

团 体 标 准

T/CI 307—2024

用于疾病治疗的间充质干细胞质量要求

Quality requirements of mesenchymal stem cells for therapy

2024 - 03 - 21 发布

2024 - 03 - 21 实施

## 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 缩略语 .....	3
5 DT-MSCs 的关键质量属性 .....	4
6 DT-MSCs 的标志性生物效力 .....	5
7 DT-MSCs 的微生物学和生物学安全性 .....	8
8 标签、包装、储存和运输 .....	8
9 放行检测报告 .....	8
参考文献 .....	10

## 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。

本文件由北京大学肿瘤医院和殷氏细胞有限公司提出。

本文件由中国国际科技促进会归口。

本文件起草单位：北京大学肿瘤医院、中国科学院生物物理研究所、华研(深圳)再生医学集团有限公司、北京协和医院、山西医科大学第二医院、中国中医科学院广安门医院、成都华西海圻医药科技有限公司、中国人民解放军总医院总医院第六医学中心、哈药集团生物工程有限公司、海南一龄医疗产业发展有限公司、北京亚新海生物医学研究有限公司、北京世研麦森细胞生物科技有限公司、海南经济特区梅赛尔医院有限公司、深圳悦荣生命科学研究有限公司、江苏多源健康生物技术有限公司、源生生物科技(青岛)有限责任公司、山西菩瑞德生物科技有限公司、浙江亚博凯康生物科技有限公司、中关村(黑龙江)未来医学研究院(有限合伙)、北京智能宝生物科技有限公司、北京科美奥康生物医学研究院有限公司、山东省医药生物技术研究中心、赛尔斯(山东)生物工程有限公司、山东殷氏干细胞有限公司、山东华奥生物工程有限公司、西安国际医学中心医院、海南玖诺生物科技有限公司。

本文件主要起草人：殷勤伟、武兆刚、朱军、姬广聚、王珊珊、韩冰、王宏伟、李光熙、王莉、沈建良、马真艳、王春亮、魏寒涛、秦瑞习、吴坚美、张雪亭、赵立明、周洁琼、苏学明、李志刚、韩博名、黄浩、丁伟、黄兵、柏雪峰、贾战生、周滨。

## 引 言

由于间充质干细胞(Mesenchymal Stem/Stromal Cell, MSC)广泛分布在人体的不同器官和组织中,它们具有异质性和属性安全、免疫原性较低、不会自成肿瘤等优点;通过规范的体外培养和严格检测,可回输人体用来修复、改善和解决多种健康问题。随着干细胞技术的不断发展,间充质干细胞由于其强大的旁分泌调节功能和多向分化潜能已被作为一种细胞疗法,正在逐步用于多种疾病的干预和治疗,所以如何驯化赋能出具有针对不同适应症的高效异质的MSCs是治疗不同疾病的关键。

间充质干细胞具有发育程序性衰老的特点,随着年龄的增长,间充质干细胞(MSC)的数量和增殖分化能力出现明显的下降。因此,很容易理解为何新生儿组织(包括脐带、羊膜、胎盘等组织)来源的MSCs更为年轻或新生儿组织含有更多的年轻活力的MSCs。与成人组织(包括成年人骨髓、脂肪、宫内膜、牙髓等)来源的BM-MSCs、AD-MSCs、EM-MSCs和DP-MSCs相比,这些年轻的MSCs具有更强的增殖和分化能力。再者,MSC易受微环境的影响,来自患者如自身免疫性疾病和糖尿病的MSCs常表现出较弱的增殖和分化能力。此外,体外培养的MSCs也出现复制性衰老,当回输入人体后还会出现对体内环境的不适应:易被体内的免疫细胞清除,不易出血管、易凋亡等问题。

本文件是为了避免上述MSCs的种种不利因素,更好地发挥其独特的异质性,将其更有效地用于人体健康养护、抗衰和不同疾病的治疗而制定的。

# 用于疾病治疗的间充质干细胞质量要求

## 1 范围

本文件规定了用于疾病治疗的人体间充质干细胞（MSCs）的关键生物学性质、生物效力、安全性、标签、包装、储存、运输、检测报告的要求，界定了是否是优质MSCs的指标，给出了鉴定MSCs有无复制性衰老的基本参数，提供了用于特定适应症MSCs的基本质量要求。

本文件适用于疾病治疗的人体间充质干细胞及其制品的研发、生产和临床应用。

## 2 规范性引用文件

本文件没有规范性引用文件。

## 3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

### 3.1

**干细胞 stem cell**

具有自我复制能力的多潜能细胞，在一定条件下可分化成多种功能细胞。

### 3.2

**间充质干细胞 mesenchymal stem cell (MSC)**

一类存在于多种组织（如骨髓、脐带血、脐带组织、胎盘组织和脂肪组织等），具有一定的自我复制更新和多向分化潜能的干细胞，可以为邻近的组织器官提供组织修复和营养支持，并具有免疫调节作用。

### 3.3

**分化能力 differentiation potential**

在体外特定诱导分化培养条件下，细胞向多种预设目标细胞分化的功能。

### 3.4

**细胞表面标志物 cell surface marker**

细胞膜表面上特异性表达的标志性蛋白和分子。

### 3.5

**细胞存活率 cell survival rate**

在细胞群体中总有一些因各种原因而死亡的细胞，总细胞中活细胞所占的百分比。

### 3.6

**MSC的异质性 MSC heterogeneity**

体外培养的MSCs在细胞形态、表面标志、分化潜能和分泌物等方面表现出不均一的特征。

### 3.7

**复制性衰老 replicative senescence**

细胞遗传物质复制和细胞分裂能力有限，在经过有限次数的复制和分裂后，细胞发生形态和结构的显著变化并逐渐失去复制和分裂的能力。

### 3.8

**免疫抑制 immunosuppression**

对于免疫应答的抑制作用，通过抑制与免疫反应有关细胞（T细胞、B细胞、NK细胞、巨噬细胞等）的增殖、分化和成熟等功能，来降低免疫反应。

### 3.9

**细胞群体倍增时间 population doubling time (PDT)**

细胞在培养条件下生长时其数目倍增所需的时间。

## 3.10

**抗炎作用 anti-inflammatory effect**

通过特异地抑制或拮抗一种或几种炎症介质和相关的活性物质,达到减轻炎症反应和其对组织细胞损伤的效果。

## 3.11

**组织修复 tissue repair**

局部组织和细胞因致病因素导致损伤和死亡后,由邻近健康细胞迁移再生来修补顶替,以恢复组织完整性的过程称为组织修复。

## 3.12

**纤维化 fibrosis**

可发生于多种器官,主要病理改变为器官组织内纤维结缔组织增多,实质细胞减少,持续进展可致器官结构破坏和功能减退。

## 3.13

**核质比 karyoplasmic ratio**

一个细胞的核与细胞质在量(容积)上的比例。

## 3.14

**MSC 归巢 MSC homing**

在多种因素的作用下, MSC能定向趋向性迁移,越过血管内皮细胞至靶向组织并定植存活的过程。

## 3.15

**细胞凋亡 apoptosis**

为维持内环境稳定,由基因控制的细胞自主的有序死亡。

## 3.16

**活性氧 reactive oxygen species (ROS)**

体内一类氧的单电子还原产物,是电子在未能传递到末端氧化酶之前漏出呼吸链并消耗大约2%的氧生成的。

注:包括氧的一电子还原产物超氧阴离子( $O_2^{\cdot-}$ )、二电子还原产物过氧化氢( $H_2O_2$ )、三电子还原产物羟基自由基( $\cdot OH$ )以及一氧化氮等。

## 3.17

**外泌体 exosome**

包含了多种RNA分子和蛋白质的双层质膜小囊泡,直径在30 nm~150 nm,具有其来源细胞的相似调节功能。

## 3.18

**核型 karyotype**

一个体细胞中的全部染色体在有丝分裂中期,按其大小、形态特征(着丝粒的位置)顺序排列所构成的图型。

## 3.19

**集落 colony**

将细胞以极低密度接种培养一段时间后,由单个细胞生长分裂形成由大于50个细胞聚集的细胞克隆。

## 3.20

**成瘤性 tumorigenicity**

细胞接种到免疫缺陷动物体内后在注射部位和(或)转移部位由接种细胞所形成肿瘤的能力。

## 3.21

**高表达 high expression**

与用10%FBS培养的第一代MSCs比较,细胞因子和/或其它相关分子的表达量明显升高,  $p$ 值 $<0.05$ 。

## 3.22

**低表达 low expression**

与用10%FBS培养的第一代MSCs比较,细胞因子和/或其它相关分子的表达量明显降低,  $p$ 值 $<0.05$ 。

## 3.23

**无血清和无异种蛋白培养基 serum-free and xeno-free media**

一种无血清、不含异种蛋白、化学性质明确的培养基，富含多种促间充质干细胞增殖和分化的细胞因子、化学因子和调节分子，具有更高的生物活性和安全性。

### 3.24

#### 细胞因子 cytokine (CK)

由免疫细胞和一些非免疫细胞经刺激而合成、分泌的一类具有广泛生物学活性的小分子蛋白质，通过结合相应受体可调控免疫应答、血细胞生成、细胞生长和损伤组织的修复等。

## 4 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

AM-MSc: 羊膜间充质干细胞 (Amniotic Mesenchymal Stem/Stromal Cell)

Ang-1/II: 血管生成素1/2 (Angiopoietin-1/II)

AP LL-37: 抗菌肽LL-37 (Antibacterial peptide LL-37)

ASK1: 凋亡信号调节激酶1 (Apoptosis signal-regulating kinase 1)

BDNF: 脑源神经营养因子 (Brain-derived neurotrophic factor)

CD: 细胞膜表面分化抗原簇 (Cluster of Differentiation)

C/EBPb: 普通转录因子c/ebpb (CCAAT/enhancer binding protein b)

CMV: 巨细胞病毒 (cytomegalovirus)

CNTF: 睫状神经营养因子 (Ciliary neurotrophic factor)

COX-2: 环氧酶-2 (Cyclooxygenase-2)

CXCR4: CXC化学受体4 (CXC chemokine receptor 4)

CXCR7: CXC化学受体7 (CXC chemokine receptor 7)

DT-MSCs: 用于疾病治疗的MSCs (Disease treatment mesenchymal stem cells)

EBV: 人类疱疹病毒4型 (Epstein-Barr virus)

EGF: 表皮细胞生长因子 (Epidermal growth factor)

FBS: 胎牛血清 (Fetal bovine serum)

GDNF: 胶质来源的神经营养因子 (Glial-derived neurotrophic factor)

GSH: 谷胱甘肽 (antioxidant glutathione)

Gpx: 谷胱甘肽过氧化酶 (glutathione peroxidase)

HGF: 肝细胞生长因子 (Hepatocyte growth factor)

HIF-1: 低氧诱导因子-1 (Hypoxia-inducible factor-1)

HIV-1/II: 1/II型人类免疫缺陷病毒 (Human Immunodeficiency Virus, HIV)

HLA-G5: 人白细胞抗原G5 (Human leukocyte antigen-G5)

HMOX1: 血红素加氧酶-1 (Hemeoxygenase-1)

HO-1: 血红素加氧酶-1 (Heme oxygenase-1)

HSP70: 热休克蛋白70 (heat-shock protein 70)

HTLV: 人类嗜T细胞病毒 (human T-lymphotropic virus)

IDO: 吲哚胺-2,3-双加氧酶 (Indoleamine-2,3-dioxygenase)

IFITM: 干扰素诱导跨膜蛋白 (Interferon-Induced Transmembrane Protein)

IGF-1: 胰岛素样生长因子1 (Insulin like growth factor 1)

IL-1ra: 白介素1受体拮抗剂 (IL-1 receptor antagonist)

IL-10: 白介素10 (Interleukin-10)

KGF: 角质细胞生长因子 (Keratinocyte growth factor)

KRIT1: Krev/Rap1相互作用陷阱-1 (Krev/Rap1 interaction Trapped-1)

MEF2: 肌增强子2 (myogenic enhancer factor 2)

MFGE-8: 乳脂肪球表皮生长因子-8 (Milk-fat globule epidermal growth factor-8)

MMP-2: 基质金属蛋白酶2 (Matrix metalloproteinase-2)

MMP-9: 基质金属蛋白酶9 (Matrix metalloproteinase-9)

NFE2L2: 核因子红系2相关因子2 (Nuclear factor erythroid 2-related factor 2)

NO: 氧化氮 (Nitric oxide)  
 NPB: 核质桥 (Nucleoplasmic bridges)  
 PD-L1: 程序性细胞死亡配体1 (Ligands for programmed cell death 1)  
 PGE2: 前列腺素E2 ( Prostaglandin E2)  
 PTGS2: 前列腺素内过氧化物合酶2 (Prostaglandin-endoperoxide synthase 2)  
 SA- $\beta$ -gal: 衰老相关的 $\beta$ -半乳糖苷酶 (Senescence-associated- $\beta$ -galactosidase)  
 SAHF: 衰老相关的异染色质位点 (Senescence associated heterochromatic foci)  
 SASP: 衰老相关的分泌型 (Senescence associated secretory phenotype)  
 SOD: 超氧化物歧化酶 (Superoxide dismutase)  
 STC1/II: 斯钙素1/2 (Stanniocalcin-1/II)  
 TGF- $\beta$ : 转化生长因子- $\beta$  (Transforming growth factor- $\beta$ )  
 TIMP-1: 基质金属蛋白酶抑制剂-1 (Tissue inhibitor of metalloproteinase-1)  
 TP: 梅毒螺旋体 (Treponemipallidum)  
 TRX: 硫氧还蛋白 (Thioredoxin)  
 TSG6: TNF- $\alpha$  诱导蛋白6 (TNF- $\alpha$ -induced protein 6)

## 5 DT-MSCs 的关键质量属性

### 5.1 MSCs 质量控制和临床治疗的关系

MSCs的基本生物学特性应包括细胞的形态、结构、功能和生命活动，它涉及显微、亚显微和分子水平的不同层次。用无血清和无异种蛋白培养基培养的DT-MSCs和其它用途的P1代MSCs相比，在下述生物学特性方面须等同或优于后者。高质量的DT-MSCs是确保临床治疗安全和有效的关键所在。

### 5.2 细胞形态、大小和生长方式

贴壁状态下为短棒形或小梭形，悬浮状态下细胞呈圆形；根据悬浮状态下细胞的直径大小，可分为 $10\mu\text{m} \leq$ 优良群 $\leq 16\mu\text{m}$ 、 $16\mu\text{m} <$ 合格群 $\leq 21\mu\text{m}$  和不合格群（大于 $21\mu\text{m}$ ）；每群细胞总数的95%应处于相应范围内。体外培养的MSCs形态均一、呈螺旋样生长。

### 5.3 细胞核质比

应有一个圆形而光滑的细胞核，核质比应大于1。

### 5.4 细胞存活率

应符合以下要求：

- 细胞制品制备完成时，细胞存活率 $\geq 99\%$ ；
- 细胞制品从制备完成到使用前， $2^{\circ}\text{C} \sim 6^{\circ}\text{C}$ 环境下保存12小时内，细胞存活率 $\geq 95\%$ ；
- 细胞制品从制备完成到使用前， $18^{\circ}\text{C} \sim 25^{\circ}\text{C}$ 环境下保存4小时内，细胞存活率 $\geq 95\%$ ；
- 细胞冷冻复苏后的存活率 $\geq 90\%$ 。

### 5.5 细胞群体倍增时间

$18\text{h} \leq$ 优良群 $\leq 26\text{h}$ ， $26\text{h} <$ 合格群 $\leq 32\text{h}$ ， $32\text{h} <$ 不合格群。

### 5.6 细胞标志物

MSCs 阳性、阴性和干性标志物如下：

- 通用阳性表面标志物群，包括但不限于 CD29、CD73、CD90、CD105、CD44、CD166，阳性率 $\geq 99\%$ ；
- 阴性表面标志物群，包括但不限于 CD11b、CD14、CD19、CD79a、CD34、CD45、CD31、CD80 和 CD86，阳性率 $\leq 1\%$ ；
- 特殊基因表型和表面标志物包括但不限于 SSEA-4、SCA-1、PDGFR $\alpha$ 、STRO-1、CD271 和 CD146 表达阳性。

## 5.7 免疫表型

在正常稳态条件下，MSC可表达MHC-I型抗原如HLA-ABC，而HLA-DR < 2%。

## 5.8 染色体核型

染色体核型应为46, XX或46, XY；无缺失、重复、倒位、易位等结构异常。

## 5.9 无细胞衰老特征

与P1代细胞相比，下述反映衰老的指标变化不明显，最大变化值不得大于5%：

- a) 细胞体积增大、形态各异、群体倍增时间增加；
- b) *p53*、*p21* 和 *p16* 基因高表达；
- c) 小于 5%的细胞具有  $\beta$ -半乳糖苷酶活性或核内 Prelamin A 堆积；
- d) 小于 5%的细胞具有  $\gamma$ H2AX 和 53BP1 等 DNA 损伤标志物；
- e) 表达 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、MMP-3、IL-8、IL-12、MCP-1/2；
- f) 表达 miR-155-5p、miR-29c-3p 或 miR-495；
- g) 脂褐质 (lipofuscin) 增多；
- h) 低表达与自噬功能相关的 LC3B、ATG12-5、Beclin-1；
- i) 低表达 DNMT1 和 DNMT3B；
- j) 低表达 CD134 和 CD264。

## 5.10 细胞周期

细胞周期中处于G0/G1期和S期的DT-MSCs应 $\leq$ 90%，而处于G2/M期的应 $\geq$ 10%。

## 5.11 集落形成

DT-MSCs的集落形成率 $\geq$ 15%。

## 5.12 遗传稳定性

5.12.1 培养至 10 代，未出现染色体异常，未出现 NPB 增多。

5.12.2 培养至 20 代，在体外长期扩增中不/低表达肿瘤细胞相关的 Meflin、TGF- $\beta$  和 BMP 表型。

## 5.13 线粒体和活性氧

5.13.1 线粒体应符合 2 大特征要求，即正常的膜电位（MMP 检测线粒体中 m-MPI 为红色荧光）和 ROS 低含量。

5.13.2 miR-21 和 miR-155-5p 低表达，KRIT1、NFE2L2、SOD1/2、HMOX1 和 KRIT1 高表达。

## 5.14 细胞株鉴定

人源短串联重复序列（STR）图谱分析应为单一细胞来源。

## 6 DT-MSCs 的标志性生物效力

### 6.1 MSCs 的生物效力和疾病治疗的关系

间充质干细胞治疗的工作原理主要包括两个方面：其一，干细胞可以分化成不同功能的细胞，它们可以再生填补组织器官中丢失和死亡的原有功能细胞；其二，MSCs可以合成和分泌多种不同形式的囊泡和分子，刺激原有干细胞的分化，修复病变和受损的细胞。因此，为了获得临床疗效，在治疗不同适应症时，要求所用的DT-MSCs与P1代的MSCs相比，应表达特征性基因和具有相应的生物学效力。

### 6.2 分化潜能

用于不同适应症的MSCs应具有多谱系分化潜能，可分化为相应的前体细胞，如骨、软骨、肝脏、神经、肌肉、脂肪、血管和上皮细胞等前体细胞，其分化标志物如下：

- a) 如分化为成骨细胞，应能表达 *RUNX1/2*、*Sp7/Osterix*、*BMP2/4*、*Msx2*、miR-21、miR-342-3p、miR-196a-5p 和 miR-210，或其它特征性基因；

- b) 如分化为软骨细胞, 应能表达 *SOX9*、*PTHrP*、miR-381-3p 或其它特征性基因;
- c) 如分化为肌母细胞, 应能表达 *MEF2*、 $\alpha$ -sarcomeric actin、*CD105+*、miR-23a、miR-125b、miR-1 和 miR-206p 或其它特征性基因;
- d) 如分化为脂肪细胞, 应能表达 *PPAR $\gamma$* 、*CCAAT*/增强子结合蛋白-a、miR-103、miR-107、miR-143 或其它特征性基因;
- e) 如分化为上皮细胞, 应能表达 *CK-19*、*CK-5*、*CCSP-26* 和 *SP-C*、miR-200 或其它特征性基因;
- f) 如分化为内皮细胞, 应能表达 *CD31*、*VWF*、和 *eNOS*、miR-126、miR-342-3p、miR-377 或其它特征性基因。

### 6.3 自我更新能力

6.3.1 应表达 *NANOG*、*SOX-2*、*OCT4*、*SSEA-4*、*KLF4*、*TERT* 或其它多能干性基因。

6.3.2 应表达 miR-486-5p、miR-10a-5p 或其它标志性 miRNAs。

### 6.4 合成和分泌外泌体的能力

分泌的外泌体特征应符合表1要求。

表1 外泌体特征

指标	要求
浓度	4~8×10 <sup>11</sup> 个/ml
大小	30 nm~150 nm
密度	1.13 g/ml~1.19 g/ml
标志蛋白	CD63+、CD81+、CD73+ (FACS阳性率≥10-15%)、Alix 和TSG101
表型	CD9+、CD29+、CD44+、CD 49e+、CD63+、CD81+、CD105+、MCSP+、CD14-、CD19-、CD34-、CD45-、CD142-、MHC-I/II-
表达标志性 miRNAs 和蛋白质	let7、miR-10b-5p、miR-21、miR-23a-3p、miR-34、miR-221/222、miR-486-5p 和/或其它标志性蛋白质
注：“+”代表阳性，“-”代表阴性。	

### 6.5 趋化/归巢能力

6.5.1 应能高表达 *CCR1/3-7*、*CXCR2/4-7*、*CXCL2*、*CXCL5-10*；*MMP1/2* (gelatinase A)、*MMP8/9*、*TIMP-2*、*PDGF-AB*、*IGF-1*、*RANTES*、*MDC*、*SDF-1*。

6.5.2 应具有高表达 miR-21、miR-124、miR-150、miR-210 或其它标志性 miRNAs 的能力。

### 6.6 抗细胞凋亡能力

6.6.1 应具有过氧化氢酶、HO-1、HIF-1 $\alpha$ 、BCL2、BAX、IGF-1、FGF-b、HGF、GDNF、VEGF、GM-CSF、STC1/2、TIMP3 和线粒体运载蛋白 Miro1 的表达能力。

6.6.2 应具有高表达 miR-301a、miR-24、miR-221/222、miR-210 或其它标志性 miRNAs 的能力。

### 6.7 抵抗微生物的能力

应具有高表达 *Lipocalin2*、*IFI6*、*PMAIP1*、*ISG15*、*SAT1*、defensins、cystatin C、elafin 和 cathelicidin 的能力。

### 6.8 抗炎作用/能力

6.8.1 应具有合成和分泌抗炎蛋白 TSG6、IL-1ra、PGE2、STC1、TNFR1、HGF、和 IL-10 的能力。

6.8.2 应有分泌 miR-223、miR-181b、miR-21a-5p、miR-146a、miR-124 或其它标志性 miRNAs 的能力。

6.8.3 应能诱导 CD68+F4/80+M0 或 CD14+ CD80+ M1 型巨噬细胞转变成 CD206+CD86+M2 型, 增加 M2/M1 的比值, 高表达 Ym-1+ 或 SPHK1 和 LIGHT 蛋白。

### 6.9 抗纤维化能力

6.9.1 应具有 HGF、FGF-b、MPP-1、3、9/14、STC1、MFGE-8、IL-10、TRX 和 PGE2 的高表达能力。

6.9.2 应具有下调 TGF- $\beta$  1、Smad2/3 和 TIMP1/2 和 Snail 等蛋白的表达能力。

6.9.3 应具有 miR-21-5p、miR-23、miR-34a-5p、miR-27b、miR-148a-5p、miR-335-5p、miR-29b-3p 或其它标志性分子的高表达能力。

#### 6.10 抗氧化能力

应具有Nrf1/2、C/EBPb、NFE2L2、SOD1/2、HMOX1、HO-1、catalase (CAT)、sirtuin (SIRT)、GSH、Gpx、HSP70、STC1、miR-29a-3p、miR-210、miR-27a、miR-146a 或其它标志性分子的高表达能力。

#### 6.11 免疫抑制/调节能力

6.11.1 应高表达 PGE2、IDO、KYN、COX-2、IL-10、TGF- $\beta$ 1、NO、HLA-G5、HLA-E、ICAM-1、VCAM1、B7-H1、Hmox1、galectin-1、PD-L1、PD-L2 或其它标志性分子。

6.11.2 应能分泌 miR-146a-5p、miR-21、miR-34a、miR-155 和/或 miR-181a。

6.11.3 应能抑制树突细胞的激活和成熟，抑制 T/Th17 和 B 细胞的增殖和分化，抑制 NK 细胞的激活和细胞毒性，诱导 Treg 扩增。

6.11.4 抑制 NK 细胞合成 perforin 和 TNF- $\alpha$ ，抑制 B 细胞合成 Blimp-1 和生产 IgM、IgG、IgA。

#### 6.12 血管再生能力

6.12.1 应具有 bFGF、HGF、MCP1、PIGF、Ang-1/2、angiostatin、TGF- $\beta$ 2、VEGF-D、GM-CSF、CXCL5 和 IL-8 的高表达能力。

6.12.2 应具有 miR-210、miR-499a-3p、miR-132 和 miR-126、miR-100 或其它标志性分子的高表达能力。

#### 6.13 组织再生和修复能力

DT-MSCs用于不同组织再生和修复时，应具有相应的标志分子的合成和分泌能力：

- a) 用于神经组织再生和修复，应表达 BDNF、CNTF、VEGF、GDNF、FGF20、NGF、CD49d、miR-24、miR-23a、miR-146a；miR-199a-3p、miR-145-5p、miR-21 或其它标志性分子；
- b) 用于肺组织再生和修复，应分泌 KGF、HGF、EGF、HO-1、NO、Ang-1、miR-451、miR-146a、miR-26a、miR-124 或其它标志性分子；
- c) 用于肾组织再生和修复，应分泌 IGF-1、IGFR-1、GDNF、VEGF、IL10 和 miR-let7c、miR-21、miR-145 和 miR-146a 或其它标志性分子；
- d) 用于肝组织再生和修复，应分泌 HGF、VEGF、IL-10、MMP9/13、MFGE-8、KGF、miR-1246、miR-26a、miR-122 或其它标志性分子；
- e) 用于心肌再生和修复，应分泌 VEGF、HGF、Ang-I、FGF-b、G-CSF、miR-223、miR-210、miR-24、miR-19a 或其它标志性分子；
- f) 用于软骨修复和再生，应分泌 IL-10、TSG、PGE2、miR-145、miR-140、miR-340-5p、miR-29b-3p、miR-26a 或其它标志性分子；
- g) 用于皮肤修复和再生，应分泌和 KGF、TIMP、ICAM、collagens、elastin、laminin、HGF、miR-100、miR-106a、miR-146a、miR-20a、miR-181a、miR-21-5p、miR-155 或其它标志性分子；
- h) 用于肌肉和肌腱组织再生和修复，应分泌 miR-29a、miR-140-5p、miR-21、miR-1、miR-133、miR-206 或其它标志性分子。

#### 6.14 抗衰老能力

6.14.1 应能分泌 miR-17-5p、miR-21、miR-29a、miR-100-5p、miR-126-3p 或其它标志性 miRNA。

6.14.2 抑制靶细胞合成 SASP 如 IL-6、IL-6R、REL、IL-1 $\beta$ 、REL-A，减少自由基和过氧化物，保护线粒体的稳态，下调 PTEN、p53、IGF-1R、p21 和 p16 的表达，刺激生长因子如 GDF11 表达、延长端粒和防止靶细胞的凋亡。

#### 6.15 抗肿瘤能力

应能高表达和分泌标志性蛋白分子如：IL12、IFN- $\alpha$ 、CXCL10、LAP、DKK-1/3、TRAIL、TNFSF14、TIMP-1 和TIMP-2。

## 7 DT-MSCs 的微生物和生物学安全性

安全性指标应符合表2要求。

表2 安全性指标

指标		要求
微生物（细菌和真菌）		不得检出
支原体、衣原体和立克次氏体		不得检出
传染病原体	乙肝五项	不得检出
	HCV	不得检出
	TP	不得检出
	HIV-I/II	不得检出
	EBV	不得检出
	HTLV	不得检出
	CMV	不得检出
内毒素		≤0.3EU/ml
成瘤性		免疫缺陷小鼠体内注射3个月不可形成肿瘤
异常毒性		试验动物无肝肾毒性且不可死亡
异常免疫学反应		淋巴细胞亚群CD4+/CD8+T 和B应无异常增殖
残留物	外源DNA残留量	≤100pg
	抗生素	不得检出
	牛血清残留	不得检出
	动物源性胰蛋白酶残留	不得检出
	悬液磷酸盐	不得检出

## 8 标签、包装、储存和运输

### 8.1 标签和编码

8.1.1 成体间充质干细胞制品外包装标签应当包含规格、细胞总量、适用范围、制备日期及时间、有效期、制品批次、制备机构等内容。

8.1.2 异体间充质干细胞除标注上述内容外，还应标注细胞的来源、供体年龄和性别；如果是来源于新生儿组织的间充质干细胞，还应标注新生儿生物学父亲与母亲的年龄。

8.1.3 MSCs 制品的编码中应体现该细胞的编码信息，以便于溯源。

### 8.2 包装

包装材料应符合医用回输袋或硅化镀膜塑料瓶等 I 类医疗器材的要求。

### 8.3 储存

8.3.1 如需长期储存，应放在低于-150℃的液氮环境中。

8.3.2 细胞制品在使用前如需暂时存储，应置于 2℃~6℃下，时间不超过 12 小时。如需要超过 12 小时的长途运输，应放于低于-150℃的液氮环境中。

### 8.4 运输

8.4.1 MSCs 的运输应有全过程的详细记录，包括产品信息、运输条件、方式路径、和时间人员等。

8.4.2 应根据细胞制品的特性选用不易破损的防震保护箱。

8.4.3 应采用冷链运输，温度保持在 2℃~6℃。

8.4.4 运输时间不能超过 12 小时。

## 9 放行检测报告

在满足第5和第6章的先行条件下，用于疾病治疗的间充质干细胞制品或药物应随附检测合格报告，放行检测报告内容应包括：

- a) 规格指标：细胞名称、代次和总量，生产批号和日期；
- b) 生物学特性指标：细胞的形态和大小分布；细胞的活力；细胞表面标志物如 CD44、CXCR4、CD73、CD105、CD142、CD47、CD166、HLA-ABC 和 HLA-Dr； $\beta$ -半乳糖苷酶、ROS 和 NPB；
- c) 适应症相关的生物效力指标：3-5 项；
- d) 安全指标：按照第 7 章要求执行。

全国团体标准信息平台

## 参 考 文 献

- [1] GB/T 42466-2023 生物样本库多能干细胞管理技术规范
- [2] 中华人民共和国药典：2020年版. 四部
- [3] ISSCR. Guidelines for Stem Cell Research and Clinical Translation: Supporting development of safe and efficacious stem cell-based interventions. 2021
- [4] Dominici, M. et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 2006, 8:315 - 317
- [5] Yin JQ, Zhu J, and Ankrum JA. Manufacturing of primed mesenchymal stromal cells for therapy. *Nat Biomed Eng.* 2019 Feb, 3(2):90-104
- [6] Bravery, C. A. et al. Potency assay development for cellular therapy products: an ISCT review of the requirements and experiences in the industry. *Cytotherapy* 15, 9 - 19 (2013)
- [7] Lee, R. H. et al. Intravenous hMSCs Improve Myocardial Infarction in Mice because Cells Embolized in Lung Are Activated to Secrete the Anti-inflammatory Protein TSG-6. *5*, 54 - 63 (2009)
- [8] Block, T. J. et al. Restoring the quantity and quality of elderly human mesenchymal stem cells for autologous cell-based therapies. *Stem Cell Res Ther* 8, 239 (2017)
- [9] Sun, Y. et al. Rescuing replication and osteogenesis of aged mesenchymal stem cells by exposure to a young extracellular matrix. *The FASEB Journal* 25, 1474 - 1485 (2011)
- [10] Klinker, M. W., Marklein, R. A., Surdo, Lo, J. L., Wei, C.-H. & Bauer, S. R. Morphological features of IFN- $\gamma$  -stimulated mesenchymal stromal cells predict overall immunosuppressive capacity. *Proc Natl Acad Sci USA* 114, E2598 - E2607 (2017)
- [11] Zhu, H. et al. The role of the hyaluronan receptor CD44 in mesenchymal stem cell migration in the extracellular matrix. *Stem Cell* 24, 928 - 935 (2006)
- [12] Moraes, D. A. et al. A reduction in CD90 (THY-1) expression results in increased differentiation of mesenchymal stromal cells. *Stem Cell Res Ther* 7, 97 (2016)
- [13] Corradetti, B. et al. Hyaluronic acid coatings as a simple and efficient approach to improve MSC homing toward the site of inflammation. *Sci. Rep.* 7, 7991 (2017)
- [14] Amarnath, S. et al. Bone marrow-derived mesenchymal stromal cells harness purinergic signaling to tolerize human Th1 cells in vivo. *Stem Cell* 33, 1200 - 1212 (2015)
- [15] Salmi, M. & Jalkanen, S. Cell-surface enzymes in control of leukocyte trafficking. *Nat Rev Immunol* 5, 760 - 771 (2005)
- [16] Ode, A. et al. Cd73 and Cd29 Concurrently Mediate the Mechanically Induced Decrease of Migratory Capacity of Mesenchymal Stromal Cells. *Eur Cell Mater* 22, 26 - 42 (2011)
- [17] Jin, H. J. et al. Downregulation of Melanoma Cell Adhesion Molecule (MCAM/CD146) Accelerates Cellular Senescence in Human Umbilical Cord Blood-Derived Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cells Translational Medicine* 5, 427 - 439 (2016)
- [18] Giuliani, M. et al. TLR ligands stimulation protects MSC from NK killing. *Stem Cell* 32, 290 - 300 (2014)
- [19] Gatta, V. et al. Gene expression modifications in Wharton's Jelly mesenchymal stem cells promoted by prolonged in vitro culturing. *BMC Genomics* 14, 635 (2013)
- [20] Angelucci, S. et al. Proteome analysis of human Wharton's jelly cells during in vitro expansion. *Proteome Sci* 8, 18 (2010)
- [21] Ankrum, J., Dastidar, R. G., Ong, J. F., Levy, O. & Karp, J. M. Performance-enhanced mesenchymal stem cells via intracellular delivery of steroids. *Sci. Rep.* 4, 4645 (2014)

- [22] Bahr, von, L. et al. Long-Term Complications, Immunologic Effects, and Role of Passage for Outcome in Mesenchymal Stromal Cell Therapy. *18*, 557 - 564 (2012)
- [23] Kretlow, J. D. et al. Donor age and cell passage affects differentiation potential of murine bone marrow-derived stem cells. *BMC Cell Biol.* *9*, 60 (2008)
- [24] van Deursen, J. M. The role of senescent cells in ageing. *Nature* *509*, 439 - 446 (2014)
- [25] Turinetto, V., Vitale, E. & Giachino, C. Senescence in Human Mesenchymal Stem Cells: Functional Changes and Implications in Stem Cell-Based Therapy. *IJMS* *17*, 1164 (2016)
- [26] Matjusaitis, M., Chin, G., Sarnoski, E. A. & Stolzing, A. Biomarkers to identify and isolate senescent cells. *Ageing Res. Rev.* *29*, 1 - 12 (2016)
- [27] Özcan, S. et al. Unbiased analysis of senescence associated secretory phenotype (SASP) to identify common components following different genotoxic stresses. *Aging* *8*, 1316 - 1329 (2016)
- [28] Wagner, W. et al. How to track cellular aging of mesenchymal stromal cells? *Aging* *2*, 224 - 230 (2010)
- [29] Tchkonja, T., Zhu, Y., van Deursen, J., Campisi, J. & Kirkland, J. L. Cellular senescence and the senescent secretory phenotype: therapeutic opportunities. *J. Clin. Invest.* *123*, 966 - 972 (2013)
- [30] Lei, Q. et al. Microvesicles as Potential Biomarkers for the Identification of Senescence in Human Mesenchymal Stem Cells. *Theranostics* *7*, 2673 - 2689 (2017)
- [31] Minieri, V. et al. Persistent DNA damage-induced premature senescence alters the functional features of human bone marrow mesenchymal stem cells. *J Cell Mol Med* *19*, 734 - 743 (2015)
- [32] Ferguson, S. W. et al. The microRNA regulatory landscape of MSC-derived exosomes: a systems view. *Sci. Rep.* *8*, 1419 (2018)
- [33] Lu, Z., Chen, Y., Dunstan, C., Roohani-Esfahani, S. & Zreiqat, H. Priming Adipose Stem Cells with Tumor Necrosis Factor-Alpha Preconditioning Potentiates Their Exosome Efficacy for Bone Regeneration. *Tissue Eng Part A* *23*, 1212 - 1220 (2017)
- [34] Hoang DM, Pham PT, Bach TQ, Ngo ATL, Nguyen QT, Phan TTK, Nguyen GH, Le PTT, Hoang VT, Forsyth NR, Heke M, Nguyen LT. Stem cell-based therapy for human diseases. *Signal Transduct Target Ther.* 2022 Aug 6;7(1):272
- [35] El Omar R, Beroud J, Stoltz JF, Menu P, Velot E, Decot V. Umbilical cord mesenchymal stem cells: the new gold standard for mesenchymal stem cell-based therapies? *Tissue Eng Part B Rev.* 2014 Oct;20(5):523-44
- [36] Mazzella M, Walker K, Cormier C, Kapanowski M, Ishmakej A, Saifee A, Govind Y, Chaudhry GR. Regulation of self-renewal and senescence in primitive mesenchymal stem cells by Wnt and TGF $\beta$  signaling. *Stem Cell Res Ther.* 2023 Oct 26;14(1):305
- [37] Le HM, Nguyen LT, Hoang DH, Bach TQ, Nguyen HTN, Mai HT, Trinh DP, Nguyen TD, Nguyen LT, Than UTT. Differential Development of Umbilical Cord-Derived Mesenchymal Stem Cells During Long-Term Maintenance in Fetal Bovine Serum-Supplemented Medium and Xeno- and Serum-Free Culture Medium. *Cell Reprogram.* 2021 Dec;23(6):359-369
- [38] Huang J, Zhao Q, Wei X, Ma W, Luo W, Gu H, Liu D, He Y, Huang T, Liu Y, Wang C, Yuan Z. miR-351-3p promotes rat amniotic fluid-derived mesenchymal stromal cell proliferation via targeting the coding sequence of Abca4. *Stem Cells.* 2021 Sep;39(9):1192-1206
-