

# HL60-IL6 法在注射用胶原酶和尿激酶热原检测中的应用研究

王灿, 王鸣人, 郑璐侠, 邵泓, 陈钢\* (上海市食品药品检验所, 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)

**摘要:** 目的 探讨 HL60-IL6 单核细胞活化反应法在注射用胶原酶和尿激酶热原检测中的应用。方法 参照中国药典 2015 年版通则 1193, 确定注射用胶原酶和尿激酶最小有效稀释浓度。通过细胞增殖抑制试验、热原干扰试验和白介素-6 (interleukin-6, IL-6) 干扰试验探讨对 HL60 细胞生长, 对热原和 IL-6 测定无影响的供试品浓度, 进而确定适用于注射用胶原酶和尿激酶体外热原测定的 HL60-IL6 方法。用该方法对 2 批注射用胶原酶、19 批注射用尿激酶供试品进行热原测定。结果 注射用胶原酶最小有效稀释浓度为  $0.04 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$ , 当浓度  $\leq 60 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$  时对 HL60 细胞生长无影响, 浓度  $\leq 6 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$  时对 IL-6 和热原测定无影响。注射用尿激酶最小有效稀释浓度为  $100 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$ , 当浓度  $\leq 1\,000 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$  时对 HL60 细胞生长无影响, 浓度  $\leq 500 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$  时对 IL-6 和热原测定无影响。因此, 适合 HL60-IL6 单核细胞活化反应法的注射用胶原酶和尿激酶浓度分别为  $6, 500 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。用该方法对供试品进行热原测定, 结果均未检出热原。结论 HL60-IL6 方法适用于注射用胶原酶和尿激酶热原测定。

**关键词:** HL60-IL6 单核细胞活化反应法; 胶原酶; 尿激酶

中图分类号: R927.12 文献标志码: B 文章编号: 1007-7693(2020)04-0455-05

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2020.04.013

引用本文: 王灿, 王鸣人, 郑璐侠, 等. HL60-IL6 法在注射用胶原酶和尿激酶热原检测中的应用研究[J]. 中国现代应用药学, 2020, 37(4): 455-459.

## Application Study on HL60-IL6 in the Pyrogen Detection of Collagenase and Urokinase for Injection

WANG Can, WANG Mingren, ZHENG Luxia, SHAO Hong, CHEN Gang\* (Shanghai Institute for Food and Drug Control, NMPA Key Laboratory for Quality Control of Therapeutic Monoclonal Antibodies, Shanghai 201203, China)

**ABSTRACT: OBJECTIVE** To explore the application of HL60-IL6 method in the pyrogen detection for collagenase and urokinase for injection. **METHODS** According to the general rule 1193 of Chinese Pharmacopoeia (the 2015 Edition), the minimum effective dilution concentration of collagenase and urokinase for injection was determined. The max concentrations of samples which had no effect on HL60 proliferation, pyrogen test and IL-6 test were determined by the methods of proliferation-inhibition test, pyrogen interference and IL-6 interference test. According to the results, the *in vitro* pyrogen test for collagenase and urokinase for injection was established. Then, the pyrogen of 2 batches of collagenase for injection and 19 batches of urokinase for injection were determined with the method. **RESULTS** For collagenase, the minimum effective dilution concentration was  $0.04 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$ , the sample which was  $\leq 60 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$  had no effect on HL60 proliferation, and  $\leq 6 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$  had no effect on pyrogen and IL-6 test. For urokinase, the minimum effective dilution concentration was  $100 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$ , the sample which was  $\leq 1\,000 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$  had no effect on HL60 proliferation, and  $\leq 500 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$  had no effect on pyrogen and IL-6 test. As a result, the suitable concentration was  $6 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$  for collagenase and  $500 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$  for urokinase respectively. Then, the suitable the *in vitro* pyrogen test for collagenase and urokinase for injection was established. There were no pyrogen in all samples. **CONCLUSION** The method is suitable for *in vitro* pyrogen test of collagenase and urokinase for injection.

**KEYWORDS:** HL60-IL6 monocyte activation test; collagenase; urokinase

注射用胶原酶是从溶组织梭状细胞芽孢杆菌中提取制备的物质, 其主要成分为胶原蛋白酶, 能水解结缔组织中胶原蛋白, 用于治疗经保守疗法无效的腰椎间盘突出症<sup>[1]</sup>, 使用时用生理盐水配制后于椎间孔内硬膜外或椎间盘内注射。该药为注射用药, 需对其热原进行控制, 但目前其质量

标准中无热原检测项<sup>[2]</sup>。

注射用尿激酶是从新鲜人尿中提取的一种能激活纤维蛋白溶酶原的酶, 主要用于血栓栓塞性疾病的溶栓治疗<sup>[3]</sup>。使用时常用生理盐水或 5% 葡萄糖溶液配制后静脉给药。目前中国药典 2015 年版仅采用细菌内毒素法进行检测<sup>[4]</sup>, 而内毒素仅能

基金项目: 上海市自然科学基金项目(17ZR1426000)

作者简介: 王灿, 女, 博士, 副主任药师 Tel: (021)50798177  
Tel: (021)50798175 E-mail: chengang@smda.gov.cn

E-mail: wangcancan3860@126.com \*通信作者: 陈钢, 男, 主任药师

检测革兰氏阴性杆菌来源的热原<sup>[5]</sup>。那么从人尿中提取的尿激酶是否含有其他种类的热原,是否会引引起临床不良反应,也是笔者一直关注的问题。

笔者所在实验室前期研究建立了 1 种全新的基于细胞系的体外热原检测方法, HL60-IL6 热原测定法<sup>[6-7]</sup>。本研究旨在探讨该方法是否可用于注射用胶原酶和尿激酶热原测定, 并确定方法的关键参数, 研究建立适用于注射用胶原酶和尿激酶的体外热原测定方法。

## 1 仪器与材料

### 1.1 仪器

Versamax 型酶标仪(BD); Series 8000WT 二氧化碳培养箱(Thermo); BA400 型倒置三目显微镜(Motic); TW12 型水浴锅(Julabo); 5702 型低温高速水平离心机(Eppendoff)。

### 1.2 试剂与供试品

内毒素国家标准品(中国生物制品检定研究院, 批号: 150601-201681); Iscove 改良的 Dulbecco 培养液(Iscove's Modified Dulbecco's Medium, IMDM, 批号: 2043469)、胎牛血清(批号: 1966174C)均购自美国 Gibco 公司; 人 IL-6 ELISA 试剂盒(美国 BD 公司, 批号: 6195887); CCK8 染色液(日本岛津分子技术公司, 批号: KH831)。2 批注射用胶原酶和 19 批注射用尿激酶信息见表 1。

## 2 方法与结果

### 2.1 HL60-IL-6 法<sup>[7]</sup>

取细菌内毒素国家标准品 1 支, 无菌条件下, 用含 2%胎牛血清的 IMDM 培养液复溶并稀释成 10, 2, 1, 0.5, 0.25, 0.125, 0.06 和 0.03 EU·mL<sup>-1</sup> 的细菌内毒素标准品溶液。取供试品适量, 无菌条件下, 用含 2%胎牛血清的 IMDM 培养液进行复溶并稀释至适当浓度。

取细胞状态良好, 处于对数生长期的 HL60 细胞, 用含 2%胎牛血清的 IMDM 培养液制备密度约为 5.0×10<sup>6</sup> 个·mL<sup>-1</sup> 的细胞悬液, 200 μL 每孔加入 96 孔细胞培养板。将已制备好的不同浓度内毒素标准品溶液和供试品溶液, 50 μL 每孔加入含 HL60 细胞的 96 孔板中。同时, 以含 2%胎牛血清的 IMDM 培养液代替供试品溶液, 作为阴性对照。将 96 孔细胞培养板置于 37 °C, 5%二氧化碳条件下培养 48 h 后, 用 IL-6 ELISA 试剂盒检测细胞上清液中的 IL-6 吸光度(OD)值。

以内毒素标准品溶液浓度为横坐标, IL-6 试

剂盒测得的 IL-6 OD 值为纵坐标拟合标准曲线。将供试品溶液测得 IL-6 OD 值代入标准曲线中, 计算供试品溶液中的热原含量。

供试品溶液中热原浓度若不超过其规定的污染物限值(contaminant limit concentration, CLC), 则供试品热原含量符合规定; 若大于或等于 CLC, 则判为不合格。若供试品稀释液测得 IL-6 OD 值低于 cut-off 值, 则判定供试品中不含热原。

表 1 供试品信息

Tab. 1 Sample information

供试品名称	编号	生成厂家	批号	规格/ ×10 <sup>4</sup> U
注射用胶原酶	1	上海乔源生物制药有限公司	JZA160701	0.06
	2	公司	JZA161102	
注射用尿激酶	1	天津生物化学制药有限公司	31610033	1
	2	公司	41603053	10
	3		41610041	10
	4		41610051	10
	5		51603033	25
	6		51603041	25
	7	丽珠集团丽珠制药厂	160702A	10
	8		160702B	10
	9		160702C	10
	10	马鞍山丰原制药有限公司	161109-2	1
	11	山东北大高科华泰制药有限公司	1506165	10
	12	有限公司	1606075	10
	13	广东天普生化医药股份有限公司	71605011	25
	14	武汉人福药业有限责任公司	22616018-1	10
	15	公司	22616019-2	10
	16		22616020-1	10
	17	南京南大药业有限责任公司	20161107	10
	18	公司	20161110	10
	19		20161118	10

### 2.2 Cut-off 值、CLC 以及供试品最大稀释倍数的确定

**2.2.1 Cut-off 值** 参照欧洲药典<sup>[8]</sup>, Cut-off 值为阴性对照平均 OD 值与其 3 个标准差的和, 即  $\bar{x} \pm 3s$ 。每次试验时因阴性对照 OD 值不同, 其 cut-off 值也不同。本研究试验 cut-off 值均在 0.03~0.3。

**2.2.2 CLC** 按以下公式计算<sup>[7]</sup>  $L=K/M$ , 其中  $K$  为人每千克体质量每小时最大可接受的热原剂量,  $M$  为人用每千克体质量每小时的供试品剂量。

胶原酶和尿激酶均为注射剂, 中国药典规定注射剂  $K=5 \text{ EU} \cdot (\text{kg} \cdot \text{h})^{-1}$ <sup>[8]</sup>。胶原酶说明书表明人每小时可接受的最大量为 12 000 U, 人按 60 kg 计算, 则  $M=1 \ 200 \text{ U} \cdot (60 \text{ kg} \cdot \text{h})^{-1}=20 \text{ U} \cdot (\text{kg} \cdot \text{h})^{-1}$ , 则胶原酶热原限值  $L=K/M=0.25 \text{ EU} \cdot \text{U}^{-1}$ 。

注射用尿激酶中国药典标准规定其内毒素限值为每 1 万单位尿激酶中含内毒素的量应 <1.0 EU, 即 L 为 0.000 1 EU·U<sup>-1</sup>[2]。

**2.2.3 供试品最小有效稀释浓度** 注射用胶原酶和尿激酶均为注射用粉末, 按中国药典要求[9], 若供试品为冻干粉末, 根据公式  $C=\lambda/L$  计算其最小有效稀释浓度。

其中  $C$  为供试品浓度,  $L$  为热原限值,  $\lambda$  为方法检测限。

前期研究已表明 HL-60 方法检测限[6]为 0.01 EU·mL<sup>-1</sup>, 根据公式  $C=\lambda/L$  计算胶原酶最小有效稀释浓度为 0.04 U·mL<sup>-1</sup>, 尿激酶最小有效稀释浓度为 100 U·mL<sup>-1</sup>。

**2.3 细胞增殖抑制试验探讨对 HL60 细胞生长无影响的供试品浓度**

该试验是基于供试品作用 HL60 细胞后, 细胞分泌 IL-6 的情况而判断供试品有无热原污染。若供试品对 HL60 细胞生长有影响, 则无法用该试验测定供试品热原含量。因此, 需通过增殖抑制试验探讨对 HL60 细胞生长无影响的供试品浓度。

将 HL60 细胞悬液用含 2%胎牛血清的 IMDM 培养液稀释至密度为 5.0×10<sup>6</sup> 个·mL<sup>-1</sup>。将供试品用含 2%胎牛血清的 IMDM 培养液溶解, 涡旋振荡后逐级稀释至试验浓度(供试品浓度见表 2)。将 200 μL 每孔 HL60 细胞悬液与 50 μL 每孔供试品稀释液(同时需设阴性对照, 阴性对照为 200 μL 每孔 HL60 细胞悬液与 50 μL 每孔含 2%胎牛血清的 IMDM 培养液混合)混合接种于 96 孔板中, 置于 37 °C, 5%二氧化碳条件下培养 48 h 后, 取出, 每孔加 20 μL CCK-8 染色液, 再置于 37 °C, 5%二氧化碳条件下培养 2 h 后, 用酶标仪读取 OD 值。单因素方差分析法将各稀释度供试品溶液与阴性对照进行比较。当  $P>0.05$  时, 表明供试品溶液对 HL60 细胞的生长无影响。

3 次试验结果表明当胶原酶浓度 ≤ 60 U·mL<sup>-1</sup>, 尿激酶浓度 ≤ 2 000 U·mL<sup>-1</sup> 时, 供试品对 HL60 细胞生长无影响作用。结果见表 2。

#### 2.4 热原干扰试验

参照欧洲药典和中国药典[8-9], 当首次应用本法进行供试品热原检测时, 须进行供试品的热原干扰试验, 以判断供试品对热原测定是否有干扰。

选择内毒素标准曲线中点或靠近中点的内毒素标准品浓度, 作为供试品干扰试验中添加的内

表 2 供试品对 HL60 细胞的增殖抑制影响(n=3)

Tab. 2 Effect of samples on the proliferation of HL60(n=3)

供试品名称	浓度/U·mL <sup>-1</sup>	P 值
注射用胶原酶	600 <sup>1)</sup>	0.000
	60	0.842
	6	0.516
	2	0.341
	0.2	0.103
	0.04	0.611
注射用尿激酶	20 000 <sup>1)</sup>	0.000
	10 000 <sup>1)</sup>	0.006
	5 000 <sup>1)</sup>	0.003
	2 000	0.156
	1 000	0.797
	500	0.713
	100	0.510

注: 与阴性对照比, <sup>1)</sup>P<0.05。

Note: Compared with the negative control, <sup>1)</sup>P<0.05.

毒素标准品浓度。本实验中添加的内毒素标准品终浓度为 0.5 EU·mL<sup>-1</sup>。取 2 倍浓度的供试品溶液, 2 倍浓度的内毒素标准品溶液, 等体积混匀, 即为干扰试验供试品溶液。按“2.1”项下方法进行试验, 将干扰试验供试品溶液、供试品溶液、添加内毒素标准品溶液测得的 IL-6 OD 值(A、B、C)代入下式, 计算本试验条件下内毒素回收率(R)。

$$R=(A-B)/C \times 100\%$$

当回收率在 50%~200%, 则认为在此试验条件下供试品溶液不存在干扰作用。当回收率不在指定的范围内, 须排除干扰因素, 并重复干扰试验来验证处理的有效性。

结果表明, 尿激酶浓度 ≤ 1 000 U·mL<sup>-1</sup>, 胶原酶浓度 ≤ 6 U·mL<sup>-1</sup> 时, 内毒素回收率均在 50%~200%, 对热原测定无干扰。结果见表 3。

表 3 供试品稀释液的细菌内毒素加标回收率(n=3)

Tab. 3 Recovery rate of LPS in the test product dilution(n=3)

供试品名称	供试品稀释浓度/U·mL <sup>-1</sup>	回收率/%
注射用胶原酶	60	58.6
	6	80.1
	0.6	80.6
注射用尿激酶	2 000	55.3
	1 000	81.0
	100	86.9

#### 2.5 IL-6 试剂盒干扰试验[8]

欧洲药典附录 2.6.30 明确规定[8], 用单核细胞激活测定法测定供试品热原时, 需做试剂盒干扰试验, 分别用试剂盒自带的标准品稀释液和供试品溶液配制一系列浓度(高、中、低浓度)IL-6 标准品溶液, ELISA 试剂盒分别检测 IL-6 含量, 2 种配制液测定 IL-6 值相差在 ±20% 内, 试剂盒干扰试

验通过。

本试验探讨了 6, 0.6 U·mL<sup>-1</sup> 胶原酶溶液和 1 000, 500, 200, 100 U·mL<sup>-1</sup> 尿激酶溶液对 IL-6 的测定有无干扰作用。

用含 2%胎牛血清的 IMDM 培养液分别复溶并配制上述浓度的胶原酶和尿激酶溶液, 用以上供试品溶液分别配制理论浓度为 4.7, 37.5, 300 pg·mL<sup>-1</sup> 的 IL-6 标准品溶液, 作为 IL-6 回收率供试品溶液。同时用试剂盒自带的 IL-6 标准品稀释液配制 300, 150, 75, 37.5, 18.75, 9.375, 4.7 pg·mL<sup>-1</sup> 7 个浓度的 IL-6 标准品溶液, 按 IL-6 ELISA 说明书测定供试品溶液, IL-6 回收率供试品溶液, IL-6 标准品溶液 OD 值。以 IL-6 标准品溶液浓度为横坐标, OD 值为纵坐标拟合 IL-6 标准曲线。将供试品溶液, 回收率溶液的 OD 值代入标准曲线中计算供试品溶液 IL-6 值(a), IL-6 回收率供试品溶液 IL-6 值(b), 按下式计算 IL-6 回收率(R<sub>IL-6</sub>)。当高、中、低 3 种 IL-6 浓度的加标回收率均在 80%~120%, 则认为 IL-6 检测系统无干扰。

$$R_{IL-6} = (b-a) / IL-6 \text{ 理论值} \times 100\%$$

结果表明当尿激酶浓度低于 500 U·mL<sup>-1</sup> 时, 胶原酶浓度为 6 U·mL<sup>-1</sup> 时, 对 IL-6 的测定无影响。结果见表 4。

结果表明, 当注射用胶原酶浓度 ≤ 6 U·mL<sup>-1</sup>, 注射用尿激酶浓度 ≤ 500 U·mL<sup>-1</sup> 时, 对 HL60 细胞生长无影响, 对热原测定和 IL-6 测定也无影响。通过以上实验, 确定适合 HL60-IL-6 热原测定方法的胶原酶和尿激酶浓度分别为 6 U·mL<sup>-1</sup> 和 500 U·mL<sup>-1</sup>。

表 4 供试品稀释液的 IL-6 加标回收率

Tab. 4 Recovery rate of IL-6 in the test product dilution

供试品	稀释液浓度/ U·mL <sup>-1</sup>	IL-6 加标回收率/%		
		4.7 pg·mL <sup>-1</sup>	37.5 pg·mL <sup>-1</sup>	300 pg·mL <sup>-1</sup>
注射用尿 激酶	1 000	76.5	68.3	91.7
	500	101.1	89.0	92.4
	200	94.2	91.3	92.8
	100	108.2	92.7	89.5
注射用胶 原酶	6	110.0	100.4	94.3
	0.6	108.8	100.5	98.7

## 2.6 热原含量测定

表 1 中 19 批尿激酶来自 7 个厂家, 2 批胶原酶来自 1 个厂家, 每个厂家的生产工艺不同, 故每个厂家选择 1 批供试品(编号为 1 的注射用胶原酶; 编号为 1, 7, 10, 11, 13, 14, 17 的注射用

尿激酶), 按已确定的供试品浓度, 按“2.4”项下方法进行热原干扰试验, 观察样品对热原测定是否存在干扰。内毒素回收率均在 50%~200%, 表明供试品对热原测定无干扰作用。按“2.1”项方法对供试品进行热原检测, 试验 cut-off 值为 0.151, 测定的 IL-6 OD 值见表 5。结果表明, 所有供试品测定的 IL-6 OD 值均低于 cut-off 值, 供试品均被判定为不含热原。

表 5 供试品内毒素回收率(n=3)

Tab. 5 Recovery rate of LPS in samples(n=3)

供试品	编号	回收率/%	IL-6 OD 值
注射用胶原酶	1	79.6	0.138
	2	-	0.081
注射用尿激酶	1	84.2	0.107
	2	-	0.075
	3	-	0.101
	4	-	0.084
	5	-	0.143
	6	-	0.082
	7	91.9	0.078
	8	-	0.089
	9	-	0.102
	10	80.6	0.123
	11	84.2	0.068
	12	-	0.066
	13	99.2	0.081
	14	95.3	0.039
	15	-	0.037
	16	-	0.038
	17	94.3	0.041
18	-	0.050	
19	-	0.036	

## 3 讨论

单核细胞激活测定法最早于 2006 年收载于欧洲药典。该方法模拟热原引起人体发热的机制而建立, 相继有 7 种单核细胞激活测定法, 包括新鲜人全血-IL-1β、新鲜人全血-IL-6、外周血单核细胞(PBMC)-IL-6、MM6-IL-6、THP-1-新蝶呤(Neo)、THP-1-TNF-α 和冻存人全血-IL-1β 得到欧洲替代方法论证中心和英国国家生物制品检定所的正式验证与推荐<sup>[10]</sup>。基于对动物的保护, 单核细胞激活测定法在欧洲已广泛推广。人全血法和外周单核细胞系法虽能较全面模拟人体发热过程, 但需用到人血液, 对人血的要求高, 血液来源个体差异大, 影响试验结果。而推荐的 3 种单核细胞系法所使用的单核细胞系分别为 THP-1 和 MM6 细胞系, 该 2 种细胞系均为经过筛选的对内毒素敏感的亚克隆细胞系, 普通市场无法获得, 这些都

限制了以上方法的应用和推广。

国内中国生物制品检定研究院最早开展单核细胞激活测定方法的研究,建立了人全血和外周血方法<sup>[11]</sup>。首次发现了1株对热原敏感的单核细胞系(HL60细胞),该细胞系易于获得,而且受革兰氏阴性菌来源的内毒素、酵母来源的酵母多糖和革兰氏阳性菌来源的脂壁酸刺激后,该细胞能分泌IL-6,据此首次研究建立了HL60-IL-6单核细胞系体外热原检测方法<sup>[6-7]</sup>。笔者前期已对该方法线性、重复性、回收率和灵敏度进行了验证,故本实验省去方法学验证的结果,前期也探讨了该方法在疫苗、单抗等生物制品热原检测中的应用<sup>[12]</sup>。本研究重点探讨该方法在注射用尿激酶和注射用胶原酶2种供试品热原检测中的应用。

注射用尿激酶和注射用胶原酶均为无菌冻干粉,因此在进行热原检测时,计算的不是最大稀释倍数,而是最小稀释浓度。在研究过程中发现若样品对HL60细胞增殖有影响,将影响到热原检测。因此,本研究通过细胞增殖抑制试验,使用统计学分析确定对HL60细胞生长无影响的尿激酶和胶原酶浓度。热原干扰试验是中国药典和欧洲药典均要求的检测项,对首次采用该方法的样品,需进行热原干扰试验。本研究参照中国药典和欧洲药典的要求,研究探讨了注射用胶原酶和尿激酶对热原无干扰的浓度。IL-6是该方法的检测指标,若样品对IL-6的测定有干扰,将影响样品热原检测结果,故本研究也进行了IL-6干扰试验。分别用样品溶液和IL-6试剂盒自带的标准品稀释液配制高、中、低3个浓度IL-6溶液,分别检测2种溶液配制的3个剂量中IL-6含量,相差在 $\pm 20\%$ 内,表明样品对IL-6的测定无干扰。通过以上研究,确定了适合该方法的尿激酶和胶原酶浓度。然后,对19批尿激酶供试品和2批胶原酶

供试品进行了热原测定,结果表明热原为阴性。

本研究探讨了适用于尿激酶和胶原酶热原测定的方法,为该2个品种标准提高提供了技术资料,同时也为该方法在后续样品热原检测中的应用探讨提供了一种思路。

## REFERENCES

- [1] ZHANG R Y, WANG L K, ZHU B F, et al. Comparison study of the effects of low-temperature plasma nucleoplasty and collagenase chemonucleolysis in the treatment of cervical disc herniation [J]. Chin J Pain Med(中国疼痛医学杂志), 2018, 24(12): 912-916.
- [2] 中华人民共和国卫生部标准. 注射用胶原酶质量标准[S/OL]. <https://m.chemdrug.com/index.php?alloc=3275&catid=1&itemid=16374067&moduleid=26>.
- [3] 赵严, 黄达, 周靖媛, 等. 重组组织型纤溶酶原激活剂联合尿激酶治疗急性脑梗死患者临床疗效观察[J]. 临床军医杂志, 2019, 47(2): 194-195.
- [4] 中国药典. 二部[S]. 2015: 532-533.
- [5] LUO J, ZHANG D, DENG S, et al. Study on bacterial endotoxin test for asarone injection [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药理学), 2016, 33(2): 203-208.
- [6] WANG C, DONG S S, ZHAO H B, et al. A novel monocyte-based pyrogen test based on the mechanism of Human fever reaction [J]. Curr Pharm Anal(现代药物分析), 2016, 12(3): 227-233.
- [7] WANG M R, DONG S S, SHAO H, et al. The optimization of HL60-IL-6 assay and its application in the pyrogen detection of monoclonal antibody [J]. Curr Pharm Anal(现代药物分析), 2020, 15(16): 319-327.
- [8] EP9.0 [S]. 2017: 227-232.
- [9] 中国药典. 三部[S]. 2015: 附录 1143: 95-98.
- [10] HOFFMANN S, PETERBAUER A, SCHINDLER S, et al. International validation of novel pyrogen tests based on human monocytoïd cells [J]. J Immunol Methods, 2005, 298(1/2): 161-173.
- [11] ZHANG Y, CAI T, DU Y, et al. Suitability of human whole blood *in vitro* pyrogen test to two vaccines [J]. Chin J Biolog(中国生物制品学杂志), 2018, 31(9): 995-997.
- [12] DONG S S, WANG C, ZHOU Q, et al. Application of monocyte activation test in the pyrogen detection of vaccine [J]. Chin Pharmacist(中国药师), 2016, 19(5): 870-873.

收稿日期: 2019-03-19

(本文责编: 沈倩)