

NGHIÊN CỨU ỨNG DỤNG KỸ THUẬT MIỄN DỊCH HUỖNH QUANG VÀ PHÂN TÍCH HÌNH ẢNH NỘI HÀM CAO TRONG ĐÁNH GIÁ HOẠT TÍNH ỨC CHẾ CHUYỂN VỊ YẾU TỐ NHÂN NF- κ B

Đỗ Hữu Nghị^{1,2,✉}, Nguyễn Xuân Vũ³, Nguyễn Xuân Thành⁴, Lưu Văn Chính^{1,2}, Lê Mai Hương^{1,2}

¹Viện Hóa học các hợp chất thiên nhiên, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

²Học viện Khoa học và Công nghệ, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

³Trường Đại học Nông Lâm Thái Nguyên, Đại học Thái Nguyên

⁴Chi cục Quản lý Chất lượng Nông Lâm Thủy sản Thái Nguyên

✉Người chịu trách nhiệm liên lạc. E-mail: nghi@inpc.vast.vn

Ngày nhận bài: 02.10.2019

Ngày nhận đăng: 16.3.2020

TÓM TẮT

Yếu tố nhân kappa B hay NF- κ B là yếu tố phiên mã thiết yếu kiểm soát quá trình biểu hiện gen mã hóa của các cytokine tiền viêm trong quá trình sinh lý bệnh viêm và ung thư. Trong nghiên cứu này trình bày ứng dụng kỹ thuật miễn dịch huỳnh quang kết hợp phân tích hình ảnh nội hàm cao để phát hiện và định lượng sự chuyển vị của tiểu đơn vị NF- κ B p65 liên kết protein huỳnh quang xanh (green fluorescent protein, GFP) kích hoạt bởi cytokine trên dòng tế bào ung thư cổ tử cung HeLa. Sau khi nghiên cứu các điều kiện thích hợp, hình ảnh thu được đủ chất lượng phân tích và đảm bảo độ tin cậy của phép thử khi hệ số Z' tính theo tỷ lệ protein trong nhân (Nu) và tế bào chất (Cyto) được xác định lần lượt là 0,70 đối với Nuc-Cyto và 0,73 cho Nuc/Cyto. Cụ thể thử nghiệm với mẫu hợp chất zerumbone (SHTN-4, nồng độ 25 μ g/mL) có thể hiện hoạt tính ức chế NF- κ B qua xác định lượng p65-GFP trong bào tương cao hơn đáng kể (82 %) so với đối chứng (19,4 %) khi xử lý tế bào HeLa với chất cảm ứng IL-1 (10 ng/mL) trong 1 giờ. Kết quả nghiên cứu là cơ sở để xây dựng quy trình định lượng protein nội bào trong sàng lọc các hoạt chất trên đích phân tử sinh học liên quan hoạt tính kháng viêm và ung thư ở điều kiện nghiên cứu trong nước.

Từ khóa: cytokine, miễn dịch huỳnh quang, sàng lọc nội hàm cao, tế bào HeLa, yếu tố nhân NF- κ B

ĐẶT VẤN ĐỀ

Được phát hiện đầu tiên bởi Sen và Baltimore vào năm 1986, NF- κ B (*nuclear factor-kappa B*) trước đây được xem như là yếu tố phiên mã hay yếu tố nhân của riêng tế bào lympho B. Hiện nay NF- κ B được tìm thấy trong nhiều loại tế bào khác nhau và có 5 thành viên được xác định: p105/p50 (*nfkb1*), p100/p52 (*nfkb2*), p65 (RelA), RelB và c-Rel. Một đặc trưng của NF- κ B là tất cả các thành viên của họ này đều bảo tồn được một vùng domain Rel giống nhau chứa khoảng 300 amino acid chịu trách nhiệm chính cho quá trình gắn với DNA, nhị phân hóa và tương tác với I κ B - chất

ức chế nội bào của NF- κ B. Khi tế bào ở trạng thái nghỉ, NF- κ B tồn tại trong bào tương ở dạng tương tác không đồng hóa trị với các protein I κ B. Những tác nhân hoạt hóa NF- κ B gây nên quá trình phosphoryl hóa các I κ B. Kết quả là I κ B bị giáng hóa bởi quá trình thủy phân protein hoặc bị phân hủy do các proteasome hay các protease khác. Khi đó các NF- κ B sẽ được giải phóng, đi vào nhân tế bào và kích hoạt quá trình phiên mã tại đây. Sự kích hoạt sai lệch tín hiệu NF- κ B có liên quan đến các bệnh viêm như viêm khớp dạng thấp và hen suyễn và một số bệnh chuyển hóa (Đỗ Thị Thanh Huyền *et al.*, 2017; Liu *et al.*, 2017). Mặt khác, khi viêm không hồi phục dễ

chuyển sang giai đoạn viêm mạn tính và nhiều nghiên cứu đã chứng minh có mối liên hệ giữa viêm mạn tính và nguy cơ ung thư cao thông qua yếu tố NF- κ B. Nhiều loại khối u khác nhau của con người do sự kiểm soát sai NF- κ B bởi nó hoạt động giúp biểu hiện của các gen giữ cho tế bào tăng sinh và bảo vệ tế bào khỏi các điều kiện cảm ứng quá trình chết theo chương trình apoptosis (Hoesel, Schmid, 2013). Việc ức chế yếu tố NF- κ B có thể dẫn đến ức chế tăng sinh tế bào khối u hoặc làm cho tế bào này trở nên nhạy cảm hơn với tác dụng của thuốc. Do vậy, NF- κ B được quan tâm trong nhiều nghiên cứu như một trong các đích sinh học quan trọng trong liệu pháp kháng viêm và ung thư.

Tuy nhiên, nghiên cứu phát hiện chuyển vị của yếu tố nhân NF- κ B thường gặp nhiều khó khăn do các tương tác protein nội bào xảy ra nhanh và phức tạp. Kỹ thuật chuyển gel hay di động điện di EMSA (electrophoretic mobility shift assay) thường được sử dụng để phát hiện liên kết đặc hiệu NF- κ B và DNA hoặc có thể sử dụng kỹ thuật Western blot (Maguire *et al.*, 2011). Một trong các yếu điểm của phương pháp EMSA và Western blot là chúng không cung cấp đầy đủ thông tin trong mẫu phân tích phức tạp và do đó thiếu độ tin cậy. Mặt khác các phương pháp hóa sinh-phân tử này cũng không đủ nhạy để phát hiện các hiện tượng hiếm khi chỉ thực hiện trên số lượng tế bào hạn chế. Trong khi đó phân tích trắc lưu tế bào flow cytometry có thể cung cấp nhiều dữ liệu từ số lượng lớn tế bào thử nghiệm, tuy nhiên rõ ràng kỹ thuật này không thể thu được các dữ liệu phân tích nội bào từ các tín hiệu huỳnh quang (Du *et al.*, 2019; Maguire *et al.*, 2011). Những hạn chế này có thể được khắc phục bằng kỹ thuật phân tích hình ảnh tế bào và chuyển vị nội bào sử dụng thiết bị hiển vi huỳnh quang. Bất lợi của kỹ thuật này là một số kit thử thương mại sử dụng dòng tế bào biến nạp hiện đã ngừng sản xuất hoặc có giá thành rất cao. Do vậy chúng tôi nghiên cứu đánh giá khả năng chuyển vị yếu tố nhân NF- κ B nhờ kết hợp phương pháp miễn dịch huỳnh quang và phân tích hình ảnh nội hàm cao trên hệ thiết bị hiển vi tự động Olympus scan^R với quy trình đơn giản hơn và chi phí thấp phù hợp với điều kiện trong nước.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Vật liệu

Dòng tế bào ung thư cổ tử cung HeLa (ATCC[®] CCL-2[™]) được mua từ nguồn ATCC (American Type Culture Collection, Virginia, USA) và lưu giữ tại Phòng Sinh học Thực nghiệm (Viện Hóa học Các hợp chất thiên nhiên).

Các kit nhuộm huỳnh quang, chất tiền viêm [Interleukin-1 (IL-1), yếu tố hoại tử khối u (TNF α)], lipopolysaccharide (LPS), môi trường nuôi cấy tế bào DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) và hóa chất sử dụng trong nghiên cứu được cung cấp bởi Sigma-Aldrich và ThermoFisher Scientific, USA. Kháng thể sơ cấp (rabbit anti-p65 NF- κ B antibody) cung cấp bởi Santa Cruz Biotechnology, USA. Mẫu hợp chất thiên nhiên được cung cấp bởi TS Lưu Văn Chính, Viện Hóa học các HCTN là mẫu chất sạch, đã được xác định cấu trúc.

Xử lý mẫu

Mẫu chất thử được pha trong dimethylsulfoxide (DMSO 100%), siêu âm trong 30-60 min. Mẫu được nhỏ lên miếng 24 hoặc 96 giếng, nồng độ cuối đến 50 μ g/mL (hoặc μ M). Nồng độ cuối cùng trong giếng thử của DMSO từ 0,25-1%.

Nuôi cấy và hoạt hóa tế bào

Tế bào được nuôi cấy ở 37°C, CO₂ 5% trong môi trường DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, high glucose; Sigma-Aldrich, USA) có bổ sung L-glutamine 2 mM, kháng sinh (100 U/mL penicillin + 100 μ g/mL streptomycin; Gibco, USA) và bổ sung huyết thanh thai bò (FBS 10%, v/v). Sau khi tế bào phát triển đạt trên 70%, loại bỏ môi trường cũ và rửa với dung dịch đệm phosphate (PBS 0,1 M, pH 7,8), sau đó bổ sung Trypsin-EDTA 0,05% để tách tế bào bám dính khỏi đáy đĩa nuôi cấy. Dịch tế bào được chuyển sang ống falcon-15 mL có chứa 4-5 mL dịch môi trường mới và ly tâm 300 rpm. Sau khi loại bỏ phần dịch, phần cặn tế bào được trộn với môi trường dinh dưỡng và được chuyển sang

binh nuôi cấy mới để sẵn sàng cho các thử nghiệm hoạt tính.

Kích hoạt yếu tố NF-κB

Đưa mẫu chất thử đã pha trong DMSO 0,25-1% lên phiên đã có dịch tế bào HeLa (90 μL/giếng), ủ 30 min ở 37°C trước khi bổ sung 10 μL chất cảm ứng [Interleukin-1 (IL-1), yếu tố hoại tử khối u (TNFα) hoặc lipopolysaccharide (LPS), nồng độ cuối 0,5-15 ng/mL]. Tiếp tục ủ ở 37°C trong 1 h tới khi kết thúc, rửa phiên 2 lần với PBS 0,1 M lạnh cho bước cố định tế bào.

Cố định tế bào

Tế bào có thể cố định bằng paraformaldehyde 3,7% (v/v) trong đệm phosphate (PBS 0,1 M, pH 7,8) theo mô tả bởi Harlow và Lane (2006). Protein NF-κB ở tế bào HeLa có thể ổn định trong một vài ngày ở 4°C trước khi nhuộm với kháng thể NF-κB và cố định với paraformaldehyde 3,7-4%.

Nhuộm huỳnh quang đích phân tử p65

Sau khi cố định tế bào, block các kháng nguyên không đặc hiệu bằng bổ sung 100 μL sữa bột không béo 5% trong đệm PBS 0,1 M, pH 7,8, để trong 20 min ở nhiệt độ phòng. Sau khi rửa 2 lần với Tris-HCl 0,1 M, ủ tế bào trong 1h với 100 μL kháng thể sơ cấp (rabbit anti-p65 NF-κB antibody). Thêm dung dịch 0,01% Tween 20 và rửa với đệm PBS 0,1 M trước khi ủ với 100 μL kháng thể thứ cấp (Alexa Fluor® 488 goat anti-rabbit) đồng thời với 300 nM DAPI. Ủ phiên trong 1h ở điều kiện tối, nhiệt độ phòng và rửa lại với đệm PBS 0,1 M. Bọc phiên và lưu giữ trong điều kiện tối ở 4°C tới khi ghi ảnh và phân tích.

Đánh giá hiệu suất sàng lọc qua hệ số Z'

Hệ số Z' (Zhang *et al.*, 1999) được sử dụng để đánh giá hiệu suất thử nghiệm sàng lọc hiệu năng cao. Tế bào được xử lý với TNFα và cố định như trên. Thử nghiệm với n=45 giếng đối chứng và mẫu có bổ sung cytokine. Hệ số Z' được xác định theo công thức:

$$Z' = 1 - \frac{3 * (\sigma_p + \sigma_n)}{|\mu_p - \mu_n|}$$

Trong đó: μ là giá trị trung bình và σ - độ lệch chuẩn. p : positive control, n : negative control.

Thu nhận hình ảnh huỳnh quang tế bào

Hình ảnh tế bào và các đích phân tử huỳnh quang được thu nhận sử dụng hệ thiết bị Olympus scan[^]R (Olympus, Nhật Bản) ở các vật kính x20 (Plan Semi-Apochromat 20xPH/0.45) với bốn bộ lọc tiêu chuẩn cho các kênh DAPI/FITC/TRICT/CY5.

Phần mềm dựa trên gradient tự động lấy nét có thể điều chỉnh thô và chỉnh tinh được sử dụng để xác định mặt phẳng lấy nét trong kênh GFP kích thích ở bước sóng 488 nm và phát hiện tại 510 nm. Hình ảnh được chụp sử dụng camera cảm biến sCMOS (Hamamatsu, Nhật Bản), độ phân giải ≥ 4.0 megapixel, tốc độ quét ≥ 100 hình/giây, mỗi lần quét và xử lý 9-16 vị trí/giếng.

Phân tích hình ảnh và số liệu

Các hình ảnh được phân tích bằng phần mềm phân tích scan[^]R Analysis ver.2.7.2 (Olympus). Các thí nghiệm được thực hiện với độ lặp lại ≥ 3 lần và phân tích thông kê trên phần mềm JMP Pro 13.2. Với giá trị $p < 0,05$ được coi là sự khác biệt có ý nghĩa thống kê.

GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA)

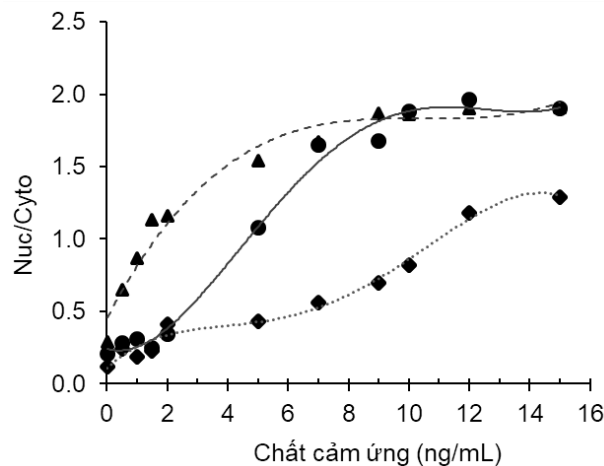
KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Kích thích chuyển vị NF-κB trên dòng tế bào HeLa bởi các cytokine tiền viêm

Nghiên cứu sự phụ thuộc kích thích chuyển vị NF-κB vào nồng độ cytokine cho thấy cả hai loại cytokine tiền viêm IL-1 và TNFα đều có hiệu quả cao ở nồng độ từ 10 ng/mL (Hình 1). Ở các nồng độ cao hơn sự chuyển vị tăng NF-κB không đáng kể, kết quả này phù hợp với các nghiên cứu trước đó (Ding *et al.*, 1998) và như vậy có thể sử dụng một trong hai cytokine này làm chất cảm ứng chuyển vị NF-κB trên dòng tế bào HeLa. Sau khi ủ 1h với các cytokine, lượng lớn p65 được phát hiện trong nhân mặc dù một lượng nhất định p65 vẫn nằm ngoài tế bào chất. Trong khi đó lipopolysaccharide của vi khuẩn

(LPS) chỉ kích thích chuyển vị nội bào tối đa ở nồng độ tới 12-16 ng và hiệu quả thấp hơn đáng kể so với các cytokine. Mặc dù LPS được sử dụng phổ biến kích thích sản sinh NO trong đánh giá hoạt tính kháng viêm trên dòng đại thực bào RAW 264.7 hoặc kích thích chuyển vị NF- κ B trên các dòng tế bào A549, AGS, L929... (Bartfeld *et al.*, 2010), rất ít nghiên cứu đánh giá vai trò của LPS là chất cảm ứng yếu tố

NF- κ B trên dòng HeLa. Để định lượng sự chuyển vị này, kỹ thuật miễn dịch huỳnh quang được phát triển nhằm đo được cường độ tín hiệu huỳnh quang cả ở tế bào chất và trong nhân đối với từng tế bào riêng lẻ cũng như phân tích tập hợp các tế bào trên phiên đa giếng. Trong nghiên cứu này chúng tôi nghiên cứu sử dụng hệ thống sàng lọc phân tích nội hàm cao Olympus scan[®]R.

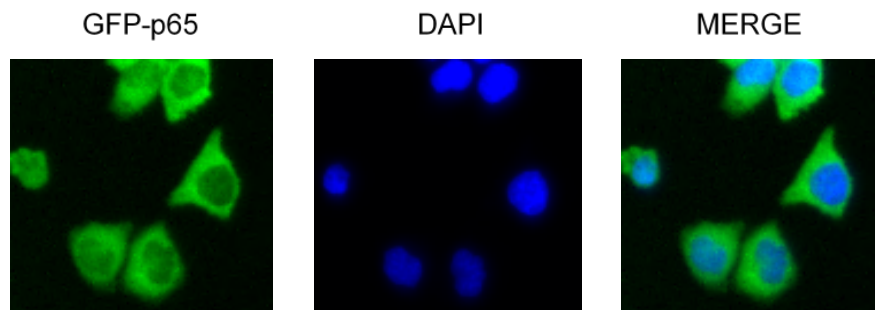


Hình 1. Tương quan nồng độ chất cảm ứng và sự chuyển vị NF- κ B ở dòng tế bào HeLa. Các chất tiền viêm cytokine Interleukin-1 (IL-1; —●—), yếu tố hoại tử khối u (TNF α ; --▲--) và lipopolysaccharide (LPS; ...◆...).

Thu nhận hình ảnh huỳnh quang

Tế bào HeLa được ủ với chất cảm ứng (IL-1 10 ng/mL), cố định tế bào và xử lý với thuốc nhuộm huỳnh quang như mô tử ở phần phương pháp ở trên. Trước khi tiến hành thu nhận hình ảnh nhuộm DAPI và GFP-p65, các mẫu đều được quét kiểm tra ở chế độ tự động lấy nét autofocus ở tất cả các giếng để đảm bảo độ đồng nhất. Để

phát hiện NF- κ B kích hoạt bởi IL-1, sử dụng kỹ thuật miễn dịch huỳnh quang với kháng thể sơ cấp anti-p65 NF- κ B và liên kết huỳnh quang xanh phát hiện trên kênh GFP, kích thích ở $\lambda = 488$ nm. Đồng thời, nhân tế bào được nhuộm với huỳnh quang DAPI, kích thích ở $\lambda = 405$ nm. Kết quả thu được hình ảnh rõ, đủ chất lượng phân tích (Hình 2).

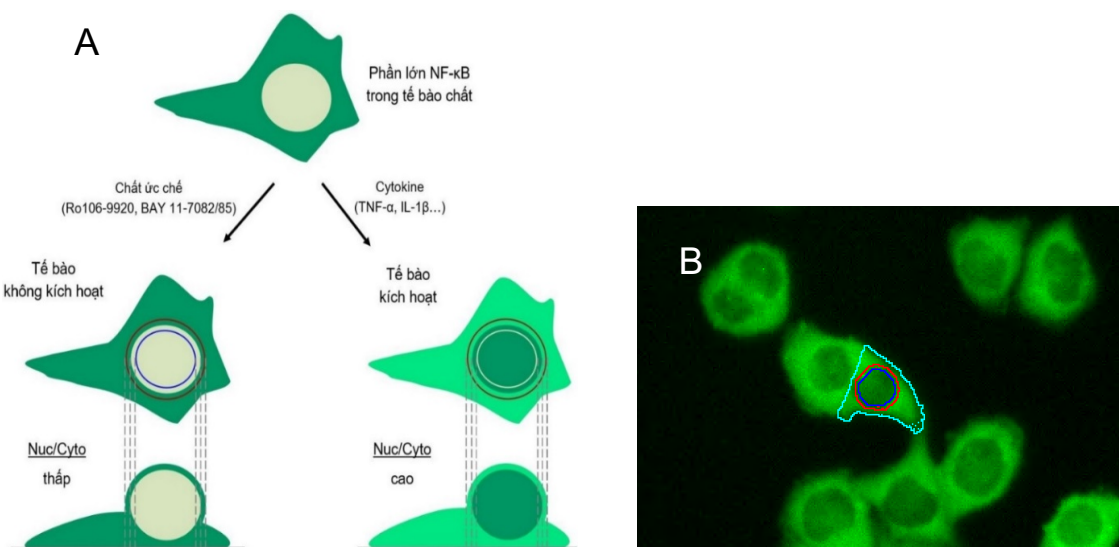


Hình 2. Tín hiệu protein huỳnh quang xanh gắn với tiểu đơn vị NF- κ B p65 (GFP-p65), DNA nhân tế bào (DAPI) và chồng hình ảnh huỳnh quang (MERGE). Hình ảnh được ghi trên thiết bị hiển vi huỳnh quang Olympus scan[®]R, vật kính x20.

Phân tích hình ảnh chuyển vị NF-κB

Trước hết, vùng tín hiệu nhân tế bào được khử trừ sử dụng một trong các thuốc nhuộm huỳnh quang đặc hiệu DAPI. Nhân tế bào được xác định theo phân vùng hình ảnh phân tích (mask) như mô tả ở trên, sau đó kỹ thuật chồng hình ảnh thứ hai (mask overlay/merge) được tạo từ viền bao quanh toàn bộ tế bào hoặc vùng giới hạn nằm trong tế bào chất. Nhờ đó NF-κB gắn huỳnh quang có thể được định lượng qua phân vùng thứ hai này (nhân hoặc/và tế bào chất). Trong sàng lọc các chất có hoạt tính, sử dụng cường độ tín hiệu vùng nhân và tế bào chất cũng có thể phát hiện đồng thời các hợp chất có huỳnh quang trùng hoặc gắn với phổ của chất dò (kit nhuộm) tương ứng sử dụng khi phát triển phương pháp thực nghiệm. Khi đó những hợp chất này được đưa vào nhóm mẫu "dương tính giả" (false positive) và cần xác định mức tín hiệu "tự phát huỳnh quang" trong tế bào khi có và không có mặt của chất dò.

Mỗi tế bào trong trường phân tích được xác định số lượng và phân định bởi đường viền quanh nhân (đường màu đỏ). Để giảm tín hiệu nhiễu vùng tế bào chất, vòng đường viền thứ hai phía trong (màu xanh) được tạo khi phân tích định lượng. Lượng protein xác định ở vùng tế bào chất và trong nhân là kết quả trung bình tín hiệu huỳnh quang đo được theo diện tích của mỗi vùng phân định. Như vậy trước khi kích thích tế bào, vùng tế bào chất sẽ có tín hiệu huỳnh quang xanh mạnh (GFP) so với ở vùng nhân. Khi kích thích chuyển vị protein bởi cytokine hay LPS, tín hiệu huỳnh quang vùng tế bào chất giảm và tăng lên trong nhân do có sự di chuyển của protein từ vùng tế bào chất, đồng nghĩa với tỷ lệ Nuc/Cyto tăng. Cần lưu ý rằng, việc đo/quan sát từ hướng trên hoặc dưới phiên tế bào có thể có hiện tượng chồng lấn do các vùng nhân trùng nhau ở các tế bào khác phía trên hay dưới nó, do vậy phân tích yêu cầu kỹ thuật quét lớp và quan sát theo hướng cạnh tế bào.



Hình 3. A. Mô hình định lượng chuyển vị NF-κB từ tế bào chất (Cyto) vào nhân (Nuc). Khi chưa kích hoạt NF-κB, tế bào chất biểu hiện tín hiệu màu xanh trong khi nhân tế bào không bao gồm protein sẽ không bắt màu và do vậy tỷ lệ Nuc/Cyto hoặc Nuc-Cyto thấp. Ở các tế bào được kích hoạt, tín hiệu huỳnh quang ở tế bào chất giảm, ngược lại tín hiệu trong nhân tăng lên do nồng độ protein tăng (đồng nghĩa với tỷ lệ Nuc/Cyto cao). B. Phân tích hình ảnh thực trên phần mềm Olympus scan[^]R Analysis ver.2.7.2. Tế bào HeLa kích hoạt NF-κB bởi IL-1 10 ng/mL trong 1h.

Các tế bào không chỉ được nhuộm với kháng thể đặc hiệu p65 để xác định NF- κ B ở mỗi tế bào riêng biệt mà còn được nhuộm với kit đặc hiệu để xác định nhân của tất cả tế bào trong giếng hay vùng phân tích. Phần mềm Olympus scan^R Analysis cho phép định rõ vùng nhân và đường viền bằng phương pháp giới hạn theo động học (dynamic threshold) qua sự thay đổi tín hiệu huỳnh quang so với tín hiệu nền. Theo đó khi kích thích tế bào HeLa với IL-1 và có sự chuyển vị của protein tiêu đơn vị p65, vùng xanh đậm được xác định trong nhân với vùng giới hạn là đường màu xanh và vùng tế bào chất nằm giữa đường phân định của nhân và đường viền màu đỏ như ở Hình 3 A, B.

Hệ số Z' và khả năng thử nghiệm sàng lọc hiệu năng cao

Mức độ chuyển vị của yếu tố nhân NF- κ B từ tế bào chất vào nhân có thể biểu thị theo 2 phương pháp: (i) Theo hiệu số cường độ huỳnh quang của NF- κ B trong nhân và vùng tế bào chất (Nuc-Cyto). Phương pháp này trước đây thường được áp dụng, tuy nhiên kết quả biến thiên lớn do tín hiệu huỳnh quang trong mỗi tế bào đơn lẻ thường có sự thay đổi đáng kể; (ii) Theo tỷ lệ cường độ huỳnh quang trong nhân và vùng tế bào chất (Nuc/Cyto; Hình 3). Ở phương pháp này có sai số thấp nên giá trị Z' thường cao hơn ở các thử nghiệm mức độ tế bào.

Để xác định hệ số Z' , 2 nhóm đối chứng (control) và mẫu bổ sung chất kích hoạt chuyển vị (vd. IL-1) phân đều trên phiên 96 giếng với $n = 48$ giếng. Hệ số Z' không khác biệt đáng kể ở hai phương pháp, theo đó giá trị Z' xác định lần lượt là 0,70 đối với Nuc-Cyto và 0,73 cho Nuc/Cyto. Về lý thuyết, Z' -factor trong khoảng 0,5 đến ~1,0 được đánh giá nhóm thử nghiệm tốt, độ tin cậy cao (excellent assay). Mặt khác, biểu đồ phân tán cho thấy sự phân tách rõ rệt của 2 nhóm control và bổ sung IL-1 (Hình 4). Kết quả này cho thấy có thể phát triển kỹ thuật miễn dịch huỳnh quang kết hợp phân tích hình ảnh nội hàm cao (High content analysis) ứng dụng cho các thử nghiệm hiệu năng cao HTS. Điều này là phù hợp vì hệ thống Olympus scan^R được thiết kế cho sàng lọc HTS và độ chính xác cao nhờ kỹ thuật

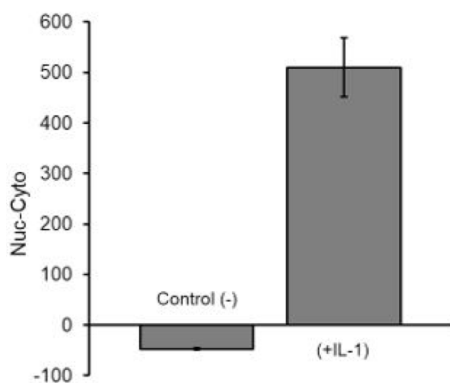
lấy nét tự động (autofocus) và xác định vị trí đối tượng phân tích độc lập. Điều này cho phép thực hiện các thử nghiệm quy mô lớn, tiết kiệm thời gian, kinh phí và đảm bảo độ chính xác của kết quả truy suất. Do hệ số Z' cao hơn nên chúng tôi sử dụng thông số tỷ lệ Nuc/Cyto trong các phân tích kết quả hình ảnh chuyển vị NF- κ B đánh giá hoạt tính kháng viêm *in vitro*. Cũng lưu ý là, quy trình phát hiện và phân tích sự chuyển vị NF- κ B bằng kỹ thuật miễn dịch huỳnh quang sử dụng hệ thiết bị sàng lọc/phân tích nội hàm cao có thể phát triển ứng dụng cho phân tích các phân tử đích protein khác với đặc tính tương tự (chuyển vị nội bào tế bào chất - nhân), ví dụ như đối với NRF2 (nuclear factor erythroid-related factor 2) - một yếu tố phiên mã liên quan đến stress oxy hóa, ung thư và quá trình viêm.

Đánh giá hoạt tính ức chế chuyển vị NF- κ B trên tế bào HeLa

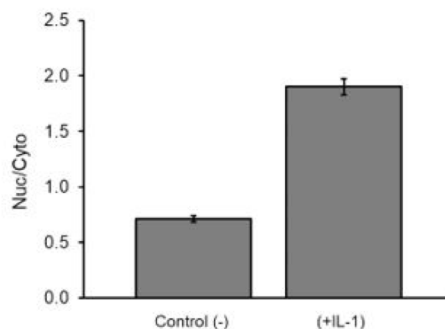
Để nghiên cứu cơ chế tác động của chất thử lên các đích phân tử, mẫu hoạt tính tiềm năng được sàng lọc trước hoạt tính ức chế tăng sinh tế bào ung thư bằng phương pháp MTT qua đó xác định giá trị IC_{25} , IC_{50} và IC_{75} (kết quả không trình bày ở đây) làm căn cứ cho các test thử tiếp theo. Ví dụ cụ thể được thực hiện với hợp chất zerumbone (SHTN-4) cho nghiên cứu đánh giá hoạt tính kháng phân bào trên dòng HeLa. Đây là một hợp chất sesquiterpene cấu trúc đơn vòng được phân lập lần đầu tiên từ tinh dầu cây gừng *Zingiber zerumbet* (L.) Smith và đã được chứng minh có hoạt tính ức chế sự tăng sinh trên nhiều tế bào ung thư (Rahman *et al.*, 2014). Trong báo cáo này trình bày kết quả đánh giá khả năng ức chế yếu tố kappa B (NF- κ B) trên dòng tế bào ung thư cổ tử cung HeLa của hợp chất SHTN-4 dựa trên sự chuyển vị protein p65 gắn với protein huỳnh quang xanh GFP từ bào tương (trạng thái không hoạt động) vào trong nhân (trạng thái hoạt động). Kết quả phân tích cho thấy 2 vùng “clouds” tương ứng với nồng độ p65 trong bào tương cao so với trong nhân tế bào (“negative”), trong khi ở mẫu đối chứng tín hiệu huỳnh quang vùng tế bào chất thấp do lượng lớn p65 di chuyển vào nhân (“positive”) sau khi kích hoạt với IL-1. Theo đó nồng độ NF- κ B trong bào tương cao (82%) sau khi xử lý tế bào HeLa với SHTN-4 (25

μg/mL) so với mẫu không xử lý (19,4%). Kết quả logic là nồng độ NF-κB trong nhân được xác định

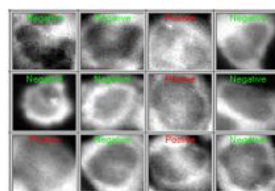
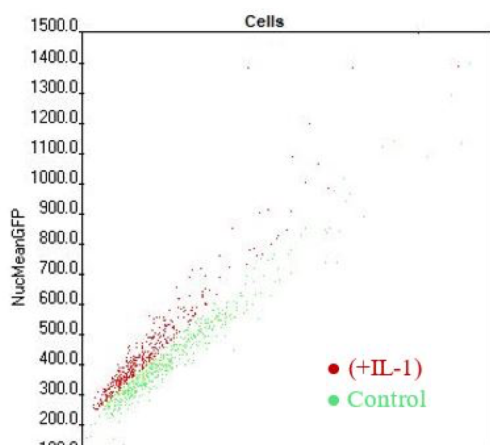
đối với mẫu xử lý SHTN-4 chỉ ở mức 8,2% so với 70% ở mẫu đối chứng (Hình 5).



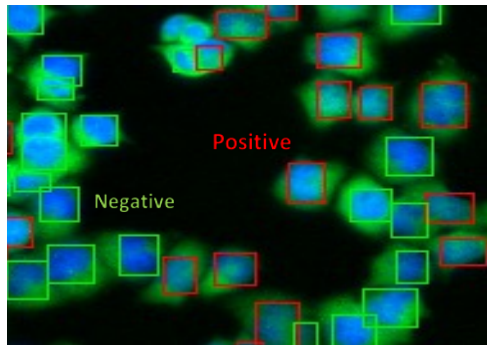
Nuc-Cyto	Control (-)	+IL-1
Mean	-47.102	510.065
%CV	5.1	11.3
Z'-factor	0.70	



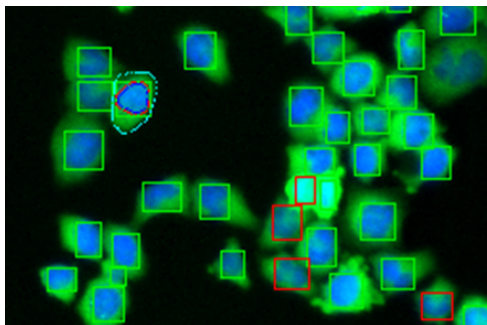
Nuc/Cyto	Control (-)	+IL-1
Mean	0.712	1.901
%CV	4.4	3.9
Z'-factor	0.73	



Hình 4. Xác định hệ số Z' đối với nhóm đối chứng (control) và tế bào HeLa kích hoạt với cytokine (hình-bảng trên). Biểu đồ phân tán cường độ tín hiệu vùng tế bào chất và trong nhân với đối chứng Control (-) và kích hoạt với IL-1 (hình dưới).



	Control	
	Counts	%
Cells in all	732.0	100.0
Cells in "Positive"	600.0	82.0
Cell in "Negative"	60.0	8.2



	SHTN-4	
	Counts	%
Cells in all	720.0	100.0
Cells in "Positive"	140.0	19.4
Cell in "Negative"	504.0	70.0

Hình 5. Hợp chất SHTN-4 điều hòa/ức chế yếu tố kappa B (NF-κB) của tế bào ung thư cổ tử cung HeLa qua đánh giá dựa trên sự chuyển vị NF-κB (p65 gắn GFP). Nhân được xác định đồng thời với nhuộm DAPI.

KẾT LUẬN

Kết quả nghiên cứu tối ưu các điều kiện (kích thích chuyển vị NF-κB nội bào, điều kiện nhuộm huỳnh quang phân tử đích, tối ưu đa thông số thu nhận, hệ số Z' và phân tích hình ảnh...) cho thấy sử dụng kỹ thuật miễn dịch huỳnh quang kết hợp phân tích hình ảnh trên thiết bị hiển vi huỳnh quang nội hàm cao thu được hình ảnh rõ nét, đảm bảo đủ chất lượng phân tích để có thể định lượng được yếu tố NF-κB nội bào. Cụ thể trong nghiên cứu đã thử nghiệm với mẫu chất zerumbone (SHTN-4, nồng độ 25 μg/mL) cho thấy SHTN-4 có hoạt tính ức chế NF-κB qua xác định được hàm lượng protein p65-GFP trong bào tương cao (82%) so với đối chứng (19,4%) khi xử lý tế bào HeLa với chất cảm ứng IL-1 ở nồng độ 10 ng/mL. Như trên đã trình bày, mặc dù có một số phương pháp xác định hoạt tính ức chế NF-κB, tuy nhiên thường chỉ đánh giá định tính và chi phí thử nghiệm cao bởi việc phát hiện chuyển vị của yếu tố nhân NF-κB thường gặp nhiều khó

khăn do các tương tác protein nội bào xảy ra nhanh và phức tạp. Kết quả nghiên cứu này góp phần đánh giá khả năng ứng dụng kỹ thuật mới phục vụ cho sàng lọc hoạt tính kháng viêm và ức chế ung thư *in vitro* trên đích phân tử protein ở điều kiện nghiên cứu trong nước.

Lời cảm ơn: Công trình nghiên cứu có sử dụng trang thiết bị từ Dự án đầu tư phòng TN trọng điểm cấp Viện Hàn lâm KHCNVN về thử nghiệm hoạt tính sinh học và Đề tài KHCN mã số VAST 04.05/18-19.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Bartfeld S, Hess S, Bauer B, Machuy N, Ogilvie L-A, Schuchhardt J, Meyer T-F (2010) High-throughput and single-cell imaging of NF-κB oscillations using monoclonal cell lines. *BMC Cell Biology* 11: 1471-2121.
- Ding G, Fischer P, Boltz R, Schmidt J, Colaianne J, Gough A (1998) Characterization and quantitation of

- NF- κ B nuclear translocation induced by interleukin-1 and tumor necrosis factor- α : development and use of a high capacity fluorescence cytometric system. *J Biol Chem* 273: 28897-28905.
- Du K, Wu J, Pan A, Li D, Cui L, Peng C (2019) Cyclic enzymatic amplification method for highly sensitive detection of nuclear factor-kappa B. *Analytica Chimica Acta* 1068: 80-86.
- Harlow E, Lane D (2006) Fixing attached cells in paraformaldehyde. *CSH Protoc* 3: 4294-4296.
- Hoesel B, Schmid JA (2013) The complexity of NF-kappaB signaling in inflammation and cancer. *Mol Cancer* 12:86.
- Đỗ Thị Thanh Huyền, Trần Thị Thùy Anh, Nguyễn Thị Hồng Vân, Nguyễn Văn Sáng, *et al.* (2017) Tách dòng, biểu hiện và tinh sạch nhân tố phiên mã NF- κ B p50 của người trong tế bào vật chủ *E. coli*. *Tap chí Khoa học Tự nhiên-Công nghệ (ĐHQGHN)* 33: 299-304.
- Liu T, Zhang L, Joo D, Sun S-C (2017) NF- κ B signaling in inflammation. *Signal Transduct Target Ther* 2, e17023; doi:10.11038/sigtrans.12017.17023.
- Maguire O, Collins C, O'Loughlin K, Miecznikowski J, Minderman H (2011) Quantifying nuclear p65 as a parameter for NF- κ B activation: Correlation between ImageStream Cytometry, Microscopy and Western blot. *Cytometry A*. 79: 461-469.
- Rahman HS, Rasedee A, Chartrand MS, Othmana M-H, Yeap S-K, Namvar F (2014) Zerumbone induces G2/M cell cycle arrest and apoptosis via mitochondrial pathway in Jurkat cell line. *Nat Prod Commun* 9: 1237-1242.
- Sen R, Baltimore D (1986) Inducibility of kappa immunoglobulin enhancer-binding protein Nf-kappa B by a posttranslational mechanism. *Cell* 47: 921-928.
- Zhang JH, Chung TD, Oldenburg KR (1999) A simple statistical parameter for pse in evaluation and validation of high throughput screening assays. *J Biomol Screen* 4: 67-73.

APPLICATION OF IMMUNOFLUORESCENCE IN COMBINATION WITH HIGH-CONTENT IMAGING TO SCREEN THE ANTI-TRANSLOCATION OF NUCLEAR FACTOR NF- κ B

Do Huu Nghi^{1,2}, Nguyen Xuan Vu³, Nguyen Xuan Thanh⁴, Luu Van Chinh^{1,2}, Le Mai Huong^{1,2}

¹*Institute of Natural Products Chemistry, Vietnam Academy of Science and Technology*

²*Graduate University of Science and Technology, Vietnam Academy of Science and Technology*

³*Thai Nguyen University of Agriculture and Forestry, Thai Nguyen University*

⁴*Thai Nguyen Department of Agriculture, Forestry and Fishery Quality Assurance*

SUMMARY

Nuclear factor-kappa B or NF- κ B is an essential transcription factor that regulates the expression of pro-inflammatory cytokine encoding genes in the pathophysiology progression of inflammation and cancer. This study lays out the result of the experimental application by using immunofluorescence technique combined with high-content imaging and analysis to detect the translocation of the nuclear NF- κ B p65 factor binding with the green fluorescent protein (GFP) activated by cytokine in the cervical cancer cell line, HeLa. Under optimized conditions, the image was acquired with a sufficient quality for further analyses as well as a high reliability as the Z-factor was defined by the protein ratio in the nucleus (Nu) and cytoplasm (Cyto) to be 0.70 for Nuc-Cyto and 0.73 for Nuc/Cyto, respectively. As the result, a zerumbone sample (SHTN-4, 25 μ g/mL) inhibited NF- κ B activation as a high amount of cytoplasmic protein p65-GFP (82%) was determined in comparison to that of negative control (19.4%) after treatment of HeLa cells with IL-1 inducers at 10 ng/mL for 1h. This result can serve to develop a standard operating procedure to qualitatively analyze the intracellular protein for the biomolecular-targeted screening of anti-inflammatory and anti-cancer active compounds in accordance with domestic conditions.

Keywords: *cytokine, immunofluorescence, high-content screening, HeLa cells, nuclear factor kappa B (NF- κ B)*