

团 体 标 准

T/CSCB 0003—2021

人 间 充 质 干 细 胞

Human mesenchymal stem cell

2021-01-09 发布

2021-04-09 实施



中国细胞生物学学会 发布

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。

本文件由中国细胞生物学学会干细胞生物学分会提出。

本文件由中国细胞生物学学会归口。

本文件起草单位：中山大学、国家干细胞资源库、中国科学院干细胞与再生医学创新研究院、北京干细胞与再生医学研究院、中国科学院动物研究所、国家干细胞资源库创新联盟、北京工商大学、中国计量科学研究院、中国科学院上海营养与健康研究所、中国科学院生物化学与细胞生物学研究所、中国食品药品检定研究院、中国医药生物技术协会。

本文件主要起草人：项鹏、赵同标、郝捷、马爱进、陈小湧、黄晶、傅博强、王莹、周波、纳涛、吴骏、张愚、张勇、魏军、李启沅、胡士军、周家喜、俞君英、吴朝晖、曹佳妮、王磊、祝焕新。

人间充质干细胞

1 范围

本文件规定了人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、运输和废弃物处理要求。

本文件适用于人间充质干细胞的生产和检测。

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/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法
 WS 213 丙型肝炎诊断
 WS 273 梅毒诊断
 WS 293 艾滋病和艾滋病病毒感染诊断标准
 T/CSCB 0001 干细胞通用要求
 中华人民共和国药典
 全国临床检验操作规程

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

人间充质干细胞 human mesenchymal stem cell

一类贴壁培养后呈成纤维细胞样形态（纺锤形和梭形）、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：人间充质干细胞可由多种人体组织（如骨髓、脐带、胎盘、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；不同来源的人间充质干细胞在基因表达和分化能力方面存在差异。

4 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

CD —— 分化簇 (Cluster of Differentiation)
 DNA —— 脱氧核糖核酸 (Deoxyribonucleic Acid)
 EBV —— 人类疱疹病毒 (Epstein-Barr Virus)
 HBV —— 乙型肝炎病毒 (Hepatitis B Virus)
 HCMV —— 人巨细胞病毒 (Human Cytomegalovirus)
 HCV —— 丙型肝炎病毒 (Hepatitis C Virus)

HIV	——人类免疫缺陷病毒(Human Immunodeficiency Virus)
HLA-DR	——人白细胞抗原-DR (Human Leukocyte Antigen-DR)
HTLV	——人类嗜 T 细胞病毒(Human T-lymphotropic Virus)
IDO	——吲哚胺 2,3-双加氧酶(Indoleamine 2,3-dioxygenase)
IFN- γ	——干扰素- γ (Interferon- γ)
TNF- α	——肿瘤坏死因子- α (Tumor Necrosis Factor- α)
PCR	——聚合酶链式反应(Polymerase Chain Reaction)
STR	——短串联重复序列(Short Tandem Repeat)
TP	——梅毒螺旋体(Treponema Pallidum)

5 技术要求

5.1 原材料和辅料

5.1.1 应符合 T/CSCB 0001 要求。

5.1.2 应建立供者细胞采集的供者评估与筛选标准、采集方法、运输标准和交接标准,保证供者和细胞的安全。

5.1.3 供体应筛查 HIV、HBV、HCV、HTLV、EBV、HCMV 和 TP,并记录结果。

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和梭形的成纤维细胞态,形态均一。

5.2.2 染色体核型

正常核型应为 46,XX 或 46,XY。

5.2.3 细胞存活率

未冻存细胞存活率 $\geq 90\%$ 且冻存复苏后细胞存活率 $\geq 70\%$ 。

5.2.4 细胞标志蛋白

CD105、CD73、CD90 阳性率均 $\geq 95\%$;CD11b、CD19、CD31、CD34、CD45、HLA-DR 阳性率均 $\leq 2\%$ 。

5.2.5 免疫调节

经炎症因子(IFN- γ 或者 IFN- γ 联合 TNF- α)诱导后表达吲哚胺 2,3-双加氧酶(IDO)。与 T 淋巴细胞共培养,能抑制 T 淋巴细胞增殖及分泌 IFN- γ 、TNF- α 。

5.2.6 三系分化

具有成骨、成脂、成软骨的分化潜能。

5.2.7 成瘤性

免疫缺陷动物(如小鼠)体内成瘤试验结果为阴性。

5.2.8 微生物

真菌、细菌、支原体、HIV、HBV、HCV、HTLV、EBV、HCMV、TP 应为阴性。

5.3 过程控制

5.3.1 扩增、冻存、复苏等过程控制应符合 T/CSCB 0001 要求。

5.3.2 细胞 STR 检测结果应与供体细胞保持一致。

6 检验方法

6.1 细胞形态

二维培养条件下,用明视场细胞显微镜进行观察。

6.2 染色体核型

按照《中华人民共和国药典》检验。

6.3 细胞存活率

按照附录 A 的方法检验。

6.4 细胞表面标志物

按照附录 B 的方法检验。

6.5 免疫调节

6.5.1 诱导 IDO 表达

按照附录 C 的方法检验。

6.5.2 抑制 T 细胞增殖

按照附录 D 的方法检验。

6.5.3 抑制 T 细胞分泌 IFN- γ 、TNF- α

按照附录 E 的方法检验。

6.6 三系分化

6.6.1 成骨分化

按照附录 F 的方法检验。

6.6.2 成脂分化

按照附录 G 的方法检验。

6.6.3 成软骨分化

按照附录 H 的方法检验。

6.7 成瘤性

按照附录 I 的方法检验。

6.8 微生物

6.8.1 真菌

按照《中华人民共和国药典》中“1101 无菌检查法”项检测。

6.8.2 细菌

按照《中华人民共和国药典》中“1101 无菌检查法”项检测。

6.8.3 支原体

按照《中华人民共和国药典》中“3301 支原体检查法”项检测。

6.8.4 HBV

按照《全国临床检验操作规程》核酸法检验。

6.8.5 HCV

按照 WS 213 核酸法检验。

6.8.6 HIV

按照 WS 293 核酸法检验。

6.8.7 HTLV

按照《全国临床检验操作规程》核酸法检验。

6.8.8 EBV

按照《全国临床检验操作规程》核酸法检验。

6.8.9 HCMV

按照《全国临床检验操作规程》核酸法检验。

6.8.10 TP

按照 WS 273 核酸法检验。

7 检验规则

7.1 抽样方法和数量

7.1.1 在一个生产周期中,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 复核检验

根据需要,应由专业细胞检验机构实验室进行复核检验。

7.4 判定规则

7.4.1 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。

7.4.2 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) 细胞代次;
- c) 细胞数量;
- d) 生产日期;
- e) 生产批号;
- f) 生产组织;
- g) 储存条件;
- h) 运输条件;
- i) 使用方法;
- j) 执行标准号;
- k) 生产地址;
- l) 联系方式
- m) 邮政编码;
- n) 注意事项。

注:根据用户需求,可标注内毒素含量。

9 标签

应至少包括以下内容:

- a) 产品名称;
- b) 细胞代次;
- c) 细胞数量;
- d) 生产批号;
- e) 生产组织;
- f) 生产日期。

10 包装、储存及运输

10.1 包装

应选择对人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/CSCB 0001 要求。

10.2.2 应在低于 $-130\text{ }^{\circ}\text{C}$ 环境下储存。

10.3 运输

10.3.1 应符合 T/CSCB 0001 要求。

10.3.2 冻存的细胞应在干冰或低于 $-130\text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件下运输,非冻存细胞建议在 $2\text{ }^{\circ}\text{C}\sim 8\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下运输。

11 废弃物处理

人间充质干细胞生产和检测过程中产生的废弃物应按照 T/CSCB 0001 中的规定处理。

附录 A

(规范性)

细胞存活率检测 细胞计数法

A.1 仪器和设备

A.1.1 明视场显微镜。

A.1.2 血球计数板。

A.2 试剂

除特别说明外,所用试剂均为分析纯,检测用水均为 18.2 MΩ 去离子水。

A.2.1 磷酸盐缓冲液:pH 为 7.4。

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

A.3 检测步骤

A.3.1 细胞悬液制备

收集待检测细胞,用磷酸盐缓冲液(A.2.1)配制细胞悬液,稀释至合适的浓度。每个血球计数板(A.1.2)的 1 mm² 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。

A.3.2 细胞染色

按 1:1 的体积比将台盼蓝染液(A.2.2)与细胞悬液(A.3.1)混合均匀。

A.3.3 细胞计数

将盖玻片盖在血球计数板(A.1.2)计数槽上,取 10 μL 混合液(A.3.2)滴在一侧计数室的盖玻片边缘,另取 10 μL 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 30 s,将计数板置明视场显微镜(A.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 1 mm² 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 A.3.2~A.3.3 再重复测定一个样品。

A.3.4 细胞存活率计算

A.4 计算与分析

细胞存活率按式(A.1)进行计算:

$$X = (M - S) / M \times 100\% \quad \dots\dots\dots (A.1)$$

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。

A.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 B

(规范性)

细胞标志蛋白检测 流式细胞法

B.1 仪器和设备

- B.1.1 流式细胞仪。
- B.1.2 水平离心机。
- B.1.3 电子天平。

B.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/T 6682 规定的一级水。

- B.2.1 磷酸盐缓冲液:pH 7.4。
- B.2.2 牛血清白蛋白(BSA):纯度 $\geq 98\%$ 。
- B.2.3 叠氮钠(NaN_3)。
- B.2.4 抗人 CD105、CD73、CD90、CD11b、CD19、CD31、CD34、CD45、HLA-DR 抗体及同型对照抗体。
- B.2.5 按照相应要求使用电子天平(B.1.3)配制流式检测所需的液体:洗涤液、抗体稀释液。

B.3 样品保存

洗涤液和标记后的样品于 $2\text{ }^{\circ}\text{C}\sim 8\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。相关抗体遵照说明书保存。

B.4 检测步骤

B.4.1 样品准备

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

B.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(B.1.2)300g 离心 4 min,弃上清。

B.4.3 过滤上机

用洗涤液重悬细胞,然后通过 $40\text{ }\mu\text{m}$ 滤网转移到流式管中,按流式细胞仪(B.1.1)应用手册上机检测。

B.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。

B.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 C
(规范性)
诱导 IDO 表达检测 PCR 法

C.1 仪器和设备

- C.1.1 核酸含量测定仪。
- C.1.2 PCR 扩增仪。
- C.1.3 电泳仪。
- C.1.4 凝胶成像仪。

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/T 6682 规定的一级水。

- C.2.1 人重组 IFN- γ 和人重组 TNF- α 。
- C.2.2 RNA 提取试剂盒。
- C.2.3 RNA 逆转录 PCR 试剂盒。
- C.2.4 PCR 引物。
- C.2.5 Taq DNA 聚合酶。
- C.2.6 Ladder 内标。

C.3 检测步骤

C.3.1 IFN- γ 或 IFN- γ +TNF- α 处理

根据附录 A 方法测定,计算人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,在人间充质干细胞培养体系中添加 IFN- γ (10 ng/mL~30 ng/mL)或 IFN- γ (10 ng/mL~30 ng/mL)+TNF- α (10 ng/mL~30 ng/mL),正常培养 12 h~36 h。同时设立未使用 IFN- γ 或 IFN- γ +TNF- α 处理的人间充质干细胞为对照组,培养同样时间。

C.3.2 人间充质干细胞总 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(C.1.1)进行核酸含量测定。

C.3.3 逆转录 PCR

根据 RNA 逆转录 PCR 试剂盒产品说明书进行,使用 PCR 扩增仪(C.1.2)获得 cDNA,并扩增 IDO 基因。

C.3.4 PCR 产物电泳

根据电泳应用手册进行电泳检测。

C.3.5 凝胶成像

根据凝胶成像仪应用手册,使用电泳仪(C.1.3),进行电泳检测。

C.4 结果分析

使用凝胶成像仪(C.1.4)进行成像,未使用 IFN- γ 或 IFN- γ +TNF- α 处理的人间充质干细胞检测不到 IDO 条带,IFN- γ 或 IFN- γ +TNF- α 刺激后检测到 IDO 条带。

附录 D

(规范性)

抑制 T 细胞增殖检测 CFSE 标记法

D.1 仪器和设备

- D.1.1 血球计数板。
- D.1.2 显微镜。
- D.1.3 水平离心机。
- D.1.4 流式细胞仪。

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/T 6682 规定的一级水。

- D.2.1 磷酸盐缓冲液:pH 为 7.4。
- D.2.2 消化酶。
- D.2.3 台盼蓝染液:使用时,用磷酸盐缓冲液(D.2.1)稀释至 0.4%(质量浓度)。
- D.2.4 植物凝集素。
- D.2.5 淋巴细胞分离液。
- D.2.6 抗体(如:anti-CD3 抗体)。
- D.2.7 羧基荧光素二醋酸盐琥珀酰亚胺脂(CFSE)染料。

D.3 检测步骤

D.3.1 T 细胞分离及染色

D.3.1.1 T 细胞分离

利用淋巴细胞分离液(D.2.5),分离外周血单核细胞(PBMC),用适量无菌磷酸盐缓冲液(D.2.1)使用水平离心机离心(D.1.3)洗涤 2 次。然后孵育抗体;用适量无菌磷酸盐缓冲液(D.2.1)使用水平离心机离心(D.1.3)洗涤 2 次。重悬细胞至细胞浓度为 5×10^7 细胞/mL, $40 \mu\text{m}$ 滤网转移到流式管中,按流式细胞仪应用手册上机分选。

D.3.1.2 T 细胞染色

根据附录 A 方法测定,使用血球计数板(D.1.1)及显微镜(D.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。

D.3.2 T 细胞与人间充质干细胞共培养

D.3.2.1 T 细胞增殖

根据附录 A 方法测定,使用血球计数板(D.1.1)及显微镜(D.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,并用 $(2 \sim 5) \mu\text{g/mL}$ 的植物凝集素(D.2.4)刺激 T 细胞增殖,设立未用植物凝集素(D.2.4)刺激的 T 细胞培养作为对照,培养 96 h,用于检测刺激后 T 细胞增殖百分比 A。

D.3.2.2 人间充质干细胞抑制 T 细胞增殖

利用消化酶消化人间充质干细胞并制备成单细胞悬液,根据附录 A 方法测定,计算 T 细胞与人间

充质干细胞悬液活细胞浓度。人间充质干细胞按 2×10^5 细胞/mL 接种,细胞贴壁后,将 T 细胞按 5 : 1 (T 细胞 : 人间充质干细胞)的比例进行共培养,并用 $(2 \sim 5) \mu\text{g}/\text{mL}$ 的植物凝集素(D.2.4)刺激 T 细胞增殖,培养 96 h,用于检测人间充质干细胞抑制后 T 细胞增殖百分比 C。

D.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(D.2.1)使用水平离心机离心(D.1.3)洗涤 2 次,通过 $40 \mu\text{m}$ 滤网转移到流式管中,按流式细胞仪(D.1.4)应用手册上机检测。

D.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)。

D.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。并计算人间充质干细胞对 T 增殖的抑制率。

抑制率按式(D.1)进行计算:

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

式中:

Y —— 抑制率;

A —— 单独 T 细胞(刺激)CFSE 子代细胞的百分比;

C —— 与人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 E

(规范性)

抑制 T 细胞分泌 IFN- γ 、TNF- α 检测 胞内因子染色法

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/T 6682 规定的一级水。

- E.2.1 磷酸盐缓冲液:pH 为 7.4。
- E.2.2 消化酶。
- 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 佛波酯(PMA)。
- E.2.5 淋巴细胞分离液。
- E.2.6 抗体(如:anti-IFN- γ 抗体、anti-TNF- α 抗体)。
- E.2.7 布雷非德菌素 A(BFA)。
- E.2.8 离子霉素。
- E.2.9 皂苷(Saponin)。
- E.2.10 4%多聚甲醛。

E.3 检测步骤

E.3.1 T 细胞分离

利用淋巴细胞分离液(E.2.5),分离外周血 PBMC,用适量无菌磷酸盐缓冲液(E.2.1)使用水平离心机离心(E.1.3)洗涤 2 次。然后孵育抗体(E.2.6);用适量无菌磷酸盐缓冲液(E.2.1)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.3.2 T 细胞与人间充质干细胞共培养

E.3.2.1 T 细胞炎症因子分泌

根据附录 A 方法测定,使用血球计数板(E.1.1)及显微镜(E.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 48 h。结束培养前 4 h~6 h 往培养体系添加 50 ng/mL 佛波酯(E.2.4)、10 μ g/mL 布雷非德菌素 A(E.2.7)和 1 μ g/mL 离子霉素(E.2.8),用于检测 IFN- γ 阳性的 T 细胞比例 A_1 ,和 TNF- α 阳性的 T 细胞比例 A_2 。

E.3.2.2 人间充质干细胞抑制 T 细胞炎症因子分泌

利用消化酶消化人间充质干细胞并制备成单细胞悬液,根据附录 A 方法测定,使用血球计数板(E.1.1)及显微镜(E.1.2)计算 T 细胞与人间充质干细胞悬液活细胞浓度,人间充质干细胞按 2×10^5

细胞/mL 接种,细胞贴别后,将 T 细胞按 5 : 1(T 细胞 : 人间充质干细胞)的比例进行共培养,培养 48 h。结束培养前 4 h~6 h 往培养体系添加 50 ng/mL 佛波酯(E.2.4)、10 μg/mL 布雷非德菌素 A (E.2.7)和 1 μg/mL 离子霉素(E.2.8),用于检测人间充质干细胞抑制后 IFN-γ 阳性的 T 细胞比例 C₁, 和 TNF-α 阳性的 T 细胞比例 C₂。

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

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,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。

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。并计算人间充质干细胞对 T 细胞分泌 IFN-γ、TNF-α 的抑制率。

抑制率按式(E.1)和式(E.2)进行计算:

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

式中:

A₁——单独 T 细胞的 IFN-γ 阳性率;

C₁——与人间充质干细胞共培养 T 细胞的 IFN-γ 阳性率。

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

式中:

A₂——单独 T 细胞的 TNF-α 阳性率;

C₂——与人间充质干细胞共培养 T 细胞的 TNF-α 阳性率。

附 录 F
(规范性)
成骨分化检测 茜素红 S 染色法

F.1 仪器和设备

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

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/T 6682 规定的一级水。

- F.2.1 磷酸盐缓冲液:pH 为 7.4。
- F.2.2 消化酶。
- 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 成骨诱导液。
- F.2.5 茜素红 S 染色试剂盒。

F.3 检测步骤**F.3.1 细胞样品的准备****F.3.1.1 细胞消化**

使用水平离心机(F.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。

F.3.1.2 细胞计数

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

F.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 14 d~21 d。

F.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。

F.4 结果分析

显微镜下可见散在大量橘红色的钙结节。

附录 G

(规范性)

成脂分化检测 油红 O 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/T 6682 规定的一级水。

- G.2.1 磷酸盐缓冲液:pH 为 7.4。
- G.2.2 消化酶。
- G.2.3 台盼蓝染液: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 成脂诱导液。
- G.2.5 油红 O 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。

G.3.1.2 细胞计数

根据附录 A 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脂诱导液产品说明书,诱导 14 d~21 d。

G.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。

G.4 结果分析

显微镜下可见橙红色的脂滴,脂肪细胞中含大小不等的脂滴。

附 录 H
(规范性)
成软骨分化检测 阿尔新蓝染色法

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/T 6682 规定的一级水。

- H.2.1 磷酸盐缓冲液:pH 为 7.4。
- H.2.2 消化酶。
- 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 成软骨诱导液。
- H.2.5 阿尔新蓝染色试剂盒。

H.3 检测步骤

H.3.1 细胞样品的准备

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 A 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软骨诱导液产品说明书。诱导 14 d~21 d。

H.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。

H.4 结果分析

显微镜下可见深蓝色的软骨细胞胞外基质。

附录 I

(规范性)

成瘤性检测 免疫缺陷小鼠检测法

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/T 6682 规定的一级水。

- I.2.1 磷酸盐缓冲液:pH 为 7.4。
- I.2.2 消化酶。
- 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.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 A 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 细胞移植

将 1×10^7 个人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(人二倍体细胞)、阳性对照组(人肿瘤细胞系,按照肿瘤细胞系接种要求的数量注射)。

I.3.3 肿瘤观察

接种后观察 16 周,每周测量体重、肿瘤大小。若荷瘤小鼠肿瘤超过 $2\,000\text{ mm}^3$ 或者肿瘤溃烂或体重下降,可考虑执行人道终点。16 周后剥离小鼠身上肿瘤,行大体观察,瘤体称重,计算成瘤率。

I.4 结果分析

成瘤率按式(I.1)进行计算:

$$Z = N/M \times 100\% \quad \dots\dots\dots(I.1)$$

式中：

Z ——成瘤率；

M ——接种小鼠总数；

N ——荷瘤小鼠总数。

中国细胞生物学学会
团体标准
人间充质干细胞
T/CSCB 0003—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

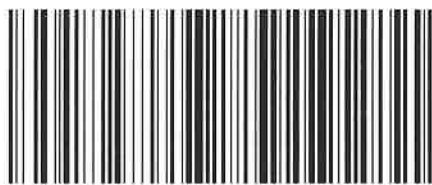
*

开本 880×1230 1/16 印张 1.5 字数 40 千字
2021年1月第一版 2021年1月第一次印刷

*

书号: 155066·5-2725 定价 24.00 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



T/CSCB 0003-2021



码上扫一扫 正版服务到