

真菌来源新活性化合物 2460A 的研究

齐小强, 朱凤昌, 张 洋, 郭连宏, 姜 蓉, 何琪杨*, 李 元*

(中国医学科学院、北京协和医学院医药生物技术研究所 卫生部抗生素生物工程重点实验室, 北京 100050)

摘要: 采用自行构建的以重组白细胞介素 6 受体 (IL-6R) 为靶位, 基于受体配基竞争结合为基础的高通量筛选模型, 从微生物代谢产物中获得了新结构化合物 2460A。本文通过对产生菌核糖体 DNA 转录间隔区 (rDNA-ITS) 序列测定结果, 确定了该化合物产生菌为哈茨木霉; 研究结果显示, 2460A 具有和白细胞介素 6 (IL-6) 竞争结合白细胞介素 6 受体 (IL-6R) 的活性, 因此是具有 IL-6R 配基活性的微生物产物; MTT 法测定结果表明, 2460A 对 CM126 和 HT-29 肿瘤细胞具有抑制作用, IC_{50} 分别为 $2.17 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $1.8 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; 对肿瘤细胞周期影响作用实验结果显示, 2460A 对 HT-29 细胞的 S 期略有阻滞作用。本化合物体内抗癌活性等深入研究工作正在进行中。

关键词: 2460A; 哈茨木霉; IL-6R 配基; 抗肿瘤活性; 细胞周期

中图分类号: R965

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2011) 02-0165-05

Study of a novel compound 2460A with activities produced by fungus

QI Xiao-qiang, ZHU Feng-chang, ZHANG Yang, GUO Lian-hong, JIANG Rong, HE Qi-yang*, LI Yuan*

(Ministry of Health Key Laboratory of Biotechnology of Antibiotics, Institute of Medicinal Biotechnology, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Beijing 100050, China)

Abstract: With IL-6R as target, a new compound 2460A was identified from fungus using HTS screening model. The taxonomics of the produced strain was confirmed to be *Trichoderma hazianum* rifai after sequencing analysis of rDNA-ITS (internal transcribed spacer). Results showed that this compound has a binding activity on IL-6R competed with IL-6, thus it is a new ligand of IL-6R originating from microbe. With MTT assay, the anti-tumor activities of 2460A were demonstrated on CM126 and HT-29 cell lines separately, the IC_{50} are $2.17 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ and $1.8 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ respectively. The compound affected lightly the HT-29 cell cycle at S phase. Studies for the anti-tumor activity of 2460A *in vivo* are in progress in our lab.

Key words: 2460A; *Trichoderma hazianum*; ligand of IL-6R; anti-tumor activity; cell cycle

本实验室采用自行构建以重组白细胞介素 6 受体 (IL-6R) 为靶位、基于受体配基竞争结合为基础的高通量筛选模型, 从哈茨木霉 (*Trichoderma hazianum*) 发酵产物中分离获得的一种新结构化合物 2460A, 已确定其结构式为: 2-(N-正庚基) 亚氨基-3-氧代-4 α -甲基-5-氧代-7-(2-羟乙基)-8-(E-异丙烯

基)-2, 3-二氢萘并[2, 3-b]1, 4-二氧六环, 分子式为 $C_{25}H_{31}NO_5$, 并已申请国家发明专利 (申请号: 200510082974.X)。

哈茨木霉 (*Trichoderma hazianum*) 是植物病原菌的拮抗菌, 该菌能产生多种酶, 如几丁质酶、 β -(1, 3) 葡萄糖酶及蛋白酶等, 可降解植物病原菌胞壁从而抑制病原菌生长, 作为植物生物防治剂具有重要的经济应用意义。由哈茨木霉所产生的抗生素为研究者所关注。如木霉菌肽 A IIIc (trichorzianin A IIIc) 是哈茨木霉产生的大肽抗生素, 其分子式为 $C_{91}H_{149}N_{23}O_{24}$ (Ac-Aib-Ala-Ala-Aib-Aib-Gln-Aib-Aib-

收稿日期: 2010-08-30.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30371702).

*通讯作者 Tel: 86-10-63131856, Fax: 86-10-63017302,

E-mail: qyh2000bj@yahoo.com.cn

Tel: 86-10-63013336, Fax: 86-10-63017303,

E-mail: yuanwli@263.net

Aib-Ser-Leu-Aib-Pro-Val-Aib-Ile-Gln-Gln-Trp-ol), 具有抗真菌活性^[1, 2]。还有由哈茨木霉产生的抗生素曲古净 HA 和 MA (trichorzins), 其含有 HAI、HAII、HAIII、HAV、HAVI、HAVII 和 HAVIII 等多种活性组分, 结构均为含 18 个氨基酸残基的多肽, 该抗生素具有抗植物致病真菌、金葡菌、大肠杆菌的活性, 此外还有增加卵磷脂酰胆碱/胆固醇 (7/3) 脂质体的膜通透性作用^[3]。Cutler 等从哈茨木霉中分离出一种新化合物 6-pentyl- α -pyrone (6-戊基- α -吡喃酮), 该化合物对若干微生物如卷曲毛壳菌、卷曲刺毛壳菌、黄曲霉、大肠杆菌及枯草芽孢杆菌等具有抗菌活性^[4]。尽管迄今为止哈茨木霉所产生的抗生素尚未有药物应用的报道, 但是上述研究显示, 该微生物的次生代谢产物有可能成为新型微生物药物的重要来源。作为具有抗肿瘤活性的新化合物 2460A, 在哈茨木霉产物中尚属首次报道。

本文将报道 2460A 产生菌的分类研究, 确定其具有 IL-6R 的配基活性、体外抗肿瘤活性及对肿瘤细胞周期的影响。

材料与方法

试剂及抗体 重组白细胞介素 6 受体 (IL-6R, 本室制备)。小鼠抗人 hsIL-6R 抗体 (R&D 公司)。辣根过氧化物酶标记的马抗小鼠抗体 IgG (北京中山生物技术有限公司)。Tween 20 (Sigma 公司)。胎牛血清为杭州四季青生物工程材料有限公司产品。细胞培养基为 Hyclone 公司产品。二甲基亚砜 (dimethyl sulfoxide, DMSO)、碘化丙锭 (propidium iodide, PI)、RNA 酶及 MTT 均购自美国 Sigma 公司。丙烯酰胺、SDS、Tris 碱和过硫酸铵均为美国 Amresco 公司产品。

哈茨木霉培养基 种子和发酵培养基: 1% 甘油, 2% 葡萄糖, 1% 蔗糖, 0.2% 黄豆饼粉, 1% 蛋白胨, 0.03% KH_2PO_4 , 0.25% 聚乙二醇, 0.3% NaNO_3 , 0.3% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, pH 6.0, 15 磅 (1 磅 = 0.453 6 kg) 消毒 30 min。斜面 YM 培养基: 0.4% 酵母粉, 1% 麦芽浸膏粉, 0.4% 葡萄糖, 1.2% 琼脂, pH 7.2, 10 磅消毒 30 min。

细胞培养 人骨髓癌细胞 CM126 来源于本所生物化学室, 培养于含 10% 胎牛血清的高糖 DMEM 培养基; 人结肠癌细胞 HT-29 由中国医学科学院药物研究所药理室提供, 培养于含 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养基。于 5% CO_2 、37 °C 条件下培养。

真菌总 DNA 提取 平板培养 10 天菌落用解剖刀刮取菌丝, 置 1.5 mL 离心管中, 加入 CTAB 提取缓冲液 [2% CTMB, 100 mmol·L⁻¹ Tris-HCl (pH 8.0),

EDTA 20 mmol·L⁻¹ (pH 8.0), 1% PVP-360, 1.4% NaCl, 用前加入 0.2% 巯基乙醇] 200 μL 及少量石英砂, 用玻璃棒研磨, 然后加入 CTAB 400 μL , 65 °C 水浴 1 h, 12 000 r·min⁻¹ 离心 10 min, 取上清液以饱和酚-氯仿-异戊醇 (25 : 24 : 1) 分别抽提, 最后以无水乙醇沉淀, 12 000 r·min⁻¹ 离心, 倒出乙醇溶液, 晾干。最后复溶于纯水 50 μL 备用。

rDNA 的 ITS 序列分析^[5, 6] 采用对 rDNA (核蛋白体 DNA) 的 ITS (内在转录间隔, internal transcribed spacer) 序列进行分析。设计 PCR 引物为 ITS1: 5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3'; ITS4: 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'。PCR 扩增体系 (50 μL): 纯水 30 μL , 缓冲液 5 μL , Mg^{2+} 3 μL , dNTP 2 μL , 引物各 2 μL , DNA 聚合酶 4 μL (4U), 模板 DNA 2 μL 。PCR 扩增条件: 95 °C 3 min, 94 °C 1 min, 54 °C 40 s, 72 °C 1 min, 30 个循环; 72 °C 10 min。序列测定委托申能博彩生物科技有限公司进行。

IL-6R 配基活性的测定 重组人 IL-6 溶解于磷酸盐缓冲液 (PBS, pH 7.2), 质量浓度为 1 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 96 孔酶标板中每孔加入 100 μL , 4 °C 放置过夜→吸去每孔上述液体, 加入含 3% BSA 的 PBS 溶液 250 μL , 4 °C 放置 8 h→吸去每孔溶液, 以 PBS 洗涤培养板 5 次→2460A 样品以含 1% BSA 的 PBS 溶解, 每孔加入 50 μL , 同时加入重组 IL-6R (1 : 1 000) 50 μL , 4 °C 放置过夜→以 PBST (含 0.1% Tween 20 的 PBS) 洗涤培养板 5 次→每孔加入以 PBST (1 : 1 000) 稀释的小鼠抗人 hsIL-6R 抗体 100 μL , 4 °C 放置 1 h→用 PBST 洗涤培养板 5 次→每孔加入以 PBST 按 1 : 5 000 稀释的辣根过氧化物酶标记马抗小鼠 IgG 抗体 100 μL , 4 °C 放置 1 h→以 PBST 洗涤培养板→每孔加入底物 TMB 和过氧化氢各 100 μL , 室温放置 45 min, 观察显色过程→每孔加入 2 mol·L⁻¹ HCl 100 μL 以终止显色, 采用酶标比色计于波长 450 nm 测定吸收度 (A) 值。本实验设定加 TMB 空白孔调零, 并设定试剂对照孔 (不加 2460A 样品)。

2460A 和 IL-6 竞争结合 IL-6R 率的计算: 2460A 竞争结合率 = [(IL-6 样品对照 A_{450} - 2460A 样品 A_{450}) / IL-6 样品对照 A_{450}] × 100%。

肿瘤细胞的抑制作用 采用 MTT 法分别对人骨髓癌细胞 CM126 和人结肠癌细胞 HT-29 进行检测。取对数生长期细胞, 按细胞数 4×10^3 / 孔接种于 96 孔培养板, 24 h 待细胞贴壁后, 用不同浓度的 2460A (1.0 ~ 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 处理细胞 72 h。测定前每孔加入 500 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ MTT 100 μL , 37 °C 孵育 2 h 后小心吸

除培养液, 每孔加入 DMSO 200 μL , 震荡混匀, 采用酶标仪于 570 nm 测定 A 值。各测试孔的 A 值减去本底 A 值 (完全培养基: 加 MTT, 无细胞), 根据各平行孔的 A 值计算 $\bar{x} \pm s$ 。细胞存活率 (%) = (加药细胞 A 值/对照细胞 A 值) \times 100%, 根据细胞存活率绘制抑制曲线, 计算 IC_{50} 值。

2460A 对肿瘤细胞周期的影响 分别取人骨髓瘤细胞 CM126 和人结肠癌细胞 HT-29 对数生长期细胞, 按细胞数 4×10^5 /孔接种于 6 孔板, 24 h 待细胞贴壁后用不同浓度的 2460A (5.0 、 10.0 和 $25.0 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 处理细胞, 继续培养 24 h, 消化经药物处理的细胞, 加入预冷的 PBS 洗涤 2 次, 以 1 mL 预冷的 70% 乙醇于 4°C 固定过夜。染色前 PBS 洗涤 2 次, 将细胞重悬于 PBS 100 μL 中, 加入 RNase A (终质量浓度 $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), 37°C 培养 30 min 消化 RNA, 然后加入碘化丙啶 (PI) 染色液 (终质量浓度 $50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), 室温避光染色 1 h, 细胞经 300 目尼龙网过滤后, 用流式细胞仪测定 PI 荧光强度, MODFIT 软件分析细胞周期变化。

结果

1 2460A 产生菌的分类

采用前述方法, 对产生菌 rDNA 的 ITS 序列进行分析, 其结果为: 5'-GGGGCTACGGAGGTAACCTCC CAACCAATGTGAACGTTACCAAACCTGTTGCCT CGGCGGGATCTCTGCCCGGGTGCCTCGCAGCC CCGACCAAGGCGCCCGCGGAGGACCAACCA AAACCTTATTGTATACCCCTCGCGGGTTTTTTT TATAATCTGAGCCTTCTCGGCGCCTCTCGTAGGC GTTTCGAAAATGAATCAAACTTTCAACAACGG ATCTCTTGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAG CGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTC AGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGC CCGCCAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTCCGAG CGTCATTTCAACCCTCGAACCCCTCCGGGGGGT CGGCGTTGGGGATCGGCCCTGCCTTGGCGGTGG CCGTCTCCGAAATACAGTGGCGGTCTCGCCGCA GCCTCTCCTGCGCAGTAGTTTGCACACTCGCATC GGGAGCGCGGCGGCTCCACAGCCGTTAAACAC CCAACTTCTGAAATGTTGACCTCGGATCAGGTA GGAATACCCGCTGAACTTAAGCATATCAAAA-3'。

采用程序 MEGA3.1, 以邻接法 (NJ) 进行 Bootstrap 分析。经 BLAST 进行比较, 与 2460 菌株序列同在一个小分支的 AF194010 序列仅在 ITS1 区有 1 个碱基的插入, 相似性达 99% 以上。用相似性搜索得到的相似性较高的序列以及作为外群的 *Trichoderma viride*

(AF140045) 序列构建系统进化树, BLAST 比较 2460A 产生菌的系统进化树分析见图 1。从进化树可见, 除登录号为 Z68187 的序列外, Bootstrap 值为 95% 的分支应同属哈茨木霉 (*Trichoderma hazianum*)。

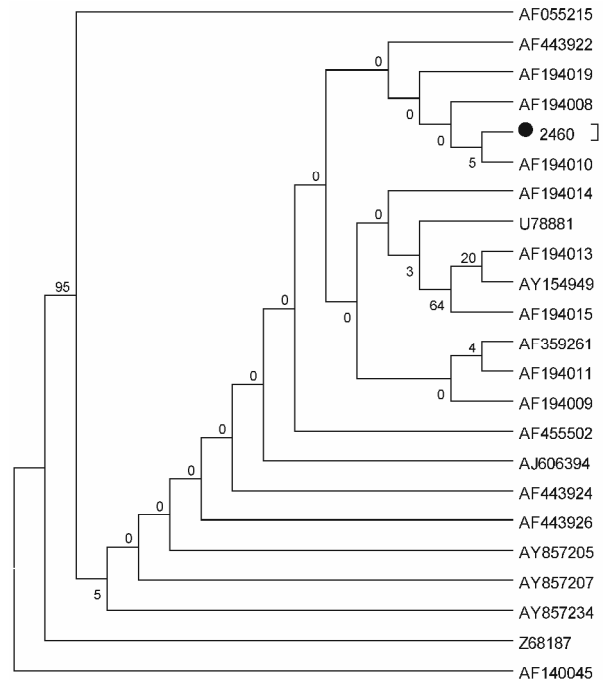


Figure 1 Evolutionary tree

2 2460A 具有白细胞介素 6 受体 (IL-6R) 的配基活性

将 2460A 配制成 0.0025×10^{-6} 、 0.025×10^{-6} 、 0.25×10^{-6} 、 2.5×10^{-6} 和 $25 \times 10^{-6} \text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 样品溶液, 分别测定样品与 IL-6 竞争结合 IL-6R 的活性, 计算出竞争结合率分别为 0.503 6%、0.588 23%、0.635 9%、0.692 8% 和 0.702%。2460A 在上述浓度范围内, 与 IL-6 竞争结合 IL-6R 活性具有剂量效应, 其 IC_{50} 为 $2.5 \times 10^{-9} \text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 表明 2460A 具有 IL-6R 的配基活性 (图 2)。

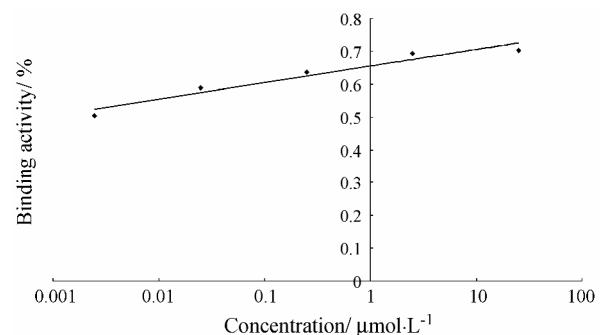


Figure 2 Binding activities of 2460A on IL-6R at various concentrations competed with IL-6. IC_{50} : $2.5 \times 10^{-9} \text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$; $y = 0.0218 \ln(x) + 0.6547$; $R^2 = 0.9403$

3 2460A 对结肠癌 HT-29 细胞和骨髓癌 CM126 细胞的抑制作用

采用 MTT 法测定 2460A 对肿瘤细胞 CM126 和 HT-29 生长的抑制作用, 结果 (图 3) 表明, 当 2460A 的浓度为 1×10^{-5} 和 $2.5 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 对 CM126 细胞的抑制率分别为 20% 和 78%; 采用相同浓度 2460A 样品对 HT-29 细胞的抑制率则分别为 29% 和 79%。在实验样品浓度 ($1 \times 10^{-6} \sim 100 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 范围内, 对两种细胞的抑制作用均呈剂量效应。结果显示, 2460A 对 CM126 细胞的 IC_{50} 为 $2.17 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 对 HT-29 细胞的 IC_{50} 为 $1.8 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

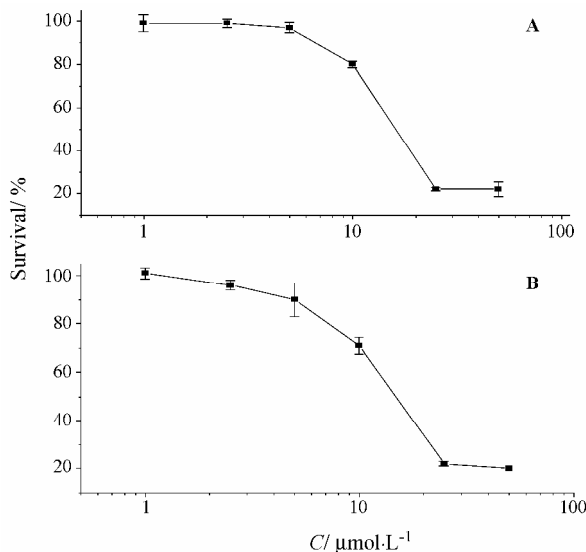


Figure 3 Inhibitory effects of 2460A on CM126 (A) and HT-29 (B) cells

4 2460A 对骨髓癌 CM126 细胞和结肠癌 HT-29 细胞的细胞周期的作用

采用不同浓度 2460A 样品 ($5 \times 10^{-6} \sim 25 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 分别作用于人骨髓癌细胞 CM126 和人结肠

癌细胞 HT-29, 24 h 后经流式细胞仪检测样品对两种细胞的细胞周期的影响。结果 (图 4) 显示, 在上述样品浓度下, 2460A 对人骨髓癌细胞 CM126 的细胞周期基本无影响, 但是对人结肠癌细胞 HT-29 在 S 期略有影响, 当 2460A 的浓度为 $25 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 阻断在该期的细胞数增加了 21%。

讨论

本研究通过对 2460A 产生菌核糖体 DNA 转录间隔区 (rDNA-ITS) 序列测定, 确定了其产生菌为哈茨木霉 (*Trichoderma hazianum*), 已证明其为新结构化合物。MTT 法测定结果表明, 该化合物能够抑制肿瘤细胞 CM126 和 HT-29 的生长, 对 CM126 细胞的 IC_{50} 为 $2.17 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 对 HT-29 细胞的 IC_{50} 为 $1.8 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。本文还探讨了 2460A 对上述两种肿瘤细胞的细胞周期的影响, 实验结果显示 2460A 对 CM126 的细胞周期无影响, 在浓度为 $2.5 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时对 HT-29 细胞 S 期略有影响, 该期的细胞数增加了 21%, 据此推测 2460A 对肿瘤细胞染色体 DNA 复制过程影响可能较小。

研究结果还显示, 2460A 能和白细胞介素 6 (IL-6) 竞争结合白细胞介素 6 受体 (IL-6R), 因此其为来源于微生物的具有 IL-6R 配基活性的化合物。已知 IL-6 是一种具有多功能的细胞因子, 和许多严重疾病如自身免疫疾病、肿瘤、心血管疾病的病理过程密切相关。实验证明^[7], IL-6R 在人骨髓瘤细胞分布丰度高, 可以促进骨髓瘤细胞生长^[8]; 在前列腺癌细胞存在 IL-6R 并分泌 IL-6 参与该癌细胞的增殖作用, 临床研究表明前列腺癌易于转移至淋巴结、骨组织和肝脏等分泌 IL-6 较高的组织, 这提示 IL-6 是促进该癌细胞生长的因子之一; 此外膀胱癌、肝癌等增殖也与 IL-6 细胞因子的作用有关^[9, 10]。鉴于 IL-6 与许多严重疾病

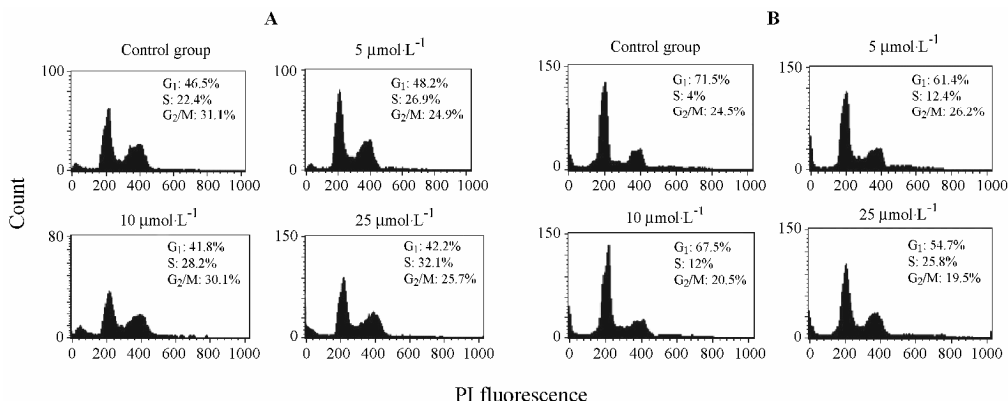


Figure 4 Effects of 2460A on the cell cycles of CM126 (A) and HT-29 (B) cells

特别是肿瘤的病理过程有密切关系, 因此通过降低该细胞因子在体内的水平有可能达到治疗这些疾病的目的。为此研究者通过不同途径进行了大量相关工作, 并获得显著进展^[11]。也对微生物和其他来源天然产物小分子化合物 IL-6 抑制剂进行了若干研究。

Masahiko 等^[12]从链霉菌 *Streptomyces nitrosporeus* K93-0711 中发现了一种化合物 Madindoline A (MDL-A), 对其进行了全合成, 该化合物阻止了 IL-6/IL-6R/gp130 三聚体的二聚化, 但不影响 IL-6/IL-6R/gp130 三聚体的形成, 可抑制 MH60 细胞生长。骨质疏松模型小鼠口服 MDL-A (剂量 60 mg·kg⁻¹) 可显著降低小鼠血清的 Ca²⁺水平。Patrick 等^[13]从青霉菌中发现了霉酚酸 (MPA), 研究显示 MPA 能降低由 IL-1 β 诱导的远端肾小管上皮细胞 (DTC) 和近端肾小管上皮细胞 (PTC) 中 IL-6 的含量, 并能以剂量依赖方式抑制 IL-6 mRNA 表达。ERBF 是 Hayashi 等^[14]从蟾蜍中分离的一种小分子化合物, 该化合物以剂量依赖方式拮抗游离的 IL-6 与 IL-6R 的结合。本文研究结果表明, 2460A 是具有抗瘤活性的小分子新化合物, 作为哈茨木霉的抗肿瘤活性产物为国内外首次报道。本化合物是否通过和炎症细胞因子 IL-6 竞争结合 IL-6R, 降低该因子的体内活性, 并进而对炎症细胞因子网络进行调节, 从而具有抗肿瘤活性尚需进行探讨。2460A 的体内抑瘤活性研究工作尚在进行中, 对其抗瘤作用机制需进行全面深入研究。

References

- [1] Bodo B, Rebuffat S, El Hajji M, et al. Structure of trichorzianine A IIIc, an antifungal peptide from *Trichoderma harzianum* [J]. *J Am Chem Soc*, 1985, 107: 6011-6017.
- [2] El Hajji M, Rebuffat S, Lecommandeur D, et al. Isolation and sequence determination of trichorzianines A antifungal peptides from *Trichoderma harzianum* [J]. *Int J Pept Protein Res*, 1987, 29: 207-215.
- [3] Goulard C, Mi S, Rebuffat S, et al. Trichorzins HA and MA, antibiotic peptides from *Trichoderma harzianum* I. Fermentation, isolation and biological properties [J]. *J Antibiot*, 1995, 48: 1248-1253.
- [4] Cutler HG, Cox RL, Crumley FG, et al. 6-Pentyl- α -pyrone from *Trichoderma harzianum*: its plant growth inhibitory and antimicrobial properties [J]. *Agric Biol Chem*, 1986, 50: 2943-2945.
- [5] Bissett J. A revision of the genus *Trichoderma*. III Section *Pachybasium* [J]. *Can J Bot*, 1991, 69: 2373-2417.
- [6] Kumar S, Tamura K, Nei M. MEGA3: integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment [J]. *Brief Bioinform*, 2004, 5: 150-163.
- [7] Nachbaur DM, Herold M, Maneschg A, et al. Serum interleukin-6 in multiple myeloma and other hematological disorders: correlation with disease activity and other prognostic parameters [J]. *Ann Hematol*, 1991, 62: 54-58.
- [8] Kawano M, Hirano T, Matsuda T, et al. Autocrine generation and essential requirement of BSF-2/IL-6 for human multiple myeloma [J]. *Nature*, 1988, 332: 83-85.
- [9] Snyers L, De Wit L, Content J. Glucocorticoid up-regulation of high-affinity interleukin 6 receptors on human epithelial cells [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1990, 87: 2838-2842.
- [10] Bauer J, Lengyel G, Bauer TM. Regulation of interleukin-6 receptor expression in human monocytes and hepatocytes [J]. *FEBS Lett*, 1989, 249: 27-30.
- [11] Stefan RJ, Georg HW, Jürgen S. The IL-6/sIL-6R complex as a novel target for therapeutic approaches [J]. *Expert Opin Ther Targets*, 2007, 11: 613-624.
- [12] Masahiko H, Mun-Chual R, Akiko E, et al. Suppression of bone resorption by madindoline A, a novel nonpeptide antagonist to gp130 [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99: 14728-14733.
- [13] Patrick CB, Binytha W, Helmut G. Effects of mycophenolic acid on IL-6 expression of human renal proximal and distal tubular cells *in vitro* [J]. *Nephrol Dial Transplant*, 2004, 19: 47-52.
- [14] Hayashi M, Rho MC, Fukami A, et al. Biological activity of a novel nonpeptide antagonist to the interleukin-6 receptor 20S, 21-epoxy-resibufogenin-3-formate [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2002, 303: 104-109.