

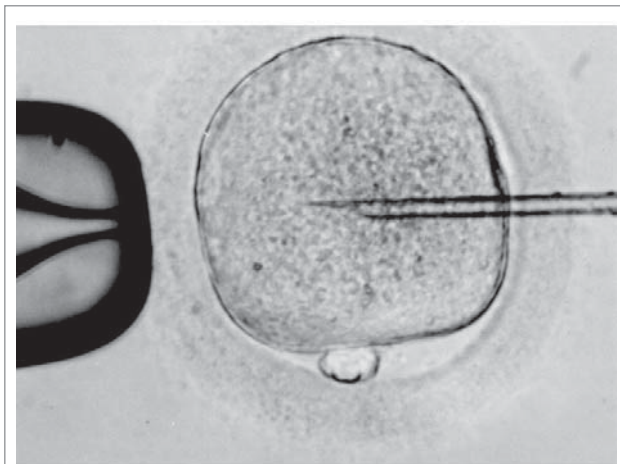


保存生育能力——

卵子、胚胎與卵巢組織冷凍

文・圖／陳思原（臺大醫院婦產部主治醫師）
楊友仕（醫學系婦產科教授）

1986年澳洲Dr. Christopher Chen報告了第一例卵子冷凍成功懷孕，當時引起了眾人的關注，但是在以後的十多年，學者們卻沒有辦法獲得穩定的成績。問題在於卵子冷凍存活率差、受精率低、成長分裂不足。我們在成功地應用精子顯微注射於嚴重男性不孕症後，對於卵子冷凍這個主題，也產生了濃厚的興趣。冷凍卵子受精率低，部分原因可能和冷凍時造成透明層變硬及細胞質周圍顆粒改變有關，而這可以用現有的精子顯微注射改善受精（圖1）。



■ 圖1：冷凍時可能造成卵子透明層變硬及細胞質周圍顆粒改變，阻礙精子進入，精子顯微注射可以有效讓冷凍卵子受精。

研發卵子冷凍的動機與重要性

卵子冷凍較胚胎冷凍有更廣的應用，它可提供未婚但可能因手術、化學治療或放射線治療等原因失去卵巢機能的病人，或目前不適合懷孕的婦女保存卵子的機會。接受試管嬰兒治療的患者，如果將刺激排卵所得過多的卵子冷凍保存，除了可以自己將來使用外，也可成為卵子捐贈的重要來源。有時做取卵手術後，精子無法獲得時，將卵子及時冷凍是實驗室相當重要的一個應變措施。我們完成精子顯微注射研究，幫助許多不孕症夫婦成功懷孕，發表多篇論文於國際著名生殖醫學雜誌。決定以此為出發，進入卵子冷凍研究領域，接受更嚴苛的實驗挫折與挑戰。

研發新冷凍方法

慢速冷凍是傳統採用的冷凍方式，所使用協助脫水之冷凍保護劑濃度較低，毒性較少。當溫度下降至-7°C時，以事先浸泡於-196°C液態氮的小鑷子夾住容器的外壁，位於接觸點附近的溶液立刻形成冰晶種，由此往外漸漸擴散結冰。細胞外的滲透壓升高，進一步吸引細胞內水分子往外滲出。受精卵與分裂期胚胎的效果相當好。

根據過去文獻的報告，卵子冷凍解凍後之存活率約為 33%。其原因為冰晶對細胞膜造成傷害，細胞質因而流出。胚胎對於冷凍保護劑、電解質、水分之調節較好，較能達成脫水，減少冰晶的形成。此外胚胎細胞膜較堅強，較能忍受解凍滲透壓之變化。卵子較胚胎容易受冷凍解凍之傷害，因此使用胚胎冷凍解凍之方法於卵子並不適合，須進一步改進。

為了改善存活率，我們嘗試用玻璃化冷凍。使用高濃度的冷凍保護劑脫水，藉由快速冷凍的過程，細胞內物質會轉化成類似玻璃的物質，不會有冰晶的形成，但要注意其毒性。基本上體積小、冷凍速度快，較易玻璃化。玻璃化方法可將原本慢速冷凍的 3 小時過程縮短為 10 分鐘。人類卵子以玻璃化冷凍的研究中，我們最早達成高存活率（90%），發表於 *Fertility and Sterility* 雜誌[1]。另一種是改良式慢速法，提高蔗糖濃度（0.3M）及脫水平衡時間，可增加脫水能力，減少冰晶形成，增加存活率至 75%。這些方法提高了卵子冷凍之實用性。

冷凍卵子解凍時紡錘體易受傷

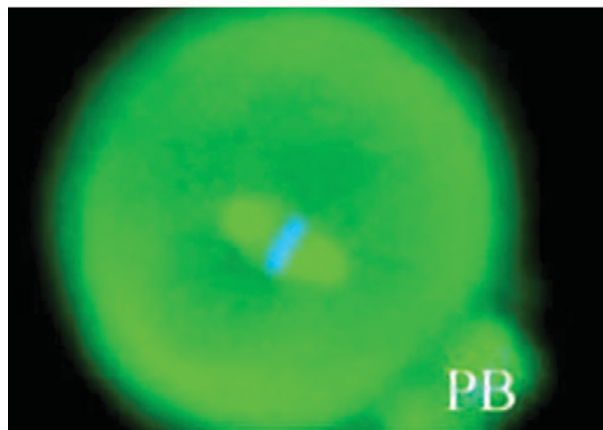
成熟的卵子完成了第一次減數分裂，進入第二次減數分裂的中期，染色體排列於紡錘體中央，許多微小管和其相連形成紡錘體。而這些微小管是由甲形、乙形小管蛋白(tubulin)形成雙體(dimer)聚合而成。微小管起自於兩側微小管組織中心，另一端則固定於染色體中央節旁的kinetochore。微小管雙體蛋白隨著細胞週期的進行形成聚合物或是分解成雙體。當精子進入卵子受精時，紡錘體會驅動染色體排出第二極體，微小管並接著扮演後續細胞分裂的關鍵角色。紡錘體的排列如果有差錯可能導致染色體散亂，異常受精，停止發育。

卵子在冷凍解凍時，由於溫度及冷凍保護劑等因素，紡錘體會受到傷害。我們先用 ICR 小鼠卵子做

研究，發現較快之玻璃化冷凍方式，可減少傷害時間，從而減低對紡錘體之傷害[2]。同時進一步發現傷害之紡錘體會恢復，而且與解凍後之培養時間有關。經過 3 小時的培養後，紡錘體會恢復至正常（圖 2）。此時再做受精，可提高受精率及胚胎成長能力。前述這些創新之觀念，已為 *Human Reproduction* 雜誌所接受[3]，並獲選為封面，被許多學者引用。 *Molecular and Cellular Endocrinology* 的主編還特別邀請我們撰寫回溯文章(Review article)。

受邀出席國際會議專講及著書

歐洲義大利 Bologna 大學 Porcu 教授，為國際上卵子冷凍最著名之學者，在閱讀過我們發表的系列論文後，特地來函及來電邀請至其所主辦之國際研討會做專題演講，令我們感到非常榮幸。因此於 2005 年 6 月前往歐洲，在會中提出注射 hCG 後 34 小時取卵，36 小時開始冷凍。當病人接受解凍治療時，3 小時後做精子顯微注射受精。整個治療流程深入考慮成熟卵子之生理，兼顧紡錘體恢復，及卵子老化之重點，與會學者均認為此為創新的重要觀念。美國 Liebermann 及 Tucker 教授，主編專書《人工生殖



■圖2：成熟小鼠(mouse)卵子經過冷凍及解凍，置於 37°C 培養箱 3 小時，受傷的紡錘體會回復至正常。染色體規則排列於紡錘體中央。PB：第一極體(first polar body)。

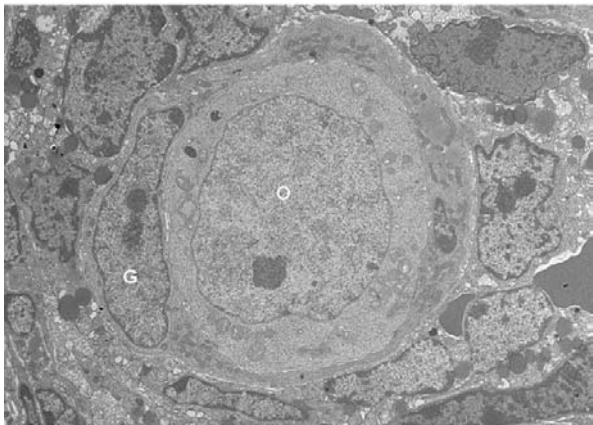


科技玻璃化冷凍)(*Vitrification in Assisted Reproductive Technology*)，也邀請我們負責撰寫卵子冷凍章節，總共7,000字，引用70篇參考文獻當中有7篇是我們發表的。於今年(2007)年3月完成校稿，預計9月出版。

挑戰體積較大的卵巢組織冷凍

在卵子冷凍有明顯成績後，我們進一步進行卵巢組織冷凍的研究。卵巢內有許多早期之卵泡位於表面組織，可受到冷凍保護劑的保護。我們以 C57BL/6J 小鼠卵巢做實驗，發展出創新之玻璃化冷凍，以較低濃度之冷凍保護劑及液態氮直接覆蓋組織，有別於傳統之方法，來加強玻璃化之形成並減少其毒性。在冷凍與解凍後，以電子顯微鏡觀察，發現與新鮮組織接近(圖3)，存活率及懷孕率提高。此外，將黑色小鼠之卵巢冷凍解凍後，植入白色小鼠體內，成功生下黑色幼鼠(圖4)，該論文發表於 *Human Reproduction*[4]，受到編主編評論為重要研究。

臨床應用上，病人接受腹腔鏡手術，取出部分的卵巢組織，加以冷凍保存。等到癌症治療完成後，確定沒有復發的疑慮，再將卵巢組織植入體內。婦



■ 圖3：以創新之玻璃化冷凍方法，小鼠卵巢冷凍與解凍後，電子顯微鏡之觀察與新鮮組織接近。圖中基始卵泡(primitive follicle)中之卵子(O)與周圍之顆粒細胞(G)的細胞膜完整，且粒腺體正常。



■ 圖4：取出母 C57BL/6J 黑色小鼠之卵巢冷凍解凍後，植入母 C57BL/6J-Tyrc-2^{+/+} 白色小鼠體內，再以公黑色小鼠與之交配成功生下黑色幼鼠，證明卵巢經冷凍後仍能存活。

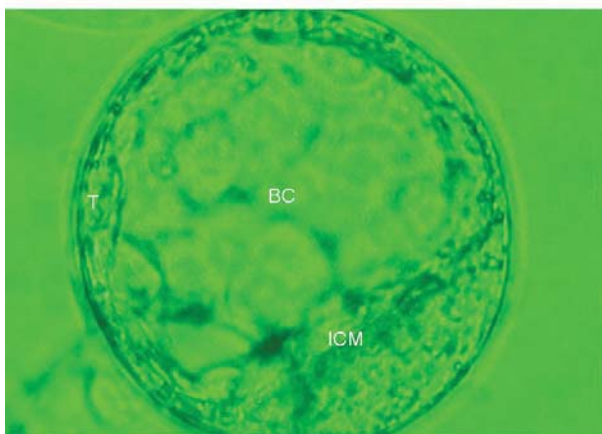
女將可恢復排卵及分泌賀爾蒙功能，有自然受孕之機會。卵巢組織在植入體內後，卵泡存活之比率約50%，其原因主要為無法及時有新生之血管，這方面值得進一步研究改善。

突破囊胚冷凍的困難

由於培養液的改進，使得胚胎可以有較高的比率成長至囊胚期，選擇較好之囊胚可以增加著床率，減少胚胎植入的數目，避免過度的多胞胎。因此當有多餘的囊胚時要如何做好冷凍，就顯得很重要。囊胚有上百個細胞，並且有一囊狀腔室，內有囊胚液(圖5)，所以要做冷凍前之脫水，比早期胚胎困難。我們發展出顯微抽吸囊胚液的技術來幫助脫水，增加冷凍保護劑的作用時間至1.6倍，並且提高冷凍的速度，以減少冰晶的形成。在老鼠的實驗，我們證實了這些論點，研究論文發表於 *Fertility and Sterility*[5]。

結語：持續精進生殖科技

從冷凍基本原理思考不同細胞、組織之差異，提



■ 圖5：囊胚是第五天之胚胎，有上百個細胞，並且有一囊狀腔室(blastocoel, BC)，內有囊胚液。囊胚外層細胞形成滋養層(trophoblast, T)，將發育為胎盤；內有內細胞團(inner cell mass, ICM)，將發育成胎兒。

出可能之解決方法，再進行實驗驗證，讓我們在人工生殖冷凍技術跨進一大步，已建立完整的治療方法：從卵巢、卵子、受精卵、分裂中之胚胎及囊胚，都能穩定地冷凍。冷凍卵子和冷凍胚胎存活率、著床率與懷孕率也很接近。自2001年9月起，我們開始進行人類成熟卵子冷凍保存的計畫，選擇於解凍後3小時實施精子顯微注射，以期讓紡錘體有時間恢復正常。截至目前為止，已有8位病人成功懷孕，研究成果發表於 *Human Reproduction* [6]，廣泛獲得國際學者之肯定。在保存癌症病患的生育能力方面，有15位病患保存卵子，5位保存卵巢組織。我們將持續進行新的生殖科技研究，為病人提高懷孕機會。**【本期本欄策畫／醫學系婦產科黃思誠教授】**

參考文獻：

- [1]Chen SU, Lien YL, Chao KH, Lu HF, Ho HN, Yang YS (2000). Cryopreservation of mature human oocytes by vitrification with ethylene glycol in straws. *Fertil Steril* 74:804-8.
- [2]Chen SU, Lien YL, Chen HF, Chao KH, Ho HN, Yang YS (2000). Open pulled straws for vitrification of mature mouse oocytes preserve patterns of meiotic spindles and chromosomes better than conventional straws. *Hum*

Reprod 15:2598-603.

- [3]Chen SU, Lien YL, Cheng YY, Chen HF, Ho HN, Yang YS (2001). Vitrification of mouse oocytes using closed pulled straws (CPS) achieves a high survival and preserves good patterns of meiotic spindles, compared with conventional straws, open pulled straws (OPS), and grids. *Hum Reprod* 16:2350-6.
- [4]Chen SU, Chien CL, Wu MY, Chen TH, Lai SM, Lin CW, Yang YS (2006). Novel direct cover vitrification for cryopreservation of ovarian tissues increases follicle viability and pregnancy capability in mice. *Hum Reprod* 21:2794-800.
- [5]Chen SU, Lee TH, Lien YL, Tsai YY, Chang LJ, Yang YS (2005). Microsuction of blastocoelic fluid before vitrification increased survival and pregnancy of mouse expanded blastocysts, but pretreatment with the cytoskeletal stabilizer did not increase blastocyst survival. *Fertil Steril* 84, Suppl. 2:1156-62.
- [6]Chen SU, Lien YL, Chen HF, Tsai YY, Chang LJ, Ho HN, Yang YS (2005). Observational clinical follow-up of oocyte cryopreservation using a slow-freezing method with 1,2-propanediol plus sucrose followed by ICSI. *Hum Reprod* 20:1975-80.

陳思原

小檔案

1985年6月畢業於臺大醫學院醫學系，服預官役兩年後，回母校接受並完成四年婦產科住院醫師充實的訓練。由於對探索生命的發生、奧秘充滿興趣，隨即進入生殖醫學研究及臨床領域。在楊友仕教授指導下從事精卵、胚胎顯微操作及冷凍研究。1996年赴美國康乃爾大學進修。在精子顯微注射，協助胚胎孵化，著床前遺傳疾病診斷，核移植，卵子、囊胚、卵巢組織冷凍，均親自操作實驗和指導研究助理。對於動物實驗，基礎研究，臨床應用，都由基本的準備工作開始，磨製顯微操作針、配製培養液、顯微操作、細胞固定、染色。研究精卵之顯微結構、受精之機轉，並創新發展新觀念及技術，發表一系列論文於生殖醫學傑出雜誌 *Fertility and Sterility*、*Human Reproduction*。現為臺大醫學院婦產科副教授及生殖內分泌科主任。與科內同仁通力合作，造福全國許多不孕症夫婦，更有從美國、英國遠渡重洋而來接受治療者，研究成果亦深受國外學者的矚目，紛紛來函索取論文。在團隊的努力下，相信明天會更好，讓臺大在研究與臨床服務均能成為世界一流之生殖醫學中心。

圖為陳思原教授與美麗的妻子和一對可愛的雙胞胎女兒，在日本雪地中留影。

