

ICS 01.040.65

CCS B 42



# 团体标准

T/GDAAV 1112-2024

## 马间充质干细胞制备技术规范

Technical specification for the preparation of equine mesenchymal stem cells

2024-03-16 发布

2024-03-16 实施

广东省畜牧兽医学会 发布

## 目 录

前 言.....	2
引 言.....	3
马间充质干细胞制备技术规范.....	4
1 范围.....	4
2 规范性引用文件.....	4
3 术语和定义.....	4
3.1 马间充质干细胞 quine mesenchymal stem cell.....	4
4 缩略语.....	4
5 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 过程控制.....	5
6 检验方法.....	6
6.1 供体马筛选.....	6
6.2 细胞形态.....	6
6.3 染色体核型.....	6
6.4 细胞存活率和细胞增殖能力.....	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 复核检查.....	7
7.4 判定规则.....	7
8 使用说明.....	7
9 标签.....	8
10 包装, 储存和运输.....	8
10.1 包装.....	8
10.2 储存.....	8
10.3 运输.....	8
附录 A.....	9
附录 B.....	10
附录 C.....	12
附录 D.....	13
附录 E.....	14
附录 F.....	16
附录 G.....	17
附录 H.....	18
附录 I.....	19

## 前 言

本文件按照 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。

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。

本文件由佛山科学技术学院、广东省畜牧兽医学会提出。

本文件由广东省畜牧兽医学会归口。

本文件起草单位：维赛（佛山）生物科技有限公司、佛山科学技术学院。

本文件主要起草人：王丙云、詹小舒、李东升、陈胜锋、李星颖、阮慧敏、叶彩玲。

全国团体标准信息平台

## 引 言

马作为竞技类动物，常因为长年累月的训练和过度负荷而造成关节磨损、退行性关节炎、悬韧带炎、肌腱炎、骨膜炎、肌肉拉伤和骨折等问题，严重影响了马的竞技水平，传统的抗炎、镇痛等方法治疗效果较差、恢复时间长并且常复发，给赛马业带来了巨大的经济损失。间充质干细胞（mesenchymal stem cells, MSCs）是源于中胚层，具有自我更新和多向分化潜能的多能性干细胞，可从多种组织器官（如骨髓、脂肪、胎盘和脐带）中分离获得。MSCs 细胞携带 CD29、CD44、CD73、CD90 和 CD105 等表面标志物，而缺乏 CD19、CD34、CD45 和 MHC-II 等造血干细胞的表面标志物。MSCs 具有来源广泛、归巢性、免疫原性低、安全性高和适应症广等特点而备受青睐，成为当前治疗动物或人类疾病的最佳种子细胞。

当前，马间充质干细胞已经在实验室和临床研究阶段取得了不少成果，完成了多项相关的生物功能试验和安全性评估。为规范马间充质干细胞的生产、使用和运输等技术要求，确保间充质干细胞在马医疗领域的规范化应用，并为从业者和相关生产企业提供明确的操作和评估指南，促进我国马的间充质干细胞的产品标准化，制订马间充质干细胞生产标准的团体要求很有必要。

# 马间充质干细胞制备技术规范

## 1 范围

本文件规定了马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。

本文件适用于马间充质干细胞的制备和检测。

## 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/T 18638-2021 流行性乙型脑炎诊断技术

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

NY/T 1185 - 2018 马流行性感冒诊断技术

SN/T 4102 - 2015 马的饲养、运输、屠宰动物福利规范

T/CSCB 0001 干细胞通用要求

中华人民共和国兽药典（2020年版）

## 3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

### 3.1 马间充质干细胞 Equine 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：马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）分离获得，也可以通过分化或转分化等方式获得；不同来源的马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

CD: 分化簇 (Cluster of Differentiation)

EIV: 马流感病毒 (Equine Influenza Virus)

JEV: 日本乙型脑炎病毒 (Japanese Encephalitis Virus)

IDO: 吲哚胺 2,3-双加氧酶 (Indoleamine 2,3 Dioxygenase)

INF- $\gamma$ : 干扰素  $\gamma$  (Interferon gamma)

STR: 短串联重复序列 (Short Tandem Repeat)

## 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 应建立供体细胞采集的供体马评估与筛选标准、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。

5.1.3 供体应筛查 EIA 和 JEV，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

正常核型为 64, XX 或 64, XY。

#### 5.2.3 细胞存活率及增殖能力

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

细胞倍增时间（细胞增殖能力） $\leq 36\text{h}$ 。

#### 5.2.4 细胞表面标记物

流式细胞仪检测细胞表面标记物 CD29、CD44 和 CD90 阳性率 $\geq 95\%$ ；CD34 和 CD45 阳性率 $\leq 2\%$ 。

#### 5.2.5 免疫调节

经炎症因子 IFN- $\gamma$  诱导后显著增强马间充质干细胞表达吡啶胺 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- $\gamma$ ，TNF- $\alpha$ 。

#### 5.2.6 三系分化

具有成骨、成脂及成软骨的分化潜能。

#### 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、内毒素、EIV 和 JEV 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 供体马筛选

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》检验。

### 6.4 细胞存活率和细胞增殖能力

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。

### 6.7 三系分化

#### 6.7.1 成骨分化

按照附录 F 的方法检验。

#### 6.7.2 成脂分化

按照附录 G 的方法检验。

#### 6.7.3 成软骨分化

按照附录 H 的方法检验。

### 6.8 成瘤性

按照附录 I 的方法检验。

### 6.9 微生物

#### 6.9.1 真菌

按照《中国兽药典》2020 版第三部中“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 版第三部中“3306 无菌检验或纯粹检验法”项检测。

### 6.9.3 支原体

按照《中国兽药典》2020 版第三部中“3308 支原体检验法”项检测。

### 6.9.4 内毒素

按照《中国兽药典》2020 版第一部中“1143 细菌内毒素检验法”检测。

### 6.9.5 EIV

按照行业标准 NY/T 1185 - 2018《马流行性感冒诊断技术》检测。

### 6.9.6 JEV

按照国家标准 GB/T 18638 - 2021《流行性乙型脑炎诊断技术》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抽检，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 复核检查

根据需要，应由具有 CMA、CNAS 等相关资质的第三方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) 细胞数量；
- c) 生产日期；
- d) 生产批号；
- e) 生产组织；

- f) 储存条件;
- 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) 生产日期;
- d) 生产批号;
- e) 生产组织。

## 10 包装, 储存和运输

### 10.1 包装

应选择对马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 $-130^{\circ}\text{C}$ 或 $-80^{\circ}\text{C}$ 环境下储存。

### 10.3 运输

- 10.3.1 应符合 T/CSCB 0001 要求。
- 10.3.2 冻存细胞应在干冰或低于 $-130^{\circ}\text{C}$ 或 $-80^{\circ}\text{C}$ 条件下运输,非冻存细胞建议在 $4\sim 25^{\circ}\text{C}$ 下运输。

## 附录 A

### (规范性)

#### 供体马评估与筛选，马组织样品采集和运输标准

##### A.1 供体马筛选标准

- A.1.1 供体马年龄应不大于 3 岁（36 个月），以确保供体马没有出现明显老化迹象。
- A.1.2 健康状况筛查：供体马应由专业兽医进行全面的健康评估，包括体格检，血液检查，并且具有有效的疫苗接种记录（至少包含马流感和日本脑炎疫苗），确保没有潜在的传染疾病。
- A.1.3 品种和遗传背景：供体马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：供体马应具有良好的心理和行为特征。挑选温顺，易驾驭的马作为供体，以减少在组织采集和实验过程中的压力和不适感。

##### A.2 马组织或器官采集方法

- A.2.1 按行业标准 SN/T 4102 - 2015《马的饲养、运输、屠宰动物福利规范》采集供体马的组织或器官。
- A.2.2 麻醉与镇定：使用合适的麻醉方法，确保供体马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技术，例如皮下脂肪、脊髓和产后废弃组织应选用不一样的手术采集方法。手术全程遵循无菌原则。
- A.2.3 供体马术后护理：术后应对供体马应进行体温，行为和身体状况等进行监测；伤口需定期清洁和更换包扎，避免感染；遵循适当的疼痛管理计划，包括使用合适的镇痛药物；为供体马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福利。

##### A.3 马组织器官运输和交接标准

- A.3.1 马组织器官的运输条件：应将组织器官置于大小合适的无菌容器中，并使用缓冲溶液保存。运输过程保证组织温度保持在 4℃~8℃，并于 6h 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，记录供体马的身份信息，健康状况，采集日期和过程，采集人信息等。

## 附录 B

(规范性)

### 细胞存活率及增殖能力检测 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  $1\text{mm}^2$  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

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

##### 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  $10\ \mu\text{L}$  混合液（B.3.2）滴在一侧计数室的盖玻片边缘，另取  $10\ \mu\text{L}$  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  $16\times 25$  规格的计数室，按对角线位，取左上、右上、左下、右下 4 个  $1\ \text{mm}^2$  的中格（即 100 个小格）计数。对  $25\times 16$  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 细胞存活率及细胞倍增时间计算。

#### B.4 计算与分析

##### B.4.1 计算细胞存活率的公式如下：

$$X = (MS) / M \times 100\%$$

式中：

X 为细胞存活率；M 为细胞总数；S 为染色的细胞数。

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.4.2 计算细胞倍增时间的公式如下：

$$DT = t \times [1g2 / (1gN_t - 1gN_0)]$$

式中：

$t$  为培养时间,  $N_0$  为首次记下的细胞总数,  $N_t$  为  $t$  时间后的细胞总数。一般  $N_0$  在接种细胞 24 小时后进行。

计算两次计数细胞倍增时间结果的平均值, 记为细胞倍增时间。

#### 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%。

全国团体标准信息平台

## 附录 C

### (规范性)

### 细胞表面标志物检测 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/T 6682 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 $\geq 98\%$ 。
- C.2.3 叠氮钠（ $\text{NaN}_3$ ）。
- C.2.4 抗马 CD29、CD 44、CD90、CD34 和 CD45 抗体及同型对照抗体。

注：若选用人源、鼠源或其他来源抗体，应将制备抗体的抗原序列进行比对，确定其与马源抗原序列相似度在 95%以上方可用于鉴定马间充质干细胞。

- C.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。

#### C.3 样品保存

洗涤液和标记后的样品于  $2^{\circ}\text{C} \sim 8^{\circ}\text{C}$  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（B.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（B.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（B.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  $40\ \mu\text{m}$  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。

##### 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/T 6682 规定的一级水。

- D.2.1 重组 IFN- $\gamma$ 。
- 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 Taq DNA 聚合酶。
- D.2.6 Ladder 内标。

#### D.3 检测步骤

##### D.3.1 IFN- $\gamma$ 处理

根据附录 A 方法测定，计算马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/cm<sup>2</sup> 接种，在马间充质干细胞培养体系中添加 IFN- $\gamma$  (10ng/mL~30ng/mL)，正常培养 12h~36h。同时设立未使用 IFN- $\gamma$  处理的马间充质干细胞为对照组，培养同样时间。

##### D.3.2 马间充质干细胞总 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 试剂盒产品说明书进行，使用 PCR 扩增仪 (D.1.2) 获得 cDNA，并扩增 IDO 基因。

##### 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- $\gamma$  处理的马间充质干细胞检测不到 IDO，IFN- $\gamma$  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/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 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 羧基荧光素二醋酸琥珀酰亚胺酯（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),分离马外周血单核细胞(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 $5 \times 10^7$ 细胞/mL,40 $\mu$ 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 A 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 细胞与马间充质干细胞共培养

###### E.3.2.1 T 细胞增殖

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)计算马 T 细胞悬液活细胞浓度,按 $1 \times 10^6$ 细胞/mL接种培养,并用(2~5) $\mu$ 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(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 马间充质干细胞抑制 T 细胞增殖

利用消化酶消化马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 细胞与马间充质干细胞悬液活细胞浓度。马间充质干细胞按 $2 \times 10^5$ 细胞/mL接种,细胞贴壁后,将 T 细胞按

5:1(T 细胞: 马间充质干细胞)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, 用于检测马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 40 μm 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。并计算马间充质干细胞对 T 增殖的抑制率。

计算 抑制率的公式如下:

$$Y=(A-C) / A \times 100\%$$

式中:

Y 为抑制率; A 为单独 T 细胞(刺激) CFSE 子代细胞的百分比; C 为与马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)

### 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 0.25%EDTA-胰酶。
- F.2.3 台盼蓝染色：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）离心收集马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，避免形成气泡或者残细胞团块。

###### 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）计算马间充质干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 14d~21d。

##### 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 0.25%EDTA-胰酶。
- 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）计算马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脂诱导液产品说明书，诱导 14d~21d。

##### 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 0.25%EDTA-胰酶。
- 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）计算马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软骨诱导液产品说明书。诱导 14d~21d。

##### 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

#### 1.1 仪器和设备

- 1.1.1 血球计数板。
- 1.1.2 明视场显微镜。
- 1.1.3 水平离心机。

#### 1.2 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。

- 1.2.1 磷酸盐缓冲液：pH 为 7.4。
- 1.2.2 0.25%EDTA-胰酶。
- 1.2.3 台盼蓝染液：使用时，用磷酸盐缓冲液（1.2.1）稀释至 0.4%（质量浓度）。

#### 1.3 检测步骤

##### 1.3.1 细胞样品的准备

###### 1.3.1.1 细胞消化

使用水平离心机（1.1.3）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。

###### 1.3.1.2 细胞计数

根据附录 A 方法测定，使用血球计数板（1.1.1）及明视场显微镜（1.1.2）计算马间充质干细胞悬液活细胞浓度。

##### 1.3.2 细胞移植

将  $1 \times 10^7$  个马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（马二倍体细胞）、阳性对照组（马肿瘤细胞系，按照肿瘤细胞系接种要求的数量注射）。

##### 1.3.3 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  $2000\text{mm}^3$  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，进行大体观察和瘤体称重，计算成瘤率。

#### 1.4 结果分析

计算成瘤率的公式如下：

$$Z=N/M \times 100\%$$

式中：

Z 为成瘤率；M 为接种小鼠总数；N 为荷瘤小鼠总数。