



发表文献中小鼠安死术方法的分析研究(2015—2016)

岳东旭¹, 池宏伟¹, 鹿双双¹, 王昕昉¹, 孙德明², 刘晓宇^{1*}, 卢选成^{1*}

(1. 中国疾病预防控制中心, 北京 102206; 2. 国家卫生计生委科学技术研究所, 北京 100081)

【摘要】 目的 了解国内小鼠处死方法使用的情况,为实验动物管理部门掌握“安死术”在国内执行情况、制定政策提供参考和依据。方法 万方数据库中检索2015年至2016年间正文中含有检索词“小鼠”和“处死”的文献,对符合纳入条件的文章进行统计分析。结果 890篇文献符合纳入标准,其中明确提出小鼠处死方法的有351篇,仅占39.44%。处死方法涉及颈椎脱臼、断头、麻醉后放血取材、过量麻醉剂、腹主动脉放血和二氧化碳窒息六种,其中颈椎脱臼法使用率最高,占75.78%。结论 目前小鼠“安死术”实施状况不容乐观,且小鼠处死方法在论文撰写中被忽视,且其描述存在不规范现象。促进“安死术”相关法规标准的切实执行,还需加强相关技术的研究和人员的培训。

【关键词】 小鼠;安死术;麻醉

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2017)11-0091-04

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2017.11.019

Analysis of current status of mouse euthanasia methods based on the publications in China(2015 - 2016)

YUE Dong-xu¹, CHI Hong-wei¹, LU Shuang-shuang¹, WANG Xin-fang¹,
SUN De-ming², LIU Xiao-yu^{1*}, LU Xuan-cheng^{1*}

(1. Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 102206, China;

2. Institute of Science and Technology, National Health and Family Planning Commission of P. R. C., Beijing 100081)

【Abstract】 Objective To investigate the current status of mouse euthanasia methods in China, and to provide the reference and basis for the administrative authorities of laboratory animal management to master the implementation of “euthanasia” and formulate related policies. **Methods** Research papers containing the terms of “mouse” and “execution” in Chinese characters during the period from 2015 to 2016 were searched in Wanfang database, and statistical analysis was performed with the articles meeting the searching criteria. **Results** A total of 890 research articles met the searching criteria, of which 351 articles clearly described the killing method, accounting for only 39.44%. The mouse-killing methods included cervical dislocation, decapitation, exsanguination and sampling after anesthesia, excessive anesthesia, abdominal aorta bleeding and carbon dioxide asphyxiation, among them cervical dislocation accounted for the highest rate, 75.78%. **Conclusions** The current implementation of mouse euthanasia methods in our country has been far from optimistic. The mouse euthanasia methods have often been ignored in scientific articles and the description of the methods is not standardized. In order to promote the effective implementation of the regulations related to mouse euthanasia, it is needed to promote the study of related techniques and to strengthen personnel training.

【Key words】 Mice; Euthanasia; Anesthesia

[基金项目] 中国疾病预防控制中心青年科研基金(编号: 2016A106)。

[作者简介] 岳东旭(1988 -), 女, 研究方向: 实验动物科学。E-mail: yuedx@chinacdc.cn

[通讯作者] 刘晓宇(1979 -), 女, 副研究员, 研究方向: 实验动物科学。E-mail: liuxyl@chinacdc.cn; 卢选成(1977 -), 男, 副研究员, 研究方向: 生物安全, 实验动物科学。E-mail: luxch@chinacdc.cn * 共同通讯

随着社会文明的进步和实验动物科学的发展,实验动物安乐死问题受到越来越广泛的关注。安乐死(euthanasia)词源于古希腊语,eu意思是好的,thanatos意思是死亡,是指公众认可的、以人道主义的方法处死实验动物的过程,即采用一种降低或消除痛苦和焦虑的方法来结束单个动物的生命,好的死亡相当于仁慈地结束动物生命。

我国现有法规标准将“安乐死”称为“安死术”,2006年科技部发布的《关于善待实验动物的指导性意见》中就提出处死动物需使用安死术^[1]。《实验动物机构质量和能力的通用要求》(GB/T 27416-2014)对安死术提出具体要求^[2]。我国孙嘉康等2007年做过调查,90.0%受调查人认为有必要对实验动物实施安乐死,但仅有不到8%的人熟知安死术技术,一些国际上禁止的方法也被误认为是安死术^[3]。鉴于法规标准要求与实际工作,实验人员主观上的意愿与客观上的技能之间的差距,本研究期望通过对2015—2016年万方数据库收录的文献做一研究,了解目前我国动物实验实际开展过程中小鼠处死常用方法,掌握“安死术”执行状况。

1 方法

在万方数据库中,以“小鼠”和“处死”为检索词,检索2015年至2016年间正文中含有检索词的文献。按照纳入条件,筛选符合要求的文献。纳入条件为:论文涉及的研究开展了小鼠实验,并对小鼠进行了处死操作。本研究针对小鼠处死方法、处死时是否麻醉等内容对纳入文献进行了整理,并对处死方法和麻醉情况做了进一步统计分析,统计分析采用Excel 2013软件。

2 结果

2.1 检索结果

按照方法中描述的检索策略,检索到1044篇文

献,其中154篇未获得全文,符合纳入标准的文献为890篇。

2.2 处死方法

890篇文献中有353篇提到小鼠处死方法,其中2篇文献对处死方法描述不准确无法辨别处死的方法,分别为“气管窒息法处死”和“窒息法处死”。

明确写出处死方法的文献有351篇,占所有文献的39.44%(351/890),涉及颈椎脱臼、断头、麻醉下放血取材、过量麻醉剂、腹主动脉放血和二氧化碳窒息共六种方法(见表1)。其中使用比例最高的是颈椎脱臼处死,占75.78%。文中描述颈椎脱臼处死方法的术语有背椎脱臼、背椎断裂法、断脊髓处死、断椎法处死、引颈处死和脱颈活杀。

采用过量麻醉剂方法的占4.27%,提到所用麻醉剂的仅有8篇,占53.33%(8/15),使用的麻醉剂有戊巴比妥钠(3篇)、乙醚(2篇)、苯巴比妥钠(1篇)、三溴乙醇(1篇)和水合氯醛(1篇)。

2.3 处死时麻醉方法的使用

断头处死使用麻醉的有6篇,占断头处死的15%(6/40),用的麻醉剂有乙醚、水合氯醛和戊巴比妥钠。腹主动脉放血处死使用麻醉的有1篇,占33.33%(1/3),使用的麻醉剂为氯胺酮和赛拉嗪混合剂。颈椎脱臼法使用麻醉的有14篇,占5.26%(14/266),使用的麻醉剂有乙醚、盐酸氯胺酮、戊巴比妥钠和水合氯醛。

3 讨论

实验动物福利是实验动物科学的重要组成部分,实施安乐死是实验动物福利的重要内容之一。如前所述,我国也已对实验动物安乐死提出明确要求。本研究结果显示,实验动物安乐死在实施层面还存在欠缺,现就调查中发现的问题进行讨论并提出相应建议。

表1 小鼠处死方法统计

Tab.1 Statistical analysis of mouse-killing methods described in the literature

方法 Methods	数量 Quantities	所占百分比/% Percentage
颈椎脱臼 Cervical dislocation	266	75.78
断头 Decapitation	40	11.40
麻醉后放血取材 Exsanguination and sampling after anesthesia	25	7.12
过量麻醉 Excessive anesthesia	15	4.27
腹主动脉放血 Abdominal aorta bleeding	3	0.85
二氧化碳窒息 Carbon dioxide asphyxiation	2	0.57
总计 Total	351	

3.1 安死术在论文撰写和发表层面被忽视

本研究纳入的 890 篇文献中仅有 2 篇文章提到“安死术”和“安乐死”,占 0.22% (2/890); 仅有 39.44% 的文章明确提到小鼠处死方法。提到处死方法的文献对小鼠处死方法的描述也不够严谨,如窒息法处死、引颈处死、脱颈活杀等。麻醉剂种类对过量麻醉处死小鼠技术是核心内容,但提到麻醉剂种类的只占 53.33%。作者认为各学术杂志应通过加强论文发表环节福利伦理要求,以规范动物实验论文撰写,进而促进我国科学安乐死在实际工作的实施。

3.2 颈椎脱臼和断头是使用率较高的两种方法

这两种方法都属于物理方法,当有动物体重限制并且由有经验和操作熟练的人实施时使用物理方法是人道的^[4]。欧盟指令 2010/63/EU 提出,在无其他方法的前提下可接受断头处死啮齿类动物^[5]。美国兽医协会(American Veterinary Medical Association, AVMA) 指南指出“颈椎脱臼和断头”一定条件下对大鼠(体重 < 200 g)和小鼠是可以接受的。所指条件集中在操作层面,包括(1) 人员需经过培训;(2) 由技术熟练和过关的人员实施;(3) 相关设备(主要针对断头法)必须合适^[6]。英国《动物法案》要求颈椎脱臼处死前,需进行镇静或麻醉^[7]。颈椎脱臼法的缺点为不是每次操作都会使动物迅速死亡,有时动物会恢复呼吸/意识,还存在意识和感觉,而这正是动物痛苦的根源。Carbone 等的研究,使用三种造成颈椎脱臼的方法即(1) 操作者一手固定尾部,另一手按住动物颈部做扭转动作;(2) 用止血钳辅助;(3) 胸椎部脱臼(实施颈椎脱臼时可能发生这种意外情况),结果显示成功率最高的第一种方法,尚有 10% (2/22) 的动物在实施颈椎脱臼后持续呼吸 180 s 以上^[8]。综上所述,颈椎脱臼方法处死小鼠是可以的,但操作者技能必须合格,实施后必须确认动物的死亡。

3.3 使用过量麻醉剂进行安乐死

调查中使用较多的戊巴比妥钠和苯巴比妥钠属于巴比妥类药物。该类药物抑制呼吸中枢,过量深度麻醉可导致窒息并伴有心脏骤停,能使动物安静死去,产生的不适感轻。腹腔注射戊巴比妥钠会因腹膜刺激反应而引起疼痛,故由技术熟练的人员静脉注射效果该类药物效果最好。三溴乙醇属于醇类物质,通过抑制神经系统和呼吸系统引起麻醉和缺氧,最终导致死亡。三溴乙醇可用于小鼠安乐

死,但如用于更大动物安乐死,所需用量过大、不易实现。水合氯醛通过抑制呼吸中枢进而血氧不足而引起死亡,动物会伴有喘息、肌肉痉挛并发出声音。因其不良反应严重,美国 AVMA 不推荐用于安乐死药物。乙醚具有刺激性、易燃易爆的特性,也不推荐用于安乐死。使用该方法安乐死时需强调的是:针对不同物种,选用合适的麻醉剂、剂量浓度和给药途径。

3.4 动物实验中存在动物麻醉后进行解剖取材的情况

动物由于失去组织、脏器或大量失血而死亡

实验期间需密切观察动物反应,确保动物在手术中濒死期免遭痛苦:(1) 确保动物进入深度麻醉后再进行操作;(2) 操作者技术标准熟练;(3) 手术前制定麻醉方案,避免术中动物遭受更多的痛苦;(4) 观察动物的状态,避免动物有知觉时进行手术。

3.5 二氧化碳窒息法

尽管此次调查仅有 2 篇文章使用该方法处死小鼠,但鉴于二氧化碳窒息法处死动物的效率高,操作者的心理负担较小,近年来有大量介绍和推荐使用二氧化碳窒息法,现实中二氧化碳窒息法的使用也有扩大的趋势。但新研究表明,啮齿类动物对二氧化碳有明显的厌恶感,高于一定浓度的二氧化碳会造成动物的疼痛^[6]。国际实验动物福利权威组织也认同这一看法,故要求执行二氧化碳窒息法,须严格控制气体浓度升高的速率。AVMA 要求二氧化碳置换率为每分钟 10% ~ 30% 容器体积^[6],以保证在引起疼痛之前,动物已失去意识。而目前市面部分二氧化碳窒息机不能精确控制进气量,一些自制仪器也存在这一问题。故作者建议,应严格选用可控制气体流速的二氧化碳窒息设备实施安乐死,条件不满足时不应使用。

3.6 实验动物安死术对实验人员心理健康的影响

对实验动物实施科学而严谨的安乐死,也是对实验人员的一种保护,特别是心理上的。当某些工作人员要较高频率地处死动物或作为旁观人员面临处死动物的场景时,经常会产生消极、厌恶情绪,影响心理健康。而当采用认可的安乐死方法处死动物时,能显著降低这种消极、负面的心理影响。

3.7 小结

综上所述,简单评价某种处死方法是否为安死术是困难的,也是不科学的。选择适合的安死术需从动物种类、动物遭受的疼痛和痛苦、人员安全性、成功率、药物获得方式、对操作者情绪影响等多方

面考虑。实际工作中,选择适合的安死术还需由兽医结合现实情况从专业角度做出判断^[9]。选定方法后,由掌握技术要点、操作熟练的人员实施安死术也至关重要^[10],包括动物的抓取与保定、静脉穿刺、麻醉剂剂量以及二氧化碳流速、安乐死箱的用法等。故全面提高我国实验动物福利,真正仁慈地结束实验动物的生命,制定政策法规仅为第一步,还需要加强相关技术的研究和培训,让实验人员切实掌握安死术。

参考文献:

- [1] 国科发财字 [2006] 398 号,关于善待实验动物的指导性意见.
- [2] 中华人民共和国国家标准. 实验动物机构 质量和能力的通用要求[S]. GB/T 27416.2-2014.
- [3] 孙嘉康,钱鑫,慎慧,等. 浅谈我国实验动物安乐死的实施[G]. 第六届生命科学研究与实验动物替代法国际大会(北京卫星会议)暨第三届北京实验动物科学国际论坛论文集编. 北京:中国实验动物学会,2008:12-15.
- [4] Hawkins P, Prescott MJ, Carbone L, et al. A good death?

Report of the Second Newcastle Meeting on Laboratory Animal Euthanasia[J]. *Animals (Basel)*, 2016, 6(9): 50-78.

- [5] European Commission. Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council of 22 September 2010 on the Protection of Animals Used for Scientific Purposes. Available online: <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2010:276:0033:0079:en:PDF> (accessed on December 2015).
- [6] AVMA Guidelines for the Euthanasia of Animals: 2013 Edition. American Veterinary Medical Association: 26.
- [7] Animals (Scientific Procedures) Act 1986 Amendment Regulations. 2012.
- [8] Carbone L, Carbone ET, Yi EM, et al. Assessing cervical dislocation as a humane euthanasia method in mice [J]. *J Am Assoc Lab Anim Sci*, 2012, 51(3): 352-356.
- [9] 刘云波. 实验动物安乐死若干问题 [J]. *中国比较医学杂志*, 2008, 18(2): 76-78.
- [10] 朱玉峰,王元占,杨培梁,等. 浅谈实验动物安乐死 [J]. *中国医学伦理学*, 2011, 24(2): 260-261, 264.

(收稿日期)2017-04-26

(上接第 90 页)

类健康和教学科研做出了巨大的贡献,每个实验人员在医学研究中都应做到尊重生命,科学、合理、人道地使用实验动物。

4.4.2 取得的成效及启示

设立实验动物纪念碑,举行实验动物墓碑献花仪式等活动,使得尊重生命、关爱动物的观念得到广泛认可,同时也为推动实验动物福利工作的开展创造了一个良好的氛围。实验动物为人类的利益付出了生命,而人类也应该在这些动物的生命周期内给予其最基本的尊重与关爱。实验动物纪念碑的树立一方面在纪念它们,另一方面也在警示我们实验人员自己,应该尽最大可能关爱实验动物,善待动物。

综上所述,在医院环境下,医学研究离不开实验动物,每一个科研人员都应该具有保障实验动物福利的意识,了解实验动物福利的真正含义,知晓保护实验动物福利的各项措施,熟悉实验动物学的相关知识,熟练掌握动物实验各项操作技能,负责任、合乎道德地使用动物,确保实验动物在实验过程中享有合理的福利,这是每个动物实验人员都应遵循的根本原则。

(致谢:本文系江苏省实验动物质量检测二站

刘年双老师校对指导,在此致谢!)

参考文献:

- [1] 梅志强,王琼,邓莉. 动物福利在研究生实验动物学教学中的应用初探 [J]. *中国比较医学杂志*, 2012, 22(3): 76-78.
- [2] 王建飞,周艳,刘吉宏,等译. 实验动物饲养管理和使用指南 [M]. 上海:上海科学技术出版社,2012:5-6.
- [3] 杨国斌. 生物医学研究中如何应对动物实验伦理学挑战 [J]. *实验动物科学*, 2010, 27(3): 29-31.
- [4] Huber-Buchholz MM, Carey DG, Norman RJ. Restoration of reproductive potential by lifestyle modification in obese polycystic ovary syndrome: role of insulin sensitivity and luteinizing hormone [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 1999, 84(4): 1470-1474.
- [5] Paoletti AM, Cagnacci A, Orrù M, et al. Treatment with flutamide improves hyperinsulinemia in women with idiopathic hirsutism [J]. *Fertil Steril*, 1999, 72(3): 448-453.
- [6] 孔琪,赵永坤. 中国实验动物环境丰富化发展现状 [J]. *中国比较医学杂志*, 2015, 25(8): 79-82.
- [7] Baumans V. Science-based assessment of animal welfare: laboratory animals [J]. *Rev Sci Tech*, 2005, 24(2): 503-513.

(收稿日期)2017-03-30