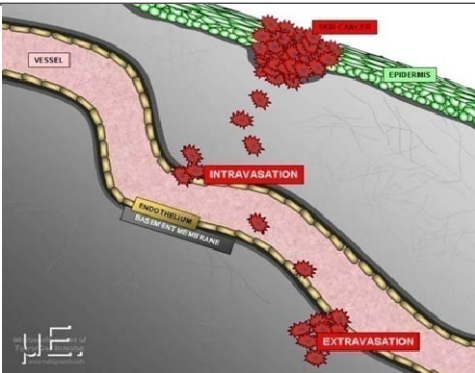


Metastasis 是一項複雜的細胞移動過程,起始於 cancer cells 從一個 primary tumor site 轉移到另一不相鄰的器官或部分.在這過程中,細胞受到諸多周遭環境因子影響. 比如, 溫度, 細胞密度,pH, 培養液的組成分, 甚至,基因細微變化皆會影響到癌細胞的轉移. 癌細胞的蔓延可能會通過血液或淋巴管. 目前發現,轉移的必要條件為 growth of a new network of blood vessels. 稱為 Angiogenesis.



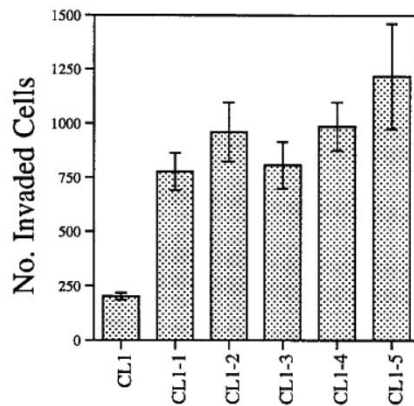
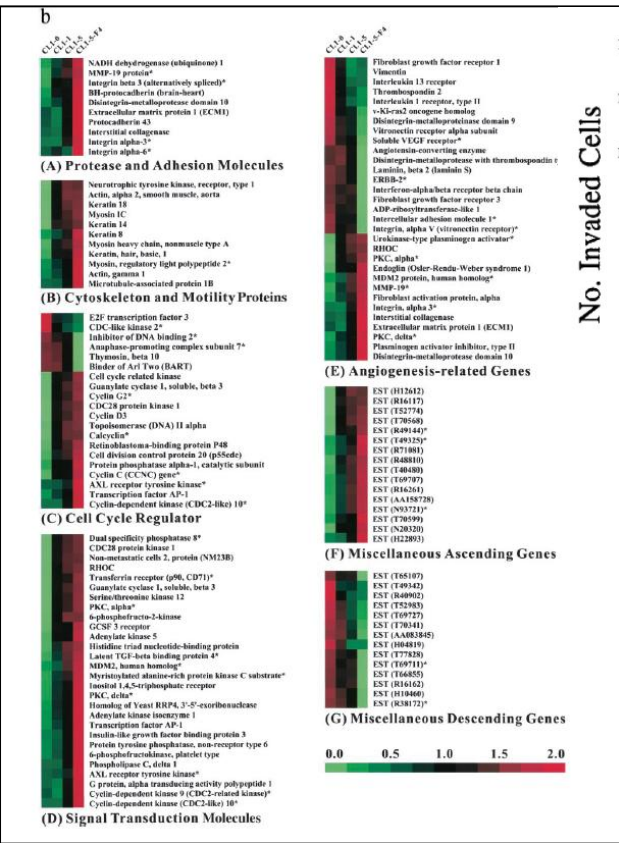
目前學者為了模擬 Metastasis 在 *in vivo* and *in vitro* 的轉移過程,並有效找出其轉移的機制,因此研究集中在 Cell migration and Cell invasion 兩個問題上的探討.

A. Cell migration, 不僅僅是 cancer cell 具有 cell migration,正常細胞的分化,發育,傷口癒合,免疫反應等皆能進行 migration.

B. Cell invasion, 其過程與 cell migration 很類似,但 cell 必須通過 extracellular matrix (ECM) or Basement membrane

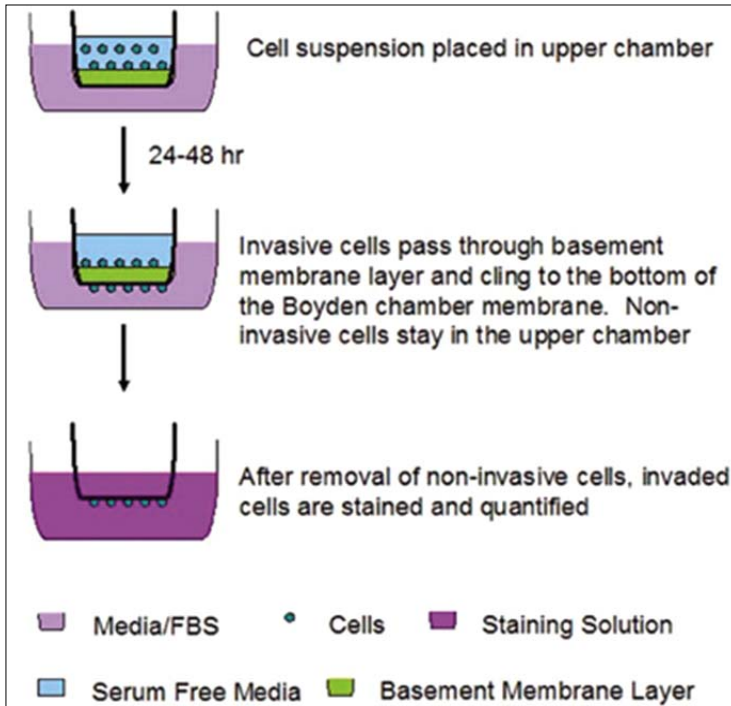
extract (BME) barrier. 一個完整有效的 invasion 必然有 3 個步驟,

1. tumor cells 貼覆在周遭的 ECM
2. Tumor cells 分泌 matrix-degrading enzymes
3. Tumor cells 穿過 matrix gel.



良性瘤轉化為惡性瘤的機制,外觀,基因影響的調控,標靶藥物的專一性,皆為學者急欲瞭解的. 況且,目前早已經進入了基因資訊爆炸的時代,各實驗室無不在競爭實

驗速度, 求快,求準確,求再線性高. 甚是利用了 microarray 的技術,來大量 screen 癌基因變化的情形,尤其是與 Metastasis 相關的基因. 因此,傳統的 transwell 方式將無法負荷大量實驗的時代,甚至無法解釋更多人為因素所帶來的誤差. Paper 擷取於以下兩篇:1. Am. J. Respir. Cell Mol. Biol., 17:353-360,1997. 2. Cancer Research 61, 5223-5230, 2001

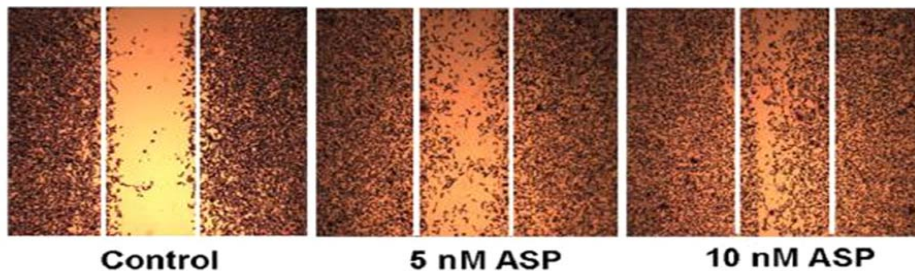


一般而言,絕大部分的實驗室會採用 **Boyden chamber or call transwell** (如左圖)來觀察 cell migration or invasion 的情形. 其做法不外乎是利用細胞 chemotaxis 的特性,誘使細胞向 down chamber 方向做一移動. 看似簡單不過的實驗或原理,卻依然存在著幾個刻意或疏忽的問題.

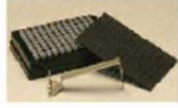


Boyden Chamber 缺點如下:

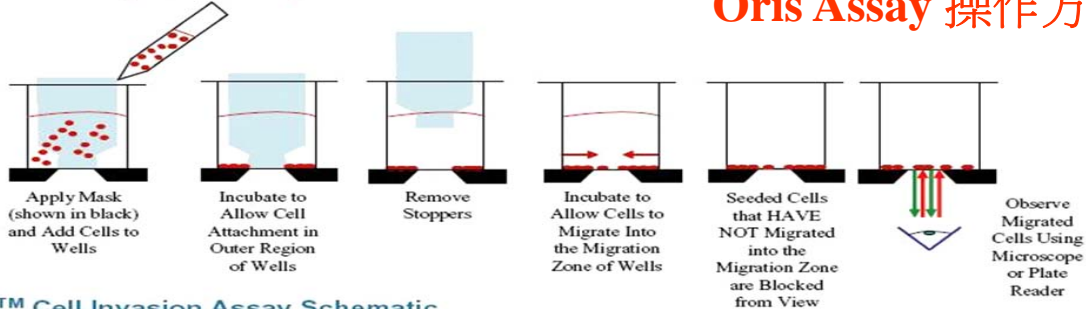
1. in vivo 中,並無真正存在著如 chamber 中間那層 filter.
2. Filter 孔徑大小上的選擇? 孔徑大小與細胞 size 間的關係,會直接影響到 migration 的數量
3. Migration 的效果,是因為重力因素,或是細胞推擠因素所導致?
4. Filter 的材質上的影響.
5. Chemotaxis 濃度的抉擇與維持?試問,多久後,transwell 依然維持著濃度梯度? 一但梯度消失後,cell 依然能進行 migration?
6. Filter 上層細胞刮除是否乾淨,將會直接影響實驗數據
7. Cell 卡在 filter 中間,尚未到達下層 filter,試問,這樣有算一顆嗎?
8. 無法做 kinetic 觀察,只能做 end-point 時間點的觀察.
9. 不利於大量藥物篩檢,或大量的基因篩檢.
10. 顯微鏡下,並非全視野,只能做局部視野下的計算細胞.



Wound-Healing Assay, 是一個最簡單,最便宜,最直接研究 in vitro cell migration 的方式,其做法也很簡單...先將細胞種滿整個 well 後,使用 tip 的尖端將細胞創造出一個“創傷”,即可方便觀察... 但,令人詭病的是,創傷的直徑會影響到 migration 的多寡,或,畫線不易平整,浪費一個 sample well.

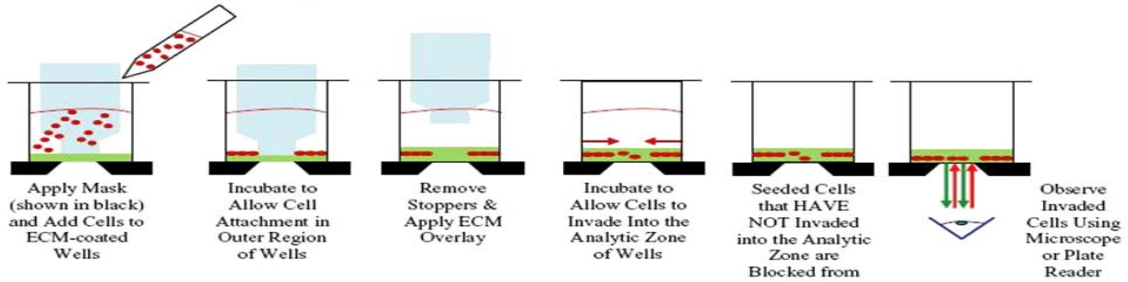


Oris™ Cell Migration Assay* Schematic



Oris Assay 操作方法:

Oris™ Cell Invasion Assay Schematic



Cell migration assay:

Day 1: am 9:00 插入 stoppers, seed cells.

pm 4:00 (依細胞貼附狀況), 拔除 stoppers, wash or replace fresh medium w/o chemical.

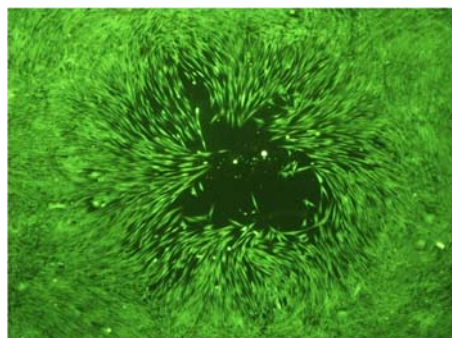
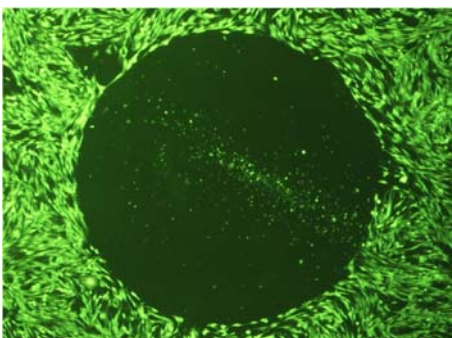
Day 2: 依照要觀察的 end-point 時間點來終結實驗 染色, 在顯微鏡下觀察, 或在 plate reader 下量化.

Cell invasion assay:

Day 1: am 9:00 Coated thin BME (serum free medium prepare), 插入 stoppers, seed cells

pm 4:00 (依細胞貼附狀況), 拔除 stoppers, Coated thick BME (含 serum, growth factor), 再加上一層 Serum Free Medium 在第二層 gel 上面.

Day 2: 依照要觀察的 end-point 時間點來終結實驗 染色, 在顯微鏡下觀察, 或在 plate reader 下量化.



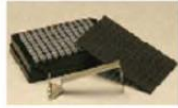
左圖為 T=0 時所創造出來的空間, 右圖為 T=16 後, end-point 的觀察, 細胞為口腔癌細胞, 使用 Calcein AM 染色. (十分感謝中國醫藥大學包大羶教授提供與指導)

Cited Reference Paper 英雄榜...期待下一個英雄將會是您...

1. Marpadga A. Reddy., et al. (2009) Role of Src Tyrosine Kinase in the Atherogenic Effects of the 12/15-Lipoxygenase Pathway in Vascular Smooth Muscle Cells. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 29:387-393
2. Helen P. Makarenkova., et al., (2009) Barx2 Controls Myoblast Fusion and Promotes MyoD-mediated Activation of the Smooth Muscle α -Actin Gene. *J. Biol. Chem.*, Vol. 284, Issue 22, 14866-14874
3. Jae Hong Park and Ho Jae Han ., (2009) Caveolin-1 plays important role in EGF-induced migration and proliferation of mouse embryonic stem cells : Involvement of PI3K/Akt and ERK. *Am J Physiol Cell Physiol* ., July 22.



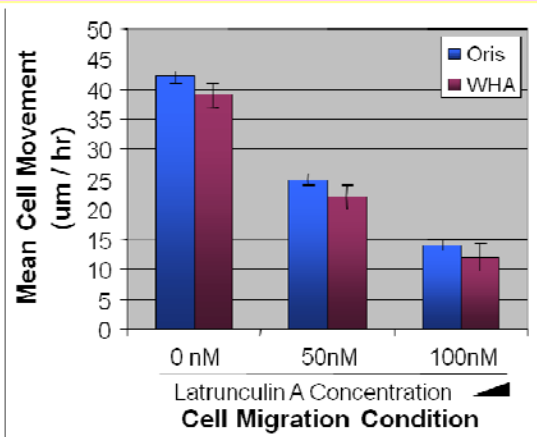
Cell Migration Assay
Cell Invasion
& Detection
Assay Kit



Bringing Science to the Surface™

為何要使用 Oris Cell Migration / Invasion Assay kit 呢?

1. 2D or 3D 模擬 cell 在 in vivo 進行 migration / Invasion 的狀態.metastasis 情形真實表現,並無 filter 的干擾與影響.
2. 減少因為 filter, 細胞刮除不乾淨,cell 卡在 filter 中間等誤判 cell 數,直接計數 cell 爬行到 detect zone 的數目.
3. 可做 kinetic 觀察,當細胞先行染色後,再去 seeding 細胞,即可在不同時間點,在同一 well 狀態下,觀察細胞進行 metastasis 的行情與數目,並量化!這是 transwell 所做不到的
4. 倘若再做 dose 實驗時,不需要耗損多個 well, 即可在同一 well 下進行觀察,也可減少人為誤差的狀況.
5. 也適合大量藥物,劑量,基因篩檢,簡單操作,誤差小,快速量化.
6. Migration / Invasion 的數目與狀況較無爭議,因為,在顯微鏡 40X 下為全視野,即是觀察到 whole cell 進行 metastasis 的情形與數目,並無像 24 well 視野下為局部,metastasis 數目與狀況有疑慮.
7. 不需要再使用 tip 來刮細胞,wound healing 的直徑既不穩定,又不直. Oris 所提供的 Stopper 直徑固定,為 2 mm.
8. 在 2mm 直徑較 tip 所創傷的直徑為大,能真正表現出 cell metastasis 的速度與能力.



Oris Assay 與 Wound Healing Assay (WHA)再線性的比較.

採用 HT1080 fibrosarcoma cells, 並加入 Latrunculin A (0-100 nM)為 migration 抑制劑. 相同條件下,一為使用 Oris

[Latrunculin]	% CoV	
	Oris™ CMA	WHA
0	6%	16%
50 nM	12%	25%
100 nM	19%	42%

system, 另一採用 48 well plate, P200 tip 創傷細胞. 在經由 6 hrs 後的觀察, 經由 7 重複的實驗下,可見 WHA 的一致性比 Oris Assay 來的差. 表示,Oris 具有較高的實驗

HOT 產品資訊:

Product Number	描述	包裝
CMA1.101 CMA5.101 CMAU101 CMAU505	Oris Cell Migration Assay (Stoppers 已經 insert 在 well 內) Oris Cell Migration Assembly Kit (Stoppers 尚未 insert 在 well 內)	1-Pack 5-Pack
CMACC1.101 CMACC5.101 CMAUCC1 CMAUCC5	Oris Cell Migration Assay — Collagen I Coated (well 有 coat Collagen I, 且 Stoppers 已經 insert 在 well 內) Oris Cell Migration Assembly Kit — Collagen I Coated (well 有 coat Collagen I, 且 Stoppers 尚未 insert 在 well 內)	1-Pack 5-Pack
CMAFN1.101 CMAFN5.101	Oris Cell Migration Assay — Fibronectin Coated (well 有 coat Fibronectin, 且 Stoppers 已經 insert 在 well 內)	1-Pack 5-Pack
CMATR1.101 CMATR5.101	Oris Cell Migration Assay – TriCoated (同一 plate 上同時有 culture treated, Collagen I and Fibronectin)	1-Pack 5-Pack
CMAUFL4	Oris Cell Migration Assembly Kit—FLEX (提供 4 盤 96well 空盤,96 個 stoppers)	1-Kit
CIA101DE CIA200DE	Oris Cell Invasion Assay Kit (規格與 Assembly kit 相同,但多了 BME and Calcein AM Reagent)	1-Pack 2-Pack