

## 凝胶法测定脐带间充质干细胞培养上清中细菌内毒素

陈耐寒<sup>1</sup>, 赵倩<sup>1</sup>, 李丽<sup>1</sup>, 左荣霞<sup>1</sup>, 郑永钦<sup>1</sup>, 高建梅<sup>1</sup>, 金华<sup>2</sup>, 沈涛<sup>1</sup>, 撒亚莲<sup>1\*</sup>

1. 昆明理工大学附属医院(云南省第一人民医院) 临床医学研究中心 云南省临床病毒学重点实验室 云南省出生缺陷与遗传病研究重点实验室, 云南 昆明 650032
2. 云南省第一人民医院 麻醉科, 云南 昆明 650032

**摘要:** **目的** 探讨凝胶法测定人脐带间充质干细胞培养上清中细菌内毒素的可行性。**方法** 收集人脐带间充质干细胞培养 72 h 的上清为供试品。参照《中国药典》2020 年版第三部通则 1143 细菌内毒素检查法中凝胶法的具体要求和步骤对鲎试剂进行灵敏度复核, 对供试品进行干扰初筛试验、干扰试验和供试品细菌内毒素的测定。**结果** 鲎试剂灵敏度测定值为 0.125 EU/mL, 在 0.5λ~2.0λ 符合规定, 可用于后续试验。供试品 1、2、4 倍稀释对鲎试剂均无干扰; 干扰试验验证 2 倍稀释供试品对细菌内毒素凝胶法检测无干扰作用; 采用凝胶法测定 2 倍稀释供试品的细菌内毒素含量均≤0.5 EU/mL, 判定供试品中细菌内毒素含量合格。**结论** 凝胶法可用于人脐带间充质干细胞培养上清中细菌内毒素的检测。

**关键词:** 脐带间充质干细胞; 培养上清; 鲎试剂; 细菌内毒素; 凝胶法

**中图分类号:** R286.02 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-5515(2023)04-0827-07

**DOI:** 10.7501/j.issn.1674-5515.2023.04.011

## Determination of bacterial endotoxin in supernatant of human umbilical cord mesenchymal stem cells by sol-gel method

CHEN Nai-han<sup>1</sup>, ZHAO Qian<sup>1</sup>, LI Li<sup>1</sup>, ZUO Rong-xia<sup>1</sup>, ZHENG Yong-qin<sup>1</sup>, GAO Jian-mei<sup>1</sup>, JIN Hua<sup>2</sup>, SHEN Tao<sup>1</sup>, SA Ya-lian<sup>1</sup>

1. Yunnan Provincial Key Laboratory of Clinical Virology, Yunnan Provincial Key Laboratory for Birth Defects and Genetic Diseases, Center for Clinical Medicine Research, Affiliated Hospital of Kunming University of Science and Technology (The First People's Hospital of Yunnan Province), Kunming 650032, China
2. Department of Anesthesiology, The First People's Hospital of Yunnan Province, Kunming 650032, China

**Abstract: Objective** To investigate the feasibility of sol-gel method to detect bacterial endotoxin in supernatant of human umbilical cord mesenchymal stem cells (hUC-MSCs). **Methods** The supernatants of hUC-MSCs cultured for 72 h were collected as the test substance. According to incoterms 1143 on sol-gel method of bacterial endotoxin test (BET) method in Chinese Pharmacopoeia Ver. 2020, sensitivity tests of tachypleus amebocyte lysate (TAL) was studied, then interference initial screening test, interference verification test, and the endotoxin content in samples were determined by sol-gel method. **Results** The TAL with the sensitivity of 0.125 EU/mL coincided with the regulation in the range of 0.5λ — 2.0λ, and could be used in the tests. The samples diluted 1, 2, and 4 times, interference initial screening test weren't observed the effect of inhibition. The interference verification test with 2 times dilution of samples had no impact on TAL. Sol-gel method was used to determine the endotoxin, and indicated the TAL in samples with 2 times dilution was less than 0.5 EU/mL qualified to regulation. **Conclusion** It is suitable for bacterial endotoxin in supernatant of hUC-MSCs by sol-gel method.

**Key words:** umbilical cord mesenchymal stem cell; supernatant; tachypleus amebocyte lysate; bacterial endotoxin; sol-gel method

人脐带间充质干细胞是一类具有自我更新和免疫调节特性<sup>[1-2]</sup>。人脐带间充质干细胞作为“活细胞多向分化潜能的成体干细胞, 而且还具有独特的免制剂”已在我国开展临床研究<sup>[3-4]</sup>, 其中人脐带间充

收稿日期: 2022-10-28

基金项目: 云南省卫生健康委员会内设机构资助项目(2017NS228, 2018NS261); 云南省临床病毒学重点实验室项目(202205AG070053); 云南省卫生科技计划项目(L-2019003); 云南省血液疾病临床医学中心开放课题(2020LCZXXKF-XY04)

作者简介: 陈耐寒, 男, 硕士, 主要从事细胞质量监测研究。E-mail: 13323903718@163.com

\*通信作者: 撒亚莲, 女, 主任技师, 博士。E-mail: sayalian@126.com

质干细胞制剂质量是临床安全性和有效性的保障。内毒素是人脐带间充质干细胞制剂质量评价技术体系中微生物学安全性的必检内容之一。内毒素通过激活中性粒细胞、巨噬细胞释放出白细胞介素-1、白细胞介素-6、肿瘤坏死因子、干扰素等内源性致热原，作用于体温调节中枢，引起机体发热；另外内毒素血症、内毒素休克等引起血压下降等危及生命的病理生理变化<sup>[5]</sup>。鉴于此，检测细胞制品中的内毒素具有重要意义。本研究收集培养 72 h 以上的人脐带间充质干细胞培养上清为供试品，参照《中国药典》2020 年版第三部通则 1143 细菌内毒素检查法中的凝胶限度试验法检测供试品中细菌内毒素，为评价人脐带间充质干细胞制品的微生物学安全性提供依据，为建立人脐带间充质干细胞制剂质量评价体系提供参考。

## 1 仪器与材料

SHHW21.600A II 电热恒温三用水箱(天津市泰斯特仪器公司)，TZL-5009 可调速涡旋混匀器(苏州珀西瓦尔实验设备有限公司)，已除热原的空安瓿、移液器枪头均购自厦门鲎试剂生物技术股份有限公司。

鲎试剂(厦门鲎试剂生物技术股份有限公司，标示灵敏度 0.125 EU/mL，批号 8002773、19111060)，细菌内毒素工作标准品(厦门鲎试剂生物技术股份有限公司，效价 10 EU/支，批号 171205)，细菌内毒素检查用水(厦门鲎试剂生物技术股份有限公司，批号 171002)。

供试品来自人脐带间充质干细胞培养 72 h 上清，用组织块贴壁法获取人脐带间充质干细胞，经酶消化法进行培养扩增，室温下  $400 \times g$  离心 5 min，取上清液为待测供试品，如果当天不检测，则分装冻存  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  待检。整理 4 批人脐带间充质干细胞(编号分别为 F1、F2、F6、F17)的原代至第 13 代培养上清为供试品。基于干扰初筛试验、干扰验证试验的供试品必须是无菌的，将新鲜配制的人脐带间充质干细胞完全培养液(CCS)置  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  细胞培养箱中培养 72 h 以后，判断其无菌生长后，收集为供试品，用于干扰初筛试验和干扰验证试验的对照组供试品。

## 2 方法与结果

### 2.1 细菌内毒素限值(L)的确定

L 为供试品的细菌内毒素限值，其单位以 EU/mL、EU/mg 或 EU/U 表示，本研究中 L 的单位

为 EU/mL。确定 L 数值的公式为： $L=K/M$ ，K 为人每千克体质量每小时最大可接受的内毒素剂量，以 EU/(kg·h)表示，《中国药典》2020 年版规定注射剂、鞘内注射剂的 K 值分别为 5、0.2 EU/(kg·h)；M 为人每千克体质量每小时最大供试品剂量，其单位以 mL/(kg·h)、mg/(kg·h)或 U/(kg·h)表示，人均体质量按 60 kg 计算；注射时间若不足 1 h，按 1 h 计算；本研究中人脐带间充质干细胞制品的规格为 100 mL 静脉注射制剂；静脉给药的细菌内毒素限值应考虑扣除大输液的细菌内毒素值 250 EU/60(kg·h)；因而本研究  $L=K/M=[5\text{ EU}/(\text{kg}\cdot\text{h})-250\text{ EU}/60(\text{kg}\cdot\text{h})]/100\text{ mL}/60(\text{kg}\cdot\text{h})=0.5\text{ EU}/\text{mL}$ ，鉴于此，本研究 L 限值定为  $\leq 0.5\text{ EU}/\text{mL}$ 。

### 2.2 最大有效稀释倍数(MVD)的计算

MVD 是指在检测试验中供试品溶液被允许达到稀释的最大倍数，即在不超过此稀释倍数的浓度下进行细菌内毒素检测。参照《中国药典》2020 年版计算 MVD， $MVD=CL/\lambda$ ，C 为供试品溶液的浓度，其中当 L 以 EU/mL 表示时， $C=1.0\text{ mL}/\text{mL}$ ；当 L 以 EU/mg 或 EU/U 表示时，C 的单位为 mg/mL 或 U/mL，本研究 L 值为 0.5 EU/mL； $\lambda$  为鲎试剂的灵敏度，本研究  $\lambda$  为 0.125 EU/mL，故本实验中供试品  $MVD_{0.125}=CL/\lambda=1.0 \times 0.5/0.125=4$  倍。

### 2.3 鲎试剂灵敏度复核试验

为明确实验室的条件、人员的操作技能和试验材料是否满足细菌内毒素检测的要求，本实验验证鲎试剂灵敏度的测定值( $\lambda_c$ )是否在  $0.5\lambda \sim 2.0\lambda$  标示灵敏度范围。

制备  $2.0\lambda$ 、 $1.0\lambda$ 、 $0.5\lambda$ 、 $0.25\lambda$  细菌内毒素工作标准品溶液，每个浓度设置 4 支平行对照管，作为 Es 组；另设置 2 支阴性对照管(NC)，作为对照组。以鲎试剂安瓿为反应管。使用移液器分别准确吸取 0.1 mL 细菌内毒素检查用水，加入到鲎试剂安瓿，避免泡沫，1~2 min 鲎试剂变澄清，再用移液器吸取 0.1 mL 不同浓度细菌内毒素工作标准品溶液，加入到已复溶的鲎试剂安瓿(反应管)；另分别取 0.1 mL 细菌内毒素检查用水加入阴性对照管。加样后轻轻摇匀鲎试剂反应管中的混合液，避免气泡，用封口膜封闭管口，轻轻将其垂直放入试管架，在  $(37 \pm 1)\text{ }^{\circ}\text{C}$  恒温水浴锅静置保温  $(60 \pm 2)\text{ min}$ 。孵育过程中避免振动水浴锅，以免影响凝胶形成。将反应试管从水浴锅中轻轻取出，缓缓倒转  $180^{\circ}$ ，若管内形成凝胶，并且凝胶坚固不变形、不从管壁滑

脱者为阳性,记录为“+”;未形成凝胶或形成的凝胶不坚实、变形并从管壁滑脱者为阴性,记录为“-”。用 Excel 软件进行对数、反对数的计算。在 Excel 表格中计算对数的公式为“=log(反应终点浓度)”,计算反对数的公式为“=power(数值,幂)”。鲎试剂产生凝集,形成凝胶的内毒素最低浓度即为鲎试剂的标示灵敏度,用 EU/mL 表示。当阴性对照管、最低浓度内毒素工作标准品管 0.25λ (E0.03) 的所有平行管均为阴性,最大浓度 2.0λ (E0.25) 所

有平行管均为阳性,提示试验有效,结果见表 1。计算反应终点浓度(反应终点浓度是指系列递减的内毒素工作标准品溶液浓度中最后一个呈阳性结果的浓度)的几何平均值,即鲎试剂灵敏度的测定值( $\lambda_c$ )。

$$\lambda_c = \text{antilg}(\sum X/n) = \text{antilg}\{[(-0.903) + (-0.903) + (-0.903) + (-0.903)]/4\} = \text{antilg}(-0.903) = 0.125$$

X 为反应终点浓度的对数值, n 为每个细菌内毒素工作标准品溶液浓度的平行管数

表 1 鲎试剂灵敏度复核试验结果

Table 1 Results of TAL sensitivity confirmation test

批号	标示灵敏度 $\lambda$ (EU·mL <sup>-1</sup> )	内毒素标准品溶液浓度/(EU·mL <sup>-1</sup> )				NC 组	测定灵敏度 $\lambda_c$ (EU·mL <sup>-1</sup> )
		2.0λ (E0.25)	1.0λ (E0.125)	0.5λ (E0.06)	0.25λ (E0.03)		
8002773	0.125	++++	++++	-----	-----	--	0.125
19111060	0.125	++++	++++	-----	-----	--	0.125

参照《中国药典》2020 年版第三部通则 1143 细菌内毒素检查法规定,当  $\lambda_c$  在 (0.5~2.0) λ 时才可用于细菌内毒素检查,并以测定灵敏度  $\lambda_c$  为该批鲎试剂灵敏度。本研究中鲎试剂  $\lambda_c$  为 0.125 EU/mL,符合规定,判定这 2 批鲎试剂可用于后续供试品干扰初筛试验、干扰试验和供试品细菌内毒素的检测。

#### 2.4 干扰初筛试验

初步判断供试品与鲎试剂是否相容可减少后续干扰验证试验的盲目性。观察一系列含 2.0λ 内毒素工作标准品的不同稀释倍数供试品溶液对鲎试剂的影响可以初步筛选出对鲎试验无干扰的供试品稀释倍数。供试品必须无菌。

供试品为 CCS 和 F1 hUC-MSCs P1、F2 hUC-MSCs P6、F17 hUC-MSCs P13 培养上清。干扰初筛试验供试品的稀释倍数不得超过 MVD (MVD 计算值为 4 倍),即干扰初筛试验供试品稀释的浓度梯度分别为 1 (原液)、2、4 倍,需逐级稀释。试验分为 4 组,每组需 2 支平行管。供试品阴性对照(NPC)组是在鲎试剂安瓿(反应管)中加 0.1 mL 细菌内毒素检查用水、0.1 mL 不同稀释倍数的供试品溶液。供试品阳性对照(PPC)组是在鲎试剂安瓿(反应管)中加 0.1 mL 细菌内毒素检查用水、0.1 mL 含不同稀释倍数供试品溶液配制的 2.0λ 细菌内毒素工作标准品。阳性对照(PC)组是在鲎试剂安瓿(反应管)中加 0.1 mL 细菌内毒素检查用水、0.1 mL 细

菌内毒素检查用水配制的 2.0λ 细菌内毒素工作标准品。阴性对照(NC)组是在鲎试剂安瓿(反应管)中加 0.2 mL 细菌内毒素检查用水。恒温反应同 2.3 项。当 NPC、NC 组所有管均为阴性,PC 组所有管均为阳性时,试验有效。在 PPC 组中第 1 个出现阳性结果的供试品稀释倍数为无干扰浓度。结果见表 2。NPC、NC 组所有平行管均为阴性,PC 组平行管均为阳性,提示试验有效。供试品 1、2、4 倍稀释均为无干扰浓度,在 PPC 组中第 1 个出现阳性结果的浓度即初步判断其为供试品的无干扰浓度,但在确定干扰试验的供试品浓度时,一般不选择第 1 个阳性结果,因此本实验选择 2 倍稀释供试品进行后续的干扰验证试验。

#### 2.5 干扰验证试验

检验某稀释倍数的供试品对鲎试剂与内毒素反应有无干扰;供试品必须无菌,需要对 3 批供试品进行干扰试验后确定该稀释倍数适合进行供试品的日常细菌内毒素检查。

供试品为 CCS 和 F1 hUC-MSCs P1、F2 hUC-MSCs P6、F17hUC-MSCs P13 的培养上清液。依照干扰初筛试验的结果确定供试品的无干扰稀释倍数为 2 倍。试验分 4 组,每组需 2 支平行管。Es 组是以细菌内毒素检查用水配制的 2.0λ、1.0λ、0.5λ、0.25λ 4 个浓度的细菌内毒素工作标准品溶液,与鲎试剂灵敏度复核试验的 Es 组相同。在鲎试剂安瓿

表 2 干扰初筛试验结果  
Table 2 Results of interference initial screening test

鲎试剂批号	供试品批号	实验序列	供试品稀释倍数			NC 组	PC 组
			1 倍	2 倍	4 倍		
8002773	CCS	NPC	--	--	--	--	++
		PPC	++	++	++		
8002773	F1 hUC-MSCs P1	NPC	--	--	--		
		PPC	++	++	++		
8002773	F2 hUC-MSCs P6	NPC	--	--	--		
		PPC	++	++	++		
19111060	CCS	NPC	--	--	--	--	++
		PPC	++	++	++		
19111060	F17 hUC-MSCs P13	NPC	--	--	--		
		PPC	++	++	++		

(反应管)中加 0.1 mL 细菌内毒素检查用水、0.1 mL 不同浓度的细菌内毒素工作标准品, 每个浓度需 4 支平行管。干扰试验序列 (Et) 组是以 2 倍稀释人脐带间充质干细胞培养上清液为溶剂, 配制含 2.0λ、1.0λ、0.5λ、0.25λ 4 个浓度的细菌内毒素工作标准品溶液。在鲎试剂安瓿 (反应管) 中加 0.1 mL 细菌内毒素检查用水、0.1 mL 不同稀释倍数的 Et 溶液, 每个浓度需 4 支平行管。供试品 2 倍稀释对照组 (NPC2) 是在鲎试剂安瓿 (反应管) 中加 0.1 mL 细菌内毒素检查用水、0.1 mL 2 倍稀释的供试品, 需 2 支平行管。阴性对照 (NC) 组是在鲎试剂安瓿 (反

应管) 中加 0.2 mL 细菌内毒素检查用水, 需 2 支平行管。恒温反应操作同 2.3 项。当 2 倍稀释供试品溶液组、NC 组所有管均为阴性,  $E_s \geq 0.5\lambda$ , 而  $\leq 2.0\lambda$  时, 试验有效。结果供试品 2 倍稀释对照组、阴性对照组的所有平行管都为阴性, 且  $E_s$  值均在  $0.5\lambda \sim 2.0\lambda$ , 提示试验有效, 见表 3。参照鲎试剂灵敏度测定值的计算公式计算 Et、 $E_s$  值。结果 Et 值均在  $0.5\lambda \sim 2.0\lambda$ , CCS 和 3 批供试品均获得一致性的干扰试验结果, 认为在此试验条件下 2 倍稀释的供试品对鲎试剂无干扰作用, 该稀释倍数可用于凝胶限度试验检测日常供试品的细菌内毒素。

表 3 干扰验证试验的测定结果  
Table 3 Results of interference verification test

鲎试剂批号	供试品批号	干扰验证试验结果				NPC2	NC	$E_s / (EU \cdot mL^{-1})$	$E_t / (EU \cdot mL^{-1})$
		2.0λ (E0.25)	1.0λ (E0.125)	0.5λ (E0.06)	0.25λ (E0.03)				
8002773	细菌内毒素水	++	++	--	--	--	0.125		
8002773	CCS	++++	++++	----	----	--		0.125	
8002773	F1 hUC-MSCs P1	++++	++++	----	----	--		0.125	
8002773	F2 hUC-MSCs P6	++++	++++	----	----	--		0.125	
19111060	细菌内毒素水	++	++	--	--	--	0.125		
19111060	CCS	++++	++++	----	----	--		0.125	
19111060	F17 hUC-MSCs P13	++++	++++	----	----	--		0.125	

2.6 凝胶限度试验

参照《中国药典》2020 年版第三部通则 1143 细菌内毒素检查法中的凝胶限度试验的具体要求和

步骤进行, 以明确供试品细菌内毒素含量是否  $\leq L$  (0.5 EU/mL)。

试验分 4 组, 各组需要 2 支平行管。待测供试

品组 (NPC2) 是在鲎试剂安瓿 (反应管) 中加 0.1 mL 细菌内毒素检查用水、0.1 mL 2 倍稀释供试品溶液。供试品阳性对照组 (PPC2) 是在鲎试剂安瓿 (反应管) 中加 0.1 mL 细菌内毒素检查用水、0.1 mL 用 2 倍稀释供试品溶液配制的 2.0 $\lambda$  内毒素工作标准品。阴性对照 (NC) 组是在鲎试剂安瓿 (反应管) 中加 0.2 mL 细菌内毒素检查用水。阳性对照 (PC) 组在鲎试剂安瓿 (反应管) 中加 0.1 mL 细菌内毒素检查用水、0.1 mL 含细菌内毒素检查用水制备的 2.0 $\lambda$  内毒素工作标准品。恒温反应操作同 2.3 项下。当 PPC2 组、PC 组所有管均为阳性, NC 组所有管均为阴性时, 试验有效。当 NPC2 组 2 支平行管均

为阴性, 判定供试品合格; 当 NPC2 组 2 支平行管均为阳性, 判供试品细菌内毒素含量  $\geq 0.5$  EU/mL; 如果 NPC2 组 2 支平行管的结果不一致时复检, 需用 4 支鲎试剂管, 若所有平行管均为阴性, 则供试品合格, 否则判定为不合格。结果本试验 NC 组的所有平行管均为阴性, PC 组的所有平行管均为阳性, PPC2 组平行管均为阳性, 提示试验有效; 判读待测供试品 NPC2 组的所有样品管均为阴性, 判定 4 批供试品 (F1hUC-MSCs、F2hUC-MSCs、F6hUC-MSCs、F17hUC-MSCs) 细菌内毒素含量符合规定, 其中判读待测供试品 F6hUC-MSCs 的试验结果见表 4。

表 4 凝胶限度试验检测供试品中细菌内毒素的测定结果

Table 4 The results of the bacterial endotoxin by Gel limit test

鲎试剂批号	供试品批号	结果			
		NC 组	PC 组	PPC2 组	NPC2 组
8002773	F6 hUC-MSCs P0	--	++	++	--
8002773	F6 hUC-MSCs P1	--	++	++	--
8002773	F6 hUC-MSCs P2	--	++	++	--
8002773	F6 hUC-MSCs P3	--	++	++	--
8002773	F6hUC-MSCs P4	--	++	++	--
8002773	F6 hUC-MSCs P5	--	++	++	--
8002773	F6 hUC-MSCs P6	--	++	++	--
8002773	F6 hUC-MSCs P7	--	++	++	--
8002773	F6 hUC-MSCs P8	--	++	++	--
8002773	F6 hUC-MSCs P9	--	++	++	--
8002773	F6hUC-MSCs P10	--	++	++	--
19111060	F6 hUC-MSCs P11	--	++	++	--
19111060	F6hUC-MSCs P12	--	++	++	--
19111060	F6 hUC-MSCs P13	--	++	++	--

### 3 讨论

细胞治疗是继药物、手术、放疗之后的第 4 类治疗手段, 是攻克尚无有效干预措施疾病的希望之星。细胞制剂的质量直接影响临床应用的安全性和有效性, 微生物学安全性是评价细胞制剂质量的核心要素, 内毒素是其中的必检指标<sup>[6-7]</sup>。

内毒素是外源性致热原, 是革兰阴性菌死亡解体后释放出来的细胞壁结构中的脂多糖成分<sup>[6-7]</sup>, 其经典的检测方法为《中国药典》2020 版第三部通则 1143 中的凝胶法和光度测定法, 前者包括凝胶限度试验和凝胶法半定量试验, 后者包括浊度法和显色

基质法<sup>[8]</sup>。当检测结果有争议时, 除另有规定外, 以凝胶限度试验结果为准, 即凝胶限度试验为“仲裁”标准<sup>[9]</sup>。本研究采用凝胶法中凝胶限度试验对 4 批培养 72 h 以上人脐带间充质干细胞培养上清进行了细菌内毒素检测, 结果提示供试品的细菌内毒素含量均  $\leq$  内毒素限值 0.5 EU/mL, 符合规定。

凝胶限度试验是半定量检测方法, 用于判定供试品中细菌内毒素含量是否在符合规定的限值范围。其工作原理是鲎试剂含有 C 因子、B 因子、G 因子、凝固酶原、凝固蛋白原等多种丝氨酸蛋白酶类物质, 能与内毒素产生凝集反应, 形成肉眼可见

的坚固凝胶，凝胶形成速率与内毒素浓度呈正相关；其方法简单、经济，结果可靠，重复性好，不需要特别的实验室设施；缺点是特异性不强，不能直接反映供试品中内毒素的量值，判断结果有主观性，技术人员需要操作熟练，精准量取液体<sup>[9-10]</sup>。其次，内毒素检测受环境与供试品的浓度、温度、反应体系中  $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$  离子浓度和 pH 值等因素的影响。细菌在自然界分布广泛，操作中有微生物污染，出现假阳性；因而试验操作需在洁净的实验环境中遵循无菌操作，避免较大空气对流<sup>[11]</sup>。另外，鲎试剂在液态时极不稳定，鲎试剂复溶后在 10 min 内使用，不能超过 30 min，在室温放置太久会影响反应灵敏度；鲎试剂与内毒素所形成的凝胶是不可逆的，试验过程中一旦凝胶受到振动就容易变形脱落，造成假阴性结果，因而要求加样混匀过程中动作需轻柔，恒温器需放置在温度稳定，无振动的环境中<sup>[12-13]</sup>。

首次检测供试品细菌内毒素时，需进行鲎试剂的灵敏度复核试验、供试品的干扰初筛试验和干扰验证试验；当鲎试剂的产家、批号出现变更时，需要重新进行鲎试剂的灵敏度复核；当供试品的处方、生产工艺或试验环境中发生了任何有可能影响试验结果的变化时，需要重新进行干扰试验，而且需要对 3 批样品进行干扰试验后，结果一致才能确定供试品日常检查的稀释倍数<sup>[9]</sup>。本研究对 2 批标示灵敏度为 0.125 EU/mL 的鲎试剂进行灵敏度复核，测定其灵敏度为 0.125 EU/mL，提示该批鲎试剂可用于后续试验。干扰预试验是初步明确供试品与鲎试剂的相容性，结果提示供试品 1、2、4 倍稀释对鲎试剂均无干扰作用；但通常不选择第 1 个出现阳性结果的供试品浓度作干扰验证试验，笔者选择 2 倍稀释供试品进行后续试验。干扰验证试验的结果明确 2 倍稀释供试品对鲎试剂无干扰作用，选择其为日常供试品细菌内毒素检测的稀释倍数。由于干扰初筛试验和干扰试验的供试品溶液应为未检出内毒素的溶液，笔者将新鲜配制的完全培养液进行 72 h 培养验证无菌后用于干扰初筛试验和干扰试验，其结果与人脐带间充质干细胞培养上清来源供试品的检测结果的一致，提示试验结果可信可靠。

笔者所在单位为国家干细胞临床研究基地，在政策允许时期开展树突状细胞、细胞因子诱导杀伤细胞等免疫细胞的临床应用工作，有相对完善的细

胞制剂生产和质量控制平台<sup>[2, 14-17]</sup>。本试验的供试品来自人脐带间充质干细胞原代培养至培养到第 13 代的培养上清，笔者整理了 4 批供试品的检测结果。在干扰初筛试验和干扰验证试验中用第 1 代细胞培养上清为供试品，未用原代组织块贴壁培养上清，原因是人脐带间充质干细胞组织块贴壁培养法的原代培养上清中有脐带组织华氏胶来源的黏多糖等成分使培养液较黏稠；其次，原代培养时间长，根据细胞爬出情况在第 9~14 天传代，如果有污染，通过肉眼和/或在倒置显微镜下观察能发现污染；另外，凝胶限量法检测 2 倍稀释原代细胞培养上清来源供试品内毒素的方法可行；因而，未选用组织块贴壁培养法的原代培养上清进行干扰初筛实验和干扰验证试验。在已完成近 30 批 2 倍稀释人脐带间充质干细胞培养上清来源供试品的内毒素检测结果提示，凝胶限度试验方法稳定。通过联合分析同一样本在笔者医院检验科用动态浊度法检测细菌内毒素和无菌试验结果的一致性，表明凝胶限度试验的检测结果可靠。

细菌内毒素检查方法除《中国药典》2020 年版规定的凝胶法和光度测定法之外，还有重组 C 因子法、流式细胞术、高效液相色谱、免疫学方法（如火箭电泳免疫法、酶联免疫吸附检测法、L-赖氨酸 ELISA 法）等<sup>[8]</sup>。由于鲎试剂是从鲎的血液中提取，而我国近年鲎资源的急剧下降，鲎已成为需要拯救的物种；因而，有必要探讨替补“金标准”的方法。中国食品药品检定研究院等多家单位对重组 C 因子检测方法的准确度、精密性、检测限、专属性、线性范围和耐用性进行了验证，结果表明该方法可替代鲎试剂法作为细菌内毒素的检测方法，但试验成本高，需要配备酶标仪<sup>[18]</sup>。

细菌内毒素检测试验中，溶液配制是一个关键环节。细菌内毒素工作标准品是从大肠埃希菌提取精制而成白色疏松海绵状固体，4 °C 保存，使用前需在室温复温 30 min 后才进行溶解使用。开启玻璃安瓿前注意检查试剂批号、规格，用手指轻轻弹下安瓿颈内部附着的试剂，随后用 75% 酒精棉球或纱布擦拭，待干燥后开启安瓿，防止玻璃碎屑落入瓶内，更重要的是要避免划伤手指。内毒素属于高分子质量脂多糖复合物，其分子具有两极活性，多糖链有亲水性，脂肪链具有疏水性，在水中呈现不均匀分布；因而，溶解内毒素工作标准品时，需在漩涡振荡器上混合 15 min 或参照标准品说明书

中要求的混匀时间进行操作,使内毒素分子均匀分布在水中,随后对内毒素工作标准品溶液进行每一个序列浓度稀释时,均需要在旋涡混合器上混合 1 min 或参照标准品说明书中要求的混匀时间进行操作后才取样。另外,配制不同稀释倍数的标准品时,稀释倍数不得超过 10 倍,而且溶解后的内毒素工作标准品超过 4 h 不再使用。

在干扰预试验中 PPC 组需用 1、2、4 倍供试品溶液配制含 2λ 细菌内毒素工作标准品,其中对于 1 倍稀释/供试品原液配制含 2λ (0.25 EU/mL) 标准品溶液时,需要考虑是多使用一支内毒素工作标准品,还是用极量稀释法,节约一支内毒素工作标准品。方法一是直接用供试品原液溶解细菌内毒素工作标准品后,用供试品原液逐级稀释标准品,配制成含 2λ 细菌内毒素工作标准品的供试品原液;方法二是用极量稀释法,用细菌内毒素检查用水溶解内毒素工作标准品为 10.0 EU/mL 后,再用供试品原液进行 10 倍稀释,配制成 1.0 EU/mL,再用供试品原液进一步稀释为含 0.25 EU/mL (2λ) 工作标准品溶液,即为 1 倍稀释供试品溶液中含 0.25 EU/mL (2λ) 工作标准品的 PPC 组。对于配制 2 倍稀释供试品溶液中含 0.25 EU/mL (2λ) 工作标准品的 PPC 组,用供试品原液与细菌内毒素检查用水配制的 0.5 EU/mL (4λ) 工作标准品以 1:1 稀释,即可得到 2 倍稀释供试品溶液中含 0.25 EU/mL (2λ) 工作标准品的 PPC 组。用 2 倍稀释供试品与细菌内毒素检查用水配制的 0.5 EU/mL (4λ) 工作标准品以 1:1 稀释,即可得到 4 倍稀释供试品溶液中含 0.25 EU/mL (2λ) 工作标准品的 PPC 组。

综上所述,供试品为 2 倍稀释人脐带间充质干细胞培养上清对鲎试剂无干扰,且凝胶法检测 4 批供试品中细菌内毒素的结果均符合规定,提示凝胶法检测供试品人脐带间充质干细胞培养上清细菌内毒素是可行的。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

#### 参考文献

[1] 张玲,孙燕玲,王晓珍,等.脐带间充质干细胞治疗难治性慢性移植植物抗宿主病[J].中国组织工程研究,2020,24(13):2034-2038.

- [2] 李士欣,华映坤,王林坪,等.人脐带 Wharton's jelly 间充质干细胞生物学特性的研究[J].中国临床解剖学杂志,2014,32(4):432-436.
- [3] 陈曦,陈照林,董静,等.脐带间充质干细胞联合双重血浆分子吸附治疗慢加急性肝衰竭患者临床效果初步观察[J].实用肝脏病杂志,2020,23(4):544-547.
- [4] 薛超,马文娜,孙庆文,等.脐带间充质干细胞治疗失代偿期肝硬化 12 例临床疗效观察[J].肝脏,2020,25(1):66-68.
- [5] 王尧尧,王贺,谢益晖,等.苯磺顺阿曲库铵细菌内毒素检查法研究[J].中国药品标准,2020,21(3):234-238.
- [6] 王佃亮.脐带间充质干细胞制剂的质量管理及有效性和安全性[J].转化医学杂志,2020,9(2):65-69.
- [7] 王军志.生物技术药物研究开发和质量控制(第三版)[M].北京:科学出版社,2018:962-989.
- [8] 宁洪鑫,毕常芬,黄欢,等.放射性药品细菌内毒素检测方法的研究进展[J].现代药物与临床,2019,34(6):1936-1940.
- [9] 中国药典[S].三部.2020:附录 538-541.
- [10] 曾艳,孙阳,蓝燕,等.动态浊度法检测冻干甲型肝炎减毒活疫苗细菌内毒素含量的研究[J].微生物学杂志,2016,36(4):62-66.
- [11] 蔡彤,裴宇盛,高华.建设符合世界卫生组织“药品质量控制实验室良好操作规范”要求的细菌内毒素检验实验室要素分析[J].中国药理学杂志,2015,50(14):1251-1254.
- [12] 王璐,刘勤,王玮.诺氟沙星葡萄糖注射液细菌内毒素检查法研究[J].中国药品标准,2019,20(6):521-525.
- [13] 张媛,孙述学.细菌内毒素检测方法的研究进展[J].中国生物制品学杂志,2023,36(3):368-372.
- [14] 唐慧,董虹,李丽,等.应用蛋白芯片检测 CIK 细胞与其培养上清蛋白谱的改变[J].肿瘤防治研究,2013,40(12):1156-1162.
- [15] 高建梅,严新民,董虹,等.CIK 细胞悬液细菌内毒素检测方法的研究[J].中国现代医生,2009,47(5):24-25.
- [16] 撒亚莲,沈晓梅,史克倩,等.hMSC 对异体 DC-CIK 细胞分泌细胞因子的影响[J].细胞与分子免疫学杂志,2010,26(10):988-991.
- [17] 李星逾,孙志为,董虹,等.CIK 细胞联合胸腺肽 α-1 治疗消化系统恶性肿瘤 65 例疗效观察[J].中国医学创新,2009,6(29):9-11.
- [18] 裴宇盛,蔡彤,陈晨,等.细菌内毒素重组 C 因子检测方法的验证[J].中国生物制品学杂志,2020,33(1):76-79.

[责任编辑 解学星]