

鹿瓜多肽体外活性测定方法的探讨研究

王灿,董闪闪,王自强,邵泓,陈钢*

(上海市食品药品检验所,上海 201203)

摘要 目的: 建立鹿瓜多肽体外活性测定方法。**方法:** 根据鹿瓜多肽药理作用机制,选用敏感骨细胞株作为试验对象,CCK-8 比色法探讨鹿瓜多肽对骨细胞株的增殖促进作用。同时对试验条件,包括培养基、细胞接种密度、药物作用时间、胎牛血清(FBS)浓度等进行探讨,建立鹿瓜多肽体外活性测定方法。对该方法线性、重复性进行验证,同时用该方法对2个厂家分别生产的鹿瓜多肽注射液和注射用鹿瓜多肽样品进行活性测定。**结果:** 鹿瓜多肽对大鼠骨肉瘤细胞株(UMR106 细胞株)具有增殖促进作用。选用不含谷氨酰胺,含1% FBS的DMEM培养液进行试验,细胞接种密度为 2×10^4 个 \cdot mL $^{-1}$,药物作用细胞72 h,药物质量浓度在0.5~4 mg \cdot mL $^{-1}$ 范围内,鹿瓜多肽对UMR106 细胞株具有增殖促进作用,刺激指数可达2.97。对该方法进行方法学验证:鹿瓜多肽质量浓度在0.5~4 mg \cdot mL $^{-1}$ 范围内,以药物浓度为横坐标,吸收度值为纵坐标进行线性拟合,相关系数(R^2)分别为0.971和0.968,均大于0.95,线性良好;对2个厂家生产的鹿瓜多肽注射液和注射用鹿瓜多肽样品重复测定3次,刺激指数平均值分别为2.72和1.86,RSD分别为9.6%和3.9%。**结论:** 该方法可用于鹿瓜多肽体外活性测定。

关键词: 鹿瓜多肽;大鼠骨肉瘤细胞株;CCK-8 比色法;活性测定

中图分类号: R 917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793(2018)07-1196-06

doi: 10.16155/j.0254-1793.2018.07.14

Research on the method for determining the *in vitro* activity of Cervus and Cucumis polypeptide

WANG Can, DONG Shan-shan, WANG Zi-qiang, SHAO Hong, CHEN Gang*

(Shanghai Institute for Food and Drug Control, Shanghai 201203, China)

Abstract Objective: To establish the method to determine the *in vitro* activity of Cervus and Cucumis polypeptide. **Methods:** According to the pharmacological mechanism of Cervus and Cucumis polypeptide, the different sensitive bone cell strains were chosen, and CCK-8 method was applied to evaluate the proliferation activity of the Cervus and Cucumis polypeptide on bone cell strains. Experiment conditions, including media, cell density, drug incubation time and concentration of fetal bovine serum (FBS) concentration, etc., were explored. Then, the method for the detection of *in vitro* activity of Cervus and Cucumis polypeptide was established. The linearity and reproducibility of the method were validated. This method was applied for the determination of the activities

* 通信作者 Tel:(021)50798175; E-mail: chengang@smda.gov.cn

第一作者 Tel:(021)50798177; E-mail: wangcancan3860@126.com

of the Cervus and Cucumis polypeptide samples from 2 different manufacturers. **Results:** Cervus and Cucumis polypeptide enhanced the proliferation of rat osteosarcoma cell strain (UMR106 cell strain). DMEM medium without glutamine but containing 1% FBS was chosen. Cell density was $2.0 \times 10^4 \text{ mL}^{-1}$ and the drug incubation time was 72 hours. The concentration of drug was between $0.5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ and $4 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$. The Cervus and Cucumis polypeptide could promote the proliferation of UMR-106 cells, and the stimulation index could reach 2.97. As for the validation, the drug concentration was plotted on the abscissa and the absorbance value was plotted on the ordinate. With concentration of Cervus and Cucumis polypeptide between $0.5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ and $4 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, the linearity of the method was good, correlation coefficients R^2 were 0.971 and 0.968, respectively (both more than 0.95). The activities of Cervus and Cucumis polypeptide samples from two different manufacturers were evaluated 3 times, and the average stimulation indexes were 2.72 and 1.86 with RSD 9.6% and 3.9%, respectively.

Conclusion: The method is suitable for determining the *in vitro* activity of Cervus and Cucumis polypeptide.

Keywords: Cervus and Cucumis polypeptide; rat osteosarcoma cell line; CCK-8 colorimetric assay; activity determination

鹿瓜多肽是由鹿科动物梅花鹿的骨骼和葫芦科植物甜瓜的干燥成熟种子,经分别提取后制成的灭菌水溶液^[1];适用于风湿、类风湿性关节炎、骨折的早期愈合、骨关节炎、腰腿疼痛及创伤恢复等^[2-5]。鹿瓜多肽主要含有骨诱导多肽、甜南瓜肽、游离氨基酸和多种有机钙、磷等元素,其中骨诱导多肽能有效促进人体骨形态发生蛋白、转化生长因子 β 、成纤维细胞生长因子等影响骨形成和骨吸收衍生生长因子的合成,参与骨代谢的调节,在促进新骨形成的同时,抑制骨的吸收,从而增加骨质疏松症患者的骨密度^[6]。

目前仅1家鹿瓜多肽国家注册标准采用大鼠骨折模型评价其炎症愈合作用。本文研究建立了一种基于骨细胞株的鹿瓜多肽体外活性测定方法,并用该方法分别对2个厂家生产的鹿瓜多肽注射液和注射用鹿瓜多肽进行了活性测定。

1 仪器和材料

Thermo Series 8000WT型CO₂培养箱,MD M5°酶标仪,Labconco Free Zone®型冻干机。

3个细胞株(大鼠骨肉瘤UMR106细胞株、小鼠颅顶前骨MC3T3-E1细胞株、人SV40转染成骨细胞株)均购至中国科学院上海生命科学研究院生物化学与细胞生物学研究所。

含谷氨酰胺的DMEM高糖培养液(厂家:Gibco;货号:12800-017)、不含谷氨酰胺的DMEM高糖培养液(厂家:Gibco;货号:10313-021)、MEM培养液(厂家:Gibco;货号:11900024)、MEM/F12培养

液(厂家:Gibco;货号:12400024),4℃保存。

完全培养液:量取胎牛血清(FBS)10 mL,加含谷氨酰胺的DMEM高糖培养液90 mL,混匀,4℃保存。

维持培养液:量取胎牛血清(FBS)1 mL,加不含谷氨酰胺的DMEM高糖培养液99 mL,混匀,4℃保存。

样品稀释液:本试验探讨了3种样品稀释液对试验结果的影响。样品稀释液1:含10%FBS的无谷氨酰胺DMEM培养液;样品稀释液2:含1%FBS的无谷氨酰胺DMEM培养液;样品稀释液3:含10%FBS的含谷氨酰胺DMEM培养液。

磷酸盐缓冲液(DPBS)(厂家:Gibco;货号:14190-144)。

胰蛋白酶(厂家:Gibco;货号:25200-056)。

CCK-8试剂盒(同仁化学研究所,货号CK04),4℃保存。

本研究选用了2个厂家生产的样品,分别是厂家A生产的鹿瓜多肽注射液(批号:20160115;规格:2 mL:4 mg),厂家B生产的注射用鹿瓜多肽(批号:1501217;规格:8 mg·支⁻¹)。

2 方法

2.1 细胞株的培养

大鼠骨肉瘤UMR106细胞株用完全培养液,小鼠颅顶前骨MC3T3-E1细胞株用含10%FBS的MEM培养液,人SV40转染成骨细胞株用含10%FBS的MEM/F12培养液于37℃、5%CO₂的培养箱内进行培

养。选择细胞状态良好,处于对数生长期的细胞进行试验。

2.2 鹿瓜多肽活性测定方法简介

选用处于对数生长期的骨细胞株,制备一定密度的细胞悬液,每孔 100 μL 接种于 96 孔细胞培养板。待细胞贴壁后,加入不同浓度的鹿瓜多肽溶液,培养一定时间,CCK-8 显色,测定加药组溶液吸收值。同时以样品稀释液代替药物溶液,进行试验,作为阴性对照组。

2.3 实验分组

实验分 2 组: 阴性对照组(不加样品溶液,加入同体积的稀释液)和加药组(加入不同浓度的样品溶液),以不加细胞的孔作为空白对照。

2.4 样品溶液的配制

将鹿瓜多肽注射液(质量浓度为 $2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)冷冻后,用冻干机进行冻干,用样品稀释液复溶,并配制成 4、2、1、0.5、0.25、0.12、0.06、0.03、0.015 和 $0.008 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的鹿瓜多肽注射液的样品溶液。

取注射用鹿瓜多肽 1 支,加样品稀释液 1 mL 复溶样品,制成 $8 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的溶液,再用样品稀释液配制成 4、2、1、0.5、0.25、0.12、0.06、0.03、0.015 和 $0.008 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的注射用鹿瓜多肽的样品溶液。

2.5 结果计算

按(加药组溶液吸收值 - 空白吸收值)/(阴性对照组吸收值 - 空白吸收值)计算刺激指数(SI),以刺激指数的大小评价鹿瓜多肽促骨细胞增长的

活性。

3 结果

3.1 关键试验参数的筛选

3.1.1 适合本试验细胞株的筛选 选用 3 种骨细胞株,大鼠骨肉瘤 UMR106 细胞株、小鼠颅顶前骨 MC3T3-E1 细胞株和人 SV40 转染成骨细胞株,按“2.2”项方法进行试验,接种细胞密度为 2×10^4 个 $\cdot \text{mL}^{-1}$,分别用含 1% FBS 含谷氨酰胺的 DMEM 培养液、MEM 培养液和 MEM/F12 培养液配制质量浓度为 2、1 和 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的样品溶液,作用细胞 3 d。样品溶液对 3 种细胞株的刺激指数测定结果见表 1; 结果表明鹿瓜多肽注射液对 UMR106 细胞和 MC3T3-E1 细胞株的增殖促进作用较注射用鹿瓜多肽明显,2 种样品溶液对人 SV40 转染成骨细胞无增殖促进作用。因鹿瓜多肽注射液对骨细胞有增殖促进作用,故对其测定结果做图(见图 1),图 1 表明鹿瓜多肽注射液对 UMR106 细胞的增殖促进作用最明显(刺激指数 $\text{SI} > 2.0$),对 MC3T3-E1 细胞有轻微的促增殖作用(刺激指数 SI 为 1.5~2.0),对人 SV40 转染成骨细胞无增殖促进作用(刺激指数 $\text{SI} < 1.5$),注射用鹿瓜多肽对 3 种骨细胞株均无增殖促进作用,但对 UMR106 细胞株的刺激指数大于 MC3T3-E1 和人 SV40 转染成骨细胞株。以上结果表明: 鹿瓜多肽对大鼠骨肉瘤 UMR106 细胞株增殖促进作用最明显,可选用该细胞株作为该方法的试验对象。

表 1 鹿瓜多肽对不同骨细胞株的增殖促进作用比较 ($n=3$)

Tab. 1 The comparison of the proliferation activity of Cervus and Cucumis polypeptide on different bone cell strains

样品 (sample)	样品浓度 (sample concentration) / ($\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)	不同细胞株进行试验所得刺激指数 (stimulation index from different cell strains)		
		UMR106	MC3T3-E1	人 SV40 转染成骨细胞株 (human SV40 transfected osteoblast strain)
鹿瓜多肽注射液 (Cervus and Cucumis polypeptide injection)	2	2.20	1.45	0.97
	1	2.05	1.40	0.99
	0.5	1.53	1.19	0.97
注射用鹿瓜多肽 (injection for Cervus and Cucumis polypeptide)	2	1.22	0.64	1.05
	1	1.34	1.19	1.12
	0.5	1.19	1.20	1.16

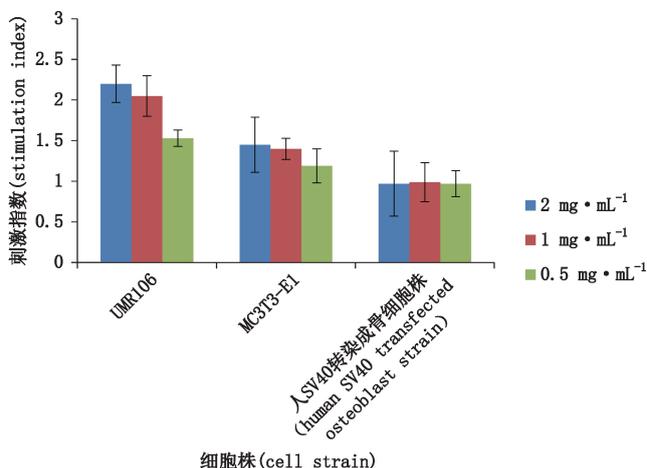


图1 鹿瓜多肽注射液对3种骨细胞株的增殖促进作用比较

Fig. 1 The comparison of the proliferation activity of Cervus and Cucumis polypeptide injection on three bone cell strains

3.1.2 细胞密度和作用时间的筛选 对该方法细胞密度和作用时间进行探讨。配制 8×10^4 、 4×10^4 和 2×10^4 个 · mL⁻¹ 密度的细胞悬液, 选用鹿瓜多肽注射液系列浓度进行试验, 样品稀释液为 UMR106 细胞株的完全培养液, 分别作用 UMR106 细胞株 1、2 和 3 d, 观察不同密度, 不同作用时间细胞的刺激指数。选择促进细胞增殖最明显的鹿瓜多肽样品溶液浓度, 计算刺激指数; 结果(见表2)表明鹿瓜多肽质量浓度在 0.06~4 mg · mL⁻¹ 范围内, 在 2×10^4 个 · mL⁻¹ 细胞密度悬液时, 样品溶液作用细胞 3 d 对细胞的增殖促进作用较明显。故选择 2×10^4 个 · mL⁻¹ 细胞密度, 样品溶液作用细胞 3 d 进行试验。但如何提高样品溶液对细胞的刺激指数, 也是后续需解决的问题。

表2 细胞密度和作用时间对试验结果的影响

Tab. 2 The effects of cell density and incubation time on the results

细胞密度 (cell density) / mL ⁻¹	不同作用时间的刺激指数 (stimulation index at different incubation time)		
	1 d	2 d	3 d
8×10^4	1.03	1.09	1.01
4×10^4	1.03	1.10	1.09
2×10^4	1.02	1.08	1.18

3.1.3 稀释液的探讨 为了提高鹿瓜多肽对 UMR106 细胞的刺激指数, 探讨稀释液对试验结果的影响。配制含 3 种样品稀释液(稀释液 1, 稀

释液 2 和稀释液 3,), 用 3 种稀释液配制 2×10^4 个 · mL⁻¹ 的 UMR106 细胞株悬液, $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的鹿瓜多肽注射液样品溶液作用细胞 3 d, 按“2.2”方法进行试验, 计算不同稀释液试验时样品对细胞株的刺激指数, 结果见表 3, 该结果提示使用稀释液 2 即含 1%FBS 的无谷氨酰胺培养液, 能得到较理想的结果。

表3 不同稀释液对试验结果的影响 (n=3)

Tab. 3 The effects of dilute solution on the results

稀释液 (diluted solution)	刺激指数 (stimulation index)			刺激指数平均值 (average stimulation index) ± SD
1	1.56	1.42	1.43	1.47 ± 0.08
2	2.32	1.75	1.63	1.90 ± 0.37
3	1.02	1.11	0.72	0.95 ± 0.20

3.2 试验方法的确定

经过以上试验, 确定了适合该试验的参数, 选用 UMR106 细胞株, 试验稀释液为含 1%FBS 的无谷氨酰胺培养液, 即维持培养液, 细胞密度为 2×10^4 个 · mL⁻¹, 样品溶液作用细胞 3 d, CCK-8 细胞染色, 计算刺激指数。

3.3 试验方法的验证及应用

对该方法的线性和重复性进行了验证。

将鹿瓜多肽注射液进行冻干, 同时取注射用鹿瓜多肽 1 支, 用维持培养液分别配制鹿瓜多肽质量浓度为 4、2、1、0.5、0.25、0.125、0.06、0.03 和 0.015 mg · mL⁻¹ 的样品溶液, 进行试验。以鹿瓜多肽质量浓度为横坐标, 以吸收值 A 为纵标准进行线性拟合(见图 2 和 3)。3 次试验结果表明鹿瓜多肽质量浓度在 4~0.5 mg · mL⁻¹ 范围内, 浓度和 A 值呈现较好的线性关系, R² 分别为 0.971 和 0.968, 表明该方法线性良好。

选择以上对细胞增殖最明显的鹿瓜多肽质量浓度计算其刺激指数, 鹿瓜多肽注射液在 $2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时对细胞的增殖刺激作用最明显, 注射用鹿瓜多肽在 $4 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时对细胞的增殖刺激作用最明显。3 次试验刺激指数及其 RSD 见表 4, 表明 2 种样品 3 次试验结果的 RSD 均低于 10%, 不同厂家的样品对细胞增殖刺激作用不同。

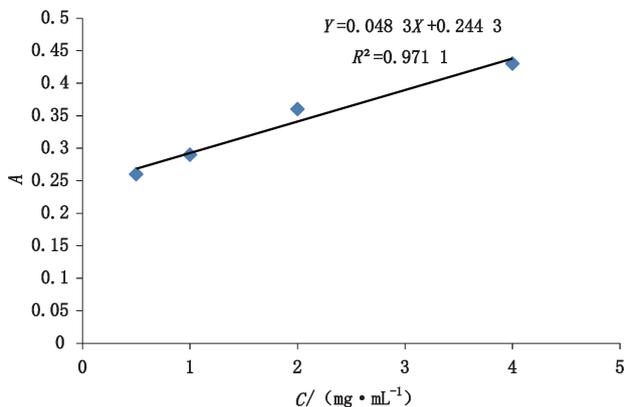


图2 鹿瓜多肽注射液样品浓度和A值之间线性关系图谱

Fig. 2 The linearity between the concentration of Cervus and Cucumis polypeptide injection and A value

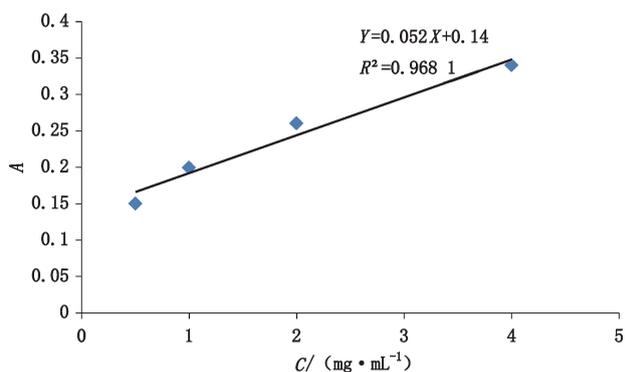


图3 注射用鹿瓜多肽样品浓度和A值之间线性关系图谱

Fig. 3 The linearity between the concentration of injection for Cervus and Cucumis polypeptide and A value

表4 样品测定结果及方法的重复性

Tab. 4 Detection results of samples and the reproducibility of the methods

样品 (sample)	试验次数 (test time)	刺激指数 (stimulation index)	RSD/ %	刺激指数 平均值 (average stimulation index) ± SD
鹿瓜多肽注射液 (Cervus and Cucumis polypeptide injection)	1	2.45	9.6	2.72 ± 0.26
	2	2.75		
	3	2.97		
注射用鹿瓜多肽 (injection for Cervus and Cucumis polypeptide)	1	1.81	3.9	1.86 ± 0.07
	2	1.82		
	3	1.94		

4 讨论

鹿瓜多肽为从动植物中提取的多组分生化药,在临床上可有效促进患者骨折愈合^[7-8]。目前的质

量标准较简单,缺乏相应的促骨细胞增殖指标。本研究建立了一种新的鹿瓜多肽促骨细胞增殖评价方法,该方法选用大鼠骨肉瘤 UMR106 细胞株作为试验对象,该细胞株体外培养较容易,也较易获得,有益于该方法的推广应用。

本试验探讨了关键参数对试验结果的影响。其中,稀释液的选择是本试验研究的关键。研究表明:用含 10%FBS 含谷氨酰胺的培养液进行试验时,鹿瓜多肽对细胞的增殖促进作用并不明显,但用含 1%FBS 不含谷氨酰胺的培养液进行试验时,鹿瓜多肽对细胞的增殖促进作用较明显。因 FBS 和谷氨酰胺均是促细胞增殖的物质,它们对细胞的增殖促进作用掩盖了鹿瓜多肽对细胞的增殖促进作用,故需用含 1%FBS 不含谷氨酰胺的培养液进行试验。这和之前对肝水解肽体外活性测定方法研究的结果^[9]一致。

刺激指数是评价细胞增殖活性的一个指标^[10-11]。行业内认为,刺激指数大于 4,表明对细胞有明显增殖促进作用;大于 2,表明对细胞有增殖促进作用;在 1.5~2.0 之间对细胞有轻微的增殖促进作用;小于 1.5 对细胞无增殖促进作用。本试验结果表明鹿瓜多肽注射液对大鼠骨肉瘤 UMR-106 细胞株有增殖促进作用。

岳云飞等^[12]研究报告了四甲基噻唑蓝 (MTT) 法测定注射用鹿瓜多肽活性的方法。该方法选用的细胞模型为人成骨肉瘤 MG-63 细胞株,培养时间为 96 h,显色方法为 MTT 法,样品对细胞的刺激指数最高达 2.5。本文建立的方法选用大鼠骨肉瘤 UMR106 细胞株,试验时间为 72 h,显色方法为 CCK-8 显色,样品对细胞的增殖刺激作用最大可达 2.97。而且,本研究还进行了线性和重复性验证,结果表明该方法线性和重复性均良好。和报道的 MTT 法^[12]进行比较,本文建立的试验方法的试验时间更短,选用的细胞株对鹿瓜多肽刺激更敏感。试验染色剂为 CCK-8,是 MTT 的一种升级替代产品,其测定原理和 MTT 法相似,但测定时不需要有机溶剂 DMSO 对染料进行溶解,操作更安全方便,测定结果更稳定^[13-15],因此,本文建立的试验方法明显优于 MTT 法,该方法操作简单,实验重复性好,为该类产品质量控制提供了方法学依据。

该方法初步用于不同厂家鹿瓜多肽促骨细胞增殖活性的比较,发现不同厂家的产品促骨细胞增殖活性差异较大,故应扩大该方法在不同厂家不同批次产

品促骨细胞增殖的应用研究,为该产品促骨细胞增殖活性限度的制定提供依据。

参考文献

- [1] 彭昊,汪喆,李章华,等. 鹿瓜多肽注射液促进骨折愈合过程中血管内皮生长因子表达的机制[J]. 中国临床康复, 2006, 10(37): 81
PENG H, WANG Z, LI ZH, *et al.* Mechanism of Cervus and Cucumis polypeptide injection in promoting the expression of vascular endothelial growth factor in the fracture healing[J]. *Chin J Clin Rehabil*, 2006, 10(37): 81
- [2] 吴晓光. 鹿瓜多肽对骨质疏松性骨折术后骨生长过程中炎症因子影响研究[J]. 辽宁中医药大学学报, 2018, 20(1): 170
WU XG. Study on the effects of application of Cervus and Cucumis polypeptide in postoperative osteoporotic fracture and its influence on bone metabolism and bone mineral density[J]. *J Liaoning Unive Tradit Chin Med*, 2018, 20(1): 170
- [3] 罗东方,詹志军,代百发. 鹿瓜多肽治疗膝骨关节炎的疗效观察[J]. 中国医院用药评价与分析, 2016, 16(10): 1334
LUO DF, ZHAN ZJ, DAI BF. Observation on efficacy of Cervus and Cucumis polypeptide in treatment of knee osteoarthritis[J]. *Eval Anal Drug Use Hosp China*, 2016, 16(10): 1334
- [4] 曾乐天. 鹿瓜多肽注射液治疗类风湿性关节炎临床疗效[J]. 海峡药学, 2016, 28(1): 106
ZENG LT. Clinical effectiveness for treatment of rheumatoid arthritis by Cervus and Cucumis polypeptide injection[J]. *Strait Pharm J*, 2016, 28(1): 106
- [5] 陈友银. 鹿瓜多肽治疗创伤性骨折的临床疗效[J]. 中国中西医结合外科杂志, 2017, 23(3): 250
CHEN YY. Clinical effectiveness for treatment of traumatic fractures by Cervus and Cucumis polypeptide injection[J]. *Chin J Surg Integr Tradit West Med*, 2017, 23(3): 250
- [6] 林文鑫. 鹿瓜多肽的药理作用和临床应用[J]. 实用全科医学, 2006, 4(6): 730
LIN WX. Pharmacological effect and clinical application of Cervus and Cucumis polypeptide[J]. *Appl J Gen Pract*, 2006, 4(6): 730
- [7] 徐文艳. 鹿瓜多肽治疗骨折患者的疗效及护理分析[J]. 临床护理, 2017, 15(15): 258
XU WY. Nursing analysis and clinical effects of Cervus and Cucumis polypeptide on the treatment of fracture[J]. *J Clin Nurs*, 2017, 15(15): 258
- [8] 杨杰,张殿英. 接骨七厘片联合鹿瓜多肽治疗四肢骨折的疗效观察[J]. 现代药物与临床, 2018, 33(2): 368
YANG J, ZHANG DY. Clinical observation of Jiegu Qili tablets combined with Cervus and Cucumis polypeptide in treatment of limb fracture[J]. *Drugs Clin*, 2018, 33(2): 368
- [9] 林上炎,王灿,邵红,等. 肝水解肽体外活性测定方法的优化[J]. 中国医药工业杂志, 2013, 44(6): 600
LIN SY, WANG C, SHAO H, *et al.* Optimization of bioassay method of liver hydrolysates *in vitro*[J]. *Chin J Pharm*, 2013, 44(6): 600
- [10] 吴耀松,尹素改,任闪闪,等. 六君子汤对食管癌 EC-9706 细胞株树突状细胞成熟的影响[J]. 中医杂志, 2018, 59(6): 508
WU YS, YIN SG, REN SS, *et al.* Effect of six gentlemen decoction on the maturation of dendritic cells in esophageal cancer cell line EC-9706[J]. *J Tradit Chin Med*, 2018, 59(6): 508
- [11] 陈书明,贾丹,王志强,等. 复方中药对感染 NIB 鸡淋巴细胞刺激指数的影响[J]. 山西农业大学学报, 2009, 29(6): 575
CHEN SM, JIA D, WANG ZQ, *et al.* Effects of compound Chinese herbal medicine on the stimulation indexes of the lymphocytes in the chicks infected by nephropathogenic infectious bronchitis virus[J]. *J Shanxi Agric Univ*, 2009, 29(6): 575
- [12] 岳云飞,张丽英. MTT 法测定注射用鹿瓜多肽活性[J]. 黑龙江医药, 2011, 24(3): 248
YUE YF, ZHANG LY. Determination of the activity of Cervus and Cucumis polypeptide for injection with MTT[J]. *Helongjiang Med Pharm J*, 2011, 24(3): 248
- [13] 刘素贞,曹晓敏,许丽娟,等. 应用 CCK8 法检测鸡淋巴细胞活性的检测最佳条件研究[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2017(13): 212
LIU SZ, CAO XM, XU LJ, *et al.* Study on the best condition for detection of chicken lymphocyte activity by CCK8[J]. *Helongjiang Anim Sci Vet Med*, 2017(13): 212
- [14] 王灿,吴利红,史芳亮,等. 肝水解肽体外活性测定方法的探讨[J]. 药物分析杂志, 2011, 31(10): 1982
WANG C, WU LH, SHI FL, *et al.* Research on the method for determining the bioactivity of liver hydrolysates *in vitro*[J]. *Chin J Pharm Anal*, 2011, 31(10): 1982
- [15] 王灿,林上炎,吴利红,等. 注射用核糖核酸 II 的抗肿瘤活性测定[J]. 中国医药工业杂志, 2015, 46(4): 375
WANG C, LIN SY, WU LH, *et al.* Determination of anti-carcinoma activity of ribonucleic acid II [J]. *Chin J Pharm*, 2015, 46(4): 375
(本文于 2017 年 8 月 9 日收到)