

CCK-8 法检测小鼠淋巴细胞增殖的条件探讨

王园园¹, 谭小燕², 胡明华¹, 马方励¹, 黄芝瑛^{2,3}, 梁金强^{3*}

1. 无限极中草药免疫研究中心, 广东 广州 510665

2. 中山大学药学院, 广东 广州 510006

3. 中山大学实验动物中心, 广东 广州 510006

摘要: **目的** 探索 CCK-8 法检测小鼠脾淋巴细胞增殖的最佳条件。**方法** 采用交叉设计或两因素完全随机设计探索分裂素刀豆蛋白 (ConA) 或脂多糖 (LPS) 刺激的脾细胞增殖实验的细胞制备方法、细胞浓度、分裂素浓度、刺激时间、培养基中胎牛血清 (FBS) 浓度、是否预培养等条件。**结果** 制备方法中以轻压制备的脾细胞增殖率高于轻磨; 脾细胞浓度以 $5 \times 10^6/\text{mL}$ 为最佳; ConA 浓度为 2、5、10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, LPS 浓度为 10、20、50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 细胞增殖率未见明显差异; 刺激时间在 48 和 72 h 间脾细胞增殖率未见明显差异; 用含 10%、15% 和 20% FBS 的培养基培养的脾细胞增殖率未见明显差异; 制备的脾细胞当天刺激比第二天刺激增殖率更高。**结论** ConA 和 LPS 刺激的 Balb/C 小鼠脾细胞增殖实验的最佳条件为, 轻压制备脾细胞, 脾细胞浓度为 $5 \times 10^6/\text{mL}$, 制备当天直接种板, ConA 的刺激浓度为 2~10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, LPS 的刺激浓度为 10~50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

关键词: CCK-8; 淋巴细胞增殖; 脾细胞制备; 刀豆蛋白; 脂多糖

中图分类号: R965 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-6376(2017)02-0206-04

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2017.02.012

Study on determination conditions for lymphocytic proliferation by CCK-8 method in mice

WANG Yuan-yuan¹, TAN Xiao-yuan², HU Ming-hua¹, MA Fang-li¹, HUANG Zhi-ying^{2,3}, LIANG Jin-qiang³

1. Infinite Immune Research Center of Chinese Herbal Medicine, Guangzhou 510665, China

2. School of Pharmaceutical Science of SUN YAT-SEN University, Guangzhou 510006, China

3. Laboratory Animal Center of SUN YAT-SEN University, Guangzhou 510006, China

Abstract: **Objective** To study the optimum determination conditions for lymphocytic proliferation by CCK-8 method in mice. **Methods** To study the different influence factors of spleen cell proliferation experiment stimulated by mitogen concanavalin A (ConA) or lipopolysaccharide (LPS), including cell preparation method, lymphocytic density, FBS and stimulating agent concentration in culture medium, and stimulating immediately or 24 h after preparing cell, with cross design or two factor completely randomized design. **Results** Spleen lymphocytic proliferation rate of preparation method by light suppression was higher than that of the light grind. The appropriate concentration of spleen cells was $5 \times 10^6/\text{mL}$. The proliferation rate has no significant difference after being stimulated for 48 or 72 h by ConA (2, 5, or 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) or LPS (10, 20, or 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) under 10%, 15%, or 20% FBS concentration in culture medium. The proliferation rate of stimulating immediately after preparing cell was higher than that of 24 h after preparing cell. **Conclusion** The optimum conditions of Balb/C mouse spleen cell proliferation assay stimulated by ConA and LPS are as follows: preparation of spleen cells with light pressure, spleen cell concentration of $5 \times 10^6/\text{mL}$, direct stimulation with 2—10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ConA or 10—50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ LPS in the day of preparation. **Key words:** CCK-8; lymphocytic proliferation; spleen cell preparation; concanavalin A; lipopolysaccharide

淋巴细胞增殖实验是检测淋巴细胞活性的重要手段, 是免疫评价的常用实验, 常用方法有 MTT 法和近年来的 CCK-8 法。MTT 法具经济、安全、简便等特点, 外源性 MTT 通过活细胞线粒体脱氢

酶转化为不溶于水的甲臜颗粒, 应用 DMSO 溶解, 但过程中可能有溶解不完全、吸出上清液时带走部分细胞等问题, 导致出现较大误差, 重复性差。在 CCK-8 (cell counting kit-8) 法中, 四唑盐-WST-8 通

收稿日期: 2016-11-09

作者简介: 王园园 (1984—), 女, 博士, 主要从事药理学研究。Tel: 020-38167273 E-mail: Yoyo.WANG@infinitus-int.com

*通信作者 梁金强 (1972—), 男, 高级工程师, 主要从事药理及毒理学研究。Tel: 020-39943402 E-mail: Ljqtoxic@21cn.com

过活细胞线粒体脱氢酶转化为高度水溶性的黄色结晶,可直接进行比色,吸光度与活细胞数量呈正比,对细胞毒性小,较MTT法简便,避免了MTT法溶解过程中的缺点,近年来在检测细胞活性中得到广泛应用,但检测淋巴细胞增殖的条件还未完全成熟,本课题组通过交叉设计对应用CCK-8法检测BALB/c小鼠脾淋巴细胞增殖的条件进行了探讨。

1 材料

1.1 实验动物

雄性SPF级BALB/c小鼠,8周龄,体质量18~22 g,由中山大学(大学城)实验动物中心提供,实验动物生产许可证号为SCXK(粤)2011-0029。

1.2 主要试剂

CCK-8试剂盒,购自广州晶欣生物科技有限公司;刀豆蛋白(ConA)和脂多糖(LPS),购自美国Sigma公司。

1.3 主要仪器

Scientific HERA Cell 150i CO₂培养箱、Multiskan Ascent多功能酶标仪(美国Thermo公司)。

2 方法

2.1 脾细胞的制备

脱颈椎处死小鼠,无菌取其脾脏,常规制备脾细胞悬液^[1]。制备过程中,脾脏剪碎,用一次性注射器活塞在筛网(200目一次性)上轻轻研磨或轻压制脾细胞。

2.2 ConA或LPS的配制

用RPMI 1640不完全培养基配制20、50、100 μg/mL ConA和100、200、500 μg/mL LPS溶液。

2.3 CCK-8法检测不同分裂素浓度、细胞浓度对小鼠脾细胞增殖的影响

按“2.1”项方法轻轻研磨制备脾细胞,10%胎牛血清(FBS)的RPMI 1640完全培养基适应培养24 h后,用含10% FBS的培养基调整细胞数为适宜浓度(1×10^6 、 2×10^6 、 5×10^6 、 1×10^7 /mL),加入96孔细胞培养板,每孔90 μL。加入10 μL ConA溶液使其终浓度为2、5、10 μg/mL或10 μL LPS溶液使其终浓度为10、20、50 μg/mL,设空白对照(空白培养基,无细胞)和细胞对照孔(无ConA或LPS刺激),各样本设置3个复孔。孵育48 h,孵育结束前4 h,每孔加入10 μL CCK-8,继续培养4 h。

450 nm波长下,酶标仪检测吸光度(A)值。计算各条件下脾细胞的增殖率。

$$\text{增殖率} = (A_{\text{ConA/LPS}} - A_{\text{空白}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}})$$

2.4 不同种板方式、孵育时间、细胞制备手法、血清浓度对小鼠脾细胞增殖的影响

按“2.1”项方法,采用轻轻研磨和轻压两种方法制备脾细胞,部分细胞不经适应培养直接种板,另一部分细胞适应培养24 h后种板,用含10%、15%、20% FBS的培养基分别调整细胞数为适宜浓度(2×10^6 和 5×10^6 /mL),加入96孔细胞培养板,每孔90 μL。

加入10 μL ConA溶液使其终浓度为5 μg/mL或10 μL LPS溶液使其终浓度为20 μg/mL,设空白对照和细胞对照孔,继续培养48或72 h,CCK-8法检测细胞增殖率,方法同“2.3”项。

3 结果

3.1 不同分裂素浓度、细胞浓度对小鼠脾细胞增殖的影响

在轻磨制备细胞、细胞适应培养24 h、含10% FBS的培养基中孵育48 h的条件下,不同细胞浓度、不同分裂素浓度对BALB/c小鼠脾细胞增殖率的影响如表1所示,最佳细胞浓度为 $2 \times 10^6 \sim 5 \times 10^6$ /mL。其中 5×10^6 /mL细胞浓度的A值在0.35~0.90,属CCK-8细胞反应的线性范围内,而 2×10^6 /mL细胞浓度A值在0.18~0.32,A值偏低,趋向于选择 5×10^6 /mL细胞浓度。ConA在2、5、10 μg/mL浓度,LPS在10、20、50 μg/mL浓度,细胞增殖率未明显差异。

3.2 细胞制备后直接种板刺激,不同孵育时间、细胞制备手法、血清浓度对小鼠脾细胞增殖的影响

如表2所示,在ConA浓度为5 μg/mL或LPS浓度为20 μg/mL、直接种板刺激的条件下,轻压的脾脏制备方法明显优于轻磨,采用轻压方法制备的细胞,经ConA或LPS刺激后,细胞增殖明显,应与轻压对细胞损伤较小有关;且 5×10^6 /mL的细胞浓度明显优于 2×10^6 /mL,进一步证实了 5×10^6 /mL细胞浓度为最合适的浓度;在其他条件保持一致的情况下,48、72 h的脾细胞增殖率无明显差异;FBS在培养基中的浓度(10%、15%、20%)对脾细胞增殖率的影响不明显。

3.3 细胞适应培养24 h,不同孵育时间、细胞制备手法、血清浓度对小鼠脾细胞增殖的影响

表3总体上进一步证实了表2的结果,结合表2和表3发现,在相同条件下脾细胞制备后直接种板刺激的A值和细胞增殖率明显高于适应培养24 h后再种板刺激。

表1 不同分裂素浓度、细胞浓度对小鼠脾细胞增殖的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)Table 1 Effects of stimulating agent with various concentration and lymphocytic density on proliferation rate in mouse spleen lymphocyte ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	浓度/ ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	细胞浓度 $10 \times 10^6 \text{ mL}^{-1}$		细胞浓度 $5 \times 10^6 \text{ mL}^{-1}$		细胞浓度 $2 \times 10^6 \text{ mL}^{-1}$		细胞浓度 $1 \times 10^6 \text{ mL}^{-1}$	
		A 值	增殖率/%	A 值	增殖率/%	A 值	增殖率/%	A 值	增殖率/%
空白对照	—	0.138 ± 0.030	—	0.138 ± 0.030	—	0.138 ± 0.030	—	0.138 ± 0.030	—
细胞对照	—	0.807 ± 0.028	—	0.402 ± 0.023	—	0.191 ± 0.002	—	0.165 ± 0.007	—
ConA	2	1.007 ± 0.004	130	0.770 ± 0.065	240	0.223 ± 0.011	161	0.169 ± 0.008	113
	5	1.107 ± 0.021	145	0.849 ± 0.033	270	0.275 ± 0.007	259	0.170 ± 0.004	117
	10	1.040 ± 0.013	135	0.811 ± 0.047	255	0.335 ± 0.010	372	0.189 ± 0.014	186
组别	浓度/ ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	细胞浓度 $10 \times 10^6 \text{ mL}^{-1}$		细胞浓度 $5 \times 10^6 \text{ mL}^{-1}$		细胞浓度 $2 \times 10^6 \text{ mL}^{-1}$		细胞浓度 $1 \times 10^6 \text{ mL}^{-1}$	
		A 值	增殖率/%	A 值	增殖率/%	A 值	增殖率/%	A 值	增殖率/%
空白对照	—	0.137 ± 0.002	—	0.137 ± 0.002	—	0.137 ± 0.002	—	0.137 ± 0.002	—
细胞对照	—	0.807 ± 0.008	—	0.324 ± 0.003	—	0.189 ± 0.000	—	0.167 ± 0.001	—
LPS	10	0.593 ± 0.038	68	0.664 ± 0.043	281	0.262 ± 0.006	239	0.175 ± 0.010	125
	20	0.600 ± 0.014	69	0.706 ± 0.036	304	0.274 ± 0.011	262	0.174 ± 0.002	124
	50	0.645 ± 0.095	76	0.758 ± 0.055	331	0.257 ± 0.016	230	0.175 ± 0.016	127

表2 细胞制备后直接种板刺激, 不同孵育时间、细胞制备手法、血清浓度对小鼠脾细胞增殖的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)Table 2 Stimulating immediately after preparing cell, effect on proliferation rate in mouse spleen lymphocyte treated with various stimulating time, cell preparation method and concentration of FBS ($\bar{x} \pm s, n=3$)

培养基	组别	孵育 48 h 轻压				孵育 48 h 轻磨			
		细胞浓度 $5 \times 10^6 \text{ mL}^{-1}$		细胞浓度 $2 \times 10^6 \text{ mL}^{-1}$		细胞浓度 $5 \times 10^6 \text{ mL}^{-1}$		细胞浓度 $2 \times 10^6 \text{ mL}^{-1}$	
		A 值	增殖率/%	A 值	增殖率/%	A 值	增殖率/%	A 值	增殖率/%
20%FBS	空白对照	0.132 ± 0.002	—	0.132 ± 0.002	—	0.131 ± 0.003	—	0.131 ± 0.003	—
	细胞对照	0.209 ± 0.004	—	0.154 ± 0.003	—	0.228 ± 0.006	—	0.166 ± 0.001	—
	ConA	0.593 ± 0.062	599	0.213 ± 0.001	363	0.436 ± 0.024	315	0.197 ± 0.011	192
	LPS	0.591 ± 0.017	597	0.214 ± 0.007	367	0.233 ± 0.001	105	0.176 ± 0.007	131
15%FBS	细胞对照	0.209 ± 0.003	—	0.160 ± 0.003	—	0.581 ± 0.023	—	0.238 ± 0.004	—
	ConA	0.806 ± 0.021	872	0.249 ± 0.008	408	0.431 ± 0.011	67	0.219 ± 0.005	82
	LPS	0.737 ± 0.044	783	0.254 ± 0.006	427	0.595 ± 0.023	103	0.231 ± 0.001	94
10%FBS	细胞对照	0.210 ± 0.003	—	0.167 ± 0.015	—	0.221 ± 0.000	—	0.170 ± 0.001	—
	ConA	0.768 ± 0.039	808	0.235 ± 0.002	291	0.383 ± 0.017	280	0.196 ± 0.008	167
	LPS	0.694 ± 0.010	715	0.247 ± 0.021	324	0.473 ± 0.004	380	0.210 ± 0.000	203
培养基	组别	孵育 72 h 轻压				孵育 72 h 轻磨			
		细胞浓度 $5 \times 10^6 \text{ mL}^{-1}$		细胞浓度 $2 \times 10^6 \text{ mL}^{-1}$		细胞浓度 $5 \times 10^6 \text{ mL}^{-1}$		细胞浓度 $2 \times 10^6 \text{ mL}^{-1}$	
		A 值	增殖率/%	A 值	增殖率/%	A 值	增殖率/%	A 值	增殖率/%
20%FBS	空白对照	0.142 ± 0.010	—	0.142 ± 0.010	—	0.130 ± 0.002	—	0.130 ± 0.002	—
	对照	0.207 ± 0.010	—	0.168 ± 0.009	—	0.236 ± 0.008	—	0.161 ± 0.001	—
	ConA	0.458 ± 0.037	484	0.213 ± 0.008	271	0.339 ± 0.007	197	0.180 ± 0.001	160
	LPS	0.596 ± 0.027	696	0.225 ± 0.016	318	0.407 ± 0.026	261	0.175 ± 0.004	146
15%FBS	细胞对照	0.216 ± 0.003	—	0.198 ± 0.012	—	0.208 ± 0.002	—	0.163 ± 0.001	—
	ConA	0.621 ± 0.040	645	0.235 ± 0.021	166	0.334 ± 0.025	264	0.188 ± 0.005	175
	LPS	0.670 ± 0.004	711	0.268 ± 0.023	224	0.427 ± 0.042	384	0.174 ± 0.006	134
10%FBS	细胞对照	0.251 ± 0.014	—	0.232 ± 0.034	—	0.202 ± 0.001	—	0.161 ± 0.001	—
	ConA	0.666 ± 0.038	480	0.262 ± 0.034	133	0.260 ± 0.003	182	0.174 ± 0.001	145
	LPS	0.771 ± 0.006	576	0.314 ± 0.045	190	0.318 ± 0.003	264	0.169 ± 0.001	127

表3 细胞适应培养24 h, 不同孵育时间、细胞制备手法、血清浓度对小鼠脾细胞增殖的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)Table 3 Cell culture for 24 h before stimulating, effects of various stimulating time, cell preparation methods, and concentration of FBS on proliferation rate in mouse spleen lymphocyte ($\bar{x} \pm s, n=3$)

培养基	组别	孵育48 h 轻压				孵育48 h 轻磨			
		细胞浓度 5×10^6		细胞浓度 2×10^6		细胞浓度 5×10^6		细胞浓度 2×10^6	
		A 值	增殖率/%	A 值	增殖率/%	A 值	增殖率/%	A 值	增殖率/%
20%FBS	空白对照	0.143±0.012	—	0.143±0.012	—	0.131±0.002	—	0.131±0.002	—
	细胞对照	0.212±0.007	—	0.181±0.013	—	0.259±0.002	—	0.157±0.009	—
	ConA	0.317±0.010	251	0.221±0.016	202	0.388±0.010	201	0.152±0.008	81
	LPS	0.347±0.002	294	0.221±0.022	203	0.441±0.005	243	0.167±0.015	139
15%FBS	细胞对照	0.177±0.007	—	0.302±0.025	—	0.219±0.005	—	0.155±0.010	—
	ConA	0.220±0.014	226	0.773±0.043	396	0.321±0.013	215	0.159±0.018	117
	LPS	0.198±0.007	162	0.613±0.052	296	0.321±0.012	216	0.163±0.006	134
10%FBS	细胞对照	0.200±0.018	—	0.315±0.057	—	0.213±0.001	—	0.159±0.004	—
	ConA	0.233±0.017	157	0.516±0.098	217	0.315±0.008	225	0.160±0.019	104
	LPS	0.232±0.018	155	0.543±0.062	233	0.266±0.012	165	0.165±0.014	122

培养基	组别	孵育时间 72 h 轻压				孵育时间 72 h 轻磨			
		细胞浓度 5×10^6		细胞浓度 2×10^6		细胞浓度 5×10^6		细胞浓度 2×10^6	
		A 值	增殖率/%	A 值	增殖率/%	A 值	增殖率/%	A 值	增殖率/%
20%FBS	空白对照	0.129±0.003	—	0.129±0.003	—	0.152±0.007	—	0.152±0.007	—
	细胞对照	0.195±0.004	—	0.149±0.005	—	0.331±0.003	—	0.184±0.008	—
	ConA	0.237±0.002	163	0.175±0.004	237	0.496±0.017	192	0.194±0.013	131
	LPS	0.267±0.003	208	0.163±0.005	172	0.539±0.027	216	0.197±0.009	140
15%FBS	细胞对照	0.145±0.002	—	0.172±0.070	—	0.270±0.001	—	0.190±0.012	—
	ConA	0.165±0.004	226	0.524±0.050	920	0.341±0.023	160	0.189±0.007	97
	LPS	0.186±0.010	357	0.495±0.022	853	0.321±0.045	144	0.184±0.008	84
10%FBS	细胞对照	0.177±0.005	—	0.263±0.001	—	0.264±0.005	—	0.199±0.006	—
	ConA	0.203±0.010	154	0.582±0.020	338	0.331±0.014	160	0.195±0.012	92
	LPS	0.189±0.008	126	0.411±0.009	210	0.321±0.008	151	0.208±0.016	119

4 讨论

脾细胞增殖实验受多种条件的影响, 如细胞制备方法、种板的细胞浓度、分裂素浓度、血清浓度、刺激时间等, 可能与细胞制备后的活性、细胞密度过大抑制生长或培养基营养不足、分裂素本身毒性等因素相关。本研究结果发现, ConA 和 LPS 刺激的 Balb/C 小鼠脾细胞增殖实验的最佳条件为: 轻压制备脾细胞、脾细胞浓度为 $5 \times 10^6/\text{mL}$ 、制备当天直接种板、ConA 的刺激浓度为 $2 \sim 10 \mu\text{g}/\text{mL}$, LPS 的刺激浓度为 $10 \sim 50 \mu\text{g}/\text{mL}$, 刺激时间在 48、72 h 对脾细胞增殖率无明显影响, 用 48 h 即可, 培养基中 10%、15%、20% FBS 的浓度对脾细胞增殖率无明显影响。

小鼠脾细胞增殖的 CCK-8 法和文献上 MTT 法最优条件^[1-3]比较发现, 分裂素浓度、培养基血清浓度、刺激时间一致, 而 MTT 法的细胞浓度较低, 为 $(1.5 \sim 2.0) \times 10^6/\text{mL}$, 与本研究结果有一定的差异。

参考文献

- [1] 徐叔云, 卞如濂, 陈修. 药理实验方法学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2004.
- [2] 刘民, 马华, 李柏青. MTT 法检测小鼠淋巴细胞增殖性反应探讨 [J]. 中国实验动物学杂志, 1999(3): 146-149.
- [3] 林忠宁, 董胜璋, 董书芸, 等. MTT 法检测 T 淋巴细胞增殖性功能的方法探讨与应用 [J]. 中国卫生检验杂志, 2000(1): 8-10.