

乳胶血管灌注技术制作小鼠头面部静脉血管模型方法初探

王成稷¹, 王珏¹, 王海杰¹, 陆炜晟¹, 史岩², 顾正页¹, 万鸣秋¹, 沈如凌¹

[1. 上海实验动物研究中心, 上海 201203; 2. 梅奥宠物(上海)有限公司, 上海 200235]

[摘要] **目的** 优化乳胶灌注技术, 并将该技术应用于小鼠头面部静脉血管模型制作。**方法** 将9只8周龄、体重(25.0±1.3) g的雄性C57BL/6小鼠随机分成60%乳胶生理盐水组、60%乳胶肝素组和30%乳胶肝素组, 相应试剂灌注完成后将标本浸泡于4℃甲醛固定液中, 24 h后解剖观察并测量颈外血管直径。**结果** 于小鼠颈外静脉灌注乳胶灌注液200 μL后, 各组小鼠的眶上静脉、眶下静脉、颞静脉、面后静脉、咬肌静脉、颈外静脉等均得到灌注, 通过对灌注后面部血管末端分支、舌下静脉及舌尖小静脉的灌注程度比较后发现, 30%乳胶肝素组的灌注效果最佳, 其次为60%乳胶肝素组, 而60%乳胶生理盐水组的灌注效果最差。**结论** 优化后的乳胶灌注技术可有效灌注小鼠头面部的静脉血管, 该技术可为小鼠面部静脉血管的走向及形态研究提供很好的参考。

[关键词] 乳胶灌注; 血管模型; 小鼠头面部血管

[中图分类号] Q95-33; R-332 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2023)05-0574-05



Application of Optimized Latex Perfusion Technique in the Establishment of Craniofacial Venous Model in Mice

WANG Chengji¹, WANG Jue¹, WANG Haijie¹, LU Weisheng¹, SHI Yan², GU Zhengye¹, WAN Mingqiu¹, SHEN Ruling¹

[1. Shanghai Laboratory Animal Research Center, Shanghai 201203, China; 2. Mayo Pet (Shanghai) Co., Ltd., Shanghai 200235, China]

Correspondence to: SHEN Ruling (ORCID: 0000-0002-7529-810X), E-mail: shenruling@slarc.org.cn

[ABSTRACT] **Objective** Optimize the latex perfusion technique and apply it to the construction of a murine craniofacial venous vascular model. **Methods** A total of nine 8-week-old male C57BL/6 mice weighing (25.0±1.3) g were randomly divided into three groups: 60% latex physiological saline group, 60% latex heparin group, and 30% latex heparin group. After completion of the perfusion, the specimens were immersed in 4℃ formalin fixative for 24 h, followed by dissection, observation, and measurement of the extracranial blood vessel diameters. **Results** After 200 μL latex perfusion solution was injected into the external jugular vein, the supraorbital vein, infraorbital vein, temporal vein, retrofacial vein, masseter vein and external jugular vein were perfused in each group. After comparing the perfusion degree of the distal branches of blood vessels, sublingual vein and tip venule, it was found that the 30% latex heparin group had the best perfusion effect, followed by the 60% latex heparin group, and the 60% latex saline group had the worst perfusion effect. **Conclusion** The optimized latex perfusion technique can effectively infuse the veins in the head and face of mice, and this technique can provide a good reference for the study of the direction and morphology of facial veins in mice.

[Key words] Latex perfusion; Vascular model; Craniofacial vessels in mice

[基金项目] 上海实验动物研究中心科技创新计划新星项目“小鼠肝癌肿瘤血管选择性灌注及透明化技术”(2021NS02)

[第一作者] 王成稷(1989—), 男, 学士, 实验师, 从事动物实验及解剖学研究。E-mail: wangchengji@slarc.org.cn;

王珏(1984—), 女, 学士, 实验师, 从事动物实验及分子生物学研究方向。E-mail: wangjue@slarc.org.cn

[通信作者] 沈如凌(1981—), 女, 博士, 副研究员, 从事模式动物模型研发及表型研究、肿瘤免疫和神经免疫方向。E-mail: shenruling@slarc.org.cn。ORCID: 0000-0002-7529-810X

在动物实验中,研究人员常会对实验小鼠进行采血后进行相关检测。小鼠采血方法多样,如尾静脉采血、眼眶静脉窦采血、颈外静脉采血、面部采血等。不同采血方法适用于不同的实验需求。例如,尾静脉采血量较少,操作简便,常适用于血糖监测等少量血样需求的实验;眼眶静脉窦采血量较大,通常用于血液学检测,如血生化、血常规检测等血样需求量较大的实验,但其操作较为复杂。相较于其他采血方式,小鼠面部采血有操作简便、采血量适中、对小鼠影响小等特点,故该采血方法在动物实验研究中应用极为广泛,尤其在生理学、药理学及药代动力学研究中,经常需要经面部采集血液样本进行一系列生化指标检测和组分分析^[1-3]。因此,对小鼠面部静脉血管走向及形态的研究显得尤为重要。

大鼠、小鼠血管模型研究常使用硫酸钡造影的方法。邹天乐等^[4]曾使用硫酸钡对大鼠皮动脉进行血管造影,并达到传统氧化铅方法能得到的造影效果。钱凤涛等^[5]通过优化硫酸钡配方对小鼠全身动脉血管进行X线造影,得到了良好的效果。但小鼠头面部血管十分复杂,使用造影方法无法直接观察面部血管,通常需要通过micro-CT等数字化技术实现血管三维重建结构^[6]。另外,乳胶灌注技术是一种常用的血管铸型方法。目前乳胶灌注技术广泛应用于人体血管模型研究中,因乳胶具有可塑性强、自行凝固快、韧性强等特点^[7],常用于心脏血管、头面部血管、手指末端血管等研究^[8-11]。由于乳胶灌注时需要一定压力,容易造成血管变形,使血管直径远大于其生理直径,操作上具有一定难度,目前尚少见将乳胶灌注技术应用于小鼠血管模型制作的文献报道。

作为使用最为广泛的实验动物,小鼠在生命科学基础研究及生物医药产业应用中发挥重要作用。对小鼠身体结构的解析和了解将有助于动物实验的评价和有效应用。在血管模型制作时,对于血液抗凝的处理也是十分必要的。临床上使用最广泛的抗凝血和抗血栓形成药物是肝素。本实验尝试使用肝素对小鼠全身血液抗凝,并使用乳胶灌注技术进行小鼠头面部静脉血管铸型制作小鼠头面部血管模型,同时对乳胶灌注技术进行了优化,以期小鼠头面部血管研究提供较好的参考。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组

SPF级8周龄雄性C57BL/6小鼠9只,体质量为

(25.0g±1.3)g,购自上海灵畅生物科技有限公司[SCXK(沪)2023-0003]。小鼠饲养于上海实验动物研究中心[SYXK(沪)2019-0003]。动物饲养环境温度为20~24℃,相对湿度为50%±10%,12h明暗交替,屏障设施条件下饲养。本实验方案经上海实验动物研究中心实验动物管理和伦理委员会审核批准(批号:210218007)。9只小鼠随机分成60%乳胶生理盐水组、60%乳胶肝素组和30%乳胶肝素组,每组各3只。

1.2 主要试剂和仪器

60%亚美尼亚乳胶(批号:20191228)购自深圳市吉田化工有限公司;生理盐水即0.9%NaCl溶液(批号:C8111301)购自江西科伦药业有限公司;氨水(批号:P15700998)购自上海泰坦科技有限公司;蓝色中性笔替芯(批号:RQHO-18120009)购自上海晨光文具有限公司;肝素钠(批号:20190706)购自国药集团;舒泰(批号:7LR9A)购自法国维克有限公司;组织固定液甲醛(批号:XS191308)购自武汉赛维尔生物科技有限公司。

体视显微镜(型号:EZ4)购自德国Leica公司;显微手术镊(规格:F11022-11)购自深圳瑞沃德生命科技有限公司;8-0结扎线(批号:19T0331B)购自上海浦东金环医疗用品股份有限公司;29G胰岛素注射器(批号:7276801)购自美国Becton Dickinson公司。

1.3 乳胶灌注液和肝素灌注液的配制

取60%白色亚美尼亚乳胶25mL,用一支蓝色中性笔替芯配制成蓝色乳胶灌注液。取60%白色亚美尼亚乳胶17.5mL,先用17.5mL氨水稀释后,再用一支蓝色中性笔替芯配制成30%的蓝色乳胶灌注液。使用1g肝素钠(活性150U/mg)与150mL生理盐水充分混合,配制成1000U/mL的肝素灌注液。

1.4 标本的灌注与解剖

60%乳胶生理盐水组:使用生理盐水将50mg/mL舒泰稀释至5mg/mL,按100mg/kg剂量进行小鼠尾静脉注射麻醉。暴露小鼠两侧颈外静脉,分别结扎两侧颈外静脉近心端,在右侧颈外静脉远心端预留一结扎线。使用PE10软管进行右侧颈外静脉插管,并结扎预留结扎线。沿腹中线开腹,分离暴露左肾静脉后的腹主动脉,使用剪刀在腹主动脉上剪开一小口,使用生理盐水灌注血管。待腹主动脉开口处的流出液由浊变清后开始缓慢灌注蓝色乳胶灌注液,每只小鼠灌注

200 μL ; 灌注完成后将小鼠标本浸泡于4 $^{\circ}\text{C}$ 甲醛固定液中, 24 h后解剖观察。

60% 乳胶肝素组: 首先于尾静脉注射1 000 U/mL 肝素钠500 μL , 然后麻醉、插管、灌洗、灌注过程同60% 乳胶生理盐水组。灌注完成后将标本浸泡于4 $^{\circ}\text{C}$ 甲醛固定液中, 24 h后解剖观察。

30% 乳胶肝素组: 首先于尾静脉注射1 000 U/mL 肝素钠500 μL , 然后麻醉、插管、灌洗过程同60% 乳胶生理盐水组, 然后使用PE10管灌注30% 蓝色乳胶。灌注完成后将标本浸泡于4 $^{\circ}\text{C}$ 甲醛固定液中, 24 h后解剖观察。

1.5 标本解剖观察及血管直径测量

分离去除小鼠面部皮肤及筋膜组织, 充分暴露小鼠头面部的眶上静脉、眶下静脉、颞静脉、面后静脉、咬肌静脉、舌下静脉、颈外静脉; 观察各静脉的灌注效果及充盈程度。应用显微镜自带S-EYE软件, 测量各组小鼠在灌注前后的颈外静脉直径, 并对这些数据进行比较。

1.6 统计学分析

应用GraphPad Prism 8软件进行结果数据分析, 组

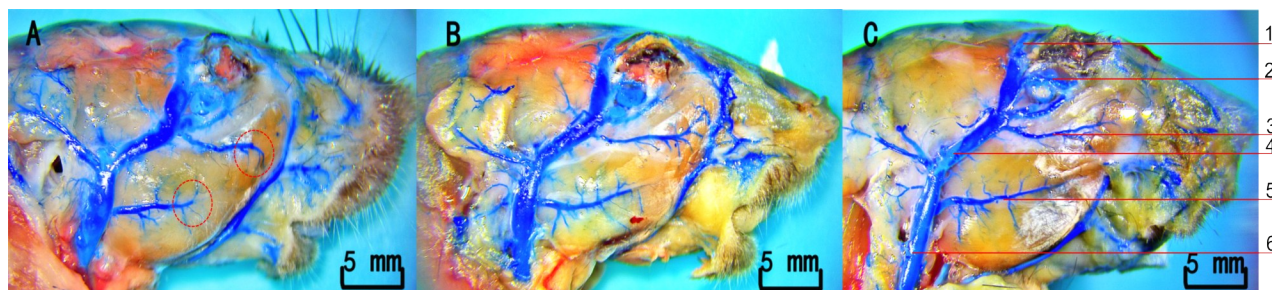
间比较采用单因素方差分析, 组内两两比较采用LSD- t 检验。计量结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组小鼠头面部静脉的灌注结果

如图1所示, 各组小鼠头面部静脉均得到灌注(图1)。图1C中标注各组小鼠的上睑静脉、眼眶静脉窦、面横静脉、颞浅静脉、咬肌静脉、颈外静脉的位置。对各组面部血管灌注效果进行观察发现: 60% 乳胶生理盐水组小鼠灌注了所有血管, 但存在血管灌注不充分的情况, 面横静脉及咬肌静脉末端均未得到充分灌注(图1A红圈标注); 60% 乳胶肝素组的小鼠头面部所有静脉均得到充分灌注, 但较细的血管末端分支未灌注充分(图1B); 30% 乳胶肝素组的小鼠头面部所有静脉和较细的血管末端分支均得到充分灌注(图1C)。

灌注结果表明: 30% 乳胶肝素组的灌注效果最佳, 其次为60% 乳胶肝素组, 60% 乳胶生理盐水组的灌注效果最差。



注: A, 60% 乳胶生理盐水组; B, 60% 乳胶肝素组; C, 30% 乳胶肝素组。1, 上睑静脉; 2, 眼眶静脉窦; 3, 面横静脉; 4, 颞浅静脉; 5, 咬肌静脉; 6, 颈外静脉。

Note: A, 60% latex saline group; B, 60% latex heparin group; C, 30% latex heparin group. 1, Superior palpebral vein; 2, Orbital venous sinus; 3, Facial transverse vein; 4, Superficial temporal vein; 5, Masseteric vein; 6, External jugular vein.

图1 小鼠头面部静脉的乳胶灌注结果

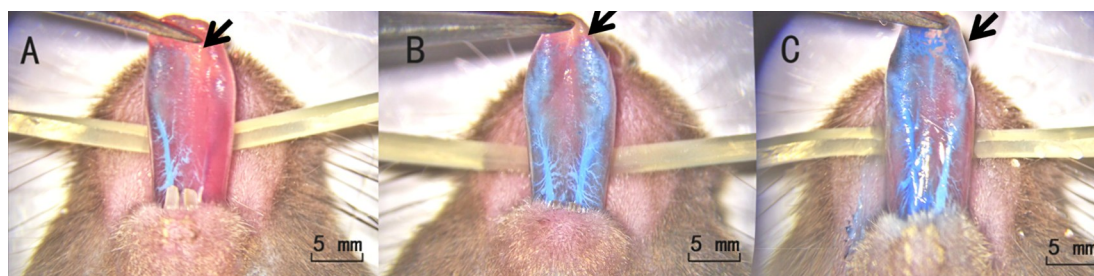
Figure 1 Results of latex perfusion in the head and facial veins of mice

2.2 各组小鼠舌下静脉的灌注结果

观察发现, 各组舌下静脉灌注的效果差异较大: 60% 乳胶生理盐水组仅一侧舌下静脉末端有少量乳胶灌注(图2A); 60% 乳胶肝素组的两侧舌下静脉都得到了灌注, 但舌尖的细小静脉未得到充分灌注(图2B); 30% 乳胶肝素组的两侧舌下静脉及舌尖处的细小静脉均得到充分灌注(图2C)。灌注结果表明: 30% 乳胶肝素组的灌注效果最佳。

2.3 各组小鼠血管直径比较

对灌注前后各组小鼠的颈外静脉直径进行测量, 其结果显示: 正常小鼠在灌注前的颈外静脉直径是 (1.33 ± 0.08) mm, 60% 乳胶生理盐水灌注后是 (1.81 ± 0.04) mm, 60% 乳胶肝素灌注后是 (1.77 ± 0.06) mm, 30% 乳胶肝素灌注后是 (1.30 ± 0.02) mm。其中, 正常小鼠灌注前的颈外静脉直径与30% 乳胶肝素组比较无显著差异($P > 0.05$), 与60% 乳胶生理盐水组及60% 乳



注: A, 60% 乳胶生理盐水组; B, 60% 乳胶肝素组; C, 30% 乳胶肝素组。

Note: A, 60% latex saline group; B, 60% latex heparin group; C, 30% latex heparin group.

图2 各组小鼠舌静脉灌注效果对比

Figure 2 Comparison of lingual vein perfusion effects among different groups of mice

胶肝素组比较的差异极显著 ($P < 0.0001$)。

3 讨论

3.1 肝素钠的使用

肝素是一种高度硫酸化的糖胺聚糖, 是世界上使用最广泛的临床抗凝剂^[12]。本文使用浓度为 1 000 U/mL 的肝素钠, 在灌注乳胶前每只小鼠注射 0.5 mL。经实验证明, 提前注射肝素钠可有效避免小鼠体内血液凝固, 使末端小血管能得到更好的灌注效果。

3.2 乳胶灌注液浓度的影响

本实验使用了 30% 和 60% 两种浓度的乳胶灌注小鼠血管。实验证明, 使用两种浓度的乳胶灌注均能得到较好的灌注效果。但解剖后发现, 使用 60% 乳胶灌注的静脉血管直径明显大于其实际生理状态, 而使用 30% 乳胶灌注的静脉血管直径与其实际生理状态更为相近。

3.3 灌注液灌注控制

乳胶灌注压力是影响乳胶灌注效果好坏的重要因素之一^[13]。本实验采用手动灌注的方法, 灌注速度应控制在 10 $\mu\text{L/s}$ 左右。灌注速度过快会导致压力过大, 使小鼠静脉血管破裂, 灌注液漏出影响灌注结果; 灌注速度过慢会导致压力过小无法突破静脉瓣, 导致灌注效果不佳。

3.4 灌注方案的选择

目前, 尚很少有小鼠头面部乳胶灌注的相关研究报道。本研究参考人类头面部血管灌注的相关方法, 优化了乳胶灌注液的配方以提高灌注精度, 选择颈外静脉作为乳胶灌注的入口, 同时暴露两侧颈外静脉, 一侧插管一侧可用于观察乳胶的灌注程度。去除胸腔的心脏及肺脏后, 灌洗及灌注时主动脉可作为液体流出口。

3.5 灌注效果差异分析

造成各组小鼠灌注效果差异的原因可能与乳胶灌注液的浓度及抗凝剂的使用有关。在灌注前注射肝素钠抗凝后, 可有效减少血管末端产生血栓, 在乳胶灌注时可使乳胶更好地进入血管末端。同时将乳胶进行稀释后, 乳胶产生的团聚体更小, 与未稀释的乳胶灌注液相比, 可进入更细小的末端血管。故在各组灌注结果中, 30% 乳胶肝素组灌注效果最佳。

本研究还观察到各组小鼠灌注后血管直径的差异, 其原因可能为稀释后的乳胶灌注液中乳胶含量相比未稀释时更低, 在乳胶灌注时压力大于小鼠正常的静脉压力, 灌入血管的灌注液体积会高于小鼠静脉中的血容量, 此时的血管直径会显著高于正常血压时的血管直径。由于未稀释的乳胶灌注液中乳胶含量高, 凝固后血管仍呈现高压时的血管状态, 血管直径高于正常直径。而 30% 乳胶肝素组中乳胶含量减半, 凝固后灌注液中的多余液体通过血管壁渗出, 血管直径收缩回接近正常血管直径。

综上所述, 经优化后的乳胶灌注技术可有效灌注小鼠面部静脉血管, 该技术可为小鼠面部静脉血管的走向及形态研究提供很好的参考。

[医学伦理声明 Medical Ethics Statement]

本研究涉及的所有动物实验均已通过上海实验动物研究中心实验动物管理和伦理委员会 (IACUC) 审核批准 (批准: 210218007)。所有实验过程均遵照中国实验动物相关法律法规条例要求进行。

All the animal experiments involved in this study have been examined and approved by the IACUC of Shanghai Laboratory Animal Research Center (Approval Letter No. 210218007). All the experimental procedures are carried out in accordance with the relevant laws and regulations on experimental animals in China.

[作者贡献 Author Contribution]

王成稷负责数据分析及论文撰写;
王珏负责收集资料,并负责数据分析和论文修改;
王海杰负责动物实验中的血管灌注;
陆炜晟负责灌注后动物样本的解剖;
史岩负责实验方案设计和技术指导;
顾正页负责解剖后样本拍照及实验记录;
万鸣秋负责实验动物饲养管理和实验动物质量控制;
沈如凌负责实验方案审核,以及本论文的审核把关。

[利益声明 Declaration of Interest]

所有作者均声明本文不存在利益冲突。

[参考文献 References]

- [1] 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. DOI: 10.3969/j.issn.1671-7856.2008.12.014.
YU C L, ZHAO L, TANG Q, et al. A new method of blood collection from the submandibular vein plexus in mice[J]. Chin J Comp Med, 2008, 18(12):53-54, 95. DOI: 10.3969/j.issn.1671-7856.2008.12.014.
- [2] 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. DOI: 10.3969/j.issn.1672-5042.2008.02.005.
CHE Z Y, ZOU Y, SONG Q B. Several experiments in rat blood collection methods commonly used[J]. J Reg Anat Oper Surg, 2008, 17(2): 84-85. DOI: 10.3969/j.issn.1672-5042.2008.02.005.
- [3] 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. DOI: 10.3969/j.issn.1671-7856.2019.01.016.
YANG J L, LIU J, ZHENG Z H. 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.
- [4] 邹天乐,龚瑜,林爱娣,等.硫酸钡血管造影术的优化[J].中国临床解剖学杂志,2010,28(1):104-106. DOI: 10.13418/j.issn.1001-165x.2010.01.017.
ZOU T L, GONG Y, LIN A D, et al. Modified Barium Sulfate-latex injection technique for angiography[J]. Chin J Clin Anat, 2010, 28(1):104-106. DOI: 10.13418/j.issn.1001-165x.2010.01.017.
- [5] 钱凤涛,王成稷,王恺,等.优化硫酸钡造影剂对小鼠血管造影效果观察[J].实验动物与比较医学,2019,39(4):319-322. DOI: 10.3969/j.issn.1674-5817.2019.04.012.
QIAN F T, WANG C J, WANG K, et al. Study on angiography in mice with Barium sulfate[J]. Lab Anim Comp Med, 2019, 39(4): 319-322. DOI: 10.3969/j.issn.1674-5817.2019.04.012.
- [6] 杨曦,徐永清,何晓清,等.数字化技术制备大鼠跨区穿支皮瓣微小血管模型的实验研究[J].中国修复重建外科杂志,2017,31(12):1485-1489.
YANG X, XU Y Q, HE X Q, et al. Establishment of micro-vessels model of cross-boundary perforator flap in rat via

digital technology[J]. Chin J Reparative Reconstr Surg, 2017, 31(12):1485-1489.

- [7] 张习高,陈超,王建武,等.采用颈内静脉逆行插管行乳胶灌注翼丛标本制作法[J].解剖学杂志,2003,26(4):359. DOI: 10.3969/j.issn.1001-1633.2003.04.035.
ZHANG X G, CHEN C, WANG J W, et al. Preparation of pterygium plexus by retrograde intubation of internal jugular vein[J]. Chin J Anat, 2003, 26(4): 359. DOI: 10.3969/j.issn.1001-1633.2003.04.035.
- [8] 甘承,田佳,刘立强,等.人体头面部解剖标本的防腐固定技术及血管内乳胶灌注技术研究[J].中国美容医学,2015,24(12):44-49. DOI: 10.15909/j.cnki.cn61-1347/r.000515.
GAN C, TIAN J, LIU L Q, et al. Research of anticorrosion and latex perfusion technology in human craniofacial specimens [J]. Chin J Aesthetic Med, 2015, 24(12):44-49. DOI: 10.15909/j.cnki.cn61-1347/r.000515.
- [9] 罗东辉,罗坤.乳胶灌注和硅胶灌注在头颅血管教学标本制作中的对比研究[J].新疆医学,2014,44(9):171-173.
LUO D H, LUO K. Comparative study of latex perfusion and silica gel perfusion in making teaching specimens of cranial blood vessels[J]. Xinjiang Med J, 2014, 44(9): 171-173.
- [10] 周文逊,王刚.乳胶灌注在心的血管标本制作中的应用[J].中国医药导报,2010,7(36):134. DOI: 10.3969/j.issn.1673-7210.2010.36.071.
ZHOU W X, WANG G. Application of latex perfusion in blood vessel specimen making of heart[J]. China Med Her, 2010, 7 (36): 134. DOI: 10.3969/j.issn.1673-7210.2010.36.071.
- [11] 成亮,陈铿,柴益民,等.手指末节指掌侧浅静脉的显微解剖及临床应用[J].中华显微外科杂志,2011,34(2):131-133, F0003.
CHENG L, CHEN K, CHAI Y M, et al. Microanatomy study and clinical application of superficial palmar digital veins in fingertip replantation[J]. Chin J Microsurg, 2011, 34(2):131-133, F0003.
- [12] ONISHI A, ST ANGE K, DORDICK J S, et al. Heparin and anticoagulation[J]. Front Biosci (Landmark Ed), 2016, 21(7): 1372-1392. DOI: 10.2741/4462.
- [13] 漆光平,杜亚政,潘爱华,等.乳胶血管灌注的技术探讨[J].湖南医科大学学报,2000,25(4):411-412.
QI G P, DU Y Z, PAN A H, et al. Filling blood vessels with latex and its application[J]. Bull Hunan Med Univ, 2000, 25(4): 411-412.

(收稿日期:2023-06-30 修回日期:2023-10-02)

(本文编辑:张俊彦,富群华,丁宇菁)

[引用本文]

王成稷,王珏,王海杰,等.乳胶血管灌注技术制作小鼠头面部静脉血管模型方法初探[J].实验动物与比较医学,2023,43(5):574-578. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2023.095.

WANG C J, WANG J, WANG H J, et al. Application of optimized latex perfusion technique in the establishment of craniofacial venous model in mice[J]. Lab Anim Comp Med, 2023, 43(5): 574-578. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2023.095.