



中国认可  
国际互认  
检测  
TESTING  
CNASL13034



# 细胞毒性试验

## MTT 法

## 最终报告



报告查询

报告编号: CSTBB21031166  
样品名称: 医用擦手纸  
参考方法: GB/T 16886.5-2017

### 委托单位

苏州维洁尔医疗科技有限公司

苏州市相城区阳澄湖镇石田路3号

### 检测机构

中检华通威国际检验（苏州）有限公司

苏州工业园区若水路388号G栋101室

中检华通威国际检验（苏州）有限公司

地址：中国 江苏省苏州工业园区若水路388号G栋101室 电话：0512-87657288 传真：0512-87657288

## 目录

说明.....	3
实验摘要.....	4
1.0 目    的.....	6
2.0 参考标准.....	6
3.0 试验样品和对照样品.....	6
4.0 试验细胞.....	6
5.0 试验细胞选择理由.....	6
6.0 仪器与试剂.....	6
7.0 样品制备.....	7
8.0 试验方法.....	8
9.0 统计方法.....	8
10.0 评价标准.....	8
11.0 测试结果.....	9
12.0 结    论.....	9
13.0 方案修订/偏离.....	9
14.0 记录存储.....	9
15.0 保密协议.....	10

## 说明

- 1.对本报告有异议者,请于收到报告之日起十五天内提出复核申请。
- 2.检测报告涂改或无检验检测章无效。
- 3.检测报告无编制人、审核人及签发人签字无效。
- 4.送样委托检验,本检验机构只对所检样品检测项目的检测结果负责。
- 5.未经本检验检测机构同意,不得部分复制本报告。



## 实验摘要

本研究按照 GB/T 16886.5-2017 的方法要求, 使用体外培养哺乳动物 L-929 细胞, 测试供试品的潜在细胞毒性作用。

将试验样品与对照样品分别放在含有 10%胎牛血清的 MEM 培养基中, 于 37°C培养箱浸提 24 小时。在浸提结束后将培养 24 小时的 96 孔板 (10<sup>4</sup> 个/孔) 内细胞培养基去除, 换成相应浸提液, 并在细胞培养箱 (37°C, 5% CO<sub>2</sub>, >90%湿度)中培养 24 小时。培养结束后镜下观察细胞形态和细胞裂解情况, 并采用 MTT 法测定供试品的细胞毒性值。

结果显示, 空白对照组和阴性对照组 (高密度聚乙烯) 中细胞在整个实验过程中形态完好正常, 没有显示细胞毒性反应。阳性对照组 (ZDEC) 中显示严重的细胞毒性反应。测试样品 100%浓度浸提液在孵育细胞 24 小时后细胞形态基本完好, 细胞活力值为 85.3%。各组数据均符合验收标准, 本次试验结果有效。

基于以上结果可得出结论: 在本实验条件下, 供试品在 MTT 法细胞毒性试验条件中没有潜在的细胞毒性影响。



## 1.0 目的

测试的目的是为了评价试验样品对 L-929 哺乳动物成纤维细胞的潜在细胞毒性。

## 2.0 参考标准

医疗器械生物学评价 第 5 部分: 体外细胞毒性试验 GB/T 16886.5-2017。

医疗器械生物学评价 第 12 部分: 样品制备与参照材料 GB/T 16886.12-2017。

## 3.0 试验样品和对照样品

组别	试验样品	阴性对照样品	阳性对照样品	空白对照样品
名称	医用擦手纸	高密度聚乙烯	ZDEC	MEM 含 10% FBS
制造商	苏州维洁尔医疗科技有限公司	Hatano Research Institute. FDSC	Sigma-Aldrich	Hyclone
规格	30*40cm	3 cm×10 cm 5 片	25 g	500 ml
型号	/	/	/	/
批号	20210302	C-161	BCBQ6847V	AF29549370
试验样品材料	纸	/	/	/
性状	固体	固体	固体	液体
颜色	白色	白色	白色	粉色
包装材料	纸盒	/	/	/
是否已灭菌	未灭菌	未灭菌	未灭菌	已灭菌
浓度	/	/	0.1%	/
表面积或重量	未提供	/	/	/
保存条件	室温	室温	室温	4°C

备注说明: 试验样品信息是由样品委托单位提供。

## 4.0 试验细胞

L-929 小鼠成纤维细胞系来自美国菌种保存中心 (ATCC)。

## 5.0 试验细胞选择理由

小鼠成纤维细胞 L-929 因其对细胞毒性物品的敏感性多用于细胞毒性研究, 通过对测试物品浸提所得溶液在体外给予 L-929 评估测试物品的细胞毒性, 是标准中推荐的测试系统中可用的最佳给药途径。

## 6.0 仪器与试剂

### 6.1 仪器

立式蒸汽灭菌器 (编号 SHB026), CO<sub>2</sub> 培养箱 (编号 SHB002), 钢直尺 (编号 SHB076), 电子天平 (编号 SHB016), 洁净工作台 (编号 SHB014), 低速自动平衡离心机 (编号 SHB022), Multiskan™ Sky 酶标仪 (编号 SHB003), 倒置显微镜(含成像) (编号 SHB005)

## 6.2 试剂

MEM 培养基 (来源: Hyclone, 批号: AF29628620), 胎牛血清 (来源: Clark, 批号: JC65927), 青链霉素 (来源: Gibco, 批号: 2175429), 胰蛋白酶 (来源: Gibco, 批号: 2085461), PBS (来源: Gibco, 批号: 8120015), MTT (来源: Solarbio, 批号: 715S051), 异丙醇 (来源: Rhawn, 批号: RH246947)

## 7.0 样品制备

根据下表, 将测试物品在含 10% FBS 的 MEM 培养基中浸提, 于 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> 以及 60 rpm 条件下孵育 24 小时。

组别	取样		惰性容器内无菌浸提				浸提液最终状态
	取样方式	实际取样	取样比例	浸提液	浸提条件	pH	是否澄清
试验样品	随机	2.0 g	0.1 g : 1 ml	20.0 ml	37 °C 24 h	7.4	澄清
阴性对照	随机	60.0 cm <sup>2</sup>	3 cm <sup>2</sup> : 1 ml	20.0 ml	37 °C 24 h	7.4	澄清
阳性对照	随机	0.02 g	0.1 g: 100 ml	20.0 ml	37 °C 24 h	7.4	澄清
空白对照	/	/	/	20.0 ml	37 °C 24 h	7.4	澄清

在浸提前后观察浸出溶液变化的状态, 在提取前和提取后未观察到颗粒或颜色变化。浸提后浸提液立即用于实验, 浸提溶液在使用前未采取调整 pH 值、过滤、离心、稀释等操作, 浸提溶液颜色和 pH 值在使用前后无变化, pH 值在浸提后为 7.4, 浸提液状态如下图所示。在相同条件下制备空白对照 (MEM 培养基, 添加 10%FBS) 和阴性/阳性对照。

浸提介质	观察时间	组别	浸提液最终状态		
			颜色	是否澄清	是否有颗粒
MEM 培养基 (含 10% FBS)	浸提前	试验样品	粉色	澄清	无
		阴性对照	粉色	澄清	无
		阳性对照	粉色	澄清	无
		空白对照	粉色	澄清	无
	浸提后	试验样品	粉色	澄清	无
		阴性对照	粉色	澄清	无
		阳性对照	粉色	澄清	无
		空白对照	粉色	澄清	无

## 8.0 试验方法

全程在超净台内操作, 保证无菌操作过程。将生长至对数生长期的细胞用 0.25%的胰蛋白酶(含 EDTA) 消化, 消化后将细胞悬浮液离心(1000 rpm, 5 分钟), 弃去上清, 用 MEM 培养基重悬细胞, 计数得到  $1 \times 10^5$  个/ml 细胞悬液。

将细胞悬液以每孔 100  $\mu$ l 接种于 96 孔板中, 并在细胞培养箱 (37  $^{\circ}$ C, 5% CO<sub>2</sub>, >90%湿度)中培养, 镜下观察细胞形态。

待孵育 24 小时后, 细胞贴壁生长至 70%左右, 弃去 96 孔板内原培养基, 在 96 孔板相应孔内各加入 100  $\mu$ l 浸提液(终浓度为 100%, 75%, 50%和 25%), 空白对照样品, 阴性对照样品和阳性对照样品。将 96 孔板置于细胞培养箱 (37  $^{\circ}$ C, 5% CO<sub>2</sub>, >90%湿度)中培养 24 小时, 每组设置六个复孔。

培养 24 小时后取出 96 孔板, 在显微镜下观察细胞形态, 然后去除液体, 每孔加入 50  $\mu$ l MTT (终浓度为 1 mg/ml), 置二氧化碳培养箱中培养。2 小时后去除上清, 每孔加入 100  $\mu$ l 异丙醇溶解结晶, 在酶标仪上测定 570 nm 波长下的吸光度值, 计算其细胞毒性。

## 9.0 统计方法

均数 $\pm$ 标准差 ( $\bar{x} \pm s$ );

细胞活力%=试验(或阳性及阴性)样品组 OD<sub>570</sub>/空白对照组 OD<sub>570</sub> $\times$ 100%。

表 1 细胞形态描述

等级	反应	培养状态
0	无	个别细胞有颗粒, 细胞无裂解, 生长状态良好。
1	轻微	呈圆形的细胞不超过20%, 松散附着且偶见胞质内颗粒, 未表现出形态变化, 偶见裂解细胞和轻微的生长抑制。
2	轻度	呈圆形的细胞不超过50%, 个别胞质内有颗粒, 没有广泛的细胞裂解, 可观察到不超过50%的生长抑制。
3	中度	不超过70%的细胞呈圆形或被裂解, 细胞层未被完全破坏, 但可观察到超过50%的生长抑制。
4	重度	细胞几乎被完全破坏。

## 10.0 评价标准

10.1 浓度为 50%的样品浸提液相比于浓度为 100%的样品浸提液作用下, 细胞活力应相同或者更高, 否则应该重复试验;

10.2 细胞活力百分比越低, 潜在的细胞毒性越大;

10.3 若细胞活力<空白组的 70%, 说明样品具有潜在的细胞毒性;

10.4 样品浸提液作用下的细胞活力以浓度为 100%的浸提液为最终结果。

## 11.0 测试结果

### 11.1 细胞形态学结果

表 2 观察细胞形态

组别	接种前细胞状态	接种后细胞状态	加样后 24 小时
空白对照	0	0	0
阴性对照	0	0	0
阳性对照	0	0	4
100%样品浸提液	0	0	0
75%样品浸提液	0	0	0
50%样品浸提液	0	0	0
25%样品浸提液	0	0	0

### 11.2 MTT 结果

表 3 MTT 结果

组别	OD 值								细胞活性 (%)
	1	2	3	4	5	6	$\bar{x}$	s	
空白对照	0.631	0.620	0.615	0.613	0.615	0.613	0.618	0.007	100.0
阴性对照	0.609	0.604	0.605	0.633	0.628	0.611	0.615	0.012	99.6
阳性对照	0.060	0.054	0.051	0.055	0.052	0.053	0.054	0.003	8.7
100%样品浸提液	0.529	0.527	0.532	0.520	0.520	0.534	0.527	0.006	85.3
75%样品浸提液	0.542	0.538	0.538	0.548	0.537	0.541	0.541	0.004	87.5
50%样品浸提液	0.563	0.557	0.569	0.583	0.578	0.582	0.572	0.010	92.6
25%样品浸提液	0.606	0.583	0.592	0.592	0.604	0.574	0.592	0.012	95.8

## 12.0 结 论

在本试验条件下, 测试物对 L-929 细胞没有潜在的细胞毒性。

## 13.0 方案修订/偏离

在本试验过程中, 没有发生任何方案修订或者偏离。

## 14.0 记录存储

所有与本次试验有关的原始数据和记录都被保存在中检华通威的档案文件中。

## 15.0 保密协议

签订检测委托合同即认为双方接受保密协议。

---

