

成像流式细胞术和免疫荧光技术检测成纤维样滑膜细胞 Ahr 入核的比较

程梦¹, 王焱¹, 董伟波¹, 魏伟¹, 常艳^{1,2}

(¹ 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, 合肥 230032;

² 安徽医科大学实验动物中心, 合肥 230032)

摘要 目的 探究成像流式细胞术和免疫荧光技术检测成纤维样滑膜细胞中 Ahr 入核的差别。**方法** 用 15% 的 DMEM 培养人来源的成纤维样滑膜细胞细胞株 MH7A, 分别用激光共聚焦显微镜和量化成像流式细胞仪 (ImageStreamX Mark II) 检测空白对照组、Kyn 组和 Kyn + CH223191 组对 MH7A 中 Ahr 的入核水平, 并采用非参数检验比较两种检测技术检测结果的相关性。**结果** 与空白对照组相比, 免疫荧光技术和成像流式细胞术测得的 MH7A 细胞中 Kyn 组和 Kyn + CH223191 组 Ahr 入核能力增加 ($P < 0.05$), 两种实验方法测得的三组结果相关性良好, R^2 值分别是 0.863 8、0.928 7 和 0.901 8, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。**结论** 相较于免疫荧光技术的操作和结果, 成像流式细胞术数据处理比较复杂, 但所得结果精确度高, 避免了实验者的主观性, 减少实验误差。

关键词 免疫荧光技术; 成像流式细胞术; 类风湿关节炎; 成纤维样滑膜细胞; 芳香烃受体; 入核; 相关性

中图分类号 R 331

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2024)09-1524-05

doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2024.09.005

免疫荧光技术是将免疫学方法(抗原抗体特异

结合)与荧光标记技术结合起来研究特异蛋白抗原在细胞内分布的方法。主要用于研究蛋白定位、蛋白间相互作用, 具有特异性强、敏感性高、速度快的优点。但它对结果判定的客观性不足, 不能精确的量化实验结果^[1-2]。成像流式细胞术将流式细胞术和荧光显微镜成像相结合, 不仅可以提供细胞群的统计数据, 还可以对单一细胞的高分辨率数字化图像进行获取并使其可见, 从而提供细胞形态、细胞结构和亚细胞信号分布。目前已经发现成像流式细胞

2024-07-15 接收

基金项目: 安徽省自然科学基金(编号: 2108085MH320); 安徽省留学人员创新项目择优资助计划项目(编号: 2022LCX019)

作者简介: 程梦, 女, 硕士研究生;

魏伟, 男, 博士, 教授, 博士生导师, 通信作者, E-mail:

wwei@ahmu.edu.cn;

常艳, 女, 博士, 教授, 硕士生导师, 通信作者, E-mail:

yychang@ahmu.edu.cn

of CRS (CRS 3W), and the model was successful; CRS 3W mice showed a significant decrease in mechanical pain threshold and developed mechanical pain sensitivity. A lot of c-Fos⁺ cells of LC was observed in CRS 3W mice, 90% of them were noradrenergic neurons. Compared with the Control group, the neuronal excitability of noradrenergic neurons decreased in LC of CRS 3W mice. Compared with the Control group, chemogenetic activation of the LC noradrenergic neurons significantly reduced mechanical pain sensitization in CRS 3W mice. **Conclusion** The excitability of noradrenergic neurons in LC of CRS 3W mice decreases, and chemogenetic activation of noradrenergic neurons in LC can relieve pain sensitization in CRS 3W mice.

Key words locus coeruleus; chemogenetics; chronic pain; chronic restraint stress; electrophysiology *in vitro*; novelty-suppressed feeding test; forced swimming test

Fund programs National Natural Science Foundation of China (No. 82101311); Scientific Research Fund Project of Anhui Medical University (No. 2020xkj014); 'Early Exposure to Research' Training Programme for Clinical Medicine ('5+3' Integration) at Anhui Medical University (No. 2021-ZQKY-172).

Corresponding author Meng Qian, E-mail: mengqian@ahmu.edu.cn

术的多种独特应用,包括蛋白质定位、吞噬、死亡过程、自体消化、核移位以及形态变迁等方面^[3]。该研究利用成像流式细胞术观察 MH7A 细胞中的 Ahr 是否能进入细胞核,以此作为衡量标准,并将结果与免疫荧光技术对比,提供了判断胞内蛋白能否成功进入细胞核的一种新途径。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞株 人来源的成纤维样滑膜细胞细胞株 MH7A,由同实验室其他课题组赠送。

1.1.2 主要试剂和仪器 DMEM 高糖培养基(批号:MA0212-Aug-19H)购自美仑生物公司;磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)(批号:B390KJ)购自上海源培生物科技股份有限公司;胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)(批号:085-150)购自加拿大 Wisent 公司;不含 EDTA 的胰蛋白酶(批号:C0205)、青链霉素(批号:C0222)购自上海碧云天生物技术研究;犬尿氨酸(批号:K8625)购自美国 Sigma 公司;Ahr 一抗(批号:NB100-128)购自美国 NOVUS 公司、兔抗山羊荧光二抗(批号:M213218S)购自艾比玛特生物医药有限公司。ImageStreamX Mark II 成像流式细胞仪购自美国 Lumines 公司;Leica TCS SP8 激光共聚焦显微镜购自德国 Leica 公司;SIGMA 3-30 K 低温高速离心机购自上海纳腾仪器有限公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 将 MH7A 放置于 37 °C、5% CO₂ 恒温培养箱内生长,通过更换包含 15% FBS 和 1% 青链霉素的培养基来维持其生命周期及繁殖过程。当该细胞群体达到约 90% 的饱和度后,便可执行相关的实验操作。

1.2.2 细胞处理 以 1.5×10^5 个/ml 的细胞密度向 6 孔板内添加 MH7A 细胞,待细胞贴壁后设为空白对照组、Kyn 组和 Kyn + CH223191 组,然后给予 Kyn 刺激(2×10^{-4} mol/L),并在接下来的 48 h 内进行观察和分析;同时加入 Ahr 抑制剂 CH223191 (10^{-5} mol/L)培养 24 h,观察其作用效果。

1.2.3 激光共聚焦显微镜检测 Ahr 入核 取出 24 孔板,每孔加入 100 μ l 5% 多聚甲醛,固定 30 min。弃上清液,用 PBS 洗涤 3 min,重复 3 次。加入 100 μ l 0.5% 破膜液,室温破膜 10 min。5% BSA 封闭 1 h 后,每孔加入 50 ~ 100 μ l 的 Ahr 一抗(1 : 100),放 4 °C 摇床过夜。次日,每管加入 100 μ l 二抗(1 :

200),避光孵育 30 min,最后滴入适量抗荧光淬灭剂,尽可能排除气泡的产生,每个检测指标设重复 5 次。

1.2.4 成像流式细胞术检测 Ahr 入核 从恒温培养箱中取出 6 孔板后,移去培养基,用 PBS 洗涤 1 次,每孔加入 500 μ l 不含 EDTA 的胰蛋白酶消化细胞,将细胞放入 15 ml 离心管中 4 °C、2 000 r/min 离心 5 min,弃去上清液,清洗,再加入 100 μ l 固定液,混匀 4 °C 避光固定 30 min。加入 100 μ l 破膜液重悬,室温破膜 10 min。加入 Ahr 一抗(1 : 100),室温孵育 1 h。每管加入 100 μ l 山羊二抗(1 : 200),避光孵育 30 min。加入 100 μ l DAPI,避光孵育 5 min,再加入 50 ~ 150 μ l PBS 重悬后上机检测。入核比例分析:首先对单阳性样本进行软件自动荧光补偿,选择分析入核所需的智能模块,设定标记 MH7A 细胞(Ch01, Ch07)的检测通道,通过调整对焦好的单个细胞,将 MH7A 细胞作为核转位分析对象,软件自动划定入核的 MH7A 细胞并计算统计结果。每个检测指标设重复 5 次。成像流式细胞术还需设置一组进行荧光补偿,该组无需染 DAPI。

1.3 统计学处理 使用 SPSS 25.0 软件进行数据分析,两组数据的比较采用 *t* 检验。多组数据的比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA),相关性分析采用线性回归和多配对标本的非参数检验(Friedman 检验),以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 免疫荧光技术检测 Ahr 的细胞内定位 免疫荧光技术结果显示,与空白对照组比较,Kyn 组和 Kyn + CH223191 组 MH7A 细胞入核增加($P < 0.05$),与 Kyn 组比较,加入 CH223191 后 Ahr 入核减少,差异有统计学意义($P < 0.05$),见图 1。

2.2 成像流式细胞术检测 Ahr 的入核率 成像流式细胞术结果显示,与空白对照组相比,Kyn 组和 Kyn + CH223191 组细胞的核移植能力显著增强($P < 0.05$),与免疫荧光技术结果一致,见图 2、图 3。

2.3 免疫荧光技术和成像流式细胞术的相关性分析 两种检测技术测得 Ahr 入核率结果的判定系数 R^2 均大于 0.8,斜率在 0.603 9 ~ 1.192 0,截距在 0.408 8 ~ 0.700 1, $P < 0.05$,相关性良好,见表 1。

3 讨论

类风湿关节炎一种主要表现为慢性的、涉及多

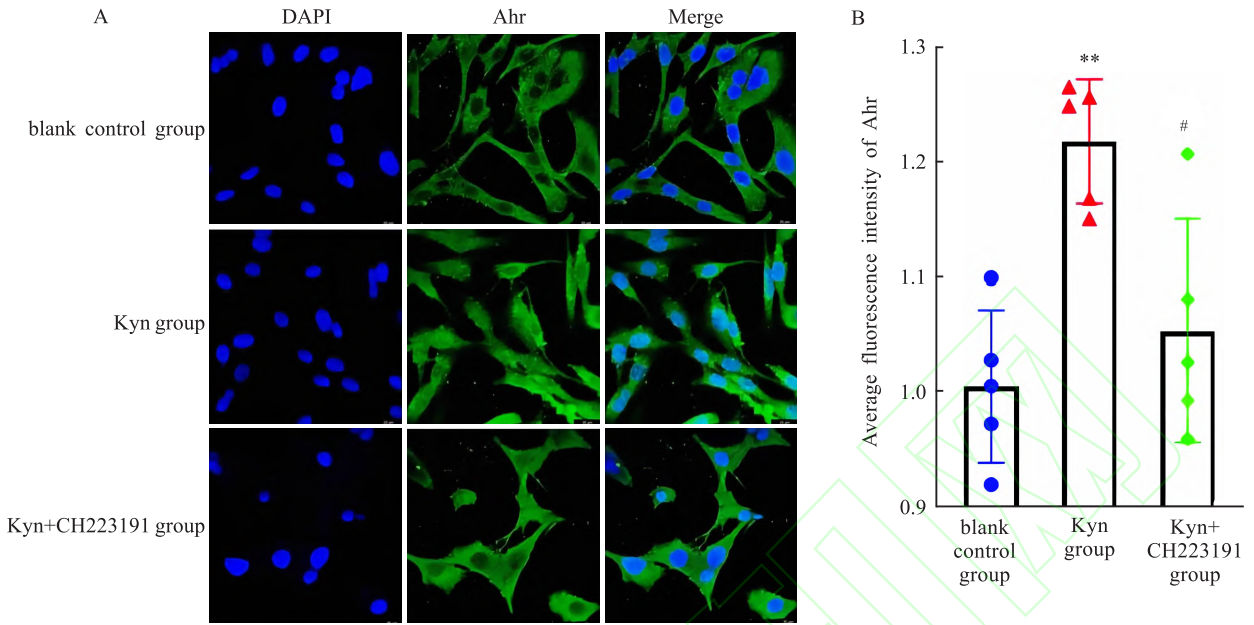


图1 免疫荧光技术检测 Ahr 入核情况 (n = 5)

Fig.1 Immunofluorescence technique to detect Ahr entry into the nucleus(n = 5)

A: Representative immunofluorescence plot of Ahr into the nucleus ×63; B: Average fluorescence density of Ahr in the nucleus; ** P < 0.01 vs blank control group; # P < 0.05 vs Kyn group.

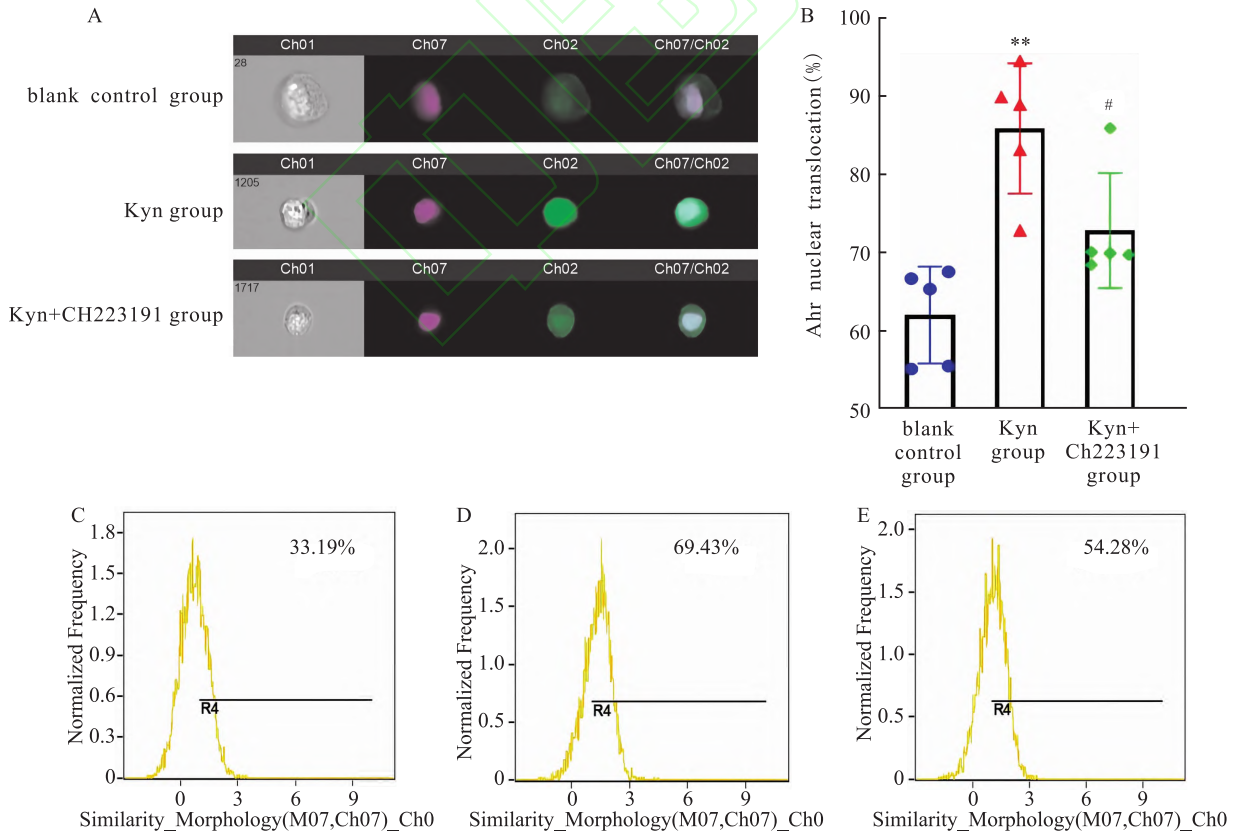


图2 成像流式细胞术检测 MH7A 细胞 Ahr 入核的情况 (n = 5)

Fig.2 Imaging flow cytometry detection of Ahr entry into the nucleus of MH7A cells(n = 5)

A: Representative imaging flow chart of Ahr nucleus entry; B: Statistical graph of Ahr nucleus entry rate; C: Ahr nucleus entry rate in the blank control group; D: Ahr nucleus entry rate in the Kyn group; E: Ahr nucleus entry rate in the Kyn + CH223191 group; ** P < 0.01 vs Blank control group; # P < 0.05 vs Kyn group.

表 1 免疫荧光技术和成像流式细胞术检测技术的相关性分析($n=5$)Tab. 1 Correlation analysis of immunofluorescence and imaging flow cytometry detection techniques($n=5$)

Group	n	Median(P_{25}, P_{75})		P value	Linear regression		
		Laser confocal (%)	ImageStreamX Mark II (%)		R^2	Slope	Intercept
Blank control	5	100.67 (97.42, 100.72)	62.38 (56.64, 66.82)	<0.05	0.863 6	0.971 3	0.400 8
Kyn	5	121.95 (116.99, 125.80)	86.01 (83.29, 90.02)	<0.05	0.928 7	0.603 9	0.700 1
Kyn + CH223191	5	105.50 (96.07, 108.28)	72.94 (69.84, 70.21)	<0.05	0.901 8	1.192 0	0.185 7

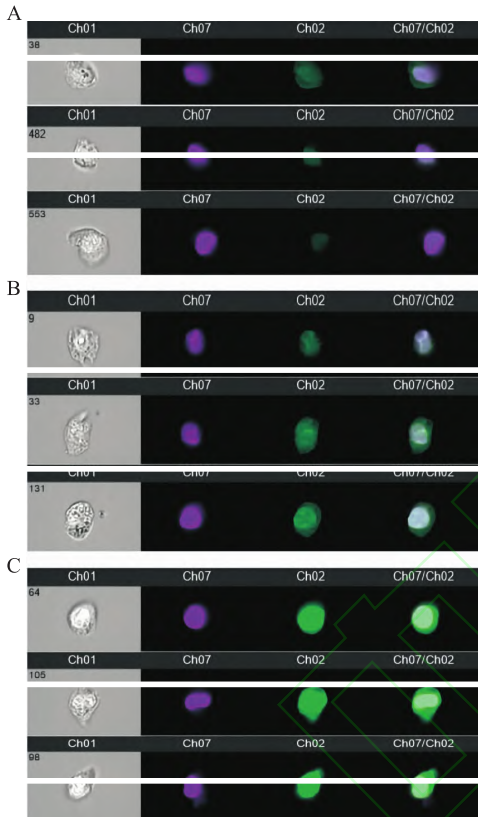


图 3 成像流式细胞术观察 MH7A 细胞中 Ahr 入核的过程

Fig. 3 Imaging flow cytometry observation of the process of Ahr entering the nucleus in MH7A cells

A: Representative diagram of MH7A in which Ahr is not entering nucleus; B: Representative diagram of MH7A in which Ahr is undergoing the nucleus-entering process; C: Representative diagram of MH7A in which Ahr is entering nucleus.

个关节发炎并引发自体免疫力自身免疫疾病^[4-5]。成纤维样滑膜细胞在其中发挥着重要作用^[6]。Ahr 是一种配体依赖性转录因子,它有很多配体,其中 Kyn 便是 Ahr 一个重要的内源性配体^[7]。在正常情况下, Ahr 与细胞质中的伴侣蛋白结合,并不活跃。但被异常激活后, Ahr 会转运到细胞核中,控制包括 CYP1A1、CYP1B1 在内的靶基因的转录活性^[8-9]。

从实验结果可以看出,成像流式细胞术和免疫荧光技术所得结果有统计学意义($P < 0.05$),具有

相关性($R^2 > 0.8$)。除了人为的操作原因外,也可能是由于使用不同的仪器所致。不过在实验过程中,均由同一人在同样操作下进行上机检测,两种实验方法具有同样适合的样本抗体配比,两台仪器测得结果的差异可以控制在较小范围内。

免疫荧光技术具备较高的特异性和灵敏度,但可能难以量化。这个技术的实施过程相对繁琐耗时,且仅能捕捉到单个孔板内细胞的形态的局部区域,因此受主观影响的可能性较高。而近年来的新兴流式细胞技术——成像流式细胞术适用于大规模定量,其本质是提供无偏定量。它凭借实施便捷性,能够提供大量信息的优势吸引了广泛关注。这种技术基于传统流式细胞术并融合了荧光显微镜成像技术,拥有多种检测通道,能够逐一观察经过流动室内的每颗细胞,从而实现对其形状的多参数量化分析,生成新的细胞形态统计数据^[10]。尽管其成本相当,但是免疫荧光技术和成像流式细胞术在时间和方法上的差异是显著的。两种实验方法的对比如下:① 免疫荧光技术要求实验人员亲自操控,成像流式细胞术则由仪器自行处理,这使得它的时间更短且更容易学习。② 相较于免疫荧光技术,成像流式细胞术能够实现高样本利用率和回收率,使剩余的细胞得以应用于其他的实验项目,例如蛋白免疫印迹或定量聚合酶链式反应。③ 由于成像流式细胞术具有识别并排除假阳性的能力,因此能极大地提升样本检测的准确度,并且可以直接获取目标蛋白质的入核比例。④ 免疫荧光技术需要使用 LAX S 软件,只需在文件夹中将保存的方案打开,适当调整荧光强度,方法同激光共聚焦上机操作类似。然而,成像流式细胞术数据处理方法相对复杂,需要使用 IDEA 软件,需要实验者根据结果重新圈出目的蛋白染色的细胞群,软件会自动计算统计学结果,即可得到相关实验数据。

综上所述,尽管成像流式细胞术在相同的操作条件下能产生更多的实验数据,但后续的数据处理过程却相对繁琐。因此,最终选择哪种实验设备还需要考虑到实验目标、实验环境以及检测指标等因素。

参考文献

- [1] Tan W C C, Nerurkar S N, Cai H Y, et al. Overview of multiplex immunohistochemistry/immunofluorescence techniques in the era of cancer immunotherapy[J]. *Cancer Commun (Lond)*, 2020, 40(4): 135–53. doi: 10.1002/cac2.12023.
- [2] McClelland R D, Culp T N, Marchant D J. Imaging flow cytometry and confocal immunofluorescence microscopy of virus–host cell interactions[J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2021, 11: 749039. doi: 10.3389/fcimb.2021.749039.
- [3] 方亦龙, 韩大飞, 檀学文, 等. 成像流式细胞术在检测巨噬细胞吞噬肿瘤细胞中的应用[J]. *安徽医科大学学报*, 2021, 56(10): 1670–4. doi: 10.19405/j.cnki.issn1000–1492.2021.10.032.
- Fang Y L, Han D F, Tang X W, et al. Application of imaging flow cytometer in detecting tumor cell phagocytosis [J]. *Acta Univ Med Anhui*, 2021, 56(10): 1670–4. doi: 10.19405/j.cnki.issn1000–1492.2021.10.032.
- [4] Gravalles E M, Firestein G S. Rheumatoid arthritis-common origins, divergent mechanisms[J]. *N Engl J Med*, 2023, 388(6): 529–42. doi: 10.1056/NEJMra2103726.
- [5] Mo J J, Zhang W, Wen Q W, et al. Genetic association analysis of ATG16L1 rs2241880, rs6758317 and ATR16L2 rs11235604 polymorphisms with rheumatoid arthritis in a Chinese population [J]. *Int Immunopharmacol*, 2021, 93: 107378. doi: 10.1016/j.intimp.2021.107378.
- [6] Panfili E, Gerli R, Grohmann U, et al. Amino acid metabolism in rheumatoid arthritis: Friend or foe [J]. *Biomolecules*, 2020, 10(9): 1280. doi: 10.3390/biom10091280.
- [7] Yue T T, Sun F, Yang C L, et al. The AHR signaling attenuates autoimmune responses during the development of type 1 diabetes [J]. *Front Immunol*, 2020, 11: 1510. doi: 10.3389/fimmu.2020.01510.
- [8] Marszałek–Grabska M, Walczak K, Gawel K, et al. Kynurenine emerges from the shadows – current knowledge on its fate and function [J]. *Pharmacol Ther*, 2021, 225: 107845. doi: 10.1016/j.pharmthera.2021.107845.
- [9] Huang T, Song J, Gao J, et al. Adipocyte–derived kynurenine promotes obesity and insulin resistance by activating the AHR/STAT3/IL-6 signaling [J]. *Nat Commun*, 2022, 13(1): 3489. doi: 10.1038/s41467–022–31126–5.
- [10] Wortzel I, Porat Z, Seger R, et al. Applying imaging flow cytometry and immunofluorescence in studying the dynamic Golgi structure in cultured cells [J]. *STAR Protoc*, 2022, 3(2): 101278. doi: 10.1016/j.xpro.2022.101278.

Comparison of imaging flow cytometry and immunofluorescence techniques for detection of ahr entry in fibroblast-like synoviocytes

Cheng Meng¹, Wang Yi¹, Dong Weibo¹, Wei Wei¹, Chang Yan^{1,2}

(¹Institute of Clinical Pharmacology, Anhui Medical University, Key Laboratory of Anti-Inflammatory and Immune Medicine, Hefei 230032; ²Laboratory Animal Center, Anhui Medical University, Hefei 230032)

Abstract Objective To investigate the difference between imaging flow cytometry and immunofluorescence techniques for detecting Ahr entry in fibroblast-like synoviocytes. **Methods** Human-derived fibroblast-like synoviocytes line MH7A was cultured with 15% DMEM. The nucleation levels of Ahr in MH7A were detected by laser scanning confocal microscopy and quantitative imaging flow cytometry (ImageStreamX Mark II) in the blank control group, the Kyn group, and the Kyn + CH223191 group, respectively. The results of the two assay techniques were compared using nonparametric tests-correlation of the results. **Results** Compared with the blank control group, the Kyn and Kyn + CH223191 groups of MH7A cells increased Ahr nucleation ability as measured by immunofluorescence technique and imaging flow cytometry ($P < 0.05$), and the three groups of results calculated by the two experimental methods were consistent, with the R2 values of 0.863 8, 0.928 7, and 0.901 8, respectively, which were statistically significant differences ($P < 0.05$). **Conclusion** Compared with the operation and results of immunofluorescence experiments, imaging flow cytometry data processing is more complicated. However, the results are notably precise, avoiding the subjectivity of the experimenter and minimizing experimental inaccuracies.

Key words immunofluorescence; imaging flow cytometry; rheumatoid arthritis; fibroblast-like synoviocytes; aromatic hydrocarbon receptor; nucleation; relevance

Fund programs Natural Science Foundation of Anhui Province (No. 2108085MH320); Provincial Innovation Project for Overseas Chinese Scholars Selection Funding Program Project (No. 2022LCX019)

Corresponding authors Wei Wei, E-mail: wwei@ahmu.edu.cn; Chang Yan, E-mail: yychang@ahmu.edu.cn