

利用 SIE 转录活性荧光素酶报告基因系统检测 白细胞介素 6 受体拮抗剂的生物活性

王自强, 王灿, 董闪闪, 邵泓, 陈钢*

(上海市食品药品检验所, 上海 201203)

摘要 目的: 利用 sis 诱导元素 (sis-inducible element, SIE) 转录活性荧光素酶报告基因系统检测白细胞介素 6 (IL-6) 受体拮抗剂的生物活性。方法: 采用脂质体转染法将含有 SIE 转录因子组件及荧光素酶报告基因的质粒 pGL 4.47 转入 293T 细胞, 并通过潮霉素压力筛选获得稳定转染细胞株。加入 IL-6 激活稳转细胞株中的荧光素酶报告基因, 构建 SIE 转录活性荧光素酶报告基因系统, 并进一步建立基于此系统的 IL-6 受体拮抗剂药物的生物学活性定量检测方法。结果: IL-6 可激活 293T-SIE 稳定转染细胞中的荧光素酶报告基因, 且具有量效关系。对此系统检测 IL-6 受体拮抗剂药物的生物学活性进行方法学验证, 显示本检测方法准确性及重复性均较好。结论: 建立了一种基于荧光素酶报告基因系统的 IL-6 受体拮抗剂药物生物学活性检测方法, 与现有方法相比, 具有耗时少、准确性高、重复性好的优势。

关键词: IL-6 受体拮抗剂; 荧光素酶报告基因; 稳定转染细胞; 生物学活性; 方法验证

中图分类号: R 917

文献标识码: A

文章编号: 0254-1793 (2018) 10-1755-06

doi: 10.16155/j.0254-1793.2018.10.13

Detection of biological activity of interleukin-6 receptor antagonist by SIE transcriptionally active luciferase reporter gene system

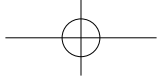
WANG Zi-qiang, WANG Can, DONG Shan-shan, SHAO Hong, CHEN Gang*

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

Abstract Objective: To determine bioactivity of interleukin-6 (IL-6) receptor antagonists using sis-inducible element (SIE) transcriptionally active luciferase reporter gene system. **Methods:** Plasmid pGL 4.47 containing the SIE transcription factor and the luciferase reporter gene was transferred into 293T cells by liposome transfection, and the stable transfected cell line (293T-SIE) was obtained by hygromycin pressure screening. Being activated by IL-6, the luciferase reporter gene system was constructed and the bioactivity detection method of IL-6 receptor antagonist based on this system was further established. **Results:** In 293T-SIE, the luciferase reporter gene could

* 通信作者 Tel: (021) 38839900-26111; E-mail: chengang@smda.gov.cn

第一作者 Tel: 18621502182; E-mail: ycwzq0219@gmail.com



be activated by IL-6 with a dose-effect relationship. The methodological validation of this system for the detection of biological activity of IL-6 receptor antagonists showed that the method had good accuracy and reproducibility.

Conclusion: A novel method was established to detect the bioactivity of IL-6 receptor antagonist based on the luciferase reporter gene system which had the advantages of being less time-consuming, having higher accuracy and better reproducibility compared with the existing methods.

Keywords: IL-6 receptor antagonist; luciferase reporter gene; stable transfected cell; bioactivity; method validation

白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6)是调节免疫反应和炎症反应的一种多效性细胞因子,与IL-6受体(IL-6R)结合后,可诱导软骨细胞和滑膜细胞产生基质金属蛋白酶(MMP)-1、MMP-3和MMP-13^[1],还可通过诱导表达RANKL,从而促进破骨细胞的破骨作用,造成软骨的损伤^[2],在类风湿性关节炎患者的关节骨和软骨组织破坏方面显示出强大的作用。托珠(tocilizumab)是一种具有IL-6R抑制剂活性的治疗性单克隆抗体,通过与IL-6竞争结合位点而抑制IL-6向胞内转导信号,阻断IL-6的生物学活性,从而起到治疗类风湿性关节炎的作用^[3]。随着近年来CAR-T细胞免疫治疗的兴起,托珠还被用于对抗因治疗后IL-6过量释放而引发的细胞因子风暴(cytokine storm)^[4-6]。

目前,托珠的生物学活性测定方法主要以IL-6生长依赖细胞KT-3为基础^[7],通过对托珠处理后的KT-3细胞的生长抑制情况的评价进而测定托珠的相对生物学活性。但KT-3细胞为悬浮细胞,且其生长依赖特定的细胞因子,培养要求高,实际操作中失败机率较大,加之该方法耗时长,更增加了实验的时间和人力成本。

IL-6可经1条直接通道Janus激酶(Janus kinase, JAK)/信号的转录子和活化子(signal transducers and activators of transcription, STAT)途径,将信号从细胞表面受体转导至核,调控基因的转录,这一过程主要包括胞浆JAK、STAT先后磷酸化, sis诱导因子(sis-inducing factor, SIF)复合物的形成、核转位及与c-fos启动区sis诱导元素(sis-inducible element, SIE)的结合^[8],其中SIF复合物与SIE的结合是IL-6信号通路的关键环节。本研究拟建立一种能够稳定表达SIE-荧光素酶报告基因的细胞株,通过检测该细胞株在外源IL-6刺

激下的荧光素酶活性即可测定托珠的相对生物学活性。

1 材料

1.1 细胞

293T细胞购自中国科学院上海细胞库,由上海食品药品检验所生化药品生物制品室建库保存。

1.2 质粒

含有SIE启动子区及Luciferase荧光素酶编码基因的质粒pGL4.47购自美国Promega公司。

1.3 主要试剂及仪器

阳离子脂质体转染试剂Lipofectamine 2000购自美国Invitrogen公司;DMEM培养基及胎牛血清(FBS)均购自美国Gibco公司;潮霉素B(Hygromycin B)购自美国Thermo Fisher公司;人重组白介素6(hrIL-6)购自美国Sigma公司;荧光素酶底物Steady-Glo购自美国Promega公司;托珠单抗注射液(批号B2050B06)及托珠单抗注射液参比品(批号11759)均由瑞士罗氏公司提供;Spectra M5多功能酶标仪购自美国Molecular DevECes公司。

2 方法与结果

2.1 稳转细胞株的构建

取对数生长期的293T细胞,转染前1天将细胞接种于6孔板,每孔 1×10^6 个细胞,24 h内待细胞融合度达到70%~90%,吸尽培养上清,加入无血清DMEM培养基1.5 mL,即得细胞培养液。另取2支1.5 mL EP管,分别加入无血清DMEM培养液0.25 mL,然后在其中1支EP管中加入pGL4.47质粒2 μ L,另1支EP管中加入lipofectamine 2000阳离子脂质体5 μ L,室温孵育10 min后将2支EP管中的液体混匀,继续室温孵育15 min。将0.5 mL孵育后的混合溶液缓慢加入细胞培养液中,温和混匀,即完成转染操作,转染后细胞置于培养箱常规培养。质

粒转染后 48 h, 加入含有 $0.4 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 潮霉素 B 的 DMEM 培养液, 继续培养, 根据细胞死亡情况和培养基的营养及时换液。以未转染的细胞作为对照, 待对照细胞全部死亡后, 消化转染组存活细胞, 制备成单细胞悬液, 接种于 96 孔板, 每孔理论上为 1 个细胞, 加入含有 $0.4 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 潮霉素 B 的 DMEM 培养液, 继续培养; 挑选生长状态良好的单细胞克隆依次全量转入 24 孔板、6 孔板、75 mm^2 细胞培养瓶, 用含有 $0.4 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 潮霉素 B 的 DMEM 培养液进行连续扩大培养至少 3 代, 得到一系列稳定表达由 SIE 所调控的荧光素酶的人肾上皮细胞株 293T-SIE 细胞克隆。

2.2 荧光素酶报告基因活性验证

分别取不同的 293T-SIE 细胞克隆, 按常规方法消化并计数^[9], 根据计数结果将细胞悬液稀释至 6×10^5 个 $\cdot \text{mL}^{-1}$, 以每孔 50 μL 加入 96 孔白板中, 共接种 6 个孔。其中 3 个孔加入无血清 DMEM 培养基 50 μL , 作为对照组, 另 3 个孔加入 hrIL-6 工作液 (取 hrIL-6 粉末 100 μg , 加入 1 mL 无菌水溶解, 得到 hrIL-6 储存液。取 hrIL-6 储存液, 用无血清 DMEM 培养基稀释至 $500 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$, 即得) 50 μL , 作为实验组, 混匀后常规培养。培养 6 h 后取出白板, 向每孔中加入荧光素酶底物 100 μL , 混匀后室温振荡 5 min。使用多功能酶标仪, 以每孔 0.5 s 的速度读取各孔的相对光单位 (relative light unit, RLU), 并计算实验组与对照组 RLU 平均值的比值。结果如图 1 所示, 编号为 T12 的细胞克隆具有显著的荧光素酶报告基因活性。

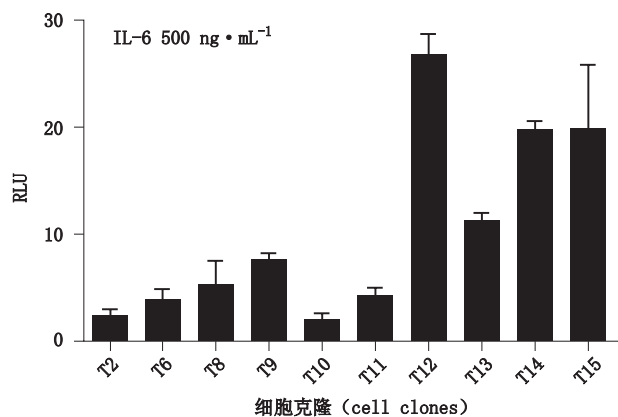
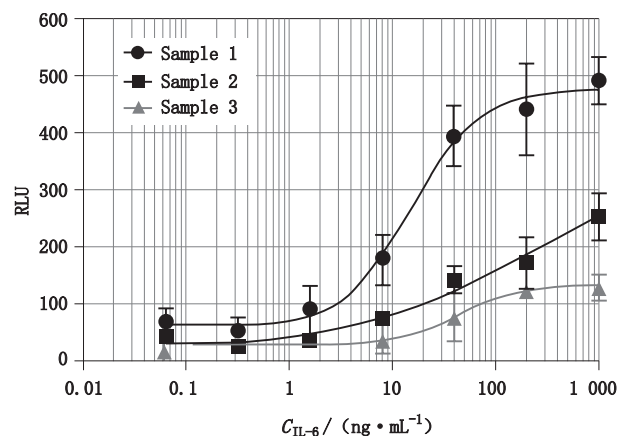


图 1 不同 293T-SIE 细胞单克隆的荧光素酶活性鉴定结果 ($n=3$)

Fig. 1 Identification results of luciferase activity of different 293T-SIE cell monoclonal

2.3 实验条件的优化

分别对细胞接种密度及 IL-6 刺激浓度进行优化。取处于对数生长期的 293T-SIE 细胞用 0.25% 胰酶消化, $1\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 2 min, 弃上清, 将细胞重悬于细胞培养液 (含 10% FBS 的无酚红 DMEM 培养基) 中, 计数。分别将细胞悬液稀释至 0.8×10^6 、 0.4×10^6 、 0.2×10^6 个 $\cdot \text{mL}^{-1}$, 以每孔 50 μL 接种于 96 孔白板。取 hrIL-6 储存液适量, 用无酚红 DMEM 培养基分别稀释至 2 000、400、80、16、3.2、0.61、0.13 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$, 得到 IL-6 梯度溶液。将 IL-6 梯度溶液加入上述细胞培养板中, 每孔 50 μL , 每个实验组均设置 3 个平行复孔, 将细胞培养板置于 37°C 、5% CO_2 培养箱中培养 6 h 后, 按“2.2”项中所述加入荧光素酶底物, 室温振荡 5 min, 读取 RLU。结果如图 2 所示, 当每孔细胞数量为 4×10^4 个时, 对不同浓度的 hrIL-6 响应强度普遍优于其他细胞接种密度, 同时在该接种密度下, 当 hrIL-6 溶液的刺激浓度为 100 $\text{ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 时, 发光信号达到次饱和, 据此确定优化后的细胞接种密度为每孔 4×10^4 个, hrIL-6 刺激质量浓度为 100 $\text{ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 。



细胞密度 (cell density): Sample 1, 4×10^4 cells per well; Sample 2, 2×10^4 cells per well; Sample 3: 1×10^4 cells per well

图 2 荧光素酶报告基因法测定生物学活性的条件优化结果图 ($n=3$)

Fig. 2 Optimization of results for the determination of biological activity by luciferase reporter gene assay

2.4 托珠单抗注射液相对生物学活性测定

取处于对数生长期的 293T-SIE 细胞以 0.8×10^6 个 $\cdot \text{mL}^{-1}$ 的浓度, 接种于 96 孔白板, 每孔 50 μL 。取 hrIL-6 储存液, 用不含血清的无酚红 DMEM 培养基稀释至 200 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$, 得到 hrIL-6 工作液。取托珠单抗参比品, 用不含血清的无酚红 DMEM 培养基稀释至

200 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 然后 3 倍倍比稀释 9 个浓度, 得到参比品溶液。取托珠单抗注射液待测样品, 用不含血清的无酚红 DMEM 培养基稀释至 200 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 然后 3 倍倍比稀释 9 个浓度, 得到待测样品溶液。将上述不同浓度的参比品溶液与待测样品溶液, 按每孔 25 μL 加至已接种细胞的 96 孔白板上。将 hrIL-6 工作液加入上述细胞培养板中, 每孔 25 μL 。另设阴性对照与空白对照: 两者均不加参比品或待测样品溶液, 且阴性对照孔每孔加 hrIL-6 稀释液 (取 200 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ hrIL-6 工作液, 用不含血清的无酚红 DMEM 培养基稀释至 100 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$, 即得) 50 μL , 空白对照孔每孔加不含血清的无酚红 DMEM 培养基 50 μL 。每个实验组均设置 3 个平行复孔, 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中培养 6 h。向每孔中加入荧光素酶底物 100 μL , 混匀后室温振荡 5 min。使用多功能酶标仪, 以每孔 0.5 s 的速度读取各孔的 RLU。以参比品或待测样品的浓度的对数值为横坐标, 各样品孔的 RLU 与空白对照 RLU 的平均值之差为纵坐标, 分别绘制参比品与待测样品的量效曲线。通过软件 GraphPadPrism 5.0 非线性拟合中的 Dose-response-Stimulation 模式下的 log [agonist] vs. response-variable slope 进行数据回归分析。当参比品和待测样品的拟合曲线平行性假设得到确认 ($P>0.05$) 时, 使用 constrained 的曲线最大值、最小值、斜率, 计算参比品和待测样品的半效量浓度 EC_{50} , 按参比品 EC_{50} /待测样品 $\text{EC}_{50} \times 100\%$ 计算待测样品相对生物学活性。结果显示, 参比品和待测样品的拟合曲线平行性假设得到确认 ($P=0.98$), 经 constrained 变形 (图 3), 计算得 EC_{50} , 参比品 EC_{50} 为 0.927 2 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 待测样品的 EC_{50} 为 0.982 5 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 按参比品 EC_{50} /待测样品 $\text{EC}_{50} \times 100\%$ 计算得待测样品的相对生物学活性为 94.37%。同批次样品经现行的 KT-3 细胞生长抑制法测定相对生物学活性, 结果为 102.27%, 2 种方法结果接近。

2.5 方法验证

2.5.1 回收率 利用托珠参比品配制相对生物学活性分别为 150% 及 50% 的验证样品, 按“2.4”项所述测定其相对生物学活性, 计算本方法的回收率。经计算, 本方法对 150% 验证样品的回收率为 85.4%, 对

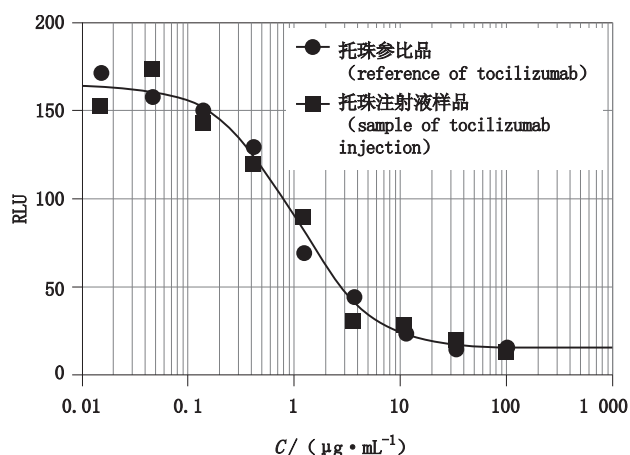


图 3 报告基因法测定托珠注射液相对生物学活性结果图

Fig. 3 Luciferase reporter gene assay for determining the relative biological activity of tocilizumab injection

50% 验证样品的回收率为 112.9%, 准确性较好 (拟合曲线见图 4, 测定结果见表 1)。

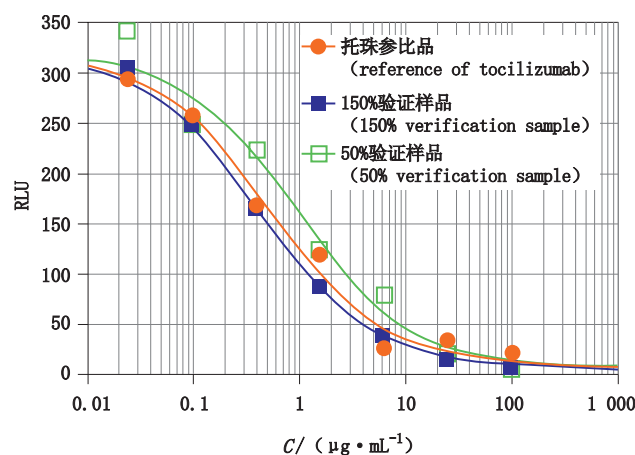


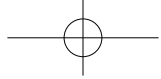
图 4 报告基因法测定托珠注射液相对生物学活性回收率验证结果图 ($n=3$)

Fig. 4 Luciferase reporter gene assay for determining the recovery rate of relative biological activity of tocilizumab injection

2.5.2 重复性 由同一实验人员针对同一批号的托珠单抗注射液样品的相对生物学活性进行 3 次独立测定, 计算 3 次结果的 RSD, 以此评价本方法的重复性。结果见表 2。3 次测定结果的 RSD 为 14.4%, 重复性较好。

3 讨论

单克隆抗体等大分子生物技术药物的理化性质与作用机制均十分复杂, 仅靠理化表征的检测很难保证质量, 因此必须根据其药物机理设计合适的生物学活性测定方法, 对其有效性进行评价^[10]。

表 1 报告基因法测定托珠注射液相对生物学活性回收率验证结果 ($n=3$)

Tab. 1 Luciferase reporter gene assay for determining the recovery rate of relative biological activity of tocilizumab injection

样品 (sample)	EC ₅₀ / ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	期望值 (expected value) / %	实测值 (measured value) / %	回收率 (recovery rate) / %
参比品 (reference)	0.537 9	/	/	/
150% 验证样品 (150% verification sample)	0.420 1	150	128.04	85.4
50% 验证样品 (50% verification sample)	0.953 1	50	56.44	112.9

表 2 报告基因法测定托珠注射液相对生物学活性重复性验证结果

Tab. 2 Luciferase reporter gene assay for determining the repeatability of relative biological activity of tocilizumab injection

实验编号 (No.)	相对生物学活性 (relative biological activity) / %	平均值 (average) / %	RSD / %
1	94.37	95.13	14.4
2	109.16		
3	81.85		

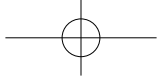
荧光素酶报告基因法是一种基于已知信号传导通路的快速、灵敏,操作较简便的细胞水平检测方法,对分子作用机制明确的药物,基于报告基因法的生物学活性测定方法已有十分广泛的应用。如 Sanchez 等^[11]利用报告基因系统解析独脚金萌发素内酯 (strigolactones) 结构与生物学活性的关系,刘春雨等^[12]建立的抗 CD20 单克隆抗体 ADCC 生物学活性测定方法,张军要等^[13]建立的重组人白介素 -22 生物学活性检测方法,张颖妹等^[14]建立的白细胞介素 1 及白细胞介素 1 受体拮抗剂的生物活性测定方法等。本研究建立的 IL-6 受体拮抗剂生物学活性测定方法是基于 JAK/STAT 这一信号通路进行设计,通过转染、压力筛选后获得对 IL-6 刺激敏感的 293T-SIE 细胞株。通过条件优化,确认在细胞接种密度为每孔 4×10^4 个,IL-6 刺激浓度为 $100 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 时,对相对生物学活性在 50%~150% 在托珠单抗注射液有准确的测定能力。与现有的基于 KT-3 细胞增殖抑制能力的测定方法相比,具有相似的准确性,但却将检测耗时由 3 d 减少至 8 h 之内,大大节约了相关产品放行或质量监督时的时间成本。同时,由于本研究构

建的细胞株在培养过程中无需添加额外的细胞因子 (KT-3 细胞为 IL-6 依赖细胞),从而降低了试剂成本与培养难度,具有成为现有检测手段的替代方法的潜力。

本研究在数据分析时采用四参数回归模型,对不同浓度样品的发光信号进行非线性拟合,四参数回归模型用于 S 型曲线拟合效果好又相对简便,且各个参数具有较为实际的意义,因此目前被广泛使用^[15]。根据段徐华等^[16]的研究结果,分别对参比品与待测样品的结果进行四参数曲线拟合后,本研究还利用 GraphPadPrism 5.0 软件对上述曲线的平行性进行验证,在验证通过之后再进行相对生物学活性的计算,以保证结果的准确性。

参考文献

- [1] HASHIZUME M, MIHARA M. Desirable effect of combination therapy with high molecular weight hyaluronate and NSAIDs on MMP production [J]. Osteoarthritis Cartilage, 2009, 17 (11) : 1513
- [2] HASHIZUME M, HAYAKAWA N, MIHARA M. IL-6 trans-signalling directly induces RANKL on fibroblast-like synovial cells and is involved in RANKL induction by TNF- α and IL-17 [J]. Rheumatology (Oxford), 2008, 47 (11) : 1635
- [3] MURRAY E, ELLIS A, BUTYLKOVA Y, *et al.* Systematic review and network meta-analysis: effect of biologics on radiographic progression in rheumatoid arthritis [J]. J Comp Eff Res, 2018. doi: 10. 2217/ce-2017-0106. [published online]
- [4] SHENG F, HAN M, HUANG Z, *et al.* Interleukin 6 receptor inhibitor tocilizumab suppresses cytokine expression, inflammasome activation and phagocytosis in a cell model of sepsis [J]. Pharmazie, 2016, 71 (11) : 636
- [5] TANAKA T, NARAZAKI M, KISHIMOTO T. Immunotherapeutic implications of IL-6 blockade for cytokine storm [J]. Immunotherapy, 2016, 8 (8) : 959



- [6] ARITA Y, NAKAOKA Y, OTSUKI M, *et al.* Cytokine storm after cessation of tocilizumab in a patient with refractory Takayasu arteritis [J]. *Int J Cardiol*, 2015, 187: 319
- [7] SHIMIZU S, HIRANO T, YOSHIOKA R, *et al.* Interleukin-6 (B-cell stimulatory factor 2)-dependent growth of a Lennert's lymphoma-derived T-cell line (KT-3) [J]. *Blood*, 1988, 72(5): 1826
- [8] 王小丹, 陈香美, 冯哲, 等. 人胚肺成纤维细胞 WI-38 中 Ang II 信号转导途径的研究 [J]. *细胞生物学杂志*, 2003, 25(1): 37
WANG XD, CHEN XM, FENG Z, *et al.* Angiotensin II signal transduction pathway in normal human fetal lung diploid fibroblast cell line WI-38 [J], *Chin J Coll Biol*, 2003, 25(1): 37
- [9] 徐兰, 刘敏英. 293T 细胞的培养 [J]. *细胞生物学杂志*, 2009, 31(1): 130
XU L, LIU MY. Culture of 293T cells [J]. *Chin J Coll Biol*, 2009, 31(1): 130
- [10] 张峰, 孟淑芳. 治疗性单克隆抗体类制品质量控制标准的思考 [J]. *中国执业药师*, 2013, 10(1): 25
ZHANG F, MENG SF. The quality control of therapeutic monoclonal antibody products [J]. *China Licensed Pharm*, 2013, 10(1): 25
- [11] SANCHEZ E, ARTUSO E, LOMBARDI C, *et al.* Structure-activity relationships of strigolactones via a novel, quantitative in planta bioassay [J]. *J Exp Bot*, 2018, 69(9): 2333
- [12] 刘春雨, 王兰, 郭玮, 等. 基于报告基因的抗 CD20 单克隆抗体 ADCC 生物学活性测定方法的建立 [J]. *药学报*, 2015, 50(1): 94
LIU CY, WANG L, GUO W, *et al.* Development of a novel reporter gene method for determination of ADCC potency of anti-CD20 monoclonal antibody [J]. *Acta Pharm Sin*, 2015, 50(1): 94
- [13] 张军要, 黄智华, 黄予良, 等. 重组人白介素-22 生物学活性检测方法研究 [J]. *四川大学学报 (医学版)*, 2009, 40(1): 162
ZHANG JY, HUANG ZH, HUANG YL, *et al.* Study on the detection method for determining the bioactivity of recombinant human interleukin-22 [J]. *J Sichuan Univ (Med Sci Ed)*, 2009, 50(1): 94
- [14] 张颖妹, 王应, 徐茜梅, 等. 利用 NF- κ B 转录活性荧光素酶报告系统检测白细胞介素 1 及白细胞介素 1 受体拮抗剂的生物活性 [J]. *北京大学学报 (医学版)*, 2006, 38(6): 653
ZHANG YM, WANG Y, XU QM, *et al.* Application of NF- κ B reporter and dual-luciferase assays in the measure of bioactivity of interleukin-1 β and interleukin-1 receptor antagonist [J]. *J Peking Univ (Health Sci)*, 2006, 38(6): 653
- [15] 冯国双, 谭德讲, 刘韞宁, 等. 四参数 log-logistic 模型在生物活性测定研究中的应用 [J]. *药物分析杂志*, 2013, 33(11): 1849
FENG GS, TAN DJ, LIU WN, *et al.* Application of 4-parameter log-logistic model in bioassay [J]. *Chin J Pharm Anal*, 2013, 33(11): 1849
- [16] 段徐华, 董闪闪, 吴利红, 等. 相对效价测定中不同四参数回归计算法的比较 [C] // 中国药学会会议论文集. 南昌: 中国药学会, 2016: 55
DUAN XH, DONG SS, WU LH, *et al.* Comparison of different four-parameter regression calculation methods for relative potency [C] // *Proceedings of the Chinese Pharmaceutical Association Conference*. Nanchang: Chinese Pharmaceutical Association, 2016: 55

(本文于 2017 年 12 月 12 日收到)