

中国质量检验协会文件

中检办发〔2026〕152号

中国质量检验协会关于《人源脐带间充质 干细胞裂解物制备与检验指南》团体 标准征求意见的通知

各有关单位和相关专家：

中国质量检验协会（以下简称本协会）批准立项的《人源脐带间充质干细胞裂解物制备与检验指南》团体标准经过有关专家和参编单位讨论和修改，据此形成上述团体标准征求意见稿。

按照《中国质量检验协会团体标准管理办法》的相关规定和要求，本协会现对上述团体标准公开征求意见，请各有关单位和相关专家对上述团体标准制定的修改意见和建议于2026年9月16日前反馈至本协会；如逾期未作反馈，则视为无意见和建议。

谨此感谢有关专家和参编单位与社会各界对本协会团体标准制修订工作的大力支持！

本团体标准编制工作组 联系人：邓寅

手机：13539434531

邮箱：1584873303@qq.com

中国质量检验协会碳中和绿色发展专业委员会 联系人：蔺枫

电话：010-59196500 手机：13601123186

邮箱：zwh@chinatt315.org.cn

附件：1.《人源脐带间充质干细胞裂解物制备与检验指南》（征求意见稿）

2.团体标准征求意见表



附件 1

ICS 11.020

CCS C05

团 体 标 准

T/CAQI ***—2026

人源脐带间充质干细胞裂解物制备与检验指南

Guidelines for synthesis and testing of Human Umbilical Cord
Mesenchymal Stem Cell Lysate

（征求意见稿）

2026 – XX – XX 发布

2026 – XX – XX 实施

中国质量检验协会 发布

– 3 –

目 次

前 言.....	- 5 -
引 言.....	- 6 -
1 范围.....	- 7 -
2 指南性引用文件.....	- 7 -
3 术语和定义.....	- 7 -
4 缩略语.....	- 8 -
5 原料要求.....	- 8 -
6 技术要求.....	- 8 -
7 检验方法.....	10
8 检验规则.....	11
9 包装、储存和运输.....	11
10 废弃物处理.....	13
附录 A (资料性) 人源脐带间充质干细胞 (hUC-MSC) 裂解物的制备.....	14
附录 B (规范性) 台盼蓝染色法测定干细胞裂解物中活细胞含量.....	17
参考文献.....	18

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。

本文件由广东新征程生命科学研究院提出。

本文件由中国质量检验协会归口。

本文件起草单位：广东新征程生命科学有限公司、广东新征程生命科学研究院、广州新征程生物科技有限公司、标管准家（北京）标准化服务中心、南方医科大学南方医院药物临床机构、精通卡替医疗生物医学临床转化中心、陆军第七十四集团军医院、南部战区海军第一医院、解放军总医院第二医学中心、南京医科大学附属无锡人民医院、肇庆广府万海细胞生物科技有限公司、广州市第一人民医院、。

本文件主要起草人：谢培增、邓寅、李元昊、李美桦、韩少华、许重远、左晋桐、孙成玲、王松青、左婧、陈瑜、王轶。

引 言

干细胞治疗已在全球范围内逐步进入临床实践阶段，其疗效得到广泛认可。然而，活细胞移植仍面临长期存活、定向归巢、免疫排斥等关键问题，制约了其规模化应用。因此，探索安全、有效且易于标准化制备的干细胞衍生制品，已成为再生医学发展的重要方向。

目前，国内外尚无针对人源脐带间充质干细胞（hUC-MSC）裂解物的相关标准。为指南该类产品的制备过程、关键质量属性、检验方法及储存运输要求，保障其安全性、有效性与可追溯性，推动我国干细胞衍生制品的标准化与产业化发展，特制定本团体标准，为行业提供统一的技术依据，促进科研成果向临床应用的高质量转化。

人源脐带间充质干细胞裂解物制备与检验指南

1 范围

本文件提出了人源脐带间充质干细胞裂解物的制备要求、检验方法、标签、包装、储存、运输和废弃物处理。

本文件适用于人源脐带间充质干细胞裂解物的生产制备、质量控制、安全性评价和科学研究。

本文件不适用于其他组织来源（如骨髓、脂肪、胎盘等）的间充质干细胞裂解物，亦不适用于未经裂解处理的活细胞制剂或仅含细胞培养上清液的产品。

2 指南性引用文件

下列文件中的内容通过文中的指南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 19489 实验室生物安全通用要求

GB/T 37864 生物样本库质量和能力通用要求

WS 213 丙型肝炎诊断

WS 273 梅毒诊断

WS 293 艾滋病和艾滋病病毒感染诊断标准

WS 299 乙型病毒性肝炎诊断标准

《中华人民共和国药典》（2025年版）》

《全国临床检验操作规程（第4版）》

《药品生产质量管理指南》

《干细胞制剂质量控制及临床前研究指导原则（试行）》

《医疗废物管理条例》

《实验室生物安全通用要求》

《中华人民共和国固体废物污染环境防治法》

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

人源间充质干细胞 human mesenchymal stem cell

存在于多种人体组织（如脐带、胎盘、脂肪、骨髓等）中的成体干细胞，贴壁培养后呈成纤维细胞样形态，具有向成骨细胞、软骨细胞、脂肪细胞等中胚层细胞分化的能力，并分泌多种生物活性因子。

3.2

人源脐带间充质干细胞 human umbilical cord-derived mesenchymal stem cell (hUC-MSC)

来源于新生儿脐带组织的人间充质干细胞，符合人间充质干细胞的一般生物学特性，且获取过程无创、伦理争议小。

3.3

人源脐带间充质干细胞裂解物 human umbilical cord-derived mesenchymal stem cell lysate (hUC-MSCL)

以人源脐带间充质干细胞为原料，采用物理和/或化学方法裂解细胞后，收集得到的全细胞成分混合物，

主要包括细胞膜成分及胞内成分（如：蛋白质、核酸、细胞器片段、生长因子、生物活性多肽等），不含完整活细胞。

注 1：细胞膜成分如脂类、蛋白质、糖类等。

注 2：胞内成分如蛋白质、核酸、细胞器片段、生长因子、生物活性多肽等。

4 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

缩略语—中文全称—英文全称

MSC—人源间充质干细胞（Mesenchymal Stem Cell）

hUC-MSC—人源脐带间充质干细胞（Human Umbilical Cord-derived Mesenchymal Stem Cell）

hUC-MSCL—人源脐带间充质干细胞裂解物（Human Umbilical Cord-derived Mesenchymal Stem Cell Lysate）

PBS—磷酸盐缓冲液（Phosphate Buffered Saline）

FBS—胎牛血清（Fetal Bovine Serum）

STR—短串联重复序列（Short Tandem Repeat）

HLA—人类白细胞抗原（Human Leukocyte Antigen）

HBV—乙型肝炎病毒（Hepatitis B Virus）

HCMV—人巨细胞病毒（Human Cytomegalovirus）

HCV—丙型肝炎病毒（Hepatitis C Virus）

EBV—人类疱疹病毒（EB 病毒）（Epstein-Barr Virus）

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

HTLV—人类嗜 T 细胞病毒（Human T-lymphotropic Virus）

TP—梅毒螺旋体（Treponema Pallidum）

HPLC—高效液相色谱法（High-performance liquid chromatography）

5 原料要求

5.1 人源脐带间充质干细胞的采集、制备及使用符合国家有关伦理管理的相关规定。细胞来源及培养过程中所使用的辅料符合《干细胞制剂质量控制及临床前研究指导原则（试行）》的要求。细胞的质量控制与验收指标按照GB/T 42466的规定执行,生物样本库的质量管理按照GB/T37864的规定执行。

5.2 人源脐带间充质干细胞的采集、制备及使用符合国家有关伦理管理的相关规定。供体筛选及知情同意书的签署符合《涉及人的生物医学研究伦理审查办法》及《干细胞临床研究管理办法（试行）》的要求。

6 技术要求

6.1 制备单位要求

6.1.1 基本资质要求

制备单位具备独立法人资格，依法取得从事细胞产品制备的相关资质。从事人源脐带间充质干细胞裂解物（hUC-MSCL）制备的单位符合《药品生产质量管理指南》（GMP）的相关要求，并建立与制备规模相适的质量管理体系。

6.1.2 设施与环境要求

6.1.2.1 制备场所具备与制备工艺相适的洁净环境，核心操作区洁净度达到C级及以上或符合GMP规定的相应级别。

6.1.2.2 配备独立的细胞培养区、裂解物制备区及质检区，各区域之间有物理隔离，避免交叉污染。

6.1.2.3 建立环境监测制度，定期对洁净区的悬浮粒子、浮游菌、沉降菌及表面微生物进行检测，检测结果符合GMP相应级别的要求。

6.1.3 设备与物料要求

6.1.3.1 配备与制备工艺相适应的关键设备，包括但不限于：生物安全柜、CO₂ 培养箱、离心机、细胞计数仪、裂解设备（如超声破碎仪、均质机等）、冷冻干燥设备（如适用）。

6.1.3.2 关键设备完成安装确认（IQ）、运行确认（OQ）和性能确认（PQ），并定期进行再确认和校准。

6.1.3.3 制备过程中使用的耗材、试剂符合相关质量标准，一次性使用耗材具有无菌、无热原证明文件，培养基、添加剂等具有明确来源和质量检测报告。

6.1.3.4 建立物料管理规程，确保物料的接收、检验、存储、发放、使用全过程可追溯。

6.1.4 人员与资质要求

6.1.4.1 制备单位配备与生产规模相适应的专业技术人员，包括质量负责人、生产负责人及质检人员。

6.1.4.2 质量负责人具有医学、生物学或药学等相关专业本科及以上学历，具有3年以上细胞治疗产品制备或质量控制工作经验。

6.1.4.3 生产负责人具有相关专业大专及以上学历，具有2年以上细胞培养或细胞产品制备工作经验。

6.1.4.4 操作人员经过细胞培养、无菌操作、裂解制备等相关专业技能培训，考核合格后方可上岗。

6.1.4.5 建立人员培训档案，定期开展GMP指南、无菌操作、生物安全及设备操作等继续教育培训，每年至少组织一次考核评估。

6.1.4.6 直接接触细胞或裂解物的操作人员每年进行健康检查，患有传染性疾病或皮肤伤口未愈者不得从事相关操作。

6.1.5 质量体系与追溯要求

6.1.5.1 建立从供者组织采集、细胞培养扩增到裂解物制备全过程的记录与追溯系统，确保每一批次的裂解物可追溯到其原料细胞来源、制备过程及所用物料。

6.1.5.2 建立变更控制、偏差管理、纠正与预防措施（CAPA）等质量管理程序。

6.1.5.3 制定内部审核计划，每年至少开展一次质量管理体系内部审核。

6.1.6 污染与交叉污染控制要求

6.1.6.1 制备过程中采取有效措施确保最大限度降低污染和交叉污染风险，包括但不限于：人员更衣规程、物料传递规程、设备专用或分时使用、清洁消毒规程。

6.1.6.2 不同供者来源的细胞独立操作，不得在同一生物安全柜内同时处理。

6.1.6.3 定期进行无菌工艺模拟验证（培养基灌装试验），证明无菌操作的有效性。

6.1.7 制备方法

人源脐带间充质干细胞裂解物的制备方法按照附录A。

6.2 人源脐带间充质干细胞裂解物关键质量属性

6.2.1 物理性状

人源脐带间充质干细胞裂解物（hUC-MSCL）为澄清或微乳光的液体，无异物，可见沉淀。

6.2.2 分子量分布

低分子量组分（低聚肽片段）的分子量分布范围宜为300Da~1000Da，其中主峰范围宜为380Da~620Da。

6.2.3 标志蛋白

人源脐带间充质干细胞裂解物（hUC-MSCL）的标志蛋白同时满足以下要求：

a) CD9、CD63及CD81中至少2个表达阳性；

b) Alix及Tsg101中至少1个表达阳性；

c) Calnexin及GM130中至少1个表达阴性（或低表达）；

d) Histone 3为阳性，此为裂解物区别于外泌体的重要特征；

e) β -微管蛋白（ β -tubulin）及 β -肌动蛋白（ β -actin）宜为阳性，用于反映细胞质成分的存在。

注1：Calnexin为内质网标志物，GM130为高尔基体标志物，两者为阴性或低表达；若高表达提示制备工艺中存在细胞器污染。

注2: Histone 3为细胞核组蛋白,全细胞裂解物中为阳性,不得要求阴性。

注3: β -微管蛋白及 β -肌动蛋白为可选检测项目,不作为符合性判定的强制依据。

6.2.4 蛋白含量要求

蛋白含量大于2.0 mg/ml。

6.2.5 微生物要求

不得检出真菌、细菌、支原体、人类免疫缺陷病毒(HIV)、乙型肝炎病毒(HBV)、丙型肝炎病毒(HCV)、人类T淋巴细胞白血病病毒(HTLV)、EB病毒(EBV)、人巨细胞病毒(HCMV)、梅毒螺旋体(TP),不得检出外源病毒蛋白及病毒核酸。细菌内毒素含量小于0.5EU/mL。

6.2.6 残余活细胞检测

无完整活细胞。

7 检验方法

7.1 物理性状

按照目测的方式。

7.2 分子量分布

按照《中华人民共和国药典》四部通则0514方法进行测定或等效的方法。

7.3 标志蛋白

按照《中华人民共和国药典》通则3421免疫印迹法或3425流式细胞术检测。

7.4 蛋白含量

按照《中华人民共和国药典》通则0731凯氏定氮法进行测定。

7.5 微生物

7.5.1 总原则

检验方法优先采用现行版《中华人民共和国药典》规定的方法。因成本、产量或快速检测等需要采用非药典方法(即替代方法)时,进行方法验证,并至少使用三批样品确认其假阴性率不高于药典方法。所有检验结果均须记录并保存原始数据备查。

7.5.2 真菌和细菌

按照《中华人民共和国药典》通则“1101 无菌检查法”检测。

7.5.3 支原体

按照《中华人民共和国药典》通则“3301 支原体检查法”检测。

7.5.4 HIV

按照WS 293核酸法检验。

7.5.5 HBV、HTLV、EBV和HCMV

按照《全国临床检验操作规程》(第4版或最新版)核酸法检验,或采用经药典替代方法验证的核酸检测试剂盒。

7.5.6 HCV

按照WS 213核酸法检验。

7.5.7 TP

按照 WS 273核酸法检验。

7.5.8 外源病毒因子

按照《中华人民共和国药典》通则“3302 外源病毒因子检查法”检测。

7.5.9 细菌内毒素

按照《中华人民共和国药典》通则“1143 细菌内毒素检查法”。

7.6 残余活细胞

按照附录B的方法测定。

8 检验规则

8.1 原则

在一个制备周期内，将来源于多个供者、多个批次的细胞混合至预定生产量，采用同一制备方法、在同一生产线上连续生产（中间无导致混淆或污染的工艺中断）所获得的均一裂解物。建立唯一的批号编码规则，确保通过该批号能够实现双向追溯——即从成品正向追溯至构成该批次的供者信息、细胞代次、混合比例、生产记录及检验报告，亦可从原材料信息逆向追溯至该成品批号。

8.2 检验

8.2.1 抽样

可参照《药品抽样原则及程序》执行，抽样过程保证样品的代表性和无菌性。检测相关SOP的编写要求，参照WS/T 227执行。

8.2.2 检验项目

检验项目包括第6.2节“裂解物关键质量属性”中规定的所有项目（形态、粒径、标志蛋白、微生物、纯度等）。其中，无菌检查（真菌、细菌、支原体）在符合洁净度要求的条件下进行，结果未出具前可结合过程控制数据（如过程监测无菌结果）进行风险评估，但最终放行必须以无菌检查合格为依据。

8.2.3 检验报告

每一批制剂均进行放行检验，由质量负责人审核并出具检验报告。检验报告包含批号、生产日期、检验日期、检验依据、各项目检验结果及结论。

8.3 留样

8.3.1 留样量

每一批裂解物必须留样，在无菌条件下留取适量裂解物。留样量一般至少满足按照相应质量标准进行2次全检验所需的量，并至少保留一件最小包装的成品。

8.3.2 留样期限

样本至少保存至产品有效期后一年。如产品未明确有效期，则留样期限不少于两年，或直至该批产品所对的临床研究或应用完全结束。

8.3.3 留样包装

留样的包装形式与放行包装形式一致，或采用与放行包装具有同等密封性的模拟包装。留样标签清晰标注批号、留样日期、留样数量及保存条件。

8.4 复核检验

在以下情形下，由专业检验机构/实验室进行复核检验：

- a) 首次制备的裂解物；
- b) 生产工艺发生重大变更后制备的批次；
- c) 放行检验结果处于临界值或出现异常波动时；
- d) 监管机构或质量管理部门有明确要求时；
- e) 复核检验机构具备相应检验资质（如CNAS或CMA），并优先采用与放行检验相同的方法学。

8.5 判定规则

8.5.1 合格判定

检验项目全部符合第6.2节“裂解物关键质量属性”规定，且无菌检查结果符合要求，即判为合格产品。

8.5.2 不合格判定

检验项目中有一项及以上不符合规定的，即判为不合格产品。

9 包装、储存和运输

9.1 包装

9.1.1 包装材料

直接和产品接触的包装材料选择低吸附、对源人源脐带间充质干细胞裂解物关键质量属性无影响的材料和容器（如医用级聚丙烯或玻璃材质）。验证包装材料与产品的相容性，确保在储存期内不出现浸出物、吸附或降解等影响产品质量的情形。

9.1.2 无菌与无热原

直接和产品接触的包装材料满足无菌、无热原要求，并提供相应的质量证明文件或检验报告。

9.1.3 包装完整性

包装容器密封性良好，防止储存和运输过程中出现泄漏、污染或失温。建立包装完整性验证方案，并在工艺验证中予以确认。

9.1.4 包装内容

包装内附人源脐带间充质干细胞裂解物使用说明，最小包装上附标签。使用说明包括产品名称、储存条件、有效期、使用方法及注意事项。

9.2 标签

标签符合《药品说明书和标签管理规定》及相关法规要求，至少包括以下内容：

- a) 制剂名称；
- b) 蛋白含量；
- c) 制剂体积（mL）；
- d) 生产日期（年、月、日、时、分）；
- e) 生产批号；
- f) 储存条件（温度范围）；
- g) 有效期至；
- h) 生产企业名称及联系方式；
- i) 执行标准编号；
- j) 警示语或注意事项（如“仅供研究/临床使用”“无菌”等）。

9.3 储存

9.3.1 储存条件

根据裂解物的稳定性研究结果确定储存条件。一般要求如下：

- a) 长期储存：在 $\leq -80^{\circ}\text{C}$ 条件下，储存期限不超过24个月；
- b) 短期储存：在 $\leq -20^{\circ}\text{C}$ 条件下，储存期限不超过6个月；
- c) 冷藏条件：在 $2^{\circ}\text{C} \sim 8^{\circ}\text{C}$ 条件下，储存期限不超过7天（基于蛋白活性）。

注1：具体储存期限以稳定性研究数据为准，上述期限为无验证数据时的推荐上限。

注2：建立储存温度监控记录系统（如连续温度记录仪），确保储存期间温度持续符合要求。温度超限时进行评估并记录。

9.3.2 储存管理

裂解物的储存信息记录，包括但不限于：名称、批号、数量、储存日期、储存条件、储存期限、储存责任人。储存设备经过验证并定期校准。

9.4 运输

9.4.1 运输条件

根据裂解物的使用要求和稳定性特征，选择适宜的运输方式和条件，确保运输过程中产品的生物特性、安全性、稳定性和活性不受影响。运输条件至少包括温度范围、防震、防污染等控制要求。

9.4.2 运输监控

运输过程对关键参数（如温度）进行连续监控，并留存监控记录。运输设备（如冷链箱、温度记录仪）经过验证。

9.4.3 运输包装

运输包装确保在预期运输周期内维持所需温度范围。如使用干冰或冷冻剂，采取防接触措施，避免产品因局部过冷而受损。运输过程中如发现温度超限或其他异常，启动偏差处理程序。

9.4.4 运输记录

建立运输记录，包括产品信息、发运日期、运输方式、运输条件、收货单位、收货确认等。

9.5 有效期

裂解物的有效期根据稳定性研究结果确定，并在标签和说明书中明确标注。

10 废弃物处理

10.1 原则

对制备、检验及研究过程中产生的不合格人源脐带间充质干细胞裂解物、剩余废弃干细胞、捐赠组织（如脐带、脂肪等）、检验剩余样品及接触过生物材料的耗材，按照《医疗废物管理条例》《实验室生物安全通用要求》及《中华人民共和国固体废物污染环境防治法》等法规要求，进行分类收集、暂存及处置。所有含有或可能含有核酸的废弃物，必须在最终处置前完成核酸降解，实现从产生到最终处置的全过程闭环追溯。

10.2 分类与处置

10.2.1 感染性废弃物

凡接触过细胞、裂解物或潜在感染性生物材料的耗材（如移液器吸头、培养瓶、离心管等），置于防渗漏的专用生物安全回收袋或锐器盒中，经高压灭菌处理（121℃，不少于30分钟）后，交由有资质的医疗废物处置单位进行最终处置。

10.2.2 组织与细胞类废弃物

捐赠组织、废弃干细胞及裂解物，置于专用生物安全回收袋中密封。先进行核酸降解处理（可采用终浓度不低于0.5%的次氯酸钠溶液浸泡不少于30分钟，或经验证等效的其他方法），再经表面消毒后，交由有资质的单位进行无害化处置。不得随意丢弃或未经处理直接排放。

10.2.3 化学废弃物

制备过程中使用的化学试剂（如有机溶剂、固定液、染色剂等）分类收集，交由具备危险废物处理资质的单位处置。

10.2.4 废弃包装材料

未接触生物材料的包装材料可按普通废弃物处置；接触过生物材料的包装按感染性废弃物处理。

10.3 管理要求

10.3.1 记录与追溯

建立废弃物管理台账，记录废弃物的种类、数量、产生部门（或批号）、交接时间、核酸降解方式、处置方式及接收单位等信息。相关记录至少保存3年，确保从产生到最终处置的全链条可追溯。

10.3.2 暂存管理
废弃物暂存场所远离制备与储存区域，配备防泄漏、防污染设施，并设置明显警示标识。暂存时间符合当地环保部门规定。

10.3.2 人员防护

处理废弃物的人员经过生物安全培训，配备必要的个人防护装备（如防护服、手套、护目镜等），并建立职业暴露急处理程序。

10.3.3 应急预案

制定废弃物泄漏、遗撒等意外事件的应急处置预案，配备应急物资，并定期开展演练。

附录A (资料性)

人源脐带间充质干细胞 (hUC-MS) 裂解物的制备

A.1 人源脐带间充质干细胞的获取与培养

干细胞培养是通过体外模拟体内环境，维持细胞自我更新及多向分化潜能的技术。核心步骤包括分离来源选择、培养基优化、环境参数控制及传代操作指南，需严格把控污染风险，确保细胞活性与功能稳定。

A.1.1 人源脐带间充质干细胞的来源与分离

A.1.1.1 组织来源

人源脐带间充质干细胞来源于健康产妇剖宫产后的脐带组织，优选华通氏胶 (Wharton's jelly) 作为分离来源。华通氏胶来源的间充质干细胞具有更强的增殖分化能力，易于分离，纯度高，无肿瘤细胞污染风险，且比成人来源的间充质干细胞更原始。

A.1.1.2 分离方法

采用组织块贴壁-部分酶消化联合法，具体步骤如下：

- 1) 无菌采集脐带组织，去除血管及外膜，剥离华通氏胶；
- 2) 将组织剪成1 mm³ ~ 3 mm³ 大小的组织块；
- 3) 组织块贴壁于培养皿，加入含人血小板裂解液 (HPL) 的培养基；
- 4) 在37 °C、5% CO₂ 培养箱中静置培养，7d~10d后可见细胞迁出；
- 5) 待细胞达到80%汇合度时进行传代。

A.1.1.3 供者筛选与伦理要求

供者筛选与采集通过医疗机构或区域伦理委员会审批，并签署知情同意书。采集前按筛查HIV、HBV、HCV、HTLV、EBV、HCMV、TP等病原体，并详细采集既往病史、家族史（包括遗传病、心血管疾病、肿瘤等）。

A.1.2 干细胞培养

A.1.2.1 培养基与生长因子

- 1) 基础培养基：采用DMEM/F12 (1:1) 作为基础培养基。
- 2) 血清替代物：推荐使用人血小板裂解液替代胎牛血清 (FBS)，添加浓度为5%~20%。研究表明，10%人血小板裂解液可获得最佳生长速率、最高活细胞计数及最高表面标志物表达水平。人脐血浆源血小板裂解物 (UCB-PL) 可作为无动物源性成分的培养体系。
- 3) 必需添加物：L-谷氨酰胺 (2 mmol/L)、青霉素/链霉素 (100 U/mL)。
- 4) 生长因子：碱性成纤维细胞生长因子 (bFGF, 5 ng/mL~10 ng/mL) 可促进细胞增殖。

A.1.2.2 培养环境参数

- 1) 温度：37°C ± 0.5°C。
- 2) CO₂ 浓度：5% ± 0.2%。
- 3) 湿度：90%~95%。
- 4) pH值：7.2~7.4。
- 5) 氧气浓度：推荐低氧培养 (5% O₂) 以维持干性。
- 6) 接种密度：间充质干细胞以5 × 10³ 个/cm² ~ 1 × 10⁴ 个/cm² 的密度接种。
- 7) 传代时机：细胞汇合度达70%~80%时进行传代。
- 8) 传代方法：采用0.25%胰酶-EDTA消化1 min~3 min，终止消化后按1:3~1:5比例分瓶。
- 9) 传代周期：每3d~5d传代一次。

A.2 人源脐带间充质干细胞裂解物的制备

A.2.1 制备原理

细胞裂解是通过物理、化学或生物方法破坏细胞膜结构，使细胞内含物释放出来的过程。裂解物中包含细胞内所有可溶性成分，包括蛋白质、核酸、小分子肽、生长因子、细胞因子等活性物质。当前研究表明，裂解物、分泌组和外泌体的标准化提取方法是细胞无细胞治疗面临的主要挑战。

A.2.2 制备流程

A.2.2.1 细胞准备

取P4~P8代对数生长期的hUC-MSC，细胞存活率 $\geq 90\%$ ，总细胞数 $\geq 1 \times 10^8$ 个。用PBS洗涤3次，去除培养基残留成分。将细胞重悬于注射用水或PBS中，细胞密度为 1×10^8 个/mL。

A.2.2.2 细胞破碎

1) 反复冻融法（推荐）：

将细胞悬液置于 -80°C 冰箱冷冻2 h以上，取出后于 37°C 水浴快速融化，重复冻融3次~5次，每次冻融间进行涡旋震荡。该方法操作简便，可有效破坏细胞膜。

2) 超声破碎法：

参数设置：功率200 W~300 W，超声3 s，间隔5 s，总超声时间10 min~15 min。在冰浴条件下进行，防止过热导致蛋白变性。超声后通过显微镜检查细胞破碎程度。

3) 高压均质法（规模化生产推荐）：

压力设定：800 bar~1200 bar，循环次数：3次~5次。适用于大规模工业化生产。

4) 联合处理法：

先反复冻融2次，再超声破碎5min，可提高裂解效率，获得更均一的裂解物。

A.2.3 裂解液处理

A.2.3.1 去脂

将裂解液于 4°C 、 $10000 \times g$ 离心30min，去除上层脂质层。

A.2.3.2 梯度过滤澄清

为保留更多裂解物中的有效成分，不采用高速离心去除沉淀，而采用梯度过滤法进行澄清处理：依次使用 $0.8 \mu\text{m}$ （预过滤）、 $0.45 \mu\text{m}$ 和 $0.22 \mu\text{m}$ 滤膜过滤。本步骤旨在去除不溶性颗粒，不作为最终灭菌环节。

A.2.4 浓缩与富集

A.2.4.1 透析处理

使用透析卡匣（22000道尔顿），于 4°C 透析24h，期间更换透析液3次。

A.2.4.2 裂解原液的处理

1) 液态处理

将澄清后的裂解液按A.2.6.1和A.2.6.2进行灭菌处理，然后分装于输血袋中（包装规格：100 mL/袋），于 -80°C 条件下冷冻保存。

需用时，将原液解冻并进行浓度配制：调整总蛋白浓度至 2.0 mg/mL 。采用 0.9% 氯化钠溶液或PBS稀释至工作浓度 2.0 mg/mL ，随后分装至西林瓶（规格： $4.0 \text{ mg}/2 \text{ mL}$ ，即每瓶含总蛋白 4.0 mg ，体积 1 mL ）中。分装后的裂解注射液根据预期使用时间选择以下保存条件：

- 长期储存：在 $\leq -80^\circ\text{C}$ 条件下，储存期限不超过24个月；
- 短期储存：在 $\leq -20^\circ\text{C}$ 条件下，储存期限不超过6个月；
- 冷藏条件：在 $2^\circ\text{C} \sim 8^\circ\text{C}$ 条件下，储存期限不超过7天（基于蛋白活性）。

注1：具体储存期限以稳定性研究数据为准，上述期限为无验证数据时的推荐上限。

注2：建立储存温度监控记录系统（如连续温度记录仪），确保储存期间温度持续符合要求。温度超限时进行评估并记录。

2) 冻干处理

透析后样品于-80℃预冻，再冷冻干燥24 h~48 h，获得裂解物冻干粉。冻干粉的灭菌处理见A.2.6.2。

A.2.4.3 富集效果

血管内皮生长因子（VEGF）富集可达2200倍，白细胞介素-6富集约400倍。

A.2.5 浓度配制（冻干固体）

冻干粉复溶后，总蛋白浓度调整为2.0mg/ml；采用0.9%氯化钠溶液或PBS稀释至工作浓度。

A.2.6 灭菌处理

根据产品形态选择适宜的灭菌方法：

A.2.6.1 过滤除菌

裂解物溶液采用0.22 μm滤膜过滤除菌，为液体状态下的主要灭菌方法。过滤操作在B级背景下的A级洁净环境（或生物安全柜）中执行，使用无菌、低蛋白吸附的滤膜，并验证滤膜的完整性。过滤除菌不适用于固态样品。

A.2.6.2 辐照灭菌

采用γ射线辐照（15 kGy~25 kGy），适用于最终包装后的冻干粉制剂。辐照灭菌在验证的剂量范围内进行，确保灭菌效果的同时不影响产品关键质量属性（如总蛋白含量等），辐照后对产品进行无菌检验和活性验证。

附录B (规范性)

台盼蓝染色法测定干细胞裂解物中活细胞含量

B.1 方法原理

台盼蓝不能透过活细胞完整细胞膜，活细胞拒染，呈透明无色；死细胞膜破损，染料进入胞内，细胞被染成蓝色。用血球计数板显微镜计数，计算活细胞率。

B.2 仪器与试剂

B.2.1 0.4%台盼蓝染液（无菌）

B.2.2 血球计数板、盖玻片、光学显微镜、EP管、移液枪

B.3 操作步骤

B.3.1 样品预处理：取干细胞裂解物，轻轻吹打混匀，减少细胞团聚。

B.3.2 染色：取细胞悬液 50 μL + 0.4%台盼蓝染液 50 μL ，EP管轻轻吹打混匀，室温染色3 min。

B.3.3 上样：将盖玻片盖在血球计数板上，吸取少量混合液沿盖玻片边缘加入计数室。

B.3.4 检测：显微镜计数，无色透亮为活细胞，深蓝色为死细胞。

B.3.5 计数：记录活细胞数量。

参考文献

- [1] 中华人民共和国生物安全法。
 - [2] 细胞治疗产品生产质量管理指南（试行）。
 - [3] 人源干细胞产品药学研究与评价技术指导原则（试行）。
 - [4] 人源干细胞产品非临床研究技术指导原则。
 - [5] 人源性干细胞及其衍生细胞治疗产品临床试验技术指导原则（试行）。
 - [6] 特殊物品海关检验检疫名称和商品编号对应名录。
 - [7] 生物医学新技术临床研究和临床转化应用管理条例：国令第818号 [S] . 2025-01-20.
 - [8] Attaelmanan GA, Khalil HB. Assessment of Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cell Cultivation Using Fetal Bovine Serum or Platelet Lysate [J] . Cureus, 2025, 17(1): e78044.
 - [9] Zununi Vahed S, Hejazian SM, Bakari WN, Landon R, Gueguen V, Meddahi-Pellé A, Anagnostou F, Barzegari A, Pavon-Djavid G. Milking mesenchymal stem cells: Updated protocols for cell lysate, secretome, and exosome extraction, and comparative analysis of their therapeutic potential [J] . Methods, 2025, 238: 40-60.
 - [10] T/CAS 1139-2025 间充质干细胞制剂的质量控制导则 [S] . 北京:中国标准化协会, 2025.
 - [11] Sakhare S, Sanap A, Bhonde R, Behera S, Potdar P, Kheur S, Kharat A. Dialysis and lyophilization of the mesenchymal stromal cell secretome for wound healing [J] . Cytotherapy, 2025, 27(4): 544-551.
 - [12] Kochetova ES, Matveeva DK, Melik-Pashayev AE, Andreeva ER, Romanov YA, Buravkova LB. Selection of Optimal Protocol for Decellularization of Extracellular Matrix of Mesenchymal Stromal Cells of Human Umbilical Cord Tissue [J] . Bulletin of Experimental Biology and Medicine, 2025, 178(4): 535-540.
-

附件 2

团体标准征求意见表

单位名称或 专家姓名			单位盖章或 专家签名	
联系人			联系方式	
标准名称		人源脐带间充质干细胞裂解物制备与检验指南		
序号	章节	修改意见		具体理由
备注：修改意见和具体理由，可另附相关说明				

抄送：本协会会员工作部，本协会存档（2）。

中国质量检验协会

2026 年 8 月 18 日印发
