

大鼠阴道涂片两种染色方法比较

张 婷^{1,2}, 王 颖^{1,2}, 王 莉^{1*}

(1. 河北省人民医院产科, 石家庄 050000; 2. 河北北方学院研究生院, 河北 张家口 075000)

【摘要】 目的 通过对 SD 雌鼠阴道涂片进行染色, 观察细胞形态, 为确定大鼠动情周期的四个阶段寻找一种简便的染色方法。**方法** 将 20 只年龄 10~13 周, 体重 216~234 g (225 ± 6 g) 的 SD 雌鼠随机分为两组 (每组 10 只), 每天做阴道涂片连续 6 天。用湿润的棉签插入雌鼠阴道 0.5~1.0 cm 轻转 1~2 圈, 涂在滴有生理盐水的干净载玻片上, 自然风干后行快速革兰氏染色和结晶紫染色, 在光镜下区分雌鼠发情周期。**结果** 结晶紫染色将细胞核染成深紫色, 细胞质为淡紫色, 白细胞为深紫色。快速革兰氏染色将细胞核染色为紫红色, 细胞质为玫红色, 白细胞为深红色。SD 雌鼠动情周期平均为 4~5 天, 分为发情前期、发情期、发情后期和发情间期四个阶段。发情前期, 主要是有核上皮细胞; 发情期, 几乎都是无核角化细胞, 可成簇状; 发情后期, 可见大量白细胞和少量无核角化细胞; 发情间期, 白细胞, 有核细胞和无核角化细胞同时存在, 以白细胞为主。两种染色方法操作过程都比较简单, 可以区分 SD 大鼠动情周期的四个阶段, 结晶紫染色细胞形态有时会有轻微变形, 快速革兰氏染色细胞形态完整, 图像清晰, 而且无需用无水乙醇固定用时较短。**结论** 快速革兰氏染色法在不改变 SD 雌鼠生殖周期的情况下能够简单、快速的区分其动情周期的各个阶段, 在进行大样本实验时, 可以推广。

【关键词】 动情周期; 阴道涂片; 染色方法

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2018)12-0098-04

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2018.12.016

Comparison of two staining methods for rat vaginal smears

ZHANG Ting^{1,2}, WANG Ying^{1,2}, WANG Li^{1*}

(1. Hebei General Hospital, Shijiazhuang 050000, China; 2. Hebei North University, Zhangjiakou 050700)

【Abstract】 Objective To find a simple staining method to determine the four phases of the estrous cycle, vaginal smear cells from female Sprague-Dawley (SD) rats. **Methods** Twenty female SD rats were randomly divided into two groups (10 each). The inclusion criteria were age 10–13 weeks and weight 216–234 grams (mean: 225 ± 6 g). Rat vaginal smears were checked daily for 6 days. A wet cotton swab was inserted into the vaginal canal at 0.5–1.0 cm deep, gently turned once or twice, and then placed on a clean glass slide with a saline solution. After air drying, the sample was stained. Rapid Gram and crystal violet staining was performed. The staining was detected under a microscope to determine the rat estrous cycle. **Results** The cell nuclei were stained deep purple, cytoplasm was lilac, and leukocytes were deep purple in crystal violet staining. The cell nuclei were stained amaranth, cytoplasm was rose red, and leukocytes were darkly red in rapid Gram staining. The estrous cycle in female rats averaged 4–5 days. The estrous cycle is divided into different four phases: proestrus, estrus, metestrus, and diestrus. During proestrus, cells were large round, well-formed nucleated epithelial cells. During the estrus, cells were almost all large polygonal cornified squamous epithelial cells packed into clusters. During the metestrus, small and round leukocytes predominated, and nucleus-free keratinocytes were present. During the diestrus, there were three kinds of cells, mainly small leukocytes. Both crystal violet and rapid Gram staining

【基金项目】 河北省科技厅重点项目 (18397779D)。

【作者简介】 张婷 (1979—), 女, 主治医师, 硕士研究生, 专业: 妇产科。E-mail: 13032683189@163.com

【通信作者】 王莉 (1972—), 女, 主任医师, 教授, 研究方向: 子痫前期发病机制。E-mail: wangli719@126.com

could determine the four stages of the estrous cycle in female SD rats. The two staining method were simple, and the results were similar. However, the morphology of the crystal violet-stained cells was sometimes deformed slightly. The cell morphology of the rapid Gram staining method was complete, and the images were clear. Rapid Gram staining was time-efficient without fixing by absolute ethyl alcohol. **Conclusions** Vaginal smears with rapid Gram staining are a simple approach to easily and quickly determine the phases of the estrous cycle in female SD rats without changing their reproductive cycle. This method can be applied to large scale experiments.

【Keywords】 estrous cycle; vaginal smear; staining methods

大鼠的动情周期平均 4~5 d, 是一个动态过程, 一般分为四个阶段, 包括发情前期, 发情期, 发情后期和发情间期^[1-2]。大鼠动情周期可以作为衡量下丘脑-垂体-卵巢生殖轴完整性的有用指标, 确定雌鼠动情周期的阶段对选择适宜的交配时机, 评估大鼠内分泌状态都是非常重要的^[2-4]。从雌鼠的行为和外观上不能区分动情周期, 阴道脱落细胞可以评估雌鼠动情周期, 通常采用阴道涂片染色后观察细胞形态来确定这个动态过程^[5-6]。阴道涂片染色方法有很多种, McLean 等^[7]认为结晶紫染色简单易行, 可以用于区分小鼠动情周期。快速革兰氏染色主要成分为结晶紫溶液, 但是用时比结晶紫染色少, 是人类常用的阴道脱落细胞染色方法, 到目前为止还没有人将其用于大鼠阴道涂片染色, 因其操作简便, 快速, 适合进行大规模的阴道涂片检查, 本课题组用快速革兰氏染色法和结晶紫染色法对 Sprague Dawley (SD) 大鼠阴道脱落细胞进行染色, 观察细胞形态, 区分大鼠的动情周期。

1 材料和方法

1.1 实验动物

10~13 周龄雌性 SD 大鼠 20 只, 体重 216~234 g, 平均(225±6)g, 清洁级, 购自河北医科大学动物实验中心[SCXK(冀)2013-1-003]。大鼠在河北医科大学动物房饲养[SYXK(冀)2013-0026], 屏障环境, 室温:20℃~25℃, 相对湿度:45%~60%, 每日 12 h 光照, 12 h 黑暗, 普通鼠粮喂养, 饮用自来水。动物实验过程遵循 3R 原则。

1.2 主要试剂与仪器

快速革兰氏染色液购自珠海贝索生物技术有限公司, 主要成分:1 号龙胆紫液(龙胆紫和乙醇)、2 号碘溶液(碘和碘化钾)、3 号脱色液(丙酮和乙醇)、4 号沙黄溶液(沙黄和乙醇), 0.1% 龙胆紫溶液自制(称取结晶紫粉末 0.1 g, 溶于 100 mL 的双蒸水中, 搅拌均匀即可)。主要仪器为正置显微镜(ECLIPSE E100, Nikon, Japan)。

1.3 实验方法

1.3.1 制作大鼠阴道涂片

用无菌棉花和牙签的钝头制作棉签, 并用无菌生理盐水将其浸湿, 取出干净的载玻片用 5 mL 注射器滴 2~3 滴生理盐水备用。每天上午 8:00~9:00 将 20 只 SD 雌鼠从鼠笼中取出, 并将其放在笼盖上, 一只手捉住大鼠的尾巴并轻轻提起, 大鼠会用前爪抓住笼盖, 暴露阴道口, 用生理盐水湿润的无菌棉签擦拭阴道口后, 将事先准备好的棉签插入大鼠阴道内 0.5~1 cm, 轻柔旋转 1~2 圈, 将棉签均匀涂在事先准备好的干净的载玻片上的盐水中进行涂片, 每次两张, 分别做结晶紫染色和快速革兰氏染色, 连续 6 d。

1.3.2 阴道涂片染色方法

(1)快速革兰氏染色:①涂片自然风干后, 用移液器将 50 μL 1 号溶液滴在载玻片上, 静置 10 s, 用蒸馏水将 1 号溶液缓慢冲洗干净;②将 50 μL 2 号溶液滴在载玻片上, 静置 10 s, 用蒸馏水将 2 号溶液缓慢冲洗干净;③将 50 μL 3 号脱色液滴在载玻片上进行脱色, 静置 10 s, 用蒸馏水将 3 号溶液缓慢冲洗干净;④将 50 μL 4 号溶液滴在载玻片上, 静置 10 s, 用蒸馏水将 4 号溶液缓慢冲洗干净, 自然风干。

(2)结晶紫染色:①涂有大鼠阴道脱落细胞的载玻片风干后用无水乙醇固定 10 min;②将 50 μL 0.1% 龙胆紫溶液滴在载玻片上, 静置 1 min;③将载玻片放入蒸馏水中水洗 1 min, 再用干净的蒸馏水冲洗 5 s, 自然风干。

1.3.3 大鼠动情周期判定标准

在 10 倍镜下观察每个涂片中的细胞形态, 依据细胞类型区分 SD 大鼠动情周期。首先评估白细胞的存在, 发情间期和发情后期的一个显著特征是白细胞大量存在, 如果白细胞难以观察到, 则该阶段是发情前期或发情期^[1]。发情前期平均持续 14 h, 这个阶段存在有核上皮细胞和无核角化细胞, 其中圆形有核上皮细胞占主要地位^[8];发情期持续 24~48 h, 满视野可见无核角化上皮细胞;发情后期只有

6~8 h, 主要为无核角化上皮细胞和白细胞; 发情间期持续时间为 48~72 h, 这个阶段的特点是大量白细胞、少量无核角化上皮细胞(也可能没有)、大小不一有核上皮细胞^[3,8]。

2 结果

2.1 结晶紫染色

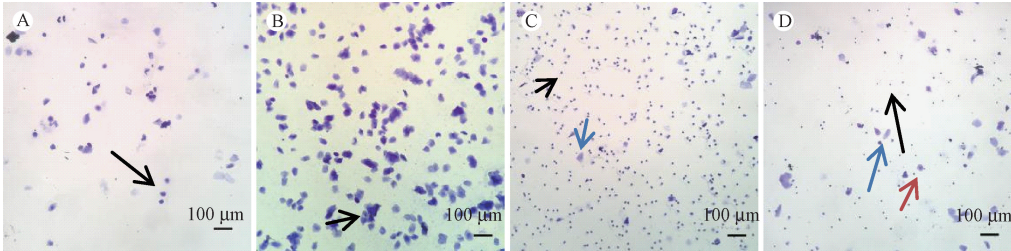
SD 大鼠性周期不同阶段阴道涂片结晶紫染色结果如下: (1) 发情前期: 涂片中主要为圆形或椭圆形有核细胞, 细胞核被染成深紫色, 细胞质呈浅紫色, 细胞膜有时欠完整, 也可见无核角化上皮细胞, 呈浅紫色(图 1A); (2) 发情期: 涂片中满视野呈现浅紫色的不规则多边形无核角化细胞(图 1B); (3) 发情后期: 可见大量白细胞和少量无核角化细胞, 白细胞小而圆, 呈深紫色, 白细胞形态有时有轻微变形(图 1C); (4) 发情间期: 涂片中主要是白细胞, 有核细胞和无核角化细胞同时存在, 无核角化细胞

和有核细胞细胞质呈浅紫色, 白细胞和有核细胞细胞核呈深紫色(图 1D)。

2.2 快速革兰氏染色

SD 大鼠性周期不同阶段阴道涂片快速革兰氏染色结果如下: (1) 发情前期: 有核细胞为圆形或椭圆形, 细胞核被染成紫红色, 细胞核轮廓清晰, 细胞质被染成玫红色, 细胞膜完整, 整体层次感明显, 易于区分, 同时存在玫红色的无核角化细胞(图 2A); (2) 发情期: 涂片中满视野为玫红色的无核角化细胞, 形态呈不规则的多边形(图 2B); (3) 发情后期: 大量白细胞和少量无核角化细胞, 白细胞为小的圆形细胞, 呈深红色, 细胞形态清晰(图 2C); (4) 发情间期: 白细胞, 有核细胞和无核角化细胞同时存在(图 2D)。

SD 大鼠阴道涂片通过结晶紫染色和快速革兰氏染色都能显示出细胞形态, 区分细胞类型, 很好的识别大鼠动情周期的阶段。结晶紫染色法用时约 12 min, 快速革兰氏染色法用时小于 1 min。

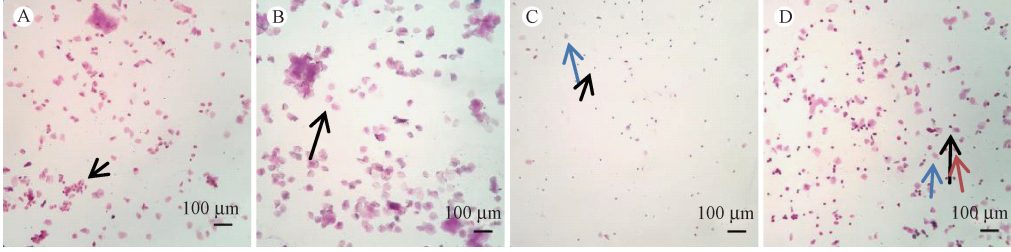


注: A: 发情前期; B: 发情期; C: 发情后期; D: 发情间期。图 A 黑色箭头和图 D 红色箭头所指是有核细胞, 细胞核染成深紫色, 细胞质染成浅紫色。图 B 黑色箭头和图 D 蓝色箭头所指是无核角化细胞。图 C 和图 D 黑色箭头所指是白细胞。

图 1 阴道涂片结晶紫染色结果(×10)

Note. Vaginal smears with crystal violet staining at various phases of the estrous cycle (A–D). Proestrus (A), estrus (B), metestrus (C), and diestrus (D). Black arrowhead in A and red arrowhead in D indicate nucleated epithelial cells. The nucleus was stained deep purple, and the cytoplasm was stained lilac. Black arrowhead in B and blue arrowheads in C and D indicate cornified squamous epithelial cells. Black arrowhead in D indicates leukocytes.

Figure 1 The results of crystal violet staining of the rat vaginal smears



注: A: 发情前期; B: 发情期; C: 发情后期; D: 发情间期。图 A 黑色箭头和图 D 红色箭头所指是有核细胞, 细胞核染成紫红色, 细胞质染成粉红色。图 B 黑色箭头和图 C 蓝色箭头所指是无核角化细胞。图 C 和图 D 黑色箭头所指是白细胞。

图 2 快速革兰氏染色结果(×10)

Note. Vaginal smears with rapid Gram staining at various phases of the estrous cycle (A–D). Proestrus (A), estrus (B), metestrus (C), and diestrus (D). Black arrowhead in A and red arrowhead in D indicate nucleated epithelial cells. The nucleus was stained amaranth, and the cytoplasm was stained rose red. Black arrowhead in B and blue arrowhead in D indicate cornified squamous epithelial cells. Black arrowhead and blue arrowhead in C indicate a leukocyte and cornified squamous epithelial cell, respectively

Figure 2 The results of rapid Gram staining of the rat vaginal smears

3 讨论

大鼠的动情周期主要通过对其大鼠阴道涂片染色后区分细胞类型来识别^[9]。苏木素-伊红(HE)染色是基本的组织染色方法,也用于细胞染色,染色结果背景清楚,细胞形态清晰,细胞核蓝染,细胞质呈粉红色,但是对染色技术要求较高,染色时间或是盐酸酒精脱色时间控制不好,染色失败率高^[10]。巴氏染色也用于阴道细胞学染色,尤其是在人类中作为筛查宫颈癌的方法(即巴氏涂片),这种染色方法提供更好的细胞核染色细节并使细胞质呈现橙色、粉红色或蓝色,便于区分细胞角化的程度,但是这种染色需要多色染料,方法复杂^[3]。大鼠动情周期的确定不需要这些细节水平,因此 HE 染色或是巴氏染色不适用于大鼠阴道涂片染色。大鼠阴道涂片染色常用改良吉姆萨染色、甲苯胺蓝染色、瑞氏染色、美兰染色,染色原理都是碱性染料使细胞核着色^[3,5,10],结晶紫染色、快速革兰氏染色也是利用此特点对大鼠阴道细胞进行染色。

本课题组通过对大鼠阴道涂片进行结晶紫染色和快速革兰氏染色后可以检测到 3 种细胞:有核上皮细胞,呈圆形或椭圆形,细胞质染色较轻,细胞核染色深;角化细胞染色均匀,呈多边形,没有细胞核;白细胞染色深,呈圆形,形态小,10 倍镜下不能观察到细胞核。本课题组通过染色后观察细胞形态识别大鼠动情周期各个阶段,发情前期:主要为有核细胞,也存在无核角化细胞;发情期:可见成片的无核角化细胞;发情后期:大量白细胞和少量无核角化细胞;发情间期:白细胞,有核细胞和无核角化细胞同时存在。与王洁等^[11]人通过分析阴道涂片中 3 种细胞总量区分大鼠动情周期的四个阶段结果基本一致,但是本课题组通过染色发现发情前期和发情期不存在白细胞,这与文献报道的一致^[3,7]。阴道涂片染色法与阴道涂片不染色进行细胞计数相比,染色后细胞形态更为清晰,易于区分,而且染色法区分大鼠动情周期简单、直观、节省时间,通过细胞计数后再进行统计分析较为复杂。

本实验通过对快速革兰氏染色和结晶紫染色两种方法的比较,发现这两种染色方法都能清晰的显示出有核上皮细胞、无核角化细胞和白细胞的形态,可以很好的识别 SD 大鼠动情周期的四个阶段,而且这两种方法操作简单,易于掌握。快速革兰氏染色法阴道细胞容易着色,形态清晰,色彩鲜明,层次感强烈,并且省略了无水乙醇固定的步骤,可以

直接进行染色,操作简单,用时不超过 1 min,与结晶紫染色相比(最少 12 min)节省了染色时间。与改良吉姆萨染色、甲苯胺蓝染色、瑞氏染色、美兰染色、结晶紫染色相比,快速革兰氏染色法同样可以很好的识别雌鼠的动情周期,但是用时最短。本实验为大鼠阴道涂片染色增加了一种简便、易行的方法,实验室中需要大规模的筛查大鼠动情周期时,应用快速革兰氏染色法,可以很大程度上节省时间和精力。

参考文献:

- [1] Byers SL, Wiles MV, Dunn SL, et al. Mouse estrous cycle identification tool and images [J]. PLoS One, 2012, 7(4):e35538.
- [2] Gonzalez G. Determining the stage of the estrous cycle in female mice by vaginal smear[J]. Cold Spring Harb Protoc, 2016, 2016(8):pdb.prot094474.
- [3] Cora MC, Kooistra L, Travlos G. Vaginal cytology of the laboratory rat and mouse: review and criteria for the staging of the estrous cycle using stained vaginal smears[J]. Toxicol Pathol, 2015, 43(6):776-793.
- [4] Ekambaram G, Sampath Kumar SK, Joseph LD. Comparative study on the estimation of estrous cycle in mice by visual and vaginal lavage method[J]. J Clin Diagn Res, 2017, 11(1):AC05-AC07.
- [5] Behringer R, Gertsenstein M, Nagy KV, et al. Selecting female mice in estrus and checking plugs[J]. Cold Spring Harb Protoc, 2016, 2016(8):pdb.prot092387.
- [6] 甄玉花, 宋阳, 关永格, 等. NOD/SCID 雌性小鼠动情周期的观察[J]. 中国实验动物学报, 2016, 24(05):526-528+545.
- [7] McLean AC, Valenzuela N, Fai S, et al. Performing vaginal lavage, crystal violet staining, and vaginal cytological evaluation for mouse estrous cycle staging identification[J]. J Vis Exp, 2012(67):e4389.
- [8] Grasso P, Rozhavskaia M, Reichert LE Jr. In vivo effects of human follicle-stimulating hormone-related synthetic peptide hFSH-beta-(81-95) and its subdomain hFSH-beta-(90-95) on the mouse estrous cycle[J]. Biol Reprod, 1998, 58(3):821-825.
- [9] Goldman JM, Murr AS, Cooper RL. The rodent estrous cycle: characterization of vaginal cytology and its utility in toxicological studies[J]. Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol, 2007, 80(2):84-97.
- [10] 丁玉龙, 孙莉, 李丽亚. 小鼠阴道涂片三种染色方法比较[J]. 实验动物科学, 2010, 27(01):67-69.
- [11] 王洁, 吴素慧, 尚海霞. 性成熟雌性 SD 大鼠动情周期的观察[J]. 当代医学, 2013, 19(28):25-26.

[收稿日期]2018-05-03