

# Transwell 细胞侵袭(一)

## 一、实验目的

本实验旨在利用 Transwell 侵袭实验初步检测中、高耐药 T24-RC48 细胞株的侵袭能力，探究耐药性与细胞侵袭行为的关系，为正式 Transwell 侵袭实验摸索条件，争取为解析膀胱癌 ADC 耐药机制提供依据。

## 二、实验内容

2.1 实验设计 样本类型：中度耐药 / 高度耐药 T24-RC48 细胞株

细胞密度：每孔 10000 个细胞

重复次数：每组 3 个复孔。

基质胶：Transwell 小室预先包被 Matrigel 基质胶 (1:8 稀释)

2.2 实验原理 Transwell 侵袭实验在迁移实验基础上增加了基质胶屏障。实验中 Transwell 小室上室预先铺 Matrigel 模拟细胞外基质环境，细胞需分泌蛋白酶降解基质胶后，才能穿过微孔膜向下室迁移。通过比较穿过多孔膜的细胞数量，可评估细胞的侵袭能力。

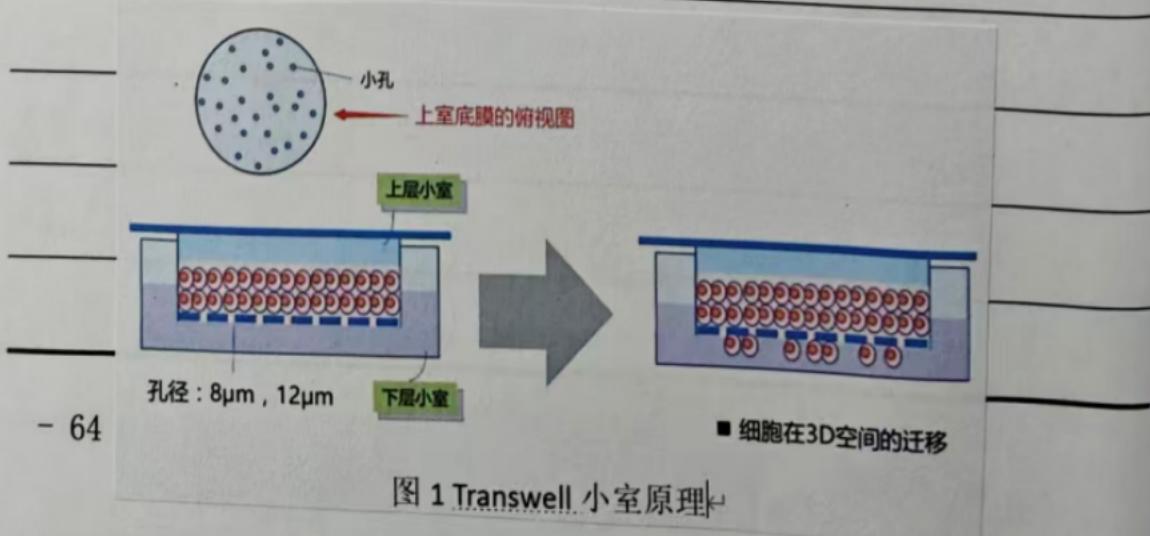


图 1 Transwell 小室原理

### 三. 材料与试剂

3.1 材料 T25 细胞培养瓶 Transwell 小室 (8 μm 孔径)

枪头、15ml 离心管均购自 Axygen 公司

吸管购自国产公司

移液器: Eppendorf

中、高耐药细胞株 T24-RC48

### 3.2 试剂

PBS、胰酶、胎牛血清(笔没, ) 血清均购自美国 Gibco 公司

基质胶 Matrigel 购自康宁, 货号 354234

McCoy's 5A 培养基购自上海源培生物科技股份有限公司.

4% 多聚甲醛, 结晶紫

### 四. 实验仪器 同 Transwell 细胞迁移(-)

### 五. 实验步骤

5.1 将中、高耐药 T24-RC48 细胞株分别接种于 T25 细胞培养瓶。

5.2 24 小时后, 将每瓶细胞的完全培养基换成 1% PBS 和 McCoy's 5A 培养基饥饿处理 24 小时。

5.3 在 4°C 条件下(冰上操作)将 Matrigel 胶用无血清和 McCoy's 5A 细胞培养基 1:8 进行稀释。

5.4 取 60 μl 均匀添加到 Transwell 小室上室面, 37°C 培养箱中静置 3 h.

5.5 培育后将上室中多余液体吸掉，加入低血清培养基100μl/小室，置于培养箱30min，进行基底膜水化。

5.6 加入10%血清 McCoy's 5A 培养基600μl/孔，然后用镊子将 Transwell 小室置于24孔板内。

5.7 用胰酶消化处理后的细胞，制备成单细胞悬液，调整细胞浓度为 $1 \times 10^5$ 个/ml。

5.8 取100μl细胞悬液加入 Transwell 小室的上室，每组设置了4个孔，培养48h。

5.9 加入800μl PBS 至室的培养孔，轻轻放入已经吸除培养基的小室，轻轻清洗(全部的清洗操作注意不要刮蹭或冲落膜下部已经迁移的细胞)。

5.10 轻轻擦去小室内层的细胞(用棉签，可以稍微扯松一点，确保边缘也被擦干净，擦后用PBS冲洗内壁)。

5.11 将小室转移至加有800μl孔4%多聚甲醛的室的培养孔中，室温固定15min；PBS清洗两遍，每次2min(所有清洗操作泡着就行，勿晃勿涮洗)。

5.12 将小室转移至加有结晶紫染液(600μl/孔)的室的培养孔中，染色10min；染色后用清水洗去浮色，洗两遍，每次2min。

5.13 将染色够的小室置于洁净载玻片，注意不要完全干燥，稍微湿润会让细胞形态更好；十字划分进行拍照。

5.14 使用图像分析软件Image J 测量并计算迁移细胞数量。

## 六、实验结果

本次实验中各组细胞侵袭能力均表现较低。结晶紫染色显示，Transwell 小室下室表面仅零星分布少量细胞（图 1）。

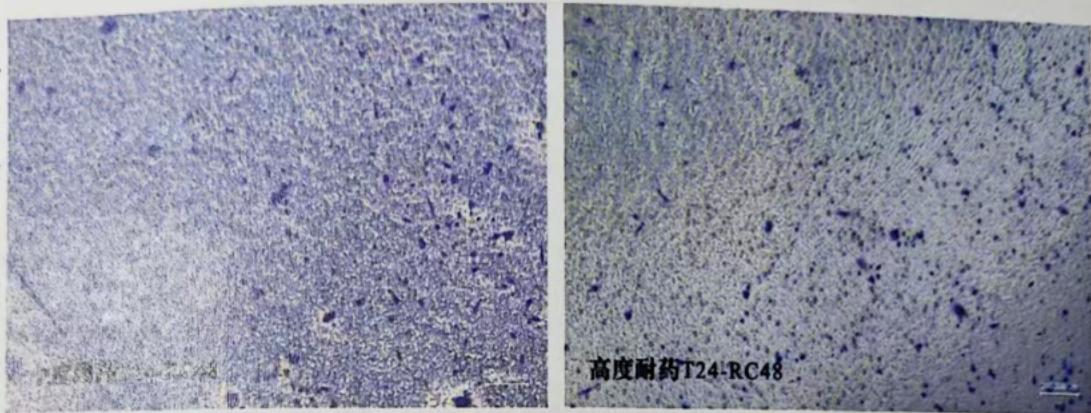


图 2 倒置相差显微镜下观察结晶紫染色后的 Transwell 小室

## 七、结果分析

实验结果显示，各组细胞侵袭数量显著低于预期，可能原因有：

- 1) 每孔 10000 个细胞在 48h 侵袭实验中难以形成有效迁移群体（基质胶屏障）；
- 2) 侵袭实验可能需更长时间完成基质胶降解及迁移过程；
- 3) 预铺布 Matrigel 稀释比例或厚度可能阻碍细胞侵袭；
- 4) 下室血清浓度不够高，与上室未形成有效的浓度梯度。

下次实验将使用全新的 Transwell 小室，将每孔细胞数调整为 50000 个以增加穿透细胞数。适当提高下室血清浓度以形成有效的浓度梯度，也可适当延长孵育时间，以确保细胞充分降解基质胶。同时优化基质胶条件，测试不同 Matrigel 稀释比例对侵袭效率的影响。通过上述调整，预期可显著提升侵袭细胞数量，为后续分析耐药性与侵袭能力的关联提供可靠依据。