

肌病小鼠卵巢正位移植技术

牧佐渭 钱松明 倪紫美

(中国科学院上海生理研究所)

卵巢移植,国外已经做了很多工作。在移植技术方面积累了不少经验。出于不同的目的,卵巢组织可以正位移植,也可以异位移植于脑、眼前房、脾脏和皮下组织等部位。卵巢移植技术的建立,不仅在研究内分泌功能方面,而且在分析组织适合性的遗传学方面亦提供很大的方便。据报导已应用于下述研究工作:(1)研究在发育过程中母体对遗传的影响;(2)检定卵巢组织生殖成分的保存方法;(3)研究内分泌环境改变后卵子发育的突变遗传和致癌作用;(4)分析卵巢器官的衰老过程等等。

此外,卵巢的正位移植技术对遗传上或生理上不能生育的动物雌体延续后代具有实际的意义。

鉴于研究进行性肌肉营养不良病工作的需要,由国外引进了一种 Rej 129 纯系小鼠。这种纯系中的病鼠,遗传学证明它是单个隐性常染色体上的基因发生突变所致的。这种肌病

小鼠是研究人的肌病的一种很好的实验模型动物。患肌病的 Rej 129 品系小鼠由于身体残疾、后肢瘫痪、运动失调,完全丧失了交配的能力。虽然可以用外表完全正常的带病体 [即具有单个隐性常染色体突变的基因 (+/dy)] 进行续代,但是选择带病体 (+/dy) 的工作量很大,其子代的肌病发生率又低 (25% 左右),往往不能满足研究工作的需要。为了克服这一缺点,参考国外有关资料,经过摸索,在我们实验室建立了一项小鼠卵巢正位移植技术。

一、显微外科操作

动物 Rej 129 纯系雌鼠的未知体 (+/dy 或 +/+), 发病体 (dy/dy) 和正常体 (+/+). 动物体重大约 10—14 克。年龄 1—2 月。

麻醉 1% 戊巴比妥纳 (Nembutal)。每只小鼠腹腔注射 0.1—0.15 毫升。发病体的麻醉剂量减半。作完小鼠一侧移植手术后,再追

加第一次注射剂量的 $\frac{1}{4}$ — $\frac{1}{3}$ 麻醉剂,就可以作完另一侧移植手术。

手术操作 手术器械煮沸 15 分钟消毒或在新洁尔灭消毒溶液中浸泡 30—45 分钟,擦干待用。

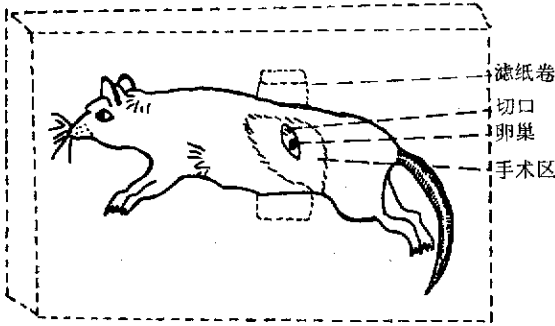


图 1

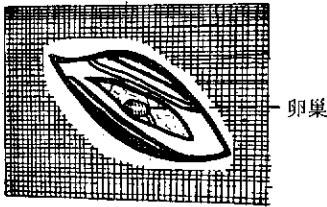


图 2

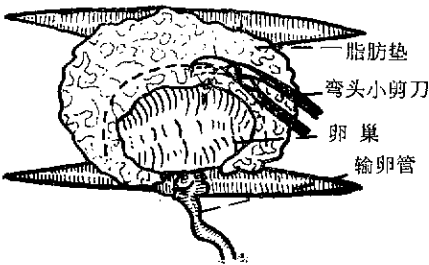


图 3

用眼科弯头剪刀将已麻醉的动物腰部两侧手术区的毛剪净(图 1)。前后肢分别用粗线缚于手术板上。动物侧放,腰下垫一卷滤纸或棉花。手术区用酒精和碘酒消毒。上覆开口的消毒白布。用眼科剪刀在腰部中线区的皮肤上作一倾斜切口,长约 1—1.5 厘米。分开皮肤,避开神经与血管,在腹肌上再开一个长约 0.5 厘米的小切口,就可以清楚地看到卵巢周围的脂

肪衬垫以及包膜内的卵巢(图 2、3)。用不锈钢游丝镊子(最好带齿)夹住卵巢脂肪衬垫,往外拉出放在消毒的小棉球上。以后的手术操作需要在显微镜下进行(放大 10—25 倍)。沿卵巢边缘用弯头眼科小剪刀剪一半圆形的切口(图 3)细心地将卵巢包膜向输卵管卷曲部位翻转,暴露卵巢(图 4),除其蒂部有血管与结缔组织同脂肪垫相联着外,整个卵巢可以以其蒂部为附着点自由转动。以弧形镊子尖头紧夹卵巢蒂部待 1—2 分钟,再用虹膜刀切除整个卵巢(图 4),若遇卵巢腔出血,可用消毒小棉球或明胶海绵

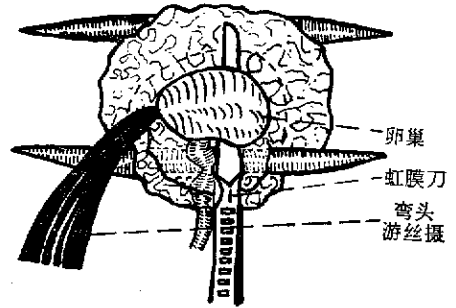


图 4

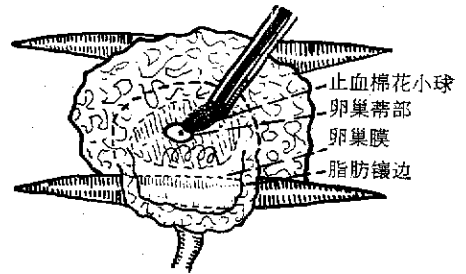


图 5

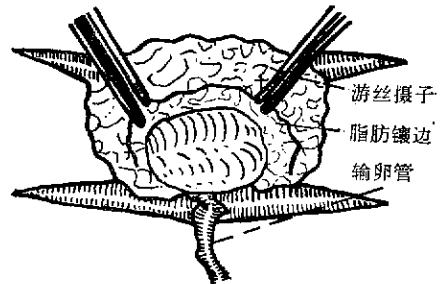


图 6

压住止血。待受体的卵巢腔完全止血后,用消毒小棉球擦净腔内及其周围血块(图5),正位移入供体的卵巢。要让供体的卵巢蒂部与受体的卵巢蒂部吻合,并翻转脂肪镶边,恢复原位,不加缝合(图6)。在整个移植过程中要经常用生理盐水湿润卵巢与包膜,免受干燥损伤。将手术后的卵巢轻轻推回腹腔原位,缝合伤口并敷以磺胺类消炎粉或滴加低浓度的青霉素水剂,以防止炎症。作完一侧手术后,一般需追加麻醉剂后再在另一侧重复上述手术。

二、移植效果

(一) 卵巢正位移植成功率

卵巢正位移植手术共作56例,其中29例的供体为未知体(+/+或+/dy);27例的供体为发病体(dy/dy),受体均是未知体。结果见表1:

表1 移植成功率

动物	移植总数	能孕数	不孕数	成功率
未知体	29	19	10	65.5%
瘫卵体	27	19	8	70.4%

小鼠经过手术后,待伤口愈合即与公鼠配对。怀孕数在一胎以上的均统计在能孕数项内。因为手术原因与公鼠配对,亦未能怀孕的鼠数列为不孕数。凡能怀孕的动物,我们认为移植手术是成功的。从表1可见,正位移植后,未知体与瘫卵体的移植成功率分别为65.5%和70.4%,同有关资料*比较,这个手术成功率是满意的。

(二) 卵巢正位移植后的瘫卵体与带病雄体(+/dy)配对,其子代的发病率

从19只正位移植成功的瘫卵体中选取7只作为子代发病率的统计数,列于表2。其余12只手术后瘫卵体虽然都有生育能力,但因为它们的各胎子代中,在出生年龄半月以内均有不等的死亡数,不能列入子鼠发病率的统计。

表2所示的7只瘫卵体,除了其中2只瘫卵体在统计时已产过第二胎外,其余5只均仅

产第一胎。这些瘫卵体目前都还在继续生育中。从表2可以清楚地看出,作过移植的瘫卵体与带病雄鼠配对,其子代发病率为50%。这就有效地解决了肌病鼠的繁殖问题。

表2 手术后瘫卵体的子代发病率

瘫卵体总数	总胎数	总仔数	发病仔数	带病仔数	发病率(%)
7	9	38	19	19	50

(三) 正位移植后小鼠的生育能力同正常鼠比较

选择203只正常的Rej 129小鼠进行自然繁殖,生育最少的是1胎,最多的达8胎。瘫卵体少则1胎,多则5胎,列如表3。表3表明,不论是正常的小鼠还是瘫卵体,其生育3胎以下的比率高,而4胎以上的百分率则明显下降。我们所移植的瘫卵体目前大部分还在继续繁殖中,生育情况最多的只能统计至第五胎。就总的情况看,移植后的瘫卵体繁殖能力与正常鼠的繁殖能力基本相似。

表3 瘫卵体生育胎次与正常鼠比较

动物	总数	生育情况									
		一胎		二胎		三胎		四胎		五胎	
		鼠数	%	鼠数	%	鼠数	%	鼠数	%	鼠数	%
正常鼠	203	77	37.9	62	35.4	29	14.0	14	6.8	11	5.4
瘫卵鼠	19	4	21.0	7	36.8	6	31.0	1	5.2	1	5.2

(四) 植入瘫卵的正常鼠生育情况

为了观察显微外科手术的可靠性,还补充了一个将瘫卵植入正常鼠的试验。共作6只,其中4只有生育能力,有的已生育了4胎,目前仍在继续生育中。所有能生育的小鼠的子代中均有发病体出现。

三、讨论

(一) 显微外科上的一些困难问题

1. 剪开卵巢包膜时,剪刀头的方向一定要

* Jones, E. C. and P. L. Krohn, (1960).

把握准确。否则很容易触伤脂肪垫上的血管，导致出血过多，并影响包膜的愈合。

2. 防止卵巢腔大出血。在摘除卵巢前，要用弯头镊子尖紧夹卵巢蒂部，稍等片刻，再用虹膜刀切去卵巢。这是防止大出血的有效办法。一旦大出血，可用消毒小棉球或明胶海绵压迫止血，也可用组织块压迫止血。3—5分钟后，待蒂部血管伤口产生凝聚，出血停止，再擦去腔内血液凝块，否则将引起卵巢包膜膨胀和粘连，导致手术后动物不育。

3. 受体本身的卵巢一定要摘除干净，不能留下残片。否则在植入供体卵巢后，受体留下的残片会快速再生，并能影响供体卵巢的功能。

(二) 一般技术上的问题

1. 供体的年龄与体重应该比受体的小一些

为好。

2. 在卵巢包膜边缘脂肪垫上作切口时，要有脂肪镶边。这对摘除卵巢和移入卵巢均增加方便，并且能有助包膜的伤口愈合。

3. 事实证明，作卵巢正位移植术时，动物两侧分别切口较腹中线单切口更为理想。后者易出现组织损伤及粘连。

根据史蒂文斯 (Stevens) 的报道，我们用供体的二分之一卵巢接入受体，手术后进行了繁殖观察。证明生育胎数与每胎产仔数均与全卵巢移植相似。

卵巢正位移植技术应用于不育的肌病小鼠后，不仅生育能力与正常小鼠相似，而且子代发病率可达半数。这就大大提高繁殖肌病小鼠的效率。这表明手术是可靠的。