

·论著·

## 三种评估大鼠受孕方法的比较

刘琳,张燕,杜明钰,马润玫

(昆明医科大学第一附属医院产科,云南 昆明 650032)

**摘要:**目的 比较阴栓检查法、阴道涂片法和孕中期腹部触诊法判断 SD 大鼠受孕的准确性,为高效构建 SD 孕鼠模型提供参考。方法 于 2018 年 1 月~3 月选取 50 只未生育过的雌性 SPF 级 SD 大鼠,9 只 SPF 级雄性 SD 大鼠,随机交配后分别用阴栓检查法、阴道涂片法和孕中期腹部触诊法检查大鼠受孕情况,以解剖发现子宫内存在仔鼠为受孕成功标准,比较三种方法检出大鼠受孕的成功率。结果 腹部触诊法判断大鼠受孕的成功率为 100.00%,阴道涂片法为 90.00%,阴栓检查法为 40.00%,差异有统计学意义( $P<0.05$ )。结论 孕中期腹部触诊法对确定大鼠受孕成功的准确率最高,但是需结合确定大鼠交配成功准确率较高的阴道涂片法共同判断。

**关键词:**阴栓;阴道涂片;腹部触诊;SD 大鼠

**中图分类号:**Q492.6

**文献标识码:**A

**DOI:**10.3969/j.issn.1006-1959.2019.16.017

**文章编号:**1006-1959(2019)16-0055-03

### Comparison and Analysis of Three Methods to Judge Pregnancy in Rats

LIU Lin,ZHANG Yan,DU Ming-yu,MA Run-mei

(Department of Obstetrics,the First Affiliated Hospital of Kunming Medical University,Kunming 650032, Yunnan,China)

**Abstract:**Objective To compare the accuracy of pregnancy in SD rats by comparing the method of vaginal suppository examination, vaginal smear and mid-abdominal palpation, and provide reference for the efficient construction of SD pregnant mice.Methods From January to March 2018, 50 female SPF SD rats and 9 SPF male Sprague-Dawley rats were randomly divided into two groups. The rats were randomly mated with vaginal smear, vaginal smear and mid-pregnancy. The palpation method was used to check the pregnancy condition of the rats. The sputum was found to be the standard for successful pregnancy in the uterus. The success rate of the conception of the rats was compared by three methods.Results The palpation rate of the abdomen palpation method was 100.00%, the vaginal smear method was 90.00%, and the vaginal suppository method was 40.00%,the difference was statistically significant ( $P<0.05$ ).Conclusion The palpation method in the second trimester of pregnancy has the highest accuracy in determining the success of pregnancy in rats, but it needs to be judged together with the vaginal smear method that determines the high accuracy of mating success.

**Key words:** Vaginal plug;Vaginal smear;Abdominal palpation;SD rat

大鼠体型较小,与人类遗传学较为一致,对实验条件反应较为相似,常被誉为精密的生物研究工具。其妊娠期为 19~23 d,平均 21 d<sup>[1]</sup>,排卵通常在发情后 8~10 h,发情多在夜间<sup>[2]</sup>。在动物实验中,因实验要求,常会用到孕鼠模型。目前对大鼠是否受孕的判断使用较多的主要有外部体型直接观察法、外阴及阴道分泌物观察法、阴栓检查法、阴道涂片法等。大鼠合笼交配后,雌鼠的阴道口形成一种特殊的腔栓即阴栓。阴栓是雄鼠的精液、雌鼠的阴道分泌物与阴道上皮细胞的混合物遇空气后迅速变硬形成的。但阴栓脱落较早,使用阴栓检查法判断大鼠受孕漏检率较高,目前多使用阴道涂片法,显微镜下看到精子即为交配成功。但看到阴栓和(或)精子只证明交配成功,不能证明已受孕,因存在假孕可能。为比较不同方法判断大鼠受孕成功的准确性,本实验分别采用阴栓检查法、阴道涂片法和孕中期腹部触诊

法对大鼠受孕进行判断,旨在为确定大鼠受孕提供更为准确、高效的办法。

### 1 材料与方法

**1.1 实验材料** 本实验方案已通过昆明医科大学动物实验伦理审查委员会审查同意,审批许可号为 KMMU2018032。①实验动物:于 2018 年 1 月~3 月选取 50 只未生育过的 2~3 月龄雌性 SPF 级 SD 大鼠,体重 230~300 g,9 只 SPF 级雄性 SD 大鼠,体重 280~300 g,由湖南斯莱克景达实验动物有限公司提供[实验动物许可证号:SCXK(湘)2016-0002]。②条件:室内温度 21~25℃,相对湿度 50%~60%,明暗周期为 12 h/12 h,分笼饲养,实验期间自由饮用自来水,食用标准普通柱状饲料。动物饲养设施条件为屏障设施环境[SCXK(滇)K2015-0002]。③器材与试剂:OLYMPUS CH30 型光学显微镜(日本,北京城夕科技有限公司)、洁净磨砂玻片(泰州市思齐教学仪器有限公司)、消毒棉签(河南飘安集团有限公司)、生理盐水。

**1.2 方法** 将 50 只 SD 雌鼠随机编号,于每日 17:00 合笼,合笼雌鼠与雄鼠(个数比为雌:雄=3:1)共同置于未放垫料的洁净笼具内。第 2 天 8:00,取出雄鼠继续正常喂养,休养后继续进行下一轮合笼。

**基金项目:**1.国家自然科学基金资助项目(编号:81160082);2.昆明医科大学硕士研究生创新基金(编号:2018S016)

**作者简介:**刘琳(1993.1-),女,山东济宁人,硕士研究生,主要从事围产医学研究

**通讯作者:**马润玫(1962.10-),女,云南昆明人,博士,教授,主要从事母胎医学研究工作、妊娠合并内分泌疾病

**1.2.1 阴栓观察法** 将待检查的雌鼠置于操作台上(避免尚未检查的雌鼠受其影响),轻柔安抚雌鼠,拇指和食指捏住其尾巴,其余三指轻压其后腰背部(此固定方法对于活跃的大鼠更为适合<sup>[3]</sup>)。翻起尾巴露出外阴,清理粪便后用生理盐水润湿的无菌棉签轻触阴道口,如发现有乳白或淡黄色固态栓状物即为阴栓,有阴栓者即交配成功,记为妊娠第“0”天。

**1.2.2 阴道涂片法** 合笼雌鼠行阴栓检查后,如未发现阴栓则继续行阴道涂片检查。将用生理盐水润湿的无菌棉签轻插入雌鼠阴道,在阴道口稍作停留以便雌鼠适应,然后继续轻轻进入阴道约 1.5 cm,缓慢转动 2 圈后轻柔拔出棉签,将棉签上的附着物均匀涂在载玻片上镜检(10×10)。若看到细长形、略有弯曲、头端稍膨大的精子即交配成功,记为妊娠第“0”天。

**1.2.3 孕中期腹部触诊法** 看到阴栓和(或)精子的雌鼠停止合笼,单独喂养,其余继续合笼直至观察到阴栓和(或)精子。交配成功的雌鼠于妊娠第 14 天进行孕中期腹部触诊。孕中期在双侧腹部触及多个花生米大小、质韧、可推动、成串珠状排列的组织团块即为胚胎,为受孕成功的标志。

**1.2.4 解剖检查** 将所有确定为交配成功的雌鼠于妊娠第 20 天进行解剖,检查双侧子宫,如有胎鼠存在,证实受孕成功,否则为受孕失败。

**1.3 统计学方法** 所有数据采用 SPSS 17.0 统计学软件进行处理,计数资料采用(%)表示,进行  $\chi^2$  检验,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 大鼠受孕情况** 在整个实验过程中,50 只 SD 大鼠中共有 40 只 SD 雌鼠受孕成功,另有 6 只证实交配成功但经腹部触诊及解剖证实并未受孕,而 4 只 SD 大鼠交配及受孕均未成功,经解剖后发现这 4 只大鼠双侧子宫内存在透亮积液,可能因此导致无法正常受孕。

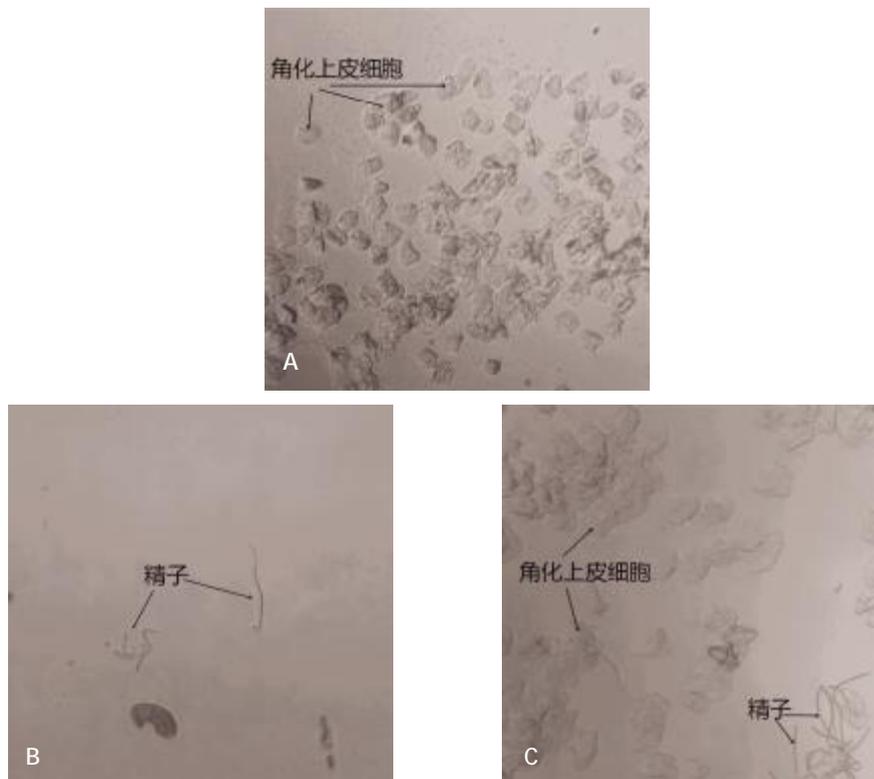
**2.2 三种方法检出情况** 阴栓检查法、阴道涂片法、腹部触诊法确定交配成功孕鼠数、解剖时见胎鼠孕鼠数、错检受孕鼠数、未检出受孕鼠数等各项指标比较,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),见表 1。

**2.3 阴道涂片检查情况** 涂片时见多量(近全视野)角化上皮细胞,当晚合笼后次日大多可见精子,可单独出现,也可伴随多量上皮细胞出现,见图 1。

**2.4 三种方法的检出率、假阳性率、假阴性率比较**

表 1 三种方法检出受孕情况比较(n)

检查方法	确定交配成功孕鼠数	解剖时见胎鼠孕鼠数	错检受孕鼠数	未检出受孕鼠数
阴栓检查法	19	16	3	24
阴道涂片法	42	36	6	4
腹部触诊法	40	40	0	0



注:A 图中为角化上皮细胞,多为发情期的特征性涂片形态;B 图中为精子;C 图中为精子和多量角化上皮细胞同时存在

图 1 大鼠阴道涂片(×100)

腹部触诊法检查大鼠受孕成功的检出率最高,为 100.00%(40/40),其次是阴道涂片法,检出率为 90.00%(36/40),阴栓检查法检出率最低,为 40.00%(16/40);三种方法假阳性率比较,腹部触诊法最低,为 0(0/40),阴栓检查法为 7.50%(3/40),阴道涂片法最高,为 15.00%(6/40);腹部触诊法检查的假阴性率最低,为 0(0/40),阴栓检查法最高,为 60.00%(24/40),阴道涂片法为 10.00%(4/40)。

### 3 讨论

在妇产科学、生殖医学及相关医学研究中,如何高效构建孕鼠模型是确保实验顺利进行的关键因素之一。目前,比较常用到的判断大鼠受孕的方法主要有四种:外部体型直接观察法、外阴及阴道分泌物观察法、阴栓检查法、阴道涂片法。但因实验环境和饲养条件不同,不同大鼠受孕后外部体型可能各有不同,且受不同实验者主观性影响,外部体型直接观察法、外阴及阴道分泌物观察法对判断大鼠是否受孕准确性不高。本实验主要对其中的阴栓检查法、阴道涂片法以及实验中观察分析得到的腹部触诊法做出研究。

大鼠性周期为 4~5 d,典型的 4 d 性周期分为发情前期、发情期、发情后期和间情期。大鼠排卵通常在发情后 8~10 h,发情多在夜间。刘晓宇等<sup>[4]</sup>研究显示,大鼠阴部外观及阴道分泌物与动情周期有一定关系。在做阴道涂片的同时观察阴部外观及阴道分泌物的性质。随着周期的变化,阴部可见红肿充血,阴道分泌物时而干燥,时而呈拉丝状。但与涂片对比,外阴及阴道分泌物观察法不具有特异性,不宜采用此法进行大鼠受孕的判断。发现阴栓和(或)精子是确定大鼠交配成功的标志,并不能保证受孕成功。因此,找到一种判断大鼠受孕成功准确性相对较高的方法非常重要。

阴栓一般在交配后 12~24 h 自动脱落<sup>[2]</sup>。本实验过程中阴栓检查法判断大鼠受孕成功的检出率最低,原因可能与无法准确了解大鼠交配时间且阴栓易脱落有关。阴栓检查虽然直观可信,但实际上阴栓有无的判定往往很困难,观察的时间过早,可能还没有形成栓,观察的时间过晚,阴栓可能已经液化或者脱落<sup>[2]</sup>,也可能被雌鼠清除<sup>[6]</sup>。因此,单纯通过检查阴栓确定大鼠受孕成功的结论缺乏严谨性。

阴道涂片法对于孕早期判断大鼠受孕具有重要意义,受孕大鼠中多数在涂片中可发现细长形、略有弯曲、头端稍膨大的精子,但是假阳性率较高,说明看到精子存在只能证实交配成功,并不能证实受孕成功。原因可能是雌鼠在交配时并非处于动情期,

由强壮的雄鼠强迫与其受孕,因此未能排卵,精卵结合不成功导致受孕失败<sup>[7]</sup>,也可因环境等因素导致<sup>[8]</sup>。另外,动物的繁殖高峰期春季,本实验于夏季进行,且与其他实验所用大鼠共同饲养于动物房,季节变化及同类影响因素均需予以考虑。降低假阳性率的方法可采用孕中期腹部触诊法,一般于磁鼠妊娠第 14 天进行检查,若早于此时期,因胚胎较小及母鼠可能出现的子宫积液的干扰,无法直观准确判断是否受孕成功;若晚于此时期,有些未成功受孕的大鼠则无法提前筛选出,造成实验周期的延长。孕中期触诊可触及仔鼠大小及轮廓,判断准确率极高,假阴及假阳性率皆为三种方法中最低。

在本次实验中,经阴道涂片发现,若将当天涂片中为多量(近全视野)角化上皮细胞的雌鼠当晚合笼,次日涂片多可见精子,精子可单独出现,也可伴随多量角化上皮细胞出现。由此可见,多量上皮细胞是雌鼠发情的特异性标志,此时合笼可提高受孕率。多量上皮细胞的出现天数是否与发情天数准确相符,可进行进一步研究。

综上所述,阴道涂片法和孕中期腹部触诊法联合应用于孕中期即可证实雌鼠是否受孕,具有准确、简便、实用等优点,可有效提高孕鼠检出率及降低假阳性受孕的发生率,对于构建孕鼠模型具有重要意义。

### 参考文献:

- [1]秦川,魏泓.实验动物学[M].北京:人民卫生出版社,2015:128-130.
- [2]贺争鸣,李根平,朱德生,等.实验动物管理与使用指南[M].北京:科学出版社,2016:131-132.
- [3]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.
- [4]刘晓宇,王娇,钱欣,等.围绝经期大鼠动情周期变化的研究[J].哈尔滨医科大学学报,2014,48(5):358-360.
- [5]于文浩,翟明胜,王亚丹,等.大鼠发情周期中子宫内肥大细胞和组织胺含量变化的观察[J].中国兽医学报,2016,36(6):1059-1064.
- [6]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.
- [7]白春霞,孙国娟,谢萍,等.两种常用染色方法在性成熟 SD 大鼠阴道涂片中的比较研究[J].中药与临床,2015,6(5):36-38.
- [8]刘莹娟,陈森,巴音达拉·夏格德尔,等.应用短时交配法建立大鼠妊娠模型的效果评价[J].毒理学杂志,2014,28(4):307-309.

收稿日期:2019-5-20;修回日期:2019-5-30

编辑/成森