

## BALB/c 小鼠繁殖性能的观察及分析

张俭, 黄星群, 刘建军

(怀化学院生物系, 湖南怀化 418008)

**摘要:** 为提高 BALB/c 小鼠受孕率, 对其生殖性能进行了研究。结果表明: 性周期动情期的鉴定是提高小鼠受孕率的关键。光照、温度、噪音及湿度等因素对小鼠性周期影响很大。自然交配的受精卵质量远比超数排卵的好, 但超数排卵仍不失为一种良好的获得更多卵子的辅助办法。

**关键词:** 性周期; 阴栓; 预接触; 超数排卵

**中图分类号:** Q95-33 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-7083(2006)01-0179-03

## Observation and Analysis on Productive Capacity of BALB/c Mouse

ZHANG Jian, HUANG Xing-qun, LIU Jian-jun

(Biology Department, Huaihua University, Huaihua, Hunan Province 418008)

**Abstract:** To improve the rate of fertilization, the productive capacity of BALB/c mouse was studied and the results showed that it was important to characterize the estrus among sexual cycles. The mice sexual cycles were influenced remarkably by light, temperature, noise and air humidity. The quality of zygote obtained by natural mating was rather better than that by superovulation, while superovulation was still an effective auxiliary method to get more ova.

**Key words:** sexual cycle; vaginal plug; pre-contact; superovulation

以 BALB/c 小鼠为实验材料, 通过对 BALB/c 小鼠进行生殖系统解剖学及阴道涂片细胞学检查, 研究了小鼠性周期各个时期的特征。

收稿日期: 2005-03-24 基金项目: 怀化学院 2003 科研基金项目 (03002)

作者简介: 张俭 (1967~), 男, 硕士, 怀化学院讲师, 从事细胞生物学教学与研究, E-mail: hhzhangjian@163.com

用, 还需要对其它鼠类如豚鼠、褐家鼠、高山姬鼠、黑腹绒鼠等进行相关实验, 此外在药物适口性上也需做进一步的研究。

## 4 参考文献

- [1] AS Salhab, MS Shomaf, MN Gharaibeh, *et al.* Effect of castor bean extract and ricin A-Chain on ovulation and implanation in rabbits [J]. *Contraception*, 1999, 59: 395~399
- [2] Abdulazim S Salhab, Salah O Al-Tamimi, Munir N Gharaibehand Maha, *et al.* The abortifacient effects of castor bean extract and ricin-A chain in rabbits [J]. *Contraception*, 1998, 58: 193~197.
- [3] ZHANG Chun-mei, WANG Rui-hong. Advance in the research of sterilants against rodents [J]. *J Forestry Research*, 2002, 13 (1): 77~81.
- [4] FK Okwuasaba, UA Osunkwo, MM Ekwenchi, *et al.* Anticonceptive and estrogenic effects of a seed extract of *Ricinus var. minor* [J]. *J Ethnopharmacology*, 1991, 34 (2): 141~145
- [5] CO Isichei, SC Das, OO Ogunkeye, *et al.* Preliminary clinical investigation of the contraceptive efficacy and chemical pathological effects of RICOM-1013-J of *Ricinus communis var Minor* on women volunteers [J]. *Phytotherapy Research*, 2000, 14: 40~42.
- [6] 张龙翔, 张庭芳, 李令媛. 生化实验方法和技术 [M]. 北京: 高等教育出版社, 1985: 166.
- [7] 张瑜, 马裕袖, 赵福民, 等. 避孕药酒抗生育作用机理的实验研究 [J]. *河南中医*, 1994, 14 (3): 145~146.
- [8] Salhab AS. Induction of mid-term abortion by ricin A-chain in mice [J]. *Int J Pharmacogn*, 1996, 34: 151~153.
- [9] 左凤. 蓖麻籽抗生育作用的毒理及临床研究 [J]. *国外医学中医中药分册*, 2001, 23 (5): 286~287
- [10] 罗满林, 顾为望. 实验动物学 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2002: 274.
- [11] Salhab AS, Issa A, Alhougog I. On the contraceptive effect of castor beans [J]. *Int J Pharmacogn*, 1997, 35: 63~65.
- [12] 郑妍. 昆丽抗生育作用实验研究 [J]. *时珍国医国药*, 1999, 10 (10): 729~730.
- [13] 江燕, 赵翠兰, 李开源, 等. 扶桑花提取物的抗早孕作用研究 [J]. *中国民族民间医药杂志*, 2001, 51: 226~227.
- [14] 朱红梅, 钟鸣, 韦玉伍, 等. 岗松根抗生育作用的实验观察 [J]. *医学理论与实践*, 1995, 8 (4): 145~146.
- [15] 朱四军, 庄临之, 谢表明, 等. 米非司酮对离体大鼠垂体细胞促黄体激素分泌的影响及其机制 [J]. *动物学报*, 2001, 47 (4): 412~418.
- [16] 曾佑炜, 宋光泉, 彭永宏, 等. 蓖麻毒蛋白研究及应用进展 (综述) [J]. *亚热带植物科学*, 2004, 33 (1): 60~63.
- [17] Scarpa A, Guerci A. Various uses of castor oil plant *Ricinus communis* [J]. *A review Journal of Ethnopharmacology*, 1982, 5: 117~137.

# 1 材料与方法

## 1.1 材料

清洁级 BALB/c 小鼠，从中山大学实验动物中心引进（合格证号：粤检证字 2003A062）。DMEM（Gibco 公司）、小牛血清（Hyclone）、倒置相差显微镜（Olympus）、体视显微镜（Nikon）。

## 1.2 方法

**1.2.1 实验小鼠的选择** 选用性成熟未交配过的 BALB/c 小鼠。雄鼠龄为 50~60 d，体重 20~30 g；雌性龄 60 d，体重为 20~30 g。

**1.2.2 阴道涂片和阴道的检查** 用沾有生理盐水的棉签轻轻插入阴道，慢慢转动一下，取出抹到载玻片上，空气干燥，制成标本镜检，观察细胞的种类和形状。观察阴道口径的变化及其充血状态，结合阴道涂片的检查结果，判断小鼠性周期各个时期，确认性周期的动情期。

**1.2.3 动物交配与受孕动物的检查** 将确定为动情期的雌鼠，按雌雄 1:1 比例晚 8:00 点钟合笼，次日清晨做阴道涂片检查，镜检发现精子，则为阳性，记为孕期 0.5 d。阴栓的检查，将合格雌雄鼠按 1:1 比例傍晚合笼，次日清晨检查雌鼠阴道有无阴栓，有阴栓者则确定为受孕，记为孕期 0.5 d。如果阴栓不易见到，需做深部检查。用眼科镊子插入阴道，撑开阴道口，查看有无阴栓。

**1.2.4 预接触与超数排卵** “预接触”：在交配前 2 天，将 1 只雄鼠放入一个 5 cm×5 cm×5 cm 的封闭栅栏筐中，把筐放在装有 10 只雌鼠的鼠笼内。雌鼠和雄鼠这样生活 2 天，第 3 天晚放出雄鼠，雌雄交配。“超数排卵”（superovulation）：常用孕马血清促性腺激素（PMSG），结合人绒毛膜促性腺激素（HCG）进行。中午向雌鼠腹腔注射 PMSG 10 U，48 h 后再腹腔注射 HCG 10 U，当晚与雄鼠 1:1 合笼。

**1.2.5 受精卵的获取和囊胚的培养** 断颈法处死

怀孕 3.5 d 的 BALB/c 小鼠。打开腹腔，从子宫与输卵管相连处剪下子宫。将子宫放入盛有 5 ml 冲胚液的培养皿中，取一带针头的 1 ml 注射器吸取冲胚液，体视显微镜下将针头从子宫颈口插入，缓缓冲洗子宫<sup>[1]</sup>。在低倍显微镜下用拉细的巴氏吸管收集细胞，移入铺有 MEFs 饲养细胞的六孔板中培养。观察囊胚透明带的脱落、囊胚贴壁生长及内细胞团（ICM）的生长情况。

# 2 结果与讨论

一般刚开始配鼠时，胚胎获取率极低，特别是在冬季配鼠。受孕失败的原因常有二种情况：一是没有把握好小鼠性周期 4 时期的特征，不能准确地确定动情期；二是勿视生殖环境。在 BALB/c 小鼠 17 次交配实验中，阴栓检查可见率达 72%，极大地提高了小鼠交配成功率，缩短了实验时间。从实验结果来看，就如何提高小鼠受孕率得出如下结论：

## 2.1 通观全局，有的放矢

提高小鼠受孕率，首先要全面了解小鼠生殖及性生理特征。

小鼠性成熟早，35 日龄雄性精液中有运动的精子，雌鼠在 40 日龄即可发情排卵、受孕。小鼠性成熟时，雄鼠睾丸下降，精子生成；雌鼠阴道口打开，阴道开放后出现求偶现象，有交配欲望，乐意接近雄鼠。

雌鼠在正常情况下，每隔 4~5 d 为一个性周期，发情后 2~3 h 即可排卵。雌鼠产后还可出现一次动情期，即分娩后 24 h 内排卵，此时交配可受孕，俗称“血配”，出现边哺育边妊娠的现象<sup>[2]</sup>。

## 2.2 确定时间，选择小鼠

**2.2.1 实验动物的选择** 选用性成熟未交配过的健康小鼠进行。实验发现，体形和体重较大动物进行交配比较容易受孕。

表 1 BALB/c 小鼠性周期阴道分泌物涂片及阴道口变化的比较

Table 1 Comparison of the vaginal secretion and the vaginal bore among BALB/c mouse sexual cycles

性周期发育阶段	涂片现象	阴道口的变化情况	备注
动情前期	大量有核上皮细胞，偶有少量角化上皮细胞	阴道开口增大，充血肿胀	卵泡加速生长
动情期	大量角化（无核）上皮细胞，细胞分散未成团成堆	外阴充血肿胀，阴道口呈白色干燥状态	卵泡成熟，排卵
动情后期	大量角化上皮细胞并聚集成团，周围混有白细胞	有的个体可见从阴道流出乳白色分泌物	黄体生成
动情间期	散在的白细胞、有核上皮细胞、角化上皮细胞，并混有粘液	阴道口径变小，阴道壁变薄	黄体退化

**2.2.2 掌握小鼠性周期时间** 镜检阴道涂片, 观察阴道涂片的组织细胞学变化, 结合阴道口变化可确定动情期的不同阶段(表 1)。小鼠动情期根据细胞学变化可分 4 个时期。交配一般应在动情前期的晚期或动情期的早期进行, 此段时间交配易受精, 为配种最佳时期。

**2.2.3 把握交配季节** 各种生殖有关的实验一般应在春秋季节进行, 因小鼠怕热畏寒, 而这二季节温度比较适宜, 动物的受孕率较高。若在夏冬季实验, 动物房室温应控制在  $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ , 空气湿度为 50% 左右。

### 2.3 动物交配, 妊娠识别

选择适龄雌雄小鼠, 鉴定动情期是确保小鼠受孕的关键。交配前查看雌鼠外阴和阴道口, 外阴充血肿胀, 阴道口张开且呈干燥状态, 确认为动情期雌鼠。必要时作阴道涂片, 涂片上有大量角化上皮细胞和少量有核上皮细胞, 细胞分散未成团成堆, 即为动情期雌鼠。

阴道栓检查: 小鼠交配后, 在雌鼠阴道口形成一种白色阴栓。阴栓外形为“Y”, 表面有细横纹, 颜色白色, “叉状”段连阴道深部。小鼠阴栓一般在交配后 12~24 h 自动脱落。由于小鼠交配后能

产生这种特殊的阴栓, 所以常把阴栓的有无作为判断是否交配的重要标志<sup>[3]</sup>。

### 2.4 受孕辅助方法及其影响

为提高受孕率, 可对动物进行动情周期诱导和同步化。常用二种方法: 一种是物理方法即“预接触”, 经“预接触”处理后的雌鼠, 40%~50% 可查见阴栓; 另一种是化学方法即对小鼠进行“超数排卵”, 腹腔注射孕马血清促性腺激素, 48 h 后结合人绒毛膜促性腺激素腹腔注射处理的雌鼠, 当晚与雄鼠 1:1 合笼, 一般均可受孕, 70%~90% 可见阴栓。

通过对移植在六孔板上培养的胚胎生长情况观察, 发现自然受精卵胚胎附着率、形成 ICM 的胚数率都较高, ICM 发育很好, 呈团状生长, 只有少量呈条状生长。而超数排卵形成的受精卵的附着率、形成 ICM 的胚数率稍低, ICM 生长出现条状、网状及散状生长, 体外增殖缓慢, 甚至出现不增长的现象(表 2)。实验结果显示, 自然同步发情的生殖是理想的, 可避免药物处理带来的副作用; 超排卵质量较差, 胚胎生活力较差, 体外培养增殖缓慢甚至不增殖。

表 2 BALB/c 小鼠胚胎质量对 ICM 生长的影响  
Table 2 Effect of the quality of BALB/c mouse embryos on ICM

受精方式	胚胎数	附着胚数	形成 ICM 胚数	ICM 形状
自然受精	41	34 (82.9%)	31 (91.2%)	团状及少量条状
超数排卵	37	23 (62.1%)	15 (65.2%)	团状、条状、网状及少量散状

### 2.5 合理管理, 精心饲养

动物饲养应在开放系统动物房进行。由于光照能刺激小鼠性激素的分泌, 对雌鼠性周期有一定的影响作用; 而小鼠又怕热畏寒, 因而采用 12 h: 12 h 明暗光照, 温度为  $18 \sim 25^{\circ}\text{C}$ 。保持鼠房空气相对湿度为 40%~60%, 噪音  $\leq 60$  分贝, 四季都应进行通风换气<sup>[4]</sup>。在冬季配鼠, 温度的控制非常关键。实验结果显示, 当温度过低时, 特别是低于  $8^{\circ}\text{C}$ , 小鼠受孕率极低; 噪音高于 80 分贝时, 小鼠烦躁不安, 打架撕咬, 几乎没有交配现象; 空气相对湿度低于 30% 时小鼠脱毛现象严重。

纯系小鼠对营养要求很高, 对营养变化极为敏感, 因而要适当增加营养。鼠笼、垫料等必须消毒灭菌, 防止病原微生物带入。总之环境要干燥、清洁、安静、温度适宜, 才利于动物繁殖生长。

综上所述, 小鼠性周期动情期的鉴定是确保小鼠按计划时间受孕的关键。光照、温度、湿度、噪音、营养等因素对小鼠性周期影响很大。尤其是在冬季, 温度、光照是影响动物性周期的重要因素。自然交配的受精卵质量较好, 超数排卵有一定副作用, 但不失为一种获得更多卵子的良好辅助办法。

### 3 参考文献

- [1] 菅原七郎著(张志超主译). 哺育动物发育工程实验方法[M]. 南京大学出版社, 1992: 71~109.
- [2] 郝光荣. 实验动物学[M]. 上海: 第二军医大学出版社, 1999: 93~116.
- [3] 王治乔. 新药临床前安全性评价与实践[M]. 北京: 军事医学科学出版社, 1997: 129~132.
- [4] 袁伯俊. 新药评价基础与实践[M]. 北京: 人民军医出版社, 1998: 96~98.