

1 附 4

2 药包材细胞毒性试验方法

3 本法系将供试品或供试品溶液接触细胞，通过对细胞形态、增殖和抑制影响
4 的观察，评价供试品对体外细胞的毒性作用。

5 **试验用细胞** 推荐使用小鼠成纤维细胞 L-929。试验时采用传代 48 ~ 72 小
6 时生长旺盛的细胞。

7 **试验前的准备** 与样品及细胞接触的所有器具均需无菌。必要时可采用湿热
8 灭菌，如 115C°保持 30 分钟；干热灭菌，如 250C°保持 30 分钟或用 180C°保持
9 2 小时。

10 **供试品溶液的制备** 取供试品，按照“药包材生物学评价与试验选择指导原
11 则（9651）”中生物学试验的要求制备供试品溶液。

12 第一法 相对增殖度法

13 **阴性对照液制备** 为不加供试品的细胞培养液。

14 **阳性对照液制备** 取阳性参比物，按照供试品溶液的制备项下的规定进行，
15 也可使用 6.3%苯酚的细胞培养液。

16 **试验方法** 取 33 个培养瓶，分别加入 4×10^4 个/mL 浓度的细胞悬液 1mL，
17 细胞培养液 4mL，在 $37\text{C}^{\circ} \pm 1\text{C}^{\circ}$ ， $5\% \pm 1\% \text{CO}_2$ 的条件下培养 24 小时。培养 24 小时
18 后弃去原培养液。

19 阴性对照组：取 13 个培养瓶分别加入 5mL 阴性对照液；

20 阳性对照组：取 10 个培养瓶分别加入 5mL 阳性对照液。

21 供试品组：取 10 个培养瓶分别加入 5mL 含 50%供试品溶液的细胞培养液，
22 在 $37\text{C}^{\circ} \pm 1\text{C}^{\circ}$ ， $5\% \pm 1\% \text{CO}_2$ 条件下继续培养 7 天。

23 细胞形态学观察和计数：在更换细胞培养液的当天，取 3 瓶阴性对照组，并
24 在更换后第 2、4、7 天，每组各取 3 瓶进行细胞形态观察和细胞计数。

25 **毒性评定** 细胞形态分析标准按表 1 规定进行。

26 细胞相对增殖度分级标准按表 2 规定进行。

27 **表 1 细胞形态分析表**

| 反应程度 | 细胞形态 |
|------|---------------------------------|
| 无毒 | 细胞形态正常，贴壁生长良好，细胞呈棱形或不规则三角形 |
| 轻微毒 | 细胞贴壁生长好，但可见少数细胞圆缩，偶见悬浮死细胞 |
| 中度毒 | 细胞贴壁生长不佳，细胞圆缩较多，达 1/3 以上，见悬浮死细胞 |
| 重度毒 | 细胞基本不贴壁，90%以上呈悬浮死细胞 |

28 **表 2 细胞相对增殖度分级表**

| 分级 | 相对增殖度 (%) |
|----|-----------|
| 0 | ≥100 |
| 1 | 75~99 |
| 2 | 50~74 |
| 3 | 25~49 |
| 4 | 1~24 |
| 5 | 0 |

29 根据各组细胞浓度按下式计算细胞相对增殖度 (RGR)。

30
$$RGR = \frac{\text{供试品组 (或阳性对照组) 细胞浓度平均值}}{\text{阴性对照组细胞浓度平均值}} \times 100\%$$

31 **结果评价** 供试品组相对增殖度 (以第 7 天的细胞浓度计算) 为 0 级或 1
32 级判为合格。试验组相对增殖度为 2 级，应结合形态综合评价，轻微毒或无毒的
33 判为合格。试验组相对增殖度为 3~5 级判为不合格。

34 第二法 琼脂扩散法

35 本法适用于弹性体细胞毒性的测定。当聚合物供试品中可滤取的化学物质扩

36 散时，琼脂层可起到隔垫的作用保护细胞免受机械损伤。供试品溶液将通过一张
37 滤纸（表面积不小于 100mm²）进行试验。

38 **阴性对照制备** 取阴性参比物，例如高密度聚乙烯，按照供试品溶液的制备
39 项下的规定进行。

40 **阳性对照制备** 取阳性参比物，例如二乙基二硫代氨基甲酸锌的聚氨酯
41 （ZDEC），按照供试品溶液的制备项下的规定进行。可采用 10%二甲基亚砷
42 （DMSO）溶液，附着到生物惰性吸收性（例如超细硼硅玻璃纤维滤纸）的基质
43 上。

44 **试验方法** 取细胞悬浮液（ 1×10^5 个/mL）7mL，均匀分散至直径 60mm 的培
45 养皿中。置于 $37\text{C}^{\circ} \pm 1\text{C}^{\circ}$ ，含 $5\% \pm 1\%$ CO₂ 气体的细胞培养箱中培养 24 小时至近汇
46 合单层细胞，弃去培养皿中培养基，将溶化琼脂冷却至 48C° 左右与含 20%血清的
47 2 倍新鲜哺乳动物细胞培养基混合，使琼脂最终质量浓度不大于 2%，在每只培养
48 皿内加入新制备的含琼脂培养基（要足够薄以利于可沥滤物的扩散）。

49 含琼脂培养基凝固后，可用适当的染色方法染色。将供试品、阴性对照、阳
50 性对照小心地放在培养皿的固化琼脂层表面。

51 每个供试品、阴性对照、阳性对照试样间尽量保持合适的距离并远离培养皿
52 壁，每一培养皿中放置不超过 3 个试样，每个试样至少设置 2 个平行。置
53 $37\text{C}^{\circ} \pm 1\text{C}^{\circ}$ ， $5\% \pm 1\%$ CO₂ 的细胞培养箱中至少培养 24 小时 ± 2 小时。用显微镜观察
54 每个供试品、阴性对照、阳性对照试样反应区域。用活体染料，如中性红有助于
55 检测细胞毒性。

56 **结果评价** 按表 3 进行细胞毒性评价和分级。如阴性对照为 0 级（无毒）、
57 阳性对照不小于 3 级（中度毒），则细胞培养试验系统有效。

58

表 3 琼脂扩散试验的毒性分级

| 分级 | 毒性 | 毒性区域的描述 |
|----|-----|-----------------------|
| 0 | 无毒 | 试样周围和试样下面无可见的毒性区域 |
| 1 | 轻微毒 | 试样下面有一些退化或畸变的细胞 |
| 2 | 轻度毒 | 毒性区域不超出试样边缘 0.45cm |
| 3 | 中度毒 | 毒性区域超出试样边缘 0.45-1.0cm |
| 4 | 重度毒 | 毒性区域超出试样边缘大于 1.0cm |

59 供试品和/或供试品溶液细胞毒性分级不大于 2 级（轻度毒）时，则判为合
60 格。

61

第三法 直接接触法

62 **供试品制备** 采用供试品的平整部分，表面积不小于 100mm²。

63 **阴性对照制备** 取阴性参比物，例如高密度聚乙烯，按与供试品相同方式制
64 备。

65 **阳性对照制备** 取阳性参比物，与供试品相同方式制备。

66 **试验方法** 取生长旺盛的细胞悬浮液（ 1×10^5 个/mL）2mL，置直径 35mm 的
67 平皿中培养单层细胞。置于细胞培养箱中培养 24 小时至近汇合单层细胞，吸去
68 培养基，替换为 0.8mL 的新鲜培养基。

69 在每个培养皿中单独放置 1 个供试品、阳性对照或阴性对照，每个试样
70 至少设置 2 个平行。将所有的培养物置 $37\text{C}^{\circ} \pm 1\text{C}^{\circ}$ 含 $5\% \pm 1\% \text{CO}_2$ 的细胞培养
71 箱中至少培养 24 小时，培养箱宜保持适当的湿度。显微镜下观察每个供试
72 品、阴性对照、阳性对照周围，必要时应进行染色。

73 **结果评价** 按照琼脂扩散法结果评价项下的规定进行。若样品不超过 2 级（轻
74 度毒），则样品判为合格。若试验系统无效需重复试验过程。

75

第四法 浸提法

76 **阴性对照制备** 取阴性参比物，例如高密度聚乙烯，按照供试品溶液的制备
77 项下的规定进行。

78 **阳性对照制备** 取阳性参比物，按照供试品溶液的制备项下的规定进行

79 **试验方法** 取生长旺盛的细胞悬浮液 (1×10^5 个/mL) 2mL，置直径 35mm
80 的平皿中培养单层细胞。培养不少于 24 小时至细胞至少达到 80%近汇合后，吸
81 去培养基，替换为供试品溶液、阴性对照液或阳性对照液。含血清培养基提取液
82 和不含血清培养基提取液无需稀释，平行试验 2 份。0.9%氯化钠注射液为介质的
83 提取液用含血清的细胞培养基稀释至提取液浓度为 25%，平行试验 2 份。所有的
84 培养物在 $37^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ ，含 $5\% \pm 1\% \text{CO}_2$ 的培养箱中培养 48 小时。48 小时后，在显微
85 镜下观察培养物，如有必要，进行染色。

86 **结果评价** 按表 4 进行毒性评价和分级。若试验系统不成立，重复试验。供
87 试品不超过 2 级（轻度毒），则判为合格。如需进行剂量-反应程度评价，可通过
88 定量稀释样品提取液，重复试验。

89 **表 4 浸提法毒性分级**

| 分级 | 毒性 | 毒性区域的描述 |
|----|-----|---|
| 0 | 无毒 | 胞内颗粒明显，无细胞溶解 |
| 1 | 极轻微 | 圆缩、贴壁不佳及无胞内颗粒的细胞不超过 20%，偶见悬浮死细胞 |
| 2 | 轻微毒 | 圆缩细胞及胞内颗粒溶解的细胞不超过 50%，无严重的细胞溶解现象，细胞间无较大空隙 |
| 3 | 中度毒 | 圆缩或溶解的细胞不超过 70% |
| 4 | 严重毒 | 几乎所有细胞坏死 |

90