

实习一 实验动物的一般操作技术

一、目的和意义

毒理学研究需要用实验动物来进行各种实验,通过对动物的实验观察和分析来研究毒作用,获得毒物的毒性、剂量-反应关系、毒作用机制等方面的资料,因此动物实验是毒理学研究中重要的手段之一。

通过本次实习学习毒理学实验中有关动物实验的基本操作技术,掌握实验动物的选择、动物抓取、染毒方法和生物材料的采集等技术。

二、内容

(一) 健康动物的选择

无论选择哪种种属品系的动物进行实验,均要求选择健康的实验动物。健康动物检查时要求达到:外观体型丰满,被毛浓密有光泽、紧贴体表,眼睛明亮,行动迅速,反应灵活,食欲及营养状况良好。选择时重点检查以下项目:

- 1.眼睛 明亮,瞳孔双侧等圆,无分泌物。
- 2.耳 耳道无分泌物溢出,耳壳无脓疮。
- 3.鼻 无喷嚏,无浆性粘液分泌物。
- 4.皮肤 无创伤、无脓疮、疥癣、湿疹。
- 5.颈部 要求颈项端正,如有歪斜提示可能存在内耳疾患,不应选作实验动物。
- 6.消化道 无呕吐、腹泻,粪便成形,肛门附近被毛洁净。
- 7.神经系统 无震颤、麻痹。若动物(大鼠、小鼠)出现圆圈动作或体位倒置呈圆圈摆动,应该放弃动物。
- 8.四肢及尾 四肢、趾及尾无红肿及溃疡。

(二) 实验动物的性别鉴定

动物性别不同对毒物的敏感性也不同,这可能与性激素、肝微粒体羟基化反应有关,也随受试物而异。因此,要根据实验要求选择性别,一般实验如对性别无特殊要求者,宜选用雌雄动物各半。

1.大鼠、小鼠 主要依肛门与生殖孔间的距离区分,间距大者为雄性,小者为雌性。成年雄鼠卧位可见到睾丸,雌性在腹部可见乳头。

2.豚鼠 用在一只手抓住豚鼠颈部,另一只手把开靠近生殖器孔的皮肤,雄性动物在圆孔中露出性器官的突起,雌性动物则显出三角形间隙,成年雌性豚鼠胸部有两个乳头。

3.家兔 将家兔头轻轻夹在实验者左腋窝下,左手按住腰背部,右手拉开尾巴并将尾巴夹在中指和无名指中间,然后用拇指和食指稍稍把生殖器附近的皮肤扒开。雄兔即可见一圆孔中露出圆锥形稍向下弯曲的阴茎(但幼年雄兔看不到明显的阴茎,只能看到圆孔中有凸起

物，即是阴茎)。雌兔此处则为一条朝向尾巴的长缝，呈椭圆形的间隙，间隙越向下越窄，此即为阴道开口处。

(三) 实验动物的抓取方法

正确地抓取固定动物，是为了在不损害动物健康、不影响观察指标、并防止被动物咬伤的前提下，确保实验顺利进行。

1.小鼠的抓取方法 先用右手抓取鼠尾提起，置于鼠笼或实验台上向后拉，在其向前爬行时，用左手拇指和食指抓住小鼠的两耳和颈部皮肤，将鼠体置于左手心中，把后肢拉直，以无名指按住鼠尾，小指按住后腿即可。

2.大鼠的抓取方法 大鼠的抓取基本同小鼠，只是大鼠比小鼠性情凶猛，不易用袭击方法抓取。为避免咬伤，可戴上帆布或棉纱手套。采用左手固定法，用拇指和食指捏住鼠耳，余下三指紧捏鼠背皮肤，置于左掌心中，这样右手可进行各种实验操作。

3.豚鼠的抓取方法 豚鼠胆小易惊，在抓取时要稳、准、迅速。用手掌迅速扣住鼠背，抓住其肩胛上方，以拇指和食指环握颈部，另一只手托住臀部即可。

4.兔的抓取方法 用右手抓住兔颈部的毛皮提起，然后左手托起臀部或腹部，让其体重的大部分重量集中在左手上。注意不要抓取双耳或抓提腹部。

(四) 实验动物的编号、标记方法

1.称重 大、小鼠秤的感应量需在 0.1g 以下。根据实验的不同要求，选择一定数量的大、小鼠，体重要求在同一组内、同性别动物体重差异应下于平均体重的 10%，不同组间同性别动物体重均值差异应小于 5%。

2.编号

(1) 染色法：以苦味酸来标记。左前腿为 1，左腰部为 2，左后腿为 3，头部为 4，背部为 5，尾基部为 6，右前腿为 7，右腰部为 8，右后腿为 9。如果动物编号超过 10，再涂染另一种涂料，表示相应的十位数，即左前腿上为 10，左腰部为 20，以此类推。

(2) 剪耳法：在耳朵不同部位剪一小孔代表某个号码。常以右耳代表个位，左耳代表十位。

(3) 烙印法：用刺数钳在动物耳上刺上号码，然后用棉签蘸着溶在酒精中的黑墨在刺号上加以涂抹，烙印前最好对烙印部位预先用酒精消毒。

(4) 号牌法：用金属的牌号固定于实验动物的耳上，大动物可系于颈上。

(五) 实验动物的随机分组方法

为了得到客观的剂量-反应关系，应将一群动物按统计学原则随即分配到各个试验组中。可按随机数字表方法进行随机分组。具体做法举例说明：

设将 30 只雄性动物平均分成 A、B、C、D、E、F 六组，每组 5 只动物。将已编号的动物以号码按随机数字表进行分配。如选随机数字表第二行，从第一个数字开始，顺次抄下 30 个数字（可依横行、竖行或斜行抄录）。将每个数字一律除以 6（组数），根据余数 1、2、

3、4、5、0（整除者）分别将动物分配到 A、B、C、D、E、F 组，结果见表 1（数字源自第二行随机数字表）

表 1 动物随机分组表

动物号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
随机数字	97	74	24	67	62	42	81	14	57	20	42	53	32	37	32
除 6 余数	1	2	0	1	2	0	3	2	3	2	0	5	2	1	2
分 组	A	B	F	A	B	F	C	B	C	B	F	E	B	A	B

动物号	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
随机数字	27	7	36	7	51	24	51	79	89	73	16	76	62	27	66
除 6 余数	3	1	0	1	3	0	3	1	5	1	4	4	2	3	0
分 组	C	A	F	A	C	F	C	A	E	A	D	D	B	C	F

按上法分组后，A 组有 7 只动物，B 组 7 只，C 组 6 只，D 组与 E 组各 2 只，F 组 6 只。为了使每组动物数均为 5 只，需要根据随即分配的原则再选出 2 只 A 组和 1 只 C 组动物给 D 组。B 组选出 2 只，F 组选出 1 只给 E 组。具体方法如下：继续抄下随机数字分别除以 A、B、C、F 组的动物数，即： $56/7$ （7 为 A 组动物数）整除，余数为 0，将 A 组第 7 只动物（25 号）调配给 D 组；下一个： $50/6$ （6 为 A 组动物数）余 2，将 A 组第 2 只动物（4 号）调配给 D 组；接下来 $26/6$ （6 为 C 组动物数）余 2，将 C 组第 2 只动物（9 号）给 D 组。余类推，最后调整分组成表 2 所示。雌性动物也按上法分组，然后将雌、雄动物合组进行试验。

表 2 30 只动物随机分组

组别	鼠号	组别	鼠号
A	1, 14, 17, 19, 23	D	4, 9, 25, 26, 27
B	5, 8, 10, 13, 15	E	2, 6, 12, 24, 28
C	7, 16, 20, 22, 29	F	3, 11, 18, 21, 30

（六）实验动物的被毛去除方法

1.剪毛 剪毛剪。注意把剪刀贴紧皮肤剪，不可用手提起被毛，以免剪破皮肤；依次剪毛，不要乱剪；剪下来的被毛集中在一个容器内，勿遗留在手术野和操作台周围。

2.拔毛 多用于兔耳缘静脉注射或取血时，以及给大、小鼠作尾静脉注射时，需用拇指、食指将局部被毛拔去，以利操作。

3.脱毛 脱毛系指用化学药品脱去动物的被毛，适用于无菌手术野的准备以及观察动物局部皮肤血液循环和病理变化。常用硫化钡或依据脱毛剂配方配制脱毛剂。

（七）实验动物染毒途径和方法

染毒的途径和方法多种多样，可根据实验目的、动物种类和药物剂型等情况确定。

1.皮下注射 注射时以左手拇指和食指提起皮肤，将连有针头的注射器刺入皮下。注射部位一般在大腿外侧、内侧、背部、耳根部、腹部。

2.皮内注射 将注射的局部脱去被毛，消毒后，用左手拇指和食指按住皮肤并使之绷紧，在两指之间，将连有针头的注射器紧贴皮肤表层刺入皮内，然后再向上挑起并再稍刺入，即可注射药物，此时可见皮肤表面鼓起一白色小皮丘。

3.肌肉注射 肌肉注射应选肌肉发达、没有大血管通过的部位，一般多选用臀部，注射时垂直迅速刺入肌肉，回抽针栓如无回血，即可进行注射。

4.腹腔注射 用大、小鼠作实验时，以左手抓住动物，使腹部向上，右手将注射针头于左或右下腹刺入皮下，使针头向前推进0.5~1.0cm，再以45°角穿过腹肌，固定针头，缓慢注入药液。若实验动物为家兔，进针部位为下腹部的腹白线离开1cm。

5. 静脉注射

（1）小白鼠和大白鼠：一般采用尾静脉注射，鼠尾静脉有三根，左右两侧尾静脉比较容易固定，多采用。操作时先将动物固定在鼠筒内或扣在烧杯中，使尾巴露出，尾部用温水浸润或用酒精擦拭，以左手拇指和食指捏住鼠尾两侧，中指从下面托起尾巴，以无名指和小指夹住尾巴的末梢，右手持注射器，使针头与静脉平行，从尾下四分之一处进针，先缓慢注入少量药液，如无阻力，可继续注入。注射完毕后把尾部向注射侧弯曲以止血或用消毒棉球压迫针眼止血。

（2）兔：兔耳中央为动脉，耳外缘为静脉。内缘静脉深不易固定，故一般不选用，常用外缘静脉。先拔去注射部位的被毛，用手指弹动或轻揉兔耳，使静脉充盈，左手食指和中指夹住静脉的近端，拇指绷紧静脉的远端，无名指及小指垫在下面，右手持针尽量从静脉的远端刺入，待有回血后，将拇指移到针头处以固定针头，放开食指和中指，将药液注入，然后拔出针头，用手压迫针眼片刻。

6. 经口染毒 在急性试验中，经口染毒多用灌胃法，此法剂量准确，适用于小鼠、大鼠、家兔等动物。

（1）小鼠、大鼠或豚鼠：灌胃时将针按在注射器上，吸入药液。左手抓住鼠背部及颈部皮肤将动物固定，右手持注射器，将灌胃针插入动物口中，沿咽后壁徐徐插入食管。针插入时应无阻力，若感到阻力或动物挣扎，应立即停止进针或将针拔出，以免损伤或穿破食管及误入食管。

（2）兔：先将动物固定，再将特制的扩口器放入动物口中，扩口器的宽度可视动物口腔大小而定，中间钻一小孔。灌胃时将扩口器放在动物上下门牙之后，并用绳固定于嘴部，将带有弹性的橡皮导管，经扩口器上的小圆孔插入，沿咽后壁进入食管，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，如不发生气泡，即认为此导管实在食

管中，此时可将药液灌入。

7.其它给药途径

(1) 呼吸道染毒：粉尘、气体、蒸气或雾等状态存在的药物或赌气，须通过呼吸道染毒。

(2) 皮肤染毒：为了鉴定化学物质经皮肤的吸收作用、局部作用、致敏作用和光感作用等，需采用经皮肤染毒方法。①斑贴法（家兔）：在脱毛区（一般 1cm^2 即可）贴敷浸有受试化合物的多层纱布（应低于致死剂量），再盖上一层油纸或塑料薄膜，贴牢固定。于 12~24 小时后解开敷料，用温水清洗皮肤，观察皮肤反应。②浸尾法（小鼠及大鼠）：目的是定性地判定受试物的经皮吸收作用。染毒前先将鼠放入特制的固定盒内，并使其尾巴通过固定盒底部的软木塞的圆孔露出管外。继之将尾巴通过小试管软木塞小孔，插入庄有受试物液体的试管内，浸泡 2~6 小时，观察中毒症状。

（八）实验动物染毒途径和方法

1.动物常用采血方法

(1) 大小鼠鼠尾采血方法：适用于需血量少的实验。方法：将动物固定后，把鼠尾浸入 $45\sim 50^{\circ}\text{C}$ 温水中使尾静脉充血，擦干皮肤后，再用酒精棉球擦拭消毒。剪去尾尖（约 $0.2\sim 0.3\text{cm}$ ），拭去第一滴血，用血色素吸管（根据需要事先在吸管内加入与不加抗凝剂）吸去一定量尾血，然后用干棉球压迫止血。

(2) 眼眶静脉丛采血法：操作者以左手拇指、食指紧紧握住大鼠或小鼠颈部压迫颈部两侧使眶后静脉丛充血（注意用力要恰当，以防止动物窒息死亡），右手持玻璃毛细管从一侧眼内眦部以 45° 角刺入，捻转前进。如无阻力继续刺入，有阻力就抽出玻璃毛细管调整方向后再刺入，直至出血为止。右手持容器收集血液后，拔出毛细管，用干棉球压迫止血。

(3) 腹主动脉或股动（静）脉采血法：为一次性采血方法。大、小鼠麻醉后，仰卧位固定动物，剪开腹腔，剥离暴露腹主动脉或暴露股动（静）脉，用注射器刺入采血。

(4) 家兔耳缘静脉采血法：家兔在兔盒中固定，拔掉一侧耳缘部细毛，轻轻以手指弹耳，使耳缘静脉充血，酒精消毒。左手压迫耳根，右手持针刺破静脉收集血液；或直接用注射器进针，耳缘静脉采血。

(5) 断头采血法：该法可用于大、小鼠。操作者左手握住动物，右手持剪刀，快速剪断头部，倒立动物将血液滴入容器。注意防止剪断的毛发掉入接血容器内。

(6) 心脏采血法：将兔或大、小鼠以仰卧位固定，家兔需在左侧胸 3~4 肋部位剪毛，常规消毒。于第 3~4 肋间近胸骨左缘处，手触心搏最明显处进针，采血。采血毕迅速拔针，用酒精棉球压迫止血。大、小鼠则在手触心搏最明显处进针。

2. 动物尿液的收集：用代谢笼收集。代谢笼主要由备有动物饮水和装饲料的笼体、粪尿分离器和收集尿液容器组成。

（九）实验动物的处死方法

1. 脊椎脱臼法 左手按住鼠头，右手抓住鼠尾猛力向后拉，使动物颈椎拉断脱节而立即死亡。此法多用于处死小鼠。

2. 断头法 操作者用右手按住大鼠或小鼠头部，左手握住背部，露处颈部，助手用大剪刀或断头器剪断颈部使之死亡。

3. 急性大失血法 可用鼠眼眶动脉和静脉急性大量失血法使大、小鼠立即死亡。

4. 击打法 右手抓住尾部，提起，用力棒打其头部，鼠痉挛后立即死亡。

5. 麻醉致死法 在密闭容器中预先放入麻醉剂（氯仿或乙醚），然后将动物放入，密封盖好，使动物吸入过量麻醉剂致死。

6. 麻醉后急性放血法 该法多用于处死大鼠。先腹腔注射麻醉动物后，固定动物于仰卧位，右手持镊子提起大腿内侧皮肤，右手用剪刀作一切口并向腹股沟方向剪开皮肤，皮肤切口长约 3~4cm。用镊子分离筋膜，于腹股沟中点大腿内侧深部，暴露股动脉和静脉，用剪子剪断股动脉即有大量血液流出，动物迅速死亡。

7. 空气栓塞法 用注射器向动物静脉内迅速注入一定量的空气，使之形成气栓栓塞血管，引起循环障碍致死。该法适用于大动物如兔、狗、猴等。使用时需注入足量的空气。

8. 化学药物致死法 此法适用于较大动物如兔、狗等。方法是给动物静脉注射化学药物而致死。常用 10%KCl 或 10% 甲醛溶液进行静脉注射。

9. 开放性气胸法 将动物开胸，造成开放性气胸，此时胸膜腔的压力与大气压力相等，肺脏因受大气压所发生萎缩、纵隔摆动使动物窒息而死亡。

实习二 经口急性毒性试验

一、原理和实验目的

了解一次或 24 小时内多次给予受试化学物后，动物多产生的急性毒性反应极其严重关系，中毒死亡的特征以及可能的死亡原因，观察受试物毒性反应与剂量的关系，求出半数致

死量 (LD_{50})。

化学毒物经口染毒的方法是卫生毒理学中重要的基本技术之一,经口急性毒性试验是研究化学毒物的基本试验。通过该实验学习化学物毒性试验的实验设计原则和掌握经口灌胃技术。

二、内容

- 1.健康小鼠的选择,性别的辨认
- 2.称重、编号和随机分组方法
- 3.受试化学物溶液的配制
- 4.小鼠经口灌胃操作技术
- 5.毒性体征的观察、 LD_{50} 计算和毒性分级

三、试剂和材料

(一) 实验动物

健康成年小鼠或大鼠若干只。

(二) 器材

注射器、吸管、容量瓶、烧杯、滴管、灌胃针、电子天平、动物体重秤、外科剪刀、镊子。

(三) 试剂

受试化合物,苦味酸酒精饱和液或其他染色液。

四、操作步骤

(一) 健康动物的选择 (见实习一)

(二) 性别鉴定 (见实习一)

(三) 动物编号与分组

1.称重 大、小鼠秤的感应量需在 0.1g 以下。根据实验的不同要求,选择一定数量的大、小鼠,体重要求在同一组内、同性别动物体重差异应小于平均体重的 10%,不同组间同性别动物体重均值差异应小于 5%。急性毒性实验一般使用体重为 18~25g 的小鼠或/和 150~240g 大鼠。

2.编号 (见实习一)

3.随机分组 (见实习一)

(四) 受试物的配制

1. 受试化学物的量取 固体化学物采用称量法,液体化学物可用称量法或吸量法。

(1) 称量法: 将受试化合物放入已知重量的容器内称量。加溶剂溶解或稀释,轻如刻

度容器内，混匀，再加溶剂至刻度。算出浓度（mg/ml）备用。

（2）吸量法：依设计剂量计算出应吸取也太受试物的容积，加入容量瓶中，用溶剂加至刻度。

$$\text{计算公式为： } X = \frac{A \cdot V}{d \cdot 1000}$$

式中：X——应吸取受试物的容积（ml）

A——设计要求的受试物浓度（mg/ml）

V——容两瓶溶剂（ml）

d——受试化学物比密

2.受试化学物的稀释

（1）等浓度稀释法：将受试化学物配成一种浓度，此时各剂量组的实验动物将给予不同提及的受试化学物。例如受试物配成 1000mg/10ml 的溶液，五个剂量组的剂量分别为 100、200、400、800、1600mg/kg，则各剂量组动物将依次给予 1.0ml/kg、2.0 ml/kg 直至最高剂量组的 16 ml/kg。

（2）等容量稀释法：按照事先设计的剂量分别稀释配制为几种不同浓度的受试物溶液，二个各剂量组的动物均给予相同单位体重体积的受试化学物。如上例的情况，将受试物分别配成 100mg/10ml、200 mg/10ml……1600 mg/10ml 等 5 个浓度的溶液，各剂量组动物给予受试物的体积均为 10 ml/kg。

（五）灌胃操作

1.小鼠、大鼠及豚鼠灌胃法：灌胃时将针按在注射器上，吸入药液。左手抓住鼠背部及颈部皮肤将动物固定，右手持注射器，将灌胃针插入动物口中，沿咽后壁徐徐插入食管。针插入时应无阻力，若感到阻力或动物挣扎，应立即停止进针或将针拔出，以免损伤或穿破食管及误入食管。

进针深度一般是小鼠 2.5~4cm，大鼠或豚鼠 4~6cm。为了验明是否已正确地插入胃部，可轻轻回抽注射器，如无气泡抽出，表明已插入胃中；如有大量气泡，则提示误差气管，应抽出重插。随后将受试物溶液诸如。灌胃容量小鼠通常为 0.2~1ml，大鼠 1~4ml，豚鼠 1~5ml。

2.注意事项 为了使受试物能完全吸收，灌胃染毒时要求动物保持空腹状态，这是因为化学毒物进入胃内易与食糜作用而降低毒性，而且胃内容物也不利于受试物溶液的灌入，因此染毒前应禁食 6~10 小时。但要注意时间不能过长。否则动物长时间饥饿会影响肝脏，影响实验结果。灌胃后至少 2~3 小时后才能喂食，油剂比水溶液要求限制喂食的时间更长。

相同剂量的受试物，若以不同浓度给药，死亡情况会有所不同。体积太小、太浓可能发生局部刺激或其他损伤；体积太大可能会引起胃部机械性损伤，影响正常生理功能。常用的方法是将受试物体积固定，根据实验设计的剂量将受试物配制成不同浓度的溶液进行灌胃。通常灌胃体积以体重的 1%~2% 计算，最多不超过 3%，即每 100g 体重灌胃 1~2ml，最多不

式中: m : $\lg LD_{50}$;

X_k : 最大剂量的对数值;

I : 相邻两剂量组之对数剂量差值;

q : 存活率 ($q=1-p$);

Σp : 各剂量组死亡率总和;

n : 每组动物数。

举例: 小鼠经口给予某种化学毒物染毒, 剂量和死亡动物数结果见表 2。

表 2 某化学物质小鼠经口染毒死亡情况

组别	剂量		动物数 (n)	死亡数 (只)	死亡率 (p)	存活率 (q)	p · q
	mg/kg	对数					
1	15.0	1.1761	10	0	0.0	1.0	0.00
2	18.0	1.2561	10	2	0.2	0.8	0.16
3	21.7	1.3361	10	5	0.5	0.5	0.25
4	26.1	1.4161	10	7	0.7	0.3	0.21
5	31.3	1.4961	10	9	0.9	0.1	0.09
i=0.08			$\Sigma p=2.3$				

按式计算得: $\lg LD_{50}=1.4961-0.08(2.3-0.5)$

$$=1.3521$$

$$S_m=0.08 \sqrt{\frac{0.16}{10} + \frac{0.25}{10} + \frac{0.21}{10} + \frac{0.09}{10}}$$

$$=0.0213$$

$\lg LD_{50}$ 及其 95% 可信限为 $1.3521 \pm 1.96 \times 0.0213$

所以 LD_{50} 及 95% 可信区间范围为 22.50mg/kg(20.44~24.76mg/kg)。