



中华人民共和国国家标准

GB/T 41212—2021/ISO/TS 19006:2016

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

Nanotechnologies—5-(and 6)-Chloromethyl-2',7' Dichloro-dihydrofluorescein diacetate (CM-H₂DCF-DA) assay for evaluating nanoparticle-induced intracellular reactive oxygen species (ROS) production in RAW 264.7 macrophage cell line

(ISO/TS 19006:2016, IDT)

2021-12-31 发布

2022-07-01 实施

国家市场监督管理总局
国家标准化管理委员会 发布

目 次

| | |
|---|----|
| 前言 | I |
| 引言 | II |
| 1 范围 | 1 |
| 2 规范性引用文件 | 1 |
| 3 术语和定义 | 1 |
| 4 符号和缩略语 | 3 |
| 5 材料 | 3 |
| 6 技术设备 | 4 |
| 7 纳米颗粒样品制备 | 4 |
| 8 准备工作 | 5 |
| 8.1 概述 | 5 |
| 8.2 流式细胞仪校准 | 6 |
| 8.3 实验培养基 | 6 |
| 8.4 试剂制备 | 6 |
| 8.5 细胞培养物的准备 | 6 |
| 8.6 准备实验用的培养物 | 6 |
| 8.7 检测细胞生长状态 | 6 |
| 8.8 评估纳米颗粒的干扰 | 7 |
| 8.9 对照组的准备 | 8 |
| 8.9.1 概述 | 8 |
| 8.9.2 对照组说明 | 8 |
| 8.9.3 Sin-1 储备溶液制备(1 mM) | 8 |
| 9 评价纳米材料对细胞内 ROS 产生的影响 | 8 |
| 9.1 准备 24 孔板中的细胞 | 8 |
| 9.2 用对照物 and 不同浓度纳米颗粒处理细胞 | 8 |
| 9.3 CM-H ₂ DCF-DA 细胞暴露 | 9 |
| 9.4 用 CM-H ₂ DCF-DA 孵育细胞 | 9 |
| 9.5 流式细胞仪分析 | 9 |
| 10 数据分析和结果 | 10 |
| 附录 A (资料性) 替代细胞系 | 11 |
| 附录 B (资料性) 可替代的荧光表征技术 | 12 |
| 附录 C (资料性) 悬浮液的制备和表征 | 13 |
| 附录 D (资料性) 来自 RAW 264.7 的实验数据示例 | 14 |
| 参考文献 | 16 |

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。

本文件使用翻译法等同采用 ISO/TS 19006:2016《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》。

与本文件中规范性引用的国际文件有一致性对应关系的我国文件如下：

——GB/T 16886.5—2017 医疗器械生物学评价 第 5 部分：体外细胞毒性试验 (ISO 10993-5:2009, IDT)。

本文件做了下列编辑性修改：

——将术语和定义一章引导语引用的文件列入了第 2 章“规范性引用文件”；

——参考文献重新排序。

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。

本文件由中国科学院提出。

本文件由全国纳米技术标准化技术委员会 (SAC/TC 279) 归口。

本文件起草单位：国家纳米科学中心、中国医学科学院基础医学研究所、中国食品药品检定研究院。

本文件主要起草人：吴晓春、纪英露、樊慧真、李海芸、李一叶、聂广军、许海燕、温涛、文海若、淡墨。

引 言

随着新材料、产品和应用的不断开发,纳米技术领域持续快速发展。与此同时,人们对其中一些纳米材料对人类健康和环境可能造成潜在风险的疑虑也在不断上升。目前国际上正在开展大量的相关研究,以便更好地了解 and 量化这些潜在风险。此外,在加工过程中或最终产品中用于包覆纳米颗粒表面的化学品也可能影响纳米颗粒与细胞之间的相互作用。特别是考虑到纳米颗粒比表面积大的特点,这一影响可能会更加突出。因此,对这些化学功能化的纳米颗粒,需要发展可靠、快速的筛选方法来判定其潜在的颗粒毒性。

监测纳米颗粒暴露后模式细胞的生物响应有望加深我们对纳米颗粒“作用模式”的理解,以及判断其中哪些因素可能需要进一步研究以便进行接下来的风险评估。

2008年,国际上一些研究团队发现,一些已发表的纳米材料毒性研究结果在不同的实验室无法重复,需要发展准确并可以重复的纳米毒理学测试方法。纳米环境健康与安全(nanoEHS)协调国际联盟(IANH)应运而生,旨在开发可以准确评估纳米颗粒毒性及其与细胞生物作用的测试规程,并且这些测试规程在任何实验室均可重复。IANH采用3-(4,5-二甲基噻唑-2-基)-5-(3-羧基甲氧基苯基)-2-(4-磺基苯基)-2H-四唑(MTS)法、5-(6)-氯甲基-2',7'-二氯-二氢荧光素二乙酸酯(CM-H₂DCF-DA)法和碘化丙啶法,对液体悬浮液中的粒径分布和纳米材料与细胞的体外相互作用进行了比对研究。IANH发现了一些增加测试不确定性的因素,并开发了降低此类不确定性的技术。

氧化应激可导致DNA损伤,是造成生物体突变累积的主要驱动力。因此评估纳米颗粒是否会导致活细胞产生活性氧(ROS)非常重要。

本文件提供了评估纳米颗粒细胞暴露产生ROS的体外测量方法。虽然测定细胞内ROS产生有很多技术,但目前仅开展了CM-H₂DCF-DA法评价RAW264.7小鼠巨噬细胞ROS产生的比对研究。CM-H₂DCF-DA法是检测细胞氧化应激的一种常用方法,对氧自由基或氧活性物种不具有特异性^[9]。虽然该方法尚未在更为广泛的细胞系中进行评估,但它提供了深入了解巨噬细胞中ROS产生可能性,而这一机制可能在清除体内颗粒中发挥重要作用。

在有对照组的情况下,CM-H₂DCF-DA法也可能出现误判。有若干因素可能会造成假阴性^[9]。CM-H₂DCF-DA法并非对所有的ROS都能实现最佳检测。例如,对半衰期较短的超氧阴离子和羟基自由基,其检测效果欠佳。2',7'-二氯二氢荧光素(DCFH)和2',7'-二氯荧光素(DCF)能从细胞中浸出或DCFH被氧化,因此用流式细胞仪测量时,应在细胞暴露后迅速进行检测。此外,CM-H₂DCF-DA法在血清中失效,在清洗细胞去除血清的过程可能会造成细胞丢失,产生假阴性。一些纳米颗粒可能与DCFH相互作用导致荧光部分淬灭。因此,如果存在上述情况,实验测得的ROS阴性结果并不是绝对的。ISO/TS 18827用电子自旋共振(ESR)波谱法检测细胞中ROS。该方法可以在无干扰的情况下区分不同的ROS。

反过来,有些因素可能会造成假阳性^[10]。有些纳米颗粒及死细胞会发荧光。有些纳米颗粒可催化CM-H₂DCF-DA氧化。检测试剂可能会优先吸附在颗粒表面^[10]。为确保阳性结果可靠,应在测试条件下采用对照组单独对纳米颗粒进行表征,并将死细胞产生的荧光与活细胞ROS产生的荧光区分开。

此外,CM-H₂DCF-DA可发生光诱导的自氧化,因此其储备液无论浓度高低都应在充氮/氩气的密闭容器中避光储存,防止光线照射和空气进入。

因此,CM-H₂DCF-DA法可能仅适用于特定的细胞系和纳米颗粒。在给出最终结论前,还应借助其他检测方法对结果进行进一步确认(参见附件A替代细胞系)。当检测体系中存在可能造成假阴性或假阳性结果的因素时,尤其需要注意。例如,对于阳性结果,应寻找其他检测方法确保该阳性结

果不是由干扰引起的。其他需要考虑的因素包括：应用对照组确定未暴露细胞的荧光基线；应确定细胞是否受无毒纳米颗粒的影响；应确保 ROS 阳性对照试剂和纳米颗粒产生的 ROS 在所使用的测定条件下都能被检测到。此外，还需确定纳米颗粒是否干扰荧光测定，进一步导致颗粒诱导细胞产生 ROS 的评估结果无效。如果可能存在这一干扰，可用暴露于 3-吗啉代二亚胺(Sin-1)的细胞添加不同剂量的纳米颗粒进行对照实验，以判定纳米颗粒是否淬灭荧光。

注：此方法被认为是一种快速筛选纳米颗粒与细胞相互作用的方法。虽然筛选类方法在评估纳米颗粒的细胞效应时非常关键，但结果解释能够被其他 ROS 及相关的细胞检测方法验证也是非常重要的。

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

1 范围

本文件描述了如何用 5-(6)-氯甲基-2',7'二氯二氢-荧光素二乙酸酯(CM-H₂DCF-DA)检测和评价 RAW264.7 巨噬细胞暴露于纳米物体、纳米颗粒及其聚集体和团聚体后产生活性氧(ROS)的方法。

本文件适用于用 24 孔板的检测。如果用其他孔板,需要调整样品用量并检验操作步骤的有效性以保证检测结果可信。

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。

ISO 10993-5 医疗器械生物学评价 第 5 部分:体外细胞毒性试验(Biological evaluation of medical devices—Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity)

ISO/TS 80004-2 纳米技术 术语 第 2 部分:纳米物体(Nanotechnologies—Vocabulary—Part 2: Nano-objects)

3 术语和定义

ISO/TS 80004-2、ISO 10993-5 界定的以及下列术语和定义适用于本文件。

下列网址为 ISO 和 IEC 负责的应用于标准中的数据库网址。

ISO 在线浏览平台:<http://www.iso.org/obp>

IEC 在线浏览平台:<http://www.electropedia.org/>

3.1

团聚体 **agglomerate**

弱束缚颗粒的堆积体、聚集体或二者的混合体,其外表面积与其单个颗粒的表面积的总和相近。

注 1: 支撑团聚体的作用力都是弱力,如范德华力或简单的物理缠结。

注 2: 团聚体也被称为次级颗粒,而源颗粒则被称为初级颗粒。

[来源:ISO/TS 80004-2:2015,3.4]

3.2

聚集体 **aggregate**

强束缚或融合在一起的颗粒构成的新颗粒,其外表面积可能显著小于其单个颗粒表面积的总和。

注 1: 支撑聚集体的力都是强作用力,如共价键或源于烧结或复杂的物理缠结。

注 2: 聚集体也被称为次级颗粒,而源颗粒则被称为初级颗粒。

[来源:ISO/TS 80004-2:2015,3.5]

3.3

培养器皿 **culture vessels**

包括玻璃培养皿、塑料培养瓶或塑料多孔培养板和微量滴定板等适用于细胞培养的器皿。