

· 研究报告 ·

一种新的非麻醉实验大鼠尾静脉采血方法的建立

陆晓华 徐蕾 王国光 江晔 谢天承 黄爱杰 陈倩 陈丹

大鼠是医学科研和教学较理想而常用的实验动物之一,实验大鼠采血标本的优劣,直接影响血液学指标的检测及实验数据的准确性,对整个实验的成败至关重要。由于大鼠体型小、血管细微且性情较凶猛,受惊时易攻击咬人,这给实验大鼠的采血带来了一定的困难。目前大鼠的采血方法主要有腹主动脉采血、眼眶后静脉丛采血、眼眶采血、心脏穿刺采血、尾静脉微量采血(即尾静脉刺血或割尾静脉采血)、尾尖采血(即剪尾采血)、颈外静脉或颈总动脉采血,还有断头取血等^[1-4]。其中眼眶后静脉丛采血、眼眶采血、尾静脉微量采血、尾尖采血为非麻醉采血;以上采血方法大多在麻醉状态下进行的,动物损伤应激反应大,采血量不足,易溶血,且不宜反复多次采血^[4-7]。这些采血方法用于某些实验有其优点,但在某些实验中就不太适合,特别是对于那些要求实验大鼠在非麻醉清醒状态下,排除麻醉药的干扰,以及采血后实验大鼠能继续饲养观察等,至今未见有很好的解决方法^[4-7]。非麻醉状态下,大鼠完全清醒,机体的功能代谢不受麻醉药的影响和干扰。在这种状态下,大鼠的药代动力学以及某些分子标志物等表达更接近实际。因此,建立一套大鼠在非麻醉状态下,避免麻醉药的干扰,减少大鼠的应激反应和损伤,采血量足,不易溶血,且能反复多次采血的方法,具有重要的实用价值。笔者经过多年的工作实践研究,摸索并建立了一套大鼠非麻醉状态尾静脉采血方法,介绍如下。

1 材料与方

1.1 实验材料:SPF 级 SD 或 Wistar 大鼠(由皖南医学院动物供应中心提供,动物许可证号:SCXK2009-0001),雌雄不拘,体质量 120~350 g。捉鼠手套、卵圆钳、7 号或 8 号静脉输液针、1.5 mm 内径硅胶管、消毒用乙醇、棉棒、纱布、EP 采血管、套装大鼠深色布袋、弯止血钳、500 mL 塑杯等。

1.1.1 套装大鼠深色布袋制作:采用较厚深色布料制作一个一端有透气孔、另一端可用棉绳收紧的圆筒布袋,圆筒直径 9 cm、长 24 cm,宽度比大鼠身体略大。装入大鼠只露尾巴。

1.1.2 尾静脉采血针的准备:根据大鼠的大小选择适合的静脉输液针(常用为 7 号、8 号),拔下针头除去导管,接上内径 1.5 mm、长 0.5 cm 的软质硅胶管。软质硅胶管具有抑制血小板、血细胞聚集的抗凝血作用,若无软质硅胶管可用静脉输液导管代替。见图 1。

DOI:10.3760/ema.j.issn.2095-4352.2014.03.015

基金项目:国家自然科学基金青年基金(30900243);国家发明专利(201210239909.3);国家实用新型专利(ZL201120527321.9)

作者单位:241002 安徽芜湖,皖南医学院机能实验中心(陆晓华),生化教研室(徐蕾),病理生理教研室(王国光),学生科研兴趣小组(江晔、谢天承、黄爱杰、陈倩、陈丹)

通信作者:王国光,Email: guoguangw1226@sina.com

1.2 实验动物的准备

1.2.1 大鼠尾静脉解剖结构:大鼠有 3 根尾静脉,位于尾巴左右两侧和背侧各 1 根(见图 2)。左右两侧静脉显露较表浅,为采血穿刺首选,背侧正中位置较深,次选之;穿刺在鼠尾末 1/4 处较适宜,此处静脉表浅显露,血管粗细适中。大鼠尾部表面常露有一层角鳞,在操作前用小镊子轻刮或用温水浸润去除角鳞,并用自来水将大鼠尾巴污垢清洗干净。

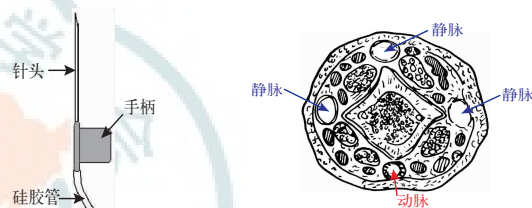


图 1 非麻醉大鼠尾静脉采血针 图 2 非麻醉大鼠鼠尾横截面

1.2.2 实验大鼠的驯化:买回来的大鼠根据实际需要,先适应性饲养驯化 2~3 d。即每天将大鼠拿起来抚摸几下,并且将大鼠放入布袋固定做出要采血的样子,每天 2 次。待大鼠驯化后再行尾静脉采血。买回来的大鼠经过适应性饲养驯化后,基本上能依从尾静脉采血。

1.3 采血方法及步骤(图 3):采血室温度以 25℃为宜,捉拿大鼠时要轻柔,将大鼠放进(引入)深色布袋,露出鼠尾收紧布袋口。将洗净的鼠尾放入 45~50℃(手感不烫即可)热水里热浴至尾静脉血管充分扩张,然后擦干鼠尾。两人同时操作,一人固定大鼠,用拇指和食指捏住鼠尾两侧,使两侧尾静脉充盈显露;另一人在鼠尾末 1/4 处用乙醇棉棒消毒,然后持尾静脉采血针沿着一侧尾静脉向心方向穿刺进针,若穿刺进入尾静脉,血液即进入针头并沿着软质硅胶管流出,用 EP 管接血。在采血过程中要不停地用拇指、食指或止血钳轻轻按摩鼠尾,以利于血液流出。采血完毕后止血消毒,将大鼠从布袋拿出,放入箱中继续饲养。要想再次采血,则可按上述方法操作。

1.4 实验大鼠的分组及观察指标:① 1 组:体质量 120~160 g 10 只,雌雄各半,每只采血 0.5 mL;② 2 组:体质量 120~160 g 10 只,雌雄各半,每只采血 1.0 mL;③ 3 组:体质量 161~200 g 10 只,雌雄各半,每只采血 1.5 mL;④ 4 组:体质量 201~250 g 10 只,雌雄各半,每只采血 2.0 mL;⑤ 5 组:体质量 251~300 g 10 只,雌雄各半,每只采血 2.5 mL;⑥ 6 组:体质量 301~350 g 10 只,雌雄各半,每只采血 3.0 mL。

1.5 统计学处理:记录每只大鼠尾静脉穿刺次数并统计均数,以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示;将采血量和穿刺次数的均数进行直线相关分析; $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。



图3 非麻醉实验大鼠尾静脉采血流程 将大鼠适应性饲养驯化后放进深色布袋(a),露出鼠尾收紧布袋(b),将鼠尾浸入热水中(c),擦干鼠尾,捏住鼠尾使两侧尾静脉充盈显露,持尾静脉采血针沿一侧尾静脉向心方向穿刺(d),血液沿硅胶管流出(e),EP采血管取血2 mL(f)

2 结果

从表1可看出,1组、2组尾静脉穿刺次数相等,3组、4组尾静脉穿刺次数相等。相关分析表明,采血量与穿刺次数之间存在高度正相关($r=0.960, P<0.01$),说明随着采血量增大,穿刺次数有相应增加的趋势。

表1 不同体质量非麻醉实验大鼠尾静脉采血量及平均穿刺次数比较

组别	体质量(g)	采血量(mL)	穿刺次数(次, $\bar{x} \pm s$)
1组	120~160	0.5	1.20 ± 0.42
2组	120~160	1.0	1.20 ± 0.42
3组	161~200	1.5	1.30 ± 0.67
4组	201~250	2.0	1.30 ± 0.48
5组	251~300	2.5	1.40 ± 0.70
6组	301~350	3.0	1.50 ± 0.71

3 讨论

大鼠实验需采血进行血液学指标检测时,若采血量不足或溶血,将直接影响血液学指标的检测及实验数据的准确,甚至影响到整个实验的成败。大鼠红细胞每45~68 d更新一代,每小时进入血循环的红细胞达 2.4×10^7 个,一次失血不超过全身血容量30%不会导致失血性休克,且1~2周内可恢复^[8]。以一只200 g体质量的大鼠为例,血容量约占体质量的6%~8%,大约相当于14 mL全血,一次采血2 mL,低于全身血量的30%,不会导致失血性休克;间隔7 d再采血2 mL,对血液成分、营养状况及生命活动无明显影响^[4,9-10]。

笔者经过多年的工作实践研究,摸索并建立了一套大鼠非麻醉状态下尾静脉采血的方法,该法不是采用惯用的注射器采血,而是采用特制的尾静脉采血针采血。以往的注射器是通过增加负压来采血,它对于牛、马、羊等大型动物的采血较为适合,而对小鼠、大鼠等小型动物的采血就不太适合了。因大鼠、小鼠血流量小,若注射器拉杆拉快了,血管内负压过大,血管就塌瘪而阻止了血液流出;若拉杆拉慢了,血液流速减慢,血液易凝结,则不易采血。本实验使用大鼠尾静脉采血针,当采血针头穿刺进入尾静脉时,血液即进入针头并沿着软质硅胶管流出,这样流出的血不易溶血。与目前常用的非麻醉实验大鼠采血如眼球后静脉丛采血、眼眶采血、尾尖采血和尾静脉微量采血等比较,该方法最大特点是实验大鼠不仅在非麻醉清醒状态下采血,不受麻醉药的干扰,而且大鼠损伤应激反应小,采血量足,不易溶血,采血后创口小不易感染,能反复多次采血,适用于采血后实验大鼠继续饲养观察、多次采血的实验。根据表1实验结果可以看出,随着采血量的不断增大,尾静脉穿刺次数也在增加,主要是因为血液经针

头软质硅胶管流出时间长导致血液凝固,这就需要再次甚至多次穿刺才能采足所需血量;其次采血时间长,大鼠长时间固定表现出强烈的挣脱不顺从,鼠尾扭转使采血针逸出脱落尾静脉等情况出现,需要重新穿刺采血,重新穿刺部位要在原穿刺部位向尾根部方向前移一点。由于大鼠尾静脉细微,穿刺采血有一定的难度,采血者要具备一定的实验技术和熟练程度采血才能成功,这可能是本采血方法的不足之处,但通过练习则可以提高采血的熟练程度。此种方法用于小鼠尾静脉采血效果也很好;用在家兔耳中央动脉、耳缘静脉、后肢胫部皮下静脉以及犬小隐静脉、头静脉等采血效果更好。

实验大鼠尾静脉采血的几点体会:①大鼠尾静脉热水浴要注意水温不能过高(以不烫手为宜),以免烫伤鼠尾。热水浴时要将鼠尾静脉热浴透,使鼠尾静脉血管充分扩张充血,这样尾静脉穿刺出血快,采血时不易凝固,单次采血量多。一只200 g的实验大鼠如果尾静脉热浴得好,尾静脉穿刺一次能采血2~3 mL。②在反复多次尾静脉采血过程中,大鼠的依从性将越来越好。

当然,这种采血法并不能完全替代其他采血法,实验者应根据自己的实验需要而选择。

志谢 本文得到了皖南医学院陈靠山教授、暨南大学陆大祥教授的悉心指导,特此鸣谢

参考文献

- [1] 魏伟,吴希美,李元建.药理学实验方法学[M].4版.北京:人民卫生出版社,2010:44-45.
- [2] 李晓晶,刘瑾.实验动物采血方式优缺点比较[J].辽宁中医药大学学报,2009,11(11):217-218.
- [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.
- [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.
- [5] Fluttert M, Dalm S, Oitzl MS. A refined method for sequential blood sampling by tail incision in rats [J]. Lab Anim, 2000, 34(4): 372-378.
- [6] Grouzmann E, Cavadas C, Grand D, et al. Blood sampling methodology is crucial for precise measurement of plasma catecholamines concentrations in mice [J]. Pflugers Arch, 2003, 447(2):254-258.
- [7] van Herck H, Baumans V, Boere HA, et al. Orbital sinus blood sampling in rats: effects upon selected behavioural variables [J]. Lab Anim, 2000, 34(1):10-19.
- [8] 施新猷. 医用实验动物学 [M]. 西安: 陕西科学技术出版社, 1989:461-462.
- [9] 陈奇. 中药药理研究方法学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1993: 106.
- [10] 赵洪礼. 现代基础医学常用实验技术 [M]. 北京: 科学出版社, 2002:211-212.

(收稿日期:2013-12-02) (本文编辑:李银平)