

重组人红细胞生成素体内生物学活性 两种测定方法的比较

刁勇 陆桂萍 吕军 周勇¹ 古卓良 苏剑

(南京军区药品检验所,南京 210002; ¹中国药品生物制品检定所,北京 100050)

摘要 采用多血小鼠法和网织红细胞法,对不同厂家的重组人红细胞生成素进行体内生物学活性测定。认为多血小鼠法灵敏度高,结果准确、客观,重现性符合要求,新申报的重组人红细胞生成素必须采用该法进行测定,但操作复杂,而且需要同位素;网织红细胞法方便、快速,结果可靠,灵敏度、重现性适合常规检验,生产厂家可用该法替代多血小鼠法。

关键词 重组人红细胞生成素;体内活性测定;网织红细胞;多血小鼠

重组人红细胞生成素(rhEPO)是治疗肾性贫血的特效药物,我国肾衰病人治疗所用的 rhEPO 制剂完全依赖进口,病人和国家负担极其沉重,迫切需要国产 rhEPO 制剂取而代之。而 rhEPO 制剂国产化的首要条件是必须保证其质量与进口产品相当,所以质量保证手段成为 rhEPO 制剂国产化的关键。rhEPO 制剂的体内生物学活性与其临床疗效密切相关,是最重要、最关键的质控指标。目前其体内生物学活性的检测方法分为两类:即 ⁵⁹Fe 摄入量^[1]和网织红细胞计数法^[2]。⁵⁹Fe 摄入量按动物模型的建立方法又可分为过量输血形成的多血小鼠法、低压氧舱形成的多血小鼠法和饥饿大鼠法。本文所采用的两种方法为低压氧舱形成的多血小鼠法和网织红细胞计数法。

红细胞的形成是一个连续的增生分化过程,从造血干细胞发生,经过原红细胞、早幼红细胞、中幼红细胞、晚幼红细胞,网织红细胞逐渐发育成熟。网织红细胞经 24~48 h 发育为成熟的红细胞,其数量与红细胞生成活性成正比,所以测定网织红细胞的数量即可反映红细胞生成的速度,从而反映 EPO 活性的高低。这就是网织红细胞计数法测定 EPO 体内生物学活性的原理。

铁是红细胞成熟过程中合成血色素的重要原料。铁进入血浆后很快与转铁蛋白结合运送至骨髓、肝、脾等器官。在骨髓等造血器官中的铁可被幼

红细胞摄入合成血红蛋白。血浆中的铁也不会被成熟的红细胞所吸收,所以测定铁渗入到循环红细胞中的量亦可反映红细胞生成的速度,从而反映 EPO 活性的高低。这就是 ⁵⁹Fe 摄入量测定 EPO 体内生物学活性的原理。

1 材料和方法

1.1 仪器和材料

ICR 品系小白鼠(雌),9 周龄,体重 20~30 g,南京药械厂提供。EPO 标准品(10 IU/ml),中国药品生物制品检定所提供。瑞氏色素,上海试剂三厂;煌焦油兰,Chroma 公司;枸橼酸铁(⁵⁹Fe),英国 Amersham 公司;样品稀释液,0.25% 小牛血清白蛋白的生理盐水。FJ2011 型 γ 计数器,西安国营二六二厂;显微镜,日本 OLYMPUS 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 多血小鼠法 将雌性 ICR 纯种小白鼠置低压氧舱中,舱内压力为 40~50 kPa,温度为 20~22℃,每天 20 h,共 14 d,在这个期间形成多血小鼠。将形成的多血小鼠在正常环境中饲养 3 d,随机分组后,分别给予不同浓度的标准品和供试品,每天一次,连续 2 d。对照组同法注射样品稀释液。在第一次注射 EPO 48 h 后,小鼠尾静脉注射 ⁵⁹Fe,剂量为 18.5 kBq/鼠,注射 ⁵⁹Fe 48 h 后,眶后静脉丛取血,测定血球压积,然后腋下静脉丛取血,用 γ -

计数器测定其放射性强度 (每分钟脉冲数 cpm)。凡血球压积小于 53% 的小鼠 ,其数据均不采用。

1.2.2 网织红细胞法 将小鼠随机分组 ,分别 sc 不同浓度的标准品和供试品 ,每天一次 ,连续 3 d 对照组同法注射样品稀释液。d 4 眶后静脉丛取血 ,计数红细胞总数 ,同时按瑞氏染色法进行原血涂片染色 ,油镜下计数网织红细胞对红细胞数的比值。

1.3 计算方法

⁵⁹Fe摄入量 (⁵⁹Fe%) 的计算公式为:

$$^{59}\text{Fe}\% = \frac{0.5\text{ ml全血的 cpm} \times a \times \text{体重} \times b \times 100\%}{18.5\text{ kBq}^{59}\text{ Fe的 cpm}}$$

式中 a 值为 2,是将 0.5 ml 全血的 cpm 转换为 1 ml 全血的 cpm,因多血小鼠的全血体积占体重的 8% ,体重乘以 0.8 即小鼠的血容量 ,故 b 值为 0.08

网织红细胞数的计算公式为:

$$RC = R \times RBC$$

RC 为网织红细胞数 ,R 为网织红细胞对红细胞数的比值 ,RBC 为红细胞总数

rhEPO 效价计算: 按照中国药典 1995 年版附录“量反应平行线测定法”进行计算。一定范围内 ,EPO 的对数剂量与 ⁵⁹Fe 摄入量或网织红细胞数的增加呈线性关系 ,标准品与供试品均采用三个等比剂量组 ,当标准品与供试品的活性组分基本相同时 ,两直线应平行。

经剂量间变异分析 ,对实验结果进行可靠性测验。如供试品和标准品的对数剂量反应关系不显著偏离平行直线 (P> 0.05) ,则认为实验结果成立 ,可以按有关公式计算供试品活性 ,否则需复试

2 结 果

2.1 线性范围及灵敏度

多血小鼠法测定 rhEPO 体内生物学活性的线性范围为 0.05~ 1 IU /m1,最小检测浓度为 0.05 IU /m1,实际测定时我们采用 0.2, 0.4, 0.8 IU /m1 三个高浓度 ,以降低测定误差^[3]。

网织红细胞计数法测定 rhEPO 体内生物学活性的线性范围为 1~ 16 IU /m1,最小检测浓度为 1 IU /m1,实际测定时我们采用 4, 8, 16 IU /m1 三个高浓度

2.2 可靠性和重复性

取美国 Amgen 公司的 rhEPO 注射液 ,批号

543C9B,标示效价为 10000 IU /m1,采用两种方法连续测定 ,结果见表 1

2.3 样品测定

采用两种方法 ,对不同厂家送检样品进行体内生物学活性测定 ,结果见表 2

Tab 1. Reliability and reproducibility of the two methods

Labeled potency (IU /ml)	Polycythaemic mice method (IU /ml)	Reticulocyte counting method (IU /ml)
10000	13405	10420
10000	11464	9752
10000	12043	10520
10000	11817	12294
10000	11976	11602
10000	10522	
10000	9472	
\bar{x}	11528	10918
RSD(%)	10.81	9.30
n	7	5

Tab 2. Comparison of *in vivo* biological activity of rhEPO produced by different manufactures

rhEPO sample	Labelled potency (IU /ml)	Polycythaemic mice method (IU /ml)	Reticulocyte counting method (IU /ml)	Ratio ^a
A ₁	80000	99836	90265	0.9041
A ₂	80000	885449	9296	1.1214
B ₁	240000	239375	252831	1.0562
C ₁	180000	185881	185389	0.9973
C ₂	200000	221352	216903	0.9799
D ₁	120000	67154	73824	1.0993
E ₁	80000	40853	39836	0.9751
F ₁	80000	35416	44638	1.2604

^a Reticulocyte counting method vs polycythaemic mice method

3 讨 论

1) 从两种方法的线性范围及灵敏度结果可以看出 ,多血小鼠法的线性范围在低浓度区域 ,灵敏度较高。目前中国药品生物制品检定所提供的标准品为 10 IU /支 ,多血小鼠法每次实验只用 1 支即可 ,而网织红细胞法需用 15 支 ,用量太大。大剂量的标准品仍在标定过程中 ,目前还不能满足厂家的需要 ,厂家仍要采用厂内工作标准

2) 从对不同厂家送检样品的测定结果可以看出 ,两种方法结果一致。样品 A B C 的体内生物学活性与标示效价基本一致 (± 30%) ,但样品 D E F 的体内生物学活性与标示效价差异较大。究其原因 ,主要是由于生产工艺不成熟 ,不完善 ,rhEPO

糖基化程度达不到要求所致。rhEPO的糖基,特别是其糖基的末端唾液酸,对其体内生物学活性至关重要^[4]。rhEPO脱N-糖基或脱N-糖基末端唾液酸后,很容易被肝脏乳糖苷受体结合,很快被清除出循环系统,造成其体内生物学活性大大降低或丧失,而其它质控指标,如体外生物学活性、免疫学活性等则可能无明显变化。所以体内生物学活性的检测对保证rhEPO的质量至关重要。

3) 多血小鼠法是测定rhEPO体内生物学活性的经典方法,美国安近公司、德国宝灵曼公司、日本麒麟公司均采用该方法作为rhEPO的质控手段,说明该法是真正可以信赖的方法。但该法实验周期长,需要对动物进行预处理,操作复杂,人员劳动强度大,实验成本高,而且需要同位素⁵⁹Fe,对放射性防护要求高,所以迫切需要一种新方法取而代之。

网织红细胞法是日本Hayakawa等人^[2]于1992年提出的新方法,1995年日本麒麟公司已采用该方法测定rhEPO体内生物学活性,并取代了多血小鼠法。目前准确计数网织红细胞应采用自动流式细胞仪,但该仪器太昂贵,不适合常规检验,所以他们采用的计数方法为:从小鼠眶后静脉丛取血,经适当稀释,加入适量溶血试剂将红细胞及成熟的网织红细胞溶解,然后采用自动微粒计数器计数未溶解的不成熟网织红细胞。经反复对比实验,

证明两种方法的计数结果呈良好的线性相关关系。但国内由于条件的局限,仍采用染色后显微镜下人工计数的方法,工作强度大,实验人员长时间工作,难免主观性因素造成的实验误差。

所以就目前情况看,完全以网织红细胞法代替多血小鼠法还为时过早,仍然需要实验条件及方法的进一步完善,如大剂量标准品的尽早标定,计数仪器的配备等。为了既保证rhEPO的产品质量,又能减轻药厂的负担,我们认为新报批的产品必须经药检机构采用多血小鼠法进行体内生物学活性测定,结果合格后才能批准进入临床研究。经临床实验证明其产品质量符合规定的厂家,可以以网织红细胞法替代多血小鼠法。

参考文献

- 1 Cotes PM, Bangham DR. Bio-assay of erythropoietin in mice made polycythaemic by exposure to air at a reduced pressure. *Nature*, 1961, **191**: 1065
- 2 Hayakawa T, Wada M, Mizuno K, *et al.* Simple *in vivo* bioassay without radioisotopes for recombinant human erythropoietins. *Biologicals*, 1992, **20**: 243
- 3 刁勇,古卓良,周勇等.重组人红细胞生成素体内生物学活性检测. *中国生化药物杂志*, 1996, **17**(3): 104
- 4 Margaret SD, Wang FF, Eugene G. The role of carbohydrate in erythropoietin action. *Endocrinology*, 1985, **116**(6): 2293

Comparison of Two Bioassay Methods to Determine the *in vivo* Biological Activity of rhEPO

Diao Yong, Lu Guiping, Lu Jun, Zhou Yong¹, Gu Zhuoliang, Su Jian
Nanjing Military Institute for Drug Control, Nanjing 210002; ¹National Institute for Drug Control of Pharmaceutical and Biological Products, Beijing 100050

Abstract Two bioassay methods were compared to determine the *in vivo* biological activity of rhEPO preparations produced by different manufacturers. The results suggested that the polycythaemic mice method was sensitive, reliable and reproducible, and the biological activity of newly applied product must be determined by this method, but the usage of radioactive compound and preliminary treatment of animals made it complicated; the reticulocyte counting method was simple and easy, and the sensitivity, reliability and reproducibility were acceptable for routine *in vivo* bioassay, so it could be used in place of the polycythaemic mice method for manufacturers.

Key words rhEPO; *In vivo* biological activity; Reticulocyte; Polycythaemic mice