

间情期与发情期比格犬子宫与卵巢组织形态学的比较

许 琴^{1,2}, 任秀梅³, 赵彦斌⁴, 胡仲明⁴, 李建瑛², 孙兆增⁴,
隋丽华⁴, 刘 一⁴, 刘文森¹

(1. 军事医学科学院军事兽医研究所, 长春 130122; 2. 兰州军区乌鲁木齐总医院动物实验科, 乌鲁木齐 830000;
3. 吉林大学畜牧兽医学院, 长春 130062; 4. 军事医学科学院实验动物中心, 北京 100071)

【摘要】 目的 比较比格犬的子宫、卵巢在间情期与发情期的组织形态学的差异, 为后期研究奠定基础。**方法** 用化学发光法测定了 23 只经产比格母犬的血清性激素水平, 选取经血清学鉴定处于发情期的比格犬 2 只, 间情期的比格犬 4 只的卵巢和子宫标本, 中性多聚甲醛固定, 石蜡包埋, 常规 HE 染色镜检, 拍照。**结果** 间情期犬子宫及其内膜较薄, 间质纤维增生, 黄体中以初级卵泡为主, 可见 1~2 个次级卵泡, 未见成熟卵泡, 卵泡和黄体细胞间纤维较多、血管少。发情期犬子宫及其内膜增厚, 内膜腺体腔较大, 部分腺体呈分枝状弯曲, 腺上皮肿大, 胞浆淡染, 少数可见核下空泡。卵巢中卵泡数量较多, 有初级、次级和 1~2 个成熟卵泡。黄体细胞数量多, 排列规则, 境界清楚, 间质纤维比较疏松, 血管多, 未见空泡变性。间情期和发情期犬卵巢中未见明显白体。**结论** 间情期比格犬的性激素维持在一比较低水平, 在发情前期雌激素水平迅速增高, 而在排卵后比格犬的孕酮水平较高。随发情周期的变化, 卵巢和子宫在形态学上发生相应的变化。

【关键词】 比格犬; 发情期; 间情期; 形态学

【中图分类号】 R332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2012)07-0044-04

doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2012.007.012

Comparison of the Uterus and Ovarian Morphology between Diestrus and Estrus Beagles

XU Qin^{1,2}, REN Xiu-mei³, ZHAO Yan-bin⁴, HU Zhong-ming⁴, LI Jian-ying², SUN Zhao-zeng⁴,
SUI Li-hua⁴, LIU Yi⁴, LIU Wen-sen¹

(1. Institute of Military Veterinary, Academy of Military Medical Sciences, Chang Chun 130122, China.
2. Department of Laboratory Animals, Urumqi General Hospital, Lan Zhou Military Districts, Urumqi 830000,
China. 3. Department of Agriculture, Ji-Lin University, Chang Chun 130000, China. 4. Laboratory Animal
center, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100071, China.)

【Abstract】 Objective To compare the uterine and ovarian morphologies between diestrus and estrus Beagles for the further study of their reproductive inefficiency. **Methods** Detected the serum sexual hormone of 23 Beagle bitches, which have been produced once or twice, using chemiluminescence and selected 2 estrus and 4 diestrus Beagles by serological identification for ovarian and uterine specimens, 4% neutral paraformaldehyde-fixed, paraffin-embedded, routine HE stained, photographed. **Results** The uterus and endometrium of diestrus dogs are thin, interstitial fibrosis,

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(31172164)。

[作者简介] 共同第一作者: 许琴(1974-), 女, 博士生, 基础兽医学专业, Email: xuqin740831@163.com。任秀梅(1987-), 女, 硕士生, 临床兽医学专业, Email: renxiumei602@163.com。

[通讯作者] 胡仲明, Email: huzhongming2005@sina.com; 刘文森, Email: Liuws85952@163.com。

corpus luteum are occupied by primary follicles, 1 – 2 visible secondary follicles, no mature follicles. Follicular and luteal cells have more fiber, less vascularized. While the uterus and endometrium of estrus Canines are more thicken, endometrial cavity is larger, part of the gland is branched bend, glandular cells are enlarged, cytoplasm pale dyed, with a small number of visible vacuoles under the nuclear. Ovarian follicles are in large numbers, and are mainly primary, secondary and 1-2 mature follicles. There are numeric luteal cells which arranged regulatory, state clearly, loose interstitial fibrosis, vascular, and no vacuolar degeneration. Diestrus and estrus dogs’ ovarian have no obvious white body. **Conclusion** Diestrus Beagle sex hormone is maintained at a relatively low level, in proestrus estrogen levels increased rapidly, and after ovulation progesterone levels were higher. Morphological changes of ovary and uterus are adapted to the estrous cycle of bitches.

【Key words】 Beagles; Estrus; Diestrus; Morphology

比格犬因其性情温顺, 体型适中, 在国内外一直被用作标准化的实验动物。但随着使用年限的延长, 比格犬种群内的不孕现象比较普遍, 影响了比格犬的生产。另一方面, 作为标准化的实验动物, 对比格犬体重、年龄、个体差异的均一性提出了更高的要求, 因此对比格犬进行诱导发情、同期发情、超数排卵和胚胎移植很必要。但不同于猪、牛、羊, 由于生殖生理的特殊性, 犬卵母细胞的体外培养成熟率低, 辅助生殖研究进展缓慢, 严重制约了其在生物科学研究中的运用^[1]。本研究室对比格犬的生殖生理进行了一定的基础研究^[2,3], 现就发情期与间情期比格犬性激素水平、卵巢与子宫组织形态学的特点进行初步研究, 为后期研究奠定基础。

1 材料和方法

1.1 实验动物

经产比格母犬 23 只, 18 ~ 22 kg, 由军事医学科学院实验动物中心提供, 合格证号: [SCXK-(军)2002-001], 实验动物使用合格证号: [SYXK-(军)2007-005]。

1.2 仪器设备

莱卡切片机(德国), BI2000 图像分析系统(成都泰盟), SIEMENS Centaur-XP 全自动生化分析仪(德国), HITACHI CF 16RX 离心机(日本)。

1.3 方法

由前肢小隐静脉采取静脉血, 室温放置 1 h 后,

经 3500 r/min, 15 min 离心, 吸取血清, -70℃ 冻存, 待检。比格犬经盐酸氯胺酮麻醉后^[4], 放血取卵巢, 子宫组织, 4% 中性多聚甲醛固定, 常规脱水、透明、浸蜡、包埋、切片, HE 染色, 镜检, 拍照^[5]。

血清 PRGE、E₂、FSH、LH 测定: 由 SIEMENS Centaur-XP 全自动生化分析仪用发光法检测。由公司提供的原装配套试剂, 按操作说明书进行。

2 结果

2.1 发情期犬与间情期犬的鉴定

2.1.1 外观及行为学观察: 在生产中, 观察到母犬外生殖器肿大, 水平直径明显增大, 阴道出现血性或浆液性分泌物, 变得兴奋, 喜欢爬跨别的母犬, 饮水增多、频尿, 并试图吸引公犬, 见到公犬后腰下凹, 骨盆部抬高, 后躯转向公犬, 尾摆向一侧露出会阴。将有这种表现的犬暂定为发情期犬, 对没有以上任何一种表现的犬归为间情期犬。

2.1.2 比格犬血清 E₂、FSH、LH、PRGE 的测定: 对比格犬血清雌激素(E₂), 促卵泡生成素(FSH), 促黄体生成素(LH)及孕酮(PRGE)的测定结果如下表:

外观及行为学观察结合血清学指标, 最终选定 2 只发情期犬, 4 只间情期犬, 按照 1.3 所述方法进行后续组织形态学观察。

2.2 发情期犬与间情期犬卵巢与子宫的组织形态学观察(封 3 图 1-9)

2.2.1 子宫: 间情期犬(C1 ~ C6 号)其子宫肌壁厚

表 1 间情期、发情期、发情后期比格犬的性激素水平
Tab.1 Determination of beagles sexual hormone of beagles in diestrus, estrus, metestrus

	雌二醇 (pg/mL) Estradiol (E ₂)	促黄体生成 (mIU/mL) Luteinizing hormone (LH)	促卵泡刺激素 (mIU/mL) Follicle stimulating hormone (FSH)	孕酮 (ng/mL) Progesterone (PRGE)
间情期 (Diestrus) n = 8	3.43 ± 1.21	0.03 ± 0.04	0.27 ± 0.18	0.05 ± 0.08
发情期 (Estrus) n = 9	182.49 ± 162.26	0.31 ± 0.75	0.31 ± 0.21	3.75 ± 6.79
发情后期 (Metestrus) n = 6	3.02 ± 0.78	0.08 ± 0.13	0.26 ± 0.16	27.98 ± 21.03

度平均为 34 mm, 内膜平均厚度 19.25 mm, 内膜腺体均表现为增殖期改变, 腺体小而少, 绝大部分成圆形或直管道, 腺上皮呈立方形, 大小较一致, 腺体间纤维组织多, 排列紧密, 血管较少, 内层肌纤维体积小, 染色较深, 排列紧密, 血管层血管数量较少, 外层肌纤维大小较一致, 排列规则(图 1)。

发情期犬(F_1 、 F_4)子宫肌壁平均厚度为 65 mm, 内膜平均厚度为 55.5 mm, 内膜腺体增生、腺腔大、部分腺体呈分枝状弯曲(图 2), 腺上皮肿大, 胞浆淡染, 偶见核下空泡(图 3), 间质纤维疏松, 血管较多。内层肌纤维增粗, 着色淡。血管层血管数量多而大, 部分血管充血, 外层肌纤维轻度增生, 体积较大(图 4)。

2.2.2 卵巢: 间情期犬的卵巢改变基本相似, 即初级卵泡多而小、次级卵泡 1~2 个、未见成熟卵泡、卵泡间纤维增生(图 5)。黄体细胞体积较小, 胞浆成颗粒状, 排列不规则, 部分细胞间境界不清、核大小不等, 主要改变是可见黄体细胞呈空泡变性(脂肪变), 间质纤维轻度增生、血管少(图 6)。

发情期犬卵巢中卵泡数量多, 有初级卵泡、次级卵泡和 1~2 个成熟卵泡(图 7)。黄体细胞数量多, 排列规则, 境界清楚, 未见空泡变性, 间质纤维比较疏松, 血管多(图 8)。

3 讨论

犬为季节性单次发情, 1 年只发情 1 次, 发情期所持续时间为 1 周左右, 但由于驯化时间较长, 家犬已经不再 1 年只发情 1 次。犬在发情开始 LH 峰后 1~2 d 开始排卵, 排卵前卵泡已经黄体化, 因此卵泡中的孕激素水平较高, 而大多数哺乳动物排卵后才形成黄体, 卵泡中雌激素水平较高; 且大多数哺乳动物排出的卵母细胞已经成熟, 处于第二次减数分裂的中期(M II 期), 而犬排卵发生在第 1 次减数分裂开始时, 排卵后不久生发泡发生破裂, 卵子在输卵管内经 1~3 d 发育至成熟^[6]。由此可见犬的生殖生理不同于大多数哺乳动物, 有其特殊性。

近年来随着养犬业的蓬勃发展, 母犬的繁殖疾病也越来越严重, 特别是不孕症。母犬不孕症在临床上主要表现为: 发情周期延长或长期不发情; 发情的外表征象不明显; 或有发情征象, 但屡配不孕, 有的空怀 1~2 年仍不怀孕^[7]。

由于个体母犬的发情期存在较大的变异, 仅凭经验和外部特征很难准确确定其是否发情排卵, 因

此, 确定母犬发情期和排卵时间是确定交配和防止交配失败的重要技术。目前, 最基本的方法是测定外周血液孕酮浓度, 进行阴道细胞学、阴道镜、行为学检查。本实验中根据犬的行为学及外观表现结合性激素的血清学检测界定其处于发情期或是间情期, 避免了主观判断的偏差。

FSH 和 LH 是调节卵泡正常发育成熟及甾体激素合成所必需的, LH 过低可能导致雌激素合成前体不足, 卵泡早期颗粒细胞对 FSH 的反应低下, 卵泡中、晚期颗粒细胞 LH 受体表达不足, 卵巢旁分泌调节紊乱, 从而影响卵泡的早期发育和最后成熟^[8]。但有资料表明 LH 的半衰期很短, 为实验研究和临床诊断增添了很多不便, 本实验中 LH 测定值普遍偏低可能与其半衰期短有关。因此对于待测样品应及时离心析出血清并于 -70°C 暂时存放, 尽可能在一周内测定结束。人的正常黄体期 P 峰值 $>15\text{ ng/mL}$ 。P 峰 $>10\text{ ng/mL}$ 提示排卵, $<10\text{ ng/mL}$ 提示黄体功能不全, 提示不排卵^[9]。在本实验中两只发情犬的 P 值均 $<5\text{ ng/mL}$, 分析犬只可能是处于排卵前期, 或者是人与犬的种属差异性, 其 P 峰值不同。

研究表明, 间情期犬子宫及其内膜较薄, 间质纤维增生, 黄体中以初级卵泡为主, 可见 1~2 个次级卵泡, 未见成熟卵泡, 卵泡和黄体细胞间纤维较多、血管少。发情期犬子宫及其内膜增厚, 内膜腺体腔较大, 部分腺体呈分枝状弯曲, 腺上皮肿大, 胞浆淡染, 少数可见核下空泡。卵巢中卵泡数量较多, 有初级、次级和 1~2 个成熟卵泡。黄体细胞数量多, 排列规则, 境界清楚, 间质纤维比较疏松, 血管多, 未见空泡变性。间情期和发情期卵巢中未见明显白体。可知卵泡的发育及黄体形成和卵巢间质纤维内血管层的形成关系密切, 这与林秋华等的阐述: 卵泡的生长和黄体的形成是依赖血管形成的, 血管形成对维持正常的卵巢生理起重要作用相一致^[10]。

致谢: 感谢兰州军区乌鲁木齐总医院动物实验科全体工作人员的支持! 特别感谢已是八十高龄, 仍致力于实验病理研究工作的老专家卢开柏主任!

参考文献:

- [1] 邢华. 犬卵母细胞的体内成熟环境与体外成熟培养[J]. 动物学杂志, 2009, 44(6): 160-165.
- [2] 孔德强, 李爱学, 曾林, 等. 一种比格犬雌二醇 β 受体剪切异构体的克隆和序列分析[J]. 中国比较医学杂志, 2011, 21

- (7):44-47.
- [3] 孙兆增,曾林,洪宝庆,等. 乙烯雌酚对间情期比格犬发情的诱导[J]. 中国比较医学杂志,2008,18(11):36-43.
- [4] 孙敬方. 动物实验方法学[M]. 北京:人民卫生出版社,2001:194-195.
- [5] 仲剑平. 医疗护理技术操作常规[M]. 北京:人民军医出版社,1998.
- [6] 张洪海,马承宝,刘国世,等. 犬科动物繁殖生物技术研究进展[J]. 中国畜牧杂志,2005,41(12):54-57.
- [7] 王树声,付伟,赫广伟,等. 母犬不孕症的病因和防治措施[J]. 当代畜牧,2002,10:29-30.
- [8] 罗江霞. LH 在 IVF 中应用的探讨[J]. 医学信息临床医学分册,2011,24(9):5750-5751.
- [9] 孙尚军. 185 例不孕症妇女血清生殖激素测定分析[J]. 中国优生与遗传杂志,2004,12(1):80-90.
- [10] 吴献青,林秋华,张志胜. 卵巢血管形成与卵巢生理[J]. 国外医学计划生育分册,2002,21(2):94-97.
- [修回日期]2012-07-05