

## ·综述·

## 玻璃化冷冻卵母细胞及卵巢组织研究进展

高 静综述 蔡 霞审校

**【摘要】** 玻璃化冷冻技术近年已广泛应用于生殖领域,尤其是在女性生育力的储备方面展示其特有的优势。目前胚胎玻璃化冷冻已较成熟,并应用于临床。首次卵母细胞玻璃化冷冻的成功以及实验动物卵巢组织成功移植并获得分娩给研究带来无限希望,但目前仍处于实验阶段,研究者企图从不同角度解决难题。卵母细胞冷冻后,细胞结构的易损伤性造成的低复苏率,以及对卵巢组织玻璃化冷冻的可行性探索,对生殖领域提出新挑战。由于卵巢组织冻存与卵母细胞的冻存有着密不可分的联系,就两者国内外新进展做综述。

**【关键词】** 卵母细胞; 卵巢组织; 玻璃化冷冻; 冷冻保护剂; 冻存

**Progress on Vitrification of Oocyte and Ovarian Tissue** GAO Jing, CAI Xia. Reproductive Center, the First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University (GAO Jing); Department of Gynaecology and Obstetrics, the Armed Police Hospital of Xinjiang, Urumqi 830054, China(CAI Xia)

**【Abstract】** Vitrification technology has been widely used in reproduction in recent years, especially its unique advantages in the reservation of female fertility. At present, the embryo vitrification has been applied in clinic with its more mature technology. The first success of oocyte vitrification and the transplantation of animal ovarian tissue with success delivery bring more hope to current studies, but the technique is still in experimental stage, and researchers are trying to solve problems from different aspects. The low recovery rate of oocyte caused by cell structure injuries and the exploration on feasibility of ovarian tissue vitrification are new challenges for reproduction. According to the close relationships between ovarian tissue vitrification and oocyte vitrification, this article reviews the recent progress of the two aspects.

**【Key words】** Oocyte; Ovarian tissue; Vitrification; Cryoprotectant; Cryopreservation

(J Int Reprod Health/Fam Plan, 2009, 28: 242-245)

近年来随着玻璃化冷冻方法的应用,卵母细胞冷冻后的妊娠率有了阶梯性提高的同时,也为卵巢组织的冻存提供新思路。这为女性生殖能力的贮存带来前所未有的广阔前景。在探索这种新方法在生殖领域的应用过程中,许多技术仍不完善,卵母细胞的玻璃化冷冻仍未广泛应用于临床,而卵巢组织玻璃化冷冻的可行性也有待进一步验证,本文仅对近期这两方面的新进展进行阐述。

#### 玻璃化冷冻原理

早在 1973 年, Luyet 就证实液体的凝固可分为两种形式:一种是晶体化,液体中的分子呈有序排列;另一种为非晶体化即玻璃化,液体中的分子呈无序排列,保持未凝固前的状态。玻璃态介于液体和晶体之间,跨膜物质浓度和渗透压差别不大,细胞膜不易损伤。在玻璃化冷冻过程中,高浓度冷冻保护剂在冷冻过程中固化,形成无结构的玻璃态,由于其质点不规则排列,能始终保持溶液的水分子

和离子分布,使跨膜物质的浓度和渗透压差别不大,从而避免了细胞内形成的冰晶对细胞的机械性损伤,也消除了细胞外冰晶形成引起的理化损伤。玻璃化冷冻能大幅度提高冷冻速率,使细胞迅速度过温度危险区,减少了对胚胎和卵细胞的透明带、细胞骨架、膜完整性等的损伤。自玻璃化冷冻鼠胚胎首次成功后,该技术已广泛应用于卵母细胞和卵巢组织的冷冻。

#### 玻璃化冷冻人卵母细胞

Yoon 等将体外受精-胚胎移植(IVF-ET)患者多余的卵细胞进行玻璃化冷冻:玻璃化保存的卵细胞解冻后妊娠率为 21.4%,每次胚胎移植种植率为 6.4%(8:125),认为用玻璃化法保存人类卵细胞可行。1999 年 Kuleshova 等首先应用玻璃化于人卵母细胞冷冻并获得成功,迄今为止卵母细胞冻融技术已探索近二十年,但因卵母细胞具有胞质丰富、表面积/体积比值小等特点,冷冻过程中纺锤体及细胞骨架的易受损伤性,所以解冻后存活率不高。

作者单位:830054 乌鲁木齐,新疆医科大学第一附属医院生殖助孕中心(高静现在武警新疆总队医院妇产科)

### 一、玻璃化冷冻载体和程序的改进

玻璃化冷冻技术主要是以提高冷冻和解冻的速率为基本目的。共同特点就是采用微小冷冻载体,尽可能减少保护液的用量以提高速率。快速降温有利于玻璃化形成,所以为提高热传导性采用各种载体,主要有麦管、拉细麦管(开放、封闭)、拉细玻璃管、铜环、尼龙环、电子显微镜栅以及无载体微滴法。Lucena 等<sup>[1]</sup>采用 15%乙二醇(EG)+15%二甲亚砜(DMSO)+0.5 mmol/L 蔗糖为保护剂,微滴法(Cryotop)进行卵细胞玻璃化冷冻,解冻后做胞浆内单精子注射(ICSI),72 h 后移植。结果发现:卵细胞冻融后存活率达 96.7%,受精率 87.2%,卵裂率 94.3%,妊娠率 56.5%。Cryotop 法玻璃化冷冻是一种高效、快速、经济的人卵细胞冷冻保存方法,并具有良好的临床效果。微滴玻璃化冷冻(SSV),因液滴的体积仍不是很小,细胞易被污染,不易标记,降低了推广价值。开放式拉细麦管法(OPS)冷冻虽提高了冷冻及解冻速度,但难以控制,在液氮中容易炸裂,浮起。解冻方面,在许多实验里成功地使用过高速率的解冻方法,即将细胞直接投入解冻液中进行解冻(即升温从-196 ℃至 37 ℃,升温速度为 75 ℃/s)。另有研究表明,采用 2.5 min 的四步法解冻人卵的效果优于 5 min 的四步法。Hong 等应用四步法玻璃化冷冻人类成熟卵细胞,以 2.5 min 时间间隔和 5 min 时间间隔为速率复温后比较发现,2.5 min 时间间隔比 5 min 时间间隔对植入前胚胎发育更有效。寻找最适平衡时间也有助于改善冷冻效果。有研究发现,采用逐步平衡法或洗脱法有助于改善冻融后鼠 GV 期卵细胞、人 M II 期卵细胞及人 3-原核期卵细胞<sup>[2]</sup>的生存率和胚泡形成率。玻璃化冷冻前预平衡时间及温度及膜渗透性会影响冷冻效果,寻求各参数的平衡点对获得好的预平衡效果十分必要。

### 二、玻璃化冷冻保护剂的应用及改进

常用细胞内冷冻保护剂有:DMSO、甘油、丙二醇(PROH)、EG 等,细胞外冷冻保护剂有蔗糖、海藻糖等。多数学者认为,EG+DMSO 和大分子糖类是比较理想的冷冻保护剂。一些学者研究新型防冻剂,如冷冻保护因子(GSF)在使用浓度为 0.01%时可使冷冻存活率增加 19%~31%。较低浓度的抗冻蛋白可通过与氢原子结合附着在冰核表面,阻止水分子形成冰晶。如果用这些新型的无毒抗冻剂冷冻卵母细胞,卵母细胞的冷冻保存将进入一个新阶段。

### 三、细胞骨架的损伤及其保护

成熟的卵细胞正处于第二次减数分裂中期,附

着于染色体的纺锤体的微管蛋白在冷冻过程中易受温度变化及保护剂的影响而发生解聚,妨碍姐妹染色单体分离,导致染色体分裂异常,卵细胞受精后将导致染色体非整倍化、双精子受精及卵裂抑制。有研究发现,冷冻后的卵细胞通过孵育,微管会以一种时间依赖性的方式重新聚合。适当的孵育,适时受精,纺锤体的结构和功能恢复,将有助于正常受精及冻存卵细胞的发育。Rho 等<sup>[3]</sup>认为,细胞松弛素 B 和 2-巯基乙醇能增加冷冻保存过程中牛成熟卵细胞微管的稳定性。紫杉醇(Taxol)是一种细胞骨架保护剂。有研究指出,紫杉醇可以促进冻融后与胚胎植入前的人未成熟卵细胞及受精卵发育<sup>[4]</sup>。GV 期卵细胞相对成熟卵母细胞来说有比较低的冷冻后染色体异常率,但其发展依赖于体外成熟技术的发展。GV 期卵母细胞的玻璃化冷冻并不影响核成熟或者内质网的连续性,但是正常胞质的成熟会因内质网的重聚而受阻<sup>[5]</sup>。

### 四、卵母细胞外围结构影响及其处理方法改进

多数学者认为,虽然卵丘细胞对卵母细胞具有分泌支持作用,但需把卵丘去除到相同的程度,以便冷冻保护剂的加入和取出能够同步化,避免由于卵母细胞的个体不同而使保护剂渗入和去除的水平参差不齐而无法确定适宜的冷冻剂平衡时间。同时去掉一部分卵丘细胞可以在一定程度上减少冷冻样本的体积,可更容易玻璃化。近期 Fujihira 等<sup>[6]</sup>研究发现,去除卵丘细胞的冷冻并不影响卵母细胞复苏后的存活率,但可降低其胚胎的发育能力。Puppert-Lingham 等对卵丘颗粒细胞研究表明,其不但不影响卵子冷冻过程中的脱水,也不影响卵子的再水化,包被的颗粒细胞对 M II 期卵子的冷冻起一定的保护作用。

### 卵巢组织玻璃化冷冻

卵巢组织玻璃化冷冻的研究大多尚处于动物实验的阶段。人类卵巢组织的冷冻研究较少,冷冻效果存在一定争议。最早关于人类卵巢组织冻存移植后卵泡存活并继续发育的报道是在 2000 年,此后许多研究将人类卵巢组织成功进行自体移植并且在不同的时期内维持卵巢功能。最近 Meirou 等<sup>[7]</sup>报道人类卵巢组织冻存移植后成功妊娠并产下活婴的病例。

### 一、冷冻前卵巢组织的处理

组织块的厚度过大影响保护剂的渗透,过小易造成卵泡破坏过多,并且产生无用的组织块。目前

对组织切片的处理大部分剪成厚约 1 mm, 表面积  $1 \text{ mm}^2 \sim 1 \text{ cm}^2$  的大小。厚度不超过 2 mm。Scott 等<sup>[8]</sup>冷冻不同形状的人类卵巢组织块及组织切片, 解冻后进行体外培养, 在 7 d, 呈立方体的组织块出现较多的存活卵泡并且卵泡生长较好, 而在组织切片中 14 d 才有明显的卵泡生长。

### 二、冷冻保护剂应用及改进

目前, 卵巢组织冷冻应用较多的冷冻保护剂包括甘油, EG, DMSO, PROH, 乙酰胺, 蔗糖。大量研究表明: DMSO, PROH 对于卵巢组织冻融后卵泡的损伤最小, 最适浓度为 1.5~2.0 mol/L。对胎儿卵巢研究发现, PROH 对胎儿卵巢的卵泡存活率比 DMSO 好。Isachenko 等研究发现, 在玻璃化冷冻人类卵巢时, 仅应用渗透性冷冻保护剂比混合应用蔗糖效果好。近来卵巢组织玻璃化冷冻较多以 EG 或 EG 和其他渗透性冷冻保护剂的混合液为主的冷冻方案。蔗糖和一些大分子物质的添加有助于玻璃化冷冻的形成。蔗糖做为一种冷冻添加剂亦常规用于玻璃化冷冻方案中, 大分子物质包括聚乙烯吡咯酮 (polyvinylpyrrolidone, PVP)、聚乙二醇 (polyethylene glycol, PEG)、聚蔗糖 (Ficoll) 或者是各种蛋白大分子等。但是对于大分子聚合物作用的积极性却也存在很多争议。

### 三、冷冻技术的进展

Newton 等报道, 鼠类卵巢组织在  $-5 \text{ }^\circ\text{C}$  植冰比在  $-7 \text{ }^\circ\text{C}$  和  $-9 \text{ }^\circ\text{C}$  时植冰能明显提高卵泡复活率, 因此, 对鼠类卵巢组织来说  $-5 \text{ }^\circ\text{C}$  是最佳植冰温度。Yang 等<sup>[9]</sup>研究发现, 将植冰温度从  $-8 \text{ }^\circ\text{C}$  提高到  $-4.5 \text{ }^\circ\text{C}$ , 能使融化后 24 h 卵泡复活率从 32% 升至 93%。将组织直接投入液氮, 避免组织内冰晶的形成, 从而达到组织玻璃化效果, 取得较好的效果。Gook 等<sup>[10]</sup>用 PROH 作为冷冻保护剂, 比较不同长短的平衡时间 30 min, 60 min, 90 min 冻融后卵巢组织中的卵泡存活率, 发现平衡 90 min 效果最好。Lucci 等研究不同的温度短期保存牛的卵巢组织, 发现  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  保存时对窦前卵泡的损伤最小, 并可保存至 18 h。而冷冻前人类卵巢组织可以在冷冻液中保存 4 h。现在用于玻璃化冷冻的载体麦管 (straw)、钢圈、铜网 (grid)、冷冻管、Cryotop 法等。对于不同载体的冷冻效果的系统研究资料不多。选择最佳载体不仅可以加快温度的传导速度, 加快降温, 而且减少冷冻保护剂的量以降低冷冻剂毒性, 同时方便实施。有人将卵巢组织以液滴形式直接投入液氮, 使组织迅速降温。

## 应用前景及展望

### 一、卵母细胞玻璃化冷冻的应用前景

人卵母细胞冷冻保存的研究最早, 系统、完整。90 年代因慢冻/快融冻存卵母细胞方法在临床应用中的有限成功率, 证实此方法无效<sup>[10]</sup>。相比较而言玻璃化可能较慢速冷冻法更适合卵母细胞保存<sup>[11]</sup>。亦有文献报道在慢速冷冻中可通过增加蔗糖浓度的方法达到类似玻璃化冷冻后效果<sup>[12]</sup>。近年来成熟卵母细胞的玻璃化冷冻有了显著成效, 但其成功率仍低于胚胎冷冻。自该项技术应用于临床的 20 年来, 有一百余名婴儿出生, 可以说仍处于实验阶段<sup>[13]</sup>。虽然结果鼓舞人心, 但技术的有效性仍需评价, 尤其是高浓度冷冻保护剂的影响和标本直接与液氮接触带来的污染问题, 还有各种冷冻技术带来的一定遗传风险都决定今后研究方向应为冷冻方法的优化与安全性。在卵母细胞的冷冻过程中, 阻止细胞内形成的冰晶造成的损伤曾是冷冻技术的瓶颈问题, 现在随着玻璃化技术逐渐为人们接受和认可, 此技术似乎可以避免或减小损伤造成的危害, 譬如纺锤体的损害可在孵育 3 h 后恢复, 玻璃化冷冻较慢速冷冻速度更快些<sup>[13]</sup>。但超低温冷冻对卵母细胞损伤的分子机制尚不十分清楚。采用免疫荧光细胞技术, 共聚焦显微镜技术和偏振光显微观察技术, 观察卵母细胞动态结构变化, 根据卵母细胞的微管、微丝、纺锤体以及染色体在冷冻过程中的变化, 探讨细胞骨架稳定和抗冻机制, 以了解卵母细胞的细胞骨架在玻璃化冷冻中的作用, 这将会是以后玻璃化冷冻和机制研究的重点内容。

另外, 由于成熟卵母细胞的玻璃化冷冻技术带来的纺锤体损伤问题, 使未成熟卵母细胞冷冻成为新的研究方向, 从理论上讲未成熟卵母细胞的冷冻应相对容易, 但目前体外成熟技术的发展限制其可行性。

### 二、卵巢组织玻璃化冷冻的应用前景

玻璃化冷冻似乎更适合像整个卵巢一样比较复杂和非均质性的组织。Li 等<sup>[14]</sup>认为, 玻璃化冷冻人类卵巢组织是一种简单、有效、廉价的方法, 这项技术避免了细胞内外冰晶的形成。然而因为卵巢组织为非均质的, 每种类型的细胞都有适合自己的冷冻速度。这就使选择合适的冷冻速度冷冻整个组织非常困难。人类玻璃化冷冻后卵巢皮质内的卵泡形态研究已有了很好的结果, 但数据有限。目前已有鼠类卵巢组织玻璃化冷冻的一些成功报道。母牛的卵巢皮质玻璃化冷冻后自体移植的妊娠率与慢

速冷冻的水平相当<sup>[15]</sup>。主要困难是分娩后卵泡储备密度仍能保持在超过 1.3~25.5 个/cm<sup>3</sup>。卵巢皮质的玻璃化冷冻使卵巢功能恢复和妊娠成为可能,但存在移植物的快速衰竭。可能的解决办法是玻璃化冷冻带血管蒂的整个卵巢组织,可减少移植后血管形成过程中的卵泡丢失。目前仅有 3 例鼠类整个卵巢组织成功玻璃化的报道。母牛整个卵巢组织的玻璃化冷冻获得了 3.2%~53.5%的结构形态上完整的初级卵泡。成功的玻璃化冷冻在于整个组织的均质渗透,通过分析玻璃化冷冻的参数发现非均质渗透以及冰晶形成<sup>[16]</sup>。已证明新的冷冻保护剂对皮质切片的低毒性,这对整个卵巢组织的冷冻大有帮助<sup>[17]</sup>。Chen 等<sup>[18]</sup>通过将整个卵巢组织直接投入液氮来加快冷冻速度,促进玻璃化形成以及减少冰晶形成,从而获得较高的妊娠率,但污染问题随之而来。冷冻带蒂的整体卵巢组织在卵巢组织的储备方面很有前景,但还需进一步探索更有效安全的冷冻方法。

总之,卵巢组织及卵母细胞的玻璃化冷冻为保存女性生育能力提供了新思路与方法,然而这些都在研究中,这些过程都只在具体某个研究机构中得到同意后实施及评价。同样,病例的选择、组织的收集方法及合适的冷冻策略都会决定该项技术的进一步发展<sup>[19]</sup>。

#### 参 考 文 献

- [1] Lucena E, Bernal DP, Lucena C, et al. Successful ongoing pregnancies after vitrification of oocytes[J]. *Fertil Steril*, 2006, 85(1): 108-111.
- [2] Isachenko V, Montag M, Isachenq E, et al. Developmental rate and ultrastructure of vitrified human pronuclear oocytes after step-wise versus direct rehydration[J]. *Hum Reprod*, 2004, 19(3): 660-665.
- [3] Rho GJ, Kim S, Yoo JG, et al. Microtubulin configuration and mitochondrial distribution after ultra-rapid cooling of bovine oocytes[J]. *Mol Reprod Dev*, 2002, 63(4): 464-470.
- [4] Fuchinoue K, Fukunaga N, Chiba S, et al. Freezing of human immature oocytes using cryoloops with Taxol in the vitrification solution[J]. *Assist Reprod Genet*, 2004, 21(8): 307-309.
- [5] Lowther KM, Weitzman VN, Maier D, et al. Maturation, fertilization, and the structure and function of the endoplasmic reticulum in cryopreserved mouse oocytes[J]. *Biol Reprod*, 2009, 3: 1-20.
- [6] Fujihira T, Nagai H, Fukui Y. Relationship between equilibration times and the presence of cumulus cells, and effect of taxol treatment for vitrification of in vitro matured porcine oocytes [J]. *Cryobiology*, 2005, 51(3): 339-343.
- [7] Meirou 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.
- [8] Scott JE, Carlsson IB, Bavister BD, et al. Human ovarian tissue cultures: extracellular matrix composition, coating density and tissue dimensions[J]. *Reprod Biomed Online*, 2004, 9(3): 287-293.
- [9] Yang HY, Cox SL, Jenkin G, et al. Graft site and gonadotrophin stimulation influences the number and quality of oocytes from murine ovarian tissue grafts[J]. *Reproduction*, 2006, 131(5): 851-859.
- [10] Gook DA, Edgar DH. Human oocyte cryopreservation [J]. *Hum Reprod Update*, 2007, 13(6): 591-605.
- [11] Lomage J, Salle B. Ovarian and oocyte cryopreservation [J]. *Curr Opin Obstet Gynecol*, 2007, 19(4): 390-394.
- [12] Chen SU, Yang YS. Slow freezing or vitrification of oocytes: their effects on survival and meiotic spindles, and the time schedule for clinical practice[J]. *Taiwan J Obstet Gynecol*, 2009, 48(1): 15-22.
- [13] Anderson RA, Wallace WH, Baird DT. Ovarian cryopreservation for fertility preservation: indications and outcomes [J]. *Reproduction*, 2008, 136(6): 681-689.
- [14] Li YB, Zhou CQ, Yang GF, et al. Modified vitrification method for cryopreservation of human ovarian tissues [J]. *Chin Med J (Engl)*, 2007, 120(2): 110-114.
- [15] Bordes A, Lomage J, Demirci B, et al. Normal gestations and live births after orthotopic autograft of vitrified-warmed hemi-ovaries into ewes[J]. *Hum Reprod*, 2005, 20(10): 2745-2748.
- [16] Courbiere B, Odagescu V, Baudot A, et al. Cryopreservation of the ovary by vitrification as an alternative to slow-cooling protocols[J]. *Fertil Steril*, 2006, 86(Suppl 4): 1243-1251.
- [17] Fahy GM, Wowk B, Wu J, et al. Cryopreservation of organs by vitrification: perspectives and recent advances [J]. *Cryobiology*, 2004, 48(2): 157-178.
- [18] Chen SU, Chien CL, Wu MY, et al. Novel direct cover vitrification for cryopreservation of ovarian tissues increases follicle viability and pregnancy capability in mice [J]. *Hum Reprod*, 2006, 21(11): 2794-2800.
- [19] ACOG Committee Opinion No. 405: ovarian tissue and oocyte cryopreservation[J]. *Obstet Gynecol*, 2008, 111(5): 1255-1256.

(收稿日期: 2008-10-07)