

T/CVDA

团 体 标 准

T/CVDA XXXXX—2025

# 有助于增强宠物关节性能产品有效性评价 技术标准

Technical standards for evaluating the effectiveness of products that help enhance pet joint performance

(征求意见稿)

XXXX - XX - XX 发布

XXXX - XX - XX 实施

中国兽药协会 发布



# 目 录

目 录.....	1
前 言.....	2
1 范围 .....	3
2 规范性引用文件 .....	3
3 术语和定义 .....	3
3.1 宠物 .....	3
3.2 关节 .....	3
3.3 关节炎 .....	3
3.4 骨性关节炎 .....	3
3.5 类风湿性关节炎 .....	4
4 受试样品要求 .....	4
5 实验设计 .....	4
5.1 实验动物 .....	4
5.2 受试样品给予剂量与分组 .....	4
5.3 受试样品给予时间 .....	4
6 动物实验 .....	4
6.1 对骨关节炎模型动物的实验 .....	4
6.2 对类风湿性关节炎模型动物的实验 .....	7
7 宠物试食试验 .....	8
7.1 试食宠物要求 .....	8
7.2 组别设置要求 .....	9
7.3 分析测试指标 .....	9
8 数据处理与结果判定 .....	10
8.1 数据处理 .....	10
8.2 结果判定 .....	11
9 实验报告 .....	12
参考文献 .....	13

## 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。

本文件由中国兽药协会提出并归口。

本文件起草单位：上海宠幸宠物用品有限公司、卫仕宠物营养科学研究院（江苏）有限公司、上海安谱实验科技股份有限公司、江苏大学、芜湖卫仕生物科技有限公司、东西志览国际文化发展无锡有限公司。

本文件主要起草人：马海乐、段玉清、李云亮、严子华、马海建、刘淑琴、宋亮亮。

## 1 范围

本标准规定有助于增强宠物关节性能产品的术语和定义，并规范有助于增强宠物关节性能产品有效性评价技术，包括受试样品要求、实验设计、动物实验、宠物试食试验、数据处理与结果判定、实验报告。

本标准适用于声称具有有助于增强宠物关节性能的宠物饲料（宠物食品）、保健产品、宠物零食、饲料原料及添加剂的有效性评价。

本标准适用于以宠物犬、猫为主的伴侣动物。

## 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；未注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本文件。

- GB/T 14924.9—2001 实验动物 配合饲料 常规营养成分的测定
- GB 13078—2017 饲料卫生标准
- GB/T 18823 饲料检测结果判定的允许误差
- GB/T 35892 实验动物 福利伦理审查指南进行
- GA/T 1661—2019 法医学 关节活动度检验规范
- DB64/T 1523.6—2018，老年慢性病护理服务规范 第6部分：退行性骨关节病
- DB44/T 2329—2021 膝骨关节炎（骨痹）中西医结合临床试验指南
- 保健食品功能检验与评价技术指导原则（2023年版）
- 保健食品功能检验与评价方法（2023年版）
- 农业农村部第20号公告《宠物饲料管理办法》、《宠物饲料标签规定》
- 中华人民共和国农业部公告第1224号《饲料添加剂安全使用规范》

## 3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

### 3.1 宠物 pet

家庭豢养并宠爱的动物。主要指作为伴侣动物的犬和猫。

### 3.2 关节 articulation

骨与骨之间的连结。基本构造包括关节面及关节软骨、关节囊和关节腔三部分。有的关节有人带、关节盘等辅助结构。

### 3.3 关节炎 arthritis

各种理化、生物因素引起的关节腔及其组成部分的炎症性病变。

### 3.4 骨性关节炎 osteoarthritis

全称“慢性骨关节炎”。关节软骨、骨骺、骨膜及关节韧带发生慢性关节变形，并伴有机能破坏性、增殖性慢性炎症的关节病。

### 3.5 类风湿性关节炎 *rheumatoid arthritis*

由于体内形成抗丙种球蛋白自身抗体所致的，以慢性进行性糜烂多关节炎为主要病变的一种全身性结缔组织（胶原-血管）疾病。

## 4 受试样品要求

应提供受试样品的名称、性状、规格、批号、生产日期、保质期、保存条件、申请单位名称、生产企业名称、配方、生产工艺、质量标准、营养功能以及推荐摄入量等信息。受试样品应是规格化的定型产品，即符合既定的配方、生产工艺及质量标准。应提供受试样品的主要成分、功效成分、标志性成分及可能的有害成分的分析报告。申请产品审定或登记的受试物，应与拟上市的产品完全一致。

## 5 实验设计

宠物犬猫关节炎主要包括骨性关节炎、类风湿性关节炎、风湿性关节炎、创伤性关节炎及化脓性关节炎。本标准根据宠物犬猫临床常见的关节炎发病种类设计骨关节炎（Osteoarthritis, OA）和类风湿性关节炎（Rheumatoid Arthritis, RA）两类动物实验，用于评价有助于增强宠物关节性能产品的有效性。实验包括动物实验和宠物试食试验，所列指标均为必做项目。根据受试样品的性能选择骨关节炎和类风湿性关节炎其中一种进行动物实验。

### 5.1 实验动物

选用 SPF 级大鼠或小鼠，雄性，6~8 周龄。SPF 环境进行饲养，恒温（22~25℃）、12h 光暗循环，自由摄食饮水，适应性饲养 1 周后开始实验。

### 5.2 受试样品给予剂量与分组

实验设三个剂量组和一个模型对照组，其中一个剂量应相当于宠物犬猫推荐摄入量（折算为每公斤体重的剂量）的 2.5 倍，且最高剂量不得超过犬、猫推荐摄入量的 10 倍。另设两个剂量组，必要时设阳性对照组和空白对照组。大鼠 8~10 只/组，小鼠 10~12 只/组。

### 5.3 受试样品给予时间

原则上为 4~10 周，一般不低于 4 周，不超过 10 周。

## 6 动物实验

### 6.1 对骨关节炎模型动物的实验

OA 是一种以关节软骨退行性变和继发性骨质增生为特征的慢性关节疾病，又称退化性关节疾病。多发生于中老年犬猫，尤其犬类。关节软骨退化出现骨质增生，在关节边缘周围形成骨赘。软骨下骨发生重塑现象。临床症状都与疼痛及僵硬有关：不易从休息（躺着）的姿势爬起；触碰时疼痛；活动量减少；跛行、散步时落后、吠叫或呜咽、不愿走动、跑跳、玩耍或爬楼梯；个性改变，包括攻击或退缩行为。OA 模型适合于大鼠注射用的药物主要有碘乙酸盐、木瓜蛋白酶和胶原酶等。以上模型任选其一用于改善宠物 OA 产品有效性评价模型。

#### 6.1.1 骨关节炎模型的建立

### 6.1.1.1 碘乙酸盐诱导骨关节炎模型

碘乙酸盐诱导的OA模型具有关节退变渐进性的特征，也是研究OA疼痛、检测治疗方法的经典模型，常用于预防和治疗骨性关节炎药物的开发。造模方法：将大鼠随机分组。模型组和受试样品组大鼠，使用碘乙酸，一次注射0.2mL到大鼠关节腔。对照组注射生理盐水到关节腔。实验周期4~6周。造模成功后，受试样品按照剂量灌胃受试样品。实验期间和结束分别测定各项指标。

### 6.1.1.2 木瓜蛋白酶诱导骨关节炎模型

木瓜蛋白酶诱导大鼠OA模型是一种经典的实验性OA造模方法，其原理是利用木瓜蛋白酶的蛋白水解作用破坏关节软骨基质（尤其是蛋白多糖），引发软骨降解、关节炎症及骨质增生等类似OA的病理改变。

①造模方法。分别配制质量浓度4%木瓜蛋白酶和0.03mol/L的L-半胱氨酸的生理盐水溶液，按体积比1:1混合后，于37℃水浴孵育15min激活酶，上述溶液现用现配。大鼠腹腔注射麻醉剂，待四肢松弛、痛觉消失后，将其俯卧固定，暴露双侧后肢膝关节；触摸膝关节，确定髌骨与胫骨平台间隙（髌韧带外侧或内侧进针点），用75%酒精消毒局部皮肤；用30G针头沿髌骨边缘斜向关节腔刺入（角度约30°，深度2~3mm），缓慢推注木瓜蛋白酶溶液，每侧膝关节注射50~100μL（根据大鼠体型调整，避免注射量过大导致关节腔破裂），间隔2~3天注射1次，共注射2~3次（如第0天、第3天、第6天），注射时无明显阻力，拔针后无液体外渗，表明注射成功。造模后2~4周检测模型是否成功。观察关节腔可见滑膜充血、水肿，关节液增多（淡黄色浑浊液体）；软骨表面早期出现粗糙、失去光泽，后期可见糜烂、溃疡或软骨下骨暴露。

②注意事项。A.进针角度和深度需熟练掌握，避免损伤关节内韧带或软骨（可先在离体关节上练习）。B.严格无菌操作，防止关节腔感染（若注射后关节明显肿胀、发红，可能为感染，需剔除该样本）。C.模型稳定性：个体差异可能导致造模效果不均，建议每组至少8只大鼠，以减少误差。D.造模后4周左右病理改变最典型，8周后可能因关节代偿出现修复反应，需根据实验周期选择检测时间点。

### 6.1.1.3 胶原酶诱导骨关节炎模型

胶原酶是一种金属蛋白酶，通过分解软骨间质的胶原蛋白，损伤关节内的肌腱、韧带和半月板等各型胶原纤维，从而导致膝关节的不稳定，诱导膝OA的发生。造模方法：选用健康SPF级6月龄SD大鼠，不限雄雌，体重(220±20)g，适应性麻醉生效后，在实验第1、4天于大鼠膝关节腔注射0.4mg/ml的II型胶原蛋白酶溶液。第7天运用膝关节核磁共振技术进行模型鉴定，确认造模成功。

## 6.1.2 分析检测指标

指标包括体征、膝关节肿胀程度、关节功能和病理以及细胞因子的检测，均为必做项目。

### 6.1.2.1 体征观察与测量

实验前、后及期间，对大鼠活动状态、炎症部位和体重进行观察和测量。该部分包括三项内容，其中一般体征和体重是必测项目，关节皮肤温度测定为选做项目。具体：①一般体征，如大鼠生长状况、膝关节发育、精神状态、皮毛光泽、活动及采食情况；②每2~3天记录大鼠体重。③膝关节部位皮肤温度测定，如有炎症性发热反应，关节部位皮肤温度会升高，可通过红外成像反映出疼痛阈值。

### 6.1.2.2 膝关节肿胀程度评分与测量

①肿胀程度观察。采用关节炎指数积分评价关节炎程度。评价标准采用5级评分法，0分为没有肿胀；4分为肿胀严重。累积得分即为每只大鼠的关节炎指数。具体见表1。

②肿胀程度测量。测量膝关节的周长评价关节的肿胀度，反映关节炎症程度。关节肿胀度测量采用游标卡尺测定膝关节周长，或者取15cm细绳围绕大鼠关节一圈，拉直后测量大鼠关节周长。每周记录3次数据，计算肿胀度。

表1 关节肿胀程度评分

分值	描述
----	----

0	无肿胀
1	轻度肿胀，肿胀范围较小，只略显肿胀
2	肿胀范围增大，出现局部肿胀难以忽略的现象，有时会伴随疼痛和不适感。
3	肿胀程度为明显肿胀，有明显不规则的肿块出现。
4	重度肿胀：肿胀区域非常广，严重影响肢体活动和正常功能。患者可能会产生强烈的不适感，包括剧烈的疼痛、明显肿胀、色素变化。对应的肿胀程度未明显改变，在其他症状下出现重度不适的情况。

#### 6.1.2.3 关节功能观察与测量

通过评估动物膝关节的运动行为和关节活动度评价关节功能。

①关节功能行为观察。使大鼠自然行走约 1min，观察大鼠行走状态、运动轨迹及运动量，并进行评分。评分标准采用 4 个级别，0 分为代表关节功能正常，3 分为严重运动障碍，具体见表 2。

②膝关节活动度测量。通过量化膝关节运动角度来评估关节活动度，使用量角器测定。膝关节做屈曲和伸展：完全伸展为 0°，屈曲可达 130~140°。注意：需暴露被测量关节；严格固定关节近端肢体；双侧对比测量。

表 2 关节肿胀程度评分

分值	描述
0	正常步态，双足均匀着地
1	足着地减轻足趾未展开，轻度跛行
2	足屈起，趾背着地，明显跛行
3	足完全离地，三足步态

#### 6.1.2.4 膝关节病理学观察

剥离已处死大鼠的完整膝关节（包括股骨远端、胫骨近端及髌骨），用 4% 的多聚甲醛固定 24h，在经 EDTA 脱钙（2~3 周），石蜡包埋切片（5 μm 厚），进行染色和观察。染色方法包括：A. 苏木精和伊红（HE）染色：观察软骨层结构紊乱、细胞减少，滑膜炎症细胞浸润，骨质增生（骨赘形成）；B. 番红 O-固绿染色：重点评估蛋白多糖丢失（番红 O 着色变浅或消失），软骨基质降解程度。评分标准：采用 OARSI 评分，将 OA 分为以下七级，量化软骨损伤程度（分数越高，OA 越严重），具体描述见表 3。

表 3 关节软骨组织病理学评分

分级	描述
0	软骨表面平整，软骨完整
1	软骨表面浅层纤维形成，且不均匀
2	软骨表面不连续，伴有细胞增殖，在 II-III 层异染物质增加或减少
3	软骨皱裂扩散至 III 层或出现侵蚀
4	软骨侵蚀加重，关节软骨出现了损害
5	关节软骨剥脱
6	关节变形

#### 6.1.2.5 细胞因子水平的检测

主要包括关节液和/或血清中细胞因子。①关节液细胞因子主要包括炎症因子（IL-1β、TNF-α）、基质金属蛋白酶（matrix metalloproteinases, MMPs,）中的 MMPs-1、MMPs-3 和 MMPs-13 含量，其中 IL-1β 和 TNF-α 为必做项目，MMPs 中任做一项；②血清细胞因子主要包括 IL-6、IL-1、IL-4、IL-1β、TNF-α 及前列腺素 E2（PGE2）水平等，其中 IL-1β、TNF-α、IL-6 为必做项目，其他三项任做一项。

以上指标均采用 ELISA 方法，按照各自试剂盒说明书进行操作。

## 6.2 对类风湿性关节炎模型动物的实验

RA 是一种以滑膜炎为病理基础并最终可能导致关节畸形的自身免疫疾病。以关节病变为主，最初主要症状呈现为关节晨僵、肿胀和疼痛，随着疾病的发展，可能发展为关节畸形，影响犬猫的正常关节功能。部分犬猫也可能表现为全身性症状，如发热、疲劳无力等。RA 研究常用模型主要包括胶原诱导型关节炎（CIA）、佐剂性关节炎（AA）和胶原抗体诱导型（CAIA）等。上述三种模型任选其一用于评价受试样品对类风湿性关节炎有效性。

### 6.2.1 类风湿性关节炎动物模型的建立

#### 6.2.2.1 胶原诱导型关节炎模型

CIA 模型临床症状（对称性关节炎、滑膜增生、血管翳形成）与人类 RA 高度相似。依赖 Th17 细胞和细胞因子（如 TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-17）介导的免疫反应。A. 适用动物与品系。常用 DBA/1J、C57BL/6 品系小鼠，5~7 周龄 SPF 级雄性；大鼠常用 SD、Wistar、Lewis 等，多选用 8 周龄雄性。B. 制备步骤。  
a. 抗原制备：将鸡/牛 II 型胶原溶于 0.05~0.1 mol/L 乙酸中，4℃过夜溶解，与完全弗氏佐剂（CFA）或不完全弗氏佐剂等体积混合乳化。b. 免疫注射。小鼠：第 1 天尾根部多点皮内注射 0.1 mL 乳剂，第 21 天腹腔注射 0.1 mL 乳剂加强免疫。大鼠：第 0 天背部、尾根部多点注射，第 7 天腹腔注射加强免疫。C. 观察指标。24~28 天后出现关节肿胀、滑膜炎及软骨破坏，42 天达病理高峰。

#### 6.2.2.2 佐剂性关节炎模型

AA 模型的病理特征（滑膜炎、骨质溶解、血管翳）与 RA 相似，但病程自限（4 个月后自愈）；以 T 细胞介导的免疫反应为主，适合研究 Th1/Th17 细胞分化机制。A. 适用动物与品系。Lewis 大鼠敏感性最高，SD 大鼠需优化佐剂浓度。B. 制备步骤。a. 佐剂配置：液状石蜡与羊毛脂按 2:1（冬季）或 6:4（夏季）混合，加入卡介苗（10~20 mg/mL）制成完全弗氏佐剂；b. 注射方法：皮内注射 0.1 mL CFA 至大鼠足垫或尾根部，1 周后加强免疫；C. 观察指标：注射后 18 小时局部肿胀达峰值，10~18 天出现对侧关节炎，20~30 天达高峰。

#### 6.2.2.3 胶原抗体诱导型模型

CAIA 模型发病迅速（3~8 天），适合快速评价有效性。依赖体液免疫和补体系统，与 CIA 的 Th17 机制互补。A. 适用动物：DBA/1J 品系小鼠，8 周龄雄性。B. 制备步骤。a. 抗体注射：腹腔注射抗 II 型胶原单克隆抗体混合物，3 天后注射脂多糖激活免疫反应。C. 观察指标：4 天后出现急性关节炎，6~8 天达高峰，表现为血管翳形成和软骨破坏。

### 6.2.3 分析检测指标

#### 6.2.3.1 体征观察和测量

按照 6.1.2.1 的内容和方法观察大小鼠一般体征和关节变化，测量关节炎症部位皮肤温度（每天）、体重（2~3 天测定一次），并拍照和记录。

#### 6.2.3.2 关节肿胀程度评分与测量

关节肿胀程度观察和测量均按照 6.1.2.2 中的方法进行。

#### 6.2.3.3 关节功能观察与测量

关节功能行为观察和关节活动度测量参见 6.1.2.3 中的方法。其中踝关节做跖屈（踝关节向足底方向弯曲 40~50°，表现为脚尖下压）、背伸（踝关节向足背方向弯曲 20~30°，表现为脚尖上抬）、内翻（足底向内侧翻转 0~35°）、外翻（足底向外侧翻转 0~25°）。注意：需暴露被测量关节；严格固定关节近端肢体；双侧对比测量。

#### 6.2.3.4 关节病理组织学评价

剪取已处死大/小鼠的踝关节，厚度小于0.5cm，面积小于15cm×15cm，标记近端、远端；迅速置于10%甲醛固定脱钙液中，脱钙时间以2~3天，至针刺组织无抵抗时为止。脱钙时禁盖瓶盖，以使脱钙时产生的气泡逸出，脱钙处理后进行石蜡包埋、切片，最后用HE染色，镜下观察。组织病理学评分依据滑膜细胞增殖、炎性细胞浸润、血管翳形成、炎症及骨质侵蚀（破坏）情况进行分级，0分为正常，分值越高代表损伤越严重，具体见表4。

表4 踝关节组织病理学评分

分值	滑膜细胞增殖	炎性细胞浸润	血管翳	炎症	骨质侵蚀
0	无增殖	无侵蚀	无改变	正常	正常
1	轻微增殖，2~4层滑膜细胞	较少的局部侵蚀	两个部位出现血管翳	轻度炎症，出现1个聚集物或较少的分散白细胞浸润	小量侵蚀，1~2个小的浅部位
2	中度增殖，4层以上滑膜细胞	广泛的局部侵蚀	4个部位出现血管翳，伴有软骨表面的侵蚀	中度炎症，2个或2个以上的白细胞聚集物	少量侵蚀，1~4个中等大小和深度部位
3	滑膜细胞过度增殖，侵蚀软骨和骨，关节间隙消失	广泛侵蚀到关节囊，伴有凝聚体的形成	4个以上部位出现血管翳或二个部位出现大范围的血管翳	重度炎症，白细胞融合、分散浸润明显	中等侵蚀，5个以上部位，局部侵蚀到骨皮质
4	—	—	—	—	重度侵蚀，多重损伤，局部或完全侵蚀到骨皮质
5	—	—	—	—	广泛损伤，皮质穿透骨长度的25%以上

#### 6.2.3.5 炎症因子水平

主要包括关节液和/或血清中细胞因子，其中IL-6、IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 为必做指标。①关节液细胞因子主要包括炎症因子(IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ )、基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMPs,)的MMPs-1、MMPs-3和MMPs-13含量；②血清细胞因子主要包括IL-6、IL-1、IL-4、IL-1 $\beta$ 及TNF- $\alpha$ 水平等。以上指标均采用ELISA方法，按照各自试剂盒说明书进行操作。

#### 6.2.3.6 免疫学指标

通过测定类风湿因子(RF)、抗环瓜氨酸肽(CCP)抗体、C反应蛋白(CRP)和红细胞沉降率(ESR)，评价免疫系统的功能和异常程度。其中CCP抗体、CRP和ESR为必做指标。RF、CCP和CRP测定方法：取血液样本经离心分离血清后，采用ELISA方法，按照各自试剂盒操作进行。ESR采用魏氏法(Westergren法)，将抗凝剂与血液按1:4体积比混合后注入刻度试管，并将其垂直固定于支架，室温静置1小时后读取红细胞下沉距离(单位为mm/h)。

### 7 宠物试食试验

需确定动物实验有效性的基础上，方可进行宠物试食试验。在进行宠物试食试验时，应对受试样品的食用安全性作进一步的观察。

#### 7.1 试食宠物要求

试食宠物犬猫应该遵循品种或遗传背景相同、年龄和体重相近的一致性原则。试验前对犬猫进行常规的免疫、驱虫处理。受试犬猫应当符合纳入标准和排除标准要求，以排除可能干扰试验目的的各种因素。

### 7.1.1 纳入标准

犬和猫有关节疼痛及压痛（包括起步痛、活动痛、负重痛和静息痛）；活动受限；关节畸形、肿大；骨擦感（音）、肌肉萎缩等关节问题。在测试开始前1个月未使用任何同类产品和药物；需与宠物主签署知情同意书。

### 7.1.2 排除标准

对受试样品及其成分有过敏史；患有严重疾病（除关节外）；由于身体原因不能遵照试验要求；由于医学原因不能达到评估时间内禁食或禁饮要求；短期内服用与受试功能有关的物品。

## 7.2 组别设置要求

应设试验组和阴性对照组，必要时可设阳性对照组或空白对照组。每组犬/猫不少于25只。以载体和功效成分（或原料）组成的受试样品，当载体本身可能具有相同功能时，在实验中应将该载体作为对照。

## 7.3 分析测试指标

### 7.3.1 一般性指标

7.3.1.1 一般状况 包括精神、睡眠、饮食、大小便、不良反应观察。

7.3.1.2 血、尿、便常规检查。

7.3.1.3 肝、肾功能检查。

### 7.3.2 功效性指标

#### 7.3.2.1 生活质量描述及评分

主要针对犬猫试食前、后日常生活质量和精神状态进行描述和评分，具体包括关节活动情况、运动状态、精神状态及毛发等。最低总分为0分，最高总分为4分，评分越高表示病情越严重。

表5 宠物犬猫生活质量的描述及评分

分值	描述
0	生活质量正常。精神状态好，皮毛光亮，关节活动正常，采食正常
1	生活质量几乎无影响。日常走路、上下楼梯、坐立等，关节活动几乎不受影响
2	生活质量轻微受损。关节活动可能会有轻度的受限，如膝关节屈伸时可能会有轻微的卡顿感。精神状态稍减
3	生活质量中度受损。在行走时可能会出现跛行，关节活动明显受限，如膝关节屈伸范围减小，上下楼梯困难等。精神状态欠佳。
4	生活质量严重受损。疼痛剧烈，难以忍受，关节功能严重受损。日常生活自理能力受到很大影响，如行走困难。精神萎靡

#### 7.3.2.2 关节周围皮肤温度和疼痛程度测定

参见6.1.2.1中②的方法。

#### 7.3.2.3 关节肿胀程度观察与测量

参见 6.1.2.2 的方法。

#### 7.3.2.4 关节功能评价

①关节活动度测量。膝关节和/或足踝关节的活动度分别参见 6.1.2.3 和 6.2.3.3。

②关节的 X 线检查。其中骨性关节炎的 X 线分级、描述及评分见表 6，分为 5 个等级，最低总分为 0 分，最高总分为 4 分，评分越高表示病情越严重。类风湿性关节炎的 X 线分期、描述及评分见表 7，分为 I~IV。

表 6 骨性关节炎的 X 线分级评分

分级	分值	描述
0	0	关节活动正常。关节间隙正常，无骨赘形成，关节面光滑，骨质结构正常，无关节面硬化和关节畸形等异常表现
1	1	可疑关节炎。可能有极轻微的骨赘形成，关节间隙基本正常，关节面光滑，无明显的关节面硬化和关节畸形。通常不影响日常生活和关节功能
2	2	轻度关节炎。有明确的骨赘形成，但较小；关节间隙轻度变窄，一般为关节间隙的宽度轻度减小，但仍大于正常关节间隙的一半；关节面基本光滑，可能有轻微的关节面硬化。关节活动可能会有轻度的受限，如膝关节屈伸时可能会有轻微的卡顿感。
3	3	中度骨关节炎。骨赘较大且明显；关节间隙中度变窄，关节间隙的宽度小于正常关节间隙的一半，但仍可见；关节面有明显的硬化，骨小梁增粗、紊乱；可能出现轻度的关节畸形，如膝关节轻度的内翻或外翻。在行走时可能会出现跛行，关节活动明显受限，如膝关节屈伸范围减小，上下楼梯困难等。
4	4	重度骨关节炎。骨赘大量形成，可相互融合；关节间隙严重变窄，甚至消失；关节面严重硬化，骨质增生明显；关节畸形严重，如膝关节严重的内翻或外翻、髋关节半脱位等。疼痛剧烈，难以忍受，关节功能严重受损。日常生活自理能力受到很大影响，如行走困难。

表 7 类风湿性关节炎的 X 线分期

分期	分值	描述
I	0	正常或关节端骨质疏松
II	1	关节端骨质疏松，偶有关节软骨下囊样破坏或骨侵蚀改变
III	2	明显的关节软骨下囊性破坏，关节间隙变窄，关节半脱位等畸形
IV	3	除 II、III 期改变外，并有纤维性或骨性强直。

#### 7.3.2.5 炎症因子测定

血清中炎症因子及其含量测定同 6.2.3.5。血清中 IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  和 IL-6 为必做项目，IL-1、IL-4 及前列腺素 E2 任做一项即可。

#### 7.3.2.6 免疫学指标测定

免疫学指标及测定方法同 6.2.3.6。

### 8 数据处理与结果判定

#### 8.1 数据处理

所有实验数据均使用国家法定剂量单位。使用数理统计软件进行统计分析，计算总实验重复数内的平均值，所有数据以平均值±标准差表示。一般采用方差分析，但需先进行方差齐性检验，方差齐，

则计算 F 值。若 F 值 $<F_{0.05}$ , 结论为各组均数间差异无显著性; 若 F 值 $\geq F_{0.05}$  (即  $p \leq 0.05$ ), 结论为各组均数间差异有显著性, 需进一步使用多个实验组和一个对照组间均数的两两比较方法进行统计分析。对非正态分布或方差不齐的数据需进行适当的变量转换, 待满足正态分布或方差齐的要求后, 用转换后的数据进行统计分析; 若经变量转换仍不能达到正态分布或方差齐的目的, 则改用秩和检验进行统计分析。

## 8.2 结果判定

### 8.2.1 动物实验

**8.2.1.1 体征观察与测量。** a. 受试样品组大鼠的一般体征较模型对照组有明显改善; b. 受试样品组大鼠的大鼠体重无显著变化或较模型对照组差异显著 ( $p<0.05$ ); c. 受试样品组大鼠的膝关节部位皮肤温度和疼痛阈值均下降, 且两项指标与模型对照组差异显著 ( $p<0.05$ )。其中指标 a 和 b 有明显改善, 可判定该项结果阳性。

**8.2.1.2 关节肿胀程度评分与测量。** 受试样品组大鼠的膝/踝关节肿胀程度评分和肿胀度值均有所下降, 且肿胀度较模型对照组差异显著 ( $p<0.05$ )。可判定该项结果为阳性。

**8.2.1.3 关节功能观察与测量。** 关节功能评分和膝/踝关节活动度均有所提高, 且膝关节活动度较模型对照组差异显著 ( $p<0.05$ )。可判定该项结果为阳性。

**8.2.1.4 膝/踝关节病理学观察。** 从形态学上均有所改善。可判定该项结果为阳性。

**8.2.1.5 炎症因子水平的检测。** 关节液中 IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  为必做项目, MMPs 中任做一项; 血清中 IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  和 IL-6 为必做项目, IL-1、IL-4 及前列腺素 E2 任做一项即可。关节液中三项指标与模型对照组相比差异显著, 可判定该结果为阳性; 血清中四项指标中有任两项指标较模型对照组差异显著, 可判定该项结果为阳性。

**8.2.1.6 免疫学指标。** 受试样品组大鼠血清中类风湿因子 (RF)、抗环瓜氨酸肽 (CCP) 抗体、C 反应蛋白 (CRP) 和红细胞沉降率 (ESR) 水平较模型对照组相比差异显著 ( $p<0.05$ )。上述四项指标中有任两项指标较对照组差异显著, 可判定该项结果为阳性。

**骨关节炎:** 体征、关节肿胀程度和关节功能三项结果均为阳性, 膝/踝关节病理和炎症因子水平两项指标中任一项结果阳性, 可判定该受试样品具有有助于增强实验动物骨关节炎关节性能的作用。

**类风湿性关节炎:** 体征、关节肿胀程度、关节功能和免疫学指标四项结果为阳性, 膝/踝关节病理和炎症因子水平两项指标中任一项结果阳性, 可判定该受试样品具有有助于增强实验动物类风湿性关节炎关节性能的作用。

### 8.2.2 宠物试食试验

**8.2.2.1 一般性指标。** 其中一般状况 (精神、睡眠、饮食、大小便、不良反应观察) 有所改善; 血、尿、便常规及肝肾功能无影响。

**8.2.2.2 功效性指标。** ①生活质量较模型对照组明显改善, 可判定结果阳性; ②关节周围皮肤温度和疼痛程度下降, 且较模型对照组差异显著 ( $p<0.05$ ), 可判定结果阳性; ③关节肿胀程度下降, 且较模型对照组差异显著 ( $p<0.05$ ), 可判定结果阳性; ④关节功能评价。关节活动度提高, 较模型对照组相比明显改善, 可判定结果阳性; ⑤血清中炎症因子水平。血清中 IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  和 IL-6 为必做项目, IL-1、IL-4 及前列腺素 E2 任做一项即可。血清中四项指标中有任两项指标较模型对照组差异显著 ( $p<0.05$ ), 可判定该项结果为阳性。⑥免疫学指标。受试样品组血清中类风湿因子 (RF)、抗环瓜氨酸肽 (CCP) 抗体、C 反应蛋白 (CRP) 和红细胞沉降率 (ESR) 水平较模型对照组相比差异显著 ( $p<0.05$ )。上述四项指标中有任两项指标较对照组差异显著, 可判定该项结果为阳性。

体征、关节肿胀程度、关节功能和免疫学四项中三项结果为阳性, 膝/踝关节病理和炎症因子水平

两项指标中任一项结果阳性，可判定该受试样品具有有助于增强宠物关节性能的作用。

## 9 实验报告

实验报告应提供试验获得的所有内容、数据及可视化信息。未纳入统计分析的数据或由于数据缺乏、丢失等无法评价的情况也应报告，并说明在各组别中的平均值及误差。所有试验样品必须留样保存，宠物饲料（食品）留样量 $\geq 500\text{ g}$ 。液体样品留样量 $\geq 500\text{ mL}$

实验报告正文至少应包括：

- a. 实验名称；
- b. 实验目的；
- c. 实验材料，至少包括实验用品、受试样品及处理方法、受试动物（包括宠物）要求；
- d. 实验方法，测试指标和方法；
- e. 结果与分析，根据数据统计结果给出平均值和标准方差、误差值及决定系数，并以可视化的数据或图和表形式体现；
- f. 结论，针对受试样品的实验结果给出判定；

此外，试验过程中涉及的所有原始数据和相关可视化图表均要存档。

## 参考文献

- GB/T 14924.9-2001 实验动物 配合饲料 常规营养成分的测定  
GB 13078-2017 饲料卫生标准  
GB/T 18823 饲料检测结果判定的允许误差  
GB/T 35892 实验动物 福利伦理审查指南进行  
GA/T 1661-2019 法医学 关节活动度检验规范  
DB64/T 1523.6-2018, 老年慢性病护理服务规范 第6部分: 退行性骨关节病  
DB44/T 2329-2021 膝骨关节炎(骨痹)中西医结合临床试验指南  
保健食品功能检验与评价技术指导原则(2023年版)  
保健食品功能检验与评价方法(2023年版)  
农业农村部第20号公告《宠物饲料管理办法》、《宠物饲料标签规定》  
中华人民共和国农业部公告第1224号《饲料添加剂安全使用规范》农业农村部第20号公告《宠物饲料管理办法》、《宠物饲料标签规定》  
蔡旋主编. 功能性宠物食品学, 中国农业出版社, 2023.2
-