

# 团 体 标 准

T/CSB 0001—2023

## 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

2023 - 12 - 29 发布

2023 - 12 - 29 实施

中国生物工程学会 发布

# 人脐带间充质干细胞检测技术规范

## 1 范围

本文件规定了人脐带间充质干细胞检测的技术要求和检测方法。  
本文件适用于人脐带间充质干细胞的检测。

## 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。

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  
中华人民共和国药典 2020版  
全国临床检验操作规程 第五版

## 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

主要来源于中胚层的具有高度自我更新能力和多向分化潜能的成体干细胞，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成骨细胞、软骨细胞、脂肪细胞等。

### 3.2

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

来源于人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种技术。

### 3.4

**细胞表型** cell phenotype

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、成骨细胞的过程。

### 3.6

#### 成软骨分化 chondrogenic differentiation

通过特定的培养条件,诱导间充质干细胞分化为软骨细胞的过程。

### 3.7

#### 成脂分化 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。

### 3.8

#### 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

是用于评估干细胞对淋巴细胞增殖的抑制能力及其调控机制的方法。常见的检测方法包括:干细胞共培养法和细胞因子分析法。

## 4 符号和缩略语

下列缩略语适用于本文件。

HIV: 人类免疫缺陷病毒 (human immunodeficiency virus)

HAV: 甲型肝炎病毒 (hepatitis a virus)

HBV: 乙型肝炎病毒 (hepatitis b virus)

HCV: 丙型肝炎病毒 (hepatitis v virus)

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

HCMV: 人巨细胞病毒 (human cytomegalovirus)

HPVB19: 人类细小病毒B19 ((human parvovirus B19)

EBV: 人疱疹病毒 (epstein-barr virus)

TP: 梅毒螺旋体 (treponema pallidum)

COX: 柯萨奇病毒 (coxsackie)

## 5 技术要求

### 5.1 细胞形态

细胞贴壁培养时应呈纺锤形或梭形的成纤维细胞态，形态均一。

### 5.2 细胞活率

细胞活率应 $\geq 90\%$ 。

### 5.3 染色体核型

正常核型应为46, XX或46, XY且400-550条段阶段未见染色体异常。

### 5.4 细胞表型

应符合表1的要求。

表 1 细胞表型要求

阳性率( $\geq 95\%$ )	阴性率( $\leq 2\%$ )
CD105	CD45
CD73	CD34
CD90	CD11b或CD14
/	CD19 或 CD79 $\alpha$
/	HLA-DR

### 5.5 三系分化

应具有成骨、成软骨、成脂的分化潜能。

### 5.6 成瘤性

免疫缺陷动物（如小鼠）体内成瘤率应为零。

### 5.7 微生物

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

### 5.8 干细胞对淋巴细胞增殖抑制

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 $\alpha$ 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。

## 6 检测方法

### 6.1 细胞形态

贴壁培养条件下，用明视场相差显微镜进行观察。

## 6.2 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。

## 6.3 染色体核型

按照《中华人民共和国药典》“生物制品生产检定用动物细胞基质制备及质量控制”检测。

## 6.4 细胞表型

按照附录A的方法检测。

## 6.5 三系分化

### 6.5.1 成骨分化

按照附录B的方法检测。

### 6.5.2 成软骨分化

按照附录C的方法检测。

### 6.5.3 成脂分化

按照附录D的方法检测。

## 6.6 成瘤性

按照附录E的方法检测。

## 6.7 微生物

### 6.7.1 细菌

按照《中华人民共和国药典》中“1101无菌检查法”检测。

### 6.7.2 真菌

按照《中华人民共和国药典》中“1101无菌检查法”检测。

### 6.7.3 支原体

按照《中华人民共和国药典》中“3301支原体检查法”检测。

### 6.7.4 HAV

按照《全国临床检验操作规程》核酸法检测。

### 6.7.5 HBV

按照《全国临床检验操作规程》核酸法检测。

### 6.7.6 HCV

按照WS 213核酸法检测。

### 6.7.7 HIV

按照WS 293核酸法检测。

#### 6.7.8 HTLV

按照《全国临床检验操作规程》核酸法检测。

#### 6.7.9 HCMV

按照《全国临床检验操作规程》核酸法检测。

#### 6.7.10 HPV19

按照《全国临床检验操作规程》核酸法检测。

#### 6.7.11 EBV

按照《全国临床检验操作规程》核酸法检测。

#### 6.7.12 TP

按照WS 273核酸法检测。

#### 6.7.13 COX

按照《全国临床检验操作规程》核酸法检测。

### 6.8 干细胞对淋巴细胞增殖抑制检测

按照附录F的方法检测。

**附录 A**  
**(规范性)**  
**细胞表型检测 流式细胞术**

**A.1 仪器和设备**

使用的仪器和设备如下：

- 流式细胞仪；
- 水平离心机；
- 电子天平。

**A.2 试剂**

使用的试剂如下：

- 磷酸盐缓冲液：pH7.4；
- 牛血清白蛋白(BSA)：纯度 $\geq 98\%$ ；
- 叠氮钠( $\text{NaN}_3$ )；
- 抗人 CD105、CD73、CD90、CD45、CD34、CD11b 或 CD14、CD19 或 CD79、HLA-DR 抗体及同型对照抗体；
- 洗涤液，抗体稀释液。

**A.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。

**A.4 检测步骤**

**A.4.1 样品准备**

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

**A.4.2 抗体孵育**

按照抗体说明书进行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4分钟，弃上清。

**A.4.3 过滤上机**

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

**A.4.4 圈门设定原则**

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，然后根据同型对照组荧光强度，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。抗体同型对照作为阴性对照。

#### A.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 B**  
**(规范性)**  
**成骨分化检测 茜素红 S 染色法**

**B.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。

**B.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。

**B.3 检测步骤**

**B.3.1 细胞消化**

采用消化酶，根据消化酶说明书消化细胞，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。

**B.3.2 细胞计数**

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。

**B.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。

**B.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。

**B.4 结果分析**

显微镜下可见散在大量橘红色的钙结节。

**附 录 C**  
**(规范性)**  
**成脂分化检测 油红 O 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）；
- 成脂诱导液；
- 油红 O 染色试剂盒。

### C.3 检测步骤

#### C.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。

#### C.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。

#### C.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。

### C.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 D**  
**(规范性)**  
**成软骨分化检测 阿尔新蓝染色法**

**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);
- 成软骨诱导液;
- 阿尔新蓝染色试剂盒。

**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软骨诱导液产品说明书。诱导14天至21天。

**D.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。

**D.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 E**  
(规范性)  
**成瘤性检测 免疫缺陷小鼠检测法**

### 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)。

### 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 细胞移植

将总体积为0.2 mL, 总数为 $1 \times 10^6$ 和 $1 \times 10^7$ 个两个浓度梯度的人间充质干细胞腋下接种到4至6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(产品对应的溶媒0.2 mL(含 $1 \times 10^6$ 及 $1 \times 10^7$ HeLa细胞))。每组免疫缺陷小鼠数量为20只, 接种方式均为腋下接种。

#### E.3.3 肿瘤观察

接种后观察16周, 每周测量体重和肿瘤大小。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。

### E.4 结果分析

成瘤率按式(1)进行计算:  $Z = N / M \times 100 \dots\dots\dots(1)$

式中:

Z——成瘤率;

N——荷瘤小鼠总数;

T/CSB 0001—2023

M——接种小鼠总数。

注：成瘤率应为零。

## 附录 F (规范性附录)

### 干细胞对淋巴细胞增殖抑制检测 干细胞共培养法

#### F.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。

#### F.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。

#### F.3 检测步骤及要求

##### F.3.1 人脐带间充质干细胞培养

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%；
- 加入终浓度为 20  $\mu\text{g/mL}$  的丝裂霉素 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，用含 10%胎牛血清的 1640 培养基重悬，调整细胞密度，接种至 48 孔板中，每孔 500  $\mu\text{L}$  培养基，各 3 个复孔，放入培养箱中培养至少 4 小时。

##### F.3.2 淋巴细胞分离液分离外周血获得外周血单个核细胞

检查步骤如下：

- 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 含 10%胎牛血清的 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 1 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 2 mL 细胞增殖示踪荧光探针染液重悬细胞沉淀，37 摄氏度孵育 5 分钟；
- 加入 4 mL 含 10%胎牛血清的 1640 培养基，1500 rpm 离心 5 分钟；

——弃上清,用含 10%胎牛血清的 1640 培养基洗涤 2 次,计数,弃上清,用含 10%胎牛血清的 1640 培养基重悬细胞沉淀,调整细胞浓度为  $1 \times 10^6$  个/mL。

### F.3.3 外周血单个核细胞与人脐带间充质干细胞按照比例共培养

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、阳性对照组各 3 个复孔,每孔 300  $\mu$ L;

——共培养第 3 天观察,每孔补液至 600  $\mu$ L;

——共培养第 6 天观察,收集各组上清,用于检测白介素 6、白介素 10、肿瘤坏死因子  $\alpha$ ;

——收集细胞,用生理盐水洗涤 1 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。

### F.4 结果分析

结果分析应符合 5.8 的要求。

### 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
-