

药理学实验指导

中南大学湘雅医学院药理学教研室编

二〇〇一年九月

药理学实验须知

一、药理学实验的目的

药理学是一门实验性科学。药理学实验是药理学的基本实践,它推动着药理学的发展。因此,药理学实验课是药理学教学的一个重要组成部分。药理实验课的目的和任务,一方面是通过实验,巩固并加强对理论知识的理解,另一方面是通过实验掌握研究药物作用的基本操作方法和技能,培养对科学工作严肃的态度,严密的方法和严格的要求,根据客观实际分析问题和解决问题的能力,为今后进行科学研究打下基础。

二、要求

(一) 实验操作:

为了提高实验效果,应作好预习,明确本次实验的目的、原理和方法步骤。实验开始前带教老师提问,未预习者不得进行实验。实验过程中,在教师指导下加强独立思考和独立操作能力的培养,在生理、生化实验的基础上进一步掌握实验动物的固定和各种给药方法、剂量换算、实验动物麻醉方法等。学会观察并记录各种生理生化指标,掌握各种基本仪器的使用和保养(注射器、电子秤、二道、多道生理记录仪、心电图机等),掌握离体心脏、肠管、气管、肺及各系统药物的主要实验方法。

(二) 实验结果的整理:

药物实验所取得的结果有记录的各种曲线,测量资料(血压、心率、瞳孔大小、睡眠时间等)和计数资料(动物死活数、阴性或阳性反应数等),须如实、准确地记录、决不可想当然地用主观想象或书本理论代替实验观察到的客观事实。实验完毕对结果分别加以整理,注明动物性别、体重、日期、实验目的、给药剂量等。计数资料和测量资料应酌情列表或画图以便比较,使结果一目了然。

(三) 实验报告的书写:

写实验报告是培养和训练文字表达能力和概括综合分析问题能力的方法,是科研工作者的基本功。完整的实验报告应包括:实验目的、方法(略写)、结果(包括整理后的图表、曲线等)和讨论、分析(包括实验结果产生的原理、或结果异常的原因),最后把实验结果加以概括总结,写成结论。实验报告要求文字简练,书写工整,措词注意科学性和逻辑性,并在实验结束以后 24 小时内完成。

目 录

第一章 基本知识与技术	1
第二章 药理学实验研究的基本知识	10
第三章 处方与制剂	15
第四章 不麻醉实验室实验	
实验一 总论实验	21
实验二 有机磷农药中毒与解救	23
实验三 氯丙嗪的抗缺氧作用	24
实验四 呼吸兴奋药	24
实验五 安慰剂的药理效应	26
第五章 麻醉动物实验室实验	
实验一 降压药中枢降压机制分析	29
实验二 药物对狗血压的影响及对受体作用的分析	31
实验三 利尿药实验	33
实验四 奎尼丁对电刺激诱发心律失常的保护作用	34
实验五 洋地黄中毒时的心电图变化	34
实验六 糖皮质激素抗内毒素性休克实验	35
实验七 心得安对抗氯化钡引起的心律失常实验	36
第六章 离体器官实验室实验	
实验一 药物的量效关系与竞争性拮抗	38
实验二 平喘药实验(豚鼠肺支气管灌流法)	40
实验三 强心甙的作用、中毒与解救	42
实验四 离体支气管、气管实验	43
实验五 药物对离体子宫的作用	45
实验六 强心甙对离体蛙心的作用	45
第七章 生化药理实验室实验	
实验一 磺胺类药物血浆半衰期的测定	47
实验二 碱化尿液对水杨酸钠经肾排泄的影响	49
实验三 乙酰化酶活性测定及乙酰化类型的分布	51
实验四 糖皮质激素的抗炎作用	53
实验五 体液 pH 对阿司匹林排泄的影响	54
第八章 麻醉药理实验	
实验一 普鲁卡因浸润麻醉和肾上腺素的影响	55
实验二 乙醚麻醉分期与麻醉前给药	56

实验三 药物对蟾蜍腹直肌的作用	57
实验四 氟哌啶醇对锥体外系的影响及东莨菪碱的对抗作用	58
实验五 氯丙嗪对乙醚麻醉的影响	59
实验六 比较普鲁卡因的传导麻醉作用	59
实验七 新斯的明对肌松药作用的影响	61
第九章 药理学讨论课	
一、总论讨论	62
二、传出神经药理讨论	63
三、中枢神经系统药理讨论	63
四、心血管药理讨论	64
五、激素讨论	65
六、化疗病例讨论	66
七、血液、呼吸、消化药理讨论	68
八、抗组胺药、抗寄生虫药理讨论	68
第十章 药理学复习思考题	69
第十一章 附 录	
附录一 LMS-2A 型二道生理记录仪	75
附录二 XDH-3 心电图机及动物心电图检查法	79
附录三 721 型分光光度计	82
附录四 常用实验动物的一些生理常数	85
附录五 常用大量挥发性麻醉药的剂量	86
附录六 常用生理溶液的成份和配制	87
附录七 常用药物的分子量及其稳定性	88

第一章 基本知识与技术

一、动物的选择

在药理学实验中,常根据实验目的和要求选用不同的动物。常用的动物有蛙、小白鼠、大白鼠、豚鼠、家兔、猫和狗等。选用动物的根据是该动物的某一系统或器官能反映试验药物的选择作用,并符合精简节约的原则。同一类实验还可选不同的动物。如离体肠或子宫实验可选用兔、豚鼠、小白鼠或大白鼠;离体血管试验常选用蛙的下肢血管和兔耳血管,也可选用大白鼠后肢血管及家兔主动脉条;离体心脏实验常选用蛙、兔、大鼠和豚鼠;在体心脏实验,选用蛙、兔、豚鼠、猫和狗。实验用各种动物的特点如下:

1、青蛙和蟾蜍:其心脏在离体情况下,能有节律地搏动很久,因此常用于药物对心脏作用的实验。其坐骨神经腓肠肌标本可用来观察药物对周围神经、对横纹肌或对神经肌接头的作用。

2、小白鼠:适用于需大量动物的实验,如某些药物(包括抗肿瘤药)的筛选,半数致死量的测量。小白鼠也适用于避孕药的实验。

3、大白鼠:需较大体型的实验动物时选用之。如药物的抗炎作用,常用大白鼠的踝关节进行实验。也可用大白鼠直接记录血压或作胆管插管。还常用于观察药物的亚急性和慢性毒性。

4、豚鼠:其因对组胺敏感,并易于致敏,故常被选用于抗过敏药,如平喘药和抗组胺药的实验。也常用于离体心房、心脏、肠实验。又因它对结核菌敏感,常用于抗结核病的实验治疗研究。

5、兔:比较容易得到,而且驯服,便于静脉注射和灌胃。常用于观察药物对心脏的作用,脑内埋藏电极可研究药物的中枢作用。由于兔体温变化较敏感也常用于体温实验及热原检查;也适用于避孕药的实验。

6、猫:猫的血压比较稳定,而兔的血压波动较大,故观察血压反应猫比兔好。猫也常用于心血管药和镇咳药的实验。

7、狗:是记录血压、呼吸最常用的大动物。如降压药、升压抗休克药的实验。狗还可以通过训练使它顺从,适用于慢性实验。用手术做成胃瘘、肠瘘,以观察药物对胃肠蠕动和分泌的影响。在进行慢性毒性试验时,也常采用狗

二、实验动物编号

狗、兔等大动物可用特别的铝质号码牌固定耳上。白色家兔和小动物可用黄色苦味酸

涂于毛上标号。如编号 1—10, 将小白鼠背部分前肢、腰部、后肢的左、中、右部共九个区域, 从右到左为 1~9 号, 第 10 号不涂黄色。

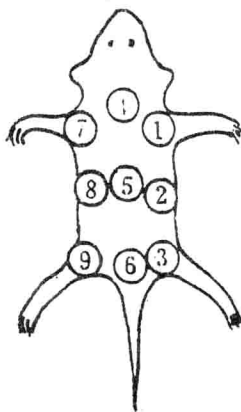


图 1-1 小白鼠背部编号

三、麻醉药的选择

进行在体动物实验时, 宜用清醒状态的动物, 这样不但接近生理状态而且有的实验必须用清醒动物。但在进行手术时或实验时动物挣扎, 为了消除疼痛或减少由挣扎而影响实验结果, 必须先用麻醉药即用麻醉动物进行实验。应根据不同的实验要求和不同的动物选择麻醉药。

1、局部麻醉: 以 2% 普鲁卡因给兔皮下作浸润麻醉, 可进行局部手术。

2、全身麻醉:

(1) 吸入麻醉: 乙醚蘸在棉球上放入玻璃罩内, 利用乙醚挥发的性质, 经肺泡吸收, 作用快, 适用于小鼠、大鼠短时间麻醉。除去乙醚后麻醉很快恢复。罩内麻醉时间不可太长, 以免缺氧。乙醚麻醉初期常有兴奋现象, 且对呼吸道有强烈刺激性, 致使呼吸道分泌增加是其缺点。乙醚易燃、易爆, 使用时应避火。

(2) 注射麻醉:

① 戊巴比妥钠: 为巴比妥类的一种, 小剂量镇静、催眠, 大剂量麻醉。因对动物麻醉作用稳定, 作用持续时间适中, 故一般动物麻醉均可用。常用 3% 水溶液, 一次给药可维持麻醉时间 2~4 小时。各种动物常用量如下: 狗 iv 30mg/kg。猫、兔: iv 或 ip 30~40mg/kg。大鼠、小鼠: ip 40~50mg/kg。

② 乌拉坦: 对呼吸抑制作用小, 作用较弱。兔、大鼠 iv 或 ip 1~1.25g/kg。

③ 氯醛糖: 对血压和神经反射影响小, 适合于心血管药物实验。本药溶解度小, 常配成 1% 溶液应用。狗、猫 iv 或 ip 80~100mg/kg。也可与戊巴比妥钠或乌拉坦合用, 可减小剂量。

四、药物的剂型

在动物实验中,常用的药物剂型有:水溶液、油溶液、乳剂和混悬液。

1、水溶液是最方便,最常用的剂型。

2、油溶液:不溶于水而溶于油的药物,如挥发油、甾体化合物等,可以溶在食用植物油中灌胃或肌肉注射。

3、乳剂:不溶于水而溶于油的药物,除可做成油溶液外,还可先加入少量乳化剂碾匀,然后慢慢加水搅拌,做成乳剂。常用的乳化剂有吐温 80,吐温 50 等。吐温 80 等也有助溶作用,因其本身有一定药理作用,故用量不宜过大。

4、混悬液:对不易溶于水的,特别是水或油中都不易溶解的药物,可以将药物放在助悬液中搅拌或碾磨,做成混悬液。助悬液中浓度以既能将药物悬浮,又不太粘稠为宜。一般用 1~2% 西黄芪胶浆剂或 1~2% 羧甲基纤维素(CMG),也可用 35% 阿拉伯胶浆剂或 5% 煮沸淀粉做助悬剂。但淀粉液易变质,不可久放。

五、药量单位、药物浓度及剂量换算

药物的重量以“克”为基本单位,容量以“毫升”为基本单位。这是衡量的公制,现将公制列表如下:

表 1-1 公制重量与容量表

单位名称	简写符号	折 算	注
微克	$\mu\text{g}(\text{r})$	1/1000 毫克	/
毫克	mg	1000 微克	/
克	g	1000 毫克	0.32 旧市钱
千克(公斤)	kg	1000 克	2 市斤
毫升	ml	1/1000 升	/
升	l	1000 毫升	/

药物浓度是指一定量液体或固体制剂中所含主药的分量。常用以下几种表示法:

1、百分浓度:是按照每 100 分溶液或固体物质中所含药物的分数来表示浓度,简写为%。由于药物或溶液的量可以用体积或重量表示,因而有三种不同的表示%浓度方法。

(1) 重量/体积(W/V)法:即每 100 毫升溶液中含药物的克数,如 5% 葡萄糖即每 100 毫升含葡萄糖 5 克。此法最常用,不加特别注明的%浓度即指此法。

(2) 重量/重量(W/W)法:即每 100 克制剂中含药物克数,适用于固体药物,如 10%

氧化锌软膏即 100 克中含氧化锌 10 克。

(3) 体积/体积(V/V)法:即 100 毫升溶液中含药物的毫升数。适用于液体药物,如消毒用 75%乙醇即 100 毫升中含无水乙醇 75 毫升,相当于 W/W 法 70%乙醇。

2、比例浓度:常用于表示稀溶液的浓度,例如:1:5,000 高锰酸钾溶液是指 5,000 毫升溶液中含高锰酸钾 1 克;1:1000 肾上腺素即 0.1%肾上腺素。

3、克分子浓度(M):一升溶液中所含溶质的克分子数称为该溶液的克分子浓度。如 0.1M NaCl 溶液表示 1000ml 中含 NaCl 5.844g (NaCl 分子量分为 58.44)。

4、克当量浓度(N):一升溶液中含有溶质的克当量数称为该溶液的克当量浓度。如 1 NH_2SO_4 表示 1000ml 中含 49g H_2SO_4 (H_2SO_4 分子量为 98)。

剂量换算:

(1) 动物实验所用药物的剂量,一般按 mg/kg(或 g/kg)体重计算,应用时须从已知药液浓度换算出相当于每公斤体重应注射的药液量(ml),以便于给药。

例:小白鼠体重 18 克,腹腔注射盐酸吗啡 10mg/kg,药液浓度为 0.1%,应注射多少量(ml)?

计算方法:0.1%的溶液每毫升含药物 1 毫克,剂量为 10mg/kg 相当的容积为 10ml/kg,小白鼠体重为 18g 换算公斤为 0.018 公斤,故 $10\text{ml} \times 0.018 = 0.18\text{ml}$ 。

(2) 在动物实验中有时须根据药物的剂量及某种动物给药途径的药液容量,然后配制相当的浓度以便于给药。

例:给兔静脉注苯巴比妥钠 80mg/kg,注射量为 1ml/kg,应配制苯巴比妥钠的浓度是多少?

计算方法:80mg/kg 相当于 1ml/kg,因此 1ml 药物应含 80mg 药物,现算成百分浓度 $1:80 = 100:X$, $X = 8000\text{mg} = 8\text{g}$,即 100ml 含 8 克,故应配成 8%的苯巴比妥钠。

百分浓度 $\longleftrightarrow$ 克分子浓度换算:

$$\text{公式} \quad (1) \quad M = \frac{10X}{W} \quad (2) \quad X\% = \frac{M \cdot W}{10}$$

式中 M 为克分子浓度;X 为百分浓度每 100ml 中药物的克药;W 为药物的分子量。

例如:(1) 0.5%盐酸组胺 ($W=184.1$) 的 M 浓度 $= \frac{10 \times 0.5}{184.1} = 2.7 \times 10^{-3} \text{M}$ 。

(2) $5 \times 10^{-5} \text{M}$ 阿托品 ($W=289.4$) 的百分浓度 $= \frac{0.00005 \times 289.4}{10} = 0.0014\%$

六、动物捉拿及固定方法

1、小白鼠

右手抓住其尾,放在台上或鼠笼铁纱网上,然后用左手拇指及食指沿其背向前抓住其颈部皮肤;并以左手的小指和掌部夹住其尾固定在手上。另一抓法是只用左手,先用食指和拇指抓住小鼠尾巴后用手掌及小指夹住其尾巴,再以拇指及食指捏住其颈部皮肤。前一方法易学,后一方法稍难,但便于快速捉拿给药。

2、兔 用手抓起它脊背近后颈处皮肤,抓的面积越大其吃重点越分散。如家兔肥大应再以另一手托住它的臀部,将吃重点承托手上。

将兔作仰卧时,一手仍抓住颈皮,另一手顺其腹部抚摸至膝关节,压住关节。另一人用绳带捆绑兔的四肢,使兔腹部向上固定在兔手术台上。头部则用兔头固定夹固定。

3、大鼠 以右手或持夹子抓住鼠尾,左手戴上防护手套或用厚布盖住鼠身作防护握住其整个身体,并固定其头骨防止被咬伤,注意不要握力过大,勿捏其颈部以免窒息致死。根据实验需要可固定大鼠于固定笼内或用绳绑其四肢固定于大鼠手术板上。

4、豚鼠 以右手抓住豚鼠头颈部,将其两前肢夹在豚鼠头与右手拇指和食指之间,整个抓住颈胸部(不要抓得太紧以免窒息),左手抓住两后肢,使腹部向上,而后进行操作。

5、狗

绑狗咀法:先将绳子绕过狗咀,在咀上部打一活结,再绕到咀下部打结,最后绕到颈后打结固定,才能避免绳子脱掉。

固定法:急性实验时,将麻醉狗固定在手术台,四肢绑上绳带。前肢的两条绳带在狗背后交叉,然后将对侧前肢压在绳带下面,再将绳带拉紧缚在手术台边缘楔子上。两下肢绳带随下肢平行方向拉紧,缚于手术台边缘楔子上。头部用狗头夹或绳带扎其上颌骨固定之。

七、给 药 方 法

1、蛙(或蟾蜍)淋巴囊注射法

蛙的皮下有数个淋巴囊,注入药物易吸收。一般以腹淋巴囊作为给药途径。注射方法:一手抓住蛙,固定四肢将腹部朝上,另一手取注射器,将注射器针头从蛙大腿上端刺入,经过大腿肌层入腹壁肌层最浅出入腹壁皮下进入腹淋巴囊,然后注入药液。因为针刺经过肌层,因此当拔出针头时刺口易于闭塞,可避免药液漏出。注射量:0.25~1.0ml/只。

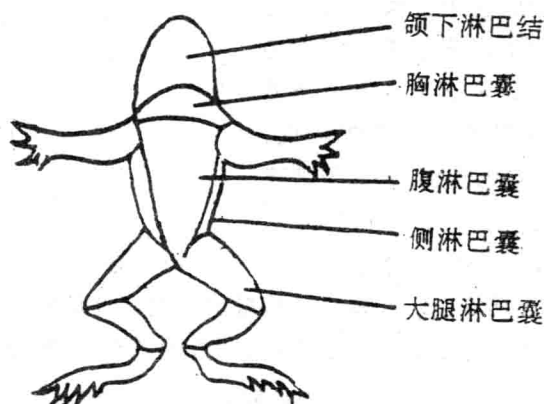


图 1-2 蛙淋巴囊图

2、小白鼠

(1) 灌胃法:用左手仰持小白鼠,使其头颈部充分伸直,但不宜抓得过紧,以免窒息。右手拿起连有小白鼠灌胃管的注射器,小心自口角插入口腔,再从舌背面紧沿上颚进入食道,注入药液。操作时,应避免将灌胃管插入气管。灌注液量:0.1~0.25ml/10g。



图 1-3 小白鼠灌胃法

(2) 皮下注射法:两人合作,一人一手抓住小白鼠头部皮肤,另一手抓住鼠尾。一人注射药物。注射部位在背部皮下组织。如一人操作时,左手抓鼠,右手将抽好药液的注射器针头(不宜太粗,宜用 5~6 号针头)插入颈部皮下或腋部皮下,将药液注入。注射量每只不超过 0.5ml。

(3) 肌肉注射法:小鼠固定同上,将注射器的针头刺入小白鼠后肢大腿外侧肌肉,再将药液注入。注射量:每腿一般为 0.2ml。

(4) 腹腔注射法:左手持鼠,右手持注射器从下腹左或右侧(避开膀胱)朝头部方向插入。宜先刺入皮下,经 2~3mm 再刺入腹腔,此时针头与腹壁的角度约 45 度。针头插入不宜太深或太近上腹部避免刺破内脏。注射量一般为 0.1~0.25ml/10g。



图 1-4 小白鼠腹腔注射法

(5) 尾静脉注射法:将小白鼠放入特制的圆筒或倒置的大漏斗(或乳钵)下,将鼠尾用电灯温烤或浸入 40~50℃ 温水中半分钟使血管扩张。将鼠尾拉直选择一条扩张最明显的血管,用拇指及食指拉住尾尖,食指压迫尾根保持血管瘀血扩张。用吸取好药物注射器的小注射针头($4\frac{1}{2}$ 或 5 号针头)插入尾静脉内,缓慢将药液注入。如果针头没有插入静脉,推注药液有阻力,而且局部变白,此为药液注入皮下表现,应重新穿刺。因此尾静脉注射时必须从尾端静脉开始,这样重复注射次

数。注射量,一般为 0.1~0.5ml/10g。

3、大白鼠

(1) 灌胃法:左手戴防护手套握住大鼠头骨部,或同时压在桌上固定之,右手将连有注射器的塑料导管或磨平针头从其口角处插入口腔,然后再进入食道。避免将导管或针头插入气管,灌注量不超过 2ml/只。

(2) 腹腔注射法:同小白鼠。

(3) 静脉注射法:麻醉后大鼠可从舌下静脉给药。清醒动物则从尾静脉给药,要充分加温使尾静脉扩张,注射才易成功。

4、豚鼠

(1) 灌胃法:一个人抓住豚鼠头颈部和四肢,另一人将“含嘴”放入豚鼠口内旋转使舌压在其下,再将塑料管或导尿管从含嘴孔插入 8~10cm,然后注入药物,因豚鼠上颌近咽部有牙齿,易阻止导管插入,应把豚鼠头部与躯体拉直,便于导管避开阻碍物而进入食道。

(2) 静脉注射法:从耳静脉注入,方法同兔耳,但注射有时较难成功。必要时在麻醉状态下作颈外静脉或股静脉切开注入。

5、兔

(1) 灌胃法:

如用兔固定箱,一人可操作。右手固定含嘴(张口器)于兔口中,左手插导尿管。如无固定箱,需两人合作。一人左手固定兔身及头部,右手将含嘴插入兔口腔并压在兔舌上。另一人取合适的导尿管从含咀中间孔插入食道约 15cm 左右。将导尿管口放入一杯水中,如不见气泡表示导尿管插入胃中。然后将药液慢慢注入。最后注入少量空气,使导管中残存的药液全部灌入胃内。灌毕后先将导尿管慢慢抽出,再取出含咀。服药前实验兔要先禁食为宜。灌胃量:一般不超过 20ml。

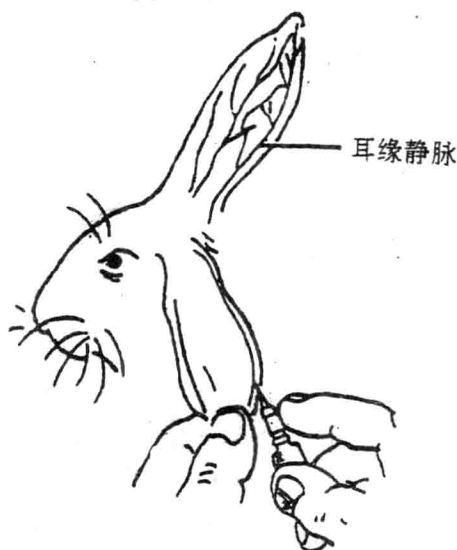


图 1-6 兔耳静脉注射法

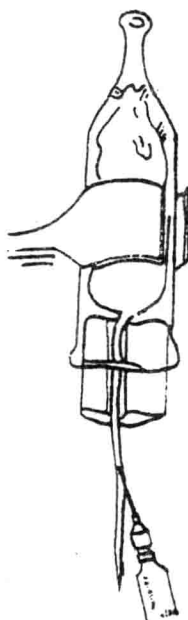


图 1-5 小白鼠尾静脉注射法

(2) 耳静脉注射法:

如两人合作,一人固定兔身。如一人操作则用兔固定箱。选用耳缘静脉,剪去粗毛,用手指轻轻弹耳壳,使血管扩张。以手指于一耳缘根部压住耳缘静脉,待血管明

显充血后,取抽好药液的注射器,从静脉近末梢处插入血管。如见到针头在血管内,便以手指将针头与兔耳固定之,不让针头滑动。放开耳根静脉手指压力,即可注入药液。如系注入血管内则通顺无阻,并可见到血液被药液冲走。如注射在皮下则耳壳肿胀。注射完毕,用手指按在针眼上,然后将针尖抽出,并继续用手指或加棉球按压片刻,以防出血。注射量:0.5~2.5ml/kg。



图 1—7 狗后肢静脉注射法

6、狗

(1) 灌胃法:

将木制含嘴横放在狗上下门牙后固定,将导尿管自含嘴的小孔插入食道。将导尿管口置于水中,如无气泡,表示已插入食道,然后将药液注入,最后注入少量水,将导管中残存的药液冲入。

(2) 静脉注射法:

常用的注射部位是后肢小隐静脉,该血管从后肢外踝后侧走向外上侧。也可用前肢皮下头静脉,在脚爪上方背侧正前位。静注时先局部剪毛,一人用手抓紧腿使血流回流受阻,此时可看出血管走向。另一人随即将药液注入静脉。

八、取 血 方 法

1、小白鼠和小白鼠

(1) 尾尖取血:这种方法适用于采取小量血样。如红细胞计数、白细胞计数、血小板计数、白细胞分类计数均适用。取血前宜先使鼠尾血管充血,室温低时可用灯照射片刻即可,然后剪去尾尖,血即自尾尖流出。

(2) 球后静脉丛取血:用左手抓住鼠的颈背部,拇指及中指抓住头颈部皮肤,食指按于眼睛后使眼球轻度突出,眼底球后静脉丛就郁血。右手取一特制的玻璃吸管或连注射器的粗钝针头,做血象检查时可用血细胞吸管,沿着内眦眼眶后壁刺入。穿刺时吸管应由眼

内角向喉头方向前进约4~5mm,轻轻转动再缩回,血液自然进入管内。在得到所需要的血量后,抽出吸管或注射针头。



图1-8 小白鼠球后静脉丛取血法

(3) 心脏取血:左手抓住鼠背及颈部皮肤,右手持注射器,在心尖搏动最明显处刺入心室,抽出血液。也可从上腹部刺入穿过横膈膜刺入心室取血。动作宜轻巧,否则取血后动物可能死亡。

(4) 断头取血:如在实验结束时取血,可剪去鼠头或剪断一侧颈总动脉,收集自颈部流出的血液。

2、兔和豚鼠

(1) 兔耳缘静脉取血:局部去毛,用电灯照射加热或用酒精或二甲苯棉球涂擦,使静脉扩张,再以石蜡油涂擦耳缘,防止流出血液凝固。用粗针头将静脉刺破或刀切小口后让血自然滴入已放抗凝剂的试管中。

(2) 心脏取血:将动物仰卧,以左手拇指在胸骨一侧,食指及中指于胸骨另侧固定心脏,在心尖搏动最明显处将针与胸壁垂直刺入胸腔,当持针手感到心脏搏动时,再稍刺入即入心脏。然后抽出血液。取血时,针头宜直入直出,勿在胸腔内左右探索。

3、狗

(1) 前肢皮下头静脉取血:剪毛后,助手压迫血管上端或用橡皮带扎其上端,以左手二指固定静脉即可用注射器针头刺入取血。

(2) 后肢小隐静脉取血:血管部位已在静脉注射法中描述。取血方法同前肢皮下头静脉。

第二章 药理学实验研究的基本知识

学生在学习药理学课程期间,对药理学科具有兴趣而学有余力的学生,可在有经验的老师指导下,成立科研小组,适当地利用课余时间或假期参加科研。学生参加科研,可使学生能得到科研基本理论、基本方法和基本技能的训练,促进智能开发,加速人才培养。本章介绍药理学实验的基础理论。

一、选题

开展科学研究的第一环节是选题。学生科研小组选题应在有经验的老师指导下,借助文献资料,发挥创造性思维,使选题体现先进性和科学性。选题必须科学思维清楚,因果关系明确,研究的问题集中具体。例如,要研究某一药物是否有抗炎作用,就用适当数量的两组动物同样进行致炎处理,一组给药物,另一组不给药物,观察该药单一因素的作用。选题应充分考虑主客观条件,尤其是学生科研课题不宜过大,以避免半途而废。例如,《萍蓬硷药理作用的研究》题目显然过大,而《萍蓬硷抗炎作用的实验研究》则较适于学生。总之,选题应体现出清晰而集中的科学思维和科学假说。

二、实验设计的基本原则

实验设计是研究工作的重要组成部分。良好的设计是科研获得可靠结果的保证。另一方面,实验设计能比较经济地使用人力、物力和时间,获到事半功倍的效果。科研实验设计的三大原则是对照、随机和重复。

1、对照 实验过程中设立对照的意义就是为了比较和鉴别。目的就在于通过对照消除或减少实验误差。“胰岛素昏迷治疗精神病”,“鸡血疗法”,针刺治疗聋哑等由于缺乏严格对照而得出假阳性的结论盲目推广应用,甚至由此而给人类带来灾难,如 20 年代用金治疗结核病引起肝、肾损伤,粒性白细胞缺乏。对照的形式包括:

空白对照:对照组不加任何处理因素。

实验对照:对照组施加部分实验因素,但不是所研究它的处理因素,如对照组应用同样手术,同样给药途径给予溶媒等。

标准对照(或有效对照):用已有的药物或方法比较受试药物或方法的相对效果。

配对对照:同一受试对象的不同的时间或两个部位的对比称为同源配对;一卵双胞胎和同窝动物的对比为异体配对。

组间对照:两组或几组间互相对照。

历史对照:本人过去研究结果或他人的研究结果与本次研究结果做对照。

2、随机 实验的样本存在差异,为了避免主观性所致的偏差,样本的分组应按随机化的原则,使样本的生物差异平衡地分配到各组,使各实验组基本上一致和均衡。

(1)简化分层随机法:常用于单因素小样本的一般实验,即将同一性别、年龄的动物按体重大小顺序排列,分组时依次按大小随机分配到各组,各组雌雄的动物数目尽可能相等。

(2)抽签法,掷硬币法:掷硬币法适用于两组时,正面为一组,反面为一组。抽签法可用于两组以上分组,先将同一性别、年龄的动物编号,根据实验分组数作成相应个签,依次抽签分组。

(3)随机数目表法:先将全部动物编号,按统计学专著所附的随机数字表,任取一段数字,依次排配各个动物的编号,然后按排配随机数字奇数(分2组时)或除以组数后的余数(分2组以上)作为归入的组次。最后随机调整,使各组的动物数达到均等。

3、重复 随机抽取样本。能在很大程度上抵消了非处理因素所造成的偏性,但不能全部消除其影响。因此,科研结果的可靠性尚依赖重复实验。重复实验是检验科研结果可靠性的唯一基本方法。

样本加大可以提高精密度,实验重复次数增多,则可提高可靠性,但使样本所含的数目很大或实验重复次数很多,在实际中有一定困难。为此,必须周密设计,严格操作,使样本的数目减到最小限度。

样本大小的估计,一般大动物(犬,猫):5—15,中等动物(兔,豚鼠):10—20,小动物(大鼠,小鼠):15—30。较为准确估计样本数常用计算法,通过文献资料或进行预备实验后的数据用计算法或查表法,推测适当的样本数。

三、确定实验方法和观察指标

确定实验方法和观察指标是完成课题的关键。选取实验方法与指标是否可靠与先进,直接影响科研成果的可靠性与先进性。实验方法往往与观察指标有联系。(1) 正确选取动物,详见第一章。(2) 建立可靠的动物模型。药理研究可在正常动物、麻醉动物和病理模型上进行,也可在整体、离体器官和细胞不同水平上进行,根据实验要求选取不同的模型。例如,研究抗心肌缺血药,可用结扎大鼠、家兔冠状脉心肌梗塞模型;为了排除神经体液因素的影响,可选取离体器官或离体细胞方法。(3) 选择敏感的观察指标,观察指标包括生理(心率、血压、痛阈值,血细胞数等)、生化(组织细胞酶活性、代谢物含量)和形态学指标。观察指标必须客观可靠,不仅定性而且能定量加以测定。

四、实验资料统计分析

实验所得资料还应进行统计学处理。因观测样本(少量动物)带有偶然性,根据样本的数据用数理统计方法推断其对总体(所有动物)的效果,以及各组间(样本间)的资料之差

异是否有本质上的不同,以使实验结论具有科学的依据。药理实验中常用显著性检验法,显著性检验的目的,是指检验两组实验结果的差别。在统计学上有没有显著意义,通常以P值来表示,P(Probability,概率)表示无效假设可以成立的概率,P值越小,表示无效假设成立的可能越小,此时,两组差异的统计学意义越大,一般 $P \geq 0.05$,认为无效假设不能推翻。

1. 质反应资料的统计分析

实验结果为阳性反应或阴性反应,例如有效与无效,死亡与不死亡,麻醉与不麻醉,惊厥或不惊厥,平喘或不平喘等这类资料属质反应资料,也称为“计数资料”。计数资料的统计方法,通常以 X^2 (卡方)法进行显著性检验。

(1) 两组质反应资料的显著性检验——四格表法

此法也称 2×2 表法,即两行格及两列格的四个方格,其形式见下表。

四 表 格 的 形 式

组 别	结 果		Σ
	+	-	
甲	a	b	a+b
乙	c	d	c+d
Σ	a+c	b+d	a+b+c+d=N

四格表法 X^2 值的公式:

$$X^2 = \frac{(|ad-bc|-0.5N)^2 \times N}{(a+b)(c+d)(a+c)(b+d)} \quad (1)$$

例如,甲药治疗组 50 人,有效 40 人;乙药治疗组 50 人,有效 25 人,检验两组有无显著差别。

	有 效	无 效	共 计
甲组	40	10	50
乙组	25	25	50
共计	65	65	100

代入公式(1)

$$X^2 = \frac{(|40 \times 25 - 10 \times 25| - 0.5 \times 100)^2 \times 100}{50 \times 50 \times 65 \times 35} = 8.61$$

查“ X^2 ”表(见统计学附表)

四格表的自由度(f)恒等于 1,查表得 0.01 的概率点为 6.61,本例 $X^2=8.61$,则 $P < 0.01$,差别非常显著。

(2) 多组质反应资料的显著性检验选用二列多格表或行 $\times$ 列表(参见统计学)。

2、量反应资料的统计分析

实验结果为测取具体数据称“计量资料”，如血压值，心率数，酶活性单位，刺激阈值，血细胞数等。配对或非配对两组间实验数据差异的显著性检验用 t 检验。

(1) 配对的测量资料的显著性检验——配对 t 值法

$$\text{公式: } t = \frac{\bar{X}}{S} \times \sqrt{n} \quad (2)$$

$$f = n - 1$$

式中 $\bar{X}$ 为差值均数, S 为差值标准差。

用高血压动物模型, 测量用药前及用药 7 天后的血压数据如下:

动物号	1	2	3	4	5	6	7	8	$\bar{X} \pm S$
用药前血压	162	160	184	161	172	217	163	164	172.9 ± 19.5
用药后血压	136	143	152	146	160	201	140	143	152.6 ± 20.9
血压降低值	26	17	32	15	12	16	23	21	20.25 ± 6.59

代入公式(2)

$$t = \frac{20.25}{6.59} \times \sqrt{8} = 8.69$$

$$f = 8 - 1 = 7$$

查表得 $t_{0.01} = 3.499$, 本例 $t = 8.69 > 3.499$, 故 $P < 0.01$, 用药后血压降低值有非常显著意义。

(2) 两组均数的显著性检验——两组 t 值法。

$$\text{公式: } t = \frac{\bar{X}_1 - \bar{X}_2}{S_{\bar{X}_1 - \bar{X}_2}} \quad (3)$$

$S_{\bar{X}_1 - \bar{X}_2}$ 为两样本均数差的标准误, 计算公式:

$$S_{\bar{X}_1 - \bar{X}_2} = \sqrt{S_c^2 \left(\frac{n_1 + n_2}{n_1 n_2} \right)} \quad (4)$$

S_c^2 为合并样本方差, 计算公式:

$$S_c^2 = \frac{S_1^2(n_1 - 1) + S_2^2(n_2 - 1)}{n_1 + n_2 - 2} \quad (5)$$

例如, 测量 A 药组和 B 药组用药后血压降低值(mmHg)数据如下, 检验两药有无显著差异。

A 药组	26	17	32	15	12	16	23	21
B 药组	26	37	18	30	38	41	31	32
已求出	A 组 $\bar{X} \pm S$		20.25 + 6.585			n = 8		
	B 组 $\bar{X} \pm S$		31.62 + 7.347			n = 8		