

冷冻后人胚胎卵巢细胞团对 hMG 作用的 内分泌与形态学反应^①

周力学^② 杨冬梓 邝健全

(中山医科大学孙逸仙纪念医院妇产科, 广州, 510120)

提 要 妊娠 20~24 周人胚胎卵巢经改进的超速冷冻仍具有内分泌功能。这种冷冻后的胚胎卵巢细胞团体外培养时, 培养天数与细胞团的 E₂ 分泌能力呈负相关, 形态学检查与此结果相吻合。冷冻后人胚胎卵巢的细胞团体外培养时培养液中人绝经期促性腺激素(hMG)最适浓度为 50 IU/L, 培养的最适天数为 1~3d。这对人胚胎卵巢细胞团同种异体移植时受体促性腺激素水平内及培养时间的选择与设定有重要指导意义。

关键词 胚胎卵巢; 超速冷冻保存; 人绝经期促性腺激素; 体外培养

中图分类号 R711

已知进行新西兰兔胚胎卵巢细胞团同种异体移植前移植物的体外短期培养有利于移植存活^[1], 在体外培养期间, 适当比例的促性腺激素^[2]有利于胚胎卵巢细胞的生长和分泌 E₂。本研究旨在探索移植前经冷冻保存的胚胎卵巢的细胞团体外培养时培养液中人绝经期促性腺激素(hMG)的最适浓度及培养时间, 为临床进行胚胎卵巢细胞团移植时供体预处理和受体促性腺激素水平的选择提供科学依据。

1 材料和方法

1.1 胚胎卵巢来源 本研究选用妊娠周数^[2]为 20~24 周(中位数 21.5 周)水囊引产的人胚胎卵巢 20 只, 均于分娩后 30min~2h 内无菌条件下取出。

1.2 冷冻方法 将刚取出的人胚胎卵巢经修剪、用无钙镁 Hanks 液漂洗 3 次后投入冷冻保护液^[3](4mol/L 甘油+0.25mol/L 蔗糖)中, 室温下加压(液相压缩 1/20)平衡 20min, 置-50℃冰箱内 10min, 然后转入液氮罐中距液氮表面 2cm 处(约-100℃),

5min 以后投入液氮之中(-196℃), 保存时间 1~2 个月。

1.3 复温 将盛有胚胎卵巢的小瓶从液氮罐中取出, 立即投入 37℃水浴中, 30s 后取出室温下置稀释液(1mol/L 蔗糖中 1min, 最后用 RPMI 1640 液漂洗 3 次, 共 20min)。

1.4 实验分组 随机将 20 只待用人胚胎卵巢平均分为 5 组, 每组培养液中 hMG 的最终浓度见表 1。

1.5 细胞团培养 将复温后的人胚胎卵巢放进一小瓶中, 剪碎制成糊状^[1], 移入培养板的小孔中, 并用 RPMI₁₆₄₀ 液冲洗小瓶, 使培养孔中冲洗液体积为 5ml(其中含 hMG 的最终浓度见表 1), 随后置 37℃、5%CO₂ 的培养箱中培养 10d, 隔天换液, 换出液置-20℃冰箱中保存待测 E₂ 浓度。

表 1 各培养组例数及 hMG 浓度

组别	例数	浓度(IU/L)
G ₀	4	0
G ₂₅	4	25
G ₅₀	4	50
G ₁₀₀	4	100
G ₂₀₀	4	200

① 卫生部科研基金资助项目;

② 第一作者, 36 岁, 男, 讲师

1.6 培养细胞团形态观察 培养第 1、3、5、6、8、10 天(简为 d1、d3、d5、d6、d8、d10)用 Olympus 倒置显微镜观察并摄影,同时将细胞团标本离心、固定后送电镜检查。空泡线粒体的计算:在 10 个不同视野中各数 10 个线粒体,计算空泡线粒体的百分数。

1.7 试剂 RPMI 1640 由 Sigma 公司产; hMG 由珠海丽宝药厂产,其中 FSH 及 LH 浓度均为 75 IU/支; E₂-RIA 药盒由美国 DPC 公司生产。

1.8 统计学处理 变异系数(CV)、均数 \bar{x} 、方差齐性检验、析因设计的方差分析、*q* 检验及直线回归。

2 结果

妊娠 20~24 周人胚胎卵巢(经冷冻保存)细胞团体外培养时,不同培养时间及不同 hMG 浓度下,细胞团的功能与形态有较明显差别。

2.1 体外培养细胞团在不同培养时间的 E₂ 分泌水平

各实验组细胞团在开始培养后 d1、d3、d5、d6、d8、d10 时,其培养液中 E₂ 浓度均值($n=4$)见表 2。对上述图表所涉及的原始数据进行析因设计的方差分析之后发现,在 G₀~G₂₀₀ 各组中,随培养天数的增加,各组培养液中 E₂ 浓度明显下降,差异有统计学意义,其中 G₅₀ 组每天 E₂ 浓度的 CV=44.7%,培养过程中 E₂ 均值为 32.4 pmol/L, $P=0.003$;其余 4 组各自每天 E₂ 浓度的 CV 按 G₀→G₂₀₀ 顺序为 52.6%、57.2%、72.9%、82.9%,培养过程中 E₂ 均值为 20.2、20.0、38.4 和 47.30 pmol/L, P 值均小于 0.0001,提示 G₅₀ 组培养液中 E₂ 浓度随时间而下降的速率较慢。

在培养 d1、d5 时,随着培养液中 hMG 浓度增加,培养液中的 E₂ 浓度增加明显($P<0.0001$),各组 E₂ 浓度的 CV 分别为 57.

8%和 38.1%,均值分别为 65.2 pmol/L 和 25.0 pmol/L;培养 d3 时,虽培养液中 hMG 浓度增加,但培养液中 E₂ 浓度较稳定($P=0.001$),各组 E₂ 的 CV 为 42.1%,均值为 41.1 pmol/L;培养 d6、d8 时,随培养液中 hMG 浓度增加,培养液中 E₂ 浓度也较稳定($P=0.007$),各组 E₂ 浓度的 CV 为 27.2%和 34.0%,但分泌量都不到培养 d3 时的一半,分别为 17.7 pmol/L 和 17.9 pmol/L;培养 d10 时,培养液中 hMG 浓度对人卵巢细胞团 E₂ 分泌已无明显影响($P=0.263$)。

进一步作统计分析表明,将所有入胚卵巢细胞团培养物($n=20$)各自在培养 d1、d3、d5 时的 3 个 E₂ 测定值对培养天数作直线回归,得 20 个斜率及 5 个平均斜率(按 G₀~G₂₀₀ 顺序分别为 -5.03, -5.70, -1.81, -16.12, -21.71)其中 G₅₀ 组的斜率最小(-1.81),有统计学意义($P<0.0001$)。提示在培养 d3 以内, G₅₀ 组中的 E₂ 的浓度较为稳定,随时间而下降的速率最慢。

G₅₀ 组在不同培养天数时 E₂ 浓度值居中,且 CV 及回归方程的斜率最小,且培养 d3 时, E₂ 随 hMG 浓度变化幅度较小,提示 G₅₀ 组胚胎卵细胞团在培养过程中分泌 E₂ 能力较好,细胞功能衰退最慢,且一般培养 3d 时收获为宜(表 2)。

2.2 G₅₀ 组不同培养时间的细胞团形态

G₅₀ 组培养 d1、d3、d5、d6、d8、d10 时的细胞团形态的光镜及电镜观察与同期的 E₂ 水平结果相吻合(附图)。光镜下,培养前、培养 d1 胚胎卵巢细胞团形态无明显差别,其透光性良好,细胞圆而饱满,胞膜光滑,背景清晰;培养 d3,细胞团的细胞稍小,个别细胞透光减弱,背景中偶见细胞裂解碎片,其余变化同前;培养 d5,部分细胞缩小变暗,透光性减弱,胞膜不光滑。此时,因细胞数减少,背景中细胞裂解碎片反而减少;培养 d6 开始,大部分细胞缩小变暗,形态不规则,细胞稀少,背景模糊。电镜下,培养前和培养 d1 人胚胎卵巢细胞团细胞中,细胞器形态无明显差别,线

粒体形态正常,嵴清晰,核膜完整;培养 d3, 线粒体肿胀并空泡化发生率小于 1/3,核膜仍完整;培养 d5,线粒体肿胀、嵴稀疏,线粒

体空泡化发生率大于 1/3,可见核膜松解;培养 d6 开始,空泡线粒体的发生率大于 2/3,无正常线粒体,核膜崩解消失。

表 2 冷冻后人胚卵巢细胞团体外培养时的 E₂ 分泌($\bar{x} \pm s$)

组别	培养时间					
	d1	d3	d5	d6	d8	d10
G ₀	35.9±7.1	30.5±4.6	15.9±5.8	17.3±1.9	10.8±4.0	10.5±1.0
G ₂₅	39.9±3.6	20.6±5.7	17.0±2.4	10.6±6.9	12.9±0.6	11.5±0.6
G ₅₀	40.8±11.0	38.1±8.2	33.6±11.0	17.2±3.3	15.8±2.6	15.2±0.7
G ₁₀₀	89.6±6.5	52.3±9.6	25.3±15.0	19.6±9.8	25.6±1.9	18.0±3.5
G ₂₀₀	120.0±3.2	64.1±18.0	33.4±15.0	23.9±6.4	24.8±4.6	17.6±7.8

注:所用胚胎胎龄为 20~24 周,E₂ 单位为 pmol/L

3 讨论

Gondos 等^[3]早已报道,胚胎期卵巢即具有分泌 E₂ 的能力;最近雷英等^[2]也证实了妊娠 16~24 周的胚胎卵巢可分泌 E₂。但人类胚胎卵巢经超速冷冻以后,是否还具有分泌 E₂ 的能力,在体外培养时对不同浓度促性腺激素(接近生理浓度)的反应如何,以及最适浓度怎样尚不清楚。这些问题的解决对于进行人类胚胎卵巢细胞团移植前的卵巢冷冻保存,受体内分泌环境的设定与维持,有着十分重要的临床意义。

本实验将超速冷冻法^[4,5]加以改进用于保存人胚胎卵巢(整体)。因胚胎卵巢太小,难以用冷冻保护液灌注,所以在冷冻之前,采用了无钙、镁 Hanks 液多次漂洗、加压渗透和适当延长与冷冻保护液的平衡时间等措施,使冷冻保护液迅速达到胚胎卵巢细胞周围并均匀分布,以加强冷冻保护液的同步化作用。经冷冻保存的胚胎卵巢细胞的线粒体较新鲜卵巢细胞的少,偶见线粒体轻度肿胀,而线粒体形态的其它特征及其它细胞器常无明显差别。冷冻保存的人胚胎卵巢制成细胞团后做体外培养,各实验组均可分泌一定浓度 E₂,说明冷冻保存的胚胎卵巢具有相当的功能。

冷冻后人胚卵巢的细胞团培养环境。

本研究将系列等量的人胚胎卵巢细胞团分别加入适量 hMG,使其每孔最终浓度为 0、25、50、100、200 IU/L,结果显示不同浓度的 hMG 对细胞团分泌 E₂ 的量和分泌方式均有一定的影响。在各实验组中,G₅₀组细胞团的分泌 E₂ 能力最好,细胞团功能衰退速度慢,提示人胚胎卵巢细胞团的 E₂ 分泌功能诱发与维持需要一定浓度 FSH(约 50IU/L),这与卵巢切除后或刚进入绝经期妇女体内 FSH 水平相接近,但高于生理剂量的 FSH 会加速靶细胞的衰竭,这与雷英等^[2]的有关报道中大剂量 FSH/LH 对体外培养胚胎卵巢影响的资料类似。

人胚胎卵巢(经冷冻)细胞团体外培养时 E₂ 分泌与培养时间的关系。本研究结果显示,随培养时间延长,细胞团分泌 E₂ 的能力明显下降,到培养 d5,E₂ 水平下降到最低点,以后 E₂ 水平不再升高,可能与细胞团内部供氧不足及代谢产物堆积有关。透射电镜显示,培养 d5 以后,胚胎卵巢细胞的线粒体已出现水肿以至空泡化^[6]等不可逆的损害。

总之,本研究结果提示:人类胚胎卵巢经改进的冷冻保存是可行的,其功能和形态保存效果可初步满足临床胚胎卵巢移植的需要。胚胎卵巢细胞团的生长与 E₂ 分泌都需要一定量的 hMG,我们认为人胚胎卵巢细胞团体外培养 1~3d 为宜,培养液中 hMG 最适

浓度约为 50 IU/L,这与人类卵巢全切除后不久或刚进入绝经期妇女体内 FSH 水平相仿,提示进行人类胚胎卵巢细胞团移植时,受体一般不宜使用促性腺激素(如 hMG),而且应在其血浆促性腺激素水平不太高(如 FSH 接近 50 IU/L)时或使用雌激素将体内促性腺激素水平调降后进行移植较为有利。

(本文图见插页 2)

(本文数据处理得到统计学教研室游志颖老师大力协助,谨表衷心感谢)

参 考 文 献

- 1 周力学,邝健全,吕超.兔胚胎卵巢细胞团同种移植的初步研究.中山医科大学学报,1992,13(4):41
- 2 雷英,郑怀美.人胎儿卵巢培养时 E₂ 分泌.上海医科大学学报,1991,18(1):53
- 3 Gondos, George FW, Wilson JD. Granulosa cell differentiation and estrogen synthesis in the fetal rabbit ovary. *Riol Reprod*, 1983,23:791
- 4 Fahning ML, Garcia MA. Status of cryopreservation of embryos from domestic animals. *Cryobiology*, 1992, 29(1):1
- 5 王燕蓉,刘斌.家兔桑椹胚超速冷冻法研究及胚胎存活力的判断.生殖与避孕,1991,11(2):12
- 6 Cheville NS. *Cell pathology*. 2nd ed. India: Surjeet Publications, 1989. 118

(1993-12-24 收稿 1994-08-29 修回)

ENDOCRINIC AND MORPHOLOGICAL REACTIONS OF CELL CLUSTERS OF SUPERRAPID FROZEN HUMAN FETAL OVARIES TO A SERIAL hMG CONCENTRATIONS

Zhou Lixue Yang Dongzi Kuang Jianquan

(Department of Obstetrics and Gynecology, Sun Yat-Sen Memorial Hospital.
Sun Yat-Sen University of Medical Sciences, Guangzhou, 510120)

Fetal ovaries at 20~24-weeks of pregnancy which had gone through freezing by improved method have fairly good function of endocrine. When clusters from the ovaries were cultured in vitro, its function in endocrine got worse with cultured days increased, so did its construction in morphology. In the clusters cultured in vitro, the most appropriate concentration of hMG in culture media was about 50mIU/ml, the most appropriate time cultured was 1~3 days. It is very important to select and establish endocrine environment before homotransplantation of human fetal ovaries were done.

Key words fetal ovaries; surperrapid frozen perservation; hMG