SD 大鼠连续尾静脉采血方法研究

王 洋[1],芦晓帆[2],李杭洁[1],吴兆寰[1],李 亚[3],宋晓琳[1] (1. 河南中医学院,河南 郑州 450008;2. 北京中医药大学,北京 100000;3. 河南中医学院第一附属医院中心实验室,河南 郑州 450000)

[摘 要] **目的** 采用自制的固定器控制 SD 大鼠,并用改进的采血方法对其尾静脉进行连续采血,根据相关指标评价其效果。**方法** SD 大鼠 24 只在乙醚麻醉下,采用改进的一次性静脉输液针进行尾静脉采血并补充生理盐水,每日 1 次,连续 13 d。观察采血成功率和大鼠存活率。**结果** 24 只 SD 大鼠连续 12 d 采血成功;1 只 SD 大鼠在第 13 天死亡,原因为乙醚麻醉过量,只采到该只大鼠 0.2 mL 血液。采血成功率为 99.68%,SD 大鼠存活率为 95.83%。**结论** 使用改良后的一次性静脉输液针,实施 SD 大鼠尾静脉采血并补充生理盐水的方法安全有效、灵活方便,适用于连续时间点采集 SD 大鼠静脉血的实验研究。

[关键词] SD 大鼠;连续;尾静脉;采血

[中图分类号] Q95 - 336 [文献标识码] A [文章编号] 1672-5042(2015)05-0505-03

Research on methods of continuous blood sampling from caudal vein of SD rat

WANG Yang[1], LU Xiao-fan[2], LI Hang-jie[1], WU Zhao-huan[1], LI Ya[3], SONG Xiao-lin[1] (1. Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou Henan 450008, China; 2. Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100000, China; 3. Central Laboratory, First Affiliated Hospital of Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou Henan 450000, China)

Abstract: Objective To continuously draw blood from caudal vein of SD rats which controlled by the homemade holder with an improved method, and the effects of this method was evaluated according to the relevant indicators. **Methods** The 24 SD rats should be drew the blood from the caudal vein by the improved disposable infusion needle and supplied physiological saline at the condition of ether inhalation anesthesia and once a day until to the thirteenth day, and then the times of draw blood and the number of survival rats only to calculate the success rate and survival rate of rats were record. **Results** In the 12 days, the tail vein blood of 24 SD rats were successfully collected.

doi:10.11659/jjssx.05E015059

[基金项目] 国家自然科学基金(81302921)

[通讯作者] 李 亚,E-mail:yuanfengtcm@126.com

[收稿日期] 2015-06-20 [修回日期] 2015-07-15

TLR4、TLR7 能够激活多个下游分子,例如 NF-KB、P38、JNK 及 IFN 等一系列调节因子,从而促进癌细胞的生长与增殖,抑制癌细胞凋亡,促进癌细胞浸润及转移。我们认为,TLR4、TLR7 可能成为 CSCC 发病的生理机制以及治疗靶点的研究提供一个新的方向,具有潜在的应用前景。但是,对于 TLR4、TLR7 在 CSCC 微环境中的具体作用机制,将是我们以后进一步研究的重要课题。

[参考文献]

[1] 孙 午,熊 莺,王 敏,等. 黄芩苷对人淋巴细胞 Toll 样受体的调节[J]. 中国免疫学杂志,2012,28(8):706 - 711.

[2] 张小立,冯修高. TLR4 分子相关疾病及其临床上潜在的应用价值[J]. 中华临床医师杂志(电子版),2013,7(5):2192 - 2194.

[3] 马玉着. 子宫颈鳞癌组织中 TOLL 样受体 4、7 和 9 蛋白的表达及意义[D]. 安徽医科大学,2014.

[4] 张芳敏,韩子明,赵德安. Toll 样受体 4 和 Toll 样受体 7 在儿童原发性肾病综合征患儿肾组织中的表达及意义[J]. 临床儿科杂志,2014,32(6):512 - 516.

[5] 周晓妮,杨 欢,温会燕,等. Toll 样受体在不同转移能力人乳腺癌细胞株中的差异表达及意义[J]. 中华实验外科杂志,2011,28(5):662 - 664.

[6] Vaisanen MR, Vaisanen T, Jukkola-VuorinenA, et al. Expression of toll-like receptor-9 is increased inpoorly differentiated prostate tumors[J]. Prostate, 2010, 70(8): 817 - 824.

[7] 薛 源,韩 悦,张欣欣. Toll 样受体在肝衰竭发病中的作用研究进展[J]. 实用肝脏病杂志,2014,17(6):665 - 668.

[8] 张瑞平,买买提艾力·吾马尔,马 红,等. 新疆哈族和汉族食管癌中 Toll 样受体的表达及其与肿瘤细胞浸润和转移的关系[J]. 临床与实验病理学杂志,2012,28(4):362 - 367.

[9] 肖晶晶,郭奇桑,王宪政,等. TLR4/NO 通路在高危型 HPV 阳性的子宫颈癌组织和细胞中的表达及意义[J]. 中华妇产科杂志,2015,50(1):41 - 47.

[10] Hasimu A, Ge L, Li QZ, et al. Expressions of Toll-like receptors 3, 4, 7, and 9 in cervical lesions and their correlation with HPV 16 infection in Uighur women[J]. Clin J Cancer, 2011, 30(5): 344 - 350.

[11] Bergmann C, Bachmann HS, Bankfalvi A, et al. Toll-like receptor 4 single-nucleotide polymorphisms Asp299Gly and Thr399Ile in head and neck squamous cell carcinomas[J]. J Transl Med, 2011, 9(97): 6419 - 6426.

(编辑:杨 颖)

But a rat died of excessive ether inhalation anesthesia on the thirteenth day. The success rate was 99.68% and the rat survival rate was 95.83%. **Conclusion** The method that applying an improved disposable infusion needle and supplying physiological saline is safe and effective, flexible and convenient, which is suitable for experimental study that needs to draw blood from caudal vein of the SD rat at the continuous time.

Keywords: SD rat; continuous; caudal vein; blood sampling

静脉采血是动物实验中的常用技术手段,不仅为动物血液学指标的测定收集标本,而且也为其血清细胞因子的分析提供原料,同时也能为血液淋巴细胞、单核细胞的分离培养创造基础。然而,实验动物的血液采集绝非易事,尤其是需要多个时间点的大鼠采血,多次、重复、连续采血不易操作,容易导致动物实验的失败。这时就需要一种科学有效的采血方法,以往常用的静脉采血方式有眼眶后静脉采血法、颈静脉采血法、尾尖采血方法等,这些方法很难满足连续时间点的大鼠血液采集。本文在现有大鼠尾静脉采血方法的基础上进行改进创新,以 SD 大鼠为对象,进行了连续 13 d 的尾静脉采血和补充生理盐水,取得一定的经验与效果,现报告如下。

1 材料与方法

1.1 材料

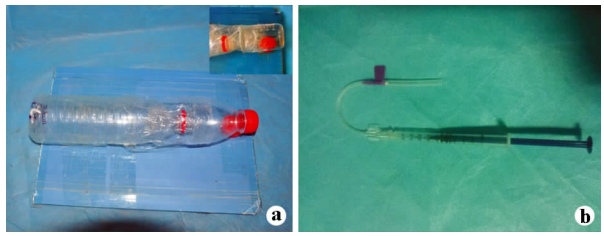
SPF 级 SD 雌性大鼠 24 只,3 月龄,体质量(200 ± 20) g,购于河南省实验动物中心[合格证号:SCXK(豫)2005-0001]。用灭菌的饲料和去离子水饲养于河南中医学院第一附属医院中心实验室标准 IVC 实验动物房内。75% 酒精、无水乙醚、0.9% 氯化钠溶液、1.5 mL 离心管、医用棉签、无菌橡胶手套。

1.2 固定器的制作

取容量为 500 mL,圆柱形且透明的矿泉水瓶制作简易的固定器。首先将商标剪下,打开瓶盖清洗干净后用 75% 酒精擦拭整个瓶体,自然风干。其次在最底部沿透明矿泉水瓶横断面将瓶底环状剪下,瓶底边缘处剪 1 个直径为 2 cm 的鼠尾洞口以便鼠尾露出,然后用橡皮筋将瓶底部和瓶身部再次连接(连接点一般选洞口对应的位置)。再次用透明胶带将修剪好的透明矿泉水瓶,整体固定在长 30 cm、宽 20 cm 的光滑塑料板上,固定时保证连接点在上而鼠尾洞口在下,两处连线最好与木板垂直,最后将瓶盖拧下套半截矿泉水瓶或烧杯,周围用保鲜膜封严备用。要求布置恰当(瓶尾部尽量靠近边缘,以便鼠尾垂下静脉充盈)、固定牢固(左右扭转无大幅度晃动,以延长固定器的寿命)、粘合紧密(瓶身与塑料板连接处均有透明胶带粘附且无漏,防止大鼠排泄物或药物进入缝隙,难于清理消毒)。使用前要求用 75% 酒精消毒以防交叉污染(图 1a)。

1.3 静脉采血针的制作

取 5.5 号一次性无菌静脉输液针。首先将静脉输液针(江苏康进医疗器材有限公司,批号 20140425)的软管从针柄连接部取下(注意不能损坏原有零部件,否则弃用),去掉前可以先扭转几下,见连接处滑脱松动,快速拉开。取下软管后,剪掉多余部分,留下 7 cm 左右软管(注意保留有针栓连接的部分),重新接到针柄尾部。因为此前软管已有松动,所以连接后一手捏紧连接处,另一手用力牵拉软管,以便软管紧密结合,保证连接处密封不漏。最后将一个 1 mL 注射器连接到剪切改装而成的静脉采血针的针栓上,待用(图 1b)。



a:简易固定器;b:改装后大鼠尾静脉采血针

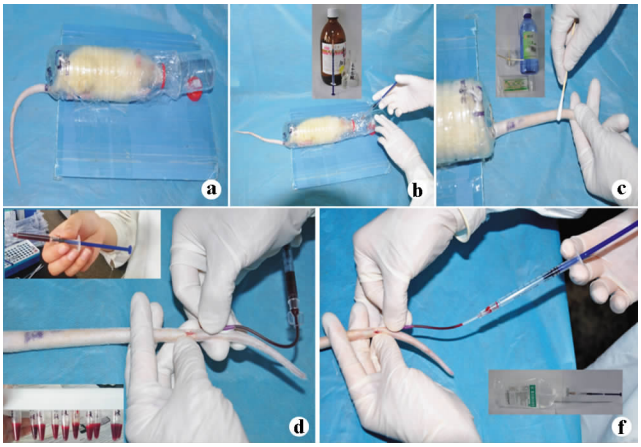
图 1 采血装置

1.4 操作方法

首先用 75% 酒精消毒制作好的大鼠简易固定器,待其自然挥发。利用 SD 大鼠喜好溜边钻洞的习性,抓起鼠尾让其快速钻入瓶中,顺势扣紧瓶底只留鼠尾在外。固定好大鼠后,向瓶口烧杯中注入 1 mL 无水乙醚,30 s 左右大鼠进入麻醉状态。此时,将大鼠尾部进行数次揉搓,使大鼠血管充分充盈,同时用 75% 酒精棉签进行消毒并去除外部鳞状角质层,充分暴露大鼠尾静脉血管,便于穿刺和快速获取血液。其次,选择尾部后 1/2 ~ 1/3段静脉血管[1],作为采血部位(应由远端开始,以免皮下出血影响持续采血)。操作者带一次性无菌手套,左手食、中指稍用力夹持 SD 大鼠尾静脉使血管充盈,同时拇指与无名指捏住鼠尾远心端(注意不能食、中指处在同一条静脉上,以免影响后续抽血),使鼠尾绷直无扭转弯曲。右手持针头,并保持 15°左右夹角 ,快速刺入血管,此时可有明显的"落空感"或将针头沿血管循行方向轻轻送入,突然阻力消失,同时软管内有少量血液露出,表明穿刺成功。此时,右手轻轻抽吸注射器,软管里有血液流出,即可继续缓慢抽吸注射器进行采血。若中途血液量少或消失,可左右微微调整针头或旋转针头,见血液流出方可继续采血。若血管瘪陷,则需稍压近心端,也可自上而下轻捋鼠尾,待其充盈后再采集。每只大鼠每天采集 0.6 mL 的血液与 1.5 mL 离心管内,采集完后回折软管,去掉采集有血液的注射器,更换上抽好 0.6 mL 生理盐水的注射器,缓缓进行注射(图 2)。

1.5 操作后护理

每只大鼠采血结束后均用 75% 酒精消毒,防止伤口感染,并用医用棉签按压针孔数秒止血。待大鼠苏醒后注意观察有无异常,无异常的放回笼中;若有异常,注意监视。



a:固定大鼠于固定器中,充分暴露鼠尾;b:在前端烧杯中注入无水乙醚对大鼠进行麻醉;c:75% 酒精棉签或棉球进行大鼠尾部消毒并去除外层鳞状角质层;d:用改装后的注射器进行尾静脉采血;e:尾静脉注射生理盐水补液

图 2　采血流程图

1.6　观察指标

每只大鼠每天成功抽取 0.6 mL 记为成功采血 1 次,记录每天采血次数。每天取血后观察大鼠的情况和大鼠的死亡数量,最后计算采血成功率以及大鼠存活率。

2　结果

连续时间段的前 12 d 内,24 只大鼠均穿刺成功,总采血次数为 311 次,采血总量达到 172.8 mL。第 13 天时,1 只 SD 大鼠因麻醉过量,采血到 0.2 mL 时死亡。采血成功率为99.68%,大鼠存活率为 95.83%。

3　讨论

SD 大鼠为美国 Sprague Dawley 农场用 Wistar 大鼠培育而成,被较多科学研究选用。实验中用 SPF 级 SD 大鼠,饲养于屏障动物房中,很大程度上避免了血液学指标的差异。其具有生长发育较快、个体较大的特点,但清醒状态下性情较 Wistar 大鼠凶猛,不易控制。所以实验操作时,固定大鼠显得尤为重要。本实验受到施文等[2]使用废弃 50 mL 离心管的启发,采用透明矿泉水瓶固定,其来源广泛、价格低廉,实验中便于观察大鼠的生命体征,实验后便于清洗、消毒。其小巧轻便,制作简单,不失为简、便、廉、效的固定方法。袁林祥等[3]采用棕色的瓶子则无方便观察的优点。另外,简易固定器的前端安置烧杯,便于乙醚注射,固定和麻醉于一体,极大缩减操作流程。

然而,在清醒状态下,直接用注射器尾静脉采血,大鼠尾部受到刺激时也容易出现缩进固定器内或者体位变动的情况,从而造成跑针,导致采血失败。若采血后进行药物干预,则需要再次穿刺才能进行。反复多次穿刺大鼠尾静脉,或者多个时间点连续采血还可造成大鼠尾部创伤较多,特别是尾静脉刺穿之后未能妥善止血,将会造成皮下淤青,导致后期无法继续采血或者影响实验结果,甚至大鼠死亡。同时在大鼠清醒状态下,其应激反应强烈,极有可能对实验结果产生背景性干扰[4]。因此,本实验对大鼠进行乙醚麻醉。乙醚为吸入性麻醉剂,容易通过血脑屏障产生中枢抑制,绝大部分以原型经呼吸道代谢,撤药后血液中含量很快下降[5],基本不影响后续实验进行。这种由气道给药、易于代谢、无呼吸抑制等作用特点,减少了麻药长期作用的不利风险[6]。

对于大鼠连续采血来说,尾尖采血法易溶血,眼眶后静脉采血对动物伤害比较大,颈静脉采血风险较大,心脏穿刺采血法动物死亡率较高[7],然而此法却克服了以上方法的弊端。大鼠连续尾静脉采血 13 d,比静脉留置针安全高效同时在留置时间上也有优势[8],同时也能避免大鼠的啃咬。

另外,静脉输液针,原料易取,购买方便。注射器针头用软管连接,增加了灵便型,不易跑针,且采血后可较方便地更换补液的注射器,避免再次穿刺,减少创伤。同时补液保持血容量,也可保证实验的顺利进行。若需药物干预,也同样方便操作。静脉输液针为临床患者使用,现改装为 SD 大鼠取血,这是真正意义上的伦理照顾。大鼠尾静脉采血时,注意选择合适型号的针头,5.5 号针头较粗,在抽吸力度较大时易出现血管塌陷,导致血管壁贴附针孔,影响采血速度,但较细针头也容易因采血过慢而发生凝血,导致针头堵塞,故采血时需适当练习注射器的抽吸力度。

综上所述,静脉输液针尾静脉采血具有方法简便、材料广泛、成本低廉、安全有效等优点,适用于连续时间点采集大鼠静脉血的实验研究。

[参考文献]

[1] 刘秉彦,白殿青,邱金成,等. 实用改良大鼠尾静脉穿刺置管术[J]. 海南医学,2011,22(14):15 - 16.

[2] 施　文,孙永强. 小鼠尾静脉注射和采血简易固定装置的制作和使用方法[J]. 免疫学杂志,2011,27(9):807 - 808.

[3] 袁林祥,刘湘丹,徐玉琴,等. 自制大鼠固定装置在大鼠断尾采血中的应用[J]. 局解手术学杂志,2015,24(1):27 - 29.

[4] 吴剑平,范乃兵,鞠晓云,等. 2 种采血方法大鼠应激神经内分泌反应的比较研究[J]. 吉林中医药,2014,34(10):985 - 986.

[5] 陈文哲,潘卫东,徐瑞云. 大鼠肝大部分切除术三种麻醉剂的效果比较[J]. 中华实验外科杂志,2011,28(6):932 - 934.

[6] 李　斌,张培建. 大鼠肝移植模型中乙醚、氯胺酮麻醉的对比研究[J]. 山东医药,2008,48(19):39 - 41.

[7] 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):44 - 45.

[8] 杨　敏,陈历健,王瑞敏,等. 大鼠尾静脉留置针固定方法的改进[J]. 中国比较医学杂志,2015,259(1):80 - 82.

(编辑:杨　颖)