

1 附 4

3 药包材体外哺乳动物细胞微核试验方法

4 本法系在有或无外源性代谢活化系统存在的情况下,将一定量的供试品溶液与体外哺乳动物细胞共
5 培养,在规定的时间内观察双核细胞中微核的情况,以判定供试品在试验条件下是否诱导体外哺乳动物
6 细胞出现微核。

7 **试验细胞** 选用的细胞系包括中国仓鼠肺细胞 (CHL)、中国仓鼠卵巢细胞 (CHO)、中国仓鼠肺细
8 胞 (V79)、小鼠淋巴瘤细胞 (L5178Y) 或人细胞系如 TK6 等。需定期检查细胞系核型和染色体数目
9 的稳定性以及支原体污染情况。

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则”中生物学试验的要求
11 制备供试品溶液,还可选择与试验体系相容的其他提取溶剂,如二甲基亚砜 (DMSO) 等。

12 **阴性对照液** 提取溶剂 (不含有供试品) 按照制备供试品溶液相同的提取条件制备作为对照液。常
13 用的阴性对照物包括水 (或 0.9%氯化钠注射液)、含血清培养基、DMSO 等。通常 DMSO 在培养液中的
14 终浓度不应超过 1.0%,水 (或 0.9%氯化钠注射液) 不应超过 10%。供试品溶液和阴性对照液应在制
15 备后 24 小时内使用,在试验前应平衡至室温,并确保充分混匀。

16 **阳性对照液** 阳性对照物举例见表 1,如有充分理由时也可采用其他适宜的阳性对照物。

17 **表 1 体外哺乳动物细胞微核试验阳性对照举例**

代谢活化条件	阳性对照物	CAS No.
无外源性代谢活 化系统	甲磺酸甲酯	66-27-3
	丝裂霉素 C	50-07-7
	阿糖胞苷	147-94-4
	4-硝基喹啉-N-氧化物	56-57-5
有外源性代谢活 化系统	苯并(a)芘	50-32-8
	环磷酰胺	50-18-0
	环磷酰胺一水化合物	6055-19-2
非整倍体剂	秋水仙素	64-86-8
	长春碱	865-21-4

18 试验方法

19 在试验中应同时包括阴性对照和阳性对照,且代谢活化和非代谢活化两种测试过程应同时进行。其
20 中,代谢活化系统是从经过酶诱导剂处理的肝脏中所提取的带有辅助因子和微粒体部分的测试系统。

21 对于无细胞毒性的供试品溶液,可以使用 100%浓度的供试品溶液进行试验,不需要梯度稀释。如
22 果 100%浓度的供试品溶液出现细胞毒性,则应以供试品溶液原液作为最高浓度组进行梯度稀释,即在
23 收获细胞时试验用最高浓度的细胞毒性发生率应控制在 (55±5)%,所选剂量浓度的细胞毒性范围包括
24 从最大到小或无细胞毒性。

25 使用含细胞松弛素 B (CytoB) 处理时, 使用 CBPI[见公式 (1)、公式 (2)]或 RI[见公式 (3)、
26 公式 (4)]来评价细胞毒性。

$$27 \quad CBPI = \frac{[S + (2 \times D) + (3 \times M)]}{T_0} \dots\dots\dots (1)$$

28 式中:

29 CBPI——胞质分裂阻断增殖指数;

30 S——单个核细胞数;

31 D——双核细胞数;

32 M——多核细胞数;

33 T_0 ——细胞总数。

$$34 \quad \text{Cytostasis} = \left(1 - \frac{CBPI_T - 1}{CBPI_C - 1}\right) \times 100\% \dots\dots\dots (2)$$

35 式中:

36 Cytostasis——细胞阻滞

37 T——试验样品组;

38 C——阴性对照组或未处理对照组。

$$39 \quad RI = \frac{[D_T + (2 \times M_T)] \div T_T}{[D_C + (2 \times M_C)] \div T_C} \times 100\% \dots\dots\dots (3)$$

40 式中:

41 RI——复制指数;

42 D_T ——试验样品组双核细胞数;

43 D_C ——阴性对照组或未处理对照组双核细胞数;

44 M_T ——试验样品组多核细胞数;

45 M_C ——阴性对照组或未处理对照组多核细胞数;

46 T_T ——试验样品组细胞总数;

47 T_C ——阴性对照组或未处理对照组细胞总数。

$$48 \quad \text{Cytostasis} = (1 - RI) \times 100\% \dots\dots\dots (4)$$

49 未经 CytoB 处理时, 使用 RICC[见公式 (5)]或 RPD[见公式 (6)]来评价细胞毒性。

$$50 \quad RICC = \frac{d_1 - d_0}{D_1 - D_0} \times 100\% \dots\dots\dots (5)$$

51 式中:

52 RICC——相对细胞增长数;

53 d_1 ——试验样品培养物中细胞的最终数量;

54 d_0 ——试验样品培养物中细胞的起始数量;

55 D_1 ——对照品培养物中细胞的最终数量;

56 D_0 ——对照品培养物中细胞的起始数量。

$$57 \quad RPD = \frac{PD_m}{PD_M} \times 100\% \dots\dots\dots (6)$$

58 式中:

59 RPD——相对群体倍增数;

60 PD——群体倍增数, 其值等于 $\lg(\text{处理后细胞数量} \div \text{初始细胞数量}) \div \lg 2$;

61 PD_m——试验样品培养物中群体倍增数;

62 PD_M——对照品培养物中群体倍增数。

63 将一定浓度的细胞接种于培养皿(瓶)内, 置于培养箱(37℃, 5%CO₂)内培养, 保证细胞在收
64 获期处于对数生长状态。试验分为短期接触组(有和无代谢活化系统)和长期接触组(无代谢活化系统)。
65 弃去培养皿(瓶)中的培养液, 在处于对数生长状态的细胞中加入供试品溶液或对照品、代谢活化系统
66 (不加代谢活化系统时, 需用培养液补足)和含或不含 CytoB 的细胞培养液, 置于培养箱(37℃, 5%CO₂)
67 中。

68 短期接触组: 接触(3~6)小时, 弃去培养皿(瓶)中的液体, 用生理等渗液洗细胞 3 次, 加入含
69 或不含 CytoB 新鲜细胞培养液继续培养至约为 1.5 个-2 个的正常细胞周期时收获细胞。

70 长期接触组: 持续接触时间约 1.5 个-2 个的正常细胞周期。

71 收获细胞后进行在 37℃ 水浴中低渗, 采用 0.075M 氯化钾溶液对细胞进行低渗处理, 加入固定液(甲
72 醇: 冰醋酸体积比为 3: 1)进行细胞固定, 以 200g 离心 5min, 弃去上清液。经过滴片, 姬姆萨染色
73 后, 显微镜对分散良好的双核细胞进行微核观察。

74 **结果判断** 显微镜下每一试验组至少分析计数 2000 个分散良好的双核细胞。将出现微核的双核细胞
75 数除以该组实际分析的总双核细胞数, 求得微核率(%)。

76 阳性对照微核率应在历史阳性数据范围内, 并且与阴性对照相比显著增加, 具有统计学意义; 阴性
77 对照微核率也应在历史阴性数据范围内。则试验系统成立。

78 在试验系统成立的前提下, 与阴性对照相比, 当短期接触组(有和无代谢活化系统)和长期接触组
79 (无代谢活化系统)中任一组供试品的结果在一个或多个浓度下, 微核率在统计上有显著的增加或微核
80 率的增加存在剂量反应关系或任一组结果超出了历史的阴性对照数据的分布范围, 即认为是阳性结果,
81 否则即为阴性结果。体外哺乳动物细胞微核试验的阳性结果表明, 在试验条件下, 供试品溶液具有诱发
82 体外哺乳动物细胞产生微核的潜能。阴性结果表明, 在试验条件下, 供试品溶液对试验细胞无微核诱变
83 作用。

起草单位: 山东省医疗器械和药品包装检验研究院

联系电话: 0531-82682901

复核单位: 深圳市药品检验研究院(深圳市医疗器械检测中心)