

毒理学基础实验教程



江高峰等 主编

湖北科学技术出版社

图书在版编目（CIP）数据

毒理学基础实验教程 / 江高峰等 主编 / 武汉市：湖北科学技术出版社，2012.04

ISBN： 978-7-5352-4961-6

毒理学基础实验教程

【作者】江高峰等主编

【出版发行】武汉市：湖北科学技术出版社，2012.04

【ISBN号】978-7-5352-4961-6

【页数】162；26CM

【原书定价】20.00

【主题词】毒理学-实验-教材

【中图法分类号】R99-33（医药、卫生>药学>毒物学（毒理学））

【内容提要】本书介绍了毒理学实验基本技术、一般毒性实验、特殊毒性实验、细胞毒理学实验、分子毒理学实验报告和生殖毒理学实验等相关内容。

【参考文献格式】江高峰等主编. 毒理学基础实验教程. 武汉市：湖北科学技术出版社，2012.04.

编 委 会

主 编 江高峰 梅 勇 陈 丹 李文芳 张 玲
编 委 张德新 宋世震 朱长才 吴 磊 石玉琴
常 薇 唐岱琨 王 萍 程 静

前 言

《毒理学基础实验教程》是根据《毒理学基础》教材编写的配套实验指导教程。本书共分六章,分别介绍了毒理学实验基本技术、一般毒性实验、特殊毒性实验、细胞毒理学实验、分子毒理学实验和生殖毒理学实验相关内容。

附录为毒理学实验的扩展阅读英文教程,主要介绍了国外毒理学实验动物的一般操作技术,也涉及到关怀动物与动物福利,实验动物安乐死等内容,有利于提高学生的专业英文水平和交流理解能力。

本教材既介绍了经典的卫生毒理学实验方法,又编写了反映现代毒理学发展水平的实验新技术,同时还包括综合性及拓展性毒理学实验项目,教材内容力求有前瞻性、针对性和可操作性。

本教材可供预防医学专业和卫生检验检疫专业本科生、研究生使用。各院校可根据不同的培养目标要求以及自身的实验教学条件,选择适当的实验内容。

目 录

第一章 毒理学实验基础	1
第一节 毒理学实验设计	1
第二节 实验动物的一般操作技术	13
第三节 毒理学实验报告的撰写及注意事项	22
第二章 一般毒性实验	25
第一节 急性毒性实验	25
I、经口急性毒性实验	25
II、经呼吸道静式吸入急性毒性实验	29
III、经皮肤急性毒性实验	32
第二节 局部毒性实验	35
第三节 蓄积性实验	40
第四节 慢性、亚慢性毒性实验	41
第三章 特殊毒性实验	46
第一节 致癌实验	46
I、哺乳动物细胞体外恶性转化实验	46
II、哺乳动物长期致癌实验	47
第二节 致突变实验	51
I、鼠伤寒沙门菌回复突变实验	51
II、小鼠骨髓细胞微核实验	56
III、骨髓细胞染色体畸变分析	58
第三节 发育毒性和致畸实验	60
I、三段生殖毒性实验	60
II、大鼠体外全胚胎培养实验	65
III、致畸试验及胚胎胎仔检查方法	68

第四章 细胞毒理学实验	74
第一节 细胞培养技术	74
第二节 细胞代谢活力测定 - MTT 实验	83
第三节 细胞凋亡检测	85
第四节 苯胺羟化酶活力测定	92
第五章 分子毒理学实验	95
第一节 生物大分子的分离与纯化	95
I、大鼠肝微粒体制备实验	95
II、大鼠肝组织 DNA 的提取及其含量测定)	96
III、蛋白质的分离与纯化实验	99
第二节 生物大分子损伤检测	103
I、DNA 交联检测实验	103
II、DNA 加合物检测实验	105
III、DNA 断裂检测实验实验	107
第三节 毒理学基因表达检测	109
I、DNA 甲基化实验	109
II、基因差异表达分析技术	112
第六章 生殖毒理学实验	117
第一节 一代生殖毒性实验	117
第二节 两代生殖毒性实验	119
第三节 大鼠子宫增重实验	120
第四节 小鼠精子畸形试验	121
附录 扩展阅读：实验动物的一般操作技术英文教程 ...	125
Lesson 1 Handling and Restraint of animals	125
Lesson 2 Determining Sex and Age	128
Lesson 3 Animal Identification	130
Lesson 4 IV Injection, IP Injection and Blood Collection	134
Lesson 5 Oral Gavage	143
Lesson 6 Anesthetics & Analgesics	145
Lesson 7 Surgical Care & Monitoring	150
Lesson 8 Minimizing Pain and Distress	152
Lesson 9 Euthanasia	157

第一章 毒理学实验基础

第一节 毒理学实验设计

一、目的和意义

毒理学的很多研究工作需要通过动物实验来进行。使用实验动物进行科研的优点是花费人力、物力较少，时间短，易发现单因素与结果的关系，能提供大量有价值的可与人类生命活动现象相类比的资料。在毒理学实验研究中，健康的实验动物是保证工作顺利进行和获得正确可靠的研究结果的重要条件。

毒理学研究外源化学物对于机体（特别是人体）的有害作用及其机制。毒理学研究的主要手段是动物实验。体内实验是以实验动物为模型，最终目的是通过外源化学物对实验动物的毒性反应，向人（原型）外推，以期评估外源化学物对人的危害及危险性。体外实验主要用于筛选和预测急性毒性和机制研究；人体实验和流行病学调查则可进一步深化和证实在动物实验中所得到的资料。实际上，毒理学作为一门实验科学是以动物实验为中心的，毒理学动物实验的设计、实施、结果观察和评价是毒理学研究的基本方法。

通过本次实验讨论，要求学生基本掌握毒理学实验设计的原则和方法。

二、内容

（一）毒理学实验的原则和局限性

1. 毒理学实验的原则

在毒理学的实验中，有三个基本的原则。

第一个原则：化学物在实验动物产生的作用，可以外推于人。

第二个原则：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的和可靠的方法。

第三个原则：成年健康（雄性和雌性未孕）的实验动物和人可能的暴露途径是基本的选择。

2. 毒理学实验的局限性

用实验动物的毒理学实验资料外推到人群接触的安全性时，会有很大的不确定性。

（二）毒理学常规毒性实验的基本目的

毒性评价或安全性评价方面的基本目的包括以下几点：

- ① 受试物毒作用的表现和性质。
- ② 剂量 - 反应 (效应) 研究。
- ③ 确定毒作用的靶器官。
- ④ 确定损害的可逆性。

毒理学研究还可能其他的目的和要求, 例如毒作用的敏感检测指标和生物学标志、毒作用机制研究、受试物的毒物动力学和代谢研究、中毒的解救措施等。对这些要求, 应扩展常规实验的设计以包括有关的项目, 或者另外设计和进行靶器官毒理学研究及机制毒理学研究。

(三) 实验动物的选择

毒理学的动物实验是以实验动物作为研究对象的, 为获得可靠的研究结果, 先决条件是正确地选用实验动物。

1. 实验动物物种的选择

对实验动物物种选择的基本原则是: 选择对受试物在代谢、生物化学和毒理学特征与人最接近的物种; 自然寿命不太长的物种; 易于饲养和实验操作的物种; 经济并易于获得的物种。

在毒理学研究中常用的实验动物物种如下: 大鼠、小鼠、豚鼠、兔、狗。其他可能用到的实验动物有地鼠、猕猴、小型猪、鸡等。常用实验动物生物学和生理学参数见表 1-1。

以上实验动物各物种中, 实际上没有一种完全符合上述物种选择的原则, 目前常规选择物种的方式是利用两个物种, 一种是啮齿类, 另一种是非啮齿类。系统毒性研究最常用的啮齿类是大鼠和小鼠, 非啮齿类是狗。豚鼠常用于皮肤刺激实验和致敏实验, 兔常用于皮肤刺激实验和眼刺激实验。遗传毒理学实验多用小鼠, 致癌实验常用大鼠和小鼠, 致畸实验常用大鼠、小鼠和兔。迟发性神经毒性实验常用母鸡。

表 1-1 常用实验动物生物学和生理学参数

参 数	猴	狗	猫	兔	大 鼠	小 鼠	豚 鼠	地 鼠
成体体重 (kg)	3.5	14.0	3.3	3.7	0.45	0.035	0.43	0.12
寿命 (a)	16	15	14	6	3	1.5	31	
水消耗 (ml/d)	450	350	320	300	35	6	145	30
饲料消耗(成本 g/d)	150	400	100	180	10	5	12	10
成体代谢 (cal/kgd)	158	80	80	110	130	600	100	250
体温 (°C)	38.8	38.9	38.6	39.4	38.2	37.4	38.6	38.0
呼吸频率 (次/min)	50 (40~60)	20 (10~30)	25 (20~30)	53 (40~65)	85 (65~110)	160 (80~240)	90 (70~100)	83 (35~130)
心率 (次/min)	200	100	120	200	328	600	300	450
血压 (mmHg) (收缩/舒张)	159/127	148/100	155/100	110/80	130/90	120/75	77/50	108/77

续表

参数	猴	狗	猫	兔	大鼠	小鼠	豚鼠	地鼠
出生体重 (g)	500~700	1100~2200	125	100	5-6	1.5	75~100	2.0
断乳时体重 (g)	4400	5800	3000	100~1500	40~50	10~12	250	35
开眼 (d)	出生当天	8~12	8~12	10	10~12	11	出生当天	15
妊娠 (d)	168	63	63	31	21	20	67	16
性周期 (d)	28	22	15~28	15~16	4~5	4~5	16~19	4
动情期 (d)	1~2	7~13	9~19	30	1	1	1	1
窝数量	1	3~6	1~6	1~13	6~9	1~12	1~5	1~12
断乳年龄 (周)	16~24	6	6~9	8	3~4	3	2	3~4
生殖年龄 (月)	54	9	10	6~7	2~3	2	3	2
生殖期 (年)	10~15	5~10	4	1~3	1	1	3	1
生殖季节	任何时间	春, 秋	冬季	2~3 个月	任何时间	任何时间	任何时间	任何时间
所需面积 (m ²) *	6	8	3	3	0.4	0.4	0.7	0.4
环境温度 (°C)	18~28	18~28	18~28	18~28	19~25	19~25	19~25	19~25
血容 (ml/kg)	75	79	60	53	65	80	75	85
凝血时间 (s)	90	180	120	300	60	14	60	143
CT (%红细胞)	42	45	40	42	46	41	42	50
Hb (g/b)	12.5	16.0	11.8	13.6	14.8	16.0	12.4	12.0

2. 实验动物品系的选择

品系 (strain) 是实验动物学的专用名词, 指用计划交配的方法, 获得起源于共同祖先的一群动物。

实验动物按遗传学控制分类可分为:

① 近交系: 指全同胞兄妹或亲子之间连续交配 20 代以上而培育的纯品系动物。如小鼠有津白 I、津白 II、615, DBA/1 和 DBA/2, BALB/C, C3H, C57B/6J, A 和 A/He 等。

② 杂交群动物 (杂交 1 代, F₁), 指两个不同的近交系之间有目的进行交配, 所产生的第一代动物。

③ 封闭群: 一个种群在五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。如昆明种小鼠、NIH 小鼠、LACA 小鼠、F344 大鼠、Wistar 大鼠、SD (Sprague-Dawley) 大鼠等。

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。不同品系实验动物对外源化学物毒性反应有差别, 所以毒理学研究要选择适宜的品系, 对某种外源化学物毒理学系列研究中应固定使用同一品系动物, 以求研究结果的稳定性。

遗传毒理学一般利用啮齿类动物，主要是小鼠或大鼠。如果有合适的理由，其他物种也可接受。有的文献报告在小鼠骨髓微核实验 MS/Ae 品系比 ddy, CD-1 或 BDF 品系更敏感。但一般认为还没能证明某一品系对所有的遗传毒性物质比其他品系都敏感。在致癌实验中对实验动物的品系有一定的要求，特别重视有关病理损害的自发生率。

3. 对实验动物微生物控制的选择

按微生物控制分类，实验动物分为 4 级，见表 1-2。对于毒性实验及毒理学研究应尽可能使用 II 级（或 II 级以上）的动物，以保证实验结果的可靠性。

表 1-2 实验动物微生物等级

级 别	要 求
I 级	普通动物，应没有传染给人的疾病
II 级	清洁动物，除 I 级标准外，种系清楚，没有该动物特有的疾病
III 级	无特定病原体动物（SPF），除 II 级标准外，动物为剖腹产或子宫切除产、按纯系要求繁殖，在隔离器内或层流室内饲养，可有不致病细菌丛，没有致病病原体
IV 级	无菌动物，在全封闭无菌条件下饲养的纯系动物，动物体外不带有任何微生物和寄生虫（包括绝大部分病毒）

4. 个体选择

实验动物对外来化学物的毒性反应还存在个体差异，应注意实验动物的个体选择。

① 性别：同一物种、同一品系的实验动物，雌雄两性通常对相同外源化学物毒性反应类似，但雌雄两性对化学物的毒性敏感性上存在着差别。

如果已知不同性别的动物对受试物敏感性不同，应选择敏感的性别。如对性别差异不清楚，则应选用雌雄两种性别。如实验中发现存在性别差异，则应将不同性别动物的实验结果分别统计分析。

在遗传毒理学体内实验中，对性别的选择有几种意见：

- 1) 对单个物种应用两种性别。
- 2) 对单个物种应用两种性别，除非已在一个性别得到阳性反应，就不必对另一种性别进行实验。
- 3) 对单个物种应用两种性别，除非经毒代动力学研究证明受试物（和其代谢产物）在雄性和雌性无差别和 / 或如果在确定剂量的预实验证明有相等毒性。此假定在非遗传毒性与遗传毒性之间有相关。
- 4) 对单个物种常规用一种性别（雄性或雌性），除非预期证明存在性别差异。由于历史的原因，UDS 体内 / 体外实验常规用雄性大鼠。

一般来说，对于初次实验的受试物，应该采用两种性别。对大鼠和小鼠各一种性别进行实验可能比单个物种两种性别提供更好的危害鉴定，但这需要更多的资料来证明。

② 年龄和体重。

③ 生理状态。

④ 健康状况。

(四) 毒理学实验设计要点

1. 体内实验设计

① 剂量分组在毒理学实验中，最重要的就是研究剂量 - 反应 (效应) 关系，也就是当外源化学物染毒剂量增加，实验动物的毒性反应 (效应) 随之而增强。剂量 - 反应 (效应) 关系的存在是确定外源化学物与有害作用的因果关系的重要依据，也可证明实验结果的可靠性。因此，在毒理学实验中，一般至少要设 3 个剂量组 (即高剂量组、中剂量组、低剂量组)，希望能得到满意的剂量 - 反应 (效应) 关系。

特别注意设立对照组：

1) 未处理对照组 (以前有称为空白对照组)；

2) 阴性 (溶剂 / 赋形剂) 对照；

3) 阳性对照；

4) 历史性对照。

② 各组动物数。

③ 实验期限。

2. 体外实验设计

① 测定受试物溶解性。

② 实验最高剂量的推荐。

③ 代谢活化。

④ 阳性对照。

⑤ 重复。

(五) 实验动物的染毒和处置

1. 动物实验前的准备

2. 受试物和样品的准备

3. 染毒途径

4. 实验动物处死及生物标本采集

① 实验动物处死方法。

② 血液采集。

③ 尿液采集。

④ 病理解剖、标本留取和组织病理学检查。

(六) 实验结果处理和分析

在毒理学实验的设计和implement中应贯彻实验设计的对照、随机和重复的原则，实验的各剂量组所得到的结果应与阴性对照组比较。根据实验结果（指标）的变量类型是数值变量（计量资料）还是分类变量（计数资料），选用不同的统计分析方法。

在评价毒理学实验的结果时，应综合考虑生物学意义和统计学意义。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。对实验结果作出科学的判断和解释，应该根据统计学分析的结果、生物学知识和经验。

1. 毒理学实验的统计学

统计学观点及方法在毒理学实验的设计和结果评价中起关键的作用，毒理学实验的发展也促进了生物统计学的发展。毒理学实验统计学评价的主要进展是剂量-反应关系研究和对超离差数据的统计。

毒理学实验设计的统计学要求毒理学实验的设计应遵循随机、重复及对照三个原则，要求各观察值具有代表性，并且是相互独立的。毒理学实验的设计具体涉及到剂量水平数目及间隔，每个剂量点的实验单位数，每个实验单位接种及计数的细胞数，对照组的设置等。实验单位的确定对于样品的独立性是很重要的，实验单位（experimental unit）是进行处理时或观察时独立的最大采样单位。以动物和培养物作为实验单位要比以细胞作为实验单位更为可取。此外，如果同时评价几个不同因素的效应，应注意均衡的原则，实验设计应可以区分不同因素的贡献并分别估计。

样本的代表性要求具有同质性，即各处理组和对照组的非实验因素的条件均一致，为此，各实验单位（动物或培养物）的分组及整个实验的全部操作都应遵循随机化原则。利用形态学指标的毒理学实验，必须采用盲法观察结果，以消除实验者观察结果的偏性。样本应有足够的大小和适当的重复次数，以估计处理之间、实验室内和实验室间的变异性。一般可根据显著性水准、检验把握度、容许误差、总体标准差等来估计样本的大小。

严格执行毒理学实验设计的上述要求，才可能得到可靠性和重复性良好的结果，也是进行正确的统计学评价的基础。良好的质量保证和实验设计可以监控系统误差，而统计处理则用来确定随机误差。

毒理学实验的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。毒理学实验处理组与阴性对照组观察值均数的比较，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；如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。

一种毒理学实验资料可以有若干种正确的统计学分析方法，但可能不存在唯一正确的方法。其原因主要是表面上不同的统计学分析方法常以相同的统计学概念和模型为基础。另一方面，利用不同的统计学方法来评价毒理学实验资料缺乏比较研究。

① 各处理组与阴性对照组两两比较和多个处理组与阴性对照组比较：各处理组与阴性对照组两两比较和多个处理组与阴性对照组比较常用的统计学方法见表 1-3。

表 1-3 各处理组与阴性对照组两两比较和多个比较的统计学方法

类 型	连续性数据, 正态分布		离散性数据		分布未知
	方差齐	方差不齐	二项分布	泊松分布	
处理组与阴性对照组两两比较	t 检验	t' 检验	卡方检验, Fisher 确切概率法 (u 检验)	u 检验	非参数法, 如 Wilcoxon 秩和检验
多个处理组与阴性对照组比较	Dunnnett 检验	改进的 Dunnnett 检验	平方根反正弦转换, 再用 Dunnnett 检验, 或者 Simes 法	Suissa 和 Salmi 法	非参数法, 如多重比较秩和检验

② 剂量 - 效应关系和剂量 - 反应关系：剂量 - 效应关系和剂量 - 反应关系是毒理学研究的重要内容。在急性毒性 (LD_{50}) 研究中，就是典型的剂量 - 反应关系研究， LD_{50} 是统计学的点值估计和区间估计。在其他毒理学实验中的阳性剂量 - 效应关系和剂量 - 反应关系的确定也应通过统计学处理和判定，尽管可以用各处理组与阴性对照组两两比较和各处理组间两两比较，发现高剂量组与中、低剂量组及对照组间差别有显著性，中剂量组与低剂量组和对照组间差别有显著性，低剂量组与对照组间差别无显著性，来证明有剂量 - 反应关系，但这种方法的效率较低。剂量 - 效应关系和剂量 - 反应关系的判定可以分为定性和定量统计学两大类。剂量 - 效应关系和剂量 - 反应关系的统计学定性分析即为趋势检验，而统计学定量分析则为模型拟合。趋势检验是检验对自变量规定的水平，反应的观察值增高或降低的趋势的显著性。当自变量 s 为定量数据时，则可进行模型拟合，即剂量 - 反应关系的定量研究。

趋势实验 (trend testing)，剂量为 x_i ；反应为 μ_i ，当有 $x_0 < x_1 < \dots < x_k$ ，无效假设为 $H_0: \mu_i = \mu_0 = \dots = \mu_k$ 备择假设为 $H_a: \mu_i \leq \mu_0 \leq \dots \leq \mu_k$ 或 $\mu_i \geq \mu_0 \geq \dots \geq \mu_k$ 单调上升或单调下降趋势。如反应 μ_i 为连续资料服从正态分布，当 x_i 为定量数据，则可选用简单的线性回归或加权线性回归；如反应 μ_i 为离散资料服从二项分布或泊松分布，可选用 Cochran-Armitage 趋势检验；如果样本所属的总体分布未知，则可利用非参数法加 Jonckheere-Terstra 趋势检验 (Jonckheere, 1954)。

在毒理学数据的统计学方法中最主要的发展是剂量 - 反应关系的统计学方法、超离差 (overdispersion) 计数资料的统计学方法及广义线性模型 (generalized linear mod-

e)。这些方法，可以利用统计程序包如 SAS, Genstat 等来实现。

③ 对常规毒理学实验资料推荐的统计学方法 (Cad 等, 1994) 如下:

A. 体重和器官重量: 体重常是毒性效应最敏感的指标之一。如果每组样品量足够大 (10 或 10 个以上), 可用下述方法: 器官重量计算为体重的百分比, 按体重或体重改变分析。如在实验开始, 动物随机化分组 (各组体重均数差别无显著性, 各组所有的动物体重在总平均体重的 2 个 SD 之内), 利用体重改变分析比较好。

对各组资料利用 Bartlett 方差齐性实验, 检测方差齐性。根据方差齐性或不齐, 决定进一步的统计学检验。如果样本量较小, 可利用 Kruskal-Wallis 非参数检测。

B. 临床化学: 过去一般用 t 检验或 ANOVA 分析, 但并非是最适当的方法。因为这些生化参数很少是彼此独立的。通常, 所研究的并不是单独某一个参数, 而是与靶器官毒作用有关的一组参数, 如 CPK, HBDH 和 LDH 同时增高强烈指示心肌损害。这时我们并不只是注意其中一个参数的增高, 而是全部 3 个参数。而血清电解质 (如钠、钾、钙) 常相互影响, 一种降低常伴另一种增加。而且资料的性质, 由于这些参数的生物学性质或测定的方法, 常不服从正态分布 (为偏态分布) 或为非连续的, 如肌苷、钠、钾、氯、钙和血尿素氮。临床化学资料适用的统计学方法: ① ANOVA, Bartlett 检验和 / 或 F 检验, t 检验, 适用于: 钙、葡萄糖、BUN、肌苷、胆碱脂酶、总蛋白、白蛋白、HBDH、ALP、CPK、LDH、ALT、AST 及血红蛋白。② Kruskal-Wallis 非参数 ANOVA 适用于: 总胆红素、GGT。

C. 血液学: 不同物种、品系的实验动物血液学检查的数据, 所服从的分布也可能是不同的。这些参数的大部分是相互有关的, 并依赖于所用的测定方法。RBC 数、血小板数和 MCV 可用仪器测定, 数据适用于参数检验。红细胞压积 (HCD) 是由 RBC 和 MCV 得到的计算值, 故依赖于此两个参数; 但如直接测定, 也可用参数检验。

血红蛋白是直接测定的并是独立的连续数据。但如同时存在血红蛋白的多种形态 (氧血红蛋白、脱氧血红蛋白、高铁血红蛋白等), 则可能不是典型的正态分布, 而呈多模型分布, 此时可用 Wilcoxon 检验或多重秩和检验。

WBC 总数服从正态分布, 并适用于参数检验。而 WBC 的分类或报告为百分比或乘以 WBC 总数得“绝对”分类 WBC 数。这些资料, 特别是嗜酸性粒细胞不符合正态分布, 应该用非参数统计。

应注意, 单个参数的变化很少有生物学意义, 因为这些参数是相互有关的, 应注意发现并分析预期的参数变化谱。

D. 组织病理学损害发生率: 在亚慢性和慢性毒性实验中, 强调了组织病理学检查。统计学分析是评价处理组动物组织病理学损害发生率是否高于对照组动物。除了癌发生率外, 也应注重发现其他病理损害。在处理组和对照组动物病理损害发生率比较常用卡方检验或 Fisher 精确检验。利用双侧检验还是单侧检验取决于研究者的要求。对于多重比较可用 Bonferroni 法, 而且可利用趋势检验来评价剂量 - 反

应关系。

E. 生殖毒性：对生殖毒性的统计学分析，是以窝（或妊娠雌性动物）为实验单位，而不是幼体。生殖毒性实验一般可得 4 个变量：生育力指数（FD）、受孕指数（GD）、存活力指数（VD）和哺育指数（LD）。对这些变量，如样本数为 10 或 10 以上可利用 Wilcoxon-Mann-Whitney U 检验或 Kruskal-Wallis 非参数 ANOVA。如样本数小于 10，则可用 Wilcoxon 秩和检验（用于 2 组比较）或 Aruskal-wallis 非参数 ANOVA（用于 3 组或 3 组以上的比较）。

F. 致畸实验：每组应有 20 只妊娠动物。并且，实验单位为窝，而不是胎体。如样本数为 10 或 10 以上，可近似为正态，利用参数检验（如卡方检验、t 检验或 ANOVA）来评价结果。当样本数小于 10，可用非参数检验（Wilcoxon 秩和检验或 Kruskal-wallis 非参数 ANOVA）。此外，Wilcoxon-Mann-Whitney U 检验也广泛用于致畸实验。

G. 饲料和染毒柜中受试物浓度分析：当受试物掺入饲料进行喂饲实验，或为气溶胶吸入实验，应定期测定饲料中受试物浓度和染毒柜中受试物气溶胶的浓度。采样应随机并有代表性。一般要求饲料或空气中浓度应在预定浓度的 $\pm 10\%$ 之内；显著增高的峰浓度可能超过代谢或修复系统能力，出现急性毒作用。如果不了解饲料/空气中真实的暴露水平，可能错误地解释该受试物的低水平慢性毒性。气溶胶颗粒直径分级采样可能得到分类资料（如 $>100\mu\text{m}$ ， $100\sim 25\mu\text{m}$ ， $25\sim 10\mu\text{m}$ ， $10\sim 3\mu\text{m}$ 等），这种资料应该用几何均数及其标准差来描述。

H. 致突变性实验：绝大多数遗传毒理学短期实验（STD）的观察值为计数资料（如突变体数、畸变数、SCE 数）或是相对数（如存活细胞的突变频率），因此 STT 结果的统计学主要是对离散性资料的统计学推断。

最常用的遗传毒理学实验的统计学方法：

a) Ames 实验的统计学评价：Ames 实验的结果中每平板回变菌落数的分布不完全服从泊松分析，有超离差现象；并且，其剂量-反应曲线呈先上升后下降的伞形。Ames 等 1975 年提出 2 倍判断标准，在 1983 年改进的方法中已不再推荐。2 倍判断标准有较大的缺点，此判断标准不是统计学判断，对自发回变率较高的菌株偏严，而对自发回变率较低的菌株偏松。已发展了几种统计学方法用于 Ames 实验的假设检验和剂量反应研究。Kim 和 Margolin 等（1999）利用基于生物学的机制模型，发展了 SALM 程序，用于 Ames 实验结果的判断。

b) 遗传毒理学体内实验：统计学评价：Adler 等（1998）提出了 3 步法。①确定实验结果是否可接受。如果同时进行的阴性对照的均数在历史性对照的均数 $\pm 3\text{SD}$ 之内，则该实验结果可以接受。如果不接受，则应重新进行实验。②剂量-反应分析。利用同时进行的阴性对照资料进行剂量-反应趋势检验。有统计学显著性的阳性趋势表明受试物处理的效应。③评价各个处理组反应，然后将各个处理组的均数分别与历史性阴性对照比较，如各个处理组均未显示差别显著性，但趋势检验有显著性意义，

此实验结果的解释需要生物学判断。如果趋势无显著性，但经多重比较校正后仅一个处理组与历史性阴性对照比较差别有显著性，则此实验结果的解释也需要生物学判断。这时，可认为该实验的结果为可疑。

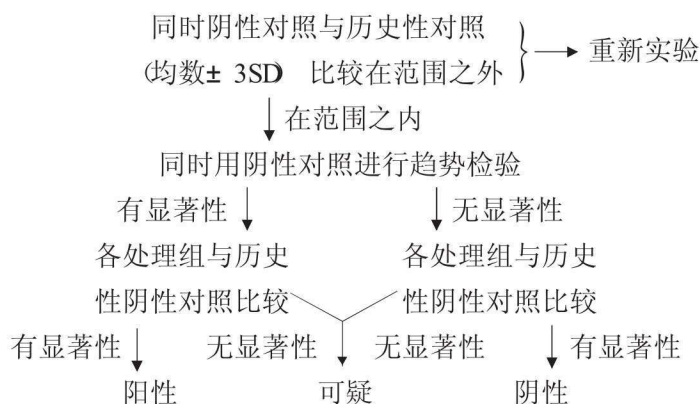


图 1-1 遗传毒理学体内实验统计学评价的程序

I. 行为毒理学：行为毒理学实验一般得到 4 种类型的资料：①观察的记分值，来自开阔场实验等；②反应率，来自舔液，总活动或压杆；③错误率，来自学习 - 记忆实验；④到达终点的时间。对这些数据常用的和推荐的统计学方法见表 1-4。行为发育毒性和生殖毒性研究的统计学方法也见表 1-4，在断乳前应以窝为实验单位进行统计。

表 1-4 行为毒理学的统计学方法

观察类型	常用的方法	常用的方法
观察记分值	t 检验或单例 ANOVA	Kruskal- Wallis 非参数 ANOVA 或 Wilcoxon 秩和检验
反应率	t 检验或单侧 ANOVA	Kruskal—wallis ANOVA 或单侧 ANOVA
错误率	ANOVA 检验, 再进行 Post hoc 检验	Fisher 精确检验或 R× C 卡方, Mann—WhitneyU 检验
到达终点时间	t 检验或单侧 ANOVA	ANOVA 检验再进行 Post hoc 检验或 Kruskal- Wallis ANOVA
行为发育或生殖实验	ANOVA 检验, 再分别进行检验	Fisher 精确检验或 Kruskal- Wallis 非参数 ANOVA 或 Mann- Whituey U 检验

2. 统计学意义和生物学意义

在评价毒理学实验结果时，要综合评价实验结果的统计学意义和生物学意义。

一般来说，具有统计学意义是具有生物学意义的必要条件之一。正确地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。在判断生物学意义（即生物学

重要性) 时, 可考虑以下步骤。

① 纵向比较: 此参数的改变有无剂量 - 反应关系。化学物毒作用的剂量 - 反应关系是毒理学研究的基本假设。当某参数的改变存在阳性剂量 - 反应关系, 就可认为此参数的改变与受试物染毒有关, 具有生物学意义。

② 横向比较: 此参数的改变是否伴有其他相关参数的改变。例如, 生化参数很少是彼此独立的, 单个剂量组的一个参数有统计学显著性的改变一般不认为有生物学意义, 除非此改变为其他参数改变所支持。如没有骨髓或脾组织学改变或没有高铁血红蛋白生成, 则单有红细胞计数的改变是没有生物学意义的。同样, 在免疫毒理学中, 单有淋巴细胞计数的改变不伴有淋巴组织学改变也可能是没有生物学意义的。

③ 与历史性对照比较: 由于目前尚无公认的实验动物参考“正常”值, 应由本实验室利用相同品系的实验动物和相同的溶剂, 进行至少 10 次独立实验的阴性 (溶剂) 对照的资料构成, 以其均值 $\pm 1.96 \times$ 标准误作为参考值的范围。同时进行的阴性对照应在历史性对照的均数 $\pm 3SD$ 范围之内, 否则应重新实验。另有认为, 凡某种观察值与对照组比较, 差别具有统计学显著性 ($P < 0.05$), 并符合下列情况之一者, 即可认为已偏离正常参考值范围, 属于有害作用。①其数值不在正常参考值范围之内。②其数值在正常参考值范围之内, 但在停止接触后, 此种差异仍持续一段时间。③其数值在正常参考值范围之内, 但如机体处于功能或生化应激状态下, 此种差异更加明显。应该指出, 后两种情况需要附加的实验设计。

另外, 还有一些其他的考虑。如处理组同时与对照组两组均数之差值应超过检测误差的两倍以上。某些血液生化指标 (如 AST、ALT 等) 的测定值升高才有生物学意义。

当处理组数据与阴性对照组比较差别有显著性, 并且经分析认为是与处理有关的生物学效应, 应进一步判断其为有害效应还是非有害效应。决定一种效应是否为有害作用需要专家的判断。不同指标或参数的生物学意义和重要性是不同的。

在分析和综合评价实验结果的统计学意义和生物学意义时, 可能遇到 4 种情况, 见表 1-5。在此表中, 第 I 和第 IV 种情况最为常见, 第 I 种情况是无统计学意义也无生物学意义, 第 IV 种情况是有统计学意义也有生物学意义。但是有时在实验结果中会出现第 II 和第 III 种情况。

表 1-5 毒理学实验结果的统计学意义和生物学意义

生物学意义	统计学意义	
	无	有
无	I	III
有	II	IV