

卵巢组织冷冻与移植及应用研究进展

卜志勤, 孙莹璞*

基金项目: 国家自然科学基金(项目编号: 81820108016); 国家自然科学基金青年基金(项目编号: 81801448)

作者单位: 450052 河南 郑州, 郑州大学第一附属医院生殖医学中心

作者简介: 卜志勤, 毕业于郑州大学, 博士, 主治医师, 主要研究方向为生殖医学。孙莹璞, 毕业于华中科技大学同济医学院, 医学博士, 教授, 主任医师, 主要研究方向为生殖医学。

* 通讯作者, E-mail: sy2008@vip.sina.com

【关键词】 卵巢组织冷冻; 卵巢组织移植; 生育力保存

【中图分类号】R 715.5 【文献标志码】A 【文章编号】1674-4020(2020)10-016-03

doi:10.3969/j.issn.1674-4020.2020.10.05

生育力保存(fertility preservation, FP)是指通过各种医学手段,对存在生育力下降或消失风险的女性提供帮助,保存其生育遗传学子代能力的方法。近年来因医学或社会原因,有FP需求的女性越来越多^[1]。目前常用的FP方法有胚胎冷冻、成熟卵母细胞冷冻,以及卵巢组织冷冻(ovarian tissue cryopreservation, OTC)与移植。美国生殖医学协会于2018年发布的第二版专家共识认为前两种技术为成熟的FP方法,而OTC与移植则依然处于试验阶段^[2];但随着该技术的不断发展和完善,其有效性逐渐得到了专家的认可,值得在临床中推广^[3]。OTC与移植按照卵巢组织来源和移植受体的不同,可分为异种移植、同种异体移植和自体移植,前两种技术不能生育和卵巢组织移植受者相关的遗传学子代,故不认为属于FP的范畴。本文旨在对和FP密切相关的OTC和自体移植,及该技术发展中新的观点和进展进行总结,为其临床应用提供借鉴和参考。

1 卵巢组织冷冻与移植的适用人群

胚胎或成熟卵母细胞冷冻技术虽然成熟,但仅局限于育龄期女性(其中胚胎冷冻还需要精子),并在原发疾病治疗开始之前,需有足够的时间进行促排卵准备。根据2018年我国OTC与移植的中国专家共识,OTC的人群筛选需满足:具有良好的卵巢储备,原发疾病预后较好,治疗原发疾病后有较高的卵巢功能低下发生风险这3个基本条件^[4],因此OTC是没有成熟卵母细胞、更无胚胎可冷冻的青春前期儿童患者,以及原发疾病治疗无法推迟或对激素敏感的育龄期患者的最佳选择。

另外,OTC作为FP技术中的一种,不仅适用于需要放化疗的患者(如恶性肿瘤、自身免疫系统或血液系统疾病),也可用于双侧卵巢良性肿瘤、反复发作的重度子宫内膜异位症、遗传性早发卵巢功能不全,甚至因社会原因自愿推迟生育年龄的健康女性^[1]。

2 影响卵巢组织冷冻与移植效果的因素

OTC与移植过程中两个核心问题是如何避免卵巢组织中的卵泡在冷冻过程中的损伤和提高卵巢组织移植后的存活概率。其主要影响因素有OTC方法、冷冻卵巢组织大小、卵巢组织移植部位等。

2.1 卵巢组织冷冻方法:慢速程序化冷冻和玻璃化冷冻

慢速程序化冷冻和玻璃化冷冻是常用的OTC方法。慢速程序化冷冻步骤繁琐,耗时较长,且冷冻过程细胞内容易产生冰晶,造成细胞损伤;玻璃化冷冻使细胞内外液迅速变为非晶体的玻璃化态,可减少细胞内外冰晶的形成,但冷冻过程中高浓度冷冻保护剂可能存在较大的细胞毒性。

在胚胎和卵母细胞冷冻中,玻璃化冷冻法已成为标准方法,而OTC过程中玻璃化冷冻的优势并不明显。2011年Oktem等^[5]的研究发现,玻璃化冷冻后复苏的卵巢组织在体外培养时产生的抗苗勒管激素水平以及原始卵泡存活率明显低于慢速程序化冷冻后复苏的卵巢组织。2017年的1篇Meta分析表明玻璃化冷冻时DNA损伤更小,对卵巢组织中基质细胞的保护作用更强^[6],但更多的研究认为卵巢组织复苏后卵泡正常形态和存活率在两种冷冻方法中没有差异^[7]。截止到2017年6

月,OTC 与移植后获得妊娠并分娩的婴儿已超过 130 例,但通过玻璃化冷冻的方法获得的活产婴儿仅 2 例^[8]。因此两种 OTC 方法的优劣性仍需更多的研究来验证。

2.2 卵巢组织大小:卵巢皮质组织和完整卵巢冷冻

不同发育阶段的卵泡均位于卵巢皮质,理论上仅对卵巢皮质组织进行冷冻便可保护卵巢的生育功能。取出卵巢皮质后,通常情况下会切成 1~2 mm 厚的条带再进行冷冻。由于冷冻保护剂的充分渗透,该方法冷冻效果好,且保存的卵巢皮质可进行多次、多部位的移植。卵巢皮质移植后面面对的最大问题是新生微血管形成过程中由于缺血造成的大量卵泡损失。1999 年的 1 项关于哺乳动物 OTC 与移植的研究发现,卵巢组织中的卵泡在冷冻和复苏的过程中仅损失 7 % 左右,但在移植后血管再生的过程中由于缺血造成的卵泡损失高达 68 %^[9]。

完整卵巢移植时进行血管吻合可即刻恢复卵巢血供,减少缺血对卵泡造成的损伤。2008 年 Silber 等^[10]报道了世界首例人完整卵巢异体移植,卵巢来源于 1 例卵巢功能低下患者的单卵双胞胎的姐姐,移植后该患者月经恢复并自然妊娠活产 1 健康女婴。由于冷冻保护剂在整个卵巢中的输注和扩散不均匀,卵巢表层和深层组织的损伤存在差异,整个卵巢组织存在较高的冷冻损伤风险;另外完整卵巢组织来源不足,移植手术难度大,且癌症患者移植后可能导致癌细胞再种植等问题限制了完整卵巢冷冻和移植的应用。遗憾的是,目前尚无人类完整卵巢冷冻及自体移植的报道。

2.3 卵巢组织移植部位

根据卵巢组织移植部位的不同,可分为原位移植和异位移植。前者是将卵巢组织移植在其起源位置、盆腔内的卵巢窝或漏斗骨盆韧带附近;卵巢组织异位移植的部位多位于盆腔外,比如腹直肌鞘下、肾背膜、乳房组织等^[11]。原位移植的优点是移植后卵泡发育的环境和生理状态相似,术后具有自然妊娠的机会,但移植需要再次行盆腔内有创手术。异位移植操作简单,由于温度和血供等问题,虽不能为卵泡自然发育提供最佳环境,但可更方便地进行卵泡发育监测和取卵,为体外受精胚胎移植提供便利^[12]。

2016 年 1 项对 49 例卵巢组织异位移植妇女随访 1 年以上发现,卵巢内分泌功能在 67 % 的患者中得到恢复,其临床妊娠率和活产率分别为 33 % 和 25 %。与卵巢组织原位移植相比,异位移植获得妊娠和活产的例数和概率均较低,因此不是以生育为主要目标的最佳选择,但可作为恢复卵巢内分泌功能的首选移植方式^[13]。

3 卵巢组织冷冻与移植研究的新思路

3.1 体外激活休眠卵子与卵巢组织自体移植

原发性卵巢功能不全(primary ovarian insufficiency,

POI)患者的卵巢功能已经衰竭,对其进行卵巢组织自体移植以进行生育力保存毫无意义,只能通过移植异体具有正常功能的卵巢组织来恢复卵巢内分泌和生育功能,但将失去获得和自己有血缘关系后代的机会。

2010 年,美国科学院院报发表文章称,PTEN 基因抑制剂和 PI 3 激酶激活物可以激活在卵巢组织中“休眠”的原始卵泡;对卵巢组织切成小片处理后,可以通过干扰卵巢内的 Hippo 信号通路,刺激卵泡的生长^[14]。将原发性卵巢功能低下患者卵巢切除后经过上述两种方法联合处理,对卵巢体内休眠的卵子进行激活并再次原位移植到输卵管浆膜下,可发现卵泡正常发育。自日本报道了世界首例应用体外激活休眠卵子(in vitro activation of dormant follicles, IVA)技术获得临床妊娠后,2015 年郑州大学第一附属医院首次在我国完成了该技术的临床应用并使该名卵巢功能低下患者妊娠并分娩 1 健康男婴。该技术是对 POI 理论上和实践上的新突破,还有望应用于卵巢不敏感综合征、癌症患者化疗前的生育力保存等^[15]。

3.2 促血管生成和抗凋亡制剂的使用

为了促进卵巢组织移植后的血管再生,减少因组织缺血导致的卵泡凋亡,新的研究表明在卵巢组织移植时给予促血管生成和抗凋亡制剂可以改善卵巢组织移植的效果^[16]。

鞘氨醇磷酸酯(sphingosine-1-phosphate, S1P)是一种存在于细胞中具有生物活性的脂质信使,能够参与细胞不同增殖过程的调控。2007 年 1 项在小鼠体内的研究表明,小鼠接受化疗药物作用 2 周后,卵巢内原始卵泡的数量明显减少;而同时卵巢内注射 S1P 可减轻化疗对卵母细胞造成的细胞凋亡作用^[17]。2011 年关于人的卵巢组织异种移植到小鼠体内的研究发现,持续给予 S1P 可以促进卵巢组织新血管生成并减少缺血性再灌注损伤,增加了卵巢组织移植存活率和寿命^[18]。S1P 不能全身系统性给药,需要长期多次的卵巢组织内局部注射,而卵巢组织移植,尤其是原位移植后由于给药不便限制了其临床应用。尽管如此,S1P 仍被认为在卵巢组织移植领域有较好的应用前景,其具体作用机制和效果值得更多深入的研究。

3.3 其他新的研究方向

卵巢组织移植手术精细,腹腔镜下操作空间有限,难度较大,对施术者手术技巧要求极高。近期有学者利用“达芬奇”机器人实施卵巢组织移植手术,术中出血少,移植位置精确,可以缩短卵巢组织复苏后到移植进入体内的时间,2016 年已有应用该技术获得临床妊娠并分娩的报道^[19]。

未成熟卵母细胞体外培养(in vitro maturation, IVM)技术已在人类辅助生殖领域广泛开展,最近有研究将 IVM 技术和 OTC 技术相结合,增加有 FP 要求的女性后续生育机会^[20]。从卵巢组织中将窦卵泡体外分离

并培养,卵母细胞成熟后可直接或经体外受精形成胚胎后冷冻保存,待时机合适进行胚胎、而非卵巢组织移植,这可以完全避免卵巢组织移植携带癌细胞再次植入的风险^[21]。

总之,OTC与移植作为一种新型的女性FP技术,为众多有FP需求的女性带来了希望,并且是目前青春前期儿童患者、以及原发疾病治疗无法推迟或对激素敏感的育龄期患者保存生育力的最佳选择。通过该技术成功分娩的例数不断增加,但目前仍存在众多不足,是一项试验性技术。相信随着其他学科及人类辅助生殖技术的发展,OTC与移植的安全性和有效性均会有更大的提高。

【参考文献】

- [1] Donnez J, Dolmans M M. Fertility preservation in women [J]. The New England Journal of Medicine, 2017, 377(17): 1657-1665.
- [2] Ethics Committee of the American Society for Reproductive Medicine. Fertility preservation and reproduction in patients facing gonadotoxic therapies: an Ethics Committee opinion [J]. Fertility and Sterility, 2018, 110(3): 380-386.
- [3] Donnez J, Marie-Madeleine D, DIAZ C, et al. Ovarian cortex transplantation: time to move on from experimental studies to open clinical application [J]. Fertility and Sterility, 2015, 104(5): 1097-1098.
- [4] 国际妇科内分泌学会中国妇科内分泌学会及共识专家. 卵巢组织冻存与移植中国专家共识 [J]. 中国临床医生杂志, 2018, 46(4): 496-500.
- [5] Oktem O, Alper E, Balaban B, et al. Vitrified human ovaries have fewer primordial follicles and produce less antimüllerian hormone than slow-frozen ovaries [J]. Fertility and Sterility, 2011, 95(8): 2661-2664. e 1.
- [6] Shi Qingquan, Xie Yidong, Yan Wang, et al. Vitrification versus slow freezing for human ovarian tissue cryopreservation: a systematic review and meta-analysis [J]. Scientific Reports, 2017, 7(1): 8538.
- [7] Huang Lili, Mo Yaqin, Wang Wenjun, et al. Cryopreservation of human ovarian tissue by solid-surface vitrification [J]. European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology, 2008, 139(2): 193-198.
- [8] Suzuki N. Ovarian tissue cryopreservation using vitrification and/or in vitro activated technology [J]. Human Reproduction, 2015, 30(11): 2461-2462.
- [9] Baird D T, Webb R, Campbell B K, et al. Long-term ovarian function in sheep after ovariectomy and transplantation of autografts stored at -196 C [J]. Endocrinology, 1999, 140(1): 462-471.
- [10] Silber S J, Grudzinskas G, Gosden R G. Successful pregnancy after microsurgical transplantation of an intact ovary [J]. New England Journal of Medicine, 2008, 359(24): 2617-2618.
- [11] Hussein R S, Khan Z, Zhao Yulian. Fertility preservation in women: indications and options for therapy [J]. Mayo Clinic Proceedings, 2020, 95(4): 770-783.
- [12] Donnez J, Jadoul P, Pirard C, et al. Live birth after transplantation of frozen-thawed ovarian tissue after bilateral oophorectomy for benign disease [J]. Fertility and Sterility, 2012, 98(3): 720-725.
- [13] 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]. Human Reproduction (Oxford, England), 2016, 31(9): 2031-2041.
- [14] Kawamura K, Cheng Yuan, Suzuki N, et al. Hippo signaling disruption and Akt stimulation of ovarian follicles for infertility treatment [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2013, 110(43): 17474-17479.
- [15] Zhai Jun, Yao Guidong, Dong Fangli, et al. In vitro activation of follicles and fresh tissue auto-transplantation in primary ovarian insufficiency patients [J]. Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 2016, 101(11): 4405-4412.
- [16] Donnez J, Dolmans M M. Fertility preservation in women [J]. Nat Rev Endocrinol, 2013, 9(12): 735-749.
- [17] Hancke K, Strauch O, Kissel C, et al. Sphingosine 1-phosphate protects ovaries from chemotherapy-induced damage in vivo [J]. Fertility and Sterility, 2007, 87(1): 172-177.
- [18] Reza S, Elke H, Oktay K. Enhancement of neoangiogenesis and follicle survival by sphingosine-1-phosphate in human ovarian tissue xenotransplants [J]. PLOS One, 2011, 6(4): e 19475.
- [19] Oktay K, Giuliano B, Pacheco F, et al. First pregnancies, live birth, and in vitro fertilization outcomes after transplantation of frozen-banked ovarian tissue with a human extracellular matrix scaffold using robot-assisted minimally invasive surgery [J]. American Journal of Obstetrics and Gynecology, 2016, 214(1): 94. e 1-94. e 9.
- [20] Ladanyi C, Mor A, Christianson M S, et al. Recent advances in the field of ovarian tissue cryopreservation and opportunities for research [J]. Journal of Assisted Reproduction and Genetics, 2017, 34(6): 709-722.
- [21] Prasath E B, Chan M-I, Wong W H, et al. First pregnancy and live birth resulting from cryopreserved embryos obtained from in vitro matured oocytes after oophorectomy in an ovarian cancer patient [J]. Human Reproduction (Oxford, England), 2014, 29(2): 276-278.

(收稿日期:2020-06-29 编辑:舒硯)