

# 免疫化学染色图像分析法检测细胞核因子 $\kappa$ B

张桂林<sup>1</sup>, 袁尚喜<sup>1</sup>, 袁燕<sup>2</sup>, 洪洪<sup>3</sup> 第一军医大学<sup>1</sup>, 南方医院肾内科袁中医系袁病理学教研室袁<sup>2</sup> 东 广州 510515 冤

**摘要**目的 探讨一种简便安全定量的细胞核因子  $\kappa$ B 活性的检测方法。方法 以晚期糖基化终产物修饰的人血清白蛋白(HSA-AGE)刺激人脐静脉内皮细胞 HUVEC 免疫化学染色后分析细胞 NF- $\kappa$ B/p65 核 / 浆的阳性染色比袁以经典的凝胶迁徙率泳动分析法作对照。结果 HSA-AGE 可激活 HUVEC NF- $\kappa$ B 活性, 且其活性随时间剂量依赖关系。两种方法检测的趋势一致。结论 免疫化学染色的图像分析法可用于定量检测 NF- $\kappa$ B 的活性。

**关键词** 细胞核因子  $\kappa$ B / 检测; 晚期糖基化终产物; 凝胶迁徙率泳动分析; 免疫化学

中图分类号 R783.1 文献标识码 B 文章编号 000-2588(2003)05-0498-03

## Detection of nuclear factor kappa B by immunochemical staining and image analysis

ZHANG Gui-lin<sup>1</sup>, LIU Shang-xi<sup>1</sup>, DENG Yan<sup>2</sup>, SHEN Hong<sup>3</sup>

Department of Nephrology, Nanfang Hospital<sup>1</sup>, Department of Traditional Chinese Medicine<sup>2</sup>, Department of Pathology<sup>3</sup>, First Military Medical University, Guangzhou 510515, China

**Abstract:** Objective To find a relatively simple and safe method for quantitative assay of nuclear factor (NF)-kappa B activity. Methods Immunochemical staining of NF-kappa B/p65 subunit with its antibody was performed in human umbilical vein endothelial cells stimulated with advanced glycation end products-modified human serum albumin (AGE-HSA). The ratio of p65 subunit staining in the nuclei and cytoplasm was determined by means of imaging analysis, and the results were compared with those of electrophoretic mobility shift assay (EMSA). Results NF-kappa B could be activated by AGE-HSA in a time- and dose-dependent manner, and the results obtained from immunochemical staining were consistent with those from EMSA. Conclusion p65 immunochemical staining and subsequent image analysis is feasible in the quantitative detection of NF-kappa B activation.

**Key words:** nuclear factor kappa B/detection; advanced glycation end products; electrophoretic mobility shift assay; immuno-histochemical

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。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。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。

收稿日期 2002-12-23

基金项目 广东省自然科学基金重点资助项目 13076 冤 广东省团队基金 0717 冤

Supported by the Key Research Project of Guangdong Provincial Natural Science Foundation (013076); Foundation for Scientific Research Team of Guangdong Province (10717)

作者简介 张桂林 1969 冤 女, 湖北孝感人, 现为第一军医大学在读博士研究生, 主治医师。电话 20-61641594

## 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。dNTP 购自大连宝生物工程有限公司。[<sup>32</sup>P]-ATP 购自北京福瑞生物医学工程公司。兔抗 NF- $\kappa$ B 因子抗体, 兔抗 NF- $\kappa$ B/p65 抗体, 羊抗兔 IgG 购自 Santa 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 [1] 的方法体外制备 HSA-AGE 修饰蛋白。将 HSA 7.5g/L 与 0.1mol/L D-葡萄糖在 0.4mol/L 磷酸盐缓冲液中 37℃ 培养 8 周。经荧光分光光度分析法, 荧光值为 82.7U/mg。经鲎试验法检测无内毒素。益菌保存。使用前在 PBS 中透析 24h, 除去未结合的葡萄糖。用 0.22μm 的微孔滤膜过滤除菌。

**1.2.2 HUVEC 的培养与鉴定** 参考 Jaffe 方法 [2]。无菌条件下取新鲜脐带, 胰蛋白酶-EDTA 消化, 收集 HUVEC 10% FBS-RPMI1640 培养液, 7% 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、核因子  $\kappa$ B 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时换用无血清培养基培养 12 h 后分别以 0、2.5、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  $^{\circ}$ 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 非免疫兔 IgG 做阴性对照 7  $^{\circ}$ C 孵育 60 min 用 PBS 洗 3 次 加入生物素 - 亲和素反应系统 (LSAB+Kit) 检测免疫反应 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 [10] 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' 和 5'-TCA ACT CCCCTGAAAGGGTCCG-3' 采用末端转移酶将  $[^{32}$ P]-dATP 标记 NF- $\kappa$ B 寡核苷酸序列 将核提取物和 DNA 探针在结合缓冲液孵育 30 min 经 6% PAGE 电泳后 胶 80  $^{\circ}$ 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- $\kappa$ B 的激活作用

HUVEC 经不同浓度 HSA-AGE 及 LPS 孵育 6 h 后用 NF- $\kappa$ B/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 经 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

### 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 经 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

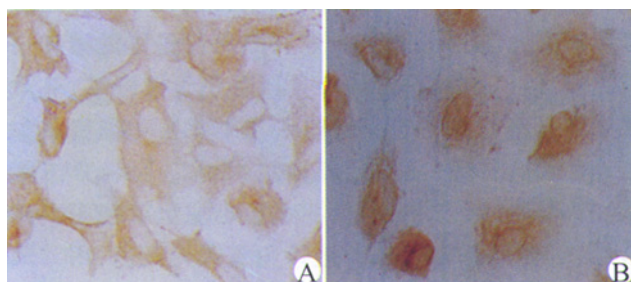


图 1 NF- $\kappa$ B/p65 免疫化学染色  
Fig.1 Immunochemical staining of NF- $\kappa$ B/p65 subunit antibody  
A:Non-activated;B:Activated

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( $\mu$ g/ml)				LPS(2 $\mu$ g/ml)
	0	12.5	50.0	200.0	
n	95	93	94	100	98
ODratio	0.32 $\pm$ 0.05	0.63 $\pm$ 0.07*	1.17 $\pm$ 0.12*	1.24 $\pm$ 0.11*	1.30 $\pm$ 0.10*

\*P<0.001 vs 0  $\mu$ g/ml group

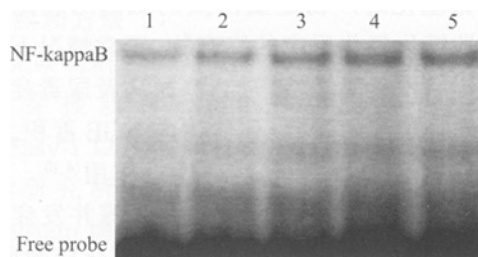


图 2 EMSA 结果显示 NF- $\kappa$ B 的激活  
Fig.2 NF-kappa B DNA-binding activity detected by EMSA

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

## 3 讨论

NF- $\kappa$ B 主要是由 p50 和 p65 组成的异源二聚体 正常情况下它们与 I $\kappa$ B 抑制蛋白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 检测 NF- $\kappa$ B 的活性对探讨疾病的发生

发展并预示转归有重要意义。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。这种检测方法灵敏且操作繁琐。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。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。检测设备昂贵。不易普及。且结果不易保存。免疫组织化学染色多用于定性检测。可判定 NF- $\kappa$ B 有无活化。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比值。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。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。AGE 可引起细胞内氧化应激增强。激活炎症细胞的 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。采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

咱暂 BarnesPJ,AdcockIM.NF-kappaB:apivotalroleinasthmaandnewtargetfortherapy.咱暂TrendsPharmacolSci,1997,18(2):46-50.  
 咱暂 LiH,YinHC,ZhangH,etal.EffectofNF-kappaBontheinductionofPDGF-BtranscriptionbyangiotensinIIintheECV304cellline.咱暂ChinMedJ(Engl),2002,115(3):433-8.  
 咱暂 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.咱暂生物医学工程学杂志,2001,18(1):105-7.  
 WuLZ,ChenHQ,ChenYQ,etal.EffectsofTNF- $\alpha$ onIL-8mRNAexpressioninendothelialcells.咱暂BiomedEng,2001,18(1):105-7.  
 咱暂 BierhausA, Illmer T, Kasper M, et al. Advanced glycationend product (AGE)-mediated induction of tissue factor in cultured endothelialcellsisdependentonRAGE.咱暂Circulation, 1997,96(7):2262-71.  
 咱暂 JaffeEA,NachmanRI,BecherCG,etal.Cultureofhumanendothelialcellsderivedfromumbilicalveins.咱暂ClinInvest,1973,52:2746-56.  
 咱暂 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.咱暂中华肾脏病杂志,2000,16(6):352-6.  
 LiangM, HouFF, ZhangX. Activationofnucleartranscription factor $\kappa$ B by dicarbonyl compounds in cultured humanvascular endothelialcells.咱暂ChinJNephrol,2000,16(6):352-6.  
 咱暂 ToddB,GalinaS,PeterL.Thenuclearfactor $\kappa$ Bsignalingpathway participatesindysregulationofvascularsmoothmusclecellsinvitro andinhumanatherosclerosis.咱暂Biochem,1997,272(25):15817-24.  
 咱暂 ReadMA,WhitleyMZ,WilliamsAJ,etal.NF-kappaBandIkappaBalpha:aninducibleregulatorysysteminendothelialactivation.咱暂JExpMed,1994,179(2):503-12.  
 咱暂 SchmitzML, BaeuerlePA. Thep65subunitisresponsibleforthe strongtranscriptionactivatingpotentialofNF-kappaB.咱暂EMBO J,1991,10(12):3805-17.  
 咱暂 YehCH,SturgisL,HaidacherJ,etal.Requirementforp38andp44/p42 mitogen-activatedprotein kinasesin RAGE-mediated nuclear factor-kappaBtranscriptionalactivationandcytokinesecretion.咱暂Diabetes,2001,50(6):1495-504.

更 正

本刊 2003 年第 4 期野经验交流栏目发表的候文明等所著《眉脂肪垫瓣转移修复上睑凹陷畸形》一文应归入野著临床研究栏目。特此更正。