



中华人民共和国医药行业标准

YY/T XXXXX—XXXX

组织工程医疗器械产品 生物活性陶瓷 多孔材料中细胞迁移的测量方法

Tissue engineering medical device products — Bioactive ceramics — Method to measure cell migration in porous materials

(ISO 19090:2018 Tissue-engineered medical products — Bioactive ceramics — Method to measure cell migration in porous materials, MOD)

(征求意见稿)

(本稿完成日期：2019.07.02)

XXXX – XX – XX 发布

XXXX – XX – XX 实施

国家药品监督管理局

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 原则 2

5 试验样品 2

6 试验步骤 2

7 计算 9

8 试验报告 10

9 参考文献 11

前 言

本标准按 GB/T 1.1-2009 给出的规则起草。

本标准使用修改采用法，转化国际标准 ISO 19090:2018 组织工程医疗产品 生物活性陶瓷 多孔材料中细胞迁移的测量方法(Tissue-engineered medical products — Bioactive ceramics — Method to measure cell migration in porous materials)。

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这些专利的责任。

本标准由国家药品监督管理局提出。

本标准由全国外科植入物和矫形器械标准化技术委员会/组织工程医疗器械产品分技术委员会(SAC/TC110/SC3)归口。

本部分主要起草单位：四川大学（四川医疗器械生物材料和制品检验中心），中国食品药品检定研究院。

本部分主要起草人：。

引 言

生物活性陶瓷因其具有良好的生物活性和生物亲和性，被广泛用于骨科和牙科领域。而多孔的生物活性陶瓷，细胞可从组织进入其孔隙，从而具有有效修复骨缺损的潜力，成为骨组织工程医疗产品细胞支架的潜在候选之一。

为了证明生物活性陶瓷的临床安全性和有效性，首先须对其物理，化学和生物特性进行检测。在所使用的方法中，动物试验是检测生物活性陶瓷的生物学特性最重要和必要的方法；然而，在 3R 原则（替代，减少，优化）下，必须减少动物和动物试验的数量。

细胞迁移能力，作为“骨再生性质”的指标之一，是多孔生物材料（包括生物活性陶瓷）的首要 and 最重要的性能。在多孔生物材料及其周围环境中，如果没有细胞迁移，就不会发生细胞增殖，分化以及组织形成和组织成熟。

目前有两种方法测试细胞迁移能力：一种是将细胞悬液滴到多孔材料表面，这种方法测试了细胞悬液在重力作用下的穿透能力；另一种是将多孔材料加到细胞悬液中通过摇晃驱使细胞进入材料中。这两种方法只能检测细胞的穿透和留存能力，但是不能模拟在体内的细胞迁移情况。体液本身足以携带细胞穿过植入材料和宿主骨组织之间的较小间隙。因此，目前还没有模拟体内细胞行为的细胞迁移测试方法的报道。

当多孔生物陶瓷植入骨缺损部位时，细胞迁移到孔中形成新骨。在这个过程中，成骨细胞的迁移在骨传导中扮演重要角色。也就是说，没有成骨细胞迁移，就不会发生骨传导或骨形成。

因此需要建立一种可量化、且模拟细胞在体内的行为的方法来测量多孔生物活性陶瓷的细胞迁移潜能，以便客观地评估其作为组织工程医疗产品支架材料的潜力。

组织工程医疗器械产品 生物活性陶瓷 多孔材料中细胞迁移的测量方法

1 范围

本标准给出了用于测量和记录多孔生物活性陶瓷材料中细胞迁移的测试方法。本标准适用于生物活性多孔陶瓷。本标准不适用于低细胞粘附性 or 无细胞粘附性的多孔材料，例如合成聚合物和金属。

2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件，仅所注日期的版本适用于本文件。凡是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 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

GB/T 16886.5中给出的术语和定义适用于本文。

3.1

生物陶瓷 bioceramics

用于人体植入以增强其生物学性能的陶瓷材料。

3.2

生物活性陶瓷 bioactive ceramics

当植入到骨缺损部位后具有引导骨结合性能的生物陶瓷。

3.3

生物材料 biomaterial

用于或将用于医疗和牙科领域的材料。

3.4

完全融合 full confluent

单层细胞几乎完全（ $\approx 95\% \sim 100\%$ ）覆盖细胞培养皿。

3.5

完全培养基 complete medium

由细胞供应商推荐用于所选细胞类型的含有所有必需添加物的细胞培养基。且该细胞培养基经使用者验证对细胞增殖有益且不会使细胞发生突变。

3.6

成骨样细胞 osteoblast-like cell

已建立的被广泛认可具有“成骨活性”的细胞系。

3.7

细胞群 cell group

由至少五个细胞组成的群，且每个细胞之间距离不超过细胞自身的宽度。

4 原则

多孔生物材料的细胞迁移能力可以通过测量经两种方法（具体描述）接种到多孔体中的细胞数量来检测。然而，它们测量的是细胞悬液的渗透能力和粘附力，而不是细胞自身的迁移。

本方法可以简单有效的测量细胞自身迁移能力。如图1所示，培养皿内融合层中的细胞能够进一步迁移至培养皿内多孔生物陶瓷材料中并增殖。为了尽量减少因细胞传代，细胞种类，细胞培养耗材（包括培养基和血清等）等差异造成的影响，本方法采用一种具有代表性的且已上市并在各国临床使用中证明有良好效果的多孔生物活性陶瓷作为计算相对迁移距离的参考材料。

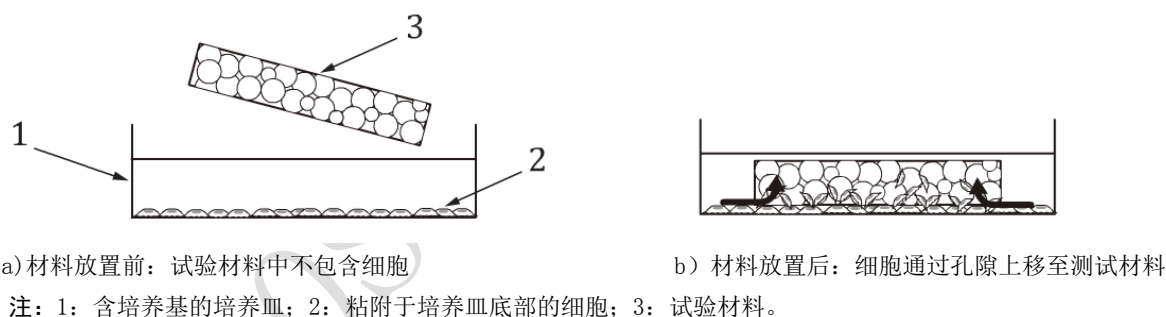


图1 测试方法示意图

细胞移行到材料界面之后，开始逐步向材料孔隙中迁移。这种迁移距离因材料性质，化学稳定性，表面形态和孔隙结构的不同有所差异。该过程类似体内骨再生过程的初始阶段。

吉姆萨染色是一种非常稳定和简便的染色方法。

从吉姆萨染色的多孔生物活性陶瓷的横截面测量的有效细胞的最长直线迁移距离很好地反映了细胞在体内的迁移情况。

5 试验样品

5.1 形状和尺寸

试验样品的形状应为直径（ 10 ± 0.2 ）mm，厚度（ 2 ± 0.1 ）mm的圆片状。

5.2 试验样品数量

采用至少5片对照样品和5片试验样品进行比较。

5.3 对照材料

经过基础研究和/或临床结果证实为良好骨填充物的已上市多孔生物活性陶瓷。推荐使用已在多个国家上市的对照材料。

6 试验步骤

6.1 试验样品厚度和直径的测量

应用卡尺或微米尺测量试验样品的厚度和直径。

6.2 试验样品灭菌

在试验前用不影响材料质量的方法对试验样品进行灭菌。

6.3 试验样品脱气

将试验样品浸入装有5 mL完全培养基的密封离心管中。用连接20 mL注射器的18~21号针头刺入试管盖后，将注射器的柱塞完全拉回到注射器2~3分钟，以消除气泡。

6.4 细胞培养

将成骨样细胞接种于6孔板或直径35 mm细胞培养皿中，培养至完全融合。推荐使用MG-63或MC3T3-E1成骨样细胞。为了使细胞在6孔培养板中3天内增殖至完全融合，每孔接种MG63， 6.0×10^4 个或MC3T3-E1， 8.0×10^4 个。在接种2~3天后，应在相差显微镜下观察细胞，以检查细胞融合情况并避免细胞过度融合。

注：使用ISO13366-1:2008或者ASTMF 2149-01中表述的细胞计数方法对细胞数量计数。

若使用非本标准推荐的细胞系进行试验时，应先通过预试验确认细胞接种数量，确保细胞于3天内达到融合状态。

当孔（皿）中细胞完全融合时，取3个孔（皿）使用吉姆萨染色，用于记录迁移试验前的细胞融合状态，具体方法如下：用2%戊二醛固定过夜后，每孔（皿）加入2.5 mL适当浓度的吉姆萨溶液（使用PBS溶液稀释），并于室温下孵育3分钟。然后去除染色液，使用2.5 mL蒸馏水清洗3次。每个孔（皿）的立体显微照片应在10倍或最大可用放大倍数下拍摄，以便在相同的范围内观察孔或皿的底部。

6.5 在细胞层上放置样品

当细胞达到完全融合状态时，在细胞层上放置一个脱气处理后的样品，并于上方放置一个外径为10 mm，线径为（0.8~1.0）mm的SUS316不锈钢双环（如图2所示）固定样品。两者均应使用镊子轻放，避免直接落入培养基或搅动培养基。因为制造过程的因素，样品表面可能有一些粗糙和不平整，应使用光滑面放置于细胞层上。

将培养板（或皿）转移到CO₂培养箱中时，小心注意不要造成样品位移，因为这样可能会损害样品与细胞层的紧密接触。细胞需继续培养3天，期间无需更换培养基或任何其他操作。



图2 不锈钢双环

在试样上放置重物（不锈钢双环）是为了确保试验样品和细胞层能够紧密接触。然而，如果额外重量对细胞的影响不明确，那么应通过如下的细胞增殖试验来评估急性细胞毒性，以确保不锈钢双环对本次试验中没有影响。

- a) 将不锈钢双环用超纯水超声清洗 1 小时，然后用超纯水冲洗 3 次。
- b) 于 160℃干热灭菌 3 小时。
- c) 将不锈钢双环放在完全融合的细胞层上，与试验中使用的细胞层相同，并用倒置荧光显微镜观察细胞形状和环绕重物周围的细胞数，至少观察 3 天。

6.6 细胞培养后处理

培养3天后收取样品。为防止细胞从样品上脱离，收取样品后，将样品底面（与细胞接触面）向上放置。样品使用PBS清洗3次，使用2%戊二醛固定过夜。固定完成后，室温下使用PBS清洗3次，并放入 10 mL 吉姆萨溶液中进行染色处理。染色3分钟后将样品转移到另一个容器中，并使用10 mL蒸馏水清洗，重复该清洗步骤3次。

如果上述操作染色效果不佳或与染色液生产商说明书有很大差异，请遵循生产商说明书中的染色方案。

将收取样品后的孔（皿）使用PBS清洗3次，并使用2%戊二醛固定过夜。固定后，室温下将孔（皿）用PBS清洗3次，并加入2.5 mL适当稀释的吉姆萨溶液进行染色。染色3分钟后，移除吉姆萨溶液，并使用蒸馏水清洗3次。如果样品和不锈钢双环不影响细胞活力，则可观察到孔（皿）上细胞转移区域边缘的细胞迁移。此外，如果在样品放置区域中的细胞没有显示形貌和数量的变化但是没有良好转移，原因则可能是由于试样的“平整度”。

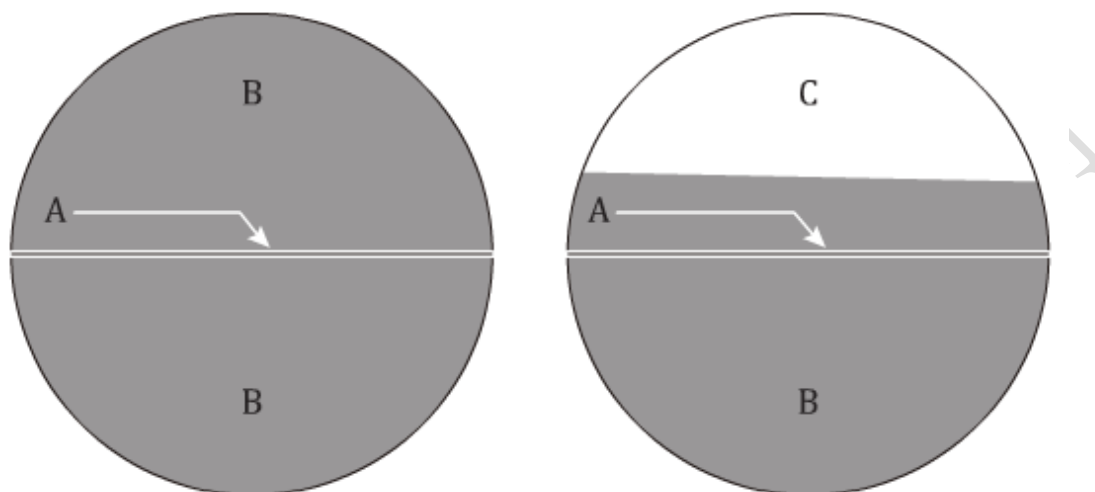
6.7 阳性和阴性对照

每次测试中均包含阳性和阴性对照是有益的。选取不含细胞的支架可以作为阴性对照。将阴性对照放在没有细胞的培养皿内，和培养基一起培养、清洗、染色、成像和评分。阳性对照使用移液管直接将细胞接种在支架上，在培养基中孵育以使细胞粘附（可能需要4小时至24小时），清洗、染色、成像和评分。

对照组的设定用于保证检测体系有效并有助于结果解释。在细胞迁移到试验样品中的情况下，阴性对照则需证明没有细胞迁移，证明材料的本底染色和评分结果是可靠的。阳性对照组有明显的细胞迁移，表明细胞有活性，染色有效，并且评分程序可靠，方可作出细胞在试验样品中迁移情况较差的判断。试验体系中包括阳性和阴性对照有助于分析结果和提高结论的可信度。

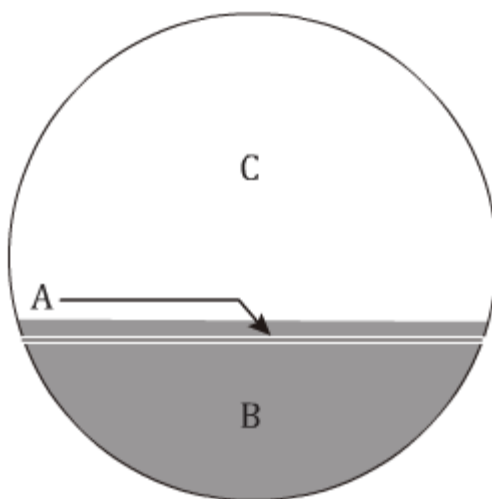
6.8 观察迁移到样品内的细胞

使用立体显微镜观察样品与细胞接触面（底部）。并拍摄底部的立体显微照片。使用薄型的眼科手术刀将样品分切成两块。根据样品底面的平整度，染色区域可能分布不均匀且形状不规则（如图A5和B3所示）；因此，切割位置应由样品与细胞层接触面（底部）的染色情况确定；切口应沿着最长的切面确定长度，穿过样本染色最深的区域（图3~6）。



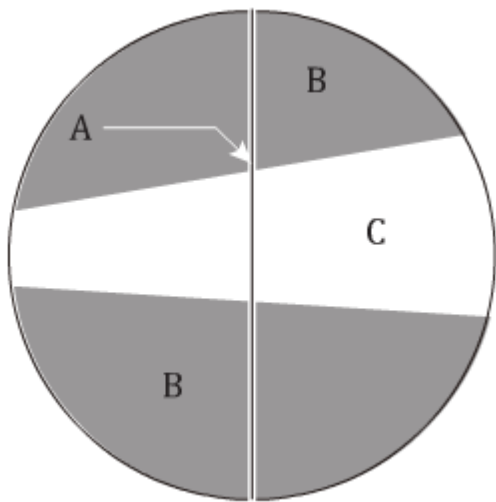
注： A 切割位置，B 染色区域，C 空白区域。

图3 样品表面染色区域超过一半时切割位置示意图



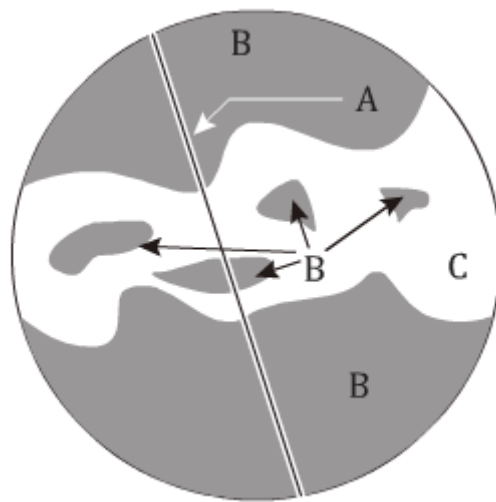
注： A 切割位置，B 染色区域，C 空白区域。

图4 样品表面染色区域未超过一半时切割位置示意图



注：A 切割位置，B 染色区域，C 空白区域。

图5 样品表面存在隔断染色区域时切割位置示意图



注：A 切割位置，B 染色区域，C 空白区域。

图6 样品表面染色区域呈分散状态时切割位置示意图

用立体显微镜观察横截面。相同放大倍数下，拍摄样品横截面的立体照片。

- 注1：样品应使用眼科手术刀切开。若使用手术刀不能切割样品，则可使用金刚石切割机或类似设备，以磷酸盐缓冲液为润滑剂切割样品。
- 注2：同样的但不含细胞的样品在相同的培养基中培养后经同样的吉姆萨染色液染色相同时间后作为对照，用于确认样品的本底染色情况，以证明试样的染色部位是否存在细胞。
- 注3：如实验室条件许可的情况下，可用共聚焦显微镜观察荧光标记的细胞的最长迁移距离。

6.9 样品内细胞迁移距离测量

6.9.1 总则

所有测量应该在放大倍数为10倍和20倍（物镜1倍和2倍，目镜10倍）的立体显微镜下进行。

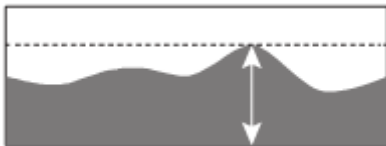
6.9.2 细胞最大迁移距离

应测量每个试验样品从样品底部到最远染色细胞或细胞群的最长直线距离。在测量之前，必须检查以下事项。

- a) 使用高倍放大（至少 40 倍）的立体显微镜，应使用通用准则来确认染色的细胞性质，包括细胞核染色和显示细胞生长过程与粘附于多孔结构表面的形态特征。
- b) 以下所述的用于测量细胞和细胞群的验证是基于多个实验室内部测试的结果。这些测试经验证避免了由于细胞培养基变化和固定前清洗而导致单个细胞或细胞群非特异性滞留在较大孔位点内的情况。
- c) 以下是验证细胞和细胞群的详细方案。
- d) 应该测量从底部到迁移最远距离的细胞或细胞群的最大直线距离。

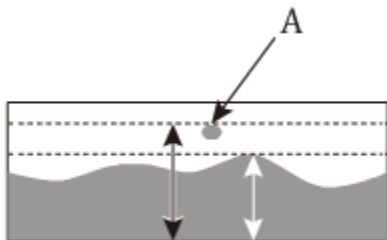
6.9.3 确定细胞群的线性最长迁移距离

在图7中，细胞群最顶端与底部相连，因此白线长度即细胞群的线性最长迁移距离。



注：灰色区域：大量细胞的染色区；白线为线性最长迁移距离

图7 单染色区域中迁移距离测量



注：灰色区域：大量细胞的染色区；A：单个细胞，白线为线性最长迁移距离

图8 单染色区域中存在单个细胞但不是细胞群时迁移距离测量



注：灰色区域：大量细胞的染色区；白线为线性最长迁移距离

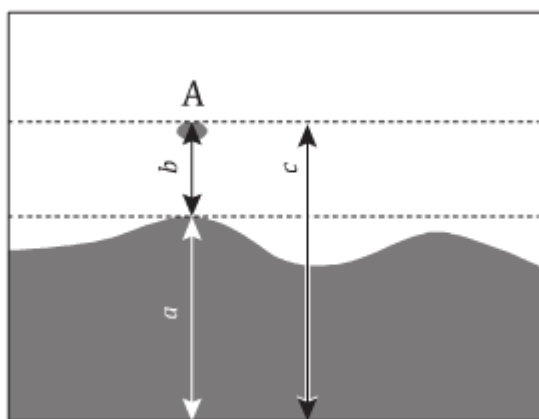
图9 染色区域隔断时迁移距离测量

如图8所示，单个细胞从细胞群的顶部分离出来，黑线为单个“细胞”而不是细胞群的线性最长直线距离；因此，“细胞群”的线性最长迁移距离是白线。

图9示当染色区域被分割时，染色较高的部分被认定为细胞群的线性最长距离，如白线所示。因此，如图7所示，如果没有观察到从底部染色区域分离的细胞群，则“细胞群”的线性最长距离为白线。

当细胞群从底部染色区域分离出来时，应进行以下验证。

在如图10所示的情况中，细胞群A到已经被确认为有效细胞群迁移的最短距离（线b的长度）比线a（有效细胞群的迁移距离）的短，因此A被确认为有效的细胞群。在这种情况下，不存在离底部距离较远的分离细胞群。因此，细胞群的线性最长距离是线c的长度。



注：A：细胞群；a：有效细胞群的迁移距离；b：细胞群A到有效细胞群的距离；c：细胞群的线性最长距离。

图10 当样品中存在离底部染色区很近的分散细胞群时迁移距离测量

在如图11所示的情况中，从距离底部最近的细胞群C开始。线i表示的直线距离是从C到最近有效细胞群的距离，这个距离比标示为j的这条直线距离短；因此C是一个有效的细胞群，而标示为h的直线距离是有效迁移距离，这与图10中的细胞群A和直线距离c相同。同理可见，从另一个细胞群D到底部的更长距离（被标示为m）也是有效的（即直线距离k比直线距离l短）。相反，细胞群B则是无效的，因为到最近有效细胞群的直线距离g比直线距离h更长。

6.9.4 确定细胞的线性最长迁移距离

在确定“细胞群”的线性最长迁移距离之后，使用最接近的“细胞群”，而不是“细胞”对单个细胞的距离进行相同的确认。例如在图11中，当所有圆圈B、C和D是“细胞”而不是“细胞群”时，细胞B应使用直线长度e和f，而不是g和h进行确认。因此，即使直线长度g比直线长度h更短，细胞B也是无效的，因为直线长度e比直线长度f更长。当C是“细胞群”时，使用直线长度g和h来确认细胞B。

在经过上述确认之后，应选择细胞和细胞群的线性最长距离中的较长距离作为样品的最大细胞迁移距离。

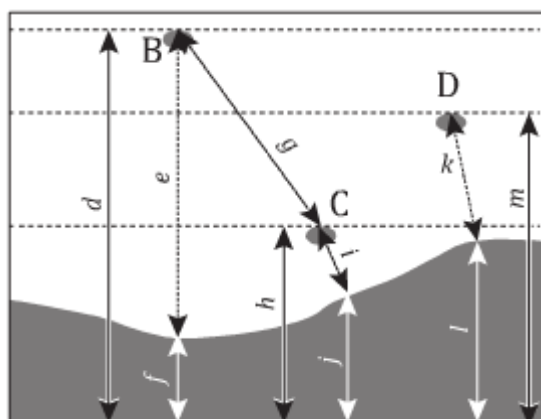


图11 当样品中存在很多分散细胞群时迁移距离测量

注：B, C, D 无序迁移的细胞群或细胞

- d 当C是有效细胞群时，细胞群/细胞B的最长直线距离
- e 当C不是有效细胞群时，细胞群/细胞B到有效细胞群的最近距离
- f 当C不有效细胞群，距离细胞群/细胞B最近的有效细胞群的迁移距离
- g 当C是有效细胞群时，细胞群/细胞B与有效细胞群之间的最近距离
- h 细胞群/细胞C的最长直线距离
- i 细胞群/细胞C到有效细胞群的最近距离
- j 距离细胞群/细胞C最近的有效细胞群的迁移距离
- k 细胞群/细胞D与有效细胞群之间的最近距离
- l 距离细胞群/细胞D最近的有效细胞群的迁移距离
- m 细胞群/细胞D的最长直线距离

6.10 收取样品后残留在孔（皿）内的细胞

为了确认细胞从孔板或皿底部移动到样品中的行为，收取样品后应对皿或孔板进行吉姆萨染色，操作如下。

固定处理3分钟后，每孔或皿内加入2.5 mL吉姆萨溶液的稀释液（使用PBS进行适当稀释）。

然后移除染色液并使用2.5 mL蒸馏水清洗3次。

以10倍或最大可用放大率拍摄每个孔或皿的立体显微照片，确保能够在一张照片中观察到板或皿的底部。

7 计算

7.1 平均值和标准偏差

根据公式（1）和（2）计算每个样品组的平均迁移距离及其标准偏差。

平均值

$$\bar{\sigma} = \frac{\sum_{i=1}^n \sigma_i}{n} \quad (1)$$

标准偏差

$$S = \left[\frac{\sum_{i=1}^n (\sigma_i - \bar{\sigma})^2}{n-1} \right]^{1/2} \quad (2)$$

公式中

σ_i 是经过验证的最大测量距离；

n 是测试样片的总数。

7.2 相对平均值和标准偏差

根据 7.1 中计算出的平均迁移距离及其标准差，运用公式（3）和（4）来计算相对均值和标准差。

相对平均值

$$\overline{\sigma_R} = \frac{\overline{\sigma_B}}{\overline{\sigma_A}} \quad (3)$$

相对标准偏差

$$S_R = \overline{\sigma_R} \times \left[\left(\frac{S_A}{\overline{\sigma_A}} \right)^2 + \left(\frac{S_B}{\overline{\sigma_B}} \right)^2 \right]^{1/2} \quad (4)$$

用公式（5）计算参考样品的相对距离和标准偏差

$$\overline{\sigma_R} \pm S_R = 1 \pm \frac{S_A}{\overline{\sigma_A}} \quad (5)$$

注：公式中

$\overline{\sigma_A}$ 是参考样品的平均距离；

$\overline{\sigma_B}$ 是试验样品的平均距离；

$\overline{\sigma_R}$ 是相对距离；

S_A 是参考样品平均距离的标准偏差；

S_B 是试验样品平均距离的标准偏差；

S_R 是相对距离的标准偏差。

8 试验报告

多孔生物陶瓷支架中细胞迁移的评估结果数据报告应包含以下内容：

- a) 参考标准，如 ISO 19090。
- b) 名称，产品编号，批号，主要成分，尺寸，孔径，孔径分布，孔形状和孔隙率及其测量方法，以及试样的制造商。
- c) 试验的年/月/日，试验人员的姓名，隶属关系和职位。如果适用，也可包括试验室的质量管理体系。
- d) 使用的细胞系的名称和来源（供应商），将陶瓷样品放置前单层细胞总数，细胞计数方法和细胞融合百分率。
- e) 培养基，血清和抗生素的名称，类型，商品编号，批号（如果适用，也需注明培养基中血清和抗生素的浓度）。
- f) 细胞培养用的培养板，移液器吸头，移液器，无菌过滤器，细胞培养瓶等的名称，商品编号，批号和生产商（或销售商）。
- g) 作为对照的多孔陶瓷样品的名称，商品编号，批号和制造商（或销售商）。
- h) 试验结果。
 - 1) 作为“细胞迁移距离”的平均最长直线距离及其标准偏差。

- 2) 样品横截面和底面的立体显微照片。
 - 3) 在迁移试验之前，六孔板中经 Giemsa 染色细胞的立体显微照片。
 - 4) 在迁移试验之后，六孔板中经 Giemsa 染色细胞的立体显微照片。
 - 5) 经参考样品数据标准化处理后的相对细胞迁移距离及其标准偏差。
- i) 结论。

TC110SC3征求意见稿

参 考 文 献

- [1] ISO 13366-1, Milk — Enumeration of somatic cells — Part 1: Microscopic method (Reference method)
- [2] ASTM F2149-01(Reapproved 2007) Standard Test Method for Automated Analyses of Cells—the Electrical Sensing Zone Method of Enumerating and Sizing Single Cell Suspensions
- [3] Russel W.M.S. The Three Rs: past, present and future, *Animal Welfare* 14, 279-286 (2005)
- [4] Kikuchi M. Cell Migration Ability Test for Bioactive Ceramics Toward International Standardization of Ceramics for Regenerative Medicine, *Key Engineering Materials* 493-494, 836-839 (2012)
- [5] Kikuchi M., Itoh S., Ichinose S., Shinomiya K., Tanaka J. Self-Organization Mechanism in A Bone-Like Hydroxyapatite / Collagen Nanocomposite Synthesized in vitro and Its Biological Reaction in vivo, *Biomaterials*, 22, 1705-1711 (2001)
- [6] Shinomiya K., Ishizuki M., Morioka H., Matsumoto S., Nakamura T., Abe S., Beppu Y. A Phase III Randomized Controlled Trial of Selforganized hydroxyapatite / collagen composite versus beta tricalcium phosphate as bone substitute for treatment of osseous defect, *Seikei-Geka (Orthopedic Surgery)*, 63, 2012-2018 (2012) in Japanese
- [7] Suetsugu Y., Hotta Y., Iwasashi M., Sakane M., Kikuchi M., Ikoma T., Higaki T., Ochiai N., Tanaka J. Structural and Tissue Reaction Properties of Novel Hydroxyapatite Ceramics With Unidirectional Pores, *Key Engineering Materials*, 330-332, 1003-1006 (2007)