doi:10.11659/jjssx.12E018020

·技术方法·

改良大鼠舌下静脉采血法的应用

安 琪[1,2],傅龙龙[1,2],张长勇[3],谷翊群[2],葛争艳[4] (1.北京协和医学院研究生院,北京 100730;2.国家卫生计生委科学技术研究所男性生殖健康重点实验室,北京 100081;3.国家卫生计生委科学技术研究所实验动物中心,北京 100081;4.中国中医科学院西苑医院基础医学研究所,北京 100091)

[摘 要]**目的** 建立改良大鼠舌下静脉采血法,以更好更快地实现实验大鼠多次、安全、高质量的采血。**方法** 以10%水合氯醛溶液腹腔内注射麻醉大鼠后,充分暴露舌下静脉,采用一次性负压管进行舌下静脉取血。**结果** 经过改良后的舌下静脉采血方法,即使是初学者也可轻松收集到2~3 mL的血液样本,并且采血间隔时间短,对大鼠日常活动无显著影响。**结论** 改良后的舌下静脉采血符合动物福利原则,对于初学者来说是大鼠活体采血的首选方式,操作便捷样本质量高且对大鼠损伤相对较小。

[关键词]大鼠;舌下静脉;采血;动物福利

[中图分类号]R331 [文献标识码]A [收稿日期]2018-12-20

Improved method of blood collection from sublingual vein in experiment rats

AN Qi[1,2], FU Long-long[1,2], ZHANG Chang-yong[3], GU Yi-qun[2], GE Zheng-yan[4] (1. Graduate School of Peking Union Medical College, Beijing 100730, China; 2. Department of Male Clinical Research National Research Institute for Family Planning/WHO Collaborating Center for Research in Human, Beijing 100081, China; 3. Animal Experiment Center of Family Planning/WHO Collaborating Center for Research in Human, Beijing 100081, China; 4. Institute of Basic Medicine, Xiyuan Hospital of Chinese Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100091, China)

Abstract: Objective To achieve a method of multiple, safe and high quality blood collection in rats with the improved sublingual vein blood sampling. **Methods** After anesthetized the rats with intraperitoneal injection of 10% chloral hydrate solution, the hypoglossal vein was fully exposed and the blood was collected by disposable negative pressure tubes. **Results** The improved method of sublingual venous blood collection can easily collect blood samples of 2 to 3 mL, and the interval of blood collection was short with no significant effect on daily activities of rats. **Conclusion** The improved hypoglossal vein blood collection is the first choice for the beginners, and it is most in line with the principle of animal welfare. It is easy to gain high quality samples with relatively less damage to rats.

Keywords: experiment rats; sublingual vein; blood collection; animal welfare

大鼠作为实验中最常见的模型动物,因其饲养条件相对简单以及繁殖率高等特点而得到广泛的应用。目前,针对大鼠的血液采集法很多,如尾静脉采血、眼眶静脉丛采血、眼球摘除采血、心脏采血等,但对于一些需要大量反复安全采血的实验来说,这些采血方法都存在着一定的不足,尤其是当研究人员操作不熟练时,大鼠会处于应激状态使得采集过程血腥狼藉。同时,外界强烈的刺激会导致实验动物的血液生化成分发生改变,从而对检测造成影响,严重者甚至可导致实验动物的死亡而无法进行标本采集,因此采集到的血液样本质量往往决定着实验的结果[1]。在遵循动物福利原则和经典舌下静脉采血的操作基础上,我们发现改良后的大鼠舌下静脉采血具有可多次重复、取血量大、间隔时间短且损伤小等优点,且使用一次性采血针和真空负压管收集血液标本,可有效提高采血成功率和血液标本质量,尤其适用于多次采血进行动态监测指标的实验[2]。现报告如下。

1 材料与方法

1.1 材料器械

水合氯醛;0.9%氯化钠注射液;止血钳;一次性2 mL无菌注射器;大鼠固定板;手术恒温加热垫;LED手术灯;一次性人体静脉血样负压采血管;一次性静脉采血针(5.5号);医用棉球;医用棉棒;医用75%酒精。

1.2 实验动物

清洁级SD雄性大鼠,80只,体质量300 g左右,购自北京华阜康生物科技股份有限公司,生产许可证号SYXK(京)2014-0004。饲养环境:室温25 ℃,相对湿度50%。

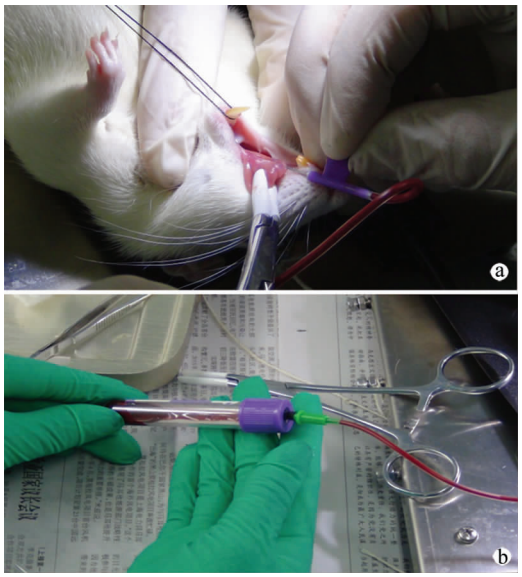
[基金项目]中央高校基本科研业务费专项资金(3332018187);中央级公益性科研院所基本科研业务费专项(2015GJZ08)

[通信作者]葛争艳,E-mail:yqgu90@126.com

1.3 方法

1.3.1 麻醉 按照0.3 mL/100 g的10%水合氯醛溶液安全剂量给药,一次性注射器抽取适量溶液后常规腹腔注射,一般在出现大鼠仰卧后无反正现象时为麻醉适宜指征,如未能麻醉完全,可最多再补充注射0.5 mL剂量并配合适当按摩腹部,忌反复追加注射。

1.3.2 取血 大鼠在注射药物3~5 min后即可处于麻醉状态,取仰卧位由1名助手左手持缝合线将下齿上提,同时右手固定大鼠头部,操作者手持止血钳夹住鼠舌后牵拉至口腔外一侧,既有利于充分暴露采血,也有利于保持呼吸道通畅,注意切勿过分牵拉反而造成采血困难。这时操作者可清楚见到大鼠舌下的2条静脉,持采血针与舌面10°~15°夹角刺入舌下静脉,如有回血则由另一名负责采血的助手将采血针的另一段插入负压管内,血液因负压吸引的作用被吸入到采集管中,而采血量多少则具体由实验需要决定(图1)。



a:采用5.5号采血针穿刺采血,注意回血情况;b:利用负压采血管收集血液样本

图1 大鼠舌下静脉暴露方法及穿刺方式

1.3.3 止血 由于牵拉的作用松开止血钳后,鼠舌自然伸出口外,待针头拔出后用棉棒按压进针处片刻即可止血。如遇到出血不止或者放置回笼后再次出血,则可用棉球填塞大鼠舌下出血部位止血,一般3~5 min即可。止血后清理口腔黏液并将大鼠取下放回鼠笼,务必采用侧卧位并保持鼠舌在嘴外置于一侧以免堵塞呼吸道,并注意在其周围补充垫料以保暖,但不要覆盖身体和头部以免影响观察苏醒情况以及影响呼吸道的通畅。

2 结果

改良后的大鼠舌下静脉采血一般都可取血2~3 mL。术后通过连续观察,未发现操作对大鼠造成任何严重影响。待大鼠苏醒后即可主动饮水,3~6 h后即可正常进食。与传统采血法相比,真空采血法可有效降低污染的风险,缩短了抽血时间,特别是采血真空管离心后既可得高质量血清样本,又可避免相互干扰影响检测指标[3](图2)。

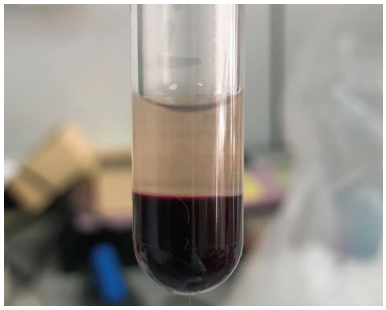


图2 离心后所得高质量血清(上层淡黄色澄清液体)

3 讨论

目前实验中应用的大鼠采血方法很多,常用的方法包括尾静脉穿刺取血、眼眶静脉丛采血、心脏采血、颈静脉采血、隐静脉采血、腹主动脉采血、断头采血等,但这些采血方式都存在一些不足之处,特别是针对要求反复安全采血时,质与量都难以保证,且时间也难以掌握,甚至造成取血致死而难以继续实验[4-8]。其中尾静脉采血量最少,仅适用于做血细胞计数,由于在操作过程中不可避免地将组织液挤入或将尾毛落入试管中造成溶血,显然这种方法很不适用于血清学指标的检测[9-10]。进行心脏采血时,需要从大鼠心跳最明显处进针,最难之处在于进针部位及深浅程度,即便是熟练的操作者也可能发生大鼠心包积血、心脏骤停等严重后果造成大鼠死亡[11-12]。断头法虽可取得大量血液,但极易被鼠毛和大量组织液所污染,最终影响实验的检测效果,且此法最大的缺陷就是只能作为实验的终极方式[13]。眼眶静脉丛采血虽然可取得一般检测所需的血量,但反复多次操作极易引发感染甚至损伤眼球[14-15]。

经典的舌下静脉采血对于操作者采血基本功要求较高,而经过改良后的舌下静脉采血可弥补以上不足,通过对80只大鼠的多次操作后发现经过改良的舌下静脉采血具有以下优点:①对大鼠损伤小,待其自然苏醒后即可饮水,3~6 h后可恢复正常进食。②大鼠舌下静脉在很短时间内便可自行修复,虽然在2~3 d内穿刺部位会有淤青,但并不影响后续采血,因此可反复操作。笔者建议每次在大鼠同一侧采血,到下次时换至对侧,这样有利于舌下静脉的自身修复以便于后续

实验操作。③对于初学者较易上手,尤其是在2~3人的团队分工配合下,磨合迅速且采血过程流畅,基本操作2~4只大鼠后即可进行流水作业。

水合氯醛是目前国内外动物实验中较常用的麻醉药物,具有诱导麻醉迅速、麻醉深度较浅,术后苏醒较快等优点,且对动物呼吸和循环系统影响较小[16]。水合氯醛在肝迅速代谢为具有活性的三氯乙醇,后者可因其脂水分配系数较高可进入血脑屏障,阻滞中枢神经系统的传导而产生麻醉作用。因此一定要术前禁食6~12 h,一方面原因为未禁食会造成动物体质量有差异,影响药物剂量的准确性从而导致过量,另一方面食物可能会反流阻塞气管。水合氯醛麻醉容易引起呼吸道分泌物增多,因此务必保持呼吸道通畅,如出现分泌物过多的情况,可肌注阿托品0.1 mL,必要时吸痰进行抢救。此外,麻醉后的大鼠体温通常较低,尤其是在冬天特别需要稳定的环境温度,因此可选用适当的取暖设备加以保温,以降低不良事件的发生率。

另外操作时还需注意:①采血时光线一定要充足,可配备使用便携式手术LED灯,且室温保持在25 ℃左右,如条件不允许则可使用手术加热垫辅助保温或使用40~45 ℃左右热水浸泡大部鼠尾,直至尾静脉明显扩张或鼠耳通红即可,但切勿过热,否则容易造成鼠尾烫伤或鼠尾挣扎,而室温过低则会造成静脉收缩影响进针,最终导致采血困难甚至失败。②麻醉深度要适宜且不要贪图麻醉数量,建议一批3~4只即可,即麻醉起效后立即实施采血。③为减少对鼠舌的损伤,笔者曾用普通饮料吸管经过剪裁后套在止血钳上,但由于大鼠自身唾液的影响口腔比较湿滑,可能会造成在采血过程中滑脱,建议用粗糙的橡皮管替代或用棉棒轻轻擦拭干唾液后再行操作。④由于初学者对此操作不熟练,可能会造成采血困难或出血,此时只需助手配合将负压管盖帽拧开并调整大鼠姿势后顺势接取血液即可,但切记要将鼠头朝下放置,且必须直接从舌下出血处滴入采集管内,这样才能避免唾液和血液混合后影响样本质量,如有条件则可使用真空分离胶管[4]。

基于安全可重复操作的前提条件下,我们认为该改良方法较简便,既可以满足基于各项实验检测所需血量,又可以减少实验动物无谓的牺牲。因此,改良后的舌下静脉取血可作为初学者的首选方法,待熟练操作累积一定经验后,再改为经典舌下静脉采血方式则更加稳妥。

[参考文献]

[1] 郑杰蔚,陆丰荣,李国樑,等. 不同麻醉剂及采血方式对SD大鼠和昆明小鼠血常规影响[J]. 中国职业医学,2018,45(1):51-54. doi:10.11763/j.issn.2095-2619.2018.01.010.

[2] 姜波涛. 探讨一种新的大鼠取血方法——舌下静脉采血[J]. 临床和实验医学杂志,2011,10(5):384. doi:10.3969/j.issn.1671-4695.2011.05.034.

[3] 邹 洪,闫洪涛,李 军,等. 大鼠实验研究中三种采血方法的应用[J]. 西南军医,2011,13(5):787-788. doi:10.3969/j.issn.1672-7193.2011.05.003.

[4] 何桂林. 大鼠舌下取血[J]. 上海实验动物科学,1999(3):136.

[5] 黄光琳,郑 军. 大鼠颈静脉采血体会[J]. 局解手术学杂志,2011,20(3):330. doi:10.3969/j.issn.1672-5042.2011.03.051.

[6] 杨 萍,赵 月,杨 帆,等. 改良大鼠颈静脉采血法[J]. 局解手术学杂志,2017,26(3):221-223. doi:10.11659/jjssx.07E016072.

[7] 王 洋,芦晓帆,李杭洁,等. 大鼠连续尾静脉采血方法研究[J]. 局解手术学杂志,2015,24(5):505-507. doi:10.11659/jjssx.05E015059.

[8] 李 研,于 峰. 大鼠腹主动脉真空采血管采血法[J]. 卫生毒理学杂志,2001(4):258. doi:10.3969/j.issn.1002-3127.2001.04.028.

[9] 王 超,王 铎,秦超,等. GLP试验中常用大鼠采血方法的探讨[J]. 实验动物科学,2017,34(6):58-60. doi:10.3969/j.issn.1006-6179.2017.06.013.

[10] 陈 霆,李枫棣,邓 巍,等. 小鼠内眦静脉丛注射与尾静脉注射比较[J]. 中国比较医学杂志,2014,24(1):72-73. doi:10.3969.j.issn.1671.7856.2014.001.017.

[11] 王明丽,张 晶,王耀辉,等. 大鼠多次采血常用的三种方法探讨[J]. 实验动物科学,2013,30(4):43-45. doi:10.3969/j.issn.1006-6179.2013.04.011.

[12] 周灵通,宋 敏,刘小钰,等. 三线定位法在大鼠心脏采血中的应用[J]. 局解手术学杂志,2017,26(12):919-921. doi:10.11659/jjssx.09E017016.

[13] 曹丽歌,蒋雪云,田 蜜,等. 不同取血方法和动静脉血对Wistar大鼠生化指标的影响[J]. 中国食品卫生杂志,2016,28(1):44-47. doi:10.13590/j.cjfh.2016.01.010.

[14] 马 征,刘秀英,黄 凰. 两种采血方法对大鼠生化和血相指标的影响研究[J]. 湖南师范大学学报(医学版),2012,9(2):44-46.

[15] 朱莹莹,李二妮,杨延云,等. 大鼠眼内眦采血的体会[J]. 局解手术学杂志,2014,23(3):324. doi:10.11659/jjssx.1672-5042.201403050.

[16] 李少春,马丽娜,李峰杰,等. 不同浓度水合氯醛对大鼠的麻醉作用比较[J]. 中国药业,2014,23(19):22-23.

(编辑:魏 源)