

人间充质干细胞质量测定技术规范
第1部分 人间充质干细胞群体倍增时间
测定

Technical specification for quality measurement of human mesenchymal stem cells
Part 1 Determination of human mesenchymal stem cell's Population Doubling Time

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 方法原理	1
5 通用要求	1
5.1 试剂或材料	2
5.2 仪器设备	2
5.3 样本准备	2
5.4 试验步骤	2
5.5 数据分析	2
参考文献	4

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。

本文件由湖北省卫生健康委员会提出并归口。

本文件起草单位：武汉珈创生物技术股份有限公司，华中科技大学同济医学院附属协和医院，武汉光谷中源药业有限公司，武汉汉密顿生物科技股份有限公司。

本文件主要起草人：郑从义、徐国东、袁冰、刘愈杰、胡豫、梅恒、姚惟琦、武栋成。

引 言

细胞群体倍增时间是指细胞在培养条件下生长时其数目倍增所需的时间。通过对人间充质干细胞群体倍增时间的测定，可以评价其在体外培养条件下的分裂增殖能力。

人间充质干细胞质量测定技术规范

第 1 部分 人间充质干细胞群体倍增时间测定

1 范围

本文件描述了通过绘制细胞生长曲线来测定人间充质干细胞群体倍增时间的方法原理、试剂或材料、仪器设备、样本准备、试验步骤以及数据分析的方法。

本文件适用于检测人间充质干细胞群体倍增时间。

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 6682 分析实验室用水规格和试验方法

中华人民共和国药典

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

人间充质干细胞 human mesenchymal stem cell

一类贴壁培养后呈成纤维细胞样形态（纺锤形和梭形）、可在体外自我更新并具有成骨、成脂、成软骨等分化能力的干细胞。

注：人间充质干细胞可由多种人体组织（如骨髓、脐带、胎盘、脂肪、脐带血等）分离得到，也可以通过分化或转分化等方式获得；不同来源的人间充质干细胞再基因表达和分化能力方面存在差异。

3.2

细胞计数 cell counting

细胞数量的测量。

[来源：ISO 20391-1：2018，3.8]

4 方法原理

细胞在体外进行传代培养时一般要经历调整期、对数期和平台期。细胞处于对数生长期时，生长速度达到最大，受到的环境因素最小，细胞群体的形态与生理特性最一致。群体倍增时间指的就是在对数生长期中期，细胞增加一倍所需要的时间。因此，要计算细胞群体倍增时间，需要先通过绘制细胞生长曲线找出细胞的对数生长期。

5 通用要求

5.1 试剂或材料

本方法使用试剂均为分析纯，除特别说明外，实验用水均为GB/T 6682规定的一级水。

5.1.1 磷酸盐缓冲液：pH 7.4

5.1.2 干细胞温和消化酶

5.1.3 人间充质干细胞完全培养基

5.1.4 细胞培养 24 孔板

5.2 仪器设备

5.2.1 细胞计数仪

5.2.2 水平离心机

5.2.3 二氧化碳细胞培养箱

5.3 样本准备

5.3.1 样品制备

选择处于对数生长期的待检样品细胞，细胞存活率 $\geq 90\%$ ，通过干细胞温和消化酶消化之后，使用水平离心机300 g离心10 min，弃上清。加入人间充质干细胞完全培养基重悬，调整细胞密度为4000-6000 细胞/mL。样品制备过程中细胞存活率检测及细胞计数方法应符合T/CSCB 0003要求。

5.4 试验步骤

5.4.1 细胞接种

将细胞悬液接种于24孔板中，每孔1 ml细胞悬液，轻轻震荡混匀后每孔再补充1 mL人间充质干细胞完全培养基，置于37 °C、5%二氧化碳浓度细胞培养箱中培养。接种孔数不少于24孔。

5.4.2 细胞计数

接种后24 h开始计数，每次消化3孔细胞。去掉细胞培养基，用磷酸缓冲液润洗培养孔，加入干细胞温和消化酶消化细胞，转移至1.5 mL的EP管中。300 g离心10 min，弃上清，加入一定量的完全培养基重悬。按照细胞计数仪的应用手册进行细胞计数，保存图像及结果，计算3孔细胞的算数平均值，作为该次计数结果。

间隔24 h取3孔细胞计数一次。在发现细胞数目未明显增加时，停止计数，以单位体积细胞数（cells/ml）为纵坐标，以时间为横坐标绘制细胞密度-时间曲线。

5.5 数据分析

根据细胞计数结果绘制细胞生长曲线，细胞生长曲线应该包括调整期，对数期和平台期，如果样品细胞满足细胞生长曲线要求，则试验有效，并计算出细胞的群体倍增时间。计算公式为：

$$\text{群体倍增时间} = T/A \quad A = \log_2(Y/X) \dots\dots\dots (1)$$

式中：Y—细胞峰值前一天的细胞计数

X—接种细胞数

T—细胞生长时间

群体倍增时间计算公式符合中华人民共和国药典要求。

参 考 文 献

- [1] 干细胞制剂质量控制及临床前研究指导原则（试行）
 - [2] T/CSCB 0001-2020 干细胞通用要求
 - [3] T/CSCB 0003-2021 人间充质干细胞
 - [4] ISO 20391-1:2018 Biotechnology-Cell counting-Part 1:General guidance on cell counting methods
 - [5] 临床研究用人间充质干细胞质量评价规范（讨论稿）
-