

隧道纳米管的诱导与观察综合性实验设计与实践^{*}刘子琦^{1,2)} 薛秀花^{1,2)†} 罗欣瑶^{1,2)} 韩雨晴^{1,2)} 王 婷²⁾

(1)1 北京师范大学生命科学与技术国家级实验教学示范中心, 北京; 2)北京师范大学生命科学学院, 北京)

摘要 将细胞生物学前沿理论和研究技术及时转化到实验教学中,是提高本科实验教学水平和人才培养质量的重要途径之一。本实验以隧道纳米管(tunneling nanotubes, TNT)知识点为基础设计了“隧道纳米管的诱导与观察”综合性、探究性实验教学内容,包括血清饥饿模型的建立及隧道纳米管诱导、细胞微丝骨架及细胞核染色观察隧道纳米管结构、流式细胞术检测细胞周期 3 部分。首先针对不同类型的细胞摸索合适血清浓度建立血清饥饿模型,接着采用细胞爬片的方式进行细胞荧光染色,使用荧光显微镜观察桥状 TNT 结构;最后利用流式细胞术检测处于饥饿状态的细胞周期 G1 细胞比例的变化情况。教学实践表明,该实验有助于培养学生动手和科研思维,激发学生探索兴趣。

关键词 隧道纳米管;细胞生物学实验;血清饥饿

中图分类号 Q939

DOI: 10.12202/j.0476-0301.2024175

细胞生物学是研究和揭示细胞基本生命活动、规律的一门学科,连接宏观生物特征和微观生命活动。细胞生物学实验是细胞生物学的重要组成部分,也是实现理论联系实践的重要教学环节。细胞生物学实验课程有助于同学们更好地理解应用理论知识,同时增强学生实践操作能力,从实验中启发学生进行思考,进而发现问题、解决问题,培养学生的创新思维。

TNT (tunneling nanotubes, 隧道纳米管)是细胞之间基于肌动蛋白丝(F-actin)的管状通道形成的连续细胞质桥,作为长程细胞间通讯结构进行着许多物质的双向和单向转移^[1-2]。TNT 最早由 Rustom 等发现于大鼠嗜铬细胞瘤 PC12 细胞间,直径为 50-200 nm,长度可达多个细胞直径^[1]。自其发现以来,针对 TNT 的多项研究将其描述为长、薄、不黏附的细胞膜结构^[1-4]。在不同的细胞系中,TNT 的组分、运输物质不同,长度差异大^[5-8]。TNT 是细胞间进行物质交换的桥梁,兼有细胞间通讯的功能,对细胞抵御胁迫状态有重大意义。TNT 的形成过程在最初发现时就被清晰描述:细胞先形成丝状突起并持续延伸,而后某些丝状突起接触到另一细胞形成 TNT,其他丝状突起随之退化。但 TNT 的形成机制目前仍不清楚,对此学界提出了不同的模型:1)细胞受到某种化学梯度或趋化性的刺激,基于含 F-actin 的丝状突起的生长进一步形

成 TNT^[9];2)针对免疫细胞^[10]或 NRK、HEK 细胞产生的 TNT^[11],2 个细胞接触并形成类似免疫突触的结构,而后细胞向相反方向迁移引出纳米管。目前,溶酶体和细胞内膜泡系统(胞内体、内质网、高尔基体)携带不同类型的分子、细胞器(线粒体)、病原体(病毒、细菌、朊病毒蛋白等)等都被证实在 TNT 内运输^[12]。总体而言,TNT 起到细胞间通讯与物质运输的作用,可以帮助细胞抵御不利环境、参与多项生理或病理活动。

血清饥饿是细胞生物学研究中常设置的胁迫条件之一,指在较少血清或者无血清的培养基中进行细胞培养。血清饥饿浓度和培养时间在不同细胞品系中不同,浓度从 0.05% 到 5% 不等,时间从 15 min 到几周^[1]。不同细胞对血清饥饿胁迫的响应不尽相同,不同下游通路的一系列反应可以诱导细胞凋亡^[2],还能使细胞进入 G0/G1 期,实现细胞周期同步化^[4],还可抑制或增强某些特异性活动,如抑制血管平滑肌细胞的迁移^[3]。

现有的细胞生物学实验教学内容中与隧道纳米管相关的实验较少。传统的细胞生物学实验按实验项目分次上课,如细胞复苏、细胞传代、细胞冻存、细胞转染、细胞结构染色等。忽略了这些独立实验在整个科研课题中起到的作用。教学团队以“细胞 TNT

^{*} 北京师范大学《细胞生物学实验》线上线下混合式课程教学改革示范项目资助北京师范大学生命科学学院(本科)教学建设与改革项目《细胞生物学实验指南》教材建设资助项目

[†] 通信作者:薛秀花(1982—),女,高级实验师。研究方向:细胞生物学实验教学及实验室管理,植物细胞骨架结构与功能。E-mail:xiuhuaxue@bnu.edu.cn

收稿日期:2024-08-21

结构诱导与观察”为主题,设计连续 2~3 周的综合探究型实验项目,鼓励学生探究 TNT 在不同细胞内发生的最适血清浓度等课题,培养其科研思维。

1 实验设计

TNT 是细胞适应外界环境变化产生的动态结构,其中进行许多物质的双向和单向转移。血清饥饿等逆境条件可以诱导细胞产生 TNT。形成血清饥饿条件操作简单,改变 DMEM 完全培养基中血清含量即可。F-actin 存在于大多数 TNT 中,沿整个管道均匀分布,是 TNT 成像中的重要标记靶点。可以使用 Alexa Fluor™ 568 染色 F-actin,以观察 TNT。从易于产生及观察 TNT 以及获取难度两方面出发,选择 HEK-293 细胞/COS-7 细胞/HeLa 细胞/CHO 细胞 4 种细胞株为材料,在设置不同血清梯度的 DMEM 培养基中培养,一段时间后用激光共聚焦显微镜观察细胞 TNT 产生情况。实验所选细胞系及所需试剂均为细胞生物学

教学实验室中常规耗材,实验结果可以通过多种形式观察,便于各高校按照具体情况对实验设计进行调整。

“隧道纳米管的诱导与观察”是一个综合性、探索性实验项目。学生在了解和掌握细胞间通讯、细胞微丝骨架结构、细胞迁移等知识点的同时,还可以掌握以下实验技术:(1) 细胞培养用实验器皿清洗方法及实验废弃物分类;(2) 培养基和试剂的配置及储存;(3) 基础无菌操作技术;(4) 细胞的复苏、计数、冻存、传代;(5) 细胞骨架染色技术;(6) 流式细胞仪的原理与操作;(7) 荧光显微镜或激光共聚焦显微镜操作;(8) 综合创新实验报告及学术论文写作技巧。学生在进行实验操作与结果分析的过程,既能锻炼规划管理和团队合作能力,又能提高学生综合应用多种基本实验技术解决实际问题的能力以及综合素质。

实验连续 2~3 周,预计每次 3 学时内可完成。需注意细胞爬片到染色需连续完成,染色与激光共聚焦显微镜观察耗时较长(表 1)。

表 1 教学安排参考时间

教学周	学时数	时间	进度安排
第一周	3	Day 1	细胞复苏与细胞计数
	3	Day 3	细胞传代
第二周	3	Day 5	细胞传代及血清饥饿处理
	3	Day6	流式细胞仪原理和使用介绍、样品制备
	3	Day7	流式细胞仪检测细胞周期时相(上机操作)
第三周	3	Day 8	细胞爬片(血清饥饿处理)
	3	Day 9	微丝骨架与细胞核染色
	3	Day 9	激光共聚焦显微镜原理及使用
	3	Day10	结果分析讨论与论文撰写

1.1 实验目的

- 1) 掌握细胞培养基本技能
- 2) 了解血清饥饿诱导 TNT 产生的原理
- 3) 了解细胞骨架标记物的种类和原理
- 4) 掌握细胞骨架染色方法
- 5) 掌握激光共聚焦显微镜的原理及使用方法
- 6) 了解流式细胞仪测定细胞周期的原理
- 7) 掌握流式细胞仪样品的制备方法

1.2 实验材料、仪器与试剂

1.2.1 实验材料 HeLa 细胞、CHO 细胞、NIH3T3 细胞、BGC823 细胞、COS-7 细胞、HEK-293 细胞,均为北京师范大学实验教学中心实验室保存。

1.2.2 实验仪器 高压蒸汽灭菌锅、超净工作台、倒置相差显微镜(Olympus CKX53)、荧光显微镜(ZEISS ImagerM1)、激光共聚焦显微镜(蔡司 LSM710)、二氧

化碳培养箱(Thermo HERAcell 150i)、离心机及离心管、流式细胞仪(NovoCyte3130)、流式管(Falcon 5 mL 带滤网)、血细胞计数板、细胞培养瓶、各种规格的移液器及枪头、六孔板、盖玻片、100 mm 细胞培养皿、巴氏滴管。

1.2.3 实验试剂 鬼笔环肽 Alexa Fluor™ 568 (A12380, Invitrogen, Thermo fisher scientific), Ho.33342, 多聚甲醛, DMEM 基本培养基(高糖:葡萄糖浓度 4 500 mg · L⁻¹, Hyclone), 胎牛血清 FBS(四季青), 100×双抗(Gibco), 胰蛋白酶溶液(Hyclone)。完全培养基: 45 mL DMEM + 5 mL FBS + 700 μL 100×双抗; 无血清培养基: 100% DMEM + 700 μL 100×双抗; PI 溶液(65 μg · mL⁻¹)、RNase(50 μg · mL⁻¹)、Triton X-100、10×PBS、4% 组织细胞固定液 PFA 等常规试剂购于索莱宝。

1.3 实验方法与步骤

1.3.1 细胞的复苏与传代 完整实验流程如图 1 所示。

细胞复苏: 从液氮罐中取出冻存管, 37 °C 水浴快

融; 300 g 离心 10 min; 转移至超净工作台内, 弃上清液, 加入 1 mL 完全培养基重悬细胞, 转移细胞悬液到细胞培养瓶中, 补加 3~4 mL 完全培养基, 于 37 °C 培养箱中培养。

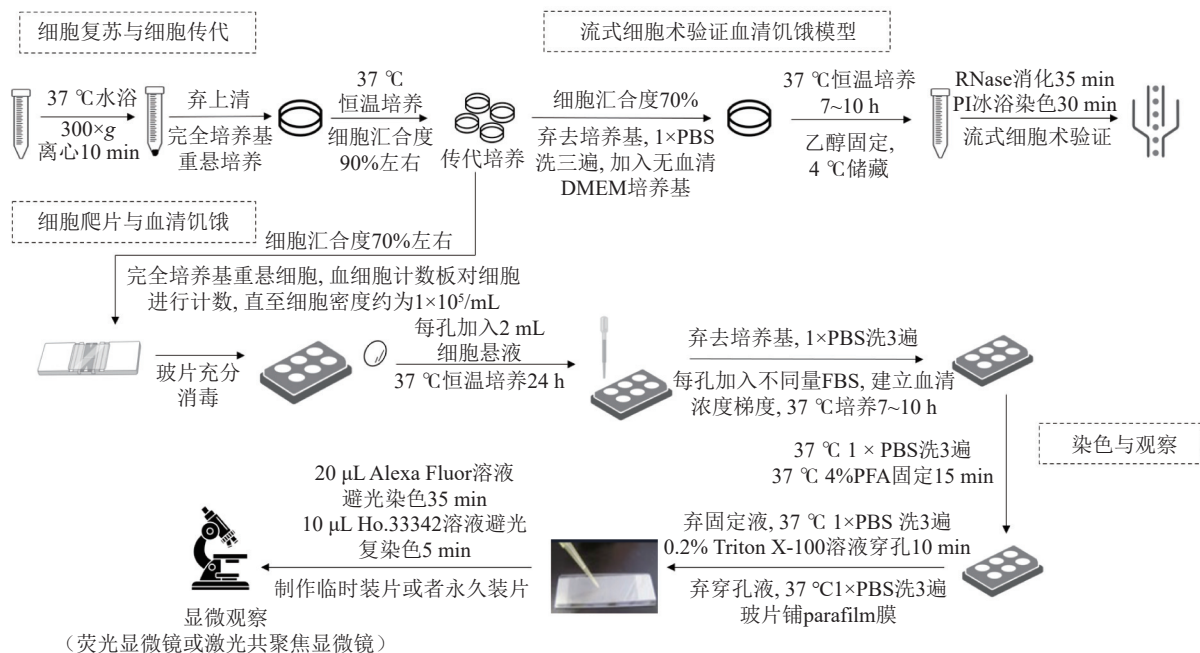


图 1 实验流程

细胞传代: 待细胞在培养瓶底部汇合度达到 90% 左右时传代。弃去培养基, 加入 2 mL 胰酶消化, 显微镜下观察到细胞周缘变圆后停止消化, 弃去胰酶, 用 2 mL DMEM 完全培养基重悬细胞, 悬液分入 2 个细胞瓶中, 补加培养基至 5 mL, 37 °C 恒温培养。

1.3.2 流式细胞术验证血清饥饿模型的建立 用倒置显微镜观察传代后细胞, 选取生长情况好, 汇合度在 70% 左右的细胞。弃去培养基并用 PBS 清洗 3 遍。依梯度在不同的培养瓶中加入 5 mL 含不同浓度 (0%、3%、5%、10%) 的血清培养基, 混匀后于 37 °C 恒温培养箱培养 7 h。

7~10 h 后固定细胞并准备流式。消化细胞后用完全培养基重悬, 转移至 10 mL 离心管, 300 g 离心 15 min; 弃上清, 0.5 mL PBS 重悬细胞; 用注射器将液体用力打入装有 4.5 mL 4 °C 预冷乙醇的离心管中; 封口后于 4 °C 下保存。检测时, 300 g 离心 15 min, 弃上清, 用 0.5 mL PBS 重悬细胞; 加入 3 μL RNase 消化 35 min, 再加 8 μL PI 避光冰浴染色 30 min, 最后将液体注入流式管, 上样分析测定数据。

如若发现低浓度血清培养得到的细胞 G1 期比例无明显上升, 则说明饥饿不到位, 应延长时间; 若发现低浓度下细胞大量死亡, 说明该细胞对低血清浓度不耐受, 可考虑将血清浓度整体提高, 或缩短饥饿时间。

细胞贴壁数目的统计。当细胞密度高时, 细胞接种效率=贴壁的细胞数目/接种的细胞数目*100。细胞传代时计算接种细胞密度和数量, 培养 7 h 后, 即贴壁细胞达到最大数目而有丝分裂还未开始, 因此我们通过统计贴壁细胞的数目, 来比较不同血清浓度对细胞贴壁的影响。通过相差显微镜拍摄同一血清浓度下的细胞形态图, 利用 Image J 软件统计不同视野下贴壁的细胞数目, 每组实验统计 10 个不同视野, 取平均值。Image J 软件统计的具体步骤为: 1) 将图片导入 Image J。2) 通过 Image—Type 选项, 将图片转化为 8-bit。3) 通过 Edit—Invert 选项, 将图片进行色彩反转, 使背景呈深色、待计数细胞呈浅色 (若背景为深色图片可以省略)。4) 通过 Image—Adjust—Brightness/Contrast 选项, 对图片亮度、对比度进行调节, 使待计数目标与背景区分清楚。5) 通过 Image—Adjust—Threshold 选项, 调节阈值, 直至待计数细胞被红色覆盖且边界清晰。6) 通过 Analyze Particles 选项, 在 Size 栏填入待计数细胞最小粒径, 点击确认后可获得计数结果。

1.3.3 细胞爬片与血清饥饿实验 细胞爬片: 观察传代后细胞, 选取生长情况好, 汇合度在 70% 以上的细胞进行爬片。弃去培养基, 加入 2 mL 胰酶消化, 加入 3 mL 完全培养基停止消化。重悬细胞后取悬液计数, 稀释悬液至细胞密度约为 1×10^5 个 $\cdot \text{mL}^{-1}$ 。爬片所用

玻片提前用培养皿于 75% 乙醇浸泡 12 h; 在超净工作台中取出玻片, 在酒精灯上充分灼烧后放入六孔板; 每孔加入 2 mL 细胞悬液, 37 °C 恒温培养 24 h.

血清饥饿实验: 小心吸去六孔板中剩余培养基, 用 PBS 清洗 3 遍. 依梯度在每孔加入含不同浓度血清的培养基(已添加双抗), 于 37 °C 下恒温培养. 7~10 h 后终止血清饥饿.

1.3.4 微丝骨架染色 饥饿结束后, 用 1 mL 37 °C 预热的 PBS 洗 3 遍, 加入 1 mL 37 °C 预热的 4% PFA, 37 °C 固定 15 min; 吸干 PFA, 用 1 mL PBS 洗 3 遍, 加入 1 mL 0.2% Triton X-100 溶液, 穿孔 10 min; 吸干溶液, 用 1 mL PBS 洗 3 遍; 取干净载玻片, 上面铺设 parafilm 膜, 膜上滴 20 μL Alexa Fluor™ 568 染色液 ($120 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$), 将玻片细胞面朝下置于液滴上, 避光染色 35 min; 如需观察细胞核, 可滴加 10 μL Ho.33342 复染 5 min. 如无法及时进行观察, 可在玻片边缘涂抹指甲油封片, 于 4 °C 冰箱中避光保存.

1.3.5 激光共聚焦显微镜实验参数设置 使用蔡司激光共聚焦显微镜 LSM710 观察并拍照, 拍摄设置如下. 物镜: 63 $\times$ NA1.35 油浸物镜; 通道选择: dsRED, DAPI; 使用 x 轴及 y 轴进行扫描, 扫描像素: 1 024 $\times$ 1 024.

2 实验结果分析及可拓展方向分析

2.1 血清饥饿模型建立 在倒置相差显微镜下, 可以从形态学角度观察血清饥饿模型的建立情况. 图 2-a 展示了 BGC823、NIH3T3、CHO 3 个细胞系在 DMEM 培养基中胎牛血清浓度分别为 0%、3%、5%、10% 浓度下的形态, 所有细胞传代后培养 12 h 后拍摄. 从图 2-a 可以看出, 对于贴壁型细胞来说, 细胞贴壁后一般会表现出更加细长、铺展、分散的形态, 而处于饥饿状态时, 其贴壁率会降低, 细胞边界更清晰, 有些细胞则完全不贴壁, 整体看细胞的贴壁率降低. 图 2-b 为 20 倍物镜下观察到视野中贴壁细胞数目, 每种类型细胞统计 10 个视野的平均值, 实验重复 3 次. Bar=100 μm . 从图 2-b 可以看出, 在血清浓度 0%~10%, 不同类型的细胞在单位面积上贴壁细胞数目随着血清浓度增加而增加. 通过显微镜下观察及统计数据可以看出, 无血清培养时不同细胞系贴壁能力有差异, BGC823 细胞贴壁能力强于 CHO 和 NIH3T3 细胞; 在血清浓度变化时, 这 3 种细胞系的贴壁能力相差不大.

低密度接种时生长出来超过一定体积(一般大约 50 个细胞)的集落的数量.

诸多实验表明, 血清饥饿胁迫会使细胞周期同步在 G₀/G₁ 期, 因此可以通过流式细胞术测定细胞周期, 通过处于 G₀/G₁ 期细胞的占比是否升高判断血清

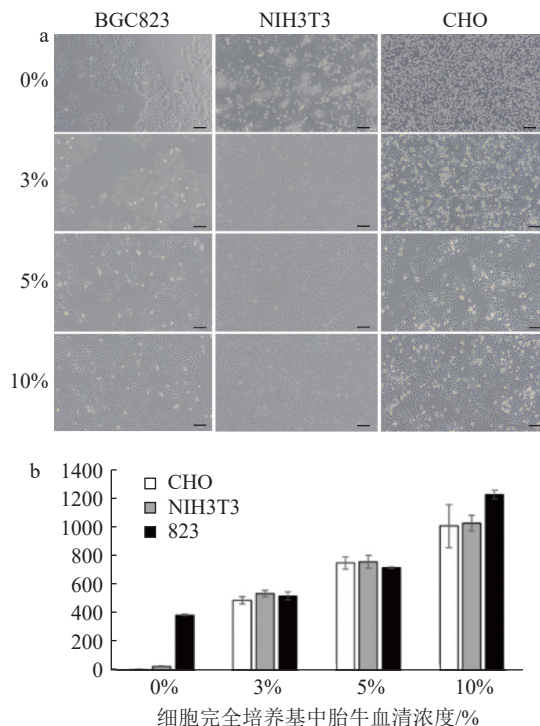


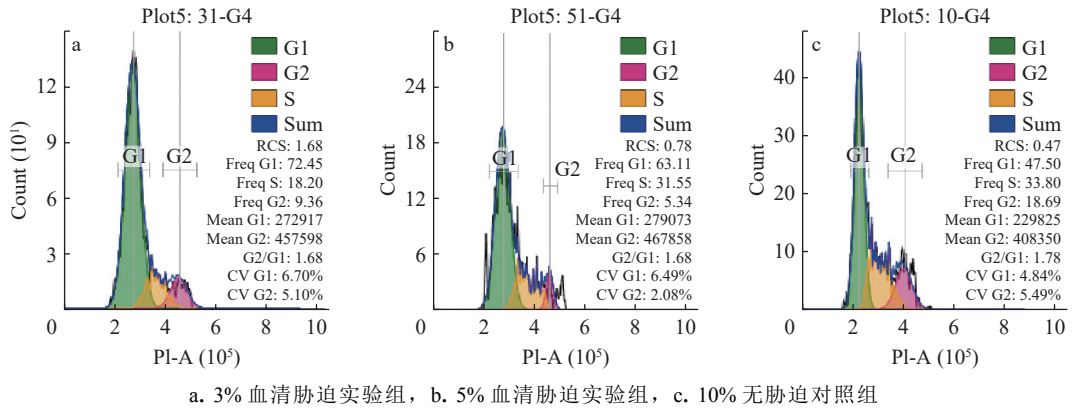
图 2 不同胎牛血清浓度下不同细胞系的形态

饥饿模型是否建立. 对设置血清梯度培养的 CHO 细胞进行流式细胞术检测后, 对比无血清饥饿胁迫的对照组, 可以发现在 3% 和 5% 血清浓度梯度下, 大部分细胞的细胞周期被同步在 G₀/G₁ 期. 这能够证明在本次实验条件下, 5% 血清浓度下培养 10 h 能够成功建立血清饥饿模型(图 3).

对细胞进行梯度血清饥饿后, 可以观察到在血清浓度较低时($\leq 1\%$), CHO 细胞、NIH3T3 细胞、HEK-293 细胞和 COS-7 细胞均大量不贴壁, 破裂死亡. 从形态上判断, 血清浓度大于 3% 时, 细胞能够在胁迫下维持一定活力, 有更大的 TNT 形成可能. 因此在教师进行预实验时, 推荐结合血清饥饿处理的时间长度, 在 3% 至 7% 的浓度区间摸索适合的血清饥饿条件.

2.2 TNT 观察结果分析

2.2.1 激光共聚焦显微镜观察结果 在激光共聚焦显微镜 LSM710 下, 可以观察到细胞在血清饥饿胁迫下产生的 TNT. TNT 的出现与细胞种类、胁迫强度均有关. 在相同胁迫强度下, CHO、COS-7 细胞中更易发生 TNT; 在 COS-7 细胞实验组中, TNT 出现在血清浓度大于或等于 3% 的所有样品中; 在 HEK-293 细胞实验组中, TNT 出现在血清浓度大于或等于 5% 的所有样品中; 在 CHO 细胞实验组中, TNT 出现在所有梯度实验组中; 在 HeLa 细胞实验组中, TNT 出现在大于或等于 3% 的样品中. 所有细胞的完全血清培养对照组中都观察到了 TNT, 可能提示了细胞即使在正常血清浓度下培养, 也会由于时间过长、营养消耗受到



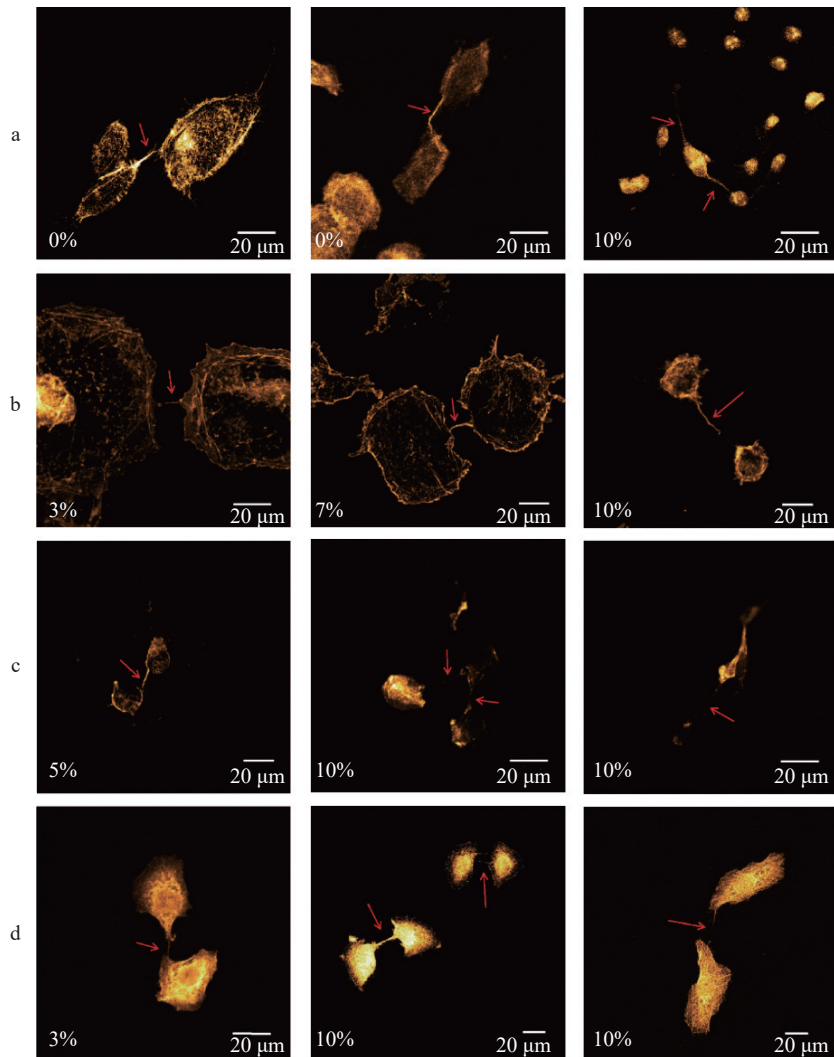
a. 3% 血清胁迫实验组, b. 5% 血清胁迫实验组, c. 10% 无胁迫对照组

图 3 流式细胞术拟合细胞周期

胁迫.

由于细胞固有差异以及对逆境胁迫的耐受差异等, 不同细胞在相同环境下产生的 TNT 在长度上存在差别. CHO/HeLa/COS-7/HEK-293 四种细胞在本次实验中产生的典型 TNT 如图 4 所示.

由于 Alexa Fluoro 568 染色肌动蛋白, 可以认为观察到的被染色区域大小能表征细胞真实大小. 4 种细胞都能在距离较近的两个细胞间产生的较短的 TNT, CHO 和 HeLa 细胞产生的 TNT 长度相似, 基本接近细胞直径; 而 COS-7 和 HEK-293 细胞产生的 TNT 长度



红色箭头指处为 TNT, 左下为对应培养血清浓度, 图片颜色经 Image J 处理, 为增强细节用 Orange Hot 调色, 故图中染色后微丝呈现为橙色. a. CHO 细胞实验组; b. COS-7 细胞实验组; c. HEK-293 细胞实验组; d. HeLa 细胞实验组.

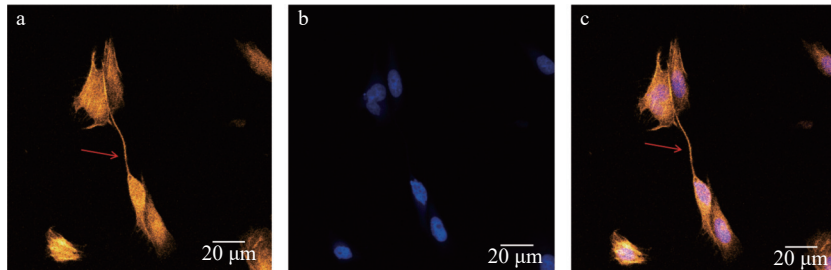
图 4 不同血清浓度下细胞间形成的 TNT (LSM710, 63×油镜)

变化较大,既有大于或接近细胞直径的,也有远小于细胞直径的极短 TNT。

为排除图 4 中的细丝状结构出现在单个细胞内

部,对 CHO 细胞实验组进行核染色,得到结果如图 5。

可以确定观察到的细丝发生在至少两个细胞之间。



红色箭头指处为 TNT, a. 细胞微丝染色; b. 为细胞核染色; c. 为通道叠加效果. 图片颜色经 Image J 处理, 为增强细节, 选择 Orange Hot 调色, 故图中染色后微丝呈现为橙色.

图 5 CHO 细胞双通道染色结果(LSM710, 63×油镜)

由于在 10% 浓度的对照组中同样观察到 TNT, 为进一步明确血清饥饿与 TNT 发生的关系, 统计 5%、7%、10% 的 CHO 细胞在激光共聚焦显微镜下三个有适量细胞视野中 TNT 的数量, 取均值后作趋势图(图 6), 可见当血清浓度下降时, 视野中可观察到 TNT 的概率上升。

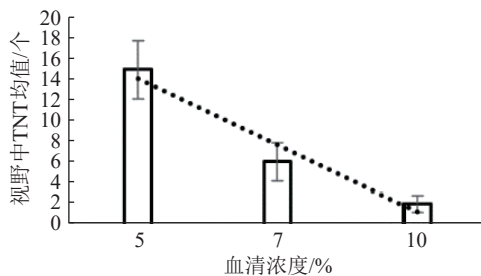


图 6 CHO 细胞中 TNT 数量随血清胁迫程度变化

由图 4 可见, TNT 在不同细胞、不同浓度中长度变化较大, 为明确 TNT 具体的长度变化范围, 统计所有拍摄记录的 TNT 的长度, 并分析如图 7. 可以看到 TNT 的长度虽然变化较大, 但在不同细胞中都有相应的趋势. 在 CHO 细胞中, TNT 的长度基本在 20~40 μm , 在 COS-7 细胞中 TNT 长度整体偏短(5~40 μm), 但也

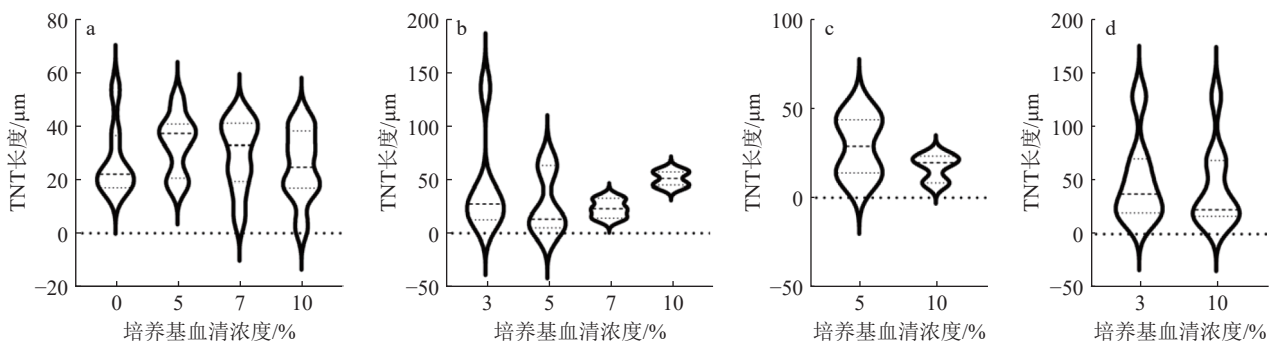
有长 TNT 出现, 在 HEK-293 细胞和 HeLa 细胞中, TNT 长度主要在 10~40 μm 之间, 但由于数据量较小, 偶然误差依旧存在。

总体上, 虽然 TNT 的长度与两细胞之间的距离一定程度上相关, 但是在本次实验使用的 4 种细胞中, 形成的 TNT 长度基本在 5~40 μm 。

此外, 尽管本实验在无血清培养的 CHO 细胞中观察到了 TNT 结构, 但由于其他细胞如 COS-7、HEK-293 在无血清培养时均大量死亡, 所以 0% 的胁迫虽更强、可能生成更多的 TNT, 教学中并不建议设置这一梯度进行饥饿。

2.2.2 多种细胞 TNT 发生情况分析 综合所有观察结果与所有细胞实验开始时细胞汇合度较好、活力较好的前提, 分析得到如下结论:

① 不同细胞在血清饥饿胁迫下产生 TNT 的长度差异较大. COS-7 细胞产生的 TNT 在长度上变化较大, 当细胞距离较近时可产生较短的 TNT, 距离远时也能够产生长 TNT. 本次实验中观察到的 CHO 细胞、HEK-293 细胞产生的 TNT 整体长度变化较小, 其长度基本与细胞直径相当, 几乎没有与 COS-7 细胞中相似的短 TNT; 但观察样本量较少, 存在一定的随机



a. CHO 细胞 b. COS-7 细胞 c. HEK-293 细胞 d. HeLa 细胞

图 7 4 种细胞中 TNT 长度的变化

误差。

② 三种细胞在血清饥饿胁迫下产生 TNT 的频率存在较大差异。在相同血清浓度下, COS-7 细胞产生的 TNT 更多, 其次为 CHO 细胞, 而 HEK-293 细胞组需要长时间、更多样本才能找到 TNT。推测这可能是由于 COS-7 细胞对于血清饥饿胁迫响应更积极。

③ COS-7 细胞组与 HEK-293 细胞组在血清浓度为 0% 或 1% 时细胞均大量死亡, 说明当血清饥饿胁迫达到一定强度后, 两类细胞都难以通过产生 TNT 响应环境变化继续生存。

肾细胞(如人胚肾细胞 HEK、猴肾细胞 COS)^[9, 11]等都是前人研究中广泛使用的用以 TNT 观察的细胞, 我们的结果也表明 CHO、HeLa 这两类细胞在本科教学条件下也较易观察到 TNT 结构。而为了更稳定地得到清晰的观察结果, 在教学过程中, 相对最优的选择为 COS-7 细胞, 其次为 CHO 细胞。

3 讨论

3.1 实验中的注意事项 血清饥饿胁迫: 文献实验数据表明, 用无血清高糖 DMEM 基本培养基(葡萄糖浓度: 4 500 mg/L)培养 HEK-293 细胞 24 h, 即可建立 HEK-293 的血清饥饿模型^[1, 4]。但由于血清饥饿模型的建立条件与细胞本身状态有关, 因此在开展教学之前, 应当进行预实验, 根据流式细胞术的结果适当调整饥饿时间及血清浓度。

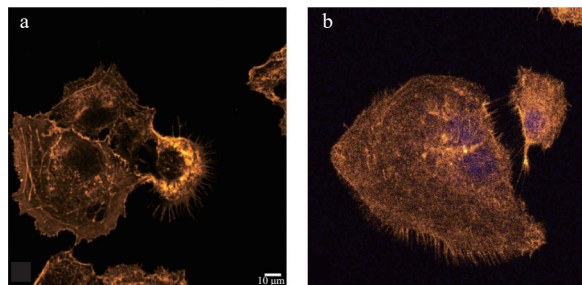
染色观察: 开展教学前可以使用普通荧光显微镜观察预实验染色结果, 判断染色条件是否合适。

该实验涉及多种如细胞传代、培养、爬片、骨架染色、流式细胞术等的细胞生物学实验基本操作, 是体现学生细胞生物学实验课程学习成果的良好载体。实验虽然在操作上较为基础, 但是整体时间长、前后实验关系紧密, 其中某一环节的失误会大大影响实验推进。因此在实验操作上应注意培养学生的无菌意识。

需注意本实验涉及到了激光共聚焦显微镜的使用。在过往的本科生细胞生物学实验教学中, 较少用到激光共聚焦显微镜。教师应提供相关视频资源或演示操作, 让学生掌握正确的仪器使用方法, 保证仪器安全以及实验正常进行。

3.2 TNT 的进一步动态分析 本实验对 TNT 的观察为静态观察, 通过固定已饥饿的细胞, 观察 TNT 的生成情况。在观察时, 可以发现有部分细胞产生了较长的丝状伸长, 但未与另一细胞连接。在本科细胞生物学实验中, 可以以此为拓展题目, 鼓励学生设计实验确定这一类丝状伸长是否确实为 TNT 前体。

3.3 细胞伪足 filopodia 的可能性 在激光共聚焦显微镜下, 可以观察到 HeLa 细胞与无血清培养的 COS-7 细胞都产生了特殊的丝状结构(图 8)。



a. COS-7 细胞 0% 血清浓度培养; b. HeLa 细胞 10% 血清浓度培养。图片颜色经 Image J 处理, 为增强细节, 选择 Orange Hot 调色, 故图中染色后微丝呈现为橙色

图 8 细胞表面的丰富丝状凸起(LSM710)

这一结构与 TNT 前体结构相似, 但排布更密、数量更多, 属于实验预期之外的发现。对比类似的其他细胞结构, 认为这一结构可能是细胞伪足 filopodia, 是直径在 60-200 nm 的细胞膜上凸起, 富含肌动蛋白, 能够被 Alexa Fluor 568 染色。

这一实验预期外的发现可以作为实验转化为教学实验时的拓展方向, 教师可以鼓励学生对这一结构进行进一步的分析, 如探究其成分、作用、发生条件等, 发展学生自主思考、设计实验的能力, 培养学生的科学素养。教师可以采用分层次化教学方式进行隧道纳米管的诱导与观察综合实验的教学如图 9 所示。

4 结束语

本科细胞生物学实验教学的内容长期保持较为固定的模式, 教授学生基本的细胞生物学实验操作。稳定的教学内容具有成功率高、技能训练属性强的特点, 但也同时带来一些弊端: 学生对于实验结果具有固定的预期, 在进行结果分析时过分关注结果的正确性, 只关注是否出现预期内的阳性结果, 忽略了预期之外的现象。对正确结果的过分关注也一定程度上导致了学生对于实验过程的记录较为简略。学生常出于按部就班的心理, 只记录对于预期内结果可能造成影响的操作与现象, 而对于其他内容有所减省。

细胞间长程连接作为细胞对胁迫环境的一种响应现象, 是理想的教学实验转化原材料。与分散的技能教学实验相比, 它能够检验学生细胞培养、传代、冻存、爬片、染色、流式细胞术等多项基础操作的能力, 连贯性强、综合性强。并且引入了较为前沿的内容, 能够鼓励学生进行科研探索, 结合理论与实际, 发展科研能力, 进而培养学生的科学素养。

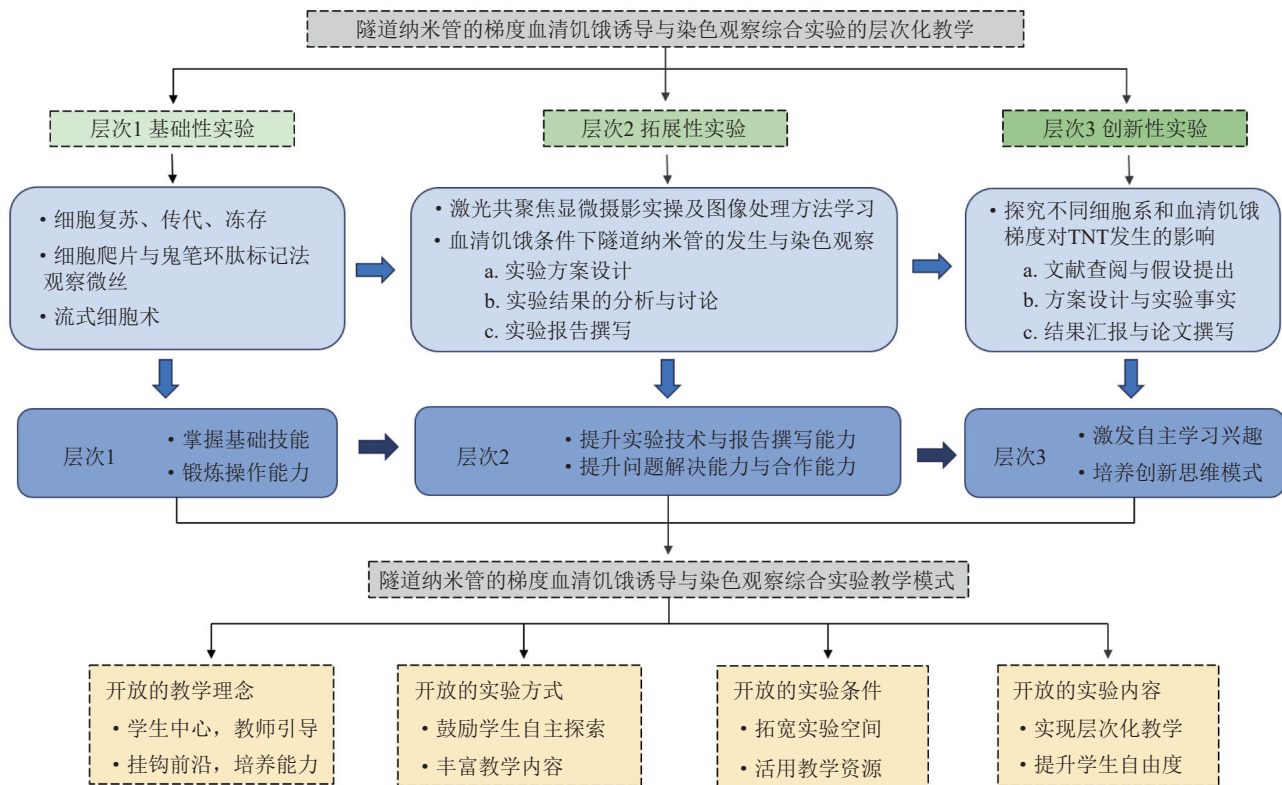


图 9 隧道纳米管的诱导与观察综合实验的层次化教学及教学模式示意图

5 参考文献

- [1] PIRKMAJER S, CHIBALIN A V. Serum starvation: caveat emptor[J]. *American Journal of Physiology Cell Physiology*, 2011, 301(2): 272
- [2] SAKAMURO D, FOLK W P, KUMARI A. To die, or not to die: E2F1 never decides by itself during serum starvation[J]. *Molecular & Cellular Oncology*, 2015, 2(2): e981447
- [3] TANG J, CHEN L J, WANG J, et al. Comparative study on Transwell and Wound healing methods for detecting vascular smooth muscle cell migration under serum starvation condition[J]. *Chinese Journal of Clinical Anatomy*, 2007, 25(6): 687
- [4] SHAO X Y, XU S Y. Study of cell cycle synchronization in fetal fibroblast by serum starvation[J]. *China Journal of Modern Medicine*, 2010, 20(1): 18
- [5] ABOUNIT S, ZURZOLO C. Wiring through tunneling nanotubes: from electrical signals to organelle transfer[J]. *Journal of Cell Science*, 2012, 125(Pt 5): 1089
- [6] VIGNAIS M L, CAICEDO A, BRONDELLO J M, et al. Cell connections by tunneling nanotubes: effects of mitochondrial trafficking on target cell metabolism, homeostasis, and response to therapy[J]. *Stem Cells International*, 2017, 2017: 6917941
- [7] ARIAZI J, BENOWITZ A, DE BIASI V, et al. Tunneling nanotubes and gap junctions-their role in long-range intercellular communication during development, health, and disease conditions[J]. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 2017, 10: 333
- [8] GOUSSET K, SCHIFF E, LANGEVIN C, et al. Prions hijack tunnelling nanotubes for intercellular spread[J]. *Nature Cell Biology*, 2009, 11(3): 328
- [9] RUSTOM A, SAFFRICH R, MARKOVIC I, et al. Nanotubular highways for intercellular organelle transport[J]. *Science*, 2004, 303(5660): 1007
- [10] SOWINSKI S, JOLLY C, BERNINGHAUSEN O, et al. Membrane nanotubes physically connect T cells over long distances presenting a novel route for HIV-1 transmission[J]. *Nature Cell Biology*, 2008, 10(2): 211
- [11] WANG X, VERUKI M L, BUKORESHTLIEV N V, et al. Animal cells connected by nanotubes can be electrically coupled through interposed gap-junction channels[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2010, 107(40): 17194
- [12] 潘鹏宇, 赵秋宇, 王英, 等. 高内涵分析系统联合激光扫描共聚焦显微镜观察细胞间隧道纳米管, 生物化学与生物物理进展 2023, 50(7): 1742

Design and Practice of the Comprehensive Experiment of Induction and Detection of Tunneling Nanotubes

LIU Ziqi^{1, 2)} XUE Xiuhua^{1, 2)} LUO Xinyao^{1, 2)} HAN Yuqing^{1, 2)} WANG Ting²⁾

(1)National Experimental Teaching Demonstration Center for Life Science and Technology, College of Life Sciences, Beijing Normal University, Beijing, China; 2)College of Life Sciences, Beijing Normal University, Beijing, China)

Abstract One of the most important ways to improve the quality of undergraduate laboratory teaching and talent cultivation is to timely transform the cutting-edge theories and research techniques of cell biology into experimental teaching. Based on the knowledge of tunneling nanotubes (TNT), this experiment is designed as a comprehensive and exploratory experimental teaching content, including the establishment of serum starvation model and tunneling nanotubes induction, observation of tunneling nanotubes structure by staining of cell microfilaments and nuclei, and detection of cell cycle by flow cytometry. Students firstly establish serum starvation model by mapping the serum concentration for different types of cells, then use cell crawler for cell fluorescence staining, and observe the bridge-like TNT structure under the fluorescence microscope; finally, flow cytometry is used to detect the change of the proportion of G1 cells in the cell cycle in starvation state. Teaching practice shows that the experiment helps to cultivate students' hands-on and scientific research thinking and stimulate students' interest in exploration.

Keywords laboratory course of cell biology; serum starvation; tunneling nanotubes

【责任编辑: 武 佳】