

附 2

药包材体外哺乳动物细胞染色体畸变试验方法

本法系在有或无外源性代谢活化系统的条件下,将一定量的供试品溶液与体外哺乳动物细胞共培养,在规定的时间内观察分裂中期细胞分裂相的情况,以判定供试品在试验条件下是否诱导体外哺乳动物细胞的染色体结构畸变。

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) 等。需定期检查细胞系核型和染色体数目的稳定性以及支原体污染情况,否则不宜使用。

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。

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。

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。阳性对照应现用现配。

表 1 体外哺乳动物细胞染色体畸变试验阳性对照举例

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

试验方法

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。其中,代谢活化系统是经过酶诱导剂处理的肝脏所提取的带有辅助因子和微粒体部分的测试系统。

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,即在收获细胞时试验用最高浓度的相对群体倍增数 (RPD) 或相对细胞增长数 (RICC) 达到(55±5)%的稀释浓度,所选剂量浓度范围的细胞毒性包括从最大到小或无细胞毒性。(公式 1 和公式 2 分别用于计算 RPD 和 RICC)。

$$RPD = \frac{PD_m}{PD_M} \times 100\% \dots\dots\dots (1)$$

式中：

RPD——相对群体倍增数；

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

PD_m——试验样品培养物中群体倍增数；

PD_M——对照品培养物中群体倍增数。

$$\text{RICC} = \frac{d_1 - d_0}{D_1 - D_0} \times 100\% \dots\dots\dots (2)$$

式中：

RICC——相对细胞增长数；

d₁ ——试验样品培养物中细胞的最终数量；

d₀ ——试验样品培养物中细胞的起始数量；

D₁ ——对照品培养物中细胞的最终数量；

D₀ ——对照品培养物中细胞的起始数量。

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）。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液、代谢活化系统（无代谢活化系统时，需用细胞培养液补足）和细胞培养液，置于培养箱（37℃，5%CO₂）中。

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。

长期接触组：持续接触时间约为 1.5 个-2 个的正常细胞周期。

于收获前（1~3）小时加入细胞分裂中期阻断剂。收获细胞后，在 37℃ 水浴中采用 0.075M 氯化钾溶液对细胞进行低渗处理，加入固定液（甲醇：冰醋酸的体积比为 3：1）对细胞进行固定，以 200g 离心 5 分钟，弃去上清液，经过滴片、姬姆萨染色后，在显微镜下观察中期分裂相细胞中染色单体断裂、染色体断裂、单体互换等染色体结构畸变。由于固定步骤会导致中期分裂相细胞的部分染色体丢失，因此，记录的细胞数可等于细胞模式数的 $2n \pm 2$ （n 为细胞染色体单倍数）。

结果判断 显微镜下每一试验组至少选择 300 个分散良好的中期分裂相细胞进行染色体畸变观察。将出现染色畸变的细胞数除以该组实际分析的总细胞数，求得染色体畸变率(%)。当观察到具有大量染色体畸变的细胞时，中期分裂相的细胞数目可以减少，并且供试品被认为是明显的阳性。记录染色体结构畸变类型（含或不含裂隙）。染色单体与染色体型畸变应分开记录，同时区分亚型（如断裂、互换等）。

阳性对照畸变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；阴性对照畸变率应在历史阴性数据范围内。则试验系统成立。

在试验系统成立的前提下，与阴性对照组相比，当短期接触组（有和无代谢活化系统）和长期接触组（无代谢活化系统）中任一组供试品的结果在一个或多个浓度下，染色体结构畸变率显著增加或染色体结构畸变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范围，即认为是阳性结

60 果，否则即为阴性结果。染色体畸变试验的阳性结果表明，在试验条件下，供试品溶液具有诱发体外哺
61 乳动物细胞染色体结构畸变的潜能。阴性结果表明，在试验条件下，供试品溶液对试验细胞无致染色体
62 畸变作用。

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）