

全国高等院校医学实验教学规划教材

毒理学基础实验指导

唐焕文 靳曙光 主编



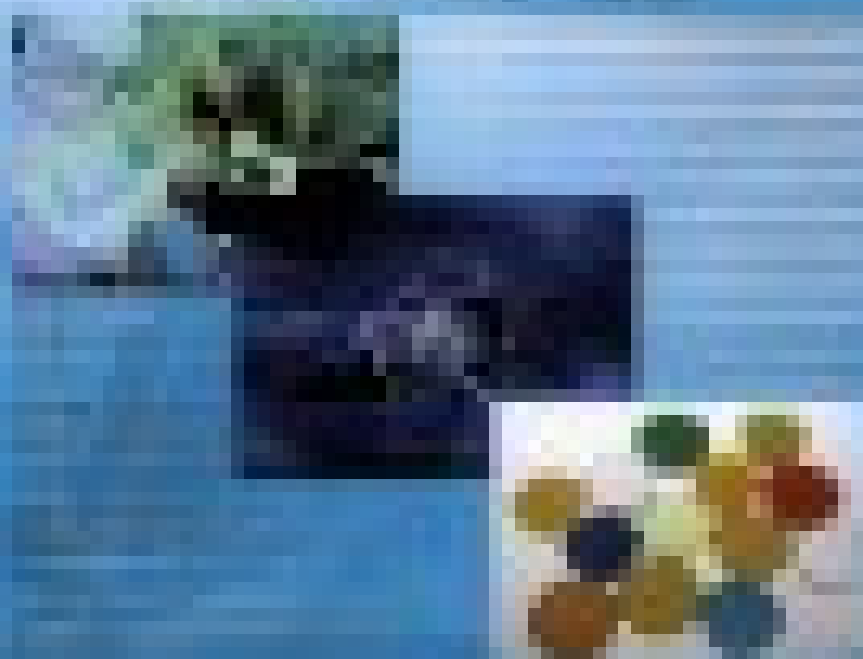
科学出版社

www.sciencep.com

全国高等医药类院校教材卫生部规划教材

毒理学基础实验指导

陈永士 陈建明 主编



科学出版社
SCIENCE PRESS

全国高等院校医学实验教学规划教材

毒理学基础实验指导

主 编 唐焕文 靳曙光

副主编 徐莉春

编 者 (按姓氏笔画排序)

甘仲霖(泸州医学院)

刘林华(广东医学院)

张青碧(泸州医学院)

张 晶(北华大学)

徐莉春(徐州医学院)

高羽亭(广东医学院)

唐焕文(广东医学院)

靳曙光(北华大学)

科 学 出 版 社

北 京

· 版权所有 侵权必究 ·

举报电话:010-64030229;010-64034315;13501151303(打假办)

内 容 简 介

本书共分三章 16 个实验内容。第一章为实验基本技术和方法,包括实验动物和动物实验基本理论,实验动物的一般操作技术,GLP 简介,分子毒理学实验技术与方法简介,酶、蛋白测定相关方法与技术,小鼠行为与运动功能检测方法,毒理学实验设计的基本原则和设计要点;第二章为验证性实验,主要包括全血胆碱酯酶活性的测定、彗星试验、小鼠骨髓细胞微核试验、急性皮肤和眼刺激性试验、Ames 试验、小鼠精子畸形试验和细胞毒理学实验;第三章为综合性及拓展性实验,主要用于拓宽学生思维和综合运用能力,包括急性毒性试验和三聚氰胺毒理学安全性评价。本教材既有毒理学实验所用的使用技术与方法、经典实验,同时还包括综合性及拓展性实验内容,适用性和可操作性强。

本书可供预防医学专业和卫生检验学专业本科生、研究生使用。

图书在版编目(CIP)数据

毒理学基础实验指导 / 唐焕文, 靳曙光主编. —北京: 科学出版社, 2010. 8

(全国高等院校医学实验教学规划教材)

ISBN 978-7-03-028633-8

I. 毒… II. ①唐… ②靳… III. 毒理学-实验-医学院校-教学参考资料
IV. R99-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2010)第 158673 号

策划编辑:周万灏 李国红 / 责任编辑:胡治国 周万灏 / 责任校对:陈玉凤
责任印制:刘士平 / 封面设计:黄 超

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>

源海印刷有限责任公司印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2010 年 8 月第 一 版

开本: 787×1092 1/16

2010 年 8 月第一次印刷

印张: 7

印数: 1—4 000

字数: 155 000

定价: 16.00 元

(如有印装质量问题,我社负责调换)

《全国高等院校医学实验教学规划教材》

编写指导委员会

主 任	丁元林				
副主任	施建明				
委 员	刘 仿	唐湘涓	吴 斌	李果明	黄培春
	苏汝好	唐焕文	贾振斌	庄海旗	
总策划	刘 仿				
秘 书	徐美奕	林华胜	余海波		

总 序

随着 21 世纪经济与社会的发展,科学技术既向纵深发展、不断分化,又互相渗透、不断融合;同时,新兴学科与边缘学科的兴起、新技术的应用、信息量的剧增,对医学的发展产生了重大而深远的影响,这些必将促进医学教育的全面改革。实验教学作为高等教育的重要组成部分,是学生实践能力和创新能力培养的重要途径,其重要性已受到越来越广泛的关注。

目前,传统实验教学模式仍占主导地位,存在不少弊端和不足:以学科为基础构建的课程体系,忽略了生命科学的整体性、系统性;学科体系繁多,相互孤立,学科间联系不够;实验室分散,功能单一,设备重复购置,资源浪费,效率低下,调配困难;实验教学内容陈旧,手段落后,方式老化,实验内容以验证理论为主,缺少现代医学实验内容;医学生学习的积极性、主动性不强。这些明显滞后于现代医学的发展,影响教学质量,不利于大学生创新意识和实践能力的培养,难以培养出高素质、创新型的医学人才。如何改革传统的实验教学模式,培养具有创新精神、知识面广、动手能力强的新型医学人才,已成为当务之急。教育部、卫生部《关于加强医学教育工作,提高医学教育质量的若干意见》(教高〔2009〕4 号)明确提出“高等学校要积极开展医学实践教学体系,加强实践能力培养平台的建设。积极推进实验内容和实验模式的改革,提高学生分析问题和解决问题的能力”,进一步明确了医学实验教学的重要性和改革的必要性。根据教育部精神,要对传统医学实验教学模式进行改革,最大限度地整合有限资源,优化重组教学实验室,依托相关学科优势,与学科建设相结合,构建开放共享的实验教学中心,力求突出和贯彻执行教育部提出的“三基”、“五性”和注重实用性的要求,以培养学生的探索精神、科学思维、实践能力和创新能力。构建新型的医学实验教学体系,要求我们从根本上改变实验教学依附于理论教学的理念,理论教学与实验教学要统筹协调,既有机结合又相对独立,建立起以能力培养为主线,分层次、多模块、相互衔接的实验教学体系。

以教学内容和课程体系改革为核心、培养高素质、创新型人才为目标,科学整合实验教学内容,打破既往学科框架,按新构建的科学体系,编写适合创新性实验教学体系的配套实验教材已显非常迫切。在科学出版社的大力支持下,《全国高等院校医学实验教学规划教材》编委会以广东医学院为主体,协同重庆医科大学、中山大学等全国 33 所高等医药院校相关专业的 167 名专家、教授共同编写了这套实验教学系列教材。全系列教材共 26 本,分别是《医学物理学实验》、《医用基础化学实验》、《医用有机化学实验》、《系统解剖学实验》、《医学机能学实验教程》、《病原生物学与医学免疫学实验》、《生物化学与分子生物学实

验指导》、《病理学实习指南》、《计算机应用基础上机与学习指导》、《预防医学实习指导》、《卫生统计学实习指导》、《流行病学实习指导》、《临床营养学实习指导》、《营养与食品卫生学实习指导》、《毒理学基础实验指导》、《环境卫生与职业卫生学实习指导》、《健康评估实验指导》、《护理学基础实验指导》、《内科护理学实验指导》、《外科护理学实验指导》、《妇产科护理学实验指导》、《儿科护理学实验指导》、《药理学实验教程》、《药学实验指导》、《临床免疫学检验实验》、《核医学实验教程》。

本系列实验教学规划教材是按照教育部国家级实验教学示范中心的要求组织策划,根据专业培养要求,结合专家们多年实验教学经验,并在调研当前高校医药实验室建设的实际情况基础上编写而成,充分体现了各学科优势和专业特色,突出创新性。同时借鉴国外同类实验教材的编写模式,力求做到体系创新、理念创新。全套教材贯彻了先进的教育理念和教学指导思想,把握了各学科的总体框架和发展趋势,坚持了理论与实验结合、基础与临床结合、经典与现代结合、教学与科研结合,注重对学生探索精神、科学思维、实践能力的培养,我们深信这套教材必将成为精品。

本系列实验规划教材编写对象以本科、专科临床医学专业为主,兼顾预防、基础、口腔、麻醉、影像、药学、中药学、检验、护理、法医、心理、生物医学工程、卫生管理、医学信息等专业需求,涵盖全部医学生的医学实验教学。各层次学生可按照本专业培养特点和要求,通过对不同板块的必选实验项目和自选实验项目相结合修选实验课程学分。

由于医学实验教学模式尚存在地区和校际间的差异,加上我们的认识深度和编写水平有限,本系列教材在编写过程中难免存在偏颇之处,敬请广大医学教育专家谅解,欢迎同行们提出宝贵意见。

《全国高等院校医学实验教学规划教材》编写指导委员会

2010年6月

前 言

毒理学与生命科学的发展同步并互为促进,它是研究物理、化学和生物因素对机体的损害作用、生物学机制、危险度评价和危险度管理的科学。毒理学既是基础科学又是一门应用性很强的学科,是现代医学尤其是公共卫生类专业的重要基础课程。新世纪的现代医学教育更加着力于学生综合创新素质和实践动手能力的培养,因此,毒理学的实践技能对于高素质、应用型公共卫生人才培养具有更重要的地位。

《毒理学基础实验指导》一书由广东医学院、北华大学、徐州医学院和泸州医学院从事毒理学教学多年的一线教师编写而成。编写过程中按照“三基”(基础理论、基本知识、基本技能)和“五性”(思想性、科学性、先进性、启发性、适用性)的原则,结合各编者的教学实践,尽量做到具有针对性、实用性。本书包括三个部分,分别为实验基本技术和方法、验证性实验和综合性及拓展性的实验,便于系统培养学生的实验操作技能和实际工作能力,以提升学生的创新观念和综合素质。

在本书编写过程中,得到科学出版社的直接指导和广东医学院有关领导的鼎力支持。作为《毒理学基础》的配套教材,主要供预防医学专业和卫生检验专业学生使用。全体编写人员在时间紧、任务重的情况下,团结协作,克服困难,按时完成编写任务,为本书付出了辛勤劳动和汗水,在此一并表示最诚挚的感谢。限于学术水平和时间仓促,书中疏漏和错误在所难免,敬请广大师生和同仁不吝批评指教。

唐焕文 靳曙光
2010年6月

目 录

第一章 实验基本技术和方法	(1)
实验一 实验动物和动物实验基本理论	(1)
实验二 实验动物的一般操作技术	(14)
实验三 GLP 简介	(20)
实验四 分子毒理学实验技术与方法简介	(33)
实验五 酶、蛋白测定相关方法与技术	(41)
实验六 小鼠行为与运动功能测验方法	(50)
实验七 毒理学实验设计的基本原则和设计要点	(53)
第二章 验证性实验	(56)
实验八 全血胆碱酯酶活性的测定	(56)
实验九 彗星试验	(59)
实验十 小鼠骨髓细胞微核试验	(62)
实验十一 急性皮肤和眼刺激性试验	(65)
实验十二 鼠伤寒沙门氏菌回复突变试验(Ames 试验)	(70)
实验十三 小鼠精子畸形试验	(79)
实验十四 细胞毒理学实验	(81)
第三章 综合性及拓展性实验	(88)
实验十五 急性毒性试验	(88)
实验十六 三聚氰胺毒理学安全性评价	(100)

实验一 实验动物和动物实验基本理论

一、实验动物的选择

动物实验是毒理学研究的重要方法,为获得可靠的研究结果,关键是正确地选用实验动物。在实际工作中选择实验动物应注意以下三个方面:

(一) 实验动物物种的选择

外源化学物的固有毒性在人和不同物种实验动物之间往往表现不同,物种差别可表现在量和质的差别上。因此,需要对实验动物物种进行选择。一般认为,从动物实验结果外推到人,定性外推的可靠性高于定量外推,毒效学预测优于毒动学预测。

对实验动物物种的选择,原则上应选择代谢、生物化学和毒理学特征与人最接近、自然寿命不太长、易于饲养和实验操作及经济并易于获得的物种。

在实际工作中,选择实验动物时常受到某些因素的限制,如经济条件、实验动物的寿命、行为和生活能力、处置及实验前需要了解实验动物物种和人对受试化学物的吸收、生物转化等资料。因此,没有一种实验动物完全符合上述物种选择的原则。

目前常用的动物是啮齿类和非啮齿类两个种系。系统毒性研究常选用的啮齿类是大鼠和小鼠,非啮齿类是犬。皮肤刺激试验常用豚鼠和兔。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。一般认为,如以与人相同的接触方式、大致相同的剂量水平,在两个物种有毒性反应,则人有可能以相同的方式发生毒性反应。当不同物种的毒性反应差异很大时,必须研究外源化学物在不同物种的代谢、动力学及毒作用机制,然后才可将实验结果外推到人。

(二) 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

近交系指由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、DBA/2、BALB/C、C3H、C57B/6J、A 和 A/He 等。由于全部动物的基因相同,对外源化学物的敏感性较一致,试验结果个体差异小、重现性好。但近交系动物体弱易病,对外界环境适应能力差。

2. 杂交群动物(杂交 1 代, F1)

杂交群动物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。他们的

个体之间在遗传上一致但又非近亲,更适于做毒理学试验。试验需选择哪两个近交系进行交配产生的杂交一代动物,应当根据文献资料中所报道的已鉴定的特性是否利于特定的毒理学研究目的而定。

3. 封闭群

一个种群在 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。如昆明种小鼠、NIH 小鼠、LACA 小鼠、F344 大鼠、Wistar 大鼠、SD 大鼠、新西兰兔等。

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,故针对不同的受试物毒理学研究要选择适宜的品系,对同种外源化学物进行毒理学系列研究时,应固定使用同一品系动物,以确保研究结果的稳定。

(三) 实验动物个体的选择

实验动物对外来化学物的毒性反应存在个体差异,其主要受到年龄、性别、生理及健康状况等因素的影响。

1. 年龄和体重

毒理学试验一般依据试验的类型选择适宜年龄的实验动物。急性毒性试验一般选用成年动物;慢性毒性试验因实验周期长,则选用较年幼或初断乳的动物,以使实验周期能覆盖成年期。实验动物的确切年龄应依其出生日期来定,但实际工作中常以动物的体重粗略地判断动物的年龄,作为挑选适龄动物的依据。在同一试验中,要求各组间平均体重差异不应超过 5%,组内个体间体重差异小于 10%,常用实验动物的寿命及体重见表 1-1。

表 1-1 常用实验动物的寿命及体重

动物种类	寿命(年)	成年体重(g)	急性实验选择体重(g)	慢性实验选择体重(g)
小鼠	1.5~2	10~24	18~25	15~18
大鼠	2~2.5	160~250	100~150	50~100
豚鼠	6~8	300~700	200~250	150~200
家兔	4~9	2000~3000	1500~2000	1200~1500
犬	15~20	10000~15000	8000~15000	4000~6000

2. 性别

同一物种、同一品系的实验动物雌雄两性对相同外源化学物毒性反应通常类似,一般情况下,对于初次试验的受试物,应该采用两种性别。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;如果已知不同性别的动物对受试物敏感性不同,则应选择敏感的性别。

3. 常用实验动物的性别鉴定

小鼠、大鼠主要依据性器官与肛门的距离区分,雄鼠的性器官与肛门间距离较长,雌鼠两者间距离极短;成年雄鼠卧位可见睾丸,成年雌鼠腹部可见乳头。家兔呈仰卧位,自尾向前观察,肛门位于尾的基部之下,雄兔肛门有一个泄殖孔,而雌兔在肛门前面有两个相距极近的孔分别为尿道口和阴道口;成年雄兔可见两睾丸,成年雌兔有五对乳头。

4. 生理状态

在毒理学试验中,动物如出现哺乳、妊娠,则影响体重及生理生化等指标的检测结果,

且性激素对外源化学物代谢转化有影响,故应选用未产未孕的雌性动物。雌雄动物一般应分笼饲养,但在某些试验,如致畸试验、繁殖试验及显性致死试验等,则需有计划地合笼交配。

5. 健康状况

实验动物的健康状态对毒理学试验结果有很大的影响,微生物控制是确保实验动物健康状态的一个重要途径。按微生物控制分类,实验动物分为四级(见表 1-2)。毒性试验及毒理学研究应使用二级(或二级以上)的动物,以保证实验结果的可靠性。健康个体的标准还包括健康的动物应发育正常、体形健壮、无外观畸形;被毛浓密、有光泽、顺贴不蓬乱;行动迅速、反应灵活;眼睛明亮有神;表皮无溃疡和结痂,天然孔道干净无分泌物等。

表 1-2 实验动物微生物等级标准

等级	饲养环境	要求
I 级 普通动物	开放系统	应没有传染给人的疾病
II 级 悉生动物	屏障系统	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)	屏障或隔离系统	除 II 级标准外,动物为剖宫产或子宫切除产、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	隔离系统	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)

二、实验动物的准备

(一) 动物实验前的准备

实验动物在购进之后,应雌雄分开饲养。为确保选择健康动物,一般应进行 5~7 天的检疫。对于大鼠和犬的亚慢性和慢性毒性试验,可在实验前采血进行血液学和血液生化学检查,对犬应常规驱除肠道寄生虫。并在此期间多次观察动物,异常的动物应及时剔除。观察期结束,按实验设计的要求对实验动物进行标记和分组。

(二) 实验动物的抓取和固定

正确地抓取和固定动物,是动物实验最基本的一项实验技术。抓取固定动物的方法依实验内容和动物种类而定。为了不损害动物并防止被动物咬伤,抓取固定动物前,必须对各种动物的一般习性有所了解,抓取固定时既要大胆敏捷,又要小心仔细,不能粗暴、恐吓动物。同时爱惜动物,使动物少受痛苦。

1. 小鼠的抓取固定方法

小鼠的抓取法有两种,一种是用右手抓住尾部提起,放在鼠笼盖或其他粗糙面上,向后上方轻拉,此时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手中;另一种抓法是只用左手,先用拇指和食指抓住小鼠尾部,再用手掌尺侧及小指夹住尾根,然后用拇指及食指捏住其颈部皮肤。在一些特殊的实验中,如进行尾静脉注射时,可使用特殊的固定装置进行固定,如尾静脉注射架。

2. 大鼠的抓取固定方法

抓大鼠操作不熟练者,最好戴上帆布或硬皮质的防护手套。如是灌胃、腹腔注射、肌肉

和皮下注射,可采用与小鼠相同的手法,即用拇、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操作。大鼠手术操作时,需对大鼠进行麻醉和固定。把麻醉的大鼠仰卧位置于大鼠实验板上,用橡皮筋或棉线固定好四肢,为防止苏醒时伤人和便于颈部、胸部实验操作,应用棉线将大鼠两上门齿固定于实验板上。若要进行尾静脉注射时,使用专用的大鼠固定器。

3. 兔的抓取固定方法

正确的抓取方法一般以右手抓住兔颈部的毛皮提起,然后左手托其臀部或腹部,让其身体重量的大部分集中在左手上。不应采用抓双耳或抓提胯部的方法,以免抓取过程中损伤动物。兔的固定方法分为盒式、台式两种。盒式固定适用于兔耳采血、耳血管注射等情况;若做血压测量、呼吸等实验和手术时,则需将兔固定在兔台上,四肢用粗棉绳活结绑住,拉直四肢,将绳绑在兔台四周的固定木块上,头以固定夹固定。

(三) 实验动物的编号标记

实验动物的编号标记方法有多种,常用的实验动物标记方法如下:①小鼠、大鼠:剪趾(胎鼠/新生鼠)、耳打孔、刺纹、植入;②豚鼠:耳打孔、耳标记、刺纹、植入;③兔:耳标记、刺纹、植入;④犬和猴:刺纹、项圈、植入。

实际工作中,啮齿动物或白色家兔等实验动物的标记常用染色法,可用苦味酸(黄色)、品红(红色)的酒精饱和溶液在动物不同部位被毛上染色标记。如要给小鼠或大鼠标记1~10号,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号不作标记。用一种颜色可编46个鼠(1~89号,不染色为10号,染两处按低号计。如3号和4号两处染色,应为34号,不是43。弃去个位号与十位号重复的号,如无11、55、99号等)。如用红色表示十位数黄色表示个位数,可标出1~99号。由于被毛上颜色会逐步消失,故需重复染色。

(四) 实验动物的随机分组

实验动物分组的原则要求所有的动物分配到各剂量组和对照组的机会均等,以保证实验中非处理因素均衡一致,避免主观选择倾向,减少偏性,以保证结果的准确可靠。正确的分组方法是随机分组。实验动物按性别,将动物称体重,再按体重从大到小排序编号,然后利用统计学的随机数字表,按完全随机分组法或配伍组随机分组法,将实验动物分配到各剂量组和对照组。然后应计算各组实验动物体重的均值和标准差,必要时可将实验动物适当调组,以使各组实验动物的平均体重不存在显著的差异;每组动物数量应按实验周期长短、实验类型及统计学要求而定。如果是慢性试验或需要定期处死动物进行检验的实验,为补足动物自然死亡和人为处死所丧失的数量,就要选较多的动物,以确保实验结束时有合乎统计学要求的动物数量存在。

三、受试物样品的准备

(一) 受试物基本资料的准备

首先应了解受试物的化学结构和理化性质,如挥发性、溶解性、pH、稳定性(包括受试物

在赋形剂中的稳定性), 纯度和杂质的可能成分等。查阅文献, 检索与受试物化学结构和理化性质相似的化合物的毒性资料以做参考。

为保证实验结果的可重复性, 对各个毒理学试验应选用同一种、同一批号受试物。受试物成分和配方必须固定。如是异构体混合物, 异构体比例必须固定。活性成分的百分比和可检测的杂质的浓度也应固定。还需了解受试物在储存期内稳定性和在饲料中的稳定性情况。

(二) 受试物的用量

受试物应一次备齐全部实验的用量, 所需受试物总量常用下面公式计算:

$$\text{所需受试物总量} = (A \times B \times C \times D) \times 1.2$$

式中: A 为每组动物数; B 为各处理组的剂量和(如 $0.1 + 0.3 + 0.9 = 1.3 \text{ mg/kg}$); C 为染毒次数(通常为天); D 为动物的平均体重; 1.2 为安全因子, 包含损耗量。

(三) 溶剂和助溶剂

染毒前根据染毒途径的不同, 应将受试物制备成一定的剂型。常用的是制备成水溶液、油溶液或混悬液。

对溶剂和助溶剂的基本要求是: ①应该是无毒或实际无毒; ②不与受试物起反应, 受试物在溶液中应稳定; ③对受试物的毒动学及毒效学无明显影响; ④无特殊气味或刺激性。对水溶性受试物, 体内试验首选的溶剂为水(经口染毒)和等渗盐水(胃肠道外染毒); 不溶水的受试物可溶于或悬浮于适当的有机溶剂中。天然植物油(如玉米油、橄榄油)、丙酮、二甲基亚砷等常用作非水溶剂。混悬液常用的赋形剂为 0.5% 羧甲基纤维素钠、10% 阿拉伯树胶或淀粉。一般受试物溶液均应新鲜配制。美国药剂协会在 1986 年推荐的常用溶剂和赋型剂如下:

(1) 水(water): 可用于所有的途径, 常为首选。

(2) 生理盐水(saline): 除皮肤和眼周外的所有途径。

(3) 玉米油(corn oil): 用于经口、皮肤、阴道、直肠、皮下。

(4) 橄榄油(olive oil): 经口。

(5) 花生油(peanut oil/arachis oil): 经口、皮肤、阴道、直肠、皮下和肌肉注射。

(6) 丙酮(acetone): 大鼠经口 LD_{50} 为 10.7 ml/kg , 重复用于皮肤可脱脂, 用于皮肤和经口, 经口限量为 5 mg/kg 。

(7) 二甲基亚砷(dimethylsulfoxide, DMSO): 大鼠经口 LD_{50} 为 17.9 ml/kg , 小鼠腹腔注射 LD_{50} 11.6 ml/kg 。重复用于皮肤可脱脂, 对原代细胞无细胞毒性。用于所有的途径, 浓度达 5% 可增强吸收。

(8) 羧甲基纤维素(carboxymethylcellulose, CMC): 惰性, 0.1%~5% 水溶液, 用于经口。

(9) 甲基纤维素(methylcellulose): 惰性, 0.1%~5% 水溶液, 用于经口。

(10) 甘油(glycerol)和丙三醇: 大鼠经口 LD_{50} 为 20 ml/kg 。用于经口、皮肤、腹腔和静脉注射(其水溶液)。

(11) 甲基乙基酮、丁酮(methylethylketone, MEK): 大鼠经口 LD_{50} 为 6.86 ml/kg , 用于皮肤, 重复用于皮肤可脱脂。

(12) 凡士林油(mineraloil/liquidpetrolatum):经口、阴道、直肠和皮肤,用作悬浮剂。

(13) 凡士林(petrolatum/Vaseline/petroleumJelly):惰性,经皮肤、阴道和直肠。

(14) 二甲基甲酰胺(*N*, *N*-dimethylformamide, DMFO):大鼠经口 LD₅₀为 7.6ml/kg,对原代细胞无细胞毒性。用于经口、皮肤、腹腔和静脉注射(浓度最高为 1%)。

(15) 乙醇(ethanol):大鼠经口 LD₅₀为 7.6ml/kg,小鼠静脉注射 LD₅₀为 11.6ml/kg。用于皮肤和经口,低浓度可用于其他途径。经口限量为 5ml/kg。

(16) 聚乙二醇-400(polyethyleneGlycol-400, PEG400):小鼠经口 LD₅₀为 23.7ml/kg,大鼠经口 LD₅₀ 30ml/kg。用于经口,助溶剂。

(17) 吐温 80(Tween 80):用于经口,助溶剂。

(18) 阿拉伯胶(gumArabic):惰性,经口,作为稀释或增黏剂。

(19) 乳糖(lactose):经口,作为稀释剂,以降低刺激性。

(四) 制剂准备要点

在准备染毒制剂时要注意以下方面:

- (1) 在准备制剂时不应改变受试物的理化性质。
- (2) 评价固体受试物对皮肤的毒性时应保持其形状和颗粒大小。
- (3) 多成分的受试物应按配方配制,以使染毒制剂准确地反映原混合物(即其成分不应被选择性地悬浮或溶解)。
- (4) 制剂应保持化学稳定性和受试物的均一性。
- (5) 制剂利用溶剂或赋形剂的量不宜过多,以减少总试验容积。
- (6) 制剂应易于准确染毒。
- (7) 一般情况下制剂的 pH 应控制为 5~9。
- (8) 尽量避免用酸或碱使受试物解离(基于保护动物及避免改变肠道或肾小管内的 pH)。
- (9) 胃肠道外染毒时,应尽可能使用等渗溶液。

四、实验动物染毒途径及技术

在毒理学试验中染毒途径的选择,应尽可能模拟人在接触该受试物的方式。同时,染毒的途径和方法也应根据实验目的、实验动物种类和药物剂型等情况而定。最常用的染毒途径为经口、经呼吸道、经皮及注射途径。不同途径染毒的其吸收速率不同,一般是静脉注射>吸入>肌内注射>腹腔注射>皮下注射>经口>皮内注射>其他途径(如经皮等)。

(一) 经口(胃肠道)染毒

对固态和不挥发性液态物质的毒理学研究常选用胃肠道染毒方式。受试物在胃肠道的吸收量和吸收速度取决于胃的内容物、受试物的理化性质和制剂的剂型及浓度等。常用的染毒方法有灌胃、喂饲和吞咽胶囊等方式。

1. 灌胃

灌胃是以注射器经导管将配制成溶液或混悬液的受试物注入胃内。一般灌胃深度从口至剑突下。常规使用等容量灌胃法,即将受试物配制成不同浓度,实验动物单位体重的

灌胃容量相同。但如果受试物存在稀释毒性(外源化学物用溶剂稀释后一般浓溶液毒性大于稀溶液,但有的稀释之后毒性反而增加)时可使用等浓度灌胃法。实验动物灌胃前应禁食空腹,其中大鼠隔夜禁食,小鼠可禁食 4 小时(因小鼠消化吸收和代谢速度较快),均不禁水,灌胃后 2~4 小时提供饲料,若经口多次染毒,一般不禁食,但应每日定时染毒。

灌胃法适用于小鼠、大鼠、兔、犬等动物,优点是剂量准确,缺点是工作量大,并有伤及食管或误入气管的可能。

(1) 小鼠和大鼠灌胃法:左手拇指和食指捏住鼠头部两耳后皮肤,无名指或小指将尾部紧压在上,使小鼠腹部向上,将动物固定成垂直体位,右手持注射器,将灌胃针(4 号注射针头,尖端磨钝,稍加弯曲)经口角插入口腔,用灌胃针轻压小鼠头部,使口腔和食管成一直线,再将灌胃针沿上腭壁缓缓插入食管,当到达膈肌水平时可稍感抵抗,如此时动物无呼吸异常,即可将受试物注入。如遇阻力或动物憋气则应抽出重插,以防损伤食管、膈肌或误入气管。注完后轻轻退出灌胃针,一般灌胃针插入深度为:小鼠 3~4cm,大鼠 4~6cm。

(2) 犬和家兔灌胃法:一般 2 人操作,先将动物固定,再将特制的扩口器放入动物上下门牙间并用绳固定于嘴部,经扩口器上的小圆孔将带有弹性的橡皮导管(如导尿管)沿咽后壁插入食管,此时应检查导管是否正确插入食管,可将导管外口置于一盛水的烧杯中,如不出现气泡,即认为此导管是在食管中未误入气管,即可用注射器推入受试物,再推入 2~3ml 水,以送入滞留在胃管内的受试物,灌胃完毕,迅速抽出胃管,然后取下开口器。

2. 喂饲

将受试物掺入饮水或动物饲料中供实验动物自行摄入。喂饲法符合人类接触受试物的实际情况,但缺点多,如适口性差的受试物,实验动物拒食;不适用易挥发或易水解的受试物。而且,实验动物应单笼喂饲,以食物消耗量计算其实际染毒剂量。如果受试物是完全无毒的,在饲料中的最高含量可为 5%,一些有营养价值的食物,其构成比可更高,但要注意不可造成饲料营养成分失衡而影响实验动物的生长发育。

3. 吞咽胶囊

将一定剂量的受试物装入胶囊中,放至动物的舌后部,迅速关闭口腔,将头部稍稍抬高,使其自然吞咽。此法剂量准确,适用于易挥发、易水解和有异味的受试物,兔、犬等较大动物常用此法。

4. 经口滴入

用注射器、吸管或移液管将受试物直接滴入动物口腔,让其自行吞咽。该法简单方便,适于小量多次染毒,但受试物吸收量不易准确控制。

(二) 呼吸道染毒

根据吸入方式的不同可分为吸入染毒法和气管内注入法。吸入染毒法主要是在染毒柜内吸入受试物,常用的有静式和动式吸入染毒法;气管内注入法是将受试物直接注入气管内,多用于建立急性中毒模型及尘肺研究。

1. 静式吸入染毒

将一定数量的实验动物放在密闭的染毒柜中,加入易挥发的液态受试物或气态受试物,使其成一定浓度,在规定的时间内观察实验动物的毒性反应。静式吸入染毒简易,消耗毒物少。缺点是:随试验进行氧分压降低(因此,实验动物数量有限),柜内受试物浓度也逐渐下降(由于动物吸入消耗、为被毛及染毒柜壁吸附所致),且实验动物有经皮吸收的可

能。染毒时间一般为 2h。要求受试物在 10min 内蒸发完毕。静式吸入染毒时应根据染毒柜容积、染毒时间及实验动物种属来确定放置的实验动物数,以保证动物的最低需气量(表 1-3)。

也可按实验动物总体重(kg)×100×染毒时间(h)来估算,相当于动物每 kg 体重每小时所需空气体积为 100L。

静式吸入染毒法染毒柜内受试物浓度计算公式

(1) 气体:

$$\text{染毒浓度}(\text{mg}/\text{m}^3)=1000 \cdot L \cdot MV/22.4 \cdot V$$

式中: L 为所加入气态受试物的体积(L); V 为染毒柜的容积(m^3); MV 为受试物的分子量。

(2) 挥发性液体:

$$\text{染毒浓度}(\text{mg}/\text{m}^3)=a \cdot d \cdot 1000/V$$

式中: a 为加入受试物的量(ml); d 为受试物的比重(g/ml); V 为染毒柜的容积(m^3)。

可在染毒期内测定受试物浓度 2~3 次,以其均值作为实际染毒浓度。

表 1-3 实验动物的最低需气量及不同染毒柜容积可放置的动物数(染毒 2h)

实验动物	呼吸量 (L/h)	最低需氧量 (L/h)	静式染毒 2h 可放动物数				
			25L	50L	100L	300L	1000L
小鼠	1.45	4.50	3~5	6~10	12~15	36~40	120~150
大鼠	10.18	30.54	0	1	1~2	5~6	16~18
豚鼠	10.18	30.54	0	1	1~2	5~6	16~18
猫	19.30	57.90	0	0	0	3~4	9~10
家兔	42.25	126.80	0	0	0	1	4~5
猴	51.60	154.80	0	0	0	1	3~4
犬	312.60	97.80	0	0	0	0	1

2. 动式吸入染毒

动式吸入染毒是通过机械通风装置连续不断地将新鲜空气和毒物送入染毒柜内进行染毒。动式吸入染毒设备由染毒柜、机械通风系统和配气系统三部分组成,动式吸入染毒适于一次较长时间的染毒和反复染毒的慢性实验。优点是在染毒过程中受试物浓度和氧分压较稳定,缺点是对设备要求高,消耗受试物量大,操作较复杂并易于污染环境,动式吸入染毒又分为整体接触和口鼻接触两种方式。

染毒柜中受试物浓度达平衡后,每天的染毒时间一般为 6h。染毒过程中实验动物禁食禁水。从实际考虑,每周可染毒 5 天。进行试验时温度应维持在(22±2)℃。相对湿度最好保持 40%~60%之间(但不适用于气溶胶试验)。染毒过程中还应注意监测以下指标:气流速度,每次暴露应监测≥3 次;受试物的实际浓度和气溶胶浓度粒度分析,每次暴露应监测 2~4 次;连续监测温度,每 30min 记录一次。

在染毒装置设计良好和运转正常时,常用计算浓度代替实际染毒浓度,计算公式基本同静式吸入染毒法,只是用实验期间补充(或排出)的总风量替换式中的染毒柜的容积。

3. 气管内注入

此法受试物染毒剂量较准确,毒物用量少,但与自然吸入作用有差异,且操作易造成动物损伤甚至死亡,故一般仅限于急性毒性试验。以大鼠为例,用乙醚轻度麻醉大鼠,将麻醉的大