

## 两种供试品不同浸提条件及作用剂量下的体外人淋巴细胞增殖实验

许建霞, 付海洋, 曲守方

<https://doi.org/10.12307/2024.718>

投稿日期: 2023-08-04

采用日期: 2023-09-11

修回日期: 2023-11-28

在线日期: 2023-12-19

中图分类号:

R459.9; R392.12; R392.8

文章编号:

2095-4344(2024)31-05017-05

文献标识码: B

## 文章快速阅读: 供试品浸提液与淋巴细胞共培养实验



## 文题释义:

**体外淋巴细胞增殖实验:** 又称淋巴细胞转化实验, 是指体外培养的T淋巴细胞在有丝分裂原或特异性抗原的刺激下发生免疫应答, 细胞的数量或代谢活性会增加。淋巴细胞增殖实验被广泛应用于药物过敏研究, 在动物源性医疗器械的免疫原性研究中也占有重要地位, 属于较为敏感的功能性检验方法。

**植物血凝素:** 是发现于植物特别是豆科植物中的凝集素, 属于高分子糖蛋白类, 是低聚糖和蛋白质的复合物, 具有促进有丝分裂的活性。

## 摘要

**背景:** 体外淋巴细胞增殖实验常用于检测医疗器械潜在的免疫原性, 但在相关标准中均未给出详尽的浸提条件及作用剂量。

**目的:** 考察供试品不同浸提条件及作用剂量对体外人淋巴细胞增殖的影响, 思考在选择体外淋巴细胞增殖实验条件时需考虑的因素。

**方法:** 实验检测同种骨修复材料与肝素修饰人工晶状体两种供试品, 均分为以下12组: ①实验组1: 供试品24 h完全培养基(含体积分数10%胎牛血清的RPMI改良培养基)浸提液200 μL+淋巴细胞悬液50 μL; ②阴性对照组1: 24 h完全培养基200 μL+淋巴细胞悬液50 μL; ③实验组2: 供试品24 h完全培养基浸提液100 μL+淋巴细胞悬液100 μL; ④阴性对照组2: 24 h完全培养基100 μL+淋巴细胞悬液100 μL; ⑤实验组3: 供试品72 h RPMI改良培养基浸提液(实验前加体积分数10%胎牛血清)200 μL+淋巴细胞悬液50 μL; ⑥阴性对照组3: 72 h RPMI改良培养基(实验前加体积分数10%胎牛血清)200 μL+淋巴细胞悬液50 μL; ⑦实验组4: 供试品72 h RPMI改良培养基浸提液(实验前加体积分数10%胎牛血清)100 μL+淋巴细胞悬液100 μL; ⑧阴性对照组4: 72 h RPMI改良培养基(实验前加体积分数10%胎牛血清)100 μL+淋巴细胞悬液100 μL; ⑨阳性对照组1: 含10 μg/mL植物血凝素M的完全培养基200 μL+淋巴细胞悬液50 μL; ⑩阳性对照组2: 含10 μg/mL植物血凝素M的完全培养基100 μL+淋巴细胞悬液100 μL; ⑪空白对照组1: 250 μL完全培养基; ⑫空白对照组2: 200 μL完全培养基。培养3 d后, 采用CCK-8法检测淋巴细胞增殖。

**结果与结论:** ①不同实验条件下, 同种骨修复材料浸提液均可增强人淋巴细胞的活性, 以RPMI改良培养基浸提72 h、浸提液与淋巴细胞悬液的体积比为4:1的实验条件最为显著; 肝素修饰人工晶状体在该条件下对淋巴细胞活性有明显的抑制作用, 可能与浸提液中的肝素有关, 但在完全培养基浸提24 h、浸提液与淋巴细胞悬液的体积比为4:1的实验条件下对淋巴细胞活性有轻微的增强作用; ②供试品不同浸提条件及作用剂量下, 体外淋巴细胞增殖实验结果可能会有较大差异, 实验条件的选择需结合产品临床应用情况, 也需考虑产品的固有特性。

**关键词:** 体外人淋巴细胞增殖; 不同实验条件; 浸提液; 同种骨修复材料; 肝素修饰人工晶状体

**In vitro human lymphocyte proliferation assay under different extraction conditions and doses of two types of test samples**

Xu Jianxia, Fu Haiyang, Qu Shoufang

National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 102629, China

Xu Jianxia, Master, Associate chief technician, National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 102629, China

**Corresponding author:** Fu Haiyang, Master, Associate chief pharmacist, National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 102629, China**Corresponding author:** Qu Shoufang, PhD, Researcher, National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 102629, China

## Abstract

**BACKGROUND:** *In vitro* lymphocyte proliferation test is often used to detect the potential immunogenicity of medical devices, but no detailed extraction conditions and dose are given in the relevant standards.

中国食品药品检定研究院, 北京市 102629

第一作者: 许建霞, 女, 1976年生, 山西省运城市人, 汉族, 硕士, 副主任技师, 主要从事医疗器械的生物安全性及有效性研究。

通讯作者: 付海洋, 硕士, 副主任药师, 中国食品药品检定研究院, 北京市 102629

通讯作者: 曲守方, 博士, 研究员, 中国食品药品检定研究院, 北京市 102629

<https://orcid.org/0000-0003-4883-543X> (许建霞)

引用本文: 许建霞, 付海洋, 曲守方. 两种供试品不同浸提条件及作用剂量下的体外人淋巴细胞增殖实验 [J]. 中国组织工程研究, 2024, 28(31):5017-5021.



**OBJECTIVE:** To investigate the effects of different extraction conditions of the test product and different doses of the extract on *in vitro* human lymphocyte proliferation, and to consider the factors that need to be considered when selecting test conditions for *in vitro* lymphocyte proliferation test.

**METHODS:** In the experiment, the homogenous bone repair material and heparin-modified intraocular lens were divided into the following 12 groups: (1) Experimental group 1: 24-hour complete medium (RPMI modified medium containing 10% fetal bovine serum) extract of 200  $\mu\text{L}$  + lymphocyte suspension of 50  $\mu\text{L}$ ; (2) negative control group 1: 24-hour complete medium 200  $\mu\text{L}$  + lymphocyte suspension 50  $\mu\text{L}$ ; (3) experimental group 2: 24-hour complete medium extract 100  $\mu\text{L}$  + lymphocyte suspension 100  $\mu\text{L}$ ; (4) negative control group 2: 24-hour complete medium 100  $\mu\text{L}$  + lymphocyte suspension 100  $\mu\text{L}$ ; (5) experimental group 3: 72-hour RPMI modified medium extract (addition of 10% fetal bovine serum before experiment) 200  $\mu\text{L}$  + lymphocyte suspension 50  $\mu\text{L}$ ; (6) negative control group 3: 72-hour RPMI modified medium (addition of 10% fetal bovine serum before experiment) 200  $\mu\text{L}$  + lymphocyte suspension 50  $\mu\text{L}$ ; (7) experimental group 4: 72-hour RPMI modified medium extract (addition of 10% fetal bovine serum before experiment) 100  $\mu\text{L}$  + lymphocyte suspension 100  $\mu\text{L}$ ; (8) negative control group 4: 72-hour RPMI modified medium (addition of 10% fetal bovine serum before experiment) 100  $\mu\text{L}$  + lymphocyte suspension 100  $\mu\text{L}$ ; (9) positive control group 1: complete medium containing 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  plant hemagglutinin-M 200  $\mu\text{L}$  + lymphocyte suspension 50  $\mu\text{L}$ ; (10) positive control group 2: complete medium containing 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  plant hemagglutinin-M 100  $\mu\text{L}$  + lymphocyte suspension 100  $\mu\text{L}$ ; (11) blank control group 1: 250  $\mu\text{L}$  complete medium; (12) control group 2: 200  $\mu\text{L}$  complete medium. After 3 days of culture, the proliferation of lymphocytes was detected by CCK-8 assay.

**RESULTS AND CONCLUSION:** (1) Under different test conditions, the extracts of the allogeneic bone repair material could enhance the activity of human lymphocytes. Under the condition of 72-hour leaching in RPMI modified medium and the volume ratio of leaching solution and lymphocyte suspension was 4:1, the most significant effect was observed. Heparin-modified intraocular lens extract also had obvious inhibitory effect on lymphocyte activity under this condition; its inhibitory effect on lymphocyte activity may be related to the heparin in the extract. However, the activity of lymphocytes was slightly enhanced by heparin-modified intraocular lens extract under the experimental conditions of complete medium extraction for 24 hours and the volume ratio of extract to lymphocyte suspension was 4:1. (2) Under different extraction conditions and doses, the results of *in vitro* lymphocyte proliferation test may be quite different. The selection of test conditions should be combined with the clinical application of the product, and the inherent characteristics of the product should also be considered.

**Key words:** *in vitro* human lymphocyte proliferation; different test conditions; leaching liquor; allogeneic bone repair material; heparin-modified intraocular lens

**How to cite this article:** XU JX, FU HY, QU SF. *In vitro* human lymphocyte proliferation assay under different extraction conditions and doses of two types of test samples. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2024;28(31):5017-5021.

## 0 引言 Introduction

因细胞外基质在组织重建中的优势，动物源性生物材料在医学领域得到广泛应用<sup>[1-3]</sup>。动物源性材料经去脂肪、脱细胞等降低免疫原性的处理后仍可能会残留少量具有免疫原性的物质，残留免疫原性物质有引发宿主产生免疫反应的风险<sup>[4-6]</sup>。免疫原性评价是动物源性医疗器械生物相容性及有效性评价中的重要内容。

体外淋巴细胞增殖实验，又称淋巴细胞转化实验，是指体外培养的T淋巴细胞在有丝分裂原或特异性抗原的刺激下发生免疫应答，细胞的数量或代谢活性会增加。淋巴细胞增殖实验被广泛应用于药物过敏的研究<sup>[7-8]</sup>，在动物源性医疗器械的免疫原性研究中也占有重要地位，属于较为敏感的功能性检验方法<sup>[9]</sup>。用于免疫原性评价的体外淋巴细胞增殖实验通常有2种方式：一种是分离经供试品免疫后动物的脾脏淋巴细胞，将淋巴细胞在体外培养一定时间后检测细胞数量或活性；一种是分离未经免疫的动物脾脏淋巴细胞或人外周血淋巴细胞，将供试品或供试品浸提液与淋巴细胞在体外共培养，培养一定时间后检测细胞数量或活性。第2种方式通常用于同种异体来源医疗器械或理论上免疫原性预期较小医疗器械的免疫原性检测。

在医疗器械的生物安全性评价中，供试品浸提液的制备方式及作用剂量均是非常重要的实验条件，直接关系到实验结果。目前与体外淋巴细胞增殖相关的医疗器械免疫原性评价标准有YY/T 1465.1和YY/T 0606.15<sup>[10-11]</sup>，该2个标准中有关供试品浸提液的具体制备方式及浸提液与细胞悬液的比例均未做明确规定。有学者对动物源性医疗器械体外淋巴细胞增殖实验的其他实验条件进行了多方位的优化及探索，但均未对这两方面进行研究<sup>[12-13]</sup>。

该文拟对一种同种异体来源的医疗器械及另外一种含肝素的医疗器械进行体外人外周血淋巴细胞增殖实验，一方面考察两种产品对淋巴细胞活性的影响，另一方面考察供试品

不同浸提条件、不同作用剂量对实验结果的影响，进而思考实验室检测与临床应用的相关性。

## 1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 完全随机设计体外细胞实验，独立样本的t检验。

1.2 时间及地点 实验于2020-09-10/15在中国食品药品检定研究院完成。

1.3 材料 供试品为同种骨修复材料、肝素修饰人工晶状体；电子天平(上海舜宇恒平科学仪器有限公司，JA5003)；恒温培养振荡器(上海智城分析仪器制造有限公司，ZHWHY-103B)；二氧化碳培养箱(Thermo Fisher, 371)；微孔板测读仪(Molecular Devices, SpectraMax M5)；胎牛血清(Gibco)；RPMI改良培养基(Hyclone)；植物血凝素M(Roch)；Cell Counting Kit8(CCK-8, Solarbio)；淋巴细胞分离液(Solarbio)。

### 1.4 方法

1.4.1 供试品浸提液的制备 分别取2g同种骨修复材料、10个肝素修饰人工晶状体，以RPMI改良培养基为浸提介质，按照0.1g/mL(同种骨修复材料)、0.2g/mL(肝素修饰人工晶状体)的比例，在(37±1)℃条件下振荡(120r/min)浸提72h，浸提完成后应在24h内开始实验。同样浸提条件，但未加供试品的RPMI改良培养基为阴性对照。

分别取2g同种骨修复材料、10个肝素修饰人工晶状体，以完全培养基(含体积分数10%胎牛血清的RPMI改良培养基)为浸提介质，按照0.1g/mL(同种骨修复材料)、0.2g/mL(肝素修饰人工晶状体)的比例，在(37±1)℃条件下振荡(120r/min)浸提24h，浸提完成后应在24h内开始实验。同样浸提条件，但未加供试品的完全培养基为阴性对照。

1.4.2 阳性对照配制 用完全培养基配制植物血凝素M溶液，质量浓度为10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，作为阳性对照液。

1.4.3 淋巴细胞的分离培养 从3位健康志愿者(志愿者均对研究内容知情且同意，符合医学伦理要求)肘静脉分别无

菌取血 20 mL, 乙二胺四乙酸二钠抗凝, 采用密度梯度离心法分离提取淋巴细胞<sup>[14]</sup>。将血液用生理盐水倍比稀释。向 15 mL 离心管中加入 5 mL 淋巴细胞分离液, 再加入等量稀释后的血液, 水平 800×g 离心 20 min, 吸取中间云雾层细胞(尽量避免吸出细胞分离液)到 RPMI 改良培养基中, 500×g 离心 10 min, 弃上清, 用 RPMI 改良培养基重复洗涤 1 次, 加入完全培养基, 调整细胞浓度分别为  $1 \times 10^9 \text{ L}^{-1}$ ,  $2 \times 10^9 \text{ L}^{-1}$ 。

**1.4.4 体外淋巴细胞增殖实验** 实验检测同种骨修复材料与肝素修饰人工晶状体两种供试品, 均分为以下 12 组: ①实验组 1: 供试品 24 h 完全培养基浸提液 200  $\mu\text{L}$ + 淋巴细胞悬液 50  $\mu\text{L}$ ; ②阴性对照组 1: 24 h 完全培养基 200  $\mu\text{L}$ + 淋巴细胞悬液 50  $\mu\text{L}$ ; ③实验组 2: 供试品 24 h 完全培养基浸提液 100  $\mu\text{L}$ + 淋巴细胞悬液 100  $\mu\text{L}$ ; ④阴性对照组 2: 24 h 完全培养基 100  $\mu\text{L}$ + 淋巴细胞悬液 100  $\mu\text{L}$ ; ⑤实验组 3: 供试品 72 h RPMI 改良培养基浸提液(实验前加体积分数 10% 胎牛血清)200  $\mu\text{L}$ + 淋巴细胞悬液 50  $\mu\text{L}$ ; ⑥阴性对照组 3: 72 h RPMI 改良培养基(实验前加体积分数 10% 胎牛血清)200  $\mu\text{L}$ + 淋巴细胞悬液 50  $\mu\text{L}$ ; ⑦实验组 4: 供试品 72 h RPMI 改良培养基浸提液(实验前加体积分数 10% 胎牛血清)100  $\mu\text{L}$ + 淋巴细胞悬液 100  $\mu\text{L}$ ; ⑧阴性对照组 4: 72 h RPMI 改良培养基(实验前加体积分数 10% 胎牛血清)100  $\mu\text{L}$ + 淋巴细胞悬液 100  $\mu\text{L}$ ; ⑨阳性对照组 1: 含 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  植物血凝素 M 的完全培养基 200  $\mu\text{L}$ + 淋巴细胞悬液 50  $\mu\text{L}$ ; ⑩阳性对照组 2: 含 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  植物血凝素 M 的完全培养基 100  $\mu\text{L}$ + 淋巴细胞悬液 100  $\mu\text{L}$ ; ⑪空白对照组 1: 250  $\mu\text{L}$  完全培养基; ⑫空白对照组 2: 200  $\mu\text{L}$  完全培养基。为保证接种细胞数量相同, 接种体积为 50  $\mu\text{L}$  的细胞悬液浓度为  $2 \times 10^9 \text{ L}^{-1}$ , 接种体积为 100  $\mu\text{L}$  的细胞悬液浓度为  $1 \times 10^9 \text{ L}^{-1}$ 。

按上述分组接种细胞于 96 孔板, 在  $\text{CO}_2$  培养箱中培养 3 d 后, 取出细胞培养板, 加入 CCK-8 试剂 20  $\mu\text{L}/$ 孔, 继续培养 3 h 后, 在微孔板测读仪上于 450 nm 波长处检测吸光度值。

**1.5 主要观察指标** 两种供试品体外淋巴细胞增殖实验结果。

**1.6 统计学分析** 利用统计学软件 SPSS 20.0, 去除不加细胞的空白对照后, 将各实验组与相应阴性对照组的吸光度进行两个独立样本的  $t$  检验, 并计算各实验组吸光度均值相对于相应阴性对照组吸光度均值的百分比。该文统计学方法已经丁文兴专家审核。

## 2 结果 Results

**2.1 同种骨修复材料体外淋巴细胞增殖实验结果** 同种骨修复材料体外淋巴细胞增殖实验各实验组及阴性对照组、阳性对照组的吸光度值(去除空白对照组)见表 1。各实验组的吸光度值均大于相应阴性对照组( $P$  均  $\leq 0.001$ )。

各实验组吸光度值相对于阴性对照组的百分比见表 2。两阳性对照组的吸光度值均大于各实验组与阴性对照组( $P$  均  $\leq 0.001$ )。

表 1 | 同种骨修复材料体外淋巴细胞增殖实验各组吸光度值 ( $\bar{x} \pm s$ )  
Table 1 | Absorbance values of the allogeneic bone repair materials of each group for *in vitro* lymphocyte proliferation test

组别	血样 1	血样 2	血样 3
实验组 1	0.254 5 $\pm$ 0.023 2	0.582 4 $\pm$ 0.040 5	0.418 4 $\pm$ 0.038 8
阴性对照组 1	0.139 5 $\pm$ 0.055 1	0.361 4 $\pm$ 0.063 2	0.214 0 $\pm$ 0.051 0
实验组 2	0.284 0 $\pm$ 0.007 8	0.545 9 $\pm$ 0.036 4	0.406 7 $\pm$ 0.036 7
阴性对照组 2	0.148 9 $\pm$ 0.018 5	0.383 0 $\pm$ 0.036 0	0.222 7 $\pm$ 0.024 3
实验组 3	0.346 6 $\pm$ 0.063 8	0.603 6 $\pm$ 0.059 0	0.446 8 $\pm$ 0.086 8
阴性对照组 3	0.111 4 $\pm$ 0.018 7	0.386 4 $\pm$ 0.061 1	0.200 6 $\pm$ 0.028 9
实验组 4	0.295 0 $\pm$ 0.031 7	0.542 8 $\pm$ 0.010 5	0.392 8 $\pm$ 0.040 3
阴性对照组 4	0.149 6 $\pm$ 0.014 2	0.382 1 $\pm$ 0.038 8	0.191 2 $\pm$ 0.019 7
阳性对照组 1	0.727 3 $\pm$ 0.146 3	0.766 0 $\pm$ 0.064 4	0.705 2 $\pm$ 0.122 7
阳性对照组 2	0.830 4 $\pm$ 0.085 3	0.883 3 $\pm$ 0.081 0	0.957 0 $\pm$ 0.084 5

表注: 实验组 1: 供试品 24 h 完全培养基(含体积分数 10% 胎牛血清的 RPMI 改良培养基)浸提液 200  $\mu\text{L}$ + 淋巴细胞悬液 50  $\mu\text{L}$ ; 阴性对照组 1: 24 h 完全培养基 200  $\mu\text{L}$ + 淋巴细胞悬液 50  $\mu\text{L}$ ; 实验组 2: 供试品 24 h 完全培养基浸提液 100  $\mu\text{L}$ + 淋巴细胞悬液 100  $\mu\text{L}$ ; 阴性对照组 2: 24 h 完全培养基 100  $\mu\text{L}$ + 淋巴细胞悬液 100  $\mu\text{L}$ ; 实验组 3: 供试品 72 h RPMI 改良培养基浸提液(实验前加体积分数 10% 胎牛血清)200  $\mu\text{L}$ + 淋巴细胞悬液 50  $\mu\text{L}$ ; 阴性对照组 3: 72 h RPMI 改良培养基(实验前加体积分数 10% 胎牛血清)200  $\mu\text{L}$ + 淋巴细胞悬液 50  $\mu\text{L}$ ; 实验组 4: 供试品 72 h RPMI 改良培养基浸提液(实验前加体积分数 10% 胎牛血清)100  $\mu\text{L}$ + 淋巴细胞悬液 100  $\mu\text{L}$ ; 阴性对照组 4: 72 h RPMI 改良培养基(实验前加体积分数 10% 胎牛血清)100  $\mu\text{L}$ + 淋巴细胞悬液 100  $\mu\text{L}$ ; 阳性对照组 1: 含 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  植物血凝素 M 的完全培养基 200  $\mu\text{L}$ + 淋巴细胞悬液 50  $\mu\text{L}$ ; 阳性对照组 2: 含 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  植物血凝素 M 的完全培养基 100  $\mu\text{L}$ + 淋巴细胞悬液 100  $\mu\text{L}$ 。各实验组与对应的阴性对照组比较差异均有显著性意义( $P$  均  $\leq 0.001$ ); 两阳性对照组的吸光度值均大于各实验组与阴性对照组( $P$  均  $\leq 0.001$ )。

表 2 | 同种骨修复材料体外淋巴细胞增殖实验各实验组吸光度值相对于阴性对照组的百分比 (%)  
Table 2 | Percentage of absorbance value of each experimental group relative to negative control group of the allogeneic bone repair materials for *in vitro* lymphocyte proliferation test

组别	血样 1	血样 2	血样 3
实验组 1	182	161	196
实验组 2	191	143	183
实验组 3	311	156	223
实验组 4	197	142	206

表注: 实验组 1: 供试品 24 h 完全培养基(含体积分数 10% 胎牛血清的 RPMI 改良培养基)浸提液 200  $\mu\text{L}$ + 淋巴细胞悬液 50  $\mu\text{L}$ ; 实验组 2: 供试品 24 h 完全培养基浸提液 100  $\mu\text{L}$ + 淋巴细胞悬液 100  $\mu\text{L}$ ; 实验组 3: 供试品 72 h RPMI 改良培养基浸提液(实验前加体积分数 10% 胎牛血清)200  $\mu\text{L}$ + 淋巴细胞悬液 50  $\mu\text{L}$ ; 实验组 4: 供试品 72 h RPMI 改良培养基浸提液(实验前加体积分数 10% 胎牛血清)100  $\mu\text{L}$ + 淋巴细胞悬液 100  $\mu\text{L}$ 。

**2.2 肝素修饰人工晶状体体外淋巴细胞增殖实验结果** 肝素修饰人工晶状体体外淋巴细胞增殖实验各实验组及阴性对照组、阳性对照组吸光度值(去除空白对照组)见表 3。3 个血样, 实验组 3 的吸光度值均小于阴性对照组 3( $P < 0.005$ ); 血样 1, 实验组 1 的吸光度值大于阴性对照组 1( $P < 0.05$ ); 血样 2, 实验组 4 的吸光度值小于阴性对照组 4( $P < 0.05$ )。

各实验组吸光度值相对于阴性对照组的百分比见表 4。两阳性对照组的吸光度值均大于各实验组与阴性对照组( $P$  均  $\leq 0.001$ )。

## 3 讨论 Discussion

植物血凝素是发现于植物特别是豆科植物中的凝集素, 属于高分子糖蛋白类, 是低聚糖和蛋白质的复合物, 具有促进有丝分裂的活性。目前市场上的植物血凝素常以植物血凝

**表 3 | 肝素修饰人工晶状体体外淋巴细胞增殖实验各组吸光度值 ( $\bar{x} \pm s$ )**  
**Table 3 | Absorbance values of the heparin-modified intraocular lens of each group for *in vitro* lymphocyte proliferation test**

组别	血样 1	血样 2	血样 3
实验组 1	0.189 5±0.022 0 <sup>b</sup>	0.278 5±0.064 9	0.239 5±0.042 4
阴性对照组 1	0.138 2±0.014 9	0.269 6±0.033 7	0.212 6±0.022 2
实验组 2	0.148 2±0.024 9	0.309 8±0.028 2	0.212 7±0.016 2
阴性对照组 2	0.129 7±0.020 2	0.328 0±0.032 7	0.205 2±0.007 4
实验组 3	0.078 4±0.010 4 <sup>a</sup>	0.176 6±0.033 8 <sup>a</sup>	0.148 2±0.033 2 <sup>a</sup>
阴性对照组 3	0.164 5±0.041 1	0.259 3±0.044 2	0.235 3±0.014 6
实验组 4	0.110 2±0.020 1	0.315 1±0.020 0 <sup>c</sup>	0.182 8±0.018 3
阴性对照组 4	0.118 8±0.009 6	0.338 2±0.014 8	0.188 2±0.011 0
阳性对照组 1	0.796 7±0.141 7	0.600 3±0.128 4	0.735 6±0.133 3
阳性对照组 2	0.850 2±0.103 2	0.838 6±0.101 4	0.795 1±0.044 7

表注：实验组 1：供试品 24 h 完全培养基（含体积分数 10% 胎牛血清的 RPMI 改良培养基）浸提液 200  $\mu$ L+ 淋巴细胞悬液 50  $\mu$ L；阴性对照组 1：24 h 完全培养基 200  $\mu$ L+ 淋巴细胞悬液 50  $\mu$ L；实验组 2：供试品 24 h 完全培养基浸提液 100  $\mu$ L+ 淋巴细胞悬液 100  $\mu$ L；阴性对照组 2：24 h 完全培养基 100  $\mu$ L+ 淋巴细胞悬液 100  $\mu$ L；实验组 3：供试品 72 h RPMI 改良培养基浸提液（实验前加体积分数 10% 胎牛血清）200  $\mu$ L+ 淋巴细胞悬液 50  $\mu$ L；阴性对照组 3：72 h RPMI 改良培养基（实验前加体积分数 10% 胎牛血清）200  $\mu$ L+ 淋巴细胞悬液 50  $\mu$ L；实验组 4：供试品 72 h RPMI 改良培养基浸提液（实验前加体积分数 10% 胎牛血清）100  $\mu$ L+ 淋巴细胞悬液 100  $\mu$ L；阴性对照组 4：72 h RPMI 改良培养基（实验前加体积分数 10% 胎牛血清）100  $\mu$ L+ 淋巴细胞悬液 100  $\mu$ L；阳性对照组 1：含 10  $\mu$ g/mL 植物血凝素 M 的完全培养基 200  $\mu$ L+ 淋巴细胞悬液 50  $\mu$ L；阳性对照组 2：含 10  $\mu$ g/mL 植物血凝素 M 的完全培养基 100  $\mu$ L+ 淋巴细胞悬液 100  $\mu$ L。与阴性对照组 3 比较，<sup>a</sup> $P < 0.005$ ；与阴性对照组 1 比较，<sup>b</sup> $P < 0.05$ ；与阴性对照组 4 比较，<sup>c</sup> $P < 0.05$ ；两阳性对照组的吸光度值均大于各实验组与阴性对照组（ $P$  均  $\leq 0.001$ ）。

**表 4 | 肝素修饰人工晶状体体外淋巴细胞增殖实验各实验组吸光度值相对于阴性对照组的百分比 (%)**  
**Table 4 | Percentage of absorbance value of each experimental group relative to negative control group of the heparin-modified intraocular lens for *in vitro* lymphocyte proliferation test**

组别	血样 1	血样 2	血样 3
实验组 1	137	103	113
实验组 2	114	94	104
实验组 3	48	68	63
实验组 4	93	93	97

表注：实验组 1：供试品 24 h 完全培养基（含体积分数 10% 胎牛血清的 RPMI 改良培养基）浸提液 200  $\mu$ L+ 淋巴细胞悬液 50  $\mu$ L；实验组 2：供试品 24 h 完全培养基浸提液 100  $\mu$ L+ 淋巴细胞悬液 100  $\mu$ L；实验组 3：供试品 72 h RPMI 改良培养基浸提液（实验前加体积分数 10% 胎牛血清）200  $\mu$ L+ 淋巴细胞悬液 50  $\mu$ L；实验组 4：供试品 72 h RPMI 改良培养基浸提液（实验前加体积分数 10% 胎牛血清）100  $\mu$ L+ 淋巴细胞悬液 100  $\mu$ L。

素 L、植物血凝素 E、植物血凝素 M 和植物血凝素 P 等形式提供，其中植物血凝素 M 是植物血凝素的黏性蛋白形式，主要用于刺激外周单个核细胞增殖，在此次研究中用作阳性对照。

体外淋巴细胞增殖实验终点检测的方法有四唑盐比色法 (MTT 法)<sup>[15]</sup>、羟基荧光素二醋酸琥珀酰亚胺脂法 (CFSE 法)<sup>[16]</sup>、CCK-8 法<sup>[17]</sup>、5-溴脱氧尿嘧啶核苷 (BrdU)<sup>[18]</sup>、阿尔玛蓝等<sup>[19]</sup>。CFSE 法、BrdU 法及显微镜下观察淋巴母细胞形态是比较直观检测到淋巴细胞增殖的方式，其他几种方法反映的是淋巴细胞的总体活性，可能淋巴细胞发生了增殖，也可能只是其代谢活性增强。在体外淋巴细胞增殖实验终点检测的方法中，CCK-8 灵敏度相对较高、操作简便。此次研究采用 CCK-8 的方法，反映的是淋巴细胞的整体活性，不能直

观地反映淋巴细胞增殖现象。

两种产品的浸提比例不同，同种骨修复材料的浸提比例为 0.1 g/mL，肝素修饰人工晶状体的浸提比例为 0.2 g/mL。同种骨修复材料不能满足 0.2 g/mL 的浸提比例，该比例下培养基不能完全淹没材料。肝素人工晶状体则完全依据 GB/T 16886.12 中推荐的 0.2 g/mL 的浸提比例，未考虑其在临床应用时一个人体最多仅用 2 个产品。

此次研究采取完全培养基浸提 24 h 和 RPMI 改良培养基浸提 72 h 两种浸提方式，体外淋巴细胞培养时，浸提液与细胞悬液的比例分别为 4 : 1, 1 : 1, 共 4 种不同的实验条件。与相应阴性对照组相比，同种骨修复材料的各实验组淋巴细胞整体活性均明显增加，其中血样 1 和血样 3 在实验组 3 最为明显，血样 2 在实验组 1 最为明显，但跟实验组 3 相近。肝素修饰人工晶状体的 RPMI 培养基 72 h 浸提液可降低淋巴细胞的总体活性，3 个血样均在实验组 3 表现最为突出。肝素修饰人工晶状体的完全培养基 24 h 浸提液，实验组 1 的 3 个血样均表现为实验组吸光度高于阴性对照组，其中血样 1 有统计学差异，表现为可增强淋巴细胞的总体活性。可见，两种供试品均是在“浸提时间长且作用剂量大”的实验组 3 条件下对淋巴细胞活性的影响最为显著；肝素修饰人工晶状体在“RPMI 改良培养基 72 h 浸提、作用比例为 4 : 1”的实验组 3 条件下对淋巴细胞活性有明显抑制作用，在“完全培养基 24 h 浸提、作用比例为 4 : 1”的实验组 1 条件下则有较轻微增强淋巴细胞活性的作用。

实验组 3 浸提液为 RPMI 改良培养基，发挥作用的主要为极性浸提物质。同种骨修复材料浸提液增加淋巴细胞整体活性，有可能是对淋巴细胞确实有激活作用引发了淋巴细胞的增殖，也可能是浸提液中的营养物质促进了淋巴细胞的生长，增强其活性。淋巴细胞是否发生增殖，需要进一步通过 CFSE 法或 BrdU 法或显微镜下观察淋巴母细胞形态来确定。在实验组 3 条件下，肝素修饰人工晶状体浸提液对淋巴细胞总体活性的抑制作用可能跟浸提液中的肝素有关，有研究表明肝素对 T 细胞活化有抑制作用<sup>[20]</sup>，对肝癌细胞、血管内皮细胞和成纤维细胞、平滑肌细胞等诸多细胞的增殖均有抑制作用<sup>[21-24]</sup>。肝素属水溶性，实验组 3 因浸提时间长、作用剂量大，共培养液中肝素的含量最高，因而对淋巴细胞活性的抑制作用最为明显。肝素修饰人工晶状体浸提液在实验组 1 条件下表现出轻微增强淋巴细胞活性的作用，可能跟完全培养基所浸提出的非极性物质相关，浸提出的非极性物质可增强淋巴细胞的活性，血样 1 的淋巴细胞对这种作用更为敏感。需要注意的是，实验组 1 所用浸提液是完全培养基，所表现出的轻微增强淋巴细胞活性作用可能是抵消了一部分肝素对淋巴细胞活性的抑制作用后体现出来的。

YY/T 1465.1 和 YY/T 0606.15 中均未对体外淋巴细胞增殖实验的浸提方式、浸提液与细胞悬液的比例进行规定。从此次研究结果中可以看出，供试品不同浸提条件、不同作用强度产生的结果会有不同，实验条件的选择需结合产品的临床

应用情况。此次研究中的肝素修饰人工晶状体考虑其临床使用最大剂量为 2 只，可适当减少浸提比例。在浸提用液体的选择上，用完全培养基更为合理，因其与人体组织液更为接近，可浸提出极性、非极性物质。在作用强度的选择上，较为敏感的 4 : 1 作用比例较易检测出产品对淋巴细胞活性的影响，但结果评估需参考该产品的临床实际应用情况。另外，也需考虑产品浸提液中特有物质对淋巴细胞的作用，如肝素对淋巴细胞活性的抑制作用。GB/T 16886.12-2017 中推荐的常用浸提比例为 0.2 g/mL 或 6 cm<sup>2</sup>/mL，也是目前生物学试验常用的浸提比例。但需要注意的是，不同器械在临床上的应用方式、应用风险有很大差异，进行实验室检测时，检测样品的浸提比例、浸提方式以及作用强度需充分考虑到这种差异。

器械的临床应用资料被称为真实世界数据，将实验室检测与真实世界数据关联起来，用真实世界数据来指导实验室检测，实验室检测的数据会更有意义。举例说明：对有潜在免疫原性风险产品的临床应用情况进行调查，如在临床上确实有因宿主对该产品的免疫反应所引发的应用风险，则可以收集已上市的该类产品，并根据临床应用情况对它们的临床风险大小进行分级，同时对它们进行实验室检测。通过对实验条件的多方位调整，建立实验室检测结果与临床应用风险之间的相关性。如此以来，实验室检测结果对临床应用风险便有相当的预示作用。

同种异体骨材料在体外有增强淋巴细胞活性的作用。肝素修饰人工晶状体在体外对淋巴细胞活性的影响则较为复杂：以 RPMI 改良培养基作为浸提液，对淋巴细胞活性有抑制作用；以完全培养基作为浸提液，对淋巴细胞活性有轻微增强作用。在实验室检测中实验条件的变化常可引起实验结果的变化。因此需将实验室检测与产品的临床应用情况相结合，建立两者的相关性，使实验室检测有一定的临床预示作用。对临床应用有预示作用，是实验室检测发展的方向，也是其终极目标。

**作者贡献：**许建霞进行实验设计，实验实施为许建霞、付海洋，实验评估为许建霞，资料收集为许建霞，许建霞成文，曲守方审核。

**利益冲突：**文章的全部作者声明，在课题研究和文章撰写过程中不存在利益冲突。

**开放获取声明：**这是一篇开放获取文章，根据《知识共享许可协议》“署名-非商业性使用-相同方式共享 4.0”条款，在合理引用的情况下，允许他人以非商业性目的基于原文内容编辑、调整和扩展，同时允许任何用户阅读、下载、拷贝、传递、打印、检索、超级链接该文献，并为之建立索引，用作软件的输入数据或其它任何合法用途。

**版权转让：**文章出版前全体作者与编辑部签署了文章版权转让协议。

**出版规范：**该研究遵守国际医学期刊编辑委员会《学术研究实验与报告和医学期刊编辑与发表的推荐规范》。文章出版前已经过专业反剽窃文献检测系统进行 3 次查重。文章经小同行外审专家双盲外审，同行评议认为文章符合期刊发稿宗旨。

#### 4 参考文献 References

- RAMIREZ-MARÍN Y, ABAD-CONTRERAS DE, USTARROZ-CANO M, et al. Perfusion Decellularization of Extrahepatic Bile Duct Allows Tissue-Engineered Scaffold Generation by Preserving Matrix Architecture and Cytocompatibility. *Materials (Basel)*. 2021;14(11):3099.
- MOSALA NEZHAD Z, PONCELET A, DE KERCHOVE L, et al. Small intestinal submucosa extracellular matrix (CorMatrix®) in cardiovascular surgery: a systematic review. *Interact Cardiovasc Thorac Surg*. 2016;22(6):839-850.
- NAKAMURA N, KIMURA T, KISHIDA A. Overview of the Development, Applications, and Future Perspectives of Decellularized Tissues and Organs. *ACS Biomater Sci Eng*. 2017;3(7):1236-1244.
- BADYLAK SF, GILBERT TW. Immune response to biologic scaffold materials. *Semin Immunol*. 2008;20(2):109-116.
- KASRAVI M, AHMADI A, BABAJANI A, et al. Immunogenicity of decellularized extracellular matrix scaffolds: a bottleneck in tissue engineering and regenerative medicine. *Biomater Res*, 2023;27(1).doi: 10.1186/s40824-023-00348-z.
- BOEER U, BUETTNER FF, KLINGENBERG M, et al. Immunogenicity of intensively decellularized equine carotid arteries is conferred by the extracellular matrix protein collagen type VI. *PLoS One*. 2014;9(8):e105964.
- FATANGARE A, GLÄSSNER A, SACHS B, et al. Future perspectives on in-vitro diagnosis of drug allergy by the lymphocyte transformation test. *J Immunol Methods*. 2021;495:113072.
- SACHS B, FATANGARE A, SICKMANN A, et al. Lymphocyte transformation test: History and current approaches. *J Immunol Methods*. 2021;493:113036.
- GB/T 16886.20-2015 医疗器械生物学评价 第 20 部分：医疗器械免疫毒理学试验 原则和方法。
- YY/T 1465.1-2016 医疗器械免疫原性评价方法 第 1 部分：体外 T 淋巴细胞转化试验。
- YY/T 0606.15-2014 组织工程医疗产品 第 15 部分：评价基质及支架免疫反应的试验方法：淋巴细胞增殖试验。
- 邵安良，穆钰峰，屈树新，等。人外周血淋巴细胞增殖试验的优化及其应用 [J]. *药物分析杂志*, 2019,39(8):1354-1361.
- 陈亮，穆钰峰，邵安良，等。不同种属小鼠用于淋巴细胞增殖试验的比较研究 [J]. *药物分析杂志*, 2019,39(8):1347-1353.
- 叶应妩，王毓三。全国临床检验操作规程 [M]. 2 版。南京：东南大学出版社，1997:375-385.
- YOSHIMURA T, KURITA C, HAYATA M, et al. Diagnosis of drug allergy by the lymphocyte stimulation test with the MTT [3-(4,5-dimethyl thiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide] assay. *Biol Pharm Bull*. 1993;16(7):686-689.
- LYONS AB, PARISH CR. Determination of lymphocyte division by flow cytometry. *J Immunol Methods*. 1994;171(1):131-137.
- MIYAMOTO T, MIN W, LILLEHOJ HS. Lymphocyte proliferation response during *Eimeria tenella* infection assessed by a new, reliable, nonradioactive colorimetric assay. *Avian Dis*. 2002;46(1):10-16.
- ALIPOUR R, ADIB M, HASHEMI-BENI B, et al. The effect of stem cell from human exfoliated deciduous teeth on T lymphocyte proliferation. *Adv Biomed Res*. 2014;3:202.
- ZHI-JUN Y, SRIRANGANATHAN N, VAUGHT T, et al. A dye-based lymphocyte proliferation assay that permits multiple immunological analyses: mRNA, cytogenetic, apoptosis, and immunophenotyping studies. *J Immunol Methods*. 1997;210(1):25-39.
- 张剑英，杨美玲，顾则娟，等。肝素与无水乙醇抑制肝癌细胞的实验研究 [J]. *护理学杂志*, 2016,31(20):47-49.
- 张凤，张瑞华，徐薇，等。肝素抑制 T 细胞活化及机制研究 [J]. *中国免疫学杂志*, 2009,25(3):197-201.
- 王宏梅，魏巍，谢涛，等。肝素对小鼠肝癌细胞 Hca-F 和 Hca-P 淋巴道转移的抑制作用 [J]. *肿瘤防治研究*, 2007,34(6):435-438,475.
- 李文涛，王建华，尚鸣异，等。低分子肝素抑制 bFGF 诱导犬动脉平滑肌细胞增殖的体外实验研究 [J]. *临床放射学杂志*, 2002,21(7):568-570.
- 张鹏，尹珺，刘毅梅。肝素和氢化可的松对血管内皮细胞和成纤维细胞的生长抑制作用 [J]. *中国肿瘤临床*, 2001,28(6):19-22.

(责任编辑：GW, ZN, QY, ZM)