

团 体 标 准

T/CSCB 0026—2024

人间充质干细胞血液相容性评估技术规范

Technical specification for hemocompatibility assessment of human
mesenchymal stem cells

中国细胞生物学学会
CHINESE SOCIETY FOR CELL BIOLOGY

2024-10-28 发布

2024-12-31 实施

中国细胞生物学学会 发 布
中 国 标 准 出 版 社 出 版

目 次

前言 III

1 范围 1

2 规范性引用文件 1

3 术语和定义 1

4 缩略语 2

5 总体原则 2

6 核心技术要素 3

7 评估报告 4

附录 A（规范性） 组织因子蛋白水平 组织因子流式检测法 5

附录 B（规范性） 凝血试验 TAT 检测法 7

附录 C（规范性） 血小板激活试验 β -TG、PF4 和 TxB2 检测法 9

附录 D（规范性） 补体激活试验 SC5b-9 和 C3a 检测法 11

附录 E（规范性） 体内血栓形成试验 大鼠模型检测法 13

参考文献 15

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。

本文件由中国细胞生物学学会标准工作委员会提出。

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、北京工商大学、中国科学院动物研究所、北京干细胞与再生医学研究院、广东省药品检验所、广州血液中心、深圳市药品检验研究院、中国食品药品检定研究院、广州赛隼生物科技有限公司、北京泽辉辰星生物科技有限公司、中国标准化研究院、复旦大学附属中山医院、深圳华大生命科学研究院(国家基因库)、中国科学院广州生物医药与健康研究院、广东省中医院(广州中医药大学第二附属医院)、中国合格评定国家认可中心、中国计量科学研究院、生物芯片上海国家工程研究中心、深圳华汉基因生命科技有限公司、深圳市前海蛇口自贸区医院、苏州大学、中国科学技术信息研究所、中国科学院北京基因组研究所(国家生物信息中心)、中国医学科学院北京协和医院、金凤实验室。

本文件主要起草人：项鹏、马爱进、赵同标、陈小湧、刘嘉玲、梁蔚阳、夏文杰、王平、郝捷、纳涛、颜孙兴、张愚、王长林、李卡、李启沅、潘光锦、魏军、陈曲波、曹佳妮、翟培军、傅博强、郜恒骏、张勇、王磊、郭梅梅、胡士军、朱礼军、张维绮、吴志宏、平轶芳、赵红玲、牛帅帅。



人间充质干细胞血液相容性评估技术规范

1 范围

本文件描述了人间充质干细胞血液相容性评估的方法,规定了人间充质干细胞血液相容性评估指标选择、指标值计算和相容性等级确定的要求。

本文件适用于人间充质干细胞与血液接触前对其相容性进行评估。

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

T/CSCB 0001—2020 干细胞通用要求

T/CSCB 0003—2021 人间充质干细胞

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

间充质干细胞 **mesenchymal stem cells**

一种在贴壁培养后呈现成纤维细胞样形态(纺锤形和梭形)的干细胞,具有自我更新和体外分化成成骨、成脂和成软骨谱系的能力。

[来源:T/CSCB 0003—2021,3.1]

3.2

组织因子 **tissue factor**

一种膜糖蛋白受体,是凝血反应的主要启动蛋白,能启动机体的外源性凝血系统,激活凝血因子Ⅶ继而激活凝血因子Ⅹ,活化凝血酶激活纤维蛋白形成凝血反应。

3.3

凝血 **coagulation**

凝血因子级联活化作用导致的血液凝固的现象。

3.4

血液相容性 **hemocompatibility**

与血液接触的间充质干细胞不会引起任何明显的不良反应,如凝血、血小板激活、补体激活和/或其他血液相关的不良事件。

注1:根据ISO 10993-4:2017的定义,血液相容性是血液对外源性物质或材料产生合乎要求的反应。

注2:根据GB/T 16886.4—2022的术语“血液相容性”修改,特指“血液”与“间充质干细胞”接触相互作用情况。

3.5

血液/间充质干细胞相互作用 **blood/mesenchymal stem cells interaction**

血液或血液成分与间充质干细胞间的相互作用。

3.6

血小板 platelet

存在于血液中的无核细胞体,通过黏附、释放因子和/或聚集形成血栓子而有助于血栓形成。

3.7

血栓 thrombus

由红细胞、聚集的血小板、纤维蛋白和其他细胞成分组成的凝固混合物。

3.8

血栓形成 thrombosis

在流动全血中由凝血系统和血小板激活引起,在体内或体外模拟条件下形成血栓。

4 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

C3a:补体成分 3a(Complement component 3a)

CD:分化簇(Cluster of Differentiation)

PF4:血小板第 4 因子(Platelet Factor 4)

SC5b-9:可溶性末端补体复合物(Soluble Terminal Complement Complex)

TAT:凝血酶-抗凝血酶复合物(Thrombin Antithrombin Complex)

TF:组织因子(Tissue Factor)

TxB₂:血栓素 B₂(Thromboxane B₂)

β-TG:β-血小板球蛋白(β-Thromboglobulin)

5 总体原则

5.1 科学性

开展评估时,应建立稳定的评估体系,科学准确地反映人间充干细胞组织因子表达水平、促发凝血、血小板激活、补体激活及体内血栓形成等变化情况。

5.2 针对性

针对人间充质干细胞的应用需求,选择性开展血液相容性评估。人间充质干细胞涉及与血液接触的应开展血液相容性评估。

5.3 规范性

用于评估的人间充质干细胞,其采集、生产制备应符合 T/CSCB 0001—2020、T/CSCB 0003—2021 相关要求,且关键质量属性应符合 T/CSCB 0003—2021 相关要求。

5.4 全面性

体内、体外相关评估均需开展。

5.5 真实性

评估数据真实,结果可靠。

6 核心技术要素

6.1 评估指标

评估指标由蛋白水平、凝血试验、血小板试验、补体试验和血栓试验 5 个类型 8 个评估因子组成,见表 1。

表 1 评估指标及其选择

评估类型		评估指标		指标选择
名称	代码	名称	代码	
蛋白水平	A	组织因子	A1	必选
凝血试验	B	TAT	B1	必选
血小板试验	C	β -TG	C1	必选
		PF4	C2	必选
		TxB2	C3	可选
补体试验	D	SC5b-9	D1	必选
		C3a	D2	可选
血栓试验	E	体内血栓形成	E1	必选

6.2 评估方法

6.2.1 评估范围

开展评估的人间充质干细胞可从不同人体组织(如骨髓、脐带、胎盘、脂肪、脐带血等)分离得到的,也可通过分化或转分化等方式获得的。

6.2.2 评估指标选择

评估指标选择情况见表 1。

6.2.3 计算方法与数据来源

根据表 2 的要求确定人间充质干细胞血液相容性评估因子的计算方法和数据来源,获得数据并记录、保存、维护相关检测数据。

表 2 评估因子的计算方法和数据来源

评估因子及代码	计算方法	数据来源
组织因子(A1)	组织因子 TF 阳性细胞占总细胞的百分比	按照附录 A 的方法检验
TAT(B1)	试验样品 TAT 与对照样品 TAT 的比值(百分比)	按照附录 B 的方法检验
β -TG(C1)	试验样品 β -TG 与对照样品 β -TG 的比值(百分比)	按照附录 C 的方法检验
PF4(C2)	试验样品 PF4 与对照样品 PF4 的比值(百分比)	
TxB2(C3)	试验样品 TxB2 与对照样品 TxB2 的比值(百分比)	

表 2 评估因子的计算方法和数据来源（续）

评估因子及代码	计算方法	数据来源
SC5b-9(D1)	试验样品 SC5b-9 与对照样品 SC5b-9 的比值(百分比)	按照附录 D 的方法检验
C3a(D2)	试验样品 C3a 与对照样品 C3a 的比值(百分比)	
体内血栓形(E1)	计算检测组织血栓数量	按照附录 E 的方法检验

6.3 血液相容性等级确定

6.3.1 相容性等级划分及确定

相容性等级依次划分为差、良好。根据评估因子计算,确定各评估因子的相容性等级,评估因子相容性等级见表 3。

表 3 评估因子的相容性等级确定

评估因子及代码	相容性等级	
	差	良好
组织因子(A1)	TF 表达率>10%	TF 表达率≤10%
TAT(B1)	比值≤80%或比值≥120%	80%<比值<120%
β-TG(C1)	比值≤80%或比值≥120%	80%<比值<120%
PF4(C2)	比值≤80%或比值≥120%	80%<比值<120%
TxB2(C3)	比值≤80%或比值≥120%	80%<比值<120%
SC5b-9(D1)	比值≤80%或比值≥120%	80%<比值<120%
C3a(D2)	比值≤80%或比值≥120%	80%<比值<120%
体内血栓形(E1)	血栓数量≥1	血栓数量为 0

6.3.2 人间充质干细胞血液相容性等级确定

将所有评估因子中最低的相容性等级确定为人间充质干细胞血液相容性等级。

注：人间充质干细胞血液相容性等级为“差”提示人间充质干细胞与血液接触时造成不良血液反应概率高,需要根据具体情况谨慎选择或采取相关应对措施。

7 评估报告

评估报告至少包括以下内容：

- a) 评估的间充质干细胞的基本情况(包括但不限于来源、活率等)；
- b) 评估使用的对照样品(细胞)的基本情况；
- c) 评估指标选择及评估方法；
- d) 评估因子的相容性等级确定；
- e) 评估结果及相关说明/建议。

附录 A

(规范性)

组织因子蛋白水平 组织因子流式检测法

A.1 总则

组织因子(CD142)是一种细胞膜蛋白,是因子Ⅶa-TF复合酶的成分,在生理止血和血栓形成中起着主要作用。当血管损伤,组织因子暴露在血液中并结合血浆因子Ⅶa,由此产生的复合物引发一系列酶反应,导致凝血形成和血栓。因此,通过流式细胞术对人间充质干细胞膜表面CD142分子进行检测,判断阳性细胞群和评估组织因子表达具有重要意义。

A.2 仪器和设备

A.2.1 流式细胞仪。

A.2.2 水平离心机。

A.2.3 电子天平。

A.3 试剂

本方法所用试剂均为分析纯,除特别说明外,试验用水均为GB/T 6682规定的一级水。

A.3.1 磷酸盐缓冲液:pH7.4。

A.3.2 牛血清白蛋白(BSA):纯度 $\geq 98\%$ 。A.3.3 叠氮钠(NaN_3)。

A.3.4 抗人CD142抗体及同型对照抗体。

A.3.5 按照相应要求使用电子天平(A.2.3)配制流式检测所需的液体:洗涤液、抗体稀释液。

A.4 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。相关抗体按照说明书保存。

A.5 检测步骤

A.5.1 样品制备

收集新鲜贴壁培养的人间充质干细胞和人脐静脉内皮细胞,使用水平离心机(A.2.2)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(A.2.2)300g离心4 min,弃上清。使用磷酸盐缓冲液(A.3.1)重悬为 1×10^6 个/mL细胞悬液。

A.5.2 试验分组

阴性对照:100 μL 人脐静脉内皮细胞+抗CD142抗体。

待测样品:100 μL 人间充质干细胞+抗CD142抗体。

同型对照 1:100 μL 人脐静脉内皮细胞+同型对照抗体。

同型对照 2:100 μL 人间充质干细胞+同型对照抗体。

A.5.3 抗体孵育

根据试验分组取适量体积细胞悬液,按照抗体制造商推荐的稀释比例加入适量比例的流式抗体,同

型对照组加入同等比例的同型对照流式抗体,按照抗体说明书推荐的条件进行孵育。抗体孵育结束后用洗涤液清洗两遍,使用水平离心机(A.2.2)300g 离心 4 min,弃上清。

A.5.4 过滤上机

用洗涤液重悬细胞,然后通过 40 μm 滤网转移到流式管中,按流式细胞仪(A.2.1)应用手册上机检测。

A.5.5 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。

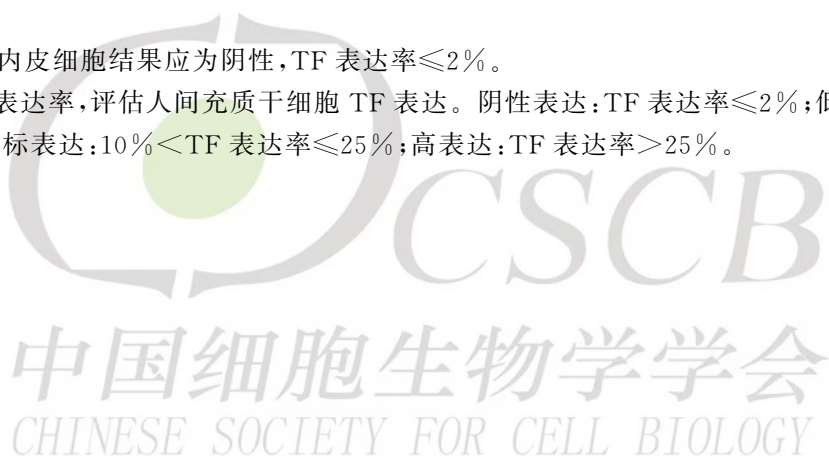
A.6 结果分析

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。

A.7 结果评价

A.7.1 人脐静脉内皮细胞结果应为阴性,TF 表达率 $\leq 2\%$ 。

A.7.2 根据 TF 表达率,评估人间充质干细胞 TF 表达。阴性表达:TF 表达率 $\leq 2\%$;低表达: $2\% < \text{TF 表达率} \leq 10\%$;中标表达: $10\% < \text{TF 表达率} \leq 25\%$;高表达:TF 表达率 $> 25\%$ 。



附 录 B
(规范性)
凝血试验 TAT 检测法

B.1 总则

凝血酶-抗凝血酶复合物(thrombin antithrombin complex, TAT)是人体内凝血和抗凝血相互作用以维持生理平衡的产物,是凝血酶生成的标志物之一。体内凝血酶形成后,部分迅速与抗凝血酶(AT)结合形成凝血酶抗凝血酶复合物(TAT),该指标是反映凝血酶生成的分子标志物,可灵敏地反映凝血系统的激活程度,直接反映凝血系统的反应启动。

B.2 仪器和设备

B.2.1 酶标仪。

B.2.2 水平离心机。

B.2.3 水浴锅。

B.3 试剂

本方法所用试剂均为分析纯,除特别说明外,试验用水均为 GB/T 6682 规定的一级水。

B.3.1 磷酸盐缓冲液:pH7.4。

B.3.2 TAT 检测试剂盒(ELISA 法)。

B.4 样品保存

磷酸盐缓冲液于 2℃~8℃保存。试剂盒按照说明书保存。

B.5 检测步骤**B.5.1 样品制备**

B.5.1.1 收集健康志愿者(已获得知情同意且至少 10 d 未接受任何药物治疗)的新鲜非抗凝全血;使用水平离心机(B.2.2)2 500g, 20℃~22℃,离心 10 min,收集血浆于室温存放(不可超过 8 h)。

B.5.1.2 收集新鲜贴壁培养的人间充质干细胞和人脐静脉内皮细胞,使用水平离心机(B.2.2)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.2.2)300g 离心 4 min,弃上清。使用磷酸盐缓冲液(B.3.1)重悬为 1×10^7 个/mL 细胞悬液。

B.5.2 试验分组

空白对照:在 1.5 mL 离心管中混合 50 μ L 磷酸盐缓冲液和 500 μ L 血浆,3 份平行样品。

阴性对照:在 1.5 mL 离心管中混合 50 μ L 人脐静脉内皮细胞悬液和 500 μ L 血浆,3 份平行样品。

待测样品:在 1.5 mL 离心管中混合 50 μ L 人间充质干细胞悬液和 500 μ L 检测血浆,3 份平行样品。

B.5.3 样品孵育

根据试验分组取适量体积细胞悬液和血浆,混匀后在水浴锅(B.2.3)37℃孵育 30 min,孵育结束后根据 TAT 试剂盒相关说明留取样品进行检测。

B.5.4 TAT 检测

按照试剂盒制造商提供的使用说明书进行试验。根据试剂盒说明书推荐的方法使用酶标仪(B.2.1)进行检测。

B.6 结果分析

根据试剂盒要求绘制标准曲线,计算 r^2 值和拟合曲线的方程式。计算每管 TAT 含量,分别计算空白对照平均值 A 、阴性对照平均值 B 、待测样品平均值 C 。

按式(B.1)进行计算阴性对照占空白对照的百分比:

$$D_1 = B/A \times 100\% \quad \dots\dots\dots (B.1)$$

式中:

D_1 ——阴性对照占空白对照的百分比;

A ——空白对照平均值;

B ——阴性对照平均值。

按式(B.2)进行计算待测样品占空白对照的百分比:

$$D_2 = C/A \times 100\% \quad \dots\dots\dots (B.2)$$

式中:

D_2 ——待测样品占空白对照的百分比;

A ——空白对照平均值;

C ——待测样品平均值。

B.7 结果评价

B.7.1 D_1 应在 80%~100%,否则试验结果不可接受。

B.7.2 阴性: $80\% < D_2 < 120\%$; 阳性: $D_2 \leq 80\%$ 或 $D_2 \geq 120\%$ 。

附录 C

(规范性)

血小板激活试验 β -TG、PF4 和 TxB2 检测法

C.1 总则

β -TG 和 PF4 是血小板 α 颗粒中所含的特异蛋白质,当血小板被某些生物活性物质如凝血酶、肾上腺素、ADP 和血栓烷 A2 等激活时,大量 β -TG 和 PF4 由血小板内释放至血小板外。测定血浆中 β -TG 和 PF4 含量可用于研究血小板的释放功能和反映血小板的状态。TxB2 是血栓素 A(TxA2)与前列环素(PGI₂)的代谢产物,在生理状态下,TxA2 和 PGI₂ 保持相对平衡,是维持血液流畅的重要因素之一。当 TxA2 增高时,两者平衡失调,导致血小板在血管内聚集,最后导致血栓形成。因 TxA2 不稳定,可用其稳定的代谢产物 TxB2 来反映,因此 TxB2 水平升高对检测血小板形成具有重要意义。

C.2 仪器和设备

C.2.1 酶标仪。

C.2.2 水平离心机。

C.2.3 水浴锅。

C.3 试剂

本方法所用试剂均为分析纯,除特别说明外,试验用水均为 GB/T 6682 规定的一级水。

C.3.1 磷酸盐缓冲液:pH7.4。

C.3.2 β -TG 检测试剂盒(ELISA 法)。

C.3.3 PF4 检测试剂盒(ELISA 法)。

C.3.4 TxB2 检测试剂盒(ELISA 法)。

C.4 样品保存

磷酸盐缓冲液于 2℃~8℃ 保存。试剂盒按照说明书保存。

C.5 检测步骤

C.5.1 样品制备

C.5.1.1 收集健康志愿者(已获得知情同意且至少 10 d 未接受任何药物治疗)的新鲜抗凝全血,颠倒混匀后室温保存备用。

C.5.1.2 收集新鲜贴壁培养的人间充质干细胞和人脐静脉内皮细胞,使用水平离心机(C.2.2)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(C.2.2)300g 离心 4 min,弃上清。使用磷酸盐缓冲液(C.3.1)重悬为 1×10^7 个/mL 细胞悬液。

C.5.2 试验分组

空白对照:磷酸盐缓冲液+抗凝全血,3 份平行样品。

阴性对照:人脐静脉内皮细胞悬液+抗凝全血,3 份平行样品。

待测样品:人间充质干细胞悬液+抗凝全血,3 份平行样品。

C.5.3 样品孵育

根据试验分组取适量体积细胞悬液,按 ELISA 试剂盒制造商推荐比例在每组中加入全血,所有试管在 37 ℃水浴中震荡孵育 1 h,转速为 60 r/min。孵育结束后,每组试管中分别加入终浓度为 5 mmol/L 的 EDTA 终止反应。轻轻混合每一试管,转移全部血液至另一相应干净试管,1 500g 离心 10 min,取上层贫血小板血浆(PPP)待于检测。

C.5.4 β-TG、PF4 和 TxB2 检测

按照试剂盒制造商提供的使用说明书进行试验。根据试剂盒说明书推荐的方法使用酶标仪(C.2.1)进行检测。

C.6 结果分析

根据试剂盒要求绘制标准曲线,计算 r^2 值和拟合曲线的方程式。计算每管 β-TG、PF4 和 TxB2 含量,分别计算空白对照平均值 A、阴性对照平均值 B、待测样品平均值 C。

按式(C.1)进行计算阴性对照占空白对照的百分比:

$$D_1 = \frac{B}{A} \times 100\% \quad \text{.....(C.1)}$$

式中:

D_1 —— 阴性对照占空白对照的百分比;

A —— 空白对照平均值;

B —— 阴性对照平均值。

按式(C.2)进行计算待测样品占空白对照的百分比:

$$D_2 = \frac{C}{A} \times 100\% \quad \text{.....(C.2)}$$

式中:

D_2 —— 待测样品对空白对照的百分比;

A —— 空白对照平均值;

C —— 待测样品平均值。

C.7 结果评价

C.7.1 β-TG、PF4 或 TxB2 的 D_1 应在 80%~100%,否则试验结果不可接受。

C.7.2 β-TG、PF4 或 TxB2 阴性: $80\% < D_2 < 120\%$; 阳性: $D_2 \leq 80\%$ 或 $D_2 \geq 120\%$ 。

附录 D

(规范性)

补体激活试验 SC5b-9 和 C3a 检测法

D.1 总则

补体系统的活化是一种高度有序的级联反应,机体通过一系列的复杂因素调节补体系统的激活过程。SC5b-9 是补体系统激活后产生的共同末端产物 C5b-9 与血清中的 S 蛋白形成的亲水的、无溶细胞活性的大分子片段;C3a 为补体 C3 分子激活后形成的小分子物质。通过检测 SC5b-9 或者 C3a 分子的含量,能反映出血清中补体系统的激活情况。

D.2 仪器和设备

D.2.1 酶标仪。

D.2.2 水平离心机。

D.2.3 水浴锅。

D.3 试剂

本方法所用试剂均为分析纯,除特别说明外,试验用水均为 GB/T 6682 规定的一级水。

D.3.1 磷酸盐缓冲液:pH7.4。

D.3.2 SC5b-9 检测试剂盒(ELISA 法)。

D.4 样品保存

磷酸盐缓冲液于 2℃~8℃ 保存。试剂盒按照说明书保存。

D.5 检测步骤

D.5.1 样品制备

D.5.1.1 收集健康志愿者(已获得知情同意且至少 10 d 未接受任何药物治疗)的新鲜非抗凝全血,于 4℃ 静置 30 min,然后 4℃,1 500g 离心 10 min,取上层血清于冰上放置备用。

D.5.1.2 收集新鲜贴壁培养的人间充质干细胞和人脐静脉内皮细胞,使用水平离心机(D.2.2)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(D.2.2)300g 离心 4 min,弃上清。使用磷酸盐缓冲液(D.3.1)重悬为 1×10^7 个/mL 细胞悬液。

D.5.2 试验分组

空白对照:磷酸盐缓冲液+血清,3 份平行样品。

阴性对照:人脐静脉内皮细胞悬液+血清,3 份平行样品。

待测样品:人间充质干细胞悬液+血清,3 份平行样品。

D.5.3 样品孵育

根据试验分组取适量体积细胞悬液,按 ELISA 试剂盒制造商推荐比例在每组中加入血清,所有试管在 37℃ 水浴中震荡孵育 1 h,转速为 60 r/min;孵育结束后,轻轻混匀所有试管,分别转移至另一对应标记试管中,并于冰上保存。

D.5.4 SC5b-9 或者 C3a 检测

按照试剂盒制造商提供的使用说明书进行试验。根据试剂盒说明书推荐的方法使用酶标仪(D.2.1)进行检测。

D.6 结果分析

根据试剂盒要求绘制标准曲线,计算 r^2 值和拟合曲线的方程式。计算每管 SC5b-9 或者 C3a 含量,分别计算空白对照平均值 A 、阴性对照平均值 B 、待测样品平均值 C 。

按式(D.1)进行计算阴性对照占空白对照的百分比:

$$D_1 = \frac{B}{A} \times 100\% \quad \text{.....(D.1)}$$

式中:

D_1 —— 阴性对照对空白对照的百分比;

A —— 空白对照平均值;

B —— 阴性对照平均值。

按式(D.2)进行计算待测样品占空白对照的百分比:

$$D_2 = \frac{C}{A} \times 100\% \quad \text{.....(D.2)}$$

式中:

D_2 —— 待测样品对空白对照的百分比;

A —— 空白对照平均值;

C —— 待测样品平均值。

D.7 结果评价

D.7.1 D_1 范围应在 80%~100%,否则试验结果不可接受。

D.7.2 阴性: $80\% < D_2 < 120\%$; 阳性: $D_2 \leq 80\%$ 或 $D_2 \geq 120\%$ 。

附录 E

(规范性)

体内血栓形成试验 大鼠模型检测法

E.1 总则

在临床相关的动物体内模型中体内血栓形成检测在衡量血液安全性中具有重要作用,已有报道间充质干细胞静脉输注后存在血栓形成的风险,由于血流动力学原因,血栓容易停留于肺、肝脏、脾脏、肾脏等终末器官。因此,通过观察肺、肝脏、脾脏、肾脏等器官血栓形成情况,有利于评估人间充质干细胞组织因子是否介导的血栓形成。

E.2 仪器和设备

E.2.1 显微镜。

E.2.2 水平离心机。

E.2.3 切片机。

E.2.4 电子天平。

E.3 试剂

本方法所用试剂均为分析纯,除特别说明外,试验用水均为 GB/T 6682 规定的一级水。

E.3.1 磷酸盐缓冲液:pH7.4。

E.3.2 1%戊巴比妥钠。

E.3.3 包埋剂。

E.3.4 苏木素和伊红。

E.4 样品保存

磷酸盐缓冲液于 2℃~8℃保存。试剂按照说明书保存。

E.5 检测步骤

E.5.1 样品制备

收集新鲜贴壁培养的人间充质干细胞,使用水平离心机(E.2.2)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(E.2.2)300g 离心 4 min,弃上清。使用磷酸盐缓冲液(E.3.1)重悬为 1×10^7 个/mL 细胞悬液。

E.5.2 试验分组

将 SPF 级饲养、健康、成年的大鼠(如 F344 大鼠等)进行分组,具体分组如下:

——空白对照:输注磷酸盐缓冲液,3 只~5 只;

——待测样品:输注人间充质干细胞悬液,3 只~5 只。

E.5.3 操作过程

将 SPF 级饲养的正常喂食的大鼠进行称重并随机分组,用无菌的 1 mL 注射器分别向每只大鼠尾静脉注射 6×10^6 个/kg 的人间充质干细胞悬液 100 μ L 或 100 μ L 磷酸盐缓冲液,注射完毕开始计时

1 h。之后,用 1%戊巴比妥钠麻醉大鼠,对大鼠进行解剖,心脏灌注;分离并取出大鼠肺、肝脏、脾脏和肾脏,使用 4% PFA 固定组织 24 h。

E.5.4 染色观察

对组织进行包埋和石蜡切片,根据试剂说明书进行苏木素和伊红染色。每只大鼠每个组织随机选取 5 个视野,在显微镜下观察大鼠肺、肝脏、脾脏和肾脏的组织血管中血栓形成情况并拍摄记录。

E.6 结果评价

采用血栓形成计数评价。阴性:所有检测组织未发现血栓;阳性:任一检测器官出现血栓。



参 考 文 献

- [1] GB/T 16886.4—2022 医疗器械生物学评价 第4部分：与血液相互作用试验选择
- [2] T/CSCB 0003—2021 人间充质干细胞
- [3] ISO 10993-4:2017 Biological evaluation of medical devices—Part 4: Selection of tests for interactions with blood
- [4] Moll G, Ankrum JA, Kamhieh-Milz J, et al. Intravascular Mesenchymal Stromal/Stem Cell Therapy Product Diversification: Time for New Clinical Guidelines[J]. Trends Mol Med. 2019 Feb; 25(2):149-163.
- [5] Oeller M, Laner-Plamberger S, Hochmann S, et al. Selection of Tissue Factor-Deficient Cell Transplants as a Novel Strategy for Improving Hemocompatibility of Human Bone Marrow Stromal Cells[J]. Theranostics. 2018 Feb 4; 8(5):1421-1434.

