

血管形成

一、实验目的

通过T24/T24-RC48细胞株与静脉内皮细胞株(HUVEC)共培养进行管腔形成实验，评估耐药细胞株的VEGFA变化对微环境的影响。

二、实验内容

2.1 实验设计 将野生型T24细胞株T24-RC48分别与静脉内皮细胞株(HUVEC)进行共培养，以此开展管腔形成实验。通过共培养中观察和记录各细胞株的生长状态、相互作用情况，分析耐药细胞株T24-RC48相较于普通T24细胞株的VEGFA表达量变化对周围微环境产生的影响差异，探究耐药细胞株的VEGFA变化是否会对血管生成相关过程，以及整个细胞微环境的构成和功能产生显著作用，从而深入了解耐药细胞对微环境调控的相关机制。

2.2 样本类型 T24野生型细胞株

高度耐药T24-RC48细胞株

2.3 实验原理

内皮细胞在促血管生成因子刺激下可自组装成管状网络：将肿瘤细胞(T24与耐药株T24-RC48)与血管内皮细胞(HUVEC)共培养时，肿瘤细胞分泌的VEGFA(血管内皮生长因子A)等因子会旁分泌作用于邻近的HUVEC，

VEGFA作为关键血管生成信号，激活内皮细胞的增殖、迁移和管腔形成能力，驱动其连接并形成三维管状结构。实验通过比较耐药株与野生株诱导的管腔形成能差异，直接反映其VEGFA表达变化对血管生成微环境的调控能力。

三 材料与试剂

3.1 材料 1000μl枪头、100μl枪头、15ml离心管均购自Axygen公司。
24孔板(Corning公司) 移液器(Eppendorf)
T25培养瓶购自Corning公司 人胎膜转移细胞瘤株(T24)
低/中/高度耐药T24-RC48细胞株。

3.2 试剂

PBS、胰酶均购自美国Gibco公司

McCoy's 5A培养基、DMEM培养基(上海源培生物科技有限公司)

胎牛血清(FBS, Gibco公司)

四 实验仪器

台式常温低速离心机(Eppendorf公司) 超净工作台(苏州净化设备厂)

37°C、5% CO₂细胞培养箱(Thermo Fisher Scientific) 细胞计数仪器

五 实验步骤

5.1 将McCoy's 5A+培养基与DMEM培养基1:1混合并加入10% FBS配成完全培养基。

5.2 使用胰酶将处于对数生长期的T24、T24-RC48和HUVEC细胞分别消化。

5.3 使用完全培养基重悬细胞，用细胞计数板进行计数，调整浓度为 2×10^4 /孔。

5.4 根据表1，24孔板布局，将T24细胞、T24-RC48细胞与HUVEC细胞按不同比例混合，分别加入24孔板中，每孔总体积为500μl，具体比例为：

1) T24与HUVEC按1:1混合：每孔加250μl T24细胞悬液与250μl HUVEC细胞悬液。

2) T24与HUVEC按1:4混合：每孔加250μl T24细胞悬液与250μl HUVEC细胞悬液。

3) T24与HUVEC按4:1混合：每孔加150μl T24细胞悬液与250μl HUVEC细胞悬液。

(4) T24-RC48与HUVEC按1:1、1:4、4:1混合方法同上。

表 24 孔板布局 (正:T24; 高:高耐药 T24-RC48)

正:HUVEC=1:1	正:HUVEC=1:1	正:HUVEC=1:1	高:HUVEC=1:1	高:HUVEC=1:1	高:HUVEC=1:1
正:HUVEC=1:4	正:HUVEC=1:4	正:HUVEC=1:4	高:HUVEC=1:4	高:HUVEC=1:4	高:HUVEC=1:4
正:HUVEC=4:1	正:HUVEC=4:1	正:HUVEC=4:1	高:HUVEC=4:1	高:HUVEC=4:1	高:HUVEC=4:1
空白	空白	空白	空白	空白	空白

对照组设置：设置空白对照组，即不添加任何细胞的24孔板孔穴，加入相应体积的培养基，用于评估背景影响。

5.5 将24孔板置于37°C、5%CO₂培养箱中培养，48h后，从培养箱中取出24孔板，使用倒置显微镜观察各孔中细胞的生长状态和管腔形成情况，拍照记录，使用ImageJ分析处理。

六、实验结果



图1 T24-RC48:HUVEC=1:1 孔（左）与:HUVEC=1:1 孔 T24（右）48h 后光镜下观察

图1 T24-RC48:HUVEC=1:1孔(左)与:HUVEC=1:1孔T24(右)48h后光镜下观察

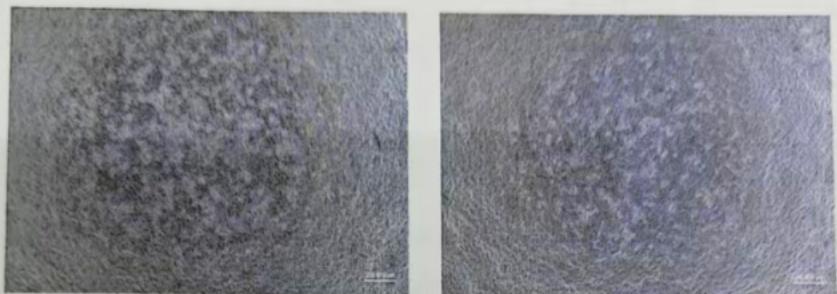


图2 T24-RC48:HUVEC=1:4 孔（左）与:HUVEC=1:4 孔 T24（右）48h 后光镜下观察

图2 T24-RC48:HUVEC=1:4孔(左)与:HUVEC=1:4孔T24(右)48h后光镜下观察



图3 T24-RC48:HUVEC=4:1 孔（左）与:HUVEC=4:1 孔 T24（右）48h 后光镜下观察

图3 T24-RC48:HUVEC=4:1孔(左)与:HUVEC=4:1孔T24(右)48h后光镜下观察

所有实验组及空白对照组培养48小时后，显微镜下观察发现：孔细胞均达到完全融合状态，形成致密单层。未观察到明显管腔网络结构。空白对照组无细胞生长，孔内仅有培养基，无背景干扰，培养基未污染。

T24野生型细胞组与T24-RC48耐药细胞组在相同比例条件下（1:1、1:4、4:1）诱导的HUVEC形态学表现无显著差异。不同细胞比例

(1:1、1:4、4:1)对管腔形成的影响无明显区别。

七、结果分析

本次实验管腔形成失败的可能原因有：1)初始细胞密度高：每孔接种总量为 1×10^5 个细胞，导致48小时内细胞过度增殖并快速融合，抑制了管腔结构的形成空间。2)检测时间点上仅观察了48小时结果，可能错过管腔形成的关键窗口期。

本次实验设计局限如下：1)仅使用高度耐药T24和48株，缺乏低、中度耐药株的对比，无法评估耐药程度与VEGFA分泌的梯度关系。2)未进行特异性染色(如VE-cadherin免疫荧光染色)。

接下来实验的改进方向有：1)降低细胞接种量：每孔总细胞数控制在 5×10^4 以内，延缓融合速度。2)增加多时间点检测：在6h、12h、24h、48h分段观察，捕捉管腔动态形成过程。3)补充实验组：纳入低、中度耐药T24和48细胞株，系统比较耐药性对血管生成的影响。

4)引入染色技术，提高管腔结构的可视化灵敏度。