

ECNU-NDT 联合实验室

文件类别及编号：(实验) SOP-3.9

版次：01

皮下肿瘤模型评价药物对肿瘤的抑制作用及存活率实验（H460 或其他肿瘤系）的标准操作规程		修订年份：2012 年
修 订 人：刘晓庆	审 核 人：	批 准 人：
修订日期：2012.9	审核日期：	批准日期：
颁发部门：	分发部门：	生效日期：

皮下肿瘤模型评价药物对肿瘤的抑制作用及存活率实验（H460 或其他肿瘤系）的标准操作规程

1. 目的：

规范裸鼠皮下肿瘤模型（H460）评价抗肿瘤药物抑瘤作用的操作规程。

2. 适用范围：

ECNU-NDT 联合实验室生物组

3. 责任人：Study director

4. 试剂、设备及材料

4.1 实验动物：荷瘤裸鼠，7-8 周（20-22g）、雌性，购自北京维通利华（VTR）实验动物中心

4.2 实验细胞：NCI-H460 细胞，购自中国科学院上海细胞库，现由 ECNU-NDT 联合实验室 in vitro 组培养

4.3 仪器、材料和试剂：细胞培养瓶（T25、T75、T175），电动移液器，二氧化碳培养箱、超净工作台、RPMI1640 培养基，超纯水、胰酶、一次性移液管（10ml, 25ml）、1ml 及 5ml 枪头、倒置生物显微镜、1ml 注射器、0.4 或者 0.5 规格的注射针头、75%酒精、小鼠固定器、分析天平、PBS（pH7.4）或生理盐水、耳钉号、耳钉钳、动物体重秤、游标卡尺。

5. 操作步骤

5.1 根据实验方案，In vivo 实验负责人 与 In vitro 实验负责人讨论确定实验的

具体实施日程，包括动物订购时间、到达时间、细胞皮下接种时间、所需细胞数量、细胞密度及分散介质（至少于皮下接种前十天进行），填写《细胞使用申请表》。

5.2 In vitro 实验负责人根据动物实验计划，准备实验所需细胞，具体操作参见《细胞培养标准操作规程》。

5.3 In vivo 实验负责人与协调员沟通，订购所需实验动物，准备实验原始数据记录表格。

5.4 In vivo 实验负责人安排接收动物，查验动物数量，规格，发票以及合格证。填写《动物接收登记表》。

5.5 皮下接种细胞当天，由 In vivo 工作人员准备好冰块或冰盒，供保存收集好的细胞，以减少细胞在接种过程中的活力损失。

5.6 In vivo 负责人应密切关注细胞收集进程，应于细胞收好前 5 min 准备好细胞接种过程中需要使用到的注射器、笼具等，并准备好要接种的动物，等待细胞送到，以减少细胞放置的时间。

5.7 In vitro 工作人员将细胞送到动物实验室。

5.8 由 In vitro 工作人员负责抽取细胞，供 In vivo 工作人员使用。每次抽取 0.25ml 细胞悬液，接种 2 只动物，每只接种 0.1ml，剩下的细胞退回到 EP 管中。

注意：在抽取细胞前，应将细胞充分摇匀，不得出现肉眼可见团块。

抽取细胞的工作人员应密切配好细胞接种工作人员的节奏，抽入注射器内的细胞应及时使用。

5.9 细胞接种的人员以抓起裸鼠，以酒精棉球消毒接种部位皮肤。将注射针扎到皮下，向前推行约 1 cm 距离，可试探性地左右晃动一下针头，以确定针的位置在皮下（皮内和肌肉不能自由晃动）。将针头轻轻挑起约 30 度角度，推注 0.1ml 细胞悬液，之后将针头旋转 180 度（由针尖朝上转至针尖朝下），驻针 1 秒，从皮下退出注射针头。

5.10 自细胞接种之日起，每天观察动物状态以及肿瘤生长情况。

5.11 待肿瘤长出后（肿瘤体积 $> 30\text{mm}^3$ ），由 In vivo 工作人员对动物进行耳钉编号（Ear tag），并以游标卡尺对肿瘤的长和宽分别进行测量，结果精确到 0.1mm。根据公式 $V = W^2 \times L / 2$ 计算肿瘤体积，记录数据，并对所得数据以肿瘤体积为关

关键词按升序排序。

5.12 挑选肿瘤体积大小为 500-800 mm³ 的动物进行随机分组，给药，并于指定时间点收集血浆和组织样品。

5.13 肿瘤体积不在 75-150mm³ 的裸鼠可根据肿瘤生长情况及实验计划安排 Tumor PK 的实验，以节约实验动物资源。

5.14 药物配制：根据 protocol 确定的给药剂量，药物的载药量，动物体重，动物数量，按照 10ml/kg 的给药体积，计算需称取的药物量加入的溶剂体积。加入指定溶剂后，振摇至药物完全溶解后方可进行尾静脉注射。

计算方法：称取化合物重量 = 给药剂量/1000/载药量×动物体重×动物数量×1.3

配制体积 = 动物体重×动物数量×1.3×给药体积

注意： 药物必需彻底溶解，否则注射会导致动物死亡；

药物配制过程需要两人配合进行，保证 double check；

药物溶液应在配制后 24h 内使用。放置时需于 4℃ 保存；

剩余的药物溶液应于-80℃保存，备查。

5.15 根据动物体重，按照 10ml/kg 的给药体积，通过尾静脉注射给药。

注意：若因为药物本身或浓度过大导致药物溶液粘度过大而无法给药，可将药物溶液对倍稀释，由于给药体积不得超过 10ml/kg，应将药液分两次注射。（两次注射需间隔半小时以上）

5.16 数据收集：给药后前七天于每天上午称重实验动物，记录动物体重，作为毒理学评价参考，隔天测量肿瘤长和宽，并根据公式 $V = W^2 \times L / 2$ 计算肿瘤体积。之后每周测量动物体重和肿瘤体积三次。

注意： 体重记录精确到 0.1g， 肿瘤测量结果精确到 0.01mm³ 。

实验数据不得有涂改，实验负责人应在测量完成后签名确认。

5.17 根据测量数据，绘制动物体重和肿瘤生长曲线 以及相对生长曲线。

5.18a. Survival 模型：根据动物死亡时间，评价实验组和对照组的动物存活时间。

以下情况视为动物死亡：

- 1) 第一周内动物体重下降等于或超过初始体重的 20%或试验中因腹泻等原因导致体重下降等于或超过初始体重的 20%；
- 2) 肿瘤体积超过 3000mm³；

- 3) 肿瘤溃烂;
- 4) 由于肿瘤存在而导致动物不能完成进食, 饮水, 呼吸, 大小便等生理活动时
- 5) 临床观察到长期的过度疼痛或痛苦, 例如: 俯卧, 弯腰驼背, 麻痹, 腹胀, 溃疡, 脓肿, 癫痫发作或出血;

5.18b. 瘤重模型: 于实验开始后三周, 处死实验组和对照组动物, 剖取肿瘤, 至于组织称重盘中称重。比较实验组与对照组瘤重, 评价药物对肿瘤的抑制情况。

5.19 整理原始数据, 提交实验报告。