

2025 年国际定向进化大赛实验记录

实验时间： 2025 年 6 月 25 日 18:00 — 2025 年 6 月 28 日 21:00

22. Transwell 细胞侵袭（二）

一、实验目的

本实验旨在利用 Transwell 侵袭实验检测 T24 细胞株及低、中、高耐药 T24-RC48 细胞株的侵袭能力，探究耐药性与细胞侵袭行为的关系。

二、实验内容

2.1 实验设计

样本类型：T24 细胞株及低、中、高耐药 T24-RC48 细胞株

细胞密度：每孔 50000 个细胞。

重复次数：每组 3 个复孔。

基质胶：Transwell 小室预先包被 Matrigel 基质胶（1:8 稀释）

2.2 测定原理

Transwell 侵袭实验在迁移实验基础上增加了基质胶屏障。实验中，Transwell 小室上室预先铺 Matrigel 模拟细胞外基质环境，细胞需分泌蛋白酶降解基质胶后，才能穿过微孔膜向下室迁移。通过比较穿过基质胶的细胞数量，可评估细胞的侵袭能力。

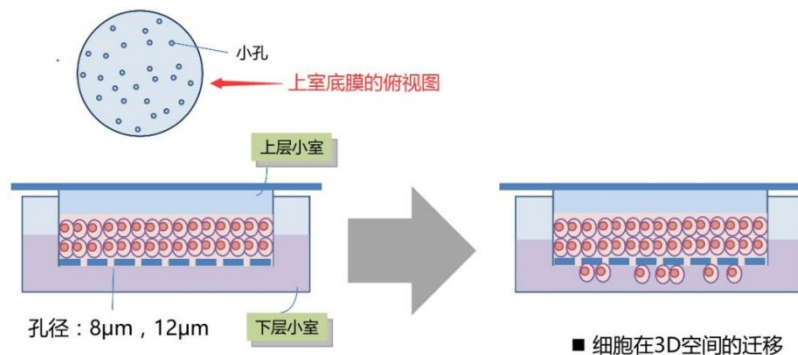


图 1 Transwell 小室原理

三、材料与试剂

3.1 材料

T25 细胞培养瓶

枪头、15ml 离心管均购自 Axygen 公司

吸管购自国产公司

移液器：Eppendorf

2025 年国际定向进化大赛实验记录

实验时间： 2025 年 6 月 25 日 18:00 — 2025 年 6 月 28 日 21:00

Transwell 小室（8 μ m 孔径）

中，高耐药细胞株 T24-RC48

3.2 试剂

PBS、胰酶、胎牛血清均购自美国 Gibco 公司

基质胶 Matrigel 购自康宁，货号 354234

McCoy's5A 培养基购自上海源培生物科技股份有限公司

4%多聚甲醛

结晶紫

四、实验仪器

超净台：苏州净化设备厂

台式常温低速离心机

倒置相差显微镜

五、实验步骤

5.1 将 T24 细胞株及低、中、高耐药 T24-RC48 细胞株分别接种于 T25 细胞培养瓶。

5.2 24 小时后，将每瓶细胞的完全培养基换成含有 1%FBS 的 McCoy's5A 培养基饥饿处理 24 小时。

5.3 在 4°C条件下（冰上操作）将 Matrigel 胶用无血清的 McCoy's5A 细胞培养基 1:8 进行稀释。

5.4 取 60 μ l 均匀添加到 Transwell 小室上室面，37°C培养箱中孵育 3h，使基质胶聚合成薄膜。

5.5 孵育后将上室中多余液体吸掉，加入基础培养基 100 μ l /小室，置于培养箱 30min，进行基底膜水化。

Tips:

- （1）将枪头沿小室内壁将 Matrigel 轻轻打出，不要产生气泡，切忌戳到小室滤膜。
- （2）加入的 Matrigel 胶的体积不可太大，把聚碳酸酯膜浸湿即可。
- （3）Matrigel 在过高或过低的温度均易凝固，操作所需枪头等都应提前在 4°C预冷。
- （4）铺胶时保证液面水平，胶的厚度均匀一致，切勿产生气泡。

5.6 下室加入 20% 血清 McCoy's5A 培养基 600 μ l /孔，然后用镊子将 Transwell 小室置于

2025 年国际定向进化大赛实验记录

实验时间： 2025 年 6 月 25 日 18:00 — 2025 年 6 月 28 日 21:00

24 孔板内。

5.7 用胰酶消化处理后的细胞，制备成单细胞悬液，调整细胞浓度为 5×10^5 个/ml。

5.8 取 100 μ l 细胞悬液加入 Transwell 小室的上室，每组设置 3 个复孔，继续培养 48h。

5.9 加入 800 μ l PBS 至空白培养孔，轻轻放入已经吸除培养基的小室，轻轻清洗（全部的清洗操作注意不要刮蹭或冲落膜下部已经迁移的细胞）。

5.10 轻轻擦去小室内层的细胞：用棉签，可以稍微扯松一点，确保边缘也被擦干净，擦后用 PBS 冲洗内壁。

5.11 将小室转移至加有 800 μ l/孔 4%多聚甲醛的空白培养孔中，室温固定 15min；PBS 清洗两遍，每次 2min（所有清洗操作泡着就行，少晃动，不要涮洗）。

5.12 将小室转移至加有结晶紫染液 600 μ l/孔的空白培养孔中，染色 10min；染色结束后用清水洗去浮色，洗两遍，每次 2min。

5.13 将染色够的小室置于洁净载玻片，注意不要完全干燥，稍微湿润会让细胞形态更好；十字划分进行拍照：沿十字线拍一遍再把四个角各拍一遍。

5.14 使用图像分析软件 Image J 测量并计算迁移细胞数量。

六、实验结果

本次实验中，调整细胞密度后（每室铺板细胞数 50000 个），Transwell 小室下室表面细胞分布显著改善。结晶紫染色显示，T24 细胞株及低、中、高耐药 T24-RC48 细胞株的 Transwell 小室下室表面可见密集分布的迁移细胞（图 2），明显高于首次实验（14.细胞侵袭（一））的结果。

结晶紫染色结果显示，迁移细胞呈均匀分散状态，单个细胞边界清晰，无显著重叠（图 2）。通过 Image J 定量分析发现，T24 野生型细胞迁移数量为（721.0 \pm 74.39）个/视野，低耐药 T24-RC48 细胞为（808.7 \pm 98.99）个/视野，中耐药 T24-RC48 细胞为（1075 \pm 141.6）个/视野，高耐药 T24-RC48 细胞为（1304 \pm 115.0）个/视野（图 3）。统计学分析显示：野生型与低耐药组（ $P=0.4558$ ）间无统计学差异、野生型与中耐药组（ $P<0.0001$ ）野生型与高耐药组（ $P<0.0001$ ）之间均呈现极显著差异。

2025 年国际定向进化大赛实验记录

实验时间： 2025 年 6 月 25 日 18:00 — 2025 年 6 月 28 日 21:00

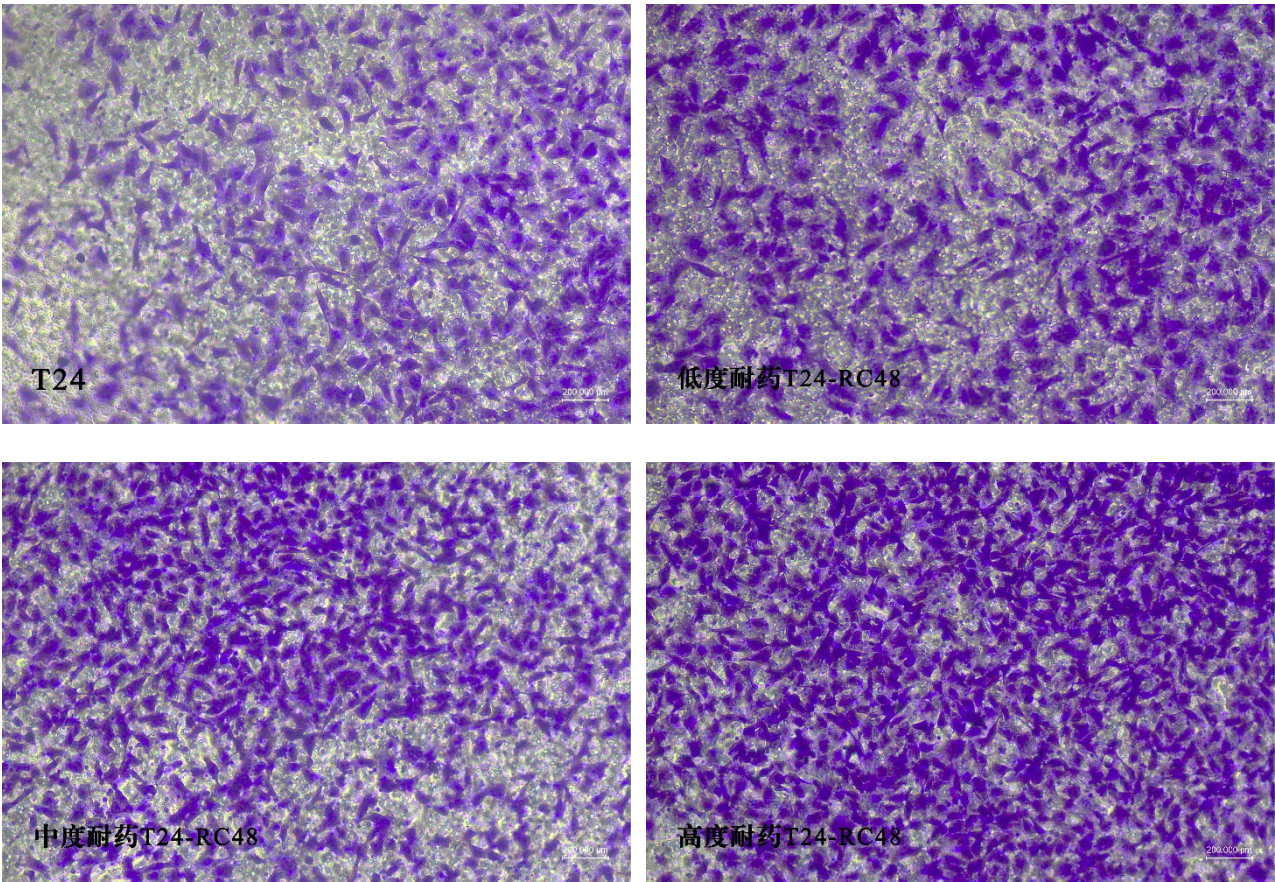


图 2 倒置相差显微镜下观察结晶紫染色后的 Transwell 小室

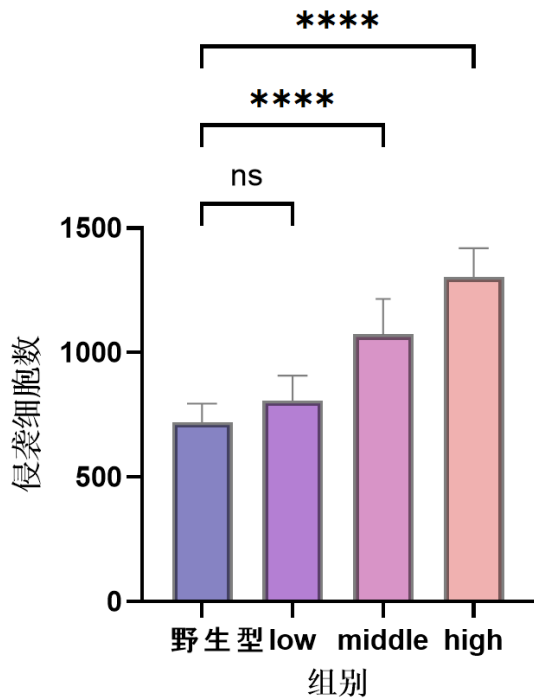


图 3 T24 野生型及低、中、高耐药 T24-RC48 细胞株的细胞侵袭情况

七、结果分析

2025 年国际定向进化大赛实验记录

实验时间：2025 年 6 月 25 日 18:00 — 2025 年 6 月 28 日 21:00

实验结果表明，T24-RC48 耐药细胞株的侵袭能力随耐药性增强呈现显著上升趋势，其中高耐药组细胞侵袭数量最高，提示耐药性与细胞侵袭能力呈正相关。具体数据显示，野生型 T24 细胞迁移数量为 (721.0 ± 74.39) 个/视野，而低、中、高耐药 T24-RC48 组分别为 (808.7 ± 98.99) 、 (1075 ± 141.6) 和 (1304 ± 115.0) 个/视野（图 3）。统计学分析显示，野生型与中、高耐药组间差异显著（中、高耐药组 $P < 0.0001$ ），表明耐药性增强可能通过特定分子机制促进了细胞的侵袭行为。相较于首次实验（14.细胞侵袭（一）），本次通过以下改进显著提升了实验灵敏度与数据可靠性：

（1）将每孔接种量从 10,000 增至 50,000 个细胞，增加穿透基质胶的细胞基数，避免因细胞数量不足导致的假阴性结果；

（2）下室血清浓度提高至 20%，形成更显著的趋化梯度，有效驱动细胞迁移；

（3）采用全新 Transwell 小室，降低背景干扰，染色后细胞观察更为清晰。

进一步分析提示耐药性增强可能伴随细胞代谢重编程或蛋白酶分泌能力的上调，从而提升其降解基质胶及迁移效率。中耐药组侵袭能力已显著高于野生型，而高耐药组侵袭能力进一步递增，提示耐药性发展可能激活促侵袭信号通路。后续研究可结合蛋白酶活性检测，明确耐药性与基质降解能力的分子关联。本实验为解析膀胱癌 ADC 药物耐药机制提供了新视角，表明耐药性可能通过增强细胞侵袭能力加速肿瘤转移进程，这对临床干预策略的优化具有潜在指导意义。