

T/WEBIO

团 体 标 准

T/WEBIO XXXX—XXXX

人间充质干细胞免疫调节功能测定技术规范

Technical Specifications for the Assessment of Immunoregulatory Functions of Human
Mesenchymal Stem Cells

征求意见稿

(在提交反馈意见时, 请将您知道的专利连同支持文件一并附上)

202X - XX - XX 发布

202X - XX - XX 实施

武汉东湖国家自主创新示范区生物医药行业协会
武汉市生物医药产业协会 发布

目 次

前言	II
引言	III
1 范围	1
2 规范性引用文件	1
3 术语和定义	1
4 通用要求	1
4.1 试剂或材料要求	1
4.2 仪器设备要求	1
4.3 环境要求	3
4.4 人员要求	3
4.5 检验方法	3
5 质量控制	3
6 结果报告	3
7 标准实施与评价	3
附录 A（规范性） 人间充质干细胞抑制 T 淋巴细胞增殖的检测方法	5
附录 B（规范性） 人间充质干细胞抑制 Th1/Th17 增殖的检测方法	8
附录 C（规范性） 人间充质干细胞促进 Treg 增殖的检测方法	7
附录 D（规范性） 标准实施信息及意见反馈表	8
参考文献	9

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。

本文件由武汉珈创生物技术股份有限公司提出。

本文件由武汉东湖国家自主创新示范区生物医药行业协会归口。

本文件由武汉东湖国家自主创新示范区生物医药行业协会联合武汉市生物医药产业协会共同发布。

本文件起草单位：武汉珈创生物技术股份有限公司、华中科技大学同济医学院附属协和医院、武汉光谷中源药业有限公司、武汉汉密顿生物科技股份有限公司、湖北团标技术创新中心有限公司。

本文件主要起草人：郑从义、徐国东、袁冰、刘愈杰、胡豫、梅恒、王华芳、张宇、姚惟琦、武栋成、岳壮、胡惠丽、杨诗吟。

引 言

人间充质干细胞是干细胞治疗产品中应用最广的一种细胞原材料，目前世界上已经获批的干细胞治疗产品有三分之二是人间充质干细胞来源的。人间充质干细胞具有独特的免疫调控能力，参与调控异常免疫反应，维护免疫平衡。另一方面，人间充质干细胞相比胚胎干细胞及诱导多能干细胞，又存在细胞建库困难，产品批次间差异大的缺点，难以持续制备大量多批次的干细胞制剂。《人间充质干细胞免疫调节功能测定》中所描述的方法适用于不同代次（3-20代）人间充质干细胞及人间充质干细胞制剂的细胞活性及免疫调节能力的评价，旨在为人间充质干细胞活性与功能检测的标准化提供基本遵循。

人间充质干细胞免疫调节功能测定技术规范

1 范围

本文件规定了人间充质干细胞免疫调节功能测定的通用要求、试验步骤、数据分析、质量控制、结果报告等要求。

本文件适用于通过流式细胞术对人间充质干细胞免疫调节功能的测定,包括抑制 T 淋巴细胞的增殖、抑制 T 淋巴细胞亚群 Th1/Th17 的增殖、促进 T 淋巴细胞亚群 Treg 的增殖三种测定方法。

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

GB/T 43459-2023 洁净室及受控环境中细胞培养操作技术规范

YY/T 0588 流式细胞仪

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

淋巴细胞增殖 lymphocyte proliferation

淋巴细胞在受到外源性刺激(如植物凝集素)后,通过细胞分裂增加数量的过程。

3.2

辅助性T细胞 helper T cell

简称Th细胞,表达CD4⁺的T细胞亚群,参与免疫应答的调节。

3.3

调节性T细胞 regulatory T cell

简称Treg细胞,表达CD4⁺、CD25⁺、CD127^{low}的T细胞亚群,具有免疫抑制作用。

4 通用要求

4.1 试剂或材料要求

本方法使用试剂均为分析纯,除特别说明外,实验用水均为GB/T 6682规定的一级水。同时,应准备如下试剂或材料:

——磷酸盐缓冲液: pH 7.4;

——干细胞温和消化酶(非动物来源,消化温和,对细胞损伤小);

——人间充质干细胞完全培养基(含非动物来源血清替代物);

——RPMI-1640 细胞培养基;

——胎牛血清;

- 植物凝集素 (Phytohemagglutinin P, PHA-P)；
- 人白细胞介素 2；
- 丝裂霉素 C；
- 羧基荧光素二乙酸琥珀酰亚胺酯 (CFDA SE) 细胞增殖与示踪检测试剂盒；
- 流式荧光抗体；
- 细胞固定/透化试剂盒；
- 白细胞活化混合物 (包含佛波酯/PMA, 离子霉素/Ionomycin 和蛋白转运抑制剂 Brefeldin A 的混合物)；
- 人外周血单个核细胞 (Peripheral Blood Mononuclear Cells, PBMC)；
- 细胞培养板。

4.2 仪器设备要求

应准备以下仪器设备：

- 符合 YY/T 0588 要求的流式细胞仪；
- 细胞计数仪 (推荐) 或血细胞计数板；
- 水平离心机；
- 冷冻离心机；
- 移液器；
- 生物安全柜。

使用的细胞计数仪应经过仪器校准和确认,并结合方法学验证,确保测定方法的重复性和线性关系符合规定。流式细胞分析仪要求不少于2激光4色,且应含488nm激光发射器,能够接收发射波长为515-520nm的荧光信号。通过检测激光功率,激光延迟,验证并校准增益等设置,确保仪器获得稳定的荧光强度及较小的变异系数(CV值)。设备需经过仪器校准和确认,并制订校准计划,定期送有资质的第三方校准机构校准。

4.3 环境要求

细胞培养室应符合GB/T 43459细胞培养所需的洁净度要求,必要时对环境条件(温度、湿度)进行监控,环境监控设施或设备按照设备管理要求进行检定。非实验室的人员未经批准不得进入检测区域。

4.4 人员要求

操作人员应具备细胞培养、无菌培养、流式细胞术等相关基础理论知识,接受过流式染色、细胞计数等实验技能培训,并定期进行培训和考核。

4.5 检验方法

4.5.1 对 T 淋巴细胞增殖抑制能力的检测

通过对 CFSE 标记的人 PBMC 加入一定浓度的植物凝集素 PHA,促进 T 淋巴细胞的增殖,与人间充质干细胞以 5:1 的比例进行共培养 7d 后,使用流式细胞仪检测人间充质干细胞对 T 淋巴细胞增殖抑制的效果。具体检测方法应符合附录 A。

4.5.2 对 Th1/Th17 增殖抑制能力的检测

通过对人 PBMC 加入 PHA 和 IL2 刺激活化，与人间充质干细胞以 5: 1 的比例进行共培养 3d 后，加入胞内因子刺激和分泌阻断剂 4-6h 后，使用流式细胞仪检测人间充质干细胞对 T 淋巴细胞亚群 Th1/Th17 增殖抑制的效果。具体检测方法应符合附录 B。

4.5.3 对 Treg 增殖促进能力的检测

通过将人 PBMC 与人间充质干细胞以 5: 1 的比例进行共培 3d 后，使用流式细胞仪检测人间充质干细胞对 T 淋巴细胞亚群 Treg 增殖促进的效果。具体检测方法应符合附录 C。

5 细胞质量控制

5.1 人外周血单个核细胞 (PBMC)

实验中使用的 PBMC 可以取健康人外周血，使用淋巴细胞分离液进行分离，制备新鲜的 PBMC，也可以购买商业化的冻存 PBMC 进行实验。使用新鲜分离的 PBMC 需保证细胞活率 $\geq 95\%$ ，冻存的 PBMC 复苏后活率 $\geq 90\%$ ；对 PBMC 的纯度要进行检测，淋巴细胞比例应 $\geq 70\%$ ，单核细胞比例应 $\leq 30\%$ ，其他细胞比例（如粒细胞、红细胞）比例应 $\leq 2\%$ ；对健康人外周血的供者需告知用途，并征得供者本人同意。单次实验中的 PBMC 需为同一来源人外周血经同一批次分离得到。

5.2 细胞状态

该实验中，人间充质干细胞需经丝裂霉素 C 处理，丝裂霉素 C 的浓度及处理时间均需根据人间充质干细胞的生长状态做调整，在第一次开展实验之前，需对处理条件进行确认，确保处理过程尽可能小的影响细胞存活率，可使用台盼蓝染色法检测细胞死活，细胞存活率 $\geq 90\%$ 。

6 结果报告

结果报告应包括以下内容：

- 实验日期、操作人员信息；
- 干细胞种类及来源；
- PBMC 的来源、淋巴细胞及单核细胞占比；
- 培养条件（如培养基类型、温度、时间等）；
- 各实验组中目的细胞占比；
- 促进率/抑制率计算公式及结果。

7 标准实施与评价

7.1 结合实际，认真做好标准实施准备，包括标准实施的方案准备、组织准备、知识准备、手段准备和物质条件准备等。

7.2 制定标准实施方案，明确适用对象和场景、提供实施必备条件和保障（组织、制度、资金、人员和设备仪器等）、推荐方法路径，确定资源要素配置、关键环节和控制点，提出标准实施中的注意事项。

7.3 针对医疗卫生机构、企业等相关方和操作人员和管理人员等进行标准宣贯和培训，结合标准要求，落实责任制，做到横向到边，纵向到底。

7.4 标准实施主要在企业管理、公共卫生等活动中开展。标准实施的重点是落实国家的健康、卫生、安全的要求。

7.5 标准实施的检查主要是检查标准实施方案的落实情况，需要逐条检查标准实施内容的落实，并记录未实施内容的理由或原因。标准实施检查也要检查标准实施的支持手段和物质条件的落实情况。做好标准实施验证记录，畅通标准实施信息采集的方式方法和反馈渠道，定期整理并处理收集到的意见建议。

7.6 在标准实施一定时间后，对照《中华人民共和国标准化法》等相关文件要求和编制的标准实施方案，开展标准实施效果评价分析，总结实施经验成效，梳理存在的薄弱环节，标准实施的评价主要是评价标准实施的效果，主要从技术进步、质量水平提高、客户满意度、规范秩序、效率提高、节约费用、节省时间、履行社会责任等方面进行有益性评价，同时还要评价标准实施带来的问题，以便为未来改进提供参考。

7.7 标准实施信息及意见反馈表相关示例参见附录 D。

附录 A

(规范性)

人间充质干细胞抑制 T 淋巴细胞增殖的检测方法

A.1 实验步骤

A.1.1 实验用人间充质干细胞的制备

1 瓶汇合度 80-90%的 T75 人间充质干细胞，弃液并用适量的磷酸缓冲液润洗后，加入含 (10-30) $\mu\text{g/ml}$ 丝裂霉素 C 的培养基，培养箱中放置 3h。弃液润洗 3 遍后使用消化酶进行消化，调整活细胞浓度为 $1 \times 10^5/\text{ml}$ ，2ml 细胞悬液铺六孔板 1 孔，过夜培养。

A.1.2 实验用 PBMC 的制备

人 PBMC 用含 10% FBS 的 RPMI-1640 培养过夜。收集 PBMC，取 2ml 1×10^6 PBMC 至六孔板的 1 孔。剩余 PBMC 离心后根据 CFDA SE 增殖试剂盒进行标记，调整活细胞浓度为 $5 \times 10^5/\text{ml}$ 。

A.1.3 人间充质干细胞与 T 细胞共培养

取 CFDA SE 染色后的 PBMC 2ml 于六孔板一孔，5ml PBMC 中加入 (5-10) $\mu\text{g/ml}$ 植物凝集素 PHA，加 2ml 于六孔板一孔，2ml 于弃液后的人间充质干细胞孔。PBMC 与人间充质干细胞按 5: 1 进行共培养，培养基为含 10% FBS 的 RPMI-1640。组别设置为 PBMC 正常培养组、CFSE 标记 PBMC 组、PHA 刺激+CFSE 标记 PBMC 组，PHA 刺激+CFSE 标记 PBMC 与人间充质干细胞共培养组，共培养 7d。

A.2 检测步骤

A.2.1 收集样本上机检测

收集 PBMC，用适量的磷酸缓冲液洗涤一次，用 300 μl 的磷酸缓冲液重悬至流式管中，按流式细胞仪应用手册上机检测。

A.2.2 圈门逻辑关系

圈门步骤为前向 (FSC) /侧向 (SSC) 图先圈目的细胞群 P1，设门至 FSC-A/FSC-W 或 H 去粘连图，圈出单个细胞群 P2，设门至 FITC 直方图，CFSE 标记 PBMC 组目的细胞群为 PBMC 未分裂的细胞，在 FITC 直方图目的细胞群左侧为 PBMC 分裂的子代细胞。

A.3 数据分析

抑制率按如下公式计算：

$$\text{抑制率} = \frac{A-C}{A} \times 100\% \dots\dots\dots (A.1)$$

式中：

A—PHA 刺激+CFSE 标记 PBMC 组中子代细胞的百分比

C—PHA 刺激+CFSE 标记 PBMC 与人间充质干细胞共培养组中子代细胞百分比

附录 B

(规范性)

人间充质干细胞抑制 Th1/Th17 增殖的检测方法

B.1 实验步骤

B.1.1 实验用人间充质干细胞的制备

1 瓶汇合度 80-90%的 T75 人间充质干细胞，弃液并用适量的磷酸缓冲液润洗后，加入含 (10-30) $\mu\text{g/ml}$ 丝裂霉素 C 的培养基，培养箱中放置 3h。弃液润洗 3 遍后使用消化酶进行消化，调整活细胞浓度为 $2 \times 10^5/\text{ml}$ ，2ml 细胞悬液铺六孔板 1 孔，过夜培养。

B.1.2 实验用 PBMC 的制备

人 PBMC 用含 10% FBS 的 RPMI-1640 培养过夜，同时用植物凝集素 PHA 及人白细胞介素 2 (IL-2) 刺激活化，PHA 终浓度为 (5-10) $\mu\text{g/ml}$ ，IL2 终浓度为 (50-100) IU/ml。第二天收集 PBMC，调整细胞浓度为 $1 \times 10^6 \text{ cells/ml}$ ，并加入 (50-100) IU/ml IL2。

B.1.3 人间充质干细胞与 T 细胞共培养

按照 PBMC 与人间充质干细胞 5: 1 进行共培养，分别取 2ml PBMC 于六孔板的 PBMC 单独培养组，PBMC 与弃液后的人间充质干细胞共培养组，共培养 3d。

B.2 检测步骤

B.2.1 胞内因子的激活和分泌阻断

收样前 4-6 小时，PBMC 单独培养组，PBMC 与人间充质干细胞共培养组加入白细胞活化混合物 (参考用量 PMA 终浓度 50 ng/ml, Ionomycin 终浓度 1 $\mu\text{g/ml}$, Brefeldin A 终浓度 5 $\mu\text{g/ml}$)

B.2.2 收样流式染色

收集 PBMC，磷酸缓冲液清洗，先标记 CD3、CD8 流式抗体，固定、破膜后标记 IFN- γ 与 IL-17A 胞内流式抗体。最终 Th1 细胞的抗体标记为 CD3⁺CD8⁻IFN- γ ⁺，Th17 细胞的抗体标记为 CD3⁺CD8⁻IL-17A⁺。

B.2.3 上机检测

用 300 μl 的磷酸缓冲液重悬至流式管中，按流式细胞仪应用手册上机检测。

B.2.4 圈门逻辑关系

圈门步骤为前向 (FSC) /侧向 (SSC) 图先圈目的细胞群 P1，设门至 FSC-A/FSC-W 或 H 去粘连图，圈出单个细胞群 P2，设门至 CD3/SSC 圈出 CD3⁺ 细胞群 P3，分别设门至 CD8⁻IFN- γ ⁺ Th1 细胞群、CD8⁻IL17A⁺ Th17 细胞群。

B.3 数据分析

Th1 抑制率按如下公式计算：

$$\text{Th1 抑制率} = \frac{A1-C1}{A1} \times 100\% \dots\dots\dots (\text{B.1})$$

Th17 抑制率按如下公式计算：

$$\text{Th17 抑制率} = \frac{A2-C2}{A2} \times 100\% \dots\dots\dots (\text{B.2})$$

式中：

A1—PBMC 单独培养组的 Th1 细胞百分比

C1—PBMC 与人间充质干细胞共培养组的 Th1 细胞百分比

A2—PBMC 单独培养组的 Th17 细胞百分比

C2—PBMC 与人间充质干细胞共培养组的 Th17 细胞百分比

附 录 C

(规范性)

人间充质干细胞促进 Treg 增殖的检测方法

C.1 实验步骤

C.1.1 实验用人间充质干细胞的制备

1 瓶汇合度 80-90%的 T75 人间充质干细胞，弃液并用适量的磷酸缓冲液润洗后，加入含 (10-30) $\mu\text{g/ml}$ 丝裂霉素 C 的培养基，培养箱中放置 3h。弃液润洗 3 遍后使用消化酶进行消化，调整活细胞浓度为 $2 \times 10^5/\text{ml}$ ，2ml 细胞悬液铺六孔板 1 孔，过夜培养。

C.1.2 实验用 PBMC 的制备

人PBMC用含10% FBS的RPMI-1640培养过夜，收集PBMC，调整细胞浓度为 1×10^6 cells/ml。

C.1.3 人间充质干细胞与 T 细胞共培养

按照 PBMC 与人间充质干细胞 5: 1 进行共培养，分别取 2ml PBMC 于六孔板的 PBMC 单独培养组，PBMC 与弃液后的人间充质干细胞共培养组，共培养 3d。

C.2 检测步骤

C.2.1 收样流式染色

收集 PBMC，磷酸缓冲液清洗，标记 CD4、CD25、CD127 流式抗体，最终 Treg 细胞的抗体标记为 $\text{CD4}^+\text{CD25}^+\text{CD127}^{\text{low}}$ 。

C.2.2 上机检测

用 300 μl 的磷酸缓冲液重悬至流式管中，按流式细胞仪应用手册上机检测。

C.2.4 圈门逻辑关系

圈门步骤为前向 (FSC) /侧向 (SSC) 图先圈目的细胞群P1，设门至FSC-A/FSC-W或H去粘连图，圈出单个细胞群P2，设门至CD4/SSC圈出 CD4^+ 细胞群P3，设门至 $\text{CD25}^+\text{CD127}^{\text{low}}$ Treg细胞群。

C.3 数据分析

Treg促进率按如下公式计算：

$$\text{Treg 促进率} = \frac{C3-A3}{A3} \times 100\% \dots\dots\dots (C.1)$$

式中：

A3—PBMC单独培养组的Treg细胞百分比

C3—PBMC与人间充质干细胞共培养组的Treg细胞百分比

附 录 D
(资料性)
标准实施信息及意见反馈表

标准实施信息及意见反馈表如表D所示。

表 D 标准实施信息及意见反馈表

标准名称及编号			
总体评价	适用性	该标准与当前所在地的产业或社会发展水平是否相匹配？	<input type="checkbox"/> 是 <input type="checkbox"/> 否
	协调性	该标准的特色要求与其他强制性标准的主要技术指标、相关法律法规、部门规章或产业政策是否协调？	<input type="checkbox"/> 是 <input type="checkbox"/> 否
	执行情况	标准执行单位或人员是否按照标准要求组织开展相关工作？	<input type="checkbox"/> 是 <input type="checkbox"/> 否
实施信息	标准实施过程中是否存在阻力和障碍？		<input type="checkbox"/> 是 <input type="checkbox"/> 否
	实施过程中存在的主要问题		
修改意见	总体意见	<input type="checkbox"/> 适用 <input type="checkbox"/> 修改 <input type="checkbox"/> 废止	
	具体修改意见	需修改章节： 具体修改意见：	
反馈渠道	<input type="checkbox"/> 标准化行政主管部门 <input type="checkbox"/> 省直行业主管部门 <input type="checkbox"/> 专业标准化技术委员会（工作组） <input type="checkbox"/> 标准起草组（牵头起草单位）		
反馈人	姓名：	单位：	联系方式：

填表说明：为及时掌握标准实施情况，了解地方标准实施过程中存在的问题，并为标准复审提供科学依据，特制定《标准实施信息及意见反馈表》。可根据实际情况在表格中对应方框打勾，有需要文字说明的反馈意见可在相应位置进行文字描述，也可另附页。

参 考 文 献

- [1] YY/T 1465.1-2016 医疗器械免疫原性评价方法第1部分：体外T淋巴细胞转化试验
 - [2] GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法
 - [3] WS/T 360-2024 流式细胞术检测外周血淋巴细胞亚群指南
 - [4] Infection of CD4+ primary T cells and cell lines, generation of chronically infected cell lines, and induction of HIV expression. *Curr Protoc Immunol.* 2005 Nov; Chapter 12:Unit 12.3
-