

生殖细胞及性腺移植*

孙童 李世杰 杨增明

(东北农业大学生命科学学院 哈尔滨 150030)

摘要:生殖细胞和性腺移植研究近年来已取得了突破性进展。这两项技术对于农业、医学及动物繁殖学的研究具有深远的意义和很大的应用价值。本文从同源移植、异源移植、移植技术及其它移植相关问题等方面对生殖细胞和性腺移植进行了简要介绍,并阐述了近年来在这方面所取得的进展。

关键词:精原干细胞;卵母细胞;卵巢;睾丸;同源移植;异源移植

中图分类号:Q26,Q952 **文献标识码:**A **文章编号:**0250-3263(2002)04-84-06

Advances in Germ Cell and Gonadal Transplantation

SUN Tong LI Shi-Jie YANG Zeng-Ming

(College of Life Science, Northeast Agricultural University Harbin 150030, China)

Abstract: Much progress has been made recently in the study of germ cell and gonadal transplantation, which is quite valuable for agriculture, medicine and animal reproduction. Syngeneic transplantation, xenogeneic transplantation, transplantation techniques and other relative problems are briefly introduced and reviewed in this article.

Key words: Spermatogonial stem cell; Oocyte; Ovary; Testicle; Syngeneic transplantation; Xenogeneic transplantation

生殖细胞和性腺的移植主要是指精原干细胞、卵母细胞以及睾丸和卵巢组织的移植,通过显微注射及一些外科手术的办法进行生殖细胞及性腺的同源移植或异源移植,并使移植后的受体能正常产生后代。通过这一技术可以治疗一些由于疾病或化学治疗引起的不孕、不育症。除了其在临床医学上的重要作用外,它对于基础科学如内分泌学等的研究,以及动物繁殖和保护濒危动物也都具有十分深远的意义。

1 精原干细胞移植

精原干细胞移植技术可以将一种动物的睾丸干细胞移植到它同种的另一个体中(同源移植),也可以将其移植到不同种动物中(异源移植)。利用精原干细胞移植技术还可以将体外培养的细胞通过基因操作的方法从而产生一种已改变基因型的功能性雄配子。然而,这项新技术的成功应用也具有很大的困难,如遗传物质导入生殖细胞后的稳定性问题,移植精原干细胞的免疫学反应等。

1.1 同源移植 也叫种内移植。将一小鼠睾丸细胞的悬浮物通过显微注射的方法直接注入到遗传不育型小鼠的曲细精管中,结果在受体小鼠中有供体精子发生^[1]。同样,将一雌激素受体 α (estrogen receptor α , ER α)基因敲除的小鼠睾丸生殖细胞移植到遗传不育型小鼠的曲细精管中,通过PCR的方法检测到受体小鼠的后代产生于携带有ER α 基因片段的供体睾丸细胞,即在受体小鼠中有供体精子发生^[2]。除了这种遗传不育型的受体外,可把正常雄鼠在移植之前约4周时,用白消安(40 mg/kg)注射处理,就会破坏几乎所有的内源精原干细胞,睾丸内就没有内源性的精子发生,在曲细精管中为植入的干细胞的发育提供了场所。由于不存在生殖细胞,也使注射过程更容易完成。但也有一少部分内源性干细胞不受白消安的影响,仍然存活,并会重

* 国家杰出青年科学基金资助项目;

第一作者介绍 孙童,女,23岁,硕士研究生;研究方向:胚胎与子宫相互作用的分子机制。

收稿日期:2001-07-05,修回日期:2002-01-10

新起始精子发生。可用一种转细菌 LacZ 基因的小鼠作为供体,用于区别两种不同的精子发生^[1]。

将生殖细胞植入曲细精管腔后,细胞继续生存并进行精子发生,这并不意味着移植的精原干细胞就定位在曲细精管的基部。当精原干细胞被注射到曲细精管腔中后,必须从管腔移到曲细精管基部,才能进行正常的精子发生。但植入的干细胞如何识别和移位到管腔基部,其分子机制至今尚不清楚^[3]。

除了小鼠向小鼠的精原干细胞的同源移植以外,也成功地进行了大鼠间的同源移植。将大鼠的睾丸细胞移植到经白消安处理的受体大鼠曲细精管中,但目前由于缺少选择性的标记物,并没有确切地证明供体细胞是否已经定位于曲细精管。受体的精子发生在管腔内,因为在支持精子发生的整个曲细精管腔中发现,具有典型的细胞相互作用的管状成分存在,腔内的精子发生与整个曲细精管的精子发生在发育阶段上同步^[4]。

精原干细胞移植技术对于人类医学研究也作出了很大的贡献。有些经过化学治疗或 X-射线照射的病人可能会导致永远无精或长期性无精,在接受治疗以前,保存一部分精液,一段时间后,再进行精液注射,可能会重新恢复正常精子发生。有人通过外科手术的方法,将生殖细胞注入到牛、猴和人的睾丸中,但不能成功地由注射位点将生殖细胞注入到曲细精管的远端,所以用一种超声波引导的睾丸网注射方法进行注射,注射后,发现在牛的睾丸网注射位点附近的间质区及曲细精管中都有被注射的生殖细胞^[5]。这种注射方法很适合于向大动物睾丸进行的较大量的精液注射。

1.2 异源移植 也叫种间移植。最初,将大鼠睾丸细胞显微注射到无免疫应答的重度综合免疫缺陷(severe combined immunodeficient mice, SCID)的裸小鼠的睾丸中,睾丸干细胞会继续发育,并且会完成精子发生。移植后的数日,在受体小鼠附睾中发现具有典型的大鼠精子头部形态的精子,这也使人们重新认识了精子发生过程中支持细胞对生殖细胞的作用^[6]。

除了大鼠可以向小鼠进行干细胞移植之外,人们也尝试了其它的种间移植。将仓鼠(*Harlan sprague dawley*)的精原干细胞移植到免疫缺陷型的受体小鼠中,会有仓鼠精子发生。然而,无论在质或量上,受体小鼠中仓鼠的精子发生都比不上小鼠-小鼠以及大鼠-小鼠的睾丸细胞移植。具体地说,在受体小鼠曲细精管中,经常发现有具异常头部形态的拉长的精子细胞,在受体小鼠的附睾中,仓鼠精子的顶体不存在或极少数能够形成,而且大部分仓鼠精子的头部和尾部彼此都不连

接^[7]。将新鲜的兔睾丸细胞以及经深低温保藏的兔睾丸细胞向免疫缺陷型的受体小鼠移植,以观察两种兔睾丸细胞移植后是否有差别。结果发现,在所有的受体小鼠中,都存在有兔睾丸细胞,并且这些兔睾丸细胞在受体小鼠睾丸中进行增殖并形成一种由细胞间桥连接的细胞链或形成更致密的“蘑菇”式结构,但经体外培养后的兔睾丸细胞却不能被成功移植。在狗向免疫缺陷型小鼠进行睾丸细胞移植的实验中,新鲜获得的以及经深低温保藏或体外培养的狗睾丸细胞都能被成功地移植到受体小鼠睾丸中^[8]。

此外,人们还进行了如牛、猪和马等家畜向免疫缺陷型小鼠睾丸的精原干细胞移植实验,这些被移植的实验动物都是具有很重要的经济价值的动物。移植后,通过供体特异性免疫组织化学方法检测,发现在大多数的受体小鼠中均有供体睾丸细胞存在,只是其集群方式及程度具有供体种属特异性。猪的生殖细胞在受体小鼠中通过细胞间桥连接方式形成链与网,并且在受体睾丸中有供体精子发生。而牛的睾丸细胞在受体小鼠的曲细精管中会形成纤维状组织。在马向小鼠的睾丸细胞移植中,在受体小鼠的曲细精管中仅检测到很少数的供体睾丸细胞,并且其集群方式与狗睾丸细胞在受体小鼠中的集群方式相似^[9]。最近发现,在小鼠或大鼠睾丸中能成功地进行人精原干细胞的移植^[10]。

1.3 精原干细胞移植的相关技术 在精原干细胞的移植过程中,还涉及到许多其它的问题,如精原干细胞的体外培养,深低温保藏,移植技术以及如何提高移植成功率等。随着精原干细胞移植技术的进展,人们希望能将体外培养的基因型改变的干细胞进行移植,问题是必须找到一个适合于干细胞发育的培养系统。有人将小鼠睾丸干细胞在含 10% 胎牛血清以 STO 细胞作为饲养层的培养基上培养 4 个月,再将其移植到受体小鼠中,仍然能成功进行精子发生。在提高移植成功率的问题上,有人用抗 β_2 或 α_1 整合蛋白的抗体来浓缩精原干细胞^[11],也有人用“免疫磁性”细胞来分离及富集活的精原细胞^[12],这两种方法都大大地提高了移植成功率。

1.4 精原干细胞移植的意义 睾丸细胞混合物在移植前能被冷冻保存很长一段时间,并且冷冻-解冻后,仍能进行正常的精子发生^[13],这样就可以无限的保存精原干细胞,对动物学、基础科学及医药学等领域的研究意义重大。由此可以推测,人们能对具有研究价值和农业应用价值的动物生殖系进行冷冻保存,一段时间后再进行移植,每一受体都能将供体的基因传给后代。

异源的精原干细胞移植也可以用来拯救濒危动物,对有些在其性成熟之前就死亡或者由于年老而不能成功繁育后代的动物来说,可以将其生殖系移植到它的近缘种中,通过各种辅助生殖技术,产生出濒危物种的后代。而且,在人类医学领域中,此技术也意义重大,即当人类经化疗或放疗后,也许会失去精子发生功能,将精液冷冻保存后,再重新移植到睾丸中,许多生殖细胞会重新恢复精子发生。

2 卵母细胞移植

2.1 同源移植 对原始卵泡在小鼠中的移植已作过大量工作。通过酶消化法从幼鼠卵巢中分离原始卵泡,即利用 1A 型胶原酶分解卵巢组织,使之形成组织小块,之后,再用显微解剖的方法分离卵泡,从而分离出单个的卵母细胞^[14]。用经 X-射线照射而引起卵巢不能正常发育的小鼠作为受体,或者将原始卵泡迅速移植到切除卵巢的小鼠的卵巢周囊状组织中,虽然移植后受体小鼠中存在的供体卵泡数目有很大差别,但大多数受体中各个阶段的供体卵泡只发育到成熟卵泡期。移植后的受体小鼠均能自发排卵并能进行正常的交配,且交配后能产生正常的后代^[15]。后来,从幼鼠卵巢中分离原始卵泡并将其深低温冷冻保存,用二甲亚砜作为冷冻保护剂,将细胞解冻后,在凝固血浆(plasma clot)中培养,再移植到切除卵巢后的受体小鼠卵巢囊中,经正常交配后,通过基因检测证明产生的后代是来源于供体卵泡的^[16]。

近年来,卵母细胞移植在马中已经多次获得成功。用经孕酮及雌激素处理后不排卵的马作为受体,并且,供体马和受体马的卵泡发育应具有同步性,从而使受体马在移植时或接近移植时排卵。将供体马的卵母细胞取出后,经侧面剖腹术移植到受体马的输卵管中,受体在移植前 7 小时授精,在妊娠第 321 d 时生出一正常小马,经 DNA 分析检测,证明是供体马的后代^[17]。

胚胎及未成熟动物的卵巢中含有丰富的原始卵泡,将其深低温保藏,解冻后,利用卵母细胞移植技术将原始卵泡移植到受体动物中,使受体动物能产生正常的排卵周期,甚至受精、怀孕和产仔。除了在动物中的应用外,卵母细胞移植技术在人类医学上的应用价值也很大,可以用它来治疗一些疾病,如:女性性成熟前绝经、性腺生殖障碍、自身免疫缺陷而导致的卵巢无卵泡等。

3 卵巢移植

3.1 同源移植 卵巢移植始于 19 世纪末,其目的在于

恢复机体其内分泌平衡,为卵巢功能衰退的病人提供一种内源性激素。

从 10 d 的 C57BL/6J-Gpi-1(a)小鼠中取出卵巢,将刚取出的和冷冻保存的卵巢分别向卵巢切除的 B6CBF1(纯合 Gpi-1(b))受体小鼠进行同位移植,将移植后的受体小鼠同 B6CBF1 雄鼠交配,并对产生的后代通过葡萄糖磷酸同工酶电泳的条带检测每一个新生的小鼠,证明移植是成功的,大部分的后代都来自移植卵巢产生的卵母细胞,并且发现用新鲜卵巢组织进行移植的受体动物产仔的成功率要高于用冷冻后的卵巢进行移植的受体^[18]。

将小鼠胚胎中和新生小鼠的卵巢移植到已切除卵巢和未切除卵巢的受体小鼠中,发现在已经切除卵巢的受体小鼠中,供体卵巢中卵泡的发育情况正常,而在未切除卵巢的受体小鼠中,胚胎及出生 3 d 的供体小鼠卵巢中的卵泡发育不到早期有腔卵泡就终止了。由此可见,受体卵巢的存在与否直接影响到移植后供体卵泡的发育情况^[19]。

梁元晶等人对小鼠单侧和双侧进行卵巢的自体异位移植,并运用组织学、组织化学和放射免疫技术进行了小鼠移植卵巢的生长及功能的研究,结果表明,移植卵巢的生长可分三个阶段:(1)坏死期:移植第 2~4 d,卵巢的原有组织处于退化状态,仅边缘可见原始卵泡和腔前卵泡;(2)恢复期:移植第 7~14 d,卵巢逐渐恢复正常结构,血清孕酮水平开始上升,大多数动物出现动情周期;(3)发育成熟期:移植第 14 d 以后,卵巢内含发育不同阶段的卵泡、黄体 and 大量间质腺,孕酮水平接近正常。单侧移植卵巢的生长比双侧推迟约 7 d。研究显示自体异位移植的卵巢能够生长发育并分泌雌性激素^[20]。

除了小鼠向小鼠的同源移植外,也成功地进行了大鼠卵巢的同源移植。将冷冻后的未成熟大鼠卵巢移植到切除卵巢的受体大鼠中,一段时间后,检测到受体大鼠卵巢中存在小的卵泡、有腔卵泡及黄体,证明受体中的供体卵巢有正常卵泡发育及排卵周期^[21]。还有一种方法就是将卵巢皮质组织移植与卵泡的体外培养相结合,即将新生小鼠的卵巢移植到切除卵巢的受体鼠中,再分离出腔前卵泡,在体外培养至卵母细胞成熟,这种方法对于促进原始卵泡的成熟和生长很有帮助,也提高了移植的供体卵巢中卵泡正常发育的成功率^[22]。

此外,在绵羊中也作过大量卵巢移植的工作。将冷冻保存后的卵巢组织移植到切除卵巢的受体中,虽然受体中供体卵巢的原始卵泡的数量会减少很多,但

供体卵巢的功能却维持了长达两年的时间^[23]。也有人将卵巢皮质组织分别进行了同位和异位的自体移植,人工注射激素控制卵泡的生长及排卵,结果表明,移植过程对卵泡生存的伤害要大于深低温保存过程对卵泡的伤害,并且异位移植的效果要更优于同位移植^[24]。

张颖杰等报道应用血管吻合方法为年轻的宫颈癌患者进行自体卵巢向盆腔外移植,以预防盆腔内及体外常规放疗对卵巢的过量照射所带来的危害,现在认为腋下是安全、合理的移植部位^[25]。卵巢移植对维护上述患者卵巢功能及改善生活质量等有积极意义。

3.2 异源移植 近年来,对卵巢间移植的研究越来越广泛和深入了。有人将小鼠、仓鼠、兔和猴的卵巢组织取出后,用液氮-196℃玻璃化法(vitrification)进行深低温冷冻,保存一段时间后,将其解冻,并移植到假孕的大鼠子宫腔中,移植后一段时间,发现受体大鼠子宫腔中的供体卵巢仍然存活^[26]。

有人将新鲜的人卵巢皮质组织和冷冻过的人卵巢皮质组织分别移植到正常裸小鼠中,发现在受体小鼠中,冷冻-解冻后被移植的卵巢组织表面发生纤维样变性的区域大于另一种被移植的供体卵巢组织,但移植后的两种供体卵巢组织中卵泡的密度却很相似,通过血管内皮生长因子的免疫组织化学检测及血管网形态检测法,发现两个受体中都有新血管发生,由此可知,即使经冷冻-解冻的卵巢组织表面在移植后早较明显的纤维化现象,但并不影响原始卵泡和初级卵母细胞的数量及亚显微结构^[27]。

新生的大鼠及小鼠的卵巢中,仅包含有原始卵泡,所以完全可能将它们的生殖细胞及体细胞重新组织而形成异源的嵌合卵巢。将大鼠及小鼠卵巢取出后,分离出卵母细胞和体细胞,重新组合,形成嵌合卵巢,再移植到双侧切除卵巢的SCID小鼠中,移植后7d,发现产生了具有正常形态的初级和次级卵泡;移植后14d,出现了次级卵泡和早期有腔卵泡,并在这一时期发现在小鼠卵泡中发育的大鼠卵母细胞与颗粒细胞紧密相连,而大鼠颗粒细胞与小鼠卵母细胞连接的却不很紧密,这种现象在大鼠卵泡中的大鼠卵母细胞发育过程中也出现过;移植后21d,受体中的重组卵巢里出现了大的有腔卵泡,即这种嵌合卵巢的移植取得了成功^[28]。由此可见,即使颗粒细胞在卵母细胞发育过程中起到很重要的作用,但在没有明显改变的异源卵泡环境中仍然能进行种属特异的卵母细胞发育。

4 睾丸移植

4.1 同源移植 利用睾丸的同源移植可以治疗无睾畸

形和雄性不育。有人作过狗的睾丸同源移植实验,通过显微外科手术进行血管和输精管接合手术。此实验中,将实验动物分成三组,在移植后分别给药,依次为环孢子菌素A(cyclosporin A, CyA), CyA加脱氢皮质甾醇以及不给任何药物。发现3组动物被移植的睾丸的平均存活时间是28d,第2组动物被移植的睾丸的存活时间最长,可能是CyA与脱氢皮质甾醇结合对狗的睾丸同源移植具有一定的帮助作用,而且这种免疫抑制药物的作用下,移植的狗睾丸内具有正常的精子细胞成熟过程^[29]。

此外,人们还多次成功地进行了其它动物的自体睾丸移植实验。比如在兔子及大鼠中,都曾成功地用显微外科血管接合术进行了睾丸的自体移植^[30]。当动物或人的睾丸在腹腔内位置过高,甚至用常规的治疗隐睾病的方法已经不能将睾丸带回到阴囊中时,人们就用睾丸自体移植技术解决这一难题。用微血管接合术对5岁以内的男孩进行自体移植外科手术,在被移植的25名患者中,仅有一例是由于动脉血栓而失败。移植时将深下方腹上部动脉(deep inferior epigastric artery)与睾丸动脉相接合,深下方腹上部静脉与睾丸静脉相接合^[31]。

将幼体大鼠的睾丸移植到切除性腺的成熟大鼠的脾内,这是一种传统的实验性产生睾丸肿瘤的办法,为了避免肿瘤发生过程中可能出现的免疫学干扰,将7周大的Wistar品系大鼠的睾丸实质组织同源移植到双侧切除性腺的同种大鼠脾中,在移植后第14个月,脾内性腺组织发生肿瘤,且与人的基质细胞瘤很相似^[32]。这种移植技术诱导产生睾丸瘤的效率很高,因此,也更值得人们再进一步的研究。

4.2 异源移植 除了睾丸的同种异体移植和自体移植之外,人们还成功地进行了小鼠向大鼠的睾丸异源移植,同样是利用显微外科血管接合技术。从供体小鼠体内取出带有大段动脉及下腔静脉(inferior vena cava, IVC)的睾丸组织,移植后使这两根血管分别与大鼠的动脉和IVC相接合,完成输精管的相互吻合,并使供体小鼠和受体大鼠的阴囊表皮相吻合,结果在53个被移植的大鼠中有29例获得了成功的移植^[33]。

将人的睾丸组织移植到小鼠中,从而确定人的睾丸组织是否能在小鼠体内存活相当长的一段时间,验证人的睾丸组织对于小鼠来说是否是一种“免疫特惠”的组织。“免疫特惠”是指一种可降低同源及异源免疫排斥反应的现象。它是通过Fas-L作用机制表现的,并且许多体外的实验都表明人的Fas-L可与小鼠的Fas相结合,而人的睾丸不表达Fas-L,而大量表达Fas。用

MHC I、MHC II、CD4、CD8 基因敲除的小鼠作为受体,即没有某种组织相容性抗原的表达,结果发现,人睾丸组织对小鼠的异源移植是免疫原性的,即存在免疫排斥反应,也可以说,人的睾丸组织对于小鼠不是一种“免疫特惠”组织^[34]。

虽然目前对于降低异源移植的免疫排斥反应并没有更好的解决方法,但随着研究的日益深入,可望在不久的将来能够进行不同种动物间的睾丸移植和器官移植。

参 考 文 献

- [1] Brinster R L, Zimmermann J W. Spermatogenesis following male germ-cell transplantation. *Proc Natl Acad Sci*, 1994, **91**:11 298 ~ 11 302.
- [2] Mahato D, Goulding E H, Korach K S *et al.* Spermatogenic cells do not require estrogen receptor- α for development of function. *Endocrinology*, 2000, **141**:1 273 ~ 1 276.
- [3] Johnston D S, Lonnie D, Russell *et al.* Advances in spermatogonial stem cell transplantation. *Rev Reprod*, 2000, **5**:183 ~ 188.
- [4] Jiang F X, Short R V. Male germ cell transplantation in rats: apparent synchronization of spermatogenesis between host and donor semiferous epithelia. *Intern Androl*, 1995, **18**:326 ~ 330.
- [5] Schlatt S, Rosiepen G, Weinbauer G F *et al.* Germ cell transfer into rat, bovine, monkey and human testes. *Hum Reprod*, 1999, **14**(1):144 ~ 150.
- [6] Clouthier D E, Avarbock M R, Maika S D *et al.* Rat spermatogenesis in mouse testes. *Nature*, 1996, **381**:418 ~ 421.
- [7] Ogawa T, Dobinski I, Avarbock M R *et al.* Xenogeneic spermatogenesis following transplantation of hamster germ cells to mouse testes. *Biol Reprod*, 1999, **60**:515 ~ 521.
- [8] Dobrinski I, Mary R, Avarbock M R *et al.* Transplantation of germ cells from rabbits and dogs into mouse testes. *Biol Reprod*, 1999, **61**:1 331 ~ 1 339.
- [9] Dobrinski I, Mary R, Avarbock M R *et al.* Germ cell transplantation from large domestic animals into mouse testes. *Mol Reprod Dev*, 2000, **57**:270 ~ 279.
- [10] Sofikitis N, Mio Y, Yamamoto Y *et al.* Transplantation of human spermatozoa into the seminiferous tubules (STs) of animal testicles results in the completion of human meiosis and the generation of human motile spermatozoa. *Fertil Steril*, 1999, ASRM/CFAS Program Suppl:abstract 0 ~ 219.
- [11] Shinohara T, Avarbock M R, Brinster R L. α_1 and β_6 -integrin are surface markers on mouse spermatogonial stem cells. *Proceedings National Academy of Sciences USA*, 1999, **96**:5 504 ~ 5 509.
- [12] Schönfeldt V V, Krishnamurthy H, Foppiani L *et al.* Magnetic cell sorting is a fast and effective method of enriching viable spermatogonia from djungarian hamster, mouse, and marmoset monkey testes. *Biol Reprod*, 1999, **61**:582 ~ 589.
- [13] Avarbock M R, Brinster C J, Brinster R L. Reconstitution of spermatogenesis from frozen spermatogonial stem cells. *Nature Medicine*, 1996, **2**:693 ~ 696.
- [14] Oktay K, Nugent D, Newton H *et al.* Isolation and characterization of primordial follicles from fresh and cryopreserved human ovarian tissue. *Fertil Steril*, 1997, **67**(3):481 ~ 486.
- [15] Gosden R G. Restitution of fertility in sterilized mice by transferring primordial ovarian follicles. *Hum Reprod*, 1990, **5**(5):499 ~ 504.
- [16] Carroll J, Gosden R G. Transplantation of frozen-thawed mouse primordial follicles. *Hum Reprod*, 1993, **8**(8):1 163 ~ 1 167.
- [17] Inrichs K, Provost P J, Torello E M. Birth of a foal after oocyte transfer to a nonovulating, hormone-treated recipient mare. *Theriogenology*, 1999, **51**:1 251 ~ 1 258.
- [18] Candy C J, Wood M J, Whittingham D G. Restoration of a normal reproductive lifespan after grafting of cryopreserved mouse ovaries. *Hum Reprod*, 2000, **15**(6):1 300 ~ 1 304.
- [19] Cox S, Shaw J, Jenkin G. Follicular development in transplantation fetal and neonatal mouse ovaries is influenced by the gonadal status of the adult recipient. *Fertil Steril*, 2000, **74**(2):366 ~ 371.
- [20] 梁元晶, 史小林, 诸定寿等. 小鼠移植卵巢的生长及功能初探. 中国组织化学与细胞化学杂志, 1997, **6**(4):470 ~ 475.
- [21] Sugimoto M, Maeda S, Manabe N *et al.* Development of infantile rat ovaries autotransplanted after cryopreservation by vitrification. *Theriogenology*, 2000, **53**(5):1 093 ~ 1 103.
- [22] Liu J, Van der Elst J, Van der Broecke R *et al.* Maturation of mouse primordial follicles by combination of grafting and *in vitro* culture. *Biol Reprod*, 2000, **62**:1 218 ~ 1 223.
- [23] Baird D T, Webb R, Campbell B K *et al.* Long-term ovarian function in sheep after ovariectomy and transplantation of autografts stored at -196°C . *Endocrinology*, 1999, **140**(1):462 ~ 471.
- [24] Aubard Y, Piver P, Cogni Y *et al.* Orthotopic and heterotopic autografts of frozen-thawed ovarian cortex in sheep. *Hum Reprod*, 1999, **14**(8):2 149 ~ 2 154.
- [25] 张颖杰, 刘长江, 吴国富. 卵巢移植——维护年轻宫颈癌患者的卵巢功能. 北京医学, 1997, **19**(4):194 ~ 196.
- [26] Kagabu S, Umezumi M. Transplantation of cryopreserved mouse, Chinese hamster, rabbit, Japanese monkey and rat ovaries into rat recipients. *Exp Anim*, 2000, **49**(1):17 ~ 21.

- [27] Nisolle M, Casanas-Roux F, Qu J *et al*. Histologic and ultrastructural evaluation of fresh-thawed human ovarian xenografts in nude mice. *Fertil Steril*, 2000, **74**(1):122 ~ 129.
- [28] Eppig J J, Wigglesworth K. Development of mouse and rat oocytes in chimeric reaggregated-ovaries after interspecific exchange of somatic and germ cell components. *Biol Reprod*, 2000, **63**:1 014 ~ 1 023.
- [29] Barten E J, Garybian H, Klopper P J *et al*. Homologous testis transplantation in dogs. *Transpl Int*, 1997, **10**(5):362 ~ 368.
- [30] Rosslein R. Experimental approaches towards testicular auto-transplantation. *Eur J Pediatr*, 1993, **152** (Suppl.) **2**:S47 ~ 49.
- [31] Dieckx W, Vereecken R, Depuydt K. Microsurgery for intra-abdominal testicular retention. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Bio*, 1998, **181**(2):191 ~ 196.
- [32] Nishida T, Ueyama T, Sugiyama T *et al*. Intrasplenic autograft of testicular tissue in rats. *Oncol Rep*, 1998, **5**(1):157 ~ 159.
- [33] Lee S, Wang Y, Kim S *et al*. Mouse-to-rat testicle transplantation. *Microsurgery*, 1999, **19**(2):66 ~ 70.
- [34] Kimmel S G, Ohbatake M, Kushida M *et al*. Murine xenogeneic immune responses to the human testis: a presumed immune-privileged tissue. *Transplantation*, 2000, **69**(6):1 075 ~ 1 084.