

YY

中华人民共和国医药行业标准

XX/T 1670.2—XXXX

医疗器械神经毒性评价 第2部分：神经细胞毒性试验

Evaluation of neurotoxicity of medical devices—Part 2: Neurotoxicity test

(征求意见稿)

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 试验材料、培养基与试剂、仪器设备 1

 4.1 试验材料 1

 4.2 培养基与试剂 1

 4.3 仪器设备 2

5 PC-12 细胞毒性试验 2

 5.1 试验原理 2

 5.2 试验分组 2

 5.3 试验步骤 2

 5.3.1 神经细胞活性评价试验 2

 5.3.2 神经细胞形态评价试验 3

 5.4 结果计算 3

 5.4.1 细胞活性计算 3

 5.4.2 神经突起长度分析 4

 5.5 试验可接受标准 4

 5.6 结果分析 4

6 试验报告 4

参 考 文 献 5

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。

本文件由全国医疗器械生物学评价标准化技术委员会（SAC/TC 248）归口。

本文件起草单位：中国食品药品检定研究院、

本文件主要起草人：

征求意见稿

引 言

神经植入物，可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，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。

细胞毒性作为神经植入物重要的安全性评价指标，如仅采用常规的细胞毒性评价方法，则不能充分反映神经植入物对神经细胞特异的毒性作用。为了科学地评价神经植入物的材料对神经细胞的潜在毒性风险，本文件提供了评价神经植入材料对神经细胞毒性影响的标准化试验方法，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。

体外细胞模型为快速筛选神经毒物提供有效工具。采用来自神经系统的细胞培养模型已被证实是神经系统发育的细胞和分子机理的强大工具，同时已被用于神经毒性机理研究。来源于大鼠肾上腺嗜铬细胞瘤的PC-12（或PC12）细胞系已被广泛用于化学物质神经毒性及其毒性作用机制的评价与研究[1-7]。

根据分化程度的不同，PC-12细胞系又分为高分化和未分化两大分支。PC-12高分化细胞株贴壁生长，可用于神经细胞活性评价。PC-12未分化细胞株表达神经生长因子（Nerve Growth Factor, NGF）受体，可在NGF的诱导下，产生神经元表型（形成神经突起等），可用于神经细胞形态评价。

本文件通过医疗器械/材料对PC-12细胞活性与NGF诱导下产生的神经突起[8-9]等形态学方面的改变，来评价试验样品潜在的神经细胞毒性。

YY/T 1670旨在建立医疗器械神经毒性研究的具体试验方法，拟由2个部分构成。

——第1部分：通用要求。目的在于给出医疗器械潜在神经毒性的试验选择指南。

——第2部分：神经细胞毒性试验。目的在于给出医疗器械神经细胞毒性的试验方法。

医疗器械神经毒性评价 第2部分：神经细胞毒性试验

1 范围

本文件规定了神经植入材料对神经细胞的毒性评价试验方法。
本文件适用于对神经植入材料进行神经细胞毒性评价试验。

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 16886.5 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：样品制备与参照材料

3 术语和定义

GB/T 16886.5界定的术语和定义适用于本文件。

4 试验材料、培养基与试剂、仪器设备

4.1 试验材料

主要材料及要求如下：

- 细胞系：推荐采用 PC-12（高分化）与 PC-12（未分化）细胞系作为神经细胞的代表用于试验体系，细胞应无支原体污染；
- 试验样品：试验样品应无菌。按照 GB/T 16886.12 要求，根据试验样品特点选择适宜的浸提条件制备试验样品浸提液；
- 阴性对照：推荐使用高密度聚乙烯等经验证无细胞毒性的材料选择与试验样品采用相同条件同步制备，若使用试剂作为阴性对照，则使用培养基配制；
- 阳性对照：推荐使用经验证具有显著神经细胞毒性的材料选择与试验样品采用相同条件同步制备，若使用试剂（如硫酸长春新碱、氯化甲基汞等）作为阳性对照，则使用培养基配制；
- 空白对照：为不含试验样品的完全培养基与试验样品采用相同条件同步制备。

4.2 培养基与试剂

细胞培养基与主要试剂如下：

- 1640 细胞培养基（含谷氨酰胺，不含酚红）；
- 胎牛血清（FBS）；
- 0.25%胰蛋白酶-EDTA 溶液；
- 青霉素-链霉素（PS）溶液；
- 磷酸盐缓冲液（PBS）；
- Cell Counting Kit-8 试剂（CCK-8）。
- 神经生长因子（NGF）
- 多聚-L-赖氨酸溶液（PLL）；
- 层粘蛋白（Laminin）；
- 马血清。

4.3 仪器设备

主要仪器设备如下：

- a) 细胞培养箱：37℃，湿化、5%CO₂/空气；
- b) 生物安全柜或超净工作台；
- c) 倒置相差显微镜；
- d) 荧光显微镜；
- e) 酶标仪或孔板光度计；
- f) 离心机；
- g) 电子天平；
- h) 恒温水浴箱；
- i) 恒温振荡器。

5 PC-12 细胞毒性试验

5.1 试验原理

本文件通过神经细胞活性和神经细胞形态两方面指标评价材料对PC-12细胞的毒性作用。其中，以细胞活性为主要评价指标，细胞形态为次要评价指标。

采用CCK-8细胞计数试剂评价细胞活性。CCK-8试剂中含有2-(2-甲氧基-4-硝基苯基)-3-(4-硝基苯基)-5-(2,4-二磺酸苯)-2H-四唑单钠盐(WST-8)，在电子载体1-甲氧基-5-甲基吩嗪硫酸二甲酯(1-Methoxy PMS)的作用下被细胞线粒体中的脱氢酶还原为具有高度水溶性的黄色甲臌产物，生成的甲臌产物的数量与活细胞的数量成正比。用酶标仪在450 nm波长处测定其光吸收值，可间接反映活细胞数量。

以PC-12(未分化)细胞在NGF诱导分化后形成的神经突起的长度为评价指标，从形态学上辅助评价材料对PC-12细胞的毒性作用。神经突起是神经细胞形态学显著特点，具有神经毒性的物质可抑制神经突起的形成，神经毒性的大小与神经突起被抑制的程度相关，故测量并比较各组细胞平均神经突起长度，可定量评价待测物质神经毒性作用。

5.2 试验分组

设置空白对照组和样品组，推荐同时设置阴性对照组和阳性对照组，保证试验体系有效并有助于结果的解释。

5.3 试验步骤

5.3.1 神经细胞活性评价试验

5.3.1.1 培养基

完全培养基：在1640细胞培养基中添加10% FBS、100 IU/ml青霉素、100 µg/ml链霉素。

完全培养基宜在4℃保存，且贮存时间不超过两周。

5.3.1.2 细胞接种

贮存PC-12(高分化)细胞解冻后，在用于试验之前应传代2次~3次。

将预先培养至近汇合状态的PC-12细胞用0.25%胰蛋白酶消化、计数，接种于96孔细胞培养板。用完全培养基重悬细胞悬液，调整密度为 1×10^5 个细胞/mL。

96孔细胞培养板的外围孔中加入100 µL完全培养基，在其余孔中加入100 µL密度为 1×10^5 个细胞/mL的细胞悬液。

将96孔细胞培养板置于5%CO₂细胞培养箱内，37℃，孵育24 h。

5.3.1.3 更换培养基

孵育24 h后，相差显微镜下检查每个孔，判定细胞接种系统误差。

除去原培养基，每孔加入100 μL试验样品浸提液，或阴性对照、阳性对照、空白对照培养基。试验样品浸提液宜至少有2个浓度梯度，推荐至少增加50%浸提液组。每组6复孔。

为了检查细胞接种系统误差，推荐将空白对照组设置在96孔板的左（第2列）、右（第11列）两侧。将细胞培养板置于5% CO₂细胞培养箱内，37 °C，孵育24 h。

5.3.1.4 细胞形态观察及活性检测

孵育24 h后，相差显微镜下检查每个板，判定细胞接种系统误差以及试验组与对照组细胞的生长特性，并拍照记录各组细胞形态学方面的改变。

更换孔内培养基，每孔加入10 μL的CCK-8溶液，继续孵育2 h（5% CO₂，37 °C），采用酶标仪测定各组在450 nm处的吸光度。

5.3.2 神经细胞形态评价试验

5.3.2.1 培养基

分化培养基：1640细胞培养基含5% FBS、50 ng/mL NGF、100 IU/ml青霉素、100 μg/mL链霉素。完全培养基宜在4 °C保存，且贮存时间不超过两周。

增殖培养基：1640培养基含10%马血清、5%FBS、100 IU/mL青霉素与100 μg/mL链霉素。

5.3.2.2 细胞接种

贮存PC-12（未分化）细胞解冻后，在用于试验之前应传代2次~3次。细胞传代、计数后接种于24孔细胞培养板。

未分化的PC-12细胞定向分化成神经元，细胞培养板表面需先经PLL与Laminin包被处理，具体步骤如下：

- a) PLL 包被：每孔加入 400 μL 浓度为 50 μg/mL 的 PLL 溶液（用无菌纯水配制），37 °C 孵育 2 h；
- b) 洗板：每孔加入 600 μL 无菌纯水，轻轻晃动约 30s 后吸除，反复 3 遍；
注：PLL有一定细胞毒性，接种细胞前宜充分清洗。
- c) Laminin 包被：每孔加入 400 μL 浓度为 25 μg/mL 的 Laminin 溶液（用 1640 配制），37 °C 孵育 2 h；
- d) 吸除 Laminin 溶液，接种细胞。

细胞悬液浓度调至1×10⁴个/mL，每孔接种1 mL细胞悬液。

将细胞培养板置于5% CO₂细胞培养箱内，37 °C，孵育24 h。

注：由于细胞接种密度较低，为避免接种后细胞分布不均，推荐细胞接种后1~2 h再转移至细胞培养箱。

5.3.2.3 更换培养基

孵育24 h后，除去原培养基，每孔加入1 mL试验样品浸提液，或阴性对照、阳性对照、空白对照培养基。试验样品浸提液宜设置2个浓度梯度，推荐增加50%浸提液组。每组4复孔。

将细胞培养板置于5% CO₂细胞培养箱内，37 °C，孵育48 h。

5.3.2.4 细胞形态观察与记录

孵育48 h后，相差显微镜下检查每个组，并拍照记录各组细胞形态。

每孔至少拍9个不同局部，合计不少于50个细胞用于神经突起分析。

注：推荐细胞经荧光染色后，或采用相差显微镜，采集细胞图像用于神经突起长度评价。

5.4 结果计算

5.4.1 细胞活性计算

按公式（1）计算各试验组PC-12细胞存活率。

$$rCV = OD_{450T}/OD_{450B} \times 100\% \dots\dots\dots (1)$$

式中：

- rCV ——相对细胞活性，%；
- OD_{450T} ——各试验组光密度平均值与外围孔试剂空白光密度平均值的差值；
- OD_{450B} ——空白对照组光密度平均值与外围孔试剂空白光密度平均值的差值。

5. 4. 2 神经突起长度分析

各试验组神经细胞以单孔为统计单元，仅统计长度不小于平均胞体直径的神经突起。所有神经细胞突起长度之和除以神经细胞数为平均神经突起长度。各试验组平均神经突起长度为各复孔的平均值。

采用合适的统计学分析方法，对比分析各试验组与空白对照组在平均神经突起长度方面的差异，以 $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

注：推荐采用图像分析软件，定量分析各组神经细胞突起长度。

5. 5 试验可接受标准

试验体系成立的条件：

- a) 空白对照组 OD_{450B} 平均值 ≥ 0.2 ；
- b) 左右两列空白对照组 OD_{450B} 平均值与全部空白平均值相差不大于 15 %；
- c) 试验样品 50 %浸提液存活率至少与 100 %浸提液的存活率相同或较高。

5. 6 结果分析

相对细胞活性较低时，试验样品的神经细胞毒性较高。

试验样品的PC-12相对细胞活性低于空白对照组的70%时，则具有潜在的神经细胞毒性。

除相对细胞活性，同时报告各试验组平均神经突起长度。

6 试验报告

试验报告中应包含下列信息：

- 试验样品名称、规格型号和批号；
- 试验样品浸提液制备方法；
- 阴性和阳性对照品；
- 细胞系选择和细胞来源；
- 试验条件和试验步骤；
- 试验结果；
- 结果分析；
- 结论。

参 考 文 献

- [1] Sadeghi S, Esmaeili A, Zarrabi A: Dextran-coated iron oxide nanoparticles in combination with ginger extract without NGF promote neurite outgrowth and PC12 cell branching. *Environ Res* 2023, 232:116302.
- [2] Radio NM, Freudenrich TM, Robinette BL, Crofton KM, Mundy WR: Comparison of PC12 and cerebellar granule cell cultures for evaluating neurite outgrowth using high content analysis. *Neurotoxicol Teratol* 2010, 32(1):25-35.
- [3] Mundy WR, Radio NM, Freudenrich TM: Neuronal models for evaluation of proliferation in vitro using high content screening. *Toxicology* 2010, 270(2-3):121-130.
- [4] Radio NM, Mundy WR: Developmental neurotoxicity testing in vitro: models for assessing chemical effects on neurite outgrowth. *Neurotoxicology* 2008, 29(3):361-376.
- [5] Das KP, Freudenrich TM, Mundy WR: Assessment of PC12 cell differentiation and neurite growth: a comparison of morphological and neurochemical measures. *Neurotoxicol Teratol* 2004, 26(3):397-406.
- [6] Parran DK, Mundy WR, Barone S, Jr.: Effects of methylmercury and mercuric chloride on differentiation and cell viability in PC12 cells. *Toxicol Sci* 2001, 59(2):278-290.
- [7] Fujita K, Lazarovici P, Guroff G: Regulation of the differentiation of PC12 pheochromocytoma cells. *Environ Health Perspect* 1989, 80:127-142.
- [8] Dichter MA, Tischler AS, Greene LA: Nerve growth factor-induced increase in electrical excitability and acetylcholine sensitivity of a rat pheochromocytoma cell line. *Nature* 1977, 268(5620):501-504.
- [9] Greene LA: A quantitative bioassay for nerve growth factor (NGF) activity employing a clonal pheochromocytoma cell line. *Brain Res* 1977, 133(2):350-353.
-