



团 体 标 准

T/CSCB 0027—2024



中国细胞生物学学会
CHINESE SOCIETY FOR CELL BIOLOGY

2024-10-28 发布

2024-12-31 实施

中国细胞生物学学会 发 布
中 国 标 准 出 版 社 出 版

目 次

前言 III

1 范围 1

2 规范性引用文件 1

3 术语和定义 1

4 缩略语 2

5 核心技术要素 2

6 检验方法 4

7 检验规则 5

8 使用说明 6

9 标签 6

10 包装、储存及运输 6

11 废弃物处理..... 7

附录 A（规范性） 人胰腺交接单 8

附录 B（规范性） 人胰岛制备操作规程 9

附录 C（规范性） 人胰岛形态检查标准检验规程 12

附录 D（规范性） 人胰岛数量标准检验规程 14

附录 E（规范性） 人胰岛活率标准检验规程 16

附录 F（规范性） 人胰岛纯度标准检验规程 18

附录 G（规范性） 人胰岛功能评估(体外试验) 19

附录 H（规范性） 人胰岛功能评估(体内试验)..... 21

附录 I（规范性） 供者基本信息登记表 23

参考文献 24

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。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

本文件由中国细胞生物学学会标准工作委员会提出。

本文件由中国细胞生物学学会归口。

本文件起草单位：天津市第一中心医院、中国科学院动物研究所、中国医科大学附属第一医院、西安交通大学第一附属医院、大连市中心医院、浙江大学医学院附属第二医院、江苏省人民医院、中山大学附属第一医院、中国科学院杭州医学研究所、首都医科大学附属北京潞河医院、南开大学生命科学学院、北京干细胞与再生医学研究院、北京泽辉辰星生物科技有限公司、北京工商大学、中国科学技术信息研究所、深圳华大生命科学研究院(国家基因库)、中国医学科学院医学实验动物研究所。

本文件主要起草人：王树森、赵同标、程颖、丁小明、李坤、傅红兴、张梅、胡安斌、田晓辉、杜媛媛、魏玲玲、陈旭春、高洁、邹家琦、梁瑞、冯新顺、李杨、王颖、蔡湘衡、孙鹏、丁雪洁、张博雅、刘腾丽、刘娜、郝捷、王磊、赵红玲、曹佳妮、马爱进、朱礼军、李启沅、魏强。



人 胰 岛

1 范围

本文件规定了人胰岛的技术要求、检测方法、检验规则、使用说明、标签、包装、储存、运输要求和废弃物处理要求。

本文件适用于研究用人胰岛的制备和检测。

本文件不适用于拟用于临床治疗的人胰岛的制备和检测。

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 293 艾滋病和艾滋病病毒感染诊断标准

中华人民共和国药典(2020年版 三部)

全国临床检验操作规程(第四版)

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

人胰岛 human islets

由胰腺组织分离纯化获得的内分泌细胞团。

注:包括分泌胰高血糖素的 α 细胞,分泌胰岛素的 β 细胞,以及PP细胞和 δ 细胞。

3.2

人胰腺灌注 human pancreatic perfusion

将消化酶溶液注射至胰腺主胰管中,使其充分膨胀的过程。

3.3

人胰岛分离 human islet isolation

从胰腺中获取胰岛的过程。

3.4

人胰腺消化 human pancreatic digestion

应用胶原酶灌注将胰岛与胰腺外分泌组织分离的过程。

3.5

人胰岛纯化 human islet purification

从胰腺外分泌组织中纯化出来,获得高纯度的胰岛的过程。

3.6

人胰岛培养 human pancreatic islet cell culture

将获得的胰岛按不同纯度区分后放置在细胞培养箱培养的过程。

4 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

BMI:体重指数(Body Mass Index)

DMSO:二甲基亚砷(Dimethyl Sulfoxide)

DNA:脱氧核糖核酸(Deoxyribonucleic Acid)

Dnase I:脱氧核糖核酸酶(Deoxyribonuclease)

DTZ:双硫腙(Dithizone)

EBV:人类疱疹病毒(Epstein-Barr Virus)

FDA:荧光素二乙酸(Fluorescent Diacetic Acid)

HbA1c:糖化血红蛋白(Hemoglobin A1C)

HBV:乙型肝炎病毒(Hepatitis Virus)

HCMV:人巨细胞病毒(Human Cytomegalovirus)

HCV:丙型肝炎病毒(Hepatitis C Virus)

HIV:人类免疫缺陷病毒(Human Immunodeficiency Virus)

IEQ:胰岛当量(Islet Equivalent)

IGF-1:胰岛素样生长因子-1(Insulin-like Growth Factor-1)

PI:碘化丙啶(Propidium Iodine)

SCID:严重联合免疫缺陷(Severe Combined Immunodeficiency)

STZ:链脲佐菌素(Streptozotocin)

UW:威斯康星大学保存液(The University of Wisconsin Solution)

5 核心技术要素

5.1 原材料要求

5.1.1 基本要求

供者胰腺来源相关要求见《人体器官捐献和移植条例》。

5.1.2 供者胰腺筛选标准

5.1.2.1 排除标准

用于胰岛制备的供者,排除标准如下:

- a) 确诊的1型或2型糖尿病;
- b) 恶性肿瘤;
- c) 艾滋病、狂犬病感染者或具有感染以上疾病的危险因素;
- d) 活动性结核;
- e) 多重耐药菌感染;
- f) 不明原因的中枢神经系统感染;
- g) 未经治疗控制的活动性感染及全身性感染;
- h) 严重的病因不明的疾病。

5.1.2.2 筛选指标

用于胰岛制备的胰腺及其供者,符合以下标准:

- a) 年龄要求:用于胰岛制备的胰腺供者年龄应在 18 岁~60 岁;
- b) BMI 选择:用于胰岛制备胰腺供者的 BMI 应高于 21 kg/m^2 ;
- c) 糖尿病相关实验室检查:宜选用 $\text{HbA1c} < 6.0\%$ 供者的胰腺进行胰岛移植;同时,也需要根据供者 C 肽水平判断其胰岛的基本功能;
- d) 外观评估:正常胰腺的长度应在 $15 \text{ cm} \sim 20 \text{ cm}$,呈淡黄色,头部扁平,体尾部略呈三角形,质地略软于肾脏;
- e) 热缺血时间:功能性热缺血时间应 $\leq 30 \text{ min}$;
- f) 其他还需要考虑的因素包括:供者死亡原因、是否有心脏骤停史、住院及 ICU 抢救时间、血流动力学状况、升压药物和激素类药物应用情况以及其他实验室检查结果等。

5.1.3 胰腺获取

应采用原位灌注、腹部多器官整块切取方法,整块切取肝脏、胰腺、十二指肠、脾、双侧肾脏及部分小肠。切取供者胰腺时,宜尽量保留完整的胰腺外包膜,可不保留血管。获取时宜尽量减少胰腺热缺血时间,器官保存液应充分灌注胰腺并迅速降温至 $0^\circ\text{C} \sim 4^\circ\text{C}$,细致游离胰腺并避免挤压损伤。

5.1.4 胰腺运输保存及交接标准

完整获取供者胰腺后,应将其放置于 $0^\circ\text{C} \sim 4^\circ\text{C}$ 低温 UW 保存液中保存。使用一次性使用无菌袋包装 2 层~3 层包裹并置于器官专用转运箱内,在器官转运过程中,应严格监控和记录转运箱温度,器官转运箱内温度应控制在 $0^\circ\text{C} \sim 4^\circ\text{C}$;供者胰腺自获取至进行胶原酶溶液灌注前的冷缺血时间应不超过 12 h。按照附录 A 要求填写《人胰腺交接单》。

5.2 关键质量属性

5.2.1 人胰岛形态

胰岛形态的放行标准为:胰岛表面圆润,折光性好,平均粒径在 $50 \mu\text{m} \sim 500 \mu\text{m}$ 之间。

5.2.2 人胰岛数量

胰岛数量以 IEQ 来计算(以直径为 $150 \mu\text{m}$ 大小的球状胰岛作为一个 IEQ)。

5.2.3 人胰岛活率

胰岛活率应 $\geq 70\%$ 。

5.2.4 人胰岛纯度

纯度 $\geq 70\%$ 定义为高纯度胰岛,纯度在 $40\% \sim 69\%$ 之间定义为中等纯度胰岛,纯度在 $30\% \sim 39\%$ 之间定义为低纯度胰岛。

5.2.5 人胰岛功能评估

5.2.5.1 葡萄糖刺激胰岛素释放试验(体外试验):高糖时的胰岛素分泌量和低糖时的胰岛素分泌量的比值即为葡萄糖刺激指数。当葡萄糖刺激指数 > 1 时判定为胰岛体外功能合格。

5.2.5.2 体内试验:通过 STZ 诱导裸鼠糖尿病模型肾包膜移植人胰岛体内试验,分析评估胰岛功能。

小鼠血糖应在胰岛移植后 1 d~3 d 内恢复到正常水平,如血糖在 7 d 内仍不能降至正常水平,则说明移植的胰岛功能不佳。移植后血糖恢复正常,但后期如果连续 3 d 小鼠血糖 >13.8 mmol/L,则说明移植胰岛的功能丧失。

5.2.6 内毒素

胰岛悬液中内毒素水平应低于 5 EU/mL。

5.2.7 微生物

真菌、细菌、支原体、衣原体、HIV、HBV、HCV、EBV、HCMV 病毒等应为阴性。

5.3 过程控制

5.3.1 胰岛分离

5.3.1.1 胰岛分离过程中避免不同供体、组织和细胞之间交叉污染、混淆等,并建立风险应对措施。

5.3.1.2 胰岛分离后培养应注明操作日期、培养条件、操作人姓名或首写字母。

5.3.2 胰岛分离流程及细胞鉴定

5.3.2.1 胰岛分离所用的设备、培养体系及操作步骤应明确,建立标准的、可重复的流程。胰岛分离及培养具体操作规程应符合附录 B 的要求。

5.3.2.2 分离产生的人胰岛应明确细胞形态、产量、活性及功能鉴定。

6 检验方法

6.1 胰岛形态

按照附录 C 的方法检验。

6.2 胰岛数量

按照附录 D 的方法检验。

6.3 人胰岛活率

按照附录 E 的方法检验。

6.4 人胰岛纯度

按照附录 F 的方法检验。

6.5 人胰岛功能评估

人胰岛体外功能评估按照附录 G 的方法检验。

人胰岛体内功能评估按照附录 H 的方法检验。

6.6 内毒素

按照《中华人民共和国药典(2020 年版 三部)》中的细菌内毒素检查法对胰岛悬液内毒素进行检测。

6.7 微生物

6.7.1 细菌及真菌

按照《中华人民共和国药典(2020 年版 三部)》中“1101 无菌检查法”检验。

6.7.2 支原体

按照《中华人民共和国药典(2020 年版 三部)》中的“3301 支原体检查法”检验。

6.7.3 HIV

按照 WS 293 中的“核酸法”检验。

6.7.4 HBV

按照《全国临床检验操作规程》(第四版)“HBV 核酸法”检验。

6.7.5 HCV

按照《全国临床检验操作规程》(第四版)“HCV 核酸法”检验。

6.7.6 EBV

按照《全国临床检验操作规程》(第四版)“EBV 核酸法”检验。

6.7.7 HCMV

按照《全国临床检验操作规程》(第四版)“HCMV 核酸法”检验。

7 检验规则

7.1 抽样方法和数量

7.1.1 同一供体来源,同一方法制备出来的人胰岛为一批。

7.1.2 在同一批次的细胞,按照不同纯度(高纯度、中等纯度、低纯度),分别抽取 3 个样本进行检测。

7.2 使用前检验

7.2.1 每批细胞进行使用前检验,并附检验报告。

7.2.2 使用前检验项目应包括 5.2 规定所有的项目。

7.3 复核检验

根据需要,应由专业细胞检验机构/实验室进行复核检验。

7.4 判定规则

7.4.1 使用前检验项目全部符合 5.2(不包括 5.2.5.2 体内功能评估)规定,判为合格品;有 1 项及以上不符合本文件规定,则判为不合格。

7.4.2 复核检验项目全部符合 5.2(不包括 5.2.5.2 体内功能评估)规定,判为合格品;有 1 项及以上不符

合本文件规定,则判为不合格。

8 使用说明

应至少包括以下内容:

a) 细胞名称;

b) 胰岛编号;

注:自 H001 起编号,同一供体来源,同一方法制备出来的人胰岛为一个独立编号。

c) 细胞数量;

d) 分离纯化日期;

e) 胰岛组织量;

f) 储存条件;

g) 运输条件;

h) 使用方法;

i) 执行标准号;

j) 分离纯化地址;

k) 联系方式;

l) 邮政编码;

m) 注意事项。

9 标签

应至少包括以下内容:

a) 产品名称;

b) 胰岛编号;

c) 细胞数量;

d) 分离纯化日期;

e) 分离纯化组织量;

f) 生产日期。

10 包装、储存及运输

10.1 包装

应选择对人胰岛关键质量属性无影响的材料和容器。

10.2 储存(培养)

胰岛应在 22℃~37℃ 环境下培养储存,且用于移植的胰岛培养时间不宜超过 72 h。

10.3 运输

胰岛应在 2℃~8℃ 下储存运输。

11 废弃物处理

11.1 人胰岛生产和检测过程中产生的废弃物应建立废弃细胞管理文档,严格执行管理规范并详细记录。

11.2 人胰岛研究和生产中不合格的细胞、剩余废弃的细胞或捐赠物,应进行合法、妥善并符合伦理的处理。



附 录 A
(规范性)
人胰腺交接单

人胰腺交接单见表 A.1。

表 A.1 人胰腺交接单

项目名称			
胰岛编号			
获取日期及时间			
转运方式(保存液)		转运温度	
运送人员		运送日期及时间	
附带文件 清单	供者基本信息登记表(来源机构) 有☐无☐		
检查项目	1. 运输容器外观是否完整。 是☐否☐ 2. 胰腺器官包装的外观(清洁完整无破损无漏液)。 是☐否☐ 3. 运输过程中转运温度是否控制在 2℃~8℃。 是☐否☐		
科接收人		接收日期及时间	
复核人		复核日期及时间	

附 录 B
(规范性)
人胰岛制备操作规程

B.1 仪器和设备

- B.1.1 细胞计数器。
- B.1.2 消化用水浴锅。
- B.1.3 胰腺灌注泵。
- B.1.4 消化用蠕动泵。
- B.1.5 血细胞淘洗机。
- B.1.6 纯化蠕动泵。
- B.1.7 真空泵。
- B.1.8 温控仪。
- B.1.9 磁力搅拌器。
- B.1.10 4℃台式离心机。
- B.1.11 体视显微镜。

B.2 试剂

- B.2.1 胰腺清洗液:其主要成分为 HBSS 缓冲液、两性霉素 B 溶液和碘伏溶液等。
- B.2.2 灌注液:其主要成分为胶原酶(Liberase MTF C/F 2:3 GMP Grade)、肝素钠、1 mol/L Hepes 缓冲液、氯化钙和 HBSS 缓冲液等。
- B.2.3 胰岛清洗液:其主要成分为 RPMI 1640 培养基、人血白蛋白、肝素钠和胰岛素等。
- B.2.4 胰岛收集液:其主要成分为 RPMI 1640 培养基、人血白蛋白、肝素钠和胰岛素等。
- B.2.5 胰岛纯化液:其主要成分为 Ficoll 1.1 分离液和 UW 液等。
- B.2.6 胰岛培养液:其主要成分为 CMRL 1066 培养基、人血白蛋白、肝素钠、IGF-1 等。
- B.2.7 双硫脲(DTZ)溶液:其主要成分为 DTZ 粉末、DMSO 和 HBSS 缓冲液等。

B.3 耗材

- B.3.1 修剪包:包括组织剪 1 把、镊子 1 把、辅料盆 3 个、托盘 1 个。
- B.3.2 灌注包:包括组织剪 1 把、镊子 1 把、托盘 1 个、持针器 1 把、止血钳 5 把、刀柄 1 把。
- B.3.3 灌注盘:1 个。
- B.3.4 冰盘:1 个。
- B.3.5 螺旋加热器:2 个。
- B.3.6 灌注管路:1 套。
- B.3.7 Ricordi 消化罐:1 套。
- B.3.8 消化管路:1 套。
- B.3.9 密度梯度烧杯:1 套。
- B.3.10 纯化管理路:纯化管理路 A、纯化管理路 B 各 1 套。
- B.3.11 纯化袋(Cobe-bag):1 套。
- B.3.12 收集瓶:3 个。
- B.3.13 称量瓶:1 个。

B.4 操作步骤

B.4.1 接收胰腺

B.4.1.1 检查包装的完整性并确认捐赠信息(血清学检验结果、医疗信息、病史)。

B.4.1.2 按照附录 I 的要求将捐献者、器官捐献组织(Organ Procurement Organizations, OPO)的信息记录在《供者基本信息登记表》中。

B.4.2 胰腺处理

B.4.2.1 在无菌条件下,打开胰腺的包装袋,将胰腺放入超净台内的手术盘中。

B.4.2.2 将器官保存液(UW)倒入手术盘中,手术分离十二指肠和脾脏。

B.4.2.3 抽取 15 mL 的器官保存液,用于微生物学检测;在需氧培养瓶和厌氧培养瓶中分别注入 10 mL、5 mL 用于细菌培养革兰氏染色。

B.4.2.4 准备消化液(所使用的消化酶可因品牌和批次的不同而存在差异,使用前需参考产品分析/检验报告单 COA)。

B.4.2.5 用碘伏、两性霉素 B、HBSS 缓冲液依次冲洗胰腺。

B.4.2.6 清洗完成后,将胰腺放入称量瓶中,称重并记录在胰岛制备记录本中。

B.4.2.7 将注射管通过胰管插入胰腺的中部并结扎固定注射管。

B.4.2.8 灌注前检查胰腺组织(包括是否附着脾脏、十二指肠,胰腺损伤、水肿、灌注情况,胰腺表面脂肪及脂肪浸润情况等)。

B.4.3 胰腺灌注

B.4.3.1 将胰腺放入加有消化酶的手术盘中,开始灌注。

B.4.3.2 应用胰腺灌注机进行胰腺灌注;灌注时间为 15 min,灌注压力为:60 mmHg/5 min~80 mmHg/5 min,160 mmHg/10 min~180 mmHg/10 min。

B.4.3.3 在灌注前修剪胰腺,灌注过程中监控灌注温度和流速;在灌注结束后,剪去胰腺上多余的结缔组织并将胰腺剪成 5 块~15 块,2 cm³~4 cm³ 的小块组织。

B.4.4 胰腺消化(1 期消化)

B.4.4.1 配制胰岛清洗液和胰岛收集液。

B.4.4.2 将胰腺组织块和消化液一起加入 Ricordi 消化罐中并加入 1 mL~2 mL 的 Dnase I 到 Ricordi 消化罐中。

B.4.4.3 启动消化系统,将螺旋加热器放入水浴箱内,以 230 mL/min±20 mL/min 的速度泵入液体并排出 Ricordi 消化罐中空气后轻轻摇晃消化罐。

B.4.4.4 在 5 min 或温度升到 35 °C 后减慢泵入液体的速度至 110 mL/min±20 mL/min,轻轻摇晃消化罐,当罐内的温度维持在 36 °C~38 °C 后,根据胰腺的消化情况改变摇晃力度。

B.4.4.5 每间隔 1 min~2 min 采集标本,检测消化程度。将消化程度的检测结果记录在胰岛制备记录本中。

B.4.5 收集标本(2 期消化)

B.4.5.1 开始收集时,将螺旋加热器移出水浴箱并控制温度在 30 °C 左右。

B.4.5.2 将消化后的产物用 1 L 收集瓶收集(预先加入胰岛收集液)(收集瓶在收集细胞前依次加入 500 mL、400 mL、300 mL 收集液,依次标号为 1、2、3)。

B.4.5.3 当染色的样品中再没有观察到胰岛,消化罐中还有少量的组织残留,停止向消化罐中加入 RPMI 1640,收集系统中剩余的组织液,然后停止循环蠕动泵;记录稀释终止的时间,计算和记录总的稀释时间。

B.4.6 人胰腺消化组织的清洗

B.4.6.1 将上述收集瓶中的收集液转移至离心管中(4℃离心 1 000 r/min,1 min)。

B.4.6.2 离心后,弃去上清液,合并离心管中消化产物,用胰岛清洗液重悬(4℃离心 1 000 r/min,1 min)。

B.4.6.3 离心后弃去上清液,合并离心管中消化产物,用胰岛清洗液重悬(4℃离心 1 000 r/min,1 min)。

B.4.6.4 将清洗后的消化产物用离心管收集,并加入 DNA 酶 1 mL~2 mL(4 mg/mL),抽取样本进行纯化前计数,轻摇 3 min 后 4℃离心 1 000 r/min,3 min。

B.4.6.5 将收集的消化产物弃上清,记录消化产物组织量,加入 150 mL UW 液(如果消化产物组织量 >50 mL,则平均分装到两个离心管中,分别加入 150 mL UW 液)。

B.4.6.6 在加入 UW 液后,用移液管吹打使溶液混匀。

B.4.7 人胰岛组织纯化

B.4.7.1 启动 COBE2991,将转速调整到最大(3 000 r/min)、泵出速度调整到最大(450 mL/min)后,按“spin”键,当转速达到最大时按“superout”键,听见“嘀”声后按“stop”键停止运行,静止机器 3 min 等待下步操作。

B.4.7.2 按“reset”键,将“纯化袋(Cobe-bag)”装入 COBE2991 中,用钳子夹住除绿导管以外的所有导管,调整转速到 1 500 r/min,泵出速度为 0 mL/min。

B.4.7.3 将连接密度梯度烧杯的纯化 A 管与纯化袋(Cobe-bag)的绿导管相连。

B.4.7.4 向密度梯度烧杯前烧杯中加入 Ficoll 液(1.100 g/mL),打开纯化蠕动泵,将 Ficoll 液(1.100 g/mL)泵入纯化袋(Cobe-bag)中,关闭纯化蠕动泵同时松开泵头并按下“spin”键,当转速达到 1 500 r/min 时按下“superout”键,将泵出速度调整到 100 mL/min,当纯化袋(Cobe-bag)中液体到前烧杯中时迅速关闭泵头同时按“stop”键停止运行,打开电磁搅拌器。

B.4.7.5 将高密度梯度液加入到前烧杯中,将低密度梯度液加入到后烧杯中后,依次松开密度梯度烧杯之间的夹子,打开纯化蠕动泵,按下“spin”键启动机器(转速 1 500 r/min,泵出速度为 0 mL/min)。

B.4.7.6 在密度梯度烧杯中的溶液完全流出之前,夹住烧杯之间的连接管,向前烧杯中加入消化产物,向消化产物离心管中加入 25 mL 清洗液,清洗离心管。消化产物完全泵出密度梯度烧杯之前加入上述清洗液,当清洗液完全进入纯化袋(Cobe-bag)后,关闭泵,松开泵头,夹住纯化袋上的导管,缓慢打开夹住纯化袋上的夹子,将纯化 B 管与纯化袋(Cobe-bag)的黄管连接。

B.4.7.7 准备 1 个空 225 mL 离心管(标记为 0)和 6 个分别加入 150 mL RPMI 1640 溶液的 225 mL 的离心管(分别标记为 1、2、3、4、5、6)。

B.4.7.8 消化产物在纯化袋(Cobe-bag)中离心 5 min 后,将泵出速度调整到 100 mL/min,收集纯化产物,纯化产物收集结束后(0 号管收集 150 mL 纯化产物,1~6 管分别收集 30 mL 纯化产物),按下“stop”键。

B.5 纯度鉴定

纯化样本收集完成后将离心管 1~6 轻轻混合均匀,依次从其中取出 1 mL 标本加入 12 孔培养板中,用 DTZ 染色,计算胰岛纯度。纯度 $\geq 70\%$ 定义为高纯度胰岛,纯度在 40%~69%之间定义为中等纯度胰岛,纯度在 30%~39%之间定义为低纯度胰岛。

附 录 C

(规范性)

人胰岛形态检查标准检验规程

C.1 仪器和设备

体视显微镜。

C.2 试剂

C.2.1 人胰岛培养基,其主要成分为:CMRL 1066 培养基、人血白蛋白、肝素钠、IGF-1。人胰岛培养基配制后需用滤器过滤,置于 2℃~8℃保存。

C.2.2 DTZ 溶液,浓度为 1 mg/mL,其主要成分为:DTZ,二甲基亚砜(DMSO),HBSS 缓冲液。DTZ 溶液配制后需用 0.22 μm 针头滤器过滤,置于 2℃~8℃避光保存,现用现配。

C.3 耗材

细胞培养皿。

C.4 检测步骤

C.4.1 细胞悬液制备

收集待检测胰岛,用 HBSS 缓冲液配制成细胞悬液,稀释至合适的浓度。

C.4.2 细胞染色

1:1 加入上述 1 mg/mL 的双硫脲工作液至胰岛悬液中,混合均匀,室温,染色 1 min~2 min。

C.4.3 细胞形态观察记录

C.4.3.1 从左到右,依次打开体视显微镜的两个开关按钮。

C.4.3.2 将细胞孔板置于光学显微镜载物台上,可将细胞球轻轻晃动于视野中央。在 4×物镜下找到细胞(染色的胰岛呈红色)。

C.4.3.3 立即观察,观察后描述细胞形态(如是否聚集、是否有碎片、边缘是否光滑等状态),并在物镜为 4×镜下拍照记录。每个视野随机选取 20 IEQ 胰岛观察并记录粒径值,计算平均值,并判定平均值是否在 50 μm~500 μm 之间。每个培养皿随机拍 3 个视野。

C.4.3.4 形态观察结束后,从右到左依次关闭普通光学显微镜开关按钮,并整理台面。

C.5 结果判定

根据胰岛质量等级评分标准(见表 C.1),将胰岛进行质量等级评定。

表 C.1 胰岛量化表

	计数 1	计数 2	平均值
TRAPPED/%			
碎片/%			

表 C.1 胰岛量化表（续）

	计数 1	计数 2	平均值
大小分布	(0 0.5 1 1.5 2)	(0 0.5 1 1.5 2)	
碎片	(0 0.5 1 1.5 2)	(0 0.5 1 1.5 2)	
密度	(0 0.5 1 1.5 2)	(0 0.5 1 1.5 2)	
边缘	(0 0.5 1 1.5 2)	(0 0.5 1 1.5 2)	
形态	(0 0.5 1 1.5 2)	(0 0.5 1 1.5 2)	
胰岛评分：_____		签名：_____	



附 录 D
(规范性)
人胰岛数量标准检验规程

D.1 仪器和设备

D.1.1 体视显微镜。

D.1.2 细胞计数器。

D.2 试剂

D.2.1 人胰岛培养基,其主要成分为:1066 培养基、人血白蛋白、肝素钠、IGF-1。人胰岛培养基配制后需用滤器过滤,置于 2℃~8℃保存并在一周内使用。

D.2.2 DTZ 溶液,浓度为 1 mg/mL,其主要成分为:DTZ,二甲基亚砜(DMSO),HBSS 缓冲液。DTZ 溶液配制后需用 0.22 μm 针头滤器过滤,置于 2℃~8℃避光保存,现用现配。

D.3 耗材

细胞计数皿。

D.4 检测步骤

D.4.1 细胞悬液制备

收集待检测胰岛,用 HBSS 缓冲液配制成细胞悬液,稀释至合适的浓度。

D.4.2 细胞染色

1:1 加入上述 1 mg/mL 的双硫脲工作液至胰岛悬液中,混合均匀,室温,染色 1 min~2 min。

D.4.3 细胞计数

D.4.3.1 从左到右,依次打开体视显微镜的两个开关按钮。

D.4.3.2 将细胞孔板置于光学显微镜载物台上,可将胰岛轻轻晃动于视野中央。在 4×物镜下找到细胞(染色的胰岛呈红色)。

D.4.3.3 利用光学显微镜目镜中标准线观测胰岛大小,根据胰岛大小将其归入不同的直径组。

D.4.3.4 利用细胞计数器记录每个直径组胰岛的数量。

D.4.3.5 计数结束后,从右到左依次关闭普通光学显微镜开关按钮,并整理台面。

D.5 结果判定

以直径为 150 μm 大小的胰岛作为一个 IEQ。按照表 D.1 来计算整个样本的 IEQ,得到胰岛个数和 IEQ 的数值后,再乘以稀释倍数,得到准确的胰岛个数和 IEQ。

表 D.1 胰岛当量的计算

胰岛直径区间/ μm	胰岛个数(IPN)	校正因子	胰岛当量(IEQ)
50~100		0.167	
101~150		0.648	
151~200		1.685	
201~250		3.500	
251~300		6.315	
301~350		10.352	
351~400		15.833	
≥ 401		22.750	
胰岛当量(IEQ)=各组 IEQ 相加 $\times$ 稀释倍数			
注：胰岛个数 $\times$ 换算指数=各组 IEQ；各组 IEQ 相加即为本次获取胰岛的 IEQ 总数；直径 $<50\ \mu\text{m}$ 的胰岛不予计数。			



附 录 E
(规范性)
人胰岛活率标准检验规程

E.1 仪器和设备

E.1.1 荧光显微镜。

E.1.2 台式离心机。

E.2 试剂

E.2.1 FDA 储液:取 1 mg FDA 溶于 50 mL 丙酮中,获得 0.02 mg/mL 的 100×储备液,分装后避光保存在-20℃下。

E.2.2 FDA 工作液:取 10 μL FDA 储液溶于 1 mL PBS 中,稀释成 46 μmol/L 的工作液,30 min 内用完。(染料配制时确保染料的充分溶解,否则染色可能出现块状杂质)

E.2.3 PI 储液:称取 1 mg PI 溶于 1 mL DPBS 中,获得 1 mg/mL 的 100×储备液,分装后避光保存在 2℃~8℃下。

E.2.4 PI 工作液:将 10 μL PI 储液溶于 1 mL DPBS 中,稀释成 14.34 μmol/L 的工作液,在 30 min 内用完。

E.2.5 PBS 缓冲液:pH 为 7.4。

E.3 耗材

细胞培养皿。

E.4 检测步骤

E.4.1 细胞悬液准备

在培养皿中加入 900 μL DPBS,混合胰岛样本,取 100 μL 胰岛混悬液至含 900 μL DPBS 的培养皿中。

E.4.2 细胞染色

E.4.2.1 快速加入 10 μL PI 染色液和 10 μL FDA 染色液至胰岛混悬液中,用移液枪混合均匀,此混悬液中 FDA 浓度为 0.46 μmol/L、PI 浓度为 14.34 μmol/L。

E.4.2.2 染色 1 min~2 min 后,将 30 mm×15 mm 培养皿放在载玻片上用荧光显微镜拍照。

E.4.3 细胞活率观察

E.4.3.1 从左到右,依次打开荧光显微镜的两个开关按钮。

E.4.3.2 将样品放在载物台上,并在 4×物镜下找到细胞。

E.4.3.3 打开荧光激光发射器,在显微镜座的右侧调节激发光通路,且“遮挡杆”杆没有挡住激发光。

E.4.3.4 拍摄:每个样品随机拍摄 3 个视野,每个视野 4×物镜拍一张,整个过程避免捕捉到杂质荧光,不然数据处理时会把杂质计算成细胞。

E.4.3.5 关闭荧光激光发射器(开机后至少半小时才能关机),从右到左依次关闭普通光学显微镜开关按钮。

E.5 结果分析

E.5.1 数据处理

随机选取三个视野,评估胰岛活率比例(%),计算平均值(肉眼可见绿色细胞为活细胞,红色细胞为死细胞)。

E.5.2 结果判定

合格标准:胰岛存活率 $\geq 70\%$ 判定为合格。



附 录 F
(规范性)
人胰岛纯度标准检验规程

F.1 仪器和设备

体视显微镜。

F.2 试剂

F.2.1 人胰岛培养基,其主要成分为:CMRL 1066 培养基、人血白蛋白、肝素钠、IGF-1。人胰岛培养基配制后需用滤器过滤,置于 2℃~8℃保存。

F.2.2 DTZ 溶液,浓度为 1 mg/mL,其主要成分为:DTZ,二甲基亚砜(DMSO),HBSS 缓冲液。DTZ 溶液配制后需用 0.22 μm 针头滤器过滤,置于 2℃~8℃避光保存,现用现配。

F.3 耗材

12 孔细胞培养板。

F.4 检测步骤

F.4.1 细胞悬液制备

F.4.1.1 将纯化样本按照纯度从高到低收集到 1~6 号离心管中,轻轻混匀胰岛,依次从其中取出 1 mL 标本加入 12 孔板中。

F.4.1.2 用 HBSS 缓冲液配制成细胞悬液,稀释至合适的浓度。

F.4.2 细胞染色

1:1 加入上述 1 mg/mL 的双硫脲工作液至胰岛悬液中,混合均匀,室温,染色 1 min~2 min。

F.4.3 细胞纯度观察记录

F.4.3.1 从左到右,依次打开体视显微镜的两个开关按钮。

F.4.3.2 将 12 孔细胞培养板置于光学显微镜载物台上,按照从高到低纯度依次将不同孔中细胞球轻轻晃动于视野中央。在 4×物镜下找到细胞(染色的胰岛呈红色)。

F.4.3.3 立即观察,根据胰岛占纯化后所有组织的比例,判定胰岛纯度。

F.4.3.4 纯度观察结束后,从右到左依次关闭普通光学显微镜开关按钮,并整理台面。

F.5 结果判定

纯度≥70%定义为高纯度胰岛,纯度在 40%~69%之间定义为中等纯度胰岛,纯度在 30%~39%之间定义为低纯度胰岛。

附录 G

(规范性)

人胰岛功能评估(体外试验)

G.1 仪器和设备

G.1.1 光学显微镜。

G.1.2 高速台式离心机。

G.1.3 超声波细胞破碎仪。

G.2 试剂

G.2.1 静态糖刺激液配方(krebs buffer): 1.19 mmol/L NaCl, 94 mmol/L KCl, 50 mmol/L $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 250 mmol/L NaHCO_3 , 24 mmol/L KH_2PO_4 , 24 mmol/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 10 mmol/L HEPES, 0.5% BSA, pH=7.4。

注: $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 需单独配, 调完 pH=7.4 后加入, 否则容易产生浑浊。

G.2.2 葡萄糖(Glucose): 50%。

G.2.3 牛血清白蛋白(BSA): 纯度 $\geq 98\%$ 。G.2.4 RPMI-1640 培养基: 置于 $2\text{ }^{\circ}\text{C} \sim 8\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。

G.2.5 胎牛血清(FBS)。

G.2.6 PBS 缓冲液: pH 为 7.4。

G.2.7 RIPA 裂解液: 置于 $2\text{ }^{\circ}\text{C} \sim 8\text{ }^{\circ}\text{C}$ 避光保存。

G.3 耗材

G.3.1 6 孔板。

G.3.2 12 孔板。

G.3.3 EP 管。

G.4 试验步骤

G.4.1 试验准备

流程简要: 1.67 mmol/L Glucose(1 h/平衡)→1.67 mmol/L Glucose(1 h/收样)→16.7 mmol/L Glucose(1 h/收样)→胰岛收集超声裂解总蛋白(100 μL RIPA 裂解液)。

G.4.2 试验操作

G.4.2.1 配制试剂

提前配制所需试剂。

G.4.2.2 细胞准备

从培养箱拿出人胰岛, 按分组在显微镜下手动挑取 10 IEQ 的胰岛/孔置于 1 mL $1\times$ PBS 溶液中, 洗涤胰岛 2 次。

G.4.2.3 低糖预孵育

分别加入 1 mL/孔 1.67 mmol/L 葡萄糖溶液, 将洗涤过的 10 IEQ 胰岛/孔按组分别转移至

1.67 mmol/L 低糖溶液,12 孔板置于 37 °C、5%CO₂ 培养箱中预孵育 1 h。

G.4.2.4 低糖孵育

按每组 3 个复孔为例,预先加入 1 mL 1.67 mmol/L 葡萄糖溶液,分别在板上标记为 L1、L2、L3,将预孵育的胰岛分别转移至 L1、L2、L3 孔内,平行孔间胰岛形态与大小需尽量均一,置于倒置显微镜 10×物镜下并聚焦进行拍照留存,每孔之间拍照参数需统一,完毕后继续放置 37 °C、5%CO₂ 培养箱中低糖孵育 1 h。

G.4.2.5 高糖孵育

按 3 个复孔在新的 12 孔板中每孔加入 1 mL 高糖溶液,同时在板上做好相应标记(H1、H2、H3),将低糖孵育的 10 IEQ 胰岛全部吸出转移到对应的 H1、H2、H3 中,置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中高糖孵育 1 h。

G.4.2.6 收集低糖上清

将低糖上清液分别收集到 1.5 mL EP 中,储存在 2 °C~8 °C 冰箱。

G.4.2.7 收集高糖上清

将高糖上清液收集至 1.5 mL EP 管中,同时做好相应标记(H1、H2、H3),储存在 2 °C~8 °C 冰箱。

G.4.2.8 胰岛素水平检测

用 ELISA 测定胰岛素水平(Mercodia)。450 测 OD 值。

附录 H

(规范性)

人胰岛功能评估(体内试验)

H.1 仪器和设备

H.1.1 体视显微镜。

H.1.2 血糖仪。

H.2 试剂

H.2.1 链脲佐菌素(STZ)。

H.2.2 三溴乙醇。

H.2.3 戊戊醇。

H.2.4 HBSS 缓冲液。

H.2.5 碘伏。

H.3 耗材

H.3.1 PE50 管。

H.3.2 血糖试纸。

H.4 试验步骤

H.4.1 试验准备

H.4.1.1 小鼠的饲养和处理

小鼠应保持在 VAF/SPF/无菌设施中,接受无菌的食物和水,并根据关于免疫缺陷小鼠的标准和程序以无菌方式处理。所有试剂和仪器使用前均应无菌。

H.4.1.2 小鼠血糖监测

H.4.1.2.1 血糖监测时间轴

小鼠将在移植后维持至少 4 周血糖监测。如果小鼠在移植后 28 d 血糖未恢复正常,则终止小鼠血糖监测;如果小鼠在 28 d 时血糖正常,则小鼠将在未来 7 d 内接受左肾切除术,如果这些小鼠再次发展为糖尿病,则终止对小鼠的血糖监测。如果肾切除后小鼠仍保持血糖正常,可持续监测小鼠血糖 14 d。

H.4.1.2.2 血糖监测的频率、记录和报告

每周至少记录 3 d 血糖。记录血糖浓度(mg/dL)。定期查看图形显示的数据。

H.4.1.3 小鼠麻醉

H.4.1.3.1 小鼠麻醉采取腹腔注射 1.2%三溴乙醇,按照 280 mg/kg 的剂量给药。

H.4.1.3.2 根据个别机构和 IACUC 标准选择合适的药物和路线。

H.4.2 试验操作

H.4.2.1 化学诱导糖尿病小鼠准备

H.4.2.1.1 在预期的胰岛移植前至少 5 d~7 d 通过腹腔注射给予 STZ 药物。给药前确认小鼠血糖

正常。

H.4.2.1.2 禁食禁水 4 h~6 h 后给药,STZ 的用量为 190 mg/kg,腹腔注射。

H.4.2.1.3 将小鼠饲养在无菌环境中,并提供足够的无菌食物和水。

H.4.2.1.4 每天检查小鼠血糖水平,连续 2 d,血糖 >19.4 mmol/L(350 mg/dL)提示造模成功。

H.4.2.2 胰岛样品准备

按照附录 A 的方法制备胰岛,将制备好的胰岛按照附录 C 的方法计算胰岛当量,用 HBSS 缓冲液将细胞调整至合适浓度。

H.4.2.3 胰岛移植

将 2000IEQ 的人胰岛移植到 6 周~8 周龄的 STZ 处理过的糖尿病 NOD-SCID 小鼠肾包膜下,设置空白对照组,移植与细胞悬液等体积的 HBSS 缓冲液。每组小鼠数量 ≥ 8 。

H.4.2.4 小鼠血糖监测

采用尾静脉取血法进行小鼠血糖检测,每周至少检查小鼠血糖 3 次,持续 4 周。

H.4.2.5 肾切除术

如果胰岛移植后 28 d 小鼠糖尿病得到逆转,将进行肾切除术,以确保血糖恢复正常是由于移植的胰岛。在 28 d“检查结束”时间点后 7 d 进行肾切除术。

H.5 结果分析

正常情况下,小鼠血糖应在胰岛移植后 1 d~3 d 内恢复到正常水平,如血糖在 7 d 内仍不能降至正常水平,则说明移植的胰岛功能不佳。移植后血糖恢复正常,但后期如果连续 3 d 小鼠血糖 >13.8 mmol/L,则说明移植胰岛的功能丧失。

附 录 I

(规范性)

供者基本信息登记表

出生日期: _____ - _____ - _____ (年/月/日) 年龄: _____

身高: _____ cm 体重: _____ kg 血型: _____

体重指数: _____ [体重 kg/(身高 m)²] 性别: 男 ☐ 女 ☐ 民族: _____

确诊感染(如:尿培养、痰培养): _____

糖化血红蛋白: _____ % C 肽: _____ ng/mL

血清学 阴性 阳性 不清楚或未检测

HIV ☐ ☐ ☐HBsAg ☐ ☐ ☐HbcAb ☐ ☐ ☐HCV ☐ ☐ ☐CMV ☐ ☐ ☐

病史: _____

胸外心脏按压: 是 ☐ 否 ☐ 时间: _____

住院时间(ICU): _____

死亡时间: _____ - _____ - _____ (年/月/日) _____ : _____ (时:分)

死亡原因: _____

胰腺灌注液: _____ 灌注液量: _____

胰腺保存前是否进行特殊处理: _____

转运方式(保存液): _____

参 考 文 献

- [1] 人体器官捐献和移植条例(中华人民共和国国务院令 第 767 号)
 - [2] 中华医学会器官移植学分会.中国临床胰岛制备技术操作规范(2023 版)[J].中华器官移植杂志,2023,44(6):321-326.
 - [3] 中华医学会器官移植学分会.胰岛移植临床技术操作规范(2019 版)[J].器官移植杂志,2019,10(6):621-627.
-

