

T/CVDA

团 体 标 准

T/CVDA XX—XXXX

治疗犬猫脊髓神经损伤的间充质干细胞

Mesenchymal stem cells for treating spinal cord nerve injuries in dogs and cats

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	I
前 言	III
治疗犬猫脊髓神经损伤的间充质干细胞	4
1 范围	4
2 规范性引用文件	4
3 术语和定义	4
3.1 间充质干细胞 Feline mesenchymal stem cells	4
3.2 脊髓神经损伤 Spinal cord nerve injury	4
4 缩略语	4
5 间充质干细胞技术要求	5
5.1 原材料和辅料	5
5.2 关键质量属性	5
5.3 细胞制备过程控制	5
6 间充质干细胞检验方法	5
6.1 供体筛选	5
6.2 细胞形态	5
6.3 染色体核型	5
6.4 细胞存活率	6
6.5 细胞表面标志物	6
6.6 免疫调节	6
6.7 三系分化	6
6.8 成瘤性	6
6.9 微生物	6
7 检验规则	7
7.1 抽样方法和数量	7
7.2 出厂检验	7
7.3 判定规则	7
8 使用说明	7
9 标签	7
10 包装, 储存和运输	7
10.1 包装	8
10.2 储存	8
10.3 运输	8
11 间充质干细胞治疗犬猫脊髓神经损伤	8
11.1 犬猫脊髓神经损伤的治疗方法	8
附 录 A	9
附 录 B	10
附 录 C	11
附 录 D	13
附 录 E	15
附 录 F	17
附 录 G	19

附 录 H	20
附 录 I	21
附 录 J	22

前 言

本标准按照 GB/T1.1-2020《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。

本标准由中国兽药协会提出并归口。

本标准起草单位：神奇毛侠宠物（上海）有限公司、南京农业大学、斯赛医疗科技（上海）有限公司。

本标准主要起草人：孙贝贝、李香凝、李雨凝、钟翔、杨平

本标准名称：治疗犬猫脊髓神经损伤的间充质干细胞

治疗犬猫脊髓神经损伤的间充质干细胞

1 范围

本文件规定了治疗犬猫脊髓神经损伤的间充质干细胞的技术要求、检验方法、检验规则、使用说明、标签、包装、储存、运输、废弃物处理要求、犬猫脊髓神经损伤诊断和治疗犬猫脊髓损伤的间充质干细胞治疗方案。

本文件适用于间充质干细胞的生产、检测、质控和指导犬猫脊髓神经损伤的间充质干细胞治疗。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过本文件的规范性引用而成为本文件必不可少的条款。

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/T6682分析实验室用水规格和试验方法。

《中华人民共和国兽药典》（2020版）

T/CSCB0001干细胞通用要求

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1 间充质干细胞 Feline mesenchymal stem cells

一类贴壁培养后呈成纤维细胞样形态(纺锤形或梭形)、可在体外自我更新并具有成骨、成脂、成软骨等分化能力的干细胞。

注：间充质干细胞可由多种组织(如骨髓、脐带、胎盘、羊膜、脂肪、脐带血等)分离得到，也可以通过分化或转分化等方式获得；不同来源的间充质干细胞在基因表达谱和分化能力方面存一定差异，但具有类似的基本生物学特性。

3.2 脊髓神经损伤 Spinal cord nerve injury

由于各种原因导致的椎管内神经结构（包括脊髓、神经根和马尾神经）的损害，暂时或永久地导致脊髓功能异常的破坏性神经病理状态。犬猫外伤性急性脊髓损伤多由两种机制引起，一是脊髓原发性损伤；二是继发性脊髓损伤。

4 缩略语

MSC—间充质干细胞（mesenchymal stem cell）

CD—分化簇(Cluster of Differentiation)

IDO—吲哚胺2, 3-双加氧酶(Indoleamine2, 3Dioxygenase)

INF- γ —干扰素 γ (Interferon gamma)

STR—短串联重复序列(Short Tandem Repeat)

TNF- α —肿瘤坏死因子- α (Tumor necrosis factor- α)

5 间充质干细胞技术要求

5.1 原材料和辅料

5.1.1 应符合 T/CSCB0001 要求。

5.1.2 应建立供体细胞采集的供体评估与筛选标准、采集方法、运输标准和交接标准，保证动物福利和细胞的安全。

5.2 关键质量属性

5.2.1 细胞形态

细胞贴壁培养时呈纺锤形或梭形的成纤维细胞态，形态均一。

5.2.2 染色体核型

犬：正常核型应为 78， XX 或 78， XY；猫：正常核型应为38， XX或38， XY。

5.2.3 细胞存活率

未冻存细胞存活率 $\geq 95\%$ ，且冻存复苏后细胞存活率 $\geq 90\%$ 。

5.2.4 细胞代次

用于治疗的细胞为P4-P6代细胞。

5.2.5 细胞标志蛋白

犬：在体外培养条件下，CD29、CD44、CD90阳性率 $\geq 95\%$ ；CD34、CD45阳性率 $\leq 2\%$ 。

猫：在体外培养条件下，CD44、CD90、CD105阳性率 $\geq 95\%$ ；CD34、CD45阳性率 $\leq 2\%$ 。

5.2.6 免疫调节

5.2.7 经炎症因子 IFN- γ 诱导后显著增强间充质干细胞表达吡哆胺 2, 3-双加氧酶(IDO)。与活化的 T 淋巴细胞共培养，能抑制 T 淋巴细胞增殖及分泌 INF- γ ，TNF- α 。

5.2.8 三系分化

具有成骨、成脂、成软骨的分化潜能。

5.2.9 成瘤性

免疫缺陷动物(如裸鼠)体内成瘤试验结果为阴性。

5.2.10 微生物

5.2.11 真菌、细菌、支原体、内毒素应为阴性。

5.3 细胞制备过程控制

5.3.1 MSC 的扩增、冻存、复苏等过程控制应符合 T/CSCB0001 要求。

5.3.2 MSC 的细胞 STR 检测结果应与供体细胞保持一致。

6 间充质干细胞检验方法

6.1 供体筛选

按照附录A的方法进行筛选

6.2 细胞形态

二维培养条件下，用明视场细胞显微镜进行观察。

6.3 染色体核型

按照《中华人民共和国兽药典（2020年版）》三部-3502《生产用细胞标准》中3.2.4胞核学检验标准进行检验。

6.4 细胞存活率

按照附录B的方法检验。

6.5 细胞表面标志物

按照附录C的方法检验。

6.6 免疫调节

6.6.1 诱导 IDO 表达

按照附录D的方法检验。

6.6.2 抑制 T 细胞增殖

按照附录E的方法检验。

6.6.3 抑制 T 细胞分泌 IFN- γ , TNF- α

按照附录F的方法检验。

6.7 三系分化

6.7.1 成骨分化

按照附录G的方法检验。

6.7.2 成脂分化

按照附录H的方法检验。

6.7.3 成软骨分化

按照附录I的方法检验。

6.8 成瘤性

按照附录J的方法检验。

6.9 微生物

6.9.1 真菌

按照《中国兽药典（2020年版）》三部中“3306无菌检验或纯粹检验法”项检测。

6.9.2 细菌

按照《中国兽药典（2020年版）》三部中“3306无菌检验或纯粹检验法”项检测。

6.9.3 病毒

按照《中华人民共和国兽药典》2020版第三部中“3305外源病毒检验法”项检测。

6.9.4 支原体

按照《中国兽药典（2020年版）》三部中“3308支原体检验法”项检测。

6.9.5 内毒素

按照《中国兽药典（2020年版）》一部中“1143细菌内毒素检验法”检测。

7 检验规则

7.1 抽样方法和数量

7.1.1 在同一个生产周期中，同一生产线，同一来源，同一代次，同一方法制备出来的产品为一批。

7.1.2 在同一批的产品中随机抽取 3 个最小包装单元。

7.2 出厂检验

7.2.1 每批产品应进行出厂检验，并附检验报告。

7.2.2 出厂检验项目应包括 5.2 规定的所有项目。

7.3 判定规则

7.3.1 出厂检验项目全部符合 5.2 规定，判为合格品；有 1 项及以上不符合本文件规定，则判为不合格品。

7.3.2 复核检验项目全部符合 5.2 规定，判为合格品；有 1 项及以上不符合本文件规定，则判为不合格品。

8 使用说明

应至少包括以下内容：

- a) 产品名称；
- b) 细胞数量；
- c) 生产日期；
- d) 生产批号；
- e) 生产组织；
- f) 储存条件及使用期限；
- g) 运输条件；
- h) 使用方法；
- i) 执行标准号；
- j) 生产地址；
- k) 联系方式；
- l) 邮政编码；
- m) 注意事项。

9 标签

应至少包括以下内容：

- a) 产品名称；
- b) 细胞数量；
- c) 细胞代数；
- d) 生产日期；
- e) 生产批号；
- f) 生产单位；
- g) 供体来源；
- h) 生产人员。

10 包装，储存和运输

10.1 包装

应选择对间充质干细胞关键质量属性无影响的材料和容器。

10.2 储存

10.2.1 应符合 T/CSCB0001 要求。

10.2.2 为保证细胞活力，种子细胞应在低于-196℃（可保存 12 个月），生产细胞应在-80℃环境保存（保存时间小于 2 个月）、临床使用细胞-80℃环境小于 3 个月用完。

10.3 运输

10.3.1 应符合 T/CSCB0001 要求。

10.3.2 冻存细胞应在干冰或液氮条件下运输。

11 间充质干细胞治疗犬猫脊髓神经损伤

11.1 犬猫脊髓神经损伤的治疗方法

11.1.1 细胞注射剂量： 1×10^6 个/kg 体重。

11.1.2 细胞注射次数

11.1.3 轻中度犬猫脊髓神经损伤，一次静脉注射和一次局部注射，一次静脉注射和一次局部注射为一个疗程，30d 复查，根据恢复情况确定是否增加疗程次数；重度犬猫脊髓神经损伤，一次静脉注射和一次局部注射，一次静脉注射和一次局部注射为一个疗程，14d 复查，根据病情恢复情况确定是否增加疗程次数。

11.1.4 细胞注射方法

11.1.5 细胞注射器使用的注射针头为 2~8 号注射针头，取两个注射器，第一个注射器取所需的生理盐水，吸入患犬/猫所需的间充质干细胞，轻微晃动注射器，充分混匀后，进行静脉注射；取第二个注射器，吸取所需的生理盐水，吸入所需的间充质干细胞，轻微晃动注射器，充分混匀后，进行局部注射，整个过程控制在 20min 内。

附录 A

(规范性)

供体犬猫评估与筛选，猫组织样品采集和运输标准

A.1 供体犬猫筛选标准

- A.1.1 供体犬猫年龄应不大于1岁（12个月），以确保供体犬猫没有出现明显衰老迹象。
- A.1.2 健康状况筛查：供体犬猫应由专业兽医进行全面的健康评估，包括体格检查，血液检查，并且具有有效的疫苗接种记录，确保没有潜在的遗传或者传染疾病。
- A.1.3 品种和遗传背景：供体犬猫的品种信息和遗传背景应当有完整记录，以排除潜在的遗传风险或疾病。
- A.1.4 心理和行为特征筛查：供体犬猫应具有良好的心理和行为特征。挑选脾气稳定，友好和适应新环境的猫作为供体，以减少在组织采集和实验过程中的应激和不适感。

A.2 犬猫组织采集方法

- A.2.1 用于干细胞分离的犬猫组织的采集应获得当地动物福利和伦理委员会的批准。
- A.2.2 麻醉与镇定：使用合适的麻醉方法，确保供体犬猫在组织采集过程中没有疼痛或者不适感。
- A.2.3 组织采集技术：根据目的间充质干细胞来源的不同，选择合适的组织采集方法，例如用手术采集皮下脂肪，用手术或从产后废弃器官组织中采集脐带。采集全程遵循无菌原则。
- A.2.4 供体犬猫术后护理：术后应对供体犬猫应进行体温，行为和身体状况等进行监测；伤口需定期清洁和更换包扎，避免猫舔舐或咬伤；遵循适当的疼痛管理计划，包括使用合适的阵痛药物；为供体犬猫提供干净舒适的环境，清洁的饮水和易消化的食物，以确保其快速恢复和动物福利。

A.3 犬猫组织运输和交接标准

- A.3.1 犬猫组织运输条件：应将组织置于大小合适的无菌容器中，并使用适当的缓冲溶液保存。运输过程保证组织温度保持在4℃~8℃，并于24h内将组织样品运送至实验室进行间充质干细胞分离。
- A.3.2 交接标准：制定详细的交接文件，记录犬猫的身份信息、健康状况、组织类型、采集日期、过程和采集人信息等。

附录 B

(规范性)

细胞存活率检测细胞计数法

B.1 仪器和设备

B.1.1 明视场显微镜。

B.1.2 血球计数板。

B.2 试剂

除特别说明外，所用试剂均为分析纯，检测用水均为18.2MQ去离子水。

B.2.1 磷酸盐缓冲液：pH为7.4。

B.2.2 台盼蓝染液：使用时，用磷酸盐缓冲液(B.2.1)稀释至0.4%(质量浓度)。

B.3 检测步骤

B.3.1 细胞悬液制备

收集待检测细胞，用磷酸盐缓冲液（B.2.1）配制细胞悬液，稀释至合适的浓度。每个血球计数板（B.1.2）的1mm²的方格中的细胞的数量应为20个～50个细胞。如果高于200个细胞，则需要稀释。

B.3.2 细胞染色

B.3.3 细胞计数

将盖玻片盖在血球计数板（B.1.2）计数槽上，取10μL混合液（B.3.2）滴在一侧计数室的盖玻片边缘，另取10μL混合液，滴在另一侧计数室的盖玻片边缘，使混合液充满盖玻片和计数板之间，静置30s，将计数板置明视场显微镜（B.1.1）下对被染色的细胞和细胞总数分别进行计数。

对16×25规格的计数室，按对角线位，取左上、右上、左下、右下4个1mm²的中格（即100个小格）计数。对25×16规格的计数室，按对角线位，取左上、右上、左下、右下和中央5个中格（即80个小格）计数。当遇到位于大格线上的细胞，一般只计数大方格的上方和左线上的细胞（或只计数下方和右方线上的细胞）。

按照步骤B.3.2～B.3.3再重复测定一个样品。B.3.4细胞存活率计算

B.4 计算与分析

细胞存活率按式（B.1）进行计算：

$$X=(M-S)/M\times 100\%.....(B.1)$$

式中：

X—细胞存活率；M—细胞总数；

S—染色的细胞数。

计算两次计数细胞存活率结果的平均值，记为细胞平均存活率。

B.5 精密度

在重复性条件下获得的两次独立测定结果的绝对差值不得超过算术平均值的10%。

附录 C

(规范性)

细胞标志蛋白检测流式细胞法

C.1 仪器和设备

C.1.1 流式细胞仪。

C.1.2 水平离心机。

C.1.3 电子天平。

C.2 试剂

本方法所用试剂均为分析纯，除特别说明外，实验用水均为GB/T6682规定的一级水。

C.2.1 磷酸盐缓冲液：pH7.4。

C.2.2 牛血清白蛋白（BSA）：纯度≥98%。

C.2.3 叠氮钠（NaN₃）。

C.2.4 抗犬CD29、CD34、CD44、CD45、CD90抗体及同型对照抗体；抗猫CD34、CD44、CD45、CD90、CD105抗体及同型对照抗体。

注：若选用人源或鼠源抗体，应将人源或鼠源抗原序列进行比对，确定其与犬猫源抗原序列相似度在95%以上方可用于鉴定间充质干细胞。

C.2.5 按照相应要求使用电子天平（C.1.3）配制流式检测所需的液体：洗涤液、抗体稀释液。

C.3 样品保存

洗涤液和标记后的样品于2℃~8℃保存。相关抗体遵照说明书保存。

C.4 检测步骤

C.4.1 样品准备

收集细胞，使用水平离心机（C.1.2）300g离心4min，弃上清。然后用洗涤液清洗一遍，使用水平离心机（C.1.2）300g离心4min，弃上清。

C.4.2 抗体孵育

按照抗体说明书进行稀释使用。抗体孵育结束后用洗涤液清洗两遍，使用水平离心机（C.1.2）300g离心4min，弃上清。

C.4.3 过滤上机

用洗涤液重悬细胞，然后通过40μm滤网转移到流式管中，按流式细胞仪（C.1.1）应用手册上机检测。

C.4.4 圈门设定原则

首先根据细胞大小和颗粒度设门，圈出目标细胞分群1，排除死细胞和其他杂细胞，然后根据Isotype对照组荧光强度，在分群1的基础上画出阳性细胞群2，排除没有被荧光抗体标记的阴性细胞。抗体Isotype作为阴性对照。

C.5 结果分析

得到的检测结果用软件综合分析，具体参考其软件使用说明。

附 录 D

(规范性)

诱导IDO表达检测PCR法

D.1 仪器和设备

D.1.1 核酸含量测定仪。

D.1.2 PCR扩增仪。

D.1.3 电泳仪。

D.1.4 凝胶成像仪。

D.2 试剂

本方法所用试剂均为分析纯，除特别说明外，实验用水均为GB/T6682规定的一级水。

D.2.1 重组IFN- γ 。

D.2.2 RNA提取试剂盒。

D.2.3 RNA逆转录PCR试剂盒。

D.2.4 PCR引物。

D.2.5 TaqDNA聚合酶。

D.2.6 Ladder内标。

D.3 检测步骤

D.3.1 IFN- γ 处理

根据附录B方法测定，计算间充质干细胞悬液活细胞浓度。按 $(1 \times 10^5 \sim 4 \times 10^5)$ 细胞/cm²接种，在间充质干细胞培养体系中添加IFN- γ （10ng/mL~30ng/mL），正常培养12h~36h。同时设立未使用IFN- γ 处理的间充质干细胞为对照组，培养同样时间。

D.3.2 间充质干细胞总RNA提取

根据RNA提取试剂盒产品说明书进行，并使用核酸含量测定仪(D.1.1)进行核酸含量测定。

D.3.3 逆转录PCR

根据 RNA 逆转录 PCR 试剂盒产品说明书，使用 PCR 扩增仪(D.1.2)获得犬猫间充质干细胞 cDNA。使用犬IDO1 特异性引物（IDO1F-5'-CCCAACTCTAGGGACCCTTC-3'；IDO1-R5'-CAGATCCATGGAGGAAGGAA-3'）在以下反应条件下进行 IDO 基因扩增：95℃-2 分钟，95℃-15 秒（40 个循环），55℃-30 秒（40 个循环），72℃-30s（40 个循环）。使用猫IDO1特异性引物（IDO1F-5'-GAACCAAGGCGGTGAAGATG-3'；IDO1-R5'-GCATAAACCAGAATAGGAGGCAGA-3'）在以下反应条件下进行IDO基因扩增：95℃-2分钟，95℃-15秒（40个循环），55℃-30秒（40个循环），72℃-30s（40个循环）。

D.3.4 PCR产物电泳

根据电泳应用手册进行电泳检测。

D.3.5 凝胶成像

根据凝胶成像仪应用手册，使用电泳仪（D.1.3），进行电泳检测。

D.4 结果分析

使用凝胶成像仪(D.1, 4)进行成像，未使用IFN- γ 处理的间充质干细胞检测不到IDO，IFN- γ 刺激后检测到IDO条带。

附 录 E

(规范性)

抑制T细胞增殖检测CFSE标记法

E.1 仪器和设备

E.1.1 血球计数板。

E.1.2 显微镜。

E.1.3 水平离心机。

E.1.4 流式细胞仪。

E.2 试剂

本方法所用试剂均为分析纯，除特别说明外，实验用水均为GB/T6682规定的一级水。

E.2.1 磷酸盐缓冲液：pH为7.4。

E.2.2 0.25%EDTA-胰蛋白酶。

E.2.3 台盼蓝染液：使用时，用磷酸盐缓冲液（E.2.1）稀释至0.4%（质量浓度）。

E.2.4 植物凝集素。

E.2.5 淋巴细胞分离液。

E.2.6 抗体（如：anti-CD3抗体）。

E.2.7 羧基荧光素二醋酸盐琥珀酰亚胺脂（CFSE）染料。

E.3 检测步骤

E.3.1 T细胞分离及染色

E.3.1.1 T细胞分离

利用淋巴细胞分离液（E.2.5），分离犬猫外单核周血细胞（PBMC），用适量无菌磷酸盐缓冲液（E.2.1）并使用水平离心机离心（E.1.3）洗涤2次。孵育抗体后用适量无菌磷酸盐缓冲液（E.2.1）并使用水平离心机离心（E.1.3）洗涤2次。重悬细胞至细胞浓度为 5×10^7 细胞/mL，40 μ m滤网转移到流式管中，按流式细胞仪应用手册上机分选。

E.3.1.2 T细胞染色

根据附录B方法测定，使用血球计数板（E.1.1）及显微镜（E.1.2）计算细胞悬液活细胞浓度。然后进行CFSE标记，根据CFSE产品说明书进行。

E.3.2 T细胞与间充质干细胞共培养

E.3.2.1 T细胞增殖

根据附录B方法测定，使用血球计数板（E.1.1）及显微镜（E.1.2）计算犬猫T细胞悬液活细胞浓度，按 1×10^6 细胞/mL接种培养，并用（2~5） μ g/mL的植物凝集素（E.2.4）刺激T细胞增殖，设立未用植物凝集素（E.2.4）刺激的T细胞培养作为对照，培养96h，用于检测刺激后T细胞增殖百分比A。

E. 3. 2. 2 间充质干细胞抑制 T 细胞增殖

利用0.25%EDTA-胰蛋白酶消化间充质干细胞并制备成单细胞悬液，根据附录B方法测定，计算T细胞与间充质干细胞悬液活细胞浓度。间充质干细胞按 2×10^5 细胞/mL接种，细胞贴壁后，将T细胞按5:1（T细胞：间充质干细胞）的比例进行共培养，并用（2~5）pg/mL的植物凝集素（E.2.4）刺激T细胞增殖，培养96h，用于检测间充质干细胞抑制后T细胞增殖百分比C。

E. 3. 3 T细胞收集并检测

收集培养后的T细胞，用适量无菌磷酸盐缓冲液（E.2.1）并使用水平离心机离心（E.1.3）洗涤2次，通过40μm滤网转移到流式管中，按流式细胞仪（E.1.4）应用手册上机检测。

E. 3. 4 圈门设定原则

首先根据细胞大小和颗粒度设门，圈出目标细胞分群1，排除死细胞和其他杂细胞，排除没有被荧光抗体标记的阴性细胞。然后根据未用植物凝集素刺激的T细胞的荧光强度，在分群1的基础上画出CFSE母代细胞位置，根据CFSE母代细胞位置画出子代细胞群2（即为T细胞增殖的百分比）。

E. 4 结果分析

得到的检测结果用软件综合分析，具体参考其软件使用说明。并计算间充质干细胞对T增殖的抑制率。抑制率按式（E.1）进行计算：

$$Y=(A-C)/A \times 100\% \dots \dots \dots (E.1)$$

式中：

Y--抑制率；

A--单独T细胞（刺激）CFSE子代细胞的百分比；

C--与间充质干细胞共培养T细胞（刺激）CFSE子代细胞的百分比。

附录 F

(规范性)

抑制T细胞分泌IFN- γ 、TNF- α 检测胞内因子染色法

F.1 仪器和设备

F.1.1 血球计数板。

F.1.2 显微镜。

F.1.3 水平离心机。

F.1.4 流式细胞仪。

F.2 试剂

本方法所用试剂均为分析纯，除特别说明外，实验用水均为GB/T6682规定的一级水。

F.2.1 磷酸盐缓冲液：pH为7.4。

F.2.2 0.25%EDTA-胰蛋白酶。

F.2.3 台盼蓝染液：使用时，用磷酸盐缓冲液（F.2.1）稀释至0.4%（质量浓度）。

F.2.4 佛波酯（PMA）。

F.2.5 淋巴细胞分离液。

F.2.6 抗体（如anti-IFN- γ 抗体、anti-TNF- α 抗体）。

F.2.7 布雷非德菌素A（BFA）。

F.2.8 离子霉素。

F.2.9 皂苷（Saponin）。

F.2.10 4%多聚甲醛。

F.3 检测步骤

F.3.1 T细胞分离

利用淋巴细胞分离液（F.2.5），分离犬猫外周血PBMC，用适量无菌磷酸盐缓冲液（F.2.1）并使用水平离心机离心（F.1.3）洗涤2次。待抗体孵育（F.2.6）后用适量无菌磷酸盐缓冲液（F.2.1）并使用水平离心机离心（F.1.3）洗涤2次。重悬细胞至细胞浓度为 5×10^7 细胞/mL，40 μ m滤网转移到流式管中，按流式细胞仪应用手册上机分选。

F.3.2 T细胞与间充质干细胞共培养

F.3.2.1 T细胞炎症因子分泌

根据附录B方法测定，使用血球计数板（F.1.1）及显微镜（F.1.2）计算T细胞悬液活细胞浓度，按 1×10^6 细胞/mL接种培养，培养48h。结束培养前4h~6h往培养体系添加50ng/mL佛波酯（F.2.4）、10 μ g/mL布雷非德菌素A（F.2.7）和1 μ g/mL离子霉素（F.2.8），用于检测IFN- γ 阳性的T细胞比例A₁，和TNF- α 阳性的T细胞比例A₂。

F.3.2.2 间充质干细胞抑制 T 细胞炎症因子分泌

利用0.25%EDTA-胰蛋白酶消化间充质干细胞并制备成单细胞悬液，根据附录B方法测定，使用血球计数板（F.1.1）及显微镜（F.1.2）计算T细胞与间充质干细胞悬液活细胞浓度，间充质干细胞按 2×10^5 细胞/mL接种，细胞贴壁后，将T细胞按5:1（T细胞：间充质干细胞）的比例进行共培养，培养48h。结束培养前4h~6h，往培养体系添加50ng/mL佛波酯（F.2.4）、10 μ g/mL布雷非德菌素A（F.2.7）和1 μ g/mL离子霉素（F.2.8），用于检测间充质干细胞抑制后IFN- γ 阳性的T细胞比例 C_1 ，TNF- α 阳性的T细胞比例 C_2 。

F.3.3 T细胞收集并标记

收集培养后的T细胞，用适量无菌磷酸盐缓冲液（F.2.1）并使用水平离心机离心（F.1.3）洗涤2次。用4%多聚甲醛（F.2.10）固定细胞，用适量无菌磷酸盐缓冲液（F.2.1）并使用水平离心机离心（F.1.3）洗涤1次。使用0.1%~0.2%皂苷（F.2.9）处理穿膜，然后孵育IFN- γ 和TNF- α 抗体，用适量无菌磷酸盐缓冲液（E.2.1）并使用水平离心机离心（F.1.3）洗涤1次。最后通过40 μ m滤网转移到流式管中，按流式细胞仪应用手册上机检测。

F.3.4 圈门设定原则

首先根据细胞大小和颗粒度设门，圈出目标细胞分群1，排除死细胞和其他杂细胞，然后根据Isotype组荧光强度，在分群1的基础上画出IFN- γ 阳性的细胞群2和TNF- α 阳性的细胞群3，排除没有被荧光抗体标记的阴性细胞。

F.4 结果分析

得到的检测结果用软件综合分析，具体参考其软件使用说明。并计算间充质干细胞对T细胞分泌IFN- γ 、TNF- α 的抑制率。

抑制率按式（F.1）和式（F.2）进行计算：

$$\text{IFN-}\gamma\text{抑制率}=(A_1-C_1)/A_1 \times 100\% \dots\dots\dots (F.1)$$

式中：

A1--单独T细胞的IFN- γ 阳性率；

C1--与间充质干细胞共培养T细胞的IFN- γ 阳性率。

$$\text{TNF-}\alpha\text{抑制率}=(A_2-C_2)/A_2 \times 100\% \dots\dots\dots (F.2)$$

式中：

A2--单独T细胞的TNF- α 阳性率；

C2--与间充质干细胞共培养T细胞的TNF- α 阳性率。

附 录 G

(规范性)

成骨分化检测茜素红S染色法

G.1 仪器和设备

- G.1.1 血球计数板。
- G.1.2 明视场显微镜。
- G.1.3 水平离心机。

G.2 试剂

本方法所用试剂均为分析纯，除特别说明外，实验用水均为GB/T6682规定的一级水。

- G.2.1 磷酸盐缓冲液：pH为7.4。
- G.2.2 0.25%EDTA-胰蛋白酶。
- G.2.3 台盼蓝染色：使用时，用磷酸盐缓冲液（G.2.1）稀释至0.4%（质量浓度）。
- G.2.4 成骨诱导液。
- G.2.5 茜素红S染色试剂盒。

G.3 检测步骤

G.3.1 细胞样品的准备

G.3.1.1 细胞消化

使用水平离心机（G.1.3）离心收集间充质干细胞于离心管中，用无菌磷酸盐缓冲液轻轻重悬细胞，避免形成气泡或者细胞团块。

G.3.1.2 细胞计数

根据附录B方法测定，使用血球计数板（G.1.1）及明视场显微镜（G.1.2）计算间充质干细胞悬液活细胞浓度。

G.3.2 细胞接种并诱导

细胞接种方式、密度及诱导步骤均遵循成骨诱导液产品说明书，诱导14d~21d。

G.3.3 钙结节染色

钙结节染色根据茜素红S染色试剂盒说明书进行。

G.4 结果分析

显微镜下可见散在橘红色的钙结节。

附录 H

(规范性)

成脂分化检测油红O染色法

H.1 仪器和设备

- H.1.1 血球计数板。
- H.1.2 明视场显微镜。
- H.1.3 水平离心机。

H.2 试剂

本方法所用试剂均为分析纯，除特别说明外，实验用水均为GB/T6682规定的一级水。

- H.2.1 磷酸盐缓冲液：pH为7.4。
- H.2.2 0.25%EDTA-胰蛋白酶。
- H.2.3 台盼蓝染液：使用时，用磷酸盐缓冲液（H.2.1）稀释至0.4%（质量浓度）。
- H.2.4 成脂诱导液。
- H.2.5 油红O染色试剂盒。

H.3 检测步骤

H.3.1 细胞样品准备

H.3.1.1 细胞消化

使用水平离心机（H.1.3）离心收集细胞于离心管中，用无菌磷酸盐缓冲液轻轻重悬细胞，避免形成气泡或者残留细胞团块。

H.3.1.2 细胞计数

根据附录B方法测定，使用血球计数板（H.1.1）及明视场显微镜（H.1.2）计算间充质干细胞悬液活细胞浓度。

H.3.2 细胞接种并诱导

细胞接种方式、密度及诱导步骤均遵循成脂诱导液产品说明书，诱导14d~21d。

H.3.3 脂滴染色

脂滴染色根据油红O染色试剂盒说明书进行。

H.4 结果分析

显微镜下可见细胞中含大小不等橙红色的脂滴。

附 录 I

(规范性)

成软骨分化检测阿尔新蓝染色法

I.1 仪器和设备

- I.1.1 血球计数板。
- I.1.2 明视场显微镜。
- I.1.3 水平离心机。

I.2 试剂

本方法所用试剂均为分析纯，除特别说明外，实验用水均为GB/T6682规定的一级水。

- I.2.1 磷酸盐缓冲液：pH为7.4。
- I.2.2 0.25%EDTA-胰蛋白酶。
- I.2.3 台盼蓝染液：使用时，用磷酸盐缓冲液（I.2.1）稀释至0.4%（质量浓度）。
- I.2.4 成软骨诱导液。
- I.2.5 阿尔新蓝染色试剂盒。

I.3 检测步骤

I.3.1 细胞样品的准备

I.3.1.1 细胞消化

使用水平离心机（I.1.3）离心收集细胞于离心管中，用无菌磷酸盐缓冲液轻轻重悬细胞，避免形成气泡或者残留细胞团块。

I.3.1.2 细胞计数

根据附录B方法测定，使用血球计数板（I.1.1）及明视场显微镜（I.1.2）计算细胞悬液活细胞浓度。

I.3.2 细胞接种并诱导

细胞接种方式、密度及诱导步骤均遵循成软骨诱导液产品说明书，诱导14d~21d。

I.3.3 软骨细胞胞外基质染色

软骨细胞胞外基质染色根据阿尔新蓝试剂盒说明书进行。

I.4 结果分析

显微镜下可见被染为深蓝色的软骨细胞胞外基质。

附录 J

(规范性)

成瘤性检测免疫缺陷小鼠检测法

J.1 仪器和设备

J.1.1 血球计数板。

J.1.2 明视场显微镜。

J.1.3 水平离心机

J.2 试剂

本方法所用试剂均为分析纯，除特别说明外，实验用水均为GB/T6682规定的一级水。

J.2.1 磷酸盐缓冲液：pH为7.4。

J.2.2 0.25%EDTA-胰蛋白酶。

J.2.3 台盼蓝染液：使用时，用磷酸盐缓冲液（J.2.1）稀释至0.4%(质量浓度)。

J.3 检测步骤

J.3.1 细胞样品的准备

J.3.1.1 细胞消化

使用水平离心机（J.1.3）离心收集细胞于离心管中，用无菌磷酸盐缓冲液轻轻重悬细胞，避免形成气泡或者残留细胞团块。

J.3.1.2 细胞计数

根据附录 A 方法测定，使用血球计数板（J.1.1）及明视场显微镜（J.1.2）计算猫细胞悬液活细胞浓度。

J.3.2 细胞移植

将 1×10^7 个间充质干细胞注射到 6 至 8 周龄的免疫缺陷型小鼠皮下，设置空白对照组(空白组注射与产品对应的溶媒)、阴性对照组(犬猫二倍体细胞)、阳性对照组(犬猫肿瘤细胞系，按照肿瘤细胞系接种要求的数量注射)。

J. 3. 3 肿瘤观察

参考中华人民共和国农业部公告第683号《兽用生物制品生产用细胞系试验研究指导原则》、《兽用生物制品实验室安全试验技术指导原则》、《兽用生物制品稳定性试验技术指导原则》以及《兽用生物制品临床试验技术指导原则》进行肿瘤观察。

J. 4 结果分析

成瘤率按式(J.1)进行计算：

$$Z=N/M\times 100\%.....(J.1)$$

式中：

Z——成瘤率；

M——接种小鼠总数； N——荷瘤小鼠总数。