

研究论文

隔离器内残留过氧化氢去污剂对MSCs和NK两种
细胞增殖及生物学特性的影响研究

李银花 欧阳军 赵振波 刘子健 俞佳 孙巍群*

(浙江泰林生物技术股份有限公司, 杭州 311400)

摘要 该文研究了特定过氧化氢去污剂残留量对间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)和自然杀伤细胞(natural killer cell, NK)的增殖及生物学特性的影响。采用低浓度过氧化氢去污剂建立特定残留量进行MSCs和NK细胞培养,应用细胞计数法分析细胞增殖能力,流式细胞术检测细胞表面标记,并采用诱导分化培养基定向诱导MSCs成骨、成脂、成软骨分化。结果显示, MSCs和NK细胞在3~5 mg/m³浓度的过氧化氢环境下形态正常且增殖活跃。流式细胞仪检测结果显示, MSCs的CD73、CD105、CD90均呈高表达, CD45、CD34、CD14、CD79a、HLA-DR为阴性表达; NK细胞表达CD56⁺和CD3⁻的百分比超过70%。诱导后, MSCs具有成骨、成脂、成软骨分化的潜能。总之, MSCs和NK细胞在含有低浓度的残留过氧化氢去污剂的培养环境中生长良好,与未含有过氧化氢去污剂的培养环境比较,增殖能力和分化潜能均无显著差异。

关键词 过氧化氢去污; MSCs; NK细胞; 过氧化氢残留; 隔离器

Effects of Residual Hydrogen Peroxide on the Proliferation and Biological
Characteristics of MSCs and NK Cells in an Isolator after Decontamination

LI Yinhua, OUYANG Jun, ZHAO Zhenbo, LIU Zijian, YU Jia, SUN Weiqun*

(Zhejiang Tailin Biotechnology Co., Ltd., Hangzhou 311400, China)

Abstract In this study, the effects of residual hydrogen peroxide disinfectant on the proliferation and biological characteristics of MSCs (mesenchymal stem cells) and NK (natural killer) cells were investigated. A low concentration of hydrogen peroxide disinfectant was used to establish a specific environment for MSCs and NK cell culture. The proliferation ability was analyzed by cell counting method, and cell surface markers were detected by flow cytometry. The differentiation potential of MSCs was tested by culturing under trilineage differentiation culture medium. The results showed that MSCs and NK cells had normal morphology and exhibited high proliferation ability in the environment of 3-5 mg/m³ concentration of hydrogen peroxide. The results of flow cytometry showed that CD73, CD105, and CD90 were highly expressed in MSCs, and CD45, CD34, CD14, CD79a and HLA-DR were negatively expressed; the percentage of NK cells expressing CD56⁺ and CD3⁻ were more than 70%. After induction, MSCs exhibited multilineage differentiation capacity into adipocytes, osteoblasts and chondrocytes. In conclusion, MSCs and NK cells were growing well in low concentrations of hydrogen peroxide disinfectant environment, and there was no significant difference in proliferation and differentiation potential compared with the cells which cultured in normal cell culture environment.

Keywords hydrogen peroxide decontamination; MSCs; NK cells; hydrogen peroxide residue; isolator

收稿日期: 2021-11-16

接受日期: 2022-02-17

*通讯作者。Tel: 0571-86589262, E-mail: yinhua_lee@163.com

Received: November 16, 2021

Accepted: February 17, 2022

*Corresponding author. Tel: +86-571-86589262, E-mail: yinhua_lee@163.com

近年来,细胞治疗技术正表现出广阔的应用前景,使得越来越多的细胞药物进入规模扩大与商业化生产阶段。由于细胞药物自身的特殊性,加强安全性以及标准化、规模化的转化技术是实现产业化的过程中需要考虑的重要因素^[1]。细胞药物商业化生产过程中的一个关键挑战是防止污染的发生,这就需要采用有效保护措施来保证产品的无菌性^[2]。使用封闭式隔离器进行细胞制备是解决这一问题的有效途径^[3-4]。用于细胞培养的隔离器是一种集成了离心机、二氧化碳培养箱等功能设备于一体的密闭式操作系统,内部环境通过汽化过氧化氢(vaporized hydrogen peroxide, VHP)进行生物去污以达到无菌状态^[5]。去污完成后,隔离器及二氧化碳培养箱等集成设备内部的过氧化氢残留对细胞培养是否产生不利影响,是评估设备适用性和过氧化氢工艺开发所关注的问题^[6]。本研究通过建立一个低浓度过氧化氢环境来培养MSCs和NK细胞,并观察了细胞生长状态及细胞的生物学特性,现将研究结果报告如下。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞 间充质干细胞由杭州原生生物科技有限公司提供;NK细胞由健康志愿者提供的外周血标本中提取的外周血单个核细胞诱导获得。

1.1.2 主要试剂 DMEM低糖培养基、胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)、胰蛋白酶均购自美国Gibco公司;成骨分化试剂盒购自加拿大STEMCELL公司;成脂和成软骨分化试剂盒购自赛业(苏州)生物科技有限公司;NK细胞扩增培养基和淋巴细胞分离液购自深圳市达科为生物工程有限公司;细胞冻存液购自友康生物科技(北京)股份有限公司。

1.1.3 主要设备 生物安全柜、全自动细胞计数仪、离心机购自美国Thermo Fisher公司;二氧化碳培养箱购自松下健康医疗器械(上海)有限公司;过氧化氢浓度检测仪购自德尔格安全设备(中国)有限公司;过氧化氢化学检测试剂盒购自德国MACHEREY-NAGEL公司;细胞培养隔离器和移动对接式二氧化碳培养箱采用浙江泰林生物技术股份有限公司产品。

1.2 方法

1.2.1 建立低浓度过氧化氢残留的培养环境 根据细胞培养时的培养箱种类,将实验分为2组。a组采用

无过氧化氢残留二氧化碳培养箱(PHCbi, MCO-5AC),培养环境为5% CO₂、37 °C、饱和湿度;b组采用含低浓度过氧化氢残留的二氧化碳培养箱(移动对接式二氧化碳培养箱),培养环境为5% CO₂、37 °C、饱和湿度,过氧化氢浓度由加入水盘中的过氧化氢溶液进行调节,使培养箱内气态过氧化氢浓度维持在3~5 mg/m³的范围内,形成低浓度过氧化氢残留环境,并采用Drager X-am 5100型过氧化氢检测仪进行浓度的测定。

1.2.2 MSCs培养 取出冻存的细胞冻存管,投入37 °C水浴锅中解冻,将细胞悬液移入预热好的培养基中,300 ×g离心5 min。弃上清,用含10% FBS的DMEM完全培养基重悬细胞,吹打均匀并转移至2个T75培养瓶和2个100 mm培养皿中,将细胞分别置于a组和b组培养箱中(每个培养箱内放置1个培养瓶和1个培养皿),持续培养5天。

1.2.3 MSCs增殖能力检测 选取第3代细胞,用DMEM培养基(含10% FBS)调整其浓度至1×10⁴个/mL,接种于24孔细胞培养板中并将其分别置于a组和b组培养箱。每隔24 h用胰蛋白酶消化液消化3个孔,收集细胞进行计数,两次计数取平均值,连续计数7天。以细胞数为纵坐标、时间为横坐标绘制生长曲线,分析比较a组和b组的细胞活力。

1.2.4 流式细胞仪鉴定MSCs表型 取分别培养于a组和b组培养箱的处于对数生长期的MSCs,用胰蛋白酶消化液消化细胞,350 ×g离心5 min,弃掉上清后重悬细胞,调整密度为1×10⁷个/mL。取100 μL细胞悬液,分别加入相应的表面标记抗体及同型对照,混匀后,室温避光孵育20 min,加入2 mL的染色缓冲液重悬细胞后,350 ×g离心5 min,弃上清。重悬细胞,进行流式细胞仪检测。

1.2.5 MSCs分化能力检测 成骨诱导分化实验选取第3代MSCs,以5×10³个/cm²的密度接种于6孔细胞培养板中,并用基础培养基培养,在细胞达到80%~90%汇合时,更换成骨诱导分化完全培养基,分别放置于a组和b组培养箱中培养。每3~4天换液1次,培养10天后进行茜素红染色,在倒置显微镜下观察并拍照。

成脂诱导分化实验选取第3代MSCs,以5×10³个/cm²的密度接种于6孔细胞培养板中,并用基础培养基培养,在细胞达到80%~90%汇合时,更换成脂诱导分化完全培养基,分别放置于a组和b组培养箱中培养。每3~4天换液1次,持续培养21天,然后将细胞用油红

O溶液染色,在倒置显微镜下观察并拍照。

成软骨诱导分化实验选取第3代MSCs,将 4×10^5 个细胞转移到15 mL离心管中,清洗细胞后 $300 \times g$ 离心5 min,所得沉淀用0.5 mL成软骨诱导分化完全培养基重悬后 $300 \times g$ 离心5 min,分别放置于a组和b组培养箱中培养。当细胞团出现聚拢现象时轻弹离心管底部使软骨球脱离管底悬浮在液体中。每2~3天换液1次,持续诱导21天后,对软骨球进行福尔马林固定和石蜡包埋切片,然后进行阿利辛蓝染色,在倒置显微镜下观察并拍照。

1.2.6 单个核细胞(PBMC)分离及NK细胞的扩增 无菌获取成人外周血,采用密度梯度离心法分离出PBMC。将血液移入50 mL离心管, $800 \times g$ 离心10 min,小心吸出血浆,56 °C水浴灭活30 min,备用;血细胞用生理盐水稀释后加至装有淋巴细胞分离液的离心管中, $700 \times g$ 离心20 min,收集白膜层细胞并用生理盐水洗涤两次,将分离得到的PBMC用NK细胞扩增培养基重悬后接种于2个T25培养瓶中,分别放置于a组和b组培养箱内进行扩增。

1.2.7 NK细胞的增殖能力检测 对分别放置于a组和b组培养箱的细胞,每隔1天补加新鲜培养基,培养第8天开始,每天取样进行计数,两次计数取平均值,连续计数7天。以细胞数为纵坐标、时间为横坐标绘制生长曲线,分析比较a组和b组细胞的增殖能力。

1.2.8 流式细胞仪鉴定NK细胞表型 取分别培养于a组和b组培养箱的NK细胞, $350 \times g$ 离心5 min,弃掉上清后,重悬细胞密度调整为 1×10^6 个/mL。取1 mL细胞悬液,分别加入相应的抗体及同型对照,混匀后,室温避光孵育20 min,用PBS洗涤两次去除未结合的抗体, $350 \times g$ 离心5 min,弃掉上清。重悬细胞,进行流

式细胞仪检测。

1.2.9 统计学分析 每组数据均来自至少三个独立实验的平均值,两组数据进行比较,采用 t 检验进行统计分析,误差棒表示标准偏差。 $P > 0.05$ 表示无显著差异。

2 结果

2.1 二氧化碳培养箱内过氧化氢浓度变化

采用过氧化氢浓度检测仪,在每天固定时间检测培养箱内的过氧化氢浓度。结果(图1)显示,在细胞培养的整个周期中培养箱内的过氧化氢浓度维持在 $3 \sim 5 \text{ mg/m}^3$ 的范围内。

2.2 MSCs形态学观察

为研究低浓度过氧化氢残留对细胞的影响,用培养瓶和培养皿两种培养器皿培养MSCs,将其分别置于a组和b组培养箱中培养并进行对比。细胞接种后2~6 h即可贴壁生长,最初为短粗的梭形或卵圆形,到第2天细胞伸展为长梭形,细胞分布均匀。在接种后第3~4天增殖速度加快,数量明显增多。第5~6天,细胞铺满整个培养瓶/皿底,镜下观察到细胞形态均一,平行排列或呈漩涡状生长。两组细胞样本的形态一致(图2)。

2.3 MSCs的增殖情况

根据培养的时间和细胞计数的结果绘制细胞生长曲线,细胞培养初始几天生长缓慢,为延滞期。第3~5天进入对数生长期,两组细胞样本均增殖活跃。采用统计学方法进行数据分析,两组样本间比较各个生长点的 $P > 0.05$,样本间无显著差异(图3)。

2.4 MSCs表型鉴定情况

流式细胞仪分析结果显示,a和b两组MSCs

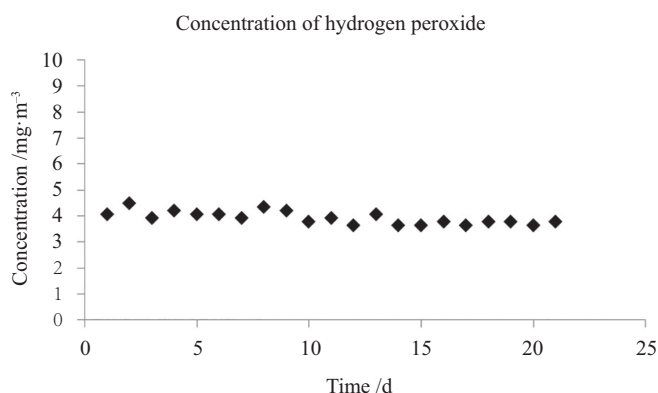
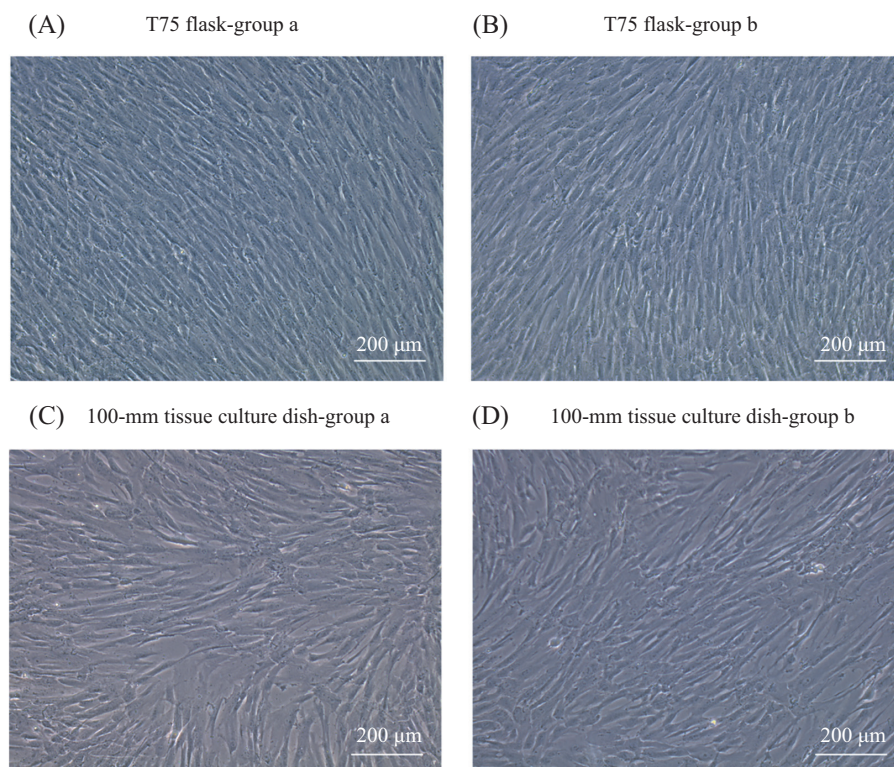


图1 培养箱内的过氧化氢浓度

Fig.1 The concentration of hydrogen peroxide in the incubator

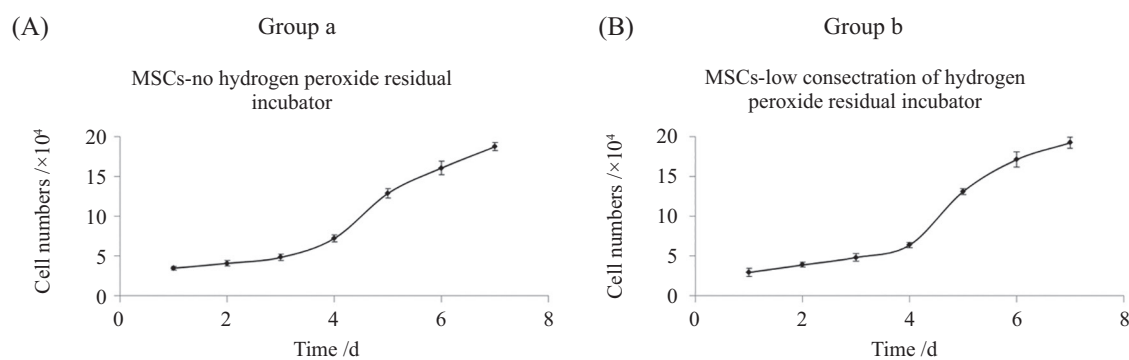


A: a组培养于T75培养瓶中的MSCs; B: b组培养于T75培养瓶中的MSCs; C: a组培养于100-mm培养皿中的MSCs; D: b组培养于100-mm培养皿中的MSCs。

A: MSCs cultured in T75 flask in group a; B: MSCs cultured in T75 flask in group b; C: MSCs cultured in 100-mm tissue culture dish in group a; D: MSCs cultured in 100-mm tissue culture dish in group b.

图2 MSCs的形态

Fig.2 Morphology of MSCs



A: a组MSCs的增殖曲线; B: b组MSCs的增殖曲线。

A: proliferation curves of MSCs in group a; B: proliferation curves of MSCs in group b.

图3 MSCs增殖曲线

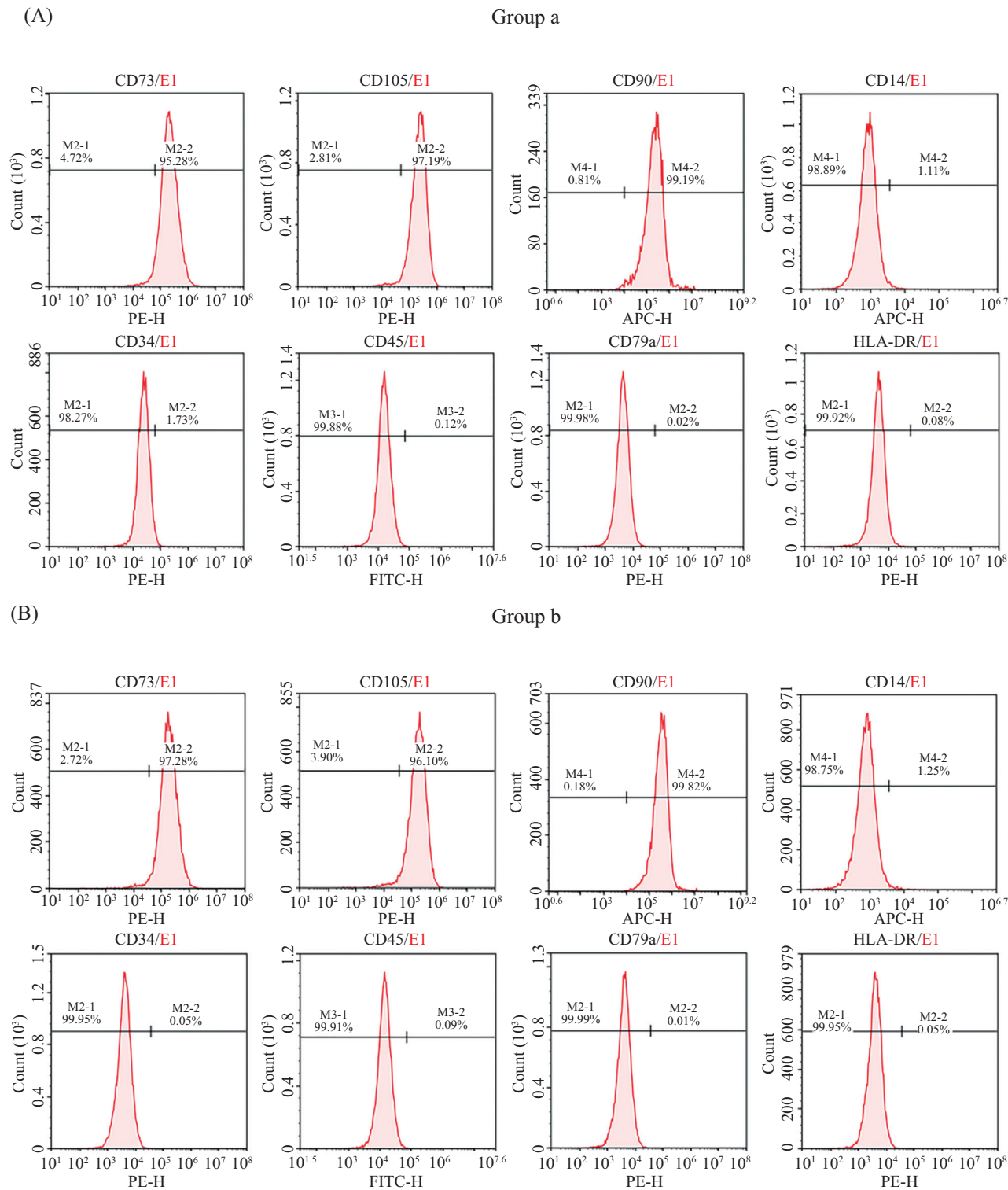
Fig.3 Proliferation curves of MSCs

表面标志物CD73、CD105、CD90的表达率分别为95.28%、97.19%、99.19%和97.28%、96.10%、99.82%，表达均为阳性。CD14、CD34、CD45、CD79a、HLA-DR的表达率分别为1.11%、1.73%、0.12%、0.02%、0.08%和1.25%、0.05%、0.09%、0.01%、

0.05%。经流式细胞鉴定，两组细胞样本的表面标志物表达情况基本一致，无显著差异(图4)。

2.5 MSCs三系诱导分化情况

成骨诱导分化：成骨诱导后3~5天，细胞形态逐渐由长梭形变为多边形或不规则形，胞质外出现许

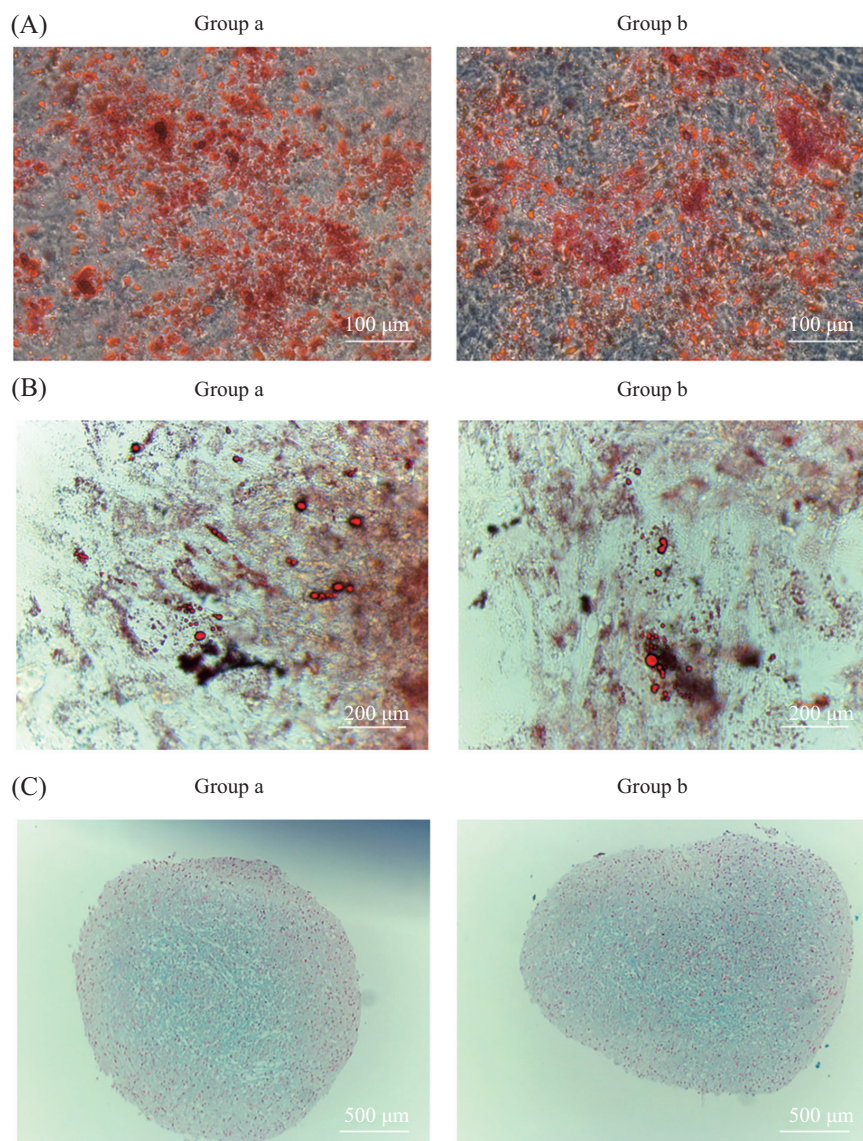


A: a组MSCs的表面标志物表达情况; B: b组MSCs的表面标志物表达情况。
A: surface markers expression of MSCs in group a; B: surface markers expression of MSCs in group b.

图4 MSCs的表面标志物鉴定
Fig.4 Characterization of cell surface markers of MSCs

多小颗粒。持续诱导10天后, 经茜素红S染色可见染料与矿化沉积物结合, 形成红色沉淀。两组细胞样本经诱导后均具有向骨细胞分化的能力(图5A)。

成脂诱导分化: 成脂诱导后3~5天, 细胞形态逐渐变肥大、扁平。显微镜下可看到细小的脂滴溢出。持续诱导21天后, 经油红O染料染色脂滴呈红色。



A: 茜素红S染色钙沉积物鉴定MSCs的成骨分化能力。B: 油红O染色脂滴鉴定MSCs的成脂分化能力。C: 阿利辛蓝染色蛋白聚糖鉴定MSCs的成软骨分化能力。

A: osteogenic differentiation was evaluated by detecting calcium depositions with Alizarin red S staining. B: adipogenic differentiation was evaluated by detecting fat droplets with Oil Red O staining. C: chondrogenic differentiation was evaluated by detecting proteoglycans with Alcian blue staining.

图5 MSCs三系分化能力

Fig.5 Trilineage differentiation potential of MSCs

两组细胞样本经诱导后均具有向脂肪细胞分化的能力(图5B)。

成软骨诱导分化: MSCs在培养过程中可自发收缩聚集形成细胞微球,并逐渐形成具有一定硬度和弹性并呈白色外观的软骨样组织。诱导21天后,对软骨球的石蜡包埋切片进行阿利辛蓝染色。阿利辛蓝染色的蓝色区域即为软骨样组织。两组细胞样本经诱导后均具有向软骨细胞分化的能力(图5C)。

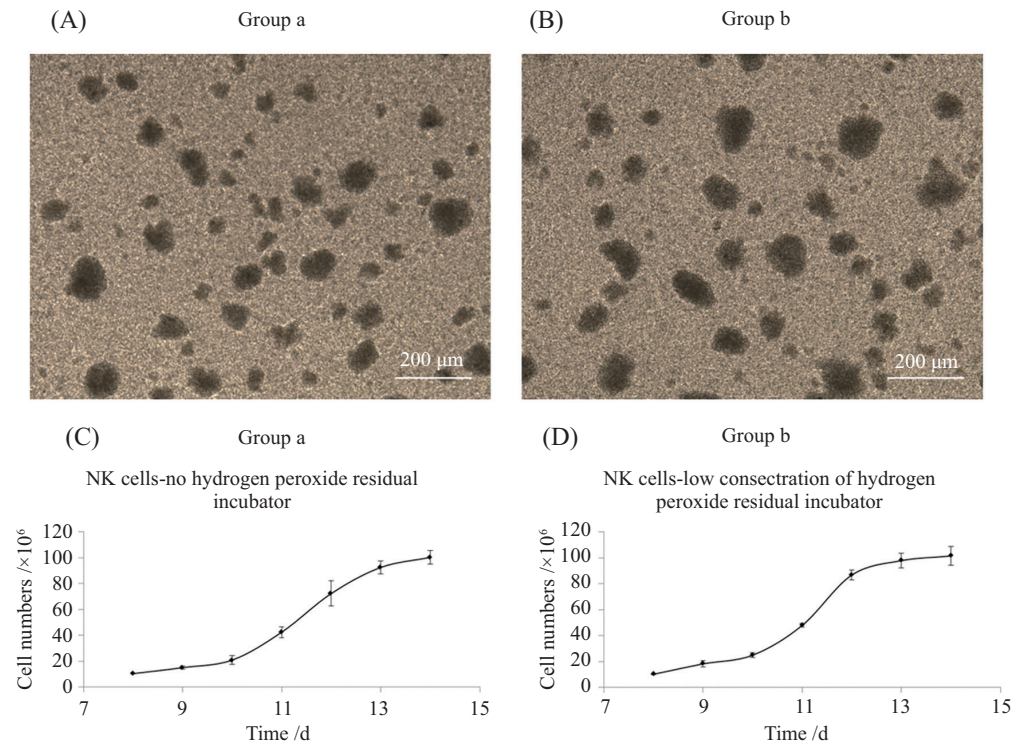
2.6 NK细胞的增殖情况

细胞接种后NK细胞呈圆形或椭圆形生长,部分

有不规则形状,细胞悬浮并伴有较多小团出现,状态良好。根据培养的时间和细胞计数的结果绘制细胞生长曲线。结果显示,NK细胞在接种后第10天开始快速增殖,培养14天后细胞增殖速度减慢,采用统计学方法进行数据分析,两组样本间比较各个生长点的 $P>0.05$,两组细胞样本的增殖与细胞存活率均无显著差异(图6)。

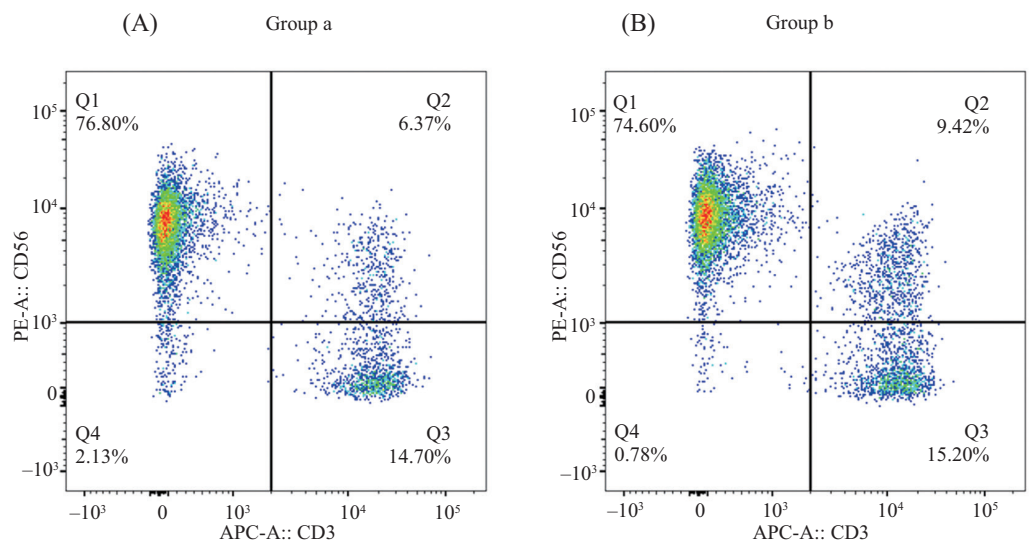
2.7 NK细胞表面标志物表达情况

通过流式细胞术进行分析以鉴定培养细胞中的NK细胞群。表型分析结果显示,培养于a组培养



A: a组NK细胞的形态; B: b组NK细胞的形态; C: a组NK细胞的增殖曲线; D: b组NK细胞的增殖曲线。
A: morphology of NK cells in group a; B: morphology of NK cells in group b; C: proliferation curve of NK cells in group a; D: proliferation curve of NK cells in group b.

图6 NK细胞的形态和生长曲线
Fig.6 Morphology and proliferation curves of NK cells



A: a组细胞表达CD56⁺和CD3⁻的百分比; B: b组细胞表达CD56⁺和CD3⁻的百分比。
A: percentage of cells expressed both CD56⁺ and CD3⁻ makers in group a; B: percentage of cells expressed both CD56⁺ and CD3⁻ makers in group b.

图7 NK细胞的表面标志物表达
Fig.7 Surface markers expression of NK cells

箱的NK细胞表面标志物CD56⁺、CD3⁻的百分比为76.8%, 而培养于b组培养箱的NK细胞表面标志物CD56⁺、CD3⁻的百分比为74.6%。两组细胞样本的最终细胞群比例基本一致, 无显著差异(图7)。

3 讨论

细胞培养过程中保持无菌, 防止发生污染是开展细胞实验研究与细胞药物制备的基本要求, 但这也是控制难点^[7]。传统的洁净室由于人员的进出,

无法将环境和人员完全隔离, 很难规避污染的风险。传统的二氧化碳培养箱去污方式主要有紫外线照射、高温消毒及消毒剂擦拭等, 难以完全达到无菌化的要求^[8]。在培养过程中, 细胞培养物从培养箱中反复多次取出和进入也增大了污染的概率^[9]。因此在这种情况下, 隔离器技术无疑是一个很好的解决方案。密闭式的隔离系统采用物理屏障的方式将人员与操作环境分割开来, 有效地防止了污染或交叉污染的发生。隔离器应用的VHP去污技术能够大幅降低细胞培养中的污染风险, 关键原因在于过氧化氢对整个隔离器的密闭空间进行净化而无需将细胞培养物暴露于低级别的环境中。目前, VHP去污技术已被广泛应用于制药、细胞/组织工程、生物安全等多个领域^[10-11]。尽管相较于许多传统的化学去污剂它具有诸多优势, 但隔离器等密闭设备采用VHP去污后过氧化氢的残留量要求却缺少权威的信息, 大多数的隔离器使用者遵循设备制造商的建议, 将过氧化氢残留量的限值按现行的美国职业安全及健康管理署对人员接触过氧化氢“允许暴露浓度值”要求为8 h“加权平均值”低于1.4 mg/m³ (1 ppm)^[12]。

本项研究评估了3~5 mg/m³范围内低浓度过氧化氢残留对MSCs和NK细胞生长及其生物学特性的影响, 而在隔离器及移动对接式二氧化碳培养箱的使用实例中, 通常是将VHP残留量降低至低于1.4 mg/m³水平, 这已远低于本次评估值范围。

本研究中我们首先观察了MSCs和NK细胞在不同生长阶段的细胞密度, 从得到的细胞生长曲线可以看出, 曲线呈典型的细胞生长曲线, 且各时间段两组的细胞密度无明显差异, 表明低浓度过氧化氢残留环境对MSCs和NK细胞的增殖无抑制作用。为进一步观察低浓度过氧化氢残留环境对细胞的影响, 我们对培养的MSCs和NK细胞进行了流式细胞鉴定。通过流式细胞学检测发现两组MSCs均不表达CD14、CD34、CD45、CD79a、HLA-DR, 而CD73、CD105、CD90的表达率均在95%以上, 结果符合国际细胞治疗协会对间充质干细胞的鉴定标准。NK细胞的流式细胞鉴定结果显示, 两组细胞样本CD56⁺和CD3⁺的百分比均在70%以上, 无显著差异。本研究进一步对培养于低浓度过氧化氢残留环境和无过氧化氢残留环境的MSCs的多项分化能力进行了比较。结果显示, 两组细胞在特定条件的诱导下均具备成骨、成脂、成软骨的分化能力, 且两组细胞的

分化潜能无明显差异。以上结果表明, 3~5 mg/m³浓度水平的过氧化氢残留量对MSCs和NK细胞生长及其特性均无明显抑制作用。目前关于采用VHP灭菌后的培养环境对细胞的增殖和生物学特性相关的研究尚未见报道。已报道的类似研究中, 采用过氧化氢等离子灭菌技术对常用医用材料灭菌后用于细胞毒性实验, 评估了灭菌材料对细胞毒性的影响。研究结果表明, 多数材料的细胞增值率均大于80%, 按照GB/T14233.2-2005中的规定, 细胞毒性在可接受范围内^[13]。与其他灭菌法相比, VHP灭菌具备较小的细胞毒性、与物料的兼容性好、安全环保等优势。

细胞隔离器及配套使用的二氧化碳培养箱使用VHP进行去污, 是一种易于验证、安全可靠的净化方式, 将VHP残留量降解至1.4 mg/m³以下, 可以满足MSCs和NK细胞培养的要求。本项研究因所选用的细胞种类和实验次数有限, 且不同隔离器采用的过氧化氢去污技术、降解技术和工艺差别也会导致实际的残留浓度限值不同^[14-16]。此外, 低浓度水平的气态过氧化氢测量精度还有待提高, 对于不同培养容器所受的影响因素差别也缺少研究。除VHP残留因素之外, 在灭菌过程中VHP是否会穿透或吸附于一些细胞培养相关容器和耗材, 这些将是今后工作中研究的重点。

参考文献 (References)

- [1] CAMPBELL A, BRIEVA B T, RAVIV C L, et al. Concise review: process development considerations for cell therapy [J]. *Stem Cell Transl Med*, 2015, 4(10): 1155-63.
- [2] 孙巍群, 陈锦阳, 刘军权. 临床用细胞培养实验室质量控制[J]. 中华临床实验室管理电子杂志(SUN W Q, CHEN J Y, LIU J Q. Quality control of clinical cell culture laboratory [J]. *Chinese Journal of Clinical Laboratory Management*), 2019, 7(3): 51-7.
- [3] 马伟, 孙石磊. 无菌隔离器的优势及其发展趋势[J]. 机电信息(MA W, SUN S L. Advantages and development trend of aseptic isolator [J]. *Mechanical and Electrical Information*), 2013, doi: 10.19514/j.cnki.cn32-1628/tm.2013.20.008.
- [4] TANIMOTO K, KOSHIDA I, KOKUBO M. Aseptic manufacturing of regenerative medicine products using isolator technology [J]. *PDA Journal of GMP and Validation in Japan*, 2017, 19(2): 45-55.
- [5] KINOOKA M, MIZUTANI M. Chapter 7-Cell production system based on flexible modular platform [J]. *Stem Cell Manuf*, 2016, doi: 10.1016/B978-0-444-63265-4.00007-8.
- [6] CHIHARA R, KITAJIMA H, OGAWA Y, et al. Effects of residual H₂O₂ on the growth of MSCs after decontamination [J]. *Regen Ther*, 2018, 9(12): 111-5.
- [7] 陈华弟. 无菌隔离器的发展和应用[J]. 医药工程设计(CHEN H D. Development and application of sterilized isolator [J]. *Phar-*

- maceutical & Engineering Design), 2013, 13(3): 36-9.
- [8] KNEGENDORF L, BRILL H, STEINMANN J, et al. Sterilization procedures for CO₂ incubators [J]. Rev Med Microbiol, 2018, 29(4): 147-52.
- [9] HENN A, DAROU S, YERDEN R. Scaling of massively parallel patient-specific cell cultures with a transportable conditioned cell culture chamber [J]. Biochem Eng J, 2018, 132: 139-44.
- [10] 郝丽梅, 衣颖, 林松, 等. 汽化过氧化氢在消毒领域中的应用研究[J]. 医疗卫生装备(HAO L M, YI Y, LIN S, et al. Application of vaporized hydrogen peroxide in field of disinfection [J]. Chinese Medical Equipment Journal), 2018, 39(2): 92-5.
- [11] 张文福. 汽化过氧化氢消毒技术及其在生物安全领域的应用[J]. 中国消毒学杂志(ZHANG W F. Vaporized hydrogen peroxide disinfection technology and application in the field of bio-safety [J]. Chinese Journal of Disinfection), 2017, 34(10): 959-62.
- [12] MURDOCH L E, BAILEY L, BANHAM E, et al. Evaluating different concentrations of hydrogen peroxide in an automated room disinfection system [J]. Lett Appl Microbiol, 2016, 63: 178-82.
- [13] 姚瑶, 丁彪. 过氧化氢等离子灭菌技术对医用材料细胞毒性影响的评价[J]. 中国医疗器械杂志(YAO Y, DING B. Evaluation of *in vitro* cytotoxicity tests for medical material using hydrogen peroxide gas plasma sterilization [J]. Chinese Journal of Medical Instrumentation), 2017, 41(2): 144-5.
- [14] KUSHWAH V, POMS J, VUYLSTEKE B, et al. Towards an understanding of the adsorption of vaporized hydrogen peroxide (VHP) residues on glass vials after a VHP decontamination process using a miniaturized Tool-ScienceDirect [J]. J Pharm Sci, 2020, 109(8): 2454-63.
- [15] MCEVOY B, ROWAN N J. Terminal sterilization of medical devices using vaporized hydrogen peroxide: a review of current methods and emerging opportunities [J]. J Appl Microbiol, 2019, 127(5): 1403-20.
- [16] 陆烨, 胡国庆, 李晔, 等. 不同过氧化氢发生装置对病房空间内微生物杀灭效果的比较研究[J]. 中国消毒学杂志(LU Y, HU G Q, LI Y, et al. Comparison study on germicidal efficacy of two types of hydrogen peroxide system in the wards [J]. Chinese Journal of Disinfection), 2019, 36(2): 92-5.