基于 Nb2-11 细胞增殖的重组人生长激素生物学活性测定方法考察

张孝明[1#]，黄　盈[2#]，梁誉龄[1]，李　晶[1*]，梁成罡[1*]
（1. 中国食品药品检定研究院，国家卫生健康委员会生物技术产品检定方法及其标准化重点实验室，北京 102629；
2. 中国药科大学，江苏南京 211198）

摘要：该研究建立了基于细胞的重组人生长激素（rhGH）生物学活性检测方法，以替代动物体内试验法。首先，用不同浓度的 rhGH 刺激大鼠淋巴瘤细胞株（Nb2-11 细胞）增殖，采用发光活细胞检测系统测定细胞增殖情况，并利用四参数拟合分析计算样品相对效价。随后，对试验条件进行了优化，并对方法的专属性、相对准确度、精密度和线性进行验证，结果显示方法专属性较好，相对准确度的相对偏倚范围为 －6.2%～ 0.9%，线性回归方程相关系数为 0.985 0，中间精密度几何变异系数范围为 5.2%～ 7.7%，线性范围为 50%～ 200%。最后用该方法和动物体内试验法分别检测 15 批 rhGH 原液的生物学活性，结果显示该方法检测结果与动物体内试验法检测结果的一致性良好。该研究建立并验证了测定 rhGH 生物学活性的 Nb2-11 细胞增殖法，可作为 rhGH 生物学活性的常规检测方法用于 rhGH 的生物学活性评价和质量控制。

关键词：重组人生长激素；生物学活性；细胞增殖；动物体内试验法；方法学验证
中图分类号：R392　　**文献标志码**：A　　**文章编号**：1001-8255(2022)12-1726-09
DOI：10.16522/j.cnki.cjph.2022.12.008

Investigation on Biological Activity Assay of Human Recombinant Growth Hormone Based on Nb2-11 Cell Proliferation

ZHANG Xiaoming[1#], HUANG Ying[2#], LIANG Yuling[1], LI Jing[1*], LIANG Chenggang[1*]
(*1. NHC Key Lab. of Research on Quality and Standardization of Biotech Products, National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 102629; 2. China Pharmaceutical University, Nanjing 211198*)

ABSTRACT: A cell-based method for recombinant human growth hormone (rhGH) bioactivity evaluation was established to replace *in vivo* animal experiments. Different concentrations of rhGH were used to stimulate the proliferation of the Nb-2 rat lymphoma cell line (Nb2-11 cell) and luminescent cell viability assay was used to measure the cell proliferation to evaluate the bioactivity of rhGH. The relative potency of rhGH was calculated by the 4-parameter logistic (4PL) regression model. Then, the method parameters were optimized. The specificity, relative accuracy, precision, and linearity of this method were verified. The results showed that this method had good specificity, and the relative bias for relative accuracy range was －6.2% － 0.9%, the correlation coefficient of the linear regression equation was 0.985 0, the geometric coefficient of variation for intermediate precision range was 5.2% － 7.7%, the linear range was 50% － 200%. The biological activities of 15 batches of rhGH products were investigated by the Nb2-11 cell proliferation method and the *in vivo* animal experiment, respectively. The results showed that these two methods had a good consistency. In this study, the Nb2-11 cell proliferation method for determination of rhGH bioactivity was established and verified, and it could be used as a routine method for rhGH bioactivity evaluation and quality control.

Key Words: recombinant human growth hormone; biological activity; cell proliferation; *in vivo* animal experiment; method validation

人生长激素是一种由脑垂体前叶嗜酸性细胞分泌的含有 191 个氨基酸的肽类激素，是生长发育过程中最重要的内分泌激素之一，具有刺激新陈代谢，促进组织、器官、骨骼以及整个人体发育成熟等功能[1—3]。重组人生长激素（recombinant human growth hormone，rhGH）是通过基因重组技术在体外表达的重组蛋白，与人体生长激素具有同等作用，是目前国内外治疗儿童矮小症的重要药物。国家药品监督管理局已批准了 6 个厂家的 32 个国产 rhGH 产品（包括 31 个短效生长激素和 1 个长效生长激素），以及 2 个进口制造商的 11 个 rhGH 产品；已批准的适应证包括儿童及成人生长激素缺乏症、特纳综合征、儿童慢性肾功能不全导致的生长障碍、手术及创伤后高代谢状态（负氮平衡）、烧伤和脓毒败血症。

生物学活性检测是评价 rhGH 质量的有效和必要手段。国际公认的 rhGH 生物学活性检测标准方法为动物体内试验法[4]，存在周期长、个体差异性大，以及对操作熟练度要求高等不足。建立基于细胞的体外生物活性分析方法来补充甚至替代动物试验方法可有效弥补这些不足，是 rhGH 生物学活性检测的热门研究方向。rhGH 是唯一具有催乳活性的动物源生长激素，与催乳素（prolactin，PRL）一样，rhGH 能与催乳素受体结合并促进大鼠淋巴瘤细胞（Nb2-11 细胞）增殖[5]，早在 1980 年，Nb2-11 细胞增殖法就被开发用于检测 rhGH 的生物学活性[6]。《美国药典》（2021 年版）收载了 Nb2-11 细胞增殖法作为考察 rhGH 原液和注射用 rhGH 活性的方法之一，并积极探索该法替代动物体内试验的可行性。《中华人民共和国药典》2020 年版（ChP 2020）已收录 rhGH 原液和注射用 rhGH，活性测定方法仍仅收录动物体内试验法用于 rhGH 原液活性测定，注射用 rhGH 尚未有活性检测要求，亟需建立体外活性替代方法，如 Nb2-11 细胞增殖法，并依据国际新技术指南进行严格的方法学验证，具备可评估国外产品质量的技术能力，实现国际互认。

本研究通过将 rhGH 与 Nb2-11 细胞共孵育，使细胞产生不同程度的增殖，采用 CellTiter-Glo® 发光活细胞检测系统定量细胞增殖情况来反映 rhGH 的生物学活性。然后依据 ChP 2020 四部通则《9401 生物制品生物活性 / 效价测定方法验证指导原则》对此方法进行了全面验证，并进行了体内和体外方法的相关性研究。

1 仪器与试药

CellXpert C170i 二氧化碳细胞培养箱（德国 Eppendorf 公司）；TS2-FL 型倒置显微镜（日本 Nikon 公司）；TC-20 型全自动细胞计数仪（美国 Bio-Rad 公司）；MTS 2/4 微孔板振荡器（德国 IKA 公司）；EnSpire 型多功能酶标仪（美国 PerkinElmer 公司，内置软件版本 4.13.3005.1482）。

RPMI-1640 培养基（批号 2276943）、胎牛血清（FBS，批号 2236255CP）、马血清（HS，批号 1763585）、β- 巯基乙醇（批号 2279505）、L- 谷氨酰胺（批号 2192423）、磷酸盐缓冲液（PBS，批号 2277093）均购自美国 Gibco 公司；CellTiter-Glo® 发光法细胞活力检测试剂盒（CellTiter-Glo® Luminescent Kit，美国 Promega 公司，批号 0000504104）；96 孔细胞培养白板（美国 PerkinElmer 公司，批号 8013-21281）；透明 96- 孔板（美国 Thermo Scientific 公司，批号 60431090）；牛血清白蛋白冻干粉（北京经科化学试剂经营公司进口分装）；氯化钠注射液（石家庄四药有限公司，批号 1910113203）。

rhGH 国家标准品（rhGH 标准品，批号 140635-201805）、重组人促卵泡激素（FSH，批号 410018-201701）、重组人胰岛素（insulin，批号 140633-201406）、人绒毛膜促性腺激素（hCG，批号 1817-0107）、重组人胰岛素样生长因子 -1（IGF-1，批号 360011-201601）均由中国食品药品检定研究院提供；rhGH 原液［本实验室留存，上海联合赛尔生物工程有限公司（批号 GHB3202009049、GHB3202009050、

#对文章贡献等同。

收稿日期：2022-08-19

作者简介：张孝明（1986—），女，博士，从事生物技术药物质量控制研究。

黄　盈（1998—），女，学士，从事生物技术药物质量控制研究。

通信作者：梁成罡（1970—），男，研究员，主要从事激素及生物技术药物质量控制研究。

E-mail：liangchenggang@nifdc.org.cn

李　晶（1973—），女，主任药师，主要从事生物技术药物质量控制研究。

E-mail：li_jing@nifdc.org.cn

GHB3202009051、GHB3202002003、GHB3202110061）、中山未名海济生物医药有限公司（批号CH20200308、CH20200402、Y-CH20200403、Y-CH20200402、Y-CH202110008）、安徽安科生物工程（集团）股份有限公司（批号P12-20210620、P12-20210621、P12-20210622、P32-20210623、P32-20210627）各提供5批］；人胎盘催乳激素（hPL，美国GlpBio公司，批号2083401）；重组促甲状腺激素国际标准品（TSH，英国国家生物制品检定所，批号03/192）；人表皮生长因子（hEGF，批号2366879）、白细胞介素-2（IL-2，批号2258434）、白细胞介素-4（IL-4，批号2256657）、白细胞介素-6（IL-6，批号2324056）均购自美国Gibco公司。

Nb2-11细胞株购自欧洲认证细胞培养物收藏中心（ECACC）。

SPF级SD大鼠，雄性，出生日龄26～28 d，体质量60～80 g，数量128只，由中国食品药品检定研究院实验动物中心提供，符合中国食品药品检定研究院《实验动物福利伦理审查程序》相关要求；动物合格证编号11125122110028156 6，动物生产许可证编号SCXK（京）2021-0003，动物使用许可证号SYXK（京）2021-0013。

2　方法与结果

2.1　细胞培养

生长用培养液：RPMI-1640培养基+10％FBS+10％ HS+L-谷氨酰胺（终浓度2 mmol/L）+β-巯基乙醇（终浓度50 μmol/L）。

实验用培养液（基础培养液）：RPMI-1640培养基+1％ HS+L-谷氨酰胺（终浓度2 mmol/L）+β-巯基乙醇（终浓度50 μmol/L）。

Nb2-11细胞为悬浮生长细胞，以每毫升2×10^4～1×10^5个的密度接种，于37 ℃、5％ CO_2的培养箱内培养，待细胞达到对数生长期可用于检测。

2.2　rhGH体外生物学活性检测方法

rhGH标准品溶液：取rhGH标准品，用PBS 1.0 ml复溶得到质量浓度为1 mg/ml（45.45 μmol/L）的标准品溶液，再用基础培养液将上述溶液稀释至300 ng/ml（13.64 nmol/L），然后进行5倍梯度稀释，稀释9个梯度。

rhGH原液：照rhGH蛋白含量用PBS将其稀释至1 mg/ml（45.45 μmol/L），随后照上述rhGH标准品溶液的稀释方法进行稀释。

细胞悬液：将处于对数生长期的Nb2-11细胞吹打混匀，离心（350×*g*）5 min收集细胞，用PBS洗涤2次，用台盼蓝染色法计数活细胞数量后，用基础培养液稀释为每毫升含1.0×10^5个细胞的悬液，以每孔50 μl加到96孔板中，置培养箱中培养。将稀释好的rhGH标准品溶液加至上述96孔板中，每孔加50 μl，每个样品设2～3个复孔，于37 ℃、5％ CO_2条件下培养（30±2）h。另以基础培养液50 μl和细胞悬液50 μl作为阴性对照。

细胞增殖检测方法：向细胞悬液中加入CellTiter-Glo® Luminescent发光底物溶液，每孔100 μl。将96孔板置微孔板振荡器上，室温避光振荡混匀15 min，随后静置15 min，用酶标仪测量荧光，激发波长560 nm。

数据结果分析：照ChP 2020通则1431，利用SoftMax Pro 7.1版软件拟合四参数自由模型和约束模型曲线并进行*F*检验，利用Graphpad Prism 6.01版软件绘图。rhGH浓度取以10为底的对数作为横坐标，相对光单位（relative light unit，RLU）几何平均值作为纵坐标，用四参数约束模型方程的参数*C*值（半数有效浓度，EC_{50}）计算相对效价（relative potency），计算公式如下。

样品相对效价 = 参比品 EC_{50}/ 样品 $EC_{50}\times100\%$

系统适用性要求为拟合的四参数曲线$R^2\geqslant0.980\ 0$，每一剂量组反应值的RSD≤10％，回归项应极显著（$P<0.01$），偏离平行应不显著（$P\geqslant0.05$）。

2.3　rhGH体内生物学活性检测方法

用0.1％牛血清白蛋白溶液配制高剂量rhGH标准品溶液（0.2 u/ml）和低剂量rhGH标准品溶液（0.05 u/ml），按估计效价照标准品溶液的制备方法配制rhGH原液稀释液作为供试品溶液。取去垂体手术后2～3周、术前体质量变化<10％的大鼠，按体质量随机分成4组，每组至少8只，每只编号并记录体质量。分别自颈部皮下注射标准品溶液或供试品溶液0.5 ml，每日1次，连续6 d。于最后1

次给药 24 h 后处死大鼠，称重。将每只动物给药后体质量增加的克数作为反应值，按照 ChP 2020 收载的反应平行线测定法计算效价及试验误差。

2.4 rhGH 生物学活性检测方法的建立及优化

首先评价 rhGH 对 Nb2-11 细胞增殖的影响。采用“**2.2**”项下方法，rhGH 作用起始质量浓度分别为 150、120 和 100 ng/ml 时，均可得到典型 S 型增殖曲线（图 1A），曲线 R^2 均大于 0.980 0，测得 EC_{50} 值的变异系数小于 5%（3.4%）。由于质量浓度为 150 ng/ml 时所得拟合曲线的 R^2 值最大，为 0.997 7，因此确定 rhGH 的优化起始作用质量浓度为 150 ng/ml（对应的 rhGH 标准品稀释液起始质量浓度为 300 ng/ml）。

以 300 ng/ml rhGH 标准品作为起始质量浓度，分别进行 4 倍梯度稀释（1 ∶ 3）、5 倍梯度稀释（1 ∶ 4）和 6 倍梯度稀释（1 ∶ 5），各稀释 9 个梯度，按“**2.2**”项下方法测定。检测结果（图 1B）表明，5 倍梯度稀释条件下所得四参数曲线的数据点分布较 6 倍梯度稀释更均匀，且对数期数据点较 4 倍梯度稀释时多，能更真实地反映数据拟合情况，计算结果更为可靠，因此确定方法的优化稀释倍数为 5 倍。

接下来对细胞密度进行优化，以 300 ng/ml 作为 rhGH 标准品溶液的起始质量浓度，进行 5 倍梯度稀释，将细胞密度分别调整为每毫升含 0.8×10^5、1.0×10^5、1.4×10^5、1.6×10^5 个细胞，按“**2.2**”项下方法测定。结果如图 1C 所示，4 种细胞密度均能得到 S 型增殖曲线，每孔接种 8 000、7 000、5 000、4 000 个细胞的四参数拟合曲线的信噪比分别为 6.706、6.526、6.240、6.338，EC_{50} 值分别为 0.149 7、0.153 8、0.151 8、0.178 2 ng/ml。考虑到细胞密度为每孔 4 000 个时，EC_{50} 值偏高，细胞密度在每孔 5 000 ～ 8 000 个时 EC_{50} 值相似（相对标准偏差为 1.351%），因此确定方法的优化细胞密度为每孔 5 000 ～ 8 000 个。

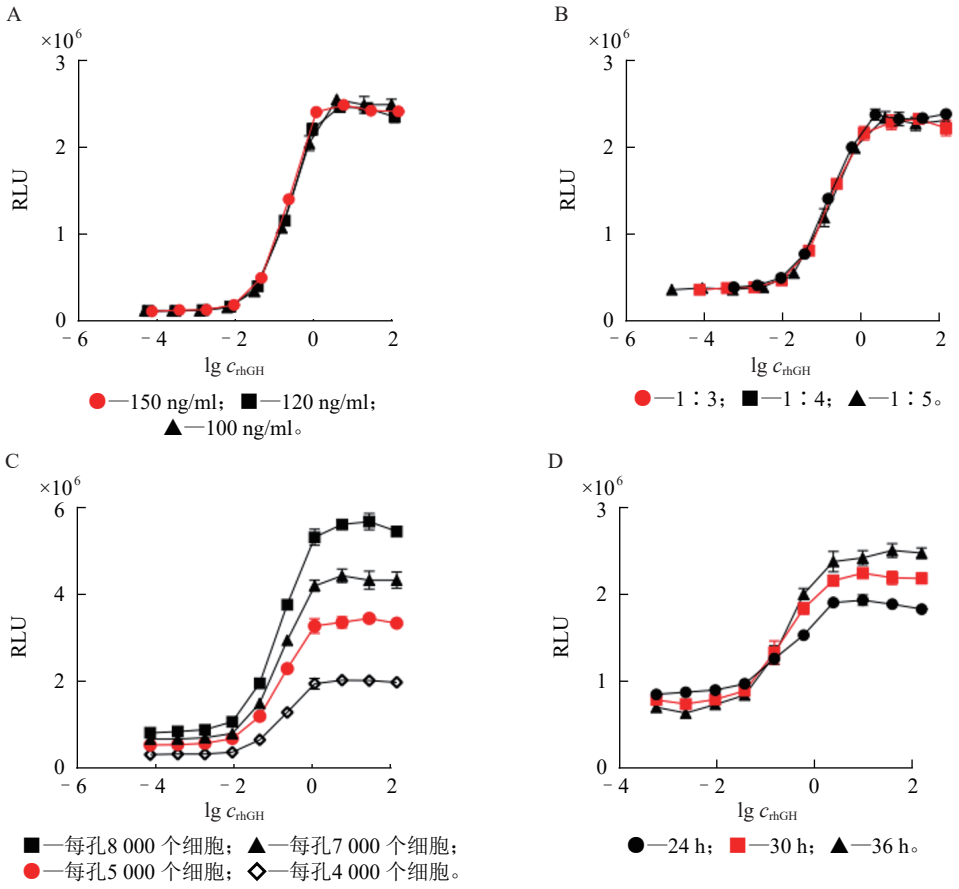
以 300 ng/ml 作为 rhGH 标准品溶液的起始质量浓度，进行 5 倍梯度稀释，细胞密度调整为每孔 5 000 ～ 8 000 个，检测了作用时间为 24、30 和 36 h 的影响，结果如图 1D 所示。3 种作用时间均能得到 S 型增殖曲线，且随着作用时间的延长，RLU 值更高。综合考虑 RLU 值和时间成本，确定方法的优化作用时间为 30 h。

2.5 rhGH 生物学活性检测方法的验证

2.5.1 专属性试验

已有研究报道除 rhGH 外，hPL 和 IL-2 也能刺激 Nb2-11 细胞增殖[6]，因此，本研究选取了 hPL、重组人胰岛素等激素及 IL-2、IGF-1 等细胞因子处理 Nb2-11 细胞，以验证方法的专属性。将 hPL、TSH、FSH、hCG、IGF-1、hEGF、IL-2、IL-4、IL-6 冻干粉用 PBS 溶解制成 45.453 μmol/L 的样品；重组人胰岛素冻干粉用 0.01 mol/L 盐酸溶解制成 45.453 μmol/L 的样品。将上述样品用基础培养液分别稀释至 13.636 nmol/L 作为起始浓度，分别进行 5 倍梯度稀释，加入 Nb2-11 细胞培养 30 h。以 rhGH 标准品作为参比品，按“**2.2**”项下方法测定。结果显示相同浓度的 TSH、FSH、重组人胰岛素、hCG 这 4 种激素均不能诱导 Nb2-11 细胞增殖（图 2A）。与文献报道一致，相同浓度的 hPL 也能诱导 Nb2-11 细胞增殖并获得良好的量效关系（图 2A），但 rhGH 的 EC_{50} 为 0.163 1 nmol/L，而 hPL 诱导细胞增殖的 EC_{50} 为 1.576 nmol/L。5 种细胞因子的检测结果显示（图 2B），相同浓度的 IGF-1、hEGF、IL-4 和 IL-6 均未诱导 Nb2-11 细胞增殖，虽然 IL-2 能诱导 Nb2-11 细胞增殖，但在该浓度范围内 IL-2 不足以诱导 Nb2-11 细胞增殖得到典型的 S 型量效曲线。以上结果表明，Nb2-11 细胞增殖法具有专属性，且 rhGH 对 Nb2-11 细胞增殖的刺激效果明显优于 hPL 和 IL-2。

根据文献报道，60 ℃加热 3 ～ 7 d 能导致 rhGH 降解，并使其生物活性显著降低[7]。将质量浓度为 1 mg/ml 的 rhGH 标准品溶液置 60 ℃水浴中分别加热 0、1、3、5、9、16 和 26 d 以制备热稳定性破坏样品，以 rhGH 标准品为对照，按“**2.2**”项下方法测定上述样品的相对效价（图 2C）。结果表明 rhGH 在 60 ℃放置后，其生物活性随着加热时间的延长而降低，加热后 rhGH 的生物活性分别为



A—rhGH 起始作用质量浓度的优化；B—稀释倍数的优化；C—细胞接种密度的优化；D—rhGH 作用时间的优化。

图 1　用于 rhGH 生物学活性检测的 Nb2-11 细胞增殖法的建立及优化（n=3）

Fig.1　Development and Optimization of Nb2-11 Cell Proliferation Assay for rhGH Bioactivity Determination (n=3)

95%、88%、79%、69%、62%、42%、3%。综上所述，Nb2-11 细胞增殖法可检测 rhGH 破坏样品的生物活性。

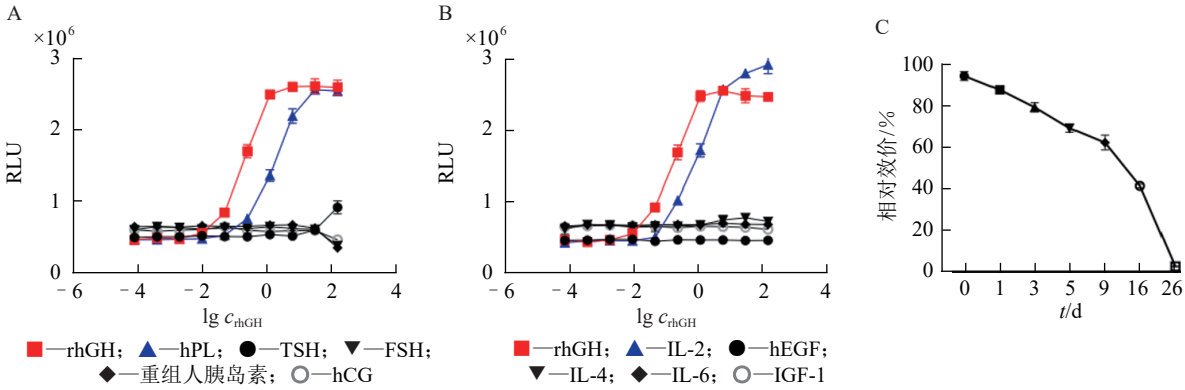
2.5.2　相对准确度、线性、中间精密度、重复性和范围

取 rhGH 标准品，按“**2.1**”项下方法复溶后，稀释为 300 ng/ml 的标准品溶液，以及质量浓度为 150、213、300、423 或 600 ng/ml 的待测溶液，5 个待测溶液的相对效价水平分别为 50%、71%、100%、141%和 200%。然后按“**2.2**”项下方法测定生物活性。每个效价水平由 2 名分析人员在 4 个不同日期使用 4 个细胞代次进行相对效价测定。测定结果如表 1 所示。

根据 ChP 2020 通则 9401 计算每个效价水平的 8 个相对效价测定值的相对偏倚及置信区间。结果如表 2 所示，5 个效价水平的相对效价测定值的平均相对偏倚范围在 －6.2%～0.9%。以效价理论值的自然对数（y）对其相应的效价测定值的自然对数（x）作直线回归，采用最小二乘法进行线性拟合，回归方程为 y=1.054x－0.019 71，R^2=0.985 0。

根据 ChP 2020 通则 9401 计算每个效价水平测得的 8 个相对效价的几何标准偏差（GSD）及几何变异系数（GCV）。以每个效价水平的 GCV 考察中间精密度，结果如表 3 所示，GCV 范围为 5.2%～7.7%，5 个效价水平的 GCV 均小于 20%。

100%相对效价水平的 GCV 最高（7.7%），因此选取 100%效价水平考察重复性。2 名实验人员测得的 100%效价水平的 GCV 分别为 7.0%和



A—rhGH、hPL、TSH、FSH、重组人胰岛素、hCG 的生物活性检测结果；

B—rhGH、IL-2、hEGF、IL-4、IL-6、IGF-1 的生物活性检测结果；C—rhGH 加热破坏样品生物活性检测结果。

图 2 用于 rhGH 生物学活性检测的 Nb2-11 细胞增殖法的专属性的验证（*n*=3）

Fig.2 Validation of Specificity of Nb2-11 Cell Proliferation Assay for rhGH Bioactivity Detection (*n*=3)

表 1 用 Nb2-11 细胞增殖法测定 rhGH 生物活性的结果

Tab.1 Determination Results of Bioactivity of rhGH by Nb2-11 Cell Proliferation Assay

相对效价/%	实测相对效价/%							
	人员 1				人员 2			
	时间 1	时间 2	时间 3	时间 4	时间 1	时间 2	时间 3	时间 4
50	45.6	51.9	56.9	45.6	57.6	47.7	42.0	40.6
	47.6	49.5	45.7	40.9	35.3	50.2	58.4	48.0
71	63.3	58.2	75.3	72.5	79.3	61.9	80.8	65.7
	57.6	74.0	63.0	56.1	61.7	69.4	60.7	72.4
100	105.1	89.2	86.0	112.8	96.5	102.7	106.1	104.9
	87.6	91.4	100.6	98.6	110.9	86.7	115.7	107.5
141	128.8	136.0	143.5	158.5	143.4	138.4	135.3	154.7
	134.5	128.5	143.8	120.8	141.0	131.8	157.0	150.1
200	193.0	185.0	205.3	208.8	216.0	190.8	204.9	217.2
	193.5	172.0	188.9	209.1	200.9	212.4	225.7	213.2

表 2 不同效价水平相对效价测定值的相对偏倚及置信区间

Tab.2 Relative Biases and Confidence Intervals of Relative Bioactivity of Different Potency Levels

效价水平/%	试验次数	对数效价/%			相对效价/%			相对偏倚/%		
		平均值	置信下限	置信上限	平均值	置信下限	置信上限	平均值	置信下限	置信上限
50	8	－0.748 7	－0.792 1	－0.705 4	47.7	45.7	49.7	－5.4	－9.4	－1.2
71	8	－0.407 0	－0.442 0	－0.371 9	67.0	64.6	69.4	－6.2	－9.5	－2.9
100	8	－0.003 0	－0.052 7	0.046 6	100.1	95.2	105.1	－0.3	－5.1	4.8
141	8	0.336 4	0.302 3	0.370 6	140.4	135.6	145.2	－0.7	－4.0	2.7
200	8	0.702 2	0.659 9	0.744 6	202.3	193.9	210.7	0.9	－3.3	5.3

6.9%，均小于 10%（表 4）。对 2 名实验人员测得的 5 个效价水平的相对效价结果分别进行单因素方差分析（图 3），各效价水平检测结果差异均不显著（P>0.05），表明方法重复性良好。

5 个效价水平的相对准确度、线性和中间精密度验证结果显示，在 50%～200%范围内方法检测结果符合通则 9401 要求，因此方法的相对效价适用范围为 50%～200%。

2.5.3 耐用性

按“**2.2**”项下方法，将细胞密度分别调整为每毫升 0.9×10^5、1.0×10^5、1.2×10^5 个，考察每孔 6 000、5 000 和 4 500 个细胞的细胞密度对相对效价测定

表 3　不同效价水平相对效价测定值的几何标准偏差及几何变异系数

Tab.3　GSD and GCV of Relative Bioactivity of Different Potency Levels

效价水平/%	试验次数	GSD/%	GCV/%
50	8	1.067 0	6.7
71	8	1.053 8	5.4
100	8	1.077 1	7.7
141	8	1.052 4	5.2
200	8	1.065 4	6.5

表 4　Nb2-11 细胞增殖法的重复性

Tab.4　Repeatability of the Nb2-11 Cell Proliferation Assay

实验人员	相对效价/%				平均值	GCV/%
	测试 1	测试 2	测试 3	测试 4		
人员 A	0.963 5	0.903 0	0.933 0	1.057 0	0.964 1	7.02
人员 B	1.037 0	0.947 0	1.109 0	1.062 0	1.038 8	6.89

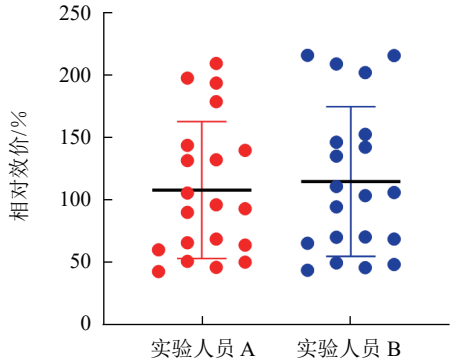


图 3　2 名分析人员所得试验结果的单因素方差分析

Fig.3　One-way Analysis of the Results Obtained by Two Analysts

的影响（图 4）。结果表明，3 种细胞密度均能得到 S 型增殖曲线，EC_{50} 值分别为 0.158 9、0.155 4、0.153 1 ng/ml，三者 EC_{50} 值无显著差异，表明细胞密度在每毫升 1.0×10^5 个附近浮动对生物活性测定无显著影响。

2.5.4　Nb2-11 细胞增殖法与体内动物法比较

为探索 Nb2-11 细胞增殖法替代经典体内动物法的可行性，以 rhGH 标准品作为参考品，分别用 2 种方法测定了 15 批 rhGH 原液的相对效价。每批 rhGH 原液重复测定 3 次并计算相对效价的几何平均值。对 2 种方法测定的 2 组数据进行夏皮罗 - 威尔克检验（Shapiro-Wilk test）分析，动物体内试验

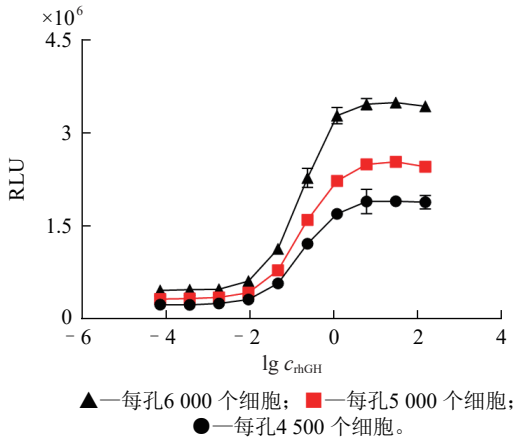


图 4　Nb2-11 细胞增殖法的耐用性（n=3）

Fig.4　Robustness of the Nb2-11 Cell Proliferation Assay (n=3)

法和体外细胞法测定结果的 P 值分别为 0.492 1 和 0.081 3，均大于 0.05，表明 2 组数据均呈正态分布。2 组数据进行双样本 t 检验，显著性水平 P=0.294 1，（P>0.05），表明 2 种方法检测结果无显著差异。对 2 种方法测定结果进行 Bland-Altman 分析（图 5），2 种方法平均比率为 0.982 1，所有数据点均在 95% 一致性区间内（0.86 ～ 1.10），表明 2 种方法具有较好的一致性。

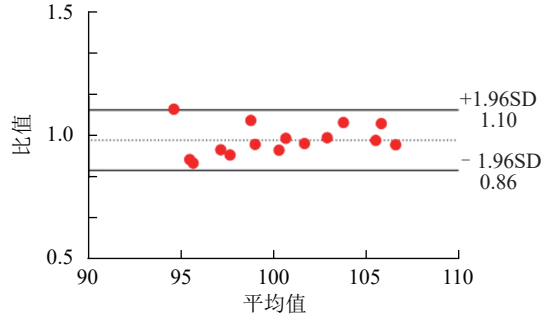


图 5　Nb2-11 细胞增殖法与体内生物活性测定法比较

Fig.5　Comparison of the Nb2-11 Cell Proliferation Assay and *in vivo* Bioassay

3　讨论

为弥补动物试验方法检测 rhGH 生物学活性的不足，基于细胞的体外生物活性分析方法——Nb2-11 细胞增殖法被建立。除 Nb2-11 细胞外，过表

达人生长激素受体（hGHR）的小鼠正常骨髓细胞系（FDC-P1-hGHR 细胞）[8]，以及过表达 hGHR 的 pro-B 淋巴瘤细胞系（Ba/F3-hGH 细胞）也曾被报道可用于 rhGH 的生物活性检测 [9]。Ba/F3-hGH 细胞对 hGH 的灵敏度比 FDC-P1-hGHR 细胞高，但 Ba/F3-hGH 细胞对 IGF-1 及牛生长激素（bGH）也有剂量依赖效应 [10]。这可能是因为 IGF-1 是生长激素发挥生理功能的重要效应蛋白 [11]，蛋白序列比对结果表明 bGH 序列与 hGH 序列的相似度达 76.7%。尽管 Nb2-11 细胞对 hPL 和 IL-2 刺激也有反应，但是 IGF-1 和 bGH 不能刺激 Nb2-11 细胞增殖。相比而言，Nb2-11 细胞增殖法的专属性更优于 Ba/F3-hGH 细胞增殖法。因此，本研究延用了 Nb2-11 细胞进行方法转化，下一步研究可通过基因敲除 Nb2-11 细胞的催乳素受体并过表达 hGH 受体来改进方法的专属性。

噻唑蓝法（MTT assay）或水溶性四唑盐法（WST-1 assay）都可被用于细胞检测，但均需要较大的细胞量（至少每孔 2×10^4 个细胞）[5—6,12]，且准确率低；放射性同位素标记法虽然灵敏度高，但半衰期短且有放射性危害；洗脱染色分析（eluted stain assay，ESTA）法检测结果与免疫分析测定结果差异大 [13]。本研究采用的 CellTiter-Glo® 发光活细胞检测系统是基于 ATP 的快速细胞活力检测方法，具有操作方便快捷、误差小和准确率高等优点，可显著提高检验效率。

本研究在根据 ChP 2020 通则 1431 进行实验数据可靠性分析时发现，方差分析 *F* 检验计算得到的模型失拟，结果被误判为显著，原因是复孔间读数差异小，导致方法的随机误差和均方差小。因此，本研究未对模型失拟项进行系统适用性要求。将来在该方法的实际应用中，还需依据日常检测结果的平均水平拟定可接受的系统适用性标准。

本研究构建了用于 rhGH 生物活性检测的 Nb2-11 细胞增殖法，耐用性强，在 50%～200%范围内线性良好。此法克服了体内法操作烦琐、变异大等不足，提高了检验效率且不需要消耗实验动物。分别采用 Nb2-11 细胞增殖法和动物体内试验法检测 15 批 rhGH 原液的相对效价。结果表明此方法准确度好、精密度高、稳定可靠，与体内法结果一致性强，可作为动物体内试验法的补充或替代方法用于 rhGH 原液研制生产和放行中的活性检测和质量控制。

综上所述，本研究表明 Nb2-11 细胞增殖法可显著提高 rhGH 质控和放行检验效率，对我国 rhGH 产品升级提质和审评审批具有重要意义。但由于 Nb2-11 细胞增殖法专属性有待提高，未来还须依据 ICH《Q6B 生物技术产品和生物制品的检验方法和可接受标准》开发更符合 rhGH 分子生物学功能的生物学活性检验方法。

致谢：中国食品药品检定研究院中青年发展研究基金（2022A1）给予支持。

参考文献：

[1] KOPCHICK J J, BERRYMAN D E, PURI V, *et al*. The effects of growth hormone on adipose tissue: old observations, new mechanisms [J]. *Nat Rev Endocrinol*, 2020, **16**(3): 135-146.

[2] TAKAHASHI Y. The role of growth hormone and insulin-like growth factor-Ⅰ in the liver [J]. *Int J Mol Sci*, 2017, **18**(7): 1447.

[3] 卢 晨, 倪晓燕, 秦建东, 等. 人生长激素的发展、应用与研究展望[J]. 生物学杂志, 2020, **37**(5): 103-107.

[4] 梁誉龄, 高学军, 李湛军, 等. 重组人生长激素体内生物活性测定中美药典方法对比研究[J]. 中国药事, 2020, **34**(6): 658-663.

[5] ISHIKAWA M, NIMURA A, HORIKAWA R, *et al*. A novel specific bioassay for serum human growth hormone [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2000, **85**(11): 4274-4279.

[6] TANAKA T, SHIU R P, GOUT P W, *et al*. A new sensitive and specific bioassay for lactogenic hormones: measurement of prolactin and growth hormone in human serum [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 1980, **51**(5): 1058-1063.

[7] YAO W R, YU L, FAN W H, *et al*. A cell-based strategy for bioactivity determination of long-acting Fc-fusion recombinant human growth hormone [J]. *Molecules*, 2019, **24**(7): 1389-1399.

[8] ROSWALL E C, MUKKU V R, CHEN A B, *et al*. Novel assays based on human growth hormone receptor as

alternatives to the rat weight gain bioassay for recombinant human growth hormone［J］. *Biologicals*, 1996, **24**(1): 25-39.

［9］ WADA M, UCHIDA H, IKEDA M, *et al*. The 20-kilodalton(kDa) human growth hormone(hGH) differs from the 22-kDa hGH in the complex formation with cell surface hGH receptor and hGH-binding protein circulating in human plasma［J］. *Mol Endocrinol*, 1998, **12**(1): 146-156.

［10］ IKEDA M, WADA M, FUJITA Y, *et al*. A novel bioassay based on human growth hormone(hGH) receptor mediated cell proliferation: measurement of 20K-hGH and its modified forms［J］. *Growth Horm IGF Res*, 2000, **10**(5): 248-255.

［11］ HUANG S Y, ZIEGLER C G K, AUSTIN J, *et al*. Lymph nodes are innervated by a unique population of sensory neurons with immunomodulatory potential［J］. *Cell*, 2021, **184**(2): 441-459.

［12］ NGUYEN M T, KOO B K, THI VU T T, *et al*. Prokaryotic soluble overexpression and purification of bioactive human growth hormone by fusion to thioredoxin, maltose binding protein, and protein disulfide isomerase［J］. *PLoS One*, 2014, **9**(3): e89038.

［13］ POPII V, BAUMANN G. Laboratory measurement of growth hormone［J］. *Clin Chim Acta*, 2004, **350**(1/2): 1-16.

广告索引

封二： Sievers 分析仪（威立雅）

封三： 天津市天大天发科技有限公司

封底： 苏州海顺包装材料有限公司

中彩插 1： 鲁南厚普制药有限公司

中彩插 2： 路博润管理（上海）有限公司