

T/CSBM

团 体 标 准

T/CSBM 0050.4—2024

创面修复材料有效性评价 第4部分：体外微血管形成试验评价方法

Effectiveness evaluation of wound repair materials
Part 3: In vitro microangiogenesis 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 样品制备	1
5 血管形成试验	1
6 结果分析	3
附录 A（资料性） 体外微血管形成试验评价实例	4

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4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、吕宾、王涵、熊英、李娜、王春仁、毛鑫礼。

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。本文件采用体外细胞培养的方法，评价材料对微血管形成的影响，评价材料促进创面愈合的有效性。

开放伤口愈合过程中伤口收缩占主要地位，一般可达80%，其余为上皮细胞新生、胶原蛋白合成及肉芽组织增殖。其中新生肉芽组织中血管的形成对创面的愈合质量影响较大，丰富的血管具有明显提高创面愈合质量的作用，反之不利于创面愈合。生物材料促进创面愈合不仅具有促进愈合速度，在一定程度上还具有促进创面微血管形成，也具有提高愈合质量的作用。本文件采用体外细胞培养技术评价创面修复再生材料的微血管形成作用。

创面修复材料有效性评价

第4部分：体外微血管形成试验评价方法

1 范围

本文件规定了创面修复材料体外评价的样品制备、血管形成试验和结果分析。
本文件适用于适用于创面修复材料促进创面微血管形成效果的评价。

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

3 术语和定义

T/CSBM 0050.1—2024界定的术语和定义适用于本文件。

3.1

血管形成 angiogenesis

血管内皮增生、延伸而形成新血管的过程。

4 样品制备

4.1 水溶性材料

水溶性材料采用的浓度按照T/CSBM 0050.1—2024中第4章规定的方法确定。

4.2 水不溶性材料

浸提液制备按照T/CSBM 0050.2—2024中第4章规定的方法制备。

5 血管形成试验

5.1 原理

人的血管系统负责将营养物质和氧气运送到几乎所有的器官和组织，并将产生的废物通过循环排除体外。血管生成在组织损伤修复中具有很大的作用，血管的缺损会延缓伤口的愈合甚至造成伤口长期不愈。血管新生有利于黏膜损伤后的修复，因此通过EA. HY926细胞探究水凝胶浸提液对于血管形成的影响。

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) T25 细胞培养瓶；
- l) 24 孔板；
- m) 基质胶；
- n) Image J 图像处理软件。

5.2.2 试剂和耗材

试验试剂和耗材如下

- a) MEM 低糖培养基：含 10% 胎牛血清；
- b) 磷酸缓冲液（PBS）；
- c) 0.25% 胰蛋白酶。

5.2.3 细胞系

EA. HY926 细胞。

5.3 样品制备

5.3.1 试验样品

按照 4.1、4.2 制备。

5.3.2 空白对照

MEM 低糖培养基，37 °C、120 r/min 摇床中震荡 24 h。

5.4 试验步骤

5.4.1 EA. HY926 细胞培养

5.4.1.1 细胞复苏

将 EA. HY926 细胞冻存管于 37 °C 恒温水浴锅内不断晃动，待细胞冻存液完全溶解，将冻存的细胞悬液转移至 15 mL 离心管内，随后加入 MEM 低糖培养基，用无菌巴氏吸管吹打均匀后 1 000 r/min 离心 3 min。弃去上清液，用 MEM 低糖培养基重悬细胞，随后将细胞转移至 T25 的培养瓶中，在 37 °C、5% CO₂ 细胞培养箱中培养，24 h 后观察细胞状态，并给细胞换液。

5.4.1.2 细胞传代

当细胞密度约为80%时，吸去培养瓶中原有的培养基，使用PBS轻洗两次，加入1 mL~2 mL 0.25%胰蛋白酶消化3 min~5 min，显微镜观察细胞消化情况，当细胞边缘缩小，贴壁松动时，手指轻叩细胞瓶身，肉眼可见细胞脱落，向培养瓶内加入一定量的MEM低糖培养基终止消化，MEM低糖培养基与0.25%胰蛋白酶的比例为5:1。终止消化后，用移液枪轻轻吹打细胞层，吹打时宜尽量减少气泡的产生，将细胞层吹落、吹散，然后将细胞悬液转移至离心管内，1 000 r/min离心3 min，弃去原有培养基，加入3 mL~5 mL MEM低糖培养基，将细胞重新混悬，取适量混匀的细胞悬液于细胞培养瓶内，在37 °C、5%CO₂细胞培养箱中继续培养。传代比例为1:4，2天~3天传代。

5.4.1.3 细胞冻存

细胞消化后，1 000 r/min离心3 min，加入冻存液将细胞混匀，取10 μL细胞悬液用细胞计数仪计数，然后将混匀的细胞悬液放入冻存管中，每管1 mL，冻存密度为 1×10^5 /mL~ 1×10^6 /mL。冻存管上应标明冻存细胞的名称、密度、代数以及冻存人和冻存时间。冻存细胞先4 °C放置10 min，再-20 °C放置30 min，然后-80 °C过夜，梯度降温后将细胞转移至液氮中保存。

5.4.2 小管形成试验

小管形成试验步骤如下：

- a) 将基质胶放入冰箱4 °C过夜缓慢融化。枪头、24孔板等放入冰箱-20 °C预冷；
- b) 将基质胶以每孔200 μL缓慢加入预冷的24孔板中，避免气泡产生，注意操作过程中手持EP管上方，手心不应接触EP管；
- c) 将铺有基质胶的24孔板放入冰箱4 °C静置15 min，然后转移至37 °C培养箱中静置30 min，使其凝固；
- d) 待细胞融合至80%左右时，将细胞消化、离心并分别用试验液和空白对照液重悬细胞，随后细胞以 1×10^5 /mL加入24孔板中，每孔1 mL，3个复孔。放入恒温细胞培养箱中继续培养，分别在3 h、6 h、9 h观察小管形成情况；
- e) 将细胞按照d)步骤铺板，在6 h时将细胞固定免疫荧光染色，显微镜下观察小管形成情况，并拍照，Image J计算成管数量，观察浸提液对血管形成的影响。

6 结果分析

6.1 附录A给出了体外微血管形成试验方法的实例。

6.2 小管形成试验结果：在观察时间内血管形成情况的描述，并给出显微镜下图片结果。

6.3 免疫荧光染色结果：评价血管网形成的数量和血管形成的总长度，采用统计学评价方法，评价材料促进血管形成的效果，并给出免疫荧光染色的结果图片。经统计学分析试验组和空白对照组比较 $p < 0.05$ 则认为该材料具有促进血管生成的作用，否则材料没有促进血管生成的作用。

附录 A
(资料性)
体外微血管形成试验评价实例

A.1 器具、试剂和耗材、细胞系

6.3.1 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) T25 细胞培养瓶；
- l) 24 孔板；
- m) 基质胶；
- n) Image J 图像处理软件。

6.3.2 试剂和耗材

试验试剂和耗材如下：

- a) MEM 低糖培养基：含 10% 胎牛血清；
- b) 无血清培养基；
- c) 磷酸缓冲液 (PBS)；
- d) 0.25% 胰蛋白酶。

6.3.3 细胞系

EA.HY926 细胞，外购，自带细胞 STR 鉴定报告。

A.2 品制备

A.2.1 浸提液制备

以消化道创面保护胶为试样，在无菌状态下，按以下条件制备浸提液：

- a) 浸提温度：37℃±1℃；
- b) 浸提时间：24 h±2 h；
- 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。

A.2.2 空白对照

MEM低糖培养基，37℃、120 r/min摇床中震荡24h±2h。

A.3 试验步骤

A.3.1 EA.HY926细胞培养

按5.4.1进行。

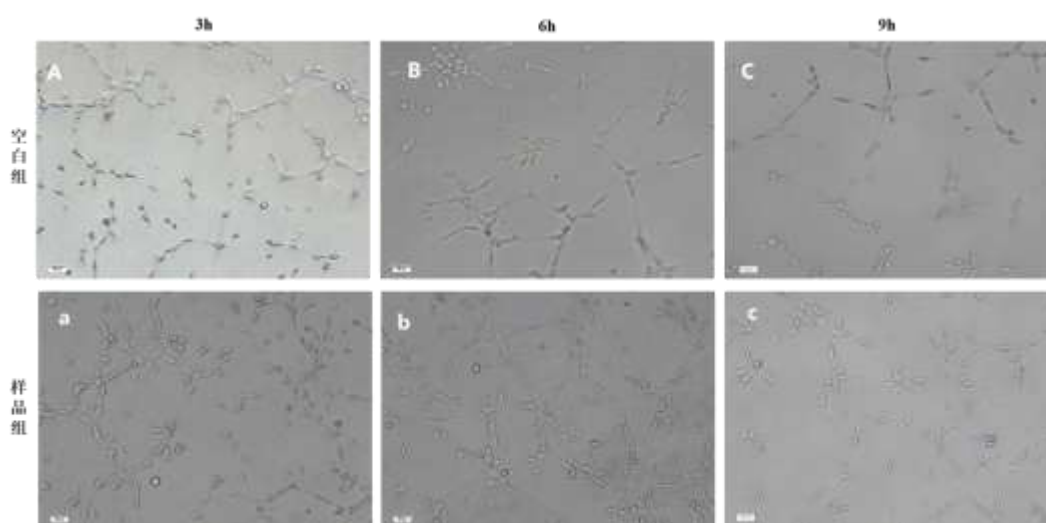
A.3.2 小管形成试验

按5.4.2进行。

A.4 血管形成试验结果

A.4.1 小管形成试验结果

各组细胞分别加入处理后的样品重悬，随后接种到铺板基质胶的24孔板中培养9 h，观察各组血管结构在不同时间的生成情况。细胞刚接种时大多呈圆形，随着培养时间的延长，细胞开始长出伪足，与相邻细胞相连；3 h时，部分细胞由圆形伸展为长梭形，部分细胞间逐渐建立连接；6 h时，细胞多数于周围细胞建立连接，线样结构增多且细胞逐渐形成管状网格结构；随着时间的延长，形成的线样结构逐渐断裂，细胞逐渐聚集，小管样结构数量减少。×100显微镜下不同时间小管形成情况见图A.1。



说明：

A——空白对照组培养3 h；

B——空白对照组培养6 h；

C——空白对照组培养9 h。

a——试验组培养3 h；

b——试验组培养6 h；

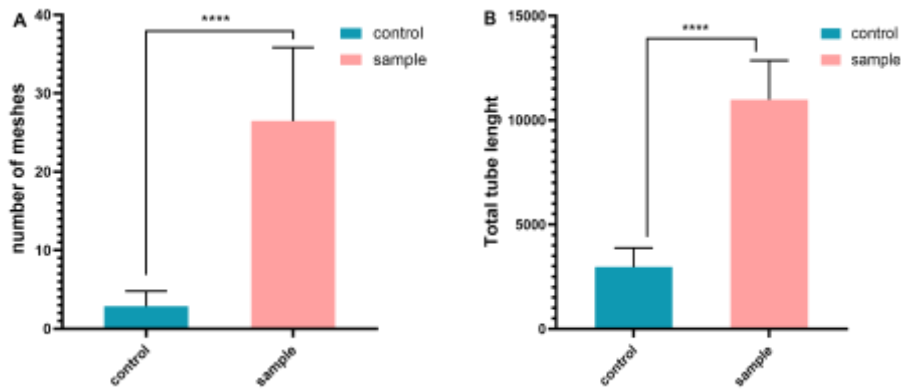
c——试验组培养9 h。

图A.1 ×100 显微镜下不同时间小管形成情况

A.4.2 免疫荧光染色结果

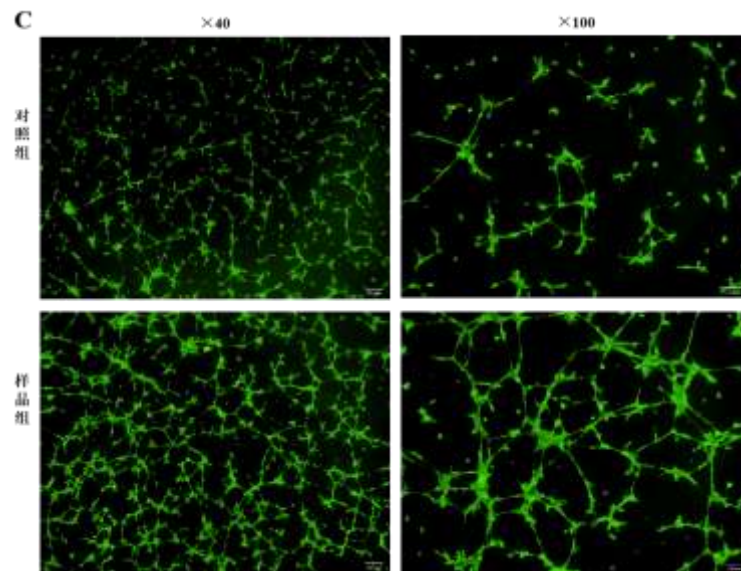
管状形成反映了人脐静脉内皮细胞的体外小管形成能力，样品浸提液与对照组相比，血管形成数目和小管总长度均有统计学差异($P < 0.001$)，免疫荧光结果可以发现，对照组细胞为长梭形，但细胞之

间未建立紧密连接，样品组细胞之间紧密相连，形成小管状。综上，水凝胶能够促进血管形成，且形成的血管网状结构也更加成熟。免疫荧光染色结果见图A. 2。



a) 小管形成数目 (n=3)

b) 小管形成总长度 (n=3)



c) 小管形成试验免疫荧光染色

图A. 2 免疫荧光染色结果

A. 5 结论

样品能有效促进微血管形成，且在6 h时小管形成效果最佳，血管数量增加。