

佐剂性关节炎大鼠脾脏组织 GRK2 免疫荧光法建立

汪 扬, 李亦凡, 崔东倩, 韩陈陈, 马 旸, 魏 伟

摘要 建立了适合佐剂性关节炎大鼠脾脏组织 G 蛋白偶联受体激酶 2 (GRK2) 免疫荧光测定法。考察了免疫荧光测定的 4 个关键条件: ① 渗透剂 Triton X-100 的影响; ② 不同抗原修复液: 柠檬酸缓冲液和 pH 9.0 乙二胺四乙酸 (EDTA) 缓冲液的影响; ③ 5% 胎牛血清封闭不同时间 (20、30、40、50 min) 的影响; ④ 不同一抗浓度 (1:50、1:100、1:200、1:400、1:500) 的影响。实验结果显示, Triton X-100 通透增强了抗原的表达; 1:100 的一抗浓度对荧光信号强度最合适; 封闭 50 min 能显著去除背景非特异性染色; 柠檬酸缓冲液优于 pH 9.0 EDTA 缓冲液, 提高了抗原表达。

关键词 G 蛋白偶联受体激酶 2; 脾脏组织; 免疫荧光

中图分类号 R 969

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2017)11-1736-04

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2017.11.034

大鼠佐剂性关节炎 (adjuvant-induced arthritis, AA) 是一种慢性炎症模型, AA 的临床表现和病理机制等方面与人类风湿性关节炎 (rheumatoid arthritis, RA) 有很多特征相似的地方, 因此该模型已经被广泛用于研究 RA 的病理机制^[1]。脾脏作为哺乳动物最重要的外周免疫器官, 含有丰富的淋巴细胞, 参与了机体众多免疫反应^[2-3], 淋巴细胞浸润到 RA 关节滑膜中, 软骨和骨的生理结构遭到破坏^[4]。G 蛋白偶联受体激酶 2 (G protein-coupled receptor kinase 2, GRK2) 在 G 蛋白偶联受体脱敏中起着重要作用^[5]。课题组前期研究^[6-8]显示在 AA 或胶原性关节炎诱导的慢性炎症中, 模型组 GRK2 较正常组均发生显著性变化, GRK2 的表达或活性变化可能是 RA 的重要病理因素。免疫荧光技术对其标记的蛋白直接显色, 定位及定量精确可靠, 而多种蛋白

可以根据不同颜色基团同时进行分析^[9], 目前在实验中被广泛应用, 因此本次实验探究以 AA 大鼠脾脏组织为研究样本, 建立 GRK2 免疫荧光测定法。

1 材料与方法

1.1 实验动物 雄性 SD 大鼠, 清洁级, 体质量 165 ~ 185 g, 购自安徽医科大学实验动物中心。

1.2 主要试剂及仪器 卡介苗 (成都生物制品研究所有限责任公司); 柠檬酸缓冲液 (无锡傲锐东源生物科技有限公司); 乙二胺四乙酸 (ethylenediaminetetraacetic acid, EDTA) 抗原修复液 (武汉博士德公司); Triton X-100 和 DAPI (上海碧云天生物技术有限公司); 过氧化氢 (北京中杉金桥); GRK2 一抗 (美国 Santa Cruz Biotechnology 公司); 594 山羊抗兔 IgG (H+L) (美国 Jackson ImmunoResearch 公司); 激光共聚焦显微镜 (德国 Leca 公司)。

1.3 方法

1.3.1 大鼠 AA 模型的诱导 将灭活的卡介苗与灭菌的石蜡研磨均匀, 制成完全弗氏佐剂, 0.1 ml 完全弗氏佐剂注射于随机选取的 SD 大鼠右后足跖皮内, 致炎^[10]。

1.3.2 标本石蜡包埋 大鼠 AA 模型造模第 22 天处死大鼠, 超净台内取大鼠脾脏组织固定于预先配制好的 10% 甲醛溶液中。用乙醇溶液 (70% ~ 100%) 依次脱水, 每步 40 min, 二甲苯透明 25 min, 石蜡包埋。

1.3.3 石蜡切片制作 切片机上组织均匀切片, 厚度约 4 ~ 5 μm , 在 40 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中缓慢展片, 60 $^{\circ}\text{C}$ 烤箱烤片 2 h。用二甲苯溶解石蜡 2 次, 每次 10 min, 不同浓度乙醇溶液对组织进行脱水, 每次 5 min。

1.3.4 Triton 通透 实验分为两组: 一组滴加 Triton X-100 完全覆盖组织, 渗透 20 min, 另一组不加 Triton X-100 通透。

1.3.5 抗原修复 ① 柠檬酸缓冲溶液修复: 将玻片放入预先微波加热沸腾的柠檬酸缓冲溶液中, 20% 火力加热 10 min; ② EDTA pH 9.0 缓冲溶液修复: 将切片浸泡在预热 (95 ~ 100 $^{\circ}\text{C}$) 的 EDTA 抗原修复液 (1 $\times$) 中, 加热 10 min。修复完成, 室温冷却

2017-07-31 接收

基金项目: 国家自然科学基金 (编号: 81330081、81673444、81502123)

作者单位: 安徽医科大学临床药理研究所, 抗炎免疫药物教育部重点实验室, 抗炎免疫药物安徽协同创新中心, 合肥 230032

作者简介: 汪 扬, 男, 硕士研究生;

魏 伟, 男, 博士, 教授, 博士生导师, 责任作者, E-mail: wwei@ahmu.edu.cn;

马 旸, 女, 博士, 讲师, 责任作者, E-mail: mayang_ahmu@126.com

后进行抗原封闭。

1.3.6 3% H_2O_2 灭活内源性过氧化物酶 3% H_2O_2 去离子水完全覆盖组织,避光条件下封闭 30 min。

1.3.7 抗原封闭 组织块上滴加现配的 5% 胎牛血清,置于孵育盒中,封闭不同时间(20、30、40、50 min)。

1.3.8 一抗工作液稀释不同浓度 Santa Cruz 公司抗体说明书推荐山羊抗兔 GRK2 用于免疫组化实验所用的浓度范围为 1:50 ~ 1:500。基于此,本研究设置的浓度范围为:1:50、1:100、1:200、1:400、1:500。用磷酸盐缓冲液代替 GRK2 一抗作为阴性对照,保持其他条件一致。切片放入湿盒置于 4℃ 冰箱孵育过夜,次日湿盒先在室温条件下复温 40 min,磷酸盐缓冲液冲洗 5 次,每次 5 min,用滤纸小心擦干组织周围的水珠后滴加 594 标记山羊抗兔二抗(1:100),置于室温暗处条件下孵育 60 min。磷酸盐缓冲液洗涤 3 次后,DAPI 染核,3 ~ 5 min,磷酸盐缓冲液洗涤 3 次,每次 3 min,甘油封片。

1.3.9 图像观察 在激光共聚焦显微镜下观察并拍照。观察组织结构形态,以考察染色方法对组织结构的损坏程度;观察阴性表达,观察背景染色是否干净,以考察染色方法是否具有特异性;观察荧光强度,以考察组织上的抗原表达程度。激光共聚焦拍摄的全部图片均在预先设置好的仪器条件下拍摄并未经过明暗度、对比度调节等处理。

2 结果

2.1 Triton X-100 对 GRK2 免疫荧光的影响 加 Triton X-100 通透 20 min,染色效果良好,组织结构清晰,荧光强度表达较强(图 1A)。不加 Triton X-100 的样本荧光表达很微弱,背景模糊(图 1B)。

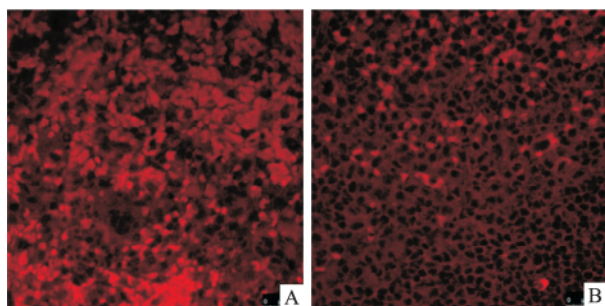


图1 Triton X-100 对 GRK2 免疫荧光的影响 SP×630
A: 加 Triton X-100 组; B: 不加 Triton X-100 组

2.2 抗原修复对 GRK2 免疫荧光的影响 柠檬酸

缓冲溶液(pH 6.0)热修复组荧光强度非常高(图 2A)。EDTA 缓冲液(pH 9.0)热修复组表达微弱的荧光强度(图 2B),而不进行抗原修复则几乎没有荧光强度表达(图 2C)。

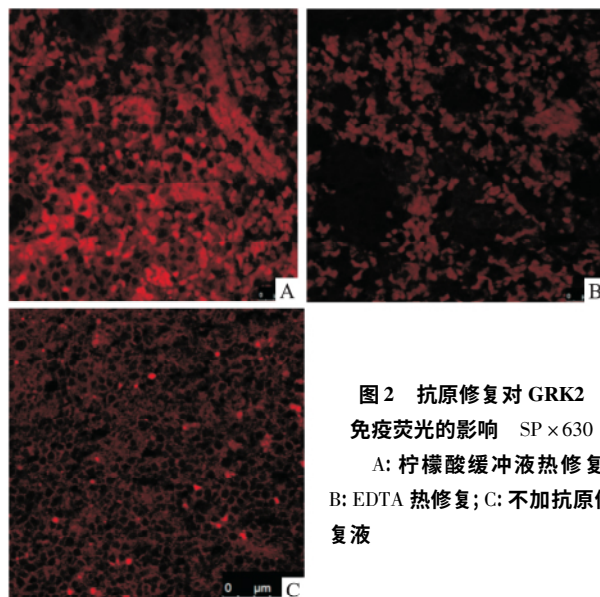


图2 抗原修复对 GRK2 免疫荧光的影响 SP×630
A: 柠檬酸缓冲液热修复;
B: EDTA 热修复; C: 不加抗原修复液

2.3 不同封闭时间对 GRK2 免疫荧光的影响 对于磷酸盐缓冲液代替 GRK2 一抗的阴性样本来说,封闭 20 ~ 40 min 组均可见背景染色,但背景染色随封闭时间的加长而减轻(图 3A、3B、3C),而封闭 50 min 组几乎没有背景染色(图 3D)。

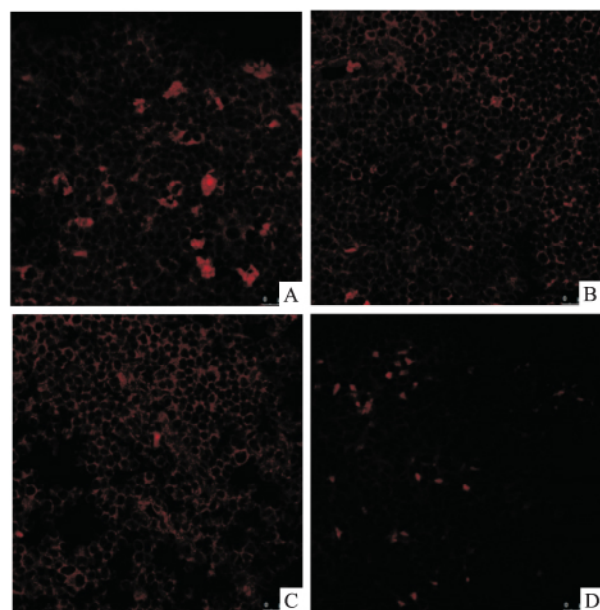


图3 5%胎牛血清封闭不同时间
对 GRK2 免疫荧光的影响 SP×630
A: 封闭 20 min; B: 封闭 30 min; C: 封闭 40 min; D: 封闭 50 min

2.4 不同一抗浓度对 GRK2 免疫荧光的影响 在 1 : 500 的一抗浓度条件下, 荧光强度表达很微弱, 基本无法辨识组织结构(图 4A)。在 1 : 50 的一抗稀释比条件下, 由(图 4E)可见, 表达很高的荧光强度, 很低的背景染色。其余一抗浓度由(图 4B、4C、4D)可见, 荧光强度介于 1 : 50 和 1 : 500 两者之间, 荧光强度随一抗工作液浓度的升高而增强。但从试剂消耗等因素综合考虑, 认为 1 : 100 的一抗工作液浓度能够保证明显的荧光信号并节约成本。

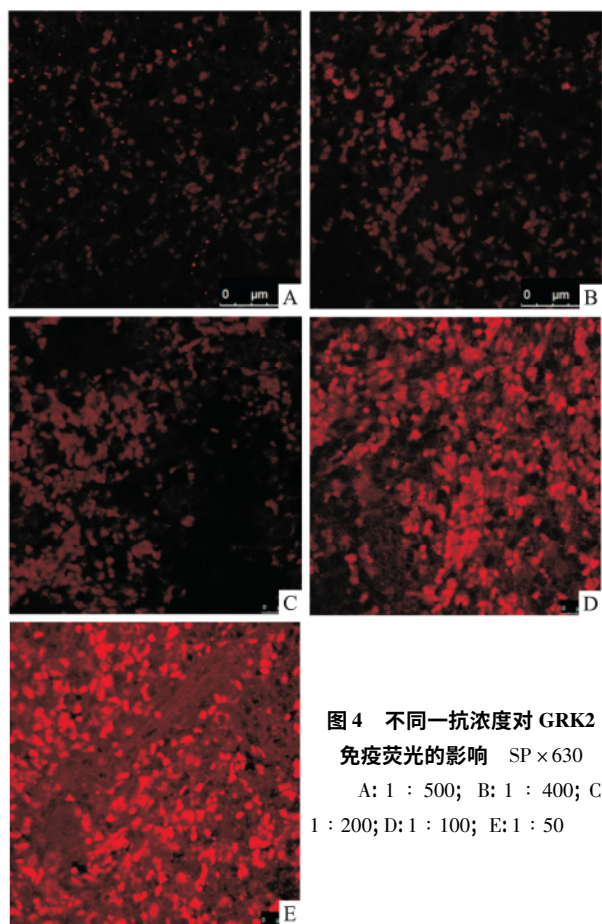


图 4 不同一抗浓度对 GRK2 免疫荧光的影响 SP×630
A: 1 : 500; B: 1 : 400; C: 1 : 200; D: 1 : 100; E: 1 : 50

3 讨论

免疫荧光技术是一项很重要的实验技术, 利用抗体和抗原特异性结合来定位和半定量组织细胞内的各种抗原或蛋白质^[1]。免疫荧光的实验效果受诸多因素影响。首先, 修复液和修复方法的选取, 对抗体的表达至关重要^[2]。当组织经过福尔马林和石蜡处理后, 使组织中的抗原形成了分子内、分子间醛键以及羧甲键, 使组织中部分抗原决定簇被封闭。此外, 甲醛属于蛋白交联剂, 经甲醛固定的组织易发生蛋白交联现象, 因此抗原决定簇被掩盖, 抗原与抗

体无法充分结合, 导致阳性染色程度降低^[3]。所以实验时需进行抗原修复, 破坏分子之间的交联, 暴露出抗原原有的空间形态。抗原修复常见的方式为热修复, 微波中微微沸腾 10 min 即可打开抗原空间结构使得一抗与抗原位点充分结合, 所以当热修复配上合理的修复液就可以极好地改善难以检测的阳性抗原的染色结果。其次, 摸索一抗的浓度在实验过程中同样很关键, 图 4 显示 1 : 50 的一抗浓度使荧光信号显著增强, 但同时不会增加背景着色。此外, 封闭时间对染色结果同样有影响, 本研究采用体积分数 5% 的胎牛血清封闭 50 min, 能够显著降低样本的背景着色, 同时在较高的一抗浓度条件下, 并不会降低阳性荧光信号。最后, Triton X-100 的作用也不容忽视, 课题组前期研究由于 GRK2 是细胞质表达(待发表), 如果不进行破膜, 抗体很难与抗原结合, 而 Triton X-100 作为一种表面活性剂能够溶解脂质, 增强抗体对细胞膜的通透性^[4], 通过细胞膜脂质的溶解来完成免疫组化中的胞膜打孔, 以确保抗体进入胞体内与抗原充分结合。

综上所述, 本研究结果显示, 一抗浓度、封闭时间、抗原修复液的种类以及 Triton X-100 对 GRK2 荧光染色有较大影响, 加 Triton X-100 渗透 20 min、选择柠檬酸缓冲液热修复、1 : 100 的一抗工作液浓度、5% 胎牛血清封闭 50 min, GRK2 的染色效果最佳。

参考文献

- [1] 宋姗姗, 张玲玲, 魏伟. 实验性关节炎动物模型建立及病理机制研究进展 [J]. 中国药理学通报, 2011, 27(12): 1648-53.
- [2] Bronte V, Pittet M J. The spleen in local and systemic regulation of immunity [J]. Immunity, 2013, 39(5): 806-18.
- [3] Mebius R E, Kraal G. Structure and function of the spleen [J]. Nat Rev Immunol, 2005, 5(8): 606-16.
- [4] Firestein G S. Evolving concepts of rheumatoid arthritis [J]. Nature, 2003, 423(6937): 356-61.
- [5] Evron T, Daigle T L, Caron M G, et al. GRK2: multiple roles beyond G protein-coupled receptor desensitization [J]. Trends pharmacol Sci, 2012, 33(3): 154-64.
- [6] Wu H, Wei W, Song L, et al. Paeoniflorin induced immune tolerance of mesenteric lymph node lymphocytes via enhancing beta 2-adrenergic receptor desensitization in rats with adjuvant arthritis [J]. Int Immunopharmacol, 2007, 7(5): 662-73.
- [7] Wu H, Chen J, Song S, et al. β 2-adrenoceptor signaling reduction in dendritic cells is involved in the inflammatory response in adjuvant-induced arthritic rats [J]. Sci Rep, 2016, 6: 24548.
- [8] Chen J Y, Wu H X, Chen Y, et al. Paeoniflorin inhibits prolife-

(下转第 1743 页)

- findings of a prospective, randomized, double-blind, placebo-controlled trial [1]. *Arthritis Rheum*, 2006, 54(11): 3623–32.
- [18] Steiman A J, Gladman D D, Ibañez D, et al. Outcomes in patients with systemic lupus erythematosus with and without a prolonged serologically active clinically quiescent period [1]. *Arthritis Care Res(Hoboken)*, 2012, 64(4): 511–8.
- [19] Thamer M, Hernán M A, Zhang Y, et al. Prednisone, lupus activity, and permanent organ damage [1]. *J Rheumatol*, 2009, 36(3): 560–4.
- [20] Fei Y, Shi X, Gan F, et al. Death causes and pathogens analysis of systemic lupus erythematosus during the past 26 years [1]. *Clin Rheumatol*, 2014, 33(1): 57–63.
- [21] Zonana-Nacach A, Barr S G, Magder L S, et al. Damage in systemic lupus erythematosus and its association with corticosteroids [1]. *Arthritis Rheum*, 2000, 43(8): 1801–8.
- [22] Danowski A, Magder L, Petri M. Flares in lupus: Outcome Assessment Trial(FLOAT) , a comparison between oral methylprednisolone and intramuscular triamcinolone [1]. *J Rheumatol*, 2006, 33(1): 57–60.
- [23] Ruiz-Irastorza G, Danza A, Perales I, et al. Prednisone in lupus nephritis: how much is enough [1]. *Autoimmun Rev*, 2014, 13(2): 206–14.
- [24] Ruiz-Arzuza I, Ugarte A, Cabezas-Rodríguez I, et al. Glucocorticoids and irreversible damage in patients with systemic lupus erythematosus [1]. *Rheumatology (Oxford)*, 2014, 53(8): 1470–6.
- [25] Condon M B, Ashby D, Pepper R J, et al. Prospective observational single-centre cohort study to evaluate the effectiveness of treating lupus nephritis with rituximab and mycophenolate mofetil but no oral steroids [1]. *Ann Rheum Dis*, 2013, 72(8): 1280–6.
- [26] Zahr Z A, Fang H, Magder L S, et al. Predictors of corticosteroid tapering in SLE patients: the hopkins lupus cohort [1]. *Lupus*, 2013, 22(7): 697–701.

(上接第 1738 页)

- ration of fibroblast-like synoviocytes through suppressing G-protein-coupled receptor kinase 2 [1]. *Planta Med*, 2012, 78(7): 665–71.
- [1] Tashiro S, Shima H. Multicolor FISH and immunofluorescence analysis [1]. *Tanpakushitsu Kakusan Koso*, 2006, 51(14): 1978–80.
- [10] 徐 澍, 魏 芳, 贾晓益, 等. BAFF-BAFFR 及信号转导分子参与佐剂性关节炎的免疫反应及芍药苷-6'-O-苯磺酸酯的作用 [1]. *安徽医科大学学报*, 2016, 51(5): 643–9.
- [11] Barbierato M, Argenti C, Skaper S D. Indirect immunofluorescence staining of cultured neural cells [1]. *Methods Mol Biol*, 2012, 846: 235–46.
- [12] Ghatak A, Combs C K. Iba1 immunoreactivity is enhanced following an antigen retrieval treatment with EDTA, pH 6.0 [1]. *Methods X*, 2014, 1: 269–74.
- [13] 于 博, 李 晨, 王 辉, 等. 不同抗原修复方法对内翻性乳头状瘤石蜡切片 Pan 染色的影响 [1]. *临床耳鼻咽喉头颈外科杂志*, 2014, 28(17): 1311–3.
- [14] 邓 娟, 周华东, 陈曼娥, 等. 局灶性脑缺血再灌注大鼠神经元 DNA 氧化损伤的研究 [1]. *中华危重病急救医学*, 2001, 13(8): 478–80.

Establishment of GRK2 immunofluorescence methods in the spleen of rats with adjuvant arthritis

Wang Yang, Li Yifan, Cui Dongqian, et al

(Institute of Clinical Pharmacology, Anhui Medical University,

Key Laboratory of Anti-inflammatory and Immune Medicine, Ministry of Education,

Collaborative Innovation Center of Anti-inflammatory and Immune Medicine, Hefei 230032)

Abstract Immunofluorescence assay for G protein-coupled receptor kinase 2 (GRK2) in spleen tissue of rats with adjuvant arthritis was established. Four key conditions of immunofluorescence assay were investigated: ① Effect of penetrating agent Triton X-100 on the result; ② Effects of different antigen repair fluids: Effects of citric acid buffer and pH 9.0 EDTA buffer; ③ Effects of different closed times: 20 min, 30 min, 40 min and 50 min; ④ Effects of different primary antibody concentrations: 1 : 50, 1 : 100, 1 : 200, 1 : 400 and 1 : 500 . Experimental results showed that Triton X-100 penetration enhancing antigen expression; Citric acid buffer is better than pH 9.0 EDTA buffer, which improves the expression of antigen; the concentration of 1 : 100 of primary antibody was most suitable for the intensity of fluorescence signal; 50 min of blocking time could significantly remove background nonspecific staining.

Key words GRK2; spleen tissue; immunofluorescence