

高级动物实验专业技术人员 考试参考教材

Gao Ji Dongwu Shixian Zhuanye Jishu Renyuan
Kaoshi Cankao Jiaocai

陈振文 李根平 孙德明 郑振辉 主编



中国农业大学出版社

ZHONGGUONONGYEDAXUE CHUBANSHE

高级动物实验 专业技术人员考试参考教材

陈振文 李根平 孙德明 郑振辉 主编

中国农业大学出版社
· 北京 ·

内 容 提 要

本书主要介绍了动物实验的发展史、现代动物实验的特点与发展趋势、动物实验与实验动物福利的关系、动物实验替代方法、动物实验设计及有关统计学问题、动物实验中实验动物的选择与动物模型的制作、影响动物实验结果的因素、遗传工程动物技术、实验动物胚胎工程技术及新药临床前安全性评价等问题。本书是高级动物实验技术人员理论考试的参考教材,也可作为从事生命科学研究、生物制药及质量控制人员的有用的参考书。

图书在版编目(CIP)数据

高级动物实验专业技术人员考试参考教材/陈振文,李根平,孙德明,郑振辉主编.

—北京:中国农业大学出版社,2011.10

ISBN 978-7-5655-0372-6

I. ①高… II. ①陈…②李…③孙…④郑… III. ①动物实验-人员考核-教材
IV. ①Q95-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2011)第 158459 号

书 名 高级动物实验专业技术人员考试参考教材

作 者 陈振文 李根平 孙德明 郑振辉 主编

策划编辑 孙 勇 宋俊果

责任编辑 莫显红

封面设计 郑 川

责任校对 陈 莹 王晓凤

出版发行 中国农业大学出版社

社 址 北京市海淀区圆明园西路 2 号

邮政编码 100193

电 话 发行部 010-62738525,8625

读者服务部 010-62732336

编辑部 010-62732617,2618

出 版 部 010-62733440

网 址 <http://www.cau.edu.cn/caup>

e-mail cbsszs @ cau.edu.cn

经 销 新华书店

印 刷 北京市庆全新光印刷有限公司

版 次 2011 年 10 月第 1 版 2011 年 10 月第 1 次印刷

规 格 787×1 092 16 开本 13.25 印张 324 千字

定 价 45.00 元

图书如有质量问题本社发行部负责调换

编委会名单

主 编 陈振文 李根平 孙德明 郑振辉

(以下按姓氏笔画为序)

副主编 周永生 郑志红 贺争鸣 徐 平 顾为望 曾 林

编 委 王冬平 孙德明 李根平 赵太云 陈振文 周永生 郑志红
郑振辉 贺争鸣 徐 平 顾为望 曾 林

主 审 陈振文 李根平

前 言

目前,快速发展的生命科学对实验动物人员队伍提出了更高要求,强化实验动物人员队伍建设,建立实验动物人员专业化职业化培训、考核和资格认定标准体系,是我国实验动物事业持续、健康、快速发展的基础和保障。根据《实验动物管理条例》对从业人员进行技术培训和考核的要求,参考国际现代实验动物人员职业化的发展趋势以及我国现代实验动物行业专业技术人员队伍建设的实际需要,根据“国家实验动物人员培训考核体系的建立”项目所制定的《实验动物人员分类分级标准》和《实验动物人员培训考核评估办法》,我们组织专家编写了《实验动物从业人员上岗培训教材》、《初级实验动物专业技术人员考试参考教材》、《中级实验动物专业技术人员考试参考教材》、《高级实验动物专业技术人员考试参考教材》、《初级动物实验专业技术人员考试参考教材》、《中级动物实验专业技术人员考试参考教材》和《高级动物实验专业技术人员考试参考教材》。

本书为《高级动物实验专业技术人员考试参考教材》,内容的编写依据了《实验动物人员考核评估办法》中针对高级动物实验人员应知应会的有关动物实验理论知识和技能及管理要求。全书共计八章,内容首先回顾了动物实验的发展史,展现了现代动物实验的特点与发展趋势及动物实验与实验动物福利的关系。技术与管理层面深刻阐述了动物实验替代方法,动物实验设计及有关统计学问题,动物实验中实验动物的选择与动物模型的制作,影响动物实验结果的因素,遗传工程动物技术,实验动物胚胎工程技术及新药临床前安全性评价等问题。通篇贯穿了动物实验的新理论和先进技术,更注重动物实验的设计与管理。力求内容翔实、新颖和具有代表性,强化与现代的动物实验联系。既有系统的理论知识又有详细的实验操作技术。同时也关注动物实验的最新进展与发展趋势,强化了动物实验中的动物伦理与福利。

本书是在全国实验动物专家学者鼎力协助下完成的,是集体劳动的结晶。首先要感谢众多编者和幕后支持者的辛勤劳动。更要感谢国家科技部的立项支持,感谢北京市科委和北京市实验动物管理办公室的支持与鼓励。感谢荣瑞章教授、赵继勋教授、赵德明教授、仇志华教授、陈华教授、卢胜明教授对本书的内容给予的宝贵意见和精心修改。

本书是高级动物实验技术人员理论考试的参考教材。通过理论考试和实际操作考核,全面反映被考核人具备复杂动物实验操作技能,能够担任大型动物实验平台管理人员的工作能力。同时也可作为从事生命科学研究、生物制药及质量控制人员的有用的参考书。

由于编者知识、水平和能力所限,加之实验动物科学发展迅速,新知识、新技术不断涌现,虽然参编者已尽全力,但遗漏和错误在所难免,恳请同行专家和读者见谅,敬请不吝指正。

陈振文
2011.4

目 录

第一章 概论	1
第一节 动物实验的沿革	1
第二节 现代动物实验的特点与发展趋势	3
第三节 动物实验与实验动物福利的关系	5
第二章 动物实验替代方法	7
第一节 概述	7
第二节 动物实验替代方法的概念与研究内容	8
第三节 动物实验替代方法的技术研究	9
第四节 动物实验替代方法的验证、认可与应用	13
第五节 国内外动物实验替代方法的研究现状	15
第六节 动物实验与动物实验替代方法的关系	19
第三章 动物实验设计及有关统计学问题	21
第一节 概述	21
第二节 动物实验设计的基本原则	22
第三节 动物实验基本工作程序及动物实验设计的内容	28
第四节 动物实验中常用设计类型	30
第四章 动物实验中实验动物的选择	47
第一节 实验动物的选择原则	47
第二节 常见动物实验中实验动物的选择	53
第五章 影响动物实验结果的因素	61
第一节 影响动物实验结果的动物因素	61
第二节 影响动物实验结果的环境因素	65
第三节 影响动物实验结果的营养因素	69
第四节 影响动物实验结果的人为因素	71
第六章 遗传工程动物技术	74
第一节 遗传工程动物的概述	74
第二节 转基因动物技术的发展概况	77
第三节 转基因动物的原理	77
第四节 常用转基因动物的制备方法	79
第五节 转基因动物的检测	87
第六节 遗传工程动物的应用	90
第七节 转基因动物研究存在的问题	94

第七章 实验动物胚胎工程技术	97
第一节 概述	97
第二节 体外受精技术	100
第三节 胚胎、配子和卵巢冷冻保存技术	110
第四节 胚胎与卵巢的移植技术	114
第五节 性别控制技术	116
第六节 实验动物嵌合体技术	119
第七节 实验动物胚胎干细胞技术	122
第八节 实验动物的核移植技术	130
第八章 新药临床前安全性评价	136
第一节 概述	136
第二节 影响药物毒性反应的因素	146
第三节 急性毒性试验	154
第四节 长期毒性试验	166
第五节 药物特殊毒性试验	174
第六节 药物依赖性试验	181
第七节 药物刺激性、过敏性和溶血性研究	188
第八节 对生物工程产品临床前安全性试验的基本要求	195
参考文献	200

第一章 概 论

动物实验方法与动物实验技术随着科学技术的发展而不断地丰富和完善。社会经济发展和科学技术进步不仅对动物实验提出了要求和提供了发展空间,与此同时,也为动物实验技术的发展奠定了基础。如果说实验动物是科技发展的基础和支撑条件,那么动物实验则是推动科技发展的重要手段之一。

第一节 动物实验的沿革

动物实验这一研究形式的出现,从一开始就与生命现象的探索紧密相关。在人类与疾病抗争的过程中,包括探索疾病的发生机制、寻求治疗方法、研究与评价药物的有效性和安全性时,往往要依赖于各种的动物实验。可以说,生物医学的每一次重大发展与进步,都离不开动物实验。现代动物实验学已涉及人类社会、国家经济和科学技术等各个领域,在自身不断完善的基础上,发挥着其他实验技术所不可替代的独特作用。

回顾生命科学发展的全过程,可以清晰地勾画出与之同步发展的动物实验的发展轨道。

一、公元前 4 世纪至 16 世纪

活体动物解剖是这一阶段动物实验发展的显著特征。亚里士多德(Aristotle,公元前 384—公元前 322)通过解剖 50 多种动物来研究动物所有的特征,提出了以生殖方式作为分类依据的思想,并首次应用“属”(genus)和“种”(species)对动物进行分类和描述。虽然他并没有明确的创立一个分类学体系,但人们从他对动物的描述和对分类系统必要条件的探讨中,已经能粗略地勾画出一幅分类草图。他在生物学方面的著作有:《动物自然史》、《动物的组成部分》和《动物的繁殖》等。

盖伦(Galen,公元 130—公元 200)是古代最后一位伟大的医学著作家,他通过解剖猪、山羊、猴子和猿类进行解剖学的研究,其成就在他的著作《论解剖过程》和《论身体各部器官的功能》得到完整的体现。但他并不满足于此,成为以实验为基础的生理学研究的拓荒者。通过动物实验,证实心脏跳动独立于神经刺激之外、尿液是在肾脏而非膀胱中形成的现象。他的理论在十七世纪之前一直被研究者们所遵循。后来教条主义取代了科学研究,动物实验技术的发展受到严重影响,即使是对死亡的动物和人的尸体进行剖解,也都被基督教会所禁止。

二、16 世纪至 18 世纪末

16 世纪是解剖学和医学进步的转折点。现代解剖学的奠基人维萨里(Andreas Vesalius, 1514—1564)将盖伦的解剖学给予了进一步深入的研究。1540 年,他制作了一副猿的骨架,并修正了盖伦结论中的 200 多个错误。利用犬和猪进行了公开的解剖学演示教学,阐明了解剖

学与生理学的一致性。哈佛博士(William Harver, 1578—1657)利用羊和狗等动物进行心脏运动和血液循环的研究,证明了心脏运动与血液循环的关系。

在 17~18 世纪期间,诞生了一些称为“科学社团”或“研究院”的协会,定期出版的杂志和开展协会之间的交流。列文虎克(Antony van Leeuwenhoek, 1632—1723)发明了对生物学研究特别重要的显微镜,并以此详细描述了鱼、蛙、鸟、人和其他哺乳动物的红细胞,证实了毛细血管连接着动脉和静脉。显微镜的出现,开拓了人们观察事物的新视野。可以毫不夸张地说,正是有了显微镜,才开创了细胞学、组织学和微生物学等领域。

三、19 世纪至 20 世纪初

从显微镜的出现到 19 世纪中叶,随着显微镜色差和球面像差问题的解决,乃至各种显微镜和电子显微镜的出现,深刻地影响着生物学研究的发展。在胚胎发育学研究方面,贝尔(Karl Ernsel von Baer, 1792—1876)利用显微镜仔细观察了狗、兔子以及其他动物的卵,把发育过程总结为胚层理论;在鸡的胚胎中发现了脊索;提出了“生物发生律”或“相应阶段律”。贝尔于 1827 年发表的“论哺乳动物和人卵的起源”一文,成为胚胎学史上的一个里程碑。

巴斯德(Louis Pasteur, 1822—1895)对微生物进行了 20 多年的探索研究,从蚕病开始,逐步开展高等动物乃至人类疾病的研究。

19 世纪中期,达尔文(Charles Darwin, 1809—1882)通过大量的调查研究,包括一系列的动物实验,于 1859 年发表了进化理论《物种起源》,为利用动物了解人类提供了科学的依据。达尔文的进化理论不仅局限在生物科学领域,对人类思想产生的影响是其他学科所无法比拟的。

贝尔纳(Claude Bernard, 1813—1878)利用狗进行物质合成与代谢实验,发现肝脏的糖原合成功能、葡萄糖的异生作用等。这些研究导致了“内分泌”概念的产生。并根据自己的工作成果,写成了《实验医学研究导论》。这本书成为生理学史上的里程碑。

孟德尔(Gregor Mendel, 1822—1884)通过大量的实验,建立了“形状分离定律”和“自由组合定律”这两个孟德尔遗传定律。从此开始,动物实验的发展进入了突飞猛进的时代。

四、20 世纪初至今

1907 年, C. C. little 在 W. E. Casetle 指导下,培育成功世界上第一个近交系动物——DBA 小鼠。实验动物近交系育种工作为遗传学、肿瘤学、免疫学等方面的动物实验研究提供了丰富的动物模型材料。近交系动物的应用成为这一时期动物实验发展的重要标志之一。

1946 年,美国 Lobund 实验室 Reyniers 等人育成无菌大鼠,使无菌动物的基本技术和理论得以初步建立。在塑料薄膜隔离器改进的基础上,多种无菌动物培育成功,使以往难以解决的科学问题迎刃而解。

1980 年, Gordon 等首先报道了用显微镜注射纯化 DNA 的方法,获得了转基因小鼠。在此后的一年中,相继有 6 个实验室陆续报道通过向原核期的小鼠胚胎显微注射 DNA,获得转基因小鼠。随着技术的发展,基因工程动物的制备技术和动物种类不断扩充和发展。

模型动物的建立与应用是这一阶段动物实验又一显著进展。通过各种方法(如:自发突变、人工诱变和遗传工程技术等),建立起不同用途(研究用、治疗用、生产用)的多种动物模型,使动物实验进入了分子水平的崭新时代。关于遗传工程动物的制备技术和应用在本书的有关

章节中有详细的介绍,在此不再繁叙。

第二节 现代动物实验的特点与发展趋势

一、现代动物实验的特点

(一)实验动物质量标准化

动物实验结果的可靠准确有赖于实验动物质量的标准化,其中实验动物健康指标是影响动物实验结果最为主要的因素之一。发达国家实验动物科学总体水平较高,基本可以保证使用符合微生物与寄生虫控制标准的动物,在我国实施的实验动物质量标准中,取消了普通级大鼠和小鼠,在一定程度上提高了动物实验水平,进而保证动物实验结果的可靠性。随着今后实验动物管理工作的加强和实验动物科学的发展,高质量的实验动物在动物实验中的应用种类和数量将会不断地增加。

(二)动物实验环境标准化

实验动物的饲养繁育和动物实验的进行都被限定在一个特定的环境中,因此,环境因素对其生理功能、行为方式、健康状况、刺激反应等均有一定程度的影响。保证实验环境符合标准要求 and 各项参数的恒定,对获得正确可靠的实验结果非常必要。与 20 年前相比较,动物实验设施条件有了非常大的改变,所用材料、工艺设计、施工质量、运行管理等逐步达到标准化的水平,这些条件极大地保证了动物实验的顺利进行和结果的可靠性。

(三)动物实验技术规范化

除去动物因素和环境因素外,实验者对动物实验的认识理解、设计水平、操作技术的熟练程度等均不同程度地影响动物实验结果的准确性,包括:动物的选择、实验步骤、麻醉技术、实验操作、动物护理等。根据我国有关要求,所有从事动物实验的人员须经过培训,取得实验动物从业人员岗位证书后方可进行有关操作,这一管理措施有效地提高了动物实验人员的技术水平,达到规范了动物实验操作和保证实验结果可靠性的目的。

(四)动物实验管理认证与国际化

认证管理是规范动物实验工作最为有效的方法之一。我国实行许可证制度,从组织管理机构、人员、环境及设施条件、动物实验用品和规章制度等方面进行全方位的动态管理。GLP 认证是药物安全性评价中动物实验法制化管理的体现,在 GLP 条件下,充分发挥动物实验这一科学研究手段在药物安全评价中的作用。近年来,随着药物安全性评价工作的国际市场化发展,我国药品检验和评价机构积极申请国际认证,如申请国际实验动物管理评估及认证协会(The Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care International, AAALAC)的认证,以获得承担国际药品安全性评价工作的资质。目前,我国已有多家单位通过 AAALAC 认证,由此也提升了动物实验的管理水平和技术水平。

(五)仪器设备和技术方法快速更新

仪器设备的更新换代与现代动物实验的研究内容与操作技术的发展密切相关,生命科学的发展赋予动物实验新的内涵,而动物实验技术的创新又为新型仪器设备的研发与应用提供了发展空间。例如,为了解癌症等疾病的发展进程以及药物治疗所产生的反应,可借助活体动物体内成像系统进行实时连续的观察,发现疾病过程中的新信息,或发现前所未知的新致病靶

点以及药物治疗效果,与其他非侵入性观察手段相比较,具有极高的检测灵敏性和低廉的试验费用。使用该仪器并以生物发光为信号,对转基因小鼠的特定基因的表达情况进行研究,从而了解其功能。此外,芯片埋植遥测技术、热原测定仪、PET 等仪器设备的应用,以及通过免疫禽类而从蛋中提取抗体等技术的应用,都使动物实验技术水平得到意想不到的提升。同时,新型仪器设备的发明和相关技术的产生又将动物实验不断引入新的境地和发展空间,从而推动生命科学的发展。

(六)动物福利与 3Rs 原则的实施

实验动物的整个生命过程是在人为控制的条件下完成的,如果实验动物处于一个不能满足自身基本生活需要的条件下,是不可能对实验处置做出正确的反应。因此,保证实验动物生产和动物实验过程中的福利,不仅是实验动物自身的需要,也是保证动物实验结果科学、可靠的基本要求。随着国际上动物福利和 3Rs 研究的展开,我国在此方面也有了较大的进展,建立动物实验福利伦理审查委员会,强调动物福利和动物实验替代方法的应用,推动了动物实验的福利化、减少动物使用和优化实验技术的应用。

(七)各种疾病模型的应用

由于人类疾病的复杂性、研究方法的可行性和人体实验伦理的受限性等方面的原因,要深入研究人类疾病的发生机制及有效的预防控制和治疗方法都离不开各种动物模型。因此,动物模型已经成为现代医学科学深入发展不可缺少的工具和实验基础。我国历来重视动物模型的研究,包括针对一些传统疾病和新发疾病,采取各种实验技术建立了众多的动物模型,使得对疾病本质的研究以及中医药的研究起到推动作用。特别是遗传工程技术的引入,使得基因修饰动物模型研究有了飞速发展,它的应用已成为 21 世纪生命科学研究最为重要的研究手段和实验材料。

二、动物实验的发展趋势

(一)动物品种的多样化

生命科学深入研究发展要求实验动物不仅要质量保证和数量满足,更重要的是品种多样性。大型动物(羊、牛、小型猪等)、遗传工程动物、水生动物(斑马鱼等)、野生动物(东方田鼠、灰仓鼠)、两栖类、家蚕、果蝇等已进入人们的视线,并在某些领域中得以应用,显示出独特作用。充分利用我国动物资源丰富的优势,积极开展动物资源的开发及实验动物化,不仅有利于提高我国实验动物学科在国际上的地位,同时也可有效地推动我国实验动物科学的发展,为生命科学研究提供更加丰富的实验材料。

(二)动物模型制备的专业化与供应的商品化

基础理论知识的不断完善和技术的不断成熟,加之专业实验室的建立与运行,使得动物模型研制的专业化以及供应服务的商品化成为可能。一些发达国家的实验动物模型研究工作起步较早,已达到规模化、标准化和商品化供应水平。我国近年来在遗传工程小鼠的研究方面发展迅速,建立了国家遗传工程小鼠资源库,搭建起遗传工程小鼠模型的研制、表型分析、数据库等平台,建立了保存库,已经开始社会化供应。这些都极大地带动我国生命科学研究的发展和生物技术产业的形成与发展。

(三)3Rs 原则的全面实施

3Rs 原则体现了科学的动物实验技术的发展方向。通过福利伦理审查,避免无意义的重

复性实验,更加符合福利伦理的要求;应用细胞实验、免疫学实验以及低等动物和计算机模拟技术等,减少动物的使用量;优化动物实验技术,避免或减轻给动物造成的与实验目的无关的疼痛,使动物实验科学更加科学化。

(四)动物实验的内容更加丰富

动物实验在人类疾病研究、药物研发与安全性评价、化学残留分析、化妆品安全性检验、环境污染评价、军事与航天、国际贸易以及商品检验等领域得到广泛的应用。

随着医学生物学的深入发展,实验动物和动物实验的重要性愈发凸显。利用转基因动物制备生物技术药物,利用干细胞技术推动再生医学的发展,通过比较基因组学研究来分析和探讨人类疾病基因的作用等,这些研究工作的展开以及成果的取得都显示出现代动物实验技术的飞速发展和巨大的推动力。从动物模型研究看,利用转基因和基因打靶等技术来构建基因工程小鼠,在此基础上建立人类疾病模型,已成为反向遗传分析最具代表性的成果。正因为如此,有人把小鼠等模式生物的基因组操作称为实验基因组学(experimental genomics)。

(五)高质量动物的使用量增加

不同等级的实验动物因质量差异直接对动物实验结果产生影响,对此科技界已达成共识。动物质量是保证动物实验结果可靠性最基本的要素,无法想象使用遗传背景不详、微生物感染、生物学特性不清楚的动物能够得到高水平的实验结果。通过近 20 多年的努力,我国实验动物质量有了明显的提高,高质量实验动物在动物实验中的应用量不断增加。相信,随着科学发展的不断深入和实验动物科学水平的不断提高,高等级实验动物的用量将会不断增加,不仅保证利用动物实验手段进行科学研究的工作质量,也必将进一步推动实验动物科学的发展。

第三节 动物实验与实验动物福利的关系

一、动物实验是实验动物福利的重点研究领域

实验动物福利涉及实验动物繁育、饲养、运输、使用诸多方面,其中动物实验是实验动物福利所关注的热点。在动物实验中,人们往往为了操作的方便或研究的需要,对动物实验过程中需要关注的实验动物福利问题考虑甚少。只注意动物实验对实验动物的要求,而没有考虑动物实验会给实验动物福利所带来的损害。动物实验结果出现偏差时,也很少从福利的角度去分析原因。因此我们说,动物实验所涉及的福利问题是实验动物福利的重要研究内容,动物实验这一科学研究领域是实验动物福利研究的最为重要的研究领域之一。

二、实验动物福利是保证动物实验结果可靠性的基本条件之一

动物实验是在人为控制的条件下进行的,如果实验动物生存在一个不能满足自身需求的条件下是不可能对受试物做出正确的反应,因此,保证在使用中的实验动物福利,不仅是实验动物自身的需要,也是保证动物实验结果科学、可靠的基本要求,实验动物福利是直接相关和影响动物实验结果科学性和准确性的重要因素之一。

三、实验动物福利与动物实验的相互促进、协调发展

实验动物福利涉及的是善待和关爱问题,而动物实验则是如何利用的问题,但在实际工作中,两者关系密切、相互依存,互为发展的推动力。为科学发展而进行的动物实验是实验动物福利的主要研究范畴之一,动物实验的发展不断为实验动物福利研究提供新的题材,并为实验动物福利的完善与发展提供了上升空间。反之,实验动物福利的改善为动物实验的标准化提供了基础和保障,为动物实验科学和研究成果的国际认可起到了保驾护航的作用。

第二章 动物实验替代方法

第一节 概述

一、动物实验替代方法的提出

减少(Reduction)科学研究活动中的动物使用量;探索能够达到相同目的或获得相同结果的动物实验替代(Replacement)方法;采用一切可行的技术和手段,使动物免受实验所造成的痛苦、不安和疼痛或/和改善生活环境,从而提高动物生存质量的优化(Refinement)方法,是动物实验替代方法的核心内容。3Rs 是动物实验替代方法的简称。

以实验动物作为人类替身接受各种实验,避免使人因实验而引起的各种伤害是科技发展史上的一大进步。随着科学技术的迅猛发展,生命科学研究领域中实验动物使用量猛增,引起社会公众的极大关注。1954 年,动物福利大学联合会(UFAW,创建于 1926 年)Charles Hume 教授提出一项有关动物实验仁慈技术的研究计划,委托 W. M. S. Russell 教授(动物学家和心理学家)和 R. L. Burch 教授(微生物学家)开展相关研究。1959 年,他们在研究工作的基础上发表了《仁慈的实验技术原理》(The Principles of Humane Experimental Technique)一书。在这本书中,他们提供了大量的资料、许多独到的思路和见解,第一次全面系统地提出了 3Rs 概念和 3Rs 理论,可以说,他们是 3Rs 理论的布道者和倡导者,他们的著作对推动 3Rs 研究在世界范围内的广泛开展起到了非常重要的作用。

二、我国 3Rs 研究工作的起步

1996 年 10 月,我国学者参加了在荷兰乌特勒支(Utrecht)举行的第二届生命科学研究中实验动物应用与动物实验替代方法世界大会,并发表了学术论文。这是我国学者第一次出席 3Rs 方面的国际会议参加国际交流。通过这次大会,了解到国际上 3Rs 研究现状和发展趋势,认识到 3Rs 研究与科学发展之间关系以及推动其发展所具有的特殊意义,获得大量的研究资料和相关信息,并与国际上一些知名专家建立了联系。

为推动我国 3Rs 研究工作的开展,1997 年,北京实验动物学学会成立了动物实验替代方法研究会,通过学术交流与专题讲座,介绍 3Rs 概念和内涵、研究方向、替代方法的验证、国外研究机构以及 3Rs 研究成果的应用等。使科技人员对 3Rs 的研究内容 and 应用意义有所了解,有助于科技人员自觉地应用 3Rs 理论,结合自己的研究工作,逐步开展 3Rs 研究工作。

1997 年,国家科学技术部(原国家科委)等四部委联合发布的《关于“九五”期间实验动物发展的若干意见》,第一次把 3Rs 的基本概念写进实验动物工作管理和科技发展的文件,作为国际实验动物发展趋势给予了高度关注,并把“实验动物替代研究”列入“实验动物基础性研

究”的重点内容,提出予以重点资助。由此开始,3Rs 研究工作逐步纳入我国科技管理工作和科学研究工作的范畴,使 3Rs 研究作为一项前沿性的研究热点问题受到广大科技工作者的关注,启动了我国 3Rs 研究工作。

第二节 动物实验替代方法的概念与研究内容

一、概念

(一)减少

在遵循科学原则的基础上,通过合理的实验设计,使用比原方案少的实验动物获取同样多的实验数据;或使用一定数量的动物获得比原方案更多的实验数据的科学方法。

(二)替代

使用没有知觉的实验材料代替活体动物,或使用低等动物替代高等动物进行实验,并获得相同实验结果的科学方法。

(三)优化

通过改进和完善实验程序,避免、减少或减轻给动物造成的疼痛和不安,或为动物提供适宜的生活条件,以保证动物健康和康乐,保证动物实验结果可靠性和提高实验动物福利的科学方法。

二、研究内容

(一)动物实验的“减少性研究”

对一个实验来讲,动物使用量应是能达到实验目的的最小数量,绝不能以节省时间或为了操作方便以及其他不科学的原因(如动物实验支出过大)为理由,使用超过能获取有意义的实验结果所需要的最少动物数量。要达到这一目的,实验前的实验方案合理设计和实验结束后的实验数据统计学分析都是非常必要的。但也不能单纯为达到减少动物使用数量而采取违反科学原则的做法。

(二)动物实验的“替代性研究”

对于认识和评价某个特定领域的替代方法是否有应用价值,存在不同观点。①在生物医学的许多领域中,应用体外方法不仅能够获得与动物实验所提供的相同信息,而且还能提供最佳的科学途径以解决某些难题。②替代方法仅可作为动物实验研究的补充,有助于减少动物使用量和改进以后的工作,但不可能完全取代动物实验。在替代方法的应用方面还需要注意的是,在基础性研究、教学示范、医药、化学试剂和化妆品的安全检测、有害环境和危险物品的检测等领域之间毕竟存在着差距,在应用替代方法时应具体考虑。特别是在法定的检验工作中,如果非动物实验(体外试验)要作为动物实验的替代方法被采纳的话,必须经过严格的验证,并由管理部门将其写入检定规程后才能在法定检验中使用。有关这方面的内容请见第四节。

(三)动物实验的“优化性研究”

优化包括诸多内容,总体说来是一个规范化和福利化的过程。在实验动物生产管理中,保证动物笼具有足够的空间和不断改善动物设施环境条件,以满足动物正常表达各种生物学特

性;在动物实验中,由具有资格的技术人员按照规范的程序实施实验操作,实验中必要时尽可能地采用麻醉术,以减少因实验处理给动物造成的疼痛等。就生命科学发展和研究发展趋势来看,全面取代动物实验是不可能的,但是科技人员有义务、也有责任去开展动物实验技术的优化研究,减少动物因实验所承受的痛苦。

第三节 动物实验替代方法的技术研究

一、“减少”技术

(一)已有研究数据的利用

获得科学数据的来源有很多,包括数据库、科学期刊、专业书籍、专题论文集、综述性文章、专题报告、参考手册、引文索引和数据参考书等。在一些专业网站和数据库里,可以查到大量与动物实验和替代方法有关的文献资料,可以满足从事不同研究的科技人员的需要。

(二)实验数据的统计分析

运用统计学方法对动物实验数据(包括计量资料和计数资料)进行分析,可以了解动物实验结果的可信度和科学性,以确定是否需要做补充实验,实验结果是否可以被应用。如果实验结果有统计学的意义,可减少盲目性的重复实验,避免实验动物资源的浪费。

(三)替代方法的使用

应用包括离体的组织器官和组织细胞培养、化学物理方法、分子生物学方法、微生物学方法和免疫学方法以及各种先进的技术方法,可以达到减少动物使用的目的。利用体外方法代替动物实验或使用低等动物替代高等动物的实验方法,需经过严格验证后方可应用。

(四)动物的重复使用

国外把动物的重复使用看作是对动物生命的尊重(因前一次实验结束后未处死动物,延长了动物生命),但在实际操作过程中,须从法律、伦理、科学与管理等方面给予明确说明,只有这样,研究中实验动物的重复使用才被认为是合理可行的,动物的重复使用可以减少科研工作中动物的使用量。

(五)选择高质量的动物

实验动物质量直接影响实验结果,必须按照标准化要求选用遗传质量和微生物质量合格的实验动物。发生遗传污染的实验动物就更无法取得可靠的实验结果,微生物状况不仅是影响实验动物健康的重要因素,也是实验能否成功、取得的实验数据是否可靠的重要影响因素。

(六)制定标准操作规程(SOP),提高动物实验成功率

实验中每一操作步骤都对最终的实验结果产生直接的影响。因此,对任何实验来讲,制定并在实验进行中严格执行 SOP 是实验人员应给予高度重视的问题。

制定 SOP 时,在实验允许的前提下,还应对实验动物福利给予充分考虑,满足动物的各种正常生理需求,避免给动物造成疼痛、痛苦和抑郁等不良刺激,保证实验结果的准确性、科学性,提高动物实验的成功率,避免因动物实验重复而导致动物使用量的无谓增加。

(七)加强协作研究,提高动物的利用率

通过有效的组织,加强不同检测实验室或研究组之间的协作,以达到利用较少的动物获取大量数据来说明动物试验的目的。比如,在小型猪质量研究工作中,协调不同的研究组,利用

同一小型猪群体,获取不同的实验材料,以开展病毒、细菌、寄生虫和遗传的检测,避免各自采样需要大量动物的弊端。在药品安全评价试验中,这方面的事例还有很多。

二、“替代”技术

(一)体外培养技术

体外培养包括器官培养、组织培养和细胞培养。长期以来,科学家把细胞培养看做是动物实验最有希望的替代载体。用细胞替代动物进行有关实验,更容易对实验条件实施控制,减少影响因素,结果解释比较容易,使实验简单化。但值得注意的是,生命活动在一个简单系统中发生的反应并不全部与整体动物中某一组织器官的反应性相同,因而这种简单化也可能成为它的一个弱点,对此应该有足够的认识,这也是将从实验中获得的数据外推到人类的一个很大的障碍。

(二)利用低等生物

在某些情况下,使用低等生物,如细菌、真菌、昆虫、软体动物或水生动物,可以减少高等动物的使用量。如斑马鱼繁殖能力强,受精是在体外进行,受精后 24 h 内胚胎就已长出主要的组织器官,胚胎透明,便于观察其发育状况。因此,斑马鱼不仅成为发育生物学研究的重要模式动物之一,而且也愈来愈多地被用于环境污染监测和药物安全性评价。酵母已被广泛用做特异性基因的表达载体。如果这个特异性基因是抗体片段或疫苗抗原的编码,通过这种分子生物学技术可以替代常规抗体制备和疫苗生产的方法,减少动物的使用量。

(三)单克隆抗体(McAb)的研究

McAb 不仅解决了多克隆抗体非特异性的问题,而且显著地减少了为获得足够量的抗体需要免疫大量的动物。但随之而来的问题是,在 McAb 制备时仍需要一定数量的动物,特别是小鼠。目前,多数欧洲国家(如荷兰、瑞典、英国)已经发布了有关 McAb 生产指南,规定除极个别情况外,限制使用动物进行 McAb 的生产。为解决这一问题,目前已有多种体外技术可被利用。例如,培养杂交瘤细胞的体外发酵系统和中空纤维系统。通过体外系统的改进,现已大批量生产 McAb。如何提高产量和 McAb 的效价,则是科学家进一步研究的课题。

(四)生物物理或生物化学替代方法的研究

利用一些物理和化学的方法作为替代性方法来替代动物实验,在生物医学研究中已有应用,在菌苗生产过程中,应用亲和层析技术检测毒素和类毒素,这种方法不仅特异性好、快速,而且可以定性定量。由于整个系统为程序控制,使得重复性好。它与小鼠中和实验的结果相关性非常显著。

(五)数学模型和计算机模拟

通过对化合物结构与它们可能具有的生物学活性两者之间关系的研究,利用计算机定向设计出新的化合物,或有目的地寻找那些最能与作用受体互补的结构基团,大大缩短新药研制开发的周期。利用这一知识,还可以预知许多新型化合物的生物学活性,包括它们的毒性,或通过研究使它们的分子结构发生微小变化而改变药物的作用效果,减少盲目进行大量化合物筛选的动物实验,从而大大减少实验动物的使用量。

科学家根据许多生命活动过程可以用数学公式来表达这一原理,利用计算机建立起许多生理生化、病理和毒理过程的数学模型,如以生理学为基础的药代数学模型,根据有机体的各