

生长曲线测定(二)

一、实验目的

通过CCK-8法动态监测T24细胞株及低、中、高耐药T24-RC48细胞株在200 μ g/ml RC48处理下的增殖能力，连续测定5天(0h、24h、48h、72h、96h、120h)的吸光度值，绘制生长曲线，评估药物对细胞生长的长期抑制作用。

二、实验内容

2.1 实验设计

细胞类型：T24野生型细胞株、低/中/高耐药T24-RC48细胞株。

药物处理：维迪西妥单抗(RC48)浓度梯度(0、50、100、200、500 μ g/ml)。

时间点：0h(D0)、24h(D1)、48h(D2)、72h(D3)、96h(D4)、120h(D5)。

重复设计：每组6个复孔。

2.2 测定原理

CCK-8试剂中的WST-8被活细胞线粒体脱氢酶还原为橙黄色甲瓒，吸光度(OD 450nm)与活细胞数量正相关。

三、材料与试剂

3.1 材料

1000 μ l枪头、100 μ l枪头、15ml离心管均购自Axygen公司

96孔板(Corning公司)×6

移液器:Eppendorf

T25培养瓶购自Corning公司

人膀胱移行细胞癌细胞株(T24)

低/中/高度耐药T24-RC48细胞株

3.2 试剂

PBS、胰酶均购自美国Gibco公司

McCoy's 5A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)

维迪西妥单抗(RC48, 荣昌生物制药股份有限公司)

CCK-8试剂盒

四、实验仪器

台式常温低速离心机(Eppendorf公司)

超净工作台(苏州净化设备厂)

酶标仪(Thermo Fisher Scientific)

五、实验步骤

5.1 取处于对数生长期的T24细胞株及低/中/高度耐药细胞株T24-RC48,

胰酶消化后离心重悬, 调整密度至 3×10^4 个/ml。

5.2 将细胞悬液按实验设计分别接种至6块96孔板中并编号每

种细胞在每板各接种 12 个孔。每孔 100 μl (含 3×10^3 个细胞), 边缘孔加 PBS 防蒸发。置于 37°C、5% CO₂ 的培养箱中培养。

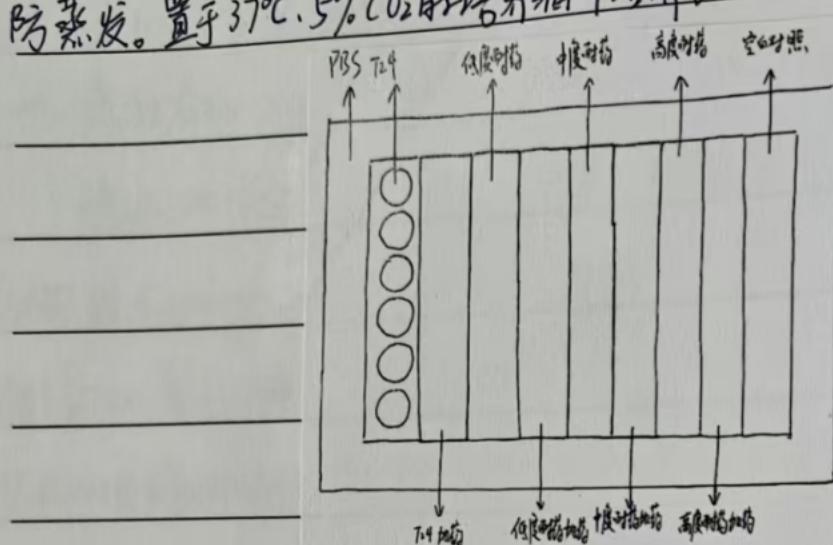


图 1 各组细胞悬液在 96 孔板中的分布情况

5.3 过夜后细胞贴壁, 吸除旧培养基, 取 5 个 96 孔板更换新鲜培养基 (每个培养板中取 6 个孔的新鲜培养基中加 200 μg/ml 的 RC48), 记此时的时间为 0, 置于 37°C、5% CO₂ 的培养箱中继续培养。剩下 1 板 (1 号板) 按照 CCK-8 试剂盒说明书要求将显色液加入培养孔中, 在培养箱中继续培养 1 h, 用酶标仪测定 450 nm 吸光度值。

5.4 分别于 24 h、48 h、72 h、96 h、120 h 取出对应孔板按照 CCK-8 试剂盒说明书要求进行处理并测定 450 nm 吸光度值。

5.5 以 RC48 处理时间为横坐标, 450 nm 处的实验组 OD 值为纵坐标, 绘制绘制时间-OD 值曲线, 即细胞增殖曲线。

六、实验结果

6.1 细胞形态观察

从图2的倒置相差显微镜照片可以看出，经过120小时，所有细胞株(T24野生型及低/中/高耐药T24-RC48)均保持着较为良好的生长状态，细胞形态相对完整，贴壁紧密，边缘清晰，未见明显凋亡小体或碎片，且细胞密度约为100%。

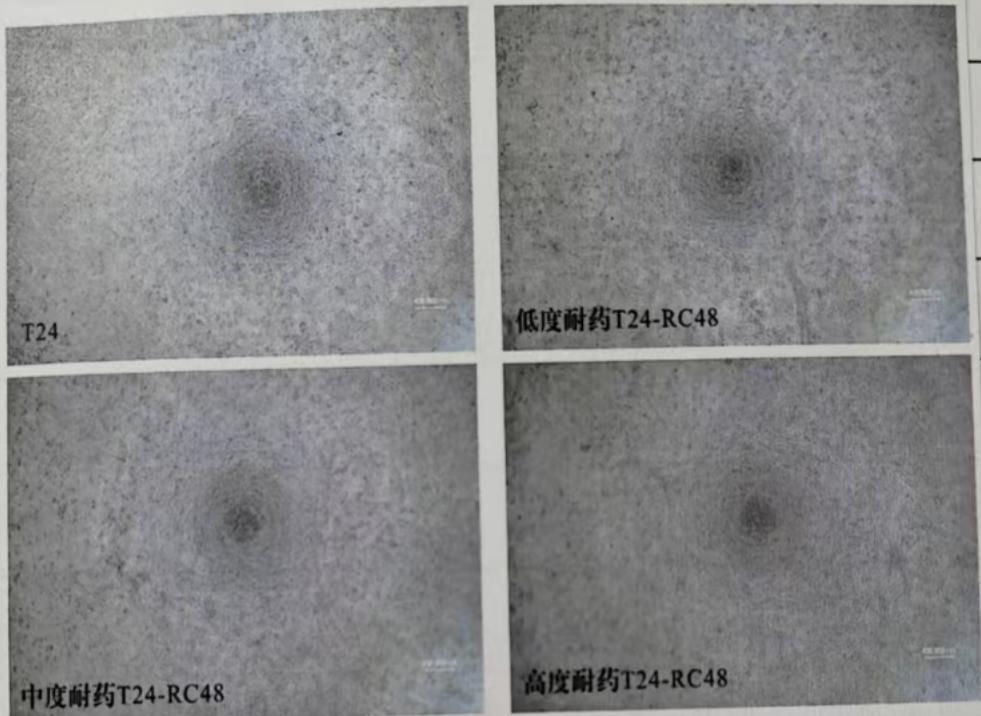


图2 低/中/高度耐药细胞株 T24-RC48 于 120h 的照片 (不加药)

从图3的倒置相差显微镜照片可以看出，经过120小时的药物处理后，T24细胞株及低/中/高度耐药细胞株T24-RC48密度明显比不加药的组有所下降，其中，T24野生型细胞株细胞大量脱落，残留细胞体积缩小，呈现典型凋亡形态；T24-RC48低耐药株贴壁部分密度仅稍高于T24野生型细胞株，且细胞丧失(笔误)，已无法判断细胞是否存活；T24-RC48中耐药株密度约

为50%，总体细胞形态较野生型及低耐药株而言有所好转，但仍有在许多形态异常的细胞；T24-RC48高耐药株的密度为四组加药细胞中最高，且形态良好，增殖区域可观察到分裂相。

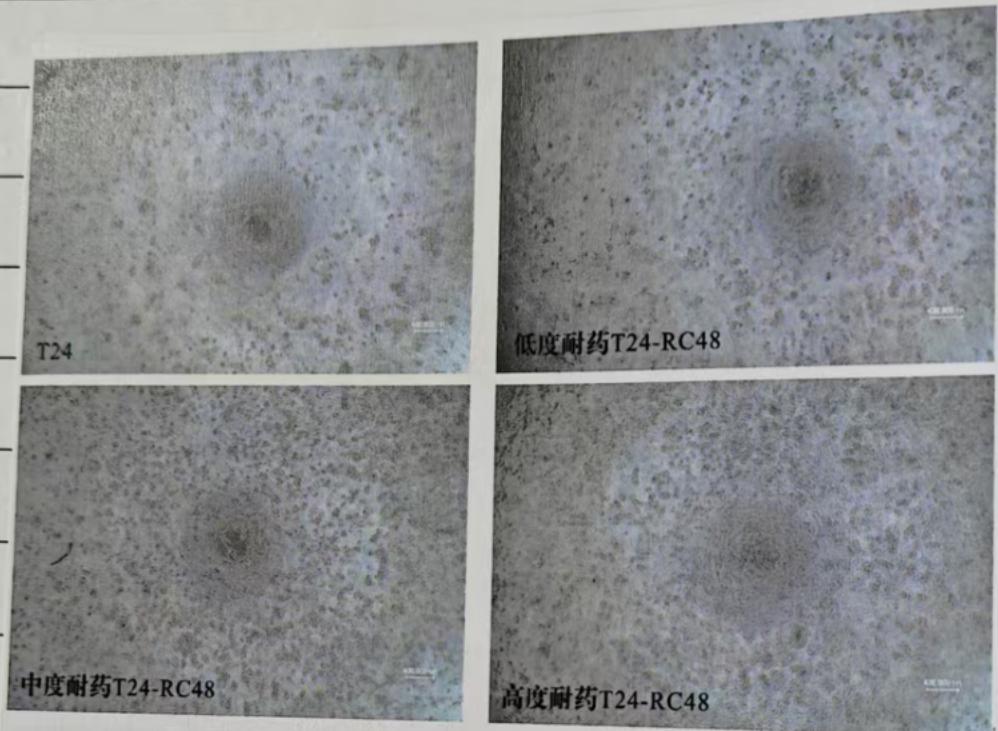


图3 低/中/高度耐药细胞株 T24-RC48 于加药后 120h 的照片

6.2 细胞增殖能力变化

在未添加 RC48 药物处理条件下(左图)，四种细胞株均呈现出较为稳定的增殖趋势，且它们的倍增时间无明显差异，表明在正常培养条件下，四者的增殖情况相近。

而在加入 200 μ g/ml 浓度的 RC48 处理后(右图)，野生型 T24 的 OD 值从 2.18 降至 0.48 (抑制率 77.1%)，而耐药株的抑制程度随耐药性增强逐步减弱：低度耐药株第五天 OD = 0.55 (抑制率 72.5%)，中度耐药株

$OD=0.61$ (抑制率60.5%),高度耐药株 $OD=1.53$ (抑制率19.4%),表明耐药梯度与RC48抑制效应呈负相关。高度耐药株在加药后仍维持近正常增殖速率,验证了其强耐药表型。

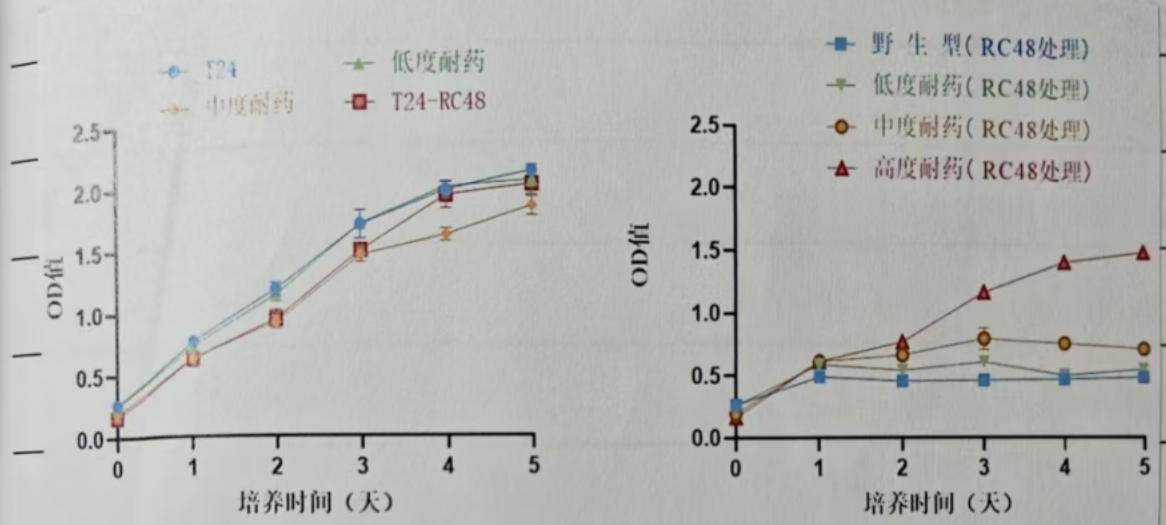


图4 T24 和低/中/高度耐药 T24-RC48 细胞株不加药(左)与加药(右)的生长曲线图

七、结果分析

经120个小时培养,未加药细胞形态相对完整,且细胞密度接近100%,表明在本实验中,铺板密度与培养时间设置合理。

经过120小时的药物处理后,T24细胞株及其低/中/高耐药株(T24-RC48)的生长状态和形态表现出显著差异:

① T24野生型细胞株细胞密度显著降低,大量细胞脱落,残留细胞体积缩小呈现典型凋亡形态。这表明药物对野生型细胞的杀伤作用最强,细胞对药物高度敏感。

② T24-RC48低耐药株贴壁部分细胞密度仅略高于野生型,细

胞形态异常，无法判断存活状态。这说明低耐药株的耐药性较弱，药物仍能显著抑制其生长。

3) T24-RC48中耐药株细胞密度约为50%，形态较野生型和低耐药株有所改善，但仍存在大量形态异常的细胞。这表明中耐药株的耐药性有所增强，但尚未完全抵抗药物作用。

4) T24-RC48高耐药株细胞株密度(笔尖，)最高，形态良好，增殖区域可观察到分裂相。这表明高耐药株已对药物产生较强的耐受性，能够维持正常增殖。

在未添加RC48药物处理时，四种细胞株均表现出稳定的增殖趋势，且倍增时间相近，表明在正常培养条件下，这四种细胞的增殖能力无显著差异。T24-RC48耐药细胞株与亲本T24细胞的倍增时间也无明显差异。

药物处理后，T24-RC48细胞的倍增时间未显著延长，且显著短于加药处理的亲本T24细胞。这表明，与传统T24细胞相比，本研究培养的T24-RC48细胞株对RC48药物表现出更强的耐药性。尽管药物处理对T24-RC48细胞的生长速率有一定影响，但这种影响远小于RC48对T24细胞的抑制作用。

数据表明细胞耐药性与细胞密度和形态变化呈正相关：耐药性越高，细胞对药物的敏感性越低，存活率和增殖能力越

高。这一结果提示，耐药性可能通过增强细胞对药物的耐受性来维持其生长和分裂能力。这种耐药性可能源于T24-RC48细胞在长期培养和筛选过程中逐渐形成的适应机制，降低了药物对细胞增殖的抑制作用。该结果对药物研究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（如药物外排、代谢改变或凋亡抑制），为开发更有效的抗癌药物和治疗策略提供理论依据。