doi:10.11659/jjssx.09E022063

·基础研究·

清醒大鼠颈静脉采血技术在药代动力学两周期交叉实验中的应用

商庆节[1],姜晓飞[2],赵永曜[1],武卫红[1],史国玉[1],葛秀允[1] (1.山东医学高等专科学校药学系,山东 济南 250002;2.山东省食品药品审评查验中心,山东 济南 250014)

[摘 要] **目的** 探讨清醒大鼠颈静脉采血技术应用于药代动力学两周期交叉实验的可行性。**方法** 24只SD大鼠,雌雄各半,按照简化随机法分成实验组和对照组,每组12只,雌雄各半。实验组大鼠模拟药代动力学两周期交叉实验,生理盐水口服灌胃或尾静脉注射,于给药前后不同时间点采用清醒大鼠颈静脉采血技术采血0.1 mL,每日记录大鼠体质量。对照组大鼠正常饲养不采血,每日记录大鼠体质量。**结果** 实验组单只大鼠在清醒状态下每周期颈静脉采血达11次,24 h内采血总量为1.1 mL,大鼠一次性颈静脉采血成功率为84.1%,大鼠存活率为100%。实验组大鼠的体质量与对照组大鼠的体质量比较,差异无统计学意义(P>0.05)。**结论** 采用清醒大鼠颈静脉采血技术不影响大鼠正常生长,可应用于药代动力学两周期交叉实验,能满足实验研究所需的采血次数和采血量要求,并符合动物福利"3R"原则。

[关键词] 清醒大鼠;颈静脉采血;药代动力学;两周期交叉实验
[中图分类号] R965.2 [文献标识码] A [收稿日期] 2022-09-12

Application of jugular vein blood sampling technique in pharmacokinetic double cycle crossover experiment in conscious rats

SHANG Qing-jie[1], JIANG Xiao-fei[2], ZHAO Yong-yao[1], WU Wei-hong[1], SHI Guo-yu[1], GE Xiu-yun[1] (1.Department of Pharmacy, Shandong Medical College, Jinan Shandong 250002, China; 2.Shandong Food and Drug Evaluation & Inspection Center, Jinan Shandong 250014, China)

Abstract: Objective To investigate the feasibility of applying jugular vein blood sampling technique in pharmacokinetic double cycle crossover experiment in conscious rats. **Methods** Twenty-four SD rats, half male and half female, were divided into the experimental group and the control group by simplified random method, with 12 rats of half male and half female in each group. Rats in the experimental group were simulated the pharmacokinetic double cycle crossover experiment, with oral administration or tail vein injection of normal saline, 0.1 mL of blood was collected by the jugular vein blood sampling technique in conscious rats at different time points before and after administration, and the body weight of the rats was recorded every day. Rats in the control group were normally fed without blood sampling, and their body weights were recorded every day. **Results** In the experimental group, blood was collected 11 times per cycle from the jugular vein in every conscious rat, and the total amount of blood collected within 24 hours was 1.1 mL, with the success rate of one-time jugular vein blood collection of 84.1%, and the survival rate in rats of 100%. There was no statistically significant difference in body weight between rats in the experimental group and the control group (P>0.05). **Conclusion** The jugular vein blood sampling technique of conscious rats does not affect the normal growth of rats and can be applied to the pharmacokinetic double cycle crossover experiment, which can meet the requirements of blood collection times and volume for experimental research, and conforms to the "3R" principle of animal welfare.

Keywords: conscious rat; jugular vein blood sampling; pharmacokinetics; double cycle crossover experiment

药物代谢动力学简称药代动力学,主要研究机体对药物的动态变化规律,阐明药物在机体内的吸收、分布、代谢、排泄过程及特征。非临床药代动力学研究结果能为临床试验设计和临床试验给药方案的优化提供相关参考。目前临床前两周期交叉药代动力学实验设计常用于研究药物生物等效性或绝对生物利用度,常采用犬、猴等大动物,费用昂贵,增加了药物开发成本。大鼠体型适中、性情温顺、易于繁育、经济易得,但是其体质量相对较轻,血容量少,而因药代动力学研究采血时间点多、清醒大鼠采血难度大等因素,目前大鼠的临床前药代动力学实验多采用眼眶静脉丛采血。眼眶静脉丛采血对大鼠生长影响大,也不符合实验动物"3R"福利的原则,严重制约了大鼠的药代动力学两周期交叉实验设计。为克服大鼠眼眶静脉丛采血难以应用于药代动力学两周期交叉实验的劣势,本研究采用清醒大鼠颈静脉采血技术,通过生理盐水口服灌胃和尾静脉注射,模拟药代动力学绝对

[基金项目] 山东省医药卫生科技发展计划项目(202013050903)
[通信作者] 葛秀允,E-mail:gexy@sdmcjn.edu.cn

生物利用度研究过程中常用的两周期交叉实验，探讨药代动力学两周期交叉实验中多次颈静脉采血对大鼠体质量的影响，以期为大鼠的临床前药代动力学两周期交叉实验设计提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

SPF级SD大鼠，24只，雌雄各半，购于济南朋悦实验动物繁育有限公司，许可证号：SCXK（鲁）20190003，合格证号：370726220100830085，体质量200～240 g；饲养环境：温度20～25 ℃，相对湿度40%～70%。^{60}Co灭菌实验动物饲料，购于济南朋悦实验动物繁育有限公司（批号：20220715）；0.9%氯化钠注射液，购于山东华鲁制药有限公司（批号：SD21112208）；一次性肝素钠抗凝管（规格：0.5 mL），购于石家庄康卫仕医疗器械有限公司（批号：210606）；一次性无菌注射器（规格：1 mL），购于安徽康泰医疗器具有限公司（批号：2022030）。

1.2 实验设计

将24只SD大鼠按雌雄分开，分别称量体质量后按简化随机法分成实验组和对照组，每组12只，雌雄各半。实验组大鼠模拟药代动力学两周期交叉实验，两周期交叉实验给药前12 h所有大鼠禁食不禁水，选取6只大鼠给予0.5 mL生理盐水口服灌胃，另外6只大鼠给予0.5 mL生理盐水尾静脉注射，并分别于给药前和给药后0.1 h、0.2 h、0.5 h、1 h、2 h、4 h、6 h、8 h、12 h、24 h采用清醒大鼠颈静脉采血技术对大鼠采血0.1 mL，置于0.5 mL一次性肝素钠抗凝管中抗凝，3 000 r/min离心10 min，取上层血浆于-20 ℃冷冻，并每日记录大鼠体质量。1周后实验组灌胃给药大鼠与尾静脉注射给药大鼠交叉重复上述给药操作，并继续每日记录大鼠体质量1周。未能一次性颈静脉采血成功的大鼠可通过及时补采血的方式完成各时间点的采血，颈静脉采血期间同时记录颈静脉采血成功率和大鼠存活率。对照组大鼠正常饲养不采血，仅在实验组禁食不禁水期间同期禁食不禁水12 h，每日记录大鼠体质量。

1.3 清醒大鼠颈静脉采血技术

将大鼠置于饲养笼笼盖或实验台上，采血者一只手向后牵拉鼠尾，在大鼠向前爬行时用另一只手抓住大鼠的颈背部皮肤，提起、翻转，让大鼠竖立，身体自然下垂，胸前部皮肤绷紧，面向采血者。将大鼠左上肢附近胸前毛发剃掉，用酒精棉球消毒。待酒精完全挥发后，以手按压大鼠胸前消毒区域，找到胸骨舌骨肌与胸乳突肌形成的凹陷沟，此处即为大鼠颈静脉采血位置，手持1 mL一次性无菌注射器，针尖斜面朝上，与大鼠胸部呈约45°夹角，沿着凹陷沟刺入针头3 mm左右，轻轻抽取注射器栓使其呈负压状态，此时若无血液流出，可试探性前后进退注射器针头，待血液自动流入注射器内达到采血量要求时，拔出注射器，用干棉球按压止血，见图1。



图1 清醒大鼠颈静脉采血

1.4 统计学处理

采用SPSS 26.0软件进行统计学分析，2组大鼠体质量以均数±标准差（$\bar{x}\pm s$）表示，采用重复测量数据的两因素多水平统计分析，将干预因素作为A因素，每天称量大鼠体质量的时间作为B因素，观察2组大鼠体质量差异是否具有统计学意义，并考察时间和分组的交互作用。

2 结果

2.1 大鼠采血与存活情况

实验组12只大鼠清醒状态下两周期交叉实验的颈静脉采血点共264个，单只大鼠在清醒状态下每周期颈静脉采血达11次，24 h内采血总量为1.1 mL，大鼠一次性颈静脉采血成功率84.1%，每次颈静脉采血可在20 s内完成，即使有个别需补采血的时间点，其整个采血时间也控制在1 min内。采集的血液经离心后分离的血浆大多呈淡黄色透明液体，极个别血浆有程度不一的溶血。所有实验大鼠采血后状态良好，存活率100%。

2.2 大鼠实验期间体质量变化

对照组大鼠体质量随大鼠周龄增加而稳步增长，实验组由于多次抓取和采血刺激，大鼠在采血期间体质量增长较慢，但由于大鼠自身恢复能力较强，每次采血后其体质量增长均能迅速恢复并接近于对照组大鼠，见表1。

重复测量数据的两因素多水平统计分析结果显示，不同组别的大鼠体质量检验结果差异无统计学意

义(P>0.05),2组大鼠不同时间点体质量比较差异具有统计学意义(P<0.05),时间和组别的交互作用无统计学意义(P>0.05),见表2。

表1 2组大鼠体质量比较($\bar{x}\pm s$,n=12,g)

时间	实验组	对照组
第1天	221.1±16.8	220.9±15.3
第2天	221.4±17.9	226.0±17.0
第3天	226.5±17.5	230.4±17.3
第4天	232.0±18.4	235.0±17.8
第5天	237.7±18.8	239.9±19.2
第6天	243.4±18.9	245.2±20.8
第7天	248.9±20.4	248.9±22.3
第8天	248.1±20.8	250.3±22.5
第9天	250.8±21.5	253.3±23.2
第10天	253.6±22.7	256.2±24.4
第11天	256.3±23.7	258.8±25.7
第12天	259.2±25.0	261.1±26.9
第13天	262.3±26.9	263.4±28.4
第14天	265.4±29.1	266.7±30.8

表2 2组大鼠两因素多水平统计分析

主体效应	检验方式	P
时间	Greenhouse-Geisser	<0.001
时间*分组	Greenhouse-Geisser	0.560
分组	主体间效应检验	0.823

时间*分组为测定时间与组别的交互作用

3 讨论

实验大鼠的循环血容量一般为58~70 mL/kg[1],为了降低采血对动物的影响,保证临床前药代动力学结果的准确性,国家药品监督管理局于2014年5月发布的《药物非临床药代动力学研究技术指导原则》建议尽量在动物清醒状态下进行实验,最好对同一动物多次采样获取药代动力学参数,同时注意采血途径和整个试验周期的采血总量应不影响动物的正常生理功能,一般不超过动物总血量的15%~20%,每只大鼠24 h内采血总量不宜超过2 mL,在采血的同时兼顾动物福利。

常用的大鼠采血方式有眼眶静脉丛采血法、舌下静脉采血法、颈静脉采血法、腹主静脉采血法等[2-3]。大鼠药代动力学研究需多次采血,由于腹主静脉采血法和舌下静脉采血法无法满足多次采血的要求,因此目前大鼠药代动力学研究最常用的采血方式是眼眶静脉丛采血法和颈静脉采血法。眼眶静脉丛采血法采用玻璃毛细管扎破大鼠眼眶静脉丛进行采血,采血过程中可能出现眼内液混入血液等情况,会影响凝血功能和血药浓度的结果[4],无法准确反映药物在大鼠体内的药代动力学真实过程。此外,非麻醉状态下进行大鼠眼眶静脉丛采血会造成动物疼痛、挣扎及其他应激反应,不符合实验动物福利,且英国实验动物"3R"国际中心提出眼眶静脉丛采血法仅建议用于动物麻醉后的临终前采血,或动物全麻状态下没有其他采血方法可代替时才能采用[5]。目前大鼠颈静脉采血法成为了代替眼眶静脉丛采血法的主流采血技术,为降低操作难度,许多操作者选择麻醉后直接颈静脉采血[6],或者将大鼠麻醉后进行颈静脉插管,利用颈静脉留置管采集血液[7]。大鼠麻醉后直接颈静脉采血虽然能降低采血操作难度,但麻醉药物有可能影响药物在动物体内的药代动力学过程,且麻醉药物的剂量难以掌握,容易导致动物死亡。此外,大鼠颈静脉插管手术难度大,还需要一定量的抗凝剂封管,为了确保实验的准确性,插管大鼠每次采血时需要弃去部分早期流出的混合了抗凝剂的血液,故插管大鼠每次实际采血量会超出设计采血量,容易影响大鼠正常的生理功能。

采用清醒大鼠颈静脉采血技术可以满足大鼠药代动力学研究所需采血次数和采血量的要求。本实验单只大鼠在清醒状态下颈静脉采血达11次,24 h内采血总量为1.1 mL,远低于《药物非临床药代动力学研究技术指导原则》建议的24 h内采血总量不超过2 mL的标准;每次采集的0.1 mL血液在肝素钠抗凝离心后能获得40 μL左右的高质量血浆,结合高灵敏度的液质联用仪或气质联用仪基本能满足大部分药物的血药浓度分析测定;此外,大鼠的自身修复能力较强,经1周的洗脱期后,大鼠身体状态基本可以恢复如初,能够满足下1个周期的药代动力学采血需求,这为采用大鼠进行药代动力学两周期交叉实验奠定了基础。

本研究通过对实验组大鼠进行生理盐水口服灌胃和尾静脉注射,模拟药代动力学两周期交叉实验,结果显示2组大鼠实验期间的体质量差异无统计学意义,可以认为在大鼠药代动力学两周期交叉实验期间多次颈静脉采血不影响大鼠的正常生长,清醒大鼠颈静脉采血技术可应用于大鼠药代动力学两周期交叉实验研究,这为采用大鼠开展两周期交叉药代动力学实验研究提供了理论依据。两周期交叉实验具有可消除个体间变异、统计精度高、可减少样本量的优势,因此采用两周期交叉实验设计符合动物福利"3R"原则中的"减少"的原则。本研究采用小动物大鼠代替犬、猴等大动物进行两周期交叉实验,符合动物福利"3R"原则中的"替代"原则。本研究采用的清醒大鼠颈静脉采血技术,具有随抓随采、单次采血时间短、操作相对简单、对动物创伤小、采血量满足实验要求、