



长爪沙鼠发情周期规律与判定方法

陈立青, 戴方伟, 郭红刚, 卢领群, 萨晓婴

(浙江省医学科学院 浙江省实验动物中心, 杭州 310013)

【摘要】 目的 研究长爪沙鼠发情周期, 揭示发情规律, 优化判定方法。方法 连续 18 d 采集 50 只长爪沙鼠阴道上皮脱落细胞涂片, 采用角化细胞计数法研究长爪沙鼠发情周期规律。比较瑞氏染色、HE 染色和直接镜检判定发情周期 4 个时相的优缺点。结果 长爪沙鼠的发情周期有稳定型、不稳定型、假孕三种类型。其中稳定型占 68.6%, 发情周期为 (106.3 ± 35.0) h, 可分为 4 个时相。4 个时相角化细胞的比例分别为发情前期 $(13.5 \pm 7.8)\%$ 、发情期 $(86.7 \pm 9.9)\%$ 、发情后期 $(27.9 \pm 12.8)\%$ 和发情间期 $(3.3 \pm 2.8)\%$ 。结论 角化细胞计数能准确地判定长爪沙鼠的发情周期及各个时相。直接镜检法能快速反映阴道脱落细胞的形态。

【关键词】 发情周期; 长爪沙鼠; 阴道涂片; 角化细胞; 细胞学

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2014) 01-0067-04

Doi: 10.3969/j.issn.1005-4847.2014.01.013

Determination of the estrus cycle phases of Mongolian gerbils and comparison of three staining methods

CHEN Li-qing, DAI Fang-wei, GUO Hong-gang, LU Ling-qun, SA Xiao-ying

(Zhejiang Center of Laboratory Animals, Zhejiang Academy of Medical Sciences, Hangzhou 310013, China)

【Abstract】 Objectives To investigate the estrus cycle in Mongolian Gerbils, to explore the mechanisms of their regularity, and to optimize the judgment criteria of estrus cycle phases. **Methods** Vaginal smears were consecutively taken from the gerbils for 18 d, and keratinocyte count was used to observe the vaginal exfoliative cytology under light microscope in 50 female gerbils. The advantages and disadvantages of Wright's staining, HE staining and direct examination under light microscope in distinguishing the four phases of estrus cycle were compared. **Results** There were three types of estrus cycles in *Mongolian Gerbils* as stable form, unstable form and pseudopregnancy form. Among these, the stable form accounted for 68.6%. The estrus cycles lasted for (106.3 ± 35.0) hours. Moreover, it could be distinguished into four phases. The proportion of cornified cells in the four phases were: proestrus $(13.5 \pm 7.8)\%$, estrus $(86.7 \pm 9.9)\%$, metoestrus $(27.9 \pm 12.8)\%$, and intermediate stage $(3.3 \pm 2.8)\%$. **Conclusions** Cornified cell count can be used to assess the estrus cycle and each phase correctly. Direct examination under light microscope is ideal for revealing the morphology of vaginal exfoliative cells rapidly. The study of estrus cycle in Mongolian Gerbils may provide a theoretical basis for superovulation, fertilization in vitro, embryo freezing, and biological purification and so on.

【Key words】 Estrus cycle; Mongolian gerbil; Vaginal smear; Cornified cell; Cytology

长爪沙鼠 (*Mongolian gerbil*) 又称蒙古沙鼠、沙土鼠、黄耗子、砂耗子, 隶属于哺乳纲、啮齿目、仓鼠科、沙鼠亚科、沙鼠属。长爪沙鼠被誉为“多功能实

验动物”: 解剖学、行为学性状独特, 适宜于脑缺血^[1]、癫痫^[2]等研究; 对多种微生物易感, 适宜于进行寄生虫^[3]、细菌^[4]等病原的研究; 脂质代谢与人

【基金项目】 国家自然科学基金项目(31101678); 国家科技支撑计划重点项目(2011BAI15B01-31、2013BAK11B01-41); 浙江省科技计划项目(2011C37080)。

【作者简介】 陈立青(1986-), 女, 研究实习生, 硕士, 研究方向: 实验动物学

【通讯作者】 萨晓婴(1952-), 男, 研究员, 研究方向: 实验动物学, E-mail: saxiaoyin@163.com

类有相似之处^[5], 适宜于脂质代谢的研究。因而, 继续研究长爪沙鼠的其他生理特性有助于拓展该动物的实际应用价值, 加快长爪沙鼠的实验动物化进程。长爪沙鼠发情周期的鉴定, 有助于我们合理选择激素的间隔时间、正确判断同期发情的实验结果。同期发情是超数排卵工作的基础, 只有保障同期发情顺利开展, 才能通过超数排卵在短时间内获得数量多、质量优的成熟卵细胞。再者, 长爪沙鼠发情周期的鉴定为选择合适的假孕母鼠, 即胚胎移植的受体提供重要保障。假孕母鼠依然有正常的发情周期, 进行胚胎移植后, 并不是任何一个时相都可以顺利受孕。结合长爪沙鼠发情周期, 鉴定假孕母鼠所处发情周期的时相, 选择受孕概率最高的时相, 才能提高胚胎移植的成功率。

1 材料与方法

1.1 实验动物

清洁级雌性长爪沙鼠 50 只, 4 月龄, 50 ~ 60 g, 每笼 3 ~ 4 只, 由浙江省实验动物中心提供【SCXK(浙)2008-0033】, 实验在浙江省实验动物中心进行【SYXK(浙)2008-0113】。长爪沙鼠饲喂⁶⁰Co 灭菌的营养配合饲料, 饮用超滤水, 笼器具、垫料等均经 121℃ 高压灭菌。

1.2 试剂与仪器

主要试剂为瑞氏染液、苏木精、伊红染液(均为上海源叶生物科技有限公司产品, 中国)、生理盐水(湖南科伦制药有限公司, 中国)、磷酸盐缓冲液(杭州吉诺生物医药技术有限公司, 中国)。显微镜(Leica DM500, 德国)、细胞分类计数器(姜堰市普康医疗器械厂, 中国)、细胞计数板(Jadering XB-K-25, 中国)等。

1.3 方法

角化细胞计数法确定发情周期、各时相持续时间、各时相细胞所占比例。冲洗法采集阴道脱落细胞悬液, 采用染色法和直接镜检法观察发情周期各时相阴道脱落细胞的形态变化。

每天上午 8:30 保定动物, 用移液器吸取 30 μ L 生理盐水, 将枪头轻轻插入长爪沙鼠的阴道内, 冲洗数次后吸出。进行有核上皮细胞、角化细胞、淋巴细胞的分类计数。然后, 将阴道冲洗液均匀涂布于载玻片中央, 自然干燥, 进行瑞氏染色、HE 染色, 然后显微镜检查。同时将阴道冲洗液加至洁净的 96 孔板中直接镜检。

1.4 数据处理

采用 Spass 16.0 软件进行分析, 数据采用均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 采用独立样本 *t* 检验, 检验标准为 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 长爪沙鼠发情周期的类型

长爪沙鼠发情周期的类型、时间范围及所占比例见表 1。根据 Naoko 的分类^[6], 长爪沙鼠稳定型发情周期循环有序、依次呈现; 不稳定型是指发情周期为 7 ~ 14 d, 发情间期不超过 7 d; 假孕型是指发情周期为 14 ~ 18 d, 发情间期超过 12 d。

表 1 长爪沙鼠发情周期的类型及所占比例

Tab. 1 Types and proportions of estrous cycle in the Mongolian gerbils

类型 Type	时间 Days	比例 Proportion /%
稳定型 Stable	4.4 \pm 1.5	68.6
不稳定型 Unstable	7 ~ 14	21.6
假孕型 Pseudopregnancy	14 ~ 18	9.8

2.2 稳定型发情周期各时相持续时间

啮齿类动物的雌性在发情周期的不同时期, 阴道上皮脱落细胞受卵巢雌、孕激素的影响会发生典型变化。根据脱落细胞的类型及比例, 可以将发情周期分为四个时期。发情前期以有核上皮细胞为主, 发情期无核角化细胞占优势, 发情后期无核角化细胞、白细胞、有核上皮细胞三者共存, 发情间期则以白细胞为主。每天早晨采集长爪沙鼠的阴道涂片, 显微镜检查并分类计数, 记录所处时期, 连续 18d 跟踪每只沙鼠的时期的变化, 取平均值, 得到每个时期的持续时间。长爪沙鼠稳定型发情周期时间范围为(4.4 \pm 1.5) d, 其中发情前期持续时间为(21.0 \pm 10.0) h, 发情期(25.8 \pm 9.8) h, 发情后期(17.6 \pm 8.7) h, 发情间期(48.0 \pm 37.8) h。见表 2。

表 2 长爪沙鼠发情周期各个时期持续时间($\bar{x} \pm s$)

Tab. 2 The persistence time of the phases of estrous cycle in Mongolian gerbils

时期 Phases	小时 Hours	天 Days
发情前期 Proestrus	21.0 \pm 10.0	0.9 \pm 0.4
发情期 Estrus	25.8 \pm 9.8	1.1 \pm 0.4
发情后期 Metoestrus	17.6 \pm 8.7	0.7 \pm 0.4
发情间期 Dioestrus	48.0 \pm 37.8	1.7 \pm 1.2

2.3 发情周期阴道脱落细胞比例变化

每天上午 8:30 采集阴道涂片, 显微镜检查, 采用分类计数器记录细胞类型及数量。根据发情前期以有核上皮细胞为主, 发情期无核角化细胞占优势,

发情后期无核角化细胞、白细胞、有核上皮细胞三者共存,发情间期则以白细胞为主,将统计结果归类,得出各个时相细胞的类型及比例。发情前期时主要以有核上皮细胞为主,比例达(78.4 ± 10.5)%;发情期主要为角化细胞,比例达(86.7 ± 9.9)%;发情后期三种细胞均存在,以角化细胞、淋巴细胞两者为主;发情间期时主要为淋巴细胞,比例达(89.8 ± 5.0)%。见表 3。

表 3 长爪沙鼠发情周期各时相阴道脱落细胞比例(% , $\bar{x} \pm s$)

Tab. 3 The proportion of vaginal exfoliative cells in different phases of estrous cycle in the Mongolian gerbils

时相 Phases	有核上皮细胞 Nucleated cells	角化细胞 Cornified cells	淋巴细胞 Lymphocytes
发情前期 Proestrus	78.4 ± 10.5	13.5 ± 7.8	8.1 ± 8.7
发情期 Estrus	9.5 ± 8.7	86.7 ± 9.9	4.2 ± 5.2
发情后期 Metoestrus	23.5 ± 14.8	27.9 ± 12.8	48.6 ± 11.8
发情间期 Dioestrus	6.9 ± 3.4	3.3 ± 2.8	89.8 ± 5.0

2.4 发情周期各时相阴道脱落细胞形态

如图 1,发情前期阴道涂片中可见大量椭圆形的有核上皮细胞,偶见少量角化细胞;发情期可见大量外形不规则的角化上皮细胞,呈“落叶状”堆积或相互连接成片,偶有少量有核上皮细胞;发情后期不规则角化上皮细胞、有核上皮细胞和淋巴细胞均可见,且比例相当;发情间期可见大量淋巴细胞及少量有核上皮细胞。图 1 中,从左至右分别是直接镜检、瑞氏染色、HE 染色的结果,其中图 a1、a2、a3 表示发情前期,图 b1、b2、b3 表示发情期,图 c1、c2、c3 表示发情后期,图 d1、d2、d3 表示发情间期(图 1 见彩插 13)。

3 讨论

长爪沙鼠的生殖特性文献已有报道,但仅包括性成熟时间、产仔数量等概况,关于长爪沙鼠的发情周期及其变化规律,目前国内未见报道,无法满足长爪沙鼠超数排卵、胚胎移植等研究的需要。根据啮齿类动物的雌性在发情周期的不同时期,阴道黏膜受卵巢雌、孕激素的影响会发生典型变化的原理^[7],我们采用角化细胞计数法统计阴道脱落细胞的类型及比例,从而将长爪沙鼠的发情周期分为发情前期、发情期、发情后期、发情间期四个时期。确定啮齿动物发情周期的常规方法有宫颈粘液结晶观察法和阴道脱落细胞检查法。宫颈粘液结晶观察法

通过肉眼判断粘液结晶的形态来区分发情周期各个时期,阴道脱落细胞检查法则通过肉眼判断脱落细胞的形态来区分。这两种方法均缺乏客观标准,只能粗略判断发情周期。角化细胞计数法由阴道脱落细胞检查法优化而来,采用对脱落细胞分类计数的方法,不会出现模棱两可的情况,因此我们选择最可靠的角化细胞计数法。

角化细胞计数法结果表明,长爪沙鼠的发情周期有稳定型、不稳定型、假孕型三种类型,所占比例分别为 68.6%、21.6%、9.8%,Naoko 等^[6]的统计结果为 67.9%、26.4%、5.7%。我们的结果表明长爪沙鼠稳定型发情周期为 4~6 d,与 Naoko 等^[6]的结果一致。关于发情周期各时期所占的时间,Naoko 等^[6]仅以 24 h 为间隔记录发情周期各时期的变化。而我们缩小时间间隔,在预实验中发现 2、4 h 内不发生发情周期各时期的改变,为便于采样,在正式实验时选择 24 h 为间隔统计发情周期各时期的持续时间。结果表明,长爪沙鼠稳定型发情周期时间范围为(4.4 ± 1.5)d,其中发情前期持续时间为(21.0 ± 10.0)h,发情期(25.8 ± 9.8)h,发情后期(17.6 ± 8.7)h,发情间期(48.0 ± 37.8)h,四个时期中发情间期持续时间最长。发情周期及各个时期持续时间的测定,可以为研究超数排卵时各类激素的注射间隔时间提供参考。角化细胞贯穿发情周期的各个时期,因而可以用角化细胞的比例来准确判定发情周期的时期。长爪沙鼠发情周期各时期角化细胞比例分别为发情前期(13.5 ± 7.8)%、发情期(86.7 ± 9.9)%、发情后期(27.9 ± 12.8)%、发情间期(3.3 ± 2.8)%。长爪沙鼠发情周期各个时期的主要细胞比例符合啮齿类动物发情周期阴道上皮细胞的变化规律,发情前期以有核上皮细胞为主,随着卵泡加速生长,有核上皮细胞逐渐转化成成熟角化细胞,即进入发情期。随即角化细胞、白细胞、有核上皮细胞三者共存,即转入发情后期。在之后的发情间期,则以白细胞为主。

为了明确长爪沙鼠阴道脱落细胞具体形态和特性,我们选择染色法和直接镜检法来观察有核上皮细胞、角化细胞、白细胞。其中 HE 染色法能较好反应细胞质及细胞核的形态及酸碱性,有利于判断细胞的分类。瑞氏染色法虽然能反应出细胞的形态,但稀释染液必须用缓冲液,冲洗用水应近中性,否则导致细胞染色呈色异常,形态难识别,甚至错误。直接镜检法与染色法相比,不需要晾干、染色、冲洗等

操作,载玻片上细胞数量也不会明显减少,不需要染料,经济、实用、便捷^[8]。采用直接镜检法在光镜下判断阴道脱落细胞的类型结果理想^[9],适用于耗时长、步骤多的实验^[10]。因而直接镜检法是观察长爪沙鼠阴道脱落细胞的最好方法。

随着长爪沙鼠科研用途的不断扩展,发情周期及其变化规律的揭示将完善长爪沙鼠生殖生理特性,为超数排卵、获得成熟卵子以便于体外受精等提供基础资料,同时为长爪沙鼠应用于妇科、产科和计划生育等医学科学研究提供参考。

(本文图 1 见彩插 13。)

参 考 文 献

- [1] Giselle PR, Javier MP, Gilberto PA, et al. C-Phycocyanin is neuroprotective against global cerebral ischemia /reperfusion injury in gerbils [J]. Brain Res Bull, 2011, 86(1-2):42-52.
- [2] Bower MR, Hui TY, Buckmaster PS. Testing the disinhibition hypothesis using tetrode recordings in Mongolian gerbils [C]// Epilepsia. 9600 Garsington Rd, Oxford OX4 2DQ, Oxon, England: Blackwell Publishing Ltd, 2006, 47: 207.
- [3] Rivero FD, Saura A, Prucca CG, et al. Disruption of antigenic variation is crucial for effective parasite vaccine [J]. Nat Med, 2010, 16(5):551-557.
- [4] Kawazoe T, Sakagami T, Nakajima K, et al. Role of bacterial strain diversity of Helicobacter pylori in gastric carcinogenesis induced by N-methyl-N-nitrosourea in Mongolian gerbils [J]. Helicobacter, 2007, 12(3):213-223.
- [5] Hayes KC, Pronczuk A, Perlman, D. Nonesterified phytosterols dissolved and recrystallized in oil reduce plasma cholesterol in gerbils and humans [J]. J Nutr, 2004, 134(6):1395-1399.
- [6] Nishino N, Totsukawa K. Study on the estrous cycle in the Mongolian gerbil (*Meriones unguiculatus*) [J]. Exp Anim, 1996, 45(3):283-288.
- [7] Long JA, Evans HM. The estrous cycle in the rat and its associated phenomena [J]. Mems Univ Calif, 1922, 6:1-148.
- [8] Marcondes FK, Bianchi FJ, Tanno AP. Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations [J]. Braz J Biol, 2002, 62(4A):609-614.
- [9] Yener T, Tunc AT, Aslan H, et al. Determination of oestrous cycle of the rats by direct examination; how reliable [J]. Anat Histol Embryol, 2007, 36:75-77.
- [10] Chateau D, Geiger JM, Samama B, et al. Vaginal keratinization during the estrous cycle in rats: a model for evaluating retinoid activity [J]. Skin Pharmacol, 1996, 9:9-16.

[收稿日期] 2013-09-03

· 征稿启事 ·

《转化医学电子杂志》杂志征稿启事

《转化医学电子杂志》是经国家新闻出版广电总局批准,中国人民解放军总后勤部主管,第四军医大学出版社主办的专业电子学术期刊。杂志国际标准刊号:ISSN 2095-6894,国内统一刊号:CN 61-9000/R。

本刊以全国各级医疗机构临床医护人员、医教科研人员及医药卫生管理者为主要读者对象,开展学术交流,服务军队和地方医学事业发展。现面向全国高等医学院校、卫生管理部门、医疗单位征集优秀学术论文。欢迎广大医学教育者、卫生管理人员、医学科研人员、医务工作者踊跃投稿,我刊对老作者本人及推荐的稿件优先录用。本刊具有容稿量大、刊登周期短、信息时效高等特点。本刊免收审稿费,凡刊登的稿件均赠当期杂志和光盘,酌付稿酬。

目前开设的主要栏目:专家视野(述评)、基础与转化医学、预防与转化医学、生物医学工程与转化医学、临床与转化医学、短篇报告、综述、转化医学动态与资讯、转化医学多媒体课件等。

投稿方式:登录 <http://www.ejotm.com> 注册后在线投稿;

联系方式:陕西省西安市新寺路 569 号第四军医大学唐都医院《转化医学电子杂志》编辑部。邮编:710038,联系电话:029-84778169(办);E-mail:zhyxdzzz@126.com。

敬请赐稿!