

抗肿瘤药物 5-氟尿嘧啶对肿瘤细胞迁移的影响

（细胞划痕法）

实验导读

瘤组织的增殖失控、瘤细胞的分化异常、瘤细胞具有侵袭和转移的能力是恶性肿瘤最基本的生物学特征，而侵袭和转移又是恶性肿瘤威胁患者健康乃至生命的主要原因。因此研究肿瘤侵袭和转移的规律及其发生机制，对恶性肿瘤的防治有重要意义。

肿瘤转移是指恶性肿瘤细胞从原发部位侵入淋巴管、血管或体腔，至靶组织或靶器官，长出与原发瘤不连续而组织学类型相同的肿瘤。前者称为原发瘤，后者称为转移瘤或继发性瘤。

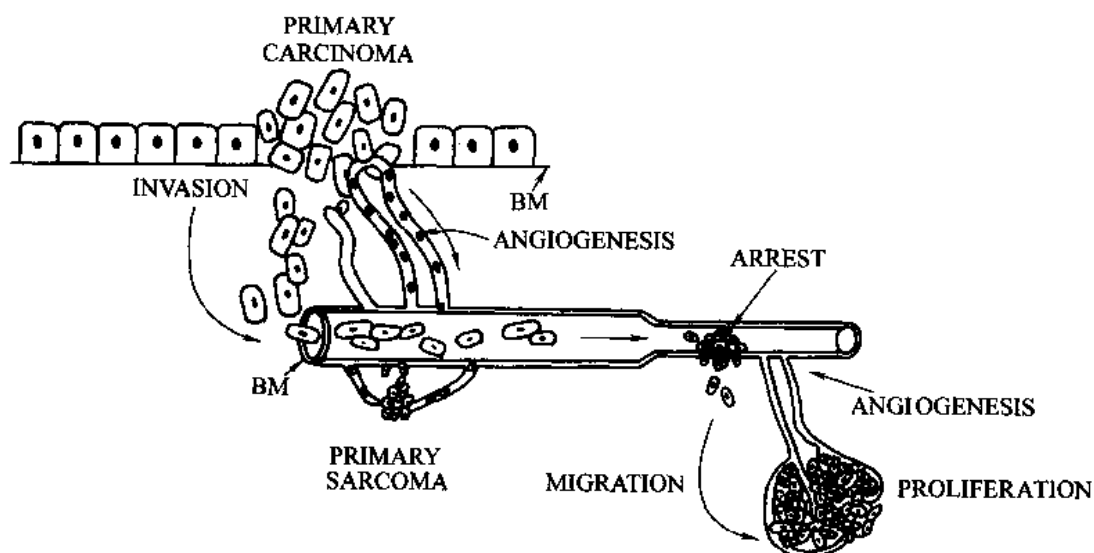


图 1 肿瘤转移示意图

根据肿瘤异质性理论，大多数恶性肿瘤最初虽属单克隆起源，但它在不断增殖演进至临床明显的肿瘤时，由于瘤细胞遗传性状的不稳定性(来自基因突变或缺失等)而不断地变异，造成该肿瘤内瘤细胞亚群表型的多样性，诸如瘤细胞的侵袭性、生长速率、转移能力，核型乃至对激素的反应性和抗肿瘤药物的敏感性等，这些瘤细胞亚群具有彼此不同的特性即所谓异质性。异质性与肿瘤转移直接有关的就是癌细胞的转移潜能，癌细胞的转移潜能有高低之分，具有高转移潜能的癌细胞易发生转移。

肿瘤细胞的运动性，来源于细胞运动“接触抑制”的概念。通过体外培养正常和恶性结缔组织细胞，发现正常纤维母细胞在移动过程中引起的皱缩脑膜与其他细胞的表面接触时，往往产生细胞膜活动的抑制和移动中细胞的缩短，然后停止。当纤维母细胞生长过程中在培

养皿上融合形成一单层时，细胞运动即显著受到抑制。间变的肉瘤细胞则缺乏接触抑制，瘤细胞的运动不会被正常纤维母细胞所抑制。

针对肿瘤转移这一复杂的过程，人们研制了各种抗转移药物，如血小板凝集抑制剂、血管生成抑制因子、内皮稳定因子、干扰素- α 以及其他化学药物。

细胞划痕法是测定了肿瘤细胞的运动特性的方法之一。其借鉴体外细胞致伤愈合实验模型，在体外培养的单层细胞上，划痕致伤，然后加入药物观察其抑制肿瘤细胞迁移的能力。下图即为划痕实验的示意图，图中可见，在细胞层上出现一道空痕（A），当加入药物后，由于药物的作用使细胞迁移受到抑制(B)，而未加入药物的细胞保持了原有的迁移能力，在一段时间后通过迁移将划痕掩盖(C)。

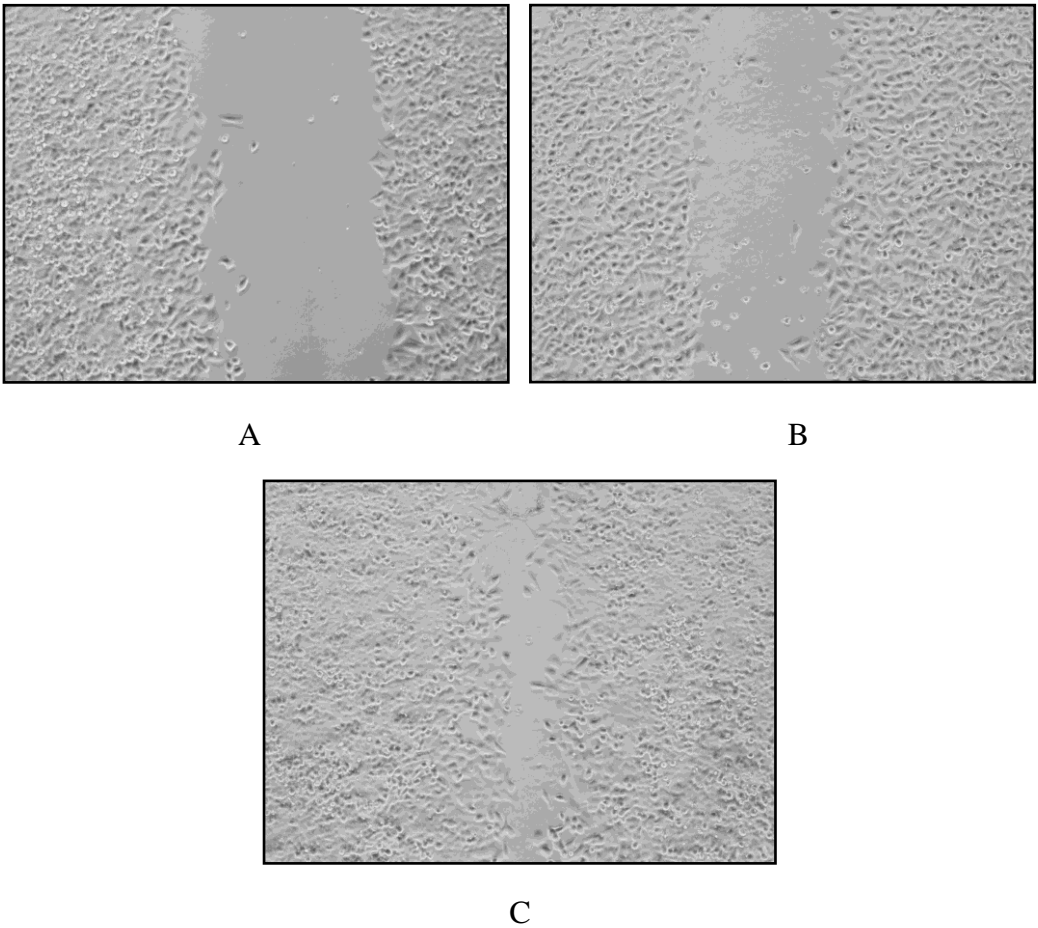


图 2 实验结果（A 表示在单层细胞上划出一道痕；B 表示加入抑制剂，为阳性对照组；C 表示未加入抑制剂，为阴性对照组）

一、实验目的

1. 了解肿瘤细胞转移的基本原理

2. 了解测定细胞运动特性的方法——细胞划痕法

二、实验原理

肿瘤细胞在体外仍具有迁移的能力，本实验借鉴体外细胞致伤愈合实验模型，利用细胞划痕法测定了肿瘤细胞的运动特性。

三、仪器和试剂

- 1) 细胞系及其培养：肝肿瘤细胞 HepG2
- 2) 24 孔板，移液器，倒置显微镜，
- 3) 主要试剂：PBS，DMEM 培养液，0.25%胰酶，胎牛血清，5-氟尿嘧啶溶液（1 μ g/ml）

四、实验步骤

1. 5-氟尿嘧啶溶液的配制

精密称取 10mg 用灭菌蒸馏水溶解，定容于 100ml 容量瓶，精密移取 1ml 溶液，稀释至 100ml，即得 1 μ g/ml 5-氟尿嘧啶溶液。

2. 制备单层细胞

将细胞密度为 $5\sim 10\times 10^5$ 个/mL 的 Hep G2 细胞铺于 24 孔板（每孔 500 μ L）上，加入含 10%胎牛血清的 RMPI.1640 培养液，培养 16~24 h,使形成单层细胞。

3. 划痕

以五氟尿嘧啶（5-Fu）为例，首先配制 1 μ g/ μ L 的母液，取 45 μ L 该母液用 PBS 稀释至 1.1 mL，得到浓度为 40 μ g/ML 的 5-Fu 溶液。

用 10 μ L 移液枪枪头（或者无菌牙签）在单层细胞上呈“一”字划痕，用 PBS 清洗 3 次，然后加入上面配好的 5-Fu 溶液，平行两个样本，孵育 24 h 后换成含 10%胎牛血清的 RMPI.1640 培养液，孵育 24 h。

4. 观察并拍照

吸去培养液，用 PBS 清洗 3 次后，在倒置荧光显微镜下观察并拍照。

五、注意事项：

1. 实验时应注意细胞生长状况，选择适当的细胞接种浓度。对不同的细胞要观察细胞的贴壁率等，确定实验时细胞的接种数量和培养时间，保证培养终止时密度适当。

2. 在用 PBS 缓冲液冲洗时，注意贴壁慢慢加入，以免冲散单层贴壁细胞，影响实验拍照结果。
3. 在药物的筛选过程中，其对细胞迁移能力的影响也是重要的一方面。实验设计过程中需要选择适当的阳性对照组和阴性对照组。