

2025 年国际定向进化大赛实验记录

实验时间：2025 年 4 月 27 日 19:00 — 2025 年 4 月 30 日 17:00

细胞凋亡流式检测（二）

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 细胞株的凋亡情况，分析耐药细胞株的凋亡特性，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 48 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，使细胞核染红。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（Corning 公司）

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）

2025 年国际定向进化大赛实验记录

实验时间： 2025 年 4 月 27 日 19:00 — 2025 年 4 月 30 日 17:00

McCoy's5A 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）

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 1×10^5 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（RC48）的完全培养基处理 48 小时。

5.3 收集原有培养基，用 PBS 洗涤细胞 3 次。

5.4 加入 Accutase 消化细胞，轻轻拍打培养瓶使细胞脱落。

5.5 收集每孔细胞悬液并与原有培养基混合， 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 $5 \times \text{Binding Buffer}$ 稀释为 $1 \times \text{工作液}$ ，取 $500 \mu\text{l}$ $1 \times \text{Binding Buffer}$ 重悬细胞，每管加入 $5 \mu\text{l}$ Annexin V-FITC 和 $10 \mu\text{l}$ PI，轻柔涡旋混匀，室温避光孵育 5 分钟。

5.8 取 1×10^6 个未加药处理野生型细胞，加入 $500 \mu\text{l}$ Apoptosis Positive Control Solution，置冰上孵育 30 分钟。

5.9 离心后弃上清，加入适量预冷 $1 \times \text{Binding Buffer}$ 重悬，并加入数量相同且未经处理的活细胞与之混合。

5.10 加入预冷 $1 \times \text{Binding Buffer}$ 补充至 1.5 ml ，等分成三管，其中一管为空白对照管、两管为单染管。单染管分别加入 $5 \mu\text{l}$ Annexin V-FITC 或 $10 \mu\text{l}$ 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不同耐药组与野生型细胞株的凋亡差异。

2025 年国际定向进化大赛实验记录

实验时间： 2025 年 4 月 27 日 19:00 — 2025 年 4 月 30 日 17:00

六、实验结果

如图 1 所示，各组细胞在加药处理条件下细胞凋亡率均升高。在未加药组中：低度耐药细胞凋亡率显著低于野生型细胞 ($p<0.001$)，中度耐药细胞凋亡率显著低于低度耐药细胞 ($p<0.001$)，高度耐药细胞凋亡率显著低于中度耐药细胞 ($p<0.05$)；在加药组中：低度耐药细胞凋亡率显著低于野生型细胞 ($p<0.0001$)，中度耐药细胞凋亡率显著低于低度耐药细胞 ($p<0.0001$)，高度耐药细胞凋亡率显著低于中度耐药细胞 ($p<0.0001$)。

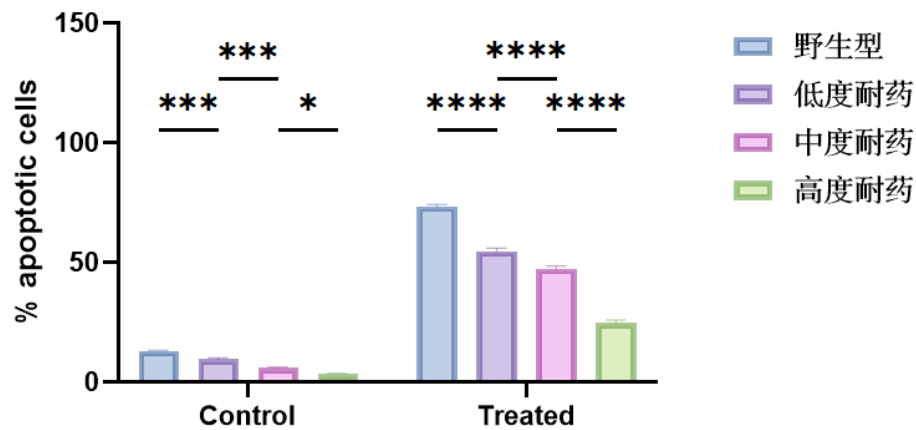


图 1 不同耐药程度膀胱癌细胞凋亡率比较柱状图

如图 2 所示，各组细胞在加药处理条件下细胞存活率均下降。在未加药组中：低度耐药细胞存活率显著高于野生型细胞 ($p<0.001$)，中度耐药细胞存活率显著高于低度耐药细胞 ($p<0.001$)，高度耐药细胞存活率显著高于中度耐药细胞 ($p<0.05$)；在加药组中：低度耐药细胞存活率显著高于野生型细胞 ($p<0.0001$)，中度耐药细胞存活率显著高于低度耐药细胞 ($p<0.0001$)，高度耐药细胞存活率显著高于中度耐药细胞 ($p<0.0001$)。

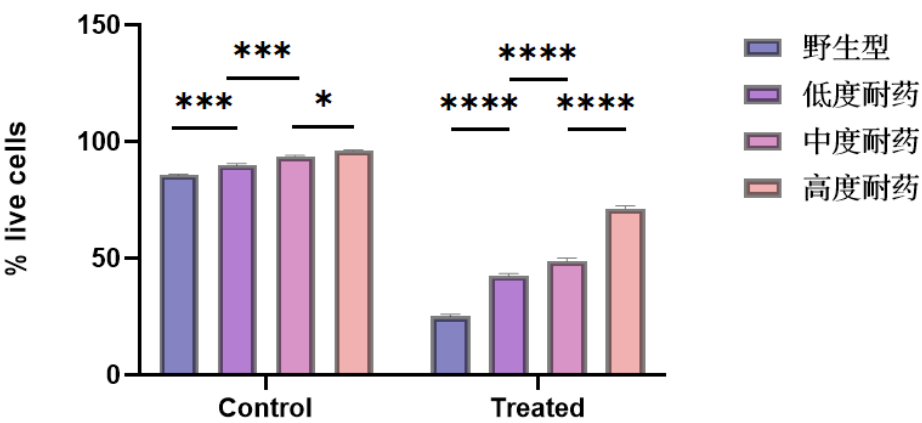


图 2 不同耐药程度膀胱癌细胞存活率比较柱状图

九、结果分析

2025 年国际定向进化大赛实验记录

实验时间：2025 年 4 月 27 日 19:00 — 2025 年 4 月 30 日 17:00

本次实验针对上一次实验做出如下优化改进：

- 将细胞接种密度调整为 1×10^5 /孔，减少接触抑制，提升药物与细胞的作用效率。
- 将 RC48 处理时间延长至 48 小时，确保凋亡进程充分完成。
- 在消化前先收集培养基中的悬浮细胞，合并离心后纳入检测，避免数据遗漏。

本次实验的改进显著提升了结果的可靠性和科学性。数据表明，膀胱癌细胞株的耐药程度与凋亡抵抗呈正相关：耐药性越高，药物的凋亡诱导和存活抑制效果越弱。值得注意的是，尽管耐药细胞对药物产生了适应性，但其仍保留一定的药物敏感性。这一结果提示，凋亡抑制可能是膀胱癌细胞对维迪西妥单抗耐药的重要机制之一。这种凋亡抑制可能源于 T24-RC48 细胞在长期培养和筛选过程中逐渐形成的适应机制，降低了药物对细胞的杀伤作用。该结果对于深入研究 T24 细胞对 RC48 药物的耐药机制具有重要意义。其支持了 T24-RC48 细胞株作为研究 RC48 耐药机制的合适模型，为后续更深入的耐药机制研究奠定了基础。提示我们在后续的研究中，可以进一步探究 T24-RC48 细胞具体的耐药机理，为开发更有效的抗癌药物和治疗策略提供理论依据。