

借



高等医学院校教材

供预防医学及相关专业使用

WEISHENG

主编 刘胜学 杨录军

DULIXUE SHIYAN JIAOCHENG

卫生毒理学

实验教程



第四军医大学出版社

# 卫生毒理学实验教程

主 编 刘胜学 杨录军

主 审 曹 佳

编 者 (以姓氏笔画为序)

刘晋祎 刘胜学 杨录军

周燕虹 周紫垣 教 琳

## 图书在版编目(CIP)数据

卫生毒理学实验教程/刘胜学,杨录军主编. —西安:第四军医大学出版社,2006.4  
ISBN 7-81086-244-8

I.卫… II.①刘… ②杨… III.毒理学-实验-教材 IV.R99-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2006)第 007319 号

## 卫生毒理学实验教程

主 编 刘胜学 杨录军  
责任编辑 土丽艳 冯安吉  
出版发行 第四军医大学出版社  
地 址 西安市长乐西路 17 号(邮编:710032)  
电 话 029-84776765  
传 真 029-84776764  
网 址 <http://press.fmmu.sn.cn>  
印 刷 蓝田立新印务有限公司  
版 次 2006 年 4 月第 1 版 2006 年 4 月第 1 次印刷  
开 本 787×1092 1/16  
印 张 8  
字 数 150 千字  
书 号 ISBN 7-81086-244-8/R·189  
定 价 15.00 元

(版权所有 盗版必究)

# 前 言

随着我国经济与社会的不断发展,各种化工产品 在工农业生产 和日常生活中的应用日益广泛,人类生活和生产活动中可能接触的外源化学物对机体的损害作用所产生的健康问题逐渐引起人们的高度重视。“卫生毒理学”正是从预防医学的角度研究外源化合物对生物机体的损害作用及其机理的科学,它是建立在生物学与毒理学实验基础之上的一门学科,实验教材对于相关专业学生的培养显得尤为重要。

我们编写的这本《卫生毒理学实验教程》紧扣高等医学院校预防医学和生物专业的培养目标和教学计划,参考国内外出版的有关卫生毒理学以及毒理学实验教材和参考书,并对近年来卫生毒理学的进展和我国预防医学实际工作对卫生毒理学知识的需求作了一定的考虑。

本教程设计了 20 个实验,包括实验动物的一般操作技术、一般毒性观察、细胞毒性试验、集落形成试验、急性和慢性毒性试验、微核试验、染色体畸变分析、SCE 试验、Ames 试验、显性致死、正向突变、精子畸形、彗星试验、致癌与致畸试验、毒理基因芯片的检测和分析等。书末还附有毒理学实验中常用溶液及配制、肝微粒体制备及酶活性的测定等。

本教程可供预防医学与生物专业本科生与研究生实验教学使用,也可供检验、基础、药学、临床等专业参考使用。由于时间匆忙,并且我们的水平和能力有限,书中肯定会存在不少错误和不当之处,恳请广大师生、同行专家和其他读者在使用过程中,不吝赐教和指正,以便使之逐步完善。

编 者

2006 年 1 月

# 目 录

|       |                             |         |
|-------|-----------------------------|---------|
| 实验 1  | 实验动物的一般操作技术 .....           | ( 1 )   |
| 实验 2  | 实验动物的一般毒性作用观察 .....         | ( 8 )   |
| 实验 3  | 细胞毒性试验(MTT法) .....          | ( 14 )  |
| 实验 4  | 小鼠原代肝细胞的分离、培养和细胞毒性检测 .....  | ( 16 )  |
| 实验 5  | 集落形成试验 .....                | ( 19 )  |
| 实验 6  | 经口急性毒性试验 .....              | ( 23 )  |
| 实验 7  | 慢性毒性试验 .....                | ( 27 )  |
| 实验 8  | 小鼠骨髓嗜多染红细胞微核试验 .....        | ( 30 )  |
| 实验 9  | 人上皮脱落细胞微核试验 .....           | ( 33 )  |
| 实验 10 | 动物骨髓细胞染色体畸变分析 .....         | ( 36 )  |
| 实验 11 | 姐妹染色单体交换试验 .....            | ( 39 )  |
| 实验 12 | 鼠伤寒沙门菌回复突变试验(Ames 试验) ..... | ( 44 )  |
| 实验 13 | 哺乳动物细胞正向突变试验 .....          | ( 48 )  |
| 实验 14 | 显性致死突变试验 .....              | ( 62 )  |
| 实验 15 | 小鼠精子畸形试验 .....              | ( 65 )  |
| 实验 16 | 致畸试验 .....                  | ( 68 )  |
| 实验 17 | 细胞体外转化试验 .....              | ( 80 )  |
| 实验 18 | 哺乳动物长期致癌试验 .....            | ( 83 )  |
| 实验 19 | DNA 损伤单细胞凝胶电泳试验 .....       | ( 88 )  |
| 实验 20 | 毒理基因芯片检测和分析 .....           | ( 91 )  |
| 附录 1  | 毒理学实验中常用溶液计算及配制 .....       | ( 98 )  |
| 附录 2  | 大鼠肝微粒体制备及有关酶活性的测定 .....     | ( 114 ) |
| 参考文献  | .....                       | ( 119 ) |

# 实验1 实验动物的一般操作技术

**【实验目的】** 学习毒理学实验中有关动物实验的基本操作技术和方法，掌握实验动物的选择、分组原则和方法、染毒方法以及生物材料的采集等基本内容。

**【实验学时】** 3学时。

## **【实验内容】**

1. 健康动物的选择 在毒理学试验中，无论选择哪种种属、品系的动物进行实验，均要求选择健康的实验动物，即要求动物外观体形丰满，被毛浓密有光泽、紧贴体表，眼睛明亮，行动迅速，反应灵活，食欲及营养良好。选择时重点检查以下项目：

(1) 眼睛：明亮，瞳孔双侧等圆，无分泌物。

(2) 耳：耳道无分泌物溢出，耳壳无脓疮。

(3) 鼻：无喷嚏，无浆性粘液分泌物。

(4) 皮肤：无创伤，无脓疮、疥癣、湿疹。

(5) 颈部：要求颈项端正，不能有歪斜。

(6) 消化系统：无呕吐、腹泻，粪便成形，肛门附近被毛洁净。

(7) 神经系统：无震颤、麻痹。若动物（大鼠、小鼠）出现圆圈动作或提尾倒置呈圆圈摆动，应放弃该动物。

(8) 四肢及尾：四肢、趾及尾部没有红肿及溃疡。

2. 实验动物的性别鉴定 动物性别不同对不同毒物的反应可能有一定差异，因此，要根据实验要求选择性别。一般实验如对性别无特殊要求者，宜选用雌雄动物各半。

(1) 大鼠/小鼠：主要根据肛门与生殖孔间的距离进行区分，间距大者为雄性，小者为雌性。成年雄鼠处卧位时可见到睾丸，雌性在腹部可见乳头。

(2) 豚鼠：用一只手抓住豚鼠颈部，另一只手扒开靠近生殖器孔的皮肤，雄性动物在圆孔中露出性器官的突起，雌性动物则显出三角形间隙，成年雌性豚鼠胸部有两个乳头。

(3) 家兔：将家兔头轻轻夹在实验者左腋窝下，左手按住腰背部，右手拉开尾巴并将尾巴夹在中指和无名指中间，然后用拇指和食指把生殖器附近的皮肤扒开。

雄兔可见到圆锥形稍弯曲的阴茎（但幼年雄兔看不到明显的阴茎，只能看到圆孔中有凸起物，即是阴茎）。雌兔则为一条朝向尾巴的长缝，呈椭圆形的间隙，间隙越向下越窄，此即为阴道开口处。

3. 实验动物的抓取方法 在不损害动物健康、不影响观察指标并防止被动物咬伤的前提下，正确地抓取并固定动物，确保实验顺利进行。

(1) 小鼠的抓取方法：先用右手抓取鼠尾提起，置于鼠笼或实验台上向后拉，当其向前爬行时，用左手拇指和食指抓住小鼠的两耳和颈部皮肤，将鼠体置于左手心中，后肢拉直，以无名指按住鼠尾，小指按住后腿即可。

(2) 大鼠的抓取方法：大鼠的抓取基本同小鼠，只是大鼠比小鼠性情凶猛，为避免咬伤，操作时可带上帆布或棉纱手套。

(3) 豚鼠的抓取方法：豚鼠胆小易惊，在抓取时要稳、准、迅速。用手掌迅速扣住鼠背，抓住其肩胛上方，以拇指和食指抓握颈部，另一只手托住臀部即可。

(4) 兔的抓取方法：用右手抓住兔颈部的毛皮并提起，然后左手托住其臀部或腹部，让其大部分重量集中在左上手上。注意不要抓取双耳或腹部。

#### 4. 实验动物的编号和标记方法

(1) 称重：根据实验的不同要求，选择一定数量的大、小鼠，体重要求在同一组内、同性别动物体重差异应小于平均体重的 10%，不同实验组间同一性别的动物体重均值差异应小于 5%。

(2) 编号：动物编号方法有多种，大、小鼠常用方法如下：

1) 染色法：一般采用染料（如苦味酸酒精饱和液）涂擦动物皮毛标记的方法进行编号。具体做法是：用毛笔或棉签蘸取染料溶液涂于动物的不同部位，以苦味酸黄色斑点等染料标记来表示不同号码。一般习惯涂染在左前腿上为 1，左腰部为 2，左后腿为 3，头部为 4，背部为 5，尾基部为 6，右前腿为 7，右腰部为 8，右后腿为 9。如果动物编号超过 10，需要编 10~100 号码时，可采用在上述动物的不同部位，再涂染另一种涂料（如 0.5% 中性红或品红溶液）斑点，即表示相应的十位数，即左前腿上为 10，左腰部为 20，以此类推。例如在左前腿上标记有红色和黄色斑点，表示为 11，如果红色标记在左前腿上，而黄色标记在左腰部，则为 12，以此类推。

2) 剪耳法：在耳朵不同部位剪一小孔代表某个号码。常以右耳代表个位，左耳代表十位。或与另一染色法配合使用，右耳剪孔代表十位，左耳代表百位。

3) 烙印法：用刺数钳在动物耳上刺上号码，然后用棉签蘸着溶在酒精中的黑墨在刺号上加以涂抹，烙印前最好对烙印部位预先用酒精消毒。

4) 号牌法：用金属的牌号固定于实验动物的耳上，大动物可系于颈上。

5. 实验动物的随机分组方法 为了得到客观的剂量 - 反应关系，应将一群动物按统计学原则随机分配到各个试验组中。可按随机数字表方法进行随机分组，

具体做法举例说明如下：

设将 30 只雄性动物平均分成 A、B、C、D、E、F 六组，每组 5 只动物。将已编号的动物以号码按随机数字表进行分配。如果选随机数字表第二行，从第一个数字开始，顺次抄下 30 个数字（可依横行、竖行或斜行抄录）。将每个数字一律除以 6（组数），根据余数 1、2、3、4、5、0（整除者）分别将动物分配到 A、B、C、D、E、F 组，结果见表 1-1（数字源自第二行随机数字表）。

表 1-1 实验动物随机分组表

|        |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |
|--------|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|
| 动物号    | 1  | 2  | 3  | 4  | 5  | 6  | 7  | 8  | 9  | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 |
| 随机数字   | 97 | 74 | 24 | 67 | 62 | 42 | 81 | 14 | 57 | 20 | 42 | 53 | 32 | 37 | 32 |
| 除 6 余数 | 1  | 2  | 0  | 1  | 2  | 0  | 3  | 2  | 3  | 2  | 0  | 5  | 2  | 1  | 2  |
| 分 组    | A  | B  | F  | A  | B  | F  | C  | B  | C  | B  | F  | E  | B  | A  | B  |

  

|        |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |
|--------|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|
| 动物号    | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 | 21 | 22 | 23 | 24 | 25 | 26 | 27 | 28 | 29 | 30 |
| 随机数字   | 27 | 7  | 36 | 7  | 51 | 24 | 51 | 79 | 89 | 73 | 16 | 76 | 62 | 27 | 66 |
| 除 6 余数 | 3  | 1  | 0  | 1  | 3  | 0  | 3  | 1  | 5  | 1  | 4  | 4  | 2  | 3  | 0  |
| 分 组    | C  | A  | F  | A  | C  | F  | C  | A  | E  | A  | D  | D  | B  | C  | F  |

按上法分组后，A 组有动物 7 只，B 组 7 只，C 组 6 只，D 组和 E 组分别为 2 只，F 组 6 只。为了使每组动物数均为 5 只，需要根据随机分配的原则再选出 2 只 A 组和 1 只 C 组动物给 D 组。B 组选出 2 只，F 组选出 1 只给 E 组。具体方法如下：继续抄下随机数字分别除以 A、B、C、F 组的动物数，即： $56/7$ （7 为 A 组动物数）余数为 0，将 A 组第 7 只动物（25 号）调配给 D 组； $50/6$ （6 为 A 组动物数）余 2，将 A 组第 2 只动物（4 号）调配给 D 组；接下来  $26/6$ （6 为 C 组动物数）余 2，将 C 组第 2 只动物（9 号）给 D 组。余类推，最后调整分组成表 1-2 所示。雌性动物也按上法分组然后将雌、雄动物合组进行试验。

表 1-2 30 只动物随机分组结果

| 组 别 | 鼠 号               | 组 别 | 鼠 号               |
|-----|-------------------|-----|-------------------|
| A   | 1, 14, 17, 19, 23 | D   | 4, 9, 25, 26, 27  |
| B   | 5, 8, 10, 13, 15  | E   | 2, 6, 12, 24, 28  |
| C   | 7, 16, 20, 22, 29 | F   | 3, 11, 18, 21, 30 |

#### 6. 实验动物的被毛去除方法 方法有三种：剪毛、拔毛和脱毛。

(1) 剪毛：固定动物后，用粗剪刀剪去所需部位的被毛。在剪毛时，要把剪刀贴紧皮肤剪，不可以用手提起被毛，以免剪破皮肤。剪下来的被毛集中在一个容器内，勿遗留在操作台周围。

(2) 拔毛：在兔耳缘静脉注射或取血时和在给大、小鼠进行尾静脉注射时，要



用拇指、食指将局部被毛拔去，以便操作。

(3) 脱毛：系指用化学药品脱去动物的被毛，适用于无菌手术的准备以及观察动物局部皮肤血液循环和病理变化。常用硫化钡或依据脱毛剂配方配制。

7. 受试物和样品的准备 染毒前根据染毒途径的不同，应该将受试物制备成一定的剂型。一般情况为水溶液、油溶液和混悬液。对溶剂和助溶剂的要求是：无毒或者实际无毒；与受试物不起化学反应，受试物在溶剂中稳定；对受试物的毒物动力学和毒作用没有影响；无特殊的刺激性或气味。

在实际的试验中，对于水溶性受试物，体内试验首选溶剂为水或者等渗盐水；不溶解于水的受试物，应该溶于或者悬浮于适当的有机溶剂中，一般用天然植物油，如玉米油、橄榄油等。混悬液最常用的赋形剂为 0.5% 羟甲基纤维素钠或 10% 阿拉伯树胶。受试物一般要新鲜配制，除非已证明储存稳定。

常用溶剂和赋形剂包括，丙酮：用于皮肤和经口；羟甲基纤维素钠：0.1% ~ 0.5% 水溶液，用于经口；玉米油：用于经口、皮肤、阴道、直肠、皮下；二甲基亚砷：用于所有途径，浓度达 5% 时可增强吸收；乙醇：用于皮肤和经口，低浓度可用于其他途径，经口限量为 5 mg/kg；甘油：用于经口、皮肤、腹腔和静脉；阿拉伯树胶：经口，作为稀释剂或增粘剂；乳糖：经口，作为稀释剂；甲基纤维素：0.1% ~ 0.5% 水溶液，用于经口；丁酮：用于皮肤；凡士林油：用于经口、皮肤、阴道、直肠，用作悬浮剂；橄榄油：经口；花生油：用于经口、皮肤、阴道、直肠、皮下和肌内注射；凡士林：用于皮肤、阴道、直肠；聚乙二醇 - 400：用于经口，作助溶剂；生理盐水：除皮肤和眼周外，用于所有途径；吐温 80：用于经口，作助溶剂；水：所有途径，首选。

在准备染毒受试物时，注意以下几点：①加热受试物不可接近改变其化学或物理性质的温度；②受试物为固体且用于皮肤毒性评价时，不可以改变其形状和颗粒的大小；③多成分受试物应该按配方配制；④制剂应该保持化学稳定性和受试物的一致性；⑤制剂应该减少总试验容积且易于准确染毒。

8. 实验动物染毒途径和方法 在毒理学试验中，染毒的途径和方法多种多样，可根据实验目的、动物种类和药物剂型等情况确定。一般情况下，应该尽可能模拟人接触该受试物的方式。最常用的染毒途径为经口、经呼吸道、经皮和注射途径。

#### (1) 注射染毒

1) 皮下注射：注射时以左手拇指和食指提起实验动物皮肤，将连有针头的注射器刺入皮下。注射部位一般在动物大腿外侧、内侧、背部、耳根部、腹部。

2) 皮内注射：皮内注射时需将注射的局部脱去被毛，消毒后，用左手拇指和食指按住皮肤并使之绷紧，从两指之间将连有针头的注射器紧贴皮肤表层刺入皮内，然后再向上挑起并再稍刺入，即可注射药物，此时可见皮肤表面鼓起一白色

小皮丘。

3) 肌肉注射：肌肉注射应选肌肉发达、没有大血管通过的部位，一般多选臀部。注射时垂直迅速刺入肌肉，回抽针栓如无回血，即可进行注射。

4) 腹腔注射：用大、小鼠做实验时，以左手抓住动物，使腹部向上，右手将注射针头于左或右下腹刺入皮下，使针头向前推进 0.5~1.0 cm，再以 45°角穿过腹肌，固定针头，缓慢注入药液。若实验动物为家兔，进针部位为下腹部的腹白线旁 1 cm 处。

#### 5) 静脉注射

兔：兔耳中央为动脉，耳外缘为静脉，常用外缘静脉。先拔去注射部位的被毛，用手指轻轻弹动兔耳，使静脉充盈，左手食指和中指夹住静脉的近端，拇指绷紧静脉的远端，无名指及小指垫在下面，右手持注射器尽量从静脉的远端刺入，待有回血后，将拇指移到针头处以固定针头，放开食指与中指，将药液注入，然后拔出针头，用手压迫针眼片刻。

小鼠和大鼠：一般采用尾静脉注射，鼠尾静脉有三根，左右两侧尾静脉比较容易固定，故多采用。操作时先将动物固定在鼠筒内或扣在烧杯中，使尾巴露出，尾部用温水浸润或用酒精擦拭，以左手拇指和食指捏住鼠尾两侧，中指从下面托起尾巴，以无名指和小指夹住尾巴的末梢，右手持注射器，使针头与静脉平行，从尾下四分之一处进针，先缓慢注入少量药液，如无阻力，可继续注入。注射完毕后把尾部向注射侧弯曲以止血或用消毒棉球压迫针眼止血。

(2) 经口染毒：常用的经口染毒有喂饲、灌胃和吞咽胶囊等方式。此法剂量准确，适用于小鼠、大鼠、家兔等动物。常用灌胃方式：将受试物配制成溶液或者混悬液，经注射器或者导管注入胃内。灌胃前一般应该禁食空腹，大鼠隔夜禁食，小鼠禁食 4 h，均不停饮水。灌胃 2~4 h 后给以食物。如果需要经口多次染毒，一般不禁食。

1) 小鼠、大鼠或豚鼠：灌胃时将灌胃针安在注射器上，吸入药液。左手抓住鼠背部及颈部皮肤将动物固定，右手持注射器，将灌胃针插入动物口中，沿咽后壁徐徐插入食管。针插入时应无阻力，若感到阻力或动物挣扎，应立即停止进针或将针拔出，以免损伤或穿破食管及误入气管。

2) 犬和兔：先将动物固定，再将特制的扩口器放入动物口中上下门牙之后，并用绳固定于嘴部，将带有弹性的橡皮导管经扩口器上的小圆孔插入，沿咽后壁进入食管，此时应检查导管是否正确插入食管，可将导管外口置于一盛水的烧杯中，如不发生气泡，即认为此导管是在食管中，此时可将药液灌入。

(3) 呼吸道染毒：粉尘、气体、蒸气或雾等状态存在的受试物，需通过呼吸道染毒。呼吸道染毒主要有吸入式染毒和气管内注入。

(4) 皮肤染毒：为了鉴定化学物质经皮肤的吸收作用、局部作用、致敏作用和

光感作用等，需采用经皮肤染毒方法。

1) 斑贴法 (家兔)：在脱毛区贴敷浸有受试化合物的多层纱布，再盖上一层油纸或塑料薄膜，贴牢固定。于 12~24 h 后解开敷料，用温水清洗皮肤，观察皮肤反应。

2) 浸尾法 (小鼠及大鼠)：目的是定性地判定受试物的经皮吸收作用。染毒前先将大、小鼠放入特制的固定盒内，并使其尾巴通过固定盒底部软木塞的圆孔露出管外。继之将尾巴通过小试管软木塞小孔，插入装有受试物液体的试管内，浸泡 2~4 h，观察中毒症状。

## 9. 实验动物生物材料的采集和制备

### (1) 动物常用采血方法

1) 大、小鼠鼠尾采血方法：适用于需血量少的实验。将动物固定后，把鼠尾浸入 45℃~50℃ 温水中使尾静脉充血，擦干皮肤后，再用酒精棉球擦拭消毒。剪去尾尖 (约 0.2~0.3 cm)，拭去第一滴血，用血色素吸管 (根据需要事先在吸管内加入或不加抗凝剂) 吸取一定量尾血，然后用干棉球压迫止血。也可以用 1 ml 注射器连上 7~8 号针头直接刺破尾静脉进行定量采血。

2) 眼眶静脉丛采血法：以左手拇指、食指紧紧握住鼠颈部，压迫颈部两侧眼眶后静脉丛充血 (注意用力要恰当，以防止动物窒息死亡)。右手持玻璃毛细管从一侧眼内眦部以 45° 角刺入，捻转前进。如无阻力继续刺入，有阻力就抽出玻璃毛细管调整方向后再刺入，直至出血为止。右手持容器收集血液后，拔出毛细管，用干棉球压迫止血。

3) 腹主动脉或股动 (静) 脉采血法：为一次性采血方法。大、小鼠麻醉后，仰卧位固定动物，剪开腹腔，剥离暴露腹主动脉或暴露股动 (静) 脉，用注射器刺入采血。

4) 断头采血法：该法可用于大、小鼠。操作者左手握住动物，右手持剪刀，快速剪断头颈部，倒立动物将血液滴入容器。注意防止剪断的毛发掉入接纳血液的容器中。也可用大鼠断头器断头后，倒立动物接血。

5) 家兔耳缘静脉采血法：先将兔固定在兔盒中，拔掉一侧耳缘部细毛，轻轻以手指弹耳，使耳缘静脉充血，酒精消毒。左手压迫耳根，右手持针刺破静脉收集血液；或直接用注射器进针，进行静脉采血。

6) 心脏采血法：将兔或大、小鼠以仰卧位固定，家兔需在左侧胸 3~4 肋部位剪毛，常规消毒。于第 3~4 肋间近胸骨左缘下，手触心搏最强部位进针，采血。采血毕迅速拔针，用酒精棉球压迫止血。大、小鼠则在手触心搏最明显处进针。

实验动物每次 (日) 采血量不可过多，最大安全采血量见表 1-3。

表 1-3 实验动物每次(日)安全采血量

| 动物品种 | 最大安全采血量 (ml) | 最小致死采血量 (ml) |
|------|--------------|--------------|
| 小 鼠  | 0.1          | 0.3          |
| 大 鼠  | 1.0          | 2.0          |
| 豚 鼠  | 5.0          | 10.0         |
| 家 兔  | 10.0         | 40.0         |

(2) 动物尿液和粪便的收集: 收集大动物与小动物的尿液和粪便, 一般使用不同类型的代谢笼。代谢笼主要由备有动物饮水和装饲料的笼体、粪尿分离器和收集尿液容器组成。一般笼体为金属制成, 如实验要求防止金属污染时, 则代谢笼应用玻璃或有机玻璃制作。兔、狗等大动物也可用导尿法收集尿液。

(3) 胆汁的采集: 在毒物动力学研究中, 可直接插管至胆总管, 其尖端接近肝门区的分叉点。在插管后应该立即给予受试物。对于有胆囊的试验动物(如豚鼠和兔), 应该在胆囊基底部结扎胆囊, 防止胆囊延缓胆汁采集速度。

#### 10. 实验动物的处死方法

(1) 脊椎脱臼法: 左手按住鼠头, 右手抓住鼠尾猛力向后拉, 使动物颈椎拉断脱节而立即死亡。此法多用于处死小鼠。

(2) 断头法: 操作者用右手按住动物头部, 左手握住背部, 露出颈部, 助手用大剪刀或断头器剪断颈部使之死亡。

(3) 急性大失血法: 可用鼠眼眶动脉和静脉急性大量失血法使大、小鼠立即死亡。

(4) 击打法: 右手抓住鼠尾, 提起, 用力摔打其头部, 鼠痉挛后立即死亡。也可用小木锤或器具猛力击打动物头部, 使其立即死亡, 常用于处死家兔或大鼠。

(5) 麻醉致死法: 在密闭容器中预先放入麻醉剂(氯仿或乙醚), 然后将动物放入, 密封盖好, 使动物吸入过量麻醉剂致死。

(6) 麻醉后急性放血法: 该法多用于处死大鼠。先腹腔注射麻醉动物后, 固定动物于仰卧位, 左手持镊子提起大腿内侧皮肤, 右手用剪刀作一切口并向腹股沟方向剪开皮肤, 皮肤切口长约 3~4 cm。用镊子分离筋膜, 于腹股沟中间大腿内侧深部, 暴露股动脉和静脉, 用剪刀剪断股动脉即有大量血液流出, 动物迅速死亡。

(7) 空气栓塞法: 用注射器向动物静脉内迅速注入一定量的空气, 使之形成气栓栓塞血管, 引起循环障碍致死。该法适用于大动物, 如兔、狗、猴等。使用时注意需注入足量的空气。

(8) 化学药物致死法: 此法适用于较大动物如兔、狗等。方法是给动物静脉注射化学药物致死。常用 10% KCl 或 10% 甲醛溶液进行静脉注射。

(9) 开放性气胸法: 将动物开胸, 造成开放性气胸, 此时胸膜腔的压力与大气压力相等。肺脏因受大气压缩发生萎缩、纵隔摆动使动物窒息而死。

(刘晋祎)

## 实验2 实验动物的一般毒性作用观察

**【实验目的】** 对急性、亚慢性与慢性毒性等一般毒性作用的中毒症状、体征、病理学改变及相关表现进行相应的了解、观察与检测。

**【实验学时】** 2学时。

**【实验原理】** 外来化合物作用于机体时，可引起动物体重、食物利用率、反应性等明显改变，毒性强者可引起动物死亡。部分化合物毒性作用于特定的系统、靶器官和靶组织，引起相关系统、器官和组织出现明显的生化和病理学改变。

**【主要器材与试剂】** 不同试验目的、不同的观察与检测方法所需要的试剂与材料见实验6、实验7。

### **【实验内容与步骤】**

#### 1. 急性毒性试验

(1) 试验观察时间：测定外来化合物的  $LD_{50}$  (或  $LC_{50}$ )，一般要求计算实验动物接触化合物之后 14 d 内的总死亡数。这是由于有的化合物中毒症状发展迟缓或发生迟发性死亡。再者，有的化合物引起动物死亡的时间存在很大的个体差异。但也有不少化合物很快引起动物死亡，动物多在给毒后几分钟至几小时内死亡。对这些速杀性化合物求其  $LD_{50}$  (或  $LC_{50}$ )，也可仅计算 24h 的死亡率，有些速杀性化合物的 24h  $LD_{50}$  与 14d  $LD_{50}$  值往往没有差别，但应注明是多少时间的  $LD_{50}$  值，以便于在进行毒性比较时有共同的基础。

在观察期间应保障实验动物有完全的膳食、充足的饮水及适宜的温湿度环境，以防止动物出现非中毒性死亡。

(2) 中毒体征的观察：观察实验动物接触外来化合物的中毒症状是了解该化合物急性毒性的十分重要的一环，是补充  $LD_{50}$  这个参数不足的重要方面。故应详细地观察动物的中毒症状、发生和发展过程及规律、死亡前症状特点、死亡时间等等，这有助于揭示化合物甚至同类化合物的不同衍生物的急性毒性特征。

很多化合物在实验动物接触的初期往往先出现兴奋现象，但是每种化合物引起的兴奋症状的具体表现可有很大的不同。如均含有氰基的丙烯腈和氰尿酸，在

小鼠接触后都有兴奋症状，但丙烯腈中毒首先出现的是活动增加，即骚动、到处窜跑等。而氰氢酸中毒首先出现的是呼吸兴奋（呼吸加快）。丙烯腈虽然也引起呼吸加快的症状，不过明显较氰氢酸迟。说明二者虽均含有氰基，但其作用机理存在差异。有的化合物在动物接触的初期首先表现为抑制现象，甚至主要为抑制现象。也有一些化合物表现短时间兴奋后，迅速转入抑制。此外，不少化合物还可以引起受试实验动物粘膜刺激症状，如出汗或大汗淋漓状如落水、流涎，甚至有血性分泌物、瞳孔改变等。一般体征观察及所反应的体征发生的部位可参考表 2-1。

表 2-1 啮齿类动物急性中毒表现的观察内容

| 系统和器官         | 观察项目       | 中毒后常见的表现               |
|---------------|------------|------------------------|
| 中枢神经系统与躯体运动系统 | 行为         | 体位异常、叫声异常、活动异常、多动或呆卧   |
|               | 运动状态       | 少动、震颤、痉挛、抽搐、强直、麻痹、运动失调 |
|               | 对刺激反应性     | 易兴奋、感觉迟钝或过敏、反应低下或过高    |
|               | 脑、脊髓反射     | 减弱或消失                  |
|               | 肌肉张力       | 松弛或紧张                  |
| 自主神经系统        | 瞳孔         | 散大或缩小                  |
|               | 腺体分泌       | 流涎、流泪、出汗               |
| 呼吸系统          | 鼻          | 鼻孔溢液、鼻翼煽动              |
|               | 呼吸表现       | 呼吸徐缓、过速、困难、衰弱          |
| 心血管系统         | 心区触诊、听诊    | 震颤、心动过速或过缓、心律不齐等       |
| 胃肠系统          | 排便         | 腹泻、便秘                  |
|               | 腹部外形       | 膨隆、凹陷                  |
|               | 粪便硬度与颜色    | 不成形，黄色、灰白色             |
| 泌尿生殖系统        | 阴道口、乳腺、阴茎  | 肿胀、分泌物增多、会阴部污秽脱出、遗精    |
| 皮肤和被毛         | 颜色、张力      | 皮肤松弛、皱褶、发红、皮疹、溃疡、皮毛蓬松  |
| 粘膜            | 结膜、口腔      | 分泌物增多、充血、水肿、苍白、紫绀、黄疸   |
| 眼睛            | 眼睑         | 上睑下垂                   |
|               | 眼球         | 眼球突出、震颤、充血             |
|               | 角膜         | 角膜混浊、血性分泌物             |
| 其他            | 直肠温和脚爪、皮肤温 | 升高或降低                  |
|               | 一般情况       | 姿势异常、消瘦等               |

(3) 死亡：急性毒性试验中实验动物的死亡数是计算  $LD_{50}$  值的依据，动物死亡数量每增加或减少一只都会对  $LD_{50}$  值产生明显影响，因此应认真观察和记录，特别是最早出现死亡的时间以及各个剂量组动物的死亡数。分析中毒死亡时间也具有一定意义，可以提供重要信息。

(4) 体重：在观察症状期间，应当同时观察动物体重变化。体重可以反映动物中毒后的整体变化。在测定外来化合物的  $LD_{50}$  时，理论上必然有半数动物在 14d 观

察期间存活。对存活动物，尤其是对低于  $LD_{50}$  剂量组的存活动物，应在观察期间注意观察其体重变化。这有助于了解受试化合物所致的中毒效应是短暂的或较长期的效应。体重变化原因很多，化合物影响动物食欲或使消化道系统功能受累，因而厌食或拒食，体重可以减轻；化合物引起腹泻，致使食物的吸收和利用发生障碍，也能导致体重减轻；化合物影响水的摄取或肾功能急性损伤，也可能在体重上有所反映。因此，对体重变化仔细分析，可以提供一些中毒原因启示。

(5) 病理学检查和其他指标观察：应当重视病理组织学检查。急性毒性试验中，对中毒死亡的动物均应及时进行大体解剖和病理组织学检查，肉眼观察主要脏器的大体病理变化，如脏器大小、外观、色泽的变化，有无充血、出血、水肿或其他改变，并对有变化的脏器进行取材作组织病理学检查。对存活动物于观察期结束后应做大体病理检查，必要时做组织病理学检查。根据试验需要可进一步扩大观察项目，如测量体温、心电、脑电或检查某些生化指标等。但选择这些指标时，应单独设计另外试验，制造中毒模型，不能合并使用求  $LD_{50}$  的实验动物，以防止促成人为加速或增加其死亡。制造中毒模型的化合物剂量最好小于或接近  $LD_{50}$  剂量。

2. 亚慢性毒性试验 一般来说，亚慢性毒性试验选择的指标应比较广泛，具有筛选性。观察指标和测试项目一般根据急性试验、蓄积试验提供的数据，以及参考有关文献资料或已有的同系物毒性资料进行选择。亚慢性毒性试验中观察指标的选择十分重要，但也有一定困难，尤其是选择特异性和敏感性指标更为不易。

(1) 一般性指标：一般性指标是非特异的观察指标，它是外来化合物对机体毒性作用的总体反映，而且常常是敏感的综合毒效应指标。只要详细记录，仔细分析，往往可以从其出现时间、次序以及程度上发现一些受试化合物的毒性特征。

1) 动物体重：实验动物在生长发育期体重的增长情况是综合反映动物健康状况最基本的灵敏指标之一。实验动物在亚慢性方式接触外来化合物过程中，有多种因素均可影响动物体重的增长，包括食欲变化、消化功能变化、代谢和能量消耗变化等。实验动物接触受试化合物过程与对照组动物是在相同环境中进行的，若出现试验组动物体重增长减慢或停止增长甚至体重反而减轻，则可以说明是由于受试化合物引起的毒性效应。如果各试验组体重增长变化呈剂量 - 反应关系，就可以肯定这是一种综合毒性效应。

一般在试验开始 1~3 个月内每周称重一次，以后可以每月称一次。表示体重变化的方式是多样的，可将试验组与对照组同期体重绝对增长的重量的重量加以比较和统计学处理；也可以将试验组与对照组同期体重百分增长率（以接触化合物开始时动物体重为 100%）进行统计和比较。

2) 食物利用率：亚慢性试验期间必须注意观察并记录动物的饮食情况，在此基础上计算食物利用率，即动物每食入 100 g 饲料所增长的体重克数。分析比较接

触组与对照组食物利用率，有助于分析受试化合物对实验动物的生物学效应。例如化合物影响食欲，则每日进食量减少，体重增长会受影响，但食物利用率不一定减低。如不影响食欲，而体重增长却受到影响，则可能受试化合物干扰了食物的吸收或代谢，此时食物利用率将有改变。

3) 中毒体征：实验动物在接触外来化合物过程中所出现的中毒体征及出现各体征的先后次序、时间均应记录和分析。尤其对动物被毛色泽、眼分泌物、呼吸、神态、行为等需注意观察。这些资料经分析，有助于探讨受试化合物损害的部位及程度。

4) 脏器系数：或称脏/体比值，是指某个脏器的湿重与单位体重的比值，通常以 100 g 体重计，即  $(\text{脏器质量}/\text{体重}) \times 100$ 。该指标适用于实质性脏器，反映脏器的肿大或缩小，如增生、充血、水肿、萎缩等变化。一般适用于肝、肾、脑、心、脾、肾上腺、甲状腺、睾丸、卵巢等脏器。此指标的意义是实验动物在不同年龄期，其各脏器与体重之间重量比值有一定规律；若受试化合物使某个脏器受到损害，则此比值就会发生变化，可以增大或减小。因此，脏/体比值是一个灵敏、有效和经济的指标。例如一般能诱导肝脏微粒体代谢酶的化合物，可使肝/体比值增大。

但使用脏/体比值指标时，应注意排除假象。如果外来化合物在亚慢性接触过程中能够明显地阻碍动物的体重增长，而脏器并没有受到明显的毒性影响，则也会出现脏/体比值增大。故当实验动物体重明显受到影响时，应同时比较接触组与对照组动物各脏器的绝对湿重，以排除可能出现的假象。

此外，使用脏器系数和脏器绝对湿重指标在技术上应注意两点：一是试验前所选的各组实验动物应当同龄，体重也相近；二是称量脏器重量前要洗净脏器表面血污，用滤纸吸干其表面水分，再精确称量。

5) 一般化验指标：主要指血象和肝、肾功能的检测。在亚慢性试验中研究外来化合物对实验动物的毒性作用，使用这类指标，一般为筛检性和探讨性。通常血象检测包括红细胞计数、白细胞计数和分类、血红蛋白定量等。肝、肾功能也是一种常规指标，如 SGOT、SGPT、血清尿素氮，以及尿蛋白定性或定量、尿沉渣镜检等。

(2) 病理学检查：亚慢性毒性试验中应重视病理学检查。它包括肉眼检查、常规切片及染色、酶组织化学和免疫组织化学、光镜或超微结构电镜检查等。凡是在染毒过程中死亡的动物均应及时解剖，肉眼检查如无资料依据，应全面检查各脏器。检查时应由有经验的病理学工作者进行或在其具体指导下进行。酶组织化学光镜检查可对酶改变进行亚细胞水平定位，而且往往可查出血清酶学检查及常规病理检查所未能查出的改变，在一定程度上反映亚细胞水平的改变。电镜可进行亚细胞水平的一般形态检查，也可进行组织化学（包括酶组化和免疫组化）检



查。超微结构电镜检查及组织化学检查都是较敏感的指标，特别有助于毒作用机制的阐明。

(3) 特异指标：所谓特异指标是反映外来化合物对机体亚慢性毒性作用本质的特征性指标。但是探讨和确定特异指标的难度很大，因为特异指标与化合物中毒机理是相联系的，只有受试化合物的毒作用机理阐明后，其特异指标才容易确定。不过任何一个新合成的外来化合物，都是已有化合物的发展，是在已有化合物结构基础上派生的衍生物，所以选择新化合物亚慢性中毒特异指标又可有所借鉴。一般可从两个方面进行分析和探讨。

1) 分析急性毒性作用特征：全面分析外来化合物对实验动物急性毒性特征，可以初步发现该化合物主要危害的组织系统或靶器官，顺此追踪有可能发现一些具有参考价值的线索。

2) 分析化合物的特殊基团：已知一些化合物的某些基团具有特定毒性，如氰基、有机磷化合物的五价磷等等。凡有这些基团的化合物都可作为参考，即利用其化学结构中的共性。

3. 慢性毒性试验 观察指标的选择，应以亚慢性毒性试验所提供的毒效应和靶器官为基础，其中包括体重、食物摄取、临床症状、行为、血象和血液化学、尿的性状及生化成分，重点观察在亚慢性毒性试验中已经显现的阳性指标。优先采用亚慢性毒性试验筛选出来的敏感指标或特异性指标。在慢性毒性试验中，组织病理学检查是非常重要的和必不可少的，常常是最客观和最有说服力的指标。

由于在慢性毒性试验中化合物的染毒剂量较低，往往一些观察指标变化甚微，加上实验周期长，动物容易发生自发性疾病，干扰实验结果的正确判断。为此应注意三点：①试验前应对一些预计的观察指标，尤其是血、尿常规及重点测定的生化指标进行正常值测定，可作为自身前后对照的基础，以利于与染毒后比较，并依此对动物健康状况进行筛选，废弃个体差异过大的动物，尽可能使实验对象保持齐同；②在接触外来化合物期间进行动态观察的各项指标，应与对照组同步测定；③各化验测定方法应精确、可靠，且进行质量控制，以保证各批动物观察指标测试结果的可信性。

由于有的化合物在接触的早期可以引起机体某些脏器出现代偿性现象或某些酶出现诱导性活力改变，而呈现一过性变化，对此应注意分析。此外，一些生理、生化甚至组织学指标可以随着年龄增长而有生理性改变。故应强调各种指标的观察，对照组和各剂量组应同步进行、同期比较，以消除年龄差别的影响。应重视病理组织学的检查，凡试验期间死亡的动物，都应做病理组织学检查。病理学检查是卫生毒理学研究中不可缺少的内容，但有时没有酶系统的反应灵敏。选择观察指标还应注意尽量减少观察项目，如需采血作有关测定，应尽量减少每次采血量，以防止实验动物贫血和减少人为的过分刺激。