

不同玻璃化冷冻载体对人卵巢组织冷冻效果的影响

郑 轶¹, 周 平²

[摘要] **目的:** 比较不同的玻璃化冷冻载体对人卵巢组织冷冻效果的影响, 为人卵巢组织玻璃化冷冻方案的选择提供理论基础和实验参考依据。 **方法:** 预处理人卵巢皮质切成 10 mm × 1 mm × 1 mm 大小, 随机分为新鲜组(A组)、针浸润玻璃化冷冻组(B组)、表面玻璃化冷冻组(C组)和直接覆盖玻璃化冷冻组(D组)。A组直接予以固定、组织切片及 HE 染色; B、C、D 3 组采用不同玻璃化冷冻载体冷冻后, 投入液氮保存 2 个月, 采用快速复温法解冻后予以固定、切片及染色。行形态学分析, 通过计算各组卵巢组织切片中正常形态始基卵泡率, 比较各组冷冻效果。 **结果:** 4 组共计计数 809 个始基卵泡, 其中正常形态始基卵泡率分别为: A 组 96.12%, B 组 88.14%, C 组 80.00%, D 组 81.25%。行玻璃化冷冻的 3 组卵巢组织正常形态始基卵泡率均明显小于 A 组 ($P < 0.01$); 而 B 组、C 组和 D 组正常形态始基卵泡率差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。 **结论:** 玻璃化冷冻后人卵巢组织正常形态始基卵泡率较新鲜组织下降, 但仍能较好地保存人类卵巢组织, 可用于人类卵巢组织的冷冻保存。

[关键词] 卵巢组织; 玻璃化冷冻; 始基卵泡

[中国图书资料分类法分类号] R 322.65 **[文献标志码]** A

Effect of different vitrification carriers on the freezing human ovarian tissue

ZHENG Yi¹, ZHOU Ping²

(1. Department of Gynecology and Obstetrics, The First Affiliated Hospital of Bengbu Medical College, Bengbu Anhui 233004;

2. Reproductive Medicine Center, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei Anhui 230031, China)

[Abstract] **Objective:** To compare the effects of different vitrification carriers on the freezing human ovarian tissue, and provide the theoretical and experimental basis in selecting frozen solution. **Methods:** The human ovarian cortex tissues were cut into the size of 10 mm × 1 mm × 1 mm, randomly divided into the fresh group (group A), needle immersed vitrification group (group B), solid surface vitrification group (group C) and direct covered vitrification group (group D) according to different vitrification carriers. The fresh group were fixed by 10% formaldehyde, embedded in paraffin, sectioned and stained with hematoxylin and eosin. The other three groups were preserved in liquid nitrogen after freezing for two months, then fixed, sectioned and stained using rapid rewarming protocol. The proportions of normal primordial follicles in group B, C and D were calculated by histological analysis, which was used to analyze the frozen effects. **Results:** There were 809 primordial follicles in four groups, the proportions of normal primordial follicles in group A, B, C and D were 96.12%, 88.14%, 80.00% and 81.25%, respectively. The proportions of normal primordial follicles in group B, C and D were lower than that in group A ($P < 0.01$), but the differences of which between group B, C and D were not statistically significant ($P > 0.05$). **Conclusions:** Compared with the fresh tissue, the proportions of normal primordial follicles decrease after freezing, but the vitrification freezing can be used to preserve the human ovarian tissue still.

[Key words] human ovarian tissue; vitrification; primordial follicles

在成年女性中, 至少有 1/250 曾患肿瘤, 其中 90% 可长期存活^[1]。治疗肿瘤所采用的放化疗可能对卵巢产生不可逆损伤, 甚至导致卵巢功能早衰, 丧失生殖和内分泌功能。卵巢组织冷冻保存及解冻后自体移植有望成为解决这一问题的有效手段。卵巢组织冷冻常采用程序化冷冻法和玻璃化冷冻法。研究^[2-4]已证明玻璃化冷冻效果优于程序化冷冻,

但迄今为止, 玻璃化冷冻仍缺少标准化程序。本实验使用不同玻璃化冷冻载体对人卵巢组织进行冷冻, 以比较不同冷冻载体对人卵巢组织冷冻效果的影响。

1 材料与方法

1.1 标本来源 标本取自安徽医科大学第一附属医院妇产科 25 例卵巢良性肿瘤患者, 年龄 18 ~ 35 岁, 月经规律, 无内分泌紊乱及激素使用史。实验通过医院生殖医学伦理委员会批准, 患者签署知情同意书。畸胎瘤患者行卵巢肿瘤剔除术时, 剪下瘤表面附着的部分正常卵巢皮质; 上皮性肿瘤患者行 1 侧附件切除时, 留取较大块的卵巢皮质。将所

[收稿日期] 2014-08-12

[作者单位] 1. 蚌埠医学院第一附属医院 妇产科, 安徽 蚌埠 233004; 2. 安徽医科大学附属医院 生殖医学中心, 安徽 合肥 230031

[作者简介] 郑 轶 (1986 -), 女, 住院医师。

[通信作者] 周 平, 副主任医师。E-mail: zhoup-325@yahoo.com.cn

获得皮质立即放入含 5% 人类血清白蛋白 (HSA) (SAGE, USA) 的 HTF1023 溶液中置于冰上, 20 min 内送到实验室。

1.2 试剂 冻融基础液: DMEM + 12% 人血清白蛋白 (体积比) + 100 IU/ml 青霉素 + 100 μ g/ml 链霉素; 玻璃化冷冻液 I [冻融基础液 + 15% 二甲基亚砷 (体积比) + 0.1 mol/L 蔗糖]; 玻璃化冷冻液 II [冻融基础液 + 15% 二甲基亚砷 (体积比) + 15% 丙二醇 (体积比) + 0.2 mol/L 蔗糖]。解冻液: PBS 液; 冻融基础液; 解冻液 I (冻融基础液 + 0.5 mol/L 蔗糖); 解冻液 II (冻融基础液 + 0.25 mol/L 蔗糖); 解冻液 III (冻融基础液 + 0.125 mol/L 蔗糖)。

1.3 方法

1.3.1 标本预处理 卵巢组织经 PBS 液反复冲洗, 在 HTF1023 溶液中解剖显微镜下以 11 号手术刀片去除卵巢髓质, 把卵巢皮质切割成 10 mm \times 1 mm \times 1 mm 的组织条。卵巢皮质组织条随机分为新鲜组 (A 组), 针浸润玻璃化冷冻组 (B 组), 表面玻璃化冷冻组 (C 组), 直接覆盖玻璃化冷冻组 (D 组)。A 组直接放入 10% 甲醛溶液固定。

1.3.2 不同冷冻玻璃化载体对标本进行冷冻

(1) 针浸润玻璃化冷冻: 将 B 组卵巢组织条顶端用 30 号针灸针串起, 5 个为 1 组, 每 2 个组织条之间留有足够的空隙, 防止组织条粘连。组织条依次在冻融基础液、玻璃化冷冻液 I、玻璃化冷冻液 II 中各平衡 5 min。在每步平衡过程中不断用无菌镊子搅动冻融基础液及冷冻液, 使冷冻保护剂有效地渗透到组织中。然后用无菌镊子夹持针灸针直接浸入到液氮中, 确保每块组织完全处于液氮中, 可见卵巢组织迅速呈玻璃态。在液氮中用预冷的镊子将玻璃态的卵巢组织取下装入预冷的标记冷冻管中, 每个冷冻管放入 5 个组织块, 借助配套磁棒拧紧冷冻管帽, 投入液氮中保存并记录存放位置。(2) 表面玻璃化冷冻法: 将冷冻小管置于液氮中预冷 10 min, 保持冷冻小管中干燥无液氮进入。将 C 组卵巢组织条依次在冻融基础液、玻璃化冷冻液 I、玻璃化冷冻液 II 中各平衡 5 min, 平衡过程中无菌镊子搅动平衡液, 促进冷冻保护剂的有效渗入。无菌镊子夹取平衡后的组织条直接放入冷冻管内, 见卵巢组织变白硬化后, 旋紧冷冻管帽, 投入液氮中冻存并记录存放位置。(3) 直接覆盖玻璃化冷冻法: 将 D 组卵巢组织条按上述三步法平衡后, 无菌镊子夹取组织条直接放入液氮中, 见卵巢组织在液氮面漂浮旋转片刻, 沉入液氮中。液氮中用已预冷的镊子夹取组织条放入预冷

好的冷冻小管中, 保持组织条、冷冻小管均处于液氮中, 旋上冷冻管帽, 投入液氮中冻存并标记位置。

1.3.3 卵巢组织解冻 B、C、D 3 组冷冻卵巢组织液氮中冻存 2 个月后, 均采用快速复温法解冻: 自液氮中取出冷冻管, 用磁性棒旋开冷冻管的盖, 迅速将卵巢组织条倒入培养皿中, 在液氮挥发完全后, 立即向培养皿中放入 38 $^{\circ}$ C PBS 液, 在卵巢组织条的冰融化后依次放入含解冻液 I、解冻液 II、解冻液 III 以及冻融基础液的培养皿中各平衡 5 min, 平衡过程中用无菌镊子搅动解冻液及冻融基础液, 平衡后将卵巢组织放入含 10% 甲醛溶液的试管中固定。

1.3.4 组织学检测 将 B、C、D 3 组解冻后的组织条置于 10% 甲醛溶液中固定, 与 A 组同法石蜡包埋组织切片, HE 染色, 光镜下计数原始卵泡数, 观察其形态 (专人单盲阅片)。判断标准: 按 Gougeon 标准^[5]判定卵泡的形态是否正常; 原始卵泡计数以卵母细胞核作为标记, 计算每个卵巢组织片中形态正常的原始卵泡及形态不正常的闭锁卵泡的比例。

1.4 统计学方法 采用 χ^2 检验。

2 结果

由切片可见 B、C、D 3 组卵巢组织形态正常始基卵泡数与 A 组相比略有下降, 始基卵泡基膜完整, 卵母细胞核膜清晰, 颗粒细胞均匀; 闭锁的卵泡表现基膜不完整、核溶解、碎裂, 外形不规则; 周围间质细胞分布均匀, 形态正常 (见图 1~3)。4 组共计数 809 个始基卵泡, 其中正常形态始基卵泡率分别为: A 组 96.12%, B 组 88.14%, C 组 80.00%, D 组 81.25%。3 组卵巢组织正常形态始基卵泡率均明显小于 A 组 ($P < 0.01$); 而 B、C 和 D 组间正常形态始基卵泡率差异均无统计学意义 ($P > 0.05$) (见表 1)。

3 讨论

随着肿瘤治疗技术的飞速发展, 癌症患者的生存率明显提高。但放疗以及细胞毒性药物的使用会损伤性腺功能, 严重者可导致性腺丧失激素分泌和生殖功能。其中化疗所采用的烷化剂等细胞毒性药物可以通过诱导细胞凋亡的方式对卵巢造成损害, 而人卵泡对放疗极为敏感, 约 20 Gy 的剂量即可引起不孕, 并且随年龄的增大, 导致生殖功能丧失的剂量逐渐减少^[6]。大多数肿瘤患者迫切希望保留生育能力, 因此, 如何保存患者卵巢功能成为亟需解决的问题。目前生育力保存有胚胎冷冻、卵母细胞冷冻和卵巢冷冻 3 种方法, 胚胎冷冻技术十分成熟, 但

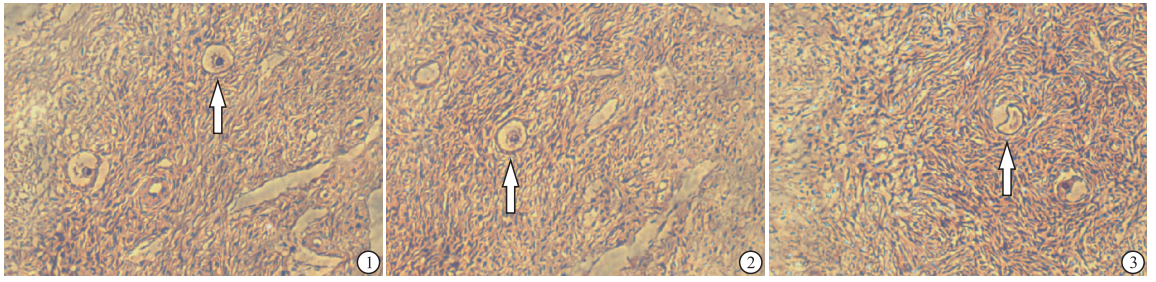


图1 新鲜卵巢组织正常形态始基卵泡 图2 冷冻卵巢组织中正常形态始基卵泡 图3 冷冻组形态异常的始基卵泡

表1 不同载体人卵巢组织玻璃化冷冻前后始基卵泡形态学分析比较(n)

分组	n	正常形态始基卵泡	闭锁卵泡	正常形态始基卵泡率/%	χ^2	P
A组	206	198	8	96.12		
B组	236	208	28	88.14**		
C组	175	140	35	80.00**	28.15	<0.01
D组	192	156	36	81.25**		
合计	809	702	107	86.77		

率的两两比较:与A组比较** $P < 0.01$

不适合于青春期前少女及未婚患者,而成熟的卵母细胞对冷冻损伤较敏感不易冻存,且需较长的促排卵及取卵的过程,不适用于急需放、化疗的患者,同时也不能恢复患者的激素分泌功能。与此相比,卵巢组织冷冻则有许多优势:(1)育龄妇女卵巢组织含有大量的处于休眠状态的始基卵泡,在患者肿瘤治愈后行解冻卵巢组织自体移植,不仅可以保存生育能力,还可保持自身激素分泌的功能;(2)与处于生长阶段以后的卵泡相比,始基卵泡体积小、代谢率低、没有透明带、周围颗粒细胞数量少,故更可耐受冷冻^[7-9];(3)卵巢组织可以行腹腔镜或开腹手术直接取得,不依赖于月经周期,不延误放化疗。冷冻的卵巢组织在患者肿瘤治愈后可用于自体移植,也可用于异体移植或者体外培养来获得成熟卵母细胞。冷冻卵巢组织解冻后行自体原位/异位移植,迄今已有恢复生殖激素分泌、妊娠并多例婴儿诞生的报道^[10-12]。目前人卵巢组织体外培养也有从始基卵泡培养到次级卵泡的报道^[13-14]。因而卵巢组织冷冻保存对卵巢功能的保存有着重要意义,为患者生殖能力及内分泌功能的恢复提供了保障。

正常情况下液体在低于冰点时形成冰晶,组织冷冻时细胞质内外冰晶形成对细胞膜及细胞内结构都有较大的损伤,甚至导致细胞死亡,使组织失去价值,故冷冻时减少冰晶的形成十分必要。组织冷冻经过了程序化冷冻和玻璃化冷冻两个阶段,两者间的区别主要在冷冻速率的不同和冷冻保护剂的使用。与玻璃化冷冻法相比,程序化冷冻法需要消耗

大量的液氮,昂贵的仪器设备并且冷冻步骤复杂。而玻璃化冷冻技术使冷冻过程简化,并可避免细胞内冰晶形成对细胞造成的损伤,使冷冻效率更高。Vajta等^[15]总结5年有关文献认为,玻璃化冷冻比程序化慢速冷冻更有效。而Kagawa等^[16]对人及胎牛卵巢组织冷冻后,也证明了玻璃化冷冻效果较好。本实验通过大量的人卵巢组织玻璃化冷冻,结果提示正常卵泡率较高,与这些文献报道的程序化冷冻结果相似,可以作为卵巢组织冷冻的有效手段。但玻璃化冷冻是纯手工操作,样本量大时操作繁复、费时,而程序化冷冻为机器辅助批量处理,故对于小样本卵巢组织冷冻可优先选择玻璃化冷冻。

玻璃化冷冻仅有十余年的历史,尽管发展迅速,但迄今为止尚缺少标准化的程序。玻璃化冷冻常采用冷冻小管、电子显微镜铜网格、小尼龙螺旋圈等作为载体,载体的使用不仅占用大量空间不利于储存,且部分载体因管壁较厚可导致降温速度下降,影响玻璃化冷冻效果。Chen等^[17]报道一种新型的直接覆盖玻璃化冷冻法,即将卵巢组织置于冷冻管中,用少量液氮直接覆盖组织进行冷冻保存,该法直接将组织与液氮接触,降温速率得以提高,冷冻效果明显优于其他传统冷冻方法,现已得到广泛应用。Isachenko等^[18]采用直接滴入液氮的方法冻存人卵巢组织,解冻后卵泡形态学变化及内分泌功能与新鲜对照组相比差异无统计学意义。Santos等^[19]采用表面玻璃化冷冻法进行冷冻,是将卵巢组织直接滴落在液氮中预冷的固体表面,复苏后卵泡活力优于传统玻璃化冷冻法。

本研究在预实验时,发现卵巢组织直接浸入液氮时,容易漂浮在液氮面旋转,不能完全接触液氮,影响降温速率。用镊子夹取卵巢组织放入在液氮中预冷的器皿时,卵巢组织极易黏附在镊子及器皿上,不利于转移到冷冻小管中,故本实验用针灸针将卵巢组织穿起,并保持卵巢组织块间留有空隙,镊子夹针灸针后直接将卵巢组织完全浸入液氮中,达到了快速降温且不损伤组织的效果。本实验结果中卵巢组织正常形态卵泡率与其他报道大体相当,且操作

方法更为便利。玻璃化冷冻后人卵巢组织正常形态始基卵泡率较新鲜组织下降,但仍能较好地保存人类卵巢组织,可用于人类卵巢组织的冷冻保存。

[参 考 文 献]

- [1] Meirow D, Nugent D. The effects of radiotherapy and chemotherapy on female reproduction [J]. *Hum Reprod Update*, 2001, 7 (6): 535 - 543.
- [2] Jeruss JS, Woodruff TK. Preservation of fertility in patients with cancer [J]. *N Engl J Med*, 2009, 360 (9): 902 - 911.
- [3] Aubard Y, Poirot C, Piver P, *et al.* Are there indications for ovarian tissue cryopreservation? [J]. *Fertil Steril*, 2001, 76 (2): 414 - 415.
- [4] Schover LR, Brey K, Lichtin A, *et al.* Knowledge and experience regarding cancer, infertility, and sperm banking in younger male survivors [J]. *J Clin Oncol*, 2002, 20 (7): 1880 - 1889.
- [5] Gougeon A. Dynamics of follicular growth in the human; a model from preliminary results [J]. *Human Reproduction*, 1986, 1 (2): 81 - 87.
- [6] Wang Y, Xiao Z, Li L, *et al.* Novel needle immersed vitrification; a practical and convenient method with potential advantages in mouse and human ovarian tissue cryopreservation [J]. *Hum Reprod*, 2008, 23 (10): 2256 - 2265.
- [7] Bleyer WA. The impact of childhood cancer on the United States and the world [J]. *CA Cancer J Clin*, 1990, 40 (6): 355 - 367.
- [8] Wallace WH, Thomson AB, Saran Fetal. Predicting age at ovarian failure following radiation to a field that includes the ovaries [J]. *Int J Radiat Biol Phys*, 2005, 62 (3): 738 - 744.
- [9] Oktay K, Karlikaya GG, Aydin BA. Ovarian cryopreservation and transplantation basic aspects [J]. *Mol Cell Toxicol*, 2000, 169 (1/2): 105 - 108.
- [10] Oktay K, Buyuk E, Vecek L, *et al.* Embryo development after heterotopic transplantation of cryopreserved ovarian tissue [J].

Lancet, 2004, 363 (9412): 837 - 840.

- [11] Meirow D, Levron J, Eldar-Geva T, *et al.* Pregnancy after transplantation of cryopreserved ovarian tissue in a patient with ovarian failure after chemotherapy [J]. *N Engl J Med*, 2005, 353 (3): 318 - 321.
- [12] Sánchez-Serrano M, Crespo J, Mirabet V, *et al.* Twins born after transplantation of ovarian cortical tissue and oocyte vitrification [J]. *Fertil Steril*, 2010, 93 (1): 268.
- [13] Lass A, Silye IT, Abrants IX, *et al.* Follicular density in ovarian biopsy of infertile women: a novel method to assess ovarian reserve [J]. *Human Reprod*, 1997, 12 (5): 1028 - 1031.
- [14] Sadeu JC, Cortvrint R, Ron-El R, *et al.* Morphological and ultrastructural evaluation of cultured frozen-thawed human fetal ovarian tissue [J]. *Fertil Steril*, 2006, 85 (Suppl 1): 1130 - 1141.
- [15] Vajta G, Nagy ZP. Are programmable freezers still needed in the embryo laboratory review on vitrification [J]. *Reprod Biomed Online*, 2006, 12 (6): 779 - 796.
- [16] Kagawa N, Silber S, Kuwayama M. Successful vitrification of bovine and human ovarian tissue [J]. *Reprod Biomed Online*, 2009, 18 (4): 568 - 577.
- [17] Chen SU, Chien CL, Wu MY, *et al.* Novel direct cover vitrification for cryopreservation of ovarian tissues increases follicle viability and pregnancy capability in mice [J]. *Hum Reprod*, 2006, 21 (11): 2794 - 2800.
- [18] Isachenko E, Isachenko V, Nawroth F, *et al.* Human ovarian tissue preservation: is vitrification acceptable method for assisted reproduction [J]. *Cryo Letters*, 2008, 29 (4): 301 - 314.
- [19] Santos RR, Tharasanit T, Van Haeflen T, *et al.* Vitrification of goat preantral follicles enclosed in ovarian tissue by using conventional and solid surface vitrification methods [J]. *Cell Tissue Res*, 2007, 327 (1): 167 - 176.

(本文编辑 刘璐)

(上接第 1610 页)

予的剂量为标准剂量的 1/3, 第 2 天给予 1/2, 之后再给予全量是比较恰当的, 可使促细胞增殖效应明显高于延迟肠内营养。通过本研究证实, EEN 减轻肠道损伤, 促进修复的机制与其促进细胞增殖, 加快蛋白质合成密切相关。

[参 考 文 献]

- [1] 蔡晨, 郭光华, 徐庆连, 等. 肠内免疫营养对烫伤大鼠肠黏膜损伤的保护作用 [J]. *中国危重病急救医学*, 2006, 18 (10): 609 - 612.
- [2] Gianotti L, Nelson JL, Alexander JW, *et al.* Post injury hypermetabolic response and magnitude of translocation; Prevention by early enteral nutrition [J]. *Nutrition*, 1994, 10 (3): 225 - 231.
- [3] Guo GH, Bai XJ, Cai C, *et al.* The protective effect of different enteral nutrition combined with growth hormone on intestinal mucosal damage of scalded rats [J]. *Burns*, 2010, 36 (8): 1283 - 1288.
- [4] Chen ZY, Wang SL, Yu B, *et al.* A comparison study between early enteral nutrition and parenteral nutrition in severe burn

patients [J]. *Burns*, 2007, 33 (6): 708 - 712.

- [5] Khorasani EN, Mansouri F. Effect of early enteral nutrition on morbidity and mortality in children with burns [J]. *Burns*, 2010, 36 (7): 1067 - 1071.
- [6] Abraham GN. Modified diphenylamine reaction for increased sensitivity [J]. *Anal Biochem*, 1972, 49 (2): 547 - 549.
- [7] Schjeide OA. Micro-estimation of RNA by the cupric ion catalyzed orcinol reaction [J]. *Biochem*, 1969, 27 (3): 473 - 483.
- [8] Marion R, Coeffier MM, Gargala G, *et al.* Glutamine and CXC chemokines IL-8, Mig, IP-10 and I-TAC in human intestinal epithelial cells [J]. *Clin Nutr*, 2004, 23 (4): 579 - 585.
- [9] Wasa M, Soh H, Shimizu Y, *et al.* Glutamine stimulates amino acid transport during ischemia/reperfusion in human intestinal epithelial cells [J]. *J Surg Res*, 2005, 123 (1): 75 - 81.
- [10] Shao L, Huang Q, He M, *et al.* Changes of occludin expression in intestinal mucosa after burn in rats [J]. *Burns*, 2005, 31 (7): 838 - 844.
- [11] 吴修文, 王焕, 吴炜, 等. 重组人肠三叶因子减轻烧伤后肠源性高代谢的实验研究 [J]. *重庆医学*, 2012, 41 (15): 1465 - 1470.

(本文编辑 刘畅)