

# 2025 年国际定向进化大赛实验记录

实验时间：2025 年 8 月 20 日 18:00 — 2025 年 8 月 25 日 21:30

## 26. 血管形成（二）

### 一、实验目的

通过未加药的 T24 野生型细胞株、低/中/高耐药 T24-RC48 细胞株以及加药的 T24 野生型细胞株、低/中/高耐药 T24-RC48 细胞株的上清液分别培养静脉内皮细胞株（HUVEC）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

将未加药的 T24 野生型细胞株、低/中/高耐药 T24-RC48 细胞株以及加药的 T24 野生型细胞株、低/中/高耐药 T24-RC48 细胞株的上清液分别培养静脉内皮细胞株（HUVEC），以此开展管腔形成实验。通过在共培养体系中观察和记录未加药和加药组的各细胞株的生长状态、相互作用情况，分析加药组中药物是否抑制了耐药细胞株 T24-RC48 的血管形成，以及在两个组中耐药细胞株 T24-RC48 相较于普通 T24 细胞株的 VEGFs 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 VEGF 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 VEGF（血管内皮生长因子）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

1000 $\mu$ l 枪头、100 $\mu$ l 枪头、15ml 离心管均购自 Axygen 公司

24 孔板（Corning 公司）

# 2025 年国际定向进化大赛实验记录

实验时间：2025 年 8 月 20 日 18:00 — 2025 年 8 月 25 日 21:30

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）

人脐静脉内皮细胞（HUVECs），第 3 代

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）

基质胶(Corning Matrigel Matrix, Growth Factor Reduced ,GFR)

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°C、5% CO<sub>2</sub> 细胞培养箱（Thermo Fisher Scientific）

细胞计数仪

## 五、实验步骤

**5.1** 提前一天将 Matrigel 从-20°C 转移至 4°C 冰箱，过夜缓慢融化。所有后续操作在超净台内进行，并使用预冷的枪头和离心管。

**5.2** 提前 24 小时取生长至 70% 的 T24 野生型细胞株、低/中/高耐药 T24-RC48 细胞株各两瓶，一瓶替换更换无血清培养基，另一瓶替换更换含 300μg/ml 依沃西单抗的无血清培养基，培养 24 小时后收集上清共 8 份作为条件培养基。

**5.3** 提前 12 小时使用 1%FBS 的 DMEM 培养基饥饿 HUVEC 细胞 12 小时。

**5.4** 将 4.8ml Matrigel 与 2.4ml DMEM 培养基 2:1 混合。用预冷的枪头分别吸取 300ul 的混合液，贴壁缓慢加入 24 个孔，注意避免产生气泡。将 24 孔板移至 37°C 培养箱中，孵育 30 分钟，使 Matrigel 完全聚合凝固。

**5.5** 取处于对数生长期的 HUVECs，弃旧培养基，用 PBS 清洗一次。加入胰酶消化细胞，待细胞变圆后加入完全培养基终止消化。轻轻吹打形成单细胞悬液并平均分装到新的 8 个离心管，1000 rpm 离心 5 分钟，弃上清。

**5.6** 将 8 管细胞沉淀分别用 8 种条件培养基重悬，吹打混匀。计数后调整密度至 30 万/ml。

# 2025 年国际定向进化大赛实验记录

实验时间： 2025 年 8 月 20 日 18:00 — 2025 年 8 月 25 日 21:30

5.7 30 分钟后 Matrigel 已完全聚合凝固，按照规划好的布局向 24 孔板每个孔逐一加入 0.5 ml 细胞悬液。每种条件培养基组 3 个复孔。上（见表一）：

表 1 24 孔板布局

野生型 加药	野生型 加药	野生型 加药	野生型 不加药	野生型 不加药	野生型 不加药
低度耐药 加药	低度耐药 加药	低度耐药 加药	低度耐药 不加药	低度耐药 不加药	低度耐药 不加药
中度耐药 加药	中度耐药 加药	中度耐药 加药	中度耐药 不加药	中度耐药 不加药	中度耐药 不加药
高度耐药 加药	高度耐药 加药	高度耐药 加药	高度耐药 不加药	高度耐药 不加药	高度耐药 不加药

5.8 分别于铺板后 2h,4h,12h 后于倒置相差显微镜下观察血管形成情况，使用 ImageJ 软件分析成管图像。

## 六、实验结果

铺板后 2 小时观察，可见在所有组别中，HUVEC 开始迁移并初步形成管状网络结构，各组间未见明显差异（图 a-h）。铺板后 4 小时观察，可见管状结构进一步扩展和成熟。在无药条件下，中度和高度耐药 T24-RC48 细胞的条件培养基促进了更显著的管状结构形成，相较于亲本 T24 细胞（图 i-p）。铺板后 12 小时观察，可见管状网络趋于成熟稳定。高度耐药 T24-RC48 条件培养基组的促血管生成效果最为明显（图 q-x）。

对各个时间点同种条件培养基的各组的连接点数目进行 T 检验，发现在 2 小时，4 小时与 12 小时节点，仅高度耐药组在加入 Ivonescimab 的条件下其连接点数目相对于不加药显著减少 ( $P < 0.05$ ) (图 y)。对无 Ivonescimab 处理条件下各个时间点各耐药组的连接点数目与野生型组进行单因素方差分析，发现在 4 小时时，中度和高度耐药组均相对于野生型组显著增加连接点数目 ( $P < 0.05$ )；12 小时时，高耐药组连接点数目相对于野生型组极显著增加 ( $P < 0.01$ ) (图 z)。

# 2025 年国际定向进化大赛实验记录

实验时间: 2025 年 8 月 20 日 18:00 — 2025 年 8 月 25 日 21:30

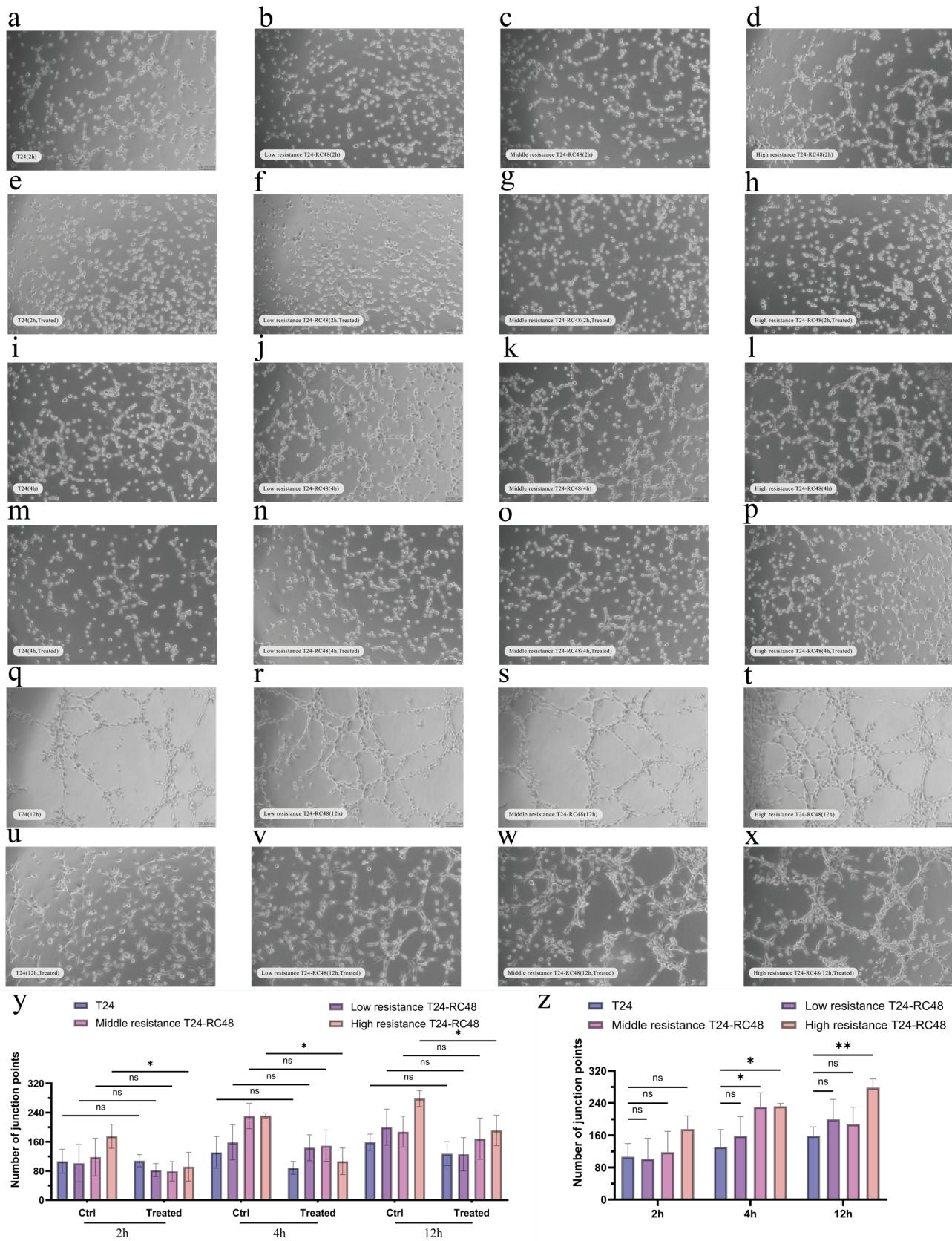


图 1 条件培养基对 HUVEC 血管形成能力的影响及 Ivonescimab 的抑制作用

图注: a-d, 不加药条件下 2 小时 HUVEC 管腔形成的代表性图像。将 HUVECs 与(a)亲本 T24、(b)低度耐药 T24-RC48、(c)中度耐药 T24-RC48 和(d)高度耐药 T24-RC48 条件培养基共培

# 2025 年国际定向进化大赛实验记录

实验时间：2025 年 8 月 20 日 18:00 — 2025 年 8 月 25 日 21:30

养。e-h, Ivonescimab (300 μg/mL) 作用于 HUVEC 2 h 后的典型图像。将 HUVECs 与(e)亲本 T24、(f)低度耐药 T24-RC48、(g)中度耐药 T24-RC48 和(h)高度耐药 T24-RC48 条件培养基共培养。i-l, 无药物条件下 HUVEC 管腔形成 4 小时的代表性图像。HUVECs 与亲本 T24, 低度耐药 T24-RC48, 中度耐药 T24-RC48, 高度耐药 T24-RC48 条件培养基共培养。m-p, Ivonescimab (300 μg/mL) 作用 HUVEC 4 h 后的典型图像。HUVECs 与 (m)亲本 T24, (n)低度耐药 T24-RC48, (o)中度耐药 T24-RC48 和(p)高度耐药 T24-RC48 的条件培养基共培养。q-t, 无药条件下 12 h HUVEC 管腔形成的代表性图像。将 HUVECs 与亲本 T24、低度耐药 T24-RC48、中度耐药 T24-RC48、高度耐药 T24-RC48 条件培养基共培养。u-x, Ivonescimab (300 μg/mL) 作用 12 h 后 HUVEC 管腔形成的代表性图像。HUVECs 与以下条件培养基共培养：(u)亲本 T24, (v)低度耐药 T24-RC48, (w)中度耐药 T24-RC48, (x)高度耐药 T24-RC48。y, 定量分析使用或不使用 Ivonescimab 治疗后 HUVEC 网络中连接点的数量。z, 定量分析不同细胞系条件培养基培养的 HUVECs 在无药物条件下随时间 (2h、4h、12h) 的连接点数量。数据以均数±标准差表示 (n=3)。(ns, 不显著, \*P < 0.05, \*\*P < 0.01)

## 七、结果分析

本实验通过体外血管形成实验，系统评估了 T24 野生型与不同耐药程度 T24-RC48 细胞株的条件培养基对 HUVEC 管腔形成能力的影响，并进一步探讨了依沃西单抗(Ivonescimab)对血管生成的抑制作用。

光镜观察显示，在共培养的早期阶段（2 小时），各组 HUVEC 均开始迁移并初步形成管状结构，各组间未见显著差异，提示初始阶段内皮细胞的响应较为一致。随着时间推移至 4 小时和 12 小时，中度和高度耐药 T24-RC48 细胞的条件培养基显著增强了 HUVEC 的管腔形成能力，表现为更复杂、更密集的管状网络结构，尤其是在高度耐药组中效果最为明显。

统计学分析进一步证实了上述观察：在无药条件下，中度和高度耐药组在 4 小时时的连接点数目显著高于野生型组 (\*P < 0.05)，而高度耐药组在 12 小时时的连接点数目极显著高于野生型组 (\*P < 0.01)，说明耐药细胞株通过分泌更高水平的 VEGFA 等促血管生成因子，显著增强了其诱导血管生成的能力。

此外，依沃西单抗处理组的实验结果显示，该药物能够有效抑制高度耐药 T24-RC48 细胞所诱导的血管生成，表现为连接点数目的显著减少 (\*P < 0.05)，而在其他组中抑制作用不显著。这表明依沃西单抗对高 VEGF 表达背景下的血管生成具有特异性抑制效果，进一步印证了 VEGF 在耐药细胞调控。