

张蕾,张若乾,秦秀云,等.快速革兰氏染色法对大、小鼠动情周期的鉴别[J].中国比较医学杂志,2023,33(3):45-50,74.
Zhang L, Zhang RQ, Qin XY, et al. Identification of estrous cycles in rats and mice by rapid Gram staining [J]. Chin J Comp Med, 2023, 33(3): 45-50, 74.
doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2023.03.006

快速革兰氏染色法对大、小鼠动情周期的鉴别

张蕾¹,张若乾¹,秦秀云²,李宏林¹,张建伟^{3*}

(1.山东中医药大学第一临床医学院,济南 250014;2.日照市妇幼保健院中医科,山东日照 276800;
3.山东中医药大学附属医院中西医结合生殖与遗传中心,济南 250011)

【摘要】 目的 通过快速革兰氏染色法分别对 SD 雌性大鼠、C57BL/6J 雌性小鼠进行阴道涂片染色,镜下观察细胞形态,为快速鉴别动情周期寻求简单易行的染色方法。**方法** 12 只 SD 雌性大鼠和 12 只 C57BL/6J 雌性小鼠,56~62 日龄,每天 9:00 采用阴道拭子法获得阴道涂片,干燥后进行快速革兰氏染色法,连续观察 12 d,于光镜下观察细胞形态,判断其动情周期阶段。**结果** 快速革兰氏染色法用时较短,操作简单,观察视野色彩鲜明,背景干净,绘制完整的大、小鼠动情周期变化图。**结论** 快速革兰氏染色法可简单、直观的判断大、小鼠动情周期,并优化染色步骤,对染色中出现的异常情况进行逐一分析,将每张涂片染色时间缩短至 1 min 以内,对实验新手易于掌握,可推广应用。

【关键词】 快速革兰氏染色法;动情周期;阴道涂片;SD 大鼠;C57BL/6J 小鼠

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2023) 03-0045-06

Identification of estrous cycles in rats and mice by rapid Gram staining

ZHANG Lei¹, ZHANG Ruoqian¹, QIN Xiuyun², LI Honglin¹, ZHANG Jianwei^{3*}

(1. the First Clinical Medical College of Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250014, China.
2. Department of Traditional Chinese Medicine, Rizhao Maternal and Child Health Care Hospital, Rizhao 276800.
3. Department of Gynecology, the Affiliated Hospital of Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250011)

【Abstract】 Objective To subject vaginal smears of female SD rats and C57BL/6J mice to rapid Gram staining, observe the cell morphology, and develop a simple staining method to rapidly identify the estrous cycle stage. **Methods** Vaginal smears from 12 female SD rats and 12 female C57BL/6J mice at 56~62 days of age were obtained by the vaginal swab method every day at 9:00, dried, and then subjected to rapid Gram staining for continuous observation over 12 days. Cell morphology was observed under a light microscope to determine the estrous cycle stage. **Results** Rapid Gram staining was performed quickly and simply, bright in the observation field with a clean background, and provided a complete overview of the changes in the estrous cycle of rats and mice. **Conclusions** The rapid Gram staining method can easily and intuitively judge the estrous cycle stage of rats and mice, staining steps can be optimized, abnormal conditions in the staining can be analyzed stepwise, and the staining time of each smear can be shortened to less than 1 min. The method is easy for novice experimenters to master and can be applied widely.

【Keywords】 rapid Gram staining; estrous cycle; vaginal smear; SD rats; C57BL/6J mice

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

【基金项目】 山东省自然科学基金面上项目(ZR2020MH363);国家自然科学基金青年科学基金项目(82205174);山东省中医药科技项目(2021M176)。

【作者简介】 张蕾(1994—),女,博士研究生,研究方向:中医药在生殖医学的应用。E-mail:zhangleitem@163.com

【通信作者】 张建伟(1970—),女,教授,博士生导师,研究方向:中医药在生殖医学的应用。E-mail:zhangjianwei1970@sina.com

雌性 SD 大鼠以及 C57BL/6J 小鼠是目前广泛应用于生殖系统、肿瘤、骨质疏松及衰老模型的实验动物,快速准确地鉴别雌性动物动情周期,对实验的成功和模型的鉴定至关重要。目前已有文献对 KM 小鼠、NOD/SCID 小鼠、ICR 小鼠的动情周期情况进行报道^[1],有研究者观察寒冷刺激对 C57BL/6J 雌性小鼠动情周期的变化^[2]。啮齿类动物动情周期可通过宫颈粘液结晶法、角化细胞技术、阴道脱落细胞的变化、生殖激素来判断^[3],阴道涂片法无创、简便易行,是首选方法,对阴道涂片进行 HE 染色、瑞氏染色、巴氏染色、吉姆萨染色、结晶紫染色等不同的染色方法^[4],显微镜下观察。当实验样本较多时,有学者^[5]提出快速革兰氏染色法在不改变大鼠生殖周期的情况下可快速鉴别其动情周期的各个阶段,染色鲜明,易于观察,缩短染色用时,还未有文献将其用于小鼠阴道涂片的染色,本课题组运用快速革兰氏染色法分别对 SD 大鼠和 C57BL/6J 小鼠进行了连续阴道涂片观察,现报道如下。

1 材料和方法

1.1 实验动物

SPF 级 SD 雌性大鼠 12 只,56~62 日龄,体重 200~220 g,购自浙江维通利华实验动物技术有限公司[SCXK(浙)2019-0001]。SPF 级 C57BL/6J Nifdc 雌性小鼠 12 只,56~62 日龄,体重 17~20 g,购自北京维通利华实验动物技术有限公司[SCXK(京)2021-0006],动物饲养于山东中医药大学附属医院实验动物中心[SYXK(鲁)2018-0015],屏障环境,12 h 光照/12 h 黑暗,室温 20~22℃,相对湿度 40%~60%,自由饮食,食用标准大小鼠维持饲料,检疫间适应性喂养 7 d 后转至饲养间。实验研究符合实验动物护理和使用指南的 3R 原则。实验动物方案已通过山东中医药大学附属医院实验动物管理委员会审批(2021-70)。

1.2 主要试剂与仪器

革兰氏染色液(快速法),购自珠海贝索生物技术有限公司,生产批号 0220202,产品检验报告合格,由 1 号龙胆紫液(龙胆紫、乙醇)、2 号碘溶液(碘、碘化钾)、3 号脱色液(丙酮、乙醇)、4 号沙皇溶液(品红、沙皇、乙醇)组成。普通光学显微镜(ZEISS, AxioScope. A1,德国);摄影显微镜(ZEISS, AxioVert. A1,德国)。

1.3 实验方法

1.3.1 制作阴道涂片

动物转至饲养间后,为使各鼠间区分清楚,采用耳标签法为大鼠、小鼠编号标记。连续 12 d,每日 9:00 于饲养间取样,采用阴道拭子法^[6-7],一人采样时,左手抓住大鼠尾部向上提起,大鼠前爪紧紧抓住笼子,使之呈倒挂状,充分暴露阴道口,避免尿液流入阴道,右手将蘸有 0.9% 生理盐水的医用消毒棉签插入大鼠阴道内约 0.5 cm,旋转 2~3 圈,将棉签置于盛有少量生理盐水的细管中,以免棉签干燥;若大鼠配合度差,可采取两人配合采样,一人抓取固定大鼠,使大鼠头部略低,暴露阴道口,另一人将棉签缓慢插入大鼠阴道内。待所有大鼠完成阴道取样,于操作台上准备好载玻片,载玻片上同时标记观察时间和大鼠编号,如观察第 1 天记做“1-X”,以此类推,棉签在载玻片上旋转一圈涂一均匀薄层,约 1.5 cm×2 cm 范围,待其自然风干。小鼠采样需两人配合,操作同上,小鼠阴道插入深度约 0.2 cm。每只大、小鼠阴道涂片的收集大约在同一时间进行,以减少变异性。

1.3.2 快速革兰氏染色法

按照试剂说明书操作进行优化,改良步骤如下:将干燥后的载玻片放置在载玻片板上,换用带有滴口的瓶盖,依次滴入 1 号龙胆紫液,染色范围覆盖涂片区域,静置 10 s,将玻片置于染色缸中,用较小水流洗掉,吸水纸吸干;加 2 号碘液,静置 10 s,水洗,吸干;加 3 号脱色液,静置 15 s,水洗,吸干;加 4 号沙皇溶液,静置 10 s,水洗,吸干。待玻片干燥后移到显微镜下观察。

1.3.3 阅片

首先在光学显微镜阅片,使用 5×物镜观察整张涂片,选择细胞分布均匀,染色合适的区域,进一步使用 10×物镜观察细胞形态,继续转至 20×物镜仔细观察,连接 ZEN2011(Blue version)软件进行彩色图像拍摄。由 2 名实验技术人员对每张玻片的动情周期进行盲检,遮盖载玻片标号,比对两人结果,有争议时请第 3 位实验技术人员判断,对处于过渡阶段的涂片,可通过前后涂片的对比,最终评估确定每张载玻片代表的动情周期。

2 结果

2.1 阴道涂片结果

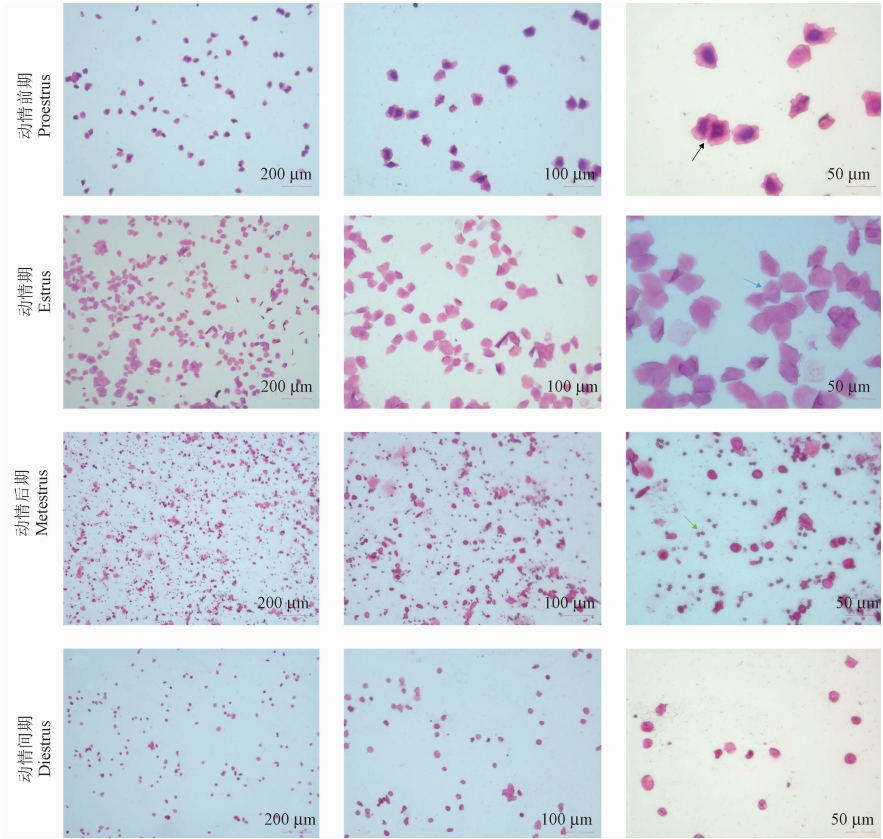
结果见表 1、图 1、图 2。动情前期:以有核的上

表 1 基于阴道涂片的大鼠阴道脱落细胞类型和细胞比例区分动情周期各阶段^[8-11]

Table 1 Types and cell proportions of vaginal exfoliated cells in rats based on vaginal smears to distinguish different stages of the estrous cycle

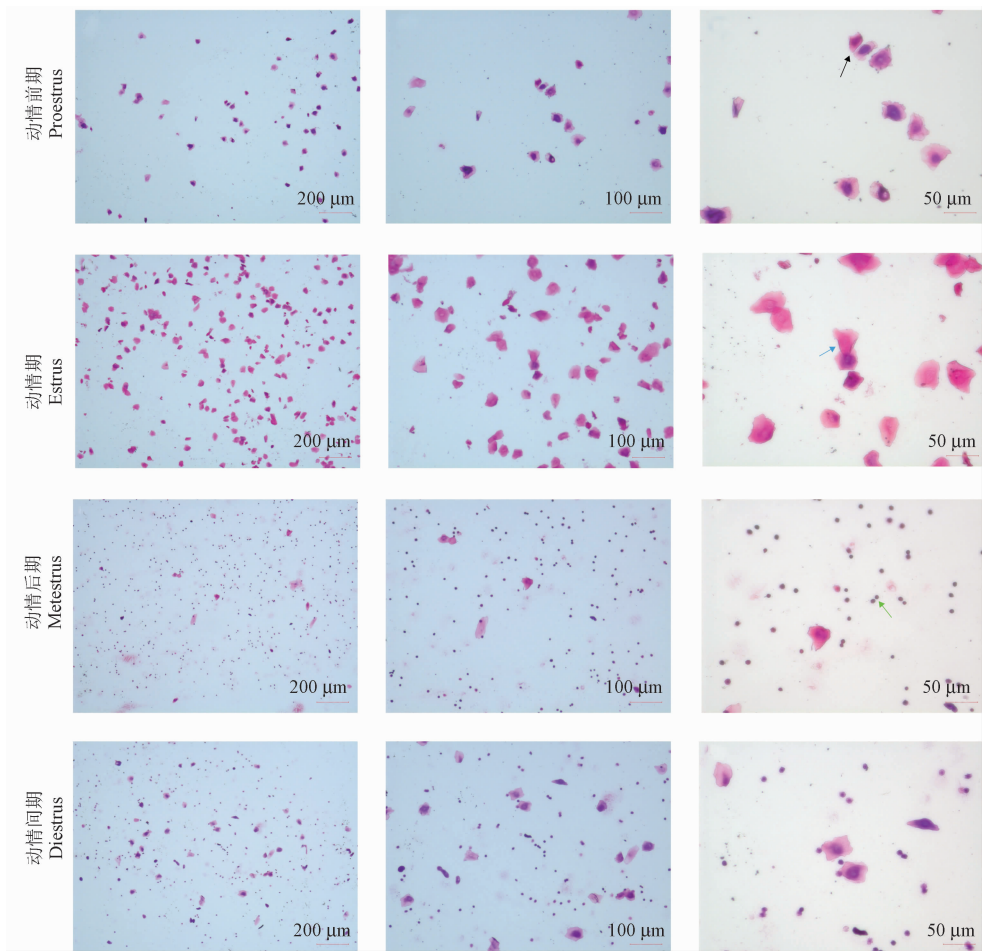
各期区分 Different period		白细胞 Leukocyte	小的有核 上皮细胞 Small nucleated epithelial cells	大的有核 上皮细胞 Large nucleated epithelial cells	角化上皮细胞 Keratinizing epithelial cells	细胞密度 Cell density	持续时间 Duration
动情前期 Proestrus		0 to +	++ to +++	0 to ++	0 to +	低度-中度 Low-moderate	小鼠<24 h Mouse<24 h 大鼠 14 h Rat 14 h
	大鼠 Rat	0 to +	0 to ++	0 to ++	++ to +++	中度-高度 Moderate-high	24~48 h
动情期 Estrus	小鼠 Mouse	0 to +	0 to +	0 to +	++ to +++	中度-高度 Moderate-high	12~48 h
	大鼠 Rat	+ to +++	+ to ++	+ to ++	+ to +++	中度-高度 Moderate-high	6~8 h
动情后期 Metestrus	小鼠 Mouse	+ to +++	0 to +	0 to +	++ to +++	中度-高度 Moderate-high	<24 h
动情间期 Diestrus		++ to +++	+ to ++	+ to ++	0 to +	低度-中度 Low-moderate	小鼠 48~72 h Mouse 48~72 h 大鼠 48~72 h Rat 48~72 h

注:0:无;+:很少;+:中等程度;+:很多。
Note. 0, None. +, Few. ++, Moderate. +++, Many.



注:黑色箭头:有核上皮细胞;蓝色箭头:无核角化细胞;绿色箭头:白细胞。
Note. Black arrowhead, Nucleated epithelial cells. Blue arrowhead, Keratinizing epithelial cells. Green arrowhead, Leukocytes.

图 1 SD 雌性大鼠动情周期
Figure 1 Female SD rat of estrous cycle



注:黑色箭头:有核上皮细胞;蓝色箭头:无核角化细胞;绿色箭头:白细胞。

图 2 C57BL/6J 雌性小鼠动情周期

Note. Black arrowhead, Nucleated epithelial cells. Blue arrowhead, Keratinizing epithelial cells. Green arrowhead, Leukocytes.

Figure 2 female C57BL/6J mouse of estrous cycle

皮细胞为主,细胞核被染成紫色,细胞质玫红色,细胞膜完整,随着动情前期向动情期转化,无核角化细胞比例越来越高。动情期:主要有玫红色无核角化细胞,形态不规则,堆积成片状,涂片细胞密度较大,充满整个视野。动情后期:主要有大量白细胞和无核角化上皮细胞,白细胞形状为圆形或椭圆形,被染成深色,在高倍镜下可进一步区分白细胞形态,白细胞自动情后期出现,在动情后期保持高度密集。动情间期:有核上皮细胞和角化细胞、白细胞 3 种细胞都有,但涂片时细胞密度一般,在动情间期的初期,仍有大量白细胞成团,随着向动情前期的转化,白细胞数量减少,可见零星分布的白细胞和上皮细胞,提示动情前期的开始。

2.2 完整动情周期观察结果

根据 3 位实验技术人员对玻片盲检判断,记录了 SD 雌性大鼠、C57BL/6J 在连续 12 d 观察期内完

整动情周期的数量和长度,以及每个完整动情周期中的动情前期、动情期、动情后期、动情间期的数量和长度,用彩色图表表示,12 只雌性大、小鼠阴道涂片观察完整动情周期变化如图 3、图 4。

2.3 染色过程异常情况及分析

快速革兰氏染色法若第一步初染紫色停留时间较长(>15 s),易出现紫色难以脱去,影响复染红色的效果,显微镜下观察到视野全是紫色(见图 5),可适当延长脱色时间,肉眼看到紫色褪去为宜;每一步水洗后用干净的吸水纸或滤纸吸去载玻片残留的水滴,不可用带毛屑的其他纸巾替代,毛屑残留,会影响镜下视野观察;取样时若不小心混入大鼠尿液,应重新取样,否则尿液污染样本,染色后尿酸结晶的存在会影响判断动情周期真实的细胞类型;媒染前仔细擦拭玻片的水渍,以免稀释碘液,影响后续步骤;若涂片时大鼠阴道分泌粘液较多,涂

	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7	D8	D9	D10	D11	D12
R1	n	c	l	l	n	c	w	l	l	n	c	l
R2	c	l	l	n	c	w	l	l	n	c	l	l
R3	c	w	l	l	n	c	w	l	l	n	c	w
R4	w	l	l	n	c	l	l	l	n	c	w	l
R5	c	w	l	l	n	c	w	l	l	n	c	l
R6	c	c	w	l	l	n	c	w	l	l	n	c
R7	w	l	l	n	c	w	l	l	l	n	c	l
R8	n	c	l	l	l	n	c	w	l	l	n	c
R9	l	l	n	c	w	l	l	n	c	w	l	n
R10	c	w	l	l	n	c	l	l	n	c	l	l
R11	l	l	n	c	w	l	l	n	c	l	l	n
R12	l	n	c	c	w	l	l	n	c	l	l	l

注:n:动情前期;c:动情期;w:动情后期;l:动情间期。

图3 SD 雌性大鼠完整动情周期变化

Note. n, Proestrus. c, Estrus. w, Metestrus. l, Diestrus.

Figure 3 Changes in the complete estrous cycle of female SD rats

	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7	D8	D9	D10	D11	D12
M1	c	w	l	l	l	n	c	w	l	l	c	w
M2	w	l	l	l	n	c	c	l	l	n	c	l
M3	c	l	l	l	n	c	w	l	l	l	n	c
M4	w	l	l	n	c	w	l	l	n	c	l	l
M5	n	c	c	l	l	n	c	w	l	l	l	n
M6	l	l	n	c	w	l	l	n	c	w	l	n
M7	n	c	w	l	l	n	c	w	l	l	l	c
M8	c	w	l	l	n	c	l	l	l	c	w	l
M9	l	l	n	c	w	l	l	l	n	c	w	l
M10	n	c	c	l	l	n	c	w	l	l	n	c
M11	c	l	l	n	c	w	l	l	n	c	l	l
M12	n	c	c	l	l	n	c	w	l	l	n	c

注:n:动情前期;c:动情期;w:动情后期;l:动情间期。

图4 C57BL/6J 雌性小鼠完整动情周期变化

Note. n, Proestrus. c, Estrus. w, Metestrus. l, Diestrus.

Figure 4 Changes in the complete estrous cycle of female C57BL/6J mice

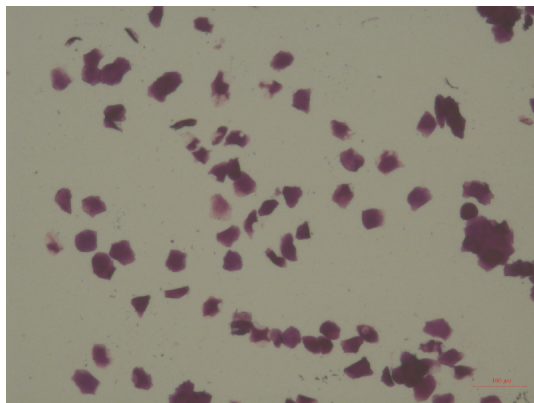


图 5 初染后脱色不足

Figure 5 Insufficient decolorization after primary dyeing

片过厚,染色后出现大量堆积的细胞团,干扰视野,可从载玻片另一侧加入 1 滴生理盐水后再固定干燥、染色。

3 讨论

阴道涂片的观察对于识别啮齿动物的动情周期至关重要,是一种可靠的鉴定方法^[12]。主要通过染色后各种细胞形态和分布特点判断,文献报道了多种染色方法,常见的 HE 染色技术成熟,用于组织染色,独具优势,但需要多步操作,对实验人员的技术要求较高,染色时间和脱色时间难以控制,新手操作困难^[13]。瑞氏染色^[14]步骤简略,但对鳞状上皮细胞角化程度区别度较小,角化上皮细胞被染成蓝紫色,细胞核被染成深蓝紫色,颜色单一。巴氏染色^[4]应用于临床宫颈癌筛查,需逐步乙醇梯度固定、水洗,操作繁琐,耗时较长,染色效果不稳定,有时候会出现角化细胞、白细胞不易染色或染色暗淡的情况。另有吉姆萨染色,耗时较长易造成背景杂乱^[4],甲苯胺蓝染色、结晶紫染色颜色单一,不便于区分。

当实验需要连续多日判断雌性大、小鼠动情周期,涂片较多时,张婷等^[5]提出,快速革兰氏染色可以简单快速识别阴道涂片中的细胞形态,将细胞核染成紫红色,细胞质为玫红色,白细胞深色,染色原理是通过碱性染料使细胞核着色,颜色分明,便于观察。先在低倍镜下观察阴道涂片中脱落细胞大体分布情况,当视野看到大量白细胞时,可判断在动情后期或间期,含有有核细胞和角化细胞的涂片分别被判断为动情前期或动情期^[15],再转至高倍镜下进一步观察细胞形态,从而鉴别处于不同动情阶段。在完整的动情周期中,动情前期是在阴道涂片

中观察到有核细胞开始,动情期结束为阴道涂片中观察到白细胞,紧接着阴道涂片中观察到有核细胞为新的动情周期开始^[16]。由于涂片需要将棉签插入大、小鼠阴道,是一种不良刺激,或造成假孕拒绝交配,本课题组每天仅进行一次检查,由于大、小鼠动情后期时间短变化快,可能存在漏检,具体动情周期各阶段持续时间可能存在一定误差,若实验对时间有严格要求,可 1 d 进行两次阴道涂片,以防漏检。

因小鼠体重轻,阴道口小,现有文献中对小鼠的阴道涂片制备有两种方法,一是阴道拭子法^[6],二是移液枪生理盐水冲洗法^[14,17],后者涂片污染少,但耗时较长,需另备 10 μ L 枪头,枪头的尖细非钝性,C57BL/6J 小鼠较为暴躁,如遇小鼠抵抗,枪头尖端在小鼠阴道吹打会损伤小鼠阴道,因此本课题组尝试了多种不同规格的医用消毒棉签,最终选用耳鼻喉专用医用消毒棉签,棉签轻柔极细,操作过程未见小鼠阴道出血、红肿,但同时注意,棉签插入不可过深,以防细胞混杂,操作速度需快。

综上,本课题组首次将快速革兰氏染色法应用于 C57BL/6J 雌性小鼠,该方法快速、简便,涂片层次清晰,背景干净,易于观察判断大、小鼠动情周期的变化,将染色时间缩短至 1 min,同时对涂片、固定、染色过程中的异常情况给出了解决方案,适用于长期大规模涂片观察大、小鼠动情周期,可供推广应用。

参考文献:

- [1] 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(5): 526-528, 545.
- [2] 赵海. 4℃ 暴露对雌性 C57BL/6J 小鼠一般生长情况、动情周期及子宫蛋白质组的影响研究 [D]. 兰州: 兰州大学, 2020.
- [3] 李靖,李炫诚,吴云霞. 确定小鼠动情周期的三种方法 [J]. 实验动物科学, 2007, 24(3): 62-64, 76.
- [4] 闫丽,温和,唐桂毅,等. 大鼠阴道细胞涂片不同染色方法在动情周期判定中的价值 [J]. 药物评价研究, 2020, 43(1): 72-76.
- [5] 张婷,王颖,王莉. 大鼠阴道涂片两种染色方法比较 [J]. 中国比较医学杂志, 2018, 28(12): 98-101.
- [6] Sano K, Matsuda S, Tohyama S, et al. Deep learning-based classification of the mouse estrous cycle stages [J]. Sci Rep, 2020, 10(1): 11714.
- [7] 孙敬方. 动物实验方法学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2001.

(下转第 74 页)