

实验动物模型 基础知识



实验动物模型制作原则

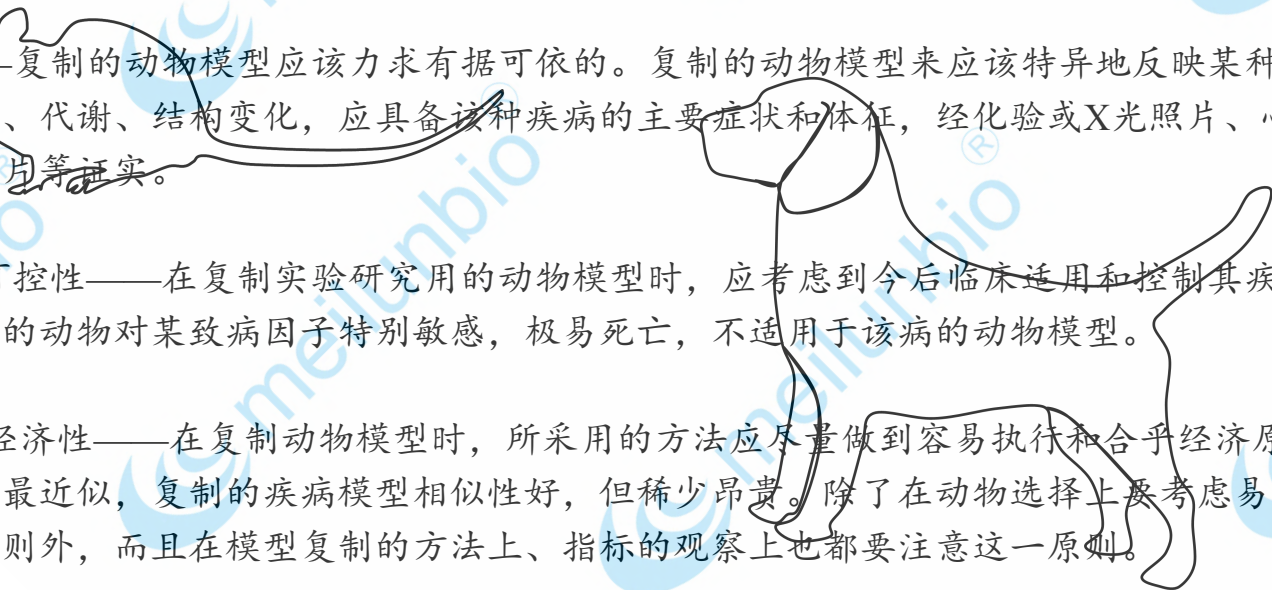
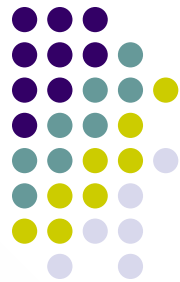
➤ 相似性——设计动物模型的一个重要原则，即所设计的动物模型需要与人类疾病高度相似。不同动物的选择能有意想不到的效果。

➤ 重复性——理想的动物模型应该是可重复的，甚至是可以标准化的。为了增强动物模型复制时的重复性，必须在动物品种、品系、年龄、性别、体重、健康情况、饲养管理；实验及环境条件，季节、昼夜节律、应激、室温、湿度、气压、消毒灭菌；实验方法步骤；药品生产厂家、批号、纯度规格、给药剂型、剂量、途径、方法；麻醉、镇静、镇痛等用药情况；仪器型号、灵敏度、精确度；实验者操作技术熟练程度等等方面保持一致。

➤ 可依性——复制的动物模型应该力求有据可依的。复制的动物模型来应该特异地反映某种疾病或某种机能、代谢、结构变化，应具备该种疾病的主要症状和体征，经化验或X光照片、心电图、病理切片等证实。

➤ 适用性和可控性——在复制实验研究用的动物模型时，应考虑到今后临床适用和控制其疾病的发展。如有的动物对某致病因子特别敏感，极易死亡，不适用于该病的动物模型。

➤ 易行性和经济性——在复制动物模型时，所采用的方法应尽量做到容易执行和合乎经济原则。灵长类动物与最近似，复制的疾病模型相似性好，但稀少昂贵。除了在动物选择上要考虑易行性和经济性原则外，而且在模型复制的方法上、指标的观察上也都要注意这一原则。



实验动物模型对照问题

- ▶ 空白对照——是在不给任何措施情况下观察动物自发变化的规律。
- ▶ 实验对照——是采用与实验相同操作条件的对照，如给药实验中的溶剂、手术、注射以及观察抚摸等都可以对动物发生影响。
- ▶ 标准对照——常用于药物研究。对一新药的疗效可用一已知的有效药或能引起标准反应的药物做对照，这样既可考核实验方法的可靠性，又可通过比较了解新药的疗效和特点。
- ▶ 配对对照——是同一个体在前后不同时间比较对照期和实验期的差异，或同一个体的左右两部分作对照处理和实验处理的差异，这样可大大减少抽样误差。在实验中也可用一卵双胞胎或同窝动物来做。
- ▶ 组间对照——是将实验对象分成两组或几组比较其差异。这种对照个体差异和抽样误差比较大。组间对照可用交叉对照方法以减少误差。
- ▶ 历史对照——必须要条件、背景、指标、技术方法相同才可进行对比，否则将会得出不恰当的甚至错误的结论。

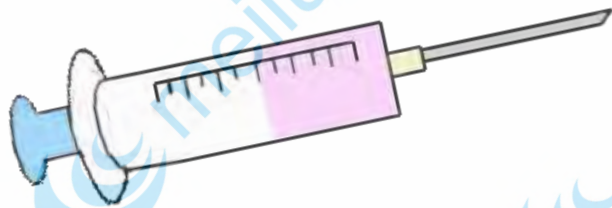


实验动物用药量的计算

动物实验所用的药物剂量，一般按mg/kg体重或g/kg体重计算，应用时须从已知药液的浓度换算出相当于每kg体重应注射的药液量（ml），以便给药。

例1：
计算给体重200g的大鼠，静脉注射10%水合氯醛溶液麻醉，按每kg体重3ml剂量注射，应注射多少ml？

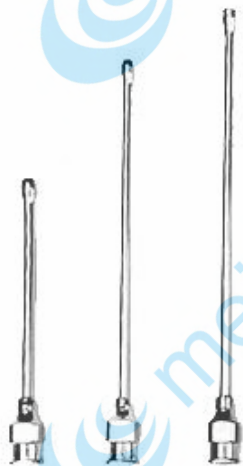
计算方法：应注射10%水合氯醛溶液用量= $3\text{ml} \times 200\text{g} / 1000\text{g} = 0.6\text{ml}$



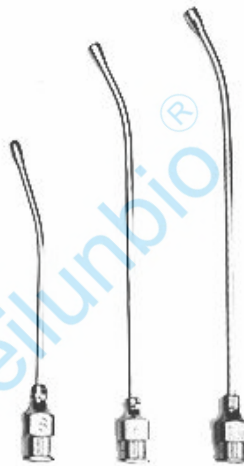
实验小鼠给药方法

1. 灌胃给药

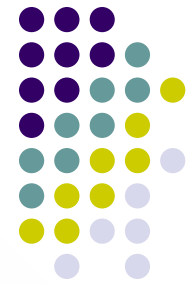
小鼠专用灌胃针由注射器和喂管组成，喂管长约1m，喂管尖端有一金属小圆球，金属球中空，用途是防止喂管插入时造成损伤。将喂管插头紧紧连接在注射器的接口上，吸入一定量的药液；左手捉住小鼠，右手拿起准备好的注射器。将喂管针头尖端放进小鼠口咽部，顺咽后壁轻轻往下推，顺着食管滑入小鼠的胃，插入深度约3cm，缓慢将注射器中的药液灌入小鼠的胃中。



直头灌胃针



弯头灌胃针



2. 注射给药

(1) 皮下注射给药

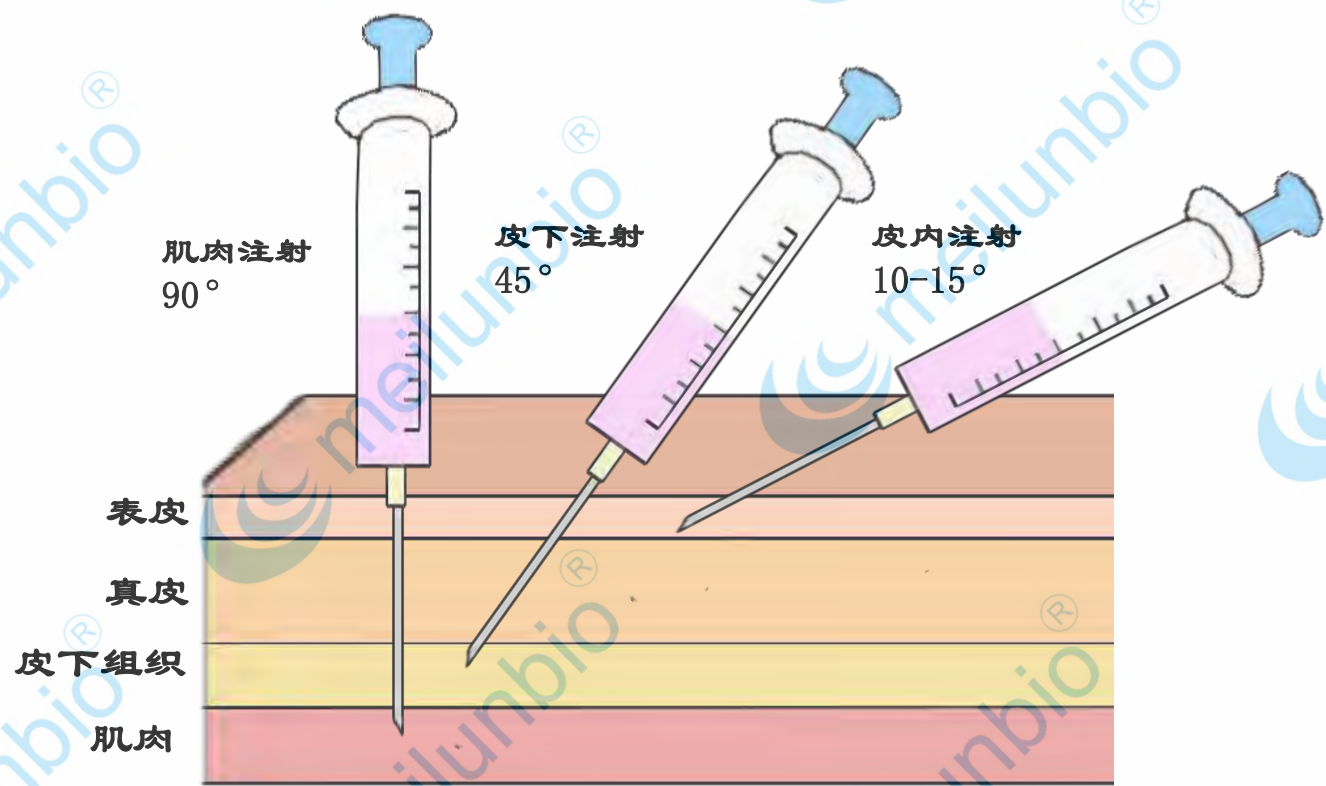
将药液推入皮下结缔组织，经毛细血管、淋巴管吸收进入血液循环的过程。通常选择项背或大腿内侧的皮肤。操作时，常规消毒注射部位皮肤，然后将皮肤提起，注射针头取一钝角角度刺入皮下，把针头轻轻向左右摆动，易摆动则表示已刺入皮下，再轻轻抽吸，如无回血，可缓慢地将药物注入皮下。拔针时左手拇、食指捏住进针部位片刻，以防止药物外漏。注射量约为0.1-0.3ml/10g体重。

(2) 皮内注射给药

将药液注入皮肤的表皮和真皮之间，观察皮肤血管的通透性变化或皮内反应，接种、过敏实验等一般作皮内注射。先将注射部位的被毛剪掉，局部常规消毒，左手拇指和食指按住皮肤使之绷紧，在两指之间，用结核菌素注射器连接4.5针头穿刺，针头进入皮肤浅层，再向上挑起并稍刺入，将药液注入皮内。注射后皮肤出现一白色小皮丘，而皮肤上的毛孔极为明显。注射量为0.1ml/次。

(3) 肌肉注射给药

小鼠体积小，肌肉少，很少采用肌肉注射。当给小鼠注射不溶于水而混悬于油或其他溶剂中的药物时，采用肌肉注射。操作时一人固定小鼠，另一人用左手抓住小鼠的一条后肢，右手拿注射器，将注射器与半腱肌呈90°角迅速插入1/4，注入药液。用药量不超过0.1ml/10g体重。





(4) 静脉注射给药

将小鼠放在金属笼或鼠筒中,拉出尾巴,左手抓住小鼠尾巴中部.小鼠的尾部有2条动脉和3条静脉,2条动脉分别在尾部的背侧面和腹侧面,3条静脉呈品字型分布,一般采用左右两侧的静脉.拔去沿尾部静脉走向的毛,用75%酒精棉球反复擦拭尾部或置尾巴于45-50℃温水中浸泡几分钟,使尾部血管扩张及软化表皮角质的目的。左手拇指和食指捏住鼠尾两侧,使静脉更为充盈,用中指从下面托起尾巴,以无名指夹住尾巴的末梢,右手持4号针头注射器,使针头与静脉平行(小于30°角),从尾巴的下1/4处进针,开始注入药物时应缓慢,仔细观察,如果无阻力,无白色皮丘出现,说明已刺入血管,可正式注入药物.有的实验需连日反复尾静脉注射给药,注射部位应尽可能从尾端开始,按次序向尾根部移动,更换血管位置注射给药。注射量为0.05-0.1ml/10g体重。拔出针头后,用拇指按住注射部位轻压1-2min,防止出血。

(5) 腹腔注射

左手提起并固定小鼠,使鼠腹部朝上,鼠头略低于尾部,右手持注射器将针头在下腹部靠近腹白线的两侧进行穿刺,针头刺入皮肤后进针3mm左右,接着使注射针头与皮肤呈45°角刺入腹肌,穿过腹肌进入腹膜腔,当针尖穿过腹肌进入腹膜腔后抵抗感消失。固定针头,保持针尖不动,回抽针栓,如无回血、肠液和尿液后即可注射药液。注射量为0.1-0.2ml/10g体重。

实验小鼠采血方法

1. 剪尾采血

左手拇指和食指从背部抓住小鼠颈部皮肤，将小鼠头朝下，小鼠保定后将其尾巴置于50°热水中浸泡数分钟，使尾部血管充盈。擦干尾部，再用剪刀或刀片剪去尾尖1-2mm，用试管接流出的血液，同时自尾根部向尾尖按摩。取血后用棉球压迫止血并用6%液体火棉胶涂在伤口处止血。每次采血量0.1mL。

2. 摘除眼球采血

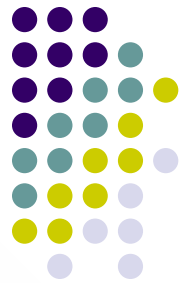
左手抓住小鼠颈部皮肤，轻压在实验台上，取侧卧位，左手食指尽量将小鼠眼周皮肤往颈后压，使眼球突出。用眼科弯镊迅速夹去眼球，将鼠倒立，用器皿接住流出的血液。采血完毕立即用纱布压迫止血。每次采血量0.6-0.1mL。

3. 心脏采血

小鼠仰卧位固定，剪去胸前区被毛，皮肤消毒后，用左手食指在左侧第3-4肋间触摸到心搏处，右手持带有4-5号针头的注射器，选择心搏最强处穿刺，当刺中心脏时，血液会自动进入注射器。每次采血量0.5-0.6mL。

4. 断头采血

右手用剪刀剪断小鼠颈部约1/2-4/5，让血液流入试管。此法可采血0.8-1.2mL。



高血脂症动物模型

—高脂饲料诱发高血脂症模型

造模机制：动物饲料中加入过量的胆固醇和脂肪，饲养一定时间后，出现高血脂症。

造模方法：

1. 大鼠：

1) 饲料配方一（1%-4%胆固醇、10%猪油、0.2%甲基硫氧嘧啶、86%-89%基础饲料）喂养7-10天，可形成高胆固醇血症。

2) 饲料配方二（10%蛋黄粉、5%猪油、0.5%胆盐、85%基础饲料）喂养7天可形成高胆固醇血症。

评价：饲养方便，所形成的病理改变与人早期者相似，但不易形成似人体的后期病变，较易形成血栓。

2. 小鼠：

雄性小鼠以1%胆固醇+10%猪油的高脂饲料喂养7天。

评价：容易饲养，节省药品，但取血不便，难做动态观察。



糖尿病动物模型

—链脲菌素 (STZ) 诱发糖尿病模型

造模机制：由于胰岛细胞中菸酰胺腺嘌呤 (DNA) 含量减少，STZ分子中的葡萄糖基可使STZ进入胰岛β细胞进行有选择性破坏，从而诱发糖尿病。

模型分类：I型和II型动物模型的制备与STZ注射剂量有关：大剂量注射时，由于直接引起胰岛β细胞的广泛破坏，可造成I型糖尿病模型；而注射较少量STZ时，由于只是破坏一部分胰岛β细胞，造成外周组织对胰岛素不敏感，同时给予高脂饲料喂养，两者结合便诱导出病理、生理改变接近于人类II型糖尿病的动物模型。

造模方法：以200克鼠均重为例

溶液配制：柠檬酸 (MW:210.14) 2.1 g加入双蒸水100 mL中配成A液；柠檬酸钠 (MW:294.10) 2.94 g加入双蒸水100 mL中配成B液。将A、B液按一定比例混合 (1: 1.32或1:1)，调节pH在4.2-4.5范围内，即是所需配制STZ的柠檬酸缓冲液。

注射时用柠檬酸缓冲液配制1%的STZ溶液，按空腹体重注射对应STZ溶液。30min内注射完毕。注意：STZ容易失活，STZ快速称取后仍要求干燥避光，推荐用干燥铝箔(或锡箔)纸。

I型糖尿病模型：健康雄性SD大鼠，适应性喂养一周。造模前禁食16h，按65-70mg/kg剂量一次性快速腹腔注射1%STZ注射液。注射后正常进食饮水，2h后灌胃给予25%葡糖糖水，防止低糖。于造模后第3天、10天测定空腹血糖， $\geq 16.7\text{mmol/L}$ 造模成功。

II型糖尿病模型：健康雄性SD大鼠，适应性喂养一周。造模前禁食16h，按25-40mg/kg剂量一次性快速腹腔注射1%STZ注射液。注射后用高脂饲料正常喂1-2个月，每周测一次空腹血糖， $\geq 16.7\text{mmol/L}$ 造模成功。



诱发性肿瘤动物模型

--利用外源性致癌因素引起细胞遗传特性异常而呈现出异常生长和高增值活性，形成肿瘤。

建立方法：

物理方法：放射性物质致癌

化学方法：使用化学致癌物，经口给药或注射给药

生物方法：病毒或转基因

举例：

1. 肝癌

1) 二乙基亚硝胺 (DEN) 诱发大鼠肝癌

取体重250 g左右的封闭群大白鼠，雌雄不拘；按性别分笼饲养。除给普通食物外，饲以致癌物，即用 0.25% DEN 水溶液灌胃，剂量为10 mg/kg，每周一次，其余5天用0.025% DEN 水溶液放入水瓶中，任其自由饮用；共约4个月可诱发成肝癌；也可以单用0.005% DEN 掺入饮水中口吸服8个月诱发肝癌。

2.) 黄曲霉素诱发大鼠肝癌

每日饲料中含0.001~0.015 ppm，混入饲料中喂6个月后，肝癌诱发率达80%。

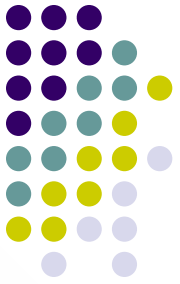
2. 肺癌

1) DEN 诱发小鼠肺癌

小鼠每周皮下注射1% DEN 水溶液一次，每次剂量56 mg/kg，DEN 总剂量达到868 mg；观察时间100天左右时，发癌率可达40%；观察时间半年左右时；发癌率可达94%。

2) 乌拉坦诱发肺腺癌

小鼠 (A系，1-1.5月龄) 每次每只腹腔注入10%乌拉坦生理盐水液0.1-0.3 ml，间隔3-5日再注，共注2-3个月，每只小鼠用量约为 100 mg；注后3个月肺腺癌发生率为100%，而且多数为多发性，这种诱发瘤为良性。



移植性肿瘤动物模型

--将各种实体瘤、付水流等一定数量的瘤细胞或无细胞的滤液（病毒性肿瘤）接种于相关品系的小鼠，就可以使该品系的小鼠带有相同的肿瘤，其生长速度一致，个体差异小，接种存活率可达100%。此模型经常用于抗肿瘤新药的筛选。

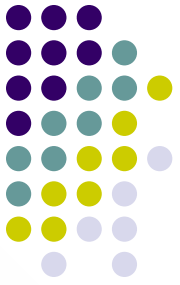
接种方法：瘤块接种、瘤细胞悬液接种、培养细胞接种等

举例：

1. 瘤块接种法：选取生长状态良好的瘤源动物，在无菌条件下，剥离出无坏死、无包膜的瘤组织，在无菌平皿内剪成 2mm^3 小块，放置在冰块上，皿内放置少许灭菌PBS。用无菌套管针抽吸瘤块，接种于同种受体腋窝皮下。从瘤块取材到接种结束应在30min内完成。

2. 瘤细胞悬液接种法：接种动物数量较多可采用此法。无菌操作取出瘤块，剪成小块，放入玻璃匀浆器中，加无菌生理盐水研磨，经滤网过滤，加生理盐水稀释成1:3-1:4的瘤细胞悬液，用台盼蓝染色法计数，用1ml注射器注射到接种部位，每个接种点接种0.2ml（一般含 1×10^6 - 1×10^7 个细胞数）。

3. 培养细胞接种法：将对数生长期细胞用0.25%胰蛋白酶消化后，用PBS或生理盐水以1000r/min离心10min，洗涤2次，用台盼蓝染色法计数，加生理盐水稀释成一定浓度的细胞悬液，细胞悬液置于冰上，用1ml注射器注射到接种部位，每个接种点接种0.2ml（一般含 1×10^6 - 1×10^7 个细胞数）。



溃疡性结肠炎动物模型

溃疡性结肠炎(UC)具有反复发作的特性,发作时病人肠道有溃疡性病变,会出现腹痛、腹泻或便血。现有的治疗手段并不能有效地应用于所有的病人,约20%的病人最终需要肠道切除。在新药研发的过程中,溃疡性结肠炎的动物模型是必需的工具。葡聚糖硫酸钠(DSS)诱发的小鼠模型是应用最为广泛的动物模型,是一种急性UC模型。

造模方法:

BALB/c小鼠雌雄各半,2%-3%(M/V)DSS溶液自由饮用。第3-4天小鼠有肠道溃疡性病变,包括水肿、腹泻和便血等症状。

特点:在这个模型中,因为DSS的毒性,动物的病变非常严重,表现为体重的急剧下降,在很多的情况下,会导致动物死亡。死亡率可达20%到40%,从而使这一模型极不稳定。

