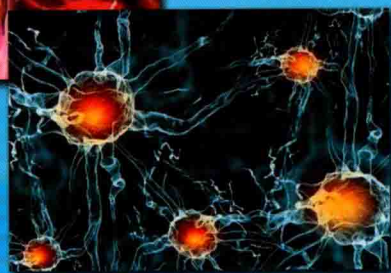
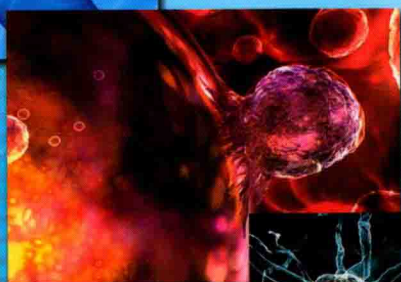
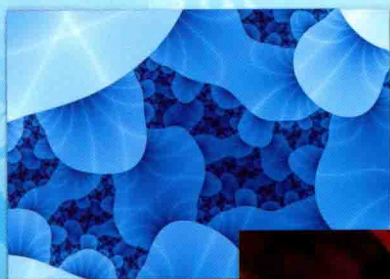




中国科学院教材建设专家委员会规划教材
全国高等院校医学实验教学规划教材

毒理学综合实验教程

主编 张爱华 蒋义国



科学出版社

中国科学院教材建设专家委员会规划教材
全国高等院校医学实验教学规划教材

毒理学综合实验教程

主 编 张爱华 蒋义国
副主编 郑金平 刘起展 徐德祥
编 委 (按姓氏笔画排序)

马 璐 (贵州医科大学)
王 军 (南京医科大学)
王春华 (蚌埠医学院)
卢国栋 (广西医科大学)
刘起展 (南京医科大学)
农清清 (广西医科大学)
李煌元 (福建医科大学)
何淑雅 (南华大学)
邹志辉 (广东药科大学)
张 荣 (河北医科大学)
张艳淑 (华北理工大学)
张增利 (苏州大学)
林忠宁 (厦门大学)
赵秀兰 (山东大学)
洪 峰 (贵州医科大学)
徐德祥 (安徽医科大学)
蒋义国 (广州医科大学)

秘 书 王大朋 (贵州医学大学)

王 华 (安徽医科大学)
王 莹 (锦州医科大学)
仇玉兰 (山西医科大学)
刘振中 (川北医学院)
刘晋宇 (吉林大学)
苏 莉 (兰州大学)
杨 萍 (广州医科大学)
余日安 (广东药科大学)
张 巧 (郑州大学)
张青碧 (西南医科大学)
张爱华 (贵州医科大学)
范广勤 (南昌大学)
郑金平 (山西医科大学)
段燕英 (中南大学)
姚茂琳 (贵州医科大学)
唐焕文 (广东医科大学)
裴秋玲 (山西医科大学)
潘雪莉 (贵州医科大学)

科 学 出 版 社

北 京

内 容 简 介

本教材是理论教材《毒理学基础》(案例版,第2版)的配套实验教材。本教材改变过去以实验方法介绍为主、实验技术与研究应用分割的编撰模式,突出以问题为导向,课题为主线,将案例、课题设计和实验技术有机结合,促进学生理论知识与实验技能应用的融会贯通,提高学生知识运用能力、分析和解决问题的能力。教材内容包括18个综合设计型实验,其中涉及13个经典毒理学实验研究与技术,如毒理学实验的基础知识与综合技能、毒物代谢动力学研究与实验技术、一般毒性和特殊毒性(遗传毒性、致癌作用、生殖发育毒性)及七个靶器官或系统的毒理学研究与实验技术;此外,本教材紧扣现代毒理学发展及社会需求实际,编撰了5个拓展创新型综合实验,如纳米材料损害作用研究与实验技术、毒理学替代法的应用与实验技术、表观遗传毒性研究与实验技术、毒理学与公共卫生安全和管理实例分析。

本教材可供预防医学、药学、卫生检验、卫生管理、基础与临床医学等专业本科生、研究生使用,也可供其他相关专业人员参考使用或作为科研入门的参考书。

图书在版编目(CIP)数据

毒理学综合实验教程 / 张爱华, 蒋义国主编. —北京: 科学出版社, 2017.1

中国科学院教材建设专家委员会规划教材·全国高等院校医学实验教学规划教材

ISBN 978-7-03-048545-8

I. ①毒… II. ①张… ②蒋… III. ①毒理学-实验-医学院校-教材 IV. ①R99-33

中国版本图书馆CIP数据核字(2016)第123288号

责任编辑: 朱 华 / 责任校对: 邹慧卿

责任印制: 赵 博 / 封面设计: 陈 敬

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>

三河市骏志印刷有限公司 印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2017年1月第一版 开本: 787×1092 1/16

2017年1月第一次印刷 印张: 16

字数: 430 000

定价: 49.80元

(如有印装质量问题, 我社负责调换)

前 言

毒理学 (toxicology) 是研究外源有害因素 (包括化学、物理、生物等因素) 对生物系统毒性作用及其机制的基础学科, 也是研究环境与健康以及安全性评价和风险评估的重要应用学科。毒理学已受到世界各国政府、企业、学术界的普遍重视, 其理论、方法和技术在解决人群健康问题、保护环境与生态等方面发挥着重要且不可替代的作用。

《毒理学综合实验教程》顺应教育部关于深化医学教育的总体要求, 力求达到培养具有创新思维的实用型人才目标, 以适应经济社会发展的需要。本实验教材紧密结合现代毒理学发展实际, 以外源有害因素对生物体的损害作用及其机制研究、安全性评价和风险评估等经典实验和相关标准为基础, 将“案例”“课题设计”和“实验技术”有机结合, 努力提高学生的动手能力和操作技巧, 锻炼学生知识运用能力、分析问题和解决问题的能力。本教材可供预防医学、药学、卫生检验、卫生管理、基础与临床医学等专业本科生、研究生使用, 也可供其他相关专业人员参考使用或作为科研入门的参考书。

本教材注重体现“学生为主体, 教师为主导, 融知识传授、能力培养、素质教育为一体”的教育理念, 突出特点为以问题为导向、课题为主线, 进行综合设计、拓展创新等实验教学探索。通过国内外典型案例的导引和课题设计方式启发学生的创新思维, 激发学生的学习兴趣, 加深学生对理论知识和实验内容的理解, 促进理论知识与实验技能应用的融会贯通, 从而达到提升学生学习能力、实践能力、创新能力和综合分析能力的目的。

本教材以《毒理学基础》(案例版, 第 1 版) 第三部分毒理学综合实验为基础, 围绕《毒理学基础》(案例版, 第 2 版) 主体内容进行了大幅度扩增并单独成册, 配套设 18 个综合设计型实验。其中包括毒理学实验的基础知识和综合技能、毒物代谢动力学研究及其技术、一般毒性研究及其技术、遗传毒性研究及其技术、致癌作用研究及其技术、生殖发育毒性研究及其技术, 以及 7 个靶器官或系统 (肝脏、肾脏、呼吸、神经、免疫、血液和皮肤) 的毒理学研究及其技术; 鉴于纳米材料、电离辐射对人类健康和环境、生态的危害日渐增多, 特编写了纳米材料损害作用研究和电离辐射损害作用研究及其常用技术; 基于表观遗传学在外源有害因素的致病机制研究中作用日益突出和毒理学替代法在安全性评价和风险评估中的重要作用, 编写了表观遗传学研究和毒理学替代法的应用与实验技术; 为促进毒理学理论和实验技术在公共卫生安全与管理中的应用, 编写了毒理学与公共卫生安全和管理实例分析。此外, 每个实验后还列出 3~5 个综合思考题, 以培养和提高学生的自主学习能力和综合分析能力。

本教材在科学出版社的大力支持下, 在国内 24 所医学院校、35 名专家教授的努力下完成。在此, 对各位专家为本教材编写付出的辛勤劳动和贡献表示崇高的敬意和衷心的感谢! 鉴于学术水平有限, 加之首次编写案例版毒理学综合实验教程经验欠缺, 书中不足之处在所难免, 竭诚希望广大师生和同仁不吝指正, 以便再版时修改完善。

张爱华 蒋义国

2016 年 6 月

目 录

实验一 毒理学实验的基础知识与综合技能	1
一、案例与问题	1
二、毒理学实验概述	1
三、毒理学实验规范与职业道德	3
四、毒理学实验设计要求	4
五、实验动物管理与实验者自身防护	6
六、动物实验流程与基本操作技术	7
七、思考题	13
实验二 毒物代谢动力学研究与实验技术	14
一、教学目的与意义	14
二、背景资料	14
三、案例与问题	14
四、课题设计与实验指导	15
课题名称：对硫磷与甲基对硫磷代谢动力学实验	15
五、毒物代谢动力学试验主要方法与技术	21
【题目】甲基对硫磷的代谢转化试验	21
六、思考题	24
实验三 一般毒性研究与实验技术	25
一、教学目的与意义	25
二、背景资料	25
三、案例与问题	26
四、课题设计与实验指导	26
课题名称：氯胺嘧草醚的一般毒性试验与评价	26
五、一般毒性试验主要方法与技术	28
(一) 急性经口毒性试验	28
(二) 急性吸入毒性试验	33
(三) 急性经皮毒性试验	34
(四) 亚慢性毒性实验	35
(五) 慢性毒性试验	38
六、思考题	40
实验四 遗传毒性研究与实验技术	41
一、教学目的与意义	41
二、背景资料	41
三、案例与问题	42
四、课题设计与实验指导	42
课题名称：苯并(a)芘的遗传毒性测试与评价	42
五、遗传毒性试验主要方法与技术	43
(一) 鼠伤寒沙门菌营养缺陷型回复突变试验	43
(二) 哺乳动物细胞基因突变试验	47
实验1 小鼠淋巴瘤细胞 L5178Y TK ⁺ 基因突变试验	48
实验2 中国仓鼠肺 V79 (CHO) / hGPRT 基因突变试验	49
(三) 小鼠骨髓细胞微核试验	51
(四) 染色体畸变分析	52
实验1 体外哺乳动物细胞染色体畸变试验	53
实验2 动物骨髓细胞染色体畸变试验	55
(五) 单细胞凝胶电泳试验	56
六、思考题	58
实验五 表观遗传毒性研究与实验技术	59
一、教学目的与意义	59
二、背景资料	59
三、案例与问题	59
四、课题设计与实验指导	60
课题名称：某环境有害因素与表观遗传修饰改变的关联性研究	60
五、表观遗传毒性实验主要方法与技术	62
(一) DNA 甲基化检测的主要方法和技术	62
实验1 亚硫酸氢盐修饰结合甲基化特异性 PCR	62
实验2 亚硫酸氢盐修饰后测序	64
(二) 组蛋白修饰检测的主要方法和技术	65
实验1 组蛋白特定位点修饰水平的检测——蛋白质印迹法	65
实验2 组蛋白特定位点在基因富集水平的检测——染色质免疫共沉淀法	67
(三) microRNA 检测的主要方法和技术	69
实验1 实时荧光定量 PCR 法检测 microRNA 表达	69
实验2 双荧光素酶报告系统验证 microRNA 靶基因	71
六、思考题	72
实验六 致癌作用研究与实验技术	73
一、教学目的与意义	73
二、背景资料	73
三、案例与问题	74
四、课题设计与实验指导	74

课题名称: NNK 致癌作用测试及评价.....74	(一) 核素溶液配制..... 113
五、 致癌作用实验主要方法与技术.....76	(二) 铀矿尘对细胞增殖的影响..... 115
(一) 细胞体外恶性转化实验.....76	(三) 铀矿尘致支气管上皮细胞损伤的活性氧检测..... 116
(二) 哺乳动物长期致癌实验.....81	(四) 电离辐射致 DNA 双链损伤的 γ -H2AX 含量变化检测..... 117
(三) 其他致癌实验.....84	六、 思考题..... 119
六、 思考题.....85	实验十 呼吸系统毒性研究与实验技术 120
实验七 生殖发育毒性研究与实验技术86	一、 教学目的与意义..... 120
一、 教学目的与意义.....86	二、 背景资料..... 120
二、 背景资料.....86	三、 案例与问题..... 121
三、 案例与问题.....86	四、 课题设计与实验指导..... 121
四、 课题设计与实验指导.....87	课题名称: PM2.5 急性肺毒性作用研究..... 121
课题名称: 镉及其化合物的生殖发育毒性评价.....87	五、 呼吸系统毒性试验主要方法与技术..... 123
五、 生殖发育毒性试验主要方法与技术.....89	(一) 潮气量和气流流速测定..... 123
(一) 生育力和早期胚体发育毒性试验.....89	(二) 胸内压测定..... 124
(二) 致畸试验.....90	(三) 呼吸道液分泌功能测定——小鼠酚红排泄法..... 124
(三) 围生期发育毒性试验.....93	(四) 支气管肺泡灌洗液 (BALF) 分析..... 125
(四) 一代 (或二代) 生殖毒性试验.....94	(五) 大鼠气道黏液中肺表面活性物质的测定..... 128
(五) 精子质量分析.....96	(六) 离体试验法..... 128
(六) 性激素水平的测定.....97	实验 1 离体肺灌流与分析..... 128
(七) 外源化学物对大鼠睾丸间质细胞的损伤模型.....98	实验 2 离体气管片试验法..... 129
(八) 外源化学物对大鼠卵巢颗粒细胞的损伤模型..... 100	实验 3 乳鼠肺细胞原代培养与上皮细胞纯化..... 130
六、 思考题..... 101	实验 4 体外培养的肺巨噬细胞中乳酸脱氢酶 (LDH) 活性测定..... 131
实验八 纳米材料损害作用研究与实验技术 102	六、 思考题..... 133
一、 教学目的与意义..... 102	实验十一 肝脏毒性研究与实验技术 134
二、 背景资料..... 102	一、 教学目的与意义..... 134
三、 案例与问题..... 103	二、 背景资料..... 134
四、 课题设计与实验指导..... 103	三、 案例与问题..... 134
课题名称: 纳米二氧化钛的毒性作用评价..... 103	四、 课题设计与实验指导..... 135
五、 纳米材料损害作用试验主要方法与技术..... 105	课题名称: 评价未知化学物肝损害及探讨其毒性作用机制..... 135
(一) 纳米材料的前处理方法..... 105	五、 肝脏毒性试验主要方法与技术..... 136
(二) 纳米材料表面特征观察..... 107	(一) 肝损伤动物模型建立..... 136
(三) 纳米材料对细胞活力的影响..... 108	实验 1 急性化学性肝损伤动物模型..... 136
(四) 纳米材料急性经口毒性实验..... 109	实验 2 肝纤维化动物模型..... 137
六、 思考题..... 111	(二) 肝脏亚细胞组分的制备..... 138
实验九 电离辐射损害作用研究与实验技术 112	实验 1 肝脏微粒体的制备..... 138
一、 教学目的与意义..... 112	
二、 背景资料..... 112	
三、 案例与问题..... 112	
四、 课题设计与实验指导..... 112	
课题名称: 电离辐射生物损伤效应特征及常用检测方法..... 112	
五、 电离辐射损害作用试验主要方法与技术..... 113	

.....	138	(八) 肾皮质薄片培养及肾膜囊	
实验 2 肝脏线粒体的制备	139	泡的分离与应用	165
(三) 肝损害体内评价技术	139	六、思考题	166
实验 1 肝微粒体细胞色素 P450	139	实验十三 神经系统毒性研究与实验技术	167
含量的测定	139	167
实验 2 丙氨酸氨基转移酶	140	一、教学目的与意义	167
(ALT) 活性测定	140	二、背景资料	167
实验 3 天冬氨酸氨基转移酶	141	三、案例与问题	168
(AST) 活性测定	141	(一) 案例一	168
实验 4 碱性磷酸酶 (ALP)	142	(二) 案例二	168
活性测定	142	(三) 案例三	168
实验 5 肝脏排泄功能测定	143	四、课题设计与实验指导	168
实验 6 肝脏分泌功能测定	144	课题名称一: 评价 MPTP 对小鼠	
实验 7 肝纤维化测定	145	大脑多巴胺能神经元的损伤	
(四) 肝损害体外评价方法	146	168
实验 1 离体肝脏灌流与分析	146	课题名称二: 综合评价有机磷	
.....	146	化合物的迟发性神经毒性	
实验 2 肝细胞、Kupffer 和 Ito	148	课题名称三: 正己烷神经毒性	
细胞的分离与培养	148	及机制探讨	
实验 3 肝细胞膜流动性检测	150	170
实验 4 肝细胞线粒体膜通透	151	五、神经系统毒性试验主要方法与技术	171
性检测	151	171
实验 5 肝细胞线粒体膜电位	152	(一) 实验动物神经行为学	171
检测	152	实验 1 自主活动度检测	
实验 6 肝细胞线粒体呼吸功	153	(旷场试验)	171
能检测	153	实验 2 Morris 水迷宫实验	
实验 7 肝细胞线粒体能量代	155	172
谢功能检测	155	实验 3 转棒试验 (滚轴试验)	
六、思考题	156	173
实验十二 肾脏毒性研究与实验技术	157	实验 4 后肢撑力实验	173
.....	157	实验 5 抓力测定	174
一、教学目的与意义	157	实验 6 感觉神经功能	174
二、背景资料	157	方法 1. 鼠尾痛觉测定	174
三、案例与问题	158	方法 2. 智能热板仪法	175
(一) 案例一	158	(二) 神经病理形态学方法	175
(二) 案例二	158	实验 1 神经细胞尼氏体染色	175
四、课题设计与实验指导	158	实验 2 免疫组化检测 MPTP	
课题名称一: 中药关木通引起	158	诱导的小鼠大脑多巴	
大鼠肾脏毒性作用探讨	158	胺能神经元损伤 (SP 法)	
课题名称二: 综合评价百草枯急	159	176
性中毒引起的肾脏毒性作用	159	(三) 周围神经传导速度测定	178
.....	159	(四) HPLC 荧光法测定动物大	
五、肾脏毒性试验主要方法与技术	160	脑兴奋性神经递质	178
.....	160	(五) 大鼠海马组织突触膜谷氨	
(一) 尿液的一般生化指标测定	160	酸受体的放射配体结合分析	
.....	160	179
(二) 肾脏血流动力学和血流量	161	(六) 神经元体外试验体系	181
分析	161	(七) 有机磷农药的迟发性神经	
(三) 肾小球滤过率测定	161	毒性评价	181
(四) 血肌酐、尿素和尿酸浓度	162	六、思考题	182
测定	162	实验十四 免疫毒性研究与实验技术	183
(五) 肾浓缩稀释试验	163	183
(六) 形态学和酶组织化学检查	163	一、教学目的与意义	183
.....	163	二、背景资料	183
(七) 肾脏微灌注及微穿刺技术	164	三、案例与问题	184
.....	164	四、课题设计与实验指导	184
		课题名称: 阿特拉津的免疫毒性	

检测与评价	184	实验 3 体内扩散盒琼脂培养技术	206
五、免疫毒性试验主要方法与技术	185	实验 4 骨髓微循环观察	206
(一) 体液免疫检测	185	六、思考题	207
实验 1 溶血空斑实验	185	实验十六 皮肤毒性研究与实验技术	208
实验 2 血清中免疫球蛋白 IgG 和 IgM 的测定	187	一、教学目的与意义	208
(二) 特异性细胞免疫反应	187	二、背景资料	208
实验 1 淋巴细胞增殖实验	187	三、案例与问题	209
实验 2 迟发型过敏反应 (delayed-type hypersensitivity, DTH)	188	四、课题设计与实验指导	210
实验 3 细胞毒性 T 淋巴细胞 (cytotoxic T lymphocyte, CTL) 活性的测定	189	课题名称: 海娜粉皮肤毒理学安全性评价	210
(三) 非特异性细胞免疫反应	189	五、皮肤毒性试验主要方法与技术	212
实验 1 NK 细胞活性检测 (乳酸脱氢酶释放法)	189	(一) 皮肤刺激性/腐蚀性试验	212
实验 2 巨噬细胞吞噬能力检测	190	(二) 急性眼刺激性/腐蚀性试验	214
六、思考题	191	(三) 皮肤变态反应试验	217
实验十五 血液毒性研究与实验技术	192	(四) 小鼠耳肿胀试验 (mouse ear swelling test, MEST)	219
一、教学目的与意义	192	(五) 皮肤光毒性试验	220
二、背景资料	192	(六) 皮肤光变态反应试验	221
三、案例与问题	193	(七) 人体斑贴试验	222
四、课题设计与实验指导	194	(八) 人体皮肤试用试验	224
五、血液毒性试验主要方法与技术	195	六、思考题	225
(一) 红细胞毒性检测	195	实验十七 毒理学替代法的应用与实验技术	226
实验 1 网织红细胞计数	195	一、教学目的与意义	226
实验 2 红细胞渗透脆性试验	196	二、背景资料	226
实验 3 高铁血红蛋白测定	196	三、案例与问题	227
实验 4 变性珠蛋白小体测定	197	(一) 案例	227
实验 5 碳氧血红蛋白测定	198	(二) 问题	228
实验 6 铁动力学试验	199	四、课题设计与试验指导	228
(二) 白细胞和血小板毒性检测	199	课题名称: 用毒理学替代试验对化妆品原料——果酸的一般毒性和特殊毒性进行筛选和检测	228
实验 1 白细胞墨汁吞噬试验	199	五、毒理学替代试验主要方法与技术	228
实验 2 血小板黏附试验	200	(一) 急性经口毒性替代试验——急性毒性分级法	228
(三) 凝血功能毒性检测	201	(二) 皮肤腐蚀性替代试验——人重组皮肤模型试验	232
实验 1 血浆凝血酶原时间测定	201	(三) 发育毒性替代试验——微团培养试验 (the micromass test, MM Test)	234
实验 2 活化部分凝血活酶时间测定	202	六、思考题	239
(四) 骨髓毒性检测	203	实验十八 毒理学与公共卫生安全和管理实例分析	240
实验 1 骨髓细胞学检查	203	一、教学目的与意义	240
实验 2 外源性脾结节测定	205	二、背景资料	240
		三、案例分析	242
		四、思考题	247
		参考文献	248

实验一 毒理学实验的基础知识与综合技能

毒理学作为一门实验科学，主要研究外源化学物对机体的损害作用及其机制。毒理学实验根据不同的实验目的，采用一定的实验方法对外源化学物的毒性进行鉴定或安全性评价。毒理学实验常采用体内或体外实验模型来观察受试外源化学物对机体的损害作用，从而发现其有害作用的剂量-反应关系，获得受试物的各种毒性参数，确定受试物毒性作用的靶器官，阐明受试物毒性作用特点，为进一步研究其毒性作用机制和防治措施提供理论依据。

一、案例与问题

(一) 案例

修正液，俗称“涂改液”或“消字灵”，被广泛用于中小学生学习写字错误后的修改。为了探索修正液对人体健康有无危害，某电视台记者在某处设计一项动物实验，即3只实验小白鼠被分入高、中、低剂量组，在3个相同带孔玻璃容器内分别倒入20 ml、10 ml和5 ml修正液。为了研究修正液对小白鼠的直接和间接毒性，记者在中、低剂量组容器内先放6个医用棉球，然后滴入相应容积修正液，但高剂量组溶剂瓶内未放棉球而直接滴入修正液，小白鼠被同时放入玻璃容器后开始计时和观察小鼠精神、活动和死亡情况。结果显示，高、中和低剂量组小白鼠分别于2分钟、3分钟和5分钟左右死亡。根据以上实验结果，记者得出修正液对中小学生学习健康有害的结论。

(二) 问题

1. 从毒理学专业角度，请你找出该动物实验设计与流程的不足之处。
2. 该动物实验结果能否直接外推到人？动物实验结果外推到人有哪些不确定因素？
3. 毒理学实验的基本原则、目的和特点分别是什么？
4. 如何获得正确可靠的动物实验结果？
5. 实验人员应该具备哪些动物实验基本操作技术？

二、毒理学实验概述

(一) 毒理学实验的基本原则

1. 外源化学物在实验动物中产生的毒性作用可外推至人 由于外源化学物在体内生物转化、代谢的方式和程度受化学物的理化性质、机体的体重及易感性的影响，外源化学物在不同物种动物体内吸收、分布、生物转化和代谢有明显不同。在进行外推时，必须尽可能全面地收集和了解外源化学物对受试动物的毒性作用和特点，需考虑外源化学物在不同物种动物体内的生物转化和代谢方式与人的相似性及适当的安全系数。

2. 毒理学研究中所选用的剂量高于人实际接触剂量 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。进行外源化学物的安全性评价和风险评估时，无论采用实验动物资料还是人群流行病学资料都存在高剂量向低剂量外推的过程。一般情况下，随着外源化学物在实验动物体内暴露剂量的增加，群体中效应发生率也逐渐增加。但高剂量的效应和低剂量的效应不一定相同。即使高剂量和低剂量的效应性质相同，用高剂量的剂量-效应关系

来推测低剂量的剂量-效应关系也存在着很大差别。低水平、长期、慢性接触是各种外源化学物质对人体影响的基本方式。随着毒理学实验方法和技术的快速发展,毒理学实验将由高剂量测试向低剂量测试发展,这就需要用灵敏的指标才能观察到亚临床毒效应,而灵敏的指标必须在多终点生物学效应研究的基础上才能确定。

3. 实验动物暴露途径尽可能与人相似 为使实验结果更具有代表性和可重复性,常采用成年健康雄性和未孕雌性实验动物。幼年和老年动物的生理状态对外源化学物的敏感性不同,幼年动物可能更敏感,老年动物可能不敏感或反应较迟钝,不能反映真实情况。幼年和老年动物、妊娠雌性动物、疾病状态作为特殊情况另作研究。外源化学物经不同途径暴露于实验动物,所表现出来的毒性作用和方式不同。毒理学实验中染毒途径的选择,应尽可能模拟人暴露的方式。

4. 准确性和可重现性 实验动物存在个体差异,选择健康成年实验动物能使实验结果具有代表性和可重复性,减少实验误差。毒理学实验要严格控制实验条件、规范实验操作、控制可能影响毒效应的因素,提高测试仪器和方法的灵敏度,以确保实验结果的准确性和可重现性。

(二) 毒理学实验的目的

1. 了解受试物毒性作用性质和特点 毒理学评价的目的是评价外源化学物的安全性和危险性。急性毒性试验通过对每个受试实验动物的全面观察和详细记录,评价化学物质对机体的毒性大小,毒效应的特征和剂量-反应(效应)关系,确定毒性作用的性质,为进一步的亚慢性、慢性毒性研究和其他毒理学试验的剂量选择和效应观察提供依据。

2. 确定剂量-反应关系 剂量-反应关系研究是毒理学评价和安全性评价的基础。所有化学物质的毒性都与剂量有关,通过对受试物不同有害作用的剂量-反应研究,可得到多种毒性参数和剂量-反应曲线的斜率。急性毒性试验可确定毒性上限参数半数致死剂量(LD₅₀),也可得到最小致死剂量(LD₀₁)和最大非致死剂量(LD₀)。急性、亚慢性和慢性毒性试验也可获得观察到有害作用最小剂量(lowest observed adverse effect level, LOAEL)和未观察到有害作用剂量(no observed adverse effect level, NOAEL)。致畸实验也可得到 LOAEL 和 NOAEL。致突变和致癌实验尽管认为是无阈值的,也可得到观察的 LOAEL 和 NOAEL。只有在一定剂量范围内剂量-反应关系曲线的斜率是可以确定的,如果超出这个范围即无法确定。

3. 确定毒性作用靶器官 毒理学试验观察染毒动物中毒的发生、发展过程及死亡数和死亡时间。对于死亡动物和观察期结束处死的动物进行尸体解剖,肉眼观察如发现异常的组织或脏器,应做病理组织学检查。根据中毒表现和特点大致确定靶器官,描述毒性作用性质和特点。

4. 确定损害作用的可逆性 毒理学试验一旦确定存在有害作用,就应该研究停止暴露或降低暴露水平后毒害作用是否可以消失或减轻,以及受损组织、器官的功能是否可以恢复。致突变、致癌和致畸作用一旦出现是不可逆的。毒性的可逆性关系到对人的危害的评价。如器官有害作用可逆,给患者治疗时就可以相应提高药物剂量以达到治疗目的。

5. 探讨毒性作用机制 传统毒理学主要采用动物模型进行毒性测试,通常以功能和形态学指标反映实验终点。机制毒理学采用分子生物学技术研究外源化学物毒性作用机制和调控作用,寻找能够在不同物种间进行毒性比较的生物学标志,确定外源化学物毒性作用靶点,据此研究诊断治疗药物,为化学物中毒的诊断和防治提供理论依据。

6. 对毒物进行科学管理 在了解外源化学物的毒性和作用机制基础上,根据描述和机制毒理学的研究资料,制定卫生标准。按照安全性评价程序对外源化学物、药品、食品进行安全性评价,以使其能够安全进入市场,达到保护人体健康的目的。为协助政府部门制定相关法规,提出科学决策提供理论依据。

毒理学研究还可用于其他目的和要求,如毒性作用敏感检测指标和生物学标志、受试物毒

物动力学和代谢研究、中毒的解救措施等。

（三）毒理学实验的特点

外源化学物毒性作用受到许多因素的影响，生物体结构和功能十分复杂。动物毒理学实验资料外推到人时，应注意以下特点。

1. **实验动物和人对外源化学物的反应敏感性不同** 毒理学实验通常采用两种或两种以上的实验动物，应尽可能地选择与人对毒物反应相似的动物和暴露途径，但有时各物种之间存在很大差别。动物毒理学实验资料外推到人要充分考虑物种间的差异。

2. **实验动物暴露剂量高于人的暴露剂量** 为寻找毒性作用靶器官，且能够在相对少数动物身上得到剂量-反应（效应）关系，往往要选用较大的暴露剂量，这一剂量比人群实际暴露水平大得多。有些化学物在高剂量效应和低剂量效应不一致，甚至完全相反。高剂量效应向低剂量效应外推时存在不确定性。

3. **实验动物外推到人的不确定性** 毒理学实验使用动物数量有限，有些外源化学物的毒性作用比较低，在少数的动物实验过程中很难发现。化学物在实际应用过程中接触人群很大，存在少量实验动物到人群外推的不确定性。

4. **毒理学实验的复杂性** 不同物种实验动物在解剖、生理、遗传学和代谢过程存在差异，同一品系不同个体间存在代谢差异，实验动物所处的健康状态、年龄、性别、营养状况都存在着差异，造成外源化学物在实验动物机体毒性作用性质和特点的复杂性。

三、毒理学实验规范与职业道德

随着化学品数量不断增加，给毒理学带来了严重的挑战。毒理学应扩大毒性研究的范围。从事外源化学物毒性研究时，其鉴定的质量应当符合科学实验的要求，确保获得实验资料的完整性、客观性、可靠性、准确性和可重复性，以便在不同国家和人群中具有可比性。为了达到以上要求，必须使从事这些实验的实验室具有良好实验室规范。

（一）良好实验室规范

良好实验室规范（good laboratory practice, GLP）是指对实验室条件、实验室管理、实验研究计划制定、实施和签发化学品毒性鉴定书等各个方面都做了具体要求和严格规定。

GLP的基本精神是全面的质量保证。GLP规范中特别强调质量保证在于从客观上保证实验的可信度。在毒理学实验中对化学品或产品进行安全性评价必须遵循GLP的原则，这是国家法规要求的。在有些毒理学研究中虽然没有强制性地要求按照GLP的规定，但是如果按照GLP规定操作，能够为实验的顺利进行和实验结果的可靠性提供质量保证。

（二）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教学和科学研究试验的脊椎动物。对于外源化学物毒性研究和新药的开发，毒理学动物实验是必不可少的。所有研究人员要尊重生命，善待实验动物。早在18世纪就出版了有关动物的伦理学书籍和文章，先后成立了动物保护组织，制定了《禁止虐待动物法》《科学实验动物法》。实验动物伦理是指人在动物实验过程中所应遵循的对待实验动物的道德准则。动物伦理包括动物福利和动物权利（解放）。目前，动物实验涉及的动物伦理问题主要集中在动物福利问题上。实验动物福利是指在饲养管理和使用实验动物过程中，要采取有效措施，使实验动物免遭不必要的伤害、不适、饥饿、恐慌、折磨、疼痛和疾病，保证动物能够实现自然行为，受到良好的管理和照料，动物个

体处于一种康乐状态下。中国《实验动物管理条例》明文规定,对实验动物必须爱护不得戏弄或虐待。对用于教学和科学研究试验的实验动物,必须负有道义上的责任。应在使用实验动物过程中对实验动物给予人道主义的管理和处理,使其痛苦和不适感减少到最低限度,避免不必要地使用实验动物。

使用实验动物进行任何科学研究时都必须符合“3R”原则,即替代(replacement)、减少(reduction)和优化(refinement)。

1. 替代 是指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试验,并获得相同实验效果的科学方法。实验动物的替代物范围很广,所有能代替整体实验动物进行试验的化学物质、生物材料、动植物细胞、组织、器官,计算机模拟程序等都属于替代物,也包括低等动、植物(如细菌、蠕虫、昆虫等)。小动物替代大动物(如转基因小鼠替代猴,进行脊髓灰质炎减毒活疫苗的生物活性检测等),同时也包括方法和技术的替代(如用分子生物学方法,代替动物实验来鉴定致癌物或遗传毒性的遗传毒理学体外实验方法等)。

2. 减少 是指在科学研究中,在动物实验时,使用较少量的动物获取同样多的试验数据或使用一定数量的动物能获得更多的试验数据的科学方法。减少的目的不仅是降低成本,而是用最少的动物达到所需要的目的,同时也是对动物的一种保护。目前,减少动物使用量常用的方法有以下几种:充分利用已有的数据(包括以前已获得的实验结果及其他信息资源等);实验方案的合理设计和实验数据的统计分析;替代方法的使用;动物的重复使用(这应根据实验要求和动物质量寿命来决定);从遗传的角度考虑动物的选择,如在生物制品效力毒性测定中,测定结果不仅受所使用实验小鼠微生物状态以及饲养条件等因素的影响,即反应性在很大程度上取决于基因型,使用国际标准小鼠可以确保测定结果的敏感度和准确度,同时可达到减少检验中使用动物数量;严格操作,提高试验的成功率;使用高质量的实验动物。

3. 优化 是指在必须使用动物进行有关实验时,要尽量减少非人道程序对动物的影响范围和程度,可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,以保证动物的健康和康乐,保证动物实验结果的可靠性和提高实验动物福利的科学方法。其主要内容包括:实验方案设计和实验指标选定的优化,如选用合适的实验动物种类及品系、年龄、性别、规格、质量标准,采用适当的分组方法,选择科学、可靠的检测技术指标等;实验技术和实验条件的优化,如麻醉技术的采用,实验操作技术的熟练掌握,实验环境的适宜等。

四、毒理学实验设计要求

毒理学实验结果易受多种因素影响,如实验动物或细胞的种属和品系、实验环境差异、仪器稳定性、受试物纯度和样本量大小。为控制这些因素产生实验误差,须制定严密、合理的实验设计尤为重要。本节主要介绍毒理学实验设计的基本原则、方法以及相关统计学要求。

(一) 毒理学实验设计的基本原则

1. 随机原则 指按照机遇均等原则来进行分组,其目的是使一切干扰因素造成的实验误差尽量减少,而不受实验者主观因素或其他偏倚的影响。随机化方法包括采用编号卡片抽签、随机数字表或采用计算器的随机数字键等。

2. 对照原则 是要求在毒理学实验中设立可与实验组比较,用以消除非处理因素影响的对照组。对照包括自体对照和组间对照,后者又分为空白对照、阴性对照、阳性对照和历史对照。设立对照组的正确方法是把研究对象随机分入对照组和实验组。对照组和实验组具有同等重要的意义,没有对照组的实验结果往往难以令人信服。对照组与实验组例数相等

时, 统计效率最高。

3. 重复原则 是指同一处理要设置多个样本例数或独立重复实验次数足够多。重复的主要作用是估计和降低实验误差, 提高样本量和增强样本代表性, 提高实验结果的精确度和真实性。样本数过少, 实验处理效应将不能充分显示; 样本数过多, 又会增加实际工作中的困难。进行实验前必须确定最少样本例数, 后者主要通过一般样本估测方法或统计学方法进行测算确定。

4. 均衡原则 是指在实验中实验组与对照组除处理因素不同外, 非处理因素基本保证均衡一致。非处理因素主要包括实验对象、实验条件、实验环境、实验时间、受试物、仪器设备和操作人员等。动物实验时研究者应选用全面合理的设计方案, 以控制非处理因素趋于一致。

(二) 毒理学实验设计方法

1. 自身对照设计 是指在同一个体上观察实验处理前后某些观测指标的变化。该设计方法的优点是能排除个体间生物差异, 但不适用于在同一个体上多次进行实验和观察的情况, 同时还应注意生理盐水等溶剂对体重、血压等生理指标的影响。

2. 完全随机设计 是将每个实验对象随机分配在各组, 并从各组实验结果的比较中得出结论。通常用随机数字表进行完全随机化分组。本设计方法的优点是设计和统计的处理都比较简单, 但在样本例数较少时往往不能保证各组间的一致性。

3. 随机区组设计 是配对比较设计的扩大。将全部动物按体重、性别及其他因素分为若干组, 每组中动物数目与拟划分的组数相等, 体质条件相似, 再将每个区组每只动物进行编号, 利用随机数字法将其分配到各组。

4. 配对设计 是指实验前将动物按性别、体重或其他因素加以配对, 以基本相同的两个动物为一对, 配成若干对, 然后将一对动物随机分入两组中。两组动物的数量、体重和性别等情况基本相同, 取得均衡进行实验, 以减少这些匹配因素对实验结果的影响。

5. 拉丁方设计 是指由拉丁字母所组成的正方形排列, 在同一横行与同一纵列中都没有重复的字母, 可进行不同横行或不同纵列之间对调。该设计适用于多因素的均衡, 如比较某药与其他 3 种药的作用, 先 4 种药物编成 A、B、C、D 4 个号码, 再按 4×4 拉丁方进行, 每个动物(纵列)没有重复使用的药物, 同一日期(横行)也没有重复使用的药物, 这样既可控制动物间的个体差异, 也可避免注射日期先后带来的实验误差。

6. 正交设计 是研究多因素实验的设计方法, 其特点是利用一套规格化的表格——正交表来安排试验, 适用于多因素、多水平、实验误差大、周期长等试验的设计。在实验设计过程中只要根据试验条件直接套用正交表即可, 而不需要另行编制, 详见统计学专著。以 $L_9(3^4)$ 为例, L 代表正交表, 右下角 9 表示这张表需安排 9 次试验, 括号内 3 表示这张表适用于三水平的试验, 3 的右上方指数 4 表示最多可以安排 4 个因素的试验, (3^4) 表示全面试验所作的试验次数。总的来说, $L_9(3^4)$ 是这张表进行试验设计, 最多可以安排 4 个因素, 每个因素取三个水平, 一共进行 9 次试验。根据不同实验的具体条件选择二水平、三水平、四水平等实验的正交表。

(三) 毒理学实验设计统计学要求

严格执行毒理学试验设计原则和要求, 才能得到可靠性和重复性良好的结果, 也是进行正确统计学评价的基础。良好的质量保证和实验设计可以避免系统误差, 而统计处理则用来确定随机误差。

毒理学试验数据通常是由剂量水平和相应观察值组成的二维关系型数据, 如处理组与阴性对照组观察值均数比较。根据实验结果(指标)的变量类型是数值变量(定量资料)还是分类变量(定性资料), 选用不同统计分析方法。如果资料可拟合某种分布, 则适用于参数检验,

其敏感度和效率高于非参数检验；若资料不能拟合某些已知的分布，则应进行数据转换，以满足正态性和方差齐性；如果任何变换都不能改善数据的分布，可能存在个别可疑值，应予以识别和剔除。另一方面，可使用不依赖总体分布模型的非参数统计分析。以上统计学方法可参阅相关统计学专著。统计检验的假设是关于总体特征的假设，检验方法是以统计量的抽样分布为根据的，得到的结论是概率性的，不是绝对的肯定或否定，不等同于有或无生物学意义和毒理学意义。

评价毒理学试验结果时要解决 3 个问题：①是否具有统计学意义；②是否具有生物学意义，即是否是真实的效应；③是否具有毒理学意义，即是否是有害效应。对毒理学实验结果作出科学判断和解释，应该根据统计学分析的结果、生物学知识和经验，其中具有统计学意义是具有生物学意义的必要条件之一。正确利用统计学假设检验的结果有助于确定实验结果的生物学关联。

五、实验动物管理与实验者自身防护

自 1988 年国务院批准《实验动物管理条例》以来，我国发布了多项国家和地方法规，并制定了有关国家标准，其中强制性国标为《GB14923—2010 实验动物哺乳类实验动物的遗传质量控制》《GB14922—2001 哺乳类实验动物微生物学和寄生虫学等级和监测》《GB14924—2001 实验动物全价营养饲料》和《GB14925—2001 实验动物环境及设施》。这些标准要求使用动物的实验室具有实验动物使用许可证，培育和产生动物的单位具有实验动物生产许可证和动物合格证，生产饲料单位具有饲料合格证。开展动物实验人员应经专业培训合格方可上岗。

（一）动物饲养室条件

1. 按照实验动物微生物等级标准，动物饲养环境分普通环境、屏障环境和隔离环境。普通环境为开放系统，符合动物居住的基本要求，不能完全控制传染因子，适用于饲养教学用途的普通级实验动物。屏障环境严格控制人员、物品和环境空气的进出，适用于饲养清洁实验动物及无特定病原体（specific pathogen free, SPF）级实验动物。隔离环境采用无菌隔离装置以保存无菌或无外源污染动物，隔离装置内的空气、饲料、水、垫料和设备均为无菌，动物和物料的动态传递须经特殊的传递系统，该系统既能保证与环境的绝对隔离，又能满足转运动物时保持内环境一致，适用于饲养悉生和无菌实验动物等。

2. 动物饲养室应具备基本设备，包括动物笼具及笼具架、操作检查设备（电子天平、干湿温度计、动物捕捉手套）、清洁消毒用具（消毒液桶、灭菌缸、污物铲、拖把挤干器）以及护理治疗用品。

3. 动物饲养室保持适宜的气候条件（温度、湿度、通风、光照等）及其他条件（如噪声、空气中氨浓度、气味、群体密度和空间限制）。

（二）实验动物的管理要求

实验动物管理一般要求：①提供良好的动物饲养环境和设施；②供应足够的水和饲料以便实验动物自由饮水和进食；③定时记录动物接收、来源、分类标志、处理及其他相关资料；④记录动物体重变化、体征与死亡情况；⑤动物实验结束后动物尸体集中回收并交由环保部门批准资质的单位进行无害化处理；⑥加强节假日动物饲养室的值班和突发事件的应急处理。有些动物尚需要特殊要求：孕期或哺乳期动物需要用富含蛋白质等的特殊饲料饲养；急性经口毒性实验中染毒前需要禁食 4 小时左右。

(三) 实验者自身防护

1. 实验中损伤的防护 动物实验过程损伤包括动物咬伤、抓伤、器械损伤。动物实验过程损伤的防护措施有：正确掌握动物抓取方法、正确固定与有效麻醉和标准操作规范。

2. 人畜共患病的防护 动物实验过程易感染的人畜共患病包括：病毒性疾病（出血热、狂犬病、传染性肝炎、淋巴细胞性脉络丛脑膜炎）、细菌性疾病（布鲁菌病、沙门菌病和真菌病）和寄生虫病（弓形虫病、阿米巴病）。对人畜共患病的防护措施有：加强个人防护和卫生管理、严格实验动物选择、搞好实验环境和及时治疗疾病。

3. 特殊实验的防护 特殊实验是指进行感染性和有害物质的动物实验，其防护措施包括：①负压操作安全柜内操作；②严格按照实验操作程序开展实验；③实验结束后严格废弃物品的处理。

六、动物实验流程与基本操作技术

(一) 动物实验流程

1. 实验前准备 主要包括理论准备、条件准备和开展预实验。理论准备主要指通过查阅文献资料了解动物实验相关基础理论知识、选择实验方法、制定研究计划与实验方案、编制记录实验数据表格；条件准备主要指实验场所与动物笼具消毒、动物预订、实验试剂配置、实验耗材购买、仪器设备校准；预实验是指正式实验前用少量动物开展初步实验，实验方法和观察指标应该与正式实验相同。充分的准备工作为顺利完成后续动物实验提供了较强的理论基础和实践依据。

2. 动物实验实施

(1) 动物选择：从物种、品系、微生物和寄生虫控制以及个体特征等方面选择受试动物。

①物种选择。物种选择的基本原则是选择受试物在代谢、生物化学和毒理学特征与人最接近的物种；选择自然寿命不太长的物种；选择易于饲养和实验操作的物种；选择经济并易于获得的物种。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。②品系选择。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。对某种外源化学物质系列毒性研究中应固定使用同一品系动物，以确保研究结果的稳定性。③微生物和寄生虫控制的选择。按照微生物和寄生虫控制程度，实验动物分为普通级、清洁级、无特定病原体和无菌四个等级，分别需要在开放系统、屏障系统、屏障或隔离系统以及隔离系统内饲养。④个体选择。选择健康、未孕动物，且雌雄各半，还需根据实验类型选择相应年龄的受试动物。此外，同一试验同一批动物体重差异应小于 20%，组内个体间体重差异应小于 10%，组间平均体重差异不应超过 5%。

(2) 染毒途径与期限：毒理学动物实验尽量选择与人群实际接触途径相一致的染毒途径，主要包括经口、经呼吸道、经皮肤和注射途径。根据实验目的、实验动物种类和毒物剂型选择最终动物染毒途径，各种染毒途径与方法介绍见动物实验基本操作技术部分。不同毒性实验内容，其动物染毒期限可能不同，主要参照经济合作与发展组织（OECD）《化学品测试方法》、美国国家环境保护局（USEPA）《健康效应评估指南》等相关规定。急性毒性实验染毒通常是一次或 2 小时内多次；重复剂量经口毒性实验规定啮齿类动物染毒期限为 28 天；亚慢性毒性实验规定染毒期限：啮齿类为 90 天，犬为 1 年；慢性毒性实验规定啮齿类动物染毒期限至少 12 个月（或终生染毒），但新药临床前慢性毒性实验染毒期限一般为临床用药周期的 2~3 倍。

(3) 剂量设计与分组: 合理剂量的选择在毒理学试验中尤为关键。针对剂量设计, 目前尚无公认的计算方法, 主要参考半数致死剂量 (LD_{50})、文献估计剂量和通过预实验估计剂量等方法。毒理学试验一般至少要设 3 个剂量组, 即高剂量组、中剂量组、低剂量组, 其中高剂量组应出现明确的有害作用, 或者高剂量组剂量已达到染毒的极限剂量 (如大鼠或小鼠灌胃或注射的最大容量); 低剂量组不应出现任何可观察到的有害作用 (相当于 NOAEL), 但低剂量组剂量应当高于人可能接触剂量, 至少等于人可能接触剂量; 中剂量组剂量介于高剂量组和低剂量组之间, 应出现轻微毒性效应 (相当于 LOAEL)。组间剂量一般按等比例计算, 剂量组间距多为 3~10 倍, 一般不低于 2 倍, 低剂量组剂量一般为高剂量组剂量的 1/20~1/10。此外, 各组动物数取决于很多因素, 如实验目的和设计, 要求的敏感度、实验动物寿命、生殖能力、经济考虑及动物可利用性, 按照一般估测方法或统计学方法测算。

(4) 生物材料收集: 实验过程中或实验结束时, 收集受试动物血液、尿液、胆汁、粪便及各种脏器, 检测生理、生化、病理及分子改变。生物材料收集方法见动物实验基本操作技术部分。

(5) 观察指标: 包括一般情况 (体重改变、进食量、饮水量等), 中毒体征 (血压、呼吸次数、心率、心电图和脑电图等), 生化指标 (血脂、血糖、尿糖、肝功能、肾功能、激素、电解质与微量元素等), 血液学指标 (血红蛋白、白细胞、血小板、凝血因子及骨髓象检查), 免疫学指标 (细胞因子、免疫球蛋白等), 组织病理学指标 (H&E 染色、组织化学、特殊染色及电镜检查) 等。

3. 实验结果整理、统计分析及实验报告与论文撰写 实验实施过程中或实验结束后, 收集所有原始数据, 及时录入计算机, 并对原始数据进行人工检查和计算机检查, 找出缺项或差错数据。针对关键数据缺失则剔除该个体, 而非关键项目缺失仅在单项分析时减少样本数处理; 针对人为造成差错项目应予以纠正, 无法纠正则只能剔除; 针对非人为因素造成的差错或异常值, 样本数大于 10 且呈正态分布时, 剔除均数 ± 3 倍 (或 2 倍) 标准差范围之外的数据。

实验数据经过检查和核对后, 首先通过统计描述计算平均数、标准差、率或构成比, 然后采取恰当的统计分析方法进行分析比较。不同类型数据资料需选用不同统计分析方法, 定量资料一般用 t 检验、方差分析、相关分析、线性回归分析, 定性资料一般用卡方检验、Fisher 确切概率法, 详见 IPCS 专家组推荐的统计学分析方法。目前常用统计分析软件有 *Microsoft Excel*、*SPSS* 和 *SAS* 等。

实验报告是描述实验过程、记录实验结果的材料, 是表达研究成果的一种形式, 报告内容一般包括实验名称、实验目的、实验器材、实验步骤、实验结果和结论, 报告撰写应做到内容准确、文字简练、语言通顺、表达清晰和格式规范。研究论文是对外表达研究成果的重要方法, 撰写动物实验研究论文, 除按照其他医学研究论文撰写要求外, 还需要准确描述动物种属和品系名称、动物来源、遗传学背景、微生物质量分级、动物合格证号、性别、年龄与体重、动物饲养环境、分组方法和动物处置方法。

(二) 动物实验基本操作技术

1. 健康动物判断 实验动物健康状况直接或间接影响毒理学实验结果, 因此, 毒理学实验务必选用正常健康动物。除实验动物微生物控制指标外, 健康动物还应发育正常、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。为确保实验选择健康动物, 一般对新购进动物在实验前进行 5~7 天的检疫, 及时剔除不健康或环境适应不良的动物。对于亚慢性和慢性毒性试验, 可在实验前进行大鼠或犬的血液生化检查, 生化指标异常动物应被剔除; 实验前对犬应常规驱

除肠道寄生虫。

2. 动物性别鉴定 区分雄性与雌性大鼠和小鼠最简单方法是观察肛门与外生殖器官之间距离。雌鼠肛门与外生殖器间距离极短，成年雌鼠可见乳头；雄鼠肛门与外生殖器间距离较长，成年雄鼠卧位可见阴囊处睾丸，且可见肛毛。针对家兔，检查方法是雌兔在肛门前面有两个相近的孔，分别为尿道口和阴道口，成年雌兔可见 5 对乳头；成年雄兔可见阴茎和两侧睾丸。

3. 动物标志 分群体标志和个体标志，群体标志主要用文字书写或号码标示于房间或笼子上，而个体标志方法如下：①小鼠：剪趾（胎鼠/新生鼠）、耳打孔、刺纹、植入；②大鼠：剪趾（胎鼠/新生鼠）、耳打孔、刺纹、耳标记、植入；③豚鼠：耳打孔、耳标记、刺纹、植入；④家兔：耳标记、刺纹、植入；⑤犬和猴：刺纹、项圈、植入。啮齿类动物或白色家兔标记常用染色法：用苦味酸（黄色染料）、品红（红色染料）乙醇饱和溶液在动物不同部位被毛上染色，其中红色表示十位数，黄色表示个位数，可标出 1~99 号。如图 1-1 所示，可将小鼠或大鼠从头顶 1 号、右前肢 2 号、右腰 3 号、右后肢 4 号、尾根 5 号、左后肢 6 号、左腰 7 号、左前肢 8 号、背中 9 号的顺序标记 1~9 号，第 10 号用红色在头顶上标记，5 号红色和 6 号黄色表示 56 号动物。耳缘孔口标记法如图 1-2 所示。

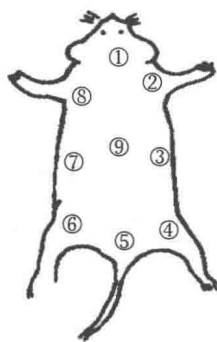


图 1-1 啮齿类动物染色标记法

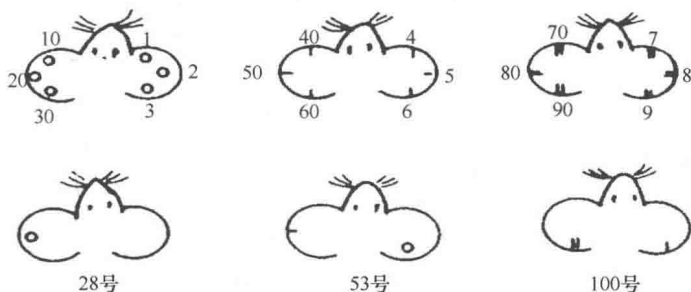


图 1-2 耳缘孔口标记法

4. 动物抓取与固定 动物实验中，染毒、手术或生物材料收集时需要正确抓取和固定动物。抓取或固定动物前，必须对实验动物的一般生理习性有所了解。抓取或固定动物时，既要胆大快捷，又要小心仔细，避免被咬伤。下面分别介绍小鼠、大鼠和家兔抓取与固定方法。

(1) 小鼠抓取与固定方法：小鼠抓取有两种方法。①用右手提起尾部，放在鼠笼盖或其他粗糙面上，向后上方轻拉，小鼠前肢紧紧抓住粗糙面，迅速用左手拇指和食指捏住小鼠颈背部皮肤并用小指和手掌尺侧夹持其尾根部固定在手；②先用左手拇指和食指抓住小鼠尾部，再用手掌尺侧及小指夹住尾根，然后用左手拇指及食指捏住其颈背部皮肤（图 1-3）。小鼠固定器及其使用方法如图 1-4 所示。

(2) 大鼠抓取与固定方法：若进行大鼠灌胃、腹腔注射、肌内注射和皮下注射，可采用与小鼠相同的抓取，即用拇指、食指捏住鼠耳头颈皮肤，余下三指紧捏住背部皮肤，置于掌心中，调整大鼠在手中的姿势后即可进行染毒操作（图 1-5）。对操作不熟练者，建议抓取大鼠前戴上帆布或硬皮质防护手套。大鼠固定器及其使用方法如图 1-6 所示。