

赵聪慧,王妍,周禹,等. 使用一次性硬膜外麻醉导管进行无创小鼠气管插管的方法建立 [J]. 中国比较医学杂志, 2021, 31 (7): 106-111.

Zhao CH, Wang Y, Zhou Y, et al. A new method of intratracheal intubation in mice using an epidural anesthesia catheter [J]. Chin J Comp Med, 2021, 31(7): 106-111.

doi: 10. 3969/j. issn. 1671-7856. 2021. 07. 016

使用一次性硬膜外麻醉导管进行无创小鼠气管插管的方法建立

赵聪慧¹, 王妍^{2,3}, 周禹⁴, 袁晓红^{1*}

(1.首都医科大学附属北京口腔医院病理科, 北京 100050; 2.山西医科大学第一医院, 太原 030001;
3.山西医科大学肝病与器官移植研究所, 太原 030001; 4.中国医学科学院药物研究所, 北京 100050)

【摘要】 目的 建立一种操作简便,可靠,可准确判定插入气管的小鼠无创气管插管方法,用于各类小鼠肺部疾病模型造模以及药物干预。**方法** 使用雌性 C57BL/6 小鼠,腹腔注射戊巴比妥钠麻醉,将小鼠通过门齿悬挂。将硬膜外麻醉导管、1 mL 注射器、10 μ L 移液器枪头等组装为插管工具组合,双手分别持握工具和感知小鼠气管,经口腔进行无创气管插管,给予台盼蓝或者 PBS。插管给药结束后,染料组小鼠观察肺组织和胃中台盼蓝着色情况,PBS 组放回饲养环境继续饲养观察小鼠存活情况。**结果** 染料组小鼠肺组织存在着色,分布较为均匀,胃中无着色。PBS 组小鼠在麻醉恢复后持续生存,并无任何异常。**结论** 建立了应用硬膜外麻醉导管、1 mL 注射器、10 μ L 移液器枪头等工具组合,进行小鼠无创气管插管给药的方法。本方法简便、稳定,可准确判定插入气管,对动物创伤小,重复性强。

【关键词】 实验动物学;小鼠气管插管;无创伤;硬膜外麻醉导管;肺纤维化

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2021) 07-0106-06

A new method of intratracheal intubation in mice using an epidural anesthesia catheter

ZHAO Conghui¹, WANG Yan^{2,3}, ZHOU Yu⁴, YUAN Xiaohong^{1*}

(1. Department of Pathology, Beijing Stomatological Hospital, Capital Medical University, Beijing 100050, China.

2. First Hospital of Shanxi Medical University, Taiyuan 030001. 2. Institute of Liver Diseases and Organ

Transplantation, Shanxi Medical University, Taiyuan 030001. 4. Institute of Materia Medica, Chinese

Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Beijing 100050)

【Abstract】 Objective To establish a simple reliable and accurately method of non-invasive intratracheal intubation in mice. **Methods** Female C57BL/6 mice were used. Mice were anesthetized with pentobarbital sodium, then suspended via the upper incisors using surgical thread. An epidural anesthesia catheter, 1 mL syringe, 10 μ L pipet tip, were assembled as intratracheal intubation equipment. Using the non-dominant hand to feel the trachea, the dominant hand inserted the equipment into the mouth cavity to deliver the liquid. The mice were administered trypan blue or PBS. After intratracheal intubation, mice that received trypan blue were killed and the lungs were checked, while the mice that

[作者简介] 赵聪慧(1988—),女,住院医师,博士,研究方向:口腔及呼吸系统疾病病理学。E-mail: zhacongghuide@126.com

[通信作者] 袁晓红(1972—),女,主任医师,硕士,研究方向:口腔病理学。E-mail: yuanxiaohong@163.com

received PBS remained under observation for monitoring of survival. **Results** The lungs of mice that received trypan blue were dyed blue, while the stomach was not dyed. The mice that received PBS remained alive after recovering from the anesthesia. **Conclusions** Equipment comprising an epidural anesthesia catheter, a 1 mL syringe, a 10 μ L pipet tip, and ophthalmic forceps enable simple and accurate non-invasive intratracheal intubation.

【Keywords】 experimental zoology; mice intratracheal intubation; non-invasive; epidural anesthesia catheter; pulmonary fibrosis

肺疾病为常见的呼吸系统疾病,极大损害了人类健康,对社会造成劳动力和医疗资源损失。通过构建动物肺部疾病模型,可以直观研究疾病发病机制,动态演变以及评估药物治疗效果。由于小鼠肺部疾病模型造模指向性强,需要直接将造模药物均匀输送到肺组织中。因此包括哮喘模型^[1],肺纤维化模型^[2],急性肺组织损伤模型^[3],病毒感染模型^[4]等肺部疾病模型均使用气管插管法造模。小鼠体型较小,呼吸道狭窄,不易发现气管入口。雾化吸入是常用的方法之一,操作简便,可批量处理。但是,此方法存在药品消耗大,每只动物吸入剂量不可控等缺点。滴鼻法操作简便,但是药物部分进入食道,造成不同动物之间实际给药剂量差异。并且,研究表明经口鼻吸入法造模效果不及气管插管法^[5]。目前为止,多种小鼠气管插管技术已被报道,可以归类为“有创法”、“无创直接法”和“无创辅助法”,这些方法各有优势,但仍存在不足。有创小鼠气管插管技术虽然经过优化将动物损伤降到最低,但是仍不利于小鼠长期生存和多次给药^[6-8];无创辅助法通过使用辅助工具,例如使用光源^[9-12]或者光源和纤维引导丝组合^[13],从而直接可视化小鼠气管入口并将插管引入气管。但是,由于小鼠气管狭窄,入口仍然不便直接观察,且对于实验器材获取和实验人员经验技术要求较高;无创直接法也称为“盲插法”,此方法不使用任何辅助,直接经小鼠口腔插入气管,操作最为简便,但手法难以掌握,并且成功插入与否难以把控。

综合目前已经报道的小鼠气管插管技术,同时参考大鼠气管插管技术,结合实际在构建小鼠肺部疾病模型经验,我们建立了一套操作简单,成本低廉,重复性好,对操作要求较低的小鼠气管插管方法。并总结出本方法训练方法。本方法立足于无创“盲插”法,组装包括一次性硬膜外麻醉导管,1 mL注射器,10 μ L 移液器枪头在内的常见实验耗材作为气管插管工具,并总结出插入气管的判断依据。使用本方法给药,过程舒缓程度可控,一名操作人员即可快速完成实验。本方法将有助于小鼠

肺部疾病模型的研究。

1 材料和方法

1.1 实验动物

SPF 级 C57BL/6 小鼠,雌性,20 只,6 周龄,体重 18~22 g。购于北京华阜康生物科技有限公司[SCXK(京)2019-0023],于中国医学科学院药物研究所动物房中饲养[SYXK(京)2019-0023],光照黑暗交替照明(12 h/12 h),自由饮水,进食,温度 22℃左右,相对湿度 50%左右。本实验已通过中国医学科学院药物研究所动物伦理委员会审批批准(00005199),实验过程中遵循 3R 原则并对动物给予人道主义关怀。

1.2 主要试剂与仪器

1%戊巴比妥钠;台盼蓝染液;1 mL 注射器(BD);胰岛素注射针(BD);一次性硬膜外麻醉导管;10 μ L 移液器枪头;缝合线;移液器架;眼科剪;眼科镊。

1.3 实验方法

1.3.1 小鼠气管插管简易装置制作

小鼠气管插管简易装置组成如图 1A 所示,一次性硬膜外麻醉导管 1 支,10 μ L 移液器枪头若干,1 mL 注射器一支,胰岛素注射针 1 支。首先将硬膜外麻醉导管软管对折,从中间剪开,插管时使用其中一半即可,将其中一端侧面开口剪去(硬膜外麻醉导管的一端为侧面开口),改为顶端开口。将处理好的软管与进药装置组合,并旋紧螺丝扣。使用胰岛素注射针吸取给定剂量药物(此处为台盼蓝染液或 PBS),将其通过进药装置注入软管内。需要说明的是,使用的胰岛素注射针与硬膜外麻醉导管的进药口必须紧密对接,并且该注射器没有死腔,有利于精确控制给药剂量。建议每次只吸取 1 只小鼠的剂量。将药物注入导管完毕后,使用 1 mL 注射器将针头弃去不用,将注射器调整至最大量程处,与进药口紧密对接,此处注射器当作“气筒”使用。小心调节注射器,观察软管中液平面,将其控制在距离软管出口处 3~5 cm 左右位置,以便于观察。

将软管出口处套入 10 μL 移液器枪头内,以液体不外露为准,如图 1B 所示。气管插管装置和药物准备完成。

1.3.2 实验动物准备

1%戊巴比妥钠深度麻醉小鼠,麻醉过浅在插管时会产生呕吐反射,不利于找到气管位置。小鼠以使用镊子夹住四肢无反应,双眼湿润,呼吸规律且较为深长为佳。使用缝合线,将小鼠悬挂于移液器架上。

1.3.3 小鼠气管插管过程

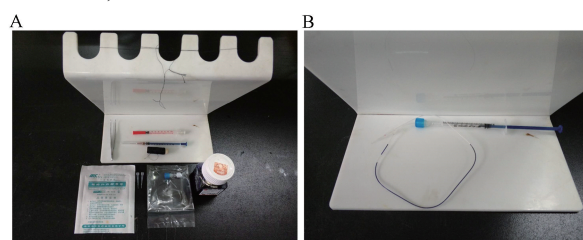
使用缝合线将小鼠悬挂于移液器架上,高度以操作人员舒适为准。使用眼科镊小心将小鼠舌头拔出。如图 2 所示,左手大拇指放在小鼠颈前部,指肚紧贴小鼠颈部(重要),其余手指置于小鼠后颈部固定小鼠,以免摇晃。右手手持套入软管的移液器枪头,沿小鼠下颚,抵住小鼠舌头缓缓插入小鼠口中,在抵达小鼠会厌部时,会感受到阻力,这是小鼠会厌软骨所造成,此时不可用蛮力向下,以免伤及小鼠。将枪头稍稍回撤,而后将枪头下端向小鼠颈部腹侧反方向向下一小段距离(此时操作员面对小鼠,小鼠颈部腹侧正对操作员脸部),而后转向颈部腹侧表皮方向轻轻挑一下,同时将枪头向下,目的为挑过会厌软骨将枪头送入小鼠气管。当感觉枪头越过阻碍后,将枪头抵住左手拇指肚,轻柔地上下摩擦,注意动作轻柔。此时如果插入气管,应感觉到移液器枪头与气管软骨摩擦“一楞一楞”的感觉,这个感觉就是成功插入小鼠气道的判断依据,同时也是本技术的重点,如果插入食道则左手拇指肚感受到平滑感。此时观察软管中的液面,如果插入气管中,液面应该波动并向小鼠方向移动。当成功插入气管后,左手把住枪头,右手持注射器,缓慢推进,直至软管内液体全部进入后继续打入 0.5 mL 刻度的气体,迅速拔掉枪头。

小鼠悬挂 30 s 后即可取下。若插管成功,小鼠呼吸应该从麻醉的深长呼吸状态变为短促呼吸状态,此状态会维持数分钟,直至渐渐变为规律的深长呼吸,此时呼吸声音明显增加。

1.3.4 注意事项

(1)小鼠麻醉程度要控制得当,麻醉浅小鼠会出现挣扎情况,麻醉过深则容易窒息死亡;(2)给药体积控制在每只小鼠 30~50 μL ,少于 30 μL 不利于药物均匀分布,多于 50 μL 则容易造成小鼠窒息死亡;(3)插管的深度不宜过深,应控制在气管中上部

分,不宜过度接近气管分支部分,以免造成药物偏向一侧肺组织;(4)气管插管过程中,由于小鼠个体差异和状态不同,不同小鼠插管的难易程度略有不同,建议连续 2~3 次插管不成功(遇到阻力,回撤再向下为一次)将小鼠取下休息一段时间,并且过程一定要轻柔,以免损伤小鼠或者造成窒息;(5)插管成功的依据是左手拇指有“一楞一楞”的感觉,因此应保持左手拇指的位置正确和敏感性,少部分情况即使成功插入气管,软管中液面的波动亦不明显;(6)此方法虽然简单,但是需要操作人员有一定的练习,可采用先将小鼠解剖,完全暴露小鼠颈部组织结构,体会枪头插入的位置和程度;(7)我们使用的是 10 μL 移液器枪头,这个部分可以换做任何可以与导管头接合的器具,以使用顺手为目的,原则是足够细,并且不会伤及小鼠;(8)推入液体时速度应保持中速和稳定,确定将液体全部推入后,应继续进气 0.5 mL 左右,以保证液体进入肺组织深部。有文章提出,补气有助于滴注物扩散,防止动物窒息,但由于小鼠肺总容量小,补气量为 0.6~0.8 mL^[14]。



注:A:小鼠气管插管所使用的工具;B:组装起来的小鼠气管插管工具。

图 1 小鼠气管插管简易装置

Note. A, Tools for tracheal intubation. B, Assembled tracheal intubation tools for mice.

Figure 1 Simple tracheal intubation tools for mice



图 2 小鼠气管插管手法

Figure 2 Schematic diagrams of tracheal intubation by epidural anesthesia catheter

1.4 统计学方法

实验数据采用 GraphPad Prism 8.0 进行统计分析,计数数据采用 Two-way ANOVA 检验, $P<0.05$ 、 $P<0.01$ 以及 $P<0.001$ 为差异有统计学意义。

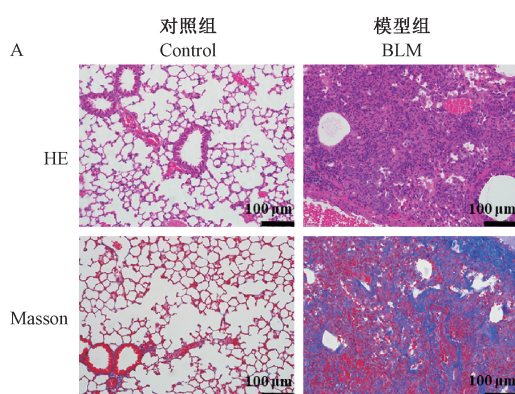
2 结果

如图 3 所示,通过气管插管给予小鼠台盼蓝染液,可见小鼠肺组织均匀蓝染,同时胃中没有蓝色,证明染液均匀分布于肺组织中。通过气管插管给予 PBS 组小鼠,在麻醉剂作用失效后,存活情况良好,无小鼠死亡。证明上述操作安全可靠。使用上文所述小鼠气管插管方法,我们已经完成多种、多次小鼠肺部疾病模型造模,包括 IL-33 诱导的小鼠



图 3 气管插管给予小鼠台盼蓝染液后,肺组织和胃染色情况

Figure 3 Trypan blue staining of mouse lung and stomach after intratracheal intubation



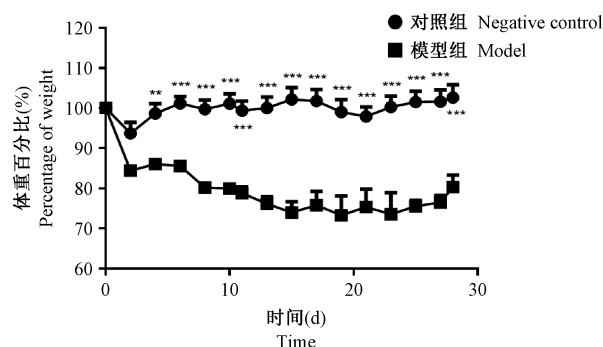
注: A: HE 染色、Masson 染色; B: 免疫组化分别对于 α SMA、Collagen I、Vimentin 进行染色。

图 5 使用经气管插管使用博来霉素造模 28 d 后,小鼠肺组织病理分析

Note. A, HE and Masson staining. B, Immunohistochemical staining of α SMA, Collagen I and Vimentin.

Figure 5 Pathological analysis of mice lung tissue at 28 d after bleomycin intratracheal intubating

哮喘模型,博来霉素诱导的小鼠肺纤维化模型,以及 LPS 引发的急性肺损伤模型。对于气管插管造模的成功率,我们以博来霉素诱导的肺纤维化为例,如图 4 所示。相比于对照组,模型组小鼠体重有显著下降,并且数据变异度小,证明模型发病率高,造模方法稳定。如图 5A 所示,使用此方法构建博来霉素诱导的肺纤维化模型 28 d 后,安乐死小鼠取肺组织,进行病理学分析,HE 染色显示对照组小鼠肺组织肺泡结构清晰,肺泡间无杂质,无炎性细胞浸润,模型组小鼠肺泡组织结构消失,原本肺泡组

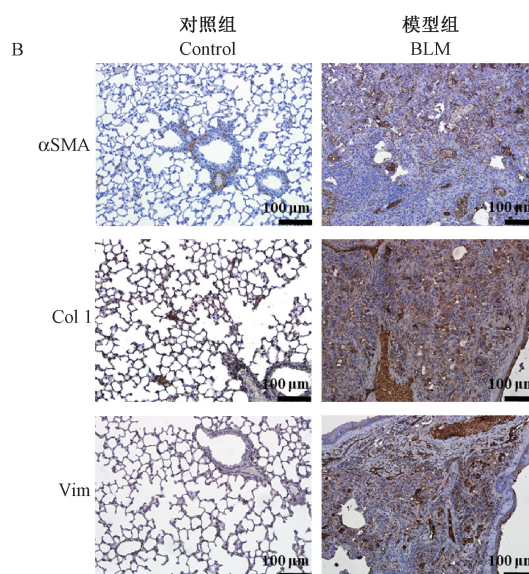


注:与对照组相比, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$ 。

图 4 经气管插管使用博来霉素小鼠肺纤维化造模后小鼠体重变化统计($n=7$)

Note. Compared with the control group, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$.

Figure 4 Body weights (%) of animals after bleomycin intratracheal intubating



织被大量细胞外基质填充,可见炎性细胞浸润。Masson 染色显示相比对照组,模型组小鼠肺组织着色显著。同时如图 5B 所示,免疫组化染色表明,肺纤维化标志 α SMA、Collagen I 和 Vimentin 在模型组显著表达增高。综上,病理分析表明小鼠肺纤维化模型成功。

小鼠气管插管过程中,由于个别小鼠较为敏感或者手法问题,会出现小鼠因窒息死亡现象。具体表现为,小鼠眼球突出眼眶,出现身体蜷曲张口深大呼吸等呼吸困难表征,此为小鼠窒息前兆,如无此现象小鼠不会窒息死亡。通过手法逐渐熟练和给与的液体量减少,小鼠死亡现象显著下降。

3 讨论

小鼠肺部疾病模型需要将造模药物直接并且均匀输送到肺组织中,口服,静脉/腹腔/皮下注射等造模方式不能完全满足需求。张晓晔等^[15]比较经尾静脉和经气管进行小鼠肺纤维化造模,结果表明动物肺纤维化程度尾静脉造模组低于气管造模组(但未见统计学差异),且小鼠肺组织病变部位二者存在显著差异。由于小鼠体积较小,口腔空间狭窄,导致难以准确找到气管开口位置。因此掌握成熟、稳定的气管插管技术就显得尤为重要。

由于大鼠也常被用于构建肺部疾病模型,因此大鼠的气管插管方法也可参考^[16-17]。已报道的各类方法可分为“有创性插管”,“使用辅助工具无创性插管”和“无创性直接插管”(也被称作“盲插”)。有创性插管采用暴露部分气管,将药物注射入动物气管内。此方法经过多次改良,力求尽可能减少对动物损伤,但是依旧易导致动物死亡,并且不利于多次干预。使用辅助工具无创性插管的改进在于使用光源,或光源与体视镜,导引丝结合,在无创条件下将气管入口可视化,提高插管成功率。有报道分别使用小鼠和大鼠比较了经口直视插管组和经颈透照直视插管的优劣,认为经颈透照直视插管可靠性更佳^[18-19]。使用辅助工具无创性插管准确性高,对动物伤害小,但是仍有不足。一方面对于操作人员技术要求较高或者需要两人一起操作,另一方面需要购买或自制相关设备。相比之下“盲插”具有成本低廉,上手较快等优点。但是,此方法具

有无法准确判定是否进入气管,插管手法难以掌握这两大缺点。王凯等^[20]在比较不同方法建立大鼠间质性肺炎模型中摸索出一套切实可用的大鼠气管“盲插”手法。但是提及的“轻微阻力”和“摩擦感”两个插入气管的特征,并不能准确判定工具进入气管。而且小鼠相比于大鼠,由于体积更小,气管更加狭窄,不利于插管。因此有必要改进“盲插”法以更好的适应小鼠实验。

本文立足于“盲插”法,使用硬膜外麻醉导管,移液器枪头,注射器等常用实验耗材,并通过手指的感觉确定进入气管,给药过程可控制速度,且药物可均匀分布到肺组织中。器材选用方面,已报道的方法多使用滞留针,穿刺针和移液器枪头等。相比于铁质针头,移液器枪头不易损伤组织。通过比较不同气管插管方法造小鼠肺纤维化模型的情况,提出插管深度对药物分散和造模效果直接相关^[21]。10 μ L 移液器枪头可满足进入气管一定深度。连接硬膜外麻醉导管后,可将推注使用的移液器放置于合适位置,有助于控制推注过程。本方法操作手法需要一定的练习,可先在解剖条件下观察插管时枪头在小鼠咽喉部的位置,记住在何处有阻力,如何避开会厌软骨隔挡。在熟练掌握手法后,每只小鼠插管给药时间可控制在 1~2 min 内,并且在 50 μ L 以内的给药体积小鼠被直接呛死的比例小于 10%。使用本方法,我们已经建立了 IL-33 诱导的小鼠哮喘模型,LPS 诱导的小鼠急性肺损伤模型,博来霉素诱导的小鼠肺纤维化模型。模型成功率接近 100%,并且出模率稳定。通过更换所使用的工具,以相同的判定方式和手法,本方法也可适用于大鼠气管插管给药。

综上,我们在无创无可视辅助工具的条件下,经过改良和创新,建立了一套成本低廉,原料易得,上手容易,并且高效,稳定的小鼠气管插管方法,此方法将有助于更多小鼠肺组织疾病模型研究。

参考文献:

- [1] Debeuf N, Haspeslagh E, Helden MV, et al. Mouse models of asthma [J]. *Curr Protoc Mouse Biol*, 2016, 6(2): 169-184.
- [2] Liu T, De Los Santos FG, Phan SH. The bleomycin model of pulmonary fibrosis [J]. *Methods Mol Biol*, 2017, 1627: 27-42.
- [3] D'Alessio FR. Mouse models of acute lung injury and ARDS [J]. *Methods Mol Biol*, 2018, 1809: 341-350.

- [4] Morales-Nebreda L, Chi M, Lecuona E, et al. Intratracheal administration of influenza virus is superior to intranasal administration as a model of acute lung injury [J]. J Virol Methods, 2014, 209: 116-120.
- [5] 邓华蓉, 龚财惠, 袁小平, 等. 气管插管和口咽吸入两种方法吸入二乙酰构建闭塞性细支气管炎小鼠模型的比较研究 [J]. 西安交通大学学报: 医学版, 2018, 39(4): 578-583.
- [6] Helms MN, Torres-Gonzalez E, Goodson P, et al. Direct tracheal instillation of solutes into mouse lung [J]. J Vis Exp, 2010, 42: 1941-1943.
- [7] 赵晓辉, 吴楠, 周健, 等. PTCA 导丝逆行引导小鼠气管插管术 [J]. 中国比较医学杂志, 2006, 16(6): 365-366.
- [8] 刘利辉, 叶玲玉, 谭渊明, 等. 一种简捷可靠的小鼠气管插管新方法 [J]. 中国医师杂志, 2006, 8(8): 1019-1020.
- [9] Lawrenz MB, Fodah RA, Gutierrez MG, et al. Intubation-mediated intratracheal (IMIT) instillation: a noninvasive, lung-specific delivery system [J]. J Vis Exp, 2014, 93: e52261.
- [10] Rayamajhi M, Redente EF, Condon TV, et al. Non-surgical intratracheal instillation of mice with analysis of lungs and lung draining lymph nodes by flow cytometry [J]. J Vis Exp, 2011, 51: 2702.
- [11] 曹婕, 高润娣, 李和权, 等. 在头戴式放大镜直视下小鼠气管插管方法的建立 [J]. 中国药理学通报, 2012, 28(5): 729-731.
- [12] 杨彪, 李新鸣, 严思远, 等. 应用冷光源内窥镜和点样吸头完成的新型小鼠气管滴注法 [J]. 中国药理学通报, 2016, 32(4): 585-587.
- [13] 魏稼黎, 袁李摇, 刘镭. 光纤引导直视下啮齿目动物气管插管的应用 [J]. 中国比较医学杂志, 2015, 25(10): 69-70.
- [14] 贾晓峰, 郭新彪. 改进型快速小鼠气管滴注法——透射灯下经口直视滴注法研究 [J]. 环境与健康杂志, 2012, 29(3): 217-219.
- [15] 张晓晔, 宁欣, 刘卫青, 等. 静脉注射和气管内滴入博来霉素诱导小鼠肺纤维化的差异 [J]. 中国实验动物学报, 2008, 16(3): 176-178.
- [16] 卢记明, 张炳熙. 大鼠气管插管方法学概述 [J]. 中国比较医学杂志, 2009, 19(8): 76-80.
- [17] 孙刚强, 郭文俊. 大鼠气管插管方法研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2019, 29(12): 116-121.
- [18] 徐尤年, 马璞, 张墨, 等. 直视下小鼠气管插管方法的比较 [J]. 中国医师杂志, 2010, 12(6): 740-742.
- [19] 叶明霞, 孔利佳. 直视下行大鼠气管插管的方法比较 [J]. 中国比较医学杂志, 2013, 23(3): 49-52, 后插 4.
- [20] 王凯, 程路, 宋远园, 等. 不同气管插管方法建立大鼠间质性肺病模型的比较 [J]. 徐州医学院学报, 2016, 36(7): 455-458.
- [21] 王志超, 冯凡超, 武琦, 等. 三种方法气管灌注博来霉素诱导小鼠肺纤维化的比较 [J]. 中国比较医学杂志, 2019, 29(5): 51-57.

〔收稿日期〕2020-11-12