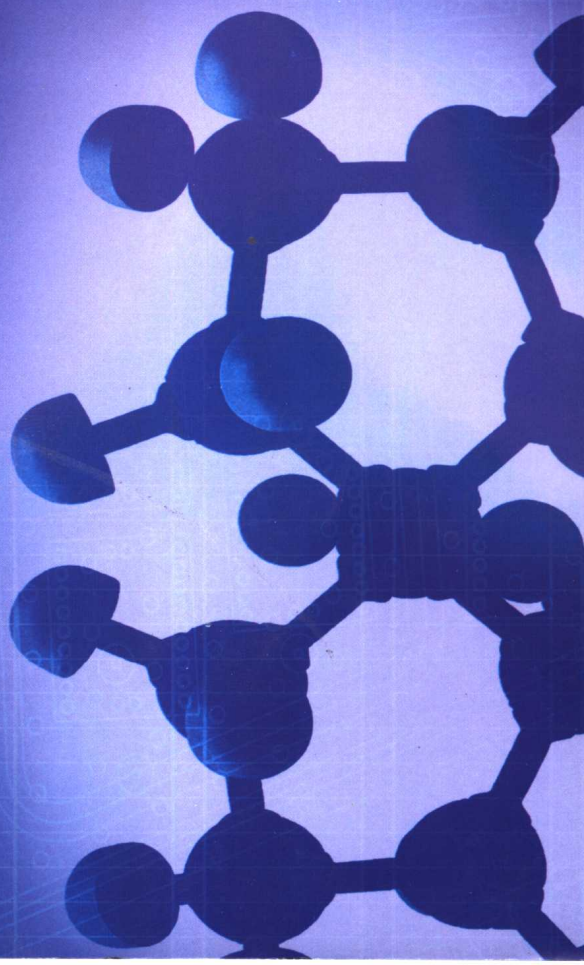


神经生物学技术

ShenJing ShengWuXue JiShu

主编 郭云良 姚维成
高焕民 范振芹

中国海洋大学出版社



SHENJING SHENGWUXUE JISHU

神经生物学技术

主编 郭云良 姚维成
高焕民 范振芹

中国海洋大学出版社
· 青岛 ·

图书在版编目(CIP)数据

神经生物学技术/郭云良,姚维成,高焕民,范振芹主编. — 青岛:中国海洋大学出版社,2005. 1

ISBN 7-81067-658-X

I. 神… II. ①郭…②姚…③高…④范… III. ①神经生物学—实验②人体生理学:神经生理学—实验 IV. ①R. 741-33②R338-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2004)第 115244 号

中国海洋大学出版社出版发行
(青岛市鱼山路 5 号 邮政编码:266003)

出版人:王曙光

日照报业印刷有限公司印刷

新华书店经销

*

开本:787 mm×1 092 mm 1/16 印张:20.375 字数:450 千字

2005 年 1 月第 1 版 2005 年 1 月第 1 次印刷

印数:1~2 000 定价:35.00 元

编写委员会

主 编 郭云良 姚维成 高焕民 范振芹

副主编 朱其秀 谭金山 韩 昆 王 清 孙勇力

编 委 郭宗君 金丽英 陈红兵 杜 芳 周 畅

刘天蔚 杨学伟 刘广义 王鲁民 王 岭

前 言

当今世界,科学技术的发展日新月异,神经科学作为新世纪科学发展的前沿领域之一,进入了空前繁荣的时期。国内外科学家预言——21 世纪将是脑科学的世纪。

长期以来,由于神经系统结构和机能的复杂性,人们往往对此望而却步,致使神经科学的研究进展缓慢,许多神经系统疾病的病因和发病机制至今尚不十分明了,在预防和治疗方面也缺乏行之有效的措施。分子生物学、神经干细胞、基因芯片和计算机网络等高新技术的发展,以及膜片钳、激光共聚焦显微镜、流式细胞仪等先进仪器的出现,给神经科学的研究插上了腾飞的翅膀。国内外大批科研工作者开始致力于神经科学领域的探索和研究,并已取得了许多可喜的成就。相信在不远的将来,科学家会揭开人类大脑的奥秘。

青岛大学医学院脑血管病研究所,长期从事神经病学的基础和临床研究,在神经生物学实验技术方面积累了较为丰富的技术资料和工作经验。特别是 2001 年山东省脑病防治重点实验室对外开放以来,越来越多的研究生和科研工作者申请到本实验室开展工作。为了使广大到实验室工作的研究人员能够迅速了解本实验室的基本情况,掌握有关实验技术和方法,顺利完成科研工作,我们组织有关人员,参考国内外有关资料,编写了《神经生物学技术》讲义,供有关研究人员参考使用。我们本着理论联系实际、边实践边修改的原则,经过近几年的试用和反复修订,最后准备印刷出版,作为我校神经病学和神经生物学等相关专业研究生的试用教材。

本书首先介绍了常用动物实验方法和神经病学研究常用动物模型的制备,然后分别介绍了组织病理学、生物化学、免疫组织化学、分子神经生物学和基因工程原理等方面的有关技术方法,并对细胞培养、神经干细胞、显微切割技术、转基因小鼠和基因敲除小鼠技术、激光共聚焦显微镜术、显微摄影技术、电子显微镜术、流式细胞术、膜片钳技术、紫外—可见分光光度术、高效液相色谱技术和医学图像分析技术等作了介绍。本书内容由浅入深、注重实践、实用性强,可满足神经病学和神经生物学等相关专业研究生开展科研工作的需要,也可供相关专业研究人员参考使用。

本书除编写人员外,同时吸收了部分研究生的建设性意见,在此表示感谢。

在编写过程中,青岛大学医学院及附属医院的有关领导给予了支持,表示感谢。

由于编者水平有限,书中难免存在不足之处,恳请读者指正。

编 者

2004 年 12 月

目 录

第一章 常用动物实验方法	(1)
第一节 实验动物的选择	(1)
第二节 实验动物的饲养	(2)
第三节 实验动物的保定	(3)
第四节 实验动物的给药途径	(4)
第五节 实验动物生命体征的检测	(6)
第六节 实验动物的行为测试	(8)
第七节 实验动物血样标本的采集	(11)
第八节 脑立体定位术	(13)
第九节 脑内微量注射术	(15)
第十节 心脏灌注固定术	(16)
第二章 常用实验动物模型	(17)
第一节 微循环障碍模型	(17)
第二节 动脉粥样硬化模型	(18)
第三节 高血压模型	(20)
第四节 脑缺血/再灌注模型	(22)
第五节 脑出血模型	(24)
第六节 蛛网膜下腔出血模型	(27)
第七节 老年性痴呆模型	(29)
第八节 帕金森病模型	(31)
第九节 癫痫模型	(32)
第十节 神经系统外伤模型	(34)
第三章 组织病理学技术	(38)
第一节 标本的采集和处理	(38)
第二节 苏木精-伊红染色	(42)
第三节 结缔组织染色	(44)
第四节 肌肉组织染色	(48)
第五节 糖类物质染色	(49)
第六节 脂类物质染色	(52)
第七节 核酸染色	(54)
第八节 内源性沉着物染色	(55)

第九节 色素类染色	(57)
第十节 无机物组化染色	(60)
第四章 神经生化与免疫学技术	(62)
第一节 神经系统的免疫学评价	(62)
第二节 神经系统的免疫学检测	(65)
第三节 神经元损害的生化检测	(68)
第四节 脑白质病变的生化检测	(70)
第五节 脂类代谢异常的生化检测	(72)
第六节 糖原累积病的生化检测	(73)
第七节 铜代谢异常的生化检测	(75)
第八节 线粒体病的生化检测	(76)
第九节 溶酶体病的生化检测	(79)
第十节 肌肉损害的生化检测	(81)
第五章 免疫组织化学技术	(84)
第一节 基本原理	(84)
第二节 免疫荧光技术	(84)
第三节 免疫酶标技术	(89)
第四节 原位末端标记技术	(97)
第六章 免疫组化双标技术	(99)
第一节 基本原理	(99)
第二节 免疫荧光双标技术	(101)
第三节 免疫酶标双标技术	(104)
第四节 其他免疫双标技术	(108)
第七章 电子显微镜技术	(111)
第一节 透射电子显微镜技术	(111)
第二节 透射电镜生物样品的制备	(115)
第三节 冷冻复型技术	(121)
第四节 扫描电子显微镜技术	(122)
第五节 电镜细胞化学技术	(126)
第六节 免疫电子显微镜技术	(129)
第八章 激光扫描共聚焦显微镜技术	(132)
第一节 LSCM 的结构和原理	(132)
第二节 LSCM 的标本处理	(134)
第三节 LSCM 的主要功能	(136)
第四节 LSCM 在神经生物学中的应用	(139)
第五节 LSCM 常用荧光染料的应用	(142)
第六节 LSCM 应用举例	(144)

第九章 医学图像定量分析	(145)
第一节 形态定量分析	(145)
第二节 图像分析的基本原理	(147)
第三节 图像分析的基本方法	(149)
第四节 图像分析的应用	(152)
第十章 显微摄影技术	(156)
第一节 显微摄影装置	(156)
第二节 显微摄影技术	(159)
第三节 数字显微摄影系统	(162)
第十一章 细胞培养技术	(164)
第一节 细胞培养室的基本条件	(164)
第二节 培养细胞生存的条件	(165)
第三节 培养用液	(168)
第四节 天然培养基	(171)
第五节 合成培养基	(173)
第六节 清洗与消毒	(175)
第七节 细胞培养的基本技术	(177)
第八节 培养细胞的生物学性状检测	(187)
第十二章 分子神经生物学技术	(192)
第一节 DNA 的制备	(192)
第二节 RNA 的制备	(194)
第三节 探针的制备	(197)
第四节 核酸分子杂交	(199)
第五节 聚合酶链反应	(211)
第六节 DNA 凝胶电泳	(214)
第七节 几种特殊的 PCR	(215)
第十三章 基因工程原理和技术	(217)
第一节 基本程序和研究策略	(217)
第二节 常用工具酶	(220)
第三节 常用载体	(223)
第四节 基因转化	(225)
第五节 基因表达	(230)
第六节 基因工程表达产物的分离纯化与鉴定	(234)
第十四章 神经干细胞技术	(239)
第一节 神经干细胞概述	(239)
第二节 神经干细胞的分离与鉴定	(240)

第三节	神经干细胞的增殖与分化	(242)
第四节	神经干细胞移植	(247)
第五节	神经干细胞载体	(249)
第十五章	显微切割技术	(251)
第一节	显微切割技术概述	(251)
第二节	显微切割技术的应用	(253)
第三节	染色体显微切割技术	(254)
第四节	显微切割技术的进展	(259)
第十六章	转基因和基因敲除技术	(260)
第一节	转基因小鼠技术	(260)
第二节	基因敲除小鼠技术	(266)
第三节	转基因和基因敲除小鼠的表型分析	(267)
第十七章	流式细胞术	(269)
第一节	基本原理	(269)
第二节	常用荧光染料	(270)
第三节	单细胞悬液的制备	(271)
第四节	细胞的荧光标记	(273)
第五节	流式细胞术的数据分析	(276)
第六节	凋亡细胞的检测	(279)
第十八章	膜片钳技术	(281)
第一节	基本原理	(281)
第二节	膜片钳记录的几种模式	(282)
第三节	全细胞膜片钳记录	(284)
第四节	穿孔膜片钳记录	(289)
第五节	脑薄片膜片钳记录	(291)
第十九章	光谱分析技术	(294)
第一节	紫外-可见分光光度术	(294)
第二节	显微分光光度术	(302)
第三节	显微荧光光度术	(303)
第二十章	高效液相色谱技术	(304)
第一节	高效液相色谱仪	(304)
第二节	高效液相色谱的固定相	(307)
第三节	高效液相色谱的流动相	(309)
第四节	高效液相色谱分析	(312)
第五节	高效液相色谱技术的应用	(315)

第一章 常用动物实验方法

医学研究需要进行大量的基础实验和临床试验,由于医学伦理和法律的限制,大部分基础实验和临床试验是不允许在人体上进行的,至少不能首先在人体上进行,因而实验动物学(laboratory animal science)便应运而生。

实验动物学是医学生物学研究的重要组成部分,动物实验技术已成为医学科研和教学工作的重要手段,直接影响着许多领域的研究水平。实验动物学的发展必将生命科学的研究引向新的层次,推动医学生物学和临床医学的发展。

第一节 实验动物的选择

用于医学实验的动物种类很多,但哪种动物最为理想,很难界定,应根据实验要求和条件而定。一般来说,理想的实验动物应具备以下几个基本条件。

一、动物的种属与人类接近

动物实验的目的是利用实验动物所得的数据和资料,来推测和判断人类的有关数据和资料。从遗传学角度讲,动物的种属愈接近人类,所得的实验数据实用价值就愈大。据此而论,哺乳动物中与人类最接近的灵长类动物(猴、狒狒、猩猩)是最理想的实验动物。但目前灵长类动物来源很少,饲养条件较高、价格昂贵,因而不宜作为首选的实验动物,退而求其次,其他哺乳类动物则是较为常用的实验动物。

二、动物的解剖生理特点与人类接近

除灵长类动物外,其他哺乳类动物在解剖和生理特征上与人类最为接近。目前,医学生物学实验中,通常应用的哺乳类动物有鼠、兔、狗、猫、小型猪、羊等。

三、种系较纯

不同种系的动物存在着较大的差异,而种系较纯动物个体间差异较小,所得实验数据在统计学上系统误差较小。目前,国内较大的实验动物中心所提供的大鼠、小鼠、沙土鼠、兔等,均为纯系动物,如 Wistar 大鼠、SD 大鼠、新西兰兔等。

四、易于繁殖、饲养

动物的繁殖和饲养条件的高低对实验也有重要的影响,用于慢性实验的动物需要存活较长的时间,如动物的繁殖和饲养条件要求太高,动物不易存活,必将影响实验的正常

进展。这不仅大大提高了整个实验的费用,而且影响实验的结果。所以,应选择繁殖和饲养条件较低的实验动物,如鼠,兔等。

五、价格低廉

由于科研费用较为紧张,在选择实验动物时,动物的价格也是一个重要的因素。

综合以上原则,在医学实验研究中,目前大鼠、小鼠、兔、狗、猴等是较为理想的实验动物。以下主要以普通实验中最常用的鼠和兔为例进行介绍。

第二节 实验动物的饲养

动物的饲养是动物实验的一个重要环节,不同的实验动物有各自的生存条件,本节只介绍普通动物实验室常用的几种动物的饲养。

一、鼠

(1)饲养环境。鼠的基础代谢率较高,气味很大,因此,动物饲养环境应宽敞、干燥,安装通风、空调设备。在 20 m^2 的房间内一般饲养 $100\sim 200$ 只成年大鼠为宜,小鼠可适当增加。室内温度夏季保持在 $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ 左右,冬季保持在 $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 左右。饲养室要每天通风、清扫、冲洗,保持良好的环境卫生。

目前,大多数饲养室均采用盒式饲养,并排在多层支架上,以节省空间。饲养盒有大小两种,均为方形塑料盒,盒盖为不锈钢丝盖,以便于喂养动物。大盒一般为 $50\text{ cm}\times 30\text{ cm}\times 20\text{ cm}$ 大小,每个饲养盒内放 $5\sim 7$ 只成年大鼠为宜,最多不宜超过 10 只。小盒约 $25\text{ cm}\times 15\text{ cm}\times 15\text{ cm}$ 大小,用于饲养小鼠和需要特殊观察(用药后、术后、怀孕)的大鼠。饲养盒底部要铺垫一层 $2\sim 3\text{ cm}$ 厚的锯末,以便于保持盒内干燥、清洁。盒内的锯末应 $1\sim 2\text{ d}$ 更换一次,必要时随时更换。

(2)饲料配制。饲料不但要保证鼠的营养需求,还要适合鼠的口味,同时要易于存放,防止霉变。目前各动物中心均有饲料加工机械装置,备有现货,可随时购买。

(3)饲养方法。鼠的喂养方法非常简单,只需每日将压制好的块状饲料放于不锈钢丝盖的食槽内,鼠便可自行觅食。一般每只成年大鼠每日食量为 100 g ,小鼠 20 g 左右。

动物饮水用清洁的自来水即可,但应保持水瓶的清洁,大盒的水瓶 500 mL ,小盒的水瓶 200 mL ,一般每日更换一次为宜。

二、兔

(1)饲养环境。兔体重大,排泄量大,饲养环境应宽敞,安装上下水通道、通风、空调设备,在 20 m^2 的房间内一般饲养 $30\sim 40$ 只成年家兔为宜。室内温度夏季保持在 $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ 左右,冬季保持在 $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 左右。饲养室要每天通风、清扫、流水冲洗。

兔多采用笼式饲养,并排在多层支架上,以节省空间。饲养笼为 $50\text{ cm}\times 35\text{ cm}\times 35\text{ cm}$ 大小的六面钢丝笼,其中一面留有活动式开门和饲料盒。每个饲养笼内放 $1\sim 2$ 只成年兔为宜,特殊动物(用药后、术后、怀孕)需单独笼养。

(2)饲料配制。目前各动物中心均有饲料加工机械装置,备有现货,可随时购买。

(3)饲养方法。兔的喂养方法也很简单,只需将压制好的块状饲料放于不锈钢饲料盒内,兔可自行觅食。一般每只成年兔每日食量为200~300 g。

第三节 实验动物的保定

正确地保定动物可以减少动物因应激(stress)对实验指标造成的不良影响,并防止研究人员被动物咬伤。对不同种类的动物和不同的实验内容,保定方法也不相同。

一、清醒动物保定方法

(1)大鼠。大鼠性情暴躁,尤其是雄性大鼠,经常咬伤实验者。因此,在给于大鼠灌胃、注射、采血时,需要将其保定。捕捉大鼠的方法是:用右手捏住鼠尾向后牵拉,用戴帆布手套(熟练者也可徒手)的左手拇指和食指迅速、准确地捏紧大鼠双耳背面的皮肤,手掌和其余手指将鼠体压于实验台面,然后将其躯体夹于手中,即可将大鼠保定,进行灌胃、注射、采血等。初学者或实施尾静脉注射时,可用铁丝笼捕捉大鼠进行保定。

(2)小鼠。小鼠一般不会咬人,保定方法与大鼠基本相同。

(3)兔。兔性情温顺,捕捉时用手抓住其颈后和脊背部皮肤,向上提起全身,用另一手托住其臀部。不要粗暴地抓提双耳和腹部,以免损伤耳部血管和腹部脏器。

兔保定方法分为盒式、台式和马蹄式固定法三种,清醒采血、注射时通常用盒式固定,也可由助手压住兔的臀部和头部,操作者直接从耳部血管采血或注射。

二、麻醉动物保定方法

在建立动物模型或实施较大的手术时,由于手术精细复杂、时间较长,为防止动物乱动影响手术的进行,需要在麻醉状态下保定动物。

1. 吸入麻醉保定法

吸入麻醉剂包括乙醚、氟烷、异氟烷、甲氧氟烷、氧化亚氮等。以乙醚(ether)为例,乙醚吸入麻醉诱导浓度为10%~20%,维持浓度为4%~5%。乙醚麻醉比较安全,很少因麻醉过量而使动物死亡。

麻醉方法:将动物放在玻璃缸中,然后放入一块浸有乙醚的棉球,盖紧玻璃缸,密闭数分钟,待动物兴奋期过后,四肢肌肉放松,即可将动物取出实施保定。

2. 注射麻醉保定法

这是最常用的麻醉保定方法。一般对鼠采用腹腔注射麻醉,对兔采用耳缘静脉注射麻醉,也可采用腹腔注射麻醉。手术时间较长时可适当追加麻醉剂量。

(1)巴比妥类(barbiturates)麻醉剂:长效、短效和超短效巴比妥类药物,均可用于实验动物的全身麻醉,常用的有以下几种:

①2.5%硫喷妥钠(thiopentone):为超短效巴比妥类麻醉剂,一次静脉注射25 mg/kg(注射量/体重,下述如无特殊说明,与此同)仅能维持45 min,但诱导麻醉平稳、迅速,便于追加剂量,可分次注射满足较长时间手术的需要。此药对呼吸和循环都有抑制作用,肌松不佳,故多只用于全麻诱导或与其他药物配合使用。腹腔注射时对腹膜刺激性较大,最好不用。

用量与用法:静脉注射首次给药,犬、兔、鼠均为0.6 mL/kg,追加剂量0.1~0.15 mL/kg。

推注速度以 0.2 mL/s 为宜。随着追加剂量次数增加,剂量适当递减,总剂量以 25 mg/kg 为限。

②2%~3%戊巴比妥钠(pentobarbital sodium):为短效巴比妥类麻醉剂,一次静脉注射 30 mg/kg,可维持 2 h,但个体差异较大,镇痛效果差,完全苏醒时间需要 6~8 h。此外,对呼吸和循环系统都有严重的抑制作用,近年来使用日趋减少。

③5%苯巴比妥钠(phenobarbital sodium):属长效巴比妥类麻醉剂,苏醒时间太长,术后监护麻烦,一般只用于不需要动物继续存活的急性实验。

(2)水合氯醛(chloral hydrate):5%水合氯醛溶液:犬静脉注射剂量为 100 mg/kg、腹腔注射 150 mg/kg。10%水合氯醛溶液:兔和鼠腹腔注射 300 mg/kg。

兔和鼠麻醉后常有肌肉紧张,宜与乌拉坦合用,临用前将两药等量混合,用 60℃等渗盐水配制成 5%~10%溶液,按 1~2 mL/kg,静脉注射。水合氯醛麻醉持续时间长,深度较浅,苏醒期常有激惹现象,一般用于不需要动物继续存活的、刺激性较轻的手术。

(3)乌拉坦(urethane):用 20%溶液静脉注射,剂量 1 g/kg,也可做腹腔、肌肉或皮下注射,适用于鼠类麻醉。作用温和持久,有效麻醉时间可达 6~10 h,深度麻醉对呼吸和循环均无明显抑制作用。但此药本身有致癌作用,不能用于肿瘤实验的动物。工作人员也要小心,避免直接长期接触。

(4)氯胺酮(ketamine):适用于大多数实验动物。肌肉、腹腔和静脉注射均可。对犬等体型较大的动物呼吸抑制不明显,但对鼠类有严重的呼吸抑制作用,且对兔和鼠的镇痛效果不可靠。与安定合用效果较好。一般诱导剂量用 1%氯胺酮溶液 2~5 mL/kg,复合安定 1~2 mg/kg。维持剂量每次用诱导剂量的 1/3~1/2。肌肉或腹腔注射氯胺酮,用 5%~10%溶液 4~10 mL 诱导麻醉。安定用肌肉和腹腔注射效果不佳。

(5)复合麻醉剂:硫喷妥钠与 γ -羟基丁酸钠复合麻醉效果好。合用药液要临用前配制,4 h 内使用,浓度为每毫升含硫喷妥钠 25 mg 和 γ -羟基丁酸钠 50 mg。用量:犬 1~1.5 mL/kg,兔和鼠 1 mL/kg,一次缓慢静脉注射。一般用麻醉全量的 3/4 可完成诱导,继续注射全量可维持麻醉时间 3~4 h。术中呼吸和循环平稳,无严重抑制作用。而且动物不易因麻醉过量而导致死亡。

麻醉动物的保定方法一般是将动物捆绑固定于实验台上,以便于手术。固定的姿势可根据具体要求采取俯卧位、仰卧位。进行脑内定位手术和脑内微量注射时,应采用脑立体定位仪固定颅骨(详见本章第八、九节)。

第四节 实验动物的给药途径

在药理和毒理学以及临床实验研究中,需要给动物一定剂量的药物以观察药物的疗效、毒性、最佳剂量和最佳给药时间等。但动物不可能像人那样,根据医嘱按时服药或接受护士的注射给药。因此,在具体实验中,应根据实验的目的,药物的理化性质、剂型、剂量,动物的种类,选择合适的给药途径。

一、定量饲养法

当药物用量较大、异味较小、能被动物所接受,并保证药物的性质不会因加工工艺而

改变时,可将药物按所需要的比例均匀地掺入常规饲料中或加入一定的赋形剂后,压制成块状饲料,根据实验要求定量饲养。该法简单易行,但因动物的食量不等、且饲养过程中能浪费数量不等的饲料,因而每只动物的药物剂量控制不很精确,只能用于一些药物剂量较大、剂量要求不太严格的实验。如利用高脂饲料喂养法,建立大鼠和兔动脉粥样硬化动物模型。

二、灌胃给药法

临床上大多数药物为口服药,因而灌胃给药法是重要的和常用的给药方法。灌胃给药一般用于大鼠或小鼠,首先需将所给药物制成液体状态,然后用灌胃器将预先准备好的药物按实验要求进行灌胃。

注意事项:大鼠和小鼠灌胃前最好禁食 6h。左手保定动物,右手持灌胃器,插入动物口中,沿咽后壁缓慢经食道插入胃腔。动作要轻柔、深度要适中,以免灌胃器刺破咽部、食管和胃;严禁将灌胃器插入气管中,以免造成动物窒息死亡;动物保定要牢固,以免动物乱动而损伤动物的消化道器官;注意不要被动物咬伤。一般当灌胃器插入小鼠 3~4 cm、大鼠 4~6 cm 后即可将药物注入。常用灌胃剂量为:小鼠 0.2~1 mL,大鼠 1~4 mL。

三、注射给药法

注射给药法是最常用的给药方法,可以精确地控制给药剂量。注射给药有静脉注射、腹腔注射、肌肉注射、皮下注射、皮内注射、椎管内注射、关节腔内注射、淋巴腔内注射以及脑室注射等方法,其中前两种最为常用,其他方法应用较少,后者只用于不能透过血脑屏障的药物或极其微量的中枢性药物。

1. 静脉注射

(1)兔:兔耳缘静脉较粗,位于兔耳外缘的皮下,易于寻找辨认,同一部位可反复应用,是兔给药的最好途径。注射时要注意消毒,注射后要压迫止血。

(2)鼠:鼠尾静脉有三条,位于鼠尾的皮下,左右两侧和背侧各一条,可以清晰辨认。但因静脉太细,易损伤,尤其是某些抗肿瘤和刺激性强的药物,同一部位不宜反复注射。一般注射前先将鼠保定于尾筒中(也可用手保定),露出尾巴,用 45~50℃ 温盐水浸泡片刻或用酒精擦拭使血管扩张。操作者左手持鼠尾,右手持注射器(大鼠用 4.5 号针头、小鼠用 4 号针头),使针头与静脉平行($<30^\circ$ 角),从鼠尾末端 1/4 处进针,此处皮肤最薄易于刺入。如反复注射,应先从末端开始,逐步向根部移动,注射时要注意消毒,压迫止血。

(3)犬:犬的前肢头静脉,后肢小隐静脉、股静脉均可作为静脉注射的部位。

2. 腹腔注射

鼠腹腔大网膜血液循环丰富,对药物吸收快而完全,因而腹腔注射是大鼠和小鼠最常用的给药方法。兔也可用腹腔注射给药。

注意事项:腹腔注射给药应注意对皮肤进行消毒,以防止感染;将动物保定牢固,以免动物乱动针头刺伤腹腔脏器;注射时由助手将腹部皮肤提起,注意不要刺伤腹腔内脏器,确保药物注入腹腔内。

3. 肌肉注射

肌肉注射应选用肌肉发达、无大血管通过的臀部或大腿外侧的肌肉。注射时保定好动物,将针头迅速垂直刺入肌肉,回抽无血即可进行注射。

4. 皮下注射

皮下注射部位,一般犬、猫选择在大腿外侧,豚鼠在后腿内侧或腹部,鼠在颈背部或侧下腹部,兔在背部或耳根部。注射时以左手拇指和食指捏起皮肤,用5号针头注射器刺入皮下,缓慢推注。

5. 皮内注射

皮内注射时需将注射部位备皮、消毒,一般用左手拇指和食指按住皮肤使其绷紧,在两指之间用TB注射器紧贴表皮刺入皮内,再向上挑起刺入,注射药液,待皮肤表面鼓起一白色圆丘,表明注射成功。

6. 脑室注射法

详见本章第九节。

四、人与动物给药剂量的换算

动物某种用药剂量的确定来自于实践,由于人与动物对同一药物的耐受性相差很大,动物的耐受性比人大,因此在用药时必须将人的用药剂量换算成动物的用药剂量。动物实验所用的药物剂量一般按mg/kg、mL/kg或g/kg(注射量/体重)计算。

由于根据体表面积计算法进行换算较为麻烦,具体实验中通常按以下大致的比例进行换算。如以人单位体重的用药量为1,则小鼠、大鼠为25~50,兔、豚鼠为15~20,犬、猫为5~10。动物越小,单位体重的用药量越大。

给药途径不同剂量也不同。以口服(灌胃)剂量为100,则灌肠剂量为100~200,皮下注射为30~50,肌肉注射为25~30,静脉注射为25。脑室注射可进一步减量。

动物的年龄不同给药剂量也有差异。一般所说的剂量是成年动物的剂量,以犬为例,如6个月以上成年犬剂量为1,3~6月龄为1/2,45~89天龄为1/4,20~44日龄为1/8,10~19日龄为1/16。其他动物可参照此标准,根据情况确定给药剂量。

例如:某药物成人(体重为60 kg)一次静脉注射剂量300 mg(0.3 g),现将该药配制成5%(0.05)的溶液给一体重25 g(0.025 kg)的小鼠灌胃给药,其用药剂量为:

$$[(0.3 \div 60 \times 50 \times 0.025) \div 0.05] \times 4 = 0.5 (\text{mL})$$

第五节 实验动物生命体征的检测

动物实验过程中,经常需要在保证动物继续存活的前提下,检测动物的呼吸(R)、体温(T)、心率(P)和血压(BP)等生命体征,作为重要的实验观察指标。一般而言,呼吸和心率只要通过密切观察就可以得到比较精确的结果;体温常用普通温度计检测肛温或用数字温度计检测;血压的测定较为困难,对于大鼠,通常用鼠尾血压计来检测。

一、大鼠血压的检测

1. RBP-1型大鼠血压计的结构和原理

RBP-1型大鼠血压计(blood pressure meter for rat model, RBP-1)是一种无创性大鼠尾压心率测量仪,由滑动式大鼠固定器、网套及卡板、鼠尾袖带、光电容积脉搏波传感器、心率数字显示器等部件组成。

采用鼠尾袖带加压阻断法测量大鼠的血压,以鼠尾光电容积脉搏波随袖带压力下降而重新出现作为收缩压的检测信号,配以高增益低噪音放大器,以声、光显示容积脉搏波,使血压检测信号的识别灵敏度提高,保证了仪器的测量准确性。测压时光电容积脉搏波传感器处于封闭状态,抗干扰能力强。

2. 操作方法

(1)保持室内相对恒温,预热和恒温加热被测动物,配合鼠尾局部保温,保持测量条件的一致,以提高测量速度和结果的重复性。

(2)将大鼠固定于滑动式大鼠固定器,根据不同体重的大鼠,配合大、中、小三种尺寸的网套及卡板,将动物牢固固定,以便于实施测量。大鼠的血压以 mmHg 表示。

(3)本仪器配有心率数字显示器,可同时显示大鼠的心率,以“次/分钟”表示。

(4)为了保证测量数据的准确性,可重复测量 2~3 次,取其均值作为测量数据。

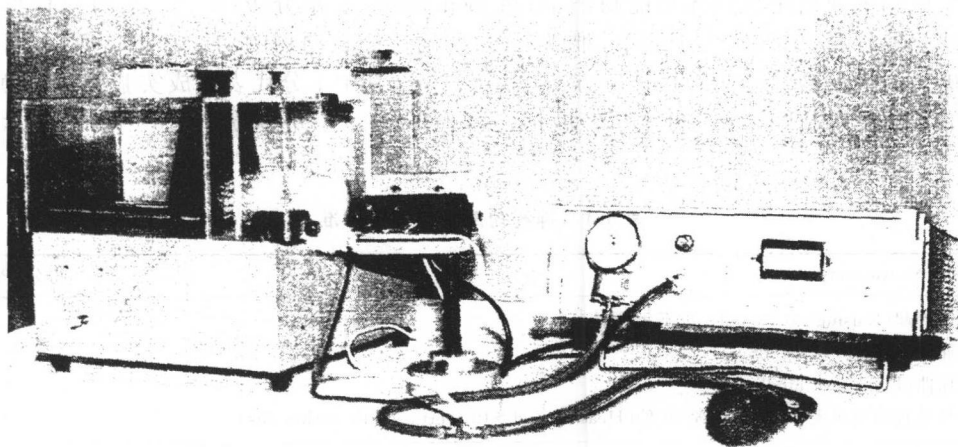


图 1-1 RBP-1 型大鼠血压计的结构和测定方法

二、大鼠体温的检测

1. 普通温度计测量

牢固保定或麻醉后固定大鼠,将肛管内粪便挤出,用普通温度计(甩至 35℃ 以下)经肛门轻轻插入肛管约 1.5~2 cm,以温度计尖端的水银部分全部插入为宜。测量 2~3 min 至温度计水银柱不再上升为止,即为大鼠肛温。

2. 数字温度计测量

观察温度对动物功能的影响时,需要精确、连续测量动物的体温,一般采用数字温度计进行测量。数字温度计由热敏传感探头(或探针)和液晶显示屏组成,可以精确测量动物的皮温、肛温、皮下及腹腔内温度等。使用时首先校正温度计 0 点。然后将热敏探头置于待测部位,注意保持平稳,待显示屏数字稳定不变时即为所测温度。

使用注意事项:测量皮温时应将热敏探头贴近皮肤,不能留有空隙。测肛温时要将肛管内的粪便挤出,切勿将探头(探针)插入粪便内而造成误差;插入时动作要轻柔,深度要适中,以免刺破肛管或直肠。测量皮下、肌肉或腹腔内温度时,应注意严格消毒,无菌操作,皮肤切口以能插入热敏探头为宜。

第六节 实验动物的行为测试

各种动物都有自己的行为活动习性,当发生疾病或人为造成病理模型后,其原有的习性将发生改变或发生一定程度的功能缺陷。应用有关药物或相关治疗措施,可能使动物的习性恢复正常或功能缺陷得以改善。经过对治疗前后的行为进行量化评分和统计分析,即可判断所用药物或治疗措施的疗效。本节以大鼠为例介绍几种动物行为测试方法。

一、神经行为功能测试

1. 神经功能等级评分

大鼠脑梗死后出现肢体功能缺陷,通过 Bedersons 定量分级(0~3 分)可以评价神经功能缺陷的程度,但该法过于简单,难以全面、准确地反映动物的功能状态。所以,目前多应用更为实用的神经功能等级评分方法,总分 18 分,其中 1 分代表完成实验项目不稳定或进行的实验反射缺陷,2~6 分表示轻度损伤,7~12 分表示中度损伤,13~18 分表示严重损伤(表 1-1)。

表 1-1 神经功能等级评分标准

运动试验(Motor tests)	得分(Points)
抓尾将鼠提起(Raising rat by tail),以下每项得 1 分:	
前肢屈曲(Flexion of forelimb)	1
后肢屈曲(Flexion of hindlimb)	1
头动与垂直轴成角大于 10°并持续 30 秒(Head moved > 10° vertical axis within 30s)	1
将鼠放在地板上,正常得 0 分,最高得 3 分(Placing rat on the floor, normal=0, maximum=3):	
正常行走(Normal walk)	0
向前直行时不稳(Instability to walk straight)	1
前行时向瘫痪侧划圈(Circling toward the paretic side)	2
向瘫痪侧摔倒(Fall down to the paretic side)	3
感觉试验(Sensory tests),以下每项得 1 分:	
放置试验(视觉和触觉试验)[Place test (visual and tactile test)]	1
本体感觉试验(深感觉,将鼠爪压向桌面刺激肢体肌肉反应) Proprioceptive test (deep sensation, pushing the paw against the table edge to stimulate limb muscle)	1
平衡木试验,正常得 0 分,最高得 6 分(Beam balance tests, normal=0, maximum=6):	
能维持正常平衡姿势(Balance with steady posture)	0
抓住平衡木的一侧(Grasps side of beam)	1
悬于平衡木并有一肢体摔下平衡木(Hang the beam and one limb falls down from the beam)	2
悬于平衡木并有两肢体摔下平衡木或在平衡木上旋转(>60 s) Hang the beam and two limbs fall down from the beam, or spins on beam(>60 s)	3
试图在平衡木上保持平衡(>40 s)但最终摔下来[Attempts to balance on the beam but falls off (>40 s)]	4
试图在平衡木上保持平衡(>20 s)但最终摔下来[Attempts to balance on the beam but falls off (>20 s)]	5
直接摔下;无保持平衡的意图或悬在平衡木上[Falls off; no attempt to balance or hang on to the beam (<20 s)]	6