

SD 大鼠脑脊液采集方法的改进

朱奕昕^{1,2}, 叶冬青^{1,2}, 李晓莉^{1,2*}

(1. 东南大学附属中大医院神经内科, 南京 210009; 2. 东南大学神经精神疾病研究所, 南京 210009)

【摘要】 目的 探索一种最适合初学者的快速、方便和无血污染的 SD 大鼠脑脊液收集方法。**方法** 取雄性 SD 大鼠 45 只, 分成三组: 第一组, 经肌肉穿刺延髓池抽取法, 第二组, 经皮直接穿刺延髓池抽取法, 第三组, 直视下经硬脊膜穿刺延髓池抽取法。**结果** 第一组共有 13 只大鼠成功获得 80 ~ 140 μL 的脑脊液, 2 只采集到血性脑脊液, 成功率为 87.6%; 第二组共成功抽取脑脊液 7 只, 成功率为 46.7%; 第三组共成功抽取脑脊液 5 只, 成功率为 33.3%。**结论** 经肌肉穿刺延髓池抽取脑脊液法是一种适合初学者的方便快捷、无污染的 SD 大鼠脑脊液采集技术。

【关键词】 大鼠; 脑脊液; 采集技术

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2018) 04-0113-03

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2018.04.020

An improved method of collecting cerebrospinal fluid in SD rats

ZHU Yixin^{1,2}, YE Dongqing^{1,2}, LI Xiaoli^{1,2*}

(1. Department of Neurology, Affiliated Zhongda Hospital of Southeast University, Nanjing 210009, China. 2. The Institute of Neuropsychiatric Research of Southeast University, Nanjing 210009)

【Abstract】 Objective To explore a rapid, convenient and non-polluting method of collecting cerebrospinal fluid (CSF) in Sprague Dawley (SD) rats for beginners. **Methods** Forty-five SD rats were divided into three groups — group 1 (collecting CSF through neck muscles), group 2 (collecting CSF through skin directly), and group 3 (collecting CSF through endorhachis). **Results** The successful rate of the CSF collection in the group 1 was 86.7%, group 2 was 46.7%, and group 3 is 33.3%. **Conclusions** The modified collection method of CSF by cisterna puncture through neck muscles in SD rats is simple, convenient, efficient and non-polluting, and is especially suitable for beginners.

【Key words】 rats; cerebrospinal fluid; collection method

脑脊液是动物实验研究中经常用到的标本, 在脑损伤机制、生物标记物、药物治疗等研究领域有着不可替代的研究价值, 但是由于鼠的脑室及蛛网膜下腔狭小, 其内血管又很丰富, 导致了脑脊液提取过程复杂, 且容易刺穿延髓致使大鼠死亡, 因此脑脊液采集的低成功率成了许多研究室面临的技术难题。本研究通过文献复习, 并在以往报道的脑脊液采集方法的基础上加以改进, 为无脑脊液采集经验的初学者提供了一种准确、方便快捷、无血污

染的大鼠脑脊液收集技术。

1 材料和方法

1.1 实验动物

SPF 级雄性 SD 大鼠 45 只, 体重 300 ~ 400 g, 8 ~ 12 周, 由上海西普尔-必凯实验动物中心提供 [SCXK(沪) 2013-2016], 饲养于东南大学医学院实验动物中心 [SYXK(苏) 2013-0037]。所有动物实验严格遵循美国“国家卫生研究所实验动物护

【基金项目】 [项目基金] 国家自然科学基金青年项目 (81501173)。

【作者简介】 朱奕昕 (1981—), 男, 主治医师, 硕士, 研究方向: 脑卒中相关肺炎的发病机制。E-mail: zhuixin001@126.com

【通信作者】 李晓莉 (1981—), 女, 医学博士, 助理研究员, 研究方向: 神经可塑与神经精神疾病。E-mail: lixiaolifirst@163.com

理和使用指南”和“东南大学实验动物护理和使用指南”相关条例。

1.2 主要试剂与仪器

脑立体定位仪(安徽正华生物仪器设备有限公司),微量进样器(100 μ L,上海光正医疗仪器有限公司),水合氯醛(国药集团化学试剂有限公司),手术器械(上海医疗器械有限公司),冷冻离心机(CT15RE,Hitachi KoKi 日本日立公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 动物分组

45 只大鼠随机分为三组,每组 15 只:第一组为经肌肉穿刺延髓池抽取法,第二组为经皮直接穿刺延髓池抽取法,第三组为直视下经硬脊膜穿刺延髓池抽取法。

1.3.2 脑脊液抽取方法

7% 水合氯醛腹腔麻醉大鼠。动物麻醉后,将脑立体定位耳杆紧贴双耳分别插入两外耳道,固定耳杆于主框上,并使两侧耳杆读数相同。将大鼠的上门齿钩住门齿杆,固定上颌。将门齿杆升高,使大鼠头部与躯体约成 135°(图 1)。于大鼠头枕部剪毛、消毒,沿后正中中线切一纵行切口(约 1.5 ~ 2 cm)。根据分组,将动物进行以下操作:(1)经肌肉穿刺延髓池抽取法:打开皮肤后,会看见枕骨隆凸后有一倒三角形的肌肉间隙,用微量进样器的针尖部抵住三角形凹陷的底部沿后正中线下滑,至枕骨大孔后进针,针尖斜面向上,并与身体平行,即针与头部的角度约为 135°(见图 1 A ~ D)。注意进针速度不宜过快。当针尖透过黄韧带时,有明显的落空感,此时针尖即进入延髓池(深度约 0.2 mm),停止进针,左手固定针头部分不动,右手缓慢抽取脑脊液,此时应注意抽取速度一定要慢,否则容易出现血性脑脊液。抽取后迅速退针,将脑脊液移入 0.5 mL 的 EP 管中,离心后于液氮或者干冰中速冻并移入 -80℃ 冰箱保存。(2)经皮直接穿刺延髓池抽取法^[3-5]:动物按照上述步骤麻醉固定后,大鼠头枕部剪毛、消毒,用微量进样器直接经枕骨大孔进入延髓池缓慢抽取脑脊液;(3)直视下经硬脊膜穿刺延髓池抽取法^[2-4]:动物按照上述步骤麻醉固定后,大鼠头枕部消毒、钝性分离枕部肌肉,暴露枕骨大孔后,微量进样器直接穿刺延髓池抽取脑脊液。

各组大鼠于脑脊液收集后,根据下一步实验需要进行其他组织取材。

1.3.3 判断标准

将收集到的脑脊液于 20 min 内,4℃、4500 r/min、10 min 离心^[1],如果脑脊液为淡红色,表明是血性脑脊液并发生溶血,如果 EP 管底部有红色沉



注:图 A ~ D:经肌肉穿刺延髓池抽取法大鼠固定及脑脊液采集方式。

图 1 大鼠固定方法及脑脊液采集方法

Note. A-D show the method of obtaining CSF through neck muscles.

Fig. 1 The method of fixing rats and collecting cerebrospinal fluid

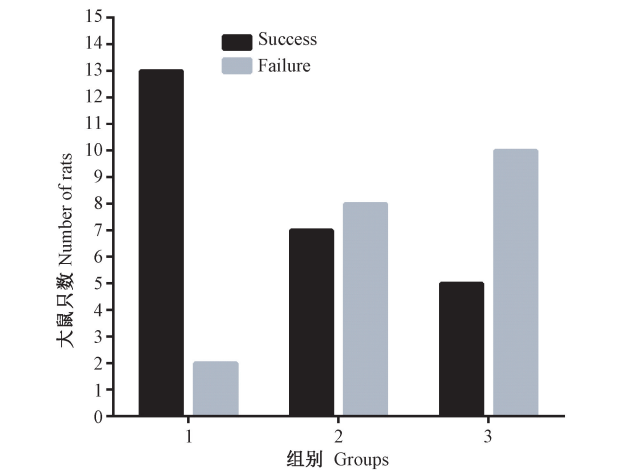
淀,表明是血性脑脊液,但未发生溶血。出现血性脑脊液或未能采集到脑脊液判为采集失败。

1.4 统计学方法

采用 GraphPad Prism 6.01 软件处理数据。使用 χ^2 检验比较各种方法脑脊液采集成功率,以 $P < 0.05$ 为差异有显著性。

2 结果

在 45 只大鼠中,第一组(经肌肉穿刺延髓池抽取法)共成功抽取脑脊液 13 只,离心后呈清亮透明状,未出现红色沉淀现象,一般一只大鼠可抽取 80 ~ 120 μ L 脑脊液,体重稍大的大鼠能抽取到 120 ~ 140 μ L 脑脊液,成功率为 86.7%,有 2 只出现了血性脑脊液,但离心后仍能获得 80 μ L 以上的清亮脑脊液;第二组(经皮直接穿刺延髓池抽取法)共成功抽取脑脊液 7 只,成功率为 46.7%,有 5 只出现了血性脑脊液,3 只抽取脑脊液失败;第三组(直视下经硬脊膜穿刺延髓池抽取法)共成功抽取脑脊液 5 只,且抽取量在 30 ~ 60 μ L 之间,成功率为 33.3%,另外 10 只未能抽取到脑脊液。 χ^2 检验结果显示经肌肉穿刺延髓池抽取法其成功率明显优于另外两组脑脊液采取法, $P = 0.0093$ (见图 2、表 1)。



注：1：经肌肉穿刺延髓池抽取法；2：经皮直接穿刺延髓池抽取法；3：直视下经硬脊膜穿刺延髓池抽取法。

图 2 三组方法大鼠脑脊液采集成功率
Note. The successful rate of collecting rat CSF in the group 1 (through neck muscles) is 86.7%, Group 2 (through skin directly) is 46.7%, and group 3 (through the endorhachis) is 33.3%.

Fig. 2 Successful collection rate of different methods for collecting CSF in the rats

3 讨论

由于脑脊液成分可以间接地反应脑组织中的情况,因此脑脊液中相关成分的分析是动物实验中经常用到的技术。但是由于脑脊液采集方法和技术的限制,常常成为动物实验研究中的难题。如何能在采集充足脑脊液的情况下避免血性污染成为脑脊液抽取的关键。

然而,在众多以往报道的脑脊液采集方法中,脑脊液抽取失败或血性脑脊液的出现往往是困扰研究

人员的关键问题。特别是对于初学者来说,如何能快速掌握一种快速有效的脑脊液采集方法成为制约后续研究的关键。目前国内外报道的采集脑脊液的方法主要有以下几种:经皮直接穿刺延髓池抽取法^[3-5]、直视下经硬脊膜穿刺延髓池抽取法^[2-4]、直视下划破硬脊膜抽取法^[3-4]等。

本研究小组在既往报道的基础上,将抽取方法做了调整,建立了更适合初学者的方法。该方法与直接经皮直接抽取脑脊液的方法相比,微量进样器抽取的位置更容易掌握,减少了操作偏差。该方法与打开皮肤和肌肉,直视状态下抽取脑脊液的方法相比,由于我们只是将皮肤剪开,避免伤及肌肉,从而减少了肌肉出血导致脑脊液污染的可能性。同时对于初学者来说,由于不熟练而出现第一次进针未能顺利抽出脑脊液的情况时,由于肌肉的收缩和封闭功能,可以第二次或者第三次调整针头方向或者位置,避免了在直视状态下当第一次未能成功抽出脑脊液后,退针后脑脊液外流严重而不能再次抽取无污染样本的情况。另外当动物需要继续饲养时,只打开皮肤经肌肉穿刺延髓池抽取脑脊液方法与打开皮肤和肌肉直视状态下抽取法相比,其具有创伤范围小,动物恢复快等显著优点。本研究的不足之处是:由于本研究所用大鼠抽取脑脊液后均被处死取材,未探讨运用各种脑脊液采集方法后大鼠远期存活率,我们将在后期研究中补充该方面的研究。

综上所述,经过探索建立的打开皮肤经肌肉穿刺延髓池抽取脑脊液的方法具有简单、快捷、高效等优点,是一种较好的采集脑脊液的方法,尤其适用于无脑脊液采集经验的初学者。

表 1 各组大鼠脑脊液采集结果			
Tab.1 Results of collecting CSF in different groups			
分组 Groups	成功 Successful	失败 Failure	成功率 Successful rate
经肌肉穿刺延髓池抽取法 Collection of CSF through the neck muscles	13	2	86.7% **
经皮直接穿刺延髓池抽取法 Percutaneous collection of CSF	7	8	46.7%
直视下经硬脊膜穿刺延髓池抽取法 Collection of CSF through endorhachis	5	10	33.3%

注:与另外两组比较比较, ** $P < 0.01$ 。
Note. Compared with other two groups, ** $P < 0.01$.

参考文献:

[1] Noga MJ, Dane A, Shi S, et al. Metabolomics of cerebrospinal fluid reveals changes in the central nervous system metabolism in a rat model of multiple sclerosis [J]. Metabolomics, 2012, 8 (2): 253 - 263.

[2] Pegg CC, He C, Stroink AR, et al. Technique for collection of cerebrospinal fluid from the cisterna magna in rat [J]. J Neurosci Methods, 2010, 187 (1): 8 - 12.

[3] 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.

[4] 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.

[5] 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.