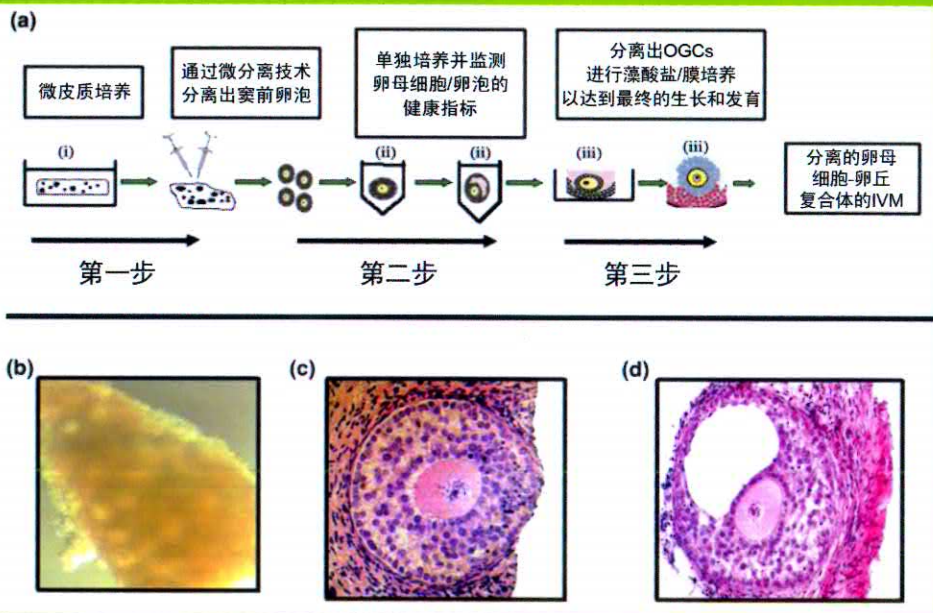


# human reproduction update

Excerpts Chinese Edition

## 人类生殖医学进展集萃



# 卵巢组织培养、卵泡体外发育和移植的当前进展及未来研究方向：对生育力保存的启示

J. Smitz<sup>1</sup>, M.M. Dolmans<sup>2</sup>, J. Donnez<sup>2</sup>, J.E. Fortune<sup>3</sup>, O. Hovatta<sup>4</sup>, K. Jewgenow<sup>5</sup>, H.M. Picton<sup>6</sup>, C. Plancha<sup>7</sup>, L.D. Shea<sup>8</sup>, R.L. Stouffer<sup>9</sup>, E.E. Telfer<sup>10</sup>, T.K. Woodruff<sup>8</sup>, and M.B. Zelinski<sup>9</sup>

<sup>1</sup>Follicle Biology Laboratory, Center for Reproductive Medicine, UZ Brussel, Laarbeeklaan 101, B-1090 Brussels, Belgium; <sup>2</sup>Department of Gynecology, University Clinic St.-Luc, Catholic University of Louvain, 1200 Brussels, Belgium; <sup>3</sup>Department of Biomedical Sciences, College of Veterinary Medicine, Cornell University, Ithaca, New York 14853, USA; <sup>4</sup>Department of Clinical Science, Intervention and Technology, Karolinska Institutet, 14186 Stockholm, Sweden; <sup>5</sup>FG Reproduktion Biologie, Leibniz-Institut für Zoo- und Wildtierforschung, 10252 Berlin, Germany; <sup>6</sup>Division of Reproduction and Early Development, Leeds Institute of Genetics, Health and Therapeutics, Faculty of Medicine and Health, University of Leeds, Leeds LS2 9JT, UK; <sup>7</sup>Biology of Reproduction Unit, Instituto de Histologia e Biologia do Desenvolvimento, Faculdade de Medicina de Lisboa, 1649-028 Lisboa, Portugal; <sup>8</sup>Department of Obstetrics and Gynecology, Northwestern University, Chicago, IL 60208-3520, USA; <sup>9</sup>Division of Reproductive Sciences, Oregon National Primate Research Center, Oregon Health and Sciences University, Beaverton, OR 97006, USA; <sup>10</sup>Institute of Cell and Molecular Biology, University of Edinburgh, EH9 3JR Edinburgh, UK

胡丹/章汉旺 摘译 黄国宁 审校

## 引言

在已有成熟生殖中心的国家，越来越多的研究热衷于卵巢组织的储存，但很少有研究致力于解决：一旦这些患者有生育需求，如何恢复解冻组织的功能。该技术上的重大进步发生在过去的6个月里。迄今为止，约有30名患者完成自体移植，并诞生了8个健康的孩子，这一进展非常令人鼓舞。该技术的优势在于能够恢复患者的内分泌和生育功能，缺点是移植时可能将侵略性的癌细胞再次带入幸存者体内。对储存卵巢组织的应用需要一种既能使获得健康孩子的几率最大化又能使癌症转移风险降到最低的方法。

然而，有关建立不同生长期卵泡体外培养体系的研究一直滞后不前，原因是组织采集困难、研究经费少及对早期卵泡生长知识的缺乏。解决以上难题有望取代卵巢同源移植，避免给患者带来不必要的癌症转移风险。目前，只有小鼠模型能实现卵泡的体外生长，证明卵泡在长期体外培养后不会损伤基本印迹过程，是可以有健康后代的。小鼠模型对于理解卵泡募集的基本原理、卵泡生长的启动、特殊生长和分化因子的作用具有非常重要的价值。然而，由于人、牛、羊、猪和小鼠的卵巢在生理和解剖上存在差异，因此很难将小鼠始基或初级卵泡的成功体外培养方案应用于其他大型物种；另由于可供研究的人类和灵长类动物卵巢组织的稀缺，使牛、绵羊、山羊和猪等家畜模型的研究数据对于转化和临床研究来说变得

尤为珍贵。为了确定最佳的人类卵泡培养方案，优先选择灵长类动物作为研究模型是必要的，可以更快地推动人类组织研究工作。

卵泡体外培养必须解决物理条件限制，如氧分压、温度和养分摄取。如此复杂的问题使得卵巢卵泡培养专家寻求组织工程师、基础生理和生化专家的帮助。已有报道利用新基质培养人类和非人灵长类卵泡，并得到了一些非常有前景的初始数据，为卵泡生物学引入了新概念，即除了激素外，卵母细胞的三维结构和周围的体细胞对卵母细胞的正常发育至关重要。此外，该研究表明，卵巢的物理环境是一种调节力量，并且这种生物力学信号可以用合适的支持基质进行表型模拟。

## 方法

对生殖医学专家和临床医生以及卵巢组织培养和移植专家在各自专业领域已发表的文献和未发表的一些有前景的数据进行讨论。

## 结果

### 卵巢组织培养技术

#### 卵巢皮质组织培养模型：从小鼠到大型哺乳动物

1996年，一只完全在体外由卵母细胞生长发育而来

THIS IS AN ABBREVIATED VERSION OF THE ORIGINAL ARTICLE.

© The Author 2010. Published by Oxford University Press on behalf of the European Society of Human Reproduction and Embryology

的活鼠诞生了, 这表明卵母细胞从始基卵泡阶段生长到有发育能力阶段这一过程可能在体外完成。这些技术之所以能够很好地应用于小鼠, 是因为小鼠卵巢在出生后几天内就能生成一批相当均匀的始基卵泡, 并且卵巢体积小便于整体培养, 质地较软容易被酶解分离。相反, 在灵长类和大部分家养物种, 卵泡在胎儿期需要数周形成, 卵巢太大不易进行整体培养, 且基质组织较硬, 因而要在不损伤卵母细胞的前提下对卵巢进行酶解分离很困难。为避开这些问题, 采用孕晚期胎牛和狒狒的小片卵巢皮质组织, 将其在含有抗生素、丙酮酸、ITS+的Waymouth's MB752培养基内培养。

尽管在牛和狒狒卵巢皮质培养体系中卵泡激活容易发生, 但只有极少数初级卵泡能够发育到次级卵泡阶段。经过许多失败的尝试后, 开发出“胚内”培养体系, 即采集胎牛或狒狒的卵巢皮层片, 将其移植到6天大的鸡胚绒毛尿囊膜(chorioallantoic membrane, CAM)下。Cushman等发现移植10天后, 血管快速生成且状态良好, 但卵泡未被激活。Hutson等在全鼠卵巢移植的研究中发现, 雄性和雌性鸡胚性腺分泌的抗苗勒激素(anti-Müllerian hormone, AMH)抑制了胚内的鼠始基卵泡激活。而Gigli将牛卵巢皮质片移植到切除性腺的鸡胚CAM下时, 发生了卵泡激活, 这也间接证明AMH是胚内牛和狒狒卵泡失活的原因所在。

总之, 卵巢皮质片的体外培养体系可用来鉴定各种卵泡激活因子, 目前已被证实的有胰岛素和kit配体; 也可用来检测假设的抑制因子如AMH对各种刺激因子的影响。然而, 体外培养体系并不能很有效地促进卵泡向次级卵泡发育, 因此, 如何解决这一难题及寻找合适的物种作为研究人类卵泡发育的理想模型成为非常重要的目标。胚内培养体系可用来检测各种因子克服AMH抑制和促使初级卵泡向次级卵泡发育的能力。该体系的缺点是由于鸡胚中CAM的发育变化, 只能保留移植在CAM下10天左右, 且技术本身难度大, 不易掌握。

### 从始基卵泡开始生长的人类卵母细胞

人类卵泡发育需要的时间很长, 使得组织培养体系的发展困难重重。事实上, 体内卵泡因受到局部环境的影响可能呈现“长-停”的生长模式。Fan等认为虽然体内颗粒细胞分裂的速度发生改变(如鼠颗粒细胞Pten缺失时), 导致了卵泡的快速生长, 但并不影响卵母细胞的受精能力。因此, 卵母细胞在快速生长的卵泡中亦能够发育成熟。日前, 在其他(如猪和牛)的培养体系

中, 已经实现了这种“加速”生长, 并获得了完全成熟的卵母细胞。

体外培养皮质带时, 卵泡生长速度失去了体内的内分泌和旁分泌调节, 但卵泡间相互作用和基质细胞因子仍会对其产生影响。培养皮质组织块时, 卵泡生长的启动速率相对较慢, 而去除基质细胞后培养组织片时, 启动速率更快, 卵泡生长更迅速。因此, 组织形态和基质密度是调节体外卵泡生长启动的重要因素。皮质组织中的物理环境会影响卵泡对刺激因子和抑制因子的反应, 进而影响卵泡的生长能力。

皮质带中的卵泡一旦被激活, 即可生长至多层窦前卵泡阶段; 此时, 皮质带环境会抑制卵泡的进一步生长发育。因此, 需要建立一个多级培养体系来完成卵泡的全面发展(图1)。在皮质带培养体系中培养6天后, 机械分离出窦前卵泡, 再将其置于独立的培养体系中进一步发育成窦卵泡。目前已找到支持牛分离卵泡发育的培养条件, 为确定人类分离卵泡发育的最佳培养条件奠定了基础。此期的关键因子是活化素A和FSH, 确定其联合给予的理想时机和浓度很重要。

### 人类卵泡体外生长所必需的激素和生长因子

**培养条件**  $\alpha$ 最低必需培养基(minimal essential medium, MEM)被广泛采用。最好使用人类激素和生长因子的重组体, 并加入防止细胞凋亡的因子, 如抗坏血酸、环磷鸟苷(cGMP)和环磷腺苷(cAMP)。分离卵泡可放在有或无细胞外基质(extracellular cellular matrix, ECM)涂层(人胎盘基质胶)的小插入式培养皿或24孔塑料板中培养。因为临床需要, 需用无异物、无血清的临床级培养基。

**卵泡培养结果的评估** 组织学评估一直是评价培养卵泡的主要途径。组织学评估参数包括: 每平方毫米组织的卵泡密度、卵母细胞和卵泡的直径、透明带的厚度、颗粒细胞的层数以及卵泡内膜细胞是否存在。部分组织可以用多聚甲醛固定进行免疫组织化学(immunohistochemistry, IHC)检查。电镜能够更准确地评估冷冻和培养的组织, 但非常麻烦。细胞功能测定可采用细胞增殖免疫标记的方法。通过测量培养基中激素的含量可以了解激素分泌情况。日前还可采用基因表达分析、实时定量PCR和微阵列从分子水平评估卵泡发育情况。

**结论: 卵泡培养所需的生长因子和激素** FSH、胰岛素、活化素A和生长分化因子9(growth and differentiation

THIS IS AN ABBREVIATED VERSION OF THE ORIGINAL ARTICLE.

© The Author 2010. Published by Oxford University Press on behalf of the European Society of Human Reproduction and Embryology

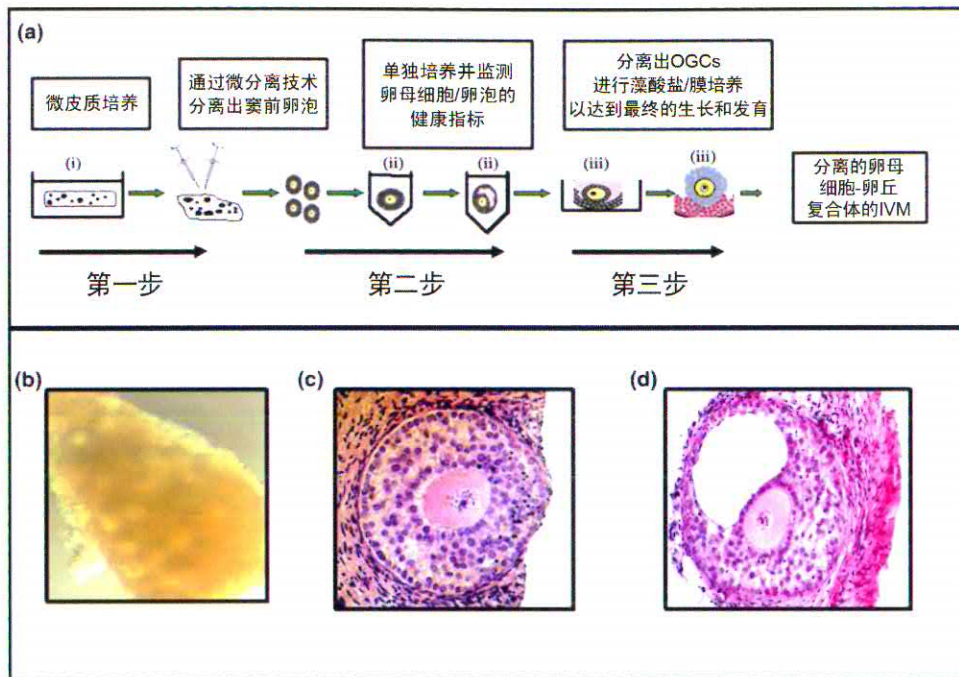


图1. 支持人类卵泡体外发育的多步培养体系。(a)图中显示人类卵泡培养的各步骤,从始卵泡到窦卵泡阶段(i-ii),然后分离出卵母细胞颗粒细胞复合物(OGCs)进行藻酸盐珠/膜培养,以达到进一步的生长和发育,最后进行IVM。人类卵泡能够在无血清的培养基中从始卵泡(b)发育至窦前卵泡(c)和窦卵泡(d)。

factor 9, GDF9)可促进卵泡发育和存活。AMH抑制始基卵泡生长的启动。要获得可受精的卵母细胞,多步培养体系及随后的卵母细胞体外成熟(in vitro maturation, IVM)过程将是必需的。

### 细胞外基质(ECM)在卵泡体外培养中的重要性

**ECM组成及调节的介绍** ECM影响着与卵泡发育相关的无数细胞过程,由多种分子组成,包括胶原、层粘连蛋白、纤连蛋白、蛋白聚糖和多糖。ECM在卵泡形成过程中的更新和重构提示,分泌型ECM分子发出的自分泌和旁分泌信号可调节卵泡从一个阶段发育到下一个阶段。

**ECM选择的原则** (1) 卵泡培养基质能够提供足够的营养支持,以保证体细胞不脱离卵子;(2) 卵泡的营养物质能够渗透到培养基,以使激素接近卵泡结构,同时卵泡分泌的因子被释放出来;(3) 周围的物质能够被调整,包括硬度和ECM特性。藻酸盐可以满足以上要求。

**藻酸盐——一种转化培养体系** 藻酸盐水凝胶已被用于维持三维结构,称之为三维培养体系。三维培养体系能维系细胞与细胞间和细胞与基质间的相互作用,因此,作用于卵泡表面细胞的机械力量会被传送到卵泡内的所有细胞,从而影响它们的发育和成熟。在卵泡发育

时,往藻酸盐基质中加入ECM,可能有助于维持旁分泌生长因子的梯度,这一梯度是卵泡极化生长所必需的。另外,必须平衡水凝胶的粘附力,以限制卵泡内细胞向凝胶迁移,避免损害卵泡结构及其生长潜能。总之,明确各阶段卵泡环境ECM的结构和生化构成,将有助于促进卵泡在三维培养体系中的生长。

**用藻酸盐培养小鼠和人类卵泡的经验** 将从小鼠、大鼠、非人灵长类动物和人类卵巢组织分离出来的次级卵泡置于藻酸盐珠上生长。之所以能够获得高质量的小鼠卵母细胞和包含卵母细胞的健康人类胚胎,是因为藻酸盐基质中存在卵母细胞与体细胞之间的重要信息通路。同时,藻酸盐体系正被应用于人类卵泡的培养。直到最近,研究的焦点集中在次级卵泡阶段,可能对癌症患者很有用。如果给予足够的物理支持,卵泡在基质中可以自主生长。卵母细胞成熟需要卵母细胞和体细胞之间时刻保持联系。因此,设计合理的组织工程方法促进卵泡成熟,能为卵泡生理学提供新的见解,并可将其应用于癌症患者。

**用藻酸盐培养恒河猴卵泡的经验** 恒河猴是研究灵长类动物的一种珍贵的动物模型,其卵巢的许多特征和周期性功能调节与人类女性极为相似。相对啮齿类动物

THIS IS AN ABBREVIATED VERSION OF THE ORIGINAL ARTICLE.

© The Author 2010. Published by Oxford University Press on behalf of the European Society of Human Reproduction and Embryology

而言,恒河猴模型可能更加有效地解决灵长类动物卵泡发育所特有的问题。Zelinski等将成年雌性恒河猴的次级卵泡封装在藻酸盐水凝胶中,并在加入牛血清白蛋白、牛胎球蛋白、胰岛素、转铁蛋白和硒的 $\alpha$ MEM培养基中单独培养。结果表明,藻酸盐水凝胶基质能支持单个恒河猴次级卵泡的三维结构,并可在30天的培养时间内使其生长到小窦卵泡阶段。FSH而非LH是卵泡生存和生长所必需的,培养20~30天的窦卵泡发育阶段伴随类固醇合成的增加。LH增加卵泡中E和A的生成,却减少P的生成。初步证据表明,与成年猴相比,从青春期前猴获取的次级卵泡能在体外存活30天的比例更高。收集卵泡时,青春期前猴和成年猴的卵泡直径没有差异,但第30天时,后者的生长卵泡直径要更大一些。然而,不论年龄大小,窦腔发育都在第25天以前。与只加入FSH相比,培养30天后再加入LH能增加青春期前猴的卵泡直径,但对成年猴并没有影响。AMH由恒河猴窦前卵泡产生,并与卵泡更快速的体外生长相关。

这一模型可能有助于理解促性腺激素、类固醇激素和肽类激素在卵泡发育中的作用及其与卵母细胞发育能力的关联,并可将这些知识与辅助生殖技术相结合,恢复妇女包括癌症幸存者的生育能力。

## 卵巢组织移植

### 卵泡的分离与筛选

对于有卵巢转移风险的癌症患者,需要寻找卵巢组织片段再植的替代方案。已在小鼠、绵羊、山羊、牛、猪和人类中进行了单个分离卵泡的研究,但只有Carroll的小鼠研究证明分离卵泡移植后能够恢复生育能力。Dolmans等提出使用纯化的低内毒素胶原酶消化人类卵巢皮质,再从卵巢皮质中分离出始基卵泡和初级卵泡。对悬液进行Ficoll梯度离心有助于分离卵泡的回收,而不改变卵泡的形态和超微结构。活体荧光染料和以纤维蛋白凝块为载体将分离卵泡异种移植到裸鼠卵巢囊上,都可用来测试人类分离卵泡的活力。此外,近期的最新数据表明,人类分离卵泡移植6个月后可发育到窦卵泡阶段。目前需要研究的是冻存卵泡是否比冻存组织更有优势。

由于这项技术已被证明可以成功恢复小鼠的生育能力,故可以考虑将卵泡分离和回收方案优化后应用于人类,用来防止癌症治愈患者在卵巢组织自体移植后,将恶性细胞再次带入体内。另外需要解决的问题是研发出发现卵巢间质瘤的敏感而快捷的方法。

### 卵巢组织的原位移植: 病案研究

对于有卵巢早衰风险的年轻患者,冻存卵巢组织已被证实是一种保存生育能力的有效方法。而对于青春期的女孩、不能推迟化疗和/或不能经过促排卵后冻存胚胎的妇女而言,是唯一的选择。迄今全世界约有30例冻存卵巢组织自体原位移植的报道,并且有8名婴儿诞生。目前,有两种方法已被成功用于冻融卵巢的原位再植,即将解冻卵巢组织移植到腹膜或残留卵巢组织的开窗处。

虽然已有数名婴儿成功分娩,但仍存在一些问题需要解决。实验研究发现移植后的卵巢组织中始基卵泡的数量显著减少,可能与再植组织的缺氧和血管再生延迟有关。已有研究用血氧仪和电-顺磁共振来评估人卵巢异体移植物的再氧化和血管再生情况,以期获得监测血管再生过程的客观指标。2009年Dolmans等的研究表明,冻存卵巢组织自体移植的患者中获得空卵泡、异常或不成熟卵母细胞的风险较高,且胚胎移植率较低。这可能与FSH升高引起颗粒细胞和卵母细胞的不恰当激活有关,而高水平的FSH可以引起卵母细胞成熟的不同步。另一个用来解释出现空卵泡的假设是,卵子在冻存、解冻和移植过程中受到了损伤。冻存人类卵巢组织的标准方法是慢速程序化冷冻;玻璃化冷冻保存仍处于实验阶段,但似乎前景很乐观。

## 讨论

癌症治疗手段的飞速发展,需要临床医生不断去了解这些治疗对女性生育能力的确切影响,这样才能为患者提供癌症治疗相关不孕风险的最准确信息。目前有更好的生化指标如AMH和无创影像技术(超声、多普勒、磁共振)可以更精确地评估生殖器官的损害。对使用有潜在性腺毒性药物治疗的患者,建议用上述检查手段进行随访。在大多数国家,癌症患者的随访工作都是由肿瘤科医生完成,没有生殖医学专家参与治疗方案的制定。所以,为各个“生育力保存库”提供足够的支持和资金,可以更好地组织和协调患者的随访工作。

### 移植技术恢复癌症后的生育力

在世界第一批报道的卵巢组织移植病例中,约20%的患者最终成功分娩,这是一个振奋人心的数据。卵巢皮质片移植发挥的临床作用与其寿命呈正相关,所以需要研发移植组织的血管再生技术,进而减少移植后数小时内因缺血而引起的卵泡死亡。单卵双胎姐妹之间通过

THIS IS AN ABBREVIATED VERSION OF THE ORIGINAL ARTICLE.

© The Author 2010. Published by Oxford University Press on behalf of the European Society of Human Reproduction and Embryology

显微外科技术进行卵巢皮质移植, 皮质组织片薄且未经冷冻保存。结果表明, 在现有的技术条件下, 卵巢功能于术后4个月内恢复, 在中位15个月内获得妊娠, 之后分娩出健康婴儿。移植后的2~4年, 平均30%的皮质组织仍来自于供者的卵巢, 受者依然月经来潮, 一些患者甚至有了第2个孩子。

移植的开创性工作是冻存的人类卵巢组织异位移植到皮下或者腹直肌鞘和腹直肌之间, 这项研究已经证明卵泡功能是可以恢复的, 并使移植技术得到了一定的发展。然而, 经过数个“周期”后, 仅能从移植物的成熟卵泡中采集到少数完整的卵母细胞。这些卵母细胞能够在体外正常受精, 少数能够形成胚胎。但在少数同意接受异位移植的患者中, 无一妊娠。

移植领域中仍有一些难题尚未解决, 如确定卵巢组织或分离卵泡的最佳移植位置, 以及如何恢复完整的冻融卵巢移植后的功能。目前, 只有少数癌症治愈患者( $\pm 1\%$ )要求卵巢组织再植, 所以我们的经验还很有限。有关冻存和移植联合处理后的卵母细胞的质量资料很少。有关新生血管形成、神经再生、旁分泌和自分泌调节的基础知识仍极为缺乏。因此, 应该加强这些基础方面的研究, 以解决阻碍成功移植的种种问题。

### 卵巢组织和卵泡培养技术的进展和挑战

不同物种卵泡的体外生长和成熟方法已经取得了重要进展, 包括啮齿动物、反刍动物、灵长类动物和人类。要使卵泡培养中的人类新鲜和冻存卵巢组织发挥最大的生殖潜能, 必须把重点放在始基卵泡、初级卵泡或次级卵泡的激活和持续生长上。虽然反刍与灵长类动物的长期培养体系优于啮齿动物的短期培养体系, 但要获得治疗用的能受精的卵母细胞最终还得依赖于人类卵泡培养体系。新鲜和冻存的卵巢组织在人类卵泡培养体系中必须同样有效。

在人体内, 卵泡的激活和生长发育成熟受到基因和生长因子的调控, 而在体外很难构建这一精确的生物信息模型, 从而阻碍了人类卵泡体外培养体系的发展。为了更好地了解调控卵泡早期发育的因子, 需要利用一些昂贵的高新技术设备, 包括激光捕捉显微解剖、定量PCR、共聚焦显微镜和DNA芯片。关键是要了解使用卵泡培养和

辅助生殖技术给卵子发生和胚胎形成这些关键程序事件带来的影响。还要评估支持体细胞和卵母细胞正常生长的代谢需要及生长过程中发生的需求变化。

研究中用于常规活检的组织通常来自35岁以上患妇科疾病的女性, 因年龄相关的卵泡衰竭使得这些组织不均一; 但又很难从年轻患者获取卵巢皮质组织进行实验。所以, 应积极招募年轻、生育力强的组织捐赠者(如剖宫产时), 收集并妥善保存IVF实验室多余的组织和细胞用于研究。用于研究的组织还可来源于人类胎儿(治疗性流产时获取的组织)和征得同意的癌症患者。

目前, 已开发出许多不同的培养体系, 但对于人类卵泡培养来说, 没有一个体系是完美的。每个体系都有各自的优势和劣势, 有效地加以利用有助于解决人类卵泡培养所遇到的问题。藻酸盐体系就是一个很好的例子。相比之下, 在没有任何ECM支持的情况下, 生理的、无血清的培养体系也被证明能非常有效地促进窦腔形成, 并能产出成熟的、能受精的绵羊卵泡和卵母细胞。小型动物卵泡培养技术所取得的绝大多数进展, 可能不能用来有效解决人类卵泡体外生长所遇到的问题。还有许多基础生物学方法, 例如, 根据体细胞相互作用、分化及生殖细胞成熟的生理需要, 在含血清的培养体系中加入药理学水平的生长添加剂, 或在不含血清的培养体系中持续加入低剂量的生长添加剂。然而, 这些措施的有效性和安全性没有在从物种间或跨物种卵泡培养的研究者之间达成明确的一致。

### 结论

简而言之, 年轻癌症妇女在接受保存生命却有损生育的治疗时, 对保存生育力的需求非常迫切。我们已经认识到这个领域在基础医学和转化医学层面上的机遇和差距, 并已经明确如何利用这些机遇来解决问题。这项计划的核心是全球致力于卵泡成熟的研究者和临床医生进行密切合作。这支前所未有的团队成立了一个前所未有的时代——越来越多的年轻癌症患者战胜疾病而存活下来。我们未来的工作不但要了解更多有关卵泡发育的知识, 更要为那些储存卵巢组织并对我们的工作报有信心癌症生存者们提供合适的选择。

THIS IS AN ABBREVIATED VERSION OF THE ORIGINAL ARTICLE.

© The Author 2010. Published by Oxford University Press on behalf of the European Society of Human Reproduction and Embryology