



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 115299405 B

(45) 授权公告日 2024. 01. 30

(21) 申请号 202210948643.3

(22) 申请日 2022.08.09

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 115299405 A

(43) 申请公布日 2022.11.08

(73) 专利权人 新疆医科大学第一附属医院
地址 830011 新疆维吾尔自治区乌鲁木齐
市新市区鲤鱼山南路137号

(72) 发明人 胡蓉 刘慧 曾倩倩 冯玉玲

(74) 专利代理机构 成都华亿智合知识产权代理
事务所(普通合伙) 51354
专利代理师 张和平

(51) Int. Cl.
A61K 49/00 (2006.01)

(56) 对比文件

CN 104087554 A, 2014.10.08

CN 108835051 A, 2018.11.20

CN 109125740 A, 2019.01.04

CN 109422808 A, 2019.03.05

CN 110279780 A, 2019.09.27

CN 112262818 A, 2021.01.26

US 2010099638 A1, 2010.04.22

审查员 袁海

权利要求书1页 说明书5页 附图3页

(54) 发明名称

一种制作裸鼠移植瘤模型的方法

(57) 摘要

本发明涉及动物模型制作技术领域,特别是涉及一种制作裸鼠移植瘤模型的方法,包括如下步骤:选择4~6周龄的裸鼠,在无菌条件下向其接种肿瘤细胞,其中肿瘤细胞的接种量为 $(0.1 \sim 2) \times 10^7/200\mu l/只$;肿瘤后采用免疫抑制剂加速瘤体生长,其中免疫抑制剂的添加量为 $(1 \sim 2) \text{mg}/\text{天}/\text{只}$;继续培养至少5天,即得裸鼠移植瘤模型。本发明解决现有技术中裸鼠移植瘤模型的成瘤成功率较低的问题。本发明的裸鼠移植瘤模型通过多个过程控制,既能拓宽接种肿瘤的类型范围,也能提高接种瘤体的成功率。



1. 一种制作裸鼠移植瘤模型的方法,其特征在于,包括如下步骤:

选择4~6周龄的裸鼠,在无菌条件下向其接种结肠癌细胞,其中结肠癌细胞的接种量为 $(0.1 \sim 2) \times 10^7/200\mu\text{l}/\text{只}$;其中,所述裸鼠的接种部位为背部、腋下、颈部中的至少一种;所述裸鼠接种过程中,进针后注射点与进针点的距离为0.8~1.2cm;

肿瘤后采用环磷酰胺加速瘤体生长,环磷酰胺共注射两天,其中环磷酰胺的添加量为 $(1 \sim 2)\text{mg}/\text{天}/\text{只}$;

继续培养至少5天得裸鼠移植瘤模型,裸鼠移植瘤模型中肿瘤的瘤体积 $\leq 2000\text{mm}^3$ 。

2. 根据权利要求1所述的制作裸鼠移植瘤模型的方法,其特征在于:所述结肠癌细胞的接种量为 $1 \times 10^7/200\mu\text{l}/\text{只}$ 。

3. 根据权利要求2所述的制作裸鼠移植瘤模型的方法,其特征在于:所述结肠癌细胞在接种前进行如下处理:将结肠癌细胞与matrigel基底胶按照1:(0.8~1.2)的体积比混匀。

4. 根据权利要求3所述的制作裸鼠移植瘤模型的方法,其特征在于:所述结肠癌细胞与matrigel基底胶的体积比为1:(0.95~1.05),所述结肠癌细胞与matrigel基底胶的混合温度为 $-2 \sim 4^\circ\text{C}$ 。

5. 根据权利要求1所述的制作裸鼠移植瘤模型的方法,其特征在于:所述环磷酰胺的添加量为 $(1.8 \sim 2.2)\text{mg}/\text{天}/\text{只}$ 。

一种制作裸鼠移植瘤模型的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及动物模型制作技术领域,特别是涉及一种制作裸鼠移植瘤模型的方法。

背景技术

[0002] 裸鼠由于其特殊的体质,可作为研究不同药物介导的裸鼠移植瘤模型,在科学研究中起着重要的作用。裸鼠一般包括裸小鼠和裸大鼠。裸小鼠的抵抗力差,易在SPF环境下可生存,所用的笼具、垫料、饲料、饮水患病毒性肝炎和肺炎,因而饲养和繁殖要求条件比较严格,等都要经过严密灭菌消毒并采用隔离器饲养,以保证长期存活并进行繁殖。裸大鼠的一般特征似裸小鼠,但躯干部仍有稀少被毛并非象裸小鼠那样完全无毛,头部及四肢毛更多;裸大鼠易患呼吸道疾病。

[0003] 在现有技术中,裸鼠移植瘤模型在制作过程中容易出现肿瘤不成功、裸鼠不耐受等问题,导致成瘤成功率较低。

发明内容

[0004] 鉴于以上所述现有技术的缺点,本发明的目的在于提供一种制作裸鼠移植瘤模型的方法,用于解决现有技术中裸鼠移植瘤模型的成瘤成功率较低的问题。本发明的裸鼠移植瘤模型通过多个过程控制,既能拓宽接种肿瘤的类型范围,也能提高接种瘤体的成功率。

[0005] 为实现上述目的及其他相关目的,

[0006] 本发明提供一种制作裸鼠移植瘤模型的方法,包括如下步骤:

[0007] 步骤一、选择4~6周龄的裸鼠,在无菌条件下向其接种肿瘤细胞,其中肿瘤细胞的接种量为 $(0.1 \sim 2) \times 10^7 / 200 \mu\text{l} / \text{只}$;

[0008] 步骤二、肿瘤后采用免疫抑制剂加速瘤体生长,其中免疫抑制剂的添加量为 $(1 \sim 2) \text{mg} / \text{天} / \text{只}$;

[0009] 步骤三、继续培养至少5天,即得裸鼠移植瘤模型。

[0010] 上述裸鼠移植瘤模型在制作过程中,首先选用4~6周龄的裸鼠,在此年龄段的裸鼠具有一定的免疫力,避免接种后出现裸鼠不耐受导致其过早死亡的问题。且,在此年龄段的裸鼠的免疫力并不够强,不会影响肿瘤细胞的成瘤过程,更利于成功肿瘤。此外,在此年龄段的裸鼠也能适应肿瘤实验周期,保证在实验周期内肿瘤的瘤体积不大于 2000mm^3 。

[0011] 裸鼠移植瘤模型在制作过程中控制肿瘤细胞的接种量,避免出现肿瘤生长速度过快或过慢的情况,更利于观察研究裸鼠的肿瘤情况。此外,在肿瘤后添加免疫抑制剂,可以避免裸鼠排异,加速瘤体在裸鼠体内的生长。

[0012] 一般而言,由于裸鼠没有胸腺,免疫力差,因此应尽可能的保证实验全程处于无菌条件下进行。此外,注射前应注意注射部位的消毒,以避免造成感染,导致不能成瘤。

[0013] 一般而言,在保证细胞数量充足的条件下,尽可能的选择复苏后3-5代长势良好的细胞进行收集与注射。且,准备进行注射的细胞应使用无血清培养基或PBS进行重悬,且保

证细胞充分混匀,以避免造成药物处理前生长的肿瘤体积差异过于明显。此外,细胞收集后应置于4℃环境中或冰面上以维持细胞低代谢状态。

[0014] 于本发明的一实施例中,所述裸鼠的接种部位为背部、腋下、颈部中的至少一种。接种部位一般选择血管较密集的部位进行注射,如腋窝下(不要注射到腋窝深部,以腋窝中部外侧皮下最佳)、颈背部等,但值得注意的是应保证所选择的注射部位在成瘤后不妨碍裸鼠进行正常饮食与其它活动。

[0015] 此外,由裸鼠体侧腰部稍靠上的部位进针时,要保证与接种点的距离小于针头的长度,向头部方穿行,此过程不能刺破皮肤或者刺破肌肉层,接种最好在1小时之内完成。

[0016] 于本发明的一实施例中,所述裸鼠接种过程中,进针后注射点与进针点的距离为0.8~1.2 cm。控制注射点与进针点的距离是为了避免造成液体外流,到达注射点后可轻轻晃动注射器,以保证注射在皮下进行;注射过程应保证连贯与缓慢,注意避免气泡产生;注射后应缓慢退出针头,以避免针头退出过程中造成液体外流。

[0017] 于本发明的一实施例中,所述肿瘤细胞包括第一肿瘤细胞、第二肿瘤细胞;

[0018] 所述第一肿瘤细胞包括肝癌细胞、喉癌细胞、大细胞肺癌细胞、表皮癌细胞、卵巢癌细胞、乳腺癌细胞、人黑色素瘤细胞、人胃肿瘤细胞、人口腔表皮样癌细胞中的至少一种;

[0019] 所述第二肿瘤细胞包括鼻咽癌细胞、肺癌细胞、肺腺癌细胞、结肠癌细胞、肝癌细胞、乳腺癌细胞、人神经母细胞瘤细胞、人胶质瘤细胞、人胃癌细胞、人前列腺癌细胞中的至少一种。

[0020] 于本发明的一实施例中,所述第一肿瘤细胞的接种量为 $1 \times 10^6 / 200 \mu\text{l}$ /只;所述第二肿瘤细胞的接种量为 $2 \times 10^7 / 200 \mu\text{l}$ /只。

[0021] 由于第一肿瘤细胞属于常规比较容易成瘤的细胞,因此其细胞接种量较少,避免肿瘤细胞过快生长。第二肿瘤细胞属于较难成瘤的细胞,因此其细胞接种量明显较高,可以提高种瘤成功率。

[0022] 于本发明的一实施例中,所述第二肿瘤细胞在接种前进行如下处理:将第二肿瘤细胞与matrigel基底胶按照1:(0.8~1.2)的体积比混匀。

[0023] 于本发明的一实施例中,所述第二肿瘤细胞与matrigel基底胶的体积比为1:(0.95~1.05),所述第二肿瘤细胞与matrigel基底胶的混合温度为-2~4℃。matrigel基底胶能够在裸鼠体内为肿瘤细胞提供充足的营养,更利于第二肿瘤细胞在裸鼠体内成瘤。但值得注意的是,由于matrigel基底胶于室温下容易凝固,因此,在接种过程中,请保证将混匀的细胞置于低温环境(冰面)以避免matrigel基底胶过早的凝固。

[0024] 于本发明的一实施例中,所述免疫抑制剂为环磷酰胺。

[0025] 于本发明的一实施例中,所述环磷酰胺的添加量为(1.8~2.2)mg/天/只。一般而言,环磷酰胺只需使用两天,一般选择注射。

[0026] 于本发明的一实施例中,所述裸鼠移植瘤模型中肿瘤的瘤体积 $\leq 2000 \text{mm}^3$ 。

[0027] 皮下接种的细胞一般会在1~2周内成瘤,一般不会超过1个月。这个过程中,需要密切观察动物的体重与状态进行判断。

[0028] 如果细胞在接种后超过预期的观察时间仍未成瘤,需要从以下方面排查原因:

[0029] 1、细胞活力:细胞活力是影响肿瘤形成的重要原因,活力不够,是不能成瘤的。因此细胞消化下来PBS清洗后要尽快接种。

[0030] 2、动物选择:选择的裸鼠周龄不宜过大,否则也会增大成瘤难度。

[0031] 3、饲养环境:环境影响着动物状态,状态差的鼠容易发生死亡,不易成瘤,因此裸鼠要饲养在SPF级环境中。

[0032] 如上所述,本发明的一种制作裸鼠移植瘤模型的方法,具有以下有益效果:

[0033] 1、上述裸鼠移植瘤模型在制作过程中,首先选用4~6周龄的裸鼠,在此年龄段的裸鼠具有一定的免疫力,避免接种后出现裸鼠不耐受导致其过早死亡的问题。且,在此年龄段的裸鼠的免疫力并不够强,不会影响肿瘤细胞的成瘤过程,更利于成功种瘤。此外,在此年龄段的裸鼠也能适应种瘤实验周期,保证在实验周期内肿瘤的瘤体积不大于 2000mm^3 。

[0034] 2、裸鼠移植瘤模型在制作过程中控制肿瘤细胞的接种量,避免出现肿瘤生长速度过快或过慢的情况,更利于观察研究裸鼠的种瘤情况。此外,在种瘤后添加免疫抑制剂,可以避免裸鼠排异,加速瘤体在裸鼠体内的生长。

[0035] 3、上述裸鼠移植瘤模型通过多个过程控制,既能拓宽接种种瘤的类型范围,也能提高接种瘤体的成功率。

附图说明

[0036] 图1为实施例1的裸鼠卵巢癌移植瘤模型。

[0037] 图2为实施例2的裸鼠肝癌移植瘤模型。

[0038] 图3为实施例3的裸鼠人结肠癌移植瘤模型。

[0039] 图4为实施例1~3的肿瘤生长曲线。

[0040] 图5为实施例1的裸鼠卵巢癌移植瘤模型的瘤体切片显微图。

[0041] 图6为实施例2的裸鼠肝癌移植瘤模型的瘤体切片显微图。

[0042] 图7为实施例3的裸鼠人结肠癌移植瘤模型的瘤体切片显微图。

具体实施方式

[0043] 以下由特定的具体实施例说明本发明的实施方式,熟悉此技术的人士可由本说明书所揭露的内容轻易地了解本发明的其他优点及功效。

[0044] 实施例1

[0045] 一种制作裸鼠移植瘤模型的方法,包括如下步骤:

[0046] S1、选取接种所需的卵巢癌细胞:

[0047] S11、在保证细胞数量充足的条件下,选择复苏后3-5代长势良好的细胞进行收集与接种;

[0048] S12、待接种的卵巢癌细胞使用无血清培养基或PBS进行重悬,且保证细胞充分混匀,以避免造成药物处理前生长的肿瘤体积差异过于明显;

[0049] S13、细胞收集后应置于 4°C 环境中或冰面上以维持细胞低代谢状态;

[0050] S2、肿瘤细胞接种:选择4~6周龄的裸小鼠10只,在无菌条件下向其背部接种卵巢癌细胞,其中卵巢癌细胞的接种量为 $1 \times 10^6 / 200\mu\text{l} / \text{只}$;在接种过程中,接种时由裸小鼠体侧腰部稍靠上的部位进针,要保证与接种点的距离小于针头的长度,接种最好在1小时之内完成;进针后应保证注射点与进针点相距1cm左右,避免造成液体外流;

[0051] S3、瘤体生长:种瘤后采用环磷酰胺加速瘤体生长,环磷酰胺的添加量为 $2\text{mg} / \text{天} /$

只,环磷酰胺共注射两天;

[0052] S4、瘤体记录:肿瘤成功后,瘤体瘤径达到约5mm或瘤体积达到约50mm³时即可开始进行监测,常规采用隔天测量肿瘤,在瘤体积接近2000mm³时应及时进行取材处理,最后再汇集数据绘制肿瘤生长曲线,具体如图4所示。

[0053] 上述卵巢癌细胞的成瘤时间为5~7天,成瘤率为100%。裸鼠卵巢癌移植瘤模型如图1所示。将此裸鼠卵巢癌移植瘤模型的瘤体切片观察,具体如图5所示,图5中可以看出瘤体内细胞即为人卵巢癌SKOV3细胞。

[0054] 值得注意的是,并非所有瘤体均为规则的球状体,因此,只要保证肿瘤组织的瘤体积分大致相等,即可用于后续监测。

[0055] 实施例2

[0056] 一种制作裸鼠移植瘤模型的方法,包括如下步骤:

[0057] S1、选取接种所需的肝癌细胞:

[0058] S11、在保证细胞数量充足的条件下,选择复苏后3-5代长势良好的细胞进行收集与接种;

[0059] S12、待接种的肝癌细胞使用无血清培养基或PBS进行重悬,且保证细胞充分混匀,以避免造成药物处理前生长的肿瘤体积差异过于明显;

[0060] S13、细胞收集后应置于4℃环境中或冰面上以维持细胞低代谢状态;

[0061] S2、肿瘤细胞接种:选择4~6周龄的裸小鼠10只,在无菌条件下向其腋下接种肝癌细胞,其中肝癌细胞的接种量为 $1 \times 10^6 / 200 \mu\text{l} / \text{只}$;在接种过程中,接种时由裸小鼠体侧腰部稍靠上的部位进针,要保证与接种点的距离小于针头的长度,接种最好在1小时之内完成;进针后应保证注射点与进针点相距1cm左右,避免造成液体外流;

[0062] S3、瘤体生长:肿瘤后采用环磷酰胺加速瘤体生长,环磷酰胺的添加量为2mg/天/只,环磷酰胺共注射两天;

[0063] S4、瘤体记录:肿瘤成功后,瘤体瘤径达到约5mm或瘤体积达到约50mm³时即可开始进行监测,常规采用隔天测量肿瘤,在瘤体积接近2000mm³时应及时进行取材处理,最后再汇集数据绘制肿瘤生长曲线,具体如图4所示。

[0064] 上述肝癌细胞的成瘤时间为7-10天,成瘤率为100%。裸鼠肝癌移植瘤模型如图2所示。将此裸鼠肝癌移植瘤模型的瘤体切片观察,具体如图6所示,图6中可以看出瘤体内细胞即为人肝癌细胞Hep G2。

[0065] 实施例3

[0066] 一种制作裸鼠移植瘤模型的方法,包括如下步骤:

[0067] S1、选取接种所需的人结肠癌细胞:

[0068] S11、在保证细胞数量充足的条件下,选择复苏后3-5代长势良好的细胞进行收集与接种;

[0069] S12、待接种的人结肠癌细胞使用无血清培养基或PBS进行重悬,且保证细胞充分混匀,以避免造成药物处理前生长的肿瘤体积差异过于明显;

[0070] S13、将人结肠癌细胞与matrigel基底胶按照体积比为1:(0.95~1.05)混匀,所述人结肠癌细胞与matrigel基底胶的混合温度为-2~4℃;

[0071] S13、细胞收集后应置于4℃环境中或冰面上以维持细胞低代谢状态;

[0072] S2、肿瘤细胞接种:选择4~6周龄的裸小鼠10只,在无菌条件下向其腋下接种人结肠癌细胞,其中人结肠癌细胞的接种量为 1×10^6 /200 μ l/只;在接种过程中,接种时由裸小鼠体侧腰部稍靠上的部位进针,要保证与接种点的距离小于针头的长度,接种最好在1小时之内完成;进针后应保证注射点与进针点相距1cm左右,避免造成液体外流;

[0073] S3、瘤体生长:肿瘤后采用环磷酰胺加速瘤体生长,环磷酰胺的添加量为2mg/天/只,环磷酰胺共注射两天;

[0074] S4、瘤体记录:肿瘤成功后,瘤体瘤径达到约5mm或瘤体积达到约50mm³时即可开始进行监测,常规采用隔天测量肿瘤,在瘤体积接近2000mm³时应及时进行取材处理,最后再汇集数据绘制肿瘤生长曲线,具体如图4所示。

[0075] 上述人结肠癌细胞的成瘤时间为7-14天,成瘤率为70%。裸鼠人结肠癌移植瘤模型如图3所示。将此裸鼠人结肠癌移植瘤模型的瘤体切片观察,具体如图7所示,图7中可以看出瘤体内细胞即为人结肠癌细胞HT-29。

[0076] 综上所述,本发明的裸鼠移植瘤模型通过多个过程控制,既能拓宽接种肿瘤类型的范围,也能提高接种瘤体的成功率。所以,本发明有效克服了现有技术中的种种缺点而具高度产业利用价值。

[0077] 上述实施例仅例示性说明本发明的原理及其功效,而非用于限制本发明。任何熟悉此技术的人士皆可在不违背本发明的精神及范畴下,对上述实施例进行修饰或改变。因此,举凡所属技术领域中具有通常知识者在未脱离本发明所揭示的精神与技术思想下所完成的一切等效修饰或改变,仍应由本发明的权利要求所涵盖。

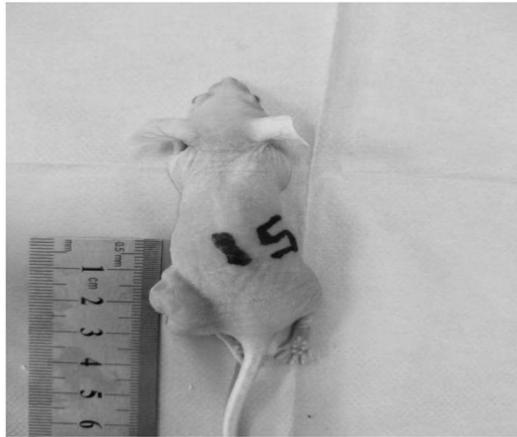


图1



图2



图3

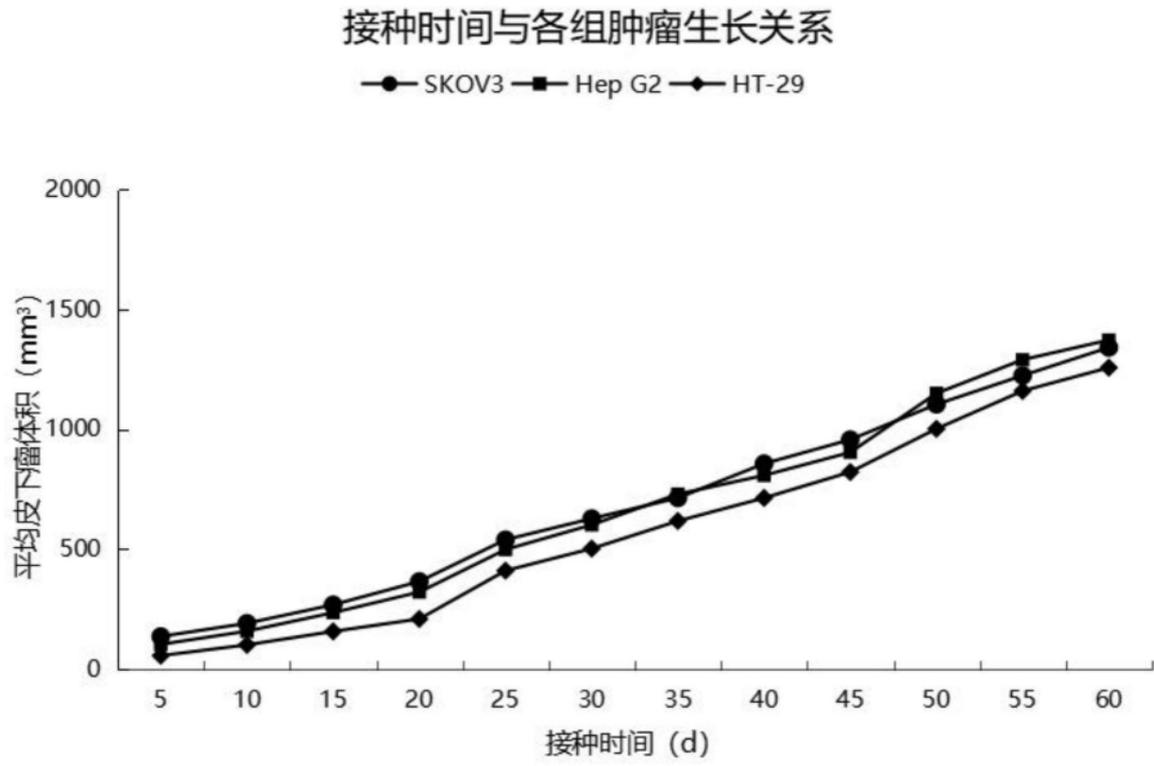


图4

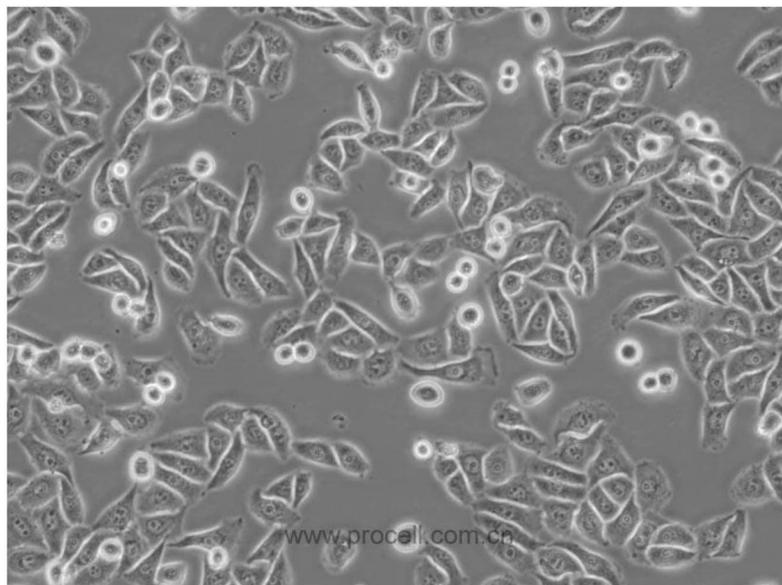


图5

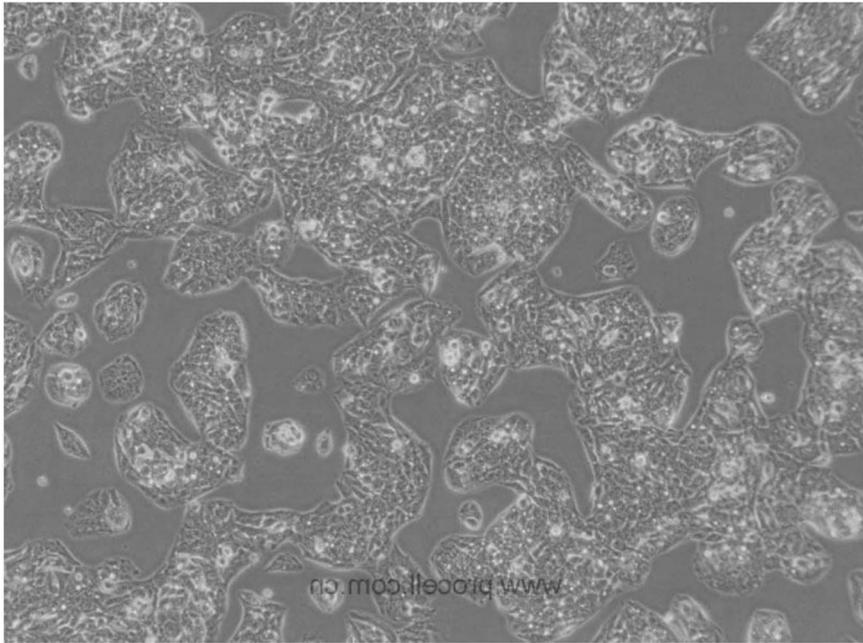


图6

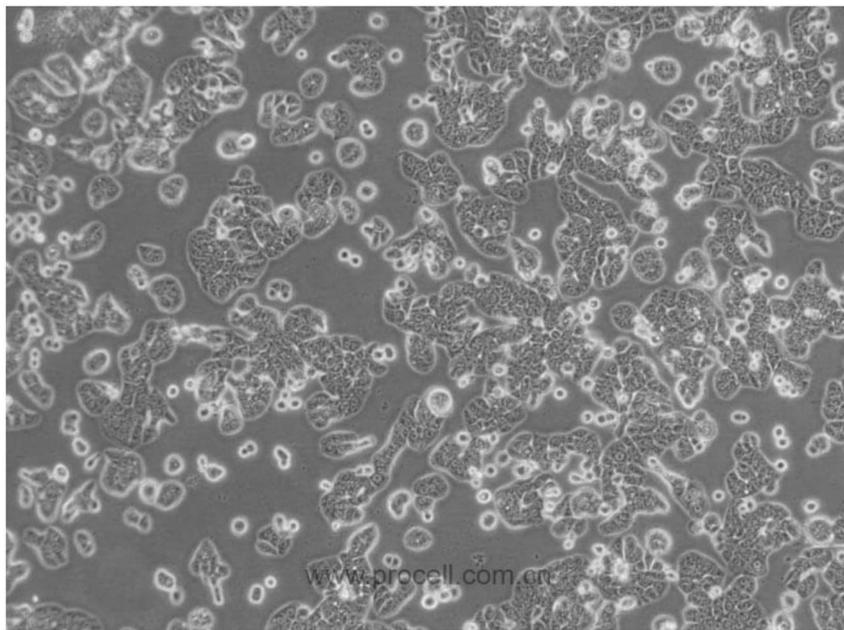


图7