ICS 11.220
CCS B 42

T/CVDA

团 体 标 准

T/CVDA 92—2026

间充质干细胞治疗马骨关节病技术

Mesenchymal Cell Therapy for Equine Osteoarthropathy

中国兽药协会

2026－10－22 发布　　2026－10－22 实施

中国兽药协会　　发 布

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
3.1　马间充质干细胞 equine mesenchymal stem cell 1
3.2　关节腔 Joint cavity 1
3.3　关节液 Synovial fluid 1
3.4　美国马业协会评分系统 American Association of Equine Practitioners Lameness Scale 1
4　缩略语 2
5　要求 2
5.1　原材料和辅料 2
5.2　关键质量属性 2
5.3　细胞制备过程控制 3
6　马间充质干细胞检验方法 3
6.1　供体马筛选 3
6.2　细胞形态 4
6.3　染色体核型 4
6.4　细胞存活率和细胞增殖能力按照附录 B 的方法检验。 4
6.5　细胞表面标志物 4
6.6　免疫调节 4
6.7　三系分化 4
6.8　成瘤性 4
6.9　微生物 4
7　检验规则 5
7.1　抽样方法和数量 5
7.2　出厂检验 5
7.3　判定规则 5
8　使用说明 5
9　标签 6
10　包装、储存和运输 6
10.1　包装 6
10.2　储存 6
10.3　运输 6
11　马间充质干细胞治疗马骨关节病 6
11.1　治疗前综合要求 6
11.2　马骨关节病的诊断 8

中国兽药协会

11.3 马骨关节病的治疗方法 8
11.4 马骨关节病的治疗疗效评估 9
11.5 不良反应监测与处理 9
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 11
附录 B （规范性 ） 细胞存活率检测细胞计数法 12
附录 C （规范性 ） 细胞表面标志物检测流式细胞法 13
附录 D （规范性 ） 诱导 IDO 表达检测 PCR 法 14
附录 E （规范性 ） 抑制 T 细胞增殖检测 CFSE 标记法 15
附录 F （规范性 ） 抑制 T 细胞分泌 IFN-γ、TNF-α 检测胞内因子染色法 17
附录 G （规范性 ） 成骨分化检测茜素红 S 染色法 19
附录 H （规范性 ） 成脂分化检测油红 O 染色法 20
附录 I （规范性 ） 成软骨分化检测阿尔新蓝染色法 21
附录 J （规范性 ） 成瘤性检测免疫缺陷小鼠检测法 22

中国兽药协会

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》进行正文规范修改。

本文件由中国兽药协会提出并归口管理。

本文件起草单位：国科明耀（山东）医学科技有限公司、烟台大学、烟台市生命科学与医学健康研究院、维赛（佛山）生物科技有限公司、山东（烟台）中日韩产业技术研究院、烟台绿圃科技有限公司、海南国科明耀医学科技有限公司

本文件主要起草人：宋益哲、王玮蔚、王颖、陈军、余雨、解秀丽、李福玉、王丙云、杨尧尧、郑亚宁

本文件在编制过程中，参考了世界动物卫生组织（WOAH，旧称OIE）《陆生动物诊断试验和疫苗手册》及《陆生动物卫生法典》的相关章节，以促进技术指标与国际标准对标。

本文件名称：间充质干细胞治疗马骨关节病技术

中国兽药协会

间充质干细胞治疗马骨关节病技术

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、马骨关节病诊断标准和马骨关节病间充质干细胞治疗方案。

本文件适用于马间充质干细胞的生产、检测、质控和指导马骨关节病以退行性骨关节炎为主，包括衰老、过度使用等所致的原发性退行性骨关节炎，继发于跗关节骨关节炎、骨软骨病、关节内骨折、软骨碎片等运动性关节损伤的退行性关节病变，以及关节软骨损伤、骨损伤等）的间充质干细胞治疗。

注： 本文件为推荐性团体标准，不作为强制兽药审批依据，仅用于行业生产、诊疗技术规范指导。本文件不适用于以基因编辑或基因修饰为目的的间充质干细胞制备，亦不适用于非关节腔内注射途径的干细胞治疗。

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 17494-2023 马传染性贫血诊断技术
GB/T 18638-2021 流行性乙型脑炎诊断技术
GB/T 18448.2-2008《实验动物 弓形虫检测方法》
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）三部
中华人民共和国兽药典（第七版）一部（2026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。

3.2 关节腔 Joint cavity

关节软骨和滑膜关节囊共同围成的密闭腔隙。腔内呈负压状态，含有少量的关节液，具有减少关节面摩擦、缓冲震荡及维持关节稳定性的生理功能。

3.3 关节液 Synovial fluid

又称滑液。存在于动物关节腔、腱鞘和滑膜囊内的透明或微黄色黏稠液体。主要由滑膜细胞分泌物（如透明质酸）和血浆渗出液组成，在关节活动中起润滑、缓冲震荡及营养关节软骨的作用。

3.4 美国马业协会评分系统 American Association of Equine Practitioners Lameness Scale

美国马业协会评分系统（通常称为AAEP跛行量表，AAEP Lameness Scale，由美国马业协会（AAEP）制定发布）是兽医学中用于评估和标准化马匹跛行严重程度的国际通用准则。该系统通过0到5的数字分级来记录动物步态的异常程度，数值越高代表疼痛或功能障碍越严重。

4 缩略语

AAEP——美国马业协会评分系统（American Association of Equine Practitioners Lameness Scale）
BFA——布雷菲德菌素A（Brefeldin A）
CD——分化簇（Cluster of Differentiation）
CFSE——羧基荧光素琥珀酰亚胺酯（Carboxyfluorescein succinimidyl ester）
CT——计算机体层成像（Computed Tomography）
EIA——马传染性贫血（Equine Infectious Anemia）
EIV——马流感病毒（Equine Influenza Virus）
ELISA——酶联免疫吸附测定（Enzyme-Linked Immunosorbent Assay）
IDO——吲哚胺2,3-双加氧酶（Indoleamine 2,3 Dioxygenase）
IFN-γ——干扰素-γ（Interferon gamma）
IL-1β——白介素-1β（Interleukin 1 beta）
IL-6——白介素-6（Interleukin 6）
JEV——日本乙型脑炎病毒（Japanese Encephalitis Virus）
MSC——间充质干细胞（Mesenchymal Stem Cell）
MRI——磁共振成像（Magnetic Resonance Imaging）
NSAIDs——非甾体抗炎药（Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs）
OCD——跗关节发育不良（Osteochondritis dissecans）
PBMC——外周血单个核细胞（Peripheral Blood Mononuclear Cell）
PPID——垂体中间部功能障碍（Pituitary Pars Intermedia Dysfunction）
STR——短串联重复序列（Short Tandem Repeat）
TNF-α——肿瘤坏死因子-α（Tumor necrosis factor-alpha）
T. gondii——弓形虫（Toxoplasma gondii）
WOAH——世界动物卫生组织（World Organisation for Animal Health）

5 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 供体应按照国内法定标准或对标世界动物卫生组织（WOAH）《陆生动物诊断试验和疫苗手册》的要求，筛查细菌、真菌、支原体、内毒素、马传染性贫血（EIA）、马流感病毒（EIV）、日本乙型脑炎病毒（JEV）和弓形虫并记录结果。
5.1.4 外源病原体感染防控措施

供体马的筛选、组织采集及运输过程中的外源病原体防控，应按照附录A的规定执行。此外，还应满足以下补充要求：

a） 采集环境应符合动物手术无菌要求，操作人员应穿戴无菌手术衣、手套、口罩及帽子；
b） 采集所用器械应为一次性无菌器械或经高压灭菌处理，每只供体马更换一套；
c） 组织运输容器外壁应经消毒处理，运输箱应具备防泄漏、防破损功能，运输温度应全程记录；
d） 组织到达实验室后，应在生物安全柜内开封，并进行外表面消毒及微生物抽检；
e） 组织采集完成后，应在6 h内送达实验室并开展细胞分离。

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样形态，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≥95%，且冻存复苏后细胞存活率≥90%。细胞倍增时间（细胞增殖能力）≤36 h。

5.2.4 细胞代次

用于临床治疗的细胞应采用P3～P6代。

5.2.5 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≥95%；CD34和CD45阳性率≤2%。

5.2.6 免疫调节

经炎症因子干扰素-γ（IFN-γ）诱导后显著增强马间充质干细胞表达吲哚胺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IFN-γ、肿瘤坏死因子-α（TNF-α）。

5.2.7 三系分化

在特定诱导条件下，具有成骨、成脂及成软骨的分化潜能。

其染色阳性判定标准为：成骨分化茜素红S染色阳性显色面积百分比≥10%；成脂分化油红O染色阳性细胞率≥15%；成软骨分化阿尔新蓝染色可见深蓝色胞外基质团块且面积占比≥20%（检测方法见附录G、H、I）。

5.2.8 成瘤性

在免疫缺陷动物（如裸鼠）体内的成瘤试验结果应为阴性。

5.2.9 微生物

真菌、细菌、支原体、内毒素、EIV、EIA、JEV和弓形虫应为阴性

5.3 细胞制备过程控制

5.3.1 细胞的分离、培养、扩增、冻存、复苏等过程控制除应符合T/CSCB 0001的要求外，其生产环境、无菌操作及质量控制体系应参照《兽药生产质量管理规范》中关于兽用生物制品（细胞类）的相关要求执行。

5.3.2 细胞STR检测结果应与供体细胞保持一致，STR分型匹配度应不低于99%，以确保细胞来源的真实性和一致性。

5.3.3 防止交叉污染与病原体传播的操作规范

细胞制备过程应符合《兽药生产质量管理规范（2020年修订）》（GMP）的基本原则，并采取以下措施防止交叉污染和病原体传播：

a）人员管理：操作人员应经GMP培训且健康合格，进入洁净区应穿戴无菌防护装备，不应同时处理不同供体来源的细胞；

b） 环境与设备：不同供体来源的细胞应在独立空间或专用生物安全柜中处理，每次操作前后对生物安全柜及台面进行清洁消毒，环境定期监测悬浮粒子和微生物；

c） 物料管理：不同批次、不同供体的细胞不应共用培养基、移液器、离心管等耗材，所有接触细胞的耗材应为一次性无菌产品；

d） 过程控制：细胞培养过程中不应使用青霉素等β-内酰胺类抗生素；对检测出微生物污染的批次应立即隔离、销毁，并记录偏差调查；

e） 可追溯性：建立细胞制备全过程的可追溯系统，记录供体来源、操作人员、关键工艺参数及检测结果；

f） 废弃物处理：细胞废弃物应经121℃高压灭菌或等效方法灭活后处理。

5.4 本文件所涉及的细胞采集及动物实验，均应通过动物伦理委员会审查批准。

6 马间充质干细胞检验方法

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（2020年版）》第三部－“3502 生产用细胞标准”中3.2.4胞核学检验标准进行检验。注：待《中华人民共和国兽药典（第七版）》三部正式发布后，相关检验方法应执行最新版本。

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。

6.6.3 抑制T细胞分泌IFN-γ、TNF-α

按照附录F的方法检验。

6.7 三系分化

6.7.1 成骨分化

按照附录G的方法检验。

6.7.2 成脂分化

按照附录H的方法检验。

6.7.3 成软骨分化

按照附录I的方法检验。

6.7.4 三系分化染色阳性判定标准

a） 成骨分化（茜素红S染色）：显微镜下可见明显钙结节形成，呈散在或团块状分布，染色阳性区域较未诱导对照组显著增加，必要时可进行半定量分析（如阳性面积或积分光密度IOD），用于辅助评价分化水平；

b） 成脂分化（油红O染色）：细胞内可见明显脂滴形成，呈橙红色或红色颗粒状分布，阳性细胞比例较未诱导对照组显著增加，必要时可结合图像分析软件进行定量评价（如阳性细胞比例或脂滴面积），用于辅助评价分化水平；

c） 成软骨分化（阿尔新蓝染色）：细胞外基质可见明显糖胺聚糖沉积，呈深蓝色团块或连续分布区域，染色强度较未诱导对照组显著增强，必要时可采用图像分析方法对染色区域面积或光密度进行半定量分析，用于辅助评价分化水平。

6.8 成瘤性

按照附录J的方法检验。

6.9 微生物

6.9.1真菌

按照《中华人民共和国兽药典（2020 年版）》三部中“3306 无菌检验或纯粹检验法”项检测。注：待《中华人民共和国兽药典（第七版）》三部正式发布后，相关检验方法应执行最新版本。

6.9.2 细菌

按照《中华人民共和国兽药典（2020 年版）》三部中“3306 无菌检验或纯粹检验法”项检测。注：待《中华人民共和国兽药典（第七版）》三部正式发布后，相关检验方法应执行最新版本。

6.9.3 支原体

按照《中华人民共和国兽药典（2020 年版）》三部中“3308 支原体检验法”项检测。注：待《中华人民共和国兽药典（第七版）》三部正式发布后，相关检验方法应执行最新版本。

6.9.4 内毒素

按照《中华人民共和国兽药典（第七版）》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。

6.9.7 EIA

按照国家标准 GB/T 17494-2023《马传染性贫血诊断技术》检测。

6.9.8 弓形虫

按照国家标准 GB/T 18448.2-2008《实验动物 弓形虫检测方法》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 判定规则

7.3.1 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。

7.3.2 复检项目全部符合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） 储存条件及使用期限；
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；
n） 强制性安全警示。

中国兽药协会

其中，n） 强制性安全警示的具体内容为：经关节腔注射，严禁静脉输入；异体干细胞存在免疫反应风险。

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）生产单位。

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 为保证细胞活力，细胞应在低于-130℃（可保存12个月）或-80℃环境（可保存3个月）下储存；细胞冻融后不应再次冷冻。

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 ℃条件下运输，运输时限宜不超过72 h；非冻存细胞宜在4 ℃～25 ℃ 条件下运输，运输时限不应超过48 h；细胞解冻复苏后不应再次冷冻。

11 马间充质干细胞治疗马骨关节病

11.1 治疗前综合要求

11.1.1 适应症与禁忌证

a） 适应症

经临床及影像学确诊为骨关节病，并完成美国马业协会（AAEP）跛行分级评估的患马。根据马再生医学临床实践，其适应症分类如下：

早期骨关节病：可选择间充质干细胞（MSC）治疗，适用于对常规关节内用药（如皮质类固醇、透明质酸）反应不佳、不宜长期使用抗炎药物，或有维持运动性能需求的患马；

中度骨关节病：宜首选MSC治疗，并作为多模态治疗的重要组成部分，结合受控运动康复程序应用；

重度骨关节病：MSC治疗效果受限，通常仅作为缓解症状的姑息性手段。对于此类患马，应明确告知疗效的不确定性及预期效果。

注： 对于关节软骨损伤、骨损伤等运动性关节损伤，可参照早期骨关节病的推荐等级，由临床兽医根据损伤程度及患马整体状况综合判断是否适用MSC治疗。

b） 绝对禁忌证

活动性肿瘤或恶性肿瘤病史；

活动性感染性疾病（全身性或关节局部感染）；

对MSC制剂中任何成分（如辅料、抗生素、异种蛋白等）存在过敏史；

未控制的全身性感染或严重免疫缺陷。

c） 相对禁忌证（需审慎评估）

正在接受全身性大剂量糖皮质激素治疗的患马（参见11.3.1）

患有严重的内分泌代谢疾病；

患关节同时存在韧带断裂或骨折等机械性不稳定性因素；

患马极度消瘦或处于严重急性炎症期。

11.1.2 治疗前知情同意

实施MSC治疗前，临床兽医须向马匹所有人或饲养员提供充分说明，告知内容应至少包括：

a）治疗性质与目的

说明MSC治疗属于再生医学疗法，作用机制以旁分泌抗炎、免疫调节为主，治疗目标为缓解疼痛、改善关节功能及延缓疾病进展，而非根治骨关节病。

b） 干细胞来源和类型

明确所用细胞为自体、同种异体或异种来源。若使用异种细胞，应告知可能存在的免疫原性风险。

c） 操作要求

治疗宜在无菌手术室或严密消毒环境下进行关节内注射，通常涉及局部麻醉或静脉镇静。

d） 预期疗效

起效时间通常为4～8周，单次注射效果可能因马匹年龄、损伤程度及后续康复计划而异。

e） 不良反应

告知常见不良反应（发生率）：注射后一过性跛行或疼痛加重（24～48 h内），多数可自行缓解。较少见但需关注的反应包括关节肿胀、积液增多。严重不良反应如感染、全身性过敏反应虽罕见，但需告知。

f） 替代治疗方案

列举可替代的治疗选择：非甾体抗炎药（NSAIDs）治疗、物理康复、关节内透明质酸注射、手术干预（关节置换、关节融合等）。

g） 费用与重复治疗

如实告知治疗费用，并说明可能需要重复注射（应根据AAEP跛行分级及疗效评估治疗效果，确定治疗对象使用次数）。

h） 联合治疗

MSC治疗可与体重管理、运动康复、环境改造等综合管理措施联合应用，治疗初期可继续或逐步减少NSAIDs使用。

i） 术后护理与随访

告知术后应控制活动量、避免剧烈运动，并按规定时间节点（如第1、3、6、12个月）进行随访评估。

知情同意书应由马匹所有人或饲养员签字确认。知情同意书及患马医疗档案属于法定告知及临床追踪档案，必须妥善留存至少5年。

11.1.3 基础健康评估

在决定实施MSC治疗前，须对患马进行系统性的基础健康评估，以确保治疗安全性及有效性：

a）基础生理及系统功能评估

临床体检：检查体温、呼吸、心率，确保无全身性发热或系统性感染；

实验室检查：血常规（排查炎症）及生化检查（关注肝肾功能，评估全身代谢水平）。

b） 骨关节病核心病灶评估

影像学检查：患关节X线摄片（标准投照位）及超声影像（评估滑膜厚度及软骨表面）；

临床计量评估：使用AAEP分级评分表或压力板分析量化基线步态；

诊断性神经阻滞/关节阻滞：明确疼痛部位是否确属待治疗关节，避免误诊。

c） 肿瘤风险排查

体格检查：触诊全身浅表淋巴结、体表肿块；

腹部超声：评估肝、脾、肾等实质脏器有无占位性病变；

胸部X线：排查肺转移性病灶；

血液学指标：关注白细胞总数、分类、血小板、碱性磷酸酶等非特异性肿瘤相关指标；

若发现可疑恶性病变，应暂缓MSC治疗，进一步行细胞学或组织病理学确诊。

d） 传染病筛查

在采集自体组织或使用异体/异种MSC前，应筛查以下病原体（依据第5.1.3条及附录A）：

真菌—阴性

细菌—阴性
支原体—阴性
内毒素—阴性
马流感病毒（EIV）—阴性
马传染性贫血（EIA）—阴性
弓形虫（T. gondii）—阴性
日本乙型脑炎病毒（JEV）—阴性

e） 心脏功能评估（适用高风险群体）

适用对象：老年马（≥15岁）或伴有垂体中间部功能障碍（PPID）等内分泌疾病的患马、需深度镇静的个体、心血管系统异常病史；

检查项目宜包括：临床心脏听诊、基础心电图、超声心动图、基础生命体征。

拟联合手术方案（如同时进行关节镜探查或清创，需全身麻醉者）。

f） 评估时机与实施要点

检查应在治疗前1～3天完成；

若确诊为感染性关节炎，严禁进行MSC注射，需先行关节灌洗及抗生素治疗；

所有检查数据应作为基线档案留存。

11.2 马骨关节病的诊断

11.2.1 病史与体格检查：通过询问病史、观察马匹姿态、触诊关节是否肿胀、增厚、疼痛，并评估关节活动度等。

11.2.2 跛行检查与分级：评估跛行严重程度，宜使用AAEP跛行评分系统进行分级。

11.2.3 屈曲试验：通过标准化的屈曲姿势与施加力度来诱发/加剧特定关节的疼痛，辅助定位；宜采用0～3分制进行主观评分。

11.2.4 诊断性麻醉：应通过逐步进行神经阻滞或关节内麻醉，观察跛行改善情况。

11.2.5 影像学检查：通过X光评估关节间隙、骨赘、软骨下骨硬化等典型骨关节病征象或使用更先进的影像技术，如超声、计算机体层成像（CT）、磁共振成像（MRI）等在复杂病例中用于评估软组织。

11.2.6 关节液分析：分析外观、黏蛋白凝块质量、总蛋白、白细胞计数，确认炎症类型，排除感染性关节炎。

11.2.7 关节镜检查：直接评估软骨、滑膜等组织的状况，进行明确诊断和干预。

11.2.8 早期癌症筛查

在确诊马骨关节病并考虑间充质干细胞治疗前，应对患马进行基础性早期癌症筛查，以排除活动性恶性肿瘤。筛查指标至少包括：

a）体格检查（重点评估体表肿块、淋巴结大小及质地）；

b） 腹部超声（评估肝、脾、肾、膀胱等实质脏器是否有异常占位或结节肿块）；

c） 胸部X线检查（排查肺转移性病灶）或CT造影增强检查；

d） 血液学指标（如白细胞总数、分类计数、血小板水平及血清碱性磷酸酶等非特异性肿瘤相关指标）。

若发现疑似恶性病变，应暂缓干细胞治疗，并进一步通过细胞学或组织病理学确诊。

11.3 马骨关节病的治疗方法

11.3.1 药物使用限制

MSC关节内注射前7 d内及注射后14 d内，不宜全身性使用大剂量糖皮质激素。正在接受糖皮质激素治疗的患马，如病情允许，应在注射前至少7 d停药或减量。因基础疾病必须持续使用糖皮质激素者，应审慎评估MSC治疗的风险与获益。

注：若因病情需要必须使用者，应详细记录并纳入疗效影响因素分析。必要时，可在注射前后使用NSAIDs控制关节炎症，但应避免与糖皮质激素同时全身性用药。

11.3.2 细胞注射剂量应为（1.5～2） × 10^7个/关节。

11.3.3 应根据治疗效果确定使用次数：若4周效果不明显，可再注射1次，总注射次数为2次，最多不应使用3次。

11.3.4 多关节注射总量控制

同一匹马单次治疗中，同时注射关节数不宜超过4个，累及多个关节时，MSC总注射量不宜超过本文件规定单关节剂量的4倍；多关节注射宜分次进行，每次注射间隔不应少于2周。

11.3.5 细胞注射前准备工作：将细胞悬液解冻复苏，通过14G套管缓慢无菌抽吸悬液。镇静马匹，单次静脉注射氟尼辛葡甲胺（500 mg, 0.83 mg/kg～1.1 mg/kg）。镇静后关节区域用抗菌肥皂（聚维酮碘或氯己定/酒精交替清洗至少2分钟）消毒。宜保持局部毛发完整；仅在关节区域严重污染、被毛过厚或解剖标志无法辨认时，可剃除局部毛发。

11.3.6 细胞注射方法：关节注射时，宜将20G针头插入患处关节，针头留置后，见到关节腔液流出后连接注射器，缓慢注射，持续时间至少10秒。

11.3.7 细胞注射后护理：注射后，宜在注射区域覆盖无菌绷带24 h，马匹在厩内休息24-72 h，然后进行2周的手牵遛。

11.4 马骨关节病的治疗疗效评估

a） 马匹所有人/骑手评估：宜使用马类特异性评估工具（如马慢性疼痛量表、马面部表情疼痛量表或马生活舒适度问卷）评估患马在日常管理（如马厩起卧、放牧行走）、骑乘或工作表现（如转向、上下坡、跳跃意愿）以及行为舒适度（如进食状态、休息时是否抬举患肢、对触碰关节的反应）的变化。

b） 兽医评估：进行AAEP跛行评分系统评估（0～5分制），内容包括静态姿势（患肢承重对称性、站立时是否频繁变换重心）、动态步态分析（直线慢步/快步跛行程度、转圈时跛行加重情况）、骨科检查（屈曲试验后跛行反应时间、关节被动屈伸范围、是否存在骨摩擦音及关节肿胀热感），以及患肢肌肉量变化（通过周径测量或对比双侧肌群萎缩程度）。

c） 影像学评估：定期复查X线或CT检查，以监测关节结构的长期变化，包括骨赘大小与数量、关节间隙狭窄程度、软骨下骨硬化/囊肿及关节面不规则等。

d） 炎症因子检测：无菌抽取患侧关节液，无菌抽取患关节液进行炎症标志物（CRP、IL-1β、IL-6和TNF-α）水平酶联免疫吸附测定（ELISA）检测，以从分子学维度评估骨关节病程度。

11.5 不良反应监测与处理

马间充质干细胞关节内注射后应建立不良反应监测与分级处置机制。所有不良反应事件均应详细记录于患马医疗档案中，包括发生时间、临床表现、严重程度、处置措施及转归。

根据不良反应的临床表现和严重程度，按以下分级进行监测与处置：

11.5.1 轻度不良反应（注射后一过性反应）

临床表现：注射后24 h～48 h内出现注射关节轻度肿胀、皮温升高或一过性跛行加重，不影响患马站立及缓慢行走，全身状态平稳，无发热。

监测要求：注射后至少观察2 h方可离院；由马主或饲养员于注射后24 h、48 h进行电话或现场随访。

处置措施：无需特殊药物治疗。宜将患马于厩内静养，控制活动量，多数病例症状可于48 h～72 h内自行缓解。必要时可于注射后24 h局部冷敷以缓解不适。

11.5.2 中度不良反应（需干预的关节炎症反应）

临床表现：注射关节明显肿胀、积液增多、跛行严重（AAEP分级≥3/5），患马抗拒负重，可能伴有体温轻度升高（38.5 ℃～39.0 ℃），症状持续超过72 h无缓解趋势。

监测要求：立即由责任兽医进行复诊，评估关节肿胀程度、跛行状态及全身状况，采集血常规及关节液进行细胞学和细菌学检查，以鉴别炎症类型。

处置措施：

a） 关节腔内积液过多者，可行无菌关节穿刺减压，并将抽吸液送检；

b） 可使用NSAIDs控制炎症及疼痛，用法用量参照药品说明书及兽医临床常规；

c） 若关节液检查提示感染迹象（如白细胞显著升高、细菌培养阳性），应立即按照11.5.3处理；

d） 加强患马护理，置舒适厩舍，减少应激。

11.5.3 重度不良反应（紧急事件）

临床表现：符合以下任一条件者，判定为重度不良反应—a） 注射关节出现化脓性关节炎征象（关节剧痛、高度肿胀、全身发热≥39.5 ℃、关节液呈脓性）；b） 全身性过敏反应（如荨麻疹、呼吸困难、黏膜发绀、心动过速、虚脱等）。

紧急处置流程：

a） 立即停止所有操作，保持患马静立或侧卧保定，确保气道通畅；

b） 建立静脉通路，按急救规程给予抗组胺药、糖皮质激素或肾上腺素（针对严重过敏反应）；

c） 怀疑化脓性关节炎者，应立即行关节腔灌洗（无菌生理盐水或含抗生素溶液），并全身性使用广谱抗生素；

d） 同时采集关节液送细菌培养和药敏试验，后续根据药敏结果调整抗感染方案；

e） 对于过敏反应或病情危重者，应持续监测心肺功能，必要时转至具备急救条件的动物医院。

上报要求：所有重度不良反应事件应在事件发生后24 h内向本文件归口单位（中国兽药协会）及当地兽医主管部门书面报告，报告内容包括患马信息、治疗过程、不良反应详况、处置措施及患者转归。

11.5.4 不良反应记录与追踪

所有不良反应（包括轻度）均应使用标准表格记录，作为患马医疗档案的组成部分。对于中度和重度不良反应，应在事件发生后14 d进行追踪随访，记录患马恢复情况及有无后遗症。

中国兽药协会

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，包括体格检查，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），并在采集组织前按5.1.3要求完成细菌、真菌、支原体、内毒素、EIA、EIV、JEV和弓形虫的病原学或血清学检测，结果均为阴性。

A.1.3品种、遗传背景及骨关节遗传病筛查

供体马的品种信息和遗传背景应有完整记录。应重点筛查马匹常见的骨关节遗传性发育疾病，包括但不限于跗关节发育不良（OCD）、髋关节发育不良等。筛查结果阳性的个体不应作为供体。

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。应选择温顺，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：应采用适宜的麻醉或镇定方法，确保供体马在组织采集过程中无痛觉或者不适感。

A.2.3 组织采集技术：应根据目标组织类型（如脂肪组织、骨髓、脐带、羊膜等）采用相应的无菌手术采集方法。

A.2.4 供体马术后护理：术后应对供体马进行体温、行为和身体状况等监测；伤口应定期清洁并更换敷料，避免感染；应实施有效的疼痛管理方案，包括使用合规的镇痛药物；应为供体马提供清洁、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6 h内将组织样品运送至实验室进行MSC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。

中国兽药协会

附 录 B
（规范性）
细胞存活率检测细胞计数法

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18.2MΩ·cm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 mm^2 的方格中的细胞的数量应为20个～50个细胞。若细胞数超过200个细胞，应进行稀释。

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 μL混合液（B.3.2）滴在一侧计数室的盖玻片边缘，另取10 μL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30 s，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16×25规格的计数室，按对角线位置，取左上、右上、左下、右下4个1 mm^2 的中格（即100个小格）计数。对25×16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：

$$X=(M-S)/M\times 100\% \qquad \cdots\cdots\cdots\cdots\cdots\cdots\cdots\cdots(B.1)$$

式中：

X—细胞存活率；

M—细胞总数；

S—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：

$$DT=t\times[\lg 2/(\lg Nt-\lg N0)] \qquad \cdots\cdots\cdots\cdots\cdots\cdots\cdots\cdots(B.2)$$

式中：

t—培养时间；

No—首次记下的细胞总数；

Nt—t时间后的细胞总数。一般No在接种细胞24 h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应超过算术平均值的10%。

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：pH为7.4。

C.2.2 牛血清白蛋白（BSA）：纯度≥98%。

C.2.3 抗马CD29、CD44、CD90、CD34、CD45 抗体及同型对照抗体。

注：若选用人源、鼠源抗体或其他来源的抗体，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应不低于95%方可用于鉴定马间充质干细胞。

C.2.4 按照相应要求使用电子天平（C.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 ℃～8 ℃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（C.1.2）300 g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.1.2）300 g离心4 min，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（C.1.2）300 g离心4 min，弃上清。

C.4.3 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（C.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，然后根据同型对照的荧光强度设定阳性边界，在目标细胞分群1的基础上划定阳性细胞群2，排除荧光强度低于该边界的阴性细胞。

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-γ。

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-γ处理

根据附录B方法测定，计算马间充质干细胞悬液活细胞浓度。按（1～4） × 10^5 cells/cm^2 接种，在马间充质干细胞培养体系中添加IFN-γ，浓度为（10～30） ng/mL，培养12 h～36 h。同时设立未使用IFN-γ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，使用PCR扩增仪（D.1.2）获得马间充质干细胞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-γ处理的马间充质干细胞在扩增产物片段大小范围内无明显条带，IFN-γ刺激后在扩增产物片段大小范围内可见明显条带。

中国兽药协会

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 0.25% EDTA-胰蛋白酶。

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 羟基荧光素二醋酸盐琥珀酰亚胺酯（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），分离马外周血细胞单个核细胞（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 × 107cells/mL，40μm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B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B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1×106cells/mL 接种培养，并用（2～5）μg/mL 的植物凝集素（E.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96 h，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0.25% EDTA-胰蛋白酶消化马间充质干细胞并制备成单细胞悬液，根据附录B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2×105cells/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96 h，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细胞增殖的抑制率。

计算抑制率的公式如下：

$$Y=(A-C)/A\times 100\% \quad \cdots\cdots\cdots\cdots\cdots\cdots\cdots\cdots (E.1)$$

式中：

Y —抑制率；

A —单独T细胞（刺激）CFSE子代细胞的百分比；

C —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。

中国兽药协会

附 录 F
（规范性）
抑制 T 细胞分泌 IFN-γ、TNF-α检测胞内因子染色法

F.1 仪器和设备

F.1.1 血球计数板。

F.1.2 显微镜。

F.1.3 水平离心机。

F.1.4 流式细胞仪。

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-胰蛋白酶。

F.2.3 台盼蓝染液：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 佛波酯（PMA）。

F.2.5 淋巴细胞分离液。

F.2.6 抗体（如anti-IFN-γ抗体、anti-TNF-α抗体）。

F.2.7 布雷非德菌素A（BFA）。

F.2.8 离子霉素。

F.2.9 皂苷。

F.2.10 4%多聚甲醛。

F.3 检测步骤

F.3.1 T细胞分离

利用淋巴细胞分离液（F.2.5），分离PBMC，用适量无菌磷酸盐缓冲液（F.2.1）并使用水平离心机离心（F.1.3）洗涤2次；待抗体孵育（F.2.6）后用适量无菌磷酸盐缓冲液（F.2.1）并使用水平离心机离心（F.1.3）洗涤2 次；重悬细胞至细胞浓度为5×107 细胞/mL，40μm 滤网转移到流式管中，按流式细胞仪应用手册上机分选。

F.3.2 T细胞与马间充质干细胞共培养

F.3.2.1 T细胞炎症因子分泌

根据附录B方法测定，使用血球计数板（F.1.1）及显微镜（F.1.2）计算T细胞悬液活细胞浓度，按1 × 106cells/mL 接种培养，培养48 h。结束培养前4 h～6 h 往培养体系添加50 ng/mL佛波酯（F.2.4）、10 μg/mL布雷非德菌素A（F.2.7）和1 μg/mL离子霉素（F.2.8），用于检测IFN-γ阳性的T细胞比例A1，和TNF-a 阳性的T细胞比例A2。

F.3.2.2 马间充质干细胞抑制T细胞炎症因子分泌

利用0.25% EDTA-胰蛋白酶消化马间充质干细胞并制备成单细胞悬液，根据附录B方法测定，使用血球计数板（F.1.1）及显微镜（F.1.2）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 × 105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，培养48 h。结束培养前4 h～6 h，往培养体系添加50 ng/mL佛波酯（F.2.4）、10 μg/mL布雷非德菌素A（F.2.7）和1 μg/mL离子霉素（F.2.8），用于检测马间充质干细胞抑制后IFN-γ阳性的T细胞比例C1，TNF-α阳性的T细胞比例C2。

F.3.3 T 细胞收集并标记

收集培养后的T细胞，用适量无菌磷酸盐缓冲液（F.2.1）并使用水平离心机离心（F.1.3）洗涤2次。用4%多聚甲醛（F.2.10）固定细胞，用适量无菌磷酸盐缓冲液（F.2.1）并使用水平离心机离心（F.1.3）洗涤1次。使用0.1%～0.2%皂苷（F.2.9）处理穿膜，然后孵育IFN-γ和TNF-α抗体，用适量无菌磷酸盐缓冲液（E.2.1）并使用水平离心机离心（F.1.3）洗涤1次。最后通过40 μm滤网转移到流式管中，按流式细胞仪应用手册上机检测。

F.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，然后根据Isotype组荧光强度，在分群1的基础上画出IFN-γ阳性的细胞群2和TNF-α阳性的细胞群3，排除没有被荧光抗体标记的阴性细胞。

F.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细胞分泌IFN-γ、TNF-α的抑制率。

抑制率按公式进行计算：

IFN-γ抑制率=(A1-C1)/A1 ×100% …… …… …… …… …… …… …… ……(F.1)

式中：

A1 —单独T 细胞的IFN-γ阳性率；

C1 —与马间充质干细胞共培养T细胞的IFN-γ阳性率。

TNF-α抑制率=（A2-C2）/A2 ×100% …… …… …… …… …… …… …… ……(F.2)

式中：

A2 —单独T 细胞的TNF-α阳性率；

C2 —与马间充质干细胞共培养T细胞的TNF-α阳性率。

中国兽药协会

附 录 G
（规范性）
成骨分化检测茜素红 S 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-胰蛋白酶。

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 成骨诱导液。

G.2.5 茜素红S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）离心收集马间充质干细胞于离心管中，用无菌磷酸盐缓冲液轻柔重悬细胞，避免形成气泡或者细胞团块。

G.3.1.2 细胞计数

根据附录B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骨诱导液产品说明书，诱导14 d～21 d。

G.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。

G.4 结果分析

显微镜下可见散在橘红色的钙结节。

中国兽药协会

附 录 H
（规范性）
成脂分化检测油红 O 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-胰蛋白酶。

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 成脂诱导液。

H.2.5 油红O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柔重悬细胞，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B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脂诱导液产品说明书，诱导14 d～21 d。

H.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。

H.4 结果分析

显微镜下可见细胞中含大小不等橙红色的脂滴。

中国兽药协会

附 录 I
（规范性）
成软骨分化检测阿尔新蓝染色法

I.1 仪器和设备

I.1.1 血球计数板。

I.1.2 明视场显微镜。

I.1.3 水平离心机。

I.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。

I.2.1 磷酸盐缓冲液：pH为7.4。

I.2.2 0.25% EDTA-胰蛋白酶。

I.2.3 台盼蓝染液：使用时，用磷酸盐缓冲液（I.2.1）稀释至0.4%（质量浓度）。

I.2.4 成软骨诱导液。

I.2.5 阿尔新蓝染色试剂盒。

I.3 检测步骤

I.3.1 细胞样品的准备

I.3.1.1 细胞消化

使用水平离心机（I.1.3）离心收集细胞于离心管中，用无菌磷酸盐缓冲液轻柔重悬细胞，避免形成气泡或者残留细胞团块。

I.3.1.2 细胞计数

根据附录B方法测定，使用血球计数板（I.1.1）及明视场显微镜（I.1.2）计算马间充质干细胞悬液活细胞浓度。

I.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14 d～21 d。

I.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。

I.4 结果分析

显微镜下可见被染为深蓝色的软骨细胞胞外基质。

中国兽药协会

附 录 J
（规范性）
成瘤性检测免疫缺陷小鼠检测法

J.1 仪器和设备

J.1.1 血球计数板。

J.1.2 明视场显微镜。

J.1.3 水平离心机

J.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。

J.2.1磷酸盐缓冲液：pH为7.4。

J.2.2 0.25% EDTA-胰蛋白酶。

J.2.3 台盼蓝染液：使用时，用磷酸盐缓冲液（J.2.1）稀释至0.4%（质量浓度）。

J.3 检测步骤

J.3.1 细胞样品的准备

J.3.1.1 细胞消化

使用水平离心机（J.1.3）离心收集细胞于离心管中，用无菌磷酸盐缓冲液轻柔重悬细胞，避免形成气泡或者残留细胞团块。

J.3.1.2 细胞计数

根据附录B方法测定，使用血球计数板（J.1.1）及明视场显微镜（J.1.2）计算马间充质干细胞悬液活细胞浓度。

J.3.2 细胞移植

将1 × 107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）。

J.3.3 肿瘤观察

参考中华人民共和国农业部公告第683 号《兽用生物制品生产用细胞系试验研究指导原则》《兽用生物制品实验室安全试验技术指导原则》《兽用生物制品稳定性试验技术指导原则》以及《兽用生物制品临床试验技术指导原则》进行肿瘤观察，接种后至少连续观察16周。观察期内记录注射部位有无进行性结节形成，出现结节并开始消退的动物应在观察期末处死并进行组织病理学检查。凡不能形成进行性结节的细胞，视为不致瘤。

J.4 结果分析

J.4.1 成瘤率计算：

$$Z=N/M\times 100\% \qquad \cdots\cdots\cdots\cdots\cdots\cdots\cdots\cdots(J.1)$$

式中：

Z—成瘤率；

M—接种小鼠总数；

N—荷瘤小鼠总数。

J.4.2 结果判定

a）试验有效性：阳性对照组应至少有9只小鼠有进行性肿瘤生长时，试验才视为有效。

b） 结节判定：如注射部位有结节形成，应对结节进行双向测量，并记录每周的测量结果，以判定结节是否为进行性、稳定还是消退。

c） 阴性判定（不具成瘤性）：不能形成进行性结节的细胞，不视为具有成瘤性。 对出现的结节开始消退的动物，应在观察期末处死。若细胞在体内没有形成进行性结节，但结节在观察期内始终存留，且具有瘤的组织病理学形态时，宜考虑是否开展进一步检测（如延长观察时间或采用其他动物模型）。

d） 阳性判定（具有成瘤性）：如待检细胞接种组10只动物中至少有2只在注射部位或转移部位形成瘤，并且组织病理学及基因型分析显示形成瘤的细胞性质与接种的细胞一致时，则判定为待检细胞具有成瘤性。

e） 需进一步分析：如待检细胞接种组10只动物中仅有1只形成瘤且满足上述d）的一致性条件，则待测细胞可能具有成瘤性，需要做进一步的分析。

中国兽药协会