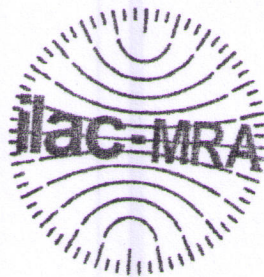




证书编号: 2013100106S



检测  
CNAS L2954

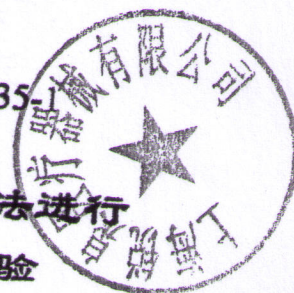
# 苏州大学 卫生与环境技术研究所 最终报告

报告编号: SDWH-M201501635

参照 GB/T 16886-5:2003 方法进行  
透气胶带的细胞毒性试验

MTT 法

含 10%胎牛血清的 MEM 浸提液



委托单位

上海锐泉医疗器械有限公司

苏州大学卫生与环境技术研究所

电话: 0512-65880038

传真: 0512-65880034

电子邮箱: sudawei huan@suda.edu.cn

地址: 中国苏州工业园区仁爱路 199 号

邮编: 215123

http://yxbfzb.suda.edu.cn

第 1 页 共 8 页



## 目 录

目 录.....	2
检测报告说明.....	3
试验确认与签名.....	3
1.0 摘 要.....	4
2.0 目 的.....	5
3.0 参考标准.....	5
4.0 执行规范.....	5
5.0 对照和试验样品确定.....	5
6.0 试验系统鉴别.....	5
7.0 试验系统确认.....	6
8.0 给药途径确认.....	6
9.0 试验设计.....	6
9.1 试验和对照样品制备.....	6
9.2 仪器设备.....	6
9.3 试剂.....	7
9.4 试验方法.....	7
9.5 细胞形态结果.....	7
9.6 细胞活力结果.....	7
9.7 统计方法.....	8
9.8 评价标准.....	8
9.9 结 论.....	8
10.0 记录存储.....	8
11.0 保密协议.....	8





## 检测报告说明

- 一、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。
- 二、检测报告涂改或无检测专用章无效。
- 三、检测报告无编制人、审核人及检测报告签发人签字无效。
- 四、送样委托检验，本检测机构仅对来样负责。
- 五、未经本检测机构同意，不得部分复制本报告。



报告日期:	2015-08-13
试验计划书编号:	SDWH-PROTOCOL-M201501635-1
试验计划书生效日期:	2015-08-13
试验操作开始日期:	2015-08-24
试验操作结束日期:	2015-08-28
报告完成日期:	2015-09-01



编制: 胡

2015-09-01  
日期

审核: 李新宝  
试验负责人

2015-09-01  
日期

签发: 李新宝  
授权签字人



苏州大学卫生与环境技术研究所



## 1.0 摘要

试验样品浸提液与生长旺盛的 L929 细胞培养 (37℃, 5% CO<sub>2</sub>) 72h 后, 观察细胞形态, 细胞裂解情况, 采用 MTT 法测定供试品的潜在细胞毒性。结果显示 100% 样品浸提液的细胞活力为 54.0%, 对照组结果显示本次试验结果有效。

在本次试验条件下, 样品透气胶带浸提液对 L929 细胞的毒性反应为 2 级。

## 2.0 目的

该试验目的是为了评价试验样品对 L929 哺乳动物成纤维细胞的生物学反应。该测试是根据样品浸提液而设计的。

## 3.0 参考标准

医疗器械的生物学评价-第 5 部分: 细胞毒性测试-体外法 GB/T 16886-5:2003

医疗器械的生物学评价-第 12 部分: 样品制备和参照样品 GB/T 16886-12:2005

## 4.0 执行规范

ISO/IEC 17025:2005《检测和校准实验室能力的通用要求》CNAS-CL01 检测和校准实验室能力认可准则 (中国合格评定国家认可委员会实验室认可证书 No.CNAS L2954)

实验室资质认定评审准则 (江苏省质量技术监督局资质认定计量认证证书 CMA 2013100106S)

## 5.0 对照和试验样品确定

### 5.1 试验样品名称: 透气胶带

来样原始状态: 已灭菌

CAS 编号: 未提供

规格: 未提供

批号: 未提供

性状: 固体

颜色: 见样品图片

密度: 未提供

稳定性: 未提供

溶解度: 未提供

保存条件: 室温

试验样品材料: 未提供

包装材质: 未提供

以上试验样品信息是由样品委托单位提供

浸提液: 含 10% 胎牛血清的 MEM 培养液

### 5.2 阴性对照

名称: 高密度聚乙烯

制造商: 美国药典委员会

规格: 3 片装

批号: J0L476



性状：固体

颜色：白色

稳定性：室温下稳定

保存条件：室温

浸提液：含 10%胎牛血清的 MEM 培养液

### 5.3 阳性对照样品名称：Zinc diethyldithiocarbamate

制造商：Sigma

规格：25g

批号：MKBD516V

浓度：1%

溶剂：10%胎牛血清的 MEM 培养液

配制日期：2015-08-24

性状：固体

颜色：白色

保存条件：4±2℃

### 5.4 空白对照样品名称：含 10%胎牛血清的 MEM 培养液

配制日期：2015-08-24

性状：液体

颜色：粉红色

保存条件：4±2℃

## 6.0 试验系统鉴别

该试验用小鼠成纤维细胞 L929,细胞系来自美国菌种保存中心

## 7.0 试验系统确认

小鼠成纤维细胞 L929 用来检测细胞毒性试验是因为其对试验样品浸提液反应灵敏。

## 8.0 给药途径确认

试验样品通过浸提液（用一种与试验系统相容的载体浸提）与试验系统接触，被认为是最佳给药途径，也是为标准推荐的。

## 9.0 试验设计

### 9.1 试验和对照样品制备

无菌操作按下表的比例（样品：浸提液体积）用含 10%胎牛血清的 MEM 培养液浸提样品，于 37℃，5% CO<sub>2</sub> 培养箱中浸提 24 小时。浸提液立即用于实验。

无菌操作取样		惰性容器内 无菌浸提			最终浸提液	
取样方式	实际取样	取样比例	浸提液	条件	pH	是否澄清
整取，撕去离型纸。	80cm <sup>2</sup>	6cm <sup>2</sup> : 1ml	13.3ml	37℃，24h	7.4	澄清

同法制备空白对照、阴性对照样品和阳性对照样品。



## 9.2 仪器设备

SDWH-M201501635-1

高压灭菌器 (SDWH030) 校正有效期 (2016-05-26);  
CO<sub>2</sub> 培养箱 (SDWH021) 校正有效期 (2015-10-22);  
CO<sub>2</sub> 培养箱 (SDWH186) 校正有效期 (2015-09-12);  
倒置显微镜 (SDWH037) 校正有效期 (2015-11-18);  
钢直尺 (SDWH463) 校正有效期 (2015-10-14);  
电子天平 (SDWH056) 校正有效期 (2016-03-16);  
超净工作台 (SDWH454) 校正有效期 (2015-10-26);  
酶联免疫检测仪 (SDWH312) 校正有效期 (2015-10-11)。

## 9.3 试剂

MTT(3-(4, 5-二甲基噻唑-2)-2, 5-二苯基四氮唑溴盐) (SIGMA, 批号: MKBR6576V);  
胎牛血清 (NTC, 批号: NTC-HK006);  
胰酶 (GiBco, 批号: 1627654);  
青霉素链霉素 (GiBco, 批号: 1655309);  
MEM (GiBco, 批号: 8115083);  
异丙醇 (国药集团化学试剂有限公司, 批号: 20150313)。

## 9.4 试验方法

试验过程无菌操作;

将 L929 细胞培养在含 10%胎牛血清和抗生素(青霉素 100 U/ml,链霉素 100 µg/ml)的 MEM 培养液中,置于 37℃, 5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养。用 0.5%胰酶 (含 EDTA) 消化细胞制备成单细胞悬液, 细胞悬液离心 (200g, 3min), 然后将细胞重新分散于培养基中, 调整细胞密度为  $1 \times 10^4$  个/ml 的细胞悬液;  
接种上述细胞悬液到 1 个 96 孔培养板中, 每孔 100 µl; 置 37℃培养箱中 (5% CO<sub>2</sub>, 37℃, >90%湿度) 培养 24 小时后, 吸出原来的培养液, 分别加入 100 µl 不同浓度的试验样品浸提液 (100%、75%、50%、25%)、空白对照液、阳性对照 (100%) 和阴性对照液 (100%)。37℃, 5% CO<sub>2</sub> 培养 72 小时。每组做 5 个平行样;  
培养 72h 后, 取出 96 孔板先做细胞形态学观察, 每孔加 20 µl MTT (5mg/ml), 培养 4 小时, 吸弃上清, 加 150 µl 99.9%纯度的 DMSO 溶解结晶;  
在酶标仪上以 570nm 为主吸收波长, 630nm 为参考波长测定吸光度值。

## 9.5 细胞形态结果

表 1 细胞形态学观察

组别	接种细胞前	加浸提液前	加浸提液 72h 后
空白对照	个别细胞有颗粒, 细胞无裂解, 生长状态良好。	个别细胞有颗粒, 细胞无裂解, 生长状态良好。	个别细胞有颗粒, 细胞无裂解, 生长状态良好。
阴性对照			个别细胞有颗粒, 细胞无裂解, 生长状态良好。
阳性对照			细胞裂解死亡。
100%样品浸提液			部分细胞变圆形, 个别有颗粒, 偶见裂解细胞, 细胞生长受到抑制。
75%样品浸提液			偶见圆形细胞及有颗粒或细胞形态改变, 偶见裂解细胞, 仅轻微的生长抑制。
50%样品浸提液			偶见圆形细胞及有颗粒或细胞形态改变, 偶见裂解细胞, 仅轻微的生长抑制。
25%样品浸提液			个别细胞有颗粒, 细胞无裂解, 生长状态良好。



## 9.6 细胞活力结果

表 2 细胞活力%

组别	$\bar{x} \pm S$	细胞活力%	级别
空白对照	0.623±0.051	100.0%	0
阴性对照	0.625±0.029	100.4%	0
阳性对照	0.007±0.001	1.1%	4
100%样品浸提液	0.336±0.025	54.0%	2
75%样品浸提液	0.400±0.019	64.2%	2
50%样品浸提液	0.452±0.010	72.5%	2
25%样品浸提液	0.534±0.018	85.7%	1

## 9.7 统计方法

均数±标准差 ( $\bar{x} \pm S$ )

细胞活力% = 试验 (或阳性及阴性) 样品组  $[\overline{OD}_{570} - \overline{OD}_{650}] / \text{空白对照组} [\overline{OD}_{570} - \overline{OD}_{650}] \times 100\%$ .

## 9.8 评价标准

细胞毒性反应分级

级别	相对增值率/%
0	≥100
1	80~99
2	50~79
3	30~49
4	0~29

50%的样品浸提液至少和 100%的细胞活力相同或者比 100%的细胞活力更高, 否则应该重复试验。  
细胞活力%越低, 潜在的细胞毒性越大;

细胞活力>2 级, 说明样品具有潜在的细胞毒性,

100%试验样品浸提液的细胞活力%为最终结果。

## 9.9 结 论

在本次试验条件下, 样品透气胶带浸提液对 L929 细胞的毒性反应为 2 级。

## 10.0 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指定的 SDWH 档案文件中。

## 11.0 保密协议

签订检测委托合同即认为双方接受保密协议。