

温病学实验教学指导

(供中医专业使用)

福建中医学院温病学教研室

一九九九年五月十九日

编写说明

在本教研室各位老师的共同努力下,自 1990 年起,我室已在中医专业本科班九个年级开设温病学实验课。通过九年的教学实践证明,开展本专业实验课,能帮助学生直观地理解《温病学》有关理论,巩固掌握理论知识,并对培养学生的科研技能,开拓学生对本专业的研究思路等方面皆有裨益。为此,我们将不断探索新的实践教学内容 and 教学方法,使本实验教学更趋完善。

本《实验指导》的实验教学内容与六版教材的教学内容相配套,安排了十项实验,每项为 3 学时,并附有有关病理片、幻灯片及电化教学等项目。

本《实验指导》为第四版的修改稿,但尚属试用阶段,内中不当之处,请各位老师及同学在教与学的过程中不断提出修改意见,以利充实与提高。

本《实验指导》由戴春福、陈锦芳、郑旭共同编写。

编 者

一九九九年五月十九日

目 次

一、实验课的目的和要求

二、实验报告的写作要求及其格式

三、实验教学内容

1. 动物实验基础知识介绍及基本操作训练
2. 内毒素性家兔温病卫、气分动物模型复制与观察
3. 内毒素性家兔温病营分证动物模型复制与观察
4. 白虎汤对家兔温病气分证防治作用的实验观察
5. 清营汤对家兔温病营分证防治作用的实验观察
6. 家兔温病气分证白细胞计数与分析
7. 家兔温病气分证白细胞分类检测与分析
8. 家兔温病营分证血小板计数与分析
9. 家兔温病营分证血小板聚集率检测与分析
10. 家兔脏器组织病理取材染色与光镜和幻灯观察
11. 温病舌诊幻灯观摩
12. 温病卫、气、营、血辨证、湿热病等电化教学

一、实验课的目的和要求

开设瘟病学实验课的目的,在于通过实验使学生初步掌握瘟病学实验的基本操作技术,了解开展瘟病理论实验研究的方法,以及验证和巩固瘟病学的基本理论。在实验过程中,培养学生对科学工作的严肃态度,严格要求、严密的工作方法和实事求是的工作作风。通过实验培养学生客观地对事物进行观察、比较、分析和综合归纳的能力,以及独立思考的能力。是提高瘟病学教学质量和促进中医现代化的有效途径。

为了实现实验课的目的,要求学生做到如下三点:

(一) 实验前:

1. 认真阅读《实验指导》中的有关内容、了解实验的目的、要求、实验步骤和操作规程。
2. 结合实验内容,复习瘟病学有关理论,做到充分理解。
3. 预测该实验各个步骤应得的结果。注意和估计实验中可能发生的误差。

(二) 实验时:

1. 实验器材的安放力求整齐、清洁、有条不紊。
2. 按照实验步骤,以严肃认真的态度循序操作,不得进行与实验无关的活动,要注意保护实验动物和标本,节省实验器材和药品。
3. 仔细观察实验过程中出现的现象,要随时记录并联系讲授内容进行思考。如发生了什么现象?为何出现这种现象?出现的现象有什么意义?等等。

(三) 实验后:

1. 将实验用具整理就绪,所用器械清洗干净,如有损坏短少,应及时报告老师。
2. 整理实验记录,作出实验结论。
3. 及时认真填写实验报告,按时交给老师详阅,作为平时成绩登记在冊。

二、实验报告的写作要求及格式

(一) 实验报告写作要求:

1. 凡是进行一项实验,均要求每人写出一份实验报告。
2. 实验报告必须按时完成,力求文字简练、通顺,书写清楚、整洁。
3. 实验报告内容:

(1) 注明姓名、班别、组别、日期、室温

(2) 实验号数和题目

(3) 实验目的

(4) 实验方法:作简短的说明即可

(5) 实验结果:是实验中最重要部分。应将实验过程所观察到的现象、指标,按实验结果的处理要求记录,要求如实准确地记述。

实验结果的处理:即将实验过程中所得到的结果进行分析和整理。凡属测量性质的结果,均应以正确的单位和数值定量;凡有曲线记录的实验,尽量用曲线记录实验结果;实验结果为了便于比较分析,可用表格或绘图表示(一般将观察项目列在表左侧由上至下填入)。表的右侧按时间或数量变化顺序由左→右逐格写入。若绘图表示,应注意以下几个问题:1)在图旁列出数值表格;2)横轴表示各种刺激条件,纵轴表示所发生的各种反应;3)坐标轴适当注解,包括剂量单位;4)选择大小适宜的标度以便作图,根据图的大小确定坐标轴长短;5)绘制经过各点曲线或折线要光滑。如果不是连续性变化,也可用柱形表示。6)在图下方注明实验条件。

(6) 讨论和结论:根据已知的理论知识对实验结果进行解释和分析,从实验结果中归纳出一般的、概括性的判断,也就是这一实验所能验证的概念,原则或理论的简明总结。

结论中不要罗列出具体的结果,实验结果中未能得到充分证据的理论分析不应写入结论。

(二) 实验报告的格式:

温病学实验报告

姓 名 班 别 小 班 日 期 气 温

实验号和题目:

实验目的:

实验方法(简介):

实验结果(观察到的各种现象指标):

讨论和结论(要联系理论,作较为全面深入的分析):

三、实验教学内容

实验(一) 动物实验基础知识介绍及基本操作训练

1. 动物实验的特点:

动物实验是医学研究中的最小的代价。最快的速度获得较准确结果的一种方法。其有以下几个特点:(1)可以更严格地控制实验条件。(2)可以进行对机体有害或可能有害的处理因素的研究。(3)可以最大限度地获取反映实验效应的样本和资料。(4)实验动物的繁育在房舍、设备、饲料、管理等方面都比较经济。

2. 使用动物的选择:

- (1) 种属:医学室实验中以兔、小鼠、狗、猫、豚鼠等哺乳动物最常用。
- (2) 品系:纯种动物为佳,最好同窝动物配对分组。
- (3) 年龄:根据实验目的和不同年龄动物的特点而定。
- (4) 性别:一般的研究多兼用雌、雄两性动物。
- (5) 健康状况:选良好者。

3. 实验动物的准备:

- (1) 检疫:如果实验动物不是来自可靠和繁殖场,有必在先行隔离检疫。具体的检疫期限和办法,视不同疾病及其潜伏期而定。
- (2) 适应训练:减少刺激,饲养室环境尽可能稳定。

(3) 饲养:饲养室的温度、通风、光照等条件要力求保持稳定。动物不可过分拥挤,定期更换饲料,饲料要保质保量,注意饲养室的卫生。

(4) 分组与标志:根据实验要求进行分组,每一只实验动物皆应标志。方法如颜色记号、项圈、爪环、耳壳打缺口,体表自然标志及耳廓数字标记等。

4. 动物模型设计的原则:

(1) 相似性 (2) 可重复性和一致性 (3) 适用性和可控性 (4) 易行性和经济性 (5) 确定性和可靠性

5. 常用动物实验操作技术:

(1) 测体温:

1) 测家兔体温时:用左臂夹住兔体抱稳,左手提起兔尾,或左臂夹住翻过身的兔体于平台上,左手抓住兔后两条腿,右手持体温计,沾上液体石蜡,插入肛门内(插入时不得用力太猛或旋转体温计)约 3.5 至 4 厘米,置肛内 3 分钟,后顺势取出,看体温计的读数。

2) 测大白鼠和小白鼠时:左手用布包着鼠身,以手指固定鼠尾,右手持体温计,沾上液体石蜡,插入肛门内约 1.5 ~ 2cm,置肛门 3 分钟。

(2) 家兔心脏、耳缘静脉采血法:

1) 心脏采血:将家兔仰卧固定于兔台上,用酒精棉球消毒左胸部、左手触摸左侧第 3 ~ 4 肋间胸骨左缘外 3 厘米处。选择心脏搏动最明显处,用 $6\frac{1}{2}$ ~ 7 号针头连接注射器垂直刺入约 4 ~ 5cm 深,当针头接近心脏时,会感到心脏的搏动,刺入心脏后,兔血可自然进入注射器内,稍加以抽动即可抽出所需血量。在进针、留针及退针整个过程中,注意勿来回转动或扭动针头,以免割损心脏。

2) 耳缘静脉采血:多取兔耳外缘静脉,剪去或拨去部分毛,用手轻弹血管,使静脉扩张,用酒精棉球轻擦局部、术者用左手食指和中指夹住静脉近心端耳廓,使静脉充盈,同时用拇指和无名指固定兔耳的远心端。右手持注射器,针头于静脉远心端与血管的角度呈 20 度左右,将针头刺入静脉,顺血管平行方向深入 1cm,放松耳根处血管的压迫,注射器回抽即可见

血,每次可抽 2~3ml。

若采血量需多时(30ml 左右),可用刀片切断耳中央动脉,直接用器皿盛血,采血毕用纱布压迫止血。

(3) 家兔脑脊液抽取法:

多采用小脑延髓池抽取法,即在家兔保持清醒的状态下,固定四肢,用 1ml 注射器连接 5 号或 6 号针头,经枕骨与第一颈椎间穿刺小脑延髓池。在刺透硬脑膜时,可感到针头前进的阻力突然消失有落空感,抽取澄清的液体约 1~2ml,迅速注入清洁干燥的试管内备用。

(4) 家兔给药途径和方法:

1) 静脉注射:一般采用耳外缘静脉,方法同“耳缘静脉采血法”,当针头刺入血管后,一手拇指和食指将针头夹持固定在兔耳上,另一手缓慢推动注射器筒芯,将药物注入静脉。如果阻力较大或局部出现肿胀,说明针头没刺入静脉,应重新操作。

2) 腹腔注射:将家兔仰卧位固定,在腹部下 1/3 略靠外侧处,用左手食指和拇指把皮肤往上提,用酒精棉球轻擦局部,针头垂直刺入腹腔,穿透腹壁时有空洞感,然后把药液注入腹腔内。

3) 灌胃:一人坐着用双腿夹住兔的躯干,左手紧握两前肢,右手抓住头部使其与颈部成 90 度角。另一人用木制开口器压在舌上面横贯口中,然后用尖端涂有石蜡油的 8~9 号导尿管,经开口器中央圆孔插入口中直至胃内(约 15~20cm)。然后将导尿管另一端放入盛水烧杯内,若无气泡证明已入胃内,即可接上注射器注入药物。注射时左手食指、中指按住注射器与导尿管连接处,以防滑脱。注完药物后,可再注入少量清水或空气将管内残留的药物全部注入胃内。每只兔子,一次灌胃量可为 10~50ml。

(5) 家兔处死法:

1) 空气栓塞法:通过耳缘静脉或心脏注射入 20~40ml 空气,造成气栓,很快致死。

2) 放血造成急性出血而致死亡:可切断肢动脉或颈动脉放血。(此法不多采用)

3) 脑震荡致死:用锤子或其他硬物,敲打后枕部,造成严重脑震荡致

死。

(6) 家兔解剖和脏器组织标本取材法:

1) 解剖法:家兔处死后,用手术剪从肛门处垂直穿刺,然后剪刀尖头往上剪开肌肉,打开腹胸腔,直至颈部下段。

2) 脏器组织标本取材:先取心、肺,再取肝、脾、肾、肾上腺、胃、肠等,脑组织一般后取。组织标本应取有病理价值的部分,标本厚度约 3~4mm,大小约 1.5~2cm² 左右,不宜过厚过大。

3) 组织标本固定法:组织标本取出后应立即固定在 10% 福尔马林液或中性福尔马林液中,固定液的体积应为组织标本的 10~20 倍。

附:10% 福尔马林液和中性福尔马林液的配制:10% 福尔马林液:37~40% 甲醛溶液 100ml,加蒸馏水或自来水 900ml;中性福尔马林液:浓福尔马林 100ml;酸性磷酸钠(含 1 分子水)4 克磷氢二钠 6.5 克,蒸馏水 900ml。

实验(二) 内毒素性家兔温病卫、气分证模型复制与观察

1. 目的和原理:

(1) 目的:从动物身上揭示温病卫、气分证的病理变化实质,以及临床表现。

(2) 原理:本实验经兔耳缘静脉直接注入小剂量大肠杆菌内毒素(15 μ g/kg),造成毒血症,观察病邪由表入里的临床表现和病理变化。

2. 实验动物:

大耳白兔或普通家兔,体重 1.8~2.5 公斤,雌(未孕)雄兼用。

3. 药品和器材:

(1) 药品:大肠杆菌内毒素(E·T),用生理盐水稀释成 15 μ g/ml,4℃ 冰箱保存、备用。用药前 30 至 40℃ 温水温浴 20 分钟。

(2) 器材:2ml、10ml 注射器,6~7 号针头、兔台、台秤、手术刀、手术剪刀、镊子、大方盘、肛温表、液体石蜡、75% 酒精、棉球、10% 福尔马林液、标准方格纸、笔记本、记录笔等。

4. 实验步骤和观察项目:

(1) 编号、称体重、辨雌雄、作好记录。

(2) 测基础体温:于攻毒前 24 小时内分别测肛温三次,取平均值为基础体温。

(3) 攻毒:经兔耳缘静脉缓慢注入 E·T 液,按 $15\mu\text{g}/\text{kg}$ 计量。

(4) 观察项目:

1) 症状与体征:发热(测体温每 30 分钟测第一次);恶寒(竖毛);口渴;进食;神情;耳廓;球结膜;二便等情况,应仔细观察做好记录。

2) 解剖后大体观察:大约攻毒后 2 小时,各种症状体征出现后,处死,即行解剖,观察家兔皮下及内脏各组织的改变情况,做好记录。

3) 病理取材:大体观察后,即取家兔心、肝、脾、肺、肾、肾上腺、胃、大小肠、脑等脏器组织的阳性部分,固定于福尔马林液中,待作切片检查。

5. 结果分析,写出实验报告:

要求对实验结果,结合温病学卫、气分证的有关理论进行分析讨论,作出本实验的结论。

附:复习思考题:

(1) 内毒素性家兔温病卫、气分证动物模型的复制方法如何?

(2) 大肠杆菌内毒素的致病特性如何?

(3) 家兔心、肝、脾、肺、肾各脏器的病理组织如何取材?

实验(三) 内毒素性家兔温病营分证动物模型的复制与观察

1. 目的和原理:

(1) 目的:从动物身上揭示温病营分证的临床表现和病理变化实质。

(2) 原理:本实验经兔耳缘静脉直接注入 E·T $40\mu\text{g}/\text{kg}$,造成较高浓度的毒血症,在短时间内出现邪入营分的临床表现和病理变化。

2. 实验动物:

大耳白兔或普通家兔,体重 $18 \sim 2.5$ 公斤,雌(未孕)雄兼用。

3. 药品和器材:

(1) 药品:大肠杆菌内毒素(E·T)用生理盐水稀释成 $40\mu\text{g}/\text{ml}$, 4°C 冰箱保存备用,用前 30 至 40°C 温水温浴 20 分钟。

(2) 器材:2ml、10ml 注射器、6~7 号针头、兔台、台秤、手术刀、手术剪

刀、镊子、大方盘、肛温表、液体石蜡、25%酒精、棉球、10%福尔马林液、标准方格纸、笔记本、记录笔等。

4. 实验步骤和观察项目:

(1) 编号、称体重、辨雌雄、作好记录。

(2) 测基础体温:于攻毒前 24 小时内分别测肛温三次,取平均值为基础体温。

(3) 攻毒:经兔耳缘静脉缓慢注入 E·T 液,按 $40\mu\text{g}/\text{kg}$ 计量。

(4) 观察项目:

1) 症状与体征:发热(测体温,每 15-20 分钟测一次);渴饮;进食;神态;抽搐;耳廓;球结膜;二便等情况,应仔细观察做好记录。

2) 解剖后大体观察:大约攻毒后 2 小时,各种症状,体征出现后,处死,即行解剖。观察家兔皮下及内脏各组织的改变情况,做好记录。

3) 病理取材:大体观察后,即取家兔心肝、脾、肺、肾、肾上腺、胃、大小肠及脑等脏器组织的阳性部分,固定于福尔马林液中,待作切片检查。

5. 结果分析,写出实验报告:

要求对实验结果,结合温病营分证的有关理论,进行分析讨论,作出本实验的结论。

附:复习思考题:

(1) 家兔营分证有何表现? 其与家兔气分证有何异同?

(2) 家兔营分证表现与患者临床表现存在哪些差异? 应如何进一步研究,使动物实验更加符合临床实际?

实验(四) 白虎汤对家兔温病气分证防治作用的实验观察

1. 目的和原理:

(1) 目的:通过复制家兔温病气分证模型,观察内毒素性发热的家兔体温变化规律以及白虎汤的退热作用,加深对家兔气分证的感性认识,深刻理解白虎汤的作用机理。

(2) 原理:运用白虎汤解热作用,控制 E·T 性毒血症由表入里的病变过程。

2. 实验动物:

大耳白兔或普通家兔,体重 1.8~2.5 公斤,雌(未孕)雄兼用。

3. 药品与器材:

(1) 药品:①大肠杆菌内毒素(E·T),用生理盐水稀释成 $15\mu\text{g/ml}$, 4°C 冰箱保存、备用。用前用 $30\sim 40^{\circ}\text{C}$ 温水温浴 20 分钟。②白虎汤腹腔注射液。药物组成及比例:生石膏 50g、知母 10g、生甘竹 5g、糯米 10g。按药:水 = 1g:10ml 为总加水量,第一煎取总水量 70%,第二煎为 30%,每次煎沸后 30 分钟,将两次煎液合并、过滤、浓缩为 100%煎液后用无水乙醇提取—过滤—蒸馏去乙醇、离心,取上清液,加 2N 氢氧化钠调 PH 至 9~9.5,过滤,再加入 6NHCL 调 PH 为 7.3 左右;经高速(10000X 克)离心后用蒸馏水稀释为 100%浓度(1 克生药/1 毫升),装入瓶内,高压灭菌,置 4°C 冰箱保存备用、用前用 50°C 左右温水温浴 20~30 分钟。

(2) 器材:2ml、10ml、20ml 注射器、6~7 号针头、兔台、台秤、手术刀、镊子、大方盘、肛温表、液体石蜡、75%酒精、棉球、10%福尔马林液、标准方格纸、笔记本、记录笔等。

4. 实验步骤和观察项目:

(1) 编号、称体重、辨雌雄、作好记录。

(2) 测基础体温:于攻毒前 24 小时内分别测肛温三次,取平均值为基础体温。

(3) 第一次腹腔注射白虎汤:于攻毒前 2 小时,经腹腔注入白虎汤腹腔注射液 10ml/kg,对照组给同等剂量无菌生理盐水。

(4) 攻毒:经兔耳缘静脉缓慢注入 E·T 液按 $15\mu\text{g/kg}$ 计量。

(5) 第二次注射白虎汤:攻毒后立即经腹腔注入白虎汤腹腔注射液 10ml/kg,对照组给同等剂量无菌生理盐水。

(6) 观察项目:

1) 症状和体征:发热(测体温,每 15~20 分钟测一次);恶寒(竖毛);口渴;进食;神情;耳廓;球结膜;二便等情况,详细观察,做好记录。

2) 解剖后大体观察:大约攻毒后 3 小时,各种症状体征观察完毕、处死,即行解剖,观察家兔皮下及内脏各组织的改变情况,做好记录。

3) 病理取材:大体观察后,即取家兔心、肝、脾、肺、肾、肾上腺、胃、大小肠、脑等脏器组织的阳性部分,固定于福尔马林液中,待作切片检查。

5. 结果分析、写出实验报告。

要求针对实验所观测的结果,结合有关理论进行分析讨论,作出本实验的结论。

附:复习思考题:

(1) 通过实验,结合已学理论写出短篇心得体会,(500~1000字)。

实验(五) 清营汤对家兔温病营分证防治作用的实验观察

1. 目的和原理:

(1) 目的:通过复制家兔温病营分证动物模型,观察清营汤对该模型的症状、体温及脏器组织病理形态学等的影响,增强对营分证病变的感性认识,深刻理解清营汤的作用机理。

(2) 原理:运用清营汤清泄热的作用,抑制 E·T 性毒血症发展为营分证的病变过程。

2. 实验动物:

大耳白兔或普通家兔,体重 1.8~2.5 公斤,雌(未孕)雄兼用。

3. 药品和器材:

(1) 药品:①大肠杆菌内毒素(E·T·),用生理盐水稀释成 $40\mu\text{g}/\text{ml}$, 4°C 冰箱保存、备用。用前用 30 至 40°C 温水温浴 20 分钟。②清营汤腹腔注射液。药物组成:水牛角 40g 、生地 15g 、元参 10g 、麦冬 10g 、丹参 10g 、竹叶心 10g 、黄连 10g 、银花 10g 、连翘 10g 。按药:水 = $1\text{g}:10\text{ml}$ 为总加水量,第一煎取总水量 70% ,第二煎为 30% ,每次煎沸后再煎 30 分钟,将两次煎液合并、过滤、浓缩为 100% 煎液后用无水乙醇提取——过滤——蒸馏去乙醇、离心、取上清液加 2N 氢氧化钠调 PH 至 $9\sim 9.5$,过滤,再加入 6NHCL 调 PH 为 7.3 左右;经高速离心后用蒸馏水稀释为 100% 浓度(1克生药/1毫升),装入瓶内,高压灭菌,置 4°C 冰箱保存备用。用前用 50°C 左右温水温浴 $20\sim 30$ 分钟。

(2) 器材:2ml、10ml、20ml 注射器、6~7 号针头、兔台、台秤、手术刀、

手术剪、镊子、大方盘、肛温表、液体石蜡、75%酒精、棉球、10%福尔马林液、标准方格纸、笔记本、记录笔等。

4. 实验步骤和观察项目:

(1) 编号、称体重、辨雌雄、作好记录。

(2) 测基础体温:于攻毒前 24 小时内分别测肛温三次,取平均值为基础体温。

(3) 第一次腹腔注射清营汤:于攻毒前 2 小时,经腹腔注入清营汤注射液 10ml/kg,对照组给同等剂量无菌生理盐水。

(4) 攻毒:经兔耳缘静脉缓慢注入 E·T 液,按 40 μ g/kg 计量。

(5) 第二次腹腔注射清营汤:攻毒后立即经腹腔注入清营汤注射液 10ml/kg,对照组给同等剂量无菌生理盐水。

(6) 观察项目:

1) 症状和体征:发热(测体温,每 15~20 分钟测一次);渴饮;进食;神态;抽搐;耳廓;球结膜;二便等情况,应仔细观察,做好记录。

2) 解剖后大体观察:大约攻毒后 3 小时,各种症状体征观察完毕,处死,即行解剖。观察家兔皮下及内脏各组织的改变情况,做好记录。

3) 病理取材:大体观察后,即取家兔心、肝、脾、肺、肾、肾上腺、胃、大小肠及脑等脏器组织的阳性部分,固定于福尔马林液中,待作切片检查。

要求针对实验所观测的结果,结合中西医有关理论进行分析讨论,作出本实验的结论。

附:复习思考题:

(1) 通过分析实验结果,从中西医两方面分析清营汤防治家兔营分证的作用机理。

(2) 结合实验及已学过的理论,写了短篇心得体会(500~1000 字)。

实验(六) 家兔温病气分证白细胞计数与分析

1. 目的和原理:

(1) 目的:通过本实验,了解内毒素性家兔气分证病变中白细胞总数的变化情况,加深理解机体正气抗邪的原理。

(2) 原理 :血液经稀释后,红细胞全部被溶解,注入计数池后,在显微镜下计数。

2. 实验动物:

大耳白兔或普通家兔、体重 1.8 ~ 2.5 公斤,雌(未孕)雄兼用。

3. 药品试剂和器材:

(1) 药品试剂:①大肠杆菌内毒素(E·T),用生理盐水稀释成 $15\mu\text{g}/\text{ml}$, 4°C 冰箱保存备用。用前用 $30 \sim 40^{\circ}\text{C}$ 温水温浴 20 分钟。②白细胞稀释液,冰乙酸 2ml 加蒸馏水至 100ml,再加 1% 亚甲蓝液 3 滴。

(2) 器材:白细胞计数池,显微镜、小试管、血红蛋白吸管、玻璃棒、2ml 注射器、6~7 号针头、手术刀、镊子、75% 酒精、棉球、记录纸等。

4. 实验步骤和观察方法:

(1) 编号、称体重、辨雌雄、作好记录。

(2) 测基础体温:于攻毒前 24 小时内,分别测体温三次,取平均值为基础体温。

(3) 第一次采血:攻毒前于兔耳静脉处作一切口取血。用血红蛋白吸管吸取 $20\mu\text{g}$ 血液,放入小试管内的稀释液中混匀(具体操作,详见计数法)。

(4) 攻毒:经兔耳缘静脉缓慢注入 E·T 液,按 $15\mu\text{g}/\text{kg}$ 计量。

(5) 第二次采血:大约于攻毒后 2 小时,出现气分症状时,再次切开耳静脉取血,用血红蛋白吸管吸取 20ml 血液,放入小试管内的稀释液中混匀(具体操作详见计数法)。

(6) 观察方法:

1) 白细胞计数法(试管稀释法):

① 取小试管 2 支,加入白细胞稀释液 0.38ml。

② 用血红蛋白吸管准确吸取末梢血 20ml,擦去管尖部余血,将吸管插入小试管中稀释液的底部,轻轻将血放出,并吸取上层清液,漱洗吸管二次,最后用手摇动试管混和。

③ 充池(白细胞计数池),静置 2~3 分钟,待血细胞下沉。

④ 用低倍镜计数先找到“井”形大方格,再计数,四角四个大方格内的

白细胞数。

⑤ 计算:将数的数字乘以 50×10^6 , 即得每升血中白细胞数, 或用下列公式计算。

计算公式: $\frac{4 \text{ 个大方格内白细胞数}}{4} \times 10 \times 20 \times 10^6 = \text{白细胞数/L}$

注:式中 $\div 4$ 为每大方格(即: $0.1\mu\text{l}$) 内白细平均数。

$\times 10$: 1 个方格容积为 $0.1\mu\text{l}$, 换算成 1ml 。

$\times 20$: 血液稀释倍数。

$\times 10^6$: 由 $1\mu\text{l}$ 换算成 1L 。

附:正常值(家兔): $6 \sim 13 \times 10^9/\text{L}$ 。

2) 观察症状和体征:

同气分证模型的复制观察。

5. 结果分析, 写出实验报告。

对实验结果(两次白细胞计数结果)进行分析比较, 结合已知理论知识进行讨论, 作出本实验的结论。

附:复习思考题:

(1) 结合实验结果, 对家兔气分证病变中白细胞总数变化情况, 机体正气与白细胞之间的关系, 以及在外感热病中的作用等, 作一讨论, 写出短篇心得体会(500 - 1000 字)。

实验(七) 家兔温病气分证白细胞分类检测与分析

1. 目的和原理:

(1) 目的:通过本实验, 了解内毒素性家兔气分证病变中的白细胞分类变化情况, 加深理解机体正气抗邪的原理。

(2) 原理:把血液制成细胞分布均匀的薄膜涂片, 用瑞氏染色法染色, 根据各类白细胞受色特征予以分类计数, 得出相对比值(百分率), 以观察数量, 形态和质量的变化。

2. 实验动物:

大耳白兔或普通家兔, 体重 $1.8 \sim 2.5$ 公斤, 雌(未孕)雄兼用。

3. 药品试剂和器材:

(1) 药品试剂:①大肠杆菌内毒素(E·T)用生理盐水稀释成 $15\mu\text{g}/\text{ml}$, 4°C 冰箱保存备用。用前用 30 至 40°C 温水温浴 20 分钟。②瑞氏染色液:瑞氏色素粉加甲醇混匀。③缓冲液:PH6.4 磷酸缓冲液,或中性蒸馏水。

(2) 器材:显微镜、血玻片、2ml 注射器 6~7 号针头、手术刀、镊子、75% 酒精、棉球、记录纸、笔等。

4. 实验步骤和观察方法:

(1) 编号、称体重、辨雌雄、作好记录。

(2) 测基础体温:于攻毒前 24 小时内,分别测体温三次,取平均值为基础体温。

(3) 第一次采血:攻毒前于兔耳静脉处作一切口取血,将血直接滴一滴在血玻片上,马上做血涂片、染色。(具体操作,详见白细胞分类计数法)

(4) 攻毒:经兔耳缘静脉缓慢注入 E·T 液,按 $15\mu\text{g}/\text{kg}$ 计量。

(5) 第二次采血:大约于攻毒后 2 小时,出现气分症状时,再次切开耳静脉取血。将血液直接滴一滴在血玻片上,马上做血涂片、染色。(具体操作,详见白细胞分类计数法)

(6) 观察方法:

1) 白细胞分类计数法:

① 制血膜片:采血后推制厚薄适宜的血膜片,方法是:用一张玻片(载玻片)取血 1 滴,另一张玻片(推片)的一端置载玻片血液的稍前方,使两玻片夹角成 $30\sim 45^{\circ}$,将推片略向右移与血液接触,用力均匀地推出,使血液沿夹角向两侧均匀散开,呈舌状,头、体、尾清晰可分。推好的血膜片在空气中晃动,以促使快干。天气寒冷或潮湿,应于 37°C 温箱中保温促干,以免细胞变形缩小。

② 染色(瑞氏染色法):平置玻片于染色架上,滴上染液 $3\sim 5$ 滴,使其迅速盖满血膜,约 1 分钟后,滴加缓冲液 $5\sim 10$ 滴,轻轻摇动玻片或对准血片吹气与染液充分混和, $5\sim 10$ 分钟后用水冲去染液,待干。

③ 分类计数:选择涂片的体尾交界处染色良好的区域,在油镜下计数 100 个白细胞,按其形态特征进行分类计数,求出各类细胞所占比值(百分