



# 实验前实验动物的准备

尹海林 Hailin Yin

Laboratory Animal Center of Sichuan  
University



# 动物实验的定义和目的

动物实验是科学研究中给予动物某种实验处理，然后观察动物的反应，发现其规律性变化，并将结果推论应用到人或其它动物的过程。

- 动物实验的目的
  - 1、实验：验证假说
  - 2、试验：未知性质的检查
  - 3、教育：知识和技术的传授
  - 4、取材：取得产品的原料

# 动物实验的要求

科学性要求（重复性）

伦理性要求（动物福利、**3R**原则）

安全性要求（生物安全和职业卫生）

经济性要求（性价比）

# 动物实验的过程

- 设计阶段（文献-动物或动物模型-实验方案）
- 准备阶段（动物订购-运输回实验室-实验处理）
- 实施阶段（实验处理-测量动物反应-数据采集）
- 总结分析阶段（数据分析-找出规律-得出结论）

# 准备动物阶段存在哪些问题？

## 对照镜子找问题

### 1. 科学性要求的镜子

将非目的变量减到最小、将个体差异降到最低，是提高实验重复性的关键。

### 2. 伦理性要求的镜子

将动物应激和疼痛反应降到最小，遵守3R原则。

# 什么非目的变量影响结果并带来动物福利的问题?

应激(stress) 和应激引起的问题即使发生在实验之前也对实验结果的科学性产生负面的影响并引起福利的问题。

**应激的定义：**动物在面对对其体内生理平衡状态造成威胁的因素时，表现出的生物学反应 (Carstens and Moberg 2000,p. 65). 这种反应包括生理学和行为学的改变，它是一种先天性的适应机制。当这种机制失灵时，动物就会处于一种具有明显生理和行为临床症状的痛苦状态。

- 在整个实验期间动物经历的所有事件都会或多或少引起动物不同程度的应激反应，包括：产子、断奶、运输、饲养操作、环境改变、实验操作等

- 将应激降到最小，提高动物适应应激因素的能力，都可以减少动物发生痛苦的可能性，是提高动物福利和实验结果科学性的保证。

- 实验者在实验前细心规范地准备动物就是将应激降到最低的一条路径。
- 准备动物一般包括动物入场检疫、动物适应环境、动物状态稳定，有些特定模型动物或特定目标的实验还包括外科手术、疾病诱发、训练动物适应实验装备。

- 许多研究已经证明实验前的众多因素会影响动物的生理和行为学指标（包括：behavioral tests, hematology and serum chemistries, and even morphology）。如运输、群居或独居、每笼动物只数、环境丰富物和饲养及实验操作等。有些时候这些影响大部分不会产生临床上可见的后果，不会引起重视，但对实验结果的影响是确实确实存在的。

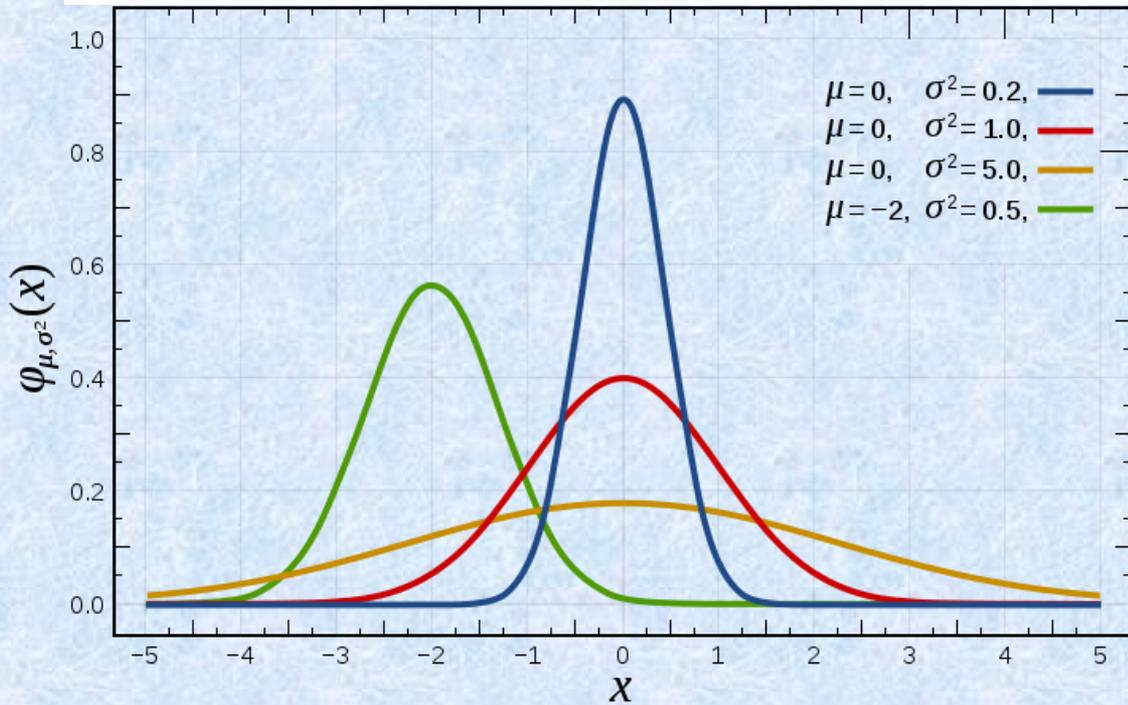
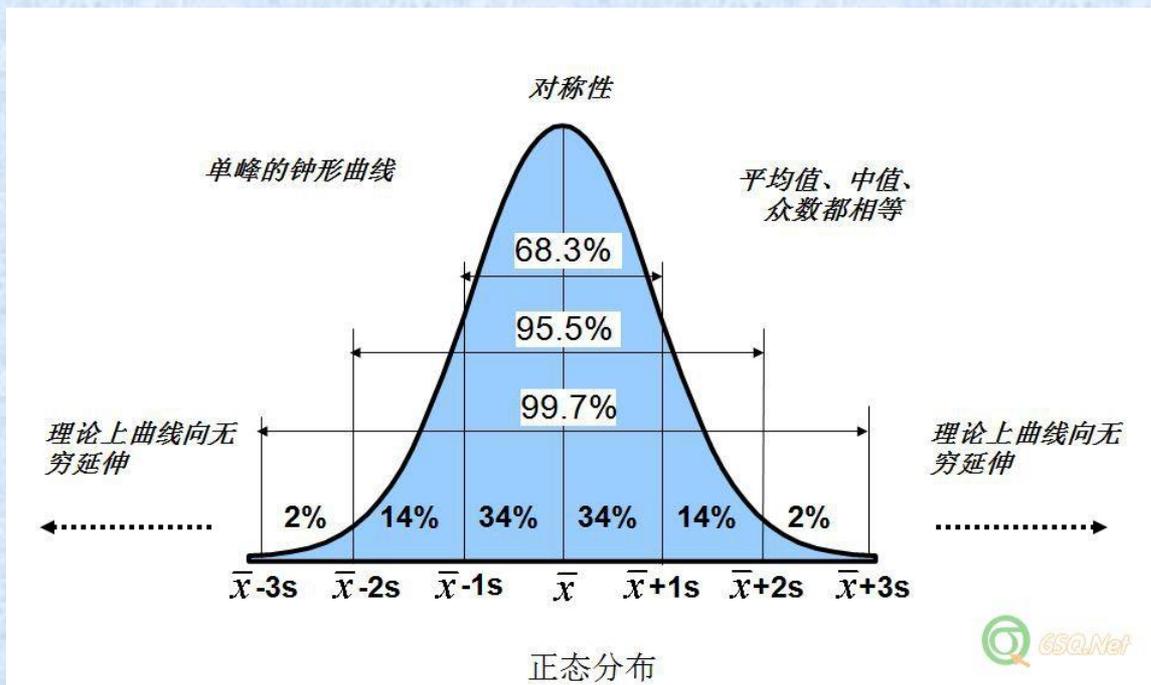
**Table 1 Factors to consider for evaluation of shipping or transportation stress**

Shipping/transportation stressors	References
Total time out of home cage environment	Landi, Kerider et al. 1982
Time in transit	Aguila et al. 1988; Landi et al. 1982; van Ruiven et al. 1998
Mode of transport	Aguila et al. 1988; Landi et al. 1982; van Ruiven et al. 1998
Exposure to temperature extremes	Baer 1971; Hirvonen et al. 1978; Oratz et al. 1967; Trapani 1966
Light/dark cycle (changes, duration, phase shift)	Mrosofsky and Salmon 1987; van Ruiven et al. 1998; Winfree 1987
Available food and water	Landi et al. 1982
Short duration transport (e.g., animal facility to laboratory)	Drozdowicz et al. 1990; Tuli et al. 1995

**Table 2 Factors to consider for evaluation of stress related to novelty of housing environment**

Housing environment stressors	References
Caging type	Gordon 2004; Kuhnen 1999;Tuli et al. 1995; Whary etal. 1993
Bedding type	Gordon 2004; Kuhnen 1999; Tuli et al. 1995
Animal density in cage	Baer 1971; Everett 1984;Plaut and Friedman 1982;Strange et al. 2000; Tuli etal. 1995; Whary et al. 1993
Change in personnel handling animals	Tuli et al. 1995
Temperature	Everett 1984
Light/dark cycle (intensity, duration)	Bellhorn 1980; Furudate etal. 2005; Mrosovsky and Salmon 1987; van Ruiven et al. 1998; Winfree 1987
Noise	Nayfield and Besch 1981
Water treatment Fidler Diet	1977; Hall et al. 1980; Everett 1984; Tou et al. 2004

- 因此建立实验前对这些指标的监测措施，制定适当的基准值评价这种影响，看来是有必要的。同样在实验分组时考虑设置适当的有着同样经历的对照组动物，对消除非实验性的变量，更精确地分析解释实验数据，也是有必要的。



# 如何准备动物？

- 动物到实验室之前要了解 and 准备

- 1、动物的健康信息、微生物和寄生虫监测和处理的历史数据

为保证实验室已有动物的健康，降低生物安全的风险，设计检疫方案时，必须了解动物提供方的相关信息，包括：近期动物微生物检测报告（判断哪些病原体或条件治病微生物可能存在），是否近期发生过污染和疾病流行事件。

# 如何准备动物？

## 2、经技术操作的过程、后续需要的处理和护理以及动物特殊状态

如果是模型动物，还要包括详细的造模操作过程，操作时间，并发症，是否需要后续的术后护理（如缝合线或缝合钉的拆除、咬合不齐需要修牙），怀孕动物分娩日期等，以此准备相应的条件。

# 如何准备动物？

## 3、 在生产设施的环境控制和饲养管理规范

为了让动物尽快适应新的环境，还还要了解生产单位设施的环境条件，如光照参数、所用垫料类型、饲料、饮水、群养、环境丰富物以及饲养管理方面的信息。

# 如何准备动物？

## 4、在动物到达之前应备好模型需要的特殊饲料或药物

有些动物模型需要特殊的饲料或者需要一定的药物维持，应该提前订购好足够量的这些物品，在动物到达之前就准备好。比如，一些诱发性的转基因模型，其饲料里面需要加入特定的药物，如多四环素（doxycycline）或他莫昔芬（tamoxifen）以保证基因的开关处在“on”/“off”正确状态；无齿表型的动物需要粉状或液态状的饲料，糖尿病的动物需要胰岛素。

# 如何准备动物？

- 动物的运输

动物的运输起始于动物离开生产设施的笼盒，结束于在实验设施的拆包装后，放入新的笼盒内。

在安排动物运输时，充分考虑可能发生的动物应激，生物安全的风险，以及动物临床状况，动物模型的敏感性。

# 如何准备动物？

## 1.动物运输引起的应激

小鼠在运输到达后**48**小时，血浆中肾上腺酮仍处于较高水平，免疫功能、血凝反应、血小板成型也是在动物到达后**48**小时恢复到正常。通过监测肾上腺酮水平，饲料和饮水消耗量，和其它表现，发现大鼠在运输**24**小时后，才开始降低血浆中肾上腺酮水平，血糖、游离脂肪酸、血尿素氮伴随总胆固醇上升，所有指标运输后**3**天才恢复到正常值，并保持稳定。

# 如何准备动物？

## 2.动物运输后的适应和稳定

运输过程引起动物应激反应可以导致动物生理学的改变，因此给与动物48-72小时的时间让其各种指标恢复到正常值的范围是非常有价值的程序和规范。为动物稳定，在动物实验操作实施前，建立2-3天动物适应环境的操作指南并规范进行是非常重要的。

# 如何准备动物？

## 3.动物运输方式的选择

动物应激的程度和运输时间的长短有关。运输方式的选择考虑减少应激的同时还要考虑减少动物污染的机会。

比起陆运，空运所花费的时间都较短，可以有效地缩短应激事件发生的时间。另外专用的运输车可以降低感染的风险，但运输时间较长。必须权衡应激发生和生物安全风险以及动物模型特殊需要等因素，综合考虑制定动物运输的方案。

# 如何准备动物？

## 4.动物运输天气的选择

对大多数种类的动物，运输沿途极端的温度是我们需要考虑极力避免的事情。

大鼠在极端低温下，甲状腺激素和盐皮质激素分泌增加，对某些药理学试剂的敏感性，如异丙肾上腺素。兔、豚鼠和小鼠在极端低温下，抗体产量会下降，抗体衰退增加。豚鼠在4°C下很短时间的暴露，就会导致胃粘膜损伤，组胺和5羟色胺细胞储备的损耗，在给与利血平和普萘洛尔注射时，其生存时间缩短。极端高温情况下，兔的采食量下降，体重下降，血清蛋白代谢下降（白蛋白、纤维蛋白原）。

# 如何准备动物？

## 5. 国际间和跨越时区的运输要延长动物的适应期

国际运输一般动物要 跨过几个时区，那么它对明暗交替的光周期的适应出现问题。地鼠经历8个小时的时区变化，需要1周时间才能适应调整到新的光周期，小鼠则需要两周。  
*(Mrosovsky and Salmon 1987; Winfree 1987) (van Ruiven et al. 1998).*

# 如何准备动物？

## 6.短途运输同样不能忽略应激的问题

Tuli 等(1995) 检测BALB/c小鼠由房间之间的搬运前后血浆肾上腺酮水平和行为学指标。结果搬运后血浆肾上腺酮水平直接升高 24小时后 才恢复到正常值。攀爬和抚养行为次数增加，梳理时间减少。这些行为的变化在搬动的第二天非常明显，在第四天还没完全恢复正常。

# 如何准备动物？

## 总结：

动物运输的情形下，动物应激的主要因素是运输时间和运输条件。每种运输工具都带来一系列新的不稳定的环境条件(e.g., light, temperature, pressure, vibration, noise, presence of other animals). 在动物运输中每一个步骤每一种因素产生的应激反应我们无法定量，但为研究准备动物时必须考虑这些因素的影响，特别制定动物适应和稳定期的SOP规范，以减轻这些不利的效应。建议一般啮齿类动物最短的适应期为2-3天。

# 如何准备动物？

- 动物到达和接收

1. 检查包装是否有破损

如果动物在运输过程中暴露于外界环境，那么动物进入设施和检疫的程序都应该有所调整。包装的损坏应该记录在案，如果供货单位有赔款和退还动物的担保，就以文书或照片的方式通知供货单位。

# 如何准备动物？

## 2.拆包装

动物运输包装的拆包，其操作应该按照SOP中规定进行。拆包装的操作有一个重要的规定，就是对包装进行一种恰当的消毒处理，防止健康状况不同动物之间的交叉污染。

# 如何准备动物？

## 3.核对检查

对照订货单检查动物的数量、性别、年龄、体重、品系/品种。  
尤其注意检查：

- 饲料和饮水在运输笼中的状况。
- 动物是否可以自由采食和饮水？饲料和饮水消耗了多少？
- 在动物到达时有没有任何异常的临床症状？根据情况，安排诊断后的治疗或再次检查。如果动物在接收时处于严重的痛苦状态，应该进行安乐死，尸体大体解剖和组织病理学检查。

# 如何准备动物？

## 4.接收后最初两三天的观察

通过监测动物适应性行为反应来准确判断动物对新环境是否已经适应，动物接收后最初**24-48**小时内的高频次的观察非常重要。比如，水的消耗量的监测可以对动物饮水量是否发生变化和稳定做出判断，尤其在水的处理程序发生变化或给水装置发生变化的情况下尤其重要。另外，观察动物是否具有异常的临床症状，对评价运输、转运、改变笼盒动物密度等的影响也很重要。

# 如何准备动物？

- 动物检疫

检疫的目的是对新来动物进行健康的监测。许多单位为新进动物制定了严格的健康监测程序和需要排除的病原体的清单。这种标准化的操作是总体性的，有时候位于不同地点设施之间甚至同一设施里不同区域之间，根据具体的情况可能有些小的不同。由于引入动物健康的状况与实验要求存在差异，研究者应该理解检疫是标准化的一部分，实验动物工作者在动物到达初期的一些处理，恰恰是为了不耽误后续的研究工作。

# 如何准备动物？

## 1. 检疫期长短

检疫期的长短和简易程序所涉及的程度和范围根据动物的来源和动物来源的可信度不同而有所不同。当制定检疫的指标时，应着重考虑运输的情况、病毒和细菌的潜伏期、哨兵动物暴露时间的长短和直接检测到达动物的时间比较、健康的历史数据。需要明确的是关于收到动物的健康检测文件都是回顾性的，并不完全表明当下的动物健康状况。每个动物的临床状况以及在运输中可能发生的感染常常是未知的。一般来讲大小鼠检疫期1周。

# 如何准备动物？

## 2. 荷瘤鼠的检疫

对于肿瘤移植鼠的检疫需附加考虑由移植的肿瘤细胞带来污染的可能性，比如，病毒和支原体。订购动物时索要肿瘤细胞或其它生物试剂病毒筛查的报告是需要的。如果这种筛查提供方没有做，那么考虑对这些动物延长检疫期，或饲养在隔离密闭的区域，直到检测表明动物对设施不构成生物威胁为止。

# 如何准备动物？

## 3. 检疫区域避免交叉污染

当多批动物需要同时检疫的时候，检疫的空间不够，需要在同一个房间进行，这时互相交叉污染的可能性增加。建议这种检疫室内采用IVC或微型隔离器饲养设备，并按避免交叉污染的饲养技术操作。

# 如何准备动物？

## 4.和动物提供者共享检疫信息

如果检疫期间发现了动物供应商提供的健康报告中未提及的病原体，应该及时将结果反馈给供货商的质量检测负责人和兽医。如果供货商发现动物生产群体中出现病原感染，也应立即通知最近购买动物的各个单位。

# 如何准备动物？

## 5. 检疫期间对寄生虫的检测和预防

许多研究单位为了防治体外和体内寄生虫，把对外来的动物进行预防性的药物处理的措施，作为检疫程序中的内容。如将芬苯达唑加在饲料里面来预防治疗大鼠和小鼠体内的蛲虫，将敌敌畏加在啮齿类动物的垫料中来防治螨虫。最好在药物防治前做以下检测。

# 如何准备动物？

## 6. 基因工程动物的检疫

转基因动物是目前在国内外实验室之间频繁流动，这种趋势还在向上发展。大量的基因工程动物经过更加严格的检疫程序，甚至越来越多的研究单位，不管动物健康的状况如何，要求基因工程动物达到实验室，进入设施之前必须经过胚胎移植重新建群。所以在这种方案中，就包括含了冷冻胚胎的技术，冷冻胚胎运输程序，冷冻精子和卵巢的技术。

# 如何准备动物？

- 动物适应和稳定

动物生产繁育单位和动物实验单位在动物饲养环境和饲养管理操作方面都会有不小的区别，这是动物到达实验单位后产生应激反应的重要原因。一个动物对新环境的稳定，对新操作的适应是研究方案中将动物准备到最佳状态必须考虑的。适应和稳定在动物被接收以后就开始了，要根据动物适应环境的机制来进行饲养管理，让它们尽快适应新的环境和操作。

# 如何准备动物？

- 动物适应和稳定

1. 引起动物应激的是突然的改变

研究表明动物在运输后放到不同类型的笼具中饲料和饮水消耗量要受到影响，必须3-5天后才能恢复到正常。环境和饲养管理的差别可以加大个体的差异从而影响实验的数据，例如，在饲料中植物雌激素的存在会引起啮齿类动物繁殖周期的很大改变，也是一个外生性的应激因子；大鼠和地鼠的体温维持受笼盒结构（实底和网底）、垫料类型的影响；动物不断地适应周围环境的变化过程会影响毒理学和感染性疾病的研究结果。

# 如何准备动物？

- 动物适应和稳定

- 2. 做好环境监控和记录

环境的监测和记录对于避免应激同样重要，哪些未检测到的，由于机械故障暂时性的环境失控，都是重点监测记录的对象。例如，光照时间的延长会导致发情周期的紊乱(Furudate et al. 2005)、白内障(Bellhorn 1980),和视网膜的光毒性退化(Bellhorn 1980)，在大鼠这种变化少至4天就会发生。所以环境的监控包括故障性的发现和记录，对于回顾性的检查出现非研究期望结果的数据非常重要。

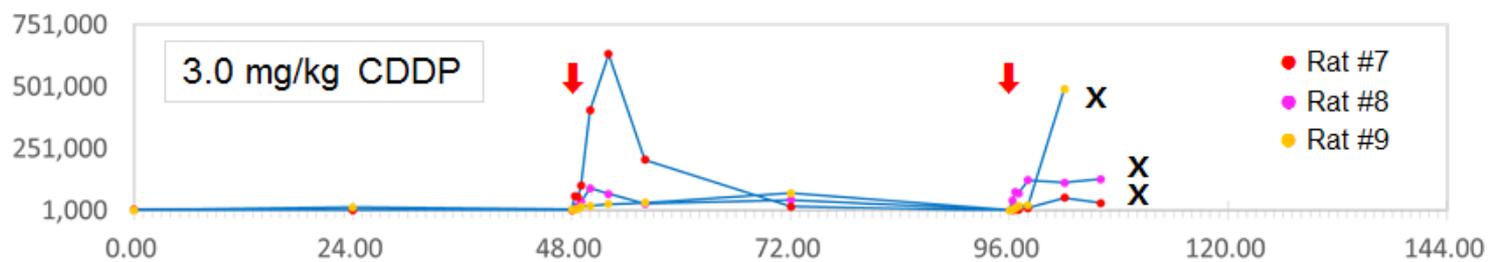
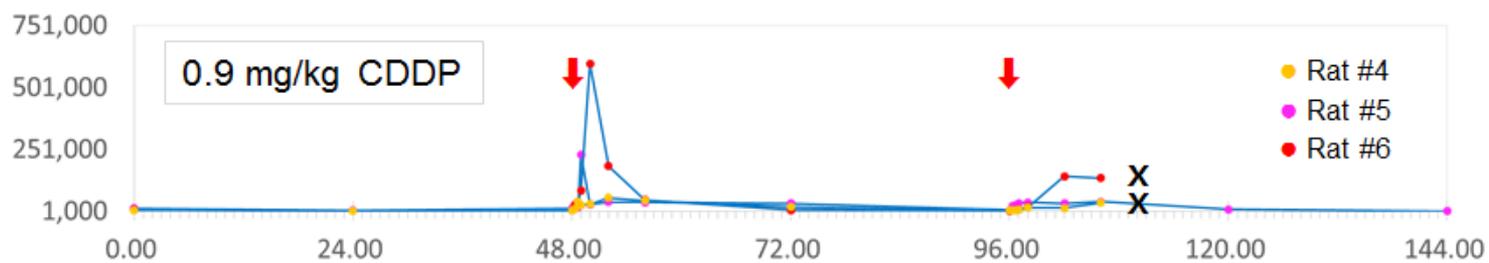
# 如何准备动物？

- 动物适应和稳定

- 3.对实验操作的适应性训练

运输后的动物对新生活环境适应，为研究提供了状态稳定的动物。但是，适应后的动物仍然面临其它的应激因子，那就是动物从来没有经历设备器材的处理和实验的操作，如手固定、给药、禁锢。

Plasma miR-122 Concentration (copies/ul)



Time (hour)

●●●: Blood Drawing Point.    ↓ : Drug Injection.    X: Dead.

# 如何准备动物？

- 动物适应和稳定

## 4.特殊的适应性

饲料的特殊类型、特殊成分、和特殊形状（如，颗粒状和粉状，脆的和硬的）可能会导致动物饲养管理过程中附加技术的使用。比如，常吃粉状饲料，液态饲料，或软饲料的啮齿类动物，应该给予磨牙的技术处理。另外，高脂饲料（如，动脉粥样硬化造模）会导致动物皮毛变得油腻外伤不容易愈合，高盐的饲料（高血压造模）会导致动物饮水量增加，需要经常更换水瓶。

# 如何准备动物？

- 动物适应和稳定

## 5.总结

在实验过程中动物要经历很多，这些经历有些和实验操作有关，有些和环境有关，理想的状况是，动物在进入实验时都应该对将要经历的事件有所适应。另外我们还要清楚的是动物适应的能力和种、发育阶段、品系品种以及性别有关。通过让动物适应和稳定的过程可以将应激对实验结果的影响降到最小。

# 如何准备动物？

- 动物适应和稳定

## 5.总结

基于一些相关共性的指标研究，大多数情况下，啮齿类的动物最少需要3天或3次的适应期可达到适应和稳定的状态。但是，一些特定的研究所涉及的动物操作复杂、器官系统或生理指标敏感可能需要延长适应期。

# 如何准备动物？

- 动物适应和稳定

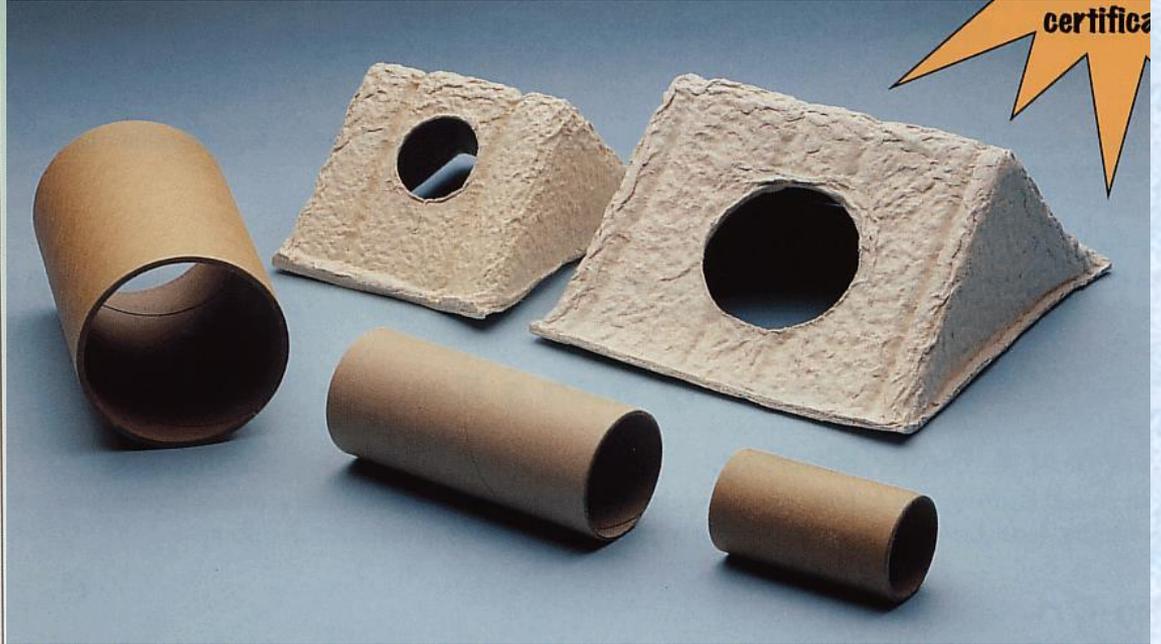
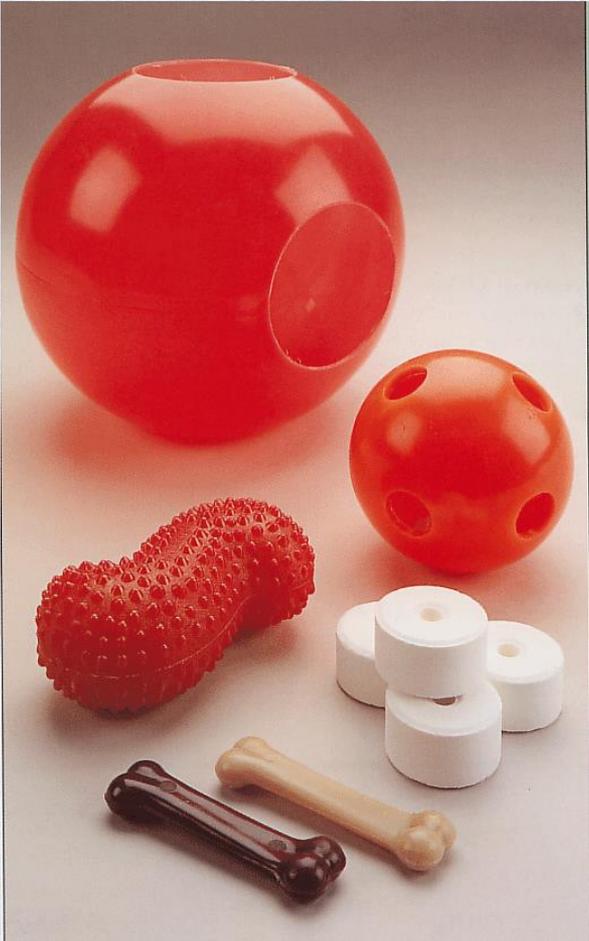
## 5.总结

用没有经过适应和稳定的动物进行实验操作对实验数据的质量影响是相当大的。通过增加动物数量和样本量来弥补个体差异的增加，提高实验数据统计学分析和处理的正确性，有时候也是于事无补的。

# 环境丰富物和动物应激

- 指南中的提法

在《Guide for the Care and Use of Laboratory Animals 》一书中，“动物的环境控制和饲养的目标之一是让动物最大地表现种属专一的行为，最小地表现应激诱发的行为。” ” (NRC 1996, p. 22) 环境丰富（Environmental enrichment）是一种将玩具情结和群居鼓舞结合起来的一种手段(Rosenzweig et al. 1978). 这种方案可能会遇到来自科学家的一些阻力，因为他们想让非实验变量的影响降到最低。但是应激一般都和限制动物表达种属专一行为的能力有关。而应激对动物福利和实验结果的影响是有害的，必须加以考虑。



# 环境丰富物和动物应激

- 实际实践

通过神经解剖和功能性学习和记忆(Wurbel 2001)、行为学(Wolfer et al. 2004)、应激方面的研究(Sharp et al. 2002), 许多文章已经发表了环境效应对动物表达种属专一行为能力的影响。

# 环境丰富物和动物应激

- 实际实践

Mering 和同事(2001) 发现，大鼠的一些生理学指标（如，肾上腺重量、肩甲棕色脂肪组织、附睾脂肪组织）在是否给予咀嚼方块、实底和网底笼具、不同群居密度之间明显不同。作者认为，这些指标的差异大小各个实验都不一样，其原因是环境效应不一样造成的。而Similarly, Knight (2001)认为实施良好的环境丰富的策略可以减小动物个体的差异性。

# 环境丰富物和动物应激

- 实际实践

所以在使用环境丰富的策略时，要权衡地考虑这种策略的使用对实验结果的影响，以及对提高动物表达专一种属行为福利的影响(Bayne 2005)。许多文献已经报道了环境丰富在肿瘤生长、神经生理学、神经解剖学、行为学、学习测试等领域动物实验中的应用，可以参考。例如，群居居住条件和好奇应激都会影响小鼠肿瘤生长速率的差异性 (Kerr et al. 1999)。

# 环境丰富物和动物应激

- 实际实践

环境丰富的措施在一些特定的研究中效果非常明显。在小鼠 Morris 水迷宫试验中，环境丰富（分层笼具、跑步轮、塑料和木头玩具）过的三体雌性 Ts65Dn 小鼠和二倍体雌鼠空间记忆能力得到改善，而对照的二倍体雄鼠没有影响，三体 Ts65Dn 雄鼠反而能力退化 (MartinezCue et al. 2002)。品系之间也有区别的一个例子是，在孔板测试中，经丰富的小鼠（纸盒、塑料管道、软纸和毛线做窝材料）比起一般垫料笼盒饲养的 C57BL/6JlcoU 雄鼠反应性和警觉性提高，露头次数增加，而用雄性的 BALB/cAnCrRyCpbRivU 做同样的实验，其表现出焦虑的水平增加。

# 动物群居

- 动物的群居要求要得到满足

大小鼠长期独居是一种应激，采食量会减少、体重增加减慢、肾上腺重量减小、白细胞减少、嗜酸粒细胞减少、脾脏重量减少、肝脏增大。当放在群居笼盒旁时，行为出现异常兴奋，攻击性增加。另外，雄性交配行为下降，雌性哺乳行为下降。在特定的实验中独居的大小鼠，环境丰富的措施可以改善由此引起的应激。

# 动物群居

- 动物的群居模式要固定

比起单独居住和成对居住，SD大鼠4只一个笼盒的群居，动物对饲养管理操作和实验操作表现出较弱和较短的应激反应（心率和血压增加）。尽管群居可以为研究提供更加稳定的动物，但社会阶层的原因会导致低层雄鼠睾丸重量减少、肾上腺皮质机能提高、脾脏重量增加。动物密度的改变会导致应激产生，需要额外的适应期的安排。

# 了解动物行为学特征

将环境应激、饲养操作和实验操作的应激降到最小，建议多去观察一下**该种**动物的典型行为学特征。对动物正常行为的了解是实验过程环境控制和采用环境丰富措施决定的基础。  
**“An environment that is maladaptive for one species or strain of animal may not be for another” .**

# 了解动物行为学特征

## 1.大小鼠Mice and Rats

啮齿类的动物一般都是群居性的，但有些品系侵略性很强，并和性别和年龄有关。正常小鼠的行为通常包括刨挖、咬嚼、好奇探索、领域气味标识、攀爬、做窝筑巢、觅食、梳理清洗。大鼠和小鼠类似，只是筑巢的倾向弱一些。

## 2.豚鼠Guinea pigs

和大小鼠不一样，豚鼠一般没有两只后退站立的姿势，也不筑巢，攀爬能力很差。豚鼠非常需要群居、温顺、怕惊吓。和其它啮齿类一样喜好被触摸。

# 了解动物行为学特征

## 3.地鼠Hamsters.

地鼠比起其它啮齿类动物群居要求较低，打架斗殴倾向，有机会就刨挖，筑巢倾向。

## 4.兔Rabbits

兔群居要求倾向，但雄性之间侵略性强，觅食、运动以及喜好在抬升的平台休息。



Thank you!

