

# 慢速冷冻和玻璃化冷冻对人类卵巢组织中卵泡形态的影响

彭 艳, 于丛一, 李 予, 麦美琪, 冯淑英, 杨冬梓, 张清学

( 中山大学附属第二医院妇产科生殖中心, 广东 广州 510120 )

**摘 要:** 【目的】比较慢速冷冻、麦管玻璃化冷冻和尼龙网玻璃化冷冻对人类卵巢组织中卵泡形态的影响。【方法】16例人卵巢组织切成薄片随机分配到新鲜卵巢组(A组)、麦管玻璃化冷冻组(B组)、尼龙网玻璃化冷冻组(C组)和慢速冷冻组(D组)后行组织学和电镜检查。【结果】A、B、C、D组中形态正常的原始卵泡比例分别为72.5%±8.4%、65.6%±12.8%、66.1%±11.1%、48.4%±13.3%；形态正常的初级卵泡比例分别为62.0%±13.9%、58.1%±7.9%、59.0%±16.2%、37.0%±14.0%。D组中形态正常的原始卵泡比例和初级卵泡比例均明显低于A、B、C组。B、C组形态正常的原始卵泡比例和初级卵泡比例,与A组相比无统计学差异。B、C组中形态正常的原始卵泡超微结构无明显改变, D组中形态正常的原始卵泡超微结构存在一定程度的改变。【结论】玻璃化冷冻是人类卵巢组织较适宜的冷冻保存方法。

**关键词:** 卵巢组织; 慢速冷冻; 玻璃化冷冻; 卵泡

中图分类号: R711.75

文献标识码: A

文章编号: 1672- 3554(2007)01- 0070- 05

## Morphology Evaluation of Follicles from Cryopreserved Human Ovarian Tissue by Vitrification and Slow Cooling

PENG Yan, YU Cong-yi, LI Yu, MAI Mei-qi, FENG Shu-ying, YANG Dong-zi, ZHANG Qing-xue

( The Second Affiliated Hospital, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510120, China )

**Abstract:** 【Objective】 To compare the effect of slow cooling with vitrification to get a more effective procedure for human ovarian tissue cryopreservation. 【Methods】 Ovarian biopsies from 16 patients were cut into ovarian pieces (OPs) of 1mm thickness which randomly distributed into fresh OPs (Group A), conventional-straw vitrified OPs (Group B), vitrified OPs using nylon mesh (Group C) and slow cooled OPs (Group D) treatment Groups. Histological and ultrastructural observation of OPs was performed after cryopreservation. 【Results】 The proportions of morphologically normal primordial and primary follicles from Group A, Group B, Group C, and Group D were 72.5%±8.4% and 62.0%±13.9%, 65.6%±12.8% and 58.1%±7.9%, 66.1%±11.1% and 59.0%±16.2%, 48.4%±13.3% and 37.0%±14.0%, respectively. The proportions of morphologically normal primordial and primary follicles from Group D were lower than those from Group A, Group B, and Group C. The difference in proportions of morphologically normal primordial follicles among Group A, Group B, and Group C was not significant, so were the proportions of morphologically normal primary follicles. The ultrastructural studies showed that in primordial follicles considered normal at histological analysis, there are no difference among Group A, Group B, and Group C. While there were a few abnormalities in Group D. 【Conclusion】 Vitrification is more favorable than slow cooling in human ovarian cryopreservation.

**Key words:** ovarian tissue; slow freezing; vitrification; follicle

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2007, 28(1):70-74]

随着医学诊疗技术的飞速发展, 恶性肿瘤患者的生存率得到明显提高, 但是抗癌治疗对卵巢

收稿日期: 2006-08-25

基金项目: 卫生部临床学科重点项目(2004年); 广州市科技局重点科研资助项目(2004Z1-E0101)

作者简介: 彭 艳(1978-), 女性, 江苏海门人, 硕士, 现工作于深圳市妇幼保健院; 通讯作者: 张清学, 硕士生导师, 副教授, E-mail: zhangqingxue@tm.com

功能存在一定程度的损伤, 出现月经稀发、闭经、不孕和卵巢功能早衰等, 对患者的生存质量和生育能力造成严重影响。因此, 如何保存患者的卵巢功能成为迫切需要解决的问题。卵巢组织冷冻保存是一种较理想的卵巢功能保存方法。目前常用的冷冻方法是慢速冷冻。但是慢速冷冻难以完全避免冰晶形成, 而且需要借助精密控温仪器, 操作较复杂, 从而影响慢速冷冻在卵巢组织冷冻保存中的推广应用。玻璃化冷冻, 是近年来出现的一种新的冷冻方法, 操作简便, 无需精密仪器控温<sup>[1,2]</sup>。玻璃化冷冻的关键是使组织细胞较好的形成“玻璃化”态, 尽量减少冰晶的形成。目前主要是通过改良冷冻载体加快冷冻降温速度来改善玻璃化冷冻效果。本研究比较慢速冷冻、尼龙网玻璃化冷冻和麦管玻璃化冷冻对人类卵巢组织中卵泡形态的影响, 探讨人类卵巢组织适宜的冷冻保存方法, 为冻融卵巢组织在移植、体外培养等研究奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 标本来源

选取中山大学附属第二医院妇产科 2004 年 6 月至 2005 年 2 月间进行卵巢手术的患者 16 例为研究对象, 年龄 27~35(30.2±2.5) 岁, 有规律月经、无内分泌紊乱、无放化疗史且半年内无激素服用史。卵巢组织冷冻保存通过医院生殖医学伦理委员会批准, 与患者签署知情同意书。

### 1.2 实验方法

在开腹或腹腔镜手术中活检外观正常的卵巢组织, 在室温保存的磷酸盐缓冲液中迅速运送至实验室。将卵巢皮质剪成约 5 mm×2 mm×1 mm 的组织片, 随机分配到新鲜卵巢组(A 组)、麦管玻璃化冷冻组(B 组)、尼龙网玻璃化冷冻组(C 组)和慢速冷冻组(D 组)。B 组: 卵巢组织片浸泡在快速冷冻液中(含有 5.5 mol/L 乙二醇、1.0 mol/L 蔗糖、100 mL/L 胎牛血清的磷酸盐缓冲液), 在室温下平衡 10 min 用麦管(0.25 mL)按 3 段式法装管, 炭粉封口后直接投入液氮中。保存 48 h 后采用 3 步法依次在含有 1.0 mol/L 蔗糖和 100 mL/L 胎牛血清的磷酸盐缓冲液、0.5 mol/L 蔗糖和 50 mL/L 胎牛血清的磷酸盐缓冲液、0.25 mol/L 蔗糖和 25 mL/L 胎牛血清的磷酸盐缓冲液中逐步稀释去除冷冻保护剂, 每次平衡时间 5 min, 最后在磷酸盐

缓冲液中冲洗 2 次。C 组: 卵巢组织片在快速冷冻液中室温下平衡 10 min, 将卵巢组织片平铺放入尼龙网袋(长 2 cm、宽 2 cm、网孔直径 80 μm), 将尼龙网袋直接投入液氮中。保存 48 h 后进行快速复温, 复温方法同 B 组。D 组: 卵巢组织片浸泡在慢速冷冻液中(含有 1.5 mol/L 乙二醇、0.1 mol/L 蔗糖、50 mL/L 胎牛血清的磷酸盐缓冲液), 在 0℃ 平衡 30 min, 装管方法同 B 组, 采用 Oktay<sup>[3]</sup> 的慢速冷冻方法保存。将麦管放入程序冷冻仪内, 从 0℃ 开始以 2℃/min 的速度降温至 -7℃, 平衡 10 min 后进行人工植冰, 再以 0.3℃/min 的速度缓慢降温至 -40℃, 后以 10℃/min 的速度降温至 -140℃, 最后将麦管投入液氮中, 保存 48 h 后进行快速复温, 以冷冻保护剂的浓度梯度逐步置换冷冻保护剂(含有 1.0 mol/L 乙二醇、0.1 mol/L 蔗糖、50 mL/L 胎牛血清的磷酸盐缓冲液, 含有 0.5 mol/L 乙二醇、0.1 mol/L 蔗糖、50 mL/L 胎牛血清的磷酸盐缓冲液, 含有 0.25 mol/L 乙二醇、0.1 mol/L 蔗糖、50 mL/L 胎牛血清的磷酸盐缓冲液), 每次平衡时间 5 min, 最后在磷酸盐缓冲液中冲洗 2 次。

### 1.3 组织学检查

石蜡包埋卵巢组织, 以 5 μm 的厚度连续切片, 间隔 50 μm 的厚度行 HE 染色在光镜下阅片。单盲法观察原始卵泡和初级卵泡的形态。按 Gougeon<sup>[2]</sup> 的标准观察卵泡形态: 正常的卵泡结构为卵泡和卵母细胞均呈圆形, 卵母细胞核无固缩, 颗粒细胞分布均匀, 基底膜完整; 异常的卵泡结构为卵泡结构不完整或消失, 卵母细胞皱缩, 卵母细胞核固缩, 颗粒细胞排列紊乱。原始卵泡和初级卵泡计数以卵母细胞核作为标记, 计算出每个卵巢组织片中形态正常的原始卵泡比例和初级卵泡比例。其他发育阶段的卵泡数目极少, 未进行统计。

### 1.4 电镜检查

A、B、C、D 4 组中每组各选 2 个卵巢组织片固定在 25 g/L 戊二醛中, 经包埋修块后行半薄切片, 甲苯胺蓝染色后在光镜下定位组织学形态正常的原始卵泡, 超薄切片后经醋酸铀及硝酸铅双重染色后在透射电镜下观察超微结构。

### 1.5 统计学处理方法

数据用 SPSS10.0 统计软件处理, 结果用均数±标准差表示, 各组中形态正常的卵泡比例采用 One-Way ANOVA 分析, 各组之间两两比较用 LSD 方法, P<0.05 认为差异有显著性。

## 2 结 果

### 2.1 组织学检查

A 组共观察到原始卵泡 196 个, 形态正常的原始卵泡比例为  $72.5\% \pm 8.4\%$ , 初级卵泡 41 个, 形态正常的初级卵泡比例为  $62.0\% \pm 13.9\%$ ; B 组共观察到原始卵泡 233 个, 形态正常的原始卵泡比例为  $65.6\% \pm 12.8\%$ , 初级卵泡 48 个, 形态正常的初级卵泡比例为  $58.1\% \pm 7.9\%$ ; C 组共观察到原始卵泡 286 个, 形态正常的原始卵泡比例为  $66.1\% \pm$

$11.1\%$ , 初级卵泡 43 个, 形态正常的初级卵泡比例为  $59.0\% \pm 16.2\%$ ; D 组共观察到原始卵泡 232 个, 形态正常的原始卵泡比例为  $48.4\% \pm 13.3\%$ , 初级卵泡 58 个, 形态正常的初级卵泡比例为  $37.0\% \pm 14.0\%$ 。D 组形态正常的原始卵泡比例明显低于 A、B、C 组 ( $t=4.12, P < 0.01$ ); A、B、C 3 组中形态正常的原始卵泡比例无明显差异 ( $t=1.32, P > 0.05$ )。D 组中形态正常的初级卵泡比例低于 A、B、C 组 ( $t=2.48, P < 0.05$ ); A、B、C 3 组中形态正常的初级卵泡比例无明显差异 ( $t=1.69, P > 0.05$ ; 图 1.A-D)。

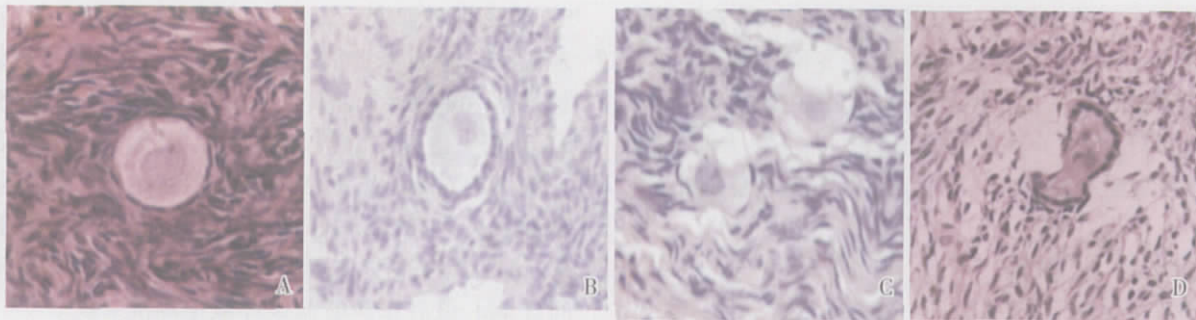


图 1 光镜下正常和异常形态卵泡

Fig.1 Micrographs of normal and abnormal follicles (microscopy $\times 400$ )

A: Normal primordial follicle; B: Normal primary follicle; C: Abnormal primordial follicle with wrinkling of oocyte nuclear membrane; D: Abnormal primary follicle with clumping of chromatin material, wrinkling of oocyte nuclear membrane

### 2.2 电镜检查

相对于 A 组中形态正常的原始卵泡超微结构, B、C 组中组织学形态正常的原始卵泡超微结构无明显改变, 仅见卵母细胞和前颗粒细胞的细胞浆基质电子密度稍下降, 个别线粒体肿胀。D 组中组织学形态正常的原始卵泡超微结构存在一定

程度的改变, 主要见前颗粒细胞和卵母细胞的胞浆基质电子密度下降, 部分线粒体和内质网肿胀, 粗面内质网表面核蛋白体稀疏, 卵母细胞浆内小空泡稍增多, 个别前颗粒细胞膜可见微小的缺损, 前颗粒细胞和卵母细胞间的微绒毛分布相对稀疏 (图 2.A-D)。

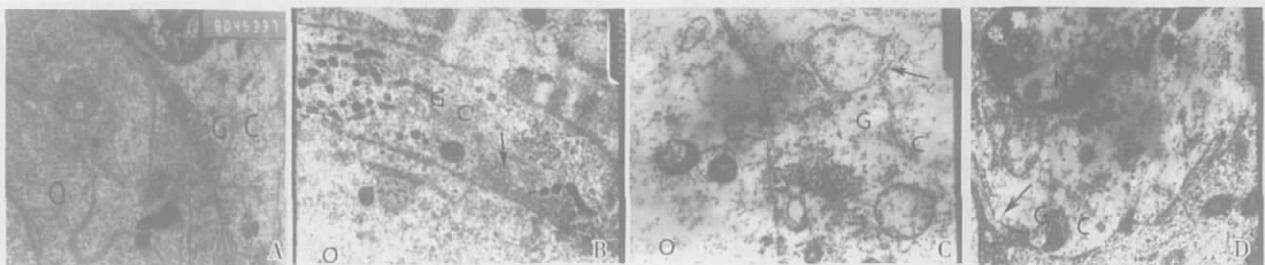


图 2 电子显微镜下原始卵泡超微结构

Fig.2 Electron micrographs of primordial follicles

A: well-preserved ultrastructure of oocytes and granulosa cells of primordial follicle ( $\times 8\ 000$ ); B: well-preserved ultrastructure of oocytes and granulosa cells of primordial follicle ( $\times 12\ 000$ ); C: ultrastructure of primordial follicle with Vesicles in cytoplasm of oocytes and granulosa cells ( $\times 20\ 000$ ); D: ultrastructure of primordial follicle with breaks in granulosa cell membrane ( $\times 20\ 000$ )

### 3 讨 论

#### 3.1 慢速冷冻和玻璃化冷冻对卵泡组织学形态的影响

张佳荣等<sup>[3]</sup>报道慢速冷冻和玻璃化冷冻对小鼠卵巢组织中原始卵泡形态的影响无明显差异。但是本实验中发现慢速冷冻对人类卵巢组织中原始卵泡和初级卵泡的形态影响较大, 而玻璃化冷冻对原始卵泡和初级卵泡的形态影响与新鲜卵巢组织相比无明显差异。Gandolfi 等<sup>[4]</sup>报道玻璃化冷冻人类卵巢组织可以较好的保存原始卵泡和初级卵泡, Gook 等<sup>[5]</sup>报道慢速冷冻人类卵巢组织对原始卵泡和初级卵泡的形态影响较大, 与本实验结果一致, 提示玻璃化冷冻是人类卵巢组织较适宜的冷冻保存方法, 相对优于慢速冷冻。可能是因为卵巢组织中含有多种类型细胞, 对缓慢降温的速度、人工植冰时机等要求各不相同而且差异较大, 使得慢速冷冻卵巢组织后较易形成冰晶, 冷冻损伤较大。而玻璃化冷冻始终保持组织细胞溶液中水分子和离子的原始分布, 减少甚至避免冰晶的形成, 避免不同类型细胞所需的不同的冷冻平衡要求, 使得卵巢组织中原始卵泡和初级卵泡均得到有效保存。

#### 3.2 慢速冷冻和玻璃化冷冻对原始卵泡超微结构的影响

本实验中发现玻璃化冷冻后组织学形态正常的原始卵泡超微结构无明显改变。有学者报道小鼠卵巢组织玻璃化冷冻后原始卵泡的超微结构无明显改变<sup>[6]</sup>, 与本实验结果相一致。提示玻璃化冷冻后组织学形态正常的原始卵泡超微结构无明显损伤。Oktay 等<sup>[7]</sup>报道慢速冷冻保存人卵巢组织, 组织学形态正常的原始卵泡超微结构无明显损伤。但是本实验发现慢速冷冻后组织学形态正常的原始卵泡超微结构中可见线粒体、内质网肿胀, 粗面内质网脱颗粒, 微绒毛减少, 卵母细胞浆内小空泡增多以及个别的前颗粒细胞膜不完整, 提示慢速冷冻后组织学形态正常的原始卵泡超微结构存在一定的损伤, 但是对原始卵泡的发育潜能是否存在影响尚需进一步研究。

#### 3.3 不同的冷冻载物对玻璃化冷冻保存卵巢组织效果的影响

玻璃化冷冻的关键是如何使组织细胞较好的

形成“玻璃化”状态, 尽量避免冰晶形成。目前主要是通过改良冷冻载物加快冷冻降温速度来改善玻璃化冷冻效果。传统的麦管玻璃化冷冻, 冷冻降温速度较慢, 约 1500 /min。而采用尼龙网、铜格等冷冻载物使组织与液氮直接接触, 降温速度达 15 000 /min。但是本实验中尼龙网玻璃化冷冻和麦管玻璃化冷冻对人类卵巢组织中卵泡形态的影响无明显差异。Isachenko 等<sup>[8]</sup>报道用铜格为冷冻载物玻璃化冷冻和麦管玻璃化冷冻对人类卵巢组织中卵泡形态影响无明显差异, 与本实验结果相一致。可能的原因是卵巢组织片结构较致密而且组织表面积与其容量之比相对较小, 使得卵巢组织内部冷热交换的速度无明显改善。因此, 通过改良冷冻载物使卵巢组织表面与液氮直接接触, 可能并不能有效地改善玻璃化冷冻效果。尼龙网玻璃化冷冻中卵巢组织与液氮直接接触, 可能会增加卵巢组织受病原体污染的机会。但是尼龙网玻璃化冷冻, 装载卵巢组织片快速简便, 每个尼龙网袋可以装载较多的卵巢组织片, 而麦管玻璃化冷冻操作较复杂, 每根麦管仅能装载 1 至 2 个卵巢组织片。因此, 尼龙网玻璃化冷冻可以在短时间内完成大量卵巢组织片的冷冻保存, 具有一定的优越性。

总之, 本研究结果提示玻璃化冷冻是人类卵巢组织较适宜的冷冻保存方法。尼龙网玻璃化冷冻对玻璃化冷冻效果无明显改善作用, 但是操作更简便, 较适宜大量卵巢组织的冷冻保存。

#### 参考文献:

- [1] OKTAY K, NEWTON H, AUBARD Y, et al. Cryopreservation of immature human oocytes and ovarian tissue: an emerging technology?[J]. *Fertil Steril*, 1998, 69 (1):1- 7.
- [2] GOUGEON A. Dynamics of follicular growth in the human: a model from preliminary results [J]. *Hum Reprod*, 1986, 1 (2):81- 87.
- [3] 张佳荣, 万小平, 陈建利, 等. 卵巢组织超速冷冻的初步探讨[J]. *中华妇产科杂志*, 2004, 39(7): 495- 496.
- [4] GANDOLFI F, PAFFONI A, PAPASSO BRAMBILLA E, 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.
- [5] GOOK A, EDGAR D H, STERN C. Effect of cooling rate and dehydration regimen on the histological appearance of human ovarian cortex following

- cryopreservation in 1,2-propanediol [J]. *Hum Reprod*, 1999, 14 (8):2061-2068.
- [6] SALEHNIYA M, ABBASIAN MOGHADAM E, REZAZADEH VELOJERDI M. Ultrastructure of follicles after vitrification of mouse ovarian tissue[J]. *Fertil Steril*, 2002, 78 (3):644-645.
- [7] OKTAY K, NUGENT D, NEWTON H, et al. Isolation and characterization of primordial follicles from fresh and cryopreserved human ovarian tissue[J]. *Fertil Steril*, 1997, 67(3):481-486.
- [8] ISACHENKO E, ISACHENKO V, RAHIMI G, et al. Cryopreservation of human ovarian tissue by direct plunging into liquid nitrogen[J]. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 2003, 108(2):186-193.

(编辑 张恩健)

(上接第 65 页 from page 65)

- [7] MOSAAD Y M, METWALLY S S, AUF F A, et al. Proinflammatory cytokines (IL-12 and IL-18) in immune rheumatic diseases: relation with disease activity and autoantibodies production[J]. *Egypt J Immunol*, 2003, 10 (2): 19-26.
- [8] CALVANI N, RICHARDS H B, TUCCI M, et al. Up-regulation of IL-18 and predominance of a Th1 immune response is a hallmark of lupus nephritis [J]. *Clin Exp Immunol*, 2004, 138(1): 171-178.
- [9] WONG C K, HO C Y, LI E K, et al. Elevated production of interleukin-18 is associated with renal disease in patients with systemic lupus erythematosus[J]. *Clin Exp Immunol*, 2002, 130(2): 345-351.
- [10] CALVANI N, TUCCI M, RICHARDS H B, et al. Th1 cytokines in the pathogenesis of lupus nephritis: The role of IL-18 [J]. *Autoimmun Rev*, 2005, 4(8): 542-548.
- [11] BOSSU P, NEUMANN D, DEL GIUDICE E, et al. IL-18 cDNA vaccination protects mice from spontaneous lupus-like autoimmune disease [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100(24): 14181-14186.

(编辑 刘清海)

(上接第 69 页 from page 69)

- of disease[J]. *Ann Neurol*, 2001, 50(6): 699-707.
- [7] LI J, ADAMS L D, WANG X, et al. Regulator of G protein signaling 5 marks peripheral arterial smooth muscle cells and is downregulated in atherosclerotic plaque[J]. *J Vasc Surg*, 2004, 40(3):519-528.
- [8] OHARA R, MURPHY E P, WHITEHEAD A S, et al. Local expression of the serum amyloid A and formyl peptide receptor-like 1 genes in synovial tissue is associated with matrix metalloproteinase production in patients with inflammatory arthritis[J]. *Arthritis Rheum*, 2004, 50(6):1788-1799.
- [9] CUI Y, LE Y, YAZAWA H, et al. Potential role of the formyl peptide receptor-like 1 (FPRL1) in inflammatory aspects of Alzheimer's disease [J]. *J Leukoc Biol*, 2002, 72(4): 628-635.
- [10] ABSI T S, SUNDT T M 3rd, TUNG W S, et al. Altered patterns of gene expression distinguishing ascending aortic aneurysms from abdominal aortic aneurysms: complementary DNA expression profiling in the molecular characterization of aortic disease[J]. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 2003, 126(2):344-357.
- [11] UEDA K, ARAKAWA H, NAKAMURA Y. Dual-specificity phosphatase 5 (DUSP5) as a direct transcriptional target of tumor suppressor p53 [J]. *Oncogene*, 2003, 22 (36):5586-5591.

(编辑 刘清海)