两种大鼠受孕方法及两种判断受孕方法比较*

毕晓洁，李 兴，杨国珍，潘 卫**
（贵阳医学院 医学检验系，贵州 贵阳 550004）

［摘 要］**目的**：探讨提高实验大鼠受孕率的方法及准确判断大鼠受孕的检测方法。**方法**：24 只 SD 雌鼠随机分为性周期筛选合笼组（筛选组）和延长时间合笼组（延长时间组），筛选组雌鼠根据阴道涂片于发情前期与雄鼠合笼 2 d，延长时间组雌鼠直接与雄鼠合笼 10 d，采用阴道精子检查法和阴道精子合并角化上皮检查法判断合笼后雌鼠是否受孕，以分娩作为受孕成功的标准，观察两组受孕率，并比较两种判断受孕的方法。**结果**：筛选组受孕率（91.67%）高于延长时间合笼组（50.00%），差异具有统计学意义（$P<0.05$）；延长时间组第 1～5 天受孕率（41.67%）高于第 6～10 天（14.28%），差异不具有统计学意义（$P>0.05$）；阴道精子检查法和阴道精子合并角化上皮检查法的假阴性率分别为 0 和 11.76%，假阳性率分别为 14.29% 和 0。**结论**：性周期筛选合笼法对雌鼠受孕率高于延长时间合笼法，阴道涂片法判断雌鼠受孕需结合雌鼠性周期推算。

［关键词］阴道涂片；受孕率；判断方法；大鼠
［中图分类号］R446.9 ［文献标识码］A ［文章编号］1000-2707（2012）06-0608-03

Raising the Pregnant Rate of Rats and Comparison of Methods for Inspecting Pregnant Rats

BI Xiaojie, LI Xing, YANG Guozhen, PAN Wei
(*Department of Laboratory Medicine, Guiyang Medical College, Guiyang 550004, Guizhou, China*)

［**Abstract**］**Objective**: To investigate the method for increasing pregnant rate of rats, and to explore the methods for judging pregnant rats. **Methods**: Twenty-four female rats were randomly divided into 2 groups: screening sexual cycle for copulating group (screening group) and prolonging time for copulating group (prolonging time group). Rats in screening group copulated with male rats for two days in proestrus stage and their sexual cycle was detected with vaginal smear. Rats in prolonging time group copulated with male rats for 10 days directly. Whether female rats were pregnant was judged by 2 methods: vaginal sperm examination method and vaginal sperm combined with cuticular epithelium examination method. Delivery served as judging pregnancy standards. Pregnant rates of rats in screening group and in prolonging time group in the 1st to 5th days and in the 6th to 10th days were observed. Two judgmental methods were compared. **Results**: There was significant difference in rat pregnant rates ($P<0.05$) between screening group (91.67%) and prolonging time group (50.00%). The pregnant rates in prolonging time group in 1～5 days (41.67%) were higher than 6～10 days (14.28%), but the difference was not obvious ($P>0.05$). The false negative rates of vaginal sperm examination method and vaginal sperm combined with cuticular epithelium examination group were 0 and 11.76%, and the false positive rates of them were 14.29% and 0. **Conclusions**: Screening sexual cycle with vaginal smear method in improving pregnant rate is better than prolonging time method. Vaginal smear combined with screening sexual cycle helps to judging pregnant rats accurately.

［**Key words**］vaginal smear; pregnant rate; judgmental method; rats

*［基金项目］贵州省科学技术厅科研基金资助项目［黔科合 J 字（2011）2275 号］，国家级教学团队资助项目［教高函（2009）18 号］。
**通信作者 E-mail：pw_6602@sina.com

大鼠以妊娠期短、产仔多等优点被广泛应用于生殖毒性实验，其受孕率的提高及受孕情况的判断是影响实验进度的关键因素。提高大鼠受孕率的方法有延长时间合笼法、性周期筛选法和“超数排卵”[1]法，“超数排卵”法存在受精卵质量差、产仔成活率低[2]等缺点，妊娠晚期及哺乳期实验多采用延长时间合笼或性周期筛选的方法提高受孕率。目前判断雌鼠受孕的方法主要有阴栓检查法[3]、阴道精子检查法、阴道精子合并角化上皮检查法，阴栓检查法直观，但易受操作者经验的影响[4]；阴道精子检查法、阴道精子合并角化上皮检查法适用于初学者。目前，国内对提高受孕率及判断受孕方法的研究报道甚少，本研究以性成熟 SD 雌性大鼠为实验材料，采用延长时间合笼和性周期筛选合笼方法，比较两组大鼠的受孕率，同时选择准确、便捷的方法来判断大鼠受孕情况。

1　材料与方法

1.1　实验动物及分组

SD 雌性大鼠 24 只，体重(220 ± 10) g，SD 雄性大鼠 12 只，体重(280 ± 20) g，由贵阳医学院动物中心提供[合格证号 scxk(黔)2002 - 0001]。24 只雌性 SD 大鼠以及 12 只雄性 SD 大鼠，随机分为延长时间合笼组及性周期筛选合笼组，每组雌鼠 12 只，雄鼠 6 只。

1.2　方法

1.2.1　延长时间合笼组　按雌∶雄 = 2∶1 比例，合笼 10 d(即大鼠两个性周期)，自合笼第 2 天起，每天上午 8∶00 开始进行阴道涂片观察，并描述、记录涂片内容，以雌鼠分娩确定受孕成功，观察合笼第 1 ~ 5 天与合笼第 6 ~ 10 天受孕率(合笼第 1 ~ 5 天受孕率 = 合笼第 1 ~ 5 天孕鼠数/各组雌鼠总数，合笼第 6 ~ 10 天受孕率 = 合笼第 6 ~ 10 天孕鼠数/(各组雌鼠总数 - 合笼第 1 ~ 5 天孕鼠数))。

1.2.2　性周期筛选合笼组　通过阴道涂片显微镜检(10 × 10)，发现大量椭圆形有核上皮细胞即判断发情前期[5]，将处于发情前期的雌鼠按照雌∶雄 = 2∶1 比例合笼 2 d，自合笼第 2 天起，每天上午 8∶00 开始进行阴道涂片观察，并描述、记录涂片内容，以雌鼠分娩确定受孕成功。

1.3　孕鼠鉴定方法

1.3.1　阴道精子检查法　对合笼后大鼠进行阴道涂片，光学显微镜 100 倍下检查，发现长条形，头端稍膨大、呈镰刀状的精子者判断为阳性，未见精子为阴性。

1.3.2　阴道精子合并角化上皮检查法　对合笼后大鼠进行阴道涂片，光学显微镜 100 倍下检查，发现大量落叶状成堆分布的角化上皮细胞夹有精子者判断为阳性，未见精子或角化上皮为阴性。

1.4　统计方法

应用 SPSS 统计软件进行 χ^2 检验，差异显著性设为 $\alpha = 0.05$。

2　结果

2.1　受孕率

对合笼后雌鼠进行长期阴道涂片，以涂片见精子确定交配日期，以分娩作为受孕成功的标准，比较延长时间合笼组和筛选组大鼠的受孕率。在延长时间合笼组中，合笼第 1 ~ 5 天受孕率(41.67%)高于合笼第 6 ~ 10 天(14.28%)，差异不具有统计学意义($P > 0.05$)。见表 1。

表 1　两组雌鼠受孕率比较

Tab. 1　The pregnant rates of female rats in each group

指标	延长时间合笼组	筛选合笼组
实验雌鼠	12	12
受孕雌鼠	6	11
受孕率(%)	50.00	91.67(1)

注：(1) 与延长时间合笼组比较，$P < 0.05$。

2.2　两种判断受孕方法比较

对 24 只合笼后雌鼠同时采用阴道精子检查法、阴道精子合并角化上皮检查法判断其受孕情况，以分娩作为受孕成功的标准，实验末期仅有 17 只雌鼠分娩，两种方法假阴性率分别为 0 和 11.76%，假阳性率分别为 14.29% 和 0，见表 2。

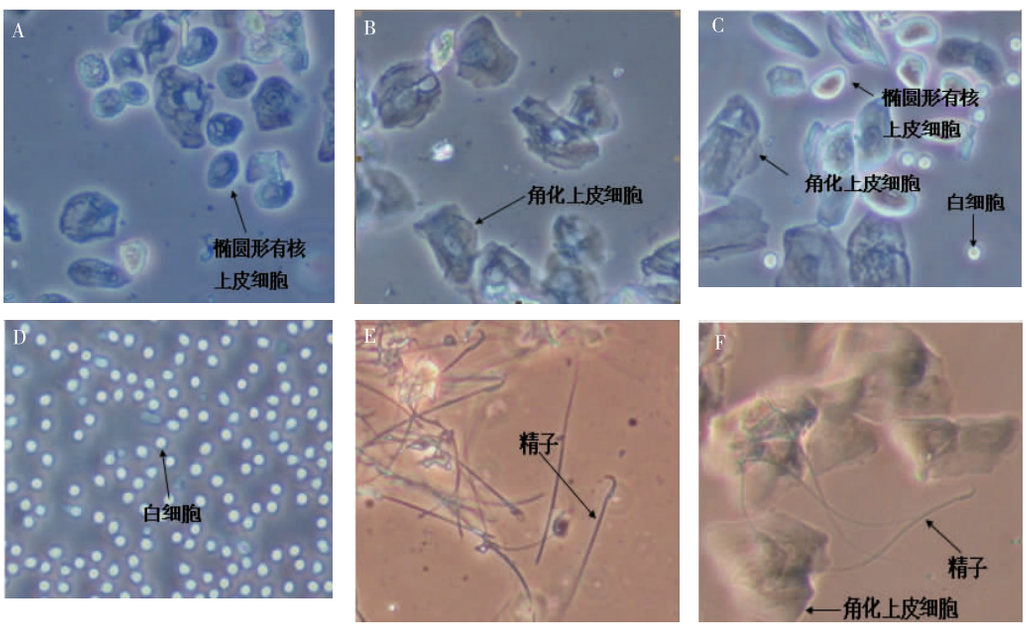
表 2　两种孕鼠判断方法的比较

Tab. 2　Comparison between the two methods in judging pregnant rates

指标	方法	
	阴道精子	阴道精子及角化上皮
孕鼠数	18	15
分娩孕鼠	17	17
假阴性(%)	0	11.76
假阳性(%)	14.29	0

2.3　阴道涂片检查

见图 1。发情前期可见大量椭圆形有核上皮细胞，发情期可见堆状排列的角化上皮细胞，发情后期可见角化上皮细胞、白细胞及有核上皮细胞，发情间期可见满视野白细胞。



注：A 为发情前期，B 为发情期，C 为发情后期，D 为发情间期，E 为精子，H 为精子合并角化上皮。

图 1　阴道涂片（×100）

Fig. 1　Vaginal Smear

3　讨论

SD 大鼠发情具有多发性、周期性的规律，其周期为 4 ~ 5 d。根据阴道上皮细胞的变化情况，将发情周期分为发情前期、发情期、发情间期和发情后期。SD 大鼠发情行为高峰和排卵高峰出现于发情前期向发情期过渡的阶段[2]，只有此时合笼大鼠才有可能受孕。本研究通过阴道涂片掌握性周期筛选合笼组大鼠发情、排卵规律，其受孕率明显高于延长时间合笼组。在生殖研究中，多采用性周期筛选合笼法，在发情期合笼，但是，由于发情前期和发情期持续时间均小于 24 h，一天一次的阴道涂片未必都能观察到典型的发情期表现，考虑到大鼠发情行为和排卵高峰出现的时间，本实验采用发情前期合笼，避免因阴道涂片时间的限制而错过大鼠排卵高峰，影响受孕率。

性周期筛选合笼法能够显著提高雌鼠受孕率，但对于动物繁殖中心，由于其动物量大，将每只雌鼠进行阴道涂片工作量大、可行性差。结果显示，连续合笼两个性周期（10 d），第二个性周期（合笼第 6 ~ 10 d）的受孕率虽低于第一个性周期（合笼第 1 ~ 5 d），但差异不具有统计学意义，建议动物繁殖中心使用延长时间合笼法，从而提高大鼠受孕率。

对于需要确切知道大鼠妊娠时间的实验研究，其受孕时间的确定十分重要。阴道精子检查法以发现精子判断受孕，该方法操作简便，假阴性率低。但在实际工作中，精子的出现仅能说明该鼠交配，并不能说明该鼠受孕。本研究发现 1 例雌鼠假阳性受孕，即阴道涂片发现精子、但实验末期未见分娩（延长时间合笼组），其原因可能是雄鼠强迫处于发情间期的雌鼠与之交配，阴道内虽有精子，但雌鼠并未排卵。因此，阴道精子检查法需结合雌鼠性周期的推算，从而降低假阳性率。

当雌鼠处于发情期时，阴道涂片可见满视野堆状分布的角化上皮细胞，若堆状分布的角化上皮中夹有大量精子，说明处于发情期的雌鼠已交配，因而采用阴道精子合并角化上皮法判断雌鼠受孕情况，假阳性率低，但由于涂片时间的限制，发情期交配的雌鼠在阴道涂片时可能已经过渡至发情后期，并不是每次涂片都能见到精子合并堆状分布的角化上皮的典型表现，会出现假阴性。因此，阴道精子检查法需结合雌鼠性周期的推算，从而降低假阴性率。

（下转第 614 页）

来,过长则会使释放出来的核酸被降解。研究发现振荡时间在 5 min 并且振荡转速为 150 r/min 时,提取的白假丝酵母菌总 RNA 效果最佳。这与传统的酸洗玻璃珠相比,不仅价格便宜,且操作简单,振荡时间 5 min,就能有效破坏白假丝酵母菌孢子相和菌丝相的细胞壁,所提取的总 RNA 浓度、纯度及完整性均较液氮破壁法和超声破壁法好。使用液氮和超声法破壁提取的白假丝酵母菌酵母相和菌丝相总 RNA 的纯度不高,分析其原因是液氮易挥发,实验操作不方便,因此导致破壁时间不够;超声法需要特殊仪器,且超声时间如果不够,破壁就不充分,而超声时间过长,则总 RNA 又容易被降解,并且超声法提取的总 RNA 暴露于空气中,容易被污染。所以,液氮和超声法破壁提取的白假丝酵母菌酵母相和菌丝相总 RNA 的浓度和纯度均不如玻璃珠法高。

本研究首次采用了 RNAiso Plus 试剂联合直径为 0.55 cm 的玻璃珠法提取白假丝酵母菌孢子相和菌丝相细胞总 RNA,所得到的白假丝酵母菌无论是孢子相还是菌丝相,其总 RNA 浓度、纯度及完整性均较以往传统的液氮破壁法和超声破壁法提取的白假丝酵母菌孢子相和菌丝相细胞总 RNA 浓度、纯度更高,并且完整性也更好。因此采用 RNAiso Plus 联合直径为 0.55 cm 的玻璃珠法,用于提取白假丝酵母菌孢子相和菌丝相细胞的总 RNA,高效、简便、经济实惠,不需要特殊的实验器材,就能满足分子生物学实验的需要,值得推广。

4 参考文献

[1] Tashiro M, Murakami H, Yoshizawa S, et al. Isolation rate and susceptibilities of Candida species from blood, vascular catheter, urineand stool[J]. Kansenshogaku Zasshi, 2010(2):187 - 192.

[2] 苏惠春,程波,傅冷西,等.3 种破壁方法提取念珠菌总 RNA 效果的比较[J].中国真菌学杂志,2007(5):286 - 288.

[3] 潘琤,魏昕,刘卫红.改进 Trizol 法提取白假丝酵母菌总 RNA 初探[J].临床口腔医学杂志,2007(9):531 - 532.

[4] 苏惠春,程波,施秀明.EFG1 和 HGC1 基因在白假丝酵母菌菌丝相和酵母相的表达差异[J].中国皮肤性病学杂志,2010(4):304 - 306.

[5] 韩慧霞,王鲁,宋秋荷,等.白假丝酵母菌菌丝相全长 cDNA 文库的构建和鉴定[J].中国皮肤性病学杂志,2011(4):260 - 263.

[6] 陈雪蓉,肖敦振.白假丝酵母菌毒力因子的研究进展[J].中国妇幼保健,2007(32):4631 - 4633.

[7] Chaffin WL, Lopez-Ribot JL, Casanova M, et al. Cell wall and secreted proteins of Candida albicans: Identification, function and expression[J]. Microbiol Mol Biol Rev,2008(1):130 - 180.

(2012-08-03 收稿,2012-11-08 修回)
编辑:潘 娅

(上接第 610 页)

本研究结果显示,性周期筛选合笼法受孕率高,是复制小规模孕鼠模型的首选方法。阴道精子检查法和阴道精子合并角化上皮检查法操作简便、可行性强,但均需要结合雌鼠性周期的推算,降低其假阳性率或假阴性率,提高判断大鼠受孕情况的准确性。

4 参考文献

[1] 张春燕,刘丽均,狄敏,等.不同剂量孕马血清促性腺激素(PMSG)对未成年大鼠超数排卵效果与质量的影响[J].中国比较学杂志,2007(6):338 - 340.

[2] 张俭,伍贤进,马岚,等.BALB/c 小鼠繁殖性能的观察及分析[J].实验动物科学与管理,2006(4):1 - 4.

[3] 唐旭,殷国荣,杨建一,等.一种简便准确的小鼠妊娠诊断法—阴栓物测法[J].中国生物制品学杂志,2008(10):898.

[4] 翟青新,招霞,哈慧馨,等.小鼠的生殖特性及阴栓[J].实验动物科学,2009(2):62 - 63.

[5] 王月鹏,赵行宇,张慧峰.成年大鼠性周期阴道细胞变化探究[J].健康与生物医药,2007(17):192 - 193.

(2012-08-28 收稿,2012-10-25 修回)
编辑:潘 娅