

[文章编号] 1674-8115(2013)08-1171-05

· 综述 ·

# 卵子冷冻技术的应用进展

王 瑶, 狄 文

(上海交通大学 医学院附属仁济医院生殖科, 上海 200127)

**[摘要]** 玻璃化卵子冷冻技术的发展使卵子冷冻后的解冻复苏率、妊娠率和婴儿出生率显著提高,目前的研究专注于降低冷冻保护剂的毒性及提高冷冻的安全性。玻璃化冷冻技术的关键是提高卵子的冻融效能。目前对冷冻后卵子长时间储存于液氮中的安全性问题尚缺乏充分研究,但鉴于其复苏率和使用效能的长足提高,现已趋于将该技术作为女性生育力保存或卵子馈赠的重要手段。文章就卵子冷冻技术的研究进展进行综述,包括玻璃化卵子冷冻的应用、意义,冷冻、解冻速率,未成熟卵子冷冻,卵子储存,卵子冷冻安全性等方面。

**[关键词]** 卵子;玻璃化冷冻;生育力;保存;妊娠

**[DOI]** 10.3969/j.issn.1674-8115.2013.08.028

**[中图分类号]** R714

**[文献标志码]** A

## Progress of application of oocyte cryopreservation techniques

WANG Yao, DI Wen

(Department of Reproductive Medicine, Renji Hospital, Shanghai Jiaotong University School of Medicine, Shanghai 200127, China)

**[Abstract]** Recent advances in vitrification techniques have markedly improved the efficacy of oocyte cryopreservation in terms of oocyte survival and pregnancy as well as live birth rates. However, there is still room for improvement of oocyte vitrification techniques. Remaining challenges include the development of less cytotoxic vitrification solutions and safe vitrification devices. Guided by the principles of cryobiology, it should be noted that the essential element to oocyte survival during the vitrification-thawing procedures is a very high warming rate during thawing. There is no solid evidence to suggest a safety issue when the vitrified oocytes are stored for prolonged periods of time in liquid nitrogen. While recent advances in the efficacy of oocyte vitrification have been positioned by this technology as a standard procedure for female fertility preservation or in the setting of egg donation, long-term follow-up of infants born from this technology remains essential. The research progress of oocyte cryopreservation techniques is reviewed in this paper, including the application and role of vitrification techniques, velocities of freezing and thawing, immature oocyte cryopreservation, oocyte preservation and safety of oocyte cryopreservation.

**[Key words]** oocyte; vitrification freezing; fertility; preservation; pregnancy

胚胎、卵子和卵巢组织的冷冻是保存女性生育力的三项主要手段,各有其优缺点,适用于不同群体。越来越多的学者<sup>[1]</sup>认为,卵子冷冻应被视为辅助生殖技术一项重要的组成部分。2013年美国生育年会颁布的指导原则表明,目前成熟卵子的冷冻已不再局限于实验研究<sup>[2]</sup>。

先前的卵子冷冻实验运用慢速冷冻法,当时被认为是胚胎冷冻金标准。然而,慢速冷冻卵子导致极低的胚胎存活率和妊娠率。随着技术的发展,通过增加冷冻保护剂中蔗糖的浓度,慢速冷冻卵子的

效能明显提高<sup>[3,4]</sup>。随着冷冻技术的进一步发展,卵子冷冻的效能有了长足的进步<sup>[5-9]</sup>。目前,世界范围内已有较多研究<sup>[10-13]</sup>报道了卵子冷冻后较高的复苏率、妊娠率和出生率,由此表明卵子冷冻可作为女性生育力保存的可信赖的方法。

### 1 卵子冷冻的应用和意义

#### 1.1 卵子冷冻的应用范围

有效的卵子冷冻系统的建立对辅助生殖的临床工作起到了很重要的作用,参考2013年美国生育年

**[作者简介]** 王 瑶(1975—),女,主治医师,博士;电子信箱:drwangyao@gmail.com。

**[通信作者]** 狄 文,电子信箱:diwen163@163.com。

会颁布的指导原则,其主要应用如下:将要接受肿瘤放、化疗而损伤卵巢功能患者,术前冷冻卵子,可为保留今后生育机会;遗传性疾病需要预防性切除输卵管卵巢(如 BRCA 突变)、卵巢早衰;体外受精取卵日取精失败;因某些原因不能冻存胚胎;希望延迟生育年龄;建立卵子库<sup>[2]</sup>;调配供卵与受孕之间的时间,提供给受卵者各种生理状况调至适于受孕的最佳时机以充分的准备时间。

## 1.2 卵子冷冻的意义

### 1.2.1 避免因胚胎冷冻产生的伦理及立法限制

卵子冷冻造福了由于胚胎冷冻而引起道德或者宗教问题的不孕夫妇。事实上,卵子冷冻在许多胚胎冷冻被禁止的国家成为生育能力保存的手段之一。

**1.2.2 为供卵项目提供便利** 患有卵巢早衰的患者欲生育只能依赖于供卵。由于需要供者和受者的内分泌激素同步化,使供卵变得复杂和耗时。卵子冷冻解决了供受双方月经周期同步化的问题,从而为卵子库的建立提供了可能性,为供受者的双方协调提供了便利<sup>[10,11]</sup>。另外,卵子冷冻期间,提供了有效的时间以发现供者传播性疾病<sup>[13]</sup>。因此,卵子库的建立有助于解决目前的供卵弊端。

**1.2.3 延迟生育年龄** 卵子冷冻为因某些原因而延迟生育的妇女提供了一种选择。年龄对妇女生育力的影响是众所周知的<sup>[14,15]</sup>。与年龄相关的 5 项不利于女性妊娠的因素分别为卵巢功能下降、流产、染色体异常、合并高血压和死产史。在女性生育年龄中,35 岁以后生育力明显下降,自然流产率上升。高龄妇女生育唐氏综合征和染色体异常子代的风险增加。尽管如此,许多妇女为了职业发展仍计划延迟生育年龄。目前,女性经常会希望将生育年龄延至 35 岁甚至 40 岁以上。高龄妇女怀孕的风险主要来自于卵子的老化,卵子冷冻技术提供了解决这一问题的方案。

### 1.3 卵子冷冻的损伤和反损伤

卵子冷冻造成的损害包括:①细胞骨架的破坏,不同冷冻保护剂的类型、浓度和接触时间均可不同程度地影响细胞骨架成分的组装和改变;②纺锤体损伤,染色体及 DNA 重组错误;③细胞膜、细胞质损伤;④透明带变硬;⑤ATP 水平降低,线粒体损伤可能。

卵子冷冻技术成熟的标志是妊娠率和出生率接近于新鲜周期。然而,该技术需运用高浓度的冷冻保护剂,如甘油(ethylene glycol, EG)、二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)、1,2-丙二醇(1,2-propanediol, PROH),将卵子暴露于高浓度的冷冻保

护剂将使其面临着化学和渗透压双重毒性<sup>[16]</sup>。虽然目前尚无标准的卵子冷冻指导程序,但是所有冷冻保护剂的浓度最低为 3.0 mol/L(单个或多种冷冻保护剂联合)。

在冷冻保护剂中添加成分可使溶液中的渗透性显著提高。如在 2.0 mol/L 的浓度中,EG、DMSO 和 PROH 溶液的渗透性约为 2 500 mOsm/kg。因此,添加和去除冷冻保护剂时卵子膜两侧的渗透压不平衡,可能导致卵子形态和功能的改变以及细胞骨架的破坏。

动物模型研究<sup>[17]</sup>报道卵子冷冻导致 H4 acetylation 和 H3 lysine 9 methylation (h3K9) 的改变。慢速冷冻和玻璃化冷冻均不同程度地改变人类 MII 成熟卵子的基因表达<sup>[18]</sup>。然而,一项 DNA 基因印记技术的随机对照研究<sup>[19]</sup>表明,卵子冷冻后行卵胞质单精子显微注射并不增加胚胎的单倍体率或者降低囊胚的着床潜能。

在解冻和复苏过程中,卵子从高浓度的冷冻保护剂转移至等渗液中将会导致反向性地渗透性休克或者过度膨胀,若超过一定阈值则会导致卵子死亡。因此,了解冷冻保护剂对卵子的冷冻保护作用非常重要的一点是判断卵子对渗透压的耐受力。若卵子直接暴露于等渗液中,液体渗透到卵胞浆内的速度比冷冻保护剂由卵胞浆向外扩散的速率快很多,卵细胞从而过度膨胀,这种现象称为渗透性膨胀损伤或者渗透性休克。将卵子在含有非渗透性冷冻保护剂(如蔗糖等)的高渗性溶液中进行解冻可以预防渗透性休克。蔗糖是运用最普遍的糖类,其用于解冻液中形成了渗透压的抵抗,防止水渗透进卵子内,预防膨胀性损伤。总之,蔗糖的保护作用可能是相当复杂的,其在卵子冷冻和解冻中的作用有待进一步研究。

卵子冷冻成功的关键是运用最小浓度的冷冻保护剂并且获得更稳定的卵子解冻效果。目前,卵子冷冻方案将着力于不断降低冷冻保护剂的毒性。

## 2 卵子的冷冻和解冻速率

卵子冷冻的方法可分为:①慢速冷冻/快速解冻(冷冻速率为 0.3 ~ 2 °C/min);②快速冷冻/解冻或玻璃化冷冻(降温速率超过 20 000 °C/min)。

冷冻导致水结晶成冰,进而破坏卵细胞内的细微结构。冷冻过程中,细胞内冰晶形成和高浓度的溶液是导致卵子或者胚胎死亡的重要因素。因此,慢速冷冻的目的在于面临冰晶形成、渗透性损伤或

者低温损伤仍能维持其复杂的卵子结构。诱导冰晶形成的过程被称为播种 (seeding), 导致冰核的异质化, 它是一种冰核同质化更稳定的状态, 在细胞冷冻过程中是一个非常重要的步骤, 能阻止细胞过度冷却, 启动细胞的脱水过程。播种后, 冷冻速率降至  $0.3 \sim 0.5 \text{ } ^\circ\text{C}/\text{min}$ , 直到达到一定程度的低温 (通常为  $-30 \sim -150 \text{ } ^\circ\text{C}$ ), 然后卵细胞被储存于液氮中。解冻是个快速温度变化的过程, 复温速率超过  $360 \text{ } ^\circ\text{C}/\text{min}$ 。这个过程预防了冰晶的再形成。

另一个防止冰晶形成的方法是通过快速降温/复温 (直接将样本投入液氮) 将卵子或胚胎内部结构玻璃化。虽然这一技术提高了卵子冷冻的可行性, 但是运用高浓度的卵子冷冻保护剂仍需要预防冰晶形成。玻璃化冷冻的基本原理是用高浓度的冷冻保护剂溶液将细胞内水分置换出来, 经急速降温由液态转化为外形似玻璃状的非晶化固体状态, 以此来保护细胞。玻璃化意味着去冰的固态水。这一概念在于如果降温达到一定速率, 即避免了冰晶的形成, 以此来保护细胞, 使冷冻成功。严格意义上说, 将慢速冷冻运用于玻璃的转化温度 ( $-130 \text{ } ^\circ\text{C}$ ) 时, 玻璃态亦可出现。因此, 玻璃化冷冻的机制是使用高浓度的冷冻保护剂和极快速的冷冻和解冻速率, 避免发生广泛的去玻璃化和再结晶, 以此快速渡过玻璃化的冰点, 以避免细胞内外冰晶形成, 维持了正常的超微结构, 减少了对细胞的损害, 提高了冷冻复苏率。

几乎所有的研究都认为降温速率是卵子玻璃化冷冻成功与否的决定性因素。既往的研究运用不同的载体以期获得高冷冻速率。起初, 电子显微镜格、开放式的麦管、尼龙网格、cryoloop 冷冻环和塑料杆等均被用作投入液氮的载体。随后, 一些商业化的设计, 如冷冻帽和冷冻叶<sup>[8,9]</sup>相继诞生, 运用这些载体冷冻标本得以直接接触液氮, 从而获得对冷冻非常关键的  $>20\ 000 \text{ } ^\circ\text{C}/\text{min}$  的冷冻速率。然而, 直接接触液氮所引起的细菌和真菌的污染是储存精子和胚胎时必须面临和考虑的重要问题<sup>[20,21]</sup>。曾有研究设想使用灭菌的液氮<sup>[22]</sup>或液氮蒸汽<sup>[23]</sup>来避免液氮在冷冻期间造成的污染, 而问题在于为了获得足够的降温速率, 是否必须将物质直接投入液氮中。

至今, 对于小体积 ( $<1.0 \text{ } \mu\text{L}$ ) 的液体和标本尚未获得最佳冷冻和复苏速率<sup>[24]</sup>。目前, 动物研究<sup>[25,26]</sup>表明, 慢速冷冻的致命弊端是再结晶过程中细胞内小冰晶的再次形成。这就意味着冷冻过程中降温速率的重要性较复温速率要小<sup>[27]</sup>。越来越多的

研究<sup>[28]</sup>证实, 与快速的降温速率比较, 快速的复温速率对冷冻的结局更重要。

### 3 未成熟或成熟卵子的冷冻

虽然 1986 年一例报道人卵子冷冻后妊娠并活产的病例使用的是慢速冷冻的方法, 但大多数早期报道中, 运用此方法后卵子冻融后的存活率和妊娠率都相当低。慢速冷冻 MII 成熟卵子的效能低, 可能与造成纺锤体的损伤或者染色体不规则排列有关。未成熟的 GV 期卵子可能对慢速冷冻的耐受更好。理论上说, 未成熟 GV 卵子冷冻后造成的多倍体和非整倍体是可以避免的, 因为 GV 期的卵子染色质在双线期的前期分散继而由核膜将其包绕, 从而可以预防纺锤体解聚。

然而, GV 期的卵子冷冻解冻后体外成熟仍有很大的困难。虽然解冻后卵子存活率提高了, 但是低体外成熟率和受精率仍是未成熟卵子冷冻的瓶颈。随着冷冻技术的提高, 未成熟 GV 卵子和成熟的 MII 卵子的玻璃化冷冻之后的存活率无显著差异<sup>[29]</sup>。但是, 研究<sup>[30-32]</sup>发现 GV 期未成熟卵子经过冻融后成熟的潜能有所降低, 建议卵子最好在体外成熟至 MII 阶段再行玻璃化冷冻, 这样的效果优于未成熟 GV 期。但至今未成熟 GV 卵子冷冻或体外成熟后冷冻解冻后活产仅有个案报道<sup>[8,9]</sup>。

### 4 卵子储存过程

理论上卵子储存在液氮里相对安全, 卵胞浆内没有明显的不可接受的生物和代谢改变。目前认为, 在液氮 ( $-196 \text{ } ^\circ\text{C}$ ) 中细胞的生物活性停滞。至今, 大多数研究着眼于胚胎储存于  $-196 \text{ } ^\circ\text{C}$ , 延长储存期限后的质量, 提示胚胎的质量不受冷冻期限的影响。许多研究<sup>[33]</sup>表明人类胚胎长期保存并不影响妊娠结局。但是, 曾有报道显示, 在液氮中保存少于 2 个月解冻后的胚胎, 妊娠率较超过 2 个月的胚胎高。

大多数卵子冷冻的报道提示冷冻时间均相对较短。目前, 有一例报道<sup>[34]</sup>运用低钠介质的慢速冷冻解冻后活产双胞胎。至今相对较长的人类卵子在液氮中的玻璃化冷冻为 5~10 年。基于卵子在液氮中冻融后活产的报道, 认为人类卵子可以用塑料管慢速冷冻法进行安全保存<sup>[35]</sup>。

冷冻储存系统, 尤其是有关玻璃化冷冻的方法, 共分两个冷冻系统, “密闭”和“开放”系统, 均为在玻璃化冷冻后卵子或者胚胎储存于液氮中的方法。

“密闭”系统是指卵子在储存期间不直接接触液氮,“开放”系统是指在储存期间卵子直接接触液氮。总的来说,目前对“开放”系统造成的卵子解冻后的存活率、受精率和胚胎发育潜能所知有限。许多研究<sup>[36]</sup>表明“开放”系统卵子冷冻不直接影响后续的受精率、胚胎发育率和临床妊娠率。据报道,将卵子冷冻于蒸汽状态的液氮中可达10个月,与用“开放”系统储存于传统的液氮罐中相比,对解冻后的存活率、受精率和胚胎发育潜能没有明显的负面影响。因此,提示蒸汽态的液氮保存系统可能减少直接与液氮接触而造成的污染等的风险<sup>[11]</sup>。

除了直接与液氮接触可能引起的细菌和真菌的污染,有动物实验<sup>[37]</sup>显示,在液氮中储存的时间与解冻后的存活率、受精率和胚胎发育潜能呈反向相关。但是,目前这些是否与卵子直接接触液氮有关尚不清楚。普遍认为细胞在-196℃液态系统中没有热能反应。然而,许多重要的物理光学反应或者化学合成反应仍旧能够在液氮中发生。物理光学反应的结果是,在这样低的温度下由放射背景或者宇宙光直接引起的离子化是造成卵子损伤的原因。类似的损伤源于自由基的形成和大分子的破碎。由于快速分解臭氧,液氮溶解了氧中的离子辐射造成了自由基的形成。许多数据表明液氮中的氮氧化提高了臭氧的接触反应。臭氧产物对DNA造成损伤,由于在液氮中无法产生酶的配对修复,因而引起DNA碎裂。

许多因素会影响人类卵子的冷冻结局,例如妇女的年龄、不孕年限,不同的促排卵方案等。因此,目前对冷冻期限影响卵子解冻后的存活率、受精率和胚胎发育下结论未免为时过早,需进一步研究证实。

## 5 卵子冷冻的安全性

虽然过去通过卵子冷冻产生的子代数量迅速增长,但这一技术的发展必须伴随着产科和围产期的结局分析以及长期的出生婴儿的随访。目前,卵子冷冻临床安全性的问题不能被准确评估,因为缺乏很好的控制性临床试验。一项研究<sup>[7]</sup>分析了卵子冻融周期的165例妊娠和200个婴儿的产科和围产结局,将卵子冷冻后出生的子代与行体外受精治疗的不孕症夫妇和自然受孕的夫妇子代进行比较,包括平均出生体质量和先天性缺陷的发生率,结果提示卵子冷冻后的妊娠以及分娩的子代没有明显提高产科和围产期风险。

另外,有研究<sup>[38]</sup>分析了1986—2008年的58篇报道,包括了936例活产婴儿(308例来自慢速冷冻,

616例来自玻璃化冷冻,12例使用了两个方法),结果提示1.3%有出生缺陷。据估计,目前全世界有数千名婴儿经卵子冷冻后出生。仅意大利就出生大约2000例卵子冷冻的婴儿,尚未见先天缺陷率上升的报道。然而,对动物模型的分子基因水平的分析,提示卵子冷冻的子代与自然生育的子代有所不同<sup>[39]</sup>。卵子冷冻是否能确保足够的安全性,尤其是对出生婴儿的长期评估,仍是需要进一步研究的问题。

## 6 小结与展望

目前,冷冻技术的进展表明卵子冷冻后的复苏率、妊娠以及出生率均有明显提高。然而,仍有一些技术需要改进。首先,在不影响冷冻结局的情况下使用更低浓度的冷冻保护剂,目前的挑战在于更好地降低卵子冷冻保护剂的浓度;第二,理想的冷冻和解冻速率配合合适的冷冻保护剂和载体;第三,明确是否冷冻的年限会影响卵子解冻后的复苏率;第四,进一步随访冷冻卵子出生后的婴儿以明确卵子冷冻技术的安全性。

鉴于稳定的复苏率和妊娠率,卵子冷冻已逐渐被作为女性生育力保存的成熟手段之一。有效的卵子冷冻方案的确立能增加卵子库建立的可行性,使共享卵子成为可能。另外,卵子冷冻可以给予供卵者短暂的时间以观察其是否存在传播性疾病。

总之,随着冷冻技术的发展,许多有效的卵子冷冻方案的确立,将有望在近年内在世界范围内建立卵子库。

## [参考文献]

- [1] Gook DA. History of oocyte cryopreservation[J]. *Reprod Biomed Online*, 2011, 23(3): 281-289.
- [2] Practice Committees of American Society for Reproductive Medicine, Society for Assisted Reproductive Technology. Mature oocyte cryopreservation: a guideline[J]. *Fertil Steril*, 2013, 99(1): 37-43.
- [3] Bianchi V, Lappi M, Bonu MA, et al. Oocyte slow freezing using a 0.2-0.3 M sucrose concentration protocol; is it really the time to trash the cryopreservation machine? [J] *Fertil Steril*, 2012, 97(5): 1101-1107.
- [4] Edgar DH, Gook DA. A critical appraisal of cryopreservation (slow cooling versus vitrification) of human oocytes and embryos [J]. *Hum Reprod Update*, 2012, 18(5): 536-554.
- [5] Kim TJ, Laufer LR, Hong SW. Vitrification of oocytes produces high pregnancy rates when carried out in fertile women [J]. *Fertil Steril*, 2010, 93(2): 467-474.
- [6] Kim TJ, Hong SW. Successful live birth from vitrified oocytes after 5 years of cryopreservation [J]. *J Assist Reprod Genet*, 2011, 28(1): 73-76.

- [ 7 ] Chian RC, Huang JY, Tan SL, et al. Obstetric and perinatal outcome in 200 infants conceived from vitrified oocytes[J]. *Reprod Biomed Online*, 2008, 16(5): 608 - 610.
- [ 8 ] Chian RC, Huang JY, Gilbert L, et al. Obstetric outcomes following vitrification of *in vitro* and *in vivo* matured oocytes[J]. *Fertil Steril*, 2009, 91(6): 2391 - 2398.
- [ 9 ] Chian RC, Gilbert L, Huang JY, et al. Live birth after vitrification of *in vitro* matured human oocytes[J]. *Fertil Steril*, 2009, 91(2): 372 - 376.
- [ 10 ] Cobo A, Meseguer M, Remohi J, et al. Use of cryo-banked oocytes in an ovum donation programme; a prospective, randomized, controlled, clinical trial[J]. *Hum Reprod*, 2010, 25(9): 2239 - 2246.
- [ 11 ] Cobo A, Remohi J, Chang CC, et al. Oocyte cryopreservation for donor egg banking[J]. *Reprod Biomed Online*, 2011, 23(3): 341 - 346.
- [ 12 ] Rienzi L, Cobo A, Paffoni A, et al. Consistent and predictable delivery rates after oocyte vitrification; an observational longitudinal cohort multicentric study[J]. *Hum Reprod*, 2012, 27(6): 1606 - 1612.
- [ 13 ] Cai LB, Qian XQ, Wang W, et al. Oocyte vitrification technology has made egg-sharing donation easier in China[J]. *Reprod Biomed Online*, 2012, 24(2): 186 - 190.
- [ 14 ] Lockwood GM. Social egg freezing; the prospect of reproductive 'immortality' or a dangerous delusion? [J] *Reprod Biomed Online*, 2011, 23(3): 334 - 340.
- [ 15 ] Dondorp W, de Wert G, Pennings G, et al. Oocyte cryopreservation for age-related fertility loss[J]. *Hum Reprod*, 2012, 27(5): 1231 - 1237.
- [ 16 ] Tulandi T, Huang JY, Tan SL. Preservation of female fertility: an essential progress[J]. *Obstet Gynecol*, 2008, 112(5): 1160 - 1172.
- [ 17 ] Spinaci M, Vallorani C, Bucci D, et al. Vitrification of pig oocytes induces changes in histone H4 acetylation and histone H3 lysine 9 methylation (H3K9)[J]. *Vet Res Commun*, 2012, 36(3): 165 - 171.
- [ 18 ] Monzo C, Haouzi D, Roman K, et al. Slow freezing and vitrification differentially modify the gene expression profile of human metaphase II oocytes[J]. *Hum Reprod*, 2012, 27(7): 2160 - 2168.
- [ 19 ] Forman EJ, Li X, Ferry KM, et al. Oocyte vitrification does not increase the risk of embryonic aneuploidy or diminish the implantation potential of blastocysts created after intracytoplasmic sperm injection; a novel, paired randomized controlled trial using DNA fingerprinting[J]. *Fertil Steril*, 2012, 98(3): 644 - 649.
- [ 20 ] Bielanski A, Vajta G. Risk of contamination of germplasm during cryopreservation and cryobanking in IVF units[J]. *Hum Reprod*, 2009, 24(10): 2457 - 2467.
- [ 21 ] Bielanski A. A review of the risk of contamination of semen and embryos during cryopreservation and measures to limit cross-contamination during banking to prevent disease transmission in ET practices [J]. *Theriogenology*, 2012, 77(3): 467 - 482.
- [ 22 ] Parmegiani L, Accorsi A, Bernardi S, et al. A reliable procedure for decontamination before thawing of human specimens cryostored in liquid nitrogen; three washes with sterile liquid nitrogen (SLN2) [J]. *Fertil Steril*, 2012, 98(4): 870 - 875.
- [ 23 ] Cobo A, Romero JL, Perez S, et al. Storage of human oocytes in the vapor phase of nitrogen[J]. *Fertil Steril*, 2010, 94(5): 1903 - 1907.
- [ 24 ] Leibo SP, Pool TB. The principal variables of cryopreservation: solutions, temperatures, and rate changes[J]. *Fertil Steril*, 2011, 96(2): 269 - 276.
- [ 25 ] Seki S, Mazur P. Effect of warming rate on the survival of vitrified mouse oocytes and on the recrystallization of intracellular ice[J]. *Biol Reprod*, 2008, 79(4): 727 - 737.
- [ 26 ] Seki S, Mazur P. The dominance of warming rate over cooling rate in the survival of mouse oocytes subjected to a vitrification procedure [J]. *Cryobiology*, 2009, 59(1): 75 - 82.
- [ 27 ] Mazur P, Seki S. Survival of mouse oocytes after being cooled in a vitrification solution to  $-196^{\circ}\text{C}$  at  $95^{\circ}$  to  $70,000^{\circ}\text{C}/\text{min}$  and warmed at  $610^{\circ}$  to  $118,000^{\circ}\text{C}/\text{min}$ : A new paradigm for cryopreservation by vitrification[J]. *Cryobiology*, 2011, 62(1): 1 - 7.
- [ 28 ] Seki S, Mazur P. Ultra-rapid warming yields high survival of mouse oocytes cooled to  $-196$  degrees c in dilutions of a standard vitrification solution[J]. *PLoS One*, 2012, 7(4): e36058.
- [ 29 ] Cao Y, Xing Q, Zhang ZG, et al. Cryopreservation of immature and *in-vitro* matured human oocytes by vitrification[J]. *Reprod Biomed Online*, 2009, 19(3): 369 - 373.
- [ 30 ] Cao YX, Chian RC. Fertility preservation with immature and *in vitro* matured oocytes[J]. *Semin Reprod Med*, 2009, 27(6): 456 - 464.
- [ 31 ] Borini A, Bianchi V. Cryopreservation of mature and immature oocytes[J]. *Clin Obstet Gynecol*, 2010, 53(4): 763 - 774.
- [ 32 ] Fasano G, Demeestere I, Englert Y. *In-vitro* maturation of human oocytes: before or after vitrification?[J] *J Assist Reprod Genet*, 2012, 29(6): 507 - 512.
- [ 33 ] Riggs R, Mayer J, Dowling-Lacey D, et al. Does storage time influence postthaw survival and pregnancy outcome? An analysis of 11, 768 cryopreserved human embryos[J]. *Fertil Steril*, 2010, 93(1): 109 - 115.
- [ 34 ] Quintans CJ, Donaldson MJ, Urquiza MF, et al. Live birth of twins after IVF of oocytes that were cryopreserved almost 12 years before [J]. *Reprod Biomed Online*, 2012, 25(6): 600 - 602.
- [ 35 ] Parmegiani L, Garelo C, Granella F, et al. Long-term cryostorage does not adversely affect the outcome of oocyte thawing cycles[J]. *Reprod Biomed Online*, 2009, 19(3): 374 - 379.
- [ 36 ] Rienzi L, Romano S, Albricci L, et al. Embryo development of fresh 'versus' vitrified metaphase II oocytes after ICSI; a prospective randomized sibling-oocyte study[J]. *Hum Reprod*, 2010, 25(1): 66 - 73.
- [ 37 ] Yan J, Suzuki J, Yu XM, et al. Effects of duration of cryo-storage of mouse oocytes on cryo-survival, fertilization and embryonic development following vitrification[J]. *J Assist Reprod Genet*, 2011, 28(7): 643 - 649.
- [ 38 ] Noyes N, Porcu E, Borini A. Over 900 oocyte cryopreservation babies born with no apparent increase in congenital anomalies[J]. *Reprod Biomed Online*, 2009, 18(6): 769 - 776.
- [ 39 ] Sanchez-Partida LG, Kelly RD, Sumer H, et al. The generation of live offspring from vitrified oocytes[J]. *PLoS One*, 2011, 6(6): e21597.