

全国高等学校配套教材

供预防医学类专业用

毒理学

实验方法与技术



主 审 张 桥
主 编 王心如
副主编 周宗灿

 人民卫生出版社

全国高等学校配套教材

供预防医学类专业用

毒理学实验方法与技术

主 审 张 桥

主 编 王心如

副主编 周宗灿

编 者 (以姓氏笔画为序)

王心如 (南京医科大学公共卫生学院)	周宗灿 (北京大学公共卫生学院)
石 年 (华中科技大学公共卫生学院)	金泰虞 (复旦大学公共卫生学院)
朱心强 (浙江大学公共卫生学院)	钟才高 (中南大学公共卫生学院)
庄志雄 (中山大学公共卫生学院)	胡渝华 (四川大学公共卫生学院)
孙志伟 (吉林大学公共卫生学院)	谢克勤 (山东大学公共卫生学院)
李百祥 (哈尔滨医科大学公共卫生学院)	裴秋玲 (山西医科大学公共卫生学院)
周建伟 (南京医科大学公共卫生学院)	蔡 原 (中国医科大学公共卫生学院)

秘 书 肖 杭 (南京医科大学公共卫生学院)

人 民 卫 生 出 版 社

图书在版编目(CIP)数据

毒理学实验方法与技术/王心如主编. —北京:
人民卫生出版社, 2003. 7

ISBN 7-117-05661-4

I. 毒… II. 王… III. 毒理学-实验
IV. R99-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2003)第 058306 号

毒理学实验方法与技术

主 编: 王 心 如

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>

E - mail: pmph@pmph.com

印 刷: 北京市增富印刷有限责任公司(万通)

经 销: 新华书店

开 本: 787×1092 1/16 印张: 13.5

字 数: 302 千字

版 次: 2003 年 8 月第 1 版 2003 年 8 月第 1 版第 1 次印刷

标准书号: ISBN 7-117-05661-4/R·5662

定 价: 18.00 元

著作权所有, 请勿擅自用本书制作各类出版物, 违者必究

(凡属质量问题请与本社发行部联系退换)

编写说明

毒理学是研究化学、物理和生物因素对机体的损害作用、生物学机制、危险度评价和危险度管理的科学。毒理学兼有基础科学和应用科学的鲜明特征,是现代医学尤其是公共卫生预防医学专业中一门重要的基础课程。纵观毒理学发展史,她源于实验医学和治疗学,而实验毒理学也促进了现代医学的发展。编者认为,毒理学基础理论与实践技能对于高素质、创新性预防医学专业人才的培养具有同等重要的地位,尝试编写实习教材《毒理学实验方法与技术》正是基于这一主要观点和根本目的。

全书共分 12 章约 20 余万字:前 3 章重点介绍了毒理学实验基础、一般毒性和特殊毒性试验方法与技术;后 9 章主要描述了靶器官(血液、免疫、生殖、神经系统和行为、呼吸、肝脏、肾脏、心血管和皮肤)毒理学研究方法与技术。本教材具有与上篇《毒理学基础》前后衔接、传统和经典实验方法与现代生物和测试分析技术紧密结合以及适用性和可操作性强等主要特点。

本书可用作全国高等医药院校本科生、研究生的毒理学实习教材或科研入门的参考书,各院校可根据不同的培养规格、目标与要求以及自身的实验教学条件,精心组织、科学选择适当的实验方法与技术,开展以问题为中心(PBL)、形式多样的设计性和综合性实验教学活动的。

本版教材的编写得到了卫生部教材办公室和人民卫生出版社的直接指导和大力支持,参加编写的各位专家、教授和中山大学公共卫生学院张桥教授付出了辛勤工作的汗水,我们谨此一并表示最诚挚的感谢。限于时间和水平,本教材定有错误和不妥之处,敬请广大师生提出宝贵意见,以便今后进一步修订使之日臻完善。

王心如 周宗灿

2003 年 5 月

目 录

第一章 毒理学实验基础	(1)
第一节 毒理学实验的原则和局限性.....	(1)
第二节 毒理学毒性评价试验的基本目的.....	(3)
第三节 动物实验的职业道德.....	(4)
第四节 实验动物的选择和管理.....	(4)
第五节 实验动物的准备.....	(8)
第六节 受试物和样品的准备.....	(12)
第七节 实验动物染毒途径和技术.....	(13)
第八节 实验动物生物标本采集及处死.....	(19)
第九节 毒理学试验的统计学.....	(22)
第十节 优良实验研究规范.....	(32)
第二章 一般毒性试验	(34)
第一节 急性毒性试验.....	(34)
一、经口急性毒性试验.....	(34)
二、经呼吸道急性毒性试验.....	(49)
三、经皮肤急性毒性试验.....	(50)
第二节 局部毒性试验.....	(51)
第三节 蓄积毒性试验.....	(54)
第四节 亚慢性和慢性毒性试验.....	(55)
一、亚慢性毒性试验.....	(55)
二、慢性毒性试验.....	(56)
第三章 特殊毒性试验方法	(59)
第一节 致突变实验方法.....	(59)
一、鼠伤寒沙门菌回复突变试验.....	(59)
二、哺乳动物细胞基因突变试验.....	(63)
三、动物骨髓细胞染色体畸变分析.....	(68)
四、小鼠骨髓细胞微核试验.....	(70)
五、单细胞凝胶电泳技术.....	(72)

第二节 致癌试验	(75)
一、哺乳动物细胞体外恶性转化试验	(76)
二、哺乳动物短期致癌试验	(78)
三、哺乳动物长期致癌试验	(79)
第三节 发育毒性和致畸作用试验	(80)
一、三段生殖毒性试验	(81)
二、大鼠体外全胚胎培养试验	(86)
第四章 血液毒理学研究方法	(92)
第一节 特殊血液学检测	(92)
一、网织红细胞计数	(92)
二、红细胞渗透脆性试验	(93)
三、高铁血红蛋白含量测定	(93)
四、变性珠蛋白小体测定(煌焦油蓝沉淀法)	(94)
五、血液细胞的化学染色	(95)
六、血液细胞的免疫细胞化学染色	(96)
七、免疫细胞表面标志的检测	(96)
八、血液细胞凋亡的检测	(97)
九、细胞遗传学和分子生物学检测	(97)
第二节 血液和骨髓毒物筛选试验	(98)
一、骨髓造血细胞的体外培养	(98)
二、体内试验-白血病实验动物模型	(98)
第五章 免疫毒理学研究方法	(100)
第一节 免疫毒性研究实验设计	(100)
一、实验动物的选择	(100)
二、接触外源化学物的剂量、途径和时间	(100)
三、重视局部免疫功能的检测	(101)
第二节 免疫抑制检测方法	(102)
一、体液免疫功能测定(溶血空斑试验)	(102)
二、淋巴细胞增殖试验(MTT 比色法)	(103)
三、细胞免疫功能测定(皮肤迟发型超敏反应, DTH)	(105)
四、NK 细胞活性测定(乳酸脱氢酶释放法)	(106)
第三节 超敏反应检测方法	(107)
一、皮肤超敏反应测定	(107)
二、呼吸道超敏反应测定	(108)
三、膈窝淋巴结试验	(108)
第六章 生殖毒理学研究方法	(110)

第一节 生殖毒性试验	(110)
一、一代生殖毒性试验	(110)
二、两代(多代)生殖毒性试验	(112)
第二节 环境雌激素检测	(113)
一、大鼠子宫增重试验	(113)
二、雌激素受体结合试验	(114)
三、MCF-7 细胞增殖试验	(115)
第三节 精子动力学研究	(116)
第四节 性激素水平分析	(118)
一、血清、睾丸/卵巢组织匀浆液中 FSH 含量测定	(118)
二、尿液中 FSH 含量测定	(119)
三、尿液中 β -hCG 含量测定	(121)
第七章 神经毒理学研究方法	(124)
第一节 迟发性神经毒性试验	(124)
第二节 神经毒理学形态学方法	(125)
一、通路示踪法	(125)
二、化学神经解剖法	(128)
第三节 神经毒理学生理学方法——神经递质定量测定	(130)
第四节 神经毒理学分子生物学方法	(131)
一、神经丝蛋白免疫印迹法	(131)
二、神经丝 mRNA 含量测定	(134)
第五节 电生理实验方法:膜片钳	(136)
第六节 行为致畸毒性测试方法	(138)
一、行为畸胎学测试组合	(138)
二、行为畸胎学研究组合	(141)
第八章 呼吸毒理学研究方法	(147)
第一节 肺功能测定	(147)
第二节 在体 BAL 与 BALF 分析	(148)
第三节 体外 IPL 与分析	(150)
第四节 胎鼠肺细胞原代培养与上皮细胞纯化	(151)
第九章 肝脏毒理学研究方法	(153)
第一节 肝损害的体内评价方法	(153)
一、血清酶活性测定	(153)
二、肝脏排泄功能测定	(155)
三、肝脏分泌功能测定	(158)
四、肝纤维化测定	(160)

第二节 肝损害的体外评价方法	(162)
一、体外离体肝灌流与分析	(162)
二、大鼠肝细胞原代培养实验方法	(164)
第三节 化学性肝损伤动物模型	(166)
一、小鼠急性肝损伤模型	(166)
二、大鼠慢性肝损伤模型	(167)
三、小鼠免疫性肝损伤模型	(168)
第十章 肾脏毒理学研究方法	(170)
第一节 体内实验	(170)
一、尿液的一般生化指标	(170)
二、肾脏血流动力学和血流量分析	(171)
三、肾小球滤过率和肾脏清除率测定	(172)
四、肾脏的微穿刺和微灌注技术与应用	(177)
五、电子探针显微分析法	(179)
第二节 体外试验	(180)
一、体外细胞培养与细胞毒性试验	(180)
二、肾膜囊泡的分离与应用	(180)
第十一章 心血管毒理学研究方法	(182)
第一节 心血管毒理学动物实验研究方法	(182)
第二节 心功能评价方法	(183)
第三节 心脏毒性体外评价方法	(184)
一、心肌细胞原代培养	(184)
二、细胞增殖试验	(185)
三、DNA 含量及细胞周期分析	(186)
第四节 细胞凋亡与坏死检测	(186)
一、形态学测定方法	(186)
二、琼脂糖凝胶电泳方法	(187)
三、酶联免疫分析方法	(188)
四、流式细胞仪检测方法	(189)
第十二章 皮肤毒理学研究方法	(190)
第一节 皮肤刺激/腐蚀实验	(190)
一、动物皮肤刺激试验	(190)
二、人体皮肤刺激试验	(191)
第二节 皮肤致敏和光敏试验	(194)
一、皮肤变态反应试验	(194)
二、皮肤光毒和光变态反应试验	(198)

第三节 皮肤吸收试验.....	(199)
一、在体皮肤吸收试验	(199)
二、离体皮肤吸收试验	(200)
参考文献.....	(202)

第一章

毒理学实验基础

毒理学研究外源化学物对于机体(特别是人体)的有害作用及其机制。毒理学研究的主要手段是动物实验。体内试验是以实验动物为模型,最终目的是通过外源化学物对实验动物的毒性反应,向人(原型)外推,以期评估外源化学物对人的危害及危险性。体外实验主要用于筛选和预测急性毒性和机制研究;人体实验和流行病学调查则可进一步深化和证实在动物实验中所得到的资料。实际上,毒理学作为一门实验科学是以动物实验为中心的,毒理学动物实验的设计、实施、结果观察和评价是毒理学研究的基本功。毒理学试验是对化学物安全性评价的主要手段,已为各国际组织或各国的行政部门所颁布的规程或指南列为常规试验,又称为法规毒理学试验(regulatory toxicology test)。这类毒理学试验是以筛查和描述外来化学物的毒性为目的,属于描述毒理学范畴。当受试物经法规毒理学的研究,确定其危害、剂量反应关系和靶器官后,应进一步研究其靶器官毒理学及其毒作用机制。

第一节 毒理学实验的原则和局限性

在描述毒理学的试验中,有三个基本的原则:

1. 化学物在实验动物产生的作用,可以外推于人。基本假设为:①人是最敏感的动物物种;②人和实验动物的生物学过程包括化学物的代谢,与体重(或体表面积)相关。这两个假设也是全部实验生物学和医学的前提。以单位体表面积计算在人产生毒作用的剂量和实验动物通常相近似。而以体重计算则人通常比实验动物敏感,差别可能达10倍。因此可以利用安全系数来计算人的相对安全剂量。已知人致癌物都对某种实验动物具有致癌性。实验动物致癌物是否都对人有致癌性,还不清楚,但此已作为动物致癌试验的基础。一般认为,如果某一化学物对几个物种实验动物的毒性是相同的,则人的反应也可能是相似的。

2. 实验动物必须暴露于高剂量,这是发现对人潜在危害的必需和可靠的方法。此原则是根据质反应的概念,随剂量或暴露增加,群体中效应发生率增加。毒理学试验中,一般要设3个或3个以上剂量组,以观察剂量-反应(效应)关系,确定受试化学物引起的毒效应及其毒性参数。毒性试验的设计并不是为了证明化学品的安全性,而是为了了解化学品可能产生的毒作用。仅仅检测受试化学物在人的暴露剂量是否引起毒效应是不够的,尽管此剂量已超过人可能的暴露剂量。当引起毒效应的最低剂量(LOAEL)与人的暴

露剂量接近时,说明该化学物不安全。当该剂量与人的暴露剂量有很大的距离(几十倍,几百倍或以上),才认为具有一定安全性,此距离越大,安全性越可靠。如果在研究中所用的一系列的剂量不能引起毒性效应,则认为所用剂量还不足够高,应增加剂量,以确定受试化学品的毒性。但如果在试验的最高剂量组的剂量与人可能的暴露剂量有足够的安全界限,则对于安全性评价来说未观察到毒效应的研究是可以接受的。在毒理学试验中实验模型所需的动物总是远少于处于危险中的人群。为了在少量动物得到有统计学意义的可靠的结果,需要应用相对较高的剂量,以使效应发生的频率足以被检测到。例如,低达0.01%的癌症发生率,这意味着在100万人群中有100人发生癌症,此发生率太高,不能为公众接受。在实验动物直接检测如此低发生率将至少需要30000只动物。因此,在毒理学试验中,对相对较少的实验动物必须以较高剂量进行试验,然后根据毒理学原则外推估计低剂量的危险性。

3. 成年的健康(雄性和雌性未孕)实验动物和人可能的暴露途径是基本的选择。成年的健康(雄性和雌性未孕)实验动物是为了使实验结果具有代表性和可重复性。以成年的健康(雄性和雌性未孕)实验动物作为一般人群的代表性实验模型,而将幼年和老年动物、妊娠的雌性动物、疾病状态作为特殊情况另作研究。这样可降低实验对象的多样性,减少实验误差。毒理学实验结果的敏感性取决于受试物处理引起毒效应强度和实验误差两个因素,处理引起的毒效应强,实验误差小,则实验结果的敏感性增加,反映受试物处理的真实效应,反之亦然。实验设计是要规定实验条件,严格控制可能影响毒效应的各种因素,保证实施质量,降低实验误差。只有这样,才能保证试验结果的准确性和可重现性。外源化学物从不同途径染毒实验动物所表现的毒性可有很大差异,这是由于染毒部位解剖生理特点不同,外源化学物吸收进入血液的速度和量也不同,首先到达的器官和组织也不同。因此,毒理学试验中染毒途径的选择,应尽可能模拟人接触该受试物的方式。

历史上,环境污染物及某些药物所引起的中毒和死亡多次发生,引起各国的重视,推动了毒理学的发展,各国政府主管部门制订和多次修订了有关药品和各种化学品安全性评价的规范或准则,希望在啮齿类和非啮齿类的毒理学研究能为有关候选新药和各种化学品提供安全性证据,但以动物的资料预测人的毒性的预测价值尚有待于研究。Lumley(1990)和Igarashi(1994)根据有限的临床资料报告对人的毒性约一半不能由临床前(动物)毒性研究预测。Heywood(1983)报告27个化学物(大多为药品)的靶器官毒性在大鼠和犬(或猴)之间的相符率仅20%。Olson等(1998)报告131种化学物对动物的毒性与人的毒性相符率,啮齿类为6%,非啮齿类(犬和猴)为28%,合并达36%,所有的物种相符率可达69%。按照目前的规范,进行毒理学安全性评价,可以在一定程度上提高新药和各种化学品的使用安全性,但仍不能完全排除对人健康危害的风险。WHO在《临床前药物安全性实验原则》的文件中指出“虽然事先对生物活性物质进行了最仔细彻底的研究,但给人使用时总是不可避免地要冒一定的风险。”这就是利用动物实验的局限性,即动物实验的结果外推到人的不确定性。

用实验动物的毒理学试验资料外推到人群接触的安全性时,会有很大的不确定性。这是因为,外源化学物的毒性作用受到许多因素的影响。首先,实验动物和人对外源化学物的反应敏感性不同,有时甚至存在着质的差别。虽然在毒理学试验中通常用两种或两种以上的动物,并尽可能选择与人对毒物反应相似的动物,但要完全避免物种差异是不可

能的。而且,实验动物不能述说涉及主观感觉的毒效应,如疼痛、腹胀、疲乏、头晕、眼花、耳鸣等,这些毒效应就难以或不可能发现。在动物实验中,可观察到体征(sign),而没有“症状(symptom)”。第二,在毒理学试验中,为了寻求毒作用的靶器官,并能在相对少量的动物上就能得到剂量-反应或剂量-效应关系,往往选用较大的染毒剂量,这一剂量通常要比人实际接触的剂量大得多。有些化学物在高剂量和低剂量的毒性作用规律并不一定一致,如大剂量下出现的反应有可能是由于化学物在体内超过了机体的代谢能力,这就存在高剂量向低剂量外推的不确定性。第三,毒理学试验所用动物数量有限,那些发生率很低的毒性反应,在少量动物中难以发现。而化学物一旦进入市场,接触人群往往会很大。这就存在小数量实验动物到大量人群外推的不确定性。第四,实验动物一般都是实验室培育的品系,一般选用成年健康动物,反应较单一,而接触人群可以是不同的人种、种族,而且包括年老体弱及患病的个体,在对外源化学物毒性反应的易感性上存在很大差异。以上这些都构成了从毒理学动物试验结果向人群安全性评价外推时的不确定因素。

第二节 毒理学毒性评价试验的基本目的

毒理学实验的常规部分是毒性评价或安全性评价试验。为了对受试物的毒性进行全面的测试,增强测试结果的可靠性,权威机构规定了评价程序,以保证毒性评价研究可以达到普遍能接受的最低要求和原则。由于受试物的多样性,试验程序应该有一定的灵活性。对毒理学试验的原理和设计思路的深入理解,有助于研究者对评价程序的实施,在发现新的现象或线索时,可进一步设计新的实验来证实,并研究其机制。

毒性评价或安全性评价方面的基本目的包括以下几点:

1. 受试物毒作用的表现和性质 在急性和慢性毒性试验中,观察受试物对机体的有害作用,对每个实验动物进行全面的逐项的观察和记录。发现有害作用是进行剂量-反应(效应)研究的前提。

2. 剂量-反应(效应)研究 剂量-反应(效应)研究是毒性评价和安全性评价的基础。通过对不同有害作用的剂量-反应(效应)研究,可以得到该受试物的多种毒性参数。在急性(致死性)毒性试验中,应该得到 LD_{50} ,也可以得到 LD_{01} 和MTD。在急性非致死性毒性试验中,应该得到急性可观察到有害作用的最低剂量(LOAEL)和未观察到有害作用的剂量(NOAEL)。在亚急性、亚慢性及慢性毒性试验中,应该得到相应的LOAEL和NOAEL。在致突变、致癌和致畸等特殊毒性试验中,剂量-反应(效应)研究将为确定受试物是否具有这些特殊毒性提供依据。在致畸试验也可得到LOAEL和NOAEL;在致突变、致癌试验中,尽管认为是无阈值的,但也可得到表观的LOAEL和NOAEL。

3. 确定毒作用的靶器官 确定受试物有害作用的靶器官,是毒理学研究的重要目的,以阐明受试物毒作用的特点,并为进一步的机制研究和毒性防治提供线索。

4. 确定损害的可逆性 一旦确认有害作用存在,就应研究停止接触后该损害是否可逆和消失,器官和组织功能是否能恢复,还是像化学致癌作用那样停止接触后损害继续发展。毒性的可逆性关系到对人的危害评价,如果受损的器官组织能够修复并恢复正常功能,则可能接受较高危险性的接触水平。

当然,毒理学研究还可能有其他的目的和要求,例如毒作用的敏感检测指标和生物学

标志、毒作用机制研究、受试物的毒物动力学和代谢研究、中毒的解救措施等。对这些要求,应扩展常规试验的设计以包括有关的项目,或者另外设计和进行靶器官毒理学研究及机制毒理学研究。

第三节 动物实验的职业道德

实验动物(laboratory animal)包括所有脱离自然环境而用于研究、教学和试验的脊椎动物。要预防和治疗人类的疾病、要认识生命过程,生物学实验是必不可少的。实验动物对医学的发展有不可忽视的贡献。所有的研究人员要尊重生命,善待实验动物。

关于人类对待动物的伦理学争论由来已久。18世纪哲学家 Jeremy Bethan 指出:“问题既不是它们能否思考,也不是它们会不会说话,而是它们痛苦不痛苦。”也出版了很多有关动物的伦理学的书籍和文章。19世纪以来兴起了动物保护主义,各国成立各种动物保护组织,其中有一部分是主张绝对禁止动物实验的激进派。科学家和大多数民众则主张对动物实验加以规范,通过立法保障动物福利。英国1822年通过了马丁法,禁止虐待动物;1876年通过了“禁止虐待动物法”;1986年通过了“科学实验动物法”。美国1873年联邦法中有人道地对待动物的条文;1966年通过了“动物福利法”。我国《实验动物管理条例》规定“对实验动物必须爱护,不得戏弄或虐待”。

对于那些人为造成丧失独立生存能力的生物和那些用于研究、教学的试验的动物,我们都负有道义上的责任。使用有知觉动物作研究时,其前提必须期望该研究对最终能使人类或动物的健康和福利得到改进的认识有重大的贡献。遵守下列原则:①给予人道主义的管理和处理;②使痛觉和不适感减少到最低限度;③避免不必要的使用实验动物。合适的建筑设备固然重要,但更重要的是管理体制和使用实验动物的各级人员的知识水平和对动物的关心程度。

应贯彻英国 William Russell 和 Rex Brursh(1959)在《The Principles of Humane Experimental Technique》提倡的3R原则,即替代(replacement)、减少(reduction)和优化(refinement)。替代是指应用无知觉材料的科学方法来代替使用活的有知觉脊椎动物的方法。减少是指在能保证获取一定数量与精确度的数据信息的前提下,减少动物的使用数量。优化是指在必须使用动物时,要尽量减少非人道程序的影响范围和程度。

第四节 实验动物的选择和管理

毒理学的动物实验是以实验动物作为研究对象的,为获得可靠的研究结果,先决条件是正确地选用实验动物。

(一) 实验动物物种的选择

外源化学物的固有毒性往往在人和不同物种实验动物之间表现不同,物种差别可以表现在量和质的差别。因此,需要对实验动物物种进行选择。一般认为,从动物实验结果外推到人,定性外推的可靠性高于定量外推,毒效学预测优于毒动力学预测。

对实验动物物种选择的基本原则是:在代谢、生物化学和毒理学特征与人最接近的物种;自然寿命不太长的物种;易于饲养和实验操作的物种;经济并易于获得的物种。

在选择实验动物时存在固有的限制。可利用的物种不多,主要原因包括经济(购买和饲养的费用)、实验动物的寿命、行为和生活能力、处置,也许最重要的是对该物种“正常”生理和病理的资料,以及对所研究的毒性的敏感性。要利用对受试物在代谢、生物化学和毒理学特征与人最接近的物种,这就需要了解实验动物物种和人对受试化学物的吸收、生物转化等资料,但这往往并不切合实际,因为首先需要进行一系列的比较研究,而对人体的资料在动物试验之前是很难得到的。

实际上没有一种实验动物完全符合上述物种选择的原则,目前常规选择物种的方式是利用两个物种,一种是啮齿类,另一种是非啮齿类。常用实验动物的生物学和生理学参数见表 1-1。系统毒性研究最常用的啮齿类是大鼠和小鼠,非啮齿类是犬。豚鼠常用于皮肤刺激试验和致敏试验,兔常用于皮肤刺激试验和眼刺激试验。遗传毒理学试验多用小鼠,致癌试验常用大鼠和小鼠,致畸试验常用大鼠、小鼠和兔。迟发性神经毒性试验常用母鸡。一般认为,如以与人相同的接触方式、大致相同的剂量水平,在两个物种有毒性反应,则人有可能以相同的方式发生毒性反应。当不同物种的毒性反应有很大的差异时,必须研究外源化学物在不同物种的代谢、动力学及毒作用机制,然后才可将实验结果外推到人。

表 1-1 常用实验动物生物学和生理学参数

参数	猴	犬	猫	兔	大鼠	小鼠	豚鼠	仓鼠
成体体重(kg)	3.5	14.0	3.3	3.7	0.45	0.035	0.43	0.12
寿命(年)	16	15	14	6	3	1.5	31	
水消耗(ml/d)	450	350	320	300	35	6	145	30
饲料消耗 (成体, g/d)	150	400	100	180	10	5	12	10
成体代谢 [cal/(kg·d)]	158	80	80	110	130	600	100	250
体温(°C)	38.8	38.9	38.6	39.4	38.2	37.4	38.6	38.0
呼吸频率 (次/min)	50 (40~60)	20 (10~30)	25 (20~30)	53 (40~65)	85 (65~110)	160 (80~240)	90 (70~100)	83 (35~130)
心率(次/min)	200	100	120	200	328	600	300	450
血压(收缩/舒张, mmHg)	159/127	148/100	155/100	110/80	130/90	120/75	77/50	108/77
出生体重(g)	500~700	1100~2200	125	100	5~6	1.5	75~100	2.0
断乳时体重(g)	4400	5800	3000	100~1500	40~50	10~12	250	35
开眼(天)	出生当天	8~12	8~12	10	10~12	11	出生当天	15
妊娠(天)	168	63	63	31	21	20	67	16
性周期(天)	28	22	15~28	15~16	4~5	4~5	16~19	4
动情期(天)	1~2	7~13	9~19	30	1	1	1	1

续表

参数	猴	犬	猫	兔	大鼠	小鼠	豚鼠	仓鼠
窝数量	1	3~6	1~6	1~13	6~9	1~12	1~5	1~12
断乳年龄(周)	16~24	6	6~9	8	3~4	3	2	3~4
生殖年龄(月)	54	9	10	6-7	2~3	2	3	2
生殖期(年)	10~15	5~10	4	1~3	1	1	3	1
生殖季节	任何时间	春,秋	2~3个月, 任何时间 冬季		任何时间	任何时间	任何时间	任何时间
所需面积(ft ²)*	6	8	3	3	0.4	0.4	0.7	0.34
环境温度(°C)	18~28	18~28	18~28	18~28	19~25	19~25	19~25	19~25
血容量(ml/kg)	75	79	60	53	65	80	75	85
凝血时间(s)	90	180	120	300	60	14	60	143
HCT(%红细胞)	42	45	40	42	46	41	42	50
Hb(g/100ml)	12.5	16.0	11.8	13.6	14.8	16.0	12.4	12.0

* 1ft=30.48cm

(二) 实验动物品系的选择

品系(strain)是实验动物学的专用名词,指用计划交配的方法,获得起源于共同祖先的一群动物。

实验动物按遗传学控制分类可分为:①近交系:指全同胞兄妹或亲子之间连续交配20代以上而培育的纯品系动物。如小鼠有津白I、津白II、615、DBA/1、DBA/2、BALB/C、C3H、C57B/6J、A和A/He等。②杂交群动物(杂交1代,F1),指两个不同的近交系之间有目的进行交配,所产生的第一代动物。③封闭群:一个种群在5年以上不从外部引进新血缘,仅由同一品系的动物在固定场所随机交配繁殖的动物群。如昆明种小鼠、NIH小鼠、LACA小鼠、F344大鼠、Wistar大鼠、SD(Sprague-Dauley)大鼠等。

根据实验动物遗传的均一性排序,近交系最高、杂交群次之、封闭群较低。不同品系实验动物对外源化学物毒性反应有差别,所以毒理学研究要选择适宜的品系,对某种外源化学物毒理系列研究中应固定使用同一品系动物,以求研究结果的稳定性。

遗传毒理学一般利用啮齿类动物,主要是小鼠或大鼠。如果有合适的理由,其他物种也可接受。在致癌试验中对大鼠和小鼠常选择有关病理损害的自发发生率低的品系。

(三) 对实验动物微生物控制的选择

1. 实验动物的选择 按微生物控制分类,实验动物分为四级,见表1-2。对于毒性试验及毒理学研究应使用二级(或二级以上)的动物,以保证实验结果的可靠性。

(1)普通动物(conventional animal, CVA):是实验动物中在微生物控制上要求最低的动物。饲养在开放系统的动物室内。空气未净化,饲喂全价颗粒饲料,可饮自来水。房舍要求有防鼠和防止昆虫入内的设施。人员进入要穿工作服,专用鞋帽。

(2)悉生动物(gnotobiotic animal, GNA):又称清洁动物。饲养在屏障系统中,空气要经过净化,饲养室要保持正压,进入室内的一切物品要经过消毒灭菌,工作人员进入要洗澡和穿灭菌工作服,动物饮灭菌水。

表 1-2 实验动物微生物等级标准

等级	饲养环境	要 求
I 级 普通动物	开放系统	应没有传染给人的疾病
II 级 悉生动物	屏障系统	除 I 级标准外,种系清楚,没有该动物特有的疾病
III 级 无特定病原体动物(SPF)	屏障或隔离系统	除 II 级标准外,动物为剖腹产或子宫切除产、按纯系要求繁殖,在隔离器内或层流室内饲养,可有不致病细菌丛,没有致病病原体
IV 级 无菌动物	隔离系统	在全封闭无菌条件下饲养的纯系动物,动物体外不带有任何微生物和寄生虫(包括绝大部分病毒)

(3)无特定病原体动物(specific pathogen-free animal, SPF): 饲养在屏障或隔离系统中,是通过无菌动物、悉生动物、SPF 动物获得的。笼具、饲料饮水要经过特殊处理,并有严格的检疫、消毒、隔离制度。

(4)无菌动物(germ free animal, GFA): 此种动物在自然界中并不存在,是在隔离器中经人工剖宫产取得仔体,用无菌母体代乳或人工哺乳,经净化培育得到。

2. 实验动物设施的分类

(1)开放系统(open system): 饲养环境与外界相同,有强力通风设施、饲料、饮水和垫料要求不被污染,应防鼠和防昆虫措施。

(2)屏蔽系统(barrier system)洁净度万级: 饲养环境是密闭的。送入的空气需经过滤,洁净度达万级,饲料、饮水和垫料要需经灭菌,饲养人员进入要经过淋浴、穿无菌工作服、戴口罩、手套。

(3)隔离系统(isolation system)洁净度百级: 是以一个隔离器(isolator)为主体及其客观存在附属装置组成的饲养系统,送入的全新风要经百级以上洁净度过滤,一切物品都要经严格灭菌后经传递仓送入,饲养人员不得入内。

(四) 个体选择

实验动物对外来化学物的毒性反应还存在个体差异,应注意实验动物的个体选择。

1. 性别 同一物种、同一品系的实验动物雌雄两性通常对相同外源化学物毒性反应类似,但雌雄两性对化学物的毒性敏感性上存在着差别。一般来说,对于初次试验的受试物,应该采用两种性别。如实验中发现存在性别差异,则应将不同性别动物的实验结果分别统计分析。如果已知不同性别的动物对受试物敏感性不同,应选择敏感的性别。

2. 年龄和体重 毒理学试验选用实验动物的年龄取决于试验的类型。急性试验一般选用成年动物;慢性试验因实验周期长,应选用较年幼的或初断乳的动物,以使实验周期能覆盖成年期。实验动物的年龄应由其出生日期来定,但实际工作中常以动物的体重粗略地判断动物的年龄,作为挑选适龄动物的依据。同一试验中,组内个体间体重差异应小于 10%,各组间平均体重差异不应超过 5%。

3. 生理状态 在毒理学试验中动物如出现妊娠,则影响体重及其他指标的检测结果,并且性激素对外源化学物代谢转化有影响,故应选用未产未孕的雌性动物。雌雄动物应分笼饲养。但在某些试验如显性致死试验、致畸试验及繁殖试验等,则需有计划地合笼

交配。

4. 健康状况 实验动物的健康状态对毒理学试验结果有很大的影响,因此应选用健康动物。上述对于实验动物微生物控制的选择实际上是选择健康状况的一个重要指标,健康个体的选择还包括了其他方面。健康动物应发育正常、体形健壮、无外观畸形,被毛浓密、有光泽、顺贴而不蓬乱、行动灵活、反应敏捷、眼睛明亮有神、表皮无溃疡和结痂,天然孔道干净无分泌物等。

为确保选择健康动物,一般在实验前观察5~7天。对于大鼠和犬的亚慢性和慢性试验,可在实验前采血进行血液学和血液生化学检查,异常的动物应剔除;对犬应常规驱除肠道寄生虫。

(五) 实验动物的管理

我国实验动物的政府管理机构是在国家科技部和省(市)、自治区科技厅领导下的各行业或系统、各行政区域、各单位的实验动物管理委员会。自1988年国务院批准《实验动物管理条例》以来,发布了多项国家和地方法规,并制定了有关的国家标准,其中强制性国标为《GB14922-2001 实验动物微生物学和寄生虫学监测等级(啮齿类的兔类)》、《GB14923-2001 实验动物哺乳类动物的遗传质量控制》、《GB14924-2001 实验动物全价营养饲料》、《GB14925-2001 实验动物环境及设施》。在毒理学实验中所用的实验动物应有动物合格证、实验动物生产许可证、饲料合格证、实验动物使用许可证等。进行动物实验的人员应经培训,取得资格认可(上岗证)。

对实验动物的管理应遵循上述的法规和标准,特别注意:

1. 动物的管理 动物的健康、动物的接收、适应、饲养、鉴别和记录。对所有实验动物都须记录每只或每群动物的来源、处理以及其他有关资料。

2. 环境条件的控制 气候(温度、湿度、通风、光照),其他条件(噪音、气味、垫料、群体密度和空间限制)、饲料、饮水、运动等。

3. 设施的管理 清洁卫生、废弃物处理、害虫控制、节假日和突发事件的管理。

第五节 实验动物的准备

(一) 动物实验前的准备

实验动物在购进之后,应雌雄分开饲养。一般应进行5~7天的检疫,在此期间应多次观察动物,及时剔除不健康的动物。观察期结束,将实验动物按实验设计的要求进行标记和分组。

实验动物分组的原则要求所有的动物分配到各剂量组和对照组的机会均等,避免主观选择倾向,减少偏性,以保证结果的准确可靠。正确的分组方法是随机分组。实验动物按性别、体重顺序编号,然后利用统计学的随机数字表,按完全随机分组法或配伍组随机分组法,将实验动物分配到各剂量组和对照组。然后应计算各组实验动物体重的均值和标准差,必要时可将实验动物适当调组,以使各组实验动物体重的均值的差别不超过允许范围。

常用实验动物性别鉴别:对小鼠和大鼠,最简单的方法是看性器官与肛门的距离。雌鼠的性器官与肛门间距离极短,界限不清。成年雌鼠有明显可见的乳头。雄鼠的性器官