

# 大鼠卵巢组织的冷冻移植\*★

鞠晓红<sup>1</sup>, 马爱新<sup>1</sup>, 王冬<sup>2</sup>

## Ovarian tissue autograft after cryopreservation in rats

Ju Xiao-hong<sup>1</sup>, Ma Ai-xin<sup>1</sup>, Wang Dong<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Staff Room of Etiology, Jilin Medical and Pharmacological College, Jilin 132013, Jilin Province, China;  
<sup>2</sup>Department of Gynaecology and Obstetrics, Affiliated Hospital of Jilin Medical and Pharmacological College, Jilin 132013, Jilin Province, China

Ju Xiao-hong★, Master, Associate professor, Staff Room of Etiology, Jilin Medical and Pharmacological College, Jilin 132013, Jilin Province, China  
lijin838@126.com

Correspondence to: Wang Dong, Chief physician, Department of Gynaecology and Obstetrics, Affiliated Hospital of Jilin Medical and Pharmacological College, Jilin 132013, Jilin Province, China

Supported by: the grant from Jilin Science and Technology Bureau, No. 200705415\*

Received:2009-07-09  
Accepted:2009-08-02

### Abstract

**BACKGROUND:** Vitrification is a comparatively new technology which applies high concentration cryoprotectant and rapid refrigeration. By the method, the cells were quickly frozen and to avoid damage by ice crystals inside and outside.

**OBJECTIVE:** To compare the effect of four cryoprotectants on morphology and function of ovarian tissue in rats after vitrification.

**METHODS:** The rats were randomly assigned into six groups with 6 rats for each: DMSO + EG, DMSO + EG + sucrose, DMSO + EG + sucrose + acetamide, EG + sucrose + acetamide, ovariectomized, and normal control groups. The ovarian tissues of four freezing groups were treated with the corresponding cryoprotectants, the vitrified ovarian tissues were then resected but not frozen and transplanted; otherwise, tissues were not treated with any treatment in the normal control group. Two weeks after freezing, the tissues were thawed and heterotopic-transplanted into femoribus internus of hind limb. At 30 days after implantation, vaginal epithelial cells and estrus cycle were observed, while after three months, blood were collected to detect the level of estradiol (E2) and the ovarian tissues were reclaimed to analyze their morphological changes.

**RESULTS AND CONCLUSION:** All ovarian tissues were damaged after cryopreservation in four freezing groups. The rates of healthy primordial follicles were 67.9%, 71.6%, 80.5%, and 59.4%, respectively, while healthy primary follicles were 41.6%, 52.3%, 55.9%, and 36.7%, respectively. In all freezing groups, the rate of the healthy follicles in DMSO + EG + sucrose + acetamide group was higher than DMSO + EG group and EG + sucrose + acetamide group ( $P < 0.05$ ). No significant difference was found in the proportion of follicles at different development stages among four groups. The typical secondary follicle was not found in four groups. Damaged oviduct showed oocyte pyknosis and vacuolation in cytoplasmic area. There was not typical cell type of all freezing groups. Ovarian autografting gained visible vascularity from surrounding tissue that connected ovarian tissue to form net. There was a lot of blood capillary in transplanted ovarian tissues and clumped primordial follicles in cortical substance. The rates of primary follicles and secondary follicles were lower than primordial follicles. The level of serum estradiol was obviously decreased compared with normal control group ( $P < 0.01$ ). There was significant difference between DMSO + EG + sucrose + acetamide group and other three freezing groups ( $P < 0.05$ ). Four kinds of freezing methods have poor effects on different stages of follicles and the structure of ovarian tissue. DMSO + EG + sucrose + acetamide group is an optimal protocol for cryopreserving ovarian tissue. Freezing methods still need to explore further because the rats had not appeared disciplinary estrus cycle after ovarian autografting.

Ju XH, Ma AX, Wang D. Ovarian tissue autograft after cryopreservation in rats. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2010;14(5): 828-832. [http://www.crter.cn http://en.zgckf.com]

### 摘要

**背景:** 玻璃化冷冻是应用高浓度的冷冻保护液结合极快的制冷速度,使细胞快速冷冻,避免细胞内外冰晶形成对细胞的破坏作用,是一种比较新的冷冻方法,具有操作简单、冷冻效率高等特点。

**目的:** 采用玻璃化冷冻技术冷冻大鼠卵巢组织,比较4种冷冻保护剂对大鼠卵巢组织学和功能的影响。

**方法:** 将大鼠随机数字表法分为6组,每组6只:二甲基亚砜+乙二醇组、二甲基亚砜+乙二醇+蔗糖组、二甲基亚砜+乙二醇+蔗糖+乙酰胺组、乙二醇+蔗糖+乙酰胺组、去势组、正常对照组。4冷冻组摘除卵巢后应用相应的冷冻保护液冻存,去势组仅摘除卵巢不冻存、不移植,正常对照组不作处理。冻存2周后解冻复苏行同体异位移植,将卵巢组织植入大鼠后肢大腿内侧。移植后30d,观察阴道上皮类型及动情周期;移植后3个月,经腹主动脉采血检测血清雌二醇水平;回收卵巢组织做组织学检查。

**结果与结论:** 4冷冻组均可见卵巢组织结构受损表现,原始卵泡的形态正常率分别为67.9%,71.6%,80.5%,59.4%,初级卵泡形态正常率分别是41.6%,52.3%,55.9%,36.7%。二甲基亚砜+乙二醇+蔗糖+乙酰胺组卵泡正常率较二甲基亚砜+乙二醇组、乙二醇+蔗糖+乙酰胺组高( $P < 0.05$ );不同发育阶段卵泡构成比差异无显著性意义,均未见典型的次级卵泡。受损的卵细胞主要表现为体积变小、胞浆内出现空泡、核皱缩等。4冷冻组未出现典型动情周期的细胞类型。移植自周围组织获得可见的血管供应,将卵巢组织块连接形成网络。移植体内毛细血管丰富,皮质中可见成群的原始卵泡,初级卵泡、次级卵泡所占比例低于原始卵泡,形态与正常者相似。4种冷冻方法冻存卵巢组织血清雌二醇水平较正常对照组明显降低( $P < 0.01$ ),二甲基亚砜+乙二醇+蔗糖+乙酰胺组高于其他冷冻组( $P < 0.05$ )。结果提示4种冷冻方法均对大鼠卵巢组织有一定程度破坏,初级卵泡的损伤大于原始卵泡。冻存复苏后,卵巢功能恢复,但并不完全,二甲基亚砜+乙二醇+蔗糖+乙酰胺组效果优于另外3组,但移植后动物没有出现规律的动情周期,提示冷冻方法尚需进一步完善。

**关键词:** 冷冻保护剂;大鼠;卵巢组织;玻璃化冷冻;组织移植

doi:10.3969/j.issn.1673-8225.2010.05.017

鞠晓红, 马爱新, 王冬. 大鼠卵巢组织的冷冻移植[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2010, 14(5):828-832.  
[http://www.crter.org http://cn.zgckf.com]

## 0 引言

在动物方面, 可以通过冻存技术体外保存动物卵巢组织, 为良种家畜、珍稀及濒危动物建立种子库。在人类, 可以为某些患良性及恶性肿瘤的女性患者保存生殖能力, 有效治疗卵巢内分泌不足、恢复正常月经周期、并可能自然妊娠<sup>[1-5]</sup>; 推迟女性绝经期的到来, 从而提高中老年女性的生活质量。

目前, 卵巢组织冷冻程序主要有快速冷冻、慢速冷冻和玻璃化冷冻法。慢速冷冻需要程序化冷冻仪, 虽冻存效果好, 但需要特殊设备, 且操作过程相对复杂<sup>[6-8]</sup>; 快速冷冻不需要程序冷冻仪, 简便易行, 但是较难控制, 对卵巢组织损伤大<sup>[9]</sup>; 玻璃化冷冻是一种比较新的冷冻方法, 应用高浓度的冷冻保护液结合极快的制冷速度, 使细胞快速冷冻, 避免细胞内外冰晶形成对细胞的破坏作用, 具有操作简单、冷冻效率高的特点, 因此在卵巢的冷冻保存中日益受到重视<sup>[10-12]</sup>。

本实验采用玻璃化冷冻技术冷冻大鼠卵巢组织, 比较 4 种冷冻保护剂对大鼠卵巢组织学和功能的影响, 旨在寻求冷冻效果最佳的玻璃化冷冻保护剂, 为人类卵巢组织冷冻研究提供实验依据。

## 1 材料和方法

**设计:** 随机分组动物实验, 卵巢组织对比观察。

**时间及地点:** 于 2008-07/2009-01 在吉林医药学院完成。

**材料:** 清洁级健康未交配成年雌性 Wistar 大鼠 36 只, 体质量 220~250 g, 购自长春高新实验动物研究所。随机数字表法分为 6 组, 每组 6 只: 二甲基亚砷+乙二醇组、二甲基亚砷+乙二醇+蔗糖组、二甲基亚砷+乙二醇+蔗糖+乙酰胺组、乙二醇+蔗糖+乙酰胺组、去势组(切除双侧卵巢, 未移植)、正常对照组。

实验过程中对动物处置符合科学技术部 2006 年《关于善待实验动物的指导性意见》的要求<sup>[13]</sup>。

### 主要试剂及设备:

试剂及设备	来源
RPMI1640	Gibco 公司
胎牛血清(FCS)	杭州四季青公司
二甲基亚砷	美国 Sigma 公司
乙二醇、蔗糖、乙酰胺	美国 Sigma 公司
检测雌二醇试剂盒	天津协合医药科技有限公司

**主要试剂配制:** 冷冻保护液及平衡液均以 RPMI1640 为基液配制, 保护液均含体积分数 20%FCS。具体组成如下:

### 4 种卵巢冷冻液及平衡液的组成:

组别	冷冻保护液	冷冻平衡液
二甲基亚砷 + 乙二醇组	20% 二甲基亚砷 + 20% 乙二醇	10% 二甲基亚砷 + 10% 乙二醇 + 0.1 mol/L 蔗糖
二甲基亚砷 + 乙二醇 + 蔗糖组	20% 二甲基亚砷 + 20% 乙二醇 + 0.3 mol/L 蔗糖	10% 二甲基亚砷 + 10% 乙二醇 + 0.1 mol/L 蔗糖
二甲基亚砷 + 乙二醇 + 蔗糖 + 乙酰胺组	20% 二甲基亚砷 + 20% 乙二醇 + 0.3 mol/L 蔗糖 + 3 mol/L	乙酰胺 10% 二甲基亚砷 + 10% 乙二醇 + 0.1 mol/L 蔗糖
乙二醇 + 蔗糖 + 乙酰胺组	20% 乙二醇 + 0.3 mol/L 蔗糖 + 3 mol/L 乙酰胺	10% 乙二醇 + 0.1 mol/L 蔗糖

### 实验方法:

**手术摘取卵巢:** 10%水合氯醛 0.3 μL/g 腹腔注射麻醉大鼠, 固定后常规消毒, 剪开背部腰椎两侧皮肤及肌肉, 从卵巢囊内完整剥离双侧卵巢, 置于加有 RPMI1640 的小培养皿中, 修剪其周围组织, 尽量去除髓质, 然后切成约 1 mm<sup>3</sup> 大小的组织块, 分别采用 4 种冷冻保护液冻存卵巢组织。大鼠术后消毒手术创口, 肌注青霉素, 2 次/d, 注射 7 d。去势组摘除卵巢后不冷冻、不移植, 作为无卵巢比较组, 旨在观测实验过程中卵巢摘除的是否彻底, 正常对照组不作处理。

**冷冻及复苏:** 参照文后文献<sup>[14-17]</sup>进行, 略有改动, 大致如下: 将 4 冷冻组大鼠处理好的卵巢组织分别放入相应的平衡液中 4 °C 渗透平衡 15 min, 然后再转移到各自的冷冻保护液中置 4 °C 继续渗透平衡 15 min, 装入 1.8 mL 冷冻管中置液氮口处继续渗透 30 min, 投入液氮

<sup>1</sup>吉林医药学院病原教研室, 吉林省吉林市 132013; <sup>2</sup>吉林医药学院附属医院妇产科, 吉林省吉林市 132013

鞠晓红★, 女, 1968 年生, 吉林省敦化市人, 汉族, 2005 年北京大学毕业, 硕士, 副教授, 主要从事肿瘤免疫和移植免疫研究。lijin838@126.com

通讯作者: 王冬, 主任医师, 吉林医药学院附属医院妇产科, 吉林省吉林市 132013

中图分类号: R617  
文献标识码: A  
文章编号: 1673-8225 (2010)05-00828-05

收稿日期: 2009-07-09  
修回日期: 2009-08-02 (20090616006/GW +)

中保存。卵巢组织冻存 2 周后, 将冷冻管从液氮罐中取出, 迅速置于 37 °C 水浴, 待冰晶融化后移入含 0.5 mol/L S、体积分数 20%FCS 的 RPMI1640 基质液中平衡 5min, RPMI1640 冲洗 3 遍, 移入含体积分数 20%FCS 的 RPMI1640 中备移植用。

**大鼠自体异位移植卵巢组织:** 双侧卵巢切除后 2 周, 阴道细胞学检查证实去势彻底者, 在后肢大腿内侧作一平行于大腿纵轴的皮肤切口, 将解冻复苏的卵巢组织块置于深筋膜与肌膜之间。术后消毒切口, 肌注青霉素。

**大鼠一般状态:** 术后常规饲养, 每日观察动物饮食、活动、毛发等, 并记录。

**阴道上皮类型及动情周期观察:** 移植后 30 d 开始, 通过阴道涂片观察脱落细胞类型, 出现动情周期者, 其分期依据阴道上皮细胞类型判定; 未出现动情周期者, 观察角化细胞, 若角化细胞大于 50% 则认为有雌激素样效应。

**解冻复苏后卵巢组织的形态学观察:** 苏木精-伊红染色后光镜下观察各级卵泡及卵巢组织结构形态学特点, 计数正常形态及异常形态的原始卵泡、初级卵泡。

**血清雌激素水平测定:** 移植后 3 个月, 20% 乌拉坦 5 mL/kg 腹腔注射麻醉, 开腹采用腹主动脉法采血, 室温放置 30 min 后, 3 000 r/min 离心收集血清, 放射免疫法测雌二醇水平。

**移植组织形态学检测:** 腹主动脉采血后, 取出移植组织, 大体观察其形态、大小及血供。甲醛固定, 石蜡包埋, 4 μm 连续切片, 苏木精-伊红染色, 观察卵泡发育情况及形态结构。

**主要观察指标:** 解冻复苏后卵巢组织形态学变化。阴道上皮类型及动情周期。血清雌二醇水平。回收卵巢组织学检查。

**设计、实施、评估者:** 设计及实施由全体作者完成, 评估由通讯作者完成, 均经过系统训练, 未使用盲法评估。

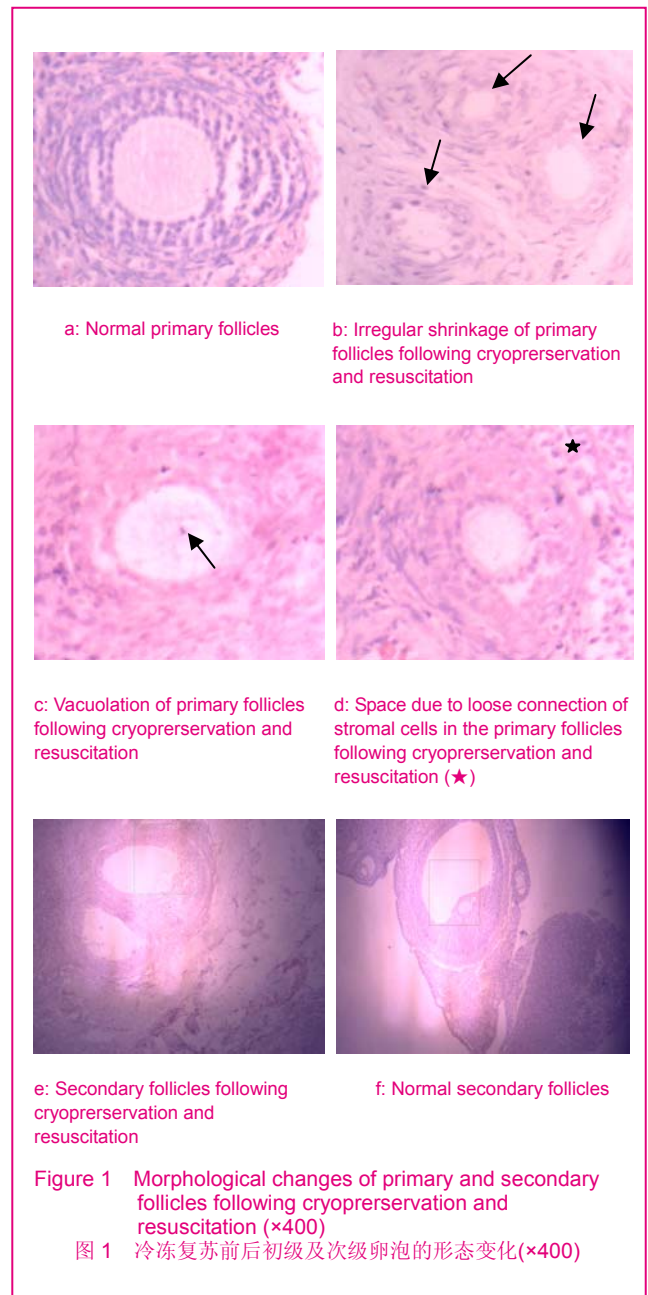
**统计学分析:** 由第一作者采用 SPSS 10.0 软件进行统计处理, 形态学比较采用  $\chi^2$  检验, 雌二醇水平比较采用 *t* 检验。

## 2 结果

**2.1 实验动物一般状态观察** 所有大鼠移植后生存状况良好, 活动、摄食正常, 手术切口无感染, 均进入结果分析。

**2.2 阴道上皮细胞学检查** 去势组阴道上皮呈持续性无角化, 可见白细胞及少量黏液; 正常对照组显示规律的动情周期; 4 冻存组均未出现典型动情周期的细胞类型, 但角化细胞逐渐增多, 二甲基亚砜+乙二醇+蔗糖组、二甲基亚砜+乙二醇+蔗糖+乙酰胺组平均角化细胞达到 75%, 二甲基亚砜+乙二醇组为 55%, 乙二醇+蔗糖+乙酰胺组为 51%。

### 2.3 解冻复苏后卵巢组织形态学观察 见图 1。



4 种冷冻方法中均可见卵巢组织结构受损的表现, 4 冷冻组原始卵泡及初级卵泡形态正常率见表 1。

表 1 各冷冻组原始卵泡及初级卵泡形态正常率比较  
Table 1 Normal rate of morphology between primary and secondary follicles (%)

Group	Primary follicles	Secondary follicles
DMSO + EG	67.9	41.6
DMSO + EG + sucrose	71.6	52.3
DMSO + EG + sucrose + acetamide	80.5 <sup>a</sup>	55.9 <sup>a</sup>
EG + sucrose + acetamide	59.4	36.7

DMSO: dimethyl sulphoxide; EG: ethyleneglycol; <sup>a</sup>*P* < 0.05, vs. DMSO + EG and EG + sucrose + acetamide groups

正常率为二甲基亚砜+乙二醇+蔗糖+乙酰胺组最



高, 与二甲基亚砷+乙二醇组、乙二醇+蔗糖+乙酰胺组比较, 差异有显著性意义( $P < 0.05$ ); 不同发育阶段卵泡构成比差异无显著性意义, 均未见典型的次级卵泡。受损的卵细胞主要表现为体积变小、胞浆内出现空泡、核皱缩等。同时卵细胞与周围的颗粒细胞之间形成较大的空隙; 部分组织块间质组织比较疏松, 卵泡周围基质细胞和胶原纤维素失去正常卵巢组织的致密性, 见图 1。

#### 2.4 移植组织形态学 异位移植卵巢回收率 100%, 多数生长成圆球状或椭圆形, 大小约 $3\text{ mm}^3$ 。移植体自周围组织获得可见的血管供应, 将卵巢组织块连接形成网络。移植体内毛细血管丰富, 皮质中可见成群的原始卵泡, 初级卵泡、次级卵泡所占比例低于原始卵泡, 形态与正常者相似。子宫发育正常。

2.5 血清雌二醇水平测定 移植后 3 个月, 各组大鼠血清雌二醇水平见表 2。

表 2 各组大鼠血清雌二醇水平  
Table 2 Serum estradiol level in each group ( $\bar{x}\pm s$ , ng/L)

Group	Estradiol
DMSO + EG	28.74±2.95 <sup>ab</sup>
DMSO + EG + sucrose	31.52±4.18 <sup>ab</sup>
DMSO + EG + sucrose + acetamide	36.17±3.42 <sup>a</sup>
EG + sucrose + acetamide	27.36±5.24 <sup>ab</sup>
Ovariectomized	14.88±8.64
Normal control	47.52±2.13

DMSO: dimethyl sulphoxide; EG: ethyleneglycol; <sup>a</sup> $P < 0.01$ , vs. normal control group; <sup>b</sup> $P < 0.05$ , vs. DMSO + EG + sucrose + acetamide

4 组冷冻组雌二醇水平均明显低于正常对照组( $P < 0.01$ ), 二甲基亚砷+乙二醇组、二甲基亚砷+乙二醇+蔗糖组比较, 差异无显著性意义, 二甲基亚砷+乙二醇+蔗糖+乙酰胺组与其他冷冻组比较, 差异有显著性意义( $P < 0.05$ )。

### 3 讨论

恶性肿瘤日益成为严重威胁人类健康的疾病之一, 特别对于年轻女性患者, 接受根治性手术治疗(如切除卵巢等)或大剂量放疗、化疗等都会不同程度导致性腺功能的破坏甚至丧失, 破坏生殖能力<sup>[18]</sup>。因此, 卵巢移植治疗成为研究的热点<sup>[19-20]</sup>。卵巢组织冷冻保存可为患有恶性肿瘤的女性提供生殖保险。随着冷冻和移植技术的不断发展, 冷冻保存技术日益成为人们关注的焦点<sup>[21]</sup>。研究人员证实, 在人类及哺乳动物体内移植冻融卵巢组织后, 卵巢能恢复分泌功能和生殖能力<sup>[22-26]</sup>。卵巢组织的冻存与移植是将来保存某些女性患者生育能力最有希望的方法<sup>[27-28]</sup>。

实验采用 4 种玻璃化冷冻保护剂冻存大鼠卵巢组织 2 周后, 观察其卵细胞形态结构, 并进行同体异位移植,

观察移植体及测定血清雌二醇水平, 判断移植体活力。结果显示, 冷冻后复苏的卵巢组织均有一定程度的损伤, 4 种冻存方法原始卵泡的正常率分别为 67.9%、71.6%、80.5%、59.4%, 而初级卵泡形态正常率则分别为 41.6%、52.3%、55.9%、36.7%, 说明冻存卵巢组织初级卵泡的损伤大于原始卵泡, 可能与初级卵泡较原始卵泡代谢率高、对冷冻降温敏感的颗粒细胞增多增大有关<sup>[29]</sup>。在 4 种冷冻保护液中, 二甲基亚砷+乙二醇+蔗糖+乙酰胺组正常卵泡数量最多, 并且与移植后大鼠血清雌二醇水平一致, 说明联合应用渗透性保护剂(二甲基亚砷、乙二醇)、非渗透性保护剂(蔗糖)和保护剂毒性中和剂(乙酰胺)是一种理想的玻璃化冷冻剂。

阴道上皮细胞和子宫内膜细胞作为卵巢激素的靶细胞, 对雌激素高度敏感。移植后阴道上皮细胞持续角化, 血清雌二醇水平明显高于同期的去势组, 说明卵巢功能开始恢复。但移植组动物没有出现规律的动情周期, 且血清雌二醇水平与正常对照组相比明显降低, 说明卵巢功能虽有恢复, 但并不完全。研究表明, 卵巢组织冷冻效果受多种因素影响, 如解冻、平衡、组织块大小等<sup>[30-31]</sup>, 而移植效果除与上述因素有关外, 还与移植部位的选择密切相关, 因此完善的卵巢组织冻存移植方案尚需进一步深入探讨与研究。

### 4 参考文献

- [1] Xu PJ, Wang QW, Yu B, et al. Zhongguo Yiyuan Yongyao Pingjia yu Fenxi. 2006; 6(6):371-373. 许培箴, 王秋伟, 虞斌, 等. 胎儿卵巢组织移植治疗卵巢性闭经的研究[J]. 中国医院用药评价与分析, 2006, 6(6):371-373.
- [2] Donnez J, Martinez-Madrid B, Jadoul P, et al. Ovarian tissue cryopreservation and transplantation: a review. Hum Reprod Update. 2006; 12(5):519-535.
- [3] Oktay K, Economos K, Kan M, et al. Endocrine function and oocyte retrieval after autologous transplantation of ovarian cortical strips to the forearm. JAMA. 2001; 286(12):1490-1493.
- [4] Donnez J, Dolmans MM, Demylle D, et al. Livebirth after orthotopic transplantation of cryopreserved ovarian tissue. Lancet. 2004; 364(9443):1405-1410.
- [5] Donnez J, Dolmans MM, Demylle D, et al. Restoration of ovarian function after orthotopic (intraovarian and periovarian) transplantation of cryopreserved ovarian tissue in a woman treated by bonemarrow transplantation for sickle cell anaemia: case report. Hum Reprod. 2006; 21(1):183-188.
- [6] Li YB, Zhou CQ, Yang GF, et al. Zhongshan Daxue Xuebao: Yixue Kexue Ban. 2006; 27(16): 704-708. 李宇彬, 周灿权, 杨国奋, 等. 人卵巢组织两种超低温冻存方法的研究[J]. 中山大学学报: 医学科学版, 2006, 27(16): 704-708.
- [7] Mao GP, Sun XS, Zhou JB. Shengzhi yu Biyun. 2005; 25(9): 551-555. 毛冠平, 孙兴参, 周佳勃. 卵巢组织冷冻保存及其应用[J]. 生殖与避孕, 2005, 25(9): 551-555.
- [8] Li YP, Qiu SD, Wang YR, et al. Xian Jiaotong Daxue Xuebao: Yixueban. 2008; 29(3): 324-328. 李跃萍, 邱曙东, 王燕蓉, 等. 两种方法冻存胎儿卵巢组织后的活力判断[J]. 西安交通大学学报: 医学版, 2008, 29(3): 324-328.
- [9] Chen SY, Wu XY, Chen H, et al. Shengzhi yu Biyun. 2005; 14(1): 17-21. 陈淑颖, 吴晓云, 陈华, 等. 小鼠卵巢组织在不同冷冻方案中形态学比较[J]. 生殖与避孕, 2005, 14(1): 17-21.
- [10] Wang GP, Cai YF, Wang HY, et al. Ningxia Yixueyuan Xuebao. 2007; 29(3): 228-230. 王国平, 蔡玉芳, 王红燕, 等. 胎儿卵巢组织玻璃化冻存效果的研究[J]. 宁夏医学院学报, 2007, 29(3): 228-230.

- [11] Courbiere B, Odagescu V, Baudot A, et al. Cryopreservation of the ovary by vitrification as an alternative to slow-cooling protocols. *Fertil Steril*.2006;86(Suppl4):1243-1251.
- [12] Rahimi G, Isachenko E, Isachenko V, et al. Comparison of necrosis in human ovarian tissue after conventional slow freezing or vitrification and transplantation in ovariectomized SCID mice. *Reprod Biomed Online*.2004; 9 (2):187-193.
- [13] The Ministry of Science and Technology of the People's Republic of China. Guidance suggestion of caring laboratory animals. 2006-09-30.  
中华人民共和国科学技术部. 关于善待实验动物的指导性意见. 2006-09-30.
- [14] Sun LJ,Zhu GJ,Tan L,et al.Shengzhi yu Biyun.2007; 27(2): 101-106.  
孙丽君, 朱桂金, 谭丽, 等.4种冷冻-解冻方法对家兔卵巢组织形态学的影响[J]. *生殖与避孕*, 2007, 27(2): 101-106.
- [15] Babaei H, Derakhshanfar A, Kheradmand A. Vitrification of mouse ovaries using ethylene glycol and DMSO as cryoprotectants: histopathological evaluation. *Vet Arh*.2007; 77 (1) : 19-27.
- [16] Wang Y, Wang,P, Shen X, et al. Endocrine function and lymphocyte infiltration of newborn rat ovaries after ultrarapid freezing and allotransplantation. *Fertil Steril*.2007; 87(6): 1438-1443.
- [17] Wang YR,Pang L,Shen XS. Shengzhi yu Biyun.2005; 25(1): 8-13.  
王燕蓉, 庞龙, 沈新生. 不同浓度保护剂对超速冻存小鼠卵巢组织时的效果观察[J]. *生殖与避孕*, 2005, 25(1):8-13.
- [18] Moffa F, Biacchiardi CP, Fagioli F, et al. Ovarian tissue cryostorage and grafting:an option to preserve fertility in pediatric patients with malignancies. *Pediatr Hematoncol*.2007; 24(1): 29-44.
- [19] Marhhom E, Cohen I.Fertility preservation options for women with malignancies. *Obstet Gynecol Surv*.2007; 62(1):58-72.
- [20] Akar M, Oktay K.Restoration of ovarian endocrine function by ovarian transplantation. *Trends Endocrinol Metab*.2005; 16(8): 374-380.
- [21] Sonmezer M, Oktay K. Fertility preservation in female patients. *Hum Reprod Update*.2004; 10 (3) :251-266.
- [22] Meriow D , Levron J , Eldar-Geva T , et al . Pregnancy after transplantation of cryopreserved ovarian tissue in a patient with ovarian failure after chemotherapy. *N Engl J Med*.2005; 353 (3):318-322.
- [23] Baird DT, Campbell B, de Souza C,et al . Long2term ovarian function in sheep after ovariectomy and autot ransplantation of cryopreserved cortical strips. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*.2004; 113 (S1): 55-59.
- [24] Almodin CG,Minguetti-Camara VC,Meister H,et al.Recovery of natural fertility after grafting of cryopreserved germinative tissue in ewes subjected to radiotherapy. *Fertil Steril*.2004; 81(1): 160-164.
- [25] Chao L,Deng XH,Li XM,et al.Jiepou Xuebao.2008; 39(5): 742-746.  
晁岚 ,邓晓惠, 李晓梅,等.兔卵巢组织冷冻移植后卵母细胞成熟及受精发育能力的研究[J]. *解剖学报*, 2008, 39(5): 742-746.
- [26] Chao L,Deng XH,Yu X,et al. Xiandai Fuchanke Jinzhan.2007; 16(11): 849-852.  
晁岚 ,邓晓惠,于璇,等.兔卵巢组织玻璃化冷冻的实验研究[J]. *现代妇产科进展*, 2007, 16(11): 849-852.
- [27] Liu CL,Xu PJ,Wang QW,et al. Xiandai Fuchanke Jinzhan.2009; 18(5): 337-339.  
刘春玲, 许培箴, 王秋伟, 等. 母兔卵巢异体异位移植的实验研究 [J]. *现代妇产科进展*, 2009, 18(5): 337-339.
- [28] Beerendonk CC ,Braat DD. Present and future options for the preservation of fertility in female adolescents with cance. *Endocr Dev*.2005;(8):166-175.
- [29] Siebzehnrubl E , Kohl J ,Ditt rich R ,et al. Freezing of human ovarian tissue not the oocytes but the granulosa in the problem. *Mol Cell Endocfinol*.2000; 169 (1-2):109-111.
- [30] Bao HQ,Li YM,Wang XZ,et al.Dongwu Yixue Jinzhan.2004; 25(6): 90-93.  
包华琼,李跃民,王新庄,等.3 种因素对牛卵母细胞玻璃毛细管玻璃化冷冻效果的影响研究[J]. *动物医学进展*, 2004,25 (6): 90-93.
- [31] Ishijima T, Kobayashi Y, Lee DS, et al. Cryopreservation of canine ovaries by vitrification. *J Reprod Dev*.2006; 52 (2) :293-299.

来自本文课题的更多信息--

**基金资助:** 吉林省科技厅项目(200705415)。

**实验设计与文章构思:** 课题为吉林省科技厅基金项目, 分两大部分完成: 第一部分为动物实验, 旨在筛选理想的冷冻保护液; 第二部分将完成的是应用筛选出来的冷冻保护液进行人体卵巢的冷冻与移植。实验创新之处在于: 一是冷冻保护液的筛选, 目前虽有研究探讨理想冷冻液的优化, 但各有不完善之处, 本课题综合多方面资料, 共配制两组8种冷冻保护液(另一组4种保护液的筛选结果另文发表), 进行优化筛选; 二是人体卵巢的冷冻与移植, 目前的研究多集中于动物实验, 人类卵巢冷冻后, 卵巢组织的活力和功能方面的研究及对卵泡的生育能力和发育能力较少见描述。

卵巢冷冻效果受多种因素影响, 实验采用液氮口平衡渗透 30 min 的冻存方案, 组别间可能存在温度差异; 此外, 应增加卵巢冷冻复苏立即的形态学观察和体外培养观察, 排除血液供应不良的影响。