·生育力保存·

玻璃化冷冻和程序化冷冻方法对人类卵母细胞骨架及其发育潜能的影响

李友筑 李娜 颜晓红 周卫东 陈琼华 周余来 吴荣锋
361003 厦门大学附属第一医院生殖医学中心（李友筑、颜晓红、周卫东、陈琼华、吴荣锋）；
361003 厦门弘爱医院重症医学科 (李娜)；130021 长春，吉林大学药学院 (周余来)
通信作者：吴荣锋，Tel：+86-592-2662313，Email：wrfeng2014@126.com
DOI：10.3760/cma.j.issn.2096-2916.2018.09.002

【摘要】 **目的** 探讨玻璃化冷冻和程序化冷冻对人卵母细胞纺锤体定位、细胞骨架及其发育潜能的影响。**方法** 将第 2 日发育为 M_{II} 卵母细胞随机分为对照组、程序化冻融组、玻璃化冻融组 (解冻 0 h、1 h、3 h)。应用液晶偏振光显微镜 (Polscope) 成像系统观察卵母细胞纺锤体与第一极体 (Pb) 的夹角、表面积、卵透明带内层光阻值和外层光阻值。采用扫描电子显微镜和透射电子显微镜观察卵母细胞的表面和内部超微结构。统计 2 种冻融方法对卵母细胞发育潜能的影响。**结果** 对照组、程序化冷冻解冻培养 3 h 组和玻璃化冷冻解冻后培养 0 h、1 h、3 h 组中的纺锤体可见率分别为 92.4%、56.4%、11.2%、24.8%、61.1%。与程序化冻融组相比，玻璃化冷冻解冻培养 3 h 后卵母细胞中纺锤体与 Pb 的夹角更小 (37.3° 与 68°，P=0.023)。对照组、程序化冻融组和玻璃化冻融后培养 3 h 组中卵母细胞的纺锤体面积、卵透明带内层光阻值和透明带外层光阻值差异无统计学意义 (P>0.05)。与程序化冻融组相比，玻璃化冻融后培养 3 h 组中卵母细胞表面突起丰富，微绒毛形态较为正常，倒伏在细胞表面，卵透明带边界较为清晰，与对照组较为接近。程序化冻融组的正常受精率 (65.7%) 明显低于对照组 (79.2%，P=0.041)，而卵裂率和囊胚形成率与对照组和玻璃化冻融组差异无统计学意义 (P>0.05)。玻璃化冻融后培养 3 h 组中正常受精率、卵裂率、囊胚形成率与对照组相比，差异无统计学意义 (P>0.05)。 **结论** 相比程序化冷冻，玻璃化冷冻对卵母细胞纺锤体和卵透明带的损伤及对卵母细胞的发育潜能的影响都较小，可以作为卵母细胞冷冻的一种有效方法。

【关键词】 玻璃化冷冻；程序化冷冻；人类卵母细胞；纺锤体；卵透明带
基金项目：国家自然科学青年基金 (81701419)；国家自然科学基金面上项目 (81571418)

Effects of vitrification and slow freezing on ultrastructure and developmental potential of human oocytes

Li Youzhu, Li Na, Yan Xiaohong, Zhou Weidong, Chen Qionghua, Zhou Yulai, Wu Rongfeng
Center for Reproductive Medicine, the First Affiliated Hospital of Xiamen University, Xiamen 361003, China (Li YZ, Yan XH, Zhou WD, Chen QH, Wu RF); Intensive Care Unit, Xiamen Hongai Hospital, Xiamen 361003, China (Li N); College of Pharmacy, Jilin University, Changchun 130021, China (Zhou YL)
Corresponding author: Wu Rongfeng, Tel: +86-592-2662313, Email: wrfeng2014@126.com

【**Abstract**】 **Objective** To compare the the spindles, cytoskeleton and the developmental potential of human oocytes between vitrification and slow freezing approaches by polscope and electron microscopy. **Methods** The immature human oocytes were randomly divided into control, slow freezing, and vitrification freezing-thawing groups (0 h, 1 h, 3 h after thawing). The spindle, the angle of spindle to the first polarbody, the surface area of oocytes and the lining and outer retardance of zona pellucida were observed by Polscope. The surface and ultrastructure of oocytes were observed by scanning electron microscopy (SEM) and transmission electron microscopy (TEM). Finally, the influences of two freezing methods on developmental capability of human oocytes were analyzed. **Results** The visible rate of spindle was 92.4%, 56.4%, 11.2%, 24.8%, 61.1% in control group, slow freezing-thawing group, and vitrification freezing-thawing after 0 h, 1 h and 3 h, respectively. Compared with slow freezing, the angle of the spindle to the first polar body in vitrification freezing-thawing after 3 h group was smaller (37.3°, 68°, P=0.023). No significant differences were observed in the surface area of oocytes, the lining and outer ret of oocytes zona pellucida between vitrification freezing-thawing after 3 h group

?1994-2019 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

and slow freezing group. The protrusions of oocyte surface were increased, the microvilli were normal, and laid down on the membrane surface in vitrification freezing-thawing after 3 h group than slow freezing group, and similar results of better recovery of perivitelline space and mitochondria were obtained. The 2 pronucleus (PN) fertilization rate in slow freezing group (65.7%) was decreased compared with control group (79.2%, *P*=0.041). No significant differences were observed between vitrification freezing-thawing after 3 h group and control group in 2PN fertilization rate, cleavage rate and blastocyst formation rate. **Conclusion** Preliminary results suggest that the vitrification freezing-thawing for oocyte cryopreservation is a better choice than slow freezing-thawing.

【**Key words**】 Vitrification; Slow freezing; Human oocyte; Meiotic spindle; Oocyte zona pellucida

Fund program: National Nature Science Foundation of China (Youth Project, 81701419); National Nature Science Foundation of China (81571418)

卵母细胞冷冻是当前女性生育力保存的热点和重点。其应用包括：①解决胚胎冷冻带来的伦理、法律和宗教方面的问题；②为卵巢早衰的女性、放化疗的肿瘤患者保存生育能力；③伴侣取精困难；④为大量有生育力问题的女性提供赠卵治疗，同时为健康女性提供生育力储备 [1-2]。可见，卵母细胞冷冻技术的发展在人类生殖技术领域发挥着重要的作用 [2]。

1986 年 Chen 等 [3] 首次报道通过冻融卵母细胞获得成功妊娠，然而在很长一段时间，卵母细胞冷冻技术的应用受到了质疑，其主要问题包括冻融卵母细胞的复苏率较低、受精率低、胚胎发育潜能差等问题。卵母细胞的表面积和体积之比小于一般细胞，这种结构的特殊性决定了卵母细胞的冷冻技术比胚胎冷冻面临更多的难题。冷冻过程中引起的损伤包括卵透明带变厚、细胞骨架成分损伤，尤其是纺锤体瓦解等 [4-5]。

现阶段，程序化冷冻和玻璃化冷冻是应用于人类卵母细胞冷冻的主要方法。程序化冷冻是早期广泛使用的方法，利用程序化冷冻法成功保存卵母细胞并获得妊娠的报道屡见不鲜。但是程序化冷冻因易形成冰晶、仪器设备昂贵、保护剂长期接触产生的毒性使其临床的应用饱受质疑 [6]。随着冷冻方法的改进，玻璃化冷冻因操作方便、卵母细胞存活率高、对卵母细胞内部结构损伤少、临床妊娠成功率稳定等优点逐渐取代了程序化冷冻 [7-8]。但是关于 2 种方法对于冷冻解冻后卵母细胞纺锤体参数及卵母细胞超微结构的影响目前文献报道较少。

本研究以人 M_I 期卵母细胞为模型，第 2 日发育成为 M_{II} 期后，采用液晶偏振光显微镜 (Polscope)、扫描电子显微镜 (SEM) 和透射电子显微镜 (TEM) 分析程序化冷冻和玻璃化冷冻对卵母细胞纺锤体、超微结构及胚胎发育潜能的影响。

1　资料与方法

1.1　研究对象　选取 71 名于 2012 年 4 月—2014 年 11 月期间在厦门大学附属第一医院生殖医学中心行体外受精 / 卵胞质内单精子注射 (IVF/ICSI) 治疗患者的 M_I 期卵母细胞 (*n*=235) 为研究对象。入选标准：①行 IVF/ICSI- 胚胎移植 (ET) 治疗的不孕不育患者；②不孕原因包括排卵障碍、子宫内膜异位症、输卵管性不孕、男方因素。剔除标准：①自然周期患者；②多囊卵巢综合征 (PCOS) 及卵巢早衰 (POF) 患者。观察周期均为第一次取卵周期，并得到患者的知情同意。本研究通过厦门大学附属第一医院生殖医学伦理委员会的批准 (No. KYX-2012-009)。

1.2　卵母细胞的获得　采用黄体期长方案超促排卵方案，于前次月经周期的第 21~23 日，注射促性腺激素释放激素激动剂 (GnRH-a，法国 Ipsenpharma)，达到降调节标准后，酌情给予重组人促卵泡刺激素 (rFSH，瑞士 Merck Serono) 和 / 或人绝经期促性腺激素 (hMG，珠海丽珠集团) 促排卵。监测卵泡发育情况，当有 4 个卵泡直径 >17 mm 或者 2 个 >18 mm 时，注射重组人绒毛膜促性腺激素 (rhCG，瑞士 Merck Serono)0.25 mg，注射 36~38 h 后取卵。如果是行 IVF 患者，卵母细胞授精后培养 4~6 h 拆除颗粒细胞，将 M_I 期卵母细胞 (*n*=105) 单独挑出到 G-1 Plus 培养液 (瑞典 Vitrolife)，第 2 日观察卵母细胞的成熟情况，若发育为 M_{II} 卵母细胞 56 枚，则将其作为研究对象。如果是行 ICSI 患者，卵冠丘复合物经过 80 IU/mL 透明质酸酶 (Santa Ana，美国 Irvine Scientific) 处理后，用显微镜观察，将 M_I 卵母细胞 130 枚单独挑出到 G-1 Plus 培养液，第 2 日观察卵母细胞的成熟情况，若发育为 M_{II} 卵母细胞 60 枚，则将其作为研究对

?1994-2019 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

象。将上述获得的 M_{II} 卵母细胞随机分为对照组 20 枚，程序化冷冻解冻培养 3 h 组 24 枚，玻璃化冷冻解冻后培养 0 h 组 24 枚，玻璃化冷冻解冻后培养 1 h 组 24 枚，玻璃化冷冻解冻后培养 3 h 组 24 枚。

1.3 偏振光观测仪 (Polscope) 卵母细胞应用 Polscope 纺锤体观测系统 (美国 CRI) 进行观察。其原理是利用波长为 546 nm 的绿光通过一个液晶体偏光补偿器，改变偏光状态，使用由特殊材料制作的纺锤体观察专用小皿在显微镜下对纺锤体进行观察。每个小皿用相应的冷冻 / 复苏液做 4~6 个小滴，每个小滴容量为 5 μL。首先，用小皿调节背景图像和基本图像，然后在小滴中加入卵母细胞，每个小滴放入一个卵母细胞。每个小皿的观察时间控制在 10 s 以内。首先选择第一极体 (Pb) 清晰的平面，然后观察纺锤体的存在情况。冷冻前及复苏后 0 h、1 h、3 h，卵母细胞于 37 ℃温台上进行观察。本研究通过 Polscope 纺锤体观测系统采集卵母细胞的纺锤体定位，纺锤体面积，卵透明带内外层光阻值等参数。根据文献定义，将纺锤体与 Pb 的夹角为 0°~5° 者称为第 I 类，6°~45° 者称为第 II 类，46°~90° 者称为第 III 类，91°~180° 者称为第 IV 类，具体参见图 1D。

1.4 卵母细胞玻璃化冷冻和解冻

1.4.1 冷冻 用拉细了的吸管将卵母细胞放到冷冻液 1 中 5 min。将 cryoloop 环在冷冻液 2 中沾一下，以制成承载卵母细胞的薄膜，备用，然后用拉细了的吸管将卵母细胞转移到冷冻液中来回吐吸洗涤 3 次，立即加入冷冻环上，并确定卵母细胞数目无误后立即浸入液氮中，此过程在 1 min 内完成，拧紧螺旋盖后置液氮罐的指定位置保存。

1.4.2 解冻 (所有操作均需在 37 ℃恒温平台上完成) ①用磁铁棒从液氮中取出冷冻环后迅速在解冻液 1 内划过，调节体视镜视野并用拉细的吸管收集卵母细胞，这个过程须 1 min 内完成。②立即将卵母细胞转移到解冻液 2 的液滴中，并计时，然后立即依次在下一行 (4 个液滴) 解冻液 2 液滴中洗涤转移卵母细胞，并在进入最后用滴中时保持在 5 min 内完成。③将卵母细胞移至解冻液 3 液滴中洗涤后立刻转移到下一滴，并在解冻液 3 液滴中保持 5~10 min，行辅助孵化术、照相和评分。④最后将卵母细胞转移到囊胚培养皿中，于 37 ℃，体积分数 6.0%CO_2 培养箱中培养 (表 1)。

表 1 玻璃化冷冻解冻液成分

Table 1 Components of vitrified freezing-thawing solution

溶液 Solution	玻璃化冷冻解冻液成分 (基础液都为 G-MOPS) Component of vitrified freezing-thawing solution (basis solution: G-MOPS)
冷冻液 1 Freezing solution 1	7.5% EG+7.5% DMSO+10 g/L HSA
冷冻液 2 Freezing solution 1	15% EG+15% DMSO+0.5 mol/L Sucrose+10 g/L HSA
解冻液 1 Thawing solution 1	1 mol/L Sucrose+10 g/L HSA
解冻液 2 Thawing solution 2	0.5 mol/L Sucrose + 10 g/L HSA
解冻液 3 Thawing solution 3	0.25 mol/L Sucrose+10 g/L HSA

注：G-MOPS 示箱外配子 / 胚胎处理液；EG 示乙二醇；DMSO 示二甲基亚砜；HSA 示人血清白蛋白；Sucrose 示蔗糖

1.5 程序化冷冻和解冻

1.5.1 冷冻 室温下，将卵母细胞放置在冷冻 1 液中洗涤 2 次，移入冷冻 2 液中放置 10 min，冷冻液 3 中放置 10 min 后，将卵母细胞吸入冷冻麦管。将装载好的麦管放入程序化冷冻仪 (澳大利亚 SY-LAB)，开始冷冻。

1.5.2 冷冻程序 20 ℃到 7 ℃ (−2 ℃ /min)，停留 5 min，人工植冰，再停留 10 min，−7 ℃到 −32 ℃ (0.3 ℃ /min)，投入液氮。

1.5.3 解冻 将冷冻麦管从液氮中取出，空气中融化 30 s，立即放入 32 ℃水浴 1 min。解冻液 1、2、3、4 液中依次放置 5 min。所有复苏程序均在室温下进行 (表 2)。

1.6 TEM 和 SEM

1.6.1 TEM 每组选择 5~6 枚 M_{II} 期卵母细胞，分

表 2 程序化冷冻解冻液成分

Table 2 Components of programmed freezing-thawing and solution

溶液 Solution	程序化冷冻解冻液成分 (基础液都为 G-MOPS) Component of programmed freezing-thawing solution (basis solution: G-MOPS)
冷冻液 1 Freezing solution 1	10 g/L HSA
冷冻液 2 Freezing solution 2	10 g/L HSA +1.5 mol/L PROH
冷冻液 3 Freezing solution 3	1.5 mol/L PROH+0.3 mol/L Sucrose+10 g/L HSA
解冻液 1 Thawing solution 1	0.5 mol/L Sucrose + 10 g/L HSA
解冻液 2 Thawing solution 2	1.0 mol/L PROH+0.3 mol/L Sucrose +10 g/L HSA
解冻液 3 Thawing solution 3	0.5 mol/L PROH+0.3 mol/L Sucrose +10 g/L HSA
解冻液 4 Thawing solution 4	10 g/L HSA

注： G-MOPS 示箱外配子 / 胚胎处理液；HSA 示人血清白蛋白；PROH 示丙二醇；Sucrose 示蔗糖

?1994-2019 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

别制作成 TEM 标本观察。首先将卵母细胞迅速放入质量分数 2.5% 戊二醛中，4 ℃固定过夜。样品经 PBS 清洗后采用质量分数 1% 锇酸 (OsO_4)4 ℃固定 1 h。卵母细胞的包埋采用琼脂铸膜法制备，避免卵母细胞的丢失。然后将琼脂小块置于前固定液中 4 ℃、避光固定过夜。样品经 PBS 清洗后采用 50%~100% 梯度浓度乙醇依次脱水。环氧丙烷透明 30 min，加入环氧丙烷与环氧树脂 812(1 ∶ 1) 配置的混合液渗透包埋 1.5 h，连续超薄切片 (切片厚度为 70 nm)。选择好的超薄切片进行重新包埋，超薄切片用乙酸双氧铀和柠檬酸铅双染后于 TEM(JEM 2100H II，日本电子株式会社) 下进行观察并拍照。

1.6.2　SEM　每组选择 6 枚 M_{II} 期卵母细胞，分别制作成 SEM 标本观察。卵母细胞在质量分数 2.5% 戊二醛固定 2 h，样品经 PBS 清洗 3 次，每次 30 min。然后用质量分数 1% 锇酸固定 2 h，PBS 继续清洗 3 次，每次 30 min。采用 30%~100% 梯度浓度乙醇依次脱水，每次 20 min。然后从乙醇逐步过渡到纯叔丁醇，4 ℃过夜。第 2 日上午进行冷冻干燥、喷金，于 SEM(JSM6390，日本电子株式会社) 下观察并拍照。

1.7　胚胎培养　M_{II} 卵母细胞经过不同处理组解冻后，行 ICSI 受精。经过知情同意后，征集本中心当日 IVF 周期男性患者多余的正常精子。采用梯度离心法处理精液。行 ICSI 后将卵母细胞放于 40 μL G-1 Plus 培养液微滴内于 37 ℃、体积分数 6%CO_2 培养条件下培养。16~18 h 后观察受精情况，以出现雌雄原核 (PN) 为受精标志。72 h 后根据形态学评分，将 3 级以上的卵裂胚再转移到囊胚培养液 G-2 Plus(瑞典 Vitrolife) 培养液微滴内，在 37 ℃、体积分数 6%CO_2、体积分数 5%O_2 三气培养箱中培养。所有实验过程要求注意无菌、保温。2PN 受精率 =2PN 受精卵母细胞数 /M_{II} 卵母细胞数 ×100%，卵裂率 = 卵裂数 /2PN 受精卵总数 ×100%，囊胚形成率 = 形成囊胚数 /72 h 评分 3 级及以上的胚胎的培养成囊胚数 ×100%。实验结束后将胚胎全部废弃。

1.8　统计学分析　数据采用 SPSS20.0 统计软件进行统计分析，呈正态分布计量资料采用均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示，多组间的比较采用单因素方差分析 (ANOVA) 判断，组间比较用 χ^2 检验，$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2　结果

本研究选取 71 名患者，平均年龄为 (30.5±3.0) 岁，平均不孕年限为 (4.6±2.2) 年。

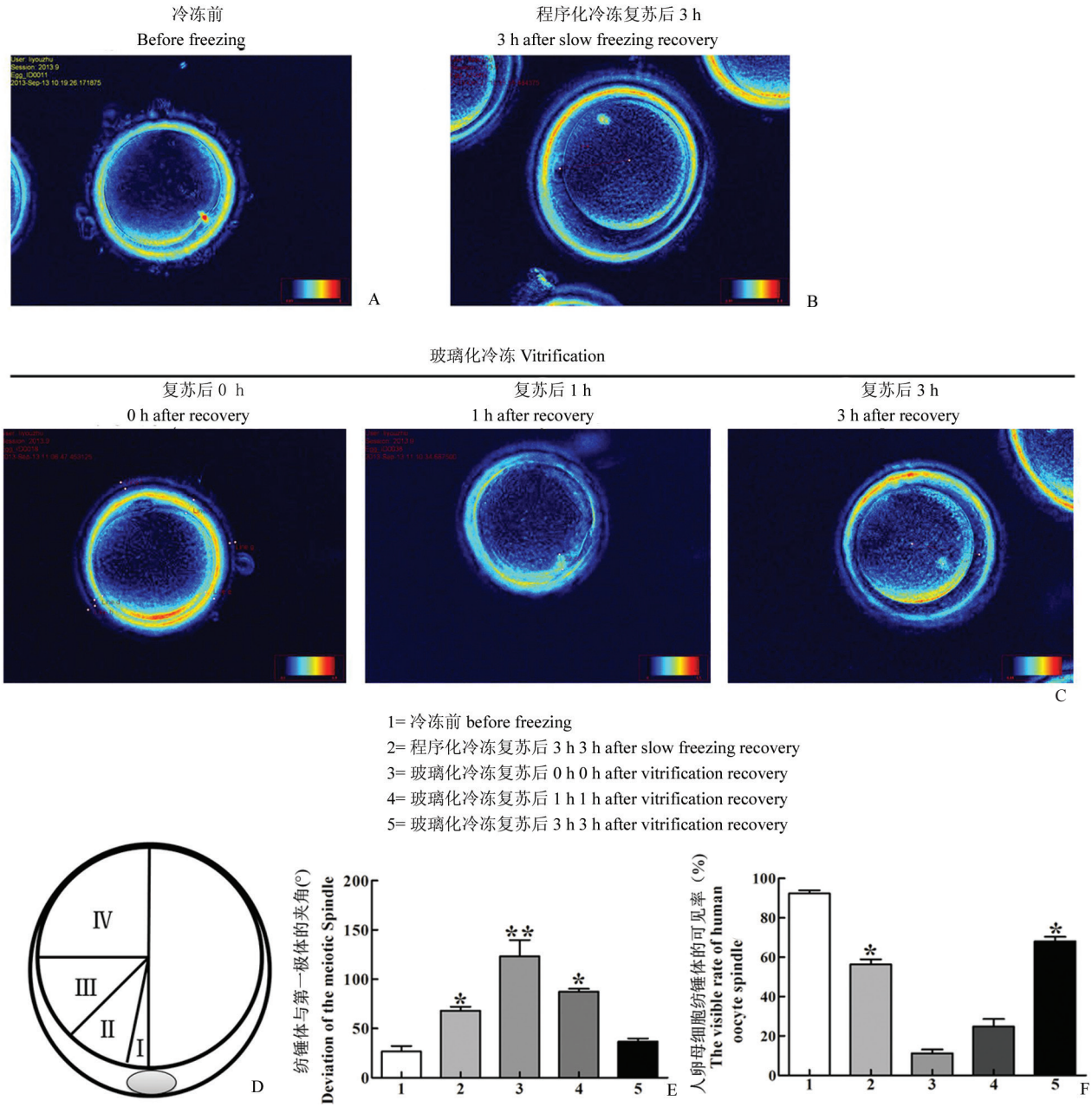
2.1　2 种冷冻方法对人卵母细胞纺锤体的影响　对照组的 M_I 卵母细胞在体外培养成熟后，用 Polscope 进行纺锤体观察 (图 1A~C)，对照组纺锤体可见率 92.4%，程序化冻融组纺锤体的可见率为 56.4%，采用玻璃化冻融组培养 0 h、1 h、3 h 纺锤体可见率分别为 11.2%、24.8%、61.1%，对照组明显高于程序化冻融组 (P=0.02) 和玻璃化冻融 3 h 组 (P=0.035)。而玻璃化冻融后培养 3 h 组纺锤体可见率稍高于程序化冻融组，但差异没有统计学意义。从图 1E 可见，对照组纺锤体与 Pb 的夹角为 23.5°(II)，程序化冻融后培养 3 h 组夹角为 68°(III)，玻璃化冻融培养 3 h 组夹角为 37.3°(II)。由此可见程序化冷冻和玻璃化冷冻都会对卵母细胞的纺锤体位置造成影响，但是玻璃化冷冻解冻后，其夹角相对较小，与对照组相比，差异无统计学意义 (P>0.05)。

2.2　2 种冷冻方法对人卵母细胞纺锤体面积、卵透明带内层光阻值和卵透明带外层光阻值的影响　图 2 结果显示：与对照组相比，程序化冻融后纺锤体面积有减少趋势，卵透明带内层光阻值和卵透明带外层光阻值升高，但差异无统计学意义 (P>0.05)。采用玻璃化冻融 0~3 h 的结果显示，与对照组相比，玻璃化冻融 0 h 和 1 h 组的纺锤体面积降低，卵透明带内层光阻值和卵透明带外层光阻值升高，差异具有统计学意义 (P<0.05)。然后玻璃化冻融 3 h 后，这 3 组参数恢复到对照组的水平，与对照组间差异无统计学意义 (P>0.05)。

2.3　2 种冷冻方法对人卵母细胞表面形态的影响　图 3 结果显示：与对照组相比，程序化冻融后卵母细胞表面突起减少，变得光滑。采用玻璃化冻融 0~3 h 后，卵母细胞表面突起逐渐增加，逐步恢复到与对照组相似。

2.4　2 种冷冻方法对人卵母细胞卵间周隙和线粒体的影响　图 4~5 结果显示：在对照组卵母细胞中，大量的皮质颗粒分布于卵质的外围。卵透明带界限清楚明显，卵周隙较大，微绒毛伏贴在细胞膜表面，数量多而丰富。线粒体成圆形或椭圆形，线粒体膜光滑平整。程序化冻融组卵母细胞，微绒毛变得短而粗，有些地方的微绒毛缺失不见，细胞质膜下的

?1994-2019 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net



* 示 $P<0.05$，** 示 $P<0.01$，与冷冻前比较 compared with before freezing

图 1 通过 Polscope 分析不同冷冻方法对人卵母细胞纺锤体可见率和第一极体夹角的影响

Figure 1 The influence of two freezing methods on the spindle and the angle of spindle to the first polar body analyzed by using Polscope

A 示对照组中卵母细胞中的纺锤体情况 spindles morphological of human oocytes in control group，n=20，×200；B 示程序化冻融组解冻后卵母细胞中纺锤体情况 spindles morphological of human oocytes in slow freezing group，n=24，×200；C 示玻璃化冷冻解冻培养 0 h、1 h、3 h 后卵母细胞中纺锤体的情况 spindles morphological of human oocytes in vitrification group (thawed after 0 h, 1 h, 3 h)，每组 n=24，×200；D 示卵母细胞中纺锤体和第一极体夹角的 4 种模式图 schematic representation represented the four oocyte groups (I：0° to 5°，II：6° to 45°； III：46° to 90°；IV：91° to 180°)；E 示采用 Polscope 检测不同冷冻方法组中人卵母细胞纺锤体和第一极体的夹角 the angles of the spindle to the first polar body in different freezing groups were visualized through the Polscope system；F 示采用 Polscope 分析不同冷冻方法组中人卵母细胞的纺锤体可见率 the visible rates of human oocytes spindle in different freezing groups were analyzed by Polscope system

皮质颗粒数量大量减少。透明带变得模糊不清，细胞基质出现大量的空泡，线粒体表面粗糙模糊。玻璃化冻融培养 3 h 后，微绒毛形态较为正常，倒伏在细胞表面，卵透明带界限较为清晰；少量线粒体膜变得模糊不清。说明玻璃化冻融培养 3 h 后对卵母细胞的形态恢复较程序化冻融好。

2.5 2 种冷冻方法对人卵母细胞受精率，卵裂率和囊胚形成率的影响 囊胚形成被认为是良好胚胎发育标准之一。图 6 结果显示：与对照组相比，程序化冻融组解冻后卵母细胞的正常受精率较正常组低，差异

?1994-2019 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

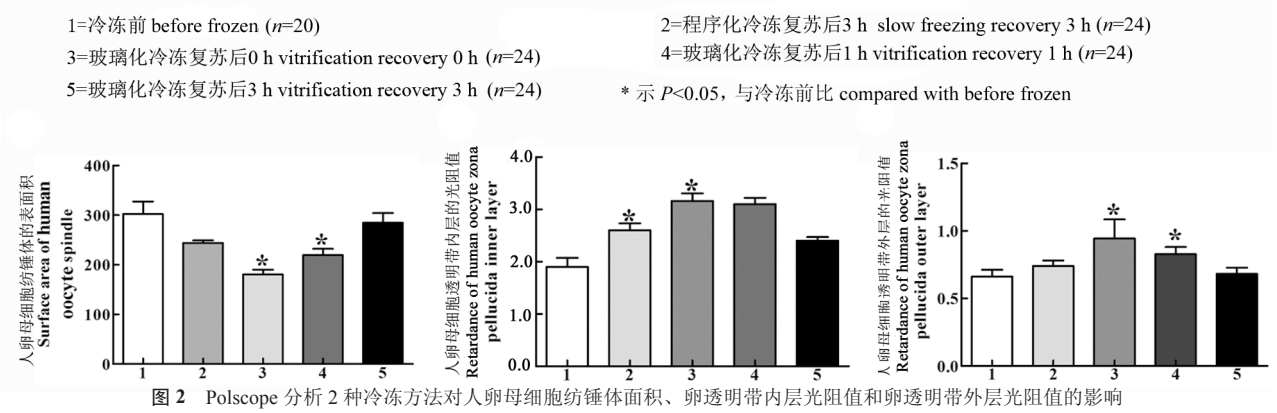


图 2　Polscope 分析 2 种冷冻方法对人卵母细胞纺锤体面积、卵透明带内层光阻值和卵透明带外层光阻值的影响

Figure 2　The influence of two freezing methods on surface area of oocytes spindle and the lining and outer ret of zona pellucida measured by Polscope

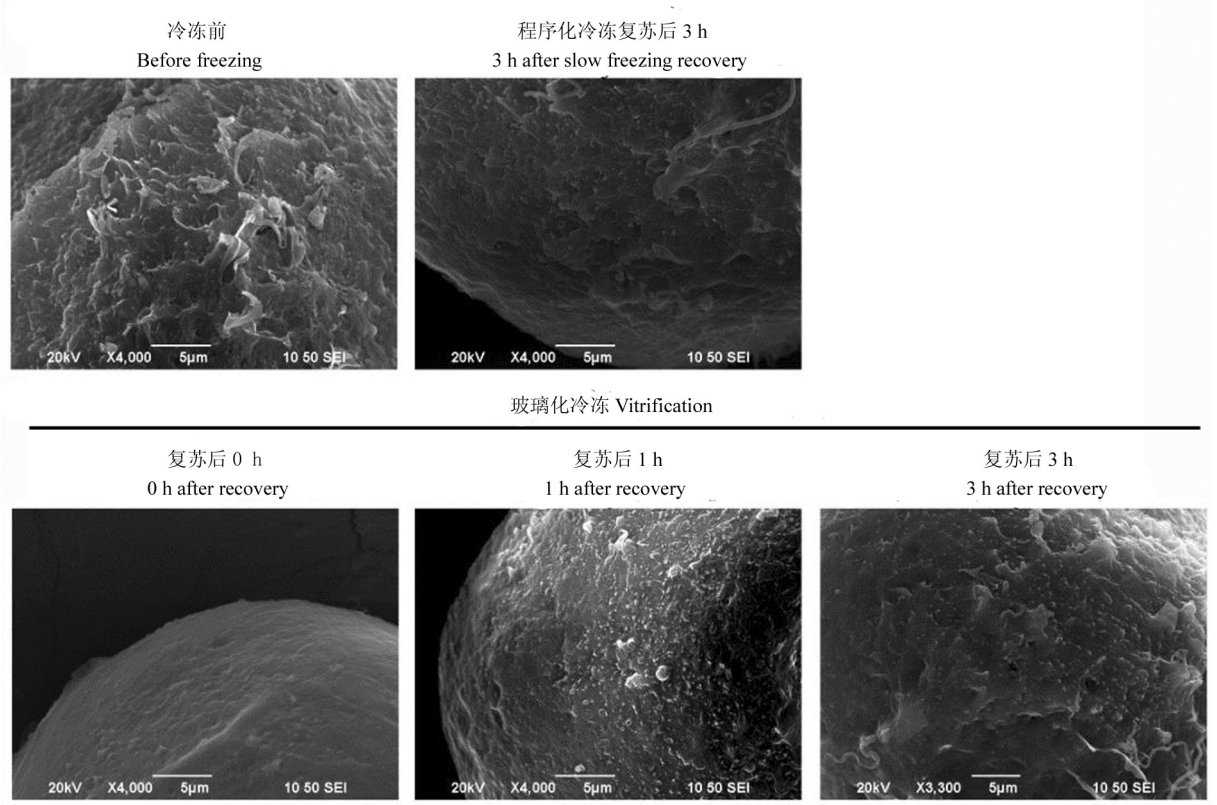


图 3　扫描电子显微镜分析 2 种冷冻方法对人卵母细胞表面状态的影响 (*n*=6，标尺均为 5 μm)

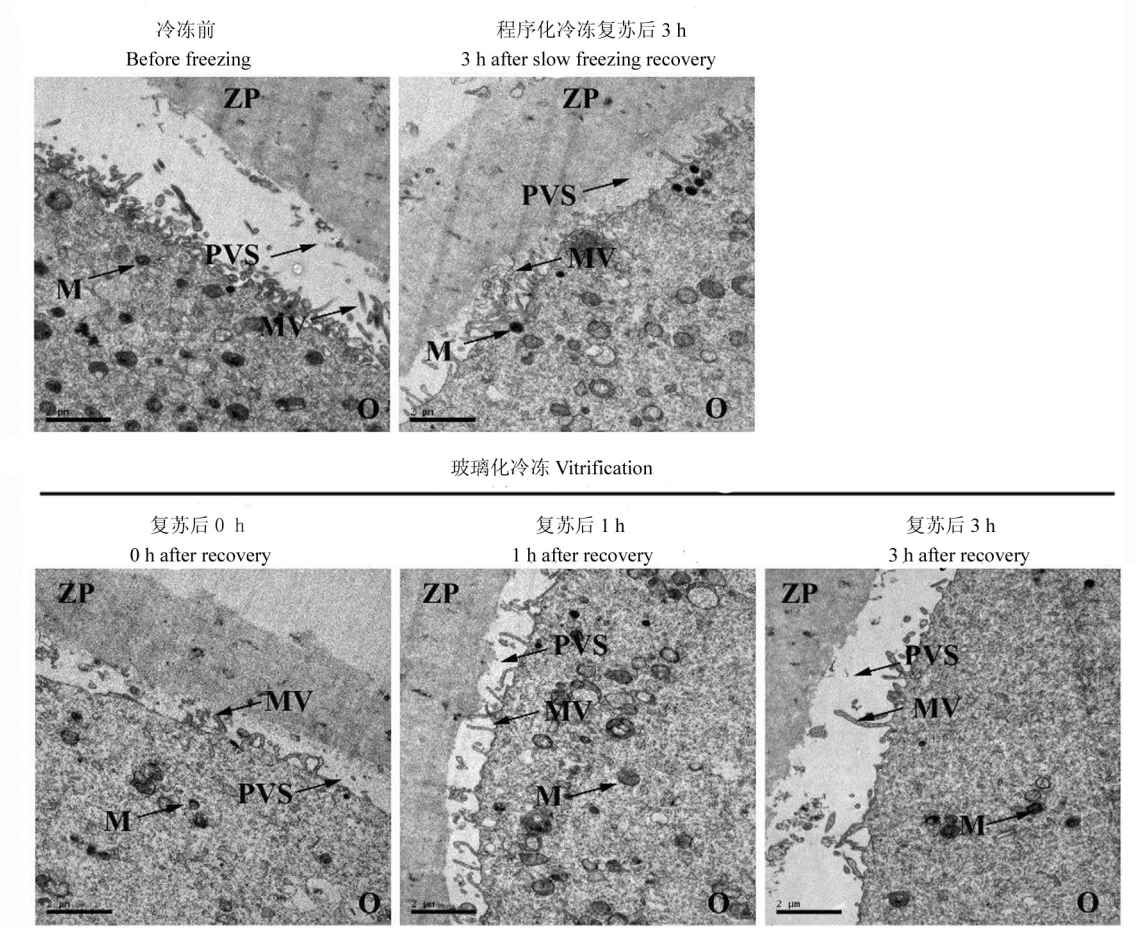
Figure 3　The influence of two freezing methods on morphological photograph of human oocytes analyzed by SEM (*n*=6, scale bars=5 μm)

具有统计学意义 ($P<0.05$)，而卵裂率和囊胚形成率差异均无统计学意义。玻璃化冷冻解冻培养 3 h 后，卵母细胞的正常受精率、卵裂率、囊胚形成率与对照组差异均无统计学意义。另外程序化冷冻组和玻璃化冷冻组中卵母细胞的正常受精率、卵裂率、囊胚形成率差异均无统计学意义。

3　讨论

由于卵母细胞自身的结构特点和生理特点等因素，近年来卵母细胞冷冻保存的进展很缓慢，其中卵母细胞本身因低温造成的细胞骨架和超微结构的改变是卵母细胞冻融成功的重要影响因素之一。本实验采用的 Polscope 纺锤体观察系统，可直接在显微镜下观察处于有丝分裂或者减数分裂中期活体细胞的纺锤体，弥补了以往使用固定和染色方法研究纺锤体的不足，避免 ICSI 时对卵细胞纺锤体的可能损伤，以及核移植时精确定位纺锤体 [9-11]。Polscope 偏振光已经证实对卵母细胞的活性不会造成伤害 [12]。这种非侵入性的观察方法可以使观察过纺锤体的卵母细胞继续受精培养，

?1994-2019 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net



PVS 示卵周间隙 perivitelline space；M 示线粒体 mitochondria；MV 示微绒毛 microvilli；ZP 示卵透明带 zone pellucida

图 4 透射电子显微镜分析 2 种冷冻方法对人卵母细胞卵间周隙和微绒毛状态的影响 (n=6，标尺均为 2 μm)

Figure 4 The influence of two freezing methods on perivitelline space and microvilli of human oocytes analyzed by TEM (scale bars= 2 μm)

进一步观察卵母细胞的发育潜能[13]。

早期使用的程序化冷冻法，其复苏率为 24%~80% 不等，冻融后卵母细胞受精率波动较大，囊胚形成率不佳，妊娠率普遍较低。玻璃化冷冻技术起步较晚，1999 年才有用于人卵母细胞冷冻的报道[14]，之后成功的报道越来越多[15-17]。目前多中心的数据显示，其复苏率较为稳定，在 65%~96%，甚至达 99%，受精率和卵裂率均在 90% 以上[18-19]。本研究玻璃化冷冻组复苏率和囊胚率有高于程序化冷冻组的趋势，但是差异无统计学意义，可能与所纳入的研究的卵母细胞数目偏少有关。本结果表明玻璃化冷冻能有效改善冻融卵母细胞复苏及胚胎发育潜能。

本研究的程序化冷冻用毒性较小的丙二醇 (PROH) 代替渗透性保护剂二甲基亚砜 (DMSO) 作为冷冻保护剂。而玻璃化冷冻方法的冷冻保护剂则采用化学毒性相对较低的 EG 和对细胞膜穿透能力较强的 DMSO 作为冷冻保护剂，这样既提高了抗冻剂的渗透性，又缓解了 DMSO 的化学毒性。结果显示，采用此玻璃化冷冻方法获得了较好的复苏率和囊胚形成率。有研究表明玻璃化冷冻和程序化冷冻会引起卵母细胞骨架的瓦解。Valojerdi 等[20]研究表明玻璃化冷冻和程序化冷冻会造成卵母细胞微绒毛的缺失，中间纤维部分溶解。本研究也观察到程序化冷冻后，与对照组相比，卵母细胞表面微绒毛大量缺失。而玻璃化冷冻解冻 3 h 后，卵母细胞表面的微绒毛部分缺失。目前关于冻融是否会造成卵透明带硬化还存在争议。一项有关小鼠卵母细胞的研究显示，程序化冷冻解冻后小鼠卵母细胞的皮质颗粒会提前释放，造成卵透明带硬化，进而影响到顶体反应。2010 年，武彩红等[21]通过比较玻璃化冷冻解冻前、后猪 M_{II} 期卵母细胞透明带消化所需的时间，结果显示解冻后卵母细胞所需的时间比冷冻前更短，因此得出玻璃化冷冻不会使卵透明带变硬的结论，不过这项研究并未对卵母细胞的发育能力进行探讨。

?1994-2019 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

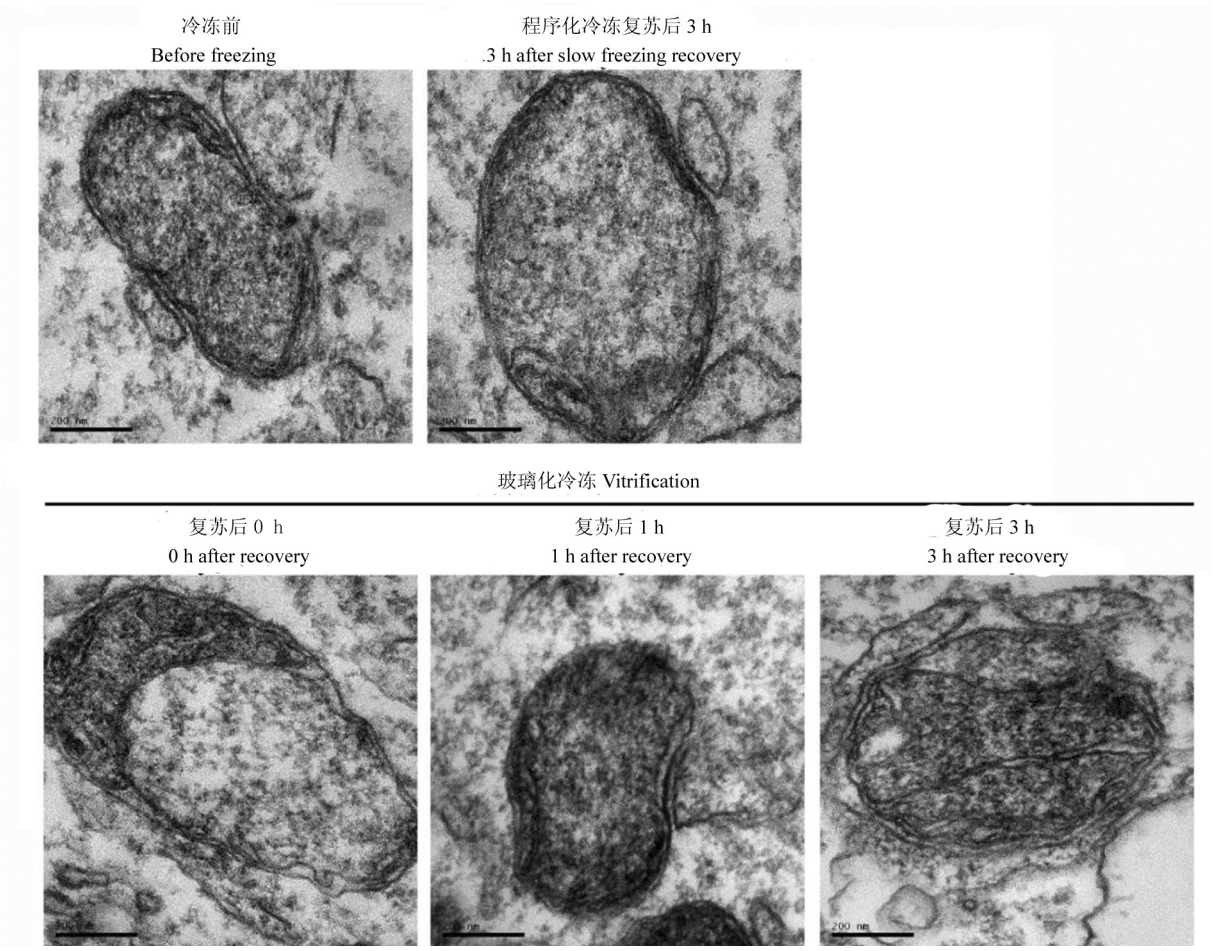
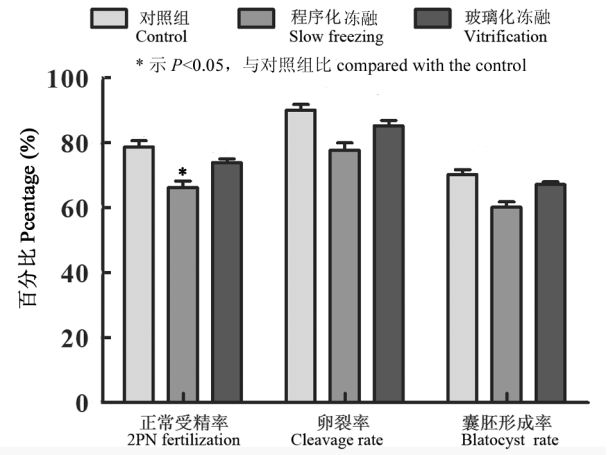


图 5　扫描电子显微分析 2 种冷冻方法对人卵母细胞线粒体的影响 (n=6，标尺均为 200 nm)

Figure 5　The influence of two freezing methods on mitochondria of human oocytes analyzed by SEM (scale bars= 200 nm)



对照组 control group (n=9)，程序化冻融解冻组培养 3 h slow freezing recovery for 3 h (n=12)，玻璃化冻融解冻组培养 3 h vitrification thawed for 3 h (n=12)

图 6　2 种冷冻方法对卵母细胞复苏后行 ICSI 后其正常受精率、卵裂率、囊胚形成率的影响

Figure 6　The influences of two freezing methods on 2PN fertilization, cleavage rate and blatocyst rate of human oocytes after ICSI

本研究也观察到，程序化冻融和玻璃化冻融后培养 3 h 的卵母细胞皮质颗粒有一部分释放到卵间周隙内，其中玻璃化冻融 3 h 组相比程序化冻融组释放皮质颗粒少，但是值得注意的是皮质颗粒的释放与卵母细胞的成熟度密切相关。因此，对于玻璃化冷冻和程序化冷冻所引起卵母细胞内皮质颗粒的提前释放需要更多的数据支撑。

线粒体正常超微结构是卵母细胞功能的物质基础，但其容易受到环境因素尤其是低温的影响。Valojerdi 等 [20] 研究表明程序化冷冻会使卵母细胞线粒体膜变得粗糙模糊，线粒体肿胀；而在玻璃化冷冻组解冻后的卵母细胞中的线粒体的损伤较小。Khalili 等 [22] 研究表明玻璃化冻融后的卵母细胞胞质保存有大量的完好、形态正常的线粒体。Palmerini 等 [23] 进一步研究显示玻璃化冷冻解冻后的卵母细胞中线粒体 - 内质网复合体比对照组卵母

?1994-2019 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

细胞中的少一些。本研究结果显示，在玻璃化冻融组卵母细胞复苏 3 h 后，微绒毛形态较为正常，倾斜在细胞表面，卵透明带边界较为清晰。少量线粒体膜变得模糊不清，可以看到光滑平整的线粒体膜。这些结果提示我们在玻璃化冻融组卵母细胞复苏 3 h 后优于程序化冷冻复苏组。

总之，本研究结果从 Polscope 纺锤体观测仪和电子显微镜的角度，发现人卵冻融后体外培养 3 h 左右为其纺锤体和超微结构的最佳恢复时间，可作为冷冻人 M_{II} 期卵母细胞解冻后行 ICSI 最佳培养时间的参考。

参 考 文 献

[1] Molloy D, Hall BA, Ilbery M, et al. Oocyte freezing: timely reproductive insurance?[J]. Med J Aust, 2009, 190(5):247-249.

[2] Rienzi L, Gracia C, Maggiulli R, et al. Oocyte, embryo and blastocyst cryopreservation in ART: systematic review and meta-analysis comparing slow-freezing versus vitrification to produce evidence for the development of global guidance[J]. Hum Reprod Update, 2017, 23(2):139-155. DOI: 10.1093/humupd/dmw038.

[3] Chen C. Pregnancy after human oocyte cryopreservation[J]. Lancet, 1986, 1(8486):884-886. DOI: 10.1016/S0140-6736(86)90989-X.

[4] Levi-Setti PE, Patrizio P, Scaravelli G. Evolution of human oocyte cryopreservation: slow freezing versus vitrification[J]. Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes, 2016, 23(6):445-450. DOI: 10.1097/MED.0000000000000289.

[5] Levi Setti PE, Porcu E, Patrizio P, et al. Human oocyte cryopreservation with slow freezing versus vitrification. Results from the National Italian Registry data, 2007-2011[J]. Fertil Steril, 2014, 102(1):90-95.e92. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2014.03.052.

[6] Borini A, Levi Setti PE, Anserini P, et al. Multicenter observational study on slow-cooling oocyte cryopreservation: clinical outcome[J]. Fertil Steril, 2010, 94(5):1662-1668. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2009.10.029.

[7] Smith GD, Serafini PC, Fioravanti J, et al. Prospective randomized comparison of human oocyte cryopreservation with slow-rate freezing or vitrification[J]. Fertil Steril, 2010, 94(6):2088-2095. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2009.12.065.

[8] Cao YX, Chian RC. Fertility preservation with immature and *in vitro* matured oocytes[J]. Semin Reprod Med, 2009, 27(6):456-464. DOI: 10.1055/s-0029-1241055.

[9] Koike-Tani M, Tani T, Mehta SB, et al. Polarized light microscopy in reproductive and developmental biology[J]. Mol Reprod Dev, 2015, 82(7/8):548-562. DOI: 10.1002/mrd.22221.

[10] Ghosh S, Chattopadhyay R, Bose G, et al. Selection of birefringent spermatozoa under Polscope: effect on intracytoplasmic sperm injection outcome[J]. Andrologia, 2012, 44 Suppl 1:734-738. DOI: 10.1111/j.1439-0272.2011.01258.x.

[11] Ganesh A, Chattopadhyay R, Narendra Babu K, et al. Analysis of spindle characteristics and embryo quality in mice stimulated with letrozole using Polscope imaging[J]. Fertil Steril, 2010, 93(5):1477-1481. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2009.04.045.

[12] Oldenbourg R. A new view on polarization microscopy[J]. Nature, 1996, 381(6585):811-812. DOI: 10.1038/381811a0.

[13] Madaschi C, de Souza Bonetti TC, de Almeida Ferreira Braga DP, et al. Spindle imaging: a marker for embryo development and implantation[J]. Fertil Steril, 2008, 90(1):194-198. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2007.05.071

[14] Kuleshova L, Gianaroli L, Magli C, et al. Birth following vitrification of a small number of human oocytes: case report[J]. Hum Reprod, 1999, 14(12):3077-3079.

[15] Yoon TK, Kim TJ, Park SE, et al. Live births after vitrification of oocytes in a stimulated *in vitro* fertilization-embryo transfer program[J]. Fertil Steril, 2003, 79(6):1323-1326. DOI: 10.1016/S0015-0282(03)00258-9

[16] Lucena E, Bernal DP, Lucena C, et al. Successful ongoing pregnancies after vitrification of oocytes[J]. Fertil Steril, 2006, 85(1):108-111. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2005.09.013

[17] Nikiforaki D, Vanden Meerschaut F, Qian C, et al. Oocyte cryopreservation and *in vitro* culture affect calcium signalling during human fertilization[J]. Hum Reprod, 2014, 29(1):29-40. DOI: 10.1093/humrep/det404.

[18] Katayama KP, Stehlik J, Kuwayama M, et al. High survival rate of vitrified human oocytes results in clinical pregnancy[J]. Fertil Steril, 2003, 80(1):223-224. DOI: 10.1016/S0015-0282(03)00551-X.

[19] Nagy ZP, Anderson RE, Feinberg EC, et al. The human oocyte preservation experience (HOPE) registry: evaluation of cryopreservation techniques and oocyte source on outcomes[J]. Reprod Biol Endocrinol, 2017, 15(1):10. DOI: 10.1186/s12958-017-0228-7.

[20] Valojerdi MR, Salehnia M. Developmental potential and ultrastructural injuries of metaphase II (M_{II}) mouse oocytes after slow freezing or vitrification[J]. J Assist Reprod Genet, 2005, 22(3):119-127. DOI: 10.1007/s10815-005-4876-8.

[21] 武彩红 , 李玲 , 张斌 , 等 . 冷冻对猪体外成熟卵母细胞透明带消化时间和皮质颗粒分布的影响 [J]. 江苏农业科学 , 2010, 5(1):280-281.

[22] Khalili MA, Maione M, Palmerini MG, et al. Ultrastructure of human mature oocytes after vitrification[J]. Eur J Histochem, 2012, 56(3):e38. DOI: 10.4081/ejh.2012.e38.

[23] Palmerini MG, Antinori M, Maione M, et al. Ultrastructure of immature and mature human oocytes after cryotop vitrification[J]. J Reprod Dev, 2014, 60(6):411-420. DOI: 10.1262/jrd.2014-027.

(收稿日期：2018-05-15)
(本文编辑：王李艳)

第 740 页选择题答案：
(1) ABCD; (2) ABC; (3) D; (4) A; (5) B

?1994-2019 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net