

T/GDMDMA

广东省医疗器械管理学会团体标准

T/GDMDMA XXXX—XXXX

组织提取胶原细胞迁移实验操作指南

Operational guidelines for cell migration experiments of tissue-extracted collagen

Social Organization Standard

T/GDMDMA

(征求意见稿)

医疗器械团体标准

在提交反馈意见时，请将您知道的相关专利连同支持性文件一并附上。

XXXX—XX—XX 发布

XXXX—XX—XX 实施

广东省医疗器械管理学会 发布

目 次

前言 II

1 范围 1

2 规范性引用文件 1

3 术语和定义 1

4 实验原理 1

5 试验试剂、耗材与设备 1

6 供试液和对照组样品的制备 2

7 试验用细胞 3

8 试验步骤 3

9 结果判定 4

10 试验报告 5

附录 A（规范性） 试验用细胞准备 6



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。

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。

本文件由广州创尔生物技术股份有限公司提出。

本文件由广东省医疗器械管理学会归口。

本文件起草单位：

本文件主要起草人：



组织提取胶原细胞迁移实验操作指南

1 范围

本文件规定了动物组织提取胶原蛋白细胞迁移实验的术语和定义、实验原理、试验试剂、耗材与设备、供试液和对照组样品的制备、细胞制备、实验步骤、结果判定与试验报告等内容。

本标准适用于评估可溶或者部分可溶的组织提取胶原蛋白促进细胞迁移的能力。

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。

YY/T 1955-2025 组织工程医疗器械产品 胶原蛋白 术语

3 术语和定义

YY/T 1955-2025界定的以及下列术语和定义适用于本文件。

3.1

组织提取胶原蛋白

指以动物组织，如皮肤、骨骼、软骨等为来源，运用酶解法、酸法、盐析法等物理化学工艺进行提取，并经特定处理后，得到的具有典型三螺旋结构、呈现纤维状的大分子蛋白质。

3.2

细胞划痕试验

又称伤口愈合实验，是一种在体外评估细胞迁移能力的实验方法。

4 实验原理

在体外培养的单层贴壁细胞上，用微量枪头或其他硬物在细胞生长汇合的区域进行划线操作，人为制造一个无细胞的空白区域，称为“划痕”。划痕边缘的细胞会逐渐进入空白区域使“划痕”愈合。通过测量细胞在一定时间内（如24 h、48 h）从划痕边缘向划痕中心迁移的面积，与初始划痕面积进行比较，以此计算细胞的迁移的程度。试验通常需设定对照组和供试组，对照组包括阳性对照组和空白对照组，通过对比不同组之间细胞迁移的程度，以此评价受试物促进细胞迁移的能力。

5 试验试剂、耗材与设备

5.1 试验设备

二氧化碳培养箱、移液器、生物安全柜或超净工作台、倒置显微镜、恒温水浴锅、离心机、移液器、冰箱。

5.2 试验耗材

细胞培养瓶、24孔细胞培养板（贴壁型）、枪头、钢尺、冻存管、离心管、试剂瓶、0.22 μm 无菌滤膜。

5.3 试验试剂

冰醋酸（纯度 $\geq 99.5\%$ ）、氢氧化钠（分析纯）胎牛血清、纯化水、DMEM高糖（无谷氨酰胺、无钙离子）、胰蛋白酶-EDTA（0.25%）、磷酸盐缓冲液（PBS）、谷氨酰胺、Animal-Free Recombinant Human EGF、钙离子吸附树脂、0.1% BSA（细胞培养用）。

5.4 试验试剂配制

5.4.1 0.1 mol/L 的醋酸溶液：准确量取 5.72 mL 冰醋酸，用纯化水定容至 1000 mL。

5.4.2 4 mol/L 的氢氧化钠溶液：称取 4.000 g 氢氧化钠，加入纯化水溶解并定容至 25 mL。用 0.22 μm 滤膜过滤，制备成 4 M NaOH 溶液储备液，室温保存。

5.4.3 去钙离子血清：称取钙离子吸附树脂 Chelex 100 Resin 2.5 g 至 50 mL 离心管，加入 50 mL FBS，在 2℃~8℃ 条件下充分振荡约 2 h，离心或者静置去除吸附剂，取上清 FBS，无菌环境下 0.22 μm 滤膜过滤，即得到去除钙离子血清。

5.4.4 基础培养基：由 99% 的 DMEM 高糖培养基（无谷氨酰胺、无钙离子）与 1% 的谷氨酰胺溶液混合而成。

5.4.5 完全培养基：由 99% 的 DMEM 高糖培养基（无谷氨酰胺、无钙离子）与 1% 的谷氨酰胺溶液，以及 10% 去钙离子血清混合而成。

5.4.6 EGF 母液（0.1 mg/mL）：开瓶前 4℃，4000 rpm 离心 5 min，加入适量恢复至常温的 0.1% BSA 溶液，使终浓度为 0.1 mg/mL。轻轻混匀溶解 EGF 粉末。待 EGF 粉末充分溶解后短暂离心分装并于超低温冰箱保存。

5.4.7 EGF 储存液（10 $\mu\text{g/mL}$ ）：将 EGF 母液（0.1 mg/mL）用 0.1% BSA 溶液进行 10 倍稀释，轻轻吹打混匀，分装并于超低温冰箱保存。

6 供试液和对照组样品的制备

6.1 通用要求

供试液制备过程中应避免加热（样品温度不应超过其热变性温度）或冷冻，同时应避免激烈的震荡、搅拌或超声处理，因为加热或剪切力等因素会导致供试液中的胶原蛋白变性，从而影响测试结果的准确性。

供试液一般宜在测试的当天配置，必要时可提前 1 天配制并在 2℃~8℃ 冰箱储存。

供试液应无菌。

6.2 供试液的制备

6.2.1 受试物溶解

受试物为可溶性的组织提取胶原蛋白固体时，称取适量受试物，加入 0.1 mol/L 的醋酸溶液，使受试物充分溶解，溶解后的终浓度为 1 mg/mL~5 mg/mL。

受试物为组织提取胶原蛋白凝胶或溶液时，参照上述方法进行稀释，使终浓度为 1 mg/mL~5 mg/mL。

注1：若受试物为部分可溶性的胶原蛋白样品，如受试物为经过交联或自组装等处理的组织提取胶原蛋白时，应在充分溶解，并经离心或过滤去除不溶解部分后，采用经验证的方法检测受试物溶液中胶原蛋白的浓度。

注2：若受试物为浓度较低的组织提取胶原蛋白溶液时，可直接用于供试液制备。

6.2.2 供试液制备

将上述溶解后的受试物，用基础培养基稀释 10 倍作为供试液。根据测试需要，可用基础培养基继续稀释，制备不同浓度的供试液。

当采用含酚红的基础培养基时，若供试液颜色变黄，推荐使用 4 mol/L 的氢氧化钠溶液调节 pH 至 7.0 $\pm$ 0.2。

注1：在配制过程中，应充分混匀，避免产生气泡，确保样本均一性。

注2：记录在调节 pH 过程中氢氧化钠溶液的添加量，以计算供试液中胶原蛋白的最终浓度。

6.3 阳性对照

推荐使用表皮生长因子（Animal-Free Recombinant Human EGF）作为阳性对照。

从-18℃或以下冰箱中取出一管经分装的EGF储存液（10 μg/mL），于2℃~8℃冰箱放置10 min使其彻底溶解，轻轻吹打混匀，使用基础培养基稀释至5 ng/mL~10 ng/mL。阳性对照应储存于2℃~8℃冰箱，一个月有效。

注：也可以使用其他经证明可以稳定促进细胞迁移的物质作为阳性对照。

6.4 空白对照

以基础培养基作为空白对照。

7 试验用细胞

7.1 细胞种类选择

人表皮角质形成细胞是构成皮肤的其中一种主要细胞。人永生化角质形成细胞（Hacat细胞）适用于评价终产品使用部位为皮肤表面的组织提取胶原蛋白的细胞迁移能力。

此外，宜根据终产品的预期使用部位，选择适合的细胞种类，参考本法或其他经验证的方法进行试验。

7.2 细胞来源

人永生化角质形成细胞（HaCaT细胞），编号：KCB 200442YJ，购自中国科学院昆明细胞库。

注：也可使用其他来源清晰、无污染且活力良好的HaCaT细胞。

7.3 细胞代次

HaCaT细胞自采购到用于划痕试验，建议传代次数不超过20次。

8 试验步骤

8.1 试验用细胞准备

按照附录A进行HaCaT细胞去分化培养、冻存、复苏、传代培养。

选取传代培养2次以上，细胞状态良好，细胞汇合度为80%的细胞培养瓶，按照A.7.2方法消化细胞，用新鲜的完全培养基重悬细胞，制备成密度为 3×10^5 cells/mL的细胞悬液，用于划痕试验。

8.2 细胞培养板画线

将24孔细胞培养板的每个孔，按照上中下，分为3个区域，用钢尺和记号笔在孔板底部平行画线。如图1所示。

8.3 细胞种板

取8.1制备的细胞悬液，按照每孔500 μL接种于画线后的24孔板，放入二氧化碳培养箱，37℃，5% CO₂条件下培养约24 h。在倒置显微镜下观察细胞，细胞培养板中央区域的细胞汇合度约80%~90%，且细胞分布均匀、无明显堆叠，可进行下述步骤，否则应重新准备细胞悬液并种板培养。

8.4 划痕制备

8.4.1 使用钢尺和经过灭菌处理且垂直安装在移液器上的10 μL枪头作为划痕工具。在每个孔的中央区域两侧垂直于画线进行划痕（见图1），划痕时使枪头垂直于孔底面，沿着钢尺边缘对各孔进行竖直划痕，划痕宽度 $0.6 \text{ mm} \pm 0.2 \text{ mm}$ ，尽量使划痕宽度保持一致，深度达到孔底，确保划痕区域细胞完全去除。

注1：划痕宽度太宽或太窄均影响细胞迁移结果，建议同一批次的划痕由同一位技术人员制备。

注2：建议在细胞种板时多种一些细胞培养孔，同时在划痕制备时多制备一些划痕，以便挑选适合宽度的划痕用于后续操作。宜保证每个实验组至少3个复孔，其中至少有9个符合要求的拍照视野。

8.4.2 划痕后，将细胞培养板倾斜 45°，用移液枪轻轻吸除孔内培养液，避免触碰细胞层。每孔加入约 300 μL PBS，轻轻冲洗划痕时掉落的细胞，反复 3 次，弃去洗液。重复此清洗步骤 2 次~3 次。

8.5 初始划痕图像收集

每孔加入 300 μL 基础培养基，在显微镜下拍照（拍照视野如图1所示），记录初始（即 0 h）划痕宽度。

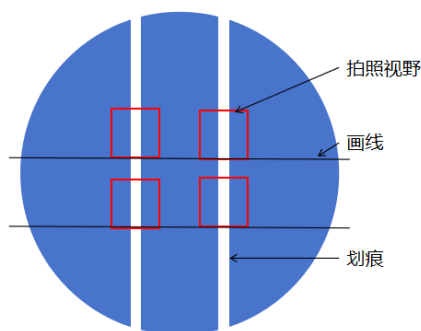


图1 24 孔板细胞划痕制备和拍照视野示意图

8.6 受试物干预

8.6.1 将细胞培养板倾斜 45°，用移液枪轻轻吸除孔内培养液，避免触碰细胞层。

8.6.2 样品组每孔加入 300 μL 供试液，轻柔晃动培养板，使供试液覆盖划痕区域，37℃，5% CO₂ 条件下培养 2 h。取出按照 8.6.1 去除供试液，加入 500 μL 基础培养基，37℃，5% CO₂ 条件下培养特定的时间（如 24 h 或 48 h）。每种浓度的供试液至少分别设置 3 个复孔。

8.6.3 将阳性对照、空白对照，按照每孔 500 μL 分别轻柔加入细胞孔板，37℃，5% CO₂ 条件下培养特定的时间（如 24 h 或 48 h）。阳性对照和空白对照至少分别设置 3 个复孔。

8.7 特定时间划痕图像收集

取培养特定时间后的细胞，在显微镜下拍照（拍照视野如图1所示），记录培养特定时间后的划痕宽度。

8.8 图像处理

采集后的图片，在同等放大倍数下，使用图像处理软件，按照相同的参数，测量各组细胞在不同时间点的划痕宽度。

8.9 结果计算

按照下列公式计算细胞迁移率：

$$\text{细胞迁移率}\% = \left(\frac{A_0 - A_t}{A_0} \right) \times 100\% \dots\dots\dots (1)$$

式中：

A₀ —— 0 h 时的划痕面积；

A_t —— 经过特定时间后的划痕面积。

9 结果判定

9.1 在特定培养时间下，阳性对照组的细胞迁移率应显著大于空白对照组，具有统计学意义 (p < 0.05)，否则应重复本测试。

9.2 受试物在特定时间下的细胞迁移率显著大于空白对照组，具有统计学意义 (p < 0.05)，则认为该受试物可以促进 HaCaT 细胞迁移。

10 试验报告

试验报告应有下列信息：

- a) 产品名称、型号或规格、生产批号等产品信息；
- b) 标明耗材、试剂、仪器和设备；
- c) 记录试验细胞的代次和培养条件；
- d) 供试液制备情况；
- e) 试验步骤；
- f) 结果计算；
- g) 结果分析和判定；
- h) 结论。



附录 A (规范性) 试验用细胞准备

A.1 原理

HaCaT细胞作为一种永生化的人角质形成细胞系，在皮肤生物学及分化研究领域应用广泛。HaCaT细胞的分化受多种因素调控，其中钙离子浓度及细胞间接触影响显著。由于标准培养基及胎牛血清中较高的钙离子浓度，在常规培养条件下，市售HaCaT细胞通常呈现出部分至完全分化的表型。分化的HaCaT细胞表现为细胞间连接紧密，呈现多层生长态势，并逐渐形成岛状结构。

可通过降低培养基中的钙离子浓度，以及控制细胞密度、保持较低的细胞汇合度来实现HaCaT细胞的去分化。在HaCaT细胞的去分化状态下，细胞间连接变得疏松，细胞以单层形式生长。这种去分化的HaCaT细胞为深入研究细胞增殖、迁移、分化以及相关信号通路等提供了重要的细胞模型。

A.2 仪器与试剂

A.2.1 仪器设备

二氧化碳培养箱、倒置显微镜、离心机、恒温水浴锅、细胞培养瓶、移液器。

A.2.2 耗材

枪头、离心管、冻存管、细胞培养瓶。

A.2.3 试剂

胎牛血清、二甲基亚砷(DMSO)、胰蛋白酶-EDTA(0.25%)溶液、DMEM高糖(无谷氨酰胺、无钙离子)、磷酸盐缓冲液(PBS)、谷氨酰胺、钙离子吸附树脂。

A.3 试剂配制

A.3.1 去钙离子血清：同5.4.3。

A.3.2 基础培养基：同5.4.4。

A.3.3 完全培养基：同5.4.5。

A.3.4 冻存液：按9:1的体积比将去钙离子血清和DMSO混合均匀。

A.4 HaCaT 细胞去分化诱导培养

A.4.1 HaCaT细胞按照供应商提供的说明书进行复苏和传代培养，观察细胞的汇合程度在70%~80%左右时，宜进行去分化诱导。

A.4.2 倾斜细胞培养瓶，小心去除瓶内培养液，加入适量PBS洗涤细胞，去除残留培养基和血清成分。

A.4.3 使用胰蛋白酶-EDTA(0.25%)溶液对细胞进行消化(具体时间根据细胞类型和消化情况调整)，显微镜下观察到细胞变圆、开始脱落时，加入适量基础培养基终止消化。

A.4.4 将细胞悬液转移至离心管，1000 rpm离心5 min，弃上清。

A.4.5 用完全培养基按照适当的密度重悬细胞，并转移至细胞培养瓶，置二氧化碳培养箱，37℃，5% CO₂条件下培养2~3天。

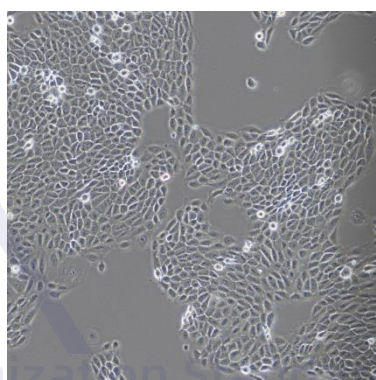
注：建议T75培养瓶接种细胞密度为 $1.0 \times 10^6 \sim 1.5 \times 10^6$ 。

A.4.6 取出培养瓶观察细胞状态并拍照记录，当细胞的汇合程度在80%左右时，按照A.4.2~A.4.5的步骤进行细胞传代培养。每2天~3天传代一次。

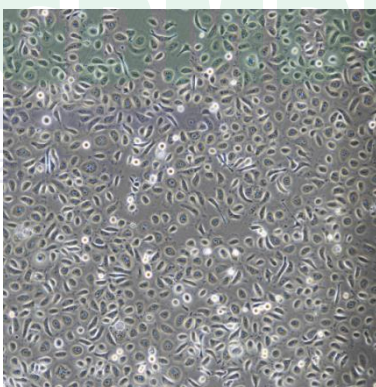
A.4.7 持续传代培养10天~15天左右，可见HaCaT细胞呈现去分化状态。去分化HaCaT细胞状态见图A.1 c)。



a) 去分化诱导前HaCaT细胞的状态



b) 去分化过程中的HaCaT细胞状态



c) 去分化HaCaT细胞状态

图A.1 HaCaT 细胞分化前、中、后的细胞形态

图A.1 a) 去分化诱导前HaCaT细胞的状态：细胞连接紧密，聚集成岛状，细胞呈多层生长；

图A.1 b) 去分化过程中的HaCaT细胞状态：低钙培养环境下持续观察细胞状态变化，当观察到细胞逐渐失去紧密的细胞连接，被压紧的细胞变少，细胞逐渐变成单层生长，并表现出形态改变，表明细胞开始出现去分化趋势；

图A.1 c) 去分化HaCaT细胞状态：细胞变成纺锤形，细胞间连接疏松，细胞呈单层生长。

A.4.8 HaCaT细胞去分化诱导后，继续按照A.4.2～A.4.5的步骤进行细胞传代培养1代～2代，观察去分化状态是否稳定。

A.5 去分化 HaCaT 细胞冻存

待HaCaT细胞去分化状态稳定后，按照每管 1.0×10^6 个细胞的密度进行细胞冻存。

A.6 去分化 HaCaT 细胞复苏

将冻存的去分化HaCaT细胞迅速置于37℃水浴中解冻，转移至含有适量完全培养基的离心管中，1000 rpm离心5 min，弃去上清液，用新鲜的完全培养基重悬细胞，接种至细胞培养瓶中（建议T75培养瓶接种细胞密度为 $1.0 \times 10^6 \sim 1.5 \times 10^6$ 。），放入二氧化碳培养箱，37℃，5%CO₂条件下培养。

A.7 去分化 HaCaT 细胞传代培养

A.7.1 当细胞生长至培养瓶的80%汇合度时，弃去瓶内培养液，加入适量PBS洗涤细胞，去除残留培养基和血清成分。

A.7.2 使用胰蛋白酶-EDTA（0.25%）溶液对细胞进行消化（具体时间根据细胞类型和消化情况调整），显微镜下观察到细胞变圆、开始脱落时，加入适量基础培养基终止消化。

A.7.3 将细胞悬液转移至离心管，1000 rpm离心5 min，弃上清，用新鲜的完全培养基重悬细胞，按照适当比例（建议T75培养瓶接种细胞密度为 $1.0 \times 10^6 \sim 1.5 \times 10^6$ 。）进行传代培养。

