



中华人民共和国医药行业标准

YY/T XXXXX—XXXX

组织工程医疗器械 脱细胞基质材料质量评价和质量控制通用要求

Tissue engineering medical devices — General requirement for quality evaluation and quality control of dECM materials

(点击此处添加与国际标准一致性程度的标识)

(征求意见稿)

(本草案完成时间：2023 年 9 月)

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

国家药品监督管理局 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 略缩语	2
5 细胞及其残留物特征属性的选择	2
6 dECM 完整性表征	3
7 加工试剂残留	5
8 脱细胞过程控制	5
附录 A（规范性） 检测项目与方法	7
参考文献	10

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这些专利的责任。

本文件由国家药品监督管理局提出。

本文件由全国外科植入物和矫形器械标准化技术委员会组织工程医疗器械产品分技术委员会（SAC/TC110/SC3）归口。

本文件起草单位：中国食品药品检定研究院、陕西佰傲再生医学有限公司、北京瑞健高科生物科技有限公司、烟台正海生物科技股份有限公司、中国科学院过程工程研究所、空军军医大学。

本文件主要起草人：

引 言

生物组织由细胞和细胞外基质（Extracellular Matrix, ECM）组成。利用物理、化学、生物等不同脱细胞技术，从动物或人的组织中去掉细胞和抗原等成分，所制备的脱细胞基质（decellularized ECM, dECM）材料在再生医疗领域已得到广泛应用。dECM材料在植入或放置于损伤部位时通常会经历或诱导宿主组织的建设性再生与重建。在植入物诱导的组织再生与重建过程中免疫系统识别外来物质，可能会引起移植部位非预期的炎症和免疫反应，从而导致慢性炎症、纤维化及钙化等，无法实现理想的组织修复。

通过脱细胞去除、破坏细胞，在保留细胞外基质结构或成分的同时，降低宿主免疫风险。但是彻底的脱细胞在产生有益效果的同时，可能会对ECM的主要成分、组织结构和生物力学等造成影响。因此，脱细胞产品在生产中的主要目标是保持组织完整性的同时不会引起不良免疫反应，实现预期用途。细胞成分的残留和ECM完整性（主要成分和结构）构成dECM材料的主要质量属性。当dECM材料直接用于终产品时，物理测试项目的选择宜结合临床预期应用场景确定，如机械性能，热分析和降解性能等。这些材料的物理性能可以反映dECM结构和成分变化，从而用于分析对预期使用性能的影响。使用性能（功能）测试，还宜包括在模拟使用场景下测试dECM材料。脱细胞处理时，在加工、清洗过程中试剂的残留或副产物的产生等，与产品质量和安全性密切相关，因此，试剂残留作为重要的质量属性也应进行评价和控制。本文件旨在通过评价脱细胞效果、对dECM材料的潜在影响，及试剂残留控制来评估脱细胞工艺的有效性和工艺稳定性，从而实现质量评价和控制的目的。

作为医疗器械产品初始材料的脱细胞基质，虽然进行了脱细胞有效性和dECM完整性质量评价及脱细胞工艺控制，但是，由这类脱细胞基质制备的产品还需要进行系统的安全性和有效性评价。常规的生物相容性评价可参考GB/T 16886系列标准，以及YY/T 0771系列标准。由dECM材料制备的成品宜结合其临床预期用途在相关模型中进行临床前评价，该模型宜能够代表产品预期所经历的生物学反应，以确保最终材料的功能符合预期用途。一般使用体内模型（缺损或损伤部位的原位植入动物模型），但适当时也可选择细胞或体外模型。

组织工程医疗器械 脱细胞基质材料质量评价和质量控制通用要求

1 范围

本文件给出了用于医疗器械产品初始材料的脱细胞基质质量评价和质量控制,包括细胞及其细胞残留物、细胞外基质结构及其完整性和试剂残留控制的通用要求及测试方法。

本文件适用于哺乳动物组织来源的脱细胞基质材料。

本文件不适用于提纯的特定细胞外基质成分或其他部分的分离成分,如细胞外基质蛋白或胶原蛋白等。

注1:脱细胞基质结构形态发生显著变化时,可参考本文件的适用条款。

注2:来源于人的组织,或者非哺乳动物组织,或者体外培养组织的脱细胞基质材料可参考本文件所提供的框架,但存在部分内容不适用或部分内容超出本文件的范围。

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 5009.6 食品中脂肪的测定

GB/T 16886 医疗器械生物学评价

YY/T 0771.1 动物源医疗器械 第1部分:风险管理应用

YY/T 0771.2 动物源医疗器械 第2部分:来源、收集与处置的控制

YY/T 1445 组织工程医疗器械产品 术语

YY/T 1453 组织工程医疗器械产品 I型胶原蛋白表征方法

YY/T 1561 组织工程医疗器械产品 动物源性支架材料残留 α -Gal抗原检测

YY/T 1562 组织工程医疗器械产品 生物材料支架 细胞活性试验指南

YY/T 1571 组织工程医疗器械产品 透明质酸钠

YY/T 1616 组织工程医疗器械产品 生物材料支架的性能和测试指南

YY/T 1805.3 组织工程医疗器械产品 胶原蛋白 第3部分:基于特征多肽测定的胶原蛋白含量检测液相色谱-质谱法

YY/T 1810 组织工程医疗产品 用以评价软骨形成的硫酸糖胺聚糖(sGAG)定量检测

YY/T 1876 组织工程医疗产品 动物源性生物材料DNA残留量测定法:荧光染色法

《中华人民共和国药典》

3 术语和定义

YY/T 1445 界定的以及下列术语和定义适用于本文件。

3.1

组织 tissue

来源相同、功能相关的细胞借细胞间质按一定方式结合在一起并发挥特定功能的细胞群体。

[来源:YY/T 1445-2016, 3.5]

3.2

脱细胞 decellularization

从生物材料中去除细胞和细胞成分,同时保持细胞外基质材料的组成特性和/或关键结构的过程。

[修改ASTM F 3354-2019, 3.1.1]

3.3

细胞外基质 extracellular matrix, ECM

存在于组织中，由细胞合成并分泌至胞外的成分。

注：包括纤维性成分（胶原蛋白、弹性蛋白和网织蛋白）、连接蛋白（纤维粘连蛋白、层粘连蛋白）和空间填充分子（主要为糖胺聚糖）等，其对细胞增殖和分化发挥重要调节作用。

[来源：YY/T 1445-2016, 3.44]

3.4

脱细胞基质 decellularized extracellular matrix, dECM

经去除细胞和细胞成分，同时保持细胞外基质材料的组成特性和/或关键结构的生物材料。

3.5

表面活性剂 detergent

一种双亲性化合物，包括疏水性和亲水性的，能够溶解疏水性、亲水性及双亲性材料，可降低水溶液的张力，溶解/游离脂膜、细胞膜等。

[来源：ASTM F 3354-2019, 3.1.3]

4 略缩语

下列缩略语适用于本文件。

dECM: 脱细胞基质 (decellularized extracellular matrix)

ECM: 细胞外基质 (extracellular matrix)

H&E: 苏木精和伊红 (Hematoxylin and Eosin)

ELISA: 酶联免疫吸附试验 (enzyme linked immunosorbent assay)

IHC: 免疫组织化学 (Immunohistochemistry)

IF: 免疫荧光 (Immunofluorescence)

FACE: 荧光团辅助碳水化合物电泳 (Fluorophore assisted carbohydrate electrophoresis)

DMMB: 1,9-二甲基-亚甲基蓝 (1,9-dimethyl-Methylene blue)

SEM: 扫描电子显微镜 (Scanning Electron Microscope)

TEM: 透射电子显微镜 (Transmission Electron Microscope)

CT: 计算机断层扫描 (computed tomography)

BCA: 双茛二酮酸测定法 ((bicinchoninic acid))

DAMPs: 损伤相关小分子物质 (Damage Associated Molecular Pattern Molecules)

MHC: 主要组织相容性复合体 (major histocompatibility complex)

DNA: 脱氧核糖核酸 (deoxyribonucleic acid)

HMGB1: 高迁移率族蛋白B1 (High Mobility Group Box 1)

ATP: 三磷酸腺苷 (Adenosine triphosphate)

5 细胞及其残留物特征属性的选择

5.1 概述

细胞及细胞内容物残留既是 dECM 材料引起异种免疫原性风险的重要因素，也是 dECM 材料重要的质量属性。细胞残留物对宿主反应的影响不能归于单一的机制；多种可能的相关机制会影响最终产物及其在体内的最终表现。因此，宜全面了解脱细胞工艺对 ECM 性能的影响，以及这些影响的一致性。

根据细胞和细胞残留物相关属性，宜对代表性细胞核组分、细胞膜组分和代表性细胞内分子进行测定并确定可接受标准。根据特定 dECM 产品的预期用途确定每个脱细胞特征属性的验收指标。如果现有的数据不足以提供方法的基本原理和验收标准，可以依靠 dECM 特征结合临床前或临床试验结果，回顾性定义验收标准，用于质量评价和质量控制。宜至少包括以下指标：

- a) 代表性的细胞核成分 (DNA 定量) + DNA 片段分析；
- b) 代表性的细胞膜成分 (Gal 抗原定量，磷脂质定量)；
- c) 代表性的细胞内分子 (β -Actin 定量)。

除上述典型指标以外，细胞内容物残留作为脱细胞的其他特征参数（质量属性）见附录A，表A.1，附加的质量属性指标见附录A，表A.2。鼓励生产商根据产品的组织来源、生产工艺和预期用途，在充分风险分析的基础上进行选择。本文件中推荐的属性以及可能与产品的预期用途相关的内容，并不限制其他所包含的内容，同时也不限制其他可能的适用于产品的属性以及未提到的检测方法。

5.2 测试项目及其方法

5.2.1 概述

宜对所有的脱细胞方法进行适当的验证。对于定量检测，宜包括加标回收率研究和方法学验证，以确认样品制备和检测方法的灵敏度。由于材料特性可能在脱细胞过程中发生改变，测试方法的验证宜包括脱细胞前的原ECM材料，作为参考比较分析dECM质量属性。对代表性成分进行测定，更详细内容见附表A.1，宜同时设置可接受标准。推荐这些属性用于评估细胞和细胞内容物的去除效率；但只能用于评估脱细胞的效果和质量属性，并不能直接评价终产品安全性或其他相关性能。

5.2.2 代表性细胞核成分

即使DNA残留与免疫反应没有特异性的联系，DNA的定量和在材料中的分布已被广泛应用于细胞残留的测定，同时结合DNA片段长度分析，可以作为所有核物质的代表，也可以作为脱细胞效果的衡量标准。

按照YY/T 1876进行DNA定量检测和DNA片段长度分析。DNA片段长度分析可反映DNA的破坏和去除作用。不同的脱细胞机制可能产生相同的DNA测定结果，但可有不同的片段分布。小于200 bp的DNA片段被认为容易被生物环境降解。

5.2.3 代表性细胞膜组分

组织中残存的 α -Gal抗原，存在引起急性和慢性的免疫排斥反应风险。因此， α -Gal抗原残留量的检测可作为脱细胞去除抗原工艺的有效性评价指标之一，也是脱细胞基质类材料的重要质量属性。按照YY/T 1561进行定量检测。

注：同种异体脱细胞材料不含 α -Gal抗原，可选择MHC I/II 免疫组化分析。

常用的磷脂检测方法为钼蓝比色法，也有测量与脂类结合的胆碱基团。在人类血清磷脂中发现的胆碱基团的比例是一致的，并且可以假定在任何物种和器官中都是一致的。因此当使用胆碱特异性反应报告测量结果时，应将结果标记为“含胆碱的磷脂”。组织中磷脂的提取技术各不相同，但通常取决于细胞裂解和膜的溶解，包括使用洗涤剂、酒精、氯仿、组织均质化和超声。可以使用磷脂检测试剂盒测定从组织中提取的磷脂含量。剩余的磷脂可能只有部分进入溶液，特别是当提取缓冲液类似于脱细胞试剂时，在这些情况下，将首选正交提取试验法。

5.2.4 代表性细胞内分子

细胞内分子的定量或分布也可以作为脱细胞工艺的另一种评估手段。例如， α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA)或 β -肌动蛋白(β -Actin)在真核细胞中普遍存在，可以作为整个细胞内成分残留的代表性标记物。其他可能表明来自细胞成分的残留，如波形蛋白，通常是间充质细胞的细胞骨架特有的。细胞内分子的定量或分布检测方法推荐采用通用的免疫技术，其中蛋白定量采用ELISA或液相-质谱法，蛋白分布采用IHC或IF。

注：上述分子的残留与临床应用中的实际风险相关性尚不明确，宜结合其他安全性有效性评价进行分析。

6 dECM 完整性表征

6.1 dECM 完整性特征属性的选择

推荐将主要dECM成分设定为典型属性，包括胶原蛋白和糖胺聚糖，并设置可接受标准。其他属性见附录A，表A.3。同时可自行决定将附加推荐的属性作为dECM完整性验收标准，见附录A，表A.4。虽然还有很多潜在的生物分子可能被认为对特定的预期用途具有重要的功能，但本文件不提供该类生物分子的清单。

根据dECM完整性的相关属性、特定dECM产品的预期作用及原ECM材料期望的特性和可接受的变化，对与ECM完整性相关的每个测量属性确定验收标准，以确保最终产品的一致性。当现有数据或指导文件

没有提供验收标准的基本原理时，来自dECM的数据特征描述，结合证明安全性和/或有效性的临床前或临床试验，可依靠基于这些回顾性表征数据的范围设置接受标准。包括但不限于以下指标：

- a) 总蛋白和胶原蛋白定量，如适用可增加胶原分型定量；
- b) 总糖定量；
- 注：如适用（在结构完整性上发挥重要作用时），可增加糖胺聚糖（或sGAG定量）和透明质酸定量分析；
- c) 如适用（如脱细胞神经），应进行脂质定量；
- d) 可溶性蛋白定量；
- e) 如适用，应进行生物分子定量（如 SIS 含有生长因子）。

6.2 dECM 主要成分测定

6.2.1 总则

一般情况下，测定ECM成分的方法需要通过酶或其他的方法消化ECM材料。ECM的主要成分通常包括：胶原蛋白、糖胺聚糖、弹性蛋白和可溶性蛋白。

进行ECM的主要成分测定时，宜通过加标回收试验研究，评估样品制备和试验方法的灵敏性。例如在脱细胞过程中和样品制备中使用的试剂的干扰。对于原ECM和dECM的测试分析，所有的测量方法都宜采用标准化方法或经过适当的方法学验证。

对于不用于再细胞化或其他体外预处理的dECM产品，dECM完整性验收标准通常会反映最终产品的一部分技术要求的内容，特别是ECM材料的预期功能方面。宜根据工艺分析的结果考虑进一步分析ECM成分、分子结构和宏观结构在产品成型工艺过程的改变或破坏。工艺过程如脱细胞、病毒灭活工艺中化学试剂的使用以及终产品的终端灭菌工艺，都有可能对ECM结构或功能的改变，宜进行相应的表征和分析。

6.2.2 总蛋白

总蛋白含量测定可参考《中国药典》四部通则0731。

6.2.3 胶原蛋白

胶原蛋白含量可通过定量测定羟脯氨酸含量进行间接定量，具体参照YY/T 1453。羟脯氨酸含量在总胶原蛋白中的比例因受动物种属、月龄等影响而不同，建议参考相同动物种属和相似月龄动物的羟脯氨酸含量比的文献数据（8%~12%或者9%~13%）进行胶原蛋白含量计算。

由于ECM成分中的弹性蛋白也含有一定比例的羟脯氨酸，因此，任何使用羟脯氨酸法测定胶原蛋白含量的方法都应考虑弹性蛋白中的羟脯氨酸。

通过天狼星红染色可以观察胶原分子排列和纤维直径。

胶原类型特异性分析方法：

——色谱/质谱法：参照YY/T 1805.3 进行胶原类型特异性测定。

——单克隆抗体法：无论是成分定量还是局部分布走向定位，都可以采用商品化单克隆抗体进行胶原类型的区分，通过ELISA方法实现定量；通过IHC或IF方法实现定性分布表征。

6.2.4 总糖

总糖含量测定可参考YY/T 1453。

6.2.5 糖胺聚糖和蛋白聚糖

——总GAG含量：通过测定糖醛酸(20)进行定量，糖醛酸与氨基糖一起组成了GAG双糖。分光光度法测定硫酸糖胺多糖(sGAG)的含量，推荐用1,9-二甲基-亚甲基蓝(DMMB)测定法，参照YY/T 1810。

注：上述GAG检测不包括广泛分布的GAG透明质酸。

——阿利新蓝染色法：用于硫酸酸化GAG和透明质酸的染色。通过预降解特异性GAGs可以增加特异性。

——Movat五色染色法：也可以使用，但多种染色剂的存在可能会干扰目标糖胺多糖识别水平。

6.2.6 透明质酸

透明质酸含量测定可参考YY/T 1571或ELISA法。

6.2.7 脂质

总脂肪残留量检测可参考GB 5009.6。

6.2.8 可溶性蛋白

可溶性蛋白可通过BCA法，Lowry法和Bradford法进行测定，使用牛血清白蛋白作为对照品。为了模拟生理环境，建议使用中性pH值和生理渗透性的浸提缓冲液，如生理盐水或磷酸盐缓冲液进行浸提。浸提条件参照GB/T 16886.12进行，为保证dECM中可溶性蛋白充分释放到浸提液中，宜将dECM材料适当剪碎后再进行浸提。

6.2.9 生物分子释放图谱

dECM产品可能包含在植入物或放置时释放的可溶性生物分子，或者在植入物或放置时溶解并随后释放的生物分子，从而增强或削弱产品的功能。

生物分子释放的评价参考ASTM F3142，可以用酶或不用酶进行。ASTM F3142中列出的一些原则一般适用于所有成分测试和胶原酶敏感性测试。

7 加工试剂残留

7.1 概述

任何脱细胞试剂都应尽可能地从dECM中去除，以防止产品使用时的毒性风险，并确保试剂不干扰产品性能。根据已知的人类毒理学数据，结合预期临床使用的形式、使用量和时间等确定可接受的限量。或者根据检测数据的范围，结合临床前试验和临床试验研究的安全性和有效性结果，回顾性追溯，确定可接受标准。

7.2 试剂残留检测方法

对于具有不可接受毒性风险的任何试剂残留都应建立残留量检测方法，规定可接受限量。当残留试剂干扰最终产品的预期性能时，宜建立检测方法，对其进行控制。以下是常见试剂及其检测方法示例。

——阴离子洗涤剂（如SDS）：通过亚甲蓝分光光度法进行检测，参考GB/T 39302。

——Triton X-100：通过液相色谱法进行检测。

——DNA酶：通过DNA酶谱检测和测量。DNA酶活性或含量可参考GB/T 34801或液相-质谱联用。功能评估残留DNA酶，可通过Ames试验或参考GB/T 16886.3。

其他试剂残留可根据需要部分参考中国药典中的方法。

8 脱细胞过程控制

8.1 过程描述

脱细胞过程控制是dECM材料质量控制的关键。完善的脱细胞过程描述有助于对工艺的分析，一般包括工艺流程图、工艺规程以及对脱细胞过程的每一步的描述。脱细胞工艺步骤描述应包括步骤目标、一般程序、所用材料和设备、持续时间或终点测定、静态工艺参数，以及任何可能随原ECM材料特性、尺寸或数量缩放的可变参数。测试和检验程序说明简要识别程序、目的和验收标准。

8.2 工艺流程分析

基于以下每一个脱细胞工艺步骤的分析进行脱细胞过程控制和dECM质量控制。

- a) 细胞破坏的机制和潜在的风险；
- b) 细胞残核去除的机制及失败的可能性；
- c) 细胞残留改变的机制；
- d) 潜在ECM损伤或改变的机制；
- e) ECM去除机理；
- f) 试剂和其他工艺材料的引入和去除，以及材料/试剂残留的可能性；
- g) 潜在污染源。

8.3 工艺参数和工艺过程控制

8.3.1 过程参数和过程控制的目的是确定始终能产生令人满意的输出的受控过程。一般确定的工艺参数和开发过程控制详见《医疗器械生产质量管理规范现场检查指导原则》中设计开发章节。脱细胞工艺步骤的工艺参数和过程控制宜特别考虑 8.2 中考虑的机制。

8.3.2 对于使用化学或生化试剂的工艺步骤，试剂混合物的组成、试剂纯度、使用试剂混合物的量或速率，以及接触或应用的时间应控制在有效的限度内。

8.3.3 应充分防止或监测污染、温度漂移、试剂不合格、设备故障和操作人员错误的风险。

8.3.4 对原 ECM 和 dECM 材料的关键特征属性进行表征。包括以下考虑：

a) 材料特征概述

- 1) 原 ECM 和 dECM 材料的表征通常涉及平行阵列测试。将 dECM 材料变化与原 ECM 变化的可追溯性和结果直接进行比较并分析，通常是有意义的。
- 2) dECM 表征结果可用于定义脱细胞可接受标准，并通过临床前研究证明可接受性。
- 3) 原 ECM 和 dECM 的特性应包括从选择的所有相关 dECM 属性的测试，并可附加包括用于信息或监管目的的测试。
- 4) 在特定的情况下，建议通过组织学或其他二维（2D）和三维（3D）技术分析 ECM 结构。脱细胞过程中的因素可能会影响 ECM 材料发生结构的化。一个完整的 ECM 加入其它试剂时，由于扩散导致混合或渗透受限，结构分析（如组织学和显微镜）可能会识别空间不一致，从而影响评估脱细胞过程中的结果。

b) dECM 可变性

对于所有特征属性的测试，建议识别引起变化的因素，以便实施适当的来源或过程控制，提高产品的一致性。可变性的来源将取决于具体的供应商和采购方式，可能的来源因素如下：

- 1) 动物品种；
- 2) 供者年龄；
- 3) 供给部位；
- 4) 动物饲养，饲料限制与护理；
- 5) 动物采集的时间/气候；
- 6) 药物/特殊治疗；
- 7) 性别；
- 8) 健康指标；
- 9) 细胞系传代（年龄）；
- 10) ECM 收获终点；
- 11) 收获细胞系遗传变异性；
- 12) 细胞培养。

ECM 变异性的许多因素可能无法实际识别或控制，而将导致明显的随机变异。虽然鼓励描述对 dECM 产品属性的所有重要影响，但宜优先考虑可能在脱细胞结果中产生瞬态（例如，批与批或月与月）变化的因素。

附录 A
(规范性)
检测项目与方法

细胞内容物残留作为脱细胞的推荐特征参数见附录 A, 表 A. 1, 附加的质量属性指标见附录 A, 表 A. 2。鼓励生产商根据产品的组织来源、生产工艺和预期用途, 在充分风险分析的基础上进行选择。

DAMPs主要包括DNA、RNA、HMGB1、ATP、腺苷、低分子量透明质酸、硫酸肝素和S100蛋白家族, 这些分子在脱细胞后可能仍留在ECM中, 可能引发免疫反应。例如高迁移率族蛋白B1 (HMGB1) 是一种高度保守的核蛋白, 胞核中HMGB1的主要生物学功能是与DNA结合。推荐采用通用的免疫技术, 其中蛋白定量采用ELISA, 蛋白分布采用IHC或IF。蛋白质组学方法可获得总体蛋白质组成概况, 结合去除高丰度蛋白的两步分析法, 可以有效分析DAMPs。

表 A. 1 细胞结构成分和细胞残留——推荐的特征属性和检测方法

特征属性描述	代表性目标分子	常用的检测方法
DNA 定量	DNA	Hoechst 染色、draq5 染色、Quantifluor (微型荧光计)、PicoGreen 荧光染料法
核分布染色	细胞核	H&E 染色、DAPI 染色、Feulgen 染色
α -Gal	定量	ELISA 法
	定位 (分布)	IHC 或 IF
细胞膜成分定量分析	磷脂质	总磷含量测定、胆碱检测
	膜蛋白	ELISA、质谱-液质联用
细胞内分子定量	α -平滑肌肌动蛋白 (α SMA)、 β -肌动蛋白、波形蛋白	ELISA、质谱-液质联用

表 A. 2 细胞结构成分和细胞残留——推荐的附加特征属性和检测方法

附加表征属性	代表性目标分子	常用的检测方法
DNA	定位 (分布)	H&E 染色、Feulgen 染色、DAPI 染色、Hoechst 染色、draq5 染色
	片段长度分析	琼脂糖凝胶电泳
细胞膜成分	定位 (分布)	IHC 或 IF (如 MHC I)
损伤相关的分子 (DAMPs)	低分子量透明质酸、硫酸乙酰肝素定量	荧光团辅助碳水化合物电泳 (FACE)
	蛋白质定量	ELISA
	蛋白质定位 (分布)	IHC 或 IF

评价dECM的完整性主要是对材料的结构以及成分进行表征和分析，宜包括ECM主要组分，以及任何次要组分或具有重要功能的非组分性质，主要反映保留ECM结构完整性的程度和一致性。

dECM完整性评价主要取决于脱细胞基质类产品的预期用途，宜包括其他特征属性，如结构表征、细胞与dECM的相互作用评价、生物分子释放特性和材料物理性能测试，分析对ECM完整性的影响及其这些对预期使用性能影响的预测。推荐的特征属性和测试方法见附录A, 表A. 3。

表 A. 3 ECM 完整性——推荐的特征属性和测试方法

特征属性描述	典型的代表性分子	常见的测试方法
胶原蛋白定量	总胶原蛋白	羟脯氨酸定量法
		特征多肽法
糖胺聚糖定量	总糖胺聚糖	T/对二甲胺基苯甲醛
	硫酸粘多糖	间羟联苯法进行糖醛酸定量
其他主要 ECM 成分的定量	取决于产品组成	1,9-二甲基亚甲基蓝, Blyscan
		ELISA、质谱分析

制备组织工程产品的初始材料的结构性能与终产品密切相关。推荐的附加特征属性和测试方法见附录A, 表A. 4。

表 A. 4 ECM 完整性——推荐的附加特征属性和测试方法

附加特征属性描述	常见的特征模式	常见的测试方法
ECM 结构	多色染色	三色染色/ Movat' sPentachrome
	微观结构	CT, 扫描电子显微镜 (SEM), 透射电子显微镜 (TEM)
Cell-dECM 相互作用	适用于预期的应用 (例如, 迁移、粘附、收缩、代谢、增殖、表型、形态和 ECM 合成、降解或重组)	适用于预期应用的基于细胞的测定 (如单核细胞激活试验)
胶原蛋白	纤维排列和直径	偏振光显微镜, 天狼星红染色
	分型定量测定	ELISA、色谱、质谱分析
	分型定位 (分布)	IHC/IF, 二次谐波产生, 拉曼光谱
糖胺聚糖定位 (分布)	所有葡糖氨基葡聚糖	阿利新蓝或 Movat 五色染色法
	透明质酸	免疫组化/IF 或透明质酸结合蛋白
蛋白质含量	总可溶性蛋白定量	双茚二酮酸测定 (BCA), Lowry, Bradford
弹性蛋白	定量	ELISA, Fastin
-	生物分子释放分析	ASTM F3142

组织学分析是ECM材料结构分析最常用的方法。ECM主要组分的结构可通过任何一种单色或多色染色进行表征，以下是常用的染色法：

- Alcian Blue染色：用于糖胺聚糖 (GAGs) 的染色；
- Masson染色：可染色肌肉、角蛋白、胶原、骨和细胞核，其中胶原纤维呈蓝色，肌纤维呈红色；
- Movat'染色：可染色胶原蛋白、GAGs、纤维蛋白、肌肉、弹力蛋白和细胞核。

此外，当特定的ECM成分迁移或整合到提供预期使用功能的特定结构中时，宜对其进行可视化。这种可视化可以通过免疫组化、免疫荧光或类似技术实现。

——Micro CT和电子显微镜(SEM和TEM): 可用于观察微观和纳米结构(例如胶原纤维排列和周期性)以及拓扑结构, 但缺乏组织学技术的分子特异性。

——拉曼光谱: 用于成像分子特异性的表面, 二次谐波(SHG)可以提供几百微米深处的胶原结构图像。

一种dECM材料可能通过几种模式与细胞相互作用, 其中一些可能被认为对产品功能很重要, 而另一些可能对脱细胞方法很敏感。可以建立功能性体外分析方法, 表征多种细胞反应, 如迁移、粘附、收缩、代谢、增殖、表型、形态、细胞ECM的合成、降解或与dECM的整合。

参 考 文 献

- [1] 医疗器械生产质量管理规范
- [2] 动物源性医疗器械注册技术审查指导原则
- [3] 医疗器械产品技术要求编写指导原则
- [4] Aaron C. Petrey and Carol A. de la Motte. Hyaluronan, a Crucial Regulator of Inflammation, *Front Immunol*, 2014; 5:101
- [5] Albrink, Margaret J. The Choline-Containing Phospholipids of Serum. *J Clin Invest*, 1950,29(1):46-51
- [6] Barbora Zvarova, Franziska E. Uhl, Juan J. Uriarte, et al. “Residual Detergent Detection Method for Nondestructive Cytocompatibility Evaluation of Decellularized Whole Lung Scaffolds ,” *Tissue Engineering: Part C Methods*, May 2016 1;22(5): 418-428
- [7] Blumenkrantz, Nelly, and Gustav Asboe-Hansen. New method for quantitative determination of uronic acids. *Analytical biochemistry*, 1973,54 (2): 484-489
- [8] Campagnola, Paul. Second Harmonic Generation Imaging Microscopy: Applications to Diseases Diagnostics, *Anal Chem*. 2011, 83(9): 3224–3231
- [9] Derby, MA and Pintar JE. “The histochemical specificity of *Streptomyces* hyaluronidase and chondroitinase ABC.” *Histochem J*, 1978,10(5):529-47
- [10] Friedrich EE, Lanier ST, Niknam{Bienia S, et al. Residual sodium dodecyl sulfate in decellularized muscle matrices leads to fibroblast activation in vitro and foreign body response in vivo. *J Tissue Eng Regen Med*. 2018;12:e1704–e1715
- [11] Junqueira, L.C., Bignolas, G., and Brentani, R. Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection. *Histochem J*.1979; 11: 447–455
- [12] Larkin DFP, Takano T, Standfield SD, Williams KA. ExperimentalOrthotopic Corneal Xenotransplantation in the Rat – Mechanisms of Graft Rejection. *Transplantation*, 1995, 60 (5): 491-497
- [13] Michael T. Lotze, MD, Albert Deisseroth, MD, and Anna Rubartelli,MD. “FOCiS on Damage Associated Molecular Pattern Molecules,”*Clinical Immunology*, 2007,124(1): 1-4
- [14] Nele Festjens, Tom Vanden Berghe, Peter Vandenabeele. Necrosis,a well-orchestrated form of cell demise: Signalling cascades, important mediators and concomitant immune response, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1757 (2006), 1371-1387
- [15] Olson JSC and Markwell J. Assays for Determination of Protein Concentration, *Current Protocols in Protein Science*. 2007, Supplement 48, 3.4.1 – 3.4.29
- [16] P.M. Steinert and D.R. Roop. Molecular and Cellular Biology of Intermediate Filaments, *Ann Rev Biochem*, 1988, 57:593-625
- [17] Rosenthal AL, Lacks SA. Nuclease detection in SDS-polyacrylamidegel electrophoresis. *Analytical biochemistry*. 1977,80(1):76
- [18] Shibnath Ghatak, Edward V. Maytin, Judith A. Mack, et al. Roles of Proteoglycans and Glycosaminoglycans in Wound Healing and Fibrosis, *International Journal of Cell Biology*, vol. 2015, Article ID 834893
- [19] Thomas W. Gilbert, John Freund, and Stephen F. Badylak. Quantification of DNA in Biologic Scaffold Materials, *J Surg Res*, 2009,152(1): 135-139