

黑龙江省中医研究院资助项目

医学动物实验基础 及基本技术方法

YIXUEDONGWUSHIYANJICHU
JIJIBENJISHUFANGFA

■吴秉纯 编著

黑龙江人民出版社

黑龙江省中医研究院资助项目

医学动物实验基础 及基本技术方法

吴秉纯 编著

黑龙江人民出版社

内容摘要

全书分七章31节,第一章动物实验基本知识(1~5节),重点介绍实验动物、动物实验含义及其动物实验重要性;按微生物学和遗传学控制原理分类;常见实验动物与医学有关的主要生物学特性,解剖生理特点及其应用。第二章动物实验基本技术方法(1~11节),主要介绍了动物抓取固定、给药途径、血液采集方法等11种技术方法。第三章动物实验设计原则方法(1~4节),重点介绍动物实验基本原则、方法;人类疾病动物模型复制目的意义、分类原则要求,建立动物模型尤其中医“病”、“证”动物模型思路方法,并指出动物模型复制方法有关文献。第四章影响动物实验结果的因素及其控制(1~3节),重点从其环境因素、动物因素及实验技术环境因素三个方面,分别介绍了影响动物实验结果的因素及其如何控制。第五章常用实验动物的生物学数据(1~3节),介绍了常用实验动物主要繁殖参数;生理数据参考值,不同周龄小鼠、大鼠体重和身长;大鼠、犬血液学,血液生化学主要指标及重要脏器系数检测参考值;饲料、饮水要求量;心电图正常值(分别见表1~表8);动物实验常用符号;动物实验常用有关资料(人和动物按体表面积折算的等效剂量比率表、生物统计用t值表等)。第六章数据处理与统计分析(1~5节)介绍统计分析前提;数据收集整理,计数与计量资料统计分析,重点介绍了金正钧《实用计算器统计方法》。第七章动物实验论文撰写,主要介绍论文格式;结构或摘要要素;正文内容;正文中图表、数字、单位和量等。本书适用性强,除了介绍动物实验的受试对象实验动物的有关基本知识外,重点介绍动物实验设计原则、方法;影响动物实验结果因素;并以理论

与实例相结合介绍了动物实验统计分析及其论文撰写。本书适用于医学专业研究生从事的动物实验参考用书,以及对从事医药学、中医学等亦具有较高的参考价值。

序 言

随着现代医学科学技术水平的迅速发展,运用现代药理学、毒理学、临床医学等科学方法,研究中药的作用以及作用机理,探讨临床疗效的理论基础,极大地促进了中医药的发展,然而现代的医学实验方法与实验动物学基础理论和技术方法息息相关。回顾生物医学史,不难看出,生物医学许多重大的发展与进步,几乎也都与动物实验密切相连,已经成为生物医学的主要手段。动物实验方法的采用及发展,大大推动了生物医学发展,解决了许多以往不能解决的实际问题和重大理论问题,动物实验广泛应用于生物医学等各个领域。实验动物学在医学科学研究中占有重要地位,其发展和应用程度被作为衡量生物医学发展水平的重要标志。

医学动物实验作为黑龙江省中医研究院攻读医学(中医、中药、针灸、中西医结合专业)研究生必修课,由我院德高望重的吴秉纯研究员担任。吴老,1961年毕业于沈阳药学院,同年9月分配到我院(原黑龙江省祖国医药研究所)工作至今;毕业参加工作后,除两年参加“西学中班”系统学习中医药外,四十多年来一直从事中药药理、毒理学专业研究工作。在继承和发扬中医药优势和特色基础上,采用实验药理学方法、技术研究了一批防治常见、多发病中药新药,并积极倡导中医治则并选择刺五加等补气方药进行扶正固本治则研究,从“双向调节”作用这一学术理念阐明了中药扶正固本治则实质。吴老在长期工作中,积累了丰富经验,尤其是以实验动物为对象的中药药理实验研究,加之多年参加国家药品审评、科技进步奖评审及医学研究生学位论文答辩等,发现了动物实

验方法和技术还存在这样或那样问题, 准确掌握和熟悉动物实验授课重点和未来的发展方向。为此, 吴秉纯研究员结合动物实验研究和实际工作需要, 参考和汲取了涉及实验动物学、动物实验技术、实验设计、数据处理、统计分析及论文撰写等多方面专著、资料, 编写了专为我院攻读医学专业研究生授课用《医学动物实验基础及基本技术方法》讲义, 经多年教学实践, 受到在读和已毕业从事动物实验研究生好评与欢迎, 本书公开出版, 既可作为攻读医学研究生的动物实验课教材, 又可作为从事动物实验工作者的参考书。一册在手, 将对读者裨益良多。

黑龙江省中医研究院院长

博士生导师 **王学军**

2007年11月

前 言

本书作者结合多年研究生医学实验动物学教学和实践经验总结而成,目前尚未见专供医学尤其中医药学研究生用的医学动物实验教材或参考书。为此,编者参考了有关实验动物学等专著,结合实际工作需要,编写了《医学动物实验基础及基本技术方法》讲义,供给本院研究生讲授用。

笔者多年参加本院及黑龙江中医药大学等单位硕士/博士研究生课题开题或学位论文答辩会,看到了大多数医学硕士学位论文(包括中医药专业)是以实验动物为对象进行的动物实验研究。目前医学院校大学本科阶段,大多数未系统的学习过实验动物学或接触动物实验很少,因而在其硕士学位论文中出现了这样或那样的问题、缺点和不足,究其原因,主要还是缺少动物实验相关知识及其基本的技术方法,往往直接影响实验研究结果判断的准确性。基于此笔者萌生编写并公开出版一本主要供攻读医学硕士动物实验教材及供从事相关专业人员的学习参考书。

本书编写指导思想:注重实用性、学用结合、理论联系实际、突出重点、以如何提高动物实验结果的准确性、可靠性和合理性为主要目的,以实际工作需要为主要编写内容,在掌握动物实验基本知识及其技术方法基础上,重点突出动物实验设计原则方法(第三章);影响动物实验结果因素及如何控制(第四章);为了获得准确可靠结果,得出科学结论,重点介绍如何正确处理动物实验数据及其新的统计分析方法;尤其主要介绍了如何撰写规范化的动物实

验论文。

编者主要从事中药药理学研究和新药开发等工作,有关动物实验基本知识及其技术方法主要参考了施新猷《现代医学实验动物学》、孙敬芳《动物实验方法学》及苗明三《实验动物和动物实验技术》等,这些专著内容丰富、图文并茂、涉及领域较广,是进行生物医学研究重要参考工具书。为了编写一本供医学研究生适用的动物实验教材或参考书。笔者总结 40 余年从事以实验动物为对象的中药实验药理实践经验或教训,以及多年参加国家药品审评、中医药课题立项、科技进步奖评审,尤其医学研究生学位论文答辩等发现的问题和关键技术难点,加之动物实验之实际工作需要,参考或汲取了涉及实验动物学、动物实验及其实验设计、数据处理、统计分析、论文撰写等多方面专著、资料,编写了这本专为医学研究生授课用的《医学动物实验基础及其技术方法》讲义,经几年教学实践,受到在读尤其已毕业从事动物实验的同学欢迎和好评:“适用性强,学以致用,一书在手,多方应用;从动物实验设计到论文撰写,大多数从本书内容可以查到,尤其以实例及通俗语言来说明其理论”等,同学们反馈的信息,使我备受鼓舞,为了发挥垂暮之年余热,萌发拟将此书公开出版,愿此书既可作为攻读医学硕士学位研究生教材,也可用于医学尤其中医药研究工作者实用型参考书。

由于笔者水平能力有限,缺点和错误在所难免,敬请读者和专家对本书提出批评指正,最后诚挚感谢本书参考或引用专著文献的作者。

编者 吴秉纯

2007 年 11 月

目 录

第一章 动物实验基本知识	1
第一节 实验动物含义及动物实验重要性	1
第二节 实验动物分类	6
第三节 主要实验动物的品种品系	14
第四节 常用实验动物主要生物学特性、 解剖生理特点及其应用	20
第五节 实验动物疾病及饲料营养	35
第二章 动物实验基本技术方法	39
第一节 动物的抓取与固定	39
第二节 动物雌雄鉴别	40
第三节 动物的编号、标记及去毛方法	41
第四节 动物的给药途径与方法	42
第五节 动物血液的采集方法	48
第六节 动物的安乐死方法	52
第七节 动物体液的采集方法	55
第八节 动物发情、交配、妊娠等检查方法	56
第九节 动物去势方法	57

第十节 动物的麻醉方法	57
第十一节 动物组织学标本选取及固定	59
第三章 动物实验设计原则方法	61
第一节 动物实验设计的基本原则	61
第二节 动物实验设计方法	72
第三节 正交实验设计	76
第四节 人类疾病动物模型复制	95
第四章 影响动物实验结果的因素及其控制	107
第一节 影响动物实验结果的环境因素	107
第二节 影响动物实验结果的动物因素	112
第三节 影响动物实验结果的主要实验技术环节因素	115
第五章 常用实验动物的主要生物学数据及常用符号	128
第一节 常用实验动物主要生物学数据	128
第二节 动物实验常用有关资料	134
第三节 动物实验常用符号	135
第六章 动物实验数据处理及其统计分析	137
第一节 统计分析前提	137
第二节 动物实验数据收集整理	139
第三节 动物实验数据的统计分析	143
第四节 计数资料统计分析的显著性检验	146
第五节 计量资料统计分析的显著性检验	149
第七章 动物实验论文撰写	157
附 录	180

附录 1 常用生理溶液的成分和配制	180
附录 2 常用非挥发性麻醉药的剂量	181
附录 3 药物的量和浓度	183
附录 4 人和动物间按体表面积折算的等效剂量比率表	184
附录 5 不同种动物的剂量折算的各种系数	185
附录 6 t 值表	186
附录 7 X^2 值表	187
附录 8 F 界值表	188
附录 9 常用正交表	190
附录 10 实验动物环境指标(GB/T 14925 - 94)	191
附录 11 药品研究实验记录暂行规定	192
附录 12 实验动物管理条例	196
参考文献	201

第一章 动物实验基本知识

第一节 实验动物含义及动物实验重要性

一、动物实验及实验动物

(一) 动物实验

是指以实验动物为实验对象(或称受试对象,或称实验材料),采用人为处理因素,观察处理因素对实验动物的效应或作用。

(二) 实验动物定义

实验动物是指经人工培育,对其携带微生物实行控制,遗传背景明确、来源清楚,可用于科学研究、药品生物制品生产、检定以及其他科学实验的动物。

(三) 实验动物特点

1. 遗传学上要求,必须经人工培育,遗传背景明确、来源清楚,实验动物的含义应是遗传限定动物。

2. 对其携带的微生物、寄生虫实行人工控制,所有实验动物都是在人工严格监控之下繁育的。

3. 从应用角度看,所有的实验动物,主要应用目的都是为了科学实验。实验动物总是作为人类的替身进行多种实验,是最精密的仪器也无法替代的。

(四) 实验动物与实验用动物区别

实验用动物是指一切用于科学实验的动物,包括野生动物、经济动物(家畜、禽)、观赏动物和实验动物。实验动物和实验用动物尽管都起源于野生动物,但两者的概念却不尽相同。前者从遗传学、微生物学、营养和环境生态学对实验动物进行严格控制,后者没有严格的人工控制,有较大个体差异和群体差异,后者很难有可比性、可重复性,也就说不上科学性。

二、动物实验重要性

(一) 动物实验在生物医学中的地位及重要条件

动物实验是生物医学乃至整个生命科学的基础,是现代医学研究的主要手段。现代医学各领域中许多最重要的进步都是以动物实验研究与探索为基础的,许多医学新知识的获得,医疗新方法的应用都得益于动物实验,探索人类疾病发病机制、寻求治疗途径往往要借助动物实验等等。通过动物实验,人类在生物医学方面取得了许多巨大成就。一句话,生物医学每一次重大发展与进步,几乎都与动物实验息息相关。

动物实验的受试对象是实验动物,是现代生物医学研究的重要支撑条件,被称为“活的试剂”、“活的精密仪器”,有着不可替代的作用,实验动物科学亦被称之为生命科学之基础,因而受到世界科学家和各国政府的重视,其发展和应用程度被作为衡量一个国家一个部门,特别是生物医学发展水平的重要标志。可见实验动物在科学研究中占有的重要地位。

(二) 动物实验的优越性及在生物医学发展中的重要作用

1. 动物实验优越性

(1) 在人体不便进行的研究,可在动物体上进行,如高盐饮食对高血压的影响,在人身上进行,会加重高血压病。

(2) 平时不易遇到的疾病,应用动物实验,可以随时进行,如断

手再植、冻伤、休克、放射病等。

(3) 动物实验容易做到严格控制实验条件和严密对照。

(4) 动物实验方法,符合多快好省原则,可缩短研究年限,如在自然条件下潜伏期或病程长的疾病(如肿瘤、肺气肿等),采用动物实验,可大大缩短其潜伏期或病程。

2. 动物实验在生物医学发展中的重要作用

回顾生物医学史,不难看出,生物医学许多重大的发现均和动物实验密切相关。动物实验方法的采用及发展,大大推动了医学科学的发展,解决了许多以往不能解决的实际问题和重大理论问题。

(1) 动物实验,成功复制了多种重要人类疾病的动物模型,如高血压、肿瘤、休克等。

(2) 动物实验,发现了化学致癌质和致癌病毒,证明了微生物在传染病的作用。

(3) 临床医学的许多重大技术的创造和发展也与动物实验息息相关,如低温麻醉、器官或组织的移植、体外循环等。

看来,动物实验重要作用,正如巴甫洛夫所说:“没有对活动物进行的实验和观察,人们就无法认识有机界的各种规律。”

(三) 动物实验在生物医学等各个领域中的应用

1. 生物医学

(1) 探讨危害人类健康的各种人类疾病的发生,防治与治愈机制及其从生理、病理、生化免疫等方面探讨其机制,以了解人类疾病及其各种生命现象的本质。

(2) 利用实验动物复制(建立)人类疾病动物模型,有助于人们更深刻地认识人类疾病的发生、发展规律和采取有效的防治措施。

2. 药物研究方面应用

(1) 药理学研究:以实验动物为受试对象,采用实验药理学(正常动物,整体和离体)及实验治疗学方法(复制动物模型),进行药

物药效学,一般药理学及药代动力学(药物在机体内的吸收、分布、代谢及排泄过程)研究,以及药物不良反应观察,以阐明药物与机体相互作用的基本规律和原理(包括生理、生化、病理过程)。

动物实验更用于:在中医理论指导下,用现代科学技术研究中药与机体相互作用和作用机制的研究。

(2)动物实验还应用于中药新药的药理毒理研究包括主要药效、一般药理学、药代动力学及毒理学研究(急性毒性、长期毒性及特殊毒性试验等),对新药有效性及其安全性评价提供科学依据。

(3)化学药品临床前毒理学(急性毒性、长期毒性)及临床前药代动力学研究。

(4)动物实验还用于生物制品安全性与有效性评价、鉴定。如以地鼠制备乙脑及狂犬疫苗,以猴肾制备小儿麻痹症疫苗,以免生产各种免疫血清等。

(5)生命科学中各专业科研、教学都必须进行解剖、胚胎、生理、病理、生化及各种疾病观察,都需要应用实验动物。

3. 其他方面

(1)轻工业:保健食品的安全性毒理学及功能学评价需要做动物试验,其他如食品添加剂、新化妆品等要用实验动物进行安全性试验。

(2)农牧业:以动物实验进行化肥、农药,尤其是合成的新农药的安全性评价。

(3)国防和军事:各种武器杀伤效果、化学辐射、细菌,激光武器的效果和防护,以及在宇宙、航天科学试验中,实验动物都作为人类的替身而取得有价值的科学数据。因此,实验动物在军事医学研究中,具有特殊应用价值。

(4)环保、地震监测等方面:对整个环境保护(如光辐射的、气体的、声干扰等);进出口动植物特殊商品的安全性鉴定,也要用动物实验,动物较人类对地震的感受性强,可利用其地震前的各种行

学的改变与其他地震前的仪器监测共同来预报地震的发生。

三、国家对实验动物工作重视

我国实验动物学的发展起步较晚,新中国成立以后,尤其是十一届三中全会以后,由于政府的重视和实验动物工作者的能力,我国实验动物科学有了较快发展。

1982年国务院责成国家科委主持召开了全国第一次实验动物科技会议;1987年成立了中国实验动物学会;1988年经国务院批准,国家科委颁布了《实验动物管理条例》,这是我国第一部实验动物与动物实验方面的统一行政法规,使我国实验动物管理工作开始走上法制轨道。

各省、自治区和有关部委,结合本地区和行业实际情况,制定并发布了实验动物管理条例或实施细则,如1989年卫生部制定并颁布了《医学实验动物管理实施细则》,它有力地推动了我国医学实验动物科技工作的发展,使我国医学实验动物质量和动物实验水平有了明显提高。

1994年国家技术监督局发布了“实验动物微生物学和寄生虫学监测等级”、“实验动物的遗传质量控制”、“实验动物全价营养饲料”及“实验动物环境及设施”等7个国家标准,表明我国实验动物的法规体系已经形成,从而使我国的实验动物工作走上了科学化、标准化的法制轨道,对推动我国实验动物的科技发展起了重要推动作用。实验动物学科学发展进度较快,使用动物的质量不断提高,品系不断增加,特殊疾病动物模型开始走向商品化(由市场供应)。

第二节 实验动物分类

一、一般生物学分类

1. 本分类法以生物的外部性状、内部构造、生物方式、生物的发生和彼此间的血缘关系等作为分类依据；生物可分为两个界：即动物界和植物界。界以下分门……现以家犬为例，说明其分类系统如下：

脊椎动物门

哺乳纲

真兽亚纲

食肉目

肢脚亚目

犬科

犬属

种

2. 常用的哺乳类实验动物的分类位置

以哺乳类实验动物为目的实验动物：

啮齿目：大鼠、小鼠、豚鼠、地鼠、沙鼠；

兔形目：兔、鼠兔；

食肉目：犬、猫；

灵长目：猕猴、黑猩猩。

还有实验用的动物偶蹄目：猪、羊等，在中药新药毒理学研究上，要求应用两种动物，啮齿类常用大鼠，非啮齿类常用食肉目犬或灵长目猴等，实际上啮齿类应称啮齿目。

3. 关于动物品种与品系的含义

(1) 品种：即按上述一般生物分类法，将动物划分为品种（生物分类法上称种，有的书上称种属）如鼠、犬、猫、猴、猪等。不同品种