ICS 11.220
CCS B 42

T/CVDA

团 体 标 准

T/CVDA 93—2026

间充质干细胞治疗犬骨关节病技术

Mesenchymal Cell Therapy for Canine Osteoarthritis

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 4
2　规范性引用文件 4
3　术语和定义 4
3.1　犬间充质干细胞 Canine mesenchymal stem cell (MSC) 4
3.2　犬骨关节炎 Canine Osteoarthritis (OA) 4
3.3　关节腔 Joint cavity 5
3.4　关节液 Synovial fluid 5
3.5　犬骨关节炎分期工具 Canine OsteoArthritis Staging Tool (COAST) 5
4　缩略语 5
5　犬间充质干细胞技术要求 5
5.1　原材料和辅料 5
5.2　关键质量属性 5
5.3　细胞制备过程控制 6
6　犬间充质干细胞检验方法 7
6.1　供体犬筛选 7
6.2　细胞形态 7
6.3　染色体核型 7
6.4　细胞存活率和细胞增殖能力 7
6.5　细胞表面标志物 7
6.6　免疫调节能力 7
6.7　三系分化潜能 7
6.8　成瘤性 7
6.9　微生物学安全性 8
7　检验规则 8
7.1　抽样方法和数量 8
7.2　出厂检验 8
7.3　判定规则 8
8　使用说明 9
9　标签 9
10　包装、储存和运输 9
10.1　包装 9
10.2　储存 9
10.3　运输 9
11　犬间充质干细胞治疗犬骨关节病 9
11.1　治疗前综合要求 9

中国兽药协会

11.2 犬骨关节病的诊断 11
11.3 犬骨关节病的治疗方法 12
11.4 犬骨关节病的治疗疗效评估 12
11.5 不良反应监测与处理 12
附录A （规范性 ） 供体犬评估与筛选，犬组织样品采集和运输标准 15
附录B （规范性 ） 细胞存活率检测细胞计数法 16
附录C （规范性 ） 细胞标志蛋白检测流式细胞法 17
附录D （规范性 ） 诱导 IDO 表达检测 PCR 法 18
附录E （规范性 ） 抑制 T 细胞增殖检测 CFSE 标记法 19
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 21
附录G （规范性 ） 成骨分化检测茜素红 S 染色法 23
附录H （规范性 ） 成脂分化检测 油红 O 染色法 24
附录I （规范性 ） 成软骨分化检测阿尔新蓝染色法 25
附录J （规范性 ） 成瘤性检测免疫缺陷小鼠检测法 26

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。

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。

本文件的编制依据包括《兽药生产质量管理规范（2020 年修订）》等法规文件。

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、瑞鹏西南转诊中心、瑞鹏宠物医院福田转诊中心、大连维克特瑞合宠物医院有限公司、青岛爱诺伴侣动物医院有限公司江西路分公司、烟台信诺宠物医院、康诚（烟台）宠物医院有限公司、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、余雨、陈军、王颖、解秀丽、李福玉、王丙云、杨尧尧、艾生权、吉才回、秦磊、张文政、赵亮、杨宗敏、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：间充质干细胞治疗犬骨关节病技术

中国兽药协会

间充质干细胞治疗犬骨关节病技术

1 范围

本文件规定了治疗用犬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、废弃物处理要求、犬骨关节病诊断标准和犬骨关节病间充质干细胞治疗方案。

本文件适用于犬间充质干细胞的生产、检测、质控和指导犬骨关节病（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，继发于髋关节发育不良、肘关节发育不良、髌骨脱位、前十字韧带断裂等疾病的骨关节炎，以及关节软骨损伤、骨损伤等）的间充质干细胞治疗。

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。

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 27532-2011 犬瘟热诊断技术
GB/T 27533-2011 犬细小病毒病诊断技术
GB/T 36789-2018 动物狂犬病病毒核酸检测方法
NY/T 573-2022 动物弓形虫病诊断技术
NY/T 683-2003 犬传染性肝炎诊断技术
WS 281-2008 狂犬病诊断标准
DB21/T 3093-2018 犬冠状病毒检测方法
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）
兽药生产质量管理规范（2020年修订）
犬骨关节炎诊断分期与治疗专家共识（2026版）

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1 犬间充质干细胞 Canine mesenchymal stem cell (MSC)

一类贴壁培养后呈成纤维细胞样形态（纺锤形或梭形）、可在体外自我更新，并具有成骨、成脂、成软骨三系分化能力的成体干细胞。

注：犬间充质干细胞可从骨髓、脂肪、脐带、胎盘、羊膜、牙髓等多种组织中分离获得。不同组织来源的犬间充质干细胞在增殖、分化及旁分泌能力上存在一定差异，但均具有相似的基本生物学特性。

3.2 犬骨关节炎 Canine Osteoarthritis (OA)

一种涉及整个关节的慢性、进行性、退行性骨关节疾病，其特征为关节软骨的磨损、缺失、软骨下骨硬化、骨赘形成、滑膜炎症以及关节囊和韧带等软组织的病理改变，临床表现为疼痛、跛行和关节功能障碍。

3.3 关节腔 Joint cavity

关节腔是指被关节囊包围的封闭空间，其中包含少量的滑液，这种液体有助于减少关节运动时的摩擦，从而保护关节软骨并确保关节的顺畅运动。关节腔的存在使得关节能够在一定范围内灵活运动，同时保持骨骼之间的稳定连接。

3.4 关节液 Synovial fluid

关节液，也称为滑液，是一种存在于关节腔内的液体，主要由关节滑膜分泌。这种液体的主要功能是润滑关节，减少关节软骨面之间的摩擦，从而保护关节软骨，减少磨损，并帮助关节在运动时顺畅运作。关节液还含有营养物质，这些物质可以通过渗透作用进入软骨，为其提供必要的营养，维持其健康和功能。

3.5 犬骨关节炎分期工具 Canine OsteoArthritis Staging Tool (COAST)

一套用于犬骨关节炎临床分期评估的标准化工具，通过整合宠主对患犬整体功能与行为的观察，以及兽医对关节局部结构与功能的专业检查，将OA严重程度客观量化为0至4期。

4 缩略语

CD——分化簇（Cluster of Differentiation）
COAST——犬骨关节炎分期工具（Canine OsteoArthritis Staging Tool）
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）
MSC——间充质干细胞（Mesenchymal Stem Cell）
NSAID——非甾体抗炎药（Non-steroidal Anti-inflammatory Drug）
OA——骨关节炎（Osteoarthritis）
PBMC——外周血单个核细胞（Peripheral blood mononuclear cell）
STR——短串联重复序列（Short Tandem Repeat）
TNF-α——肿瘤坏死因子-α（Tumor necrosis factor-alpha）

5 犬间充质干细胞技术要求

5.1 原材料和辅料

5.1.1 应符合T/CSCB 0001的要求。
5.1.2 应建立供体犬的评估与筛选标准、组织采集方法、运输标准和交接标准，确保供体福利和初始细胞材料的安全性。
5.1.3 供体犬应筛查真菌、细菌、病毒、支原体、内毒素、犬瘟热病毒（CDV）、犬细小病毒（CPV）、狂犬病病毒（RV）、ICH（传染性犬肝炎病毒）、CCV（犬冠状病毒）、弓形虫，结果应为阴性，并记录在案。

5.1.4 外源病原体感染防控措施

供体犬的筛选、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，每只供体犬更换一套；
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

贴壁培养时，细胞应呈典型的纺锤形或梭形成纤维细胞样形态，折光性强，形态均一。

5.2.2 染色体核型

正常核型应为78，XX或78，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%。细胞倍增时间应≤36 h。

5.2.4 细胞代次

用于治疗的细胞代次应为P3～P6代。

5.2.5 细胞表面标志物

流式细胞术检测，CD29、CD44、CD90阳性率应≥95%；CD34、CD45阳性率应≤2%。

5.2.6 免疫调节能力

经炎症因子干扰素-γ（IFN-γ）诱导后，犬MSC应显著上调吲哚胺2,3-双加氧酶（IDO）的表达。与活化的T淋巴细胞共培养时，应能抑制T淋巴细胞的增殖，并抑制其分泌IFN-γ和肿瘤坏死因子-α（TNF-α）。

5.2.7 三系分化潜能

在特定诱导条件下，应能分化为脂肪细胞、成骨细胞和软骨细胞。

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 微生物学安全性

真菌、细菌、病毒、支原体、内毒素、犬瘟热病毒（CDV）、犬细小病毒（CPV）、狂犬病病毒（RV）、ICH（传染性犬肝炎病毒）、CCV（犬冠状病毒）、弓形虫检测结果均应为阴性。

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。

6 犬间充质干细胞检验方法

6.1 供体犬筛选

按照附录A的方法进行筛选。

6.2 细胞形态

在二维培养条件下，使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 免疫调节能力

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 三系分化潜能

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

中国兽药协会

按照附录J的方法检验。

6.9 微生物学安全性

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 病毒

按照《中华人民共和国兽药典（2020 年版）》三部中“3305 外源病毒检验法”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 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

6.9.5 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。

6.9.6 CDV

按照国家标准GB/T 27532-2011《犬瘟热诊断技术》检测。

6.9.7 CPV

按照国家标准GB/T 27533-2011《犬细小病毒病诊断技术》检测。

6.9.8 RV

按照国家标准GB/T 36789-2018《动物狂犬病病毒核酸检测方法》检测。

6.9.9 ICH

按照行业标准NY/T 683-2003《犬传染性肝炎诊断技术》检测。

6.9.10 CCV

按照地方标准DB21/T 3093-2018《犬冠状病毒检测方法》检测。

6.9.11 弓形虫

按照行业标准NY/T 573-2022《动物弓形虫病诊断技术》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检验，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 复核检验项目全部符合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。

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。

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

应选择对犬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 犬间充质干细胞治疗犬骨关节病

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COAST分期的患犬。根据中国兽医协会《犬骨关节炎诊断分期与治疗专家共识（2026版）》，推荐如下：

中国兽药协会

COAST 1～2期（早期骨关节病）：MSC治疗为可选方案，适用于传统保守治疗效果欠佳或有早期干预需求的患犬。

COAST 3期（中度骨关节病）：MSC治疗为可选方案，可与药物、物理治疗等联合应用。

COAST 4期（重度骨关节病）：MSC治疗为推荐方案，尤其适用于非甾体抗炎药反应不佳或不耐受的患犬。

注： 对于关节软骨损伤、骨损伤等非典型骨关节炎表现的关节病变，可参照COAST 1～2期的推荐等级，由临床兽医根据损伤程度及患犬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（包括辅料、培养基残留物、异种血清等）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）

正在接受全身性免疫抑制治疗的患犬；

体重过轻（<5 kg）或年龄过小（<1岁）；

同时存在多关节严重病变；

怀孕或哺乳期母犬；

严重肝肾功能不全（可能影响麻醉耐受性及细胞代谢）。

临床兽医应基于COAST分期及患犬整体状况，综合判断MSC治疗的适宜性。

11.1.2 治疗前知情同意

实施MSC治疗前，临床兽医须向犬主人或法定监护人提供充分、可理解的书面及口头说明，并签署知情同意书。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）干细胞来源与类型

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）治疗步骤

说明完整治疗流程：细胞制备周期（如需体外扩增）、关节腔内注射操作（需麻醉）、术后观察及随访安排。

d）预期疗效与不确定性

说明疗效存在个体差异，部分患犬可能改善不明显，起效时间（数周至数月）不等，单次注射有效持续时间通常约为6个月。

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小时内），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：非甾体抗炎药物治疗、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（根据COAST分期及疗效评估治疗效果，确定治疗对象使用次数）。

h）联合治疗

说明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

告知术后需适度休息、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。

知情同意书应由犬主人签字确认。知情同意书及患犬医疗档案属于法定告知及临床追踪档案，应妥善留存至少5年。

11.1.3 基础健康评估

在决定实施MSC治疗前，须对患犬进行系统性的基础健康评估，以确保治疗安全性及有效性。评估内容应至少包括以下五大类：

a）基础生理功能评估

血常规：评估红细胞、白细胞、血小板计数，排查感染、贫血、血小板减少等。

血清生化：重点评估肝功能（ALT、AST）、肾功能（CREA、BUN）、总蛋白、血糖等。

凝血功能：有出血倾向史或术前筛查异常者，应检测PT、APTT。

b）骨关节病核心病灶评估

影像学检查： 患关节X线摄片（必要时CT/MRI），评估关节间隙、骨赘、软骨下骨硬化、积液等。

COAST分期：按照《犬骨关节炎诊断分期与治疗专家共识（2026版）》进行标准化分期。

临床计量评估： 使用CBPI、LOAD、mCOAST等量表记录基线疼痛及功能状态。

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

病毒——阴性

支原体——阴性

内毒素——阴性

犬瘟热病毒（CDV）——阴性

犬细小病毒（CPV）——阴性

狂犬病病毒（RV）——阴性

ICH（传染性犬肝炎病毒）——阴性

CCV（犬冠状病毒）——阴性

弓形虫——阴性

e）心脏功能评估（适用高风险群体）

适用对象：老年犬（≥8岁）、高风险品种（如拳师犬、杜宾犬等）、需深度镇静或麻醉者。

推荐检查：心脏听诊、心电图（ECG）；临床需要时行超声心动图。

评估时机与实施要点：

上述检查宜在治疗前1～2天完成，避免当日集中检查造成患犬应激。

若发现暂不宜治疗的状况（如急性感染、显著肝肾功能异常、可疑肿瘤等），应先处理基础问题，待改善后重新评估。

所有评估结果应作为基线数据存档，用于后续疗效及安全性对比分析。

11.2 犬骨关节病的诊断

11.2.1 诊断参考标准

应符合中国兽医协会印发《犬骨关节炎诊断分期与治疗专家共识（2026 版）》的诊断方法。

11.2.2 早期癌症筛查

在确诊犬骨关节病并考虑间充质干细胞治疗前，应对患犬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 犬骨关节病的治疗方法

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犬，如病情允许，应在注射前至少7 d停药或减量。因基础疾病应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。

11.3.1 细胞注射剂量：（1~10）× 106个/关节，关节腔内注射。

11.3.2 细胞注射次数：根据COAST评级，早期骨关节病患犬（COAST 1-2期），移植1 次，若四周效果不明显，再注射1次 ，宜使用2次，具体移植次数和治疗疗程要根据病情及疗效评估结果确定；中度重度骨关节病患犬（COAST 3-4期），初始治疗移植1次，宜间隔4-6周后进行第2次注射，单次疗程最多使用3次，具体移植次数和治疗疗程要根据病情及疗效评估结果确定。

11.3.3联合用药：干细胞治疗可作为综合管理方案的一部分，与体重管理、运动康复、环境改造等措施联合应用。在治疗初期，可根据疼痛评估情况继续使用或逐步减少非甾体抗炎药的剂量。

11.3.4 细胞注射方法：使用前轻轻旋转，以确保内容物充分混合，使用23G注射器抽吸细胞悬液。所有操作均在严格无菌原则下，患宠于全身镇静或麻醉后标准摆位，患肢关节周围剃毛标准消毒后，铺设好无菌创单，关节维持半屈曲状态以最大化关节间隙。采用 22G 尺寸（25 mm）穿刺针，垂直皮肤刺入关节腔。穿刺过程中施加负压抽吸，当针管尾端见清亮滑液溢出时，确认为关节腔内。若抽出血液，则需调整进针方向或深度。确认位置无误后，连接装有干细胞悬液的注射器，缓慢推注。推注时应无明显阻力，若遇较大阻力（提示误入脂肪垫或关节囊组织），需重新调整位置。

11.4 犬骨关节病的治疗疗效评估

宜在治疗前及治疗后第1、3、6、12个月进行系统评估，评估内容包括：

a）宠主评估：使用COAST体系中的宠主问卷、犬简明疼痛量表（CBPI）或利物浦犬骨关节炎问卷（LOAD）评估患犬在家中的活动能力、行为和舒适度变化。

b）兽医评估：进行COAST体系中的兽医部分评估，包括静态姿势、步态分析、骨科检查（疼痛反应、关节活动范围）、患肢肌肉量变化等。

c）影像学评估：定期复查X射线或者CT检查，以监测关节结构（如骨赘、关节间隙）的长期变化。并且参照骨关节炎Kelgren-Lawrence评分系统记录评分。

d）炎症因子检测：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

犬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犬医疗档案中，包括发生时间、临床表现、严重程度、处置措施及转归。

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、触诊皮温升高或轻微跛行（负重减轻），但患犬仍可行走，可自主站立，不影响日常室内活动及短距离散步。全身状态平稳，体温正常（<39.0 ℃），精神及食欲无显著变化。

监测要求：注射后于医院观察至少1 h，确认无急性过敏反应后方可离院；由宠主于注射后24 h、48 h接受电话或视频随访，反馈患肢状态及活动情况。

处置措施：无需特殊药物治疗。宜将患犬于笼内或小范围区域内静养，限制跑跳、爬楼梯及长时间遛行，可使用伊丽莎白圈防止舔舐注射部位。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内局部冷敷（每次10～15分钟，每日2～3次）以缓解不适。

11.5.2 中度不良反应（需干预的关节病症反应）

临床表现：注射关节明显肿胀、关节腔积液增多、跛行严重（负重显著减少或呈跳跃式步态，患肢抬起频率增加），患犬抗拒患肢着地或触碰，可能伴有体温轻度至中度升高（39.0 ℃~39.5 ℃），精神沉郁、食欲减退，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（可采用视觉模拟评分或步态分析系统）、疼痛评分及全身状况。采集血常规、C反应蛋白（CRP）及关节液进行细胞学和细菌学检查，以鉴别非感染性炎性反应与感染性关节病。

处置措施：

a）关节腔内积液过多引起明显肿胀及疼痛者，可行无菌关节穿刺减压，并将抽吸液送检（细胞学计数、分类及细菌培养）；

b）可使用非甾体抗炎药（NSAIDs，如卡洛芬、美洛昔康等）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，注意监测肝肾功能及消化道安全性；

c）若关节液检查提示感染迹象（如中性粒细胞显著升高、细胞总数>50,000/μL、细菌培养阳性），应立即按照11.5.3处理；

d）加强患犬护理，置于安静舒适的笼舍内休息，使用软垫减少关节受压，减少应激，确保饮水充足。

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、局部皮肤发红发热、全身发热≥39.7 ℃、关节液呈脓性或血性）；

b）全身性过敏反应（如急性荨麻疹、面部或眼睑水肿、呼吸困难、黏膜发绀、心动过速、呕吐腹泻、虚脱或意识障碍等）。

紧急处置流程：

a）立即停止所有操作，保持患犬静卧或侧卧保定，确保气道通畅，必要时给予吸氧；

b）建立静脉通路，按急救规程静脉注射抗组胺药（如苯海拉明）、糖皮质激素（如地塞米松）或肾上腺素（针对严重过敏反应，按0.01 mg/kg静脉或肌内注射）；

c）怀疑化脓性关节炎者，应立即在镇静或麻醉下行关节腔灌洗（无菌生理盐水或含抗生素溶液反复冲洗），并全身性使用广谱抗生素（初选方案应覆盖革兰氏阳性菌和阴性菌，如头孢类或阿莫西林克拉维酸钾）；

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，抗生素疗程通常需持续4~6周；

e）对于过敏反应或病情危重者，应持续监测心肺功能、血压及血氧饱和度，必要时转诊至具备ICU条件的动物转诊中心。

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

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，记录内容应包含注射日期、细胞制品批号、注射部位、不良反应发生时间及具体表现，作为患犬医疗档案的永久组成部分。对于中度和重度不良反应，应在事件发生后14 d及30 d进行追踪随访（电话或复诊），记录患犬关节功能恢复情况、有无后遗症（如关节强直、持续性跛行或软骨损伤等），并评估整体治疗效果与安全性。

附件：
附录A：供体犬评估与筛选，犬组织样品采集和运输标准
附录B：细胞存活率检测，细胞计数法
附录C：细胞标志蛋白检测，流式细胞法
附录D：诱导IDO 表达检测，PCR 法
附录E：抑制T 细胞增殖检测，CFSE 标记法
附录F：抑制T 细胞分泌IFN-γ、TNF-α检测胞内因子染色法
附录G：成骨分化检测，茜素红S 染色法
附录H：成脂分化检测，油红O 染色法
附录I：成软骨分化检测，阿尔新蓝染色法
附录J：成瘤性检测，免疫缺陷小鼠检测法

中国兽药协会

附 录 A
（规范性）
供体犬评估与筛选，犬组织样品采集和运输标准

A.1 供体犬筛选标准

A.1.1 供体犬年龄应不大于5岁（60个月），以确保供体犬没有出现明显衰老迹象。

A.1.2 健康状况筛查：供体犬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（至少包含犬瘟热、犬细小和狂犬病疫苗），并且检测真菌、细菌、病毒、支原体、内毒素、犬瘟热病毒（CDV）、犬细小病毒（CPV）、狂犬病病毒（RV）、ICH（传染性犬肝炎病毒）、CCV（犬冠状病毒）、弓形虫阴性，确保没有潜在的遗传或者传染疾病。

A.1.3 品种和遗传背景：供体犬的品种信息和遗传背景应当有完整记录，以排除潜在的遗传风险或疾病。

A.1.4 心理和行为特征筛查：供体犬应具有良好的心理和行为特征。挑选脾气稳定、友好且适应新环境的犬作为供体，以减少在组织采集和实验过程中的应激和不适感。

A.2 犬组织采集方法

A.2.1 用于干细胞分离的犬组织的采集应获得当地动物福利和伦理委员会的批准。

A.2.2 麻醉与镇定：使用合适的麻醉方法，确保供体犬在组织采集过程中没有疼痛或者不适感。

A.2.3 组织采集技术：根据目的间充质干细胞来源的不同，选择合适的组织采集方法，例如用手术采集皮下脂肪，用手术或从产后废弃器官组织中采集脐带。采集全程遵循无菌原则，使用一次性无菌器械，每只供体犬更换一套。

A.2.4 供体犬术后护理：术后应对供体犬进行体温、行为和身体状况等监测；伤口需定期清洁和更换包扎，避免犬舔舐或咬伤；遵循适当的疼痛管理计划，包括使用合适的镇痛药物；为供体犬提供干净舒适的环境、清洁的饮水和易消化的食物，以确保其快速恢复和动物福利。

A.3 犬组织运输和交接标准

A.3.1 犬组织运输条件：应将组织置于大小合适的无菌容器中，并使用适当的缓冲溶液保存。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间充质干细胞分离。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，并记录运输过程中的温度曲线。

A.3.2 交接标准：制定详细的交接文件，记录犬的身份信息、健康状况、组织类型、采集日期、过程和采集人信息等。

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18.2 MQ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。如果高于200个细胞，则需要进行稀释。

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 细胞存活率计算

B.4 计算与分析

细胞存活率按式（B.1）进行计算：

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

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.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）
细胞标志蛋白检测流式细胞法

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 7.4。

C.2.2 牛血清白蛋白（BSA）：纯度≥98%。

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

注： 若选用人源或鼠源抗体， 应将人源或鼠源抗原序列进行比对，确定其与犬源抗原序列相似度在95%以上方可用于鉴定犬间充质干细胞。

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。

中国兽药协会

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，计算犬间充质干细胞悬液活细胞浓度。按（1×105～4×105）细胞/cm2接种，在犬间充质干细胞培养体系中添加IFN-γ（10 ng/mL～30 ng/mL），正常培养12 h～36 h。同时设立未使用IFN-γ处理的犬间充质干细胞为对照组，培养同样时间。

D.3.2 犬间充质干细胞总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）获得犬间充质干细胞cDNA。使用犬IDO1特异性引物（IDO1F-5′-CCCAACTCTAGGGACCCTTC-3′；IDO1-R5′-CAGATCCATGGAGGAAGGAA-3′）在以下反应条件下进行IDO基因扩增：95℃-2分钟，95℃-15秒（40个循环），55℃-30秒（40个循环），72℃-30s（40个循环）。

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处理的犬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。

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），分离犬外周血单核细胞（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5×107细胞/mL，用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 细胞与犬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）计算犬T 细胞悬液活细胞浓度，按1×106细胞/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 犬间充质干细胞抑制T细胞增殖

利用0.25%EDTA-胰蛋白酶消化犬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细胞与犬间充质干细胞悬液活细胞浓度。犬间充质干细胞按2×105细胞/mL 接种，细胞贴壁后，将T细胞按5:1（T细胞：犬间充质干细胞）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，用于检测犬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。并计算犬间充质干细胞对T细胞增殖的抑制率。抑制率按式（E.1）进行计算：

$$Y=(A-C)/A\times100\% \quad \cdots\cdots\cdots\cdots\cdots\cdots\cdots\cdots\cdots\cdots\cdots (E.1)$$

式中：

Y — 抑制率；

A — 单独T 细胞（刺激）CFSE 子代细胞的百分比；

C — 与犬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（Saponin）。

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），分离犬外周血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细胞与犬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1×106 细胞/mL 接种培养，培养48 h。结束培养前4 h～6h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-α阳性的T 细胞比例A2。

F.3.2.2 犬间充质干细胞抑制T细胞炎症因子分泌

利用0.25%EDTA-胰蛋白酶消化犬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 细胞与犬间充质干细胞悬液活细胞浓度，犬间充质干细胞按2×105细胞/mL 接种，细胞贴壁后，将T 细胞按5:1（T 细胞：犬间充质干细胞）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），用于检测犬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。并计算犬间充质干细胞对T细胞分泌IFN-γ、TNF-α 的抑制率。

抑制率按式（F.1）和式（F.2）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 — 与犬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 — 与犬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/T6682 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 台盼蓝染色：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）离心收集犬间充质干细胞于离心管中，用无菌磷酸盐缓冲液轻轻重悬细胞，避免形成气泡或者残细胞团块。

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）计算犬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～21d。

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轻重悬细胞，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）计算犬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14d～21d。

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轻重悬细胞，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）计算犬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～21d。

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轻重悬细胞，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）计算犬细胞悬液活细胞浓度。

J.3.2 细胞移植

将1×107 个犬间充质干细胞注射到4 至7 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（犬二倍体细胞）、阳性对照组（犬肿瘤细胞系，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

成瘤率按式（J.1）进行计算：

$$Z=N/M\times100\% \quad \cdots\cdots(J.1)$$

式中：

Z——成瘤率；

M——接种小鼠总数；

N——荷瘤小鼠总数。