

## 玻璃化冷冻人卵巢组织形态学研究

屈清华<sup>1</sup>, 谭世桥<sup>1△</sup>, 黄丽萨<sup>2</sup>

(1. 四川大学华西第二医院妇产科, 成都 610041; 2. 四川省绵阳市中心医院妇产科 621000)

**[摘要]** **目的** 探讨玻璃化冷冻及体外培养对人卵巢组织内各级卵泡的形态影响。**方法** 采用液氮直接覆盖玻璃化冷冻(DCV)方法冷冻保存成人卵巢组织, 复苏后行体外培养, 观察卵巢组织中卵泡的形态学改变。**结果** 新鲜培养组与新鲜组、冷冻培养组与冷冻组相比, 原始卵泡所占比例明显下降, 初级卵泡和次级卵泡构成比显著增加( $P < 0.05$ ); 新鲜培养组较新鲜组形态正常的原始、初级、次级卵泡比例降低( $P < 0.01$ ); 冷冻组形态正常的初级、次级卵泡比例均低于新鲜培养组( $P < 0.05$ ); 冷冻培养组形态正常的次级卵泡比例低于新鲜培养组, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。**结论** DCV 方案卵泡形态结构有一定损伤, 体外培养有一定修复作用。

**[关键词]** 玻璃; 低温保存; 冷冻; 卵巢; 卵泡; 形态学**[中图分类号]** R318.52**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2016)03-0375-02**Morphology of follicles from cryopreserved human ovarian tissue by direct cover vitrification**Qu Qinghua<sup>1</sup>, Tan Shiqiao<sup>1△</sup>, Huang Lisa<sup>2</sup>

(1. Obstetrics and Gynecology Department, West China Second Hospital, Sichuan University, Chengdu, Sichuan 610041, China;

2. Obstetrics and Gynecology Department, Mianyang Central Hospital, Mianyang, Sichuan 621000, China)

**[Abstract]** **Objective** To study the effect of direct cover vitrification (DCV) on the morphology of follicles from human ovarian tissue. **Methods** Biopsies of ovarian tissue was cryopreserved by DCV and some of them was cultured for 7 days. The rates of primordial follicles, primary follicles and secondary follicles were counted. **Results** Compared to the fresh group and frozen group, the percent of primordial follicle of fresh-cultured group, frozen group decreased, primary follicle significantly increased ( $P < 0.05$ ). The percent of primordial follicle, primary follicle, secondary follicles of fresh-cultured group were lower than those of fresh group ( $P < 0.01$ ). In frozen group, the rates of the primary and secondary follicles with normal morphology were lower than those of fresh cultured group ( $P < 0.05$ ). The rate of normal morphology of secondary follicles of frozen-cultured group was demonstrably lower than that of fresh-cultured group ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** Partial follicles might be injured in cryopreserved human ovarian tissues by direct cover vitrification. A period of post-thaw culture may enhance follicle recovery.

**[Key words]** glass; cryopreservation; freezing; ovary; ovarian follicle; morphology

2004 年世界第 1 例冷冻人卵巢组织经自体移植后获得妊娠<sup>[1]</sup>, 由于卵巢组织中卵泡多、获取方便, 卵巢组织冷冻在保存卵巢功能和生育力方面体现出广阔的应用前景, 尤其适用于未婚女性。玻璃化冷冻技术是近年发展起来的冷冻方式, 较传统冷冻方式更有优越性, 玻璃化冷冻方法是卵巢组织冷冻的另一种可供选择的方法<sup>[2]</sup>。复苏后卵巢组织活力的恢复及损伤的降低对辅助生殖有重要意义。液氮直接覆盖卵巢组织(DCV)冷冻方法是改良的玻璃化冷冻方法, 在冷冻小鼠卵巢取得良好效果<sup>[3]</sup>。本研究旨在探讨 DCV 方案冷冻人卵巢组织及体外培养后各级卵泡的形态学改变及体外培养在冷冻损伤中的作用, 现报道如下。

**1 资料与方法**

**1.1 一般资料** 选择四川大学华西第二医院因病情需要经腹腔镜或开腹手术进行良性卵巢囊肿剥除术的 18 例患者, 年龄 20~40 岁, 月经周期规律, 内分泌检查正常, 无化疗及放疗史, 半年内未服用激素。采集卵巢组织病理检查后剩余的卵巢组织或囊肿被覆上皮作为标本收集对象。术后病检示其中 13 例卵巢成熟性畸胎瘤, 3 例单性囊腺瘤, 2 例浆液性囊肿。本研究经四川大学华西第二医院医学伦理委员会同意, 并与患者签署

知情同意书。

**1.2 方法**

**1.2.1 标本前期处理** 迅速将离体的卵巢组织在含双抗的 1640 培养基内清洗, 去除血迹及卵巢髓质, 留下卵巢皮质, 再将卵巢皮质切割成的组织块, 体积约 3.0 mm×2.0 mm×1.5 mm, 每例患者卵巢组织分成 8 块, 并分为新鲜组、新鲜培养组、冷冻组、冷冻培养组, 每组 2 块。

**1.2.2 DCV 冷冻方法及复苏过程** 室温下, 将卵巢组织块放入平衡液中渗透平衡 15 min, 转入冷冻液中继续渗透平衡 5 min, 再放入冷冻保护剂处理好的无菌冻存管底部。在液氮面下, 用镊子旋紧冻存管的盖子, 立即放入装有液氮储存罐内保存, 此法参照 Chen 等<sup>[3]</sup>报道的 DCV 玻璃化冷冻方案。人卵巢组织在液氮中放置 1 周后进行解冻, 从液氮罐中取出冻存管后去除冻存管盖子, 37℃水浴至液氮完全挥发(约 30 s), 组织块表面冰晶融化。室温下, 取出组织块, 依次放入浓度为 1.00、0.50、0.25 mol/L 蔗糖溶液中, 放置时间均 5 min, 再将组织块用基础液[20%胎牛血清(FBS)DPBS 溶液]清洗 5 min, 重复操作一遍, 后 10%甲醛固定。

**1.2.3 组织块体外培养** 此培养方案基本参照 Scott 等<sup>[4]</sup>的

方案。于 24 孔培养板中放入新鲜组织及冻融后组织,每孔放入 2 块,加少量培养液至刚能覆盖组织块。再将培养板置于培养箱(37℃、CO<sub>2</sub>)中,待组织贴壁后补足 1 mL 培养液(约 4 h)。每隔 1 d 更换培养液 500 μL。组织培养 7 d 时收集组织,甲醛固定。

**1.2.4 组织包埋及切片** 每块组织单独包埋,5 μm 厚度连续切片。石蜡切片,苏木素-伊红(HE)染色后在光学显微镜下观察卵泡形态,对有卵母细胞核的原始、初级、次级卵泡进行计数,卵泡分级参照 Gougeon 分级标准。

**1.3 统计学处理** 采用 SPSS17.0 软件包内进行统计分析,计量资料用  $\bar{x} \pm s$  表示,组间比较采用 *t* 检验;计数资料用率表示,组间采用  $\chi^2$  检验,检验水准  $\alpha=0.05$ ,以  $P<0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结 果

**2.1 冻融及培养前后卵巢组织中卵泡分布变化** 冷冻前后各级卵泡构成比例差异无统计学意义( $\chi^2=0.961, P>0.05$ ),体外培养前后各级卵泡分布比例差异无统计学意义( $P>0.05$ )。新鲜培养组与新鲜组、冷冻培养组与冷冻组相比,原始卵泡所占比例明显下降,初级卵泡和次级卵泡构成比显著增加( $P<0.05$ ),见表 1。

表 1 冷冻及体外培养前后卵泡分布[n(%)]

组别	n	原始卵泡	初级卵泡	次级卵泡
新鲜组	187	159(85.0)	18(9.6)	10(5.3)
冷冻组	179	147(82.1)	23(12.8)	9(5.1)
新鲜培养组	139	56(40.3) <sup>a</sup>	58(41.7) <sup>a</sup>	25(18.0) <sup>a</sup>
冷冻培养组	121	65(47.4) <sup>b</sup>	51(37.2) <sup>b</sup>	21(15.3) <sup>b</sup>

<sup>a</sup>: $P<0.05$ ,与新鲜组比较;<sup>b</sup>: $P<0.05$ ,与冷冻组比较。

**2.2 冻融及培养前后卵巢组织中卵泡形态观察** 新鲜培养组较新鲜组形态正常的原始、初级、次级卵泡比例降低( $P<0.01$ );冷冻组形态正常的初级、次级卵泡比例均低于新鲜培养组( $P<0.05$ );冷冻培养组形态正常的原始卵泡、初级卵泡比例低于新鲜培养组,但差异无统计学意义( $P>0.05$ ),形态正常的次级卵泡比例低于新鲜培养组,差异有统计学意义( $P<0.05$ ),见表 2。

表 2 冷冻及培养前后正常形态卵泡变化(%)

组别	形态正常的 原始卵泡	形态正常的 初级卵泡	形态正常的 次级卵泡
新鲜组	89.9	88.9	80.0
冷冻组	78.9	60.9	22.2
新鲜培养组	76.8	53.4	28.0
冷冻培养组	69.2	47.1	4.8

## 3 讨 论

玻璃化冷冻和慢速冷冻-快速解冻是目前卵巢组织冷冻的两种方法。由于慢速冷冻-快速解冻操作复杂,冰晶形成、渗透损伤,以及冷冻保护剂的毒性,易导致细胞间电解质的浓缩、冷冻损伤。玻璃化冷冻法是 1985 年发展的一种快速冷冻方法,操作简单,无细胞内冰晶形成,减少细胞损伤,冷冻效率更高<sup>[5]</sup>,其特点是采用高浓度的冷冻保护剂,但高浓度保护剂对细胞有渗透毒性损伤。在室温和生理温度下,冷冻保护剂乙二醇(EG)被认为是低毒性的<sup>[6]</sup>,目前常用玻璃化冷冻方案是将

EG 与二甲基亚砜(DMSO)等其他细胞内冷冻保护剂联合,既加快玻璃化过程、提高冷冻效率,又减少两者用量,从而降低冷冻保护剂的对组织或细胞的毒性作用。在本研究中采用了浓度较低的 DMSO(15%)、EG(15%)作为冷冻保护剂,对人卵巢组织进行玻璃化冷冻。DCV 方案的特点是低浓度的冷冻保护剂,严格掌握每种渗透液中渗透时间及复苏过程中的时间是本方法的关键。在收集标本后立即送入实验室清洗处理,缩短组织离体时间,尽快冷冻,有助于降低损伤。

本研究采用卵巢囊肿上皮(大多数为皮样囊肿)组织作为研究对象,文献报道在皮样囊肿、巧克力囊肿及单纯性囊肿的被覆上皮中,皮样囊肿被覆上皮的组织结构形态与正常卵巢组织最相近<sup>[7]</sup>,这为取材提供了重要依据。卵巢组织保存后其生育潜力取决于存活卵泡数量。本研究发现冻融过程对初级、次级卵泡的损伤较原始卵泡重,与文献<sup>[8]</sup>报道一致。目前认为,因原始卵泡代谢相对缓慢,以及细胞稳定、体积小及无透明带、卵母细胞表面积相对较大使冷冻保护剂易于渗透,故认为卵巢组织冻存过程中原始卵泡能够得到更好保存。除原始卵泡外,卵巢组织中含量最高的是初级卵泡,其周围颗粒细胞为单层立方,颗粒细胞增生分化,膜表面具有高亲和力的卵泡刺激素(FSH)受体,且间隙连接在颗粒细胞与卵母细胞之间形成,使得初级卵泡发育潜能增强。如果能保存初级卵泡,可以缩短卵泡体外成熟时间,且无原始卵泡发育的启动困难。本研究显示冷冻后形态正常次级卵泡比例 60.9%。次级卵泡更接近成熟卵泡,但含量少,保存效率低下,因此探索人卵巢组织玻璃化对初级卵泡保存问题可能具有重要的应用价值。本研究还提示冻融后形态正常的次级卵泡,低于初级卵泡,但差异无统计学意义,说明冷冻对初级、次级卵泡的损伤程度可能相似,本方法用于人卵巢组织冷冻还有待于进一步研究。

本研究表明,体外培养后冻融卵巢组织中原始卵泡及初级卵泡的损伤与新鲜组差距缩小,体外培养对原始卵泡、初级的冷冻损伤损伤有一定修复作用,接近新鲜培养组;而次级卵泡可能由于损伤较难以修复,在培养后差距进一步扩大。本研究中培养后原始卵泡所占比例明显下降,初级卵泡和次级卵泡构成比则显著增加,说明原始卵泡经体外培养能够启动并进一步向初级、次级卵泡发育。文献报道在体外因去除了内源性抑制原始卵泡启动发育的因素,短期内可自发启动生长,故体外培养卵巢组织可以促进原始卵泡向初级卵泡转化的启动<sup>[9]</sup>。

本研究提示人类卵巢组织使用 DCV 方法冷冻,能保存一定数量的卵泡,冻融后组织仍有继续发育的潜力。体外培养对原始卵泡及初级卵泡损伤可能有一定的修复作用,但该冷冻方案还需要更进一步研究和完善。

## 参考文献

- [1] Aubard Y, Poirot C, Piver P, et al. Are there indications for ovarian tissue cryopreservation? [J]. Fertil Steril, 2001, 76(2): 414-415.
- [2] Amorim CA, Curaba M, van Langendonck A, et al. Vitri-fication as an alternative means of cryopreserving ovarian tissue[J]. Reprod Biomed Online, 2011, 23(2): 160-186.
- [3] Chen SU, Chien CL, Wu MY, et al. Novel direct cover vit-rification for cryopreservation of ovarian tissues increases follicle viability and pregnancy capability in mice[J]. Hum Reprod, 2006, 21(11): 2794-2800. (下转第 379 页)

淋巴瘤等<sup>[19]</sup>,与本研究结果相似,这可能是 miR-145 在白血病的发病过程中担任了抑癌基因的角色,一定程度上可以衡量疾病的进展程度,提示 miR-145 的表达水平可能与白血病的发生、发展及临床预后有关。

本研究通过比较发现,miR-145 表达水平与初诊时骨髓原始细胞百分数、初诊时外周血白细胞数及疾病分型均无相关性。初步揭示了 miR-145 的表达与 AML 的相关性,miR-145 在 AML 及健康人骨髓中呈现差异性表达,提示 miR-145 与白血病的发生、发展存在着非常密切的关系,然而产生的差异及作用机制有待于进一步的研究。随着研究的深入,miR-145 骨髓表达水平可能成为 AML 的诊断及化疗敏感性检测的一种生物标记物。

#### 参考文献

- [1] Arner P. Human fat cell lipolysis: biochemistry, regulation and clinical role [J]. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, 2005, 19(4): 471-482.
- [2] MacDougald OA, Burant CF. Obesity and metabolic perturbations after loss of aquaporin 7, the adipose glycerol transporter[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102(31): 10759-10760.
- [3] Hibuse T, Maeda N, Funahashi T, et al. Aquaporin 7 deficiency is associated with development of obesity through activation of adipose glycerol kinase[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102(31): 10993-10998.
- [4] Hara-Chikuma M, Sohara E, Rai T, et al. Progressive adipocyte hypertrophy in aquaporin-7-deficient mice; adipocyte glycerol permeability as a novel regulator of fat accumulation[J]. *J Biol Chem*, 2005, 280(16): 15493-15496.
- [5] Zeng Y. Principles of micro-RNA production and maturation[J]. *Oncogene*, 2006, 25(46): 6156-6162.
- [6] Volk N, Shomron N. Versatility of microRNA biogenesis [J]. *PLoS One*, 2011, 6(5): e19391.
- [7] 张之南,沈悌. 血液病诊断及疗效标准[M]. 北京: 科学出版社, 2007: 125-139.
- [8] Friedman RC, Farh KK, Burge CB, et al. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs[J]. *Genome Res*, 2009, 19(1): 92-105.
- [9] Berezikov E, Chung WJ, Willis J, et al. Mammalian mirtron genes[J]. *Mol Cell*, 2007(28): 328-336.
- [10] Wu W, Sun M, Zou GM, et al. MicroRNA and cancer: current status and prospective[J]. *Int J Cancer*, 2007, 120(5): 953-960.
- [11] Brennecke J, Stark A, Russell RB, et al. Principles of microRNA-target recognition[J]. *PLoS Biol*, 2005, 3(3): e85.
- [12] Lewis BP, Burge CB, Burge DP. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets[J]. *Cell*, 2005, 120(1): 15-20.
- [13] Grimson A, Farh KK, Johnston WK, et al. MicroRNA targeting specificity in mammals: determinants beyond seed pairing[J]. *Mol Cell*, 2007, 27(1): 91-105.
- [14] Vasudevan S, Tong Y, Steitz JA. Switching from repression to activation: microRNAs can up-regulate translation [J]. 2007, 318(5858): 1931-1934.
- [15] Konishi H, Ichikawa D, Komatsu S, et al. Detection of gastric cancer-associated microRNAs on microRNA microarray comparing pre- and post-operative plasma[J]. *Br J Cancer*, 2012, 106(4): 740-747.
- [16] Du L, Pertsemilidis A. microRNAs and lung cancer: tumours and 22-mers[J]. *Cancer Metastasis Rev*, 2010, 29(1): 109-122.
- [17] Shi B, Sepp-Lorenzino L, Prisco M, et al. MicroRNA 145 targets the insulin receptor substrate-1 and inhibits the growth of colon cancer cells[J]. *J Biol Chem*, 2007, 282(45): 32582-32590.
- [18] Chen X, Gong J, Zeng H, et al. MicroRNA145 targets BNIP5 and suppresses prostate cancer progression[J]. *Cancer Res*, 2010, 70(7): 2728-2738.
- [19] Sachdeva M, Mo YY. miR-145-mediated suppression of cell growth, invasion and metastasis [J]. *Am J Transl Res*, 2010, 2(2): 170-180.

(收稿日期: 2015-08-28 修回日期: 2015-10-22)

(上接第 376 页)

- [4] 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.
- [5] Nawroth F, Rahimi G, Isachenko E, et al. Cryopreservation in assisted reproductive technology: new trends[J]. *Semin Reprod Med*, 2005, 23(4): 325-335.
- [6] Chi HJ, Koo JJ, Kim MY, et al. Cryopreservation of human embryos using ethylene glycol in controlled slow freezing[J]. *Hum Reprod*, 2002, 17(8): 2146-2151.
- [7] Schubert BC. Human ovarian tissue from cortex surrounding

benign cysts: a model to study ovarian tissue cryopreservation [J]. *Hum Reprod*, 2005, 20(7): 1786-1792.

- [8] Hovatta O. Cryopreservation and culture of human primordial and primary ovarian follicles[J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2000, 16(1): 95-97.
- [9] Kezele P, Skinner MK. Regulation of ovarian primordial follicle assembly and development by estrogen and progesterone: endocrine model of follicle assembly[J]. *Endocrinology*, 2003, 144(8): 3329-3337.

(收稿日期: 2015-08-08 修回日期: 2015-10-16)