

## 教学研究

# 细胞生物学实验教学改革实践探索——小鼠腹腔巨噬细胞的提取及NF- $\kappa$ B信号通路活化水平检测

可月双\* 巴雪青 曾宪录  
(东北师范大学生命科学学院, 长春 130024)

**摘要** 细胞生物学实验是细胞生物学课程教学的重要组成部分, 对于帮助学生更好掌握相关理论知识, 培养学生的实验操作能力、科研思维能力均具有重要作用。细胞信号转导是细胞生物学理论课内容的重要章节, 目前在高校本科生细胞生物学实验教学中, 鲜有关于细胞内信号通路转导检测和观察的实验。该团队根据自身的科研活动和教学经验累积设计了一个独立完整的综合性实验, 包含4个相互联系的实验, 意在探究小鼠腹腔巨噬细胞中NF- $\kappa$ B信号通路的活化情况, 实验分别为: (1) 小鼠腹腔巨噬细胞的提取及纯化; (2) 炎症因子刺激下, RelA/p65在细胞内定位的观察; (3) 小鼠腹腔巨噬细胞中炎症因子mRNA表达变化的检测; (4) 小鼠腹腔巨噬细胞中炎症因子蛋白表达变化的检测。该综合性实验容易获得较纯的原代小鼠腹腔巨噬细胞, 并且在提取的细胞中能够明显检测到细胞内信号通路的转导情况, 实验结果易于观察。这样一个独立完整的综合性实验, 不仅能够丰富和优化本科生细胞生物学实验教学的内容和模式, 并且能够使学生在实验中真正深入了解机体内炎症反应过程中信号通路的转导等相关知识, 加深学生对于理论课程的理解。

**关键词** 细胞生物学实验; 教学改革; 小鼠腹腔巨噬细胞; NF- $\kappa$ B信号通路; 细胞生物学实验教学

## The Exploring Reform of Cell Biology Experiment Teaching—Extraction of Murine Peritoneal Macrophages and Detection of NF- $\kappa$ B Signaling Pathway Activation

KE Yueshuang\*, BA Xueqing, ZENG Xianlu

(Northeast Normal University, School of Life Sciences, Changchun 130024, China)

**Abstract** Cell Biology Experiment is an important part of Cell Biology courses and plays an important role in cultivating students' practice and scientific research thinking abilities. "Cell Signal Transduction" is the key and difficult chapter of Cell Biology course. The detection of intracellular signal transduction is an crucial experiment to the universities' undergraduate students. Due to the complicated steps of signal transduction experiments and students are not familiar with the procedures, the experimental results are often not satisfactory, and it is difficult for students to observe significant phenomena. Therefore, in the current teaching of undergraduate Cell Biology

收稿日期: 2024-02-01

接受日期: 2024-04-24

东北师范大学本科教学综合改革项目(第三期)资助的课题

\*通信作者。Tel: 17790008809, E-mail: keys585@nenu.edu.cn

Received: February 1, 2024

Accepted: April 24, 2024

This work was supported by the Northeast Normal University Undergraduate Teaching Comprehensive Reform Project (the Third Phase)

\*Corresponding author. Tel: +86-17790008809, E-mail: keys585@nenu.edu.cn

Experiments in universities, there are few experiments on the detection and observation of intracellular signal transition. The purpose of this study is to investigate the activation of NF- $\kappa$ B signaling pathway in murine peritoneal macrophages. Four interrelated experiments were designed, which were: (1) extraction and purification of murine peritoneal macrophages; (2) observation of the localization of RelA/p65 in cells stimulated by inflammatory factors; (3) the mRNA expression of inflammatory factors in murine peritoneal macrophages were detected; (4) the protein expression of inflammatory factors in murine peritoneal macrophages were detected. This experiment is easy to isolate the murine peritoneal macrophages and observe the obvious relocation of RelA/p65. The independent and complete comprehensive experiment can enrich and optimize the content and model of undergraduate teaching of Cell Biology Experiment. Furthermore, the experiment can help students to truly understand the cell signaling pathways in the inflammatory response process.

**Keywords** Cell Biology Experiment; teaching reform; murine peritoneal macrophages; NF- $\kappa$ B signaling pathway; teaching of Cell Biology Experiment

细胞信号转导是细胞生物学课程的重点兼难点章节。细胞信号转导是指细胞应答外界刺激,细胞外信号配体与细胞受体结合,引发细胞内的一系列生物化学反应,直至形成各种生物学效应的过程。学习和掌握细胞信号转导对于了解生物学现象以及理解疾病的发生发展具有重要意义。信号转导通路调控具有复杂性,相关内容的讲授基本呈现为对一种信号通路活化过程的描述,这使得学生对相关内容的学习缺乏感性理解。细胞生物学实验课是细胞生物学课程的重要组成部分,细胞信号转导检测相关实验操作可以极大帮助学生们掌握和理解细胞内信号转导的相关理论知识。然而,目前高校细胞生物学本科实验教学中,几乎没有关于细胞内信号转导检测和观察的相关实验,这严重影响了学生们对于该部分实验基本操作的掌握,同时不利于学生们对于相关理论知识的理解。

在国内各高校生命科学相关专业普遍使用的《细胞生物学》教材中的细胞信号转导章节里,信号通路举例均对应激性的NF- $\kappa$ B信号通路进行了介绍,显示了NF- $\kappa$ B信号通路的重要性和代表性。NF- $\kappa$ B是细胞内一类重要的转录因子,能够参与TNF $\alpha$ 、IL-6、IL-8等多种炎症介质的转录活化,在炎症反应中扮演着重要的角色。NF- $\kappa$ B家族广泛存在于几乎所有的真核细胞中,由5个亚基组成,即p50/NF- $\kappa$ B1、p52/NF- $\kappa$ B2、RelA/p65、RelB及c-Rel。NF- $\kappa$ B以同源或异源二聚体的形式存在,其中研究最多的NF- $\kappa$ B二聚体是p50/NF- $\kappa$ B1与RelA/p65组成的二聚体复合物,其中RelA/p65亚基是具有转录活化活性的亚基。人们所熟知的NF- $\kappa$ B经典信号活化调节模

型认为,在未受刺激的细胞中,NF- $\kappa$ B二聚体与抑制蛋白I $\kappa$ B形成复合物,RelA/p65以非活性形式存在于细胞质中,当细胞感受到外界信号(如促炎细胞因子)的刺激时,I $\kappa$ B被降解,从而使RelA/p65的核定位信号暴露出来,RelA/p65移位至细胞核内驱动靶基因的转录。我们在科学研究过程中常常将小鼠腹腔巨噬细胞作为实验材料进行探究炎症进程中不同信号通路的调节情况。因此,我们在本科生细胞生物学实验教学活动中,基于科研经验进行探索与尝试,指导本科生:(1)提取和纯化小鼠腹腔巨噬细胞;(2)在炎性刺激条件下,通过免疫荧光技术标记RelA/p65,利用显微镜观察RelA/p65在细胞内的定位变化;(3)提取全细胞RNA,反转录后通过PCR检测炎症因子mRNA的表达变化;(4)流式细胞术检测小鼠腹腔巨噬细胞中炎症因子的蛋白表达变化。通过这4个有联系且逐步递进的实验项目,从而检测NF- $\kappa$ B信号通路的活化以及机体对外界炎性刺激的应答情况(图1)。本综合性实验能够明显检测到细胞内信号通路的转导情况,结果比较稳定,易于观察。该实验不仅能够弥补目前高校细胞生物学实验课程教学中关于信号转导相关实验的空缺,还能够加深学生们对于细胞生物学中信号转导这一章内容的理解。

## 1 实验原理

高压灭菌处理后的6%淀粉肉汤作为一种无菌刺激异物,通过腹腔注射到小鼠腹部后,小鼠会立即启动免疫系统,产生大量的巨噬细胞吞噬注入的淀粉肉汤,清除异物,实现自我保护。因此注射6%淀

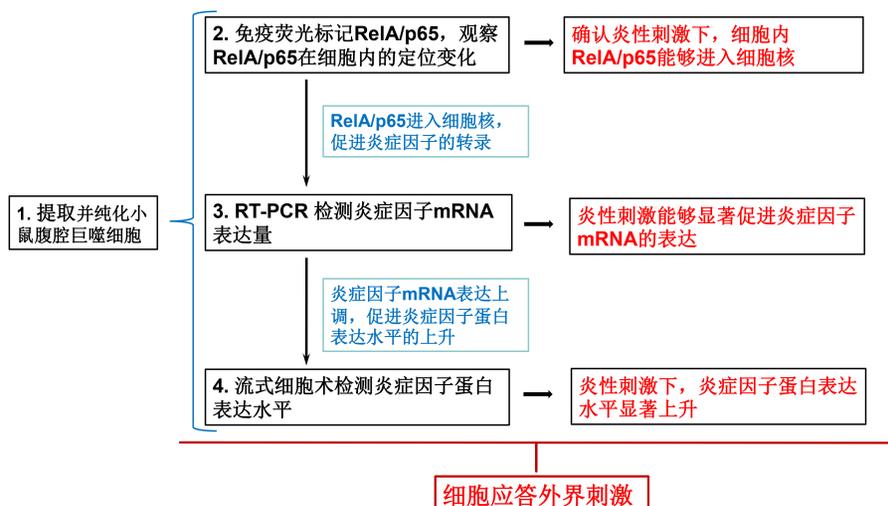


图1 实验流程图

Fig.1 Schemes of experimental processes

粉肉汤是提高原代小鼠腹腔巨噬细胞数量的重要方法。在本实验中,我们连续两天给与小鼠腹腔注射6%淀粉肉汤,之后提取和纯化小鼠腹腔巨噬细胞,对小鼠的腹腔巨噬细胞进行原代培养。接下来,利用脂多糖(lipopolysaccharide, LPS, 革兰氏阴性细菌细胞壁外壁的组成成分,是由脂质和多糖构成的物质)刺激提取的细胞,建立细胞炎症反应模型。通过免疫荧光技术标记RelA/p65,利用荧光显微镜分析RelA/p65的入核情况。之后,提取全细胞RNA,利用RT-PCR(reverse transcription PCR)技术检测炎症因子mRNA的表达变化。进一步,在加入蛋白质转运抑制剂(protein transport inhibitor, 阻滞炎症因子向细胞外分泌)后利用流式细胞术检测小鼠腹腔巨噬细胞炎症因子的蛋白表达情况。

## 2 教学设计与安排

### 2.1 教学目的

本综合性实验将提取的小鼠腹腔巨噬细胞作为实验材料,通过LPS刺激细胞建立炎症模型,利用免疫荧光标记、RT-PCR、流式细胞术等实验检测细胞内应答炎性刺激时NF- $\kappa$ B信号通路活化以及细胞对炎性刺激的应答情况。希望学生通过连续性的实验对细胞内信号转导的动态过程有一个直观的理解,激发学生对生命活动的探索精神,使学生能掌握倒置显微镜、荧光显微镜、PCR仪和流式细胞仪的使用方法。

### 2.2 教学重点与难点

教学重点在于锻炼学生原代细胞的分离培养

操作,熟练掌握倒置显微镜、荧光显微镜、PCR仪的使用及如何对实验结果进行分析。本实验是一个综合性的实验,教学难点在于锻炼学生的实验操作能力,指导学生注意操作的安全性以及培养小鼠腹腔巨噬细胞时要细心,避免污染。

### 2.3 教学安排

2.3.1 学时安排 本课程针对本学院二年级上学期的本科生进行教学,是在细胞生物学理论课程细胞信号转导章节完成后开展的独立实验课程。该实验课连续2周进行,每周上课4天,针对2个平行班级开设,每个平行班分上下午进行操作。本实验可以分为4个阶段:(1)小鼠腹腔巨噬细胞的提取与纯化(4学时);(2)免疫荧光标记RelA/p65及显微镜观察RelA/p65的细胞内定位变化(4学时);(3)小鼠腹腔巨噬细胞中mRNA表达变化的检测(4学时);(4)小鼠腹腔巨噬细胞中炎症因子表达变化的检测(4学时)。本实验前后连续,总共16学时,每一阶段教师都会提前将相关课程PPT或操作视频上传至网络课堂,学生们需要提前预习,并在课后及时处理实验数据,具体安排如图2。在4个阶段的实验进行后,学生需要依据四部分实验内容书写1份完整的实验报告,并在最后对课程内容和结果进行分析和总结。

2.3.2 考核方式 以往的细胞生物学实验课程仅仅通过学生们提交的实验报告来评价学生的成绩。本课程将采用综合考核方式进行学生成绩的评定。具体为:总成绩=实验报告(30%)+课堂表现(15%)+线上网络课堂互动(15%)+实验结果分析和总结(40%)。

		课前	课上	课后
第一周	第一次课 (2课时)	1. 教师给与小鼠腹腔注射第一针淀粉肉汤 2. 录制小鼠操作视频 3. 上传PPT及视频至网络课堂	1. 教师讲授课程 2. 学生完成小鼠腹腔第二针淀粉肉汤的注射	通过网络课堂, 预习下一节课的内容
	第二次课 (2课时)	教师上传PPT及视频至网络课堂	1. 教师讲授课程 2. 学生完成小鼠腹腔巨噬细胞的提取和纯化, 并拍照	1. 整理实验结果 2. 通过网络课堂, 预习下一节课的内容
	第三次课 (2课时)	1. 教师上传PPT及视频至网络课堂 2. 教师提前做好一抗、二抗等试剂	1. 教师讲授课程 2. 学生给与小鼠腹腔巨噬细胞LPS刺激 3. 学生进行免疫荧光实验操作, 一抗过夜	通过网络课堂, 预习下一节课的内容
	第四次课 (2课时)	教师上传PPT及视频至网络课堂	1. 教师讲授课程 2. 学生完成免疫荧光的后续操作 3. 荧光显微镜拍照	1. 整理实验结果 2. 通过网络课堂, 预习下一节课的内容
第二周	第一次课 (2课时)	1. 教师上传PPT及视频至网络课堂 2. 教师准备反转录试剂盒等试剂	1. 教师讲授课程 2. 学生给与小鼠腹腔巨噬细胞LPS刺激; 3. 学生提取RNA, 进行反转录实验	通过网络课堂, 预习下一节课的内容
	第二次课 (2课时)	1. 教师上传PPT及视频至网络课堂 2. 教师准备引物等试剂	1. 教师讲授课程 2. 学生进行PCR实验, 检测小鼠腹腔巨噬细胞中炎症因子mRNA表达变化	1. 整理实验结果 2. 通过网络课堂, 预习下一节课的内容
	第三次课 (2课时)	1. 教师上传PPT及视频至网络课堂 2. 教师提前1.5 h给与小鼠腹腔巨噬细胞LPS刺激并添加Protein Transport Inhibitor	1. 教师讲授课程 2. 学生通过流式细胞术检测小鼠腹腔巨噬细胞炎症因子TNF $\alpha$ 蛋白表达情况	1. 整理实验结果 2. 通过网络课堂, 对比自己结果与教师预实验结果的差别
	第四次课 (2课时)	教师上传预实验结果至网络课堂	1. 教师针对学生的结果进行分析 2. 针对学生实验过程中的问题, 进行答疑	整理实验数据, 总结实验结果

图2 教学安排流程图

Fig.2 Schemes of teaching arrangement processes

## 2.4 实验材料与设备

2.4.1 实验材料 本研究拟在8~12周龄Balb/c小鼠中提取小鼠腹腔巨噬细胞并对提取的小鼠腹腔巨噬细胞进行后续信号转导实验。小鼠相关的所有操作严格遵照《实验动物环境及设施》(GB14925-2010)和《实验动物福利伦理审查指南》(GB/T35892-2018), 以及东北师范大学科技伦理委员会(批准号: 202402003)的要求。

2.4.2 实验仪器和用具 实验器材包括: 细胞培养箱、低速离心机、高速离心机、流式细胞仪(ThermoFisher Scientific), 倒置显微镜(Nikon), 解剖刀、解剖刀柄(北京宏百业科技有限公司), 超净工作台(苏州安泰空气技术有限公司), 凝胶图像分析系统(上海天能生命科学有限公司), 倒置荧光显微镜(Olympus), 移液器及对应吸头(Eppendorf), 1.5 mL Ep管(武汉伯明辉生物科技有限公司), PCR仪(ABI), 水浴锅(江苏新春兰科学仪器有限公司), 电泳仪(北京市六一仪器厂)。小鼠 $\beta$ -actin引物(201 bp)序列: 上游引物(F) 5'-CTC ATG ACC ACA GTC CAT GC-3', 下

游引物(R) 5'-CAC ATT GGG GGT AGG AAC AC-3'; 小鼠*Tnfa*引物(162 bp)序列: 上游引物(F) 5'-CCA CCA TCA AGG ACT CAA-3', 下游引物(R) 5'-CAG GGA AGA ATC TGG AAA-3'; 小鼠*Cxcl1*引物(132 bp)序列: 上游引物(F) 5'-ATG GCT GGG ATT CAC CTC AA-3', 下游引物(R) 5'-CAA GGG AGC TTC AGG GTC AA-3'; 小鼠*Cxcl2*引物(127 bp)序列: 上游引物(F) 5'-CCC AGA CAG AAG TCA TAG C-3', 下游引物(R) 5'-TCC TTT CCA GGT CAG TTA-3'。

2.4.3 试剂配制 6%淀粉肉汤(称取1.0 g蛋白胨、0.5 g NaCl溶于100 mL蒸馏水中, 加热后加入6.0 g可溶性淀粉。高压灭菌处理后, 置于4 °C保存, 用时水浴融化即可)、PBS缓冲液(货号: KGB5001)、DMEM培养基(货号: KGM12800-500)购于江苏凯基生物技术股份有限公司; 胎牛血清(FBS)、脂多糖(LPS, Sigma L2880-10MG, 工作浓度为200 ng/mL)、RelA/p65抗体(货号: F-6, sc-8008)购于Santa Cruz Biotechnology公司; TRITC Goat Anti-Mouse IgG (H+L)二抗(货号: AS026)购于ABclonal公司; 0.1% PBST(100  $\mu$ L Tween 20+100 mL

PBS)、0.5% Triton X-100(500  $\mu$ L Triton X-100+100 mL PBS)、Trizol裂解液(货号: T9424)购于Sigma公司; 反转录试剂盒(包含5 $\times$  反应缓冲液、MgCl<sub>2</sub>、dNTPs)、反转录酶(reverse transcriptase)、Taq酶预混体系、6 $\times$  上样缓冲液、RNA primer(随机引物)购于TaKaRa公司; 蛋白转运抑制剂(protein transport inhibitor)购于BD公司、PE/Cyanine7 Anti-Mouse TNF $\alpha$ 购于Biolegend公司; DAPI、三氯甲烷、异丙醇DEPC、琼脂糖、4%多聚甲醛购于北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司。

### 3 实验步骤

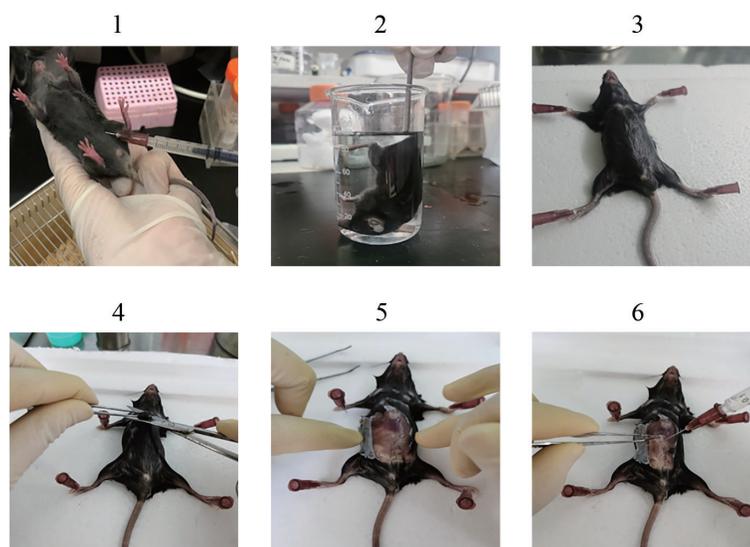
#### 3.1 小鼠腹腔巨噬细胞的获得及纯化

第1天, 教师进行第1次小鼠腹腔淀粉肉汤的注射。第2天, 学生进行第2次小鼠腹腔淀粉肉汤的注射, 并在第3天提取和纯化小鼠腹腔巨噬细胞。学生的具体操作如下: 取8~12周龄的Balb/c小鼠, 给小鼠腹腔注射500  $\mu$ L的淀粉肉汤。在第2天引颈处死小鼠并浸入75%酒精中1~2 min进行消毒。将消毒过的小鼠固定四肢于解剖台或泡沫板上并置于超净工作台中。用剪刀剪开毛皮暴露出腹膜, 用75%的酒精棉球擦拭腹膜壁后再用10 mL注射器吸取2~4 mL PBS注入腹腔内, 同时用手指均匀揉压腹

膜壁, 使液体在腹腔内充分流动, 保证能够获取较多的巨噬细胞(图3)。用针头吸取腹腔液并注入到离心管中, 250  $\times$ g室温离心10 min, 弃上清, 细胞沉淀中加入含有10%血清和双抗的DMEM培养基, 将细胞制成单细胞悬液后置于细胞培养板中, 于37  $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub>培养箱中培养。因为该实验后续要进行其他实验, 因此应该直接将细胞悬液铺在后续实验所需求的不同培养板中。由于获得的小鼠腹腔巨噬细胞混有其他的细胞, 所以需要进一步去除不需要的细胞。巨噬细胞相对于其他细胞来说, 贴壁时间更短, 1~2 h就能贴壁。细胞培养1~2 h后, 除去培养液, 用DMEM培养基冲洗1~2次后即可去除其他细胞, 重新加入DMEM完全培养基(含有10%血清和1%双抗)后, 置于37  $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub>培养箱中培养。

#### 3.2 炎症因子刺激下, 免疫荧光检测RelA/p65在细胞内定位的变化

提取小鼠腹腔巨噬细胞之后的第2天, 学生按照比例在细胞中加入刺激物LPS(终浓度为200 ng/mL), 对照组不做炎性刺激处理。将细胞培养板重新放回细胞培养箱中带着刺激物继续培养1 h, 之后利用免疫荧光技术检测小鼠腹腔巨噬细胞中RelA/p65在细胞内定位的变化情况, 具体操作如下。移除正常组



1: 取8~12周龄的Balb/c小鼠, 向每只小鼠腹腔连续两天注射500  $\mu$ L的淀粉肉汤; 2: 引颈处死Balb/c小鼠, 并将其浸入75%酒精中, 浸泡1~2 min; 3: 将消毒过的小鼠置于解剖台或泡沫板上, 用针头固定四肢; 4: 双手持镊子和剪刀撕开毛皮, 拉向两侧撕开, 暴露出小鼠腹膜; 5: 用75%的酒精棉球反复擦洗腹膜壁, 然后用10 mL注射器吸取2~4 mL PBS注入腹腔内, 同时用手指均匀揉压腹膜壁; 6: 用针头轻轻挑起腹壁, 吸取小鼠腹腔液。

1: 8 to 12 weeks Balb/c mice were injected with 500  $\mu$ L starch broth into the abdominal cavity for two consecutive days; 2: Balb/c mice were killed and immersed in 75% alcohol for 1-2 min; 3: the mice were placed on a dissection table or foam board, and the limbs were fixed with needles; 4: tear the fur and expose the mouse's peritoneum; 5: scrub the peritoneal with 75% alcohol cotton ball, then inject 2-4 mL PBS into the abdominal cavity with a 10 mL syringe, and evenly knead the peritoneal with fingers at the same time; 6: gently stir the abdominal wall with a needle and absorb the mouse abdominal fluid.

图3 提取小鼠腹腔巨噬细胞的流程图

Fig.3 Schemes of murine peritoneal macrophage extraction

和刺激组细胞培养板中的完全培养基,用PBS清洗细胞1次后去除PBS。用移液器向每孔细胞中加入500  $\mu\text{L}$  4%组织细胞固定液,15 min后移除固定液,用500  $\mu\text{L}$  0.1% PBST清洗细胞3次,每次5 min,最后去除0.1% PBST。加入500  $\mu\text{L}$  0.5% Triton X-100透化处理细胞10 min之后,去除透化液并用0.1% PBST清洗细胞3次。每孔中加入300  $\mu\text{L}$  2%血清室温封闭细胞30 min,之后,移除封闭液并用0.1% PBST洗涤细胞3次。每孔加入500  $\mu\text{L}$  PBS稀释好的一抗(anti-RelA/p65, 1:200), 4  $^{\circ}\text{C}$ 过夜或室温作用1 h。移除一抗后每孔加入500  $\mu\text{L}$  0.1% PBST洗涤细胞3次。每孔细胞中加入200  $\mu\text{L}$  PBS稀释好的荧光二抗(1:200),室温避光作用1 h之后移除二抗,彻底清洗细胞之后加入DAPI室温孵育细胞10 min,去除DAIP之后加入500  $\mu\text{L}$  0.1% PBST充分洗涤细胞3次。吸取5~10  $\mu\text{L}$ 封片剂滴在载玻片上,将细胞爬片用镊子扣出孔板后,用滤纸吸除样本周围多余的液体,倒扣在含有封片剂的载玻片上,利用显微镜观察实验结果。

### 3.3 小鼠腹腔巨噬细胞中炎症因子mRNA表达变化的检测

学生按照比例在细胞中加入刺激物LPS(终浓度为200 ng/mL),对照组不做炎性刺激处理。将细胞培养板重新放回细胞培养箱中带着刺激物继续培养1 h之后提取细胞内的总RNA并进行反转录,之后利用PCR检测炎症因子的表达情况,具体步骤如下:去除细胞的培养基,每孔细胞中加入1 mL PBS清洗细胞后,加入1 mL Trizol,吹打细胞后移至1.5 mL Ep管中,室温静置10 min。加入200  $\mu\text{L}$ 三氯甲烷,剧烈振荡1 min后,室温静置3 min。12 000 r/min室温离心5 min后,可以看到Ep管中液体分为三层,上层透明状液体中含有RNA。吸取400  $\mu\text{L}$  RNA层液体到不含RNA酶(RNase-free)级别的1.5 mL Ep管中,加入等体积的异丙醇,混匀,室温静置10 min后,12 000 r/min离心5 min,弃上清。加入1 mL DEPC处理水配制的70%酒精,轻轻振荡后12 000 r/min离心5 min,吸净上清。在室温条件下,打开1.5 Ep管管盖,干燥3~5 min后加入10~20  $\mu\text{L}$  DEPC水溶解RNA并测定RNA浓度。按照反转录试剂盒(TaKaRa)说明书中的实验步骤混合反转录体系并进行退火、延伸和灭活处理。反转录反应结束后,瞬时离心Ep管,加入20  $\mu\text{L}$  ddH<sub>2</sub>O。以反转录获得的cDNA为模板,分别用趋化

因子基因*Cxcl1*和*Cxcl2*、肿瘤坏死因子*Tnfa*和 *$\beta$ -actin*的mRNA引物进行PCR实验。PCR结束后每个反应样品中加入4  $\mu\text{L}$  6 $\times$ 上样缓冲液,混匀,利用2%琼脂糖凝胶电泳检测炎症因子mRNA的表达情况。

### 3.4 小鼠腹腔巨噬细胞中炎症因子表达的检测

教师提前1.5 h按照比例在小鼠腹腔巨噬细胞中加入刺激物,使LPS终浓度为200 ng/mL,蛋白转运抑制剂(protein transport inhibitor)按照说明书1:1 000(每1 mL培养基加入1  $\mu\text{L}$  protein transport inhibitor)使用,对照组不做炎性刺激处理。将细胞培养板重新放回细胞培养箱中带着刺激物继续培养1.5 h后学生通过流式细胞术检测炎症因子的表达情况,具体操作如下:移除细胞培养板中的完全培养基,用提前预冷的PBS清洗细胞1次,之后去除PBS。向细胞培养板中加入预冷的1 mL PBS,用刮刀将细胞从培养板上刮取下来并移至1.5 mL Ep管中,4  $^{\circ}\text{C}$ 、2 000 r/min离心细胞5 min后移除PBS。用移液器向每管细胞中加入500  $\mu\text{L}$ 的4%组织细胞固定液,10 min之后,4  $^{\circ}\text{C}$ 、2 000 r/min离心5 min,移除固定液。向1.5 mL Ep管中加入500  $\mu\text{L}$  10%血清,将细胞重悬之后,4  $^{\circ}\text{C}$ 、2 000 r/min离心5 min,移除10%血清。再重复加入1次10%血清,4  $^{\circ}\text{C}$ 、2 000 r/min离心5 min后去除血清。每管细胞中加入500  $\mu\text{L}$  0.5% Triton X-100处理细胞10 min,之后,4  $^{\circ}\text{C}$ 、2 000 r/min离心5 min,移除固定液,再用10%血清清洗细胞2次,最后4  $^{\circ}\text{C}$ 、2 000 r/min离心5 min后去除血清。每管细胞中加入100  $\mu\text{L}$ 用10%血清稀释好的抗体(PE/Cy7-Anti-Mouse TNF $\alpha$ , 1:200),室温作用1 h。抗体孵育后加入500  $\mu\text{L}$  PBS,4  $^{\circ}\text{C}$ 、3 000 r/min离心5 min,弃上清。加入200  $\mu\text{L}$  PBS悬起细胞于流式管内,利用流式细胞仪检测。

## 4 实验结果

### 4.1 明视野下低倍镜(10 $\times$ )观察小鼠腹腔巨噬细胞形态

在显微镜下,我们能看到小鼠腹腔巨噬细胞的形态,多呈现圆形、椭圆形或不规则的有伪足和突起,在培养过程中几乎没有发现细胞分裂的现象(图4)。

### 4.2 免疫荧光检测小鼠腹腔巨噬细胞中RelA/p65的定位变化

免疫荧光实验结果显示,在加入炎性刺激物LPS刺激细胞1 h后(图5标注LPS组)能够看到细胞内RelA/p65明显的入核情况,而在没加刺激的细胞

中(图5标注Mock组), RelA/p65主要定位在细胞质中。实验结果表明, LPS刺激细胞促进了RelA/p65的入核。

### 4.3 RT-PCR检测小鼠腹腔巨噬细胞中炎症因子mRNA的表达变化

通过RT-PCR实验可以看到, 在加入炎性刺激

物LPS刺激细胞1 h后, 炎症因子*Tnfa*、*Cxcl1*、*Cxcl2* mRNA的表达水平显著上升(图6标注LPS组), 而在没加刺激的细胞中显示, 几乎没有炎症因子mRNA的表达(图6标注Mock组)。实验结果表明, RelA/p65入核之后, 促进了炎症基因的转录。

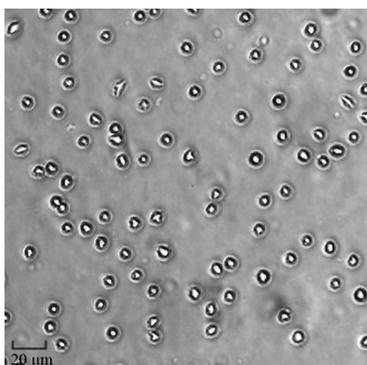
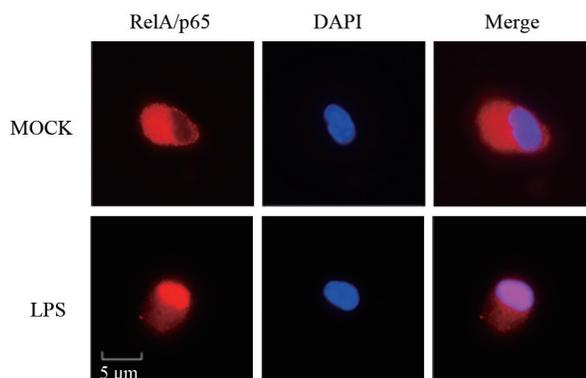


图4 倒置显微镜下小鼠腹腔巨噬细胞形态

Fig.4 Morphology of murine peritoneal macrophages under inverted microscope

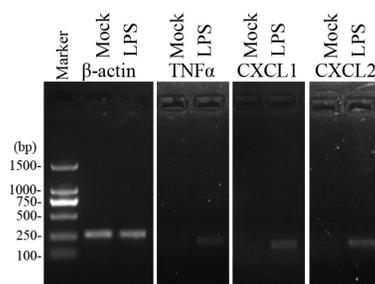


对正常细胞以及经过LPS处理的细胞进行免疫荧光标记, 检测RelA/p65在不同处理下在细胞内的定位情况。Mock: 不加任何处理的细胞组。LPS: LPS处理细胞组。

Immunofluorescence microscopy visualizes the localization of RelA/p65 in normal cells and LPS-treated cells. Mock: a group of cells without any treatment. LPS: LPS treats groups.

图5 荧光显微镜下观察小鼠腹腔巨噬细胞中RelA/p65的定位情况

Fig.5 The localization of RelA/p65 in murine peritoneal macrophages

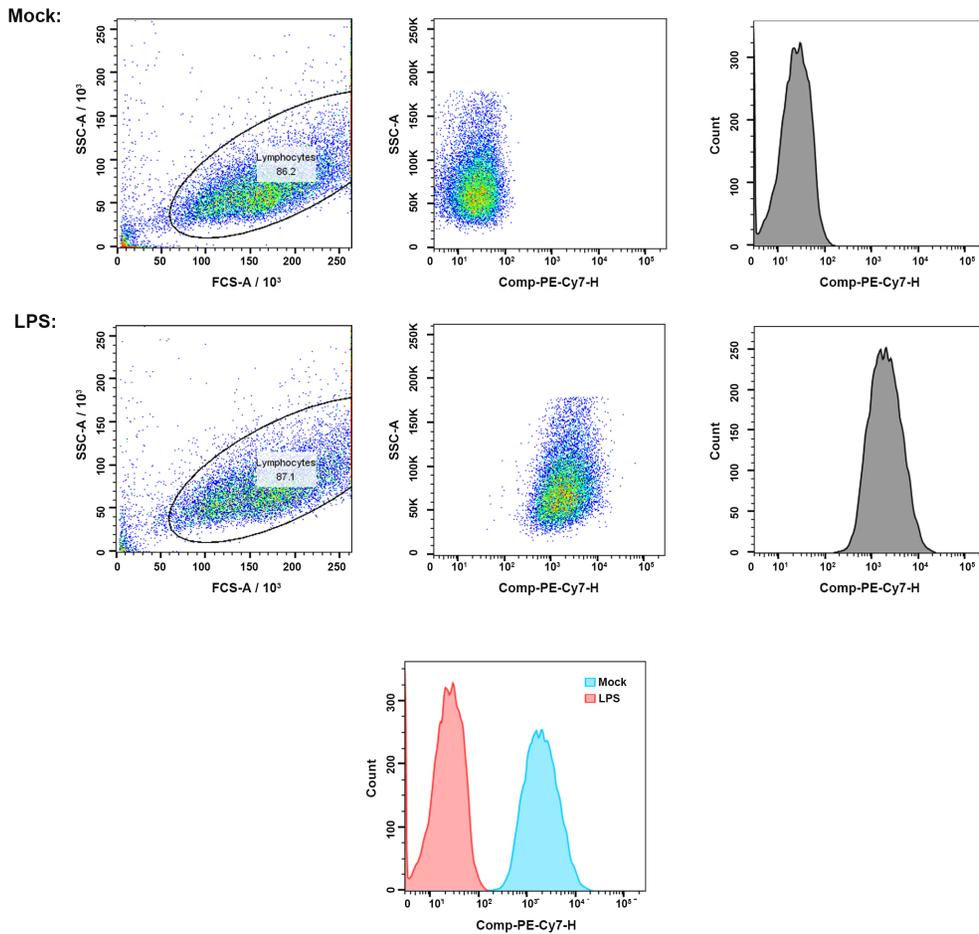


提取正常细胞以及经过LPS处理的细胞全部RNA, 反转录之后通过PCR检测炎症因子*Tnfa*、*Cxcl1*、*Cxcl2*表达情况。Mock: 不加任何处理的细胞组。LPS: LPS处理细胞组。Marker: DNA分子量大小的参照。

All RNA is extracted from normal cells or LPS-treated cells, and the mRNA expressions of inflammatory factors *Tnfa*, *Cxcl1* and *Cxcl2* are detected by PCR after reverse transcription. Mock: a group of cells without any treatment. LPS: LPS treats groups. Marker: reference of DNA molecular weight size.

图6 RT-PCR检测小鼠腹腔巨噬细胞中炎症因子mRNA的表达变化

Fig.6 mRNA expression of inflammatory factors in murine peritoneal macrophages detected by RT-PCR



正常细胞以及经过LPS处理的细胞同时给予蛋白转运抑制剂,之后利用PE/Cy7-Anti-Mouse TNF $\alpha$ 标记细胞,流式细胞仪检测细胞内炎症因子TNF $\alpha$ 的蛋白表达情况。Mock:不加任何处理的细胞组。LPS: LPS处理细胞组。底部展示的是两组比较的结果。

Normal cells and LPS-treated cells are treated with protein transport inhibitors, and then PE/Cy7-Anti-Mouse TNF $\alpha$  is used to label the cells. The expression of TNF $\alpha$  protein in the cells is detected by flow cytometry. Mock: a group of cells without any treatment. LPS: LPS treats groups. The results of the two groups are shown at the bottom.

图7 流式细胞术检测小鼠腹腔巨噬细胞中炎症因子的表达变化

Fig.7 The protein expression of inflammatory factors in murine peritoneal macrophages detected by flow cytometry

#### 4.4 流式细胞术检测小鼠腹腔巨噬细胞炎症因子TNF $\alpha$ 蛋白表达情况

流式细胞术结果显示,在加入炎性刺激物LPS刺激细胞3 h后,炎症因子TNF $\alpha$ 蛋白表达水平显著上升(图7标注LPS组),而在没加刺激的细胞中(图7标注Mock组),炎症因子TNF $\alpha$ 表达水平较低。图7最下面为两组TNF $\alpha$ 表达对比图。

## 5 讨论

### 5.1 开设该实验项目的意义

对于细胞生物学理论课程的改革及建设,已有大量实践和报道,如科教融合的教学方法、翻转课堂、思政结合的教学模式等,并已取得了较好的实践效果,但与其密切相关的实验课程教学改革进展

却显得较为缓慢。目前,细胞生物学实验课改革的难点是如何在有限的学时和仪器设备下提高学生的科研思维能力、动手能力并加强学生对于细胞生物学理论课程的理解和掌握。细胞信号转导作为细胞生物学理论教学中的重要章节,一直是学生们掌握的难点和重点。目前国内细胞生物学实验课鲜有关于该章节的实验课程设置,不能充分发挥实验课对于理论课的实践指导作用。本文意在建立细胞生物学实验中关于信号转导的相关实验课程,在本文设计的4个相互关联的实验中,能够看到NF- $\kappa$ B信号通路在炎性刺激情况下活化的过程,并且能够在转录和翻译水平检测到细胞对外界刺激响应(图1)。该实验能让学生们直观地观察到细胞内信号转导事件以及由此产生的细胞基因表达的改变,这能够充分

相较于独立的实验内容,本次连续性的细胞生物学实验是否让你更好地掌握和理解细胞生物学实验课程呢?(本题答题人数:148人)

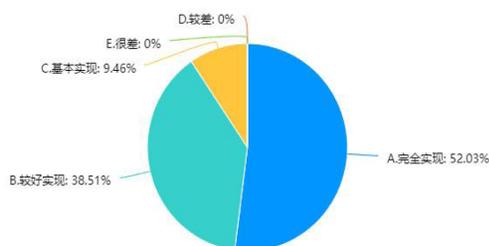


图8 教学效果

Fig.8 Teaching effect

调动学生们的积极性,并加强学生们对于信号转导理论知识的学习和理解。

## 5.2 实验教学效果

**5.2.1 教学模式和教学方法** 本综合性实验课程涉及的实验步骤较多,因此将采用线上线下混合式教学模式。每一阶段实验课前,将课程原理PPT和相关操作视频提前上传到网络课堂,方便学生们提前预习。课上教师讲授实验原理和实验步骤后,学生们分组进行实验操作,教师在旁进行辅助教学。最后一个阶段实验结束后,教师将在网络课堂上展示预实验结果,学生们通过将预实验结果与自己结果进行对比,分析实验结果差异的原因并进行总结。

**5.2.2 教学效果** 我们将本文设计的综合性实验课程的前两部分即“(1)小鼠腹腔巨噬细胞的提取与纯化”和“(2)免疫荧光标记RelA/p65及显微镜观察RelA/p65的细胞内定位变化”等内容在本校本科生细胞生物学实验课教学中进行了实施,得到了学生们的充分肯定。除此之外,我们还在课堂中引入与该课程相关的科学问题,如“已知某种药物具有抗炎作用,如何检测该药物是否通过影响NF- $\kappa$ B信号通路的活化进而参与炎症进程?”,鼓励学生思考,并发表自己的观点。课程中学生们实验操作热情高涨,以及对实验数据和科学问题的分析、讨论都比较积极。从前期对学生的调查中发现,相较于独立的实验内容,52.03%的学生完全认同连续性实验能够更好地促进学生们对于细胞生物学实验课程内容的理解和掌握,38.51%的学生持认同态度(图8)。基于前期两个实验的实施效果以及我们的调查结果,学生对本文设计的综合性实验课程接受度较高。

## 5.3 实验教学的可行性和可调整性

该课程是由四部分组成的一个综合性大实验,可以根据学校的实际学时和开课情况选择由学生全

部完成或由学生完成其中部分实验。高校在能够集中开课的情况下,学生可以在两周的时间里完成实验,并及时与老师就实验结果进行分析和探讨。如因客观因素无法进行集中授课,也可以按照一周一次的实验课方式进行教学,课下供学生们使用的实验室每天开放,方便学生根据自己的时间,对提取的原代细胞进行持续培养。该课程相关的PPT和操作视频等教师会提前上传至网络课堂,学生通过提前预习的方式进行自主学习,课堂上教师概述教学内容后,学生们就可以进行实验操作,老师从旁指导。

## 5.4 实验的推广和应用

本实验将小鼠腹腔巨噬细胞作为科研材料,其便于提取且容易纯化,能够很好地应用于本科生的实验教学中。实验过程中通过4个相互关联的实验,检测和观察炎症信号通路NF- $\kappa$ B的活化情况以及细胞对于外界炎性刺激的应答反应情况,实验结果明显,易于观察。相对于以往实验结果不稳定导致学生学习热情较低的情况,该综合性实验可大大提高学生的兴趣。该实验可推广至其他高校的细胞生物学实验课的教学中,高校根据自身情况选取其中几个实验或者对实验进行延伸,教学安排中可增加例如染色质免疫沉淀实验,用于检测RelA/p65与特定靶基因的结合情况;增加蛋白免疫印迹实验,通过细胞核及细胞质分离技术检测RelA/p65在细胞内的定位变化;酶联免疫吸附实验,检测炎症因子的分泌情况等实验内容。我们相信该实验的建立能够弥补目前高校细胞生物学实验课程中关于信号转导相关实验的空缺,并能够极大地提高学生的实验操作、科研思维等各方面的能力,以及学习的主动性。

## 参考文献 (References)

- [1] 何晓燕,乔磊. 教研融合的细胞生物学实验教学改革与实践

- [J]. 实验室研究与探索(HE X Y, QIAO L. Reform and practice of cell biology experiment teaching with the integration of teaching and research [J]. Research and Exploration in Laboratory), 2023, 42(3): 196-201,268.
- [2] 高润池, 蒋锐达, 王晓燕. 基于科学精神的细胞生物学实验课程思政设计与实践[J]. 中国细胞生物学学报(GAO R C, JIANG R D, WANG X Y. Design and practice of cell biology experiment course based on scientific spirit cultivation of ideology and politics [J]. Chinese Journal of Cell Biology), 2023, 45(8): 1201-7.
- [3] LIU L L, KE Y S, JIANG X, et al. Lipopolysaccharide activates ERK-PARP-1-ReI $\alpha$  pathway and promotes nuclear factor- $\kappa$ B transcription in murine macrophages [J]. Human Immunol, 2012, 73(5): 439-47.
- [4] 范仕郡, 刘鑫, 黄敏, 等. 小鼠腹腔巨噬细胞的快速提取及培养[J]. 局解手术学杂志(FAN Z J, LIU X, HUANG M, et al. Establishment of a rapid method for the isolation of murine peritoneal macrophages [J]. Journal of Regional Anatomy and Operative Surgery), 2015, 24(2): 130-1.
- [5] 李丹, 任亚娜, 范华焯. 巨噬细胞的分类及其调节性功能的差异[J]. 生命科学(LI D, REN Y N, FAN H Y. Macrophages classification and the difference of their regulatory function [J]. Chinese Bulletin of Life Sciences), 2011, 23(3): 249-53.
- [6] 赵阳, 赵勇. 单核-巨噬细胞起源及发育分化的特征与分子调控[J]. 中国免疫学杂志(ZHAO Y, ZHAO Y. Characterization and molecular regulation of monocyte-macrophage origin and developmental differentiation [J]. Chinese Journal of Immunology), 2014, 30(1): 126-32.
- [7] 王艳玲, 李哲, 付海英. 免疫学实验教学中小鼠腹腔巨噬细胞化学染色实验方案改革的探索[J]. 中国免疫学杂志(WANG Y L, LI Z, FU H Y. Exploration on reform of mouse peritoneal macrophage immunocytochemical staining in immunology practice teaching [J]. Chinese Journal of Immunology), 2019, 35(8): 989-91.
- [8] SINGH H, SEN R, BALTIMORE D, et al. A nuclear factor that binds to a conserved sequence motif in transcriptional control elements of immunoglobulin genes [J]. Nature, 1986, 319(6049): 154-8.
- [9] 李立斌, 况铧. IKK/NF- $\kappa$ B信号转导通路与危重病[J]. 国际麻醉学与复苏杂志(LI L B, KUANG X. IKK/NF- $\kappa$ B signaling pathway and critical illnesses [J]. International Journal of Anesthesiology and Resuscitation), 2004, 25(6): 331-3.
- [10] 龚建苗, 陈庆森, 阎亚丽. 生物活性肽调节NF- $\kappa$ B信号通路的研究进展[J]. 食品科学(GONG J M, CHEN Q S, YAN Y L. Research progress in immune regulation of bioactive peptides on NF- $\kappa$ B [J]. Food Science), 2013, 34(21): 379-88.
- [11] 张萍, 秦敏君, 郑有丽, 等. 以能力培养为导向的细胞生物学实验课程思政建设[J]. 实验室研究与探索(ZHANG P, QIN M J, ZHENG Y L, et al. Curriculum ideological and political education construction in cell biology experimental course oriented by ability cultivating [J]. Research and Exploration in Laboratory), 2023, 42(2): 226-30.