

小鼠股动脉及股静脉插管手术模型制备方法

史宏博, RUTH Magaye, 王 尊, 赵进顺, 邹宝波*

(宁波大学 医学院, 浙江 宁波 315211)

摘要: 介绍一种小鼠经股动脉及股静脉插管手术模型. 具体方法为: 小鼠经异氟烷麻醉后, 无菌切开小鼠的颈部及腹股沟皮肤, 将已制备好的 2 根 J 形塑料导管植入皮下, 并从颈部引出, 经股动脉及股静脉造口, 将 J 端导管分别插入股动脉及股静脉内. 再将双股拧成麻花状的细铁丝固定于颈部肌肉, 并与引出的塑料导管捆绑在一起. 固定细铁丝, 将塑料导管通过旋转输液阀与输液泵相连. 手术后, 输液泵持续灌注 $20 \text{ u}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的肝素($12\sim 15 \mu\text{L}\cdot\text{h}^{-1}$), 以防止塑料导管内凝血. 手术后 1~2 d, 动物基本都能恢复到正常生理状况. 手术感染率低于 6%, 7 d 动脉导管堵塞率低于 5%. 这种经显微外科手术建立的动物模型, 可在动物清醒、自由活动状态下, 无痛苦地完成采血、给药及血压等生命体征的系统监测, 被广泛应用于药理学、毒理学等各学科的研究中.

关键词: 小鼠; 股动脉插管; 股静脉插管; 显微外科手术模型

中图分类号: R-332

文献标识码: A

文章编号: 1001-5132 (2012) 03-0071-04

小鼠是世界上用量最大、用途最广、品种(系)最多、研究最充分的一种实验动物. 为方便开展深入细致的研究工作, 采用小鼠制备动物手术模型是一种发展趋势. 但由于小鼠个体小, 手术难度较大, 目前利用小鼠手术模型进行研究的报道不多^[1-4], 国内更是鲜有报道^[5-6]. 笔者介绍一种小鼠股动脉及股静脉插管手术技术, 利用这种显微外科手术技术建立的动物模型可用于多学科、多系统的实验研究.

1 材料与方法

1.1 实验动物

选取 8~10 周雄性小鼠, 体重 20~30 g, 种类有 C57BL/6J, B6V-Lepob/J, FVB/NJ 等.

1.2 股动脉及股静脉导管制作方法

导管材料为美国 Braintree Scientific Inc. 生产的聚乙烯导管(Micro-renathane Tubing MRE-025), 内径 0.30 mm, 外径 0.64 mm. 将导管一端浸在热芝麻油中后迅速提出, 随后轻轻向两端牵拉使塑

料管变细, 冷却后通过显微镜在变细的部位切割. 再将细的一端置 J 型模具中, 热水中放置 5~8 s 后立即置入冰中冷却, 塑料管即成 J 型(图 1).

1.3 手术用的设备、器械及药品

手术用的设备: 显微镜、恒温手术台(常规)、动物吸入麻醉机(美国 Harvard Bioscience Company)、微分析旋转输液阀(375/d/22qm, 美国 Instech Laboratories, Inc.)(图 2)、微量注射泵(BS-8000, 美国 Braintree Scientific, Inc.), $12\sim 15 \mu\text{L}\cdot\text{h}^{-1}$ 用于常规肝素维持、信号转换系统(DI720 系列, 美国 Datag Instruments, Inc.)用于信号的输送与转换.

手术用器械: 眼科剪、组织剪、1 号及 5 号无齿镊子(美国 World Precision Instruments); 6-0 柔软非吸收外科缝合针线、5-0 无损伤尼龙缝合针线及 5-0 polyglactin 910 缝线(美国 Ethicon, Inc.); 外加其他常规手术器械.

药品: 异氟烷(isoflurane)、肝素、青霉素钠、0.9%氯化钠、碘伏、75%酒精、叔丁啡(避光)、用 0.9%生理盐水配制 $20 \text{ u}\cdot\text{mL}^{-1}$ 肝素钠及 240 000

收稿日期: 2012-03-19.

宁波大学学报(理工版)网址: <http://3xb.nbu.edu.cn>

基金项目: 宁波市科研项目(SZX11073); 宁波大学实验技术项目(SYJS-201101).

第一作者: 史宏博(1988-), 女, 内蒙古呼伦贝尔人, 在读硕士研究生, 主要研究方向: 工业毒物. E-mail: 583179597@qq.com

*通讯作者: 邹宝波(1962-), 女, 山东海阳人, 硕士/副主任技师, 主要研究方向: 实验动物手术技术. E-mail: zoubaobo@nbu.edu.cn



图1 制作的导管



图2 旋转输液阀

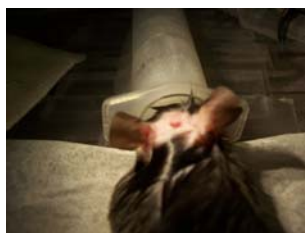


图3 手术过程示意图

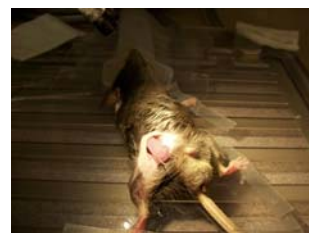


图4 手术过程示意图

$\text{u}\cdot\text{mL}^{-1}$ 青霉素钠。

已经制成 J 型的塑料导管用环氧乙烷灭菌, 手术器械高温灭菌。无菌纱布、棉棒及胶水备用。

1.4 股动脉、股静脉插管方法

用异氟烷对小鼠进行吸入性麻醉(5%)。待小鼠进入麻醉状态后, 将小鼠俯卧在手术恒温台上, 将异氟烷的剂量调整为 1.5% 进行手术。手术过程中, 可以根据动物的安静程度适当调整麻醉剂的用量。

用肥皂水涂擦颈部背面的毛发, 再用剃毛刀进行备皮。常规酒精消毒, 于两耳中间的颈部背面做纵向切口并分离皮下组织(图 3)。

将小鼠翻转, 取侧仰位, 用同样方法对右侧腹股沟处皮肤进行备皮。酒精消毒皮肤, 切开右侧腹股沟处皮肤, 用棉花棒上下钝性分离腹股沟处皮下深浅筋膜组织。用 16 号针头辅助将 2 根 J 型导管(可以用红色笔涂抹标记动脉导管, 未标记的作为静脉导管)从腹股沟处至颈部引出, J 端靠近腹股沟处, 另一端与含有 $1\text{ mL } 20\text{ u}\cdot\text{mL}^{-1}$ 肝素钠的注射器连接, 并完全排除注射器内的气泡(图 4)。

用 4 个挂钩固定手术部位, 以充分暴露手术视野。用 1 号、5 号无齿镊子在显微镜下小心分离股动脉、股静脉。待完全分离, 分别于其下方各放置 3 根短的细结扎线备用(动脉 3 根, 静脉 3 根)。分离时注意止血, 并间断用无菌生理盐水湿润手术视野。

分离血管时需要注意股静脉, 股动脉和股神经共同走行在动脉鞘内。需要一层一层打开外面的包膜。动脉是淡红色的, 静脉颜色略深, 在动脉的内侧, 最外侧是神经。最后结扎股动脉、股静脉远心端(图 5)。

1.4.1 动脉导管的插入方法

用第 1 根结扎线结扎远心端动脉, 再将已经剪成 45° 的 J 型导管摆好位置。用牵拉器提起动脉近

心端的结扎线(靠近腹股沟处, 第 3 根结扎线), 确信无血液回流, 再用眼科剪在远心端(已经结扎的部位, 第 1 根结扎线的前方)动脉管壁上剪一小切口, 并用镊子扩大切口口径。剪口要小心, 因为动脉很细, 容易整个剪断。用 5 号镊子提起近心切口一端, 1 号镊子从切口处向近心端插入导管, 使导管跨过第 2 根结扎线大约 0.5 cm 即可。然后用第 2 根结扎线打一个活结, 以固定插入的导管, 再放下牵拉器观察血液回流情况。用含有 $20\text{ u}\cdot\text{mL}^{-1}$ 肝素钠注射器回抽, 若血液回流正常且注射器内无气泡, 方可用第 2 根结扎线再打 2 个死结, 同时用第 1 根结扎线固定导管。最后剪短牵拉器提起的第 3 根结扎线。

1.4.2 静脉导管的插入方法

同样方法进行静脉导管的插入。静脉导管插入后, 放下牵拉器前必须立即打结固定静脉与导管。因静脉管腔较大, 且管壁无弹性, 插入的导管易滑出。若先放下牵拉器, 会丢失过多血液。

待 2 根导管都固定好后, 剪去多余的结扎线, 用胶水固定手术部位, 以防出血及导管脱离(图 6)。

腿部肌肉注射 $12\text{ 000 u}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的青霉素防感染, 皮下注射 $3\text{ }\mu\text{g}$ 的叔丁啡去除疼痛。

待胶水完全干燥后, 再用 6 号线缝合皮肤。用含碘消毒剂进行皮肤消毒。

1.5 手术后导管的固定方法及术后导管的使用

植入的微小塑料管途经后背部, 从颈部已经切开的部位引出。将已经准备好的双股拧成麻花状的细铁丝用 5 号线缝合在颈部肌肉上, 再用 6 号线荷包式缝合塑料导管与铁丝周围的皮肤。最后用胶带固定引出的塑料导管与铁丝。特别是要牢牢固定最靠近颈部皮肤的胶带(图 7)。随后将小鼠放入单笼中, 用螺丝刀将铁丝顶端固定在旋转输液阀上, 通过旋转输液阀, 股动脉及股静脉小塑料管与微量注射泵($20\text{ u}\cdot\text{mL}^{-1}$ 肝素泵)连接。然后持续

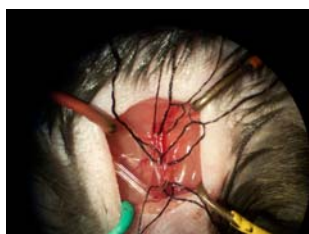


图5 手术过程示意图

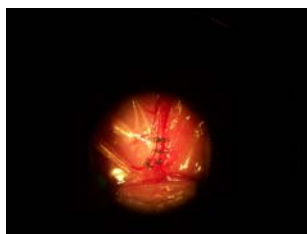


图6 手术过程示意图



图7 塑料导管的固定



图8 给药装置

低流量的肝素注入($12\sim 15\ \mu\text{L}\cdot\text{h}^{-1}$), 以免塑料管凝血堵塞(图8).

待动物恢复后, 可以根据研究需要, 用注射泵通过股静脉持续注入药物、毒物、营养物等. 同时可以从股动脉定期采血进行各项生理与病理指标的分析, 如血糖等^[1-2]. 可以分离保存血浆进行更进一步的研究, 如胰岛素测定等^[1-2].

1.5.1 从动脉导管的采血方法

用钳子夹住动脉导管, 打开导管与旋转输液阀的连接处, 用1 mL含有 $20\ \text{u}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的肝素的注射器连接导管, 松开钳子回抽血液, 当血液到达针头处, 再用钳子夹住动脉导管, 换用具有抗凝功能的注射器抽血液, 这样可以防止血液被稀释. 一般一次抽血量为 $0.1\sim 0.2\ \text{mL}$. 同样方法, 用1 mL含有 $20\ \text{u}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的肝素的注射器将导管内的血液推输回体内. 再将导管与旋转输液阀连接, 用肝素泵输入微量肝素, 以观察连接处是否连接严密.

1.5.2 血细胞输回小鼠体内的方法

血液离心后, 取其血浆保存, 血细胞可以用 $100\ \mu\text{L}$ 的肝素($100\ \text{u}\cdot\text{mL}^{-1}$)稀释后重新输回小鼠体内(经稀释, 血细胞的颜色由深红色转为鲜红色), 以免多次抽血而引起动物贫血. 血细胞输回小鼠体内的方法同采血. 无论是采血还是血细胞输回, 均应最少量的输入肝素. 特别是手术刚刚结束, 若给予过多的肝素易导致小鼠手术部位出血.

1.6 信号的转换系统

动脉导管可以通过信息转换器与电脑信号系统连接, 通过屏幕可以观察小鼠的血压、脉搏与呼吸的动态变化.

通过屏幕上的血压曲线的宽窄, 可以知道动脉导管的堵塞情况. 若变成一条直线, 说明导管堵塞或注射泵中有气泡. 若没有电脑信号显示系统, 需要密切观察动脉导管的堵塞情况. 经常用注射器测试其是否畅通. 若发现动脉管抽血有阻力, 可

以给予多量的 $20\ \text{u}\cdot\text{mL}^{-1}$ 或少量的 $100\ \text{u}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的肝素去疏通导管.

2 结果与讨论

一般情况下, 完成1例手术的时间为1 h左右. 手术完成后, 小鼠会在 $1\sim 5\ \text{min}$ 内苏醒. 手术后 $1\sim 2\ \text{d}$, 动物一般都能恢复到正常生理状况. 表现为: 在术前给予的小棉花垫已经变成絮状, 小鼠皮毛光滑, 反应灵敏, 饮水饮食正常. 进行此类手术多例, 手术后动物均存活良好. 术后感染率一般低于6%(多为血液系统), 术后第7天动脉导管堵塞率低于5%.

如果手术后动物恢复较慢, 这可能与手术过程中麻醉剂的吸入过量、动物失血量过多、组织损伤较为严重、手术时间过长以及手术后感染等因素有关.

进行该手术, 最易发生血液系统的感染. 手术时的无菌程度及术后旋转输液阀、微量注射泵系统的洁净程度, 均是导致感染的危险因素. 因此, 每例实验结束后, 需对所用的旋转输液阀进行清洗消毒. 先用 $500\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 含氯消毒剂冲洗一遍, 再用75%乙醇冲洗, 最后用0.9%无菌生理盐水冲洗. 同样方法定期对微量注射泵系统进行消毒. 可根据具体情况进行处理, 一般 $1\sim 3$ 个月消毒1次. 实验发现, 血液系统的感染多与旋转输液阀与微量注射泵系统污染有关. 若严格按照规定操作, 手术后小鼠血液系统的感染率较低. 若为免疫低下动物或手术后给予免疫抑制剂, 在抽血过程中更应严格无菌技术操作.

本动物模型易发生动脉导管堵塞, 其影响因素为: 动脉导管的粗细, 导管固定的牢固程度, 微量注射泵系统是否有气泡, 肝素的给予量多少等. 研究人员可根据自己的研究目的决定动物的存活时间, 一般情况为 $1\sim 2$ 周.

3 结论

通过查阅国内文献发现,股动脉及股静脉插管活体手术模型仅限于大鼠及较大的动物^[7-9],未见小鼠的研究报道。笔者介绍的经显微外科手术建立的小鼠股动脉及股静脉插管动物模型,达到了动物活动不受限制,并且可以长期给药、采血的目的。这种模型既减少了动物的痛苦,又大大提高了实验人员的工作效率,降低了研究成本,具有一定的推广使用价值。

参考文献:

- [1] Woodske M E, Yokoe T, Zou B, et al. Hyperinsulinemia predicts survival in a hyperglycemic mouse model of critical illness[J]. Crit Care Med, 2009, 37(9):2596-2603.
- [2] Lee E J, Woodske M E, Zou B, et al. Dynamic arterial blood gas analysis in conscious, unrestrained C57BL/6J mice during exposure to intermittent hypoxia[J]. J Applied Physiology, 2009, 107(1):290-294.
- [3] Mattson D L. Long-term measurement of arterial blood pressure in conscious mice[J]. The American Physiology, 1998, 274:564-570.
- [4] Cholewa B C, Meister C J, Mattson D L. Importance of the renin-angiotensin system in the regulation of arterial blood pressure in conscious mice and rats[J]. Acta Physiol Scand, 2005, 183(3):309-320.
- [5] 杨明杰, 周建嫦, 谭小华, 等. 小鼠胃插管模型制备方法探讨[J]. 毒理学杂志, 2005, 4:326-327.
- [6] 傅宇阳, 何晓顺, 陈剑琳, 等. 小鼠肾移植模型的建立[J]. 中华显微外科杂志, 2003, 26(3):213-214.
- [7] 马宝苗, 张栗, 吕秀依, 等. 大鼠静脉自身给药颈静脉插管手术方法的改进[J]. 中国药物依赖性杂志, 2010, 19(6):476-480.
- [8] 包伦, 徐贤坤, 曾贤垠. 大鼠股动脉、静脉插管手术方法的建立及应用[J]. 医药卫生论坛, 2005, 18:235-237.
- [9] 尚敬, 孙辉, 肖方喜, 等. 清醒状态下大鼠尾动静脉插管高胰岛素-正糖钳夹实验[J]. 上海交通大学学报:医学版, 2006, 26(9):968-971.

Introduction of a Micro-surgery Model Through Femoral Arterial and Venous Catheters in Mice

SHI Hong-bo, RUTH Magaye, WANG Zun, ZHAO Jin-shun, ZOU Bao-bo*
(Medical School, Ningbo University, Ningbo 315211, China)

Abstract: Through femoral arterial and venous catheters in mice, a micro-surgery model is introduced for sampling of arterial blood, and continuous intravenous infusion in the free-moving conscious mice. Some 8-to-10-week-old mice weighing 20-30 g were used in this study. After anesthesia by inhalation of isoflurane (5%), 1.5% of isoflurane was administered to the mouse during surgery. With the use of aseptic techniques, catheters were placed in the femoral artery for the measurement of arterial pressure and sampling of blood. Catheters placed in the femoral vein were used for infusions. The arterial and venous catheters, tunneled subcutaneously in the back of the neck in a lightweight tethering wire, were attached to a swivel device at the top of the cage. To prevent blood cruor, 20 u heparin ($12-15 \mu\text{L}\cdot\text{h}^{-1}$) was continuously infused through a double-channel swivel. All mice fully recovered after surgery (1-2 d). Infection rate was less than 6%. The blockage rate of artery catheters was less than 5% 7 days after micro-surgery operation. The femoral arterial and venous cannular surgery is proven to be a dynamic, safe, as well as efficient micro-surgery model, which can be widely applied in pharmacological, toxicological, and clinical experimental studies.

Key words: mice; femoral artery catheter; femoral vein catheter; micro-surgery model

(责任编辑 史小丽)