

# 2025 年国际定向进化大赛实验记录

实验时间：2025 年 5 月 9 日 18:00 — 2025 年 5 月 14 日 17:00

## 细胞周期流式检测（二）

### 一、实验目的

本实验旨在利用细胞周期检测试剂盒（Cell Cycle Staining Kit），检测 T24 野生型细胞株及低、中、高耐药 T24-RC48 细胞株加药前后的细胞周期分布，分析耐药细胞株的周期变化，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（T24 野生型细胞株及低、中、高耐药 T24-RC48 细胞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

在细胞周期中，G0/G1 期细胞的 DNA 含量为 2N，S 期细胞的 DNA 含量介于 2N 到 4N 之间，G2/M 期细胞的 DNA 含量为 4N。细胞周期检测试剂盒（Cell Cycle Staining Kit）使用 DNA 结合染料碘化丙啶（Propidium Iodide, PI），对细胞进行染色，通过流式细胞仪检测细胞的 DNA 含量，从而得到细胞周期分布的直方图。通过比较加药前后的细胞周期分布直方图，可以分析药物对细胞周期进程的影响，例如是否导致细胞周期阻滞在某个特定阶段。

### 三、材料与试剂

#### 3.1 材料

枪头、15ml 离心管均购自 Axygen 公司

吸管购自国产公司

移液器：Eppendorf

六孔板（Corning 公司）

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

# 2025 年国际定向进化大赛实验记录

实验时间：2025 年 5 月 9 日 18:00 — 2025 年 5 月 14 日 17:00

McCoy's5A 培养基购自上海源培生物科技股份有限公司

细胞周期检测试剂盒（联科生物，CCS012）

## 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 公司流式细胞仪（BD 公司，非 C6 型）

## 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 6 孔板中，每种细胞铺 6 个孔，每孔  $2 \times 10^5$  个细胞。

**5.2** 24 小时后，每种细胞取 3 个孔正常换液，另外 3 孔换成含有  $200 \mu\text{g/ml}$  维迪西妥单抗的完全培养基处理 36 小时。

**5.3** 弃去培养基，用 PBS 洗涤细胞 3 次。

**5.4** 加入胰酶消化细胞，轻轻拍打培养瓶使细胞脱落。

**5.5** 收集每孔细胞悬液， $1000 \text{rpm}$  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** 加入 1 ml DNA Staining solution 和  $10 \mu\text{l}$  Permeabilization solution，涡旋振荡 5 - 10 秒混匀，室温避光孵育 30 分钟。

**5.8** 上流式细胞仪检测。

**5.9** 使用 FlowJo 软件对流式细胞仪数据进行分析，计算细胞处于各细胞周期阶段的占比，并比较不同耐药组与野生型细胞株在细胞周期分布上的差异。

## 六、实验结果

经 RC48 处理 36 小时后，流式细胞术检测显示各组细胞周期分布发生显著变化：从各组细胞周期分布直方图（图 1）中可以看出，所有细胞经加药处理的 G2 期峰均明显升高，其中野生型 T24 细胞株最为明显。

未加药情况下，低、中、高耐药细胞株的直方图肉眼观察无明显区别；加药情况下，低、中、高耐药细胞株的直方图肉眼观察同样无明显区别。

野生型无论加药前后，其 G1 期峰和 G2 期峰对应的横坐标与耐药组细胞有所不同。

2025 年国际定向进化大赛实验记录

实验时间： 2025 年 5 月 9 日 18:00 — 2025 年 5 月 14 日 17:00

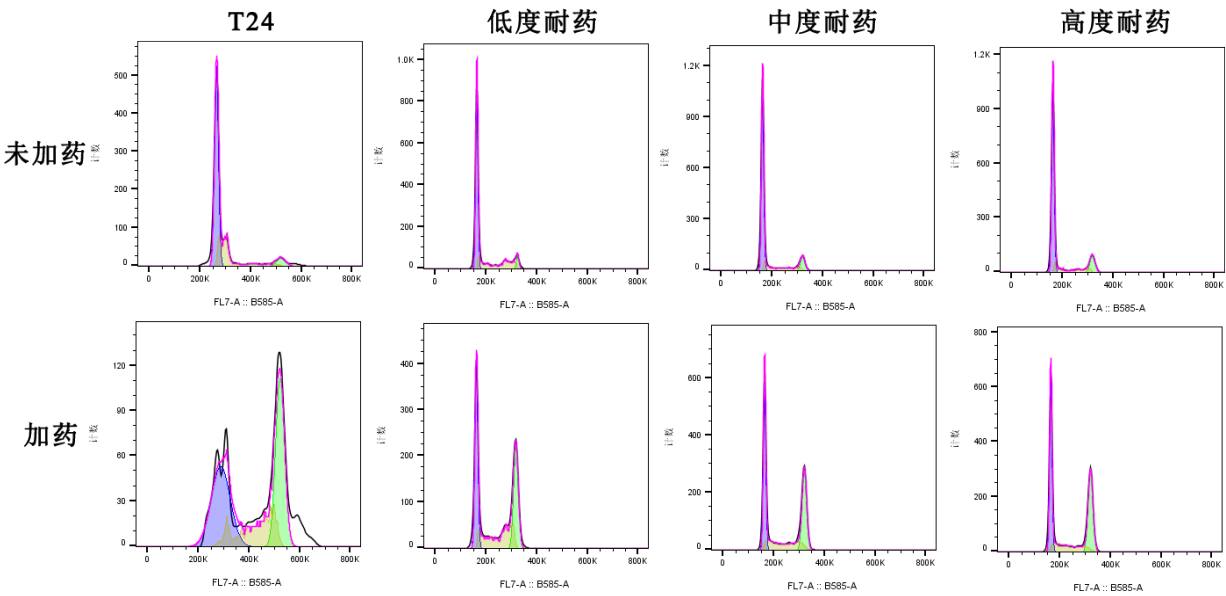


图 1 各组细胞周期分布直方图

图 2 显示，各组细胞 G1 期占比经加药处理后均显著下降 ( $p<0.0001$ )， G2 期占比经加药处理后均显著上升 ( $p<0.0001$ )。而对于 S 期，野生型 S 期占比经加药处理后显著下降 ( $p<0.05$ )，低度耐药组 S 期占比加药与未加药无显著差异，中度耐药组与高度耐药组 S 期占比经加药处理后均显著上升 ( $p<0.0001$ )。

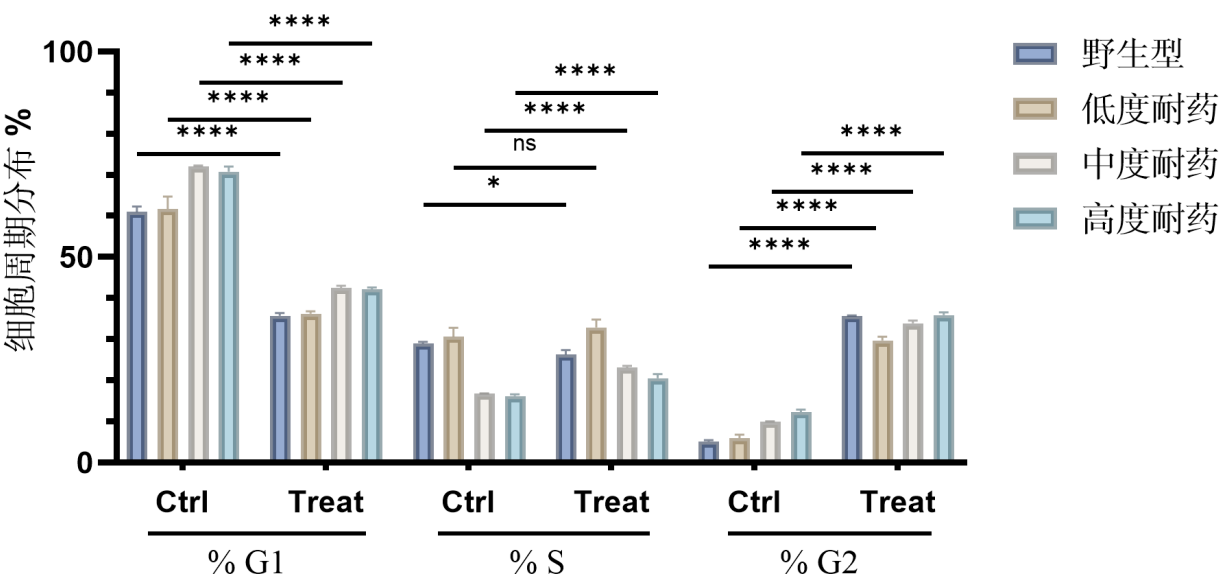


图 2 RC48 处理对 T24 野生型及耐药细胞株周期阶段占比的影响分析图

七、结果分析

野生型与耐药组细胞在 G1 期和 G2 期峰的横坐标 (DNA 含量分布位置) 存在差异表

# 2025 年国际定向进化大赛实验记录

实验时间：2025 年 5 月 9 日 18:00 — 2025 年 5 月 14 日 17:00

明，耐药细胞可能因长期药物压力导致 DNA 复制模式或染色体稳定性发生适应性改变，从而改变 DNA 含量分布特征。

RC48 处理后所有组别均出现 G1 期占比下降和 G2 期占比上升，表明药物可能通过诱导 G2/M 期阻滞抑制细胞增殖。其中，野生型 T24 细胞株 G2 期增幅最大，提示其对 RC48 的敏感性较高。

在加药与未加药条件下耐药细胞株 S 期占比变化差异显著：低耐药组 S 期无变化，而中、高耐药组 S 期占比增加。S 期进展可能与耐药细胞中 DNA 损伤修复能力增强（如 ATM/ATR 通路激活）或复制压力耐受性提升有关。此外，耐药细胞 G2 期增幅低于野生型，可能通过上调抗凋亡蛋白（如 BCL-2）或削弱 G2/M 检查点功能来逃逸药物作用。

综上所述，RC48 对敏感细胞的周期调控作用显著，而耐药细胞可能通过 S 期适应性增强及对 G2/M 期的特殊调控介导耐药性。