

常用实验动物带血管蒂全卵巢灌注及冷冻保存方法

陈文铭¹ 徐芝慧^{2*}

(1.温州医科大学附属第一医院产科 浙江 温州 325000; 2.温州医科大学附属第一医院生殖中心 浙江 温州 325000)

[摘要] 目的 采用独创的已获专利授权的灌注针和灌注技术,对常用实验动物(成年兔、豚鼠和大鼠)的带血管蒂全卵巢进行灌注,研究可调节灌注针是否适用于不同体型动物全卵巢的灌注,同时采用经典的冷冻方案进行冷冻及解冻。方法 分别取 6 只性成熟雌性中国大耳白兔、6 只 Dunkan-Hartley 系豚鼠、6 只 SD 大鼠各 12 个带血管蒂全卵巢进行实验。结果 计数兔、豚鼠、大鼠 3 种动物卵巢组织 HE 染色切片中形态正常的原始卵泡率,结果显示差异均无统计学意义($P>0.05$);血管损伤主要在远卵巢端,3 种动物近卵巢端的各组动脉、静脉均未见明显损伤。结论 通过调节麦管针的粗细可用于灌注大小不同的动物卵巢,初步证实了相同的灌注压力(60 mmHg)和灌注速率(1 ml/min)同时适用于不同体积的兔、豚鼠和大鼠卵巢。

[关键词] 全卵巢;灌注;麦管针;HE 染色;兔;豚鼠;大鼠

[中图分类号] R322.65 **[文献标志码]** A **[DOI]** 10.16098/j.issn.0529-1356.2019.05.022

Perfusion and cryopreservation of whole ovaries with vascular pedicles in common experimental animals

CHEN Wen-ming¹, XU Zhi-hui^{2*}

(1. Department of Obstetrics, the First Affiliated Hospital of Wenzhou Medical University, Zhejiang Wenzhou 325000, China;

2. Reproductive Center, the First Affiliated Hospital of Wenzhou Medical University, Zhejiang Wenzhou 325000, China;)

[Abstract] **Objective** Using the perfusion needle which is authorized and special perfusion technology to perfuse the whole ovary with vascular pedicle of common animals, such as rabbits, guinea pigs and rats, then comparative analysis of the adjustable perfusion needles whether can be applied to different animals, whether this kind of perfusion pressure and perfusion rate is appropriate for different sizes of ovaries, and using the classic cryopreservation protocol to freeze and thaw. **Methods** Collecting 12 ovaries respectively from 6 chinese sexual maturity rabbits, 6 Dunkan-Hartley guinea pigs and 6 SD rats to do experiments. **Results** Through HE staining to count the normal proportion of primordial follicles in each section, the result of HE staining in three animals indicated that there was no statistical significance ($P>0.05$), vascular injury was mainly in the upper (far away from ovary), there was no obvious damage in lower (close to ovary) in three animals' each group. **Conclusion** The experiment confirms that through adjusting straw needle size we can perfuse different size of animal organs and under the condition of the same perfusion pressure (60 mmHg) and rate (1 ml/min) it is suitable for rabbits' ovaries, guinea pigs' ovaries and rats' ovaries at the same time.

[Key words] Whole ovary; Perfusion; Straw needle; HE staining; Rabbit; Guinea pig; Rat

抗癌治疗技术进步使肿瘤患者长期生存率显著提高。然而,大剂量放化疗对卵巢也造成不可逆损害^[1],使年轻女性和儿童癌症幸存者在育龄阶段面临卵巢早衰甚至不孕的风险。人们尝试在放化疗之

前先冷冻保存癌症患者的部分卵巢组织,待癌症治愈之后再将卵巢组织解冻自体移植以恢复生育力^[2-11]。然而,冻融卵巢组织移植的临床应用仍然存在许多问题,其中之一是由于移植早期无血管吻合,缺血缺氧损伤将导致大量卵泡丢失。带血管蒂全卵巢冷冻保存及移植,理论上可以通过血管直接吻合立即恢复卵巢血供,大大降低因缺血缺氧导致的卵泡丢失^[12-16]。因此,本研究拟采用可调节灌注针和血管灌注技术,对常用实验动物带血管蒂全卵巢进行冷冻保护液灌注,观察此法对不同体型动物全卵巢冷冻保存效果。

[收稿日期] 2019-03-14 **[修回日期]** 2019-06-11

[基金项目] 浙江省自然科学基金(LQ19H040004);温州市科技局公益性科技计划(Y20170593)

[作者简介] 陈文铭(1988—),女(汉族),浙江省平阳县人,硕士研究生,住院医师。

* 通讯作者(To whom correspondence should be addressed)

E-mail: xzhwmc@163.com Tel: (0577) 88069643

材料和方法

1. 实验动物

健康性成熟雌性中国大耳白兔, 4~5月龄, 2.0~2.5 kg, 由温州医科大学实验动物中心提供, 动物合格证号: WYDW2012-0037; 健康性成熟 Dunkin Hartley 雌性豚鼠, 10~12周龄, 350~400 g, 购自上海斯莱克斯有限公司, 动物合格证号: SYXK(浙)2019-0009; 健康性成熟 SD 雌性大鼠, 8~10周龄, 200~220 g, 购自上海斯莱克斯有限公司, 动物合格证号: SYXK(浙)2015-0009。

2. 主要试剂与灌注针制作

L-15 (Sigma 公司, L4386), FBS (Sigma 公司, ZLI-9039), 二甲基亚砜 (dimethyl sulfoxide, DMSO, Sigma 公司, D-2650), 蔗糖 (Sigma 公司, S1888), 肝素钠生理盐水注射液 (上海第一生化药业有限公司), 明胶 (上海试剂总厂), 墨汁 (北京一得阁墨业有限责任公司)。

采用牙科打火机 (Phoenix-dent) 明火加热聚氯乙烯麦管 (0.25 ml, Cryo Bio System 公司)。麦管变软后可被拉长变细, 在空气中冷却后定型。采用手术刀片将其细段切开, 获得两截灌注针, 可切除多余长度, 保留本实验需要的细端长度 2 cm 左右。本实验根据成年大鼠腹主动脉、豚鼠卵巢动脉和兔卵巢动脉管径大小, 制作略小于相应直径的麦管针细端。

3. 带血管蒂全卵巢的获取

摘除双侧全卵巢术前, 动物禁食 12 h, 麻醉后, 在外科显微镜 (Nikon SMZ2000) 下分离血管和组织, 将卵巢连同其动静脉一起取下 (大鼠卵巢连同腹主动脉和上腔静脉一起取下), 放置于含取材液 (L-15 + 10% FBS) 的培养皿中, 培养皿置于冰袋上进行血管插管和灌注。

4. 卵巢血管灌注可行性及实验分组

4.1 大鼠、豚鼠和兔带血管蒂全卵巢墨汁灌注: 将制备的麦管针从腹主动脉近心端插入已取下的大鼠全卵巢血管蒂 (豚鼠及兔则将麦管针插入卵巢动脉游离端), 采用微泵 (北京鑫禾丰医疗技术有限公司) 连接延长管和麦管针以 1 ml/min 速度灌注, 先用 100 000 IU/L 的肝素钠生理盐水灌注, 再用 37 °C 的 3% 明胶墨汁混合液灌注卵巢, 直至观察到整个卵巢均匀变墨黑, 停止灌注, 将标本投入 4% 多聚甲醛中固定, 石蜡包埋用于 HE 染色形态学观察, 验证经卵巢血管蒂灌注全卵巢的可行性。

4.2 实验分组: 将 12 个兔全卵巢、12 个豚鼠全卵巢、12 个大鼠全卵巢进行分组, 每种动物卵巢均分为新鲜组 (3 个)、肝素组 (3 个)、毒性组 (3 个) 和冻融组 (3 个)。新鲜组卵巢离体后未进行灌注; 肝素

组仅用肝素钠生理盐水灌注卵巢, 直至血管蒂静脉端流出清澈液体; 毒性组卵巢完成肝素钠生理盐水灌注后, 再灌注冷冻保护液 (1.5 mol/L DMSO + 10% FBS + L-15) 15 min, 接着灌注射解液 (依次为含 0.25 mol/L、0.1 mol/L、0 mol/L 蔗糖的取材液), 每个梯度均灌注 10 min; 冻融组卵巢依次灌注肝素钠生理盐水、冷冻保护液后, 进行程序性冷冻保存, 再将其置于液氮中保存至少 7 d, 随后取出组织, 依次灌注射解液。

5. 冷冻与解冻方法

将已灌注了冷冻保护液的卵巢转移至含冷冻保护液的冷冻管 (1.8 ml, Greiner Bio-One 公司) 中平衡 15 min, 根据程序性冷冻方法^[17]冷冻。开启程序化冷冻仪, 冷冻程序为: 0 °C 开始, 以 -2 °C/min 降至 -7 °C, 等待 5 min 后开始植冰, 植冰后在 -7 °C 保持 10 min, 再以 -0.3 °C/min 降至 -40 °C, 然后以 -10 °C/min 的速度降至 -140 °C, 最后于液氮中至少保存 7 d。解冻时将冷冻管取出液氮, 室温放置 1 min, 再浸入 37 °C 水浴中直至冰溶解约 2 min, 接着从冷冻管中取出卵巢, 连接麦管针依次灌注射解液, 以 1 ml/min 速度, 每个梯度均灌注 10 min。

6. 全卵巢及血管蒂组织学观察

带血管蒂全卵巢分成卵巢和血管两部分, 卵巢固定于 4% 多聚甲醛; 血管分成远 (灌注针插管端)、中 (中段血管)、近 (近卵巢端) 3 部分分别固定于 4% 多聚甲醛。标本经梯度酒精脱水、石蜡包埋后 4 μm 连续切片, 每个标本均连续切片 40 张, 每隔 5 张选取 1 张切片做 HE 染色后在 400 倍光学显微镜下观察卵巢中原始卵泡及血管形态, 并计算各组卵巢中正常原始卵泡的比例, 以百分比 (%) 表示。为避免卵泡重复计数, 只计数有卵母细胞核的卵泡。卵巢组织冷冻保存的卵泡形态的判定参照 1986 年 Gougeon 创建的标准^[18]。正常的动脉结构具有完整的血管内皮, 内弹性膜和平滑肌层。若血管内皮细胞脱落, 内弹性膜断裂或平滑肌层细胞脱落, 则认为动脉壁受损。静脉血管主要评判内皮细胞是否分离^[19]。

7. 统计学处理

采用 SPSS 19.0 统计学软件进行分析, 数据以百分比表示, 比较新鲜组、肝素组、毒性组及冷冻组中正常原始卵泡的比例, 采用卡方检验, $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义。

结 果

1. 灌注麦管针的制备

根据不同动物动脉管径大小制备稍小于相应管径的麦管针细端, 如图 1 中黑色箭头所示。

2. 经血管蒂灌注全卵巢可行性

卵巢血管蒂插管成功后,首先灌注肝素钠生理盐水,可见卵巢内残余血液从血管蒂静脉端缓慢流出,卵巢由原先的红色逐渐变苍白,再用 37℃ 的 3% 明胶墨汁混合液灌注,直至观察到整个卵巢均匀变墨黑,退灌注针,并用丝线结扎血管蒂。经 HE 染色后,400 倍显微镜下可观察到卵巢门至卵巢髓质内各级小血管,以及生长卵泡周围微血管均可见有墨汁分布,墨汁起到示踪作用,如图 1。

3. 卵巢及血管蒂的组织形态学观察

HE 染色后观察兔、豚鼠、大鼠 3 种动物的新鲜组、肝素组、毒性组及冻融组中原始卵泡的形态结构(图 2),发现各组中均存在形态异常的原始卵泡,异常主要表现为卵母细胞核固缩、卵母细胞包膜皱缩及胞质中出现空泡。计算卵巢切片中形态正常原始卵泡率,结果显示 3 种动物的新鲜组、肝素组、毒性组及冻融组 4 组组间比较差异无统计学意义($P > 0.05$,表 1)。

光学显微镜下观察各组卵巢血管结构,发现 3 种动物新鲜组动静脉血管均未见损伤;3 种动物冻融组血管蒂均存在远段静脉损伤,豚鼠和大鼠卵巢血管还可见远段动脉损伤;豚鼠、兔卵巢血管的肝素组及毒性组中发现远段动脉损伤(图 3)。

讨 论

本实验采用常用实验动物兔、豚鼠及大鼠作为动物模型,对带血管蒂全卵巢灌注冷冻保护液及冻融过程可行性进行探索。我们使用自制灌注针对带血管蒂全卵巢进行明胶墨汁的灌注,进一步在光学显微镜下观察到墨汁出现在卵巢皮质、髓质及生长卵泡周围的微血管中,从微观上验证墨汁的确被灌注到卵巢中,以 1 ml/min 速度灌注卵巢可以有效地防止压力过大引起的血管破裂外渗。对于不同体型动物,需要使用与卵巢动脉管径相匹配的灌注针。以往豚鼠、兔全卵巢血管灌注针采用钢针^[20],质地硬,容易损伤卵巢血管,最小管径为 30G,难以对体型更小的动物卵巢血管进行灌注。本研究采用的控制麦管针已获专利授权(专利号:ZL 2011 2 0474042.0),原材料来源方便,操作简单,可以根据

大小不同的动物卵巢动脉管径控制相应的麦管灌注针,且质地相对柔软,对血管损伤相对小。

从组织形态学上观察,我们发现 3 种动物卵巢中,各自的新鲜组、肝素组、毒性组及冻融组正常原始卵泡率差别不显著,说明在本实验过程中所用的冷冻保护剂浓度、冷冻程序以及灌注方案同时适用于兔、豚鼠及大鼠全卵巢的冷冻保存。这可能跟原始卵泡体积小,胞质少,所需营养少,耐缺血性质有关。但考虑到形态学检查是在解冻后立即进行的,可能组织仅发生了轻微的损伤或仅有细胞器的改变^[21],导致 HE 染色光学显微镜下观察结果未见明显改变。豚鼠毒性组形态学正常的原始卵泡率(83.25%)明显低于其他两组(兔:86.25%;大鼠:88.50%)。这可能由于冷冻保护剂及解冻液本身对不同动物卵巢的毒性不同,或对不同动物组织细胞的渗透速率有差别,导致各组织细胞脱水程度不一,也可能是随着灌注时间的延长,相同灌注压力和速率对不同体积的卵巢产生差异。

冻融后卵巢血管的完整性是全卵巢冷冻保存及移植后卵巢存活的重要保证。在成功吻合血管后,如果卵巢动静脉的内膜受损,将增加卵巢移植术后血管狭窄、血栓形成、脱落、血管闭塞的风险,从而降低移植的成功率^[13,15]。在本实验结果中显示,兔卵巢血管蒂经 HE 染色后,在肝素组灌注近端的 1 条动脉及冻融组的 1 条静脉发现损伤;在豚鼠肝素组、毒性组、冻融组各发现 1 条灌注近端的动脉损伤,以及冻融组的 1 条静脉损伤;大鼠各组腹主动脉均未见损伤,冻融组见灌注近端的 1 条动脉损伤及 1 条静脉中段的损伤。而 3 种动物近卵巢端的各组动静脉均未见明显损伤。兔肝素组动脉损伤除可能是灌注压力、灌注针摩擦的损伤外,还可能是技术人员在操作过程中,手持器械时难以避免的机械损伤。而冻融组静脉的损伤,可能是因灌注时间过长或过短导致血管内皮细胞过度脱水或脱水不足,经冻融后组织性质发生改变,从而引起损伤^[22]。在进行豚鼠带血管蒂全卵巢冻融过程中,机械性损伤的几率明显高于兔,原因可能为豚鼠体型较小,血管相对较细、较柔软,给灌注带来了挑战,同时也增加了损伤的风险。但相比之下,大鼠卵巢动静脉在 3 种动物

表 1 3 种动物各组卵巢中正常原始卵泡率(% $\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Table 1 Normal primordial follicular rates in three animals' ovary(% $\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

	新鲜组 fresh group	肝素组 heparin group	毒性组 toxicity group	冻融组 freeze-thawing group
大耳白兔(rabbit)	90.00±2.4	89.75±4.6	86.25±1.7	83.75±1.7
豚鼠(guinea pig)	89.50±2.6	89.00±2.2	83.25±4.2	80.50±2.3
大鼠(rat)	90.25±2.2	90.00±0.8	88.50±2.4	84.00±2.7

大耳白兔、豚鼠、大鼠的肝素组、毒性组及冻融组分别与对应的新鲜组比较 $P > 0.05$

Heparin group, toxicity group and freeze-thawing group of rabbits, guinea pigs and rats were compared with the corresponding fresh group $P > 0.05$

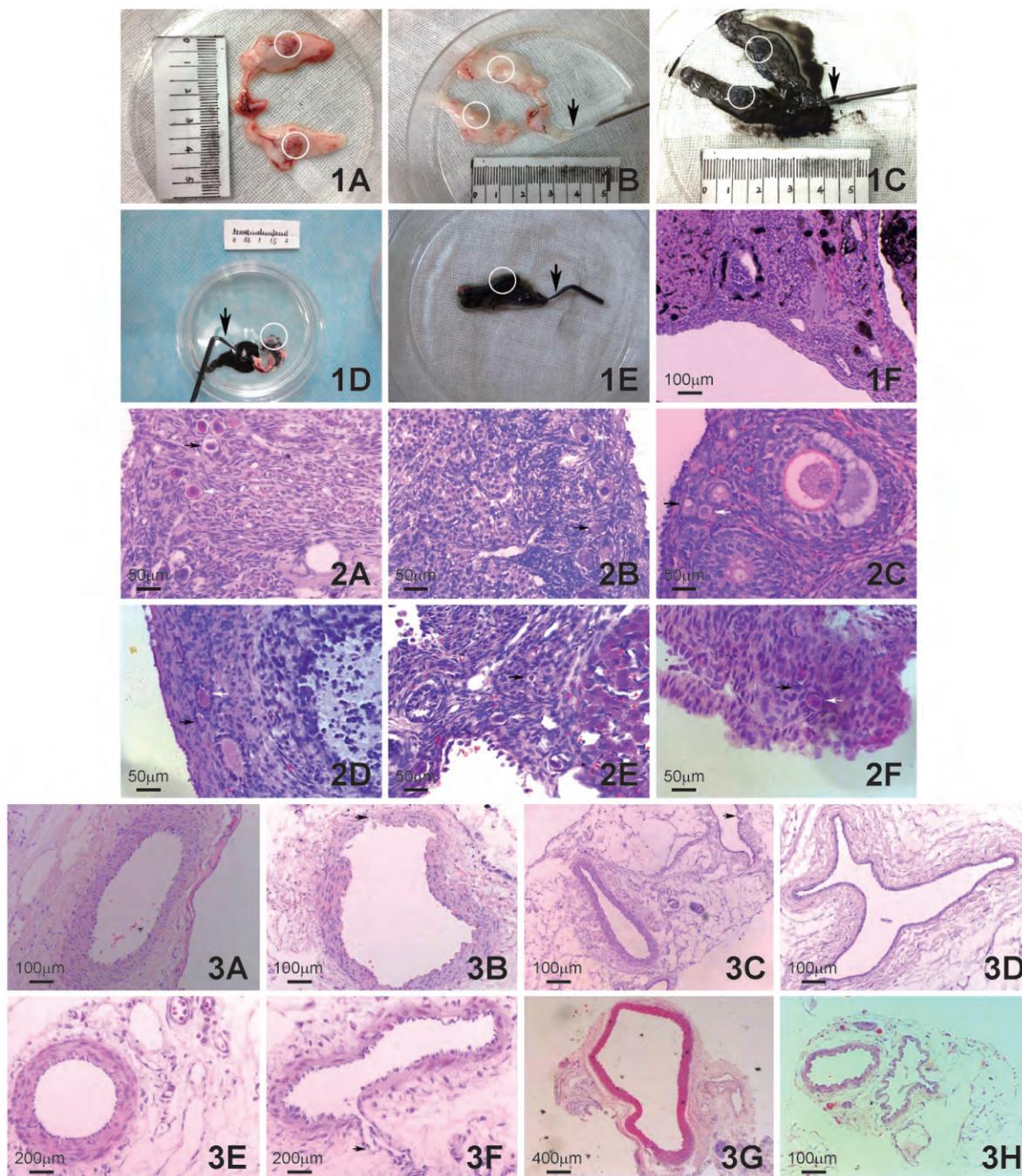


图1 经3%明胶墨汁灌注后的大鼠、豚鼠、兔带血管蒂全卵巢，◎示卵巢，↑示麦管针
 A.刚离体的大鼠带血管蒂全卵巢；B、C分别为经肝素钠生理盐水、3%明胶墨汁灌注后的大鼠卵巢；D、E分别为经3%明胶墨汁灌注后的豚鼠卵巢、兔卵巢；F.3%明胶墨汁灌注后的大鼠卵巢 HE 染色结果 标尺示 100 μm
 图2 新鲜组和冷冻组的兔、豚鼠、大鼠卵巢组织 HE 染色结果 标尺示 50 μm；↑示正常原始卵泡，↑示异常原始卵泡
 A~F.兔新鲜卵巢、兔冻融卵巢、豚鼠新鲜卵巢、豚鼠冻融卵巢、大鼠新鲜卵巢、大鼠冻融卵巢组织 HE 染色
 图3 兔、豚鼠、大鼠3种动物血管组织 HE 染色结果，↑示血管受损部位
 A~D.新鲜组兔卵巢动脉、肝素组兔卵巢动脉、冻融组兔卵巢动静脉、冻融组兔未受损的卵巢静脉 HE 染色结果 标尺示 100 μm；E、F.冻融组豚鼠未受损的卵巢动脉、静脉 HE 染色结果 标尺示 200 μm；G.冻融组大鼠未受损的腹主动脉 HE 染色结果 标尺示 400 μm；H.冻融组大鼠卵巢动静脉 HE 染色结果 动脉尚完整 静脉的内皮细胞出现局部成块脱落 标尺示 100 μm
 Fig.1 Whole ovary with vascular pedicle of rats , guinea pigs and rabbits were perfused by 3% gelatin ink separately , noting the presence of ovary (◎) , noting the presence of straw needle (↑)
 A , Freshly isolated rat ' s whole ovaries with vascular pedicles , which were filled with blood; B , Rat ' s ovaries perfused by heparin saline; C-E were rat ' s , guinea pig ' s and rabbit ' s ovary perfused by 3% gelatin ink; F , HE staining of rat ' s ovary after perfused by 3% gelatin ink , Bar= 100 μm
 Fig.2 HE staining of rabbit ovarian tissue , guinea pig ovarian tissue and rat ovarian tissue Bar= 50 μm
 ↑ noting the presence of normal primitive follicle; ↑ noting the presence of abnormal primitive follicle
 A-F , HE staining of ovarian tissue of fresh rabbit , freeze-thawing rabbit , fresh guinea pig , freeze-thawing guinea pig , fresh rat , freeze-thawing rat
 Fig.3 HE staining of rabbit vascular tissue , guinea pig vascular tissue and rat vascular tissue , noting the presence of damaged blood vessel (↑)

A-D, HE staining of rabbit ovarian artery in fresh, in heparin and of rabbit ovarian artery and vein in freeze-thawing and undamaged rabbit ovarian vein in freeze-thawing, Bar=100 μm ; E, F, HE staining of undamaged ovarian artery and vein of guinea pig in freeze-thawing, Bar=200 μm ; G, HE staining of undamaged rat abdominal aorta, Bar=400 μm ; H, HE staining of rat ovarian artery and vein in freeze-thawing, the artery was intact, and the endothelial cells of the vein were locally exfoliated, Bar=100 μm

中最细,血管壁最薄,而且大鼠卵巢及血管附近的脂肪最多,大幅度提升了灌注的难度系数,增加了操作过程中机械性损伤的风险。因此,我们选择大鼠腹主动脉为灌注起始位置,为灌注过程带来了方便,大大提升了灌注效率。但无论哪种动物,近卵巢端的动静脉均未受伤,或许仅需在血管吻合之前对远卵巢端的血管进行修剪,以增加血卵巢移植的成功率。带血管蒂全卵巢冷冻保存及移植^[20]被认为是未来生育力保存的发展方向之一,它使冷冻保护剂快速灌注进入卵巢脉管系统,渗透到组织。卵巢解冻后再进行血管吻合,使卵巢移植后立即获得血液供应,这不仅保存了卵巢组织结构的完整性,同时也减少了卵泡的丢失。但这些仅仅是理论上的描绘,实际操作中仍需解决两方面的问题:多细胞组织结构的器官冷冻保存和微血管显微吻合技术。由于带血管蒂全卵巢冷冻保存与移植技术的研究才刚刚起步,其技术关键点之一在于从卵巢动脉灌注冷冻剂经脉管系统均匀渗透全卵巢,以达到冷冻保存全卵巢的目的。

本实验采用相同的血管灌注和冷冻保存方案对兔、豚鼠及大鼠带血管蒂全卵巢进行冷冻保存,发现虽然在形态学上未有明显的损伤,但冻融过程是否会造成卵巢氧化-抗氧化平衡的失调,是否会激活细胞的凋亡程序,增加凋亡蛋白的产生,需进一步求证。

参 考 文 献

- [1] Sivasakthivel T, Lipeng X, Kalyanasundaram R, et al. Glycyrrhizin induces apoptosis in prostate cancer cell lines DU-145 and LNCaP [J]. *Oncol Rep*, 2008, 20(6): 1387-1392.
- [2] Silber SJ, Derosa M, Goldsmith S, et al. Cryopreservation and transplantation of ovarian tissue: results from one center in the USA [J]. *J Assist Reprod Genet*, 2018, 35(12): 2205-2213.
- [3] Donnez J, Silber S, Andersen CY, et al. Children born after autotransplantation of cryopreserved ovarian tissue: a review of 13 live births [J]. *Ann Med*, 2011, 43(6): 437-450.
- [4] Donnez J, Jadoul P, Pirard C, et al. Live birth after transplantation of frozen-thawed ovarian tissue after bilateral oophorectomy for benign disease [J]. *Fertil Steril*, 2012, 98(3): 720-725.
- [5] Kim SS, Lee WS, Chung MK, et al. Long-term ovarian function and fertility after heterotopic autotransplantation of cryobanked human ovarian tissue: 8-year experience in cancer patients [J]. *Fertil Steril*, 2009, 91(6): 2349-2354.
- [6] Rosendahl M, Andersen CY, Ernst E, et al. Ovarian function after removal of an entire ovary for cryopreservation of pieces of cortex prior to gonadotoxic treatment: a follow-up study [J]. *Hum Reprod*, 2008, 23(11): 2475-2483.
- [7] Andersen CY, Rosendahl M, Byskov AG, et al. Two successful pregnancies following autotransplantation of frozen/thawed ovarian tissue [J]. *Hum Reprod*, 2008, 23(10): 2266-2272.
- [8] Meirou D, Ra'anani H, Shapira M, et al. Transplantations of frozen-thawed ovarian tissue demonstrate high reproductive performance and the need to revise restrictive criteria [J]. *Fertil Steril*, 2016, 106(2): 467-474.
- [9] Jensen AK, Kristensen SG, Macklon T, et al. Outcomes of transplantations of cryopreserved ovarian tissue to 41 women in Denmark [J]. *Hum Reprod*, 2015, 30(12): 2838-2845.
- [10] Silber S. Ovarian tissue cryopreservation and transplantation: scientific implications [J]. *J Assist Reprod Genet*, 2016, 33(12): 1595-1603.
- [11] Silber SJ, Derosa M, Goldsmith S, et al. Cryopreservation and transplantation of ovarian tissue: results from one center in the USA [J]. *J Assist Reprod Genet*, 2018, 35(12): 2205-2213.
- [12] Kim SS. Time to re-think: ovarian tissue transplantation versus whole ovary transplantation [J]. *Reprod Biomed Online*, 2010, 20(2): 171-174.
- [13] Imhof M, Bergmeister H, Lipovac M, et al. Orthotopic microvascular reanastomosis of whole cryopreserved ovine ovaries resulting in pregnancy and live birth [J]. *Fertil Steril*, 2006, 85(Suppl 1): 1208-1215.
- [14] Arav A, Gavish Z, Elami A, et al. Ovarian function 6 years after cryopreservation and transplantation of whole sheep ovaries [J]. *Reprod Biomed Online*, 2010, 20(1): 48-52.
- [15] Bedaiwy MA, Jeremias E, Gurunluoglu R, et al. Restoration of ovarian function after autotransplantation of intact frozen-thawed sheep ovaries with microvascular anastomosis [J]. *Fertil Steril*, 2003, 79(3): 594-602.
- [16] Ding Y, Shao JL, Li JW, et al. Successful fertility following optimized perfusion and cryopreservation of whole ovary and allotransplantation in a premature ovarian insufficiency rat model [J]. *J Ovarian Res*, 2018, 11(1): 35.
- [17] Jin S, Lei L, Shea LD, et al. Markers of growth and development in primate primordial follicles are preserved after slow cryopreservation [J]. *Fertil Steril*, 2010, 93(8): 2627-2632.
- [18] Zhao M, Mydlarz WS, Califano J. Head and neck cancer cell lines are resistant to mitochondrial depolarization-induced apoptosis [J]. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec*, 2008, 70(4): 257-263.
- [19] Courbiere B, Massardier J, Salle B, et al. Follicular viability and histological assessment after cryopreservation of whole sheep ovaries with vascular pedicle by vitrification [J]. *Fertil Steril*, 2005, 84(Suppl 2): 1065-1071.
- [20] Xu Z, Wang X, Wu Y, et al. Slow-controlled freezing versus speed-cooling for cryopreservation of whole guinea pig ovaries [J]. *Theriogenology*, 2012, 77(3): 483-491.
- [21] Yang Ch. Tempromandibular joint surgery [J]. *Chinese Journal of Stomatology*, 2004, 16(5): 193-198. (in Chinese)
杨驰. 颞下颌关节外科 [J]. *中华口腔医学杂志*, 2004, 16(5): 193-198.
- [22] Onions VJ, Webb R, Pincott-Allen C, et al. The effects of whole ovarian perfusion and cryopreservation on endothelial cell-related gene expression in the ovarian medulla and pedicle [J]. *Mol Hum Reprod*, 2013, 19(4): 205-215.