**细胞表型实验**

**前提：**设计实验组和对照组

**目的：**研究肿瘤细胞表型特征或在特定情况下（相关基因或蛋白改变）肿瘤细胞的表型变化。

**内容：**细胞凋亡、周期、迁移、侵袭、迁移、趋化、增殖、生长等。

**1.细胞凋亡**

* 概念：是指细胞在一定的生理或病理条件下，受内在遗传机制的控制自动结束生命的过程。
* 实验方法：检测试剂盒和细胞流式。
* 注意点：进行细胞凋亡实验时，要用不含EDTA的胰酶进行消化。

磷脂酰丝氨酸（PS）正常位于细胞膜内侧，但在细胞凋亡早期，PS可以从细胞膜的内侧翻转到细胞膜的表面，暴露在细胞外环境。Annexin V是一种钙离子依赖性磷脂结合蛋白，能与PS高亲和力特异性结合。将Annexin V进行荧光素FITC标记可以用流式细胞仪进行检测。胰酶中的EDTA能够螯合钙离子，从而削弱Annexin V结合效率，对凋亡实验造成不可控影响。因此实验时，需要另外购买不含EDTA的胰酶，不能直接使用实验室现有的胰酶。

**2.细胞迁移**

* 目的：测定肿瘤细胞的运动特性方法之一。
* 原理：体外培养单层细胞，人为制造空白区域——“划痕”，细胞逐渐进入空白区使划痕愈合。
* 实验方法：
1. 培养板接种细胞之前先用marker笔在培养板背面画横线标记（方便定位同一个视野）。
2. Day1, 种板，数量以贴壁后铺满板底为宜（也可在划痕前做其它处理如转染、感染）。
3. Day2，细胞铺满板底后，用10ul枪头比着直尺，垂直于孔板制造细胞划痕，尽量保证各个划痕宽度一致。
4. 用PBS冲洗孔板三次，去除划痕产生的细胞碎片，加入有血清/无血清培养基。

注意点：

* 根据不同细胞系的贴壁情况，选择是否立刻用PBS清洗。例如转染后的huh7细胞系划痕后易飘起。
* 关于有血清/无血清培养基的选择：当划痕实验周期比较短的时候（小于48h），或者不考虑增殖对实验造成的影响，可以用有血清培养基培养。当划痕实验周期比较长的时候，用无血清或者低血清或者用放线菌酮抑制细胞增殖。
1. 将培养板放入培养箱培养，每隔8-12小时（至少一天2次）取出拍照。

例如RBE细胞隔6小时拍照，拍照间隔和拍照时间要根据不同细胞系决定。

1. 根据收集的图片，分析实验结果，将实验结果量化。

Note：用AI量化结果，建议比较划痕间的距离而非面积。

**3.细胞生长和增殖**

**克隆形成**

* 克隆的概念：单个细胞在体外增殖6代以上（>1week），其细胞形成的细胞群体。
* 目的：克隆形成率反映细胞群体依赖性和增殖能力两个重要性状。（贴壁后的细胞不一定每个都能增殖和形成克隆，而形成克隆的细胞必为贴壁和有增殖活力的细胞。）
* 实验方法：
1. 取对数期生长的细胞，计数种板。
2. 当培养皿中出现肉眼可见的克隆时(3mm)，终止培养。弃去上清液，用PBS小心浸洗2次。加甲醇固定15分钟。然后去固定液，加适量结晶紫染色液染色约15分钟，然后用流水缓慢洗去染色液，空气干燥。

Note：细胞增殖慢且细胞数少时，注意补液，如huh1，培养一周后换液。

1. 拍照定性定量，注意评估染色后的细胞克隆与细胞碎片。

Note：

* 判定是否为克隆，形状规整，大小大于一个定值。
* 克隆形成因为细胞数目少，生长速度慢，缺乏群体效应，不能按照平时传代速度计算细胞形成克隆后的大小。
* 克隆大小有差异，可能是由于细胞本身的干性或者受到外界损伤差异。

**MTT**

* 目的：检测细胞存活和生长。
* 原理：活细胞中的酶能够还原外源的MTT，使其沉积在细胞中，通过加入DMSO溶解检测570nm波长（根据购买的MTT选定）的吸光值，间接反映活细胞数量。
* 实验方法：
1. 以96孔板为例，液封边缘孔，选择适合的细胞数种板，种5个复孔。
2. 每天同一个时间点，加入MTT（避光，1:10/well添加），4h后加入DMSO，在摇床上使有色物质充分溶解，然后测定570nm处的吸光值。

**4.悬浮小球sphere formation assay**

* 目的:反映肿瘤细胞的干性特征，能够判断单个细胞在合适的条件培养基中自我更新的能力。
* 实验方法：
1. 根据所选的细胞计数，确保形成单细胞悬液，种到低附板中（6孔板，完全培养基）。
2. 培养10-12天后，计数（前5天勿移动、勿更换培养基，可以补液）。

Note：ICC细胞系中RBE和HUCCT1不成球。

**5.细胞侵袭**

* 目的：分析细胞的运动能力。
* 原理：Matrigel人造基质膜。滤膜孔径一般为8um，而且膜孔都被Matrigel覆盖，细胞不能自由穿过，必须分泌水解酶，并通过变形运动才能穿过这种铺有Martrigel 的滤膜。肿瘤细胞穿过重建基质膜的能力与它的体内侵袭转移能力表现出较好的相关性。

在聚碳酸酯膜上涂上一层基质胶，模仿细胞外基质，上层种肿瘤细胞，下层加FBS或实验设定的药物或者影响因子，肿瘤细胞在侵袭能力较强的情况下，会分泌相关的酶类消化基质胶，从上室迁移到下室，通过计数进入下室的细胞量测定细胞的侵袭能力。

细胞穿膜所用的时间与Martrigel的用量有关。穿过滤膜的细胞多数粘附在滤膜下表面，可用棉签将上表面的细胞拭去，然后固定染色，在光镜下观察统计穿过Martrigel的细胞数。（侵袭小室不止transwell）

* Transwell原理：将小室放入培养板中，小室内称上室（free FBS），培养板内称下室(根据细胞转移力调整FBS浓度)，上下层培养液以膜相隔，并在膜上室铺基质胶，用来模拟体内细胞外基质，如果上室的细胞要转移到下室，需要分泌基质金属蛋白酶（MMPs）将基质胶降解，才能通过膜，最后通过计数下室的细胞量可反映细胞的侵袭能力，如下图：



* 视频：https://www.biomart.cn/experiment/430/488/490/705/206556.html
* 应用：
1. 不铺基质胶，Transwell可用于细胞迁移实验。
2. 可用于细胞共培养（研究细胞分泌或代谢物对另一细胞的影响）。
3. 趋化性实验（在下室中加有LN或FN或在滤膜下表面铺上LN或FN，可分析药物对肿瘤细胞的趋化性或趋固性的影响。）

**6.细胞共培养**

目的：模拟多细胞相互作用。

1. 直接接触共培养：要求生长特征一致的细胞一起培养。
2. 间接接触共培养：
* *爬片式：*将细胞先接种到处理的玻片上，贴壁后，放入到另一种细胞的培养皿与其共培养。爬片步骤：

https://wenku.baidu.com/view/916c27baaf1ffc4fff47ac20.html?rec\_flag=default&sxts=1580889298279

* *嵌入式：*（Transwell共培养）小室铺上PC或PET膜，孔径小于3.0um,一般为0.4um， 细胞不能通过此膜，但是细胞因子等能够自由通过。

Note：

* THP1作为悬浮细胞可以直接与贴壁HCC细胞共培养；
* 利用Polyester (PET) Membrane Tissue Culture Plate Insert with 0.4 μm pores (JET biofil)的6孔板，类似上下两室分别种需要的细胞，数目1:1（约12-15万细胞数目）共培养后，可以提取RNA或蛋白，检测相关基因；或共培养48-72h，用于表型实验。