

细胞筛网作为载体运用于玻璃化法冻存人卵巢组织的效果分析

马 龙^{1,2},蔡令波²,严正杰²,冯 婷²,董 娟²,刘嘉茵^{2*},王守林^{1*}

(¹南京医科大学公共卫生学院职业医学与环境卫生学系,江苏 南京 211166;²南京医科大学第一附属医院生殖医学中心,江苏 南京 210029)

[摘要] 目的:研究细胞筛网作为载体运用于玻璃化冷冻人卵巢组织的效果,并寻找合适的冷冻剂浓度。方法:选择来自卵巢切除、子宫内膜异位、卵巢浆液性囊肿患者的卵巢组织共10例,以细胞筛网为载体,以二甲基亚砜、乙二醇和蔗糖为冷冻保护剂进行玻璃化冷冻。分别以二甲基亚砜和乙二醇等浓度混配(12%、15%、18%和20%)和0.5 mol/L的蔗糖配成4组不同的冷冻液,并以新鲜组织及常规程序化冷冻组织为对照,观察不同冷冻液组合对卵巢组织始基卵泡的形态学、凋亡以及体外培养后雌激素、孕酮和乳酸脱氢酶的影响,评价冷冻效果。结果:与新鲜组相比,细胞筛网玻璃化冷冻的卵巢组织冻融后,始基卵泡正常率虽有所降低,但优于常规程序化冷冻组,其中18%组和15%组的正常率显著增高。组织细胞的凋亡率比新鲜组有所增加,但低于常规程序化冷冻组,其中15%组和12%组明显降低。因此,15%组的冷冻效果最好。比较了该浓度组合对卵巢组织培养后的雌激素、孕酮、乳酸脱氢酶的影响,结果发现,与新鲜组和程序化冷冻组相比,培养液中雌激素水平无明显差异,孕酮水平略好于程序组,但乳酸脱氢酶与新鲜组的变化完全一样,都显著优于程序化组。结论:细胞筛网玻璃化冷冻法优于程序化冷冻法,可作为临床卵巢组织冷冻的一种方法,15%的二甲基亚砜和乙二醇等浓度组合效果最佳。

[关键词] 卵巢组织;细胞筛网;玻璃化冷冻;复苏效果

[中图分类号] R329.1

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2013)09-1180-06

doi: 10.7655/NYDXBNS20130902

Efficiency of cell strainer-based vitrification in human ovarian tissue cryopreservation

Ma Long^{1,2}, Cai Lingbo², Yan Zhengjie², Feng Ting², Dong Juan², Liu Jiayin^{2*}, Wang Shoulin^{1*}

(¹Department of Occupational Medicine and Environmental Health, School of Public Health, NJMU, Nanjing 211166; ²Center of Clinical Reproductive Medicine, the First Affiliated Hospital of NJMU, Nanjing 210029, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the efficiency of cell strainer-based vitrification in human ovarian tissue cryopreservation, and to find suitable concentration of cryoprotectants. **Methods:** Human ovarian biopsy tissues were obtained from ten female patients undergoing oophorectomy, endometriosis surgery, and ovarian cystectomy. The ovarian tissues were vitrified by cryoprotectants containing ethylene glycol (EG), dimethylsulfoxide (DMSO) and sucrose using cell strainer as a device. The cryoprotectant mixtures were formulated as follows: 12%DMSO + 12%EG + 0.5 mol/L sucrose, 15%DMSO + 15%EG + 0.5 mol/L sucrose, 18%DMSO + 18%EG + 0.5 mol/L sucrose, 20%DMSO + 20%EG + 0.5 mol/L sucrose. The morphology of the primordial follicles, cellular apoptosis in ovarian tissues, estradiol (E2), progesterone (P) and lactate dehydrogenase (LDH) in culture medium were evaluated. The fresh tissues and the tissues in programmed cryopreservation were used as controls. **Results:** Compared with the fresh group, the proportion of normal primordial follicle declined a little in the cell strainer-based vitrification group but was higher than the programmed cryopreservation group, of which the proportion increased significantly in the 18% and 15% groups. Furthermore, the proportion of TUNEL-positive primordial follicles in the vitrification group was higher than that of the fresh group but was lower than that of the programmed cryopreservation group, of which the proportion decreased significantly in the 15% and 12% groups. Therefore, 15% cryoprotectant mixtures was optimum for the ovarian tissues preservation. After recovery culturing the ovarian tissues from vitrification in 15% cryoprotectant mixtures, the levels of E2 and P were similar to the controls. However, the level of LDH was almost same as the

[基金项目] 国家973课题(2009CB941701);江苏省临床医学科技专项(BL2012009);江苏省临床生殖医学中心(ZX201110)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: jyliu_nj@126.com; wangshl@njmu.edu.cn

fresh group, both of which were much more superior than the programmed cryopreservation group. **Conclusion:** The cell strainer-based vitrification is superior than the programmed cryopreservation, it could be a new vitrification method for clinical human ovarian tissue cryopreservation. The mixture containing 15%DMSO + 15%EG + 0.5 mol/L sucrose should be a optimized cryoprotectant.

[Key words] ovarian tissues; cell strainer; vitrification; resuscitation efficiency

[Acta Univ Med Nanjing, 2013, 33(9): 1180-1185]

随着临床放化疗药物和骨髓移植技术广泛应用,肿瘤患者的生存率得到很大提高^[1]。然而治疗肿瘤所采用的放化疗药物可能对卵巢产生不可逆损伤,甚至导致卵巢功能早衰,丧失生殖和内分泌功能。因此,若在抗癌治疗之前将女性的生殖组织或细胞保存下来,待其病情缓解后再行自体移植,将是恢复女性生育能力的有效途径^[2]。卵巢组织的冷冻保存和移植是一种理想的保存女性生育能力的方法,常采用程序化冷冻法和玻璃化冷冻法。玻璃化冷冻因不需要程序化冷冻仪、操作时间短、耗费液氮少、易普及等特点,被认为是具有广阔应用前景的冷冻方法。但玻璃化冷冻仍存在诸多影响因素,其中,冷冻载体选择是影响玻璃化效果的重要因素。目前应用的玻璃化冷冻载体有麦管、cryoloop^[3]、电镜铜栅^[4]以及直接覆盖玻璃化法(DCV)^[5]、针浸润玻璃化法(NIV)^[6]、无载体的微滴法^[7]等,复苏后卵巢组织中各级卵泡均能保持较好的形态,并有继续发育潜能。除此以外,冷冻保护剂的配伍浓度也很重要,浓度低达不到冷冻效果,而浓度过高则会损伤组织和细胞。有鉴于此,本研究拟选用细胞筛网作为玻璃

化冷冻载体,通过比较不同浓度组合的冷冻保护剂对卵巢组织冻融后的效果,探讨细胞筛网玻璃化冷冻的可行性,并寻找合适的冷冻剂组合浓度,为临床卵巢组织的冷冻保存提供新的方法。

1 材料和方法

1.1 材料

本院 10 例人卵巢组织取自绝经期前因各种原因需行卵巢手术的患者,其中卵巢切除 1 例、子宫内膜异位症 7 例、卵巢浆液性囊腺瘤 2 例,患者年龄 24~40 岁,基本资料见表 1。获取卵巢组织后放入含 10% (V/V)血清替代物(SSS,Sage 公司,美国)的 M-199 (Sigma 公司,美国)基础培养液中,分离残余囊肿囊壁及髓质,将卵巢皮质切成约 3 mm³左右的小块。然后将每位患者的卵巢组织随机分为 6 组(每组 6 块),设为新鲜组、程序化冷冻组和 4 个细胞筛网玻璃化冷冻组。卵巢组织冷冻前的切割在添加 100 U/ml 青霉素、100 μg/ml 链霉素、20% SSS 的 M-199 培养液中于 30 min 内完成。

1.2 方法

表 1 卵巢组织来源患者的基本资料

Table 1 The basic data of patients with ovarian tissue

患者	病因	年龄(岁)	基础 FSH (U/L)	获取组织面积(mm ²)
1	浆液性囊腺瘤	34	7.4	102
2	浆液性囊腺瘤	30	5.6	110
3	变性手术	25	6.3	400
4	子宫内膜异位	27	8.9	125
5	子宫内膜异位	36	5.7	144
6	子宫内膜异位	32	10.6	96
7	子宫内膜异位	28	6.8	110
8	子宫内膜异位	40	11.3	112
9	子宫内膜异位	24	7.5	125
10	子宫内膜异位	33	9.4	90

1.2.1 玻璃化冷冻复苏方案

冷冻:玻璃化冷冻基础液为含 20%SSS 的 M-199 溶液,所有玻璃化冷冻平衡液和冷冻液均在此基础液中添加不同浓度的二甲基亚砷和乙二醇配制而成。组织块分别放入平衡液中,室温平衡 15 min,

4 组平衡液的浓度分别为 6% 二甲基亚砷 + 6% 乙二醇、7.5% 二甲基亚砷 + 7.5% 乙二醇、9% 二甲基亚砷 + 9% 乙二醇、10% 二甲基亚砷 + 10% 乙二醇,充分平衡后再分别移入双倍浓度的冷冻液中(即 12%、15%、18% 和 20%),室温放置 2 min,移入细胞

筛网后直接投入液氮中保存2周。细胞筛网为直径18 mm、网眼直径100 μm的人未成熟卵母细胞过滤网(REF352360, BD公司, 美国)。

复苏: 含卵巢组织的细胞筛网从液氮中取出后直接放入1.0 mol/L的蔗糖中, 3 min后将卵巢组织块分别移入0.500、0.250和0.125 mol/L的蔗糖中5 min, 最后用M-199基础液洗涤3次, 移入含10%SSS的M-199中完成复苏。程序化冷冻复苏参见Chen等^[5]的方案执行。

1.2.2 卵巢组织的形态学观察和卵泡计数

冷冻前后卵巢组织用4%多聚甲醛固定、常规脱水、二甲苯透明、石蜡包埋后行5 μm连续切片, 苏木素-伊红染色。根据Gougeon^[8]的标准进行观察和计数。其中, 始基卵泡为单层扁平或扁平与立方混合的颗粒细胞包绕卵母细胞; 初级卵泡为单层立方型颗粒细胞包绕中间的卵母细胞; 次级卵泡为2层或以上立方型颗粒细胞包绕的卵母细胞。每组观察5张切片, 每张共观察20个高倍视野。观察指标为形态正常卵泡比值: 形态正常卵泡数(不含闭锁卵泡和冷冻损伤卵泡)/总卵泡数×100%。

1.2.3 卵泡的凋亡检测(TUNEL法)

将各组卵巢组织石蜡切片用TUNEL方法染色, 观察卵泡内卵母细胞和颗粒细胞凋亡情况。切片常规脱蜡和水化, 以蛋白酶K消化后, 用0.3% H₂O₂阻断内源性过氧化物酶的活性, 然后加荧光素标记的核苷酸和脱氧核苷酸末端转移酶(TdT)混合液, 37℃孵育60 min。加POD转换剂后, DAB室温避光显色, 苏木精复染后封片。TdT缓冲液代替TdT酶作为阴性对照。每组观察5张切片, 每张共观察20个高倍视野。观察指标为凋亡卵泡比值: 凋亡

卵泡数/总卵泡数×100%。

1.2.4 卵巢组织体外培养和雌激素、孕酮及乳酸脱氢酶的测定

根据Scott^[9]推荐的组织培养方法, 将所有患者新鲜和冻融后卵巢组织每组选择3片分别放入中间含有1 ml培养液的双井皿(REF353653, BD公司, 美国)中培养, 在5%CO₂、37℃培养箱中各培养10 d, 隔天收集组织代谢后培养液500 μl放入-20℃冰箱保存直至实验结束。采用化学发光法、速率法分别测定培养液中雌激素、孕酮和乳酸脱氢酶。

1.3 统计学方法

本文临床病例资料来源于临床生殖医学管理系统(CCRM), 采用SPSS17.0进行数据分析, 率的比较采用χ²检验, 计量资料数据采用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 雌激素、孕酮及乳酸脱氢酶水平比较采用重复测量的方差分析, P≤0.05为差异有统计学意义。

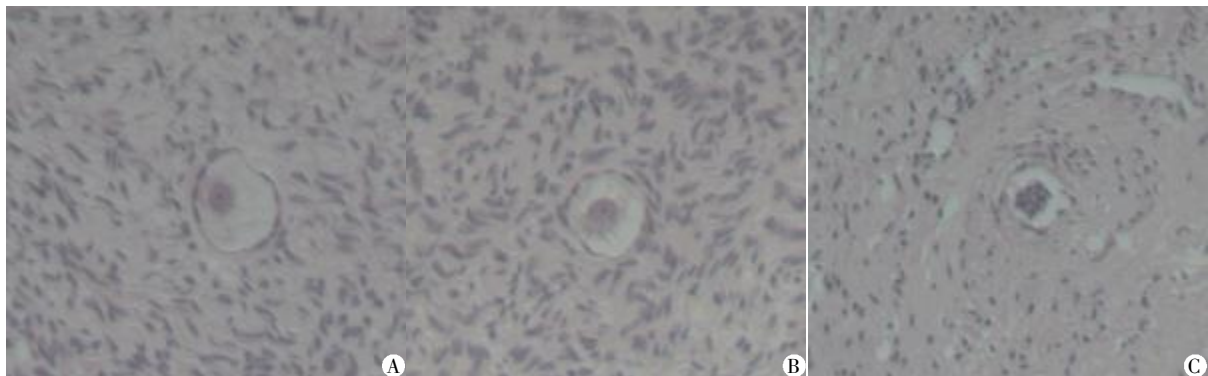
2 结果

2.1 不同浓度冷冻剂组合对卵巢组织形态学影响

由图1可见, 形态正常卵泡为圆形或椭圆形卵泡结构, 卵母细胞或颗粒细胞未见浓缩核, 颗粒细胞分布均匀, 与基膜连接紧密; 闭锁卵泡为卵母细胞形态不规则, 颗粒细胞核固缩。冷冻损伤的卵泡: 卵母细胞核浓缩成实心核, 无法辨认核内结构; 颗粒细胞从基底膜脱离, 细胞间排列极为混乱, 连接不紧密, 缺失明显。各组始基卵泡的正常率见表2。

2.2 不同浓度冷冻剂组合对卵巢组织细胞凋亡的影响

图2显示, 卵母细胞核内出现棕黄色颗粒视为



A: 新鲜卵巢组织正常形态的始基卵泡; B: 复苏后卵巢组织正常形态的始基卵泡; C: 复苏后异常形态的始基卵泡, 卵母细胞核固缩, 颗粒细胞与基膜脱离。

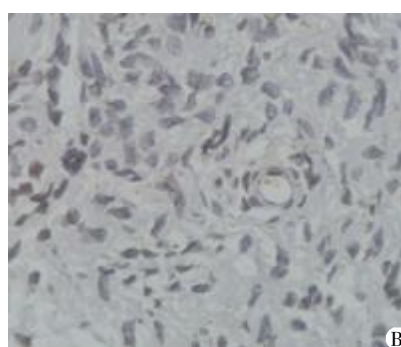
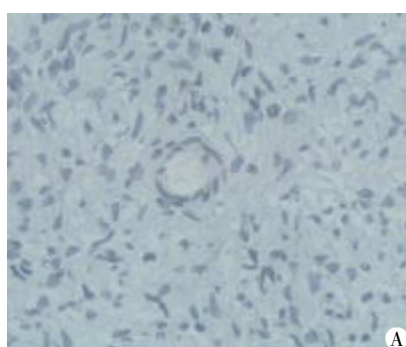
图1 新鲜和冻融后卵巢组织的形态学(HE, ×400)

Figure 1 Morphology of fresh and frozen-thawed ovarian tissues(HE, ×400)

表 2 新鲜和冻融后卵巢组织始基卵泡的正常形态率比较
Table 2 Proportion of the normal primordial follicle in fresh and frozen-thawed ovarian tissues

组别	正常形态率(%)
新鲜组	92.0(184/200)
20%组	75.0(150/200) ^a
18%组	83.5(167/200) ^{ab}
15%组	84.5(169/200) ^{ab}
12%组	72.0(144/200) ^a
程序化组	74.0(148/200) ^a

与新鲜组比较,^a $P < 0.05$;与 20%组、12%组、程序化组比较,^b $P < 0.05$ 。



A:TUNEL 阴性始基卵泡(TUNEL, ×400);B:TUNEL 阳性始基卵泡,卵母细胞核和部分颗粒细胞呈棕黄色(TUNEL, ×400)。

图 2 卵巢组织 TUNEL 分析的阴性与阳性对照

Figure 2 Negative and positive controls of ovarian tissues in TUNEL assay

表 3 新鲜和冻融后卵巢组织始基卵泡的凋亡率比较
Table 3 Proportion of the apoptotic primordial follicle in fresh and frozen-thawed ovarian tissues

组别	始基卵泡凋亡率(%)
新鲜组	7.0(14/200)
20%组	37.0(74/200) ^a
18%组	32.5(65/200) ^a
15%组	22.0(44/200) ^{ab}
12%组	21.0(42/200) ^{ab}
程序化组	39.0(78/200) ^a

与新鲜组比较,^a $P < 0.05$;与 20%组、18%组、程序化组比较,^b $P < 0.05$ 。

卵母细胞凋亡的卵泡, ≥ 2 个颗粒细胞核内出现棕黄色颗粒为颗粒细胞凋亡的卵泡。各组始基卵泡的凋亡率见表 3。

2.3 不同冷冻方案对卵巢组织雌激素和孕酮分泌的影响

综合始基卵泡正常形态率和凋亡率的分析,选择 15%组作为最佳玻璃化冷冻组进行组织体外培养,观察复苏效果。由图 3 可见,冻融卵巢组织培养后雌激素、孕酮水平逐渐升高,玻璃化冷冻组与新鲜组基本接近,略优于程序化组,但无统计学差异。

2.4 不同冷冻方案对卵巢组织乳酸脱氢酶释放的影响

冻融卵巢组织培养后,随着培养时间的延长,培养液中乳酸脱氢酶水平呈现先上升再逐步下降的过程。玻璃化组和新鲜组基本接近,但都显著低于程序化冷冻组($P < 0.05$,图 4),提示玻璃化冷冻对卵巢组织的损伤较小。

3 讨论

目前保存生育力有 3 种方法:胚胎冷冻、卵母细

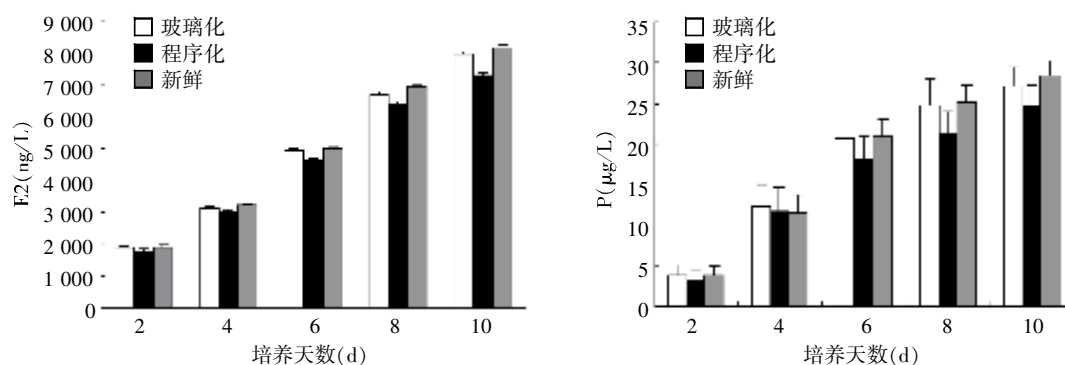
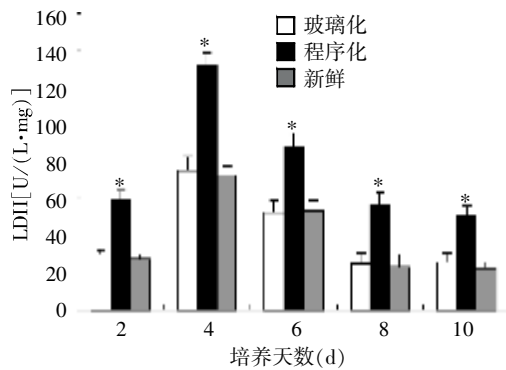


图 3 复苏的卵巢组织体外培养后雌激素和孕酮水平的变化

Figure 3 Changes of E2 and P levels produced by ovarian tissue *in vitro* cultured medium



与玻璃化组和新鲜组比较, * $P < 0.05$ 。

图4 卵巢组织体外培养后乳酸脱氢酶水平变化

Figure 4 Changes of LDH level produced by ovarian tissue *in vitro* cultured medium

胞冷冻和卵巢组织冷冻。前两种方法在收集卵母细胞之前需要特殊的激素处理,并需要相当长时间的预处理,这将延缓患者治疗,且移植后无法恢复女性自身的激素分泌功能。卵巢组织冷冻的优点在于:①卵巢组织可以在任何时候进行冷冻,且不需要激素的处理,移植后能够恢复卵巢的分泌功能^[10];②卵巢组织皮质区的始基卵泡占卵泡总数的70%~90%,因其体积小、代谢率低、缺少透明带等特征,更耐受冷冻复苏损伤,且复苏率高。因此,卵巢组织的冷冻保存和移植是一种理想的保存女性生育能力的方法。卵巢组织冷冻常采用程序化慢速冷冻法和玻璃化冷冻法。慢速冷冻方法已比较成熟,在许多研究领域已广泛应用。玻璃化冷冻技术作为一项经济、简便和高效的冷冻技术在卵巢冷冻研究领域的应用日渐增多^[11-12],玻璃化冷冻与慢速冷冻的主要差别包括冷冻速率和冷冻保护剂的使用。玻璃化冷冻通过高浓度冷冻保护剂的使用,在快速降温中(常常会超过1500°C/min)能形成一种玻璃化状的固体,使胞浆内外的水物质迅速通过-5°C~-15°C的冷冻敏感区,避免了胞浆内冰晶的形成^[13]。

近年来卵巢组织玻璃化冷冻技术有着快速的发展,各种新型冷冻载体如 cryoloop、cryotop 及电镜钢栅等的应用,其目的是为了提提高降温速率,减轻冷冻对组织细胞的损伤,复苏后卵泡可以保持较好的形态^[3-6]。但细胞筛网是否可以作为玻璃化冷冻载体尚无报道。筛网底层为网眼直径100 μm的纤维尼龙网,远大于电镜铜网42 μm的网眼直径,可极大地增加组织片与液氮的接触面积;可一次性承载较多的卵巢组织,将卵巢组织直接投入液氮中,不会出现微滴直投法在液氮面较长时间的“沸腾”现象,大大增加了玻璃化降温速度,且冻融后卵巢组织不易

丢失。因此,更加适合临床上大批量卵巢组织冻存的需要。本研究结果显示,采用细胞筛网为载体后,玻璃化冷冻的效果较程序组要好,有些指标已接近了新鲜组,表明细胞筛网作为玻璃化冷冻载体的可行性。

玻璃化冷冻需要相对较高浓度的冷冻保护剂,但冷冻保护剂浓度越高毒性越大,冷冻时高浓度的冷冻保护剂渗透入卵巢组织细胞,将会产生较大的损伤,甚至造成细胞死亡。常用的渗透性冷冻保护液包括乙二醇、丙二醇和二甲基亚砜^[14]。卵巢组织结构不同于胚胎和囊胚,它有特定的空间立体结构,多种类型细胞以及一套血管系统,进行玻璃化冷冻时需要更高的浓度、更长的平衡时间。有研究证明联合应用两种或以上冷冻保护剂冻存卵巢组织能够降低毒性和增强冷冻效果^[15]。虽然已有玻璃化冷冻保存卵巢组织的文献报道,但到目前为止还没有公认的适合卵巢组织玻璃化冷冻的最佳保护剂配方。本实验通过冻融后卵泡的形态学、凋亡分析、体外培养后组织功能的恢复以及损伤的影响,发现15%二甲基亚砜+15%乙二醇+0.5 mol/L蔗糖的组合可获得较好的冷冻效果和较小冷冻损伤,可推荐于临床使用。

体外培养是较好反映卵巢组织冻融效果的检测手段,首例冻融人卵巢自体移植前使用体外培养作为检测复苏卵巢功能的方法,发现在含促性腺激素培养基中培养6 d后,雌激素、孕酮升高^[16]。Yeoman等^[17]应用玻璃化方法冻融猴的卵巢组织,复苏后体外培养实验证明玻璃化冷冻与慢冻方法一样,是有效的卵巢组织冷冻方法。Rahimi等^[18]将玻璃化冷冻复苏的人卵巢组织移植到SCID鼠皮下,与对照组比较,组织坏死区域无明显增加。本实验中,随着卵巢组织培养时间的延长,培养液中雌激素和孕酮逐渐升高,说明冷冻复苏后始基卵泡开始生长,同时内分泌功能逐步恢复,这与Huang等^[19]的报道一致。细胞代谢液中乳酸脱氢酶的浓度是评价细胞损伤的重要指标,弥补了单纯形态学观察的不足,Kim等^[20]报道了组织细胞损伤的程度与培养液中乳酸脱氢酶浓度密切相关。本实验中,随着培养时间的延长,培养液中乳酸脱氢酶水平呈现先上升后逐步下降的趋势。玻璃化冻融卵巢组织和新鲜组织培养后乳酸脱氢酶水平相当,均显著低于程序化冻融组,进一步验证了细胞筛网玻璃化冷冻的效果及可行性。

总之,细胞筛网作为玻璃化冷冻载体,因可一次性承载大批量卵巢组织、易于操作,且冷冻的卵巢组

织不易丢失等特点,比较适合临床上肿瘤和卵巢早衰患者卵巢组织的冻存。本研究进一步证实了细胞筛网作为玻璃化冷冻卵巢组织的可行性,并在此基础上,寻找到了合适的冷冻剂组合浓度,这无疑为临床卵巢组织的保存提供了新的方法。当然,影响组织冷冻复融效果的因素还很多,尤其在冷冻条件的优化及标准化方面还需要进一步系统研究,使之能尽快在临床中推广应用。

[参考文献]

- [1] Kim SS. Fertility preservation in female cancer patients: current developments and future directions [J]. *Fertil Steril*,2006,85(1):1-11
- [2] Chung K,Donnez J,Ginsburg E,et al. Emergency IVF versus ovarian tissue cryopreservation:decision making in fertility preservation for female cancer patients [J]. *Fertil Steril*,2013,99(6):1534-1542
- [3] 李豫峰,吕 艳,刘 群,等. 自制冷冻环人卵巢组织玻璃化冷冻的可行性研究 [J]. *中国实用妇科与产科杂志*,2010,26(1):39-42
- [4] Isachenko E,Isachenko V,Rahimi G,et al. Cryopreservation of human ovarian tissue by direct plunging into liquid nitrogen [J]. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*,2003,108(2):186-193
- [5] Chen SU,Chien CL,Wu MY,et al. Novel direct cover vitrification for cryopreservation of ovarian tissues increases follicle viability and pregnancy capability in mice[J]. *Hum Reprod*,2006,21(11):2794-2800
- [6] Xiao Z,Wang Y,Li L,et al. Needle immersed vitrification can lower the concentration of cryoprotectant in human ovarian tissue cryopreservation [J]. *Fertil Steril*,2010,94(6):2323-2328
- [7] 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
- [8] Gougeon A. Dynamics of follicular growth in the human: a model from preliminary results [J]. *Hum Reprod*,1986,1(1):81-87
- [9] 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
- [10] Nawroth F,Rahimi G,Isachenko E,et al. Cryopreservation in assisted reproductive technology:new trends [J]. *Semin Reprod Med*,2005,23(4):325-335
- [11] Kagawa N,Silber S,Kuwayama M. Successful vitrification of bovine and human ovarian tissue [J]. *Reprod Biomed Online*,2009,18(4):568-577
- [12] 潘永苗,徐向荣,钱羽力,等. 玻璃化冷冻对人卵巢组织形态结构及组织增殖活性的影响 [J]. *浙江大学学报:医学版*,2013,42(1):75-80
- [13] Rall WF,Fahy GM. Ice free cryopreservation of mouse embryos at -196°C by vitrification [J]. *Nature*,1985,313(6003):573-575
- [14] Shaw J,Oranrattachai A,Trounson A. Fundamental cryobiology of mammalian oocytes and ovarian tissue [J]. *Theriogenology*,2000,53(1):59-72
- [15] 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
- [16] Oktay K,Karlikaya G. Ovarian function after transplantation of frozen,banked autologous ovarian tissue [J]. *N Engl J Med*,2000,342(25):1919-1929
- [17] Yeoman RR,Wolf DP, Lee DM. Coculture of monkey ovarian tissue increases survival after vitrification and slow-rate freezing [J]. *Fertil Steril*,2005,86(1):1248-1254
- [18] Rahimi G,Isachenko E,Isachenko V,et al. Comparison of necrosis in human ovarian tissue after conventional slow freezing or vitrification and transplantation in ovariectomized SCID mice [J]. *Reprod Biomed Online*,2004,9(2):187-193
- [19] 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
- [20] Kim SS,Yang HW,Kang HG,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

[收稿日期] 2013-05-03