

高原鼢鼠发情周期阴道细胞变化特征及血清促性腺激素含量动态

王艳莉^{1,2,3} 姚宝辉^{1,2,3} 张彩军^{1,2,3} 谭宇尘^{1,2,3}
康宇坤^{1,2,3} 张德罡^{1,2,4} 苏军虎^{1,2,3,4*}

(1 甘肃农业大学草业学院, 草业生态系统教育部重点实验室, 中美草地畜牧业可持续发展研究中心, 兰州 730070)

(2 甘肃农业大学—新西兰梅西大学草地生物多样性研究中心, 兰州 730070) (3 国家林业和草原局高寒草地鼠害防控工程技术研究中心, 兰州 730070) (4 甘肃省祁连山草原生态系统野外科学观测研究站, 天祝 733200)

关键词: 高原鼢鼠; 发情周期; 阴道细胞涂片; 卵泡刺激素; 黄体生成素

中图分类号: Q494

文献标识码: A

文章编号: 1000–1050 (2021) 06–0731–10

Characteristics of vaginal cells and dynamics of serum gonadotropin content in estrus cycle of plateau zokor (*Eospalax baileyi*)

WANG Yanli^{1,2,3}, YAO Baohui^{1,2,3}, ZHANG Caijun^{1,2,3}, TAN Yuchen^{1,2,3}, KANG Yukun^{1,2,3}, ZHANG Dengang^{1,2,4}, SU Junhu^{1,2,3,4*}

(1 College of Grassland Science, Key Laboratory of Grassland Ecosystem (Ministry of Education), Pratacultural Engineering Laboratory of Gansu Province, Sino-U. S. Centers for Grazing land Ecosystem Sustainability, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, China)

(2 Gansu Agricultural University-Massey University Research Centre for Grassland Biodiversity, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, China)

(3 Engineering and Technology Research Center for Alpine Rodent Pest Control, National Forestry and Grassland Administration, Lanzhou 730070, China)

(4 Gansu Qilianshan Grassland Ecosystem Observation and Research Station, Tianzhu 733200, China)

Abstract: In order to determine the change characteristics of vaginal cells in the estrus cycle and the duration of the estrus cycle, vaginal smears and HE staining methods were used to observe and count the types, morphological changes, and proportions of vaginal cells in plateau zokor (*Eospalax baileyi*). The hormone secretion dynamics of follicle-stimulating hormone (FSH) and luteinizing hormone (LH) in the serum of plateau zokor in the estrus cycle were determined by ELISA. The results showed that the main vaginal cells of plateau zokor were leukocytes, nuclear epithelial cells, incompletely cornified epithelial cells, and complete cornified epithelial cells. The proportion of nuclear epithelial cells in the proestrus was significantly higher than that during the other three periods ($48.4 \pm 3.09\%$ ($n = 12$, $P < 0.05$)). The proportion of complete cornified epithelial cells in the oestrus was the highest and significantly higher than that in the other three periods ($59.73 \pm 7.59\%$ ($n = 15$, $P < 0.05$)). The proportion of leukocytes in the metestrus and dioestrus was significantly higher than that in the proestrus and oestrus ($P < 0.05$). The expression level of LH was the highest in the metestrus (4.7095 ± 1.0940 ng/mL ($n = 6$, $P < 0.05$)), which showed an increasing trend in proestrus and oestrus, and a decreasing trend in the metestrus and dioestrus. There was no significant difference in the expression level of FSH among the four periods ($P > 0.05$); the estrus cycle duration of plateau zokor was 16 to 19 d, the characteristics of vaginal cell types in different stages of the estrus cycle were obvious, and the relative number was statistically significant. The study provided a basis for vaginal smear identification in the estrous cycle and reproductive physiology study

基金项目: 国家自然科学基金 (31760706); 甘肃省陇原青年创新创业人才项目 (LYRC2018-02); 甘肃省科技计划项目 (20JR10RA564)

作者简介: 王艳莉 (1996–), 女, 硕士研究生, 主要从事草地保护研究.

收稿日期: 2020-11-28; 接受日期: 2021-04-26

* 通讯作者, Corresponding author, E-mail: jhsu_627@126.com

of plateau zokor.

Key words: Plateau zokor; Estrus cycle; Vaginal cell smear; Follicle-stimulating hormone; Luteinizing hormone

野生动物繁殖调控是动物生态学研究的核心问题之一,其目的是通过研究调控动物个体及种群繁殖因素,揭示物种繁殖调控和生存规律(孙儒泳等,1997;Zenuto *et al.*,2001)。一般而言,雌性生殖细胞生殖能力的获得需经历卵泡发育和卵子发生两个过程,而这两个相互依存的过程皆在发情周期完成。发情周期的启动为雌雄配子相互结合及下一代个体发育奠定基础(张嘉保和田见晖,2011)。发情周期的确定是雌性动物繁殖研究的关键,准确判断动物的发情时间对研究其生殖生理、获得其发情周期各阶段血液和组织样品等具有重要的现实意义,也是后续研究工作的基础和前提(Reith and Hoy,2018)。早期,对于大型哺乳动物,研究者多采用动物外阴的宏观变化和生殖道的微观变化来确定发情周期。然而,小哺乳动物外阴变化肉眼不易观察,性腺组织学分析亦不适宜活体的发情周期鉴别(Ajayi and Akhigbe,2020)。迄今已研发出阴道细胞涂片(Mclean *et al.*,2012)、阴道外观检查(Ramos *et al.*,2001)、血清中性激素水平(Gal *et al.*,2014)、阴道壁评估(Sahoo *et al.*,2014)和尿生化参数测定(Singletary *et al.*,2005)等方法来鉴定动物的发情周期。因野外工作中的简便、适用性等,外阴观察和阴道细胞涂片法运用最为常见(Byers *et al.*,2012)。而临床上多用生殖激素的变化来检测发情状况,也研发出了诸多的试纸条等(Heshuang *et al.*,2015),动物阴道细胞变化特征及其生殖激素的变化是评估动物发情周期的一个有效方法(Auta and Hassan,2016)。根据阴道涂片的细胞生物学原理,阴道上皮组织和脱落细胞的变化可作为判断雌性发情周期各阶段的重要依据(Ajayi and Akhigbe,2020)。动物发情时,卵泡刺激素(Follicle-stimulating hormone,FSH)和黄体生成素(Luteinizing hormone,LH)分泌增加,作用于卵巢靶细胞促使雌激素(杨增明等,2005)、性类固醇激素(雌二醇-17 β 和黄体酮)调控阴道上皮组织(Sugiyama *et al.*,2020),继而引起阴道上皮细胞形态及数量发生变化,基于阴道涂片法分析这些细胞在阴道分泌物中的相对数量就可判断发情周期(Auta and Hassan,2016)。目前,国内外已通过阴道细胞

涂片法确定小鼠(*Mus musculus*)(Gonzalez,2016)、大鼠(*Rattus norvegicus*)(Mohammed and Sundaram,2018)、子午沙鼠(*Meriones meridianus*)(沙塔娜提等,2020)和豚鼠(*Cavia porcellus*)(刘艳等,2010)等啮齿类的发情周期。结合不同种动物发情周期的阴道细胞特征,建立其阴道涂片检测方法可为后续繁殖研究和野外管理提供重要基础。而激素的相关分析,也能辅助分析发情的时长和模式,对于动物的后续相关研究具有重要意义。

高原鼯鼠(*Eospalax baileyi*)隶属于啮齿目(Rodentia)鼯形鼠科(Spalacidae)鼯鼠亚科(Myospalacinae)凸颅鼯鼠属(*Eospalax*),是青藏高原高寒草甸生态系统特有物种之一(Norris *et al.*,2004)。作为随高寒草甸共生的物种,高原鼯鼠是高寒草甸生态系统的重要组成部分,能维持系统的多功能性和生态系统效率,但在环境变化等影响下,高原鼯鼠种群密度上升,引发鼠害,并对农牧业生产和生态安全造成严重影响(张知彬和王祖望,1998;张堰铭和刘季科,2002)。动物种群数量的上升与繁殖密切相关,小哺乳动物世代周期短、发育快,种群密度波动较大,其种群动态和调节一直是防控管理的重、难点。繁殖生理研究是理解种群数量动态及其调节的基础,对优化动物管理策略具有重要意义。目前,高原鼯鼠繁殖特性研究主要集中在雌雄配比和年龄组成(汪志刚等,1995)、精子发生(安晓宇等,2020)、繁殖行为比较(魏万红和周文扬,1996)、繁殖性能(郭万春等,2015)、胎仔数和性比(韩金花,2011)等方面。由于高原鼯鼠独特的地下生活方式,活捕采样等限制,阻碍了其生殖生理学等相关的研究,对其发情周期阴道细胞变化特征及生殖激素的变化等研究未见报道。因不同海拔和纬度的物候特征不同,高原鼯鼠繁殖起始时间在4—6月不等(Hegab *et al.*,2018),管理实践中亦需要对其发情时间进行确定。因此,需要一种简便可行的方法来检测其发情状况,用于指导各地高原鼯鼠繁殖高峰时期鼠情调查和防控用药时机的选择等。

本研究采用阴道涂片法、HE染色法和ELISA检测法,通过检测高原鼯鼠阴道细胞类型及其相

对数量、血清中促性腺激素分泌水平, 分析自然状况下繁殖期高原鼯鼠发情周期各阶段的阴道上皮细胞变化规律及FSH、LH分泌动态, 旨在为高原鼯鼠的繁殖生物学研究提供基础资料, 同时也为野外防治时机的选择提供参考。

1 研究方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物

实验动物采集于甘肃省武威市天祝藏族自治县抓喜秀龙镇。于2020年5月, 在该镇周围用笼捕法随机捕获生长发育正常的高原鼯鼠, 其年龄信息根据体重来鉴别(苏军虎等, 2018)。根据乳头的肿大程度及触摸腹部判断雌鼠是否怀孕(Berris *et al.*, 2020); 根据雌鼠外阴有少量粘液, 有明显的肿胀或充血等判断是否处于繁殖期, 初步选择成年健康未孕雌性高原鼯鼠60只作为实验动物, 单独饲养在塑料饲养箱中(75 cm × 50 cm × 40 cm), 取高原鼯鼠生活洞道土质(20 cm深)作为垫料来模仿其自然栖息地, 尽可能减少人为干扰, 以减少鼯鼠对环境的应激, 提高结果的有效性(Zhang, 2007), 以高原鼯鼠喜食食物红薯(*Ipomoea batatas*)和胡萝卜(*Daucus carota* L. var. *sativa* Hoffm)等饲喂。

1.1.2 血样收集

对29只健康的高原鼯鼠跟踪观察统计, 根据雌鼠外阴有少量粘液, 有明显的肿胀或充血等外部特征并结合阴道涂片法确定发情周期各个阶段。对各阶段的高原鼯鼠个体进行采血, 其中发情前期6只, 发情期5只, 发情后期6只, 发情间期12只, 严格按照甘肃农业大学实验动物福利伦理审查条例(GAU-LC-2020-38), 断颈取血, 4 500 r/min离心血样10 min后取上清液, -80℃保存待测。

1.2 实验方法

1.2.1 阴道涂片制作及染色

固定高原鼯鼠使其露出阴道口, 将湿润过的棉签插入其阴道内0.5 ~ 1 cm处, 轻转1 ~ 2圈, 然后均匀涂在滴有生理盐水的载玻片上, 连续28 d(张婷等, 2018)。每天08:00开始制作涂片, 每间隔4 h采样1次(后期可根据涂片结果适当调整采样时间); 待涂片风干后滴加甲醇固定15 min, 再风干, 最后进行HE染色(该过程均在染色缸中进行)

(英永等, 2010): 苏木精染色液中染色10 min, 盐酸酒精分化数秒, 流水冲洗返蓝, 伊红Y染色5 min, 95%酒精、100%酒精梯度脱水, 二甲苯透明, 中性树胶封片, 普通光学显微镜(Motic Panthera U)镜检及细胞计数。

1.2.2 血清FSH和LH的测定

采用ELISA法测定FSH、LH分泌水平。按照大鼠卵泡刺激素(FSH)和黄体生成素(LH)ELISA检测试剂盒采样Cloud-Clone Corporation(武汉云克隆科技股份有限公司)说明书操作流程进行, 全自动酶标仪(型号Bio-ELx800)450 nm测定其OD值并计算其激素水平。

1.3 阴道涂片镜检及发情周期各阶段的判定

用普通光学显微镜观察阴道细胞涂片, 根据细胞形态区分细胞类型, 每张涂片随机选择5个视野分别对完全角化上皮细胞、未完全角化上皮细胞、上皮细胞、白细胞进行计数, 统计分析各类细胞在每张阴道涂片视野中所占的比例。参照以细胞类型(各细胞类型的相对数量)划分发情周期的报道(张森等, 2006; 靳光和薛艳蓉, 2016; 沙塔娜提等, 2020), 划分高原鼯鼠发情周期各阶段。发情周期时长的确定以小时计算, 最后换算成天。发情周期激素分泌动态分析, 是通过采集阴道样本, 快速涂片并记录时段和发情状况, 将发情阶段相同的个体划分为同一组(包含发情前期、发情期、发情后期和发情间期4组), 之后分不同时间段对其进行断颈采血, 分析发情周期的激素分泌水平和动态。

1.4 数据分析

应用Excel 2010对所得实验数据进行简单记录和处理, 并制作相关图表; 用SPSS 19.0软件对同一激素不同时期的激素水平和发情周期各类细胞的出现率进行单因素方差分析, 数据用平均数 ± 标准误(mean ± SE)表示, 以 $P < 0.05$ 为表示差异显著。

2 结果

2.1 发情周期中阴道细胞种类及形态变化特征

2.1.1 白细胞

高原鼯鼠在发情周期中白细胞多呈圆形, 胞体边界清晰, 且小于上皮细胞。着色后胞核为深蓝紫色, 胞浆着色淡(图1A)。发情前期白细胞占

细胞总量的 1/3 左右, 随后逐渐下降, 到发情期时可降至 0, 但在发情后期又急剧增加。

2. 1. 2 上皮细胞

高原鼯鼠阴道细胞涂片中最典型的是副基底层细胞、中间层上皮细胞和表层上皮细胞, 这些统称为上皮细胞 (又称角化前上皮细胞)。上皮细胞直径 20 ~ 70 μm, 大多呈圆形、四边形或菱形, 轮廓清晰, 核浓缩, 核质分形明显, 核呈蓝紫色, 胞浆呈淡粉色, 染色比较淡, 透明度高 (图 1B)。发情前期上皮细胞占比可达 64. 00%, 之后逐日减少, 至发情期时可降至 27. 15% 以下, 到发情后期又有所上升 (表 1)。

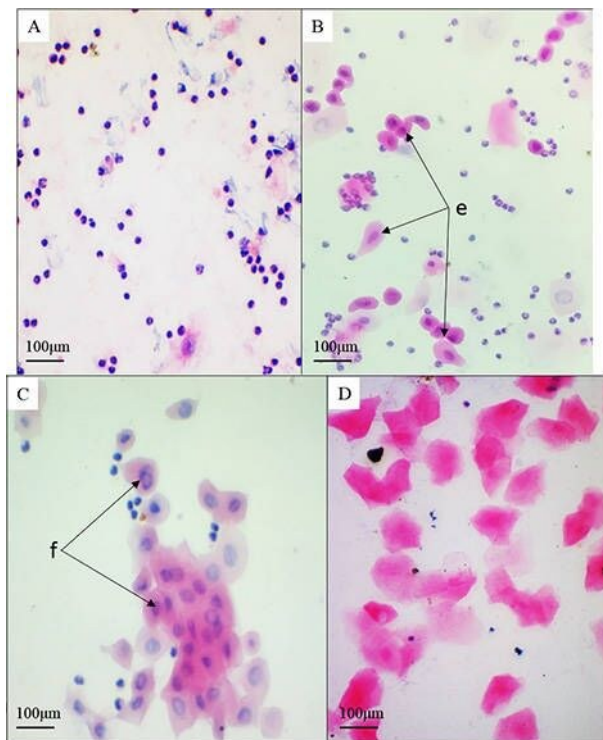


图1 高原鼯鼠阴道涂片主要细胞类型及形态 (HE 染色, 400×) 。
A: 白细胞; B: 上皮细胞 (e 为上皮细胞); C: 未完全角化上皮细胞 (f 为未完全角化细胞); D: 完全角化上皮细胞; 样本数: 60
Fig. 1 Main cell types and morphology in vaginal smear of plateau zokor (HE staining, 400×). A: Leukocytes; B: Nuclear epithelial cells (e is Nuclear epithelial cells); C: Incompletely cornified epithelial cells (f is Incompletely cornified epithelial cells); D: Completely cornified epithelial cells; Number of samples: 60

2. 1. 3 未完全角化上皮细胞

高原鼯鼠未完全角化上皮细胞多以边缘不规则的多边形分布, 核变小, 核膜界限模糊, 染色

表 1 高原鼯鼠发情周期各阶段细胞类型统计及其出现率 (%)

发情周期 Estrus cycle	n	白细胞 Leukocytes			上皮细胞 Nuclear epithelial cells			未完全角化上皮细胞 Incompletely cornified epithelial cells			完全角化上皮细胞 Completely cornified epithelial cells		
		最小值 Min.	最大值 Max.	mean±SE	最小值 Min.	最大值 Max.	mean±SE	最小值 Min.	最大值 Max.	mean±SE	最小值 Min.	最大值 Max.	mean±SE
发情前期 Proestrus	12	19.51	46.60	33.65 ± 2.53 ^{Bc}	37.02	64.00	48.4 ± 3.09 ^{Aa}	0	20.63	7.74 ± 2.81 ^{Cc}	0	20.94	7.31 ± 2.68 ^{Cb}
发情期 Oestrus	15	0	60.93	23.88 ± 5.46 ^{Bd}	0	27.15	10.91 ± 2.20 ^{Bc}	3.80	26.59	12.32 ± 1.68 ^{Bb}	9.16	96.20	59.73 ± 7.59 ^{Aa}
发情后期 Metestrus	16	12.84	75.13	51.78 ± 5.82 ^{Ab}	10.73	43.11	21.09 ± 3.24 ^{Bb}	4.03	28.66	15.15 ± 2.05 ^{BGa}	2.61	12.21	8.58 ± 1.13 ^{Cb}
发情间期 Dioestrus	17	61.42	96.10	82.68 ± 3.00 ^{Aa}	2.29	26.24	11.28 ± 1.60 ^{Bc}	0	5.74	3.27 ± 0.41 ^{Cc}	0.77	2.68	1.68 ± 0.22 ^{Cb}

同一列不同大写字母表示同一时期不同细胞之间差异显著 ($P < 0.05$); 同一行不同小写字母表示同一细胞不同时期之间差异显著 ($P < 0.05$); n : 各时期样本数
Different capital letters in the same column represent significant differences among the different cells in the same cycle ($P < 0.05$); Different lowercase letters in the same row represent significant differences among the same cell in different cycles ($P < 0.05$). n : number of samples in each period

加深；未完全角化细胞角化程度不同，细胞的形态略有差别(图1C)。核质着色深浅因细胞角化程度不同而有明显差别，胞浆呈粉色、胞核呈深蓝紫色或粉色。细胞质由核至边缘区着色逐渐变浅(图1C)。发情前期可达20.63%，之后逐日增加，发情后期时可达28.66%，到发情间期开始下降(表1)。

2.1.4 完全角化上皮细胞

高原鼯鼠完全角化上皮细胞是视野中最大的细胞，细胞核角化，胞质染成粉色，一般呈多边

形且边缘不规则(图1D)。随着发情状态的持续，至完全处于发情期时无核角质化细胞占比可达96.20%，发情后期会逐渐下降(表1)。

2.2 发情周期不同阶段的时间分布特点

高原鼯鼠发情前期：雌鼠阴道口开始红肿的5~6 d内，平均持续5.4 d；发情期：阴道口红肿后的4~4.5 d，平均持续4 d；发情后期：发情期后的2~3 d；平均持续2.3 d；发情间期一般持续5~6 d，平均持续5.6 d(图2)。

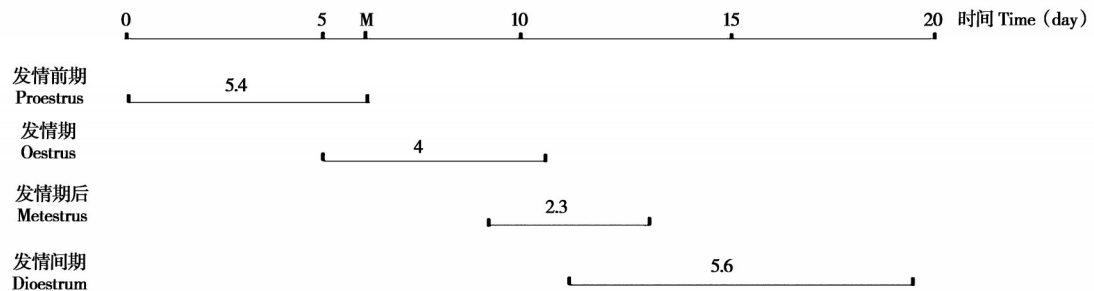


图2 高原鼯鼠发情周期各阶段的时间分布(天)($n = 60$)。M：阴道口开始红肿

Fig. 2 Time distribution in each stage of the estrus cycle of plateau zokor (day) ($n = 60$). M: the vaginal opening began to well

2.3 高原鼯鼠发情周期各阶段阴道细胞变化特征

2.3.1 发情前期阴道细胞变化特点

高原鼯鼠发情前期从开始到结束的过程中，阴道细胞涂片上的细胞数量逐渐增加(图3A)。特别是上皮细胞数量变化明显，从无到有明显增多，在发情前期的中期，上皮细胞的比例最高可以达到64.00%。从发情前期的中期开始，不完全角化上皮细胞所占比例逐渐增加(0~20.63%)、完全角化上皮细胞所占比例逐渐增加(0~20.94%)，平均分布比例为7.74%、7.31%。

白细胞所占比例逐渐减少(46.00%~19.51%)，平均为33.65%(表1)。

2.3.2 发情期阴道细胞的变化特点

高原鼯鼠发情期完全角化上皮细胞在阴道细胞涂片中的占比最高，可达96.20%(表1)，平均为59.73%。完全角化上皮细胞所占比例在发情期先增高，在中间阶段持续一段时间，然后下降(图3B)。未完全角化上皮细胞一般以片状或串状出现，所占比例平均为12.32%。上皮细胞和白细胞所占比例平均为10.91%、23.88%(表1)。

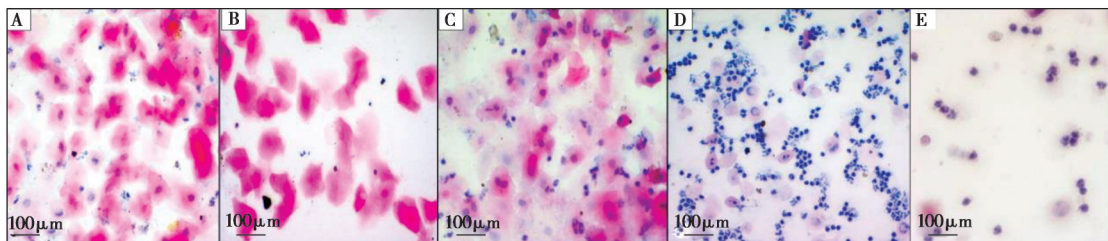


图3 高原鼯鼠发情周期中各时期阴道涂片的观察(400×)。A：发情前期($n = 12$)；B：发情期($n = 15$)；C：发情后期($n = 16$)；D：发情间期($n = 17$)；E：非繁殖期($n = 6$)

Fig. 3 Observation of vaginal smears at various stages in the estrus cycle of plateau zokor (400×). A: Proestrus ($n = 12$); B: Oestrus ($n = 15$); C: Metestrus ($n = 16$); D: Dioestrus ($n = 17$); E: Non-breeding period ($n = 6$)

2.3.3 发情后期阴道细胞的变化特点

高原鼯鼠发情后期阴道细胞涂片中细胞变化特点为上皮细胞逐渐增多, 白细胞数量逐渐增多, 完全角化上皮细胞逐渐减少, 未完全角化上皮细胞逐渐减少 (图 3C)。完全角化上皮细胞和未完全角化上皮细胞所占比例差异不显著。其中, 上皮细胞所占比例为 21.09%, 显著大于发情期 ($P < 0.05$); 完全角化上皮细胞占比为 8.58%, 显著小于发情期 ($P < 0.05$); 未完全角化上皮细胞占比为 15.15%, 白细胞占比为 51.78% (表 1)。

2.3.4 发情间期阴道细胞的变化特点

高原鼯鼠发情间期上皮细胞数量逐渐减少, 白细胞数量开始增加 (图 3D), 上皮细胞占比平均仅为 11.28%, 白细胞占比平均为 82.68% (表 1)。非繁殖期阴道脱落物极少, 且细胞为少量的白细胞, 细胞形态不完整 (图 3E)。

2.3.5 发情周期各阶段阴道细胞的变化特点

高原鼯鼠发情周期不同时期阴道细胞形态和

所占比例存在显著性差异。发情前期以上皮细胞为主, 其占比显著高于其他 3 个时期 ($P < 0.05$)。发情期未完全角化上皮细胞、完全角化上皮细胞为主要变化细胞, 但完全角化上皮细胞占比最大且显著高于其他 3 个时期 ($P < 0.05$)。白细胞在发情间期和发情后期的占比显著高于前两个时期 ($P < 0.05$)。

2.4 高原鼯鼠发情周期血清中 FSH、LH 分泌规律

2.4.1 发情周期血清中 FSH 分泌规律

高原鼯鼠发情周期 (1 ~ 19 d) 血清中 FSH 为脉冲式分泌。发情前期 (1 ~ 6 d) 有 2 个峰值: 第 3 天 (17.112 7 ng/mL) 和第 6 天 (38.927 6 ng/mL); FSH 在发情期 (6.8 ~ 10 d) 有 1 个峰值: 第 8.4 天 (23.026 4 ng/mL); 发情后期 (10.5 ~ 13 d) 有 2 个峰值: 第 12 天 (30.353 1 ng/mL) 和第 13 天 (15.989 2 ng/mL); FSH 在发情间期 (13.5 ~ 19 d) 有 2 个峰值, 第 14.5 天 (7.889 0 ng/mL) 和第 16.5 天 (15.626 6 ng/mL) (图 4)。

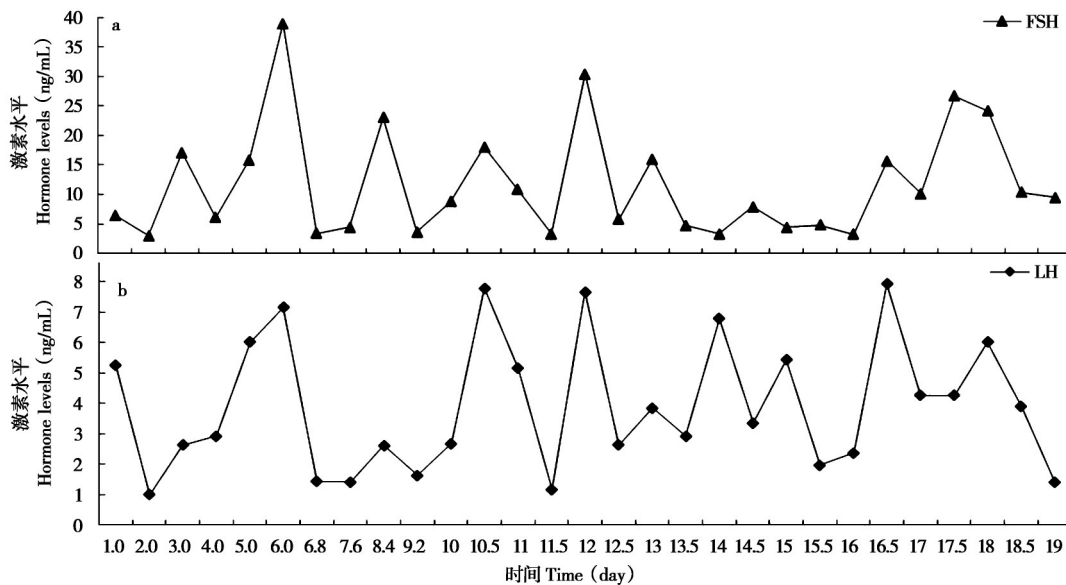


图 4 高原鼯鼠发情周期 FSH (a)、LH (b) 分泌水平。发情前期: 1 ~ 6 d; 发情期: 6.8 ~ 10 d; 发情后期: 10.5 ~ 13 d; 发情间期: 13.5 ~ 19 d. $n = 29$

Fig. 4 Comparison of FSH (a) and LH (b) secretion in plateau zokor during estrus cycle. Proestrus: 1 ~ 6 d; Oestrus: 6.8 ~ 10 d; Metestrus: 10.5 ~ 13 d; Dioestrus: 13.5 ~ 19 d. $n = 29$

2.4.2 发情周期血清中 LH 分泌规律

高原鼯鼠发情周期 (1 ~ 19 d) LH 的分泌方式呈波动式和脉冲式。发情前期 (1 ~ 6 d) 为脉冲式和波动式分泌, 在第 1 天 (5.244 0 ng/mL) 和第 6 天

(7.146 9 ng/mL) 有 2 个峰值; 发情期 (6.8 ~ 10 d) 呈脉冲式分泌, 在第 8.4 天 (2.612 9 ng/mL) 有 1 个峰值; 发情后期 (10.5 ~ 13 d) 呈脉冲式分泌, 在第 10.5 天 (7.788 8 ng/mL)、第 12 天 (7.656 0 ng/mL)

和第 13 天 (3.847 7 ng/mL) 有 3 个明显的峰值; LH 在发情间期 (13.5 ~ 19 d) 呈脉冲式和波动式分泌, 有 3 个明显的峰值, 分别为第 14 天 (6.787 5 ng/mL)、第 15 天 (5.427 5 ng/mL) 和第 16.5 天 (7.923 9 ng/mL) (图 4)。

2.4.3 血清中 FSH、LH 分泌规律比较

高原鼯鼠 LH 水平在发情期最低, 与其他 3 个时期差异显著 ($P < 0.05$)。FSH 水平在 4 个时期之间差异不显著。FSH 和 LH 的分泌特点为发情前期和发情期升高, 后期和间期降低, 二者变化趋势相似; FSH 在前 3 个时期的平均分泌水平明显高于同时期 LH; 在发情间期 LH 前两个峰值出现的时间均早于 FSH 峰值出现的时间, 从第 16 天开始 FSH 和 LH 的分泌趋势相似, 先升高再降低, 且 FSH 平均分泌水平高于 LH (表 2)。

表 2 发情周期各阶段高原鼯鼠血清中 FSH、LH 平均分泌水平
(mean $\pm$ SE) (ng/mL)

Table 2 The average secretion levels of FSH and LH in serum at each stage of the estrus cycle (mean $\pm$ SE) (ng/mL)

发情周期 Estrus cycle	样本数 Number of samples	FSH	LH
发情前期 Proestrus	6	14.5470 $\pm$ 5.3992 ^a	4.1620 $\pm$ 0.9549 ^{ab}
发情期 Oestrus	5	8.6481 $\pm$ 3.7227 ^a	1.9545 $\pm$ 0.2854 ^b
发情后期 Metestrus	6	12.4108 $\pm$ 3.7579 ^a	4.7095 $\pm$ 1.0940 ^a
发情间期 Dioestrus	12	10.3890 $\pm$ 2.2860 ^a	4.2181 $\pm$ 0.5773 ^{ab}

不同字母表示同一激素不同时期差异显著 ($P < 0.05$)

Different letters indicate that the same hormone has significant differences in different periods ($P < 0.05$)

3 讨论

本研究发现, 高原鼯鼠阴道涂片中细胞类型主要为完全角化上皮细胞、未完全角化上皮细胞、上皮细胞和白细胞, 且各时期细胞形态和相对数量有一定的周期性变化规律, 发情期的细胞类型主要为完全角化上皮细胞, 细胞形态变化特征最为显著。靳光和薛艳蓉 (2016) 发现小鼠阴道细胞类型呈周期性变化, 可依据各细胞类型的占比及变化特点准确判断小鼠发情周期各阶段, 本研究

结果与其一致, 也与豚鼠、大鼠阴道细胞类型和形态变化规律一致 (刘艳等, 2010; Cora *et al.*, 2015)。但与子午沙鼠阴道细胞类型不一致, 其细胞类型主要为淋巴细胞、核上皮细胞和角化上皮细胞 (沙塔娜提等, 2020), 该差异与细胞的划分方式和叫法不同有关, 而且涂片的染色方法和涂片制作过程中样本的均匀程度也会对其有影响。此外, 动物的发情周期生殖激素水平会影响细胞变化特征, 马博文和何伟华 (2013) 发现生殖激素水平升高时, 雌激素使上皮细胞增生, 阴道鳞状上皮细胞对性激素的敏感性增强, 中层细胞质边缘着色较浓, 或出现皱褶, 模糊核仁, 以致影响细胞形态的观察。高原鼯鼠营地下洞道生活, 室内饲养难度较大, 应激性较强 (蔡志远等, 2020), 我们推测室内饲养可能会影响动物发情状况和繁殖。此外, 不同的物种, 发情周期各阶段同类型细胞所占的比例有差异, 这与制片及细胞计数方式有关。张森等 (2006) 研究发现大鼠发情期完全角化上皮细胞所占比例为 (78.0 $\pm$ 5.4)%, 本研究中海原鼯鼠的完全角化上皮细胞所占比例为 (59.73 $\pm$ 7.59)%, 其他时期各异, 但各时期显著性细胞类型一致。依据高原鼯鼠阴道细胞变化特征划分高原鼯鼠发情周期各阶段, 且发现了阴道涂片法是高原鼯鼠高效、准确和简便的发情周期鉴定方法, 阴道涂片可有效鉴别动物发情周期, 可在今后高原鼯鼠生殖生理研究工作中进行应用。

本研究发现, 高原鼯鼠 FSH、LH 在发情周期呈脉冲式分泌, LH 在发情前期呈波动式分泌, 且在发情前期和发情期呈上升趋势, 发情后期和发情间期逐渐下降, 具有周期性变化规律。Aritonang 等 (2017) 研究表明, 在整个发情周期中, 下丘脑—垂体—性腺轴 (hypothalamic-pituitary-gonadal, HPG) 参与了发情周期开始、发育及终止的整个过程, 阴道粘膜在性激素作用下发生了大规模的形态结构变化, 如 FSH 促进卵泡生长和发育, LH 控制雌激素和孕酮激素在发情周期的作用, FSH 和 LH 协同促进卵泡生长, 并可诱发排卵, 增加血流量。Auta 和 Hassan (2016) 研究表明, 阴道口展开与雌二醇浓度增加有关。在发情周期, 血液中促性腺激素 FSH、LH 含量开始升高, 促使卵巢分泌雌二醇, 加速了阴道上皮的新陈代谢; 阴道开口变得饱满、肿胀和潮湿, 呈粉红色, 在外阴的背

唇和腹唇都有条纹 (Ajayi and Akhigbe, 2020)。本研究表明, 高原鼯鼠发情周期血清中促性腺激素分泌动态与阴道外部形态呈正相关, 促性腺激素水平在一定程度上反映了动物发情时的生理调控机制。在动物发情的起始状态阴道口开始充血和红肿, 阴道上皮细胞增生或出现角质化, 黏液分泌增多 (杨增明等, 2005)。发情期, 血液中的 FSH、LH 含量升高, 雌激素分泌迅速增加, 阴道外部变化与发情前期的类似, 但阴道红肿更明显、湿润; 阴道分泌物明显增多, 形成易于脱落的角化上皮细胞。发情间期, 血液中的 FSH、LH 含量逐渐降低, 雌激素含量也相应降低, 角质化上皮细胞减少, 上皮变薄, 阴道细胞以白细胞为主 (王少兵, 2009)。这与本研究中外阴道观察结果类似, 也与阴道细胞的变化相一致。本研究中, 限于高原鼯鼠室内饲养存活和非死亡性采血困难等, 无法对同一时期的个体样本进行连续采样和监测。本文对 60 只雌性高原鼯鼠个体连续密集的采集阴道涂片 (400 个涂片) 和激素指标筛选。在今后的研究中可进一步优化饲养方式和采血方法, 活体采血进行持续分析。

一般情况下, 通过动物行为和生殖生理的规律性变化可确定动物发情周期 (韩志强等, 2018)。本文通过预试验对间隔 2 ~ 10 h 采样时间进行了摸索, 发现 4 h 的间隔, 细胞呈典型变化特征。采用间隔 4 h 采样, 结合 HE 染色法观察, 确定高原鼯鼠的发情周期为 16 ~ 19 d。刘艳等 (2010) 采用间隔 8 h 阴道涂片采样法确定豚鼠的发情周期为 15 ~ 17 d, 其中发情前期 (63.1 ± 2.3) h, 发情期 (39.1 ± 2.8) h, 发情后期 (46.3 ± 5.1) h, 发情间期 (233.4 ± 18.6) h。而 SD 大鼠则是采用快速革兰式和结晶紫染色法, 每天采样一次, 确定 SD 大鼠的发情周期为 4 ~ 5 d (张婷等, 2018)。子午沙鼠也是采用间隔 4 h 采样和 HE 染色法观察到发情周期为 (4.7 ± 1.2) d (沙塔娜提等, 2020)。本研究中高原鼯鼠的发情周期与豚鼠、SD 大鼠和子午沙鼠略有不同, 这与物种自身的生物学特性密切相关。高原鼯鼠是地下啮齿类, 生活在高寒草甸, 一年内的繁殖时间有限, 发情周期较长, 发情持续时间较长, 符合物种的季节性繁殖特征。此外, 野外实践中发现, 高原鼯鼠的繁殖受区域物候等影响, 甘南、青海等地因海拔、温度等不同, 导致高原

鼯鼠繁殖时期不一致, 发情起始的时间不一样, 这需要依据发情起始的时间对野外防控时机进行选择 (唐忠民和刘承毅, 2014; 郭万春等, 2015)。本研究的 HE 染色结合阴道涂片法, 可简便、高效地鉴定出高原鼯鼠雌性发情周期, 能为高原鼯鼠不同分布区域的管理提供依据, 同时也为高原鼯鼠繁殖生物学等相关研究提供参考。

参考文献:

- Ajayi A F, Akhigbe R E. 2020. Staging of the estrous cycle and induction of estrus in experimental rodents: an update. *Fertility Research and Practice*, **6** (1): 2-15.
- An X Y, Wang Y J, Li Y C, Jia G X, Yang Q E. 2020. Morphological features and regulation of seasonal spermatogenesis in plateau zokor (*Eospalax baileyi*). *Acta Theriologica Sinica*, **40** (5): 435-445. (in Chinese)
- Aritonang T R, Rahayu S, Sirait L I, Karo M B, Simanjuntak T P, Natzir Ru, Kamelia E. 2017. The role of FSH, LH, estradiol and progesterone hormone on estrus cycle of female rats. *Journal of Basic and Applied Research*, **35** (1): 92-100.
- Autar T, Hassan A T. 2016. Alteration in oestrus cycle and implantation in *Mus musculus* administered aqueous wood ash extract of *Azadirachta indica* (neem). *Asian Pacific Journal of Reproduction*, **5** (3): 188-192.
- Byers S L, Wiles M V, Dunn S L, Taft R A. 2012. Mouse estrous cycle identification tool and images. *PLoS ONE*, **7** (4): e35538.
- Berris K K, Breed W G, Moseby K E, Carthew S M. 2020. Female reproductive suppression in an Australian arid zone rodent, the Spinifex hopping mouse. *Journal of Zoology*, **312** (3): 163-173.
- Cora M C, Kooistra L, Travlos G. 2015. Vaginal cytology of the laboratory rat and mouse review and criteria for the staging of the estrous cycle using stained vaginal smears. *Toxicologic Pathology*, **43** (6): 776-793.
- Cai Z Y, Wang C, Guo H L, Yao B H, Tan Y C, Su J H. 2020. Effects of two chemical drugs on the behavior and physiology of *Eospalax baileyi*. *Sichuan Journal of Zoology*, **39** (4): 375-384. (in Chinese)
- Gal A, Lin P C, Barger A M, Macneill A L, Ko C. 2014. Vaginal fold histology reduces the variability introduced by vaginal exfoliative cytology in the classification of mouse estrous cycle stages. *Toxicologic Pathology*, **42** (8): 1212-1220.
- Gonzalez G. 2016. Determining the stage of the estrous cycle in female mice by vaginal smear. *Cold Spring Harbor Protocols*, **2016** (8): pdb.prot094474.
- Guo W C, Guo Z Z, Zeng Q H, Guo Z X. 2015. Research on the harm of plateau zokor and its reproductive performance. *Heilongjiang Animal Husbandry and Veterinary*, **17**: 149-150. (in Chinese)
- Han Z Q, Wang H J, Zhao J P, Song X C, Xing X M, Chen X L, Zhao Q M, Xu C. 2018. Research progress of estrus identification

- technology in animals. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, **49** (10): 2086-2091. (in Chinese)
- Han J H. 2011. The study of *Myospalax baileyi* sbreeding performance on nature pasture in Men Yuan County. *Chinese Qinghai Journal of Animal and Veterinary Sciences*, **41** (1): 12-13. (in Chinese)
- Hegab M I, Zhang Q, Pu Q S, Wang Z C, Kang Y K, Cai Z Y, Guo H L, Wang H F, Ji W H, Hanafy A, Su J H. 2018. Gender difference in unconditioned and conditioned predator fear responses in smith's zokors (*Eospalax smithii*). *Global Ecology and Conservation*, **16**: e00503.
- Heshuang D I, Jiang S, Chen A, Wang L, Liu J. 2015. Comparisons of methods for pregnancy diagnosis in female poodles. *Agricultural Biotechnology*, **4** (6): 43-45.
- Jin G, Xue Y R. 2016. Morphological changes of vaginal epithelial cells in mice during estrus cycle. *Heilongjiang Animal Reproduction*, **24** (6): 6-8. (in Chinese)
- Liu Y, Xing J, Wang L. 2010. Study on changes of vaginal cells in guinea pig sex cycle. *Laboratory Animal Science*, **27** (6): 26-28. (in Chinese)
- Ma B W, He W H. 2013. Cervical cytopathology diagnostic atlas. *Clinical Laboratory Journal* (Electronic Edition), (4): 463-463. (in Chinese)
- Mclean A C, Valenzuela N, Fai S, Bennett S A L. 2012. Performing vaginal lavage, crystal violet staining, and vaginal cytological evaluation for mouse estrous cycle staging identification. *Journal of Visualized Experiments*, **15** (67): e4389.
- Mohammed S, Sundaram V. 2018. Comparative study of metachromatic staining methods in assessing the exfoliative cell types during oestrous cycle in sprague-dawley laboratory rats. *International Journal of Morphology*, **36** (3): 962-968.
- Norris R W, Zhou K, Zhou C, Yang G, William K C, Honeycutt R L. 2004. The phylogenetic position of the zokors (Myospalacinae) and comments on the families of muroids (Rodentia). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **31** (3): 972-978.
- Ramos S D, Lee J M, Peuler J D. 2001. An inexpensive meter to measure differences in electrical resistance in the rat vagina during the ovarian cycle. *Journal of Applied Physiology*, **91** (2): 667-670.
- Reith S, Hoy S. 2018. Review: Behavioral signs of estrus and the potential of fully automated systems for detection of estrus in dairy cattle. *Animal: An International Journal of Animal Bioscience*, **12** (2): 1-9.
- Sahoo H, Nandy S, Senapati A, Sarangi S, Sahoo S. 2014. Aphrodisiac activity of polyherbal formulation in experimental models on male rats. *Pharmacognosy Research*, **6** (2): 120-126.
- Singletary S J, Kirsch A J, Watson J, Karim B O, Huso D L, Hurn P D. 2005. Lack of correlation of vaginal impedance measurements with hormone levels in the rat. *Contemporary Topics in Laboratory Animal Science*, **44** (6): 37-42.
- Sha T N T, Shi S, Liao L F, Sun Y W, Zhao H Q, Xu Y M. 2020. Experimental observation on estrus cycle of female meridian gerbils in Turpan, Xinjiang. *Laboratory Animal Science*, **37** (6): 26-28. (in Chinese)
- Su J H, Peng R, Nan Z B, Ji W H, Cai Z S. 2018. Age Determination and composition analyses of plateau zokor (*Eospalax baileyi*) in gannan meadow. *Chinese Journal of Zoology*, **53** (1): 46-54. (in Chinese)
- Sugiyama M, Yasunaga A, Kobayashi R, Fukasawa H, Yoshioka K. 2020. Improvement in identification of pro-estrous mice by using a novel method of detecting vaginal mucous cells. *Cell and Tissue Research*, **383**: 1183-1190.
- Sun R Y, Zhang Y S, Fang X Y. 1977. The significance of male reproductive intensity in the research of rodent reproductive ecology. *Acta Zoologica Sinica*, **23** (2): 187-200. (in Chinese)
- Tang Z M, Liu C Y. 2014. Research on the optimal habitat and activity law of plateau zokor and control strategy. *Grass and Livestock*, **1**: 16-17. (in Chinese)
- Wang S B. 2009. Expression and localization of the receptorgene frizzleds in wnt/b-catenin pathway in the mouse ovary during estrous cycle. Ph. D thesis. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 61-65. (in Chinese)
- Wang Z G, Liu R T, Chen Y Y, Ru J. 1995. Discussion on reproductive index of plateau zokor. *Acta Prataculturae Sinica*, **4** (1): 61-68. (in Chinese)
- Wei W H, Zhou W Y. 1996. Comparison of behavior in reproductive and non-reproductive periods of plateau zokor (*Eospalax baileyi*). *Acta Theriologica Sinica*, **16** (3): 194-201. (in Chinese)
- Yang Z M, Sun Q Y, Xia G L. 2005. *Reproductive Biology* (2nd Edition). Beijing: Science Press, 41-43. (in Chinese)
- Ying Y, Li L, Wang S Y. 2010. Application of several conventional staining methods in rat vagina smear. *Shanghai Animal Husbandry and Veterinary News*, **4**: 28-29. (in Chinese)
- Zenuto R R, Vassallo A I, Busch C. 2001. A method for studying social and reproductive behaviour of subterranean rodents in captivity. *Acta Theriologica*, **46** (2): 161-170.
- Zhang Y M. 2007. The biology and ecology of plateau zokors (*Eospalax fontanierii*). In: Begall S, Burda H, Schleich C E eds. *Subterranean Rodents: News from Underground*. Springer, Berlin, Heidelberg, 237-249.
- Zhang S, Wang X, Wei X B, Tan J H. 2006. Observation on the changes of vaginal cells in each stage of the estrus cycle in rats. *Progress in Veterinary Medicine*, **27** (2): 69-72. (in Chinese)
- Zhang Z B, Wang Z W. 1998. *Ecology and Control Strategies of Important Agricultural Pests*. Beijing: China Ocean Press, 250-265. (in Chinese)
- Zhang Y M, Liu J K. 2002. The biological characteristics of underground rat and its role in ecosystem. *Acta Theriologica Sinica*, **22** (2): 144-154. (in Chinese)
- Zhang T, Wang Y, Wang L. 2018. Comparison of two staining methods for rat vaginal smears. *Chinese Journal of Comparative Medicine*, **28** (12): 98-101. (in Chinese)

- Zhang J B, Tian J H. 2011. *Animal Reproduction Theory and Biotechnology*. Beijing: China Agriculture Press, 73-78. (in Chinese)
- 马博文, 何伟华. 2013. 子宫颈细胞病理学诊断图谱. 临床检验杂志 (电子版), (4): 463-463.
- 王少兵. 2009. 小鼠动情周期卵巢中 *Wnt/β-catenin* 信号通路受体基因 *Frizzleds* 的表达与定位研究. 南京: 南京农业大学博士学位论文, 61-65.
- 孙儒泳, 张玉书, 方喜叶. 1977. 啮齿类繁殖生态研究中雄性繁殖强度的意义. 动物学报, **23** (2): 187-200.
- 安晓宇, 王玉军, 李永昌, 贾功雪, 杨其恩. 2020. 高原鼯鼠精子发生的形态学特征和关键调控因子探究. 兽类学报, **40** (5): 435-445.
- 汪志刚, 刘荣堂, 陈艳宇, 如甲. 1995. 高原鼯鼠繁殖指数探讨. 草业学报, **4** (1): 61-68.
- 杨增明, 孙青原, 夏国良. 2005. 生殖生物学 (第二版). 北京: 科学出版社, 41-43.
- 张森, 王新, 韦旭斌, 谭建华. 2006. 大鼠发情周期各阶段的阴道细胞变化观察. 动物医学进展, **27** (2): 69-72.
- 张知彬, 王祖望. 1998. 农业重要害鼠的生态学及控制对策. 北京: 海洋出版社, 250-265.
- 张嘉保, 田见晖. 2011. 动物繁殖理论与生物技术. 北京: 中国农业出版社, 73-78.
- 张堰铭, 刘季科. 2002. 地下鼠生物学特征及其在生态系统中的作用. 兽类学报, **22** (2): 144-154.
- 张婷, 王颖, 王莉. 2018. 大鼠阴道涂片两种染色方法比较. 中国比较医学杂志, **28** (12): 98-101.
- 刘艳, 邢进, 王珑. 2010. 豚鼠性周期阴道细胞变化的研究. 实验动物科学, **27** (6): 26-28.
- 苏军虎, 彭然, 南志标, Ji Weihong, 蔡卓山. 2018. 甘南草原高原鼯鼠年龄划分及其组成分析. 动物学杂志, **53** (1): 46-54.
- 沙塔娜提, 史深, 廖力夫, 孙亚伟, 赵红琼, 徐艺玫. 2020. 新疆吐鲁番雌性午沙鼠发情周期的实验观察. 实验动物科学, **37** (2): 1-4.
- 英永, 李莉, 王韶艳. 2010. 几种常规染色方法在大鼠阴道涂片中的应用. 上海畜牧兽医通讯, **4**: 28-29.
- 靳光, 薛艳蓉. 2016. 小鼠发情周期阴道上皮细胞形态变化的研究. 黑龙江动物繁殖, **24** (6): 6-8.
- 郭万春, 郭占泽, 曾青华, 郭占显. 2015. 高原鼯鼠的危害及其繁殖性能研究. 黑龙江畜牧兽医, **17**: 149-150.
- 唐忠民, 刘承毅. 2014. 高原鼯鼠的最适生境及其活动规律研究与防治策略. 草业与畜牧, **1**: 16-17.
- 韩志强, 王海军, 赵家平, 宋兴超, 邢秀梅, 陈晓丽, 赵全民, 徐超. 2018. 动物发情鉴定技术的研究进展. 畜牧兽医学报, **49** (10): 2086-2091.
- 韩金花. 2011. 门源县天然草场高原鼯鼠繁殖性能研究. 青海畜牧兽医杂志, **41** (1): 12-13.
- 蔡志远, 王缠, 郭怀亮, 姚宝辉, 谭宇尘, 苏军虎. 2020. 2种化学药物对高原鼯鼠行为及生理的影响. 四川动物, **39** (4): 375-384.
- 魏万红, 周文扬. 1996. 高原鼯鼠繁殖期和非繁殖期的行为比较. 兽类学报, **16** (3): 194-201.