

团体标准

T/LNBA 001—2025

脐带间充质干细胞制剂放行技术规范

Technical specification for release of umbilical cord mesenchymal stem cell
preparation

2025 - 08 - 20 发布

2025 - 09 - 20 实施

辽宁省生物技术协会 发布

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。

本文件由辽宁省生物技术协会提出并归口。

本文件起草单位：辽宁省生物技术协会、辽宁医学诊疗科技研发中心有限公司、拜澳泰克（沈阳）生物医学集团有限公司、辽宁盛京干细胞技术有限公司、沈阳盛京生物细胞研发中心有限公司、沈阳中安再生医学研发中心有限公司、中嘉康源（辽宁）生物技术有限公司、辽宁省标准化研究院。

本文件主要起草人：鞠险峰、魏敏杰、常方照、常月红、樊淼、郭川、宫世强、金大棋、焦雪、康悦、刘明妍、李文良、梁玉、马世良、单国峰、孙婷、隋欣、孙璇、王建华、王暘、夏远博、尹瀛浩、赵峰、张佳鹏、张学敏、肇宇、刘晓硕、于钟怡、薛志文、姚月、阎雪姣。

脐带间充质干细胞制剂放行技术规范

1 范围

本文件规定了脐带间充质干细胞制剂放行的术语和定义、要求、检验方法、检验规则和包装、贮存、运输。

本文件适用于脐带间充质干细胞制剂的放行、检验。

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 39729 细胞纯度测定通用要求 流式细胞测定法

GB/T 39730 细胞计数通用要求 流式细胞测定法

WS 273—2018 梅毒诊断

WS 293—2019 艾滋病和艾滋病病毒感染诊断

《中华人民共和国药典》

《全国临床检验操作规程》

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

脐带间充质干细胞 umbilical cord mesenchymal stem cells

从人类脐带结缔组织中分离得到的，具有多向分化潜力，非造血干细胞的成体干细胞。

[来源：《干细胞制剂质量控制及临床前研究指导原则（试行）》，有修改]

3.2

干细胞制剂 stem cell-based medicinal products

用于治疗疾病或改善健康状况的、以不同类型干细胞为主要成分、符合相应质量及安全标准，且具有明确生物学效应的细胞制剂。

[来源：《干细胞制剂质量控制及临床前研究指导原则（试行）》]

4 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

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

HBV：乙型肝炎病毒（Hepatitis B Virus）

HCV：丙型肝炎病毒（Hepatitis C Virus）

HIV：人类免疫缺陷病毒（Human Immunodeficiency Virus）

HLA-DR：人类白细胞抗原DR等位基因（Human Leukocyte Antigen DR）

TP：梅毒螺旋体（Treponema Pallidum）

5 要求

5.1 干细胞质量属性

5.1.1 基本生物学属性

干细胞基本生物学属性要求见表 1。

表 1 干细胞基本生物学属性

项目	要求
细胞形态	细胞贴壁生长，亮度高，伸展呈长梭形，形态均一
细胞计数/（个/kg ^a ）	$\geq 1 \times 10^6$
细胞活率/（%）	> 95
^a 受体体重。	

5.1.2 微生物安全性

干细胞微生物安全性要求见表 2。

表 2 干细胞微生物安全性

项目	要求
细菌	阴性
真菌	阴性
支原体	阴性
内毒素/（EU/mL）	≤ 0.5
病毒 （TP、HCV、HBV、HIV、新冠病毒）	阴性

5.1.3 生物学有效性

干细胞生物学有效性要求见表 3。

表 3 干细胞生物学有效性

项目	要求
干性标志物（CD73、CD90和CD105） 阳性率/（%）	> 95
分化标志物（CD14、CD19、CD34、CD45 和 HLA-DR）阳性率/（%）	< 2
三系分化能力	第十代的脐带间充质干细胞，在体外条件培养基诱导培养下，具备分化成脂肪、骨和软骨细胞的能力。

5.2 干细胞制剂配制

干细胞制剂配制应符合附录 A 的规定。

6 检验方法

6.1 基本生物学属性

6.1.1 细胞形态

贴壁培养条件下，使用倒置显微镜，在物镜 10 倍或 20 倍下观察。

6.1.2 细胞计数

按照 GB/T 39730 规定的方法检测。

6.1.3 细胞活率

按照《全国临床检验操作规程》白细胞计数的方法检测。

6.2 微生物安全性

6.2.1 细菌

按照《中华人民共和国药典》四部，通则 1101 无菌检测法检测。

6.2.2 真菌

按照《中华人民共和国药典》四部，通则 1101 无菌检测法检测。

6.2.3 支原体

按照《中华人民共和国药典》四部，通则 3301 支原体检查法检测。

6.2.4 内毒素

按照《中华人民共和国药典》四部，通则 1143 细菌内毒素检查法检测。

6.2.5 病毒

6.2.5.1 TP

按照 WS 273-2018 附录A.3检测。

6.2.5.2 HCV

按照《全国临床检验操作规程》核酸法检测。

6.2.5.3 HBV

按照《全国临床检验操作规程》核酸法检测。

6.2.5.4 HIV

按照 WS 293-2019 附录B.3检测。

6.2.5.5 新冠病毒

参照《全国临床检验操作规程》病毒核酸法检测。

6.3 生物学有效性

6.3.1 细胞表型

参照GB/T 39729规定的方法检测。

6.3.2 三系分化能力

参照附录 B 的方法检测。

7 检验规则

7.1 放行检验

7.1.1 产品出厂前，应由制备机构的质量检验部门按本标准规定对每个干细胞制剂产品进行检验，检验合格，方可出厂。

7.1.2 检验项目：干细胞基本生物学属性、微生物安全性和细胞表型。

7.2 型式检验

7.2.1 检验项目：5.1 全部要求。

7.2.2 型式检验至少每年进行一次。有下列情况之一者，亦应进行：

- 原辅材料有较大变化时；
- 更换设备或停产后，重新恢复生产时；
- 出厂检验与上次型式检验结果有较大差异时；
- 国家市场监督管理总局提出抽检要求时。

7.3 判定规则

任何一项指标检验不合格时，判该产品为不合格。

8 包装、贮存、运输

- 8.1 应选择对干细胞制剂质量属性无影响的包装材料和容器。
- 8.2 干细胞制剂应贮存于 $-150\text{ }^{\circ}\text{C}$ 及以下的气相或液相液氮中。
- 8.3 干细胞制剂运输和转运容器的材质应防漏、抗震、抗压力变化。
- 8.4 运输和转运容器应定期进行验证，并保持其处于有效运行状态。
- 8.5 干细胞制剂在不同运输时间条件下应符合以下要求：
 - 2 h 内常温运输；
 - 2 h 以上冷藏（ $2\text{ }^{\circ}\text{C}\sim 8\text{ }^{\circ}\text{C}$ ）运输；
 - 最长运输时间不得超过 24 h。

附 录 A
(规范性)
干细胞制剂配制要求

- A.1 用于配制干细胞制剂的中间细胞产品，应以每平方厘米接种 3×10^4 个细胞为基础核算代数，代数不少于四代，不超过六代。
- A.2 干细胞制剂重悬液应严格按照经批准的配方进行配制和灌装，其中白蛋白含量不得低于 2 %。

附 录 B
(资料性)
三系分化能力检验方法

B.1 成脂分化检验（油红 O 染色法）

B.1.1 仪器和设备

B.1.1.1 二氧化碳培养箱。

B.1.1.2 显微镜。

B.1.1.3 血球计数板。

B.1.1.4 离心机。

B.1.2 试剂

B.1.2.1 磷酸盐缓冲液：pH 7.4。

B.1.2.2 消化酶。

B.1.2.3 间质干细胞完全培养基。

B.1.2.4 成脂诱导培养基。

B.1.2.5 油红 O 染色液试剂盒。

B.1.3 检测步骤

B.1.3.1 细胞消化

将干细胞置于 37℃，5% CO₂培养箱中培养，至细胞融合度达到 80%～90%。采用消化酶，根据消化酶说明书消化细胞。收集消化后的干细胞使用血球计数板及显微镜进行细胞计数，按照 1×10⁴个/cm²的细胞密度接种在事先包被基质胶的 T 25 培养瓶中，加入适量完全培养基，继续培养至细胞融合度 100%。

B.1.3.2 细胞诱导

吸除培养瓶中的干细胞完全培养基，按照成脂诱导培养基说明书的使用方法及诱导时间，诱导分化干细胞。

B.1.3.3 脂滴染色

根据油红O染色液试剂盒说明书进行脂滴染色。

B.1.4 结果分析

显微镜下可见橙红色的大小不等的脂滴。

B.2 成骨分化检验（茜素红 S 染色法）

B.2.1 仪器和设备

B.2.1.1 二氧化碳培养箱。

B.2.1.2 血球计数板。

B.2.1.3 显微镜。

B.2.1.4 离心机

B.2.2 试剂

B.2.2.1 磷酸盐缓冲液：pH 7.4。

B.2.2.2 消化酶。

B. 2. 2. 3 间质干细胞完全培养基。

B. 2. 2. 4 成骨诱导培养基。

B. 2. 2. 5 茜素红 S 染色液试剂盒。

B. 2. 3 检测步骤

B. 2. 3. 1 细胞消化

将干细胞置于 37 °C, 5 %CO₂ 培养箱中培养, 至细胞融合度达到 80 %~90 %。采用消化酶, 根据消化酶说明书消化细胞。收集消化后的干细胞使用血球计数板及显微镜进行细胞计数, 按照 1×10^5 个/cm² 的细胞密度接种在事先包被基质胶的 T 25 培养瓶中, 加入适量完全培养基, 继续培养至细胞融合度 60 %~70 %。

B. 2. 3. 2 细胞诱导

吸除培养瓶中的干细胞完全培养基, 按照成骨诱导培养基说明书的使用方法 & 诱导时间, 诱导分化干细胞。

B. 2. 3. 3 钙结节染色

根据茜素红 S 染色液试剂盒说明书进行钙结节染色。

B. 2. 4 结果分析

显微镜下可见散在大量橘红色的钙结节。

B. 3 成软骨分化检验 (阿尔新蓝染色法)

B. 3. 1 仪器和设备

B. 3. 1. 1 二氧化碳培养箱。

B. 3. 1. 2 血球计数板。

B. 3. 1. 3 显微镜。

B. 3. 1. 4 离心机。

B. 3. 2 试剂

B. 3. 2. 1 磷酸盐缓冲液: pH 7.4。

B. 3. 2. 2 消化酶。

B. 3. 2. 3 成软骨诱导培养基。

B. 3. 2. 4 阿尔新蓝染色液试剂盒。

B. 3. 3 检测步骤

B. 3. 3. 1 细胞消化

采用消化酶, 根据消化酶说明书消化细胞。收集消化后的干细胞使用血球计数板及显微镜进行细胞计数, 取 4×10^5 个细胞, 用磷酸盐缓冲液清洗重悬 2 次~3 次。

B. 3. 3. 2 细胞诱导

按照成软骨诱导培养基说明书的使用方法 & 诱导时间, 诱导分化干细胞。

B. 3. 3. 3 软骨染色

根据阿尔新蓝染色液试剂盒说明书进行软骨染色。

B. 3. 4 结果分析

显微镜下可见深蓝色的软骨细胞胞外基质。

参 考 文 献

- [1] T/CSB 0001-2023 人脐带间充质干细胞检测技术规范
- [2] T/CSCB 0001-2020 干细胞通用要求
- [3] 国家食品药品监督管理总局关于印发《干细胞临床研究管理办法（试行）》的通知（国卫科教发〔2015〕48号）
- [4] 国家卫生计生委办公厅 国家食品药品监管总局办公厅关于印发《干细胞制剂质量控制及临床前研究指导原则(试行)》的通知（国卫办科教发〔2015〕46号）
- [5] 国家食品药品监督管理总局关于实施《药品生产质量管理规范（2010年修订）》有关事宜的公告（2011年 第19号）
- [6] 国家药监局关于发布《药品生产质量管理规范（2010年修订）》生物制品附录修订稿的公告（2020年第58号）
- [7] 国家食品药品监督管理总局关于发布《细胞治疗产品研究与评价技术指导原则》的通告（2017年第216号）
- [8] 袁宝珠.干细胞的“法规—监管—指导原则”体系[J].生命科学,2016,28(08):949-957
- [9] 袁宝珠.治疗性干细胞产品的相关风险因素[J].中国生物制品学杂志,2013,26(05):736-739
- [10] 张可华, 纳涛, 韩晓燕, 袁宝珠.人间充质干细胞生物学有效性的质量评价[J].中国新药杂志,2018,27(21):2511-2518
- [11] 张可华, 纳涛, 韩晓燕, 袁宝珠.基于免疫调控功能的间充质干细胞生物学有效性质量评价策略[J].中国新药杂志,2016,25(03):283-290+296
- [12] 樊金萍, 袁宝珠.用于鉴别猴源细胞及其交叉污染短串联重复序列图谱分析方法的建立[M].中国生物制品学杂志,2018.31(8):874-881
- [13] 刘晶, 徐英辉, 邹伟, 任晓春.干细胞临床研究质控体系的建立[M].北京:人民卫生出版社, 2017
- [14] 韩忠朝, 李宗金, 韩之波.间充质干细胞基础与临床[M].北京:科学出版社, 2013
-