

## 大鼠阴道细胞涂片不同染色方法在动情周期判定中的价值

闫 丽<sup>1</sup>, 温 和<sup>2,3</sup>, 唐桂毅<sup>2,3</sup>, 傅 鹏<sup>2,3\*</sup>, 刘 妍<sup>2,3\*</sup>

1. 安徽医科大学药学院, 安徽 合肥 230032

2. 天津药物研究院新药评价有限公司, 天津 300301

3. 天津药物研究院非临床评价技术工程中心, 天津 300301

**摘要:** **目的** 比较吉姆萨、巴氏和邵氏染色在大鼠阴道脱落细胞中的染色效果以及对正确判断动情周期的影响, 确定最佳染色方法。**方法** 对11~12周龄的SD大鼠连续15 d每天上午同一时间采用灌洗法进行阴道涂片, 使用吉姆萨、巴氏和邵氏染色液进行染色, 观察染色效果, 并对三种染色方法的灵敏度、特异度和正确率进行比较。**结果** 吉姆萨染色的细胞颜色单一, 不利于分辨各细胞类型。巴氏和邵氏染色的细胞颜色丰富, 可将不同角化程度的细胞染成不同颜色, 更有助于动情周期的准确判断, 且邵氏较巴氏更易于上色; 和吉姆萨和巴氏染色相比, 邵氏染色灵敏度、特异度最高, 而且阅片结果的正确率也是最高。**结论** 邵氏染色法能更好地反应细胞的形态结构, 有利于正确的判断大鼠动情周期, 且染色过程耗时少, 阅片时间短, 是一种具有良好实用性的大鼠阴道涂片染色方法。

**关键词:** 大鼠; 动情周期; 染色方法; 灵敏度; 特异度; 正确率; 吉姆萨染色; 巴氏染色; 邵氏染色

中图分类号: R965

文献标志码: A

文章编号: 1674-6376(2020)01-0072-05

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2020.01.012

## Diagnostic value of three staining methods for rat vaginal cell smears in determination of estrous cycle

YAN Li<sup>1</sup>, WEN He<sup>2,3</sup>, TANG Guiyi<sup>2,3</sup>, FU Peng<sup>2,3</sup>, LIU Yan<sup>2,3</sup>

1. School of Pharmaceutical Sciences, Anhui Medical University, Hefei 230032, China

2. Tianjin Institute of Pharmaceutical Research New Drug Evaluation Co., Ltd., Tianjin 300301, China

3. Tianjin Engineering Research Center of Drug Preclinical Assessment Technology, Tianjin 300301, China

**Abstract: Objective** To compare the staining effect of Giemsa, Papanicolaou and Shorr staining solution in rat vaginal exfoliated cells and its effect on the correct judgment of estrous cycle, and to determine an optimal staining method for judging estrous cycle.

**Methods** The vaginal smears of 11-12 week old SD rats were carried out by lavage at the same time every day for 15 days. Giemsa, Papanicolaou and Shorr staining solutions were used to observe the staining effect, and the sensitivity, specificity and accuracy of the three staining methods were compared. **Results** The cell color of Giemsa staining was single, which was not conducive to distinguishing the cell types. The cells stained by Papanicolaou and Shorr staining were rich in color, which can dye the cells with different keratosis degrees into different colors, which was more helpful to the accurate judgment of estrous cycle, and Shorr staining was easier to color than Papanicolaou staining. Compared with Giemsa and Papanicolaou staining, Shorr staining had the highest sensitivity and specificity, and the correct rate of reading results was also the highest. **Conclusion** Shorr staining can better reflect the morphology and structure of cells, which is helpful to correctly judge the estrous cycle of rats, and the staining process takes less time and the reading time is short. It is a practical staining method for rat vaginal smear.

**Key words:** rat; estrous cycle; staining methods; sensitivity; specificity; accuracy; Giemsa staining; Papanicolaou staining; Shorr staining

收稿日期: 2019-09-03

基金项目: 国家科技重大新药创制项目(2015ZX09501004)

第一作者: 闫 丽(1991—), 女, 在读研究生, 主要从事生殖毒理学研究。E-mail: yanli3025@163.com

\*通信作者: 傅 鹏(1973—), 男, 硕士生导师。E-mail: fup@tjipr.com

刘 妍(1973—), 女, 硕士, 研究员, 主要从事新药临床前安全性评价研究。E-mail: liuy8@tjipr.com

大鼠动情周期的变化与性激素分泌密切相关<sup>[1]</sup>,在临床前生殖毒性研究中检查大鼠动情周期是预测受试物有无内分泌系统毒性的可靠方法之一。通常情况下,大鼠的动情周期为4~5 d,由动情前期、动情期、动情后期和动情间期4个经典阶段组成<sup>[2]</sup>。在动情周期的4个不同阶段,大鼠阴道上皮细胞的比例和形态等呈现出不同的特点。

高质量的阴道涂片是保证动情周期准确判定的前提,其中染色是至关重要的一个环节。本研究选用吉姆萨、巴氏和邵氏3种染色方法,通过对涂片染色效果的对比,及不同染色方法对动情周期判定的灵敏度、特异度和正确率<sup>[3]</sup>的比较,选择最佳染色方法,为生殖毒性研究提供有效的评价工具。

## 1 材料

### 1.1 实验动物

SPF级健康雌性SD大鼠3只,11~12周龄,体重255~275 g,由北京维通利华实验动物技术有限公司提供,实验动物生产许可证号SCXK(京)2016-0006。动物饲养温度20~26℃,相对湿度40%~70%,换气15次/h,12 h光/暗循环。大鼠自由饮水,食用标准大小鼠维持饲料。

### 1.2 主要试剂

巴氏染色液EA36(批号20190621)、邵氏染色液(批号20190621),生产厂家:Solarbio。吉姆萨应用液自行配制,配制方法为:取约0.76%的吉姆萨母液20 mL,加pH为7.0的磷酸盐缓冲液180 mL混匀。

### 1.3 主要仪器

BX51普通光学显微镜(日本奥林巴斯光学株式会社);DP71显微摄影(日本奥林巴斯光学株式会社);SHHW21三用电热恒温水箱(天津市泰斯特仪器有限公司);通风橱(天津市拉贝尔实验室设备有限公司)。

## 2 方法

连续15 d每天上午9:00采用灌洗法对大鼠进行阴道涂片,将每只大鼠回抽的阴道液制备3份阴道涂片,分别用于吉姆萨、巴氏和邵氏染色。

### 2.1 涂片和固定

大鼠手持固定后,移液枪吸取60 μL生理盐水,轻轻插入阴道内3~5 mm,吹打2~5次<sup>[4]</sup>至液体变浑浊,立即回抽。将10~20 μL回抽液滴于载玻片上,均匀涂开后吸去多余液体。吉姆萨和邵氏的涂片自然干燥后固定,巴氏涂片待湿时固定,均用

95%酒精固定15 min。

### 2.2 染色

**2.2.1 吉姆萨染色** 自来水缓慢冲洗2 min,自然干燥。吉姆萨应用液倒入染色缸,染色时间为35~65 min。冲洗,自然干燥。

**2.2.2 巴氏染色** 自来水缓慢冲洗2 min,自然干燥。95%、80%、70%乙醇各自浸泡1 min,自来水浸泡1 min;苏木素染液染色5~10 min,自来水冲洗2 min;1%盐酸乙醇溶液分化4~5 s,自来水冲洗2 min;蓝化液蓝化2 min,自来水冲洗2 min;70%、80%、95%乙醇(I)(II)各脱水2 min;橘黄G6染液染色2 min,95%乙醇(I)(II)各脱水2 min;EA36染液染色3~5 min,95%乙醇(I)(II)、无水乙醇(I)(II)各脱水1 min。自然干燥。

**2.2.3 邵氏染色** 自来水缓慢冲洗2 min,自然干燥。80%、70%、50%乙醇各自浸泡1 min,自来水浸泡1 min;苏木素染液染色3~5 min,0.5%盐酸乙醇分化4~5 s,自来水冲洗2 min;蓝化液蓝化4 min,自来水冲洗2 min;用猩红橙黄染色液染色1 min,蒸馏水速洗;然后入媒染液处理2 min,入固绿染色液4 min;1%冰醋酸分化30 s,50%、70%、80%、95%、无水乙醇各脱水1 min。自然干燥。

### 2.3 阅片

使用BX51普通光学显微镜,首先在10×物镜下快速浏览整张涂片,选择细胞分散均匀,着色适当的区域,转为20×物镜进行详细阅片,使用DP71显微摄影照相系统进行拍照。

3种染色的阴道涂片分别由3名专业技术人员独立反复评估,评估标准采用的是OECD的相关指导文件,通过观察阴道涂片中上皮细胞(两种类型)、角质化细胞和白细胞的存在、缺失或比例来进行判断<sup>[2]</sup>,对于处于过渡阶段的涂片,通过对前后涂片的对比,辅助进行周期的判断。当3名技术人员评估结束后,将结果进行比对,对于判断结果不一致的涂片进一步复核,并通过讨论得出最终评估结果,该结果即为真实结果。

此后,将所有阴道涂片的玻片号遮盖,并打乱顺序。另外选择一名有经验的技术人员,采用相同判断标准,分别对3种染色的阴道涂片进行盲检,得出一次性盲检结果。

### 2.4 数据计算及统计方法

计算不同染色方法对动情周期各阶段判定的灵敏度和特异度:灵敏度=真阳性/(真阳性+假阴性),特异度=真阴性/(假阳性+真阴性)。

采用 SPSS 20.0 统计学软件进行数据分析,各染色方法间的判定正确率比较采用  $\chi^2$  检验。

### 3 结果

#### 3.1 涂片染色效果

如图 1 所示,动情前期:巴氏和邵氏染色中的有核细胞以粉红色细胞质为主,细胞核显示深蓝至紫色颗粒,对比明显;吉姆萨染色将胞浆与胞核均染为蓝色,深浅不同,总体呈现出一种蓝色色调。

动情期:吉姆萨染色的角化细胞染色较浅;巴氏染色角化细胞的细胞质不均匀染色,部分角化细胞显示淡紫色;邵氏染色将角化细胞均染为橘红色。

动情后期:与巴氏染色相比,吉姆萨和邵氏染色中的白细胞易染成蓝色,有核细胞的胞核为深蓝色,胞核膜周围具有明显的浅蓝色边界;细胞质为粉红色或蓝色,邵氏染色将不同分化程度的角化细胞染成不同的颜色,较吉姆萨和巴氏染色效果鲜明。

动情间期:3种染色白细胞为深蓝至蓝紫色。巴氏将粘液染成淡绿色,吉姆萨和巴氏的有核细胞胞质为蓝色,与白细胞染色相近。邵氏染色有核细胞胞核为深蓝色,在胞核膜周围具有明显的蓝色边界,细胞质呈粉色。结果见图 1。

#### 3.2 3种染色方法对动情周期判定的灵敏度和特异度

每种染色方法共有 45 个样本,经多人反复评议后,其中动情前期 10 个、动情期 11 个、动情后期 3 个、动情间期 21 个。

灵敏度结果:3种染色方法,在动情期的判定中邵氏染色>吉姆萨染色>巴氏染色,在动情间期的判定中邵氏染色=巴氏染色>吉姆萨染色,在动情前期和动情后期的判定中均为邵氏染色>巴氏染色>吉姆萨染色。

特异度结果:3种染色方法,除在动情期的判定中邵氏染色=巴氏染色>吉姆萨染色,其他各期的判定中均为邵氏染色>巴氏染色>吉姆萨染色。

除了在动情期判定中吉姆萨染色法和巴氏染色法的灵敏度方向和特异度方向不一致外,其他各阶段均可视为灵敏度和特异度方向一致。具体结果见表 1、2。

#### 3.3 3种染色方法对动情周期判定的正确率对比

盲检时,采用巴氏和邵氏染色的阴道涂片,对动情周期各阶段的判定正确率均高于吉姆萨染色方法,统计学差异显著( $P<0.05, 0.01$ )。巴氏和邵氏两种染色方法对于动情周期的正确判断无明显差别。

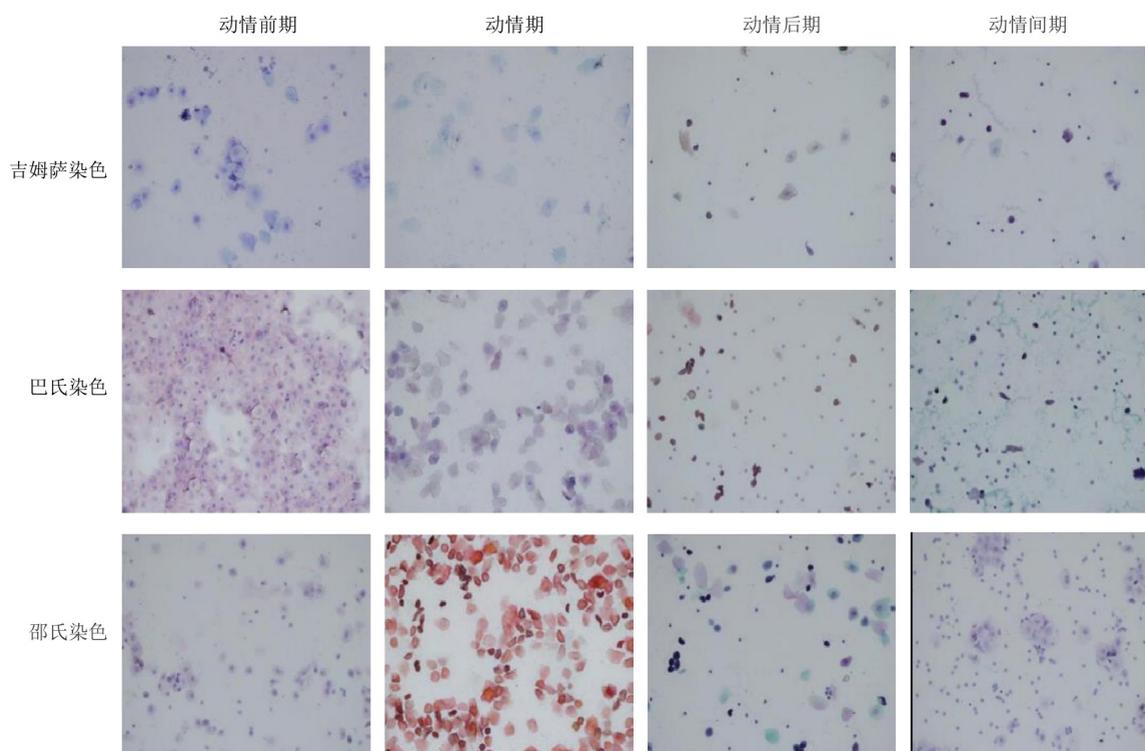


图 1 大鼠阴道脱落细胞不同染色效果对比( $\times 200$ )

Fig. 1 Comparison of different staining effects of vaginal exfoliative cells in rats( $\times 200$ )

表1 3种染色方法动情周期各阶段判断结果比较

Table 1 Comparison of judgment results of each stage of estrous cycle by three staining methods

染色方法	动情周期	阳性(10)	阴性(35)	合计	染色方法	动情周期	阳性(11)	阴性(34)	合计
吉姆萨	动情前期	6(TP)	4(FN)	10	吉姆萨	动情期	9(TP)	2(FN)	11
	非动情前期	4(FP)	31(TN)	35		非动情期	2(FP)	32(TN)	34
巴氏	动情前期	10(TP)	0(FN)	10	巴氏	动情期	8(TP)	3(FN)	11
	非动情前期	1(FP)	34(TN)	35		非动情期	0(FP)	34(TN)	34
邵氏	动情前期	10(TP)	0(FN)	10	邵氏	动情期	11(TP)	0(FN)	11
	非动情前期	0(FP)	35(TN)	35		非动情期	0(FP)	34(TN)	34
染色方法	动情周期	阳性(3)	阴性(42)	合计	染色方法	动情周期	阳性(21)	阴性(24)	合计
吉姆萨	动情后期	2(TP)	1(FN)	3	吉姆萨	动情间期	17(TP)	4(FN)	21
	非动情后期	3(FP)	39(TN)	42		非动情间期	2(FP)	22(TN)	24
巴氏	动情后期	3(TP)	0(FN)	3	巴氏	动情间期	20(TP)	1(FN)	21
	非动情后期	2(FP)	40(TN)	42		非动情间期	1(FP)	23(TN)	24
邵氏	动情后期	3(TP)	0(FN)	3	邵氏	动情间期	20(TP)	1(FN)	21
	非动情后期	1(FP)	41(TN)	42		非动情间期	0(FP)	24(TN)	24

TP:真阳性;FP:假阳性;FN:假阴性;TN:真阴性

TP: true positive;FP: false positive; FN: false negative Sex; TN: True negative

表2 3种染色方法的灵敏度和特异度

Table 2 Sensitivity and specificity of three staining methods

染色方法	动情周期	灵敏度/%	特异度/%
吉姆萨	动情前期	60.00	88.57
	动情期	81.82	94.12
	动情后期	66.67	92.86
	动情间期	80.95	91.67
巴氏	动情前期	100.00	97.14
	动情期	72.73	100.00
	动情后期	100.00	95.24
	动情间期	95.24	95.83
邵氏	动情前期	100.00	100.00
	动情期	100.00	100.00
	动情后期	100.00	97.62
	动情间期	95.24	100.00

表3 3种染色方法动情周期判断正确率的比较

Table 3 Comparison of accuracy of estrous cycle judgment between three staining methods

染色方法	总例数	正确例数	错误例数	正确率/%
吉姆萨	45	34	11	75.6
巴氏	45	41	4	91.1*
邵氏	45	44	1	97.8**

与吉姆萨染色结果判定的正确率比较:\*P<0.05 \*\*P<0.01

\*P<0.05 \*\*P<0.01 vs correct rate of Giemsa staining results

#### 4 讨论

吉姆萨染色为目前常规阴道涂片染色方法,巴氏染色多应用于临床子宫颈癌的筛查<sup>[5]</sup>,临床前研究中也应用,邵氏染色用于大鼠阴道细胞涂片的报道较少。从本研究的3种染色涂片镜检结果来看,吉姆萨染色时间较长易造成杂质被染色,导致背景杂乱暗淡,致使细胞成分与背景颜色的对比度不鲜明,清晰度差;而巴氏和邵氏染色背景干净,杂质不易着色,有利于动情周期的判断。就细胞染色效果而言,吉姆萨染色胞浆不易着色,染色的细胞颜色相近,区分各细胞类型有一定困难;巴氏和邵

氏染液均可将不同类型的细胞以及不同分化程度的角化细胞染成不同的颜色,分色明显,易于区分,但巴氏染液染色效果不稳定,有时候会出现角化细胞、白细胞不易染色或染色暗淡的情况,不利于区分动情后期和动情间期。邵氏染色能较好的反应细胞的形态结构,色彩丰富,分色恰当,各细胞类型容易识别。

本研究中采用的盲检方法,除了将玻片号遮盖、玻片顺序打乱外,在阅片过程中,也不允许阅片人员对于可疑结果进行前后涂片的对比,使所得结果均为一次镜检样本产生的结果。通过这种限制,更有利于区分不同染色效果在动情周期准确判断上的差异。研究结果显示,邵氏和巴氏染色对于动情周期结果判断的准确率较高,均在90%以上。

灵敏度和特异度自Yerushalmy于1947年提出以来,一直是临床中用来评价诊断方法优劣和临床

价值的两个常用指标。本研究引入这两个指标,将镜检结果进行量化,更利于直观理解不同染色方法的优劣。研究结果显示,邵氏染色方法在动情周期各阶段的准确判断中灵敏度和特异度最高,巴氏染色除在动情期判断中的灵敏度略低于姬姆萨染色外,在其他各阶段的判断中均高于姬姆萨染色。

通过对3种染色方法的染色效果对比、灵敏度和特异度对比、结果判断的准确率比较,综合分析认为,大鼠阴道涂片采用邵氏染色,使细胞色彩鲜明、形态结构清晰,更加利于阅片,能够提高动情周期结果判断的准确率。目前市场上已有一步式邵氏染色液销售,可使染色过程更简化、染色耗时更短。

#### 参考文献

- [1] Cora M C, Kooistra L, Travlos G. Vaginal cytology of the laboratory rat and mouse: review and criteria for the staging of the estrous cycle using stained vaginal smears [J]. *Toxicol Pathol*, 2015, 43(6): 776-793.
- [2] OECD Guidance document for histologic evaluation of endocrine and reproductive tests in rodents. Part 5: Preparation, Reading and Reporting of Vaginal Smears [S]. <https://www.oecd.org/chemicalsafety/testing/43804816.pdf>.
- [3] Son S Y, Choi H Y, Lee Y, et al. Rapid staining using the shorr method for intraoperative peritoneal washing cytology in advanced gastric cancer: a pilot study from a single institution [J]. *J Gastric Cancer*, 2019, 19(2): 173-182.
- [4] Hubscher C H, Brooks D L, Johnson J R. A quantitative method for assessing stages of the rat estrous cycle [J]. *Biotech Histochem*, 2005, 80(2): 79-87.
- [5] Paccola C C, Resende C G, Stumpp T, et al. The rat estrous cycle revisited: a quantitative and qualitative analysis [J]. *Anim Reprod*, 2013, 10(4): 677-683.