技术方法

微量采血法较常规采血法的技术与优势

吴筱琴[1,2],钟 声[2],孙 锴[2],黄孙峰[2],张 怡[2],欣 坚[2],崔 立[1*]

(1. 上海交通大学农业与生物学院,上海 200240; 2. 上海罗氏创新中心,上海 201203)

【摘要】 目的 在体内药物代谢动力学实验中,为了减少动物的使用量(3R-Reduction)以及减轻动物的痛苦(3R-Refinement),本研究首次建立了小鼠后肢隐静脉进行微量采血的方法,利用较以往灵敏 5 ~ 10 倍的生物分析技术进行药代动力学研究。**方法** 给予雄性 CD-1 小鼠静脉注射或者口服灌胃模型化合物 A、B、C、D,通过隐静脉微量采血法(所需动物数量少、采血量少、动物承受痛苦轻微)以及常规眼眶后静脉丛采血法(所需动物数量多、采血量较多、动物承受痛苦较严重)两种采血方法,分别在给药后的相同时间点进行采血,测定各组的小鼠血浆药物浓度,并对计算所得的药代动力学参数进行比较。**结果** 对于所有模型化合物,隐静脉微量采血与眼眶后静脉丛常规采血法所获得的主要药代动力学参数一致,无明显差异。**结论** 在小鼠药代动力学实验中隐静脉微量采血法完全可以替代现有的常规眼眶后静脉丛采血法,从而显著地减少了动物使用量、减轻了动物所承受的痛苦,采血量减少了 80%,动物使用量减少了 65%,更加符合动物福利 3R 原则。

【关键词】 小鼠;微量采血法;药代动力学;动物福利;3R 原则
【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】**1671-7856(2018) 03-0084-07
doi: 10.3969/j.issn.1671 -7856. 2018.03.016

Technique and advantages of a blood micro-sampling method compared with regular sampling method in mice

WU Xiaoqin[1,2], ZHONG Sheng[2], SUN Kai[2], HUANG Sunfeng[2], ZHANG Yi[2], XIN Jian[2], CUI Li[1*]
(1. School of Agriculture and Biology, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China.
2. Roche Innovation Center Shanghai, Shanghai 201203)

【Abstract】 Objective To establish a micro volume blood sampling method via the saphenous vein for pharmacokinetic studies (PK studies) in mice, aiming at reducing animal use and alleviate animal pain in *in vivo* procedures. **Methods** CD-1 mice were intravenously or orally administered with model compounds A, B, C and D. Blood samples were collected by both the micro-sampling method and regular method at the same time points, and used for the measurement of plasma drug concentration. Pharmacokinetic parameters obtained from each method were compared. **Results** For each of the four compounds, plasma PK profiles generated by micro-sampling via saphenous vein were in good accordance with those by the regular sampling method via retro-orbital venous plexus. **Conclusions** Our newly developed micro-sampling blood collecting method can replace the regular blood collecting method used in pharmacokinetic studies in mice. It can significantly improve animal welfare by alleviating animal pain. The volume of blood withdrawn can be reduced by 80%, and the number of mice used for the pharmacokinetic studies can be reduced by 65%.

【Key words】 mice; blood micro-sampling method; pharmacokinetics; animal welfare; 3R principle

[作者简介]吴筱琴(1987—),女,硕士研究生,专业:兽医。E-mail: Xiaoqin.wu@roche.com
[通信作者]崔立,女,研究员,研究方向:动物感染模型的建立,感染与免疫,新发人兽共患病流行病学调查。E-mail: lcui@sjtu.edu.cn

小鼠体型小,生长繁殖快,成本低,易于操作和控制,是医学实验尤其是药代动力学实验常用动物。在各种动物实验研究中,为了评价药物、新化合物等的药理学、药物代谢动力学特征,常在一定时间内多次采集动物血液[1]。目前,小鼠常用的采血方法有眼眶后静脉丛采血法,眼球摘除采血法,心脏采血法,尾静脉采血法等[2]。据研究报道,采血本身会引起动物应激,某些采血方法甚至会引起动物局部组织的严重损伤甚至是动物死亡[3-4]。其中,小鼠眼眶后静脉丛采血是目前最常用的小鼠连续多次采血方法[5],其采血量可满足药代、药效等常用指标的分析。但在实际应用中,眼眶静脉丛采血会造成动物眼睛局部的严重损伤、甚至是失明,采血过程中动物表现明显痛苦,需要麻醉,且所需动物数量较大、采血量较多,因此该采血方法不完全符合动物福利 3R 原则。近年来,生物分析仪器灵敏度有大幅提高。以本实验使用的三重四极杆质谱灵敏度为例,Triple Quad 5500 比 API 4000 灵敏度提到了 5 ~ 10 倍。这就从技术上实现了能够支持微量血液样品的生物分析[6]。但目前,以微量采血进行生物分析及药代动力学研究国内尚未见报道。而在这一研究领域,于小鼠后肢隐静脉采血国内外均未见报道。本研究首次建立了小鼠后肢隐静脉微量采血的新方法。该方法所需动物数量显著减少,同时动物表现痛苦小,无需麻醉,对动物局部组织的损伤较小,并可重复采血,采血量小。与常规眼眶后静脉丛采血法比较,所获得的主要药代动力学参数一致,无明显差异。因此在小鼠药代动力学实验中隐静脉微量采血法完全可以替代现有的常规眼眶后静脉丛采血法,且更加符合动物福利 3R 原则。

1 材料和方法

1.1 实验动物

SPF 级雄性 CD-1 小鼠 92 只,6 ~ 8 周龄,体重 20 ~ 25 g;由上海斯莱克实验动物有限责任公司提供[SCXK(沪) 2012 - 0002]。本实验在上海美迪西生物医药有限公司 SPF 动物房进行[SYXK(沪) 2015 - 0026],动物房恒温恒湿(温度 21℃ ~ 23℃,湿度 40% ~ 60%),光照时间 8:00 ~ 20:00。实验开始前,小鼠在动物房中适应至少 5 d。本实验由上海罗氏创新中心实验动物使用与管理委员会批准号:RICS - 20150921。

1.2 主要试剂与仪器

给药溶液的配置:静脉注射溶液由 5%(w/v)二甲基亚砜(DMSO)、40%(w/v)聚乙二醇(PEG 400)和 55%(w/v)生理盐水配制;口服溶液由 2%(w/v)羟丙基纤维素、0.1%(w/v)聚山梨醇酯(polysorbate 80)和 0.1%(w/v)对羟基苯甲酸甲酯的水溶液配制;色谱级乙腈、甲醇:Thermo Fisher 公司;实验所用其他试剂纯度均为色谱级别。

麻醉机:Matrx 公司,型号 91805060;超高效液相色谱仪(UPLC - MS/MS):Shimadzu 公司,型号 Nexera LC System;三重四级杆质谱仪:AB SCIEX 公司,型号 5500;Chromolith FastGradient RP-18 Endcapp(50 × 2.0 mm)色谱柱:默克公司;离心机:梅特勒公司,型号 5424,Beckman 公司,型号 Allegra 64R;电子天平:梅特勒公司,型号 XP205DR;微量采血毛细管:Sarstedt Ag & Co. 公司,型号 Minivette POCT;灭菌注射针及注射器:上海米沙瓦公司,型号 4.5 和 6 号;一次性抗凝管及一次性血样采集针:江苏康健公司;酒精棉球等。

1.3 实验方法

1.3.1 小鼠药代动力学实验设计

将 92 只 CD-1 小鼠分别随机编号并称重,分为 16 组。分别单次给予静脉注射(intravenous injection,IV)1 mg/kg 以及口服灌胃(oral gavage,PO)10 mg/kg 的模型化合物 A、B、C、D。

① 常规眼眶后静脉丛采血法:静脉注射每组 9 只动物,口服灌胃每组 8 只动物;

② 后肢隐静脉微量采血法:静脉注射、口服灌胃每组均 3 只动物。具体实验设计见表 1。

1.3.2 采血时间点

静脉给药组:于给药后 5 min、15 min、30 min、1 h、2 h、4 h、7 h、24 h 采集样品,共 8 个时间点。

口服给药组:于给药后 15 min、30 min、1 h、2 h、4 h、7 h、24 h 采集样品,共 7 个时间点。

对于常规眼眶后静脉丛采血法,因采血量较大(每只各时间点 150 μL),对动物进行间隔采血,每个时间点采用 3 只动物,每只动物最多采集不超过 3 次,具体采血安排见表 2。

对于隐静脉微量采血法,采血量小(每只各时间点 30 μL),在全部 3 只动物中采集所有时间点的样品。

表 1 单个模型化合物实验设计

Tab. 1 Experimental design of the single model compound

组别 Groups	给药途径 Administration routes	动物数 Number of animals	采血量(μL) Sampling volume	给药浓度(mg/kg) Administration dose	给药体积(mL/kg) Administration volume
常规采血 Regular sampling	静脉注射 IV	9	150	1	5
常规采血 Regular sampling	口服灌胃 PO	8	150	10	10
微量采血 Micro-sampling	静脉注射 IV	3	30	1	5
微量采血 Micro-sampling	口服灌胃 PO	3	30	10	10

表 2 动物间隔采血安排

Tab. 2 Time points of blood collection

时间点 Time points	动物编号 Animal No.																
	静脉给药组 IV group									口服给药组 PO group							
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	1	2	3	4	5	6	7	8
5 min	✓	✓	✓														
15 min				✓	✓	✓				✓	✓	✓					
30 min							✓	✓	✓				✓	✓	✓		
1 h	✓	✓	✓							✓						✓	✓
2 h				✓	✓	✓							✓	✓	✓		
4 h							✓	✓	✓		✓					✓	✓
7 h	✓	✓	✓										✓	✓	✓		
24 h				✓	✓	✓						✓				✓	✓

注:“✓”为该采血点所使用动物。

Note. “✓” indicates the animals for blood collection at that time point.

1.3.3 采血方法

(1)常规眼眶后静脉丛采血法:将小鼠放入异氟烷麻醉箱进行吸入麻醉后,左手抓紧小鼠颈部皮肤固定头部,并轻轻向下压迫颈部两侧,以突出小鼠眼球并使眼球充血,右手用事先准备好的一次性血样采集针针头顶端(针尖斜面朝内)垂直插入外眦,见针管有血液后,保持此位置连接离心管,血液便会连续不断地滴入,当血液量达到 150 μL 时拔出采集针立即用灭菌干棉球压迫止血。

(2)隐静脉微量采血法:小鼠无需麻醉,实验前先将小鼠后肢部位剃毛,将小鼠放入合适的固定器中,露出后肢,酒精棉球擦拭采血部位消毒后,将灭菌注射针头迅速刺入后肢隐静脉,血液流出,用微量采血毛细管收集 30 μL 血液于离心管中。采血结束,立即用灭菌干棉球压迫止血。

1.3.4 小鼠疼痛评估

小鼠在隐静脉微量采血过程中,根据国际 NC3R[S]“小鼠痛苦表情评分”及遵循 AAALAC《实验动物饲养管理和使用指南(第八版)》,通过观察小鼠的表情、外貌表现(被毛、理毛行为、眼睛、躯干体姿、呼吸)、饮食和排泄、行为(合群情况、运动、性格、声音)及临床症状(心血管系统、呼吸系统、消化系统、神经系统)评估和判定小鼠的疼痛程度。此评估仅适用于清醒动物,因常规眼眶后静脉丛采血法动物表现明显痛苦,实施麻醉,未进行疼痛评分。

1.3.5 血浆样品处理

(1)常规采血法血浆样品处理:取小鼠血浆样品 20 μL,加入 60 μL 冰乙腈进行 1∶4(v/v)蛋白沉淀,涡旋使其充分混合后在 4℃ 条件下以 12 000 r/min转速离心 10 min 后,取上清液进样到 AB Sciex Triple Quad 5500 MS/MS 系统使用电喷雾离子化模式进行分析。进样体积均为 2 μL。

(2)微量采血法血浆样品处理:取小鼠血浆样品 5 μL,加入 95 μL 冰乙腈进行 1∶20(v/v)蛋白沉淀,涡旋使其充分混合后在 4℃ 条件下以 12 000

r/min转速离心 10 min 后,取上清液进样到 AB Sciex Triple Quad 5500 MS/MS 系统使用电喷雾离子化模式进行分析。进样体积均为 1 μL。

1.4　数据处理

通过 Phoenix 软件计算主要药代动力学参数,包括 AUC(药时曲线下面积)、$t_{1/2}z$(消除半衰期)、C_{max}(峰浓度)、T_{max}(达峰时间)、MRT(平均驻留时间)、CLz(清除率)和 Vz(分布容积)。

2　结果

在采血过程中,通过对比 NC3R^S 的“小鼠痛苦表情评分”以及 AAALAC《实验动物饲养管理和使用指南(第八版)》,小鼠表现均为正常(所有评分项目为“0”-正常),表明的确将动物损伤降至了最低。对于 A、B、C、D 四种化合物在小鼠中分别单次给药,采用两种采血方法计算所得的主要药代动力学参数见表 3 ~6,药时曲线见图 1 ~4。结果表明,与常规眼眶后静脉丛采血法相比,采用隐静脉微量采血所获得的主要药代动力学参数一致,无明显差异。因此在小鼠药代动力学实验中隐静脉微量采血法完全可以替代现有的常规眼眶后静脉丛采血法。

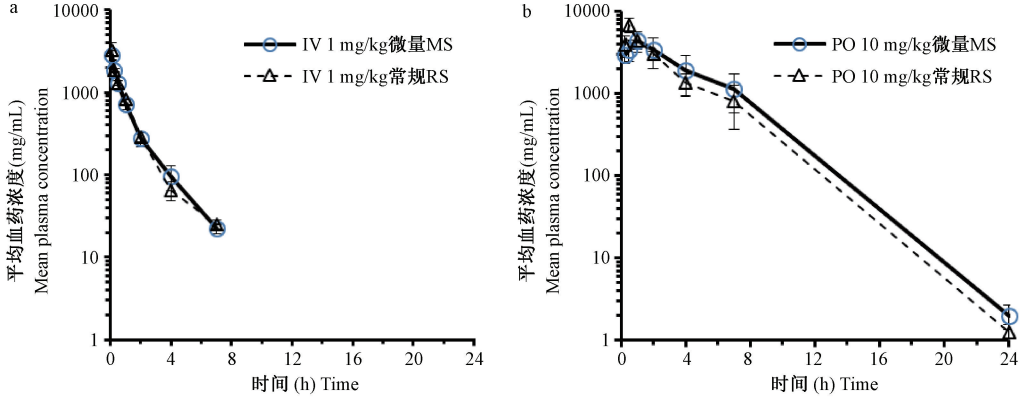
表 3　小鼠单次给予静脉注射及口服灌胃模型化合物 A 后微量和常规采血方法的主要药代动力学参数

Tab. 3　Pharmacokinetics parameters of compound A in the CD-1 mice following an intravenous injection or gastric gavage

采血方法 Blood collection methods	给药途径 Administration routes	剂量 (mg/kg) Dose	药时曲线下面积 (μg/L * h) AUC (0-t)	药时曲线下面积 (μg/L * h) AUC (0 - ∞)	平均滞留时间 (h) MRT (0 - ∞)	消除半衰期(h) $t_{1/2}z$	达峰时间 (h) T_{max}	分布容积 (L/kg) Vz	清除率 [mL/(min * kg)] CLz	峰浓度 (μg/L) C_{max}
微量采血 Micro-sampling(MS)	静脉注射 IV	1	2606	2651	1.3	1.4	0.083	0.75	6.29	2843
常规采血 Regular sampling(RS)			2714	2752	1.1	1.1	0.083	0.56	6.06	3250
微量采血 Micro-sampling	口服灌胃 PO	10	26720	26725	4.3	2.0	1	NA*	NA*	4407
常规采血 Regular sampling			22813	22817	3.7	2.0	0.5	NA*	NA*	6820

注:* 表示不适用。下同。

Note. * indicates not applicable (NA). The same below.



注:a:小鼠单次给予静脉注射 1 mg/kg 模型化合物;b:小鼠单次给予口服灌胃 10 mg/kg 模型化合物。下同。

图 1　微量和常规采血法测得模型化合物 A 的平均药时曲线

Note. a: Mouse intravenous injection of 1 mg/kg of model compound each time. b: Mouse oral gavage of 10 mg/kg of model compound each time. The same below.

Fig. 1　Comparison of mean plasma concentration-time curves of model compound A in mice by regular blood sampling or micro-sampling method

表 4 小鼠单次给予静脉注射及口服灌胃模型化合物 B 后微量和常规采血方法的主要药代动力学参数

Tab. 4 Pharmacokinetics parameters of compound B in the CD-1 mice following an intravenous injection or gastric gavage

采血方法 Blood collection methods	给药途径 Administration routes	剂量 (mg/kg) Dose	药时曲线下面积 (μg/L*h) AUC (0-t)	药时曲线下面积 (μg/L*h) AUC (0-∞)	平均滞留时间 (h) MRT (0-∞)	消除半衰期 (h) $t_{1/2}z$	达峰时间 (h) T_{max}	分布容积 (L/kg) Vz	清除率 [mL/(min*kg)] CLz	峰浓度 (μg/L) C_{max}
微量采血 Micro-sampling	静脉注射 IV	1	412	414	0.6	0.8	0.083	2.9	40.3	862
常规采血 Regular sampling			459	465	0.7	1.0	0.083	3.1	35.9	1005
微量采血 Micro-sampling	口服灌胃 PO	10	2460	2465	2.8	3.2	0.25	NA*	NA*	1247
常规采血 Regular sampling			1980	2198	2.4	3.1	0.25	NA*	NA*	1410

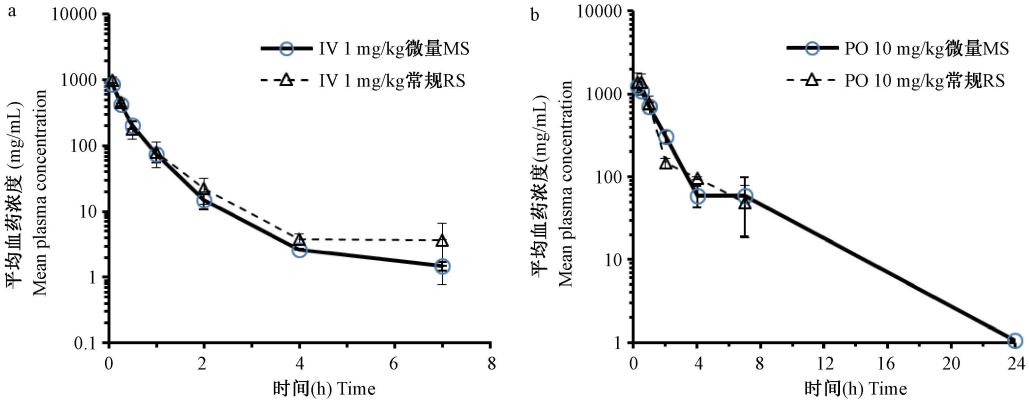


图 2 微量和常规采血法测得模型化合物 B 的平均药时曲线

ig. 2 Comparison of mean plasma concentration-time curves of model compound B in mice by regular blood sampling or micro-sampling method

表 5 小鼠单次给予静脉注射及口服灌胃模型化合物 C 后微量和常规采血方法的主要药代动力学参数

Tab. 5 Pharmacokinetics parameters of compound C in the CD-1 mice following an intravenous injection or gastric gavage

采血方法 Blood collection methods	给药途径 Administration routes	剂量 (mg/kg) Dose	药时曲线下面积 (μg/L*h) AUC (0-t)	药时曲线下面积 (μg/L*h) AUC (0-∞)	平均滞留时间 (h) MRT (0-∞)	消除半衰期 (h) $t_{1/2}z$	达峰时间 (h) T_{max}	分布容积 (L/kg) Vz	清除率 [mL/(min*kg)] CLz	峰浓度 (μg/L) C_{max}
微量采血 Micro-sampling	静脉注射 IV	1	169	177	0.6	0.5	0.083	4.1	94.1	299
常规采血 Regular sampling			142	158	0.7	0.7	0.083	6.5	106	259
微量采血 Micro-sampling	口服灌胃 PO	10	132	147	1.7	1.2	0.5	NA*	NA*	79.4
常规采血 Regular sampling			96	122	4.1	2.8	0.5	NA*	NA*	43.2

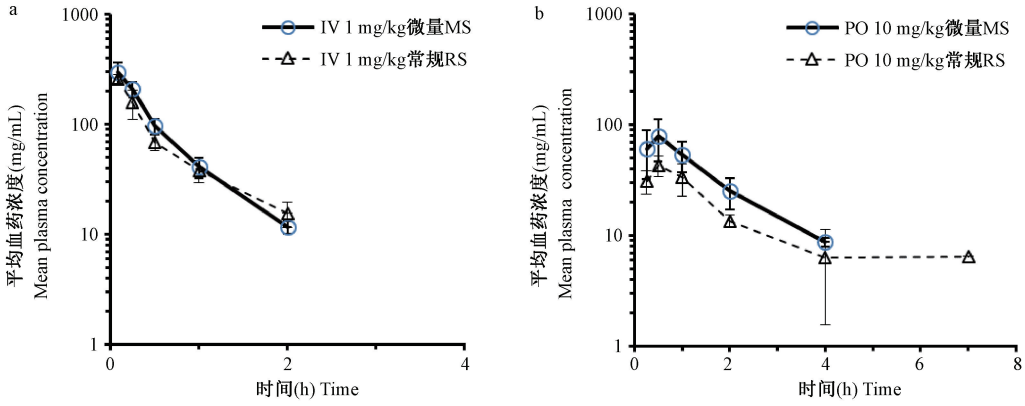


图 3　微量和常规采血法测得模型化合物 C 的平均药时曲线

Fig. 3　Comparison of mean plasma concentration-time curves of model compound C in mice by regular sampling or micro-sampling method

表 6　小鼠单次给予静脉注射及口服灌胃模型化合物 D 后微量和常规采血方法的主要药代动力学参数

Tab. 6　Pharmacokinetics parameters of compound D in the CD-1 mice following an intravenous injection or gastric gavage

采血方法 Blood collection methods	给药途径 Administration routes	剂量 (mg/kg) Dose	药时曲线下面积 (μg/L * h) AUC (0-t)	药时曲线下面积 (μg/L * h) AUC (0 - ∞)	平均滞留时间 (h) MRT (0 - ∞)	消除半衰期 (h) $t_{1/2}z$	达峰时间 (h) T_{max}	分布容积 (L/kg) Vz	清除率 [mL/(min * kg)] CLz	峰浓度 (μg/L) C_{max}
微量 Micro-sampling	静脉注射 IV	1	256	258	0.4	0.9	0.083	5.2	64.7	746
常规 Regular sampling			239	241	0.3	0.3	0.083	2.1	69.2	669
微量 Micro-sampling	口服灌胃 PO	10	782	837	2.1	1.7	0.25	NA *	NA *	754
常规 Regular sampling			743	796	2.1	1.7	0.25	NA *	NA *	741

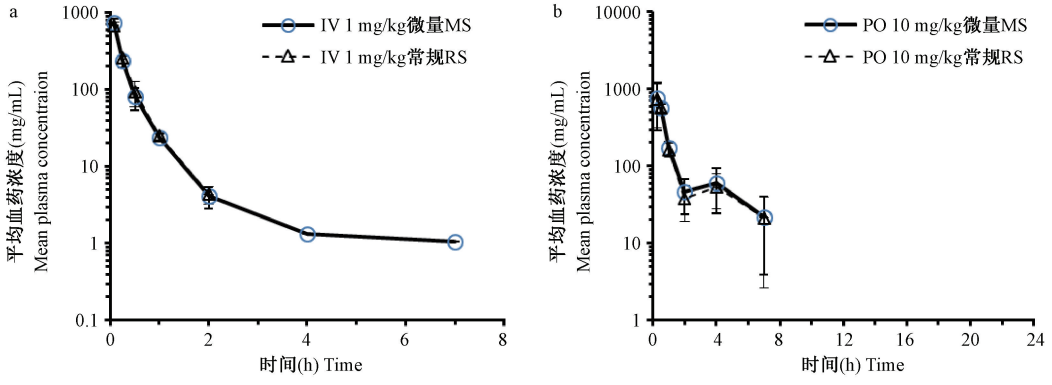


图 4　微量和常规采血法测得模型化合物 D 的平均药时曲线

Fig. 4　Comparison of mean plasma concentration-time curves of model compound D in the mice by regular sampling or micro-sampling method

3　讨论

本研究在国内外首次建立了小鼠后肢隐静脉微量采血法，并利用高灵敏度的质谱技术生物分析方法，成功实施了药代动力学研究。微量采血法的应用得益于生物分析仪器灵敏度的大幅提高。通过表 7 可以发现，同样浓度的血浆样品在使用不同质谱进行定量时的灵敏度（色谱峰高）存在明显差异。对于药物研发早期的药动学试验，LLOQ（low limit of quantitation）值通常为 1 ng/mL。虽然使用相对老旧型号的质谱也可满足此要求，但往往需要使用更多的血浆以及其他生物样品（20 ~ 50 μL）用于方法开发以及样品测定，而新型仪器可以明显降低动物血浆以及其他生物样品的使用量（5 ~ 10 μL）。

表 7 同一浓度血浆样品(化合物 B,1500 ng/mL)使用不同质谱仪分析时的灵敏度比较

Tab. 7 Sensitivity evaluation by different mass spectrometers using of the samples at the same concentration (compound B, 1500 ng/mL)

质谱型号 Mass spectrometers	API 4000	Triple Quad 5500
色谱柱 Column	Chromolith FastGradient RP-18 endcapp (50 × 2.0 mm)	
进样量(μL) Injection volume	1	1
色谱峰宽(min) Peak width	0.077	0.214
色谱峰高 Peak height	418	4.02×10^5

小鼠常用的采血方法有眼球摘除采血法、心脏采血法、眼眶后静脉丛采血法、尾静脉采血法等,这些方法各有其优缺点。例如眼球摘除采血法采血量约为 300 ~ 400 μL,而且易致小鼠失明、易感染,止血不严密时还可致小鼠死亡[7];心脏采血法采血量可达 800 μL,但由于小鼠个体小、心脏小、心脏搏动快、采血时位置较难固定,因而操作难度系数大,且需要麻醉[8-9]。这两种方法均不可重复采血,不适用于目前的药代动力学研究。眼眶后静脉丛与尾静脉采血法可重复采血,常用于药代动力学研究,但采用眼眶后静脉丛采血容易混入组织液,且需要麻醉,有可能造成眼球后组织损伤及鼻骨的破坏,甚至导致动物窒息死亡[10]。国外有报道采用尾静脉微量采血法进行药代动力学研究[6,11],但尾静脉采血法易凝血,常须采用暖灯或者温水浴加热尾部以确保重复采血操作正常进行。小鼠隐静脉血管丰富,位置浅表[12]。因此本研究在国内外首次采用了小鼠后肢隐静脉采血实施药代动力学研究。该方法无需麻醉,操作方法简单易学,采血位置和深度易把握,动物所承受痛苦降至最低。同时采血量减少了 80%,动物使用量减少了 65%。此外,因所有采血时间点来源于同一动物,实验数据更加优化。该采血方法更加符合动物福利 3R 原则,在药代动力学及其他医学实验研究中应该予以推广。

参考文献:

[1] 梁月琴, 杨波. 大鼠、小鼠给药及采血的几点体会[J]. 山西医科大学学报, 2000, 31(1): 92 - 93.

[2] 宗阿南, 邹悦, 任萍萍. 实验动物质量检测中不同采血方法的比较[J]. 中国比较医学杂志, 2008, l8(2): 74 - 75.

[3] Diehl KH, Hull R, Morton D, et al. A good practice guide to the administration of substances and removal of blood, including routes and volumes [J]. J Appl Toxicol, 2001, 21(1): 15 - 23.

[4] Tse FL, Nickerson DF, Aun R. Effect of isoflurane anesthesia on antipyrine pharmacokinetics in the rat [J]. Pharm Res, 1992, 9(11): 1515 - 1517.

[5] 陈霆, 李枫棣, 邓巍, 等. 小鼠内眦静脉丛注射与尾静脉注射比较[J]. 中国比较医学杂志, 2014, 24(1): 72 - 73.

[6] Jonsson O, Palma Villar R, Nilsson LB, et al. Capillary microsampling of 25 μL blood for the determination of toxicokinetic parameters in regulatory studies in animals [J]. Bioanalysis, 2012, 4(6): 661 - 674.

[7] 孙奎, 梅丹, 姜华, 等. 实验鼠采血方法及特点[J]. 第四军医大学吉林军医学院学报, 2003, 25(1): 31 - 32.

[8] 吴晓晴, 郝晨霞. 160 只小鼠心脏采血的操作体会[J]. 实验动物科学与管理, 2004, 21(1): 53 - 54.

[9] 吕春燕, 马跃荣. 小鼠心脏穿刺采血并存活的几点注意事项[J]. 泸州医学院学报, 2006, 29(3): 206.

[10] Said R, Abdel-Rehim M, Sadeghi B, et al. Cyclophosphamide pharmacokinetics in mice: a comparison between retro orbital sampling versus serial tail vein bleeding [J]. The Open Pharmacology Journal, 2007(1): 30 - 35.

[11] Hui YH, Huang NH, Ebbert L, et al. Pharmacokinetic comparisons of tail-bleeding with cannula- or retro-orbital bleeding techniques in rats using six marketed drugs [J]. J Pharmacol Toxicol Methods, 2007, 56(2): 256 - 264.

[12] Jonsson O, Villar RP, Nilsson LB, et al. Validation of a bioanalytical method using capillary microsampling of 8 μL plasma samples: application to a toxicokinetic study in mice [J]. Bioanalysis, 2012, 4(16): 1989 - 1998.

〔收稿日期〕2017 - 08 - 10