一种新型细胞智造产线与人工制备对比

钟桂强[1]，张　芬[1]，王清芳[1]，梁　晓[1]，刘沐芸[2*]

（1. 深圳市北科生物科技有限公司，广东深圳 518061；2. 细胞产业关键共性技术国家工程研究中心，广东深圳 518061）

摘要：针对人工制备细胞效率低、成本高及产品批间差异大等缺点，该研究开发了一种新型的人源性脐带间充质干细胞（hUC-MSCs）智造产线，并对比了其与传统人工制备所得细胞的基本特性、安全性及有效性。结果显示，智造产线制备的hUC-MSCs呈纤维状，细胞表面标志物均符合国际细胞与基因治疗协会中定义的间充质干细胞的要求；细胞无菌、支原体结果均呈阴性，内毒素含量低于0.5 EU/mL；癌基因、抑癌基因和核型分析结果正常，端粒酶表达为低活性，异常毒性结果正常；所得细胞的活率高于90%，具有良好的成骨、成脂、成软骨能力，对Th1、Th2、Th17细胞的增殖呈抑制作用，对T_{reg}细胞的增殖则有促进作用。该细胞智造产线制备的hUC-MSCs与人工制备的相比，无显著差异且符合质量标准；并且，在细胞均一性、产能提升、成本优化和部署优越性等方面更有优势，为实现细胞的规模化和产业化制备提供了新思路。

关键词：间充质干细胞；细胞智造产线；自动化；产能提升

中图分类号：TP278　　**文献标志码**：A　　**文章编号**：1001-8255(2024)07-1016-08

引用：钟桂强，张　芬，王清芳，等. 一种新型细胞智造产线与人工制备对比[J]. 中国医药工业杂志，2024, 55(7): 1016-1023. DOI：10.16522/j.cnki.cjph.2024.07.016

Comparison between a New Type of Cell Intelligent Manufacturing Line and Manual Preparation

ZHONG Guiqiang[1], ZHANG Fen[1], WANG Qingfang[1], LIANG Xiao[1], LIU Muyun[2*]

(*1. Shenzhen Beike Biotechnology Co., Ltd., Shenzhen 518061; 2. National Engineering Research Center of Foundational Technologies for CGT Industry, Shenzhen 518061*)

ABSTRACT: To address the shortcomings of low efficiency, high cost and large batch-to-batch variation of manually prepared cells, this study developed a novel smart production line for human umbilical cord mesenchymal stem cells (hUC-MSCs), and compared the basic cell characteristics, safety and efficacy of the obtained cells with those of traditional manually prepared cells. The results showed that the hUC-MSCs prepared by the smart production line were fibrous, and the cell surface markers met the requirements of MSCs defined by the International Society for Cell & Gene Therapy. The results of cell sterility and mycoplasma were negative, and the content of endotoxin was lower than 0.5 EU/mL. The results of oncogenes, oncogenes suppressor and karyotyping analyses were normal. The expression of telomerase was in low activity. The results of abnormal toxicity were normal. The cell viability was higher than 90% . And the strong capabilities of osteogenesis, adipogenesis and chondrogenesis were observed under the microscope. And the cells could inhibit the proliferation of Th1, Th2 and Th17 cells and promote the proliferation of T_{reg} cells. The hUC-MSCs prepared by this production line met the quality standards and showed no significant difference compared with those prepared manually. In conclusion, the cell intelligent production line developed in this study is more advantageous in terms of cell homogeneity, capacity enhancement, cost optimization and superiority of deployment, which provides a new idea to realize the scale-up and industrialization of cell preparation.

Key Words: mesenchymal stem cell; cell intelligent manufacturing line; automation; capacity enhancement

收稿日期：2024-04-14

基金项目：细胞产业关键共性技术国家工程研究中心建设项目（发改高技〔2023〕447号）、哈尔滨市细胞制剂数字化智能化生产线开发和推广应用项目（哈松发改函〔2023〕79号）

作者简介：钟桂强（1991—），男，本科，助理工程师，从事生物技术药物研究与开发。

通信作者：刘沐芸（1973—），女，博士，正高级工程师，从事生物技术药物研究与开发。

E-mail：project@kenuomedicallab.com

干细胞具有自我更新和多向分化能力，且可体外培养、扩增[1]。人源性脐带间充质干细胞（human umbilical cord mesenchymal stem cells，hUC-MSCs）易获取、复制力强，成骨、成脂及成软骨分化潜能突出[2—3]，可用于治疗糖尿病[4—5]、系统性红斑狼疮[6—7]和移植物抗宿主病[8]等疾病，临床应用潜

力巨大。

当前干细胞治疗产品依赖人工制备，存在制剂批间一致性差、污染风险高、生产规模和效率受限等问题。开发规模化、可重复的细胞智能制造产线已成为当务之急。2019 年，美国发布的《2030 先进细胞制造路线图》指出干细胞治疗产品的生产未来将倾向于采用全自动、数字化和全封闭的方式。近年来，实际生产中出现了不同解决方案，但存在产能、自动化及市场推广等方面的局限。3D 细胞培养技术虽取得进展，但尚未成熟。通过整合工艺参数和生产数据，结合先进技术，研发高效、自动化、标准化的细胞智造产线，可望为 hUC-MSCs 的生产提供技术支持和解决方案。

本研究开发的细胞智造产线采用模块化设计，通过软件控制和调度，能实现各仓模块协同；产线中使用专用密闭管路进行溶液传送，可根据工艺需求和生产规模进行调整，在少量人员参与下即可完成 hUC-MSCs 的制备生产。本研究立足于当下 hUC-MSCs 产品走向临床应用的大背景，将该产线产品与人工制备产品进行全面对比，为 hUC-MSCs 的规模化、产业化生产提供了新思路。

1 仪器与试药

细胞智造产线 1.0（深圳赛动智造科技有限公司）；TT-2JA-2088 型细胞分析仪（德国 Innovatis 公司）；BACT-ALERT 3D240 型全自动微生物培养仪（法国梅里埃公司）；FACS-Lyric™ 型流式细胞仪（美国 BD 公司）；TC9610-230 型 qPCR 仪（美国 Labnet 公司）；CKX41SF 型荧光倒置显微镜（日本 Olympus 公司）。

专用密闭管路（深圳赛动智造科技有限公司）；T75/T175 型培养瓶（美国 Corning 公司）；胰酪大豆胨液体培养基（TSB，广东环凯微生物科技有限公司）；NutriStem MSC XF 基础培养基（以色列 Biological Industries 公司）；PBS（江西科伦药业有限公司）；胰蛋白酶消化液（深圳市北科生物科技有限公司）；5% DMSO 冻存液（德国 WAK 公司）；血培养瓶 BPA/ 血培养瓶 BPN（法国梅里埃公司）；支原体培养基（日本 TaKaRa 公司）；Vero 细胞（武汉普诺赛生命科技有限公司）；流式检测抗体（深圳科诺医学检验实验室）；成骨分化诱导试剂盒（主要成分为基础培养基、血清、双抗、谷氨酰胺、维生素 C、β- 甘油酸钠、地塞米露）、成脂分化诱导试剂盒［主要成分为基础培养基、3- 异丁基 -1- 甲基黄嘌呤（3-isobutyl-1-methylxanthine，IBMX）、地塞米露、胰岛素、罗格列酮、双抗、谷氨酰胺］、成软骨分化诱导试剂盒［主要成分为基础培养基、胰岛素 - 转铁蛋白 - 硒（ITS）+Supplement、维生素 C、丙酮酸钠、脯氨酸、地塞米露、转换生长因子（transforming growth factor-β3，TGF-β3）］均购于赛业生物科技有限公司；原癌基因、抑癌基因检测试剂盒（美国 Applied Biosystems 公司）；总 RNA 提取试剂盒（RNeasy Mini Kit，德国 QIAGEN 公司）；反转录试剂盒（ReverTra Ace -α-™ High Efficient Reverse Transcription Kit，日本 TOYOBO 公司）；双色荧光 TERT 基因检测试剂盒（江苏凯基生物技术股份有限公司）；Advanced RPMI-1640 培养基（美国 Gbico 公司）；钙离子载体（ionomycin）、佛波酯（PMA）、布雷非德菌素 A（brefeldin A，BFA）均购自上海碧云天生物技术股份有限公司；Cytofix/Cytoperm Plus Kit（美国 BD 公司）；秋水仙素（上海阿拉丁生化科技股份有限公司）。

hUC-MSCs、外周血单个核细胞（peripheral blood mononuclear cell，PBMC）均深圳综合细胞库。

25 只 SPF 级健康小鼠，雄性，体质量 18 ～ 22 g，动物合格号 SCXK（粤）2022-0002；10 只普通级豚鼠，雄性，体质量 250 ～ 350 g，动物合格号 SCXK（粤）2019-0035。小鼠、豚鼠均来源广东省医学实验动物中心。本研究涉及的动物实验经北科生物动物伦理委员会批准，批准号 BK-SL-20230102-01。

2 方法与结果

2.1 细胞智造产线与人工制备方法的综合对比

对细胞智造产线与传统人工制备方法进行多维度对比，以年产量 3 600 份、规格为 5×10^7 个细胞的中型实验室规模为基准，评估产线的可行性。

如表 1 所示，细胞智造产线在设备设施成本、运营成本、产品成本均有所降低。运营成本降低幅度较大，达 89.01%，每月可节省约 40 万元。该产线采用全封闭设计，可直接部署于 D 级洁净环境，进一步降低成本，并在验证和生产阶段生产 100+ 批次细胞，污染率为 0，有效规避了外源性污染风险。

移液精度在细胞制备过程中起关键作用。传统人工制备时为确保移液精度，需选用高精度移液器

表 1　细胞智造产线与人工制备方法的综合对比

Tab.1　Comprehensive Comparison between Cell Intelligent Manufacturing Line and Manual Preparation

类别	具体项目	人工制备方法	细胞智造产线	变化率 /%
设备设施	设备采购 / 万元	241.3	800	231.54
	厂房建设 / 万元	660	35	－94.70
	小计 / 万元	901.3	835	－7.36
	厂房面积 /m^2	1 200	100	－91.67
	生产区域洁净等级	B 级	D 级	
运营成本	每月租金及公共物料 / 万元	26.6	1.9	－92.86
	每月人工成本 / 万元	18	3	－83.33
	小计 / 万元	44.6	4.9	－89.01
	人数 / 人	12	2	－83.33
产品成本	单支成本 / 万元	0.347 9	0.159 6	－54.12

并持续进行人员培训。分别采用细胞智造产线与人工方式进行分装，比较 2 种方式的差异。5 名实验人员分别用移液枪混匀细胞并分装至 5 mL 冻存管中，每管 2.5 mL，每人分装 3 管；细胞智造产线则执行分装程序。

分装结束后进行精密称定，结果人工制备和细胞智造产线的每支产品质量分别为 (2.603±0.139) 和 (2.603±0.012) g (n=3)；采用 SPSS 26.0 软件对数据进行处理，F 检验结果为 72.84，P=0.001 1<0.05。可见，细胞智造产线产品的分装方差更小，2 种方式移液有显著差异 (P<0.05)，体现出细胞智造产线的精确度、均一性更好。原因是细胞智造产线配备了高精度的细胞分装系统，通过既定的系统参数，可将液体均匀分到冻存管中。

2.2　细胞智造产线的验证

2.2.1　专用密闭管路的质量评估

专用密闭管路作为产线的关键核心耗材，与细胞直接接触，其无菌和密闭性对产品质量至关重要。根据《输液、输血用硅橡胶管路及弹性件：YY/T 0031—2008》[9] 标准，进行外观检查、密闭性和耐压性检测，并根据 ChP 2020 年版对内毒素、不溶性微粒进行检测。

随机选取 3 批专用密闭管路进行检测，将管路逐一与产线中的蠕动泵连接，按产线的最大驱动频率反复吸液测试。结果 (表 2) 显示，专用密闭管路完整无破损、管路内部无可见异物，且规格尺寸与需求保持一致，外观检查结果良好，管路的密闭性、耐压性、内毒素和不溶性微粒均符合使用要求。

2.2.2　无菌工艺模拟验证

根据无菌工艺模拟试验指南 (2023 年版) 的要求，对产线连续进行 3 次模拟灌装。过程中采用 TSB 替换制备过程使用的试剂及细胞，产线执行细胞制备程序。

采用全自动微生物培养系统检测法，对最终模拟分装的细胞和过程留样进行“细菌及真菌”检测，结果显示均为阴性，说明产线无菌，符合无菌模拟灌装要求。

2.3　细胞智造产线的关键质量属性评价

2.3.1　人工制备细胞流程

细胞培养：hUC-MSCs 以每 1 cm^2 含 5 000 ～ 6 000 个细胞的密度接种至培养瓶中，于 37.0 ℃、5.0％ CO_2 培养箱中静置培养，当细胞融合度达 85％～ 90％时，传代培养。

细胞冻存：当细胞融合度达 85％～ 90％时，用胰蛋白酶消化，离心 (300×g) 10 min，收集细胞沉淀于 5 mL 冻存管，加入冻存液 (体积比为 19 ： 1 的完全培养基和 DMSO 混合溶液) 混匀，每管细胞数量控制为每管 5×10^7 个 (±10％)。

2.3.2　细胞智造产线制备流程

细胞智造产线执行的是全密闭、自动化制备程

表 2　专用密闭管路的质量评估结果

Tab.2　Quality Assessment Results of Specific Closed Pipeline

专用密闭管路批次	外观	密闭性和耐压性	内毒素 /(EU·mL^{-1})	不溶性微粒 /(每 1 mL 含微粒个数)	
				≥ 10 μm	≥ 25 μm
第 1 批	无破损 无可见异物	良好	<0.25	12	0
第 2 批	无破损 无可见异物	良好	<0.25	10	0
第 3 批	无破损 无可见异物	良好	<0.25	15	0

序，包括细胞复苏、细胞传代和细胞冻存工序（图1），由不同的功能仓室协同工作而实现（图2）。主功能仓包括核心仓、配液仓和培养仓。核心仓完成细胞复苏、洗涤、离心和混匀、过滤和分装、取样等操作；配液仓执行吸弃上清、盐水洗涤、细胞消化、终止培养、细胞悬液的收获和分装等操作；培养仓用于培养和定期观察细胞，通过算法对拍摄的细胞照片进行评估，以确认细胞融合度。辅助仓包括物料仓、存储仓、小入料仓和小出料仓。物料仓用于存储培养瓶，通过传输系统将培养瓶传送到存储仓；存储仓用于临时存放当前阶段所需的培养瓶，并通过机械臂将培养瓶传送到配液仓或丢弃已使用的培养瓶；小入料仓和小出料仓分别用于提供需要复苏和移出分装好的样本。

取与人工制备方法同一来源的P2代hUC-MSC进行制备，每个阶段开始前进行清洁和消毒。提前准备好所需试剂，并在每个阶段开始前安装专用密闭管路、无菌灌装针和无菌滑块，系统每隔24 h自动执行细胞观察操作，用以评估细胞融合度，并根据评估结果初步评判下一步的操作任务，待人员确认后执行。

2.3.3 细胞基本特性的评估

将最终收获的细胞样品送往第三方检测机构（深圳科诺医学检验实验室）检测。检测项目包括细胞形态和细胞分化能力。

细胞形态：通过显微镜，观察2种制备方式得到的hUC-MSCs形态。

细胞表面标志物检测：分别取2种方法收获的细胞样品，去除上清，用PBS洗涤、离心（500×*g*）3 min，共2次；取细胞悬液100 μL加至各抗体管，于4 ℃避光孵育30 min；再用PBS洗涤、离心（500×*g*）3 min、定容，使用流式细胞仪分析细胞表面标志物。

结果如图3、4所示，2种方式所得细胞均贴壁生长，整体呈纤维状。细胞培养至D3，呈现旋涡状的细胞群（融合度≥90%）。对于细胞智造产线所得的细胞进行流式细胞术分析，可见其表面标志物CD73、CD90、CD105、CD29均呈阳性，表达率高于95 %；CD45、CD34、CD79a、CD14、HLA-DR均呈阴性，表达率低于2%，均符合国际细胞与基因治疗协会（International Society for Cell & Gene

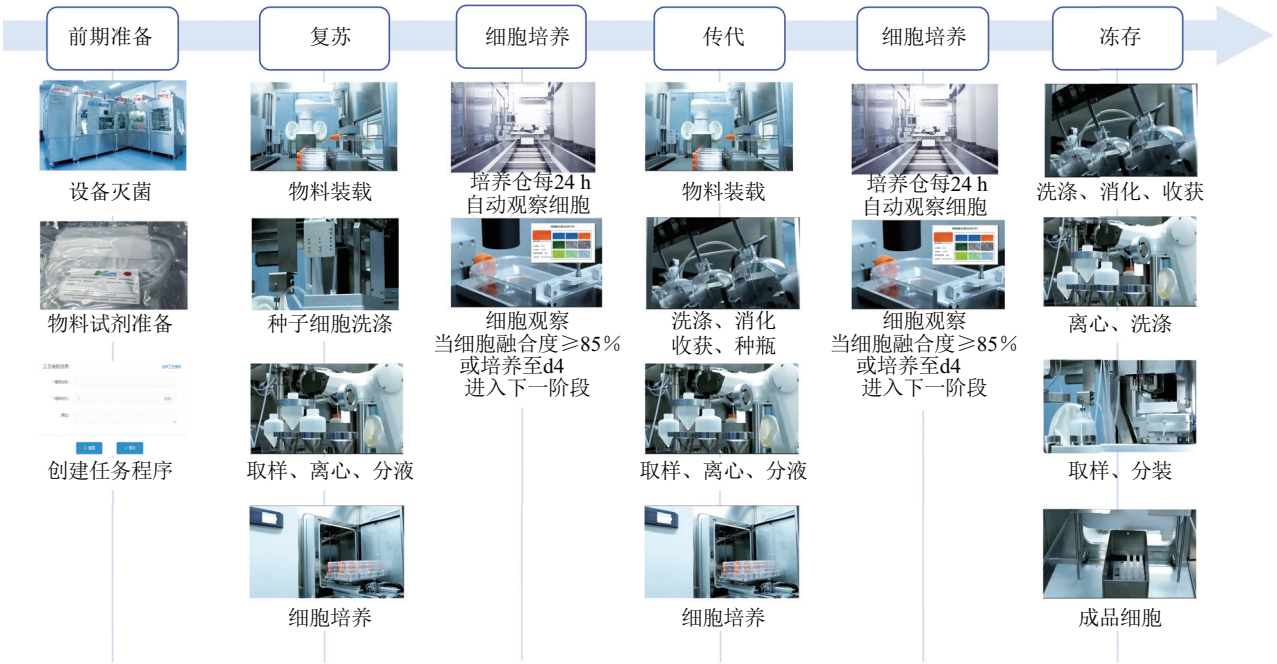


图1 细胞智造产线制备hUC-MSCs的流程图

Fig.1 Production Flowchart of hUC-MSCs by the Cell Intelligent Manufacturing Line

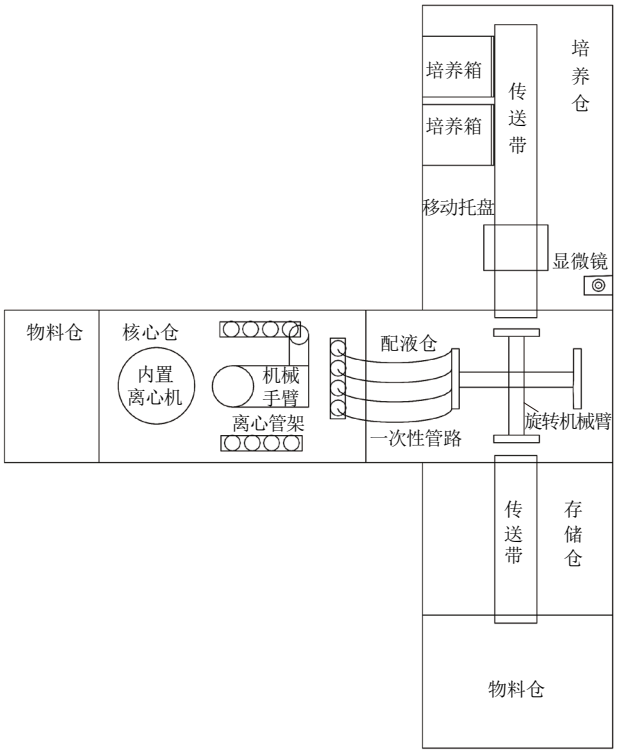


图 2　细胞智造产线的结构平面图

Fig.2　Structure Plan of the Cell Intelligent Manufacturing Line

Therapy，ISCT）定义的间充质干细胞的要求。

2.3.4　细胞安全性评估

将收获的细胞样品送往第三方检测机构（深圳科诺医学检验实验室）检测。检测项目包括无菌状态、支原体污染、内毒素含量、染色体核型分析、原癌基因和抑癌基因表达分析、端粒酶活性评估以及细胞异常毒性检测。无菌检测采用全自动微生物培养系统检测法，支原体和内毒素检测采用 ChP 2020 年版收载的直接培养法。

染色体核型分析：分别取 2 种方法收获的细胞样品，用 Advanced RPMI-1640 培养基按每瓶 0.5×10^6 ～ 1.5×10^6 个细胞的密度接种于 T75 型细胞培养瓶，置 37 ℃、5% CO_2 培养箱中培养 2 ～ 3 d，待细胞处于对数生长期（细胞密度达到 70%～ 80% 的融合度）后，加入秋水仙素溶液（20 g/mL），使其终质量浓度为 0.3 g/mL，轻轻摇匀后，放回 CO_2 培养箱继续培养 2 ～ 3 h。将处理培养后的细胞收集在 15 mL 离心管中，进行低渗处理、固定、制片、滴片、烘片和烤片后，采用 Ikaros 6.3 核型分析软件对染色体图像进行检测。

原癌基因及抑癌基因分析：分别取 2 种方法收获的细胞沉淀，使用总 RNA 提取试剂盒提取细胞中总 RNA，再使用反转录试剂盒以 mRNA 为模板合成 cDNA，按原癌基因和抑癌基因实时荧光定量 PCR 检测试剂盒说明书进行检测，以 P_0 代细胞作为对照细胞，考察冻存收获的细胞质量。

端粒酶活性分析：试验方法同上，选用人胚肾细胞（293T 细胞）为阳性对照以及人胚肺细胞（MRC-5 细胞）为阴性对照，通过 $\Delta\Delta C_t$ 法检测样本中 *Tert* 基因的相对表达量。

细胞异常毒性：参照 ChP 2020 年版三部通则 1141 异常毒性检查法对 2 种方法收获的细胞进行异常毒性检测对比。其中小鼠平行试验 5 组，豚鼠平行试验 2 组。

结果如表 3 所示，2 种方法收获的细胞无菌状态、支原体检测均呈阴性，内毒素含量均低于

0.5 EU/mL，符合 ChP 的要求。原癌基因及抑癌基因表达正常，且端粒酶活性表达均为低活性。G 显带核型分析结果显示，所得细胞染色体为正常人体的二倍体，结构未出现异常。采用 SPSS 26.0 软件对实验动物的体质量数据进行处理。结果显示，7 d 后，试验组和对照组小鼠和豚鼠的体质量较注射给药前均增加，但增长量无统计学意义（P>0.05，表 4）。

2.3.5 细胞有效性评估

将收获的细胞样品送往第三方检测机构（深圳科诺医学检验实验室）检测细胞有效性，检测项目包括细胞存活率、免疫调节功能和细胞分化能力。

存活率检测：采用细胞计数仪通过台盼蓝染色检测细胞存活率。

MSC 对 Th1/Th2/Th17 亚群抑制作用检测：在 12 孔细胞培养板中接种 1.2×10^5 个 hUC-MSCs，平行接种 3 孔，标准条件下培养 4 ～ 6 h 至贴壁后弃上清，按 PBMC 和 hUC-MSCs 数量比 5 ∶ 1，加入经钙离子载体和 PMA 刺激后的 PBMC，在标准条件下培养 36 h 后，加入 BFA，刺激 6 ～ 8 h 后收集细胞作为试验组。另取 12 孔细胞培养板，接种 6×10^6 个经钙离子载体和 PMA 刺激后的 PBMC，平行接种 3 孔，在标准条件下培养 36 h 后，加入 BFA，刺激 6 ～ 8 h 后收集细胞作为阳性对照组。再另取 12 孔细胞培养板，接种 6×10^6 个 PBMC，平行接种 3 孔，在标准条件下培养 36 h 后收集细胞作为阴性对照组。收集试验组、阳性对照组和阴性对照组细胞，使用 Cytofix/Cytoperm Plus 试剂盒进行流式细胞术检测，检测 $CD3^+CD8^-IFN\text{-}\gamma^+$ 细胞比例、$CD3^+CD8^-IL\text{-}4^+$

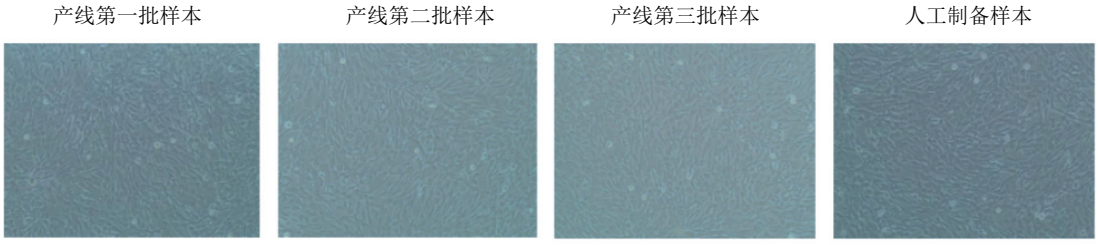
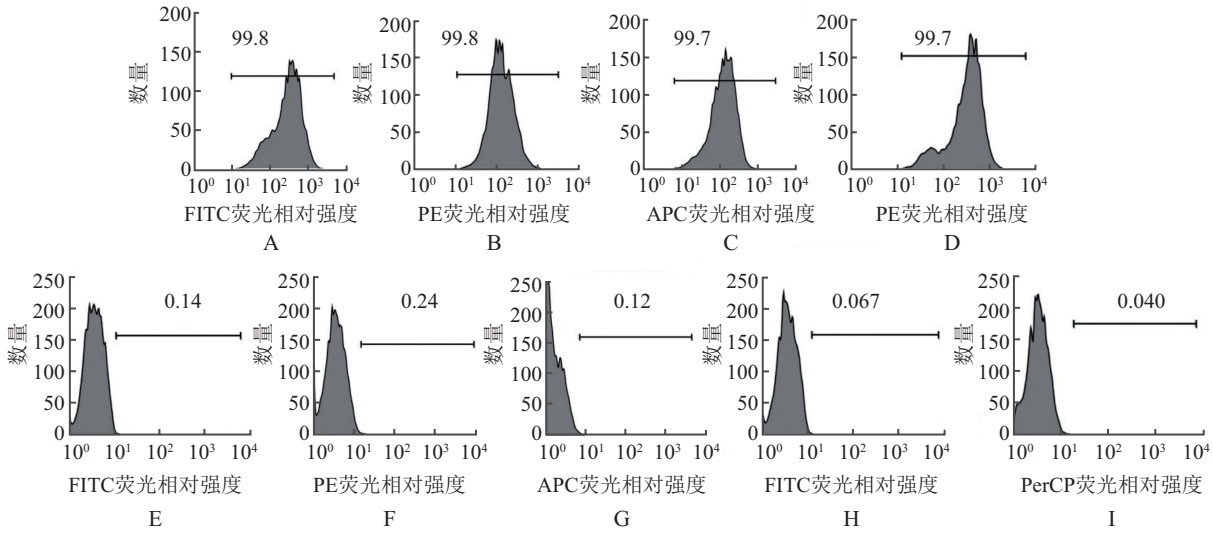


图 3 细胞智造产线和人工制备的细胞的形态学观察（×100）

Fig.3 Morphological Observation of Cell Obtained by Cell Intelligent Manufacturing Line and Manual Preparation (×100)



A—$CD90^+$；B—$CD73^+$；C—$CD105^+$；D—$CD29^+$；E—$CD45^+$；F—$CD34^+$；G—$CD790^+$；H—$CD14^+$；I—$HLA\text{-}DR^+$。

图 4 细胞智造产线 hUC-MSCs 表面标志物

Fig.4 Surface Markers of hUC-MSCs from Cell Intelligent Manufacturing Line

细胞比例、$CD3^+CD8^-IL\text{-}17A^+$ 细胞比例，并按式①计算 MSC 对 Th1/Th2/Th17 细胞的抑制率。

$$抑制率 = (B - T)/(B - N) \quad ①$$

式中：N 为阴性对照中 Th1/Th2/Th17 细胞比例；B 为阳性对照组中 Th1/Th2/Th17 细胞比例；T 为试验组中 Th1/Th2/Th17 细胞比例。

MSC 对调节性 T 细胞（T_{reg} 细胞）增殖的促进作用检测：在 12 孔细胞培养板中，接种 1.2×10^5 个 hUC-MSCs，平行接种 3 孔，标准条件下培养 4 ～ 6 h 至贴壁后弃上清，按 PBMC 和 hUC-MSCs 数量比 5 ∶ 1，加入 PBMC，培养 96 h 后收集作为试验组。另取 12 孔细胞培养板，接种 6×10^6 个 PBMC，平行接种 3 孔，在标准条件下培养 96 h 后收集细胞作为对照组。收集试验组、对照组细胞进行流式细胞术检测，检测 $CD3^+CD4^+CD25^+CD127^-$，并按式②计算 hUC-MSCs 对 T_{reg} 细胞的增殖率。

$$增殖率 = (D - C)/C\times100\% \quad ②$$

式中：C 为对照组中 T_{reg} 细胞比例；D 为试验组中 T_{reg} 细胞比例。

细胞成骨、成脂分化能力的检测：将细胞样品接种于明胶包被的 12 孔细胞培养板中，在标准培养条件（37 ℃、5 % CO_2）下培养至细胞融合度 70%～ 100%，用相应的诱导培养基分化，每 3 ～ 4 d 半量换液，培养 28 d 后染色观察。

细胞成软骨分化能力的检测：将细胞样品接种于离心管，用诱导培养基分化，离心（210×*g*）3 min，然后在培养箱中培养至细胞成团，每 2 ～ 3 d 换液，诱导 21 ～ 28 d 后处理切片染色。通过染色结果判断细胞分化能力。

结果显示，试验组细胞活率均高于 90 %。镜下观察显示，细胞具有良好的成骨、成脂、成软骨能力（图 5）。细胞的免疫调节功能分析结果显示，hUC-MSCs 与外周血单核细胞共培养后，呈现出对 Th1、Th2、Th17 细胞增殖呈抑制作用，对 T_{reg} 细胞增殖则有促进作用（表 5）。

3　讨论

本研究全面对比了一种 hUC-MSCs 新型的细胞智造产线与传统人工制备方法。结果显示，本产线整体及专用密闭管路均符合 GMP 无菌要求，产线制备的细胞在安全性（无菌性、支原体、内毒素、遗传稳定性和细胞异常毒性）、有效性（存活率、免疫调节功能和分化能力）和细胞基本特性（表面

表 3　细胞智造产线所得细胞的安全性评估结果

Tab.3　Safety Assessment Results of the Cells Obtained by Cell Intelligent Manufacturing Line

项目	无菌状态	支原体	内毒素 /（EU·mL^{-1}）	端粒酶活性	原癌基因和抑癌基因的表达
人工制备样本	阴性	阴性	0.34	低活性	正常
第一批产线样本	阴性	阴性	0.34	低活性	正常
第二批产线样本	阴性	阴性	0.32	低活性	正常
第三批产线样本	阴性	阴性	0.25	低活性	正常

表 4　细胞智造产线与人工制备方法所得细胞的毒性检测结果

Tab.4　Cytotoxicity Detection Results of the Cells Obtained by Cell Intelligent Manufacturing Line and Manual Preparation

试验动物	组别	批次	初始体质量（m_1）/g	终体质量（m_2）/g	△ m（即 $m_2 - m_1$）	标准差 ±s	t 检验
小鼠	对照组	0.9%氯化钠水溶液	20.33	29.58	9.25	9.25±0.39	—
	试验组	人工制备样本	20.20	29.52	9.32	9.30±0.39	P>0.05
		第一批产线样本	19.72	28.99	9.27	9.25±0.62	P>0.05
		第二批产线样本	20.06	29.35	9.29	9.29±0.65	P>0.05
		第三批产线样本	20.18	29.41	9.23	9.23±0.32	P>0.05
豚鼠	对照组	0.9%氯化钠水溶液	275.77	318.24	42.47	42.47±0.49	—
	试验组	人工制备样本	264.05	306.96	42.91	42.92±0.42	P>0.05
		第一批产线样本	271.12	313.65	42.53	42.52±0.45	P>0.05
		第二批产线样本	272.85	315.35	42.50	42.49±0.50	P>0.05
		第三批产线样本	270.80	313.38	42.58	42.58±0.25	P>0.05

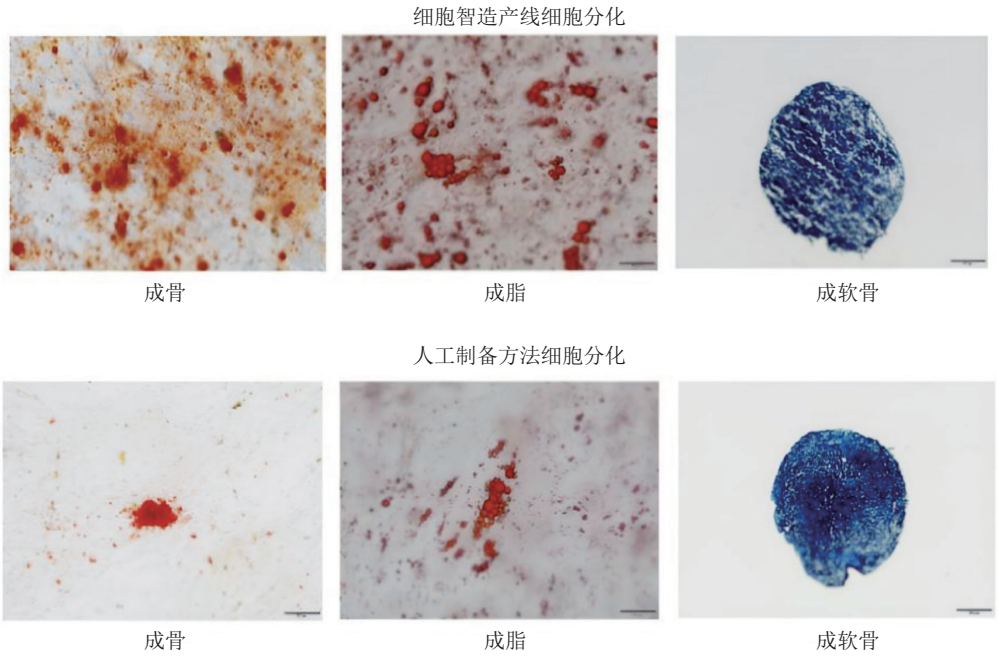


图 5 细胞智造产线（上）和人工制备方法（下）的 hUC-MSCs 分化结果

Fig.5 Differentiation Results of hUC-MSCs from Cell Intelligent Manufacturing Line (the Upper) and Manual Preparation (the Lower)

表 5 细胞智造产线与人工制备方法所得细胞的免疫调节功能测定结果

Tab.5 Determination Results of Cellular Immunomodulatory Function of the Cells Obtained by Cell Intelligent Manufacturing Line and Manual Preparation

样本批次	检测项目	检测结果[1)]/%
人工制备方法样本	Th1	-22.09
	Th2	-60.34
	Th17	-8.55
	T_{reg}	+74.07
第一批产线样本	Th1	-26.09
	Th2	-62.34
	Th17	-7.55
	T_{reg}	+84.07
第二批产线样本	Th1	-62.75
	Th2	-83.72
	Th17	-26.32
	T_{reg}	+38.89
第三批产线样本	Th1	-28.97
	Th2	-57.89
	Th17	-14.29
	T_{reg}	+51.83

注：[1)]“-”指抑制增殖；“+”指促进增殖。

标志物和形态）方面与人工制备相比，均无显著差异且符合质量标准。并且，本产线在细胞均一性、产能提升、成本优化和部署的优越性等方面更有优势，为实现细胞的规模化和产业化制备提供了新思路。

本研究中的细胞智造产线采用全密闭结构，可部署在 GMP 车间的 D 级环境中，且设计容量大、移液精度高，可满足大规模生产需求。该细胞智造产线是基于 hUC-MSCs 生产设计的。这种细胞具有低免疫原性、强分化潜能和增殖能力，适合大规模制备，有望成为临床应用前景广阔的干细胞。hUC-MSCs 具有贴壁生长的特点，并具有“定向迁移”能力。因此，该产线采用了培养瓶 / 细胞工厂来富集培养细胞。相应的，该产线也具有明显局限性，即只适用于培养贴壁生长的细胞。从脐带原代细胞到子代细胞的主要方法为组织块贴壁培养法和胶原酶消化法。考虑到胶原酶消化法的杂质较多，设计产线时未采用这种方法；而组织块贴壁法主要涉及人工剥离，而产线目前并不具有该功能属性。解决这些问题是未来的研究方向。综上所述，本研究设计的细胞智造产线解决了传统制备的问题，为细胞培养的规模化和自动化提供了新思路，有望进一步推动细胞产业的发展。

（下转第 1031 页）

安全性考量[J]. 中国药学杂志, 2019, **54**(14): 1121-1125.

[36] FDA. Inactive ingredients in approved drug products search: frequently asked questions [EB/OL]. (2022-01-26)[2023-10-15]. https://www.fda.gov/drugs/drug-approvals-and-databases/inactive-ingredients-approved-drug-products-search-frequently-asked-questions.

[37] GALANDE A D, KHURANA N A, MUTALIK S. Pediatric dosage forms – challenges and recent developments: a critical review [J]. *J Appl Pharm Sci*, 2020, **10**(7): 155-166.

[38] BUCKLEY L A, SALUNKE S, THOMPSON K, *et al*. Challenges and strategies to facilitate formulation development of pediatric drug products: safety qualification of excipients [J]. *Int J Pharm*, 2018, **536**(2): 563-569.

[39] TURNER M A, STORME T. European study for neonatal excipient exposure (ESNEE) [J]. *Eur J Hosp Pharm*, 2012, **19**(2): 67.

[40] VALEUR K S, HERTEL S A, LUNDSTRØM K E, *et al*. Safe excipient exposure in neonates and small children – protocol for the SEEN project [J]. *Dan Med J*, 2017, **64**(2): A5324.

[41] KOZAREWICZ P, LOFTSSON T. Novel excipients – regulatory challenges and perspectives – the EU insight [J]. *Int J Pharm*, 2018, **546**(1/2): 176-179.

[42] FDA. Pilot program for the review of innovation and modernization of excipients (PRIME) [EB/OL]. (2022-07-09)[2023-10-17]. https://www.fda.gov/drugs/development-approval-process-drugs/pilot-program-review-innovation-and-modernization-excipients-prime.

[43] 李永圆, 陈 晨, 王海霞, 等. 儿童药物制剂存在的问题及其创新开发策略 [J]. 中国现代应用药学, 2022, **39**(12): 1597-1603.

(上接第 1023 页)

参考文献:

[1] YAMANAKA S. Pluripotent stem cell-based cell therapy-promise and challenges [J]. *Cell Stem Cell*, 2020, **27**(4): 523-531

[2] ZHOU H, SHEN X, YAN C, *et al*. Extracellular vesicles derived from human umbilical cord mesenchymal stem cells alleviate osteoarthritis of the knee in mice model by interacting with METTL3 to reduce m6A of NLRP3 in macrophage [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2022, **13**(1): 322.

[3] 吴明兰, 吴梅佳, 翟 优, 等. 干细胞临床研究的进展与展望 [J]. 中国临床药理学杂志, 2023, **39**(10): 1511-1515.

[4] XIE Q X, LIU R, JIANG J, *et al*. What is the impact of human umbilical cord mesenchymal stem cell transplantation on clinical treatment? [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2020, **11**(1): 519.

[5] 王颜刚, 于江苏. 干细胞治疗 2 型糖尿病及其并发症的可行性 [J]. 中国组织工程研究, 2012, **16**(49): 9276-9282.

[6] DARLAN D M, RAGA A, MUHAR A M, *et al*. Mesenchymal stem cells suppress dendritic cells and modulate proinflammatory milieu through interleukin-10 expression in peripheral blood mononuclear cells of human systemic lupus erythematosus [J]. *Acta Inform Med*, 2023, **31**(1): 20-25.

[7] 梁 军, 孙凌云. 间充质干细胞治疗系统性红斑狼疮的基础和临床研究 [J]. 浙江医学, 2017, **39**(21): 1836-1841.

[8] KELLY K, RASKO J E J. Mesenchymal stromal cells for the treatment of graft versus host disease [J]. *Front Immunol*, 2021, **12**: 761616.

[9] 国家食品药品监督管理局. YY/T 0031-2008, 输液、输血用硅橡胶管路及弹性件 [S/OL]. 北京: 中国标准出版社, 2008. https://std.samr.gov.cn/hb/search/stdHBDetailed?id=8B1827F19B28BB19E05397BE0A0AB44A.