




国家卫生和计划生育委员会“十三五”规划教材
全国高等医药教材建设研究会“十三五”规划教材
全国高等学校教材

供法医学类专业用

法医毒理学实验指导

主 编 朱少华

副主编 黄飞骏 李 凡 喻林升

 人民卫生出版社





国家卫生和计划生育委员会“十三五”规划教材
全国高等医药教材建设研究会“十三五”规划教材
全国高等学校教材

供法医学类专业用

法医毒理学实验指导

主 编 朱少华

副主编 黄飞骏 李 凡 喻林升

编 者 (以姓氏笔画为序)

朱少华 (苏州大学)

周 静 (内蒙古医科大学)

刘 茜 (华中科技大学)

胡永良 (皖南医学院)

闫 杰 (中南大学)

贺 盟 (复旦大学)

李 凡 (河南科技大学)

党永辉 (西安交通大学)

李 楨 (昆明医科大学)

黄飞骏 (四川大学)

张志湘 (苏州大学)

喻林升 (温州医科大学)

岳 霞 (南方医科大学)

秘 书 张志湘 (苏州大学)

人民卫生出版社

图书在版编目(CIP)数据

法医毒理学实验指导 / 朱少华主编. —北京: 人民卫生出版社, 2016

ISBN 978-7-117-22119-1

I. ①法… II. ①朱… III. ①法医毒理学—实验—医学院校—教材 IV. ①D919.1-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2016)第 032011 号

人卫社官网	www.pmph.com	出版物查询, 在线购书
人卫医学网	www.ipmph.com	医学考试辅导, 医学数据库服务, 医学教育资源, 大众健康资讯

版权所有, 侵权必究!

法医毒理学实验指导

主 编: 朱少华

出版发行: 人民卫生出版社(中继线 010-59780011)

地 址: 北京市朝阳区潘家园南里 19 号

邮 编: 100021

E - mail: pmph@pmph.com

购书热线: 010-59787592 010-59787584 010-65264830

印 刷: 中国农业出版社印刷厂

经 销: 新华书店

开 本: 850×1168 1/16 印张: 11

字 数: 325 千字

版 次: 2016 年 3 月第 1 版 2016 年 3 月第 1 版第 1 次印刷

标准书号: ISBN 978-7-117-22119-1/R · 22120

定 价: 42.00 元

打击盗版举报电话: 010-59787491 E-mail: WQ@pmph.com

(凡属印装质量问题请与本社市场营销中心联系退换)



· 主编简介

朱少华, 法医学教授, 博士研究生导师, 1987年毕业于原同济医科大学医学系并留该校法医学系任教, 1997年4月至2001年6月在德国海德堡大学和吕贝克大学学习, 获吕贝克大学博士学位后回华中科技大学同济医学院法医学系工作, 2014年6月人才引进到苏州大学医学部法医学系工作, 近5年主持和参加国家自然科学基金、国家973项目子项目, 湖北省科技攻关计划、湖北省自然科学基金、教育部博士点基金等科研项目7项, 参与国家级规划教材《临床法医学》第3版, 《法医毒理学》第4版, 《法医病理学实验指导》及《法医学辞典》等6部教材及教学参考书的编写, 在国内外法医学专业期刊发表论文60多篇, 其中SCI收录16篇, 现任苏州大学司法鉴定中心常务副主任, 江苏省司法鉴定协会法医专业委员会委员, 苏州市医学会医疗事故鉴定专家库成员。

副主编简介



黄飞骏, 法医学教授, 博士研究生导师。1988年毕业于原华西医科大学法医学系并留校工作至今。1998年10月至2001年9月赴美国圣地亚哥贝汉姆研究所工作学习。2003年至今担任中华医学会医疗事故鉴定专家库专家。长期从事法医病理学及法医临床学检案、教学、科研工作。承担三项国家自然科学基金、两项973项目分课题、一项国家杰出青年基金、两项四川省科技厅科技招标项目等多项课题研究, 发表SCI收录论文10多篇。2005年“法医物证学教学课程改革”获四川省教学成果一等奖、国家级教学成果二等奖。2013年“乙型肝炎病毒转录复制调控机制及致病机制研究”获四川省科学技术进步奖二等奖、中华医学科技奖三等奖。参编“十五”规划教材《法医毒理学》, 二十一世纪教材《法医学》《法医临床学理论与实践》《法医学辞典》《法医学轻重伤鉴定指南》等。



李凡, 法医学教授, 硕士研究生导师, 日本金泽医科大学客座研究员。河南省高校青年骨干教师, 河南省法医病理司法鉴定专家委员会副主任, 洛阳市青年科技奖获得者。

从事法医毒理学和法医病理学工作28年, 参编“十一五”规划教材《法医毒理学》(第4版), 主编《法医学心脏检验理论与实践》, 任《法医学司法鉴定》和《实用法医学司法鉴定》副主编, 编导《法医学心脏检查》电教录像, 获河南省电教成果二等奖。获河南省科技进步二等奖1项, 河南省教育厅科技进步二等奖3项, 主要研究方向为: 酒精中毒和颅脑损伤的分子生物学机制。发表学术论文60余篇。



喻林升, 教授, 博士, 硕士研究生导师, 从事法医学和病理学教学、科研和检案工作30余年。温州医科大学法医学系首届主任, 温州医科大学司法鉴定中心副主任, 温州医科大学司法鉴定科学技术研究所副所长, 浙江省司法鉴定协会法医病理专业委员会副主任委员, 全国高等学校法医学专业第五轮规划教材评审委员会委员。参编国家级规划教材《法医毒理学》和《法医学》3部, 参加和主持国家自然科学基金、浙江省自然科学基金、省厅级课题十余项, 先后在国家级、省级专业杂志发表论文50多篇, 其中SCI收录6篇, CA收录5篇, 科研成果获浙江省人民政府科学技术奖二等奖、浙江省高校科研成果奖二等奖等多种奖项。

前 言

1983年山西晋祠会议后,全国六所重点医药院校先后成立法医学系,并将“法医毒理学”列为法医学专业的必修课,《法医毒理学》理论教材于1988年10月出版,20多年来经过广大法医学教学工作者的努力,我国法医毒理学的教学水平及课程建设已有了很大的提高,随着全国各地对法医学人才需求的不断增加,目前从事法医学专业教育的高等院校已增至30所,在法医毒理学实验课教学中,由于各校选用的教学方法和手段不同,教学效果参差不齐,大家一直希望有一部较系统的实验指导教材,2014年8月全国高等院校法医学专业教育指导委员在湖南长沙召开会议,确定编写《法医毒理学实验指导》,经过全体编委的努力,按《法医毒理学》理论教材的内容编排体系,组织编写了这本实验指导。

全书共十六章。在绪论中重点介绍法医毒理学实验教学目的和要求;毒理学动物实验基础知识、实验设计的基本原则、动物模型、一般操作、实验观察及记录;中毒尸体的鉴定要点、检材提取、结果分析和鉴定意见书的编写。第二章到第十一章是根据各类毒物特点设置的具体实验,分为动物实验、中毒案例大体标本及组织病理学观察,加深学生对课堂内容的理解,掌握各类毒物的中毒症状及毒理病理学变化,同时进行实验能力的培养;另外,每章都设有典型中毒的案例分析,使学生对毒物作用的靶器官形态学、病理学改变及死因分析有更好的理解。近十年来,由于法医毒物动力学理论与实践的发展,加之部分高校进行教学改革,设置了大学生创新基金资助项目,为适应当前教学需要,在第十二章设计了综合性、自主设计性实验,主要培养学生对所学知识融会贯通,综合运用所学知识进行自主创新和科学研究的能力。第十三章和第十四章是细胞毒理学和分子毒理学实验,主要介绍了目前毒理学研究中常用的方法和原理,希望对学生未来进一步工作、学习有所帮助。第十五章为法医毒理学论文写作,第十六章为复杂、疑难中毒案例分析,希望可以提高学生的学习兴趣和求知欲望,培养其进行科学思维,总结科研成果,对疑难复杂案例进行分析解决的能力。另外,为了更好地方便学生的学习,文后列出了相关名词的中英文对照索引。

各校在使用该教材时,可依据自身的特点、教学优势,对内容进行取舍,合理安排使用。

由于《法医毒理学实验指导》教材是首次编写,尽管编委们作出了很大努力,但由于经验不足,加之水平和实践有限,书中难免有不妥或错误之处,请使用本书的师生及同行多提意见,以便再版时修改。

本书在编写过程中,得到苏州大学医学部、华中科技大学同济医学院法医学系、中国医科大学法医学院、四川大学基础医学与法医学院、河南科技大学法医学院、温州医科大学法医学系、昆明医科大学法医学院的大力支持。苏州大学王芸同学、四川大学卢玫瑰同学在文字校对方面也做了大量工作,在此特表致谢。

朱少华

2016年2月于苏州

目 录

第一章 绪论	1
第一节 法医毒理学实验教学的目的是要求.....	1
一、实验教学的目的	1
二、基本要求	1
三、实验教材及参考书目	2
四、课程考查及考核方法	2
五、法医毒理学实验项目设置、内容	2
第二节 法医毒理学实验基本内容和实验方法.....	2
一、动物实验设计的基本原则和要点	3
二、实验动物模型及一般操作	4
三、实验动物中毒表现的观察、解剖及组织病理学检查	6
四、毒理学动物实验及报告编写的要求	8
五、中毒量、致死量、致死血浓度	8
第三节 中毒尸体检验与鉴定.....	10
一、中毒尸体法医学检验要点及准备	10
二、中毒尸体尸表、解剖及组织病理学观察	11
三、毒物分析检材的提取、保存和送检	12
四、毒物分析结果的评价	13
五、中毒尸体检验鉴定意见书的书写	14
第二章 腐蚀性毒物中毒	15
实验一 腐蚀性酸、碱中毒动物实验	15
一、急性浓硫酸中毒	15
二、急性浓氨水中毒	17
实验二 大体标本、组织病理学图片观察和案例分析	19
一、大体标本	19
二、组织病理学图片	21
三、案例分析	22
第三章 金属毒物中毒	26
实验三 金属毒物中毒动物实验.....	26

实验四 图片观察和案例分析	27
一、图片观察	27
二、案例分析	29
第四章 脑脊髓功能障碍性毒物中毒	31
实验五 乙醇中毒实验	31
一、急性乙醇中毒动物实验	31
二、乙醇中毒人体实验	32
实验六 苯巴比妥中毒动物实验	33
实验七 大体标本、组织病理学图片观察	34
第五章 毒品中毒	38
实验八 毒品中毒动物实验	38
一、急性吗啡中毒及干预实验	38
二、急性氯胺酮中毒	39
三、急性甲基苯丙胺中毒	40
四、毒品依赖性评价实验	41
五、甲基苯丙胺行为敏化实验	42
六、甲基苯丙胺条件性位置偏爱实验	43
七、甲基苯丙胺自身给药实验	44
实验九 案例分析	45
第六章 呼吸功能障碍性毒物中毒	49
实验十 呼吸功能障碍性毒物中毒实验	49
一、急性氰化物中毒	49
二、急性一氧化碳中毒	50
实验十一 图片观察和案例分析	51
一、图片观察	51
二、案例分析	53
第七章 农药中毒	60
实验十二 农药中毒	60
一、有机磷农药中毒动物实验	60
二、不同途径氨基甲酸酯类农药中毒动物实验	61
三、急性百草枯中毒动物实验	63
实验十三 大体标本、组织病理学图片观察和案例分析	64
一、大体标本	64
二、组织学图片	67
三、案例分析	67

第八章 杀鼠剂中毒	70
实验十四 杀鼠剂中毒动物实验.....	70
一、急性毒鼠强中毒	70
二、急性氟乙酰胺中毒	72
三、急性磷化锌中毒	74
四、溴敌隆中毒	76
实验十五 中毒案例分析.....	78
第九章 有毒动物中毒	82
实验十六 河豚中毒动物实验.....	82
实验十七 斑蝥中毒动物实验.....	83
实验十八 蛇毒中毒动物实验.....	84
实验十九 常见有毒动物标本及中毒案例分析.....	85
一、有毒动物标本	85
二、案例分析	85
第十章 有毒植物中毒	88
实验二十 有毒植物中毒动物实验.....	88
一、急性乌头中毒	88
二、制马钱子粉急性中毒	89
实验二十一 有毒植物标本、中毒案例图片观察和案例分析	90
一、有毒植物标本	90
二、中毒案例图片	91
三、组织学图片	92
四、案例分析	94
第十一章 突发性、群体性中毒	96
实验二十二 急性硫化氢中毒实验.....	96
实验二十三 急性磷化氢中毒实验.....	98
实验二十四 中毒案例分析.....	99
第十二章 综合、设计性实验	109
第一节 毒物代谢动力学及死后再分布实验.....	109
实验二十五 苯巴比妥代谢动力学实验.....	109
实验二十六 溴氰菊酯死后再分布实验.....	110
第二节 毒(药)物LD ₅₀ 测定实验	112
实验二十七 百草枯农药LD ₅₀ 测定实验	112

第十三章 细胞毒理学实验	115
实验二十八 细胞计数及台盼蓝染色法测定细胞成活率.....	115
实验二十九 MTT 法检验细胞代谢活力	116
实验三十 亲和免疫细胞化学法(ABC 法)	117
实验三十一 流式细胞仪分析技术.....	119
实验三十二 TUNEL 原位末端标记法检测细胞凋亡	120
第十四章 分子毒理学实验	122
实验三十三 8-OHdG 高效液相色谱 - 电化学法(HPLC-ECD)检测	122
实验三十四 DNA 甲基化重亚硫酸盐 - 焦磷酸测序	123
实验三十五 定量 QRT-PCR 法测定 microRNA	124
实验三十六 蛋白质的提取及含量测定.....	126
实验三十七 蛋白质氧化产物的检测(Western 印迹法)	127
实验三十八 差异蛋白质组分析.....	129
第十五章 法医毒理学论文写作	131
第一节 法医毒理学论著写作要点.....	131
一、标题或篇名	131
二、作者署名	131
三、摘要或内容提要	132
四、关键词	132
五、前言或序言	132
六、材料与方法	132
七、实验结果	133
八、讨论	133
九、参考文献	133
第二节 法医毒理学综述写作要点.....	134
一、前言	134
二、正文	134
三、总结	134
四、参考文献	134
第三节 法医学毒理学案例报道写作要点.....	134
一、前言	134
二、案例报告	134
三、讨论	134
四、小结	135
五、参考文献	135
第十六章 复杂、疑难中毒案例分析	136

附录 案例分析参考答案·····	146
参考文献·····	156
中英文名词对照索引·····	157

第一章 绪 论

第一节 法医毒理学实验教学的目的是和要求

法医毒理学 (forensic toxicology) 是一门应用毒理学及有关学科的理论和技术, 研究与法律有关的自杀、他杀和意外、灾害事故引起中毒的一门法医学专业课程, 也是一门实践性很强的学科。法医毒理学作为毒理学的分支学科, 与毒理学的发展密不可分。近年来, 随着社会的发展和生活条件的改善, 人们在生产和日常生活中接触化学物的品种和数量越来越多, 不同性质的中毒和中毒死亡事件时有发生, 毒物的品种也不断发生变化, 对法医毒理学理论和实践的发展都提出了更高的要求。法医毒理学教学的目的除揭露以毒物为暴力手段对人体造成的危害, 为涉及毒物的中毒案件提供侦破线索和犯罪证据外, 也给临床实践提供诊断和治疗的依据。因此, 法医毒理学理论与实践存在着紧密联系。通过本实践课的学习, 应着重培养广大学生掌握法医毒理学基本理论及解决实际问题的能力。

一、实验教学的目的

法医毒理学研究的内容主要为常见毒物的性状、中毒原因、毒理作用、中毒量和致死量、中毒血浓度和致死血浓度, 器官组织的病理学改变, 毒物化验检材的提取、保存与送检, 中毒或死亡方式鉴定等, 主要涉及的对象是人体。法医毒理学与法医病理学和法医毒物分析存在着必然的联系。法医毒理学实验教学的目的是加深和巩固对理论教学内容中相关基础理论和知识的理解, 提高学生的动手能力, 培养其发现问题和解决问题的能力, 综合分析解决中毒案件的的实际应用能力。本教材部分内容以实验动物为研究对象, 观察毒物中毒症状、尸检所见、组织器官中毒病理变化, 希望通过法医毒理学实验课的学习, 掌握常见毒物中毒的法医学鉴定要点, 通过复杂疑难中毒案例分析, 全面提高学生的综合素质和创新思维能力; 结合毒理学理论和实验技术的发展, 通过综合性自主设计性、细胞毒理学和分子毒理学实验, 指导学生掌握现代生物学的理论和技术, 培养学生创新能力和从事科学研究的基本能力, 为今后发展打下良好的基础。

二、基本要求

在掌握和熟悉法医毒理学理论教材的基础上, 通过本教材的学习, 使学生达到如下要求:

1. 掌握常见中毒案件的毒物种类、性状和法医毒理学鉴定的基本知识;
2. 掌握常见毒物中毒的中毒量、致死量、中毒血浓度和致死血浓度的关系;
3. 掌握常见毒物中毒的毒理机制、中毒症状、实验室生化检查及毒物分析样本的采取方法等;
4. 掌握常见毒物中毒的尸检要点、组织病理学变化及法医毒理学鉴定方法;
5. 通过典型、复杂、疑难中毒案件的分析, 掌握法医毒理学鉴定的基本理论和方法;
6. 通过自主设计实验, 培养学生的创新思维和从事科学研究的能力。

结合高等院校实际, 要求学生通过本学科的学习并综合应用相关知识, 在实验中发现、解决问题

并提出新观点和新方法,再通过实践去验证,把法医毒理学实验课作为学生培养创新能力的平台,全面提高学生的综合素质。

三、实验教材及参考书目

本实验教材共 16 章,实验内容涵盖了演示性实验、验证性实验、综合性实验和自主设计性实验等。本教材与理论教材《法医毒理学》章节安排相一致,各校可依据自身的特点和教学优势对教学内容进行取舍。有兴趣和学有余力的同学如想进一步扩充和更好地掌握本学科内容,建议挑选如下参考书目:

1. 孙敬方. 动物实验方法学. 北京:人民卫生出版社,2001.
2. 袁伯俊,廖明阳,李波. 药物毒理学实验方法与技术. 北京:化学工业出版社,2007.
3. 负克明. 法医毒物动物学. 北京:人民卫生出版社,2015.
4. 周志俊. 基础毒理学. 上海:复旦大学出版社,2008.
5. 王心如,孙志伟,陈雯. 毒理学基础. 第 6 版. 北京:人民卫生出版社,2012.

四、课程考查及考核方法

实验课程开始前,学生应该按教学要求做好课前预习准备;实验课程完毕后,学生应整理实验资料,总结实验结果,分析实验观察所见并书写实验报告,认真按实验报告格式填写实验报告,将实验中发现的问题以实验报告的形式真实记录,最后分析实验结果交带教老师批改。法医毒理学实验报告格式及内容如下:

1. 实验名称
2. 实验目的
3. 实验材料
4. 实验步骤
5. 实验观察结果
6. 实验结果分析及讨论
7. 实验结论

五、法医毒理学实验项目设置、内容

法医毒理学实验主要分为两部分。第一部分为动物实验,让学生对理论课的学习有直观的理解,同时培养学生的动手能力;第二部分为形态学观察和案例讨论,通过对大体标本、组织病理学的观察,掌握化学物质作用于机体后不同器官的形态学改变和病理生理机制。

(朱少华)

第二节 法医毒理学实验基本内容和实验方法

法医毒理学实验基本内容主要包括动物实验和中毒案例大体标本观察及组织病理学观察两大部分,前者主要观察在控制条件下(如剂量、时间、染毒途径等)毒物作用的靶器官和靶组织的功能和病理形态学改变,后者主要为实际检案中积累的中毒死亡案例标本。由于实验动物多为哺乳动物,其解剖学、生理学、生物化学与人类有很多相似的一面,因此观察实验动物接触外源性化学物后发生的毒效应,并将结果预测到人,仍具有重要的参考意义,此外利用毒物的毒性及毒理作用机制,观察中毒后实验动物出现的中毒症状和表现,对中毒死亡的尸体进行解剖检查和病理组织检查,结果直观,便于理解,对毒物中毒靶器官、靶组织及毒物在体内的分布、代谢的确定也具有重要价值,但实验前应对动物种属、饲养条件、中毒方式做好选择和准备。

一、动物实验设计的基本原则和要点

(一) 实验设计的基本要素

良好的实验设计是保证实验结果与质量的重要前提。在实验设计时,不仅要保证实验的科学性和逻辑性,以使研究结果具有重现性和可靠性,而且还要经得起时间的考验。一般来说,动物实验设计的基本要素有以下几个方面。

1. 实验对象 实验对象往往根据研究目的而定。在法医毒理学实验中根据实验对象的不同主要分为整体动物实验、组织器官实验、细胞实验和分子生物学试验等。总体上要求实验对象对处理因素要敏感,反应要稳定。

2. 处理因素 处理因素是能引起实验对象产生效应的因素。在进行法医毒理学实验时,处理因素可以是单因素,也可以是两个或两个以上的因素。由于多个处理因素对实验对象共同作用时不易判断处理因素的剂量与其作用性质的效应关系,而且往往造成整个实验难以控制,因此一般实验设计时应以单处理因素为主,同时该处理因素也应设立多个处理水平,如对某一毒物进行观察时设计多个剂量组。

3. 实验效应 实验效应指处理因素产生作用后所达到的实验对象的效果和结局,通常以某项或多项实验指标的变化来表示。需要指出的是,这些指标应具有客观性、精确性、特异性和灵敏性。

(二) 实验设计的基本原则

实验设计中必须遵守的基本原则有对照(control)、随机化(randomization)和重复(replication)。

1. 对照原则 在确定接受处理因素的实验组(experimental group)时,应同时设置对照组(control group),其目的是在实验中消除各种无关因素对实验结果的影响,它与实验组相比具有同等重要的意义,没有对照组的结果很难使人信服。对照组有可比性,是在同时、同地、同条件下进行的,也必须将实验对象随机分配给对照组和实验组。

在实际操作中,对照组的设置方式有2种,即自身对照和组间对照。自身对照是指在同一个体观察实验处理前后某种或几种指标的变化,即把实验处理前的指标和实验处理后的指标,作为处理后同一指标和同几种指标的对照,有时也可以把两种实验处理因素的作用在同一个体上进行一前一后的比较。自身对照的优点是可有效减少个体差异对实验处理反应的影响。组间对照是指将若干受试对象随机分成若干单行组,随机挑选一组作为对照组而其他组作为实验组,进行的实验比较。此外,有时还应设置空白对照和阳性对照以确保实验的精确性。

(1) 空白对照:空白对照组即受试对象不接受任何处理,主要用于评定观察方法的准确度,以观察受试对象是否处于正常状态。例如,在实验中设置空白对照以测本底值。

(2) 阳性对照:阳性对照组即对受试对象给予标准的阳性物质处理或经典的治疗(处理)方法作为阳性对照。

2. 随机化的原则 采用随机的方法,使每个受试对象都有同等机会被抽取或分配到不同的实验组和对照组。随机化原则应贯穿于实验设计和实验的全过程中,包括:①抽样的随机:即每个个体都有同等的机会被抽到样本中来,以保证所得样本具有代表性,使实验结论具有普遍意义;②分组的随机:使每个受试对象机会均等,以保证受试对象的各方面状况在对比组间尽可能均衡,以提高组间可比性;③实验顺序的随机:指每个受试对象先后接受实验处理的机会均等,以消除实验顺序的影响。

3. 重复原则 重复原则是指在相同实验条件下进行多次研究和观察的实验原则,以利于提高实验可靠性及科学性,包括:①整个实验的重复,能确保实验的重现性,提高实验的可靠性,不可重复的实验是不可信的,通过重复,可避免机会造成的影响;②用多个受试对象进行重复,能避免把个别情况误认为普遍现象,把偶然性或巧合性当成必然规律,因此每组要有足够的样本量;③同一受试对象的重复观察,实验误差是客观存在的,只有在同一实验条件下对同一观测指标进行多次重复测量,才能计算出误差大小,重复测量的目的是降低实验误差,多次重复测量会减少均数的误差。

重复原则是实验可靠、稳定的前提,如果实验结果不能再现或不稳定,就得不到公认,因此应选用标准化的实验动物,只有这样才能排除遗传上的不均一而引起的个体差异,排除动物自身所携带的微生物、寄生虫和潜在疾病对实验结果的影响,获得可靠的实验结果,便于研究比较和交流。

(三) 实验动物涉及的伦理问题

实验动物用于研究、教学和实验。为明确毒物作用靶器官和在体内的代谢过程,动物实验是必不可少的。实验动物对毒理学的发展有巨大的贡献。因此,所有实验操作者要尊重生命,善待实验动物。《实验动物管理条例》规定了对实验动物必须受到爱护,不得戏弄或虐待。对待实验动物应遵守以下原则:给予人道主义的管理和处理;使痛觉和不适感减少到最低;避免不必要的动物实验。操作者应贯彻由英国动物学家 William 和微生物学家 Rex 在《人性动物实验技术原则》中提出的 3R 原则,即替代(replacement)、减少(reduction)和优化(refinement)。替代是指应用低等的动物或材料代替高等的动物的方法;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;优化是指使用动物时,减少动物不必要的痛苦。

二、实验动物模型及一般操作

(一) 整体动物实验

正确选择实验动物是科学实验首先要考虑的问题之一,由于实验有不同研究目的和应用不同技术手段,而且不同种类实验动物也有其各自不同的生物学特点和解剖生理特征,因此,随意选择动物用于实验研究,可能会得出不可靠的实验结论。总体上,整体动物实验应遵照以下原则。

1. 相似性原则 利用动物与人体组织结构、系统、生理特性、解剖特性、疾病特点和繁殖方面的相似性选择实验动物,如哺乳类动物在某些功能、代谢、组织结构和疾病特点方面与人类近似,可以将不同实验动物与人类进行比较,选择相似性强的动物。实验动物进化层次越高,其功能、结构越复杂,反应也越接近于人类。因此像猴这样的灵长类动物是最接近人的实验动物,但其数量少,价格昂贵,不易获得。某些动物进化程度并不一定高,但其组织器官的结构与人很相似,价格也便宜,容易获得,因此便于使用。例如,在研究神经系统方面,两栖类动物由于大脑不够发达,不适合用于测试高级神经活动,但是在简单反射中却有良好的效果。在生理方面,人类的血压、体温、呼吸之间是具有相关性的,体温升高会导致呼吸和心率的加快。因此在进行动物实验的时候,也要注意选择选用恒温动物。解剖方面,不同种类的动物之间,各器官的大小、形态、构造等方面都有所不同。如哺乳类动物都有两个心房和两个心室,但是蟾蜍、青蛙等只有两个心房和一个心室。在其他重要脏器中,如肝、肺、脑中都有各自的特异性。其次,在年龄上也要具有相似性,不同种属动物寿命长短不一,但大多动物的寿命比人类的短,选择时应了解相关知识,挑选与人的某年龄段相对应的动物进行实验研究,如:慢性实验或观察动物生长发育应选择幼龄动物,一般实验应选择成年动物;此外在实验动物的遗传背景、营养及环境背景标准化后,在生理和健康状况方面也应具有近似性,微生物控制可将动物分为普通动物、清洁动物、无特定病原体动物和无菌动物,要根据实验研究的不同要求选择适当级别的动物。

2. 差异性原则 各种实验动物在基因型、表型、代谢型、易感性等特点上的差别也是选择时要考虑的重要原则之一,如研究过程中要求以这样的差异为指标或特殊条件时,选用不同实验动物的某些特殊反应,更适合于不同研究目的的要求。

3. 可获得性原则 许多啮齿类动物,繁殖周期短,具有多胎性,饲养容易,遗传和微生物控制等也方便,在毒理学实验中应用广泛,如实验大鼠、小鼠是应用最多、用途最广的实验动物。

4. 经济性原则 是指在不影响实验结果的准确性和精确性的前提下,尽量减少实验成本,包括选用价格便宜的动物或者简化实验方法。

(二) 实验动物的选择方法

动物对外界刺激的反应存在着种属差异和个体差异,为了减少误差发生,在动物的选择上应注

意年龄、体重、性别、生理状态及健康状况等多种因素。

1. 实验动物物种选择 常见的为啮齿类和非啮齿类,一般认为如果两个物种以大致相同的剂量,在相同的接触方式下均有中毒反应的发生,那么人则有可能以相同的方式发生毒性反应。如果不同物种的毒性反应有很大差别,就必须研究毒物在物种中的代谢动力学及毒物作用机制,然后才能将结果外推给人。

2. 实验动物的选择 对于小鼠和大鼠可以按遗传学控制分为近交系、杂交群和封闭群。近交系指全同胞兄妹或亲人之间连续交配 20 代以上而培养的纯品动物,如(A)(BALB/c)(C₃H)(DBA);杂交群是指两个不同的近交之间有目的地进行交配,所产生的第 1 代动物,如 nu、dw、hr 等;封闭群也称为远交群,是指一个群在 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 KM 小鼠、NIH 小鼠、Wista 大鼠、Sprague Dawley (SD) 大鼠等。按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。家兔常用的品种包括新西兰白兔、大耳白兔和青紫兰兔。动物的个体差异性对实验有较大的影响,包括性别、年龄、健康状况、营养状况和个体敏感性。例如,通常雌性对药物的敏感性高于雄性,因此在实验随机分组中要注意动物性别分配要平均。年龄不同的小鼠对毒物的吸收、代谢和排泄等都有所不同,因此会对实验结果有一定影响。营养不足会影响动物对毒物作用的反应,因此应给予实验动物充足的营养。个体敏感性差异是指同种动物的不同个体对毒物有不同的反应,可从无反应到出现死亡。个体敏感性差异主要与个体本身对毒物的代谢能力有关。

3. 实验动物微生物控制的选择 按微生物控制可将实验动物分为 4 级,毒理学应使用Ⅱ级或以上动物,以确保实验结果的可靠性。Ⅰ级为普通动物,实验动物中微生物控制要求最低的动物。Ⅱ级为清洁动物,饲养中要注意空气净化并且全部仪器设备在进入室内均要消毒。Ⅲ级为无特定病原体动物,只能从Ⅱ级以上的动物中获得,要求纯系繁殖,饲养在隔离器内,没有致病病原体。Ⅳ级为无菌动物,在自然界中不存在。因此对实验动物的饲养区每 3 个月进行一次微生物监测,记录结果同时对不合格指标进行处理。

(三) 动物实验的一般操作

动物实验的基本操作包括:对健康动物的识别、动物的抓取及固定、实验动物性别的判断,实验动物的标号、麻醉、染毒方法及样本的采集。

1. 健康动物的识别 实验动物的健康情况与实验的结果有很大关系,不健康的动物对化学物质的耐受性较低,可能造成实验结果的假阳性。要在实验前 7~14 天开始对实验动物的体型、行为、反应、体重等进行仔细的观察和记录,同时让实验动物适应新环境。

2. 动物的抓取与固定 实验动物包括小鼠、大鼠、家兔、狗、猴等,由于毒理学实验中通常采用小鼠和家兔,因此着重介绍这两种动物的抓取和固定。

(1) 小鼠:用一只手先抓住鼠尾提起,使其向前爬行,另一只手的拇指和食指抓住颈部,身体于掌心处,尾巴由无名指和小指压住,另一只手可以进行后续操作。通常使用大头针或线将小鼠的四肢固定在木板上不令其活动。

(2) 家兔:抓住家兔的后颈部,另一只手托住兔臀部。将四肢固定在实验台的两侧,门牙用线拴在实验台的铁柱上。

3. 性别判定 动物实验中,同种动物的不同性别对化学物质的敏感性不同,因此性别对实验结果也有一定的影响。一般而言,依据动物的肛门和外生殖器的距离进行判别。距离较长的为雄性,短的为雌性。

4. 编号 动物实验中,为了将个体之间区分,需要进行编号。基本要求是清楚和易认。最常采用的是染色法,将试剂在躯体的不同部位处进行涂染,常用的有苦味酸溶液和品红溶液。染色的基本原则是:从左至右,由上到下。左上肢为 1 号,左腹部为 2 号,左下肢为 3 号,头顶为 4 号,腰背部为 5 号,尾部为 6 号,右上肢为 7 号,右腹部为 8 号,右下肢为 9 号,如果多于 10 只,可用双染料进行

标记,一种颜色表示个位,另一种颜色为十位即可。但是颜色法不持久,因此多用于实验周期较短的实验。

5. 麻醉 为了方便实验的进行和减少实验动物的痛苦,麻醉的实施是极为重要的。实验室中常采用静脉注射方法,可以让动物很快进入麻醉状态。小鼠由尾静脉注射,兔子由耳缘静脉注射,注射时要注意麻醉药的量和浓度。过多会导致动物死亡,过少动物会在实验中醒来,导致实验无法顺利进行。

6. 染毒 无论动物实验是急性、慢性或者亚慢性,染毒途径主要是经口、皮肤和呼吸道三种方式。

(1) 经口染毒

1) 喂饲:将化学物质拌入饲料或水中,让动物自己摄入,根据每日摄入量计算化学物质的摄入量。喂饲法的优点是与人类摄入毒物的方式一致,但由于可能产生异味导致实验动物拒食或者化学物质挥发等原因会导致剂量不准确。另外实验动物必须单独饲养。

2) 灌胃:化学物质直接灌入动物胃内剂量准确,但是灌胃染毒工作量较大,且可能会伤及器官导致动物中途突然死亡,最终导致实验结果不准确。

3) 吞咽胶囊:此方法简单易行,大型动物多用此方法。

(2) 经皮肤染毒:脂溶性化学物质通常可以采用经皮肤染毒的途径。但在进行皮肤染毒实验时,应该注意皮肤与化学物质的接触时间、面积、环境的温度、化学物质的挥发性等。通常使用实验动物的背部皮肤。

(3) 经呼吸道染毒

1) 自行呼吸:将实验动物放入含有稳定浓度化学物质的容器中,容器中的氧气、二氧化碳的分压、温度和湿度都应该稳定。但是该方法不能避免皮肤与化学毒物的接触,故而可以只将动物的头部放于容器中。

2) 人工气管注入:该方法在毒理学实验中极少用到。

7. 样本采集 常规毒性实验需要采集动物的血液和其他体液。

(1) 血液的采集方法

1) 小鼠:多从尾静脉采血。先将动物麻醉固定后,将尾巴置于温水中浸泡,用酒精擦拭尾巴,待血管扩张后擦干,剪去尾尖,直接用试管接住,采血完毕后,用棉球压迫止血并用6%的火棉胶涂在伤口处,此方法可反复使用。

2) 兔:从耳缘静脉采血。先将动物固定,拔去采血部位的毛后消毒,用手指轻弹,使血管扩张,沿耳缘静脉刺入血管采血。

(2) 体液的采集:尿液、粪便、胆汁和脑脊液的采集根据动物的物种不同采集方法也各不相同。

三、实验动物中毒表现的观察、解剖及组织病理学检查

(一) 动物毒性实验

动物毒性实验的主要目的是通过毒物在实验动物上产生的效应经过合理推断后可以大概推测出在人体上的效应。动物毒性实验主要目的是测定该物质的作用效果或者与其结构类似的物质的毒性效应。动物毒性实验包括:急性致死实验,亚急性、亚慢性和慢性实验。

1. 急性致死实验 对物质进行毒性测定时,首先测定的是其急性毒性。给予单一剂量的物质14天内每天对实验动物进行检查,并作相应死亡统计。急性致死实验目的包括:①定量估计半数致死量(LD₅₀);②为其他实验的剂量设计提供参考剂量;③观察动物急性中毒的症状。在急性致死实验中对动物中毒症状、临死前表现和死亡时间的观察都是极为重要的。

2. 亚急性实验 实验动物经过在14天内反复多次给药,观察其毒性,确定亚急性实验所需用量。

3. 亚慢性实验 亚慢性实验通常需要持续90天。亚慢性实验通常包括高、中、低三种剂量。其中要求高剂量引起的致死率不超过10%,低剂量不引起显著毒性。必须每天观察实验动物的状况,