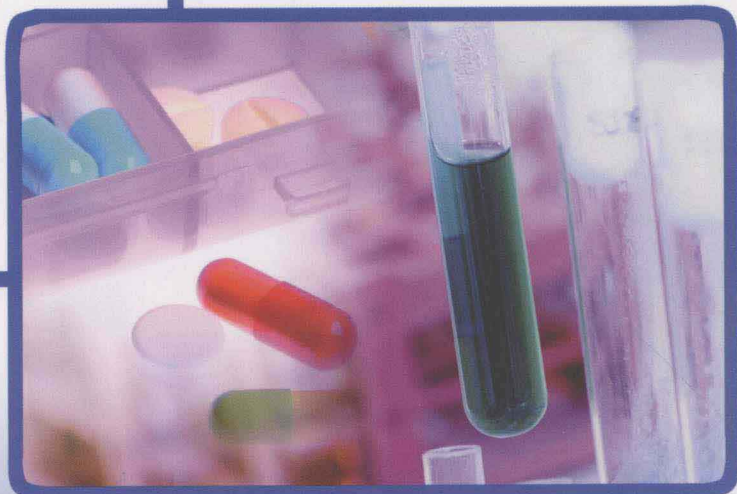


全国高等院校医学实验教学规划教材

药理学实验教程

闵 清 主编



科学出版社

全国高等医药院校药学专业规划教材

药理学实验教程

· 第二版 ·



人民卫生出版社

全国高等院校医学实验教学规划教材

药理学实验教程

主 编 闵 清

副主编 蔡 飞 余 薇

编 委 (以姓氏汉语拼音排序)

蔡 飞 郭 霜 李炎坤 刘 丽

闵 清 邱春玉 任 平 宋 伟

汪新亮 王 诗 吴 丹 余 薇

张又枝 张志鹏

科 学 出 版 社

北 京

· 版权所有 侵权必究 ·

举报电话:010-64030229;010-64034315;13501151303(打假办)

内 容 简 介

本教程由湖北科技学院药理学教研室根据药理学教学大纲和实际教学需要组织编写,介绍了常用动物实验的基本知识和技能、常用药理学实验仪器的使用方法,然后结合教学进程,选择的实验内容经典、实用,做到既与理论课有密切联系,又有实验课的独特体系;既有整体动物(包括清醒动物和麻醉动物)实验,又有器官水平实验;既有验证性实验,又有设计性实验,还有综合性实验。通过本书的学习,可以使学生初步具备对客观事物进行观察、比较、分析、综合和解决问题的能力,并验证、巩固和加深理解基本理论,从而初步掌握药理学实验的基本方法。

本书适用于临床医学、药学、口腔医学、影像学、护理等专业的本专科学学生使用。

图书在版编目(CIP)数据

药理学实验教程 / 闵清主编. —北京:科学出版社,2013.3

全国高等院校医学实验教学规划教材

ISBN 978-7-03-036846-1

I. 药… II. 闵… III. 药理学-实验-高等学校-教材 IV. R965

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2013)第 039615 号

责任编辑:王 颖 / 责任校对:张林红

责任印制:肖 兴 / 封面设计:范璧合

版权所有,违者必究。未经本社许可,数字图书馆不得使用

科学出版社 出版

北京东黄城根北街 16 号

邮政编码:100717

<http://www.sciencep.com>

北京市文林印务有限公司印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2013 年 3 月第 一 版 开本:787×1092 1/16

2013 年 3 月第一次印刷 印张:7 1/4

字数:167 000

定价:19.80 元

(如有印装质量问题,我社负责调换)

前 言

药理学是研究药物与机体间相互作用的一门实验性科学,是基础医学与临床医学之间、医学和药学之间的桥梁学科;药理学的学科任务是要为阐明药物作用机制、改善药物质量、提高药物疗效、开发新药、发现药物新用途并为探索细胞生理、生化及病理过程提供实验资料。药理学的方法是实验性的,即在严格控制的条件下观察药物对机体或其组成部分的作用规律并分析其客观作用原理。药理学实验是药理学教学内容的重要组成部分。

药理学是医学生必修的一门专业基础课,也是药学专业学生的一门重要的专业课。为了培养学生科学思考能力,理论联系实际和解决实际问题的能力,以及提高学生动手能力,湖北科技学院药理学教研室根据药理学教学大纲和实际教学需要,特编写了《药理学实验教程》。本教程介绍了常用动物实验的基本知识和技能、常用药理学实验仪器的使用方法,然后结合教学进程,选择的实验内容经典、实用,做到既与理论课有密切联系,又有实验课的独特体系;既有整体动物(包括清醒动物和麻醉动物)实验,又有器官水平实验;既有验证性实验,又有综合性实验,还有设计性实验。通过本书的学习,可以使学生初步具备对客观事物进行观察、比较、分析、综合和解决问题的能力,并验证、巩固和加深理解基本理论,从而初步掌握药理学实验的基本方法。此外,本教程既编写了《药理学》的经典、综合以及设计性实验,同时也融入了《临床药理学》的部分实验和《生物药剂学与药物动力学》部分实验内容,既方便学生又经济实用。本教程适用于临床医学、药学、口腔医学、影像学、护理等专业的本专科学学生使用。

在编写教材过程中参考了兄弟院校的某些实验内容,谨表谢意。由于编者水平有限,教材内容难免有疏漏和不妥之处,敬请谅解。在使用过程中我们会不断总结经验,进一步修正和完善教材内容。

闵 清
2013年1月

目 录

第一章 药理学实验概述	(1)
第二章 药理学实验动物操作基本技术	(12)
第三章 药理学实验	(25)
实验一 不同因素对药物作用的影响	(25)
实验二 药动学参数的测定	(27)
实验三 药物血浆半衰期的测定	(33)
实验四 药效学参数的测定	(35)
实验五 有机磷酸酯类中毒及解救	(40)
实验六 传出神经系统药物对麻醉家兔血压的影响	(41)
实验七 传出神经系统药物对离体肠平滑肌的作用	(42)
实验八 N_2 受体阻断药对骨骼肌的松弛作用	(44)
实验九 局部麻醉药对神经传导作用的影响	(44)
实验十 烟碱的毒性作用	(46)
实验十一 巴比妥类药物的抗惊厥作用	(47)
实验十二 氯丙嗪的镇静、镇吐与降温作用	(48)
实验十三 药物的镇痛作用	(50)
实验十四 吗啡急性中毒所致呼吸抑制的解救	(52)
实验十五 利多卡因的抗心律失常作用	(53)
实验十六 普萘洛尔对肾上腺素所致心动过速的治疗作用	(55)
实验十七 维拉帕米对心肌缺血再灌注损伤大鼠的影响	(56)
实验十八 尼莫地平对脑缺血再灌注损伤大鼠的影响	(57)
实验十九 强心苷对家兔心衰的治疗作用及其毒性反应	(58)
实验二十 药物的促凝和抗凝作用	(60)
实验二十一 药物的抗缺氧作用	(61)
实验二十二 呋塞米对麻醉家兔的利尿作用	(62)
实验二十三 药物对小白鼠小肠蠕动的的影响	(64)
实验二十四 可待因的镇咳作用	(65)
实验二十五 药物对家兔的祛痰作用	(66)
实验二十六 氢化可的松对急性炎症的影响	(67)
实验二十七 缩宫素对离体子宫平滑肌的兴奋作用	(68)
实验二十八 药物对糖尿病大鼠的降糖作用	(69)
实验二十九 链霉素中毒及其解救	(70)

实验三十 安慰剂的药理效应	(72)
实验三十一 磺胺噻唑钠的组织分布测定	(73)
实验三十二 药物的小肠吸收实验	(75)
实验三十三 对乙酰氨基酚片溶出实验	(79)
实验三十四 磺胺嘧啶尿液浓度测定	(82)
实验三十五 黄芪对慢性酒精中毒小鼠行为学的影响	(83)
实验三十六 丹参酮对小鼠急性肝损伤的影响	(84)
附录一 常用药理学实验仪器的使用方法	(86)
附录二 体表面积算法及药物剂量换算法	(98)
附录三 常用实验室液体的配制	(101)
附录四 随机数字表	(109)

第一章 药理学实验概述

一、药理学实验的目的

药理学实验课目的在于通过实验使学生掌握药理学实验的基本方法,了解获得药理学知识的科学途径,验证药理学中的重要理论,更牢固地掌握药理学的基本概念和基本知识。

药理学实验课更高层次的目的是在于培养学生的能力,实验课是培养学生发现问题、分析问题和解决问题的重要课程。几乎所有药理学知识都是通过实验——有目的的科学实验而得到的。我们上实验课,就是要了解我们的前辈科学家们是怎样提出问题、分析问题并最终设计出科学的实验来验证或解决问题。也就是说,我们上实验课的目的是教会学生一种方法,一种科学的方法,一种获取知识的新手段。能否通过实验课培养学生的发现问题、分析问题和解决问题的能力,是我们实验课成败的关键,对学生来说,能否通过实验课培养自己严肃认真和实事求是的科学态度,使自己具有初步的科研能力,是医学生能否成才的关键问题。

二、药理学实验的要求

为达到上述目的,在实验课上学生必须做到下列几项:

1. 实验前

- (1) 仔细阅读实验指导,了解实验目的、要求、方法和操作步骤,领会其设计原理。
- (2) 对实验中所用的药物,要了解其药理作用,并明白该药在本实验中的意义,预测给动物用药后可能出现的情况。
- (3) 结合实验内容,复习有关药理学和生理学等方面的理论知识。

2. 实验时

- (1) 将实验器材妥善安排,正确装置。
- (2) 严格按照实验指导上的步骤进行操作,准确计算药量,防止出现意外差错。
- (3) 认真、细致地观察实验过程中出现的现象,准确记录药物反应的出现时间、表现及发展进程。联系课堂讲授内容进行思考。
- (4) 注意节约实验材料。

3. 实验后

- (1) 及时整理实验结果,保存好原始记录,并写出实验报告。
- (2) 清洁实验器材,保持室内卫生,存活或死亡的动物分送至指定地点。

三、实验结果的整理和实验报告的撰写

整理实验结果和撰写实验报告,是培养学生观察能力和分析综合能力的重要方法,对自己所完成的实验进行科学总结,是实验课的最重要的目的之一。通过认真地、科学地总结,可使我们把实验过程中获得的感性认识提高到理性认识,明确该实验已证明的问题及

已取得的成果。实验中尚未解决的问题或发现的新问题,以及实验设计中或操作中的优缺点等,这些十分重要。实验报告反映了学生的实验水平及理论水平。实验报告也是向他人提供研究经验及供本人日后查阅的重要资料,可以为毕业后开展科研工作打下良好的基础。因此,应该充分认识到在校学习期间掌握这一项科学研究工作中关键性工序的重要性。

(一) 实验结果的整理

实验结束以后应对原始记录进行整理和分析。药理实验结果有测量资料(如血压值、心率数、瞳孔大小、体温变化、生化测定数据和作用时间等);计数资料(如阳性反应或阴性反应、死亡或存活数等),描记曲线,心电图,脑电图,照片和现象记录等。凡属测量资料和计数资料,均应以恰当的单位 and 准确的数值作定量的表示,不能笼统提示。必要时应作统计处理,以保证结论有较大的可靠性,尽可能将有关数据列成表格或绘制统计图,使主要结果有重点地表达出来,以便阅读、比较和分析。作表格时,要设计出最能反映动物变化的记录表,记录单个动物的表现时,一般将观察项目列在表内左侧,由上而下逐项填写,而将实验中出现的变化,按照时间顺序,由左至右逐格填写。

将多个或多组动物实验结果统计时,一般将动物分组的组别列于表左侧,而将观察记录逐项列于表右。绘图时,应在纵轴和横轴上画出数值刻度,标明单位。一般以纵轴表示反应强度,横轴表示时间或药物剂量,并在图的下方注明实验条件。如果不是连续性变化,也可用柱形图表示。凡有曲线记录的实验,应及时在曲线图上标注说明,包括实验题目,实验动物的种类、性别、体重、给药量和其他实验条件等。对较长的曲线记录,可选取有典型变化的段落,剪下后粘贴保存。这里需要注意的是必须以绝对客观的态度来进行裁剪工作,不论预期内的结果或预期外的结果,均应一律留样。

(二) 实验报告的写作

每次实验后应写好报告,交负责教师批阅。实验报告要求结构完整、条理分明、用词规范、详略得宜、措辞注意科学性和逻辑性。一般包括下列内容:

1. 实验题目 实验题目一般应包括实验药物、实验动物、实验主要内容等。如“心得安对麻醉犬的降压作用分析”,“普鲁卡因肌注对小鼠局麻作用及中毒抢救”,“奎尼丁抗电诱发的蛙心心律失常的作用”等。

2. 实验目的 说明本次实验的目的,实验的意义所在,要做什么。

3. 实验材料 实验材料包括三个方面。

(1) 实验动物:写出本次实验所用动物种类、性别、体重、数量。

(2) 实验药品:列出本次试验所用药品、试剂的名称、浓度、剂量。

(3) 实验器材:写出本次实验所用主要使用仪器,手术器材、玻璃器材可不写。

4. 实验方法 要详细、步骤清晰,使别人能看懂、能重复。如果实验方法临时有所变动,或者发生操作技术方面的问题,影响观察的可靠性时,应作详细说明。

5. 实验结果 实验结果可用文字,也可用表格或图示多种方法表示,是实验报告中重要的部分。需绝对保证其真实性。应随时将实验中观察到的现象在草稿本上记录,实验告一段落后立即进行整理,不可单凭记忆或搁置了长时间后再作整理,否则易致遗漏或差错。实验报告上一般只列经过归纳、整理的结果。但原始记录应予保存备查。

6. 讨论 讨论应针对实验中所观察到的现象与结果,联系课堂讲授的理论知识,进行

分析和讨论。不能离开实验结果空谈理论。要判断实验结果是否为预期的。如果属于非预期的,则应该分析其可能原因。讨论的描述一般是:首先描述在实验中所观察到的现象,然后对此现象提出自己的看法或推论,最后参照教科书和文献资料对出现这些现象的机制进行分析,如实验观察到用药后动物出现了什么现象,提示了该药可能具有什么药理作用,文献曾报道该药可对什么受体有作用。因此,可初步推测该药的这种药理作用可能与其作用于什么受体有关。

7. 结论 用简短的一两句话,总结实验是否达到预期的目的,实验观察药物作用的结果有无预期的药理作用。实验结论是从实验结果归纳出来的概括性判断,也就是对本实验所能说明的问题、验证的概念或理论的简要总结。不必再在结论中重述具体结果。未获证据的理论分析不能写入结论。

四、药理学实验的设计

(一) 药理学实验设计的基本要素

科研立题后,从题目中通常可反映出研究内容的三个要素:处理因素、受试对象、实验效应,如表 1-1。

1. 处理因素 处理因素(study factor)是指对实验对象施加的某种外部干预。处理因素可以是物理因素,如电刺激、温度、射线、外伤、手术等;可以是化学因素,如药物、毒物、营养物、缺氧等;也可以是生物因素,如细菌、病毒、真菌等。处理实验对象的目的有两个,一是复制人类疾病的动物模型,观察其发病机制;二是进行实验治疗,观察药物或其他治疗手段的疗效。

表 1-1 药理学实验设计的三个要素		
处理因素	受试对象	实验效应
缩宫素	小鼠	子宫平滑肌活动的影响
新斯的明	大鼠	离体肠管的作用
阿托品	家兔	瞳孔调节的影响

(1) 确定主要处理因素:根据所提出假设的目的和可能性,实验主要处理因素可确定为单因素或多因素。一次实验的处理因素不宜过多,否则会分组过多,受试对象增多,实验时难以控制。而处理因素过少又难以提高实验广度、深度和效率。

(2) 确定因素的强度:处理因素的强度是因素的量的大小,如电刺激强度、药物剂量等。处理的强度适当,同一因素有时可以设置几个不同的强度,如一种药设几个剂量(处理因素的水平也不要过多)。

(3) 处理因素的标准化:处理因素在整个实验过程中应保持不变,否则会影响实验结果的评价。例如,电刺激的强度(电压或电流、持续时间、频率等),药物的质量(来源、纯度、生产厂家、批号、配制方法等)应一致。

(4) 重视非处理因素:非处理因素(干扰因素)可能会影响实验结果,应加以控制,如动物的年龄、性别、饲养环境,离体实验时的恒温或灌流条件等。

2. 受试对象 受试对象(study subjects)包括动物和人。

(1) 实验动物:随着科学技术的发展,无损伤技术、遥控技术和微量技术等现代化检测技术使某些实验直接在人体上进行的可能性越来越大,但基于人道和安全等原因,往往用动物作为实验对象。

1) 动物实验的道德责任:①凡使用实验动物的实验室应配备相应的专职或兼职技术人员负责实验动物的管理工作。工作人员应接受专业培训,自觉遵守实验动物管理的各项制

度,熟悉、掌握操作规程。②为了增进实验动物的敏感性、准确性和实验结果的可重复性,医学实验必须使用合格动物并使之逐步达到标准化。拒绝已经死亡或患传染病的动物进实验室。③应当在麻醉下进行动物外科手术操作,严禁在不使用麻醉剂下使用肌肉松弛剂进行实验。④必须爱护实验动物,不得戏弄或虐待。对处死后的动物或动物的器官组织应按照实验室规定做适当处理,不可随便乱抛乱弃。

2) 选择动物复制人类疾病模型的要点:①根据实验的要求,动物的生物学特征要接近人类而又经济易得。②动物的种属及其生理、生化特点适合于复制稳定可靠的疾病模型,如家兔适合于做发热模型,而不宜做休克模型;犬不宜做发热模型,而适合做休克模型。③动物的品系和等级能符合研究要求,一般以用纯系动物为好。④动物的健康和营养状况良好。⑤动物的年龄、体重、性别等尽可能一致,以减少个体差异。

3) 动物特征:实验动物是供研究使用的,有明确生物学特征、遗传和微生物背景清楚的实验动物。

a. 微生物背景:分为Ⅰ级动物(普通动物)、Ⅱ级动物(清洁动物)、Ⅲ级动物(无特异性动物)、Ⅳ级动物(无菌动物)。

b. 遗传背景:有近交系动物(纯种动物)、突变系动物和系统杂交动物。

c. 饲料控制:包括营养素要求、合理加工和无发霉变质等。

d. 设备标准化:如饲养环境的温度、湿度、空气清洁度和噪音控制等。

4) 实验动物的选择

a. 小鼠:繁殖力强,价廉,易于饲养,广泛用于需要大量动物的实验。如药物筛选实验、急性毒性实验;镇痛、抗感染、抗肿瘤、避孕实验;生物制品和遗传性疾病研究等。

b. 大鼠:在医学研究中,用量仅次于小鼠,如心血管系统、神经系统、内分泌系统及长期毒性实验、致畸实验;免疫学、关节炎实验、肿瘤学研究等。

c. 蛙:用于神经肌肉系统和心血管系统实验等。

d. 豚鼠:用于过敏、抗感染实验等。

e. 兔:用于心血管实验、离体耳实验、发热实验、生殖生理研究等。

f. 猫:用于神经系统实验、呕吐实验等。

g. 猪:用于烧伤实验、肿瘤实验、心血管系统实验、泌尿系统实验等。

h. 犬:用于神经系统、心血管系统、消化系统和毒性实验及外科实验等。

i. 非人灵长类:本类动物具有许多与人类相似的生物学特征,科研广泛应用的是猕猴属的猴,用于避孕实验、镇痛药耐受性、传染病及心血管疾病研究等。

同一药物对不同动物的同一器官系统的效应可以不同,如吗啡对人、猴、犬、兔的中枢神经系统产生抑制效应,而对虎、猫、小鼠的中枢神经系统则引起兴奋。

(2) 人:人体实验,是以人体为对象,采取实验手段,有效地对人体进行观察和研究的行为过程。人体实验是医学发展到实验医学后遇到的新课题,常常涉及道德和法律问题。1946年,《赫尔辛基宣言》问世,规定了人体实验的道德原则。主要有以下四条:

1) 医学目的的原则:医学的目的在于防病治,全心全意为人民健康服务人体实验使医学知识建立在科学的基础之上,对于医学的发展和人类的健康有重要意义。人体实验的目的必须与医学的目的相一致,通过人体实验研究疾病发生的原因和发病机制,提高预防和诊疗技术水平,从而更好地为人类的健康利益服务,任何以医学科研为名而进行的离开医学目的的人体实验,都是不道德的,是不允许的。要保证人体实验的严肃性和科学性,实验

前要进行论证,并经过上级有关部门批准后才能实施。

2) 维护受试者利益原则:人体实验必须以维护受试者利益为前提和出发点,其内容包括:①实验前要反复权衡利弊,充分估计实验中可能发生的问题和困难并制定有关措施。必须先经过动物实验获取无危害的符合科学的良好效果后再做人体实验,不能只顾医学科研而牺牲患者的根本利益。②在实验过程中要有充分的安全措施,以保证受试者身心受到的不良影响减少到最低限度;实验中一旦出现严重意外要立即终止实验。③实验必须具有相当学术水平的医学科研工作者和丰富经验的实验室人员共同参与或在其指导、监督下进行。

3) 知情同意原则:知情同意原则,包括知情和同意两个方面。受试者及其家属在实验前有权了解实验的目的、方法、预期好处和潜在危险,在知情以后表示同意接受人体实验并履行承诺手续,才能实施人体实验。受试者随时都有权撤销其承诺。任何采取欺骗性、强迫性或半强迫性手段而实施的人体实验,或利用经济诱惑而取得“同意”的做法,都是违背医学科研道德的,因此是应当绝对禁止的。

4) 实验对照原理:为保证实验结果的客观性,人体实验必须正确设置对照组,并注意对照组和实验组的齐同性和可比性,一般采用随机化分组的方法。实验对照组的操作方法主要是安慰剂和双盲剂,二者相互关联,必须严格限制在不损害受试者利益的范围之内。

3. 实验效应 实验效应(experimental effect)是反映实验对象在经过处理前后发生生理或病理变化的客观指标。其与实验方法有密切关系。

(1) 实验方法:按性质可将实验方法分为功能学、生物化学和形态学方法等;按学科可分为生理学方法、生物化学方法、毒理学和免疫学方法等;按范围可分为整体方法(应用清醒动物、麻醉动物、病理模型动物的方法)和局部分析法;按水平可分为整体、器官、细胞、亚细胞、分子等;按时间可分为急性、慢性实验,前者又分为在体和离体实验。

(2) 实验指标:实验指标(检测指标)是指在实验中用于反映研究对象中某些可被检测或研究者感知的特征或现象。实验指标选择的基本条件如下:

1) 特异性:指标应能特异性地反映某一特定的现象而不至于与其他现象相混淆。如研究心律失常和心肌缺血应用心电图做指标。研究心功能不全,以室内压变化和心输出量作为指标比用心电图做指标好。特异性低的指标容易造成“假阳性”。

2) 客观性:应避免受主观因素干扰造成误差。尽可能选用具体数字或图形表示客观指标,如心电图、脑电图、血压、心率、室内压、血液生化指标等。而用疼痛、饥饿、疲倦、全身不适、咳嗽等症状和研究者目测等主观指标则较差。

3) 灵敏度:指处理因素引起某种变化的灵敏程度,灵敏高的指标能使微小效应显示出来。灵敏度低的指标可使本应出现的变化不出现,造成“假阴性”。

4) 精确度:精确度包括精密度和准确度。精密度指重复观察时观察值与其均值的接近程度,其差值属随机误差。准确度指观察值与其真实值的接近程度,主要受系统误差的影响。实验指标要求既精密又准确。

5) 重现性:指在相同条件下所测指标的结果可以重现。重现性高的指标一般意味着误差小,能较真实地反映实际情况。为提高重现性,需注意仪器的稳定性,减少操作误差,控制实验动物的机能状态和实验条件。

6) 可行性:指研究者的技术水平和实验室的设备条件能够完成本实验指标测定。

7) 认可性:指现成指标必须有文献依据,自己创立的指标必须经过专门的实验鉴定,方

被认可。

实验资料可以分为计量资料(graded response, 量反应)和计数资料(all-or-none response, 质反应)。有连续量变的资料为计量资料(measurement data), 如血压、尿量、检验值、收缩力、身高、体重、体温等。计量实验效率较高, 实验要求的例数可较少, 其统计主要为均数和标准差, 常用 t 检验或 F 检验。

只有出现与否(全或无, 阳性或阴性)的资料为计数资料(enumeration data), 如有效或无效、死与活等, 其实验效率较低, 要求的例数较多, 其统计描述主要为率, 统计检验主要为 χ^2 检验。另一为等级资料, 如病理改变的程度—、+、++、+++、++++ (“—”为正常, “++++”为病变最严重); 也有人把药物的疗效分为—(无效)、+(显效)、++(有效)、+++ (治愈), 等级资料一般可归入计数资料。计数资料的“数”也是一种量表达, 计数资料不意味着是定性研究的资料。

(二) 药理学实验设计的基本原则

实验设计三大原则是对照、随机、重复。这些原则是为了避免和减少实验误差并及取得实验可靠结论所必须和始终遵循的。

1. 对照原则 要比较就要有对照(control), 以确定处理因素对实验指标的影响, 如无对照就不可能说明问题。实验分组可分为处理组和对照组。对照原则要求处理组和对照组除处理因素以外, 其他可能影响实验的因素应力求一致。对有自然痊愈倾向的疾病研究尤其要有对照, 心理因素影响药物疗效时也必须要有对照。对照形式有:

(1) 空白对照: 空白对照指不对受试对象做任何处理。严格地说, 这种对照组与处理组缺乏“齐同”, 如处理因素是给药, 除用药外, 有给药操作如注射的差异, 因此, 这种对照通常少用。

(2) 假处理对照: 经过同样的麻醉、注射甚至进行假手术, 但不用药或不进行关键的处理。假处理所用的液体 pH、渗透压、溶媒等均与处理组相同, 因而可比性好。在做药物实验时, 常将动物做成一定的病理模型, 然后才用药, 不用药的做模型组, 这对于评价药物的作用是必需的。

(3) 安慰剂对照: 安慰剂是一种在形状、颜色、气味等方面均与药物相同而不含主药的制剂。安慰剂通过心理因素对患者产生“药效”, 对某些疾病如头痛、神经官能症等可以产生 30%~50% 的疗效。安慰剂也可产生“不良反应”, 如嗜睡、乏力、头晕等。在新药研究中, 应尽量采用双盲法, 即患者及医务人员均不能分辨治疗药品和对照品(安慰剂), 以确定其真实疗效。安慰剂在新药临床研究双盲对照中极为重要, 可用以排除假阳性疗效或假阳性不良反应。研究者应掌握用药组和安慰剂对照组的患者, 必要时采用适当措施, 以保证患者的安全。

(4) 历史对照: 用以往的研究结果或文献资料作为对照。在进行癌症、狂犬病等难治性疾病的疗效研究时可采用此法。如某病以往治愈率为 0, 则现用新药有 2 例治愈, 可认为是一种好药。但一般疾病不应使用此法, 因为不同时代的医疗水平和病情等不同, 干扰因素又不易控制。

(5) 自身对照: 对照与处理在同一受试对象中进行, 如以给药前的血压值作为对照。这种对照简单易行, 但它不是随机分配的, 如实验前后某些因素发生改变会影响结果, 这就难以得到正确的结论。故在实验中常仍需单独设立对照组, 通常分别比较处理组和对照组前后效应的差异。

(6) 标准对照:用现有的标准方法或用同类典型的药物作为对照,其目的是比较标准方法或典型药物与现用方法(或现用药物)。

(7) 相互对照:指各处理因素间互为对照,如几种药物治疗某种疾病时,观察几种药物的疗效,各给药组间互为对照。

以上(1)~(5)属于阴性对照,(6)属于阳性对照。并非每项实验均需上述所有对照,而视具体情况决定。

2. 随机原则 随机(randomization)是使每个实验对象在接受分组处理时均具有平等的机会。随机化有两个作用,一是尽量使抽取的样本能够代表总体,减少抽样误差;二是使各组样本的条件尽量一致,消除或减小组间人为的误差,从而使处理因素产生的效应更加客观,以便得出正确的实验结论。随机的类型和方法很多,现简要介绍几种常用的随机方法。

(1) 完全随机设计:完全随机设计(completely random design)是把实验动物完全随机地分配到处理组及对照组中去。仅涉及一个处理因素,又称单因素设计。可分为两组或两组以上,各组例数可相等,也可不相等。本法设计和处理简单易行,但只能处理一个因素,效率较低。实施方法有抽签法及随机数字表法。

例1 将雌兔 16 只分为 2 组,2 组动物数相同。编上动物号(按体重由小到大)。从随机数字表中取第 7 行 1~16 列数字。先以随机数字奇数编为 A 组,偶数编为 B 组。得 A 组 9 只,B 组 7 只。因需要将 A 组 1 只调入 B 组,再取以上随机数字后的一个数字(76)除以 9 (即 9 只兔子有均等归入 B 组的机会)的余数 4,故将 A 组的第 4 只归入 B 组(表 1-2)。

表 1-2 完全随机设计

兔号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
随机数字	84	42	17	53	31	57	24	55	06	88	77	04	74	47	67	21
组别	B	B	A	A	A	A	B	A	B	B	A	B	B	A	A	A
组别调整						B										

如将动物分为 3 组,过程相似,其中将随机数字被 3 除,余数为 1、2、0 者分别归入 A、B、C 组。

完全随机设计的数据分析,可接单因素方法(F 检验)。如只有两组,可用成组比较 t 检验。质反应数据常用 χ^2 检验法。

(2) 配对设计:配对设计先将受试对象按相似条件配对,再随机分配每对受试对象到两个组中。在动物实验中常将同窝、同性别、相近体重的动物配对。本设计与配伍设计能提高统计效率。

例2 将 12 对动物进行配对设计(表 1-3)。取第 20 行前 12 个随机数字,数字为奇数者将配对组第一个动物分入 A 组,偶数分入 B 组(配对设计资料的分析用配对 t 检验法)。

表 1-3 动物配对设计

动物对数	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
随机数字	31	16	93	32	43	50	27	89	87	19	20	15
配对组第一个动物组别	A	B	A	B	A	B	A	A	A	A	B	A
配对组第二个动物组别	B	A	B	A	B	A	B	B	B	B	A	B

(3) 配伍设计:配伍设计(随机区组设计)是配对设计的扩大,每一配伍组的动物数在 3 只或 3 只以上。各配伍组的例数为组数。本设计涉及两个处理因素,又称双因素设计。

例 3 将已分成 5 组的 20 只动物随机分配到 A、B、C、D 四个组。取随机数字,每取 3 个数字留一个空位,第一个配伍组中 3 个数字依次用 4、3、2 除之,余数分别为 1(A)、1(B,即剩下的 B、C、D 之第一位)、0(D、C、D 的第二位)、第四个只能为 C,其他配伍组类推。进而整理出各配伍组的动物编号(表 1-4,表 1-5)。

表 1-4 动物配伍设计

动物编号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
随机数字	61	58	22	—	04	02	99	—	99	78	78	—	83	82	43	—	67	16	38	—
除数	4	3	2	—	4	3	2	—	4	3	2	—	4	3	2	—	4	3	2	—
余数	1	1	0	—	0	2	1	—	3	0	0	—	3	1	1	—	3	1	0	—
组别	A	B	D	C	D	B	A	C	C	D	B	A	C	A	B	D	C	A	D	B

表 1-5 配伍组

配伍组	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	配伍组	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)
A 组	1	7	12	14	18	C 组	4	8	9	13	17
B 组	2	6	11	15	20	D 组	3	5	10	16	19

配伍设计的数据可用双因素方差分析。

A	B	C	D
B	A	D	C
C	D	B	A
D	C	A	B

图 1-1 拉丁方设计

(4) 拉丁方设计:拉丁方设计涉及三个因素,又称三因素设计。本设计被安排在一个 $n \times n$ 拉丁方阵中,如 4×4 拉丁方(图 1-1)。

从左图可见,每行或每列均有 A、B、C、D 四种处理,比配伍设计更均衡,故这种设计误差更小,效率更高,特别适用于立体标本,可以消除标本间和用药次数间的干扰,准确比较药效。在实际应用时使用优化拉丁方则更佳,如 4×4 优化拉丁方(表 1-6)。

在上表中,每种药物受前其他药物影响各一次,每一种药物又影响之后其他药物各一次,即抵消了各药间的相互影响。在统计计算时不必计算各药的后遗作用。

拉丁方设计的数据可用三因素方差分析。

(5) 正交设计:要分析的处理因素较多时可用正交设计,以提高实验效率及节省试验次数,例如做一个 4 因素各因素有 3 个水平的全面试验需要 $3^4 \sim 81$ 次,单应用正交设计仅需作 9 次。正交设计是利用一套正交表,将各个处理因素与每个水平之间各组合均匀配搭,是一种高效和快速的多因素试验设计方法。正交设计一般记为 $L_9(3^4)$ 、 $L_8(2^7)$ 等, L 表示正交, L 的右下标表示试验次数,括号内的数字表示水平数,右上角的数字表示因素数,如 $L_8(2^7)$ 表示做 8 次试验,每个因素有 2 个水平,可以安排 7 个因素。正交设计特别适于优化工艺方法、实验条件及多种药物配比等情况。如有 4 种药物(因素),每种药物有 3 个剂量(水平),可用 $L_9(3^4)$ (表 1-7)。

表 1-6 4×4 优化拉丁方

标本号	1	2	3	4
用 1	A	B	C	D
药 2	B	D	A	C
顺 3	C	A	D	B
序 4	D	C	B	A

在表 1-7 中,各药计量以 1(低剂量)、2(中剂量)、3(高剂量)表示,第一次试验表示 4 种药均用低剂量混合,第五次试验表示 A、B 药均用中剂量,C 药用高剂量,D 药用低剂量。经各次试验后,用效果最好的(可用某些指标和定量计分)。判断某次试验的药物配比最佳处方。

3. 重复原则 重复(replication)是指可靠的实验应能在相同条件下可重复出来(重现性),这就要求实验要有一定的例数(重复数)。因此,重复的含义包括重现性与重复数。

重现性可用统计学中显著性检验的值来衡量其是否满意。

$P \leq 0.05$:差异在统计学上有显著意义,不可重现的概率小于或等于 5%,重现性好。 $P \leq 0.01$:差异在统计学上有非常显著意义,不可重现的概率小于或等于 1%,重现性非常好。

在动物实验中,每组应选用的动物数见表 1-8。

表 1-8 动物实验中选用动物数

动物	计量资料	计数资料
小动物(小鼠、大鼠、蛙)	≥ 10	≥ 30
中等动物(豚鼠、兔)	≥ 8	≥ 20
大动物(猫、猴、犬)	≥ 6	≥ 10

注:药物分为 3~5 个剂量组时也可少些例数

表 1-7 正交设计示例

药物	A	B	C	D
1	1	1	1	1
2	1	2	2	2
3	1	3	3	3
4	2	1	2	3
5	2	2	3	1
6	2	3	1	2
7	3	1	3	2
8	3	2	1	3
9	3	3	2	1

重复性(实验例数)应适当,过少不行,过多也不必要。实验例数与许多因素有关。一般而言,在生物个体差异较小、处理因素强度较大、实验技术(仪器等)较先进、计量资料、组间例数相同、高效实验设计(如拉丁方设计、正交设计)及大动物可选用较少的例数。反之,要较多的例数。

另外,实验设计还要注意均衡原则,实验组与对照组除了处理因素不同外,非处理因素基本一致者称为均衡。均衡是处理因素具有可比性的基础,研究可采用各种设计方案,控制干扰因素趋于一致。主要在以下几方面:

- (1) 动物:要在品系、体重、年龄、性别、饲养和饲养方式等方面一致。
- (2) 仪器:要在仪器种类、型号、灵敏度、精确度、零点漂移、电压稳定性、操作步骤和熟练程度等方面一致。
- (3) 药物:要使药物厂商、批号、纯度、剂型、剂量、注射容量和速度、酸碱度、温度,给药途径和顺序等方面保持一致。
- (4) 环境:要使实验室温度、气压、湿度、季节乃至时间等条件保持一致。

(三) 药理实验设计中的剂量问题

1. 安全剂量的探索 首先用小白鼠做急性毒性实验,求出最大耐受量(或 LD_1)。然后按等效剂量的直接折算法计算出实验中所用动物的最大耐受量;取其 1/3~1/5 作为较安全的试用量。

2. 剂量递增方案 对于非致死性毒性反应较明显的药物,可先采用较小的剂量(例如 LD_1 的 1/50)做预试,以策安全。试用后如未出现药效,也无任何不良反应,可将药物剂量递增。每次增幅由 100%递减至 30%,直至出现明显药效或产生明显不良反应。具体方案见表 1-9:

表 1-9 剂量递增表
The Increasing of dosage

实验次数(Experiment NO.)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
剂量倍数(Dosage Times)	1	2	3.3	5	7	9	12	16	21	28	38	50

3. 不同种属动物间的剂量换算 对于文献中有在其他种属动物使用剂量的药物,可通过剂量换算过渡到实验需用动物上来。以往常用的标准动物的等效剂量折算系数法,简便适用,但不宜用于体重不标准的动物(表 1-10)。

表 1-10 不同种属标准体重动物整体(只)剂量折算倍数 K
Times(K) of Dosage Conversion Between Various Standard Weight Animals

动物种属 Animal sorts	小鼠 mouse	大鼠 rat	豚鼠 cavy	兔 rabbit	猫 cat	猴 monkey	犬 dog	人 human
小鼠 mouse(20g)	1	7.0	12.25	27.8	29.7	64.0	124	388
大鼠 rat(200g)	0.14	1	1.74	3.9	4.2	9.2	17.8	56.0
豚鼠 cavy(400g)	0.08	0.57	1	2.25	2.4	5.2	9.2	31.5
兔 rabbit(1.5kg)	0.04	0.25	0.44	1	1.08	2.4	4.5	14.2
猫 cat(2.0kg)	0.03	0.23	0.41	0.92	1	2.2	4.1	13.0
猴 monkey(4.0kg)	0.016	0.11	0.19	0.42	0.45	1	1.9	6.1
犬 dog(12kg)	0.008	0.06	0.10	0.22	0.23	0.52	1	3.1
人 human(70kg)	0.0025	0.018	0.031	0.07	0.078	0.16	0.32	1

整体动物剂量(dosage of a whole animal): $D_B=D_A\times K_B/K_A$

现介绍一种对任何体重动物都适用的“等效剂量直接折算法”:后面的表列出了不同动物的公斤体重剂量折算的有关系数和标准体重整体剂量折算倍数,供计算时使用(表 1-11)。

表 1-11 不同种属动物单位体重(kg)剂量折算系数

动物种属	小鼠	大鼠	豚鼠	兔	猫	猴	犬	人
剂量折算系数 K	1	0.71	0.62	0.37	0.30	0.32	0.21	0.11
动物体型系数 R	0.059	0.09	0.099	0.093	0.082	0.111	0.104	0.1
标准体重(kg)	0.02	0.2	0.4	1.5	2	4	12	70

标准体重动物: $DB=D_A\times K_B/K_A$

非标准体重动物: $DB=D_A\times R_B/R_A\times (W_A/W_B)^{1/3}$

(四) 实验设计的方法与步骤

进行药理学实验设计应包括以下步骤:

1. 查阅文献 确定选题和提出立题依据。选题时一定要注意所选课题应具有科学性、创新性和可行性,特别应是创新性和可行性的辩证统一。

(1) 科学性:是指选题应建立在前人的科学理论和实验研究基础之上,应符合科学规律,而不是毫无根据的胡思乱想。