

## ICR 老鼠原始卵泡移植之研究

羅正民 蔡佳臻 溫兆遠 曾啓瑞

### 摘 要

在本次實驗中，我們利用 ICR 老鼠和 C 57 BL/6 老鼠作為卵泡來源，移植到 ICR 老鼠體內，觀察其荷爾蒙分泌以及排卵受孕情形。

我們將老鼠卵巢取出之後，以 Collagenase 分解成細胞態再進行移植，但是在本次實驗中，只發現有些許荷爾蒙分泌的情形，並未發現到有排卵以及受孕。此外，我們也嘗試將整顆卵巢移植，發現有些許荷爾蒙分泌的情形，同時有些老鼠也發現有排卵，但是並未發現有受孕，雖然曾發現有些老鼠的子宮有數處膨大，不過無法證實為懷孕。

由本次實驗可以得知：以移植原始卵泡的方式來恢復內分泌及生殖功能，的確有其可行性，但是目前我們仍有部分技術上的問題尚未完全克服。

(關鍵詞：老鼠，原始卵泡，移植)

器官移植 (organ transplantations) 在近年來有非常顯著的進步，已被廣泛地應用於多種器官衰竭的治療上，而在卵巢組織的移植方面，則由於卵巢功能的喪失並不會對生命造成立即且顯著的危害，再加上牽涉到了倫理和技術上的一些問題，因此發展較慢，直到最近因為冷凍技術的發展，以及不孕症研究的進步，有人提出使用流產胎兒的卵巢組織來做移植的研究報告。

早期嘗試保存卵子及卵巢組織的最大困難，往往在於冷凍、解凍的過程中，只有極少部份的卵泡能存活下來；近來則由於冷凍胚胎技術的進步，已能成功地將老鼠的原始卵泡和成熟卵子冷凍起來，存活率可達八成，甚至可使冷凍過的卵子受精、發育，且成功率和未冷凍過的卵子差不多。

目前我們對於早期的卵巢衰意 (POF: premature ovarian failure)、因卵巢腫瘤或其他原因必須將卵巢切除、以及因癌症接受放射線或化學治療的影響而喪失卵巢功能的病人，不但要給與長期的荷爾蒙補充外，生育的問題除了極少數人可經由卵子捐贈及試管嬰兒的技術加以解決外，並無其他方法可行。

為了解決這個問題，不少研究都致力於卵巢組織的移植，以期恢復正常荷爾蒙及生殖功能。就這方面而言，曾經有報告指出可以利用自體異位移植的方式，將卵巢植入手臂內側的皮下組織 (subcutaneous heterotopic transplantation of the ovary)，可避免放射線治療的影響，而保有正常荷爾蒙功能<sup>(6,11)</sup>，但仍會喪失生殖功能；此外，在動物實驗中，也有報告指出可利用異體移植的方式，移植卵巢及輸卵

管 (tubo-ovarian transplantation), 來恢復其生殖功能<sup>(2,7)</sup>, 不過仍必須和其他器官移植一樣, 使用 cyclosporine 等一類抗排斥藥物 (immunosuppressive drugs), 同時還須注意 cyclosporine 所可能造成的胎兒畸形。

## 材料與方法

實驗動物: 6~8 週大 ICR 老鼠

4~8 天大 C 57 BL/6 老鼠

3 週大 C 57 BL/6 老鼠

- (A) 1. 取 4~8 天大 C 57 BL/6 母鼠 (台大動物中心) 10 隻, 以頸椎脫臼法 (cervical dislocation) 殺死後, 在無菌操作下, 由腹部切開, 移開腸子後, 取下兩側位於後腹壁上的卵巢, 並置於 37°C 的 DPBS 溶液 (Dulbecco's phosphate-buffered saline) 中。
2. 將取下的 20 個卵巢以 27 號針頭切割成數小塊後, 置於試管中, 加入 2 cc 含有 1.5 mg/cc collagenase (SIGMA Chemical Co.) 的 HTF (human tubal fluid) 溶液中, 在 37°C、5%CO<sub>2</sub> 下, 培養一小時。
3. 取出試管, 以 2500 rpm 離心 15 分鐘, 除去上清液, 再以 DPBS 溶液清洗沉澱物兩次。
4. 取一根內徑 1.1~1.2 mm 的 capillary tube, 先以 sodium citrate (3.8%) 浸潤過, 用之後 ICR 老鼠的後眼血管叢吸取約 1 cc 血液至含有約 0.01 cc sodium citrate (3.8%) 的試管中, 並混合均勻, 避免凝血, 再以 2000 rpm 離心 3 分鐘, 取上層澄清血漿。
5. 將上述 3 中的沉澱物移至 1.0 cc eppendorf 中, 加入以 sodium citrate (3.8%) 處理過的 ICR 老鼠血漿 50 ul 之後, 再加入 calcium chloride (500 mM) 5 ul, 置於 37°C、5% CO<sub>2</sub> 下 10 分鐘, 使之形成凝塊 (clot)<sup>(1,9)</sup>。
6. 將凝塊以 27 號針頭取出, 置於含有 HTF 溶液 & 1% BSA (Bovine Serum Albumin) 的細胞培養皿中, 在 37°C、5% CO<sub>2</sub> 下, 培養 1 至 2 天。
7. 取 6~8 週大 ICR 母鼠一隻, 由腹腔注射 Citosol (5 mg/cc) 0.4 cc 加以麻醉後, 在無菌操作下, 從老鼠背部切開, 夾出兩側的卵巢。
8. 藉由解剖顯微鏡, 將卵巢外的囊 (bursa) 剪開, 用鑷子將卵巢夾除, 再把上述 5 中培養好的兩凝塊, 放入兩側已夾除卵巢的囊中, 並將切開的囊以縫線縫合。
9. 最後, 將老鼠的背部肌肉和皮膚層各別縫合, 並繼續飼養手術後的老鼠, 直到手術三星期後, 再將之與 8 週大 ICR 公鼠交配, 並觀察其懷孕情形。
- (B) 取 3 週大 C 57 BL/6 老鼠 5 隻, 皆以頸椎脫臼法 (cervical dislocation) 殺死後, 在無菌操作下, 由腹部切開, 移開腸子後, 取下兩側位於後腹壁上的卵巢共十個, 其他同上述 (A) 法操作 1~9。
- (C) 1. 取 6~8 週大 ICR 母鼠一隻, 以頸椎脫臼法 (cervical dislocation) 殺死後, 在無菌操作下, 由腹部切開, 移開腸子後, 取下兩側位於後腹壁上的卵巢, 並置於 37°C 的 DPBS 溶液 (Dulbecco's phosphate-buffered saline) 中。
2. 取另一隻 6~8 週大 ICR 母鼠, 由腹腔注射 citosol (5 mg/cc) 0.4 cc 加以麻醉後, 在無菌操作下, 從老鼠背部切開, 夾出兩側的卵巢。
3. 藉由解剖顯微鏡, 將卵巢外的囊 (bursa) 剪開, 用鑷子將卵巢夾除, 再把上述 1 中所取出的兩卵巢, 分別放入兩側已夾除卵巢的中囊中, 並將切開的囊以縫線縫合。
4. 最後, 將老鼠的背部肌肉和皮膚層各別縫合, 並繼續飼養手術後的老鼠, 直到手術三星期後, 再將之與 8 週大 ICR 公鼠交配, 並觀察其懷孕情形。

- (D) 1. 取 3 週大 C 57 BL/6 母鼠一隻，以頸椎脫臼法 (cervical dislocation) 殺死之後，在無菌操作下，由腹部切開，移開腸子後，取下兩側位於後腹壁上的卵巢，並置於 37°C 的 DPBS 溶液 (Dulbecco's phosphate-buffered saline) 中。
2. 取另一隻 6~8 週大 ICR 母鼠，由腹腔注射 Citosol (5 mg/cc) 0.4 cc 加以麻醉後，在無菌操作下，從老鼠背部切開，夾出兩側的卵巢。
3. 藉以解剖顯微鏡，將卵巢外的囊 (bursa) 剪開，用鑷子將卵巢夾除，再把上述 1 中所取出的兩卵巢，分別放入兩側已夾除卵巢的囊中，並將切開的囊以縫線縫合。
4. 最後，將老鼠的背部肌肉和皮膚層各別縫合，並繼續飼養手術後的老鼠，直到手術三星期後，再將之與 8 週大 ICR 鼠交配，並觀察其懷孕情形。
- (E) 1. 爲了了解開刀對老鼠的影響，故取 6~8 週大 ICR 母鼠一隻，由腹腔注射 Citosol (5 mg/cc) 0.4 cc 加以麻醉後，在無菌操作下，從老鼠背部切開，夾出兩側的卵巢。
2. 夾出兩側的卵巢後，在不破壞卵巢外的囊 (bursa) 的情形下，把卵巢再放回老鼠腹腔內，並將老鼠的背部肌肉和皮膚層各別縫合。
3. 手術後的老鼠繼續飼養，直到手術三星期

後，再將之與 8 週大 ICR 公鼠交配，並觀察其懷孕情形，以得知手術過程是否會影響老鼠的交配以及受孕結果。

- (F) 1. 爲了了解沒有懷孕的老鼠是否有排卵的能力，老鼠在手術後五星期，以腹腔內注射 (intraperitoneal injection) 的方式打入 0.1 cc, 100 IU/cc 的 PMSG (pregnant mare serum gonadotropin)，經四十八小時後再注射 0.1 cc, 100 IU/cc 的 HCG (human chorionic gonadotropin)。
2. 在注射 HCG 十五小時之後，若老鼠有排卵，則可由老鼠的輸卵管中取得含有顆粒細胞 (granulosa cells) 的卵子。

## 結果

各組老鼠實驗後的觀察結果列於表一。

在實驗(A)中，經過手術的老鼠，曾經有觀察到其陰道開口呈開放狀，但是並沒有懷孕。而經實驗(F)注射 PMSG 及 HCG 之後，在輸卵管中並無發現有任何卵子的存在。此外，兩側的輸卵管及卵巢也發現有沾黏 (adhesion) 的現象。

在實驗(B)中，從 3 週大 C 57 BL/6 老鼠所取得的卵巢，經過處理之後，無法藉由血漿凝結形成凝塊 (clot)，因此本部份無法繼續實驗。

表一：各組老鼠實驗後的觀察結果

	陰道開口	排卵與否	輸卵管	移植卵巢	懷孕與否
A組	曾發現有開放	未發現	兩側沾黏	未發現	未發現
B組	未觀察	未觀察	未觀察	未觀察	未觀察
C組	曾發現有開放	左側九顆，右側一顆	清晰可見	左側較明顯	未發現
	曾發現有開放	未發現	清晰可見	未發現	未發現
	曾發現有關放	未發現	兩側沾黏	兩側沾黏	未發現
	未發現有開放	未發現	左側沾黏	左側沾黏	未發現
	未發現有關放	未發現	左側有囊腫	右側沾黏	未發現
D組	未發現有開放	未觀察	清晰可見	隱約可見	左側子宮有三處膨大
	曾發現有開放	未觀察	未觀察	未觀察	子宮有數處膨大

在實驗(C)中，經過手術的老鼠，有的可以觀察到其陰道開口呈開放狀，但是皆沒有懷孕。而經實驗(F)注射 PMSG 及 HCG 之後，有一隻老鼠的輸卵管中發現有十個卵子。此外，經由腹腔的觀察，可發現有的輸卵管及卵巢有與後腹壁沾黏，有的並沒有發現卵巢，甚至在有的輸卵管旁可發現有透明囊腫狀的形成，而且大部份存在於卵巢旁的脂肪塊都有變得比較緊密、肥大的現象，有的還會把卵巢及輸卵管包在內，以致於不易觀察卵巢是否存在。

在實驗(D)中，經過手術的老鼠，有的也可以觀察到其陰道開口呈開放狀，而經實驗(F)注射 PMSG 及 HCG 之後，在打開腹腔的時候，發現其子宮有數處膨大的現象，可能為懷孕。

實驗(E)中(即對照組)，經過手術的老鼠仍可生育(有的一胎可生十六隻)，表示麻醉、開腹腔手術、縫合這些過程，並不會影響老鼠的交配、受孕以及生產。

## 討論

本實驗的目的，是嘗試藉由小白鼠的模式來探討使用從不成熟到成熟卵巢組織的原始卵泡(primordial follicles)，移植到卵巢已切除的小白鼠上，以觀察其荷爾蒙及生殖功能恢復的可能性。

如果這樣的模式可行，則將來可利用於因其他良性病變而必須將卵巢切除時，或是因癌症治療而會破壞卵巢功能時，可將其卵巢組織做冷凍保存後，在適當的時機或適當的接受者身上再做移植，以期可以恢復卵巢分泌及生殖的功能。除了對喪失卵巢功能的人將有所助益之外，對於更年期後症狀(postmenopausal symptoms)的治療、骨骼疏鬆症、及心臟血管疾病的預防等，也可以在年輕時預先將卵巢組織冷凍保存起來，到停經後再植回去。

我們都知道，女性卵巢中的卵泡數目，自胎兒時期就逐漸減少，從出生時的數百萬個，一直到更年期剩下數千、甚至只剩下數百

個<sup>(10,12,13)</sup>，因此，想要使移植的卵巢有最大的功能，當然是越年輕的卵巢越好<sup>(14)</sup>，所以在本實驗中，(A)組便是選用四至八天大的老鼠，而(B)組則是選用三週大的老鼠<sup>(4,5)</sup>。

至於選用 C 57 BL/6 品系的原因，則是由於 ICR 品系為白色老鼠，C 57 BL/6 品系為黑色老鼠，因此，把黑色母鼠的卵巢移植到白色母鼠體內，使之與白色公鼠交配，便可由產出老鼠的毛色得知，卵巢功能的恢復是來自植入的卵巢，或是因為未把原來卵巢清除乾淨所致。有的研究卵巢移植的報告，則是以分析老鼠內 GPI 01 (glucose phosphate isomerase -1) genotypes 活性來確定產出的老鼠是否來自植入卵巢的卵子<sup>(8)</sup>；而我們選用 C 57 BL/6 以及 ICR 品系，一方面是因為實驗上的方便，同時也有報告指出 C 57 BL/6 以及 ICR 品系兩者確實能相互交配，而產出不同毛色的子代。

在本實驗中所使用的麻醉藥 Citosol，其成份為 thiamylal sodium，是屬於非腸胃投予的全身麻醉藥(parenteral general anesthetics)，一般用於人體時是以靜脈注射的方式來誘導麻醉，而我們在本實驗中則是以腹腔內注射的方式來麻醉老鼠。老鼠經由腹腔注射麻醉藥之後，大多皆能順利麻醉，但曾經有一次在注射麻醉藥之後，老鼠便發生猝死的情形。不過大多數的老鼠除了誘導麻醉的時間長短略有不同之外，在麻醉上並沒有什麼問題。

老鼠在手術之後，有些約經六小時便可以恢復些許活動能力，而在二十四小時之後皆可恢復近乎正常的行動能力。然而，有一次老鼠是在手術的時候死亡，由於在手術時此老鼠呼吸有雜音，因此可能是有分泌物阻塞呼吸道因而窒息死亡。

大部份的器官移植，都相當重視時效性，當移植器官由捐贈者身上取出之後，由於器官不像細胞、血液可以冷凍保存一段時間，所以往往必須儘快地植入接受者體內。在本實驗中使用 collagenase 的目的是在於將卵巢由原來

的器官型態，分解成爲細胞型態，如此一來便可以加以冷凍保存，就如同冷凍保存精子、卵子、胚胎一樣。

那如何將已分解的細胞移植呢？我們利用血漿形成凝塊的性質，將已分解的細胞再度聚集在一起，然後再移植。有報告指出，這些已分解的卵巢組織細胞，在植入之後，會有器官發生(organogenesis)的現象<sup>(3)</sup>，也就是這些已分解的卵巢組織細胞會重新形成卵巢組織，並獲得血液供應。由於植入的組織中沒有免疫性強的細胞(如白血球)，因此這種移植的排斥問題也比整個器官移植的排斥問題小。

在本實驗中，我們取得老鼠血液的方式是：捏起老鼠頸部皮膚，使其頸部無法轉動，同時眼睛外突，此時將毛細管緩緩轉入後眼角內，當毛細管刺入後眼血管叢時，血液自然順由毛細管流出，便可收集於試管中。由於所取的血量並不多，因此該老鼠仍可存活，但是有時老鼠會因頸部受壓迫過久而死亡。

當我們使血漿凝結時，曾經碰到一些問題：有時候將以 sodium citrate 處理過的血漿加入 eppendoff 中，再加入 calcium ions 之後，血漿並無法形成凝固，其原因應該不是濃度不足，可能是因爲在吸取老鼠血液時，血液在毛細管中已有凝血情形發生，以致於凝血因子耗盡，因此在分離出的血漿中也缺乏凝血因子，即使加入 calcium 也無法使血漿形成凝塊。此外，有時候血漿有形成凝塊，但是卻沒有將我們所要的細胞聚集在凝塊內，這是我們必須再克服的問題。

一般來說，血漿凝塊在培養一至二天之後，會稍微縮小<sup>(3)</sup>。而在將血漿凝塊植入老鼠體內時，必須注意到幾種情形：在切開卵巢外的囊以及取出原有卵巢時，常會有出血的情形發生，雖然量並不大，但是往往會妨礙手術操作，因此必要時可以燒灼器(cautery)止血。此外由於卵巢外的囊小且薄，縫合不易，因此必須注意植入的血漿凝塊是否確實在縫合的囊內，若縫合不良，植入的血漿凝塊便可能在受擠壓時

便掉出囊外。

我們由實驗結果可知，老鼠未懷孕的原因可能有以下幾種：

(1)排斥現象(rejection)：由於本實驗是移植異體卵巢，並且沒有使用抗排斥藥物，因此移植植物可能被視爲外來物(foreign body)而被免疫系統所排斥，以致於喪失功能。

(2)萎縮、閉鎖(atrophy, atresia)：移植卵巢組織中的卵泡，可能因爲自然閉鎖、或是荷爾蒙周期無法配合而閉鎖，或因手術、老化等原因而萎縮，以致於無排卵。

(3)纖維化(fibrosis)：由於卵巢手術對老鼠爲一外來傷害，在其自然修復過程中，常有結締組織的增生，如果過度增生，很容易造成對正常組織的不良影響，例如造成輸卵管的壓迫、堵塞，甚至卵巢、輸卵管的沾黏，都會造成排卵的障礙。

(4)未植入：植入的卵巢組織，可能因爲卵巢外的囊縫合不良而掉出，造成無法排卵。

## 誌謝

本文曾接受國科會 NSC 84-2815-C 038-007 B 計畫補助，特此致謝。

## 參考文獻

1. Brown BA: Hematology: Principles and Procedures, 5th edition, Lea & Febiger 1988.
2. Carmona F, Balasch J, Gonzalez-Merlo J: Ovarian function, tubal viability and pregnancy after tubo-ovarian transplantation in the rabbit. Human Reproduction 8; 929-931, 1993.
3. Gosden RG: Restitution of fertility in sterilized mice by transferring primordial ovarian follicles. Human Reproduction 5; 499-504, 1990.

4. Gosden RG: *Biology of Menopause: The Causes and Consequences of Ovarian Ageing*. Academic Press, London, 1985.
5. Gosden RG: Follicular status at the menopause. *Human Reproduction* 2; 617-621, 1987.
6. Lara HE, Dees WL, Hiney JK, et al.: Functional Recovery of the Developing Rat Ovary after Transplantation: Contribution of the Extrinsic Innervation. *Endocrinology* 129 (4); 1849-1860, 1991.
7. Scott JR, Hendrickson M, Lash S, et al.: Pregnancy after tubo-ovarian transplantation. *Obstetrics & Gynecology* 70 (2); 229-234, 1987.
8. Carroll J, Gosden RG: Transplantation of frozen-thawed mouse primordial follicles. *Human Reproduction* 8; 1163-1167, 1993.
9. Dacie JV and Lewis SM: *Practical Haematology*, 4th edition, J. & A. CHURCHILL, reprinted 1970.
10. Lintern-Moore S, Peters H, Moore GPM, et al.: Follicular development in the infant ovary. *J Reprod Fertil* 39; 53-64, 1974.
11. Leporrier M, von Theobald P, Roffe J, et al.: A new technique to protect ovarian function before pelvic irradiation. *Cancer* 60; 9, 2201-2204, 1987.
12. Faddy MJ, Gosden RG, Gougeon A, et al.: Accelerated disappearance of ovarian follicles in mid-life: implications for forecasting menopause. *Human Reproduction* 7; 1342-1346, 1992.
13. Richardson SJ, Senikas V, Nelson JF: Follicular depletion during the menopausal transition: evidence for accelerated loss and ultimate exhaustion. *J Clin Endocrinol Metab* 65, 1231-1237, 1987.
14. Parkening TA, Collins TJ, Elder FFB: Orthotopic Ovarian Transplantations in Young and Aged C57BL/6J Mice. *Biology of Reproduction* 32; 989-997, 1985.

# Transplantation of Ovarian Primordial Follicles in ICR Mouse

Cheng-Min Lo, Chia-Chen Tsai, Jaw-Yuan Wen and Chii-Ruey Tzeng

## ABSTRACT

The purpose of this study is to try using primordial follicles with immature to mature ovarian tissue for allograft transplantation by using the mouse model.

Ovaries of 4~8 day-old female C57BL/6 mice were dissected and transferred to HTF (Human Tubal Fluid) with collagenase(1.5mg/cc). The disaggregated cells were collected by mouse plasma clots. The clots were transplanted into the bursa of a 6~8 week-old ICR female mouse which was ovariectomized. 3 weeks later, the ICR female mouse mates with 8 week-old ICR male mouse.

After allograft transplantation, we can see that the vaginas of some mice were open. It seems that the transplanted grafts may have some hormonal function. But we did not find ovulation and pregnancy of the mice. The reasons may be rejection, atrophy of follicles, atresia of follicles, fibrosis, or failure of transplantation.

In this study, we can know that the hormonal and reproductive functions could be restituted by transplantation of ovarian primordial follicles, but there are still some technical problems that we have to resolve.

Key words: Mouse, Primordial follicle, Transplantation