

生长激素标准品历程及其计量单位

李湛军, 郝苏丽, 范慧红

(中国药品生物制品检定所, 北京 100050)

摘要: 综述了生长激素国际标准品和国家标准品研究的发展历程, 及生长激素表示单位的变化。

关键词: 生长激素; 标准品; 计量单位

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793(2009)12-2179-05

Development of standards for growth hormone and its measuring unit

LI Zhan-jun, HAO Su-li, FAN Hui-hong

(National Institute for the Control of Pharmaceutical and Biological Products, Beijing 100050, China)

Abstract Overview of the development of international standards and national standards for growth hormone (GH) and its defined units changed.

Key words GH; standard; measuring unit

1 背景介绍

早在上世纪 20 年代人们就发现了由大脑垂体前叶分泌的一种可促进生长的活性物质——生长激素 (growth hormone, GH), 30~40 年代由 Marx 等学者建立了去垂体大鼠体重增加法, 用于测定 GH 的生物活性, 评价牛 GH 在临床的治疗功效, 并定义为去垂体大鼠体重增加 10 g 所需 GH 的量为 1 个单位, 由于大鼠种属来源、饲养环境、检验时间地点等诸多因素造成结果不确定性, 迫切需要有一个统一的标尺, 这就是标准品。而国际标准品 (international standard, IS) 是由世界卫生组织 (World Health Organization, WHO) 组织有条件的国家检定机构和药厂参加国际协作标定, 生物类 IS 的单位数值由 WHO 的生物标准化专家委员会 (Expert Committee on Biological Standardization, ECBS) 开会研究决定的, 并遵循使用原则: 供试品应与标准品同质 (like against like)^[1-3]。

2 生长激素国际标准品及参考品的演变历史

2.1 动物来源生长激素国际标准品 第 1 个标准品为牛源性生长激素, 1st bGH IS 1955 年 WHO 为生物测定制备了第 1 次牛生长激素 (bovine growth hormone: bGH) IS 批号 55/1^[2] (表 1), 有 3 个实验室参加协作标定, 以体内的生物测定方法标定, 由于

当时没有国际公认的 GH 标准品作对照, 因而其单位制定是根据 55/1 的 IS 最低活性基线来规定的, 即 $1.0 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$ 。

2.2 人原性生长激素国际参考品 1st hGH RP 随着 GH 临床内分泌学研究深入, 1956 年探明人 GH 的种属特异性, 明确人使用动物 GH 无效。1957 年首次从人脑垂体中提取出人生长素 (human GH: hGH), 20 世纪 60 年代提纯的人垂体源 GH 用于临床, 同时开始应用放射免疫技术测定 GH, 因此 1969 年 WHO 为免疫测定制备了第 1 次人 GH 国际参考品 (international reference preparation, IRP hGH) 批号 66/217^[2] (表 1), 原料正是由人脑垂体提取的 hGH, 有 4 个实验室参加了协作标定, 以企业标准品为对照用免疫测定方法标定, 结果为 $50 \sim 400 \mu\text{g} \cdot \text{amp}^{-1}$ (ampoule amp) 平均 $200.7 \mu\text{g} \cdot \text{amp}^{-1}$, 接近标示含量 $175 \mu\text{g} \cdot \text{amp}^{-1}$, 初步的在体生物测定标定结果 $2 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$, 为与 bGH 的 IS 表示单位一致, WHO 的 ECBS 决定以 U 表示含量, 正式定义 (也是硬性规定) 本批: $0.35 \text{ U} \cdot \text{amp}^{-1}$, 大约 $0.175 \text{ mg} \cdot \text{amp}^{-1}$ 为附加信息, 尽管 hGH 与 bGH 不同质, 属于 2 个不同的生物制剂, 但保持了 bGH 的 IS 延续性、量值的传递。

2.3 人源性生长激素国际标准品 1st hGH IS

1982年 WHO 为生物测定制备了第 1次 hGH 国际标准品,批号 80/505^[4](表 1),随后在 1987年由于 66/217 RP发完,又规定为生物测定和免疫测定共用(用于当时的所有检测方法)。该批原料是人脑垂体源性的 hGH。有 10个国家的 22个实验室参加国际协作标定:以 55/1 hGH 的 IS 为对照用去垂体大鼠的在体生物测定方法标定结果为 1~ 6 U·

amp⁻¹,以 66/217 IRP为对照用免疫测定方法标定结果为 3~ 9 U· amp⁻¹,由于 55/1 hGH 与 hGH 不同质,且在体生物测定法与免疫测定法测定结果差异有显著性意义,故结合 2种方法 3~ 6 U· amp⁻¹为共有,取其均值,WHO 的 ECBS 定义 80/505 的 IS 生物效价为 4.4 U· amp⁻¹,1.7 mg· amp⁻¹和大约 2.5 U· mg⁻¹为附加信息。

表 1 GH 国际标准品
Tab 1 International standards for GH

批号 (code)	制备时间 (date of establishment)	名称 (title)	应用 (application)	标定 (calibration)	单位量 (unitage)
55/1	1955	1 st hGH IS	生物测定 (bioassay)	硬性规定 (arbitrary)	1.0 U· mg ⁻¹
66/217	1969	1 st hGH IRP	免疫测定 (immunoassay)	以 55/1 为对照生物测定的 U; 以地方标准为对照免疫测定的 mg [By bioassay against 55/1 in U; By immunoassay against local standard(in mg)]	0.35 U· amp ⁻¹ , 2 U· mg ⁻¹ , 大约 0.175 mg· amp ⁻¹ (Approximately 0.175 mg/ampoule)
80/505	1982	1 st hGH IS	生物测定 (最初) 当时的所有方法 (随后) [bioassay (initially); all assay methods(subsequently)]	以 55/1 为对照生物测定的 U; 以 66/217 为标准品免疫测定的 U (by bioassay against 55/1, in U; By immunoassay against 66/217, in U)	4.4 U· amp ⁻¹ , 2.5 U· mg ⁻¹ 大约 1.7 mg· amp ⁻¹ (approximately 1.7 mg/ampoule)
88/624	1994	1 st hGH IS	所有测定方法 (all assay methods)	以 80/505 为对照生物测定和免疫测定; 以企业内部标准品为对照理化方法测定 (by bioassay and immunoassay against 80/505. By physicochemical methods in absolute terms)	2 mg· amp ⁻¹ , 3.0 U· mg ⁻¹ (国际规定 hGH 特有活性固定值) (specific activity of somatotropin fixed at 3 U· mg ⁻¹ by international agreement)
98/574	1998	2 nd hGH IS	所有测定方法 (all assay methods)	以 88/624 为对照理化测定, 生物测定验证 (by physicochemical methods against 88/624 assignment to be confirmed by bioassay)	1.95 mg· amp ⁻¹ 3.0 U· mg ⁻¹

2.4 hGH 研究历程 20 世纪 80 年代由于美国 FDA 公布垂体源性 hGH 带有阮病毒,致人死亡,各国相继停用。而随着基因重组、生物工程技术的迅猛发展,美国 Genentech 公司作为全球第 1 家生物技术公司,率先研制成功 DNA 重组技术生产的 hGH (recombinant DNA - derived hGH, rhGH),并被批准上市在临床大范围使用,使 GH 缺乏的矮小症患者得到治疗,如今在 Tumer 综合征、烧伤、慢性肾衰竭、抗衰老、治疗骨质疏松症、心血管疾病等方面得到广泛应用^[5-10]。目前基因工程方法生产 hGH 可分为 2 类,一类是在原核细胞中生产,另一类是在真核细胞中生产。由于 hGH 无糖链,在原核细胞中表

达不存在无翻译后修饰造成的影响,故大多数采用在原核细胞中生产;早期生产的是 N - 端带有 1 个 Met 残基的 rhGH,因病人易产生抗体 (50% ~ 80% 病人产生抗体)^[11],故研究生产无 Met 残基的 rhGH。20 世纪 90 年代大肠杆菌分泌型技术成为 hGH 生产的主流技术,即用分泌型载体,把 hGH 成熟蛋白的编码序列直接转录入高表达高分泌启动子和信号序列后面,在分泌过程中切去信号肽,使表达的 hGH 积累在细胞周质中,高效生产第五代 rhGH (表 2),而普通大肠杆菌胞内基因表达产生 Met-rhGH,要在加工纯化过程中用酶法除去 Met^[12-15]。

表 2 hGH 发展史
Tab 2 Phylogeny of hGH

hGH 代 (hGH generation)	年 (years)	hGH 生产方法 (way of prepared hGH)
第 1 代 (1st generation)	1950 s~ 1970 s	人垂体源性 hGH (human pituitary hGH)
第 2 代 (2nd generation)	1980 s 早期 (Early 1980 s)	大肠杆菌包涵体基因表达 rhGH (expression of rhGH by recombinant DNA technology in Escherichia coli inclusion)
第 3 代 (3rd generation)	1980 s 中期 (mid 1980 s)	普通大肠杆菌基因表达 rhGH (expression of rhGH by recombinant DNA technology in Escherichia coli)
第 3 代 (4th generation)	1980 s 后期 (Late 1980 s)	哺乳动物细胞基因表达 rhGH (expression of rhGH by recombinant DNA technology in mammal cell)
第 4 代 (5th generation)	1990 s	大肠杆菌分泌型基因表达 rhGH (expression of rhGH by recombinant DNA technology in secretion genetic engineering strain Escherichia coli)

2.5 重组人生长激素国际标准品

1st rhGH IS, 1994年 WHO 制备发行了第 1次 rhGH 国际标准品, 批号 88/624^[16], 原料为大肠杆菌中表达的、单一组分的 rhGH。迫于 rhGH 生产厂商强烈要求常规检定中取消去垂体大鼠在体生物测定法, 建立体外生物测定或理化测定方法的压力, WHO 考虑制备适用于生物测定和理化测定 2 种方法的 IS。有 12 个国家的 18 个实验室参加国际协作标定。以 80/505 IS 为对照, 用生物测定和免疫测定法测得生物效价平均值为 $6.7 \text{ U} \cdot \text{amp}^{-1}$; 以地方标准品为对照理化测定含量以及氨基酸分析, 结果蛋白含量 $1.98 \text{ mg} \cdot \text{amp}^{-1}$ (表 3), 故 WHO 的

表 3 第一次 rhGH 的 IS 国际协作标定结果

Tab 3 The first International Standard for somatropin (88/624: international collaborative study estimates of content

方法 (method)	标准品 (standard)	测定结果 (overall estimate)
氨基酸分析 (amino-acid analysis)	无 (绝对测定) [none (absolute determination)]	$1.98 \text{ mg} \cdot \text{amp}^{-1}$ (RSD= 2.88%)
排阻 HPLC (size-exclusion HPLC)	企业内部标准品 (in-house standard)	$2.07 \text{ mg} \cdot \text{amp}^{-1}$
在体生物测定 (in vivo bioassays)	80/505	$6.73 \text{ U} \cdot \text{amp}^{-1}$ 可信限 6.19–7.33 (fiducial limits 6.19–7.33)
离体生物测定 (in vitro bioassays)	80/505	$6.55 \text{ U} \cdot \text{amp}^{-1}$ 可信限 5.96–7.2 (fiducial limits 5.96–7.2)
免疫测定 (immunoassays)	80/505	$6.15 \text{ U} \cdot \text{amp}^{-1}$ 可信限 5.95–6.36 (fiducial limits 5.95–6.36)

2nd rhGH IS, 1998年因考虑发行速率, 88/624 IS 将在 3 年内发完, 故 WHO 又制备了 2nd rhGH 国际标准品, 批号 98/574^[18], 有 9 个国家的 16 个实验室参加国际协作标定, 检测项目包括 (i) 效价: 以 88/624 IS 为对照, 排阻 HPLC 方法测定。(ii) 纯度: 用反向 HPLC 方法测定相关蛋白百分比和用排阻 HPLC 方法测定聚合物、二聚体高分子蛋白百分比。(iii) 生物活性 (基于促进机体生长的在体生测方法或促细胞繁殖的离体生测方法)。(iv) 鉴别 (理化技术: 肽图、等电点、毛细管电泳等)。(v) 稳定性 (加速试验热处理样品的理化稳定性)。由于已达成国际共识: 成品常规检定取消生物测定而以理化测定代替, 单一组分纯品 rhGH 活性固定为 $3.0 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$, 生物测定仅用于验证原料具有生物活性并达到 $3 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$, 故仅有 1 个实验室采用去垂体大鼠胫骨法, 3 个实验室采用去垂体大鼠体重法, 2 个实验室采用促 FDC-P1 细胞繁殖的离体生测方法; 而 16 个实验室参与其它理化测定, 最后确定 98/574 的 2nd rhGH IS 为 $1.95 \text{ mg} \cdot \text{amp}^{-1}$, 活性为 $3.0 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$ 。

3 重组人生长激素国家标准品

3.1 第 1 次国家标准品 1st rhGH 国家标准品 (National Standards NS) 20 世纪 90 年代我国多家企业研制成功 rhGH, 迫切需要标准品, 而 IS 数量有

ECBS 正式定义 1st rhGH 的 IS 每支含量为 2 mg 蛋白 (rhGH 加相关杂质蛋白), 并定义 rhGH 纯品的活性固定为 $3.0 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$, 故本批 IS 的活性 $3.0 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$ 。尽管 80/505 IS 是垂体源性、非单一组分 rhGH, 与 88/624 的 IS 不同质, 但有计量单位一致性、量值传递的要求^[11], 故 U 和 mg 2 种表示单位并存。笔者所在实验室参加了本批 IS 国际协作标定中的在体生物测定, 即去垂体大鼠体重法和胫骨法, 是 12 个国家的 18 个实验室之一, 经刻苦练习, 掌握大鼠去除脑垂体的技术, 成功率达 50% 左右, 完成国际协作标定要求的 5 个独立实验结果^[17]。

限, 价格昂贵, 一般只用于各国标定国家标准品, 不可能用于常规检定, 因而 1997 年我国制备了首批 rhGH 国家标准品^[19], rhGH 和 Met-rhGH 2 种, 批号 0627-9701A 和 B, 原料由上海细胞所提供, 2 个实验室参加协作标定。以 80/505 和 88/624 的 IS 为对照, 在体生物测定法测定效价, 以 88/624 的 IS 为对照理化测定, 最后确定 rhGH $5.0 \text{ U} \cdot \text{amp}^{-1}$, $1.8 \text{ mg} \cdot \text{amp}^{-1}$; Met-rhGH $5.5 \text{ U} \cdot \text{amp}^{-1}$, $2.1 \text{ mg} \cdot \text{amp}^{-1}$ (表 4), 该标准品应用于所有测定方法。

3.2 第 2 次国家标准品 2nd rhGH NS, 2000 年制备了第 2 次 rhGH 国家标准品, 批号 635-200002, 签于要与国际定义的活性一致, 需要选用达到 $3.0 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$ 的原料, 经筛选用长春金赛药业有限责任公司生产的 rhGH 原料, 以 98/574 的 IS 为对照, 经理化测定最后确定 $1.0 \text{ mg} \cdot \text{amp}^{-1}$, 并在在体生物测定验证本批生物效价达到 $3.0 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$, 与国际定义活性一致。该标准品应用于所有测定方法。

3.3 第 3 次国家标准品 3rd rhGH NS, 2006 年因考虑发行使用较快, 批号 635-200002 rhGH 国家标准品将发完, 故又制备了第 3 次 rhGH 国家标准品, 批号 140635-200603, 选用长春金赛药业有限责任公司生产的 rhGH 原料, 经理化测定最后确定 $1.1 \text{ mg} \cdot \text{amp}^{-1}$, 后经在体生物测定验证本批生物活性

达到国际要求,故活性固定为 $3.0 \text{ IU} \cdot \text{mg}^{-1}$ 。该标准品应用于所有测定方法。

表 4 rhGH 国家标准品
Tab 4 National standards(NS for rhGH)

批号 (code)	制备时间 (date of establishment)	名称 (title)	原料来源 (bulk material source)	标定 (calibration)	单位量 (unitage)
0627-9701A	1997	1st rhGH NS	上海细胞所 (Shanghai Institute Cell Biology)	以 80/505 和 88/624 的 IS 为对照生物测定,以 88/624 的 IS 为对照理化测定 (by bioassay against 80/505 and 88/624. By physicochemical methods against 88/624)	$5.0 \text{ IU} \cdot \text{amp}^{-1}$ $1.8 \text{ mg} \cdot \text{amp}^{-1}$
0627-9701B	1997	1st Met- rhGH NS	上海细胞所 (Shanghai Institute Cell Biology)	$5.5 \text{ IU} \cdot \text{amp}^{-1}$, $2.1 \text{ mg} \cdot \text{amp}^{-1}$	
635-200002	2000	2nd rhGH NS	金赛药业 (Genescience Pharmaceuticals)	以 88/624 为对照理化测定,生物测定验证 (by physicochemical methods against 88/624 assignment to be confirmed by bioassay)	$1.0 \text{ mg} \cdot \text{amp}^{-1}$ $3.0 \text{ IU} \cdot \text{mg}^{-1}$
140635-200603	2006	3rd rhGH NS	金赛药业 (Genescience Pharmaceuticals)	以 88/624 为对照理化测定,生物测定验证 (by physicochemical methods against 88/624 assignment to be confirmed by bioassay)	$1.1 \text{ mg} \cdot \text{amp}^{-1}$ $3.0 \text{ IU} \cdot \text{mg}^{-1}$

4 生长激素标示的计量单位

生长激素通常采用能够表示其预期的体内生物效应及药效作用强度的单位标示,包括活性或质量标示。比活性是 GH 活性单位 (IU) 和质量单位 (mg) 之间的转换系数: 1955 年第 1 次牛 GH 的 IS 定义为 $1.0 \text{ IU} \cdot \text{mg}^{-1}$, 1969 年第 1 次 hGH 的 RP 为 $2 \text{ IU} \cdot \text{mg}^{-1}$, 1982 年第 1 次 hGH 的 IS 为 $2.5 \text{ IU} \cdot \text{mg}^{-1}$, 1994 年第 1 次 rhGH 的 IS 及 1998 年第 2 次 rhGH 的 IS 均为 $3.0 \text{ IU} \cdot \text{mg}^{-1}$, 由此可见比活性逐渐提高,表明代表同时代生产技术水平、反映当时产品质量的 IS 质量不断提高; 2nd 和 3rd rhGH NS 达到国际标准,与国际接轨活性定为 $3.0 \text{ IU} \cdot \text{mg}^{-1}$ 。早在 1992 年 WHO 就组织了对 rhGH 大型的理化测定代替生物测定方法的国际协作研究^[20], 由此 WHO 的 ECBS 提议 rhGH 的 IS 应活性单位 IU ($\text{IU} \cdot \text{mg}^{-1}$) 与含量 mg ($\text{mg} \cdot \text{amp}^{-1}$) 并存,并在 1993 年定义 rhGH 单一组分纯品的特有活性固定为 $3.0 \text{ IU} \cdot \text{mg}^{-1}$, 因当时被批准上市的 rhGH 生产厂的各种产品活性范围为 $2.6 \sim 3.3 \text{ IU} \cdot \text{mg}^{-1}$ 。过去提取的 GH, 只能采用生物测定法由标准品评估出有差异的活性 (IU), 现在 DNA 重组技术生产的 hGH, 可用物理化学方法 (HPLC) 测定含量, 像描述化学品一样以 mg 表示, 标示单位发生变化。对于活性国际上达成共识: 规定单一组分 rhGH 的重量 1 mg 相当于 3.0 活性单位 (IU), 即对 rhGH 赋以固定的“理论值”活性, 当 HPLC 测得含量 mg 后可按 $3.0 \text{ IU} \cdot \text{mg}^{-1}$ 换算活性单位 (IU)^[21]。目前英国药典 (BP) 和美国药典 (USP) 都规定产品研发过程中必

须用验证过的生物测定法证明生产出的成品具有促生长作用, 且每 mg 不低于 2.5 IU (USP 规定每 1 mg 不低于 2.0 IU), 而一旦得到药监局批准后制剂的检测可用物理化学方法替代生物测定, 并规定 (By convention) rhGH 制剂每 1 mg 无水 rhGH (scamotropin) 相当于 3.0 IU 生物活性, 符合规定的 rhGH 制剂都可按此定义换算理化测定的结果。由于国外制剂以 $\text{mg} \cdot \text{瓶}^{-1}$ 标示, 病人用量也都是以 mg 表示, 也由于 (IU) 单位的使用的历史惯性, 导致了科学文献中既出现以 IU 报告的 GH, 也出现以 mg 报告的 GH, 但国际上临床医生的用药都是按照国际定义的 $3.0 \text{ IU} \cdot \text{mg}^{-1}$ 折算的^[22, 23]。

5 国内待解决的问题

5.1 固定的活性值 由于中国药典 2005 年版对 rhGH^[14] 没有与国际共识的定义“每 1 mg 无水重组人生长激素生物活性为 3.0 IU ”, 故国内制剂折算活性比较混乱, 如注射用重组人生长激素规格: (1) 0.8 mg (2 IU); (2) 0.85 mg (2.5 IU); (3) 1.0 mg (2.5 IU); (4) 1.2 mg (3 IU); (5) 1.33 mg (4 IU); (6) 1.6 mg (4 IU); (7) 1.7 mg (4.5 IU); (8) 2.0 mg (5 IU); (9) 3.7 mg (10 IU); (10) 4.0 mg (10 IU); (11) 4.0 mg (12 IU)^[24], 即活性值为 $2.5 \text{ IU} \cdot \text{mg}^{-1}$, $2.7 \text{ IU} \cdot \text{mg}^{-1}$, $3.0 \text{ IU} \cdot \text{mg}^{-1}$ 不等, 与国际定义的 $3.0 \text{ IU} \cdot \text{mg}^{-1}$ 不符; 因此已提交国家药典委员会, 建议中国药典 2010 年版增加国际共识定义: 每 1 mg 无水重组人生长激素相当于 3.0 IU 的固定值, 制剂规格取消括弧内的 IU, 仅以 mg 标示, 完成计量单位的转换, 与国际接轨。

5.2 生物活性测定 中国药典 2005年版强调“本品为 DNA 重组技术生产, 必须在生产过程中, 用体内生物测定方法测定其生物效价, 每 1 mg 蛋白效价不得少于 2.5 IU”。对上述药典说明的理解, 各方有所不同, 一方面, 有些企业误解为生产中应批批检生物活性; 另一方面, 有些生产厂家认为理化测定方法已完全取代生物活性测定方法, 对 rhGH 产品很少测定生物活性, 甚至有的企业从没测定过。我们认为两方面的认识都有偏差, 带有极端性。虽然研究人员开展过理化测定与生物活性测定相关性研究的比较分析, 检测分析的技术条件和分辨能力决定两者之间存在相关性, 目前的常规检定中含量测定可以用理化测定代替生物测定, 但在生产过程中由于生产工艺、规模、技术条件及其它因素的变化, 使用单独开展理化检测的前提条件不够充分, 故应定期进行生物测定以验证理化替代及其相关性是否发生重大偏移, 增加对原料药每 1 年至少测定 1 次生物活性, USP 对 rhGH 原料药是有生物鉴别 (Bioidentity)^[25] 的。上述建议已提请国家药典委员对中国药典 2010年版的 rhGH 加以修改, 以进一步提高国内 rhGH 的生产水平, 保证产品质量。

致谢: 感谢长春金赛药业有限责任公司医学部吴芳对本文的帮助。

参考文献

- 1 Wood P. Growth hormone Its measurement and the need for assay harmonization. *Ann Clin Biochem*, 2001, 38 471
- 2 Bristow AF. International Standards for Growth Hormone *Horm Res*, 1999, 51(Suppl 1): 7
- 3 Trainer PJ, Barth J, Sturgeon C, et al. Consensus statement on the standardisation of GH assays *Eur J Endocrinol*, 2006, 155(1): 1
- 4 Bangham DR, Gaines - Das RE, Schulster D. The International standard for human growth hormone for bioassay: Calibration and characterization by international collaborative study. *Mol Cell Endocrinol* 1985, 42 269
- 5 Mazzanti L, Tamburrino F, Bergamaschi R, et al. Developmental syndromes growth hormone deficiency and treatment *Endocr Dev*, 2009, 14 114
- 6 Spiliotis BE. Recombinant human growth hormone in the treatment of Turner syndrome *Ther Clin Risk Manag*, 2008, 4(6): 1177
- 7 Branski IK, Hemdon DN, Barrow RE, et al. Randomized controlled trial to determine the efficacy of long-term growth hormone treatment in severely burned children. *Ann Surg*, 2009, Sep 2 (Epub ahead of print)
- 8 Nissel R, Fischer DC, Puhmann A, et al. Short-term growth hor-

- 9 monic treatment and microcirculation effects in patients with chronic kidney disease *Microvasc Res*, 2009, 78(2): 246
- 10 Johannsson G. Treatment of growth hormone deficiency in adults *Horm Res*, 2009, 71(Suppl1): 116
- 11 Barke A. Growth hormone and aging a challenging controversy. *Clin Interv Aging*, 2008, 3(4): 659
- 12 Massa G, Vanderschueren - Lodeweyckx M, Bouillon R. Five-year follow-up of growth hormone antibodies in growth hormone deficient children treated with recombinant human growth hormone *Clin Endocrinol*, 1993, 38(2): 137
- 13 Oliveira JE, Soares CR, Peroni CN, et al. High-yield purification of biosynthetic human growth hormone secreted in Escherichia coli periplasmic space. *J Chromatogr A*, 1999, 852(2): 441
- 13 Canova - Davis E, Baldonado P, Moore JA, et al. Properties of a cleaved two-chain form of recombinant human growth hormone. *Int J Pept Protein Res*, 1990, 35(1): 17
- 14 Andersson C, Edlund PO, Gellerfors P, et al. Isolation and characterization of a trisulfide variant of recombinant human growth hormone formed during expression in Escherichia coli. *Int J Pept Protein Res*, 1996, 47(4): 311
- 15 Koo TY, Park TH. Expression of recombinant human growth hormone in a soluble form in Escherichia coli by slowing down the protein synthesis rate. *J Microbiol Biotechnol*, 2007, 17(4): 579
- 16 Bristow AF, Gaines - Das R, Jeffcoate SL, et al. The First International Standard for Somatropin report of an international collaborative study. *Growth Regul*, 1995, 5(3): 133
- 17 LI Zhan - jun (李湛军), YAN An - zhuang (阎安庄). Investigation of bioassay of rhGH: I. Weight gain of hypophysectomized rats II. Tibial line widening in hypophysectomized rats (rhGH 生物测定方法的探讨: I. 去垂体大鼠体重法. II. 胫骨法). *Chin J Pharm Anal* (药物分析杂志), 1995, 15(2): 3
- 18 Bristow AF, Jespersen AM. The Second International Standard for somatropin (recombinant DNA - derived human growth hormone): preparation and calibration in an international collaborative study. *Biologicals*, 2001, 29(2): 97
- 19 LI Zhan - jun (李湛军), YANG Zhao - peng (杨昭鹏). Studies on standardization of the first national reference standard for recombinant DNA - derived human growth hormone: rhGH (首次 DNA 重组人生长激素 (rhGH) 国家标准品的研制). *Chin J Pharm Anal* (药物分析杂志), 1998, 18(1): 9
- 20 Bristow AF, Jeffcoate SL. Analysis of therapeutic growth hormone preparations report of an interlaboratory collaborative study on growth hormone assay methodologies. *Biologicals*, 1992, 20(3): 221
- 21 Wieringa GE. Growth hormone assay standardization a biased view. *Clin Endocrinol*, 2004, 60: 538
- 22 Billingmaier M. Problems with GH assays and strategies toward standardization. *Eur J Endocrinol*, 2008, 159(Suppl 1): S41
- 23 Billingmaier M, Strasburger CJ. Growth hormone assays current methodologies and their limitations. *Pituitary*, 2007, 10(2): 115
- 24 ChP (中国药典). 2005 Vol II (二部): 143
- 25 USP 32 Somatropin

(本文于 2009年 4月 29日收到)