现代毒理学丛书

现代毒理学实验技术原理与方法

The Experimental Technologies of Modern Toxicology: Principles and Methods

李龙　陈家堃　主编

化学工业出版社

现代毒理学丛书

现代毒理学实验技术原理与方法

The Experimental Technologies of Modern Toxicology: Principles and Methods

李 龙 陈家堃 主编

化学工业出版社
·北京·

（京）新登字 039 号

图书在版编目（CIP）数据

现代毒理学实验技术原理与方法/李龙，陈家堃主编．—北京：化学工业出版社，2005.8
（现代毒理学丛书）
ISBN 7-5025-7536-7

Ⅰ.现… Ⅱ.①李…②陈… Ⅲ.毒理学-实验 Ⅳ.R99-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字（2005）第 094387 号

现代毒理学丛书
现代毒理学实验技术
原理与方法
The Experimental Technologies of Modern Toxicology: Principles and Methods
李 龙 陈家堃 主编
责任编辑：杨立新
责任校对：顾淑云 宋 玮
封面设计：胡艳玮

*

化学工业出版社出版发行
（北京市朝阳区惠新里 3 号 邮政编码 100029）
购书咨询：（010）64982530
（010）64918013
购书传真：（010）64982630
http://www.cip.com.cn

*

新华书店北京发行所经销
北京永鑫印刷有限责任公司印刷
三河市东柳装订厂装订
开本 787mm×1092mm 1/16 印张 21½ 字数 526 千字
2006 年 1 月第 1 版 2006 年 1 月北京第 1 次印刷
ISBN 7-5025-7536-7
定 价：49.00 元

版权所有 违者必究
该书如有缺页、倒页、脱页者，本社发行部负责退换

《现代毒理学丛书》序

猴年春节前夕，广州医学院吴中亮教授寄来快件，委托叶常青教授让我为《现代毒理学丛书》写个序。近年来因健康原因，一般的事情都不再处理，但这件事情我答应下来。一是因为这套丛书编审委员会成员都是我国毒理学专家，其中有好几位都是我的学长、老朋友，如吕伯钦教授、周炯亮教授等；二是因为这套丛书内容颇为丰富，涉及现代毒理学的广泛领域，而且是连续出版物，它将弥补我国的空白，促进我国毒理学的发展。以我微薄之力能为其作些摇旗呐喊之事也算尽了一名老毒理学工作者之心。事情总要通过比较才能认清，我愿将此丛书与20世纪末以国际毒理学职合会前主席Glenn Sipes为首席主编而出版的一套题为《毒理学全集》(Comprehensive Toxicology)的丛书相比较。Sipes的全集共14卷。本丛书第一批专著在内容上已基本覆盖了Sipes全集的内容。以本丛书的《现代毒理学概念》而言，它的第四部分有些内容，如生态毒理学、比较毒理学、时间毒理学等均为Sipes全集未涉及；以本丛书的《现代毒理学实验技术——原理与方法》而言，除了介绍传统的急性慢性毒性试验、致突变、致癌、致畸试验方法外，更多的是介绍现代分子生物学方法，如细胞凋亡、蛋白质芯片、基因芯片等，它反映了当今毒理学研究充分吸收了生命科学研究方法的最新成就；本丛书还专门编写了《临床毒理学》，这是国内第一本临床毒理学方面的专著，在Sipes全集的目录中也未见到。它反映了中国当今社会更应从毒理学基础上重视中毒及如何正确使用药物的客观需求；本丛书在靶器官毒理学方面单独编写了一本，增加了皮肤、眼、耳、软骨、肌肉等内容。所有这些说明，本丛书第一批专著与Sipes全集相比，总体上各有千秋，都反映了当代毒理学进展。

作为读者，应从更大的范围来获取毒理学领域的各种分支信息。在2003年11月第五届发展中国家毒理学会议期间获悉，国际上毒理学的发展非常快。在国内，虽然近年来毒理学专著出版的形势也颇喜人，相继出版了《细胞毒理学》(刘国廉主编，2001年)，《动物毒理学》(史志诚主编，2001年)，《实用生物毒素学》(陈率庆主编，2001年)，《分子毒理学基础》(夏世钧、吴中亮主编，2001年)，《遗传毒理学》(印木泉主编，2002年)，《环境毒理学》(孟紫强主编，2003年)以及《英汉毒理学词汇》(黄吉武主编，2003年)等。当然还会有不少书名不直接冠以“毒”字而与毒理学有关的专著，但与学科的发展相比还远远不够。毫无疑问，本丛书编审委员会发起组织我国毒理学专家编写《现代毒理学丛书》将为我国毒理学事业增辉，为我国毒理学这片知识园地带来繁荣，这正是我们大家应该高兴的一件大事。我相信中国毒理学会理事会和我国的毒理学家一定会积极支持和参与。

中国工程院院士，中国毒理学会名誉理事长
军事医学科学院放射医学研究所研究员

吴德昌

2005年3月4日

编写者的话

毒理学是生命科学的重要组成部分，也是生物学和预防医学的重要分支学科。近五十多年来，我国毒理学与世界同步有了突飞猛进的发展，毒理学已延伸到了保护人类健康、环境保护和国民经济发展有关的各个领域。我国的毒理学文献已成为国际毒理学文献不可缺少的一部分。为了总结和介绍国内外毒理学的新理论、新方法和新成果，由我国一批毒理学专家教授提议组织编写一套大型毒理学专著——《现代毒理学丛书》，同时承担编写重任。本丛书的第一批专著都是通过丛书编审委员会成员担任主编和副主编，组织了一批我国的毒理学专家教授和青年科学工作者共同编写的。它们包括《分子毒理学基础》、《毒理学辞典》、《现代毒理学概论》、《现代毒理学实验技术——原理与方法》、《临床毒理学》、《靶器官毒理学》、《农药毒理学》和《生态毒理学》。《现代毒理学丛书》是一套连续的毒理学专著，成熟一本出版一本。编审委员会已提出新的选题，如《生殖与发育毒理学》、《免疫毒理学》、《食品与营养毒理学》等，正在组织有关毒理学专家教授编写，同时也欢迎同行专家教授推荐选题，出任主编，只要编写出提纲，内容具有先进性、科学性和实用性，经编审委员会同意，可入选本丛书，订立出版合同即可进行编写，为丰富我国毒理学文库做出贡献。

本丛书的编写是一项繁重的任务，是我国一批毒理学家无私奉献、通力合作、辛勤劳动的结晶。编写者都尽可能地加以完善，希望在推动我国毒理学发展和应用中起到促进作用。然而由于毒理学发展十分迅速，涉及面很广，疏漏仍不可避免，恳请读者批评指正，以便我们在再版或续编的书中加以弥补。在编写和出版丛书过程中，我们得到了化学工业出版社的大力支持、编写者所在单位领导的支持，尤其是得到广州市委组织部知识分子工作处的关心、鼓励与经费支持，关承蒙中国毒理学会名誉理事长吴德昌院士为丛书赐序，这对我们是莫大的鼓舞，在此我们表示衷心的感谢。

《现代毒理学丛书》编审委员会
2004 年春节于广州

试读结束：需要全本请在线购买： www.ertongbook.com

《现代毒理学丛书》
现代毒理学实验技术
原理与方法
编写人员名单

主　　编　李　龙　陈家堃

主　　审　夏世钧

编写人员　（按所撰文稿出现先后排序）

金　肆　华中科技大学同济医学院

孙秀发　华中科技大学同济医学院

王爱国　华中科技大学同济医学院

陈家堃　广州医学院

高　璞　美国国家环境保护局

刘仁刚　华中科技大学同济医学院

严　红　华中科技大学同济医学院

李　龙　华中科技大学同济医学院

裴晓方　四川大学华西公共卫生学院

许　欣　四川大学华西公共卫生学院

吴　坤　哈尔滨医科大学公共卫生学院

王舒然　哈尔滨医科大学公共卫生学院

单毓娟　哈尔滨医科大学公共卫生学院

艾宝民　中山大学公共卫生学院

薛　彬　北京大学公共卫生学院

魏雪涛　北京大学公共卫生学院

雷志明　北京大学公共卫生学院

陈炳卿　哈尔滨医科大学公共卫生学院

刘家仁　哈尔滨医科大学公共卫生学院

李　丹　哈尔滨医科大学公共卫生学院

闻　颖　哈尔滨医科大学公共卫生学院

王家春　华中科技大学同济医学院

夏世钧　华中科技大学同济医学院

前　言

现代毒理学既是一门与其他学科特别是生命科学广泛联系和相互渗透的基础学科，又是一门实用性很强的应用学科。现代毒理学研究方法和实验技术在药理学、营养与食品卫生学、环境卫生与劳动卫生学、临床医学、职业医学、法医学、兽医学、环境科学和生态学等领域有着极为广泛的应用。为总结各相关学科在现代毒理学实验方法应用上的经验及发展趋势，经20余位编者共同努力，完成了此书的编写。

本书旨在介绍现代毒理学常用实验技术的基本原理、操作方法、最新进展以及这些实验技术的具体应用。全书共十五章，介绍了包括离体器官灌流、细胞毒理学、组织学、蛋白质的分离与功能测定、亚细胞组分的分离制备、分子毒理学、信号传递与细胞通讯、免疫毒理学、行为毒理学、毒理学指标的统计分析方法、毒理学实验室规范等多个方面的原理与技术。在进展方面，除了各章涉及最新进展外，还对一些先进的实验技术诸如细胞凋亡、蛋白芯片、基因芯片等进行了较为详尽的介绍。对已有较多专著介绍的一般毒性实验方法本书未再涉及。另因篇幅所限，本书对当今毒理学研究的一些热点问题，如毒物基因组学与环境基因组学、毒物蛋白质组学、毒物代谢组学、细胞组学、糖原组学、转基因和基因删除技术、干细胞技术等未作更多介绍。

本书作者在编写过程中，利用繁忙工作之余，尽心竭力，付出了辛勤的劳作。华中科技大学同济医学院孙秀发教授、刘烈刚教授为本书的编写做了大量的组织工作，广州医学院吴中亮教授、华中科技大学鲁文清教授在本书的编写过程中给予了诸多帮助和支持，在此特致以由衷而真挚的谢忱。

由于现代毒理学常用实验技术应用范围广，涉及众多学科，加之各位编著者各有所长，书写风格各异，少数内容可能在不同章节中均有涉及，本书予以充分尊重，由此带给读者的不便，尚请见谅。尤其由于主编人员业务水平和经验所限，书中难免存在不少缺点、遗漏乃至错误，真诚希望各位同仁与读者不吝批评赐教。

承蒙化学工业出版社对本书编写和出版的大力支持，在此谨表衷心感谢！

编　者

2005年6月

目　录

第一章　离体器官的灌流技术 …… 1
第一节　离体肺灌流技术 …… 1
一、仪器装备 …… 1
二、灌流液体 …… 1
三、通气气体 …… 2
四、操作步骤 …… 2
五、毒理学应用举例 …… 2
六、注意事项 …… 3
第二节　离体心脏灌流技术 …… 3
一、仪器装置 …… 4
二、灌流液的配制 …… 5
三、心脏灌流的应用实例 …… 6
第三节　离体肝脏灌流技术 …… 6
一、仪器装置 …… 7
二、灌流液的配制 …… 8
三、离体肝脏灌流程序 …… 8
四、灌流肝脏可用性的鉴定 …… 8
五、离体肝脏灌流的应用及实例 …… 9
第四节　人胎盘灌流技术 …… 10
一、胎盘灌流 …… 11
二、结果及计算 …… 13
三、锌的体外人胎盘灌流研究 …… 15
主要参考文献 …… 17
第二章　细胞毒理学研究方法 …… 20
第一节　细胞培养 …… 20
一、培养细胞生物学 …… 20
二、细胞培养技术 …… 21
三、常用几种细胞的培养 …… 26
第二节　培养细胞的生物特征与检测 …… 29
一、培养细胞的常规观察 …… 29
二、细胞染色体分析 …… 31
三、培养细胞恶性转化 …… 35
四、大鼠气管上皮细胞转化试验 …… 38
五、鸡胚绒毛膜（抗）新生血管形成试验 …… 40

主要参考文献 …… 43
第三章 组织学方法 …… 45
第一节 光镜和电镜的制片技术 …… 45
一、光镜切片的制备 …… 45
二、常用组织学染色法 …… 48
三、电镜超薄切片的制备 …… 51
第二节 酶组织化学技术 …… 53
一、水解酶 …… 53
二、氧化酶与过氧化物酶 …… 59
三、脱氢酶和一氧化氮合酶 …… 61
第三节 免疫组织（细胞）化学技术 …… 63
一、荧光标记免疫组织化学法 …… 64
二、酶标记免疫组织化学法 …… 65
三、金标记免疫组织化学法 …… 69
四、免疫电子显微镜技术 …… 71
主要参考文献 …… 73
第四章 细胞凋亡常用的研究方法 …… 74
第一节 概述 …… 74
第二节 细胞凋亡的形态学评价 …… 76
一、倒置显微镜和光学显微镜观察法 …… 76
二、荧光显微镜观察法 …… 77
三、透射电子显微镜观察 …… 79
第三节 细胞凋亡时质膜的改变 …… 80
一、磷脂酰丝氨酸外化分析（Annexin V 联合 PI 法） …… 80
二、Hoechst 33342/PI 双染色法 …… 81
第四节 细胞凋亡时 DNA 的改变 …… 81
一、DNA Ladder 测定 …… 81
二、大分子染色体 DNA 片段的测定 …… 83
三、凋亡细胞 DNA 含量的流式细胞仪分析 …… 84
四、DNA 片段原位标记 …… 85
五、凋亡细胞断裂核小体 DNA 的免疫化学测定 …… 88
第五节 细胞凋亡时线粒体膜电位变化的检测 …… 89
一、线粒体跨膜电位的检测 …… 89
二、与线粒体膜电位有关的因素 …… 90
第六节 其他 …… 90
一、Caspase-3 活性的检测 …… 90
二、PARP 活性的测定 …… 93
三、人类凋亡相关蛋白 TFAR19 蛋白的表达和细胞定位分析 …… 94
四、凋亡相关基因的检测 …… 95
主要参考文献 …… 96

第五章　亚细胞组分的制备与功能检测 …… 97
第一节　细胞膜的制备 …… 97
一、红细胞膜的分离与鉴定 …… 97
二、肝细胞膜的分离与鉴定 …… 99
三、脑突触体膜的分离制备 …… 101
第二节　肾小管和小肠上皮细胞刷状缘膜的制备 …… 102
一、肾小管上皮细胞刷状缘膜的分离与鉴定 …… 102
二、小肠上皮细胞刷状缘膜的分离与鉴定 …… 106
第三节　线粒体的分离制备 …… 107
一、脑线粒体的分离及鉴定 …… 108
二、心脏线粒体的分离制备 …… 109
三、肝脏线粒体的分离制备 …… 109
四、肾脏线粒体的分离制备 …… 110
第四节　微粒体的制备及微粒体酶系的测定 …… 110
一、微粒体的分离制备 …… 110
二、微粒体混合功能氧化酶系活性的测定 …… 111
第五节　溶酶体和过氧化氢酶体的分离制备 …… 112
一、原理 …… 112
二、仪器与试剂 …… 112
三、分离技术 …… 113
四、溶酶体纯度鉴定 …… 113
主要参考文献 …… 114
第六章　蛋白质（酶）的分离与纯化 …… 116
第一节　蛋白质（酶）的粗分离 …… 116
一、细胞破碎和蛋白质（酶）的溶剂提取方法 …… 116
二、盐析方法 …… 118
三、有机溶剂沉淀方法 …… 121
第二节　蛋白质（酶）的层析纯化 …… 122
一、吸附层析方法 …… 122
二、离子交换层析方法 …… 122
三、凝胶过滤层析方法 …… 124
四、亲和层析方法 …… 127
五、金属螯合层析方法 …… 130
第三节　电泳技术分离纯化蛋白质（酶） …… 132
一、醋酸纤维素电泳 …… 132
二、聚丙烯酰胺凝胶电泳 …… 134
三、双向聚丙烯酰胺凝胶电泳 …… 136
主要参考文献 …… 138
第七章　蛋白质（酶）的功能测定 …… 139
第一节　酶的功能测定 …… 139

一、胆碱酯酶的活性测定 …… 140
二、O^6-烷基鸟嘌呤-DNA 烷基转移酶的测定 …… 143
三、超氧化物歧化酶的测定 …… 145
四、细胞色素 P450 单加氧酶测定 …… 146
五、乳酸脱氢酶同功酶测定 …… 148
六、附：蛋白质定量测定（Lowry 法） …… 149
第二节 蛋白质受体功能的测定 …… 151
一、受体放射分析法 …… 151
二、基因重组检测系统 …… 152
第三节 蛋白加合物测定 …… 153
一、血红蛋白加合物的测定 …… 154
二、白蛋白加合物的测定 …… 155
第四节 蛋白质（酶）功能研究新进展 …… 157
一、质谱技术 …… 157
二、酵母双杂交技术 …… 158
三、蛋白芯片技术 …… 159
主要参考文献 …… 160
第八章 分子毒理学基本技术 …… 162
第一节 核酸的印迹杂交 …… 162
一、核酸杂交的基本原理——核酸的变性和复性 …… 162
二、核酸杂交的重要工具——核酸探针 …… 163
三、常用的核酸分子杂交技术 …… 165
第二节 蛋白质印迹杂交 …… 169
一、蛋白质样品的制备 …… 169
二、SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 …… 170
三、蛋白质的电转移 …… 171
四、蛋白质的杂交 …… 172
第三节 聚合酶链式反应 …… 173
一、参与 PCR 反应体系的因素及其作用 …… 174
二、PCR 反应温度和循环次数 …… 176
三、常用的几种 PCR 反应 …… 177
第四节 基因的序列测定 …… 179
一、双脱氧链末端终止法 …… 179
二、化学（裂解）法 …… 181
第五节 重组 DNA 技术 …… 181
一、基因工程的重要工具——酶类 …… 182
二、基因工程的重要工具——载体 …… 183
三、获得目的基因 …… 185
四、目的基因与载体的连接 …… 187
五、重组子导入受体菌 …… 189

试读结束：需要全本请在线购买： www.ertongbook.com

六、重组子的筛选与鉴定…… 189
七、重组体在宿主细胞中表达与调控…… 190
八、表达产物——蛋白质的分离与纯化…… 193
主要参考文献…… 194
第九章　分子毒理学技术的应用…… 195
第一节　单细胞凝胶电泳技术…… 195
一、检测机理…… 195
二、实验程序及方法…… 195
三、结果评价…… 197
四、SCGE 实验中的注意事项…… 197
五、SCGE 在毒理学中的应用…… 198
第二节　荧光原位杂交（FISH）技术…… 199
一、基本原理…… 199
二、FISH 技术的发展…… 199
三、毒理学研究中应用的 FISH 技术…… 201
四、FISH 技术中的注意事项…… 202
五、FISH 操作举例…… 202
第三节　PCR-SSCP 技术…… 203
一、基本原理…… 204
二、基本实验过程…… 204
三、影响因素…… 205
四、银染显色法…… 205
五、PCR-SSCP 分析在毒理学中的应用…… 206
第四节　mRNA 差异显示 PCR 技术…… 206
一、基本原理…… 207
二、主要操作步骤及注意事项…… 207
三、该技术的不足之处及弥补办法…… 208
四、mRNA 差异显示法在毒理学中的应用…… 209
主要参考文献…… 209
第十章　基因芯片技术…… 210
第一节　基因芯片的原理和合成方法…… 210
一、基因芯片的原理…… 210
二、基因芯片的离片合成法…… 210
三、基因芯片的在片合成法…… 211
四、基因芯片的基质…… 212
五、基因芯片的微排列制作…… 212
六、基因芯片的生化反应…… 212
七、基因芯片的结果检测与分析…… 213
第二节　基因芯片的分类…… 213
一、载体材料分类…… 213

二、点样方式分类 …… 214
三、DNA 种类分类 …… 214
四、用途分类 …… 215
五、新近发展的两种芯片技术 …… 215
第三节　基因芯片的广泛应用 …… 216
一、在基础医学研究方面的应用 …… 216
二、在药物筛选方面的应用 …… 217
三、在指导用药方面的应用 …… 217
四、在临床诊断方面的应用 …… 217
五、在卫生毒理学研究中的应用 …… 217
六、在其他方面的应用 …… 219
主要参考文献 …… 219
第十一章　信号传递与细胞通讯 …… 220
第一节　细胞间缝隙连接通讯的检测 …… 220
一、划痕标记染料示踪技术（SLDT） …… 220
二、显微注射染料示踪技术 …… 222
三、代谢合作检测法 …… 224
第二节　细胞膜受体的分离与纯化 …… 225
一、概述 …… 225
二、受体溶脱 …… 226
三、受体纯化 …… 228
第三节　第二信使系统 …… 230
一、磷脂酶 A_2 …… 230
二、蛋白激酶 C 活性测定 …… 232
三、环核苷酸 …… 233
四、三磷酸肌醇的检测 …… 234
五、一氧化氮及合酶的测定 …… 235
六、二酰甘油的测定 …… 241
七、细胞内 pH 值的测定 …… 243
主要参考文献 …… 245
第十二章　免疫毒理学方法 …… 246
第一节　B 淋巴细胞功能检测方法 …… 246
一、空斑形成细胞检测方法 …… 246
二、血清溶血素测定 …… 249
第二节　T 淋巴细胞功能检测方法 …… 250
一、小鼠外周血 T 淋巴细胞酸性 α-醋酸萘酯酶（ANAE）染色法 …… 250
二、T 淋巴细胞亚群的检测 …… 252
三、T 淋巴细胞增殖功能测定 …… 254
四、迟发型超敏反应试验 …… 256
第三节　巨噬细胞功能测定 …… 256

一、巨噬细胞非特异性吞噬功能测定…… 257
二、巨噬细胞 Fc 受体功能检测 …… 258
三、肿瘤坏死因子（TNF）的测定 …… 260
四、一氧化氮生成的测定…… 261
第四节　中性粒细胞和 NK 细胞活性测定 …… 262
一、中性粒细胞吞噬功能的测定…… 262
二、NK 细胞活性的测定 …… 262
第五节　细胞因子的测定…… 264
一、白细胞介素 1（IL-1）的检测 …… 264
二、白细胞介素 2（IL-2）的检测 …… 265
第六节　过敏反应和自身免疫…… 266
一、皮肤致敏试验…… 266
二、小鼠耳肿胀试验…… 268
三、耳淋巴结试验…… 268
四、腘窝淋巴结实验…… 269
第七节　宿主抵抗力试验…… 270
一、肿瘤细胞攻击试验…… 271
二、对细菌的抵抗试验…… 272
三、对旋毛虫螺旋体的抵抗试验…… 274
主要参考文献…… 275
第十三章　行为毒理学方法 …… 276
第一节　动物行为评价方法…… 276
一、一般行为毒理学方法…… 276
二、行为致畸学方法…… 279
三、神经科学的发展与行为毒理学…… 283
第二节　人的行为功能评价方法…… 289
一、发展概况…… 289
二、研究方法…… 290
主要参考文献…… 292
第十四章　毒理学指标的统计分析方法 …… 294
第一节　联合作用的统计方法…… 294
一、比值法…… 294
二、效应图解法…… 295
三、等概率和曲线法…… 295
四、Logistic 图解法 …… 297
第二节　存活寿命表的统计指标…… 299
一、存活寿命表的统计指标…… 299
二、计算步骤…… 300
第三节　生殖发育试验的统计指标…… 301
一、试验动物与剂量…… 301

二、生殖发育的统计指标…… 301
三、数据处理和结果评价…… 302
第四节　致突变试验的统计指标…… 302
一、概述…… 302
二、实例…… 305
第五节　致癌试验的数学模式示例…… 307
一、几项指标…… 307
二、实例…… 307
第六节　行为毒理学…… 308
第七节　毒理学相关学科的统计分析指标…… 310
一、数据类型…… 310
二、体重与器官重量…… 311
三、临床化学…… 312
四、血液学…… 313
五、组织病理学损害的发生率…… 314
第八节　样品与染毒方式的统计问题…… 315
一、经食物和空气染毒分析…… 315
二、悬浮颗粒物统计量…… 315
第九节　对毒理学数据处理中常见错误的分析…… 317
一、统计学结论的描述性错误…… 318
二、随机分组不均衡…… 318
三、非参数资料不能用参数统计方法分析…… 318
四、配对关系…… 318
五、计量资料中方差是否整齐及计数资料中样本是否足够大…… 319
六、有顺序关系的计数资料…… 319
七、有效数字的取舍…… 319
主要参考文献…… 320
第十五章　毒理学良好实验室规范…… 322
一、概述…… 322
二、良好实验室规范…… 323
三、附言…… 326
主要参考文献…… 326

第一章　离体器官的灌流技术

离体器官的灌流技术是在体外，通过一定的设备、装置和条件等，模拟动物和人体器官在在体必要的存活环境中，研究器官对外源化合物的代谢、屏障以及外源化合物的毒性等规律的技术。该技术解决了在体内情况下无法或很难达到的研究目的，具有极其重要的研究应用价值。目前，该技术已有很快的发展，并有多种离体器官的灌流技术，本章由于篇幅有限，仅对最常用的几种技术作一介绍。

第一节　离体肺灌流技术

离体肺灌流技术是模拟肺在生理条件下的呼吸循环功能，利用全血或生理性灌流液对离体全肺进行灌流的一种方法。利用这种方法可以研究灌流液的成分、各种内外源性血管活性物质、药物、毒物在肺内的代谢情况以及对肺结构、功能（尤其是肺血管功能）的影响，因此被广泛地应用于生理、病理生理、药理、毒理学科学研究中。

肺灌流技术有原位和异位之分，本文着重介绍异位离体肺灌流技术，原位离体肺灌流技术是在异位离体肺灌流技术基础上改进而来的。

一、仪器装备

仪器装备如图 1-1，主要包括恒温、呼吸、灌流、记录四个部分。恒温系统包括超级恒温器、回旋加热管、双层塑料盒；呼吸系统由小动物人工呼吸机与大鼠气管相连；灌流系统由恒温泵、导管、贮液池组成；记录系统包括压力传感器与计算机压力记录系统相连。

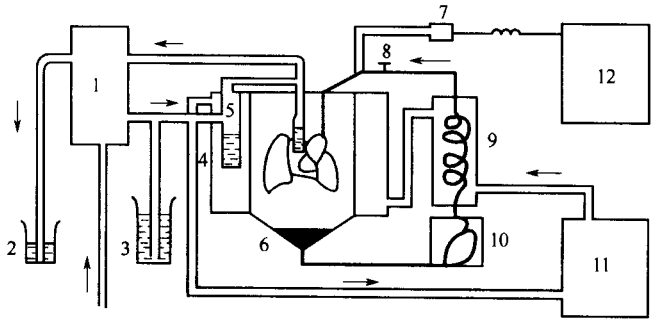

图 1-1　大鼠异位离体肺灌流装置示意图

1—小动物人工呼吸机；2—呼气末气道内压控制瓶；3—吸气末气道内压控制瓶；4—恒温盒；5—湿化加温室；6—贮液槽；7—压力换能器；8—压力缓冲器；9—恒温管；10—恒流泵；11—超级恒温器；12—计算机压力记录系统

二、灌流液体

（1）全血　将两只大鼠麻醉后，分别作颈总动脉插管，先对全身血液进行肝素化后，经颈总动脉抽取全血各 10～12mL。

（2）生理性灌流液体　NaCl 116.3mmol/L，KCl 5.4mmol/L，$MgSO_4$ 0.83mmol/L，$NaHCO_3$ 19.0mmol/L，NaH_2PO_4 1.04mmol/L，$CaCl_2$ 1.8mmol/L，D-glucose 5.5mmol/L，为减少肺水肿的发生，加入 Ficoll 或低分子右旋糖酐 4g/100mL，以提高灌流液体的胶体渗透压，调节 pH 值至 7.3～7.4 之间。

三、通气气体

如用生理性液体进行灌流，可采用 95% O_2 + 5% CO_2 混合气体；如用全血进行灌流，O_2 浓度可降低，增加 N_2 浓度，仍保持 5% CO_2。

四、操作步骤

（1）麻醉　以 20%氨基甲酸乙酯腹腔注射，从左下腹腔倾斜 45°进针，有明显落空感后回抽，无回血，表明针头在腹腔内，将麻醉药注射进去。

（2）肝素化　以 200U 腹腔注射，使全身血液肝素化，避免处死动物后，血液凝固在肺血管内，影响肺灌流。

（3）固定　将大白鼠仰卧固定在鼠板上。

（4）颈部正中切口　以手术弯剪将颈部正中皮肤剪开，以弯止血钳对颈部正中肌肉和筋膜作钝性分离，直至暴露并分离出气管，在气管下穿一根粗棉线备用。

（5）剪断气管　将适当直径的气管插管插入气管，迅速与呼吸机相连，进行正压人工呼吸，使呼气时间/吸气时间（E/I）= 1.5∶1，呼吸频率 45 次/min，吸气末压（end inspiration pressure，EIP）为 14～16cmH_2O，呼气末压（end expiration pressure，EEP）为 0～2cmH_2O。

（6）一腹部切口，暴露腹主动脉，将腹主动脉剪断，放血处死大白鼠，以免开胸时血液大量积聚在胸腔，导致视野模糊。

（7）将颈部正中切口延长至膈肌处，打开胸腔，暴露心肺，常可看到心脏的跳动，用钟表镊游离肺动脉起始段，穿粗棉线备用，剪去心脏下小部分，迅速将充满灌流液的动脉插管插入肺动脉，用粗棉线结扎固定牢靠，插管接换能器以四导生理记录仪描记肺动脉压（pulmonary artery pressure，PAP）。

（8）气管后壁，用眼科剪仔细游离出完整心肺，将整个心肺悬挂在一个恒温（38℃）的自制双层灌流盒内。

（9）以 10mL 灌流液冲洗肺内残余血液后，再以 30mL 灌流液通过恒流泵对离体肺进行循环灌流，灌流后的液体从左心房流出，流入灌流盒下方的锥形贮液池内；调整流量，使 PAP 维持在 2666Pa（20mmHg）时固定流量。观察并记录各项指标的变化。

原位离体肺灌流是在异位离体肺灌流的基础上改进来的，不同之处在于打开胸腔后，不将心肺从胸腔取出，将整个动物放置在一个较大的恒温塑料盒内，在原位进行插管灌流，见图 1-2；由于心肺在胸腔内，不需分离出来，大大减少肺受损机会，肺周围环境更适宜，结果的稳定性及可靠性更为理想，因此也为越来越多的研究者所采用。

五、毒理学应用举例

如要专门研究肺对某毒性物质的清除率，离体肺灌流实验（图 1-2）是一个很理想的方法。

将该毒性物质加入到灌流液中，设该毒性物质灌流前在灌流液中的浓度为 A，经肺灌流后，可在不同的时间点上收集经左心房流出的灌流液，测定该物质的浓度为 B，则肺对该物质的清除率为（A－B）/A×100%；另外，还可对灌流后的离体肺进行形态学的分析，以研究该毒性物质对肺的毒性作用。

试读结束：需要全本请在线购买：　www.ertongbook.com