

Transwell 实验方法

概念

这里想明确两个概念，一个是 Transwell，另一个是肿瘤细胞侵袭模型。

1. Transwell

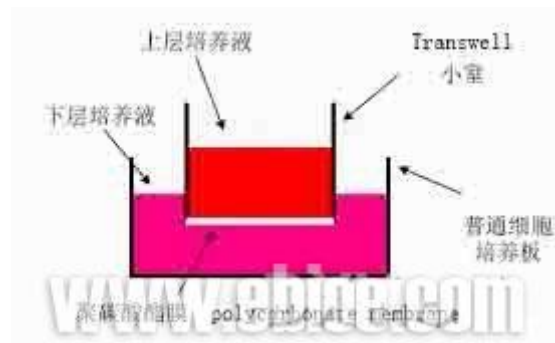
关于 Transwell 这个词该如何解释，查了很多资料也未见准确的注解，我觉得可以这么理解吧，trans-这个词根有转移、转运、穿过等意思，well 有小室的意思，可以从字面上理解，这是一类有通透性的杯状的装置，根据 Corning 公司的 Transwell 说明书中的介绍，可以认为这是一种膜滤器 (Membrane filters)，也可认为是一种有通透性的支架 (permeable supports)。

更准确地说，Transwell 应该是一种实验技术，这项技术的主要材料是 Transwell 小室 (Transwell chamber, Transwell insert)，其外形为一个可放置在孔板里的小杯子，不同厂家对 Transwell 会有不同的命名，而不同型号也可有不同形状，不同大小，根据实验需要，可有不同选择。



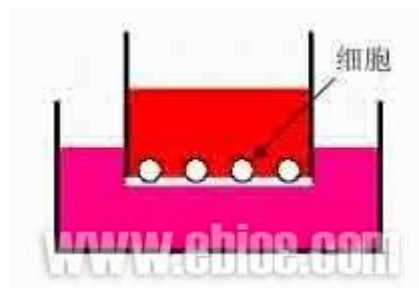
但无论是何种外形，其关键部分都是一致的，那就是杯子底层的一张有通透性的膜，而杯子其余部分的材料与普通的孔板是一样。这层膜带有微孔，孔径大小有 $0.1 - 12.0\mu\text{m}$ ，根据不同需要可用不同材料，一般常用的是聚碳酸酯膜 (polycarbonate membrane)。

下图是一个 Transwell 装置的纵切面



将 Transwell 小室放入培养板中, 小室内称上室, 培养板内称下室, 上室内盛装上层培养液, 下室内盛装下层培养液, 上下层培养液以聚碳酸酯膜相隔。

我们将细胞种在上室内, 由于聚碳酸酯膜有通透性, 下层培养液中的成分可以影响到上室内的细胞, 从而可以研究下层培养液中的成分对细胞生长、运动等的影响。

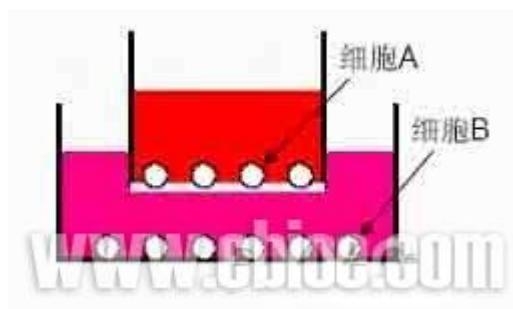


应用不同孔径和经过不同处理的聚碳酸酯膜, 就可以进行共培养、细胞趋化、细胞迁移、细胞侵袭等多种方面的研究。

下面参考 guxuefeng 战友和 cosmosci 战友的帖子具体来谈谈孔径的选择, 当然不同细胞其体积不同, 具体选择时要考虑到细胞大小。这里主要谈几种大家常用的实验:

(1) 共培养体系:

小于 $3.0\mu\text{m}$ 孔径条件下，细胞不会迁徙通过，因此，若研究不涉及细胞运动能力，不需要细胞穿过聚碳酸酯膜，则应选择 $3.0\mu\text{m}$ 以下孔径。常用 0.4 、 $3.0\mu\text{m}$ 。我们实验室用的是 $0.4\mu\text{m}$ 。



将细胞 A 种于上室，细胞 B 种于下室，可以研究细胞 B 分泌或代谢产生的物质对细胞 A 的影响。

(2) 趋化性实验

可用 5.0 、 8.0 、 $12.0\mu\text{m}$ 膜，上室细胞可穿过聚碳酸酯膜进入下室，计数进入下室的细胞量可反映下室成分对上室细胞的趋化能力。

①细胞 B 对细胞 A 的趋化作用：将细胞 A 种于上室，细胞 B 种于下室，可以研究细胞 B 分泌或代谢产生的物质对细胞 A 的趋化作用。

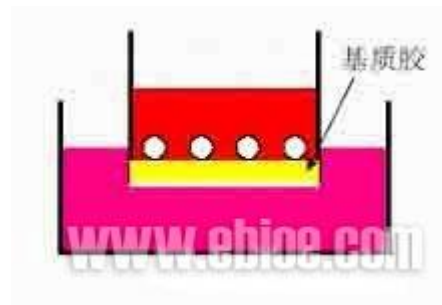
②趋化因子对细胞的趋化作用：将细胞种于上室，下室加入某种趋化因子，可研究该趋化因子对细胞的趋化作用。

(3) 肿瘤细胞迁移实验

常用 8.0 、 $12.0\mu\text{m}$ 膜，上室种肿瘤细胞，下室加入 FBS 或某些特定的趋化因子，肿瘤细胞会向营养成分高的下室跑，计数进入下室的细胞量可反映肿瘤细胞的迁移能力。

(4) 肿瘤细胞侵袭实验

常用 8.0、12.0 μm 膜，原理与肿瘤细胞迁移实验类似。



上室种肿瘤细胞，下室加入 FBS 或某些特定的趋化因子，肿瘤细胞会向营养成分高的下室跑，但与肿瘤细胞迁移实验不同的是，聚碳酸酯膜上室侧铺上一层基质胶，用以模仿体内细胞外基质，细胞欲进入下室，先要分泌基质金属蛋白酶（MMPs）将基质胶降解，方可通过聚碳酸酯膜。计数进入下室的细胞量可反映肿瘤细胞的侵袭能力。

2.肿瘤细胞侵袭模型

用于研究肿瘤细胞侵袭能力的肿瘤细胞侵袭模型有如下几种（引自司徒镇强《细胞培养》）：

2.1 体内癌细胞侵袭模型

2.1.1 皮下移植侵袭模型

2.1.2 肌肉内移植侵袭模型

2.1.3 腹腔内移植侵袭模型

2.1.4 小鼠肾包膜下移植侵袭模型

2.1.5 鼠睾丸包膜下移植侵袭模型

2.1.6 小鼠耳廓皮下移植侵袭模型

2.1.7 鼠爪垫皮下移植侵袭模型

2.1.8 视网膜内界膜侵袭模型

2.2 体外癌细胞侵袭模型

2.2.1 体外静止器官培养法

2.2.1.1 半固体培养基单细胞器官培养法

2.2.1.2 液体培养基单细胞器官培养法

2.2.2 半体外半体内器官培养法

2.2.3 单层细胞器官培养法

2.2.4 瘤细胞球体器官培养法

2.2.4.1 静止球体器官培养法

2.2.4.2 旋转摇动球体器官培养法

2.2.5 单层细胞侵袭实验模型

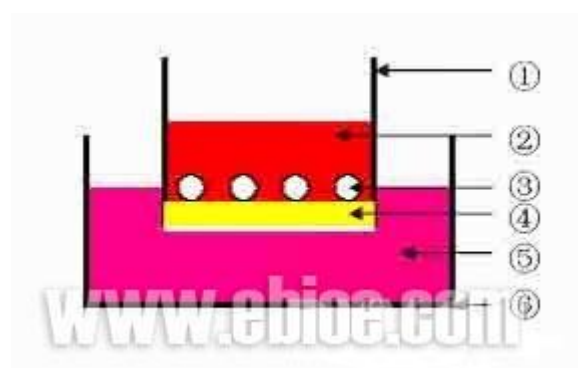
2.2.6 Transwell 侵袭小室测定法

可见，Transwell 与侵袭实验之间并不能划等号，Transwell 有多种应用，侵袭实验也有多种方法。所谓 Transwell 侵袭实验，其实是指将 Transwell 这一技术应用于肿瘤细胞侵袭研究的一种实验。由于其简单易行、重复性好，因而得到了越来越广泛的应用，但不能认为研究肿瘤侵袭只有 Transwell 一种方法。

第二节 Transwell 侵袭实验

我的课题涉及 Transwell 侵袭实验和 Transwell 迁移实验，其他方面的 Transwell 应用我不太清楚，因此这里主要谈谈 Transwell 侵袭实验。

1.实验用品：



① Transwell 小室：

多种厂家可提供，论坛里常用的是 Costar、Corning、BD 生产的小室，我们实验室用的是 Chemicon 公司的 ECM550 系列，另有 Boyden chamber、Millipore 公司的 millicell 和雕弓满月射天狼战友介绍的 Thincert。

这些厂家提供的小室，有的已铺好基质胶，买来就可以用，很方便，但也比较贵，我们实验室用的 Chemicon 公司的 ECM550 系列是已经铺好胶的，质量很好，但是非常贵，24 孔板配套的小室，每个价格约 130 元，不推荐给大家。BD 也有已包被好的，价格不清楚。Costar 和 Corning 公司生产的小室，是论坛里比较常用的，好像是要自己铺胶，但据说每个小室成本只有 40 左右，应该比较适合中国国情。

下面是一些战友提供的价格，具体建议大家联系代理商咨询。linanping1979 战友提供的价格：costar 的 24 孔板的 transwell 的价格是 456 元 RMB, 8 μ m，用于肿瘤的侵袭实验。iceyxy 战友提供的价格：Millipore 的 8 μ m 的 50 个 1760RMB, 0.4 μ m 的 2000 多, 是一次性的。梅林战友提供的 BD 价格：240RMB 一块 (6.5 μ m, 24 孔, 12 insert)，好像是没胶的。liguofan 说国产的 boyden 30 块一个。jjyy 提供的价格是：corning cat No.3422. 6.

5mm transwell with 8.0um pore polycarbonate membrane insert, Qty 48,950

人民币不到。平均每个 20 元不到。

Transwell 小室按照公司的要求,都是一次性使用的。不过其实洗洗泡泡还是可以重复用的。

我用的 Chemicon 公司的 ECM554, 用完后擦去基质胶, 再用胰酶和 75%酒精泡, 可以把膜洗得很干净, 用前用紫外里外都照 30min。sword01 战友提供的处理方法: 用棉签轻轻擦去胶和反面细胞, 清水冲洗, 超声清洗, 低挡, 30min, 清水 3×5min, 蒸馏水 3×5min, 室温凉干, 用前紫外线小室正面 3h, 反面 6h, 微波, 低火 10min×2。

因为我买的是铺好胶的, 所以没买 Matrigel, 二次利用的小室只用来做不需要铺胶的迁移实验。以前的 Chemicon ECM550 系列, 膜很结实, 擦不坏, 可以反复用很多次, 但现在的膜已经改用一种很薄很脆的材料, 一般只能重复用一次, 真黑啊! 很多战友说 Costar 和 Corning 也是可以重复用的, 大家可以试试。

本人没见过, 有兴趣的可以自己研究一下。

另外, 根据论坛战友提供的信息, osmonic 公司有专用的膜出售, 鼎国生物代理。Transwell 小室用过后, 可把原来的膜切下, 贴上 osmonic 公司的膜, 这样又可以用了, 不过我没用过, 有兴趣的可以试试。maojianwen 战友的使用方法: transwell 小室做一次后, 将原来的膜去掉, 重新泡酸, 泡酒精, 使用前照紫外, 然后用女士用指甲油 (注意用无色较稀的) 将 osmonic 公司的膜贴上, 剪掉多余的边缘。再照紫外。

② 上层培养液:

上层培养液采用无血清培养基, 为维持渗透压, 需加入 0.05%-0.2% BSA。

③ 细胞:

值得注意的是，有侵袭能力的细胞才可用于 Transwell 侵袭实验。建议实验前先用酶谱法检测 MMPs 的表达，特别是 MMP-2 的表达。如果不清楚细胞 MMPs 的表达情况，就盲目进行 Transwell 侵袭实验，可能会造成不必要的浪费，一次 Transwell 侵袭实验花钱少则数百，多则数千，并不是笔小数目，还是小心为妙。

另外，为了让实验结果更明显，可先撤血清让细胞饥饿 12 - 24h，再进行实验。

④ 基质胶：

常用的是人工重构基底膜材料 Matrigel，主要成分为层黏连蛋白和IV型胶原，生产厂家有 BD、美国 Collaborative Research 公司等。CaoY 战友的帖这么说的：Matrigel 是 BD 公司生产的，是一种细胞外基质，4 度时是液体，在 37 度会逐渐凝固成胶状，不可逆。同样的东西在 sigma 叫 ECM。zhangyong1036 战友提供的价格：BD 公司的 matrigel 1500 左右。

如果购买的小室是已经铺好基质胶的，那么 Matrigel 就不需要购买了。

⑤ 下层培养液：

下层常用含 5% - 10% FBS 的培养基，具体浓度根据细胞侵袭力而定，侵袭力弱的细胞可适当提高 FBS 浓度。下层也可用趋化因子，有战友将纤维粘连蛋白加入下层培养液作为趋化因子，但个人认为，FBS 仍是最合适的。

⑥ 细胞培养板：

常用于 Transwell 侵袭实验的细胞培养板有 6 孔板、12 孔板、24 孔板等，以 24 孔最常用。细胞培养板没什么特殊要求，普通的细胞培养板就可以。但要注意，细胞培养板应当与购买的 Transwell 小室相配套。

⑦ 此外，膜的下室面可涂上纤维粘连蛋白(fibronectin, FN, Sigma 有售)，这样做的目的是使穿过膜的细胞更好地附着在膜上，也可用胶原 (collagen) 或明胶 (gelatin) 。很多战友认为这不是必须的，而且我也是不涂的，细胞照样贴壁很好。如果贴壁不好的话可以试试看。 linanping1979 战友认为，如果培养时间很长 (>24h) ，细胞还是会掉到下室里面去，所以有条件的话，最好还是在膜下层涂上 FN。

另外，值得一提的是，膜下层涂上 FN 还有一定的趋化作用。

2. 步骤

2.1 Transwell 小室制备

2.1.1 无基质胶 Transwell 小室制备

① 包被基底膜：

用 50mg/L Matrigel 1:8 稀释液包被 Transwell 小室底部膜的上室面，4℃风干。如果需要在下室面铺 FN 的话，可将 200ul 枪头的尖端剪掉，吸取 FN 均匀涂抹在小室的下面。用胶原 (collagen) 的话，一般配成 0.5mg/ml，直接用枪吸了涂在膜上。

② 水化基底膜：

吸出培养板中残余液体，每孔加入 50ul 含 10g/L BSA 的无血清培养液，37℃，30min。

另有 tianjin_glioma 战友提供的方法：在上室的聚碳酸酯膜上加入稀释后的 Matrigel (3.9ug/ul) 60-80μl (注意体积不可太大，以刚把聚碳酸酯膜浸湿为最好)，置 37℃ 30min 使 Matrigel 聚合成凝胶。

2.1.2 有基质胶的 Transwell 小室制备

Chemicon 公司的 ECM550 系列说明书要求, 将小室放入培养板中, 在上室加入 300 μ l 预温的无血清培养基, 室温下静置 15 - 30min, 使基质胶再水化。再吸去剩余培养液。

2.2 制备细胞悬液

① 制备细胞悬液前可先让细胞撤血清饥饿 12 - 24h, 进一步去除血清的影响。但这一步并不是必须的。

② 消化细胞, 终止消化后离心弃去培养液, 用 PBS 洗 1 - 2 遍, 用含 BSA 的无血清培养基重悬。调整细胞密度至 $1 - 10 \times 10^5$, 个人认为不要超过 5×10^5 。

具体实验时采用密度要自己摸索, 因为不同细胞, 其侵袭能力是不同的。个人经验, 细胞量过多, 穿过膜的细胞会过多过快, 如果最后用计数法统计结果的话将难以计数; 而过少的话, 可能还没到检测的时间点, 所有的细胞都已穿过, 因此最少也要保证在收样的时候, 上室内还要有一定量的细胞存在。

个人认为, 对照组和处理尽量不要分开计数, 因为细胞数目的差异会严重影响实验结果。如果需要对细胞预处理而不得不分开计数, 那么计数一定要多重复几次, 力求准确, 尽量保证对照组和处理组细胞密度一致。

2.3 接种细胞

① 取细胞悬液 100 - 200 μ l 加入 Transwell 小室, 不同公司的、不同大小的 Transwell 小室对细胞悬液量有不同要求, 请参考说明书。24 孔板小室一般 200 μ l。

② 24 孔板下室一般加入 500 μ l 含 FBS 或趋化因子的培养基, 不同的培养板加的量有不同要求, 具体请参考说明书。这里要特别注意的是, 下层培养液和小室间常会有气泡产生, 一

一旦产生气泡，下层培养液的趋化作用就减弱甚至消失了，在种板的时候要特别留心，一旦出现气泡，要将小室提起，去除气泡，再将小室放进培养板。

③ 培养细胞：常规培养 12 - 48h（主要依癌细胞侵袭能力而定）。时间点的选择除了要考虑到细胞侵袭力外，处理因素对细胞数目的影响也不可忽视。

以我的课题为例，我使用的药物不仅会抑制肿瘤细胞侵袭力，还对细胞增殖有明显抑制。我选择的药物浓度是用 MTT 筛选出的 72h 的 IC₅₀。用这个浓度处理细胞，24h 内对细胞增殖并无明显抑制，但 24h 后，抑制作用就开始出现了。所以，用这个浓度来做 Transwell，处理时间也必须限定在 24h 内，否则一旦药物抑制了细胞增殖或者诱导出凋亡，使处理组细胞数目少于对照组，那么就难以肯定穿过膜的细胞比对照组少，究竟是由于侵袭被抑制引起，还是处理后细胞数目本身就比对照组少而引起的了。

时间过长不可以，同样，过短也不行，因为细胞内会有一定量的 MMPs 储存，短时间内可能侵袭能力不会有太大改变。同时从药物被吸收进去，进而发挥作用，影响 MMPs 表达，到最后释放到培养基中，还需要一个过程。时间点的选择可尽量长点，也可选择多个时间点研究时间依赖效应，但前提是这个时间范围内细胞数目不能有明显变化。

另外，我看到细胞在小室内的形态不是正常培养贴壁的形态，而是圆形的，仍是悬浮时的形态，不过会聚集成团，所以看到细胞不正常贴壁也不要紧张，是正常现象

在培养过程中，膜下会逐渐有少量小气泡产生，这是正常现象，可不予处理，但我遇到过培养一段时间后，膜下出现了大气泡，幸亏及时发现，否则后果将非常严重。因此，个人建议，最好接种细胞后 1 - 2h 把培养板从培养箱里拿出来看看，确信没有大气泡产生。

2.4 结果统计

检测穿过的细胞数有两种方法：

2.4.1 直接计数法

2.4.1.1 “贴壁”细胞计数

这里所谓的“贴壁”是指细胞穿过膜后，可以附着在膜的下室侧而不会掉到下室里面去。如下图：



通过给细胞染色，可在镜下计数细胞

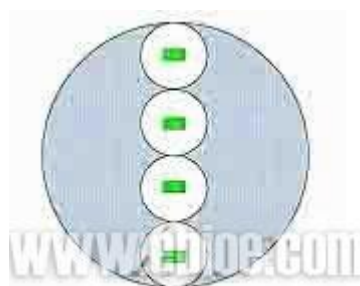
① 用棉签擦去基质胶和上室内的细胞

② 染色：常用的染色方法有结晶紫染色、台盼蓝染色、Giemsa 染色、苏木精染色、伊红染色等。

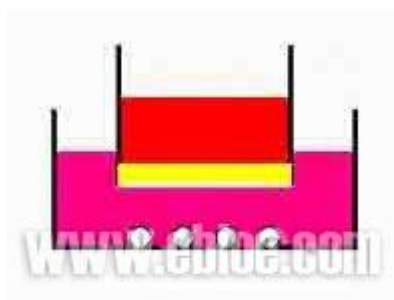
个人推荐采用 0.1%结晶紫染色，这种方法有如下优势：(1). 不需要固定细胞，直接染色即可。(2). 配制简单方便。(3). 染色后可以用 33%醋酸脱色，将结晶紫完全洗脱下来，洗脱液可在酶标仪上 570nm 测其 OD 值，间接反映细胞数。个人认为这是结晶紫染色最大的优势所在。因为，虽然经过准确的细胞计数，往往穿过膜的细胞数仍难以准确控制，可能某一批实验穿过的细胞会特别多，以致细胞成堆，这种情况下就难以计数了，这种情况下就可以用醋酸脱色后用酶标仪检测。使用结晶紫染色要注意，染色前要将膜风干，否则可能会染不上。

③ 细胞计数：我们使用的是 Leica DC 300F 正置显微镜进行观察和拍照，把 Transwell 小室反过来底朝上就可清楚看到小室底膜上下室侧附着的细胞。也有不少人用手术刀将膜切下后染色，再贴在玻片上，滴二甲苯，再盖上盖玻片，就可以长期保存，但是这样做小室就成了一次性的了，未免有点浪费。

取若干个视野计数细胞个数。论坛里一般采用 3 - 5 个视野，也有人用 10 个，都是随机选取，个人认为这样选择的视野带有很大的偶然性，也会掺进人为影响，特别是计数视野较少的时候。我选取 16 个视野，不是随机选择，而是有固定的位置。我们使用的显微镜所看到的视野的直径刚好是 Chemicon 公司的 ECM550 系列小室底面膜的直径的 1/4。



如图，蓝色部分表示膜的大小，白色圆形表示视野的大小，绿色方形则表示拍照时所能拍下的视野的中心部分。这样，每个小室都拍摄如下图的 16 个视野进行计数，这样得到结果是比较客观和准确的。



2.4.1.2 “非贴壁” 细胞计数

由于某些细胞自身的原因或某些膜的关系，有时细胞在穿过膜后不能附着在膜上，而是掉进下室。如下图：



2.4.2 间接计数法

间接计数法主要用于穿过细胞过多，而无法通过计数获得准确的细胞数所采用的方法，与常用的 MTT 实验是同样的原理。

2.4.2.1 MTT 法

- ① 用棉签擦去基质胶和上室内的细胞
- ② 24 孔板中加入 500 μ l 含 0.5mg/ml MTT 的完全培养基，将小室置于其中，使膜浸没在培养基中，37 $^{\circ}$ C 4h 后取出。
- ③ 24 孔板中加入 500 μ l DMSO，将小室置于其中，使膜浸没在 DMSO 中，振荡 10min，使甲臜充分溶解。取出小室，24 孔板于酶标仪上测 OD 值。

2.4.2.2 荧光试剂检测

这类方法一般是与 Transwell 小室一起出售的，其原理与 MTT 法类似，是用一种荧光染料染细胞，再将细胞裂解，检测荧光值。Chemicon 的 ECM554 即属于这类。

2.4.2.3 结晶紫检测

上文已说过，这里不再赘述，原理与 MTT 法也是类似的。但结晶紫染色还有个优点，就是染色和脱色的过程并不影响膜上细胞，在脱色后还可重新染色。

这是用正置显微镜拍摄的图，结晶紫染色，进行细胞计数。



第三节 Transwell 的其他应用的实验步骤

1. Transwell 肿瘤细胞迁移实验

过程与 Transwell 侵袭实验基本一致，不同的只是不需要铺 Matrigel。个人认为，由于没有基质胶的阻挡，细胞穿过膜的速度较侵袭实验明显加快，所以细胞量要更大。我做侵袭实验的细胞密度是 1×10^5 ，而迁移实验的密度是 1×10^6 。另外，下层培养液的 FBS 浓度也可适当下调，我做侵袭实验的浓度是 5%，迁移实验的浓度是 2.5%。

2. cathywxy 战友的 Transwell 上皮细胞培养步骤

做了一段时间的原代细胞培养，把经验拿出来跟大家分享一下吧，请有关战友共同探讨：

(1) 将雄性 wistar 大鼠麻醉，开胸，将气管取出，置于 4℃ 含 0.1% 胰蛋白酶 XIV (Sigma)，100 U/ml 青霉素和 100ug/ml 链霉素 (Gibco-BRL)、无 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} ，无血清的 MEM。

(2) 用无菌的细胞刮棒刮气管内壁，将所得溶液离心后得到游离细胞。

(3) 离心后立即用新鲜的上述 MEM 溶液 (含 10%胎牛血清) 清洗 3 次, 以中和胰蛋白酶, 再用含 5%胎牛血清、100U/ml 青霉素和 100 ug/ml 链霉素的 LHC-8 medium (Biofluids)冲洗一次。

(4) 冲洗过后, 将得到的细胞悬液用台盼兰测定活力, 若存活率大于 90%, 则将细胞以 $10^6/\text{cm}^2$ 密度接种于可通透的多聚碳滤膜上 (12 mm SNAPWELL, Costar), 以 37°C 5% CO_2 -95% 空气含 5% 胎牛血清(Gibco-BRL) and 100 U/ml 青霉素 and 100ug/ml 链霉素的 LHC-8 medium 孵育 6~10 天。

(5) 孵育后, 经测定跨上皮电阻在 $1000\sim 2000\Omega$ 之间, 即可用于电生理试验。

显微镜下气管上皮细胞形细胞呈铺路石状, 圆形核位于中央, 生长时常彼此紧密连接成单层细胞片

3. metastasis 战友的 Transwell B16 细胞的体外迁移实验

我以前用 costar 的 Transwell 做过 B16 细胞的体外迁移实验, 具体是这么做的: 首先把 Transwell 倒置, 在 Transwell 的 PVDF 膜 (0.8 μm) 的下表面涂一层 fibronectin(10 ug/ml, 50ul), 37°C 2 小时, PBS 洗一遍后, 放入预先每孔加有 600ul 的培养基 (含 10%血清) 的 24 孔板内, 后在 Transwell 的内室加入细胞 (100ul, 用含 0.1%血清的培养基稀释好自己所需密度), 放入培养箱, 12-18 小时后, 取出 Transwell, 用棉签擦去 PVDF 膜靠近内室那一面的细胞, 另一面的细胞用甲醛室温固定 30 分钟, 结晶紫染色 20 分钟, 用清水洗 3 遍以上, 后在显微镜下观察细胞, 记数。

4. mci 战友的内皮细胞 HMEC-1 迁移实验

1%明胶处理的 transwell 经无血清的 MCDB131 培液于培养箱中平衡 1 小时后, 上室加入 100 μ l 用 serum-free MCDB131 稀释的 5×10^4 /孔的 HMEC 及不同浓度的药物, 下室加入 0.6ml serum-free 的 MCDB131 培液及 20%FCS 刺激迁移,同时设置相应阴性及阳性对照, 置于 CO₂ 培养箱中作用 8 小时, 然后弃去孔中培液, 用 90%酒精常温固定 30 分钟, 0.1% 结晶紫常温染色 10 分钟, 清水漂净, 用棉签轻轻擦掉上层未迁移细胞, 显微镜(Olympus, DP50, Japan).下观察并拍照, 最后用 10%乙酸 100 μ l/孔抽提 10 分钟, 于 600nm 处测定 OD 值。抑制率计算公式为: 抑制率 (%) = [(OD 值给药组-OD 值无刺激阴性对照)/ (OD 值不加药阳性对照- OD 值无刺激阴性对照)] \times 100%.