

玻璃化冷冻对人类卵巢皮质组织形态学和凋亡的影响

汪翔, 方丛*, 狄春光, 史亚男, 梁晓燕

(中山大学附属第六医院生殖医学研究中心, 广东 广州 510655)

摘要:【目的】检测玻璃化冷冻方法对人卵巢皮质组织形态学和凋亡情况的影响,为其进一步应用于肿瘤患者卵巢生育力保存的安全性及可行性奠定基础。【方法】卵巢组织来自 4 例因疾病原因行部分卵巢切除术的患者,术后病理均提示无肿瘤细胞转移或其他干扰实验结果的病灶存在。将获得的卵巢组织分离出皮质切割成薄片,采用自身对照,随机平均分为新鲜对照组(F组)和玻璃化冷冻组(V组),两组薄片进行 HE 染色后,比较两组卵巢组织冻融前后的卵泡形态与各级卵泡所占比例及组织间质形态,原位末端转移酶标记(TUNEL)技术和 Westernblot 检测卵巢组织冻融前后细胞的凋亡情况。【结果】F组的原始卵泡、初级卵泡、次级卵泡分别为(55.5 ± 4.9)%、(34.6 ± 1.6)%和(9.9 ± 7.6)%,V组的各级卵泡比例分别为(51.2 ± 5.1)%、(36.7 ± 1.6)%和(12.1 ± 3.5)%,两组间比较差异无统计学意义($P > 0.05$);使用 TUNEL 法比较两组的组织内细胞凋亡情况,其差异无统计学意义($P > 0.05$);进一步使用 Western Blot 法检测两组组织内 Cleaved Caspase-3 的表达量,其结果与 TUNEL法一致,两组间差异无统计学意义($P > 0.05$)。【结论】玻璃化冷冻法对卵巢组织的形态学和凋亡没有明显的影响,但其大规模临床应用仍有待更多的研究论证。

关键词:玻璃化冷冻;人卵巢组织;形态学变化;细胞凋亡

中图分类号:R711.6 **文献标志码:**A **文章编号:**1672-3554(2015)04-0545-06

Effect of Vitrification on Morphology and Apoptosis of Human Ovarian Cortex Tissue

WANG Xiang, FANG Cong*, DI Chun-guang, SHI Ya-nan, LIANG Xiao-yan

(Reproductive Medicine Research Center, The Sixth Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University, Guangzhou 510655, China)

Corresponding to: FANG Cong, E-mail: fangcongd@foxmail.com

Abstract:【Objective】 To examine the effect of vitrification on morphology and apoptosis in human ovarian cortex tissue. 【Methods】 Ovarian tissues came from 4 cases of partial ovariectomy, with necessity of diagnosis or treatment. In each case, the cortex was cut into small pieces. After that they were randomly divided into Fresh Group and Vitrification Group. The morphology of follicles and stromal cells were examined by HE staining, and the cell apoptosis in situ was analyzed by TUNEL assay. Furthermore, we quantified the expression of Cleaved Caspase-3 (an indicator of apoptosis). 【Results】 The percentage of primordial follicles, primary follicles and secondary follicles in Fresh Group are (55.5 ± 4.9)%, (34.6 ± 1.6)%, and (9.9 ± 7.6)%, respectively, while the percentage in Vitrification Group are (51.2 ± 5.1)%, (36.7 ± 1.6)%, and (12.1 ± 3.5)%. The percentage of primordial follicles, primary follicles and secondary follicles and the apoptosis in situ show no significance between these two groups. Besides, the expression of Cleaved Caspase-3 in ovarian tissue is the same between two groups. 【Conclusion】 The strategy of vitrification of human ovarian tissue is viable, and still needs more researches.

Key words: vitrification; human ovarian tissue; morphology; apoptosis

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2015, 36(4): 545-550]

卵巢具有生殖和内分泌两大主要功能。早有研究指出雌激素对女性的心血管系统具有保护作

用^[1],卵巢分泌的激素对延缓女性衰老也可能大有裨益^[2]。但年轻女性肿瘤患者接受高剂量的放

收稿日期:2015-03-20

基金项目:国家自然科学基金(81070495);广东省自然科学基金(S2013010013404)

作者简介:汪翔,硕士研究生,研究方向:生殖医学,E-mail:m13560318074@163.com; * 通信作者:方丛,研究员,硕士生导师,研究方向:生殖医学,E-mail:fangcongd@foxmail.com

疗和化疗后,其卵巢功能会快速下降,严重影响其生育能力^[3-4]。因此,如何保存女性肿瘤患者的生育能力是一个亟待解决的重要问题。20多年前,卵巢组织冻融和移植的动物实验就已报道取得成功^[5]。但是,直至2004年,才有学者首次报道人类卵巢组织冻融和移植的临床试验取得成功,Donnez等^[6]首次报道了罹患霍奇金淋巴瘤4期的患者进行卵巢皮质组织冻存复苏后腹腔镜下原位移植获得了活产婴儿。2013年,Kawamura等^[7]将卵巢皮质组织玻璃化冷冻保存应用于罹患POF的患者获得了活产婴儿。2014年,Macklon等^[8]报道了在两位卵巢组织程序化冷冻患者进行冻融卵巢皮质组织移植5年后,获得了活产婴儿,为冻融卵巢皮质组织移植术后的长期时效增加了证据支持。迄今为止,全世界范围内,卵巢组织冷冻保存技术已被试验性应用于女性生育力保存,约26名健康婴儿的出生得益于此技术^[8]。玻璃化冷冻技术作为一种新兴的冷冻保存技术,已广泛应用于辅助生殖领域中的胚胎冻存^[9]、卵子冻存^[10-11]。Silber^[12]提出相较于传统的程序化冷冻而言,玻璃化冷冻技术可能更适合冷冻卵巢组织。在操作方面,玻璃化冷冻技术步骤更少,更加便捷,对仪器设备的要求更低,但是其对卵巢组织的冷冻效果仍存在争议^[13-15]。因此本研究主要探讨玻璃化冷冻技术对人卵巢皮质组织形态学和凋亡情况的影响。

1 材料与方法

1.1 研究对象

2012年9月至2013年6月因疾病治疗需要而手术切除的4例患者的卵巢组织,各切取约10 mm × 10 mm × 3 mm的楔形组织块,余送病理检查。纳入标准为:患者年龄 ≤ 40岁,病理报告无肿瘤细胞浸润,且无其他可能影响结果的病理因素。

1.2 研究分组

本研究采用自身对照的配对设计。将每例卵巢组织切割处理后,获得约2 mm × 2 mm × 1 mm皮质组织片再随机平均分为2组:F组为新鲜对照组,V组为玻璃化冷冻组。即编号1-F的样本来自第一例患者的新鲜组,1-V的样本来自该患者的冷冻组,以此类推。

1.3 研究方法

1.3.1 卵巢组织的处理 无菌操作切取卵巢组织,立即置于预冷的添加10%人血清蛋白(HSA, Vitrolife, Sweden)的无菌HEPES(Quinn's Advantage, SAGE, USA)中,置于冰盒内迅速转移至实验室,运送时间短于1 h。将卵巢组织置于冰上的3003培养皿(100 mm, Falcon, BD, USA)中,用无菌HEPES漂洗净血液后,用手术刀小心分离皮质和髓质,并剔除黄体组织,可获得约厚1 mm的皮质片,将获得的皮质组织片修剪边缘后,切割成2 mm × 2 mm的方块。

1.3.2 玻璃化冷冻与解冻 本研究所用的乙二醇(EG)、二甲基亚砜(DMSO)购自sigma Aldrich, USA,重组血清替代物(SPS Serum Protein Substitute)购自Quinn's Advantage, SAGE, USA。冷冻液及解冻液的配制方法见Silber报道的文献^[12],冷冻液及解冻液的基础液(BM)都为HEPES,平衡液(ES)中含7.5%EG、7.5%DMSO及20%SSS,冷冻液(VS)中含20%EG、20%DMSO、0.5 mol/L蔗糖和20%SSS;解冻液(TS)中含1 mol/L蔗糖和20%SSS;稀释液(DS)中含0.5 mol/L蔗糖和20%SSS,冲洗液(WS)中含20%SSS。冷冻操作:将卵巢组织置于ES中平衡25 min,转移至VS中平衡15 min,将卵巢组织小心地置于冷冻条(Cryotissue: KitazatoBioPharma, Fujinomiya, Japan)上后,快速把冷冻条浸入液氮中30 s,然后置于液氮罐中保存。冻存1个月后,进行解冻操作:将TS、DS及WS均复温至室温,将卵巢组织置于TS中,37℃复温3 min,转移至DS中复温5 min,最后转移至WS中漂洗,完成解冻。

1.3.2 组织学分析 每例新鲜组与解冻组均保存2片皮质片于100 mL/L甲醛中,固定24 h后进行脱水、浸蜡、包埋,4 μm连续切片,每隔10张取1张切片进行检测,使用苏木精-伊红(HE)染色封片后,400倍镜下随机观察10个视野,以卵母细胞核仁为标记,参照Gougeon^[16]分级标准进行卵泡计数:始基卵泡(Primordial Follicle)即卵母细胞周围包绕单层扁平颗粒细胞,初级卵泡(Primary Follicle)即卵母细胞周围包绕单层立方颗粒细胞,次级卵泡(Secundary Follicle)即卵母细胞周围包绕两层或两层以上立方颗粒细胞。计算各级卵泡所占比例。

1.3.3 原位末端转移酶标记技术检测组织内细胞凋亡 石蜡切片常规脱蜡、复水,PBS冲洗后,使

用蛋白酶 K (Proteinase K, Merck, Germany) 室温孵育 20 min, 使用凋亡检测试剂盒 (In situ Cell Death Detection Kit, POD, Roche, Germany), 阳性对照使用 Dnase I (DNase I recombinant, RNase-free, Roche, Germany) 室温孵育 10 min, 每样本加 50 μ L 工作液后暗湿盒 37 $^{\circ}$ C 避光孵育 60 min, DAPI (Beyotime, China) 室温避光孵育 5 min 后, 515~565nm 下检测绿色荧光。TUNEL 阳性和 DAPI 阳性的细胞用 Image J.v1.38 软件 (NIH, Bethesda, Maryland, USA) 计数, 每组分析 5 张切片。

1.3.4 Western Blot 定量检测 Cleaved Caspase-3 液氮研磨组织, 提取总蛋白, 使用 BCA 法定量, 15% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳后, 转移至硝酸纤维素薄膜上, 5% 脱脂奶粉包被 1.5 h, 加入 1:500 稀释的 Caspase-3 (Cell Signaling Technology, USA) 及 β -actin (Abcam, UK), 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜后, 1:2000 稀释的荧光二抗 (IRDye 800CW Goat Anti-Rabbit, IRDye 700CW Goat Anti-Mouse, Licor, USA) 室温

孵育 1 h, 红外荧光扫描成像系统 (Odyssey, Licor, USA) 扫膜。重复实验 3 次后分析结果。

1.4 数据分析

使用 Image J 软件对图像资料进行处理。采用 SPSS 13.0 软件分析。计量资料以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 数据分析采用配对 t 检验, $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 患者的基本情况

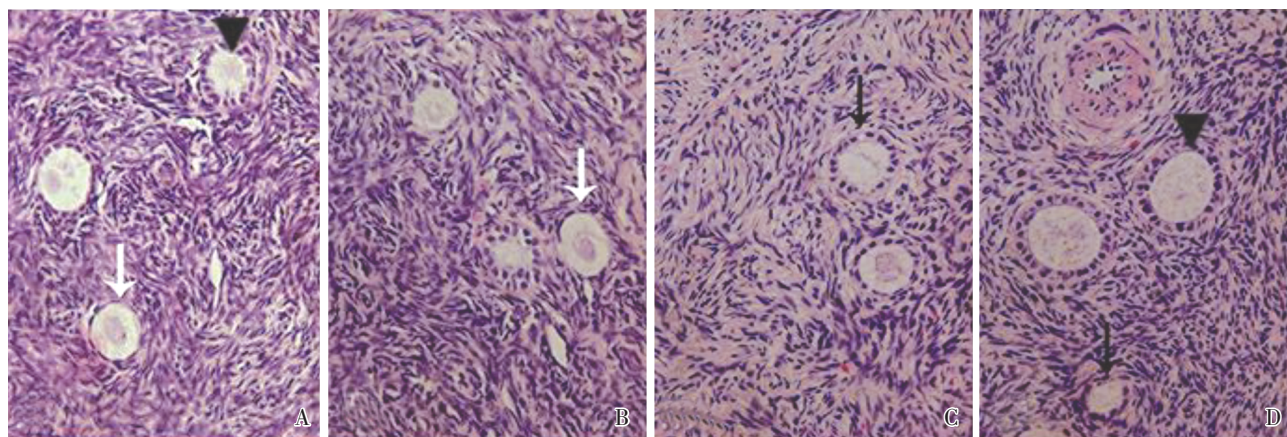
患者的基本情况见表 1。平均年龄为 (37.25 \pm 1.26) 岁。

2.2 玻璃化冷冻的卵巢皮质组织解冻后显示正常的形态学特点

对卵巢皮质组织进行 HE 染色后, 发现与新鲜组 (图 1A、C) 相比, 冷冻组显示出正常的形态学特点 (图 1B、D)。新鲜的卵巢组织中原始卵泡、初

表 1 患者基本情况统计
Table 1 Patient Characteristics

No.	Age/years	Clinical diagnosis	Surgery operation
1	36	Right ovarian endometrialcyst	oophorocystectomy
2	39	Cervical carcinoma	hysterectomy and bilateral adnexectomy
3	37	Left ovarian teratoma	oophorocystectomy
4	37	Right ovarian cyst	oophorocystectomy



A and C; HE staining of fresh ovarian tissue ($n = 4$), $\times 400$; B and D; HE staining of ovarian tissue thawed after vitrification ($n = 4$), $\times 400$. A showed the morphology of primordial follicle (white arrow) and secondary follicle (black triangle), C showed the morphology of primary follicles (black arrow), both of which were found in fresh ovarian tissue; B showed the morphology of primordial follicle (white arrow), D showed the morphology of primary follicle (black arrow) and secondary follicle (black triangle), both of which were found in ovarian tissue thawed after vitrification.

图 1 卵巢组织玻璃化冷冻前后的 HE 染色情况

Fig.1 HE staining of ovarian tissue

表 2 新鲜组与冷冻组各级卵泡所占比例的比较

Table 2 Comparison of the ratio of follicles at different levels between F and V Groups ($\bar{x} \pm s, \%$)

	Primordial follicles	Primary follicles	Secondary follicles
F Group ($n = 4$)	55.5 ± 4.9	34.6 ± 5.9	9.9 ± 7.6
V Group ($n = 4$)	51.2 ± 5.1	36.7 ± 1.6	12.1 ± 3.5
P Value	0.156	0.206	0.477

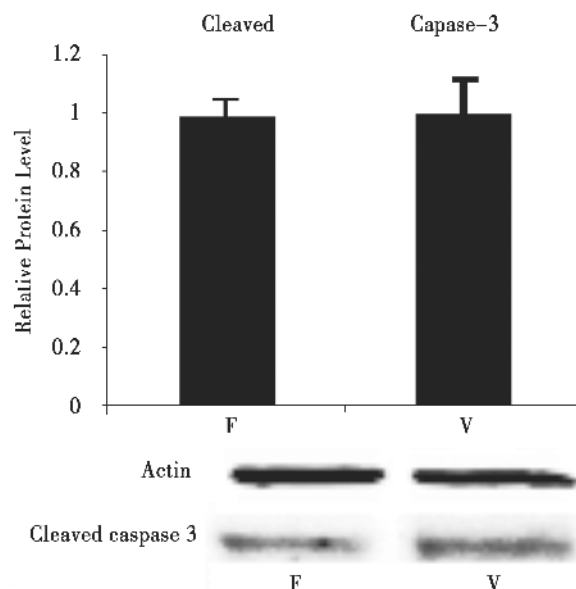
Paired-samples *t* test: Differences were considered as statistically significant when $P < 0.05$.

级卵泡、次级卵泡结构清晰,颗粒细胞紧密排列在卵母细胞周围,与间质组织分界明显;而在冻融后的卵巢组织中可见原始卵泡、初级卵泡、次级卵泡结构也较完整,颗粒细胞、卵母细胞与间质组织的形态学特征与新鲜组相似。对两组 HE 染色后的卵巢皮质组织计数各级卵泡所占比例,其结果如表 2 所示,两组间的各级卵泡所占比例没有统计学差异($P > 0.05$)。

2.3 玻璃化冷冻技术对卵巢组织细胞凋亡的影响无统计学意义

用 TUNEL 法检测玻璃化冷冻技术对卵巢组织细胞凋亡的影响,如图 A 所示新鲜组 TUNEL 阳性率为(13.5 ± 3.9)%,而图 B 所示冷冻组 TUNEL 阳性率为(14.1 ± 5.3)%,两组间的比较用配对 *t* 检验,差异无统计学意义($P > 0.05$)。

为进一步比较两组间卵巢组织内细胞的凋亡情况,使用 Western Blot 法检测凋亡标志 Cleaved

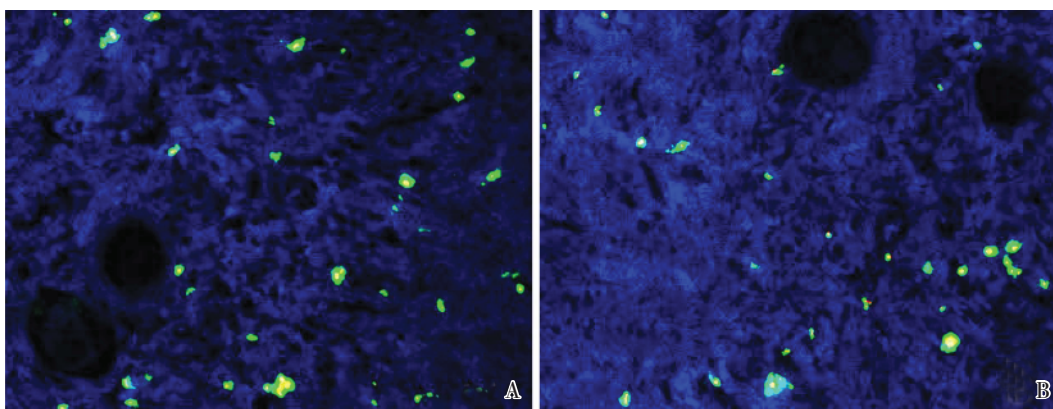


The comparison of the expression of Cleaved Caspase-3 in fresh group and in vitrification group. Representative blots (lower). Quantitative analyses (upper). Fresh group ($n = 4$) vs Vitrification group ($n = 4$), Paired-samples *t* test, $P = 0.907$.

图 3 Western Blot 法检测两组卵巢组织内凋亡标志 Cleaved Caspase-3 的表达量

Fig.3 Quantification of the level of Cleaved Caspase-3 in fresh group and in vitrification group

Caspase-3 在两组卵巢组织内的表达量,其结果如图 3 所示。卵巢组织内的 Cleaved Caspase-3 的表达量组间比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$),与 TUNEL 法检测结果一致。



A: TUNEL staining of fresh ovarian tissue, $\times 200$; B: TUNEL staining of ovarian tissue thawed after vitrification, $\times 200$. A showed the positive cells in ovarian tissue in fresh group; B showed the positive cells in ovarian tissue in vitrification group. Fresh group ($n = 4$) vs Vitrification group ($n = 4$), $P = 0.545$. Paired-samples *t* test: Differences were considered as statistically significant when $P < 0.05$.

图 2 TUNEL 法检测卵巢组织玻璃化冷冻前后的组织内细胞凋亡情况

Fig.2 TUNEL staining of ovarian tissue

3 讨论

在本研究中,我们发现人卵巢组织玻璃化冻融后,其各级卵泡数目及所占比例与新鲜组比较差异无统计学意义,且卵泡结构中卵母细胞和颗粒细胞形态学特点与新鲜组十分相似。通过TUNEL和Cleaved Caspase-3的表达量分析发现卵巢组织玻璃化冻融后细胞凋亡情况与新鲜组比较差异无统计学意义。这些结果表明玻璃化冷冻法对卵巢组织的形态学和凋亡没有明显的影响,因此,这一技术可以作为女性卵巢生育力保存的良好方法。

本研究结果显示卵巢组织玻璃化冻融后,其卵母细胞和颗粒细胞都得到了较完好的保存。Fabbri等^[17]也报道了与我们相似的结论。但关于玻璃化冷冻技术对卵巢组织的影响,也有文献持不同的观点,Gandolfi等^[18]报道了玻璃化冷冻技术对人卵巢组织中的始基卵泡在形态上造成较严重的损坏,始基卵泡丢失明显。Isachenko等^[19]则比较了慢速冷冻和玻璃化冷冻对人卵巢组织中卵泡质量、类固醇活性及增殖能力的影响,认为慢速冷冻比玻璃化冷冻能更好地保存人卵巢组织中的各类型卵泡和细胞增殖能力。卵巢组织玻璃化冷冻技术的影响因素包括组织大小、冷冻液浓度、冷冻载体等,目前这一技术在这些方面尚无统一标准。文献报道的对卵巢组织玻璃化冷冻技术的比较大多建立在不同冷冻处理的前提下,我们认为上述文章中玻璃化冷冻的效果之所以差,可能是由于卵巢组织块通过高浓度的冷冻保护剂平衡后,在快速降温过程中不能完全由液态转变为无结构的玻璃化状态或无冰晶结构的固态,造成了冷冻过程中冰晶的形成,从而形成了冻融损伤。如何使细胞从液态迅速转变为无结构的玻璃化状态或无冰晶结构的固态,减少冷冻过程中冰晶的形成是玻璃化冷冻技术的关键之处。故一方面,卵巢组织在冷冻前,必须先进行切割加工,剔除不含有卵泡的髓质部分以及黄体等,再修剪切割成较小的组织块,以利于冷冻保护液的渗透。本研究中,我们切割卵巢组织时借鉴Silber^[12]报道的切割器辅助操作,以尽可能使卵巢组织片厚薄均匀,其后将组织片切割成 $2.0\text{ mm} \times 2.0\text{ mm} \times 1.0\text{ mm}$ 的小块,使细胞内平衡液和冷冻液渗透得更加充分,以避免不完全玻璃

化的出现。Gook等^[20]将卵巢组织块切割成 $2.0 \sim 5.0\text{ mm}$ 大小,认为对于冷冻的结果影响不大,同时减少操作时间,保护了窦前卵泡。而Silber^[12]所报道的切割大小更是达到了 $10\text{ mm} \times 10\text{ mm} \times 1\text{ mm}$ 。

卵泡结构的完整性并不能证明它们实际的生理状态^[21]。因此,本研究中我们还评估了玻璃化冷冻技术对卵巢组织细胞凋亡的影响。细胞凋亡中,染色体DNA双链断裂或单链断裂而产生大量的黏性 $3'-\text{OH}$ 末端,可在脱氧核糖核苷酸末端转移酶(TdT)的作用下进行凋亡检测^[22]。本研究中新鲜组与玻璃化冷冻组比较,其差异无统计学意义。TUNEL法检测只能是对玻璃化冷冻技术对卵巢组织细胞凋亡影响的一个初步分析。Caspase家族在介导细胞凋亡的过程中起着非常重要的作用,其中Caspase-3为关键的执行分子,它在凋亡信号传导的许多途径中发挥功能。Caspase-3以酶原(35 ku)形式存在于胞浆中,在凋亡的早期阶段被激活,活化的Caspase-3由两个大亚基(17 ku)和两个小亚基(12 ku)组成,裂解相应的胞浆胞核底物,最终导致细胞凋亡。因此,我们还以Cleaved Caspase-3的表达量检测对玻璃化冷冻技术对卵巢组织细胞凋亡没有显著影响进行了佐证。Salehnia等^[23]报道的结果也与我们的一致。这一发现表明玻璃化冷冻技术可能不会诱导细胞凋亡。但是,本研究的样本量有限,我们仍需进一步扩大样本量,并对组织内细胞超微结构进行分析,以观察玻璃化冷冻技术对组织内细胞的微损伤。

与程序化冷冻技术相比,玻璃化冷冻技术步骤更少,更加便捷,对仪器设备的要求更低,随着玻璃化冷冻技术的不断改进和逐渐成熟,其必然在重建女性生育功能方面具有广泛的临床应用前景。但目前玻璃化冷冻的方案尚无定论,其安全性仍有待深入研究和大量样本的长期随访资料来验证。

参考文献:

- [1] Novella S, Dantas AP, Segarra G, et al. Vascular aging in women; is estrogen the fountain of youth? [J]. *Front Physiol*, 2012, 3(1): 165-169.
- [2] Silva I, Naftolin F. Brain health and cognitive and mood disorders in ageing women [J]. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*, 2013, 27(5): 661-672.
- [3] Meirou D. Reproduction post-chemotherapy in young cancer patients [J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2000, 27

- (169): 123-131.
- [4] Larsen EC, Muller J, Schmiegelow K, et al. Reduced ovarian function in long-term survivors of radiation- and chemotherapy-treated childhood cancer [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2003, 88(11): 5307-5314.
- [5] Gosden RG, Baird DT, Wade JC, et al. Restoration of fertility to oophorectomized sheep by ovarian autografts stored at -196 degrees C [J]. *Hum Reprod*, 1994, 9(4): 597-603.
- [6] Donnez J, Dolmans MM, Demylle D, et al. Livebirth after orthotopic transplantation of cryopreserved ovarian tissue [J]. *Lancet*, 2004, 364(9443): 1405-1410.
- [7] Kawamura K, Cheng Y, Suzuki N, et al. Hippo signaling disruption and Akt stimulation of ovarian follicles for infertility treatment [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2013, 110(43): 17474-17479.
- [8] Macklon KT, Jensen AK, Loft A, et al. Treatment history and outcome of 24 deliveries world-wide after autotransplantation of cryopreserved ovarian tissue, including two new Danish deliveries years after autotransplantation [J]. *J Assist Reprod Genet*, 2014, 31(11): 1557-1564.
- [9] Son WY, Lee SY, Chang MJ, et al. Pregnancy resulting from transfer of repeat vitrified blastocysts produced by in-vitro matured oocytes in patient with polycystic ovary syndrome [J]. *Reprod Biomed Online*, 2005, 10(9): 98-101.
- [10] Kyono K, Fuchinoue K, Yagi A, et al. Successful pregnancy and delivery after transfer of a single blastocyst derived from a vitrified mature human oocyte [J]. *Fertil Steril*, 2005, 84(9): 1017-1027.
- [11] Kuwayama M, Vajta G, Kato O, et al. Highly efficient vitrification method for cryopreservation of human oocytes [J]. *Reprod Biomed Online*, 2005, 11(3): 300-308.
- [12] Silber SJ. Ovary cryopreservation and transplantation for fertility preservation [J]. *Mol Hum Reprod*, 2012, 18(2): 59-67.
- [13] Isachenko V, Isachenko E, Weiss JM, et al. Cryobanking of human ovarian tissue for anti-cancer treatment: comparison of vitrification and conventional freezing [J]. *Cryo Letters*, 2009, 30(6): 449-454.
- [14] Herraiz S, Novella-Maestre E, Rodríguez B, et al. Improving ovarian tissue cryopreservation for oncologic patients: slow freezing versus vitrification, effect of different procedures and devices [J]. *Fertil Steril*, 2014, 101(3): 775-784.
- [15] Klocke S, Bündgen N, Köster F, et al. Slow-freezing versus vitrification for human ovarian tissue cryopreservation [J]. *Arch Gynecol Obstet*, 2015, 291(2): 419-426.
- [16] Gougeon A. Dynamics of follicular growth in the human: a model from preliminary results [J]. *Hum Reprod*, 1986, 1(2): 81-87.
- [17] Fabbri R, Vicenti R, Macciocca M, et al. Good preservation of stromal cells and no apoptosis in human ovarian tissue after vitrification [J]. *Biomed Res Int*, 2014: 673537. Epub 2014 Apr 3.
- [18] Gandolfi F, Paffoni A, Brambilla EP, et al. Efficiency of equilibrium cooling and vitrification procedures for the cryopreservation of ovarian tissue: comparative analysis between human and animal models [J]. *Fertil Steril*, 2006, 85(Suppl 1): 1150-1156.
- [18] Isachenko V, Lapidus I, Isachenko E, et al. Human ovarian tissue vitrification versus conventional freezing: morphological, endocrinological, and molecular biological evaluation [J]. *Reproduction*, 2009, 138(2): 319-327.
- [20] Gook DA, Edgar DH, Borg J, et al. Diagnostic assessment of the developmental potential of human cryopreserved ovarian tissue from multiple patients using xenografting [J]. *Hum Reprod*, 2005, 20(1): 72-78.
- [21] Keros V, Xella S, Hulthenby K, et al. Vitrification versus controlled-rate freezing in cryopreservation of human ovarian tissue [J]. *Hum Reprod*, 2009, 24(7): 1670-1683.
- [22] Faustino LR, Carvalho AA, Silva CM, et al. Assessment of DNA damage in goat preantral follicles after vitrification of the ovarian cortex [J]. *Reprod Fertil Dev*, 2014 Jan 3, Epub ahead of print.
- [23] Salehnia M, Sheikhi M, Pourbeiranvand S, et al. Apoptosis of human ovarian tissue is not increased by either vitrification or rapid cooling [J]. *Reprod Biomed Online*, 2012, 25(5): 492-499.

(编辑 徐杰)