

大鼠胚胎性腺异体异位埋植的研究*

史小林** 曹金燕 许 晴 路 欣 翁 静

首都医科大学生殖医学研究中心, 北京 100054

摘要 为探讨胚胎性腺(睾丸与卵巢)异体异位埋植后的生长发育和内分泌功能, 将大鼠胚胎睾丸和卵巢分别移入摘除性腺的成年雄性和雌性大鼠颈部皮下和肾被膜下. 埋植后分不同时间取出埋植物, 常规染色观察埋植物在异体异位的生长发育. 细胞化学和免疫组织化学法观察埋植物的功能状态. 放射免疫法测定血清性激素浓度. 结果显示埋植的胚胎性腺在异体可生长发育至成年状, 3- β 羟甾脱氢酶、性激素与性激素受体在睾丸与卵巢的内分泌细胞中呈阳性反应, 血清促性腺激素和性激素在埋植后均有明显增加. 由此证明胚胎性腺埋植到异体成年大鼠体内后可正常发育并具内分泌功能.

关键词 胚胎卵巢 胚胎睾丸 埋植 大鼠

性腺的内分泌功能除生殖外, 还影响机体的正常生理功能. 特别是当性腺功能减弱时机体可出现一系列失健现象. 因此以纠正性腺功能的方法治疗机体衰老是研究者的设想. 早在 1889 年 Brown-Sequard 将豚鼠的睾丸提取液注入自己体内, 结果尿量增大, 便秘消失并能轻松上楼, 因此认为睾丸提取液有返老还童的作用^[1]. 此后, 研究者们又尝试着使用器官移植方法纠正睾丸功能衰退现象, 结果证明移植睾丸具有内分泌功能^[2-6]. 目前临床用替代疗法治疗性激素分泌不足, 但外源性激素对机体具有不可避免的副作用; 器官移植后使用免疫抑制剂, 对机体也是一种损伤, 因此我们试图用免疫原性较低的胚胎性腺^[7]进行异体埋植研究. 但性腺是青春期才开始发育的器官, 埋植后是否能在异体成年大鼠体内生长发育, 并具生理功能, 证明此问题是我们此项研究的主要目的.

1 材料与方法

1.1 实验动物与分组

成年 Wistar 雄、雌性大鼠各 100 只, 共 200 只, 体重 200 ~ 300 g. 实验分为 2 组, 对照组为正常和摘除性腺的雄、雌性大鼠各 10 只, 共 40 只; 埋植组使用雄、雌性大鼠各 80 只, 共 160 只. 埋植组大鼠在埋植前行去性腺手术, 去势当日进行胚胎性腺埋植. 埋植部位分别为颈部皮下组织(血管丰富区)和肾被膜下(免疫特赦区), 各埋植部位 40 只. 埋植物为 18 ~ 19 d 的同种大

2000-12-11 收稿, 2001-03-07 收修改稿

* 国家自然科学基金资助项目(批准号: 39670096)

** Email: X.L.SHI@263.net

鼠胚胎睾丸或卵巢(每只供体孕鼠留胎鼠睾丸和卵巢各一个,作形态观察)。

埋植组于埋植后第 5,10(每组 5 只)、25~35 和 35 d 以上(35~50 d,每组 15 只)取出埋植物,对照组大鼠摘取的双侧性腺入液氮骤冷并用 10% 福尔马林固定。

对照组(去势组于术后 20 d)和埋植组(取出埋植物当日)大鼠断头取血,分离血清 -20℃ 冷冻保存。

1.2 方法

(1)组织学:10%福尔马林固定,石蜡包埋,切片 5 μm ,HE 染色。

(2)细胞化学:液氮骤冷组织经恒冷箱切片(8 μm),3- β 羟甾脱氢酶(3- β HSD)染色。

(3)免疫组织化学:石蜡切片,链霉亲和素生物素(ISAB)法进行孕激素(P)和孕激素受体(PR)染色,雄性埋植组增加雄激素(A)和雄激素受体(AR),雌性埋植组增加雌二醇(E_2)和雌激素受体(ER)染色(抗体购于北京中山生物技术有限公司)。

(4)血清生殖激素测定:放射免疫法(试剂盒购于天津九鼎医学生物工程有限公司)测定血清中卵泡刺激素(FSH)、黄体生成素(LH)和孕激素的含量,雄性埋植组增加睾酮(T),雌性埋植组增加雌二醇的测定。

(5)阴道上皮涂片观察:雌性埋植组大鼠自埋植后每日上午 8 时,检查阴道脱落上皮。

2 结果

2.1 组织形态学观察

埋植前胚胎性腺:睾丸实质由大量实心的生精小管组成,生精小管壁由外周的支持细胞和中心的生精细胞构成,间质中可见少量睾丸间质细胞(图版 I(a))。卵巢主要由皮质组成,皮质中可见大量分裂状生殖细胞,未见典型的原始卵泡(图版 I(b))。

颈部埋植组:睾丸埋植后在成体内存活率,占埋植总数的 70%(28 只);卵巢存活率,占胚胎卵巢埋植总数的 55%(22 只)。

组织学显示埋植 5 d 的埋植物由结缔组织包绕,中心未见正常发育的胚胎睾丸或卵巢组织,主要由固缩状核的细胞和数量不等的红细胞构成。埋植物周围有血管及散在的淋巴细胞。埋植 10 d 的埋植物呈现性腺组织结构,睾丸由大量无腔的生精小管构成,管壁可见支持细胞和精原细胞,睾丸间质中血管丰富并可见睾丸间质细胞及少量淋巴细胞(图版 I(c))。卵巢皮质中可见形态正常的原始卵泡(图版 II(a)),埋植物周围血管丰富,并可见血管长入。埋植 25~35d 的埋植物体积明显增大,可见大量血管长入。睾丸生精小管出现管腔,管壁由支持细胞和精原细胞及少量初级精母细胞和精子细胞构成,睾丸间质细胞数量增多,嗜酸性增强。卵巢中可见发育不同阶段的卵泡,特别是有窦状卵泡出现(图版 II(b))。埋植物周围仍可见少量的淋巴细胞。埋植 35 d 以上的埋植物与正常性腺结构相似。但埋植睾丸的生精小管中未发现精子。而埋植卵巢内,除各级卵泡外,在部分卵巢中发现了正常的黄体结构(图版 II(c))。

肾被膜下埋植:埋植后成体内胚胎存活率,睾丸为 100%(40 只),卵巢为 85%(34 只)。存活性腺组织学观察与颈部埋植组无明显差异,不同的是埋植物周围未见明显的结缔组织包绕。

2.2 酶组织化学染色

颈部埋植组与肾被膜下埋植组 3- β -HSD 染色相同,表现为睾丸间质细胞和卵泡膜内层细胞、黄体细胞及间质腺细胞呈阳性反应。

2.3 免疫组织化学染色

对照组孕激素在睾丸间质细胞呈阳性反应. 卵巢颗粒细胞、卵泡膜内层细胞、间质腺和黄体呈阳性反应. 孕激素受体在睾丸的部分生精细胞、睾丸间质细胞和卵巢的卵泡膜内层细胞呈阳性反应. 雄激素在睾丸间质细胞呈阳性反应,其受体在睾丸间质细胞和生精细胞均可见. 雌激素在卵巢颗粒细胞、卵泡膜内层细胞、间质腺和黄体为阳性,其受体在卵巢颗粒细胞与间质腺细胞亦呈阳性反应. 实验组大鼠性激素与性激素受体的阳性细胞分布与正常对照组相同,两组间无明显差异. 不同的是个别埋植物的阳性反应较低.

2.4 血清学测定

随埋植胚胎性腺在异位生长发育时间的不断延长,测定的各项血清指标也逐渐接近正常对照组,检测结果见表 1 和表 2.

表 1 睾丸埋植组血清生殖激素测定($\bar{X} \pm SD$)

	组别	$T/\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$	$P/\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$	$\text{FSH}/\text{mIU} \cdot \text{mL}^{-1}$	$\text{LH}/\text{mIU} \cdot \text{mL}^{-1}$
对照	正常组	136.80 ± 54.59	1.87 ± 0.45	1.58 ± 0.41	13.17 ± 2.78
	去势组	0.43 ± 0.63	1.56 ± 0.89	0.86 ± 0.29	10.76 ± 3.29
颈部	5~10d	0.54 ± 0.62	1.15 ± 0.64	0.73 ± 0.32	10.69 ± 2.75
	25~35d	2.59 ± 0.96	1.79 ± 0.71	1.53 ± 0.50	12.10 ± 3.30
	35d 以上	41.96 ± 24.01	2.53 ± 1.95	1.41 ± 0.57	11.87 ± 3.54
肾被膜	5~10d	0.73 ± 0.72	0.92 ± 0.42	0.94 ± 0.13	11.28 ± 2.69
	25~35d	1.66 ± 1.25	1.03 ± 0.76	1.26 ± 0.59	11.96 ± 2.97
	35d 以上	49.91 ± 33.08	1.13 ± 0.84	1.22 ± 0.59	11.46 ± 2.79

表 2 卵巢埋植组血清生殖激素测定($\bar{X} \pm SD$)

	组别	$E/\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$	$P/\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$	$\text{FSH}/\text{mIU} \cdot \text{mL}^{-1}$	$\text{LH}/\text{mIU} \cdot \text{mL}^{-1}$
对照	正常组	14.35 ± 5.97	57.47 ± 15.71	0.64 ± 0.40	6.22 ± 2.50
	去势组	2.05 ± 1.21	7.58 ± 2.98	0.63 ± 0.22	4.48 ± 2.01
颈部	5~10d	1.36 ± 0.88	7.84 ± 3.23	0.53 ± 0.33	4.63 ± 2.27
	25~35d	1.23 ± 0.46	31.49 ± 9.57	1.06 ± 0.73	4.40 ± 2.64
	35d 以上	12.34 ± 5.56	47.52 ± 18.69	0.86 ± 0.29	6.08 ± 1.35
肾被膜	5~10d	1.55 ± 0.80	7.39 ± 3.10	0.43 ± 0.28	3.77 ± 2.71
	25~35d	3.10 ± 2.33	15.23 ± 8.45	0.91 ± 0.56	3.87 ± 2.69
	35d 以上	16.35 ± 6.08	41.60 ± 11.71	0.83 ± 0.29	5.79 ± 2.78

2.4 阴道脱落上皮细胞涂片检查

去势雌鼠阴道涂片呈现满视野的白细胞,偶见少量角化上皮细胞,未出现动情周期的变化. 颈部皮下和肾被膜下埋植胚胎卵巢后,阴道上皮分别在埋植的第(21.1 ± 3.3)天和第(24.2 ± 2.7)天出现动情周期,每个动情周期平均 4~5 d.

3 讨论

本实验使用埋植的方法(未做血管吻合)将大鼠胚胎性腺移植到成年大鼠体内,目的是使受者的损伤降到最低. 埋植区选择了血管丰富的颈部和机体免疫特赦区——肾被膜下,埋植后未使用免疫抑制剂. 结果两个部位埋植物均能正常生长发育,但免疫特赦区的胚胎组织存

活率明显高于富含淋巴细胞的颈部。结果提示胚胎组织埋植(移植)物存活率较高,即使不行血管吻合术,也能在埋植部位生长发育,但仍有可能引起机体的免疫反应。而埋植物是否能生长发育关键在于是否有新生血管长入。将胚胎睾丸与卵巢埋植进行比较,显示胚胎睾丸在异体异位的生长存活率优于胚胎卵巢。

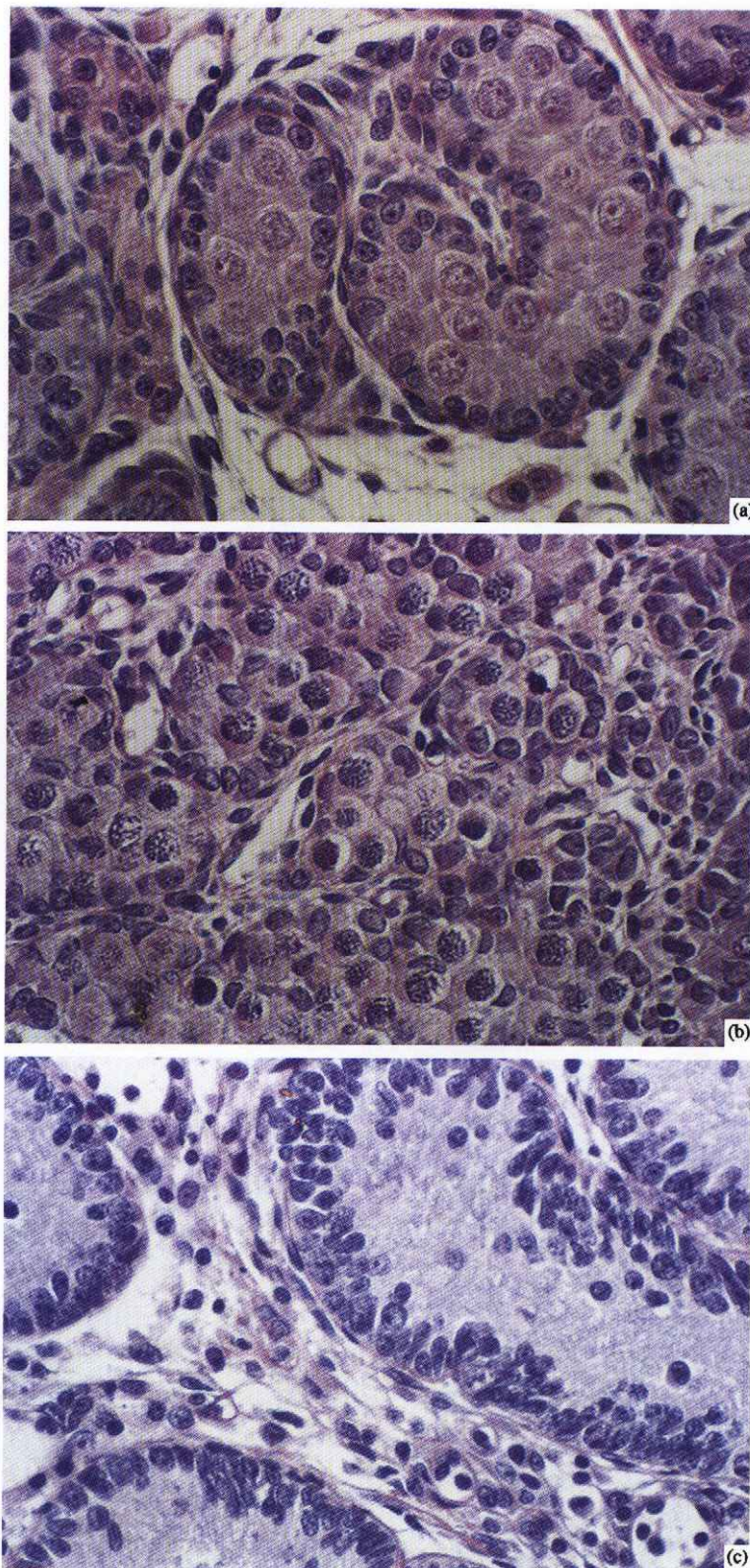
性腺的功能之一是产生生殖细胞。实验结果显示,胚胎睾丸的生精细胞在埋植后可以生长发育,但不能发育到精子阶段,根据正常睾丸生长发育条件分析,体内“高温”有可能是精子形成障碍的主要原因之一。而胚胎卵巢被埋植后能正常发育至成熟并能排卵。卵泡生长的各个阶段需要不同的生长条件,发育至初级卵泡主要是在卵巢自身的雌激素调控之下,但如继续生长,即发育到次级卵泡(窦状卵泡)必须在垂体促性腺激素的调控下才能完成,本实验在埋植胚胎卵巢中发现了窦状卵泡和黄体结构,说明胚胎卵巢不仅能在异体异位存活、生长发育,而且能置身于垂体的调控之下。

性腺的功能之二是分泌性激素,通过对埋植性腺 3- β HSD(类固醇激素合成过程中的重要酶)、性激素与性激素受体和血清生殖激素的检测证明,埋植的胚胎性腺具有分泌性激素的功能,但受者鼠血清生殖激素测定的结果虽显示了生殖激素随埋植时间延长而明显增高的趋势,但雄鼠血清 T 和 LH,雌鼠血清 P 浓度与正常相比仍有差距,其原因有待探讨。在对雌性受者鼠的阴道脱落上皮细胞的观察显示,在接受胚胎卵巢埋植后,阴道出现了周期性变化,说明埋植卵巢不仅能接受上级器官垂体的调控,而且还能通过自身的内分泌功能对下级靶器官进行调控。

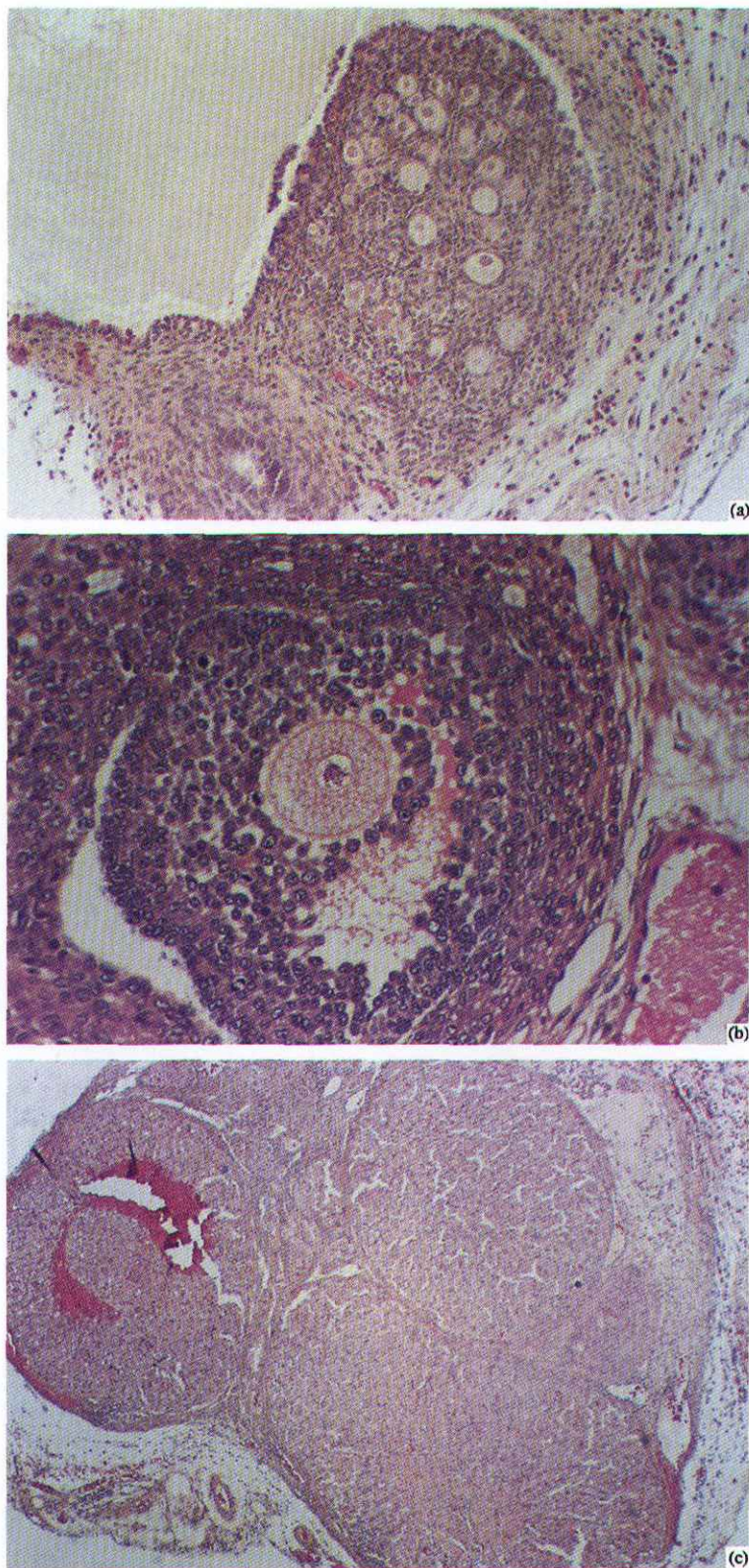
在埋植物周围可见散在的淋巴细胞,说明胚胎器官仍能引发受者免疫系统的反应,但其免疫反应强度可能还不足以使机体产生排斥。在此值得讨论的是胚胎睾丸的存活率高于卵巢,据报道睾丸是一个免疫特赦区,同种和异种移植物均能在其长期存活。分子生物学研究表明免疫赦免的机制在于睾丸组织细胞表面含有的 FasL 可诱导因接触移植抗原而被激活的受者的 T 细胞凋亡,从而产生免疫耐受^[8]。因此本实验胚胎睾丸埋植存活率高的原因可能是基于这一理论。

参 考 文 献

- 1 Guthrie C C. Blood vessel surgery and its applications. In: Harrison S, et al. ed. Contributions of Dr. C. C. Guthrie to Vascular Surgery. Pittsburgh: University of Pittsburgh Press, 1959
- 2 Attaran S E, et al. Heterotransplantation of the testis. J Urol, 1966, 95: 397
- 3 Lee S, et al. Testicular transplantation in the rat. Transpl Ant Proc, 1971, 3: 586
- 4 Altwein J E, et al. Gonadotropic response to testicular transplant in the rat. Endocrinology, 1989, 91: 312
- 5 Tai J, et al. Successful transplantation of Leydig cells in castrated inbred rats. Transplantation, 1989, 47: 1087
- 6 钱辉军,等. 大鼠睾丸 Leydig 细胞同种埋植后的形态学观察. 中华器官移植杂志 1997, 18(3): 142
- 7 Statter M B, et al. Correlation of fetal kidney and testis congener graft survival with reduced major histocompatibility complex burden. Transplantation, 1988, 47(4): 651
- 8 姜泊主编. 细胞凋亡基础与临床. 北京:人民军医出版社, 1999. 32



(a) 18d 胚胎辜丸; (b) 19d 胚胎卵巢皮质; (c) 颈部埋植第 10d 的胚胎辜丸



(a) 颈部埋植 10d 的胚胎卵巢；(b) 颈部埋植 25d 的胚胎卵巢中的窦状卵泡；(c) 颈部埋植 35d 的胚胎卵巢中的黄体