

结肠癌细胞侵袭实验报告

一、实验材料

1. 细胞株

人结肠癌细胞（武汉普诺赛，CL-0223）

2. 主要试剂

DMEM/F12 培养基（武汉普诺赛，PM150312）

RPMI-1640 培养基（武汉普诺赛，PM150110P）

FBS（武汉普诺赛，164210-500/100 ml）

青霉素-链霉素溶液（武汉普诺赛，PB180120）

0.25%胰酶（美国 Hyclone，SH30042.01/100 ml）

PBS（南京生兴生物，SN331）

4%多聚甲醛（博士德，AR1069）

1%结晶紫染色液（北京索莱宝，G1062）

Matrigel 基质胶（BD Biocoat，356234）

3. 主要实验仪器

超纯水仪（美国密理博公司，Milli-Q synthesis）

超净工作台（苏净集团安泰公司，SW-CJ-1F）

高压灭菌锅（西安仪创公司，BXM-30R）

水浴锅（姜堰市天力医疗器械厂有限公司，TL-420D）

CO₂ 培养箱（美国 ThermoFisher，3131）

离心机（美国 Eppendorf，5417R）

倒置相差显微镜（日本 Olympus，CKX31 型）

二、实验方法

1. Transwell 小室检测细胞侵袭

(1) 将提前 24 h、4°C 预冷的 Matrigel 基质胶与预冷的无血清培养基按照 1:3 比例于冰上混匀，每个小室内加入 100 μ l 稀释后的 Matrigel 基质胶，置于 37°C、5% CO₂ 培养箱中孵育 30 min~1 h，至 Matrigel 基质胶凝固。

(2) 将融合至 80% 的细胞去掉原培养基，使用 PBS 清洗 2~3 次，加入胰酶进行消化，显微镜观察到大量细胞脱离呈漂浮状态时，立即加入两倍胰酶量的含血清的培养基，终止胰酶作用。

(3) 将液体转移到灭菌的 15 ml 离心管中，1000 rpm 离心 5 min，加入无 FBS 的新鲜培养基重悬细胞并进行细胞计数。

(4) 调整细胞悬液中的细胞浓度 (5×10^5 /ml)，滴加 100 μ l 的细胞悬液至 Transwell 上室，下室滴加含 10% FBS 的培养液 500 μ l (下层培养液和小室间不要有气泡产生)，置于 37°C、5% CO₂ 培养箱中培养 24 h。

(5) 拆下 Transwell 小室，并将小室内培养液吸掉，使用 PBS 洗涤 3 次小室下层的膜，干棉签擦去小室内 Matrigel 基质胶，随后放入 4% 多聚甲醇溶液中固定 20 min。

(6) 用 PBS 洗涤 3 次小室，吸去水分后放入 1% 结晶紫染液中，染色 20 min。

(7) 去掉结晶紫溶液，用 PBS 小心缓慢清洗 3 次，置于常温下，倒置晾干。

(8) 显微镜下每组分别选取 5 个视野，20 倍物镜下拍照后计算各组 5 个固定视野中穿膜细胞的平均数，本实验重复 3 次。

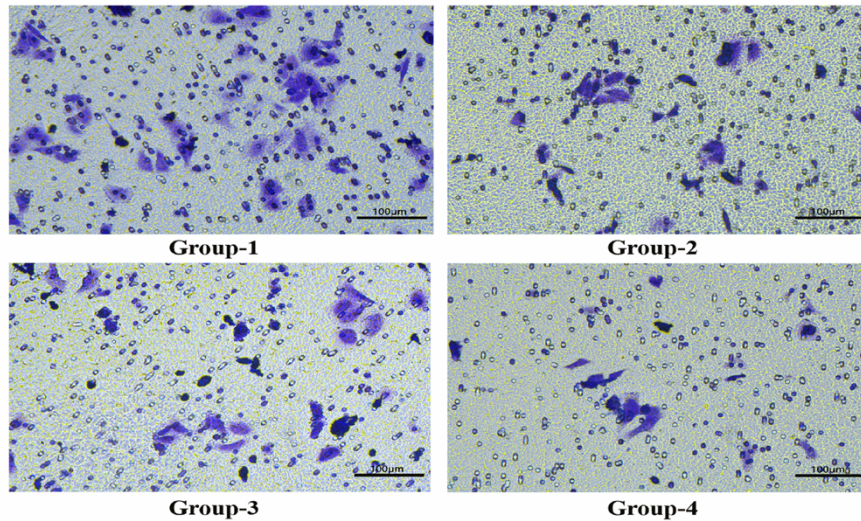
2. 数据处理及统计学方法

实验所得数据采用平均数 \pm 标准误 (Mean \pm SEM) 表示，所有的数据均使用 GraphPad Prism 6 处理及统计分析。两组样本均值之间的比较采用 *t* 检验，多组样本均值之间的比较采用 ANOVA 检验，*P*<0.05 表示差异具有统计学意义。

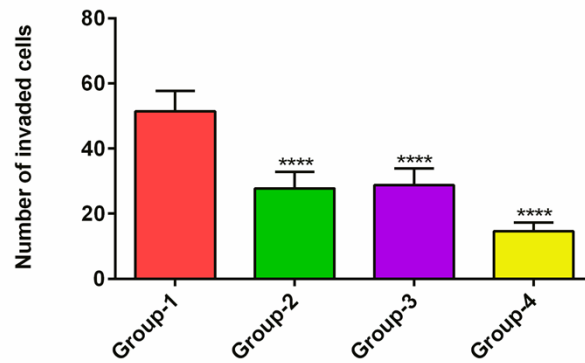
三、实验结果

Transwell 小室实验结果（图 1）显示，与 Group-1 相比，Group-2、Group-3 和 Group-4 的细胞侵袭能力在 24 h 内受到明显抑制，其中 Group-4 最为显著。

A



B



A: 倒置显微镜下侵袭细胞观察 ($\times 200$) ; B: 侵袭细胞的数量统计

图 1 各组结肠癌细胞侵袭情况比较

(**** $P < 0.0001$ vs. Group-1, $n=3$)