

人间充质干细胞质量测定技术规范 第3部分 人间充质干细胞调节淋巴细胞 亚群功能测定

Technical specification for quality measurement of human mesenchymal stem cells
Part 3 Determination of human mesenchymal stem cell regulates human lymphocyte
subsets

目 次

前言	II
引言	III
1 范围	1
2 规范性引用文件	1
3 术语和定义和缩略语	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	3
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并归口。

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

人间充质干细胞免疫调节能力体现在对Th细胞的增殖抑制以及Treg细胞的增殖促进上。通过荧光抗体标记Th细胞以及Treg细胞的标志性分子，从人外周血单核细胞中准确的识别不同的淋巴细胞亚群，用流式细胞术来检测在淋巴细胞与人间充质干细胞共存条件下，淋巴细胞亚群数目的变化，能够直观的反映人间充质干细胞的免疫调节能力。

人间充质干细胞质量测定技术规范

第3部分 人间充质干细胞调节淋巴细胞亚群功能测定

1 范围

本文件描述了检测人间充质干细胞调节淋巴细胞亚群功能的方法原理、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。

本文件适用于人间充质干细胞调节淋巴细胞亚群功能测定。

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 术语和定义和缩略语

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

初始CD4⁺T细胞主要分化为辅助性T细胞及调节性T细胞。辅助性T细胞能够分泌炎症因子，促进机体炎症的发生。调节性T细胞能够通过分泌细胞因子，参与改善包括自身免疫病、移植免疫、肿瘤在内的多种免疫性疾病的临床症状。人的辅助性细胞Th1标志性蛋白为CD3⁺CD8⁻IFN- γ ⁺，人的辅助性T细胞Th17标志性蛋白为CD3⁺CD8⁻IL-17A⁺，人的调节性T细胞Treg标志性蛋白为CD4⁺CD25⁻CD127⁺。

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 细胞培养基
- 5.1.5 胎牛血清
- 5.1.6 植物凝集素 (PHA-P)
- 5.1.7 人白细胞介素 2
- 5.1.8 流式荧光抗体
- 5.1.9 Leukocyte Activation Cocktail
- 5.1.10 Fixation/Permeabilization Concentrate
- 5.1.11 Fixation/perm Diluent
- 5.1.12 Permeabilization Buffer 10×
- 5.1.13 人 PBMC
- 5.1.14 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 涡旋振荡器
- 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($25-50 \mu g/mL$) $37^\circ C$ 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 4×10^5 细胞/mL,每孔接种1 mL。

人PBMC(活率 $\geq 90\%$)用含10% FBS的RPMI-1640培养过夜,同时用植物凝集素及人白细胞介素2刺激活化,终浓度为植物凝集素($5 \mu g/mL$),人白细胞介素2($40 IU/mL$),细胞密度为 1×10^6 细胞/mL。

Treg细胞检测时PBMC不需要刺激活化。

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

设置实验组分别为PBMC单独培养组,PBMC与人间充质干细胞共培养组。人PBMC经过夜培养活化后,调整细胞密度为 2×10^6 细胞/mL,该步骤需洗涤去除PHA-P,但是共培养体系中仍需加入终浓度为40 IU/ml的人白细胞介素2。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。

Treg细胞检测时细胞共培养不需要加入人白细胞介素2。

5.4.2 刺激炎症因子分泌

细胞共培养72 h后，将Leukocyte Activation Cocktail按照使用说明书描述用量加入PBMC单独培养组，PBMC与人间充质干细胞共培养组。刺激4-6 h后，收集PBMC，用适量的磷酸缓冲液洗涤一次。

Treg细胞检测时不需要加入Leukocyte Activation Cocktail。

5.4.3 荧光抗体标记

分别用Th1, Th17以及Treg细胞的特异性蛋白抗体CD3, CD4, CD8, CD25, CD127标记PBMC，其中IFN- γ ，IL-17A为细胞内蛋白，需在完成细胞表面抗体标记之后用试剂盒（5.1.10, 5.1.11, 5.1.12）破膜之后，再用荧光抗体标记IFN- γ ，IL-17A分子。

5.4.4 上机检测

抗体标记完成后，用200 μ 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，然后根据阴性对照组荧光强度，在分群1的基础上画出CD3⁺CD8⁻IFN- γ ⁺的Th1细胞，CD3⁺CD8⁻IL-17A⁺的Th17细胞，CD4⁺CD25⁻CD127⁺的Treg细胞。

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亚群增殖的影响。

Th1抑制率按如下公式计算：

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

式中：

A1—单独淋巴细胞的Th1细胞百分率；

C1—与人间充质干细胞共培养的Th1细胞百分率。

Th17抑制率按如下公式计算：

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

式中：

A2—单独淋巴细胞的Th17细胞百分率；

C2—与人间充质干细胞共培养的Th7细胞百分率。

Treg促进率按如下公式计算：

$$\text{Treg 促进率} = \frac{C3-A3}{A3} \times 100\% \dots\dots\dots (3)$$

式中：

A3—单独淋巴细胞的Treg细胞百分率；

C3—与人间充质干细胞共培养的Treg细胞百分率。

参 考 文 献

- [1] WS/T 360-2011 流式细胞术检测外周血淋巴细胞亚群指南。
- [2] 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.
-