

## · 研究进展 ·

# 神经系统接触类器械的生物学评价要点和神经细胞培养技术简介

段晓杰<sup>#</sup>, 魏利娜<sup>#</sup>, 邵安良, 陈亮<sup>\*</sup>, 徐丽明<sup>\*</sup> (中国食品药品检定研究院, 北京 102629)

**摘要:** 目前, 有关与人体神经系统直接或者间接接触的植入类医疗器械越来越多。这些植入类医疗器械可能会引起神经系统结构和/或功能的不利反应, 导致广泛的副作用, 这些副作用则被称为医疗器械产品的神经毒性。由于神经系统有限的修复能力, 因此增加了临床前评价神经毒性的重要性。目前, 还没有特定的标准或指南来规范医疗器械产品的神经毒性评价要求。本文结合国内外最新的相关标准和参考文献, 给出植入类医疗器械神经毒性评价的要点, 为相关产品的临床前安全性评价、质量控制及注册前技术审评提供技术参考。

**关键词:** 植入类医疗器械; 神经系统; 神经毒性; 神经毒性评价要点; 安全性评价; 质量控制

中图分类号: R95 文献标识码: A 文章编号: 1002-7777(2018)09-1251-06

doi:10.16153/j.1002-7777.2018.09.016

## The Key Items of Biological Evaluation of Medical Devices Contacted with Nerverous System and Introduction of Nerve Cell Culture Techniques

Duan Xiaojie<sup>#</sup>, Wei Lina<sup>#</sup>, Shao Anliang, Chen Liang<sup>\*</sup>, Xu Liming<sup>\*</sup> (National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 102629, China)

**Abstract:** Currently, there are more and more implantable medical devices which directly or indirectly make contact with the human nervous system. These implantable medical devices may cause adverse reactions to the structure and/or function of the nervous system, leading to extensive side effects, which are known as neurotoxicity of medical device products. Due to the limited repair capacity of the nervous system, preclinical evaluation of neurotoxicity becomes important. At present, there are no distinct standards or guidelines to regulate the neurotoxicity evaluation for medical devices. In this paper, based on the latest relevant standards and references at home and abroad, the keypoints of neurotoxicity evaluation for implantable medical devices were introduced, and relevant nervous cells culture techniques were demonstrated in order to provide technical references for preclinical safety assessment, quality control and technical review of related products before registration.

**Keywords:** implantable medical devices; nervous system; neurotoxicity; keypoints of neurotoxicity evaluation; safety evaluation; quality control

基金项目: 科技部重点研发计划“生物源性材料及产品的检测与评价关键技术和标准化研究”(编号 2016YFC1103203)

作者简介: 段晓杰; Tel: (010) 53852629; E-mail: duanxiaojie@nifdc.org.cn

并列第一作者: 魏利娜; Tel: (022) 53852628; E-mail: shui.4@126.com

通信作者: 徐丽明; Tel: (010) 53852556; E-mail: xuliming@nifdc.org.cn

并列通信作者: 陈亮; Tel: (010) 53852558; E-mail: cc539@aliyun.com

神经系统是由独特的细胞、蛋白质和生物化学通路构成的异质性组织。由于神经系统在结构、组成及功能上的特殊性,与人体神经系统,包括中枢神经和/或周围神经以及脑脊液直接或者间接接触的植入类医疗器械,如:硬脑膜补片、硬脑膜缝合医用胶、脑动脉瘤夹、脑积水分流器等,可能会引起神经系统结构和/或功能的不良反应,导致广泛的副作用,这些副作用则被称为医疗器械产品的神经毒性。因此,对该类产品进行临床前安全性和有效性评价时除了按照GB/T 16886.1进行常规医疗器械生物学评价项目之外,还应充分考虑选择必要的神经毒性试验,进行综合的、系统的潜在神经毒性评价。由于神经系统有限的修复能力,因此,增加了临床前评价神经毒性的重要性。目前,有关与人体神经系统直接或者间接接触的植入类医疗器械越来越多,然而,缺乏相关的被普遍接受的标准或者指南来指导该类产品的安全性评价。

## 1 概述

美国试验与材料学会(American Society for Testing and Materials, ASTM)最早提出了神经植入物的神经毒性评价指南(ASTM F2901-13, 2018年修订中);并且,在修订时不断完善标准的技术内容<sup>[1]</sup>。该指南强调:需要在医疗器械生物学评价风险管理的策略框架内(GB/T 16886.1),对预期与人体神经系统直接或者间接接触的植入类医疗器械进行神经毒性评价;需要结合充分的材料表征资料,以及材料的其他有关信息,例如非临床试验、临床研究、上市后信息等综合考虑神经毒性评价;对在神经系统植入的新材料,或对已在神经系统植入使用,但接受了可能影响神经组织反应的不同加工处理的材料,或者在神经系统有新的预期用途的材料,应考虑进行神经毒性评价试验。

神经毒性的评价可考虑选择如下重点项目:

1) 细胞毒性; 2) 遗传毒性; 3) 植入反应; 4) 热原反应; 5) 间接溶血反应; 6) 磨损的颗粒反应; 7) 发育神经毒性; 8) 器械-药品/生物制品相容性; 9) 间接脑脊液接触器械的神经毒性评价。

试验可选择最终灭菌的产品,或从最终灭菌产品上选择有代表性的样品,或选择与最终灭菌产品相同处理的材料。选择有代表性的样品时,应按比例包括所有直接或间接与神经系统接触的组分材料。对单一材料进行神经毒性评价有助于产品的研

发,但对产品的最终神经毒性评价应包括成品的所有材料。为区分神经毒性和一般毒性,需要检测神经系统功能特殊的终点指标,比较这些终点指标和其他非特异性终点指标的暴露关系,以及其他与所有真核细胞一致的非特异性终点指标。

## 2 神经毒性评价试验

### 2.1 细胞毒性

细胞毒性试验是医疗器械生物学评价最基本的试验。常规的医疗器械生物学评价中多选择L929细胞作为细胞毒性的试验模型。在评价神经细胞毒性时,在传统细胞毒性试验的基础上可考虑增加神经细胞毒性试验。原代神经细胞毒性试验的敏感性、特异性和可预测性还有待进一步验证,可能存在假阳性或者假阴性的限制。而神经组织来源的细胞株的使用改善了原代神经元细胞毒性试验的不足。神经组织来源的细胞株与传统细胞毒性相比,更能反映神经组织特殊的靶毒性。有关体外神经毒性评价技术可参考Harry等<sup>[2-3]</sup>神经细胞毒性试验进展。

### 2.2 遗传毒性

神经组织含有增殖的细胞群,能够对植入物呈现增殖反应响应。神经组织也可被诱发各种类型的肿瘤。为确保医疗器械不含有遗传毒性物质,建议用遗传毒性试验组合进行评价。遗传毒性试验组合包括:细菌基因突变试验和哺乳细胞体外染色体损伤的细胞遗传毒性评价或者体外小鼠淋巴瘤细胞(tk基因突变)试验。另外,如果医疗器械中含有新型材料,在器械极限浸提条件下,受试浸提液中材料的定量是体内试验测定的阈值以上时,应考虑利用啮齿动物造血干细胞的染色体损伤体内试验;遗传毒性试验可参照GB/T 16886.3(ISO 10993-3)<sup>[3]</sup>。

### 2.3 植入试验

建议开展临床相关的植入试验,即原位植入试验研究。宜依据植入医疗器械产品的预期临床用途选择植入位点和试验动物。

试验应包括一个急性植入期,及根据临床暴露时间或者根据组织反应达到稳定状态的时间点确定适当的时间间隔。研究周期内应适当地表征对植入物的反应(如可吸收硬脑膜补片),并根据临床预期用途进行设计及验证。

试验研究应包括组织病理学和神经行为评

价。在常规形态学染色(HE染色)的基础上,应考虑增加更敏感和特异的组织病理学评价方法,包括能够增强和定量神经退行性变、星形胶质细胞增生、小胶质细胞活化和脑白质变性评价方法<sup>[4-8]</sup>。例如:用氟玉(Fluor-Jade)评价神经退行性变;用胶质纤维酸性蛋白(glial fibrillary acidic protein, GFAP)评价星形胶质细胞增生;用巨噬细胞-1抗原(macrophage-1 antigen, MAC-1)、凝集素(Isolectin IB4)或者钙离子结合受体分子-1(ionized calcium binding adaptor molecule 1, IBA-1)评价小胶质细胞活化;用勒克司坚牢蓝(luxol fast blue)评价脑白质变性。

组织切片应包括植入物-组织界面和植入物周围足够的区域,确保在组织学分析时获取扩散、降解和/或可沥滤物的潜在反应。应考虑是否根据解剖区域纵向或横向切面,最大程度地获取了靶部位。

建议设计一组功能性的观察项目,测定功能异常的神经行为征象,即:包括功能性测试和组织病理学评价的染色<sup>[9]</sup>。可参照ISO 10993.6-2016的附录D中关于脑部植入试验的要求和方法。

#### 2.4 热原试验

为评价器械的神经炎性反应可能性,建议对最终的灭菌医疗器械产品开展热原试验。材料介导的热原试验宜选择《中国药典》(四部通则1142)<sup>[10]</sup>及GB/T 16886.11的附录F<sup>[11]</sup>(ISO 10993-11, Annex F)中给出的家兔热原试验。细菌内毒素试验,如使用鲎试剂(LAL, Limulus Amebocyte Lysate)宜参照《中国药典》(四部通则1143)<sup>[12]</sup>进行。对医疗器械细菌内毒素的限量应依据预期用途和与病人的接触类型进行规定。

美国FDA关于与脑脊髓液接触的医疗器械产品,其技术要求中关于内毒素检测的限量是每个器械2.15 EU,这个数值低于其他医疗器械的要求,如与心血管或淋巴系统接触的器械,其内毒素检测的限量是每个器械20 EU<sup>[13]</sup>。

#### 2.5 间接溶血反应试验

对于直接地或者间接地接触脑脊液的最终灭菌医疗器械产品,建议做间接(浸提液)溶血反应试验。间接溶血反应试验将评价任何来源于器械的残留物或者可沥滤物,这些具有通过静脉系统-脑脊液的再吸收,间接接触血液的潜在溶血风

险;试验宜参照GB/T 16886.4(表4植入器械试验方法)<sup>[14]</sup>。

#### 2.6 磨损的颗粒试验

在骨科脊柱器械近端的脊髓神经组织或者神经根可能易受器械碎屑和磨损颗粒的不良反应影响。应评价器械生成磨损颗粒物的可能性,进而充分评价磨损颗粒物的潜在神经毒性。动物模型的选择应科学、合理。可参考ASTM F 1904<sup>[15]</sup>和Cunningham等<sup>[16]</sup>人的文献,该文献讨论了颗粒物诱导的神经毒性评价方法的举例。动物实验研究应设计能够评价颗粒物对局部、全身和神经行为反应。宜评价脊柱、神经根、周围组织和远端组织的毒性和炎症反应征象。动物试验研究中颗粒物的大小、形状和剂量应能代表预期临床产生的颗粒物。

#### 2.7 发育神经毒性

发育中的神经系统处于生长和重建阶段,处于脆弱的关键窗口期,对一些神经毒性物质的持久效应可能是特殊敏感<sup>[17]</sup>。是否需要做发育神经毒性评价,可结合考虑评价以下因素:1)在子宫内的暴露风险;2)器械在新生儿、婴儿或者易感儿童群体的预期使用;3)暴露类型和时间;4)具有有限毒性数据的新材料的使用;5)已知有神经毒性的基础材料或加工添加剂的使用。神经发育毒性的评价包括用功能性试验和组织学的动物试验研究,和/或材料可沥滤物表征。一个评价试验的时间周期宜跨越发育相关的重要窗口期。关于发育神经毒性研究设计可参考Raffaele等的文献<sup>[18]</sup>。

#### 2.8 器械-药品/生物制品相容性

器械和药品或生物制品组合使用(如作为释放系统的组成部分使用的导管)需要确保器械和药品之间的相容性,进行相容性评价,包括:器械对药物的影响(如药效、组成、pH值等)和药物对器械的影响(如可浸提/可沥滤物质的概况、器械性能、材料稳定性等),因为这些能够改变与神经毒性相关的安全性结局。器械构成中的材料有影响药物或者生物制品的可能性,因此,有必要包括对药品浓度和药效在极性暴露状态下的充分评价。另外,药品、生物制品或辅料可能对器械的材料有影响,因此,这种影响可能需要通过在药品、辅料(赋形剂)(或者有相似化学特征的容积)极性暴露状态下对器械中可浸提/可沥滤物质的表征,然后进行毒性风险评价。在风险评价时,器械的累积

使用(如多次注射或用药物释放器械的灌注)应予以考虑。

### 2.9 间接接触脑脊髓液器械的神经毒性评价

对于与脑脊液(CSF)间接接触的器械(如灌注泵管道、给药装置、神经轴注射器)应开展在良好试验规范条件下的动物试验研究,阐述器械的沥出液体释放到含有CSF的区域没有不可接受的神经毒性风险。浸提(萃取)宜对装置的流体路径部件进行提取。浸提(萃取)介质宜选择在极性暴露状态下药品与器械预期使用的配方。动物模型的选择宜基于适当的科学理由(如用SD大鼠的髓鞘内研究)。依据ISO 10993-6 附录D推荐的方法,通过一组功能观测指标(functional observation battery, FOB)、组织学、运动和感觉功能的大体功能测试和临床观察。宜选择评价组织病理学的染色,以便识别关键的神经生物学变化。关于临床观察和组织病理学染色的更多信息可参见ISO 10993-6附录D。

## 3 神经细胞毒性试验进展

虽然在评价医疗器械的神经毒性时,仍然推荐首先做细胞毒性试验;建议在常规的细胞毒性试验基础上增加神经细胞毒性评价。然而,目前尚没有较成熟的神经细胞毒性试验方法。神经组织是由多种细胞协同作用才能形成神经网络,发挥神经系统的功能。因此,任何单一的细胞群都无法模拟生体的神经组织。然而,目前有许多新的研究方法尝试用于神经细胞毒性评价<sup>[2,19]</sup>下对一些方法进行简述。

### 3.1 细胞培养技术

自我复制培养的HCN-1Aa细胞是来源于人大脑皮层神经元,由单侧巨脑畸形病人,一种发育神经病理组织(未成熟的神经元)持续增殖而来。从慢性增长的星形细胞瘤到快速增长的胶质瘤分离的细胞株有大鼠C6、小鼠G26-24、人U-251/HTB-16和A-172细胞,如果将神经元细胞播种在这些细胞中混合培养,能抑制胶质的增长,展示了不同神经细胞的相互作用。典型的细胞型之间动态相互作用是胶质细胞诱导的内皮细胞分化,可将C6胶质细胞和视网膜内皮细胞共培养。

### 3.2 器官培养技术

器官培养技术一般包括大段脊髓、神经节、眼。眼神经刺激试验的主要试验方法:在麻醉条件下分离眼球,将导管插入眼睫状动脉,通过插管灌

注和洗出受试液,通过电生理参数测定受试液的作用。参考电极放在眼角膜和后极,稳定电压(静息电位)和视网膜电图,通过放置在玻璃体的玻璃管记录光峰。这种方法的好处是如果受试液中受试物的浓度和血液的浓度一样,那么受试物在靶细胞的浓度与生体条件具有可比性。另外,电生理效应能够在不知道靶细胞型的情况下被测定,不足之处是最大记录时间只有6 h,因此,只能测定急性反应,无法测定所诱导刺激的恢复性。

### 3.3 外植体/片培养技术

外植体/片是一种从相对未分化的胚胎脑、脊髓或感觉器官演化而来,发展成聚集的神经或胶质细胞群。对用于外植体/片培养的神经系统的一些区域,从胚胎到出生后的动物年龄不同而有差异,应保证持续可比性。组织外植体可以做成薄的切片、块状或者完整器官,如交感神经节。这种系统的主要利点是具有三维器官的特性,保持了一些器官的结构和功能特征。外植体/片依据培养条件不同,能够存活一周到一个月,不足之处是很难定量判断小的分化和活性变化。外植体/片培养时,细胞对营养的供给,如氧和培养液成分,依存于灌注率,是由外植体/片的厚度决定的。在延长培养时间时常常也是依存于外植体/片的厚度,不能排除组织中心部缺氧导致坏死,因此,仅仅少量外层的组织能够维持生体样的生理条件。

这种培养技术的目标是获得具有高度细胞成熟、分化的、能够评价个体神经元能力的有机器官。托辊管(rolle-tube)技术使延长时间的培养成为可能。

切片培养从刚出生的婴儿动物获得,供体的周龄是关键因素,与最终准备切片时器官所达到的有机化程度有关。通常从出生后1周内的大鼠组织制备,这个时期,相当程度的组织特异性细胞结构已经形成,神经元迁移高峰已经过去。在2~3周培养阶段,一个400 μm厚的切片将变薄形成假细胞层(伪膜,在相差增强光下可见),在生存状态可以观察到个体的神经元。根据厚度可以看到切片中心部的缺氧和坏死,但由于厚度的原因,显微镜检查往往受到局限。进行切片培养时需要测定其在培养条件下的分化和成熟程度。在这种培养条件下突触重排的可能性很高,必须用组织学技术测定。形态学分化可以通过细胞注射染料,如荧光黄或者辣

根过氧化物酶。

功能性突触的存在可以通过电生理记录,需要一个复杂的方法学和关键参数的控制,如温度、刺激和抑制体系都需要评价。虽然一只动物可以制备许多切片,但统计学分析需要以个体动物为单位(进行多只动物的比较),给出每一个脑部区域的各种发育成熟时间和所选择的动物周龄。应考虑切片在制备过程中的存活时间,如切片制备成培养物需要在限定的时间内完成,通常为45 min。

### 3.4 原代培养技术

原代培养包括悬浮培养和聚集体培养。脑组织分离成个体细胞悬液,在旋转培养条件下形成融合的单细胞层,具有和体内相似的细胞排列模式。在1 h内形成小的细胞团块(聚集球),2 d后便可形成直径0.15~0.8 mm稳定聚集球。聚集球被建议用于毒性研究,在一定的培养条件下(持续旋转培养、化学成分限定的培养液)可持续最长6个月。

神经元原代培养:供体的年龄是不同脑部区域成功获得神经元细胞型的关键。切片技术和培养液营养物质对于神经轴突生长水平的判断是唯一被证明的指标。如海马神经元来源于婴儿期脑组织,皮质和小脑神经元来源于出生后的脑组织。

神经胶质细胞原代培养:通常一种混合神经胶质细胞培养是从出生或者出生后2 d大鼠或者小鼠的脑皮质分离而来。6~18个幼崽有助于保证每个培养由3种清楚的胶质细胞表型构成,即星型细胞、少突胶质细胞和小胶质细胞。根据各种细胞粘附特性的不同,每个细胞型能够被继代培养成相对富集的群体。供体动物周龄的不同所获得的胶质细胞群体构成、成熟过程和生物化学反应会有戏剧性的变化。因此,供体动物周龄维持在一个生物学和形态学充分表征的窗口是任何结果解释的关键。如:啮齿类脑皮质星型胶质细胞和少突胶质细胞在出生到出生后2 d内为宜<sup>[2]</sup>。个体胶质细胞培养可依据不同细胞型的黏附接触特性进行制备。一旦建立了胶质细胞混合培养,可在2周时通过震荡(250 rpm)从单层的星形细胞层上分离小胶质细胞(2 h)和少突胶质细胞(18 h)。即将胶质细胞混合培养震荡2 h,取出培养液,另外播种在新的培养瓶内,1 h后弃掉原培养液,换成新鲜培养液即可得到单纯的小胶质细胞群。震荡培养18 h后,星形细胞可通过酶消化脱黏附,过滤和1 h播种后,去

除任何其他混入的胶质细胞进行继代培养。最后一步就是如何从震荡培养18 h后的培养液中去除任何其他的小胶质细胞,获得少突胶质细胞,即经过细胞富集后,把培养液调整为1%胎牛血清或者使用化学成分限定培养液,确保祖细胞分化成少突胶质细胞。富集继代培养细胞群体的形成依存于相对大量的动物。

### 3.5 细胞株培养技术

可持续培养的细胞株是由神经纤维瘤、胶质瘤和嗜铬细胞瘤演化而来,大约可以用50代。有限生命周期的细胞株在其生长潜能改变时往往陷入危机,变得可以无限增殖,这些细胞株被称为不死化细胞株。持续克隆细胞株的最大优点是均质性和容易扩增获得大量的细胞。

神经元细胞株很有限,相对成熟可用的主要有神经元(来源于神经纤维瘤)和神经胶质细胞(来源于少突胶质细胞、神经鞘瘤、星形细胞瘤)。不死化交感神经祖细胞株(MAH),暴露在纤维生长因子中分化成神经元。神经纤维瘤C1300细胞通过血清变换可以诱导形成延伸的突起。胶质瘤细胞株:C6胶质细胞株是从成年大鼠化学试剂诱导的胶质瘤演化而来。这些细胞拥有许多胶质瘤细胞规律性的调控机制和分化特性。当双丁酰环AMP被加入到原代CNS胶质细胞或者胶质细胞株培养时,形态学的复杂性增加,且可在cAMP移除后逆转。化合物增加了细胞内cAMP,诱导了相似的形态学改变。双丁酰环AMP被广泛应用于研究各种因子对分化的胶质细胞的作用。C6胶质细胞被用于毒性研究和基础细胞机理研究。

神经纤维瘤:主要有小鼠和人源神经纤维瘤细胞,它们表达几种神经递质合成的酶。但在应用这种细胞时,最大的困难在于其形态学分化和细胞毒性区分的关键时间。人的神经纤维瘤细胞有IMR32,它依据各种药物刺激而分化,表达几个神经特征和功能,如:神经递质合成和储存、受体及离子通道。在这种细胞中,检测的特殊神经终点是与轴突生长和神经递质受体表达相关。因此,作为神经毒性的特性指标在一般的细胞毒性评价中被测定。这种细胞已经被用于各种金属的毒性评价,它反映在体内的胆碱能神经系统靶标。

嗜铬细胞瘤(一种交感神经系统的肿瘤):PC-12克隆细胞株来源于大鼠的嗜铬细胞瘤(肾上

腺肿瘤)。与原代交感神经元及嗜铬细胞有许多共同特性。这些细胞在神经生长因子存在下可以被诱导分化,形成类似的交感神经元,延伸突起,增加酪氨酸羟化酶活性;相反,通过移除神经生长因子而呈现脱分化现象。PC-12已经被广泛地用于NGF反应和神经分化的机制研究。

### 3.6 微载体培养技术

微载体培养技术已经被广泛应用于体外不同细胞的研究。微载体具有非常大的表面积-体积比,能够被用于从小的培养体积中获得大量的细胞。微载体培养体系允许进行几种细胞型的混合培养,通过限定不同细胞的比例获得用于评价特殊细胞-细胞相互作用某一特定问题的模型。微载体培养技术已经被应用于神经细胞的纤维增生、突触发生、髓鞘形成和细胞间代谢相互作用。

#### 参考文献:

- [1] ASTM Standard F2901-2013 (2018 under-revising). Standard Guide for Selecting Tests to Evaluate Potential Neurotoxicity of Medical Devices[S]. 2013.
- [2] Harry GJ, Billingsley M, Bruinink A, et al. In vitro Techniques for the Assessment of Neurotoxicity[J]. Environ Health Perspect[J]. 1998, 106 ( Suppl 1 ) : 131-158.
- [3] 中国国家标准化管理委员会. GB/T 16886.3-2008医疗器械生物学评价第3部分遗传毒性、致癌性和生殖毒性试验[S]. 2008.
- [4] Polikov VS, Tresco PA, Reichert WM. Response of Brain Tissue to Chronically Implanted Neural Electrodes[J]. J Neurosci Methods, 2005, 148 ( 1 ) : 1-18.
- [5] Schmued LC, Stowers CC, Scallet AC, et al. Fluoro-Jade C Results in Ultra High Resolution and Contrast Labeling of Degenerating Neurons[J]. Brain Res, 2005, 1035 ( 1 ) : 24-31.
- [6] O'Callaghan JP, Sriram K. Glial Fibrillary Acidic Protein and Related Glial Proteins as Biomarkers of Neurotoxicity[J]. Expert Opin Drug Saf., 2005, 4 ( 3 ) : 433-442.
- [7] Bolon, Brad. STP Position Paper: Recommended Practices for Sampling and Processing the Nervous System (Brain, Spinal Cord, Nerve, and Eye) during Nonclinical General Toxicity Studies[J]. Toxicologic Pathology, 2013, 41 ( 7 ) : 1028-1048.
- [8] Mattsson, JL, Spencer PJ, Albee RR. A Performance Standard for Clinical and Functional Observational Battery Examinations of Rats[J]. International Journal of Toxicology, 1996, 15: 239-254.
- [9] ISO 10993-6:2016 Biological Evaluation of Medical Devices-Part 6: Tests for Local Effects after Implantation[S]. 2016.
- [10] 国家药典委员会.《中华人民共和国药典》2015年版四部[M].北京:中国医药科技出版社,通则 1142: 153-154.
- [11] 中国国家标准化管理委员会. GB/T 16886.11-2011医疗器械生物学评价第11部分:全身毒性试验[S]. 2011.
- [12] 国家药典委员会.《中华人民共和国药典》2015年版四部[M].北京:中国医药科技出版社,通则 1143: 154-157.
- [13] FDA Guidance for Industry Pyrogen and Endotoxins Testing: Questions and Answers[EB/OL]. [2018-04-23].[tps://www.fda.gov/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/ucm314718.htm](https://www.fda.gov/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/ucm314718.htm).
- [14] 中国国家标准化管理委员会. GB/T 16886.4-2003医疗器械生物学评价 第4部分:与血液相互作用试验选择[S]. 2003.
- [15] ASTM Standard F 1904. Practice for Testing the Biological Responses to Particles In Vivo[S]. 2014.
- [16] Cunningham BW. Basic Scientific Considerations in Total Disc Arthroplasty[J]. Spine J, 2004, 4 ( Suppl 6 ) : 219-230.
- [17] Rice D, Barone JS. Critical Periods of Vulnerability for the Developing Nervous System: Evidence from Humans and Animal Models[J]. Environmental Health Perspectives, 2000, 108 ( Suppl 3 ) : 511.
- [18] Raffaele KC, Fisher JE, Hancock S, et al. Determining Normal Variability in a Developmental Neurotoxicity Test: a Report from the ILSI Research Foundation/Risk Science Institute Expert Working Group on Neurodevelopmental Endpoints[J]. Neurotoxicol Teratol, 2008, 30 ( 4 ) : 288-325.
- [19] Bal-Price AK, Hogberg HT, Buzanska L, et al. In Vitro Developmental Neurotoxicity (DNT) Testing: Relevant Models and Endpoints[J]. NeuroToxicology, 2010, 31: 545-554.

(收稿日期 2018年6月24日 编辑 范玉明)