

## 裸鼠皮下成瘤实验报告

### 一、实验材料

#### 1. 实验动物

SPF 级，雄性，6~8 周龄，裸鼠 60 只，购自常州卡文斯实验动物有限公司，实验动物许可证号：SCXK（苏）2016-0010。所有实验动物适应性饲养一周后开始正式实验。

#### 2. 细胞株

骨肉瘤细胞（武汉普诺赛，CL-0157， $1 \times 10^6$  cells/T25 培养瓶）

骨肉瘤耐药细胞（自行诱导培养）

#### 3. 主要试剂

MEM 培养基（武汉普诺赛，PM150410/500 ml）

DMEM 培养基（武汉普诺赛，PM150210/500 ml）

FBS（武汉普诺赛，164210-500/100 ml）

青霉素-链霉素溶液（武汉普诺赛，PB180120）

胰酶（美国 Hyclone，SH30042.01/100 ml）

PBS（南京生兴生物，SN331）

生理盐水（0.9%氯化钠注射液，安徽双鹤药业有限责任公司）

顺铂（CDDP，大连美仑生物公司，MB1055）

#### 4. 主要实验仪器

超净工作台（苏净集团安泰公司，SW-CJ-1F）

高压灭菌锅（西安仪创公司，BXM-30R）

CO<sub>2</sub> 培养箱（美国 ThermoFisher 公司，3131）

游标卡尺（海宁上匠工具有限公司，SJ-455515）

普通电子天平（常熟市双杰测试仪器厂，T1000）

## 二、实验方法

### 1. 制备细胞悬液

(1) 将骨肉瘤细胞培养在 MEM 培养基中，含 20%胎牛血清、100 U/ml 的青霉素、100 µg/ml 的链霉素，培养在 37°C 含 5% CO<sub>2</sub> 的细胞培养箱中。

(2) 将长到培养皿 80%~90%的细胞用胰酶消化下来，1000 rpm 离心，去除上清，加入 PBS 将细胞洗一遍，再次加入 PBS 重悬，对细胞进行计数，将数量调整为 2×10<sup>6</sup> cells/ml。

(3) 根据裸鼠数量，制备足量的细胞悬浮液待接种裸鼠时使用。制备好的细胞悬液于 4°C 冰箱保存并尽快接种裸鼠，放置时间过长影响细胞活性。

### 2. 建立裸鼠皮下成瘤模型

注射部位统一为裸鼠右前肢腋窝靠背部 0.3 cm 处，碘伏棉球消毒后，使用 1 ml 注射器抽取混匀的细胞悬液（密度为 2×10<sup>6</sup>/ml）0.2 ml，注射器针头刺透裸鼠皮肤后，略上挑针头，移至注射部位，缓慢注射细胞悬液。注射完毕后，无菌棉球按压进针处，将实验器械及废弃物无害化处理。刚建模的裸鼠放入更换新垫料的笼具，于次日观察裸鼠的精神状态及活动进食情况，注射部位是否有红肿。

### 3. 分组及药物干预

待裸鼠出现小结节（大约接种第 7 天），生理盐水（NS）治疗组腹腔注射 100 µl/次生理盐水，2 次/周持续 5 周；顺铂（CDDP）组腹腔注射 CDDP（2 mg/kg/次），2 次/周持续 5 周。具体分组如下：

- (1) Group-1 (n=6)
- (2) Group-2 (n=6)
- (3) Group-3 (n=6)
- (4) Group-4 (n=6)
- (5) Group-5 (n=6)

#### 4. 检测指标

(1) 动物观察：记录裸鼠体重、精神状态、兴奋度、撕咬、活动等情况。

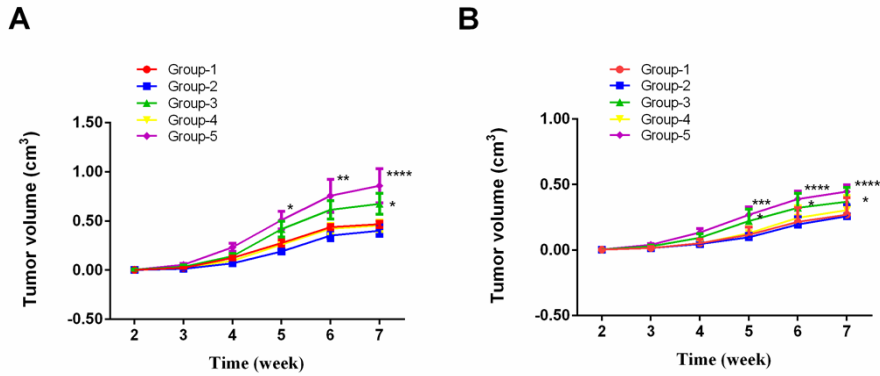
(2) 肿瘤测量：肉眼可见形成肿瘤后，用游标卡尺测量移植瘤体是短径（W）、长径（L），按公式  $V(\text{cm}^3) = L \times W^2 / 2$  计算肿瘤的体积，每周测量肿瘤大小两次。

(3) 终末取材：裸鼠接瘤 6 周后，收集肿瘤组织，计算肿瘤的体积与重量，然后分成两部分保存：①4%多聚甲醛固定，②-80°C低温保存。同时收集血清标本，保存于-80°C，用于后续检测。

#### 5. 数据处理及统计学方法

实验所得数据采用平均数±标准误（Mean±SEM）表示，所有的数据均使用 GraphPad Prism 6 处理及统计分析。两组样本均值之间的比较采用 *t* 检验，多组样本均值之间的比较采用 ANOVA 检验， $P < 0.05$  表示差异具有统计学意义。

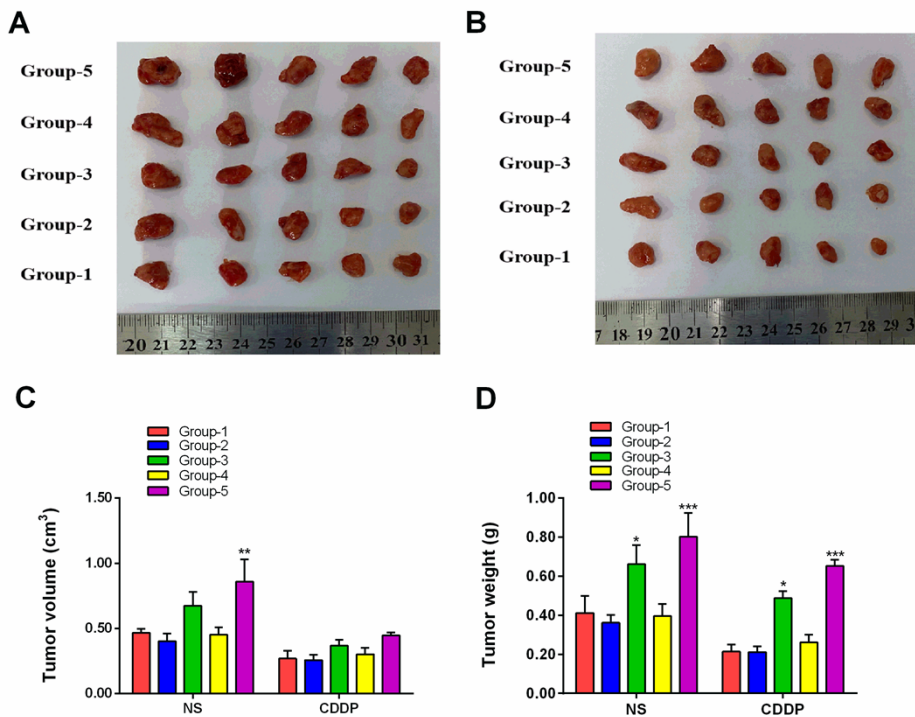
### 三、实验结果



A: 生理盐水 (NS) 治疗组; B: 顺铂 (CDDP) 治疗组

图 1 各组裸鼠体内肿瘤生长情况比较

(\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$ , \*\*\*\*  $P < 0.0001$  vs. Group-1,  $n = 5$ )



A: 生理盐水 (NS) 组肿瘤; B: 顺铂 (CDDP) 组肿瘤; C: 肿瘤体积; D: 肿瘤重量

图 2 各组裸鼠体外肿瘤体积、重量比较

(\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$  vs. Group-1,  $n = 5$ )