



# 中华人民共和国医药行业标准

XX/T XXXXX—XXXX  
代替 XX/T

## 组织工程医疗器械产品 软骨支架与细胞 相互作用的评价试验

tissue engineered medical device Evaluation of the interaction between cartilage  
scaffold and cells

(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 概述 .....	1
5 细胞试验体系 .....	2
5.1 细胞 .....	2
5.2 培养基 .....	2
5.3 生物力学因素 .....	2
5.4 参考样品和对照样品 .....	2
6 细胞培养 .....	2
7 细胞迁移 .....	3
7.1 试验周期 .....	3
7.2 细胞迁移样品处理和观察 .....	3
7.3 细胞迁移距离 .....	3
7.4 试验结果 .....	3
8 细胞增殖 .....	3
8.1 试验周期 .....	3
8.2 细胞总数 .....	3
8.3 细胞活性成像分析 .....	3
9 细胞分化 .....	3
9.1 试验周期 .....	4
9.2 软骨分化基因表达 .....	4
9.3 软骨基质成分测定 .....	4
9.4 组织学分析 .....	4
附录 A (资料性) 离体动物关节骨软骨组织培养 .....	5
参考文献 .....	6

## 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归口。

本文件起草单位：

本文件主要起草人：

## 引 言

组织工程软骨支架可由胶原、聚乳酸、无机钙盐等天然生物材料、合成聚合物、无机材料等单一或复合生物材料组成，可制成海绵状膜、多孔支架、可注射凝胶等多种形式。组织工程软骨支架，可单独或与细胞联合使用，达成关节软骨缺损修复或再生。对细胞而言，软骨支架可调节外源性细胞（指与支架联合使用的细胞）和/或内源性细胞（指支架单独使用时募集的体内细胞）的生物特性（包括但不限于粘附、迁移、增殖、分化）。

软骨支架对细胞的作用是其发挥软骨修复或再生的生物学基础。这些作用的发挥有赖于软骨支架的材料特性，包括但不限于材料物理化学、形态学、表面拓扑学等特性。目前已有大量研究揭示了材料特性与软骨修复或再生的相关性，但尚未获得被临床应用所证实的、与支架软骨修复或再生具有因果相关性的材料特性。并且，软骨支架的材料特性是复杂多变的，预期通过必要、充分的软骨支架材料特性表征来预测产生的细胞生物学效应，从而获得基于细胞作用而发生的软骨修复或再生效果的保证，其合理性和可操作性等有待商榷。

因此，本文件提出在材料特性表征作为软骨支架质量控制的基础上，通过软骨支架与细胞相互作用的评价试验，获得软骨支架实际的细胞生物学效应。当所评价的细胞生物学效应涉及软骨支架修复或再生软骨的机制，并能获得定量评价数据时，可为基于细胞作用而发生的软骨修复或再生效果提供更切实的保障。然而，确定与软骨支架修复或再生软骨具有因果关系的细胞生物学机制途径具有挑战性，甚至需要临床试验结果的反馈验证。另一方面，考虑到软骨支架的材料特性是复杂多变的，在所选择的特定的材料特性表征的基础上，结合软骨支架与细胞相互作用的评价，可为软骨支架提供更进一步的质量控制。本文件给出了在设计这些细胞生物学效应评价试验时宜考虑的关键因素，以及建议的试验方法。

# 组织工程医疗器械产品 软骨支架与细胞相互作用的评价试验

## 1 范围

本文件规定了在体外检测细胞在软骨支架上增殖、迁移、分化的试验方法，本文件适用于对软骨支架与细胞作用的评价。

## 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。

YY/T 1744 组织工程医疗器械产品 生物活性陶瓷多孔材料中细胞迁移的测量方法

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 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）的定量检测

## 3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

### 3.1 支架 scaffold

由合成或天然来源的材料组成的支持物、结构成分、投送载体或基质，用于调节外源性和/或内源性细胞的生物特性（包括但不限于粘附、迁移、增殖、分化），或外源性和/或内源性细胞的转运，和/或生物活性因子的结合与转运。

### 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 1445-2016, 3.12]

### 3.3

#### 软骨再生 cartilage regeneration

具有与正常软骨相似结构与功能的组织的形成过程。

[来源：YY/T 1445-2016, 3.11]

## 4 概述

4.1 软骨支架发挥软骨修复或软骨再生作用时，依靠支架材料特性，产生细胞生物学效应是必不可少的途径。一般认为相关的细胞生物学效应包括细胞迁移、增殖、分化等方面，在评价特定的软骨支架时，宜选择合适的细胞生物学效应项目进行评价，可能不需要进行本文件所列出的所有细胞生物学效应试验。也可采用本文件未给出的细胞生物学效应试验和评价指标，但需要对所采用的细胞生物学效应试验和评价指标给出合理性说明。定量的细胞生物学效应评价试验结果对于软骨支架质量控制更有保障。

4.2 当软骨支架和细胞联合使用修复软骨缺损时，可以使用经最低程度处理的自体来源的细胞，或者使用非最低程度处理的细胞。此时细胞已经进入或分布于软骨支架内，本文件中给出的细胞迁移试验方法可能不适用。本文件的使用者可给出不进行细胞迁移评价的理由，也可设计更有针对性的、未在本文件中给出的细胞迁移评价方法。

4.3 本文件所列出的细胞生物学效应试验和可能的试验结果，尚未被证实涉及软骨支架修复或再生软骨的细胞生物学机制，即与预期的软骨修复或软骨再生的因果相关性未被证实。

## 5 细胞试验体系

### 5.1 细胞

5.1.1 软骨支架可单独用于浅表层的部分层厚软骨缺损，或限定面积的全层软骨缺损的修复。在浅表层部分缺损的软骨修复时，支架所募集的内源性细胞可能来自于滑膜、周围正常软骨等；在结合软骨下骨微骨折处理修复全层软骨缺损时，支架所募集的内源性细胞可能来自于骨髓、滑膜、周围正常软骨等。

5.1.2 当软骨支架和细胞联合使用修复软骨缺损时，可以使用经最低程度处理的自体来源的细胞（例如骨髓间充质干细胞等），或者非最低程度处理的细胞（自体培养的软骨细胞、自体来源的间充质干细胞等）。

5.1.3 在建立软骨支架与细胞相互作用的评价试验时，如果该试验不仅用于软骨支架的质量控制，还用于评价软骨支架的细胞生物学效应机制，进而预测其软骨修复或软骨再生效果时，宜考虑临床应用时的细胞相关信息来选择评价试验用细胞，宜给出选择体外评价试验用细胞的理由，规定体外评价试验用细胞的来源、类型、代次等信息，并在特定软骨支架与细胞相互作用的评价试验中保持一致，以使软骨支架评价结果具有可比性。

5.1.4 在建立与细胞相互作用的评价试验时，如果主要试验目的是用于不同批次软骨支架的质量控制，宜考虑细胞因素对（定量）评价试验结果的影响，宜选择稳定的参考用细胞，并验证参考细胞具有可供检测的细胞迁移、增殖、分化等性能后用于评价试验，并在不同批次的特定软骨支架与细胞相互作用的评价试验中使用相同的细胞，以使软骨支架评价结果具有可比性，达到软骨支架质量控制的目的。

注：宜考虑能建细胞库的细胞，作为稳定的参考用细胞，例如iPSC来源的间充质干细胞、永生间充质干细胞、软骨细胞系、原代获取的间充质干细胞等。

### 5.2 培养基

5.2.1 对于间充质干细胞，宜使用无血清培养基，并明确其特定化学成分添加物（非诱导培养基）、特定诱导添加物（诱导培养基）。对培养基成分的改变宜做出说明。

注1：对于间充质干细胞，使用无血清培养基具有合理性和可行性。

注2：以DMEM/F12为基础的无血清培养基，可适用于大多数类型间充质干细胞的培养。

5.2.2 对于软骨细胞，在进行细胞迁移、增殖试验时，可使用含血清培养基；在进行细胞分化功能试验时，可使用无血清培养基，宜明确其特定化学成分添加物。对培养基成分的改变宜做出说明。

注：对于软骨细胞类细胞，无血清培养条件下难以达成细胞的增殖、迁移。

5.2.3 对预期具有软骨诱导分化功能的软骨支架，试验采用的培养基宜包括不添加额外软骨诱导分化因子的培养基。

### 5.3 生物力学因素

关节软骨在生理状态下承受多种力学载荷，力学载荷会对软骨修复或再生产生影响。在体外细胞评价试验中，施加力学载荷需要特定的仪器设备，可在体外细胞评价试验中考虑生物力学因素，使试验体系更能模拟临床软骨修复或再生的条件。

### 5.4 参考样品和对照样品

试验中宜设置参考样品或对照样品，可将经过评价证实具有相应生物学效应的某批次软骨支架作为该种软骨支架的参考样品，或者选用证实具有相应生物学效应的其他软骨支架作为对照样品，用于对试验体系的质量控制，以及对试验样品的比较评价或相对评价。

## 6 细胞培养

6.1 细胞接种后培养至完全汇合形成单细胞层。

注1：根据试验样品规格选择合适的培养器皿，一般使用6孔板或直径35 mm细胞培养皿。

注2：宜获取单位面积上的细胞数量，用于后续试验结果的分析。

6.2 宜选择有代表性规格的软骨支架试验样品。具有孔隙结构的试验样品宜进行脱气处理。

注1：对于预期修复单个缺损面积在10 cm<sup>2</sup>以下的软骨支架，试验样品规格可为直径（10±1）mm的圆柱体，厚度（3±0.5）mm；当软骨支架厚度小于3 mm时，试验样品厚度可选择实际的支架厚度。

注2：多孔的试验样品脱气时，可将试验样品浸入装有适当体积培养基的密封离心管中。用连接20 mL注射器的18号～

21号针头刺入试管盖后，将注射器芯杆活塞完全拉回到基线并保持2 min~3 min，以使试验样品脱气，浸满培养液。

**6.3** 弃去培养板器皿中原培养液，将脱气处理后的试验样品放置在细胞层上。对于密度轻会悬浮在培养液中的试验样品，可在上方放置固定物固定试验样品。

注：对直径为 $(10 \pm 1)$  mm的圆柱体试验样品，可放置外径为9 mm，壁厚为0.8 mm~1.0 mm的316L不锈钢环固定样品。对于胶原海绵等易被压缩的试验样品，宜考虑固定环的重量，使试验样品不被明显压缩。

**6.4** 加入规定体积的培养液，将培养器皿转移到培养箱中进行培养，定期更换培养液，注意不要造成试验样品位移。

注：体外细胞培养周期一般可长达21天。

**6.5** 利用离体动物关节骨软骨组织进行软骨支架的细胞培养，宜参考附录A所描述的方法进行。

**6.6** 与细胞联合使用的软骨支架，宜按照规定的方法进行细胞在软骨支架试验样品上的接种。

## 7 细胞迁移

### 7.1 试验周期

宜通过预试验测定了解细胞随时间在试验样品内的迁移距离。正式试验宜选择至少2个时间点，选择的时间点宜代表细胞迁移距离——时间曲线的不同时期，如迁移距离迅速增加和迁移距离达到平台期的时期等。

### 7.2 细胞迁移样品处理和观察

按照YY/T 1744对“细胞培养后处理”、“阳性和阴性对照”、“观察迁移到样品内的细胞”的规定进行。

### 7.3 细胞迁移距离

按照YY/T 1744对“样品内细胞迁移距离测量”的规定进行测定。

### 7.4 试验结果

每个时间点采用至少5份试验样品，计算每个时间点试验样品的平均迁移距离及其标准偏差。

注：宜建立设定时间点的软骨支架细胞迁移距离的参考值范围，用于不同批次软骨支架的质量控制。

## 8 细胞增殖

### 8.1 试验周期

宜通过预实验测定了解细胞随时间在试验样品内的增殖。正式试验宜至少选择2个时间点，选择的时间点宜代表细胞增殖——时间曲线的不同时期，如细胞迅速增殖和增殖达到平台期的时期等。

### 8.2 细胞总数

每个时间点采用至少3个试验样品，按照YY/T 1562“DNA检测”的要求测定试验样品的DNA含量。同时采用已知数量的细胞建立DNA含量——细胞数量标准曲线，计算获得试验样品所含的细胞总数。

注：宜建立设定时间点的软骨支架细胞增殖总数的参考值范围，用于不同批次软骨支架的质量控制。

### 8.3 细胞活性成像分析

**8.3.1** 在设定的时间点，使用荧光染料对试验样品中活性和无活性细胞进行染色。钙黄绿素AM可被活性细胞吸收发出绿色荧光，溴乙吡啶二聚体可被膜受损的无活性细胞吸收发出红色荧光，其他合适的染料也可使用。每个时间点采用至少1个试验样品。

注：钙黄绿素AM和溴乙吡啶二聚体染色可购买商用试剂，按说明书操作。

**8.3.2** 将试验样品切割成适于用共聚焦显微镜观察的切片，使用共聚焦显微镜定量分析试验样品内活细胞比例。

注：宜建立设定时间点的软骨支架细胞活性的参考值范围，用于不同批次软骨支架的质量控制。

## 9 细胞分化

### 9.1 试验周期

宜通过预实验测定了解试验样品内细胞随时间变化的软骨分化基因表达。正式试验选择的时间点宜能表现出所检测的软骨分化基因表达的变化趋势。

### 9.2 软骨分化基因表达

宜采用RT-qPCR检测试验样品内细胞转录因子Sox9、聚集蛋白聚糖aggrecan、II型胶原mRNA表达水平，以GAPDH为看家基因。每个时间点采用至少3个试验样品。

注1：推荐在7天、14天、21天时检测软骨分化基因表达。

注2：宜建立设定时间点的软骨支架上软骨分化基因相对GAPDH表达强度的参考值范围，用于不同批次软骨支架的质量控制。

### 9.3 软骨基质成分测定

宜对培养后试验样品中II型胶原蛋白和硫酸糖胺聚糖进行定量检测。参考YY/T 1805.3，采用液相色谱-质谱法测定试验样品II型胶原特征多肽含量，计算获得II型胶原蛋白含量。按照YY/T 1810的要求进行硫酸糖胺聚糖（sGAG）的定量检测。每个时间点采用至少3个试验样品。

注1：推荐采用培养21天的试验样品，进行软骨基质成分测定。

注2：II型胶原蛋白分子量采用Uniprot蛋白数据库中相应种属II型胶原蛋白理论分子量，用于从II型胶原蛋白特征多肽分子量和含量计算II型胶原蛋白含量。

注3：宜建立设定时间点的软骨支架上软骨基质成分含量的参考值范围，用于不同批次软骨支架的质量控制。

### 9.4 组织学分析

宜将培养后试验样品制备组织学切片，进行甲苯胺蓝或番红固绿等特殊染色，以及II型胶原免疫组织化学染色，进行试验样品阳性染色分布区域和/或阳性染色程度评价。每个时间点采用至少3个试验样品。

注1：推荐采用培养21天的试验样品，进行组织学分析。

注2：每个圆片状试验样品从底面（细胞接触面）向上，在1/3、2/3厚度处平行切割，修整包埋为3个组织块，每个组织块连续切片，进行上述的组织学染色分析。甲苯胺蓝或番红固绿等软骨特殊染色、II型胶原免疫组织化学染色可采用商用试剂和试剂盒，按说明书操作。

## 附录 A

(资料性)

## 离体动物关节骨软骨组织培养

A.1 从选定的动物关节部位(如猪的股骨髁、滑车沟,山羊的股骨髁、滑车沟、胫骨平台、髌骨等),获取外径为15 mm至20 mm的关节骨软骨圆柱体,其关节面宜平整。然后在关节面中央造成外径为10 mm的软骨全层缺损,软骨游离缘宜保持平整、垂直。再移除显露的软骨下骨板全层,从软骨下骨面向下的缺损不宜超过1 mm,宜使显露的松质骨创面平整。将关节骨软骨圆柱体截取为高度10 mm的一段用于离体培养试验。上述操作过程需在无菌操作条件下进行。

A.2 骨软骨圆柱体离体培养所用培养基宜按5.2要求进行选择,可在培养基中加入透明质酸。

A.3 将10 mm高的骨软骨圆柱体放入培养器皿,加入培养液,液面高于软骨面2 mm至3 mm。

A.4 软骨支架试验样品规格为直径 $(10\pm 1)$  mm的圆柱体,厚度 $(3\pm 0.5)$  mm,多孔试验样品按5.4.2描述的操作进行脱气处理,

注:采用其他直径规格的试验样品时,可使用相应规格的骨软骨圆柱体。

A.5 将脱气后的试验样品放置在骨软骨圆柱体的软骨缺损部位,使试验样品底面密切接触缺损部位的松质骨面,可在试验样品表面使用固定环保持其密切接触,同时防止试验样品漂浮。

A.6 培养过程中隔天更换培养液,注意不要造成试验样品位移。

A.7 宜通过试验确定骨软骨圆柱体合适的离体培养时间,并在确定的培养时间点按7、8、9章的规定进行细胞生物学效应评价试验。

注:骨软骨圆柱体离体培养时间可长达60天。

## 参 考 文 献

[1]YY/T 1805.3-2022 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

[2]Albrecht C, Tichy B, Nürnberger S, Hosiner S, Zak L, Aldrian S, Marlovits S. Gene expression and cell differentiation in matrix-associated chondrocyte transplantation grafts: a comparative study. *Osteoarthritis Cartilage*. 2011;19(10):1219-27.

[3]Baboolal TG, Boxall SA, El-Sherbiny YM, and etc. Multipotential stromal cell abundance in cellular bone allograft: comparison with fresh age-matched iliac crest bone and bone marrow aspirate. *Regen Med*. 2014;9(5):593-607.

[4]Chen P, Tao J, Zhu S, and etc. Radially oriented collagen scaffold with SDF-1 promotes osteochondral repair by facilitating cell homing. *Biomaterials*. 2015;39:114-23.

[5]Chubinskaya S, Di Matteo B, Lovato L, and etc. Agili-C implant promotes the regenerative capacity of articular cartilage defects in an ex vivo model. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*. 2019;27(6):1953-1964.

[6]Corradetti B, Taraballi F, Minardi S, Van Eps J, Cabrera F, Francis LW, Gazze SA, Ferrari M, Weiner BK, Tasciotti E. Chondroitin Sulfate Immobilized on a Biomimetic Scaffold Modulates Inflammation While Driving Chondrogenesis. *Stem Cells Transl Med*. 2016;5(5):670-82.

[7]Meng F, He A, Zhang Z, Zhang Z, Lin Z, Yang Z, Long Y, Wu G, Kang Y, Liao W. Chondrogenic differentiation of ATDC5 and hMSCs could be induced by a novel scaffold-tricalcium phosphate-collagen-hyaluronan without any exogenous growth factors in vitro. *J Biomed Mater Res A*. 2014;102(8):2725-35.

[8]van der Valk J. Fetal bovine serum—a cell culture dilemma. *Science*. 2022;375(6577):143-144.

---