



大、小鼠 CO₂ 安乐死方法研究

何嘉玲 王天奇 张长勇 暴 国 李 楠 孙德明

(国家卫生健康委科学技术研究所, 北京 100081)

摘要:大鼠和小鼠是目前运用最广、使用量最大的哺乳类实验动物,其安乐死方法一直备受关注。二氧化碳安乐死方法具有使用简便,危害小,低成本的优点。为了使二氧化碳安乐死的实施更加符合实验动物福利伦理的要求,应用该技术应该充分考虑实验动物的压力、疼痛等反应。鉴于此,本文综述了动物吸入二氧化碳实施安乐死的评价体系,二氧化碳与其他麻醉剂的联合使用情况以及大小鼠二氧化碳安乐死的具体实施方法及注意事项等,以期为推动该方法的实施提供有用的技术借鉴。

关键词:安乐死,二氧化碳,大鼠,小鼠

中图分类号: R-052 **文献标识码:** A **文章编号:** 1006-6179(2019)05-0081-04

DOI: 10.3969/j.issn.1006-6179.2019.05.016

据小鼠处死方法的文献统计,在我国颈椎脱臼法和断头法使用率最高,但这两种物理方法对操作者的专业技术要求较高。如操作不熟练将使动物遭受不必要的痛苦,不符合实验动物福利伦理的要求。其次是使用麻醉剂,但麻醉剂存在无法大量使用和较大副作用和安全隐患等问题。近年来国际上有大量报道使用吸入 CO₂ 实施安乐死的文章,但在我国应用 CO₂ 实施安乐死的研究报道较少。

“安乐死”(euthanasia)一词源自希腊语,‘eu’意思是“好的”,‘thanatos’意思是“死亡”,即最小疼痛和痛苦的死亡。依据动物福利和动物保护的原则,实验者应在适当的时机采取适当的方法对动物施行安乐死。在广泛阅读国内外 CO₂ 吸入安乐死文献的基础上,本文将就大小鼠吸入 CO₂ 实施安乐死的应用细节,包括评价体系,具体实施方法、注意事项以及仍需要研究的问题作一综述,为 CO₂ 在安乐死中的应用提供借鉴。

1 安乐死方法使用的原则

施行安乐死要求在动物的抓取和处死全过程中将动物的疼痛和痛苦降到最低,并尽量减少动物丧

失意识(LOC)前的痛苦^[1]。实施安乐死应考虑以下几个要素:①导致意识丧失的同时尽量减少动物的痛苦;②导致意识丧失所需要的时间;③可靠性;④不可逆性;⑤可操作性和人员的安全性;⑥与实验目的相适应的可兼容性;⑦对观察者和操作者情绪的影响;⑧进一步评价、检查及使用动物组织的兼容性;⑨药物的可用性和人员滥用的可能性;⑩符合实验要求的经济性。此外,安乐死的实施必须遵循实验动物福利伦理的相关标准和要求^[2]。

2 吸入 CO₂ 在大小鼠安乐死中的应用

吸入 CO₂ 可引起呼吸性酸中毒并通过降低细胞内 pH 产生可逆麻醉状态,可靠而迅速地导致意识丧失。操作过程不需要高度专业化的设备,对人员要求不高且安全危害小。其尸体残留物不会或很少对后续实验产生干扰和危害。然而,由于有研究显示大小鼠对 CO₂ 气体表现出厌恶情绪,且高浓度的 CO₂ 会导致疼痛和呼吸困难,在过去的几十年中,使用 CO₂ 作为安乐死药物受到了严密的审查。但鉴于 CO₂ 安乐死的高效性和安全性,目前国际上

收稿日期:2019-04-03

* 基金项目:2018 年度国家卫计委科研院所科技创新重点项目(No.2018GJ07);2019 年度国家卫生健康委科研院所科技创新面上项目(No.2019GJM03)

作者简介:何嘉玲(1980—),女,助理研究员,博士,研究方向:实验动物科学.E-mail:missu329@aliyun.com

通信作者:孙德明(1958—),男,博士,研究员,研究方向:实验动物科学.E-mail:sundemingnet@163.com



CO₂ 应用于安乐死的报道大量增加。在我国也有一些研究者开始选择使用 CO₂ 处死大小鼠^[3],但报道比例远远低于物理方法(颈椎脱臼法和断头法)。

2.1 CO₂ 安乐死过程中压力和疼痛的判断及存在的问题

最佳的安乐死技术旨在引导快速无意识,其次是快速死亡。从动物角度看,手术麻醉和安乐死的麻醉诱导没有本质区别。公认的麻醉阶段有 4 个。阶段 I 被定义为从诱导到意识丧失的时间段。阶段 II 是从意识丧失到对刺激的反应丧失的时间段。阶段 III 是深度麻醉阶段,伴随失忆、镇痛和肌肉松弛。阶段 IV 是在上述基础上,心血管反应和呼吸功能停止。对安乐死方法的评估而言,阶段 I 动物的感受是关注的焦点。已知脊髓区域负责应对有害化学刺激,大鼠研究表明,当吸入 25% 的 CO₂ 时,延髓背角神经元的放电增加,CO₂ 浓度在 37% 和 87% 之间发生近线性增加,即 CO₂ 浓度增加,疼痛增加^[4]。然而确定动物何时变得无意识并不是一项简单的任务。以下简述几种可能的评估方式和存在问题。

2.2 评价体系

2.2.1 应激激素变化评判:任何一种安乐死的方法都会不同程度导致动物产生压力。任何压力,都会引发一系列被称为压力反应的活动。动物机体通过交感神经-肾上腺髓质系统(SAM)和下丘脑-垂体-肾上腺轴(HPA)这两条途径产生急性应激反应。当大脑感受到压力时,SAM 几乎立即通过释放主要来自交感神经末梢的去甲肾上腺素和来自肾上腺髓质的肾上腺素来响应。同时,沿着 HPA,应激反应开始于杏仁核,启动促肾上腺皮质激素释放因子分泌。这种激素随后刺激垂体释放促肾上腺皮质激素(ACTH)。ACTH 作用于肾上腺皮质释放皮质酮。为了评估这种应激反应,可以测量 HPA 轴和 SAM 激素的组分。有研究表明,小鼠 ACTH 水平在暴露于 CO₂ 气体等应激物后大约 30 s 内增加,且去甲肾上腺素在 CO₂ 暴露后 5 s 内升高,而皮质酮水平的升高大约需要 4 min。鉴于皮质酮产生的延迟效应,一般通过检测 ACTH,去甲肾上腺素和肾上腺素评价压力的差异。

2.2.2 行为学评判:对安乐死的压力、疼痛/痛苦的反应还表现在动物的行为中,包括逃跑倾向、挣扎、攻击性行为、痉挛、呻吟等。有研究显示,用 CO₂ 安乐死的小鼠在卧位时是不敏感的,而用异氟醚安乐死的小鼠在最初卧位时就有蹬踏反应。然而因为运

动和对刺激的反应可能发生在没有脊髓结构的情况下,因此仅利用蹬踏作为安乐死压力的评估方法有其不足。

2.2.3 神经反射评判:脑电图(EEG)是评估麻醉深度的一种方法,在动物中,EEG 已被用于评估各种麻醉剂以及断头术,颈椎脱臼,异氟烷,氯化钾或 CO₂ 过量使用的安乐死。目前评估啮齿类安乐死脑电图反应的研究较少,少量的研究发现断头后皮质功能中断而皮质活动仍存在 15 到 20 s。但通过 EEG 无法确定的无意识状态的确切发生,因此将 EEG 用作无意识状态的确定,仍需要进一步的实验证据。

2.2.4 心血管反应的评判:疼痛和压力会导致儿茶酚胺水平升高,随后心率和血压升高。动物研究发现安乐死试剂可导致心率和血压骤升,说明安乐死对动物产生了压力,但同时也发现,压力水平并没有因使用安乐死的方法不同而有所不同。如果压力水平与安乐死方法没有对应关系,那么心血管参数的变化就不是评判安乐死压力水平的理想参数。

2.3 CO₂ 安乐死的具体实施方法及伦理分析

CO₂ 安乐死过程中,动物在无意识前的不适与 CO₂ 浓度和室腔换气率(CRR)相关,研究表明混合使用麻醉剂和其他吸入性气体能一定程度上改善动物无意识前的感受。因此,以下将重点讨论 CO₂ 安乐死实施过程中,最佳的 CO₂ 浓度和 CRR 以及辅助性麻醉药物或气体的使用。此外,还将讨论特殊时期的大小鼠如孕鼠,胎鼠和新生鼠等的 CO₂ 安乐死实施方法,以及不同品种和饲养环境等对安乐死实施的影响。

腔室内 CO₂ 最佳更换率及浓度实验表明:小鼠实验发现不同的 CO₂ CRR 对心血管数据、疼痛或 ACTH 水平的影响都没有显著差异。因此建议使用较快的 CO₂ 流速较快诱导安乐死。然而也有研究得出与此相反的结果,在 HiRoad 安乐死室(Lab Etc., Clayton, DE)中比较使用慢流(30%)CO₂ 和快速流(70%)CO₂ 实施安乐死发现,快速流动 CO₂ 中 CD1 小鼠焦虑行为增加。提示安乐死过程中使用的技术和评价指标的差异可能影响结果的判断。

有证据表明不同浓度的 CO₂ 会导致动物的痛苦和/或疼痛。根据 Leach 的研究,在人类,大鼠和猫中,大多数伤害感受器能被 40 %CO₂ 激活^[5]。在小鼠中,已经显示浓度为 10 %的 CO₂ 就可以通过冻结和激活边缘结构包括杏仁核诱发恐惧^[6]。在大鼠中,二氧化碳浓度达到 30%~40%就可以导致无



意识;然而实验发现即使使用 100 %CO₂ 预先填充气室,在大鼠和小鼠中诱发快速皮质脑的损伤也分别需要 39 s 和 30 s,此前,动物将饱受痛苦。

因此根据上述研究数据,使用较高的流速以及低于诱发疼痛的浓度(<40%)是 CO₂ 输入较理想的方式。目前 CO₂ 安乐死的推荐程序为:使用气缸里的压缩 CO₂ 并结合流量计以精确调节流量。起初气流应恒定在 15%至 35%V/min,在 LOC 后(一般需要 49 s)增加流量^[7]。同时在临床死亡后应至少维持 1 min 气流,避免逆转。此外,国内研究者赵建文等关于安乐死箱设计的研究报道可为安乐死容器的选择提供一定的参考^[8]。

2.4 CO₂ 与其他麻醉剂的联合使用

研究表明,加入一氧化二氮(N₂O)、氧(O₂)或异氟醚可以改善 CO₂ 暴露的不良反应,减少呼吸困难的发作。与单独使用 CO₂ 相比,N₂O 与 CO₂ 的联合使用能将 LOC 的时间缩短 10%。但 N₂O 存在潜在的人类滥用的危险;O₂ 的加入可以防止缺氧,从而减少痛苦。然而,也有研究表明将 O₂ 添加到 CO₂ 中对动物厌恶情绪的改善效果甚微甚至没有效果。补充 O₂ 还可能引起 LOC 之前的肺部出血^[9]。因此,美国兽医协会(American Veterinary Medical Association, AVMA)安乐死小组认为,将 O₂ 与 CO₂ 联合用于安乐死没有任何优势;在小鼠实验中,异氟醚的加入可在一定程度上(10%)减少动物 LOC 的时间,但研究发现与 30%CO₂ 相比,小鼠对异氟醚产生较强烈的抵抗和焦虑行为,包括逃避及蹬踏反应等^[10]。雌鼠在断头术前短暂的异氟醚暴露还可提高血浆皮质醇浓度,雄性则出现 ACTH 分泌量增加,表明压力增大^[10]。综上所述,异氟醚尽管在一定程度上减少了动物安乐死 LOC 的时间,但是给动物增加了更大的压力,单独使用异氟醚或与 CO₂ 混合使用施行安乐死并不合理。但有一种情况例外,与异氟醚相比,CO₂ 安乐死会导致较高频率的肺组织学损伤。因此在需要肺组织学分析的情况下,可优先选择异氟醚。

3 胎鼠和新生鼠

针对胎儿安乐死建议的具体方法基于其神经元发育情况。由于具备非功能性大脑皮质和皮质下脑结构,小于 15 日龄胎鼠被认为不具备疼痛感知,处死母鼠的同时即能引起胎儿的快速无痛苦死亡。因此,安乐死的实施主要针对 15 日胎龄后的胎鼠。但

在安乐死方法的选择上,还应兼顾实验目的和结果,尤其是需要获取胎儿或种质进行下一步实验时。有研究比较了颈椎脱臼与 CO₂ 安乐死,发现两种方法并没有造成胚胎数量及胚胎生存力的差异。然而,也有研究工作表明动物用 CO₂ 安乐死后精子和卵母细胞功能与断头法比较存在差异,因此实验者应该同时兼顾实验目的和福利伦理要求选择恰当的安乐死方法。当胎儿不用于进一步的实验时,对母鼠施行安乐死则可重点考虑较快的脑缺氧和最小的子宫破裂,例如通过使用 CO₂ 安乐死后进行颈椎脱臼。

研究表明新生的大小鼠对缺氧有抵抗,CO₂ 暴露后成年啮齿动物与新生儿的死亡时间有巨大差异。在大鼠中,随着年龄的增长死亡时间稳步下降,即日龄越小,所需 LOC 时间越长。10 日龄小鼠 CO₂ 暴露 5 min 后会 100%的被安乐死。100%的死亡时间在第 0 至 10 天之间每天降低 3 min^[11]。因此,对新生大小鼠施行 CO₂ 暴露安乐死,必须彻底修改成年动物所使用的剂量和方法。此外,当使用 CO₂ 施行安乐死时,还观察到小鼠心脏停搏后的恢复,因此建议延长 CO₂ 暴露时间,并应用二次安乐死方法,如断头术以减少动物的痛苦。

4 影响安乐死的其他因素

动物的品种和饲养环境也会影响 HPA 对压力源的反应,因此 CO₂ 安乐死除了考虑 CO₂ 本身以外,还应考虑其他因素对动物福利的影响。在实施 CO₂ 安乐死期间,C57BL/6 小鼠比 CD1 小鼠丧失意识时间更短,但反应更剧烈。在 21%CO₂ CRR 下,BALB/c 小鼠肺出血的严重程度较 C57BL/6 小鼠高^[12]。因此,应该兼顾实验目的和动物福利选择恰当的安乐死方法。此外,研究显示小鼠对共同饲养了 14 d 或 21 d 其他小鼠,表现出同情心,但对于一个陌生小鼠没有反应^[13]。因此,在实施安乐死过程中小鼠是否熟悉那些被同时安乐死的小鼠,也应予以考虑。

5 小结

尽管 CO₂ 应用于安乐死存在一些有争议的问题,但作为一种安全有效、简便易行、成本低廉的安乐死方法,越来越受到研究人员的青睐。目前,在安乐死的实施方法中,存在一些不同的观点。关于麻醉药品的使用,一些研究者主张先通过麻醉药实现

意识丧失,然后使用 CO₂ 达到死亡^[14]。而另一些研究者认为使用替代性气体如异氟醚、氩气和氮气对安乐死并没有人性化改进;关于 CO₂ 的流速也存在两种观点,AVMA 安乐死小组建议使用 10% 至 30% CRR 的 CO₂^[14-15]。减少动物痛苦。而另一种观点认为,只要动物没有经历疼痛(小鼠在 CO₂ 达到 40% 的疼痛诱导水平之前无疼痛),推荐使用更快的 CO₂CRR 来减少小鼠 LOC 的时间;此外,安乐死方法选择的另一难点在于动物的意识的评判。评判标准能否真实客观地与动物的疼痛/痛苦相关联是评判安乐死方法选择的关键。因此,在后续的研究中,仍然需要积累更多的关于安乐死评判的数据,更加客观真实地判断动物在 LOC 前的生理和心理状态,为安乐死方法的选择提供确切的依据。

我们认为尽管 CO₂ 在安乐死过程中出现压力,但目前没有一种安乐死方法不会导致压力。因此,在没有更好的替代药物的情况下,鉴于 CO₂ 的简便易行,危害小,成本低,使用 CO₂ 实施大小鼠的安乐死不失为一种较理想的办法。

参 考 文 献

[1] 刘晓宇,卢造成,贺争鸣. 实验动物仁慈终点技术研究的发展与应用[J]. 实验动物科学,2016,**33**(2) :54-60.

[2] 实验动物福利伦理审查指南[S]. 2018.

[3] 庞帅,师晓萌,鹿双双,等. IVC 笼盒原位实施小鼠二氧化碳安乐死方法的建立[J]. 实验动物科学,2018,**35**(4) :67-70.

[4] Peppel P, Anton F. Responses of rat medullary dorsal horn neurons following intranasal noxious chemical stimulation: effects of stimulus intensity, duration, and interstimulus interval[J]. J Neurophysiol,1993,**70**(6) :2260-2275.

[5] Leach M C, Bowell V A, Allan T F, *et al.* Degrees of aversion shown by rats and mice to different concentrations of inhalational anaesthetics[J]. Vet Rec,2002,**150**(26) :808-815.

[6] Ziemann A E, Allen J E, Dahdaleh N S, *et al.* The amygdala is a chemosensor that detects carbon dioxide and acidosis to elicit fear behavior[J]. Cell,2009,**139**(5) :1012-1021.

[7] Moody C M, Makowska I J, Weary D M. Testing three measures of mouse insensibility following induction with isoflurane or carbon dioxide gas for a more humane euthanasia[J]. APPLIED ANIMAL BEHAVIOUR SCIENCE,2015,163:183-187.

[8] 赵建文,银欢,张志芬,等. 安乐死箱的技术条件的研究[J]. 实验动物科学,2007,**24**(3) :54-55.

[9] Danneman P J, Stein S, Walshaw S O. Humane and practical implications of using carbon dioxide mixed with oxygen for anesthesia or euthanasia of rats[J]. Lab Anim Sci,1997,**47**(4) :376-385.

[10] Makowska J, Golledge H, Marquardt N, *et al.* Sedation or inhalant anesthesia before euthanasia with CO₂ does not reduce behavioral or physiologic signs of pain and stress in mice[J]. J Am Assoc Lab Anim Sci,2012,**51**(4) :396-397, 397-399.

[11] Pritchett-Corning K R. Euthanasia of neonatal rats with carbon dioxide[J]. J Am Assoc Lab Anim Sci,2009,**48**(1) :23-27.

[12] Fisher S, Burgess W L, Hines K D, *et al.* Interstrain Differences in CO₂-Induced Pulmonary Hemorrhage in Mice[J]. J Am Assoc Lab Anim Sci,2016,**55**(6) :811-815.

[13] Langford D J, Crager S E, Shehzad Z, *et al.* Social modulation of pain as evidence for empathy in mice[J]. Science, 2006, **312** (5782) :1967-1970.

[14] Hawkins P, Prescott M J, Carbone L, *et al.* A Good Death? Report of the Second Newcastle Meeting on Laboratory Animal Euthanasia[J]. Animals (Basel),2016,**6**(9) :50.

[15] Howell R L, Donegan C L, Pinkert C A. Mouse embryo yield and viability after euthanasia by CO₂ inhalation or cervical dislocation [J]. Comp Med,2003,**53**(5) :510-513.

Caarbon Dioxide for Euthanasia to Mice and Rats

HE Jialing, WANG Tianqi, ZHANG Changyong, BAO Guo, LI Nan, SUN Deming
(National Research Institute for Health and Family Planning, Beijing 100081, China)

Abstract: Rats and mice are currently the most widely used laboratory animals, and their euthanasia method have been heatedly debated. The carbon dioxide euthanasia method has the advantages of simple use, low risk and low cost. In order to make the implementation of carbon dioxide euthanasia more in line with the requirements of experimental animal welfare ethics, the application of this technology should fully consider the pressure, pain and other reactions of experimental animals. In view of this, this paper reviews the evaluation system of euthanasia by inhaling carbon dioxide, the combined use of carbon dioxide and other anesthetics, and the specific implementation method of carbon dioxide euthanasia in mice and rats. The purpose of this review is to provide useful technical references to caarbon dioxide for euthanasia to mice and rats

Key words: Euthanasia; CO₂; Rat; Mice