

## 宿主状态对人卵巢组织异种皮下移植的影响

李宇彬, 麦庆云, 李 涛, 周灿权

(中山大学附属第一医院生殖中心, 广东 广州 510080)

**摘要:**【目的】探讨异种移植宿主状态对解冻后人类卵巢组织皮下移植效果的影响。【方法】利用解冻后的人类卵巢组织片进行 SCID 小鼠皮下移植。按照卵巢组织在宿主不同的性别、去势以及局部创伤情况分为六组, 观察移植后人类卵巢组织片中卵泡存活、生长、凋亡以及间质重构等情况。【结果】各组原始卵泡存活率与解冻后未移植组织相比明显下降 ( $P < 0.05$ )。六组间比较, 移植后第一周原始卵泡形态正常率差别有统计学意义 ( $P = 0.046$ ), 无菌创伤雄性小鼠组最高 (64.6%), 完整雌性小鼠组最低 (39.7%)。性别、去势情况对移植后一周原始卵泡形态正常率无明显影响, 差别无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。异种移植 10 周中, 随移植时间推移, 生长期的卵泡百分比明显增加 ( $P$  均  $< 0.05$ ); 而六组间比较, 不同时间点差别都没有统计学意义 ( $P$  均  $> 0.05$ )。移植后组织中的 Ki-67 和 TUNEL 原位杂交表达情况与解冻组织相似, 而 MMP-9 的表达在间质中显得更加广泛。经过 10 周的 SCID 小鼠异种移植后, 有肉眼可见小窦卵泡形成。【结论】人类卵巢组织异种皮下移植后能存活并生长, 但有着不一样的间质重构; 宿主性别和去势情况对 10 周移植效果影响不大, 局部无菌性创口可改善卵泡存活率。

**关键词:** 人类卵巢组织; 异种移植; 卵泡; 间质重构

**中图分类号:** R321.3

**文献标志码:** A

**文章编号:** 1672-3554(2013)05-0681-07

## Influence of Host State on the Human Ovarian Tissue Subcutaneous Xenotransplantation

LI Yu-bin, MAI Qing-yun, LI Tao, ZHOU Can-quan

(The Reproductive Center, The First Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, China)

**Abstract:** 【Objective】 To explore influence of host state on the result of thawing human ovarian tissue subcutaneous xenotransplantation. 【Methods】 According to the different host genders, castration condition and subcutaneous local environment, the xenotransplanted ovarian tissue were divided into six groups. We observed the survival rates, growth, apoptosis and interstitial reconstruction of the human ovarian tissue slice after xenotransplantation. 【Results】 The primordial follicles survival rates in all groups were significantly decreased compared with the just thawing tissue ( $P < 0.05$ ). Among the six groups, the primordial follicles morphological normal rates of the first week after transplantation were significantly difference ( $P = 0.046$ ). The highest morphological normal rate was in the group of male mice with subcutaneous aseptic wound (64.6%), and the lowest one was in the intact female mice group (39.7%). The sex, castration condition had no effect on the primordial follicles morphologically normal rate after one week of transplantation ( $P > 0.05$ ). During 10 weeks after xenotransplantation, the percentage of growth phase follicle increased significantly with time going by ( $P < 0.05$ ). However compared among the six groups, it was not statistically different at different time points ( $P > 0.05$ ). The expression of Ki-67 and TUNEL in situ hybridization after transplantation were similar with thawing tissue, but MMP-9 expressed more widely in stroma. Small human antral follicle can be visible 10 weeks after xenotransplantation into SCID mice. 【Conclusions】 The human ovarian tissue can survive and grow after xenotransplantation subcutaneously. But the tissue has different interstitial reconstruction. Host local aseptic wound can improve follicle survival rate, however its gender and castration has little effect on the 10 weeks xenotransplantation.

**Key words:** human ovarian tissue; xenotransplantation; follicle; interstitial remodeling

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2013, 34(5):681-687]

收稿日期: 2013-02-25

基金项目: 国家自然科学基金青年基金(81100470 和 81270750); 中山大学青年教师培育项目(12ykpy24)

作者简介: 李宇彬, 博士, 生殖医学专业; E-mail: liyubin97200@163.com

追溯卵巢组织移植的渊源, 尽管结果并不令人满意, 但早在 1906 年就有学者报道历史上第一例卵巢移植<sup>[1]</sup>。此后, 卵巢组织移植的相关研究发展缓慢。近年来随着辅助生育、超低温冷冻和肿瘤诊疗技术的迅猛发展, 以及生命科学对人类卵子研究的需求, 重新燃起了人们对卵巢移植研究的热情。目前卵巢组织冻融后的利用已经逐渐取得令人瞩目的成果<sup>[2]</sup>, 但是其对于内分泌和排卵功能长期维持等方面却有待进一步改良。究其原因, 很可能是移植宿主本身和局部环境对卵巢组织有一定负面影响, 缺血再灌注作用更使大量卵泡在移植早期就丧失<sup>[3]</sup>; 另外, 重建的非生理性血循环也可能导致卵泡过度耗竭<sup>[4]</sup>。为了改善人类卵巢组织移植效果, 学者们进行了大量联合免疫缺陷 (SCID) 小鼠异种移植的基础研究。本研究旨在探索改良人类卵巢组织异种移植技术, 探讨异种移植宿主本身和局部状态对解冻后卵巢组织移植效果的影响, 为将来卵巢组织库基本技术的完善奠定技术基础。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

1.1.1 人类卵巢组织的来源 本研究得到中山大学附属第一医院伦理委员会批准后, 募集 9 名签署知情同意书、年龄为 22 ~ 29 (25.1 ± 2.7) 岁妇女。卵巢组织是在卵巢良性肿块行手术治疗切下的组织中获得, 其中 6 名妇女进行了腹腔镜手术, 其余 3 名进行了开腹手术。收集好的卵巢组织通过病理切片证实卵泡储备良好, 经过慢速程序化冷冻保存起来用于本实验研究。

1.1.2 SCID 小鼠来源 健康 SCID 小鼠, SPF 级, 5 ~ 6 周大小, 购于中山大学北校区动物中心。实验动物遗传背景稳定。动物于无病原微生物的层流间中饲养。鼠笼、饲料、饮水和室内空气均经过消毒处理。SCID 小鼠在本实验中充当移植宿主。

### 1.2 方 法

1.2.1 人类卵巢组织的解冻及预处理 人类卵巢组织慢速程序化冷冻方法如前研究所报道<sup>[5]</sup>。解冻后的卵巢组织用手术刀切割成约 3 mm × 1 mm × 1 mm 大小的组织小片, 将得到的组织片分成若干份, 分装到装有体积分数为 5% 的人类血清白蛋

白 (HSA, SAGE IVF, USA) + α-MEM 液 (Gibco, BRL) 的小试管中, 每管 8 小片, 依次编号。在 37 ℃、体积分数 5.5% CO<sub>2</sub> 培养箱中平衡 15 min, 然后将小试管置于冰块间带至 SPF 级 SCID 小鼠动物房。

1.2.2 人类卵巢组织的异种移植 采用完全随机分组方法, 将 48 只 SCID 小鼠分为 6 组, 每小组 8 只: 第 1 组: 雄性小鼠组, 即完整的雄性小鼠; 第 2 组: 去势雄性小鼠组, 即行睾丸切除的雄性小鼠; 第 3 组: 雌性小鼠组, 即完整的雌性小鼠; 第 4 组: 去势雌性小鼠组, 即行卵巢切除的雌性小鼠; 第 5 组: 无菌创伤雄性小鼠组; 第 6 组: 无菌创伤雌性小鼠组。各组所有小鼠均行双侧肩背、腰部皮下四个部位点的人类卵巢组织片移植, 每部位点种植解冻后人类卵巢组织条两片 (8 片/小鼠)。术后 3 d 每天 1 次给予庆大霉素 100 U 肌注。移植后 1、4、8、10 周每组分别处死 2 只宿主小鼠, 收集其中移植组织供分析。

1.2.3 移植前小鼠预处理手术 行去势手术小鼠组在移植前 4 d 进行双侧睾丸、卵巢切除, 手术方式参照文献报道进行, 术后恢复良好者方进行后续研究。无菌创伤小鼠组在移植前两天在拟移植部位制造无菌性皮下创伤。方法如下: 按 0.6 mL/100 g 剂量给小鼠腹腔注射 0.15% 的水合氯醛以麻醉。消毒背部皮毛, 使用 1 mL 注射针头在拟移植部位刺入, 以穿刺点为圆心, 划刮一直径为 1.5 cm 左右的皮下创伤圆, 以划刮整区域但不引起明显出血血肿为度, 并标记相应位点供后续移植。

1.2.4 卵泡组织学形态分析 收集各移植卵巢组织片进行卵泡组织学形态分析、启动生长情况比较。生长卵泡率 (Growing follicle rate, GFR) = (初级卵泡 + 次级卵泡) / (原始卵泡 + 初级卵泡 + 次级卵泡) × 100% (注: 窦卵泡数较少, 忽略不计)。另外进行 Ki-67、MMP-9 免疫组化及 TUNEL 凋亡检测分析, 以判断各组间卵巢组织的生长、卵巢间质重构以及凋亡情况。卵泡颗粒细胞 Ki-67 阳性率: 随机选取 10 个高倍视野, 计数 30 个颗粒细胞, 计算阳性率, 再求平均值。MMP-9 免疫组化分析, 半定量分为: 白色 (-); 浅褐色 (+); 黄褐色 (++) ; 黑褐色 (+++)。解冻后移植前的卵巢组织片作为对照组。

### 1.3 统计学分析

使用 SPSS 11.0 统计软件分析。率和构成比的

比较使用  $\chi^2$  检验分析, 检验水准  $\alpha = 0.05$ 。

## 2 结果

### 2.1 异种移植人卵巢组织的组织学分析

在各组每只 SCID 小鼠的四个组织移植点中, 每移植点 2 片组织至少找回 1 片。6 组合计移植了 384 片卵巢组织, 成功回收 352 片 (91.7%), 32 片 (9.3%) 未能找回。移植第一周标本显示, 许多新生血管已经向卵巢组织间延伸 (图 1)。此与人类卵巢组织自然生理血液供应有明显组织解剖学上的差别, 生理卵巢组织中很少有类似血管增生, 在原始卵泡周围极少有毛细血管。图 2 显示组织切片中各级正常卵泡, 并显示皮下移植 10 周后, 有小窦卵泡形成。

本研究解冻后移植前原始卵泡存活率为 72.6%。移植 1 周后, 许多原始卵泡发生了形态学上不可逆的闭锁, 情况如表 1 所示: 各组原始卵泡存活率与解冻后未移植组织相比明显下降 ( $P$  均 <

0.05)。六组间总体比较, 移植后第 1 周原始卵泡形态正常率差别有统计学意义 ( $P = 0.046$ ), 无菌创伤雄性小鼠组最高 (64.6%), 完整雌性小鼠组最低 (39.7%)。按照性别差异进行比较, 第一、三组间, 第二、四组间, 以及第五、六组间原始卵泡形态正常率相比差别无统计学意义 ( $\chi^2$  分别等于 0.431、0.066 和 0.013,  $P$  分别等于 0.512、0.797 和 0.909)。去势影响各组比较, 第一、二组间, 第三、四组间原始卵泡形态正常率差别亦无统计学意义 ( $\chi^2$  分别等于 0.018 和 0.654,  $P$  分别等于 0.894 和 0.419)。结果提示, 异种移植 1 周时, 宿主性别、去势情况对原始卵泡存活率没明显影响。雄性小鼠三组 (第一、二、五组) 间比较,  $\chi^2 = 5.405$ ,  $P = 0.067$ , 第五组最高 (64.6%); 雌性小鼠三组 (第三、四、六组) 间比较,  $\chi^2 = 5.708$ ,  $P = 0.058$ , 第六组最高 (63.4%)。虽然结果差别尚未有统计学意义, 但进行局部无菌创口移植有较高原始卵泡存活率的趋势非常明显。

移植 1 周后组织片基本形成血供, 本研究未

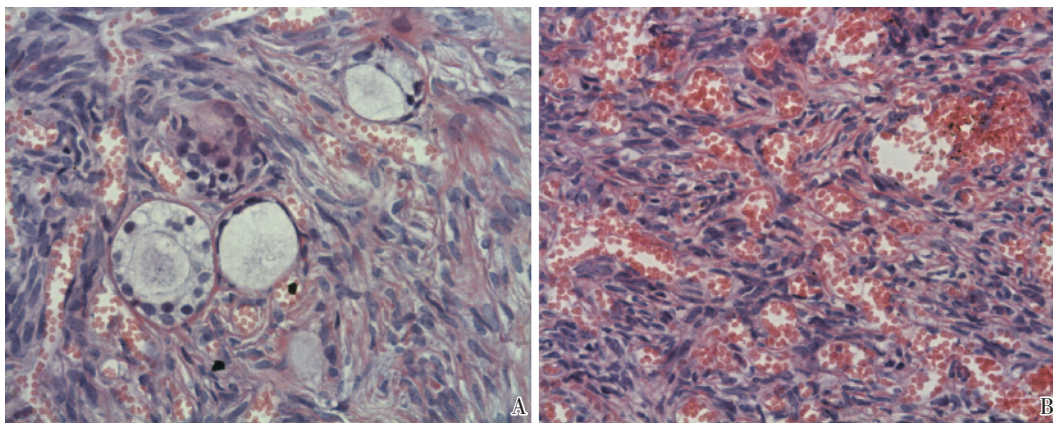


图 1 移植 1 周后大量小血管生成

Fig.1 A large number of small vascular generated one week after xenotransplantation (HE,  $\times 400$ )

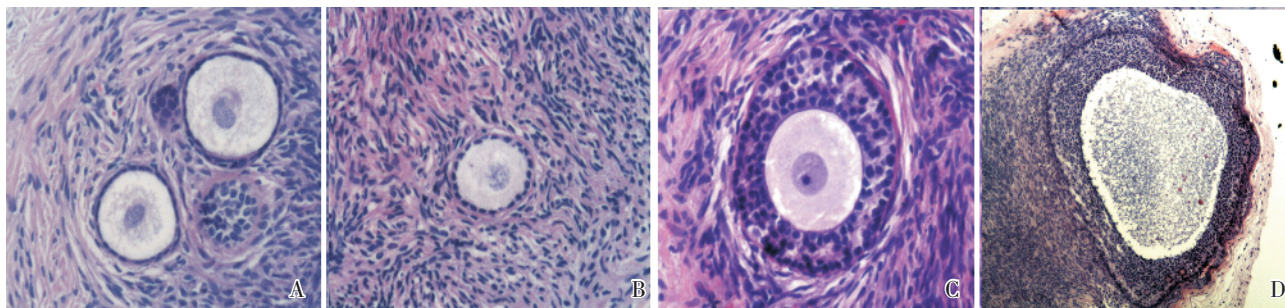


图 2 回收移植后组织切片中各级正常卵泡

Fig.2 Four stages of normal follicles in ovarian tissue after xenotransplantation

A~C: primordial follicle, primary follicle and secondary follicle (HE,  $\times 400$ ); D: antral follicle (HE,  $\times 200$ )

表 1 移植 1 周后各组原始卵泡存活情况 (卵泡数)

	Normal	Atresic	Total	Survival rate
Group 1 <sup>1)</sup>	26	31	57	45.6%
Group 2	32	40	72	44.4%
Group 3	25	38	63	39.7%
Group 4	34	39	73	46.6%
Group 5	31	17	48	64.6%
Group 6	26	15	41	63.4%

Among the six groups, the primordial follicles morphological normal rates of the first week after transplantation were significantly difference ( $\chi^2 = 11.289, P = 0.046$ ).

行其它取材时间点卵泡存活率的分析, 而进行生长卵泡率比较。异种移植后 10 周间, 如表 2 所示, 反映了六组人类卵巢组织移植后生长卵泡总体情况。结果显示, 随移植时间的增加, 生长期的卵泡百分比明显增加, 各  $P$  值均小于 0.05。而各处理组间相比, 不同时间点差别都没有统计学意义, 各  $P$  值均大于 0.05。特别地, 结果显示在第八周时, 两无菌性局部创伤组(第五、六组)有增高趋势( $P = 0.327$ ), 但尚未达统计学意义上差异。

## 2.2 异种移植人卵巢组织 Ki-67 表达情况

Ki-67 为核表达, 反映的是细胞增殖情况。在阴性对照组中, 未见 Ki-67 阳性细胞。各组人类卵巢组织间质中, 表达 Ki-67 的阳性细胞呈稀疏散在分布(图 3), 每高倍视野 0 ~ 1 个左右。窦卵泡和次级卵泡中颗粒细胞较多的表达 Ki-67, 平均阳性率分别为 35.9% 及 23.1%。而在原始卵泡和初级卵泡的颗粒细胞中 Ki-67 的表达率常较低(图 3), 平均阳性率 14.8%。三组卵泡间比较差别有统计

学意义( $F=23.7, P<0.001$ ); 在各级卵泡中, 卵子都有轻度的阳性表达。Ki-67 免疫组化总体结果显示, 移植组织中 Ki-67 表达与解冻组织相似; 异种移植后 10 周间, 人类卵巢组织各成份具有相当活力, 并保持有分裂增殖能力。

## 2.3 异种移植人卵巢组织 MMP-9 表达情况

实验结果显示, MMP-9 为细胞浆中表达。卵子和卵泡膜细胞呈黄褐色(++)表达。在各组人类卵巢组织间质细胞中广泛表达。在解冻组织间质中 MMP-9 的表达(图 4D), 普遍呈浅褐色(+); 不如移植后(图 4 A-C)明显, 普遍呈黄褐色或黑褐色(++~+++)。这提示移植后卵巢间质组织进行更显著的重构过程。而在各级卵泡的颗粒细胞中, MMP-9 是呈强阳性(+++)表达的, 表现出比间质组织更强的黑褐色。在次级卵泡、初级卵泡和原始卵泡颗粒细胞间, MMP-9 表达强度上相差不明显(图 4)。也基于此现象, 在此不累赘进行各组间的卵泡 MMP-9 表达统计学比较。结果提示卵巢中颗粒细胞是表达 MMP-9 最为活跃的细胞, 对调控卵巢组织移植后重构有着最为重要的作用。

## 2.4 异种移植人卵巢组织 TUNEL 凋亡检测

在进行 TUNEL 原位杂交切片中, 除检测到窦卵泡颗粒细胞和卵泡膜细胞中有阳性表达外, 人类卵巢组织异种移植后其它类型卵泡中亦未见有阳性表达细胞。在卵巢组织间质常有散在的阳性细胞。

## 3 讨论

利用冻融后的人类卵巢组织以获得临床妊娠, 在国外已经有许多成功的报道, 复习文献, 到目前为止报道了解冻后人类卵巢组织自体移植至

表 2 六组间生长池卵泡率比较 (生长期卵泡/总卵泡)

	1 Week	4 Week	8 Week	10 Week	$\chi^2$	$P$
Group 1	36.6%(15/41)	41.2%(14/34)	51.2%(17/33)	82.1%(23/28)	15.586	0.001
Group 2	37.3%(19/51)	43.2%(18/44)	53.7%(21/41)	79.3%(23/29)	14.708	0.002
Group 3	35.9%(14/39)	38.9%(14/36)	48.0%(12/25)	78.8%(26/33)	15.853	0.001
Group 4	34.6%(18/52)	41.4%(24/58)	53.3%(24/45)	81.5%(22/27)	17.372	0.001
Group 5	38%(19/50)	42.5%(17/40)	71.1%(27/38)	80%(36/45)	23.597	< 0.001
Group 6	39.5%(17/43)	41.3%(19/46)	63.9%(23/36)	76.2%(16/21)	11.714	0.008
$\chi^2$	0.292	0.108	5.791	0.339		
$P$	0.998	0.999	0.327	0.997		

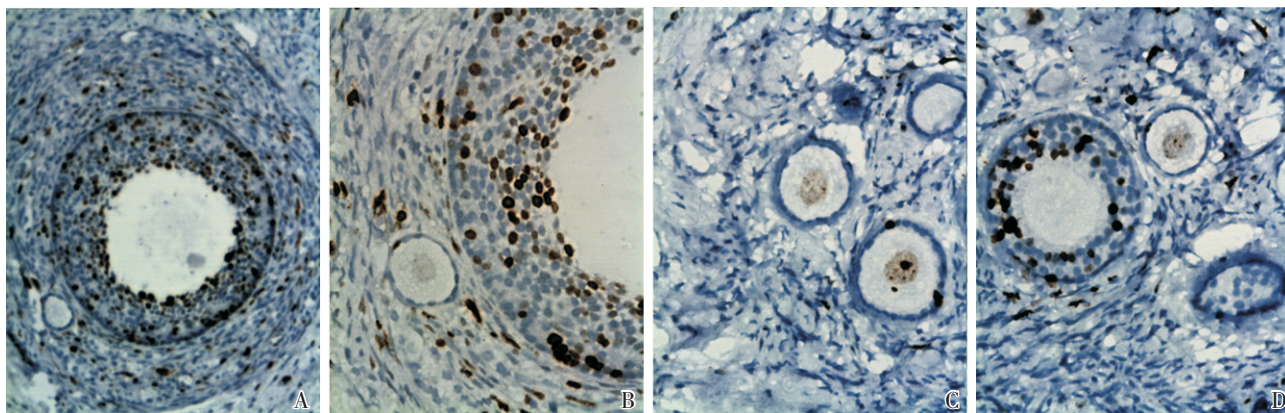


图 3 移植后组织 Ki-67 免疫组化结果

Fig.3 Ki-67 immunohistochemical results of ovarian tissue after transplantation

A: Large quantities of positive cells in antral follicle granulosa cells and theca cells; B: A positive granulosa cell showed in a primordial follicle, and in stroma tissue positive cells scattered; C: Positive granulosa cells showed in primary follicles, and the oocytes showed weakly positive; D: Positive granulosa cells were scattered in secondary follicles, also an oocyte in a primordial follicle showed weak positive. (A:  $\times 200$ , B-D:  $\times 400$ )

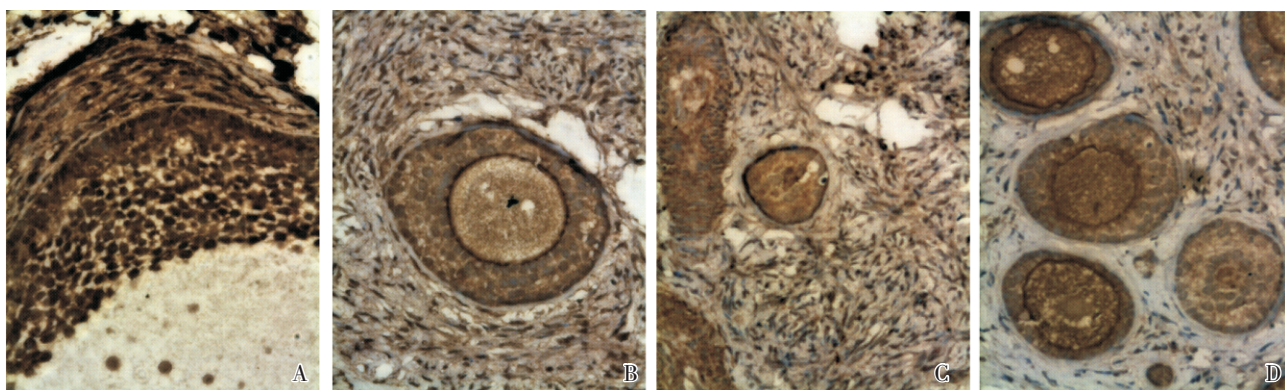


图 4 人类卵巢组织 MMP-9 免疫组化结果

Fig 4 The results of MMP-9 immunohistochemistry of human ovarian tissue

A: Granulosa cells and theca cells expressed strong positive in antral follicle after transplantation; B: Secondary follicles and stroma cells expressed wide and strong positive after transplantation; C: Primordial follicles expressed strong positive after transplantation; D: Granulosa cells expressed strong positive in secondary and primary follicles after thawing; but the stroma cells expressed weaker signal compared with those in xenotransplantation tissue ( $\times 400$ ).

少有 17 名活产后代分娩<sup>[6]</sup>,而在国内开展处于起步阶段。本研究探索冻融后人类卵巢组织异种移植的效果,同时主要观察了 10 周间,宿主 SCID 小鼠整体和局部状况对解冻后异位皮下卵巢组织异种移植效果的影响。结果表明,经过慢速冷冻后人类卵巢组织能够在异种皮下继续生长,并且可得到小窦卵泡。

### 3.1 SCID 小鼠性别和去势情况与移植效果关系

人类卵巢组织片异种移植到 SCID 小鼠皮下原理上会受到宿主环境对其的影响。既往研究显示,小鼠的性别对移植效果有一定的影响。

Weissman 等<sup>[7]</sup>研究显示,宿主为雄性小鼠的移植比雌性小鼠能得到更多窦卵泡,其推测原因可能是因为雄激素水平、血供和能量供应等内环境不同所致。但是在本研究进行卵巢组织异种移植 10 周实验中,在 1 周的原始卵泡存活率以及第 1、4、8 和 10 周时间点生长池卵泡率方面,不同性别小鼠并没有表现出统计学上的差别。这可能是由于本实验主要关注 10 周内上述指标的变化、与 Weissman 等更长时限的研究不同引起的。宿主性别对于更长时限的移植效果影响值得今后研究。

对宿主小鼠进行去势,其目的主要是取消小

鼠性腺功能对其中枢的负反馈,使促性腺激素 FSH 升高,进而试图促进卵泡的发育。部分研究<sup>[8]</sup>显示,去势后可以促进移植组织中卵泡的发育。然而另有一些文献结果显示差别不明显<sup>[9]</sup>。本研究中亦未能证明去势能明显地影响移植 1 周原始卵泡的存活率,以及第 1、4、8 和 10 周时间点生长池卵泡率。因为生理水平的 FSH 是可以维持移植后卵泡生长至窦卵泡阶段的<sup>[10]</sup>;另外,卵巢组织重新建立血液循环后,分泌的雌孕激素将重新发挥负反馈作用<sup>[9]</sup>,抵消去势的影响,所以究竟应不应该进行去势手术值得进一步研究比较。本研究中由于卵泡分布的不均匀性和分组样本尚未足够大,所以暂未能探索去势是否会加速卵泡的耗竭。另外,再考虑到反复手术对于免疫缺陷小鼠抵抗力的影响,我们认为完整状态的 SCID 小鼠是良好的移植宿主。

### 3.2 移植局部情况与移植效果关系

在如何提高人类卵巢组织移植后的效果方面已经进行了很多研究,Andersen 等<sup>[11]</sup>报道了一例自体移植卵巢组织条后可维持卵巢功能达 7 年之久。然而一直以来解冻后卵巢组织的移植遇到的最大技术困境仍然是缺血再灌注损伤,而不是冻融过程的破坏。一般认为 50%~60%的原始卵泡再移植初期丢失<sup>[12]</sup>。再灌注损伤是血管重构后出现的损害,目前有效的处理方法不多。如何更快的建立组织微循环,减少卵巢组织缺血时间是目前研究的主要方向。使用药物来减少缺血引起的自由基损害取得一定效果。Nugent 等<sup>[13]</sup>曾经使用维生素 E 一定程度地减少这种损伤。Kim 等<sup>[14]</sup>使用维生素 C 在体外处理能延长组织耐缺氧能力。肉芽肿组织中有大量的促进血管生成和重构的因子(如 VEGF、EGF 等等),并且在创伤发生后 3~4 天达到高峰。Israely 等<sup>[15]</sup>曾报道在小鼠卵巢组织异位移植中,局部的新生肉芽组织能够减少移植后小鼠卵巢中卵泡死亡。Donnez 等<sup>[2]</sup>所报道的第一例自体移植后成功分娩者在移植前,也进行过两次腹腔镜手术,并在目标移植区制造肉芽肿类似的局部环境供移植。本研究中,在移植前两天使用注射针在移植前两天进行无菌性局部创伤,试图制造出类似肉芽肿样的无菌性炎症促进组织微循环的建立以减少卵泡死亡。结果显示,在最重要的血管生成时期(第一周)中,无菌性创伤组(第 5、6 组)其原始卵泡存活率是明显高于其它组别

的。第八周时,这两组中生长池卵泡率有增高去势。这提示本研究所选用的无菌性创伤方法改善移植后卵泡存活率是可行的。当然,由于 SCID 小鼠缺乏特异性免疫功能,其创伤的修复与一般动物是有差别的,但是局部血管和间质增生修复却是共通的。因此,无菌性创伤操作简便,效果良好,且对小鼠身体影响小,可能是一种良好移植方式。

### 3.3 异位皮下移植与移植组织生理

为了探索良好的移植位置,学者们进行了大量的研究。一些学者认为,肾囊部位由于血供极其丰富,效果会比皮下移植为好<sup>[16]</sup>。然而其他一些学者认为,皮下血供同样丰富,而且空间较大,可以支持卵泡完整的生长过程,更适合人类卵泡生长<sup>[9]</sup>。但是,我们都应该注意到无论进行肾囊还是皮下移植,异位与原位环境是有差别的,压力、温度等因素改变会影响经典卵泡参数评估。

卵巢组织移植的生长与生理情况下相比,由于环境的改变,表现出很大的差异。生理情况下,原始卵泡近周是没有血管直接供应的。其代谢水平低,营养供给和物质交换主要靠较远距离的组织液渗透进行。卵巢组织片中可能去除人体内的抑制因素<sup>[17]</sup>以及血供环境明显的改变,许多原始卵泡得以启动生长,原始卵泡启动生长率明显增加。Ki-67 抗原是一种与细胞周期相关的增殖细胞核抗原<sup>[18]</sup>,经常用于卵泡颗粒细胞增殖生长的研究。本研究显示,异位皮下移植后,各级生长卵泡能够表达 Ki-67。特别地,在不成熟卵子中也轻度表达 Ki-67,原因可能是卵子虽未进入分裂相,但是其 DNA 修复和线粒体复制,会有 Ki-67 的表达。移植组织能够广泛地表达 MMP-9,而 MMP-9 能够降解胶原酶 VI,其表达是与卵泡生长、间质重构密切相关<sup>[19]</sup>。本实验移植组织中多量原始卵泡启动生长后,颗粒细胞分泌多量的 MMP 类因子对间质进行持续的非生理重构,重构过程反过来再亦会影响了卵泡的启动生长。在本研究中亦发现这种改变可能导致了卵泡过快耗竭。血管生成与重建对于卵泡耗竭这种现象也提示我们对辅助生育和妇科临床手术操作的思考。反复的卵巢创伤操作后由于新生血管的形成,可能会诱导卵巢间质重构,周围卵泡过快地进入生长状态,导致卵泡耗竭的加速,使卵巢储备下降。相关推测有待进一步研究证实。在我们的实验中 MMP-9 持续表达,反映了组织始终保持重构活性,虽然我们认为这

种重构为非生理性的。在移植1周后进行卵巢组织的TUNEL凋亡检测结果亦与先前研究一致,推测早期的卵泡缺少凋亡程序激活所必需的信号和物质,其闭锁是一种形式的坏死<sup>[20]</sup>。卵泡闭锁机理目前仍然有待阐明。

综上所述,本研究探索了人类卵巢组织在不同宿主状态下异种移植的生长状况,并提示局部无菌性创口可改善卵泡存活率,通过皮下移植是可以得到窦卵泡。这为下一步研究建立了较好的研究基础。然而,移植后卵巢组织的重构对卵巢储备的影响值得更深入的研究。

#### 参考文献:

- [1] Carrel A, Guthrie CC. Technique de la transplantation homeoplastique de l'ovarie. C.R[J]. Seances Soc Biol, 1906, 6: 466-468.
- [2] Donnez J, Dolmans MM, Demylle D, et al. Livebirth after orthotopic transplantation of cryopreserved ovarian tissue[J]. Lancet, 2004, 364(9443): 1405-1410.
- [3] Labied S, Delforge Y, Munaut C, et al. Isoform 111 of Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF111) Improves Angiogenesis of Ovarian Tissue Xenotransplantation[J]. Transplantation, 2013, 95(3): 426-433.
- [4] Maltaris T, Beckmann MW, Mueller A, et al. Significant loss of primordial follicles after prolonged gonadotropin stimulation in xenografts of cryopreserved human ovarian tissue in severe combined immunodeficient mice[J]. Fertil Steril, 2007, 87(1): 195-197.
- [5] Li YB, Zhou CQ, Yang GF, et al. Modified vitrification method for cryopreservation of human ovarian tissues[J]. Chin Med J, 2007, 120(2): 110-114.
- [6] Burmeister L, Kovacs GT, Osianlis T. First Australian pregnancy after ovarian tissue cryopreservation and subsequent autotransplantation[J]. Med J Aust, 2013, 198(3): 158-159.
- [7] Weissman A, Gotlieb L, Colgan T, et al. Preliminary experience with subcutaneous human ovarian cortex transplantation in the NOD-SCID mouse [J]. Biol Reprod, 1999, 60(6): 1462-1467.
- [8] Maltaris T, Koelbl H, Fischl F, et al. Xenotransplantation of human ovarian tissue pieces in gonadotropin-stimulated SCID mice: the effect of ovariectomy [J]. Anticancer Res, 2006, 26 (6B): 4171-4176.
- [9] Hernandez-Fonseca H, Bosch P, Sirisathien S, et al. Effect of site of transplantation on follicular development of human ovarian tissue transplanted into intact or castrated immunodeficient mice [J]. Fert Steril, 2004, 81 (Suppl 1): 888-892.
- [10] Lee DM, Yeoman RR, Battaglia DE, et al. Live birth after ovarian tissue transplant [J]. Nature, 2004, 428 (6979): 137-138.
- [11] Andersen CY, Silber SJ, Berghold SH, et al. Long-term duration of function of ovarian tissue transplants: case reports [J]. Reprod Biomed Online, 2012, 25(2): 128-132.
- [12] Donnez J, Martinez-Madrid B, Jadoul P, et al. Ovarian tissue cryopreservation and transplantation: a review [J]. Hum Reprod Update, 2006, 12(5): 519-535.
- [13] Nugent D, Newton H, Gallivan L, et al. Protective effect of vitamin E on ischaemia-reperfusion injury in ovarian grafts [J]. J Reprod Fertil, 1998, 114(2): 341-346.
- [14] Kim SS, Yang HW, Kang HG, et al. Quantitative assessment of ischemic tissue damage in ovarian cortical tissue with or without antioxidant (ascorbic acid) treatment [J]. Fertil Steril, 2006, 82(3), 679-685.
- [15] Israely T, Nevo N, Harmelin A, et al. Reducing ischaemic damage in rodent ovarian xenografts transplanted into granulation tissue [J]. Hum Reprod, 2006, 21(6): 1368-1379.
- [16] Abir R, Orvieto R, Raanani H, et al. Parameters affecting successful transplantation of frozen-thawed human fetal ovaries into immunodeficient mice [J]. Fertil Steril, 2003, 80(2): 421-428.
- [17] Baird DT, Campbell BK, Souza C, et al. Long-term ovarian function in sheep after ovariectomy and autotransplantation of cryopreserved cortical strips [J]. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol, 2004, 113(suppl 1): 55-59.
- [18] Gerdes J, Scwab U, Lemke H, et al. Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation [J]. Int J Cancer, 1983, 31(1): 13-20.
- [19] Goldman S, Shalev E. MMPS and TIMPS in ovarian physiology and pathophysiology [J]. Front Biosci, 2004, 9: 2474-2483.
- [20] Jin S, Lei L, Shea LD, et al. Markers of growth and development in primate primordial follicles are preserved after slow cryopreservation [J]. Fertil Steril, 2010, 93 (8): 2627-2632.