文章编号:1000-5404(2010)16-1781-04

论著

自体卵巢冷冻后移植治疗卵巢早衰的实验研究

李彩霞,李玉艳,俞炽阳,何 畏,王凤英 (400038 重庆,第三军医大学西南医院妇产科)

【摘要】 **目的** 研究卵巢早衰小鼠自体冷冻卵巢移植后移植卵巢的存活、生长及功能恢复情况。**方法** 将60只雌性昆明鼠分为化疗组、放疗组、化疗+移植组、放疗+移植组、正常组、去势组,每组10只。取出小鼠单侧卵巢经液氮冷冻后,利用环磷酰胺、白消安或^{60}Coγ照射处理小鼠,使其卵巢功能衰竭,随后将解冻后自体卵巢植入部分小鼠肾脏包膜下。观察冻融后卵巢组织学变化,移植后卵巢、子宫内膜组织学变化及雌二醇(E_2)水平。**结果** 解冻后卵巢中卵泡的数量与新鲜卵巢相似,但卵泡体积变小,卵母胞与周围颗粒细胞之间的空隙增大。化疗、放疗组卵巢呈典型的早衰样组织学改变:表现为卵巢明显萎缩,卵泡闭锁,卵母细胞及透明带退行性改变,黄体及间质纤维化、坏死等。冷冻卵巢移植后,可见不同阶段的发育卵泡,并可见间质腺和黄体,移植组小鼠阴道上皮细胞及子宫内膜有雌激素效应。血清学结果显示,移植组血清E_2水平[化疗+移植组(27.47±1.98)pg/L,放疗+移植组(25.89±2.78)pg/L]明显高于未移植组[化疗组(16.88±2.06)pg/L,放疗组(15.50±1.17)pg/L,$P<0.05$],而与正常组[(30.93±4.05)pg/L]之间差异无统计学意义($P>0.05$)。**结论** 卵巢早衰小鼠自体冷冻卵巢移植后能在异位存活、生长发育并具有内分泌功能。

【关键词】 卵巢功能实验;冷冻;移植,自体;卵巢功能早衰;小鼠
【中图法分类号】 R617;R711.75 【文献标志码】 A

Transplantation of autologous cryopreserved ovarian tissue to treat premature ovarian failure in mice

Li Caixia, Li Yuyan, Yu Chiyang, He Wei, Wang Fengying (Department of Gynecology and Obstetrics, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

【**Abstract**】 **Objective** To investigate the survival, growth and functional recovery of cryopreserved ovarian tissue after autologously transplanted into mice with premature ovarian failure (POF). **Methods** Sixty mice were divided into 6 groups with 10 animals in each, that is, chemical treatment, radiation treatment, chemical or radiation treatment with transplantation, normal control and ovariectomy control group. For the latter 2 groups, no ovary resection or resection of both ovaries was preformed. For the other 4 groups, after one of the ovaries was removed and frozen, the mice were induced to POF by administering cyclophosphamide (120 mg/kg, i.p.) and busulfan (12 mg/kg, intradermal injections) for chemical treatment groups or receiving ^{60}Co γ-ray irradiation (0.5 Gy, 60 cGy/min, 20 cm×20 cm) for radiation groups. After 1 week the cryopreserved ovarian tissue were autologously transplanted into subrenal capsule. The morphology and histology of the fresh and frozen ovarian tissue, estrous cycle determination, serum estradiol hormone levels, histological changes of graft ovaries and endometrium were examined. **Results** The follicle numbers in the thawed ovarian tissue were similar to that in fresh ovary, but the size of follicles became smaller, and the spaces between oocytes and their peripheral granular cells became larger. The typical histological changes like POF were found in chemical and radiation treatment groups, including ovary atrophy, follicles atresia, retrograde degeneration of oocytes and zona pellucida, the fibrosis or necrosis of corpus lutea and interstitial tissues. After the frozen ovary transplantation, there were follicles at different stage of development, corpus luteum and interstitial gland in the grafts. The effect of estrogen on the vaginal epithelium and endometrium were observed. Serological studies showed that serum estradiol levels of mouse with ovarian transplantation were significantly higher than those without ovarian transplantation in POF [(27.47±1.98) pg/L in chemical treatment group with transplantation *vs* (16.88±2.06) pg/L in chemical treatment group, and (25.89±2.78) pg/L in radiation treatment group

【基金项目】 第三军医大学西南医院优生优育技术中心专项基金(2005)
【通信作者】 王凤英,电话:(023)68765903,E-mail:fyw018@163.com

with transplantation *vs* (15.50 ± 1.17) pg/L in radiation treatment group, $P < 0.05$], and had no significant difference as compared with those in normal control ($P > 0.05$). **Conclusion** Cryopreserved ovarian tissue can be survival, development and restoring endocrine function after autologously ectopic-transplanted into POF mouse.

[Key words] ovarian function tests; cryopreservation; transplantation, autologous; premature ovarian failure; mouse

Supported by the Special Funds of the Technical Center for Improving Birth Outcome and Child Development by Southwest Hospital of Third Military Medical University (2005). Corresponding author: Wang Fengying, Tel: 86-23-68765903, E-mail: fyw018@163.com

卵巢早衰(premature ovarian failure, POF)主要表现为月经失调或闭经、不孕、性功能降低和性欲减退、更年期综合征等一系列症状。该病不仅严重影响患者生活质量,且发病率呈不断上升趋势。尤其是肿瘤患者,除一些手术方式可造成卵巢的损害外,化疗和放疗更进一步加重了卵巢衰竭的发生[1-3]。如何在延长患者生命的同时保护生殖功能,提高其生活质量是医学研究者面对的重大课题。目前,POF 的治疗方法包括雌激素替代、中药调理、类固醇激素治疗、促性腺激素促排卵、供卵体外受精-胚胎移植等,但这些方法大多只能暂时缓解患者症状。由于 POF 一系列症状得不到根本改善,患者的生活质量仍然无法保证。研究认为卵巢移植有望成为治疗 POF 的新途径[4-6]。本研究拟对化学药物、放射线处理后卵巢早衰小鼠[7]进行自体冻融卵巢异位移植,以期为 POF 特别是医源性 POF 的治疗提供一种可行性高、疗效确切的新方法。

1 材料与方法

1.1 动物分组

雌性昆明鼠 60 只,5~6 周龄,体质量约 29 g,购自第三军医大学实验动物中心,经阴道脱落细胞涂片检查确定其动情周期正常。

实验分组:未移植组 20 只,包括化学药物处理组(化疗组)10 只:切除单侧卵巢后给予环磷酰胺(cyclophosphamide, CTX)120 mg/kg 腹腔注射、白消安(Busulfan, BUS, Sigma)12 mg/kg 皮内注射;放射处理组(放疗组)10 只:切除单侧卵巢后给予总剂量为 0.5 Gy ^{60}Coγ 射线放射,照射率 60 cGy/min,照射野 20 cm×20 cm,距离 80 cm。处理 1 周后 2 组均行背部皮肤、筋膜、肌层切开缝合,60 d 后取材。移植组 20 只,其中化疗+移植组 10 只:前期处理同化疗组,化学药物处理后 1 周将冻融的自体卵巢移植于肾包膜下;放疗+移植组 10 只:在放射处理后 1 周同法进行移植手术。均于 60 d 后取材。正常组 10 只,仅行背部皮肤、筋膜、肌层切开缝合,30 d 后取材。去势组 10 只,切除双侧卵巢后缝合,30 d 后取材。

1.2 手术方法

术前用 10% 水合氯醛按 0.3 ml/kg 腹腔注射进行麻醉。手术部位消毒后,进行以下手术。

卵巢切除术:经腰背部切口逐层进入腹腔,寻找一侧肾上缘大量脂肪堆,可见卵巢包裹其中,小心摘取卵巢,置于 PBS 中备用。

肾包膜下卵巢移植术:经腰背部切口暴露一侧肾脏,在肾包膜上缘造一小口,用镊子将 3 块冻融后卵巢组织轻轻推向包膜下缘,成功后逐层关闭切口。

1.3 卵巢组织冻融方法

1.3.1 卵巢冷冻 ①卵巢取出后立即置于 PBS 中,镜下除去周围组织,剪成 2 mm×2 mm×1 mm 大小。置于 4 ℃含 4 mg/ml 人血清蛋白(human serum albumin, HSA)、1.5 mol/L 二甲基亚砜(DMSO, Sigma)的 Leibovitz-15(L-15, Sigma)培养基的冷冻管中,依次装入冷冻架。②程序冷冻仪(kryo360-1.7, planer)冷冻 0 ℃开始,以 2 ℃/min 的速度降至 -7 ℃;植冰前渗透 10 min;-7 ℃植冰;以 0.3 ℃/min 速度降至 -40 ℃;以 10 ℃/min 速度降至 -140 ℃;投入液氮罐中保存[5]。

1.3.2 卵巢解冻 冷冻保存 1 周后,将冷冻架从液氮罐中取出,室温放置 30 s 后迅速投入 37 ℃水浴,直到内容物完全溶解。依次在含 1 mol/L DMSO、0.5 mol/L DMSO + 0.1 mol/L 蔗糖、10% HSA 的 L-15 培养基中轻晃 3 min,逐渐将冷冻保护剂置换出来。该洗涤液均在 37 ℃、5% CO_2 培养箱中平衡过夜,最后置于 PBS 中备移植用。

1.4 观察指标

1.4.1 动物的一般状态 观察处理后各组小鼠的活动、饮食及皮毛变化等情况。

1.4.2 阴道细胞学检查 每日行阴道脱落细胞涂片检查,根据脱落细胞类型按标准分析动情周期,以动情期或动情间期占总观察时间的百分比为其构成比。

1.4.3 卵巢组织形态学观察 观察新鲜卵巢、冻融后卵巢、化学处理后卵巢、放射处理后卵巢、移植卵巢的外观形态。分别取上述标本固定、石蜡包埋切片后 HE 染色。光镜下观察卵巢中生长卵泡、颗粒细胞、黄体及间质等的组织学变化。

1.4.4 子宫组织学观察 动物处死后,取出整个子宫,修剪周围组织,固定标本,行子宫组织切片,观察子宫内膜变化。

1.4.5 血清雌激素(E_2)水平 用摘眼球法取血,2 000 r/min 离心 10 min 取血清,化学发光法测定血清 E_2 水平,使用 Roche 公司 E170 电化学发光分析仪、配套试剂及标准品。

1.5 统计学方法

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 10.0 统计软件,多组均数比较采用单因素方差分析 Scheffe 法。

2 结果

2.1 一般情况

小鼠 POF 造模后出现一过性活动减少、精神萎靡、摄食少等变化,持续 3 d 左右好转。手术后切口无感染,所有动物 2 h

内恢复活动,术后 2 d 恢复正常状态。

2.2 阴道脱落细胞变化

小鼠在造模干预后即出现动情周期紊乱:未移植组在出现较长时间上皮细胞及白细胞后偶有角化细胞类型变化,随时间延长出现频率降低。移植组移植前期无典型动情周期变化,偶有角化细胞出现,3 周后角化细胞出现频率增加。化疗 + 移植组 1 只小鼠、放疗 + 移植组 2 只小鼠持续无角化细胞出现,2 组间动情期构成比差异无统计学意义($P > 0.05$)。正常组呈正常动情周期变化;去势组阴道上皮呈持续性无角化状态;各组动情期、动情间期构成比比较差异有统计学意义($P < 0.01$,表 1)。

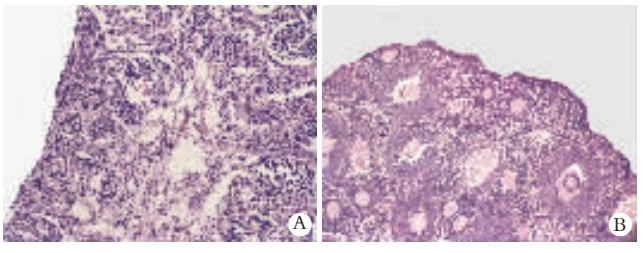
表 1 卵巢早衰小鼠卵巢移植后各组动情周期构成比(%,$\bar{x} \pm s$)

组别	n	动情期构成比	动情间期构成比
化疗组	10	18.4 ± 4.9^{b}	57.1 ± 10.0^{ab}
放疗组	10	6.9 ± 5.0^{a}	79.9 ± 11.3^{a}
化疗 + 移植组	10	19.0 ± 7.1^{b}	47.8 ± 5.9^{ab}
放疗 + 移植组	10	16.2 ± 5.6^{b}	49.2 ± 7.6^{ab}
正常组	10	20.7 ± 9.1	23.5 ± 3.3
去势组	10	0.9 ± 1.6^{a}	96.7 ± 2.7^{a}

a:$P < 0.01$,与正常组比较;b:$P < 0.01$,与去势组比较

2.3 卵巢组织学改变

2.3.1 卵巢冻融后组织学改变 光镜下见冻融卵巢(图 1A)中卵泡的数量及分布与新鲜卵巢(图 1B)相似,但卵泡体积变小,与周围的颗粒细胞之间空隙增大。部分卵泡中卵母细胞虽然仍保持圆形,但细胞质内出现较多空泡;部分卵母细胞呈不规则状,形成皱缩。卵巢间质组织比较疏松,卵泡周围的基质细胞和胶原纤维素失去了正常卵巢组织的致密性。

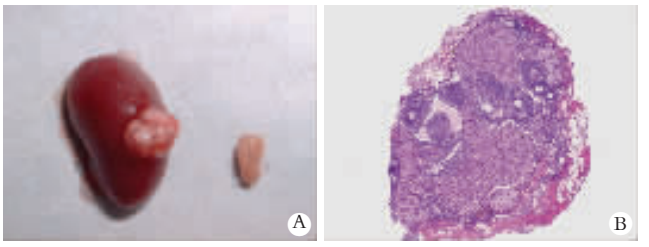


A:液氮冷冻 1 周后卵巢 B:正常卵巢

图 1 液氮冷冻后卵巢和正常卵巢组织学观察 (HE ×100)

2.3.2 化学药物、放射干预造模后卵巢组织学改变 化疗、放疗组干预后卵巢呈典型早衰样组织学改变:表现为卵巢明显萎缩,光镜下见卵巢皮质增厚、结构混乱、卵泡闭锁凋亡、卵母细胞及透明带呈变性、固缩或消失等退行性变化及空泡样改变;颗粒细胞层排列紊乱、细胞间隙增大,黄体及间质纤维化、坏死,病理损伤随观察时间延长而加重。放疗组卵巢间质严重纤维化,皮质中仅存极少量或所有的原始卵泡均消失,有淋巴细胞浸润。

2.3.3 移植后卵巢组织学改变 共有 20 只小鼠进行自体卵巢异位移植,85%(17/20,化疗 + 移植组 9 只,放疗 + 移植组 8 只)小鼠可在肾包膜下见移植卵巢组织,其中 20%(4/20,2 组各 2 只)移植物萎缩、纤维化,其余 65% 卵巢组织发育良好,体积与正常小鼠卵巢接近,大于未移植组卵巢。移植物多数呈椭圆形,亦有呈串珠状生长,表面可见丰富血管网,色粉红,凹凸不平。镜下见移植卵巢被结缔组织包围,其内血管丰富,可见不同发育阶段的卵泡、黄体和间质腺及退化闭锁的卵泡,无明显淋巴细胞浸润(图 2)。



A:肾包膜下移植 60 d 后的卵巢(左)、化学药物处理 60 d 后(未移植)的卵巢(右)肉眼观察 B:肾包膜下移植 60 d 后卵巢组织学观察(HE ×40)

图 2 肾包膜下移植 60 d 后卵巢大体及组织学观察

2.4 子宫组织学观察

正常组子宫内膜厚,上皮以分泌细胞为主,细胞质中含大量分泌泡,固有层有大量子宫腺,腺腔大,内含分泌物,结缔组织疏松,有丰富的毛细血管及小动静脉。未移植组子宫上皮细胞分泌泡减少,固有层结缔组织增多,腺体减少,腺腔变小。移植组子宫内膜出现不同程度增生,腺体较未移植组增加、腺腔变大。去势组子宫萎缩,内膜薄,腺体少。

2.5 血清 E_2 水平

化疗组、放疗组、化疗 + 移植组、放疗 + 移植组、正常组及去势组的血清 E_2 值分别为(16.88 ± 2.06)、(15.50 ± 1.17)、(27.47 ± 1.98)、(25.89 ± 2.78)、(30.93 ± 4.05)、(14.82 ± 2.13)pg/L,与正常组相比,化疗、放疗组血清 E_2 水平明显下降($P < 0.01$),化疗 + 移植、放疗 + 移植组血清 E_2 水平明显高于未移植组及去势组($P < 0.05$)。化疗 + 移植组、放疗 + 移植组与正常组之间,化疗、放疗组与去势组之间差异无统计学意义($P > 0.05$)。

3 讨论

POF 是许多恶性肿瘤患者接受放疗或化疗后的一个主要远期并发症[2],如何在提高患者生存率的同时保护卵巢功能,减轻或避免化疗所致的 POF,提高其生活质量成为重要研究内容。研究认为卵巢移植有望成为其治疗新途径。卵巢异种移植因免疫排斥反应、卵母细胞发育能力不健全[8]、伦理学及安全性等问题而限制了其临床应用。而冷冻保存技术的发展和自体卵巢移植技术的成熟和完善将为年轻肿瘤患者治愈后生育问题的解决和生活质量的提高带来希望。

卵巢组织冷冻保存的目的是将其移植回体内或进行体外培养时,在一定程度上恢复卵巢内分泌功能和生育能力。卵巢组织对冻融过程的耐受提高了生殖能

力储备的可行性。卵巢组织冷冻实际上是一个细胞脱水的过程,伤害主要发生在大卵泡,始基卵泡大多分布在卵巢皮质的外周,并且处于代谢率最低的静止阶段,受冻融和缺血的影响最小,移植后存活的大多为始基卵泡。研究认为采用程序降温慢速冷冻能有效地保存小而薄的卵巢皮质切片,卵泡存活率较为满意[9]。本研究发现卵巢冻融后组织疏松、部分生长卵泡形态改变、基质细胞及颗粒细胞间隙增宽,可见冻融过程对卵泡丢失有一定的影响。同时研究认为冷冻卵巢移植后,始基卵泡可以发育成熟,并且获得受精能力[10],本研究也证实冻融后卵巢移植可存活并具备功能,但冷冻程序仍需进一步调整完善。

移植部位的选择对于保证卵巢的存活起着重要的作用,由于原位移植的局限性,选择血供充足、易被接受的部位给临床应用提供了较大的空间。目前异位移植的部位主要有皮下、肌肉内、腹膜(下)、肾包膜等。与肌肉组织内移植相比,皮下移植方法简便,但皮下移植血供较差;而腹膜(下)、肾包膜下移植时,卵泡的存活和发育比皮下移植要好[11]。故本研究选择肾包膜下移植,效果良好。

本研究采用放免法测定各组 E_2 浓度来评估卵巢移植物的活力,发现移植后小鼠浓度明显高于 POF 未移植组及去势组,此结果与卵巢组织学结果一致。在移植物的组织切片上,可见存活卵巢内血管丰富,各生长阶段卵泡、黄体、间质腺及闭锁卵泡均存在,这些生长卵泡正是产生雌激素的结构基础。阴道和子宫作为卵巢激素的靶器官,也随雌激素的分泌而出现了相应变化。移植组小鼠阴道上皮角化细胞出现频率快,子宫内膜厚、腺体增多、腺腔增大。本研究表明:小鼠卵巢能耐受冻融过程,在自体异位移植后可生长发育,并具有内分泌功能。体内雌激素的合成依赖促卵泡生成素、黄体生成素对卵泡颗粒细胞、卵泡膜细胞的作用,因此,推测小鼠卵巢移植后可重建异位的下丘脑-垂体-卵巢轴。

冻融卵巢的自体移植技术还待完善,其难点是如何尽可能减少卵泡丢失,以延长移植后卵巢组织内分泌功能维持时间和获取足够数量的卵母细胞,从而达到生育目的。与冻融过程相比,移植后不能立即建立血供,移植物局部缺血和再灌注损伤所致造成的卵泡遗失更为严重[12,13]。因此如何在移植后尽快建立血供,缩短缺血、缺氧对卵巢组织的损伤;选择最佳移植部位和时机,完善移植技术与减轻冻融损伤均是亟待解决的问题。

总之,本研究对 POF 小鼠进行自体冻融卵巢异位移植,发现小鼠卵巢组织可耐受冻融过程,移植物存活率高,能重建血液供应且具有内分泌功能,能明显改善 POF 各项症状。自体卵巢移植不存在免疫排斥反应、无伦理学争议,随着该技术的发展,用冻存后的自体卵巢移植来治疗医源性 POF 必定会有广阔的研究和应用前景。

参考文献:

[1] Steigrad S, Hacker N F, Kolb B. *In vitro* fertilization surrogate pregnancy in a patient who underwent radical hysterectomy followed by ovarian transposition, lower abdominal wall radiotherapy, and chemotherapy[J]. Fertil Steril, 2005, 83(5):1547-1549.

[2] Wallace W H, Thomson A B, Kelsey T W. The radiosensitivity of the human oocyte[J]. Hum Reprod, 2003, 18(1):117-121.

[3] Schmidt K T, Larsen E C, Andersen C Y, *et al*. Risk of ovarian failure and fertility preserving methods in girls and adolescents with a malignant disease[J]. BJOG, 2010, 117(2):163-174.

[4] Oktay K, Buyuk E. Ovarian transplantation in humans: indications, techniques and the risk of reseeding cancer[J]. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol, 2004, 113(Suppl 1):S45-S47.

[5] Demeestere I, Simon P, Emiliani S, *et al*. Fertility preservation: successful transplantation of cryopreserved ovarian tissue in a young patient previously treated for Hodgkin's Disease[J]. Oncologist, 2007, 12(12):1437-1442.

[6] von-Wolff M, Donnez J, Hovatta O, *et al*. Cryopreservation and autotransplantation of human ovarian tissue prior to cytotoxic therapy—a technique in its infancy but already successful in fertility preservation[J]. Eur J Cancer, 2009, 45(9):1547-1553.

[7] 李彩霞, 王凤英, 李玉艳, 等. 小鼠卵巢早衰动物模型的构建[J]. 第三军医大学学报, 2008, 30(6):506-509.

[8] Liu J, Van-der-Elst J, Van-den-Broecke R, *et al*. Early massive follicle loss and apoptosis in heterotopically grafted newborn mouse ovaries[J]. Hum Reprod, 2002, 17(3):605-611.

[9] Maltaris T, Dimmler A, Muller A, *et al*. The use of an open-freezing system with self-seeding for cryopreservation of mouse ovarian tissue[J]. Reprod Domest Anim, 2005, 40(3):250-254.

[10] Candy C J, Wood M J, Whittingham D G. Follicular development in cryopreserved marmoset ovarian tissue after transplantation[J]. Hum Reprod, 1995, 10(9):2334-2338.

[11] Yang H Y, Cox S L, 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.

[12] Candy C J, Wood M J, Whittingham D G. Effect of cryoprotectants on the survival of follicles in frozen mouse ovaries[J]. J Reprod Fertil, 1997, 110(1):11-19.

[13] Nisolle M, Casanas-Roux F, Qu J, *et al*. Histologic and ultrastructural evaluation of fresh and frozen-thawed human ovarian xenografts in nude mice[J]. Fertil Steril, 2000, 74(1):122-129.

(收稿:2010-03-02 修回:2010-04-09)

(编辑 王小宴)