

本文引用:肖小芹,汤婉婷,成绍武,邓桂明.小鼠阴道涂片技术及其染色方法的研究[J].湖南中医药大学学报,2018,38(4):376-378.

小鼠阴道涂片技术及其染色方法的研究

肖小芹¹,汤婉婷¹,成绍武¹,邓桂明^{2*}

(1.湖南中医药大学,湖南长沙410208;2.湖南中医药大学第一附属医院,湖南长沙410007)

[摘要] **目的** 比较研究棉签法、生理盐水冲洗法进行阴道涂片,HE染色法、瑞氏染色法、巴氏染色法染色对C57BL/6小鼠阴道涂片细胞组织染色的效果,为小鼠动情周期的确定寻找便捷、有效的检验方法。**方法** 对10只C57BL/6雌性小鼠分两笼饲养,每日10:00用棉签法、生理盐水法进行阴道涂片,连续15d,并使用HE染色法、瑞氏染色法、巴氏染色法,观察记录。**结果** 连续实验生理盐水法优于棉签法,HE染色染料易于获得;瑞氏染色分型清楚,染色佳;巴氏染色形态清晰,分色明显,透明度好。**结论** 大样本旨在判断动情周期的发生与改变实验应采用瑞氏染色法,可辅以巴氏染色以增强实验动物数据资料的可靠性。

[关键词] C57BL/6;动情周期;阴道涂片;HE染色;瑞氏染色;巴氏染色

[中图分类号] R34 **[文献标志码]** A **[文章编号]** doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2018.04.003

Study of Vaginal Smear and Staining Methods of Mice

XIAO Xiaoqin¹, TANG Wanting¹, CHENG Shaowu¹, DENG Guiming^{2*}

(1. Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China; 2. The First Affiliated Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410007, China)

[Abstract] **Objective** To compare the staining effect of HE staining, Wright staining and Pap staining on the cell smear of C57BL/6 mice, and to find a relatively simple and effective staining method for identification of estrous cycle. **Methods** The 10 female C57BL/6 mice were taken vaginal smear at 10:00 every morning, with the course of 15 days. The results were analyzed by HE staining, Wright staining and Papanicolaou staining methods. **Results** The normal saline method was better than swab method. HE staining method was simple and easy. Wright staining method was clear with obvious color separation. Papanicolaou staining was with good diaphaneity. **Conclusion** The Wright staining method is firstly selected in large sample examination of mice vaginal smear for estimating the development of estrous cycle. The reliability of experimental information can be supplemented by Papanicolaou staining method.

[Keywords] C57BL/6; estrous cycle; vaginal smear; HE staining; Wright staining; Papanicolaou staining

小鼠作为常用的实验动物之一,雌性小鼠广泛应用于生殖系统相关疾病研究^[1]。小鼠动情周期的变化是评价生殖系统功能的一项重要指标,其性周期一般为4~6d,可依据动物的性表现及生殖器官变化将动情周期分为动情前期、动情期、动情后期及动间期^[2]。小鼠生殖及内分泌系统随性周期发

生一系列组织、生理学变化,进而体现在阴道细胞形态及比重的改变,因而,阴道涂片可简便快捷的体现动情周期而成为目前常用的判定小鼠性周期的方法之一^[3]。但C57BL/6成年雌鼠体质量较小,性情较为暴躁,现有文献所述阴道涂片技术实际操作中存在一定问题,文献记载染色方法缺乏直观对

[收稿日期] 2018-01-07

[基金项目] 湖南省中医科研计划重点项目(201815);湖南省教育厅项目(17C1219)。

[作者简介] 肖小芹,男,博士,教授,研究方向:中西医结合基础研究。

[通讯作者] * 邓桂明,女,博士,副主任药师,E-mail:guimingd1004@163.com。

比,本试验对 C57BL/6 小鼠阴道涂片方法进行优化,并对常用的三种染色方法进行比较研究,旨在建立快速、简单、可靠的阴道涂片方法。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 实验动物 选取 54~58 日龄,体质量 18~20 g,性成熟的 C57BL/6 雌鼠 10 只,SPF 级,由湖南斯莱克景达实验动物有限公司提供(实验单位使用许可证编号:SYXK(湘)2013-0005;许可证号:SCXK(湘)2016-0002)。

1.1.2 饲养条件 室内温度为 23~27 ℃,相对湿度为 45%~55%,明暗周期为 12/12 h,分两笼饲养,试验期间自由饮用灭菌纯化水(灭菌方法:经 121 ℃ 灭菌 30 min,有效期 14 d),食用标准普通维持饲料。

1.1.3 器材与试剂 OLYMPUS CH30 型光学显微镜(北京城夕科技有限公司)。灭菌牙签,无菌脱脂棉球,10 μL 移液枪、10 μL Tip 头、玻片(载玻片、盖玻片)、医用生理盐水。Ehrlich 苏木素液^[4](将苏木素 2 g 溶于 100 mL 纯乙醇,再将 15 g 钾明矾溶于 100 mL 蒸馏水中,溶解后将甘油倾入混合,然后加入苏木素乙醇混合液,最后加入 10 mL 冰醋酸,充分混匀后暴露在日光下自然成熟 3 个月),伊红染液[伊红 Y(水溶)0.5~1 g,蒸馏水 99 mL 混匀],瑞氏(Wright)染液^[5](瑞氏染料粉 1 g 放入研钵内,加中性甘油 10 mL,研磨至细糊状时,慢慢加入 600 mL 甲醇,充分溶解,移至棕色瓶内 1 周后即可使用),磷酸盐缓冲液(10 g/L 磷酸二氢钾 30 mL,10 g/L 磷酸氢二钠 20 mL,蒸馏水加至 1 000 mL),巴氏染色液 Papanicolaou EA36(品牌:Solarbio,货号:G1612)。

1.2 方 法

每日 10:00 对两笼小鼠分别使用自制棉签法及生理盐水冲洗法进行阴道涂片,并进行 HE 染色、瑞氏染色及巴氏染色。

1.2.1 阴道涂片 自制棉签法^[6]:将牙签顶端尖锐处剪去,从脱脂棉球上撕取 2 cm×2 cm 大小棉絮,折叠缠绕于牙签顶端。将自制棉签于生理盐水中浸湿,插入小鼠阴道约 5 mm,顺牙签缠绕方向旋转 1 周后取出,顺牙签缠绕方向于清洁载玻片上滚动 1 周。自然干燥玻片。

生理盐水冲洗法^[6]:取 10 μL 移液枪,装 10 μL Tip 头后,吸取 10 μL 生理盐水,将枪头插入小鼠阴道约 5 mm,吹打 2~3 次后吸出 10 微升,滴至载玻片,均匀铺开至 1.5 cm×2 cm 左右,自然干燥玻片。

1.2.2 HE 染色 阴道涂片自然干燥后浸润苏木素

染液染色 5~10 min;流水冲洗;盐酸乙醇分色数秒(根据涂片染蓝色的深浅确定时间);自来水浸泡返蓝 5 min;伊红染液染色 3 min;流水冲洗;干燥,封片,镜检^[4]。

1.2.3 瑞氏染色 阴道涂片自然干燥后滴加瑞氏染剂数滴(按涂片面积大小而定),静置 1 min(如天气炎热,时间应缩短,以防止染液干涸。若染液挥发,表面趋于干燥,应即增添染液);加相当于染液 1.5 倍的磷酸盐缓冲液,与染液混匀,保持约 10 min;流水冲洗(冲洗时应将玻片平放,缓缓加水,切勿先倾去染料,否则涂片易残留染料沉淀物);干燥,封片,镜检^[7]。

1.2.4 巴氏染色 阴道涂片自然干燥后放入 95%乙醇固定 3~5 min;85%乙醇 2 min;80%乙醇 2 min;70%乙醇 2 min;流水冲洗;放入染色试剂盒内 A:苏木素染色 5 min;流水冲洗;B:蓝化液蓝化 5 min;C:G6 染液染色 5 min;入 95%乙醇分色数秒;D:EA36 染液染色 5 min;两次 95%乙醇分色各数秒;干燥,封片,镜检。(此方法在染色试剂盒附说明书基础上根据试验情况进行了优化)。

2 结 果

2.1 阴道涂片方法的选择

连续多日采集阴道涂片后,棉签组小鼠阴道口明显红肿,且操作速度相对较慢。移液枪组小鼠阴道口未见红肿,操作过程中未见阴道出血,且操作速度较快。

2.2 HE 染色

细胞核被苏木素染成蓝紫色,角化细胞、细胞浆、嗜伊红颗粒等被伊红 Y 染成不同程度的粉红色,白细胞分叶核较明显。如图 1。

2.3 瑞氏染色

细胞核被苏木素染成深蓝紫色,角化细胞、细胞浆等被染成不同程度的浅蓝紫色,白细胞分叶核较明显。如图 2。

2.4 巴氏染色

细胞核被染成深蓝色,完全角化细胞胞浆染成橘黄色,不完全角化细胞被染成不同程度的粉红色,中间层、基底层表皮细胞被染成青色、蓝色,白细胞被染成蓝色且分叶核明显,形态结构清晰。如图 3。

3 讨 论

通过取材、染色、镜检分析,就阴道涂片方法而言,移液枪生理盐水冲洗法简便、高效,涂片污染少,新手易于操作。就阴道涂片染色方法而言,HE 染色法技术成熟,染料易于获得,镜下动情间期易于辨

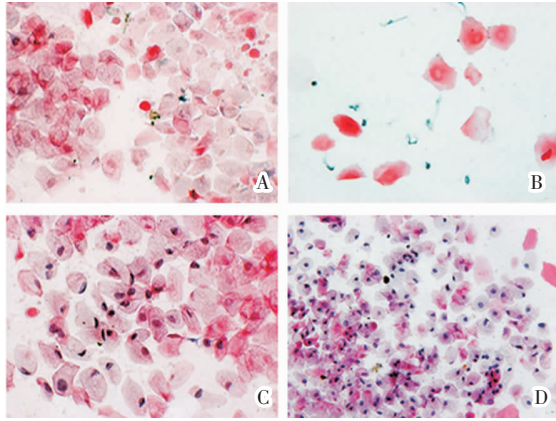


图1 HE染色结果
A.角化的上皮细胞染成粉红色,且无细胞核($\times 400$);B.角化细胞间散在白细胞,白细胞细胞核分叶明显($\times 400$);C.未完全角化的上皮细胞、中间层细胞可见核被染成蓝紫色($\times 400$);D.低倍镜下细胞边界清晰,分型清楚,染色佳($\times 100$)

图1 HE染色结果

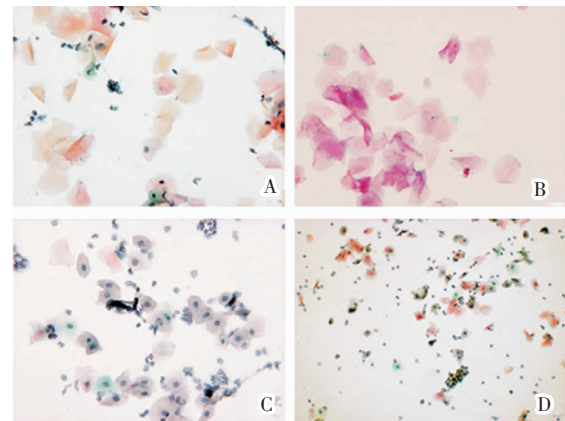


图3 巴氏染色结果
A.完全角化的上皮细胞染成均匀透明,不同深浅的橘色、黄色,且无细胞核($\times 400$);B.未完全角化的上皮细胞被染成不同程度的粉红色($\times 400$);C.中间层、基底层细胞胞浆被染成青、蓝色,其核被染成深蓝色,白细胞分叶结构清晰($\times 400$);D.低倍镜下各种形态细胞,巴氏染色细胞边界清晰,分型清楚,各期明确,染色效果佳($\times 100$)

图3 巴氏染色结果

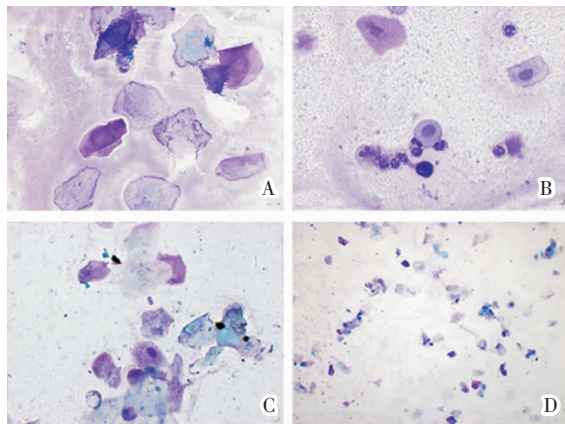


图2 瑞氏染色结果
A.角化的上皮细胞染成均匀透明的蓝紫色,且无细胞核($\times 400$);B.白细胞着色明显,核形态清晰($\times 400$);C.角化上皮中可见部分未完全角化的上皮细胞、中间层细胞,其核被染成深蓝紫色($\times 400$);D.低倍镜下细胞边界清晰,分型清楚,染色佳($\times 100$)

图2 瑞氏染色结果

别,但对角化细胞及中间层细胞区别较弱,取材部位过深易误判为动情前期或后期;瑞氏染色法步骤简略,操作便捷,省量节能,镜下动情期、动情间期明显,动情前期杂质易染色,故易于判断,但对鳞状上皮细胞角化程度区别度较小,取材部位对动情周期判断影响较小。巴氏染色对不同的细胞及不同分化程度的角化细胞染成不同颜色,分色明显,透明度高,便于鉴别、区分动情分期,且可排除取材过深的影响,实验结果准确,但操作较前复杂,成本较高。

综上,长时间连续涂片应采用生理盐水冲洗法进行阴道涂片取材。实验样本量大,旨在判断动情周期的发生与改变可应用瑞氏染色法;实验样本量小,旨在明确动情各期改变,或对阴道脱落细胞形态、比率进行研究时应采用巴氏染色法。临时染色、准确度要求较低时可采用 HE 染色法,但需注意采用棉签法,且取材不宜过深,防止细胞混杂。

参考文献:

- [1] 秦川,魏泓.实验动物学[J].北京:人民卫生出版社,2015:164.
- [2] 覃海章,肖胜军,华英杰,等.不同方法确定动情周期及动情期生殖器官结构[J].安徽医科大学学报,2017,52(11):1650-1653.
- [3] 宋孟秋,马永生,曹玉凤,等.小鼠发情周期中黄体大小及细胞的数量变化规律[J].动物医学进展,2015,36(11):31-35.
- [4] 高登慧,龚宁,裴占阳,等.动物组织胚胎学实验指导[M].贵阳:贵州大学出版社,2014:60-65.
- [5] 臧贵勇,张祥令,杨燕平.快速 Wright 液与改进的 Wright 液染色比较分析[J].重庆医学,2017,46(5):676-677.
- [6] 荆宝琴.成年 SD 大鼠不同阴道涂片方法探索[A].中国毒理学会第七次全国毒理学大会暨第八届湖北科技论坛论文集[C].中国毒理学会、湖北省科学技术学会,2015:1.
- [7] JOHN D BANCROFT, MARILYN GAMBLE. 组织学技术 Theory and Practice of Histological Techniques:英文[M].北京:北京大学医学出版社,2008:105-108.

(本文编辑 李杰)