HL-60/NF-κB 报告基因法在重组人Ⅱ型肿瘤坏死因子受体 - 抗体融合蛋白热原检测中的应用

李甜甜[1,2]，史卓维[1,2]，董闪闪[1,2]，王　灿[1,2]*，邵　泓[1,2]*

（1. 上海市食品药品检验研究院，国家药品监督管理局治疗类单抗质量控制重点实验室，上海 201203；
2. 上海市创新生物制品质量检验检测中心，上海 201203）

摘要：探索了人急性早幼粒白血病细胞（HL-60）/ 核转录因子 -κB（NF-κB）报告基因法检测重组人Ⅱ型肿瘤坏死因子受体 - 抗体融合蛋白热原含量的可行性。参照 ChP 2020 年版第一增补本通则 <3309>“体外热原检查法（报告基因法）”，选取了 4 个厂家生产的产品，评估其对 HL-60/NF-κB 报告基因法的潜在干扰，并使用 HL-60/NF-κB 报告基因法检测该产品热原含量。结果显示，该产品对 HL-60/NF-κB 报告基因法检测热原无干扰作用，并且 4 个厂家 16 批产品的热原含量均低于质量标准限度。综上所述，该研究建立的方法适用于重组人Ⅱ型肿瘤坏死因子受体 - 抗体融合蛋白的热原检测，可为生物制品相关产品的热原检测提供参考。

关键词：重组人Ⅱ型肿瘤坏死因子受体 - 抗体融合蛋白；热原；脂多糖；融合蛋白；报告基因法；应用；安全性

中图分类号：R917；TQ450.2^{+}6　　**文献标志码**：A　　**文章编号**：1001-8255（2025）06-0798-05

引用：李甜甜，史卓维，董闪闪，等．HL-60/NF-κB 报告基因法在重组人Ⅱ型肿瘤坏死因子受体 - 抗体融合蛋白热原检测中的应用［J］．中国医药工业杂志，2025, 56（6）: 798-802．DOI：10.16522/j.cnki.cjph.2025.06.013

Application of the HL-60/NF-κB Reporter Gene Method to Pyrogen Detection in Recombinant Human Type Ⅱ Tumor Necrosis Factor Receptor-Antibody Fusion Protein

LI Tiantian[1,2], SHI Zhuowei[1,2], DONG Shanshan[1,2], WANG Can[1,2]*, SHAO Hong[1,2]*

（*1. NMPA Key Lab. for Quality Control of Therapeutic Monoclonal Antibodies, Shanghai Institute for Food and Drug Control, Shanghai 201203;*
2. Shanghai Quality Inspection and Testing Center for Innovative Biological Products, Shanghai 201203）

ABSTRACT: This study explored the feasibility of using the human promyelocytic leukemia (HL-60)/nuclear transcription factor kappa B (NF-κB) reporter gene method to detect the pyrogen content in recombinant human type Ⅱ tumor necrosis factor receptor-antibody fusion protein. According to the "*In vitro* Pyrogen Test (Reporter Gene Pyrogen Testing Method)" in the General Chapter <3309> of the 2020 Edition of ChP First Supplement, products from 4 manufacturers were selected to investigate potential interference with the HL-60/NF-κB reporter gene assay. Then, the HL-60/NF-κB reporter gene assay was applied to detect pyrogen content. The results showed that there was no interference from the tested products in pyrogen detection. Furthermore, the pyrogen contents in 16 batches of products from the four manufacturers were below the limit standard value. Therefore, this method is suitable for pyrogen detection in recombinant human type Ⅱ tumor necrosis factor receptor-antibody fusion protein, which provides a reference for pyrogen testing in biopharmaceutical products.

Key Words: recombinant human type Ⅱ tumor necrosis factor receptor-antibody fusion protein; pyrogen; lipopolysaccharide; fusion protein; reporter gene method; application; safety

重组人Ⅱ型肿瘤坏死因子受体 - 抗体融合蛋白（rhTNFR: Fc）将人 IgG 的 Fc 段与 TNF 受体融合产生二聚体形式，对 TNF 具有更高的亲和力[1]，可用于治疗类风湿关节炎[2]、强直性脊柱炎[3]、银屑病[4]、脓毒症[5]等免疫炎症性疾病。

热原污染的药物或医疗器械可能会导致患者发热甚至是感染性休克[6—8]。因此，热原是安全性检测的重要质控项目[9]。传统的热原检测方法包括家兔法、细菌内毒素检测法（鲎试剂法）[10—11]。家兔法检测热原受品种、试验条件等因素影响易出现假阳性结果，重复性差[12—13]。内毒素检测法在检测热原的种类上存在限制，只能检测革兰阴性菌的内毒素[14]。此外，单核细胞活化反应测定法（monocyte activation test，MAT）也是热原检测方法研究的热点，具有检测范围广[15]、可对热原进行定量分析等优点，但检测周期较长，操作烦琐。

荧光素酶报告基因法因操作简单、检测时间短、灵敏度高等优点而备受关注[6,10,16]。该方法检测热原的原理是模仿病原体感染宿主细胞后的早期生理反应，当病原体与宿主细胞表面的 Toll 样受体相互作用时，会刺激下游 NF-κB 信号的转导，进而诱导 IL-1β、IL-6 和 TNF-α 等炎症因子的释放，引起炎症反应[11]。

本课题组前期基于人急性早幼粒白血病细胞（HL-60 细胞）构建了适合热原检测的稳转细胞株。HL-60 细胞株可表达丰富的 Toll 样受体，转入由 NF-κB 启动子驱动的荧光素酶报告基因后，得到了 HL60-NF-κB 稳转细胞株。在受到热原［如来源于革兰阴性细菌的脂多糖（lipopolysaccharide，LPS），革兰氏阳性细菌的脂磷壁酸（lipoteichoic acid，LTA）和真菌的酵素等］刺激后，会激活该细胞株荧光素酶的表达，且荧光素酶的表达量与热原的浓度存在量效关系，由此建立了一种报告基因热原检测法[17]。

目前，热原报告基因法在单抗、疫苗等生物制品中的应用均备受关注[16—18]。为了探索该方法是否适合 rhTNFR: Fc 产品的热原检测，本研究根据国内 rhTNFR: Fc 产品的生产情况，选择了 4 个厂家不同批号的 rhTNFR: Fc 产品，测定这些产品对该方法是否会产生干扰，并采用该法检测 4 个厂家的产品，期望为该品种的热原检测提供参考和选择。

1 仪器与试药

Paradigm 型酶标仪（美国 Molecular Devices 公司）；BA400 型倒置三目显微镜（美国 Motic 公司）。

HL-60-pNL3.2 稳转细胞株（上海张江生物技术有限公司，批号 20230721）；IMDM 培养液（批号 2937461）、胎牛血清（批号 2532547CP）、DPBS（批号 2842151）均购于美国 Gibco 公司；潮霉素 B（美国 Invitrogen 公司，批号 H044-86US）；LPS 标准品（中国食品药品检定研究院，规格为每支 9 000 EU，批号 150800-201601）；荧光素酶显色液（美国 Promega 公司，批号 0000485038）。

选择 4 个厂家的 16 批供试品进行热原检测，供试品的具体信息如表 1 所示。

2 方法与结果

2.1 HL-60/NF-κB 报告基因热原检测试验方法

取 LPS 标准品溶液 1 支，复溶并稀释至 1 000 EU/mL，再进行 10 次 3 倍稀释，得 LPS 标准品系列溶液，浓度依次为 1 000.00、333.33、111.11、37.04、12.35、4.12、1.37、0.46、0.15、0.05、0.02 EU/mL。

取 HL-60-pNL3.2 细胞，加至完全培养液（含 20% FBS、0.1 mg/mL 的潮霉素 B 的 IMDM 培养液）中，于 37 ℃、5% 二氧化碳条件下培养。将处于对数生长期的 HL-60-pNL3.2 细胞悬液收集于 15 mL 离心管中，离心（200×*g*）5 min，弃去上清液，剩余物用检测培养基（含 2% FBS 的 IMDM 培养液）制备成密度约为每 1 mL 含 1×10^6 个细胞的悬液，以每孔 50 μL 接种到白色不透明平底 96 孔板中。分别将系列稀释的标准品溶液和供试品溶液（按本项下计算的最大稀释倍数以内的样本稀释液）加至 96 孔板中，每孔 50 μL，每个浓度设置 4 个复孔，以检测培养基 50 μL 作为空白对照（至少设 4 个复

收稿日期：2025-03-24

作者简介：李甜甜（1996—），女，硕士研究生，专业方向：药物分析。

通信作者：王　灿（1980—），女，博士，从事生化药品和生物制品的分析和质量研究与开发。

E-mail：wangcancan3860@126.com

邵　泓（1969—），女，主任药师，硕士生导师，从事生化药品和生物制品的分析和质量研究与开发。

E-mail：shaohong@smda.sh.cn

表 1　用于热原测定的供试品信息表

Tab.1　Information of Test Samples Used for Pyrogen Determination

编号	厂家	内毒素限制值/(EU·mg^{-1})	批号	规格	最大有效稀释倍数（maximum valid dilution，MVD）
1	厂家 1	<2	202301007	12.5 mg	250
2	厂家 1	<2	202301002	12.5 mg	250
3	厂家 1	<2	202212068	12.5 mg	250
4	厂家 1	<2	202211060	12.5 mg	250
5	厂家 1	<2	202212071	25 mg	500
6	厂家 1	<2	202211063	25 mg	500
7	厂家 1	<2	202212069-1	25 mg	500
8	厂家 1	<2	202212069-2	25 mg	500
9	厂家 1	<2	202211062	25 mg	500
10	厂家 1	<2	202301003	25 mg	500
11	厂家 2	<0.32	20220714	25 mg	80
12	厂家 2	<0.32	20220610	25 mg	80
13	厂家 2	<0.32	20220715	25 mg	80
14	厂家 3	<0.32	A20211140	25 mg	80
15	厂家 4	<0.4	GG0055	0.47 mL ∶ 25 mg	213
16	厂家 4	<0.4	GA5942	0.47 mL ∶ 25 mg	213

注：厂家 1 ～ 3 的样品均需加入无菌注射用水 1 mL 进行复溶。

孔），置 37 ℃、5％二氧化碳条件下孵育 3 h 后，取出 96 孔板，降至室温，每孔加入显色液 100 μL，室温振荡 15 min，用酶标仪读取相对荧光素酶信号（relative light units，RLU）值。

使用 Softmax7.03 软件，以 LPS 标准品溶液浓度/(EU·mL^{-1}) 为横坐标（对数坐标）、各浓度对应的 RLU 值为纵坐标，绘制四参数曲线。将供试品溶液测得的 RLU 值代入四参数曲线，计算各稀释度溶液中的 LPS 浓度。

2.2　最低检测限（LOD）、热原污染物限值（contaminant limit concentration，CLC）以及 MVD 的确定

2.2.1　LOD

按 ChP 2020 年版第一增补本通则 <3309>“体外热原检查法（报告基因法）”，将“**2.1**”项下测得的空白对照组平均 RLU 值与其 3 个标准差（SD）之和代入标准曲线，计算对应的内毒素值，即得本测定法的 LOD。所得 LOD 根据实验室历史数据进行确认。

2.2.2　CLC

CLC 的计算公式如式①所示。

$$CLC=K/M \quad ①$$

式中：K 为人每 1 kg 体质量每 1 h 最大可接受的内毒素剂量；M 为人用 1 kg 体质量的最大供试品剂量。

2.2.3　MVD

按 ChP 2020 年版第一增补本通则 <3309>“体外热原检查法（报告基因法）”，计算注射用供试品的 MVD。MVD 指在试验中供试品溶液被允许稀释的最大倍数，在不超过此稀释倍数的浓度下进行热原检测。具体计算公式如式②所示。

$$MVD=CLC\times c/LOD \quad ②$$

式中：c 为供试品溶液浓度，当 CLC 的单位以“EU/mL”表示时，则 c 为体积分数“mL/mL”，当 CLC 的单位以“EU/mg”或“EU/U”表示时，c 为质量浓度“mg/mL”或酶活力单位“U/mL”。根据实验室历史数据[17]，该方法检测 LPS 的最低检测限按 0.1 EU/mL 计算；根据式②，各供试品的 MVD 计算结果如表 1 所示。

2.3　热原干扰试验

按本实验室方法进行干扰试验[17]，选择标准曲线中点或靠近中点位置的 LPS 浓度，作为干扰考察溶液所含 LPS 标准品的浓度。将供试品溶液稀释至 n/2 倍（稀释倍数 n 在最大稀释倍数内），加入等体积的 2 倍浓度干扰考察溶液，按“**2.1**”项下方法进行试验。将干扰考察溶液的测得 LPS 值（A）、供试品溶液（n 倍稀释液）的测得 LPS 值（B），以及加入的 LPS 标准品的浓度（C）代入式③，计算回收率（R）。当回收率在 50％～ 200％，可认为供试品对该方法不存在干扰；当回收率不在指定的范围内，须排除干扰因素，并重复进行干扰试验。

$$R=(A-B)/C\times 100\% \quad ③$$

本研究按照从严的稀释倍数，将 4 个厂家供试品最大稀释倍数均设置为 40 倍进行干扰试验和样品测定。选取 4 家企业各 1 批供试品（分别为 202212069-1、20220715、A20211140 和 GG0055），进行 5、10、20 倍稀释，再分别与 30 EU/mL 的 LPS 标准品溶液等体积混合，制备成约含 LPS 15 EU/mL 的 10、20、40 倍的干扰试验考察溶液，按“**2.1**”项下方法进行试验，测定干扰试验考察溶液中 LPS 的

回收率和供试品中 LPS 的含量。10、20、40 倍回收率结果如表 2 所示，供试品对该热原测定方法无干扰，表明该方法可用于重组人Ⅱ型肿瘤坏死因子受体 - 抗体融合蛋白产品中的热原测定。

表 2 4 个厂家产品的热原回收率结果

Tab.2 Results of Pyrogen Recovery Rates from Four Manufacturers

厂家	回收率 /%		
	10 倍稀释液	20 倍稀释液	40 倍稀释液
厂家 1	76.7	71.5	76.3
厂家 2	81.4	59.3	81.5
厂家 3	69.0	61.0	68.9
厂家 4	55.7	50.6	54.4

确定样品对该热原报告基因法无干扰后，分别将 16 批供试品经 10、20 和 40 倍稀释，测定其热原含量，结果如表 3 所示。可见，4 个厂家 16 件样品的热原检测结果均低于其质量标准限度，符合规定。

表 3 4 个厂家热原检测结果

Tab.3 Pyrogen Testing Results from Four Manufacturers

编号	厂家	批号	40 倍稀释溶液测定值 /（EU·mg^{-1}）	测定值 ×40 倍稀释倍数 /（EU·mg^{-1}）	限度 /（EU·mg^{-1}）
1	厂家 1	202301007	1.60×10^{-3}	0.064	2
2	厂家 1	202301002	未检出	未检出	2
3	厂家 1	202212068	未检出	未检出	2
4	厂家 1	202211060	1.60×10^{-3}	0.064	2
5	厂家 1	202212071	1.24×10^{-3}	0.050	2
6	厂家 1	202211063	1.20×10^{-3}	0.048	2
7	厂家 1	202212069-1	1.20×10^{-3}	0.048	2
8	厂家 1	202212069-2	6.40×10^{-4}	0.026	2
9	厂家 1	202211062	1.20×10^{-3}	0.048	2
10	厂家 1	202301003	8.0×10^{-4}	0.032	2
11	厂家 2	20220714	1.36×10^{-3}	0.054	0.32
12	厂家 2	20220610	1.24×10^{-3}	0.050	0.32
13	厂家 2	20220715	未检出	未检出	0.32
14	厂家 3	A20211140	未检出	未检出	0.32
15	厂家 4	GG0055	6.98×10^{-4}	0.028	0.4
16	厂家 4	GA5942	3.21×10^{-4}	0.013	0.4

3 结论

热原报告基因法具有检测范围广、操作简单、检测快速等优点。据报道，报告基因法和鲎试剂法的热原检测结果没有差异，并且报告基因法、单核细胞活化反应测定法和家兔法的检测结果一致[10]；在检测热原的灵敏度方面，报告基因法与鲎试剂法相当[11]。因此，本研究采用报告基因法检测重组人Ⅱ型肿瘤坏死因子受体 - 抗体融合蛋白热原含量，并参照 ChP 2020 年版第一增补本通则 <3309>“体外热原检查法（报告基因法）”，通过回收率试验探讨在重组人Ⅱ型肿瘤坏死因子受体 - 抗体融合蛋白的最大有效稀释倍数范围内，产品对热原的测定有无干扰。研究表明，不同来源的 rhTNFR: Fc 产品在 10 倍、20 倍和 40 倍稀释时，对热原测定均无干扰作用，提示该报告基因法可用于 rhTNFR: Fc 热原检测，并且 4 家企业 16 批供试品的热原测定值均符合规定，并且有 4 件供试品的热原含量较低，未检出热原。在检测热原含量之前，可根据实验室历史数据和预试验确定本方法的检测限。本研究采用了新兴的热原检测报告基因法，为融合蛋白等生物制品的热原检测方法提供了补充，有望成为 rhTNFR: Fc 品种热原检测的替代方法之一。

参考文献：

[1] MOHLER K M, TORRANCE D, SMITH C, *et al*. Soluble tumor necrosis factor (TNF) receptors are effective therapeutic agents in lethal endotoxemia and function simultaneously as both TNF carriers and TNF antagonists [J]. *J Immunol*, 1993, **151**(3): 1548-1561.

[2] WOOLEY P H, DUTCHER J, WIDMER M, *et al*. Influence of a recombinant human soluble tumor necrosis factor receptor FC fusion protein on type Ⅱ collagen-induced arthritis in mice [J]. *J Immunol*, 1993, **151**(11): 6602-6607.

[3] 陈慕芝，照日格图，王海云，等. 重组人Ⅱ型肿瘤坏死因子受体 - 抗体融合蛋白与传统免疫抑制剂治疗强直性脊柱炎的临床对照研究 [J]. 新疆医科大学学报，2010, **33**(8): 913-915.

[4] LIU L F, CHEN J S, GU J, *et al*. Etanercept biosimilar (recombinant human tumor necrosis factor-α receptor Ⅱ : IgG Fc fusion protein) and methotrexate combination therapy in Chinese patients with moderate-to-severe plaque psoriasis: a multicentre, randomized, double-blind, placebo-controlled trial [J]. *Arch Dermatol Res*, 2020, **312**: 437-445.

[5] XUE W L, BAI X, ZHANG L. rhTNFR: Fc increases Nrf2 expression via miR-27a mediation to protect myocardium

against sepsis injury [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2015, **464**(3): 855-861.

[6] PALMA L, ROSSETTI F, DOMINICI S, *et al*. Determination of interference during *in vitro* pyrogen detection: development and characterization of a cell-based assay [J]. *Assay Drug Dev Technol*, 2017, **15**(2): 64-76.

[7] FENNRICH S, HENNIG U, TOLIASHVILI L, *et al*. More than 70 years of pyrogen detection: current state and future perspectives [J]. *Altern Lab Anim*, 2016, **44**(3): 239-253.

[8] STANG K, FENNRICH S, KRAJEWSKI S, *et al*. Highly sensitive pyrogen detection on medical devices by the monocyte activation test [J]. *J Mater Sci*, 2014, **25**: 1065-1075.

[9] EL AZAB W. Contamination control strategy: implementation road map [J]. *J Pharm Sci Tech*, 2021, **75**(5): 445-453.

[10] WANG C, WANG M, LIU L, *et al*. Development and validation of a novel luciferase reporter gene assay to detect pyrogen [J]. *Biologicals*, 2022, **77**: 16-23.

[11] LI K, XU H, JIANG W, *et al*. Development and characterization of stable reporter cells for fast and sensitive detection of pyrogen [J]. *Anal Biochem*, 2018, **557**: 69-76.

[12] HULL D, MCINTYRE J, VINTER J. Age-related changes in endotoxin sensitivity and the febrile response of newborn rabbits [J]. *Neonatology*, 1993, **63**(6): 370-379.

[13] VIPOND C, FINDLAY L, FEAVERS I, *et al*. Limitations of the rabbit pyrogen test for assessing meningococcal OMV based vaccines [J]. *Alter Animal Expe*, 2016, **33**(1): 47-53.

[14] VALENTINI S, SANTORO G, BAFFETTA F, *et al*. Monocyte-activation test to reliably measure the pyrogenic content of a vaccine: an *in vitro* pyrogen test to overcome *in vivo* limitations [J]. *Vaccine*, 2019, **37**(29): 3754-3760.

[15] SCHNEIER M, RAZDAN S, MILLER A M, *et al*. Current technologies to endotoxin detection and removal for biopharmaceutical purification [J]. *Biotechnol Bioeng*, 2020, **117**(8): 2588-2609.

[16] HE Q, YU C F, WU G, *et al*. A novel alternative for pyrogen detection based on a transgenic cell line [J]. *Signal Transduction Targeted Ther*, 2024, **9**(1): 33.

[17] 刘荔桢, 王　灿, 王鸣人, 等. HL-60/NF-κB 报告基因热原检测法在单抗药品热原检测中的应用 [J]. 中国医药工业杂志, 2022, **53**(2): 202-207.

[18] HE Q, YU C, WANG L, *et al*. A novel reporter gene assay for pyrogen detection [J]. *Jpn J Infect Dis*, 2020, **73**(2): 111-118.