



同品系小鼠卵巢移植方法的建立

郁丽丽¹, 刘丽均¹, 王俊风¹, 魏勤², 李森², 张艺宝³, 施美莲¹, 廖侃², 徐平^{1,2}

(1. 上海斯莱克实验动物有限责任公司, 上海 201615; 2. 中国科学院上海生命科学研究院, 上海 200031;
3. 南京农业大学动物医学院, 南京 210006)

【摘要】 目的 建立 KM、ICR、C57BL/6J、BALB/C 四个品系新鲜卵巢异体同位移植的方法。方法 上述四个品系出生 10 d、20 d、4 周的仔鼠作为供体, 取出整个卵巢, 将卵巢原位移植到同品系 4 周龄受体雌鼠, 术后置于屏障系统内精心饲养, 5~8 周后, 与同品系成年雄鼠交配, 观察移植受体是否有正常的繁殖功能。结果 同品系不同时间段的新鲜卵巢, 移植到同品系受体中, 移植卵巢在受体体内可以恢复正常功能, 受体可以正常交配, 产生正常的仔鼠。结论 同品系不同日龄的异体同位卵巢移植方法可行。

【关键词】 小鼠; 卵巢移植; 同位移植

【中图分类号】 R-332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2013)07-0041-03

doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2013.07.010

Established a method of ovarian heterotopically transplantation in same strain

YU Li-li¹, LIU Li-jun¹, WANG Jun-feng¹, WEI Qing², LI Miao², ZHANG Yi-bao³, SHI Mei-lian¹, LIAO Kan², XU Ping^{1,2}
(1. Shanghai SLAC Laboratory Animal Co. Ltd., Shanghai, 201615; 2. Shanghai Institutes of Biological Sciences, Chinese academy of science, 201615; 3. college of veterinarian medicine, Nanjing agriculture university, 210006)

【Abstract】 Objective To establish a method of ovarian heterotopically transplantation in KM, ICR, BALB/c and C57BL/6J mice. **Methods** the ovaries were used as donor from 10d, 20d and 4w of KM, ICR, BALB/C and C57BL/6J mice, and were grafted to the 4w accepters of same strains. All accepters were bred about 4-week-old, then mated with the same strain male mice to identify the reproductive capacity of the donors. **Results** the grafted ovaries could be restored reproduction, and gotten the normal pups when mated with same strain males. **Conclusion** It is feasible that ovarian heterotopically transplantation in the same mouse strains of different age phases.

【Key words】 Mouse; Ovarian; Heterotopically transplantation

随着分子生物学技术的发展, 各种转基因鼠、基因剔除鼠、基因导入鼠的品系日益增多。很多的基因工程小鼠, 尤其是疾病模型小鼠, 因自身的繁殖能力低下或者未成年就死亡, 亦因先天性无输卵管、子宫等而出现繁殖困难或断种等问题。如何繁育这些品系, 除体外受精、辅助体外受精(ICSI, PZD) 等技术

外, 卵巢移植也是一个行之有效的方法。卵巢移植始于 19 世纪末, 科学家通过大量的动物实验将卵巢移植到皮下、脑内前房或腋下等^[1-3], 发现移植的卵巢能够存活、排卵、分泌雌激素并维持正常的性周期。目前国内外卵巢组织移植研究中, 移植部位较多的有卵巢蒂即原位移植、肾包膜下、腹壁皮下、手臂内侧皮

[基金项目] 上海市科委科技项目(11140902700); “重大新药创制”科技重大专项(2011ZX09307-302); 国家科技支撑计划课题(2013BAK11B02)。

[作者简介] 郁丽丽(1983 -), 实验师, 专业领域: 低温生物学和生殖工程学, jiliyu_ren@sina.com。

[通讯作者] 徐平, 研究员, E-mail: pingxu@sibs.ac.cn。

下等^[4]。国外文献报道卵巢原位移植和肾包膜下及腹壁皮下移植,卵巢组织血管再生,血供形成,卵泡和卵子的发育情况无明显差异^[5],本实验选用原位移植,采用不同品系小鼠进行异位同位移植,并进行比较。以期建立同位卵巢移植的方法,为小鼠卵巢移植提供依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物

SPF 级 KM、ICR、C57BL/6J、BALB/c 雌性,10 d、20 d、4 周龄幼鼠各 5 只,为供体鼠,受体鼠为同品系 4 周龄雌性小鼠 15 只,同品系能正常繁殖交配成年雄鼠各 15 只。四个品系小鼠均由上海斯莱克实验动物有限责任公司提供,生产许可证【SCXK(沪)2012—0002】。

1.1.2 饲养管理及环境

实验小鼠均饲养在屏障系统中,使用许可证【SYXK(沪)2012—0002】。屏障内的空气为 10000 级的全新风,室内温度控制在 $(23 \pm 2)^\circ\text{C}$,相对湿度 45%~65%,换气次数 15 次/h;光照明暗交替 12h/d;动物自由采食和饮水。

1.1.3 仪器及试剂

手术剪刀、维纳斯剪、镊子、脂肪镊、解剖镜(Nikon SMZ645)、M2(SIGMA M7167)。

1.2 实验方法

1.2.1 供体卵巢采集

采用颈椎脱臼法处死,可在解剖镜下,剖开腹部,找到子宫后,沿着子宫往上找到输卵管和卵巢,用一镊子夹住输卵管,另一镊子夹住卵巢上方脂肪垫,向外撕开卵巢囊膜,整个卵巢膜被撕坏,沿卵巢蒂底部剪断卵巢,将整个卵巢取出,置于 0°C 的 M2 溶液中待移植。

1.2.2 受体卵巢移植

受体鼠用 0.5% 的戊巴比妥钠麻醉,腹背部开口,拉出脂肪垫,用脂肪镊夹住脂肪,固定卵巢,在卵巢包膜上滴一滴肾上腺素,在包膜边缘剪一小口,沿着卵巢外缘,小心的将包膜剪开 1/2,不要将包膜中间剪坏,沿着开口往上翻开包膜,使整个卵巢暴露出来,用弯头维纳斯剪剪掉卵巢蒂,摘除整个卵巢,然后将上述同品系供体的待用卵巢移植入受体鼠卵巢原位中,将卵巢包膜翻下,覆盖住刚植入的新鲜卵巢,将子宫和卵巢轻轻塞入腹腔复位后,缝合肌肉和皮肤。另一侧卵巢用同样方法摘除再植入供体卵巢。手术后的受体鼠置于 37°C 恒温

台保温,待其苏醒。

1.2.3 实验设计

实验组一:将供体鼠四个品系 10d 龄的整个卵巢,移植入同品系 4 周龄的受体雌鼠卵巢包膜内,各 5 只。实验组二:供体鼠四个品系 20d 的整个卵巢,移植入同品系 4 周龄的受体雌鼠卵巢包膜内,各 5 只。实验组三:四个品系 4w 龄的整个卵巢,移植入同品系 4 周龄的受体雌鼠卵巢包膜内,各 5 只。

1.2.4 术后繁殖

将术后苏醒的小鼠转移到动物房精心饲养。植入 10 d 和 20 d 龄的受体鼠饲养 8 周,4 周龄的受体鼠饲养 5 周后,分别与同品系雄鼠交配,待怀孕产仔后,统计产子数。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 11.2 统计软件进行单因素方差分析,数据以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。

2 结果

2.1 卵巢移植后产仔情况

表 1 结果显示 4 个品系不同日龄小鼠移植卵巢后,均能得到正常的后代,由此证明移植的新鲜卵巢在受体体内可以恢复正常功能,受体可以正常交配并产下正常的仔鼠。三种日龄中 4 周龄供体的怀孕率比 10d 和 20d 龄的怀孕率低,但产仔数较高。ICR 和 KM 小鼠的平均产仔数比正常鼠的产仔数低。

2.2 移植卵巢图片

将小鼠进行剖检,ICR、KM、C57BL/6J、BALB/C 小鼠龄卵巢坏死、包膜内积液和包膜内斑点占总卵巢的 28%、23%、10%、10%,未发现卵巢占总卵巢 18%、16%、13%、23%,以上几种情况见图 1(彩插 5) ①卵巢坏死,萎缩,卵巢成黄色,如图 A; ②卵巢包膜内是液体没有实质的卵巢,卵巢组织被吸收,如图 B; ③卵巢包膜上有白色的斑点,如图 C; ④无卵巢或滑入腹腔,如图 D; ⑤卵巢在受体体内发育良好,颜色鲜红,可见卵泡,如图 E。

3 讨论

三组实验以 10d、20d、4 周龄鼠的卵巢为供体,移植到 4 周龄同品系的小鼠体内的结果显示,将卵巢异位移植受体后和正常的雄鼠交配,三组实验鼠均可怀孕、产仔。说明移植卵巢可以在受体内存活,并正常发育、成熟和输卵管、子宫建立互动关系。梁元晶等^[6]、陈淑颖等^[7]的研究均显示,小鼠卵巢自体异位移植后,可以很好的存活,并能恢复正常的性周期。在受体动物双侧卵巢全切,体内缺

表 1 4 个品系小鼠三个日龄的卵巢移植结果比较($\bar{x} \pm s$)
Tab. 1 comparing the result of 4 strains ovarian heterotopically transplantation with 3 ages

供体(受体)	日龄	供体数	怀孕个体数	产仔数	平均产仔数
Donor(receptor)	ages	Numbers of donors	Numbers of pregnancy	Number of new borns	Average of new borns
ICR(ICR)	10 d	10	4	16	4.0 ± 0.8
	20 d	10	8	52	6.5 ± 4.7
	4 w	5	3	12	4.0 ± 1.7
KM(KM)	10 d	5	4	22	5.5 ± 3.9
	20 d	5	5	34	6.8 ± 2.9
	4 w	5	2	16	8.0
BALB/c(BALB/c)	10 d	5	4	25	6.3 ± 3.0
	20 d	5	5	31	6.2 ± 3.4
	4 w	5	3	23	7.7 ± 1.2
C57BL/6J(C57BL/6J)	10d	5	5	27	5.4 ± 0.9
	20 d	5	3	14	4.7 ± 2.8
	4 w	5	2	11	5.5 ± 2.1

乏性激素的条件下,植入异体的双侧卵巢发育良好,具有内分泌功能,并能与上级器官,即下丘脑、垂体产生反馈应答,维持正常的动情周期^[8],本实验结果与此结论相符。

卵巢移植面临的障碍是不同个体之间存在免疫排斥反应,故在本实验中选用 10d 龄幼仔卵巢,同种异体移植,组织相容性抗原含量少,免疫原性低下,不易引起宿主的免疫排斥反应^[9]。本实验结果显示, BALB/c 和 C57BL/6J 平均产仔数与正常 BALB/c 小鼠产仔数无显著性差异,这与刘丽均等^[10] BALB/c 小鼠的移植受体鼠可以正常产仔,其产仔数、窝重与正常的 BALB/c 小鼠相比,差异不大的结果相符。ICR 和 KM 两个品系小鼠的平均产仔数比正常产仔数低。这有可能是远交系个体之间差异比较大,卵巢在免疫排斥现象下,卵巢某些成分在受体体内发育受到限制,虽然卵巢能排卵,但卵泡排卵数量较少,交配后产仔少。

20d 龄幼鼠卵巢移植结果显示 4 个品系的受孕数及产仔数都比较稳定。在移植实验的全过程中均未使用免疫抑制剂,但移植 4 周龄的卵巢也能生长发育,受体交配后产仔,但受孕率较低,产仔数较高。梁元晶对生后 30d 龄的雌性小鼠进行双侧卵巢自体皮下移植,实验显示自体双侧异位移植的卵巢能够存活发育并分泌性激素,维持性周期^[11]。有研究发现卵巢组织内有高浓度的血管内皮因子,可促使内皮细胞进入组织内,有利于血供迅速恢复。产仔数较高原因可能是供体与受体日龄相同,卵巢发育时间同步,内分泌激素方面也相同,移植入的卵巢有血供后,卵巢各机能就正常,卵巢发育的好。本实验三组结果说明同品系之间不同时间段移植新鲜卵巢后,和正常雄鼠交配,移植受体鼠可以正常产仔,此方法可行。

(本文图 1,见彩插 5。)

参考文献:

[1] Chihal HJY , Bast JD. Plasma estradiol217β , progesterone , FSH , LH , and follicular development in castrated female rats with subcutaneous ovarian autografts [J]. Bi olReprod , 1976 , 15: 406 - 413.

[2] Jones EC , Krohn PL. Orthotopic ovarian transplantation in mice [J]. J Endocrinol , 1960 , 20: 135 - 146.

[3] Mussett MV , Parrott DMV. Factors affecting the fertility of mice with orthotopic ovarian grafts [J]. J Reprod Fertil , 1961 , 2: 80 - 88.

[4] Oktay K , Karlikaya GG , AydinBA. Ovarian cryopreservation and transplantation: basic aspects [J]. Mol Cell Endocrino , 2000 , 169: 105 - 108.

[5] Callejo J , Jauregui MT , Valls C , et al. Heterotopic ovarian transplantation without vascular pedicle in syngeneic Lewisrats: sixmonth control of estradiol and folliclestimulating hormone concentrations after intraperitoneal and subcutaneous implants [J]. Fertil Steril , 1999 , 72: 5 - 517.

[6] 梁元晶,史小林,诸定寿,等. 小鼠自体与胚胎异体卵巢移植比较研究 [J]. 首都医科大学学报, 1998, 19 (3): 209 - 212.

[7] 陈淑颖,陈华,吴晓云,等. 新鲜小鼠卵巢组织自体异位移植后卵巢功能的研究 [J]. 现代妇产科进展, 2005, 14(1): 20 - 23.

[8] Lara HE , Dees WL , Green K , et al. Functional recovery of the developing ratovaryafter transplantation: Contributionof the extrinsic innervations [J]. Endocrinology , 1991 , 129: 18 49 - 186.

[9] Crombleholme TM , Langer JC , Santana P , et al. Transplantation of fetal cells [J]. AmJ Obstet Gynecol , 199 , 164: 221.

[10] 刘丽均,郁丽丽,谢夏,等. 小鼠卵巢异体移植研究 [J]. 中国比较医学杂志 2007 , 17(3): 164 - 167.

[11] 梁元晶,史小林,诸定寿. 小鼠双侧卵巢自体异体移植的形态学研究 [J]. 首都医科大学学报, 1995 , 16(4): 259 - 262.

(修回日期) 2013-04-03