

团体标准

T/SBIAORG 001-2023

《间充质干细胞外泌体质量控制标准》

Criteria for quality control of exosomes from mesenchymal stem cells

2023-03-27 发布

2023-04-01 实施

上海市生物医药行业协会

目 录

前言	3
间充质干细胞外泌体质量控制标准.....	4
1 范围.....	4
2 规范性引用文件.....	4
3 术语和定义.....	4
4 间充质干细胞外泌体的采集.....	5
4.1 间充质干细胞来源要求.....	5
4.2 间充质干细胞上清.....	5
4.3 间充质干细胞伦理要求.....	5
5 技术要求.....	5
5.1 原材料.....	5
5.2 外泌体的质量标准.....	6
6 鉴定方法.....	7
6.1 粒径及浓度.....	7
6.2 形态.....	8
6.3 表面标志蛋白.....	8
6.4 无菌检测.....	8
6.5 细胞内外致病因子检测.....	8
6.6 内毒素检测.....	8
6.7 异常免疫学反应检测.....	8
7 保存.....	8
8 运输.....	9
9 标签.....	9
附录 A（规范性附录）外泌体样品透射电镜观察.....	10
附录 B（规范性附录）外泌体样品荧光标记及纳米流式检测.....	11
主要参考文献	12

前言

本标准按照 GB/T 1.1-2020 给出的规则起草。

本标准由上海市生物医药行业协会提出

本标准起草单位：上海埃格颂赞生物科技有限公司、江西惠肽生物科技有限公司、海南松林生物科技责任有限公司、深圳特瑞特生物科技有限公司、北京汉氏联合生物技术股份有限公司、上海骨泌特生物科技有限公司、上海莱威生物科技有限公司、江西善泰健康产业发展有限公司、江西汉氏医学发展有限公司、江西东弘惠肽生物科技有限公司、绍兴埃格颂生物科技有限公司、绍兴优铭生物科技有限公司、上海循源生物科技有限公司、上海东弘盛康生物科技有限公司、上海宇玫博生物科技有限公司、上海惠肽生物科技有限公司、上海峰林生物科技有限公司。

本标准主要起草人：余跃飞、韩忠朝、王京苏、王晓冰、韩之雷、高博、严月华、王端贺、艾辉、李国荣、陈云生、唐卫、刘丽娟。

间充质干细胞外泌体质量控制标准

1 范围

本标准规定了间充质干细胞来源外泌体的质量控制方法。

本标准适用于间充质干细胞外泌体制备、储存、运输和应用的质量管理要求。

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/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

T/CSCB 0001 干细胞通用要求

T/CSCB 0003 人间充质干细胞

T/CSCB 0015-2022 人干细胞来源细胞外囊泡制备通用要求

3 术语和定义

干细胞

干细胞是来自于胚胎、胎儿或成人体内具有在一定条件下无限制自我更新与增殖分化能力的一类细胞，能够产生表现型与基因型和自己完全相同的子细胞，也能产生组成机体组织、器官的已特化的细胞，同时还能分化为祖细胞。

间充质干细胞

间充质干细胞是一种多能干细胞，它具有干细胞的所有共性，即自我更新和多向分化能力。

外泌体

外泌体（exosome）是细胞分泌的膜外双层脂质小囊泡，直径 30 ~ 200nm，包含了蛋白质、脂质、多糖及 RNA 等物质，可以转运核酸、脂质和蛋白质，参与细胞间的信息交流。

4 间充质干细胞外泌体的采集

4.1 间充质干细胞来源要求

4.1.1 对间充质干细胞组织样本的供者来源需进行规范的供者筛查，且在样本采集期间无人源特定病毒（包括 HIV、HBV、HCV、EBV、CMV、HTLV）的感染，无梅毒螺旋体感染。

4.1.2 对于人类胚胎干细胞系或诱导多能干细胞（iPSC）来源的间充质干细胞，须能追溯原始供体，并符合前述供者筛查要求。不得使用患有严重的传染性疾病和家族史中有明确遗传性疾病的供者作为异体干细胞来源。

4.1.3 间充质干细胞供者相关信息需可追溯。间充质干细胞可从脐带、脂肪、羊膜获取，并应用于制备各种治疗用的外泌体。

4.2 间充质干细胞上清

间充质干细胞培养过程中，细胞培养基中去除细胞、细胞碎片及其他细胞成分后所余留的液体。

4.3 间充质干细胞伦理要求

间充质干细胞在使用及临床中应符合《涉及人的临床研究伦理审查委员会建设指南》（2019 版，附则六：干细胞临床研究伦理审查）规定。

5 技术要求

5.1 原材料

5.1.1 应符合 T/CSCB 0001、T/CSCB 0003 的要求。

5.1.2 间充质干细胞

间充质干细胞质量控制要符合 T/CSCB 0003 的规定。

5.1.3 干细胞培养上清

为了获得高质量的外泌体，收获外泌体最佳时间为 P5 代间充质干细胞，要求融合率达 95% 以上的细胞上清。

5.1.4

外泌体的制备与纯化要符合 T/CSCB 0015-2022 的规定。

5.2 外泌体的质量标准

5.2.1 粒径

外泌体粒径应小于 200 纳米，且在 60-120 纳米范围内形成粒径峰值(图 1)。

5.2.2 形态

透射电显微镜观察，外泌体形态为双层膜结构的茶托状或杯状结构，具体见图 2。

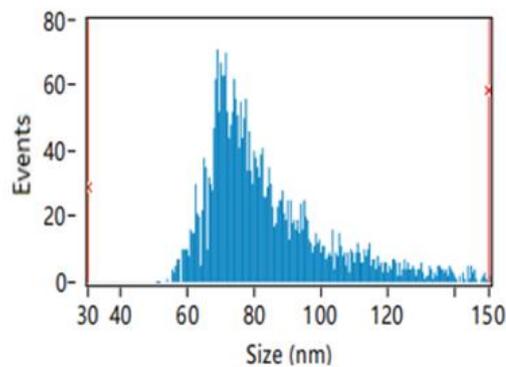


图 1

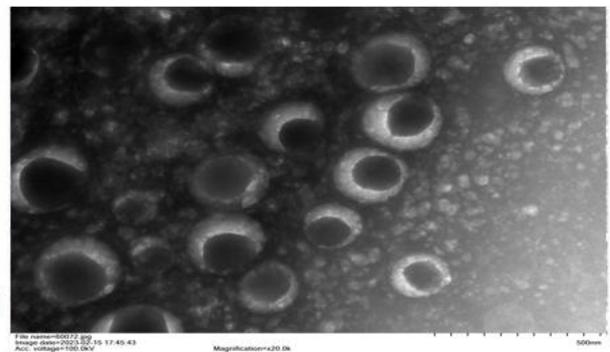


图 2

5.2.3 浓度

用于皮肤及骨关节抗衰用间充质干细胞外泌体浓度应不低于 3×10^{10} /ml。

5.2.4 标志蛋白

外泌体膜上富含的参与外泌体运输的四跨膜蛋白家族 (CD63、CD81 和 CD9) 是最常用的外泌体标志物，鉴定标准是其中任意两个表达阳性。

5.2.5 无菌检查

细菌等微生物检测应为阴性。

5.2.6 支原体检测

支原体检测结果应为阴性。

5.2.7 细胞内外致病因子检测

HIV 抗体、HBsAg、HCV 抗体、TP 抗体、CMV-IgM、HTLV 抗体、HPV 抗体、HHV 抗体、EBV 抗体检测应为阴性，HCV、HBV、HIV 病毒核酸检测应为阴性。

5.2.8 内毒素检测

各样本中内毒素检测值应小于等于 0.5 EU/mL。

5.2.9 异常免疫学反应检测

淋巴细胞亚群应无异常增殖。

6 鉴定方法

6.1 粒径及浓度

外泌体粒径及浓度分析方法采用纳米流式检测法(Flow NanoAnalyzer)和纳米颗粒跟踪分析 (NTA)。

A 纳米流式检测仪(Flow NanoAnalyzer): 是基于鞘流单分子荧光检测技术开发的一种先进的单颗粒、多参数、高通量的纳米颗粒定量表征。纳米流式检测仪覆盖了传统流式细胞仪 200 nm 以下粒径检测的盲区，囊括了纳米颗粒以及亚细胞结构，可实现单个纳米颗粒(7-1000 nm)的粒径及其分布检测。

B 纳米颗粒跟踪分析 (NTA): 其原理是对每个颗粒的布朗运动进行追踪和分析，计算出纳米颗粒的流体力学直径和浓度。NTA 技术已被外泌体研究领域认可为外泌体表征手段之一。

6.2 形态

透射电子显微镜观察法（TEM）可从形态和大小上对外泌体进行鉴定。通过负染的方法，在高倍镜下直接观察单个外泌体的形态结构和大小。检测时标本一定要注意避免反复冻融。详见附录 A

6.3 表面标志蛋白

外泌体表面标志蛋白 CD63、CD9、CD81 可通过纳米流式检测，流式细胞仪检测技术比较快速，适合高通量筛选。先用标志蛋白 CD63、CD9、CD81 相应的抗体进行标记，再用流式细胞仪检测其阳性表达，从而验证外泌体。详见附录 B

6.4 无菌检测

细菌等微生物检测按照《中华人民共和国药典》中“1101 无菌检查法”和“3301 支原体检查法”项检测。

6.5 细胞内外致病因子检测

ELISA 检测法检测抗体水平；核酸检测法检测病毒核酸。

6.6 内毒素检测

按照《中华人民共和国药典》中“1143 细菌内毒素检查法”检测。

6.7 异常免疫学反应检测

抑制淋巴细胞增殖检测方法（CFSE 标记法）进行异常免疫学反应检测，用流式细胞术检测淋巴细胞增殖率。

7 保存

外泌体储存稳定性是生物库临床样本稳定性和生产一致性的关键问题，也是外泌体用于治疗用途的先决条件。迄今为止，许多研究都探讨了储存条件对外泌体的影响，表明储存条件相关因素可能会影响外泌体的各种特性，包括生物物理稳定性、颗粒回收率和直径以及外泌体的功能。

迄今为止，最好的综合储存方式是-80℃冷冻贮藏，将外泌体长期存放几个月的适当条件是冷冻在-80° C 或更低的温度下，避免反复冻融。为防止外泌体冻伤，可选择地添加防冻剂海藻糖以延长保质期。另外，从几个小时到两天的短期存储通常是放置于+ 4° C 的温度。

8 运输

冻存的外泌体应在-20~-80° C 条件下冷链运输，而非冻存的外泌体应在 2 ° C~8 ° C 条件下运输。

9 标签

标签内容包括： 外泌体来源细胞名称及代次；外泌体的浓度；生产日期，生产批号；储存条件。

附录 A
(规范性附录)

外泌体样品透射电镜观察

主要试剂与仪器

戊二醛溶液。

醋酸双氧铀溶液

透射电子显微镜。

载样铜网

检测步骤

- 1 将外泌体取出 10 μ L。
- 2 吸取样品 10 μ L 滴加于铜网上沉淀 1 min，滤纸吸去浮液。
- 3 滴加戊二醛溶液于样本上，固定 5 min
- 4 醋酸双氧铀 10 μ L 滴加于铜网上沉淀 1 min，滤纸吸去浮液。
- 5 常温干燥数分钟。
- 6 100 kv 进行电镜检测成像。
- 7 获得透射电镜成像结果。

附录 B
(规范性附录)

外泌体样品荧光标记及纳米流式检测

主要试剂与仪器

FITC Mouse Anti-Human CD63

FITC Mouse Anti-Human CD81

FITC Mouse Anti-Human CD9

PBS

小型冷冻离心机 Beckman

粒径分析仪 NanoFCM

检测步骤

- 1 将 20 μ L 外泌体稀释至 60 μ L, 取 30 μ L 稀释外泌体分别加入 20 μ L 荧光标记的抗体 (CD63、CD9、CD81), 混匀, 避光 37 $^{\circ}$ C 孵育 30min。
- 2 加入 1 mL 预冷的 PBS, 选择超速转子, 4 $^{\circ}$ C, 110,000 \times g, 超速离心 70 min。
- 3 小心去除上清, 加入 1 mL 预冷的 PBS, 选择超速转子, 再次 4 $^{\circ}$ C, 110,000 \times g, 超速离心 70 min。
- 4 小心去除上清, 用 50 μ L 预冷的 1 \times PBS 重悬。
- 5 先用标准品进行仪器性能测试合格后方可进行外泌体样品上样, 注意需进行梯度稀释避免样本堵塞进样针。
- 6 待样本完成检测即可获得 NanoFCM 仪器检测蛋白指标结果。

主要参考文献

- 1) 中华人民共和国药典
- 2) Identification of storage conditions stabilizing extracellular vesicles preparations. *J Extracell Vesicles*. 2022 Jun;11(6):e12238.
- 3) Gelibter S, Marostica G, Mandelli A, Siciliani S, Podini P, Finardi A, Furlan R. The impact of storage on extracellular vesicles: A systematic study. *J Extracell Vesicles*. 2022 Feb;11(2):e12162. doi: 10.1002/jev2.12162. PMID: 35102719;PMCID: PMC8804350.
- 4) Rohde E., Pachler K., Gimona M. Manufacturing and characterization of extracellular vesicles from umbilical cord-derived mesenchymal stromal cells for clinical testing. *Cytotherapy*. 2019, 21: 581-592.
- 5) Yong T, Wei Z, Gan L, Yang X. Extracellular Vesicle-Based Drug Delivery Systems for Enhanced Anti-Tumor Therapies through Modulating Cancer-Immunity Cycle. *Adv Mater*. 2022:e2201054.
- 6) Preservation of small extracellular vesicles for functional analysis and therapeutic applications: a comparative evaluation of storage conditions. *Drug Deliv*. 2021 Dec;28(1):162-170. .
- 7) Post-production modifications of murine Mesenchymal Stem Cell 1 (mMSC) derived Extracellular Vesicles (EVs) and impact on their cellular interaction. *Biomaterials*. 2020 Feb;231:119675.