

人间充质干细胞质量测定技术规范  
第4部分 人间充质干细胞抑制淋巴细胞  
增殖测定

Technical specification for quality measurement of human mesenchymal stem cells  
Part 4 Determination of human mesenchymal stem cell inhibits human lymphocyte  
proliferation

## 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 方法原理 .....	1
5 通用要求 .....	1
5.1 试剂或材料 .....	1
5.2 仪器设备 .....	2
5.3 样本准备 .....	2
5.4 试验步骤 .....	2
5.5 数据分析 .....	2
参考文献 .....	4

## 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。

本文件由湖北省卫生健康委员会提出。

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。

本文件主要起草人：郑从义、徐国东、袁冰、刘愈杰、胡豫、梅恒、姚惟琦、武栋成。

## 引 言

抑制淋巴细胞增殖是人间充质细胞免疫调节能力的一个重要体现。淋巴细胞对外源性物质的免疫应答是机体的一种重要的防御机制，直观体现在受到外源性物质刺激时淋巴细胞会大量增殖。用植物凝集素刺激CFSE标记的淋巴细胞，通过流式细胞仪记录淋巴细胞的增殖情况，是检测淋巴细胞增殖的常用实验。

# 人间充质干细胞质量测定技术规范

## 第4部分 人间充质干细胞抑制淋巴细胞增殖测定

### 1 范围

本文件描述了人间充质干细胞抑制淋巴细胞增殖测定的方法原理、试剂或材料、仪器设备、样本准备、试验步骤以及数据分析的方法。

本文件适用于CFSE法检测人间充质干细胞抑制淋巴细胞增殖。

### 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

### 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再基因表达和分化能力方面存在差异。

### 4 方法原理

羧基荧光素乙酰乙酸（CFSE）是一种可以穿透活细胞膜并不可逆地与细胞内蛋白质结合的活体荧光染料。当细胞分裂时，CFSE标记的荧光可以平均分配至两个子代细胞中，其荧光强度是亲代细胞的一半。因此，在一个分裂增殖的细胞群中，各个连续细胞代次之间的荧光强度呈2倍递减。将CFSE标记的淋巴细胞通过流式细胞术进行分析，可以根据CFSE荧光强度的变化判断淋巴细胞的分裂增殖情况。

### 5 通用要求

#### 5.1 试剂或材料

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。

##### 5.1.1 磷酸盐缓冲液：pH 7.4

##### 5.1.2 干细胞温和消化酶

- 5.1.3 人间充质干细胞完全培养基
- 5.1.4 RPMI-1640 培养基
- 5.1.5 胎牛血清
- 5.1.6 丝裂霉素 C
- 5.1.7 CFDA SE 细胞增殖与示踪检测试剂盒
- 5.1.8 植物凝集素 (PHA-P)
- 5.1.9 人 PBMC
- 5.1.10 细胞培养六孔板

## 5.2 仪器设备

- 5.2.1 流式细胞仪
- 5.2.2 水平离心机
- 5.2.3 冷冻离心机
- 5.2.4 细胞计数仪

## 5.3 样本准备

### 5.3.1 细胞制备

将人间充质干细胞消化后重悬为 $5-6 \times 10^5$  细胞/mL细胞悬液,加入丝裂霉素C( $25-50 \mu\text{g/ml}$ )  $37^\circ\text{C}$  处理0.5-2 h。处理完成后用人间充质干细胞完全培养基洗涤去除残留的丝裂霉素C,将细胞接种于细胞培养六孔板中,接种密度为 $3 \times 10^5$  细胞/mL,每孔接种1 mL。

人PBMC用CFDA SE细胞增殖与示踪检测试剂盒标记,并调整细胞密度为 $1.5 \times 10^6$  细胞/mL。

样品制备过程中细胞存活率检测及细胞计数方法应符合T/CSCB 0003要求。

## 5.4 试验步骤

### 5.4.1 细胞共培养

设置实验分组分别为PBMC正常培养组,CFSE标记PBMC组,植物凝集素刺激CFSE标记PBMC组,植物凝集素刺激CFSE标记PBMC与人间充质干细胞共培养组。其中植物凝集素终浓度为 $(5-10) \mu\text{g/ml}$ ,PBMC与人间充质干细胞共培养细胞比例为5: 1,共培养体系培养基为含10% FBS的RPMI-1640。

### 5.4.2 上机检测

养4-7天后,收集PBMC,用适量的磷酸缓冲液洗涤一次,400-800 g离心10 min,去除上清。用200  $\mu\text{L}$ 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。

## 5.5 数据分析

根据细胞大小和颗粒度,设门圈出目标细胞分群1,排除死细胞和杂细胞。然后根据未用植物凝集素刺激的淋巴细胞的荧光强度,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(即为淋巴细胞增殖的百分比)。

得到的检测结果用软件综合分析，具体参考软件使用说明。并计算人间充质干细胞对淋巴细胞增殖的抑制率。

抑制率按如下公式计算：

$$Y = \frac{A-C}{A} \times 100\% \dots\dots\dots (1)$$

式中：

Y—抑制率；

A—单独淋巴细胞刺激CFSE子代细胞的百分比。

C—与人间充质干细胞共培养淋巴细胞（植物凝集素刺激）CFSE子代细胞占比。

### 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] T/CSCB 0001-2020 干细胞通用要求。
  - [3] T/CSCB 0003-2021 人间充质干细胞
-