

2025 年国际定向进化大赛实验记录

实验时间： 2025 年 3 月 22 日 18:00 — 2025 年 3 月 30 日 21:00

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 200ug/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 $\mu\text{g/ml}$ ）。

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瓚，吸光度（OD450nm）与活细胞数量正相关。

三、材料与试剂

3.1 材料

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

96 孔板（Corning 公司） $\times 6$

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'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）

维迪西妥单抗（RC48，荣昌生物制药股份有限公司）

2025 年国际定向进化大赛实验记录

实验时间： 2025 年 3 月 22 日 18:00 — 2025 年 3 月 30 日 21:00

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）

37°C、5% CO₂ 细胞培养箱（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 μ l（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。

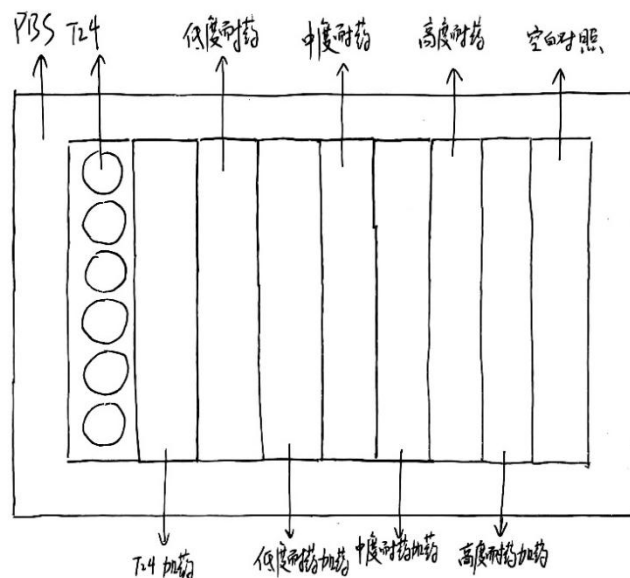


图 1 各组细胞悬液在 96 孔板中的分布情况

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含 200 μ g/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。剩下一板（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 1h，用酶标仪测定 450nm 吸光度值。

5.4 分别于 24h、48h、72h、96h、120h 取出对应孔板按照 CCK-8 试剂盒说明书要求进行处

2025 年国际定向进化大赛实验记录

实验时间： 2025 年 3 月 22 日 18:00 — 2025 年 3 月 30 日 21:00

理并测定 450nm 吸光度值。

5.5 以 RC48 处理时间为横坐标，450nm 处的实验组 OD 值—空白对照孔 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%。

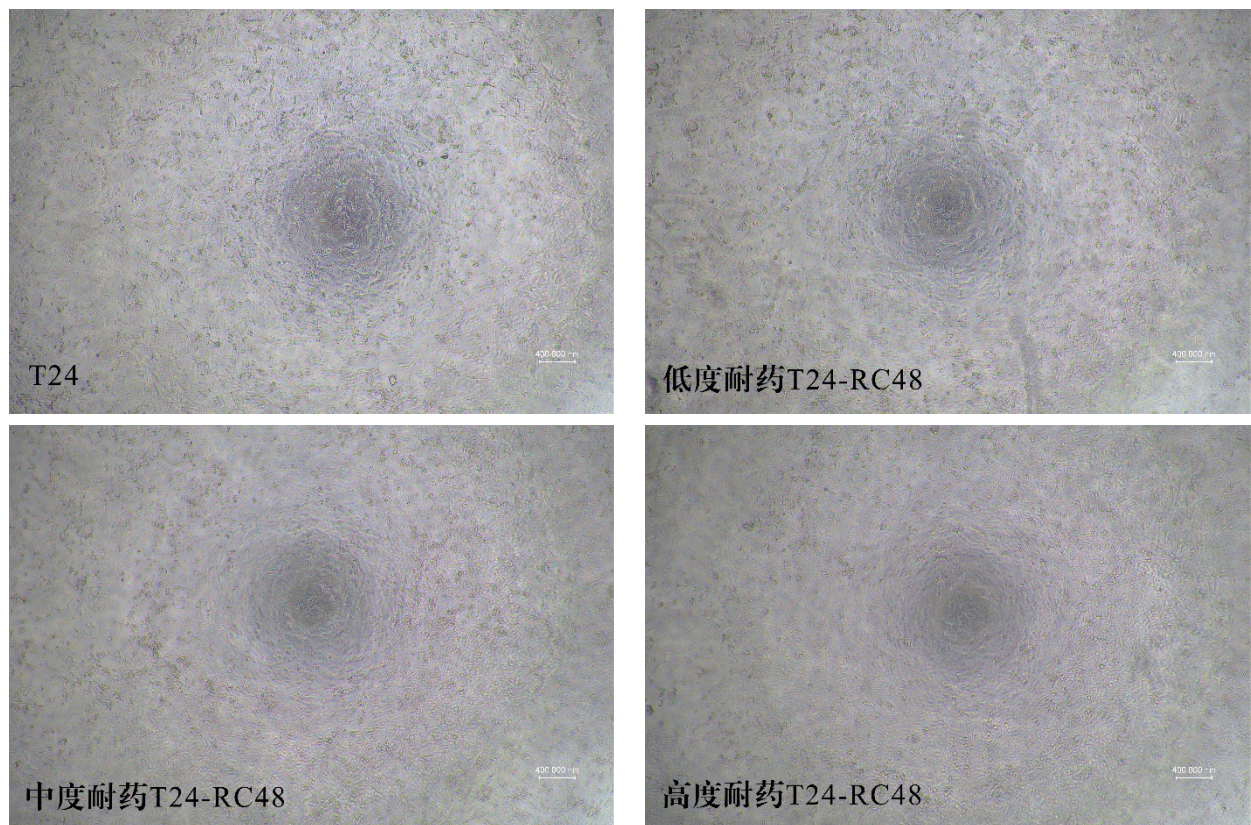


图 2 低/中/高度耐药细胞株 T24-RC48 于 120h 的照片（不加药）

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，且细胞丧失了正常形态，无法判断细胞是否存活；T24-RC48 中耐药

2025 年国际定向进化大赛实验记录

实验时间： 2025 年 3 月 22 日 18:00 — 2025 年 3 月 30 日 21:00

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，但仍存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。

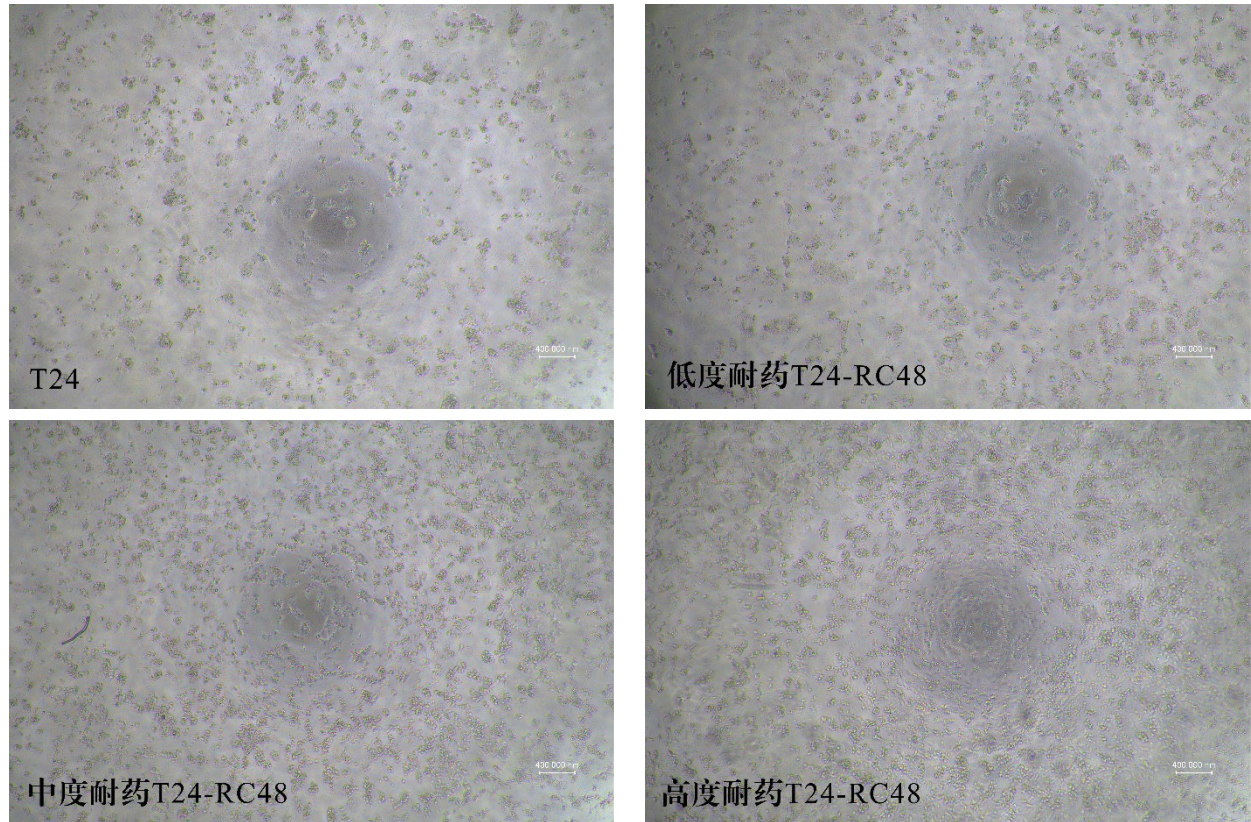


图 3 低/中/高度耐药细胞株 T24-RC48 于加药后 120h 的照片

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 200μg/ml 浓度的 RC48 处理后（右图），野生型 T24 的 OD 值从 2.1 骤降至 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。

2025 年国际定向进化大赛实验记录

实验时间： 2025 年 3 月 22 日 18:00 — 2025 年 3 月 30 日 21:00

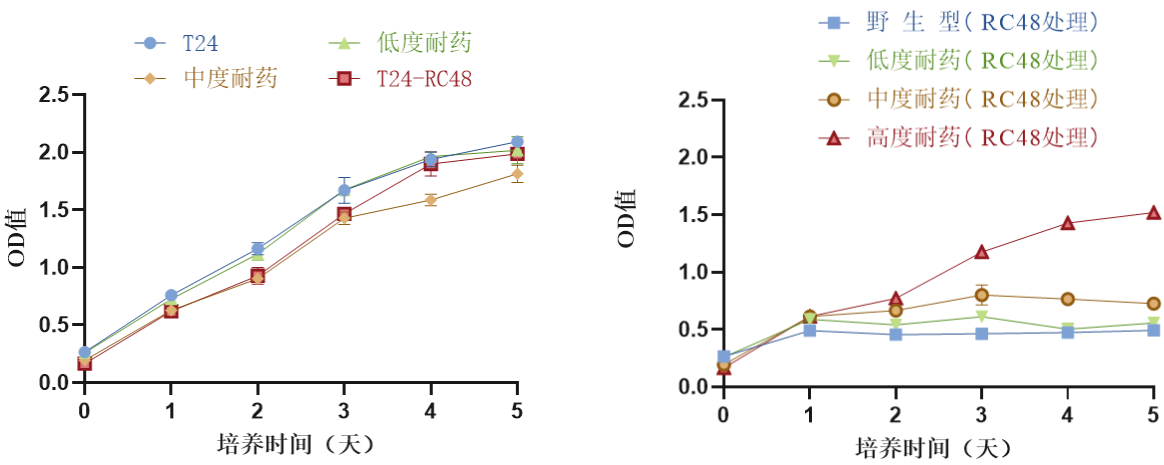


图 4 T24 和低/中/高度耐药 T24-RC48 细胞株不加药 (左)与加药(右)的生长曲线图

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**细胞密度最高，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。

2025 年国际定向进化大赛实验记录

实验时间：2025 年 3 月 22 日 18:00 — 2025 年 3 月 30 日 21:00

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（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。