

T/CSBM

团 体 标 准

T/CSBM 0050.3—2024

创面修复材料有效性评价 第3部分：刺激因子屏蔽评价方法

Effectiveness evaluation of wound repair materials
Part 3: In vitro irritants barrier evaluation method

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 刺激物浓度确定试验	1
5 物理屏蔽细胞活力试验	3
6 物理屏蔽细胞迁移试验	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3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、于栋杰、高欣怡、王良静、王涵、徐磊、李娜、王春仁、王莹。

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。本文件采用物理隔离模型和体外细胞培养的方法，评价材料对细胞增殖和迁移的影响，确定材料物理隔离作用的有效性。

通过体外物理防护模型试验评价材料对各种刺激因子如胃酸、胃蛋白酶、胰蛋白酶、氧化物、内毒素等物质的隔离作用，在保护材料的作用下，细胞增殖试验应显示细胞处于存活增殖状态，细胞迁移试验在有保护材料存在时显示细胞迁移作用。本文件采用Transwell细胞培养技术评价创面修复再生材料的屏蔽效果。

创面修复材料有效性评价

第3部分：刺激因子屏蔽评价方法

1 范围

本文件规定了创面修复材料体外评价的刺激物浓度确定试验、物理屏蔽细胞活力试验和物理屏蔽细胞迁移试验。

本文件适用于水凝胶或固态创面修复生物材料屏蔽保护创面细胞活力和迁移效果的评价。

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

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。

3.1

细胞活力 cell viability

总细胞中活细胞所占的百分比。

3.2

刺激物 irritants

可致眼、皮肤、呼吸道黏膜、消化道黏膜发生可逆炎症反应的物质。

4 刺激物浓度确定试验

4.1 原理

将刺激物溶解在培养基中，配成不同梯度已知浓度的样品，按照GB/T 16886.5测定刺激物不同浓度下的细胞毒性，确定刺激物存活率40%、50%和60%的浓度。

4.2 器具、试剂和耗材、细胞系、刺激物

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) 二甲基亚砷 (DMSO);
- c) 异丙醇;
- d) 高密度聚乙烯。

4.2.3 细胞系

4.2.3.1 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。

4.2.3.2 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。

4.2.4 刺激物

试验可使用的刺激物如下:

- a) 盐酸;
- b) 胃蛋白酶;
- c) 胰蛋白酶;
- d) 过氧化氢;
- e) 细菌内毒素;
- f) 其他。

4.3 样品制备

4.3.1 刺激物梯度溶液

准确称取刺激物溶解在含 10% FBS DMEM 低糖培养基中,配置成不同梯度浓度的刺激物,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 个不同梯度浓度的刺激物。

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 cm²/mL加入含10%FBS DMEM低糖培养基，37℃、120 r/min摇床中浸提24 h，取上清液使用。

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、刺激物组，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1×10⁵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24h，移去旧培养基，按照试验设置加入对应培养液，继续培养24h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3h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	细胞系	37℃、5%CO ₂ 共培养24h	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			
刺激物组	不同浓度刺激物溶液			

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

式中：

P_1 ——细胞相对存活率，%；

$A_{570\text{ nm}}$ ——阴性对照组在570 nm处的平均吸光度；

$A_{650\text{ nm}}$ ——阴性对照组在650 nm处的平均吸光度；

$B_{570\text{ nm}}$ ——阳性对照组在570 nm处的平均吸光度；

$B_{650\text{ nm}}$ ——阳性对照组在650 nm处的平均吸光度。

4.5 试验用刺激物浓度的确定

根据细胞毒性试验结果，做刺激物浓度和细胞毒性关系曲线，选择细胞毒性存活率40%、50%、60%的3个浓度用于物理屏蔽细胞活力和物理屏蔽细胞迁移试验。若试验结果的细胞毒性存活率未能达到以上要求，宜进一步增加浓度或降低浓度重新进行细胞毒性试验。

5 物理屏蔽细胞活力试验

5.1 原理

采用Transwell细胞培养技术评价创面修复再生材料对胃酸、胃蛋白酶、胰蛋白酶、过氧化氢、细菌内毒素等刺激因子屏障作用。物理屏蔽保护试验模式如图1所示。在有保护材料屏蔽的情况下可以避免刺激因子对细胞的刺激和毒性作用，细胞可以生长良好，而在没有保护的情况下细胞生长被抑制或细胞死亡。

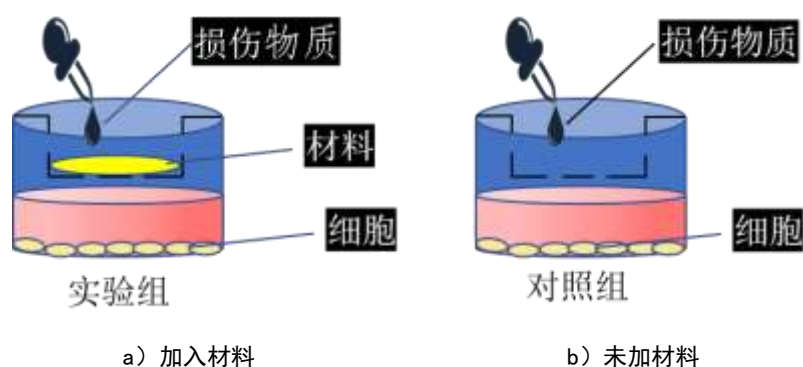


图1 材料屏蔽保护试验模型示意图

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) 24孔板；
- l) Transwell孔板；
- m) 96孔板。

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) CCK-8试剂。

5.2.3 细胞系

同4.2.3。

5.3 刺激物溶液制备

按4.5确定的浓度，按4.3.1配制3个浓度的刺激物溶液。

5.4 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，试验组的Transwell孔板中加入0.2 mL保护胶使其厚度为1.0 mm~1.5 mm，空白对照组不做处理，分别向每组中加入3个不同浓度的刺激物观察24 h、48 h、72 h细胞增殖情况，酶标仪下检测450 nm的吸光度，按照式（2）计算细胞存活率，评估创面修复材料屏蔽保护细胞活力作用。

表2 物理屏蔽细胞活力试验

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	无材料	细胞系	24 h、48 h、72 h	CKK—8法
试验组	有材料			

$$P_1 = \frac{A_{450 \text{ nm}}}{B_{450 \text{ nm}}} \times 100\% \dots\dots\dots (2)$$

式中：

P_1 ——细胞存活率，%；

$A_{450 \text{ nm}}$ ——试验组在450 nm处的平均吸光度；

$B_{450 \text{ nm}}$ ——空白对照组在450 nm处的平均吸光度。

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、试验组结果进行综合分析评估。经统计学分析试验组和空白对照组比较 $p < 0.05$ 则认为该材料具有屏蔽保护细胞活力的作用，否则材料没有屏蔽保护细胞活力的作用。

6 物理屏蔽细胞迁移试验

6.1 原理

采用Transwell细胞培养技术评价创面修复再生材料对胃酸、胃蛋白酶、胰蛋白酶、过氧化氢、细菌内毒素等刺激因子屏障作用。物理屏蔽保护试验模式如图1所示。在有保护材料屏蔽的情况下可以避免刺激因子对细胞的刺激和毒性作用，细胞可以迁移，而在没有保护的情况下细胞迁移被抑制。

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) 恒温水浴锅;
- g) 恒温水浴摇床;
- h) 酶标仪;
- i) 电子天平;
- j) 液氮罐;
- k) 24孔板;
- l) Transwell孔板;
- m) 细胞培养瓶;
- n) Image J图像处理软件。

6.2.2 试剂和耗材

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

6.2.3 细胞系

同4.2.3。

6.3 刺激物溶液制备

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 $10 \times$ 显微镜下观察。样品组的Transwell孔板中加入0.2 mL的保护胶使其厚度为1.0 mm~1.5 mm，空白对照组不做处理，分别在每组中加入3个不同浓度的刺激物。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 物理屏蔽细胞迁移试验

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	无材料	细胞系	0 h、12 h、24 h	显微镜观察 并拍摄图片
试验组	有材料			

$$P_2 = \frac{S_0 - S_{12}/S_{24}}{S_0} \times 100\% \dots \dots \dots (3)$$

式中：

P_2 ——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、试验组结果进行综合分析评估。经统计学分析试验组和空白对照组比较 $p < 0.05$ 则认为该材料具有屏蔽保护促进细胞迁移的作用，否则材料没有屏蔽保护促进细胞迁移的作用。

参 考 文 献

- [1] 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
- [2] 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.
- [3] 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.
-