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.
Yang JL, Liu J, Zheng ZH. Comparison and analysis of blood sampling methods from rats and mice［J］. Chin J Comp Med, 2019, 29(1): 90-94.
doi: 10.3969/j.issn.1671-7856. 2019.01.016

常用实验大小鼠采血方法及其对实验动物福利的影响

杨健莉,刘　佳,郑志红*

(中国医科大学实验动物部,沈阳　110122)

【摘要】 近些年大量的文献对实验大小鼠采血方法进行了比较研究,以探究出最适合的采血方法,从而获得高质量的血液样本。本文主要介绍了几种实验大小鼠常用的采血方法,及不同采血方法对动物福利的影响,为选择最适的采血方法提供相关的理论依据,提高实验效率,降低实验影响。

【关键词】 实验大小鼠;采血方法;实验动物福利
【中图分类号】R-33　【文献标识码】A　【文章编号】1671-7856(2019) 01-0090-05

Comparison and analysis of blood sampling methods from rats and mice

YANG Jianli, LIU Jia, ZHENG Zhihong*
(Department of Laboratory Animal Science, China Medical University, Shenyang 110122, China)

【Abstract】 Recently, many studies have compared different methods for blood collection from experimental rats and mice to determine the most suitable method to obtain high-quality blood samples. This review introduces several blood collection methods commonly used in rats and mice, and their effects on animal welfare. This will provide a theoretical basis for selecting the most suitable method of blood collection to improve experimental efficiency and reduce the impact on experimental results.

【Keywords】 experimental rats and mice; methods of blood collection; laboratory animal welfare

实验大小鼠的使用在哺乳动物实验中约为75%左右[1],主要应用于药代动力学、毒理学、行为学、遗传学以及肿瘤学等领域,对实验大小鼠进行血液采集是实验操作过程中重要的实验操作,不同的采血方法对动物组织损伤程度、采血间隔及采血量要求等各不相同;那么选择适合的采血方法,获得高质量的血液样本,是获得良好动物实验数据的基础。本文主要介绍几种大小鼠常用的采血方法,对采血量的确定、采血频率的选择及不同采血方法对动物福利的影响进行阐述,为实验者在操作过程中选择合适的采血方法提供依据。

1　常用的采血方法

依据采血位点不同实验大小鼠常用的采血方法可分为鼠尾采血、眼眶采血、颈静脉采血、隐静脉采血、面部采血、心脏采血和腹主动脉采血;下面分别对不同的采血方法要点及应用进行介绍。

[基金项目]国家自然科学基金(2015408002)。
[作者简介]杨健莉(1989—),女,学士学位,专业:实验动物学。E-mail: yangjianli0603@126.com
[通信作者]郑志红(1969—),女,教授,研究方向:实验动物转基因与基因敲除研究。E-mail: zhihongzheng@163.com

1.1　鼠尾采血

鼠尾采血主要包括尾尖采血、鼠尾刺血和尾静脉穿刺采血,适用于少量多次采血。尾尖采血又称剪尾采血,一般可采集血量:大鼠 0.3~0.5 mL,小鼠 0.1~0.2 mL;剪尾长度:小鼠不超过 1 mm,大鼠不超过 2 mm,最长剪尾长度均不超过 5 mm;所采集血液为动静脉混合血,不适用于老龄鼠[2]。鼠尾刺血常用于大鼠,一般可采集血量 0.01~0.05 mL。尾静脉穿刺采血可采集血量:小鼠 0.1~0.15 mL,大鼠 0.1~2 mL;常规方法选择使用注射器采血,操作时应注意抽拉速度,避免因为抽拉过快致使血管内呈负压,阻止血液流出,为此实验人员将原有的注射式采血针进行改进,即选用真空采血管进行血液采集[3],有效的避免了使用注射器抽取血液因抽拉不均匀而产生的风险。

从动物福利角度出发鼠尾采血应优先选择用于需血量较少的连续多次采血,如血常规或血糖的动态监测等[4]。

1.2　眼眶采血

眼眶采血是大小鼠常用的采血方法,采血量一般大鼠 0.4~0.6 mL,小鼠 0.2~0.3 mL,适于多次重复采血。采血后需要一段的组织修复时间,一般同一眼眶重复采血至少需要 10 d 的组织修复过程,否则会对采血量产生一定的影响[5]。大鼠眼眶采血常规方法即选用毛细玻璃管进行内眦取血,采血时选择使用无菌的毛细玻璃管,可以有效降低眼周感染和眼部损伤,同时也应保证毛细管周围的平滑度从而将眼损伤降至最低[6]。一些文献表明眼眶的多次取血会引起组织学改变,使动物临床表现异常,出现不适[7],从而对动物的昼夜节律性有一定的潜在影响,甚至最终导致动物死亡[2]。然而也有研究显示重复进行眼眶采血对动物的昼夜节律性没有影响[8],可用于进行眼眶组织的长期研究[9]。

眼眶采血因其风险性,英国实验动物“3R”国际中心(简称 NC3RS)[10]建议眼眶采血应用于终末期实验的采血,或动物处于全麻状态下,且无其他可替代方法,并提供合理的科学依据。

1.3　颈静脉采血

颈静脉采血一般可采集血量为大鼠 2~2.5 mL,小鼠 0.3~0.5 mL。颈静脉采血一般无需麻醉,直接从穿刺点进针采集血液[11],但是此种方法要求操作者技术娴熟,而且由于动物未麻醉和相应的器械固定,动物容易挣扎,增加进针难度,易使动物产生应激反应造成皮下出血;对此杨萍等人[12]选择麻醉后使用一次性真空采血管进行采血,该方法操作简捷、创伤小、采血量大,;但是多次大量采血时,由于动物长时间处于麻醉状态,易损坏动物神经系统,且一次性真空采血导管不适宜重复使用,此时套管技术的应用大大弥补了重复采血多次进针的不足,最大限度的降低了动物的痛苦以及不适感,通过此种方法可连续采集到血液样本 0.25 mL[13];同时 可以对大鼠血流动力学数据进行实时的检测,有效的应用于啮齿动物脓毒血症的模型中[14]。

颈静脉采血所采集的血液质量较高,单次采血一次可采集全身循环血量的 15%,常应用于药代动力学研究,尤其颈静脉套管技术的不断应用,为连续多次采血提供了便利。

1.4　隐静脉采血

隐静脉采血常用于大小鼠的少量血液采集,单次采血的安全采血量为动物体重的 0.5%,间隔一天多次采血采血量为动物体重的 0.05%,隐静脉采血无需麻醉,待动物固定后,后腿外侧区域剃毛后暴露采血点,采血针刺入采血点,即可获得血液样本;隐静脉采血常用于药代动力学研究,以及生化指标和血液计数的检测等[15];由于在穿刺部位形成的痂可在后期轻轻擦掉,因此可从原来的穿刺点连续取样[16]。

隐静脉采血操作简单,因其静脉位置表浅,穿刺准确性较高,操作过程无需麻醉,消除了麻醉剂对实验结果的影响,有文献研究表明隐静脉采血可作为眼眶采血的替代方法用于相关实验研究[17]。

1.5　面部静脉采血

面部静脉采血主要适用于成年小鼠,一般可采集血量约 0.2~0.5 mL,常用采血位点为面静脉和颞浅静脉[18],面部采血一般无需麻醉,待动物固定,确定采血点后采血针迅速刺入,获得血液样本; 面部采血可通过对面颊两侧分别采血进行重复采血,所得血样为动静脉混合血。相较于面静脉而言颞浅静脉的应用较少,因其靠近内耳,血液采集时若操作不当会损害内耳,对动物造成不可避免的压力和疼痛[19];面部取血一般不适用于与血凝相关的实验研究[20],因为会有不可控的出血过多产生,小鼠可能面临低血容量和死亡的风险[21]。

因此面部取血的主要采血位点是面静脉,其采血量较大,且操作过程无需麻醉,操作方法简便快捷,对动物损伤较小,但因其有不可控的出血过多

产生,所以应避免应用于与血凝相关的实验研究。

1.6 心脏采血

心脏采血为无菌采血,采血量大,可采集血量大鼠 1~1.5 mL,小鼠 0.5~0.8 mL;此方法需在麻醉状态下进行,操作时,选择胸部左侧心脏博动最强处进针,缓慢回抽针筒可见血液流入针管,避免气体进入心脏研究发现不同性别的小鼠心脏采血后白细胞计数差异有显著性,雌性小鼠白细胞计数最低,提示在白细胞计数和分化的研究中,动物性别和采血部位应保持一致,确保实验数据的准确性[22]。

心脏采血所采血液为循环血液,由于其会给动物带来潜在的痛感,引起心包出血以及心包填塞等,故常用于实验终末期的动物采血[1];心脏采血中的右心室采血所得结果具有代表性,较优于其它的终末采血方法[23]。

1.7 腹主动脉采血

适用于大、小鼠实验终末期采血,可采集血量大鼠 1.0~2.0 mL,小鼠 0.8~1.2 mL;李学娟等人[24]通过动物麻醉固定后,解剖暴露腹主动脉的方式采集血液,此过程耗时 30~60 s。李研等人[25]将采血针进行了改良,采用真空采血管进行采血,本法较传统的腹主动脉采血法有“方便、快捷、准确、不易凝血、不易溶血”等优点。

腹主动脉采血法取血量大、不易溶血,适用于多项目检测,不损伤器官不会出现因操作不当造成气栓与瘀血等,有利于病理组织学检查,但操作比较复杂,技术性较强,应注意掌握适宜的麻醉深度,防止心跳骤停、减少出血、及大鼠躁动[26]。

综上所述,结合不同采血方法的特点,总结见表 1。

2 采血方法的选择

不同的采血方法采血量不同,且对动物福利的影响也不相同,因此我们应结合实验要求选择最适合的采血方法。

2.1 采血量的选择

实验大鼠的循环血容量一般约为 58~70 mL/kg,小鼠的循环血容量一般约为 63~80 mL/kg[1],动物的采血量一般与被采血动物的体重、采血频率以及采血前是否给予补液有关系,且同种动物不同采血位点的采血量一般也不相同。每 2~4 周可以采集血量为循环血容量的 10%,每 7 d 可以采集循环血容量的 7.5%,每 24 h 可以采集循环血容量的 1%[27]。

2.2 采血方法的选择对实验动物福利的影响

实验中应考虑不同的采血方法对动物福利的影响,在满足“3R”原则的同时,应选择对动物的疼痛、组织损伤及压力最小的采血方法,实验过程中与压力相关的福利指标通常指血清或血浆中的皮质酮水平、血糖值、生长激素或泌乳素、心率、血压以及行为学等,依据不同的实验目的可以对血液样本进行相应的福利指标检测[28]。

近些年大量文献针对不同采血方法对动物福利的影响进行了研究,Tsai 等人[29]比较了大小鼠常用的五种采血方法对 *BALB/cO1aHsd* 小鼠动物福利指标的影响,结果显示在无麻醉少量采血时应选择眼眶采血,因其对动物的压力最小,颈静脉和面部静脉的采血方法对动物的压力最大,隐静脉对动物的损害最持久;Aasland 等人[30]将隐静脉和尾静脉两种采血方法进行比较,结果显示尾静脉采血尤其多次采血相较于隐静脉会对动物造成更多的压力;Shirasaki 等人[11]比较颈静脉穿刺和尾静脉切割两种采血方法,结果显示尾静脉切割相较于颈静脉穿刺会更易产生溶血,两种方法对动物产生的压力相似,因此颈静脉采血更适用血液变量等相关研究中的多次连续的大量采血;Holmberg 等人[31]研究眼眶采血和面部采血对血友病小鼠的血液质量和动物福利影响,结果显示面部采血后 FVIII 小鼠会有失血过多产生,而眼眶采血仅引起了小鼠的轻微出血,且无临床致盲现象,对动物的压力较小,因此眼眶采血相较于面部采血更适用于凝血功能的检测。

综上可见,隐静脉相较于尾静脉更适合多次少量的采血,颈静脉采血适合于多次连续的大容量采血,面部静脉采血由于其采血后出血的不可控性,故不适宜应用于与凝血功能相关的实验研究,但其可用于无麻醉下多次采血的其他实验研究。

3 小结

不同实验所需要检测的参数指标不同,应该根据自身的实验性质(是否涉及凝血功能等)选择合适的采血方法,避免因为选择不当致使动物出血过多,发生致盲,组织损伤等损害;选择适合的采血方法,明确实验中所需血样的特点,确定最适采血位点及采血频率,熟练的掌握各种采血方法的操作技能,从而获得良好的实验数据,最大程度的降低了对实验结果的影响。

表 1　实验大小鼠常用采血方法比较

Table 1　Common methods of blood collection from rats and mice

项目 Items	眼眶采血 Retrobulbar plexus blood sampling	鼠尾采血 Lateral tail vein blood sampling	颈静脉采血 Jugular vein blood sampling	面部采血 Facial vein blood sampling
适应条件 Adaptive conditions	重复采血;中到大量采血;保存生命 Repeated sampling; medium to large volume; keeping alive	重复采血;采血量少;保存生命 Repeated sampling; little volume; keeping alive	中到大量采血;保存动物生命 Medium to large volume; keeping alive	重复采血;中到大量采血;保存生命 Repeated sampling; medium to large volume; keeping alive
适宜动物 Adaptive animals	大鼠、小鼠 Rats, mice	大鼠、小鼠 Rats, mice	大鼠 Rats	小鼠 Mice
采血量 Volumes	大鼠 Rats 0.4 ~ 0.6 mL 小鼠 Mice 0.2 ~ 0.3 mL	大鼠 Rats 0.3 ~ 0.5 mL 小鼠 Mice 0.1 ~ 0.2 mL	大鼠 Rats 2.0 ~ 2.5 mL 小鼠 Mice 0.3 ~ 0.5 mL	小鼠 Mice 0.2 ~ 0.5 mL
是否麻醉 Anaesthesia or not	是 Yes	否 No	否 * No	否 No
血液清洁度 Cleanliness of blood	污染少 Less pollution	污染少 Less pollution	污染少,清洁度高 Less pollution, high cleaning degree	污染少 Less pollution
血液类型 Blood type	静脉血 Venous blood	动脉血/静脉血/混合血 Arterial blood/Venous blood/Mixed blood	静脉血 Venous blood	混合血 Mixed blood

项目 Items	心脏采血 Cardiac puncture blood sampling	腹主动脉采血 Abdominal aortic blood sampling	隐静脉采血 Saphenous vein blood sampling
适应条件 Adaptive conditions	大量采血;无需保存动物生命 Large volume; no need to keep alive	大量采血;无需保存动物生命 Large volume; no need to keep alive	重复少量采血;保存生命 Repeated sampling; little volume; keeping alive
适宜动物 Adaptive animals	大鼠、小鼠 Rats, mice	大鼠、小鼠 Rats, mice	大鼠、小鼠 Rats, mice
采血量 Volumes	小鼠 Mice 0.5 ~ 0.8 mL 大鼠 Rats 1.0 ~ 1.8 mL	小鼠 Mice 0.8 ~ 1.2 mL 大鼠 Rats 1.0 ~ 2.0 mL	大鼠 Rats 0.5 ~ 0.6 mL 小鼠 Mice 0.02 ~ 0.10 mL
是否麻醉 Anaesthetizing or not	是 Yes	是 Yes	否 No
血液清洁度 Cleanliness of blood	清洁度高 High cleaning degree	污染少 Less pollution	污染少 Less pollution
血液类型 Blood type	动脉血/静脉血 Arterial blood/Venous blood	动脉血 Arterial blood	静脉血 Venous blood

注:* 表示颈静脉套管技术除外,套管技术需在麻醉的情况下进行。

Note. * Except for the jugular cannula, which should be performed under anesthesia.

参考文献:

[1] Brussels. Seventh Report on the Statistics on the Number of Animals used for Experimental and other Scientific Purposes in the Member States of the European Union [EB/OL]. https://speakingofresearch.com/facts/uk-statistics/, 2013-5-12.

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

[3] 陆晓华, 徐蕾, 王国光, 等. 一种新的非麻醉实验大鼠尾静脉采血方法的建立 [J]. 中华危重病急救医学, 2014, 26(3): 195-196.

[4] 吴剑平, 鞠晓云, 范乃兵, 等. 不同采血方法对大鼠内分泌及血常规相关指标的影响 [J]. 实验动物与比较医学, 2014, 34(5): 377-380.

[5] van Herck H, Baumans V, Brandt CJ. et al. Orbital sinus blood sampling in rats as performed by different technicians: the influence of technique and expertise [J]. Lab Anim, 1998, 32(4): 377-386.

[6] Sharma A, Fish BL, Moulder JE, et al. Safety and blood sample volume and quality of a refined retro-orbital bleeding technique in rats using a lateral approach [J]. Lab Anim, 2014, 43(2): 63

-66.

[7] Krinke A, Kobel W, Krinke G. Does the repeated orbital sinus puncture alter the occurrence of changes with age in the retina, the lens, or the Harderian gland of laboratory rats? [J]. Z Versuchstierkd, 1988, 31(3): 111-119.

[8] Fried JH, Worth DB, Brice AK, et al. Type, duration and incidence of pathologic findings after retroorbital bleeding of mice by experienced and novice personnel[J]. Lab Anim, 2015, 54(3): 317 - 327.

[9] Van Herck H, Baumans V, Van der Craats NR, et al. Histological changes in the orbital region of rats after orbital puncture [J]. Lab Anim, 1992, 26(1): 53-58.

[10] Sharma A, Fish BL, Moulder JE, et al. Safety and blood sample volume and quality of a refined retro-orbital bleeding technique in rats using a lateral approach [J]. Lab Anim (NY), 2014, 43(2): 63-66.

[11] Shirasaki Y, Ito Y, Kikuchi M, et al. Validation studies on blood collection from the jugular vein of conscious mice [J]. J Am Assoc Lab Anim Sci, 2012, 51(3): 345-351.

[12] 杨萍, 赵月, 杨帆, 等. 改良大鼠颈静脉采血法 [J]. 局解手术学杂志, 2017, 26(3): 221-223.

[13] Bardelmeijer HA, Buckle T, Ouwehand M, et al. Cannulation of the jugular vein in mice: a method for serial withdrawal of blood samples [J]. Lab Anim, 2003, 37(3): 181-187.

[14] Feng J, Fitz Y, Li Y, et al. Catheterization of the carotid artery and jugular vein to perform hemodynamic measures, infusions and blood sampling in a conscious rat model [J]. J Vis Exp, 2015, 95: 1-6.

[15] Wickremsinhe ER, Renninger M, Paulman A, et al. Impact of repeated tail clip and saphenous vein phlebotomy on rats used in toxicology studies [J]. Toxicol Pathol, 2016, 44(7): 1013-1020.

[16] Beeton C, Garcia A, Chandy KG. Drawing blood from rats through the saphenous vein and by cardiac puncture [J]. J Vis Exp, 2007(7): 266.

[17] Horne D, Saunders K, Campbell M. Refinement of saphenous vein blood collection from a mouse without the use of restraining devices or anesthesia [N]. Newport, RI, 2010: 3-5.

[18] Forbes N, Brayton C, Grindle S, et al. Morbidity and mortality rates associated with serial bleeding from the superficial temporal vein in mice [J]. Lab Anim (NY), 2010, 39(8): 236-240.

[19] 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.

[20] 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]. Am Assoc Lab Animl Sci, 2015, 54(1): 76-80.

[21] Popesko P, Rajtova' V, Hora'k J. A colour atlas of anatomy of small laboratory animals [M].1990.

[22] Doeing DC, Borowicz JL, Crockett ET. Gender dimorphism in differential peripheral blood leukocyte counts in mice using cardiac, tail, foot, and saphenous vein puncture methods [J]. BMC Clin Pathol, 2003, 3(1): 3.

[23] Neptun DA, Smith CN, Irons RD, et al. Effect of sampling site and collection method on variations in baseline clinical pathology parameters in Fischer-344 rats [J]. Fundam Appl Toxicol, 1985, 5(6): 1180-1185.

[24] 李学娟, 刘政. 大鼠和小鼠腹主动脉穿刺采血法[J].上海实验动物科学, 1995, 15(4): 232.

[25] 李研,于峰. 大鼠腹主动脉真空采血管采血法 [J]. 卫生毒理学杂志, 2001, 15(4): 258.

[26] 车兆义, 邹悦, 宋清斌. 大鼠实验中几种常用的采血方法探讨 [J]. 局解手术学杂志, 2008, 17(2): 84-85.

[27] McGuill MW, Rowan AN. Biological effects of blood loss: implications for sampling volumes and techniques [J]. ILAR News, 1989, 31(4): 5-18.

[28] Balcombe JP, Barnard ND, Sandusky C, et al. Laboratory routines cause animal stress [J]. Contemp Top Lab Anim Sci, 2004, 43(6): 42-51.

[29] Tsai PP, Schlichtig A, Ziegler E, et al. Effects of different blood collection methods on indicators of welfare in mice [J]. Lab Anim, 2015, 44(8): 301-310.

[30] Aasland KE, Skjerve E, Smith AJ. Quality of blood samples from the saphenous vein compared with the tail vein during multiple blood sampling of mice [J]. Lab Anim, 2010, 44(1): 25-29.

[31] Holmberg H, Kiersgaard MK, Mikkelsen LF, et al. Impact of blood sampling technique on blood quality and animal welfare in haemophilic mice [J]. Lab Anim, 2011, 45(2): 114-120.

〔收稿日期〕2018-08-29