

ICS 11.040.40
CCS C 35

T/CSBM

团 体 标 准

T/CSBM 0029—2022

用于关节软骨组织修复或再生的
植入性医疗器械体内评价

Standard guide for in vivo assessment of implantable devices intended to
repair or regenerate articular cartilage

2022-04-12 发布

2022-10-01 实施

中国生物材料学会 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 缩略语	2
5 基本要求	2
6 动物模型	2
6.1 概述	2
6.2 关节大小和载荷选择	2
6.3 动物性别与年龄	3
6.4 研究周期	3
6.5 动物模型特点	3
7 缺损部位	4
7.1 股骨髁	4
7.2 滑车沟	4
7.3 胫骨平台	5
8 缺损类型、植入物固定和关节制动	5
8.1 软骨缺损和骨软骨缺损	5
8.2 微骨折	5
8.3 植入物固定	5
8.4 关节荷载和制动	5
9 试验过程	5
9.1 植入物的制备	5
9.2 缺损的构建	5
9.3 植入物的植入和固定	6
9.4 恢复和管理	6
9.5 生存期	6
9.6 动物尸检	6
10 结果与分析	6
10.1 影像学检查	6
10.2 大体评价	8
10.3 组织学和免疫组织化学评价	8
10.4 生物化学分析	9
10.5 修复组织的力学测试	9
10.6 统计分析	10
附录 A (资料性) 软骨大体观评分系统	11
参考文献	12

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。

本文件由中国生物材料学会提出。

本文件由中国生物材料学会团体标准化技术委员会归口。

本文件起草单位：国家药品监督管理局医疗器械技术审评中心、四川大学、北京大学第三医院运动医学研究所、中国人民解放军总医院、上海交通大学第九人民医院、华南理工大学、上海瑞金医院、浙江大学、北京大学、华中科技大学、北京积水潭医院、浙江星月生物科技股份有限公司。

本文件主要起草人：樊渝江、余家阔、郭全义、秦安、徐昕荣、曹晓东、任力、邓廉夫、欧阳宏伟、葛子钢、张胜民、孙磊、刘斌、李晓云、滕颖影、林海、刘舒云、赵洪石。

本文件首次发布。

用于关节软骨组织修复或再生的植入性医疗器械体内评价

1 范围

本文件规定了用于修复或再生关节软骨的植入性医疗器械体内评价的通用方法。本文件中的植入性医疗器械可由天然或合成生物材料（具有生物相容性和生物可降解性），或其复合物构成，可含有细胞或生物活性成分，如生长因子、合成肽、质粒或cDNA等。

本文件包括了多种动物模型的描述及基本原理，如兔、犬、猪、山羊、绵羊，并简要描述和提供了相关组织学、生物化学分析和力学评价等方法。

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/T 16886.1 医疗器械生物学评价 第1部分：风险管理过程中的评价与试验

YY/T 0606.10-2008 组织工程医疗产品 第10部分：修复或再生关节软骨植入物的体内评价指南

YY/T 1445 组织工程医疗器械产品术语

YY/T 1636 组织工程医疗器械产品 再生膝关节软骨的体内磁共振评价方法

3 术语和定义

YY/T 0606.10-2008和YY/T 1445界定的以及下列术语和定义适用于本文件。

3.1

软骨再生 *cartilage regeneration*

具有与天然软骨相似的形态学、组织生物化学和力学特性的关节样软骨的形成过程。

[来源：YY/T 0606.10-2008，定义3.1]

3.2

软骨修复 *cartilage repair*

受损的软骨或其替代物通过细胞增殖和新细胞外基质合成的愈合过程。

[来源：YY/T 0606.10-2008，定义3.2]

3.3

纤维性软骨 *fibrocartilage*

软骨基质中含有大量平行或交织排列的胶原纤维束，其化学成分为I型胶原蛋白的软骨组织，无定型基质很少，软骨细胞常成行分布于纤维束之间。

[来源：YY/T 0606.10-2008，定义3.3]

3.4

透明关节软骨 *hyaline articular cartilage*

位于关节表面的软骨组织，软骨基质的主要成分是水和蛋白多糖，纤维主要是由II型胶原蛋白组成的胶原原纤维，软骨细胞位于软骨陷窝内。

[来源：YY/T 0606.10-2008，定义3.4]

4 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

MRI: 磁共振成像 (Magnetic Resonance Imaging)

GAG: 糖胺聚糖 (Glycosaminoglycan)

TSE: 快速自旋回波 (Turbo Spin Echo)

GRE: 梯度回波 (Gradient-Recalled Echo)

CT: 电子计算机断层扫描 (Computed Tomography)

Micro-CT: 微计算机断层扫描 (Micro Computed Tomography)

EDTA: 乙二胺四乙酸 (Ethylene Diamine Tetraacetic Acid)

5 基本要求

本文件使用者应按照GB/T 16886.1的要求，在做本文件所述的体内评价前，进行材料和/或器械的细胞毒性和生物相容性试验。

注1：对于特定的产品，本文件中所建议的某些方法可能不完全适用时，可根据技术发展现状，结合国内外相关指南进行个案分析。

注2：动物模型结果并不一定能完全预示人体使用结果，所以应谨慎解释其在人体的适用性。

6 动物模型

6.1 概述

6.1.1 本章提供了在确定合适的动物模型、关节软骨缺损大小和部位等方面的考虑点，详见表1。

6.1.2 本文件中涉及的动物研究应符合伦理和福利的要求。

表1 软骨组织修复评价的动物模型

种属	常用品种	成年年龄	成年体重, kg	常用缺损部位	股骨髁关节软骨厚度, mm	关键/临界缺损大小(直径), mm
兔 ^a	新西兰白兔	9个月	3~4	股骨髁、滑车沟、胫骨平台、髌骨	0.25~0.75	5
犬 ^b	比格犬、混种犬	1年~2年	15~30	股骨髁、滑车沟、髌骨	1.3	6
猪 ^b	小型猪	10个月~12个月	20~40	股骨髁、滑车沟	-	6
山羊 ^b	山羊、西班牙山羊、奶山羊、波尔山羊	2年~3年	40~70	股骨髁、滑车沟、胫骨平台、髌骨	1.5~2.0	6
绵羊 ^b	绵羊、萨福克羊、德克塞尔羊	2年~3年	35~80	股骨髁、滑车沟	1.7	7
注：“-”指尚无相关数据。						
^a 小型动物。						
^b 大型动物。						

6.2 关节大小和载荷选择

6.2.1 人体透明关节软骨损伤常发生在膝关节，主要在内侧部分（如股骨内髁和胫骨平台）。因此，宜在动物模型中选择膝关节评价软骨修复/再生。

6.2.2 不同种属的动物在重量、关节解剖和步态方面有显著差异，具有不同的关节力学。这些因素影响了关节软骨的厚度和分布、关节基质的大分子物质含量、分布和胶原结构等。上述环节在关节软骨疾病或损伤反应中起着重要作用。宜仔细考虑适于植入物阶段的动物模型。

6.2.3 应选择合适的动物和关节部位，尤其是关节面和关节软骨厚度应选择适于进行对预期在人体使用的配方、设计、尺寸和配套使用器械等的充分研究和优化，其中：

- 较大的动物具有更大的关节软骨表面积和厚度，更接近人体情况，更适于关节软骨修复研究；
- 较大的缺损通常需要某种方式的固定以保护植入物，减少植入物脱位。植入物的固定方法可能对缺损周围宿主组织和修复有不利影响。小型动物通常不需要固定，通过小型动物试验结果预测在需要固定的大型动物和人体试验的结果时，需要注意试验中植入物设计的不同之处。

6.2.4 对每种动物而言，关键大小的缺损定义为动物不经干预不能修复的最小尺寸（直径）的缺损。每种动物的关键缺损的大小通常不同，应在设计植入物大小和固定方法时仔细考虑。

6.2.5 力学载荷影响关节软骨修复。在力学生物学因素中，间歇性静水压力和剪切应力在调控软骨发育、滋养以及关节退化等方面起着重要作用。力学载荷大小或作用时间对植入物、植入部位周围原有关节软骨及其下骨组织的影响随解剖位置和关节部位而变化，因此，选择用于评价植入物的缺损部位时应体现力学载荷对植入物的影响：

- 当分析植入部位在站立和运动中的受力状况时，应考虑每一种属动物的步态和姿态；
- 股骨髁、滑车沟和胫骨平台，以及同一关节面不同解剖部位的受力状态和强度显著不同；
- 由于动物跑动、跳跃、关节过度伸展或屈曲而使植入物受到过度和迅速变化的应力，会导致试验结果变异性增加，应采取措施减少导致快速和/或过度关节运动的行为或其他因素。

6.3 动物性别与年龄

6.3.1 由于血液循环中类固醇对软骨、骨代谢和再生的影响，应考虑试验动物的性别。不应使用妊娠和哺乳期的动物。试验动物性别宜一致。

6.3.2 在生长过程中，骨和关节处于代谢和重塑的动态变化中，由于存在这些生理过程对组织修复的影响，因此试验中每种动物的年龄应超过骨骼成熟年龄。试验动物应骨骼闭合。每种动物骨骼成熟情况有所不同，需要时可考虑放射显影确定。

6.3.3 年龄较大的动物更有可能发生骨质减少和退行性关节病，如骨关节炎，关节软骨修复能力下降。故除非这些情况对植入的预期目的具有重要意义，应避免使用过老的动物。

6.3.4 间充质干细胞池、生长因子反应性和细胞代谢活性通常随年龄的增加而降低。因此，取决于宿主细胞数量和活性的修复过程在更老的动物可能会有一定影响。

6.4 研究周期

6.4.1 研究周期取决于植入物发展阶段、动物种属、缺损大小以及植入物组成和设计。

6.4.2 小型动物模型植入 6 周~12 周的小缺损可提供植入物和固定器械的存留时间，以及修复类型等信息。

6.4.3 大型动物模型 8 周~12 周的研究应仅限于提供生物相容性、早期细胞反应以及缺损内植入物的存留和状况等方面的信息。

6.4.4 在形态学和组织生物化学检测结果的基础上判断关节软骨修复或再生程度通常需要 6 个月~12 个月的研究。

注：形态学和组织生物化学检测结果包括邻近软骨和软骨缺损下骨界面，及相对的软骨部位。

6.5 动物模型特点

6.5.1 兔模型

6.5.1.1 与大型动物相比, 兔模型通常更为经济。

6.5.1.2 由于兔关节软骨表面积小和厚度薄, 缺损的大小受限, 缺损内植入物的固定方法的评估较难实施。

6.5.1.3 兔模型适于评价生物相容性、材料配方及植入物基本设计筛选等。兔股骨髁和滑车沟是最常使用的植入物评价部位, 髌骨的使用也有相关研究。

6.5.1.4 通常, 兔关节软骨的修复速率、类型和程度较大型动物更为显著, 这可能与其具有更高的新陈代谢活性及缺损部位旁多能干细胞的密度有关。

6.5.2 犬模型

犬膝关节表面为中等大小, 介于兔和成年绵羊之间。犬滑车沟和股骨髁可作为植入物评价部位。

6.5.3 猪模型

猪胫骨关节角的解剖不同于其他许多四足动物, 其活动范围减小。猪股骨髁可用作植入物评价部位。

6.5.4 绵羊模型

6.5.4.1 绵羊股骨髁通常用作植入试验部位。

6.5.4.2 在正常活动范围内, 股骨髁和胫骨平台的接触发生在胫骨平台的尾侧。胫股关节活动度为 $72^\circ \pm 3^\circ$ (完全屈曲) 到 $145^\circ \pm 5^\circ$ (完全伸展)。

6.5.4.3 在使用绵羊模型的某些研究中观察到手术后组织钙化。

6.5.5 山羊模型

6.5.5.1 由于山羊后腿膝关节的尺寸、关节软骨厚度, 以及易于获得和处理等特点, 山羊代表了关节软骨修复研究中一类良好的动物模型。山羊股骨髁和滑车沟最常用作植入试验部位, 也有报道使用胫骨平台和髌骨等表面。

6.5.5.2 在正常活动范围内, 股骨髁和胫骨平台的接触发生在胫骨平台的尾侧, 胫骨关节活动范围与绵羊相似。与绵羊相比, 通常认为山羊对人为手术干预耐受性好。在纳入试验组前, 每只山羊应通过山羊脑炎的血液筛选。

7 缺损部位

7.1 股骨髁

植入物所用的缺损根据动物大小可在直径 $2\text{ mm} \sim 15\text{ mm}$, 深度 $1\text{ mm} \sim 10\text{ mm}$ 的范围内变化。通常, 缺损不应超过关节面积的 $15\% \sim 20\%$, 或髁宽度的 $50\% \sim 60\%$ 。由于股骨髁的凸出形貌, 缺损的深度从中心到边缘可能有不同。要根据股骨髁上缺损的位置考虑关节连结, 包括半月板和胫骨平台的作用, 特别在休息体位时。

7.2 滑车沟

可将滑车沟作为承受不同于股骨髁的载荷和剪切力的评价部位。为达到此部位, 在制造缺损前可能需要髌骨脱位。滑车沟关节软骨的厚度通常较同一动物股骨髁的薄, 植入物原型设计应考虑这一因素。由于滑车沟的凹陷, 缺损的深度可能随缺损大小和在滑车沟内的位置 (壁或底部) 变化。应注意滑车沟关节表面的头侧和尾侧 (近端和远端) 力学载荷的差异, 以及这些差异对修复的影响。

7.3 胫骨平台

胫骨平台在一些试验中有应用。由于存在股骨髁、半月板和交叉韧带带来的手术入路困难，使其较少使用。

8 缺损类型、植入物固定和关节制动

8.1 软骨缺损和骨软骨缺损

8.1.1 通过使用合适的器械，可移除软骨和骨组织，而不过多损伤周围组织，形成全层或部分厚度的软骨或全层和跨骨的骨软骨缺损。

8.1.2 对于软骨缺损，可使用环钻或磨钻，但应小心避免移除或损伤软骨下骨组织。应小心选择磨钻的转速和压力，因为可能产生过多热量引起周围组织的热坏死。另外，也可使用刮除术移除软骨直至软骨下骨组织，首先用活检打孔器形成一致的缺损轮廓，然后用小的骨刮匙移除软骨。

8.1.3 应注意软骨厚度和软骨下骨板厚度均存在变化。试验者在决定深度时应考虑这一变化，以获得一致的软骨缺损或骨软骨缺损。应形成垂直于关节表面的缺损。

8.1.4 在一个关节表面可形成多个缺损以评价一个以上的植入物。然而，应考虑多个缺损的大小和位置，以及对周围组织的影响。试验应包括阴性对照和其他对照。

8.1.5 过度的关节软骨损伤可增加慢性滑膜炎的风险。同一关节软骨上过大或过多的缺损而致的力学载荷不稳定分布可能会损害周围软骨组织，从而影响植入物性能评价。

8.2 微骨折

可利用缺损底部软骨下骨板的微骨折，达到出血。应使用合适的器械产生一致的骨穿透部位，尽量减少对软骨下骨板的过度损害。软骨下骨组织对微骨折的反应包括不同程度的吸收（骨溶解）。影响骨溶解的因素包括骨损伤程度、力学载荷、滑膜液和植入材料的降解产物等。

8.3 植入物固定

根据缺损大小、部位、动物种属等，选择合适的植入物固定方法来防止过度运动和/或脱位。固定方法应能反映在站立和运动中的受力状况。应考虑固定对周围组织和植入物性能的短期和长期影响。

8.4 关节荷载和制动

应考虑动物的关节解剖、关节大小、动物的步态等确定合适的制动方法。可在术后使用夹板、外固定器械和石膏减少关节运动和载荷。在确定制动期限时，应考虑废用性萎缩和可能的负面结果对关节软骨的影响。在人体和动物关节软骨损伤后，连续的主动活动对再生过程有一定益处。在动物模型试验中相似的治疗方式可行性低，未被广泛接受。应考虑石膏和夹板带来的相关术后护理问题。应有合格的兽医日常检查动物，以便发现任何大体畸形和关节制动带来的动物过度不适症状。

9 试验过程

9.1 植入物的制备

所有动物植入试验的材料应按GB/T 16886.1的要求进行生物相容性评价。植入物组分可经灭菌处理或无菌制备，或应用已知适于植入物组分和功能的方法进行终末期灭菌处理。

9.2 缺损的构建

应检测关节和滑膜液是否有不可接受的病理学改变。缺损的大小应一致。应在钻孔过程中和钻孔后冲洗缺损，以降低热量和在植入前除去存留的骨和软骨微粒。为降低热坏死所致的组织损伤，应使用速度不超过500 r/min的电动磨钻。钻头的设计要能减少钻孔中的可能移动。可使用穿透关节软骨层的套管以使钻孔居中，减少钻孔过程中的偏心移动。移除软骨直至软骨下板产生软骨缺损时不应引起出血。穿透软骨下板产生骨软骨缺损时一般将出现随深度变化的骨性表面点状出血。推荐在植入物植入前，用止血海绵控制严重出血。出血的程度在动物种属和试验组间会有明显差异。手术操作期间，应以无菌生理盐水保持关节面润湿，防止脱水。

9.3 植入物的植入和固定

植入物应以标准的可重复操作的方式植入。应小心确保缺损周围关节组织不被过度损伤。植入物应在周缘与缺损的垂直壁接触，对于全厚缺损在底部与骨接触。如果使用组织瓣（如骨膜），应以对邻近和相对的关节软骨损伤最小的方式固定在原有软骨上。植入物放置的深度应使其关节面和周围关节表面充分匹配（平齐）。滑膜腔的缝合应尽量降低关节表面的缝线摩擦。

9.4 恢复和管理

设计的恢复条件应减少应力和过度运动的可能性。对于山羊、绵羊，推荐使用可减少过度活动的恢复性围栏2天至3天。应经常监测动物，并记录观察结果以确保合适的健康和生理状态。在将试验动物放归更大的种群时，应有兽医证实动物的健康状况。

9.5 生存期

与标准的敷料相比，夹板能减少关节运动和载荷，然而在选择治疗时间的长短时应考虑废用性萎缩和其可能的不利结果对关节软骨的影响。在研究中推荐用影像学来评价植入物的放置。在恢复后，大型动物应继续留在保护性围栏至少9天。其后动物可在围栏或种群中放养。针对任何大体畸形和不适表现，兽医应常规检查动物。

9.6 动物尸检

9.6.1 动物应根据相应的管理办法和条例的可行规范以人道方式实施安乐死。

9.6.2 应进行动物尸检以确定关节是否有可能影响研究结果的任何大体畸形。大体评估应包括：

- a) 膜液颜色和数量，以及关节腔面外观的描述；
- b) 原有关节软骨的外观（是否存在原纤维形成）；
- c) 周围骨的外观（是否存在骨赘）；
- d) 修复部位组织颜色和数量的描述（包括表面外观和结构），植入物的整合程度。

注：推荐按照ASTM F561的要求获取活检标本。

9.6.3 应沿着周围的软骨和骨组织取出植入物，也可收集与植入部位直接相对的关节面周围软骨和其下的骨组织（数量标准化）。

9.6.4 应将取材组织放置在符合形态学（脱钙石蜡或不脱钙塑料包埋）、组织生物化学或生物力学测试等检测方法要求的溶液中。应获取若干标准部位的滑膜组织以评估微粒摄取，以及微粒引起的细胞聚集等。

10 结果与分析

10.1 影像学检查

10.1.1 方法选用依据

以下评价方法可根据需要选用。

10.1.2 MRI 评价

10.1.2.1 建议进行术前及术后数据采集工作, 以便于后续对比分析。同时可考虑进行 MOCART 评分评估或做横向弛豫时间图 (T2 mapping) 分析。

10.1.2.2 可应用 MRI 检查显示关节软组织病变, 以观察关节腔内关节滑液、关节软骨、及关节周围软组织层次。T2 mapping 主要反应软骨内胶原的含量、构象及水的含量的变化; 磁共振软骨延迟增强成像 (dGEMRIC) 根据软骨内负电荷密度成像间接反映软骨组织中的 GAG 含量。

10.1.2.3 关于动物软骨磁共振成像多选择以下几种实验动物:

——新西兰兔软骨厚度小于 1 mm, 虽然可在 3.0 T 成像, 但成像时间长, 对线圈要求较高, 推荐采用专用动物实验线圈成像;

——羊、猪与犬膝关节软骨厚度尚可, 可在 3.0 T 磁共振采用腕关节线圈或膝关节线圈成像。

10.1.2.4 不同动物的 MRI 扫描条件会不相同, 不同场强 MRI 设备的评估参数也不尽相同。体内磁共振评价方法可参考 YY/T 1636 方法进行。以新西兰兔膝关节的尺寸和其特定特征为例, 使用特定设备、场强和特定新西兰兔的前提下 MRI 对软骨和软骨下骨的评估条件:

a) 在使用 3.0 T MRI 成像系统时, 通过 T1 加权像、T2 加权像和质子密度加权像评估软骨或骨软骨损伤区的组织修复、周边组织反映、关节积液和关节内其他组织情况, 扫描参考参数如表 2;

表2 3.0 T MRI 成像扫描参考参数

成像序列	图像方向	重复时间, ms	回波时间, ms	视野, mm	翻转角, °	层厚, mm	距离因子, %	矩阵	带宽, Hz/pixel
脂肪饱和T2加权TSE成像	矢状面	2 000	72	70	150	2	10	256×256	199
质子加权TSE成像	矢状面	2 000	36	70	150	2	10	256×256	199
3D T1加权GRE成像	矢状面	26	4.6	60	25	1	20	512×256	200

注: 不同设备的参数可视情况调整。

b) 使用 9.4 T 高分辨率磁共振按 3D-FLASH 成像扫描序列进行检测, 扫描参考参数如表 3。

表3 9.4 T 高分辨率磁共振扫描参考参数

成像序列	重复时间, ms	回波时间, ms	翻转角, °	视野, mm	矩阵	带宽, kHz
3D-FLASH成像	48	6.22	10	35×25.6×25.6	350×256×128	30

注: 不同设备的参数可视情况调整。

10.1.3 X-射线评价

可用X-射线显示关节的骨性结构。一般是通过观察关节间隙有无狭窄及狭窄程度、骨赘形成情况、骨质表面是否光滑及修复区的软骨下骨整体改变等来判断关节软骨是否有缺损, 对早期关节疾病进行预测诊断。

10.1.4 高频超声评价

高频超声能用于检测关节积液增多、滑膜增厚, 以及软骨损伤并判定其程度。

10.1.5 CT 关节造影

定量检测关节软骨内GAG含量的变化及分布,以此来判断关节软骨的损伤程度,此方法对软骨完整性检查的敏感性和特异性都较高。

10.1.6 Micro-CT 评价

10.1.6.1 可对关节间隙、骨赘进行更准确的定量评估。尤其是对软骨缺损修复模型的软骨下骨反应性改变进行定量评估,对骨软骨缺损模型的软骨和软骨下骨修复情况及对周边软骨下骨影响进行定量评估。

10.1.6.2 当软骨损伤至软骨下骨时,需进行骨重建评估。骨重建评估至少应包含表4所列参数。

表4 骨重建评估参数

参数	单位
相对骨体积分数 (BV/TV)	%
骨小梁数量 (Tb. N)	1/mm
骨小梁厚度 (Tb. Th)	μm
软骨板厚度	μm

10.2 大体评价

10.2.1 观察膝关节有无积液、积液颜色变化、透明度及粘稠度等表现;滑膜颜色及质地有无改变,有无水肿、充血及增生等表现;内外侧髁关节面颜色、有无粗糙表现、增生、是否生产骨赘等变化。

10.2.2 应沿周围的软骨和骨组织取出植入物,以确定关节内是否存在任何可能影响研究结果的大体观的异常。大体评价内容应参照本文件9.6动物尸检要求进行,可按照软骨大体观评分系统进行评分(参见表A.1)。

10.2.3 也可收集与植入部位直接相对的关节面周围软骨和其下的骨组织。

10.3 组织学和免疫组织化学评价

10.3.1 一般要求

10.3.1.1 组织学和免疫组织化学评价用于评估缺损内组织再生或修复的程度和质量。

10.3.1.2 组织切片应连续切割和染色,以便评估组织质量和检测GAG。

10.3.1.3 标准染色包括但不限于:苏木精和伊红、番红-O、甲苯胺蓝、苯胺蓝和/或改良三色染色、魏格特氏染色。

10.3.1.4 免疫组织化学分析如:II型胶原染色、I型胶原染色、X型胶原染色、蛋白聚糖。

10.3.2 显微镜分析和评分

10.3.2.1 针对包含骨和软骨组织的样本,应通过脱钙处理,用化学或物理方法去除组织内的磷酸钙和碳酸钙,再进行切片。

10.3.2.2 脱钙有多种方法,为保证能顺利切片,保持染色对比鲜明,并尽可能保存抗原,应根据处理组织的类型、要求以及允许脱钙的时间进行选择,其中:

——硝酸脱钙:速度很快,但细胞核不容易上色,对抗原也影响较大;

——EDTA、电解等方法染色鲜艳,对抗原保存好,但脱钙时间较长。

10.3.2.3 组织切片制作方法主要有石蜡切片和冰冻切片两种:

——石蜡切片可以保持组织细胞的形态结构,且容易存放在室温;

——冰冻切片不经过脱水而快速冷冻，组织保持原有的韧性，切片顺畅，对组织处理均匀一致性好，组织结构清晰，核质染色对比好，并且冰冻切片染色是在新鲜组织上进行，组织着色更鲜明。但需保存在-80 °C 的低温冰箱中。

10.3.2.4 可采用恰当的如表 A.1 所列的软骨大体观评分系统评价软骨的修复程度。为评价植入器械同时修复软骨和软骨下骨的性能，可使用 Wakitani 或 O'Driscoll 等组织学评分系统进行组织学评价来确定以下各项：

- a) 缺损部位内和周围的透明软骨与纤维软骨质量；
- b) 表面外观和与天然软骨的连续性；
- c) 修复软骨与天然骨和软骨的结合程度；
- d) 软骨下骨重建质量；
- e) 细胞形态；
- f) 固定装置周围组织质量。

10.3.2.5 组织形态学分析可用于测量组织学参数，如厚度、整合度、细胞数量和表面质量。

10.3.2.6 由于修复组织的生化成分和组织随着时间的推移可能发生变化，因此低于 6 个月的时间点不一定能够反映长期结果。

10.3.2.7 短期组织学评估可用于筛选和优化，而长期评估应基于组织学、生物化学和可能的力学检测。

10.4 生物化学分析

10.4.1 正常的透明关节软骨主要由 II 型胶原和蛋白多糖组成。修复组织中蛋白质和蛋白多糖的生化定量分析，与天然软骨对比，可提供有关修复程度和质量的有用信息。

10.4.2 应使用已确立的方法来检测胶原蛋白类型和蛋白聚糖含量。推荐将生物化学分析和形态学评价相结合来比较结果：

- a) 对新生的组织用 GAG 试剂盒对修复组织中的蛋白多糖进行定量；
- b) 对新生的组织中的羟脯氨酸含量进行定量检测进一步检测其胶原含量；
- c) 也可对新生组织的其它蛋白进行定量分析。

10.4.3 通常，如果缺乏良好的组织学结果，生物化学组分的测定不能保证评价的正确性。

10.5 修复组织的力学测试

10.5.1 在人体中，关节软骨是一种具有各向异性、分层特性和非均一性的结构材料，其功能的实现高度取决于其粘弹性。当前的生化测定方法并不足以确定关节软骨的力学性能。

10.5.2 建议经修复/再生软骨的力学性能用固相特性：聚集模量 (HA)、泊松比 (v)、渗透率 (k)、动态刚度 (1 Hz) 来表征。

10.5.3 进行限制性压缩蠕变和周期性加载—卸载来测定组织的聚集模量 (HA)、渗透性 (k) 和动态刚度 (1 Hz)。可参考 Mow 所述方法进行。

注：周期性加载—卸载频率为 1 Hz。

10.5.4 也可用有孔压痕器的蠕变压痕试验来测定聚集模量 (HA)、渗透性 (k) 和泊松比 (v)。蠕变压痕测试时，将试验曲线与能体现相应天然软骨压痕蠕变特定的理论 (模型) 曲线相比较，组织工程软骨的压痕蠕变曲线应与理论 (模型) 曲线相似。

10.5.5 以新西兰兔修复软骨的压缩模量测定为例，使用不同方法测得的数值不同，经以下两种常用的方法评估后，需要达到的参考值如下：

- 如果使用生物纳米压痕仪，软骨有效弹性模量 (压缩) 为 1.8 MPa~2.5 MPa；
- 如果使用纳米原位测量仪，软骨折合模量 (压缩) 为 10.0 MPa~15.0 MPa。

10.5.6 对于修复手术时所用植入物的力学特性要求，不一定要求植入物本身的力学性能达到周围软骨

或骨软骨的力学性能，因为修复完成以后，这些性能会改变。当然，如果刚刚植入时植入物的力学性能匹配性很好，会提供对再生软骨的早期的支撑，对修复有利。

10.6 统计分析

统计分析应该计算各个类别的平均值和标准偏差以及每个分级样本的总分。费舍尔精确检验(Fisher exact test)、卡方检验(chi-square test)或克鲁斯卡尔-沃利斯检验(Kruskal-Wallis test)(一种单因素非参数方差分析)可用于组间差异比较。

附录 A
(资料性)
软骨大体观评分系统

表A.1 软骨大体观评分系统

评分标准		分值
缺陷修复程度	与周围软骨平齐	4
	75%填充缺损	3
	50%填充缺损	2
	25%填充缺损	1
	0%填充缺损	0
与周围组织整合程度	与周围组织完全整合	4
	分离边界<1 mm	3
	3/4整合, 1/4分离边界>1 mm	2
	1/2整合, 1/2分离边界>1 mm	1
	与周围组织整合<1/4	0
宏观的外表	完整光滑的表面	4
	纤维化的表面	3
	少数小的, 散乱的裂纹	2
	多数小的裂纹或少数大的裂缝	1
	缺损区完全降解	0
总分	I级: 正常	12
	II级: 基本正常	11~8
	III级: 异常	7~4
	IV级: 严重异常	3~1

参 考 文 献

- [1] 中华人民共和国药典
 - [2] ISO 13019-2018 组织工程医疗产品 用于评价软骨形成的硫胺多糖 (sGAG) 的定量测定 (Tissue-engineered medical products -- Quantification of sulfated glycosaminoglycans (sGAG) for evaluation of chondrogenesis)
 - [3] ASTM F2451-2010 用于修复或再生关节软骨的可植入装置的体内评定指南(Standard Guide for in vivo Assessment of Implantable Devices Intended to Repair or Regenerate Articular Cartilage)
 - [4] ASTM F561-05 植入医疗器械和相关组织、体液的取材和分析规范 (Standard Practice for Retrieval and Analysis of Medical Devices, and Associated Tissues and Fluids)
 - [5] S. Wakitani, K. Imoto, T. Yamamoto, M. Saito, N. Murata and M. Yoneda. 2002. Human autologous culture expanded bone marrow mesenchymal cell transplantation for repair of cartilage defects in osteoarthritic knees. *Osteoarthritis and Cartilage*. 10, 199–206.
 - [6] Amu Kawaguchi, Hiroyuki Nakaya, Takahiro Okabe, Keiji Tensho. 2009. Blocking of tumor necrosis factor activity promotes natural repair of osteochondral defects in rabbit knee. *Acta Orthopaedica*. 80 (5) :606–611.
 - [7] O'Driscoll, S. , R. Salter, and F. Keeley. 1985. A Method for Quantitative Analysis of Ratios of Types I and II Collagen in Small Samples of Articular Cartilage. *Analytical Biochemistry* 145:277–285.
 - [8] Mow, V. C. ;Kuei, S. C. ;Lai, W. M. ;and Armstrong, C. G. 1980. Biphasic creep and stress relaxation of articular cartilage in compression Theory and experiments. *J Biomech Eng*, 102(1) : 73–84.
 - [9] Mak AF, Lai WM, Mow VC. 1987. Biphasic indentation of articular cartilage. I Theoretical analysis *J Biomech*. 20:703–14.
 - [10] Mow VC, Gibbs MC, Lai WM, Zhu WB, Athanasiou KA. 1989. Biphasic indentation of articular cartilage II. A numerical algorithm and experimental study. *J Biomech*. 22, 853–61.
-