

卵巢移植对雄性受体鼠精子及生殖能力的影响

彭南妮^{1a, 2}, 薛立群^{1b}, 邓治邦^{1b}, 梁苑燕^{1b}, 袁安文^{1b*}

(1.湖南农业大学 a.动物科学技术学院; b.动物医学院, 湖南 长沙 410128; 2.深圳市罗湖区人民医院 生殖医学中心, 广东 深圳 518000)

摘要: 将 1 日龄小鼠卵巢移植入成年受体雄鼠肾囊下, 分别于移植后 21 d(A 组)和 28 d(B 组), 回收卵巢移植体和卵母细胞, 采集附睾尾精子, 并对睾丸及精子进行形态学检测, 计算畸形精子数. 移植受体雄鼠的繁殖能力将依据与雌鼠合笼交配后的窝产活仔记录进行评价. 结果表明, 卵巢移植体生长并有卵泡发育, A、B 组回收卵母细胞数组间无显著差异($P>0.05$); 移植组不同时期卵巢移植体对雄鼠睾丸及精子形态无明显影响, 其畸形率与对照组(正常雄鼠)相比差异不显著($P>0.05$); 移植受体雄鼠与母鼠配种的窝产活仔数与对照组无显著差异($P>0.05$). 初步证实在卵巢异性移植构建雌、雄性腺同体的生理环境中, 卵巢移植体对受体雄鼠精子及生殖能力无明显影响.

关键词: 小鼠; 卵巢移植; 雄性生殖; 精子

中图分类号: S865.1⁺³ 文献标志码: A 文章编号: 1007-1032(2010)01-0073-04

Effect of ovarian transplantation on sperms and reproductive ability of male recipient mice

PENG Nan-ni^{1a,2}, XUE Li-qun^{1b}, DENG Zhi-bang^{1b}, LIANG Yuan-yan^{1b}, YUAN An-wen^{1b*}

(1.a.College of Animal Science and Technology; b.College of Veterinarian, HNAU, Changsha 410128, China; 2.Reproductive Medical Center of Luohu Hospital Shenzhen, Shenzhen, Guangdong 518000, China)

Abstract: Effects of ovarian transplantation on sperms and reproductive ability of male recipient mice were investigated by designing group A, B for ovarian transplantation and group control. 1-day-old mouse ovaries were transplanted into kidney capsule of adult male mice and collected to observe their status of development, recover oocytes were recovered from ovarian grafts on day 21 and 28 after the transplantation in groups A and B respectively. At the same time, the testes and sperms from epididymies of male recipients were observed morphologically and the number of abnormal sperms were counted. The litter size for the female mice mated with male recipients was recorded for evaluation of reproductive ability of recipients. The retrieved grafts developed with many antral follicles and there was no significant difference in the number of collected oocytes between group A and B($P>0.05$). The notable morphological changes of recipient testes were not found and the rate of abnormal sperms in grafted groups did not differ from control group($P>0.05$). The litter size for the female mice mated with male recipients was also comparable to male mice in the control group($P>0.05$). It could be demonstrated basically that heterosexual ovarian transplantation has no significant effect on sperms and reproductive ability of male recipient mice.

Key words: mice; ovarian transplantation; male reproduction; sperm

卵巢移植技术与动物辅助生殖技术相结合, 已在动物繁殖和扩大濒危动物种群方面显示了特殊的应用价值, 被认为是延续和保存雌性生殖能力的

一种有效方法^[1-3]. 伴随着卵巢自体、异体和异种移植, 卵巢异性移植也获得新的突破. 2004 年 Waterhouse 等^[4]从移植到雄性受体小鼠的卵巢移植

收稿日期: 2009-10-21

基金项目: 湖南省科学技术厅重点项目(01NKY1002-01); 湖南农业大学人才稳定基金项目(09WD05)

作者简介: 彭南妮(1964-), 女, 湖南新化人, 博士研究生, 副主任医师, nnpeng@126.com; *通讯作者, yuananwen@yahoo.com.cn

体采集卵母细胞,经体外受精获得小鼠后代.已有研究^[3-4]证实,移植卵巢在雄性动物受体中具有与雌性受体相似的卵泡发育能力,且可以由出生时的幼稚型卵巢完成生长发育过程^[5],并对外源促性腺激素刺激卵泡发育作用产生相应反应^[6].2006年Yang等^[7]通过体外培养试验证明,雄性激素可以刺激牛卵巢组织的初级卵泡发育成次级卵泡.然而,在睾丸、卵巢并存的卵巢异性移植受体中,精子的发生及成熟是否受移植卵巢的影响仍有待确认.为此,笔者对卵巢移植雄性受体精子质量及生殖能力进行了观测,探讨卵巢移植体对受体精子发育及生殖能力的影响,旨在为发展初生期卵巢异性异位移植技术提供依据.

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试验动物

昆明小鼠购自中南大学实验动物学部.自繁1日龄雌鼠作为卵巢供体,10~12周龄雄鼠作为卵巢移植受体.供试小鼠在自然光照、22~25℃下饲养,自由饮水、采食.

1.1.2 主要试剂与仪器

Leibovitz 15(L15)(Invitrogen公司);新生牛血清(NBS)(北京鼎国生物科技有限公司);L15*(L15+10%NBS+100 IU/mL青霉素+100 IU/mL链霉素).

体视显微镜(Motic, SMZ-168);显微照相系统(Motic, Moticam 350);洁净工作台(净集团安泰公司, VS-1300L-U);倒置显微镜(Leica, DMIL);生物显微镜(Motic, BA200);石蜡切片机(SAKURA, SRM 200 CW).

1.2 方法

1.2.1 供体卵巢采集

参照袁安文等^[8]的方法,将1日龄供体雌鼠断颈处死,体表用75%酒精消毒,用眼科镊撕开腹腔,在体视显微镜下摘取卵巢部分,放入L15*液中,去掉卵巢周围的包膜,放入L15*液中备用,在0.5 h内移植到受体鼠.

1.2.2 肾囊下卵巢移植

肾囊下卵巢移植参照袁安文等^[8]的方法,对受

体雄鼠称重,用1%戊巴比妥钠按10 g体重0.1 mL进行全身麻醉,背部剪毛,用75%酒精消毒;沿背中线剪开皮肤,在腹壁剪1小口,暴露左肾脏,用一锐利镊在肾囊上撕开1个小口,用自制玻璃吸管吸住卵巢送入肾囊下,移植卵巢2~3枚,还纳肾脏,缝合切口.

1.2.3 卵巢移植体回收及卵母细胞的采集

卵巢移植分为A、B两组,以移植当天记为0天,分别于移植后第21天(A组)、第28天(B组)断颈处死受体小鼠,取出卵巢移植肾,分离卵巢移植体,放入L15*液中,在体视显微镜下用4号针头刺破有腔卵泡,释放出卵母细胞,记录每个受体回收卵母细胞数,在倒置显微镜下进行形态学观察与照相.

1.2.4 受体精子的采集与精子畸形率的测定

A、B两组受体小鼠在回收卵巢移植体后取其睾丸、附睾,在体视显微镜下进行观察并照相.取一侧附睾尾放入L15*液中,轻轻挤压,释放精子,用100倍倒置显微镜观察精子活动情况,取扩散后的精液涂片.将一侧睾丸、附睾放入10%中性福尔马林液中固定.以同龄的正常雄鼠为对照组(C组),操作同上.

精子畸形率的测定方法:精液涂片干燥后,用95%的乙醇固定3 min,龙胆紫染液染色5 min,用蒸馏水洗净,干燥后每只鼠随机镜检不同视野的精子300~500个,计数畸形精子,计算畸形精子的百分率.畸形精子的计数参照文献^[9]的标准进行,包括精子的头部畸形、颈部畸形、尾部中段畸形、尾部主段畸形以及未成熟精子.

1.2.5 睾丸组织学检查

睾丸、附睾组织经10%中性福尔马林液固定,石蜡包埋后切片,切片厚度为5 μm,HE染色,对切片进行观察与显微照相.

1.2.6 雄鼠受体配种试验

将卵巢移植后21~35 d的雄性受体与成年雌鼠合笼,常规饲养,记录雌鼠窝产活仔数,以评价其繁殖能力,以同龄的正常雄鼠与成年雌鼠合笼组作为对照.于移植后第35天断颈处死受体小鼠,观察卵巢移植体生长发育状况.

1.3 数据分析

采用 SAS.V9.0 统计软件 One-way ANOVA 进行显著性检验。

2 结果与分析

2.1 卵巢移植体和卵母细胞的观察与回收结果

A、B 两组移植体均生长、增大，呈圆形或肾形凸起，表面可见有网状血管分布(封二图 1-A)。从肾囊下剥离出来的移植体在体视显微镜下可见有半透明泡状结构(封二图 1-B)，此为有腔卵泡。用针刺破有腔卵泡可获得卵母细胞(封二图 1-C)，其形态正常，生发泡明显。回收卵母细胞数见表 1。经 *t* 检验，A、B 组间差异不显著($P>0.05$)。

表 1 回收卵母细胞数与精子畸形率

Table 1 Number of recovered oocytes and rates of abnormal sperms

组别	样本数/只	回收卵母细胞数/个	精子畸形率/%
A	12	55.9±51.7	7.3±4.2
B	12	38.1±24.9	7.9±2.7
CK	12		5.9±3.4

2.2 睾丸、附睾组织形态观察与精子畸形率测定

卵巢移植受体睾丸、附睾形态正常(封二图 1-D)，与对照雄鼠相比无可见异常。镜下可见附睾尾管腔内充满精子，分离精子大多数呈前进运动，绝大多数精子形态正常(封二图 1-E)，精子畸形率见表 1。经 *F* 检验，组间差异不显著($P>0.05$)，但卵巢移植组精子畸形率有增高的趋势。组织学检查发现，卵巢移植受体睾丸曲精小管形态正常，管腔内有精子(封二图 1-F)，附睾头(封二图 1-G)、附睾尾(封二图 1-H)管腔内充满精子，形态学上与对照雄鼠的睾丸(封二图 1-I)、附睾头(封二图 1-J)和附睾尾(封二图 1-K)没有明显的不同。

2.3 卵巢移植对受体繁殖力的影响

移植 35 d 后，受体肾囊下有卵巢移植体(封二图 1-L)。卵巢移植受体、正常对照雄鼠与雌鼠合笼产仔情况见表 2。受体配种的雌鼠平均窝产活仔数比对照雄鼠的低，经 *t* 检验，两组间差异不显著($P>0.05$)，说明卵巢移植受体有正常的繁殖能力。所产仔鼠外观形态正常，无畸形。

表 2 卵巢移植对受体繁殖力的影响

Table 2 Effects of ovarian transplantation on reproduction of the recipients

组别	样本数/只	产仔窝数/窝	平均窝产活仔数/只
移植组	5	19	8.3±1.9
对照组	6	25	9.8±2.1

3 讨论

本试验结果显示，在雌、雄性腺同体的卵巢异性移植受体中，新生鼠卵巢移植体的生长及卵泡发育未对雄性受体的精子发生与成熟产生明显影响。雄性受体的精子畸形率、睾丸形态、附睾管组织结构以及与雌鼠配种的窝产活仔数均与对照组无显著性差异($P>0.05$)。尽管目前尚未见到与此相关的研究报道，但本试验结果可以初步证实卵巢异性移植不会明显地影响雄性受体自身的生殖机能。

精子的生成和成熟是复杂的生理过程，受内分泌相关激素调节^[10]。有研究表明，大剂量的雌激素可引起成年动物睾丸发生异常和生精障碍，而体外条件下小剂量的雌激素又能诱导精子发生和成熟，减少细胞凋亡^[11]。然而，本试验中卵巢移植体的生长及卵泡发育未对雄性移植受体精子的生成及成熟产生明显影响，雄性受体精子的形态、精子畸形率及配种的产仔率均保持在与对照组相近水平，无显著差异。内源性雌激素对精子成熟和睾丸功能的影响取决于组织局部的雌激素水平^[12]，芳香化酶抑制剂或抗雌激素抗体的处理可以减少精子生成的数量和影响精子的成熟^[13]。由此笔者推论，在通过卵巢异性移植构建的雌、雄性腺同体的雄性受体中，卵巢移植体并未对调节精子生成及成熟的下丘脑-垂体-睾丸系统产生明显干扰作用，也说明卵巢移植体产生的生理剂量雌激素对雄性受体的生殖机能无显著不利影响。

此外，本试验中卵巢移植体的生长及卵泡发育与前期的研究报道^[5]相一致，也进一步证实雄性受体可以为满足新生鼠幼稚型卵巢的生长、卵母细胞及有腔卵泡的生长发育提供基本的生理环境保障。在这种卵巢异性移植构建的雌、雄性腺同体个体中，两性的生殖细胞卵子和精子均可得到良好发育的有趣现象，说明生殖细胞的生长发育

可能在两性生殖模式动物中没有严格的性别生理环境的要求。

参考文献:

- [1] Snow M, Cox S L, Jenkin G, et al. Generation of live young from xenografted mouse ovaries[J]. Science, 2002, 297(5590): 2227.
- [2] Lee D M, Yeoman R R, Battaglia D E, et al. Live birth after ovarian tissue transplant[J]. Nature, 2004, 428(6979): 137-138.
- [3] Weissman A, Gotlieb L, Colgan T, et al. Preliminary experience with subcutaneous human ovarian cortex transplantation in the NOD-SCID mouse[J]. Biol Reprod, 1999, 60(6): 1462-1467.
- [4] Waterhouse T, Cox S L, Snow M, et al. Offspring produced from heterotopic ovarian allografts in male and female recipient mice[J]. Reproduction, 2004, 127(6): 689-694.
- [5] 袁安文, 彭南妮, 王乃东, 等. 新生小鼠卵巢移植雄鼠肾囊下卵泡的生长发育[J]. 动物学报, 2008, 54(2): 265-270.
- [6] 袁安文, 邓治邦, 王乃东, 等. 促性腺激素促进雄性小鼠体内卵巢移植体卵泡卵母细胞生长发育的研究[J]. 中国农业科学, 2009, 42(5): 1776-1782.
- [7] Yang M Y, Fortune J E. Testosterone stimulates the primary to secondary follicle transition in bovine follicles in vitro[J]. Biol Reprod, 2006, 75(6): 924-932.
- [8] 袁安文, 许道军, 王乃东, 等. 移植时间对小鼠卵巢卵母细胞在雄性体内生长发育的影响[J]. 湖南农业大学学报: 自然科学版, 2008, 34(1): 56-60.
- [9] 杨利国. 动物繁殖学[M]. 北京: 中国农业出版社, 2003: 120-122.
- [10] de Kretser D M, Loveland K L, Meinhardt A, et al. Spermatogenesis[J]. Hum Reprod, 1998, 13(Supp. 1): 1-8.
- [11] 杨莉, 王鲜忠, 张家骅. 雌激素对睾丸发育及生精功能的影响[J]. 动物医学进展, 2007, 28(11): 100-103.
- [12] 陈江. 雌激素和精子发生[J]. 国外医学: 卫生学分册, 2003, 30(2): 74-79.
- [13] Carreau S, Genissel C, Bilinska B, et al. Sources of oestrogen in the testis and reproductive tract of the male[J]. Int J Androl, 1999, 22(4): 211-223.

责任编辑: 苏爱华
英文编辑: 罗文翠

(上接第 68 页)

- [7] 韩文瑜, 何昭阳, 刘玉斌. 病原细菌检验技术[M]. 长春: 吉林科学技术出版社, 1992: 38-66, 196-229, 448-449.
- [8] 范秀容, 沈萍. 微生物学实验[M]. 北京: 高等教育出版社, 1987: 8-29, 114-117.
- [9] 陈驹声, 王大琛, 赵大健. 生物工程[M]. 北京: 化学工业出版社, 1987: 23-33.
- [10] 林炜铁. 酵母细胞原生质体融合技术的研究[J]. 华南理工大学学报: 自然科学版, 1991, 3(1): 1-8.
- [11] 李永明, 赵玉琪. 实用分子生物学方法手册[K]. 北京: 科学出版社, 1999: 21-23.
- [12] 谭周进, 肖启明, 肖克宇. 微生物菌种选育中的原生质体融合技术[J]. 生物技术, 2003, 13(1): 35-36.
- [13] Kao K N, Michayluk M R. Fusion of plant protoplast-techniques[C]//Bajaj VP S. Biotechnology in Agriculture and Forestry. Berlin: Springer-Verlag, 1989: 277-288.
- [14] Szxoboda. Study of protoplast fusion of *Micromonospora echinospora*[J]. Surgery, 1978(84): 224-227.
- [15] 金玉娟, 刘自镛, 任建平. 芽孢杆菌和欧文氏菌的原生质体融合的研究[J]. 微生物学杂志, 2002, 22(3): 10-11.
- [16] 刘玲, 连芙菲, 刘长江. 康宁木霉和白腐真菌原生质体融合子生物学特性的研究[J]. 沈阳农业大学学报, 2007, 38(2): 186-189.

责任编辑: 苏爱华
英文编辑: 罗文翠