

· 技术研究 ·

人卵巢组织两种超低温冻存方法的研究

李宇彬, 周灿权, 杨国奋, 王 琼, 麦庆云

(中山大学附属第一医院妇产科生殖中心, 广东 广州 510080)

摘 要: 【目的】探索两种人卵巢组织冷冻方案用于生殖细胞保存的效果。【方法】活检卵巢组织来自 15 名知情同意的手术患者。组织被随机分配到新鲜组、玻璃化冷冻组和慢速冷冻组。观察和比较各组卵巢组织冻融后的原始卵泡形态完整率, 并通过体外培养系统测定培养液中的雌二醇和孕酮水平, 观察和比较冻融后卵巢组织内分泌功能。【结果】本研究中新鲜组、慢速冻融组和玻璃化冻融组的原始卵泡形态完整率分别是 97.6%、72.6%和 80.3%。两冻融组与新鲜组相比明显下降($P < 0.001$), 而在两冻融组间差异并无统计学意义($P=0.237$)。在体外组织培养期间, 两种冻融卵巢组织都能持续分泌雌二醇和孕酮, 两组间差异无统计学意义($P > 0.05$)。【结论】本研究中两种人类卵巢组织超低温冻存的方法是可行的, 可适应不同需要。

关键词: 超低温冻存; 卵巢组织

中图分类号: R714

文献标识码: A

文章编号: 1672- 3554(2006) 06- 0704- 05

Research of Two Methods for Human Ovarian Tissues Cryopreservation

LI Yu- bin, ZHOU Can- quan, YANG Guo- fen, WANG Qiong, MAI Qing- yun

(Department of Assisted Reproductive Medicine, The First Affiliated Hospital of SUN Yat- sen University, Guangzhou 510080, China)

Abstract: 【Objective】 The aim of this study was to explore the effects of two human ovarian tissue cryopreservation protocols for preserving germ cells. 【Methods】 Biopsies of ovarian tissue were collected from total 15 patients after informed consents. The tissues were randomly allocated to fresh, vitrification and conventional slow freezing groups. Morphological integral primordial follicles rates were compared between fresh and the post warming/thawing tissue. Endocrinal functions of the post- cryopreservation tissue were also investigated and compared by estradiol and progesterone detections in in- vitro culture medium every other day. 【Results】 In this study, the morphological integral primordial follicles rates in the fresh, vitrification, and slow- freezing groups were 97.6%, 80.3% and 72.6%, respectively. After warming/thawing, the rates significantly reduced in both freezing groups ($P < 0.001$). No statistically significant differences in normal morphology primordial follicle rates were observed between the two cryopreservation approaches ($P=0.237$). During in- vitro culture, estradiol and progesterone were secreted continuously by the both post- cryopreservation tissue pieces. And there were no statistical differences between the two groups ($P > 0.05$). 【Conclusions】 Our study demonstrates that the two methods for human ovarian tissues cryopreservation are effective and can be fitted for different requires .

Key words: cryopreservation; ovarian tissue

[J SUN Yat- sen Univ(Med Sci),2006,27(6):704- 708]

近年因大剂量放化疗和骨髓移植的广泛应用, 肿瘤治疗效果得到明显改善^[1]。调查提示到 2010 年每 250 个成人中将有 1 人是儿童期恶性肿瘤长期存活者^[2]。但卵巢对有细胞毒性的治疗特别是烷化

剂和放疗非常敏感, 可导致生育和内分泌功能丧失^[3]。而对这些患者行卵巢组织冷冻保存已被证明是有效的^[4,5]。本研究目的是探索建立有效的玻璃化和慢速人卵巢组织冷冻方案以适应不同需要。

收稿日期: 2006-07-25

基金项目: 卫生部临床重点专科([2004]468); 广东省科委科技攻关基金项目(2003 A3020305); 广州市科技计划资助项目(2004Z1- E0101)

作者简介: 李宇彬(1978-), 男, 广东台山人, 博士生, 生殖医学专业; 周灿权, 教授, 博士生导师. E- mail: liyubin97200@163.com

1 材料与amp;方法

1.1 人卵巢组织的收集

2004年10月至2005年5月间,本研究募集了15名签署知情同意书、年龄为22~37(33.1±2.9)岁的妇女。活检卵巢组织是通过其良性卵巢囊肿手术中获得,其中11名进行了腹腔镜手术,其余4名进行了开腹术。在进行囊肿剔除术后,剪下一面积1~2 cm²,附于囊肿上无明显血栓的卵巢组织片,随即卵巢组织片浸泡在添加了人类白蛋白(HSA, SAGE IVF, USA)的Hepes液(SAGE IVF, USA)中,置于冰上,20 min左右送回实验室。术后患者组织进行病理学检查,只有良性病变才纳入本研究。本研究经中山大学附属第一医院伦理委员会批准。

1.2 卵巢组织片的预处理

在立体显微镜下,卵巢组织片所有髓质用手术刀片刮除,剪切成大约5 mm×1 mm×1 mm大小的组织小条。冷冻前组织切割和处理是在室温下添加HSA的Hepes液中进行的,所有操作在1 h内完成。

1.3 玻璃化冷冻和慢速冷冻方案

实验用所有液体都使用0.2 μm孔径过滤器(Millipore, France)进行除菌。以下除标注者外,所使用的试剂都由Sigma公司提供。基础液为添加了体积分数12% HSA、100 IU/mL青霉素和100 μg/mL链霉素的-MEM液(Gibco, BRL)。全部冷冻液用基础液作溶媒。完成上述切割程序后,随机选取2~3条新鲜组织被固定进行组织学分析。其它组织条被随机分配到两组冷冻方案中。进入冷冻方案前,组织条在基础液中浸泡5 min。

1.3.1 玻璃化冷冻方案 以两步法对组织进行脱水: 2.0 mol/L二甲基亚砷(DMSO)+0.1 mol/L蔗糖溶液中浸泡5 min; 2.0 mol/L二甲基亚砷+2.0 mol/L丙二醇(PROH)+0.2 mol/L蔗糖溶液中浸泡5 min。随后立即用消毒好的巴氏管吸取组织条到管口,轻轻晃动让含组织的液滴直接滴入盛有液氮的浅容器中,使用预冷镊子将组织小滴收集装到无菌冷冻管中,置液氮罐保存2个月以上。复苏组织时,冻存的组织滴由冷冻管里取出。立即浸泡于38℃的PBS液中水浴,缓慢晃动,直到表面的冰层近乎完全溶解。再将组织于室温下迅速移到0.5 mol/L蔗糖溶液中置5 min,接着依次在0.25、0.125

mol/L蔗糖溶液中各5 min。最后,解冻的卵巢组织在基础液中漂洗3次,一起放入37℃,体积分数5.5%CO₂湿润培养箱15 min,待后续处理。

1.3.2 慢速冷冻方案 在基础液中添加1.5 mol/L DMSO或添加1.5 mol/L DMSO+0.1 mol/L蔗糖分别作为第一和第二步冷冻保护液。室温下将组织条移到第一步保护液中浸泡5 min,接着将其移到装有1 mL第二步保护液的1.8 mL冷冻管(Nunc, Roskilde, Denmark)中于4℃平衡30 min,最后转到冷冻仪程序化冷冻。慢速冷冻方案如下: 自4℃开始,-2℃/min降到-8℃; -8℃浸泡10 min后,手工植冰,再维持10 min; -0.3℃/min降温到-40℃; -30℃/min降温到-150℃; 迅速投入液氮中,保存2月以上。本方案基本参照Donnez等^[4]应用的方案。解冻时将冷冻管在室温下晃动1 min,然后在37℃水浴2 min; 接着把组织条放入0.25、0.125 mol/L蔗糖浓度梯度液中重吸水。最后,将其在基础液中漂洗若干次,置培养箱中待后续处理。

1.4 解冻后人卵巢组织的培养技术

体外培养系统基本参照Scott的方案^[6]。在基础液中将解冻的组织切割成约1 mm×1 mm×1 mm大小小粒,放入预处理的24孔板(Corning, USA)中。板孔中先置入了Millicell嵌入式培养小皿(Millipore, Sundbyberg, Sweden),小皿底部铺上100 μL稀释Matrigel胶(Becton Dickinson, Stockholm, Sweden)用于支持组织体外生长。每嵌入小皿放两小粒组织。培养液配方为:在-MEM液中加入50 mL/L HSA、10 mL/L ITS、0.5 IU/mL人绝经期促性腺激素(HMG, Livzon, China)、50 μg/mL维生素C、0.47 mmol/L丙酮酸钠、2 mmol/L的L-谷氨酰胺、100 IU/mL青霉素和100 μg/mL链霉素。培养开始时,在小皿内加入150 μL培养液,小皿外则加550 μL。组织在37℃、体积分数5.5%CO₂湿润培养箱中培养14 d。400 μL的小皿外培养液隔天被吸出,换上新鲜培养液。培养后,所有组织粒被固定进行组织学分析。

1.5 组织学分析

在冷冻前后和体外培养14 d后,每位患者的若干小块组织用福尔马林液固定行组织学分析。组织用石蜡包埋4 μm连续切片HE染色。每10个组织切面分析1次,对形态正常和闭锁的原始卵泡进行记数。闭锁卵泡的特征是:卵子胞浆伊红染、核染色质收缩凝集、核膜皱缩和颗粒细胞离散^[7]。

1.6 雌二醇和孕酮的检测

每 48 h 采集的 400 μL 培养液保存在 -20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中待测。放射免疫试剂盒由 LRW (ShenZhen, China) 提供, 检测按说明书要求进行。

1.7 统计学分析

组间原始卵泡形态正常率比较使用 χ^2 检验分析, 两周体外培养两组间激素分泌量比较使用随机配对方差分析, 检验水准 $\alpha=0.05$ 。

表 1 本研究中观察到的各组正常和闭锁原始卵泡形态学情况

Table 1 Proportions of normal and atretic primordial follicles analyzed in this study n (%)

	Fresh	Slow freezing	Vitrification	Slow freezing 2 W- culture	Vitrification 2 W- culture	Total
Normal	121(97.6) ¹⁾	69(72.6) ²⁾	65(80.3)	6(25.0) ³⁾	9(24.3)	270
Atretic	3	26	16	18	28	91
Total	124	95	81	24	37	361

1) Compared among the fresh, slow freezing and vitrification groups, $\chi^2=28.22$, $P < 0.001$; 2) Compared with the vitrification group, $\chi^2 = 1.396$, $P > 0.05$; 3) Compared with the vitrification 2 W- culture group, $\chi^2 = 0.004$, $P > 0.05$

璃化组及慢速冷冻三组共同比较, 原始卵泡形态正常率差别有统计学意义 ($\chi^2=28.22$, $P < 0.001$)。两实验组下降明显; 而两冷冻组间相比差别没有统计学意义 ($\chi^2=1.396$, $P = 0.237$)。另外我们也观察到在人卵巢皮质中, 卵泡分布是呈簇状, 而不是均匀分布 (图 2)。

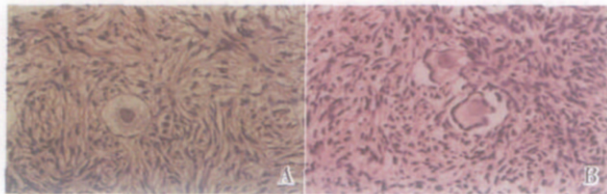


图 1 冻融后原始卵泡形态

Fig.1 The morphology of primordial follicles after cryopreservation (HE, $\times 400$)

A: Typical example of non-damaged human ovarian tissue including a primordial follicle independent on cooling protocols; B: Typical example of damaged follicles after cryopreservation independent on cooling protocols

2.2 体外解冻卵巢组织培养

经过 4-7 d 的体外培养后, 两组中有活力的卵巢组织小粒慢慢变成圆形, 并且有单层的间质细胞缓慢向外生长。因有外迁生长, 体外培养两周后, 两组圆形组织粒直径都会变大 (图 3)。表 1 显示培养后两组的正常和闭锁卵泡的情况。卵泡形态正常率在两冷冻组间的差异无统计学意义 ($\chi^2 = 0.004$, $P = 0.952$)。结果提示, 人卵泡能经受这两种冻融方法,

2 结果

2.1 卵巢组织的组织学分析

在冷冻前、后和培养 14 d 后, 各组合计共 361 个原始卵泡进行了形态学分析 (图 1)。表 1 显示了在新鲜组中 97.6% 原始卵泡保持形态学正常, 玻璃化组和慢速组分别为 80.3% 与 72.6%。新鲜组、玻

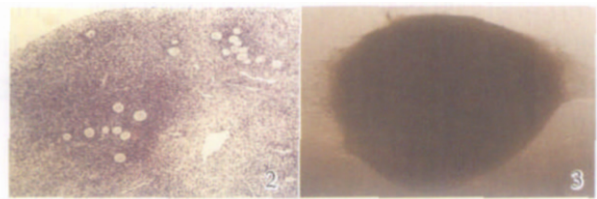


图 2 卵泡在人类卵巢组织中的不规则分布

图 3 卵巢组织在体外培养系统中生长

Fig.2 Irregular distribution of follicles in human ovarian tissues (HE, $\times 100$)

Fig.3 The growth of ovarian tissues in in-vitro culture system ($\times 50$)

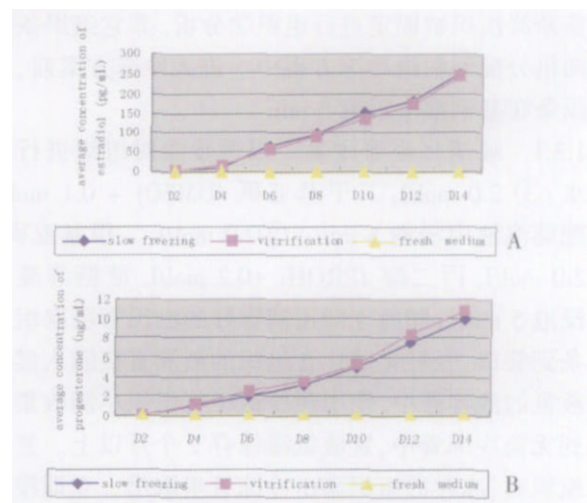


图 4 卵巢组织体外培养中雌二醇和孕酮的分泌

Fig.4 The secretes of estradiol and progesterone of ovarian tissue in in-vitro culture system

A: estradiol; B: progesterone

并且能够在体外培养系统中生长。

2.3 体外培养中雌二醇和孕酮的生成

图 4.a 和 b 示在体外培养 2 周中,培养液平均雌二醇和孕酮水平不断增高 ($F=72.1$ 和 55.6 , $P<0.001$),同期组间雌二醇和孕酮浓度差别无统计学意义 ($F=1.28$ 和 1.37 , $P=0.96$ 和 0.93)。

3 讨论

本研究探索建立有效的人卵巢组织冷冻保存方法。组织学和体外培养的结果表明,人卵巢组织能较好地经受玻璃化和慢速冷冻过程。而且利用上述卵巢组织培养体系,解冻后的组织能体外生长,并能保持一定的内分泌功能。

3.1 卵巢组织冷冻保存的优势

人卵巢组织超低温保存可为因恶性肿瘤治疗或遗传等其它因素而将导致卵巢功能不全甚至丧失的女性提供生育和内分泌功能保存的可能性。解冻后的组织可通过自体移植或体外培养的方法加以利用。冻存卵巢组织,特别对于肿瘤病人,比冻存卵子或胚胎有着许多优势^[8]。首先,育龄妇女卵巢皮质中含有大量处于休眠状态原始卵泡。其次,卵巢组织冷冻不但能保存生育能力,还可以保存其自身性激素分泌功能。后者是卵子和胚胎冻存所不能实现的。第三,卵巢组织可以不依赖月经周期,比较容易地通过腹腔镜或开腹术获得。第四,因卵巢组织中原始卵泡处于很低代谢状态,其中的卵子处于第一次减数分裂前期,而且没有透明带,只有少量冷敏感性胞内脂质,所以原理上比成熟卵子更能耐受冻融。最后,原始卵泡没有种属间明显差异,很适合作为基础研究模型。正由于原始卵泡在总卵泡数中占绝大多数(>90%)而其它类型卵泡百分率在不同标本间常有较大波动,本研究集中对原始卵泡形态进行评估。

3.2 玻璃化与慢速冷冻方法应用

由于慢速冷冻方法比较成熟,在许多研究领域已经得到广泛的使用。包括人类在内的许多物种中应用慢速冷冻技术保存卵巢组织已经获得许多令人惊叹的成果^[4,5,9]。玻璃化冷冻与慢速冷冻的主要差别包括冷冻速率和冷冻保护剂的使用。前者通过高浓度冷冻保护剂的使用,在快速降温中(常常会超过 $1\ 500\ ^\circ\text{C}/\text{min}$)能形成一种玻璃状的固体,使胞浆内外的水物质迅速通过 $-5\ \sim\ -15\ ^\circ\text{C}$ 的冷冻敏感

区,避免了胞浆内冰晶的形成。1985年,Rall等^[10]首先使用玻璃化冷冻法进行鼠类胚胎的冷冻。现在,此冷冻方法已经在较多方面得到应用,包括人类胚胎^[11]、卵子^[12]和人类干细胞等^[13]。然而,人卵巢组织玻璃化冷冻方面的研究资料还很有限。各种各样的载体被应用到玻璃化冷冻研究中,这包括冷冻小管、开放麦管(OPS)、电子显微镜铜网格、小尼龙螺旋圈、尼龙筛和冷冻环等等。所有的载体适合目前各种不同需要。卵巢组织与单个分离的细胞或细胞小群非常不一样。它有特定的空间立体结构、多种细胞类型、高细胞密度和一套血管系统。前述使用的载体很可能不适合组织的玻璃化冷冻保存。一些载体,包括冷冻小管、开放麦管等,因管壁相对较厚导致降温速度下降;另外一些,如电子显微镜铜网格、尼龙螺旋圈、尼龙筛和冷冻环等价格昂贵,并且占用大量空间,不利于储存。本研究采用了改良的玻璃化冷冻方法,使用无载体的方法进行卵巢组织的玻璃化冷冻尝试。解冻后,组织学分析显示玻璃化冷冻组中 80.3%的卵泡维持了正常形态,与目前其它文献报道的 70%~90%的冷冻后正常形态原始卵泡率大体相当^[14,15]。但与先前的这些研究比较,本玻璃化冷冻方法显得更为便利。2005年 Yeoman 等^[16]用相似的方法在灵长类卵巢组织上进行玻璃化冷冻研究,也取得了良好的效果。而在人类卵巢组织冷冻保存中尚未见相似报道。然而,玻璃化冷冻方法是全手工操作,虽单份样本操作效率很高,但如果样本量较大,就会使操作研究非常繁复和劳累,并且随操作时间延长,无疑使后冷冻的组织较先冷冻的效果会明显变差。慢速冷冻却是机器辅助批量处理的,虽耗时但每次可同时处理较多组织,有其不可完全替代的优势。

3.3 体外培养对组织活力的评估

在两组解冻后 2 周的体外培养中,伴随着组织块的生长,雌二醇和孕酮水平不断增高。提示解冻后的卵巢组织能保持一定程度的性激素分泌功能。体外培养是较好反映卵巢组织冻融效果的简便手段。然而,值得注意的是 Wotiz 等^[17]的研究显示,除了卵泡外,间质也可能分泌雌激素。因此,冻融后卵巢组织的内分泌功能与其生育潜能之间的关系值得进一步研究。

综上所述,本研究探索了人卵巢组织慢速和改良的无载体玻璃化冷冻保存方法。结果显示它们是有用的,经过更好的完善后,相信可用于不同情况

需要的冷冻保存; 并有希望成为将来肿瘤病人超低温冻存卵巢组织和建立人卵巢组织库的基础技术。

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] BLATT J. Pregnancy outcome in long- term survivors of childhood cancer[J]. Med Pediatr Oncol, 1999, 33(1):29- 33.
- [3] DONNEZ J, GODIN P A, QU J, et al. Gonadal cryopreservation in the young patient with gynaecological malignancy[J]. Curr Opin Obstet Gynecol, 2000, 12(1): 1- 9.
- [4] DONNEZ J, DOLMANS M M, DEMYLLE D, et al. Livebirth after orthotopic transplantation of cryopreserved ovarian tissue[J]. Lancet, 2004, 364(9443): 1405- 1410.
- [5] 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.
- [6] SCOTT J E, CARLSSON I B, BAVISTER B D, et al. Human ovarian tissue cultures: extracellular matrix composition, coating density and tissue dimensions [J]. Reprod Biomed Online, 2004, 9(3):287- 293.
- [7] GOUGEON A. Dynamics of follicular growth in the human: a model from preliminary results [J]. Hum Reprod, 1986, 1(1):81- 87.
- [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.
- [9] OKTAY K, BUYUK E, VEECK L, et al. Embryo development after heterotopic transplantation ovarian tissue[J]. Lancet, 2004, 363(9412):837- 840.
- [10] RALL W F, FAHY G M. Ice free cryopreservation of mouse embryos at - 196 by vitrification [J]. Nature, 1985, 313(6003):573- 575.
- [11] SON W Y, LEE S Y, CHANG M J, 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(3):398- 401.
- [12] 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(4):1017.
- [13] ZHOU C Q, MAI Q Y, LI T, et al. Cryopreservation of human embryonic stem cells by vitrification [J]. Chin Med J 2004, 117(7):1050- 1055.
- [14] 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.
- [15] FABBRI R, VENTUROLI S, et al. Ovarian tissue banking and fertility preservation in cancer patients: histological and immunohistochemical evaluation [J]. Gynecol Oncol, 2003, 89(2): 259- 266.
- [16] YEOMAN R R, WOLF D P, LEE D M. Coculture of monkey ovarian tissue increases survival after vitrification and slow- rate freezing[J]. Fertil Steril, 2005, 83 (Suppl 1):1248- 1254.
- [17] WOTIZ H H, DAVIS J W, LEMON H M, et al. Studies in steroid metabolism. Part V. The conversion of testosterone- 4- C14 to estrogens by human ovarian tissue [J]. J Biol Chem, 1956, 222(1):487- 501.

(编辑 张恩健)