

负压吸引装置抽取大鼠脑脊液方法的改良

王 伟, 李东斌, 罗秀梅, 刘竞丽*

(广西医科大学第一附属医院神经科, 南宁 530021)

【摘要】 目的 在负压吸引装置法抽取大鼠脑脊液的基础上进行改良, 进一步提高大鼠脑脊液收集的成功率。**方法** 通过增加流量调节器控制负压强度、限定脑脊液的每次抽取量对原装置进行改良; 36 只雄性 SD 大鼠随机分为 3 组, 分别用经皮延髓池穿刺法、负压吸引装置法、改良负压吸引装置法抽取脑脊液, 用 Kruskal-Wallis 秩和检验评价 3 种方法的差异。**结果** 改良负压吸引装置法能有效减少出血, 取得的脑脊液的质量高于负压吸引装置法 ($P < 0.01$) 及经皮穿刺延髓池穿刺法 ($P < 0.001$), 抽取合格样本的成功率为 75%。**结论** 改良负压吸引装置制作方便, 操作简单, 损伤小, 不易出血, 可明显提高大鼠脑脊液采集的成功率。

【关键词】 改良; 负压吸引装置; 大鼠; 脑脊液; 穿刺

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2018) 01-0091-05

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2018.01.016

A modified suction device with negative pressure for cerebrospinal fluid collection in rats

WANG Wei, LI Dongbin, LUO Xiumei, LIU Jingli*

(Department of Neurology, the First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530021, China)

【Abstract】 Objective To improve the success rate of cerebrospinal fluid (CSF) collection in rats using a modified suction device with negative pressure. **Methods** A flow regulator was added to the original apparatus to adjust the intensity of negative pressure and to limit the volume of CSF collected each time. A total of 36 male Sprague-Dawley (SD) rats were randomly divided into 3 groups, and the CSF was collected in 3 ways: drawing from the cerebellomedullary cistern via percutaneous puncture, using a suction device with negative pressure and using a modified device. Kruskal-Wallis test was used to evaluate the differences in result between these three methods. **Results** The modified suction device with negative pressure effectively reduced bleeding. The quality of CSF collected with it was 75% of 12 rats, significantly higher than that obtained with the original device (33.3%, $P < 0.01$) or drawn from the cerebellomedullary cistern via percutaneous puncture (0%, $P < 0.001$). The success rate of qualified sample collection was highly superior to those of previously reported CSF collection methods. **Conclusions** Our modified suction device for CSF collection is simple and user-friendly, with minimal damage and little bleeding to rats. It can obviously improve the success rate of CSF collection in rats.

【Key words】 modification; suction device with negative pressure; rats; cerebrospinal fluid, CSF; puncture

[基金项目] 国家自然科学基金项目(编号:81660354)。

[作者简介] 王伟(1983 —), 男, 硕士, 专业: 神经病学。E-mail: wangweimedical@163.com

[通信作者] 刘竞丽(1972 —), 女, 教授, 博士生导师, 主任医师, 研究方向: 脑血管病。E-mail: lilicomet@163.com

在中枢神经系统疾病、损伤及其相关药理学研究中,常常需要对脑脊液的性状及成分进行分析^[1]。在动物实验中,大鼠是常用的实验动物,然而大鼠脑室及蛛网膜下腔狭小,血管丰富,采集脑脊液时易损伤血管,造成血液污染,往往影响后续实验结果^[2];并且脑脊液抽取过程复杂,容易伤及延髓致大鼠死亡。目前常用的脑脊液抽取方法包括经皮延髓池穿刺法、经皮经侧脑室穿刺法、直视下划破硬脊膜抽取脑脊液法、直视下微量进样器经硬脊膜穿刺抽取脑脊液法等等。经皮延髓池穿刺法对大鼠的创伤性小,能在短时间内完成脑脊液的收集,但技术难度高,成功率低。Li 等^[3]提出的脑脊液收集装置通过负压吸引可明显提高经皮延髓池穿刺法成功率;本研究通过对该装置进行改良,旨在进一步提高大鼠脑脊液收集的成功率。

1 材料和方法

1.1 实验动物

SD 大鼠 36 只,雄性,体重 250 ~ 280 g,清洁级,由广西医科大学实验动物中心提供 [SCXK (桂) 2014 - 0002]。脑脊液抽取在广西医科大学实验动物中心实验室内进行 [SYXK (桂) 2014 - 0003],动物饲养按照

实验动物使用的 3R 原则给予人道主义关怀。大鼠按脑脊液抽取方法不同随机分成 3 组,每组 12 只。

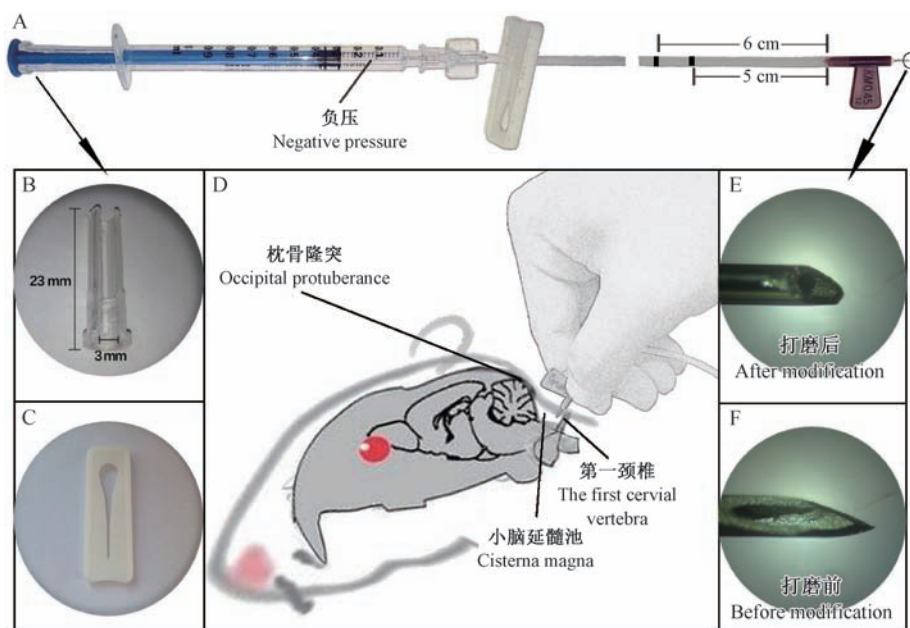
1.2 主要试剂与仪器

水合氯醛(中国成都市科龙化工试剂厂,分析纯)。1 mL 一次性注射器(中国北仑河广西巨龙医疗器械有限公司);26 G 一次性静脉输液针(中国恩康湖南岳阳民康医用材料有限公司);流量调节器取自一次性使用连接管(中国洁瑞山东威高集团医用高分子制品股份有限公司);STT-1 大鼠手术台(广西医科大学实验动物中心提供);高速冷冻离心机(德国 Eppendorf 5417R)。

1.3 实验方法

1.3.1 改良负压吸引装置的制作

用钢丝钳将 26 G 静脉输液针(0.45 × 15 mm,褐色柄)在距针柄 4 mm 处剪断,用砂轮打磨断端,使倾角呈 45°,减少其锋利程度(图 1E、1F),使穿刺时有更强的突破感并且不易对脑组织及血管造成损伤^[4]。在输液管上距棕色针柄末端 5 cm 及 6 cm 处用记号笔预先做好标记(图 1A),将流量调节器(图 1C)套入输液管末端,卡紧,接入 1 mL 一次性注射器;用注射器的针帽按图 1B 制作成一个限位器,注射器抽成负压时将限位器套入活塞尾部,使针管



注:A:改良负压吸引装置的构造;B:由 1 mL 注射器针帽制作成的限位器;C:流量调节器;D:大鼠脑脊液抽取示意图;E:穿刺针头打磨成 45°角,尖端钝化;F:打磨前的穿刺针头。

图 1 改良负压吸引装置的制作

Note. A: Structure of the modified suction device. B: The limiter made out of the protective sheath of a 1-mL syringe. C: A flow regulator for adjustment of the intensity of negative pressure. D: Schematic diagram of rat CSF collection. E: The needle tip is rubbed to be about 45° and less sharp for puncture. F: Shape of the needle tip before modification.

Fig. 1 Construction of the modified suction device with negative pressure

内维持恒定的负压。

1.3.2 脑脊液的收集

(1) 经皮穿刺延髓池抽取脑脊液法: 用 10% 的水合氯醛 (35 mg/kg, 腹腔注射) 麻醉大鼠, 然后参照富宏等^[2]的研究方法进行操作。用左手握住大鼠头部, 并将大鼠的头部向胸部屈曲, 右手探及枕骨隆凸与第 1 颈椎之间的凹陷 (枕骨大孔), 沿平行大鼠头部方向从凹陷处将 1 mL 注射器针头小心地刺入小脑延髓池, 缓慢抽取脑脊液, 后转移至离心管。

(2) 负压吸引装置穿刺抽取脑脊液法: 用 10% 的水合氯醛 (35 mg/kg, 腹腔注射) 麻醉大鼠, 用左手握住大鼠头部, 并将大鼠的头部向胸部屈曲, 探及凹陷处, 按 Li 等^[3]的方法操作, 右手持脑脊液收集装置的针头沿大鼠鼻侧方向从第 1 颈椎上缘缓慢进针, 当有明显的突破感时停止进针, 助手打开夹子, 脑脊液会被快速地吸引至输液管内, 当管内脑脊液停止流动时再次夹闭输液管, 拔针, 取下限位器, 将管内的脑脊液转移至离心管。

(3) 改良负压吸引装置穿刺抽取脑脊液法: 按改良前的方法进行操作, 进针后有明显的突破感时停止进针, 助手打开流量调节器, 只给一个较小的负压, 并根据脑脊液进入管腔的速度调整调节器, 使脑脊液缓慢进入输液管, 当液面达到标志处时, 立即关闭调节器, 拔针, 取下限位器, 将管内的脑脊液转移至离心管。

1.3.3 判断标准

对脑脊液进行分析时要求有一定的纯净度及采集量, 当样本中混有血液将直接影响后续实验结果, 故本研究根据是否有血污染来判断样本是否合格, 根据实际情况分为 4 种情况: ①未能成功抽取脑

脊液; ②抽取的脑脊液混有血液, 肉眼观呈红色; ③抽取的脑脊液肉眼观透明, 离心 (4℃, 800 r/min, 10 min)^[5]后管底有红细胞沉淀; ④抽取的脑脊液肉眼观透明, 离心后未见沉淀。第 4 种情况视为成功抽取合格脑脊液。

1.4 统计学方法

用 SPSS 16.0 统计软件进行分析, 脑脊液质量的比较用完全随机设计多样本秩和检验 (Kruskal-Wallis 法), 两两比较用扩展 *t* 检验。 $P < 0.05$ 为差异有显著性。

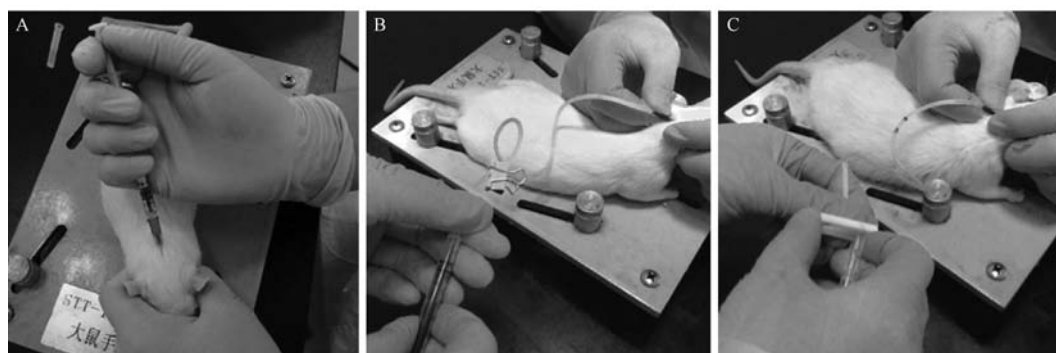
2 结果

经皮穿刺延髓池抽取脑脊液法: 12 只大鼠 4 只未能抽取到脑脊液, 6 只抽出血性脑脊液, 仅有 2 只抽出少量清亮脑脊液, 在离心后仍可见红细胞沉淀。未能成功抽取合格脑脊液。

负压吸引装置穿刺抽取脑脊液法: 12 只大鼠除 1 只未能抽出脑脊液外, 11 只均能抽取, 其中 4 只在中后期因速度过快混有较多血液, 7 只抽取至肉眼观清亮脑脊液, 在离心后仍有 3 只可见红细胞沉淀。成功率 33.3%。

改良负压吸引装置穿刺抽取脑脊液法: 12 只大鼠 1 只因操作原因未能很好地控制速度抽取到血性脑脊液, 其它 11 只均可获得清亮脑脊液, 离心后 2 只可见红细胞沉淀。成功率 75%。

以上 3 种方法抽取脑脊液结果见表 1。经完全随机设计多样本秩和检验, 3 种方法差异有显著性 ($P < 0.01$)。3 种方法之间的两两比较用扩展 *t* 检验, 均为 $P < 0.05$, 差异有显著性, 见表 2。



注: A: 经皮穿刺延髓池抽取脑脊液法; B: 负压吸引装置穿刺抽取脑脊液法; C: 改良负压吸引装置穿刺抽取脑脊液法。

图 2 不同脑脊液收集方法示意图

Note. A: Drawing from the cerebellomedullary cistern via percutaneous puncture. B: Using a suction device with negative pressure. C: Using a modified suction device with negative pressure.

Fig. 2 Diagram of three different methods of cerebrospinal fluid collection in rats

表 1 3 种方法收集大鼠脑脊液结果
Tab. 1 Cerebrospinal fluid of rats collected with three different methods

脑脊液收集方法 CSF collection methods	SD 大鼠数量 Number of SD rats	抽取不成功 Failed	血性脑脊液 Bloody CSF	清亮,离心后有沉淀 Clean, pellet observed after centrifugation	清亮,离心后无沉淀 Clean, no pellet observed after centrifugation
经皮延髓池穿刺法 Drawing from cerebellomedullary cistern via percutaneous puncture	12	4	6	2	0
负压吸引装置法 Using the suction apparatus with negative pressure	12	1	4	3	4
改良负压吸引装置法 Using the modified suction apparatus with negative pressure	12	0	1	2	9

表 2 不同脑脊液收集方法的两两比较
Tab. 2 Comparison between three different methods of cerebrospinal fluid collection

脑脊液收集方法两两比较 Comparison between each two of the three CSF collection methods	t 值 t-value	P 值 P-value
改良负压吸引装置法与负压吸引装置法比较 Using the modified suction apparatus with negative pressure vs. using the original one	2. 46	< 0. 01
改良负压吸引装置法与经皮延髓池穿刺法比较 Using the modified suction apparatus with negative pressure vs. drawing from cerebellomedullary cistern via percutaneous puncture	5. 32	< 0. 001
负压吸引装置法与经皮延髓池穿刺法比较 Using the original suction apparatus with negative pressure vs. drawing from cerebellomedullary cistern via percutaneous puncture	2. 86	< 0. 01

3 讨论

脑脊液由脑室的脉络丛上皮细胞产生分泌,经蛛网膜下腔循环,由蛛网膜粒重吸收入血。脑脊液提供脑组织一定的营养,运走脑组织的代谢产物。脑脊液的改变往往直接反应了中枢神经系统的变化,因此对脑脊液进行分析是动物实验研究的常用技术^[6]。据文献报道,体重 300 g 大鼠脑脊液总体积大约 580 μL ^[7],而一次能从延髓池中抽取的脑脊液更少,在 100 ~ 120 μL ^[8]。相对于直视下划破硬脊膜抽取脑脊液法及直视下微量进样器经硬脊膜穿刺抽取脑脊液法,直接从皮肤穿刺进入延髓池抽取脑脊液操作简单,对脑立体定位仪依赖程度低,免去了繁琐的手术过程,创口小,减少了感染机会。但是经皮穿刺延髓池抽取脑脊液技术难度较高,要求术者不仅要熟悉大鼠项部的解剖结构,还要掌握进针的部位、深度与穿刺方向^[9]。此法抽取脑脊液失败的常见原因有:①定位不准确;②进针方向不合适;③穿刺过浅或过深;④抽取过程用力过度,脑室内负压过大使脑内血管破裂出血。

Li 等^[3]提出的脑脊液负压吸引收集装置根据大鼠体重保留了不同的针尖长度,将倾角打磨成

45°,减少了锋利程度,增强了进针时的突破感,很好地控制了进针深度;恒定的负压避免了手动抽吸用力不均的情况;且创口微小,有较好的重复性。效果优于经皮延髓池穿刺法(表 2),但较强的负压与较快的抽取速度难免会使脑内压力迅速降低,使脑内血管破裂,增加了抽取过程中后期出血的风险。

改良后的负压吸引收集装置由于增加了流量调节器,抽取过程随时可以调整负压大小,可将抽取速度精确地控制在 50 $\mu\text{L}/\text{min}$ 左右^[5]。预先在输液管上 5 cm、6 cm 处做好标记,分别等同于脑脊液的量达到 100 μL 、120 μL 。当液面到达标记处时,即关闭调节器,停止抽液,有效防止了脑内压力过快过多地降低导致的出血,效果优于改良前的负压吸引收集装置及传统经皮延髓池穿刺法,差异有显著性(表 2)。另外,即便后期有少许出血,也能及时处理,此时可考虑用止血钳从有血液污染处夹闭输液管,将污染端剪下。值得注意的是,在打开调节器之后,如果未见脑脊液吸出,不必继续增大负压,这可能是由于针孔接触到了延髓,只需稍微将针尖后退或稍微旋转即可。

综上所述,改良后的负压吸引收集装置由于控制了负压的强度而有效降低了出血的风险,能够便

捷、高效地收集到合格的大鼠脑脊液;装置的材料简单容易获得,短时间内即可完成制作;替换针头方便;对于操作者技术要求不高,只需熟悉装置的操作稍加练习即可顺利完成脑脊液的收集,从而保证实验顺利进行。

参考文献:

- [1] Mahat MY, Fakrudeen Ali Ahamed N, Chandrasekaran S, et al. An improved method of transcutaneous cisterna magna puncture for cerebrospinal fluid sampling in rats [J]. J Neurosci Methods, 2012, 211(2): 272 - 279.
- [2] 富宏, 陶迎红, 王学美, 等. 经皮穿刺延髓池抽取兔和大鼠脑脊液的方法 [J]. 中国比较医学杂志, 2006, 16(11): 684 - 687.
- [3] Li Y, Zhang B, Liu XW, et al. An applicable method of drawing cerebrospinal fluid in rats [J]. J Chem Neuroanat, 2016, 74: 18 - 20.
- [4] Li Y, Zhang B, Wen W, et al. The comparison of three methods of drawing cerebrospinal fluid in rabbit [J]. J Neurosci Methods, 2012, 209(2): 398 - 402.
- [5] 杨子, 赖关朝, 王国彬, 等. SD 大鼠脑脊液采集方法改进 [J]. 中国职业医学, 2011, 38(2): 117 - 119.
- [6] 任长虹, 高明清, 曹金强, 等. 大鼠脑脊液抽取的新方法 [J]. 实验动物科学, 2012, 29(1): 61 - 62, 68.
- [7] Lai YL, Smith PM, Lamm WJ, et al. Sampling and analysis of cerebrospinal fluid for chronic studies in awake rats [J]. J Appl Physiol Respir Environ Exerc Physiol, 1983, 54(6): 1754 - 1757.
- [8] Nirogi R, Kandikere V, Mudigonda K, et al. A simple and rapid method to collect the cerebrospinal fluid of rats and its application for the assessment of drug penetration into the central nervous system [J]. J Neurosci Methods, 2009, 178(1): 116 - 119.
- [9] 王松军, 孟小楷, 丛斌, 等. 大鼠脑脊液抽取方法的改良 [J]. 河北医科大学学报, 2010, 31(2): 125 - 127.
- [7] 于世明, 贾海涛, 范宏刚, 等. 猪用复合麻醉剂(ZFM)对猪的麻醉效果观察 [J]. 中国兽医杂志, 2012, 48(1): 27 - 29.
- [8] 范宏刚, 胡魁, 卢德章, 等. 小型猪麻醉研究进展 [J]. 中国畜牧兽医, 2009, 36(11): 178 - 179.
- [9] 赵玉, 李静淑, 杨桂芝, 等. 小猪冠状动脉支架模型的建立 [J]. 哈尔滨医科大学学报, 2014, 48(6): 468 - 471.
- [10] 张贺, 师文, 李傲楠, 等. 安氟醚吸入麻醉应用于巴马小型猪的实验研究 [J]. 临床军医杂志, 2015, 43(10): 1056 - 1059.
- [11] 王洋, 王承利, 张贺. 异氟醚吸入麻醉在巴马小型猪中的应用 [J]. 中国比较医学杂志, 2010, 20(10): 38 - 40.
- [12] 苏强, 李浪, 马国添, 等. 猪急性冠状动脉微栓塞模型的建立 [J]. 中国动脉硬化杂志, 2014, 22(4): 335 - 339.
- [13] 李强, 张卫, 谢积胜. 咪达唑仑联合氯胺酮在巴马香猪腮腺磁共振检查中的麻醉效果 [J]. 广西医学, 2015, 37(9): 1219 - 1221.
- [14] Rascón-Martínez DM, Carrillo-Torres O, Ramos-Nataren RG, et al. Advantages of ketamine as a perioperative analgesic [J]. Rev Med Hosp Gen Méx, 2016, 145: 1 - 9.
- [15] 曾志文, 柴云飞, 俞润英, 等. 异丙酚-氯胺酮用于夹层主动脉瘤腔内隔绝术麻醉的体会 [J]. 实用医学杂志, 2013, 29(6): 950 - 952.
- [16] Talcott M, Corey M. Developing and maintaining a surgical research program; surgical suite design [J]. Lab Anim (NY), 2004, 33(6): 28 - 33.
- [17] 滕雪, 王国年. 成人丙泊酚输注综合征研究进展 [J]. 临床麻醉学杂志, 2016, 32(4): 402 - 403.

[收稿日期]2017-08-25

[收稿日期]2017-03-24

(上接第 85 页)