

生长曲线测定(一)

一、实验目的

通过CCK-8测定法测定T24细胞株及高度耐药T24-RC48细胞株在 $200\mu\text{g}/\text{ml}$ RC48处理下的三天内的增殖能力，绘制生长曲线，评估药物对不同细胞生长的抑制作用。为正式测定生长曲线摸索条件。

二、实验内容

2.1 实验设计

细胞类型：T24野生型细胞株、高度耐药T24-RC48细胞株。

药物处理：维迪西妥单抗(RC48)浓度为 $200\mu\text{g}/\text{ml}$ 。

时间点： 0h 、 24h 、 48h 、 72h 。

重复次数：每组6个复孔。

2.2 测定原理

CCK-8试剂中的WST-8被细胞线粒体脱氢酶还原为橙黄色甲瓒，其吸光度($\text{OD}=450\text{nm}$)与活细胞数呈正相关，通过酶标仪测定吸光度值计算细胞存活率。

三、试剂与材料

3.1 材料

1000μl枪头、100μl枪头、15ml离心管均购自 Axygen公司

96孔板(Corning公司)×6

移液器:Eppendorf

T25培养瓶购自Corning公司

人膀胱移行细胞癌细胞株(T24)

高度耐药细胞株 T24-RC48

3.2 试剂

PBS、胰酶均购自美国Gibco公司

McCoy's 5A 培养基来自上海源培生物科技股份有限公司

胎牛血清(FBS, Gibco 公司)

维迪西妥单抗(RC48, 莱昌生物制药股份有限公司)

CCK-8 试剂盒

McCoy's 5A 基础培养基(上海源培生物科技股份有限公司)

四. 实验仪器

超净台:苏州净化设备厂

台式常温低速离心机:Eppendorf公司

酶标仪

五. 实验步骤

5.1 取处于对数生长期的T24细胞株及高度耐药T24-RC48细胞

株，胰酶消化后离心重悬，调整密度至 4×10^4 个/ml。

5.2 将细胞悬液按实验设计分别接种至4块96孔板中并编号，每种细胞在每板各接种12个孔。每孔100μl(含 4×10^3 个细胞)，边缘孔加PBS防蒸发。置于37°C、5% CO₂的培养箱中培养。

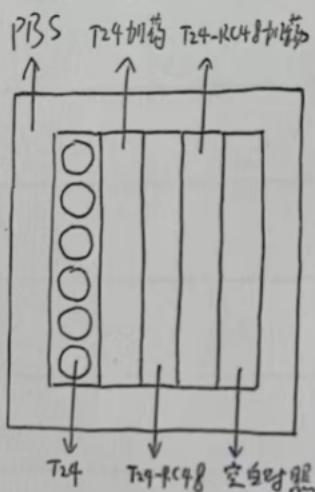


图1 各组细胞悬液在96孔板中的分布情况

5.3 过夜后细胞贴壁，吸除旧培养基，取3个96孔板更换新鲜培养基(每个培养板中取6个孔的新鲜培养基中加含200μg/ml的RC48)，记此时的时间为0，置于37°C、5% CO₂的培养箱中继续培养。剩下1板(1号板)按照CCK-8试剂盒说明书要求将显色液加入培养孔中，在培养箱中继续培养1h，用酶标仪测定450nm吸光度值。

5.4 分别于24h、48h、72h取出对应孔板按照CCK-8试剂盒说明书要求进行处理并测定450nm吸光度值。

5.5 以RC48处理时间为横坐标，450nm处的实验组OD值-空白对照孔OD值为纵坐标，绘制时间-OD值曲线，即细胞增殖曲线。

二、实验结果

6.1 细胞形态观察

从图2的倒置相差显微镜照片可以看出，经过72小时的处理后，T24-RC48细胞依然保持着较为良好的状态，细胞形态相对完整，且细胞密度约为100%。

6.2 细胞增殖能力变化

在未添加RC48药物处理时，两种细胞株均呈现出较为稳定的增殖趋势，且它们的倍增时间无明显差异，表现在正常培养条件下，两者的增殖情况相近。而在加入 $200\mu\text{g}/\text{ml}$ 浓度的RC48处理后，T24-RC48细胞株的倍增时间虽略有延长，但相较于加药后的亲本T24细胞，其延长幅度明显较小，且仍显著短于加药后的T24细胞。T24细胞加药的增殖曲线明显低于未加药时的水平，呈现出明显的抑制趋势。

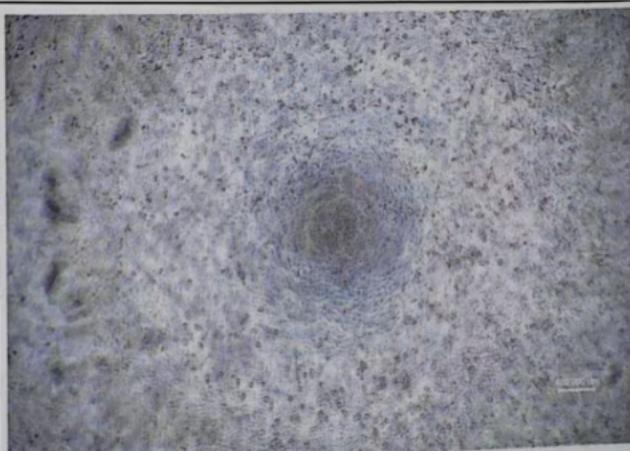


图2 T24-RC48细胞72h后于倒置相差显微镜下的照片

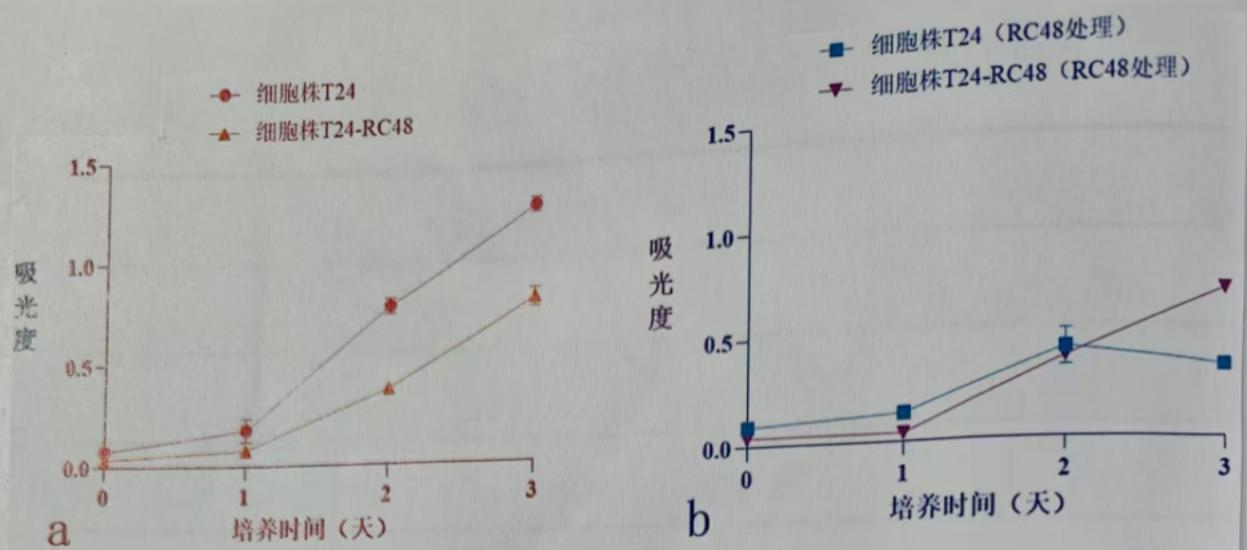


图 3 T24 和 T24-RC48 细胞在加药前(3a)后(3b)生长曲线图

七、结果分析

经过72小时培养,未加药细胞形态相对完整,且细胞密度接近100%,表明在本实验中,铺板密度与培养时间设置合理,这为后续开展为期5天的生长曲线测定提供了参考,提示我们应适当降低铺板浓度。

由图3可知,RC48耐药细胞T24-RC48与亲本细胞T24倍增时间无明显差异。加药后T24-RC48倍增时间相对未加药时未出现明显延长,且显著短于加药的亲本T24细胞。由此可见,本研究所培养的T24-RC48细胞株相较于传统的T24细胞株,对RC48药物展现了更强的耐药性。在药物处理下,T24-RC48细胞的生长速率虽受到一定影响,但这种影响远小于RC48对T24细胞的影响。这可能是因为T24-RC48细胞在长期的培养和筛选过程中,逐渐发展出了对RC48药物的适应机制,例如通过增强药物代谢酶的活性、增加药物外排泵的表达、改变细胞内信号通路等方式,来降低药物对细胞增殖的抑制作用。同时,T24细胞加药的增殖曲线呈现出明显的抑制趋势,提示我们200μg/ml

的药物处理浓度较为合理，在后续实验中可以沿用。

这一结果对于深入研究T24细胞对RC48药物的耐药机制具有重要意义。它验证了实验的预期，即T24-RC48细胞在RC48处理下能够保持相对较高的增殖能力，为后续更深入的耐药机制研究奠定了基础。提示我们在后续的研究中，可以进一步探究T24-RC48细胞具体的耐药机理，为开发更有效的抗癌药物和治疗策略提供理论依据。