

教学研究

设计性细胞生物学实验探索—— 肿瘤细胞的耐药性分析

蔡燕飞 陈蕴 史劲松 金坚*

(江南大学药学院, 无锡 214122)

摘要 肿瘤多药耐药是临床上肿瘤化疗失败的主要原因, 国内外对多药耐药机制的研究已有多年历史。肿瘤细胞的耐药性状分析是研究耐药机制的基础工作, 其实验思路和方法多样且较为成熟。该实验教学改革项目以“肿瘤细胞的耐药性分析”为主旨设计细胞生物学实验项目, 通过全开放式的实验教学模式激发学生从细胞形态学、药物敏感性、耐药相关蛋白表达及功能等各方面, 对野生型人乳腺癌MCF-7/WT细胞和耐阿霉素人乳腺癌MCF-7/ADM细胞的耐药性进行分析。学生以小组为单位进行自主调研并设计实验方案, 在开放的本科实验教学平台开展实验, 最后通过多样化的考核模式进行实验总结与评价。该文通过具体实施例进行实验结果展示, 并从整体的方案设计、结果统计和课后满意度调查三方面进行实践总结和反思。该实验教学项目整体内容成熟、安全、稳定, 具有一定的创新性、实用性和可操作性, 对于培养学生的主动性和创造性, 提高学生的综合实验能力具有重要的作用。

关键词 细胞生物学; 设计性实验; 肿瘤耐药

Exploration of the Designed Experiment of Cell Biology — Drug Resistance Analysis of Tumor Cells

CAI Yanfei, CHEN Yun, SHI Jinsong, JIN Jian*

(School of Pharmaceutical Sciences, Jiangnan University, Wuxi 214122)

Abstract Multi-drug resistance is the main reason for the failure of tumor chemotherapy in clinic, and its mechanism has been studied for many years. Drug resistance analysis of tumor cells is the basic work to study the mechanism of drug resistance. Its experimental ideas and methods are diverse and mature. During the open experimental teaching mode, students are encouraged to analyze the drug resistance of wild-type human breast cancer MCF-7/WT cells and adriamycin-resistant human breast cancer MCF-7/ADM cells from the aspects of cell morphology, drug sensitivity and expression of drug-resistant related proteins. First, students conduct independent research and design experimental programs in groups, then practice in the open undergraduate experimental teaching platform, finally summarize and evaluate experiments through diversified assessment modes.

收稿日期: 2019-10-21 接受日期: 2019-12-16

江南大学实验室管理专项(批准号: JDSYS201910)和江南大学重点教学改革项目(批准号: JG2017032)资助的课题

*通讯作者。Tel: 13706196319, E-mail: jinjian31@163.com

Received: October 21, 2019 Accepted: December 16, 2019

This work was supported by the Laboratory Management Project of Jiangnan University (Grant No.DSYS201910) and the Key Teaching Reform Project of Jiangnan University (Grant No.JG2017032)

*Corresponding author. Tel: +86-13706196319, E-mail: jinjian31@163.com

URL: <http://www.cjcb.org/arts.asp?id=5228>

This paper presents the results through a specific embodiment, and makes a practical summary and reflection from the three aspects of overall scheme design, result statistics and after-class satisfaction survey. The whole experimental system is mature, safe and stable, with certain innovation, practicability and operability, which plays an important role in cultivating students' initiative and creativity, improving their comprehensive experimental ability.

Keywords Cell Biology; designing experiment; drug resistance of tumor

细胞生物学是现代生命科学的基础和前沿学科,在整个生命科学的教育环节中占据着重要的地位^[1]。细胞生物学实验课程是理论课程的实践和补充,其实验内容主要分为基础性实验和设计性实验。基础性实验注重理论知识的进一步理解和验证,一般通过传统的教与学的授课方式进行教学,实验内容基础,方法简单,创新性和设计性内容不多;设计性实验是具有探索性和创造性的实验,一般采取半开放或全开放方式进行教学,半开放式教学一般指教师提前设计好实验的主要思路和方法,学生在教师的指导下,进行实验的进一步细化和延伸。全开放式教学是指教师只给定实验题目,学生以小组为单位自行调研并设计实验思路和具体方案,在规定的时间内,在全开放式的实验场所完成实验。通过设计性实验充分发挥学生的主动性和创造性,激发学生对科学的求知欲和探索欲,是高等教育新形势下最可行且有效的教学形式^[2-5]。

肿瘤多药耐药是临床上肿瘤化疗失败的最主要原因,细胞本身是一个复杂的有机整体,肿瘤细胞耐药性状的产生是多因素、多环节、多基因参与的复杂过程,目前国内外对于耐药机理的研究工作也在不断推进^[6-8]。对肿瘤细胞耐药性状的分析是研究肿瘤耐药机理的基础工作,其研究方法已较为成熟,适合作为药学类专业本科生设计性细胞生物学实验项目。该实验项目通过全开放式的教学形式,以“肿瘤细胞的耐药性分析”为主旨,以野生型人乳腺癌细胞MCF-7/WT和耐阿霉素(adrimycin, ADM)人乳腺癌细胞MCF-7/ADM为实验材料,学生通过文献调研,并根据相应的硬件开放条件,自行设计整个实验思路,制定详细的实验方案,从而分析两株细胞的耐药性状差异。

1 课程实施过程

1.1 课前

该实验项目面向制药工程专业全体大学三年

级学生开设。由于实验的特殊性,该课程的开展需要连续2周的时间,因此开课时间一般选在大三下学期末。在正式开课前2~3周,学生按照每组4~5人分组,教师给定研究题目和背景,各小组开展自主调研活动,学生可通过图书馆、网络、研究室等多方面调研,设计实验思路并构建整体框架。此时学生和教师开展一次讨论会,根据实验的可行性以及实验材料和设备设施的配备情况,从而明确整体实验方案。然后各小组制定详细的实验细则,包括实验材料、实验步骤、时间安排和人员分配等,经多次组内讨论最终确定细则,开出实验材料清单并提交给指导教师。

1.2 课上

学生按照实验方案正式开展实验。该实验项目的实验课时为2周,为确保实验安全性,规定学生的实验时间必须为每天8:00~20:00,教师采用轮班制的方式全程陪同指导实验过程。实验课期间江南大学药学院1~2楼的本科实验教学平台全面开放,本实验平台配备有标准的哺乳动物细胞培养室及相配套的细胞培养设备,以及凝胶成像系统、多功能酶标仪、流式细胞仪、荧光倒置显微镜、共聚焦显微镜等大型分析仪器,具备开展设计性细胞生物学相关实验的硬件条件。该实验开展过程中,学生组内人员需要分工明确,相互配合,实验过程中做好实验记录,及时总结和统计,才能在规定的时间内完成实验内容。其间学生除了在上课过程中可与老师或学生开展讨论以外,也可通过微信讨论群进行提问或探讨。

1.3 课后

学生以小组为单位进行数据统计,并撰写实验报告。实验报告内容需包括实验目的、实验原理、实验步骤、实验结果和实验讨论五部分。同时制作实验小结PPT,以展示实验方案和实验结果。

该实验项目的考核内容包括:课前方案制定、课上表现、课后实验报告以及答辩PPT四大部分。其中实验方案制定占20%,体现在实验方案的合理性、可行性和创新性;课上表现占30%,体现在学生

的实验操作动手能力、相互协作能力、分析和解决问题的能力; 课后实验报告占25%, 体现在实验报告的完整性、内容的合理性、实验结果的可靠性和真实性; 答辩PPT占25%, 体现在PPT制作和答辩能力。

2 具体实施例

2018~2019学年第二学期, 该实验项目面向我院制药工程专业学生第一次开放。以其中一组作为实施例进行阐述。

2.1 实验方案

根据教师给出的研究题目和相关背景知识, 学生首先走进图书馆, 查阅了近年来出版的细胞生物学、药理学、免疫学等相关实验手册, 结合理论基础知识了解相关实验方法。然后通过网络查阅与肿瘤多药耐药相关的研究内容, 总结研究肿瘤耐药性

的实验方法并确定实验框架。最后学生还走进了药物设计与分子药理学研究室, 通过与研究生的经验交流进一步完善实验方案。经过多次讨论会, 最终确定实验方案和实施细则。

实验整体框架如图1所示。首先通过倒置显微镜观察两株细胞的形态差异, 然后通过MTT法检测耐药细胞的耐药指数, 同时运用ADM具有自发荧光的特点, 通过激光共聚焦显微镜观察ADM在两种细胞中的分布情况, 最后通过Western blot法检测经典耐药相关蛋白P糖蛋白(P-glycoprotein, P-gp)在两种细胞中的表达差异^[9-10]。

实验的具体时间安排如表1所示。第1~5天主要开展细胞培养和传代的相关实验, 从第6天开始实施药敏性检测、药物分布情况检测及耐药相关蛋白表达的检测, 整体实验时间安排紧凑合理, 其间有空

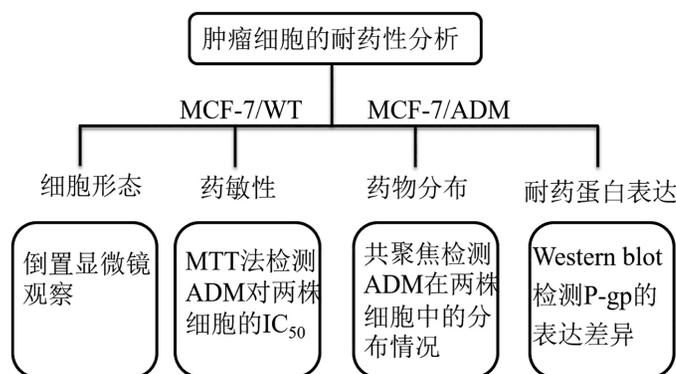


图1 研究框架

Fig.1 Research framework

表1 实验时间安排表

Table 1 Experiment schedule

时间 Time	实验内容 Experiment content
Day 1	(1)细胞培养相关耗材准备与灭菌 (2)细胞培养相关培养基配置
Day 2	(1)细胞复苏
Day 3	(1)细胞观察与换液
Day 4	(1)倒置显微镜观察并拍照 (2)细胞传代
Day 5	(1)细胞观察
Day 6	(1)一瓶细胞铺96孔板 (2)一瓶细胞铺激光共聚焦小皿, 4 h后加药
Day 7	(1)96孔板细胞换液并加药 (2)共聚焦显微观察并拍照
Day 8	(1)收集细胞, 蛋白电泳及转膜
Day 9	(1)加MTT, 4 h后溶解并在酶标仪上检测 (2)抗体孵育并显色
Day 10-14	(1)补充实验并总结

余时间用于实验数据整理、分析和讨论, 如果一次实验失败, 最后也有空余时间用于重复实验。

2.2 实验材料步骤

2.2.1 实验材料 ADM购自浙江海正药业股份有限公司; DMEM培养液和FBS均购自Gibco公司; 胰蛋白酶、抗生素和全细胞蛋白裂解液均购自上海碧云天生物技术有限公司; MTT染色液和DMSO溶液均购自Sigma公司; P-gp单克隆抗体及相应的二抗均购自Abcam公司。

实验涉及的仪器设备主要包括二氧化碳箱、倒置显微镜、蛋白电泳系统、转印系统、凝胶成像系统、酶标仪、激光共聚焦显微镜等。

2.2.2 主要实验步骤 (1)MTT法检测药敏性。消化收集MCF-7/WT和MCF-7/ADM细胞, 按照7 000个/孔分别铺96孔板, 培养过夜后加不同浓度的ADM, 每个浓度设置4个复孔, 同时设置空白对照和阴性对照, 培养48 h后换不含药物的培养液, 每孔加入5 mg/mL MTT, 置于37 °C培养箱孵育4 h, 弃培养上清后每孔加入150 μ L DMSO, 待结晶完全溶解后于490 nm波长处测吸光度值。以 $\log C_{\text{药物浓度}}$ 为横坐标, 细胞抑制率为纵坐标绘制细胞生长曲线。

(2)激光共聚焦检测药物分布特征。消化收集MCF-7/WT和MCF-7/ADM细胞, 按照200个/孔分别铺于共聚焦小皿, 培养6 h后在MCF-7/WT细胞中加入终浓度为0.05 μ mol/L的ADM, 在MCF-7/ADM细胞中加入终浓度为5.00 μ mol/L的ADM, 培养过夜。将共聚焦小皿中的药物溶液换成新鲜的培养基, 置激光共聚焦显微镜下观察并拍照。

(3)Western blot法检测耐药相关蛋白的表达情况。收集 1.0×10^6 个细胞, 用全细胞裂解液裂解, 蛋白

定量后进行SDS-PAGE, 转膜并用脱脂奶粉封闭后, P-gp一抗室温孵育1 h, TBST清洗后用二抗室温孵育1 h, 最后通过ECL显色并成像。

2.3 实验结果

2.3.1 细胞形态学观察 细胞形态是细胞的最基础特征, 可通过最基础的显微观察法进行观察。在10倍倒置显微镜下观察两株细胞, 实验结果如图2所示。MCF-7/WT细胞主要呈梭形, 细胞饱满, 立体感强, 细胞成簇生长。MCF-7/ADM细胞部分呈梭形, 部分形态不完整, 细胞立体感差, 无光泽, 并分散生长。虽然MCF-7/ADM细胞起源于MCF-7/WT细胞, 但在经过药物长期诱导后, 其细胞形态产生了较大的变化。

2.3.2 药物敏感性检测 体外肿瘤细胞的药物敏感性实验是评价、筛选和研发抗肿瘤药物的重要途径。将不同的药物浓度作用于体外培养的肿瘤细胞, 随后检测细胞的存活率从而判断药物的作用强度, 或者说是细胞对于药物的敏感性。MTT法用于检测体外细胞活性的最传统也是最经典的实验方法, 其主要原理是活细胞线粒体中的琥珀酸脱氢酶能将外源性MTT还原为水不溶性的蓝紫色结晶甲瓚, 经DMSO溶解后在490 nm波长处测定其吸光度值, 可间接反映活细胞数量。通过MTT法检测MCF-7/WT和MCF-7/ADM对化疗药ADM的敏感性, 结果如图3所示。以ADM的药物浓度为横坐标, 对细胞的抑制百分率为纵坐标绘制曲线, 与野生型MCF-7/WT细胞相比, 耐药型MCF-7/ADM细胞曲线明显右移, 经计算, ADM对MCF-7/WT细胞的 IC_{50} 为0.2 μ mol/L, 对MCF-7/ADM细胞的 IC_{50} 为45 μ mol/L, MCF-7/ADM细胞的耐药指数为225, 该实验结果表明, MCF-7/

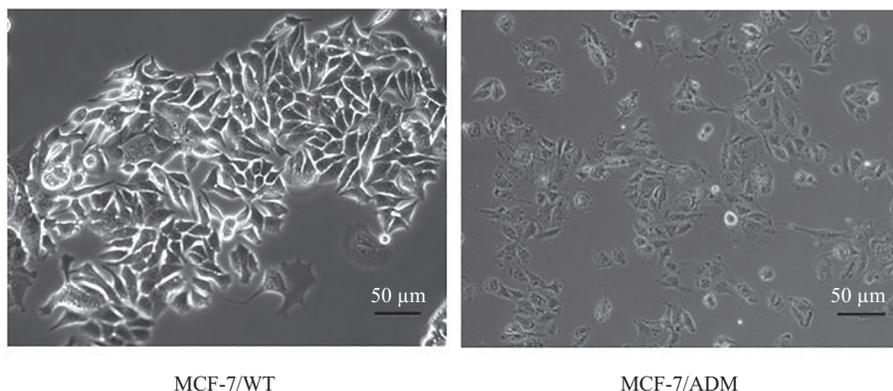


图2 人乳腺癌MCF-7/WT和MCF-7/ADM细胞形态观察

Fig.2 Morphological observation of the human breast cancer MCF-7/WT and MCF-7/ADM cells

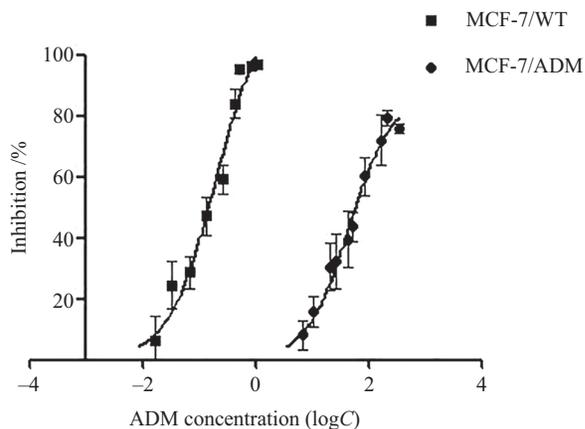


图3 人乳腺癌MCF-7细胞对ADM的药敏性检测

Fig.3 Drug sensitivity of human breast cancer MCF-7 cells to ADM

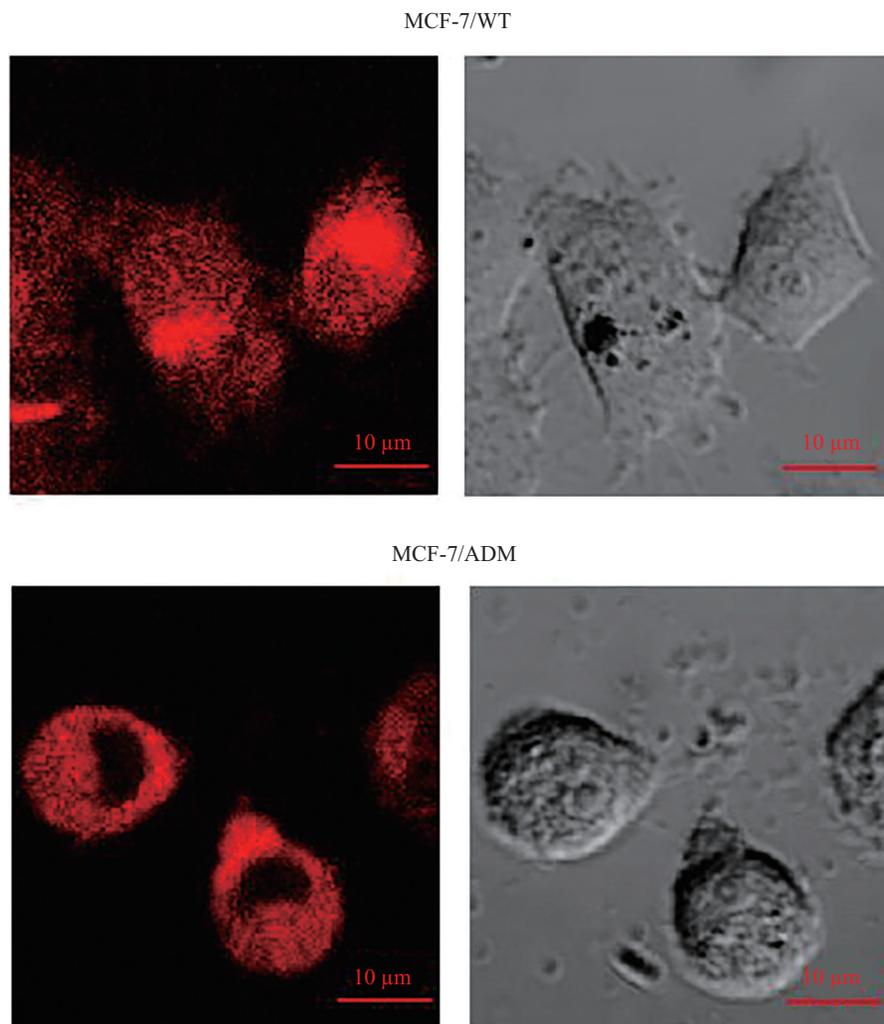


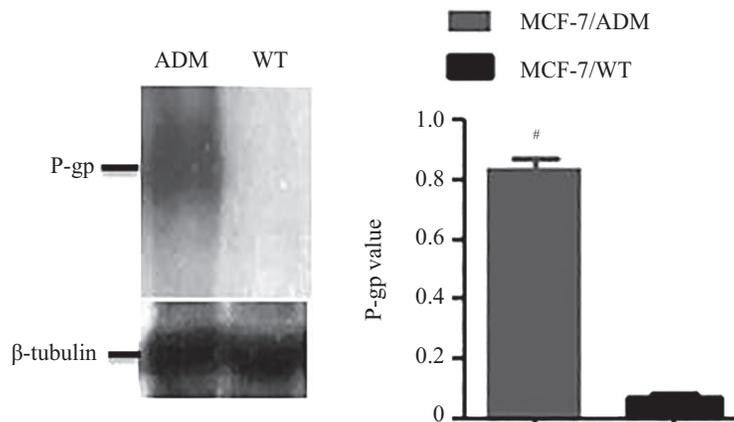
图4 ADM在人乳腺癌MCF-7细胞中的分布情况检测

Fig.4 ADM distribution in human breast cancer MCF-7 cells

ADM细胞具有较强的耐药性。

2.3.3 药物分布情况检测 ADM是一种具有自发荧光的抗肿瘤药物,可通过与RNA和DNA相互作用从而抑制两者的合成,从而杀灭肿瘤细胞。ADM自

发荧光由波长为488 nm(青绿色)激光激发产生,发射光波长为591 nm(红色)。结果如图4所示,运用激光共聚焦显微镜观察ADM在MCF-7/WT和MCF-7/ADM细胞中的分布特征。图中左边为在488 nm激发光下,



[#] $P < 0.05$, 与MCF-7/WT组比较。

[#] $P < 0.05$ vs MCF-7/WT group.

图5 Western blot检测P-gp的表达情况

Fig.5 Detection the expression of P-gp by Western blot

ADM在两种细胞中的分布情况,右边为在可见光下的细胞图片。图中显示在野生型MCF-7/WT细胞中,ADM在胞质和胞核中均有分布,在胞核中较为浓聚,而在耐药型MCF-7/ADM细胞中,ADM主要分布在胞质中,胞核中几乎没有ADM存在,该结果可以解释药物对耐药细胞的杀伤力减弱的原因。

2.3.4 耐药相关蛋白的表达情况 耐药相关蛋白的表达是介导肿瘤耐药的重要机制之一,ABC(ATP binding cassette family)超家族跨膜转运蛋白是研究最早也是最经典的耐药相关蛋白,包括P-gp、多药耐药相关蛋白(multidrug resistance-related protein, MRP)、肺耐药蛋白(lung resistance protein, LRP)、乳腺癌耐药蛋白(breast cancer resistance protein, BCRP)等,这些蛋白的高表达均与肿瘤耐药呈正相关。通过Western blot法检测MCF-7/WT和MCF-7/ADM细胞中P-gp的表达情况,结果如图5所示。MCF-7/WT细胞几乎不表达P-gp蛋白,而在MCF-7/ADM细胞中P-gp蛋白呈高表达,两者具有显著性差异,该结果进一步证实了MCF-7/ADM具有耐药性。

3 实践总结

3.1 实验方案总结

该实验项目实施过程中,学生按照每组4~5人分组,共20组,分3轮授课。对该年度学生的整体实验情况进行统计分析。首先学生通过文献调研及走访调研,进行了实验方案设计,并在老师的指导下确定了最终的实验方案。结果如图6所示。图6展示了

具有代表性的4组学生的设计方案,从该4组方案中可以看出,每组均考虑到了通过观察细胞形态、检测细胞对药物的耐药性以及检测耐药相关蛋白的表达情况来评价细胞的耐药性状,虽然各组选择的实验方法和难度系数有所差异,如第1、3组选择运用最简单便捷的倒置显微镜观察细胞的形态差异,第2组选择使用激光共聚焦显微镜观察,第4组选择了难度较高的扫描电镜来观察细胞形态,但是实验目的是一致的,能从最基本的细胞形态、药物敏感性及耐药标志物三方面来检测耐药性状。除此以外,部分组别还设计了具有一定创新性的实验内容,如第1组设计了通过激光共聚焦显微镜观察ADM的分布特征,抓住了ADM有自发荧光的特点,通过简单的药物处理细胞后观察药物分布的实验来判断耐药性状;第3组设计了在低营养条件下比较两种细胞的生长差异,体现耐药细胞能耐受极限培养条件的特点^[11];第4组结合近几年的研究热点,设计了通过免疫荧光染色来检测外泌体在两种细胞中的分布差异^[12-13]。

实验方案设计虽然是课前的准备阶段,但是对于整个实验课程的开展至关重要。在此过程中学生的文献调研能力、总结归纳能力和设计创新能力都得到了很大的提升。

3.2 实验结果总结与分析

将各组实验报告中的实验内容、所采用的实验方法、进行相关实验的组数以及对应的实验成功率进行归纳与统计。结果如表2所示。从表中可以看出,大部分组选择采用较为通用的、简单快速的实验方

- 组1 { (1) 倒置显微镜观察细胞形态;
(2) MTT法检测细胞对ADM的耐药性;
(3) 激光共聚焦显微镜观察ADM在细胞中的分布特征;
(4) Western blot 检测耐药相关蛋白P-gp的表达情况
- 组2 { (1) 激光共聚焦显微镜观察细胞形态;
(2) MTT法检测细胞对ADM的耐药性;
(3) 流式细胞仪检测耐药相关蛋白P-gp的表达情况
- 组3 { (1) 倒置显微镜观察细胞形态;
(2) 低血清培养条件下比较野生型和耐药型细胞的生长情况;
(3) MTT法检测细胞对ADM和PTX的耐药性;
(4) Western blot 检测耐药相关蛋白P-gp的表达情况
- 组4 { (1) 扫描电镜观察细胞形态;
(2) MTT法检测细胞对ADM的耐药性;
(3) Western blot 法检测耐药相关蛋白P-gp的表达情况;
(4) 免疫荧光染色检测外泌体在野生型和耐药性细胞中的分布情况

图6 实验方案

Fig.6 Experimental scheme

表2 实验报告统计表

Table 2 Statistical table of experimental reports

实验内容 Experiment content	实验方法 Method	实验组数 Number	实验成功率/% Successful rate /%
细胞形态观察	倒置显微镜观察	11	100
	激光共聚焦观察	3	100
	扫描电镜观察	2	50
	DAPI染色, 倒置荧光显微镜观察	3	100
	HE染色, 倒置显微镜观察	1	100
细胞药敏性检测	MTT法检测细胞对ADM的敏感性	8	75
	MTT法检测细胞对ADM和PTX的敏感性	2	100
	结晶紫染色法检测细胞对ADM的敏感性	4	50
	CCK8法检测细胞对ADM的敏感性	6	83
耐药标志物检测	Western blot法检测P-gp的表达情况	15	80
	免疫荧光染色, 流式检测P-gp的表达情况	3	33
	免疫荧光染色, 共聚焦检测P-gp的表达情况	2	100
药物分布检测	共聚焦显微镜观察ADM在细胞中的分布	6	83
	倒置荧光显微镜观察ADM在细胞中的分布	2	100
细胞生长情况	低血清培养条件下, MTT法检测野生型和耐药型细胞的生长情况	2	100
外泌体分布情况检测	免疫荧光染色, 共聚焦显微镜检测外泌体在细胞中的分布情况	2	50

法进行研究。例如, 通过倒置显微镜或激光共聚焦显微镜观察细胞形态; 运用经典的MTT法和Western blot法检测细胞的药敏性和耐药标志物等。这一类实验的成功率较高, 基本都在75%以上, 部分实验失败的原因在于培养的细胞状态太差、药物梯度设计存在问题或计算错误等; 有少数组别设计了难度系数相对较高的实验方法, 如运用扫描电镜观察细胞形态、运

用流式细胞技术检测耐药标志物的表达情况等, 该类实验的成功率较低, 为30%~50%, 样本制作步骤繁琐、仪器设备操作难度系数偏大是导致此类实验失败率较高的主要原因; 还有部分组别设计了一些较为新颖的实验内容和方法, 如运用ADM自发荧光的特点, 设计了通过共聚焦显微镜观察药物的分布特点; 根据耐药细胞能耐受极限培养条件的特点, 设计了运

用MTT法检测细胞在低营养条件下的生长情况等,这些实验的难度系数不同,实验的成功概率也有所差异。

3.3 课后满意度调查

课程结束后,以网络电子问卷的形式对该年度上课学生进行了课程满意度调查,调查内容主要包括:(1)课程的设计和课程内容;(2)教学模式及考核方式;(3)实验平台的软硬件配置及师资配备;(4)校园图书及网络资源;(5)课程对于学生个人能力的培养,包括专业实验能力、发现并解决问题的能力、团队协作能力、创新能力、个人表达及交流能力等;(6)课程对于专业认知及学科前沿水平的提升效果。调查表的统计结果如表3所示。结果显示:学生对于课程的设计及课程研究的内容满意度最高,99%的学生认为很满意或满意;对于实验平台建设、学生各项能力及对专业认知及学科前沿水平的提升方面,有90%以上的学生都认为很满意或满意;对于教学模式及考核方式、师资队伍、校园图书及网络资源,有80%以上的学生认为很满意或满意。从整体调研的结果可以看出,学生对于该课程的满意度相对较高,表明新型的课程设计及教学模式、开放的教学资源是培养现代化创新型专业人才的必要途径。

当然,从调研结果也可以看出,在课程的教学模式、考核方式、师资配备、公共图书网络资源等各方面还有待进一步完善和提升,在接下来的教

学实践过程中,可以通过以下几方面进行持续改进:(1)优化教学模式。全开放的教学模式能激发学生的学习潜能,提升学生的创新意识,但对于本科生来说,实际的动手实践基础能力欠缺,单一地通过理论知识调研还无法更好地发挥学生的潜能,如果在当前的教学模式中添加一些虚拟的实践操作学习,能更好地指导后续的实践操作,同时也减轻了指导教师在实验操作管理方面的负担,并提高实验成功的概率;(2)完善考核模式。当前的考核内容包括课前方案制定、课上表现、课后实验报告以及答辩PPT四大部分,内容覆盖面已经较为广泛,但在实施过程中仍然会存在一些漏洞,从而导致考核结果不够公正,无法突出拔尖学生的情况。如实验报告和答辩PPT都是以小组为单位提交,无法体现不同学生的不同贡献,部分学生存在“浑水摸鱼”的情况。为避免此类情况发生,可进一步调整分数比例,降低公共部分分数比例,突出学生个人理念和观点;(3)优化师资队伍。与一般单项实验课程相比,本实验课程的老师需要付出更多,无论是课前的实验准备、课上的指导以及课后的总结与讨论,老师都需要花费更多的时间和精力。同时由于开放性课程的特殊性,指导老师的专业方向需要更加广泛。因此在后期的实践过程中需要进一步优化师资团队;(4)加大公共图书网络资源开放。定期汇总无法获取的图书或网络信息,通过学院向学校图书馆提交申请,逐步完善公共资源开放。

表3 课程满意度调查汇总表

Table 3 Summary table of course satisfaction survey

评价内容 Evaluation content	满意度 Satisfaction degree				
	很满意 Very satisfied	满意 Satisfied	一般 OK	较差 Bad	
课程设计和内容	82%	17%	1%	0	
开放式教学模式	79%	8%	13%	0	
课程考核方式	68%	19%	12%	1%	
实验平台	81%	11%	8%	0	
师资	67%	13%	18%	2%	
学校图书、网络资源	42%	35%	5%	8%	
专业实验技能获得提升	59%	31%	9%	1%	
实验过程中发现问题、解决问题的能力获得提升	61%	48%	2%	0	
团队协作能力、创新能力获得提升	70%	26%	3%	1%	
个人的表达能力和交流能力获得提升	58%	38%	2%	2%	
深入了对专业知识的认知,加强了对于科学前沿的探索欲望	51%	40%	9%	0	

4 讨论

开放型的设计性实验最大的特点即没有固定的实验思路和实验方法, 不同组别的学生围绕同一个研究主题, 通过自行调研, 设计出不同的实验方案。在此过程中, 研究主题的选择至关重要, 选题需要具备内容前沿、方法成熟、技术多样化等特点。本实验设计的选题“肿瘤细胞的耐药性分析”均符合这些特点, 肿瘤多药耐药研究是目前国内外研究的热点, 肿瘤细胞的耐药性分析方法众多, 技术也较为成熟, 以最常用的形态学分析方法为例, 本文中运用最简单的在可见光下观察野生型细胞与耐药型细胞的形态差异, 除此以外也可以通过一些染色方法更加细微地观察细胞的整体形态和内部结构。如通过苏木精-伊红染色, 使细胞核内的染色质与胞质内的核酸着紫蓝色, 使细胞质和细胞外基质中的成分着红色, 从而更清晰地观察细胞形态差异; 也可通过荧光染料DAPI染色, DAPI能快速进入细胞中并与DNA结合发射蓝光, 在荧光显微镜下可更加细致地观察细胞和细胞核结构; 更深入的可以通过扫描电镜或透射电镜更加细微地观察细胞表面结构及细胞内部的细胞器结构差异等。通过不同的形态学分析方法检测两种细胞在形态学上的差异, 符合开放型设计性的理念。

除了选题, 教学平台建设也是开展此类实验至关重要的因素, 平台设备的专业性、多样性、先进性是开设开放型设计性实验的根本条件, 任何因素的缺乏都是导致课程质量下降的重要原因。本实验平台配备有标准的哺乳动物细胞培养室及相配套的细胞培养设备, 以及多功能酶标仪、流式细胞仪、激光共聚焦显微镜等大型分析仪器, 目前具备开展设计性细胞生物学相关实验的硬件条件。当然, 仪器设备的发展创新日新月异, 任何一个实验平台都需要紧跟科学发展时代的潮流, 不断更新硬件条件, 其科学研究才能跟上发展的脚步。

无论是传统的教学模式还是开放式的教学模式, 教师始终是课堂的引领者。教师的综合水平是提升课程质量的关键因素。在开放型的设计性实验课堂中, 教师需要具备跨学科的专业知识储备, 了解学科发展前沿, 运用科学的教学模式, 才能整体把握课程的进展。由于课程的特殊性, 教师间还需要相互协作, 投入更多的时间和精力才能完成课程的教授。教师需要通过经验交流、专业培训等方式不断提升整体教学水平。

参考文献 (References)

- [1] 朱海英, 晔晓渊, 苏娟, 等. 基于“平台”理念, 打造实用型课程——谈研究生“细胞生物学大实验”课程建设[J]. 中国细胞生物学学报(ZHU H Y, ZI X Y, SU J, et al. Establishment of practical course based on the concept of platform—a new comprehensive course for graduate student training, great experiment of cell biology [J]. Chinese Journal of Cell Biology), 2014, 36(1): 149-52.
- [2] 侯元, 霍德胜, 刘永茂. 细胞生物学创新实验设计——精子细胞学分析[J]. 实验室研究与探索(HOU Y, HUO D S, LIU Y M. Experiment design for innovation of cell biology—an analysis of sperm cytology [J]. Research and Exploration in Laboratory), 2013, 32(8): 102-4.
- [3] 薛雅蓉, 刘常宏. 细胞生物学“半开放设计性实验”教学的意义与实验方法[J]. 实验技术与管理(XUE Y R, LIU C H. Teaching significance and implementation ways of “half-open-designed experiments” in cell biology [J]. Experimental Technology and Management), 2013, 30(8): 167-70.
- [4] 于威, 全滢平, 吴月红, 等. 细胞生物学实验开放式教学模式实践研究[J]. 高校生物学教学研究(YU W, QUAN Y P, WU Y H, et al. Practice of open teaching model in experiment course of cell biology [J]. Biology Teaching in University), 2018, 8(2): 55-9.
- [5] 董秀, 王淳, 王梅, 等. 细胞生物学实验课创新能力培养的实践与思考[J]. 基础医学教育(DONG X, WANG C, WANG M, et al. Practice and thinking on the cultivation of innovative ability in experiment of cell biology [J]. Basic Medical Education), 2018, 20(11): 979-80.
- [6] BAGULEY B C. Multiple drug resistance mechanisms in cancer [J]. Mol Biotechnol, 2010, 46(3): 308-16.
- [7] KOZOVSKA Z, GABRISOVA V, KUCEROVA L. Colon cancer: cancer stem cells markers, drug resistance and treatment [J]. Biomed Pharmacother, 2014, 68(8): 911-6.
- [8] ALEKSAXHINA S N, KASHYAP A, IMYANITOV E N. Mechanisms of acquired tumor drug resistance [J]. Biochim Biophys Acta Rev Cancer, 2019, 1872(2): 188310.
- [9] MA X, CAI Y, HE D, et al. Transient receptor potential channel TRPC5 is essential for P-glycoprotein induction in drug-resistant cancer cells [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2012, 109(40): 16282-7.
- [10] ZHANG P, LIU X, LI H, et al. TRPC5-induced autophagy promotes drug resistance in breast carcinoma via CaMKK β /AMPK α /mTOR pathway [J]. Sci Rep, 2017, 7(1): 3158.
- [11] 蔡燕飞, 马鑫, 张鹏, 等. 营养胁迫条件与耐药乳腺癌细胞生长优势的相关性研究[J]. 中国细胞生物学学报(CAI Y F, MA X, ZHANG P, et al. The study in correlation between nutrient stress and growth advantage of drug resistance cancer cells [J]. Chinese Journal of Cell Biology), 2017, 39(9): 1173-7.
- [12] ZHANG F F, ZHU Y F, ZHAO Q N, et al. Microvesicles mediate transfer of P-glycoprotein to paclitaxel-sensitive A2780 human ovarian cancer cells, conferring paclitaxel-resistance [J]. Eur J Pharmacol, 2014, 738: 83-90.
- [13] DONG Y, PAN Q, JIANG L, et al. Tumor endothelial expression of P-glycoprotein upon microvesicular transfer of TrpC5 derived from adriamycin-resistant breast cancer cells [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2014, 446(1): 85-90.