

中华人民共和国医药行业标准

YY/T 1465.8—XXXX

医疗器械免疫原性评价方法 第8部分：巨
噬细胞吞噬迁移功能试验

The methodology of immunogenicity—Part 8: Macrophage phagocytosis and
migration function test

(点击此处添加与国际标准一致性程度的标识)

2024.06.26

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

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。

本文件是YY/T 1465《医疗器械免疫原性评价方法》的第8部分。YY/T 1465已经发布了以下部分：

- 第1部分：体外T淋巴细胞转化试验；
- 第2部分：血清免疫球蛋白和补体成分测定（ELISA法）；
- 第3部分：空斑形成细胞测定 琼脂固相法；
- 第4部分：小鼠腹腔巨噬细胞吞噬鸡红细胞试验 半体内法；
- 第5部分：用M86单克隆抗体测定动物源性医疗器械中 α -Gal抗原清除率；
- 第6部分：用流式细胞术测定动物脾脏淋巴细胞亚群；
- 第7部分：流式液相多重蛋白定量技术；
- 第8部分：巨噬细胞吞噬迁移功能试验。

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。

本文件由全国医疗器械生物学评价标准化技术委员会（SAC/TC248）归口。

本文件起草单位：

本文件主要起草人：

引 言

免疫应答是机体的一种重要的防御机制。医疗器械作为外源性物质，在与人体接触后，通过多种途径影响机体免疫系统的免疫应答。特别是针对动物源性医疗产品、同种异体产品和组织工程医疗制品等。虽然医疗器械/材料与免疫系统的相互作用可能产生不同的免疫应答，但大体上可分为两种类型，即体液免疫应答和细胞介导免疫应答。目前，还无法判定医疗器械或材料刺激产生的免疫应答对宿主有利还是有害，因此，应用医疗器械/材料进行免疫应答研究来获取相关的信息是非常重要的。

巨噬细胞功能性试验是GB/T 16886.20规定的医疗器械免疫毒理学试验原则和方法的后续评价步骤中推荐的一种体外试验方法。本文件在GB/T 16886.20给出的检测免疫毒理学基本原则的基础上，根据医疗器械/材料的特性规定了详细的试验步骤，可作为GB/T 16886.20中免疫毒理学试验原则和方法的补充。

YY/T 1465旨在建立医疗器械免疫原性评价方法的具体试验方法，拟由8个部分构成。

- 第1部分：体外T淋巴细胞转化试验；
- 第2部分：血清免疫球蛋白和补体成分测定（ELISA法）；
- 第3部分：空斑形成细胞测定 琼脂固相法；
- 第4部分：小鼠腹腔巨噬细胞吞噬鸡红细胞试验 半体内法；
- 第5部分：用M86单克隆抗体测定动物源性医疗器械中 α -Gal抗原清除率；
- 第6部分：用流式细胞术测定动物脾脏淋巴细胞亚群；
- 第7部分：流式液相多重蛋白定量技术；
- 第8部分：巨噬细胞吞噬迁移功能试验。

医疗器械免疫原性评价方法 第8部分：巨噬细胞吞噬迁移功能试验

1 范围

本文件规定了医疗器械/材料免疫原性评价方法中巨噬细胞吞噬迁移功能试验的试验原理、试验方法和试验结果。

本文件适用于对医疗器械/材料诱导机体产生的免疫应答。

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 16886.12 医疗器械生物学评价 第12部分：样品制备与参照样品

3 术语和定义

GB/T 16886.1、GB/T 16886.12界定的以及下列术语和定义适用于本文件。

3.1

巨噬细胞 macrophages

巨噬细胞是一种位于组织内的白血球，源自单核细胞，而单核细胞又来源于骨髓中的前体细胞。

3.2

免疫毒理学 immunotoxicology

异物直接或间接与免疫系统相互作用所导致的不良健康作用的研究。

3.3

活性氧 reactive oxygen species (ROS)

活性氧是指在生物体内与氧代谢有关的、含氧自由基和易形成自由基的过氧化物的总称。

4 试验原理

巨噬细胞作为单核吞噬细胞系统的主要细胞，承担着吞噬、消除细胞内寄生菌、真菌、大颗粒异物，和清除衰老的自身细胞的职能，它在特异性体液免疫或细胞免疫应答中都有重要作用，所以巨噬细胞的吞噬消化功能，在一定程度上可以反映机体的免疫状态。因此，巨噬细胞和医疗器械/材料孵育一定时间后，基于荧光标记物与细胞共同作用的原理，通过观察荧光信号的变化来评估细胞吞噬的程度和效率，通过细胞内ROS总体水平和巨噬细胞趋化功能的检测来评价医疗器械的诱导的免疫毒理学。

5 主要设备

流式细胞仪、离心机、移液枪等。

6 试剂

DMEM-H培养基，胎牛血清（FBS），PBS缓冲液，青霉素，链霉素，活性氧检测试剂盒，吞噬作用检测试剂盒等。

7 细胞

可选用的细胞有RAW264.7，其他细胞系宜同样适用，但使用其他细胞系时宜对方案进行验证。宜使用合适的培养液和培养条件来维持所培养细胞的生长。宜定期检查细胞系模态染色体数目的稳定性和支原体污染情况，否则不宜使用。实验室宜建立细胞系或原代细胞的正常细胞周期时间，并与公开发表的细胞特征一致。

8 样品制备

宜根据GB/T 16886.12的原则制备试验液，使用适宜的极性和/或非极性溶剂作为浸提介质。若使用未经充分确认的浸提介质，应提供相应的数据支持资料来表明它们与试验样品和试验系统之间的相容性并排除浸提介质自身的免疫毒性。

9 试验方法

9.1 荧光染色法

9.1.1 试验原理

巨噬细胞和医疗器械/材料孵育一定时间后，基于荧光标记物与细胞共同作用的原理，通过观察荧光信号的变化来评估细胞吞噬的程度和效率。吞噬作用检测试剂盒通过跟踪外来颗粒（此处指经荧光染料荧光素标记的已杀死大肠杆菌（K-12 菌株）细胞）的内化，提供一种观察和定量测定巨噬细胞中吞噬过程的方法。

9.1.2 试验步骤

制备细胞和荧光生物颗粒：将细胞浓度调整至 1×10^6 个/mL开展试验。将浓缩的平衡盐溶液（HBSS）移液到荧光颗粒小瓶中，并对悬浮液进行简短超声处理。将悬浮液转移到含有4.5 mL去离子水的干净玻璃管中。对玻璃管进行超声处理，直到所有荧光颗粒均匀分散。

制备实验和对照样品：

阴性对照孔：150 μ L/孔细胞培养液（不含细胞），平行五个孔。

阳性对照和试验组：100 μ L/孔细胞悬液移液，每组平行五个孔。

将50 μ L/孔细胞培养液（不含细胞）加至五个含细胞的孔中来完成阳性对照孔。将5 μ L/孔生物材料或生物材料浸提液分别加至五个含细胞的孔中来完成试验孔。将细胞培养板置于37°C培养箱中并孵育至少1h，以使细胞黏附在微孔板表面上。

添加荧光颗粒和台盼蓝：在适当的细胞孵育时间后，弃去细胞培养板中的试验液。分别加入制备的荧光生物颗粒悬浮液到所有阴性对照、阳性对照和实验孔，100 μL/孔。将细胞培养板置于37℃培养箱中2h。弃去细胞培养板中生物颗粒加载悬浮液。立即向所有孔中加入准备好的台盼蓝悬浮液，100 μL/孔，在室温下孵育1min。弃去细胞培养板中过量的台盼蓝悬浮液。

9.1.3 荧光测量和结果

使用480 nm激发，520 nm发射和适当的灵敏度设置在荧光板读数器中读取微孔板的实验孔和控制孔。为了尽量减少实验误差的影响，计算阴性对照、阳性对照和实验样品组的平均荧光强度值。

按式（1）、式（2）计算评价巨噬细胞的吞噬功能：

$$\text{吞噬指数} = \frac{C1}{T} \times 100\% \dots\dots\dots (1)$$

$$\text{吞噬率} = \frac{C2}{T} \times 100\% \dots\dots\dots (2)$$

式中：

- C1——被吞噬的荧光微球总数
- C2——吞噬荧光微球的巨噬细胞数
- T——计数的巨噬细胞数

当试验组与阴性对照组在吞噬指数和吞噬率上出现具有统计学意义的差异时，可认为试验物质对巨噬细胞吞噬功能有影响。

9.2 活性氧检测

9.2.1 试验原理

组织微环境和受损组织（例如：炎症中释放的微生物产物和细胞因子）能调控巨噬细胞的极化，从而激活免疫反应并产生ROS，ROS的适度升高可以激活一些因子，上调抗氧化因子的表达，从而促进吞噬作用的进行，同时促进巨噬细胞M2极化，促进修复。当达到一定的阈值时，产生ROS会导致细胞功能障碍，使巨噬细胞M1极化，M1型巨噬细胞数量过多会引起过度炎症，抑制巨噬细胞的吞噬能力，导致组织受损。

活性氧检测试剂盒是一种利用荧光探针2', 7'-二氯荧光黄双乙酸盐（DCFH-DA）进行ROS检测的试剂盒。DCFH-DA 本身没有荧光，可以自由穿过细胞膜，进入细胞内后，可以被细胞内的酯酶水解生成2',7'-二氯二氢荧光素（DCFH）。而DCFH不能通透细胞膜，从而使探针很容易被装载到细胞内。细胞内的ROS可以氧化无荧光的DCFH生成有荧光的2',7'-二氯荧光素化氢探针（DCF）。检测DCF的荧光就可以知道细胞内ROS的水平。

9.2.2 试验步骤

原位装载探针：该方法仅适用于贴壁培养细胞。按照1：1000用无血清培养液稀释DCFH-DA，使终浓度为10μ mol/L。去除细胞培养液，加入适当体积稀释好的DCFH-DA。37℃细胞培养箱内孵育20分钟。用无血清细胞培养液洗涤细胞三次，以充分去除未进入细胞内的DCFH-DA。

收集细胞后装载探针：按照1：1000用无血清培养液稀释DCFH-DA，使终浓度为10μmol/L。细胞收集后悬浮于稀释好的DCFH-DA中，细胞浓度为二百万至二千万/mL，37℃细胞培养箱内孵育20分钟。每隔3~5分钟颠倒混匀一下，使探针和细胞充分接触。用无血清细胞培养液洗涤细胞三次，以充分去除未进入细胞内的DCFH-DA。

9.2.3 检测及结果分析

在488nm激发波长，525nm发射波长下，利用流式细胞仪检测荧光的强弱。

9.3 巨噬细胞趋化功能的检测

9.3.1 试验原理

巨噬细胞迁移是其在感染及损伤部位发挥免疫活性的首要条件，巨噬细胞趋化功能反映其迁移能力，是评价巨噬细胞免疫功能的主要指标之一。巨噬细胞趋化功能测定的基本原理是Transwell小室根据靶细胞能够趋化性主动迁移，穿过一定孔径的滤膜而检测趋化功能的。

9.3.2 试验步骤

用 Hanks 液（pH7.2）调整为 $2\sim3\times10^5$ 细胞/mL，将趋化因子液 25μl 加入趋化小室的下室。将滤膜光泽的一面朝向趋化因子盖在孔上，并将滤膜左上方剪去一小角；盖上趋化小室的上室部分，用固定器夹紧；将细胞悬液 50μl 注入上室。盖上载玻片，在 37℃，5%CO₂ 温箱中静置 90min 诱导细胞趋化移动；从温箱中取出多孔趋化小室，将朝向细胞的滤膜面（即无光泽面朝下）浸入生理盐水盘内，将滤膜光泽面朝上，贴在涂有蛋清甘油（甘油与蛋清等量混合而成）的载玻片上，冷风吹干滤膜后，用甲醇固定，进行 Giemsa 或瑞氏染色。

9.3.3 结果分析

用低倍镜确认移动细胞后，换用400倍高倍镜任意计数10个视野内的移动细胞的总数，每个样品至少重复计数3次。趋化结果以趋化指数表示。采用统计分析软件对数据进行分析处理。

趋化指数 = $\frac{t}{c} \times 100\%$ (3)

式中：

- t——样品组 10 个视野内的移动细胞的总数；
- c——对照组 10 个视野内的移动细胞的总数

10 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；
 - 试验和对照样品制备方法；
 - 试验细胞的详细信息；
 - 试验结果；
 - 结果评价；
 - 结论。

参 考 文 献

- [1]SNT 2497 26-2010 进出口危险化学品安全试验方法 第26部分：巨噬细胞功能试验
[2]GB/T 41212-2021 纳米技术 荧光素二乙酸酯法检测纳米颗粒诱导巨噬细胞产生的活性氧
-