ICS 11.040.99
CCS C 35

中国医疗器械行业协会
China Association for Medical Devices Industry

团　　体　　标　　准

T/CAMDI 122—2023

3D 生物打印肿瘤模型的通用要求

General requirements for 3D-bioprinted tumor model

全国团体标准信息平台

2023-12-31 发布　　2023-12-31 实施

中国医疗器械行业协会　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　3D 生物打印肿瘤模型建立的一般流程 2
5　3D 生物打印肿瘤模型的药物敏感性检测 3
6　3D 生物打印肿瘤模型的药物敏感性检测报告 4
7　数据管理 4
8　废弃物管理 4
参考文献 5

全国团体标准信息平台

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。

本文件由中国医疗器械行业协会增材制造医疗器械专业委员会提出并归口。

本文件起草单位：中国医学科学院北京协和医院、中国医学科学院生物医学工程研究所、清华大学、宁波长都生物科技有限责任公司、上普博源(北京)生物科技有限公司。

本文件主要起草人：毛一雷、杨华瑜、黄鹏羽、庞媛、余剑伟、毛双双。

本文件指导专家：卢秉恒、戴尅戎、王迎军、杨华勇、冷劲松、孙伟（组长），陈晓峰，曹晓东，尹俊，周长春，张开泰，游正伟，边黎明，刘媛媛，刘纯，马少华，张雪莉，袁朦。

本文件首次发布于 2023 年

全国团体标准信息平台

引　言

临床前肿瘤模型作为一种可靠的工具，在肿瘤机制研究、临床前抗肿瘤药物的评价等方面发挥着不可替代的作用。3D 生物打印技术通过对载细胞的生物墨水进行三维成型，可提供三维空间架构和适宜的细胞微环境，已逐渐成为组织工程领域的重要工具。

3D 生物打印肿瘤模型被认为是体外肿瘤模型构建的有效方案之一。目前已广泛应用在如消化系统肿瘤 (如肝细胞癌，肝内胆管癌，胆囊癌，结直肠癌，胃癌，胰腺癌) ，呼吸系统肿瘤 (如肺癌) ，口腔肿瘤 (如口腔鳞状细胞癌) ，女性生殖系统肿瘤 (如卵巢癌，宫颈癌)等癌种。

3D 生物打印技术的应用需要严格的质量控制和高水平的技术水准，目前国内尚无有关 3D 生物打印肿瘤模型的规范化文件。因此，本文件为 3D 生物打印体外肿瘤模型的规范化建立和应用提供必要的指导，对推动肿瘤基础研究、个体化精准治疗等领域具有重要意义。

本文件是由从事 3D 生物打印肿瘤模型体外构建的专家组基于该技术目前的发展现状而制定。为了不阻碍技术的发展和创新，本文件的条文在一些领域未做规定。企业可根据具体实际情况，对本文件的适用条文加以应用。本文件在有些方面还不完善。随着知识更新和技术发展，将有可能需要进行进一步的修订。

全国团体标准信息平台

3D 生物打印肿瘤模型的通用要求

1 范围

本文件规定了 3D 生物打印肿瘤模型的通用要求。

本文件适用于基于 3D 生物打印构建的肿瘤模型，以用于肿瘤基础研究、肿瘤分子亚型诊断、抗肿瘤药物的敏感性检测等方面。药物敏感性检测可以包括并不限于化疗药物、靶向药物、免疫药物及新药候选化合物；可以对单一药物进行检测，也可以对药物组合进行检测。

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 19489 实验室 生物安全通用要求

GB 39707 医疗废物处理处置污染控制标准

GB/T 38736 人类生物样本保藏伦理要求

GB/T 42060-2022《医学实验室--样品采集、运送、接收和处理的要求》

药物临床试验质量管理规范(GCP)

中华人民共和国药典

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

3D 生物打印 3D bioprinting

将生物材料和/或生物单元 （细胞/细胞团簇/类器官/蛋白质/DNA 等）按仿生形态学，生物体结构或细胞特定环境等要求用“三维打印”的技术手段制造出具有功能化的体外三维生物模型，应用于再生医学，癌症治疗，新药研发等。

3.2

3D 生物打印肿瘤模型 3D bioprinted tumor model

利用 3D 生物打印技术生成的用于研究肿瘤生物学、发展机制以及评估抗肿瘤药物疗效的实验系统，具有可以模拟肿瘤特性、实用性、可操作性和可重复性等特点。

3.3

生物墨水 bio-ink

一种适用于生物制造技术的细胞与载体材料组合配方。

3.4

半数抑制浓度 IC50

半数抑制浓度 (或称半数抑制率) 是物质抑制特定生物或生化功能的效力的量度，表明需要多少特定的抑制物质 (例如药物) 才能体外抑制 50%给定生物过程或生物成分。

4 3D 生物打印肿瘤模型建立的一般流程

4.1 签署知情同意书

在采样前应根据采样的方式常规签署样本采集的知情同意书，样本采集后检测单位（医疗机构或第三方检测单位）应和患者签署 3D 生物打印肿瘤模型进行药物敏感性检测的相关知情同意书。知情同意应按照 GB/T 38736 人类生物样本保藏伦理要求 进行规范。

知情同意内容至少应包括：

(a) 3D 生物打印肿瘤模型建立的过程及成功率；

(b) 药物敏感性检测所检测的药物种类；

(c) 肿瘤组织样本的利用以及剩余肿瘤样本的处理，充分保障患者的隐私信息及生物信息安全；

(d) 3D 生物打印肿瘤模型的药物敏感性检测结果仅对临床治疗提供参考建议，具体实际用药及治疗方案应根据临床实际情况决定；

(e) 药物敏感性检测的收费标准及耗时；

(f) 参与药物敏感性检测的人员等。

4.2 肿瘤组织采集与送检

组织样本的采集应当符合 GB/T 42060-2022《医学实验室--样品采集、运送、接收和处理的要求》的相关要求，部分细节略有不同。

(a) 尽可能多采集肿瘤细胞含量高的肿瘤组织，剔除冗余以及活性不佳的组织，保留活性良好的组织。

(b) 采集的肿瘤组织样本应尽快置于专用样本保存液中，减少暴露在空气中的时间，在低温 (推荐 4 ℃) 下 2 小时以内运转至检测单位。

(c)做好采集信息的登记，并和组织细胞提供者的资料一起保存、归档管理，便于进行追溯。

(d) 样本运输过程应注意防震、防摔和防泄漏，保护样本不发生外源性污染的同时，避免样本运输过程中对环境造成生物污染。

4.3 3D 生物打印肿瘤模型构建、培养、鉴定

以下所有操作均在无菌环境中进行。

4.3.1 样本组织的清洗

在预冷的含抗生素的磷酸盐缓冲液 (Phosphate buffer saline, PBS) 中使用灭菌的手术器械去除样本中的脂肪组织、结缔组织、坏死和钙化组织。将样本分为以下几部分：组织病理染色和诊断（建议约 0.5 cm^3），全外显子测序（WES，建议约 0.3 cm^3），以及 RNA 测序（RNA-seq，建议约 0.3 cm^3），消化（剩余部分，建议约 3 cm^3）。随后将消化部分放入离心管，加入含抗生素的 PBS 进行洗涤。洗涤次数应不少于 3 次，每次洗涤时间应不少于 1 min。

4.3.2 样本组织的消化以及细胞悬液的制备

将肿瘤组织分离为细胞悬液，可取悬液置于镜下观察，建议形成 3-10 个细胞的细胞团时停止。计算细胞数，建议得到的细胞浓度为 5×10^6/ml 以上。

4.3.3 3D 生物打印肿瘤模型的构建

根据不同癌种、同一癌种不同类型或不同转移部位等选择合适的 3D 生物打印方式。以目前应用较多的基于挤出的 3D 生物打印为例。将肿瘤细胞（目前较为稳定的模型体仅包含单一的肿瘤细胞，不含间质细胞等）与生物材料混合成生物墨水，将配制好的生物墨水移至螺口注射器中，装配口点胶针头，放置于冰箱至生物墨水凝胶形成以备打印。上述生物墨水成凝胶状后装置于 3D 生物打印机中，温度平衡后检查确定挤出的生物墨水为均匀丝滑的凝胶，根据癌种、生物墨水的体积和种类等选择合适的打印条件（如温度、是否开启紫外光等）及模型种类（如逐层网格状）和大小（如 5mm × 5mm × 1.0mm）

进行打印。根据选择生物墨水的不同选择合适的交联方式（如紫外光照射或氯化钙浸泡等），洗涤后加入培养基，于细胞培养箱培养。

4.3.4 3D 生物打印肿瘤模型的培养

3D 生物打印肿瘤模型构建后在培养板上标记样本编号、打印体编号、代数、操作日期、操作人等信息，置于培养箱内于 37℃ 、5%的 CO2 浓度条件下培养。培养过程中应密切观察模型的生长状态，根据癌种不同，选择对应肿瘤的培养基，每隔 2-3 天更换培养基。通过计数活细胞和死细胞数量来计算细胞活力。对肿瘤模型状态进行密切观察，把控扩增时机。

4.3.5 3D 生物打印肿瘤模型的鉴定

3D 生物打印肿瘤模型的鉴定至少应包括以下方面：

(a)染色体核型

按照《中华人民共和国药典》检验，应为 46，XX 或 46，XY。

(b)肿瘤标志物的鉴定

将 3D 生物打印肿瘤模型分离成单细胞悬液，并采用荧光抗体标记细胞。建议采用流式细胞仪分析被荧光抗体标记的细胞比例。宜采用人成纤维细胞或间充质干细胞作为阴性参考品。

(c)基因表达变化及基因突变分析

建议使用全外显子测序分析、RNA 测序分析等技术手段对 3D 生物打印肿瘤模型的基因突变及基因表达变化分析。

(d)组织细胞的形态结构观察

在三维培养条件下，用显微镜进行观察。或将 3D 生物打印肿瘤模型铺于载玻片上，用显微镜进行观察。

(e)细胞存活率

采用 Calcein AM 和 PI 染色法或使用 CCK8 法检测细胞的存活率。建议细胞存活率在 90%以上模型构建成功率较高。

(f)肿瘤组织模型的 H&E 和免疫组化染色

将 3D 生物打印肿瘤组织模型与原始肿瘤组织的 H&E 和免疫组化染色对比，观察其在形态结构及肿瘤特异性生物标记物表达的拟合度。

5 3D 生物打印肿瘤模型的药物敏感性检测

(a) 在肿瘤模型的快速生长期内进行药物敏感性实验。

(b) 加药前用显微镜观察每孔样本状态，剔除异常孔，并在显微镜下拍照。

(c) 实验设置阴性对照组，空白组，药物测试组。根据不同的 3D 生物打印肿瘤模型合理设计药物浓度梯度、测试的复孔数等。建议在培养第 6-10 天时进行药敏试验，在新鲜的培养基中按设置的梯度加入测试的药物，在加药后第 1 天和第 2 天分别更换新鲜的包含测试药物的培养基，在加药后第 3 天进行细胞活力测试。

(d) 加药后第 3 天取出培养板，在显微镜下拍照。

(e) 建议通过使用 CellTiter-Glo® 3D 细胞活力分析试剂盒检测细胞存活率。使用具有检测化学发光功能的多功能酶标仪进行化学发光检测。

(f) 待检测完成后，导出数据，做好标记。剔除孔需做好标记并标注原因。

(g) 样本孔 ATP 浓度计算：将药物测试孔与对照孔发光均值代入标准曲线，得到 ATP 浓度值。

(h) 相对肿瘤抑制率计算：

$$\text{相对抑制率} = \frac{\text{药物测试孔ATP浓度}}{\text{对照孔ATP浓度}} \times 100\%$$

(i) 药物半数抑制浓度 (IC50) 计算：根据药物不同浓度下的相对抑制率，拟合量效曲线计算该药物的 IC50 值。

(j) 药敏结果的判定：根据 IC50 值判定药物的敏感性结果。

6 3D 生物打印肿瘤模型的药物敏感性检测报告

药物敏感性检测结束后，检测机构以纸质版或电子版报告形式将检测报告发送给患者或其医师。检测报告中应当明确展示出 3D 生物打印模型建立及使用的全过程，至少应包括肿瘤模型显微镜图片、肿瘤模型特征分析、药物敏感性曲线、用药前后对比图等。

7 数据管理

宜结合 3D 生物打印肿瘤模型的使用目的制订数据管理规范，至少应包括取样登记信息，组织细胞提供者的资料、肿瘤模型建立及鉴定、药敏检测结果等数据内容及保存时间、数据管理与使用的权限及责任。详细的临床样本数据管理可参照《药物临床试验质量管理规范》 (GCP)中的数据管理部分内容。

8 废弃物管理

在组织样本获取、3D 生物打印肿瘤模型培养、药物敏感性测试等操作过程中产生的生物医学废弃物， 应按照 GB 19489 中 7.19 和 GB/T 38736 中 3.1 的要求，遵循《医疗废物管理条例》丢弃到指定地点 妥善处置。对于使用过的 3D 生物打印肿瘤模型或不合格的 3D 生物打印肿瘤模型须严格按照生物样本处置 与管理规范操作。

全国团体标准信息平台

参考文献

[1]T/CAMDI 095—2022 基于增材制造的皮肤修复产品的通用要求

[2]20214638-T-469　单细胞测序样本采集与处理规范

[3]孙铭浩,杨华瑜,孙乐家等.3D 生物打印肿瘤模型诊治平台质量控制标准[J/OL].肿瘤:1-11[2023-11-21].

[4]Mao S, He J, Zhao Y, Liu T, Xie F, Yang H, Mao Y, Pang Y, Sun W. Bioprinting of patient-derived in vitro intrahepatic cholangiocarcinoma tumor model: establishment, evaluation and anti-cancer drug testing. Biofabrication. 2020 Jul 29;12(4):045014.

[5]Sun H, Sun L, Ke X, Liu L, Li C, Jin B, Wang P, Jiang Z, Zhao H, Yang Z, Sun Y, Liu J, Wang Y, Sun M, Pang M, Wang Y, Wu B, Zhao H, Sang X, Xing B, Yang H, Huang P, Mao Y. Prediction of Clinical Precision Chemotherapy by Patient-Derived 3D Bioprinting Models of Colorectal Cancer and Its Liver Metastases. Adv Sci (Weinh). 2023 Nov 16:e2304460.

[6]Neufeld L, Yeini E, Pozzi S, Satchi-Fainaro R. 3D bioprinted cancer models: from basic biology to drug development. Nat Rev Cancer. 2022 Dec;22(12):679-692.

[7]Xie F, Sun L, Pang Y, Xu G, Jin B, Xu H, Lu X, Xu Y, Du S, Wang Y, Feng S, Sang X, Zhong S, Wang X, Sun W, Zhao H, Zhang H, Yang H, Huang P, Mao Y. Three-dimensional bio-printing of primary human hepatocellular carcinoma for personalized medicine. Biomaterials. 2021 Jan;265:120416.

全国团体标准信息平台