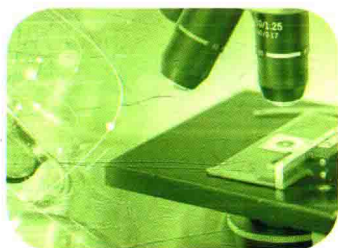


实验动物模型 制备手册

.....

丁赛丹 主编



上海交通大学出版社
SHANGHAI JIAO TONG UNIVERSITY PRESS

实验动物模型 制备手册

.....

丁赛丹 主编



上海交通大学出版社
SHANGHAI JIAO TONG UNIVERSITY PRESS

内容提要

使用动物模型是现代医学研究中必不可少的方法和手段。本书主要介绍了各种病理机制下的常见人类疾病相关的动物模型的多种制备方法。本书共十章,包括肿瘤类动物模型、纤维化类动物模型、炎症类动物模型、精神障碍类动物模型、积水类动物模型、结石类动物模型、循环障碍类动物模型、代谢障碍类动物模型、功能障碍类动物模型以及其他疾病动物模型的制备方法。本书内容详尽、实用,内容简单、易懂,是一本实用的工具书。

图书在版编目(CIP)数据

实验动物模型制备手册 / 丁赛丹主编. -- 上海:

上海交通大学出版社, 2018

ISBN 978-7-313-20614-5

I. ①实… II. ①丁… III. ①医用实验动物 - 试验模型 - 制备 - 手册 IV. ①R-332

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2018) 第 283466 号

实验动物模型制备手册

主 编: 丁赛丹

出版发行: 上海交通大学出版社

邮政编码: 200030

出 版 人: 谈 毅

印 制: 定州启航印刷有限公司

开 本: 710×1000mm 1/16

字 数: 261 千字

版 次: 2019 年 3 月第 1 版

书 号: ISBN 978-7-313-20614-5/R

定 价: 46.00 元

地 址: 上海市番禺路 951 号

电 话: 021-64071208

经 销: 全国新华书店

印 张: 16.25

印 次: 2019 年 3 月第 1 次印刷

版权所有 侵权必究

告读者: 如发现本书有印装质量问题请与印刷厂质量科联系

联系电话: 010-61370827

编 者

主 编 丁赛丹（温州医科大学附属第一医院 副研究员）

副主编（按姓氏笔画为序） 王 剑 温芳芳

参 编（按姓氏笔画为序） 卢小爱 游瑞敏

前 言

人类疾病的动物模型 (Animal Model of Human Diseases) 是生物医学科学研究中所建立的具有人类疾病模拟性表现的动物实验对象和材料。使用动物模型是现代生物医学研究中的一个极为重要的实验方法和手段。人类疾病的发生和发展十分复杂, 病因多样, 临床实验不仅在时间和空间上都存在局限性, 而且在伦理及方法上也受到限制。因此, 为进一步了解人类疾病的发生机制, 推动医药学的发展, 借助于动物模型的间接研究正方兴未艾。动物模型可以尽可能地模拟疾病的发生进程, 更方便、更有效、更准确地认识人类疾病的发生和发展规律, 并有助于探索防治措施。为此, 使用实验动物制备人类疾病模型的生命科学和医学研究者越来越多, 编写一本实用又能方便查阅的人类疾病实验动物模型制备手册工具书是十分必要的。

本书分为十章, 每章按照疾病发生的不同病理机制分类, 将人类疾病分为肿瘤类疾病、纤维化类疾病、炎症类疾病、精神障碍类疾病、积水类疾病、结石类疾病、循环障碍类疾病、代谢障碍类疾病、功能障碍类疾病以及其他疾病。介绍了人类疾病相关的细胞模型和动物模型制备, 主要以动物模型为主, 大多数为生物医学领域公认的经典疾病动物模型制备方法。本书尽可能全面地收录每种疾病的多种模型制备方法, 包括自发性动物模型和诱发性动物模型, 还有一些重要疾病的转基因疾病动物模型, 供读者根据自身条件进行选择, 也便于生命科学领域的基础研究者参考。本书涵盖了每种疾病的概述, 针对此疾病的模型动物选择 (动物种类品系、年龄体重等), 模型制备的详细步骤方法以及模型制备成功与否的评价标准。全书主要来源于公开发表的国内外的学术文献, 并且涵盖对有些疾病模型制备方法的客观性评价比较, 更具有实用参考意义。

本书适合从事生物学、基础医学、临床医学、药学和军事医学等相关领域研究的本科生、研究生和青年科学家使用。

目 录

第一章 肿瘤类疾病动物模型 / 001

- 第一节 脑部肿瘤类疾病动物模型 / 001
- 第二节 呼吸系统肿瘤类疾病动物模型 / 011
- 第三节 肝胆胰系统肿瘤类疾病动物模型 / 016
- 第四节 消化系统肿瘤类疾病动物模型 / 023
- 第五节 泌尿系统肿瘤类疾病动物模型 / 027
- 第六节 女性生殖系统肿瘤类疾病动物模型 / 031
- 第七节 男性生殖系统肿瘤动物模型 / 034
- 第八节 内分泌系统肿瘤类疾病动物模型 / 037
- 第九节 骨骼肌系统肿瘤类疾病动物模型 / 040
- 第十节 免疫系统肿瘤类疾病动物模型 / 043
- 第十一节 血液系统肿瘤类疾病动物模型 / 048
- 第十二节 皮肤系统肿瘤类疾病动物模型 / 051
- 第十三节 五官科肿瘤类疾病动物模型 / 052
- 参考文献 / 057

第二章 纤维化类疾病动物模型 / 061

- 第一节 呼吸系统纤维化疾病动物模型 / 061
- 第二节 肝胆胰系统纤维化疾病动物模型 / 062
- 第三节 泌尿系统硬化疾病动物模型 / 064
- 第四节 皮肤纤维化疾病动物模型 / 065
- 参考文献 / 066

第三章 炎症类疾病动物模型 / 067

- 第一节 脑系统炎症类疾病动物模型 / 067

- 第二节 呼吸系统炎症疾病动物模型 / 071
- 第三节 循环系统炎症疾病动物模型 / 077
- 第四节 肝胆胰系统炎症疾病动物模型 / 080
- 第五节 消化系统炎症疾病动物模型 / 083
- 第六节 泌尿系统炎症疾病动物模型 / 088
- 第七节 分泌系统炎症疾病动物模型 / 091
- 第八节 女性生殖系统炎症疾病动物模型 / 092
- 第九节 男性生殖系统炎症疾病动物模型 / 094
- 第十节 骨骼肌系统炎症疾病动物模型 / 098
- 第十一节 免疫系统炎症疾病动物模型 / 103
- 第十二节 皮肤系统炎症疾病动物模型 / 104
- 第十三节 五官炎症疾病动物模型 / 107
- 参考文献 / 119

第四章 精神障碍类疾病动物模型 / 125

- 第一节 抑郁症疾病动物模型 / 125
- 第二节 精神分裂症疾病动物模型 / 129
- 第三节 焦虑症疾病动物模型 / 130
- 第四节 阿尔茨海默症动物模型 / 136
- 第五节 帕金森综合征动物模型 / 137
- 第六节 亨廷顿疾病动物模型 / 138
- 第七节 癫痫症疾病动物模型 / 139
- 第八节 惊厥类疾病动物模型 / 140
- 第九节 自闭症疾病动物模型 / 141
- 第十节 缺陷多动障碍疾病动物模型 / 142
- 参考文献 / 143

第五章 积水类疾病动物模型 / 145

- 第一节 颅内积水类疾病动物模型 / 145
- 第二节 胸腔积液动物模型 / 147
- 第三节 内耳积水动物模型 / 148
- 参考文献 / 150

第六章 结石类疾病动物模型 / 152

- 第一节 胆结石类疾病动物模型 / 152
- 第二节 胆色素结石类疾病动物模型 / 153
- 第三节 肝内胆管结石类疾病动物模型 / 154
- 第四节 肾结石类疾病动物模型 / 155
- 第五节 膀胱结石类疾病动物模型 / 156
- 第六节 尿路结石类疾病动物模型 / 157

第七章 循环障碍类疾病动物模型 / 158

- 第一节 脑系统循环障碍类疾病动物模型 / 158
- 第二节 心血管系统循环障碍动物模型 / 162
- 第三节 消化系统循环障碍类疾病动物模型 / 173
- 第四节 泌尿系统循环障碍动物模型 / 174
- 第五节 血液系统循环障碍类疾病动物模型 / 176
- 参考文献 / 178

第八章 代谢障碍类疾病动物模型 / 181

- 第一节 心血管代谢障碍类疾病动物模型 / 181
- 第二节 肝胆胰代谢障碍类疾病动物模型 / 187
- 第三节 肥胖症类动物模型 / 194
- 第四节 泌尿系统代谢障碍类疾病动物模型 / 194
- 第五节 内分泌系统障碍类疾病动物模型 / 197
- 参考文献 / 199

第九章 功能障碍类疾病动物模型 / 202

- 第一节 神经系统障碍类疾病动物模型 / 202
- 第二节 心血管功能障碍类疾病动物模型 / 206
- 第三节 胃肠道功能障碍类疾病动物模型 / 212
- 第四节 骨骼肌系统功能障碍类疾病动物模型 / 213
- 第五节 免疫系统功能障碍类疾病动物模型 / 220
- 第六节 甲状腺功能减退动物模型 / 221
- 第七节 肾功能障碍动物模型 / 222

- 第八节 眼部疾病功能障碍类疾病动物模型 / 224
- 第九节 女性生殖器官功能障碍疾病动物模型 / 227
- 参考文献 / 229

第十章 其他类疾病动物模型 / 234

- 第一节 脑系统其他疾病动物模型 / 234
- 第二节 血液系统其他疾病动物模型 / 235
- 第三节 积气疾病动物模型 / 238
- 第四节 泌尿系统疾病动物模型 / 240
- 第五节 毒品成瘾动物模型 / 241
- 第六节 脊髓损伤动物模型 / 242
- 参考文献 / 243

索引 / 245

第一章 肿瘤类疾病动物模型

第一节 脑部肿瘤类疾病动物模型

一、胶质瘤动物模型

(一) 疾病概述

脑胶质瘤 (glioma) 是一类常见的颅内脑肿瘤, 占颅内原发肿瘤的 35% ~ 60%, 其中 50% 为胶质母细胞瘤。根据病理又可分为星形细胞瘤、髓母细胞瘤、多形性胶母细胞瘤、室管膜瘤等, 其中星形胶质细胞瘤 (astrocytome) 是最常见的胶质瘤, 约占胶质细胞瘤的 65%; 髓母细胞瘤 (medulloblastoma, MB) 是一种恶性、侵袭性高的小脑胚胎性肿瘤, 好发于儿童。伴有明显的神经元分化, 易通过脑脊液途径 (cerebro-spinal fluid, CSF) 遗传和散播; 多形性胶母细胞瘤 (glioblastoma multiforme, GBM) 为最常见且致死率极高的脑部肿瘤; 常渗入邻近组织, 且形状多变而无确定范围, 是一种神经胶质瘤, 是脑瘤中特别致命的一种。这种脑瘤具有高浸润性, 可大范围转移。

(二) 模型制备

1. 细胞模型

方法 1: 胶质瘤细胞模型。

神经胶质瘤细胞: 大鼠神经胶质瘤细胞 C6 细胞, 人神经胶质瘤细胞 LN-18; 恶性胶质母细胞瘤细胞系: U87, U251, U118, U138, U373, SHG44; 人骨髓神

经母细胞瘤: SHSY5Y。细胞于 CO_2 恒温培养箱 (温度 37°C , CO_2 体积分数 5%) 培养, 培养基为含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基。

方法 2: 原代星形胶质瘤细胞模型。

将患者的肿瘤组织于无菌操作台中用磷酸缓冲溶液清洗干净, 去除表面血液、脑膜和血管, 置于钢丝网研磨粉碎, 将得到的组织混悬液经过 400 目尼龙网过滤, 得到细胞悬液, 将细胞悬液置于离心机中, $1\,000\text{ r/min}$ 离心 5 min , 去上清, 用含有 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液重悬细胞, 以 1.1×10^5 个/毫升的密度将细胞接种到培养瓶中, 于 37°C 5% CO_2 , 95% 湿度条件下培养。3 天后更换培养液, 待细胞铺满培养瓶底约 95% 时传代。

方法 3: 髓母细胞瘤细胞模型。

自发髓母细胞瘤小鼠 C57BL/6-Tg (Neurod2-Smo* $A1$), 简称 SmoA1 小鼠, SmoA1 小鼠 4 月龄开始陆续出现髓母细胞瘤的临床症状。将病鼠肿瘤组织剥离, 在 PBS 中清除肿瘤组织表面的脑膜及血管后于 50% Accutase 中剪切至呈糜状, 37°C 条件下放在前面的混合溶液里静置消化后经 200 目无菌细胞筛过滤收集单细胞悬液。经 $1\,000\text{ r/min}$ 离心 5 min , 去除上清液, 细胞团用神经干细胞培养基重悬。细胞计数时, 将细胞悬液稀释 10 倍后加入等体积台盼蓝染液混匀。取 $10\ \mu\text{l}$ 置于细胞计数器中观察计数。统计未被台盼蓝染液染色的活细胞数。按 $10\,000$ 个/毫升活细胞数将细胞接种于含有 EGF、bFGF 及 B27 的干细胞培养基 (stem cell medium, SCM) 中培养。

方法 4: 原代多形性胶质瘤细胞模型。

手术台上无菌取出多形性胶质母细胞瘤病人新鲜胶质瘤标本, RPMI 1640 洗涤, 用眼科剪将其剪成糊状, 胰酶消化、钢网过滤, 制备成胶质瘤细胞悬液; 离心、洗涤 2 次后, 完全 RPMI 1640 培养液重悬孵育; 待细胞长满瓶底后, 传代培养。传至 5 ~ 6 代后形成稳定的人脑多形性胶质母细胞瘤细胞系后, 进行下一步实验。

2. 动物模型

方法 1: 胶质瘤移植动物模型——C6 细胞。

(1) 细胞悬液制备。C6 细胞通常传至 2 ~ 3 代。细胞呈对数期生长时使用 10% 胰酶消化。消化后计数、离心, 加入不含血清的培养基, 轻柔吹打均匀, 制成 $1 \times 10^8\text{ ml}^{-1}$ 单细胞悬液。

(2) 细胞接种。实验用动物为体重 180 ~ 220 g 的雄性 SD 大鼠, 大鼠 10% 水合氯醛麻醉后, 头部固定于脑立体定位仪上, 消毒后手术暴露颅骨标记, 坐

标确定接种靶点后以牙科钻颅骨钻孔，注射位点为冠状缝前 1 mm，中线右旁开 3 mm，深 5 mm。25 μ l 微量加样注射器抽取 C6 细胞悬液 10 μ l (1×10^8 或 5×10^7 个 C6 细胞)。注射速度为 1 μ l/min，注射完毕留针 5 min，再缓慢垂直拔针。最后以骨蜡封闭骨孔后生理盐水冲洗手术范围，4 号线缝合切口后消毒皮肤。

方法 2：胶质瘤移植动物模型——U87 细胞。

取对数生长期的 U87 细胞，用 0.025% 胰酶消化后离心，弃上清；PBS 重悬沉淀，配成 0 个/微升， 0.05×10^5 个/微升， 0.2×10^5 个/微升， 1×10^5 个/微升的细胞悬液。实验动物为 4 ~ 6 周龄雄性 BALB/c-nu 裸鼠，将裸鼠麻醉后固定在小动物脑立体定位仪上，夹好鼻夹，插入耳杆；做头顶部正中切口，剥离骨膜，暴露出前囟；注射针对准前囟点，将前后坐标 (front and back coordinates, AP) 和左右坐标 (left and right coordinates, ML) 调零。调节好 AP 和 ML 坐标后，将针尖移至触碰颅骨，最后将深度坐标 (depth coordinates, DV) 调零，裸鼠右侧纹状体的注射坐标为 AP-1 mm，ML-1.8 mm，DV-3.5 mm。分别应用微量注射针直接注射 0 个/微升， 0.05×10^5 个/微升， 0.2×10^5 个/微升， 1×10^5 个/微升的细胞悬液 5 个/微升 (细胞数分别为 0 个， 0.25×10^5 个， 1×10^5 个， 5×10^5 个)，速度设为 1 μ l/min。注射后留针 3 min，缓慢出针，无菌骨蜡封闭骨孔，缝合皮肤，消毒伤口。

方法 3：胶质瘤移植动物模型——原代星形胶质瘤细胞。

实验动物为 4 ~ 6 周龄雄性 BALB/c-nu 裸鼠。取原代恶性星形胶质细胞瘤细胞第 4 代，收集对数生长期的细胞，调整密度为 5×10^7 个/毫升，注射于裸鼠右侧背肋部皮下，100 微升/只，每日观察肿瘤生长情况，并记录肿瘤大小，按下列公式计算肿瘤体积：肿瘤体积 (mm^3) = 长径 \times 短径² \times 0.5。至建模后第 4 周处死裸鼠，取瘤组织进行固定染色。

方法 4：髓母细胞瘤动物模型。

髓母细胞瘤小鼠模型可直接采用世界卫生组织国际癌症研究所构建的 PARP-1 和 P53 基因双敲除小鼠肿瘤模型。也可直接选择 SmoA1 小鼠。

方法 5：胶质瘤移植动物模型——SHSY5Y。

(1) 细胞混悬液制备。SHSY5Y 细胞在对数生长期达 80% 融合时，用 0.25% 胰蛋白酶消化细胞，显微镜下观察，当大部分细胞变成圆形、突起回缩、间隙增大时，加入培养基终止消化。吸管吹打后收集细胞并计数，台盼蓝染色测定细胞活性，1 500 r/min 离心 10 min，去上清，PBS 洗涤 1 次，10 μ l 1640 培养基调整细胞密度 5×10^5 个/微升，4 $^{\circ}$ C 冰箱中保存备用注射动物体内。

(2) 脑干肿瘤动物模型的制作。雄性 nu/nu 裸鼠，周龄 4 周，体重 16 ~ 19

g。裸鼠用 10% 水合氯醛腹腔注射麻醉，将其头部固定于立体定位仪上，安尔碘消毒后纵行切开顶枕部皮肤，暴露矢状缝和人字缝。注射部位定位坐标：人字缝后 1.50 mm、矢状缝左侧旁开 1.00 mm、深度距骨窗缘 4.75 mm。手术时于定位点用牙科钻，钻一直径约为 0.5 mm 的骨孔，用 10 μ l 微量注射器 5 min 内缓慢注射 1×10^6 个细胞 (2 μ l)。留针 10 min，5 min 内缓慢匀速退针，骨蜡封闭骨孔，缝合皮肤。细胞种植 2.5 周后进行 MRI 扫描，观察肿瘤生长情况，经鼠尾静脉注射钆喷酸葡胺 (GdDTPA, 0.4 ml/kg) 进行增强扫描。

方法 6：多形性胶质细胞瘤移植动物模型。

(1) 准备实验。BALB/C 裸鼠，雄性，25 g 左右。麻醉、头部用立体定向架固定与消毒 BALB/C 裸鼠均放入事先经高压灭菌的备用鼠笼中，放入沾有少量乙醚的无菌纱布块，约 1min 后裸鼠处于麻醉状态，观察裸鼠呼吸均匀，状态稳定；用立体定向架将裸鼠头部固定，两耳针深入外耳道对称固定；碘伏、酒精消毒后铺洞巾。用 10% 的水合氯醛 (0.3 ml/100g 剂量) 腹腔注射麻醉裸鼠后将裸鼠头部固定在脑立体定向仪上，剪去头顶部毛发，碘酒、乙醇消毒后铺孔巾。

(2) 定位。裸鼠内毗连线与头部矢状中线交汇处纵向 0.5 cm 长头皮切口，分离切口两侧表皮，暴露颅骨。根据裸鼠头部立体定向解剖图谱确定对应于右脑尾状核的钻孔位置：冠状缝与矢状中线交点处后 0.40 mm，中线右 3.00 mm。用圆头牙科钻或手术尖刀钻一小孔，孔径约 1.2 mm，钻头钻透颅骨深 1.0 ~ 1.5 mm，深达硬脑膜表面而不伤及脑组织 (注意防止刺破硬脑膜)，并用无菌生理盐水冲洗。

(3) 多形性胶质瘤细胞准备。接种前用胰酶消化细胞，镜下观察细胞变圆后终止消化，离心后倒掉上清液，加入 0.1 ml 完全培养液吹打起细胞，用计数板计算细胞数，约为 5×10^6 个；调整细胞浓度为 1.0×10^5 个 / 毫升， 1.0×10^6 个 / 毫升， 1.0×10^7 个 / 毫升，置于 37 $^{\circ}$ C 水浴保存备用。台盼蓝排斥实验检测细胞活力 >95%。

(4) 胶质瘤细胞右脑尾状核接种。使用 20 μ l 微量注射器吸入 20 μ l 4 组细胞悬液，垂直进针，深度约为 5 mm (距硬脑膜)，以约 1 μ l / min 注射细胞悬液，注射完毕后留针 5 min 再缓慢拔针，使细胞充分沉积，避免细胞悬液返流。骨孔立即用无菌骨蜡封闭，无菌生理盐水冲洗，1 号线缝合切口并用碘伏、酒精涂擦两遍后放回标记好的鼠笼。

(5) 交替间隔接种。每次实验接种一组裸鼠。接种前，裸鼠钻孔，同时进行瘤细胞准备，尽量使细胞在完全培养液内放置少于 20 min，以减少细胞活力丧失和细胞死亡。

(三) 判断标准

1. 常规状态观察

每周检测实验动物体重3次, 每日定时检查其接触反应、运动缺陷、颅神经损害、视觉反应、听觉反应及观察有无偏瘫、苍老及有无癫痫发作。

2. 病理解剖学检查

处死实验动物后, 多聚甲醛固定后获取全脑标本, 取心、肝、脾、肺、肾、脊髓等主要脏器, 大体检查有无转移灶。将获取的全脑标本按裸鼠脑表面的接种穿刺点做冠状切口, 观察肿瘤生长情况。

3. 组织病理学检查

所有脑标本和主要脏器放入甲醛溶液中固定48h, 沿肿瘤的最大切面做冠状切片, 脱水、浸蜡后包埋后切片, 沿最大冠状面以 $4\mu\text{m}$ 的厚度切片。将每张切片脱蜡, 苏木精和伊红染色, 树胶封片后, 光镜下观察肿瘤远位转移情况和胶质细胞瘤的组织病理学特征。

小贴士:

胶质瘤C6细胞是由Benda等用N-亚硝基甲脒诱导的大鼠胶质瘤克隆, 并经过一系列的体外培养和动物传代交替后建成的。

二、颅咽管瘤动物模型

(一) 疾病概述

颅咽管瘤(craniopharyngioma, CP)是由外胚叶形成的颅咽管残余的上皮细胞发展起来的一种常见的胚胎残余组织肿瘤, 为颅内最常见的先天性肿瘤, 好发于儿童, 成年人较少见, 好发于鞍上。其主要临床特点有下丘脑——垂体功能紊乱、颅内压增高、视力及视野障碍, 尿崩症以及神经和精神症状。

(二) 模型制备

1. 细胞模型

方法： 颅咽管瘤细胞模型。

(1) 获取组织。新鲜颅咽管瘤手术切除组织块来源于患者。无菌条件下于术中取下肿瘤组织后，以含 100 U/ml 青霉素的磷酸盐缓冲液 (phosphate buffered solution, PBS) 浸泡肿瘤组织约 5 min，立即置入高糖 DMEM 培养基，用 PBS 液反复冲洗肿瘤组织去除附着在表面的血细胞。

(2) 消化组织。显微镜下将组织修剪去除烧灼及坏死的絮状组织，切成约 1 mm³ 大小碎块，按体积加入 0.25% 胰蛋白酶 / 0.05% EDTA，37℃ 静置用 0.25% 胰蛋白酶溶液消化 25 ~ 30 min 之后，吸管轻轻吹打组织块 2 min 分散细胞，此时消化液变混浊，小部分组织块变成白色，用吸管吸取细胞悬液放入 15 ml 的离心管中，加入 10% FBS 高糖 DMEM 培养基终止消化，1 000 r/min 离心 5 min，去上清液，收获的所有细胞过 200 目铜网。

(3) 获得原代 CP 细胞。将其置入内含 10% FBS 高糖 DMEM 培养基的 25 cm 培养瓶，置培养箱中培养，放置 90 min 差速贴壁，最先贴壁为成纤维细胞，将未贴壁的细胞悬液 (含有 CP 细胞) 收集到 15ml 离心管中，再次离心后弃上清，加入 10% FBS 高糖 DMEM 再次培养，原代培养 3 天后换液，当原代培养集落基本覆盖瓶底后，再次消化并按 1 : 2 比例传代于培养瓶中。

(4) 分离纯化 CP 细胞。成纤维细胞分裂增殖能力较强，比 CP 细胞生长迅速且贴壁早，可根据此原理做差速分离。早期成纤维细胞从组织周围向外部生长贴壁，可在显微镜下间断机械刮除去上清后更换培养液纯化 CP 细胞。同时，待细胞生长到培养皿的 50% ~ 60% 时，按体积加入 0.25% 胰蛋白酶 / 0.05% EDTA 消化，在显微镜下观察消化程度，严格控制消化时间，一般为 1 ~ 2 min，待细胞形态由长梭形逐渐变成圆形，终止消化，轻轻吹打培养皿底部，使细胞悬浮，1 000 r/min 离心 5 min，去上清液，调整细胞数接种于不同的培养皿、培养板中，显微镜下观察形态，收集原代培养贴壁后的 CP 单细胞悬液。

2. 动物模型

方法： 颅咽管瘤组织移植动物模型。

(1) 标本准备。人脑颅咽管瘤标本在冰冻证实后，除普通病理检查外，将肿瘤实质部分修剪为 0.5 mm 直径左右碎块，放在含有青霉素、链霉素、两性霉素 B

和 10% 胎牛血清的培养皿中，并尽快种植到裸小鼠的皮下。

(2) 组织移植。选用无胸腺 BALB/C-nu/nu 裸小鼠于无菌笼中饲养，在特制的无菌操作台上，用 4% 水合氯醛 0.3 ml 腹腔内注射麻醉后，固定动物，70% 酒精消毒左右腋部，并切开 5 mm 的皮肤切口，用显微镊子将组织块植入到距切口 1 ~ 2 cm 皮下，单层缝合皮肤。每例标本每只左右腋下各 1 个瘤块，其形成 4 个移植瘤。

(三) 判断标准

1. 观测

肿瘤最初大小（零体积）用显微镜中的目镜显微尺测量。移植后第 7 天测一次，作为基线，后每周测量 1 次，计算体积 = 长 × 宽 × 高 × $\pi/6$ (mm^3)。

2. 移植肿瘤观察及鉴定

接种 12 周后，处死荷瘤裸小鼠，取出皮下移植瘤，洗净血迹，镜下剔除表面的皮下组织和肌肉组织，一部分瘤组织 10% 中性甲醛固定，然后 HE 染色，镜下观察组织细胞结构；一部分福尔马林固定、石蜡包埋，做免疫组化法鉴定肿瘤性质。

三、颅内动脉瘤动物模型

(一) 疾病概述

颅内动脉瘤 (intracranial aneurysm) 多为发生在颅内动脉管壁上的异常膨出，是造成蛛网膜下腔出血的首位病因，在脑血管意外中，仅次于脑血栓和高血压脑出血，位居第三。造成颅内动脉瘤的病因尚不甚清楚，多数学者认为颅内动脉瘤是在颅内动脉管壁局部的先天性缺陷和腔内压力增高的基础上引起的，高血压、动脉硬化、血管炎与动脉瘤的发生与发展有关。颅内动脉瘤好发于脑底动脉环 (Willis 环) 上，其中 80% 发生于脑底动脉环前半部。

(二) 模型制备

方法 1：胰弹性蛋白酶诱导动脉瘤动物模型。

日本大耳白兔，36 月龄，体重 2 ~ 2.5 kg。耳缘静脉注射 10% 乌拉坦麻醉白兔，取颈部正中切口，分离筋膜，暴露气管，在气管两侧游离出右颈总动脉 (RCCA)，

继续向近心端方向游离直至右颈总动脉与右锁骨下动脉(RSCA)分叉处,在距RCCA与RSCA分叉处上方2.5 cm处,结扎RCCA,然后用动脉瘤夹夹闭RCCA与RSCA分叉,在距RCCA与RSCA分叉上方1.5 cm处,用26G静脉留置针(内径0.6 mm,长1.5 cm,流量15 ml/min)穿刺RCCA并注入75 U猪胰弹性蛋白酶,最后松开RCCA远心端结扎,并移除动脉瘤夹。术后每日皮下注射10万U青霉素,连续5天。

方法2: 自发性高血压诱导颅内动脉瘤动物模型。

健康雄性SD大鼠,体重180~220 g。以10%的水合氯醛腹腔注射麻醉SD大鼠(0.4 ml/100 g),仰卧位固定,颈部上段正中中线做一长5 mm的切口,分离左侧颈总动脉(LCCA)并用3-0丝线结扎,缝合切口。然后俯卧位固定,先于背部一侧肋缘下5 mm、脊柱中线旁开10 mm处做长约10 mm的纵行切口,于背阔肌边缘处切开,进入后腹腔。分离、暴露肾动脉“Y”形分叉,“Y”形分叉后上支即为肾动脉后支,以4-0丝线结扎,间断缝合肌层和皮肤。按同样方法结扎对侧肾动脉后支,术毕消毒切口。术后腹腔内注射20~30 ml生理盐水,将大鼠置于温度适宜、清洁通风的环境中单笼饲养。各组术后1周开始喂养含1%氯化钠和0.12%的 β -氨基丙腈饲料,采用经背部入路双侧肾动脉后支结扎和左侧颈总动脉结扎术,建立自发性高血压颅内动脉瘤模型;对照组仅暴露血管,不予结扎。

方法3: 结扎动脉诱导颅内动脉瘤动物模型。

健康雄性SD大鼠,鼠龄为4~8周,体重150~250 g。由速眠新1 ml/kg肌内注射麻醉动物,俯卧位固定大鼠四肢,首先在右侧肋缘下1 cm、旁开脊柱中线1.5 cm处切开大鼠背部皮肤1.5~2 cm,用拇指和食指触摸到肾脏后,小心将其挤出,看到明显搏动的肾动脉后,继续向肾门解剖,肾动脉Y形分叉的后上支即为肾动脉后支。用镊子夹闭肾动脉后支,之后肾脏出现扇形局部缺血改变,待缺血区变暗后,用细线结扎该动脉,按同样方法结扎对侧肾动脉后支。然后行颈部正中切开,在左侧胸锁乳突肌内侧小心向下分离,剪开颈动脉鞘,结扎左侧颈总动脉(注意不要结扎迷走神经,以防心动过缓),结扎完毕后缝合皮肤切口。动物放回笼内饲养,任其自由取食。

(三) 判断标准

大鼠颅内动脉瘤共分三类:①颅内动脉瘤前期,仅有内弹性膜断裂而无动脉壁的膨出;②早期颅内动脉瘤,动脉壁向外膨出,但膨出度小于动脉瘤颈远心和近心端之间距离的1/2;③进展期动脉瘤:膨出度大于动脉瘤颈远心和近心端之间距离的1/2。