

## CCK-8 法检测重组人白细胞介素-2 的活性

马 静<sup>1\*</sup>, 路 琛<sup>1\*</sup>, 左 丽<sup>2</sup>, 胡平生<sup>3</sup>, 赵 星<sup>2\*\*</sup>

(1. 贵阳医学院 生物技术专业, 贵州 贵阳 550004; 2. 贵阳医学院 基础医学院免疫学教研室, 贵州 贵阳 550004; 3. 江苏太瑞生诺生物医药科技有限公司, 江苏 太仓 215400)

**[摘 要]** 目的: 建立快速、简便、稳定的检测白细胞介素-2 (Interleukin-2, IL-2) 活性的方法。方法: 利用 CCK-8 (cell counting kit-8) 试剂盒, 检测 3 个生产厂家的 IL-2 对 CTLL-2 细胞株增殖的影响。结果: IL-2 浓度在 2 ~ 2 000 U/ml 范围内, IL-2 浓度与细胞增殖成正比, 3 个厂家的 IL-2 活性存在差异。结论: CCK-8 法简便易行, 结果可靠, 重复性好, 可用于 IL-2 活性的检测。

**[关键词]** 白细胞介素 2; CCK-8; 生物技术

**[中图分类号]** R34-33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1000-2707(2011)05-0503-02

### Determination of Recombinant Human Interleukin-2 Activity with Cell Counting Kit-8

MA Jing<sup>1</sup>, LU Chen<sup>1</sup>, ZUO Li<sup>2</sup>, HU Pingsheng<sup>3</sup>, ZHAO Xing<sup>2</sup>

(1. Department of Biotechnology, Guiyang Medical College, Guiyang 550004, Guizhou, China; 2. Department of Immunology, Guiyang Medical College, Guiyang 550004, Guizhou, China; 3. Jiangsu SINORDA Biotechnology Limited Company, Taicang 215400, Jiangsu, China)

**[Abstract]** **Objective:** To establish a rapid, convenient and stable method for detecting interleukin-2 (IL-2) activity. **Methods:** IL-2 activity was detected by testing the proliferation of IL-2 stimulation depended CTLL-2 cell strain with cell counting kit-8 (CCK-8). **Results:** When IL-2 concentration was in the range of 2-2000U/ml, the proliferation of CTLL-2 cells was positively correlated with IL-2 concentration. But IL-2 activities from 3 different companies were different. **Conclusions:** Method with CCK-8 is convenient, reliable and reproducible for detecting IL-2 activity.

**[Key words]** interleukin-2; cell counting kit-8; biotechnology

IL-2 是一条单链多肽分子, 主要由激活的 CD4<sup>+</sup>T 淋巴细胞分泌。IL-2 具有多种功能, 如活化 T 淋巴细胞、促进 B 淋巴细胞分化和分泌抗体、活化自然杀伤细胞、促进已活化的 T 淋巴增殖及增加抗原递呈细胞表面 MHC 分子的表达, 增强抗原递呈等作用<sup>[1]</sup>。CTLL-2 细胞株是 IL-2 依赖生长的小鼠细胞毒性 T 细胞, 常用于 IL-2 生物活性的检测, 在检测时, 多采用 MTT 法进行检测, 但该方法操作繁琐且重复性差。因此利用 CCK-8 试剂盒检测 CTLL-2 细胞株的增殖情况, 来判断 IL-2 的活性, 建立快速检测 IL-2 活性的方法。

## 1 材料与方法

### 1.1 仪器、试剂及细胞株

CCK-8 试剂盒 (DOJINDO, 同仁化学研究所), RPMI 1640 培养基 (GIBCO), 胎牛血清 (Hyclon), IL-2 (A 型: PeproTech, B 型: 长春生物制品研究所, C 型: 上海华新生物), 酶标仪 (BIO-TEK, ELX 800uv), 96 孔细胞培养板 (购于 Costar)。CTLL-2 细胞株 (购于上海生命科学院细胞库) 由本室传代保存, 生长液为 10% 胎牛血清 1640 (含青霉素 100

\* 贵阳医学院 2007 级生物技术专业本科学生。

\*\* 通讯作者 E-mail: xingzhao@gmc.edu.cn

U/ml、链霉素 100 mg/L、谷氨酰胺 2 mol/L), IL-2 500 U/ml 传代培养<sup>[3]</sup>。

### 1.3 方法

**1.3.1 CTLL-2 的增殖** 将对数生长期的 CTLL-2 细胞以不同细胞数(1、5、10、15、20 × 10<sup>3</sup>/ml)接种于 96 孔细胞培养板中,设实验组、细胞对照组以及空白对照组,每组设 3 个复孔,每孔 100 μl 生长液培养,5% CO<sub>2</sub> 37 °C 培养箱孵育 24 h,加入 CCK-8 检测试剂 10 μl/孔,37 °C 5% CO<sub>2</sub> 培养箱孵育 4 h,终止反应。酶标仪检测吸光值,检测波长 450 nm。

**1.3.2 3 个不同厂家 IL-2 对 CTLL-2 细胞增殖影响** 不同细胞数 CTLL-2 的增殖实验结果显示,(1.6 ~ 2) × 10<sup>5</sup>/孔细胞浓度的 CTLL-2 对 IL-2 较敏感,本实验将对数生长期的 CTLL-2 细胞按 1.9 × 10<sup>5</sup>/孔接种于 96 孔细胞培养板中,设置 4 组,A 组、B 组、C 组和空白对照组,每组 3 个复孔,IL-2 的浓度分别为 2、20、200、2000、20 000 U/ml,每孔 100 μl 生长液进行培养,孵育条件和检测方法同上。

## 2 结果

### 2.1 CTLL-2 的增殖

从图 1 可观察到,随着细胞数的增加,细胞增殖呈明显上升趋势,细胞数在 1 000 ~ 20 000/孔均能检测到明显的细胞增殖,说明 CCK-8 试剂盒敏感性较好,并且 15 000 ~ 20 000/孔细胞增殖状态较好,故后续实验选择 CTLL-2 细胞数为 15 000 ~ 20 000。

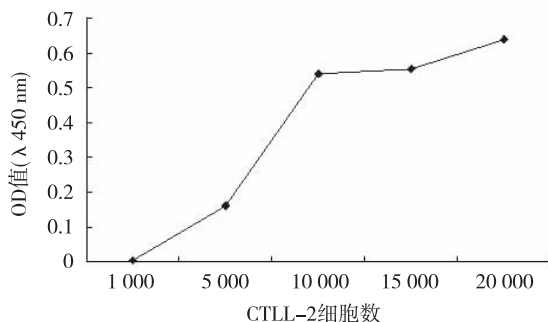


图 1 CTLL-2 细胞增殖

Fig. 1 A curve showing CTLL-2 cell proliferation

### 2.2 IL-2 刺激 CTLL-2 细胞增殖

从图 2 观察到,PeproTech、长春生物制品研究所、上海华新生物生产的 IL-2 在细胞数相同的情况下,在 2 ~ 200 U/ml 浓度范围内,随着 IL-2 浓度

的增加细胞增殖呈上升趋势,3 个不同厂家 IL-2 刺激 CTLL-2 细胞增殖活性存在差异。在 200 ~ 2 000 U/ml 细胞增殖明显,但在 2 000 ~ 20 000 U/ml 这个浓度 CTLL-2 的增殖受到抑制。

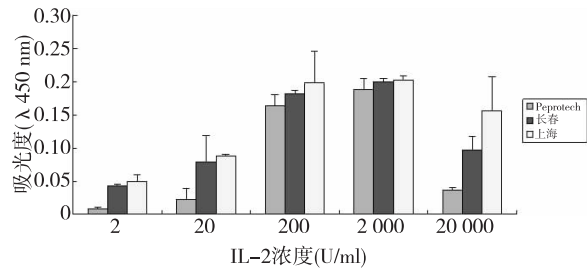


图 2 3 种 IL-2 刺激 CLL-2 细胞增殖

Fig. 2 Comparison of CTLL-2 cell proliferation stimulated by 3 kinds of IL-2

## 3 讨论

在细胞学实验中,MTT 比色法、<sup>3</sup>H-TdR 掺入法及 Brdu 掺入法常用于细胞增值、细胞毒性以及细胞活性的检测。MTT 法检测原理是活细胞线粒体中的琥珀酸脱氢酶能使外源性 MTT 还原为不溶性的蓝紫色结晶甲瓚(Formazan)并沉积在细胞中,而死亡细胞无此功能。MTT 方法虽然经济安全,但操作复杂,需加入 DMSO 溶解甲瓚颗粒,常常因为溶解不了或者溶解不充分而影响实验结果<sup>[4]</sup>; <sup>3</sup>H-TdR 掺入法能准确反映细胞内 DNA 复制和细胞增殖时期对胸腺嘧啶的摄取情况,灵敏度高、特异性强、稳定性好,但由于操作麻烦,设备价格昂贵,并且存在放射性危害而不宜常用;Brdu 检测法是利用和细胞一起孵育的 BrdU 能掺入 DNA 分子中,结合 BrdU 抗体与掺入 DNA 的 BrdU 特异性结合,就能够检测到 DNA 复制活跃的细胞,这种方法比 <sup>3</sup>H-TdR 低廉,且不具有放射性危害,结果比较客观,常用于细胞增殖的检测。但 Brdu 法操作耗时较长,本实验的预实验用 Brdu 法进行检测,但由于 CTLL-2 是悬浮细胞株,在细胞固定以及反复洗板的过程中细胞丢失过多,直接影响最终的增殖结果,并且因其操作时间较长,所以本实验采用 CCK-8 法进行检测。

CCK-8 法在电子载体 1-Methoxy PMS 存在的情况下能够被还原成水溶性的甲瓚染料,橙色甲瓚染料能够溶解在组织培养基中,实验中生成的甲瓚

(下转第 507 页)

临床症状改善明显、生化指标明显下降、蛋白尿减少、血浆白蛋白上升,饮食增加,在整个治疗过程中,无明显不良反应发生,安全性较好,适应症相对较广,临床可以借鉴。但本组样本小,应进一步大样本,随机双盲对照实验和长期随访加以验证。

## 4 参考文献

- [1] Dang XQ, Yi ZW, He XJ, et al. Liver lesions in children with hepatitis B virus associated glomerulonephritis [J]. Chinese Journal of Contemporary Pediatrics, 2006 (4): 275 - 278.
- [2] Fabrizi F, Dixit V, Martin P. Meta-analysis: antiviral therapy of hepatitis B virus associated glomerulonephritis [J]. Aliment Pharmacol Ther, 2006 (24): 781 - 788.
- [3] Zhang Y, Zhou JH, Yin XL, et al. Treatment of hepatitis B virus-associated glomerulonephritis: A meta-analysis [J]. World J Gastroenterol, 2010 (16): 770 - 777.
- [4] 赖祥红, 朱有鸿. 拉米夫定治疗 HBeAg 阳性慢性乙型肝炎长期临床疗效观察 [J]. 临床合理用药, 2009 (19): 56 - 57.
- [5] Jonas MM, Mizerski J, Badia IB, et al. Clinical trial of lamivudine in children with chronic hepatitis B [J]. N Engl J Med, 2002 (346): 1706 - 1713.
- [6] 李兴平. 玉屏风散的免疫药理研究 [J]. 陕西中医学院学报, 2003 (2): 36 - 38.
- [7] 张红军, 唐小云, 鞠宝玲, 等. 玉屏风散对 S180 荷瘤小鼠肿瘤生长及免疫功能的影响 [J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2008 (7): 683 - 685.
- [8] 梁春敏, 王贤喜, 董群, 等. 玉屏风散对小鼠免疫调节作用的血清药理学研究 [J]. 上海免疫学杂志, 2003 (6): 385 - 388.
- [9] 林娜, 刘运广, 郭瑜修, 等. 玉屏风颗粒对儿童肾病综合征免疫功能影响的研究 [J]. 时珍国医国药, 2010 (8): 2006 - 2008.
- [10] Lin CY, Lin CC, Chang GJ, et al. Defect of cell-mediated immune response against hepatitis B virus: an indication of pathogenesis of hepatitis- B- virus-associated membranous nephropathy [J]. Nephron, 1997 (76): 176 - 185.
- [11] 赵金荣, 郭立中. 玉屏风散治疗肾脏病的研究进展 [J]. 中医药导报, 2009 (9): 72 - 73.

(2011-05-12 收稿, 2011-06-14 修回)

(上接第 504 页)

量和细胞数量成正比,因此可以用于检测细胞数量。CCK-8 法是用于测定细胞增殖或细胞毒性试验中活细胞数目的一种高灵敏度、无放射性的比色检测法,显色时间短、操作简便、灵敏度高、重复性好,而且检测后的细胞可重复利用,可以替代其他检测方法并广泛应用<sup>[5,6]</sup>。本实验中观察到 3 个厂家 IL-2 在 2 ~ 2 000 U/ml 浓度内 CTLL-2 细胞株的增值呈上升趋势,在 2 000 ~ 20 000 U/ml 内呈下降趋势,认为 IL-2 浓度过高抑制 CTLL-2 细胞株的增值,可能是 CTLL-2 细胞株对高浓度 IL-2 呈低反应状态,因此细胞增殖受到抑制<sup>[7]</sup>。实验结果提示 CCK-8 法检测 IL-2 活性是可行的,其较好的重复性以及实验结果稳定性使其可以代替其他常规方法检测 IL-2 活性。

## 4 参考文献

- [1] 刘佳, 单安山, 孙进华. 白细胞介素-2 的研究进展与应用 [J]. 黑龙江畜牧兽医, 2009 (11): 19 - 20.
- [2] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典 [S]. 2 部. 北京: 化学工业出版社, 2005: 附录 57 - 58.
- [3] 张银霞. CTLL-2 细胞株的饲养 [J]. 陕西医学检验, 1998 (11): 13 - 14.
- [4] 弗雷谢尼 RI. 动物细胞培养 [M]. 4 版. 北京: 科学出版社, 2004: 363 - 366.
- [5] 侯春梅, 李新颖, 叶伟亮, 等. MTT 法和 CCK8 法检测悬浮细胞增殖的比较 [J]. 军事医学科学院院刊, 2009 (8): 400 - 401.
- [6] 李红艳, 夏启胜, 徐梅, 等. MTT、MTS、WET-1 在细胞增殖检测中最佳实验条件的研究 [J]. 中国康复医学杂志, 2005 (11): 824 - 826.
- [7] 陈巧英, 李大金. CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> 调节性 T 细胞的生物学特性及功能 [J]. 中国免疫学, 2007: 780 - 781.

(2010-11-17 收稿, 2011-03-18 修回)

[1] 刘佳, 单安山, 孙进华. 白细胞介素-2 的研究进展与应