



卵巢组织玻璃化冷冻的研究进展

王劲松, 左 琴, 范 涛, 李保文

(中国食品药品检定研究院, 北京 100050)

【摘要】 玻璃化冷冻法是在急速降温过程中使溶液行成一种无冰晶的玻璃化状态, 可以最大程度避免冰晶形成对细胞膜及细胞骨架结构的损伤。影响卵巢组织玻璃化冷冻保存效果的主要因素有卵巢组织块的大小、冷冻保护剂的种类、渗透平衡方法、冷冻载体等。卵巢组织结构较复杂, 尚未形成统一的玻璃化冷冻程序。提出了目前存在的问题。

【关键词】 卵巢; 玻璃化冷冻; 影响因素

【中图分类号】 R33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2014) 12-0071-04

doi: 10. 3969. j. issn. 1671. 7856. 2014. 012. 014

Research progress of ovarian tissue vitrification

WANG Jin-song, ZUO Qin, FAN Tao, LI Bao-wen

(National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 100050, China)

【Abstract】 Vitrification provides a rapid cooling to induce glass-like solidification inside cells and protect cell membrane and cytoskeleton system free of injury by ice crystals. The main factors that can influence the effect of vitrification are the size of ovarian tissue, the kind of cryoprotectants, the method of permeation, carrier system and so on. Ovarian tissue structure is very complex, and there is no uniform standardized protocol of vitrification yet. This paper presents also the current problems of ovarian tissue vitrification.

【Key words】 Ovary; Vitrification; Influencing factors

随着我国生命科学的快速发展, 体外受精、核移植、转基因动物制作等胚胎工程技术对卵源的需求量大幅增加, 卵巢组织的冻存技术使卵母细胞的收集保存得以实现, 并且卵巢组织的冻存不受年龄、生殖周期的影响, 甚至可以从死亡的动物获得, 是行之有效的保存卵母细胞的方法。近年来, 新的基因打靶技术(如TALENs和CRISPR)日渐成熟, 为基因工程动物的制作提供了便利, 从而极大地丰富了疾病模型动物的资源, 为生命科学基础研究及新药研发筛选提供了有力保障, 但丰富的实验动物种

质资源也对保种方法提出新的要求; 此外, 一些疾病模型动物繁殖力低甚至无繁殖力的情况时有发生。卵巢冷冻保存可以通过复苏后移植、体外受精(IVF)或胞质内精子注射(ICSI)技术得到后代, 是继胚胎冷冻、精子冷冻后, 又一有效保存实验动物种质资源的方法。

1 卵巢组织的程序化冷冻与玻璃化冷冻

卵巢组织的冷冻是利用低温使细胞降温、脱水, 形成非损伤性结冰, 其分子运动速度降低、停止, 组

【基金项目】 国家科技部支撑课题项目(2013BAK11B00)。

【作者简介】 王劲松(1982-), 男, 助理工程师, 硕士研究生, 研究方向: 低温生物学。

【通讯作者】 李保文(1967-), 男, 副主任技师, 研究方向: 实验动物管理与 GLP。

组织细胞处于休眠状态,达到冷冻贮存的目的。目前常用的卵巢组织冷冻方法为程序化冷冻法和玻璃化冷冻法。程序化冷冻法是较为成熟的保存卵巢组织的方法,冷冻效果稳定,但该方法需程序降温仪来控制降温速度,仪器价格昂贵,过程复杂,样本处理数量少,并不适合对实验动物种质资源的保存;此外,在冻融过程中不可避免地在细胞内、外形成冰晶,损伤细胞及细胞间连接结构,相互挤压、变形甚至破裂死亡,影响组织结构及活性。玻璃化冷冻是近十几年新发展起来的冷冻保存技术,在快速降温的过程中,与高浓度的冷冻保护剂混合的水分子没有足够时间排列成晶体结构,并可迅速通过冷冻敏感区,形成介于液体和固体之间的高黏度非晶体的“玻璃化状态”,可使液体分子的凝固呈无序排列,维持溶液的水分子和离子分布,跨膜物质浓度和渗透压差别较小,可以最大限度减少冰晶形成对细胞的机械性损伤^[1]和冻融效应。Fahy 等^[2]将该过程描述为:“液体的黏度逐渐增加直到分子停止运动,从液态性质转变为固态性质”。Liebermann 等^[3]提出合适的冷冻速率会导致水分外流,形成细胞外的玻璃化现象。玻璃化冷冻技术简单、高效,已经成功应用于胚胎和卵母细胞的冷冻保存。1985 年 Rall 首先应用玻璃化冷冻法成功冻融了小鼠胚胎,随后该方法在胚胎、卵母细胞的冻存中开展了应用研究^[4-6],在 20 世纪 90 年代初期,学者对小鼠、大鼠、兔、猴、牛等的卵巢组织进行了玻璃化冷冻研究,取得一系列的成功。

2 影响卵巢玻璃化冷冻的因素

2.1 卵巢组织的前处理

卵巢组织过大或过厚会影响冷冻保护剂的渗透,而且移植后需要更长时间与受体动物形成血管重建、恢复组织供血,易造成移植初期的组织缺血损伤,影响卵泡发育,甚至导致组织坏死。液氮的沸点为 -196°C ,在玻璃化冷冻过程中,卵巢组织块会在浸入液氮时导致液氮的沸腾而产生氮气,包围卵巢组织,形成“蒸汽罩”,减缓热传递,减缓组织降温速率,引起细胞损伤,影响冻存效果。理论上,组织块体积越小,其表面形成的“蒸汽罩”面积就越小,对冻存的效果的影响越小,但组织块体积太小,会造成在切割处理时丢失较多卵泡,产生不能利用的组织块。目前卵巢组织的处理大多为厚度约 1 mm,一般不超过 2 mm。有研究表明,在鼠类动物模

型中,冷冻卵巢组织的一般大小为 $1\text{ mm} \times 1\text{ mm} \times 0.5\text{ mm}$ ^[7]。国内有学者将小鼠卵巢组织块切成 $1 \sim 3\text{ mm}^3$,均可较好地保存其原始卵泡和初级卵泡^[8]。Gook 等^[9]认为,将卵巢组织切割成 $2.0 \sim 5.0\text{ mm}$ 大小对于冻存结果影响不大,但可以保护体积较大的腔前卵泡。有学者对不同形状的卵巢组织块冷冻复苏后的效果做了比较研究,Scott 等^[10]冷冻不同形状的人类卵巢组织,立方体形的组织块较其他形状的组织块更早出现生长较好的存活卵泡。Ishijima 等^[11]将卵巢组织处理为不同大小的立方体,观察发现,冷冻保护剂对 125 mm^3 卵巢组织仍可起到保护作用。

2.2 冷冻保护剂的选择

合适种类与浓度的冷冻保护剂对卵巢玻璃化冷冻至关重要。冷冻保护剂的种类分为渗透性和非渗透性两种,常用的渗透性冷冻保护剂包括二甲基亚砜(DMSO)、乙二醇(EG)和丙二醇(PROH)、甘油、乙酰胺和甲醇等可以渗透到细胞内的小分子类物质;非渗透性冷冻保护剂不能渗透到细胞内,一般是大分子物质,主要包括糖类、聚合物、血清及抗冷冻蛋白等。玻璃化冷冻保护剂的浓度较程序化冷冻保护剂高,高浓度的冷冻保护剂可以升高玻璃化温度,在冷冻降温过程中使细胞内外水分子形成高黏度的“玻璃态”。同时高浓度冷冻保护剂具有更高的细胞毒性作用,增加对细胞的损伤。将不同的冷冻保护剂组合使用,利于其协同作用,提高整体浓度,保证冷冻效果,亦利于控制各组分的浓度,有效降低细胞毒性。渗透性冷冻保护剂中,乙二醇毒性较低,是应用较广泛的冷冻保护剂,但乙二醇在冷冻时形成“玻璃态”的能力较差。二甲基亚砜是较适合卵巢组织冷冻的保护剂,它分子量较小、渗透力强于乙二醇,但细胞毒性较大。有学者将二甲基亚砜与乙二醇、丙二醇混合使用,在卵巢的玻璃化冷冻保存研究中取得较好的效果^[12-15]。蔗糖、海藻糖、棉子糖等糖类及聚乙烯吡咯烷酮(PVP)、聚乙二醇(PEG)、聚乙烯醇(PVA)、聚蔗糖、葡聚糖等聚合物是较常用的非渗透性冷冻保护剂,一般与渗透性冷冻保护剂联合使用,可以减少渗透性冷冻保护剂的用量^[16],降低其细胞毒性。同时大分子物质能够提高冷冻液黏度,加快冷冻液玻璃化过程;并且能够增加细胞外压引起细胞脱水,防止冰晶的形成。此外,非渗透性冷冻保护剂还具有稳定细胞膜结构的作用。高分子聚合物作为非渗透性冷冻保

护剂能够在细胞表面形成黏性膜状结构,在冷冻过程中阻断冰晶形成,减轻冷冻及复温对组织的损伤^[17]。Hashimoto 等^[18]在卵巢的玻璃化冷冻保护剂中添加聚乙烯吡咯烷酮作为非渗透性冷冻保护剂,取得较好效果。Isachenko 等^[19]在将二甲基亚砷、乙酰胺、聚乙二醇及丙二醇联合使用作为冷冻保护剂,具有较好的冷冻保存效果。动物血清和抗冻蛋白的添加对卵巢的玻璃化冷冻效果也有积极地影响。

2.3 渗透平衡方法

卵巢组织结构较复杂,细胞在组织内相互连接成团,其中包括卵泡、基质细胞、颗粒细胞、膜细胞等,冷冻保护剂对不同类型细胞的渗透作用存在差异,为使组织中不同类型的细胞达到相同的冷冻保护剂浓度,适宜的渗透平衡的时间尤为关键,要保证足够的时间使冷冻保护剂充分渗透到细胞内,同时又要避免平衡时间过长增加冷冻保护剂的细胞毒性。此外,渗透平衡的时间也取决于冷冻保护剂的浓度及温度。较高浓度的冷冻保护剂能更好的降低液体的冰点,避免冷冻时结成冰晶损伤组织,但过高的冷冻液浓度会导致细胞内外过高的渗透压差,产生细胞损伤。加入渗透性保护剂后,可降低液体的冰点,并且随浓度升高其降低冰点的能力也升高,因此提高液体中冷冻保护剂的浓度可大大降低液体的冰点。但同时面临的另一问题是随着胞内溶质浓度的升高其渗透压也加大,导致细胞内外产生的较高的渗透压差进而对细胞产生破坏作用。因此冷冻保护剂的浓度必须尽可能的高,使在胞内冰晶形成之前细胞能更充分地脱水,但同时又要调整溶质的渗透压使其造成的有害影响较小。较高的温度会增加冷冻保护剂的毒性,多数文献报道的渗透平衡温度在 0℃~4℃,但也有学者认为在较高的温度下冷冻保护剂可以更快速地渗透,需要更少的平衡时间,反而会降低冷冻保护剂毒性^[20]。

在卵巢组织浸入冷冻保护剂的渗透平衡过程中,要综合分析所用冷冻保护剂的种类、浓度确定平衡温度及平衡时间,着重考虑其保护效果和细胞毒性,以减少冷冻过程对卵巢造成的损伤,保证冻存的效果。Newton 等^[21]的研究表明,以 DMSO 和 EG 用作冷冻保护剂,较适宜的平衡温度为 4℃,而 PROH 在 37℃ 经过 30 min 的渗透平衡,其渗透效果优于 DMSO 和 EG。Fabregues 等^[22]的研究也提出,在 4℃ 时,相比 PROH, DMSO 和 EG 渗透进入卵

巢组织的速度更快。陈薪等^[23]采用乙二醇和蔗糖两步法,预平衡 10 min,将卵巢组织直接投入液氮进行玻璃化冷冻,没有造成细胞 DNA 的损伤。Gook^[24]用 1.5 mol/L 的 PROH 及 1.5 mol/L PROH + 0.1 mol/L 蔗糖作为冷冻保护剂,室温下两步平衡,预平衡 10 min,也取得较好的冻存效果。Moniruzzaman 等^[25]、Santos 等^[26]、Wang 等^[27]均使用两步平衡法,取得成功。

2.4 冷冻载体

冷冻管作为目前普遍采用的卵巢玻璃化冷冻载体,投入液氮时会使液氮沸腾在管周围产生蒸汽,形成“蒸汽罩”,而且冷冻管壁较厚,其材质热传导性也较差,影响降温速率。理想的冷冻载体能保证卵巢组织块的降温速率,使其迅速通过冷冻温度的危险区,同时又能降低卵巢细胞形成“玻璃态”所需要的细胞内液体浓度^[28],减轻冷冻保护液的细胞毒性。目前已有多种新的冷冻载体及操作方法被应用到卵巢组织的玻璃化冷冻上,如电镜铜网 (EMG)^[29]、尼龙网 (nylon mesh)、冷冻环 (cryoloop)^[30]、冷冻载杆 (crytop)、封口式拉长麦管 (CPS)、开口式拉长麦管 (OPS)^[31]、直接覆盖玻璃化冷冻 (direct cover vitrification, DCV)、固体表面玻璃化冷冻 (solid surface vitrification, SSV)、针刺式载体浸入冷冻 (needle immersed vitrification, NIV) 等。中国台湾学者 Chen 等^[32]采用 DCV 法冷冻小鼠卵巢组织,冻存效果优于传统的玻璃化冷冻方法:将经过渗透平衡的卵巢组织放入冻存管底部后直接浸入液氮,盖上冻存管盖,随即放入液氮罐中保存,该方法降温速率可达 15 000 °C/min。Zhou 等^[14]用 DCV 法冷冻人类卵巢组织,冷冻效果与新鲜对照组相似。DCV 法较传统的玻璃化冷冻法大幅提高了冷冻时的降温速率,但是卵巢组织与液氮直接接触,并没有避免液氮沸腾形成的“蒸汽罩”,对冷冻速率仍然有影响。Dinnyes 等^[33]建立了 SSV 法,将经过冷冻液渗透平衡后的卵巢组织放在预先浸入液氮的金属表面上,有效减少“蒸汽罩”的产生,提高了冻存效果。Santos 等^[26]、Carvalho 等^[34]的研究也报道了相似的结论。Wang 等^[35]提出 NIV 方法,以针灸针作为冷冻载体穿刺卵巢组织,直接浸入液氮冻存,这种冻存方法能最大程度减少冷冻降温过程中保护剂的用量,提高降温速率,冻融后获得较好的移植效果。亦有学者采用 NIV 法,使用更低浓度的冷冻保护剂获得较好的冷冻效果^[36]。

3 存在的问题

目前卵巢的玻璃化冷冻尚没有标准的冷冻方法和冷冻液配置方案^[37],最佳的冷冻方法和冷冻液配置方案应对卵巢组织的前处理、冷冻保护液浓度及种类、冷冻平衡时间方法、冷冻载体的选择等方面综合考虑,尽可能减少细胞的物理损伤,降低细胞的化学毒性,保证冻存卵巢的组织活性,提高冻融后卵泡的存活率。近年来,各国学者不断尝试新的冷冻方法,其冻存效果取得了一定的进展。尤其开放载体的应用有很多报道,在获得更快的降温速率的同时,由于卵巢组织直接与液氮接触,存在被微生物污染的风险,对卵巢组织的安全应用有一定的影响。

但随着低温生物学和生殖生物学的不断发展,在新方法、新材料的方面的不断探索尝试,卵巢组织冷冻保存技术一定会日趋完善,为更安全、更高效地保存实验动物种质资源,推动生命科学基础研究及新药研发的更快发展提供有力保障。

参考文献:

- [1] Yeoman RR, Wolf DP, Lee DM. Coculture of monkey ovarian tissue increases survival after vitrification and slow-rate freezing [J]. *Fertil Steril*, 2005, 83(Suppl 1): 1248-1254.
- [2] Fahy GM, MacFarlane DR, Angell CA, et al. Vitrification as an approach to cryopreservation [J]. *Cryobiology*, 1984, 21(4): 407-426.
- [3] Liebermann J, Nawroth F, Isachenko V, et al. Potential importance of vitrification in reproductive medicine [J]. *Biol Reprod*, 2002, 67(6): 1671-1680.
- [4] Rall WF, Fahy GM. Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196 degrees C by vitrification [J]. *Nature*, 1985, 313(6003): 573-575.
- [5] Son WY, Lee SY, Chang MJ, et al. Pregnancy resulting from transfer of repeat vitrified blastocysts produced by in-vitro matured oocytes in patient with polycystic ovary syndrome [J]. *Reprod Biomed Online*. 2005, 10(3): 398-401.
- [6] Kyono K, Fuchinoue K, Yagi A, et al. Successful pregnancy and delivery after transfer of a single blastocyst derived from a vitrified mature human oocyte [J]. *Fertil Steril*. 2005, 84(4): 1017.
- [7] Soleimani R, Heytens E, Van den Broecke R, et al. Xenotransplantation of cryopreserved human ovarian tissue into murine back muscle [J]. *Hum Reprod*, 2010, 25(6): 1458-1470.
- [8] 严晓南, 刘平, 张小为, 等. 玻璃化冷冻保存对小鼠卵巢组织的影响 [J]. *中国比较医学杂志*, 2007, 17(5): 262-265.
- [9] Gook DA, Edgar DH, Borg J, et al. Diagnostic assessment of the developmental potential of human cryopreserved ovarian tissue from multiple patients using xenografting [J]. *Hum Reprod*. 2005, 20(1): 72-78.
- [10] 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.
- [11] Ishijima T, Kobayashi Y, Lee DS, et al. Cryopreservation of canine ovaries by vitrification [J]. *J Reprod Dev*. 2006, 52(2): 293-299.
- [12] 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.
- [13] Sheikhi M, Hultenby K, Niklasson B, et al. Clinical grade vitrification of human ovarian tissue: an ultrastructural analysis of follicles and stroma in vitrified tissue [J]. *Hum Reprod*. 2011, 26(3): 594-603.
- [14] Zhou XH, Wu YJ, Shi J, et al. Cryopreservation of human ovarian tissue: comparison of novel direct cover vitrification and conventional vitrification [J]. *Cryobiology*, 2010, 60(2): 101-105.
- [15] Huang L, Mo Y, Wang W, et al. Cryopreservation of human ovarian tissue by solid-surface vitrification [J]. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 2008, 139(2): 193-198.
- [16] Shaw JM, Kuleshova LL, MacFarland DR, et al. Vitrification properties of solutions of ethylene glycol in saline containing PVP, Ficoll, or dextran [J]. *Cryobiology*, 1997, 35(3): 219-229.
- [17] Kuleshova LL, Shaw JM, Trounson AO. Studies on replacing most of the penetrating cryoprotectant by polymers for embryo cryopreservation [J]. *Cryobiology*, 2001, 43(1): 21-31.
- [18] Hashimoto S, Suzuki N, Yamanaka M, et al. Effects of vitrification solutions and equilibration times on the morphology of cynomolgus ovarian tissues [J]. *Reprod Biomed Online*. 2010, 21(4): 501-509.
- [19] Isachenko E, Isachenko V, Nawroth F, et al. Human ovarian tissue preservation: is vitrification acceptable method for assisted reproduction? [J]. *Cryo Letters*, 2008, 29(4): 301-314.
- [20] Amorim CA, David A, Van Langendonck A, et al. Vitrification of human ovarian tissue: effect of different solutions and procedures [J]. *Fertil Steril*, 2011, 95(3): 1094-1097.
- [21] Newton H, Fisher J, Arnold JR, et al. Permeation of human ovarian tissue with cryoprotective agents in preparation for cryopreservation [J]. *Hum Reprod*, 1998, 13(2): 376-80.
- [22] Fabregues F, Balasch J, Creus M, et al. Ovarian reserve test with human menopausal gonadotropin as a predictor of in vitro fertilization outcome [J]. *Assist Reprod Genet*, 2000, 17(1): 13-19.
- [23] 陈薪, 朱桂金, 魏玉兰, 等. 小鼠卵巢组织玻璃化冷冻的初步研究 [J]. *中国优生与遗传杂志*, 2006, 14(1): 97-99.

(下转第 81 页)