

2025 年国际定向进化大赛实验记录

实验时间：2025 年 7 月 20 日 18:00 — 2025 年 7 月 25 日 21:30

25. 血管形成（一）

一、实验目的

通过 T24/T24-RC48 细胞株与静脉内皮细胞株（HUVEC）共培养进行管腔形成实验，评估耐药细胞株的 VEGFA 变化对微环境的影响。

二、实验内容

2.1 实验设计

将野生型 T24 细胞株及耐药细胞株 T24-RC48 分别与静脉内皮细胞株（HUVEC）进行共培养，以此开展管腔形成实验。通过在共培养体系中观察和记录各细胞株的生长状态、相互作用情况，分析耐药细胞株 T24-RC48 相较于普通 T24 细胞株的 VEGFA 表达量变化对周围微环境产生的影响差异，探究耐药细胞株的 VEGFA 变化是否会对血管生成相关过程，以及整个细胞微环境的构成和功能产生显著作用，从而深入了解耐药细胞对微环境调控的相关机制。

2.2 样本类型

T24 野生型细胞株

高度耐药 T24-RC48 细胞株。

2.3 实验原理

内皮细胞在促血管生成因子刺激下可自组装成管状网络：将肿瘤细胞（T24 与耐药株 T24-RC48）与血管内皮细胞（HUVEC）共培养时，肿瘤细胞分泌的 VEGFA（血管内皮生长因子 A）等因子会旁分泌作用于邻近的 HUVEC。VEGFA 作为关键血管生成信号，激活内皮细胞的增殖、迁移和管腔形成能力，驱动其连接并形成三维管状结构。实验通过比较耐药株与野生株诱导的管腔形成差异，直接反映其 VEGFA 表达变化对血管生成微环境的调控效力，揭示耐药性如何通过改变促血管因子分泌重塑肿瘤微环境。

三、材料与试剂

3.1 材料

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

24 孔板（Corning 公司）

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）

2025 年国际定向进化大赛实验记录

实验时间： 2025 年 7 月 20 日 18:00 — 2025 年 7 月 25 日 21:30

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、DMEM 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）

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）
37℃、5% CO₂ 细胞培养箱（Thermo Fisher Scientific）
细胞计数仪器

五、实验步骤

- 5.1 将 McCoy's 5A 培养基与 DMEM 培养基 1:1 混合并加入 10% FBS 配成完全培养基。
- 5.2 使用胰酶将处于对数生长期的 T24、T24-RC48 和 HUVEC 细胞分别消化。
- 5.3 使用完全培养基重悬细胞，用细胞计数板进行计数，调整细胞浓度为 2×10^5 个/ml。
- 5.4 根据表 1 24 孔板布局，将 T24 细胞、T24-RC48 细胞与 HUVEC 细胞按不同比例混合，分别加入 24 孔板中，每孔总体积为 500μl，具体比例为：
- 1）T24 与 HUVEC 按 1:1 混合：每孔加 250μl T24 细胞悬液与 250μl HUVEC 细胞悬液。
 - 2）T24 与 HUVEC 按 1:4 混合：每孔加 100μl T24 细胞悬液与 400μl HUVEC 细胞悬液。
 - 3）T24 与 HUVEC 按 4:1 混合：每孔加 400μl T24 细胞悬液与 100μl HUVEC 细胞悬液。
 - 4）T24-RC48 与 HUVEC 按 1:1、1:4、4:1 混合方法同上。

表 1 24 孔板布局（正:T24；高:高耐药 T24-RC48）

正:HUVEC=1:1	正:HUVEC=1:1	正:HUVEC=1:1	高:HUVEC=1:1	高:HUVEC=1:1	高:HUVEC=1:1
正:HUVEC=1:4	正:HUVEC=1:4	正:HUVEC=1:4	高:HUVEC=1:4	高:HUVEC=1:4	高:HUVEC=1:4
正:HUVEC=4:1	正:HUVEC=4:1	正:HUVEC=4:1	高:HUVEC=4:1	高:HUVEC=4:1	高:HUVEC=4:1
空白	空白	空白	空白	空白	空白

对照组设置：设置空白对照组，即不添加任何细胞的 24 孔板孔穴，加入相应体积的培养基，用于评估背景影响。

2025 年国际定向进化大赛实验记录

实验时间： 2025 年 7 月 20 日 18:00 — 2025 年 7 月 25 日 21:30

5.5 将 24 孔板置于 37°C、5% CO₂培养箱中培养。48h 后，从培养箱中取出 24 孔板，使用倒置显微镜观察各孔中细胞的生长状态和管腔形成情况，拍照记录，使用 ImageJ 分析处理。

六、实验结果

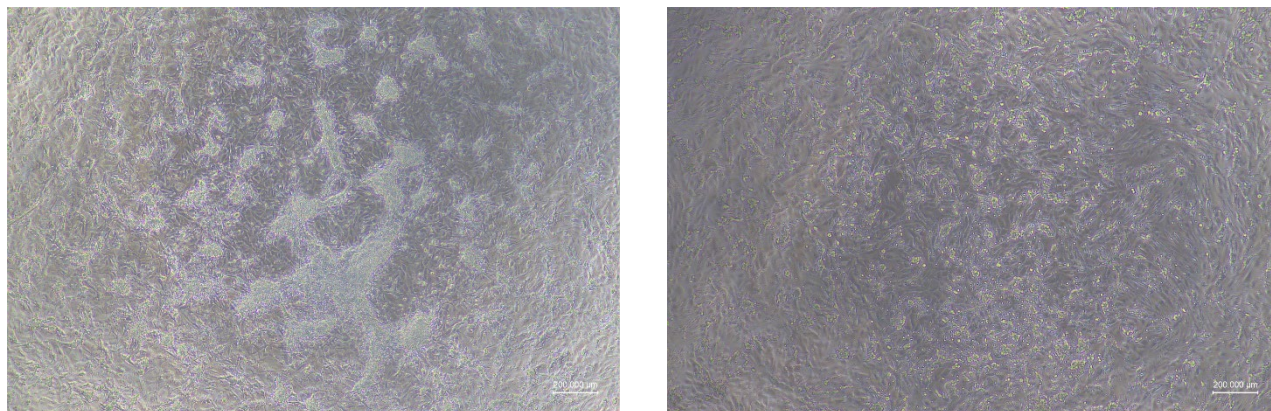


图 1 T24-RC48:HUVEC=1:1 孔（左）与:HUVEC=1:1 孔 T24（右）48h 后光镜下观察

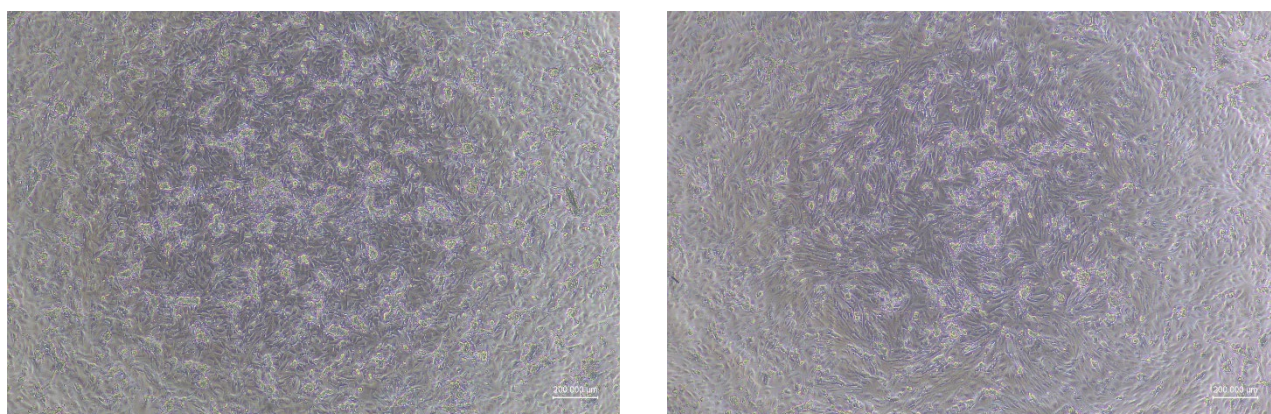


图 2 T24-RC48:HUVEC=1:4 孔（左）与:HUVEC=1:4 孔 T24（右）48h 后光镜下观察

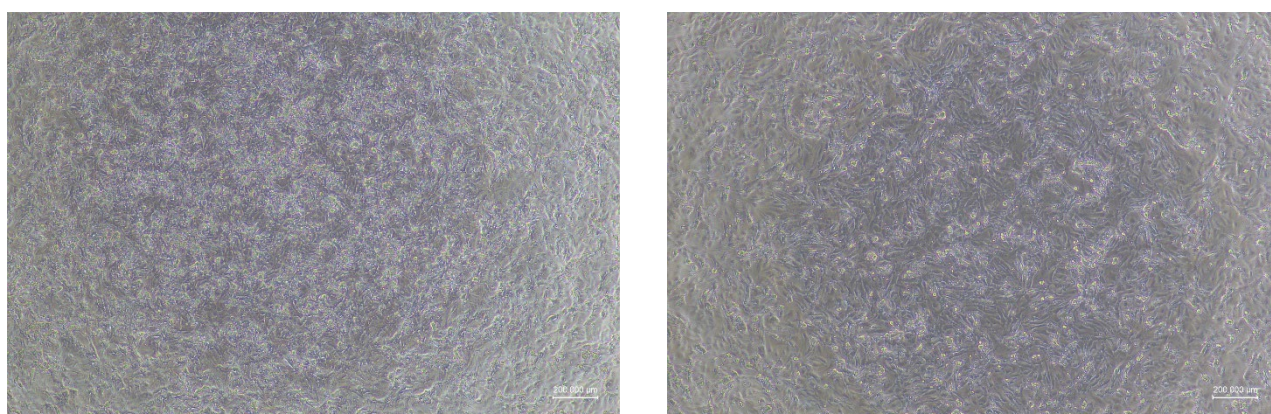


图 3 T24-RC48:HUVEC=4:1 孔（左）与:HUVEC=4:1 孔 T24（右）48h 后光镜下观察

所有实验组（T24/HUVEC、T24-RC48/HUVEC 的 1:1、1:4、4:1 比例共培养孔）及空白对照组培养 48 小时后，显微镜下观察发现：孔细胞均达到完全融合状态，形成致密单层。未观察到明显管腔网络结构。空白对照组无细胞生长，孔内仅存培养基，无背景干扰，培养

2025 年国际定向进化大赛实验记录

实验时间：2025 年 7 月 20 日 18:00 — 2025 年 7 月 25 日 21:30

基未污染。

T24 野生型细胞组与 T24-RC48 耐药细胞组在相同比例条件下（1:1、1:4、4:1）诱导的 HUVEC 形态学表现无显著差异。不同细胞比例（1:1、1:4、4:1）对管腔形成的影响未见明显区别。

七、结果分析

本次实验管腔形成失败的可能原因有：1）初始细胞密度过高：每孔接种总量为 1×10^5 个细胞，导致 48 小时内细胞过度增殖并快速融合，抑制了管腔结构的形成空间。2）检测时间点上仅观察了 48 小时结果，可能错过管腔形成的关键窗口期。

本次实验设计的局限如下：1）仅使用 高度耐药 T24-RC48 细胞株，缺乏低、中度耐药株的对比，无法评估耐药程度与 VEGFA 分泌的梯度关系。2）未进行特异性染色（如 VE-cadherin 免疫荧光染色），仅依赖光镜形态观察，难以识别早期/细微管腔结构。

接下来实验的改进方向有：1）降低细胞接种量：每孔总细胞数控制在 5×10^4 以内，延缓融合速度。2）增加多时间点检测：在 6h、12h、24h、48h 分段观察，捕捉管腔动态形成过程。3）补充实验组：纳入低、中度耐药 T24-RC48 细胞株，系统比较耐药性对血管生成的影响。4）引入染色技术，提高管腔结构的可视化灵敏度。