

女性生育力保存新进展*

李尚为

(四川大学华西第二医院生殖医学中心, 四川 成都 610041)

【摘要】 目的 女性生育力整体呈下降趋势,在影响了女性生殖健康的同时,也严重影响了生活质量。生殖健康和生育力保存日渐成为社会关注的焦点。生育力保存手术日渐被妇科肿瘤患者接受,胚胎冷冻、卵母细胞冷冻和卵巢组织冷冻方法的不断改善为生育力保存提供了可行的方法。未成熟卵母细胞体外成熟、卵巢体外激活技术及干细胞技术的探索为生育力保存提供了更宽广的思路。本文将从女性生育力的影响因素、生育力保存技术的适应征及其生育力保存的主要方法与进展作一述评。

【关键词】 生育力保存;女性;生育力保存手术;深低温保存;述评

【中图分类号】 R 715.5 **【文献标志码】** A **doi:**10.3969/j.issn.1672-3511.2016.05.001

New progress of female fertility preservation

LI Shangwei

(Reproductive Medicine Center, West China Second University Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China)

【Abstract】 The current female fertility declined on the whole, and this trend affected women's reproductive health and the quality of life at the same time. Reproductive health and fertility preservation is increasingly becoming the focus of social attention. Fertility-sparing surgery is accepted by more and more gynecology tumor patients. Improvement of embryo, oocyte and ovarian tissue cryopreservation provides feasible methods for fertility preservation. And the exploration in vitro maturation, in vitro activation and stem cell technology provide broader thinking for fertility preservation. This article is a review about the influence factors of female fertility, indications for fertility preservation technology and the main method and progress of fertility preservation.

【Key words】 Fertility preservation; Female; Fertility-sparing surgery; Cryopreservation; Review

女性生育力是指女性能够产生卵母细胞、受精并孕育胎儿的能力。通常包括:生育质量、妊娠或再次妊娠称之为母亲的潜力^[1]。生育力保存(fertility preservation)是指使用手术、药物或实验室技术对存

在不育风险的各年龄段女性提供帮助,保护和保存其产生遗传学后代的能力^[2]。

社会的不断发展带给人类巨大物质和精神财富的同时,环境污染、社会压力等综合因素也影响了人们的生育能力。世界卫生组织在 25 个国家的 33 个研究中心的调查结果表明,发达国家不孕症的患病率约为 5% ~ 8%,发展中国家一些地区可高达 30%^[1]。不孕症已经成为发病率最高的三大疾病之一。女性生育力存在个体差异,易受众多因素影响,女性生育力的改变影响了女性生殖健康的同时,也严重影响了生活质量。生殖健康和生育力保存日渐成为社会关注的焦点。本文将从女性生育力的影响因素、生育力保存技术的适应症和生育力保存的主要方法三个方面做一评述。

1 女性生育力的影响因素

1.1 生理因素 女性年龄增加导致生育力下降的主

基金项目:国家自然科学基金(31171442)

执行编委简介:李尚为,女,四川大学华西二院教授,博士生导师,生殖医学中心学科主任,四川省学术和技术带头人,享受国务院政府特殊津贴专家。中华医学会生殖医学分会第一、二届常务委员,曾担任中华医学会生殖医学分会管理与伦理学组副组长,现任中华医学会生殖医学分会临床学组委员,中华医学会妇产科内分泌学组委员,中华医学会四川省生殖医学专委会主任委员,《西部医学》编委。1993 年~1994 年赴日本神户大学高级访问学者,在四川省率先开展生殖医学辅助生殖技术临床及前沿基础研究。1997 年获得四川省首例试管婴儿成功诞生,1999 年获得西南地区首例卵巢早衰的绝经妇女赠卵试管婴儿成功;获国家自然科学基金,国家“十二五”及“十一五”科技支撑项目等国家级及省级课题 20 余项;国家发明专利 1 项,省科技进步奖 2 项,参编教材及专著多部,国内外知名期刊发表论文百余篇,其中 SCI 收录 20 余篇。培养博士、硕士研究生 50 余名。E-mail: lswivf01@sina.com

要原因是卵巢储备功能降低,卵巢内存留的可募集卵泡数目减少及卵子质量下降。

1.2 病理因素 卵巢早衰(POF, premature ovarian failure)是常见的严重影响女性生育力的病理因素,患病率高达 1%^[3],可能与遗传、自身免疫性异常、卵巢破坏等多种因素相关。①遗传因素:决定卵巢功能的基因位点为 Xq21.3-q27 或 Xq26.1-q27 和 Xq13.3-q21.1,此区域的缺失可能减少原始卵泡数、增加凋亡或卵泡成熟障碍导致的闭锁,如 Turner 综合征。大多数 Turner 综合征病人在出生时生殖细胞已丧失,但是也有部分病人是 XO/XX 嵌合体,晚期才出现卵巢功能早衰^[4]。②免疫学因素:POF 患者及自然绝经后妇女体内 CD8⁺、CD16⁺ T 淋巴细胞数量明显升高,CD4⁺/CD8⁺明显降低,可能影响淋巴细胞的调节功能,引起 POF。③卵巢破坏因素:包括子宫内膜异位症、盆腔感染因素、放化疗史、盆腔手术史等。子宫内膜异位症可从盆腔解剖结构、卵巢功能和卵子质量、腹腔免疫环境改变、子宫内膜容受性降低等多个方面影响育龄期女性的生育能力。值得注意的是,腹腔镜双极电凝术产生的热能可损伤卵巢基质血管和卵巢髓质组织,导致卵巢储备功能降低更显著。化疗后癌症病人,尤其是采用烷化药物,卵巢早衰的风险增加 9 倍,其中 21~25 岁女性病人卵巢早衰风险高达约 27 倍,儿童病人化疗后卵巢早衰发生率高达 60%^[5]。盆腔放射治疗过程中,20Gy 辐射就可导致 40 岁以下病人卵巢功衰竭^[6]。化疗、全身放疗联合骨髓移植治疗,卵巢毒副作用更明显,80%的儿童病人面临卵巢功能早衰^[7]。

1.3 环境因素 包括生活方式相关危险因素、职业相关危险因素和内分泌因素。职业相关危险因素常见:麻醉性气体、抗肿瘤药物、重金属和溶剂等。内分泌因素是指外源性的化学物质和混合物干扰内分泌系统功能。

1.4 社会因素 因个人、职业或经济等社会因素推迟生育计划的女性越来越多^[8]。另一方面,由于各种外界因素的影响,很多女性怀孕后会选择人工流产,甚至多次人工流产,如人工流产后处理不当,患各种疾病,从而导致不怀孕。基于人口普查和近年国家统计局数据,使用人口预测模型得出:“全面二胎”每年带来的新增人口在 300 万~800 万之间,估计中值为 500 万。夫妇中 60%是 35 岁以上的育龄妇女,生育难度增大。另外,人口学数据显示,1975 年到 2010 年中国产生 2.18 亿独生子女,每年新增约 7.6 万个失独家庭。截至 2012 年,我国已有 100 多万个失独家庭,未来将达到一千万。失独家庭夫妇较多已达到高龄,错

过再生育的最佳时期。

1.5 其他因素 不良生活方式和过大心理压力均会对生育力产生影响。不良生活方式包括:吸烟、饮酒、长期服用咖啡因、不规律饮食、营养不良或营养过剩。自然怀孕或助孕过程中,精神紧张、焦虑、沮丧等不良情绪也常影响女性生育力。生活方式或心理因素的单个因素在不同程度上影响女性生育力,如果两种或多种叠加,会加重对生育力的危害。

2 生育力保存的适应征

2.1 癌症病人 青春期前及生育期女性发病率最高的恶性肿瘤主要包括:乳腺癌,宫颈癌,脑肿瘤,肾癌,骨肉瘤,白血病、淋巴瘤及其他血液系统恶性疾病^[9,10]。放疗、化疗和盆腔手术治疗都可能对卵巢功能造成不可逆转的损害,降低或损失生育力。随着癌症早期诊断率的提高、新型化疗药的出现和放化疗方案的改进,儿童、年轻女性癌症患者生存率明显提高。大剂量放、化疗及骨髓移植(bone marrow transplantation, BMT)可使超过 90%年轻女性恶性肿瘤患者病情得到缓解^[11],但卵巢功能受到明显影响,约 80%的病人面临卵巢功能早衰^[7]。

2.2 自体免疫性或血液系统疾病的病人 自身免疫性或血液系统疾病的病人,接受大剂量化疗/放疗后,有卵巢功能衰竭的风险。

2.3 妇科手术病人 卵巢部位手术可引起卵巢储备功能下降,如卵巢囊肿剥除术、子宫内膜异位症的保守性或半根治性手术、子宫切除术、根治性输卵管切除术等。另外,腹腔镜双极电凝术可能对卵巢造成热损伤,引起卵巢功能下降。

2.4 卵巢功能早衰病人

2.5 要求推迟生育的病人

2.6 不孕症病人 不孕症病人移植新鲜胚胎后剩余胚胎可以冻存,以备再次移植。

3 女性生育力保存技术的主要方法

3.1 手术治疗 卵巢移位:肿瘤患者在接受盆腔放疗时,可将卵巢固定到尽量远离盆腔的位置,而不改变其与输卵管的解剖关系。然而,由于辐射具有分散性,卵巢移位有一定的风险性,卵巢并非总能得到保护,因此卵巢移位实施时间应尽量接近开始放疗的时间,以缩短移位时间^[10]。生育力保存手术(Fertility-sparing surgery, FSS)^[12]。①宫颈癌:为保存年轻女性生育力,Ⅰa2~Ⅰb 期宫颈癌患者可行根治性宫颈切除术,术式包括经阴道、开腹、腹腔镜和机器人宫颈切除术^[10]。经阴道宫颈切除术仅适用于肿物直径<2cm 患者,因为当肿物直径>2cm 时,阴式手术切除范围局限,复发率显著增高。其他三种术式可在必要时

扩大宫旁组织的切除范围,因此可适用于肿物直径 >2 且 $<4\text{cm}$ 的患者^[13]。②子宫内膜癌:浸润深度局限于子宫内膜,病理分型为高分化腺癌的子宫内膜癌患者可选择口服孕激素来暂时保存生育力。由于子宫内膜癌高发率的特点,当患者完成生育计划后,应手术治疗。文献报道早期子宫内膜癌患者经孕激素治疗后成功妊娠,但是孕激素治疗的最佳剂量和治疗方案尚需进一步明确。另外,该治疗在高期别和复发率较高子宫内膜癌患者中的安全性也需进一步证实。③卵巢癌:交界性卵巢癌和恶性卵巢干细胞肿瘤患者可考虑生育力保存手术。但在侵袭性卵巢上皮癌患者中,生育力保存手术的应用晚于交界性卵巢癌和恶性卵巢干细胞肿瘤。目前尚缺乏前瞻性实验来评估生育力保存手术在侵袭性卵巢上皮癌患者中的作用,但就目前的证据来看,FSS在部分年轻的卵巢上皮癌患者中是安全的,适用于病理分型不明的IA-IC1-2期患者和病理分型明确的IA期患者。最新报道指出,对于高期别的交界性卵巢癌患者,FSS与肿瘤复发无明确关系^[14],对于高风险的卵巢癌患者不应该完全否定FSS^[15]。

3.2 辅助生殖技术

3.2.1 胚胎冷冻技术 目前胚胎冷冻技术较成熟,卵裂球期或囊胚期的胚胎对冷冻较稳定,玻璃化冷冻胚胎复苏率已达到90%以上^[16],是目前惟一被北美生殖医学委员会认可的临床可开展的生殖力保存方法,能有效减少患者反复接受激素刺激促排卵治疗。研究表明,冻融周期与新鲜周期胚胎相比,妊娠率显著提高^[17]。冻融胚胎与新鲜胚胎移植后单胎妊娠患者产前出血、早产、低体重儿和围产期死亡率风险均降低,差异有统计学意义,提示冻融胚胎移植后围产期不良事件发生率显著低于新鲜胚胎移植^[18]。该技术仅适用于已结婚的女性,而且需要对卵巢进行药物刺激以获得多个卵母细胞进行受精。卵巢刺激过程中的高雌激素治疗方法对激素依赖性肿瘤,例如乳腺癌、子宫内膜癌等有不利的影响,无法很好的保证其安全性^[16]。另外,获取卵母细胞进行体外受精之前,促排卵需要2~5周的时间,因此该技术也不适用于开始化疗或恶性程度高的肿瘤患者^[19]。

3.2.2 卵母细胞冷冻 包括未成熟卵母细胞(GV或MI期)或成熟卵母细胞(MII期)的冷冻。将卵母细胞冷冻保存,在需要时解冻并通过体外受精-胚胎移植(In vitro fertilization-embryo transfer, IVF-ET)技术受精获得胚胎,在女性生育力的保存方面有广阔的应用前景^[19,20]。对于成熟卵母细胞的冷冻,玻璃化冷冻方法冻存的卵母细胞存活率优于慢速程序化冷冻

方法,是冻存卵母细胞非常有效的方法^[21]。随着卵母细胞冷冻技术及胞浆内单精子显微注射(Intracytoplasmic sperm injection, ICSI)技术的逐步成熟,冷冻卵母细胞的复苏率、受精率、临床妊娠率都有了明显提高^[22,23]。成熟卵母细胞(MII)解冻后经受精形成胚胎,单胚胎移植后妊娠率32%~65%,活产率 $>50\%$,出生婴儿的先天性异常率与自然妊娠相似^[19]。

未成熟卵母细胞的冷冻主要针对卵巢不能刺激和不能推迟治疗的癌症患者,可从卵泡期、黄体期以及卵巢组织中收集,但是总体妊娠率是很低的^[24],低体外成熟率和受精率仍是未成熟卵母细胞冷冻的瓶颈。另外关于GV是在培养成熟后冷冻还是冷冻后再培养的问题,目前普遍倾向于未成熟卵母细胞先体外培养成熟后冷冻^[24]。主要应用于以下几方面:接受肿瘤放、化疗而损伤卵巢功能患者;遗传性疾病(如BRCA突变)需要预防性切除输卵管、卵巢及卵巢早衰;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;调配供卵与受孕最佳时机之间的时间^[19]。

3.2.3 卵巢组织冷冻 癌症病人因治疗时间紧迫或禁忌症等原因不能接受超排卵而冻卵或冻胚,可采选择冻存卵巢组织方法保存生育力。冻存卵巢组织则可以通过自体原位或异位移植,恢复病人内分泌功能和/或排卵功能。卵巢组织冻存与再植技术具有广阔前景,不需要激素刺激卵巢组织,对于青少年及儿童恶性肿瘤生存者是保留生育力的唯一方法,有充足的证据支持卵巢组织冷冻和再移植技术,不应该局限于实验阶段^[25]。

关于卵巢组织冷冻方法,程序化冷冻的优点是使用低浓度冷冻保护剂,缺点为可诱导细胞内冰晶形成。玻璃化冷冻是快速冷冻方法,需要高浓度的冷冻保护剂,具有化学毒性和渗透性损伤,降温快减少了冰晶形成对卵子的损伤^[19]。目前全球共有超过40名新生儿通过程序化冷冻法冻存卵巢技术出生^[10],通过玻璃化冷冻法冻存卵巢技术出生的新生儿据报道仅有一名^[26]。玻璃化冷冻原理是为防止细胞外冰晶形成而减少对细胞的损害,与程序化冷冻相比,可更好地保存卵泡和基质结构,提高卵泡存活率,从而改善移植后卵巢组织功能。但就目前数据分析,两种冷冻方法用于卵巢组织冷冻的效果相当,尚需以活产率作为评价目标的前瞻性随机对照试验来进一步证实^[26]。

卵巢组织冻存后移植可分为原位(盆腔或卵巢髓质或腹膜窗)或异位(腹壁,前臂,直肠肌等)移植。影响移植后卵巢组织寿命的因素包括:①卵巢储备功能(与年龄相关的窦卵泡数量)。②冷冻保存前的化疗。

③卵巢组织块大小和冷冻、解冻技术。④卵巢组织中不同卵泡的分布。⑤移植后卵巢组织局部缺血损伤^[19]。无论是慢速冷冻还是玻璃化冷冻卵巢组织,均有两个难题需要攻克:一是冷冻保护剂在卵巢组织块内渗透性差和细胞毒性,二是移植后组织缺血损伤和血供重建。

本课题组发现改良玻璃化冷冻 NIV (needle immersed vitrification) 法的冷冻效果优于程序化冷冻法及微滴法,能有效保存卵泡形态和发育潜能^[27,28]。冻融小鼠卵巢组织异体移植后,与慢速冷冻法相比, NIV 法可以更好地保存间质细胞、胶原束、细胞间隙及始基卵泡^[27,29,30]。而卵巢组织间质细胞和基质成分的完整保存,对冷冻复苏后卵巢组织片体外培养或移植后卵泡的支持和营养以及微循环的建立具有重要作用^[27]。在此基础上,课题组进一步探讨改善卵巢组织移植后缺血再灌注损伤,提高卵巢移植质量的方法。通过高通量蛋白芯片技术检测冻融前后卵巢组织中多种促血管生成因子的表达量,发现冻融后间质中多种促血管生成因子水平下降,其中差异最显著的因子是 Angiogenin 及 bFGF (basic fibroblast growth factor)。之后建立 NIV 冷冻法冻融人卵巢组织短期体外培养后异种移植模型,采用免疫组织化学法检测微血管密度、间质细胞增殖和凋亡和卵泡计数,评估移植后效果。发现 NIV 法冻融人卵巢组织在体外培养液中添加 200ng/ml Angiogenin 培养 5 天后异种移植后血管重建作用最佳,间质细胞凋亡降低。添加 100ng/ml 和 150ng/ml bFGF 体外培养 2 天后人卵巢组织异种移植后血管重建作用最佳,间质细胞增殖增加。提示添加 Angiogenin 及 bFGF 至体外培养体系中并培养适当时间,对 NIV 法冻融人卵巢组织短期移植后血管重建及基质保护有明显促进作用^[31]。此外,冻存卵巢组织中是否携带肿瘤细胞,关系到移植安全性问题。研究表明,这主要取决于肿瘤的类型和分期,白血病、神经母细胞瘤及 Burkitt 淋巴瘤患者卵巢再植后引入恶性细胞具有高风险性^[32]。

3.2.4 未成熟卵母细胞体外培养成熟 (in vitro maturation, IVM) 是指将 GV 期或 MI 期的卵母细胞在体外培养发育到第二次减数分裂中期 (MII 期),能够正常发育、受精和着床。IVM 具有治疗简单、药物使用少、减轻患者经济负担、避免卵巢过度刺激等优点,目前 IVM 研究已由单纯基础研究扩展到治疗多囊卵巢综合症、卵巢高/低反应性、卵巢反应不齐、自然周期降低治疗成本和预防促排卵不良反应、供卵、生殖保险等多个领域,有广阔的应用前景^[33]。虽然目前研究表明人卵母细胞体外发育潜能明显低于体内成熟,

临床妊娠率较低,但大量研究表明 IVM 是可行的^[34],近期已有活产婴儿报道^[35]。目前很多研究发现利用 TGF- β 因子、EGF 样因子及 cAMP 调控因子等的作用可以改善 IVM 体外培养体系,但仍需进一步缩小体外培养和体内培养间的差距^[26]。

IVM 技术可以联合卵巢冷冻技术,在切割及冷冻卵巢皮质之前,将所有可见窦卵泡中的生殖泡期 (GV) 卵母细胞抽吸出来,去除部分卵丘颗粒细胞,以适用于冷冻卵子的玻璃化冷冻方法对其进行保存,降低卵巢组织移植后肿瘤复发的风险。对于患雌激素依赖性肿瘤和需要尽快行抗肿瘤治疗而不允许促排卵的患者,可在抗肿瘤治疗前取出小卵泡并行 IVM,将所获得的成熟卵或胚胎进行玻璃化冷冻,且取卵时机不受月经周期时相的限制^[10]。

3.2.5 卵巢体外激活 (in vitro activation, IVA) 将患者卵巢组织玻璃化冷冻保存,取出 1~2 块组织剪碎为大小 1~2 mm² 的碎片约 100 块。将 40~80 块碎片移植入患者输卵管浆膜层下。超声监测卵泡发育生长情况,给予卵泡刺激素 (FSH) 刺激,待发现植入组织正常生长后行促排卵。IVA 的机制目前认为与海马肿瘤抑制通路有关。海马肿瘤抑制通路可以调控人体内器官大小,此通路的失调将导致组织器官的增长。而对取出的卵巢组织实施剪碎处理的过程能够刺激海马通路并促使结缔组织生长因子 (connective tissue growth factor, CTGF/CCN2) 表达增多,从而激发卵巢碎片的生长,促进卵泡生长发育^[36,37]。虽然 IVA 技术仍处于探索阶段,仍需要更多的研究以证实 IVA 技术的安全性,但对于卵巢功能已经衰退的患者具有重要意义。

3.3 药物治疗 主要指激素治疗,包括下丘脑促性腺激素释放激素激动剂 (GnRH-a)、孕激素、抗雌激素制剂和芳香化酶抑制剂等。GnRH-a 一般主张在化疗前 7~10 d 使用^[38],可抑制下丘脑-垂体-卵巢轴,使大部分卵泡处于静息状态,减小化疗药物对生长期卵泡的损伤^[16];抑制 FSH 分泌,减少子宫卵巢血流灌注,激活卵母细胞 GnRH 受体,上调性腺内抗凋亡分子和(或)保护未分化的胚胎干细胞^[10]。Del 等使用 GnRH 激动剂暂时抑制卵巢功能,可显著降低化疗导致年轻肿瘤患者发生 POF 的危险性^[39]。雌激素受体阳性的恶性肿瘤患者应禁用 GnRH-a,若仍需使用 GnRH-a,也应在严格的风险效益评估后进行^[16]。

3.4 现代生物技术治疗 ①间充质干细胞移植:通过间充质干细胞移植技术提高烷化剂损伤卵巢的功能^[40] ②成年小鼠及人卵巢分离雌性生殖干细胞系 (female germline stem cells, FGSC),通过生殖干细胞

移植以来使衰竭的卵巢重获功能^[41]。干细胞技术的不断探索有望使育龄期放化疗病人重获卵巢功能。

4 小结与展望

女性生育力保存技术大大改善了肿瘤等疾病康复者生育需求和生殖健康。在多种生育力保存措施中,生育力保存手术、药物治疗、胚胎冷冻、卵母细胞冷冻、卵巢组织冷冻和体外成熟培养的联合应用,以及体外激活技术和干细胞技术的不断发展和应用,为保存女性生育力提供了更加灵活、可行的方案,是将来的发展趋势。

【参考文献】

- [1] 何方方. 生育力评价专题讨论——女性生育力及其影响因素, 实用妇产科杂志 2015, 31(1): 1-2.
- [2] 乔杰, 夏曦, 李红真. 生育力保护与妇科恶性肿瘤治疗后患者的辅助生育问题. 实用妇产科杂志 2014, 30: 729-731.
- [3] Rebar RW. Premature ovarian failure [M]. Menopause: biology and pathobiology, JKelsey, RMarcus, Editors. 2000, Academic Press; San Diego. p. 135-146.
- [4] Huang JY, Tulandi T, Holzer H, et al. Cryopreservation of ovarian tissue and in vitro matured oocytes in a female with mosaic Turner syndrome: Case Report [J]. Hum Reprod, 2008, 23(2): 336-339.
- [5] Larsen EC, Muller J, Schmiegelow K. Reduced ovarian function in long-term survivors of radiation-and chemotherapy-treated childhood cancer [J]. J Clin Endocrinol Metab, 2003, 88(11): 5307-5314.
- [6] Lushbaugh CC, Casarett GW. The effects of gonadal radiation in clinical radiation therapy: a review [J]. Cancer, 1976, 37: 1111-1125.
- [7] Thibau dE, Rodriguez-Macias K, Trivin C, et al. Ovarian function after bonemarrow transplantation during childhood [J]. Bone Marrow Transplant, 1998, 21(3): 287-290.
- [8] te Velde ER, Pearson PL. The variability of female reproductive ageing [J]. Hum Reprod Update, 2002, 8(2): 141-154.
- [9] American Cancer Society. Cancer facts and figures-006 [J]. American Cancer Society: Atlanta, GA. 2006, 15(5): 860-764.
- [10] 韩莹, 张云山. 女性肿瘤患者生育力的保存. 实用医学杂志, 2015, 31(20): 3454-3456.
- [11] Donnez J, Dolmans MM, 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.
- [12] Jeong-Yeol Park, Hextan Yuen Sheung Ngan, Won Park, et al. Asian Society of Gynecologic Oncology International Workshop 2014, J Gynecol Oncol, 2015, 26(1): 68-74.
- [13] Li J, Wu X, Li X, et al. Abdominal radical trachelectomy: is it safe for IB1 cervical cancer with tumors ≥ 2 cm. Gynecol Oncol, 2013, 131(1): 87-92.
- [14] Helpman L, Beiner ME, Aviel-Ronen S, et al. Safety of ovarian conservation and fertility preservation in advanced borderline ovarian tumors. Fertil Steril, 2011, 104(1): 138-144.
- [15] Antonino Ditto, Giorgio Bogani, Fabio Martinelli, et al. Fertility-sparing surgery in high-risk ovarian cancer. J Gynecol Oncol, 2015, 26(4): 350-351.
- [16] 潘宁宁, 马彩虹. 女性生育力保存与肿瘤生殖学, 中国妇产科临床杂志, 2015, 16: 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] Maheshwari A, Pandey S, Shetty A, et al. Obstetric and perinatal outcomes in singleton pregnancies resulting from the transfer of frozen thawed versus fresh embryos generated through in vitro fertilization treatment: a systematic review and meta-analysis [J]. Fertil Steril, 2012, 98(2): 368-377.
- [19] 徐清华, 李冬秀, 张敏. 女性生育力保存冷冻技术研究进展. 解放军医药杂志, 2015, 27(5): 17-20.
- [20] 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.
- [21] Mature oocyte cryopreservation: a guideline. Fertil Steril, 2013, 99(1): 37-43.
- [22] Sarit A, Ronit M, Tal C, et al. What is the quality of information on social oocyte cryopreservation provided by websites of Society for Assisted Reproductive Technology member fertility clinics? Fertil Steril, 2014, 101(8): 2222-2226.
- [23] 潘宁宁, 郑晓英, 马彩虹等. 卵母细胞玻璃化冷冻的临床结局分析, 中国妇产科临床杂志, 2015, 16(3): 483-485.
- [24] 姜季乐, 韦多, 张翠莲. 未成熟卵母细胞冻存, 生殖医学杂志, 2014, 23(4): 589-593.
- [25] Donnez J, Dolmans MM. Ovarian tissue freezing: current status. Curr Opin Obstet Gynecol, 2015, 27(3): 222-230.
- [26] Michel De Vos, Johan Smits, Teresa K Woodruff, et al. Fertility preservation 2: Fertility preservation in women with cancer [J]. Lancet, 2014, 384(9950): 1302-1310.
- [27] Wang Y, Xiao Z, Li L, et al. Novel needle immersed vitrification: a practical and convenient method with potential advantages in mouse and human ovarian tissue cryopreservation. Hum Reprod, 2008, 23(10): 2256-2265.
- [28] Xiao Z, Wang Y, Li L, et al. Needle immersed vitrification can lower the concentration of cryoprotectant in human ovarian tissue cryopreservation. Fertil Steril, 2010, 94(6): 2323-2328.
- [29] Xiao Z, Wang Y, Li LL, et al. In vitro culture thawed human ovarian tissue: NIV versus slow freezing method. Cryo Letters, 2013, 34(5): 520-526.
- [30] Xiao Z, Li SW, Zhang YY, et al. Niv versus dropping vitrification in cryopreservation of human ovarian tissue. Cryo Letters, 2014, 35(3): 226-231.
- [31] Kang BJ, Wang Y, Zhang L, et al. bFGF and VEGF improve the quality of vitrified-thawed human ovarian tissues after xenotransplantation to SCID mice. J Assist Reprod Genet, 2016, 33(2): 281-289.

(下转第 605 页)

度为 200ng/ml 在体内仍能较好的促进血管生成。

4 结论

本研究提示在 angiogenin 浓度为 200ng/ml 的培养液中培养 7 天并进行移植一周后的卵巢组织凋亡比率较空白对照组低。较低的凋亡比率意味着更好的保存现有组织细胞,从另一个角度说明了 angiogenin 对卵巢组织功能的保护作用。

本研究在卵巢组织体外培养过程中添加不同浓度的 angiogenin 因子进行体外干预,促进移植微循环的及时建立并保持其稳定性,抑制凋亡发生,促进卵巢组织血供的早期恢复。本研究从改善间质存活和促进微循环建立着手,为优化和改进女性生育力保存体系提供研究思路。但是,卵巢功能的长期恢复在移植物血循环改善的基础上,还与原始卵泡的发育启动和生长成熟过程相关,该过程的调控因素尚需要后续实验进一步研究。

【参考文献】

- [1] TIONG V, ROZITA A M, TAIB N A, *et al.* Incidence of Chemotherapy-Induced Ovarian Failure in Premenopausal Women Undergoing Chemotherapy for Breast Cancer [J]. *World J Surg*, 2014, 38(9): 2288-2296.
- [2] DOLMANS M M, JADOUL P, GILLIAUX S, *et al.* A review of 15 years of ovarian tissue bank activities [J]. *J Assist Reprod Gen*, 2013, 30(3): 305-314.
- [3] XIAO Z, WANG Y, LI L-L, *et al.* In vitro culture thawed human ovarian tissue: NIV versus slow freezing method [J]. *Cry-*

oletters, 2013, 34(5): 520-526.

- [4] SCOTT J E, CARLSSON I B, BAVISTER B D, *et al.* Human ovarian tissue cultures: extracellular matrix composition, coating density and tissue dimensions [J]. *Reprod Biomed Online*, 2004, 9(3): 287-293.
- [5] PEREZATAYDE A R, SALLAN S E, TEDROW U, *et al.* Spectrum of tumor angiogenesis in the bone marrow of children with acute lymphoblastic leukemia [J]. *Am J Pathol*, 1997, 150(3): 815-821.
- [6] JALAVA P, KUOPIO T, JUNTTI-PATINEN L, *et al.* Ki67 immunohistochemistry: a valuable marker in prognostication but with a risk of misclassification: proliferation subgroups formed based on Ki67 immunoreactivity and standardized mitotic index [J]. *Histopathology*, 2006, 48(6): 674-682.
- [7] KIM S S, YANG H W, KANG H G, *et al.* Quantitative assessment of ischemic tissue damage in ovarian cortical tissue with or without antioxidant (ascorbic acid) treatment [J]. *Fertil Steril*, 2004, 82(3): 679-685.
- [8] SILBER S J. Ovary cryopreservation and transplantation for fertility preservation [J]. *Molecular Human Reproduction*, 2012, 18(2): 59-67.
- [9] KAWANO Y, HASAN K Z, FUKUDA J, *et al.* Production of vascular endothelial growth factor and angiogenic factor in human follicular fluid [J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2003, 202(1-2): 19-23.
- [10] 傅锦媚,汪燕,肖准, *et al.* 不同冷冻方法对人卵巢组织血管内皮生长因子表达及血管生成的影响 [J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2010, 14(2): 233-236.

(收稿日期:2016-02-01; 编辑: 张文秀)

(上接第 597 页)

- [32] Greve T, Schmidt KT, Kristensen SG, *et al.* Evaluation of the ovarian reserve in women transplanted with frozen and thawed ovarian cortical tissue [J]. *Fertil Steril*, 2012, 97(6): 1394-1398.
- [33] 姜李乐,韦多,张翠莲,人未成熟卵母细胞培养体系研究进展,生殖与避孕, 2014, 34(3): 388-394.
- [34] Strowitzki T. In vitro maturation (IVM) of human oocytes. *Arch Gynecol Obstet*, 2013, 26(9): 37-42.
- [35] Prasath EB, Chan MLH, Wong WHW, *et al.* First pregnancy and live birth resulting from cryopreserved embryos obtained from in vitro matured oocytes after oophorectomy in an ovarian cancer patient. *Hum Reprod*, 2014, 29(2): 276-278.
- [36] 王碧君,郭艺红,妇科肿瘤患者卵巢生育功能的维持和激发,国际生殖健康/计划生育杂志, 2015, 34(3): 437-440.
- [37] Kawamura K, Cheng Y, Suzuki N, *et al.* Hippo signaling disruption and Akt stimulation of ovarian follicles for infertility treat-

ment [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, 110(43): 17474-17479.

- [38] 严杰,乔杰,年轻女性癌症患者的生育力保存,国际生殖健康/计划生育杂志, 2011, 30(2): 275-278.
- [39] Del ML, Ceppi M, Poggio F, *et al.* Gonadotropin-releasing hormone analogues for the prevention of chemotherapy-induced premature ovarian failure in cancer women: Systematic review and meta-analysis of randomized trials [J]. *Cancer Treat Rev*, 2014, 40(5): 675-683.
- [40] Wang S, Yu L, Sun M, *et al.* The therapeutic potential of umbilical cord mesenchymal stem cells in mice premature ovarian failure [J]. *Biomed Res Int*, 2013, 2013: 690491. doi: 10.1155/2013/690491.
- [41] 王燕蓉,裴秀英,肿瘤生育与女性癌症患者的生育力保存,宁夏医科大学学报, 2014, 36(1): 115-120.

(收稿日期: 2016-02-26; 编辑: 张文秀)