

人脐带间充质干细胞复方电解质注射液制剂的制备及稳定性研究

王秀娟, 李政楠, 李 伟, 牟春琳, 杨 莹, 金 星, 徐永胜*

天津长和生物技术有限公司, 天津 301925

摘要: 目的 探索人脐带间充质干细胞复方电解质注射液制剂稳定性。方法 人脐带间充质干细胞(密度 $5 \times 10^5/\text{mL}$)分别与复方电解质注射液及0.9%氯化钠注射液(分别设加/不加2%人血白蛋白组)制备制剂,通过观察24 h内不同时间节点凋亡变化趋势优选出制剂方案;探讨该制剂的光照稳定性、热循环稳定性、加速稳定性以及长期稳定性。结果 复方电解质注射液制剂较0.9%氯化钠注射液制剂细胞凋亡水平低;2%白蛋白添加能够有效降低细胞凋亡水平。光照对复方电解质注射液添加2%白蛋白细胞制剂无严重影响;温度波动能导致细胞存活率快速下降;高温对细胞制剂状态有较大影响,导致絮状物大量出现,细胞存活率快速下降;在低温条件下,该制剂能长时间保持细胞存活率。结论 复方电解质注射液添加2%白蛋白是一种优良的人脐带间充质干细胞制剂方法。

关键词: 制剂;人脐带间充质干细胞;稳定性;复方电解质注射液

中图分类号: R329 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2020)12-2394-04

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2020.12.007

A preparation quality research of human umbilical cord mesenchymal stem cells in Multiple Electrolytes Injection

WANG Xiujuan, LI Zhengnan, LI Wei, MOU Chunlin, YANG Ying, JIN Xing, XU Yongsheng

Ever Union Biotechnology Company Limited, Tianjin 301925, China

Abstract: **Objective** To explore a preparation method of human umbilical cord mesenchymal stem cells and its stability in Multiple Electrolytes Injection. **Methods** Observed the apoptosis levels of human umbilical cord mesenchymal stem cells ($5 \times 10^5/\text{mL}$) in Sodium Chloride Injection and Multiple Electrolytes Injection (2% human serum albumin was added or not). The best preparation was further studied, which included light stability, thermal cycle stability, accelerated stability and long-term stability. **Results** The apoptosis level of Multiple Electrolytes Injection preparation was lower than that of 0.9% sodium chloride injection, and 2% albumin could effectively reduce the apoptosis level. The results showed that light had no serious effect on the cell preparation supplemented with 2% albumin; the fluctuation of temperature could lead to the rapid decrease of cell survival rate; the high temperature had a great influence on the state of cell preparation, which led to the rapid decline of cell survival rate; under the condition of low temperature, the preparation could maintain the cell survival rate for a long time. **Conclusion** Multiple Electrolytes Injection is a good preparation method for stem cell.

Key words: preparation; stem cell; stability; multiple electrolytes injection

生物制品种类繁多,包括微生物、细胞、动物或人源组织和体液等。近十几年,广泛走向临床的细胞治疗产品是一种更为特殊的生物制品——人源的活细胞产品,包括由细胞系,以及来源于自体或异体的免疫细胞、干细胞和组织细胞等生产的产品^[1]。

细胞治疗产品制剂类型,临床常用的有0.9%氯化钠注射液、5%葡萄糖注射液以及2%人血白蛋白溶液等。通常情况下,制剂后细胞活性下降的重要

因素是制剂组分简单,不能够保持细胞状态,引起细胞凋亡,直至死亡。细胞治疗产品制剂的不稳定性,是制约细胞治疗临床应用范围不可忽略的重要因素^[2-4]。

复方电解质注射液(勃脉力A),1 000 mL含氯化钠5.26 g、葡萄糖酸钠5.02 g、醋酸钠3.68 g、氯化钾0.37 g、氯化镁0.30 g,其离子组分多样,能满足细胞代谢基本需求,较传统制剂方法更优。本研究探索脐带间充质干细胞复方电解质注射液制剂的效

收稿日期: 2020-11-09

基金项目: 国家重点研发计划“干细胞及转化研究”重点专项(2019YFA0112100);天津市科技计划项目(17ZXXYSY00020)

*通信作者: 徐永胜 E-mail: brian.xu@chinaeubio.com

果及稳定性,探索高温、光照对制剂的影响,以及制剂的长期稳定性。

1 材料

1.1 主要试剂

0.9%氯化钠注射液(辰欣药业股份有限公司,批号 CXN250);复方电解质注射液(勃脉力A,广州百特医疗用品有限公司,批号 BA500);人血白蛋白(Octapharma,批号 A438C6661);Tryple™select(Gibco,批号 12563029);Annexin V-FITC/PI凋亡检测试剂盒(Dojindo,批号 AD01-10);磷酸盐缓冲液(Hyclone,批号 SH30256.01);CD73 PE(550257)、CD90 PE (555596)、CD105 PE (560839)(BD Biosciences);流式细胞仪(BD FACS Calibur,美国)。

1.2 实验细胞

脐带为健康状态良好,足月剖宫产产妇自愿捐

献。经贴壁法培养人脐带间充质干细胞,传代至P5代后,胰酶替代物消化,磷酸盐缓冲液清洗3次。

2 方法与结果

2.1 脐带间充质干细胞不同制剂制备方法

本研究所用细胞均为同一批号、P5代脐带间充质干细胞。该细胞按 $5 \times 10^5/\text{mL}$ 密度分别制剂,制剂处方见表1。细胞制剂后,流式检测细胞表型CD73、CD90、CD105,以表达率 $>95\%$ 作为合格标准。

结果见图1和表2。各制剂细胞表型CD73、

表1 细胞制剂处方

Table 1 preparation prescription	
基础液	添加物
0.9%氯化钠注射液	无
	2%人血白蛋白
复方电解质注射液	无
	2%人血白蛋白

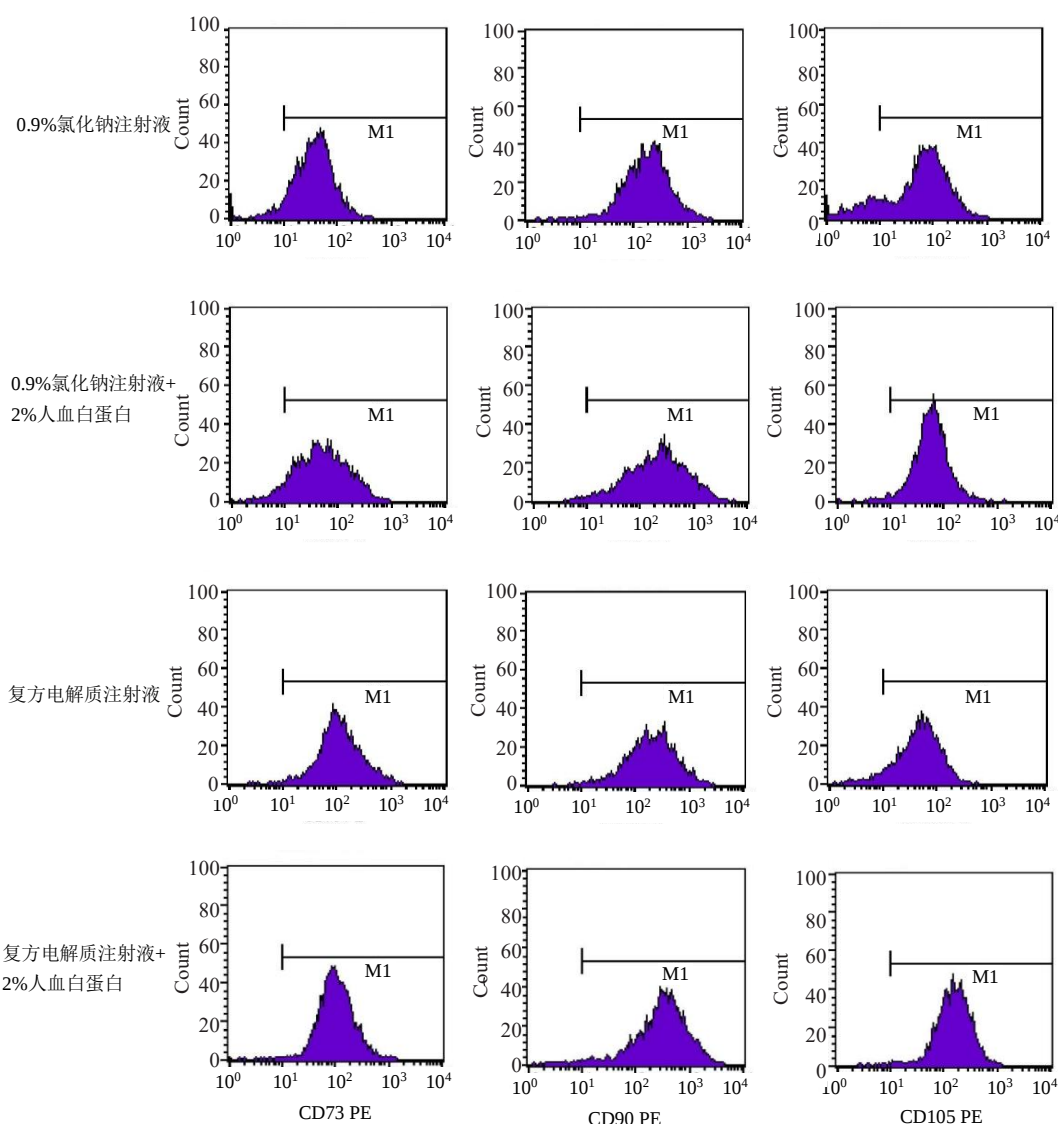


图1 制剂细胞表型

Fig. 1 phenotype of stem cells in different preparation

CD90、CD105 表达率均>95.46%。

2.2 流式细胞术检测不同制剂方法对细胞凋亡的影响

上述4种制剂完成后,避光保存于2~8℃冰箱

表2 制剂细胞表型汇总

组别	表面标志物表达量/%		
	CD73	CD90	CD105
0.9%氯化钠注射液	97.71	99.58	95.81
0.9%氯化钠注射液+2%人血白蛋白	95.46	99.28	99.15
复方电解质注射液	99.77	99.86	95.61
复方电解质注射液+2%人血白蛋白	99.78	99.00	99.66

中。于0、3、6、9、12、18、24 h分别取样进行检测,每次取样前均上下颠倒混匀。取不同制剂5 mL,用PBS洗涤2次后,按照说明书,用1×Annexin V Binding Solution重悬细胞,染色,流式细胞仪检测各组细胞的凋亡情况。根据细胞凋亡情况优选出制剂方案,对该优选制剂进行后续研究。

9 h时,0.9%氯化钠注射液组细胞凋亡率为55.74%,0.9%氯化钠注射液+2%人血白蛋白组细胞凋亡率为27.26%,复方电解质注射液组细胞凋亡率为36.59%,复方电解质注射液+2%人血白蛋白组细胞凋亡率为20.41%,可见制剂组分对细胞状态影响较大。结果见图2。

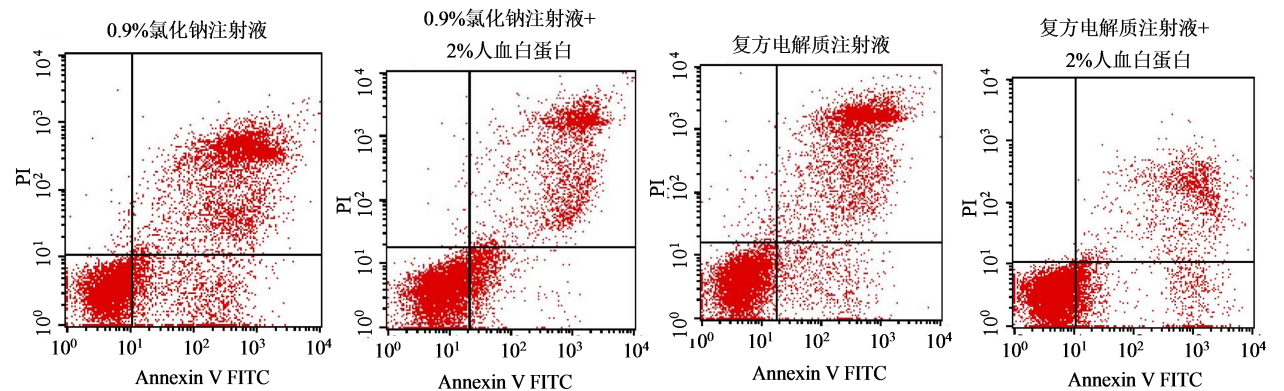


图2 9 h时各制剂组细胞凋亡情况
Fig. 2 Apoptosis levels of different preparation in 9 h

通过变化趋势可以看到,复方电解质注射液较氯化钠注射液更优,细胞凋亡水平较低。2%白蛋白添加对细胞具有极大的保护作用,能够有效降低细胞凋亡水平,增加细胞对环境的抵抗能力。结果见图3。本研究以复方电解质注射液+2%白蛋白作为优选制剂方案开展后续研究。

2.3 光照稳定性试验

将制剂置于4℃稳定性保存箱内,光照强度调

整为(4 500±500)lx,0、6、12 h观察制剂外观,流式细胞术考察细胞存活率变化及细胞表型变化,CD73、CD90、CD105表型>90%为合格。

制剂于4℃,(4 500±500)lx强光下照射12 h后,细胞制剂出现絮状物,细胞存活率明显降低,但总体趋势较缓慢,细胞表型符合规定,说明光照对细胞制剂无严重影响。结果见表3。

表3 制剂光照稳定性试验结果 Table 3 Light stability results			
光照时间	外观	细胞存活率/%	细胞表型
0 h	无絮状物	96.5±2.18	符合规定
6 h	有絮状物出现	88.2±3.17	符合规定
12 h	有微量絮状物	80.4±5.16	符合规定

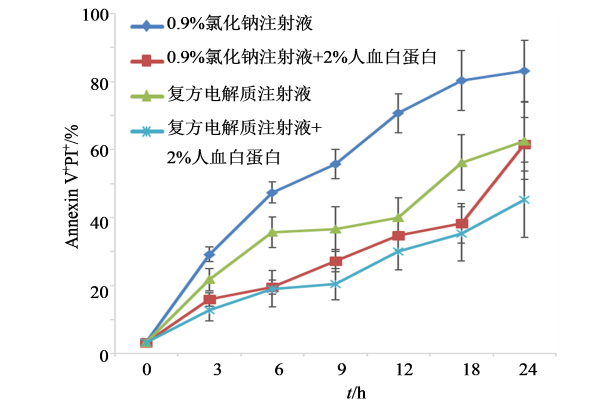


图3 各制剂凋亡趋势
Fig. 3 Trends of apoptosis levels in different preparation

2.4 热循环试验

进行热循环试验3次,每次循环2~8℃、1 h,(25±2)℃、1 h,观察制剂外观,流式细胞术检测细胞存活率及细胞表型变化。CD73、CD90、CD105表型>90%为合格。

温度波动能导致絮状物出现,导致细胞存活率快速下降,细胞表型不符合规定,细胞制剂作为一

种特殊的生物制品,需严格控制制剂后温度。结果见表4。

2.5 加速试验

(25±2)℃的条件下,每隔3小时取样检测1次,观察制剂外观及细胞存活率变化。细胞存活率快速下降到90%以下,可见高温对细胞制剂状态有极大的影响。结果见表5。

表4 直接热循环试验结果

Table 4 Thermo cycle stability results

热循环	外观	细胞存活率/%	细胞表型
开始前	无明显变化	96.50±2.18	符合规定
第1次	无明显变化	90.37±3.33	符合规定
第2次	有絮状物出现	85.77±5.54	不符合规定
第3次	有微量絮状物	76.00±5.17	不符合规定

表5 加速试验结果

Table 5 Results of accelerated stability

加速时间	外观	细胞存活率/%
0 h	无明显变化	96.50±2.18
3 h	出现絮状物	85.53±4.03
6 h	微量絮状物	78.34±6.91
9 h	大量絮状物	65.81±5.23
12 h	大量絮状物	58.92±4.59

2.6 长期稳定性试验

2~8℃条件下,每隔6小时取样检测1次,观察24 h内的细胞存活率变化。24 h后,每隔4 h取样检测。

在低温条件下,该制剂能长时间保持细胞存活率,12 h内检测指标保持稳定,细胞存活率大部分不低于90%。24 h后细胞存活率下降到80%左右,32 h前后下降到80%以下。结果见表6。

3 讨论

稳定性试验贯穿于整个药品研发过程,是产品

表6 长期稳定性试验结果

Table 6 Results of long term stability

项目	外观	细胞存活率/%
0 h	无明显变化	96.50±2.18
6 h	出现絮状物	92.55±3.13
12 h	出现絮状物	89.67±3.66
18 h	微量絮状物	83.50±4.72
24 h	微量絮状物	80.73±5.12
28 h	微量絮状物	77.78±4.03
32 h	微量絮状物	77.36±6.83

质量研究的重要内容,是产品有效期制定的依据,为药品生产工艺、制剂处方、包装材料、贮存、运输条件等方面提供依据,同时也是产品质量标准制定的基础^[5]。细胞制品作为一种更为特殊的生物制品,其稳定性研究具有特殊性,需要特别关注细胞治疗产品的运输稳定性研究和使用过程中的稳定性研究等,应开展研究证明在拟定的存储条件下,细胞治疗产品的质量不会受到运输、使用中或其他外界条件的影响^[6]。

目前细胞制品的制剂配方多较简单,本试验简单探索了一种新的制剂方案,对该方案的稳定性进行了初步探讨。通过研究发现复方电解质注射液的细胞保护能力明显优于氯化钠注射液,而蛋白保护剂也能有效保护细胞状态。

本实验尚存在诸多问题,没有涵盖生物学效力、细胞纯度、细胞特性、活细胞数及比率、功能细胞数和安全性相关的全部内容,仅关注了细胞存活率及制剂外观。通过研究发现。细胞凋亡比台盼兰活率计数更能真实反映细胞的状态,这与凋亡的机制有关。另外,随着时间增长,死细胞增多,碎片增多,虽然活细胞的表型没有显著降低,但细胞的生物学效力应该已经发生变化,这是后续研究需要重点关注的问题。

参考文献

- [1] 国家药品监督管理局食品药品审核查验中心. «GMP附录-细胞治疗产品» (征求意见稿) [EB/OL]. (2019-11-28) [2020-11-06]. <http://www.ccpic.org.cn/yjxx/yphzp/webinfo/2019/12/1573204076930845.htm>.
- [2] Yuan B Z, Wang J. The regulatory sciences for stem cell-based medicinal products [J]. Front Med, 2014, 8(2): 190-200.
- [3] Yuan B Z. Establishing a quality control system for stem cell-based medicinal products in China [J]. Tissue Eng Part A, 2015, 21(23-24): 2783-2790.
- [4] Stute N, Holtz K, Bubenheim M, et al. Autologous serum for isolation and expansion of human mesenchymal stem cells for clinical use [J]. Exp Hematol, 2004, 32(12): 1212-1225.
- [5] 中国药典 [S]. 四部. 2010.
- [6] 食品药品监管总局. «细胞治疗产品研究与评价技术指导原则(试行)» [EB/OL]. (2017-12-18) [2020-11-06]. <https://www.nmpa.gov.cn/xxgk/ggtg/qtggtg/20171222145101557.html>.