

皮下成瘤

一、实验目的

验证低/中/高耐药细胞株(T24-RC48-LR/MR/HR)及亲本细胞(T24-WT)在裸鼠体内的成瘤能力差异,为后续耐药机制研究提供模型。

二、实验内容

2.1 分组设计 实验组: 高度耐药 T24-RC48, 中度耐药 T24-RC48 (每组 n=6),

对照组: T24-WT (n=6)。

2.2 监测指标 1)肿瘤体积动态变化、成瘤率、肿瘤组织病理特征,
2)裸鼠体重及生存状态评估。

三、材料与试剂

3.1 材料 实验动物: BALB/c-nu裸鼠(4-5周龄, SPF 级) × 25

基质胶: Corning Matrigel®(货号: 354234), 4°C 预融。

1000 μl 枪头、100 μl 枪头、15ml 离心管、1.5ml EP管(均购自 oxygen 公司)

移液器购自 Eppendorf。T25 培养瓶、10cm 细胞培养皿购自 corning 公司

人膀胱移行细胞癌株(T24)及低、中、高度耐药株(T24-RC48)。冰盒。

3.2 试剂

PBS、胰酶均购自美国 Gibco 公司。胎牛血清(FBS, 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

福尔马林试剂(固定肿瘤组织)

四、实验仪器

超净台：苏州净化设备

生物安全柜(Thermo Scientific, A2级)

台式常温低速离心机(Eppendorf公司) 倒置显微镜(Olympus, CKX63)

电子游标卡尺(Mitutoyo, 精度 $\pm 0.1\text{mm}$) 注射器(Hamilton, 1ml)

五、实验步骤

5.1 将人膀胱移行细胞癌细胞株(T24)与低、中、高度耐药细胞株T24-KC48接种于10cm细胞培养皿，通过细胞传代扩增至每种1皿。

5.2 收细胞前一天将基质胶置于 4°C 冰上融化。

5.3 取对数生长期的T24细胞株与低、中、高度耐药株，胰酶消化后离心，PBS洗涤1次。
(1000rpm, 5min)

5.4 用McCoy's IA基础培养基重悬细胞，调整密度至 $1 \times 10^8 \text{ cells/ml}$ ，冰上保存备用。

在印管中将100μl细胞悬液与100μl 4°C 预离心的基质胶均匀混合。

5.5 动物房中用移液枪重悬，每只裸鼠皮下注射200μl混合悬液(含 1×10^7 细胞)

5.6 裸鼠单笼饲养于SPF环境，恒温($25\pm1^{\circ}\text{C}$)、湿度($50\pm5\%$)，自由摄食饮水。

5.7 接种后，每日观察注射部位有无感染、溃疡及异常行为。每周2次测量肿瘤长

径(L)和短径(W)，按公式计算体积： $V = \frac{\pi \times L \times W^2}{6}$ ，同步记录裸鼠体重变化(每周1次)。

5.8 第28天脊椎脱臼处死裸鼠，完整剥离肿瘤组织。

5.9 称重并测量计算体积后，部分组织固定于福尔马林(用于后续病理分析)，其余液氮冷冻

六、实验操作照片



图 1 收集细胞前准备



图 2 通过观察和触摸判断是否成瘤



图 3 部分组织保存于福尔马林中

七、实验结果

观察时期内，各组裸鼠体重无显著下降，活动均正常。前2周部分裸鼠注射部位出现肿大，疑似肿瘤。中度耐药组一只裸鼠于实验中期（4月20日）死亡，解剖时见肿瘤生长较大，且有恶变倾向，可能与操作方式或人体方面的导致。

表 1 成瘤记录表

组别	2025.4.9	2025.4.13	2025.4.16	2025.4.20	2025.4.23	2025.4.27	2025.4.30	2025.5.4
	长径 V/mm ²							
高+	5.71±4.81 69.14	6.30±5.64 104.88	6.63±5.96 123.25	7.46±6.47 163.43	6.35±3.66 44.52	4.20±3.00 19.78	4.30±2.91 19.06	5.60±4.00 46.89
高+	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
高+	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
高+	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
高+	6.37±4.32 62.21	5.67±5.24 81.47	6.12±5.56 99.01	6.80±6.41 146.22	6.37±4.85 78.42	6.80±4.70 78.61	7.04±4.97 91.00	4.40±3.20 23.58
高+	5.45±3.85 42.28	6.47±2.86 27.70	6.89±3.51 44.42	5.97±4.21 55.38	5.88±4.47 61.49	5.60±4.90 70.37	5.22±4.64 58.81	5.90±2.20 14.94
高+	0.00	3.52±2.41 10.70	4.02±2.83 16.85	5.47±3.54 35.87	5.98±4.14 53.64	6.40±4.70 73.99	5.75±4.91 72.55	5.60±3.30 31.91
中+	7.42±4.23 69.48	6.94±5.38 105.12	7.07±5.54 113.56	7.43±6.20 149.47	0.00	0.00	0.00	0.00
中+	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
中+	5.29±4.51 56.31	6.78±4.32 66.22	7.21±4.53 77.43	6.35±5.00 83.08	0.00	0.00	0.00	0.00
中+	5.63±5.38 85.28	6.17±4.81 74.71	6.52±5.24 93.69	6.24±3.76 46.17	6.08±5.04 80.82	6.13±4.98 79.56	6.05±4.88 75.40	6.10±4.70 70.52
中+	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
中+	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
低+	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	3.70±2.88 16.06	3.69±2.94 16.69	3.78±3.22 20.51
低+	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	3.60±3.00 16.96
低+	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
低+	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	3.61±2.67 13.47	3.50±3.10 17.60	3.73±2.83 15.63
低+	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	3.57±3.38 33.30	6.10±3.00 28.73	3.90±2.80 32.15
低+	7.31±4.58 80.25	4.82±4.65 54.54	5.12±5.01 67.25	6.40±4.80 77.17	6.33±4.56 68.88	6.83±4.43 70.15	6.74±4.55 73.02	6.55±4.40 20.08
低+	0.00	3.26±2.14 7.81	3.29±2.26 8.79	3.80±3.10 19.11	0.00	0.00	0.00	0.00
正+	0.00	4.26±3.17 22.40	4.50±3.30 25.65	5.30±3.73 38.59	5.58±3.41 33.96	6.20±3.10 31.18	0.00	0.00
正+	5.57±5.22 79.43	6.40±4.20 59.08	6.42±4.53 68.95	6.77±5.20 95.80	6.59±4.52 70.46	8.19±5.50 129.65	0.00	0.00
正+	0.00	3.63±2.74 14.26	4.21±3.11 21.31	5.14±3.64 35.64	0.00	0.00	0.00	0.00
正+	7.04±5.66 118.03	6.80±6.73 161.18	7.20±7.00 184.63	7.54±6.92 188.96	0.00	0.00	0.00	0.00
正+	6.61±4.92 83.74	7.40±4.32 72.27	7.83±4.76 92.84	8.43±5.27 122.53	5.25±3.62 36.00	7.00±3.30 39.89	7.19±3.12 36.63	7.18±3.15 37.28
正+	5.00±4.18 45.72	6.10±5.36 91.71	6.45±5.66 108.14	7.23±6.74 171.88	0.00	0.00	0.00	0.00

如表所示，高度耐药组小鼠成瘤率，达100%；低度耐药次之，为66.6%。

中度耐药组50%；野生型组小鼠成瘤率最低，仅为16.67%，显著高于其他组（低度66.67%，中度50%，野生型16.67%），表明耐药性与成瘤能力呈相关 $(\chi^2$ 检验, $P<0.05)$

表2 各组细胞株成瘤率对比

组别	高度耐药	中度耐药	低度耐药	野生型
成瘤率	100%	50%	66.67%	16.67%

如表3所示，高度耐药组($29.77 \pm 16.78 \text{ mm}^3$)显著大于低度耐药组($29.85 \pm 22.03 \text{ mm}^3$) (ANOVA分析, $P=0.032$)，但与野生型组(37.28 mm^3)无显著差异(ANOVA分析, $P=0.621$)。中度耐药组($48.5 \pm 20.15 \text{ mm}^3$)体积最大，显著大于野生型组(ANOVA分析, $P=0.004$)。高度耐药组($0.035 \pm 0.015 \text{ g}$)质量显著高于低度耐药组($0.022 \pm 0.012 \text{ g}$) (ANOVA分析, $P=0.038$)。

表3 各组细胞株成瘤情况概况

组别	高度耐药	中度耐药	低度耐药	野生型
体积(mm^3)	46.89 53.70 7.54 23.58 14.94 31.91 70.52 44.24 30.77 16.96 16.00 20.08 66.36 37.28			
质量(g)	0.02 0.06 0.04 0.02 0.04 0.03 0.05 0.03 0.05 0.02 0.01 0.02 0.04 0.03			

肿瘤生长曲线(图5)显示，各组裸鼠体重无明显下降，体重变化趋势十分接近。野生型组裸鼠整体水平略高于其他三组，高度耐药组整体略低于其他三组。



图4 解剖出的肿瘤照片

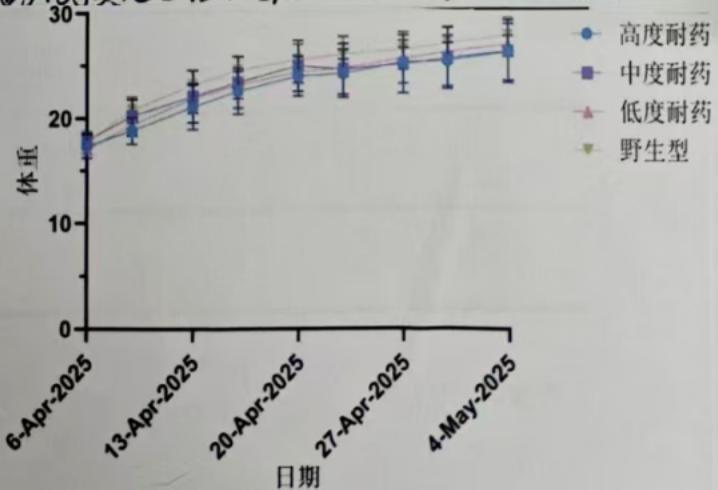


图5 各组裸鼠体重随时间变化折线图

八、结果分析

7.1 高度耐药细胞株T24-RL148成瘤率及肿瘤体积显著高于其他组，可能与其耐药性相关的基因突变增强了存活与增殖能力。

7.2 中度耐药组成瘤率偏低，可能与小鼠非肿瘤因素死亡导致样本量减少有关。

7.3 野生型组成瘤率低可能由于亲本细胞(T24-WT)缺乏耐药性相关适应性改变。

7.4 各组体重无显著差异表明实验条件下肿瘤负荷未导致系统性代谢紊乱。

7.5 野生型组仅例成瘤，统计效力受限，但其单例体积(37.28mm³)与高度耐药组无显著差异。中度耐药组部分样本因小鼠死亡导致数据缺失。

7.6 实验局限性：本实验暂未检测耐药相关分子标志物，且实验周期较短(28天)，长期观察可能更全面反映肿瘤进展差异。

综上所述，高度耐药细胞株在裸鼠体内表现出最强的成瘤能力，为后续研究耐药机制提供了可靠体内模型支持。可以进一步进行转录组学或蛋白组学分析，揭示耐药性与成瘤表型的分子关联。