

C57BL/6 小鼠尾静脉四种穿刺方法的比较

温军业¹, 范晓燕^{2*}, 何东伟³, 张万星¹, 黄书静¹, 张宇龙⁴

(1. 河北省人民医院普外三科, 石家庄 050000; 2. 河北省人民医院肿瘤科, 石家庄 050000;
3. 河北医科大学第四医院, 石家庄 050000; 4. 石家庄市第一医院外三科, 石家庄 050000)

【摘要】 目的 探究 C57BL/6 小鼠不同尾静脉注射方法的差异, 为小鼠尾静脉注射提供更为安全、可靠、成功率高的基础实验依据。**方法** 将 320 只小鼠按照随机数字法随机分成 4 组: 空白对照组、白炽灯烘烤法组、三头线法组和联合应用法组。选择穿刺小鼠左侧或右侧外周静脉进行取血, 记录各组穿刺成功率, 采用 SPSS 13.0 统计软件进行分析, 比较各组间的统计学差异。**结果** 与空白对照组相比, 白炽灯烘烤法组、三头线法组和联合应用法组穿刺成功率均显著提高 ($P < 0.001$)。其中, 三头线法组优于白炽灯烘烤法组 ($P < 0.001$), 而联合应用法组成功率则明显高于三头线法组和白炽灯烘烤法组 ($P < 0.001$)。**结论** C57BL/6 小鼠尾静脉不同注射方法中, 联合应用法操作简单, 可重复性高, 穿刺成功率很高, 值得进一步推广使用。

【关键词】 尾静脉注射; 三头线法; 联合应用法

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2018) 05-0105-04

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2018.05.019

Comparison of different puncture methods in C57BL/6 mouse tail veins

WEN Junye¹, FAN Xiaoyan^{2*}, HE Dongwei³, ZHANG Wanxing¹, HUANG Shujing¹, ZHANG Yulong⁴

(1. Department of Hepatobiliary Surgery, Hebei General Hospital, Shijiazhuang 050000, China.

2. Department of Oncology, Hebei General Hospital, Shijiazhuang 050000.

3. The Fourth Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050000.

4. Department of Surgery, Shijiazhuang First Hospital, Shijiazhuang 050000)

【Abstract】 Objective Four different methods were examined to identify a safer and more reliable method for tail vein punctures in C57BL/6 mice. **Methods** In total, 320 mice were randomly divided into four groups: a blank group, incandescent lamp baking method group, three-line method group, and combined method group. Blood samples were taken from the left or right peripheral vein of puncture mice. Puncture success rate of each group was recorded. SPSS 13.0 software was used to compare statistical difference among groups. **Results** Compared with the blank group, success rates of the other three methods were significantly higher ($P < 0.001$). Further, the three-line method was better than the incandescent lamp baking method ($P < 0.001$). The success rate of the combined method was significantly higher than the three-line and incandescent lamp baking methods ($P < 0.001$). **Conclusions** The combined method greatly improved the success rate of tail vein punctures in C57BL/6 mice. This method is more reliable and should be more widely used in the future.

【Key words】 tail vein injection; three-line method; combined method

[作者简介] 温军业(1985—), 男, 硕士, 主治医师, 研究方向: 肝胆肿瘤的综合治疗。E-mail: wenjunyan6@163.com

[通信作者] 范晓燕(1980—), 女, 博士, 副主任医师, 研究方向: 肿瘤的生物免疫治疗。E-mail: xiaoyanfan1980@hotmail.com

动物模型中常用到小鼠,特别是 C57BL/6 小鼠,是肿瘤学、生理学、免疫学、遗传学等研究中常用的品系。小鼠通过尾静脉采血、给药等是免疫学小鼠动物实验中的常用操作技术,因此尾静脉穿刺的成功与否直接决定着实验能否顺利进行^[1]。不同于白色小鼠,C57BL/6 小鼠因其体表为黑色,故常规实验条件下其尾静脉观察存在一定的难度。该品系小鼠尾部共有 3 根静脉,分别为背侧静脉、左侧和右侧外周静脉。一般选择左侧或右侧外周静脉进行穿刺取血,所以实验是否能够达到预期疗效,取决于鼠尾静脉注射给药是否成功。基于以前有人研究水浴浸泡法、酒精擦拭法、白炽灯烘烤法,但并未研究三头线法及联合法成功率,本实验将尝试通过比较小鼠尾静脉的四种不同注射方法,为研究者选择合适的尾静脉穿刺方法提供成功率更高的实验依据。

1 材料和方法

1.1 实验动物

SPF 级 C57BL/6 小鼠 320 只,6~8 周龄,雌雄不限,体重约 18~20 g,购自河北省实验动物中心 [SCXK (冀) 2013-0051],饲养于河北省实验动物中心 (SPF 级动物实验室) [SYXK (冀) 2013-1-003]。

1.2 主要试剂与仪器

0.9% 生理盐水 (石家庄四药有限公司),75% 酒精 (邯郸市捷利康商贸有限公司),纯净水 (河北医科大学第四医院提供)。

一次性使用无菌胰岛素注射器若干 (江苏万邦生化医药股份有限公司,注册标准 YZB/USA 0355-2011),1 号、7 号手术缝合线若干 (河北省人民医院手术室提供),棉签 (新乡市华西卫材有限公司),超薄刀片 (上海飞鹰刀片厂),白炽灯 (南皮亚明灯泡制造有限公司)。此外,还需自制小鼠固定器若干套进行动物的固定:自制小鼠固定器为 50 mL 塑料离心管,管盖中心处打一圆形小孔,仅容尾巴露出。将小鼠放入自制小鼠固定器内,因小鼠较小,50 mL 离心管相对活动空间较大,所以在离心管前方中上 2/3 处划一道缝,可用硬卡片或者废旧银行卡堵于此处,以防止小鼠向前自由行走。此外,管壁上打少许小孔,以防小鼠窒息。

1.3 实验方法

1.3.1 实验动物分组

将 320 只小鼠随机分成四组:空白组、白炽灯烘烤法组、三头线法组、联合应用法组,每组 80 只。

1.3.2 各组穿刺前预处理

(1)空白组:将小鼠放入自制固定器内,仅尾巴露出,无需任何特殊处理,固定好直接穿刺。见图 1A。

(2)白炽灯烘烤法组:将小鼠固定于自制固定器内,尾巴露出,用白炽灯照射小鼠尾部,同时用适当压力按摩小鼠尾部。为避免加热温度过高及对小鼠身体进行照射,以遮挡物遮挡小鼠身体,减少刺激,以防止引起小鼠血液激素水平的改变,从而影响实验结果。照射时间一般为 8~10 min,照射结束后移去白炽灯,即可进行穿刺。见图 1B。

(3)三头线法组:将小鼠固定于自制固定器内,仅尾巴露出,用 7 号缝合线于 1 号缝合线上打一外科结,再用 1 号缝线在 7 号缝线上打一外科结,形成固定十字交叉,剪断 1 号线两头其中的一根,形成三头线。先用 7 号缝合线在鼠尾根部打一活结,阻断根部静脉,扩张了背部静脉血管,注射成功后由另一协助者协助向上提拉 1 号线,使结松开,避免了单根缝合线打结后解结的繁琐程序,固定好即可穿刺。见图 1C。

(4)联合应用法:将小鼠固定于自制固定器内,固定好小鼠,用白炽灯照射小鼠尾部,同样以遮挡物遮挡小鼠身体部位,照射小鼠尾部时间一般为 8~10 min,然后立即用三头线在鼠尾静脉根部结扎,不要太紧,迅速用酒精棉球在鼠尾静脉擦拭 2~3 遍,用左手拇指和食指捏住鼠尾下 1/3 处,撑直尾巴,切不可用力过大,以防尾巴撑断,以适当力使尾巴固定穿刺即可。当注射器穿入鼠尾静脉后,这时可以让协助者向上提拉 1 号线,松开结。见图 1D。

1.3.3 尾静脉穿刺操作及成功标准

鼠尾左侧或右侧静脉中 1/3 到下 1/3,皮下组织相对较少,静脉比较浅表,是穿刺取血的较好部位。本实验由同一个操作者进行穿刺,另一个人协助操作。操作进行一段时间后,视体力情况稍事休息再继续实验。操作者用左手拇指和食指捏住鼠尾下 1/3 处,撑直尾巴,切不可用力过大,以防尾巴撑断,以适当力使尾巴固定即可,中指顶于固定器尾盖处,固定小鼠尾巴,防止摆动,右手持注射器,针尖斜面向上,以约 10°角穿入小鼠尾静脉,针

尖约长 2 mm,当针尖刺入约一半时,可以近乎平行的角度缓慢进针,进针 3 ~ 5 mm,试推少许生理盐水,若注射不通畅,则表明未在血管内,若血管变白,无阻力,表明在血管内,每只小鼠穿刺时间小于 2 min。注射完毕后拔出针尖,并以棉签压迫穿刺点,3 d 后观察鼠尾是否出现局部肿胀、溃疡及坏死现象,来判断穿刺是否成功。所有实验操作程序均经过河北省人民医院实验动物中心批准,并按照实验动物使用的 3R 原则给予特定的人道主义关怀。

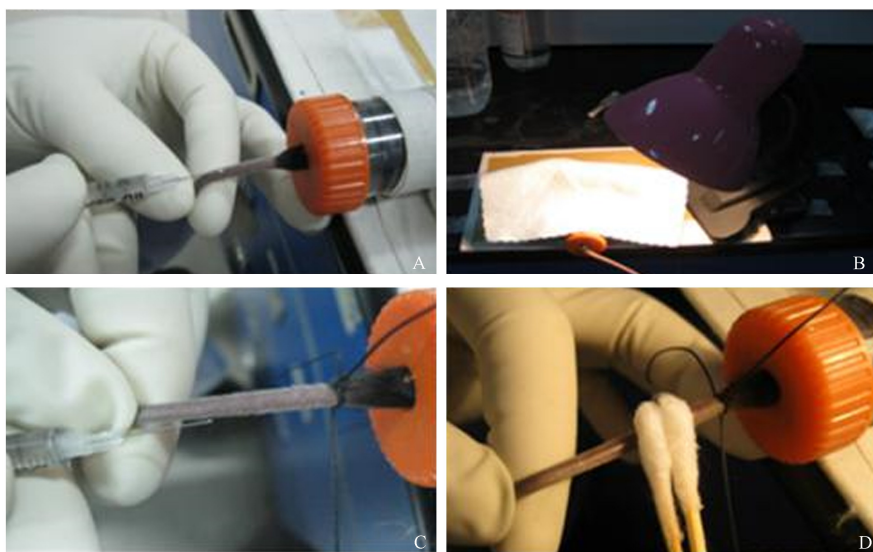
1.4 统计学方法

实验结果用 SPSS 13.0 统计软件进行分析。计数资料用卡方检验,以 $P < 0.05$ 为差异有显著性。多个样本间多重比较用 χ^2 分割法比较,比较 $\alpha = 0.05 / (4 \times 3 / 2 \times 1) \approx 0.008$,以 $P < 0.008$ 为差异

有显著性。

2 结果

四种方法鼠尾静脉穿刺成功率如表 1 所示。通过组间两两比较可见:白炽灯烘烤法效果强于空白对照组($\chi^2 = 40.172, P < 0.001$);三头线法较空白对照组、白炽灯烘烤法而言,穿刺成功率明显提高($\chi^2 = 85.066, P < 0.001; \chi^2 = 12.745, P < 0.001$);与空白对照组、白炽灯烘烤法或三头线法相比,联合应用法提高了穿刺效率,且差异有显著性($\chi^2 = 129.681, P < 0.001; \chi^2 = 41.243, P < 0.001; \chi^2 = 10.667, P = 0.001$)。此外,在穿刺过程中,白炽灯烘烤法组有 1 只因注射速度较快,出现心衰导致死亡,记为无效。



注:A:空白组;B:白炽灯烘烤法组;C:三头线法组;D:联合应用法组。

图 1 各组操作示意图

Note. A: Blank group; B: Incandescent lamp baking method group; C: Three-line method group; D: Combined method group.

Fig.1 Different devices used in four groups

表 1 四种方法的穿刺成功率

Tab.1 Puncture success rate of the four methods

组别 Groups	有效 Valid	无效 Invalid	合计 Total	注射成功率(%) Puncture success rate
空白组 Blank group	3	77	80	3.75
白炽灯烘烤法组 Incandescent lamp baking method group	38	42	80	47.50
三头线法组 Three-line method group	60	20	80	75.00
联合应用法组 Combined method group	75	5	80	93.75
合计 Total	176	144	320	55.00

3 讨论

小鼠尾静脉穿刺是采血、注射给药等小鼠模型实验的关键技术,联合应用法成功率较其他三种方法静脉注射成功率高,原因主要是不仅综合了白炽灯烘烤法,而且采用三头线阻断根部静脉回流,且注射后连续观察 3 d 均未出现局部肿胀及坏死现象,大大提高了注射成功率。单用静脉阻断会降低其穿刺成功率,白炽灯烘烤法延长了静脉扩张时间,方便操作者更好地注射,为其提供了更充分的时间,三头线静脉阻断则是明显扩张背部静脉血管,避免了单根缝合线打结后解结的繁琐程序,固定好即可穿刺,也避免注射针穿刺成功后解结所带来的摆动性,避免穿刺失败。李轶惊等^[2]报道的笼盖压制法对于需多次重复的尾静脉注射实验不太适宜。另外需要注意的是:①注射时应注意注射速度,相关研究表明^[3-4],成年小鼠血循环的总容量约 1.4 mL,鼠尾静脉直径平均小于(0.6 ± 0.5) mm,每次注射的剂量不应超过 0.2 mL,防止小鼠心衰;如果一旦出现小鼠心衰情况,立即停止注射,对小鼠实行心脏按摩。②因鼠尾静脉血管管壁较薄,针头进入及注射药物时,手不要发抖,防止扎穿。③应先从鼠尾中下部位注射,若第一次失败,可逐渐沿鼠尾静脉走行向上进行穿刺。④穿刺过程中应手稳、心静。⑤可先用超薄刀片将小鼠鼠尾背部两侧静脉走行区尾毛蜕干净,在蜕毛过程中,应从鼠尾根部以 20°角自上向下蜕毛,切忌用劲过大,削破鼠尾,一般蜕毛应两遍,可使穿刺视野更加清楚,

提高穿刺成功率。⑥穿刺完毕后,应用棉签压迫止血,对于连续多次、多日的鼠尾静脉注射,需注意尾部的消毒,防止感染。良好彻底的止血对于保护血管是非常重要的。⑦本实验在注射时拇指、食指、中指的姿势依据个人习惯,熟练掌握以后,也可一人操作完成,因数量较多,两人操作较快,效率较高。⑧为避免人为刺激引起小鼠血液激素水平的改变,应避免加热温度过高^[5],还应保持实验室内温度在 28℃左右,特别是冬季很有必要,因为适宜的室内温度对小鼠尾静脉也有一定的扩张作用,并且能够使血流通畅,降低注射阻力。目前 C57BL/6 小鼠尾静脉注射不同方法报道文献较少,本实验通过对比研究,得出联合应用法穿刺成功率高,值得推广。

参考文献:

- [1] 李富荣,王新根,邓春艳,等. 间充质干细胞联合胰岛移植对受体鼠 T 淋巴细胞亚群的影响 [J]. 免疫学杂志, 2010, 26(7): 606-611.
- [2] 李轶惊,张娜,田枫. 一种简易小鼠尾静脉注射固定法——笼盖压制法 [J]. 中国比较医学杂志, 2016, 26(10): 79-81.
- [3] 余绍兰,马跃荣. 实验用小鼠尾静脉穿刺的几点体会 [J]. 泸州医学院学报, 2007, 30(4): 330.
- [4] 苏丽娜,郭剑伟,饶光玲. 小鼠尾静脉注射与断头取血实验技术的改进 [J]. 大理学院学报, 2010, 9(6): 25-27.
- [5] 施文,孙永强. 小鼠尾静脉注射和采血简易固定装置的制作和使用方法 [J]. 免疫学杂志, 2011, 27(9): 807-808.

[收稿日期]2017-11-09