doi:10.11659/jjssx.07E016072

改良大鼠颈静脉采血法

杨 萍[1],赵 月[1],杨 帆[1],邵 震[1],王梦洁[1],李宇轩[1],庞小刚[2] (1.山东中医药大学中医学院,山东 济南 250355;2.山东中医药大学实验室管理处,山东 济南 250355)

[摘 要] **目的** 改进大鼠颈静脉采血法,以实现实验大鼠高质量、可循环采血,满足特殊实验要求。**方法** 实验大鼠腹腔麻醉后,采取特殊固定方法,充分暴露颈静脉,使用一次性真空采血管进行采血。**结果** 此法创伤性极低,本实验对60只大鼠进行间隔14 d的采血,一次采血1.8~2.5 mL,成功率在95%以上,对大鼠正常活动无明显影响。真空采血法保障了血清质量,血液检测与分析结果的准确性明显提高。**结论** 在动物福利原则基础上,改进后的大鼠颈静脉采血法具有操作简捷、创伤小、采血量大、血液标本质量高、可循环采血等优点,保障了特殊实验的有效进行。

[关键词] 实验大鼠;颈静脉采血;真空采血法;动物福利
[中图分类号] R331 [文献标识码] A [收稿日期] 2016-07-24

An improved method of blood collection from jugular vein in rats

YANG Ping[1],ZHAO Yue[1],YANG Fan[1],SHAO Zhen[1],WANG Meng-jie[1],LI Yu-xuan[1],PANG Xiao-gang[2] (Shandong University of Traditional Chinese Medicine,Jinan Shandong 250355,China;2. Laboratory Management,Shandong University of Traditional Chinese Medicine,Jinan Shandong 250355,China.)

Abstract: Objective To improve the method of blood collection from external jugular vein in rats,so as to repeatedly obtain blood samples of high quality and to meet the special requirements of the experiment. **Methods** The experimental rats were anesthetized by intraperitoneal anesthesia,and the jugular vein was fully exposed with special fixed method. Whereafter, the blood samples were collected by disposable vacuum blood vessels. **Results** This method had little traumatic effect. The blood samples were collected from 60 rats at an interval of 14

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81503539);山东中医药大学SRT项目(2015487)
[通信作者] 庞小刚,E-mail:pxgang@126.com

[5] Funao H,Kebaish KM,Isogai N,et al. Utilization of a technique of percutaneous S2-alar-iliac fixation in immunocompromised patients with spondylodiscitis:two case reports[J]. World Neurosurg,2016. doi:10.1016/j.wneu.2016.10.018.
[6] Chopko BW. Percutaneous thoracolumbar decompression combined with percutaneous pedicle screw fixation and fusion:a method for treating spinal degenerative pain in a biplane angiography suite with the avoidance of general anesthesia[J]. J Spine Surg,2016,2(2):122-127. doi:10.21037/jss.2016.06.03.
[7] Cui S,Busel GA,Puryear AS. Temporary percutaneous pedicle screw stabilization without fusion of adolescent thoracolumbar spine fractures[J]. J Pediatr Orthop, 2016, 36(7): 701-708. doi: 10.1097/BPO.0000000000000520.
[8] Wang MY,Grossman J. Endoscopic minimally invasive transforaminal interbody fusion without general anesthesia:initial clinical experience with 1-year follow-up[J]. Neurosurg Focus,2016,40(2):E13. doi:10.3171/2015.11.foucus15435.
[9] Tian Y,Liu X. Clinical outcomes of two minimally invasive transforaminal lumbar interbody fusion(TLIF) for lumbar degenerative diseases[J]. Eur J Orthop Surg Traumatol, 2016, 26(7):745-751. doi: 10.1007/s00590-016-1755-1.
[10] Lo WL,Lin CM,Yeh YS. Comparing miniopen and minimally invasive transforaminal interbody fusion in single-level lumbar degeneration[J]. Biomed Res Int,2015,2015:168384. doi:10.1155/2015/168384.
[11] Wang J,Zhou Y. Perioperative complications related to minimally invasive transforaminal lumbar fusion:evaluation of 204 operations on lumbar instability at single center[J]. Spine J,2014,14(9):2078-2084. doi:10.1016/j.spinee.2013.12.016.
[12] Wang J,Zhou Y,Zhang ZF,et al. Disc herniation in the thoracolumbar junction treated by minimally invasive transforaminal interbody fusion surgery[J]. J Clin Neurosci,2014,21(3):431-435. doi:10.1016/j.jocn.2013.04.029.
[13] Mobbs RJ,Phan K. History of retractor technologies for percutaneous pedicle screw fixation systems[J]. Orthop Surg,2016,8(1):3-10. doi:10.1111/os.12216.
[14] Bhatt AD,Schuler JC,Boakye M,et al. Current and emerging concepts in non-invasive and minimally invasive management of spine metastasis[J]. Cancer Treat Rev,2013,39(2):142-152. doi:10.1016/j.ctrv.2012.08.002.
[15] Mobbs RJ,Raley DA. Complications with K-wire insertion for percutaneous pedicle screws[J]. J Spinal Disord Tech,2014,27(7):390-394. doi:10.1097/BSD.0b013e3182999380.
[16] Raley DA,Mobbs RJ. Retrospective computed tomography scan analysis of percutaneously inserted pedicle screws for posterior transpedicular stabilization of the thoracic and lumbar spine:accuracy and complication rates[J]. Spine(Phila Pa 1976),2012,37(12):1092-1100. doi:10.1097/BRS.0b013e31823c80d8.
[17] 谢雁春,轩安武,项良碧,等. X线片对C1侧块螺钉位置的评估[J]. 局解手术学杂志,2016,25(11):819-823. doi:10.11659/jjssx.04E016077.

(编辑:刘 艺)

days with 1.8 to 2.5 mL each time. The success rate was above 95%, and the normal activities of the rats were not apparently affected. This vacuum blood collection method guaranteed the quality of serum, and the veracity of blood detection and analysis were also significantly improved. **Conclusion** On the basis of the principle of animal welfare, the improved rat jugular vein blood collection method has the advantages of simple operation, less trauma, large blood collection, high blood sample quality and so on, which can ensure the effect of the special experiment.

Keywords: experimental rat; jugular vein blood collection; vacuum blood collection; animal welfare

动物实验中常需进行血液指标检测。采血部位和方法的选择需根据实验要求、动物种类而确定,大型动物一般采取颈静脉采血法,小型动物一般采用眼球、断尾采血。高质量的采血方法是提高血液指标检测准确率的关键。颈静脉采血法具有创伤小、采血量大、可反复采血等优点[1],尤其适用于需多次采血动态检测血液各项指标的实验。真空采血法具有无菌、血液标本质量高等优点[2],亦可满足各项实验要求。我们在遵循动物福利原则基础上,结合真空采血法对大鼠颈静脉采血方法进行改进,有效提高了采血成功率和血液标本质量,为医学研究中实验大鼠血液指标检测提供实验基础。

1 材料与方法

1.1 材料

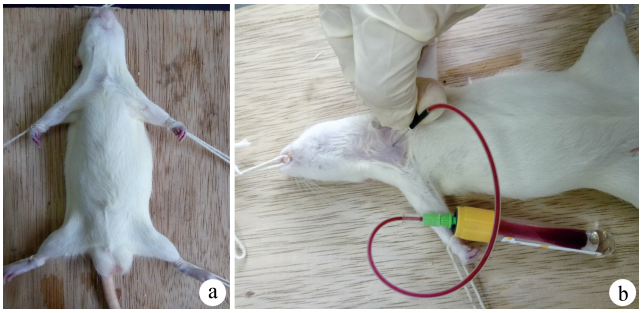
清洁级 SD 雄性大鼠,60 只,购自济南朋悦实验动物繁育有限公司,生产许可证号 SCXK(鲁)2014-0007,体质量 250 ~ 300 g。饲养环境:室温 20 ~ 25 ℃,相对湿度 40% ~70%。水合氯醛,天津市科密欧化学试剂有限公司,批号 20151010;0.9% 氯化钠注射液,山东华鲁制药有限公司,批号 E15122806;一次性 3 mL 真空采血管(分离胶管),江苏宇力医疗器械有限公司,批号 20160303;一次性血样采血针(22G),山东奥赛特医疗器械有限公司,批号 20150108;一次性 2 mL 注射器;解剖台。

1.2 实验方法

1.2.1 麻醉和固定 实验大鼠腹腔注射 7% 水合氯醛,0.5 mL/100 g 麻醉,达到最适麻醉指征,即呼吸平稳、角膜反射迟钝、全身肌肉松弛、止血钳夹捏皮肤反应消失。

采用特殊体位固定,保持头和身体平正。绑绳套住大鼠门牙将头拉直固定在解剖台上,下肢自然伸展固定。上肢向下肢的斜下方伸展固定;颈部与前肢呈大于 90°,小于 150°角(图 1a),一定不能将上肢固定成平举姿势,更不能固定成上举姿势,这些姿势改变了动物正常体位[3],不利于颈静脉在皮下充分暴露。

1.2.2 定位及穿刺 酒精棉球在颈静脉和锁骨交界区做大范围消毒,鼠毛即可自动分开显露穿刺区。肉眼可见血管在胸锁乳突肌下缘区搏动,若搏动不够明显,直接用手在锁骨中线处做小范围拔毛,使其应激搏动更加明显。将搏动处作为穿刺点,与皮肤成 45° ~60°角进针(图 1b),进针约 2 mm 后连接真空管,若见血流顺压力差进入真空管,则针尖已在颈静脉内,此时固定好针头,勿使其移动。若出血速度较慢,可用拇指轻度按压心脏;若针头处有进血,却未形成血流,可据实际情况往后移动针头,但多次移动会发生溶血;若未见出血则向前或向左右方向移动针头,切忌破坏真空环境。单侧取血失败可在短时间内换用对侧。常规情况下,一次抽取 1.8 ~2.5 mL 血液,大鼠无异常表现,采血完毕后轻压穿刺点 3 s 即可止血。



a:大鼠特殊固定方法;b:进针角度

图 1 大鼠固定方法及穿刺位置、角度

2 结果

2.1 采血量和采血成功率

所有大鼠腹腔注射 7% 水合氯醛 2 ~3 min 后即进入麻醉状态,麻醉持续时间为 60 ~90 min。对 60 只大鼠进行 5 次间隔 14 d 的采血,一次采血 1.8 ~2.5 mL,成功率为 96.7%,死亡 2 只。熟练掌握此技术,可将每只大鼠采血时间控制在 15 s 以内。此法创伤性低,短期内可进行循环性采血;7% 水合氯醛对心肌损伤小,能够明显降低心衰发生概率,大鼠死亡率较低。

大鼠血量约占体质量的 6% ~8%,一只 200 g 大鼠总血量约 14.0 mL。一次采血 2.0 mL 低于血容量的 20%,不会导致失血性休克[4]。红细胞 45 ~68 d 更新 1 次,一次失血 20% 后 1 ~2 周可恢复正常。观察发现,间隔 14 d 采血 1.8 ~2.5 mL 对大鼠正常活动无明显影响。

2.2 血样质量

与传统采血法相比,真空采血法优势如下[2,5]:血液采集过程中密封性好,无菌程度高;一次性将血液标

本注入到真空管内,直接用于离心,省略掉注射器抽血后注入试管的环节,消除了致污因素;注射器采血不可避免的推拉对固定很不利,易造成针头刺破血管,而采血针易于固定,可缩短抽血时间,避免因采血时间过长造成的溶血,血液检测与分析结果的准确性高。同时分离胶管可快速将血清与血浆分离,减少血液污染和细胞与血清间的相互干扰,维持血清中被测组分的稳定。真空采血法离心所得上层淡黄色澄清透明液体为血清,中间层为分离胶,下层为血细胞(图2)。

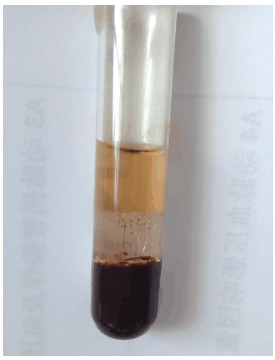


图2 离心所得高质量血清(上层淡黄色澄清透明液体)

3 讨论

大鼠颈静脉采血是常用的大鼠采血方法之一,以往文献有记载在大鼠清醒状态下直接抽取血液[4,6],但绑绳的强力束缚以及针刺痛感,违背了实验动物福利原则。亦有对大鼠采用乙醚吸入麻醉[1-2],然而乙醚麻醉剂量不易控制,且持续时间短,需不断补充给药,延长了实验时间;同时,其局部刺激作用大,反复吸入可刺激上呼吸道黏液分泌增加,并通过神经反射扰乱呼吸、血压和心脏活动,易引起窒息,增加了实验风险性[7-8]。在以往的实验中发现,吸入麻醉情况下,麻醉深度不易掌握,麻醉较浅动物容易挣扎,针头易从颈静脉中脱出,导致取血失败。

水合氯醛作为国内常用的麻醉药物,对动物呼吸和循环影响较小,具有麻醉诱导迅速、术后苏醒较快的优点。7%水合氯醛具有麻醉持续时间长、对心肌损伤小的优点,可显著提高实验动物的耐受性而降低死亡率[9],符合实验动物福利原则,充分保障实验结果稳定性,因此本实验选用7%水合氯醛腹腔注射方式进行麻醉后采血。

实验成功关键在于采取的特殊固定方法,即保持头和身体平正,用绑绳套住门牙将头拉直固定,上肢向斜下方伸展固定使颈静脉在皮下充分暴露。常规固定方法掩盖了颈静脉的搏动,成功率低。以往颈静脉采血法文献中未曾报道采血时应采用的具体固定方式[1,4],仅心脏采血法中有提及[3]。

本方法选用真空分离胶管进行采血,有效保障了血清质量,血液检测与分析结果的准确性进一步提高。血液采集在无菌条件下进行,消除了致污因素;血液标本直接注入到真空管内用于离心,避免了注射器反复抽吸对血细胞造成的破坏;真空采血管密封性好,避免了玻璃试管不加盖导致血液水分蒸发、血清浓缩影响测定;采血针灵活且易于固定,缩短了抽血时间,可避免因采血时间过长造成的溶血;同时分离胶管可将血清与血浆快速分离,减少血液污染和细胞与血清间的相互干扰,维持血清中被测组分的稳定。血样处理全过程均在同一真空管中进行,避免了血样污染,提高了工作效率,也减少了实验废物,有利于环境保护。

改进后的颈静脉采血法符合《实验动物管理条例》中规定的"从事实验动物工作的人员对实验动物必须保护,不得戏弄或虐待"[10],不仅满足3R原则(replacement 替代,reduction 减少,refinement 优化),减小了创伤面及血液浪费,可简捷、准确地完成实验,有效节约动物资源;而且在科学原则基础上,通过优化实验技术和完善实验程序,避免了给动物造成与实验目的无关的疼痛。提高科研人员对动物福利的重视,采用改良后的大鼠颈静脉采血法既能减少实验动物不必要的恐惧和疼痛,得到准确、有效的实验数据,又可保证实验的准确性和重复性,减少实验动物无谓的牺牲。

[参考文献]

[1] 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.

[2] 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,2001,15(4):258. doi:10.3969/j.issn.1002-3127.2001.04.028.

[3] 张 颖,望文桢. 大鼠心脏采血的几点体会[J]. 实验动物科学,2008,25(1):67-70. doi:10.3969/j.issn.1006-6179.2008.01.019.

[4] 车兆义,邹 悦,宋清斌. 大鼠实验中几种常用的采血方法探讨[J]. 局解手术学杂志,2008,17(2):84-85. doi:10.3969/j.issn.1672-5042.2008.02.005.

[5] 高燕波,何金苗,连永娥,等. 真空采血法与传统采血法在门诊与体检中应用效果比较[J]. 广东医学,2012,33(9):1362. doi:10.3969/j.issn.1001-9448.2012.09.069.

[6] 安 丽,鲍 清. 大鼠颈静脉采血新方法[J]. 中国比较医学杂志,2003,13(4):223. doi:10.3969/j.issn.1671-7856.2003.04.022.

[7] 周 洁,李 旸,张稳燕. 水合氯醛和戊巴比妥钠对KM小鼠麻醉效果实验研究[J]. 医学信息,2010,23(10):3795-3796.

[8] 何 华. 乙醚吸入与戊巴比妥那腹腔注射联合麻醉的应用[J]. 中国比较医学杂志,2008,18(1):30-31. doi:10.3969/j.issn.1671-7856.2008.01.009.

[9] 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.

[10] 刘 艳,王 珑. 浅谈动物实验过程中实验动物福利问题[J]. 中国公共卫生管理,2010,26(1):113-114.

(编辑:刘 艺)