

ICS 65.020.30
CCS B44



中国实验动物学会团体标准

T/CALAS xxx—202x

实验动物 口腔癌中国地鼠模型制 备与评价规范

Laboratory animal—Specification for the establishment and
Evaluation of an Oral Cancer Model in Chinese Hamsters
(征求意见稿)

202x-xx-xx 发布

202x-xx-xx 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：山西医科大学、四川大学华西口腔医院、中国医学科学院医学实验动物研究所、首都医科大学。

本文件主要起草人：宋国华、杨钧婷、续国强、姚洋、陈朝阳、高菁、杜小燕、高继萍、轩瑞晶、苏金金。

实验动物 口腔癌中国地鼠模型制备与评价规范

1 范围

本文件规定了实验动物中国地鼠口腔癌模型制备过程和评价方法，包括实验动物、操作人员、环境控制、模型制备、模型评价等。

本文件适用于利用化学诱导的中国地鼠口腔癌模型的制备与评价。

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。

GB 14925 实验动物 环境及设施

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

GB/T 39646 实验动物 健康监测总则

GB/T 39760 实验动物安乐死指南

RB/T 173 动物实验人道终点评审指南

T/CHSA 003 口腔癌及口咽癌病理诊断规范

3 术语和定义

以下术语和定义适用于本文件。

3.1

地鼠 hamster

来源于野生仓鼠，经过长期人工饲养和培育而成的一类小型啮齿类实验动物。

3.2

中国地鼠 Chinese hamster

经人工饲育，对其携带的病原微生物和寄生虫实行控制，遗传背景明确或来源清楚，用于科学研究、教学、生产、检定及其他科学实验的中国地鼠。

3.2

口腔鳞状细胞癌 Oral squamous cell carcinoma

起源于口腔黏膜上皮的伴有鳞状分化的癌，口腔黏膜包括颊黏膜、牙龈黏膜、磨牙后三角区黏膜、舌体（界沟前 2/3）黏膜、口底黏膜、硬腭黏膜、唇黏膜。

3.3

中国地鼠口腔癌模型 Chinese hamster oral cancer model

以中国地鼠为对象，采用二甲基苯并蒽（DMBA）作为化学致癌剂，涂抹于颊囊黏膜诱导其发生从正常黏膜、上皮单纯增生、上皮异型增生直至口腔鳞状细胞癌的系列病变，其是在组织病理学上与人口腔鳞状细胞癌的癌变进程高度相似的动物模型。

4 缩略语

DMBA，二甲基苯并蒽（N,N-Dimethylaniline）

SCC-Ag，鳞状细胞癌抗原(squamous cell carcinoma antigen)

CK5，细胞角蛋白 5（Cytokeratin 5）

CK6，细胞角蛋白 6（Cytokeratin 6）

P63，肿瘤蛋白 p63（Tumor protein p63）

Ki-67，增殖标志物 Ki-67（Kiel 67）

5 模型制备

5.1 试剂与耗材

5.1.1 致癌剂：二甲基苯并蒽（DMBA）。

5.1.2 溶剂：丙酮，分析纯。

5.1.3 固定液：4%多聚甲醛溶液或 10%中性福尔马林溶液。

5.1.4 其他耗材：小头棉签、无菌冻存管、1.5 mL 离心管、手术器械等。

5.2 设备

5.2.1 生物安全柜。

5.2.2 组织脱水机、包埋机、石蜡切片机。

5.2.3 光学显微镜、病理图像分析系统。

5.2.4 透射电子显微镜。

5.2.5 -80℃超低温冰箱。

5.3 实验动物

5.3.1 动物选择：选用 8~10 周龄、体重 21g~25g 的 SPF 级中国地鼠。

5.3.2 饲养环境：应符合 GB 14925 的规定。正式实验前，动物应适应性饲养至少 1 周。

5.4 造模方法

5.4.1 溶液配制：将 DMBA 粉末溶于丙酮中，配制成浓度为 0.5% (w/v) 的 DMBA 丙酮溶液。

5.4.2 涂抹造模：用小头棉签蘸取 0.5% DMBA 丙酮溶液，均匀涂抹于中国地鼠双侧颊囊黏膜，用洗耳球吹干后，禁食禁水 2 小时。

5.4.3 涂抹频率：每周 3 次，持续涂抹 18 周。

6 样品采集与处理

6.1 血液采集

取材前，经眼眶静脉丛采血，室温静置 30 min 后，3000 rpm/min，4℃离心 15min，分离血清，分装后于-80℃保存。

6.2 组织采集

安乐死方法处死动物后，沿口角至耳根部剪开皮肤，暴露颊囊区域。观察并记录颊囊黏膜大体病变（位置、大小、颜色、质地、有无破溃及与周围组织粘连），沿颊囊边缘完整剥离双侧颊囊肿瘤组织，用 PBS 缓冲液清洗。一部分置于 4%多聚甲醛或 10%中性福尔马林中固定，用于组织病理学检查；一部分切成 1 mm³ 大小的碎块，置于 2.5%戊二醛固定液中，用于透射电镜检测。

7 模型评价

7.1 临床观察

每日观察并记录动物的健康状况、颊囊黏膜的变化（充血、水肿、增厚、粗糙、白斑、糜烂、溃疡、赘生物等）。

肉眼观察结果宜采用半定量评分系统进行记录，对黏膜颜色（正常/充血）、厚度（正常/增厚/明显增厚）、表面性状（光滑/粗糙/白斑）及病变类型（糜烂/溃疡/赘生物）等维度分别评分并汇总，形成动态观察曲线，与组织病理学结果相互参照。

7.2 诊断指标

7.2.1 肿瘤组织病理学评价

将固定后的组织进行常规脱水、石蜡包埋、切片（厚度 4 μm）、HE 染色，于光学显微镜下观察。

7.2.2 超微结构评价

取肿瘤组织样本，经戊二醛固定、锇酸固定、梯度脱水、包埋、超薄切片、铀铅双染色后，于透射电子显微镜下观察细胞超微结构的变化，包括细胞间隙、桥粒、线粒体、细胞核形态等。

7.2.3 血清标志物检测评价

可采用 ELISA 等方法检测血清中口腔癌相关标志物 TNF- α 、SCC-Ag，作为模型评价的辅助指标。

7.2.4 肿瘤组织标志物检测评价

在口腔癌模型中，CK5、CK6 及 P63 作为鳞状上皮分化的标志物，Ki-67 是评估肿瘤细胞增殖活性和模型有效性的关键指标。显微镜下随机选取 5 个高倍视野（ $\times 400$ ），每个视野计数 200 个肿瘤细胞，计算阳性细胞百分比。

8 判定标准

8.1 肉眼观察指标

颊囊黏膜出现充血、水肿、增厚、粗糙、白斑、糜烂、溃疡及赘生物等外观改变。

8.2 肿瘤组织病理学改变

组织病理学证实癌细胞突破基底膜，向下浸润结缔组织，形成癌巢。

8.3 超微结构指标

透射电镜下观察到的细胞间隙增宽、桥粒减少、线粒体肿胀、细胞核形态不规则等改变。

8.4 血清分子标志物

ELISA 方法检测血清中 TNF- α 、SCC-Ag 表达水平显著升高。

8.5 免疫组化指标：CK5、CK6、P63 及 Ki-67 免疫组化染色

8.5.1 CK5、CK6、P63 表达可判断肿瘤的口腔癌特异性，阳性表现为胞核或胞质棕黄色染色。

8.5.2 Ki-67 表达可通过计算阳性细胞百分比表示。根据阳性细胞比例，判读肿瘤增殖活跃情况，低增殖（Ki-67 阳性率 $\leq 10\%$ ），中等增殖（Ki-67 阳性率 $10\% < X \leq 30\%$ ），高增殖（Ki-67 阳性率 $> 30\%$ ）。

9 动物福利保障

9.1 动物实验应符合 GB/T 35892-2018 及 GB/T 39646-2020 要求，并经过实验动物福利伦理委员会审批。

9.2 实验过程中，若出现颊囊肿瘤体积过大（体积 $> 2000 \text{ mm}^3$ ，直径 $> 20 \text{ mm}$ ），严重妨碍正常进食、饮水或呼吸，须终止实验。动物处死按 GB/T 39760 要求执行。

10 人员要求

动物模型制备和检测人员应经过实验动物技术培训或具有相关资质，熟练掌握相关仪器设备操作和实验技能。
