

## 细胞凋亡流式检测(一)

### 一、实验目的

利用Annexin V-FITC/PI细胞凋亡试剂盒，检测T24野生型细胞株及低、中、高耐药T24-RC48细胞株加药前后的凋亡情况，分析耐药细胞株的凋亡特性，为揭示ADC耐药机制提供依据。

### 二、实验内容

#### 2.1 实验设计

样本分组：空白对照组（未处理的T24野生型细胞株及低、中、高耐药T24-RC48细胞株）药物处理组（野生型及低、中、高耐药株分别用维迪西妥单抗RC48 处理36小时）。

重复次数：每组3个样本。

#### 2.2 测定原理

Annexin V-FITC 是一种荧光标记的膜联蛋白，能够特异性结合凋亡细胞表面外翻的磷脂酰丝氨酸(PS)。PI（碘化丙啶）是一种核酸染料，能够穿透晚期凋亡和坏死细胞的细胞膜，使细胞核变红。通过流式细胞仪检测 Annexin V-FITC 和 PI 的荧光信号，可以区分活细胞、早期凋亡细胞和晚期凋亡/坏死细胞。

### 三、材料与试剂

3.1 材料 人膀胱移行细胞癌细胞株(T24).

低、中高耐药细胞株T24-RC48

T25细胞培养瓶和六孔板(Corning公司)

15ml离心管(Axygen公司)

移液器(Eppendorf) 枪头(Axygen公司)

3.2 试剂

Annexin V-FITC/PI细胞凋亡试剂盒(联科生物, AT101)

McCoy's 5A培养基(上海源培生物科技股份有限公司)

胎牛血清(FBS, Gibco公司) 胰酶(Gibco公司) PBS缓冲液(Gibco公司)

#### 四、实验仪器

超净台(苏州净化设备厂) 流式细胞仪(BD公司, 非C6型)

台式常温低速离心机(Eppendorf公司)

#### 五、实验步骤

5.1 将T24野生型细胞株及低、中高耐药T24-RC48细胞株分瓶接种于6孔板中, 每种细胞铺2个孔, 每孔 $2 \times 10^5$ 细胞。

5.2 24小时后, 每种细胞取1个孔正常换液, 另外1孔换成含有200μg/ml RC48的完全培养基处理36小时。

5.3 弃去培养基, 用PBS洗涤细胞3次

5.4 加入Accutase消化细胞, 轻轻摇打培养瓶使细胞脱落。

5.5 收集每孔细胞悬液, 1000rpm离心5分钟, 弃上清。

5.6 用预冷的 PBS 离心洗涤细胞两次，弃上清。

5.7 用双蒸水将 5× Binding Buffer 稀释为 1× 工作液，取 200μl 1× Binding Buffer

重悬，每管加入 5μl Annexin V-FITC 和 10μl PI，轻旋混匀，室温避光孵育 5 分钟。

5.8 取  $1 \times 10^6$  个未加药处理野生型细胞，加入 500μl Apoptosis Positive Control

Solution，置冰上孵育 30 分钟。

5.9 离心洗涤弃上清，加入适量预冷 1× Binding Buffer 重悬，并加入等量相同且未经处理的冻细胞与之混合。

5.10 加入预冷 1× Binding Buffer 补充至 1.5ml，等分成三管（空白对照管和两管单染管。单染管分别加 5μl Annexin V-FITC 或 10μl PI，室温避光孵育 5 分钟。

5.11 上流式细胞仪检测。

5.12 使用 FlowJo 软件分析流式细胞仪数据，计算各组细胞的凋亡率，绘制凋亡率柱状图来比较凋亡差异。

## 六、实验结果。

表 1 不同耐药程度膀胱癌细胞流式细胞术结果

	野生型	低度耐药	中度耐药	高度耐药	野生型	低度耐药	中度耐药	高度耐药
凋亡率 (%)	4.05 <sup>±</sup>	1.8 <sup>±</sup>	1.93 <sup>±</sup>	1.69 <sup>±</sup>	(加药)	(加药)	(加药)	(加药)
存活率 (%)	95.95 <sup>±</sup>	98.2 <sup>±</sup>	98.07 <sup>±</sup>	98.31 <sup>±</sup>	95.66 <sup>±</sup>	97.08 <sup>±</sup>	97.52 <sup>±</sup>	97.92 <sup>±</sup>

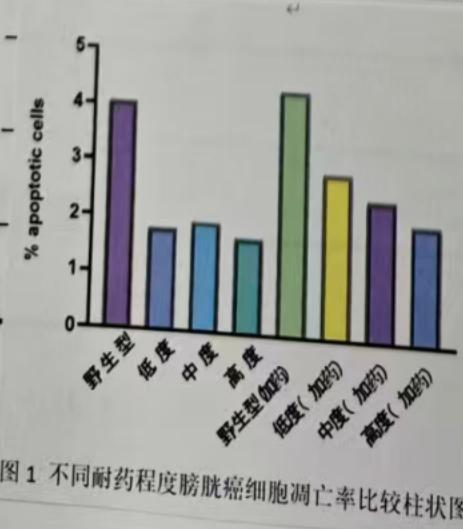


图 1 不同耐药程度膀胱癌细胞凋亡率比较柱状图

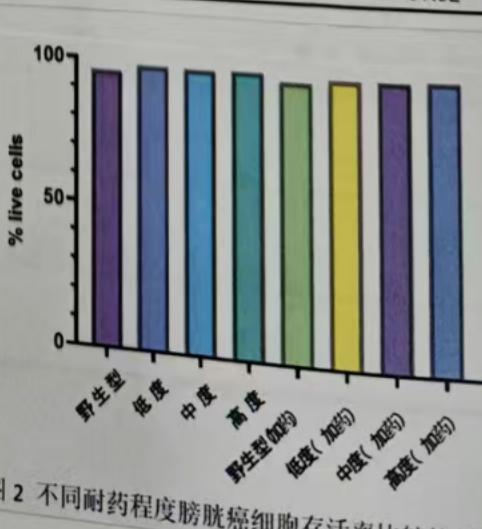


图 2 不同耐药程度膀胱癌细胞存活率比较柱状图

## 七. 结果分析

T24野生型细胞株及低、中、高耐药T24-RC48细胞株的存活率整体差距不大。不同耐药程度膀胱癌细胞的凋亡率虽然一定程度上与耐药程度呈负相关，但各细胞株的凋亡率整体较低，可能由以下问题造成：

- 1) 初始铺板密度过高( $2 \times 10^5/\text{孔}$ )，胞间接触抑制增强，渗透效率降低。
- 2) 36小时药物处理可能未达到凋亡进程的峰值，部分细胞未进入凋亡阶段，导致Annexin V-FITC/PI标记效率下降。
- 3) 晚期凋亡或坏死细胞可能已脱离培养板并漂浮于培养基中，未纳入检测样本，造成凋亡率低估。

针对这些可能的原因，我们对正式实验的方案做出如下改进：

- 1) 将细胞接种密度调整为 $1 \times 10^5/\text{孔}$ 。
- 2) 将RC48处理时间延长至48小时。
- 3) 在消化贴壁细胞前，先收集培养基中的悬浮细胞，合并离心后纳入检测，避免遗漏。