ICS 11.040.30
CCS C 30

T/CSBM

团　　体　　标　　准

T/CSBM 0050.1—2024

创面修复材料有效性评价
第 1 部分：水溶性材料体外评价方法

Effectiveness evaluation of wound repair materials
Part 1:In vitro evaluation method for water soluble materials

2024－05－14 发布　　2024－10－01 实施

中国生物材料学会　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　细胞毒性试验 1
5　细胞增殖试验 3
6　细胞迁移试验 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。

本文件是T/CSBM 0050—2024《创面修复材料有效性评价》的第1部分。包括以下部分：

——第 1 部分：水溶性材料体外评价方法；

——第 2 部分：水不溶性材料体外浸提液评价方法；

——第 3 部分：刺激因子屏蔽评价方法；

——第 4 部分：体外微血管形成试验评价方法；

——第 5 部分：体外细胞粘附和增殖直接接触评价法；

——第 6 部分：动物食管创面模型促修复愈合评价方法；

——第 7 部分：动物胃创面模型促修复愈合评价方法；

——第 8 部分：动物肠道创面模型促修复愈合评价方法；

——第 9 部分：动物皮肤创面模型促修复愈合质量评价方法。

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。

本文件由中国生物材料学会提出。

本文件由中国生物材料学会团体标准化技术委员会归口。

本文件起草单位：杭州英健生物科技有限公司、中国食品药品检定研究院、四川大学。

本文件主要起草人：戴建英、韩倩倩、梁洁、高欣怡、于栋杰、高洁、王涵、徐磊、邹文、王春仁、孔祥东。

引　言

早期的创面愈合材料为普通无菌的敷料，主要起到物理隔离保护创面的作用。随着生物材料的不断发展，具有组织再生能力的材料不断出现，这些材料不仅具有保护创面，而且具有促进创面细胞再生迁移，加速创面愈合速度和提高创面愈合质量的作用。目前评价创面材料的有效性主要是评价对细菌的隔离作用，尚无从细胞水平评价材料促进创面愈合的方法。创面修复材料主要包括水溶性材料和非水溶性材料。本文件主要是针对水溶性生物材料，例如海藻酸钠、羧甲基壳聚糖、胶原蛋白、透明质酸钠等生物材料，采用体外细胞培养的方法评价材料对细胞增殖和迁移的影响，确定材料促进细胞增殖和迁移的有效量。

水溶性生物材料主要是合成或天然高分子材料，有中性高分子、阴离子性高分子、阳离子性高分子和两性高分子材料以及其它无机材料，由于这些高分子材料在水溶液中的状态随着浓度的改变以及溶液中反离子的相互作用以及分子量的不同等而呈现为不同的物理状态，因此也会表现出不同的生物活性。研究表明这类生物材料在溶解状态时的生物作用不是随着浓度的增加作用增强，因此有必要确定这些材料最佳的细胞增殖和细胞迁移的有效浓度。在此基础上研究材料的促进细胞增殖和迁移的作用，确定材料是否具有促进细胞增殖和迁移的效果。

创面修复材料有效性评价　第1部分：水溶性材料体外评价方法

1　范围

本文件规定了水溶性创面修复材料体外评价的细胞毒性试验、细胞增殖试验和细胞迁移试验。

本文件适用于适用于水溶性创面修复生物材料促进细胞增殖和迁移效果的评价。

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 16886.5—2017　医疗器械生物学评价　第5部分：体外细胞毒性试验

3　术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

水溶性材料　water soluble material

强亲水性的生物材料，能溶解于水中形成水溶液或均匀分散体系。如海藻酸钠、羧甲基壳聚糖、胶原蛋白等。

3.2

细胞增殖　cell proliferation

细胞生长和分裂产生两个子细胞的过程，导致细胞数量呈指数增长，是组织修复过程中的主要机制。

3.3

细胞迁移　cell migration

细胞在接收到迁移信号或感受到某些物质的浓度梯度后而产生的移动。在这一过程中，细胞不断重复着向前方伸出突足，然后牵拉胞体的循环过程。

[来源：YY/T 0606.20—2014，3.3]

4　细胞毒性试验

4.1　原理

将待测生物材料溶解在培养基中，配成不同梯度浓度的样品，按照GB/T 16886.5—2017确定不同浓度下材料是否具有细胞毒性。

4.2　器具、试剂和耗材、细胞系

4.2.1　器具

试验器具如下：

a)　二氧化碳细胞培养箱；

b） 恒温水浴摇床；
c） 高压蒸汽灭菌锅；
d） 倒置荧光显微镜；
e） 细胞计数仪；
f） 恒温水浴摇床；
g） 酶标仪；
h） 电子天平；
i） 液氮罐；
j） 冷冻离心机；
k） 96 孔板；
l） 细胞培养瓶或细胞培养皿。

4.2.2 试剂和耗材

试验试剂和耗材如下：
a） 含 10％新生胎牛血清 DMEM 低糖培养基（含 10％FBS DMEM 低糖培养基）；
b） 二甲基亚砜（DMSO）；
c） 异丙醇；
d） 高密度聚乙烯。

4.2.3 细胞系

L929细胞。

4.3 样品制备

4.3.1 试验样品

准确称取样品溶解在含10％FBS DMEM低糖培养基中，配置成不同梯度浓度的样品，过滤除菌低温保存备用。根据样品现有的细胞毒性数据，配置10个不同梯度浓度的试验样品。

4.3.2 阴性对照

计算直径为1 cm的高密度聚乙烯双面的面积，按3 cm^2/mL加入含10％FBS DMEM低糖培养基，37 ℃、120 r/min摇床中浸提24 h，取浸提液使用。

4.3.3 阳性对照

取适量DMSO加入含10％FBS DMEM低糖培养基内，制备10％DMSO溶液，37 ℃、120 r/min摇床中震荡24 h。

4.3.4 空白对照

含10％FBS DMEM低糖培养基，37 ℃、120 r/min摇床中震荡24 h。

4.4 试验方法

按照GB/T 16886.5—2017中附录C规定的MTT细胞毒性试验方法进行，处理条件、检测模型、观察时间按表1进行。试验设置空白对照组、阴性对照组、阳性对照组，试验组，每个试验组设置6个复孔。将复苏好的成纤维细胞传至两代以上呈对数生长期时，按照1×10^5个/mL密度制备细胞悬液，每孔加入100 μL细胞悬液，然后接种到96孔板内，放入二氧化碳细胞培养箱在37 ℃下培养24 h，移去旧培养基，按照

试验设置加入对应培养液，继续培养24 h后，在显微镜下观察每组细胞形态，弃去每组培养液后加入1 mg/mL 50 μL MTT溶液，放入细胞培养箱中孵育2 h后弃去孵育液，加入100 μL异丙醇，用振荡器上振荡使蓝紫色结晶充分溶解混匀，在酶标仪上检测570 nm和650 nm波长的吸光度值并按照式（1）计算细胞存活率。

表1　细胞毒性试验

试验分组	处理条件	试验模型	观察时间	试验方法
空白对照组	含10％FBS DMEM低糖培养基	成纤维细胞（L929）	37 ℃、5％CO_2共培养24 h	MTT法
阴性对照组	高密度聚乙烯含10％FBS DMEM低糖培养基			
阳性对照组	10％DMSO含10％FBS DMEM低糖培养基			
试验组	不同浓度样品溶液			

$$P_1 = \frac{A_{570\,nm} - A_{650\,nm}}{B_{570\,nm} - B_{650\,nm}} \times 100\% \quad (1)$$

式中：

P_1——细胞相对存活率，％；

$A_{570\,nm}$——阴性对照组在570 nm处的平均吸光度；

$A_{650\,nm}$——阴性对照组在650 nm处的平均吸光度；

$B_{570\,nm}$——阳性对照组在570 nm处的平均吸光度；

$B_{650\,nm}$——阳性对照组在650 nm处的平均吸光度。

4.5　试验用样品浓度的确定

根据细胞毒性试验结果，选择无细胞毒性的高、中、低3个浓度用于细胞增殖和迁移试验。若试验结果的细胞毒性在最高浓度或最低浓度表现为细胞增殖率为最大值，宜进一步增加浓度或降低浓度重新进行细胞毒性试验。

5　细胞增殖试验

5.1　原理

在无血清培养基条件下测定细胞增殖的情况，以无血清培养基为空白对照，含血清培养基为阳性对照。若材料具有促进细胞增殖的作用，则和空白对照相比具有明显细胞增殖反应。

5.2　器具、试剂和耗材、细胞系

5.2.1　器具

同4.2.1。

5.2.2　试剂和耗材

试验试剂和耗材如下：

a)　含 10％新生胎牛血清 DMEM 低糖培养基（含 10％FBS DMEM 低糖培养基）；

b)　无血清培养基；

c)　CCK-8 试剂。

5.2.3 细胞系

5.2.3.1 试验可使用的细胞系如下：

a) 成纤维细胞；
b) 皮肤上皮细胞；
c) 食管上皮细胞；
d) 胃黏膜上皮细胞；
e) 肠黏膜上皮细胞。

5.2.3.2 对于用于不同部位的修复材料选择合适的细胞系，如用于皮肤的修复材料可用皮肤细胞，用于食管的材料可选择食管上皮细胞。

5.3 样品制备

5.3.1 试验样品

按照细胞毒性试验确认的3个浓度称取样品溶解在无血清培养基中，完全溶解过滤除菌备用。

5.3.2 阳性对照

含10%FBS DMEM低糖培养基，37 ℃、120 r/min摇床中震荡24 h。

5.3.3 空白对照

无血清培养基，37 ℃、120 r/min摇床中震荡24 h。

5.4 试验方法

将在对数生长期内的细胞按照1×10^5个/mL的细胞密度加入到96孔板内，每孔100 μL，6个复孔。在细胞培养箱中培养24 h后弃去旧培养基，按照表2规定加入对照组和试验组溶液。于24 h、48 h和72 h分别观察细胞增殖情况，弃去孔内液体，加入CCK-8溶液，放入培养箱内孵育3 h。孵育结束使用酶标仪测量450 nm的吸光度值，按照式（2）计算细胞增殖率，评估试验样品溶液不同浓度对细胞的增殖作用，并筛选出最佳增殖浓度。

表2 细胞增殖试验

试验分组	培养条件	检测模型	观察时间	检验方法
阳性对照组	含10%FBS DMEM低糖培养基	细胞系	24 h、48 h、72 h	CCK-8法
空白对照组	无血清培养基			
试验组	样品无血清培养基溶液			

$$P_2=\frac{A_{450\ nm}}{B_{450\ nm}}\times100\% \quad\cdots\cdots(2)$$

式中：

P_2——细胞增殖率，%；

$A_{450\ nm}$——阳性对照组不同浓度样品组平均吸光度；

$B_{450\ nm}$——空白对照组平均吸光度。

5.5 结果分析

采用统计学方法评价试验结果，并对空白对照组、试验组和/或阳性对照品组各组结果进行综合分析评估。经统计学分析：

a) 在阳性对照和空白对照应有显著性差异（$p<0.05$）条件下，试验组和空白对照组比较 $p<0.05$，则认为该材料具有促进细胞增殖的效果，否则材料没有促进细胞增殖的作用；
b) 若阳性对照和空白对照没有显著性差异（$p>0.05$），则试验不成立；
c) 若细胞增殖试验表现为增殖抑制作用，该材料可能与培养基中的血清蛋白相互作用，在有血清蛋白存在的情况下可能不会表现出细胞增殖抑制作用，必要时可进一步研究明确其作用机理。

6 细胞迁移试验

6.1 原理

当细胞长到融合成单层状态时，在融合的单层细胞上人为制造一个细胞空白区域，即为“划痕”，划痕边缘的细胞会逐渐进入空白区域使“划痕”愈合。通过对不同时期划痕区域细胞状态的观察，对细胞的迁移能力进行判断。该方法模拟了细胞在体内愈合过程中的迁移过程。在细胞单层中创建一个“伤口”，在细胞迁移过程中在开始和定期捕获图像以关闭伤口，以及比较图像以确定细胞迁移速率。

6.2 器具、试剂和耗材、细胞系

6.2.1 器具

试验器具如下：

a) 二氧化碳细胞培养箱；
b) 恒温水浴摇床；
c) 高压蒸汽灭菌锅；
d) 倒置荧光显微镜；
e) 细胞计数仪；
f) 恒温水浴摇床；
g) 酶标仪；
h) 电子天平；
i) 液氮罐；
j) 24 孔板；
k) 细胞培养瓶或细胞培养皿；
l) Image J 图像处理软件。

6.2.2 试剂和耗材

试验试剂和耗材如下：

a) 含 10%新生胎牛血清 DMEM 低糖培养基（含 10%FBS DMEM 低糖培养基）；
b) 无血清培养基。

6.2.3 细胞系

同5.2.3。

6.3 样品制备

同5.3。

6.4 试验方法

按照表3规定将处于对数生长期的细胞按照1×10^5个/mL的细胞密度铺于24孔板内，每孔加入1 mL，3个复孔，24h后将一灭菌直尺放置于孔板孔上方，用1 mL枪垂直于孔板和直尺间划一道横线，在10×显微镜下观察，拍摄0 h、以及培养12 h、24 h时的细胞图片，应用Image J按式（3）计算不同时间的细胞迁移率，评估生物材料作用后的对细胞迁移的影响。

表3 细胞迁移试验

试验分组	培养条件	检测模型	观察时间	检验方法
阳性对照组	含10%FBS DMEM低糖培养基	细胞系	0 h、12 h、24 h	显微镜观察拍摄图片
空白对照组	无血清培养基			
试验组	样品无血清培养基溶液			

$$P_3 = \frac{S_0 - S_{12}/S_{24}}{S_0} \times 100\% \quad (3)$$

式中：

P_3——细胞迁移率，%；

S_0——细胞划痕后0h细胞未覆盖的区域面积；

S_{12}——细胞划痕后12h细胞未覆盖的区域面积；

S_{24}——细胞划痕后24h细胞未覆盖的区域面积。

6.5 结果分析

采用统计学方法评价试验结果，并对空白对照组、试验组和/或阳性对照品组各组结果进行综合分析评估。经统计学分析：

a) 在阳性对照和空白对照应有显著性差异（$p<0.05$）条件下，试验组和空白对照组比较 $p<0.05$，则认为该材料具有促进细胞迁移的效果，否则材料没有促进细胞迁移的作用；

b) 若阳性对照和空白对照没有显著性差异（$p>0.05$），则试验不成立。

参 考 文 献

[1] YY/T 0606.20—2014 组织工程医疗产品 第20部分：评价基质及支架免疫反应的试验方法：细胞迁移试验

[2] GB/T 16886.12—2023 医疗器械生物学评价 第12部分：样品制备与参照样品

[3] 杨敏一,王涵,曾行,等.离子温度双敏感型黏膜创面保护胶性能及黏膜修复有效性体外评价研究[J].北京生物医学工程,2022,41(04):405-412.

[4] Hang Z ,Muye H ,Minyi Y , et al.In Vitro and In Vivo Investigation on the Effectiveness of Alginate-Based Gastric Mucosal Protective Gel.[J].BioMed research international,2022,20228287163-8287163.