

## R2 细胞用于测定人白介素 6 受体的生物活性

康晓平\*, 任蕴芳, 于 鸣, 沈倍奋  
(军事医学科学院基础医学研究所, 北京 100850)

**摘要:** **目的** 确定可靠的筛选小分子人白介素 6 (IL-6)受体拮抗剂先导化合物的细胞模型。**方法** 分别用间接免疫荧光法和 MTT 检测法检测了 R2 细胞的人 IL-6 受体蛋白表达水平和对重组人白介素 6 (rhIL-6)的反应性。**结果** 检测到 R2 细胞具有高丰度的人 IL-6 受体蛋白表达并对 rhIL-6 具有极为灵敏的反应性和极高的亲和力;用 R2 细胞检测抗人 IL-6 单克隆抗体对 rhIL-6 的拮抗活性,发现单抗在 20 mg·L<sup>-1</sup>浓度下对 rhIL-6 所引起的 R2 细胞的增殖有很强的抑制作用,抑制率达 92%。**结论** R2 细胞是可靠的筛选人 IL-6 受体拮抗剂的细胞模型。

**关键词:** 细胞系, R2; 受体, 白介素 6; 免疫荧光法, 间接

中图分类号: R392.11 R965

文献标识码: A

文章编号: 1000-3002(2002)04-0312-04

很多临床研究已经证实人白介素 6 (interleukin 6, IL-6)及其受体的异常表达是某些疾病的典型特征,在类风湿性关节炎、多发性骨髓瘤及全身性红斑狼疮病人体内常发现 IL-6 及其受体水平的显著上升<sup>[1,2]</sup>,因此,研究人 IL-6 受体拮抗剂具有重要的临床意义。目前对人 IL-6 受体拮抗剂的研究主要集中于抗人 IL-6 或抗人 IL-6 受体的单克隆抗体和人 IL-6 或人 IL-6 受体突变体两个方面<sup>[1~4]</sup>,单克隆抗体仅有鼠源性的应用于临床治疗多发性骨髓瘤<sup>[1,2]</sup>,但它易引起人抗鼠单克隆抗体反应<sup>[1]</sup>,并且在体内存在半衰期问题,所以无长期疗效;人源性单克隆抗体的研究目前还仅处于实验室研究阶

段,未有临床应用报道;而突变体属于生物大分子,在体内易被生物代谢,并且容易引起免疫排斥,所以临床应用价值并不大。而很多小分子药物具有抗代谢、抗免疫排斥反应、稳定性好等优点,能够克服以上缺点,因此小分子人 IL-6 受体拮抗剂的研究具有很大的临床价值。

目前,本实验室正致力于小分子人 IL-6 受体拮抗剂的研究,以人生长激素受体的 X 射线晶体三维结构为模板同源建模了人 IL-6 受体胞外区配基结合功能域的空间构象<sup>[5]</sup>,并根据受体胞外区配基结合功能域的活性部位<sup>[6]</sup>进行合理药物设计,共设计和寻找了 22 个结构类别 113 个小分子化合物,作为可供筛选的人 IL-6 受体拮抗剂的候选化合物。为了对这些化合物进行可靠的生物筛选,本实验室对所构建的表达人 IL-6 受体蛋白的大鼠急性白血病细胞(R2 细胞系)进行了生物学活性测定,检测到它的细胞膜表面有大量的人 IL-6 受体蛋白表达,并对重组人白介素 6 (recombinant human interleukin 6, rhIL-6)具有非常灵敏而稳定的反应性。因此,建立以 R2 细胞系筛选人 IL-6 受体小分子拮抗剂的细胞模型,它对于人 IL-6 受体拮抗剂的生物筛选和活性测定,具有很大的应用价值。

### 1 材料和方法

#### 1.1 试剂及仪器

RPMI-1640 培养基购自 Gibco BRL 公司;噻唑蓝 [3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide, MTT]购自 Sigma 公司;胎牛血清 (fetal calf serum, FCS)购自杭州四季青生物工程有限公司;rhIL-6 (比活性 10<sup>8</sup> μmol·min<sup>-1</sup>·g<sup>-1</sup>蛋白),抗人 IL-6 单克隆抗体, R&D Systems 产品。

流式细胞仪为 Coulter 公司产品;高速低温离心机为 Sigma 公司产品。

#### 1.2 细胞培养

表达人 IL-6 受体的大鼠 R2 细胞由本实验室构

收稿日期: 2001-11-28 接受日期: 2002-04-27

基金项目: 国家自然科学基金项目(39980036)

作者简介: 康晓平(1976-),女,河南省巩义市人,理学硕士研究生,主要研究方向为生物化学。

\* 联系作者 Tel: (010)66931326,

E-mail: kang-xp@hotmail.com

建并保存<sup>[7]</sup>,在37℃,5%CO<sub>2</sub>条件下,培养于含10% FCS,400 mg·L<sup>-1</sup>G418,100 kU·L<sup>-1</sup>青霉素,100 kU·L<sup>-1</sup>链霉素的RPMI-1640培养液中,每隔2~3 d传代一次。

### 1.3 间接免疫荧光法检测 R2 细胞表面人 IL-6 受体的表达

取约1×10<sup>6</sup>细胞,用含2%FCS的磷酸盐缓冲液(PBS)离心(3300×g,30 s)洗涤3次,实验组中加入1:10稀释的100 μL抗人IL-6受体兔抗血清,对照组中加入100 μL PBS,冰浴振荡30 min,离心(3300×g,30 s),用含2%FCS的PBS离心洗涤3次后,实验组和对照组中均加入1:100稀释的异硫氰酸荧光素(fluorescence isothiocyanate, FITC)标记的羊抗兔IgG,冰浴振荡30 min,离心(3300×g,30 s),用含2%FCS的PBS离心洗涤3次。1%多聚甲醛固定后,用流式细胞仪检测细胞表面荧光阳性率<sup>[8]</sup>。

### 1.4 MTT 法检测 R2 细胞对 rhIL-6 的反应性

将R2细胞用含10%FCS的RPMI-1640调为每升1×10<sup>8</sup>的密度,种入96孔细胞培养板中,每孔80 μL,实验组中加入不同浓度的rhIL-6,每孔20 μL,使其终浓度为0.1~1000 ng·L<sup>-1</sup>,对照组中加入20 μL RPMI-1640。CO<sub>2</sub>孵箱中培养3 d,加入10 μL MTT(5 μg·L<sup>-1</sup>)作用6 h后,裂解液(含10%SDS的10 mmol·L<sup>-1</sup> HCl)裂解,37℃放置过夜,酶联仪测570 nm吸光度值(A<sub>570 nm</sub>)<sup>[9]</sup>。

### 1.5 R2 细胞用于检测抗人 IL-6 单克隆抗体对 rhIL-6 的拮抗活性

将R2细胞用含10%FCS的RPMI-1640调为每升1.5×10<sup>8</sup>的密度,种入96孔细胞培养板中,每孔60 μL,抗体组中再加入rhIL-6,每孔20 μL,使其终浓度为10 ng·L<sup>-1</sup>,再加入2倍稀释的抗人IL-6单克隆抗体,每孔20 μL,终浓度为0.625~20 mg·L<sup>-1</sup>,其中rhIL-6和抗人IL-6单克隆抗体均用RPMI-1640稀释。对照组中不加rhIL-6和抗人IL-6单克隆抗体,补40 μL RPMI-1640培养液,rhIL-6组中加入rhIL-6后补20 μL RPMI-1640培养液。在CO<sub>2</sub>孵箱中培养3 d,加入10 μL MTT(5 μg·L<sup>-1</sup>),作用6 h后,裂解液(含10%SDS的10 mmol·L<sup>-1</sup> HCl)裂解,37℃放置过夜,用酶联仪测A<sub>570 nm</sub><sup>[7]</sup>。

### 1.6 统计学处理

所有数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间差异采用Student *t* 检验进行显著性检验。

## 2 结果

### 2.1 R2 细胞表面人 IL-6 受体的表达

流式细胞仪检测到,R2细胞表面的荧光阳性率随抗人IL-6受体兔抗血清浓度的增大而增大,当抗人IL-6受体兔抗血清以1:10稀释时,R2细胞表面的荧光阳性率最大,达到46%(图1)。

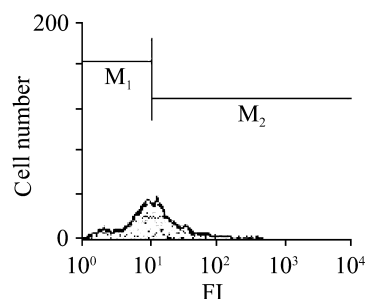


Fig 1. Flow cytometric assay of expression of human interleukin-6 receptor on R2 cells. FI: Fluorescent intensity; M1: ungated cell; M2: gated cell. Having been treated with fluorescence isothiocyanate-goat anti-rabbit IgG, the percentage of gated cell was measured by flow cytometry.

### 2.2 R2 细胞对 rhIL-6 的反应性

以0.1~1000 ng·L<sup>-1</sup>的rhIL-6刺激R2细胞,生长3 d后,显微镜下观察,可明显看到细胞数量随rhIL-6浓度增大而减少,用MTT法检测,A<sub>570 nm</sub>结果见图2。

图2结果表明,当rhIL-6的浓度在0.1~10 ng·L<sup>-1</sup>时,A<sub>570 nm</sub>下降得最为明显,说明R2细胞对rhIL-6反应最敏感的剂量范围在此浓度范围之内。当rhIL-6的浓度为10 ng·L<sup>-1</sup>时,细胞的生长抑制率达

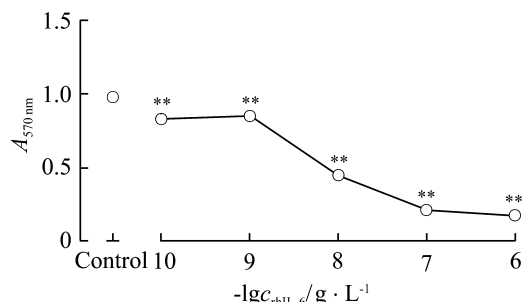


Fig 2. Effect of recombinant human interleukin-6 (rhIL-6) on the proliferation of R2 cells. The proliferation was determined by MTT method.  $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 3$ . \*\*  $P < 0.01$ , compared with control group by *t* test.

到 58%, 经分析得出 rhIL-6 对 R2 细胞的半数抑制量(ED<sub>50</sub>)为 8 ng·L<sup>-1</sup>, 故以 10 ng·L<sup>-1</sup> 作为筛选人 IL-6 受体拮抗剂的 rhIL-6 浓度。

### 2.3 R2 细胞用于检测抗人 IL-6 单克隆抗体对 rhIL-6 的拮抗活性

在 10 ng·L<sup>-1</sup> 的 rhIL-6 刺激下, R2 细胞的生长抑制率达到 58%, 加入抗人 IL-6 单克隆抗体, R2 细胞的生长抑制得到逆转, 抗体在 1.25 ~ 20 mg·L<sup>-1</sup> 时, 拮抗率随抗体浓度的增高而增大, 在 20 mg·L<sup>-1</sup> 时, 拮抗率已达 92% (表 1)。

**Tab 1. Antagonism of anti-human interleukin-6 monoclonal antibody to the inhibitory effect of recombinant human interleukin-6 on proliferation of R2 cells**

rhIL-6 /ng·L <sup>-1</sup>	Antibody /mg·L <sup>-1</sup>	A <sub>570 nm</sub>	Antagonistic rate/%
0	0	0.96 ± 0.016	
10	0	0.45 ± 0.018	
10	1.25	0.50 ± 0.018 * * * #	9.7
10	2.5	0.53 ± 0.009 * * #	15.6
10	5	0.65 ± 0.033 * * * #	40.2
10	10	0.77 ± 0.017 * * * #	63.6
10	20	0.91 ± 0.012 * * * #	92.0

The proliferation of R2 cells was determined by MTT method. rhIL-6 And anti-human IL-6 antibody were added at the same time. Antagonistic rate (%) = (A<sub>570 nm-antibody</sub> - A<sub>570 nm-rhIL-6</sub>) / (A<sub>570 nm-control</sub> - A<sub>570 nm-rhIL-6</sub>) × 100%.  $\bar{x} \pm s$ , n = 3. \* \* P < 0.01, compared with control group; # P < 0.05, ## P < 0.01, compared with rhIL-6 group.

### 3 讨论

R2 细胞是本实验室构建的具有高丰度人 IL-6 受体表达的大鼠髓系白血病细胞, 该细胞系与 [<sup>125</sup>I]-rhIL-6 结合分析的饱和曲线, 按 Scatchard 作图分析, 求得 IL-6 受体结合配基的亲合常数(K<sub>D</sub>)为 4.7 nmol·L<sup>-1</sup>, 细胞表面 IL-6 受体的最大密度(B<sub>max</sub>)为每个细胞 4166 结合部位<sup>[7]</sup>, 在本次实验中, 作者又用非同位素的方法间接免疫荧光法检测到冻存一段时期后复苏的 R2 细胞有大量的人 IL-6 受体表达, 充分说明 R2 细胞稳定表达人 IL-6 受体基因, 具有与 rhIL-6 反应的结构基础。在体外液体培养中, 用 MTT 法检测到它对 rhIL-6 有极为灵敏的反应性,

在终浓度为 10 ng·L<sup>-1</sup> 的 rhIL-6 刺激下, R2 细胞的增殖抑制率达到 58%; 作者用 R2 细胞检测一种人 IL-6 受体拮抗剂(抗人 IL-6 单克隆抗体)对 rhIL-6 的拮抗活性, 发现 20 mg·L<sup>-1</sup> 的单克隆抗体基本上可以完全逆转 10 ng·L<sup>-1</sup> 的 rhIL-6 刺激引起的 R2 细胞增殖抑制, 充分说明 R2 细胞是灵敏而可靠的筛选人 IL-6 受体拮抗剂的细胞模型。

综上所述, R2 细胞对于人 IL-6 受体拮抗剂的生物筛选及亲和力分析, 是一个良好的体外检测模型。

### 4 参考文献:

- [1] Emilie D, Wijdenes J, Gisselbrecht C, Jarrousse B, Billaud E, Blay JY, *et al.* Administration of an anti-interleukin-6 monoclonal antibody to patients with acquired immunodeficiency syndrome and lymphoma: effect on lymphoma growth and on B clinical symptoms[J]. *Blood*, 1994, **84**(8): 2472 - 2479.
- [2] Klein B, Wijdenes J, Zhang XG, Jourdan M, Boiron JM, Brochier J, *et al.* Murine anti-interleukin-6 monoclonal antibody therapy for a patient with plasma cell leukemia[J]. *Blood*, 1991, **78**(5):1198 - 1204.
- [3] Brakenhoff JP, de Hon FD, Fontaine V, ten Boekel E, Schooltink H, Rose-John S, *et al.* Development of a human interleukin-6 receptor antagonist[J]. *J Biol Chem*, 1994, **269**(1):86 - 93.
- [4] Salvati AL, Lahm A, Paonessa G, Ciliberto G, Toniatti C. Interleukin-6 (IL-6) antagonism by soluble IL-6 receptor alpha mutated in the predicted gp130-binding interface[J]. *J Biol Chem*, 1995, **270**(20):12242 - 12249.
- [5] Ren YF, Qu H, Feng JN, Li S, Shen BF. Active regions setting of the extracellular ligand-binding domain of human interleukin-6 receptor[J]. *Chin Sci Bull*, 2000, **45**(13): 1182 - 1187.
- [6] Ren YF, Qu H, Feng JN, Li S, Shen BF. Three-dimensional structure and function study on the active region in the extracellular ligand-binding domain of human IL-6 receptor [J]. *Sci Sin*(中国科学), 2000, **30**(2):219 - 224.
- [7] Ren YF, Guo N, Zhang HQ, Mao N, Martens ACM, Hagenbeek A. Introduction and expression of the recombinant human IL-6 receptor gene in rat myelocytic leukemia cell[J]. *Chin J Exp Hematol*(中国实验血液学杂志), 1994, **2**(1):35 - 41.
- [8] Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, *et al.* *Short Protocols in Molecular Biology* [M](精编分子生物学实验指南). Beijing: Science

press, 1999. 5632 - 5633.

[9] Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and

survival: application to proliferation and cytotoxicity assays

[J]. *J Immunol Methods*, 1983, 65(1-2):55-63.

## R2 cells applied to measure human interleukin 6 receptor bioactivity

KANG Xiao-Ping, REN Yun-Fang, YU Ming, SHEN Bei-Fen

(*Institute of Basic Medical Sciences, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China*)

**Abstract: AIM** To confirm R2 cells being reliable cell model to screen small molecular human interleukin-6 (IL-6) receptor antagonists.

**METHODS** Indirect immunofluorescence method and MTT method were used to test the expression of human IL-6 receptor on R2 cells and the reaction of R2 cells to recombinant human IL-6 (rhIL-6). **RESULTS** R2 cells expressed high level human IL-6 receptor and it responded to rhIL-6 sensitively. Furthermore, when R2 cells were used to test the antagonistic activity of anti-IL-6 monoclonal antibody to rhIL-6, it showed

that anti-IL-6 monoclonal antibody can significantly antagonize the biological activity of rhIL-6.

**CONCLUSION** R2 cells are a reliable cell model to screen small molecular human IL-6 receptor antagonists.

**Key words:** cells, R2; receptors, interleukin-6; immunofluorescence, indirect

**Foundation item:** The project supported by National Natural Science Foundation of China(39980036)

(本文编辑 周宇红)

## 欢迎订阅《中国药理学通报》

《中国药理学通报》是由中国药理学会主办,安徽医科大学临床药理研究所编辑出版的全国性学术性杂志。本刊主要刊登药理学研究论文,辟有论著、讲座与综述、小专论、实验方法学、新药介绍与老药新用、国内外医药学动态、研究简报、快报等专栏。

本刊荣获第1、第2届全国科技部、中共中央宣传部、国家新闻出版署优秀科技期刊二等奖,第1、第2届中国科学技术协会优秀期刊二等奖,第1届华东地区优秀期刊一等奖,第2届华东地区最佳期刊奖。

本刊已被中国科学院文献情报中心中国科学引文数据库确定为医学类核心期刊;被北京大学图书馆主编《中国核心期刊要目总览》第1、第2版及第3版(2000版)选定为药学类核心期刊;被国际核心期刊研究会确定为核心期刊;被国家科技部科技信息研究所确定为科技论文统计源期刊。

本刊已被国内几乎所有检索期刊及国际著名检索期刊 Chemical Abstract(美国)、《PJK》(俄罗斯)、Biochemical Abstract(美国)、Index Medicus(美国)、EMBASE/Excerpta Medica(荷兰)、Kunst and Wissen(德国)、Centre for Agriculture and Biosciences international(CAB international, 英国)等收录利用。

本刊为月刊,大16开120页,每期定价12.00元,全年144.00元。邮发代号:26-52,请及时向当地邮局订阅,漏订读者请直接汇款至本刊编辑部,免收邮寄费。地址:安徽省合肥市安徽医科大学校内《中国药理学通报》编辑部,邮编:230032,联系人:武明静。电话:0551-5161221,电子信箱:huanghs@mail.hf.ah.cn。