

团 体 标 准

T/CRHA 013—2022

经血源子宫内膜干细胞资源储存规范 第 2 部分：子宫内膜干细胞的分离、处理与 储存

Specification for menstrual blood-derived mesenchymal stem cells resource storage -
Part 2: Isolation, processing and cryopreservation of menstrual blood-derived
mesenchymal stem cells

2022 - 06 - 15 发布

2022 - 07 - 01 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 基本原则	1
5 分离前准备工作	1
6 分离、处理与储存	1
7 稳定性考察	3
8 记录	3
参 考 文 献	5

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。

本文件是《经血源子宫内膜干细胞资源储存规范》的第2部分。

考虑到本文件中的某些条款可能涉及专利，中国研究型医院学会不负责对该类专利的鉴别。

本文件由中国研究型医院学会临床数据与样本资源库专业委员会提出。

本文件由中国研究型医院学会归口。

本文件起草单位：唐颐控股（深圳）有限公司、国家卫生健康委科学技术研究所国家人类遗传资源中心、解放军总医院临床生物样本中心、中国医学科学院血液病医院（中国医学科学院血液学研究所）、天津经济技术开发区唐颐细胞智造与神经创伤修复研究院、解放军总医院医学创新研究部创伤修复与组织再生研究中心、北京唐颐惠康生物医学技术有限公司、新乡医学院干细胞与生物治疗中心、福建省妇幼保健院、河南省妇幼保健院、深圳华大基因细胞科技有限责任公司、唐颐惠康（深圳）生物医学技术有限公司、新疆乌鲁木齐妇幼保健院、广西壮族自治区妇幼保健院、安徽省妇幼保健院、深圳市妇幼保健院、深圳市宝安区妇幼保健院、广东赛尔生物科技有限公司、北京艾颐生物科技有限公司、浙江卫未生物医药科技有限公司。

本文件主要起草人：曹毓琳、赵秀梅、李国喜、徐绍坤、田亚平、贺媛、程世翔、马士卉、林俊堂、曹华、赵鑫、孙晓艳、程国梅、薛淑媛、陈果、金平、何升、王心睿、徐凤萍、王魁星、刘斌、王泰华、史辛艺、梁文涛、江婧婧、郝建秀、陈锦阳、李霞云。

引 言

健康人经血中的子宫内膜干细胞资源具有极高的利用价值。临床研究结果显示人的机体免疫力随着年龄增长而逐步衰减，尤其是经血中的细胞成分和功能随着年龄的增长而变化。青年阶段健康人员经血中的子宫内膜干细胞活性最强，如何将该类细胞进行纯化并保存，是国内外研究的热点。

《经血源子宫内膜干细胞资源储存规范》旨在规范经血源子宫内膜干细胞资源储存活动，拟由三个部分构成：

- 第1部分：采集与运输。
- 第2部分：子宫内膜干细胞的分离、处理与储存。
- 第3部分：子宫内膜干细胞产品质量评价与放行。

通过对经血源子宫内膜干细胞资源样本的采集、运输、分离、处理、储存以及产品质量评价与放行等环节进行规范，提高干细胞产品质量。

经血源子宫内膜干细胞资源储存规范 第2部分：子宫内膜干细胞的分离、处理与储存

1 范围

本文件规定了基于健康供者提供的经血中的子宫内膜干细胞的分离、处理与储存基本原则、血液分离前准备工作、分离与处理以及记录要求。

本文件适用于公共库健康供者的经血源子宫内膜干细胞的分离、处理与储存。

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 50457 医药工业洁净厂房设计标准

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

经血源子宫内膜干细胞 menstrual blood-derived mesenchymal stem cells, MenSCs

从女性月经血中脱落的子宫内膜组织分离的干细胞，可称为子宫内膜干细胞。

4 基本原则

4.1 经血源子宫内膜干细胞的分离、处理应在满足 GB 50457 中要求的洁净度等级为 C 级环境下的 A 级环境中完成。

4.2 对经血样本进行分离处理前，其保存时限应不超过 24 h。

4.3 子宫内膜组织宜采用消化法进行细胞分离。

5 分离前准备工作

5.1 环境确认：洁净室和洁净工作台或生物安全柜应经紫外灯灭菌 30 min，并启动净化风机和空调系统自净 20 min 以上。

5.2 工作人员核对样本与采集信息内容一致性，用 75% 的乙醇对采集瓶外表面自下而上进行清洁消毒，并放置传递窗自净 15 min 后，传入分离、处理区域。

5.3 物料准备：取出所需的试剂及耗材待用，核查确认批号及是否在有效期内。

5.4 培养液准备：自配培养液使用前确认微生物培养 72 h 以上结果为阴性；商品化的细胞培养液使用前应核查确认合格证和有效期。

6 分离、处理与储存

6.1 分离与处理

6.1.1 将采集瓶转移到洁净工作台或生物安全柜内中。

6.1.2 将 100 μm 细胞滤网置于一次性离心管上，过滤采集的经血中的子宫内膜组织。

6.1.3 过滤液送检无菌和支原体。

6.2 子宫内膜组织消化分离

6.2.1 洗涤子宫内膜组织：将 6.1.2 过滤的子宫内膜组织用无菌有齿镊转移至一次性离心管中，加入生理盐水冲洗，去除血渍。

6.2.2 消化：用无菌组织剪将子宫内膜剪成 1 $\text{mm}^3 \sim 3 \text{mm}^3$ 大小，0.1% I 型胶原酶 37 $^{\circ}\text{C}$ 消化 1 h。

6.2.3 将消化后的混合液过 40 μm 细胞筛网，收集滤液，在室温条件（18 $^{\circ}\text{C} \sim 25^{\circ}\text{C}$ ）下，500g 水平离心 5 min。

6.2.4 细胞混悬液制备：离心完毕后弃上清，加入 0.9% 的生理盐水或 DPBS 定容，重悬并混匀。取样并进行细胞活率及数量的计算。

6.2.5 洗涤离心：在室温条件（18 $^{\circ}\text{C} \sim 25^{\circ}\text{C}$ ）下，500g 水平离心 5 min。

6.3 细胞培养

6.3.1 经 6.2.5 洗涤离心后弃上清，加入完全培养基，吹打混匀，按照 5000 \sim 6000 个/ cm^2 的传代细胞密度，平均接种到培养瓶中。

6.3.2 每瓶补充完全培养基，平置培养瓶，使细胞尽量均匀分布，将培养瓶放置于二氧化碳恒温恒湿培养箱。培养条件：37 $^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ ，二氧化碳体积分数为 5% \pm 0.2%。

6.4 细胞传代

6.4.1 在倒置显微镜下观察细胞形态有无异常，细胞有无污染，如观察到细胞融合度达到 70% \sim 80% 时，即可进行消化收获传代。

6.4.2 细胞清洗：弃去旧培养基，用 0.9% 的生理盐水或 DPBS 洗涤 2 次。

6.4.3 细胞消化：培养瓶中加入 0.125% 胰酶-EDTA，每瓶 1 mL，轻摇，使每个培养瓶的消化液都能浸润培养瓶底面。静置 1 min 后，取出培养瓶轻轻拍打，取一培养瓶到倒置显微镜下观察，待见镜下细胞变圆，大部分细胞脱落即表示消化可终止。

6.4.4 终止消化：往培养瓶中加入消化终止液（含 10% FBS 的 DMEM-F12 培养基或完全培养基），进行消化终止，将细胞和组织块的悬液转移至一次性离心管中，然后用 0.9% 的生理盐水或 DPBS 洗涤粘附在培养瓶中的细胞残余，并转移至一次性离心管中（胰酶消化时间不宜超过 5 min）。

6.4.5 洗涤离心：在室温条件（18 $^{\circ}\text{C} \sim 25^{\circ}\text{C}$ ）下，500g 水平离心 5 min。

6.4.6 细胞混悬液制备：离心完毕后弃上清，加入完全培养基定容，重悬并混匀。取样并进行细胞活率及数量的计算。

6.4.7 传代：按照 5000 个 \sim 6000 个细胞/ cm^2 的传代细胞密度，平均接种到培养瓶中。

6.4.8 每瓶补充完全培养基，重复 6.3.2 的操作。

6.5 细胞冻存

6.5.1 在倒置显微镜下观察细胞形态有无异常，细胞有无污染，如观察到细胞融合度达到 70% \sim 80% 时，即可进行消化收获。

6.5.2 按照 6.4.2 \sim 6.4.6 对细胞进行消化收集。

6.5.3 离心完毕后，留取洗涤上清并取样送检微生物，剩余上清样本 35℃环境留样 14 天，微生物检测无异常留样可按医疗废弃物处置。

6.5.4 取出预先 4℃ 预冷 20 min 以上的细胞冻存液，核查批号及有效期，吸取并缓慢注射到细胞沉淀物中，轻轻反复吹打定容。

6.5.5 细胞悬液定容后，依据 6.5.2 操作所得的细胞数量及活率数据，计算冻存终体积，细胞最终冻存密度宜在 8×10^6 个~ 1×10^7 个细胞/mL，缓慢添加预冷冻存液定容至相应终体积。

6.5.6 分装：准备一次性无菌冻存管或冻存袋，粘贴细胞编码标签并复核确认。将细胞终悬液缓慢分装至冻存管或冻存袋中，密封并核查确认。

6.5.7 程序化冷冻降温：可采用经验证的全自动程序性降温仪或程序降温盒进行子宫内膜干细胞的程序化冷冻降温。如采用全自动程序性降温仪，其最终细胞冷冻温度应至 -80°C 及以下；如采用程序降温盒，应先转移至 -80°C 深低温冰箱存放不低于 12 h。

6.5.8 程序冷冻降温完成后，可在深低温操作平台上将细胞转入冻存架或冻存盒中，登记细胞入库信息并双人复核，转入暂存气相液氮罐中。

6.5.9 依据子宫内膜干细胞入库相关标准，完成质量评价与放行审核后，将暂存气相液氮罐中的细胞产品依次转入永久储存液氮罐区，登记冻存细胞批号、编码、冻存日期、数量、物理位置等信息，双人复核确认。

6.5.10 子宫内膜干细胞应储存于气相液氮罐中，长期储存温度应不高于 -135°C 。

6.5.11 深低温冰箱、暂存气相液氮罐、永久性储存气相液氮罐等关键温控设备应进行实时温度监测。

7 稳定性考察

7.1.1 应依据干细胞产品的特性，制定年度的储存细胞质量稳定性考察方案和计划，并制定稳定性考察的相关质量标准。

7.1.2 稳定性考察的相关质量标准包括但不限于以下内容：

- a) 冻存容器完整性和密闭性；
- b) 细胞活率；
- c) 微生物培养；
- d) 细胞冻存复苏回收率；
- e) 细胞表面标记物表达；
- f) 细胞生物学效力。

7.1.3 子宫内膜干细胞在冻存后 1 周复苏存活率不应低于 90%，1 年复苏存活率不应低于 80%。

7.1.4 常规每年至少执行一次稳定性考察计划，如遇特殊情况（例如气相液氮罐故障）可临时性增加稳定性考察计划。

7.1.5 应对年度性的稳定性考察结果进行趋势分析，便于监测细胞储存的连续稳定性并改进细胞储存工艺。

8 记录

8.1 原始记录应确保其可追溯细胞分离、处理和储存操作所有环节，记录内容应包含但不限于以下信息：

- a) 供者身份号码；
- b) 产品描述码、采集类型和分类码；

- c) 产品名称和组分；
- d) 供者唯一身份标识符，如适用；
- e) 采集日期和时间；
- f) 生产制备机构的名称和地址；
- g) 制备、保存、冻存中关键步骤的所有细节及结果；
- h) 关键步骤的日期和时间，如果适用；
- i) 每一步骤的操作人员姓名；
- j) 在分离、处理、冻存、储存过程中使用的所有关键物料的名称、生产商、批号、有效期限；
- k) 使用试剂的数量；
- l) 使用设备编码。

8.2 记录的审核：应对记录的准确性和完整性与标准、法律法规的符合性进行审核。

8.3 记录的保存：记录应归档于受控区域进行保存，确保整个保存期间记录的清晰和完整性，并应避免意外或非授权的调阅、丢失、损坏、破坏、混淆或篡改。

8.4 记录的修改：机构应建立并保持合适的记录修改程序。记录修改人的签名及日期应记录下来；修改前的记录内容应清晰可辨认。

8.5 隐私保护：应建立保密机制，确保供者、员工信息的保密性。

8.6 记录保存期限：文件记录是要保存至细胞应用或处理后 20 年。

8.7 电子记录

8.7.1 数据访问应受控。应避免数据信息的非授权访问和发布。

8.7.1.1 应对信息输入和输出的人员进行指定授权，指定人员访问、更改、发布的结果应有审核确认。

8.7.1.2 电子记录应包括更改人员的身份信息和日期。

8.7.2 应确保数据的完整性可供检索及使用。

8.7.2.1 数据应准确可靠的按照从登陆到最终执行结束的时间顺序发送。

8.7.2.2 在整个数据保存期限内数据均应可检索获取。

8.7.3 应保护数据储存介质的避免损毁或意外破坏。

8.7.4 机构应定义关键数据并对其定期备份。

8.7.4.1 备份数据应异地镜像储存。

8.7.4.2 备份数据应避免未授权的闯入，丢失和修改。

8.7.4.3 应定期检测从备份系统获取数据的性能。

参 考 文 献

- [1] 血站技术操作规程（2019版）[EB/OL]，（2019-04-28）[2019-05-08]，
<http://www.nhc.gov.cn/yzygj/s7658/201905/bdd4f4ccd15c4201bfb6d9e7492d7fab.shtml>.
- [2] Lori D. Campbell, 生物样本库最佳实践[M]. 4th ed., ISBER, 2018.
-

全国团体标准信息平台