

韩穆轩,邢影,王岳睿,等.大鼠颌下静脉丛采血技术方法及其效果比较[J].中国比较医学杂志,2023,33(4):104-108.
Han MX, Xing Y, Wang YR, et al. Localization of blood collection points in the submandibular venous plexus and blood collection method of rats [J]. Chin J Comp Med, 2023, 33(4): 104-108.
doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2023.04.015

大鼠颌下静脉丛采血技术方法及其效果比较

韩穆轩¹,邢影²,王岳睿²,张家钰³,张浩⁴,李自发⁴,耿希文^{4*},魏盛^{4*}

(1.山东中医药大学健康学院,济南 250355;2.山东中医药大学中医学院,济南 250355;
3.山东中医药大学康复医学院,济南 250355;4.山东中医药大学实验动物中心,济南 250355)

【摘要】 目的 介绍一种操作简便、可多次、大量采血的大鼠采血方法以及采血点的定位。方法 通过大鼠自身的体表特征,判定最佳进针点,使用注射器针头刺入动物颌下静脉丛缓慢抽取血液。结果 非麻醉状态下,单人平均77.46 s可完成一只大鼠的采血操作,平均采血量为0.53 mL;双人平均56.28 s可完成采血操作,平均采血量为0.59 mL。麻醉状态下,单人大鼠的采血操作平均耗时28.67 s,平均采血量为0.56 mL。结论 颌下静脉丛采血成功率高,对动物创伤小,且操作简单,采血量较大,可作为药理毒理实验中大批量动物活体多次采血的优先选择。

【关键词】 大鼠;颌下静脉丛;采血方法;动物福利

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2023) 04-0104-05

Localization of blood collection points in the submandibular venous plexus and blood collection method of rats

HAN Muxuan¹, XING Ying², WANG Yuerui², ZHANG Jiayu³, ZHANG Hao⁴, LI Zifa⁴, GENG Xiwen^{4*}, WEI Sheng^{4*}

(1. College of Health Sciences, Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250355, China.
2. College of Traditional Chinese Medicine, Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250355.
3. Rehabilitation Medical College, Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250355.
4. Laboratory Animal Center, Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250355)

【Abstract】 Objective To develop a blood collection method for rats that is easy to perform and can be used for repeated, high-volume blood collection, and a method of positioning blood collection points. **Methods** The optimal entry point was determined by the body surface characteristics of rats, and blood was collected using a syringe needle to pierce the submaxillary venous plexus and then slowly draw blood. **Results** When rats were not anesthetized, a single operator completed the blood collection operation in 77.46 s on average, and the average blood collection volume was 0.53 mL. Two operators completed the blood collection in 56.28 s on average, and the average blood collection volume is 0.59 mL. Under anesthesia, blood collection by a single operator required 28.67 s on average, and the average blood collection volume was 0.56 mL. **Conclusions** The success rate of submandibular plexus blood collection is high, trauma to the animal is minimal, the operation is simple, and the blood collection volume is large, which can be used as the preferred choice for multiple blood collections from large numbers of live animals in pharmacological and toxicological experiments.

【Keywords】 rats; submandibular venous plexus; blood collection method; animal welfare

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

【基金项目】 国家自然科学基金(82274383,81974553,82004078);山东省自然科学基金(ZR2021LZY018,ZR2020ZD17);山东中医药大学中医药与脑科学青年科研创新团队(22202101);山东省大学生创新创业训练计划(S202210441007)。

【作者简介】 韩穆轩(2001—),男,在读本科生,研究方向:动物行为科学。E-mail:muxuan_han@163.com

【通信作者】 魏盛(1980—),男,教授,博士,研究方向:中医情志病证的脑环路基础和中医药干预机制。E-mail:weisheng@sducm.edu.cn
耿希文(1990—),女,副教授,博士,研究方向:情志病证神经环路及中药干预机制。E-mail:xwgeng@sducm.edu.cn

* 共同通信作者

进行动物实验的过程中,常需采集动物的血液样本以用于生化分析或生理检测。因此是否能够顺利地采集到动物血液是实验中较为关键的一步。大鼠作为常用的实验动物,与兔、狗等中大型实验动物相比,体型较小、血管较细,因而对大鼠进行取血操作存在一定的难度。目前常用于实验大鼠的采血方法有眼眶后静脉丛采血法、心脏采血法、腹主动脉采血法等^[1-2]。眼眶后静脉丛采血法不仅采血量有限、短时间内难以重复多次采血,而且所获血液样本中常含组织液,无法满足采集高质量血液样本的要求。此外,眼眶后静脉丛采血法易因操作不当或者反复取血导致大鼠眼部感染、失明或眼球坏死,对动物伤害较大,有违实验动物福利的要求。心脏采血法应用于小型实验动物时操作困难,成功率较低,需要经长时间培训、多次练习后才可用于正式实验;且动物挣扎剧烈,常需对动物施以麻醉来辅助取血。腹主动脉采血法虽操作简单、取血量大,但需将动物麻醉并暴露腹腔操作,仅适用于实验结束后取材时使用。综上所述,现有采血方法难以满足操作快捷简便、能够反复取血、血样量大质优、符合福利规范等要求,而颌下静脉丛采血法较好的弥补了这些取血方式的缺点^[3-5],但有关文献中存在对采血位点定位方法描述模糊、操作方式不完善等问题,使得该方法尚未得到广泛应用。因此,我们结合自身操作经验,通过反复实验确定了准确的采血位点,并改进了已有取血方式的弊端,使颌下静脉丛采血法的操作流程更加规范化,有助于其推广实践。

1 材料和方法

1.1 实验动物

SPF 级 SD 大鼠 15 只(雄性,6~8 周龄),体重(200±20)g,购自北京维通利华实验动物技术有限公司[SCXK(京)2021-0006]。大鼠饲养于山东中医药大学实验动物中心屏障环境内[SYXK(鲁)2017-0022]。适应性饲养 7 d 后,将大鼠根据体重进行基线匀齐后分为 3 组:麻醉状态下单人操作组、非麻醉状态下单人操作组和非麻醉状态下双人操作组。本研究获山东中医药大学实验动物伦理委员会批准(SDUTCM20210806007),实验设计及操作均遵循 3R 原则。

1.2 主要试剂与仪器

异氟烷,深圳市瑞沃德生命科技有限公司,批

号:217161201;75%乙醇,山东利尔康医疗科技股份有限公司,批号:20211107。小动物麻醉系统,深圳市瑞沃德生命科技有限公司;脱脂棉球,聊城市大明医疗器械有限公司,批号:20211216;医用注射器(带有 26 G 灭菌注射针头),湖南康利来医疗器械有限公司,批号:20201028。

1.3 实验方法

1.3.1 采血点定位

观察大鼠头面部可发现其下颌左右两侧各有一处无毛斑点,即下颌斑点(submandibular spots)。连接下颌斑点与同侧耳根部前缘,然后由动物前内眼角做与该连线的垂线,其相交处即为最佳采血点。见图 1。

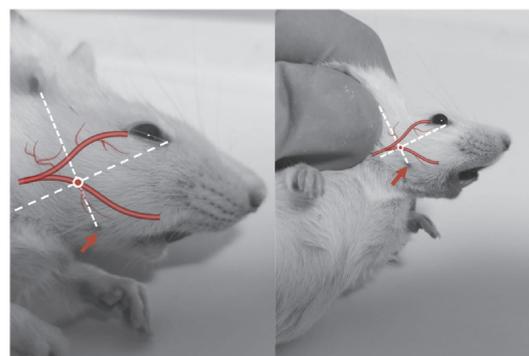
1.3.2 动物麻醉

使用异氟烷对麻醉状态下单人操作组的大鼠进行吸入式麻醉。将大鼠置于麻醉诱导盒中,连接装有异氟烷液体的小动物呼吸麻醉机对动物进行诱导麻醉(异氟烷浓度为 3%,氧气流量为 400 mL/min)。待大鼠充分麻醉后,将大鼠取出进行采血操作。期间使用麻醉面罩维持麻醉(异氟烷浓度为 1.5%,氧气流量为 400 mL/min)。

1.3.3 单人操作

保定方式:从笼中取出大鼠,将其置于笼盖上,以非惯用手的拇指及中指抓握住动物颈部皮肤,食指抵住动物头部以减少晃动。同时以无名指和小指夹住动物尾部,如图 2 所示。

使用酒精棉球对大鼠面部皮肤进行常规消毒,后根据 1.3.1 中所述定位方法来确定采血点。取一



注:红色箭头:大小鼠下颌斑点;白色虚线相交处:采血点。

图 1 大小鼠下颌斑点及采血点定位

Note. Red arrows, Submandibular spots in rats and mice. Intersection of white dashed lines, Blood collection points.

Figure 1 Positioning of submandibular spots and blood collection points in rats and mice

次性注射器,用持针手手指将大鼠头面部轻压于笼盖或桌面上,以垂直动物头部的方向斜向下 45° 入针,入针深度约为 9 mm(26 G 针头的四分之三处)。待见针头处有回血时缓慢抽动活塞收集血液。取血完成后及时拔出注射器,用灭菌棉球轻压采血点 5 s 左右,待止血后将大鼠放回笼盒中。见图 3。

1.3.4 双人操作

保定方式:助手用非惯用手按单人操作中所述的保定方法固定大鼠后,以惯用手食指抵住大鼠下颚,拇指及中指夹住动物前肢,同时用手腕抵住大鼠的腹部。将大鼠置于笼盖或桌面上,充分暴露头面部以便采血者操作。见图 4。其定位、采血操作



图 2 大鼠单人操作时保定方法

Figure 2 Method of single operator holding the rat

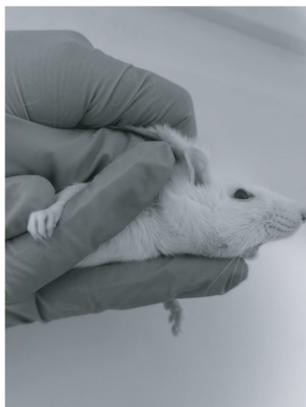


图 4 大鼠双人操作时保定方法

Figure 4 Method of double operators holding the rat

与单人操作时相同。

2 结果

对 15 只大鼠连续取血 7 d,记录其取血量、平均耗时以及总失败次数(定位采血点失败或未成功取到 0.5 mL 血样记为 1 次)并计算其成功率,经统计分析后如表 1。

所取血液样本经离心后上层血清澄清,且无溶血情况发生。见图 5。采血过程中,未发生大鼠残疾或死亡等情况。采血完成后将大鼠置于原饲养环境中正常饲养 7 d,动物饮食活动正常,无后续感染、死亡等异常情况。

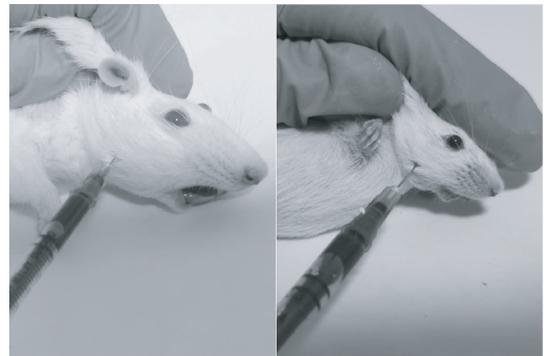


图 3 大小鼠颌下静脉丛采血操作

Figure 3 Blood collection from the submandibular venous plexus in rats and mice



图 5 颌下静脉丛采血法所取血液样本

Figure 5 Blood sample taken by submandibular plexus blood collection method

表 1 颌下静脉丛采血对大鼠的影响

Table 1 Effects of blood collection from the submandibular venous plexus on rats

组别 Groups	平均取血量 (mL) Average blood collection volume	平均耗时 (s) Average time spent	总失败次数 Total number of failures	成功率 Success rate	
麻醉状态下 Under anesthesia	单人操作 Single operator	0.56±0.09	28.67±3.27	2	94.59%
非麻醉状态下 Under non-anesthesia	单人操作 Single operator	0.53±0.10	77.46±25.33	5	87.50%
	双人操作 Double operators	0.59±0.11	56.28±14.17	3	92.11%

3 讨论

颌下静脉丛采血法是目前集众多采血方法之长的、适合广泛推广使用的采血方式,与眼眶后静脉丛采血法和眼球摘除采血法相比,有着采血量高、血样质量高,可重复多次取血的优势^[6-7];与心脏采血法相比,有着操作便捷简单、易于上手的特点;与腹主动脉采血法相比,颌下静脉丛采血法不仅对动物的伤害较小,而且能够在动物非麻醉状态下进行多次活体采血。相较于传统的采血方法,颌下静脉丛采血法更加符合 3R 原则和实验动物福利与伦理规范。

目前国内有关颌下静脉丛采血方法的文献较少,且各个文献对采血点的描述不统一,这也是该采血法尚未被推广的原因之一。此前,余琛琳等^[8]和张东淑等^[9]对采血点的描述为“下颌骨后方咬肌边缘”、“小鼠嘴角平面与外眼角延长线交点处”,但这种描述较为模糊,不仅对于初学者来说难以理解实践,而且该定位方法用于大鼠时,失败次数较高。基于此,我们根据对大小鼠血管的观察、解剖以及多次实践操作,确定了一种可依靠大鼠自身体表特征的简单易行的采血点定位方法。并且经反复实验,我们发现此定位方式也可运用于小鼠。同时,该定位方法有着定位点个体差异小,可重复操作性高的特点,优化了定位方法,使颌下静脉丛采血法的操作更加便捷。

除此之外,目前国内外也少见对大鼠颌下静脉丛采血的报道^[10]。对小鼠进行颌下静脉丛采血时,台雪姣等^[11]所采用的毛细吸管难以刺破动物面部皮肤,并且毛细吸管易在操作时断裂,刺伤动物或实验人员;余琛琳等^[8]使用注射器针头刺入颌下静脉丛血管,收集滴落血液的操作易导致血样被动物面部毛发污染,造成溶血,影响后续实验分析;因此,我们使用了实验室中常见且经济的医用注射器作为采血器材,将针头刺入取血和针筒抽取血液相结合,避免了血液在收集过程中被污染,并且该方式对动物组织损伤小、愈合快,减轻了动物痛苦的同时还可以重复多次采血。除了操作方式不确定之外,我们认为由于大鼠力量较大,在采血过程中难以采取有效的保定方法固定大鼠,从而易导致采血失败也是颌下静脉丛采血法未在大鼠中得到广泛应用的原因之一。因此我们提出了可由单、双人操作且简便可行的徒手保定法,这种方法不仅操作快速,保定效果好,而且可以有效减少由传统抓握方式导致的面部血管变形,有利于精准定位采血点,

提高采血成功率。

4 建议与注意事项

在标准操作流程之外,以下细节也值得操作者注意:(1)对大鼠的充分麻醉或固定是采血成功的重要因素之一,若麻醉过浅或固定不稳,则易因大鼠在采血操作过程中的扭动而导致针头偏移或滑落,造成采血失败。是否采用麻醉可根据实验设计、对血样的要求、采血人员人数及熟练度、大鼠体质、年龄及被采血次数来进行确定。由于颌下静脉丛采血法操作简单快捷、耗时较短,所以我们推荐对动物使用吸入式麻醉剂(如异氟烷)来进行麻醉,可极大的缩短动物之间的麻醉时间间隔;(2)在使用酒精棉球进行消毒时,应注意保持大鼠面部毛发走向,以免影响后续对采血点的定位。可分开大鼠下颌处毛发,充分暴露下颌斑点,方便定位;(3)对大鼠进行保定操作时动作应轻柔,避免抓握过紧导致大鼠面部血管位移或窒息;(4)由双人进行采血操作时,采血者可用非持针手虎口处轻压大鼠头面部,以减少大鼠头部的晃动;(5)在进行短时间内的重复多次采血操作时,可对大鼠双侧颌下静脉丛进行交替采血,避免短时间内对大鼠单侧面颊的重复损伤,延长采血后大鼠的恢复时间;(6)大鼠下颌部肌肉丰富,在应激状态下易肌肉紧张,难以入针,所以从笼中取出大鼠时应动作轻柔,以减小对大鼠的刺激。若大鼠面部肌肉已紧绷,可轻轻按摩大鼠面颊部,待肌肉放松后再进行采血操作;(7)采血完毕后,应及时使用棉球对采血点进行止血。操作时需注意不要用力按压采血点导致瘀血,影响后续采血点的定位和实验操作。

参考文献:

- [1] 杨健莉,刘佳,郑志红.常用实验大小鼠采血方法及其对实验动物福利的影响[J].中国比较医学杂志,2019,29(1):90-94.
- [2] 李静.实验大鼠常规采血法及改进研究进展[J].当代畜牧,2017,398(30):48-50.
- [3] Francisco CC, Howarth GS, Whittaker AL. Effects on animal wellbeing and sample quality of 2 techniques for collecting blood from the facial vein of mice [J]. J Am Assoc Lab Anim Sci, 2015, 54(1): 76-80.
- [4] Heimann M, Roth DR, Ledieu D, et al. Sublingual and submandibular blood collection in mice: a comparison of effects on body weight, food consumption and tissue damage [J]. Lab Anim, 2010, 44(4): 352-358.
- [5] Regan RD, Fenyk-Melody JE, Tran SM, et al. Comparison of submental blood collection with the retroorbital and submandibular methods in mice (mus musculus) [J]. J Am

- Assoc Lab Anim Sci, 2016, 55(5): 570-576.
- [6] Frohlich JR, Alarcón CN, Toarmino CR, et al. Comparison of serial blood collection by facial vein and retrobulbar methods in C57BL/6 mice [J]. J Am Assoc Lab Anim Sci, 2018, 57(4): 382-391.
- [7] Teilmann AC, Kalliokoski O, Sørensen DB, et al. Manual versus automated blood sampling: impact of repeated blood sampling on stress parameters and behavior in male NMRI mice [J]. Lab Anim, 2014, 48(4): 278-291.
- [8] 余琛琳, 赵乐, 汤球, 等. 一项小鼠采血新技术——颌下静脉丛采血法 [J]. 中国比较医学杂志, 2008, 18(12): 53-54, 95.
- [9] 张东淑, 林少霞, 韩强, 等. 小鼠颌下静脉丛采血法改良 [J]. 毒理学杂志, 2018, 32(6): 499-500.
- [10] Golde WT, Gollobin P, Rodriguez LL. A rapid, simple, and humane method for submandibular bleeding of mice using a lancet [J]. Lab Anim (NY), 2005, 34(9): 39-43.
- [11] 台雪皎, 郭兴荣, 罗超, 等. 小鼠颌下采血法改良 [J]. 四川动物, 2017, 36(2): 211-214.
- [收稿日期] 2022-09-28

(上接第 89 页)

- [3] 王媛媛, 周华. 慢性肾脏病微炎症与肠道菌群的研究进展 [J]. 中国实用内科杂志, 2022, 42(5): 423-426.
- [4] 王宏, 徐娟, 江西, 等. 大黄-丹参药对慢性肾衰竭模型大鼠肠源性尿毒素含量和肠道屏障功能的影响 [J]. 中国药房, 2021, 32(7): 825-831.
- [5] 袁玲, 聂卫, 王蕾, 等. 慢性肾脏病血管钙化大鼠并发心肌炎性反应 [J]. 基础医学与临床, 2021, 41(2): 197-202.
- [6] Fu Q, Song T, Ma X, et al. Research progress on the relationship between intestinal microecology and intestinal bowel disease [J]. Animal Model Exp Med, 2022, 5(4): 297-310.
- [7] Xia F, Ding F, Lv Y, et al. A high efficient method to isolate exosomes from small intestinal epithelium [J]. Mol Biotechnol, 2019, 61(5): 325-331.
- [8] Mallegol J, van Niel G, Lebreton C, et al. T84-intestinal epithelial exosomes bear MHC class II/peptide complexes potentiating antigen presentation by dendritic cells [J]. Gastroenterology, 2007, 132(5): 1866-1876.
- [9] Ghannad F, Nica D, Fulle MI, et al. Absence of $\alpha v \beta 6$ integrin is linked to initiation and progression of periodontal disease [J]. Am J Pathol, 2008, 172(5): 1271-1286.
- [10] Liu J, Chen T, Lei P, et al. Exosomes released by bone marrow mesenchymal stem cells attenuate lung injury induced by intestinal ischemia reperfusion via the TLR4/NF- κ B pathway [J]. Int J Med Sci, 2019, 16(9): 1238-1244.
- [11] 肖军华, 周晓燕, 贺志龙, 等. 外泌体对炎症性肠病调节巨噬细胞和肠道上皮细胞的影响 [J]. 中国临床研究, 2018, 31(12): 1681-1685.
- [12] Bui TM, Mascarenhas LA, Sumagin R. Extracellular vesicles regulate immune responses and cellular function in intestinal inflammation and repair [J]. Tissue Barriers, 2018, 6(2): e1431038.
- [13] Chen P, Li Y, Li L, et al. Circulating microRNA146b-5p is superior to C-reactive protein as a novel biomarker for monitoring inflammatory bowel disease [J]. Aliment Pharmacol Ther, 2019, 49(6): 733-743.
- [14] 李艳丽, 申元英, 郭乐. miR-146a 在黏膜免疫中的调控作用 [J]. 中国感染控制杂志, 2022, 21(3): 297-304.
- [15] Sharma N, Verma R, Kumawat KL, et al. miR-146a suppresses cellular immune response during Japanese encephalitis virus JaOArS982 strain infection in human microglial cells [J]. J Neuroinflammation, 2015, 12: 30.
- [16] 熊琳, 朱婷婷, 张丽玲, 等. 慢性肾病大鼠血管钙化与骨代谢标志物的相关性研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2021, 31(1): 87-94.
- [17] 吴伦碧. 糖尿病肾病肾小球内皮细胞外泌体源性 miR-486-5p 对足细胞损伤的影响及机制研究 [D]. 石家庄: 河北医科大学, 2022.
- [18] 陈依梦, 王振国, 何小舟, 等. 血浆外泌体 miR-210, miR-21 和 miR-4639 对肾移植术后并发慢性移植肾病的诊断价值 [J]. 中华移植杂志(电子版), 2020, 14(4): 210-215.
- [19] 李双双. 抑制肾小管上皮细胞 Rab27a 通过 miR-26a-5p/CHAC1/NF- κ B 通路改善糖尿病肾病炎症的机制研究 [D]. 广州: 南方医科大学, 2020.
- [20] 王琪, 姜大朋. 间充质干细胞来源的细胞外囊泡与肾损伤修复 [J]. 临床泌尿外科杂志, 2020, 35(3): 233-236.
- [21] 李清茹, 张琳琪, 陈旭, 等. 间充质干细胞来源细胞外囊泡治疗和修复急性慢性肾损伤 [J]. 中国组织工程研究, 2022, 26(31): 5069-5075.
- [22] 刘博. 间充质干细胞外泌体通过 miR-146a-5p/TRAF 调控自噬减轻慢性肾病的作用及机制研究 [D]. 重庆: 重庆医科大学, 2021.
- [收稿日期] 2022-11-12