

2025 年国际定向进化大赛实验记录

实验时间： 2025 年 5 月 24 日 18:00 — 2025 年 5 月 29 日 21:00

13. Transwell 细胞迁移（二）

一、实验目的

本实验旨在利用 Transwell 实验检测 T24 野生型细胞株及低、中、高耐药 T24-RC48 细胞株的迁移能力，分析耐药细胞株的迁移特性，为揭示膀胱癌 ADC 耐药机制提供实验依据。

二、实验内容

2.1 实验设计

样本类型：T24 野生型细胞株、低/中/高度耐药 T24-RC48 细胞株。

重复次数：每组 3 个复孔。

2.2 测定原理

Transwell 测细胞迁移的原理是基于细胞的趋化性运动。实验中，细胞被放置在上室，而下室加入含有趋化因子的培养基，形成化学浓度梯度。细胞感知到这种梯度后，会主动穿过带有微孔的膜向趋化因子浓度较高的下室迁移。实验结束后，通过显微镜观察并计数穿过膜的细胞数量，即可评估细胞的迁移能力。

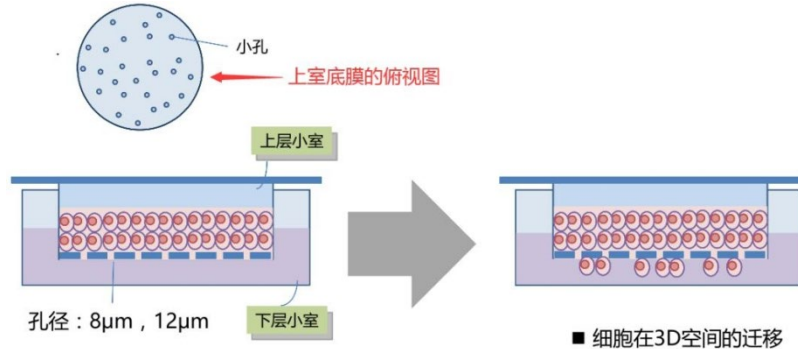


图 1 Transwell 小室原理

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

Transwell 小室（8μm 孔径）

2025 年国际定向进化大赛实验记录

实验时间： 2025 年 5 月 24 日 18:00 — 2025 年 5 月 29 日 21:00

人膀胱移行细胞癌细胞株 (T24)

低, 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

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 野生型细胞株及低、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 将 Transwell 小室放入 24 孔板中, 下室加入 500 μ l 含 10%FBS 的 McCoy's5A 培养基。

5.4 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 1×10^5 个/ml。

5.5 取 100 μ l 细胞悬液加入 Transwell 小室的上室, 每组设置 3 个复孔。

5.6 将 24 孔板置于 37°C、5%CO₂培养箱中培养 24 小时。

5.7 取出 Transwell 小室, 用 PBS 轻轻冲洗上室内外表面, 去除未迁移的细胞。

5.8 用棉签轻轻擦去上室内层未迁移的细胞。

5.9 使用 4%多聚甲醛固定细胞 15 分钟。

5.10 用 PBS 冲洗 2 次, 每次 3 分钟。

5.11 使用结晶紫染色 10 分钟。

5.12 清水洗去浮色, 晾干。

5.13 将染色后的小室置于湿润的载玻片上, 沿十字线拍照记录细胞迁移情况。

5.14 使用图像分析软件 Image J 测量并计算迁移细胞数量。

2025 年国际定向进化大赛实验记录

实验时间： 2025 年 5 月 24 日 18:00 — 2025 年 5 月 29 日 21:00

六、实验结果

调整细胞密度后（每室铺板细胞数 10000 个），Transwell 小室下室表面细胞分布显著改善。结晶紫染色显示，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（752±31.6）个/视野，低耐药 T24-RC48 细胞为（894±144.3）个/视野，中耐药 T24-RC48 细胞为（978±133.9）个/视野，高耐药 T24-RC48 细胞为（1252±338.3）个/视野（图 3）。统计学分析表明：野生型与低耐药组（ $P=0.6057$ ）、野生型与中耐药组（ $P=0.2394$ ）均无显著性差异；而野生型与高耐药组间差异极显著（ $P<0.01$ ）。

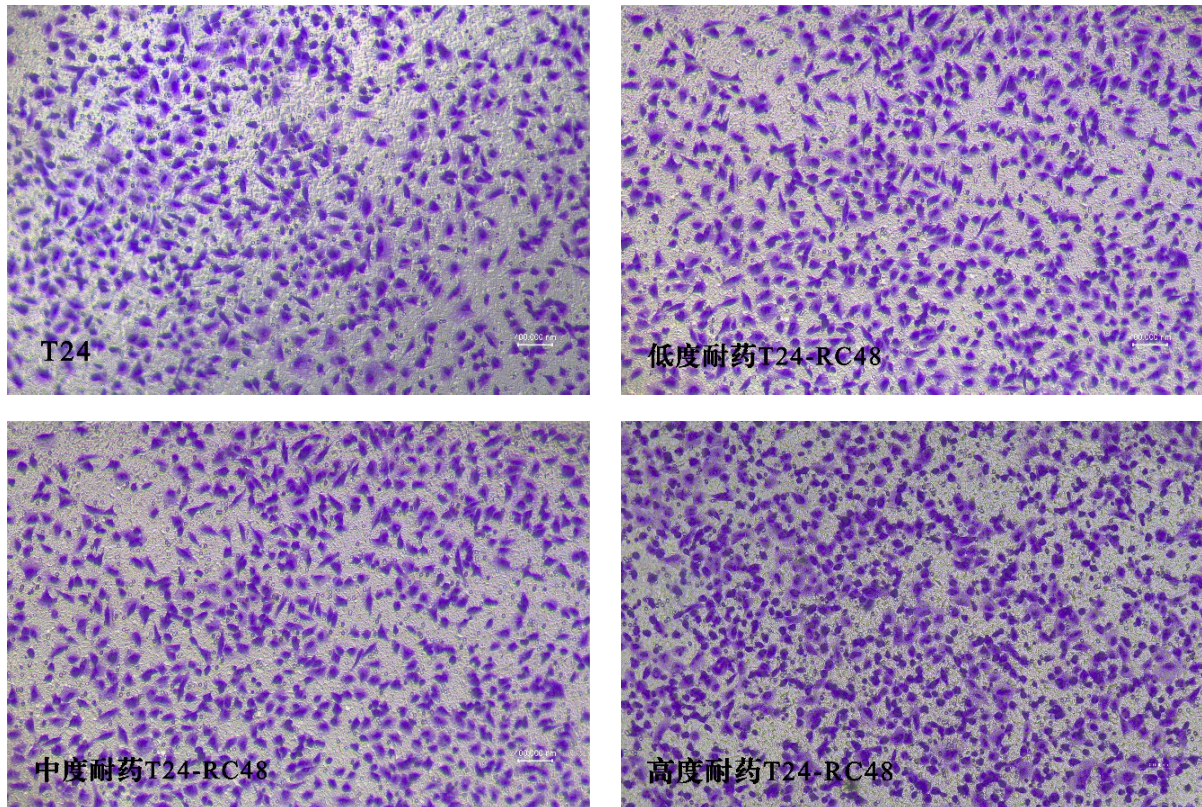


图 2 倒置相差显微镜下观察结晶紫染色后的 Transwell 小室

2025 年国际定向进化大赛实验记录

实验时间： 2025 年 5 月 24 日 18:00 — 2025 年 5 月 29 日 21:00

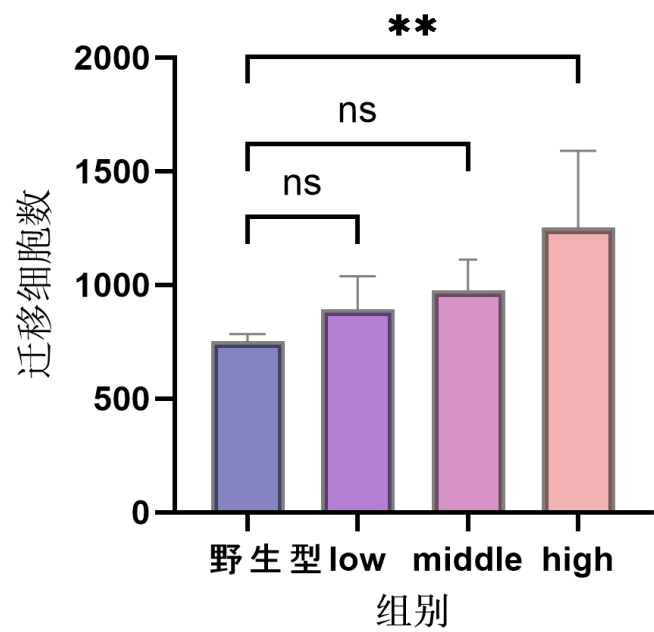


图 3 T24 野生型及低、中、高耐药 T24-RC48 细胞株的细胞迁移情况

七、结果分析

本次实验通过降低细胞密度 (1×10^5 个/ml)，有效避免了细胞重叠问题，显著提升了迁移细胞计数的准确性。结果显示，T24-RC48 高耐药细胞的迁移能力较野生型显著增强 ($P < 0.01$)，而低、中耐药细胞与野生型无统计学差异，提示高度耐药可能通过特定机制来促进迁移。

进一步分析表明，细胞密度的优化是实验成功的关键：首次实验中高密度导致的细胞聚集掩盖了高耐药细胞的真实迁移能力，而本次调整后数据可靠性显著提高。野生型与高耐药组的差异可能与其对化疗药物（如 ADC）的耐受性相关，高度耐药细胞为逃避药物杀伤，可能激活迁移相关信号通路。后续研究可结合分子机制实验（如 Western blot 检测迁移标志物）深入解析耐药性与迁移能力的关联，为膀胱癌耐药机制研究提供新依据。