

[doi: 10.3969/j.issn.1006-7795.2017.04.001]

· 更年期与妇科内分泌 ·

人卵巢组织冻存与移植研究进展

李扬璐¹ 阮祥燕^{1,2*} Alfred O. Mueck^{1,2}

(1. 首都医科大学附属北京妇产医院内分泌科, 北京 100026; 2. 德国图宾根大学妇产医院内分泌与绝经中心, 图宾根 D-72076, 德国)

【摘要】 随着癌症治疗学的发展, 癌症病人的生存率有了很大的提高。但性腺毒性治疗对肿瘤病人的生育力造成了不可逆的影响。有效的保护肿瘤病人的生育力, 提高她们的生殖健康水平, 是医疗工作者面临的重要问题。卵母细胞冻存、胚胎冻存、卵巢组织冻存等技术的发展是为女性生育力保护提供了可能。本文将简述目前常用的生育力保护方法, 重点介绍人卵巢组织冻存与移植技术在生育力保护方面的重要作用。

【关键词】 性腺毒性治疗; 生育力保护; 卵巢组织冻存与移植; 卵母细胞冻存; 胚胎冻存

【中图分类号】 R711.75

Progress in human ovarian tissue cryopreservation and transplantation

Li Yanglu¹, Ruan Xiangyan^{1,2*}, Alfred O. Mueck^{1,2}

(1. Department of Gynecological Endocrinology, Beijing Obstetrics and Gynecology Hospital, Capital Medical University, Beijing 100026, China; 2. Section of Endocrinology and Menopause, Department of Women's Health, University of Tubingen, Tubingen D-72076, Germany)

【Abstract】 The survival rate of cancer patients is increasing with the development of cancer treatment methods. However, gonadotoxic therapies have an irreversible impact on ovarian function. Effective fertility protection and improving the level of reproductive health have become a crucial problem that health care providers confront. Improvements of oocyte and embryo cryopreservation, and ovarian tissue cryopreservation and transplantation provide feasible options for women's fertility protection. This review discusses the common fertility protection methods, focusing on the important role of human ovarian tissue cryopreservation and transplantation for fertility protection.

【Key words】 gonadotoxicity therapy; fertility protection; ovarian tissue cryopreservation and transplantation; oocyte cryopreservation; embryo cryopreservation

卵巢是女性重要的生殖内分泌器官, 主要作用为产生卵子并排卵和分泌激素, 对于维持女性的生殖功能和内分泌功能有重要意义。随着癌症诊断和治疗学的进步, 放射治疗(以下简称放疗)以及细胞毒性抗癌药物在临床上的普遍应用, 癌症病人的生存率有了很大提高。研究^[1]显示, 15~29岁癌症病人总体5年生存高达83%。年轻癌症病人在病愈后的生育要求也越来越突出, 年龄在45岁以下的癌症病人中约有33.5%~78.3%渴望在治疗后生育或再次生育^[2]。因此, 除降低癌症相关病死率外, 提高癌症病人病愈

后的生活质量、保护生育力也是应当研究的重点。本文将简述放疗及化学药物治疗(以下简称化疗)对女性生殖力的影响、女性生育力保护方法, 着重介绍人卵巢组织冻存与移植的相关研究进展。

1 放射治疗与化学药物治疗对卵巢功能的影响

放射治疗与化学药物治疗(以下简称放化疗)导致卵泡耗竭、间质纤维化、血管损伤^[3], 使得年轻癌症女性早绝经的发病风险增高, 患癌女童在性腺毒性治

基金项目: 首都临床特色应用研究与成果推广(Z161100000516143), 首都卫生发展科研专项项目(2016-2-2113), 北京市医院管理局临床技术创新项目(XMLX201710), 北京市卫生系统高层次卫生技术人才(学科带头人)(2014-2-016), 国家外国专家局2017年度北京市引进国外技术、管理人才项目(20171100004)。This study was supported by Capital Characteristic Clinic Project of China(Z161100000516143); Beijing Capital Foundation for Medical Science Development and Research(2016-2-2113); Clinical Technique Innovation Project of Beijing Municipal Administration of Hospitals(XMLX201710); Beijing Municipality Health Technology High-level Talent(2014-2-016); Foreign Technical and Administrative Talent Introduction Project in 2017, State Administration of Foreign Experts Affairs of China(20171100004).

* Corresponding author, E-mail: ruanxiangyan@163.com

网络出版时间: 2017-07-16 17:23 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3662.r.20170716.1723.028.html>

疗后会出现青春期延迟、原发性或继发性闭经^[4]。放疗对卵巢功能的损伤程度取决于化疗方案和剂量,放疗剂量和照射区域以及治疗前的卵巢储备功能^[5]。对于使用含有烷化剂(如环磷酰胺)的化疗方案,造血干细胞移植前的全身照射或卵巢直接照射的女性,其卵泡耗竭程度最明显。Meirow^[6]的研究显示,使用烷化剂可致42%的女性出现卵巢早衰,其可能机制是烷化剂经肝脏首过效应后的代谢产物可引起DNA双链断裂,增生活跃的细胞对烷化剂最敏感,各种发育程度的卵泡也受累^[7]。卵巢受到放疗($\geq 5\text{Gy}$)或造血干细胞移植前放疗后,早绝经风险增高20倍^[8]。原始卵泡体外培养显示,化疗药物可诱导凋亡机制,引起卵泡结构紊乱以及前颗粒细胞肿胀^[5]。放化疗后女性出现闭经、潮热、盗汗等围绝经期症状,进而出现心血管疾病、骨密度降低甚至骨质疏松,这将严重影响癌症病人的生存质量^[9]。因此,为癌症病人选择有效化疗方案的同时,避免年轻病人的卵巢医源性损伤也是医生应当考虑的内容。

2 女性生殖力保护方法

目前,女性生殖力保护的方法主要有:卵母细胞冻存、胚胎冻存和卵巢组织冻存,以及药物治疗和手术^[10]。

2.1 卵母细胞冷冻

卵母细胞冻存包括成熟卵母细胞和未成熟卵母细胞的冻存。一项Meta分析^[11]显示,玻璃化冷冻方法在卵子存活率、受精卵和胚胎质量方面可获得更好的结果。成熟卵母细胞(M II期)冻存是在放化疗前进行控制性超促排卵获取成熟卵母细胞并进行冷冻,在病人痊愈后解冻,通过体外受精-胚胎移植(in vitro fertilization-embryo transfer, IVF-ET)受精获得胚胎。癌症病人与非癌症病人卵母细胞解冻后的每例胚胎移植活产率相似(44% vs 33%),说明卵母细胞冻存对于育龄期癌症女性是一种安全有效的选择^[12]。需要注意的是,促排卵时机需根据女性的月经周期而定,从确立癌症诊断到促排卵实施需要较长时间,一项关于乳腺癌的Meta分析^[13]显示,化疗开始时间每延迟4周,总体生存率即下降15%。促排卵过程中所致的雌激素升高对于雌激素依赖性肿瘤(如乳腺癌、卵巢癌等)病人是否适用,也是选择成熟卵母细胞冻存时医生应考虑的问题。Oktay等^[14]建议对乳腺癌病人在放化疗前采用芳香化酶抑制剂(如来曲

唑)联合卵泡刺激素进行促排卵,但目前缺乏长期随访的结果。

未成熟卵母细胞(GV期或MI期)冷冻不需超促排卵,不推迟放化疗开始时间,可从卵泡期、黄体期或卵巢组织中获取,但与传统辅助生殖技术相比,卵母细胞体外成熟的临床结局较低^[15]。目前,通过未成熟卵母细胞体外培养冻融后的活产案例鲜有报道。

2.2 胚胎冷冻

胚胎冷冻技术已成为临床常规使用的生育力保护方法,冷冻卵裂球期或囊胚期的胚胎较稳定,玻璃化冷冻复苏率可达90%以上^[16],冻融周期的妊娠率显著高于新鲜周期胚胎移植的妊娠率,这有可能是胚胎和子宫内膜同步发育的结果^[17]。尽管缺乏大型随机对照研究评价胚胎冷冻对出生子代健康的影响,冻胚移植仍被认为是安全可靠的^[18]。胚胎冷冻能有效减少促排卵治疗中的激素刺激,并提高累计妊娠率。Roy等^[19]的研究认为,与慢速冷冻法相比,玻璃化胚胎冷冻能最大程度减小细胞损伤,提高复苏后存活率。但该技术仅适用于已婚女性。与成熟卵母细胞一样,胚胎冷冻也需卵巢刺激获取多个卵母细胞,标准的促排卵方案从卵巢刺激到获取卵母细胞,大约需要2~6周的时间^[20],卵巢超促排卵过程中的高雌激素暴露对乳腺癌、子宫内膜癌、卵巢癌等雌激素依赖性肿瘤有可能产生不利影响。

2.3 卵巢组织冻存与移植

1996年Hovatta等^[21]首次报道人卵巢组织冻存成功。2004年,第1例经卵巢组织冻存及自体移植的婴儿出生^[22]。截至2016年12月底的数据,目前世界范围内通过卵巢组织冻存及自体移植技术已成功诞生86名婴儿,另有9名婴儿即将出生^[23]。与卵母细胞冻存和胚胎冻存相比,一片卵巢组织可保存数百甚至上千个不同发育等级的卵泡,生殖力储备丰富,日后可用于自体移植或分离卵泡体外培养为成熟卵母细胞,通过体外受精(in vitro fertilization, IVF)获得胚胎^[24];不依赖于病人的生理周期,不需超促排卵,在癌症确诊后可立即进行腹腔镜下卵巢组织取材,或在癌症治疗开腹手术时取材,不推迟放化疗开始时间^[25];无论病人婚否,均可进行卵巢组织冻存,是青春期前女孩的唯一选择^[26];不仅能够有效保存病人生育力,还能在一定程度上恢复卵巢的内分泌功能。基于这些优势,卵巢组织冻存与移植具有广阔的应用前景。

2.3.1 卵巢组织冻存的适应人群

年龄是卵巢组织冻存需考虑的重要因素,女性在35岁以后,卵巢储备功能随年龄下降,年龄大于38岁的女性不建议进行卵巢组织冻存。许多中心将卵巢组织冻存年龄上限定为35岁^[27]。

Donnez等^[27]认为,寻求卵巢组织冻存的因素可分为癌症、良性疾病和社会因素3大类,具体如下:

1) 癌症:①系统性疾病,包括霍奇金淋巴瘤、非霍奇金淋巴瘤、白血病、成神经管细胞瘤;②盆腔外疾病,包括骨肿瘤(骨肉瘤、尤文肉瘤)、乳腺癌、黑色素瘤、神经母细胞瘤、肠道恶性肿瘤;③盆腔疾病,包括盆腔肉瘤、横纹肌肉瘤、骶骨肿瘤、直肠乙状结肠癌、早期宫颈癌、早期阴道癌、早期外阴癌、卵巢癌早期(I A期)、卵巢交界性肿瘤。

2) 良性疾病:①单侧或双侧卵巢切除,原因包括良性卵巢肿瘤、严重或复发性子宫内膜异位症、BRCA1或BRCA2基因突变携带者;②具有早绝经风险的疾病,包括特纳综合征、早绝经家族史、需化疗的良性疾病(系统性红斑狼疮、类风湿关节炎、贝赛特氏症、Wegener's肉芽肿病);③需骨髓移植的疾病,包括良性血液病(镰状细胞贫血、重症地中海贫血、再生障碍性贫血)、对免疫抑制剂不应答的自身免疫性疾病。

3) 社会因素:年龄因素、因社会或经济因素推迟生育的病人。

需要注意的是,白血病病人的卵巢组织中可能存在恶性白血病细胞。Delmarn等^[28]对比利时某卵巢组织冻存库15年的数据进行了分析,发现391名癌症病人的卵巢组织中,13%在光学显微镜下发现卵巢组织中有癌细胞转移,白血病病人的卵巢组织移植片中恶性白血病细胞的风险最高。Dolmans等^[29]采用反转录酶-聚合酶链锁反应(reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR)技术发现50%的白血病病人中恶性细胞阳性,而在白血病完全缓解后取材的卵巢组织并未发现恶性白血病细胞^[30],因此,在第一次缓解后和骨髓移植前进行卵巢组织取材可有效降低移植的风险。尽管目前未发生移植后癌症复发^[24],但严格的监测方法,应用组织学、免疫组织化学以及RT-PCR、荧光原位杂交等方法以避免癌细胞的人侵、肿瘤复发和播散是保障卵巢组织移植后安全性的关键^[31]。

对于白血病、Burkitt淋巴瘤、神经母细胞瘤等移

植高风险的疾病^[32],从卵巢组织中分离第一次减数分裂前期双线期(G V期)或第一次减数分裂中期(M I期)的卵母细胞体外培养至第二次减数分裂中期(M II期)的成熟卵母细胞,可以有效避免卵巢组织移植后肿瘤复发的风险^[33]。未成熟卵泡体外培养对环境要求较高,技术复杂,需要动态、多步的培养环境以配合卵泡发育不同阶段,维持卵母细胞与体细胞(即颗粒细胞)的相互联系^[34]。目前只有动物实验能够通过该技术实现子代出生^[35],Xiao等^[36]通过两步培养法首次将人类窦前卵泡体外培养至M II期。

2.3.2 卵巢组织冻存方法

卵巢组织冻存是在低温条件下使卵巢组织细胞降温、脱水和非损伤性冰晶形成,进而使各种分子运动速度减慢、停止,细胞代谢率降低,处于休眠状态。目前广泛使用的冻存方法根据冻存速度的不同分为快速冷冻和慢速冷冻(slow freezing)。快速冷冻又称玻璃化冷冻(vitrification),使用高浓度的冷冻保护剂(cryoprotective agent, CPA)逐步渗透和梯度洗脱的方法,经快速降温后,使物质由液态直接转化为非晶体玻璃化状态或无定形态,胞质内外的水物质在超过1500 °C/min的降温速度下,迅速通过5~15 °C的冷冻敏感区,可最大限度避免细胞内冰晶形成,减轻冰晶形成所造成的挤压损伤和冻融效应,降低细胞损伤^[37]。慢速冷冻又称程序化冷冻,是一种传统冷冻方法,采用较低浓度的冷冻保护剂在程序化冷冻仪的控制下缓慢降温使细胞充分脱水,直至进入液氮。方法成熟、效果稳定,由于降温速度慢,适合体积相对较大的卵巢组织块。

目前哪种方法更有利于保存卵巢组织存在争议。有研究^[38-39]认为慢速程序化冷冻需要的CPA浓度较低,对细胞毒性相对较小,CPA可在冻存前和冻存过程中缓慢均匀地渗入整个组织,可有效保存细胞活性;也有研究认为,玻璃化冷冻使细胞内外的水物质转化为介于固、液态之间且粘度高的非晶体“玻璃化”状态,减少对细胞结构的损伤,在保存次级卵泡形态和卵巢基质细胞方面更有优势^[40-41]。研究^[39, 42-43]显示,二者在维持形态学完整性(原始和初级卵泡形态),体外培养雌激素释放量,以及冻存后卵泡增生/凋亡比率方面相似。值得注意的是,目前各中心采用玻璃化冷冻的CPA浓度、种类差别较大,冷冻载体也不尽相同,因此,许多中心将玻璃化冷冻与慢速冷冻比较得出不同的结论,不排除此原因。此外,玻璃化

冷冻的卵巢组织复苏后有被液氮中微生物污染的风险,安全性也是该冷冻技术未来应用中需要克服的问题。根据现有报道^[23],世界范围内通过卵巢组织冻

存技术出生的 86 名婴儿中,只有 2 名经玻璃化冷冻技术诞生。因此,这 2 种方法的优劣仍有待研究,二者的比较见表 1。

表 1 程序化冷冻与玻璃化冷冻的比较
Tab. 1 Comparison of slow freezing and vitrification for ovarian tissue cryopreservation

	Slow freezing	Vitrification
Freezing speed	Slow cooling by a control rate freezing device, taking a longer time	Plunged directly into liquid nitrogen after permeating and eluting of CPA step by step, taking a shorter time
Toxicity	High concentration of CPA with low toxicity	Low concentration of CPA with high toxicity
Cell injuries	Easier to induce ice crystal formation	Reducing ice crystal formation
Carriers	Cryotubes	Cryoloop, straw, acupuncture needle (NIV), free carriers (direct dropping)
Microbial contamination	sterile	nonsterile
Successful births	A total of 84 successful births (until Dec 2016)	Only 2 births (until Dec 2016)

CPA: cryoprotective agent; NIV: needle immersed vitrification

2.3.3 卵巢组织移植

卵巢组织的移植分为原位移植和异位移植,原位移植包括卵巢髓质、子宫阔韧带、卵巢囊或腹膜窗等,异位移植多选择腹壁、前臂、腹直肌等^[44]。原位移植的优点在于更靠近输卵管,所以只有原位移植有自然怀孕的可能;缺点是如果移植部位选择卵巢髓质或卵巢囊,移植片数量受卵巢体积的限制,且原位移植需进行侵入性操作^[45]。理论上讲,由于卵泡发育对温度、压力、血供和旁分泌等有严格的要求,与异位移植相比,盆腔及腹膜内环境(腹膜液及特殊的氧化作用)能够为卵泡发育提供更好的环境^[24]。但在一项研究^[46]中,5 名将卵巢组织异位移植到腹直肌或腹直肌鞘的女性,内分泌功能在移植后 3~5 个月均得以有效恢复。异位移植的优点在于:①避免了侵入性操作;②易获取卵泡;③再移植成本较低;④如因放疗或手术后出现严重盆腔粘连而不适合移植时,可进行异位移植^[46],但需通过 IVF 技术才能妊娠。

卵巢功能的恢复可通过雌二醇水平的升高和促性腺激素水平降低来判定,超声下检测到黄体可证实有排卵^[44]。研究^[24]报道的卵巢组织自体移植后恢复卵巢功能的时间不一,多数为 2.0~6.5 个月不等。采用程序化冷冻后复苏的卵巢组织块,无论较大[如(8~10)mm×5mm]或较小的组织块(如 2mm×2mm)均能有效恢复卵巢的内分泌功能^[47]。每次移植后的妊娠率约为 27%~33%^[47-49],这些妊娠妇女中自然怀孕率高达 50%~91%^[49-50]。

影响移植后卵巢寿命的因素有:①卵巢储备功能(卵泡密度,取决于年龄);②冻存前化疗;③移植组织

片体积和卵巢组织准备方法(冷冻-复苏技术);④移植的皮质片中卵泡分布;⑤移植部位的血管形成能力,影响移植后缺血程度^[24]。

2.4 药物治疗

主要指在放疗前注射促性腺激素释放激素激动剂(gonadotropin-releasing hormone agonist, GnRHa)抑制卵巢功能,首次应用于 30 多年前。其可能涉及的机制有降低原始卵泡活性、减少低刺激素状态下的卵巢血流灌注、减少卵巢凋亡或通过 GnRH 激活化疗中的抗凋亡途径^[51]。但 GnRHa 能否有效保护卵巢功能,各方观点不一。Turner 等^[52]对 12 项试验结果分析指出,GnRHa 在保护年轻乳腺癌病人卵巢功能方面效果并不确切。体外研究^[51]显示 GnRHa 对放疗造成的卵巢功能损伤无任何保护作用。而一项 Meta 分析^[53]显示,化疗期间采用 GnRHa 短暂抑制卵巢功能能够降低卵巢早衰风险。出现上述争议可能是病人的人口学特征、化疗方案、随访时间、研究终点等不同所致。2013 年美国临床肿瘤学会(American Society of Clinical Oncology, ASCO)指南^[18]指出,GnRHa 在生殖力保护方面的证据并不充分,但也许可以产生其他益处,如减少化疗所致血小板降低时的阴道出血。因此,GnRHa 在保护卵巢功能方面的效果仍值得探究。

2.5 卵巢移位

卵巢移位一般在腹腔镜下即可完成,在盆腔照射前将卵巢固定在距盆腔较远的位置,但不改变其与输卵管的位置关系,通常选择腹前外侧壁,脐上 3~5 cm。但该手术对卵巢功能的保护作用很有限,经卵巢悬吊的女性在盆腔放疗后发生卵巢早衰的风险曾有

报道达15%~40%^[27],但现在越来越多的临床实践证明,基本没有保护作用。2013年ASCO指南^[18]建议育龄期女性在盆腔放疗前可行卵巢移位手术以保护卵巢功能,但由于放射线比较分散,应告知病人该技术并非能够成功有效地保护卵巢功能。

3 小结与展望

近年来由于患癌人群的逐年增长,肿瘤生殖学也越来越受到人们的关注。2013年ASCO指南^[18]建议,“医疗工作人员(包括妇科肿瘤、儿科肿瘤、血液科医生等)进行知情同意的过程中,应当向即将采取性腺毒性治疗的病人告知其治疗不孕的可能性,并为他们提供生殖力保护的指导建议,为她们选取合适的生殖医学专家”。重视肿瘤病人的生殖力保护,对提高其病愈后的生活质量,给予她们生活的勇气,具有重要的意义。卵母细胞冻存、胚胎冻存均可以满足病人未来的生育要求,但如前所述,具有一定的局限性;GnRHa和卵巢悬吊手术在保护卵巢功能方面效果并不明确;卵巢组织冻存除解决病人癌症痊愈后的生育要求外,还能够恢复卵巢的内分泌功能,对于治疗时间紧迫或不能接受超促排卵的病人,是最佳的生殖力保护选择,也是青春期前癌症生存者的唯一选择。现有的研究^[54]有足够的证据表明,卵巢组织冻存及移植技术,是应该从实验阶段快速发展到临床实践的时候了,此技术具有广阔的应用前景,是保护女性生育力的理想选择。

4 参考文献

- [1] Furlong W, Rae C, Greenberg M L, et al. Surveillance and survival among adolescents and young adults with cancer in Ontario, Canada[J]. *Int J Cancer*, 2012, 131(11):2660-2667.
- [2] Schmidt R, Richter D, Sender A, et al. Motivations for having children after cancer—a systematic review of the literature [J]. *Eur J Cancer Care*; (Engl), 2016, 25(1):6-17.
- [3] Morgan S, Anderson R A, Gourley C, et al. How do chemotherapeutic agents damage the ovary? [J]. *Hum Reprod Update*, 2012, 18(5):525-535.
- [4] Chemaitilly W, Li Z, Krasin M J, et al. Premature ovarian insufficiency in childhood cancer survivors: A Report from the St. Jude Lifetime Cohort[J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2017, Epub ahead of print.
- [5] Meirou D, Biederman H, Anderson R A, et al. Toxicity of chemotherapy and radiation on female reproduction [J]. *Clin Obstet Gynecol*, 2010, 53(4):727-739.
- [6] Meirou D. Reproduction post-chemotherapy in young cancer patients[J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2000, 169(1-2):123-131.
- [7] Codacci-Pisanelli G, Del P L, Del G M, et al. Mechanisms of chemotherapy-induced ovarian damage in breast cancer patients[J]. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2017, 113:90-96.
- [8] Swerdlow A J, Cooke R, Bates A, et al. Risk of premature menopause after treatment for Hodgkin's lymphoma[J]. *J Natl Cancer Inst*, 2014, 106(9):pii.
- [9] Sullivan S D, Sarrel P M, Nelson L M. Hormone replacement therapy in young women with primary ovarian insufficiency and early menopause [J]. *Fertil Steril*, 2016, 106(7):1588-1599.
- [10] De Vos M, Smits J, Woodruff T K. Fertility preservation in women with cancer[J]. *Lancet*, 2014, 384(9950):1302-1310.
- [11] Glujovsky D, Riestra B, Sueldo C, et al. Vitrification versus slow freezing for women undergoing oocyte cryopreservation[J]. *Cochrane Database Syst Rev*, 2014(9):D10047.
- [12] Druckenmiller S, Goldman K N, Labella P A, et al. Successful oocyte cryopreservation in reproductive-aged cancer survivors[J]. *Obstet Gynecol*, 2016, 127(3):474-480.
- [13] Yu K D, Huang S, Zhang J X, et al. Association between delayed initiation of adjuvant CMF or anthracycline-based chemotherapy and survival in breast cancer: a systematic review and meta-analysis[J]. *BMC Cancer*, 2013, 13:240.
- [14] Oktay K, Turan V, Bedoschi G, et al. Fertility preservation success subsequent to concurrent aromatase inhibitor treatment and ovarian stimulation in women with breast cancer[J]. *J Clin Oncol*, 2015, 33(22):2424-2429.
- [15] Gremeau A S, Andreadis N, Fatum M, et al. In vitro maturation or in vitro fertilization for women with polycystic ovaries? A case-control study of 194 treatment cycles[J]. *Fertil Steril*, 2012, 98(2):355-360.
- [16] 潘宁宁,马彩虹. 女性生育力保存与肿瘤生殖学[J]. *中国妇产科临床杂志*, 2015, 16(6):481-482.
- [17] Roque M, Lattes K, Serra S, et al. Fresh embryo transfer versus frozen embryo transfer in in vitro fertilization cycles: a systematic review and meta-analysis [J]. *Fertil Steril*, 2013, 99(1):156-162.
- [18] Loren A W, Mangu P B, Beck L N, et al. Fertility preservation for patients with cancer: American Society of Clinical Oncology Clinical Practice Guideline update[J]. *J Clin Oncol*, 2013, 31(19):2500-2510.
- [19] Roy T K, Brandi S, Tappe N M, et al. Embryo vitrification using a novel semi-automated closed system yields in vitro

- outcomes equivalent to the manual Cryotop method [J]. *Hum Reprod*,2014,29(11):2431-2438.
- [20] Bedoschi G, Oktay K. Current approach to fertility preservation by embryo cryopreservation [J]. *Fertil Steril*,2013,99(6):1496-1502.
- [21] Hovatta O, Silye R, Krausz T, et al. Cryopreservation of human ovarian tissue using dimethylsulphoxide and propanediol-sucrose as cryoprotectants [J]. *Hum Reprod*,1996,11(6):1268-1272.
- [22] Donnez J, Dolmans M M, Demylle D, et al. Livebirth after orthotopic transplantation of cryopreserved ovarian tissue [J]. *Lancet*,2004,364(9443):1405-1410.
- [23] Jensen A K, Macklon K T, Fedder J, et al. 86 successful births and 9 ongoing pregnancies worldwide in women transplanted with frozen-thawed ovarian tissue: focus on birth and perinatal outcome in 40 of these children [J]. *J Assist Reprod Genet*,2017,34(3):325-336.
- [24] Donnez J, Dolmans M M, Pellicer A, et al. Restoration of ovarian activity and pregnancy after transplantation of cryopreserved ovarian tissue: a review of 60 cases of reimplantation [J]. *Fertil Steril*,2013,99(6):1503-1513.
- [25] Lambertini M, Del M L, Pescio M C, et al. Cancer and fertility preservation: international recommendations from an expert meeting [J]. *BMC Med*,2016,14:1.
- [26] Wallace W H, Smith A G, Kelsey T W, et al. Fertility preservation for girls and young women with cancer: population-based validation of criteria for ovarian tissue cryopreservation [J]. *Lancet Oncol*,2014,15(10):1129-1136.
- [27] Donnez J, Dolmans M M. Fertility preservation in women [J]. *Nat Rev Endocrinol*,2013,9(12):735-749.
- [28] Dolmans M M, Jadoul P, Gilliaux S, et al. A review of 15 years of ovarian tissue bank activities [J]. *J Assist Reprod Genet*,2013,30(3):305-314.
- [29] Dolmans M M, Marinescu C, Saussoy P, et al. Reimplantation of cryopreserved ovarian tissue from patients with acute lymphoblastic leukemia is potentially unsafe [J]. *Blood*,2010,116(16):2908-2914.
- [30] Greve T, Clasen-Linde E, Andersen M T, et al. Cryopreserved ovarian cortex from patients with leukemia in complete remission contains no apparent viable malignant cells [J]. *Blood*,2012,120(22):4311-4316.
- [31] Bockstaele L, Tsepelidis S, Dechene J, et al. Safety of ovarian tissue autotransplantation for cancer patients [J]. *Obstet Gynecol Int*,2012,2012:495142.
- [32] Dolmans M M, Luyckx V, Donnez J, et al. Risk of transferring malignant cells with transplanted frozen-thawed ovarian tissue [J]. *Fertil Steril*,2013,99(6):1514-1522.
- [33] Fadini R, Dal Canto M, Mignini R M, et al. Embryo transfer following in vitro maturation and cryopreservation of oocytes recovered from antral follicles during conservative surgery for ovarian cancer [J]. *J Assist Reprod Genet*,2012,29(8):779-781.
- [34] Telfer E E, Zelinski M B. Ovarian follicle culture: advances and challenges for human and nonhuman primates [J]. *Fertil Steril*,2013,99(6):1523-1533.
- [35] Lonergan P, Fair T. Maturation of oocytes in vitro [J]. *Annu Rev Anim Biosci*,2016,4:255-268.
- [36] Xiao S, Zhang J, Romero M M, et al. In vitro follicle growth supports human oocyte meiotic maturation [J]. *Sci Rep*,2015,5:17323.
- [37] 覃颖,李慕军. 卵巢组织玻璃化冷冻保存和移植的研究进展 [J]. *中国组织工程研究*,2012,16(18):3411-3416.
- [38] Gosden R G, Yin H, Bodine R J, et al. Character, distribution and biological implications of ice crystallization in cryopreserved rabbit ovarian tissue revealed by cryo-scanning electron microscopy [J]. *Hum Reprod*,2010,25(2):470-478.
- [39] Klocke S, Bundgen N, Koster F, et al. Slow-freezing versus vitrification for human ovarian tissue cryopreservation [J]. *Arch Gynecol Obstet*,2015,291(2):419-426.
- [40] Ting A Y, Yeoman R R, Lawson M S, et al. In vitro development of secondary follicles from cryopreserved rhesus macaque ovarian tissue after slow-rate freeze or vitrification [J]. *Hum Reprod*,2011,26(9):2461-2472.
- [41] Herraiz S, Novella-Maestre E, Rodriguez B, et al. Improving ovarian tissue cryopreservation for oncologic patients: slow freezing versus vitrification, effect of different procedures and devices [J]. *Fertil Steril*,2014,101(3):775-784.
- [42] Sanfilippo S, Canis M, Smits J, et al. Vitrification of human ovarian tissue: a practical and relevant alternative to slow freezing [J]. *Reprod Biol Endocrinol*,2015,13:67.
- [43] Amorim C A, Curaba M, Van Langendonck A, et al. Vitrification as an alternative means of cryopreserving ovarian tissue [J]. *Reprod Biomed Online*,2011,23(2):160-186.
- [44] Rodriguez-Wallberg K A, Oktay K. Recent advances in oocyte and ovarian tissue cryopreservation and transplantation [J]. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*,2012,26(3):391-405.
- [45] Practice Committee of American Society for Reproductive Medicine. Ovarian tissue cryopreservation: a committee opinion [J]. *Fertil Steril*,2014,101(5):1237-1243.
- [46] Kim S S. Assessment of long term endocrine function after

- transplantation of frozen-thawed human ovarian tissue to the heterotopic site; 10 year longitudinal follow-up study[J]. *J Assist Reprod Genet*,2012,29(6):489-493.
- [47] Donnez J, Dolmans M M. Transplantation of ovarian tissue [J]. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*,2014,28(8):1188-1197.
- [48] Jadoul P, Guilmain A, Squifflet J, et al. Efficacy of ovarian tissue cryopreservation for fertility preservation: lessons learned from 545 cases [J]. *Hum Reprod*,2017,32(5):1046-1054.
- [49] Van der Ven H, Liebenthron J, Beckmann M, et al. Ninety-five orthotopic transplantations in 74 women of ovarian tissue after cytotoxic treatment in a fertility preservation network; tissue activity, pregnancy and delivery rates [J]. *Hum Reprod*,2016,31(9):2031-2041.
- [50] Donnez J, Silber S, Andersen C Y, et al. Children born after autotransplantation of cryopreserved ovarian tissue. A review of 13 live births[J]. *Ann Med*,2011,43(6):437-450.
- [51] Bildik G, Akin N, Senbabaoglu F, et al. GnRH agonist leuprolide acetate does not confer any protection against ovarian damage induced by chemotherapy and radiation in vitro [J]. *Hum Reprod*,2015,30(12):2912-2925.
- [52] Turner N H, Partridge A, Sanna G, et al. Utility of gonadotropin-releasing hormone agonists for fertility preservation in young breast cancer patients: the benefit remains uncertain[J]. *Ann Oncol*,2013,24(9):2224-2235.
- [53] Lambertini M, Ceppi M, Poggio F, et al. Ovarian suppression using luteinizing hormone-releasing hormone agonists during chemotherapy to preserve ovarian function and fertility of breast cancer patients: a meta-analysis of randomized studies[J]. *Ann Oncol*,2015,26(12):2408-2419.
- [54] Donnez J, Dolmans M M. Ovarian tissue freezing: current status[J]. *Curr Opin Obstet Gynecol*,2015,27(3):222-230.

(收稿日期:2017-06-05)

编辑 慕 萌