

实验动物

SHIYAN DONGWU

质量管理标准与检验检测技术实用手册

主编：娄成民



贵州科技出版社

实验动物质量管理标准 与检验检测技术实用手册

中卷

贵州科技出版社

第五章 实验动物的生理病理检测

实验动物的生理病理检测内容广、方法多,可根据研究目的和要求选择。

第一节 一般体征的检查与测量方法

一、体重的测量方法

动物体重借助称量仪器测量,方法较为简单。一般在早晨未进食前称重。进行长期慢性实验时,应每隔 7~10d 称重 1 次,实验周期不长时可 2~3d 称重 1 次。

小鼠、大鼠:称重可用带游码的普通天平或电子秤称重。

兔、豚鼠:可直接放在婴儿秤上称重,从婴儿秤圆形刻度盘上读取动物体重。

犬:经训练后可直接放在磅秤上称重。未经驯服的犬,先将犬嘴绑好,由实验员把犬抱起站在磅秤上称重,记下读数,减去实验员体重,即为动物体重。

二、体温的测定方法

动物体温测定是动物实验中最常用的检测指标之一,为防止测定过程中动物挣扎,以致挫伤肠壁或折断体温计,在测定前应先固定好动物。一般测大鼠或小鼠体温时,左手带上布手套,将鼠抓起,并将鼠固定于实验者手心,同时用环指和小指把鼠尾固定;兔则可用左臂夹住兔体,左手提起尾巴,犬可固定在台上,然后右手持头端涂上少许凡士林的肛表,由肛门插入直肠一定深度。

测定体温除了用肛表外,还可用半导体点温度计。肛表测温可由实验者右手固定体温计,3min 后取出观察读数。半导体点温度计在测定时可立即从温度表上读取温度数。

测定温度时应注意如下几点:

- (1)检查肛表水银柱是否已甩下来,半导体点温度计的指针是否指在零位。
- (2)每 1 动物要固定用同 1 只体温计,测小鼠体温最好用口表,因为小鼠肛门口较小。
- (3)每次插入直肠的深度要一致,深度取决于动物的大小,如犬、猫、兔 3.5~5cm,豚鼠 3.5cm,大鼠、小鼠 1.5~2.0cm。为了使插入深度一致,可用胶皮管套在温度计上,作为“限止环”。
- (4)每次测定时间要一致。一般体温计放入直肠内固定时间为 3min,而每天测定的时间也大致一样,如第 1 次在上午测定,以后均应在上午测定。

- (5)每次体温计插入直肠后,要闭住肛门,否则不易测准,对小动物更应注意。
 - (6)防止有大便阻塞和动物挣扎造成直肠损伤及出血现象。
 - (7)注意外界温度对动物体温的影响。冬天气温较低,体温计较冷,在测大鼠、小鼠体温时,最好先放在手中温暖一下再测。
 - (8)测定时尽可能使动物处于自然状态,勿使其过于紧张、恐惧。
- 各种成年动物的正常体温见表 4-5-1。

表 4-5-1 各种成年动物的正常直肠体温

动物种类	体温变动范围(℃)	平均体温(℃)	动物种类	体温变动范围(℃)	平均体温(℃)
猿、猴	38.3~38.9	38.6	大鼠	38.5~39.5	39.0
犬	38.5~39.5	39.0	小鼠	37.0~39.0	38.0
猫	38.0~39.5	38.7	鸡	41.6~41.8	41.7
兔	38.5~39.5	39.0	鸽	41.5~42.5	42.0
豚鼠	37.8~39.5	38.6	猪	38.0~40.0	39.0

三、脉搏的检查方法

检查脉搏较为重要,可以根据脉搏频率和性质,判断动物心脏和血液循环状态,甚至可以诊断动物的疾病及判定其预后。

检查犬、猫、兔等较大动物的脉搏时,先将动物略加固定,待其安静后,用右手伸入动物股部内侧,其示指和中指压于血管上左右滑动,可感觉到血管像富有弹性的橡皮管在指下滑动。按脉的大小、强弱和软硬,分别施以轻压、中压和重压,体会脉搏的性质和节律。

小动物的脉搏不易摸测,可直接在动物左侧胸部用手触及心跳最明显处,计数一定时间,算出每分钟心跳次数。

四、呼吸频率的测定方法

动物呼吸频率和呼吸深度的改变是实验时常见的症状之一,对阐明药物作用的机制具有重要意义。因此在实验前后必须注意检查动物的呼吸节律、频率、深度的变化。呼吸频率和深度的变化可以呈现各种形式,有时频而表浅,或少而深,这些变化可标志出呼吸器官的功能状态。频而表浅的呼吸是肺通气量不足的症状。

动物呼吸频率的测定方法十分简单。首先使动物处于相对安静状态,以肉眼观察并记录呼吸的次数,一般要求记录 1min 的呼吸次数。

第二节 血液及造血功能常用指标的检查方法

一、血液常用指标的检查

(一)红细胞计数

动物红细胞计数可用普通的血细胞计数器。这种方法的重复性误差为 $\pm 8\%$,对操作技术熟练的人员来说,操作简单,比较方便,测定误差在许可范围之内。也可用光电比浊法。

1. 计数方法(试管法)

(1)用血红蛋白吸管吸取动物静脉血(采血方法可参考动物取血法)至 20mm^3 处,擦净尖端的血。

(2)迅速挤入盛有 4mL 红细胞稀释液的华氏小试管中摇匀,此时血液的稀释倍数为 $1/200$ 。

(3)将稀释液滴入计数池,静置 3min ,在高倍镜下数中央大方格中的5个中方格,将5个中方格计数的红细胞数相加。

(4)计算: $5\text{格的总和} \times 1/50\text{mm}^3$ (5个中格的体积) $\times 1/200$ (稀释倍数) $= 1/10000\text{mm}^3$ 。

故5格的总和 $\times 10000$ 即为每 $1/2\text{mm}^3$ 内的红细胞数。

2. 红细胞稀释液的配制

配方1:

氯化钠 0.8g

蒸馏水 1000mL

配方2:

氯化钠 9g

重碳酸钠 1g

蒸馏水加至 1000mL

(二)白细胞计数

1. 计数方法

与红细胞计数一样,可用普通的血细胞计数器,也可用电子血细胞计数机计数。

(1)用血红蛋白吸管吸取动物静脉血至 20mm^3 处,擦净尖端的血。

(2)立即挤入盛有 0.4mL 白细胞稀释液的小试管内,充分摇匀。

(3)将混悬液滴1小滴入计数池。

(4)静置 3min ,在低倍镜下数四角4个大方格的白细胞数。

(5)计算: $4\text{个大方格的体积为 } 4/10\text{mm}^3$,血液稀释倍数为20倍。故4格白细胞数的总和 $\times 4/10 \times 1/20 = 1/50\text{mm}^3$,4格白细胞总数 $\times 50 = 1\text{mm}^3$ 的白细胞总数。

2. 白细胞稀释液的配方

冰醋酸(纯)	200mL
蒸馏水加至	1000mL

稀释液内加入少许结晶紫或美蓝,呈浅紫色,以资识别,并可使白细胞更明显。

(三)白细胞分类计数

1. 采血:取动物血米粒大小1滴滴于载玻片的1端。

2. 取1片边缘光滑平整的玻片作推片,先放血滴前方,两者成30~35°角,将推片稍向后拉,并左右移动使血滴形成一线,粘着推片边缘。

3. 将推片由1端向另1端平稳地推进,用力须均匀,直至血液推尽为止。推片角度的大小可控制血片的厚薄,角度大、移动快则血片厚,相反则血片薄。应移动稍快不加压力将血液推成薄膜。

4. 将推好的血片置于空气中完全干燥。一般良好的血片应有头、体、尾3部分,血膜开始端较厚,末端较薄,玻片两侧及两端都有适当空余部位。

5. 染色:将血片需染的部分两端用蜡或蜡笔画一线,防止染液流出。把血片放在染色架上或平台上,滴瑞氏染液5~7滴,盖满整个血膜,1min后加等量磷酸缓冲液。在常温下染色10min,用水冲洗。将染好的血片直立于空气中,待镜检。

6. 计数:先在低倍镜下全面观察已染血片,可略知细胞分布情况、染色好坏,以及对白细胞总数作出初步估计。选择血片厚薄均匀,在血片体、尾部之间,转换油镜下数满100~200个白细胞。一般白细胞总数在10000左右数100个,10000以上数200个。将中性粒细胞、嗜酸性粒细胞、嗜碱性粒细胞、淋巴细胞、单核细胞分别记录在血细胞分类计数器上,求出百分率。

1张染色好的血片,在显微镜下红细胞呈橘红色,中央色淡;白细胞核呈紫红色,嗜中性粒细胞呈浅红紫色或粉红色;嗜酸性粒细胞呈亮红色;嗜碱性粒细胞呈暗紫色;淋巴细胞浆呈浅蓝色;单核细胞浆呈极浅蓝色。

7. 白细胞形态鉴别

(1)嗜中性粒细胞:10~12 μ m,有嗜中性颗粒。

(2)嗜酸性粒细胞:略大于嗜中性粒细胞,颗粒大,位于核外,粉红色,核明显,常分两叶。

(3)嗜碱性粒细胞:略大于嗜中性粒细胞,颗粒粗大压在核上,呈紫色,核不明显。

(4)淋巴细胞:8~15 μ m,一般圆的多,核偏一边,核染色质排列成斑块状,较致密。核与胞浆比例为9:1或8:2。胞浆呈浅蓝色,有时有灰青颗粒。核的形状以圆形最多。

(5)单核细胞:15~20 μ m,胞浆浅淡,核肾形多有压迹,核染色质疏松,核两端常切断胞浆。

8. 染液和缓冲液的配制

(1)染液的配制:

瑞氏染粉	0.1g
中性甘油	3mL
甲醇	60mL

配法:准确称取瑞氏染粉,放入洁净研钵中研细。加入中性甘油再研,加入少量甲醇再研。将上层溶解的染料倒入棕色瓶中,再加少量甲醇研磨,如此直至染料全部溶解,加甲醇至需配制容量。混匀后置棕色瓶中保存,用前过滤。一般配制后在常温下保存1周即可使用。

(2)缓冲液配制(pH6.4)

10%无水磷酸二氢钾	30mL
10%无水磷酸氢二钠	20mL
蒸馏水加至	1000mL

(四)血小板计数

计数方法:

(1)小试管内加血小板稀释液 0.4mL。取动物静脉血 20mm^3 ,迅速挤于稀释液内,立即充分摇匀。

(2)放置 4~10min,待溶液呈透明红色,说明红细胞已经充分溶解,充分摇匀,取 1 小滴加入计数池。

(3)放置 10~15min,待血小板完全下沉后,先将中央大方格移至低倍镜视野内,再转以高倍镜,数 5 个中方格内的血小板数。

(4)血小板大小形态不一致,但均呈折光的发亮淡蓝色小点,大小约红细胞的 $1/7 \sim 1/2$,呈不规则圆形或长圆形。在计数时必须来回扭动显微镜微调,不要遗漏计数。

(5)计算: 5 个中方格血小板总和 $\times 1/50\text{mm}^3$ (5 个中方格的体积) $\times 1/20$ (稀释倍数) $= 1/1000\text{mm}^3$ 。

故 5 个中方格的总和 $\times 1000 = 1\text{mm}^3$ 血液的血小板数。

(6)血小板稀释液的配制

配方 1:尿素稀释液:

尿素	13g
枸橼酸钠	0.5g
甲醛	0.1mL
蒸馏水加至	100mL

将尿素、枸橼酸钠溶于蒸馏水中,然后加入甲醛。为观察方便,可加入少许美蓝,放冰箱保存,用前必须过滤。

配方 2:1%草酸铵稀释液:

草酸铵	1g
蒸馏水加至	100mL

(五)血细胞比容容量及红细胞沉降率(血沉)测定

1. 血细胞比容容量测定

常用 Wintrobe 测定法:所用的 Wintrobe 管,口径为 3mm,有 10 个大刻度,每个大刻度的距离为 1cm,自下而上标有 0-10,每个大刻度又分 10 个小刻度,每个小刻度距离为 1mm。测定时,以 EDTA 二钠作为抗凝剂,5mL 静脉血加 1 滴 EDTA 二钠,以细而长的吸管吸取抗凝血,插入 Wintrobe 管底部,自上而下轻轻地把血液注入至刻度 10 处,不能夹有

气泡,在校准过的离心机内以 3000r/min 的速度离心 30min,压紧的红细胞柱的高度(mm)即为血细胞比容容量数值,常以百分率表示。使用此法平均误差为 $\pm 1.13\%$,是目前各种方法中最好的一种。

2. 红细胞沉降率的测定

以干燥草酸钾和草酸铵或 EDTA 二钠作为抗凝剂,将抗凝血加入 Wintrobe 管内到刻度 10 处,垂直放置,记录 1h 红细胞沉降的毫米数。测定时应在 22~27℃ 之间的室温下进行。

二、造血功能常用指标的检查

1. 骨髓细胞计数

将小鼠颈椎脱臼处死,取 1 根股骨,用 10mL 3% 醋酸溶液冲出骨髓细胞,在血细胞计数器上计数 4 个大方格的细胞数,所得细胞数乘以 $2.5 \times 100\,000$,即为 1 根股骨中骨髓有核细胞数。 $2.5 \times 100\,000$ 表示稀释倍数。4 个大方格的体积为 0.4mm^3 ,而 $1000\text{mm}^3 = 1\text{mL}$,现稀释成 10mL,所以乘 $2.5 \times 100\,000$ 。

2. 骨髓细胞分类

将小鼠解剖后,取 1 或 2 节胸骨作骨髓涂片,经甲醇固定后,用瑞氏或姬姆染液染色。分类计数 500 个骨髓有核细胞。如将 1 节胸骨髓用镊夹压挤出,蘸 1 小滴鼠血清混匀涂片,效果更好。

3. 骨髓粒细胞分裂指数

小鼠腹腔注射 0.1mL ($50\mu\text{g}$) 秋水仙碱溶液,5h 后,取出胸骨作骨髓涂片,经甲醇固定,用瑞氏或姬姆染液染色,计数每 1000 个粒细胞中分裂的粒细胞数。

4. 白细胞计数和分类

切开小鼠腹股沟,切断股动脉,取 0.02mL 全血加在 15.9mL 的生理盐水中,加入 0.1mL 1% 皂素溶解红细胞,利用电子血细胞计计数白细胞。同时取 1 滴全血作涂片,经甲醇固定后,用瑞氏或姬姆染液染色,分类计数 100 个白细胞。

5. 白体在脾脏和骨髓中的掺入试验

每只小鼠腹腔注射含有 ^{59}Fe 的枸橼酸盐缓冲液 0.2mL (pH6.1),6h 后取出脾脏和两根股骨,分别置于玻璃胶布内,应用 Fricarb 1700 型定标器测定放射性强度。

6. 白体在周围血细胞中的掺入试验

每只小鼠腹腔注入含有 ^{59}Fe 的枸橼酸盐缓冲液 0.2mL (pH6.1),3d 后切开放动脉,取全血 0.2mL 滴入脱脂棉球内,用玻璃胶布包好后,测放射性强度。

7. ^3H -胸腺嘧啶核苷的掺入试验

小鼠腹腔注入 $1\text{mL}^3\text{H}-\text{TdR}$,2h 后取出脾脏,用生理盐水冲出股骨和胫骨中的骨髓细胞,分别测定 DNA 含量和放射性强度。

8. 胸腺和脾脏重量测定

动物活杀后取出脾脏和胸腺,用扭力天平称重,分别计算出占动物体重的百分比。脾脏占体重的百分比反映动物骨髓外造血功能,正常小鼠脾脏占体重的 1.81% 左右。

第三节 血压的测定与记录方法

一、直接描记法

动物血压直接描记法是动物实验中最常用的方法,将套管直接插入动物动脉或静脉内,套管的另一端连接血压换能器,血压换能器并与生理记录仪相连。动物动脉血压测定常采用颈总动脉或股动脉。分离出一侧颈总动脉后,用缝线将动脉离心端扎紧,再用动脉夹在近心端夹住。在近扎线处下方,用眼科剪向心端将动脉剪一小口。将预先充满抗凝剂的换能器插管从剪口向心方向插入颈总动脉,然后用预先备好的缝线连同套管及动脉一起扎牢,并固定于动物体上。松开动脉夹,动脉压力信号由换能器转换变为电信号后输入生理记录仪,描记出动脉血压曲线。

动物静脉血压的测定方法与动脉血压测定大致相同。

二、间接测压法

动物血压间接测压方法又称非出血性测压法。在慢性实验进行长期反复的血压观察时,多采用此种方法。

(一)犬

1. 股动脉测压法

测量方法基本同一般人体血压测量,但血压计的压力袋规格不同。此时所用的压力袋是按狗大腿的圆锥形状制成的橡皮袋,皮袋宽 6cm,外弧长 44cm,内弧长 38cm。股动脉多半用融诊法来测量(只测得收缩压,因为听诊时常不易听到声音)。这种方法精确度较差,数值常偏高 20~30mmHg(2.67~4.00kPa)。

2. 颈部皮桥测压法

狗的间接测压法多按 Von Leesum 法将颈动脉引至皮瓣内,然后测量该动脉血压。皮桥手术后 10~12d,皮桥变柔软,试诊时脉搏良好,即可进行测压。用的压力袋规格为 2.5cm × 6.0cm 或 4cm × 8cm,此时用一般听诊器可测知收缩压和舒张压。

(二)兔

1. 颈部皮桥测压法

基本和狗一样。但兔皮瓣必须保留较多的皮下组织,以防止手术后皮瓣干枯。

2. 腹主动脉测压法

将兔背卧固定在手术台上,然后把血压计的橡皮压力袋(特制细长形的)缠于兔的下腹部,松紧要适当。压力袋一端接打气球,另一端接血压计。其他方法与测人血压同。

(三)大鼠

一般多用鼠尾动脉测压,亦有用下肢动脉测压。目前多采用压尾器、尾容积器和尾保

暖器等测血压仪(详情参考上海市高血压研究所研制的电脑控制自动测试大鼠心率血压仪)。

第四节 尿液与粪便的检查方法

一、尿液的检查方法

尿液的性状与组成,可反应机体的代谢情况。特别是泌尿系统本身的疾病,对尿液成分影响更大。尿液检查是泌尿系统疾病的诊断和观察疗效的重要方法。

尿液的采集,参照实验动物各种体液收集方法。一般用清洁容器收集新鲜尿液,以晨尿为好,因晨尿浓度较高,易发现病理成分。作细菌培养时,应消毒外阴后留中段尿,必要时进行导尿。化学定量检查时,应收集 24h 全部尿液,并加入适当的防腐剂(按尿量的 0.5%~1%加入甲苯)。

1. 尿量检查 常用实验动物的尿量见表 4-5-2。

表 4-5-2 常用实验动物一昼夜排尿量

动物种类	尿量(mL)	动物种类	尿量(mL)
猕 猴	110~550	犬(4.5kg)	65~400
马	1 900~11 400	猫(2~4kg)	40~120
牛	1 1400~19 400	兔(1.5~2.5kg)	60~250
猪	1 900~3 800	豚鼠	15~75
山羊	700~2 000	大鼠	10~15
绵羊	900~1 900	小鼠	1~3

(1)尿量增多 一昼夜尿量超过正常值范围,称为多尿。生理性尿量增多见于大量饮水或食含水分过多的蔬菜所致。病理性尿量增多,见于糖尿病、尿崩症等。

(2)尿量减少 一昼夜尿量少于正常值范围称少尿。见于急性肾炎、急性肾功能衰竭等。

2. 尿色检查

正常新鲜尿液多为黄色或淡黄色,尿的颜色多受食物或药物的影响。病理情况下可有以下变化:

- (1)血尿 呈洗肉水样或混有血凝块。
- (2)血红蛋白尿 呈浓茶色或酱油色,镜检无红细胞,隐血试验为阳性。
- (3)胆红素尿 呈深黄色,振荡后泡沫亦呈黄色。
- (4)乳糜尿 为乳白色尿液,有时混有少量血液。

3. 尿酸碱反应

正常一昼夜混合尿液呈弱酸性,pH 值为 5.4~8.4。食肉类动物尿液多呈酸性;素食

类动物尿液可呈中性或弱碱性。在酸中毒、发热时,尿液可呈较强酸性,可用 pH 试纸测定。

4. 尿比重

尿液比重与其中所含溶质的浓度成正比,一般用尿比重计进行测定,比重计上的刻度是以尿温在 15℃时制定的,当被检尿温每增加 3℃加 0.001,每减少 3℃减 0.001。大量饮水时尿量增加,其比重降低;体内缺水时,尿量减少,比重增高。

5. 尿蛋白定性试验

加热醋酸法:取小试管一支,加尿液至 2/3 高度,手持试管下端,将上部尿液以火焰加热,煮沸后加 5% 醋酸 2~4 滴,再加热至沸即可观察结果。如混浊不消失,为尿蛋白阳性;若混浊消失则是磷酸盐所致。结果判断应以试管下部尿液为对照,观察上部尿液的变化,判定结果见表 4-5-3。

表 4-5-3 尿蛋白含量判定标准

结 果	符 号	含蛋白量(g/L)
无混浊	-	无
微混浊		0.1 以下
混 浊	+	0.1~0.5
颗粒状混浊	++	0.5~2.0
絮状混浊	+++	2.0~5.0
凝聚成块	++++	5.0 以上

6. 尿糖定性试验 取试管一支,加入班氏尿糖定性试剂 2mL,加热至沸;加尿液 0.2mL,再煮沸 2min,判定结果标准见表 4-5-4。

表 4-5-4 尿葡萄糖含量判定标准

结 果	符 号	含葡萄糖量(g/L)
蓝色不变	-	无
绿色	+	5.0 以下
黄绿色	++	5.0~10.0
土绿色	+++	10.0~20.0
砖红色	++++	20.0 以上

班氏尿糖定性试剂配制:

- 硫酸铜 20g
- 柠檬酸钠 8.5g
- 无水碳酸钠 50g
- 蒸馏水加至 1000mL

先将柠檬酸钠和无水碳酸钠一起加蒸馏水 700mL,不断搅拌加热溶解,冷却后将

200mL 蒸馏水溶解的硫酸铜溶液慢慢加入,最后用蒸馏水稀释至 1 000mL。

二、粪便的检查方法

粪便检查是了解和诊断消化系统疾病的重要方法。粪便检查常用于了解粪便中有无炎性产物、血液、寄生虫卵或虫体等病理成分,并可判断胃肠、胰腺、肝、胆功能状态及粪便中有无致病菌。

1. 一般性状检查

(1)颜色:黄褐、黑色、灰白、鲜红等。

(2)性状:水样或粥样、粘液、脓样、血样。

(3)气味:特殊臭味、酸臭、腐败臭。

2. 显微镜检查 在洁净的载玻片上滴 1 滴生理盐水,用木签挑取少许粪便与生理盐水混合,涂匀,厚度适中。先用低倍镜将全片检视一遍,再用高倍镜仔细观察各种细胞、阿米巴包囊及滋养体等。注意下面各种物体的种类和数量。

(1)细胞:红细胞、白细胞、巨噬细胞等。

(2)原虫及滋养体:阿米巴、鞭毛虫的滋养体及包囊。

(3)寄生虫卵:各种寄生虫卵的量,一般以低镜视野下的数量表示。

3. 隐血检查 当上消化道少量出血时,粪便外观无异常改变。凡疑有上消化道少量出血,应进行隐血检查。

隐血检查时,将少许粪便涂于洁净玻片或滤纸条上,加 1% 联苯胺冰醋酸液及 3% 过氧化氢液各一滴。如无颜色改变为阴性反应;出现蓝颜色变化为阳性反应。根据颜色出现的快慢和深度,将阳性结果分为四级:立即出现深蓝色为(++++); 30s 内出现为(++); 1min 内出现为(++); 2min 内出现为(+)。

正常为阴性,上消化道出血为阳性。

第五节 胸、腹腔及脑脊液的检查方法

一、胃液的检查

胃液检查的目的在于了解胃的分泌、运动功能和胃液中是否有病理成分,以及与胃液成分改变有关的疾病。

胃液收集在清晨空腹插入胃管,抽出全部胃液。

1. 一般性状检查

(1)量:当十二指肠溃疡或幽门梗阻时,空腹胃液量常增多。

(2)色:正常胃液无色,如胆汁反流时呈黄色或草绿色。如有红色表示有新出血;咖啡色,证明血液在胃内存留时间较长,多为慢性溃疡病。

(3)味:正常胃液有轻度酸味,无特殊臭味。腐败气味或恶臭味均为病理改变。

2. 化学检查

(1)游离盐酸和总酸度检查:给实验餐后 1h,游离盐酸和总酸度明显增多,如给组胺 20min 后增多可达最高峰。患溃疡性病变,其胃液酸度增多;萎缩性胃炎、肿瘤时,胃液酸度明显减少。

(2)乳酸定性检查:正常胃液内仅有少量乳酸,一般定性检查为阴性。当胃酸缺乏时,胃内容物发酵,乳酸含量增多,乳酸试验呈阳性反应。

3. 显微镜检查

正常胃液内无红细胞,可有少数白细胞及扁平上皮细胞。当胃受损出血时,胃液内可见红细胞,胃炎时白细胞数增多。

二、十二指肠引流液检查

十二指肠引流液是指用导管引流的十二指肠、胆总管、胆囊和肝胆管内的液体。通过引流检查,可了解实验动物胆汁分泌情况、胆管和胰腺功能状态,对肝脏和胆道疾病有重要诊断意义。

1. 引流液的收集

引流液的收集方法,参考十二指肠、胰腺导管、胆总管或胆囊引流术。

2. 一般性状检查

注意各部分胆汁的分段是否明显;十二指肠液、胆总管胆汁(A)、胆囊胆汁(B)、肝胆汁(C)各部分胆汁的量、色、性状等。将四种引流液分别收集于无菌试管内及时送检。

病理情况下,无 B 胆汁排出时,灌胃 33% 硫酸镁后,仍无 B 胆汁排出则应考虑为胆总管梗阻或胆囊收缩不良。在灌入 33% 硫酸镁前已有绿色或黑褐色 B 胆汁流出,则多见于胆管扩张,并伴有感染、胆汁淤积。

3. 显微镜检查

正常胆汁中可有少量白细胞,偶见上皮细胞、胆固醇结晶、胆红素结晶、胆红素钙结晶。胆管炎症时可见大量脓细胞。

4. 细胞学检查

十二指肠的引流液的细菌学检查,可发现胆道炎症的病原菌,作为治疗的参考。

三、胸、腹腔积液的检查

穿刺取出标本分为两份。一份加 3.8% 枸橼酸钠(1/10 量)抗凝;另一份不加抗凝剂,以观察能否自凝。标本采集后应立即送检。

1. 一般性状检查

(1)相对密度:应在标本采取后立即测定,方法同尿液相对密度测定。

(2)外观:漏出液多为淡黄色,透明或微浊,不自凝。渗出液可呈深浅不同的黄色,混浊而凝结。

2. 化学检查

(1) 粘蛋白定性(Rivalta)试验:粘蛋白在稀醋酸溶液中可产生沉淀。

取 100mL 量筒一个,加 100mL 清水,然后滴入冰醋酸 2 滴,混匀。再加入标本 1~2 滴,立即观察结果。如有明显白云雾状混浊,下降很快,沉淀能拖长 20cm 左右,为阳性反应;如混浊不明显,下降缓慢,中途消失者,为阴性反应。漏出液为阴性反应,渗出液为阳性反应。

(2) 蛋白定量测定:漏出液蛋白含量在 25g/L 以下,渗出液在 25g/L 以上。

3. 显微镜检查

漏出液细胞计数常少于 1×10^5 个/mL,分类以淋巴细胞和间皮细胞为主。渗出液常多于 5×10^5 个/mL,出现大量中性粒细胞。

4. 细菌学检查

标本采集后经离心沉淀,取沉渣涂片,作革兰染色及抗酸染色,油镜观察。结果漏出液无细菌;渗出液中常可找到致病菌。

四、脑脊液的检查

当脑组织与脑膜有病变时,脑脊液可发生变化。样本采集常用腰椎穿刺法以收取脑脊液。穿刺后有脑脊液流出时,应先作压力测定,然后分别作细菌检查、化学检查、细胞计数。标本采取后应立即送检,以免影响结果。

1. 一般性状检查

(1) 压力测定:根据脑脊液自穿刺针流出的滴速来推测压力的高低。如每分钟 60 滴以下,表示颅内压大致正常;每分钟 60 滴以上即表示颅内压增高。

(2) 颜色:正常脑脊液为无色液体。如蛛网膜下腔出血、脑出血,则脑脊液呈均匀血性,离心后上清液呈淡红色或黄色;当蛛网膜下腔陈旧性出血或脊椎管阻塞时,脑脊液的蛋白质含量增高而呈黄色。

(3) 透明度:正常清晰透明。

(4) 凝结:正常脑脊液静置 2h 亦不会凝结。当脑膜炎症时,脑脊液静置 12h 后即可出现凝结。

2. 化学检查

(1) 蛋白定性试验:本试验为脑脊液中蛋白质与石炭酸结合,形成不溶性蛋白而析出沉淀。正常脑脊液为阴性。当脑膜或脑实质炎症时,脑脊液蛋白质含量增加,定性试验呈不同程度的阳性反应。

(2) 蛋白定量试验:在脑膜或脑实质炎症、脑出血时,脑脊液蛋白质含量增加。

(3) 葡萄糖定量试验:脑脊液葡萄糖含量与血糖浓度关系密切,约为血糖的 60%。细菌感染时,脑脊液中糖含量减少;病毒感染却增加。

3. 显微镜检查

(1) 红细胞:正常脑脊液中无红细胞。如脑出血或穿刺损伤血管时,可有大量红细胞出现,若为陈旧性出血,可见多数皱缩的红细胞。

(2)白细胞计数及分类:正常脑脊液中细胞数极少、平均为 $0 \sim 8$ 个/ μL ,多为淋巴细胞,偶见内皮细胞。病毒感染以淋巴细胞增多为主;化脓性炎症,以中性粒细胞增多为主。

第六节 肝、肾功能的检查方法

一、肝功能检查

肝脏是重要的贮存库之一,但又是重要的解毒脏器。

(一)肝脏解毒功能的测定

可采用马尿酸测定法测定。

1. 原理 苯甲酸及甘氨酸在动物肝脏内能合成马尿酸而随尿排出体外。当肝脏受到损害时,其合成马尿酸的功能障碍,出现马尿酸合成减少。

2. 试剂 20% CuSO_4 , 5% 苯酸生理盐水, 2.7% 甘氨酸生理盐水, 1N NaOH , 1N H_2SO_4 , 结晶 NaCl , 30% NaCl 溶液, 0.5% 酚酞酒精溶液, 0.1 N KOH , 刚果红试纸。

3. 器材 5mL 注射器, 代谢笼, 10mL 刻度离心管, 离心机, 25mL 量筒, 50mL 三角烧瓶, 吸管、微量滴管、烧杯、酒精灯。

4. 操作步骤

(1)当晚取预先喂饱的大鼠,于两大腿内侧腹股沟部皮下各注射苯甲酸及甘氨酸生理盐水溶液 3mL。

(2)然后经口灌服 2mL 水,将动物置于代谢笼,收集 24h 的尿量,如尿量少于 4mL 者应重复一次。

(3)1mL 尿量加入 20% CuSO_4 及 1N NaOH 溶液各 0.05mL,搅匀静置 5min。

(4)把上述混合尿液注入刻度离心管内,以 $1500 \sim 2000\text{r/min}$,离心 35min。

(5)取出离心管,计上层清液的量,并将上层清液移入三角烧瓶内。为了使马尿酸成结晶状析出,向瓶内按 1mL 上层清液加 0.3g 结晶 NaCl ,并加热至第一个气泡出现为止。

(6)放入刚果红试纸,用 1N H_2SO_4 滴定,直到刚果红试纸变蓝为止,此时马尿酸更不溶解。促使马尿酸充分沉淀,将三角烧瓶置冰箱内冷却 $40 \sim 60\text{min}$ 。

(7)冷却后的溶液倒入离心管内离心 35min,弃去上清液。用冰冻的 30% NaCl 溶液 45mL,洗涤烧瓶后将洗涤液倒入离心管内,搅匀后离心。反复洗涤 3~5 次,在最后一次洗液加酚酞二滴,用 0.1N KOH 滴定,出现微红色时为止, KOH 用量不超过 $0.2 \sim 0.25\text{mL}$ 。

(8)用热水将沉淀在离心管内的马尿酸溶解,并倒入烧瓶内,继续加热至完全溶解。

(9)加酚酞二滴,用 0.1 N KOH 滴定至出现微红色为止。

(10)记录 KOH 的用量,根据 1mL 0.1N KOH 相当于 14.4g 马尿酸,按下列公式计算每毫升尿中马尿酸的量。

$$C = \frac{A \times 14.4 + k}{B}$$

C 为 1mL 尿中的马尿酸量(mg)。A 为滴定马尿酸所消耗的 0.1N KOH 量(mL)。B 为尿总量(mL),总量在 7.5mL 以上时仍按 7.5mL 计算。 k 为修正系数,1mL 尿液在操作过程中均损失 1mL 马尿酸,尿总量少于 4mL 则不能做。

大鼠正常马尿酸量为 9~12mg/mL 尿。

(二)肝脏排泄功能的测定

肝脏受损时,其排泄功能下降。可采用酚四溴钠(BSP)测定法测定。

1. 原理

BSP 静脉注射后,大部分被肝实质细胞所吸收而经胆管排出体外。肝细胞受损,其排泄功能下降,BSP 的滞留量增加。BSP 在碱性溶液中引起结构的改变而显紫红色。

2. 试剂

0.5N NaOH 溶液, 0.005N NaOH 溶液, 0.5N 盐酸溶液。

3. 操作步骤

(1)称取 50mgBSP,放入 50mL 容量瓶内,加少许蒸馏水溶解,加入 0.005N NaOH 溶液 0.5mL,然后加蒸馏水至 50mL 处,混匀。

(2)取上述溶液 1mL,放入 100mL 容量瓶内,加 0.005N NaOH 溶液 1mL,再将蒸馏水加至 100mL 刻度处,混匀。

(3)血清 BSP 滞留量百分率的测定方法:

①给兔、犬一侧前肢或后肢静脉注射 BSP 溶液 1.5mL/kg 体重,记录注射时间。

②注后 45min,从对侧前肢或后肢静脉采血 3~5mL,放入干燥试管内。

③待血液完全凝固后,仔细分离血凝块与管壁粘连处,然后离心 7~10min。

④用刻度吸管吸取上层血清 1mL,平均放入 2 支试管内。

⑤一管中加入 0.5N 盐酸溶液 0.5mL,另一管中加入 0.5N NaOH 溶液。

⑥两管中分别加蒸馏水各 4mL,摇匀。

⑦加盐酸溶液管作为对照,校正零点,在 524 毫微米或绿色滤光板下进行比色测定氢氧化钠溶液管的光密度(实验管),然后从标准曲线上查出 BSP 滞留量的百分率。

⑧肝功能正常时,兔、犬血液中酚四溴钠滞留量不超过 10%,如在 10% 以上为不正常,表示肝脏有损伤。

4. 注意事项

(1)注射器、针头、试管必须洁净与干燥,以免发生溶血,造成颜色的干扰,影响比色的准确性。

(2)动物出现各种类型黄疸时,不宜用本法。

(三)丙氨酸氨基转移酶(ALT)测定

1. 原理

血清中丙氨酸氨基转移酶(ALT)能使丙氨酸与 α -酮戊二酸转氨基和酮基,生成丙酮酸和谷氨酸,丙酮酸与 2,4-二硝基苯肼作用生成丙酮酸二硝基苯腙,在碱性溶液中显红棕色。根据色泽深浅,计算出丙酮酸含量,再换算转氨酶的活性单位。

2. 试剂

(1)0.1N 磷酸盐缓冲液(pH7.4):称取无水磷酸二氢钾 2.69g 和磷酸氢二钾(K_2HPO_4 ·

3H₂O)13.97g,加蒸馏水溶解后移至 1L 容量瓶中校正 pH 值到 7.4,再用 0.1N 磷酸盐缓冲液稀释到 100mL,充分混合,分装在小瓶中冰冻保存。

(2)2,4-二硝基苯肼溶液(1mL):精确称取 2,4-二硝基苯肼 19.8mg,溶于 10N 盐酸 10mL 中,溶解后再加蒸馏水至 100mL。

(3) 0.4N 氢氧化钠:取标定的 1N 氢氧化钠 400mL,加蒸馏水至 1000mL 混合。

(4)丙酮酸标准液(2 μ mol/mL):准确称取丙酮酸钠(AR)22mg,置于 100mL 容量瓶中,以 0.1N 硫酸溶解并稀释至刻度,混匀后,置冰箱保存。

3. 操作步骤

(1)将所用测定试剂除氢氧化钠溶液外,全部置于 37℃ 水浴箱内,预温至 37℃ 然后使用。

(2)取试管两只,标明测定管及试剂空白管,在测定管内加血清标本 0.1mL,试剂空白管内加 0.1N 磷酸盐缓冲液 0.1mL,放入 37℃ 水浴箱内预温 5min。

(3)在测定管及试剂空白管中各加入 ALT 基质液 0.5mL,混匀并立即计时。

(4)30min 后,在测定管及试剂空白管中各加入 2,4-二硝基苯肼 0.5mL 混匀。

(5)20min 后,在测定管及试剂空白管中各加入 0.4N 氢氧化钠溶液 5mL,混匀 10min 后将试管从水浴箱中取出,冷却至室温。

(6)用 520nm 或绿色滤光板进行比色,以蒸馏水校正光密度到 0 点,读取试剂空白管及测定管读数。

如果试剂空白管的光密度在绘制标准曲线时测得的试剂空白管光密度均值 ± 0.015 范围内,说明这次正常,则将测定管光密度减去绘制标准曲线时的试剂空白管光密度均值,基线,即得血清标本的酶单位值。如果试剂空白管光密度超出了绘制标准曲线时测得的试剂空白管光密度均值 ± 0.015 范围,则须检查试剂及其他方面的原因,找出问题(一般是 2,4-二硝基苯肼由于结晶析出浓度减低或基质中 α -酮戊二酸量不准引起),纠正以后,进行测定,标准曲线绘制见表 4-5-5。

表 4-5-5 GPT 比色测定法标准曲线绘制操作步骤(赖氏法)

	管 号					
	0	1	2	3	4	5
0.1N 磷酸盐缓冲液(mL)	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10
基质液(mL)	0.50	0.45	0.40	0.35	0.30	0.25
丙酮酸标准液 2 μ mol/mL(mL)	0	0.05	0.10	0.15	0.20	0.25
相当于丙酮酸实际含量 μ mol(mL)	0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5
相当于酶活力(mL)	0	28	57	97	150	200

上列各管各作三份,在 37℃ 水浴箱内预温 5min,再在各试管中加 2,4-二硝基苯肼溶液 0.5mL,混匀,以下步骤同酶测定操作法,最后以蒸馏水校正光密度至 0 点,读取各管光密度读数,并计算出各管的三个重复测定的光密度均值,所得差值与其对应的酶活力单位数作图,连接各点,画成平滑曲线即成标准曲线,并将 0 号管读数的均值标在标准曲线图