

NOD/SCID 雌性小鼠动情周期的观察

甄玉花¹, 宋阳^{1*}, 关永格², 李坤寅¹, 胡光云¹, 廖慧慧²

(1. 广州中医药大学, 广州 510405; 2. 广州中医药大学第一附属医院, 广州 510405)

【摘要】 目的 观察 NOD/SCID 小鼠动情周期及卵巢切除术后阴道涂片的变化。方法 连续观察 9 d NOD/SCID 鼠, 每日进行两次阴道涂片, 计算动情周期时间及发生率。卵巢切除后, 阴道涂片并观察阴道涂片变化。结果 NOD/SCID 小鼠动情周期为 4~6 d。有规律动情的小鼠占 80%。阴道口状态与动情周期无明显相关。卵巢切除术后, 阴道涂片呈动情后期或动情间期改变。结论 采用阴道脱落细胞涂片法可判断 NOD/SCID 雌性小鼠的动情周期及特点, NOD/SCID 雌性小鼠卵巢切除手术有效。

【关键词】 NOD/SCID 小鼠; 动情周期; 阴道涂片; 卵巢切除术

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2016)05-0526-04

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2016.05.016

Observation of the estrous cycle in female NOD/SCID mice

ZHEN Yu-hua¹, SONG Yang^{1*}, GUAN Yong-ge², LI Kun-yin¹, Hu Guang-yun¹, LIAO Hui-hui²

(1. Guangzhou University of TCM, Guangzhou 510405, China;

2. The First Affiliated Hospital, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405)

【Abstract】 Objective To observe the changes in estrous cycle and vaginal smears in ovariectomized NOD/SCID mice. **Methods** To continuously observe the estrous cycle time by vaginal smears of NOD/SCID mice in consecutive nine days, twice daily. After ovariectomy, the changes of estrous cycle were observed by vaginal smears for 7 days. **Results** The estrous cycle in NOD/SCID mice was 4-6 days. Regular estrous mice accounted for 80%. There was no significant correlation between vaginal opening and estrous cycle status. After ovariectomy, the vaginal smears showed characteristics of metestrus or diestrus. **Conclusions** Vaginal smear cytology can be used to determine the estrous cycle and characteristics of NOD/SCID female mice. The ovariectomized operation of NOD/SCID female mice is effective.

【Key words】 NOD / SCID mice; Estrous cycle; Vaginal smear; Ovariectomy

Corresponding author: SONG Yang. E-mail: fau20@126.com

非肥胖糖尿病/严重联合免疫缺陷(NOD/SCID)小鼠是非肥胖糖尿病小鼠NOD/Lt与SCID小鼠杂交而成的免疫缺陷小鼠^[1],该小鼠除了具有先天缺陷的特点,还缺乏T细胞、B细胞和NK细胞,免疫渗漏不到10%,目前广泛应用于糖尿病、白血病、肿瘤等疾病的研究^[2,3]。目前已经有文献报道关于KM小鼠、ICR小鼠等动情周期情况,NOD/SCID雌性小鼠动情周期特点尚未有文献报道。对于小鼠动情周期的判断,文献报道有宫颈粘液结晶法、阴道脱落细胞法、角化细胞计数法几种^[4]。本

研究主要采用阴道脱落细胞法研究NOD/SCID小鼠的动情周期及卵巢去势后阴道涂片变化,为今后利用该品系生物学方面的研究提供借鉴。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

雌性SPF级NOD/SCID小鼠15只,6周龄,体重17.9~20.4g,平均(19.4±0.63)g,由北京维通利华实验动物技术有限公司提供【SCXK(京)2012

[基金项目]广东省自然科学基金(2014A030313401)。

[作者简介]甄玉花(1987-),女,博士研究生,主要从事补肾活血法治疗妇科肿瘤及月经病的研究。Email: drzhenyuhua@163.com

[通讯作者]宋阳,男,博士,教授,主要从事促进女性生殖健康等方面的研究。Email: fau20@126.com

-0001】。适应性饲养一周,每笼 5 只,温度 26℃,湿度 60%~70%,12 h 明暗交替,实验期间自由饮用蒸馏水。实验在广州中医药大学实验动物中心的 SPF 级实验室内进行【SYXK(粤)2013-0001】。

1.1.2 器材和试剂

光学倒置显微镜(Olympus IX-71,日本),显微镜载玻片(江苏世泰实验器材有限公司,中国),1%亚甲基蓝染色液(北京雷根生物技术有限公司,中国),氢氧化钾(天津市瑞金特化学品有限公司,中国),水合氯醛(Ceres Chemical),氨基甲酸乙酯(Maya Reagent),多聚甲醛(北京雷根生物技术有限公司,中国),生理盐水(贵州天地药业有限责任公司,中国)。

1.2 方法

1.2.1 阴道涂片

第 1~9 天阴道涂片,每日 2 次(8:00-9:00,16:00-17:00)。进行阴道涂片前,将阴道口状态进行记录。用拇指和食指固定小鼠背部皮肤,将小鼠握于掌心,无名指和小指固定尾根,暴露阴道口。用沾有生理盐水的细轴棉棒缓慢插入小鼠阴道,轻轻旋转一周,将棉棒抽出,将粘液均匀涂抹在载玻片上。玻片晾干后,用 4% 的多聚甲醛固定 30 min。

1.2.2 卵巢切除术

第 10 天行卵巢切除术,过程如下:以水合氯醛(5%) + 氨基甲酸乙酯(10%)腹腔注射麻醉,俯卧位,固定双后肢。从后肢前缘 1 cm 正中处做一长约 1 cm 横切口,正中左侧旁开 1 cm 逐层钝性分离,进入腹腔,眼科镊轻夹白色脂肪团,缓慢拉出切口外,轻轻分离脂肪团,可见到鲜红色或淡红色椭圆形小米粒大小卵巢组织。眼科镊钝性分离穿过子宫角下方组织,注意避开血管,3-0 丝线结扎子宫角处,再结扎卵巢周围脂肪,眼科剪摘除卵巢,将脂肪垫和子宫送回腹腔。同法处理右侧卵巢,缝合皮肤。术后每日阴道涂片 2 次,持续 7 d。

1.2.3 美兰染色液的配制

亚甲基蓝溶液(1%) 60 mL,加入 95% 乙醇 30 mL,加入 0.01 g KOH,加蒸馏水 10 mL,混合均匀。

1.2.4 阴道涂片染色

将固定后的阴道涂片载玻片放在玻片架上,放入美兰染色液中进行染色,10 min 后,取出载玻片,用蒸馏水冲洗玻片缓慢冲洗边缘,晾干后,显微镜观察(左,×40,右×200),拍照。

2 结果

2.1 NOD/SCID 小鼠动情周期情况

大量文献资料总结^[5],采用阴道脱落细胞法,

小鼠不同动情周期阴道涂片的变化如下:动情前期,大量椭圆形有核上皮细胞少量白细胞(图 1A,B);动情期,大量无核角化上皮细胞(图 1C,D);动情后期,无核角化上皮细胞、椭圆形有核细胞、白细胞同时存在(图 1E,F);动情间期:大量白细胞,少量有核上皮细胞(图 1G,H)。据此,判断 NOD/SCID 小鼠的各个动情阶段的阴道涂片。NOD/SCID 小鼠动情周期为 4~6 d,6 只鼠观察到 1 次动情,占 40%;6 只鼠观察到 2 次动情,占 40%。小鼠发生规律动情的有 12 只,占 80%。在动情期持续时间方面,由于本实验每日进行两次阴道涂片,每日两次均见到动情期变化的有 4 次,时间大约 7~8 h 左右。见图 1。

2.2 NOD/SCID 小鼠外阴变化

文献报道^[6],ICR 小鼠随动情周期变化,阴门口颜色呈明显变化,动情期阴门口为红色,皱襞明显肿胀。NOD/SCID 小鼠阴门口颜色一般呈粉色,未见明显阴门皱襞变化,阴道口呈现开或闭合的状态。将阴道口状态与动情周期进行对比,赋值如下:阴道口闭合为 0,张开为 1;动情间期为 0,动情前期为 1,动情期为 2,动情后期为 3。进行 Spearman 相关分析, $P=0.085$,二者无明显相关。

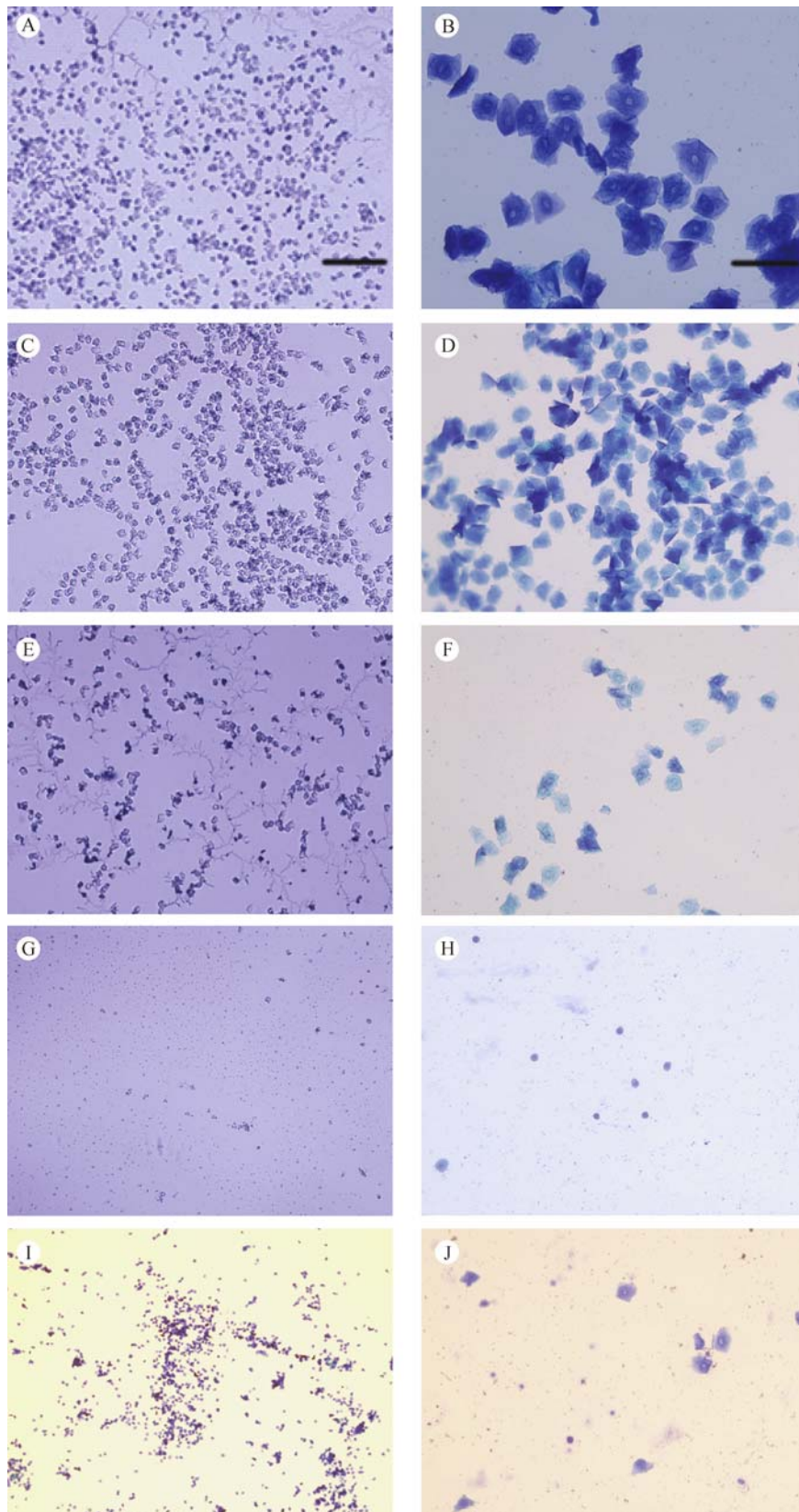
2.3 卵巢切除术后阴道涂片变化

卵巢切除术后 1~3 d,阴道涂片呈动情后期或动情间期状态。卵巢切除术后 3 d:大量白细胞,少量有核上皮细胞(图 1I,J)。卵巢切除术后 3~7 d,阴道涂片呈连续动情间期状态。以此证明,卵巢切除手术有效。

3 讨论

本实验系统研究 NOD/SCID 雌性小鼠的动情周期,并且观察卵巢切除术后的阴道涂片。文献指出^[6],手术应激对小鼠动情周期的时间、各期持续时间无明显影响,且 NOD/SCID 小鼠价格昂贵,故本实验未专门设立正常对照组和假手术组。

NOD/SCID 小鼠 2~3 周龄离乳,6~7 周龄达到性成熟,一般选用 6~8 周龄用于实验研究。本实验研究结果显示,NOD/SCID 小鼠 6 周龄,17.9~20.4 g,动情周期为 4~6 d,波动范围相对较大,80% 小鼠有规律动情周期。卵巢切除术后 1~2 d,由于小鼠体内残留的雌激素作用,小鼠阴道涂片出现动情后期状态。随时间推移,体内残留雌激素代谢以后,阴道涂片呈连续动情间期状态。采用阴道脱落细胞法进行动态观察,可有效判断 NOD/SCID 小鼠的动情周期。在受孕实验中,将处于动情前期或动情期的雌鼠交配,可有效提高受孕率^[7]。



注:A,B:动情前期;C,D:动情期;E,F:动情后期;G,H:动情间期;I,J:卵巢切除术后。(左侧 $\times 40$,比例尺: $\times 200 \mu\text{m}$;右侧 $\times 200$,比例尺: $\times 40 \mu\text{m}$)。

图1 NOD/SCID 小鼠不同动情周期阴道涂片

Note. A, B: Proestrus stage. C, D: Estrus stage. E, F: Metestrus stage. G, H: Diestrus stage. I, J: After ovariectomy.

Fig. 1 Vaginal smears of the NOD/SCID mice at different stages of estrous cycle. (left panel: $\times 40$; Right panel: $\times 200$)

(下转第 545 页)

