

ICS 65.020.30

B 44



中国实验动物学会团体标准

T/CALAS 110-2021

实验动物 人源肿瘤异种移植小鼠 模型制备技术规范

Laboratory animal—Specification of patient-derived xenograft mouse models

2022-01-10 发布

2022-01-10 实施

中国实验动物学会 发布

前 言

本文件按照 GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

本文件由中国实验动物学会归口。

本文件由全国实验动物标准化技术委员会（SAC/TC281）技术审查。

本文件由中国实验动物学会实验动物标准化专业委员会提出并组织起草。

本文件起草单位：西安交通大学、空军军医大学、南昌大学。

本文件主要起草人：刘恩岐、薛莹、师长宏、何远桥、王维蓉、张海、赵四海、白亮。

实验动物 人源肿瘤异种移植小鼠模型 制备技术规范

1 范围

本文件规定了利用小鼠建立人源肿瘤异种移植（patient-derived xenograft, PDX）模型基本原则,包括动物选择、模型制备和评价方法等,规定了 PDX 模型信息化管理基本原则,包括临床标本选择与处理、模型质量控制、应用研究和信息化管理等。

本文件适用于 PDX 模型制备、质量管控和模型应用,反映了 PDX 模型建立、验证和使用过程。

2 规范性引用文件

下列文件对于本标准的应用是必不可少的。凡是注明日期的引用文件,仅注日期的版本适用于本文件。凡是不注日期的引用文件,其最新版本（包括所有的修改单）适用于本文件。

GB14922.1	《实验动物 寄生虫等级与监测》
GB14922.2	《实验动物 微生物等级与监测》
GB 14925	《实验动物 环境及设施》
GB/T 14926.55	《实验动物 免疫酶组织化学法》
GB 19489	《实验室 生物安全通用要求》
GB/T 35823	《实验动物 动物实验通用要求》
GB/T 35892	《实验动物 福利伦理审查指南》

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

人源肿瘤异种移植 PDX

将患者的肿瘤组织或细胞移植到免疫缺陷动物（一般指小鼠）体内形成的移植瘤模型。

3.2

传代 passage

肿瘤在动物体内生长到一定程度后,从其体内取出肿瘤组织并移植到新的免疫缺陷动物体内的过程,称为 PDX 模型的传代。

3.3

实体瘤 solid tumor

临床影像检查（如 X 线、CT、B 超等）或触诊扪及的有形肿瘤组织。

3.4

非实体瘤 non-solid tumor

临床影像检查（如 X 线、CT、B 超等）以及触诊无法看到或扪及的肿瘤。例如，白血病属于非实体瘤。

3.5

荷瘤小鼠 tumor-bearing mice

被移植了肿瘤组织或细胞的小鼠，在 PDX 模型中指移植肿瘤患者来源肿瘤组织或细胞的免疫缺陷小鼠。

3.6

免疫缺陷动物 immunodeficiency animal

由先天性遗传突变或用人工方法造成一种或多种免疫系统组成成分缺失的动物。

3.7

裸小鼠 nude mouse

由于 *Foxn1* 基因发生突变而形成，无毛、缺乏正常胸腺，T 淋巴细胞生成障碍，应用广泛。

3.8

SCID 小鼠

由于常染色体 *Prkdc* 基因隐性突变而形成，表现为严重的联合免疫缺陷（severe combined immunodeficiency, SCID）症状，B 淋巴细胞和 T 淋巴细胞功能缺失。

3.9

NOD-SCID 小鼠

将 *Prkdc* 突变基因导入非肥胖糖尿病背景小鼠（non-obesity diabetes, NOD）体内获得。*Prkdc* 突变基因影响 T 淋巴细胞、B 淋巴细胞的正常发育，NOD-SCID 小鼠除了 T 淋巴细胞、B 淋巴细胞功能缺陷，NK 细胞功能和补体结合能力也下降。

3.10

重度联合免疫缺陷小鼠

是在 NOD-SCID 背景下，IL-2 受体 γ 链（*IL2r γ* ）缺失而形成的重度联合免疫功能缺陷

小鼠,此小鼠缺乏成熟的 T 淋巴细胞、B 淋巴细胞和 NK 细胞,巨噬细胞功能降低,是异种移植模型的良好宿主动物。

常见重度联合免疫缺陷小鼠品系有:

NOG (NOD.Cg-Prkdc^{scid}Il2rg^{tm1Sug}/JicCr1)

NSG (NOD.Cg-Prkdc^{scid}Il2rg^{tm1Wjl}/SzJ)

NCG (NOD/ShiLtJGpt-Prkdc^{em26Cd52}Il2rg^{em26Cd22}/Gpt)

B-NDG (NOD-Prkdc^{scid}Il2rg^{tm1}/Bcgen)

NPG (NOD.Cg-Prkdc^{scid}Il2rg^{tm1}Vst/Vst)

M-NSG (NOD-Prkdc^{scid}Il2rg^{em1}/Smoc) 等

4 生物安全风险评估

实施 PDX 实验前,按照 GB 19489 要求,评估其生物安全危害。实验操作应在生物安全二级或以上级别生物安全实验室或相应级别生物安全柜中开展。对于肿瘤患者基础患病信息,需要进行风险评估,确定其生物安全危害及开展实验的环境要求。

5 动物模型选择

5.1 选择原则

PDX 模型选择 SPF 级免疫缺陷动物进行移植。可根据购买成本、饲养环境和科学研究需求,选择不同品系小鼠移植。

5.2 常用于建立 PDX 模型免疫缺陷小鼠品系

常用于建立 PDX 模型的免疫缺陷小鼠品系有裸小鼠、SCID 小鼠、NOD-SCID 小鼠以及重度联合免疫缺陷小鼠等。

5.3 用于建立 PDX 模型的小鼠的年龄、性别

多选择 4~12 周龄、雌性小鼠。若某种肿瘤与性别强相关,则多依照肿瘤的种类选择小鼠性别,如乳腺癌一般选择雌性小鼠,前列腺癌一般选择雄性小鼠。

5.4 模型小鼠饲养环境

PDX 模型小鼠均使用 SPF 级免疫缺陷动物,即在屏障环境中用独立通气笼具(individual ventilation cage, IVC)装置或隔离器内饲养。饮用高压灭菌水或酸化水,使用 Co⁶⁰或电子束照射后的饲料。进入屏障环境的材料均通过高压灭菌或物理化学方法进行辐射、消毒。定期开展饲养环境监测,确保免疫缺陷动物身体健康。

6 肿瘤样本选择与前处理

6.1 患者肿瘤样本选择

在符合医学伦理学规范和《中华人民共和国人类遗传资源管理条例》前提下,根据科

学研究需要、肿瘤分型、肿瘤特征、实验条件、外科手术或活检取材方式等进行选择。

6.2 肿瘤样本前处理

肿瘤组织标本离体后采用 $2^{\circ}\text{C}\sim 8^{\circ}\text{C}$ 预冷生理盐水冲洗，去除脂肪、结缔组织和坏死部分，经病理医生确认后，选择肿瘤活性最好的部分放入预冷样本运输保存液的无菌样本采集管，封口后在管壁标记好患者信息，将采集管放入冰包中低温条件下（ $2^{\circ}\text{C}\sim 8^{\circ}\text{C}$ ，不能结冰）转移至实验室。在生物安全二级或以上级别生物安全实验室或相应级别生物安全柜中，按照无菌操作流程，将肿瘤组织剪或切成直径 $1\text{ mm}\sim 3\text{ mm}$ 大小的微组织块，整个操作过程中，使样本保持低温。

6.3 肿瘤样本保存

在 PDX 模型制备整个过程中，对肿瘤患者和每一代小鼠模型的肿瘤组织样本均需进行适当保存，以备鉴定和药物评价。

6.3.1 病理保存

将肿瘤组织块放入装有组织固定液的病理管常温保存，并标记样本信息。在 30 天内对固定的组织进行脱水包埋处理。

6.3.2 样本冻存

将肿瘤组织块修剪后，放入含有冻存液的无菌冻存管内，采用冻存体系或程序降温盒冻存。

冻存体系： 4°C 、15 min $\rightarrow -20^{\circ}\text{C}$ 、30 min $\sim 2\text{ h}\rightarrow -80^{\circ}\text{C}$ 过夜，液氮长期保存。

7 PDX 模型制作

7.1 模型制作环境和生物安全防护

操作人员应在生物安全二级或以上级别生物安全实验室或相应级别生物安全柜中进行接种、传代实验，实验过程中始终保持无菌操作。操作人员应穿着无菌工作服，佩戴手套、口罩，对血液、体液类肿瘤应佩戴护目镜。对于肿瘤患者基础患病的情况，根据风险评估，操作人员进行相对应级别的更严格的防护。

7.2 皮下接种

麻醉小鼠，接种部位备皮，用乙醇和碘伏消毒。将移植肿瘤组织块放入套管针中，一般接种在皮下血供丰富的双侧肩胛区。将接种后的小鼠置于温暖环境清醒后正常饲养。注意需将手术后的小鼠和未手术小鼠分开放置、饲养。手术接种信息须进行详细记录。

7.3 肾包膜下接种

以侧卧位肋下切口为例。麻醉、备皮后，将小鼠侧面位放置，用乙醇和碘伏消毒，切开表皮、肌肉，暴露肾，用小刀片或其他利器轻轻划开肾包膜，用镊子将肿瘤组织块放置进去，将肾复位，缝合好肌肉和表皮。将接种后的小鼠放置于温暖环境中，待小鼠清醒后

正常饲养。注意需将手术后的小鼠和未手术小鼠分开放置、饲养。手术接种信息须进行详细记录。

7.4 原位接种

根据患者肿瘤发生的部位，对应接种在小鼠体内相应部位。常见的原位接种肿瘤有：胶质瘤、乳腺癌、胃癌、肠癌、肝癌、胰腺癌、卵巢癌、前列腺癌等。注意需将手术后的鼠标和未手术小鼠分开放置、饲养。手术接种信息须进行详细记录。

8 操作后的清理

患者肿瘤样本以及携带患者肿瘤样本的小鼠组织，都被视为潜在的健康威胁，使用消毒剂（如 10%漂白剂、双氧水消毒剂、84 消毒液等）冲洗或浸泡任何可能与人体组织接触的实验物品（如离心管、注射器、培养皿等）至少 10 min，然后将其放置在生物危害废物或尖锐容器处置器皿中，由专业机构处理。

9 PDX 模型观测、传代、取材及安乐死

9.1 模型观测

小鼠 PDX 模型制作成功后，定期（每周不少于一次）测量小鼠体重和肿瘤大小。

皮下接种模型可用游标卡尺测量接种肿瘤大小。肿瘤大小计算公式： $V=\pi/6\times L\times W^2$ 或 $V=1/2\times L\times W^2$ 。其中， V 表示肿瘤体积； L 表示肿瘤长边长度； W 表示肿瘤短边长度。

肾包膜和原位肿瘤接种模型，可应用影像学方法观测接种肿瘤大小。

9.2 模型传代

选择肿瘤大小为 $1000\text{ mm}^3\sim 1500\text{ mm}^3$ 范围内 PDX 模型传代。麻醉小鼠，剥离肿瘤组织，重复前文所述造模过程，把肿瘤组织接种在下一批动物身体上。同时，留取部分肿瘤组织冻存。

一般将患者肿瘤组织第一次接种给小鼠，培育成功的 PDX 模型称为 P0 代，从 P0 代小鼠体内取出肿瘤组织，传给下一代 PDX 模型称为 P1 代，以此类推。

9.3 模型取材

实体瘤根据造模方式不同，分别取肿瘤和荷瘤脏器，非实体瘤采集血液或其他体液。

9.3.1 移植瘤剖检

将荷瘤小鼠麻醉，局部皮肤消毒，切开皮肤，取出肿瘤，用生理盐水或磷酸缓冲盐溶液（phosphate buffer saline, PBS）冲洗干净，观察测量并在有标尺的背景下拍照记录。

9.3.2 原位肿瘤模型的脏器剖检

荷瘤小鼠实施安乐死，局部皮肤消毒，将荷瘤脏器取出，用生理盐水或 PBS 冲洗干净，观察测量并在有标尺的背景下拍照记录。

9.4 安乐死

单个肿瘤在任何角度测量长度不应大于 1.5 cm, 肿瘤过大时应对荷瘤小鼠实施安乐死。如果动物的肿瘤生长方式限制了它们的活动能力, 阻碍了它们获取食物和水, 动物表现出嗜睡、呼吸困难、不活动、毛发皱缩、体温下降、食欲不振等现象或者接种肿瘤处皮肤显示出坏死的症状, 也应对其实施安乐死。

10 PDX 模型鉴定

为了保证 PDX 模型肿瘤与最初取材的患者肿瘤病理特征一致, 需要进行鉴定。

10.1 模型病理鉴定

组织病理学鉴定: 苏木精-伊红染色 (hematoxylin and eosin, H-E 染色) 和免疫组化染色。

10.2 模型分子生物学鉴定

短串联重复序列 (short tandem repeat, STR) 分型检测、聚合酶链反应 (polymerase chain reaction, PCR)、全外显子组测序 (whole exome sequencing, WES)、基因芯片、单核苷酸多态性 (single nucleotide polymorphism, SNP)、比较基因组杂交 (comparative genome hybridization, CGH) 分析等。

10.3 影像学检测

采用肾包膜和原位制作的 PDX 模型, 需要影像学方法测量实体瘤体积, 观察肿瘤生长情况。常见的方法有: 核磁共振、B 超、活体成像、CT 等与人类肿瘤诊断类似的其他手段。

10.4 细胞学鉴定

对于非实体瘤的血液类肿瘤, 主要通过细胞学技术判断造模情况。

11 PDX 模型制备成功判定标准

11.1 病理学

H-E 染色观察模型肿瘤组织与患者肿瘤组织形态相同, 免疫组化染色判断具有相同的肿瘤标志物。

11.2 分子生物学

STR 或 PCR 法等进行肿瘤组织溯源性检测, 证明模型的肿瘤是人源性而非鼠源性。

11.3 细胞学

细胞学技术判定非实体瘤类肿瘤。

11.4 其他方法辅助判定

前文所述的其他鉴定方法。

12 PDX 模型信息化管理

12.1 临床

12.1.1 临床患者

12.1.1.1 临床患者的必要信息

患者住院号、年龄、性别、疾病诊断、患者知情同意书、输血前四项（乙肝、丙肝、艾滋病、梅毒）。

12.1.1.2 临床患者的补充信息

患者种族/民族、目前治疗药物和措施、患者治疗史及必要的微生物检查。

12.1.2 临床肿瘤

包括肿瘤分类、分型、解剖位置和肿瘤组织病理学等相关信息。

12.1.2.1 临床肿瘤的必要信息

肿瘤编号、肿瘤发展阶段（如原发、转移、复发）、组织病理学、肿瘤等级分类、疾病分期分类、特定肿瘤诊断标志物以及是否来源于未经治疗的患者等。

12.1.2.2 临床肿瘤的补充信息

肿瘤标本取样方法（如手术、活检、腹水等），肿瘤是否来源于已有编号的 PDX 模型。

12.2 模型建立

12.2.1 模型建立的必要信息

PDX 模型编号、模型宿主动物品系和来源、宿主动物是否经过人源化免疫系统重建及重建类型、肿瘤组织处理过程（如组织或细胞悬液）、肿瘤植入类型和解剖位置（如皮下、原位等）、研究单位伦理批件、实验动物管理委员会批件。

12.2.2 模型建立的补充信息

肿瘤移植成功率、药物反应、肿瘤生长曲线等。

12.3 模型质量控制

根据患者肿瘤的关键特征，获取关于传代肿瘤组织来源等全面、可靠信息。

12.3.1 模型质量控制的必要信息

组织病理学、免疫组化染色，评估人类肿瘤标志物、STR 分型等。

12.3.2 模型质量控制的补充信息

PCR 人源化鉴定、原位杂交、基因突变和重排评估、DNA 甲基化、基因表达谱、DNA 序列分析、测量 PDX 肿瘤生长对标准治疗的反应、动物健康状况监测、PDX 模型功能性评估等。

12.4 模型研究和其他相关数据

12.4.1 模型研究

PDX 模型的研究方向和内容。

其他补充信息：治疗、治疗控制（如剂量、细节）、治疗反应、肿瘤组学信息、样本编号、取样位置、人源或鼠源、所用技术等。

12.4.2 与 PDX 模型相关的数据库

建立 PDX 相关数据库及数据存储和使用规范。

附录 A

(资料性附录)

试剂配方

A.1 样本运输保存液配方：基础培养基（DMEM/F12、DMEM 高糖、RPMI1640 等）+2%~3%双抗（青链霉素混合液）+3%~5%胎牛血清（FBS）。根据样本污染、耐药情况，必要时添加两性霉素 B、万古霉素。

A.2 冻存液配方：①50% RPMI1640 + 40% FBS + 10%二甲基亚砷（DMSO）；②90% FBS+10% DMSO。

A.3 组织固定液：4%多聚甲醛。

参考文献

Meehan T F, Conte N, Goldstein T, et al. 2017. PDX-MI: minimal information for patient-derived tumor xenograft models. Cancer Res, 77(21) : e62-e66.

刘恩岐, 何远桥, 李文得. 2022. 人源肿瘤异种移植模型构建、鉴定及应用. 北京: 科学出版社.
