

实验报告书

项目名称： 药物化疗敏感性的细胞实验研究

实验内容： 流式检测药物对肝癌细胞凋亡的影响

客 户：

技术员： 牛国晓

复核人： 胡慧 联系方式：[0571-28311903](tel:0571-28311903)

报告时间： 2014 年 4 月 26 日

如您对本报告有异议，请于 10 个工作日内联系我们

1 实验材料:

1.1 细胞株:

人肝癌细胞 HepG2: 购自中国科学院上海细胞库。

1.2 试剂:

- (1) : 客户提供;
- (2) : 客户提供;
- (3) : 客户提供;
- (4) 1640 培养基: GIBCO Company;
- (5) 胎牛血清: GIBCO Company;
- (6) 胰蛋白酶(trypsin): GIBCO Company;
- (7) 凋亡试剂盒: 联科生物, 货号 AP101;
- (8) 其余试剂均为国产分析纯。

2 实验仪器:

- (1) 二氧化碳培养箱: 3111 型, Thermo 公司;
- (2) 倒置荧光显微镜: ECLIPSE Ti-S 型, Nikon 公司;
- (3) 流式细胞仪: BD 公司, Accuri C6 型;
- (4) 台式高速冷冻离心机: 5810R 型, Eppendorf 公司;
- (5) 台式低速离心机: 80-2 型, 上海医疗器械(集团)有限公司;
- (6) 电子显微镜: H-9500 型, 日立高新技术(上海)国际贸易有限公司;
- (7) 细胞培养瓶: Fisher Scientific 公司;
- (8) 细胞培养皿: Fisher Scientific 公司;
- (9) 微量加样器: Thermo 公司。

3 实验步骤

3.1 细胞培养

人肝癌细胞 HepG2 的培养条件: 含 10% FBS 的 1640 培养基, 37 °C、5% CO₂、饱和湿度培养箱中培养, 待细胞融合 90%左右吸除培养基, PBS 洗 2 次, 加入 1ml 0.25%

胰蛋白酶消化，当细胞回缩、变圆，瓶底有少许细胞脱落，加入 4ml 正常培养基终止消化，轻轻吹打瓶底至细胞全部脱落，1500rpm 离心 5min，弃上清，加入正常培养基吹打混匀，计数，以 1×10^6 密度接种 T75 培养瓶中正常培养。

3.2 铺板

取正常培养的处于对数期的 HepG2 细胞，胰酶消化，离心，计数板下计数，铺 3 块 6 孔板，每孔加入 2.7×10^5 个细胞，放入培养箱中静置 24h。

3.3 加药

细胞贴壁 24h 后，更换为含不同浓度的药物继续培养，药物分组如下：

- (1) (CK 组);
- (2) ($75 \mu\text{M}$);
- (3) ($1 \mu\text{g/mL}$);
- (4) 联合组 ($1 \mu\text{g/mL} + 75 \mu\text{M}$);
- (5) 组 ($120 \mu\text{g/mL}$);
- (6) 联合组 ($120 \mu\text{g/mL} + 75 \mu\text{M}$)。

3.4 流式检测细胞凋亡

药物作用 24h 后，胰酶（不含 EDTA）消化、离心收集细胞，PBS（4°C 提前预冷）洗涤细胞两次（1500RPM，离心时间 5min 收集细胞），用 $500 \mu\text{L}$ $1 \times$ Binding Buffer 悬浮细胞，在细胞悬浮液中加入 $5 \mu\text{L}$ Annexin V-FITC 和 $10 \mu\text{L}$ PI，轻轻混匀后于 4°C 避光条件下孵育 5 min，上机检测。

4 实验结果

流式检测细胞凋亡共分为四个象限：Q1-UL（坏死细胞和碎片），Q1-UR（晚期凋亡细胞和坏死细胞），Q1-LL（正常细胞），Q1-LR（早期凋亡细胞，可被 CCK8 检测）；以 Q1-UR 和 Q1-LR 两象限之和统计为凋亡率，详细结果见表 1，图 1-6。

表 1 药物对肝癌细胞凋亡的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	细胞凋亡率 (%)
正常对照组	0.0%
组	0.2%
组	1.6%
联合组	1.2%
组	2.8%
联合组	3.0%

注：与对照组比较，*P<0.05, ** P<0.01

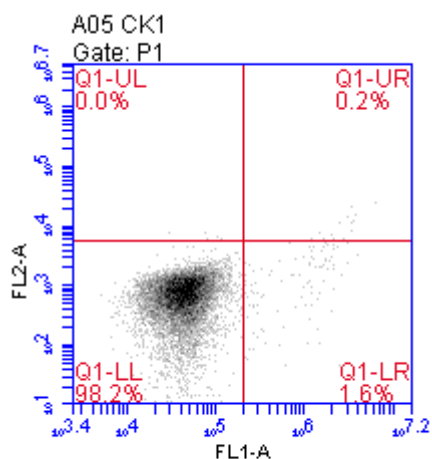


图 1 CK 组

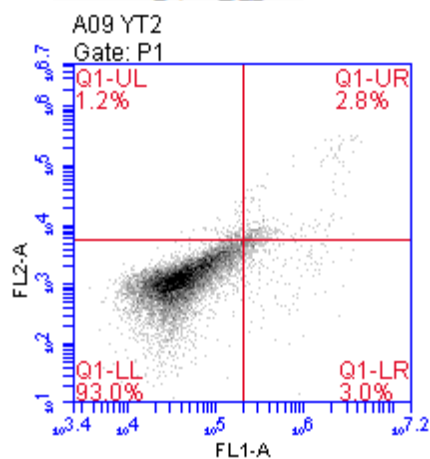


图 2 组

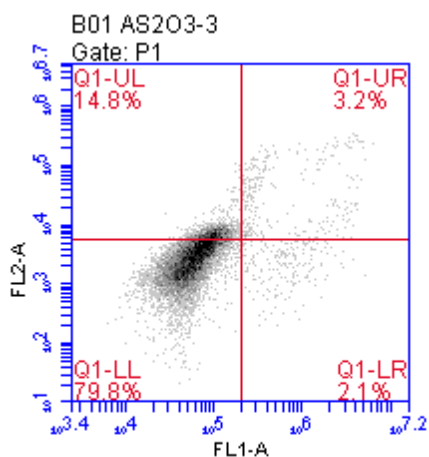


图 3 组

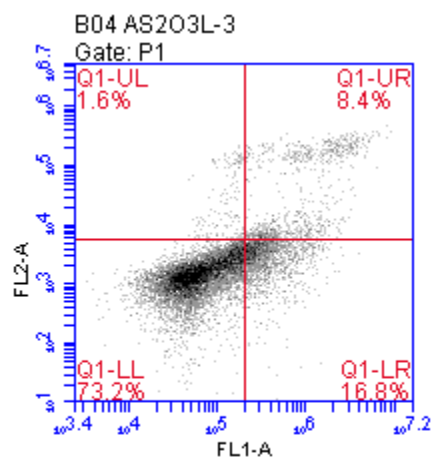


图 4 联合组

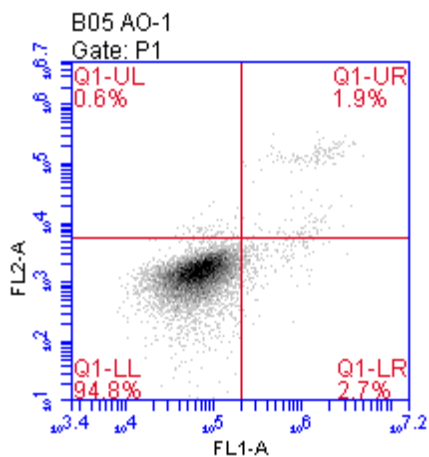


图 5 组

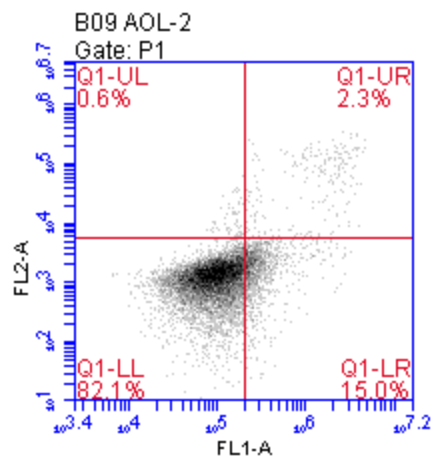


图 6 组