

ICS 65.020.30
CCS B44



中国实验动物学会团体标准

T/CALAS XXX-2025

实验动物 食管癌动物模型制备和评价技术规范

Laboratory animal—Technical specification for the preparation
and evaluation of animal models of esophageal cancer

（征求意见稿）

2024-3-27 发布

2024-3-27 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。

本文件参考 XXX 发布的国际标准《XXX》起草，一致性程度为 XXX。

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：河南中医药大学，郑州大学第一附属医院，河南中医药大学第三附属医院，郑州大学，河南医药大学，广州医科大学附属第五医院，辽宁中医药大学，河南省科研平台服务中心。

本文件主要起草人：苗晋鑫，苗明三，宋亚刚，赵强，张金英，王发展，鲍伟杰，张忠献，宋宇，梁雪，吴运谱。

实验动物 小鼠食管癌模型制备与评价技术规范

1 范围

本文件规定了食管癌的动物模型制备和评价方法。

适用范围：该模型主要用于药物体内抑瘤活性筛选药物作用、体内机制验证以及联合用药协同效应。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；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。

GB14925

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1 食管鳞癌 Esophageal squamous cell carcinoma, ESCC：起源于食管黏膜鳞状上皮的恶性肿瘤。

4 模型制备

4.1 化学诱导法（以饮水 4-硝基喹啉-1-氧化物诱导的 C57BL/6 小鼠 ESCC 模型为例）

4.1.1 实验原理

4-硝基喹啉-1-氧化物（4-NQO）是目前主要用于构建小鼠食管鳞癌模型的芳香族杂环化合物，作为一种水溶性很强的前体致癌剂，它在进入机体后被体内的硝基还原酶代谢为致癌物 4-羟基氨基喹啉-1-氧化物，并进一步被丝氨酸-tRNA 合成酶代谢为乙酰化丝氨酸-AMP 酶复合物，随后结合在 DNA 的鸟嘌呤残基处诱发基因突变造成癌变。

4.1.2 实验材料

a) 实验动物：C57BL/6 雄性小鼠。

b) 实验试剂：丙二醇、4-NQO、灭菌饮用水。

4.1.3 模型建立技术要求

小鼠分为 ESCC 模型组和对照组。用丙二醇溶解 4-NQO 溶液，配制成 2% 的母液，使用时使用灭菌饮用水配制成对应的使用浓度。模型组：小鼠连续饮水 4-NQO 溶液 16 周，推荐 4-NQO 的饮水浓度为 100 µg/mL。对照组：连续 16 周饮用对应浓度的丙二醇灭菌自来水溶液，然后再换为普通饮水继续饲养 12 周，造模结束后进行相关指标检测。

4-NQO 溶液配置的注意事项：4-NQO 为黄色粉状物，用丙二醇配置母液时需要充分涡旋使其充分溶解，然后避光保存在 4℃冰箱中，备用。

4.2 移植瘤法（以细胞系移植为例）

4.2.1 实验原理：将人源食管癌细胞系（如 KYSE 系列、TE 系列细胞系）接种于免疫缺陷小鼠（如 BALB/c 裸鼠、超重度免疫缺陷小鼠）的皮下。由于宿主免疫系统缺失，无法排斥异种细胞，肿瘤细胞在小鼠皮下增殖形成瘤块。此模型主要用于评估药物对已形成肿瘤的抑制效果

注意事项：若使用人源肿瘤组织移植须经医学伦理委员会审查批准，提供者须签署知情同意书。

4.2.2 实验材料

a) 实验动物：BALB/c nude 裸鼠。

b) 实验试剂：KYSE-150 细胞系，RPMI 1640 基础培养基，PBS 磷酸盐缓冲液，注射器，0.25%胰蛋白酶-EDTA 消化液，PBS 缓冲液，细胞培养瓶

4.2.3 模型建立技术要求

（1）制备细胞悬液：选择对数生长期的人食管癌细胞，消化、离心、重悬于 PBS 或无血清培养基中。细胞活力需>90%。细胞计数：用台盼蓝染色法计数，调整细胞浓度至 $5 \times 10^6 \sim 1 \times 10^7$ cells/mL。

（2）固定裸鼠，用碘伏消毒其右侧腋下皮肤。用 1mL 注射器吸取 200 μ L 细胞悬液（约含 $1-2 \times 10^6$ 个细胞）。

（3）皮下注射，看到皮丘鼓起即可。

（4）观察与测量：接种后约 5-7 天可触及瘤块。用游标卡尺定期测量肿瘤的长径（a）和短径（b）；计算肿瘤体积：公式为 $V=1/2 \times a \times b^2$ 。终止实验：当对照组肿瘤体积平均达到 1000-1500mm³，或出现溃烂、影响动物活动时，处死动物，剥离瘤块称重，并进行后续分析。

5 ESCC 模型评价技术要求

5.1 模型的一般状态观察要求

至实验结束，对照组小鼠毛发光泽、活动正常、反应迅速。ESCC 组小鼠在前 16 周无异常行为，毛发正常，活动正常。17 周至 23 周实验结束，ESCC 组小鼠逐渐体型消瘦、活动渐变迟缓、毛发蓬乱无光泽，并伴随弓背、蜷缩、眼神迷离。

5.2 食管表观形态观测

取血后处死小鼠，取出食管（舌-食管-胃一起取出）、拍照，记录外观变化；然后剪下食管，用 PBS 进行冲洗干净，纵向剖开，观察内侧食管壁的变化。

结果判定：对照组食管长约 3.0 cm-4.0 cm，食管光滑细长且无突起肿大现象。ESCC 组食管长约 2.0 cm-2.5 cm，食管变粗，有突起肿大表现；食管内壁有大小不等的白色菜花样凸起。

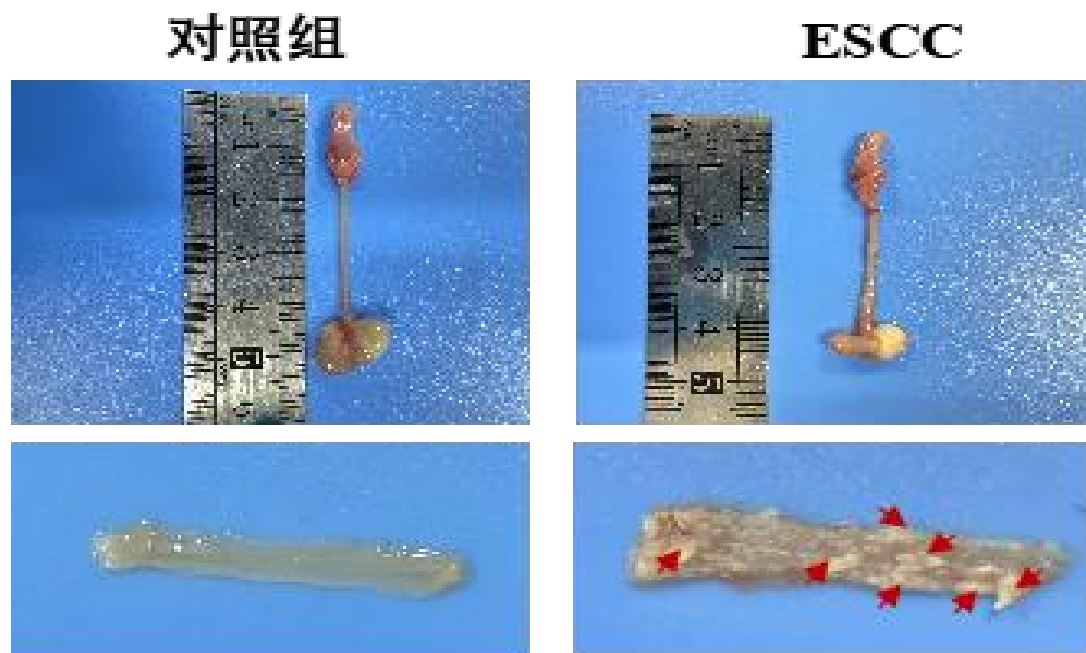
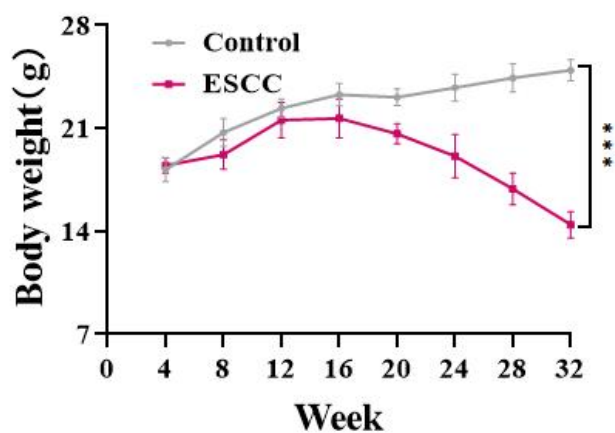


图 1 4-NQO 诱导小鼠 ESCC 模型食管表观变化的代表性图片

5.3 体重变化

操作过程：模型组小鼠饮水第八周起，以后每隔 4 周记录每组小鼠体重，直至实验结束。

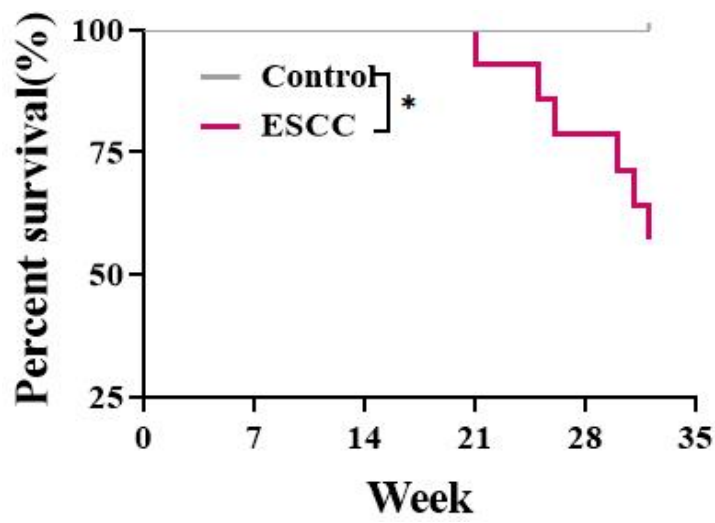
结果判定：ESCC 模型组小鼠体重明显下降 ($P < 0.001$)。



5.4 生存率变化

操作过程：观察每组小鼠的死亡情况，记录死亡时间和只数，至实验结束。

结果判定：ESCC 模型组小鼠生存率明显下降。



5.5 食管病理观察

5.5.1 食管标本获取技术要求

在进行小鼠食管组织取材时，剖开小鼠腹部并取出舌—食管—胃结构，使用 PBS 缓冲液清洗组织表面的杂质，在浸泡在 4%多聚甲醛中固定 24 h；

5.5.2 苏木素-伊红（HE）染色食管组织病理学检测

石蜡切片经二甲苯梯度脱蜡、无水乙醇及 75%酒精水化后水洗；苏木素染核 3-5 min，经水洗、分化、返蓝并流水冲洗，再经 85%、95%梯度酒精脱水后伊红染色 5 min；最后用多组无水乙醇脱水、二甲苯透明，中性树胶封片完成 HE 染色。

结果判定：对照组小鼠食管粘膜正常，包含约 1-3 层基底/基底上层细胞、3-4 层中间层、表层鳞状细胞和角化层，细胞排列整齐，视野下无明显异形细胞或病理性核分裂像。ESCC 组小鼠食管粘膜形成食管鳞状细胞癌。主要表现为多角形、圆形、梭形的肿瘤细胞无序、紧密排列，病理性核分裂多见，形成癌巢。癌细胞已突破基层至粘膜下层，出现弥漫的间质浸润，核分裂活性较高，细胞核深染，部分区可见角化珠形成，间质血管较丰富，可见大量炎细胞浸润。

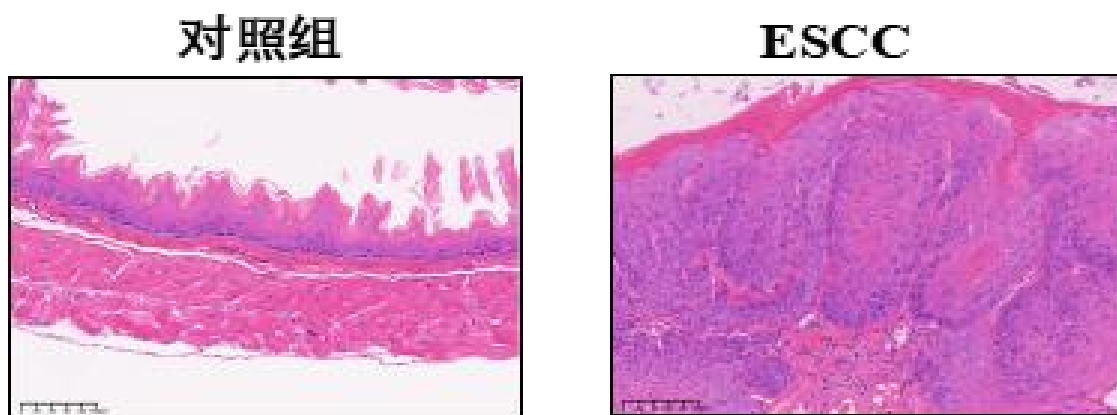


图 2 4-NQO 诱导小鼠 ESCC 模型 HE 病理切片的代表性图片（标尺：100 μm ）

5.5.3 食管组织中增殖细胞核抗原 Ki67 蛋白检测

免疫荧光检测食管组织 Ki67 的表达：切小鼠食管组织石蜡包埋，切片常规脱蜡至水，PBS 缓冲液冲洗，抗原修复后，BSA 封闭。在切片上滴加对应的一抗，4℃孵育过夜。PBS 清洗，5 min/次。滴加二抗覆盖组织，避光条件下室温孵育。PBS 清洗，DAPI 染色，避光孵育。封片，镜检拍照。

结果判定：每张切片选取 3 个视野，定量阳性区域平均光密度。对照组细胞棕色着色深且面积较大，蛋白表达量高。模型组细胞棕色着色较浅，蛋白表达量低，平均光密度值明显下降。

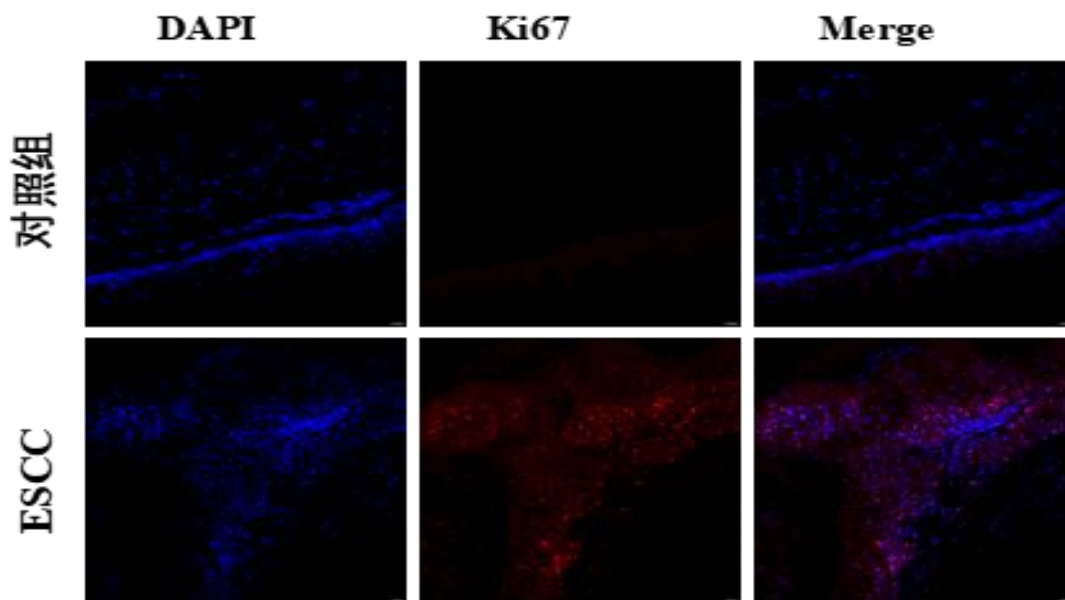


图 3 4-NQO 诱导小鼠 ESCC 模型 Ki67 蛋白荧光标记的代表性图片

6 动物福利保障

肿瘤负荷：小鼠单瘤最大径 $\leq 20\text{ mm}$ 、肿瘤重量不超过动物体重 10%；大鼠单瘤最大径 $\leq 40\text{ mm}$ ；损伤指标：肿瘤破溃、出血、坏死、继发皮肤/全身性感染；生理指标：体重较

基线下降 $\geq 20\%$ 、进食饮水显著减少、活动萎靡。

附录 A

A.1 基因工程食管癌小鼠模型

A.1.1 实验原理

运用 CRISPR/Cas9 等基因编辑技术，对 C57BL/6 小鼠特定基因进行敲除、插入或编辑。人为操控食管癌变核心驱动基因，模拟临床食管癌高频基因突变（TP53 突变占 ESCC 70% 以上），无外源致癌物，肿瘤完全由基因异常驱动，原发灶位于食管。

A.1.2 模型建立技术要求

基因编辑小鼠构建：运用 CRISPR/Cas9 基因编辑技术，设计针对 C57BL/6 小鼠 P53 基因的 gRNA（向导 RNA），将其与 Cas9 核酸酶共同导入小鼠受精卵中，通过同源重组或非同源末端连接机制，实现 P53 基因特定片段的敲除。将编辑后的受精卵移植到代孕母鼠体内，使其发育成子代小鼠。

基因型鉴定：子代小鼠出生后，剪取少量鼠尾组织，提取基因组 DNA，采用 PCR 扩增含敲除位点的基因片段，结合测序技术，鉴定小鼠基因型，筛选出 P53 基因成功敲除的小鼠（P53^{-/-}小鼠）。

模型观察与验证：将 P53^{-/-}小鼠饲养至 8 周龄后，开始定期观察其一般状态。在不同时间点（第 12 周、16 周、20 周）处死部分小鼠，解剖获取食管组织，进行病理组织学检查（HE 染色、免疫组化等），观察食管上皮病变情况，检测相关分子标志物（如 Ki-67、p53 等）表达，验证食管癌模型是否成功构建

A.2 基因修饰食管癌动物模型

A.2.1 实验原理

依托 Cre-loxP 条件基因编辑系统，ED-L2 启动子仅在小鼠食管鳞状上皮激活 Cre 重组酶，精准敲除抑癌基因（如 Trp53）或过表达癌基因（如 Cyclin D1），经长期饲养自发多阶段食管鳞癌。

A.2.2 模型建立技术要求

品系准备：选用 C57BL/6 背景三类小鼠：食管特异性 ED-L2-Cre 工具鼠、Trp53^{fl/fl}条件敲除鼠、Ccnd1^{LSL/LSL}条件过表达鼠。

多代杂交繁育：三代交配配种，最终筛选基因型为 Trp53^{fl/fl};Ccnd1^{LSL/LSL};ED-L2-Cre⁺的阳性小鼠，同窝野生型小鼠作为对照。

基因型鉴定：2~3 周龄剪鼠尾提取 DNA，PCR 电泳分型，仅保留基因编辑纯合阳性个体入组实验。

SPF 环境长期饲养造模：6 周龄阳性小鼠分笼饲养 6~12 个月；定期监测体重、精神、食管黏膜病变。

模型有效性验证：实验终点分离食管组织：HE 病理确认鳞癌病灶；qPCR/WB 验证目标基因编辑效果；IHC 检测 Ki67 等增殖、通路标志物，判定模型构建合格。

A.3 ESCC 模型的中医证候评分

A.3.1 评价指标

根据 ESCC 中医辨证分型，参照《肿瘤中医证候量化评价专家共识》《食管癌中西医结合诊疗专家共识》，ESCC 主流中医辨证分型包括：气虚、痰瘀互结、阴虚毒热、气虚阳微，主要评价可分为宏观指标和微观辅助指标。采用 0-3 分四级分级法，0 分无证候、1 分轻度、2 分中度、3 分重度，总分判定证候轻重（表 1）。

（a）宏观指标：精神萎靡、蜷缩扎堆；毛色晦暗无光、蓬松竖立；严重弓背，蜷缩成团；食量减少、体重下降；水样便或便血等。

表 1 证候量化评分量表（宏观观测指标）

观测项目	0 分（无）	1 分（轻度）	2 分（中度）	3 分（重度）	对应证型
精神活动	活动灵敏，自主游走	活动减少，轻微倦怠	喜蜷缩，刺激后缓慢活动	静卧不动，对外界刺激无反应	气虚、气虚阳微
进食饮水	采食饮水正常	食量减少 1/3	食量减少 1/2	几乎拒食、饮水极少	气虚、阴虚
体质量变化	体重波动<5%	体重下降 5%~10%	体重下降 10%~20%	体重下降>20%	气虚、阴虚毒热
皮毛爪甲色泽	毛发顺滑光亮，爪甲淡红润泽	毛发略干枯，爪甲淡白	毛发粗糙脱落，爪甲偏暗紫	毛发枯槁大片脱落，爪甲青紫	气虚、血瘀
肿瘤局部状态	瘤体平整，表皮完整无破损	瘤体轻微隆起，表皮完整	瘤体膨大，局部充血红肿	瘤体破溃、渗液、继发感染	痰瘀互结、毒热
二便状态	排便成型、尿量正常	大便偏干/稀，尿量略少	便干难排或溏稀，尿量减少	黏液便 / 便血、少尿无尿	痰瘀、阴虚毒热

总分分级

总分 0~5 分：证候轻微；6~12 分：中度复合证候；13~18 分：重度证候，同步启动 RB/T173-2018 人道终点评估。

气虚：精神、进食、体重单项 ≥ 2 分；

血瘀：爪甲青紫、肿瘤充血破溃单项 ≥ 2 分；

痰瘀互结：肿瘤病灶异常+二便失常双项 ≥ 2 分；

阴虚毒热：体重骤降、口干少津、便干尿少综合高分。

（b）微观指标：

气虚：血清白蛋白、血红蛋白降低，IL-6、TNF- α 炎症升高；

血瘀：血液流变学异常、CD31 血管新生、EMT 蛋白高表达；

阴虚毒热：氧化应激紊乱、肿瘤 Ki67 增殖指数升高；

痰瘀复合：食管组织炎症浸润、脂质代谢紊乱、肿瘤侵袭深度增加。