性对照组的尾 DNA 含量（%）应该与实验室前期建立的数据范围保持一致。阳性对照物质及其靶器官（作用于啮齿动物）见表 1。也可以选择其他一些被证实阳性的物质。

表 1 阳性对照物及其靶器官

化学物及 CAS.号	靶器官
甲磺酸乙酯 EMS (CAS 62-50-0)	所有组织
乙基亚硝基脒 (CAS 759-73-9)	肝、胃、十二指肠、空肠
甲磺酸甲酯 MMS (CAS 66-27-3)	肝、胃、十二指肠、空肠、肺及支气管肺泡细胞、肾、膀胱、睾丸、骨髓造血系统
N-甲基-N-硝基-N-亚硝基胍 (CAS 70-25-7)	胃、十二指肠、空肠
二甲基胍吡啶 (CAS 306-37-6)	肝、肠
甲基亚硝基脒 (CAS 684-93-5)	肝、骨髓、血细胞、肾、胃、空肠、脑

阴性对照。阴性对照组的动物用溶剂单独染毒，其余操作过程与试验组相同，每次试验每个采样点每种组织都应该设置阴性对照。阴性对照组的尾 DNA 含量（%）应该在实验室前期建立的背景数据范围之内。必要时增加空白对照。

9 剂量设计

受试物应设3个剂量组。首先通过预试验确定最大耐受剂量,一般取最大耐受剂量及至少两个适当间隔的剂量水平（优选剂量间隔为 $\sqrt{10}$ ）。对于无毒物质，14天或以上的染毒期，最大染毒剂量采用1000 mg/kg/BW/d。如果染毒期少于14天，最大染毒剂量采用2000 mg/kg/BW/d。

10 染毒方式

染毒方式一般选用灌胃方式，除一些阳性物质外，一般不建议腹腔注射。灌胃或注射一次染毒的最大体积取决于受试动物的体重，灌胃量不应超过1 mL/100g 体重，水溶液受试物最大染毒量可达到2mL/100g 体重。

11 采样时间

最佳采样时间是由受试物或染毒途径决定的，依据受试物药代动力学数据[在血浆中达到峰值的时间或组织浓度时，或在多次染毒后的稳定状态]。在没有动力学数据的情况下，一般在持续两次及以上染毒的最后一次染毒后2h~6h 采样，或在单次染毒后的2h~6h 和16h~26h 均采样。在最后一个（或一次性）采样后，在同一时间内尸检所有动物。采样时间

还可以依据出现在靶器官（如果可用）上的毒作用表现来判断。

12 试验方法

12.1 组织收集及样本制备

肝脏是最常用来研究并收集数据的组织。如果没有任何背景资料或特定组织，即可选取肝脏。在某些情况下，也可检查直接接触部位的脏器（如，经口染毒可选取胃）。肝脏及胃的组织收集方法如下。

肝脏：

- （1）取约5mm³肝左叶中间部分，用冷的组织匀浆缓冲液洗去多余的血细胞；
- （2）剩下的肝左叶部分用福尔马林固定用于病理检查；
- （3）取下的肝组织用剪刀剪约100次以释放细胞；
- （4）用3 mL 组织匀浆缓冲液 将剪碎的细胞制成单细胞悬液，轻轻吹打约15次，过筛（孔径：40μm）得上清液用于制片；

胃：

- （1）将胃沿胃大弯剪开，用冷的PBS清洗胃部；
- （2）胃分为左右两部分，分别用于制片和福尔马林固定病理检查；
- （3）用冷的组织匀浆缓冲液 清洗用于试验的胃，弃去前胃部分，腺胃浸于现配冷的组织匀浆缓冲液 15min~30min；
- （4）胃表面上皮用塑料刮板/解剖刀片或Teflon 刀片刮几次后用冷的组织匀浆缓冲液充分冲洗；
- （5）用不锈钢压舌板平的那一面/解剖刀片或Teflon 刀片轻轻刮胃粘膜5次或更多以释放细胞；
- （6）用3 mL 组织匀浆缓冲液 将刮下的细胞制成单细胞悬液，轻轻吹打约15次，过筛（孔径：40 μm）得上清液用于制片；

备注：最好将取下的胃展平后固定在硅胶垫板上再进行细胞的刮取（该垫板也需冰浴）。

12.2 制备玻片

预涂载玻片。制片前，载玻片应用甲醇浸泡过液以除去表面的油脂，风干。预涂载玻片保证干净无尘，滴1%凝胶溶液50μL于载玻片上，加上盖玻片，使琼脂糖溶液散开，凝固后取下盖玻片，风干30min。

制片过程需在单细胞悬液制备完成1h内完成。用冷的组织匀浆缓冲液将细胞浓度调至 2.0×10^5 个/mL。取上述制备好的各组织单细胞悬液与0.5%低熔点凝胶1:10混合(应确保玻片上的低熔点琼脂糖的百分比不少于0.45%)。

混匀后的单细胞悬液与低熔点琼脂糖混合物均匀铺于第一层凝胶上面，加上盖玻片，置于4℃冰箱固化5-10min，至凝胶凝固，盖玻片可慢慢从琼脂糖上移除。

12.3 裂解细胞

载玻片在预冷的裂解液中，于4℃~8℃冷藏浸泡至少1h（或过夜），应避免暴露于可能含有紫外线的白光，可以使用黄光或避光。裂解后使用纯净水、中性缓冲液或磷酸盐缓冲液来冲洗载玻片以去除残留洗涤剂和盐份。

12.4 解旋和电泳

载玻片均衡放置在水平电泳槽中，加入足够的电泳溶液，使得玻片的表面被完全覆盖（覆盖深度应该始终一致），并尽量减少批次之间的变化。玻片应该放置至少20min，等待DNA解旋。

在0.7V/cm 条件下，电泳时间不少于20min。电泳时间越长（例如30min~40min，可最大限度地提高灵敏度）已知诱变剂的阳性反应越强。但是延长电泳时间也可能会导致阴性对照组样品过度迁移。根据实验需求调整缓冲液的深度以保持电压稳定，以0.7 V / cm的速度电泳，电流应保持在300 mA。在电泳开始和结束都需要记录电流。用于解旋和电泳通常在4℃~10℃避光进行，记录解旋开始时、电泳开始时和电泳结束后的温度。

12.5 中和与固定

电泳后，用预冷的中和缓冲液漂洗玻片至少 5 min，在 37℃ 下干燥 15min 后，室温或冷藏保存（湿度不高于 60%）。

12.6 染色

使用适当的DNA荧光染料（如SYBR Gold、SYBR Green I、Gelred、碘化丙啶或溴化乙锭等）避光染色5min。可在红光或黄光下进行，避免受试细胞受外界其他因素影响，增加结果的可靠性和真实性。

13 结果测定方法

13.1 使用自动或半自动的图像分析系统来定量评分彗星。显微镜使用恰当的放大倍数（如 200 倍）进行观察，显微镜上可配备有荧光发射器和适当的检测器或数码照相机（如 CCD）。

13.2 分析所有玻片，包括阴性对照和阳性对照，每个样本（每个动物的每个组织）至少观察 150 个细胞。每剂量至少 5 只动物，每只动物计数 150 个细胞。在同样的密度下多观察几个视野以确保彗星的尾部没有重叠。玻片边缘部分不需要计分。单独记录“刺猬状”细胞的发生频率。

13.3 细胞在彗星图像中可分为 3 类图谱，即计分细胞（有清晰的头部和尾部并与相邻细胞没有干扰）、“刺猬状”细胞和不计分细胞（如彗星头、彗星尾不清晰或重叠细胞等），其中只有计分细胞能够进行尾部 DNA 百分比的分析，避免伪影。

13.4 彗星试验 DNA 链断裂的观察终点以尾部 DNA 含量（也称尾部强度）作为结果评价与分析的指标。

14 试验结果的评价

14.1 试验结果计算方法：每个样本（每个动物的每个组织）至少观察 150 个细胞，计算每个细胞的终点指标（尾长、尾矩、尾 DNA 含量），每个终点指标首先计算 150 个细胞的平均值，再计算每剂量组 5 只动物的平均值作为该剂量组该项指标的结果。

$$\text{每个细胞的终点指标} = \frac{T_i - \bar{M}_{\text{溶剂对照组}}}{\bar{M}_{\text{空白对照组}}}$$

T_i = 受试组或阳性物终点测定指标（尾长、尾矩、尾部 DNA 含量）

$\bar{M}_{\text{溶剂对照组}}$ = 溶剂对照组终点测定指标（尾长、尾矩、尾部 DNA 含量）平均值

$\bar{M}_{\text{空白对照组}}$ = 空白对照组终点测定指标（尾长、尾矩、尾部 DNA 含量）平均值

14.2 试验满足以下标准，则认为试验成立：

14.2.1 阴性对照组数值落在实验室预先建立的历史阴性对照数据范围内，且阴性对照组尾部 DNA 含量百分比值应 < 8%；

14.2.2 阳性对照组数值落在实验室预先建立的历史阳性对照数据范围内，且与阴性对照组数值相比差异有统计学意义；

14.3 受试物组与平行阴性对照组相比，尾部 DNA 含量百分比值增加且差异有统计学意义，并有明显剂量-反应关系，则判定该受试物体内彗星试验结果阳性，认为在本试验体系中，该受试物可诱导靶组织细胞 DNA 断裂；若尾部 DNA 含量百分比增加且差异有统计学意义，但无剂量-反应关系，则应进行重复试验，结果能重复可判定为阳性；若受试物所有剂量组尾部 DNA 含量百分比值与阴性对照组相比差异无统计学意义，则判定该受试物体内彗星试验结果阴性，在本试验体系中受试物不能诱导靶组织细胞的 DNA 断裂。

15 试验报告

试验报告应包括以下内容：

试验名称、试验单位名称、报告编号；

受试物名称，批号、理化性状、配制方法、所用溶剂及配制；

动物种属和品系、体重、数量、来源（注明合格证号和动物级别）；

动物饲养环境，包括饲料来源、室温、相对湿度、实验动物室合格证号；

剂量和组别：剂量选择原则、剂量和组别、阴性和阳性对照物和剂量；

试验条件和方法：受试物的准备过程及染毒过程描述、靶器官选择原则、简述解剖及组织器官分离过程及单细胞悬液的制备方法、裂解液及解旋、电泳液的主要成份描述、电泳条件、染色技术，所采用的统计学方法；

试验结果：记录每只动物的健康状况和体征观察情况，每只动物观察和分析细胞数，以列表方式报告每组动物的尾部DNA百分比和“刺猬状”细胞发生率，剂量-反应关系，给出数据的统计结果，以及组织病理检查结果及是否有病理性损伤；

试验结论：阳性结果表明，在本试验条件下受试物具有引起哺乳动物靶组织细胞DNA损伤的作用；阴性结果表明，在本试验条件下受试物不引起哺乳动物靶组织细胞DNA损伤。

体内彗星试验方法起草说明

为加强化妆品的监督管理，进一步提高化妆品使用安全性，国家药品监督管理局化妆品标准专家委员会秘书处组织开展了体内彗星试验方法的起草工作。现就起草工作有关情况说明如下：

一、起草原则

本方法主要参照 OECD 在 2014 年发布的“化学品检测指南——体内哺乳动物彗星试验”（TG489）编制。结构框架在现行《化妆品安全技术规范》的基础上进行调整，包含了范围、定义及通用技术等，本着继承发展、科学规范、与时俱进的指导原则，突出体现适用性与可操作性。

二、起草过程

起草过程中主要参照 OECD 的“Guideline for testing of chemicals（TG489）”。先后征求了“上海国家新药安全评价研究中心”及“中国疾病预防控制中心”多位专家意见，修改后形成初稿。初稿形成后经专家评审讨论，形成如下意见：1.与 OECD 原文不同的内容，在起草说明中应加以说明；2.对方法中的实验动物的周龄、性别、灌胃体积，在 OECD 原文基础上，根据国内实际操作情况进行调整；3.建议在结果表述方法中增加计算方法描述及公式。根据专家意见，并参考最新发布的 GB31655-2021《食品安全国家标准哺乳动物体内碱性彗星试验》对初稿进行反复修改，形成修改稿。

修改稿经“化妆品标准专家委员会”专家评审，形成评审意见：1.方法文本 13.4 修改为“彗星实验 DNA 链断裂的观察终点以尾部 DNA 含量作为结果评价与分析的指标”；2. 方法适用范围应为化妆品原料；3. 规范方法文本。结论：修改后结题。根据专家意见修改文本，形成终稿。

三、与我国已有相关标准的关系

我国现已发布国家标准 GB31655-2021《食品安全国家标准哺乳动物体内碱性彗星试验》、GBZ/T243-2013《单细胞凝胶电泳用于受照人员估算技术规范》以及行业标准 SN/T 2910.2-2011《出口辐照食品的鉴别方法 第 2 部分：单细胞凝胶电泳法》、SN/T 2497.12-2010《进出口危险化学品安全试验方法 第 12 部分：单细胞凝胶电泳分析试验》。本方法在参考上述我国已有相关标准的基础上，主要针对于化妆品原料的特点，以 OECD 发布的适用于化学品的彗星试验检测方法为依据进行编写，具有化妆品原料检测适用性及我国本土化可操作性的特点。

四、与国际同类标准的关系

本方法以 OECD 发布的“体内彗星试验”（TG489）为指导原则，根据国内实验条件及操作的具体情况，以现行《化妆品安全技术规范》为编撰模板，略有调整。

五、其他需要说明的问题

与 OECD 发布的 TG489 相比，具体调整内容如下：

1. 在体内动物试验中，可针对不同的靶器官进行研究。因此在本试验中组织器官的收集与处理需进行重点考虑。鉴于肝脏是最常用来研究并收集数据的组织，经大量文献调研及征求意见，本方法拟定在没有任何背景资料或特定组织，即可选取肝脏作为靶器官。另外，在某些情况下，应检查直接接触部位，由于本方法主要推荐以灌胃的方式进行染毒，因此胃部是主要直接接触部位，因此在本方法仅对肝脏及胃部的组织收集与处理的方法进行了详细描述。

2. 实验动物周龄在 OECD 的指导原则中描述大鼠为 6 周龄~10 周龄，也可以选择周龄稍大的动物。根据操作的实际上，在本方法中统一改为“6 周龄以上”。

3. 在 OECD 指导原则中关于实验动物性别中提到“雌雄各半”，但在其所引用的相关文献证明体内彗星试验中实验动物的性别对结果无明显影响，且国内一般均采用单一性别雄性大鼠进行该实验，因此根据国内实际操作情况，本方法中实验动物性别选择上统一改为“单一性别雄性大鼠”

4. 根据 OECD 对结果计算及解释方法的要求，结合国内外文献中体内彗星试验常用结果计算方式，以扣减对照组及计算平均值的方式进行结果计算，并列相应公式以清晰表述。

5. 在 OECD 原文的“附录 1 定义”部分有 4 个定义，其中第 3 个定义是关于“重要参数”的解释。在 OECD 的原文中，所有关键步骤的不可随意更改的参数都说明了这个为重要参数，在附录中又对“重要参数”的概念进行了进一步解释。而考虑到本规范的前提就是依照执行，对于其中的实验条件不可随意更改，因此在每一步骤就没有过多说明，因此“重要参数”这个概念在本规范的定义部分就进行了删减。

6. 在文中剂量水平设置环节中，出现了“最大耐受量（MTD）”的概念。OECD 原文是以同一段落中做以解释。考虑到规范描述的连贯性及国内规范撰写习惯，本规范在定义部分增加了“最大耐受量（MTD）”的概念。