

T/CSBM

团 体 标 准

T/CSBM 0050.2—2024

创面修复材料有效性评价 第2部分：水不溶性材料体外浸提液评价方法

Effectiveness evaluation of wound repair materials
Part 2: In vitro extracts evaluation method for water insoluble 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 浸提液制备	1
5 细胞增殖试验	1
6 细胞迁移试验	3
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。

本文件是T/CSBM 0050—2024《创面修复材料有效性评价》的第2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、李锐、王涵、虞朝辉、李娜、王春仁、陈坛轲。

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水不溶性材料。本文件主要是针对水不溶性生物材料，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。

水不溶性生物材料主要是水溶性生物材料采用交联的方式制备的海绵状多孔材料、水凝胶等型的材料，这类材料不溶于水，但是这类材料在水溶液中可以游离出没有交联的分子或降解的小分子。这些游离的分子可能会具有促进细胞增殖和迁移的作用，另外在制备交联材料时可以添加具有促进细胞增殖和迁移的作用的材料，这些材料可以游离到浸提液中，发挥促进细胞增殖和迁移的作用。本文件采用浸提液的方法评价创面修复材料是否具有促进细胞增殖和迁移的作用。

创面修复材料有效性评价

第2部分：水不溶性材料体外浸提液评价方法

1 范围

本文件规定了水不溶性创面修复材料体外评价的浸提液制备、细胞增殖试验和细胞迁移试验。

本文件适用于水不溶性创面修复生物材料促进创面细胞增殖和迁移效果的评价，如海绵多孔材料、水凝胶材料等。

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 16886.12—2023 医疗器械生物学评价 第12部分：样品制备与参照样品
T/CSBM 0050.1 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

3 术语和定义

T/CSBM 0050.1界定的术语和定义适用于本文件。

4 浸提液制备

在无菌状态下，按照以下条件制备浸提液：

- a) 浸提温度：37℃±1℃；
- b) 浸提时间：24h±2h 或 48h±2h 或 72h±2h；
- c) 浸提介质：无血清培养基；
- d) 浸提条件：120 r/min 摇床中震荡；
- e) 样品和浸提介质的比例：按照 GB/T 16886.12—2023 中表 1 的规定进行。

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

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。

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

将浸提液使用无血清培养基稀释成100%、75%、50%、25%、12.5%的浓度。

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24h。

5.3.3 空白对照

无血清培养基,37℃、120 r/min摇床中震荡24h。

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 μ L,6个复孔。在细胞培养箱中培养24h后弃去旧培养基,按照表1规定加入对照组和试验组溶液。于24h、48h和72h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3h。孵育结束使用酶标仪测量

450 nm的吸光度值，按照式（1）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1 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			

$$P_1 = \frac{A_{450\text{ nm}}}{B_{450\text{ nm}}} \times 100\% \dots\dots\dots (1)$$

式中：

P_1 ——细胞增殖率，%；

$A_{450\text{ nm}}$ ——阳性对照组不同浓度样品组平均吸光度；

$B_{450\text{ nm}}$ ——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：

- 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；
- 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。

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：

- 二氧化碳细胞培养箱；
- 恒温水浴摇床；
- 高压蒸汽灭菌锅；
- 倒置荧光显微镜；
- 细胞计数仪；
- 恒温水浴摇床；
- 酶标仪；
- 电子天平；

- i) 液氮罐；
- j) 24 孔板；
- k) 细胞 T75 培养瓶；
- 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 2 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，24 h 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 $10 \times$ 显微镜下观察，拍摄 0 h、以及培养 12 h、24 h 时细胞图片，应用 Image J 按式 (2) 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 2 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			

$$P_2 = \frac{S_0 - S_{12}/S_{24}}{S_0} \times 100 \% \dots \dots \dots (2)$$

式中：

- P_2 ——细胞迁移率，%；
- S_0 ——细胞划痕后 0 h 细胞未覆盖的区域面积；
- S_{12} ——细胞划痕后 12 h 细胞未覆盖的区域面积；
- S_{24} ——细胞划痕后 24 h 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] 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.

[2] 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.
