

## 免疫化学染色图像分析法检测细胞核因子 $\kappa$ B

核转录因子(NF)- $\kappa$ B是调节基因转录的重要因子,存在于多种细胞,参与调控免疫、炎症、细胞增殖等多种病理生理过程的基因转录,具有重要的生理和病理意义[1]。因此,测定NF- $\kappa$ B的活化情况对探讨疾病的发生及防治具有重要的意义。检测NF- $\kappa$ B活性的方法有几种,经典的凝胶迁徙率泳动分析法(EMSA)和免疫荧光染色共聚焦显微镜测定法可定量检测其活化程度,免疫组织化学染色法仅用于定性检测[2][3]。我们用晚期糖基化终产物修饰的人血清白蛋白(HSA-AGE)刺激培养的人脐静脉内皮细胞(HUVEC)后进行免疫化学染色,图像分析仪检测细胞核与细胞浆中NF- $\kappa$ B阳性染色的灰度值,计算核/浆灰度值比来判定其活化程度,以经典的EMSA法作为标准对照,探讨此种定量检测方法的可行性。

### 1 材料与方法

#### 1.1 材料

NF- $\kappa$ B同序寡核苷酸序列购自上海生物工程有限公司;TdT购自大连宝生物工程有限公司; $\alpha$ -[32P]-ATP购自北京福瑞生物医学工程公司;兔抗VIII因子抗体、兔抗NF- $\kappa$ B/p65抗体、羊抗兔IgG购自Sant Cruz;生物素-亲和素反应系统(LSAB+Kit)购自DAKO公司。

#### 1.2 方法

1.2.1 HSA-AGE的制备 按文献[4]的方法体外制备HSA-AGE修饰蛋白。将HSA(1.75 g/L)与0.1 mol/L D-葡萄糖在0.4 mol/L磷酸盐缓冲液中37 °C孵育8周。样本经荧光分光光度分析法荧光值为82.7 U/mg,经鲎试验法检测无内毒素,4 °C无菌保存。使用前在PBS中透析24 h,除去未结合的葡萄糖,用0.22 mm的微孔滤膜过滤除菌。

1.2.2 HUVEC的培养与鉴定 参考Jaffe方法[5][6],无菌条件下取新鲜脐带,胰蛋白酶-EDTA消化,收集HUVEC。10% FBS-RPMI 1640培养,37 °C、5% CO<sub>2</sub>条件下培养。用原代和第2代细胞进行实验。采用免疫组化染色(抗VIII因子)及电镜鉴定细胞。

1.2.3 免疫细胞化学染色检测NF- $\kappa$ B的活性 细胞接种于置有盖玻片的24孔培养板中,待生长至接近融合,换用无血清培养基培养12 h。分别以0、12.5、50.0、200.0  $\mu$ g/ml HSA-AGE及2  $\mu$ g/ml脂多糖(LPS)刺激6 h后,将细胞置于-20 °C甲醇中固定10 min。用PBS清洗后加入1:100稀释的兔抗人NF- $\kappa$ B/p65,以非免疫兔IgG做阴性对照,37 °C孵育60 min。用PBS洗3次,以生物素-亲和素反应系统(LSAB+Kit)检测免疫反应,DAB显色。梯度乙醇脱水,二甲苯透明后封片。显微镜下观察,图像分析仪检测细胞核及细胞浆染色的灰度值。

1.2.4 EMSA检测NF- $\kappa$ B的活化 培养至接近融合的细胞,换用无血清培养基培养12 h后,分别以0、12.5、50.0、200.0  $\mu$ g/ml HSA-AGE及2  $\mu$ g/ml LPS刺激6 h后,以冰TBS洗涤3次,用细胞刮子刮收细胞。按文献[7]的方法制备胞核蛋白,用Bradford法测定蛋白浓度。NF- $\kappa$ B基序寡核苷酸序列为5' AGT TGA GGG GAC TTT CCC AGG C 3'; 3' TCA ACT CCC CTG AAA GGG TCC G 5'。采用末端转移酶将 $\alpha$ -[32P]-dATP 标记NF- $\kappa$

B寡核苷酸序列。将核提取物(10 μg)和DNA探针在结合缓冲液孵育30 min, 经6% PAGE电泳后, 干胶, -80 °C放射自显影24 h。结果用医学图像分析系统测定其吸光度。

### 1.3 统计学处理

用one-ANOVA及Tamhane多重比较方法, 因方差不齐, 比较不同浓度组的灰度比, 经SPSS10.0软件处理。

## 2 结果

### 2.1 免疫细胞化学染色法测定AGE对HUVEC NF-κB的激活作用

HUVEC经不同浓度HSA-AGE及LPS孵育6 h后, 用NF-κB/p65免疫化学染色。结果显示, 正常细胞浆有较强的阳性染色, 多数细胞胞核无明显染色, 少数细胞胞核有一定程度的染色。用HSA-AGE 及LPS刺激后, 胞浆染色减弱, 胞核呈现明显的阳性染色, 随HSA-AGE刺激浓度的增高, 胞核染色强度增加(图1)。每张片随机约取100个细胞, 应用图像分析仪对每个细胞的胞核与胞浆的灰度值进行分析, 计算核浆灰度比值。经统计学处理, 结果显示核/浆灰度比随HSA-AGE刺激浓度增加而增大。LPS刺激后核/浆灰度值与高浓度的HSA-AGE刺激后结果相近(表1)。

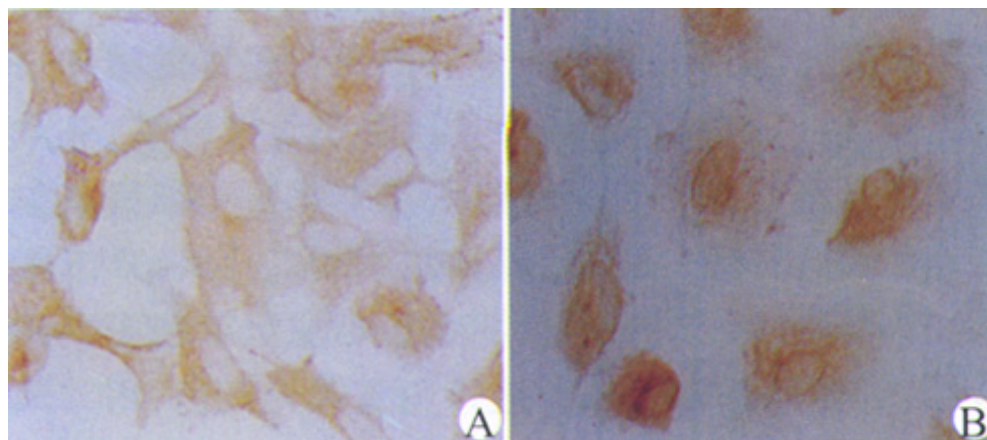


图1 NF-κB/p65免疫化学染色

Fig.1 Immunochemical staining of NF-κB/p65 subunit antibody  
A: Non-activated; B: Activated

表1 免疫化学染色后图像分析细胞核 / 浆灰度比  
Tab.1 Optical density ratio of p65 subunit staining  
in the nuclei and cytoplasm determined by image  
analysis designating NF- kappa B activity after  
immunochemical staining

Item	AGE-HSA (μg/ml)				LPS (2 μg/ml)
	0	12.5	50.0	200.0	
n	95	93	94	100	98
OD ratio	0.32±0.05	0.63±0.07*	1.17±0.12*	1.24±0.11*	1.30±0.10*

\*P<0.001 vs 0 μg/ml group

## 2.2 EMSA检测AGE对HUVEC NF- $\kappa$ B的激活作用

用EMSA检测不同条件处理细胞的NF- $\kappa$ B活性，结果显示：正常细胞有一定基础水平的NF- $\kappa$ B活化，HSA-AGE刺激后活性增加，并呈现一定的浓度刺激效应。阳性对照LPS刺激后NF- $\kappa$ B有明显激活(图2)。两种方法检测的NF- $\kappa$ B活化趋势一致。

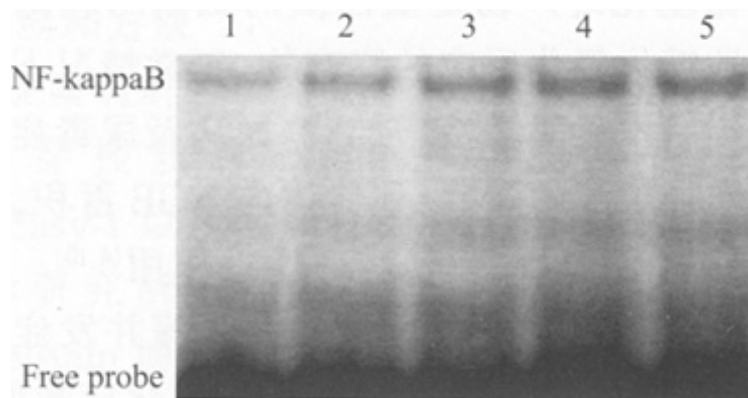


图2 EMSA结果显示NF- $\kappa$ B的激活

Fig.2 NF-kappa B DNA-binding activity detected by EMSA

Lane 1: Control; Lanes 2, 3, 4: Cells treated with 12.5, 50.0, 200.0 mg/ml AGE-HSA respectively for 6 h; Lane 5: Cells treated with 2 mg/ml LPS for 6 h.

## 3 讨论

NF- $\kappa$ B主要是由p50和p65(Re1A)组成的异源二聚体，正常情况下，它们与 $\kappa$ B抑制蛋白I $\kappa$ B结合以无活性的三聚体形式存在于胞浆中。当细胞受到某些因素刺激时，I $\kappa$ B可发生磷酸化而被降解，NF- $\kappa$ B则从胞浆转移进入胞核内。在胞核内激活的NF- $\kappa$ B可与某些基因启动子上的基元序列结合，调控这些基因的表达[8]。检测NF- $\kappa$ B的活性对探讨疾病的发生、发展、干预及转归有重要意义。EMSA是检测NF- $\kappa$ B活性的经典方法，采用同位素标记的NF- $\kappa$ B特异性寡核苷酸为探针，检测核蛋白中NF- $\kappa$ B的DNA结合活性。这种检测方法灵敏，但操作繁琐，提取核蛋白所需标本量大，且易造成同位素污染并对身体健康有一定的危害。正常情况下，NF- $\kappa$ B存在于细胞浆，被激活后转入细胞核，故可通过检测细胞浆和细胞核中NF- $\kappa$ B的含量间接反映NF- $\kappa$ B的激活。NF- $\kappa$ B二聚体中，p65含有反式激活区，在启动基因中起主要作用[9]。通常用NF- $\kappa$ B/p65进行免疫荧光染色，用共聚焦显微镜测定核/浆荧光比。此方法操作方便，但检测设备昂贵，不易普及，且结果不易保存。免疫组织细胞化学染色多用于定性检测，可判定NF- $\kappa$ B有无活化，但尚未见用于NF- $\kappa$ B的定量测定。

我们用抗NF- $\kappa$ B/p65抗体对HSA-AGE刺激后细胞进行免疫化学染色，用图像分析仪检测细胞浆和细胞核内NF- $\kappa$ B染色的灰度值，计算细胞核和细胞浆中灰度值比，定量反映NF- $\kappa$ B的活化程度。当细胞用HSA-AGE和LPS刺激后，NF- $\kappa$ B在细胞核和细胞浆的灰度比增加，说明当细胞受到两种因素刺激后，NF- $\kappa$ B被激活。用不同浓度的HSA-AGE刺激结果显示，NF- $\kappa$ B在胞核和胞浆的比值随刺激浓度的增加而升高，说明HSA-AGE对NF- $\kappa$ B的激活具有浓度效应。这些结果与经典的EMSA检测结果的趋势一致，说明免疫化学染色图像分析结果可靠。

晚期糖基化终产物是蛋白质的氨基与糖的醛基发生非酶性糖化氧化反应的终产物。正常情况下在体内水平随年龄增长而缓慢增加。糖尿病及尿毒症患者由于生成增加或清除障碍，致使体内AGE蓄积，通过与细胞受体结合，而发挥其病理生理作用[4][10]。AGE参与糖尿病、尿毒症病人心血管、关节等并发症及自然年龄的进程[10]。AGE可引起细胞内氧化应激增强，激活炎性细胞的NF- $\kappa$ B，产生炎性介质，引起炎症反应和组织损伤。增强机体排出AGE、封闭其受体、加强抗氧化、抑制NF- $\kappa$ B的活性均是减弱AGE损伤的有效方法。用免疫组化的方法快速检测NF- $\kappa$ B的活性，可以间接反映机体的损伤状况及判断治疗的效果。

参考文献：

- [1] Barnes PJ, Adcock IM. NF-kappa B: a pivotal role in asthma and a new target for therapy[J]. Trends Pharmacol Sci, 1997, 18(2): 46-50.
- [2] Li H, Yin HC, Zhang H, et al. Effect of NF-kappa B on the induction of PDGF-B transcription by angiotensin II in the ECV304 cell line[J]. Chin Med J (Engl), 2002, 115(3): 433-8.
- [3] 吴立志, 陈槐卿, 陈友琴, 等. TNF- $\alpha$  对内皮细胞白介素-8基因表达的影响[J]. 生物医学工程学杂志, 2001, 18(1): 105-7.
- Wu LZ, Chen HQ, Chen YQ, et al. Effects of TNF- $\alpha$  on IL-8 mRNA expression in endothelial cells[J]. J Biomed Eng, 2001, 18(1): 105-7.
- [4] Bierhaus A, Illmer T, Kasper M, et al. Advanced glycation end product (AGE)-mediated induction of tissue factor in cultured endothelial cells is dependent on RAGE[J]. Circulation, 1997, 96(7): 2262-71.
- [5] Jaffe EA, Nachman RI, Becher CG, et al. Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins[J]. J Clin Invest, 1973, 52: 2746- 56.
- [6] 梁敏, 侯凡凡, 张训. 二羰基化合物激活人血管内皮细胞核因子 $\kappa$ B[J]. 中华肾脏病杂志, 2000, 16(6): 352-6.
- Liang M, Hou FF, Zhang X. Activation of nuclear transcription factor- $\kappa$ B by dicarbonyl compounds in cultured human vascular endothelial cells[J]. Chin J Nephrol, 2000, 16(6): 352-6.
- [7] Todd B, Galina S, Peter L. The nuclear factor  $\kappa$ B signaling pathway participates in dysregulation of vascular smooth muscle cells in vitro and in human atherosclerosis[J]. J Biochem, 1997, 272(25): 15817- 24.
- [8] Read MA, Whitley MZ, Williams AJ, et al. NF-kappa B and I kappa B alpha: an inducible regulatory system in endothelial activation[J]. J Exp Med, 1994, 179(2): 503-12.
- [9] Schmitz ML, Baeuerle PA. The p65 subunit is responsible for the strong transcription activating potential of NF-kappa B[J]. EMBO J, 1991, 10(12): 3805-17.
- [10] Yeh CH, Sturgis L, Haidacher J, et al. Requirement for p38 and p44/ p42 mitogen-activated protein kinases in RAGE-mediated nuclear factor-kappa B transcriptional activation and cytokine secretion[J]. Diabetes, 2001, 50(6): 1495-504.

#### 参考文献:

- [1] Barnes PJ, Adcock IM. NF-kappa B: a pivotal role in asthma and a new target for therapy[J]. Trends Pharmacol Sci, 1997, 18(2): 46-50.
- [2] Li H, Yin HC, Zhang H, et al. Effect of NF-kappa B on the induction of PDGF-B transcription by angiotensin II in the ECV304 cell line[J]. Chin Med J (Engl), 2002, 115(3): 433-8.
- [3] 吴立志, 陈槐卿, 陈友琴, 等. TNF- $\alpha$  对内皮细胞白介素-8基因表达的影响[J]. 生物医学工程学杂志, 2001, 18(1): 105-7.
- Wu LZ, Chen HQ, Chen YQ, et al. Effects of TNF- $\alpha$  on IL-8 mRNA expression in endothelial cells[J]. J Biomed Eng, 2001, 18(1): 105-7.
- [4] Bierhaus A, Illmer T, Kasper M, et al. Advanced glycation end product (AGE)-mediated induction of tissue factor in cultured endothelial cells is dependent on RAGE[J]. Circulation, 1997, 96(7): 2262-71.
- [5] Jaffe EA, Nachman RI, Becher CG, et al. Culture of human endothelial cells

derived from umbilical veins[J]. J Clin Invest, 1973, 52: 2746- 56.

[6] 梁敏, 侯凡凡, 张训. 二羰基化合物激活人血管内皮细胞核因子 $\kappa$ B[J]. 中华肾脏病杂志, 2000, 16(6): 352-6.

Liang M, Hou FF, Zhang X. Activation of nuclear transcription factor- $\kappa$ B by dicarbonyl compounds in cultured human vascular endothelial cells[J]. Chin J Nephrol, 2000, 16(6): 352-6.

[7] Todd B, Galina S, Peter L. The nuclear factor  $\kappa$ B signaling pathway participates in dysregulation of vascular smooth muscle cells in vitro and in human atherosclerosis[J]. J Biochem, 1997, 272(25): 15817- 24.

[8] Read MA, Whitley MZ, Williams AJ, et al. NF-kappa B and I kappa B alpha: an inducible regulatory system in endothelial activation[J]. J Exp Med, 1994, 179(2): 503-12.

[9] Schmitz ML, Baeuerle PA. The p65 subunit is responsible for the strong transcription activating potential of NF-kappa B[J]. EMBO J, 1991, 10(12): 3805-17.

[10] Yeh CH, Sturgis L, Haidacher J, et al. Requirement for p38 and p44/ p42 mitogen-activated protein kinases in RAGE-mediated nuclear factor-kappa B transcriptional activation and cytokine secretion[J]. Diabetes, 2001, 50(6): 1495-504.

---

[回结果列表](#)