

ICS 01.040.11

C 04

团 体 标 准

T/JPMA 008—2020

药用纳米氧化铁示踪剂标记临床级人脐带 间充质干细胞的技术规范

The technical specification practices of medicinal nano-sized iron oxide tracers
labeling clinical grade human umbilical cord mesenchymal stem cells

2020 - 09 - 02 发布

2020 - 10 - 01 实施

江苏省预防医学会 发布

目 次

前 言	II
1 范围	1
2 规范性引用文件	1
3 术语和定义	1
4 操作前准备	3
5 操作规范	3
6 质量检测	6
附 录 A（规范性附录）表 A.1 人脐带间充质干细胞供者健康信息采集表	11



前 言

本标准按照GB/T 1.1-2009给出的规则起草。

本标准由南京鼓楼医院提出。

本标准由江苏省预防医学会归口。

本标准起草单位：南京鼓楼医院，东南大学，南京市口腔医院。

本标准主要起草人：王斌，顾宁，秦海燕，谢园园，刘硕，孙剑飞，麦筱莉，杨慧，高天芸，王留娣，王文清，邵晨旭，陈冬，黄霏霏，曾生。



药用纳米氧化铁示踪剂标记临床级人脐带间充质干细胞的技术规范

1 范围

本标准规定了药用纳米氧化铁示踪剂标记临床级人脐带间充质干细胞的术语和定义、操作前准备、操作规范和质量检测。

本标准适用于药用纳米氧化铁示踪剂标记临床级人脐带间充质干细胞,为干细胞示踪的临床转化提供技术性支持。

2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件,仅所注日期的版本适用于本文件。凡是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 3095 环境空气质量标准

T11/CSSCR 001-2017 干细胞通用要求

实验室生物安全手册(WHO第三版)

中华人民共和国药典四部(2015年版)

中国药品检验标准操作规程(2010年版)

人体细胞治疗研究和制剂质量控制技术指导原则(2003年版)

ISSCR 干细胞研究和临床转化指南(2017版)

干细胞制剂质量控制及临床前研究指导原则(试行)(国卫办科教发〔2015〕46号)

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

纳米氧化铁示踪剂 nano-sized iron oxide tracer

基于氧化物和纯金属的具有磁响应性的纳米级铁粒子,是一种表面积大、生物利用度高的无机金属类纳米化合物,具有良好的光学性质、磁性和催化性能等特点。可以标记干细胞响应MRI信号作为干细胞移植的示踪剂。

3.2

药用纳米氧化铁 medicinal nano-sized iron oxide

应用于干细胞标记的药用纳米氧化铁是由国家药品监督管理局(National Medical Products Administration, NMPA)批准用于临床的药用产品,已用于治疗缺铁性贫血及MRI的对比剂等。其具体参数如下:颗粒水动力尺寸与多分散性系数是34 nm (0.2),氧化铁晶体核心尺寸 6 nm ~ 8 nm,铁含量为29.34 mg/mL,为保证制剂的等渗性,制剂中包含约44 mg/mL的甘露醇。氧化铁晶体类型为 γ -Fe₂O₃,外部修饰的材料是聚葡萄糖山梨醇羧甲基醚,厚度约为14 nm。

3.3

临床级人脐带间充质干细胞 clinical grade human umbilical cord mesenchymal stem cell

从健康供体的新生儿脐带组织中分离和制备的符合质量要求的可用于临床项目和应用的多功能的间充质干细胞。

3.4

人脐带间充质干细胞扩增 human umbilical cord mesenchymal stem cell amplification

人脐带间充质干细胞从新鲜脐带组织样本分离制备，经过一系列规范培养后，细胞数量得到增加的过程。

3.5

细胞标记 cell marking

为了追踪调查靶细胞（群）在多细胞系统中的作用和行为，采用合适的物理或化学方法将示踪剂标记靶细胞（群）的方法。

3.6

人脐带间充质干细胞分化 human umbilical cord mesenchymal stem cell differentiation

同一来源的人脐带间充质干细胞在特定条件下逐渐产生出形态结构、功能特征各不相同的细胞类型的过程。

3.7

人脐带间充质干细胞冻存 human umbilical cord mesenchymal stem cell cryopreservation

将合适的冻存剂与人脐带间充质干细胞混合后，保存在低温环境使其暂时脱离生长状态，减少细胞代谢，保存干细胞特性的长期储存技术。

3.8

人脐带间充质干细胞复苏 human umbilical cord mesenchymal stem cell thawing

人脐带间充质干细胞从低温冷冻状态解冻后重新恢复生长活性的过程。

3.9

人脐带间充质干细胞传代培养 human umbilical cord mesenchymal stem cell subculture

为避免细胞随着时间延长，不断分裂导致融合度过高而发生接触性抑制，将培养中的人脐带间充质干细胞以化学或物理方法处理成单细胞悬液，重新接种培养的过程。

3.10

人脐带间充质干细胞纯度 human umbilical cord mesenchymal stem cell purity

具有特定生物学特性（如细胞表面标志物、遗传多态性及生物学活性等）的人脐带间充质干细胞占全部细胞的百分比。

3.11

干细胞质量检测 stem cell quality detection

在符合GMP要求基础上，干细胞在采样、制备、入库、出库和临床使用过程中所建立的标准操作、质量控制及管理程序。

3.12

致瘤性 tumorigenicity

干细胞形成肿瘤或者异常生长的特征。

4 操作前准备

4.1 知情同意

4.1.1 干细胞操作人员应用通俗、清晰、准确的语言告知干细胞样本捐献者所参与的干细胞研究项目的目的、意义和内容，预期受益和潜在风险。

4.1.2 确保干细胞标记示踪项目应符合伦理原则和法律规定。样本捐献者或其近亲属对项目信息在当时科学技术条件下充分知情、形成全面和准确的认识，自愿做出是否同意采集样本的决定，并签署知情同意书。

4.2 隐私保护

4.2.1 采取具体措施保护样本提供者的隐私，记录数据仅对操作人员、监督机构和有合法权力审查数据的机构公开。

4.2.2 若确需提供信息，需经相关申请程序并提交伦理委员会批准同意后方可实施。所有原始数据，相关文件材料，作为机要档案保管。

4.3 伦理学审查

4.3.1 经过严格质量评价，在确保示踪剂的安全性和有效性后，药用纳米氧化铁示踪剂标记临床级人脐带间充质干细胞在应用于临床前应严格按照国家干细胞监管法规要求，通过专门的干细胞研究伦理专家委员会审查批准，确保标记干细胞的临床应用符合伦理规范。

5 操作规范

5.1 总则

5.1.1 内容涉及干细胞样本采集、细胞制备、扩增、药用纳米氧化铁标记细胞过程、标记后细胞的质量检验以及细胞出库前的放行检验等，均需制定相应标准操作程序(Standard Operating Procedure, SOP)、质量管理文件和管理规范，并按照标准操作程序和《药品生产质量管理规范》(Good Manufacturing Practice, GMP)的基本原则和相关要求严格执行。

5.1.2 主要操作人员须经过临床试验管理规范(Good Clinical Practice, GCP)培训，并获得相应资质。

5.1.3 原辅材料、制备过程和质量检测应优选符合 GMP、《干细胞通用要求》和《干细胞制剂质量控制及临床前研究指导原则》要求，最大限度地降低制备过程中的污染风险，确保持续稳定地制备符合预定用途和质量要求的干细胞制剂。

5.1.4 操作过程中涉及的所有操作都应有文档记录，确保资料具有可追溯性。

5.2 新生儿脐带样本采集

5.2.1 供者健康

5.2.1.1 应对干细胞供者的基本信息与健康信息进行详细采集与记录，包括供者的一般信息、既往病史、家族史等，供者应无血液系统疾病、内分泌系统疾病、恶性肿瘤史、性病及高危人群史、吸毒史、一般传染性疾病或其他遗传疾病，同时做好对供者的隐私保护。

5.2.1.2 供者的年龄宜小于 35 周岁。供体应经过检验筛选证明无人源特定病毒（包括但不限于 HIV、HBV、HCV、HPV、EBV 和 CMV 等）及梅毒螺旋体的感染。必要时需要收集供者的 ABO 血型、HLA-I 类和 II 类分型的资料，以备追溯性查询。

5.2.1.3 供者健康信息应详细记录，健康信息采集表按附录 A 填写。

5.2.2 采集场所

新生儿脐带样本的采集场所应达到 II 级标准洁净手术室要求，无菌采集。

5.2.3 采集方法

5.2.3.1 新生儿脐带样本采集应由经严格专业培训的助产士或产科医生在胎盘娩出后立即采集。

5.2.3.2 胎儿分娩后即刻按产科常规断脐，胎盘娩出后，采集者用碘伏自胎盘端向脐带断端快速消毒脐带 20 cm，清除血液、羊水及胎粪等混合物。

5.2.3.3 在距胎盘最近处 5 cm ~ 8 cm 处用两把止血钳夹住，然后在靠近脐带止血钳的内端用手术绳（脐带圈）结扎，从两把止血钳间剪断脐带。结扎两端的内侧可用脐带大于 15 cm。

5.2.3.4 将脐带样本置于无菌采集瓶中，同时加入保存液以浸没脐带组织。采集瓶密闭包装，并贴条形码作为标识。

5.2.3.5 采集完毕，立即清场，医疗废弃物送往指定地点销毁，彻底清洗地面及台面污渍。

5.3 样本运输

5.3.1 应保证脐带样本从采集机构到制备机构的运输过程中完好。

5.3.2 运输脐带样本的容器应能够将运输过程中的温度控制在 2℃ ~ 8℃。运输容器的性能在使用前进行确认和验证，以确保其能为脐带组织提供符合要求的贮运条件。

5.3.3 脐带样本运输人员应是经过培训的专业人员，样本运输容器表面应有明确的标识，包括但不限于：内容物名称、发运人及联系方式、接收人及联系方式、运输条件和警示标志等。

5.3.4 运输过程中需防放射线、抗震动、耐压和耐热等，样本包装需贴上条形码作为标识。

5.3.5 脐带样本运输应有完整运输记录。根据运输记录，应能够追溯采集医疗机构的名称、样本的名称、样本的采集时间、离开采集医疗机构的时间、送达干细胞制剂制备机构时间以及交接的确认。

5.4 样本接收

5.4.1 脐带样本接收人员应是经过培训的专业人员，应遵从安全与准确的原则对样本接收制定规范及应急预案，并对样本接收过程进行记录。

5.4.2 脐带样本接收时，需进行样本的核对与检查，包括但不限于名称、数量、重量、供者信息、健康调查表单等，确保容器完整及密封状态。

5.4.3 确认记录表信息完整性，核对条形码信息，做到样本与供者信息相对应，确认无误后进行接收。

5.4.4 脐带样本接收后，常规消毒容器表面，暂置于 2℃ ~ 8℃ 医用冰箱内。

5.4.5 干细胞制备方需制定样本不符合标准的拒收准则，如样本出现异常，拒收时，及时通知有关部门或负责人，同时做好相应记录。

5.5 人脐带间充质干细胞分离与培养

5.5.1 基本要求

5.5.1.1 临床级人脐带间充干细胞分离与原代培养应在符合 GMP 操作要求、空气质量标准符合 GB 3095 标准分级二级标准的细胞培养间内进行。

5.5.1.2 制备机构应建立人脐带间充质干细胞全过程的操作规程，包括干细胞的富集、扩增、收获、冻存和分装等操作，分离与培养过程中应标明干细胞的名称、代次、操作日期、培养条件、操作人员姓名等信息。

5.5.1.3 培养基、辅料和耗材的选择，尽量采用符合《中华人民共和国药典》、《干细胞通用要求》和《干细胞制剂质量控制及临床前研究指导原则》要求的药品辅料或已经获批的药品，应出具产品质量合格报告，并对各批次试剂进行质量抽检。

5.5.1.4 应尽可能避免使用人源或动物源性血清及蛋白，不得使用同种异体人血清或血浆。如必须使用动物血清，应确保其无特定动物源性病毒污染。如需要使用猪源胰酶，应确保其无猪源细小病毒污染。严禁使用来自海绵体状脑病疫区的牛血清。

5.5.1.5 培养基中如果含有人的血液成分，如白蛋白等生物源性成分，应尽量采用具有临床资质的产品，并明确其来源、批号、制造商及制造商提供的质量检定合格报告，同一批次产品在使用前复检病毒学和传染病学指标，包括但不限于 HBV、HCV、HIV 和梅毒螺旋体等。

5.5.2 人脐带间充质干细胞分离与原代培养方法

5.5.2.1 将脐带剪成 2 cm 左右的小段，用含 2% 双抗的 CTS™ 0.01 M 磷酸缓冲盐溶液(Phosphate Buffer Saline, PBS) (+Ca²⁺,+Mg²⁺) 洗至无血液存在。

5.5.2.2 剔除脐带中的 3 根血管，即两根动脉、一根静脉。

5.5.2.3 剔除血管后的脐带用眼科剪剪碎成大约 1 mm³ 的细小块。

5.5.2.4 组织块贴壁法或消化法直接在 T 75 培养瓶中培养。

5.6 人脐带间充质干细胞传代

5.6.1 人脐带间充质干细胞一般在达到 80% ~ 90% 融合度可进行传代操作，消化液 37℃ 孵育 2 min ~ 3 min 后用完全培养基终止，传代操作应及时、迅速。

5.6.2 传代所使用消化酶应符合相应的要求。如必须使用动物源性消化酶，应确保其无特定动物源性病毒污染。

5.7 人脐带间充质干细胞冻存

5.7.1 细胞在培养瓶(皿)中达到冻存的数量要求时，应按标准操作规程消化细胞，后加入适当的冻存液，以梯度降温为原则，最终保存在液氮中，并做好细胞名称、代次、储存日期、储存位置和操作人员等信息的记录。

5.7.2 冻存液宜采用有临床资质或国家规定的产品。

5.7.3 细胞库应选择符合规定的的冻存容器，定期补充液氮，保证细胞库温度恒定。

5.8 人脐带间充质干细胞复苏

5.8.1 将金属浴预热至 37℃。

5.8.2 将欲复苏的细胞冻存管自液氮容器中快速取出并确认盖子处于密闭状态，确保信息准确。

5.8.3 将冻存管立即置于 37℃ 金属浴模块中，使其迅速融化后采用 75% 乙醇擦拭冻存管外部，移入无菌操作台内。

5.8.4 将含有冻存液的细胞加入培养基中离心洗涤 2 ~ 3 次, 加入新鲜培养基重悬细胞, 混合均匀, 转移至培养瓶, 放入 37 °C, 5 % CO₂ 培养箱中培养。

5.8.5 在复苏的记录单和培养瓶上标明细胞复苏时间、代次、名称和操作人员等。

5.9 标记细胞溶液配制

5.9.1 多聚赖氨酸 (Poly-L-lysine, PLL) (分子量大于 30,000 KD) 的配制: 使用无菌超纯水配置成 1 mg/mL 的储存液。

5.9.2 标记溶液浓缩液配制: 药用纳米氧化铁示踪剂终浓度 5 mg/mL、多聚赖氨酸终浓度 100 µg/mL, 无菌超纯水补齐配至总体积为 1 mL。

5.9.3 将上述溶液混匀后, 放入超声水浴锅 (10 Hz ~ 30Hz) 持续超声 3 小时以上, 超声过程中勿盖超声水浴锅盖, 避免超声产热导致温度过高。

5.9.4 标记溶液工作液配制: 以 200 µg/mL 铁终浓度(平均每个细胞吞入铁含量为 10 pg 左右)配 10 mL 完全培养基为例: 加入 400 µL 上述超声后的复合物、9.6 mL 干细胞完全培养基, 配制后用孔径 0.22 µm 滤器过滤。

5.9.5 在操作的记录单上标明溶液配制时间、配制体积和操作人员等。

5.10 标记人脐带间充质干细胞方法

5.10.1 药用纳米氧化铁示踪剂标记临床级人脐带间充质干细胞的过程操作也应严格遵照 GMP 要求, 保证无外源微生物污染。

5.10.2 人脐带间充质干细胞准备: 待细胞生长密度达到 80 % ~ 90 % 融合度时消化细胞, 离心后重悬并计数细胞。根据细胞的生长速度和特性接种适量的细胞至培养瓶或培养板中。

5.10.3 上述细胞置于 37 °C, 5 % CO₂ 培养箱中培养 24 h 后, 细胞密度生长至 40 % ~ 50 % 融合度, 更换成基础培养基。

5.10.4 上述细胞置于 37 °C, 5 % CO₂ 培养箱中饥饿 24 h 后, 细胞密度生长至 70 % ~ 80 % 融合度更换成标记溶液工作液 (5.9.4 中配置)。

5.10.5 上述细胞置于 37 °C, 5 % CO₂ 培养箱中孵育 24 h 后采用普鲁士蓝染色或电镜观察检测细胞是否标记成功。

5.11 标记的人脐带间充质干细胞收集

5.11.1 标记后的细胞在融合度达到 80 % ~ 90 % 可进行收集, 收集前弃去含纳米氧化铁的培养基, 0.01 M PBS 洗涤两次。

5.11.2 以化学或物理方法收取的细胞用 0.01 M PBS 离心 (1,200 rpm, 5 min) 两次。

5.11.3 根据使用要求, 依据《人体细胞治疗研究和制剂质量控制技术指导原则》, 制成适宜浓度的细胞悬液。

6 质量检测

6.1 质检内容

药用纳米氧化铁示踪剂标记的临床级人间充质干细胞的检测项目、标准要求、检验方法见表1。

表1 药用纳米氧化铁示踪剂标记的临床级人脐带间充质干细胞的质量标准及检验方法

检测项目	标准要求	检验方法
标记阳性率	阳性率大于90 %	普鲁士蓝染色法
细胞内铁分布	细胞内可见大量黑色铁颗粒弥散分布	电镜法
细胞内平均铁含量	pg 级	ICP-MS
磁共振成像	T2*序列标记干细胞呈低信号	MRI
细胞形态	贴壁生长, 呈现均一的纤维状长梭形	光学显微镜观察
细胞活率	大于等于85 %	台盼蓝拒染法
支原体	阴性	PCR法
微生物	细菌和真菌阴性	微生物培养鉴定法
细胞表面标志物	CD11b/CD19/CD34/CD45/HLA-DR/H LA-DQ均小于等于2%; CD44/CD73/CD90/CD105阳性率均大 于等于95%	流式细胞术测定法
细胞凋亡	与未标记的细胞无显著性差异	凋亡试剂盒FITC/PI双染色法
多系分化潜能	可以分化成骨、脂和软骨细胞	条件培养基诱导分化法
细胞周期	G0期细胞数小于等于10%	流式细胞术
倍增时间	“S形”曲线生长	CCK-8法
生长活性	与未标记的对照组无差异	端粒酶活性检测法
遗传均一性	与未标记的对照组STR无差异	基因组二代测序法
内毒素	小于等于0.25 EU/mL	鲎试剂盒法
染色体核型分析	染色体数量应为46, XX/XY, 无染色 体缺失、异位和重排等异常	G带分析法
致瘤性	体内无成瘤性	免疫缺陷小鼠体内细胞接种法
特定淋巴细胞亚群影响能力	抑制Th1和Th17亚群增殖, 促进Tregs 亚群增殖	细胞共培养后流式细胞术测定法
淋巴细胞增殖抑制能力	抑制淋巴细胞增殖	CFSE 染色法

6.1.1 标记的干细胞标记阳性率检测

6.1.1.1 普鲁士蓝染色法

标记的干细胞经过多聚甲醛固定后，通过普鲁士蓝染色，显微镜下观察细胞内的纳米氧化铁颗粒被染成蓝色，标记效率应大于90%。

6.1.1.2 电镜观察法

标记的干细胞经过固定、脱水和干燥等步骤后，制作好标本在电镜下进一步观察纳米氧化铁颗粒在细胞内的分布。

6.1.1.3 电感耦合等离子体质谱法（Inductively coupled plasma mass spectrometry, ICP-MS）

用于检测平均单个细胞内铁含量：标记的干细胞经过离心收集后，加入浓盐酸和浓硝酸的混合液（3:1, V/V；推荐 2×10^6 细胞加入3 mL混合液），在60℃水浴锅裂解达8 h以上，经电感耦合等离子体质谱检测后，平均每个细胞内的铁含量应达到pg级别。

6.1.1.4 磁共振成像

用磁共振成像仪采集标记干细胞的信号：梯度稀释的标记干细胞单细胞悬液与琼脂糖溶液混合均匀且不含气泡，在超高场7.0 T布鲁克磁共振仪进行标记干细胞的成像采集。采集序列为：初始TE：2.3 ms；TE间隔：2.7 ms；回波数：6；翻转角：15；TR：50 ms。T₂*序列分析，标记干细胞呈现低信号。

6.1.2 标记的干细胞生物学特性

6.1.2.1 细胞形态检测

标记的干细胞显微镜下观察，细胞贴壁生长，伸展呈长梭形纤维细胞样，形态均一，与未标记的对照组细胞形态无差异。

6.1.2.2 表面标志物检测

采用流式细胞术检测，标记的干细胞表面标志物CD11b、CD19、CD34、CD45、HLA-DR和HLA-DQ阳性率不高于2%；CD44、CD73、CD90和CD105阳性率不低于95%。与未标记的对照组细胞表面标志物无差异。

6.1.2.3 多项分化潜能检测

标记的干细胞在体外条件培养基诱导培养下仍具有分化为脂肪、骨和软骨细胞的潜能。成脂、成骨和成软骨分化可分别采用油红O、茜素红和阿尔辛蓝染色法鉴定。

6.1.2.4 细胞遗传学检测

标记的干细胞遗传学可采用核型-Giemsa染色法检定，正常细胞染色体参考值为二倍体（46, XX）或（46, XY）。标记后的干细胞应无染色体缺失、异位和重排等异常。

6.1.3 标记的干细胞安全性

6.1.3.1 通用要求

依据《ISSCR干细胞研究和临床转化指南》，对标记的干细胞样本采集、运输、分离、培养、冻存、复苏和标记等生产制备环节进行留样检测。

6.1.3.2 无菌检测

包括细菌和真菌检测，依据现行版《中华人民共和国药典》（2015年版四部）通则1101，采用薄膜过滤法，直接培养法14 d。目前常规使用自动化微生物检测系统（BacT / ALERT 3D, BioMérieux）培养5 d。细菌和真菌检测结果都应为阴性。

6.1.3.3 支原体检测

依据现行版《中华人民共和国药典》（2015年版四部）通则3301，采用28 d培养法、指示细胞培养法（DNA染色法）或聚合酶链反应（Polymerase Chain Reaction, PCR）检测方法。目前ATCC生产的“通用支原体检测试剂盒”是基于PCR的方法，可以通过基于核酸扩增技术（Nucleic Acid Amplification Testing, NAAT）的方法替换传统的金标准方法，具有相同的灵敏度和特异性，但检测快捷方便。支原体结果应为阴性。

6.1.3.4 内毒素检测

该方法用于检测最终产物中的细菌内毒素水平。参考《中国药品检验标准操作规程》（2010年版），依据现行版《中华人民共和国药典》（2015年版四部）通则1143，采用凝胶血块变形细胞裂解物测定法和光度测定法。各类样本中的内毒素检测值应小于等于0.25 EU/mL。

6.1.3.5 致瘤性检测

采用免疫缺陷动物（裸鼠或SCID鼠），通过皮下或尾静脉方式接种标记的干细胞，评价药用纳米氧化铁示踪剂标记的人脐带间充质干细胞致瘤性。体内致瘤试验严格遵照动物伦理要求执行，单只小鼠接种标记的干细胞数量大于等于 1×10^7 细胞/kg，观察期大于等于4个月。标记的干细胞应无致瘤性。

6.1.3.6 培养基及其他添加成分残余量检测

应对制剂制备过程中残余的、影响干细胞制剂质量和安全性的成分，如牛血清蛋白（Bovine Serum Albumin, BSA）等进行检测。依据现行版《中华人民共和国药典》（2015年版四部）通则3411，通过ELISA方法来定量检测BSA残留。BSA残留量应小于50 ng/mL。

6.1.4 标记的干细胞稳定性

6.1.4.1 存活率检测

采用血细胞计数器测定细胞数，并通过台盼蓝拒染法进行细胞存活率测定，标记的干细胞活细胞比例大于等于85 %。

6.1.4.2 凋亡率检测

采用流式法或免疫荧光等方法检测。标记方法对人脐带间充质干细胞凋亡率无明显影响。

6.1.4.3 细胞倍增时间检测（CCK-8 检测法）

标记的干细胞铺板在96孔板内（ 2×10^4 细胞/孔），按照试剂操作说明进行操作，连续测量细胞7 d生长变化，细胞生长曲线应呈现“S形”增长。

6.1.4.4 细胞周期检测

采用流式细胞仪检测处于指数增长期的标记干细胞，G₀期细胞数应小于等于10 %。

6.1.4.5 生长活性

采用端粒酶活性检测试剂盒进行检测。药用纳米氧化铁示踪剂不显著影响端粒酶活性。

6.1.4.6 遗传均一性检测

采用人基因组DNA短片段重复序列（Short Tandem Repeat, STR）测序进行检定。单一细胞系的标记干细胞各批次STR检测结果应保持一致。

6.1.4.7 免疫调节检测

采用流式细胞术测定标记的干细胞对于活化的人总淋巴细胞的增殖和对不同淋巴细胞亚群增殖能力的影响。将标记的干细胞与外周血单个核细胞（Peripheral Blood Mononuclear Cell, PBMC）共培养，应抑制总淋巴细胞增殖，抑制促炎症CD4⁺淋巴细胞增殖，如Th1和Th17淋巴细胞亚群增殖，同时促进调节性T细胞（Tregs）的成熟和Th2淋巴细胞的增殖。

6.2 标记的干细胞放行检验

6.2.1 总则

依据《人体细胞治疗研究和制剂质量控制技术指导原则》，放行检验项目应能在相对短的时间内，反映细胞制剂的质量及安全信息。待出库的细胞应尽快使用（12 h内），以确保细胞处于最优状态。

6.2.2 显微镜下观察

细胞状态良好，贴壁生长，呈长梭形纤维细胞样，形态均一，生长密度在80% ~ 90%。

6.2.3 安全性检查

包括细菌和真菌、支原体、内毒素和牛血清白蛋白残留检测，均为阴性。

6.2.4 标记效率检测

普鲁士蓝染色法快速检测阳性率应大于90%。

附 录 A
(规范性附录)
人脐带间充质干细胞供者健康信息采集表

供者基本资料

姓名		年龄		民族		住院号	
联系地址				电话			

既往史

曾患各类型的肝炎 (无 有) 肝炎病毒检查阳性 (无 有)
 与传染病病人接触史 (无 有) 与患有艾滋病者性接触 (无 有)
 疫苗接种史 (无 有) 组织、器官移植史 (无 有)
 家族遗传病 (无 有) 白血病/癌 (无 有)
 同性恋者 (否 是) 吸毒史 (无 有)
 贫血 (无 有) 因溶血性疾病切除脾脏 (无 有)
 性病史 (无 有) 与患有性病者性接触 (无 有)
 与患有急慢性病毒性肝炎性接触 (无 有)

其他_____

查体

营养_____ 皮肤_____ 淋巴结_____ 甲状腺_____
 乳房_____ 心率_____ 呼吸音_____ 脊 柱_____
 四肢_____ 外阴_____ 其 他_____

供者检查结果

1.血型 (□A, □B, □O, □AB) Rh (□+, □-, □未查)
 2.HBsAg (□-, □+) 3.HBcAb (□-, □+) 4.Anti-HCV (□-, □+)
 5.Anti-HIV (□-, □+) 6.梅毒血清 (□-, □+)
 7.CMV-DNA (□-, □+) 8.EBV-DNA (□-, □+)

孕育情况

1.分娩方式 (□自然分娩, □剖宫产) 2.孕期:_____周
 3.分娩过程是否使用药物(催产素除外) (□无, □有)
 4.妊娠期间曾患何种病 (□无, □有)

婴儿资料

1.分娩时间: _____年_____月_____日_____时_____分
 2.性别 (□男, □女) 3.体重_____g
 4.胎儿情况 (□正常, □畸形) 5.Apgar 评分____分

备注

- 1.表格内容务必真实, 完整。
- 2.在对应项前的“□”内打“√”。
- 3.内容如有更改, 请在更改的内容后面签字确认, 并注明日期。