



# 中华人民共和国医药行业标准

YY/T 0127.18—2016

---

## 口腔医疗器械生物学评价 第 18 部分：牙本质屏障细胞毒性试验

Biological evaluation of medical devices used in dentistry  
Part 18: Dentine barrier cytotoxicity test

2016-01-26 发布

2017-01-01 实施

---

国家食品药品监督管理总局 发布



## 前 言

YY/T 0127《口腔医疗器械生物学评价》分为 18 个部分：

- YY/T 0127.1 口腔材料生物试验方法 溶血试验；
- YY/T 0127.2 口腔医疗器械生物学评价 第 2 单元：试验方法 急性全身毒性试验：静脉途径；
- YY/T 0127.3 口腔医疗器械生物学评价 第 3 部分：根管内应用试验；
- YY/T 0127.4 口腔医疗器械生物学评价 第 2 单元：试验方法 骨埋植试验；
- YY/T 0127.5 口腔医疗器械生物学评价 第 5 部分：吸入毒性试验；
- YY/T 0127.6 口腔材料生物学评价 第 2 单元：口腔材料生物试验方法 显性致死试验；
- YY/T 0127.7 口腔材料生物学评价 第 2 单元：口腔材料生物试验方法 牙髓牙本质应用试验；
- YY/T 0127.8 口腔材料生物学评价 第 2 单元：口腔材料生物试验方法 皮下植入试验；
- YY/T 0127.9 口腔医疗器械生物学评价 第 2 单元：试验方法 细胞毒性试验：琼脂扩散法及滤膜扩散法；
- YY/T 0127.10 口腔医疗器械生物学评价 第 2 单元：试验方法 鼠伤寒沙门氏杆菌回复突变试验(Ames 试验)；
- YY/T 0127.11 口腔医疗器械生物学评价 第 11 部分：盖髓试验；
- YY/T 0127.12 牙科学 口腔医疗器械生物学评价 第 2 单元：试验方法 微核试验；
- YY/T 0127.13 口腔医疗器械生物学评价 第 2 单元：试验方法 口腔黏膜刺激试验；
- YY/T 0127.14 口腔医疗器械生物学评价 第 2 单元：试验方法 急性经口全身毒性试验；
- YY/T 0127.15 口腔医疗器械生物学评价 第 2 单元：试验方法 亚急性和亚慢性全身毒性试验：经口途径；
- YY/T 0127.16 口腔医疗器械生物学评价 第 2 单元：试验方法 哺乳动物细胞体外染色体畸变试验；
- YY/T 0127.17 口腔医疗器械生物学评价 第 17 部分：小鼠淋巴瘤细胞(TK)基因突变试验；
- YY/T 0127.18 口腔医疗器械生物学评价 第 18 部分：牙本质屏障细胞毒性试验。

本部分为 YY/T 0127 的第 18 部分。

本部分按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本部分参考 ISO 7405:2008《牙科学 用于口腔的医疗器械生物相容性评价》附录 B“牙本质屏障细胞毒性试验”。

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这些专利的责任。

本部分由国家食品药品监督管理总局提出。

本部分由全国口腔材料和器械设备标准化技术委员会(SAC/TC 99)归口。

本部分起草单位：国家食品药品监督管理总局北大医疗器械质量监督检验中心。

本部分主要起草人：林红、蒋若丹、郑刚。



## 口腔医疗器械生物学评价

### 第 18 部分:牙本质屏障细胞毒性试验

#### 1 范围

YY/T 0127 的本部分规定了口腔材料牙本质屏障细胞毒性试验方法。

本部分适用于评价牙体充填材料和牙齿窝洞治疗的相关材料及其可滤沥成分经牙本质屏障后对细胞毒性的影响。

#### 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(GB/T 16886.5—2003, ISO 10993-5:1999, IDT)

GB/T 16886.12 医疗器械生物学评价 第 12 部分:样品制备与参照样品(GB/T 16886.12—2005, ISO 10993-12:2002)

ISO 7405-AMD:2013 Dentistry—Evaluation of biocompatibility of medical devices used in dentistry(牙科学 用于口腔的医疗器械生物相容性评价)

#### 3 目的

本试验用于通过细胞培养的方法,评价牙体充填材料的细胞毒性。细胞和材料被一个牙本质屏障分隔开,从而模拟临床牙齿窝洞用修复材料充填的情况。

如果采用琼脂覆盖法或滤膜滤过法所得细胞毒性为 0~1 级时,则不必进行该试验。

#### 4 器具和材料

##### 4.1 细胞

使用已建立细胞系的细胞,例如来自 ATCC(American Type Culture Collection)[如 ATCC CCL1 (NCTC clone 929)小鼠成纤维细胞]或者选择克隆 SV 40 大 T 抗原基因转染的细胞,例如来源于小牛牙乳头的细胞。细胞应保持在温度为 $(37\pm 2)^{\circ}\text{C}$ 、含 5% $\text{CO}_2$  的潮湿空气的生长培养基中。也可以使用其他拥有类似成牙本质细胞性质的或其他具有与牙髓组织生理相关性质的已经建立细胞系的细胞。

##### 4.2 培养基

培养基应适宜所选细胞系,例如由 ATCC 或类似机构提供。

注:可参见 [HTTP://WWW.ATCC.ORG](http://www.atcc.org) 的指导。克隆 SV 40 大 T 抗原基因转染细胞的生长培养基包含添加 20% 胎牛血清(FBS)的 MEM $\alpha$ 、150 IU/mL 青霉素、150  $\mu\text{g/mL}$  链霉素、0.125  $\mu\text{g/mL}$  两性霉素 B 和 0.1 mg/mL 遗传霉素。



## YY/T 0127.18—2016

## 4.3 试剂

## 4.3.1 四唑盐(MTT)[3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide]

## 4.3.2 抗菌素/抗真菌剂

青霉素、链霉素、两性霉素 B 和遗传霉素(遗传霉素仅适用于克隆 SV40 转染细胞)。

## 4.4 设备和器具

## 4.4.1 培养皿

插入式细胞培养皿[例如 Millicell<sup>1)</sup>]。

## 4.4.2 培养板

6 孔、24 孔、48 孔和 96 孔培养板。

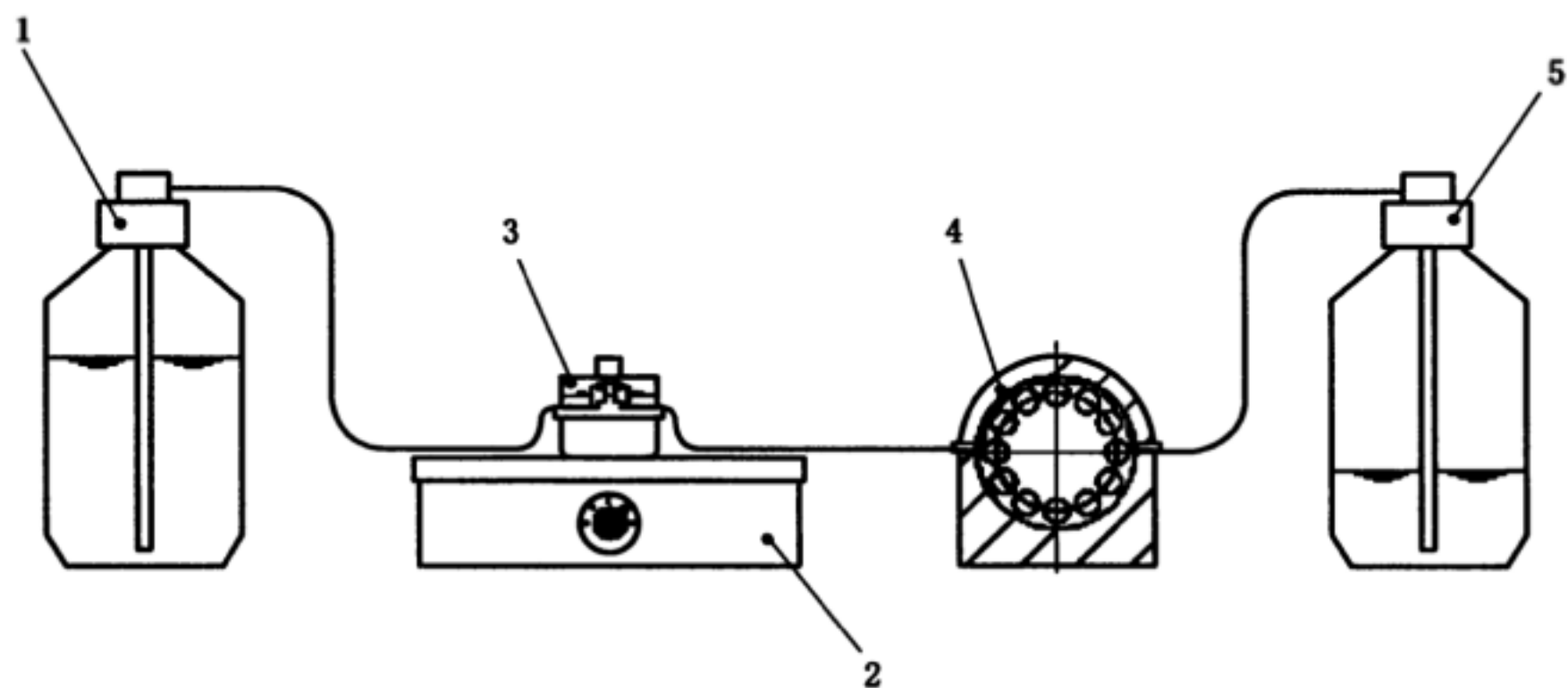
## 4.4.3 三维细胞培养网

如直径 8 mm 聚酰胺网[例如 Sefar<sup>2)</sup>]或三维网状支架,宽网 150  $\mu\text{m}$ ~200  $\mu\text{m}$ ,纤维直径 150  $\mu\text{m}$ ,厚 0.6 mm。

## 4.4.4 分隔小室灌注器具

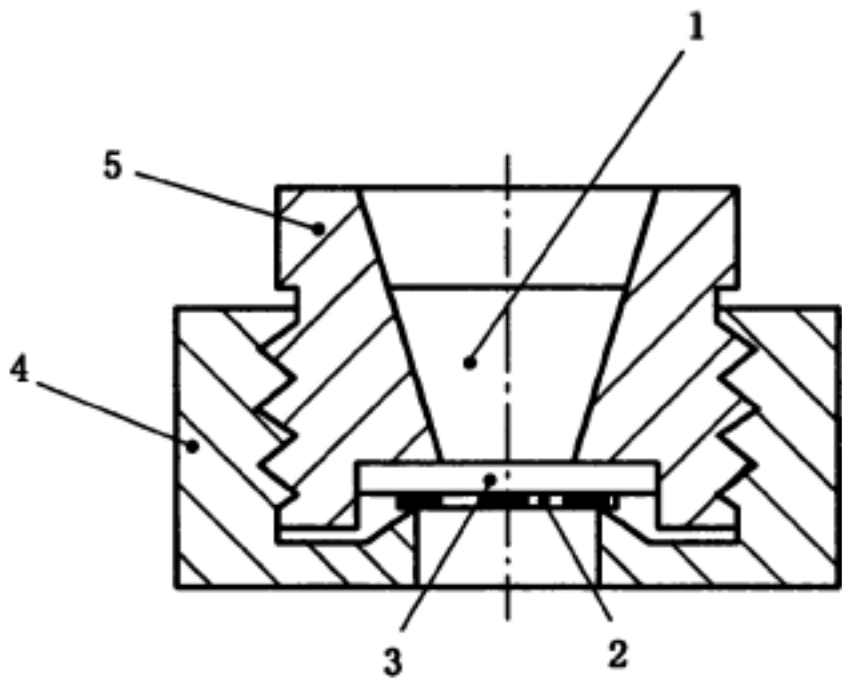
分隔灌注小室(简称灌注小室)可以是 3D Bioreactor<sup>3)</sup>或 Minucells<sup>4)</sup>(图 1)或其他合适的灌注小室。3D Bioreactor<sup>3)</sup>灌注小室是一个由聚碳酸酯制成的圆柱形空腔,其内径约 6 mm,高约 20 mm。灌注小室被一片牙本质片分隔成上下两个腔(上腔即“窝洞”,下腔即“牙髓腔”),牙本质片被固定在合适的位置(图 2)。3D Bioreactor<sup>3)</sup>装置的“牙髓腔”部分一侧入口与提供培养基的瓶子相连,另一侧出口与一个转动的泵相连,该泵与回收废培养基的瓶子相连。或者此装置的“牙髓腔”部分一侧入口与提供培养基的瓶子和一个转动的泵相连,另一侧出口与回收废培养基的瓶子相连。

- 
- 1) Millicell 是 Millipore, Billerica, USA 产品的商品名。此信息是给本部分用户提供方便,不代表我们认可其产品。用户可以使用其他类似的产品,只要它们可以达到相同的结果。
  - 2) Sefar 是 Sefar, Wasserburg/Inn, Germany 产品的商品名。此信息是给本部分用户提供方便,不代表我们认可其产品。用户可以使用其他类似的产品,只要它们可以达到相同的结果。
  - 3) 3D Bioreactor 是 3D Biotek, New Jersey, USA 产品的商品名。此信息是给本部分用户提供方便,不代表我们认可其产品。用户可以使用其他类似的产品,只要它们可以达到相同的结果。
  - 4) Minucells 是德国 Bad Abbach, Minucells & Minutissue GmbH 公司产品的商品名。此信息是给本部分用户提供方便,不代表我们认可其产品。用户可以使用其他类似的产品,只要它们可以达到相同的结果。



- 说明：
- 1——培养基的供应；
  - 2——加热板或合适装置以保证细胞在适宜环境里生长；
  - 3——灌注小室；
  - 4——泵；
  - 5——废液瓶。

图 1 牙本质屏障细胞毒性试验装置示意图



- 说明：
- 1——试验材料；
  - 2——有细胞的网子；
  - 3——牙本质片；
  - 4——不锈钢或合适材料制成的小室壁；
  - 5——不锈钢或合适材料制成的固定牙本质片的支架。

图 2 固定牙本质片的支架和细胞培养灌注小室示意图

4.4.5 酶标仪

96 孔板, 波长 540 nm, 或者任何其他适合的光度计。

4.4.6 牙本质片

来自于人或者牛的牙本质。

注：如果使用非人源牙本质, 使用前应先确定牙本质的通透性, 以确保其通透性与人牙牙本质的牙髓-牙本质界面处是同一水平。同一试验所用牙本质片的通透性应尽可能相近。可采用毛细管系统, 如 Flowdec<sup>5)</sup> 测试。测试原理见附录 A。通透性测试结果应在同一数量级。

5) Flowdec 是 DeMarco Engineering, Geneva, Switzerland 产品的商品名。此信息是给本部分用户提供方便, 不代表我们认可其产品。用户可以使用其他类似的产品, 只要它们可以达到相同的结果。

## YY/T 0127.18—2016

## 5 试验步骤

## 5.1 细胞培养准备

使用三维细胞培养并推荐与 3D Bioreactor 或 Minucells 灌注小室一起使用。根据产品不同,有些聚酰胺网使用前应先用 0.1 mol/L 乙酸浸泡 30 min,用去离子水清洗 3 遍,空气干燥。在三维细胞培养网上涂满纤维连接蛋白(0.03 mg/mL),在无菌环境下空气干燥。在 6 孔板的每一个孔内放置一个插入式细胞培养皿(4.4.1),将三维细胞培养网放置在其内,加入 1.25 mL 培养基,再加入 20  $\mu$ L 细胞密度为  $4 \times 10^6$ /mL 的克隆 SV40 转染细胞悬液;或加入 2 mL 培养基,再加入 40  $\mu$ L 细胞密度为  $2.5 \times 10^5$  的 L929 细胞悬液。在温度  $(37 \pm 2)^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$ , 相对湿度  $(90 \pm 10)\%$  的环境下孵育 48 h 后,将三维细胞培养网转移至 24 孔板继续孵育  $(14 \pm 2)$  d。一周更换 3 次培养基,且在第一周结束时将三维细胞培养网转换到一个新的 24 孔板中。

## 5.2 试样制备

按照生产厂家说明书制备试样,试样直径 6 mm,厚 2 mm(试样直径应依据所选小室的尺寸而定)。不固化材料直接使用。材料为液状时,用液状材料浸湿直径 6 mm 的醋酸纤维滤纸。

## 5.3 牙本质试片的准备

## 5.3.1 人来源

选择新鲜拔除的无龋磨牙,用手持器械清除牙垢和附着的软组织,在 70%乙醇中浸泡至少 15 min。以与牙长轴垂直的角度,在牙冠最宽处,于咬合面釉质以下,牙髓腔的咬合面边界以上,切取牙本质片。

## 5.3.2 牛来源

从 3 岁~7 岁屠宰的牛的中间四颗下切牙中选择完整无过度磨损的切牙。牙齿拔出后,用手持器械清除牙垢和附着的软组织,贮存在 0.5%氯胺中或其他相似的试剂中备用。沿牙齿的长轴,尽可能地贴近牙髓腔切取牙本质片。使用靠近牙颈部的牙本质片进行试验。

## 5.3.3 牙本质片的处理

用 50%的柠檬酸酸蚀牙本质片的“牙髓”面 30 s,彻底清洗并灭菌,可在 0.9%NaCl 中高压蒸汽灭菌  $(121^\circ\text{C}, 9.6 \text{ MPa}, 25 \text{ min})$ ,或者在 70%乙醇中浸泡 15 min 后再用去离子水彻底清洗。牙本质片可以贮存在  $(4 \pm 2)^\circ\text{C}$  的 0.9%NaCl 溶液中最多 3 周。使用之前,对每批牙本质片中的一个样本进行微生物培养以确定牙本质片的无菌性。

注:牙本质片的厚度可以根据试验模仿的临床牙齿窝洞的深度而变化。厚度为  $(0.5 \pm 0.05)$  mm 的牙本质片可以代表中等深度的临床牙齿窝洞下面存留的牙本质的厚度。更薄的牙本质片可以代表临床更深的牙齿窝洞的情况。

牙本质片可以贮存在 0.9%NaCl 中备用。

## 5.3.4 灌注装配

将长满细胞的网子置于实验装置中,放入牙本质片,将其固定在合适的位置。

注:合适的固定支架见图 2。

用分析介质(含 6 g/L HEPES 缓冲液的生长培养基)以 0.3 mL/h 的速度灌注小室 24 h。停止灌注,将被试材料放在小室的上腔,直接与牙本质的“窝洞”面接触。



一段合适的时间后(如 24 h 或 3 d),从小室的“牙髓腔”移走长有细胞的网子,将其置于含有 0.5 mL 预热过的 1 mg/mL 的 MTT 溶液的 48 孔板中,在(37±2)℃孵育 2 h。用 0.25 mL DMSO (Dimethyl sulfoxide)提取蓝色的甲瓚沉淀,在室温下震荡板子 30 min。将 200 μL 该溶液转移至一个 96 孔板内,在 540 nm 波长下测定吸光度值。结果表达为与阴性对照的百分率或吸光度值。

一次试验中,每一个材料和对照均使用 5~10 个小室,每次试验至少重复 1 次。

6 对照

每一个受试材料均应使用阳性和阴性对照。阳性对照在接触细胞 24 h 后细胞活性应该低于 50%,阴性对照应该对细胞活力没有影响,可参见 GB/T 16886.12,或采用已知无细胞毒性的物质作为阴性对照。ISO 7405-AMD:2013 给出了阳性对照材料的例子。疏水的无毒加聚型硅橡胶印模材料是合适的阴性对照。

7 结果评价

如果阴性对照与阳性对照的结果没有统计学显著性差异,该试验无效。

除了评价描述外,可参见 GB/T 16886.5 获取更多信息。来自 3D Bioreactor 或 Minucells 装置的试验数据的评价是基于对试验材料的数据和对照材料的数据的统计学比较(非参数方法),每个材料应有 5~10 个独立的培养试验数据。依据表 1 评价细胞的损害,依据表 2 对结果分级。

试验报告中应包括评价结果。

表 1 细胞损害的评价

等级	分级评价
0	与阴性对照没有统计学差异,但是与阳性对照有差异或吸光度值高于阴性对照
1	与阴性对照和阳性对照均有统计学差异且吸光度值高于阳性对照
2	与阳性对照没有统计学差异,但是与阴性对照有差异或吸光度值低于阳性对照

表 2 受试材料分级

等级	描述
0	无细胞毒性
1	中度细胞毒性
2	重度细胞毒性

8 试验记录

试验记录应该包括以下信息:

- a) 使用的细胞系;
- b) 使用的培养基;
- c) 试验材料的详细信息;

**YY/T 0127.18—2016**

- d) 试验材料的详细准备信息；
- e) 阳性及阴性对照的详细信息；
- f) 与阴性对照相比,细胞活力的百分率；
- g) 评价结果。

## 附录 A

### (规范性附录)

### 牙本质片通透性测量

#### A.1 测量装置

测量装置见图 A.1。

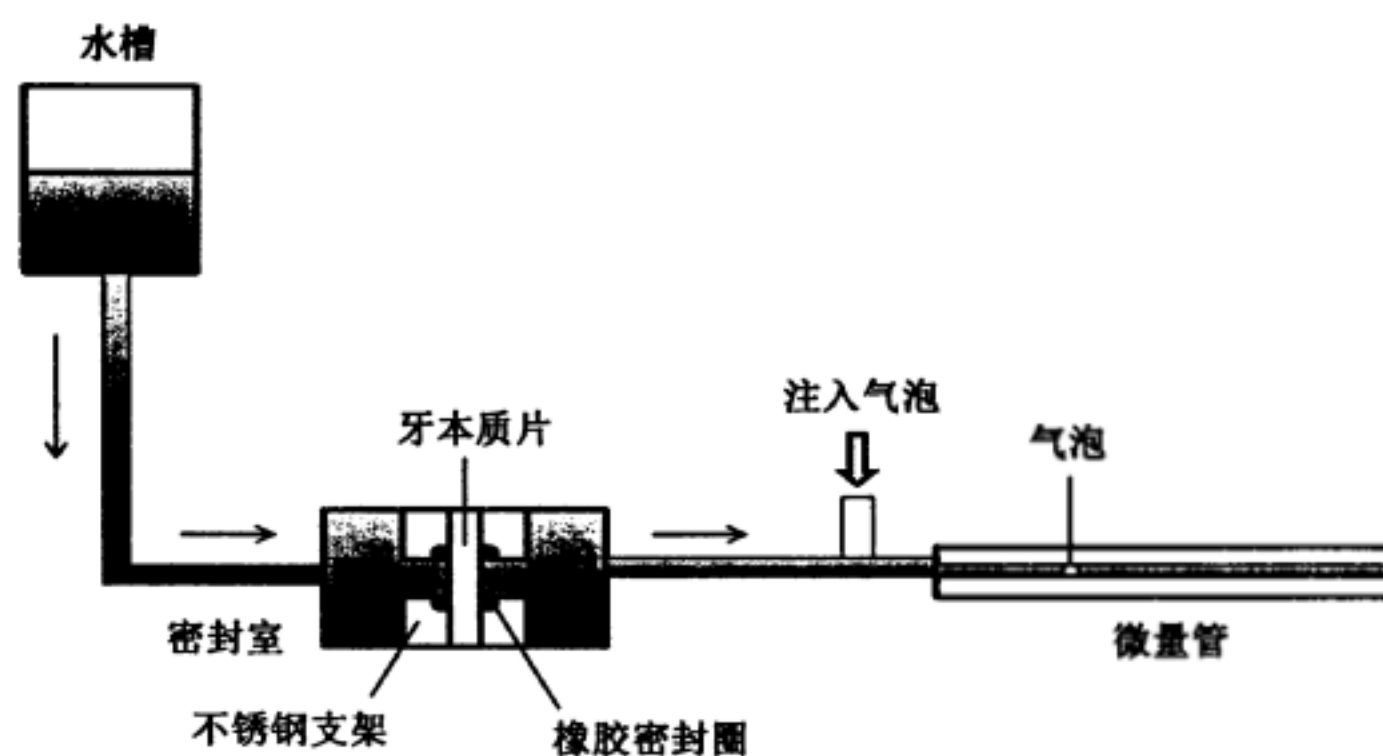


图 A.1 牙本质片通透性测量装置示意图

##### A.1.1 水槽

液面距密封室中心为一固定高度,以使牙本质片承受一定的水柱压力(例如 32 cm 水柱压力)。

##### A.1.2 密封室

不锈钢制成的密封室内能放置直径约 8 mm 的牙本质片。用内径为 6 mm 的密封圈将牙本质片固定在密封室中间,密封圈内径所限定的面积即为所测牙本质片的通透面积。液体应始终从牙本质片的“牙髓”面向“牙面”通透。

##### A.1.3 气泡进孔

带有开关,可以允许气泡打入。

##### A.1.4 气泡测量器具

计时器,精度 0.01 s;带刻度的 0.1 mL 微量管,精度 5  $\mu$ L,或等效的液体流量计量装置。

#### A.2 测量原理

通过观察和记录在一段时间内液体通过牙本质小管的流量,测量牙本质小管的通透性。

#### A.3 通透性测量

##### A.3.1 排除气泡

装配好密封室后,开启水槽,让液体充满整个测量装置,以排除装置内残留的气泡。

### A.3.2 注入气泡

从气泡注入孔打入一个小气泡。

### A.3.3 观察

观察并记录气泡移动的距离和时间,用下式计算牙本质片的通透性:

$$L_p = Q/AT$$

式中:

$L_p$  ——牙本质通透性,单位为微升每分钟每平方厘米( $\mu\text{L}/\text{min}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$ );

$Q$  ——观察时间内液体流过牙本质片的体积,单位为微升( $\mu\text{L}$ );  $Q = \text{管的截面积} \times \text{气泡移动的距离}$ ;

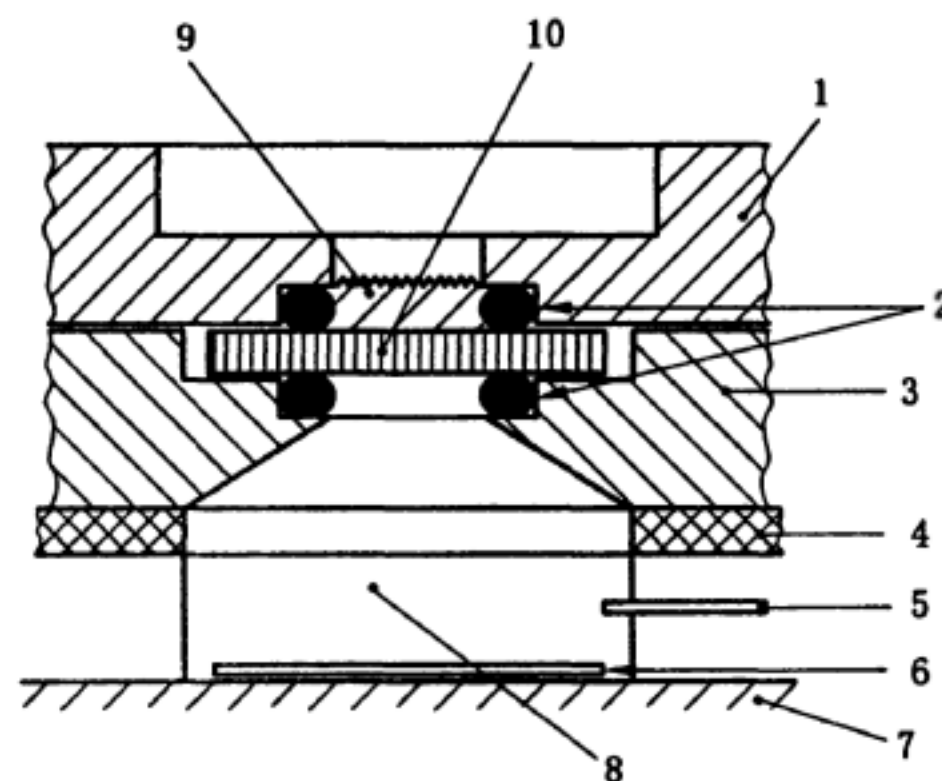
$A$  ——牙本质片的通透面积,单位为平方厘米( $\text{cm}^2$ );

$T$  ——观察时间,单位为分钟(min)。

**附 录 B**  
(资料性附录)  
**ADA 分隔灌注小室<sup>6)</sup>**

**B.1 ADA 灌注小室**

ADA 灌注小室(图 B.1)包括由 Delrin<sup>7)</sup> 或 Lexan<sup>8)</sup> 制作的无毒半透明壁。入口和出口的阀门均为无毒的不锈钢针端口。大 O 形圈是由红色的有机硅塑料制成(外径 15.9 mm, 内径 12.42 mm)。内径 6 mm 的小 O 形圈形成 28 mm<sup>2</sup> 的扩散面积。小室的面积可以容纳 0.5 mL 液体。该面积可以通过从小室的底部填充无毒聚乙硅橡胶印模材料而减小, 可使小室中的液体小于 100 μL。



说明:

- 1 ——上部;
- 2 ——小 O 形橡胶圈;
- 3 ——中部;
- 4 ——大 O 形橡胶圈;
- 5 ——入口-出口;
- 6 ——盖玻片;
- 7 ——底部;
- 8 ——培养基;
- 9 ——试验材料;
- 10——被 O 形橡胶圈固定在合适位置的牙本质片。

**图 B.1 ADA 灌注小室示意图**

- 
- 6) ADA 灌注小室是 Biomedical Engineering, Medical College of Georgia, Augusta, GA 30912, USA, # NT-8214A. 提供的产品的商品名。此信息是给本部分用户提供方便, 不代表我们认可其产品。用户可以使用其他类似的产品, 只要它们可以达到相同的结果。
  - 7) Delrin 是由 DuPont 公司提供的聚醛树脂类材料制成的产品的商品名。此信息是给本部分用户提供方便, 不代表我们认可其产品。用户可以使用其他类似的产品, 只要它们可以达到相同的结果。
  - 8) Lexan 是由 General Electric Plastics 公司提供的聚碳酸酯类材料制成的产品的商品名。此信息是给本部分用户提供方便, 不代表我们认可其产品。用户可以使用其他类似的产品, 只要它们可以达到相同的结果。



## **B.2 单层细胞培养**

单层细胞培养法推荐与 ADA 灌注小室一起使用。使用已建立的细胞系,如来自 ATCC,运用 GB/T 16886.5 中描述的方法试验。

## **B.3 ADA 灌注小室的装配**

在灌注小室装置中调整牙本质片。用合适的细胞培养基(或其他提取介质)充满下面的间隔,必要时将其与培养液供给瓶和废液瓶相连。然后填入被试材料。经过一段给定的暴露时间,吸出细胞培养液,将其用于单层细胞培养进行常规的细胞毒性检验,例如使用 DNA 合成分析,线粒体活性(MTT)分析或者用一些功能刺激如基因调控来作为生物学终点(标记)。

## 参 考 文 献

- [1] FRANZ, A., KÖNIG, F., SKOLKA, A., SPERR, W., BAUER, P., LUCAS, T., WATTS, D. C. and SCHEDLE, A., Cytotoxicity of resin composites as a function of interface area, *Dent. Mater.*, 23, pp.1438-1446, 2007
  - [2] HANKS, C. T., DIEHL, M. L., CRAIG, R. G., MAKINEN, P. L. and PASHLEY, D. A., Characterization of the "in vitro pulp chamber" using the cytotoxicity of phenol, *J. Oral Path.*, 18, pp.97-107, 1989
  - [3] MAGLOIRE, H., JOFFRE, A. and BLEICHER, F., An in vitro model of human dental pulp repair, *J. Dent. Res.*, 75, pp.1971-1978, 1996
  - [4] MURRAY, P. E., LUMLEY, P. J., ROSS, H. F. and SMITH, A. J., Tooth slice organ culture for cytotoxicity assessment of dental materials, *Biomaterials*, 21, pp.1711-1721, 2000
  - [5] SCHMALZ, G., GARHAMMER, P. and SCHWEIKL, H., A commercially available cell culture device for dentin barrier tests, *J. Endod.*, 22, pp.249-252, 1996
  - [6] SCHMALZ, G. and SCHWEIKL, H., Characterization of an in vitro barrier test using a standard toxicant, *J. Endod.*, 20, pp.592-594, 1994
  - [7] SCHUSTER, U., SCHMALZ, G., THONEMANN, B., MENDEL, N. and METZL, C., Cytotoxicity testing with three-dimensional cultures of transfected pulp-derived cells, *J. Endod.*, 27, pp.259-265, 2001
  - [8] WENNBERG, A., HASSELGREEN, G. and TRONSTAD, L., A method for toxicity screening of biomaterials using cells cultured on millipore filters, *J. Biomed. Mater. Res.*, 13, pp.109-120, 1979
  - [9] OUTHWAITE WC, MCKENZIE DM, PASHLEY DH. A versatile split-chamber device for studying dentine permeability. *J Dent Res.*, pp.53:1503, 1974
  - [10] PASHLEY DH, NELSON R, PASHLEY EL. In-vivo fluid movement across dentine in the dog. *Arch Oral Biol.*, 26, pp.707-710, 1981
  - [11] PASHLEY DH, ANDRINGA HJ, DERKSON GD, DERKSON ME, KALATHOOR SR. Regional variability in the permeability of human dentine. *Arch Oral Biol.*, 32, pp.519-523, 1987
  - [12] PASHLEY DH. Dentine permeability: theory and practice. In: *Experimental endodontics*. [M]. Spangberg LSW, editor. *Experimental endodontics*. Boca Raton, CRC Press Inc., pp.19-49, 1990
  - [13] PASHLEY DH. Dentine permeability, dentine sensitivity and treatment through tubule occlusion. *J. Endod.*, 12, pp.465-474, 1986
-

中华人民共和国医药  
行 业 标 准  
口腔医疗器械生物学评价  
第 18 部分：牙本质屏障细胞毒性试验  
YY/T 0127.18—2016

\*

中国标准出版社出版发行  
北京市朝阳区和平里西街甲 2 号(100029)  
北京市西城区三里河北街 16 号(100045)

网址 [www.spc.net.cn](http://www.spc.net.cn)

总编室：(010)68533533 发行中心：(010)51780238

读者服务部：(010)68523946

中国标准出版社秦皇岛印刷厂印刷  
各地新华书店经销

\*

开本 880×1230 1/16 印张 1 字数 26 千字  
2017 年 1 月第一版 2017 年 1 月第一次印刷

\*

书号：155066·2-31124 定价 24.00 元



YY/T 0127.18-2016