

生物医学机能 实验与研究

主编 肖德生 谢克平 吕力为



人民卫生出版社

生物医学机能 实验与研究

主编 肖国栋 副主编 曹海平 吕为民

人民卫生出版社

生物医学机能实验与研究

Experimental Methodology for Functional
Research in Biomedical Science

主 编 肖德生 谢克平 吕力为

副主编 许 燕 车力龙 李永金 王顺林

编 者 (按姓氏笔画为序)

王顺林 车力龙 任春兰 吕力为 朱武江 许 燕

余俊先 张正仙 李 静 李月英 李永金 汪凤维

肖德生 陈 闽 陈月芳 陈素仙 徐 霞 徐顺高

钱忠明 蒋 璐 谢克平

人 民 卫 生 出 版 社

图书在版编目 (CIP) 数据

生物医学机能实验与研究/肖德生等主编. - 北京:
人民卫生出版社, 2003. 4

ISBN 7-117-05470-0

I. 生… II. 肖… III. 机能(生物)-实验医学
IV. R33-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2003) 第 025002 号

生物医学机能实验与研究

主 编: 肖德生 谢克平 吕力为
出版发行: 人民卫生出版社 (中继线 67616688)
地 址: (100078) 北京市丰台区方庄芳群园 3 区 3 号楼
网 址: [http://www. pmph. com](http://www.pmph.com)
E - mail: [pmph @ pmph. com](mailto:pmph@pmph.com)
邮购电话: 010-67605754
印 刷: 三河市宏达印刷有限公司
经 销: 新华书店
开 本: 787 × 1092 1/16 印张: 31.5
字 数: 712 千字
版 次: 2003 年 4 月第 1 版 2006 年 1 月第 1 版第 2 次印刷
标准书号: ISBN 7-117-05470-0/R · 5471
定 价: 40.00 元

著作权所有, 请勿擅自用本书制作各类出版物, 违者必究
(凡属印装质量问题请与本社销售部联系退换)

本书介绍

这是一部适应于新世纪机能学实验教学体系，满足机能学综合教学和开放性教学需要，培养高素质和创新性人才，实施教学质量工程的机能学教科书，也是一部具有启发性和指导性的机能学研究参考书。

本书由江苏大学医学院肖德生博士、江苏大学校友和兼职教授谢克平博士（美国 M. D. Anderson 癌症研究中心副教授）和吕力为博士（香港大学病理学系助理教授）组织编写。分为九篇。第一篇详细介绍了机能学实验的基本理论和基本过程，重点阐述了如何进行实验立题、实验设计和组织实施，以及如何书写论文和参加论文答辩。第二篇和第三篇分别介绍了机能学实验准备过程中的一些操作技术，包括实验用水、器材洗涤和消毒灭菌方法，以及溶液与药液的配制方法。第四篇介绍了机能学实验常用器材的基本原理和使用方法与技巧，常用实验动物机能学特点及动物实验一般操作技术。第五篇至第八篇分别介绍了系统和器官机能学、临床药理学、细胞机能学、分子机能学等方面的实验方法与技术。第九篇介绍了机能学实验教学基本实验项目。书中还附录了实验室常用英文词汇。

本书可作专升本、五年制、七年制生物医学专业的机能学实验教材，也可作为从事机能学教学和研究工作的广大青年教师、研究生的重要参考书。

前 言



高等学校应紧密围绕培养高素质、创新性人才以及提高办学效益等方面进行办学，这是时代的呼唤。面对这样的呼唤以及二十世纪中后期办学模式中所存在的若干弊端，中共中央国务院、国家教育部在二十世纪九十年代下发了一系列关于教学改革的纲领性和指导性文件，相关部门也采取了一系列配套措施以保证教学改革卓有成效地实施。同时，高等学校积极推进教学改革，在办学体系、学科设置、教学管理和实验室管理等方面采取了一系列行动和全方位教学改革，以适应新时期对人才的竞争性需求。

经过一系列改革，生物医学教学模式发生了重大转变。新的办学模式下，基于学科交融，将实验教学从宏观上分为形态学和机能学两大部分，并将实验教学从相关学科中独立出来，合理地组建综合教学实验室。这样，一方面打破了学科壁垒，实现各学科间实验教学的有机组合，强调理论来自于实践，由原来片面强调学生通过实验去验证有关理论内容，转向培养学生的创新思维和分析问题、解决问题的能力。另一方面，有利于开展实验教学研究，加强实验教学管理，加大实验教学投入，提高办学效益。

从1999年开始，我们开展了如何进行机能学实验教学的专题研究，边摸索，边吸收兄弟院校成功的办学经验。2002年上半年，江苏省生理科学会在我校召开了机能学实验教学现场研讨会，与会专家为我们提供了更为宝贵的办学经验和坦诚的建议。2002年下半年，江苏大学教务处对机能实验教学的进一步改革高度重视并进行了课题立项和资助。最近教育部提出实施教学质量工程的要求。我们在进一步研究和总结基础上，广泛吸收了兄弟院校同仁的宝贵意见，组织编写本教材，力求适应新的实验教学模式和教学质量工程的需要，打造精品教材。

本教材编写的基本思想及特点是：

1. 首先详细介绍开展机能学实验所必须具备的基本知识和基本技能，为开展机能实验打基础。
2. 总体上，机能学研究包括系统与器官机能学、细胞机能学和分子机能学三个水平，后两个水平的研究在当今机能学领域具有举足轻重的地位。

要培养学生的创新意识和创新能力,实验教学内容不能仅局限于系统与器官机能学,否则人为限制学生的视野和知识面。因此,编写内容突破了传统的编写范围,首次加入了有关细胞机能学和分子机能学基本操作技术部分,不仅可满足学科间横向综合的教学需要,而且可满足在不同研究水平之间进行纵向综合的教学需要。

3. 对机能学实验教学质量的衡量标准不在于所开设实验项目的多少。学生通过对机能学实验基本知识的学习和实际操作与实践,在掌握了机能学实验的基本方法、技术和原理之后,对未开展的一些实验方法进行研究和分析,不仅有助于学生进行实验设计,而且有助于培养启发式思维和创新意识。因此,本教材注重内容的覆盖面和方法多样性,并对一些方法的优缺点进行了评价。

基于上述基本思想,本教材可通行于专升本、五年制、七年制生物医学专业的机能学实验教学,也可作为从事机能学教学和研究工作的广大青年教师、研究生的重要参考书。

江苏大学副校长许化溪教授十分重视和关心机能学实验教学的改革和发展,发起本书的编写工作。香港大学病理学助理教授吕力为博士和 M. D. Anderson 癌症研究中心副教授谢克平博士十分关心国内教学事业,积极组织并参加了本教材的编写工作;在编写过程中,苏州大学徐斌教授、苏州大学许美凤博士(美国 Cincinnati 大学博士后)、蚌埠医学院关宿东教授提出过大量宝贵意见;香港理工大学钱忠明博士从百忙之中参加了有关神经系统和微量元素代谢方面的编写工作并进行了认真审阅。这些专家为本教材付出了辛勤的劳动,并为教材的思想性、科学性、启发性、适用性做出了重要贡献,在此一并感谢。

由于编写经验不足,不当之处难免,敬请批评指正。

肖德生

目 录



第一篇 总 论

第一章 概述	2
第一节 机能学实验与医学发展史	2
第二节 生物医学机能学及其研究范畴	3
第三节 机能实验与医学其他学科的关系	4
第四节 机能学实验在医药院校教学中的重要性	4
第五节 机能实验中的伦理道德	6
第二章 机能实验和研究的基本方法和途径	9
第一节 在体实验与离体实验	9
第二节 机体不同层次和不同水平的实验	10
第三节 两种医学模式相结合	13
第四节 人体机能研究与动物机能实验相结合和比较	14
第三章 机能实验研究的基本过程	15
第一节 立题	15
第二节 机能学实验设计	16
第三节 预实验	20
第四节 实验的正式实施与实验数据的收集	21
第五节 实验数据的整理与分析	22
第六节 实验报告或论文的书写	25
第七节 论文答辩的注意事项	25

第二篇 机能实验用水、洗涤、消毒灭菌

第一章 机能实验用水	28
第一节 实验用不同水质的纯水	28
第二节 实验对纯水质量的要求	29
第二章 器具的洗涤与消毒灭菌	31

第一节 器具的洗涤	31
第二节 器具的消毒灭菌	33
第三章 溶液的消毒灭菌	35
第一节 溶液的高压消毒灭菌	35
第二节 过滤消毒除菌	35
第三节 抗生素抑菌	37

第三篇 动物机能实验用溶液和药液的配制

第一章 溶液配制的基本知识	40
第一节 物质质量的单位、化学试剂的规格与溶解度	40
第二节 配制溶液用溶剂	41
第三节 溶液的浓度	42
第四节 电子天平与酸度计的使用方法	43
第五节 溶液配制的一般原则及注意事项	45
第二章 机能实验常用溶液	47
第一节 缓冲液	47
第二节 器官组织人工生理溶液	53
第三节 组织细胞平衡盐溶液	55
第四节 组织细胞分离液、洗涤液和细胞裂解液的配制	57
第五节 细胞培养液的配制	58
第六节 机能实验常用药物及其配制	59

第四篇 常用仪器设备、动物及有关操作技术

第一章 动物机能实验的基本器材和仪器设备	64
第一节 手术、标本制作常用器材	64
第二节 固定类器材	66
第三节 电刺激器及其输出类器材	67
第四节 信号引导和能量转换类及其有关器材	71
第五节 电信号放大	76
第六节 生物信号检测、显示、记录类设备器材	78
第七节 生物信号采集和分析系统	83
第八节 恒温类器材设备	84
第九节 灌流类及其相关设备器材	85
第十节 离心机与离心方法	87
第十一节 分析类及其相关器材设备	89
第二章 常用实验动物的特点及应用	93
第一节 蟾蜍和蛙	93
第二节 小白鼠	94
第三节 大鼠	96

第四节	豚鼠	98
第五节	家兔	99
第六节	狗	102
第七节	猫	103
第三章	动物机能实验的基本技术	105
第一节	动物实验的一般性操作	105
第二节	哺乳动物局部解剖与外科手术操作常规	119
第三节	给药途径与给药方法技术	122
第四节	插管	132
第五节	灌流	137
第六节	脑立体定位和相关操作	140
第七节	脑区分离和神经核团取样	142
第八节	血液和骨髓的采集与处理	143
第九节	尿液与消化液的采集	151
第十节	其它	154

第五篇 动物系统和器官机能实验方法与技术

第一章	血液和造血系统	158
第一节	几种血液标本的制备	158
第二节	凝血与抗凝血功能测定方法	159
第三节	红细胞脆性检测法和红细胞沉降率测定	161
第四节	急性播散性血管内凝血 (DIC) 模型	163
第五节	贫血模型	164
第二章	心血管系统实验技术	165
第一节	心脏收缩功能	165
第二节	心脏电活动观察方法	167
第三节	心律失常模型	171
第四节	心肌缺血缺氧和心肌梗塞模型	173
第五节	急性右心衰竭模型	176
第六节	血管阻力和血管通透性测定	177
第七节	血压测量	178
第八节	实验性高血压模型	180
第九节	动脉粥样硬化模型和高血脂模型	184
第十节	微循环观察	185
第十一节	微循环障碍动物模型	188
第十二节	失血性休克模型	189
第三章	神经系统实验技术	191
第一节	离体神经干标本动作电位的记录方法	191
第二节	传入 (感觉) 功能	195

第三节	传出(运动)功能	200
第四节	中枢神经系统机能	206
第五节	反射	210
第六节	疼痛模型	214
第七节	脑缺血-再灌注模型	219
第八节	老年性痴呆动物模型	219
第九节	其它几种神经系统疾病模型	221
第四章	骨骼肌和运动实验	222
第一节	肌电生理	222
第二节	骨骼肌脱耦联	224
第三节	骨骼肌负荷实验	225
第五章	消化系统实验技术	228
第一节	消化道运动实验方法	228
第二节	消化道溃疡模型	230
第三节	胃炎与胰腺炎模型	233
第四节	肠系膜实验性缺血-再灌注模型	234
第六章	泌尿系统实验方法技术	235
第一节	利尿药及抗利尿药筛选实验	235
第二节	肾病与急性肾功能不全模型	235
第三节	肾炎模型	238
第七章	呼吸系统实验技术	240
第一节	胸内压和肺顺应性测定	240
第二节	缺氧模型与药物干预作用	241
第三节	呼吸系统疾病动物模型	243
第八章	体温与能量代谢实验技术	245
第一节	能量代谢测定法	245
第二节	发热模型	246
第九章	内分泌与生殖系统实验技术	249
第一节	内分泌系统模型	249
第二节	生殖系统实验方法	253

第六篇 临床药物实验方法

第一章	新药的安全评价	258
第一节	急性毒性试验	258
第二节	长期毒性试验方法	260
第二章	药代动力与药效学	262
第一节	药代动力学一室模型	262
第二节	药效学研究方法	265

第七篇 细胞机能学实验方法与技术

第一章 细胞培养技术	270
第一节 基本知识.....	270
第二节 细胞培养所需器材.....	277
第三节 细胞培养中污染源及途径.....	278
第四节 培养室消毒灭菌及无菌操作常规.....	278
第五节 细胞培养的一般操作过程.....	279
第六节 细胞培养的常规观察.....	285
第七节 培养细胞的传代.....	286
第八节 细胞的低温保存与复苏.....	287
第九节 细胞纯化处理.....	288
第十节 细胞生长及细胞活力定量评估.....	289
第十一节 培养细胞的组成和类型的识别.....	291
第二章 组织细胞体外培养技术	294
第一节 神经细胞原代培养的要求.....	294
第二节 海马神经元与星形胶质细胞共培养.....	295
第三节 大鼠星形胶质细胞培养.....	298
第四节 大鼠心肌细胞培养.....	300
第五节 肾小球细胞培养.....	301
第六节 巨噬细胞培养.....	302
第七节 组织培养法.....	302
第三章 细胞机能学实验操作技术	304
第一节 细胞手工计数及分类技术.....	304
第二节 组织细胞破碎方法.....	306
第三节 亚细胞组分的分离技术.....	310
第四节 蛋白质浓度测定常用方法.....	312
第五节 蛋白质分离纯化.....	316
第六节 MDA 测定	320
第七节 谷胱甘肽过氧化酶、巯基转移酶和 GSH 还原酶活性测定	321
第八节 一氧化氮与一氧化碳代谢实验方法.....	322
第九节 放射性碘的蛋白标记.....	323
第十节 受体的放射配体结合分析(RBA)	325
第十一节 受体的放射配体竞争抑制实验.....	332
第十二节 受体的量效关系与机能干预(药物)	335
第十三节 放射免疫分析测定(RIA)	339
第十四节 细胞信使分子.....	343
第十五节 微量元素代谢实验方法.....	351

第八篇 分子机能学实验方法与技术

第一章 分子生物学技术在机能实验中研究的策略	361
第一节 目的基因的调控机制改变在机能干预中的作用	361
第二节 机能干预后相关基因和蛋白质水平的检测	363
第二章 分子生物学基本知识	366
第一节 分子生物学专用仪器及实验材料	366
第二节 有关 RNA 实验操作的注意事项	367
第三节 常用工具酶	369
第三章 分子生物学基本技术	372
第一节 DNA 的提取和纯化	372
第二节 RNA 的分离和纯化	379
第三节 DNA 和 RNA 的定量	382
第四节 电泳	382
第五节 聚合酶链反应 (PCR) 体外扩增目的基因	388
第六节 核酸探针的制备和标记	392
第七节 DNA 限制性酶切技术	399
第八节 载体质粒的制备与目的基因的亚克隆	402
第九节 DNA 序列测定	405
第四章 机能实验常用分子生物学定性、定量技术	408
第一节 Southern 杂交	408
第二节 Northern 杂交	410
第三节 RNA 酶保护试验 (RPAs)	414
第四节 虚拟 Northern 杂交	416
第五节 逆转录聚合酶链反应 (RT-PCR)	418
第六节 原位杂交	419
第七节 Western 免疫印迹	422
第八节 凝胶阻滞试验	425
第九节 mRNA 差别显示技术 (DD-PCR)	426
第十节 消减杂交 (SSH)	429

第九篇 机能学实验教学项目

第一部分 基本项目	439
第一节 人体机能测量	439
第二节 实验基本技能培训	454
第二部分 代表性实验和综合实验	459
第三部分 传统性开设的部分动物实验	467
附录: 实验室常用英文词汇	484

第一篇

总论



第一章

概述



第一节 机能学实验与医学发展史

在整个医学发展史上许多重大的发现，特别是那些开拓了某个新领域或在某一方面有划时代意义的发现，都离不开机能学实验。兹列举几例说明：

机能实验使生理学确定为一门科学。英国学者 William Harvey 经过一系列动物实验后发现血液循环是在一个密闭的系统，循环的动力是心脏，并在此基础上测定了每搏输出量，因此成为生理学的奠基人。

机能实验开辟了高级神经活动生理学。著名科学家巴甫洛夫通过大量的动物实验发现温血动物的心脏有特殊的神经支配，这种神经能调节心脏活动的强弱；消化腺分泌受到条件反射性调控。他提出了高级神经活动学说，开辟了高级神经活动生理学，对医学、心理学以及哲学等方面产生了很大影响。1904 年他因此获诺贝尔生理和医学奖。

机能实验发现了机体的稳态。Claude Bernard 进行了大量动物实验后获得了一系列重大发现。其中，提出了机体的外环境和内环境概念（他所指的内环境主要是血液），尽管外环境不断变化，内环境却保持相对恒定。后来的研究者在此基础上对“稳态”下了更确切的定义，稳态已经成为当

前机能学研究的主要内容。

机能实验使生物-医学模式向社会-心理-生物医学模式转变。Selye 的实验室做了一系列的实验,如果给予动物各种有害刺激(如注射亚致死量的肾上腺素、甲醛、吗啡或阿托品,肌肉运动、脊髓横断、过冷、过热等),都可引起“全身适应症候群”(general adaptation syndrome),并证明了垂体-肾上腺皮质轴在其中发挥主要作用,该作用有利于提高机体对有害刺激的抵抗力,从而创立了“应激学说”。该学说已经成为我们当前理解各种疾病的全身性、非特异性反应的理论基础,并促进了医学史发生重大转变:诞生了社会-心理-生物医学模式,该模式要求医生在诊断和治疗时不能只将病人看作是一个类似机器的生物体,而应当同时看到环境、社会等因素通过心理应激影响机体,临床处理上应当着眼于减轻应激反应,以避免或减少应激反应所导致的并发症。

机能实验发现了一氧化氮(NO)。早在1953年,美国纽约州立大学药理系 Furchgott 教授发现内皮依赖性血管舒张(endothelium-dependent relaxation)的现象,并于1982年将这种诱导血管松弛的内皮细胞介质称为内皮细胞舒张因子(endothelium-derived relaxing factor, EDRF)。1986年, Furchgott 和美国加州大学洛杉矶分校的 Ignarro 分别独立提出 EDRF 可能就是 NO。以后的一些研究证明了 EDRF 确实是 NO,而且 NO 是机体内重要的信使分子和效应分子。1992年,美国 Science 杂志将 NO 分子选为当年的“明星分子”。在 NO 研究中做出重要贡献的三位美国科学家 Furchgott, Murad 和 Ignarro 于1998年度获得了诺贝尔生理学 and 医学奖。

分子生物学、分子遗传学与机能学的结合建立了分子医学(molecular medicine)。

机能学与诺贝尔生理学 and 医学奖。100年来共有20多个国家的460多名科学家获得诺贝尔科学奖,其中诺贝尔生理学 and 医学奖有170多人。

第二节 生物医学机能学及其研究范畴

生物医学的研究大体分为形态学研究和机能学研究两大部分。形态学研究侧重于研究机体的形态结构及其与机能的关系,而机能学研究的是机体机能活动的规律及其与疾病的发生、发展、临床诊断和治疗的关系,因此,机能学在生物医学研究中占据极其重要的地位。机能学研究的目的是任务一般包括:

①研究机体生命活动的基本规律 机能学研究的首要任务是探讨生命活动的机理。这部分是对整体、系统、器官、组织、细胞和分子水平调控机能及其机制开展研究。

②研究机体生命活动的特殊规律 由于不同年龄、不同环境、机体所处的不同状态决定或影响机体的生理活动,表现出某些特殊规律。这部分是对发育、老年、运动、航空航天、潜水、妊娠、低氧或高氧等情况下的机能变化规律及其调控开展研究。

③研究异常的机能活动发生原因、变化规律及其机理 主要是研究疾病发生的原因、机能活动变化的规律及其表现、机能活动代偿和失代偿机制。这部分一般是对上述①或②的延伸,但有时也对①或②产生推动作用。

④研究药物对机能活动的作用以及机能活动对药物作用的反应规律 主要是研究药物对机能活动的作用和机制、机能活动对药物的反应性和规律。

从机能学研究目的和任务的角度分析,经典的生理科学是机能学的前身。多年来,机能学研究不断深入、研究范围不断扩大和学科分类越分越细,经典的生理科学已经形成了当前的生理学、生物化学与分子生物学、药理学、病理生理学、营养学及免疫学等学科。此外,随着各学科间相互交叉和相互渗透越来越深以及科学技术不断进步,数学、物理、化学、哲学、信息学等学科将各自领域的方法和技术应用于生物医学机能学研究,形成了生物数学、生物物理学、生物信息学等学科。因此,机能学几乎涉足到各学科领域。

第三节 机能实验与医学其他学科的关系

一、所有研究几乎都要回归到机能学研究

机体是由各组织器官的机能在中枢神经系统统一协调和高度组织下运行的有机体。机能活动出现异常导致失代偿时就会出现相应的疾病,而疾病的治疗也是紧紧围绕如何纠正异常的机能活动。因此,不论是临床学科还是基础学科都离不开机能学实验或试验。

二、各相关学科的研究手段和进展对机能学实验研究的支撑作用

机能学实验不应该脱离其他学科而独立开展,它需要多学科的配合甚至在某种程度上依赖于其他学科的手段和研究进展。例如,形态学研究发现心房肌细胞中存在一些内分泌样颗粒。这种颗粒如果真是内分泌颗粒,那么分泌的是什么物质?机能作用又是什么?后来的研究很快得出了结论:心房分泌一种具有保钾排钠作用的肽类物质即心房利钠肽,这种肽是迄今为止所发现的体内唯一具有拮抗醛固酮作用的物质。这一发现使人们重新认识了心脏或心房的功能,心脏不仅具有泵功能,而且具有极其重要的内分泌功能,心房利钠肽已试用于治疗高血压。

严格说来,数学、物理、化学以及其他任何一门自然科学一旦取得重大发现或突破,机能学的研究将接踵而至地取得革命性的进展。例如,计算技术、激光技术等对机能学的发展发挥了强烈的推动作用。

哲学似乎距离机能学比较遥远,实际上机能学的研究与哲学紧密联系在一体,这是因为机能学的研究类似于“瞎子摸象”,几乎完全依赖于研究者对实验现象和实验资料的逻辑推理。如果推理链中任何一个环节出错,所得出的结论将会偏离机体的规律甚至大相径庭。

各学科对机能学研究的支撑作用,表明了从事机能学研究需要拓宽知识面,并需要关注其他学科的研究进展,以便及时应用于机能学的研究。

第四节 机能学实验在医药院校教学中的重要性

机能学实验不仅是整个基础医药实验教学体系的重要课程,而且是临床课程教学体