

肺癌PDX模型构建

1. 标本处理

- 1.1 无菌条件下，取人肺癌肿瘤新鲜标本，置于冰上。
- 1.2 剔除包膜和坏死组织，切取直径约1 cm左右组织块，保存于RPMI-1640培养液（含青霉素-链霉素溶液）中。

2. 小鼠准备

- 2.1 麻醉小鼠，剃除背部操作区域毛发，放置于保温垫上。
- 2.2 用碘伏消毒小鼠背部皮肤。

3. 首次接种

- 3.1 超净工作台内，用RPMI-1640培养液反复冲洗肺癌组织块，将组织块修剪成直径约2 mm的小块。
- 3.2 用注射器将组织块移植至裸鼠背部皮下（每例标本接种5只小鼠）。
- 3.3 缝合创口，消毒后，待小鼠复温苏醒后，放回笼中饲养。

4. 观察测量

- 4.1 每日观察小鼠状态及肿瘤生长情况。发现肿瘤后，每3天用游标卡尺测量肿瘤长径（b）和短径（a），按公式 $V = a^2b\pi/2$ 计算肿瘤体积。

5. 首次传代

- 5.1 待肿瘤体积达800 mm³时，处死裸鼠，钝性分离肿瘤组织。
- 5.2 部分组织固定于4%多聚甲醛，剩余组织按步骤3接种至5只新裸鼠。

6. 后续传代

- 6.1 重复步骤4-5，获得第3代移植瘤组织。

7. 组织学分析

- 7.1 取原代及第1、2、3代肿瘤组织（固定于多聚甲醛），进行石蜡包埋、切片、HE染色。

肺癌CDX模型构建

1.细胞准备

- 1.1 A-549细胞用含10%胎牛血清的DMEM培养液，在37°C、5% CO₂培养箱中培养至对数生长期。
- 1.2 0.25%胰蛋白酶消化成单细胞悬液，台盼蓝染色检测活细胞率≥95%。
- 1.3 调整密度至 1×10^7 个/mL。

2.小鼠准备

- 2.1 麻醉小鼠，剃除左侧肋弓下缘以上约1 cm处（第5-6肋弓之间）的毛发。
- 2.2 将小鼠置于保温垫上，用碘伏对手术区皮肤进行消毒。

3.手术暴露肺部

- 3.1 沿肋间隙剪开约5 mm小口，钝性分离皮下组织，暴露左肺（可见随呼吸收缩）。

4.肿瘤细胞注射

- 4.1 取100 μL细胞悬液（含 1×10^6 个细胞）。垂直肋间隙进针，深度约3 mm，缓慢注射。注射后停针3-5 s，左右旋转缓慢拔针。
- 4.2 注射后观察数秒，确认无气胸形成。
- 4.3 缝合切口，碘伏消毒，复温苏醒后放回笼内。

5.观察和测量

- 5.1 记录小鼠饮食、活动、皮毛状态等。
- 5.2 待肿瘤形成后，每3天用游标卡尺测量长径（b）和短径（a）。按公式 $V = a^2b\pi/2$ 计算肿瘤体积。肿瘤体积达 500 mm³ 时处死小鼠。钝性分离肿瘤，固定于4%多聚甲醛。

6.组织学分析

- 6.1 石蜡包埋 → 切片 → HE染色 → 光镜观察。

常见问题解析

1. 肺癌PDX模型

(1) 为什么造模过程中小鼠出现感染或死亡?

①可能是由于麻醉剂过量注射；②移植过程中操作不规范，造成感染。

③由于免疫缺陷鼠的易感性，实验过程中应严格无菌操作，必要时建议添加抗生素。

2 为什么移植后成瘤率低甚至没有肿瘤形成?

可能是由于样本质量差，操作时间过长组织坏死。建议增加样本量，获得样本后6小时内进行移植。

2. 肺癌CDX模型

(1) 为什么异种移植成瘤率低?

①可能是由于注射用的细胞活性不足，建议优化细胞培养条件，保证细胞存活率>95%，方可用于实验；

②细胞注射量过多或注射操作有误导致渗漏；③未使用免疫缺陷鼠发生免疫排斥反应，建议在实验前验证小鼠品系。

(2) 为什么肿瘤生长不均匀?

①可能是由于人肺腺癌A-549细胞悬液未充分混匀，建议充分混匀。②注射过程中导致细胞渗漏，注射后旋转针一周，缓慢拔针，以减少渗漏。

参考文献

[1] 吕慧, 周清华. 动物模型在肺癌研究中的应用[J]. 中国肺癌杂志, 2007, 10(1): 72-75.

[2] Berthelsen MF. Comparative Analysis of Stk11/Lkb1 versus Pten Deficiency in Lung Adenocarcinoma Induced by CRISPR/Cas9 [J]. Cancers (Basel). 2021, 13(5): 974.

[3] Kwon MC. Mouse models for lung cancer [J]. Mol Oncol. 2013, 7(2): 165-77.