

• 论 著 •

不同品牌 ELISA 试剂盒检测细胞培养上清液中 IL-8 对比研究*

张 梅^{1,4}, 阳小凤², 饶忠美², 余福勋⁴, 叶芝旭^{3△}

(1. 贵州大学生物医学系, 贵州 贵阳 550000; 2. 遵义医科大学第一临床医学院儿科, 贵州 遵义 563000;
3. 贵州省人民医院儿科, 贵州 贵阳 550002; 4. 贵州省人民医院中心实验室, 贵州 贵阳 550002)

[摘要] **目的** 对比研究 2 种不同品牌 ELISA 试剂盒检测细胞培养上清液中人白细胞介素-8(IL-8)水平情况。**方法** 不同浓度聚肌胞苷酸(Poly I:C)刺激 A549 细胞 10、24 h, 收集细胞上清液, 共获得 40 份样本, 分为 1~10 组, 每组 4 份。采用 2 种 ELISA 试剂盒(试剂盒 A、试剂盒 B)检测细胞培养上清液中 IL-8 水平, 对比 2 个试剂盒检测得到的组间数据或同组数据的一致性 or 差异性。**结果** 2 种试剂盒拟合曲线中相关系数值分别为: 0.999 600、0.999 602, 检测标准品结果相关性良好。试剂盒 B 检测样品 1、2 组中 IL-8 水平比较, 差异有统计学意义($P < 0.01$), 但试剂盒 A 检测样品 1、2 组中 IL-8 水平比较, 差异无统计学意义($P > 0.05$); 2 种试剂盒检测样品 8、9 组及样品 9、10 组中 IL-8 水平比较, 差异均有统计学意义($P < 0.01$)。仅试剂盒 B 检测样品 1、5 组中 IL-8 水平明显低于试剂盒 A, 差异有统计学意义($P < 0.01$)。**结论** 不同品牌 ELISA 试剂盒均可用于检测 IL-8 水平, 但检测结果仍在一定程度上存在差异。为避免实验误差, 研究中应尽量选择同一个厂家生产的同品牌试剂盒。

[关键词] 酶联免疫吸附试验; 上皮细胞; 白细胞介素-8; 细胞培养; 实验室检测

DOI: 10.3969/j.issn.1009-5519.2024.05.004

中图法分类号: R446.1

文章编号: 1009-5519(2024)05-0741-04

文献标识码: A

Comparative study on IL-8 detection in cell culture supernatant
by ELISA kit of different brands*

ZHANG Mei^{1,4}, YANG Xiaofeng², RAO Zhongmei², YU Fuxun⁴, YE Zhixu^{3△}

(1. Department of Biomedical Sciences, Guizhou University, Guiyang, Guizhou 550000, China;

2. Department of Pediatrics, First Clinical Medical College of Zunyi Medical University,

Zunyi, Guizhou 563000, China; 3. Department of Pediatrics, Guizhou Provincial

People's Hospital, Guiyang, Guizhou 550002, China; 4. Center Laboratory Room,

Guizhou Provincial People's Hospital, Guiyang, Guizhou 550002, China)

[Abstract] **Objective** To compare the difference of human interleukin-8 (IL-8) in cell culture supernatant detected by two commercial ELISAs. **Methods** After stimulating A549 cells with different concentrations of polyinosine (PolyI:C) for 10 and 24 hours, the cell supernatant was collected, and a total of 40 samples were obtained, which were divided into 1 to 10 groups with four samples per group. Two ELISA kits (Kit A, kit B) were used to detect IL-8 levels in the supernatant of cell culture, and the consistency or difference of the data detected by the two kits between groups or within the same group was compared. **Results** The correlation coefficient values in the fitting curves of the two kits were 0.999 600 and 0.999 602, respectively, indicating a good correlation between the results of test standards. There was statistical significance in IL-8 level between group 1 and 2 of samples detected by kit B ($P < 0.01$), but there was no statistical significance in IL-8 level between group 1 and 2 of samples detected by kit A ($P > 0.05$). There were significant differences in IL-8 levels between groups 8 and 9 of samples and groups 9 and 10 of samples detected by the two kits ($P < 0.01$). The level of IL-8 in groups 1 and 5 of samples detected by kit B was significantly lower than that of kit A, and the difference was statistically significant ($P < 0.01$). **Conclusion** Different brands of ELISA kits can be used to detect IL-8 levels, but the detection results are still different to a certain extent. In order to avoid experimental errors, the same brand kit produced by the same manufacturer should be selected as far as possi-

* 基金项目: 国家自然科学基金地区科学基金项目(81860003; 81960001); 贵州省科技厅高层次创新型人才(千层次)项目(GZSYQCC2023011 号); 贵州省贵阳市科技局重大专项计划(筑科合同[2022]-4-1 号); 贵州省中医药管理局中医药、民族医药科学技术研究课题(QZYY-2018-010); 贵州省卫健委科学技术基金项目(gzwwjw2018-1-049)。

作者简介: 张梅(1999—), 硕士研究生在读, 主要从事病毒免疫学方向研究。△ 通信作者, E-mail: yezhixu126@126.com。

ble in the study.

[Key words] Enzyme-linked immunosorbent assay; Epithelial cells; Interleukin-8; Cell culture; Laboratory test

白细胞介素-8(IL-8)又称为趋化因子 CXCL8,是一种具有强大中性粒细胞趋化活性的细胞因子,会引起组织损伤。各种免疫细胞、上皮细胞均可分泌 IL-8^[1-2]。IL-8 介导细胞发育和炎症反应过程中的中性粒细胞迁移,因此其与许多炎症性疾病和肿瘤性疾病相关^[3-5]。目前,IL-8 已经从一种中性粒细胞趋化剂演变为多种炎症及肿瘤性疾病的治疗靶点^[6]。因此,检测 IL-8 水平在科学研究中具有重要意义。目前,IL-8 实验室检测技术主要包括酶联免疫吸附试验(ELISA)及实时荧光定量聚合酶链式反应(Q-PCR)。ELISA 是一种定量 IL-8 的可靠方法,操作简单。市场上有不同品牌 ELISA 试剂盒检测 IL-8,价格不等,在检测范围和检测下限方面均有所不同,但不同厂家的试剂盒检测性能之间是否存在差异目前尚不清楚。本研究选取了 2 个不同厂家生产的 ELISA 试剂盒,检测细胞培养上清液中的 IL-8 水平,比较 2 种试剂盒的性能,分析检测结果之间的一致性 & 差异性,为进一步研究中选取合适的试剂盒提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞 肺腺癌上皮细胞 A549 细胞系由重庆医科大学附属儿童医院呼吸病研究室刘恩梅教授惠赠。

1.1.2 主要试剂及器材 聚肌胞苷酸(Poly I:C)购自中国 Med Chem Express 公司(货号 42424-50-0);DMEM 液体培养基和胎牛血清购自美国 Hyclone 公司;人 IL-8 ELISA 试剂盒分别购自武汉博士德公司(货号:EK0413)及北京四正柏公司(货号:CHE0011);311 细胞培养箱购自德国 Thermo Scientific 公司;酶标仪购自美国 BioTek 公司。

1.2 方法

1.2.1 Poly I:C 刺激 A549 细胞模型建立 A549 细胞按每孔 2.5×10^5 铺板于 24 孔板中,待细胞单层生长至 80% 时,每孔分别加入含不同浓度 Poly I:C (2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 及 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 的 DMEM 培养基(含 2% 胎牛血清)500 mL 进行刺激,细胞在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 条件下培养。分别收集刺激 10、24 h 后细胞上清液,−80 $^{\circ}\text{C}$ 保存。将样品分为 1~10 组,每组 4 份。

1.2.2 ELISA 检测及结果分析 博士德品牌为试剂盒 A 组,四正柏品牌为试剂盒 B 组。2 种试剂盒检测原理均为双抗体夹心法,包被物均为抗人 IL-8 抗体,酶结合物均为链霉亲和素(HRP)标记的抗人抗体,显色液均为四甲基联苯胺(TMB),实验均在室温下进行,检测范围均为 15.6~1 000.0 pg/mL 。

ELISA 检测步骤均严格按说明书操作。均在同

一时间、同一条件下由实验经验丰富的实验人员独立完成,检测样本为同一样本。每个试剂盒的细胞培养上清液样本和标准品均采用双复孔实验。主要步骤内容相同:配制标准曲线样品浓度;加入标准品及样品,每个标准品或样品均按双复孔加样;37 $^{\circ}\text{C}$ 反应 90 min;洗板(试剂盒 A 不洗板,甩干即可;试剂盒 B 需洗板);加生物素标记抗体,37 $^{\circ}\text{C}$ 反应 60 min;洗板;加入酶结合物,37 $^{\circ}\text{C}$ 反应 30 min;洗板;加入显色液 TMB 37 $^{\circ}\text{C}$ 反应 15~20 min;加入终止液;用酶标仪在 450 nm 上测定吸光度(A)值。

1.3 统计学处理 对标准品及每份样本双复孔的 2 个 A 值取平均值,以标准品浓度为横坐标,A 值为纵坐标,采用 ELISA Calc 软件绘制并选取最佳拟合曲线,计算结果。最终实验数据采用 GraphPad 9.2 软件进行统计分析,所有结果均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,统计显著性分析采用 *t* 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

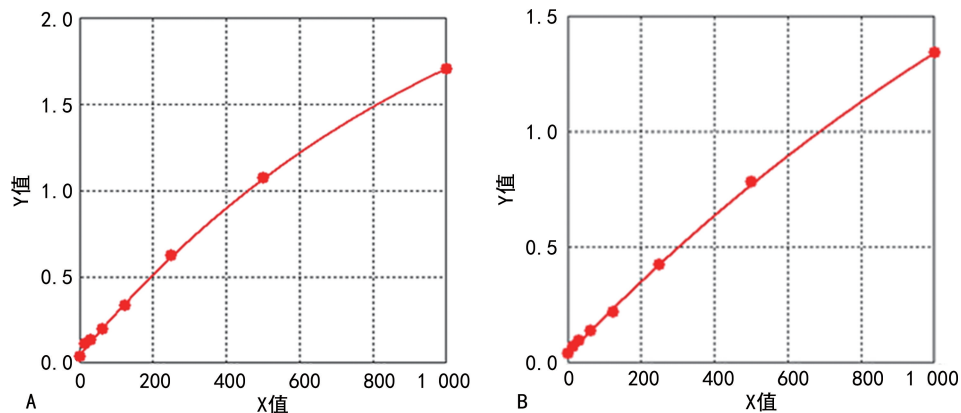
2.1 2 种试剂盒检测标准品的拟合曲线比较 2 种试剂盒均采用指数绘制拟合曲线,相关系数(R^2)值分别为:0.999 600,0.999 602。见图 1。

2.2 2 种试剂盒检测不同样品组别中 IL-8 水平比较 对相邻样品组间存在差异的结果进行统计分析,结果显示:试剂盒 B 检测样品 1、2 组中 IL-8 水平比较,差异有统计学意义($P < 0.01$),但试剂盒 A 检测样品 1、2 组中 IL-8 水平比较,差异无统计学意义($P > 0.05$);2 种试剂盒检测样品 8、9 组中 IL-8 水平比较,差异均有统计学意义(试剂盒 A: $P < 0.001$,试剂盒 B: $P < 0.01$);2 种试剂盒检测样品 9、10 组中 IL-8 水平比较,差异均有统计学意义(试剂盒 A: $P < 0.01$,试剂盒 B: $P < 0.001$)。2 种试剂盒其余各样品组间 IL-8 水平比较,差异均无统计学意义($P > 0.05$)。见表 1、图 2。

表 1 2 种试剂盒检测不同样品组别中 IL-8 水平比较($\bar{x} \pm s$, pg/mL)

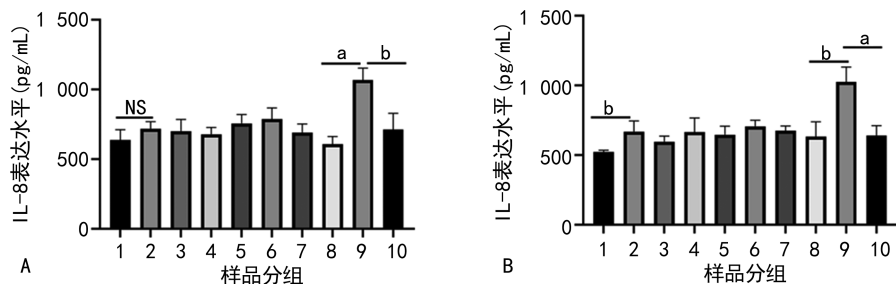
| 组别 | 试剂盒 A | 试剂盒 B |
|---------|----------------------------------|----------------------------------|
| 样品 1 组 | 638.60 \pm 73.81 | 523.80 \pm 12.12 ^c |
| 样品 2 组 | 719.80 \pm 49.78 | 669.90 \pm 75.94 ^a |
| 样品 3 组 | 702.40 \pm 82.63 | 597.40 \pm 39.46 |
| 样品 4 组 | 679.50 \pm 48.49 | 665.40 \pm 101.30 |
| 样品 5 组 | 756.70 \pm 64.32 | 646.40 \pm 61.72 ^c |
| 样品 6 组 | 787.50 \pm 81.19 | 706.30 \pm 44.06 |
| 样品 7 组 | 690.40 \pm 63.20 | 675.10 \pm 34.07 |
| 样品 8 组 | 607.70 \pm 54.86 ^b | 633.10 \pm 106.00 ^b |
| 样品 9 组 | 1 068.00 \pm 86.89 | 1 026.00 \pm 107.10 |
| 样品 10 组 | 713.50 \pm 115.20 ^b | 640.70 \pm 71.02 ^b |

注:与同种试剂盒检测样品 1 组比较,^a $P < 0.01$;与同种试剂盒检测样品 9 组比较,^b $P < 0.01$;与不同种试剂盒检测同样品组比较,^c $P < 0.01$ 。



注:A. 试剂盒 A;B. 试剂盒 B。

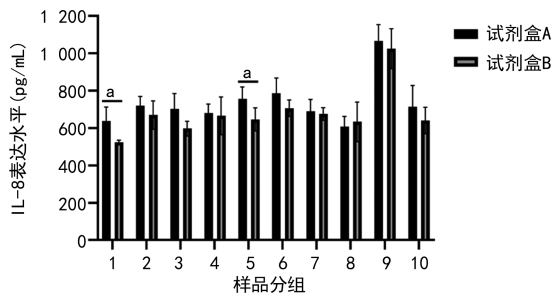
图 1 2 种试剂盒检测标准品的拟合曲线



注:A. 试剂盒 A;B. 试剂盒 B;^a $P < 0.001$,^b $P < 0.01$,^{NS} $P > 0.05$ 。

图 2 2 种试剂盒对不同组别样品检测结果差异比较

2.3 2 种试剂盒对同一样品组别中 IL-8 水平检测结果差异比较 仅样品 1、5 组中试剂盒 B 检测 IL-8 水平明显低于试剂盒 A, 差异有统计学意义($P < 0.01$), 其余各样品组中试剂盒 A、B 检测 IL-8 水平比较, 差异均无统计学意义($P > 0.05$)。见表 1、图 3。



注:^a $P < 0.05$ 。

图 3 2 种试剂盒对同一样品组别中 IL-8 水平检测结果差异比较

3 讨论

IL-8 与多种炎症性疾病及肿瘤性疾病密切相关^[1-2]。Poly(I;C)是病毒双链 RNA(dsRNA)的模拟物, 作为 TLR3 配体, 能在体内外明显诱导气道上皮细胞和中性粒细胞产生 IL-8^[7]。本研究采用 Poly(I;C)刺激 A549 细胞中 IL-8 产生, 收集细胞培养上清液, 选用 2 种不同品牌试剂盒, 在同一条件下检测同一样本, 结果发现, 2 个试剂盒检测标准品结果相关性良好, 说明 2 个试剂盒均可用于 IL-8 水平的检测,

且利用标准品绘制的拟合曲线可较好反映待测样品中 IL-8 的水平。比较不同样品组间检测数值及同一个样品组中 2 种试剂盒检测数据, 二者总体上趋势一致, 提示 2 种试剂盒检测一致性较好。IMTIAZ 等^[8]比较不同品牌的 ELISA 试剂盒对牛奶中黄曲霉毒素的定量测定结果, 发现所有品牌 ELISA 试剂盒对黄曲霉毒素的定量测定效果相当, 且定量均在可接受范围内, 无假阳性或假阴性结果。分析本研究中 2 种试剂盒检测性能相对原因: 可能是 2 种试剂盒检测原理、包被物、酶结合物均相同, 检测过程均相似。2 种试剂盒均为国产试剂盒, 价格便宜, 二者价格相当, 实验过程简单, 检测一致性相对较好, 研究中均可选用。

本研究对比 2 种试剂盒检测得到的组间数据或同组数据, 仍在一定程度上存在差异。较多研究显示, 不同厂家试剂盒会对实验结果产生影响。一项研究比较 3 种 ELISA 试剂盒检测抗载脂蛋白 A1 的自身抗体, 结果发现 3 种试剂盒之间存在实质性差异, 血清阳性率检出率为 1.9%~24.5%^[9]。另一项研究比较 2 种试剂盒对治疗克罗恩病的乌司奴单抗浓度进行检测, 结果发现试剂盒 A、B 测得的中位谷浓度分别为 0.26、0.38 mcg/mL。低谷浓度时, 试剂盒 A 在许多情况下不能检测到, 并且测量值为 0, 而试剂盒 B 即使在低浓度下也显示其相对值^[10]。余悠悠等^[11]比较了 3 种 ELISA 试剂盒检测血清抗酿酒酵母菌抗

体的结果,发现不同试剂盒间的检测结果亦不完全一致。李红等^[12]对比 2 个厂家生产的试剂检测大鼠血清碱性磷酸酶,虽然结果相关性良好,但结果比较,差异有统计学意义($P < 0.05$)。MÜLLER 等^[13]研究结果显示,尽管采用 2 种检测原理和方法均相同的 ELISA 试剂检测血清中病毒中和抗体水平,2 种试剂盒特异性甚至敏感性上均存在令人惊讶的差异。采用不同 ELISA 试剂盒也会影响疾病流行病学的研究结果^[14]。VAN DEN HOOGEN 等^[15]比较了 5 种商业试剂盒对疟疾抗体的检测情况,并结合流行病学分析,发现有 3 种试剂盒存在灵敏度低、特异性差、对弓形虫的交叉反应性高等缺点,而其中一种试剂盒能最准确地描述历史和最近的疟疾传播模式,相反,有些试剂盒的结果却不能反映出疟疾在任何一种情况下的传播模式。另一项研究对比了不同试剂盒对弓形虫的检测情况,发现不同试剂盒特异性也不同,而某些试剂盒对弓形虫的假阳性检出结果更多,强调需要用不同的血清学检测技术来确定疾病状态^[16]。结合众多研究,分析本研究中 2 个试剂盒存在差异的原因可能与不同厂家 ELISA 试剂盒制作的原材料、制作工艺、酶标板包被技术、不同厂家抗体的来源及纯化方式存在差异等有关^[17-19]。此外,基质的选择(血浆和血清)也影响抗体的检出结果及血清阳性率^[9]。本研究中,虽然 2 个 ELISA 试剂盒对 IL-8 检测水平存在一定程度的差异,但它们肯定能检测到样品中绝大多数的 IL-8 水平。不同 ELISA 试剂盒检测得到的结果之间不可互换^[20]。IL-8 水平检测的准确性在研究中至关重要,使用的试剂对检测结果会存在影响,提示研究中应避免更换试剂盒,其次重复验证实验结果、采取多种方法证实研究结果至关重要。

综上所述,2 种不同品牌 ELISA 试剂盒均可用于检测 IL-8 水平,检测结果大体一致,但仍一定程度上存在差异。实验如要进行对比研究,尽量选择同一个厂家生产的同品牌试剂盒,不应随意更换试剂盒,避免实验误差。

(致谢:重庆医科大学附属儿童医院呼吸病研究室刘恩梅教授。)

参考文献

- [1] MATSUSHIMA K, YANG D, OPPENHEIM J. Interleukin-8: An evolving chemokine[J]. Cytokine, 2022, 153: 155828.
- [2] 范傲, 黄钟, 段宇清, 等. 慢性阻塞性肺疾病患者血浆中性粒细胞胞外诱捕网和白细胞介素-8 及白细胞介素-33 的表达水平及其临床意义[J]. 中国呼吸与危重监护杂志, 2022, 21(2): 84-89.
- [3] 赵睿, 袁昆, 张跃栋, 等. IL-6、IL-8、CRP、PCT 联合检测在儿童感染性疾病中的诊断价值及临床可报告范围研究[J]. 医学动物防制, 2022, 38(2): 197-200.
- [4] 朱晓茵, 林爱琴, 寇应琳, 等. 血清 IL-8 与 TNF- α 和 MCP-1 对革兰阴性菌感染呼吸机相关性肺炎的诊断价值[J]. 中华医院感染学杂志, 2021, 31(23): 3532-3536.
- [5] 马慧颖, 刘翔宇, 李文静, 等. 卵巢癌患者血清 MMP-9 和 IL-8 水平及其临床价值[J]. 现代妇产科进展, 2021, 30(8): 571-574.
- [6] LIU K W, SHEN L, WU M, et al. Structural insights into the activation of chemokine receptor CXCR2[J]. FEBS J, 2022, 289(2): 386-393.
- [7] LAURA G, LIU Y, FERNANDES K, et al. ORMDL3 regulates poly I:C induced inflammatory responses in airway epithelial cells[J]. BMC Pulm Med, 2021, 21(1): 167.
- [8] IMTIAZ N, YUNUS A W. Comparison of Some ELISA kits for aflatoxin M1 quantification[J]. J AOAC Int, 2019, 102(2): 677-679.
- [9] FRIAS M A, VIRZI J, BATUCA J, et al. ELISA methods comparison for the detection of auto-antibodies against apolipoprotein A1 [J]. J Immunol Methods, 2019, 469: 33-41.
- [10] KWON Y, KANG B, KIM E S, et al. Comparison of ustekinumab trough concentrations measured by 2 ELISA kits and evaluation of clinical response in crohn's disease[J]. Ther Drug Monit, 2022, 44(4): 535-542.
- [11] 余悠悠, 曾俊祥, 罗婷, 等. 三种不同品牌 ELISA 试剂盒检测 ASCA 的结果比较及性能评估[J]. 诊断学理论与实践, 2019, 18(4): 454-459.
- [12] 李红, 余儒洋, 李疆, 等. 不同厂家试剂盒检测大鼠血清中碱性磷酸酶活性的比较[J]. 实验动物与比较医学, 2017, 37(3): 222-223.
- [13] MÜLLER K, GIRL P, VON BUTTLAR H, et al. Comparison of two commercial surrogate ELISAs to detect a neutralising antibody response to SARS-CoV-2[J]. J Virol Methods, 2021, 292: 114122.
- [14] FELIN E, NÄREAHO A, FREDRIKSSON-AHOMAA M. Comparison of commercial ELISA tests for the detection of Toxoplasma antibodies in the meat juice of naturally infected pigs[J]. Vet Parasitol, 2017, 238: 30-34. (下转第 749 页)

(7):473-479.

- [10] ZANGRANDO J, ZHANG L, VAUSORT M, et al. Identification of candidate long non-coding RNAs in response to myocardial infarction [J]. *BMC Genomics*, 2014, 15(1):460.
- [11] MIZUSHIMA N, LEVINE B, CUERVO A M, et al. Autophagy fights disease through cellular self-digestion [J]. *Nature*, 2008, 451 (7182): 1069-1075.
- [12] SLEUTELS F, ZWART R, BARLOW D P. The non-coding air RNA is required for silencing autosomal imprinted genes [J]. *Nature*, 2002, 415(6873):810-813.
- [13] TSAI M C, MANOR O, WAN Y, et al. Long noncoding RNA as modular scaffold of histone modification complexes [J]. *Science*, 2010, 329 (5992):689-693.
- [14] KIM K T, HEMBERG M, GRAY J M, et al. Widespread transcription at neuronal activity-regulated enhancers [J]. *Nature*, 2010, 465 (7295):182-187.
- [15] EBERT M S, SHARP P A. Emerging roles for natural microRNA sponges [J]. *Curr Biol*, 2010, 20(19):R858-R861.
- [16] BARTEL D P. MicroRNAs: Target recognition and regulatory functions [J]. *Cell*, 2009, 136

(2):215-233.

- [17] CHENG D, DENG J, ZHANG B, et al. LncRNA HOTAIR epigenetically suppresses miR-122 expression in hepatocellular carcinoma via DNA methylation [J]. *EBioMedicine*, 2018, 36:159-170.
- [18] SUN M, NIE F, WANG Y, et al. LncRNA HOXA11-AS promotes proliferation and invasion of gastric cancer by scaffolding the chromatin modification factors PRC2, LSD1, and DNMT1 [J]. *Cancer Res*, 2016, 76 (21): 6299-6310.
- [19] BOON R, IEKUSHI K, LECHNER S, et al. MicroRNA-34a regulates cardiac ageing and function [J]. *Nature*, 2013, 495(7439):107-110.
- [20] HUANG Y, QI Y, DU Y, et al. MicroRNA-34a regulates cardiac fibrosis after myocardial infarction by targeting Smad4 [J]. *Expert Opin Ther Targets*, 2014, 18(12):1355-1365.
- [21] HU C, ZHANG X, TENG T, et al. Cellular senescence in cardiovascular diseases: A systematic review [J]. *Aging Dis*, 2022, 13 (1): 103-128.

(收稿日期:2023-06-01 修回日期:2023-11-16)

(上接第 744 页)

- [15] VAN DEN HOOGEN L L, BARENG P, ALVES J, et al. Comparison of commercial ELISA Kits to confirm the absence of transmission in malaria elimination settings [J]. *Front Public Health*, 2020, 8:480.
- [16] DAMBRUN M, SARE N, VIANOU B, et al. Serological diagnosis of toxoplasmosis in pregnancy: comparison between a manual commercial ELISA assay and the automated VIDAS® kit [J]. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 2023, 42 (6):759-769.
- [17] 戚凤敏, 范新新. 献血者初复检使用不同厂家 ELISA 抗-HCV 试剂组合对实验效果探讨 [J]. *系统医学*, 2020, 5(5):7-9.

- [18] 李红, 敬海明, 林长缨, 等. 不同厂家试剂盒检测大鼠血清总蛋白、白蛋白的比较 [J]. *医学动物防制*, 2021, 37(10):970-972.
- [19] KINN RØD A M, HARKESTAD N, JELLES-TAD F K, et al. Comparison of commercial ELISA assays for quantification of corticosterone in serum [J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1):6748.
- [20] EECKHOUT K, VAN COTTHEM K, GUERTI K. Evaluation of three commercially available ELISA kits for the determination of chromogranin A [J]. *J Immunoassay Immunochem*, 2021, 42(2):95-105.

(收稿日期:2023-05-29 修回日期:2023-10-24)