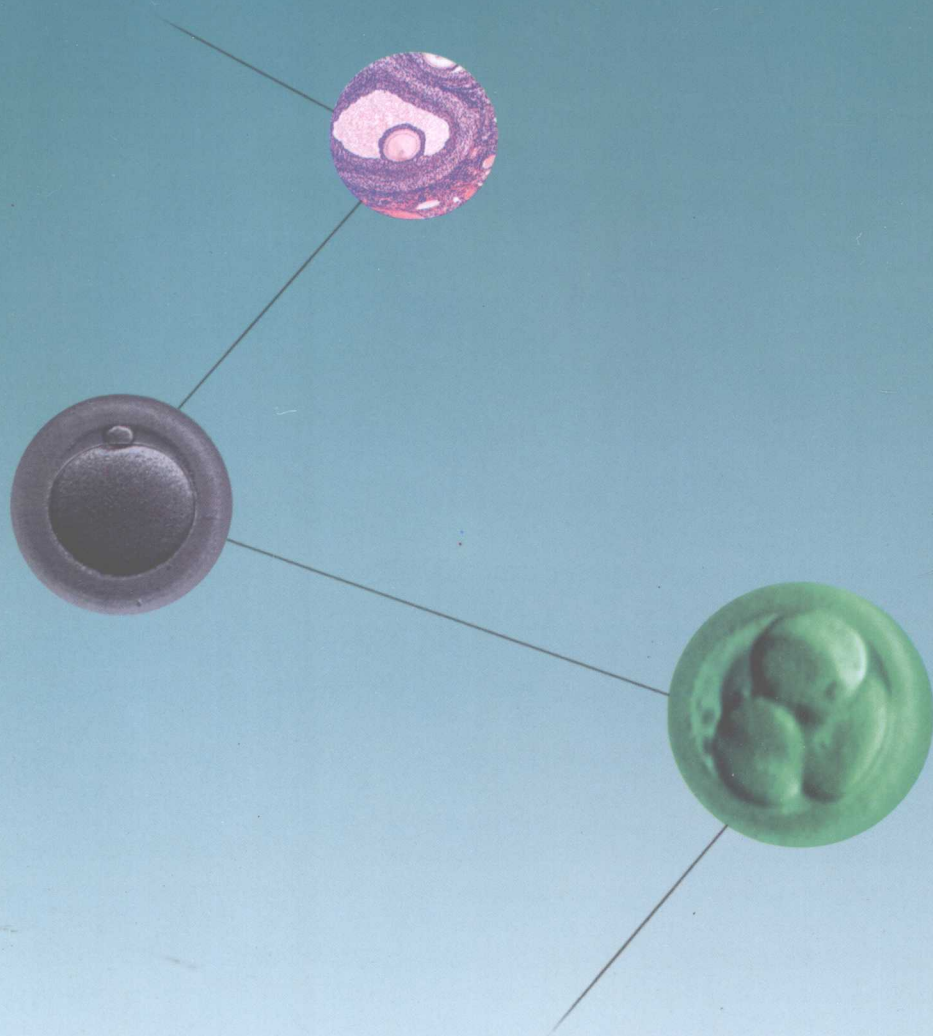


女性生育力体外保存技术

The Techniques in Cryopreservation of Female Fertility

主编 王燕蓉

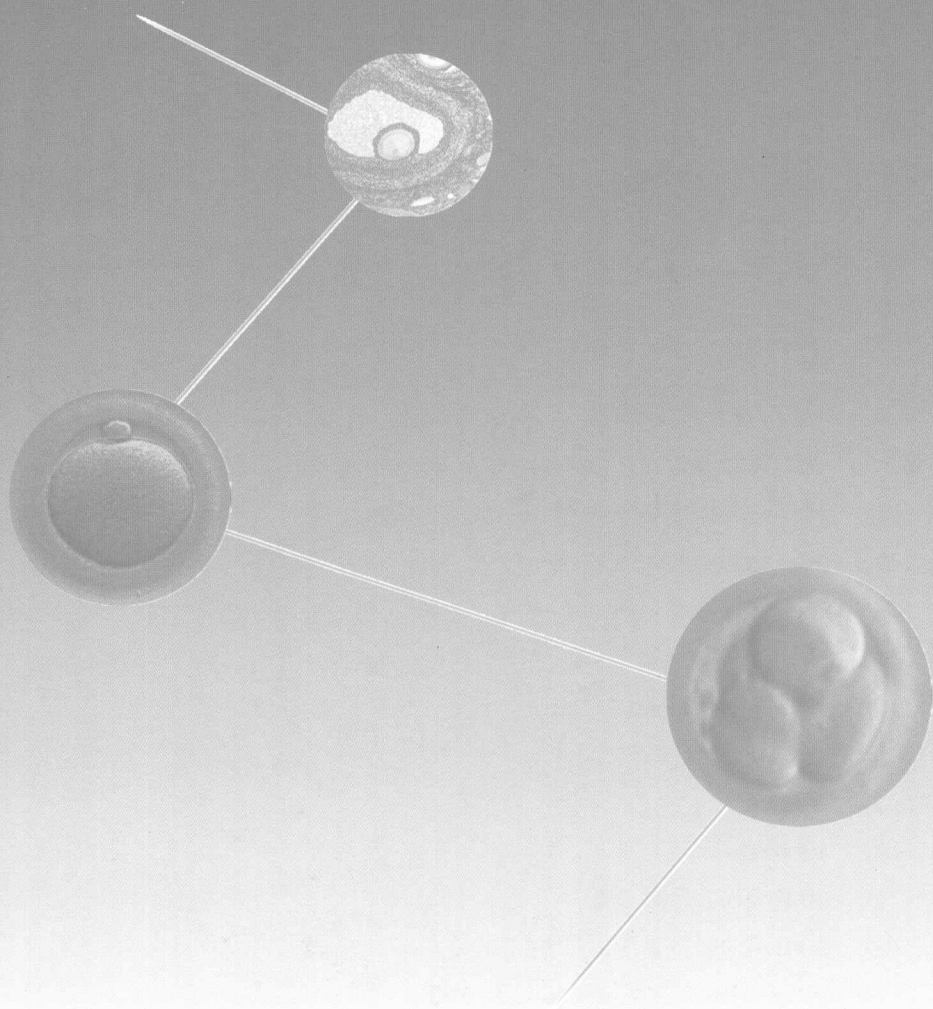


宁夏人民出版社

女性生育力体外保存技术

The Techniques in Cryopreservation of Female Fertility

主编 王燕蓉



宁夏人民出版社

图书在版编目(CIP)数据

女性生育力体外保存技术 / 王燕蓉主编. —银川:宁夏
人民出版社, 2007.12

ISBN 978-7-227-03646-3

I. 女… II. 王… III. 女性—生育—健康—研究 IV. R17

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2007)第 176990 号

女性生育力体外保存技术

主编 王燕蓉

责任编辑 吴月霞

封面设计 万明华

责任印制 来学军

宁夏人民出版社 出版发行

出版人 高伟

地址 银川市北京东路 139 号出版大厦(750001)

网址 www.nxcbn.com

电子信箱 nxcbmail@126.com

印刷装订 银川市飞马印刷厂

开本 787mm×1092mm 1/16

印张 15.75

字数 350 千

印数 1000 册

版次 2007 年 12 月第 1 版

印次 2007 年 12 月第 1 次印刷

书号 ISBN 978-7-227-03646-3/R·102

定价 32.00 元

版权所有 翻印必究

女性是家庭和社会中的重要成员,虽然不孕的原因可能来自男女一方或双方,但从生理学范畴来讲,女性在生育中所承担的角色更加多元化,这就使得女性在维持家庭幸福、美满方面的作用显得更为突出。无论何种原因导致的不孕症,都是一种特殊的生殖健康缺陷,且危害着患者的身心健康。女性健康则家庭稳定、社会稳定。目前,女性生育力保存已成为临床关注的一个重要话题。在过去的30年里,多种癌症的发病年龄也呈现年轻化,其中儿童肿瘤的发病率升高了20%。随着强有力的化疗和放疗及骨髓移植技术的应用,90%患恶性肿瘤的女孩和青年妇女能够存活下来。然而,由于卵巢对有细胞毒性的抗癌治疗、特别是烷化剂和放疗非常敏感,她们在治疗后可能会丧失卵巢功能,降低生命质量。同时,卵巢在经历化疗和放疗后对子代生长发育和遗传安全性的影响,使妇产科专家在实施保留生育功能的妇科恶性肿瘤治疗中不敢有丝毫的大意。此外,遗传、感染、自身免疫性疾病以及一些医源性因素等也可能造成患者卵巢功能早衰,陷入老龄并发问题的困扰中。随着社会的不断发展,许多妇女的结婚和生育年龄都推迟了,她们将面临卵巢早衰所致不育的风险。上述因素所引发的共同问题导致了保存生育力需求的增加。

基于上述的实践需求及本研究室20余年来在低温生物学研究中积累的经验,我们编写了《女性生育力体外保存技术》一书,希望能为将要从事这项工作的医务工作者提供一定的帮助。我们的宗旨是:

1. 力求能如实反映生育力保存的科学面貌、最新成就和发展前景。
2. 在系统阐述基本知识的同时,注重相关技术细节的呈现。
3. 为适应医学、实验动物学专业领域工作者、研究生、本科生的阅读所需,本书力求简明扼要、图文并茂,并附主要参考文献及英汉专业名词对照。

4. 强调基础理论与临床研究的有机结合。

生育力低温保存技术的迅猛发展,不但在医学领域,而且也为农业、畜牧业、医药工业及食品工业等带来了巨大的效益。特别是对保护人类赖以生存的环境、挽救濒危物种、保存生物多样性产生了深远的影响。由于我们的能力有限,疏漏乃至错误在所难免,希望同行和读者批评指正。

王燕蓉

2007年8月于银川

目 录

第一章 女性生育力保存的现状	1
第一节 女性生育力保存的需求	1
第二节 女性生育力保存的途径和可能性	2
第三节 女性生育力保存展望	8
第二章 低温冻存机理及常用方法	16
第一节 低温冻存原理	17
第二节 低温保护剂	18
第三节 低温冻存方法	24
第三章 胚胎的低温冻存技术	34
第一节 人胚胎的低温冻存	34
第二节 小鼠胚胎的冻存技术	49
第三节 家兔桑葚胚的冷冻保存研究	53
第四章 卵母细胞的低温冻存技术	66
第一节 卵母细胞低温冻存的特点及进展	66
第二节 卵子冻融的常用方法	71
第三节 卵母细胞低温冻存技术操作	78
第四节 影响卵母细胞成功冻存的因素	81
第五章 卵巢组织低温冻存活力检测方法	85
第一节 卵巢的结构及功能	85
第二节 冻存卵巢的组织学检查	91
第三节 冻存卵巢组织的体外培养	98
第四节 冻存卵巢组织移植后的功能学检测	102
第六章 实验动物卵巢的低温冻存技术	110
第一节 小鼠卵巢组织及器官的常用冻存方法	110
第二节 小鼠卵巢组织快慢速冻存方法的效果比较	114
第三节 动物卵巢玻璃化冻存技术	119
第七章 成人卵巢组织的冻存与临床应用	134
第一节 成人卵巢组织冻存的临床意义	134

第二节 成人卵巢组织的冻存技术	138
第三节 冻存成人卵巢组织的临床应用研究	146
第八章 胚胎卵巢组织的常规冻存技术	154
第一节 胚胎卵巢组织冻存的意义及可行性	154
第二节 胚胎卵巢组织的慢速程序冻存技术	159
第三节 胚胎卵巢组织的快速冻存技术	163
第九章 胎儿卵巢组织的玻璃化冻存技术	169
第一节 玻璃化冻存法在胎儿卵巢库建立中的作用	169
第二节 人胎儿卵巢组织的玻璃化冻存技术	171
第三节 超玻璃化冻存技术	174
第四节 玻璃化冻存案例分析	175
第十章 抗氧化剂在卵巢组织冻存技术中的应用	188
第一节 氧化损伤对低温冻存效果的影响	188
第二节 抗氧化剂的作用	191
第三节 抗氧化剂在卵巢组织冻存中的应用	195
第十一章 移植免疫基础知识及相关检测技术	202
第一节 移植免疫学基本知识	203
第二节 同种异型移植排斥反应的防治	211
第三节 移植物内淋巴细胞的检测	214
第四节 移植物内 HLA 的检测	219
第十二章 女性生育力保存的伦理原则	223
第一节 生育力保存的伦理学研究	224
第二节 人类辅助生殖技术研究的国际伦理准则	227
第三节 我国实施人类辅助生殖技术的伦理原则	234
第四节 展望	237
汉英专业名词对照	239
后记	247

第一章 女性生育力保存的现状

目前越来越多的女性癌症患者经过治疗后能够长期存活,但一些需要大剂量全身化疗和(或)放疗的年轻女患者和儿童在治疗后可能会丧失卵巢或其功能,因此,对女性恶性肿瘤患者进行保留生育功能的治疗越来越受到重视。而人类生殖技术的发展使女性生育力的保存(preserving fertility in women)成为可能。

第一节 女性生育力保存的需求

一、放疗和化疗病人

1. 青年女性癌症的发病并不罕见。据报道,美国2001年诊断为恶性肿瘤的患者中5万名为40岁以下的年轻女性。经生殖器官的切除、化疗、放疗,骨髓移植后,治愈率可达90%。然而烷基化制剂及电离化放疗可导致卵巢早衰(premature ovarian failure)。已有研究表明,放化疗会使超过30%患有恶性肿瘤的育龄妇女不孕。

2. 儿童癌症发病率在上升。由于癌症治疗水平的提高,使得儿童癌症患者的生存率得到提高,如霍奇金病和Wilm's病的长期存活率达85%。然而大剂量放疗、化疗的严重副作用是对患者生育功能的严重或全部的破坏,Saunders等报道,即使在治疗中采取了卵巢保护措施,只有不到2%的接受过全身放疗的患儿未来能够怀孕。新近的调查提示:到2010年每250个成人中将有1人是儿童期恶性肿瘤长期存活者。这些儿童癌症患者的生育力保存就成为一个研究的重要领域。

3. 非恶性肿瘤患者,如骨髓移植治疗再生障碍性贫血、镰刀性贫血、自身免疫或免疫缺陷性疾病前,需进行大剂量的放疗、化疗,亦严重影响女性的生育力。

二、卵巢功能早衰群体

遗传、感染、自身免疫性疾病以及一些医源性因素等也可能造成患者卵巢功能早衰。卵巢功能衰退造成的雌激素不足,是促成老龄并发问题的因素,其治疗已被看做有关公共健康的重要问题。

三、因事业发展而晚育的阶层

女性生殖衰老的核心是因卵泡数量逐渐减少引起的卵巢衰老。随着社会经济、教育等的不断发展,一些女性的婚育观念逐渐发生了改变,结婚和生育年龄推迟,高龄的生育将使她们面临卵巢衰老、卵母细胞衰老所致不孕的风险,也导致了保存生育力需求的增加。

第二节 女性生育力保存的途径和可能性

对尚无子女的卵巢功能遭受破坏的青年女性癌症患者,有几种生育力体外保存的方法供她们在战胜癌症后实现做母亲的夙愿,这些方法就是胚胎的低温冻存、卵母细胞的低温冻存和卵巢的低温冻存。

一、胚胎的低温冻存

在人类辅助生殖技术中,由体外受精、胚胎移植周期获得的多余胚胎可以通过胚胎冷冻保存(embryo cryopreservation)在移植失败的其他周期使用。它在提高累积妊娠率、增加移植机会、减少卵巢过度刺激、降低患者费用以及限制新鲜胚胎的移植数、降低多胎妊娠率等方面起着重要作用,也为女性体外生育力保存提供了有效的方法。

(一)适用范围

胚胎的低温冻存用于已婚妇女或愿意接受赠精的单身妇女。冻存的胚胎,可在需要时解冻后通过胚胎移植获得后代。

(二)实施要求和限制

胚胎冷冻是较为成熟的体外生育力保存技术,在人类辅助生育技术的快速发展进程中已圆了许多不孕夫妇的生育梦,但下列特点使其应用受限:①需通过促排卵和体外受精(IVF)才能获得所需的胚胎,周期准备、进入实施至结束需要2~3个月的时间。这就不利于及时进行相关的临床治疗,可能会延误癌症治疗的最佳时机。②促排卵治疗的应用有促进部分癌症(如对雌激素敏感的乳腺癌)进一步发展的风险。③对于月经尚未来潮的女孩促排卵存在伦理学争议。④未婚妇女很难同意接受赠精者的精子进行IVF。⑤虽可解决生育问题,但不能恢复自身卵巢的内分泌功能。因此,胚胎冷冻应用十分有限。

二、卵母细胞的低温冻存

卵母细胞的低温冻存(oocyte cryopreservation)是辅助生殖技术中的又一新技术,在辅助生殖技术中,未预期的取精失败及睾丸活检无精子的情况发生在经促超排卵已采集到卵母细胞时,冷冻卵母细胞可作为一种补救手段。应用该项技术还可在法律允许的范围

内为要求接受赠卵的不孕症患者提供人卵,该法也为即将手术或放疗、化疗患者,尤其是青春期或单身女性,提供将来受孕的机会。诞生于北京大学第三医院生殖医学中心的世界第2例、我国第1例“三冻”婴儿(冷冻精子、冷冻卵母细胞、冷冻胚胎),反映了我国目前在卵母细胞冻存技术方面的发展已经达到了国际水平。

(一) 卵子冻存的适用范围

原则上讲卵子冻存适用于已婚妇女、单身妇女和进入青春期后的青少年。冻存卵子复苏后,可通过体外受精和胚胎移植技术获得自己的后代。尽管卵母细胞保存技术有了极大的改善,但来自卵母细胞冻存的婴儿只有200余名。对于卵母细胞的保存方法而言,其应用面临较大的挑战。

(二) 实施要求和限制

同胚胎冻存一样,成熟卵母细胞冻存也需要促排卵治疗,因此,既不适合年幼的患者,也存在延误患者疾病治疗的难题。要想获得成熟的卵母细胞,只能在月经周期的限定时间段收集,且数量有限。卵母细胞的冻存虽可解决生育问题,但不能恢复自身卵巢的内分泌功能。

单精子卵浆内注射术(intracytoplasmic sperm injection, ICSI)的发展使卵子受精率得到明显提高,通过冻存卵母细胞达到生育目的已不再是梦想。但卵母细胞的冻存尚有一些瓶颈需要突破,首要问题就是冷冻方法需进一步改善,这是由于卵母细胞特殊的细胞生物学特性所决定的。

1. 成熟卵母细胞的冻存

成熟卵母细胞(第二次减数分裂中期,metaphase II, M II期)体积相对较大,具有复杂的细胞内骨架结构和大量的细胞质,对温度变化很敏感。冷冻的过程、冻存液等因素都可使纺锤体解聚,虽然复温时可复聚,但正常的染色单体分离过程可能被扰乱,造成染色体缺失,产生非整倍体的几率增加,而且细胞损伤的修复能力很差。因此,与胚胎和精子冻存相比,成熟卵母细胞解冻后的存活率比较低,妊娠及分娩率在1%~5%/冻卵。因此必须研究能够确保卵母细胞遗传安全的低温保护剂和冷冻程式。

2. 未成熟卵母细胞的体外成熟效率亟待提高

未成熟卵母细胞(germinal vesicle, GV, 或 metaphase I, M I)体积小,没有减数分裂中期的纺锤体,因此对冻存具有较强的耐受力。冻存未成熟卵母细胞的显著优点是患者无需进行刺激排卵。但是,未成熟卵母细胞解冻后需在体外培养至成熟,有人报道,冻融后未成熟卵母细胞的核成熟率较高,但发育能力普遍较低。人的生发泡(GV)期卵母细胞解冻后的存活率小于40%,仅有约20%存活的卵母细胞在体外发育到囊胚。这是因为激素环境以及培养基的组成成分等大量因素会影响卵母细胞其后的受精率、卵裂率和妊娠率,尤其是对其安全性的确切报道并不多。

三、卵巢的低温冻存

目前,对各种原因所致的卵巢早衰的防治仍处在研究阶段,应用促性腺激素释放激素类似物可防止化疗药物对卵巢的损害;卵巢自身移植术或移位术对宫颈癌术后需加放射治疗者也是一种保留卵巢功能的有效方法。但有研究发现,将宫颈癌患者一侧或双侧卵巢移位于髂前上棘2cm水平以上并不能避免盆腔放疗对卵巢的损伤。同时卵巢在经历了化疗和放疗后,对子代生长发育和遗传安全性的影响也使妇产科专家在妇科恶性肿瘤保留生育功能治疗中不敢有丝毫的大意。

卵巢组织冷冻(ovarian tissue cryopreservation)及复苏后的移植,理论上讲可为患者提供均衡的生殖内分泌激素和其他生物活性因子,同时,由于该技术可不经促排卵而冻存大量未成熟卵,具有节省费用和减少超排卵可能引起的卵巢过度刺激征的优点,对癌症患者也不用担心延误治疗。因此,对于青年癌症患者和希望保存年轻时卵巢的女性,将卵巢组织冷冻保存,待拟生育或病情缓解后再行卵巢自体移植,在一定程度上可恢复卵巢内分泌功能和生育能力。

(一)适用范围

对于肿瘤病人而言,冻存卵巢组织,比冻存卵子或胚胎有着诸多优势,尤其适用于希望恢复女性性腺功能的妇女,其优点在于:

1. 卵巢是一个巨大的卵子库

年轻妇女 1mm^3 的卵巢皮质内有数百个小卵泡,理论上,每一个卵细胞都可能产生一个成熟的卵子,这是一个巨大的卵子库。

2. 不耽误肿瘤的治疗

卵巢冷冻可使数以百万计的卵母细胞在未经促排卵的情况下保存起来,且不耽误原有肿瘤的治疗,没有伦理道德方面的限制。

3. 移植后可恢复生殖内分泌功能

在卵泡发育过程中必然伴随着卵巢内分泌功能的恢复,不但可以减轻因生理性、病理性或医源性引发的卵巢早衰患者的更年期症状,提高生活质量,而且对一般妇女来讲,在绝经前将年轻时冻存的卵巢组织移植回体内也可以减缓其衰老进程,还女性第二青春,这是卵子和胚胎冻存所不能实现的。

4. 具有更高的子代遗传安全性

少量的卵巢皮质包含大量原始卵泡,理论上这些卵泡能够通过移植术或体外成熟培养获得成熟卵子;同时,由于这些原始卵泡大多停止于细胞分裂前期,因而理论上这些卵子携带的细胞遗传学错误风险较小。

5. 较强的冷冻耐受性

由于卵巢皮质中大量的原始卵泡尚未形成透明带,且含有较少的细胞器,只有少量

冷敏感性胞内脂质,所以理论上比成熟卵子更能耐受冻融。

因此,卵巢冻存是青春期前的女性患者及不可延误和影响治疗的女性癌症患者保存生育力和生殖内分泌功能的唯一选择。

(二) 冻存方式

卵巢可通过3种方式进行冻存:一是卵巢组织的冻存;二是带血管蒂的完整卵巢的冻存;三是分离卵泡的冻存。

1. 卵巢组织的冻存

Okta^y 等报道,将一位30岁乳腺癌患者的卵巢组织冻存6年后自体移植入腹部皮下组织,3个月后移植的卵巢功能恢复,经皮穿刺取出20个卵母细胞,在体外受精的8个卵母细胞中,有1个正常受精并发育为4细胞胚胎。Donnez 研究组于1997年在1名Ⅳ期霍奇金淋巴瘤患者进行化疗前,将其卵巢皮质的活检组织冷冻保存。化疗后,该患者出现卵巢早衰。2003年将冷冻的卵巢皮质组织复苏后,采用腹腔镜法原位移植到患者体内。移植5个月后,患者恢复了正常的排卵周期。移植11个月后,血HCG浓度和阴道超声图像检查证实为宫内妊娠,分娩一健康女婴。Meirow 研究组于2000年对一位28岁患非霍奇金淋巴瘤的妇女在经历了两个疗程的化疗和骨髓移植后,在IVF刺激排卵没有成功后进行了卵巢皮质的冻存。腹腔镜下取出卵巢组织,组织学检查含大量的原始卵泡和少量的初级卵泡,没有窦卵泡(大的次级卵泡)。采用程序控制慢速降温法,以1.5mol/L DM-SO 为保护剂对卵巢皮质片(15mm×5mm×1mm~15mm×5mm×2mm)和极小的卵巢组织片(ovarian cortical strips)进行了冻存。大剂量化疗后2年,该病人卵巢衰竭。Meirow 进行了冻存卵巢皮质片的原位移植,移植后8个月恢复自发月经,第9个月行IVF,成功妊娠,38周后,娩出一健康女婴。这两个成功的例子提示,卵巢组织冷冻移植适用于患有癌症的年轻女性。到目前为止,人卵巢的冷冻毫无例外的是使用无血管吻合的卵巢皮质片的冷冻,而且也是有活婴出生的仅有的方法。

2. 整体卵巢的冻存

冷冻整体卵巢是低温生物学和生殖医学的一个巨大的挑战。众所周知,影响卵巢组织冻存后移植卵泡存活、发育及卵巢功能维持时间长短最主要的因素是在移植最初阶段的缺血损伤。血管吻合的整体卵巢的移植可有效地解决这个问题。Wang 等报道将Lewis 大鼠的卵巢、输卵管、部分子宫以及血管完整切除,冻融后经血管吻合进行整体卵巢移植,术后大鼠血雌二醇(E₂)升高,卵泡刺激素(FSH)下降,并成功妊娠。Bedaiwy 等对绵羊进行大量实验证实:冻融的整体卵巢移植后组织内的细胞凋亡率和卵泡成活率与冻融的卵巢皮质片相比无明显差别;此外,将冻融的完整卵巢自体移植回绵羊体内,1周内检测FSH和E₂的水平与未切除卵巢前也无明显差别。Courbiere 研究组对羊卵巢灌注后进行玻璃化冻存,解冻后61.4%的卵泡存活,正常的原始卵泡百分率保持在48%。采用慢速程序控制冷冻法冻存灌注的整体卵巢,原位移植后9只羊中4只显示黄体功能,1只怀孕,产下一健康仔羊,移植

18~19个月后,组织学检查显示,9只中的6只大部分卵巢基质保持完整,移植物的卵泡存活率为1.7%~7.6%。以上研究证实了整体卵巢移植的可行性。因此,冻存和移植整体卵巢为将来希望保存卵巢功能的患者提供了一个新的选择方法。

3. 分离卵泡的冻存

卵巢皮质组织内含大量未成熟的卵母细胞,其体积小,保护剂易于渗入,且结构简单,代谢率低,卵子无透明带及周围皮质颗粒,静止于第一次减数分裂前期,理论上发生细胞遗传错误的几率低,且在以后的生长过程中有时间修复细胞器和其他结构的非致死性损伤,因此不易受到冷冻损伤。而且,这种方法可以给宿主引入大量已知数量的卵泡,可快速获得血供,并最大限度地减少缺血和再灌注损伤。来自冻存卵巢的原始卵泡移植已在小鼠获得成功产仔。然而,由于人卵泡的体积较大、富含纤维和基质致密,故机械分离卵泡困难较大,必须结合胶原酶进行酶解。Oktay发展了人卵泡的分离技术,无论是新鲜的还是冷冻的卵巢均获得了较高的卵泡存活率。

对于癌症患者来说,由于卵泡的基底膜将卵母细胞和颗粒细胞包裹在一起,癌细胞不能进入该结构中,移植完全分离的卵泡可以防止微小肿瘤灶的移植后复发。的确,分离的原始卵泡在裸鼠体内的移植存活率达60%以上,如果通过卵巢皮质移植而将癌细胞再次导入病人体内的风险不能排除的话,那么我们有理由相信未来卵泡移植具有的可能性和安全性。然而,分离原始卵泡和体外培养使其达到成熟的工作依然比较困难。为了提高卵泡存活率和生殖功能恢复的能力,必须对人卵泡分离的程序进一步优化和标准化。

4. 其他

有研究者建议将卵母细胞和卵巢组织的冻存与体外培养和成熟技术相结合,作为保存患者生殖功能的新方法。还有研究者将冻融的卵巢组织自体移植或异种移植,当卵泡发育到一定阶段取出卵母细胞,再将其体外培养至成熟。这一方案不仅充分利用了卵母细胞,而且扩大了冻存的范围,进一步满足了卵巢早衰患者保存卵巢功能的迫切要求。

(三) 实施要求及限制

冷冻技术与卵巢移植技术的结合将有效地解决各种原因所致的卵巢功能衰竭带来的后果。一般采用将解冻的卵巢组织进行自体或异体移植的方法恢复卵巢功能,也可采用从冻存卵巢组织中分离卵泡进行培养的方法获得成熟卵泡。

1. 自体移植

自体移植由于不受免疫排斥因素的影响,操作相对简单,并发症少,能维持正常的内分泌功能和恢复正常的月经周期,具有比其他移植方式更佳的效果。自体移植主要有自体原位移植和自体异位移植两种方法。

(1) 原位移植

①卵巢移植和卵巢组织移植:如果子宫和输卵管的功能正常,自体原位移植后可恢

复生育力。移植的方法主要有带血管蒂的卵巢移植和无血管吻合的卵巢组织移植。Lee 等成功将新鲜卵巢移植于猴子的不同部位,有卵母细胞产生,通过受精和代孕,有一健康雌猴出生。该实验中异位移植的卵巢组织在没有进行重要血管吻合的情况下,恢复了功能。绵羊和受照射鼠的卵巢移植实验证明,冻融卵巢组织自体原位移植能够保存卵泡数,且妊娠率与新鲜卵巢相比无显著差异。羊卵巢皮质片原位移植,几天内有血管生成,4个月建立排卵周期,卵巢皮质片作用长达2年,并有小羊出生。Radford 等将1例32岁的霍奇金淋巴瘤患者化疗前卵巢切除并冻存,化疗后19个月,再将冻存后的卵巢皮质片移植于卵巢悬韧带处的腹膜上,术后7个月患者潮热症状改善,并有1次月经来潮,移植植物中卵泡直径最大达2cm。目前,全世界已有两例来自自体冻存卵巢原位移植出生的健康婴儿。对保留血管系统的卵巢组织进行自体移植,血管吻合不仅是解决由于局部缺血而影响组织成活率的最佳方法,同时也是最大限度地延长卵巢功能的唯一途径。临床实验认为,血管吻合有利于改善移植后卵巢的生存状况和生理功能。小动物如鼠、兔卵巢器官的冷冻后无血管吻合移植可以存活,但家畜和人卵巢体积相对较大,一方面过大的体积限制冻存效果,且必须进行显微血管吻合,难度较大。尽管已有羊整体卵巢冻存后移植的报道,但尚无人全卵巢冻存移植成功的报道。

②播种移植:Almodin 等的研究提供了一种新的称为播种移植的方法。先将4只母羊的右侧卵巢切除并将皮质切成小碎片冻存,左侧卵巢接受了3周的放射治疗,经组织学证实,经过放疗后的卵巢组织已纤维化,无存活卵泡。放疗结束后6周,冻存后的卵巢组织通过注射方式被“种植”到其中2只母羊的左侧卵巢,术后6个月,移植组自然受孕并活产,其中1只母羊2次受孕并活产,而非移植组母羊没有受孕。

(2) 异位移植

①肾是一个免疫特赦区,肾被膜下卵巢移植是移植组织迅速血管化的一个理想部位。然而此部位不适合人卵巢的移植,但却是检测卵巢组织冻存效果的一个稳定的部位。

②人体卵巢移植选用皮下移植或肌肉内移植。选取的部位有乳房外侧、前臂、腹壁下、腹股沟部及腋窝内。这些部位较为隐蔽,皮下脂肪丰富、疏松,易容纳移植植物,移植植物受压小,并且便于随访观察。前臂卵巢组织移植术不需要全麻,且相对简单,更易于监控及必要时切除卵巢组织。当移植组织的卵泡耗尽时可以再次手术植入新的皮质片。Ok-tay 等报道了将冻存卵巢自体移植到宫颈癌(鳞癌)患者前臂皮下和乳腺癌患者腹壁下,术后卵巢功能基本恢复,从移植植物中抽吸出卵子,并有卵子正常受精并发育成4细胞胚胎。尽管皮下移植有利于超声检查和收集卵母细胞,但有研究报告,肌肉内移植卵泡的完整性保持得更好,卵泡损伤的数量显著低于皮下移植。皮下移植后卵巢的周期性排卵及卵泡液的刺激常形成皮下囊肿或结节,而腹腔内则无此弊端。

2. 异种移植

目前临床实验中采用的异种移植,是指将冻融的卵巢组织移植于不同种的宿主动物体

内,然后收集成熟卵子达到为肿瘤患者保存生殖能力的目的。常用的异种动物为重症联合免疫缺陷鼠(severe combined immunodeficiency, SCID)。由于癌细胞不能穿过透明带,应用该技术可避免癌症病人因自体冻存卵巢的回移可能导致的肿瘤传播及复发,也可避免原始卵泡(始基卵泡)体外生长和成熟过程中遇到的一些技术难点。本研究组将冷冻的人胎儿卵巢组织移植到免疫缺陷小鼠体内,卵泡继续发育到成熟,观察到排卵和黄体的形成。

3. 体外培养

卵巢组织体外成熟有着巨大的潜在价值,可以将冻存卵巢组织中的多个原始卵泡分离收集起来,不需要对患者进行卵巢移植手术,尤其对于肿瘤化疗的患者,可避免癌细胞的转移,对于保存其生殖能力有着巨大的优势。

有研究表明,解冻后培养的卵巢可进一步降低免疫原性,有利于移植卵巢组织的存活。因此解冻后的卵巢组织可通过体外培养的方法提高异体卵巢移植的利用效果。

由于体外成熟、异体和异种移植受到技术和伦理问题的限制,原位、异位自体移植已成为目前最有前途的应用途径。

4. 存在的限制

然而,卵巢的低温冻存的应用面临以下问题:①卵巢移植对癌症妇女存在一定风险,这个风险就是伴随自体卵巢移植带来的微小残存癌症灶有可能引起癌症的复发。②移植卵巢功能维持时间较短。单就该技术的临床应用来讲,卵巢组织移植后移植物的维持及受体生育力恢复的技术研究尚处于实验阶段,如移植物的功能目前多维持在2年,这是由于冻存皮质片不能过大所造成的。③体外成熟需要改进现有的卵巢体外成熟系统、弄清卵泡发育的机制、研究体外成熟的安全性。

综上所述,女性生育力保存的3种方法中,以胚胎冻存最为成熟,而卵子和卵巢的低温冻存虽然适用对象宽泛,富于诱人的前景,但临床应用却面临诸多的挑战。

第三节 女性生育力保存展望

对于女性恶性肿瘤患者,生殖能力的储备要根据肿瘤患者化疗时间、肿瘤类型、年龄及配偶情况选择不同的方法。

一、胚胎的冻存

患者有配偶或愿意接受供者配子的,胚胎冷冻保存应为首选方法。对于卵巢组织库来说,首选卵母细胞冷冻保存。面对这两种方法存在的刺激排卵的弊端,临床学家们正在积极选择可应用于不同患者的促排卵药,以克服超排卵带来的使部分对雌激素敏感的癌症进一步发展的可能。对于乳腺癌患者,他莫昔芬和芳香酶抑制因子可用于卵巢刺

激。对子宫内膜癌患者,芳香酶抑制因子是唯一可用的超排卵的刺激药。

二、卵母细胞的低温冻存

人类卵母细胞冻存虽然取得了很大进展,解冻存活率及移植妊娠活婴分娩率较前有所提高,但技术上的问题仍需完善。如何进一步提高复苏率及降低冷冻对卵子的影响一直是研究的重点。冷冻 M II 期卵母细胞对纺锤体可能造成的损伤,会影响到胚胎的遗传物质。由于出生的孩子数目不多,对遗传安全性的长期追踪随访还需进行。玻璃化冷冻法快速有效,但由于采用的载体支架均为开放性,如何避免污染就成为实验室要解决的首要问题。

三、卵巢的低温冻存

(一)存在的问题

尽管卵巢组织的冷冻和应用已有很大发展,但真正应用于临床还有下列问题亟待解决:①寻求最佳冷冻-解冻方案,以减少冷冻损伤;②如何降低移植过程中产生的缺血-再灌注损伤;③最佳移植部位的确定和为移植物提供快速血管化的优良条件;④癌症患者冻存卵巢自体移植的安全性,特别是癌细胞筛查的结果须引起注意;⑤能否真正完全恢复卵巢组织的功能以及怎样延长其移植后的功能。如果以上问题得到解决,卵巢组织的冷冻及其应用将会有更大发展。

(二)对策

近年来,研究者的目光集中到了增大卵巢皮质片、优化冷冻程式和寻找保护移植组织免受缺血损伤的方法上。其目的在于维持较为长久的冻存卵巢移植后的功能。

1. 提高冷冻效率

已成功产下两名婴儿的冻存卵巢采用的是慢速冻存法。玻璃化冷冻法比传统的慢速冷冻法简单、有效,具有强大的发展潜力。但还没有一个通用的冷冻方法和标准的冷冻液配制方案,且高浓度的冷冻保护剂对细胞和组织有毒害作用,故还有待进一步的研究。

2. 提供可延长移植卵巢生命周期的有效措施

维持较长的生殖生命周期(reproductive life span, RLS)是卵巢冻存和移植的主要目的。如果卵巢移植的目标是长期保存生育能力或从移植卵巢的小碎片中收集大量的成熟卵泡,那么扩大存活卵泡的数量就显得极为重要。虽然小的皮质片可迅速达到保护剂和温度变化的内外平衡,但过小的切片会造成卵泡破坏过多,并且产生无用的组织片。增大组织切片的面积和厚度可能是一个可供选择的途径,研究者们正在寻求最佳的条件和对策。

(1)增大冻存的皮质片体积的可行性

卵巢皮质片的冻存及解冻后的无血管吻合移植较整体卵巢的冻存和移植更简便、经

济,且易于操作,目前大多数移植实验都来自没有血管吻合的卵巢组织皮质片的冻存。由于卵巢组织切片移植后的功能状态及其保存时期长短的不确定性,为保存生育能力,储存相对较多卵泡的卵巢皮质则更为安全。已有的研究显示,小皮质片冻存后移植卵巢功能的恢复在4.5~8个月,维持时间在3年左右。Salle等报道在9只母羊上自体移植冻存卵巢后,其中4只母羊自然受孕并活产。经过长期监测,发现曾产下幼仔的4只母羊中的2只,在移植2年后再次受孕,但娩出后的幼仔死亡,尸检未发现畸形,同时组织学证实移植植物中的卵泡数目大量减少。实验提示了自体移植冻存卵巢能在一定时间内恢复生殖功能,但随着卵泡数目的减少,远期移植植物的功能还不能确定。

(2) 大皮质片冻存移植带来的问题

卵巢皮质片移植属于非血管吻合术,移植后血运的迅速重建是手术成功的关键。移植后的缺血期以及缺血-再灌注损伤常导致原始卵泡大量丧失(原始卵泡的丢失可达50%~60%),造成移植后卵巢功能低下和生存期缩短,而对大皮质片来讲这个问题就尤为突出。整体卵巢冻存可通过显微血管吻合使血液及时到达移植的卵巢,但它的冻存和移植难度大。虽然从移植的可操作性看,完整卵巢的移植符合生理状态,保存的卵泡数多,但由于需要进行血管蒂的吻合,技术要求较高;同时完整卵巢体积大,保护剂的渗入靠灌流实现,冷冻时内外温度变化不易快速达到平衡。Courbiere等对带血管蒂的完整羊卵巢进行玻璃化液灌注,灌注后进行玻璃化冻存。伴随而来的严重问题是血管的破裂和损伤,尤其是动脉内皮细胞,而内皮细胞的损伤常导致移植后的血栓形成。令我们看到希望的是有研究证明,无血管吻合的较大卵巢组织片(直径约2cm,厚2~3mm)自体异位移植后能够存活,且2mm与3mm两组间原始卵泡的数量和微血管的密度无明显差异。目前大多数移植实验都是没有血管吻合的卵巢组织皮质片移植。

(3) 降低卵巢移植后的缺血损伤所致的卵泡丢失

有研究表明,冻融过程中有7%的卵泡丢失,而在移植后血管再生过程中有65%的卵泡丢失。很明显,这种移植过程造成的初级卵泡的丢失远比冻存过程要多,除了与冻存效果有关外,无疑还与移植植物局部缺血缺氧的持续时间有关,而血管生成是影响无血管吻合移植植物存活和生长的重要因素。

①血管吻合技术:该技术需要对卵巢动静脉与移植部位相应血管进行吻合,技术要求高,是整体卵巢冻存后移植必须采用的方法,也是延长移植植物功能寿命(functional life span of a graft)的有效方法。显微外科的发展提高了移植卵巢吻合血管的通畅率,血管在移植术后几分钟就可为移植植物提供充足的血液,并长期开放。Martinez-Madrid采用慢速程序控制降温法对带血管蒂的完整人卵巢进行冻存,60℃水浴解冻后观察,发现卵巢内各种细胞的超微结构与细胞凋亡均未发生明显的变化。该结果为完整卵巢的冻存和血管吻合移植提供了有利的技术支撑和形态学依据。

②血管内皮生长因子的应用:血管生成过程受多种因子调控,其中血管内皮生长因

子(vascular endothelial growth factor, VEGF)是目前发现的最重要的促血管生成因子。它是一种高度特异的内皮细胞有丝分裂原,通过与受体结合,直接刺激内皮细胞分裂、游走和增殖,从而促进血管形成。VEGF 同时还具有提高血管通透性的作用,促进血浆胶体成分外渗,从而为移植物的早期营养及与受体间的血管重建提供前提条件。理论上可以用外源性血管生成因子促进移植部位新生血管形成,但由于血管形成和生长的过程复杂,这些因子的使用时间、剂量和方式研究尚不成熟。

③促性腺激素的应用降低了卵泡的凋亡:近几年,人们明确了与血管生成特异相关的 VEGF 与女性生殖系统血管生成的关系。然而,最新发现的内分泌腺相关血管内皮生长因子(endocrine gland-derived vascular endothelial growth factor, EG-VEGF),它仅限制性地表达在卵巢等产类固醇的内分泌腺中,可诱导靶内皮细胞的增生、迁徙和有孔表型,并可能与 VEGF 互补,共同调节血管生成。在正常人体器官中,血管生长处于静息状态,但妇女生殖系统具有周期性变化与损伤组织的周期性修补,因而具有周期性的血管分布与生成的变化。在每个月经周期中,卵泡与黄体的交替变化伴随有毛细血管网的同步发展。说明卵巢组织含有丰富的血管生长基因,因此找到一种有利于血管生长或避免缺血损伤的办法十分必要。研究表明,在卵巢移植血管化重组过程中 VEGF 起着上调作用,这种血管形成刺激因子的上调作用除了受缺氧诱导外,促性腺激素可调节卵巢内血管生长因子水平。Weissman 等证明卵巢皮质移入 NOD/SCID 小鼠皮下后,外源性促性腺激素能刺激移植的卵泡生长发育,同时也能刺激窦卵泡的发育并恢复排卵。皮下移植卵巢具有过程简单、观察方便、可直接吸取卵泡进行评价等优点。Imthurn 等为研究外源性促性腺激素(gonadotropin, Gn)对移植卵巢成活卵泡数的影响,将小鼠卵巢组织移植到血管相对较少的腹壁皮下,结果显示,受体或供体在移植前和移植后各接受两天外源性促性腺激素(rhFSH + rhLH)刺激,移植后生长卵泡数明显增加。其解释为,可能血管生长因子,如 VEGF, TGF 等的合成在移植前已达到有效浓度,并维持一定时间,以诱导新血管的形成,减轻局部缺血缺氧的发生。我们的实验发现,在微量促性腺激素的刺激下,移植 18 周的冻存胎儿卵巢组织内卵泡只能停留在窦前卵泡阶段。而移植时加大促性腺激素后,移植后第 10 周卵巢组织学检查发现移植物内有窦卵泡发育。

既然 VEGF 在血管新生过程中有着如此重要的作用,那么给予外源性的 VEGF 不是更直截了当吗?但许多研究证实:局部使用外源性 VEGF,可以刺激血管生成及增强皮瓣和肌瓣存活,但是,直接使用 VEGF 效果短暂。还有研究表明,移植后外源性促性腺激素的给予将明显消耗原始卵泡数,从而降低卵巢的生命周期。因此摸索可调控 VEGF 的基因表达的相关因素,确定最佳部位,或许可避免缺血损伤。

3. 防止微小癌症灶的转移

尽管育龄妇女中大多数癌症不会向卵巢转移,且导管癌通常多发生在育龄后妇女中,癌肿子宫转移亦多发生于癌症晚期,但其卵巢移植仍然存在着一定风险。动物实验