



中华人民共和国医药行业标准

XX/T XXXXX—XXXX

代替 XX/T

组织工程医疗器械产品 周围神经植入物 修复再生性能评价试验方法

Tissue engineered medical device products test method for evaluating the repair and
regeneration performance of peripheral nerve implants

(点击此处添加与国际标准一致性程度的标识)

(征求意见稿)

(本草案完成时间：2023 年 9 月)

在提交反馈意见时，请将您知道的相关专利连同支持性文件一并附上。

XXXX – XX – XX 发布

XXXX – XX – XX 实施

国家药品监督管理局 发布

目 次

前言 II

引言 III

1 范围 1

2 规范性引用文件 1

3 术语和定义 1

4 试验原理和试验体系 1

5 试验材料、试剂及仪器设备 2

 5.1 材料 2

 5.2 试剂 2

 5.3 仪器设备 2

6 实验操作 3

 6.1 DRG 神经元试验 3

 6.2 施万细胞（RSC96）试验 5

参考文献 7

前 言

本文件按照GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别这些专利的责任。

本文件由国家药品监督管理局提出。

本文件由全国外科植入物和矫形器械标准化技术委员会组织工程医疗器械产品分技术委员会（SAC/TC110/SC3）归口。

本文件起草单位：

本文件主要起草人：

引 言

神经植入物，特别是生物源性神经植入物，可以通过促进神经细胞或神经胶质细胞的生长、增殖、迁移，或者通过为损伤的神经组织提供利于细胞生长、增殖或迁移及损伤修复的微环境，防止周围组织长入及炎性细胞侵入，从而实现损伤或断裂神经的修复。材料特性不同，所引起神经损伤修复的作用及机理可能不同，得到的修复效果可能有差异。为了科学地评价神经植入物的材料对神经损伤的修复功能及考察其作用机理，需要开发一系列标准化的方法，客观地评价材料对神经细胞及神经胶质细胞的生物学效应。

神经元即神经元细胞，是神经系统最基本的结构和功能单位。作为感觉传导的初级神经元，背根神经节（DRG）是各椎间孔内侧面附近脊髓背根的膨胀结节，由向心感觉纤维细胞构成。负责接收来自身体感受器的全部神经冲动，包括一般躯体感觉和内脏感觉，通过向心纤维，将它们传送到脊髓。是身体感觉的始发站。背根亦称“感觉根”，由背根发出的神经纤维由脊髓神经节内的感觉神经元的轴突组成。来自身体感受器的神经冲动，经过脊神经——背根神经节——背根，传送到脊髓。因此，通过将神经植入物与背根神经节共培养一定时间后，通过观察背根神经节轴突长度、轴突辐射面积等，可以评价植入材料对背根神经节的诱导作用，从而评价材料对背根神经节的生物学效应。

施万细胞（Schwann Cell），主要分布在周围神经系统中神经元的突起周围，是周围神经纤维的鞘细胞，细胞形状不规则，排列成串，包裹着周围神经纤维的轴突，反复包卷形成同心圆板层，构成髓鞘。无髓神经纤维的薄层髓鞘是由施万细胞细胞膜深度凹陷形成。施万细胞外表面有一层基膜，在周围神经再生中起重要作用。施万细胞作为一种神经胶质细胞，具有支持和引导神经元的迁移，参与神经系统的修复和再生，参与免疫应答，形成髓鞘以及血脑屏障，参与神经细胞外的钾离子浓度的维持等作用。因此，通过将神经植入物与施万细胞共培养，检测共培养一定时间后的施万细胞活性变化，可以评价植入材料对施万细胞活性的影响，从而评价材料对细胞的生物学效应。

本文件提供了评价神经植入材料对背根神经节和施万细胞生物学效应评价的标准化试验方法，为神经植入材料的研究及其医疗器械产品的研发提供技术支持。

组织工程医疗器械产品 周围神经植入物 修复再生性能评价试验方法

1 范围

本文件提供了周围神经植入物对神经元（背根神经节，DRG神经元）和施万细胞生物学效应评价的试验方法，主要包括材料对DRG神经元轴突长度、轴突辐射面积以及对施万细胞的活性和迁移作用的评价试验；

本文适用于周围神经植入物对DRG神经元和施万细胞的生物学效应评价。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本文件。

GB/T 16886.1 医疗器械生物学评价 第1 部分：风险管理过程中的评价与试验

GB/T 16886.5 医疗器械生物学评价 第5 部分：体外细胞毒性试验

GB/T 16886.12 医疗器械生物学评价 第12 部分：样品制备与参照样品

YY/T XXXX 组织工程医疗器械产品 生物源性周围神经植入物通用要求

3 术语和定义

YY/T XXXX 界定的以及下列术语和定义适用于本文件。

3.1

背根神经节 dorsal root ganglion, DRG

又称DRG神经元，指脊椎动物各椎间孔内侧面附近脊髓背根的膨胀结节，由向心感觉纤维细胞构成，负责接收来自身体感受器的全部神经冲动。

3.2

细胞活性 cell viability

细胞在特定培养条件下，以细胞代谢指标为检测靶点的活性情况。

注：一般通过与常规培养条件（如空白对照）下的细胞活性对比，测定特定培养条件下（植入物材料与细胞共培养一定时间）细胞的活性变化，称为“相对细胞活性（relative cell viability）”。

3.3

对照材料 control material

神经元或施万细胞常规培养材料，一般为包被处理的细胞培养板或孔板。

注：可以增设同类型上市产品为对照组，或以不同批次产品为对照。

3.4

近汇合 sub-confluency

在对数生长期末，细胞密度达到约80 %的汇合状态。

4 试验原理和试验体系

将神经植入物与背根神经节（DRG神经元）共培养一定时间后，通过观察背根神经节轴突长度、轴突辐射面积等，可以评价植入材料对背根神经节的生物学效应。

理想的周围神经植入物应具有良好的细胞相容性，能够促进细胞的生长和增殖，或者为细胞（如施万细胞）提供良好的微环境，利于细胞的生长和增殖。将神经植入物与施万细胞共培养一定时间后，通过细胞活性试验，可以评价植入材料对施万细胞的生物学效应。

DRG神经元消化培养法和DRG神经元植块培养法的试验体系包括：1) DRG的分离和培养；2) DRG神经元活性和纯度鉴定；3) 材料——背根神经节共培养后的生物学效应评价，如轴突长度、轴突辐射面积等。

施万细胞的试验体系采用RSC96细胞进行细胞活性试验。

5 试验材料、试剂及仪器设备

5.1 材料

5.1.1 DRG 神经元相关试验主要试验材料

主要试验材料如下

- a) DRG神经元：出生1天的SD大鼠幼崽用于DRG的分离；
- b) 供试品：在不改变工艺的前提下将供试品制备成单层圆形薄片状，略小于细胞培养板的孔径（便于放置在孔板内，将细胞培养在材料上面），如12-孔板。供试品应无菌。
注：导管材料可沿纵向切面剖开；膜状材料可轻压成片状等。
- c) 对照材料：宜包括空白对照（常规细胞培养板孔，不放置材料）和同类型上市产品（如果有）。

5.1.2 施万细胞相关试验主要试验材料

主要试验材料如下：

- a) 施万细胞：推荐采用RSC96 细胞系作为施万细胞的代表用于试验体系，细胞应无支原体污染；
- b) 供试品：在不改变工艺的前提下将供试品制备成单层圆形薄片状，略小于细胞培养板的孔径（便于放置在孔板内，将细胞培养在材料上面），如48-孔板。供试品应无菌。
- c) 对照材料：宜包括空白对照（常规细胞培养板孔，不放置材料）和同类型上市产品（如果有）。

5.2 试剂

主要试验试剂如下：

- a) 基础培养基（DMEM高糖培养基）；
- b) 高糖培养基：高糖DMEM添加10 %胎牛血清和1 %青霉素/链霉素；
- c) DRG培养基：神经基础（Neurobasal）培养基，添加谷氨酰胺（2 mmol/L）、2 % B27、神经生长因子（50 ng/mL）；
- d) 纯化培养基：神经基础（Neuro- basal）培养基，添加尿嘧啶（10 μ mol/L）、5-氟尿嘧啶（10 μ mol/L）、谷氨酰胺（2 mmol/L）、2 % B27、10 μ M阿糖胞苷、神经生长因子（50 ng/mL）；
- e) 多聚赖氨酸（Poly-D-lysine, PDL）, 0.1 mg/mL；
- f) 0.01 M 磷酸盐缓冲液（PBS）；
- g) 0.25 %胰蛋白酶（不含EDTA）；
- h) 0.25 %胰蛋白酶-EDTA溶液；
- i) 胎牛血清（FBS）；
- j) 活/死细胞检测试剂盒；
- k) 大鼠神经特异性烯醇化酶（NSE）ELISA试剂盒；
- l) mouse anti-rat NF-200 antibody。

5.3 仪器设备

主要仪器设备如下

- a) CO₂恒温培养箱：恒温，湿化、5 % CO₂/空气；
- b) 荧光显微镜；
- c) 水浴锅；
- d) 正置光学显微镜；
- e) 离心机；
- f) 细胞计数仪。

6 实验操作

6.1 DRG 神经元试验

6.1.1 材料及培养板的准备

DRG神经元试验材料按以下步骤准备：

- 将适宜大小的供试品或对照材料（若有）放置于培养板的孔内（材料大小和形状以平铺放置完全覆盖孔板的底部为宜）；
- 取适量多聚赖氨酸（Poly-D-lysine, PDL）（0.1 mg/mL）加入培养板孔内，完全覆盖板孔底部（空白对照组）、供试品或对照材料（若有），置于 37 °C 细胞培养箱内过夜孵育；

注：PDL包被孔板或供试品的目的是利于DRG神经元的黏附。

- 弃除/回收孔板内 PDL 包被液，用 0.01 M 磷酸盐缓冲液漂洗 3 次后，在安全柜内风干，备用。

6.1.2 DRG 培养

6.1.2.1 SD 大鼠 DRG 的分离

按以下步骤进行大鼠DRG的分离：

- 取新生 1 d SD 大鼠幼崽，用 75 %酒精对其擦拭消毒；
- 将大鼠幼崽放置在冰盒上进行冷冻麻醉后，使用手术剪切断颈部进行处死；
- 将灭菌棉片贴于大鼠幼崽颈部切口吸去血液，从颈椎端开始沿脊柱腹侧面中线剖开脊柱，止血钳掰断、压平脊椎骨，去除脊柱内的脊髓以及被膜；逐节打开椎间孔，找到背根神经节并用显微镊夹住 DRG 根部将其取出，迅速将“DRG 组织块”放入含有冷 0.01 M 磷酸盐缓冲液的培养皿中备用。

6.1.2.2 DRG 消化培养法

用于DRG消化培养法时，按下列操作步骤进行DRG神经元制备和纯化。

- 用眼科剪小心剪碎 DRG 组织块，加入 1 mL 胶原酶(I 型)（3 mg/ml）孵育消化 30 min；
- 弃除胶原酶消化液，用 PBS 清洗 1 次；加入 0.25 %胰蛋白酶(不含 EDTA) 1 mL，37 °C，继续消化 10 min；
- 用含 10 % FBS 的 DMEM 终止消化，1000 rpm 离心，弃上清，用 1 mL 完全培养基重悬 DRG 消化后神经元；
- 用 200 目筛网过滤后，均匀接种于 6.1.1 制备的孔板内；接种量 5×10^5 细胞/孔（以 12-孔板为例），
- 在 37 °C，5 % CO₂ 培养箱内培养 5 h 后，更换 DRG 培养基，继续培养 24 h；
- 纯化：更换纯化培养基，继续培养 48 h 后得到纯化的 DRG 神经元。

6.1.2.3 DRG 组织块培养法

用于DRG植块培养法时，按下列操作步骤进行DRG神经元制备和纯化。

- 将6.1.2中取出的完整“DRG组织块”直接接种于6.1.1制备的孔板内，加适量完全培养基；
- 将培养板置于37 °C，5 % CO₂培养箱内培养12 h后，更换纯化培养基，隔日换一次，直至培养5 d后得到纯化的DRG神经元。

6.1.3 鉴定与分析

6.1.3.1 纯度鉴定

6.1.3.1.1 实验原理

神经元特异性烯醇化酶(neuron-specific enolase, NSE)是参与糖酵解途径的烯醇化酶中的一种，存在于神经组织和神经内分泌组织中，常被用于神经组织或神经元的鉴定和纯度分析。采用大鼠神经特异性烯醇化酶(NSE)ELISA试剂盒进行DRG 神经元细胞鉴定，适用于DRG消化/组织块培养法。

6.1.3.1.2 检测及结果计算

试剂配制和检测参考试剂盒使用说明进行。以下给出检测主要步骤：

- DRG神经元培养5 d后，弃去培养基，用PBS漂洗1次，去剩余的培养基；
- 加入适量4 %多聚甲醛溶液，室温固定30 min；
- 每孔加入适量0.6 % H_2O_2 -甲醇稀释液，室温浸泡30 min，去除内源性过氧化物酶；
- 滴加适量5 % BSA封闭液，室温封闭20 min；
- 滴加一抗（1:200），置湿盒内，4 ℃过夜，次日PBS漂洗3次，每次2 min；
- 滴加二抗，室温孵育20 min，PBS漂洗3次，每次2 min；
- 滴加 S-ABC，置湿盒内，33 ℃孵育 20 min，PBS 漂洗4次，每次5 min；
- 滴加显色液DAB，室温显色，显微镜下控制显色时间，约显色25 min后，纯水冲洗，苏木素复染1 min；
- 镜下观察细胞染色情况，被染成棕黄色的细胞即为 DRG 神经元。随机选取6 个视野，统计阳性染色的细胞占视野内全部细胞的比例，按式（1）计算，细胞纯度（Cell purity, CP）宜 $\geq 70\%$ 。公式需要用软件编辑后插入

$$CP = C_{\text{positive}} / C_{\text{total}} * 100 \% \dots\dots\dots (1)$$

式中，

CP ——细胞纯度，%；

C_{positive} ——阳性染色细胞数，即棕黄色细胞数，个；

C_{total} ——总细胞数，个。

6.1.3.2 细胞存活率检测

6.1.3.2.1 实验原理

细胞存活率是判定供试品是否利于神经元细胞存活的重要指标，适用于DRG消化培养法。

碘化丙啶（Propidium Iodide, PI）染料是一种溴化乙啶的类似物，在嵌入双链DNA后释放红色荧光。PI不能通过活细胞膜，但却能穿过破损的细胞膜而对核染色，因此，采用PI染色可检测死细胞；钙黄绿素（Calcein-AM）是一种疏水性非荧光探针，可渗透质膜并可水解为 calcein，是一种荧光极强且带负电荷的分子，可以检测活细胞。PI和Calcein-AM联合使用可以鉴定活/死细胞，可直接使用商品化试剂盒。

6.1.3.2.2 检测及结果计算

试剂配制和检测参考试剂盒使用说明进行。主要检测步骤如下：

- DRG神经元培养5 d后，弃去培养基，用PBS漂洗1次，去除剩余的培养基；
- 加入适量活/死细胞染色工作液，在37 ℃，5 % CO_2 培养箱内孵育20 min；活/死细胞染色工作液比例：Calcein-AM:PI:DMEM=1:3:1000；
- 荧光显微镜下拍照观察，Calcein-AM（活细胞，绿色荧光），PI（死细胞，红色荧光）；荧光波长： λ_{ex} 496 nm， λ_{em} 516 nm；
- 通过Image-J软件统计细胞的活/死比率，活细胞比率宜 $\geq 90\%$ ，至少取6个视野平均值；活细胞比率（Living cell ratio, LCr）按式（2）计算。公式需要用软件编辑后插入

$$LCr = LC / (LC + DC) * 100\% \dots\dots\dots (2)$$

式中，

LCr——活细胞比率，%；

LC ——活细胞数，即绿色荧光细胞数，个；

DC ——死细胞数，即红色荧光细胞数，个。

6.1.4 供试品的神经细胞/组织生物学效应评价

6.1.4.1 概述

将DRG神经元或组织块与供试品材料共培养一定时间后,采用DRG特异性荧光染色法,观察神经元活性、轴突取向性、轴突长度、轴突辐射面积的变化,与空白对照及材料对照组进行比较,分析评价供试品材料对神经细胞/组织的生物学效应。

宜在满足DRG神经元细胞存活率($\geq 90\%$,仅适用于DRG消化培养法)和细胞纯度($\geq 70\%$)的前提下进行供试品材料对神经细胞/组织的生物效应评价。

6.1.4.2 DRG与供试品共培养

按照 6.1.1进行供试品处理,将6.1.2 制备的DRG与供试品的共培养5 d。

注:可以依据实际情况选择消化培养法或组织块培养法。

6.1.4.3 评价方法

DRG神经元或组织块的轴突取向性、轴突长度、轴突辐射面积评价方法如下:

- 将DRG神经元或组织块与供试品材料共培养5 d后,弃去培养基,用PBS漂洗1次,去除剩余的培养基;
- 加入4 %多聚甲醛室温下固定30 min;
- 去除固定液,用PBS在室温下漂洗3次,每次10 min;
- 加入适量封闭液进行封闭,室温下封闭1 h;
- 去除封闭液,加入一抗(mouse anti-rat NF-H antibody, 1:400), 4℃孵育过夜;
- 用PBS漂洗3次,每次10 min;
- 加入二抗(Alexa 488 goat anti-mouse Ig G, 1: 400)在4℃避光孵育过夜;
- 用PBS漂洗3次,每次10 min;
- 加入适量免疫荧光封片液封片,在荧光显微镜下进行拍照观察;
- 通过Image-J软件统计轴突取向性、轴突长度、轴突辐射面积。
 - 轴突取向性:呈发散性,各个方向均匀分布。若材料表面有拓扑结构,通常按拓扑结构取向生长;
 - 轴突长度:用Image J软件测量轴突长度;
 - 轴突辐射面积:用Image J软件测量。

注:轴突辐射面积仅适用于组织块培养法。

6.1.4.4 结果和评价标准

给出试验各组的轴突取向性、轴突长度和轴突辐射面积(仅适用于DRG组织块培养法)的观察和检测结果。

供试品材料满足以下指标,或者与对照组相比给出供试品材料诱导神经元作用的生物学效应评价结果。

- 轴突取向性
 - 材料表面无拓扑结构:待测样品组轴突呈发散性,各个方向均匀分布;
 - 材料表面有拓扑结构:待测样品组轴突沿拓扑结构取向生长,取向角小于 15° ;
- 轴突长度
 - DRG神经元:待测样品组5 d轴突长度 $\geq 100\ \mu\text{m}$;
 - DRG组织块:待测样品组5 d轴突长度 $\geq 1500\ \mu\text{m}$;
- 轴突辐射面积

DRG组织块与供试品材料共培养5 d后,轴突辐射面积 $\geq 10\ \text{mm}^2$ 。

注:轴突辐射面积仅适用于组织块培养法。

6.2 施万细胞(RSC96)试验

6.2.1 材料及培养板的准备

施万细胞试验材料准备如下:

将适宜大小(如直径为1.0 cm)的单层圆形薄片状供试品或对照材料放置于细胞培养板的孔内(如48-孔板),平铺,向孔板中添加DMEM高糖培养基,浸泡4 h后弃除培养基。

注:若由于薄片材料过轻导致添加培养液时材料漂浮,可考虑使用适宜的聚四氟乙烯环置于材料上面,使材料固定,

此种情况需要预先确认聚四氟乙烯环对试验用细胞无细胞毒性。

6.2.2 施万细胞与供试品共培养

- 将预先培养至 80 % 左右近汇合状态的 RSC96 细胞用胰蛋白酶消化、计数；
- 按适宜密度接种于 (6.2.1) 准备好的细胞培养板内，接种密度宜根据孔面积（孔径）大小，如使用 48-孔板时，每孔加入 1×10^4 个/mL 的 RSC96 细胞悬液 500 μ L。

注：贮存细胞解冻后培养需传代 2 次~3 次后用于试验。

- 将细胞培养板置于 5 % CO_2 恒温培养箱内，37 $^{\circ}\text{C}$ ，培养 24 h，培养更长时间时（如 48 h、72 h）每 24 h 更换新鲜培养基。

6.2.3 施万细胞活性检测

6.2.3.1 实验原理

CCK-8法的工作原理为：WST-8试剂在电子载体1-甲氧基-5-甲基吩嗪鎓硫酸二甲酯（1-Methoxy PMS）的作用下被细胞中的脱氢酶还原为具有高度水溶性的黄色甲瓚产物（Formazan dye），生成的甲瓚物的数量与活细胞的数量成正比，因此可利用这一特性直接进行细胞活性检测。

将施万细胞RSC96与供试品材料共培养一定时间后，采用CCK-8检测细胞活力，与空白对照孔进行比较，分析评价供试品材料对施万细胞RSC96的生物学效应。

6.2.3.2 检测及结果计算

- 施万细胞按照6.2.2处理后，按照用48孔板，每孔加入500 μ L (1×10^4 个/mL) RSC96细胞悬液；
- 细胞/材料共培养至预定时间点后，吸弃培养基；
- 按照CCK-8试剂盒的使用说明，每孔加入200 μ L的CCK-8检测液（以DMEM高糖培养基稀释10倍），于细胞培养箱中避光孵育2 h；
- 每孔吸取100 μ L到新的96孔板；
- 采用酶标仪测定其在450 nm处的吸光值。

采集在450 nm测量的光密度值数据，按公式（3）计算与空白对照比较的相对细胞活性(Relative cell viability, rCV)。

$$\text{rCV} (\%) = \text{TOD}_{450} / \text{BOD}_{450} \times 100\% \cdots \cdots (3)$$

式中：

rCV —— 相对细胞活性，%；

TOD_{450} —— 试验样品光密度平均值；

BOD_{450} —— 空白对照孔光密度平均值。

6.2.3.3 施万细胞活性分析

- 试验体系成立的条件：空白OD450平均值 ≥ 0.2 ，则试验符合接受标准。每组复孔的标准偏差在SD ± 20 %之内。
- 细胞活性分析参考GB/T 16886.5进行，供试品的相对细胞存活率低于空白对照孔的70 %时，判定为材料对细胞活性有抑制作用，这种抑制效应可能来源于材料的细胞毒性，建议采用细胞毒性试验体系进行进一步的评价；但也可能来源于材料的特异性生物效应，宜进一步开展效应机理研究；
- 供试品的相对细胞存活率高于空白对照孔（ > 20 %）时，表明供试品具有一定的促细胞增殖或为细胞存活提供良好微环境的作用。

参 考 文 献

- [1] Kong Y, Zhang L, Han Q, et al. Effect of anisotropic silk fibroin topographies on dorsal root ganglion[J]. *Journal of Materials Research*, 2020, 35(13):1-11
- [2] Lza B, Qi H, Sca B, et al. Soft hydrogel promotes dorsal root ganglion by upregulating gene expression of Ntn4 and Unc5B[J]. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2020
- [3] X. Chen, X. Tang, Y. Wang, et al., Silk-inspired fiber implant with multi-cues enhanced bionic microenvironment for promoting peripheral nerve repair, *Materials Science & Engineering C*, 2021
- [4] National Institutes of H, & Ealth. (2015). Guidance Document on Using In Vitro Data to Estimate In Vivo Starting Doses for Acute Toxicity. NIH Publication No: 01-4500, 2015, 1-102
- [5] Zhu M, Li W, Dong X, et al. In vivo engineered extracellular matrix scaffolds with instructive niches for oriented tissue regeneration[J]. *Nature Communications*, 2019, 10(1)
- [6] Dong X, Yuan X, Wang L, et al. Construction of a bilayered vascular graft with smooth internal surface for improved hemocompatibility and endothelial cell monolayer formation[J]. *Biomaterials*, 2018, 181:2620
-