

动物实验的设计

陈 丽

安徽省动物中心

安徽医科大学实验动物中心



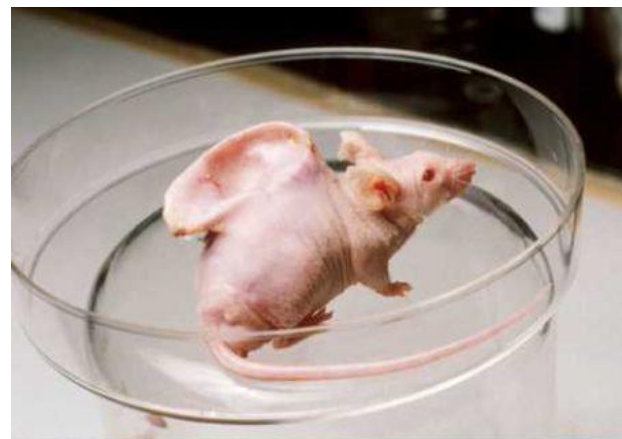
动物实验

- **动物实验 (animal experiment)**：指在实验室内，为了获得有关生物学、医学等方面的新知识或解决具体问题而使用动物进行的科学研究。动物实验必须由**经过培训的、具备研究学位或专业技术能力的人员进行**或在其指导下进行。



什么叫动物实验设计?

- ❑ 动物实验设计是指研究者为了达到研究目的而制定的**动物实验方案和实施计划**，并用文字记录表述的过程。
- ❑ 动物实验的结果能否达到预期的研究目的，很大程度上取决于研究者的动物实验设计是否科学、严密。
- ❑ **实验设计的作用：**
合理安排实验因素，提高研究质量，
控制误差，使研究结果保持较好的稳定性，
通过减少观察例数，获取尽可能丰富的信息。





动物实验设计的意义

- 正确的动物实验设计对提高科学研究质量、发表高水平的学术论文非常重要。

目前许多动物实验的质量不高的原因：

动物质量不高

实验设计和统计学分析能力有限

- 一个好的实验设计，对统计学分析来说帮助很大，可以使问题变得更加容易解决。
- 一个不正确的实验设计，导致结果信息无用。



内 容

- 第一节 动物实验的基本要求
- 第二节 实验动物的选择
- 第三节 常见医学实验中动物的选择
- 第四节 动物实验设计方法
- 第五节 动物实验记录的规范要求
- 第六节 动物实验报告或论文的写作方法

第一节 动物实验的基本要求

一、动物实验的基本要素

处理因素：指外部所施加的因素，如某种药物、某种手术方法、某种毒物、某种射线的照射、物理因素等；

受试对象：指处理因素所作用的对象；

动物实验



人体实验

实验效应：指处理因素作用于受试对象后出现的实验效应或反应，通过各种指标来鉴定实验效应。



处理因素

(标准化)



受试对象

(同质性)



实验效应

(主观指标、客观指标)
(可靠性、比对性)



二、动物实验设计遵循的原则

- 对照原则
- 随机原则
- 重复原则
- 均衡原则
- 盲法原则
- 福利原则



1. 对照原则

- 在实验中设立可与实验组比较，用于消除各种非处理因素影响
- 设立对照的正确方法

把研究对象随机分配给对照组和实验组。对照设立有两种方式，即自体对照和组间对照。

- 组间对照的形式

阳性对照——实验结果已知，检验实验方法是否正常，作为“标尺”，

阴性对照——验证实验方法的特异性，防止假阳性结果产生，

空白对照——不加任何措施，反映受试对象在研究过程中自身变化，

模型对照——验证实验方法，考察模型制作是否成功，

溶剂对照组——排除药物以外的其它溶剂的影响。

Tab 3 Effects of TFA Na^+ , K^+ -ATP in liver in rats

Group	Dose	Na^+ , K^+ -ATP / $\mu\text{mol} \cdot (\text{mg} \cdot \text{h})^{-1}$
Normal control	—	0.87 ± 0.8
Model	—	$0.52 \pm 0.21^*$
Losan Pharma GmbH	60 mg	$1.15 \pm 0.78^{##}$
High dose	$2 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$	$0.94 \pm 0.38^{##}$
Mid dose	$\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	$0.94 \pm 0.28^{##}$
Low dose	$0.75 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$	$0.89 \pm 0.58^{##}$

溶剂对照组 vs normal control; $^{##}P < 0.01$ vs model

- 使每个实验对象在接受处理时，都有相同的机会，随机而定。
- 随机可以减少主观因素的影响，减少或避免偏性误差，是实验设计的重要原则之一。
- 随机化的手段可采用抽签、随机数字表、随机排列表或采用计算器的随机数值键等。

...
...	85	53	83	29	95	56	27	09	24	43	21	78	55	09	82
...	37	79	49	12	38	48	13	93	55	96	41	92	45	71	51
...	89	09	39	59	24	00	06	41	41	20	14	36	59	25	47
...	76	62	16	48	68	58	76	<u>17</u>	14	86	59	53	11	52	21
...	71	82	13	50	41	27	55	10	24	92	28	04	67	53	44
...
...	34	18	04	52	35	74	13	39	35	22	68	95	23	92	35
...	11	20	99	45	18	76	51	94	84	86	13	79	93	37	55
...	27	37	83	28	71	79	57	95	13	91	09	61	87	25	21
...	10	65	81	92	59	77	31	61	95	46	20	44	90	32	64
...	59	71	74	17	32	48	38	75	93	29	73	37	32	04	05
...
...	87	63	93	95	17	81	83	83	04	49	77	45	85	50	51
...	08	61	74	51	69	92	79	48	89	79	29	18	94	51	23
...	08	52	85	08	40	48	40	35	94	22	72	65	71	08	86
...	89	85	84	46	06	64	71	06	21	66	89	37	20	70	01
...	42	29	72	23	19	06	94	76	10	08	81	30	15	39	14
...



3. 重复原则

- 重复性原则是指同一处理要设置多个样本例数。
- 重复的主要作用是估计实验误差、降低试验误差和增强代表性，提高实验结果的精确度，同时为体现结果的真实性，保证实验结果能在同一个体或不同个体中稳定地重复出来，也需要足够的样本数。

无限增加样本含量，将加大实验规模，延长实验时间，浪费人力物力，增加系统误差的可能性。

样本含量不足，检验效能偏低，导致总体中本来具有的差异无法检验出来。



4. 均衡原则

保证实验组及其对照组在非处理因素方面，如遗传背景、性别、年龄、环境等方面力求均衡一致。

5. 盲法原则

避免主观判断对实验结果的影响。如生理生化指标，病理切片等。

6. 福利原则（3R原则）

3R原则：替代（replacement），减少（reduction），优化（refinement）



第二节 实验动物的选择

- 相似性原则
- 差异性原则
- 易化性原则
- 相容或相匹配原则
- 可获性原则
- 重复性和均一性原则

1. 相似性原则

1.1 结构、功能及代谢的相似性

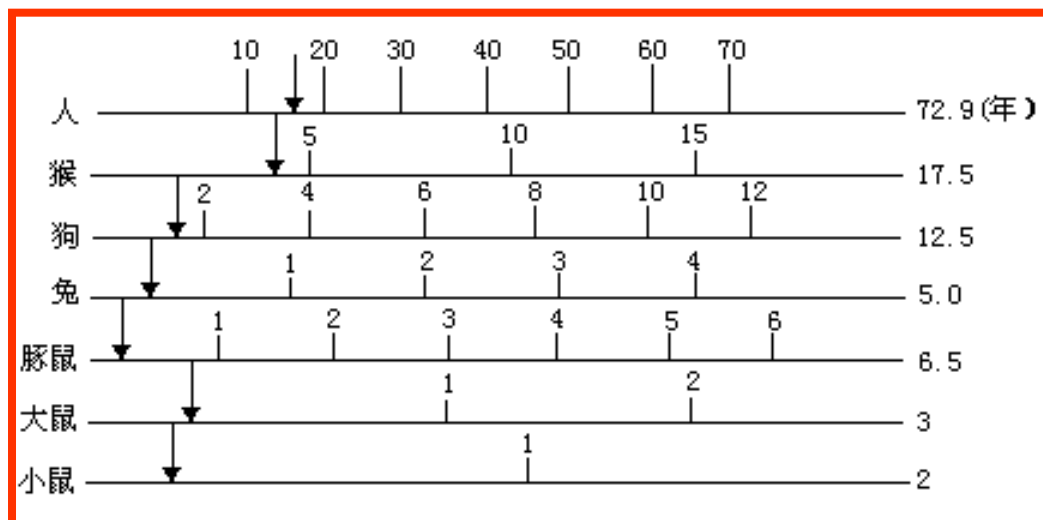
人和实验动物在解剖生理及代谢方面的比较

动 物	相 似 点	相 异 点
小 鼠	老龄肝变化	肝脏、脾脏
大 鼠	脾脏，老龄胰变化	网膜循环，心脏循环，无胆囊，肝脏，汗腺
兔	脾脏血管，脾脏，免疫，神经分布，鼓膜张肌	肝脏，汗腺，呼吸细支气管，肺
豚 鼠	脾脏、免疫	汗腺
猫	脾脏血管，蝶骨窦，表皮，锁骨，硬膜外，脂肪分布，鼓膜张肌	脾脏，对异种蛋白的反应，汗腺，喉部中隔，性索的发育，睡眠，热调节
狗	垂体血管，肾动脉，脾脏，脾脏血管，蝶骨窦，肾表血管，肝脏，表皮核酸代谢，肾上腺神经分布，精神变化	心丛，肠道循环，网膜循环，肾动脉，胰管，热调节，汗腺，膈，喉神经，睡眠，淋巴细胞显性
猪	心血管分支，红细胞成熟，视网膜血管，胃肠道，肝脏，牙齿，肾上腺，皮肤，雄性尿道	淋巴细胞显性，脾脏，肝脏，汗腺，丙种球蛋白（新生）
灵长类	脑血管，肠循环（猩猩），胎盘循环，胰管，牙齿，肾上腺，神经分布，核酸代谢，坐骨区（新世界猴），脑（大猩猩），生殖行为，胎盘，精子	止血，腹股沟，坐骨区（旧世界猴）

猴、犬、大鼠与人在药物代谢方面的相似性

动物	与人相似性			总计
	很相似	相似	有些相似	
猴	12	15	4	31
犬	6	12	14	32
大鼠	1	13	17	31

1.2 时象或年龄的相似性



1.3 群体分布的相似性

在以群体为对象的研究课题,有时要考虑到选择与人群基因型及表现型分布类型相似的动物类别。主要是一些封闭群动物,如:KM小鼠, Wistar大鼠, 毕格犬等。



人类

群体分布相似

封闭群动物



1.4 生态或健康状况的相似性

在正常生命过程的研究中，找到与人类生态情况相似的替代模型非常重要。现有的不同微生物学质量级别的普通动物、清洁动物、SPF动物、无菌及悉生动物分别代表着不同的微生态模式并具有不同特点, 适用于不同研究目的。

1.5 疾病特点的相似性

实验动物有许多自发或诱发性疾病能局部或全部地反映与人类类似的疾病过程及特点，可用于研究相关的人类疾病。

1.6 操作实感的相似性

外科手术性的操作模型中或教学示教中,常选择体型较大的动物。





2. 差异性原则

由于物种之差异，各种动物之间存在基因型、组织型、代谢型、易感性等方面的差别，这种差异有时可作为研究课题所需的一种指标或特殊条件。

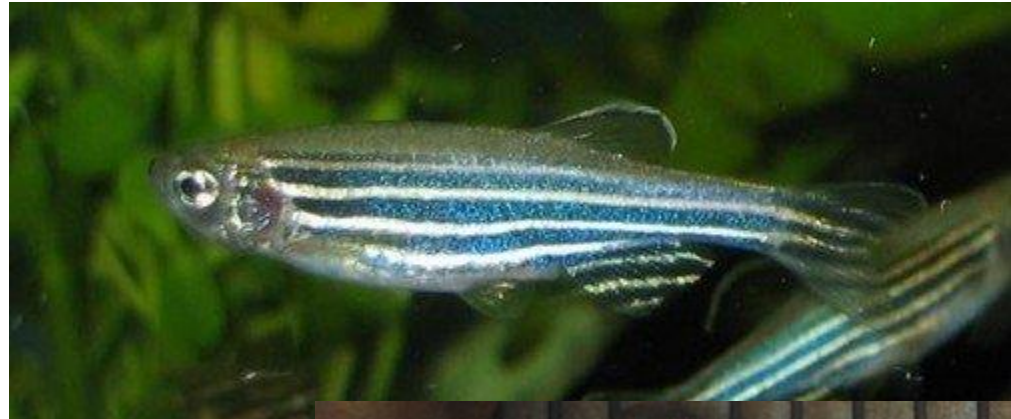
利用不同种系实验动物机体存在的特殊结构或某些反应选择解剖、生理特点符合实验目的和要求的实验动物。

不同种系实验动物对同一因素的反应有其共同的一面，也会出现特殊的反应。

不同品系动物，对同一刺激的反应差异很大，在选择时也应注意。

3. 易化原则

进化程度高或结构机能复杂的动物有时会给实验条件的控制和实验结果的获得带来难以预料的困难。应依据易化原则选择那些结构功能简单而又反映研究指标特质的动物。



4. 相容或匹配原则

- ❑ 所谓“相容”或“匹配”是指所用动物的标准化品质应与实验设计、技术条件、实验方法等条件相适应。在设计实验时不但要了解实验仪器精度和灵敏性能。了解试剂的品质、性能以及试剂和仪器之间的匹配性能，也要了解动物或动物模型对实验手段的反应能力。
- ❑ 避免应用高精仪器、试剂和低品位动物或低反应性能匹配，或用低性能测试手段与高反应性动物相匹配的不相协调的配合。

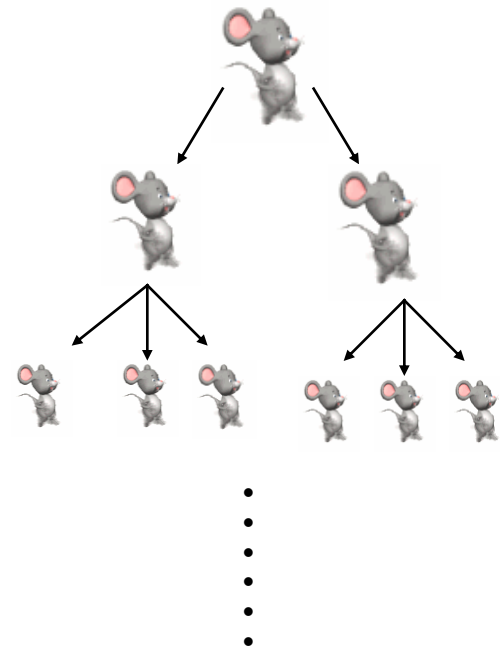


5. 易获性原则

虽然猫、狗、猪及灵长动物居于较高进化水平，各有其研究价值，尤其是灵长类动物在许多方面有不可替代的优越性。然而这些大动物则往往由于其较长生殖周期，低繁殖率或产仔率等弱点而影响其易获性，因而亦影响其被选用，故通常不作首选。

◆从1901年育成第一株近交小鼠至今，已有常用近交系小鼠260多系，近交大鼠100多系，30多系近交地鼠，还有近交系鼠和近交兔。此外，还有许多啮齿目封闭群、突变系、杂交系动物可供选择。

◆这些动物因其繁殖周期短，多胎性等特点，使其非常易获，且又是小型哺乳动物，在进化上比其他纲的脊椎动物要优越，而且有丰富而清楚的背景资料、文献索引、价低、分布又广，故为实验的良好选择。





6. 重现性、均一性原则

重现性和均一性为实验结果质量品质所在。若实验结果不能再现或不稳定，则该结果的可靠性便成了问题。

- ◆ 理论上说一定的基因型产生一定的表现型和演出型。因此，选择基因型一致或相似是保障重现性和稳定性的重要措施。一般情况下近交系动物的生物反应稳定性、实验重复性都较封闭群好。F1代杂交群在一定程度上兼有近交系和远交群的特点。
- ◆ 封闭群动物虽然能较好地代表自然群体。但群与群之间有时存在有差异。因而在重现性上都有一定问题。



7. 选用与实验要求相适应的实验动物规格

1. 年龄：实验动物的年龄不同，其生物学特性也不同。
2. 体重：实验动物的体重与年龄有一定的相关性，在正常营养状态及饲养条件下，也可根据体重加以选择，发育正常、体重符合要求的实验动物。
3. 性别：许多实验证明，同一品种（系）动物不同性别对许多外界刺激的反应不一致，对实验结果的影响不同。

一般来说，无特殊要求宜选用雌雄各半。

♂ ≠ ♀

4. 生理状态、健康状况及动物的品种品系、等级等因素。

第三节 常见医学实验中动物的选择

1. 药效学研究中的选择

1.1 临床前药物代谢动力学研究

选用成年健康的LA（大、小鼠、兔、狗、豚鼠），首选动物及其性别应尽量与药效学或毒理学研究一致。动力学参数测定首选狗、猴，可多次采样。做药物分布与排泄实验首选大鼠。





1.2 作用于神经系统的药物研究

促智药（大、小鼠）、镇静催眠药（小鼠）、镇痛药（大、小鼠），在热板法或跖刺激法试验中不用雄性。解热药首选家兔，神经节传导阻滞药（猫）。





1.3 作用于心血管系统的药物研究

降压药（狗、猫、大鼠）、降血脂药（大鼠、家兔），抗血小板聚集、抗凝血药（雄性大鼠、家兔）。

1.4 作用于呼吸系统的药物研究

镇咳药初筛首选小鼠，豚鼠适用于观察镇咳作用持续时间。支气管扩张药首选豚鼠，祛痰药一般选用雄性小鼠。

1.5 作用于消化系统的药物研究

催吐或止吐药用狗、猫，而不用兔、豚鼠、大、小鼠（无呕吐反射）。

1.6 用于泌尿系统的药物研究

利尿/抗利尿药选用雄性大鼠或狗。

1.7 作用于内分泌系统的药物研究：大鼠。



1.8 心血管系统疾病研究

- ❑ 动脉粥样硬化症研究：目前常用大鼠、兔等。
- ❑ 高血压研究：常用狗和大鼠（自发性高血压大鼠SHR、遗传性高血压大鼠GH、易卒中自发性高血压大鼠SHRSP、自发性血栓形成大鼠STR等）。
- ❑ 心肌缺血试验研究：狗、猪、兔、大鼠、猫。（冠状动脉阻塞实验）
- ❑ 心率失常试验研究：豚鼠、狗、猪、猴、兔、大鼠、猫。

1.9 内分泌和生殖系统疾病研究

- ❑ 糖尿病：大鼠、兔、狗。
- ❑ 高血糖、多尿症、酮尿症、胰岛素缺乏、高血糖素亢进：大鼠。
- ❑ 生殖生理和避孕药物：兔。



1.10 抗炎与免疫试验研究

裸鼠、SCID小鼠、CBA/N小鼠常用于免疫学研究；大鼠常用于多发性关节炎与人类风湿性关节炎；豚鼠易于致敏，对组织胺反应十分敏感，适于作过敏性实验研究和平喘药、抗组织胺药的筛选；兔常用于制备各种免疫血清的原材料，还适于发热、解热和检查致热源、筛选解热药的研究。

1.11 微循环试验研究

外周微循环实验观察常用小鼠耳廓、兔眼球结膜等；内脏微循环实验观察常用青蛙、大鼠、小鼠、豚鼠、兔、猫、狗的肠系膜、大网膜和肠壁

1.12 放射学实验研究

大鼠和小鼠造血系统损伤出现早。而不用兔（对放射线太敏感）。

1.13 休克试验研究

失血性休克（狗或山羊、猫）、感染性休克（应注意不同LA对感染的反应差异，狗对大肠杆菌内毒素很敏感，猫和啮齿类有较大耐受性）、创伤性休克（大鼠和兔）。



1.14 药物依赖性试验

对于身体依赖性试验，无论是自然戒断试验、替代试验抑或催促试验，都采用大、小鼠、猴；而诱导试验一般只选用大、小鼠，不用猴。

1.15 计划生育试验研究

筛选口服避孕药的实验动物多使用啮齿类实验动物，大鼠、小鼠等，因为它们具有规律的动情周期，排卵有明显的指标，易于检测，价格便宜。常选用成年雄性大白鼠，如观察药物对生育率的影响，精子数的影响，精子活动力的影响以及对雄性激素的影响。

1.16 老年病研究中实验动物的选择

用于老年医学研究的实验动物有小鼠、大鼠、豚鼠、兔、狗、猪、猴等，其中使用大鼠使用最多。



2. 一般药理研究：大、小鼠、猫、狗。

3. 药物安全性评价试验中LA的选择

药物安全性评价的内容是多方面的，包括急性毒性、长期毒性、生殖毒性、致突变、致癌、刺激过敏及一般药理。



3.1 急性毒性试验

通常是观察单次供给药后所产生的急性毒性反应和死亡情况，可发现该药的可能靶器官及其特异性作用。

药物的半数致死量 LD_{50} 测定常选用小鼠和大鼠，而且常用封闭群动物，如KM小鼠、Swiss小鼠、Wistar、SD 大鼠等。

若药物毒性很小，则进行最大耐受剂量试验。

3.2 长期毒性试验

是观察连续给予受试物后，由于药物蓄积而对机体产生的毒性反应及其严重程度，提供毒性反应的靶器官及其损害是否可逆等信息，确定无毒反应的剂量，为拟定人用安全剂量提供参考。

长期毒性试验常需两种以上的动物，才能比较正确地预示受试物在临床上的毒性反应，常用的一种是啮齿类大鼠，另一种是非啮齿类比格犬或非洲狒狒。



3.3 生殖毒性试验

分为一般生殖毒性试验、致畸敏感期毒性试验、围产期毒性试验等三个阶段。

在生殖毒性试验时，至少应用两种以上的动物。啮齿类可用小鼠、大鼠、仓鼠等，非啮齿类可用家兔、犬、雪貂或非人灵长类。

3.4 致突变及致癌试验

长期致癌试验（2~3年）对环境要求很高，必须在严格的SPF环境条件下进行。常用F344大鼠及Swiss小鼠，长期致癌试验必须排除一切其他的致癌因素，必须提供5年内该品系大、小鼠癌自发率的数据。

短期致癌试验常用6~8周龄小鼠。

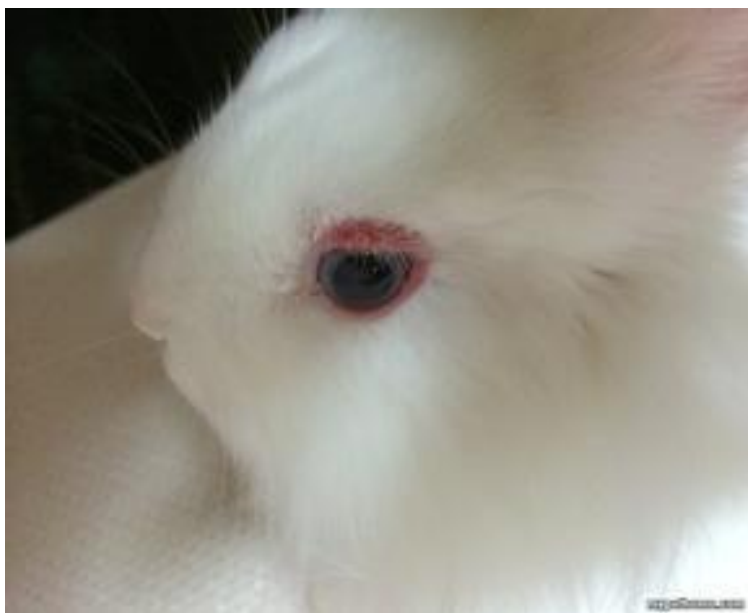
3.5 其他毒性试验

药物毒理试验的一项原则是供给药途径必须与将来的临床给药途径相一致。

- 皮肤给药，无论皮肤急性毒性实验，还是长期毒性实验，一般均选用家兔、豚鼠或大鼠，背部脱毛，占体表面积10%左右。还需要进行该药的刺激性实验（常用家兔和豚鼠）和过敏实验（首选豚鼠）。



- ❑ 栓剂，无论是直肠给药或者是阴道给药，通常选用家兔或大鼠。
- ❑ 滴鼻剂或吸入剂，参照临床给药途径，用大鼠、豚鼠和家兔进行试验
- ❑ 眼科用药的刺激试验，宜选用家兔。





第四节 动物实验设计方法

一般来说，动物实验的研究工作应该明确描述：

- 研究的目的是/或者需要验证的假说。
- 选择特定动物模型的原因。
- 动物种、品系、来源和类型。
- 每个独立实验步骤的详细描述，包括研究设计和使用动物数量。
- 数据分析所用的统计学方法。



1 动物实验的分类

1.1 确证性的实验：用一种最大可能, 正确解答问题的系统方法, 收集有关处理实施后动物反应的科学数据。

1.2 探索性的实验：为产生新的假说提供素材。

上述两类实验都涉及在实验人员的控制下, 对动物施加一定的处理或操作, 来发现是否处理在实验对象上引起一定的反应, 或者对这种反应进行定量。

1.3 检验性实验：是观察性的实验, 用于发现科研人员不能控制的变量之间的联系。这种联系可能是暂时的也可能是长期的。



2 实验设计的主要目的

- 保证所测变量的任何差异是由处理造成的，而不是其他非对照变量引起；
- 通过控制确定的变量在尽可能小的范围内，减少所测反应的变异性，这样对处理效应的评介更准确。



3 差异的分类和控制

3.1 实验者带来的差异——主要有两种：

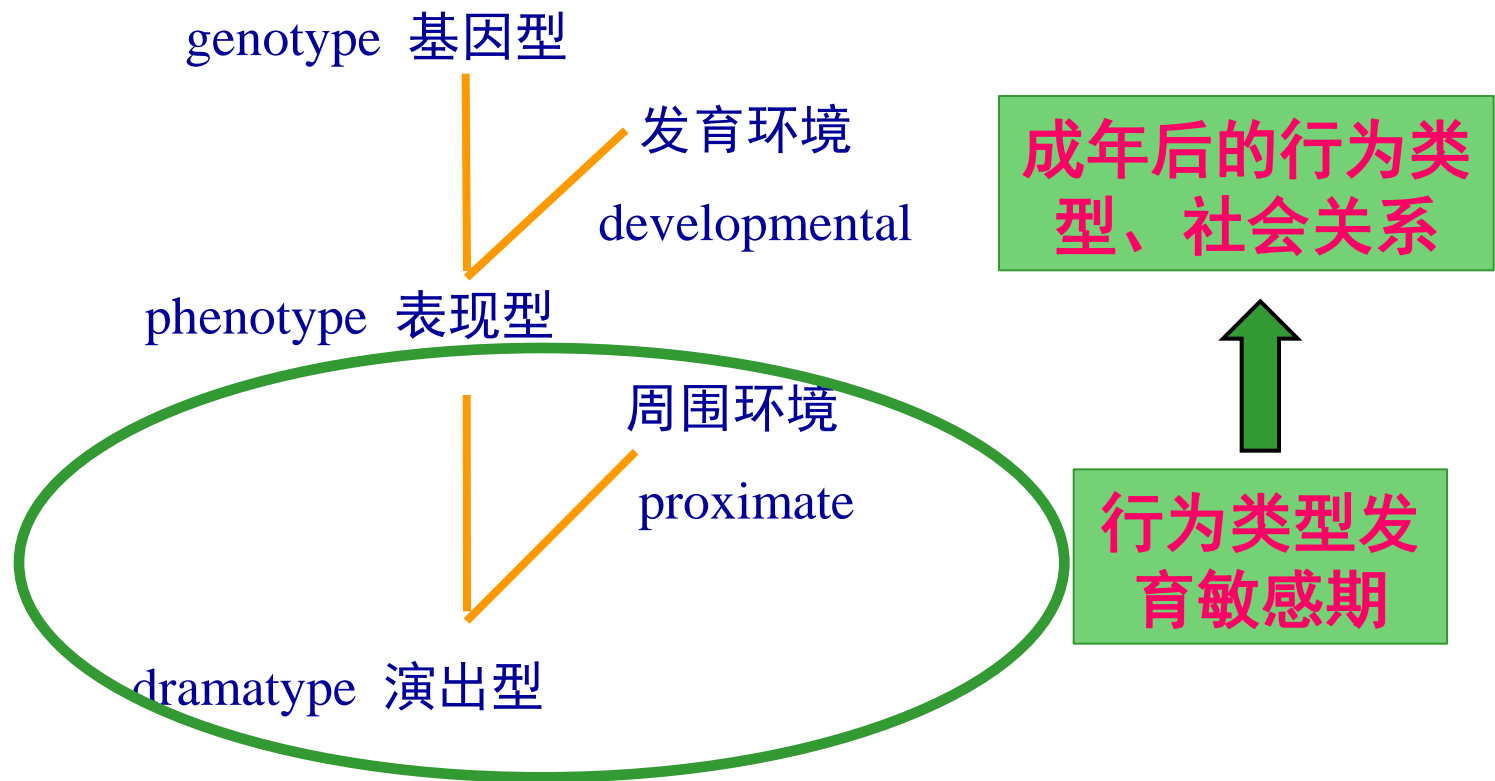
- 与正确恰当的实验操作有关，如：注射、灌胃口服、外科手术等；其控制应以确保实验过程和操作的一致性、准确性和完整性为目的。
- 缺乏准确的测量手段。如：①测量仪器本身的不准确，②观察的不准确。控制的主要方法就是对观测数据进行多次测量。



3.2 动物带来的差异

- 动物的来源的差异
- 动物饲养管理的差异
- 生活在不同的环境
- 动物之间相互作用引起的差异
- 健康状况不同

3.2.1 动物来源的差别



遗传漂变来源于不同供货商的动物存在遗传学的差异，随后由于饲养的环境方面的差异造成表型上的差异。



3.2.2 动物饲养管理的差别

动物饲养管理方面的微小变化会对动物的行为、生化和生理产生就巨大的影响。

换饲养员：小鼠繁殖性能下降

原因：影响群体视觉、嗅觉和听觉

解决方法：保证动物在新的环境和更换饲养人员的情况下
动物适应调整一周，才可开始做实验。

3.2.3 生活在不同的环境

动物对其生活的环境是敏感的，一个微小的变化都可以影响到它们的行为和生理学。例如：空间微环境。

与进风口、出风口的相对位置不同，垂直位置不同，会造成物理的、化学的和微生物组成的空间差异。



SPF级（屏障系统）小鼠饲养间及实验操作室

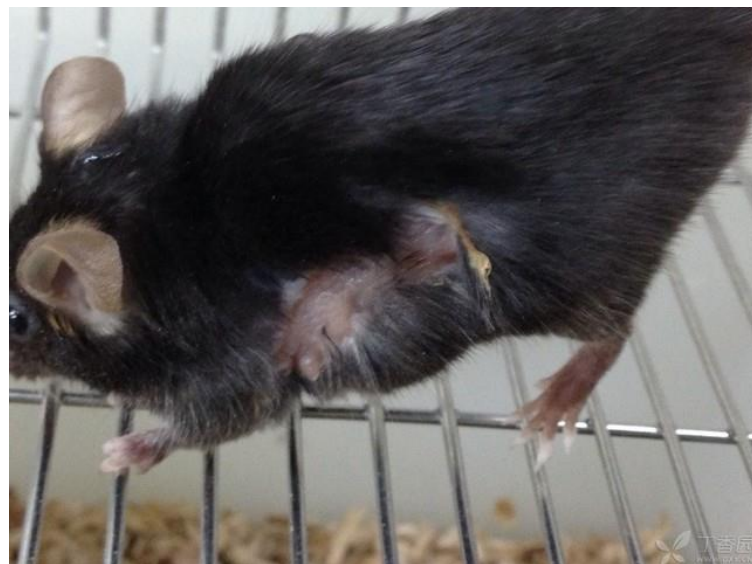
3.2.4 动物之间相互作用引起的差异

- ① 动物是群居还是独居要根据动物种属的行为学特性而定
- ② 动物社会阶层的建立，会影响到实验的数据的差异。



3.2.5 动物健康状况

- ❑ 临床疾病会引起明显的疾病症状，患病的动物是不能用来做实验的。
- ❑ 亚临床疾病不表现出疾病症状，不容易判断它是否存在。
- ❑





□主要的影响有

- ① 疾病可能影响特定的器官，抑制它们的功能，改变动物的生理和生化状态。
- ② 亚疾病从广义上讲，对动物的健康造成不利影响，使动物对研究的操作影响变得敏感。
- ③ 感染带来的更大问题是疾病的严重程度根据动物的体质而变，因此在实验的整个动物群体中差别被加大。



人员培训的重要性

- ① 了解动物饲养管理的基本知识。
- ② 规范操作减少动物紧张和痛苦水平。
- ③ 随机化的处理安排减少处理动物对随后动物处理的困难和带来实验数据差异。



4 实验设计的步骤

- 开始阶段
- 文献查阅
- 科研方法
- 陈述问题预期可能的结果
- 动物模型的确定
- 实验人员的确定



4.1 文献查阅

查阅的文献应广泛包括现在和过去的杂志以及网络上的信息资源，如，MEDLINE、TOXLINE、PUBMED、NCBI等，目的是了解清楚你所研究的焦点问题都已知道些什么，明确所用的方法、动物模型，排除不必要的重复研究。也是为IACUC审查提供项目不是重复研究、替代动物实验的方法不可行、可能引起动物疼痛的操作已得到评估认可的证据。



4.2 科研方法

- 1 观察和描述实验中的现象,
- 2 系统地提出问题的解释和学说,
- 3 利用学说预测新的观察结果,
- 4 验证学说。

4.3 问题的陈述

明确提出的问题是十分关键。提出的问题应包括实验将要说明的问题和它的意义。对每一个实验方案有两个清晰的结果（如，一个无效，一个预备假说）。无效假说明确两实验组间没有差别，预备假说表明在实验组之间有真实的差别。尽管可能随着实验的进行对这些都可能要加以修改，但明确提出问题和假说是进行实验设计下一步的基础。



例子：

- 提出问题：那种饲料引起大鼠体重增加，是饲料A还是B？
- 无效假说：各组实验预期得到同样结果，即大鼠用饲料A和B体重增加相同。
- 预备假说：实验组之间预期出现不同的结果。
- 不可检验的假说：结果不容易明确或解释。



4.4 动物模型的确定

为实验选择最适当的动物模型，有以下几点建议：

- 使用系统发育水平最低的动物，
- 使用的动物具有想要的种属或品系专一的特点或者具有特定研究目的必需的特点，
- 考虑在实验期间得到和维持动物模型所需要的花费，
- 充分查阅文献，与同一领域的同事讨论，与供应商或动物模型资源库联系确定动物模型可能的来源渠道，
- 在最终决定动物模型前征询实验动物兽医的意见。



4.5 实验合作者的确定

根据实验实施的操作，决定什么样专长的人是需要的。在开始项目前，就确定每个人的职责和进行的工作以及资格。合理地进行人员的分工安排，参与计算、实验设计和样品收集对确保所得数据的有效性是十分重要的。一般一个大型研究单位的实验动物中心设施可提供涉及本专业高技术含量的操作和昂贵装备的服务。



科学研究人员应具备的基本条件

1. 智力因素

是科技工作者进行科技创造最基本、最重要的心理因素，由观察力、记忆力、思维能力、想象力与操作力五个基本能力组成。

① 观察力：是一种有目的、有组织、主动地直觉，培养良好的观察习惯和观察类型，进行分析-综合推理

② 思维能力：积累丰富的知识与经验，建立良好的分析能力、综合能力、比较能力、抽象能力与概括能力，善于发现问题和提出问题。

③ 操作能力：操作的迅速性、准确性、协调性、灵活性。

2. 非智力因素

情绪、意志、兴趣、性格



5 正式设计阶段

- 研究方案
- 实验单元
- N因子：实验组别的动物只数
- 对照
- 随机化



5.1 研究方案

针对提出的问题、研究目标和假说，进行实验的所有操作及安排应细心地计划和记录在案。方案中应包括针对可控实验变量的实验操作、适合测定的变量参数（即得到准确测定实验变量控制的效应）、获得样品和产生实验数据的最适方法。项目的所有实物和数据收集和测定的时间安排表都应这时确定。

实际操作的讨论包括动物模型持续的时间（慢性研究），模型中预期疾病的进程（决定测定的最适时间点），人员参加项目的时间和岗位，实验花费。已知和潜在的危害因子也必须明确，最小危害因子风险适当预防措施也必须在方案中明确。所有实验操作步骤应通过SOP详细规定。



方案中还应包括**数据分析的方法**，如果组间差异是通过统计学计算而得，那么应明确所用统计学检验的方法。由数据分析对最初所提问题作出回答并接受或否决假说，由此得出结论。



5.2 实验单元

研究的实体是实验单元，可以是一个动物个体，也可以是一组动物群体。例如，当测试药物治疗和外科手术时，一个大鼠个体就是一个实验单元，当测试环境致畸时，一整窝大鼠就是一个实验单元。



5.3 实验组别的动物只数

将适当数量的动物分配到每一个实验组别，是实验设计的一个重要环节。为了得到统计学意义的结果，每一实验组的动物数量一般是通过预期各组间结果差异的可能程度采用特定统计学检验而决定的。一个标准笼所能容纳动物的数量也是实验组动物数量确定的实际考虑的因素。



5.3.1 样本大小的确定

□ 小规模预实验

确定是否能在不同的实验条件下对研究的变量以足够的精度测得变量值，同时检查所要进行实验的必备条件。

目的：

- ◆ 是使用数量少的动物得到预示性的数据，
- ◆ 通过预实验将操作和使用的技术固定完善，
- ◆ 预实验的数据是申请资助项目方案中证明其合理性的重要依据，增加中标的机会。
- ◆ 估计变量参数测定的误差，为计算样本量提供依据。



□ 预期目标成功率低的实验

通过基因插入到受精卵或ES细胞制作转基因动物，需要大量的动物。假定所有步骤的成功率都是5%，那么用单组实验的公式 $N = \log \beta / \log p$ ，计算可得要用50只动物，如果成功率为1%，将需要300只动物，制作一个转基因动物系。

□ 验证假说的实验

一般来说，有三种类型的变量可以测定1) 二分变量，一般表现为是/否结果的百分率，如，在某给定时间疾病或生存的发生，2) 连续变量，如某一物质在体液中的浓度或生理功能如血流速度或排尿，3) 一个事件发生的时刻，如疾病或死亡发生的时刻。变量数据之间的显著性差异现在有许多统计学方法来检测。



5.3.2 如何确定最少样本数

□ 一般估测的样本数

小动物(大鼠、小鼠、蛙、鱼) 每组10~30例, 计量资料每组不少于10例, 计数资料每组不少于30例;

中等动物(豚鼠、家兔) 每组8~20例, 计量资料每组不少于8例, 计数资料每组不少于20例;

大动物(犬、猫、猪、羊等) 每组6~20例, 计量资料每组不少于6例, 计数资料每组不少于20例。

□ 按统计学方法测算的样本数 ——计算公式:

根据已经确定的检验水准和提出所期望的检验效能及实验设计等相关因素套用相应的公式即可获得。

详见倪宗瓚主编《医学统计学》(高等教育出版社) P110

□ 网站

www.biomath.info

www.lal.org.uk/hbook14.htm



例：两均数比较时的样本含量估计(两组相等)

$$N = \left[\frac{2(u_{\alpha} + u_{\beta})\sigma}{\delta} \right]^2$$

α : I 类误差, 常取0.05

β : II 类误差, 常取0.20, 0.10

$1 - \beta$: 把握度

σ : 标准差, 个体变异

δ : 两个总体的差值(专业认可)

第五节 动物实验记录的规范要求

实验数据的来源、记录

动物实验统计表
(数据、标本等)

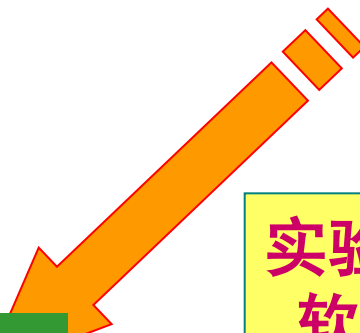
化验报告

日常工作记录



实验数据

及时、直接、
准确、清楚、
不易消除



实验数据储存

实验专用记录本
软盘和光盘等



一、实验记录的主要内容

□项目（课题）名称

□实验目的

□实验设计原理

□研究方法

□实验日期

□实验条件

□实验材料

□实验过程

□实验结果

□实验讨论

□参考文献

□记录者签名



二、实验记录的书写和保存

- 书写规范，字迹工整；
- 不得随意删除、修改或增减数据；
- 打印的图标和数据资料等按顺序粘贴，并标明实验日期；
- 实验记录及时、真实、准确、完整的进行记录，以防漏记；
- 实验记录应保存完整；
- 每项研究应使用一本专用的实验记录本；
- 课题研究结束后，原始记录归档，实验者不得擅自带走，但实验研究人员可复印记录。



三、实验准备过程的记录

- 实验动物的种属、品系、微生物控制级别、来源及合格证号；
- 实验用菌种、瘤株、传代细胞系及其来源；
- 实验原材料的特性、来源、生产单位；
- 实验仪器设备名称、型号；
- 主要试剂的名称、生产厂家、规格、批号和有效日期；
- 自制试剂应标明配制方法、配制时间和保存条件；
- 实验材料裱花应加以说明；
- 参与人签名。



四、其 他

- 动物设施和实验室运转的记录
- 实验操作的记录
- 仪器操作的记录



第六节 动物实验报告或论文的写作方法

一. 1 动物实验报告的基本格式与要求

动物实验报告是对实验目的、内容、方法及实验结果的描述，是对实验的总结、评价材料。动物实验报告一般包括实验名称、实验目的、实验器材、实验步骤、实验结果和实验结论等。



1.1 实验名称：能够明确表达实验的内容，使人一看就能明确实验内容。

1.2 实验目的：实验目的要直截了当地说明为什么要作此实验，解决什么问题，具有什么意义。

1.3 实验器材：对实验用的所有仪器、材料的种类、名称、型号、规格、数量等介绍清楚。

1.4 实验步骤：一般按实验时间顺序，说明实验的操作过程，是实验技术问题最集中的部分。可用序号列出每一步操作，也可作操作流程图，总之，实验步骤应表达详细，使他人能按表达重复实验过程。



1.5 实验结果：实验结果是在实验过程产生的现象和数据的原始记录的基础上，经过科学加工而成的资料。在实验结束后，应对原始资料进行认真核对，系统分析，对数据进行科学的处理，形成的结果，正式写进实验报告中。

1.6 实验结论：实验结论是是根据实验过程观察到的现象和测得的数据等感性材料进行理论上的分析、推理而产生的理性认识的客观表述。实验结论不是实验结果的简单重复。如果实验结果不能说明问题，就不能勉强下结论。



2 动物实验论文的撰写及注意事项

涉及动物实验的论文撰写，除了要按照其他实验性研究论文撰写的要求外，还有一定的特定要求。主要表现在对实验动物和动物实验方面的描述，描述是否规范一定程度上影响论文的质量。

实验动物和动物实验描述的主要内容包括：

- 动物种系名称、背景资料、动物规格，以及饲养条件和某些处理方式。
- 背景资料中应包括动物来源、遗传学分类及微生物质量合格证号和饲养环境合格证号。



2.1 实验动物名称：论文中应准确、规范描述实验动物的品种或品系名称，避免使用通俗称谓，如SD大鼠不能写成SD大白鼠，更不能简写成大白鼠，KM小鼠不能写俗称小白鼠。

2.2 动物背景资料：动物从何获得，属于遗传学分类（近交系、远交系、突变系、封闭群、杂交群）中的哪一类，属于微生物分级（普通级、清洁级、SPF级、无菌级中的哪一级，必须在论文中描述清楚。有时，报告中还要叙述所用动物的合格证号及颁发合格证的单位。

2.3 动物规格：论文中应准确描述实验所用动物的数量、性别、体重、年龄等。



2.4 动物实验条件：论文中应对动物饲养方式（如饲料种类、营养成分、饲喂方式、饮水方式、饲养密度、笼具及垫料种类）实验观察环境（如温度、湿度、照度、噪音、环境洁净度、通风换气方式等）动物饲养环境的级别，以及相应级别的实验条件使用合格证号及颁布单位，作出尽可能的描述。

2.5 动物实验的某些处理方式：使用麻醉剂的种类、剂量与方法，动物的处死方法等均应注明。

胡黄连素硝酮对大鼠急性肺损伤的保护作用及机制研究

万赛男¹, 江晓间¹, 卢肖宇¹, 蒋杰¹, 王玉强¹, 于沛¹, 任俊兰², 徐立朋¹

(1. 暨南大学药学院新药研究所, 广东 广州 510632; 2. 广东华南新药创制中心, 广东 广州 510663)

中国图书分类号: R-332; R284.1; R329.24; R563.053.1

文献标识码: A 文章编号: 1001-1978(2011)02-0243-05

摘要:目的 探讨胡黄连素硝酮衍生物(AN-4)在保护叔丁基过氧化氢诱导的 RAW 264.7 细胞中的抗氧化作用及对脂多糖(LPS)诱导的大鼠急性肺损伤的保护作用。方法 MTT 法测定 AN-4 对叔丁基过氧化氢(*t*-BHP)诱导的 RAW 264.7 细胞损伤的保护作用。活性氧(ROS)敏感的荧光探针 2',7'-二氢二氯荧光素(DCFH-DA, $20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)标记细胞,激光共聚焦显微镜下观察活性氧强弱。Western blot 法检测 NADPH 氧化酶亚基 gp91^{phox}表达。通过气管内滴注 LPS 建立大鼠急性肺损伤模型,胡黄连素(apocynin)及 AN-4 治疗两周,HE 染色病理切片观察 LPS 诱导的急性肺损伤模型大鼠的肺组织切片,检测肺组织中总超氧化物歧化酶(SOD)活性变化。结果 AN-4 在 1 和 $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时可明显保护 *t*-BHP 诱导的细胞损伤,且在 $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时作用效果最明显。AN-4 呈剂量依赖性地减少 *t*-BHP 诱导 RAW 264.7 细胞中 ROS 的产生,下调 NADPH 氧化酶亚基 gp91^{phox} 的表达,病理切片显示 AN-4 给药两周对 LPS 诱导的大鼠急性肺损伤有明显的治疗作用并能提高肺组织中 SOD 的活性。结论 胡黄连素硝酮衍生物通过下调 NADPH 氧化酶亚基 gp91^{phox} 和清除细胞内 ROS 保护 RAW 264.7 细胞的氧化损伤,并且能明显改善 LPS 诱导的大鼠急性肺损伤,是治疗急性肺损伤潜在的药物。

态,被认为在 ALI 的发生发展中具有重要作用^[4]。Apo 作为一种抗氧化剂可以清除自由基,重建体内氧化和抗氧化的平衡,起到治疗 ALI 的作用。已有研究表明^[5],胡黄连素主要是通过抑制 NADPH 氧化酶活性来发挥药理作用。Apo 通过下调 NADPH 氧化酶亚基表达,从而抑制 ROS 的产生,达到减少超氧阴离子对肺组织损伤的目的。有文献报道^[6] NADPH 氧化酶在高氧所致的急性肺损伤中起着关键作用。另外也有研究证明^[6] Apo 能够抑制中性粒细胞 NADPH 氧化酶的活性,防止 ROS 的产生,对肺缺血/再灌注损伤有一定的保护作用。

近期研究表明 Apo 在心脑血管系统疾病、呼吸系统系统疾病、软骨组织病变和癌症等方面有潜在的治疗作用,关于 Apo 的结构修饰研究和结构-活性关系研究却鲜有报道。选择目前已知有效的 ROS 清除剂,作为辅助官能团与 Apo 形成轭合物,我们合成了胡黄连素新型硝酮类衍生物,深入研究 AN-4 在抗氧化损伤等方面是否比原化合物具有更好的效果。本研究通过观察胡黄连素及其硝酮衍生物对叔丁基过氧化氢诱导小鼠巨噬细胞 RAW 264.7 损伤的保护作用、细胞内 ROS 的变化和 NAD-

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞株 RAW 264.7 细胞株购于中山大学细胞库。

1.1.2 动物 SPF 级 δ SD 大鼠, 40 只, 体质量 (200 ± 20) g, 购自广东省动物中心。

1.1.3 药品和试剂 胡黄连素, 纯度 $\geq 98\%$, 购自浙江省台州市东东医药化工有限公司, 胡黄连素硝酮衍生物, 由本研究所合成, 经 HPLC 检测, 纯度 $\geq 98\%$; 用 DMSO 溶解受试药物, 加无血清培养基配制, $0.22 \mu\text{m}$ 过滤器过滤除菌, 使用时用无血清培养基稀释至应用浓度 (DMSO 终浓度 $\leq 1\%$); RIPA 裂解自美国 Sigma 公司; Purified Mouse Anti-gp91^{phox} 购自美国 BD Biosciences 公司, Actin 鼠单克隆抗体购自美国 NeoMarkers 公司; PVDF 膜购自 PALL 公司; ECL 发光试剂盒购自美国 Pierce 公司。

1.1.4 主要仪器设备 CO_2 培养箱 (REVCO, USA); 酶标仪 (Bio-RAD680, USA); 激光共聚焦显微镜 (Carl Zeiss 510 META DUO SCAN, Germany); 美

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养 RAW 264.7 细胞培养于含 10% 胎牛血清且含有青霉素 $1 \times 10^5 \text{ U} \cdot \text{L}^{-1}$ 和链霉素 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 DMEM 高糖培养基中, 置于 37°C , $5\% \text{ CO}_2$ 培养箱中培养, 细胞生长至对数生长期用 0.25% 胰酶消化。

1.2.2 动物分组及模型制备 实验动物适应环境后, 分别于 d 1 和 d 16, 气管内滴注 LPS ($1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) 建立大鼠急性肺损伤模型, 假手术 (Sham) 组滴注等量生理盐水, 将所有大鼠分为 4 组: 假手术组、LPS 组、Apo ($3 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) + LPS 组及 AN-1 ($5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) + LPS 组。于 d 2 ~ 15, Sham 组与 LPS 组大鼠分别灌胃 1 ml 的生理盐水。在 Apo ($3 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) + LPS 组, 灌胃等体积 Apo ($3 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$); AN-1 ($5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) + LPS 组, 灌胃等体积 AN-1 ($5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)。所有的实验指标测定均在 d 17 进行^[9]。

1.2.3 MTT 法检测 AN-1 对 *t*-BHP 诱导 RAW 264.7 细胞损伤的保护作用 取对数生长期的 RAW 264.7 制备成细胞悬液, 以 1×10^4 个/ $100 \mu\text{l}$ 的密度接种于 96 孔板中, 生长 24 h 后, 除正常组 (Control) 和模型组 (*t*-BHP) 外, 分别用不同浓度 Apo (0.1 、 1 和 $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)、AN-1 (0.1 、 1 和 $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 预处理 1 h 后, 除正常组其余组加入 $200 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ *t*-BHP 诱导 24 h, 之后每孔加入终浓度为 $0.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 MTT 溶液孵育 4 h, 加入 $150 \mu\text{l}$ DMSO 待紫色结晶充分溶解, 用酶标仪在 570 nm 吸收光波长处检测吸光度值, 分析各组细胞生长的情况。细胞相对存活率/ $\% = (\text{实验组吸光度值} / \text{正常})$

1.3 统计学分析 实验结果数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 统计学分析采用 SPSS 17.0 软件处理系统进行, 均数比较采用单因素方差分析 (One-way ANOVA) 方法中的 LSD 检验, 组间比较采用 *t* 检验。



谢谢!