

教学研究

细胞分化模型在细胞生物学实验教学中的应用与实践

赵颖岚 贾方兴 宋亚坤 余春红 生悦*

(南方科技大学, 深圳 518055)

摘要 生命活动包括细胞分化、生长、衰老、死亡等一系列变化, 是一个连续发展的过程, 而在当前的细胞生物学实验教学中, 针对独立、单个知识点的实验设计仍占多数, 这不利于学生系统、有机地理解生命现象。该研究以U-937细胞分化过程为对象, 设计了3个相互联系的实验, 分别为: (1)分化对细胞形态影响的观察; (2)分化对细胞周期影响的观察; (3)分化对细胞吞噬功能影响的观察。通过对实验结果的观察, 学生发现分化后, (1)细胞由悬浮生长转变为贴壁生长, 细胞形态由圆形变为不规则多边形, 并伸出伪足; (2)细胞周期则会发生G₁/S期阻滞, 停留在G₁期; (3)分化后的细胞对细菌的吞噬能力明显增强。该教学设计巧妙地将3个知识点有机整合在一起, 旨在通过细胞分化这一生命现象, 让学生深入理解细胞在发育成熟过程中形态学、分裂增殖及吞噬功能的变化, 帮助学生充分理解生命活动是动态发展这一本质, 且能很好地培养学生全面思考、分析及解决问题的能力, 进而提升学生对教学实验的兴趣, 发挥学习的主观能动性。

关键词 细胞分化; U-937; 细胞形态变化; 细胞周期; 细胞吞噬; 细胞生物学实验教学

The Application and Practice of Cell Differentiation Model in Cell Biology Experiment Teaching

ZHAO Yinglan, JIA Fangxing, SONG Yakun, YU Chunhong, SHENG Yue*

(Southern University of Science and Technology, Shenzhen 518055, China)

Abstract Life activities include a series of changes such as cell differentiation, growing, aging and death of cell. It is a continuous process of development. At present, in the experimental teaching of cell biology, experimental designs for independent and single knowledge points are still in the majority, which is not conducive to students' systematic and organic understanding of life phenomena. In this study, three interrelated experiments were designed to study the differentiation process of U-937 cells: (1) observation of the effect of differentiation on cell morphology; (2) observation of the effect of differentiation on cell cycle; (3) observation of the effect of differentiation on cell phagocytosis. Through the observation of the experimental results, students will find that after differentiation: (1) cell growth changes from suspension to adherence, cell morphology change from circular to ir-

收稿日期: 2019-06-18

接受日期: 2019-11-06

深圳市教育科学规划课题(批准号: ybfz17007)、广东省实验教学示范中心建设项目(批准号: SJZLGC201701)、深圳市科技计划项目(批准号: JCYJ20170817110213252)和南方科技大学教学改革项目(批准号: XJJG201902)资助的课题

*通讯作者。Tel: 0755-88010750, E-mail: shengy@sustech.edu.cn

Received: June 18, 2019

Accepted: November 6, 2019

This work was supported by Shenzhen Education Science Planning Project (Grant No.ybfz17007), Guangdong Experimental Teaching Demonstration Center Construction Project (Grant No.SJZLGC201701), Shenzhen Science and Technology Plan Project (Grant No.JCYJ20170817110213252) and the Southern University of Science and Technology Teaching Reform Project (Grant No.XJJG201902)

*Corresponding author. Tel: 86-755-88010750, E-mail: shengy@sustech.edu.cn

URL: <http://www.cjcb.org/arts.asp?id=5184>

regular polygon, with extended pseudopodia; (2) cell cycle arrest occurs in G_1/S phase, staying in G_1 phase; (3) the phagocytosis ability of differentiated cells to bacteria is significantly enhanced. The purpose of this teaching design is to enable students to deeply understand the changes of morphology, division, proliferation and phagocytosis of cells in the process of development. It integrates the three knowledge points skillfully, so as to help students fully understand the essence that life is a dynamic process of development. In the process, it can cultivate students' ability to think, analyze and solve problems in an all-round way, enhancing students' interest in teaching experiments, and motivate their subjective initiative.

Keywords cell differentiation; U-937; cellular morphology change; cell cycle; phagocytosis; experimental teaching of cell biology

细胞是生命体的基本构成单位,对细胞结构、功能的研究对于揭示生命活动的机理具有重要的作用。《细胞生物学实验》作为生命科学、医学等专业的基础课,具有极强的实践性,能锻炼学生的动手能力,培养学生的科研思维。以往本科《细胞生物学实验》教学内容主要是通过单个的实验项目,着重于单一知识点的实验设计,不同实验设计间缺乏有机联系,不利于学生全面、深入地理解生命活动。

生命活动具有连续性,对于哺乳动物,如人类来说,人体是由一个受精卵细胞发育而来的,过程中所涉及的细胞活动包括细胞增殖、分化、衰老、死亡等。因此,寻找到一个合适的模型,设计一系列有机联系的实验项目,让学生能体会到生命活动发展规律,对于培养学生的学习兴趣及科研思维具有重要的作用。笔者首次将U-937细胞分化模型引入到本科《细胞生物学实验》教学中,设计出3个有机联系且逐步递进的实验项目(图1),让学生能从细胞形态观察入手,逐步了解细胞在分化过程中的形态、细胞周期、吞噬功能等的动态变化。

U-937细胞为人组织细胞淋巴瘤细胞,于1976

年建立,取材于患组织细胞淋巴瘤病人的胸水。该细胞系是生物安全1级细胞(ATCC)^[1],属于单核细胞系,具有悬浮生长的特性,在体外培养时,能在不同条件的刺激下分化成多种不同类型的巨噬细胞或树突状细胞^[2-6]。U-937作为癌细胞系中的一员,具有无限繁殖的特征,易于在体外培养,且诱导分化过程简单,因此U-937细胞适用于本科实验教学材料,通过该细胞在分化过程中的形态及功能的改变,帮助学生认识生命活动的动态变化。

1 实验原理

利用U-937细胞为模型,通过一系列有机结合的实验项目研究细胞分化过程中的形态、细胞周期等的动态变化。从细胞形态观察入手,观察分化对细胞形态的影响,进而研究分化是否会对细胞周期及细胞吞噬功能产生改变,使学生对生命活动是一个连续、动态的过程具有更深刻的理解。

佛波醇-12-十四烷酰-13-乙酸酯(phorbol-12-myristate 13-acetate, PMA)是二脂酰甘油(diacylglycerol, DG)的类似物,可以进入细胞,激活蛋白激酶C(protein

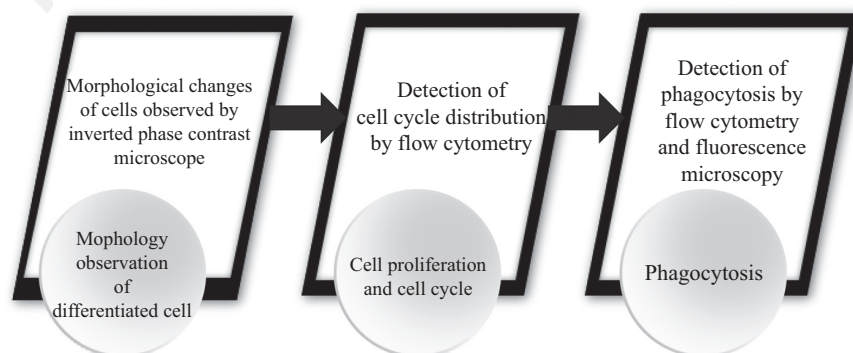


图1 U-937细胞用于教学中的实验及递进关系

Fig.1 Experiments and progressive relations of U-937 cells in teaching

kinase C, PKC)。在体外研究中,多种体外培养单核细胞系U-937、HL-60或THP-1可经PMA诱导分化成为单核细胞或巨噬样细胞^[7-10]。经PMA诱导分化后的U-937细胞由悬浮生长转变为贴壁生长,其形态变为巨噬样细胞,且经过LPS(lipopolysaccharide)刺激后,能显著提高其吞噬功能。

2 教学设计与安排

2.1 教学目的

本实验室将U-937细胞分化引入本科实验教学,设计出3个相互联系的实验,希望学生通过连续性的实验对生命活动的动态过程有一个直观、动态的理解,激发学生对生命活动的探索精神。通过学习,学生能掌握使用倒置相差显微镜观察U-937细胞形态,并应用流式细胞仪和荧光显微镜分析细胞周期及细胞吞噬功能。

2.2 教学重点与难点

本实验的教学重点是通过U-937细胞的分化过程,研究细胞生命活动的动态变化,系统地了解细胞分化所引起的细胞形态变化背后的一系列生理、功能的变化。教学难点在于锻炼学生细胞培养操作,熟练掌握倒置相差显微镜、荧光显微镜、流式细胞仪的使用及如何对实验结果进行分析。

2.3 实验材料与设备

2.3.1 实验材料 U-937细胞系为生物安全1级细胞(ATCC),该细胞购自中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库。sfGFP-*E.coli*为本实验所保藏具有能表达超折叠绿色荧光蛋白的大肠杆菌。

2.3.2 实验仪器和用具 CO₂细胞培养箱、生物安全柜、恒温水浴锅购自ThermoFisher公司;倒置相差显微镜、荧光显微镜购自Nikon公司;流式细胞仪购自Beckman Coulter公司;离心机购自Eppendorf公司;超净工作台购自上海智诚分析仪器制造有限公司;高压灭菌锅购自hirayama公司;60 mm培养皿、15 mL无菌离心管等购自Corning公司。

2.4 教学安排

2.4.1 学时安排 本项目可分为以下3个阶段:(1)U-937细胞培养及PMA诱导(无菌操作,细胞培养间中进行),倒置相差显微镜观察诱导24、48、72 h后细胞形态的变化(4学时);(2)碘化丙啶(propidium iodide, PI)染色后利用流式细胞仪分析PMA诱导前后细胞周期的变化(4学时);(3)诱导分化前、后细胞吞噬功能的荧光显微镜及流式细胞仪分析(4学时)。本

项目前后连续,总共需12学时,首先通过观察分化后细胞的形态结构变化,提示结构的变化能反映细胞功能的变化。阶段(2)、(3)通过对细胞周期及吞噬功能的分析,检测细胞分化所引起细胞的生理变化,实验结束后学生需根据这3个实验书写1份实验报告。

2.4.2 课前准备 复苏U-937细胞菌种(从液氮罐中复苏细胞,并传代3次),所有试剂均为教师提前配制。

2.4.3 实验分组 实验中每组2人,2名学生在实验过程中可以相互讨论,协同完成整个实验项目。

3 实验步骤

3.1 试剂配制

实验材料包括:RPMI-1640培养基(Corning, 10-040-CVR)、胎牛血清(Gibco)、PMA(Sigma, P1585, 溶解于DMSO中,配制成10 mmol/L储存液)、DMSO(Sigma, D2650)、LPS(Sigma, L2630, 溶解于PBS,配制成1 mg/mL储存液)、Accutase(Sigma, A6964)、PI溶液(Sigma, P4864)、RNase A溶液(sigma, R6148)、PBS(Corning)。其他试剂(KCl、无水乙醇、乙酸)均为国产分析纯(上海西陇化工有限公司)。

3.2 分化后U-937细胞形态观察

细胞培养是细胞生物学实验中的重要内容,此部分实验需在细胞培养间中进行,锻炼学生的无菌操作技术。每组2名同学共用一台生物安全柜,将培养瓶中的细胞转移到15 mL离心管中,120 ×g离心3 min,用巴氏吸管弃去上清,加入1 mL RPMI-1640完全培养基重悬细胞,取10 μL细胞悬液稀释后计数。根据计数结果,将1×10⁶个细胞(细胞悬液体积为4 mL)接种至60 mm培养皿中,每组接种2皿。向其中一个培养皿中加入终浓度为10 nmol/L的PMA,同时在另一皿中加入同样比例稀释的DMSO溶液作为对照,混匀后放入37 °C、5% CO₂培养箱培养指定时间。本实验针对3个平行班级开设,这3个班级开设在连续3天,教师安排所有班级统一在最后一个班级上课后的第2天进行观察,学生的观察结果为分化后24 h(实验三班结果)、48 h(实验二班结果)及72 h(实验一班结果),观察分化后细胞形态变化过程。

3.3 U-937细胞分化前后细胞周期的检测

课前3天,教师在两个60 mm培养皿内接种U-937细胞,(1)实验组接种1×10⁶个细胞,加入终浓度为10 nmol/L PMA;(2)对照组接种1.25×10⁵个细胞,加入按同样比例稀释的DMSO溶液,将两皿细胞

置于37 °C、5% CO₂培养箱中培养(72 h)。课程当天, 学生需完成以下操作, 收集实验组细胞培养上清于15 mL离心管中, 用2 mL PBS洗涤细胞, 并将洗涤后的PBS转入同一15 mL离心管中。在培养皿中加入1.5 mL Accutase溶液, 于37 °C培养箱内消化, 期间学生用倒置相差显微镜观察, 直至皿内80%的细胞变圆且晃动培养皿时大部分细胞从皿上脱离(约20 min), 加入3 mL完全培养基终止消化反应, 用巴氏吸管反复吹打重悬细胞, 并将细胞悬液转移至同一15 mL离心管中。对照组细胞则用巴氏吸管吹打混匀后, 直接转入15 mL离心管中。将收集得到的2组细胞以120 ×g离心5 min, 弃去上清, 用离心管中剩余的液体(约100 μL)重悬细胞, 加入3 mL预冷的PBS洗涤细胞。120 ×g离心5 min, 弃去上清, 用离心管中剩余的液体(约100 μL)重悬细胞, 缓慢加入2 mL预冷的70%乙醇, 边加边混匀, 防止局部乙醇浓度过高使细胞粘聚。将细胞悬液置于-20 °C冰箱内固定30 min。取出固定后的细胞, 以450 ×g离心5 min, 弃去乙醇, 用离心管中剩余的液体(约100 μL)重悬细胞, 加入3 mL预冷的PBS洗涤细胞。450 ×g离心5 min, 弃去上清, 用离心管中剩余的液体(约100 μL)重悬细胞, 加入500 μL PI染色液(每mLPI染色液包括: 50 μL PI溶液、10 μL RNase A、2 μL TritonX-100、938 μL PBS), 室温避光染色10 min。将细胞过滤膜后转入流式管内, 上机检测。

3.4 分化对U-937细胞吞噬能力的影响

课前2天, 教师在实验组60 mm培养皿内接种 2×10^6 个U-937细胞, 加入100 nmol/L PMA; 对照组则接种 2.5×10^5 个细胞, 加入相应比例稀释的DMSO溶液, 均置于37 °C、5% CO₂培养箱中培养48 h后, 向两皿中加入终浓度为100 ng/mL的LPS, 处理24 h。以下操作由学生在课程当天完成:

实验组: 弃去培养基, 用PBS洗涤3次后, 加入含有 2×10^8 个sfGFP-*E.coli*细菌的完全培养基4 mL(细菌:细胞比例为100:1), 置于37 °C培养箱中孵育1 h。弃去上清液, 用PBS洗涤10次后, 在荧光显微镜下(488 nm波长激发光)观察培养皿中sfGFP-*E.coli*被吞噬情况并拍照。荧光显微镜观察后, 加入1.5 mL Accutase溶液, 于37 °C培养箱内消化约20 min后加入3 mL完全培养基终止消化反应, 用巴氏吸管反复吹打重悬细胞, 并将细胞悬液转移至15 mL离心管中, 250 ×g离心5 min。弃去上清, 用3 mL

PBS洗涤细胞, 再次离心后, 弃去上清, 用500 μL PBS重悬细胞, 经滤膜过滤后转入流式管内, 上机检测。

对照组: 用巴氏吸管吹打混匀细胞后, 转移至15 mL离心管内, 120 ×g离心5 min。弃去上清, 加入含有 2×10^8 个sfGFP-*E.coli*细菌的完全培养基4 mL(细菌:细胞比例为100:1), 重悬细胞并转入新的60 mm培养皿, 置于37 °C培养箱中孵育1 h。将混有细菌的细胞悬液转入15 mL离心管内, 250 ×g离心5 min, 弃去上清。加入3 mL PBS洗涤细胞, 250 ×g离心5 min, 弃去上清, 重复洗涤过程4次。弃去上清, 用离心管中剩余的液体(约100 μL)重悬细胞, 取10 μL细胞悬液制作临时装片, 于荧光显微镜下(488 nm波长激发光)观察对照组细胞对sfGFP-*E.coli*的吞噬情况并拍照。向离心管内剩余的细胞中加入500 μL PBS, 混匀后经滤膜转入流式管内, 上机检测。

4 实验结果

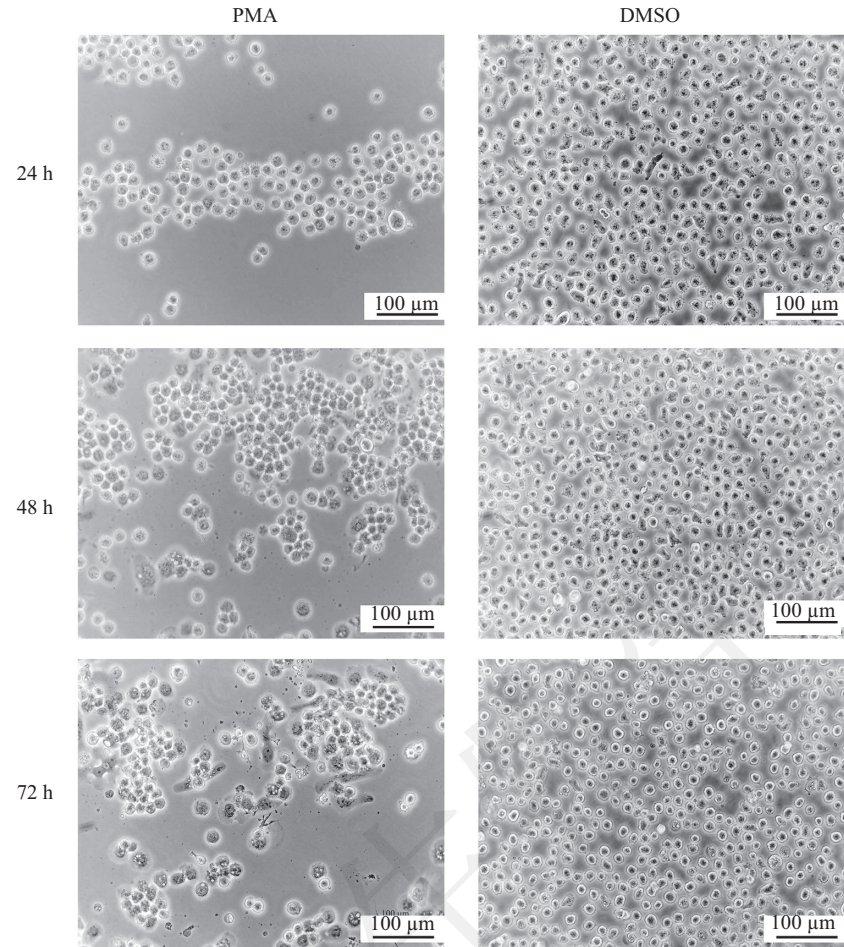
4.1 分化后U-937细胞形态变化

U-937细胞经10 nmol/L PMA处理24、48、72 h后, 于倒置相差显微镜下观察细胞的数量和形态变化(图2)。图2可以观察到, 随着PMA处理时间的延长, PMA处理组细胞数量和形态与对照组相比均发生显著变化。对照组细胞仍然保持悬浮状态, 且随着培养时间的延长细胞数目明显增多, 细胞形态无明显变化(图2B、图2D和图2F); 而实验组随着PMA处理时间的延长, 细胞数目明显少于对照组, 细胞由悬浮状态转变为贴壁状态的比例增高(图2A、图2C和图2E)。处理组细胞的形态也发生明显改变, PMA处理24 h后的细胞, 虽然贴壁细胞的比例增多, 但细胞的形态仍为圆形(图2A); PMA处理48 h后, 部分贴壁细胞开始出现分支, 细胞表面褶皱和伪足增多, 细胞体积变大(图2C); 而PMA处理72 h的细胞, 贴壁细胞伪足更为明显, 胞质中有大量的溶酶体和其他各种细胞器(图2E)。

通过对实验结果的观察, 学生可发现分化后细胞的增殖能力明显减弱, 且形态也发生了较大变化, 提示细胞分化会对细胞周期及功能产生影响。因此, 通过具有连续性的分化细胞作为本科生细胞生物学实验教学材料, 可以锻炼学生的科学思维, 提升学习兴趣。

4.2 分化对细胞周期的影响

如图3所示, 对照组细胞在培养72 h后, G₀/G₁占总



此结果为学生实验结果代表图。
Here just showed one representative result from students.

图2 倒置相差显微镜观察PMA刺激对U-937细胞形态的影响
Fig.2 Effect of PMA stimulation on U-937 cell morphology by inverted-phase contrast microscope

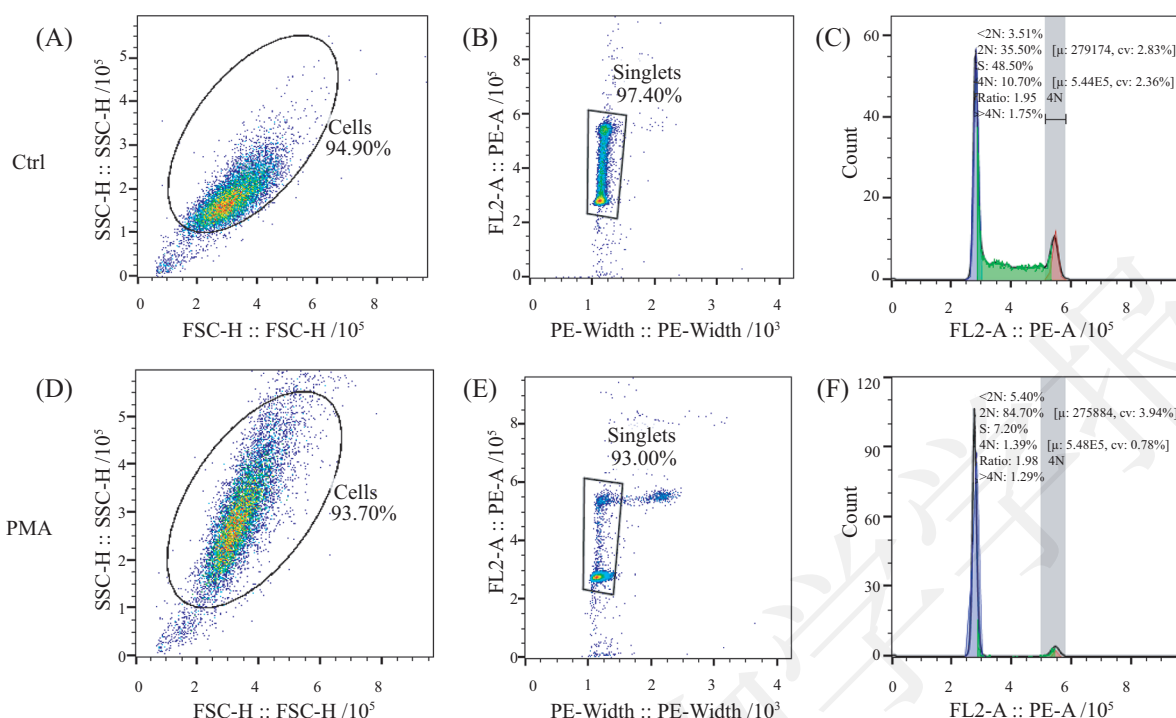
细胞的35.50%，S期细胞占总细胞的48.50%，而G₂/M期细胞占总细胞的10.70%。实验组细胞在经10 nmol/L PMA诱导72 h，G₀/G₁占总细胞的84.70%，S期细胞占总细胞的7.20%，而G₂/M期细胞占总细胞的1.37%。该结果表明，U-937细胞分化后G₀/G₁期的细胞比例显著增加，细胞周期发生了G₁→S期阻滞，提示分化对细胞增殖的影响，这与我们已经学习过的理论知识相符合，即随着细胞分化程度的增加，细胞的增殖能力会减弱，而终末分化的细胞，如心肌细胞、神经细胞则均无增殖功能^[1]。图3A和图3C显示，U-937细胞分化前后，其前向和侧向散色角发生了明显变化，分化后的细胞侧向反射光(side scatter, SSC)明显变大，表明细胞内颗粒物的增多，这也与我们在形态观察时看到的分化后细胞质中出现大量的溶酶体和其他细胞器所吻合。同时，我们也发现，分化后细胞的异质性增加，在流式图中呈现更加分散的状态。

4.3 分化对U-937细胞吞噬功能的影响

为了进一步研究分化对细胞功能的影响，我们采用流式细胞术和荧光显微镜分析U-937细胞分化前后对sfGFP-*E.coli*工程菌的吞噬作用。流式结果(图4)显示，FITC⁺细胞的比例由为分化的3.59%上升到20.20%，荧光显微镜结果(图5)也显示，分化后U-937细胞内绿色荧光细菌的比例也较分化前细胞多，由此我们可以得到以下结论，分化后的U-937细胞对荧光细菌具有更强的吞噬能力。由上述3个相互联系的实验，能增进学生对生命发展过程的理解，细胞的分化不仅仅是形态结构的改变，而是由此所引起的细胞功能的改变。

5 讨论
5.1 开设该实验项目的意义

细胞生物学的研究内容几乎涉及机体中所有



A~C: 对照组; D~F: 10 nmol/L PMA诱导U-937细胞72 h实验组; A、D: 前向、侧向散点图; B、E: 去除黏连细胞图; C、F: 细胞周期分析图, 本结果采用FlowJo V10软件分析; 此结果为学生实验结果代表图。

A~C: control group; D~F: experimental group, U-937 cells induced by 10 nmol/L PMA for 72 h; A,D represented forward scatter and side scatter; B,E used to eliminate adhesive cells; C,F showed the analysis of cell cycle, all the figures analyzed by FlowJo V10; here just showed one representative result from students.

图3 分化对U-937细胞周期的影响
Fig.3 Effect of differentiation on U-937 cell cycle

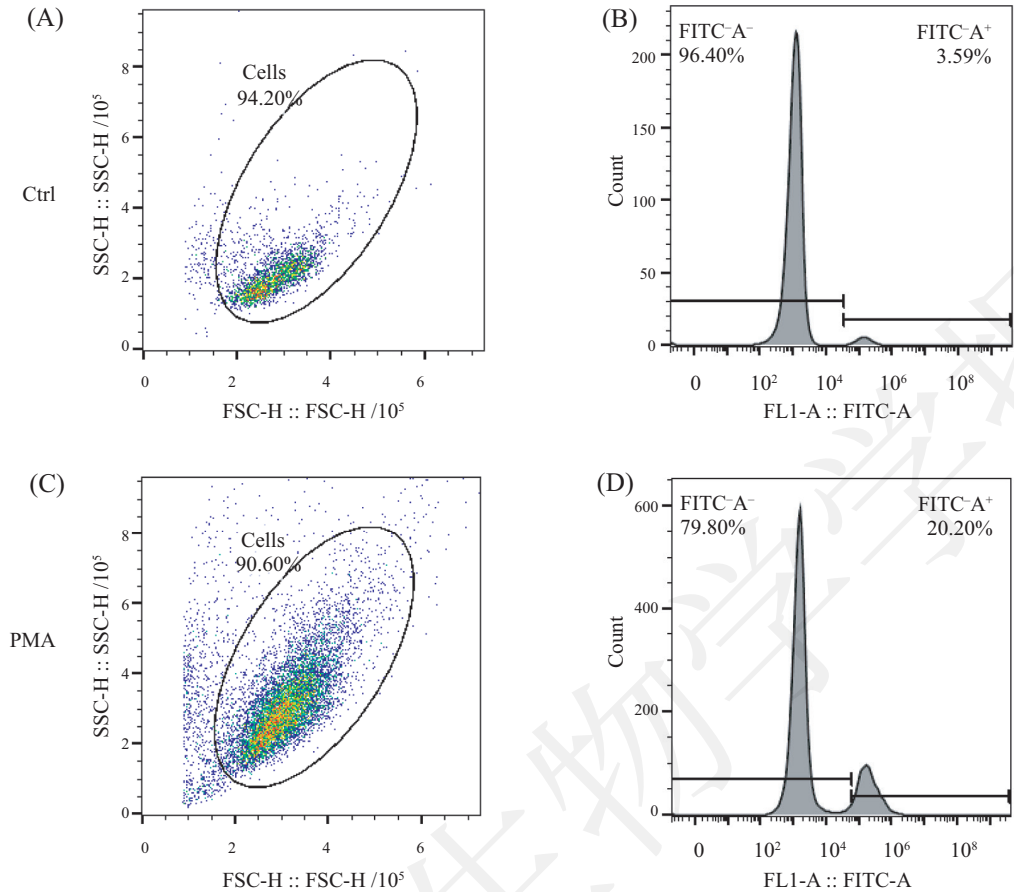
重要且基本的生命现象, 图6简略地显示了与细胞活动相关的生命现象。多细胞生物从受精卵开始发育生长, 形成由多种细胞构成的有机体。生物个体的这些细胞都是由受精卵分裂(细胞增殖)而来, 但它们无论在形态结构还是生理功能上都有显著差异(基因的差异表达—细胞分化), 分化后的细胞行使不同功能, 保证机体正常、有序的生命活动。由此可见, 生命活动不是孤立不变, 而是动态发展的。因此, 以细胞为研究对象的实验教学也应改变以往独立、单个知识点的传授方式, 建立一系列具有有机联系的实验项目, 使学生在实验过程中体会到生命活动的动态发展, 对培养学生探索生命活动的科研精神、激发学生的学习兴趣, 具有重要作用。

在多细胞生物个体发育的过程中, 细胞分化能体现细胞有规律的形态结构和生理功能的阶段性变化, 是建立连续性实验项目的理想模型。本实验课程将U-937细胞模型引入本科生实验教学, 结合倒置相差显微镜、荧光显微镜、流式细胞术等技术, 观察分化前对细胞形态结构、细胞周期及吞噬功能的

影响。该实验项目旨在使同学们了解到, 分化是细胞一系列连续事件的综合结果, 同学们可以通过多种手段对分化现象进行分析。通过对该项目的学习, 学生应该能独立完成细胞培养操作(无菌操作、细胞计数及加药处理等), 熟练使用倒置相差显微镜, 掌握荧光显微镜就流式细胞仪的原理及使用方法, 如何对样本进行前处理, 并学会使用FlowJo软件对流式结果进行简单分析。

5.2 实验安排的可行性

目前大多数高校本科实验教学采用每周固定课时的方式开设, 即一周开设一次实验课, 时长为4学时。本实验项目涉及3周实验内容, 每次内容均为4学时, 已在本校连续开设3年, 每年学生均能顺利完成。实验前期, 老师提前复苏好细胞, 并将培养好的细胞提供给学生: 阶段(1)老师提供培养至对数生长期的细胞, 学生需在细胞培养室内进行无菌操作, 对细胞计数后进行接种, 并将PMA或DMSO稀释至相应浓度后, 加入到接种好的细胞中, 处理指定时间(24、48或72 h); 阶段(2)、(3)教师提供经PMA



A、B: 对照组; C、D: 100 nmol/L PMA诱导U-937细胞72 h实验组; A、C: 前向、侧向散点图; B、D: 细胞吞噬sfGFP-*E.coli*直方图; 本结果采用FlowJo V10软件分析; 此结果为学生实验结果代表图。
A,B: control group; C,D: experimental group, U-937 cells induced by 100 nmol/L PMA for 72 h; A,C represented forward scatter and side scatter; B,D: histogram showed phagocytosis of sfGFP-*E.coli*; all the figures analyzed by FlowJo V10; here just showed one representative result from students.

图4 分化对U-937细胞吞噬功能的影响

Fig.4 Effect of differentiation on phagocytic function of U-937 cells

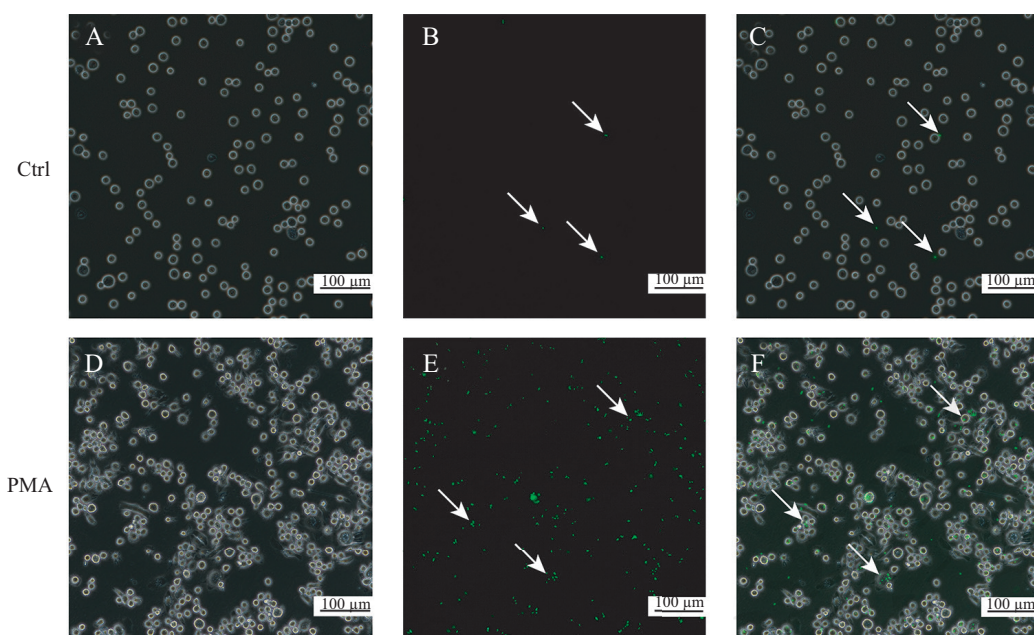
或DMSO处理72 h的U-937细胞, 学生对细胞进行消化、染色等制样步骤后, 经流式细胞仪或荧光显微镜进行检测。阶段(1)中, 对照组与实验组接种相同数目的细胞, 通过实验, 学生除了观察到分化对细胞形态的影响, 还能发现分化能影响细胞的复制, 提示分化对细胞周期的影响。阶段(2)、(3)中, 为了保证在收获细胞时对照组与实验组两组的细胞数目相当, 因此在接种时, 这两组的细胞数目不同。

每次4学时中, 前1学时为老师讲解, 教师通过PPT、自制视频等方式讲授细胞培养的原理及操作方式, 流式细胞仪、荧光显微镜工作原理及使用方法; 后3学时, 学生根据操作手册进行实操及上机检测。因流式细胞仪、荧光显微镜操作较为复杂, 教师通过拍摄视频、录屏等方式介绍仪器的使用方法, 学生以小组为单位进行操作, 教师从旁指导。由于细胞分化

需要一定的时间, 因此课后学生还需进入实验室对实验结果进行观察。为了使 学生观察到细胞分化过程中细胞形态的变化, 本项目充分利用了平行班级的优势, 每个班级学生的处理时间不同, 所有班级的学生同一天来实验室进行观察, 通过观察其他班级的实验结果, 学生可以了解到分化过程中细胞形态变化的过程。课后, 学生则需要根据这三个实验结果撰写一份实验报告, 由于U-937是目前科研工作中所广泛使用到的分化模型, 因此学生可以在数据库中检索到U-937细胞分化的背景知识以及最新的研究进展, 作为实验报告讨论及其对本项目的扩展。

5.3 实验教学效果

该实验课程已在我校开展多年, 从学生的问卷调查中发现, 相较于单个知识点的实验内容, 学生对连续性实验具有较高的认可度。认为连续性实验能



A~C: 对照组; D~F: 100 nmol/L PMA诱导U-937细胞72 h实验组; A、D: 明场下细胞; B、E: 488 nm蓝光激发下sfGFP-*E. coli*; C、F明场与荧光照射叠加图片; 白色箭头表示荧光细菌; 此结果为学生实验结果代表图。

A-C: control group; D-F: experimental group, U-937 cells induced by 100 nmol/L PMA for 72 h; A,D: cells under bright light; B,E: sfGFP-*E. coli* under 488 nm blue light; C,F: merge of bright and blue light; arrows showed the fluorescent bacteria; here just showed one representative result from students.

图5 荧光显微镜观察分化前后U-937细胞对sfGFP-*E. coli*的吞噬作用

Fig.5 Phagocytosis of sfGFP-*E. coli* by U-937 cells before and after differentiation was observed by fluorescence microscope

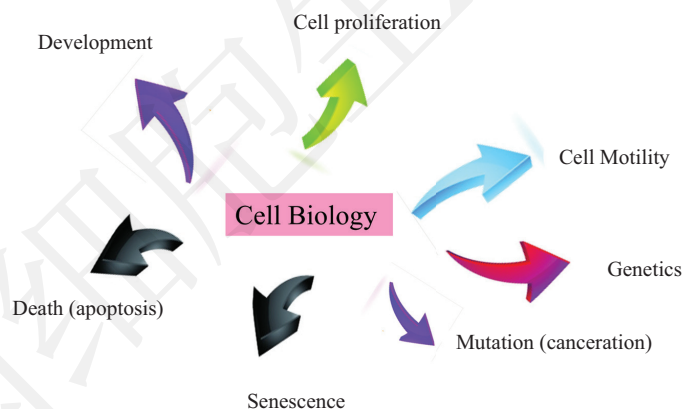


图6 细胞活动相关的生命现象

Fig.6 Life phenomena related to cell activity

帮助他们更好地理解生命过程的变化及发展,并希望能有机会更进一步了解引起分化现象的机制。同时,本实验所采用的技术均为目前细胞生物学领域所广泛使用的,如细胞培养技术,能培养学生的无菌操作意识及动手能力;荧光显微镜是研究亚细胞结构定位所常用到的仪器,学习荧光显微镜的原理及应用是本实验的重点;而流式细胞仪则在细胞分型、细胞内物质含量变化等细胞生理研究中具有广泛的应用,是本实验项目中学生学习的重点与难点。通

过本实验的学习,学生对于以上三种技术原理均有较为详细的理解,但由于操作次数较少,学生对仪器的使用还不熟练,但本实验为学生今后使用该类型的仪器打下了基础。因此,本实验的开展,不但激发了学生探索生命现象本质的兴趣,还提升了学生对目前常用实验手段和实验技术的理解与使用,具有较好的教学效果。

5.4 本实验的推广与应用

本实验所利用的U-937细胞模型为肿瘤细胞系,

其在体外培养条件简单, 短时间内即可获得大量的实验材料, 这为该细胞在本科实验教学中采用提供了极大的便利。本实验项目所采用的技术手段包括细胞培养、倒置相差显微镜观察、荧光显微镜观察、流式细胞仪检测分析, 这些技术已是目前生命科学中所广泛使用的技术, 绝大部分高校的生命平台均能进行相应的检测, 因此在技术上具有广泛推广的前景。

除此以外, 由细胞分化所引起的基因表达的变化及其机理探究, 可设计成一系列连续的实验项目, 在综合性实验项目中开展。学生需查找文献, 提交实验方案, 与教师探讨实验方案的可行性, 进行实验试剂、材料的准备, 完成实验项目并进行汇报总结, 在这一系列的过程中可锻炼学生的科研思维、创新性、主动性等各方面的能力, 提升学生的学习兴趣。因此, 本文所介绍的细胞分化模型除了在基础细胞生物学实验教学中具有推广性外, 还能在给高年级本科生开设的综合性实验项目中作为材料而被推广使用, 具有较高的推广性。

参考文献 (References)

- [1] SUNDSTROM C, NILSSON K. Establishment and characterization of a human histiocytic lymphoma cell line (U-937) [J]. *Int J Cancer*, 1976, 17(5): 565-77.
- [2] STEPHENS T A, NIKOPOUR E, RIDER B J, et al. Dendritic cell differentiation induced by a self-peptide derived from apolipoprotein E [J]. *J Immunol*, 2008, 181(10): 6859-71.
- [3] WHELAN R D, KILEY S C, PARKER P J. Tetradecanoyl phorbol acetate-induced microtubule reorganization is required for sustained mitogen-activated protein kinase activation and morphological differentiation of U937 cells [J]. *Cell Growth Differ*, 1999, 10(4): 271-7.
- [4] CHUN E M, PARK Y J, KANG H S, et al. Expression of the apolipoprotein C-II gene during myelomonocytic differentiation of human leukemic cells [J]. *J Leukoc Biol*, 2001, 69(4): 645-50.
- [5] ISHIKAWA M, INOUE T, INUI T, et al. A novel assay system for macrophage-activating factor activity using a human U937 cell line [J]. *Anticancer Res*, 2014, 34(8): 4577-81.
- [6] YAMAMOTO T, SAKAGUCHI N, HACHIYA M, et al. Role of catalase in monocytic differentiation of U937 cells by TPA: hydrogen peroxide as a second messenger [J]. *Leukemia*, 2009, 23(4): 761-9.
- [7] HARRIS P, RALPH P. Human leukemic models of myelomonocytic development: a review of the HL-60 and U937 cell lines [J]. *J Leukoc Biol*, 1985, 37(4): 407-22.
- [8] CHANPUT W, PETERS V, WICHES H. THP-1 and U937 Cells [M]//VERHOECKX K, COTTER P, LOPEZ-EXPOSITO I, et al. *The Impact of Food Bioactives on Health: in vitro and ex vivo models*. Cham (CH). 2015: 147-59.
- [9] DAIGNEAULT M, PRESTON J A, MARRIOTT H M, et al. The identification of markers of macrophage differentiation in PMA-stimulated THP-1 cells and monocyte-derived macrophages [J]. *PLoS One*, 2010, 5(1): e8668.
- [10] LEE C W, SOKOLOSKI J A, SARTORELLI A C, et al. Induction of the differentiation of HL-60 cells by phorbol 12-myristate 13-acetate activates a Na(+)-dependent uridine-transport system. Involvement of protein kinase C [J]. *Biochem J*, 1991, 274 (Pt 1): 85-90.
- [11] PARDEE A B. G1 events and regulation of cell proliferation [J]. *Science*, 1989, 246(4930): 603-8.