

# 大熊猫的早期妊娠诊断

刘维新 刘农林 谢 钟

(北京动物园科研所)

## 摘 要

大熊猫 (*Ailuropoda melanoleuca*) 的早期妊娠诊断, 是大熊猫繁殖生物学研究中引人注意的课题之一, 国内外尚无这方面报道。我们在 1985—1987 年间采用 E-玫瑰花环形成试验进行探索, 根据母体外周血中 T 细胞的 E-玫瑰花环结合率的变化诊断大熊猫妊娠。试验结果发现, 妊娠者在配种后 96—144 小时 T 淋巴细胞的 E-玫瑰花环结合率有明显下降, 而未妊者则不明显, 借此能比较准确地诊断大熊猫妊娠。

**关键词 (Key words):** 大熊猫 (*Giant panda, Ailuropoda melanoleuca*), 妊娠 (Pregnancy), 诊断 (Diagnosis), E-玫瑰花环形成试验 (Erythrocyte rosette formation test)。

大熊猫 (*Ailuropoda melanoleuca*) 的妊娠诊断, 特别是早期妊娠诊断, 一直是大熊猫繁殖生物学研究中引人注目的课题之一。准确的早期妊娠诊断能使我们及时确定配种效果, 据此制定饲养护理方案, 提高繁殖存活率; 同时, 对于即刻判定精液的品质, 能提供重要的参考依据。

大熊猫的妊娠诊断, 国外曾有报道, Hodges 等 (1984) 报道了大熊猫妊娠期甾体激素的变化, Masui 等 (1985) 连续 5 年测定了大熊猫尿液中的雌激素和孕二醇。以上研究都想借激素或其代谢产物的变化规律预测大熊猫的妊娠。但是, 这种方法往往要在配种 50 天以后才能得到结果, 由于非妊娠熊猫也出现近似妊娠熊猫的激素分解产物的峰值变化, 所以这种方法曾多次出现诊断错误, 结果不能十分令人满意。因此, 准确的早期妊娠诊断对于大熊猫繁育实践更为重要。

免疫学研究的进展, 使人们把免疫机能与妊娠联系起来。Medawar (1953) 提出“母体免疫机能在妊娠期间相应降低”。Morton 等 (1974) 应用玫瑰花环抑制实验研究了与妊娠相关的 T 细胞反应性的变化, 结果表明, 取自妊娠 14 天内的孕鼠淋巴细胞与标准抗淋巴细胞血清 (Als) 形成的玫瑰花环抑制反应滴度 (RIT) 明显高于未孕鼠的淋巴细胞, 而且这一反应在小鼠交配 4—6 个小时之后即可测出。因此, 他们认为 RIT 的增加是由于一种称为早期妊娠因子 (EPF) 的血清因子所致 (Morton 等, 1976)。Clarke 等 (1980) 的研究证明, EPF 是一种具有多分子量结构的蛋白质。Noonan 等 (1979) 研究证明了 EPF 对 T 细胞的作用没有种属特异性。Morton 等 (1979) 对羊进行的早期妊娠试验及 Koch 等 (1983) 的研究都说明早期妊娠因子生物学可以应用于早期妊娠诊断。

本文于 1989 年 7 月 10 日收到, 同年 11 月 27 日修回。

此后,卢伟成(1983)、邵振堂(1987)、郑德先(1983)、吴白涛(1981)等先后对人、小鼠、猪、羊、牛等的T细胞免疫机能进行了研究,丰富和证明了上述研究成果。

据此,本实验采用E-玫瑰花环形成试验测定母体外周血中T细胞的变化,根据T细胞的机能变化,作大熊猫早期妊娠诊断。

## 材料和方法

### 1. 实验动物

大熊猫 供试验用的7只大熊猫均为本园饲养的健康雌兽,与雄兽隔离管理,年龄为3.5—22岁(表1)。

绵羊 本园饲养的成年雄性健康个体。

表1 实验动物状况表  
Table 1 Condition of laboratory animals

年 度 Year	1985		1986				1987		
动物编号 No. of animals	I	I	IV	I	VI	I	V	II	VI
实验时年龄 Age of being experimented	11	3.5	4.5	4.5	21	12	9	17	4.6
实验序号 Ordinal No. of laboratory	1	2	3	4	5	6	7	8	9

### 2. 试剂

(1) 无钙镁Hank's液。(2) 肝素:12500单位/支,用NS稀释成500单位/毫升备用。(3) Ficoll-IP;比重1.075—1.080。(4) 灭菌灭活吸收之小牛血清。(5) pH 6.4的1/15磷酸缓冲液。(6) 0.8%戊二醛溶液。(7) 瑞氏染色液。

### 3. 试验方法

(1) 采用全量法E-玫瑰花环形成试验,测定外周血中E-玫瑰花环结合率,根据结合率的变化进行早期妊娠诊断。

(2) 血样采集 大熊猫血:无菌操作,从四肢静脉采血,每次4毫升,分装两试管中,肝素抗凝,用以分离淋巴细胞,作两组平行试验。在发情期人工授精,第一次人工授精时,在操作之前采集血样,作自身对照样,以后每隔48小时授精一次,同时采集血样,作试验样,直至发情结束。绵羊血:无菌操作,采集颈静脉血,用玻璃珠脱纤,以Hank's液洗涤3次,2500转/分离心,弃上清液后,将压积的羊红细胞以Hank's液配成1%羊红细胞悬液,细胞浓度约为 $2 \times 10^8$ /毫升,4℃冰箱保存,两周内使用。

(3) 大熊猫血样在采集后4小时之内开始试验,将第一次人工授精前采集的血样经试验测定的数值作为该个体的自身对照值。

(4) 操作程序 完全采用余赟等(1982)的全量法E-玫瑰花环形成试验的操作程序:肝素抗凝血2.0毫升加等量Hank's液,混匀后置于2.0毫升Ficoll-IP分层液上,2000转/分离心20分钟。吸出淋巴细胞层至含5毫升Hank's液试管中,1000转/分离心10分钟,随后再重复一次。用Hank's液配成 $5 \times 10^6$ /毫升的淋巴细胞悬液,取淋巴细胞悬液0.1毫升,加入小牛血清0.1毫升及1%羊红细胞悬液0.2毫升后混匀。37℃水浴5分

钟, 500转/分离心5分钟。然后在4℃冰箱2小时或过夜。取出样品, 旋转混匀, 加入0.8%戊二醛1滴。4℃冰箱内置20分钟, 500转/分离心5分钟, 弃上清液。沉淀混匀后, 推片, 染色, 镜检。

(5) 结果观察 凡结合3个以上羊红细胞者为阳性花环形成细胞, 计数200个淋巴细胞中形成花环的淋巴细胞数, 并算出百分率。

(6) 数据处理 将妊娠大熊猫与非妊娠大熊猫分成两组, 采用成对比较试验的方法, 分别对两组的实验结果进行差异显著性检验。

## 结 果

1985—1987年对9只次大熊猫做了E-玫瑰花环形成试验, 结果如下:

1. 不同大熊猫个体间T淋巴细胞E-玫瑰花环结合率的差异很大。如表2所示, I号和Ⅶ号个体都在70%以上, IV号却只有41.5%。即使同一只大熊猫在不同年度E-玫瑰花环结合率也会有差别, 只有以每只大熊猫试验期的样品间作自身对照, 才能确定E-玫瑰花环结合率在该试验期间的变化。

表2 E-玫瑰花环结合率  
Table 2 The percentage of E-RFC

实验号 Ordinal No.	动物编号 No. of animals	小 时 Hours						
		0	48	96	144	192	240	288
		数 值 Figures						
*1	I	59.0%	50.0%	29.0%	11.0%			
2	I	73.5%	40.0%	71.0%	60.0%			
3	IV	41.5%	40.0%	44.5%				
*4	I	78.3%	80.3%	27.7%	39.5%	36.7%	51.5%	42.3%
5	Ⅶ	67.5%	67.0%	75.0%				
*6	I	58.3%	49.5%	61.7%	96.7%			
7	V	60.0%	86.0%	59.0%	67.5%	50.6%		
8	I	57.9%	49.1%	61.5%				
*9	Ⅶ	70.9%	54.8%	59.3%	51.3%			

\* 妊娠 pregnancy

2. 对9只次大熊猫E-玫瑰花环形成试验所得数据进行差异显著性检验(表3)。结果表明: 妊娠组大熊猫首次与末次血样的E-玫瑰花环结合率差异显著( $t > t_{0.05}$ ), 末次E-玫瑰花环结合率明显低于首次(图1), 而未妊娠组首末次值近似(图2), 无显著差异( $t < t_{0.05}$ )。

3. 以每只大熊猫自身对照, 计算末次血样所测数值较首次下降的相对差值  
( $\frac{\text{首次数值} - \text{末次数值}}{\text{首次数值}}$ ) 得知妊娠组相对差值最小为27.64%, 而非妊娠熊猫最大为

18.37%。如表4、图3所示, 当配种后的雌熊猫末次血样E-玫瑰花环结合率较首次对照下降的相对差值大于27.64%时, 显示早期妊娠。

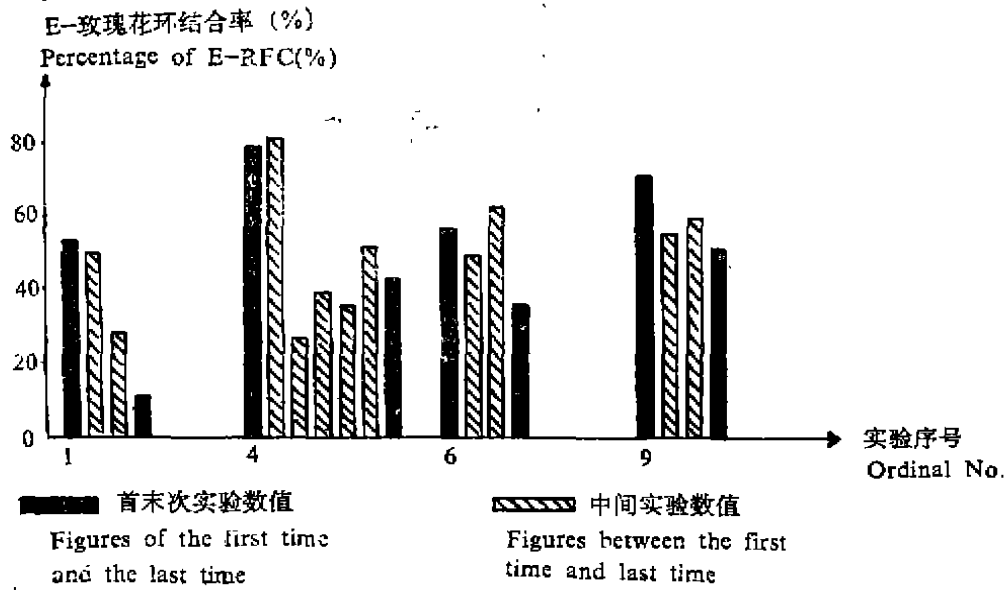


图 1 E-妊娠玫瑰花环结合率  
Fig. 1 The percentage of E-RFC in pregnancy group

表 3 E-玫瑰花环结合率差异显著性检验  
Table 3 The significant difference test of the percentage of E-RFC

	实验序号 Ordinal No. of laboratory	首次数值 Fig. of the first time	末次数值 Fig. of the last time	差数 d Margin d	d <sup>2</sup> Variance	备注 Remarks
妊娠组 Pregnancy group	1	53.0	11.0	42.0	1764.0	t = 5.11
	4	78.3	42.3	36.0	1296.0	t <sub>0.05</sub>
	6	56.3	36.7	19.6	384.2	= 3.182
	9	70.9	51.3	19.6	384.2	t > t <sub>0.05</sub>
		258.5	141.3	117.2	3828.4	
非妊娠组 Non-pregn- ancy group	2	73.5	60.0	13.5	182.3	t = 0.43
	3	41.5	44.5	-3.0	9.0	t <sub>0.05</sub>
	5	67.5	75.5	-7.5	56.3	= 2.776
	7	60.0	50.6	9.4	88.4	t < t <sub>0.05</sub>
	8	57.9	61.5	-3.6	13.0	
		300.4	291.6	8.8	349.0	

表 4 首末次 E-玫瑰花环结合率相对差值表  
Table 4 Relative margin of the percentage of E-RFC the first time and the last time

实验序号 Ordinal No. laboratory	动物编号 No. of animals	首次数值 Fig. of the first time	末次数值 Fig. of the last time	相对差值 Relative margin
*1	I	53.0	11.0	78.25%
2	I	73.5	60.0	18.37%
3	IV	41.5	44.5	-7.23%
*4	I	78.3	42.3	45.98%
5	V	67.5	75.0	-11.11%
*6	I	56.3	36.7	34.81%
7	V	60.0	50.6	15.67%
8	II	57.9	61.5	-6.22%
*9	V	70.9	51.3	27.64%

\* 妊娠 Pregnancy

E-玫瑰花环结合率 (%)  
Percentage of E-RFC (%)

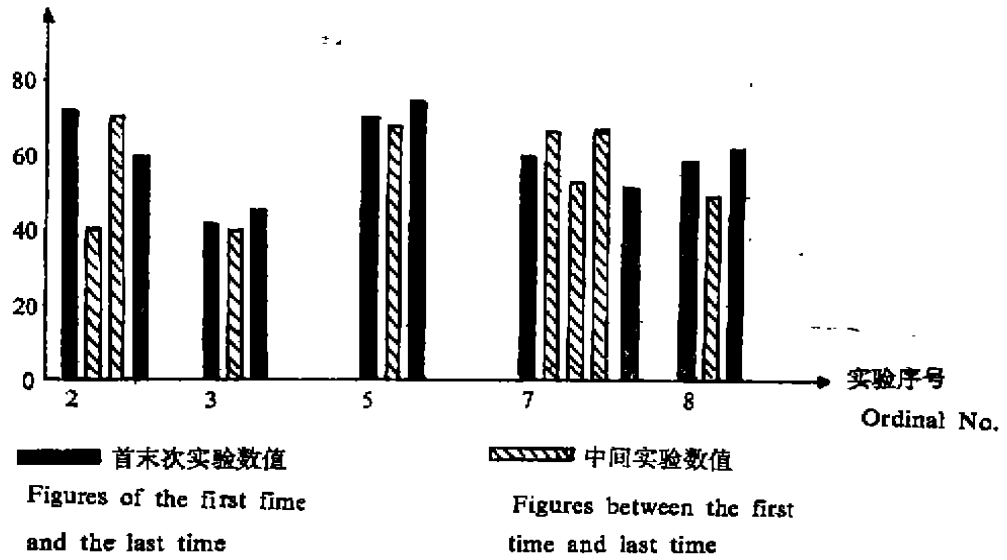


图 2 未妊娠组 E-玫瑰花环结合率  
Fig. 2 The percentage of E-RFC in non-pregnancy group

相对差值 (%)  
Relative margin (%)

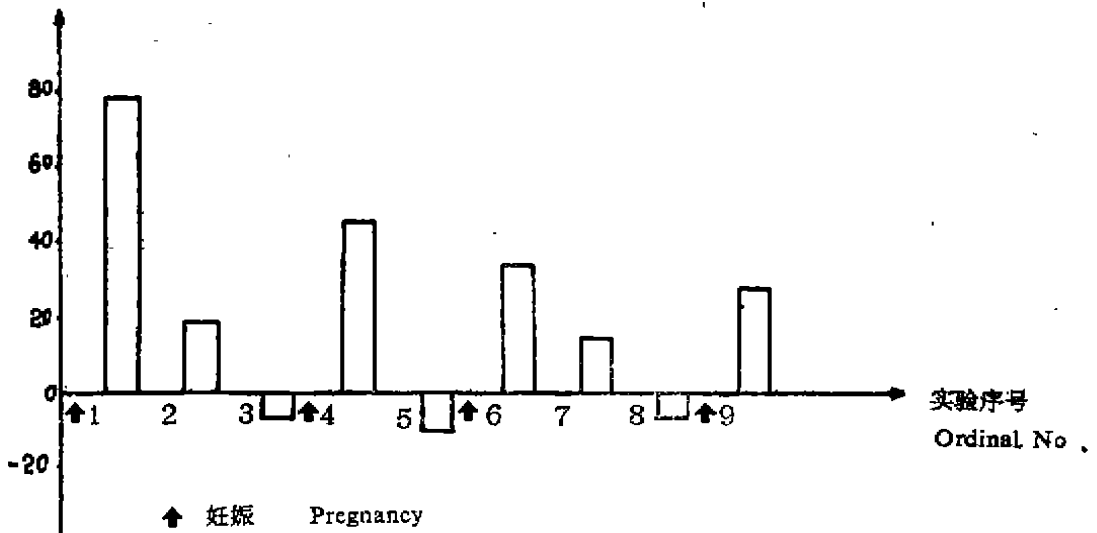


图 3 首次 E-玫瑰花环结合率相对差值  
Fig. 3 Relative margin of the percentage of E-RFC of the first time and the last time

## 讨 论

1. 以 E-玫瑰花环结合率的变化对 9 只次大熊猫作早期妊娠诊断, 鉴别出 4 只次母兽早期妊娠和 5 只次母兽未妊, 这一结果与吴白涛 (1981) 用同样方法对人所做的实验结果是一致的。可见以 E-玫瑰花环结合率明显下降为依据, 作大熊猫的早期妊娠诊断

是可行的，并且比较准确。

2. 试验过程中发现，妊娠大熊猫 E-玫瑰花环结合率下降的幅度差异较大，下降最大者相对差值可达 79.25%，而最小者仅 27.64%，同时发现，产双胎者下降幅度相当于产单胎者的两倍左右。如表 4 中之实验号 1 产双胎，相对差值为 79.25%；实验号 4 相对差值为 45.98%，实验号 6 相对差值为 34.81%，实验号 9 为 27.64%，这 3 只次均产单胎。这种现象是否偶然，仍需进一步研究。

3. 鉴于可供研究的大熊猫是珍稀兽种，不允许完全按试验需要连续长时间采集血样，因此，难以测定出妊娠母兽 E-玫瑰花环结合率开始下降的准确时间，以及其开始恢复正常水平的的时间。尽管如此，对大熊猫来说，配种后 96~144 小时即可确诊妊娠，这种诊断方法仍是快速的。

4. 有受精卵存在时，母体免疫机能发生改变，这在小鼠和猪等多种动物实验中已得到证实。所以，大熊猫在人工授精后其 T 淋巴细胞 E-玫瑰花环结合率出现明显下降，这可能是受精卵出现的反映。这一信息不仅对于孕兽早期管理有实际价值，而且对胚胎移植手术有重要参考价值，手术人员可根据这种信息确定移植早期胚胎的日期。

5. 由于可供研究的大熊猫个体很少，采集样品必须不干扰其正常的繁殖活动，有很大的局限性。所以，此项研究虽然已有 3 年，仍需利用一切机会和条件进行继续探索，以完善本试验，并应用于生产实践。

### 参 考 文 献

- 卢伟成, 李宝贵, 高进, 谢少文 1983 猪外周血淋巴细胞的扫描电镜观察。中国医学科学院学报 5 (6): 330—331。  
 吴白涛, 刘绚 1987 正常妊娠时母体细胞免疫功能。中华妇产科杂志 16 (3): 147—149。  
 邵振堂, 刘慕真, 佟慕光, 侍庆, 俞亚平, 陈希珍 1987 关于正常孕妇 T 细胞功能的研究。中华妇产科杂志 22 (3): 150—152。  
 余演, 谢少文, 杨贵贞, 许以平 1982 临床免疫技术, 302—338, 上海科学出版社。  
 郑德先, 刘士廉 1983 猪外周血淋巴细胞表面 E 受体的分离纯化及其生物化学性质的研究。中国科学 B 辑 (4): 329—337  
 Clarke, F.M., H.Morton, B.E.Rolfe and G.J.A.Clunie 1980 Partial characterisation of early pregnancy factor in the sheep. Journal of Reproductive Immunology. 2, 151—182.  
 Hodges, J.K., D.J.Bevan, M.Celma, J.P.Hearn, D.M.Jones, D.G.Kleiman, J.A.Knight and H.D.M. Moore 1984 Aspects of the reproductive endocrinology of the female Giant panda (*Ailuropoda melanoleuca*) in captivity with special reference to the detection of ovulation and pregnancy. J.Zool., Lond. 203, 253—287.  
 Koch, E., H.Morton and F.Ellendorff 1983 Early pregnancy factor: Biology and practical application. Br.vet. J.Vol. 139, No. 52—58.  
 Masui, M.ph.D.D.V.M., H.D.V.M.Hiramatsu, K.D.V.M.Saito and K.D.V.M.Nose, 1985 Seasonal fluctuation of urinary estrogens and pregnanediol in Giant panda *Ailuropoda melanoleuca*  
 Medawar, P.B. 1953 Some immunological and endocrinological problems raised by the evolution of viviparity in vertebrates. Symposium of the Society for Experimental Biology No.7. 320—338.  
 Morton, H., V.Hegh and G.J.A.Clunie 1974 Immunosuppression detected in pregnant mice by rosette inhibition test. *Nature*, Lond. 249, 459—460  
 Morton, H., V.Hegh and G.J.A.Clunie 1976 Studies of the rosette inhibition test in pregnant mice: evidence of immunosuppression? *Proc.R.Soc.Lond.B* 193, 414—419  
 Morton, H. G.J.A. Clunie 1979 A test for early pregnancy in sheep. *Research in Veterinary Science* 28, 281—262  
 Noonan, F.P., W.J.Halliday, H.Morton and G.J.A.Clunie 1979 Early pregnancy factor is immunosuppressive. *Nature*, London. 278, 649—850

## 外文摘要( Abstract)

DIAGNOSIS OF THE EARLY STAGE OF GIANT  
PANDA'S PREGNANCY

LIU Weixin LIU Nonglin XIE Zhong

*(Science and Technology Research Institute, the Beijing Zoological Garden)*

No report had ever been published on the diagnosis of the early stage of pregnancy of the Giant panda (*Ailuropoda melanoleuca*) either in China or abroad. This is a valuable subject in the field of Giant Panda breeding biology. On the basis of many years of research, we had made erythrocyte rosette formation test to diagnose the early stage of Giant Panda's pregnancy from 1985 to 1987. The diagnosis was based on the variation of the combination rate of erythrocyte rosette of T-cell in the blood of the female. The result showed that pregnant female had obvious decline in the combination rate of erythrocyte rosette of T-cell after 96—144 hours of mating while non-pregnant female hadn't. By such test we can readily distinguish the pregnant from the non-pregnant.