

ECNU-NDT 联合实验室

文件类别及编号：（实验）SOP-3.12 版次：01

肿瘤药物动力学实验标准操作规程		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：

肿瘤（H460）药物动力学实验标准操作规程

1. 目的：

规范药物肿瘤药动力学实验方法，步骤及操作规程，研究药物经单剂量给药后在血浆、肿瘤、肝脏、肾脏等组织的动力学行为，评价药物的靶向性及安全性。

2. 适用范围：

ECNU-NDT 联合实验室生物组

3. 责任人：Study derector

4. 试剂、设备及材料

4.1 实验动物：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 仪器、材料和试剂：Matrix 小动物麻醉机、异氟烷、1ml 注射器、0.4 规格的注射针头、75%酒精、分析天平、PBS（pH7.4）或生理盐水、Marker 笔、小鼠笼、小鼠固定器、计时器、组织称量盘、手术器械，组织匀浆器。

5. 操作步骤

5.1 实验前准备。

5.1.1 标签。根据实验方案，制备样品标签。标签内容应包括：实验编号，时间点，样品种类、动物编号。例如：0212-ECNU-009-TPK, 1h-1, plasma。由于样品需要留存外送一份，留存一份，故标签也应准备两套，标签应区分，如留存样品标签为：0212-ECNU-009-MPK, 1h'-1。

5.1.2 EP 管及样品盒。根据 protocol，准备相应数量的 2mlEP 管和 0.5 ml EP 管，

贴上标签，置于样品盒中，备用。样品盒盒盖上应注明如下信息：实验编号，样品种类及数量，制备人。

注意：2mlEP 管共收集组织样品用，为防止液氮条件下标签脱落，建议使用 Marker 笔标记，0.5ml EP 管供收集血浆和组织匀浆液使用。

5.1.3 实验负责人制备原始数据记录表格，。表格内容参见附表：肿瘤药动力学原始数据记录表格模板。

5.2 建立肿瘤模型。

5.2.1 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》。

5.2.2 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》。

5.2.3 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，根据 protocol 合理安排给药和组织采集时间。

5.2.4 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》。

5.2.5 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。

5.2.6 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，以节省细胞放置的时间。

5.2.7 In vitro 工作人员将细胞送到动物实验室。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。

5.2.8 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。

5.2.9 自细胞接种之日起，每天观察动物状态以及肿瘤生长情况。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 0.01mm。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键词按升序排序。肿瘤体积生长至 500-800mm³ 时，可用于肿瘤药动学实验。

说明：若实验室有 XNO 实验同时在进行，可使用 XNO 实验分组剩下的动物（肿瘤体积小于 800mm³，同一批动物数量够完成一个 Tumor PK 实验。），操作步骤 5.2 项下项目可以省略。

5.3 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。

5.4 分组：挑选肿瘤体积大小为 500-800 mm³ 的动物进行随机分组，

5.5 给药。具体操作参见《小鼠尾静脉注射操作规程》。根据设计的时间表对每只实验动物进行给药。注射时应根据动物的反应确定给药速度，不宜过快，防止动物猝死。注射完成时，在原始记录—给药采血时间表上记录给药的实时时间。

注意：设计时间点时，根据技术人员水平，同组内不同动物应间隔 2-5min 给药，以保证血液采集时有足够的时间处理突发的状况，尤其是短的时间点，如 5min, 15min 的时间点应预留 5min 时间以处理诸如前一只动物血样收集不顺利的突发状况，减少实验误差。

5.6 取样准备。根据预定的时间点，结合实际给药时间，确定取样时间。准备血样收集过程中要用到的注射器，已编号的抗凝 EP 管(1.5ml)及冰盒，培养皿（盛放组织样品）

5.7 麻醉。提前 3min 钟打开并调试好麻醉机，保证氧气分压为 400-600mm，异氟烷通量调至刻线 2-4.让麻醉盒中充入异氟烷。于取样时间点前 2 min 放入麻醉盒内，根据动物反应情况调节异氟烷通量，于指定时间点取出动物。

5.8 血样收集。以心脏取血法或脸颊取血法收集血样，具体操作参见血液收集标准操作规程。取出 0.4-0.6ml 全血后停止取血，立即转入抗凝管，轻轻翻转抗凝管，保证血液接触到抗凝管内壁的抗凝剂。盖紧盖子，置于冰盒中。记录实际取样完成时间。

5.9 组织采集。采血完成后即刻将动物脱颈椎处死，收集肝脏，肿瘤，肾脏等组织，置于培养皿。具体操作参见组织采集标准操作规程。

注意：不同动物及不同组织样品应分开放置，避免样品交叉污染。

组织样品取出后必需低温保存。

5.10 血样离心及血浆分离。调节离心温度为 4℃，离心机转速为 4000 rpm，离心时间为 10 min。将取好的血样置于冷冻离心机中，配平后按上述条件离心。从离心机中取出样品管（注意不要随意晃动样品管）。以移液器取出血浆（离心后上层清液），分别置于预先贴好标签的样品管中。

注意：血浆样品应准备两份，一份送出去分析，一份留存备用。防止寄送及分析时出现意外带来的损失；

每份样品血浆量应大于 100 μ l；

分离后的血浆应及时置于冰上保存，之后转入 - 80℃ 条件下保存。

5.11 组织样品处理。根据 protocol 要求，将组织样品切块。称重组织样品全重及分别用于药动学分析和药效学分析部分的样品重量（要求切分成 200-300mg 重量）。即刻将样品管转入液氮中冷冻。记录数据。称重结束后将样品转入 - 80℃ 冻存。

5.12 组织样品匀浆。提前 1h 将样品从 - 80℃ 冰箱中取出，置冰上解冻。解冻后首先使用手术剪将组织样品尽可能剪碎，按后 2:1 （体积/质量比样）加入 1%Triton100 溶液，用小型组织匀浆器匀浆样品。

注意：为避免样品交叉污染，每个样品应使用单独的组织剪和匀浆器探头。上述物品清洗时应先用 PBS 清洗，再用 75%乙醇清洗。

5.13 组织离心及分离上清。调节离心温度为 4℃，离心机转速为 13000 rpm，离心时间为 20 min。将匀浆好的组织样品置于冷冻离心机中，配平后按上述条件离心。从离心机中取出样品管（注意不要随意晃动样品管）。以移液器取出离心后的上层清液，分别置于预先贴好标签的样品管中。 -80℃保存

注意：离心后，样品分成上中下三层，分别为：油脂层、上清层、组织碎片层。

取上清时应避免将离心后上层油脂混入上清液中。

5.14 样品寄送。填写原始数据表格中样品寄送清单，联系有资质的干冰运输机构，送出样品，并及时与 CRO 收货人确认样品是否安全到达。

5.15 数据分析。根据 CRO 提供的测定结果，利用 Graphprism 对实验数据进行药动学分析，得到曲线下面积（ $AUC_{0-\infty}$ ），并比较药物在各组织分布行为及药物释放行为。参见肿瘤药动学（tumor pk）数据处理模板。

5.16 整理原始数据，提交实验报告。