

张道涵,邵红霞. 实验动物非麻醉安乐死技术的伦理学探讨 [J]. 中国比较医学杂志, 2023, 33(3): 82-89.

Zhang DH, Shao HX. Ethical analysis of non-anesthetic euthanasia for experimental animals [J]. Chin J Comp Med, 2023, 33(3): 82-89.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2023.03.011

实验动物非麻醉安乐死技术的伦理学探讨

张道涵,邵红霞*

(复旦大学基础医学院,上海 200032)

【摘要】 对实验动物实施仁慈终点,是动物实验伦理的基本要求,除了被广为接受的麻醉法安乐死,非麻醉手段的使用也极为普遍。本文以动物实验伦理的“3R”原则和实验动物福利的“五项自由”为准则,系统探讨了断颈、颈椎脱臼两大非麻醉安乐死方法的伦理正当性,分析了空气栓塞法、液氮冰冻法、放血法、窒息法等作为安乐死方法存在的伦理问题及改进对策,并探讨了多种安乐死方法综合应用的可行性,为处于使用非麻醉安乐死方法伦理困境中的实验者提供借鉴和思路。

【关键词】 实验动物;动物实验伦理;安乐死;断颈;颈椎脱臼

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2023) 03-0082-08

Ethical analysis of non-anesthetic euthanasia for experimental animals

ZHANG Daohan, SHAO Hongxia*

(School of Basic Medical Science, Fudan University, Shanghai 200032, China)

【Abstract】 Euthanasia of laboratory animals is among the fundamentals of animal experimental ethics. Apart from the widely accepted euthanasia method involving anesthesia, non-anesthesia method are also commonly used. On the basis of the “3R” principle of animal experimental ethics and the “five freedoms” of experimental animal welfare, we systematically discuss the ethical legitimacy of two non-anesthetic euthanasia method, decapitation and cervical dislocation. Additionally, potential ethical problems and possible improvements of air embolism, liquid nitrogen freezing, bloodletting, and apnea as euthanasia method are discussed. We also propose feasible approaches of euthanasia involving integrative method. Our analysis may assist researchers in performing ethical non-anesthesia euthanasia.

【Keywords】 laboratory animal; animal experimental ethics; anesthesia; decapitation; neck-dislocation

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

安乐死(euthanasia)一词来源于希腊文,原意为“平安和有意义的死亡”,在实验动物学领域指“以科学人道的理念和方式,使动物生理和心理痛苦最小化而采取的动物意识迅速丧失的处死过程”^[1]。鉴于实验动物为人类健康奉献了它们宝贵的生命,我们有责任对实验动物实施仁慈终点,即采用安乐死技术以最大程度减轻实验动物死亡时的痛楚,使

它们的死亡过程平和、安宁,进而使实验动物的死亡更有意义和价值。然而如何选用恰当的安乐死技术,使其既不会干扰生物医学研究结果又符合实验动物福利伦理要求,成为困扰不少科研工作者的难题。

根据实验动物福利原则,实验动物安乐死过程需要尽可能避免其出现疼痛、焦虑、恐惧等负性情

[作者简介]张道涵(2002—),男,本科,研究方向:疼痛相关情绪神经机制研究。E-mail: 20301050208@fudan.edu.cn

[通信作者]邵红霞(1971—),女,博士,高级讲师,研究方向:基础医学教育教学改革研究。E-mail: shaohx@fudan.edu.cn

绪,或尽量减少其持续时间。“麻醉法”因其可阻断痛觉的传播,进而让动物失去意识,成为实施实验动物安乐死的首选方法。美国兽医协会(American veterinary medical association, AVMA)推荐的直接安乐死均直接或间接使用了麻醉性的化学药物(包括吸入性药物与注射药物)^[2-3]。然而麻醉性的化学药物的使用存在一定的局限性,不能满足所有生物医学研究需要,因而采用颈椎脱臼、二氧化碳(CO₂)安乐死方法、空气栓塞、断颈等不使用化学药物处死实验动物仍然很常见,成为直接安乐死与非安乐死之间的“灰色地带”。对于非麻醉性方法处死实验动物所代表的条件安乐死方法,有关其伦理正当性的论证少见且零散,亟待相关从业人员开展交流探讨。本文将依据动物实验的伦理原则,探讨各种非麻醉实验动物处死方法的伦理正当性,以期有条件安乐死方法的优化和改进提供借鉴。

1 实验动物安乐死的伦理学基础

1.1 实验动物福利基本原则

“动物具有感知力,并且可以分辨快乐和痛苦”,彼得辛格《动物解放》一书观点,奠定了将动物权益纳入伦理考虑的基础,“快乐最大化、痛苦最小化”成为动物福利伦理的基本考虑。由于实验动物的特殊性,实验过程中难以完全避免对实验动物的伤害,因此实验者应权衡动物实验为人类乃至整个地球生态带来的潜在受益及给受试实验动物个体带来的可能伤害^[4],遵循替代(replacement)、减少(reduction)原则开展相关研究设计,并将优化(refinement)原则贯彻始终^[5-6]。在实验动物生命周期的全过程尽可能采取措施以减轻动物的痛苦,并提供相应的外部条件,在生理、环境、卫生、心理、行为 5 个方面提倡动物福利^[7-8],以确保实验动物处于健康、舒适、快乐的自然生活状态。替代、减少和优化的“3R 原则”和免于饥渴、不适、痛苦/伤病、恐惧/焦虑和表达天性的“五项自由”为善待实验动物提供了基本伦理框架,并被包括我国在内的众多国家纳入实验动物福利伦理审查要求以及实验动物保护相关法文中^[7,9]。

1.2 实验动物福利在安乐死中的具体体现

安乐死作为对实验动物实施仁慈终点的技术,在实施过程中侧重关注“免于痛苦/伤病”以及“免于恐惧/焦虑”两条原则^[10]。虽然安乐死很难完全实现“没有痛苦与伤害”,但可通过改善实施安乐死

的条件和技术,减少动物死亡过程中的痛苦以及死亡前的恐惧与焦虑。无疼痛安乐死的建立有助于减少疼痛;尽量减少动物感知,尽快使动物进入无意识状态,有助于减轻恐惧与焦虑^[9],从而实现让实验动物仅在短时间承受微量的疼痛和痛苦,达到仁慈终点的目标。

1.3 实验动物麻醉安乐死方法及其局限性

2020 年出版的《AVMA 动物安乐死指南》(以下简称《指南》)是世界范围内实验动物安乐死时普遍使用的指导性文件。根据该指南,处死实验动物的方式分为 3 种:(1)直接安乐死;(2)条件安乐死;(3)非安乐死^[3,9]。其中直接安乐死主要包括吸入性药物法及通过静脉注射、肌肉注射、腹腔注射、口服或直肠内灌注等给药途径进行的注射药物法。麻醉安乐死可以阻断痛觉的传播并让动物失去意识,符合“免于痛苦/伤病”以及“免于恐惧/焦虑”原则,如过量注射巴比妥酸盐或其衍生物(巴比妥类药物)可逆行抑制中枢神经系统,即先抑制动物产生意识的大脑皮层,进而抑制动物维持心跳、呼吸的脑干生命中枢^[11-12]。这种注射麻醉法不需要特殊的麻醉设备,引发环境污染或实验者中毒的风险亦小于吸入性药物法。因此,静脉或腹腔注射巴比妥类药物注射液成为目前国际公认的绝大多数动物种类首选的直接安乐死方法^[13]。然而,麻醉安乐死存在一定的局限性,当有以下特殊实验需求时,实验人员常需选取非麻醉的“条件安乐死”。

(1) 生物样本质量有特殊需要时

巴比妥类药物等液体麻醉药物常通过静脉或腹腔注射途径给药,药物会随循环系统扩散至动物体内各处;吸入性药物法使用的乙醚、异氟烷等气体,由于分子量较小,也会快速扩散至动物体内各处。死亡动物体内致麻醉的气体或药剂的存在,一定程度上会影响组织、血液、尿液等样本的分析^[14],如腹腔注射强碱性巴比妥类药物注射液可导致体液 pH 降低、腹腔内器官表面潮红^[11,13]、皮肤中神经递质分布改变、主动脉与肠道平滑肌对神经递质敏感性下降^[15-16]以及肝组织超微结构变化^[17];而使用气体麻醉剂易造成肺泡毛细血管阻塞、血管通透性改变^[18]与脑脊液酸性增强^[10]。

(2) 有较高取材时效性要求时

有研究表明,120 mg/kg 超剂量注射巴比妥酸盐进行大鼠安乐死时,大脑神经元膜电位一直持续到药物注射后 1 h 余(3660 s)才出现了标志彻底脑

死亡的“死亡波”(由大量神经元同时失去活性而去极化产生)^[19]。即便提高注射剂量至 200 mg/kg 并以呼吸或心跳停止作为实验动物死亡的判断标准,也需要至少 7 min^[12,20]。在此期间,许多脏器可能会因为呼吸停止或减缓造成的缺氧而衰竭^[21-22]。在一项比较不同安乐死对小鼠卵细胞质量的研究中,异氟烷麻醉组小鼠卵细胞的完整率(65.8%)显著低于颈椎脱臼组小鼠卵细胞的完整率(93.1%)^[23]。因此,对于有较高取材时效性要求的研究,常不适合使用麻醉类安乐死。

(3) 麻醉状态的动物会干扰实验结果时

注射巴比妥类药物注射液会让动物在完全死亡之前相继进入 1 期与 2 期麻醉状态^[9],这种麻醉状态会显著改变不同种类神经元中的基因与蛋白质的表达^[24],甚至可能通过神经递质与激素分泌的改变进一步影响肝等重要脏器的新陈代谢过程^[21,25],进而对相关实验结果造成严重干扰。

2 常见非麻醉处死方法及其伦理分析

由于麻醉安乐死存在一定的局限性,常需选择非麻醉方法进行替代,不仅如此,非麻醉法,如颈椎脱臼处死实验小鼠,因其操作便捷,无须额外工具和药物,在研究和教学中均有较广泛应用。那么,以非麻醉法处死实验动物,是否符合动物实验伦理要求的“仁慈终点”要求,需逐一展开分析。

2.1 断颈

断颈,顾名思义,是操作人员利用特制的断头装置(如闸刀),实施动物断头操作。行断颈需由熟悉操作的实验人员抓取已麻醉镇静或清醒的动物保定于与动物体型配套的断头装置上,随即快速拉动闸刀,切断动物头颈连接处;断头完成后,断头装置需清洗去血迹与气味,闸刀刀片亦需擦拭清洁、涂抹轻机油润滑且定期磨刀或更换刀片以保证刀片锋利,从而使断头装置始终保持干净且性能良好。断颈常用于啮齿类动物、禽类、两栖类与爬行类,而对新生啮齿类动物行断颈亦可使用锋利的剪刀而非闸刀。此外,使用 DecapiCone[®] 等一次性保定器辅助保定可以缓解动物保定时的应激状态,且使动物姿态固定更准确,受到《指南》推荐^[3]。断颈能够使动物的中枢神经系统在安乐死实施早期即发生阻抑,从而丧失各种知觉(主要是疼痛)和意识^[26]。通过对大鼠脑组织内氧含量的测定发现,断头后 3 s 脑内氧含量即低于维持意识所需的氧含

量^[25,27],脑主要供能物质(ATP、NADH、磷酸肌酸、葡萄糖等)含量也迅速降低^[28-29];脑电记录则显示断头后小鼠在约 5~10 s 内即丧失视觉诱发电位(即通常所指的“完全失去意识”),且无论断头前是否处于麻醉状态,约 15~20 s 后将不再有脑电信号发生,约 30 s 后脑电信号不再持续(即通常所指的“脑死亡”)^[10,25,28,30]。此外,由于切断处的颈 1 缺乏感觉神经,从神经解剖学角度来看,规范的断颈也不构成产生疼痛的条件,即便由于断头操作不当使得切断处位于颈 1 以下,根据疼痛闸门控制理论,由于大量组织瞬间损伤产生的过载感觉信号也会被脊髓神经元抑制,使其无法上行至大脑皮层进而被感知^[31],已有类人病例进行佐证。另有实验表明,若规范操作,大鼠和小鼠不会因为断头或处于其他大鼠或小鼠被断头的现场而产生下丘脑-垂体-肾上腺轴的应激反应^[9],即采用断颈不会增加被执行安乐死的动物本身以及附近其他实验动物的焦虑、恐惧与压力。因此断颈从动物福利原则来看是人道的,此外,出于实验需求的考虑,神经科学、脑科学实验中往往需要进行脑部取材,断颈可以方便后续取材实验的开展^[32-34];亦有研究表明,无麻醉的断颈对动物血清生物标志物的干扰远小于二氧化碳(CO₂)安乐死方法与腹腔/静脉注射巴比妥类药物注射液^[35]。基于以上分析,断颈目前被认为是一种条件性接受的安乐死方法,并在很多情况下是权衡实验需要与动物伦理之下的最优解^[35]。

特别值得一提的是,1986 年版《指南》曾反对对无麻醉的断颈,原因在于当时有文献表明对清醒大鼠实施断颈后,脑电活动能维持 13~14 s,且脑电波形与疼痛状态下观察到的波形类似^[36]。然而脑电波的存在不等价于意识存在,即便是麻醉状态下的动物也仍然可以检测到对疼痛刺激的脑电反应^[37],该反应并不足以表明疼痛刺激能被动物所感知。后续研究亦表明断颈前动物是否麻醉对断颈后动物脑电的变化并无显著影响^[19],麻醉甚至可能延长断头后脑电消失的时间(可能是麻醉状态下脑耗氧速率降低,导致断头后神经元缺氧延迟)。此外,行断颈后大鼠脑电波形也不仅仅在疼痛状态下才会产生,而是更接近于神经元受到抑制的麻醉状态与深度睡眠^[38],清醒状态下给予食物等事件亦可诱发类似波形。此外,针对大鼠特定脑区的新皮质低电压快速活动(LVFA)和海马节律性慢活动(RSA)的精细脑电记录进一步佐证了大脑对断颈的反应与大

脑对疼痛刺激的反应并不相同^[38]。基于以上证据,《指南》自 2000 年版起,一定程度上支持断颈的使用,将措辞从原来的“正当性有待科学检验”改为“根据实验需要采用”^[25,39];2013 版《指南》则完全没有提及“断颈后的脑电活动与疼痛相关”这一观点^[40];2020 版《指南》亦仅声明“对断颈后的脑电活动的解释存在争议,仍需讨论”。

由于人类历史上断头台曾被作为酷刑的象征,又兼断头后实验动物易大量出血,断头瞬间动物躯干会不自觉产生抽搐^[30],因此断颈相比于注射麻醉法易被公众认为是“直观上难以接受”的安乐死。然而,基于专业设计的实验动物断颈并不是通常意义上“流血的杀戮”,已被现代神经科学证明既不会增加实验动物的痛苦,也不会增加其恐惧和焦虑情绪,不仅符合源于西方的现代动物实验伦理,更与我国儒家倡导的“恻隐之心”,“不忍其觳觫”等动物伦理思想不谋而合^[41]。此外,我国及基督教、伊斯兰教文化国家的民众在屠宰肉用畜禽(包括牛、羊、猪等哺乳类与鸡、鸭等鸟类甚至鳖等爬行类)时也均采取类似的方法^[42-44],因而断颈作为一种安乐死方式,事实上已被中外普通大众所接受。此外,一项针对 801 名实验人员的调查亦显示,使用断颈等看似“残酷”的物理方式相比于吸入性药物法,对于实验人员继发性创伤后应激的发生程度与同情心满足感没有显著影响^[45]。因此,就实验人员主观感受而言,断颈也是可被接受的安乐死方法。

但是,动物行断颈前保定时发出的叫声、释放出某种外激素^[13]、断颈后流出血液的气味等对周围其他动物的影响尚有许多不确定性,尤其是对于某些较敏感的种属,仍然存在致使其他动物焦虑与恐惧的可能。此外,虽然“尸体完整权”目前被认为是一种“人格权”的体现^[46],并不为非人所享有(如死胎断头取出术是目前被广泛接受的处理忽略性横位的妇科手术,未娩出的胎儿依我国法律不属于人,因此也不享有包括尸体完整权在内的人格权),但出于对实验动物的尊重,若非实验特殊需要(例如脑科学研究取材常不可避免地需要彻底破坏颅骨以取出完整大脑^[3]),应避免采用让动物首身分离的非“人道”方法。鉴于此,断颈仍应当作为条件性使用的安乐死方法,在伦理审查时需要严格慎重,如美国实行断颈需经实验动物管理与使用委员会(institutional animal care and use committee, IACUC)批准。

2.2 颈椎脱臼

颈椎脱臼的原理与断颈类似,且不需要固定器械与锋利的刀片。采用直接脱颈椎法实施安乐死,动物的脑电活动与视觉诱发电位与断颈无统计学差异^[25]。有研究认为,颈椎脱臼前动物是否处于麻醉状态对于颈椎脱臼后的脑电信号没有影响,即动物在脱颈椎后很快失去意识,因此该脑电信号不足以证明动物仍然能感受到疼痛。出于动物福利考量,颈椎脱臼主要弊端在于操作不熟练将会导致动物有较长时间的挣扎,因此对于操作人员有较高要求。从另一方面来讲,安乐死成功率不高的问题并不是颈椎脱臼方法特有的。即便是实验技巧熟练的操作者实施麻醉药物注射,动物在被抓取、保定与注射的过程中挣扎、发出叫声的时间也显著长于颈椎脱臼抓取与保定的用时。此外,根据对经颈椎脱臼安乐死的小鼠尸体检验进行的不完全估计,巴比妥类药物腹腔注射位点错误率约为 6%~20%,与实施颈椎脱臼后 3 min 动物仍未完全停止呼吸的几率约 10%无显著差异^[10,12],巴比妥类药物错误注射的位置多为肠道、胃、子宫角、膀胱与皮下^[12],麻醉药液从这些组织进入循环系统需要较长时间,而这些组织通常又分布有较为丰富的感觉末梢,因此积累在此处的巴比妥类药物注射液酸盐溶液不仅不能起到麻醉或者安乐死作用,反而会给动物带来巨大痛苦感,并不符合“免于痛苦/伤病”原则。由于不同动物对剂量敏感性不同,常常会发生由于麻醉不彻底导致动物苏醒,需要重新注射补给药的情况,动物在接受注射的过程中出于恐惧将反复挣扎,不符合“免于恐惧/焦虑”原则。相比之下,较高的成功率与不可逆性使得颈椎脱臼成为一种值得推荐的非麻醉安乐死方法。考虑到诸多优越性,2020 年版《指南》撤销了 2013 版当中对颈椎脱臼安乐死适用动物体型的限制,同时对必要的辅助器械使用条件以及安乐死实施细节进行了细化说明^[3,13]。

在实践层面上,国内外均存在不少实验者常在实施颈椎脱臼前先行用乙醚、异氟烷等气体麻醉剂对动物进行麻醉或镇静,特别多见于消化道功能研究、血液感染与肿瘤等需要取材的在体实验^[47-54],这种方式使实验人员执行安乐死及取材过程更为便捷、高效,一定程度上也缓解实验人员在实施颈椎脱臼时的心理负担。颈椎脱臼还常配合其他安乐死方法使用,作为确保动物死亡的第二道程序,

进一步提高安乐死的成功率。

2.3 空气栓塞法

空气栓塞法通过向动物血管中注射空气形成空气栓塞阻断供血,最终导致动物死亡,此过程不需消耗任何耗材、产生创伤,也不会向动物体组织中引入任何可能干扰生化鉴定的杂质,并且被认为可以排除脑部的血流,减少神经科学、脑科学实验中脑组织取材时凝血造成的样本污染。基于以上优点,空气栓塞法一度应用较广。然而根据国内文献报道,我国实验者并没有向动物颈内静脉注射空气诱发脑空气栓塞处死动物的做法,常用的方法(乃至教学实验的操作方法^[55])均为向兔耳缘静脉注射空气。尸检结果表明,耳缘静脉注射的空气随血流进入右心室,并在心脏中与空气混合致血液呈泡沫状,随血液循环进入肺动脉并栓塞主干及分支,诱发呼吸功能衰竭,而空气进入脑动脉的发生率仅 50% 左右,且进入其中的空气仅形成不足以完全栓塞血管的气泡串^[56],更难以“排除脑部血流”。因此接受空气栓塞法的动物常死于肺部气体交换障碍所致的窒息,而非脑部血管栓塞直接导致的脑功能丧失。空气注射后动物出现呼吸急促,心跳加快,口唇发绀,大小便失禁以及临终喘息样呼吸等窒息样症状并伴有剧烈挣扎,亦可佐证此观点^[57-58]。由于清醒实验动物经空气栓塞法处死时承受巨大痛苦、恐惧、焦虑的时间可持续几分钟,有违“免于痛苦/伤病”、“免于恐惧/焦虑”原则。因此,若将空气栓塞法用于动物安乐死,必须先将动物麻醉以减少其痛苦。

2.4 液氮冰冻法

为防止变性或细胞中溶酶体破裂导致蛋白质分解,需测定蛋白质的生物样本往往储存于液氮中。放入液氮中的生物组织可以在极短时间内降至超低温,因此用液氮直接冰冻法似乎可以在极短时间内使动物进入超低温无意识状态,同时生物组织即刻得到低温保存^[22],满足较高取材时效性的实验操作,看似是一举两得的安乐死。1986 年的《指南》甚至规定唯一可以不麻醉就实行断颈的情况是在断颈后立即用液氮冷冻法保存大鼠头部^[59]。然而有研究表明,0.5 g 的鼠肾放入液氮中,其核心温度保持在 30℃ 以上的时间显著大于 20 s^[19],而动物脑部更因有颅骨、头皮等结构的隔热作用,需要更长时间才能使核心温度降至神经元正常工作的温度下限。以大鼠为例,通常需 30~80 s^[60],远超单

独使用断颈后大鼠残存脑电活动的时间,在这段时间内,由于传入神经未遭到破坏,动物完全可以感知超低温造成的剧烈疼痛。冰冻法虽然一定程度上减少了动物意识丧失需要的时间,减少了动物的焦虑与恐惧,但是在生命的最后时刻给动物造成极大的疼痛,因此并不适合作为安乐死方法使用。2000 年版《指南》明确指出,只有体重小于 4 g 的爬行动物、两栖动物和出生时间短于 5 d 的新生小鼠,鉴于其体积小、降温快以及对冷致痛觉敏感程度不高,可以采用急速冷冻法^[3,13]。

2.5 放血法

对于需要获得大量血液或活体血细胞进行后续研究的实验,采用放血法不易使样本受到麻醉剂污染,且放血过程本身不会造成较大疼痛感,看似是比较理想的非麻醉安乐死方法。然而放血过程耗时较长,如家兔放血过程常需持续 2~3 h 才会导致最终死亡^[61],且动物进入昏迷状态之前,低血容量易引起焦躁、恐惧^[13],因此放血法常常配合其他安乐死方法使用以确保动物死亡,如若作为处死动物的单一方法使用,放血法只能用于无意识的动物^[62],如已被击晕的动物。此外,以放血法处理携带有传染性病原体的动物时,还需注意操作者的生物安全问题^[63]。

2.6 窒息类方法

窒息类方法如闷死、绞死、溺水、胸廓按压等机械方式阻止动物呼吸,动物在失去意识之前会因承受巨大的恐惧、痛苦而猛烈挣扎反抗,甚至有可能危害到实验者自身安全,因此从人与动物两方的福利来看,都不是适宜的安乐死方法,AVMA 评价其为“不人道的杀害动物方法”^[3,13],应坚决避免作为安乐死的实施方法。

2.7 其他

在处理一些体型较大(如牲畜)、难以保定(如攻击性较强的动物)等特殊实验动物或者需进行研究但难以捕获的野生动物,出于物理条件上的限制,采用吸入性药物法或注射药物法以及断颈或颈椎脱臼均不可行^[64],甚至可能对安乐死实施人员的生命安全构成威胁。此种情况下,可用穿透型系簧枪(penetrating captive bolt, PCB)法、脑内爆破法以及枪击法等^[3]。这些方法的正确使用可以直接损毁动物脑中枢,让动物瞬间丧失意识,因此普遍被认为也是符合动物伦理的安乐死。

此外,对于二氧化碳(CO₂)安乐死方法的使用,

目前仍存在较大争议。支持者认为二氧化碳(CO₂)安乐死方法可以批量处死大量小型动物,不易造成环境污染、生物安全性高、成本低廉,且可以在饲养动物的笼箱中完成,省去了安乐死实施时所需的抓取、保定以及与其他动物混笼、转移等操作,一定程度上减少了动物被执行安乐死之前的恐惧与焦虑,也是目前应用广泛的安乐死^[10]。反对者则认为,无论是放入动物前即将笼箱充满二氧化碳气体的预灌注法,还是直接向动物笼箱内释放二氧化碳的灌注法,均可能造成动物的痛苦和不适。脑电活动显示,预灌注法将动物置于纯二氧化碳后因窒息而死亡的时间短于颈椎脱臼和断颈^[25],但清醒动物吸入过高浓度的二氧化碳气体将导致动物呼吸道黏膜因碳酸刺激而产生明显的疼痛。灌注法中,二氧化碳流量过高同样也可能引起动物黏膜疼痛,而二氧化碳充盈速率过低则会造成动物因呼吸困难而痛苦。此外,还有研究表明啮齿类动物嗅神经中存在专门感受二氧化碳刺激的感受器,0.1%浓度的二氧化碳即可引起该感受器去极化,因此对人类而言无色无味的二氧化碳,对于啮齿类动物而言可能是一种异味,回避箱实验也从行为学角度证实了这一点^[10,65]。考虑到这些争议与问题,新版《指南》对于二氧化碳(CO₂)安乐死方法的应用采取相对开放的态度,相较于 2013 版,新版不但将“预灌注法是不可接受的”改为“预灌注法是不建议的”,而且将二氧化碳最佳充盈速率从每分钟置换安乐死容器体积的 10%~30%,修改为每分钟 30%~70%^[3,13]。

3 讨论与展望

综上所述,虽然目前广泛推荐使用麻醉安乐死,但以断颈与颈椎脱臼为代表的一系列符合动物伦理的非麻醉安乐死方法仍具有不可替代的优势。

当今生物科学与医学研究的需求各异,实验人员在实际应用时,应权衡研究需求和伦理福利需要^[62],兼顾不同品类、不同年龄实验动物的生理、心理需求,并可综合使用多种安乐死以减轻实验动物在生命最后时刻的疼痛感以及恐惧与焦虑^[66],如针对小鼠大脑皮层研究时,采用异氟烷镇静处理后,先行颈椎脱臼,再使用断颈,通过综合应用多种安乐死,既能确保符合动物伦理要求的仁慈终点,又方便进行脑部取材且不会干扰实验结果。

此外,为避免实验人员因技术操作不熟练增加实验动物的痛苦,应加强对初学者的伦理教育以及

实验动物操作技能训练,如使用已实施安乐死的动物或已取材完毕的动物尸体替代活体动物供初学者练习,或开发相关模拟器具供实验者练手。对参与教学实验的学生,也可采取一些辅助措施,如采用异氟烷镇静后,再实施颈椎脱臼,不仅可降低实施难度,也可减少实验者的心理负担,各教学院校可根据各自教学需要选择性使用。

随着认知神经生物学的发展,科研人员在对动物意识、疼痛与负性情绪的评估中纳入了更全面、客观的电生理(如视觉诱发电位)以及行为学指标(如可以有效反映动物腹腔注射后不适感的腹腔相关行为(peritoneum-directed behaviors, PDB)指数^[11]与动态负重测试(dynamic weight bearing, DWB)指数^[67]),从而对被执行安乐死动物的具体感受有了更全面的认识。与此同时,通过迅速且直接破坏脑部重要结构以期实现无痛、无意识安乐死的非麻醉安乐死方式,如贯穿特定脑中枢的微波辐射法、电击法等技术正在逐渐发展成熟中^[2]。这些技术进展,不仅让我们可利用更合理的评估方式重新审视实验动物安乐死的伦理正当性,还有助于实现安乐死的迭代更新,进而让实验人员可根据各自的研究需求,更加从容自信地选择适宜的安乐死。

参考文献:

- [1] 全国实验动物标准化技术委员会. 实验动物 安乐死指南 GB/T 39760-2021 [S]. 2021.
- [2] 李楠, 王天奇, 何嘉玲, 等. 实验动物的安乐死及其实施方法的伦理分析 [J]. 中国比较医学杂志, 2018, 28(10): 128-132.
- [3] AVMA Panel on Euthanasia. 2020 Report of the AVMA panel on euthanasia [J]. J Am Vet Med Assoc, 2021, 256(3): 322-332.
- [4] Frid MH, Perea AT. Euthanasia & thanatology in small animals [J]. J Vet Behav, 2007, 2(2): 35-39.
- [5] Hubrecht RC, Carter E. The 3Rs and humane experimental technique: implementing change [J]. Animals (Basel), 2019, 9(10): 754.
- [6] Tramacere A, Iriki A. A novel mind-set in primate experimentation: Implications for primate welfare [J]. Animal Model Exp Med, 2021, 4(4): 343-350.
- [7] 全国实验动物标准化技术委员会. 实验动物 福利伦理审查指南 GB/T 35892-2018 [S]. 2018.
- [8] Schafrum Macedo A, Cezaretti Feitosa C, Yoiti Kitamura Kawamoto F, et al. Animal modeling in bone research—Should we follow the White rabbit? [J]. Animal Model Exp Med, 2019, 2(3): 162-168.
- [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] 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.
- [11] Dutton JW, Artwohl JE, Huang X, et al. Assessment of pain associated with the injection of sodium pentobarbital in laboratory mice (*Mus musculus*) [J]. *J Am Assoc Lab Anim Sci*, 2019, 58(3): 373-379.
- [12] Laferriere CA, Pang DS. Review of intraperitoneal injection of sodium pentobarbital as a method of euthanasia in laboratory rodents [J]. *J Am Assoc Lab Anim Sci*, 2020, 59(3): 254-263.
- [13] 卢今, 张颖, 潘学营, 等. 2020 版美国兽医协会动物安乐死指南解析 [J]. *实验动物与比较医学*, 2021, 41(3): 195-206.
- [14] 张若曦, 苑望, 伍晓雄, 等. 共轭亚油酸对高脂血症大鼠脂质代谢及 *visfatin* 基因表达水平的影响 [J]. *中国实验动物学报*, 2009, 17(6): 452-456.
- [15] Butler MM, Griffey SM, Clubb FJ, et al. The effect of euthanasia technique on vascular arachidonic acid metabolism and vascular and intestinal smooth muscle contractility [J]. *Lab Anim Sci*, 1990, 40(3): 277-283.
- [16] Fendius RR, Rathsack R, Hinz G, et al. Changes in substance P concentration in rat plasma under different conditions of blood letting [J]. *Pharmazie*, 1987, 42(8): 535-536.
- [17] 赵厚德, 陶均, 郝智慧, 等. 麻醉对动物实验的影响 [J]. *中国比较医学杂志*, 2004, 14(6): 386-387.
- [18] Feldman DB, Gupta BN. Histopathologic changes in laboratory animals resulting from various methods of euthanasia [J]. *Lab Anim Sci*, 1976, 26(2): 218-221.
- [19] Van Rijn CM, Krijnen H, Menting-Hermeling S, et al. Decapitation in rats: latency to unconsciousness and the "wave of death" [J]. *PLoS One*, 2011, 6(1): e16514.
- [20] Zatroch KK, Knight CG, Reimer JN, et al. Refinement of intraperitoneal injection of sodium pentobarbital for euthanasia in laboratory rats (*Rattus norvegicus*) [J]. *BMC Vet Res*, 2017, 13(1): 60.
- [21] Allred JB, Berntson GG. Is euthanasia of rats by decapitation inhumane? [J]. *J Nutr*, 1986, 116(9): 1859-1861.
- [22] Faupel RP, Seitz HJ, Tarnowski W, et al. The problem of tissue sampling from experimental animals with respect to freezing technique, anoxia, stress and narcosis. A new method for sampling rat liver tissue and the physiological values of glycolytic intermediates and related compounds [J]. *Arch Biochem Biophys*, 1972, 148(2): 509-522.
- [23] Roustan A, Perrin J, Berthelot-Ricou A, et al. Evaluating methods of mouse euthanasia on the oocyte quality: cervical dislocation versus isoflurane inhalation [J]. *Lab Anim*, 2012, 46(2): 167-169.
- [24] Chang E, Ruan X, Zhu R, et al. Values of single-cell rna sequencing in development of cerebral cortex [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2020, 1255: 231-247.
- [25] Cartner SC, Barlow SC, Ness TJ. Loss of cortical function in mice after decapitation, cervical dislocation, potassium chloride injection, and CO₂ inhalation [J]. *Comp Med*, 2007, 57(6): 570-573.
- [26] 韩志刚, 潘永全, 衣启营, 等. 实验动物安乐死的科学应用与伦理思考 [J]. *医学与哲学*, 2019, 40(6): 36-38.
- [27] Derr RF. Pain perception in decapitated rat brain [J]. *Life Sci*, 1991, 49(19): 1399-1402.
- [28] King LJ, Schoepfle GM, Lowry OH, et al. Effects of electrical stimulation on metabolites in brain of decapitated mice [J]. *J Neurochem*, 1967, 14(6): 613-618.
- [29] Mayevsky A, Chance B. The effect of decapitation on the oxidation-reduction state of NADH and ECoG in the brain of the awake rat [J]. *Adv Exp Med Biol*, 1976, 75: 307-312.
- [30] McIntyre DC. Electroencephalographic response of amygdala-kindled rats after decapitation [J]. *Exp Neurol*, 1982, 78(3): 786-789.
- [31] Holson RR. Euthanasia by decapitation: evidence that this technique produces prompt, painless unconsciousness in laboratory rodents [J]. *Neurotoxicol Teratol*, 1992, 14(4): 253-257.
- [32] 杨友, 陈惠金, 钱龙华. 血糖水平对缺氧缺血新生大鼠体重和脑重的影响观察 [J]. *中国实验动物学报*, 2004, 12(1): 44-49.
- [33] 樊春笋, 黄一波, 李雯, 等. 分泌性中耳炎大鼠咽鼓管鼓室 β -防御素的表达 [J]. *中国实验动物学报*, 2010, 18(4): 322-325, 326.
- [34] 王玉洁, 韩彬, 郭向阳, 等. 不同剂量异丙酚在新生大鼠不同脑区的分布 [J]. *中国实验动物学报*, 2015, 23(6): 602-606.
- [35] Pierozan P, Jernerén F, Ransome Y, et al. The choice of euthanasia method affects metabolic serum biomarkers [J]. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, 2017, 121(2): 113-118.
- [36] Mikeska JA, Klemm WR. EEG evaluation of humaneness of asphyxia and decapitation euthanasia of the laboratory rat [J]. *Lab Anim Sci*, 1975, 25(2): 175-179.
- [37] Kongara K, Meilhane AE, Kells NJ, et al. Electroencephalographic evaluation of decapitation of the anaesthetized rat [J]. *Lab Anim*, 2014, 48(1): 15-19.
- [38] Vanderwolf CH, Buzsáki G, Cain DP, et al. Neocortical and hippocampal electrical activity following decapitation in the rat [J]. *Brain Res*, 1988, 451(1-2): 340-344.
- [39] AVMA Panel on Euthanasia. 2000 Report of the AVMA panel on euthanasia [J]. *J Am Vet Med Assoc*, 2001, 218(5): 669-696.
- [40] Herrmann K, Flecknell P. The application of humane endpoints and humane killing methods in animal research proposals: A retrospective review [J]. *Altern Lab Anim*, 2018, 46(6): 317-333.
- [41] 曹永福. 动物伦理的几个理论焦点与道德难题 [J]. *医学与哲学*, 2016, 37(15): 28-30, 33.
- [42] 刘博. 犹太教与伊斯兰教的洁食文化——解读饮食禁忌及其

- 伦理思想 [J]. 青海民族研究, 2014, 25(4): 175-178.
- [43] 宛磊. 伊斯兰文化与中华传统文化的碰撞与调试——浅析回民宰牛引起的冲突 [A]. 第八届“黄河学”高层论坛暨“回族伊斯兰文化与黄河文明”学术研讨会论文集 [C]; 2016.
- [44] 马贵宝. 伊新兰教关于宰牲的教法规定 [J]. 中国穆斯林, 2003, 17(4): 15-16.
- [45] Lafollette MR, Riley MC, Cloutier S, et al. Laboratory animal welfare meets human welfare; a cross-sectional study of professional quality of life, including compassion fatigue in laboratory animal personnel [J]. *Front Vet Sci*, 2020, 7: 114.
- [46] 何萌. 文明的礼物——现代死刑犯权利的探索与研究 [J]. 才智, 2013, 17(26): 173.
- [47] Khaejornbut J, Wilson DJ, Owens PD. The development and fate of the dental lamina of the mandibular first molar tooth in the rat [J]. *J Anat*, 1991, 179: 85-96.
- [48] Heim J, Rossi M, Fried B. Survival and distribution of *Echinostoma caproni* in the small intestine of ICR mice up to 36 hours after the death of the host [J]. *J Parasitol*, 2000, 86(2): 415-416.
- [49] Byrav DS, Medhi B, Vaiphei K, et al. Comparative evaluation of different doses of green tea extract alone and in combination with sulfasalazine in experimentally induced inflammatory bowel disease in rats [J]. *Dig Dis Sci*, 2011, 56(5): 1369-1378.
- [50] Mishra S, Chattopadhyay A, Naaz S, et al. Oleic acid as a restorative agent in alleviating adrenaline induced altered morphofunctional milieu of gastric tissue and mitochondria [J]. *Heliyon*, 2021, 7(3): e06476.
- [51] Sonavane G, Tomoda K, Makino K. Biodistribution of colloidal gold nanoparticles after intravenous administration; effect of particle size [J]. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2008, 66(2): 274-280.
- [52] 张程程, 彭艳, 陈海交, 等. 成年 SD 大鼠胃窦 Cajal 间质细胞分离、培养及鉴定 [J]. 湖南中医药大学学报, 2017, 37(11): 1226-1230.
- [53] 王敏, 杨柳, 谭红, 等. CK19 与 E-cad 在大鼠舌黏膜癌变过程中外周血的表达 [J]. 广东医学, 2016, 37(24): 3659-3662.
- [54] 李媛媛, 亓翠玲, 周芷晴, 等. 枸杞多糖对自发乳腺癌 MMTV-PyMT 小鼠肿瘤生长和转移的作用 [J]. 中国实验动物学报, 2016, 24(6): 618-621.
- [55] 张小红. 护生进行家兔空气栓塞实验的研究 [J]. 护理研究, 2008, 22(24): 2244-2245.
- [56] 何仕远, 张锡流, 崔锦珠, 等. 动物空气栓塞实验探讨 [J]. 华夏医学, 2007, 20(5): 896-897.
- [57] 夏晶, 张琳琳, 陈新山. 兔静脉空气栓塞死后不同间隔时间气体变化的初步研究 [J]. 中国法医学杂志, 2008, 23(3): 171-174.
- [58] Close B, Banister K, Baumans V, et al. Recommendations for euthanasia of experimental animals; Part 2. DGXT of the European Commission [J]. *Lab Anim*, 1997, 31(1): 1-32.
- [59] AVMA Panel on Euthanasia. 1986 report of the AVMA panel on euthanasia [J]. *J Am Vet Med Assoc*, 1986, 188(3): 252-268.
- [60] Brown OM. Impact of the 1986 report of the AVMA Panel on Euthanasia. American veterinary medical association [J]. *J Nutr*, 1987, 117(7): 1311-1313.
- [61] 盛超. 虎杖对产兔失血性休克后肺损伤保护作用的研究 [D]. 广州: 南方医科大学, 2010.
- [62] 董雪松, 刘伟, 刘淑英, 等. 百草枯致小鼠肺间质纤维化过程中 Smad3 蛋白的表达 [J]. 中国实验动物学报, 2012, 20(1): 88-90.
- [63] 韩凌霞, 王兴童, 陈洪岩. 关于禽类实验动物感染实验中的安乐死的分析与思考 [J]. 中国实验动物学报, 2015, 23(1): 105-109.
- [64] Ellis MV. Development of a compact system for field euthanasia of small mammals [J]. *J Mammal*, 2017, 98(4): 1211-1214.
- [65] Shusterman D, Avila PC. Real-time monitoring of nasal mucosal pH during carbon dioxide stimulation; implications for stimulus dynamics [J]. *Chem Senses*, 2003, 28(7): 595-601.
- [66] 潘金春, 罗银珠, 吴瑞可, 等. 小鼠感染细小病毒的临床特征分析 [J]. 中国实验动物学报, 2017, 25(1): 64-96.
- [67] Regmi B, Shah MK. Possible implications of animal models for the assessment of visceral pain [J]. *Animal Model Exp Med*, 2020, 3(3): 215-228.

[收稿日期] 2022-06-17