

## 细胞毒性检查法

### Xibao Duxing Jianchafa

### Tests for Cytotoxicity

本法是将一定量的供试液加入细胞培养液中，培养 L-929 细胞，通过对 L-929 细胞形态、增殖和抑制影响的观察，评价供试品对体外细胞的潜在毒性作用。

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

**试验前的准备** 与样品及细胞接触的所有器具均需无菌。（必要时可采用湿热灭菌如 115℃、30 分钟；干热灭菌如 250℃、30 分钟或用 180℃、2 小时）

**细胞悬液的制备** 对已培养 48~72 小时生长旺盛的 L-929 细胞消化混匀进行计数，将其配制成  $4 \times 10^4$  个/ml 的细胞悬液。

**供试品溶液的制备** 将供试品用肥皂水清洗除去油污，再用纯化水冲洗干净，滤纸吸干后切成 0.5cm×2cm 条状，用湿热灭菌或紫外线照射消毒后，置玻璃容器内。除另有规定外，按表 1 加入氯化钠注射液或无血清培养基作为浸提液，使浸提液浸没供试品，按表 2 选择浸提条件（若采用含血清培养基，应用  $37^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ 、24 小时  $\pm 2$  小时的条件），浸提，即得。

**表 1 供试品表面积或重量与浸提液的比例**

供试品厚度（mm）	表面积或重量与浸提液体积的比例
≤0.5	6cm <sup>2</sup> /ml
>0.5~1.0	3cm <sup>2</sup> /ml
>1.0	1.25cm <sup>2</sup> /ml
不规则形状	0.2g/ml

**表 2 浸提条件**

浸提温度（℃）	浸提时间（小时）
37±1	24±2
37±1	72±2
50±2	72±2
70±2	24±2

#### 检查法

##### 第一法 相对增殖度法

**阴性对照液** 为不加供试品的细胞培养液。

**阳性对照液** 6.3% 苯酚的细胞培养液

**测定** 取 33 个培养瓶，分别加入细胞悬液 1ml，细胞培养液 4ml，置  $37^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ ，5% 二氧化碳的条件下培养 24 小时。培养 24 小时后弃去原培养液。

阴性对照组：取 13 个培养瓶加入 5ml 阴性对照液；阳性对照组：取 10 个培养瓶加入 5ml 阳性对照液；试验组：取 10 个培养瓶加入 5ml 含 50% 供试液的细胞培养液，置  $37^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ ，5% 二氧化碳的条件下继续培养 7 天。

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。

毒性评定：细胞形态分析标准按表 3 规定：

**表 3 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，L-929 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
严重毒	细胞基本不贴壁，90% 以上呈悬浮死细胞

细胞相对增殖度分级标准按表 4 规定：

**表 4 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

根据各组细胞浓度按下式计算细胞相对增殖度（RGR）：

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

**结果评价** 试验组相对增殖度（以第 7 天的细胞浓度计算）为 0 级或 1 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，轻微毒或无毒的判为合格。试验组相对增殖度为 3~5 级判为不合格。

### 第二法 琼脂扩散法

本法适用于弹性体细胞毒性的测定。当聚合物样品中可滤取的化学物质扩散时，琼脂层可起到隔垫的作用保护细胞免受机械损伤。材料中的提取物将通过一张滤纸被进行试验。

**阳性对照制备** 取生物毒性阳性参比物质，照供试液制备项下的规定进行。

**阴性对照制备** 取高密度聚乙烯参比物质，照供试液制备项下的规定进行。

**测定** 取细胞悬浮液 7ml，置直径 60mm 的平皿中培养单层细胞。培养后，吸去培养基，替换为添加琼脂不少于 2% 的含血清培养基。（注：琼脂的量必需适应细胞生长。琼脂层必需足够薄以利于滤取的化学物质的扩散）。

将供试液、阴性对照、阳性对照或它们在合适的浸提介质中的提取物放置在固化的琼脂表面，平行试验 2 份。每个平皿中的样品不超过 3 个。37℃±2℃ 培养至少 24 小时，最好选用增湿的培养箱，含二氧化碳浓度为 5%。在显微镜下观察每个样品、阴性对照、阳性对照周围的培养基，如有必要，进行染色。

**结果评价** 生物毒性（细胞退化和畸变）按 0~4 级（见表 5）评价和分级。记录样品、阴性、阳性细胞培养基的现象。如阴性对照为 0 级（无毒）、阳性对照不小于 3 级（中等毒），则细胞培养基试验系统有效。若试验系统不成立，重复试验。样品不大于 2 级（轻微毒），则样品判为合格。

表 5 琼脂扩散试验和直接接触试验的毒性分级

分级	毒性	毒性区域的描述
0	无毒	样品周围或底部无可见的毒性区域
1	极轻微	样品底部有一些退化或畸变的细胞
2	轻微毒	仅限于样品底部有毒性区域
3	中度毒	毒性区域超出样品边缘 0.5~1.0cm
4	重度毒	毒性区域超出样品边缘大于 1.0cm

### 第三法 直接接触法

本法适用于各种形状的材料细胞毒性的测定。适用于同时提取并测试从含血清培养基中提取到的化学物质。该试验对极低或极高密度的材料，因其有可能对细胞有机械性损伤而不适用。

**样品制备** 按规定采用样品的平整部分，表面积不小于 100mm<sup>2</sup>。

**阳性对照制备** 取生物毒性阳性参比物质，照供试品制备项下的规定进行。

**阴性对照制备** 取高密度聚乙烯参比物质，照供试品制备项下的规定进行。

**测定** 取细胞悬浮液 2ml，置直径 35mm 的平皿中培养单层细胞。培养后，吸去培养基，替换为 0.8ml 的新鲜培养基。

在每个双层培养基上单独放置 1 个样品、阳性对照或阴性对照。将所有的培养物在 37℃±2℃，增湿且含二氧化碳浓度为 5% 的培养箱中培养至少 24 小时。直接目视观察或在显微镜下观察每个样品、阴性对照、阳性对照周围的培养基，如有必要，应进行染色。

**结果评价** 照第二法琼脂扩散法结果评价项下的规定进行。若样品不超过 2 级（轻微毒），则样品判为合格。

### 第四法 浸提法

本法适用于聚合物材料细胞毒性的测定。采用生理温度或非生理温度及各种不同时间进行提取。它适用于高密度材料及剂量—反应程度评价。

**样品制备** 照供试液制备项下规定，（若样品的表面积难以测量，弹性材料可按 0.1g/ml 比例提取，塑料或聚合物材料可按 0.2g/ml 比例提取）。或者，选用含血清的哺乳动物细胞培养基作为浸提介质可更好地模拟生理条件。在含二氧化碳浓度为 5% 的培养箱中保温 24 小时制备提取物，温度控制在 37℃±2℃，过高的温度将会导致血清蛋白变性。

**阳性对照制备** 取生物毒性阳性参比物质，照供试液制备项下的规定进行。

**阴性对照制备** 取高密度聚乙烯参比物质，照供试液制备项下的规定进行。

**测定** 取细胞悬浮液 2ml，置直径 35mm 的平皿中培养单层细胞。培养后，吸去培养基，替换为样品溶液、阴性对照或阳性对照。含血清培养基浸提液和不含血清培养基浸提液无需稀释，平行试验 2 份。氯化钠注射液为介质的浸提液用含血清的细胞培养基稀释至浸提液浓度为 25%，平行试验 2 份。所有的培养物在 37℃±2℃，增湿且含二氧化碳浓度为 5% 的培养箱中培养 48 小时。48 小时后，在显微镜下观察培养物，如有必要，进行染色。

**结果评价** 按琼脂扩散法结果评价项下的规定进行，但使用表 6。若试验系统不成立，重复试验。样品不超过 2 级（轻微毒），则样品判为合格。如需进行剂量—反应程度评价，可通过定量稀释样品浸提液，重复试验。

表 6 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	重度毒	几乎所有细胞坏死