

微波复温对人胚胎卵巢细胞团形态 与 E₂ 分泌功能的影响^①

周力学^② 邝健全 吴义方^③ 麦美琪

(中山医科大学孙逸仙纪念医院妇产科, 广州, 510120)

提 要 本研究用 8 对超速冷冻保存的人胚胎卵巢进行配对复温方法对比。在每对卵巢中, 1 只用 37℃ 微波复温, 另 1 只用 37℃ 水浴复温。通过检测复温后卵巢的超微形态及 E₂ 分泌功能, 发现微波复温组胚胎卵巢细胞的超微形态及 E₂ 分泌功能均优于水浴复温组, 提示超速冷冻保存的胚胎卵巢采用微波复温效果较好。

主题词 微波; 卵巢/超微结构; 雌二醇/分泌; 采暖

中图分类号 R 711

已知水浴复温过程对被冷冻的胚胎组织有一定的损伤, 其机理可能是复温的不均一性引起细胞内冰晶再形成所致^[1], 而微波对物体加热具有均匀、同步的特点^[2]。故利用微波进行冷冻卵巢复温, 减少冷冻损伤, 提高卵巢移植成活率。本研究目前国内外尚未见报道。

1 材料和方法

1.1 选材及分组

1.1.1 选材 选用妊娠 17~24 周(平均 21 周 2d)水囊引产的新鲜或经超速冷冻^[3]保存 6~11 个月的人胚胎卵巢。

1.1.2 实验分组 微波复温组(microwave group, MG)与水浴复温组(water bath group, WG)配对, 共 8 对卵巢; 新鲜组(fresh ovary group, FG)与 MG 组配对, 累积 5 对卵巢。

1.2 复温方法

1.2.1 37℃ 微波复温 将 8 个分别盛 1 只冷冻卵巢的小瓶(直径 1cm, 内装 2cm 高冻结物)放入微波炉(接调压器)转盘中央, 排成一圈, 把火力旋钮旋至 65W 挡, 起启动加温 2min 取出。

1.2.2 37℃ 水浴复温 将 8 只水浴复温卵巢连瓶置 37℃ 水浴箱内 2min 取出, 复温后在 25℃ 置 1mol/L 蔗糖、1640 培养液中分别漂洗 10min。

1.3 细胞团悬液制备及细胞团培养

按细胞团制备法^[3]将复温后胚胎卵巢逐个制成细胞团悬液分置于培养孔中, 加无血清 1640 培养液, 使终体积为 4ml。培养第 1, 2, 3 天(d1, d2, d3)各取培养液 3ml 置 -20℃ 下待测雌二醇(E₂), 卵泡刺激素(FSH), 黄体生成素(LH)浓度; FG 组只培养 24h, 留培养液测 E₂ 浓度。

1.4 电镜标本的取材和固定

从 MG 组、WG 组及 FG 组中分别随机选 4、4、2 例制电镜标本。取材部位是其长轴的正中及一端的切面, 厚约 1mm, 标本用 2.5% 戊二醛-多聚甲醛固定液固定, 送中山医科大学电镜室作电镜常规制片。

1.5 激素测定及仪器

用 Serono 酶免(MAIA)药盒测定激素; SMC-E100E 微波炉, Serono-1 型酶标仪。

1.6 统计方法

配对 *t* 检验。

2 结 果

2.1 微波复温、水浴复温及新鲜胚胎卵巢的电镜特征

MG 组: 电镜下分别观察胚胎卵巢端切面和正中切面中直径 < 8~10μm 的卵泡细胞及间质细胞, 见细胞边界尚清晰, 细胞器清晰且量多, 线粒体多数

① 本校科研基金资助项目;

② 第一作者, 1957 年出生, 男, 讲师;

③ 中山医科大学电镜室

正常,嵴清晰,空泡线粒体较少,核膜可辨,核仁大呈网状,见图1。WG组,端切面同类细胞边界较清,线粒体较少,嵴断裂及空泡线粒体多见,核染色质凝聚。正中切面可见“中心坏死现象”(3/4),即该处细

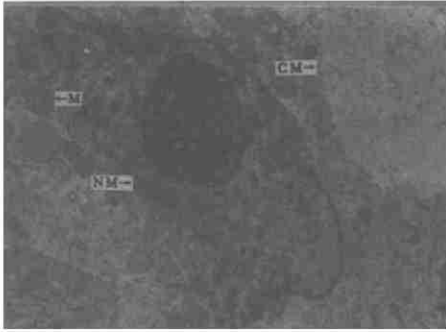


图1 微波复温人胚卵巢

细胞膜(CM)、核膜(NM)可辨,线粒体(M)形态基本正常

胞边界模糊,胞浆出现致密小体,细胞器完全消失,核固缩,见图2。FG组,各切面细胞膜清晰,线粒体形态正常量多,嵴清楚,核膜核仁清晰正常。图略。

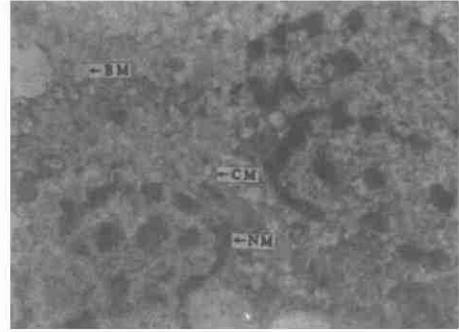


图2 水浴复温人胚卵巢

CM、NM 边界较模糊,M 较少,可见空泡线粒体(BM)

2.2 微波、水浴复温胚胎卵巢的细胞团在不同培养时间的 E₂ 分泌[ng/L](见附表)

培养第1、2天,MG组细胞团分泌 E₂ 浓度高于 WG 组,培养第3天,两组 E₂ 浓度已无差异。

附表 微波、水浴复温后不同培养时间胚胎卵巢细胞 E₂ 分泌($\bar{x} \pm s$)

d1		d2		d3	
MG ¹⁾	MG	MG ²⁾	MG	MG ³⁾	MG
417.1 ± 211.8	277.5 ± 131.5	202.9 ± 47.5	172.6 ± 44.5	107.7 ± 15.1	103.5 ± 13.3

注:与 WG 组比较 1)、2) $P < 0.01$, 3) $P > 0.05$, $n = 8$

2.3 新鲜、微波复温后人胚卵巢的细胞团 E₂ 分泌

FG 组细胞团培养 24h 的 E₂ 分泌量均值 639.2 ± 52.9 ng/L, 高于微波组 553.1 ± 47.4 ng/L, $P < 0.01$, $n = 5$ 。

2.4 培养物中 FSH 及 LH 水平及代谢

培养第1天时,各组($n_1 \sim 4$)FSH 浓度的检出率为 4/4,其中 MG 组均值 1.82 ± 0.94 IU/L, WG 组为 1.33 ± 0.30 IU/L, FG 组为 1.27 ± 0.62 IU/L, 培养第2、3天时,各组 FSH 检出率均为 0/4 (< 0.2 IU/L)。LH 情况类似。

3 讨 论

3.1 微波复温的均一性是区别于水浴复温的主要特点

在水浴复温卵巢的中切面电镜标本中可见明显“中心性坏死”。因水浴复温是由外向内通过传导进行,具不均一性,常导致细胞内冰晶再形成^[1]引起组织损伤加重,而微波复温时胚胎卵巢内各点产热是相同的^[1],且本实验中待复温的冻结物厚度 1cm,在 2450MHz 微波有效穿透厚度^[2](2~4cm)之内,因而可有效地阻止复温时细胞内冰晶再形成,减少卵巢细胞损伤,且适量的微波可刺激细胞代谢,抑制自由基氧化^[3],降低组织中毒性产物如自由基、过氧化物,利于复温对象存活。

3.2 微波复温及水浴复温后的胚胎卵巢细胞形态与功能联系

微波复温组较水浴复温组 E₂ 分泌功能强,微波复温组卵巢颗粒细胞的线粒体形态优于、数量多于水浴复温组,因而保证了微波组细胞胞浆及内织网中 E₂ 合成所需的能量。

3.3 培养物中微量 FSH 和 LH 的来源

培养 24h 后原来不含 FSH/LH 的培养液中测到接近可测值下限的 FSH/LH 及作者的另一组资料(n=4)脐血 FSH 浓度为 34.2 ± 2.7 IU/L, 相应母血 FSH 浓度为 0.63 ± 0.12 IU/L, LH 情况类似, 提示培养物中微量促性腺激素来自胚胎卵巢微循环, 其分泌源很可能是胎儿垂体, 其浓度在培养 24h 后至可测值以下, 主要原因可能是加入新鲜培养液的稀释作用。

3.4 微波复温的安全性

常用医疗及家用微波发生器的频率为 2450 MHz, 波长 12.5cm^[2]。一般认为, 波长 $< 10^{-4}$ cm 的辐射是人体发生突变的主要因素, 遗传学家更注意的是波长 $< 10^{-6}$ cm 的射线^[4]。目前, 单次短时(< 6 分钟)、低强度(< 65 W)照射尚未见有引起上述损伤

及致癌的报道^[2], 更深入的问题有待进一步研究。

参 考 文 献

- 1 刘金钢, 刘作斌. 低温医学. 北京: 人民卫生出版社, 1993. 28
- 2 刘普和, 邝华俊, 吴幸生, 等. 医用物理学. 北京: 人民卫生出版社, 1980. 486
- 3 周力学, 杨冬梓, 邝健全. 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, 中山医科大学学报, 1994, 15(4): 265
- 4 陈正宜, 张金栋. 实用人类遗传学. 北京: 科学技术文献出版社, 1992. 222

(1995-02-11 收稿 1995-07-05 修回)

INFLUENCE OF MICROWAVE AND WATERBATH THAWING ON MORPHOLOGY AND ENDOCRINE OF CELL CLUSTERS OF SUPERRAPID FROZEN IN HUMAN FETAL OVARIES

Zhou Lixue Kuang Jianquan Wu Yifang Mai Meiqi

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

In this study a comparison of thawing methods was done by taking 8 pairs of human fetal ovaries super-rapid frozen. One frozen ovary was thawed by microwave, the other one by waterbath. We found that the morphology and estradiol secretion function of the ovarian cells in microwave group were better than those of waterbath group. The findings suggest that it should be better that the superrapid frozen human fetal ovaries were thawed by microwave.

Subject headings microwaves; ovary/ultrastructure; estradiol/secretion; heating