

兔胚胎卵巢细胞团同种异体移植研究

周力学 邝健全 吕超

(孙逸仙纪念医院妇产科)

提 要 本实验随机将 18 只 NZW 雌兔分为 4 组。A 组 (5 只): 系内移植, 供、受体同系; B 组 (5 只): 系间移植, 供体为 NZW 封闭群, 受体为 NZW 近交系; C 组 (5 只): 系间移植, 供、受体情况同 B 组, 移植物预培养 2~3 天; D 组 (3 只): 移植部位注射等体积培养液, 其余条件同前。实验结果显示: (1) A、B、C 3 组受体兔在卵巢细胞团移植后, 血浆 E2 水平明显上升 ($P < 0.01$), 提示移植物有 E2 分泌; 移植后 30 天内, A 组较 B、C 组 E2 水平高 ($P < 0.05$ 或 < 0.01), 提示同系移植卵巢功能恢复较好; 移植后 30~60 天, C 组 E2 较 B 组高 ($P < 0.01$), 提示培养后移植优于未培养直接移植。(2) 同期移植部位有生长卵泡存在, 生殖道组织学也与此结果吻合。

关键词 卵巢细胞团移植; 胚胎; 兔

中图分类号 R711.75; R65

卵巢早衰等疾病的共同特征是血循环中雌激素水平低落或急剧下降, 不但造成女性性征、性心理方面的改变, 不孕, 还明显增加骨质疏松、动脉硬化等老年病的发病率^[1]。目前, 国内外对卵巢早衰等疾病主要采取雌激素长期替代疗法。

雌激素替代疗法多需长期服药, 有部分学者认为, 长期使用外源性雌激素可增加宫体癌等疾病的发病率, 效果也不理想。在给药方面, 难以精确控制需药量。因此, 理想的疗法是将雌激素的给药置于下丘脑-垂体-卵巢轴系统的管理之下, 恢复卵巢激素的内源性分泌, 以达到自动精细调节体内雌激素水平的目的。本文作者认为, 达到这一目的的可能途径之一是胚胎卵巢细胞团同种异体移植。

材 料 和 方 法

动物来源及分组 实验动物由本校动物中心定点(顺德实验动物场)提供。动物合格证号为 90010。受体兔为近交系新西兰雌性白兔, 体重 2.5~3 kg; 供体为同系或同种繁殖群的子代成熟兔胚胎(以下称兔胚胎)。随机将 18 只兔分为 4 组。A 组 (5 只): 系内移植, 供、受体同系; B 组 (5 只): 系间移植, 供体为 NZW 封闭群, 受体为 NZW 近交系; C

组 (5 只): 系间移植, 供、受体情况同 B 组, 移植物预培养 2~3 天; D 组 (3 只): 移植部位注射等体积培养液, 其余条件同前。

观察指标及检测方法 (1) 移植部位的组织学改变 (HE 染色); (2) 双侧卵巢全切除前 (BO)、双侧卵巢全切除后 (AO) 及胚胎卵巢细胞团移植后 (AT) 受体兔血浆雌二醇 (E2)、孕酮 (P)、卵泡刺激素 (FSH)。其中 E2、P 用 RIA 测定, FSH 用 RRA^[2]测定; (3) BO、AO 及 AT 各期受体兔生殖道组织学改变, 用 HE 染色和/或 AB 染色。

移植方法和程序

1. 兔胚胎卵巢的取材和鉴别 用人工气脑法将兔胚胎处死, 无菌条件下在下腹正中作一纵切口, 取出双侧卵巢, 镜下所见与 Gondos 等^[3]描述的一致。

2. 兔胚卵巢细胞团的制备 无菌条件下, 将取出的 18~20 个兔胚胎卵巢投入 4℃ 培养液中, 依次取出放在双层纱布上, 剪去较大的血管及其它非卵巢组织, 随即放入 4℃ 的 Hanks 液中漂洗数次, 然后集中在一小空瓶中, 用眼科剪将其剪成约 0.5 mm 的小块, 再投入 4℃ 的 Hanks 液中漂洗数次, 随后转入另一瓶中, 将该卵巢组织剪成近似糊状, 并经过 40 目不锈钢网, 最后将该悬液体积调至 0.4 ml。每批取

10 μ l 进行质检, 活度 $\geq 75\%$ (台盼蓝染色)者用作移植。镜下所见的细胞团大小和形态见图 1。

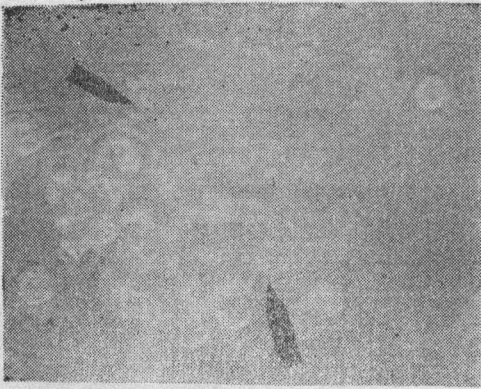


图 1 移植前的兔胚胎卵巢细胞团
大约含 30~40 个胚胎卵巢细胞, HE.40 \times 10
子弹样黑色箭头所指为胚胎卵巢细胞团

3. 受体采血时间和方法 采血时间为上午 8~10 间。BO 期, 采血 10 次, 3 天 1 次, 每次 3 ml, 肝素抗凝。AO 期、AT 期同样采血 10 次, 以后为每周 1 次, 每次 2 ml, 连续 5 次。采血部位为兔耳缘静脉。采血后常规分离血浆, 置 -20 $^{\circ}$ C 下保存待测血浆性激素水平。

4. 双侧卵巢全切除的时间和方法 在受体兔采血 10 次后, 在氯安酮麻醉 (4-6 mg/kg) 下行双侧卵巢全切除术 (方法从略)。

5. 胚胎卵巢细胞团移植前体外培养 将制好的组织匀浆 (含 18~20 对兔胚胎卵巢) 移入细胞培养专用的斜颈瓶中, 加入 5 ml RPMI 1640 培养液 (RPMI 1640 85% + BSA 15% + SM 500 IU/ml + PG 100 IU/ml, 最后按 10:1 比例加入去卵巢兔血清) 中, 置 5% CO₂, 37 $^{\circ}$ C 培养箱中培养 2~4 天, 隔天换液, 换出液置 -20 $^{\circ}$ C 下保存待测 E₂ 水平。

6. 兔胚胎卵巢细胞团移植的时机和方法 双侧卵巢全切除后满 1 个月时施行手术。术前先备好卵巢细胞团匀浆或经培养的卵巢细胞团。开腹后, 暴露输卵管伞端系膜, 用 1 ml 注射器吸取细胞团匀浆 0.4 ml, 将其缓缓注入伞端附近输卵管系膜下 (分两侧), 此时见系

膜稍隆起, 拔出针头后, 轻轻压按 2~3 分钟。

7. 组织学取材方法和时间 1. 移植 30 天时取左侧, 60 天时取右侧。部位是移植处有明显突起部分, 大小约长 5~10 mm, 宽 1~2 mm、深 3~5 mm。2. 分别在双侧卵巢全切除时, 移植时及移植后 1 个月时进行, 部位是近端子宫和阴道上段。取材大小约长 3~5 mm, 宽 1~2 mm, 深达粘膜。

结 果

兔胚胎卵巢细胞团移植后不同时期的形态学变化

1. 肉眼观 可见移植部位输卵管系膜局部增厚, 呈不规则结节状, 其总面积约有 1.5 cm \times 2 cm, 颜色较周围系膜略淡。移植后 30 天与 60 天比较大小和外形未见明显差别, 图略。

2. 镜下观 结节内部有较多的纤维结缔组织, 其间有散在的卵巢组织团块, 内有不同发育阶段的卵泡, 可分辨出卵母细胞、颗粒细胞及卵泡膜细胞。不同时间活检各受体移植部位组织学所见 (图 2, 3) 归纳于表 1 中。

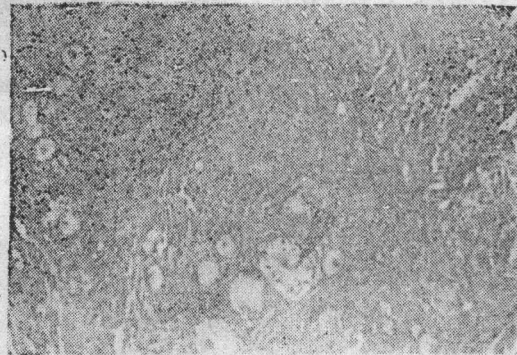


图 2 移植 30 天时的兔胚胎卵巢细胞团
BE.10 \times 10, 子弹样箭头示颗粒细胞, 长三角箭头
示卵母细胞, 图中可见生长卵泡

BO、AO 及 AT 各期血浆性激素水平

1. E₂ 浓度 各组各期血浆 E₂ 浓度均值 (pmol/L) 相互比较, 见表 2 和图 4。各组受体兔在 AO、AT 各期血浆 E₂ 比较, 各组



图3 移植60天时的兔胚胎卵巢细胞团

HE, 10×10, 子弹样箭头示颗粒细胞, 三角箭头示卵母细胞, 图中可见发育较好的生长卵泡

表1 移植后不同时间受体兔的移植物生长情况

| 组别 | 30 天 | | 60 天 | | | |
|----|------|----|------|----|----|----|
| | L1 | L0 | L1 | L2 | L3 | L0 |
| A | 5 | 0 | 5 | 0 | 0 | 0 |
| B | 5 | 0 | 2 | 0 | 2 | 1 |
| C | 5 | 0 | 3 | 1 | 1 | 0 |

注: L1 卵泡生长良好(细胞层次清楚、饱满);
L2 卵泡生长较好(半数以上卵母细胞核结构不清);
L3 卵泡生长差(仅见泡膜细胞);
L0 无可辨认的卵巢组织

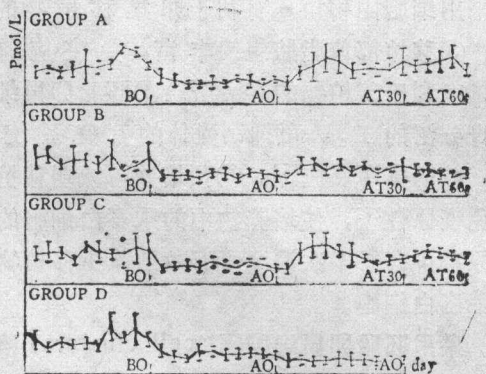


图4 各组各期受体兔血浆 E₂ 水平变化
 $P < 0.01$; 移植后30天内各组受体兔间血浆 E₂ 比较, A组与B组、C组比较, $P < 0.05$; B组与C组比较, $P > 0.05$ 。移植后30~60天之间, B组, C两组受体兔血浆 E₂ 水平均值分别为 $127.2 \pm 7.72 \text{ pmol/L}$ 和 172.6 ± 7.7

表2 BO、AO 及 AT 各期兔血浆 E₂ 水平

| 组别 | 动物号 | BO | AO | AT |
|----|-----|----------|----------|----------|
| A | 1 | 206 ± 58 | 124 ± 22 | 200 ± 76 |
| | 2 | 208 ± 58 | 132 ± 20 | 210 ± 74 |
| | 3 | 208 ± 50 | 130 ± 22 | 206 ± 76 |
| | 4 | 246 ± 60 | 86 ± 28 | 154 ± 30 |
| | 5 | 192 ± 48 | 124 ± 22 | 186 ± 64 |
| B | 1 | 192 ± 56 | 108 ± 20 | 170 ± 76 |
| | 2 | 188 ± 54 | 106 ± 20 | 148 ± 36 |
| | 3 | 200 ± 60 | 112 ± 20 | 124 ± 26 |
| | 4 | 180 ± 48 | 106 ± 18 | 144 ± 34 |
| | 5 | 190 ± 56 | 106 ± 22 | 142 ± 24 |
| C | 1 | 196 ± 52 | 110 ± 22 | 186 ± 66 |
| | 2 | 202 ± 60 | 120 ± 22 | 166 ± 52 |
| | 3 | 198 ± 60 | 110 ± 22 | 160 ± 60 |
| | 4 | 168 ± 54 | 90 ± 18 | 152 ± 60 |
| | 5 | 178 ± 36 | 108 ± 0 | 148 ± 38 |

pmol/L, $P < 0.01$ 。D组未移植兔胚胎卵巢细胞团, 血浆 E₂ 浓度保持在 $126 \pm 8.6 \text{ pmol/L}$ 的低水平。

2. 血浆P水平 BO、AO 及 AT 各期受体兔血浆 P水平变化均无统计学意义($P > 0.05$)。

3. FSH水平 A组受体兔在胚胎卵巢细胞团移植后血浆 FSH 水平呈下降趋势, 与同期血浆 E₂ 水平作相关分析, 结果显示两者存在明显的负相关($r = -0.9566, P < 0.05$), 见表3。

双侧卵巢全切除前、后及移植后受体兔生殖道变化

1. 阴道组织学改变 正常成熟母兔的固有阴道为柱状上皮, 高柱状的核位于细胞的基底部, 胞浆丰富, 经粘液染色证实内含丰富的酸性粘多糖。切卵巢30天后, 固有阴道的柱状上皮已转变为立方上皮。原来富含酸性粘液物质的柱状上皮胞浆明显减少, AB染色阴性。

移植后30天, 受体兔阴道上皮由双侧卵巢全切除后的立方方向柱状转化, 胞浆较丰富, 但阴道上皮中仍可见少量立方细胞。AB染色证明, 上皮细胞中酸性粘液物质含量大都接近正常水平。

2. 子宫组织学改变 正常成熟母兔的子

表3 A组兔移植后血浆FSH和E₂值的关系(FSH IU/L)

| 观察指标 | 移植后天数 | | | | |
|----------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| | 3 | 9 | 15 | 21 | 27 |
| E ₂ | 111.4±40.1 | 172.4±37.8 | 204.0±78.2 | 258.0±74.0 | 239.8±65.0 |
| FSH | 20.2±4.5 | 17.4±0.7 | 14.1±2.4 | 10.3±3.0 | 8.50±1.8 |

宫内膜覆有单层柱状上皮,内膜腺体成管状,数量较多。切卵巢后30天,子宫内膜腺体明显减少。移植后30天,受体兔子宫内膜增生,腺体增多,腺腔增大。

讨 论

选用胚胎作为移植供体的依据

据 Erichson^[4]报道,新生兔的颗粒细胞有合成类固醇激素的能力。Milewich、Gondos^[3]也都证实,胚胎卵巢即具备分泌雌激素能力。本文作者测得体外培养1天、3天的胚胎卵巢细胞团培养液E₂浓度分别为172 pmol/L和300 pmol/L,与原培养液E₂浓度70 pmol/L相比,差异均有极显著意义(P<0.01),提示移植后可分泌E₂。

各组各期受体兔血浆性激素水平的比较及其意义

1. E₂水平变化的意义 A、B、C各组在移植前后,血浆E₂水平均有显著差异,说明移植的胚胎卵巢有功能。卵巢移植30天和60天,A组E₂水平较B组、C组高,差异均有显著性,说明同系移植卵巢功能恢复较好。移植后30~60天,C组E₂较B组高,说明培养后移植效果更好。生殖道的组织学变化与受体兔血浆E₂浓度消长情况相吻合。

2. P水平变化的意义 受体兔血浆P水平在各期间和各组间比较,差异均无显著性。提示存活的移植植物中无孕酮分泌。

3. FSH水平变化的意义 移植后,受体兔血浆FSH水平下降,间接说明E₂水平回升,提示受体兔体内存在激素反馈机能。

胚胎卵巢细胞团未培养直接移植与培养后移植的效果比较 两者各有利弊,但后者好处更多。新鲜细胞团直接移植,细胞活度较大

(平均为82%,而培养后为76%),污染环节少,所需时间短,设备要求简单,易于操作,而经培养2~3天再种植,却有以下几个明显的优点:①有助于减弱移植物的免疫源性;②培养步骤可以调节供、受体比不协调的矛盾;③培养基中加入的切除双侧卵巢后的兔血清中含促性腺激素,有助于移植植物中卵泡的生长。

本研究的组织学结果显示:C组移植的胚胎卵巢细胞团中卵泡生长良好和较好的有4例,比B组多2例,而B组移植的胚胎卵巢细胞团中卵泡生长差或不生长的有3例,比C组多2例,且B组移植的胚胎卵巢细胞团分泌E₂的能力也不如C组。当然,由于例数少取材本身会有一定的随机误差,但进一步结合E浓度进行全面考虑,组织学检查仍不失其重要的半定量参考作用。

取得兔胚胎卵巢细胞团移植近期存活的相关因素

①采用的胚胎卵巢抗原性较弱^[5];②采用细胞团移植,有利于卵巢移植物的存活;③移植部位脂肪组织丰富,免疫应答受限,有利于移植物的存活^[6];④胚胎卵巢细胞本身分泌的E₂,可抑制受体的免疫系统功能,减弱排斥反应^[7];⑤预培养可减弱移植物的免疫原性^[8],使培养物中的乘客白细胞的模抗原减少;⑥多次漂洗可有效地减少移植植物中的乘客白细胞。

采用胚胎卵巢细胞团(cell clusters)移植的优点

细胞团可有效地保留胚胎卵巢中生殖细胞与内分泌细胞的自然结构和功能上的依存关系;细胞团移植法有利于胚胎卵巢移植物的抗游走,便于固定生长;细胞团在移植植物中可在新生血管较少的情况下,通过组织间隙的通透性来获取营养物质;细胞团保留了移植组织的良好颗粒性,便于用注射法进行移植。

参 考 文 献

1. 蒋味根. 妇科恶性肿瘤手术时卵巢去留问题. 实用妇科与产科杂志 1987; 3(5):229
2. Bhalla VK, et al. Properties of FSH-Receptor interactions. J Bio Chem 1974; 249(1):43
3. Gondos B, et al. Granulosa cell differentiation and estrogen synthesis in the fetal rabbit ovary. Bio Reprod 1983; 29:791
4. Erichson GF, et al. A development study on the capacity of rabbit granulosa cell to respond to trophic hormones and secrete progesterone in vitro. Dev Biol 1974; 40:208
5. 秦兆演. 胚胎器官应用于器官移植国内外进展. 中华器官移植杂志 1986; 7(4):155
6. Siiteri PK, et al. Immunologic endocrine interrelationships in pregnancy Bio Reprod 1982; 26:1
7. Serie J. Prolongation of culture-isolated neonatal islets xenografts without immunosuppression. Transplantation 1983; 36(1):6 (1991-10-29收稿 1992-06-18修回)

EXPERIMENTAL RESEARCH IN ALLOGENEIC TRANSPLANTATION OF FETAL OVARIAN CELL CLUSTERS IN RABBITS

Zhou Lixue Kuang Jianquan Lu Chao

(Department of Obstetrics and Gynecology, Sun Yat-Sen Memorial Hospital)

Syngeneic or allogeneic transplantation of ovarian cell clusters of fetal rabbit had not been found to be reported in the world. In the study, according to random principle, 18 female mature rabbits were divided into four groups. Group A (5 rabbits): syngeneic transplantation, the donors and recipients were from the same strain (New Zealand white rabbit); Group B (5 rabbits): allogeneic transplantation, enclosed group of New Zealand white rabbit as donors, inbred strain New Zealand white rabbit as recipients; Group C (5 rabbits): allogeneic transplantation, donors and recipients were like Group B, but the graft (cell clusters) cultured for 2-3 days before transplantation; Group D (3 rabbits): control group, the condition was ditto except culture fluid equivalent volume injected.

The findings demonstrated that varieties of E_2 levels were significant ($P_{AB} < 0.05$, $P_{AC} < 0.01$) between Group A and Group B or between Group A and Group C in 30 or 60 days after transplantation. During day 30 to day 60 after transplantation, varieties of plasma E_2 concentration between Group B ($127.2 \pm 8.6 \text{ pmol/L}$) and Group C ($172.6 \pm 8.2 \text{ pmol/L}$) were highly significant ($P < 0.01$). It was verified that syngeneic transplantation was better than allogeneic transplantation and transplantation of cell clusters cultured for 2-3 days was more effective than that of cell clusters not cultured in restoring ovarian functions. Presence of growing follicles in sites of transplantation and changes of related reproductive tracts also supported the findings of elevation in plasma E_2 concentration.

Key words transplantation of ovarian cell clusters; fetal; rabbit