



中华人民共和国医药行业标准

YY/T 1679—2021

组织工程医疗器械产品 骨 体内临界尺寸骨缺损的临床前评价指南

Tissue engineering medical device products—Bone—
Standard guide for pre-clinical in vivo evaluation in critical
size segmental bone defects

2021-03-09 发布

2022-04-01 实施

国家药品监督管理局 发布



目 次

前言 III

引言 IV

1 范围 1

2 规范性引用文件 1

3 术语和定义 1

4 动物模型 3

5 缺损部位 5

6 关节的负重和制动 5

7 实验步骤 5

8 评价和结果 6

9 分析 7

附录 A（资料性附录） 骨修复的临界尺寸缺陷评估常见动物模型参数 8

附录 B（资料性附录） CSD 模型举例 10

参考文献 18

前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

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。

本标准由国家药品监督管理局提出。

本标准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/TC 110/SC 3) 归口。

本标准起草单位:南方医科大学、中国食品药品检定研究院、中国人民解放军总医院。

本标准主要起草人:欧阳钧、戴景兴、杨宇超、徐丽明、郭全义、邵安良。

引 言

本标准是评价骨组织工程医疗产品(tissue engineering medical products, TEMPs)的一般性指导文件。本标准的起草参考了 ASTM F2721-09(14)(Standard guide for pre-clinical in vivo evaluation in critical size segmental bone defects)。骨组织工程医疗产品,是指在体内能够修复骨缺损或重建骨组织的产品,包括天然的生物材料、合成的生物材料(生物相容的和生物可降解的)或复合材料,可能含有细胞或生物活性物质(如生长因子、合成多肽、质粒或 cDNA 等)。本标准所描述的部分临界尺寸的骨缺损模型,是指在动物没有接受治疗的情况下,体内终生不能自行修复的最小骨缺损。因此,这个模型是对骨组织工程医疗产品诱导或促进骨生长能力的测试和评价。

本标准的目的是提供一系列的动物体内模型,用于临床修复或再生的骨组织工程医疗产品(TEMPs)的临床前研究。在使用本标准描述的体内模型评估前,宜使用合适的国家标准或者行业标准对材料或(和)TEMPs 进行细胞毒性和生物相容性评价。

本标准包括动物模型、外科手术观察、组织处理以及组织标本的定性和定量分析的描述。

标准中包含了对各种动物模型的描述与原理阐述,包括鼠、兔、狗、山羊、绵羊。对基于影像学、组织学和力学分析得出的结果作了简要描述,具有参考价值。使用者在设计具体的试验方法时需要考虑更多的因素。

本标准并不包括原料的测试、生物材料的制备、灭菌以及最终产品的包装。

本标准中的任何方法在具体的应用中都有可能产生与实际临床表现不一致的结果,因此,不排除其他可用的检测方法用于临床前评价。材料需与其预定的目的相适应,当然,根据材料的特性,额外的生物学检测与评价也是必要的。

本标准中所述的值都是国际标准单位,其他的计量单位都不包含在此文件中。

本标准并非旨在解决所有安全问题,还与其使用有关。标准的使用者有责任保证实验的安全性、决定规则的适用性。动物模型的结果不一定能预测人的结果,因此对于人的潜在应用条件需要谨慎解读。

组织工程医疗器械产品 骨

体内临界尺寸骨缺损的临床前评价指南

1 范围

本标准规定了预期修复或再生骨组织植入物骨形成活性的体内临界尺寸骨缺损评价通则；对骨缺损动物模型的制备、骨缺损部位及范围、缺损类型、植入物的制备和评价提供了相关参数。

本标准适用于部分临界尺寸骨缺损模型的制备，以及合理利用临界尺寸骨缺损模型对具有诱导或促进骨生长的骨组织工程医疗产品的测试和评价。

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 14925 实验动物 环境及设施

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

中华人民共和国药典(2015 版)四部

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

骨再生 bone regeneration

生成在组织学、生物化学和力学性能上类似于天然骨组织的骨形成过程。

3.2

骨修复 bone repair

通过细胞增殖和新的细胞外基质合成使创伤骨组织愈合的过程。

3.3

密质骨 compact bone

是一种骨化的结缔组织，其特征为具有骨单位的板层骨。板层骨由高度规则的同心薄板样结构组成。

3.4

皮质骨 cortical bone

骨组织的两个主要类型之一。皮质骨致密，形成骨的表面。

3.5

临界尺寸缺损 critical size defect; CSD

自然发生的或者是人为制造的一种骨缺损，在没有外界干预的情况下不会愈合。在临床上，这个词适用于健康成年人出现缺损后连续观察 6 个月不愈合的情况。

3.6

骨干 diaphyseal

指的是长骨中段。

3.7

软骨内骨化 endochondral ossification

骨形成的两种主要类型之一,软骨基质首先形成,随后被骨组织替换。

注 1: 脊椎动物的大多数骨生长都属于软骨内骨化,特别是长骨。

注 2: 骨形成的另一个主要机制为膜内成骨,骨组织直接形成,不需要软骨预先生成;它主要发生在扁骨(颅骨)的形成中。

3.8

生长板 growth plate

在长骨的骺区里,是软骨内成骨生长区。

注: 在骨骼发育成熟的动物中生长板是融合的。

3.9

长骨 long bone

它的长度大于宽度,主要通过骨干的延伸生长。长骨包括股骨、胫骨、腓骨、肱骨、桡骨、尺骨、掌骨、指骨、跖骨、趾骨。

3.10

骨髓 marrow

骨髓腔里填充的红色或黄色的柔软胶状组织,颜色取决于造血组织占优势(红色)还是脂肪组织占优势(黄色)。

注: 红骨髓也被称为骨髓组织。

3.11

基质 matrix

本标准中,基质可指外源性植入支架或来自宿主的内源性细胞外物质(也称为细胞外基质)。

3.12

干骺端 metaphyseal

附属于长骨致密的末端。

3.13

重塑 remodeling

指旧骨从骨骼上移走(骨吸收),且新骨增加(骨形成)的伴随终生的过程。

3.14

残留时间 residence time

材料(合成的或天然的)从植入宿主组织到不能从宿主组织检测到的时间。

3.15

骨成熟期 skeletal maturity

骺板融合的年龄。

注: 在啮齿动物中,骨骼发育成熟的动物特征是有成熟的生殖腺。

3.16

松质骨 trabecular bone

以骨髓包围针状骨为特征的骨化的骨结缔组织。

3.17

负重与非负重模型 weight-bearing versus non-weight bearing models

负重是指作用于患者或实验动物手术腿上的重量,通常以体重的百分比描述。

注 1: 非负重意味着腿不能接触地面(即,支持 0% 的体重)。

注 2: 完全负重意味着腿在迈出一步的时候可以承受身体 100 % 的体重。

4 动物模型

4.1 概述

本标准描述了用于确定动物模型、骨缺损位置和尺寸的选项,详细参见附录 A。给出了选择大鼠和兔子模型的考虑。其他动物模型的考虑可参见附录 A。

使用这些动物模型进行研究时应遵守国家实验动物护理和使用的管理规定,在实验前要通过实验动物护理和使用机构的检查和批准(必要时可咨询兽医师后制定研究计划)。

4.2 缺损尺寸

4.2.1 大部分人类骨折的部位发生在长骨,因此,在动物模型中一般采用长骨缺损模型来评价骨修复/再生。骨修复的临界尺寸缺损评估常见动物模型参数参见附录 A。

4.2.2 原则上讲,临界尺寸缺损可位于两个干骺端和骨干的位置。本标准只描述长骨骨干的缺损。

4.2.3 关于缺损尺寸和动物的体重、解剖结构、步态等方面在动物种属之间存在明显差异,因此对骨缺损有动力学、运动范围和力学等方面的影响。这些因素影响骨的构造和结构,在对骨损伤或疾病的反应中发挥了重要作用。使用者应该谨慎考虑动物模型是否适合于植入 TEMP 的研究阶段。

4.2.4 力学载荷能影响骨修复。在所有力学生物学因素中,间歇静水压力和载荷应力在调节骨发育和维持、以及退化中起重要作用。力学载荷强度或持续时间对植入 TEMP 以及周围天然骨的影响依据解剖部位不同而变化。所以,选择评估植入效果的缺损部位时应考虑到力学载荷对植入物性能的影响。

4.2.5 建议选择适当的动物种属和解剖部位。要具有足够大的尺寸,能充分研究和优化设想为人使用的植入物配方、设计、尺寸等,特别是在开发产品的后期。

4.2.6 较大的动物可能更适于骨缺损修复的研究,特别是在与人相近的解剖部位。

4.2.7 较大的骨缺损一般需要一种固定方法来固定植入物,以减少植入物脱位。固定植入物的方法会对周围的宿主组织和修复组织产生不利影响。因此,以不需要固定的 TEMP 模型实验结果来预测需要固定的较大动物模型和人的结果时,需要考虑这个因素带来的差异。

4.2.8 对于每个种属,临界尺寸缺损被定义为该动物在不经治疗的情况下,不能修复的最小尺寸。临界缺损尺寸因动物种属不同而不同,当设计植入物尺寸和固定方法时,应认真考虑。作为一个经验法则,骨缺损(由骨切除形成)的长度至少应等于所选骨直径的 1.5 倍。一些学者建议至少是所选骨直径的 2 倍。

4.2.9 骨切除段的骨膜是否保留会影响骨缺损的愈合。在多数临界尺寸骨缺损研究中,骨膜都被切除。在报告结果时,应说明骨膜是否切除。

4.2.10 每个研究应包括一个空白的缺损对照组,以证实该模型是一个临界尺寸的缺损。如果模型非常成熟,为节省动物数量,宜考虑使用历史数据,而不是实际对照动物,除非这不利于研究的目标。例如,在关键的临床前概念验证研究中,同步对照可能是适当的。

4.2.11 通常建议采用单侧缺损模型。尤其对于使用四肢进行负重(尤其是山羊,绵羊和马)动物的负重位置。

4.3 力学影响因素

4.3.1 由于跳跃或跑步而使植入物受极端和高度变化的力学影响,会增加观测结果差异。

4.3.2 应仔细考虑使用负重和非负重模型对结果带来的潜在差异。

4.4 染色体性别

4.4.1 由于循环类固醇对软骨和骨的代谢及再生的影响,染色体性别的选择应该加以考虑。不能使用在哺乳期的动物。为了某些目的,采用年龄较大或卵巢切除的雌性(特别是大鼠),可用于模拟骨质疏松的情况。

4.4.2 建议在同一组实验中使用相同的性染色体动物,并且需要在报告中说明。研究者应该意识到性别间可能存在差异,需要适当的统计学分析。

4.5 年龄

4.5.1 骨生长过程经历代谢的动态变化和重塑。由于这些生理过程对组织修复的影响,宜使用骨发育成熟的动物。实验组动物的骨髓生长板宜已经融合。如有必要可通过 X 线平片摄影判断不同种属动物间的骨成熟差异。

4.5.2 年长的动物有骨量减少的倾向,并且骨缺损修复能力下降。如果认为特定条件对 TEMP_s 的评估是重要的,应该使用一个相适应的模型。

4.5.3 间充质干细胞池、对生长因子的响应性和细胞的代谢活动一般随年龄增长而下降。因此,依赖于自身细胞数量和活性的修复过程,在年长动物中可能会受影响。

4.6 饮食或并发症

在一般情况下,采用正常饲养条件下的健康动物进行研究。然而,也有通过添加氟化物,以及禁止摄入维生素 D 和/或钙等方法制作具有骨病的动物模型。在考虑伴有影响骨修复的系统性疾病患者治疗时,考虑使用模拟该疾病或条件的非临床模型是适当的。

4.7 研究期限

4.7.1 研究的时间长短取决于 TEMP_s 的开发阶段、使用的动物种属、缺损的大小、植入物的组成和设计。

4.7.2 大鼠和兔子的小缺损模型,植入 8 周~12 周即可提供植入物停留时间,TEMP_s 的固定以及修复类型的相关信息。

4.7.3 使用较大的动物(狗、绵羊、山羊),8 周~12 周的研究周期对于获得缺损内植入物的生物相容性、细胞的早期反应、植入物存留状态和条件等信息是有限的。

4.7.4 基于组织学观察结果判断成功修复骨缺损和骨重建,需要超过 3 个月的研究周期。

4.7.5 根据不同的研究目的,建议在缺损完全愈合之前对一个或多个组进行评价。当将一种新材料和标准材料(如自体骨)进行比较时,两组之间的差异可能在早期最大,之后随时间延长而消失。一般而言,需要通过统计学分析来比较研究的结果。

4.8 动物数量

每组使用的动物数量需要满足统计学分析的要求。所需动物数量取决于所用动物间的差异、手术治疗的一致性、评价方法的准确性、实验过程中预期的动物损耗率以及分析数据的统计学方法。另一个重要因素可能是研究目的(例如,比较空白缺损组或不同植入物组的可行性和效果)和治疗的差异性(例如,加入细胞/生长因子,植入物的尺寸)。如果各组模型已经建立完善(源于文献或预实验结果),那么试验所需实验动物的数量可从现有的数据中查询。试验研究表明,利用组织学和力学性能方法评价的试验中,每组 6 只~8 只动物是合适的。文献中所记载的每组动物的数目,参见附录 B。

4.9 动物种属

4.9.1 大鼠模型

4.9.1.1 大鼠是开发早期最常用的试验动物,因为其价格低廉,饲养空间较小以及容易饲养。最常使用

的模型是股骨缺损模型。

4.9.1.2 由于股骨是负重部位,其缺损必须通过内固定或外固定使其稳固。由于动物的尺寸偏小,其固定系统一般需要定制。可使用螺钉、克氏针或者环扎术固定板材(聚合物或金属)作为固定系统。

4.9.1.3 典型的缺损尺寸是 5 mm,可使用锯或牙科钻切除骨干中部。在切除中要注意不要损伤坐骨神经,术后腿的废用将延迟缺损的愈合时间。要了解更多细节,请参见附录 A。

4.9.2 兔子模型

4.9.2.1 相对于大型动物(狗,绵羊或山羊)来说,兔子作为试验对象更经济。

4.9.2.2 相对于其他骨缺损评价所使用的种属而言,兔子的皮质骨厚度较薄。

4.9.2.3 由于兔桡骨是管状的,更适宜采用影像学、组织学和力学方法进行评价。

4.9.2.4 尺骨或桡骨的临界尺寸缺损模型无需固定,因为另一块骨可以起到稳定作用。

4.9.2.5 典型的缺损尺寸是 15 mm~20 mm。

注:一些研究中指出 15 mm 的缺损可能是不够大的。

4.9.2.6 试验一般选择生长板闭合的成年兔(大约 20 周龄)。在年轻的动物中,如果手术腿中的完整骨可能过度负重,将导致生长板滑动而被排除出试验组。

4.9.2.7 如果力学性能测试是结果分析之一,那么兔尺骨模型是有一定风险的,因为桡骨易附着在缺损部位(融合)。扭转试验的旋转轴很难重复,横截面积也难以测量。

5 缺损部位

5.1 本标准重点关注长骨的骨干中部节段性缺损。CSD 模型举例参见附录 B。

5.2 建立典型骨干骨缺损模型的骨包括尺骨、桡骨、胫骨、腓骨和股骨。但不是所有动物各部位缺损都有报道。

5.3 注意事项也应包括在实施外科手术和固定时的难易程度。

5.4 临界尺寸节段性骨缺损对称模型通常被认为是不可取的,这是出于人道和可能会对数据的完整性产生影响的原因。

6 关节的负重和制动

6.1 应综合考虑动物关节构造、尺寸以及步态来确定合适的制动方法。

6.2 在术后任何时候均可使用夹板、外固定器和支具来减少关节运动。应确定一个关节恢复正常活动或活动不受限制的时间点。

6.3 选择固定期应考虑废用性萎缩和其他潜在的消极因素对骨的影响。

6.4 持续被动运动已被证明对人和动物骨损伤后的再生过程有一定程度的益处。在动物模型中的类似治疗方法由于可行性较差还没有被广泛接受。

6.5 在术后护理中应考虑到使用支具和夹板会限制手术切口的护理。

7 实验步骤

7.1 植入物的准备

7.1.1 所有植入动物体内的试验材料应进行无细胞毒性和生物相容性评价。植入物可以是灭菌后在无菌条件下准备,或根据植入物成分和功能可接受的方法在准备完毕后灭菌。

7.1.2 如果适用生物负荷测试或无菌测试,应采用相关规范的方法进行。无菌测试可按照《中华人民

共和国药典》(2015 版)四部。

7.1.3 可降解生物材料作为体内植入物的生物相容性评价见 GB/T 16886.1。

7.2 缺损制备

7.2.1 缺损的制备应采用标准化且可重复的方法。

7.2.2 为保证制备骨缺损的一致性,如果可行,可考虑使用模板或其他标尺工具。

7.2.3 一项研究中所有动物的骨缺损应该使用相同类型的工具及手术器械。

7.3 植入物的移植和固定

7.3.1 植入物的移植需要按照标准化和可重复的方法操作。

7.3.2 应注意确保植入材料周围的骨不过度损坏且植入的植入物与相邻缺损断面相接触。

7.3.3 骨缺损应以一个标准的、可重复的方法固定。

7.4 痊愈和饲养

7.4.1 痊愈条件应该旨在减少潜在的应力和过度运动。

7.4.2 所有饲养条件都应该符合 GB 14925 的规定。

7.4.3 应经常监测、观察并记录试验动物,确定其健康和身体状况。

7.4.4 放养动物的健康状况应该事先经过兽医确认。

7.5 实验周期

7.5.1 使用夹板比标准化的绷带包扎更能减少关节运动和负荷,需要注意的是,在选择治疗周期长度时,应考虑废用性萎缩和潜在的负面因素对骨愈合的影响。

7.5.2 如适用,X 线照片可用于评估植入物的位置。

7.5.3 康复后,大型动物宜在受保护的围栏中至少饲养 9 天。经过这一时期的动物可以留在受保护的养殖栏内或在群体内自由活动。

7.5.4 宜请有资质的兽医定期检查动物,以发现任何异常迹象。

7.5.5 根据研究目的应指定取材时间。通常情况下,选择一个早期的时间点(例如,检查植入物对早期愈合的影响),以及一个或两个随后的时间点(次)(例如,当完全愈合或接近完全愈合时),可参见附录 B。

7.6 尸检

7.6.1 应根据我国相关规定以人道的方式处死动物。

7.6.2 植入部位应与周围的软骨和骨组织一并取材。

7.6.3 取材的组织应放置在溶液中,组织学(脱钙石蜡与非脱钙塑料包埋比较)、生物化学或力学性能应与预期观察指标相一致。

8 评价和结果

8.1 组织学

对于组织学处理程序,可参阅 ASTM F561(医疗器械的检索和分析,及相关的组织和体液)。组织学部分用于评估缺损内组织再生或修复的数量和质量。应连续地进行组织学切片并染色,这样才能进行组织质量评价和钙化组织检测。标准的染色剂包括:苏木精和伊红、甲苯胺蓝、改良三色染色等。应考虑脱钙与不脱钙的部分,这可能需要不同的染色方法。

8.2 显微分析和计分

8.2.1 组织切片应利用组织病理学指数进行不良组织反应分析。

8.2.2 对骨植入物/组织工程医疗产品性能的评估,计分制被用来确定以下几个方面:骨痂形成,缺损中新骨的形成(矿化/非矿化),骨移植物的再吸收,皮质重塑,骨髓变化,骨结合(远端,近端)。此外,应该评估炎症纤维结缔组织。

8.2.3 组织形态计量学分析可被用于测量组织学参数,如厚度、集成、细胞数量和表面质量。

8.2.4 不到6个月的时间点不一定反映长期的结果,因为随着时间的变动,生化成分和修复组织也有可能变化。

8.2.5 短期组织学评估,可用于筛选和优化。长期的评估,应根据组织学和力学测量结果。

8.3 X线照片

8.3.1 在研究正在进行和结束时,X线照片是用来评价实验周期内新骨形成的数量和质量的重要手段。

8.3.2 通常情况下,X线片应采取两个正交平面,以便评估时适当地校准和形成准三维视图。

8.3.3 X线照片显示的愈合可能是标志着一个研究可以结束的决定性因素之一。它应该与其他指标结合使用,例如,临床体征能够完全负重。

8.3.4 涉及骨痂形成,桥接或结合(近端,远端),移植物外观和改建的各种影像学评分系统已经公布。评分系统应在实验说明中明确指定。

8.3.5 在画面中包含一个金属片有助于X线片的标准化。

8.3.6 不能透过射线的植入物和固定材料可能影响从X线片评估愈合的能力。

8.4 计算机断层扫描

8.4.1 近年来,计算机断层扫描(CT)已经成为一种有用的工具,用于观察所采集标本骨再生的三维成像,以及在体监测骨再生的修复过程。

8.4.2 CT图像用来评估骨痂和骨(矿化组织)区域。同样也可用来纠正计算和解释力学测试结果。

8.4.3 CT分析最大的挑战是调整合适的阈值,保证骨缺损中能够分辨新形成的骨和支架材料。

8.5 修复组织的力学测试

8.5.1 通常需要将骨切开之后进行力学测试。当发现尺骨和桡骨有融合时分离需要小心。样品制备可能将其部分嵌入树脂块里,保证适当的放置在固定装置中。

8.5.2 长骨一般地宜一直测试到骨折。

8.5.3 典型的测试方法包括3-或4-点弯曲和抗扭强度测试。

8.5.4 需考虑到并记录测试速度。

8.5.5 通过典型压力曲线可以计算出强度(最大扭矩)、硬度、折断的最大能量。如果能从扭力测试中得到折断时的角度更好。

8.5.6 建议监测和记录裂缝或折断发生处(在新形成的骨组织中或者骨缺损处之外的原生骨)。

9 分析

统计分析—应计算单个群组的平均值和标准偏差,每个分级样本的总分。通过费歇尔恰当概率试验, χ^2 平方检验,Kruskal-Wallis 试验(方差的单向非参数分析)来分析各组得分差异。

附 录 A
(资料性附录)

骨修复的临界尺寸缺陷评估常见动物模型参数

A.1 概述

常见的动物模型除了大鼠、兔子之外,还有狗、羊等。大动物模型可能更有利于骨修复的评价。使用大动物模型的评价参见 A.2、A.3、A.4。表 A.1 给出了骨修复的临界尺寸缺陷评估常见动物模型参数。

A.2 狗模型

犬科,如中型尺寸(10 kg~15 kg)的杂种动物,猎犬等都已经用于临界尺寸的骨缺损修复模型。已有研究认为犬科长骨包括尺骨、桡骨和股骨有助于骨缺损修复的评价。

A.3 绵羊模型

A.3.1 在临界尺寸长骨缺损修复研究中,绵羊是在大型动物中较常用的骨修复模型。

A.3.2 绵羊最常用的部位是跖骨和胫骨的中间部分。

A.3.3 在绵羊胫骨部分,典型的缺损尺寸约是 2 cm~5 cm,而在跖骨部分,约是 2.5 cm。

A.3.4 绵羊的缺损模型应是单侧的骨缺损,双侧的骨缺损强烈建议不要使用。

A.4 山羊模型

A.4.1 与绵羊相比,山羊一般对人更友好,因此更容易操作。

A.4.2 山羊应该通过血液测试筛选,排除患羊脑炎的个体。

A.4.3 推荐使用山羊胫骨单侧的临界尺寸缺陷模型,不推荐使用双侧的骨缺损模型。

表 A.1 骨修复临界尺寸缺陷评估的常见动物模型参数

物种	常见类型	成人等效的 年龄	常用缺 损部位	典型的临界缺 陷尺寸/mm	固定的方法	典型的结束 时间点/周	评价
鼠 ^A (鼠)	斯普拉格-杜勒 鼠,无胸腺裸 鼠,菲舍尔,大 鼠,刘易斯	6个月	F	5~10	聚乙烯/用克氏 针聚缩醛板/ 螺丝	8~24	组 织 学, X 线 片/Faxitron,生 物力学
兔 ^A (天兔)	新西兰,白色	9个月	R,U	20	无(桡骨或尺骨 保持不变)	8~12	组 织 学, X 线 片,抗扭强度
狗 ^B (犬)	小猎犬,猎犬, 杂种	>1年~2年	R,U,F	21~25	前修复,板/螺丝	12~24	组 织 学, X 线 片,抗扭强度

表 A.1 (续)

物种	常见类型	成人等效的年龄	常用缺损部位	典型的临界缺陷尺寸/mm	固定的方法	典型的结束时间点/周	评价
山羊 ^B (公山羊)	瑞士山	2年~3年	T	26~35	前修复	26	组织学, X线片, 压缩强度
羊 ^B (绵羊)	美利奴羊, 前阿尔卑斯, 其他	2年~3年	T, M	25~50	前修复, 板/螺丝, 髓内钉	16~24	组织学, X线片, 扭转或压缩强度
注: A——小动物; B——大型动物; F——股骨; T——胫骨; R——桡骨; U——尺骨; M——跖骨。							

附 录 B
(资料性附录)
CSD 模型举例

B.1 大鼠股骨节段 CSD 型号示例

参见表 B.1。

表 B.1 大鼠股骨节段 CSD 型号示例

类别	Yasko 等	Chen 等	Oakes 等	Tsuchida 等	Vogelin 等	Jager 等	Betz 等
文献来源	JBJS-A, 74(5), 659-670, 1992	J Orthop Res, 20 (1): 142-50, 2002	ClinOrthop RelRes, 413: 281-290, 2003	J Orthop Res, 21(1): 44-53, 2003	JBJS-A, 87(6): 1323-31, 2005	Biomed Technik, 50(5): 137-142, 2005	JBJS-A, 88A(2): 355-365, 2006
类型	斯普拉格-杜勒鼠	斯普拉格-杜勒鼠	无胸腺或者裸体	天生的费舍尔 344; 布朗挪威	Lewis	大鼠, 无胸腺 rnu 裸大鼠	斯普拉格-杜勒鼠
性染色体	雄性	雄性	未指定	雄性, 雌性	雄性	不适用	雄性
年龄	成年	未报道	未报道	未报道	3 个月	成年	成年
体重	325 g~350 g	351 g~468 g	未报道	90 g~240 g	345 g±10.4 g	未报道	400 g~425 g
组的大小(n)	15	18 (3+3+12)	(共 90)	6-8	4 组 (10+10+15+15)	7(pilot); 12(pilot); 42	24+12+12
缺损尺寸	5 mm	6 mm	8 mm	6 mm	10 mm	4 mm	5 mm
骨膜是否切除	未报道	未报道	是	不适用	2 组使用骨膜瓣; 否则切除超过 20 mm	是	是
单侧/双侧	单侧	单侧	双侧	单侧	不适用	单侧	单侧
固定	聚乙烯板, 克氏针	聚乙烯板; 克氏针, 钢丝环扎	板/ K 线/ 钢丝环扎	聚乙烯板; 克氏针	板(6 孔, 1.5 mm)/螺丝	IM 钉(不推荐使用); 外固定支架	外固定支架
植入材料	RhBMP-2+失活的鼠 DBM	OP-1+胶原蛋白	以透明质酸钠或甘油为载体的人源脱钙骨基质浆料	Allogen, Mesench.SC	OPLA-HY	无	腺病毒携带 rhBMP-2 基因
植入物体积	10 mg(重组)	未报道	未报道	不适用	(直径 10 mm×3.7 mm)	不适用	不适用

表 B.1 (续)

类别	Yasko 等	Chen 等	Oakes 等	Tsuchida 等	Vogelin 等	Jager 等	Betz 等
持续时间	9 周	9 周	16 周	24 周	8 周	10 周	56 天(8 周)
X 线片	1 周、2 周、3 周、 4 周、5 周、6 周、 9 周	2 周、4 周、9 周	4、8、16 周	2、4、6、8 周	4、8 周	每周	每周
X 线平片分级 (定量)	0-5 级 (5=100% 愈合)	(BioQuant workstation)	0-5 (5=100% 治愈)	5 分制	无	无	3 类(愈合, 形成, 没有形成)
组织学	未脱钙的, 脱钙(多重染色)	福尔马林, 脱水, 包埋; 75 μm ~100 μm 切片(苏木素/伊红)	非脱钙 (甲苯胺蓝)	(甲醛) 脱钙, 5 μm 切片(苏木)	(Goldner-Masson 三色染色)	无	(甲醛)软化水(苏木素, 伊红, 番红 0-快绿)
生物力学测试	是	不适用	否(“报在别处”)	不适用	不适用	不适用	5 rad/min
空白对照组	未报道	在 10 周、12/12 新骨形成不足 9%	36 肢; 16 周中 没有愈合	未报道	全部空白缺损		
其他评估	动态的放射性同位素骨显像	未报道	未报道	pQCT	形态计量学	不适用	形态计量学, microCT, 双 X-射线骨密度

B.2 兔前臂节段 CSD 型号示例

参见表 B.2。

表 B.2 兔前臂节段 CSD 型号示例

尺骨			
类别	Cook 等	Bostrom 等	Smith 等
文献来源	JBJS-A, 76(6):827-38, 1994	Clin Orthop Rel Res. (327):272-82, 1996	J Controlled Release. 36(1-2), 183-195, 1995
品种	新西兰白色	新西兰白色	新西兰白色
性染色体	雄性	雄性	尺骨:混合; 桡骨:雄性
年龄	成年	6 个月	最小 6 个月
体重	4 kg~5 kg	3.5 kg~5 kg	未报道

表 B.2 (续)

尺骨			
类别	Cook 等	Bostrom 等	Smith 等
组的大小(<i>n</i>)	总共 30; <i>n</i> =6 为对照组, 2-3 对于剂量反应组	共 50; <i>n</i> =10	<i>n</i> =10 尺骨组, <i>n</i> =8 或 <i>n</i> =10 为桡骨的群体
缺损大小	1.5 cm	2.0 cm	20 mm 尺骨;2.0 mm 桡骨;1.5 mm 非临界尺寸
骨膜切除?	(是)	是(桡骨也切除)	去除骨段(未报道)
单侧/双侧	双侧(单侧,1 组)	双侧	尺骨(双侧)
固定术	没有(没有必要, 桡骨保持不变)	没有(桡骨保持不变)	没有
植入材料	胫提取物,不溶性兔 DBM 复合 rhOP-1	RhBMP-2 复合 PLGA 微球 自体血	RhBMP-2 复合 PLGA 微球 自体血液或 CMC;ICBM
植入体积	125 mg 载体	约 550 μ L=479 616 mg	
持续时间	12 周	8 周	8 周尺骨-8/12 周桡骨
X 线片	每周	两周	两周
X 线平片分级 (定量)	无	5 分,分级:0~4 (4 级为 76%~100%)	6 分,分级(5 级为 80%~100%)
组织学	非脱钙(碱性品红,甲苯胺蓝; von Kossa,Goldner 三色染色法)	非脱钙(苏木素,伊红; GOLDNER-Masson 三色染色法)	脱钙(苏木素,伊红)
生物力学测试	(未冷冻)扭转至失效 (50 mm/min)	(冷冻)扭转至失效;缺陷 分析分类	未报道
空白对照组	未报道	无	
其他评价	未报道	未报道	未报道

B.3 犬骨节段 CSD 模型示例

参见表 B.3。

表 B.3 犬桡骨节段 CSD 模型示例

类别	Bruder, et al(1)	Cook, et al	Itoh, et al	Sciadini, et al	Arinze, et al
文献来源	JBJS-A,80-A(7): 985-996,1998	J Ortho Trauma, 12(6):407-12,1998	J Vet Med Sci, 60(4):451-58,1998	J Ortho Res,18(2): 289-302,2000	JBJS-A,85A(10): 1927-35,2003
品种	猎犬	杂种	比格犬	杂种	猎犬
性染色体	雌性	雄性	雄性(3),雌性(6)	雄性(18),雌性(9)	未报道
年龄	成年	2 岁~4 岁	1.8 岁~2.5 岁		

表 B.3 (续)

类别	Bruder, et al(1)	Cook, et al	Itoh, et al	Sciadini, et al	Arinzeh, et al
体重	(20.3±1.1) kg		9.2 kg~14.8 kg	21.7 kg~38.8 kg	22 kg~25 kg
分组情况(n)	15 只	16 只	8 只(4 只/组)	27 只(3 只/5 组)	12 只
缺损大小	2.1 cm	2.5 cm (≥1.5D)	2 cm	2.5 cm	2.1 cm
骨膜是否去除	是	是	是	是	是
双侧/单侧	单侧股骨	双侧尺骨	双侧尺骨	双侧桡骨	单侧(未报道)
固定术	加长板 (辛迪思)	无(桡骨完整)	骨板	外固定支架	加长板 (辛迪思)
植入材料	HA/ TCP 复合 MSCs 和单独 HA/ TCP 或空白	rhOP-1(28), 单独胶原(2), 没有植入物(2)	BMP2 + PLGA/ 胶原胶 (0,40, 160,640 μg)	胶原+ BMP-2 (0,150,600, 2 400 μg)	MSCs 复合 HA/TCP (与组织学对照)
植入体积	空心管:外径 14 mm×21 mm 长	3.5 mL	1.6 cm ³	3 cm ³ (1~4 组); 1.33(5 组), 6 cm ³ (7 组)	中空管:外径 14 mm×21 mm 长
持续时间	16 周	12 周	16 周	12 周,24 周; 48 周(1)	16 周
X 线片	4 周,8 周,16 周	0 周,2 周,4 周, 6 周,8 周,12 周		0 周,2 周,4 周, 8 周,12 周,...,24 周	4 周,8 周,16 周
X 线平片 分级(定量)	不适用	分级:0~6	X 射线骨密度仪 (骨密度),0~5	密度(微图像/ 图像分析)	不适用
组织学	非脱钙托尔蓝或麦 克尼尔亮绿染色, 组织形态计量学	非脱钙-50 μm, 5 μm 切片,碱性品 红和托尔蓝	脱钙 H&E	未脱钙,矢状和纵 向切片,改良托尔蓝	脱钙和未脱钙,托尔 蓝,组织形态计量学
生物力学 测试	不适用	扭转至失效(8 h 内),50 mm/min, 6 cm 杠杆臂	未报道	福尔马林固定后 扭转至失效, 50 mm/min, 6 cm 杠杆	不适用
空白对照	有(3)。没有愈合; 16 周后只在边缘处 有少量骨	有(2)。只有边缘有 少量骨;纤维填充	无	无	无, 使用组织学空白对 照(Bruder,JBJS-A, 1998)
评论		全部恢复正常 负重功能			

B.4 山羊骨节段 CSD 模型示例

参见表 B.4。

表 B.4 山羊骨节段 CSD 模型示例

类别	Buma 等	Dai 等
文献来源	Biomaterials 25(9):1487-95,2004	Calcif Tiss Int,77:55-61,2005
品种	山羊	山羊
性染色体	未报道	
年龄	未报道	1 岁
体重	未报道	18.6 kg~31.5 kg
组的大小(<i>n</i>)	未报道	26 (9/6/6/3/2)
缺陷大小	3.5 cm	2.6 cm
骨膜是否去除	否	是
双侧/单侧	未报道	单侧(R)胫骨
固定术	IM 棒,螺丝	环形外固定架
植入材料	未报道	双相煅烧骨+MSCs±转导的 BMP-2
植入体积	未报道	外径 16 mm×长度 25 mm (内径 7 mm)
持续时间	26 周	8 周(<i>n</i> =1/组),26 周
X 线片	未报道	4 周,8 周,16 周,26 周
X 线平片分级(定量)	未报道	与小鼠体内的植入物对比
组织学	未报道	脱钙,H&E
生物力学测试	扭转失败	外植体的抗压强度
空白对照	未报道	是(2 只)1 例未愈合,1 例少量骨形成
其他评估	未报道	未报道

B.5 绵羊骨节段 CSD 模型示例

参见表 B.5。

表 B.5 绵羊骨节段 CSD 模型示例

类别	Gao, et al	Gugala, et al	Marcacci, et al	Kon, et al
文献来源	Acta Orthop Trauma Surg,116:290-294,1997	J Ortho Trauma,13(3): 187-195,1999	Calcif Tissue Int, 64:83-90	J Biomed Matls Res, 49:328-337,2000
品种	绵阳	瑞士羊	意大利 massese 羊	意大利 massese 羊
性染色体	未报道	雌性	雌性	雌性
年龄	成年	6 岁~7 岁	2 岁	2 岁
体重	平均 51 kg (41 kg~66 kg)	50 kg~60 kg		
组的大小(<i>n</i>)	19 只(11 只/8 只)	18 只(3 只/组)	5 只(1 只/组)	4 只(2 只/组)

表 B.5 (续)

类别	Gao, et al	Gugala, et al	Marcacci, et al	Kon, et al
缺陷大小	2 cm	4 cm	3.5 cm	3.5 cm
双侧/单侧	单侧(左侧胫骨)	双侧胫骨(未报道)	单侧(左侧胫骨)	单侧(左侧胫骨)
骨膜切除	未报道	是	是	与 Marcacci 一样
固定术	外部环+K-线(11), 自动压缩板(8)	AO 外固定+骨圆针	外固定(VM-Jet CiTiEffe, 意大利)	外固定(VM-Jet CiTiEffe, 意大利)
植入材料	TCP 垫片(11), 无(8)	PLGA 膜 or CBM (自体/异体)	多孔空心 HA 柱	HA 柱或 HA 柱复合 MSCs
植入体积	未报道(柱 2 cm 长)	未报道	(35 mm×20 mm D; 10 mm 中心孔)	
持续时间	16 周	16 周	直到 270 天	8 周
X 线片	术后 3 周, 6 周, 12 周, 16 周	0, 每两周	0, 每 20 天	0, 每 20 天; 术后 X 线片
X 线平片 分级(定量)	Displ 指数(DI) 对最大侧向	未报道	未报道	未报道
组织学	未脱钙(van Gieson 染色)和脱钙 (阿尔新蓝)	脱钙和未脱钙 吉姆萨和伊红	脱钙(H&E, Mallory, PAS, 阿尔新蓝)	未脱钙切片; 图像分析骨形成百分比
生物力学 测试	不适用	—	无	压痕
其他评价		CT(8 周, 10 周, ..., 16 周)	microrad	Gross exam, microrad, SEM
空白对照	是, 16 周时对照组的 缺损无愈合	否, 但无愈合没有 自体/异体缺损	无	否, 控制—HA 柱 w/o 细胞; 部分骨生长
类别	Blokhuis, et al	Petite, et al	Gugala and Gogolewski	Viateau, et al
引用	J Biomed Matls Res, 51(3):369-375, 2000	Nature Biotechnol, 18: 959-63, 2000	Injury, 33: SB71-SB76, 2002	Amer J Vet Res, 65: 1653-1657, 2004
品种	羊	羊	瑞士的山羊皮	预阿尔卑斯羊
性染色体	雌性	未报道	未报道	雌性
年龄	未报道	未报道	未报道	2 岁
体重	50 kg~75 kg	未报道	未报道	平均 60 kg
组的大小(n)	31 只(n=8 只/组 or 7 只/组)	未报道	3 只/组	18 只(3 只/3 只/5 只/7 只)
缺陷大小	3 cm	6 mm, 12 mm, 15 mm, 25 mm 长	4 cm 长	0.5, 1, 1.5, 2×直径 (平均 6 mm, 13 mm, 25 mm)
双侧/单侧	单侧胫骨	跖骨	胫骨(单边)	左跖骨Ⅲ及Ⅳ
骨膜去除			是的(骨段切除)	

表 B.5 (续)

类别	Gao, et al	Gugala, et al	Marcacci, et al	Kon, et al	
固定术	AO 非扩髓胫骨钉, 锁紧螺栓	板/6 个螺丝	AO 外固定架	动力加压接骨板	
植入材料	磷酸钙, CP/ BMA, 自体移植, 空	珊瑚 w/w/o 细胞	膜(6)配置; 2 组包括自体	无, 自体(4 组)	
植入体积	未报道	未报道	未报道	未报道	
持续时间	12 周	16 周	16 周	16 周	
X 线片	12 周(接触)	4 周, 8 周, 12 周, 16 周	每周通过 16 周	0 周, 4 周, 8 周, 12 周, 16 周	
X 线平片分级 (定量)	0 (none)-4 (断缘少量骨)			定性; 量骨附着在 microrad	
组织学	脱钙, 托尔蓝 & GOLDNER 三色	脱钙, 皮质骨和松质骨区	未脱钙; 定性	未脱钙, Stevenal 蓝染色	
生物力学测试	扭转至失效	N	—	—	
其他评估	QCT, DEXA				
空白对照	有。与 CP 颗粒, CP + 骨髓相比扭转刚度更大	有。无骨性愈合。少量成骨	无	有(3 组)。对照组均无愈合。可见骨吸收和纤维组织	
类型	Zhangua, et al	Regauer, et al	Viateau, et al	Pluhar, et al	Viateau, et al
引用	J Huazhong Univ Sci Technol, 24(10): 62-67, 2004	Bone, 38(4): 564-570, 2006	Veterinary Surg, 35: 445-452, 2006	JBJS-Br, 88B: 960-966, 2006	JOR, 25: 741-749, 2007
品种	羊	美利奴羊	前阿尔卑斯羊	羊	前阿尔卑斯羊
性染色体	未报道	未报道	雌性	雌性	雌性
年龄	(2±0.5) 年	成年	2 年	骨骼发育成熟	2 年
体重	(35±10) kg		平均 60 kg	平均 70 kg	平均 60 kg
组的大小(n)	20 只(8 只/8 只/4 只)	19 只	11 只	26 只 (10 只/10 只/6 只)	21 只
缺陷大小	2.5 cm 长	5 cm	2.5 cm	5 cm	2.5 cm
双侧/单侧	单侧跖骨	单侧胫骨	左跖骨	单侧胫骨	单侧跖骨
骨膜去除	未报道	未报道	未报道	是	是
固定术	未报道	IM 杆	压缩板, 支具 (第一次手术)	髓内钉	压缩板
植入材料	多孔 HA 复合 MSCs, 多孔 HA, 或空白	OP-1/失活 DBM, OP-1/失活 DBM 复合自体骨, 单独自体骨	PMMA 垫片 6 周、然后自体骨或空白	胶原/OP-1; 胶原/OP-1/CMC, 空白	PMMA 垫片 6 周; 然后自体骨颗粒, 自体骨颗粒复合细胞或空白
植入体积	未报道		4 000 mm ³		
持续时间	6 周, 12 周, 24 周	12 周	6 mos 2 日手术后	4 个月	2 次手术后 6 个月

表 B.5 (续)

类别	Gao, et al	Gugala, et al	Marcacci, et al	Kon, et al	
X 线片分级 (定量)	6 周, 12 周, 24 周	Faxitron, 12 周	未报道	每月 (5 / 组)	每月
“分级”的 X 射线 (定量)	0-4 定性; 愈合组织厚度	未报道	未报道	未报道	未报道
组织学	未脱钙; 自体移植	未脱钙; 扫描电镜	脱钙 H&E, Masson 染色等; 胶原 I 免疫 染色, CBFa (preOBs), CD14 (macs), RANK (preOCs)	未报道	未脱钙-Stevenolo 蓝染色, Van Gieson picrofuschine
生物力学 测试	压缩强度 (载荷 10 N/mm)	未报道	未报道	扭转强度、 模量、硬度 (100 Hz)	未报道
其他评估	未报道	未报道	CT	未报道	CT
空白对照	是 (4)。24 周末愈合	无	是。无骨愈合; 只有皮质骨断 端有骨沉积	是。无愈合, 60% 纤维填 充物。力学 强度显著低 于治疗组	是。仅切缘有骨 生长, 缺损内 填充纤维组织

参 考 文 献

- [1] ASTM F2721-09(2014) Standard Guide for Pre-clinical in vivo Evaluation in Critical Size Segmental Bone Defects
- [2] ASTM F 561 Practice for Retrieval and Analysis of Medical Devices and Associated Tissues and Fluids
- [3] ASTM F 565 Practice for Care and Handling of Orthopedic Implants and Instruments
- [4] ASTM F 895 Test Method for Agar Diffusion Cell Culture Screening for Cytotoxicity
- [5] ASTM F 981 Practice for Assessment of Compatibility of Biomaterials for Surgical Implants with Respect to Effect of Materials on Muscle and Bone
- [6] ASTM F 1983 Practice for Assessment of Compatibility of Absorbable/Resorbable Biomaterials for Implant Applications
- [7] ASTM F 2150 Guide for Characterization and Testing of Biomaterial Scaffolds Used in Tissue-Engineered Medical Products
- [8] ASTM F 2451 Guide for in vivo Assessment of Implantable Devices Intended to Repair or Regenerate Articular Cartilage
- [9] ISO 10993 Biological Evaluation of Medical Devices—Part 5: Tests for *in vitro* Cytotoxicity³
- [10] 21 CFR Part 58 Good Laboratory Practice for Nonclinical Laboratory Studies⁴
- [11] 21 CFR 610.12 General Biological Products Standards—Sterility⁴
- [12] ASTM F 561 Standard Practice for Retrieval and Analysis of Medical Devices, and Associated Tissues and Fluids
- [13] ASTM F 565 ASTM F565-04(2013) Standard Practice for Care and Handling of Orthopedic Implants and Instruments
- [14] ASTM F 895 Standard Test Method for Agar Diffusion Cell Culture Screening for Cytotoxicity
- [15] ASTM F 981 Standard Specification for Free-Machining Stainless Steel Plate, Sheet, and Strip
- [16] Bruder, S. P., Kraus, K. H., Goldberg, V. M., and Kadiyala, S., “The Effect of Implants Loaded with Autologous Mesenchymal Stem Cells on the Healing of Canine Segmental Bone Defects,” *Journal of Bone and Joint Surgery-American*, Vol 80-A, No.7, 1998, pp.985-996
- [17] Cook, S.D., Salkeld, S.L., Brinker, M.R., Wolfe, M.W., and Rueger, D.C., “Use of an Osteo-inductive Biomaterial (rhOP-1) in Healing Large Segmental Defects,” *Journal of Orthopaedic Trauma*, Vol 12, No.6, 1998, pp.407-412
- [18] An, Y.H., and Friedman, R.J., eds., *Animal Models in Orthopaedic Research*, CRC Press LLC, Boca Raton, FL, 1999
- [19] Itoh, T., Mochizuki, M., Nishimura, R., Matsunaa, S., Kadosawa, T., Kokubo, S., Yokota, S., and Sasaki, N., “Repair of Ulnar Segmental Defect by Recombinant Human Bone Morphogenetic Protein-2 in Dogs,” *J Vet Med Sci*, Vol 60, No.4, 1998, pp.451-458
- [20] Sciadini, M.F., and Johnson, K.D., “Evaluation of Recombinant Human Bone Morphogenetic Protein-2 as a Bone Raft Substitute in a Canine Segmental Defect Model,” *Journal of Orthopaedic Research*, Vol 18, 2000, pp.289-302

- [21] Arinzech, T.L., Peter, S.J., Archambault, M.P., Van Den Bos, C., Gordon, S., Kraus, K., Smith, A., and Kadiyala, S., "Allogenic Mesenchymal Stem Cells Regenerate Bone in a Critical-Sized Canine Segmental Defect," *Journal of Bone and Joint Surgery-American*, Vol 85-A, No.10, 2003, pp. 1927-1935
- [22] Petite, H., Viateau, V., Bensaid, W., Meunier, A., de Pollak, C., Bourguignon, M., Oudina, K., Sedel, L., and Guillemain, G., "Tissue-Engineered Bone Regeneration," *Nature Biotechnology*, Vol 18, 2000, pp.959-963
- [23] Zhanghua, L.I., Yan, Y., Wang, C., Xia, R., Zhang, Y., Zhao, Q., Liao, W., Wan, Y., and Lu, J., "Repair of Sheep Metatarsus Defects by Using Tissue-Engineering Technique," *Journal of Huazhong University of Science and Technology*, Vol 24, No.10, 2004, pp.62-67
- [24] Viateau, V., Guillemain, G., Yang, Y.C., Bensaid, W., Reviron, T., Oudina, K., Meunier, A., Sedel, L., and Petite, H., "A Technique for Creating Critical-Size Defects in the Metatarsus of Sheep for Use in Investigation of Healing of Long-Bone Defects," *American Journal of Veterinary Research*, Vol 65, No.12, 2004, pp.1653-1657
- [25] Viateau, V., Guillemain, G., Calando, Y., Logeart, D., Oudina, K., Sedel, L., Hannouche, D., Bousson, V., and Petite, H., "Induction of a Barrier Membrane to Facilitate Reconstruction of Massive Segmental Diaphyseal Bone Defects: An Ovine Model," *Veterinary Surgery*, Vol 35, 2006, pp.445-452
- [26] Viateau, V., Guillemain, G., Bousson, V., Oudina, K., Hannouche, D., Sedel, L., Logeart-Avramoglou, D., and Petite, H., "Long-Bone Critical-Size Defects Treated with Tissue-Engineered Grafts: A Study on Sheep," *Journal of Orthopaedic Research*, Vol 25, 2007, pp.741-749
- [27] Gao, T.J., Lindholm, T.S., Kommonen, B., Ragni, P., Paronzini, A., and Lindholm, T.C., "Stabilization of an Inserted Tricalcium Phosphate Spacer Enhances the Healing of a Segmental Defect in Sheep," *Arch Orthop Trauma Surg*, Vol 116, 1997, pp.290-294
- [28] Gugala, Z. and Gogolewski, S., "Regeneration of Segmental Diaphyseal Defects in Sheep Tibiae Using Resorbable Polymeric Membranes: A Preliminary Study," *Journal of Orthopaedic Trauma*, Vol 13, No.3, 1999, pp.187-195
- [29] Kon, E., Muraglia, A., Corsi, A., Bianco, P., Marcacci, M., Martin, I., Boyde, A., Ruspantini, I., Chistolini, P., Rocca, M., Giardino, R., Cancedda, R., and Quarto, R., "Autologous Bone Marrow Stromal Cells Loaded onto Porous Hydroxyapatite Ceramic Accelerate Bone Repair in Critical-Size Defects of Sheep Long Bones," *Journal of Biomedical Materials Research*, Vol 49, 2000, pp.328-337
- [30] Blokhuis, T.J., Wipperfman, B.W., den Boer, F.C., van Lingen, A., Patka, P., Bakker, F.C., and Haarman, H.J.T.M., "Resorbable Calcium Phosphate Particles as a Carrier Material for Bone Marrow in an Ovine Segmental Defect," *Journal of Biomedical Materials Research*, Vol 51, 2000, pp. 369-375
- [31] Gugala, Z., and Gogolewski, S., "Healing of Critical-Size Segmental Bone Defects in the Sheep Tibiae Using Resorbable Polylactide Membranes," *Injury*, Vol 33, No. (Suppl 2, 2002, pp. SB71-SB76
- [32] Pluhar, G.E., Turner, A.S., Pierce, A.R., Toth, C.A., Wheeler, D.L., "A Comparison of Two Biomaterial Carriers for Osteogenic Protein-1 (BMP-7) in an Ovine Critical Defect Model," *Journal of Bone and Joint Surgery-British*, Vol 88-B, 2006, pp.960-966
- [33] Regauer, M., Jurgens, P., Budenhofer, U., Hartstock, M., Bocker, W., Burklein, D., Mutschler, W., Sader, R., and Schieker, M., "Quantitative Scanning Acoustic Microscopy Compared to Microradiography for Assessment of New Bone Formation," *Bone*, Vol 38, 2006, pp.564-570

- [34] Dai, K. R., Xu, X. L., Tang, T. T., Zhu, Z. A., Yu, C. F., Lou, J. R., and Zhang, X. L., "Repairing of Goat Tibial Bone Defects with BMP-2 Gene-Modified Tissue Engineered Bone," *Calcified Tissue International*, Vol 77, 2005, pp.55-61
- [35] Yasko, A. W., Lane, J. M., Fellingner, E. J., Rosen, V., Wozney, J. M., and Wang, E. A., "The Healing of Segmental Bone Defects, Induced by Recombinant Human Bone Morphogenetic Protein (rhBMP-2). A Radiographic, Histological, and Biomechanical Study in Rats," *Journal of Bone & Joint Surgery-American Volume*, Vol 74, No.5, 1992, pp.659-670
- [36] Chen, X., Kidder, L. S., Lew, W. D., "Osteogenic Protein-1 Induced Bone Formation in an Infected Segmental Defect in the Rat Femur," *Journal of Orthopaedic Research*, Vol 20, No.1, 2002, pp.142-150
- [37] Oakes, D. A., Lee, C. C., and Lieberman, J. R., "An Evaluation of Demineralized Bone Matrices in a Rat Femoral Defect Model," *Clin Orthop Rel Res*, Vol 413, 2003, pp.281-290
- [38] Tsuchida, H., Hashimoto, J., Crawford, E., Manske, P., and Lou, J., "Engineered Allogeneic Mesenchymal Stem Cells Repair Femoral Segmental Defect in Rats," *Journal of Orthopaedic Research*, Vol 21, No.1, 2003, pp.44-53
- [39] Vogelin, E., Jones, N. F., Huang, J. I., Brekke, J. H., and Lieberman, J. R., "Healing of a Critical-Sized Defect in the Rat Femur with Use of a Vascularized Periosteal Flap, a Biodegradable Matrix, and Bone Morphogenetic Protein," *Journal of Bone & Joint Surgery-American Volume*, Vol 87, No.6, 2005, pp.1323-1331
- [40] Jager, M., Sager, M., Lensing-Hohn, S., and Krauspe, R., "The Critical Size Bony Defect in a Small Animal for Bone Healing Studies (II): Implant Evolution and Surgical Technique on a Rat's Femur," *Biomedizinische Technik*, Vol 50, No.5, May 2005, pp.137-142
- [41] Betz, O. B., Betz, V. M., Nazarian, A., Pilapil, C. G., Vrahas, M. S., Bouxsein, M. L., Gerstenfeld, L. C., Einhorn, T. A., and Evans, C. H., "Direct Percutaneous Gene Delivery to Enhance Healing of Segmental Bone Defects," *Journal of Bone & Joint Surgery-American Volume*, Vol 88A, No.2, 2006, pp.355-365
- [42] Cook, S. D., Baffes, G. C., Wolfe, M. W., Sampath, T. K., Rueger, D. C., and Whitecloud, T. S. 3rd, "The Effect of Recombinant Human Osteogenic Protein-1 on Healing of Large Segmental Bone Defects," *Journal of Bone & Joint Surgery-American Volume*, Vol 76, No.6, 1994, pp.827-838
- [43] Bostrom, M., Lane, J. M., Tomin, E., Browne, M., Berberian, W., Turek, T., Smith, J., Wozney, J., and Schildhauer, T., "Use of Bone Morphogenetic Protein-2 in the Rabbit Ulnar Nonunion Model," *Clinical Orthopaedics & Related Research*, Vol 327, 1996, pp.272-282
- [44] Smith, J. L., Jin, L., Parsons, T., Turek, T., Ron, E., Philbrook, C. M., Kenley, R. A., Marden, L., Hollinger, J., Bostrom, M. P. G., Tomin, E., and Lane, J. M., "Osseous Regeneration in Pre-clinical Models Using Bioabsorbable Delivery Technology for Recombinant Human Bone Morphogenetic Protein 2 (rhBMP-2)," *Journal of Controlled Release*, Vol 36, No.1-2, 1995, pp.183-195
- [45] Wheeler, D. I., Chamberland, D. I., Schmitt, J. M., Buck, D. C., Brekke, J. H., Hollinger, J. O., Joh, S. P., and Suh, K. W., "Radiomorphometry and Biomechanical Assessment of Recombinant Human Bone Morphogenetic Protein-2 and Polymer in Rabbit Radius Osteotomy Model," *Journal of Biomedical Materials Research*, Vol 43, No.4, 1998, pp.365-373
- [46] Brekke, J. H., Toth, J. M., "Principles of Tissue Engineering Applied to Programmable Osteogenesis," *Journal of Biomedical Materials Research*, Vol 43, No.4, 1998, pp.380-398
- [47] Mackenzie, D. J., Sipe, R., Buck, D., Burgess, W., and Hollinger, J., "Recombinant Human

Acidic Fibroblast Growth Factor and Fibrin Carrier Regenerates Bone,” *Plastic & Reconstructive Surgery*, Vol 107, No.4, 2001, pp.989-996

[48] Geiger, F., Bertram, H., Berger, I., Lorenz, H., Wall, O., Eckhardt, C., Simank, H.G., and Richter, W., “Vascular Endothelial Growth Factor Gene-Activated Matrix (VEGF165-GAM) Enhances Osteogenesis and Angiogenesis in Large Segmental Bone Defects,” *Journal of Bone & Mineral Research*, Vol 20, No.11, Nov 2005, pp.2028-2035

[49] Marcacci, M., Kon, E., Zaffagnini, S., Muraglia, A., Giardino, R., Rocca, M., Corsi, A., Benvenuti, A., Bianco, P., Quarto, R., Martin, I., Cancedda, R., “Reconstruction of Extensive Long Bone Defects in Sheep Using Porous Hydroxyapatite Sponges,” *Calcified Tissue International*, Vol 64, 1999, pp.83-90

[50] Buma P., Schreurs W., Verdonchot N., “Skeletal tissue engineering - from in vitro studies to large animal models,” *Biomaterials*, Vol 25, No.9, 2004, pp.1487-1495

[51] Carson, F., *Histotechnology, A Self Instructional Text*, ASCP Press, Chicago, IL, 1997

[52] Sheehan, D., and Hrapchak, B., “Bone,” *Theory and Practice of Histotechnology*, McGrawHill Book Company, NY, 1960, p.787

[53] Callis, G. and Sterchi, D., “Decalcification of Bone: Literature Review and Practical Study of Various Decalcifying Agents, Methods, and Their Effects on Bone Histology,” *J. Histotechnol.* Vol 21, 1998, pp.49-58

[54] Luna, L., *Manual of Histologic Staining Methods of Pathology*, Armed Forces Institute, 1960

[55] Sterchi, D., and Keefer, L., “Modified Mallory Aniline Blue Stain for Bone, Cartilage, and Other Connective Tissues,” *Journal of Histotechnology*. Vol 21, 1998, pp.129-133

中 华 人 民 共 和 国 医 药
行 业 标 准
组织工程医疗器械产品 骨
体内临界尺寸骨缺损的临床前评价指南
YY/T 1679—2021

*

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
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

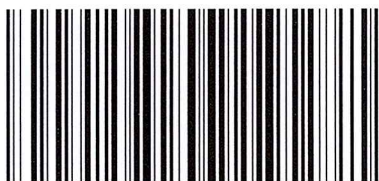
*

开本 880×1230 1/16 印张 1.75 字数 46 千字
2021年3月第一版 2021年3月第一次印刷

*

书号: 155066·2-34568 定价 33.00 元

如有印装差错 由本社发行中心调换
版权专有 侵权必究
举报电话:(010)68510107



YY/T 1679-2021