

团体标准

T/CRHIA XXXX—XXXX

人脐带间充质干细胞检测技术规范

Technical specification for human umbilical cord mesenchymal stem cell detection

点击此处添加与国际标准一致性程度的标识

(征求意见稿)

XXXX - XX - XX 发布

XXXX - XX - XX 实施

中国生物工程学会

发布

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 技术要求	2
5 检测方法	3
附录 A (资料性) 人间充质干细胞质量检测表	6
附录 B (资料性) 细胞表型检测 流式细胞法	7
附录 C (资料性) 成骨分化检测 茜素红 S 染色法	9
附录 D (资料性) 成脂分化检测 油性 O 染色法	10
附录 E (资料性) 成软骨分化检测 阿尔新蓝染色法	11
附录 F (资料性) 成瘤性检测 免疫缺陷小鼠检测法	12
附录 G (资料性) 干细胞对淋巴细胞增殖抑制检测 干细胞共培养法	13
参考文献	15

前 言

本标准按照GB/T 1.1-2020给出的规则起草。

本标准由中国生物工程学会归口。

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这些专利的责任。

本标准起草单位：湖南南华生物技术有限公司。

本标准主要起草人：

引 言

间充质干细胞已经被广泛应用于科学研究和临床试验研究，对退行性疾病、免疫失调疾病等取得了较好的临床治疗效果，具有十分广阔的临床应用前景。其中人脐带来源的间充质干细胞与其他来源相比，人脐带间充质干细胞更加易于获得，对母子均无损伤，且冻存和复苏后细胞的生物学性状无明显变化。本标准旨在通过对人脐带间充质干细胞检测技术进行规范，使人脐带间充质干细胞的检测方法和操作规范化，从而保障人脐带间充质干细胞的检测结果的可靠性与稳定性，保证人脐带间充质干细胞的各项指标符合相关研究预期要求。在制订过程中，根据国内外人脐带间充质干细胞的相关文献、规范性和指导性文件，制定本技术规范。

人脐带间充质干细胞检测技术规范

1 范围

本文件给出了人源脐带间充质干细胞质量检测的技术要求和检测方法。
本文件适用于人源脐带间充质干细胞质量检测。

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 42076.1-2022 生物技术 细胞计数 第1部分：细胞计数方法通则

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

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

间充质干细胞 Mesenchymal Stem Cells

是中胚层来源的具有高度自我更新能力和多向分化潜能的多能干细胞，广泛存在于全身多种组织中，可在体外培养扩增，并在特定条件下分化为神经细胞、成骨细胞、软骨细胞、肌肉细胞、脂肪细胞等。

3.2

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

人脐带间充质干细胞是指来源于脐带的间充质干细胞。

3.3

流式细胞术 flow cytometry

利用流式细胞仪快速定量分析细胞群的物理化学特征以及根据这些物理化学特征精确分选细胞的技术，主要包括流式分析和流式分选两部分。

3.4

细胞表型 cell phenotype

T/CRH1A XXXX—XXXX

是某种细胞或者细胞亚群表达一些重要的抗原分子的情况,明确细胞表达这些抗原分子的情况可以从一定程度上判断这群细胞的某些特征,也可以从一定程度上判断该群细胞的功能状态。

3.5

成骨诱导分化 osteogenic differentiation

通过特定的培养条件,诱导间充质干细胞分化为骨原细胞、成骨细胞,进而形成骨组织的过程。

3.6

成脂诱导分化 adipogenic differentiation

通过特定的培养条件,诱导间充质干细胞分化为脂肪细胞的过程。

3.7

成软骨诱导分化 chondrogenic differentiation

特定的培养条件,诱导间充质干细胞分化为软骨细胞的过程。

3.8

核型 karyotype

细胞有丝分裂中期所具备的整套染色体数目、长度、着丝点位置、随体、主缢痕和次缢痕等特征。

3.9

干细胞对淋巴细胞增殖抑制检测 stem cell inhibition on lymphocyte proliferation

干细胞对淋巴细胞增殖抑制检测是用于评估干细胞对免疫应答的调控作用的方法。常见的检测方法包括:干细胞共培养实验和细胞因子分析。

3.10

干细胞共培养实验 stem cell co culture experiment

将干细胞与淋巴细胞一起培养,并观察干细胞对淋巴细胞增殖的影响。

4 技术要求

4.1 总则

4.1.1 实验室各设备在使用前需认真阅读设备说明书,确认设备状态,规范操作,使用后需填写设备使用记录。

4.1.2 实验所需试剂在使用前需认真阅读产品说明书,注意易燃、有毒有害试剂的规范操作,使用前需做试剂出入库登记。

4.2 重要质量属性

4.2.1 细胞形态

细胞贴壁培养时呈纺锤形和梭形的成纤维细胞态,形态均一。

4.2.2 细胞计数及细胞活率

细胞活率 $\geq 90\%$ 。

4.2.3 染色体核型

正常核型应为46, XX或46, XY。

4.2.4 细胞表型

表1 细胞表型要求

Positive ($\geq 95\%$)	Negative ($\leq 2\%$)
CD105	CD45
CD73	CD34
CD90	CD14 or CD11b
	CD79 α or CD19
	HLA-DR

4.2.5 三系分化

具有成骨、成软骨、成脂的分化潜能。

4.2.6 成瘤性

免疫缺陷动物（如小鼠）体内成瘤试验结果为阴性。

4.2.7 微生物

细菌、真菌、支原体、HIV、HAV、HBV、HCV、HTLV、HCMV、HPVB19、EBV、TP、COX应为阴性。

4.2.8 干细胞对淋巴细胞增殖抑制

评估干细胞对免疫应答的调控作用，具体要求见检测方法。

5 检测方法

5.1 细胞形态

二维培养条件下，用明视场细胞显微镜进行观察。

5.2 细胞计数及细胞活率

按照GB/T 42076.1-2022的方法检测。

5.3 染色体核型

按照《中华人民共和国药典》检测。

5.4 细胞表型

按照附录B的方法检测。

5.5 三系分化

5.5.1 成骨分化

按照附录C的方法检测。

5.5.2 成软骨骨分化

按照附录D的方法检测。

5.5.3 成脂分化

按照附录E的方法检测。

5.6 成瘤性

按照附录F的方法检测。

5.7 微生物

5.7.1 细菌

按照《中华人民共和国药典》中“1101无菌检查法”检测。

5.7.2 真菌

按照《中华人民共和国药典》中“1101无菌检查法”检测。

5.7.3 支原体

按照《中华人民共和国药典》中“3301支原体检查法”检测。

5.7.4 HAV

按照《全国临床检验操作规程》检测。

5.7.5 HBV

按照《全国临床检验操作规程》检测。

5.7.6 HCV

按照WS 213检测。

5.7.7 HIV

按照WS 293检测。

5.7.8 HTLV

按照《全国临床检验操作规程》检测。

5.7.9 HCMV

按照《全国临床检验操作规程》检测。

5.7.10 HPV19

按照《全国临床检验操作规程》检测。

5.7.11 EBV

按照《全国临床检验操作规程》检测。

5.7.12 TP

按照WS 273检测。

5.7.13 COX

按照《全国临床检验操作规程》检测。

5.7.14 干细胞对淋巴细胞增殖抑制检测

按照附录G的方法检测。

征求意见稿

附 录 A
(资料性)
人间充质干细胞质量检测表

人间充质干细胞质量检测表格式见表A.1。

表A.1 人间充质干细胞质量检测表

样品名称			
信息编码			
检测人员			
质量属性	细胞形态		
	细胞计数及细胞活率		
	染色体核型		
	细胞表型		
	三系分化	成骨分化	
		成软骨分化	
		成脂分化	
	成瘤性		
	微生物	细菌	
		真菌	
		支原体	
		HAV	
		HBV	
		HCV	
		HIV	
		HTLV	
HCMV			
HPVB19			
EBV			
TP			
COX			
	干细胞对淋巴细胞增殖抑制检测		
复核人员			
放行人员			
备注			

附 录 B
(资料性)
细胞表型检测 流式细胞法

B.1 仪器和设备

使用的仪器和设备如下:

- 6 流式细胞仪;
- 7 水平离心机;
- 8 电子天平

B.2 试剂

使用的试剂如下:

- 9 磷酸盐缓冲液: pH7, 4;
- 10 牛血清白蛋白 (BSA): 纯度 \geq 98%;
- 11 叠氮钠 (NaN₃);
- 12 抗人 CD105、CD73, CD90、CD11b、CD19、CD31, CD34、CD45, HLA-DR 抗体及同型对照抗体;
- 13 洗涤液, 抗体稀释液

B.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。

B.4 检测步骤

B.4.1 样品准备

收集细胞, 使用水平离心机300g离心4min, 弃上清。然后用洗涤液清洗一遍。使用水平离心机300g离心4min弃上清。

B.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300g离心4min, 弃上清。

B.4.3 过滤上机

用洗涤液重悬细胞, 然后通过40m滤网转移到流式管中, 按流式细胞仪应用手册上机检测。

B.4.4 圈门设定原则

T/CRH1A XXXX—XXXX

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Isotyp对照组荧光强度，在分群的基础上画出阳性细胞群2，排除没有被荧光抗体标记的阴性细胞。抗体Isotype作为阴性对照。

B. 4. 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。

附 录 C
(资料性)
成骨分化检测 茜素红 S 染色法

C.1 仪器和设备

使用的仪器和设备如下：

- 血球计数板；
- 明视场显微镜；
- 水平离心机。

C.2 试剂

使用的试剂如下：

- 磷酸盐缓冲液：pH7, 4；
- 消化酶；
- 台盼蓝染液：使用时，用磷酸盐缓冲液稀释至 0.4%（质量浓度）；
- 成骨诱导液；
- 茜素红 S 染色试剂盒。

C.3 检测步骤

C.3.1 细胞消化

使用水平离心机离心收集细胞于离心管中，用无带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。

C.3.2 细胞计数

根据附录A方法测定，使用血球计数板及明视场显微镜计算细胞悬液活细胞浓度。

C.3.3 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天至21天。

C.3.4 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。

C.3.5 结果分析

显微镜下可见散在大量橘红色的钙结节。

附 录 D
(资料性)
成脂分化检测 油性 O 染色法

D.1 仪器和设备

使用的仪器和设备如下：

- 血球计数板；
- 明视场显微镜；
- 水平离心机。

D.2 试剂

使用的试剂如下：

- 磷酸盐缓冲液：pH7, 4；
- 消化酶；
- 台盼蓝染液：使用时，用磷酸盐缓冲液稀释至 0.4%（质量浓度）；
- 成脂诱导液；
- 油红 O 染色试剂盒。

D.3 检测步骤

D.3.1 细胞样品的准备

使用水平离心机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。使用血球计数板及明视场显微镜计算细胞悬液活细胞浓度。

D.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14天至21天。

D.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。

D.3.4 结果分析

显微镜下可见橙红色的脂滴，脂肪细胞中含大小不等的脂滴。

附 录 E
(资料性)
成软骨分化检测 阿尔新蓝染色法

E.1 仪器和设备

使用的仪器和设备如下：

- 血球计数板；
- 明视场显微镜；
- 水平离心机。

E.2 试剂

使用的试剂如下：

- 磷酸盐缓冲液：pH7, 4；
- 消化酶；
- 台盼蓝染液：使用时，用磷酸盐缓冲液稀释至 0.4%(质量浓度)；
- 成软骨诱导液；
- 阿尔新蓝染色试剂盒。

E.3 检测步骤

E.3.1 细胞样品的准备

使用水平离心机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。使用血球计数板及明视场显微镜计算细胞悬液活细胞浓度。

E.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天至21天。

E.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。

E.3.4 结果分析

显微镜下可见深蓝色的软骨细胞胞外基质。

附 录 F
(资料性)
成瘤性检测 免疫缺陷小鼠检测法

F.1 仪器和设备

使用的仪器和设备如下：

- 血球计数板；
- 明视场显微镜；
- 水平离心机。

F.2 试剂

使用的试剂如下：

- 磷酸盐缓冲液：pH7, 4；
- 消化酶；
- 台盼蓝染液：使用时，用磷酸盐缓冲液稀释至 0.4%(质量浓度)。

F.3 检测步骤

F.3.1 细胞样品的准备

使用水平离心机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。使用血球计数板及明视场显微镜计算细胞悬液活细胞浓度

F.3.2 细胞移植

将 1×10^7 个人间充质干细胞注射到6至8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(人二倍体细胞)阳性对照组(人肿瘤细胞系，按照肿瘤细胞系接种要求的数量注射)。

F.3.3 肿瘤观察

接种后观察16周，每周测量体重、肿瘤大小。若荷瘤小鼠肿瘤超过2000毫米或者肿瘤溃烂或体重下降，可考虑执行人道终点。16周后剥离小鼠身上肿瘤，行大体观察，瘤体称重，计算成瘤率。

F.3.4 结果分析

成瘤率按式进行计算： $Z=N/M \times 100\%$ (1)

式中：

- Z——成瘤率；
- M——接种小鼠总数；
- N——荷瘤小鼠总数。

附录 G

(资料性)

干细胞对淋巴细胞增殖抑制检测 干细胞共培养法

G.1 仪器和设备

使用的仪器和设备如下：

- 二氧化碳恒温培养箱；
- 水平离心机；
- 血球计数板；
- 48孔细胞培养板。

G.2 试剂

使用的试剂如下：

- 人脐带间充质干细胞完全培养基；
- 丝裂霉素 C；
- 生理盐水；
- 红细胞裂解液；
- 1640培养基；
- 胎牛血清。

G.3 检测步骤及要求

G.3.1 人脐带间充质干细胞培养

G.3.1.1 检测步骤

检查步骤如下：

- 解冻 P4 代人脐带间充质干细胞培养至细胞融合度为 80-90%；
- 加入丝裂霉素 C 放入培养箱中 37 摄氏度孵育 1 小时；
- 弃去原培养基，加入生理盐水，洗涤 2 次；
- 消化收集细胞，计数，用 10%胎牛血清-1640 培养基重悬，调整细胞密度，接种至 48 孔板中，每孔 500 μ L 培养基，各 3 个复孔，放入培养箱中培养至少 4 小时。

G.3.1.2 检测结果

应满足：贴壁后的干细胞形态呈长梭形，细胞不增殖，细胞融合度80-90%。

G.3.2 淋巴细胞分离液分离外周血获得外周血单个核细胞

G.3.2.1 检测步骤

检查步骤如下：

T/CRH1A XXXX—XXXX

- 淋巴细胞分离液分离得到外周血单个核细胞，红细胞裂解液裂解红细胞，1000 rpm 离心 5 分钟，得到细胞沉淀用 5mL 10%胎牛血清-1640 培养基重悬贴壁培养 2 小时；
- 收集悬浮细胞用生理盐水洗涤一次，计数外周血单个核细胞，离心弃上清；
- 外周血单个核细胞沉淀加入 2mL 细胞增殖示踪荧光探针染液重悬细胞沉淀，37℃ 孵育 5 分钟；
- 加入 4mL 10%胎牛血清-1640 培养基稀释，1500rpm 离心 5 分钟；
- 弃上清，用 10%胎牛血清-1640 培养基洗涤 2 次，计数，弃上清，10%胎牛血清-1640 培养基重悬细胞沉淀，调整细胞浓度为 1×10^6 个/mL。

G. 3. 2. 2 检测结果

应满足：分离得到白色的单个核细胞，细胞增殖示踪荧光探针染液染色后，细胞呈淡黄色。

G. 3. 3 按照比例与人脐带间充质干细胞共培养

G. 3. 3. 1 检测步骤

检测步骤如下：

- 人脐带间充质干细胞：外周血单个核细胞分为 1:1、1:5、1:10 三组，每组 3 个复孔，阴性对照组、阳性对照各 3 个复孔，每孔 300 uL；
- 共培养第 3 天观察，每孔补液至 600 uL；
- 共培养第 6 天观察，收集各组上清，用于送检白介素 6、白介素 10、肿瘤坏死因子 a；
- 收集细胞，用生理盐水洗涤一次之后，用细胞增殖示踪荧光探针染液染色的外周血单个核细胞流式细胞术检测细胞增殖、淋巴细胞亚群检测。

G. 3. 3. 2 检测结果

应满足下列要求：

- 共培养组与阳性对照组相比，白介素 6、肿瘤坏死因子 a 表达下调，白介素 10 表达上调；
- 共培养组与阳性对照组相比，淋巴细胞增殖被显著抑制；
- 共培养组与阳性对照组相比，淋巴细胞亚群辅助性 T 细胞上调，细胞毒性 T 淋巴细胞下调。

参 考 文 献

- [1] 《脐带来源间充质干细胞的免疫抑制功能研究》（2020）
 - [2] 《临床级人脐带间充质干细胞资源库的构建》（2021）
 - [3] 《间充质干细胞制备及质量控制技术规范》（2020）
 - [4] Current Regulations for the Production of Multipotent Mesenchymal Stromal Cells for Clinical Application (2008)
 - [5] Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement (2006)
 - [6] 《间充质干细胞基础与临床》韩忠朝
 - [7] 《中华人民共和国药典》
 - [8] 《全国临床检验操作规程》
-