

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.2012.40.013 [http://www.cjter.org/cjter-2012-qikanquanwen.html]

蔡玉芳, 王燕蓉, 孔斌, 崔岫, 沈新生. 枸杞多糖对胎儿卵巢组织冷冻保存的影响[J]. 中国组织工程研究, 2012, 16(40):7475-7479.

## 枸杞多糖对胎儿卵巢组织冷冻保存的影响\*★◆

蔡玉芳<sup>1,2</sup>, 王燕蓉<sup>1,2</sup>, 孔斌<sup>1</sup>, 崔岫<sup>1</sup>, 沈新生<sup>1</sup>

**文章亮点:** 400 mg/L 的枸杞多糖和 100 μmol/L 的 β-巯基乙醇有利于卵巢组织的冷冻保存, 并可显著提高冷冻卵巢组织移植后的存活率。

**关键词:** 胎儿卵巢; 异种移植; 枸杞多糖; β-巯基乙醇; 裸鼠

### 摘要

**背景:** 抗氧化剂的应用对于提高卵巢组织冻存后的活力起着很重要的作用。

**目的:** 通过观察冷冻保存的胎儿卵巢组织异种移植到裸鼠肾被膜下的发育情况, 探索枸杞多糖在卵巢组织冷冻保存中的作用。

**方法:** 实验分为 4 组。①新鲜移植组: 取材后的新鲜胎儿卵巢组织直接进行移植。②冻存对照组: 冷冻保护液为基液。③β-巯基乙醇组: 冷冻保护液为基液添加 100 μmol/L β-巯基乙醇。④枸杞多糖组: 冷冻保护液为基液添加 400 mg/L 枸杞多糖。对冷冻复温后的胎儿卵巢皮质块进行裸鼠的肾被膜下移植, 并于移植后 12 周取材。

**结果与结论:** 各组在移植物的存活率上差异无显著性意义 ( $P > 0.05$ )。在卵泡计数上冷冻对照组最低 ( $P < 0.05$ )。在卵泡的存活率上, 各组间差异均有显著性意义, 其中以冷冻对照组最低, 枸杞多糖组最高。β-巯基乙醇组和枸杞多糖组卵巢超微结构较冷冻对照组保存的好。提示 400 mg/L 的枸杞多糖和 100 μmol/L 的 β-巯基乙醇有利于卵巢组织的冷冻保存, 并可显著提高冷冻卵巢组织移植后的存活率。

## Effects of lycium barbarum polysaccharides on fetal ovarian tissue cryopreservation

Cai Yu-fang<sup>1,2</sup>, Wang Yan-rong<sup>1,2</sup>, Kong Bing<sup>1</sup>, Cui Xiu<sup>1</sup>, Shen Xin-sheng<sup>1</sup>

### Abstract

**BACKGROUND:** The application of antioxidant plays a key role in improving the viability of frozen-thawed ovarian tissue.

**OBJECTIVE:** To explore the effects of lycium barbarum polysaccharides on fetal ovary tissue cryopreservation by observe the developmental condition of cryopreserved fetal ovarian tissue xenografts after transplanted into nude mice kidney capsule.

**METHODS:** The experiment was divided into four groups. ①Fresh transplanted group: the fresh fetal ovary tissue was transplanted directly. ②Cryopreservation control group: the cryoprotectant solution was the base fluid. ③β-mercaptoethanol group: the cryoprotectant solution was the basic fluid with 100 μmol/L β-mercaptoethanol. ④Lycium barbarum polysaccharides group: the cryoprotectant solution was the basic fluid with 400 μmol/L lycium barbarum polysaccharides. The ovarian cortex block was transplanted into the nude mice kidney capsule after freezing thawing, and the specimen was obtained at 12 weeks after transplantation.

**RESULTS AND CONCLUSION:** There was no significant difference of the survival rate in the grafts among groups ( $P > 0.05$ ). The cryopreservation control group had the most follicle ( $P < 0.05$ ). As for the survival rate of follicles, there was significant difference among groups; it was lowest in cryopreservation control group and highest in lycium barbarum polysaccharides group. Preservation of ovarian ultrastructure in β-mercaptoethanol and lycium barbarum polysaccharides group was better than that in the cryopreservation control group. Lycium barbarum polysaccharides with concentration of 400 mg/L and β-mercaptoethanol with concentration of 100 mg/L is benefit to the ovarian tissue cryopreservation and can significantly improve the survival ratio of cryopreserved ovarian tissue after transplantation.

Cai YF, Wang YR, Kong B, Cui X, Shen XS. Effects of lycium barbarum polysaccharides on fetal ovarian tissue cryopreservation. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu. 2012;16(40): 7475-7479.

<sup>1</sup>宁夏医科大学人体解剖与组织胚胎学系, 宁夏回族自治区银川市 750004; <sup>2</sup>宁夏回族自治区生殖与遗传重点实验室, “生育力保持”省部共建教育部重点实验室, 宁夏回族自治区银川市 750004

蔡玉芳★, 女, 1970 年生, 宁夏回族自治区盐池县人, 汉族, 2005 年宁夏医科大学毕业, 硕士, 副教授, 主要从事生殖医学方面的研究。Cyfang\_123@yahoo.com.cn

通讯作者: 王燕蓉, 女, 教授, 宁夏医科大学人体解剖与组织胚胎学系, 宁夏回族自治区生殖与遗传重点实验室, “生育力保持”省部共建教育部重点实验室, 宁夏回族自治区银川市 750004 4083304@163.com

中图分类号: R318  
文献标识码: A  
文章编号: 2095-4344 (2012)40-07475-05

收稿日期: 2012-01-05  
修回日期: 2012-04-21  
(20120105011/W · C)

<sup>1</sup>Department of Human Anatomy and Histology-Embryology, Ningxia Medical University Yinchuan 750004, Ningxia Hui Autonomous Region, China; <sup>2</sup>Key Laboratory of Fertility Preservation and Maintenance of Ningxia Medical University, Ministry of Education, Key Laboratory of Reproduction and Heredity of Ningxia Hui Autonomous Region, Yinchuan 750004, Ningxia Hui Autonomous Region, China

Cai Yu-fang★, Master, Associate professor, Department of Human Anatomy and Histology-Embryology, Ningxia Medical University Yinchuan 750004, Ningxia Hui Autonomous Region, China; Key Laboratory of Fertility Preservation and Maintenance of Ningxia Medical University, Ministry of Education, Key Laboratory of Reproduction and Heredity of Ningxia Hui Autonomous Region, Yinchuan 750004, Ningxia Hui Autonomous Region, China Cyfang\_123@yahoo.com.cn

Corresponding author: Wang Yan-rong, Professor, Department of Human Anatomy and Histology-Embryology, Ningxia Medical University Yinchuan 750004, Ningxia Hui Autonomous Region, China; Key Laboratory of Fertility Preservation and Maintenance of Ningxia Medical University, Ministry of Education, Key Laboratory of Reproduction and Heredity of Ningxia Hui Autonomous Region, Yinchuan 750004, Ningxia Hui Autonomous Region, China 4083304@163.com

Supported by: the National Natural Science Foundation of China, No. 81160085

Received: 2012-01-05  
Accepted: 2012-04-21

## 0 引言

目前, 在放化疗前将患者的卵巢冷冻保存起来, 待疾病控制后再移植回体内是保存青年癌症患者生育力的一个可选择的方法, 并且是儿童患者仅有的选择。在卵巢组织的取材和冷冻保存过程中, 卵巢组织处于缺血缺氧的不良环境中, 而这种环境极大地影响着组织解冻后的存活率。目前的研究认为这种损伤与氧自由基有关, 氧自由基可以导致细胞膜蛋白的损伤, 线粒体功能的减退以及脂质过氧化<sup>[1]</sup>, 内源性的抗氧化剂可以中和在缺血缺氧过程中产生的氧自由基, 但其作用很短暂, 已有学者将外源性的抗氧化剂如抗坏血酸、甘露醇和维生素E等用于器官移植中<sup>[2-3]</sup>, 以期能消除由于缺血所产生的氧自由基造成的损伤, 并且取得了一定的效果。

枸杞多糖是一种含杂多糖的枸杞果实的提取物, 大量研究表明枸杞多糖具有增强机体免疫及抗氧化作用<sup>[4-5]</sup>, 作为一种可食用的保健产品, 枸杞多糖是否可作为抗氧化剂用于卵巢组织的冷冻保存, 其作用是否与抗氧化剂 $\beta$ -巯基乙醇相当, 目前也未见到报道。因此作者在冷冻保护液中加入枸杞多糖, 期望它们能提高卵巢组织的冷冻保存效果和移植后的存活率, 并比较枸杞多糖和 $\beta$ -巯基乙醇的效果, 探索枸杞多糖在胎儿卵巢快速冷冻方面的保护作用, 为拓宽枸杞多糖的应用领域提供科学依据。

## 1 材料和方法

**设计:** 分组对比观察。

**时间及地点:** 实验于2007-09/2011-12在宁夏医科大学生殖与遗传重点实验室, “生育力保持”省部共建教育部重点实验室完成。

**材料:**

**卵巢组织:** 经由宁夏医科大学医学伦理委员会同意和取得知情同意后, 胎儿卵巢取自因脑积水、面部畸形和染色体异常等原因所致的必须要终止妊娠、经水囊引产的24-32周死亡女胎, 于引产后2 h内无菌取材, 并将皮质切成2 mm×2 mm×1 mm大小等体积的组织块待用。

**实验动物:** BALB/CA清洁级裸鼠40只, 由宁夏医科大学实验动物中心提供, 品系合格证号: 医动字第13-203号, 6-8周龄, 体质量(25.0±1.8) g, 雌性处女鼠。

**试剂:**  $\beta$ -巯基乙醇: sigma公司; 枸杞多糖: 宁夏中药厂。

**实验方法:**

**实验分组:** 所用液体以1.5 mol/L PROH的DMEM液为基液, 依实验分组分别添加100  $\mu$ mol/L  $\beta$ -巯基乙醇和400 mg/L枸杞多糖。实验分组如下: ①新鲜移植组: 取材后的新鲜胎儿卵巢组织直接进行移植。②冻存对照组: 冷冻保护液为基液。③ $\beta$ -巯基乙醇组: 冷冻保护液为基液添加100  $\mu$ mol/L  $\beta$ -巯基乙醇, 作为抗氧化剂阳性对照组。④枸杞多糖组: 冷冻保护液为基液添加400 mg/L枸杞多糖。

**卵巢组织的冷冻:** 采取快速冻存法: 主要包括3个步骤, 即冷冻前的渗透平衡、冷平衡和冷冻, 冷冻管为0.5 mL的国产塑料麦管, 将准备好的胎儿卵巢皮质块经渗透平衡和冷平衡后, 投入-196 °C的液氮罐中保存。

卵巢组织冻存1-28 d后复温, 最后置于37 °C温箱内30 min后准备移植。

**卵巢移植:** 取BALB/CA清洁级裸鼠40只。将处理好的胎儿卵巢皮质片移入裸鼠肾下极的肾被膜下, 依次缝合手术切口, 待其麻醉恢复后回笼正常饲养。

**受体鼠动情周期的恢复情况:** 移植术第5天起, 每日同一时间观察受体鼠阴道涂片, 记录动情周期恢复时间和脱落细胞类型, 判断移植后的胎儿卵巢组织是否恢复了内分泌功能和受体鼠动情周期的恢复情况。

**光镜观察移植组织形态结构:** 于移植12周后将裸鼠处死, 取移植物行常规石蜡切片, 苏木精-伊红染色, 光镜下在各组存活移植连续切片中的卵泡最多切面随机选5个视野放大400倍, 计数每个视野内的卵泡数并计算其平均值。

**超微结构观察:** 制作超薄切片, 在透射电镜下观察冷冻-复温前后的卵巢皮质片卵泡细胞的微细结构。

**主要观察指标:** ①各组动情周期恢复情况。②异种移植前后组织学观察。③异种移植后的卵泡数目。④卵巢组织的超微结构。

**统计学分析:** 各指标数值均采用 $\bar{x}\pm s$ 或%表示, 各移植组动情周期恢复率和移植物的存活率采用 $\chi^2$ 检验, 动情周期开始天数、卵泡计数均数间比较采用方差分析, 用SPSS 12.0软件包进行统计学处理,  $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

## 2 结果

**2.1 实验动物数量分析** 实验选用BALB/CA裸鼠40只, 随机分为4组, 实验过程中有11只脱失, 共有29只进入结果分析。

**2.2 动情周期的观察** 各移植组在动情周期的恢复率上,  $\beta$ -巯基乙醇组和枸杞多糖组均高于冷冻对照组, 但差异无显著性意义( $P > 0.05$ )。各冷冻移植组在动情周期恢复所需要的天数上明显长于新鲜移植组( $P < 0.05$ ), 而在 $\beta$ -巯基乙醇组和枸杞多糖组之间差异无显著性意义( $P > 0.05$ ), 具体结果见表1。

表 1 各移植组动情周期恢复情况  
Table 1 The results of estrum recovery in groups following transplantation (n=6)

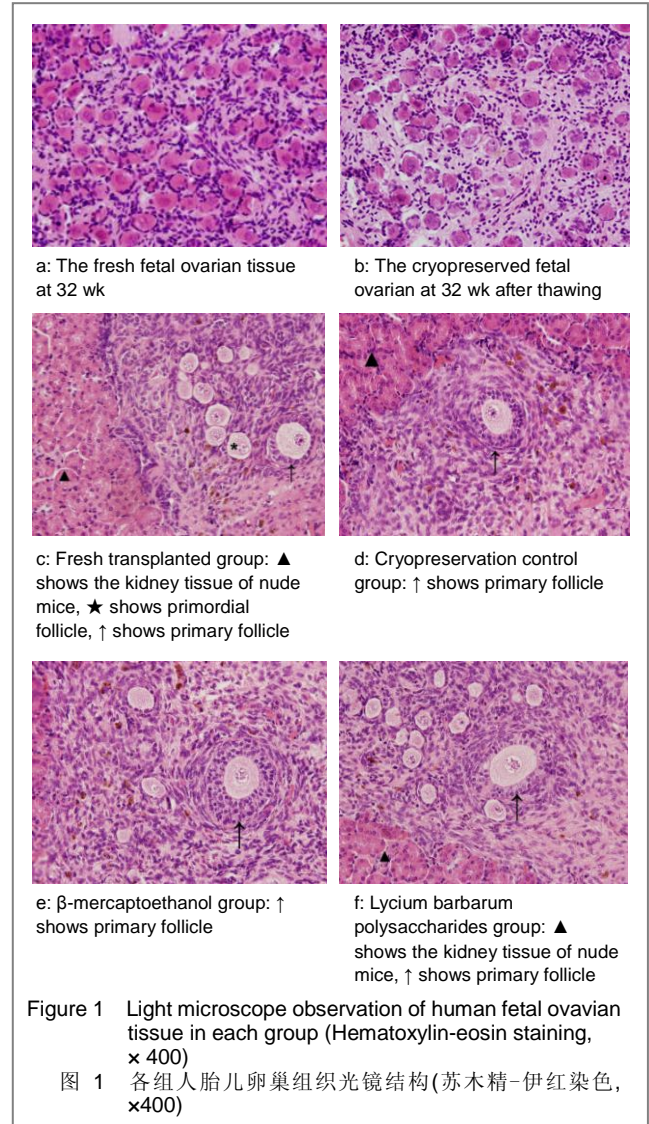
Group	Numbers of animal of estrum recovery (n%)	Beginning days of estrum ( $\bar{x}\pm s$ , d)
Fresh transplanted	2/33.3	12.75 $\pm$ 1.5
Cryopreservation control	1/16.7	23.5 $\pm$ 6.26 <sup>a</sup>
$\beta$ -mercaptoethanol	4/50.0	18.26 $\pm$ 2.06 <sup>ab</sup>
Lycium barbarum polysaccharides	5/55.6	20.00 $\pm$ 3.08 <sup>a</sup>

<sup>a</sup> $P < 0.05$ , vs. fresh transplanted group; <sup>b</sup> $P < 0.05$ , vs. cryopreservation control group

从表1中可以看出: 各移植组在动情周期的恢复率上,  $\beta$ -巯基乙醇组和枸杞多糖组均高于冷冻对照组, 但差异无显著性意义( $P > 0.05$ )。各冷冻移植组在动情周期恢复所需要的天数上明显长于新鲜移植组( $P < 0.05$ ), 而在 $\beta$ -巯基乙醇组和枸杞多糖组之间差异无显著性意义( $P > 0.05$ )。

**2.3 异种移植前后组织学观察** 各移植组于移植后12周取材时, 可看到有大多数移植体存活, 大体观察可见存活的移植体体积明显增大, 体积约为3 mm $\times$ 4 mm $\times$ 4 mm大小, 约为移植前的2倍以上, 且表面色泽红润。光镜下观新鲜胎儿卵巢内可见有大量的原始卵泡, 见图1a。以1.5 mol/L PROH+400 mg/L枸杞多糖快速冷冻的胎儿卵巢组织复温后可见到原始卵泡的数目略有下降, 但结构正常, 见图1b。新鲜移植组: 可见到移植体内有不同发育阶段的卵泡, 有些卵泡体积增大, 是初级卵泡, 见图1c。冷冻对照组: 存活的卵泡数目明显下降,

卵泡体积增大, 发育到初级卵泡阶段, 见图1d。 $\beta$ -巯基乙醇组: 存活的卵泡数目较多, 体积也增大, 可见到卵泡细胞增至3-5层, 见图1e。枸杞多糖组: 移植体内有多个卵泡存活, 结构很好, 卵泡细胞达五六层, 透明带清晰, 放射冠结构完整, 卵泡膜可清楚的区分出内外两层, 图1f。



**2.4 异种移植后的卵泡数目分析** 根据Newton等<sup>[6]</sup>认为只要有一个原始卵泡存在的移植体即被认为是存活的观点, 对各组移植体的存活率和单位高倍视野(667.25  $\mu\text{m}^2$ )内的卵泡进行计数并作了统计, 结果显示, 在存活移植体数及存活率上, 各移植组间差异无显著性意义。在卵泡计数上, 各组移植体内存活的卵泡数均低于移植前, 进行组间比较显示,  $\beta$ -巯基乙醇组和枸杞多糖组要明显高于新鲜移植组和冷冻对照组, 差异极显著, 其中冷冻对照组的卵泡数目最少。在比较卵泡的存活率上, 各组间均有显著性差异, 枸杞多糖组卵泡的存活率最高。见表2。

表2 卵巢组织解冻移植后各组移植物的存活情况  
Table 2 The number of survival grafts in each group after thawing ( $\bar{x}\pm s$ )

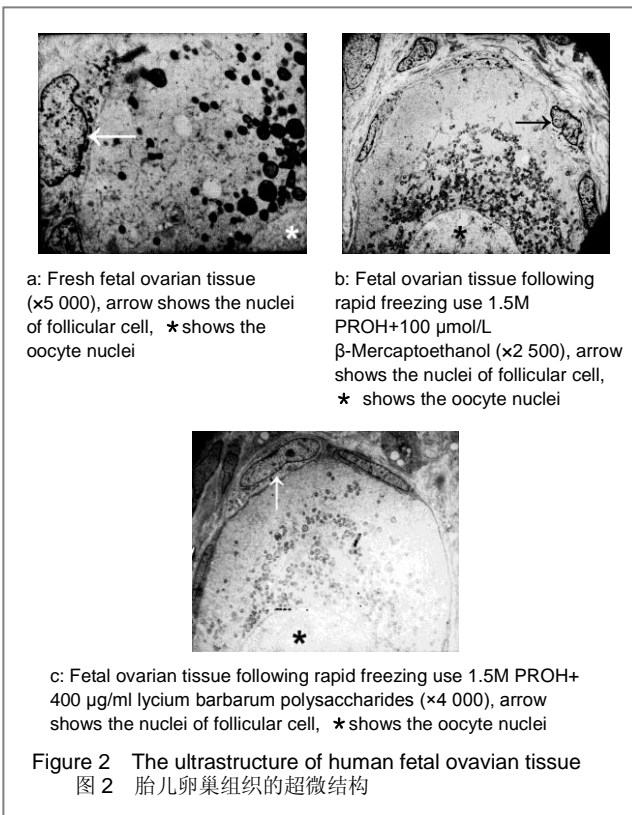
Group	The number and ratio of survival grafts (n/%)	Number of follicle in ovarian tissue before transplantation (/HPF)
Fresh transplanted	9/75.0	67.2±1.84 <sup>b</sup>
Cryopreservation control	4/33.3	38.2±0.65 <sup>b</sup>
β-mercaptoethanol	11/68.75	41.7±1.32
Lycium barbarum polysaccharides	14/77.78	43.5±1.11

Group	Number of follicle in grafts (/HPF)	The survival ratio of follicles in grafts
Fresh transplanted	3.13±0.43 <sup>a</sup>	0.077±0.001 <sup>c</sup>
Cryopreservation control	1.35±0.17 <sup>a</sup>	0.036±0.001 <sup>c</sup>
β-mercaptoethanol	6.75±0.29	0.157±0.015 <sup>c</sup>
Lycium barbarum polysaccharides	7.63±0.23	0.196±0.167 <sup>c</sup>

<sup>a</sup> $P < 0.00$ , vs. β-mercaptoethanol group and lycium barbarum polysaccharides group; <sup>b</sup> $P < 0.001$ , vs. β-mercaptoethanol group and lycium barbarum polysaccharides group; <sup>c</sup> $P < 0.001$ , vs. other groups

2.5 卵巢组织超微结构观察 通过对冷冻解冻后卵巢组织的超微结构观察发现大部分卵泡超微结构保持良好, 见图2, 卵母细胞及卵泡细胞核膜清晰完整, 核仁明显, 内质网、线粒体形态正常, 胞质内含有较丰富的脂滴, 细胞连接清晰可见。



但是在正常细胞之间也可看到损伤的细胞, 主要表现为卵母细胞和卵泡细胞核膜不连续, 线粒体肿胀, 嵴消失, 粗面内质网肿胀, 细胞连接多消失。冷冻对照组的冷冻损伤要比其他两组明显, 损伤的细胞较多。

### 3 讨论

有研究表明, 在冻融过程中有7%的卵泡丢失<sup>[6-7]</sup>, 但移植后组织的局部缺血性损伤会使移植物损失全部的生长卵泡群以及大部分的原始卵泡, 卵巢组织移植后血供重新建立前可能丧失65%–90%的原始卵泡<sup>[8-10]</sup>, 显然移植后在等待血管建立的48 h内, 移植卵巢没有血管吻合, 缺氧导致的氧化损伤成为卵泡丢失的一个原因。因此抗氧化剂被越来越多地用来缓解移植卵巢在没有血供以前所受到的缺氧损伤。

β-巯基乙醇是一种低分子量的硫醇类化合物。对胚胎的研究表明, 在体外培养系统中添加β-巯基乙醇可以通过提高胞质内还原性谷胱甘肽的浓度而防止细胞的氧化损伤, 有助于促进组织细胞的发育成熟, 并可促进细胞分裂, 提高培养组织细胞的成活率<sup>[11-12]</sup>。作者在进行胎儿卵巢组织体外培养时, 也发现添加β-巯基乙醇后, 可以使得更多的卵泡进入生长阶段, 有利于胎儿卵巢组织的体外培养<sup>[13]</sup>。虽然抗氧化作用好, 但β-巯基乙醇有毒, 使用剂量需严格控制, 因此, 若能寻找出与之作用相当的无毒抗氧化剂, 对提高冻存卵巢的活力有更好的效果和应用前景。

枸杞子是宁夏枸杞的干燥成熟果实, 具有增强机体免疫、抗癌、降血压、降血脂和抗衰老等作用<sup>[4-5, 14]</sup>。枸杞多糖是从枸杞子中提取的一种杂多糖, 是枸杞的有效成分之一, 可保护低密度脂蛋白, 防止其氧化, 并能100%清除自由基<sup>[15]</sup>, 可以增强体内超氧化物歧化酶和谷胱甘肽-Px的活性<sup>[16-17]</sup>, 使OH-活性氧变成低毒性物质, 从而有效地阻止脂质过氧化。已有研究证实枸杞多糖在培养小鼠睾丸组织时对生精上皮的热损伤有很好的修复作用并可降低DNA的氧化损伤<sup>[18-20]</sup>。以上研究均表明, 枸杞多糖具有较强的清除活性氧自由基的能力而起到抗氧化作用。作者在培养液内添加了200 mg/L和400 mg/L的枸杞多糖, 对胎儿卵巢组织进行体外培养后异种异位移植到裸鼠肾被膜下, 结果显示400 mg/L的枸杞多糖在动情周期的恢复率、移植物的存活率和卵泡计数及卵泡发育上均好于200 mg/L的枸杞多糖组。

根据枸杞多糖和β-巯基乙醇在胎儿卵巢组织培养的实验结果提示, 在冷冻保护液和解冻液内分别添加了100 μmol/L β-巯基乙醇和400 mg/L的枸杞多糖, 在进行了新鲜胎儿卵巢移植和冷冻后移植, 结果显示β-巯基乙醇组和枸杞多糖组的动情周期的恢复率分别是50%和55.56%, 均高于冷冻对照组的16.7%, 两者动情周期

开始所需要的天数均短于冷冻对照组, 并且 $\beta$ -巯基乙醇组与冷冻对照组相比, 差异有显著性意义( $P < 0.05$ )。 $\beta$ -巯基乙醇组和枸杞多糖组两组间在动情周期恢复率和开始所需要的天数上均无明显的差异。在对移植植物取材后, 于光镜下观察, 可见到 $\beta$ -巯基乙醇组和枸杞多糖组两组在移植物的存活率上均好于冷冻对照组和新鲜移植组, 在单位高倍视野下的卵泡计数上, 差异有显著性意义。在卵泡的存活率比较上, 以 $\beta$ -巯基乙醇组和枸杞多糖组两组最好。在卵泡的形态学观察上, 可见到在 $\beta$ -巯基乙醇组和枸杞多糖组两组内有很多生长卵泡, 在电镜下观察也发现,  $\beta$ -巯基乙醇组和枸杞多糖组两组大部分卵巢组织细胞结构保持良好, 损伤细胞数目较冷冻对照组少。表明, 枸杞多糖对卵泡的保护作用是明显的, 不亚于 $\beta$ -巯基乙醇, 400 mg/L的枸杞多糖有利于卵巢组织的冷冻保存, 并可显著提高冷冻卵巢组织移植后的存活率, 枸杞多糖作为一种可食用的保健产品, 安全性是它最大的优点, 本实验可为拓宽枸杞多糖的应用领域提供科学依据。

#### 4 参考文献

- [1] Kupiec-Weglinski JW, Busutil RW. Ischemia and reperfusion injury in liver transplantation. *Transplant Proc.* 2005;37(4): 1653-1656.
- [2] Kim SS, Yang HW, Kang HG, et al. Quantitative assessment of ischemic tissue damage in ovarian cortical tissue with or without antioxidant (ascorbic acid) treatment. *Fertil Steril.* 2004; 82(3):679-685.
- [3] Sagsoz N, Kisa U, Apan A. Ischaemia-reperfusion injury of rat ovary and the effects of vitamin C, mannitol and verapamil. *Hum Reprod.* 2002;17(11):2972-2976.
- [4] Gao C, Tian C, Zhou M. Study on Antioxidation Activities of Ch. Wolfberry Polysaccharides. *Journal of China Three Gorges University.* 2005; 27(5):456-458.
- [5] Jin L, Xie X, Chang L., Studies on Extraction of Antioxidant from Lycium and Its Antioxidant Activities. *Chemistry and Industry of Forest Products.* 2006; 26(3):55-58.
- [6] Newton H, Aubard Y, Rutherford A, et al. Low temperature storage and grafting of human ovarian tissue. *Hum Reprod.* 1996; 11(7):1487-1491.
- [7] Nisolle M, Casanas-Roux F, Qu J, et al. Histologic and ultrastructural evaluation of fresh and frozen-thawed human ovarian xenografts in nude mice. *Fertil Steril.* 2000;74(1): 122-129.
- [8] Aubard Y. Ovarian tissue xenografting. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2003; 108(1):14-18.
- [9] Liu L, Wood GA, Morikawa L, et al. Restoration of fertility by orthotopic transplantation of frozen adult mouse ovaries. *Hum Reprod.* 2008; 23(1):122-128.
- [10] Zhang H, Guan Y, Sun X. The Function of Grafted Cryopreserved Ovarian Tissue and Its Influential Factors. *Progress of Anatomical Sciences.* 2004; 10(4):332-335.
- [11] Caamano JN, Ryoo ZY, Thomas JA, et al. beta-mercaptoethanol enhances blastocyst formation rate of bovine in vitro-matured/in vitro-fertilized embryos. *Biol Reprod.* 1996; 55(5):1179-1184.
- [12] Takahashi M, Nagai T, Okamura N, et al. Promoting effect of beta-mercaptoethanol on in vitro development under oxidative stress and cystine uptake of bovine embryos. *Biol Reprod.* 2002; 66(3):562-567.
- [13] Cai Y, Wang Y, Li Y. Effect of  $\beta$ -Mercaptoethanol on Fetal Ovaries Development After Culturing in vitro. *Ningxia medical college.* 2005; 27(1):5-7.
- [14] Chan HC, Chang RC, Koon-Ching Ip A, et al. Neuroprotective effects of Lycium barbarum Lynn on protecting retinal ganglion cells in an ocular hypertension model of glaucoma. *Exp Neurol.* 2007; 203(1):269-273.
- [15] Yuan B. Ascorbic acid protect blood lipid from free radical destroy. *Foreign medical information.* 1990; 1:6.
- [16] Amagase H, Sun B, Borek C. Lycium barbarum (goji) juice improves in vivo antioxidant biomarkers in serum of healthy adults. *Nutr Res.* 2009;29(1):19-25.
- [17] Zhang R, Kang KA, Piao MJ, et al. Cytoprotective effect of the fruits of Lycium chinense Miller against oxidative stress-induced hepatotoxicity. *J Ethnopharmacol.* 2010;130(2): 299-306.
- [18] Huang X, Yang M, Wu X, et al. Study on protective action of lycium barbarum polysaccharides on DNA impairments of testicle cells in mice. *Wei Sheng Yan Jiu.* 2003;32(6):599-601.
- [19] Wang Y, Zhao H, Sheng X, et al. Protective effect of Fructus Lycii polysaccharides against time and hyperthermia-induced damage in cultured seminiferous epithelium. *J Ethnopharmacol.* 2002; 82(2-3):169-175.
- [20] Zhao H, Alexeev A, Chang E, et al. Lycium barbarum glycoconjugates: effect on human skin and cultured dermal fibroblasts. *Phytomedicine.* 2005; 12(1-2):131-137.

#### 来自本文课题的更多信息—

**基金声明:** 国家自然科学基金项目资助(81160085), 项目名称: 促性腺激素干预在卵巢玻璃化冻存中的抗凋亡及促移植后血管重建的作用。

**作者贡献:** 实验设计由第一作者和通讯作者完成, 评估由通讯作者完成, 实施由一、三、四、五作者完成, 均经过系统训练, 未使用盲法评估。

**利益冲突:** 课题未涉及任何厂家及相关雇主或其他经济组织直接或间接的经济或利益的赞助。

**伦理要求:** 实验的卵巢组织的所有供者均对实验过程完全知情同意, 在充分了解本实验目的的前提下签署“知情同意书”, 并获宁夏医科大学伦理委员会批准。

**作者声明:** 文章为原创作品, 数据准确, 内容不涉及泄密, 无一稿两投, 无抄袭, 无内容剽窃, 无作者署名争议, 无与他人课题以及专利技术的争执, 内容真实, 文责自负。