

# 自然卵巢和人工卵巢保存生育力的研究进展

申敬<sup>1,2,3</sup>, 李维杰<sup>1,2,3</sup>, 谭佳<sup>1,2,3</sup>, 夏春宇<sup>1</sup>, 王建信<sup>4</sup>, 周新丽<sup>1,2,3\*</sup>

- 1 上海理工大学生物系统热科学研究所, 上海 200093
- 2 上海市生物资源低温保存技术服务平台, 上海 200093
- 3 上海市肿瘤能量治疗技术与器械协同创新中心, 上海 200093
- 4 上海原能细胞生物低温设备有限公司, 上海 201203

申敬, 李维杰, 谭佳, 夏春宇, 王建信, 周新丽. 自然卵巢和人工卵巢保存生育力的研究进展[J]. 生物工程学报, 2024, 40(5): 1469-1485.

SHEN Jing, LI Weijie, TAN Jia, XIA Chunyu, WANG Jianxin, ZHOU Xinli. Fertility preservation through natural and artificial ovaries: a review[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(5): 1469-1485.

**摘 要:** 卵巢组织冷冻保存(ovarian tissue cryopreservation, OTC)是青春期前女性和需要立即化疗的年轻女性保存生育力的唯一选择。卵巢组织移植已被证明可以恢复激素周期和生育能力。对于某些类型的癌症患者, 卵巢组织冷冻后移植有将恶性细胞和移植组织一起重新植入的风险。因此, 人工卵巢作为一种创新的互补方案, 能够实现离体卵泡正常发育、卵母细胞成熟和排卵, 可以部分恢复内分泌的功能。文中总结了自然卵巢组织保存生育力的方法, 主要包括卵巢组织慢速冷冻、玻璃化冷冻, 以及水凝胶包封卵巢组织。同时对于人工卵巢组织保存生育力进行综述, 主要包括水凝胶包封卵泡、支架构建卵巢微组织和 3D 打印的工程策略。最后对于卵巢组织保存生育力目前面临的问题和挑战进行分析, 并展望了未来的发展趋势, 为卵巢组织生育力保存的应用提供参考。

**关键词:** 生育力保存; 卵巢组织; 冷冻保存; 卵泡发育; 人工卵巢

资助项目: 上海市肿瘤能量治疗技术与器械协同创新中心

This work was supported by the Shanghai Co-innovation Center for Tumor Treatment with Energy.

\*Corresponding author. E-mail: zjulily@163.com

Received: 2023-09-24; Accepted: 2023-12-19

# Fertility preservation through natural and artificial ovaries: a review

SHEN Jing<sup>1,2,3</sup>, LI Weijie<sup>1,2,3</sup>, TAN Jia<sup>1,2,3</sup>, XIA Chunyu<sup>1</sup>, WANG Jianxin<sup>4</sup>, ZHOU Xinli<sup>1,2,3\*</sup>

1 Institute of Biothermal Science and Technology, University of Shanghai for Science and Technology, Shanghai 200093, China

2 Shanghai Technical Service Platform for Cryopreservation of Biological Resources, Shanghai 200093, China

3 Shanghai Co-Innovation Center for Tumor Treatment with Energy, Shanghai 200093, China

4 Shanghai Origincell Biological Cryo Equipment Company Limited, Shanghai 201203, China

**Abstract:** Ovarian tissue cryopreservation (OTC) is currently the exclusive choice for preserving fertility in both young girls before reaching puberty and young women who require immediate chemotherapy. Ovarian tissue transplantation has proven to be effective in restoring hormonal cycles and fertility. However, in certain cancer cases, there is a potential risk of inadvertently reintroducing malignant cells when transplanting cryopreserved ovarian tissue. Therefore, the use of an artificial ovary as an innovative and complementary approach allows for the development of isolated follicles, facilitates oocyte maturation and ovulation, and can partially restore endocrine function. This paper presents a comprehensive overview of techniques used to preserve fertility in natural ovarian tissues, including slow freezing, vitrification and hydrogel encapsulation methods. Additionally, it reviews fertility preservation techniques for artificial ovarian tissues, such as strategies involving hydrogel-encapsulated follicle, scaffolding for constructing ovarian microtissues, and 3D printing engineering. Lastly, this article explores current challenges and difficulties encountered in preserving ovarian tissue fertility, while also anticipating future trends in development, making it a valuable reference for the implementation of ovarian tissue fertility preservation.

**Keywords:** fertility preservation; ovarian tissue; cryopreservation; follicular development; artificial ovaries

女性生殖系统的功能可因各种先天性缺陷或后天因素而永久丧失,从而导致不育。目前女性生育力保存的方法主要包括激素治疗恢复卵巢功能、卵母细胞/胚胎的冷冻保存、卵巢组织冷冻(ovarian tissue cryopreservation, OTC)及相关衍生技术如卵母细胞体外成熟(*in vitro* maturation, IVM)、卵泡培养构建人工卵巢等。

中国每年新发恶性肿瘤患者 450 多万例,其中超过 78% 的年轻肿瘤患者有生育需求<sup>[1]</sup>。对于年轻的肿瘤患者,化学疗法和放射疗法对卵巢有毒性作用,可能会导致不育和卵巢功能衰竭。卵巢组织冻存适用于肿瘤、非肿瘤性疾病患者的生

育力与卵巢内分泌功能的保护,最适应人群是青春期前患者、性腺毒性治疗无法延迟的患者以及激素依赖性肿瘤的患者。此外,女性卵泡的数量会随着时间的推移而大量减少,因此,想要推迟生育的女性随着年龄增加,不孕不育的风险将会增大。通过冷冻保存包含健康卵泡的卵巢组织在未来用于原位移植,也是保护女性生育力的重要方法。在过去的几十年里,卵巢组织冷冻保存和自体移植已经越来越多地应用于保存生育力,根据 Trapphoff 等<sup>[2]</sup>的统计,全球已有 200 多名婴儿通过卵巢冷冻保存和移植出生。

然而,对于临床检查已经明确有卵巢转移或

者卵巢恶性肿瘤患者,以及卵巢功能彻底衰退患者,无法进行卵巢组织冷冻保存后移植。根据恶性肿瘤卵巢转移风险<sup>[1,3]</sup>,对于卵巢恶性肿瘤或由于其他恶性肿瘤向卵巢转移的风险为中风险及以上的肿瘤患者,移植时应充分讨论评估。为了应对这种问题,研究人员一直寻找替代方法,使用分离的卵泡和卵巢上皮细胞构建人工卵巢,使其在移植的早期阶段充当细胞外基质,并执行内分泌功能,促进卵泡发育并暂时或者永久地替代自然卵巢<sup>[4]</sup>。3D 打印和卵泡包封构建卵巢微组织等组织工程学的进步成为一种用于精确模拟正常组织的转化策略,包括物理结构、血管化以及分子和细胞的空间分布等。尽管自然卵巢结构复杂,但是在使用各种生物材料修复或替代生

殖组织方面也取得了一些进展。

本文综述了自然卵巢和人工卵巢保存生育力的研究进展。如图 1 所示,总结了自然卵巢和人工卵巢保存生育力的策略和基本流程。自然卵巢保存生育力的方法主要包括慢速冷冻、玻璃化冷冻和卵巢组织包封后移植等。制备人工卵巢的先进的工程策略,包括卵泡包封和支架构建人工卵巢微组织、3D 打印等。其中,卵泡包封主要是使用天然或合成的水凝胶材料进行包封;支架材料主要包括脱细胞支架、天然支架和合成支架;3D 打印包括载细胞打印和打印支架后种植细胞。最后,总结概括了卵巢组织保存生育力的挑战和未来展望,以促进卵巢组织保存在生育力保存领域的蓬勃发展。

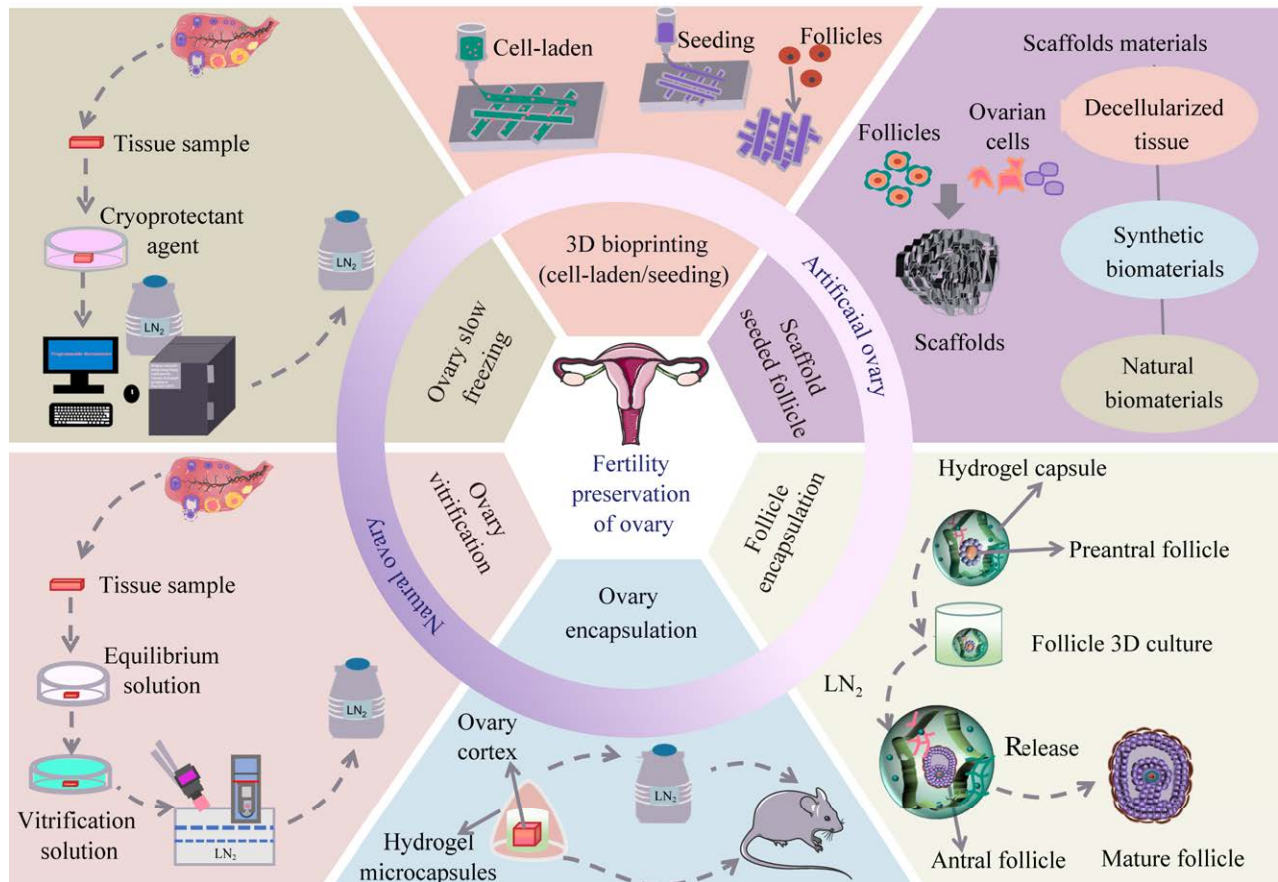


图 1 卵巢组织保存生育力的策略

Figure 1 Strategies for preserving fertility in ovarian tissue.

# 1 卵巢组织的结构和生物力学特性

## 1.1 卵巢组织的结构

卵巢是女性生殖系统中最重要器官之一，它产生卵母细胞，发挥内分泌的功能。女性刚出生时卵巢中就有数百万个原始卵泡，它们是孕育卵子的场所，每个卵泡内有初级卵母细胞，初级卵母细胞发育成熟后就是卵子。图 2 为卵巢结构示意图以及卵巢卵泡的发育过程。卵巢组织从外到内主要由 4 层组成，分别为：卵巢表面的单层立方上皮，即生发上皮，这层上皮下面是由胶原蛋白组成的结缔组织称为白膜，白膜下包含浅层的皮质和深层的髓质两部分。皮质是卵巢的主体部分，主要由卵巢的功能单位卵巢卵泡构成，还包含有结缔组织构成的基质，排卵后形成的黄体白体等。髓质是指卵巢深部有许多血管、淋巴管和神经分布的部位，由疏松结缔组织构成。皮质和髓质没有明显的分界。卵巢组织特殊的生理结构为卵母细胞的存活和发育

提供了条件。

## 1.2 卵巢组织的生物力学特性

卵巢中胶原蛋白的含量从外部皮质到内部髓质逐渐降低。皮质中富含的胶原纤维呈放射状排列，因此在机械性能方面相对较硬<sup>[5]</sup>。髓质是由各向异性胶原纤维组成的多孔结构，有较弱的机械性能。早期的卵泡在坚硬的皮层中生长和发育，随着进一步的发育，卵泡向更柔软的髓质层移动并扩张<sup>[6]</sup>。卵巢的刚性梯度对于卵母细胞的存储、卵泡的存活发育至关重要。

近年来，结合先前发现的垂体激素、类固醇激素和生长因子等因素，研究发现卵巢的生物力学特性是调节卵泡生长的关键<sup>[7]</sup>。越来越多的证据表明，机械环境可以促进或者抑制卵泡的生长，而其中的机械环境又由激素或者生长因子控制<sup>[8]</sup>。Hopkins 等<sup>[5]</sup>使用原子力显微镜(atomic force microscopy, AFM)球形探针压痕技术绘制和量化了小鼠卵巢的力学微环境，发现卵巢是一种相当软的组织，与脂肪或者肾脏相当，组织硬度的总体范围为 0.5–10 kPa (图 3)。通过与免疫组化图

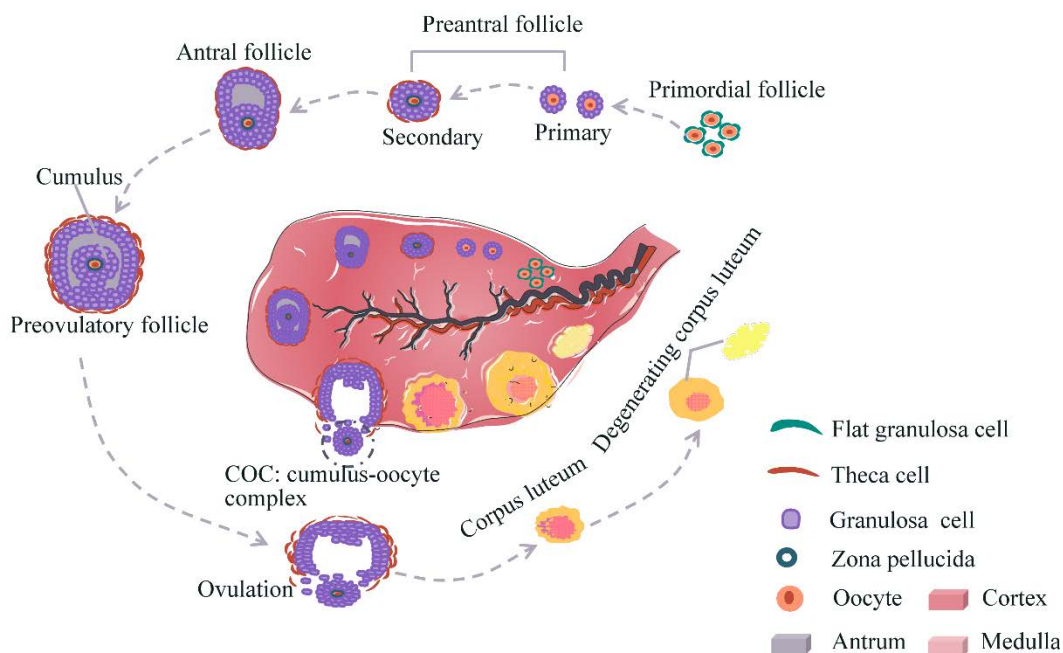


图 2 卵巢的结构和卵泡发育

Figure 2 Structure of the ovary and follicular development.

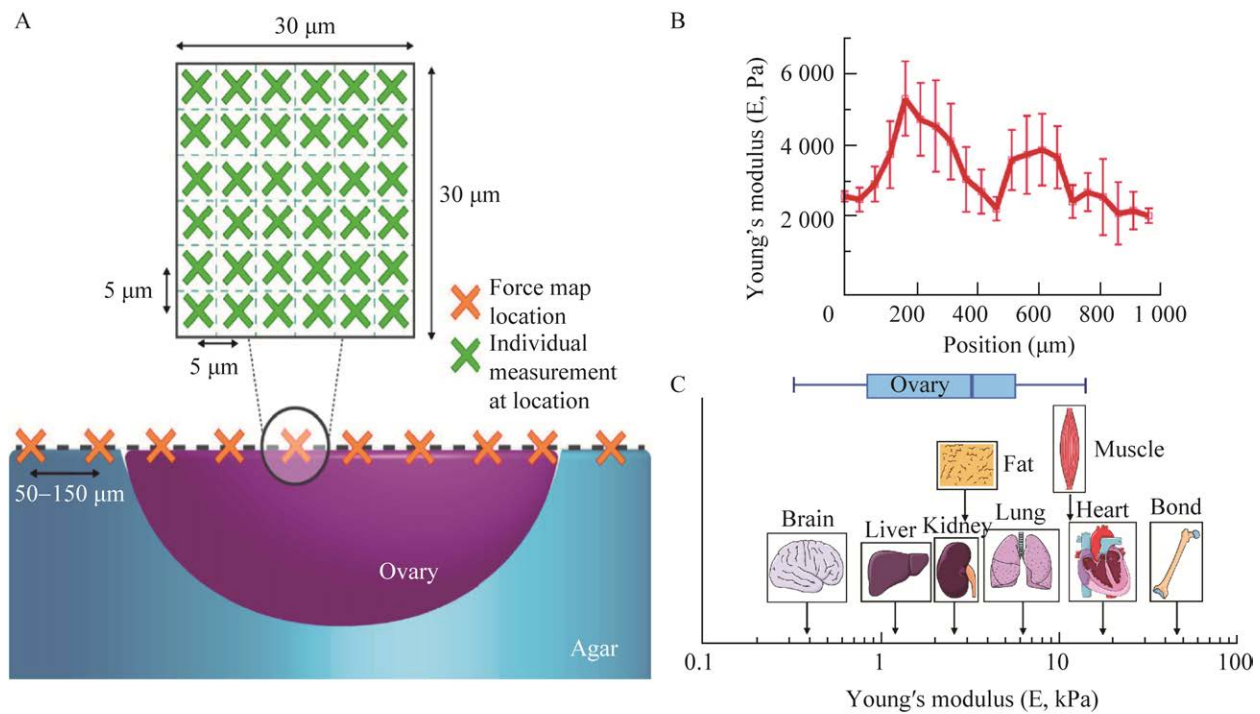


图3 利用 AFM 球形探针压痕技术绘制和量化小鼠卵巢力学微环境<sup>[5]</sup>

Figure 3 Measuring the mechanical properties of the ovarian microenvironment by AFM<sup>[5]</sup>. A: Schematic of indentation line-scan. B: Averaged line-stiffness profile of ovaries ( $n=6$ ). C: The measured stiffness of the ovary placed in the context of other mouse tissues.

像相比较，确认了卵巢的边缘和中心硬度较低，其余以卵泡为主导的皮质区域硬度最高。

## 2 自然卵巢保存生育力

### 2.1 卵巢组织冷冻保存

OTC 与卵巢组织移植 (ovarian tissue transplantation, OTT) 技术是指患者在性腺毒性治疗之前通过手术取出部分卵巢组织(一般为双侧各 1/2 的卵巢组织<sup>[9]</sup>)冷冻并保存在低于  $-190\text{ }^{\circ}\text{C}$  的液氮或液氮蒸气中，待患者痊愈且卵巢功能衰竭时再将冻存的卵巢组织复苏移植回体内。

#### 2.1.1 卵巢组织慢速冷冻

慢速冷冻是一种相对高效、简便的 OTC 技术，是目前最常用的标准卵巢组织冷冻保存方法<sup>[10]</sup>。慢速冷冻的优点是能够较好地保存卵巢

皮质中的始基细胞，卵巢组织复苏后，不影响其激素分泌功能。但该方法需要昂贵的冷冻仪器，操作复杂，耗时较长，存在结晶造成膜损伤的风险。1994 年，Gosden 等<sup>[11]</sup>首次使用卵巢组织保存技术恢复了去势绵羊的卵巢功能。有羔羊出生且在 2 年的时间内维持了卵巢的功能。全球首例人冻融卵巢组织于 2000 年成功实现原位移植<sup>[12]</sup>，2001 年成功实现人卵巢皮质异位移植<sup>[13]</sup>。2004 年，卵巢组织冷冻保存和移植 (ovarian tissue cryopreservation and transplantation, OTCT) 技术在人类第 1 例活产出世<sup>[14]</sup>。2005 年第 2 例出生<sup>[15]</sup>。迄今为止，全球数以千计的女性接受了卵巢组织冻存，卵巢组织冻存移植程序在欧洲应用广泛，特别是比利时、丹麦、法国、德国和西班牙。德国、瑞士和奥地利在内的国家合作网络“Fertiprotekt”是最大的卵巢组织冻存移植数据

库之一<sup>[16]</sup>。

### 2.1.2 卵巢组织玻璃化冷冻

玻璃化的主要特点为通过将细胞从液体状态快速转变为玻璃态避免冰晶形成和细胞内冰晶的损伤。玻璃化冷冻通常使用两种或多种低温保护剂(cryoprotectant agents, CPA)的组合,且配合冷冻载体减小样本及 CPA 体积,以减小 CPA 对细胞的毒性作用。为了减小 CPA 的体积,研究者们使用了各种方法和工具,例如固体表面玻璃化法(solid-surface vitrification, SSV)、微滴法、麦管法等<sup>[17]</sup>。此外,一项通过浆态氮玻璃化卵巢组织的方案发现卵泡的活力、结构和基质细胞的完整性都有很好的结果,该方法提高了冷却速率并降低了“莱顿弗罗斯特效应”<sup>[18]</sup>。在全球 200 多例通过卵巢组织冻存技术诞生的婴儿中,使用玻璃化技术冷冻卵巢组织的有 5 例妊娠和 2 例活产<sup>[19]</sup>。

关于慢速冷冻和玻璃化冷冻卵巢组织的组织病理学和形态学差异的研究有相矛盾的结论。Behl 等<sup>[20]</sup>研究发现,与慢速冷冻相比,玻璃化冷冻的基质细胞完整性、卵泡数量和质量更佳,细胞凋亡程度更轻。Lee 等<sup>[21]</sup>得出相反的结论,表明慢速冷冻在原始卵泡保存、卵泡颗粒细胞增殖、血管生成、抗缪勒氏管激素分泌和 DNA 损伤等方面均优于玻璃化冷冻。但大多数研究表明两种冷冻方法卵泡形态、分布和活力没有显著性差异<sup>[10,22]</sup>。一般来说,两种冷冻方法研究结果的差异可以归因于卵巢组织切片的大小、用于冷冻的 CPA 种类及浓度、CPA 的添加顺序和时间、慢速冷却速率和温度梯度,以及所使用的复温方法等<sup>[20]</sup>。对于卵泡保存、基质细胞完整性以及 DNA 损伤等方面,目前尚未就慢速冷冻和玻璃化保存方案中哪一种方法更优越达成一致意见。

### 2.1.3 卵巢组织冷冻保存尺寸对移植结果的影响

卵巢组织冷冻可以通过 2 种方式进行,常见的是保存卵巢皮质碎片,另一种是全卵巢保存。卵巢皮质碎片冷冻保存一般是将卵巢组织去除髓质,保留皮质,获得厚度约 1 mm,大小为 4 mm×8 mm 的皮质片后进行冷冻保存<sup>[23]</sup>,但目前尚无卵巢组织冷冻保存前处理的标准化方法。有学者统计了世界各地的卵巢组织冷冻保存的尺寸以及移植后的结果,统计结果发现冷冻保存的卵巢组织被加工成条状( $n=51$ )、碎片( $n=37$ )、方块状( $n=4$ ),妊娠率分别为 81.3%、45.5%、66.7%,活产率分别为 56.3%、18.2%、66.7%。卵巢移植到卵巢激素恢复的平均时间为 3.88、3.56、3 个月。卵巢功能恢复时间和卵巢组织大小无显著性差异<sup>[24]</sup>。但此项研究仅包含了慢速冷冻,且碎片与方块状的研究数据相对较少,还需要更多的数据确定更合适的卵巢组织处理方案。

卵巢皮质移植是唯一获得美国生殖医学会批准的手术,但它存在一个主要的问题是卵巢皮质无血管移植后由于长时间缺血会导致严重的卵泡损伤。全卵巢移植可以通过血管吻合迅速实现血运重建,显著降低缺血性损伤的风险<sup>[25]</sup>。然而,冷冻保存完整的卵巢具有挑战性,首先整个卵巢取材手术和冻融后实施功能性血管再吻合存在挑战,其次,难以在大的组织块中渗透足量的 CPA,并且血管中冰结晶可能会造成损伤。全卵巢冷冻保存和移植已经在多项实验动物中成功实现<sup>[26]</sup>。Zhang 等<sup>[27]</sup>报道,全卵巢组织玻璃化冷冻优于常规冷冻和快速冷冻,传统的卵巢皮质条缓慢冷冻优于任何方式的全卵巢冷冻保存。

## 2.2 水凝胶包封卵巢组织

组织碎片封装将组织固定在生物材料中,允许营养物质、氧气和废物的双向扩散,从而促进细胞相互作用。常用的包封材料为水凝胶,天然

水凝胶的两大类主要是蛋白质(胶原、明胶、纤维蛋白原等)和多糖(海藻酸盐、葡聚糖、糖胺聚糖等),合成水凝胶主要为饱和脂肪族聚酯,用于包封的常见的合成聚合物为聚乳酸(poly-lactic acid, PLA)、聚羟基乙酸(polyglycolide acid, PGA)、聚乙二醇(polyethylene glycol, PEG)和聚己内酯(poly-ε-caprolactone, PCL)等。

众多研究者们使用水凝胶添加不同生长因子包封卵巢组织后进行移植,发现可以加速血运重建和功能性血管的生成。例如,有团队将冻融后的绵羊卵巢皮质包封在含有血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)的胶原基质中,并异种移植到免疫缺陷小鼠的卵巢中,发现在移植后 3 d 即可改善卵巢移植血管的生成,显著增加小鼠卵巢血管密度,更早地实现移植物的血运重建等<sup>[28]</sup>。2011 年,Shikanov 等<sup>[29]</sup>将小鼠卵巢封装在含有肝素结合肽和

VEGF<sub>168</sub> 的水凝胶中,同种原位移植到去势的小鼠体内,发现移植的卵巢移植植物在 3 周时进行了血管化,且后期产下了健康自然受孕的幼崽(图 4)。此后该团队进行了多项水凝胶包封卵巢组织的研究。在进行小鼠内分泌功能恢复研究时,制备了双层聚乙二醇水凝胶(PEG-Dual),包含可蛋白水解的核心和不可水解的外壳,研究发现所制备的 PEG-Dual 可以减少免疫反应,允许营养物质和代谢物质自由扩散<sup>[30]</sup>。将卵巢组织和 4T1 癌细胞共同封装在 PEG-Dual 中,移入小鼠背部皮下,发现加快了移植植物血运重建,并且可以避免组织移植后癌细胞的扩散等<sup>[31]</sup>。Thuwanut 等<sup>[32]</sup>将猫卵巢包封在不同浓度的纤维蛋白原中,之后进行慢速冷冻或者玻璃化,发现水凝胶封装可以促进卵泡存活和卵泡发育。目前,对水凝胶包封是否有利于卵巢组织的冷冻保存尚未见报道。

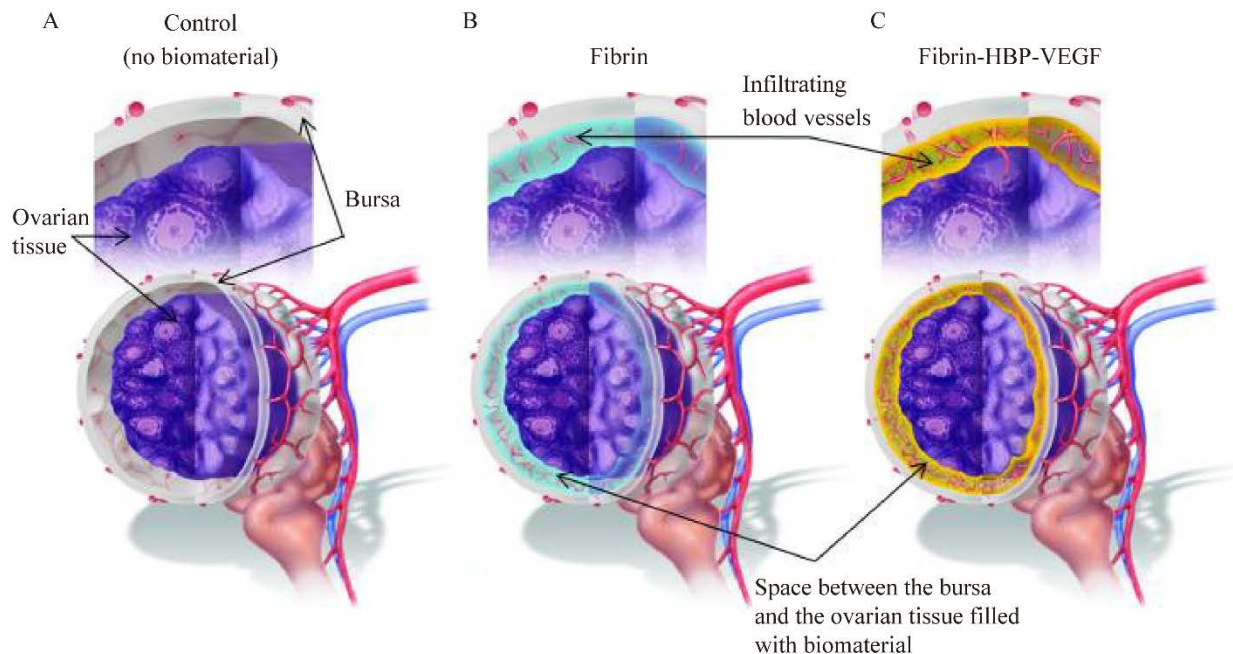


图 4 小鼠卵巢封装效果示意图<sup>[29]</sup>

Figure 4 Schematic diagram of mice ovarian encapsulation<sup>[29]</sup>. A: Ovarian tissue transplanted into the bursal cavity lacks spatial connectivity with the host. B: Encapsulating ovarian tissue in degradable fibrin enables physical connectivity. C: Controlled release of VEGF promotes revascularization.

### 2.3 冻融卵巢组织移植及血运重建

OTCT 在女性生育力保存方面的作用与移植寿命长短有关。目前, OTCT 的移植物的寿命预计为 2–5 年<sup>[33]</sup>。卵巢移植组织的寿命长短取决于多种因素, 包括组织制备过程的卵泡损失、低温损伤、移植的时间和位置、手术技术及最关键的术后的血运重建等<sup>[34]</sup>。

#### 2.3.1 改善卵巢组织移植后的卵泡生成

Cacciottola 等<sup>[35]</sup>报道, 冷冻保存后卵泡损失约占整个卵巢储备的 50%–90%。血运重建的延迟导致移植缺血是卵泡过早耗竭的主要原因。有研究发现, 冷冻保存会对卵泡各细胞造成不利的影响, 这会导致卵泡中卵母细胞和颗粒细胞的成熟不同步、卵泡功能紊乱、冻融的卵巢组织出现空卵泡综合征, 从而会缩短移植物的寿命<sup>[20,34,36]</sup>。根据 Andersen 等的统计, 在接受冻融的卵巢组织移植的女性中, 空卵泡率在 23%–35%之间<sup>[37]</sup>。通过添加生长因子、使用生物相容性支架或利用水凝胶包封卵巢解决卵泡大规模丢失的问题, 这可以促进冻融卵巢移植中的血管再生, 还可以在异位异种移植中构建卵泡存活所需要的环境, 减少移植组织的损伤<sup>[38]</sup>。

#### 2.3.2 卵巢移植物的缺氧和氧化应激

卵巢移植成功率较低可能是由于冷冻保存和/或移植后缺血再灌注诱导的卵泡损伤<sup>[39]</sup>。低温保存过程的任何步骤都有可能产生氧化损伤, 其中产生的活性氧可能会影响许多细胞内的信号通路, 如转录因子、蛋白激酶、蛋白磷酸酶等<sup>[40]</sup>。研究人员尝试通过抗氧化剂促进血管生成, 减轻氧化损伤, 解决低温保存或缺血再灌注导致的卵泡损失问题, 提高卵巢组织低温保存移植的成功率<sup>[34]</sup>。抗氧化剂, 如白藜芦醇、褪黑素、维生素、Trolox 和过氧化氢酶等, 可以减轻不同类型细胞和组织低温过程中受到的损伤, 有利于冻融卵巢组织的移植<sup>[40-41]</sup>。

### 2.4 自然卵巢面临的挑战和对策

OTCT 已经成为女性生育力保存的重要部分, 尽管 OTCT 取得了很大的成功, 但仍然存在一些问题与挑战, 例如卵泡的大规模丢失和移植缺血再灌注造成的氧化损伤等。在移植完全的血运重建以前, 卵巢组织移植的无血管性质导致 50%–90%的卵泡丢失<sup>[33]</sup>。移植组织血管重建导致初始缺血期间大量卵泡丢失是卵巢组织移植的关键挑战<sup>[34]</sup>。在卵巢组织移植的过程中, 根据血运重建的时间, 缺氧期可持续长达 7 d<sup>[35]</sup>, 因此通过加快血运重建和减少氧化应激来减轻组织移植后的缺血再灌注损伤是解决大量卵泡丢失的一种有希望的策略。

## 3 人工卵巢保存生育力

人工卵巢(artificial ovary, AO)是指将卵巢中的卵泡、卵巢基质细胞等在体外构建的类卵巢结构微组织。为了制备人工卵巢, 必须设计一个类似于自然卵巢的环境来促进卵泡的存活和生长。人工卵巢主要由 3 部分组成, 完整的卵泡、卵巢基质细胞和支持细胞生长和组织发育的生物材料。在材料方面, 人工卵巢需要满足以下要求: (1) 绿色无毒: 材料能够长期维持细胞的活力, 使得卵泡和周围的卵巢细胞可以进行正常的物质交换, 卵泡得以生存和发展; (2) 适当的弹性: 根据自然卵巢的机械异质性以及卵泡的发育规律, 人工卵巢的材料必须具有适当的力学性能和降解率, 以适应卵泡体积的增大, 并为其球形的形态学维持提供足够的支持, 以防止卵母细胞的脱落; (3) 适当的降解速率: 该材料需要在适当的时间释放适当浓度的生长因子、激素、转铁蛋白和胰岛素等<sup>[4]</sup>。

### 3.1 卵泡包封构建人工卵巢

#### 3.1.1 水凝胶封装卵泡构建人工卵巢

卵巢的结构由细胞外基质、血管、卵泡和



卵巢细胞组成。能够促进卵母细胞的发育和释放, 恢复生殖激素的分泌和释放的仿生卵泡的研发已经成为制备人工卵巢的重要突破。传统的二维(2-dimensional, 2D)培养破坏了卵母细胞与周围基质细胞之间密切的相互作用, 从而限制了卵泡发育到窦卵泡, 降低了卵泡的存活率。目前, 制造人工卵巢的传统方法是将卵泡包裹在血浆凝块、合成水凝胶或天然水凝胶(如胶原蛋白、纤维蛋白、藻酸盐)中<sup>[4,42]</sup>。具有三维

(3-dimensional, 3D)结构的水凝胶能够模拟体内的细胞外基质的结构, 为封装的细胞提供机械支持, 并通过被动扩散实现氧气、营养物质和代谢产物的交换, 维持卵母细胞与基质细胞之间的信号传递, 促进原始卵泡发育为窦卵泡, 促进卵母细胞成熟和排卵。水凝胶封装卵泡构建人工卵巢可能会成为制备人工卵巢的主要方法。几种制备人工卵巢常见的水凝胶材料及应用如表 1 所示。

表 1 人工卵巢常用生物材料的优劣势和应用策略

Table 1 Advantages, limitations and application strategies of biomaterials in artificial ovaries

Type of biomaterial	Advantages	Limitations	Strategies	References
Natural				
Alginate	Has good biocompatibility, biodegradability, nontoxicity and nonimmunity	Not readily degradable, may disrupt spindle assemble during oocyte meiosis	Alginate solution forms a gel in the presence of $Ca^{2+}$ . The hardness of alginate can be regulated by altering its composition or concentration	[43]
Silk fibroin (SF)	High mechanical strength, enzymatically degradable, biocompatibility, and stability	Lack of biological functions	The kinetics of RSF hydrogel gelation can be modified by adjusting pH, temperature, and protein concentration	[44]
Fibrin protein	Good biological activity, good biocompatibility, enriched bio-factors, easy crosslinking with different angiogenic factors	Rapid degradability, low elastic modulus, risk of pathogen contamination, and immunoreaction	Increasing the concentration of fibrinogen and thrombin or incorporating other natural or synthetic polymers can regulate degradability and stiffness	[45]
Gelatin	Good physical and chemical properties, good biocompatibility, no toxicity, biodegradability	Lack of structural integrity, rapid dissolution and melting	Enhanced structural stability can be achieved through cross-linking, modification, or utilization as a material for 3D printing	[46]
Collagen	High biocompatibility, high water content, low immunogenicity, high flexibility and tensile strength, good biodegradability, porosity and permeability	Lack of mechanical strength and structural stability, opacity, rapid degradation rate, high shrinkage	Significantly enhancing the mechanical and biological stability of collagen hydrogels by crosslinking collagen with other materials like chitosan, alginate, or fibrin	[47]
Agarose	Good biological safety and degradability, reversible temperature-sensitive gelling	Unitary structural composition, unable to adapt to complex biological environments	Altering agarose into diverse forms through physical, biological, and chemical modifications	[48]

(待续)

(续表 1)

Type of biomaterial	Advantages	Limitations	Strategies	References
Acellular ovarian matrix	No toxicity, excellent biocompatibility, provides structural support for cell growth, allows cellular migration, and serves as a repository of several growth factors	Decellularization approach has some limitations	Improved decellularization protocols, improved mechanical properties, and a controlled degradation rate	[49]
Hyaluronic acid (HA)	Good biocompatibility, biodegradability, remarkable biological activity, water-retention, and non-immunogenic properties	Rapid degradation and high solubility in water, poor mechanical properties and lack of pores	Better mechanical properties and more stable by combining with other biomaterials	[50]
Chitosan (CS)	Good biocompatibility, cytocompatibility, no immunogenicity, excellent biodegradability, antibacterial, antioxidant and anti-inflammatory bioactivities	Poor mechanical properties, rapid degradation, limited solubility in at physiological pH, and low stability	Forms hydrogels by cross-linking with enzymes and changes viscoelasticity by adjusting the concentration of each component	[51]
Plasma clots	High biocompatibility and rich in growth factors	Easily degradable and inconsistent composition lead to greater follicle loss	Finding alternative natural materials or combining with other materials for more stable performance	[42]
Synthetic				
Polyethylene glycol (PEG)	Harmless to follicles, biocompatible and can be produced in large uniform quantities and have a long shelf life	Inert nature and low cellular interaction	Altering the composition of PEG hydrogel by incorporating natural polymers like fibrin or crosslinking it with ECM-derived peptides	[52]
Poly-ε-caprolactone (PCL)	High biocompatibility, strength, and good mechanical properties, non-toxic, slow degradation rate	Hydrophobic surface impairs cell adhesion, low cell affinity, and slow degradation rate	Enhancing bioactivity through approaches like combining with other biomaterials (e.g., gelatin), copolymerization, surface functionalization, or blend formulation	[53]
Polypropylene (PP)	High porosity, no toxicity, chemical inertness, satisfactory biocompatibility and biostability	Degradable by ultraviolet (UV) rays and high thermal expansion	Achieving crosslinking with biomaterials or bioactive molecules	[54]
Polyglycolide acid (PGA)	Good biocompatibility, biodegradability, no toxicity, and low solubility in organic solvents, high malleability	Easily degradable, weak performance for cell adhesion and proliferation	Changing performance through innovative production processes	[54-55]
SFX-1	Easy encapsulation and retrieval of follicles, thermo-sensitivity, good degradability, low toxicity, and pH sensitivity	Low mechanical strength, low degradability	Extending follicle culture by incorporating defined extracellular components and recombinant growth factors into SFX-1	[56]

### 3.1.2 微流控封装及体外培养卵泡

由于卵巢的机械异质性以及氧气和营养物质的穿透长度小于  $200\ \mu\text{m}$  的特性, 微流体芯片也被用于体外培养卵泡<sup>[57]</sup>。Choi 等<sup>[58]</sup>开发了一种微流体微囊化技术, 设计了仿生卵巢微组织, 揭示了卵巢的机械异质性在调节卵泡发育和排卵中的关键作用。He<sup>[59]</sup>开发了一种非平面聚二甲基硅氧烷(polydimethylsiloxane, PDMS)微流体装置(图 5), 用于将鹿鼠早期窦前卵泡封装在核壳微胶囊中, 用 2% 的海藻酸盐作为外壳模拟卵巢皮质, 0.5% 的胶原蛋白作为核心模拟髓质组织, 以生成仿生卵巢微组织, 将卵巢微组织在细胞培养板中培养 9 d 后发现卵巢卵泡发育到窦卵泡。Aziz 等<sup>[60]</sup>设计了微流控芯片培养单个人类窦前卵泡, 首先将卵巢卵泡封装在海藻酸钙水凝胶珠中, 然后在芯片中进行培养, 结果表明芯片上培养的卵泡与传统培养皿中培养的卵泡有

相似的激素分泌趋势和卵泡生长情况。微流控装置的单卵泡培养非常重要, 因为女性 1 个月经周期只有 1 个卵泡达到成熟阶段, 而体外培养系统中的多卵泡培养可能存在相互作用对结果产生影响<sup>[61]</sup>。微流控芯片平台的另一个优势是动态培养微组织, Xiao 等<sup>[57]</sup>使用 Solo-MFP 和 Duet-MFP 微流体系统体外培养小鼠卵巢组织, 结果表明卵巢卵泡产生了 28 d 月经周期激素谱。Babaliari 等<sup>[62]</sup>综述了微流控系统允许细胞共培养, 可以在微流控体系中添加或去除所需的物质, 如生长因子或性激素, 也可以及时输送氧气和营养物质并清除废物。此外, 微流体平台可以复制细胞相关的生物力学环境, 模拟卵泡在卵巢中的机械异质的发育环境。He<sup>[59]</sup>利用微流体封装卵泡构建仿生卵巢微组织, 这对提高体外培养卵泡的质量、了解卵泡发育和排卵机制具有重要意义。

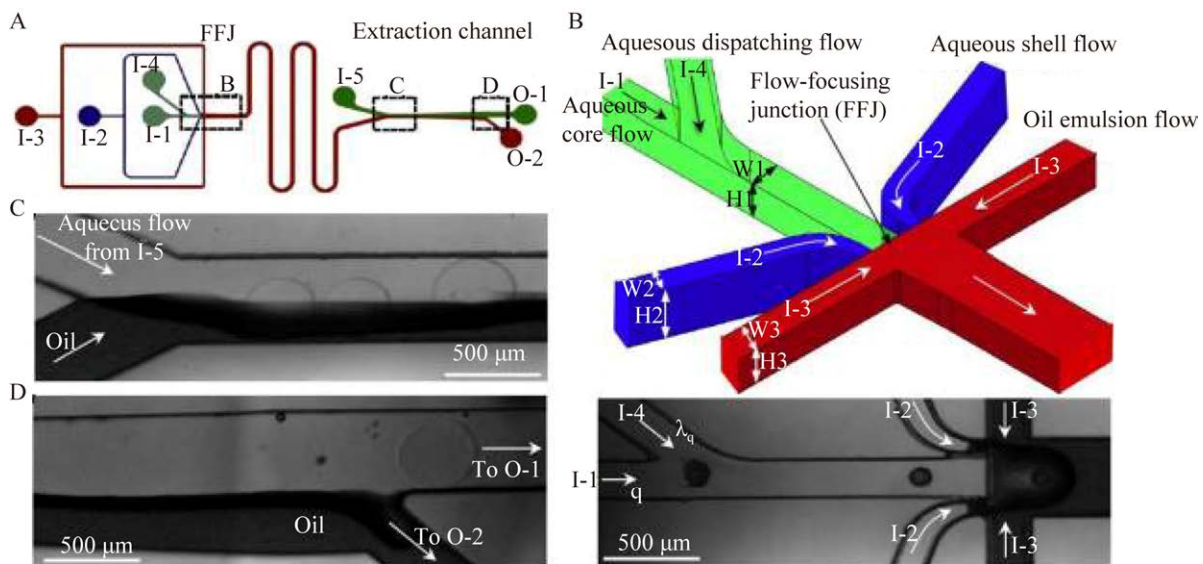


图 5 微流体系统构建仿生卵巢微组织<sup>[59]</sup>

Figure 5 Microfluidic fabrication of biomimetic ovarian microtissue<sup>[59]</sup>. A: A schematic top view of the microchannel system. B: The corresponding real image (top view) of the flow-focusing junction. C: Image of the extraction channel at its entrance. D: Image of the extraction channel at its end. The symbol  $q$  represents the flow rate of the aqueous core flow of sodium alginate.

### 3.2 支架种植卵泡构建人工卵巢

在人工卵巢微环境中,卵泡应该可以适当生长和成熟,以实现全面发育。局部微观结构还应该包括互连的孔使细胞能够存活和生长。合成或天然材料都具有允许卵巢结构重建和细胞增殖/发育的特性,然而通过直接封装卵泡无法完全模拟卵巢的空间分布、血管化或机械特性。在过去的10年,由天然或者合成材料制成的3D支架已成为女性生育力保存的一种工具。

#### 3.2.1 脱细胞支架

脱细胞基质(decellularized extracellular matrix, dECM)旨在去除引起免疫排斥反应的细胞,保留原组织结构和成分。由于其与原有的组织器官有相似的结构和成分,使得其构造的人工器官更接近自然器官,已成为一种很有前景的生物医学材料<sup>[63]</sup>。Laronda等<sup>[64]</sup>2015年首次成功构建了牛卵巢脱细胞支架,并将小鼠原始卵泡接种到支架上构建人工卵巢。所构建的人工卵巢在体外培养发现可以产生雌二醇,并可以恢复去势小鼠的内分泌功能,启动青春期。然而,所使用的脱细胞方法有一些局限性,长时间使用SDS对支架材料的超微结构有严重影响。Liu等<sup>[65]</sup>用Triton X-100代替SDS缩短了化学处理时间,加入了DNase I酶处理并增加了冻融次数,诱导细胞快速溶解,促进化合物渗透。获得的猪卵巢脱细胞支架可以支持小鼠卵巢颗粒细胞生长,改善卵巢的内分泌功能。Wu等<sup>[66]</sup>结合机械、化学、生物方法对卵巢组织脱细胞,首先将卵巢组织冷冻到-80℃后恢复到室温,冻融3次后在超纯水中振荡6h,然后使用2%SDC/4%Triton X-100和1%SDS进行处理,并配合加入DNase酶,获得猪的卵巢脱细胞支架种植小鼠颗粒细胞和卵泡构建人工卵巢,证明了构建的人工卵巢在体外有足够的效率和良好的生物相容性,但是在移植到小鼠体内后,由于先天的免疫反应,没有恢

复去势小鼠的卵巢功能。

目前卵巢组织常用的脱细胞方法包括物理方法、化学方法、生物方法等<sup>[63]</sup>。为了获得更高质量的脱细胞支架材料,还需要优化和标准化脱细胞的方案。现有的研究表明,dECM作为支架种植卵泡在体外培养或构建人工卵巢是可行的,但它还处于起步阶段,面临着再细胞化过程的挑战。

#### 3.2.2 人工支架

考虑到初级卵泡直径30-150 μm,较难找到合适孔径的基质,因此可以根据自然卵巢的刚性以及孔径结构合成人工支架。在体内研究使用的所有不同基质中,基于纤维蛋白的支架似乎是最优选择<sup>[67]</sup>。Chiti等<sup>[45]</sup>优化了纤维蛋白基质组成,封装人卵巢卵泡,模拟了人类卵巢组织结构,发现纤维蛋白原和凝血酶(F/T)浓度为F50/T50,在超微结构和刚性方面最接近人卵巢皮质。Felder等<sup>[68]</sup>利用冻干技术获得了坚固的大孔藻酸盐支架,该大孔支架具有80-100 μm的孔径,有较大的孔隙连通性,可以满足卵泡的生长需要。此外,所制备的大孔藻酸盐支架带有骨形态发生蛋白和生长因子,种植猪原始卵泡和卵巢细胞后植入去势小鼠体内,恢复了小鼠的卵巢功能。大孔支架的制造可以通过多种方式实现,具体取决于聚合物化学性质。在水溶性聚合物体系中,一般使用冷冻干燥方法获得目标孔隙率<sup>[69]</sup>。

这种简单的受生物启发的方法在一定程度上模仿了卵巢中卵泡发育的自然过程,但目前的研究对象仍局限于小鼠,还需要更多的研究和更长的移植时间来评估人工支架及外源性生长因子的添加与安全性。

### 3.3 3D打印支架及负载结构

3D打印可以精确调节支架的孔径和厚度,还可以逐层打印模仿组织结构及控制支架的刚性以满足需求,具有实现卵巢形态修复和生殖内

分泌功能重建的潜力。2017年, Laronda 等<sup>[70]</sup>以明胶为主要材料, 打印了 15 mm×15 mm 的卵巢 3D 支架, 将小鼠卵泡植入 3D 打印的支架后, 恢复了去势小鼠卵巢的部分功能并产生了子代小鼠。自此, 逐渐出现了 3D 打印构建卵巢支架的相关研究。

2021年, Wu 等<sup>[46]</sup>使用明胶-甲基丙烯酸酯(gelatin methacryloyl, GelMA)作为生物墨水通过挤出式方法 3D 打印卵巢支架, 种植卵泡之后卵泡发育, 最终产生成熟的卵母细胞。表明了基于 GelMA 的 3D 打印培养系统是卵泡生长、发育和获得成熟卵母细胞的一个可行的替代选择。2022年, Zheng 等<sup>[71]</sup>使用卵巢来源的 dECM 做生物墨水, 3D 打印支架制造小鼠原代卵巢细胞(primary ovarian cells, POCs)负载结构, 这是首个使用由 dECM 组成的生物墨水进行卵巢 3D 打印的研究。研究结果表明 3D 打印的 POCs 负载结构可以支持 POCs 在体外和体内的长期存活。雌性去势小鼠模型表明, 封装 POC 的支架有利于改善卵巢功能, 部分去势小鼠启动了青春期。这项工作表明, 基于 dECM 的生物墨水提供了一种制造仿生 3D 结构的新方法。3D 打印的 POCs 负载结构在修复受损的卵巢功能中发挥着重要作用, 是一种有前景的生育力保存方法。

### 3.4 人工卵巢面临的挑战与对策

尽管人工卵巢技术在小鼠上取得了重大的进展, 但在大型动物和人类身上的研究仍然处于初级阶段。首先, 小鼠卵巢的区域相关性远低于人类, 且人类的卵巢比小鼠的卵巢要大得多, 结构也更加复杂。此外, 人工卵巢也面临着移植后缺血缺氧的问题, 人工卵巢移植的寿命和成功率受到限制。再生医学现在真正的困难是对微环境的调节, 以及如何遵循一套固定的程序, 在体内在不受干扰的情况下生长为预期的组织或器官, 这个问题目前在世界范围内尚未得到解决。

为了应对这些挑战, 未来对人工卵巢的研究需要特别关注卵泡形态测量学、生长速率、激素分泌、分子标记和卵母细胞的表观遗传状态。当移植支架变大时, 通过设计支架内的血管通道在移植支架保持卵泡活力的同时促进植入物的血管化。其中, 微通道网络水凝胶和干细胞治疗等设计是材料和医学领域中较新的, 快速建立血液再循环的有效方法。在构建人工卵巢时通过充分考虑卵巢的结构及机械异质性, 构建结构坚固、稳定、耐用的人工卵巢, 可进行多时间点检测和更多的体内研究, 分析人工卵巢组织的生殖和内分泌能力。

## 4 总结与展望

本文总结了自然卵巢组织和人工卵巢组织的适应症和技术策略。自然卵巢冷冻保存和移植已经成为临床重要的生育力保存方法, 现有研究表明卵巢组织冷冻保存和进一步移植用于恢复生育力是可行且有效的, 几乎所有的患者在卵巢组织移植后都可恢复卵巢功能, 其中血运重建和卵泡损失仍然是需要重点关注的问题。卵巢组织移植不是对所有患者有效, 例如移植后卵泡的大规模的丢失限制了其有效性, 特别是对于卵巢初始储备少的患者。在某些癌症中, 也存在着恶性细胞随卵巢组织再植入的风险。作为自然卵巢无法自体移植的补充方法, 人工卵巢也在蓬勃发展。相比于技术成熟的卵母细胞冷冻保存, 人工卵巢有不可替代的优势: (1) 人工卵巢可以用于卵巢组织移植维持女性生育能力; (2) 人工卵巢可以通过细胞增殖和组织再生维持内分泌系统的功能, 并为有相关疾病的绝经后女性提供激素治疗的替代方案; (3) 可以作为临床前药物开发中卵泡生理学和毒理学检测的工具。目前, 在工程化卵巢中准确模拟真实卵巢的复杂细胞区室化, 动态细胞外基质和机械特性极具挑战性。组

织工程学的不断发展将为解决人类生育力保存和卵巢疾病等生殖问题提供新的解决方案。

## REFERENCES

- [1] 首都医科大学附属北京妇产医院, 中国人体健康科技促进会生育力保护与保存专业委员会, 阮祥燕. 卵巢组织冻存移植技术规范团体标准[J]. 中国全科医学, 2023, 26(23): 2836-2841.  
Beijing Obstetrics and Gynecology Hospital, Capital Medical University, Preservation of China Association for the Promotion of Health Science, Technology, RUAN XY. Specification for ovarian tissue cryopreservation and transplantation[J]. Chinese General Practice, 2023, 26(23): 2836-2841 (in Chinese).
- [2] TRAPPHOFF T, DIETERLE S. Cryopreservation of ovarian and testicular tissue and the influence on epigenetic pattern[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2023, 24(13): 11061.
- [3] DOLMANS MM. From isolated follicles to the artificial ovary: why and how?[J]. Current Opinion in Endocrine and Metabolic Research, 2021, 18: 62-68.
- [4] PENG X, CHENG C, ZHANG XM, HE XL, LIU Y. Design and application strategies of natural polymer biomaterials in artificial ovaries[J]. Annals of Biomedical Engineering, 2023, 51(3): 461-478.
- [5] HOPKINS TIR, BEMMER VL, FRANKS S, DUNLOP C, HARDY K, DUNLOP IE. Micromechanical mapping of the intact ovary interior reveals contrasting mechanical roles for follicles and stroma[J]. Biomaterials, 2021, 277: 121099.
- [6] PASCOLETTI G, Di NARDO M, FRAGOMENI G, BARBATO V, CAPRIGLIONE T, GUALTIERI R, TALEVI R, CATAPANO G, ZANETTI EM. Dynamic characterization of the biomechanical behaviour of bovine ovarian cortical tissue and its short-term effect on ovarian tissue and follicles[J]. Materials, 2020, 13(17): 3759.
- [7] STEWART S, OU W, ARANDA-ESPINOZA H, RAHAMAN SO, HE XM. Micromechanical characterizations and viscoelastic modeling reveal elastic and viscoelastic heterogeneities in ovarian tissue and the significant viscoelastic contribution to the apparent elastic modulus determined by AFM indentation[J]. Acta Biomaterialia, 2023, 168: 286-297.
- [8] SHAH JS, SABOUNI R, CAYTON VAUGHT KC, OWEN CM, ALBERTINI DF, SEGARS JH. Biomechanics and mechanical signaling in the ovary: a systematic review[J]. Journal of Assisted Reproduction and Genetics, 2018, 35(7): 1135-1148.
- [9] RUAN XY. Chinese society of gynecological endocrinology affiliated to the international society of gynecological endocrinology guideline for ovarian tissue cryopreservation and transplantation[J]. Gynecological Endocrinology: the Official Journal of the International Society of Gynecological Endocrinology, 2018, 34(12): 1005-1010.
- [10] SCHALLMOSER A, EINENKEL R, FÄRBER C, EMRICH N, JOHN J, SÄNGER N. The effect of high-throughput vitrification of human ovarian cortex tissue on follicular viability: a promising alternative to conventional slow freezing?[J]. Archives of Gynecology and Obstetrics, 2023, 307(2): 591-599.
- [11] GOSDEN RG, BAIRD DT, WADE JC, WEBB R. Restoration of fertility to oophorectomized sheep by ovarian autografts stored at  $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ [J]. Human Reproduction, 1994, 9(4): 597-603.
- [12] OKTAY K, KARLIKAYA G. Ovarian function after transplantation of frozen, banked autologous ovarian tissue[J]. New England Journal of Medicine, 2000, 342(25): 1919.
- [13] OKTAY K, ECONOMOS K, KAN M, RUCINSKI J, VEECK L, ROSENWAKS Z. Endocrine function and oocyte retrieval after autologous transplantation of ovarian cortical strips to the forearm[J]. JAMA, 2001, 286(12): 1490.
- [14] DONNEZ J, DOLMANS MM, DEMYLLE D, JADOUL P, PIRARD C, SQUIFFLET J, MARTINEZ-MADRID B, van LANGENDONCKT A. Livebirth after orthotopic transplantation of cryopreserved ovarian tissue[J]. Lancet (London, England), 2004, 364(9443): 1405-1410.
- [15] MEIROW D, LEVRON J, EL-DAR-GEVA T, HARDAN I, FRIDMAN E, ZALEL Y, SCHIFF E, DOR J. Pregnancy after transplantation of cryopreserved ovarian tissue in a patient with ovarian failure after chemotherapy[J]. New England Journal of Medicine, 2005, 353(3): 318-321.
- [16] KHATTAK H, MALHAS R, CRACIUNAS L, AFIFI Y, AMORIM CA, FISHEL S, SILBER S, GOOK D, DEMEESTERE I, BYSTROVA O, LISYANSKAYA A, MANIKHAS G, LOTZ L, DITTRICH R, COLMORN LB, MACKLON KT, HJORTH IMD, KRISTENSEN SG, GALLOS I, COOMARASAMY A. Fresh and cryopreserved ovarian tissue transplantation for preserving reproductive and endocrine function: a systematic review and individual patient data meta-analysis[J]. Human Reproduction Update, 2022, 28(3): 400-416.
- [17] 申敬, 刘宝林, 李维杰, 周新丽, 王建信. 生育力保

- 存领域冷冻载体的研究进展[J]. 制冷技术, 2023, 43(3): 78-85.
- SHEN J, LIU BL, LI WJ, ZHOU XL, WANG JX. Research progress of frozen carrier in fertility preservation[J]. Chinese Journal of Refrigeration Technology, 2023, 43(3): 78-85 (in Chinese).
- [18] BARBATO V, GUALTIERI R, CAPRIGLIONE T, PALLOTTA MM, BRAUN S, DI NARDO M, COSTANZO V, FERRARO R, CATAPANO G, TALEVI R. Slush nitrogen vitrification of human ovarian tissue does not alter gene expression and improves follicle health and progression in long-term *in vitro* culture[J]. Fertility and Sterility, 2018, 110(7): 1356-1366.
- [19] DOLMANS MM, von WOLFF M, POIROT C, DIAZ-GARCIA C, CACCIOTTOLA L, BOISSEL N, LIEBENTHON J, PELLICER A, DONNEZ J, ANDERSEN CY. Transplantation of cryopreserved ovarian tissue in a series of 285 women: a review of five leading European centers[J]. Fertility and Sterility, 2021, 115(5): 1102-1115.
- [20] BEHL S, JOSHI VB, LARSON NB, YOUNG MC, BILAL M, WALKER DL, KHAN Z, GRANBERG CF, CHATTHA A, ZHAO YL. Vitrification versus slow freezing of human ovarian tissue: a systematic review and meta-analysis of histological outcomes[J]. Journal of Assisted Reproduction and Genetics, 2023, 40(3): 455-464.
- [21] LEE S, RYU KJ, KIM B, KANG D, KIM YY, KIM T. Comparison between slow freezing and vitrification for human ovarian tissue cryopreservation and xenotransplantation[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2019, 20(13): 3346.
- [22] KOMETAS M, CHRISTMAN GM, KRAMER J, RHOTON-VLASAK A. Methods of ovarian tissue cryopreservation: is vitrification superior to slow freezing?—ovarian tissue freezing methods[J]. Reproductive Sciences, 2021, 28(12): 3291-3302.
- [23] 国际妇科内分泌学会中国妇科内分泌学分会及共识专家. 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.  
Chinese Society of Gynecological Endocrinology Affiliated to International Society of Gynecological Endocrinology (CSGE-ISGE) and Expert Consensus group. Ovarian tissue cryopreservation and transplantation: the first chinese expert consensus[J]. Journal of Chinese Clinical Medicine, 2018, 46(4): 496-500 (in Chinese).
- [24] DIAZ AA, KUBO HN, HANDA N, HANNA M, LARONDA MM. A systematic review of ovarian tissue transplantation outcomes by ovarian tissue processing size for cryopreservation[J]. Frontiers in Endocrinology, 2022, 13: 918899.
- [25] ARAV A, PATRIZIO P. Techniques of cryopreservation for ovarian tissue and whole ovary[J]. Clinical Medicine Insights Reproductive Health, 2019, 13: 1179558119884945.
- [26] HOSSAY C, DONNEZ J, DOLMANS MM. Whole ovary cryopreservation and transplantation: a systematic review of challenges and research developments in animal experiments and humans[J]. Journal of Clinical Medicine, 2020, 9(10): 3196.
- [27] ZHANG JM, SHENG Y, CAO YZ, WANG HY, CHEN ZJ. Cryopreservation of whole ovaries with vascular pedicles: vitrification or conventional freezing?[J]. Journal of Assisted Reproduction and Genetics, 2011, 28(5): 445-452.
- [28] HENRY L, LABIED S, FRANSOLET M, KIRSCHVINK N, BLACHER S, NOEL A, FOIDART JM, NISOLLE M, MUNAUT C. Isoform 165 of vascular endothelial growth factor in collagen matrix improves ovine cryopreserved ovarian tissue revascularisation after xenotransplantation in mice[J]. Reproductive Biology and Endocrinology: RB&E, 2015, 13: 12.
- [29] SHIKANOV A, ZHANG Z, XU M, SMITH RM, RAJAN A, WOODRUFF TK, SHEA LD. Fibrin encapsulation and vascular endothelial growth factor delivery promotes ovarian graft survival in mice[J]. Tissue Engineering Part A, 2011, 17(23/24): 3095-3104.
- [30] DAY JR, DAVID A, CICHON AL, KULKARNI T, CASCALHO M, SHIKANOV A. Immunisolating poly(ethylene glycol) based capsules support ovarian tissue survival to restore endocrine function[J]. Journal of Biomedical Materials Research Part A, 2018, 106(5): 1381-1389.
- [31] DAY JR, DAVID A, LONG C, BUSHNELL GG, WOODRUFF TK, SHEA LD, SHIKANOV A. Immuno-isolating dual poly(ethylene glycol) capsule prevents cancer cells from spreading following mouse ovarian tissue auto-transplantation[J]. Regenerative Medicine Frontiers, 2019(1): e190006.
- [32] THUWANUT P, COMIZZOLI P, PIMPIN A, SRITURAVANICH W, SEREEPAPONG W, PRUKSANANONDA K, TAWEEPOLCHAROEN C, TUNTIVIRIYAPUN P, SUEBTHAWINKUL C, SIRAYAPIWAT P. Influence of hydrogel encapsulation during cryopreservation of ovarian tissues and impact of post-thawing *in vitro* culture systems in a research animal model[J]. Clinical and Experimental Reproductive Medicine, 2021, 48(2): 111-123.

- [33] DOLMANS MM, DONNEZ J, CACCIOTTOLA L. Fertility preservation: the challenge of freezing and transplanting ovarian tissue[J]. Trends in Molecular Medicine, 2021, 27(8): 777-791.
- [34] RONESS H, MEIROW D. FERTILITY PRESERVATION: follicle reserve loss in ovarian tissue transplantation[J]. Reproduction (Cambridge, England), 2019, 158(5): F35-F44.
- [35] CACCIOTTOLA L, DONNEZ J, DOLMANS MM. Ovarian tissue damage after grafting: systematic review of strategies to improve follicle outcomes[J]. Reproductive Biomedicine Online, 2021, 43(3): 351-369.
- [36] LEONEL ECR, LUCCI CM, AMORIM CA. Cryopreservation of human ovarian tissue: a review[J]. Transfusion Medicine and Hemotherapy: Offizielles Organ der Deutschen Gesellschaft für Transfusionsmedizin und Immunhamatologie, 2019, 46(3): 173-181.
- [37] ANDERSEN ST, PORS SE, La COUR POULSEN L, COLMORN LB, MACKLON KT, ERNST E, HUMAIDAN P, ANDERSEN CY, KRISTENSEN SG. Ovarian stimulation and assisted reproductive technology outcomes in women transplanted with cryopreserved ovarian tissue: a systematic review[J]. Fertility and Sterility, 2019, 112(5): 908-921.
- [38] TANAKA A, NAKAMURA H, TABATA Y, FUJIMORI Y, KUMASAWA K, KIMURA T. Effect of sustained release of basic fibroblast growth factor using biodegradable gelatin hydrogels on frozen-thawed human ovarian tissue in a xenograft model[J]. Journal of Obstetrics and Gynaecology Research, 2018, 44(10): 1947-1955.
- [39] RAJABI Z, ALIAKBARI F, YAZDEKHASTI H. Female fertility preservation, clinical and experimental options[J]. Journal of Reproduction & Infertility, 2018, 19(3): 125-132.
- [40] NAJAFI A, ASADI E, BENSON JD. Ovarian tissue cryopreservation and transplantation: a review on reactive oxygen species generation and antioxidant therapy[J]. Cell and Tissue Research, 2023, 393(3): 401-423.
- [41] LI JJ, LIU LY, WENG J, YIN TL, YANG J, FENG HL. Biological roles of L-carnitine in oocyte and early embryo development[J]. Molecular Reproduction and Development, 2021, 88(10): 673-685.
- [42] DADASHZADEH A, MOGHASSEMI S, SHAVANDI A, AMORIM CA. A review on biomaterials for ovarian tissue engineering[J]. Acta Biomaterialia, 2021, 135: 48-63.
- [43] SADR SZ, FATEHI R, MAROUFIZADEH S, AMORIM CA, EBRAHIMI B. Utilizing fibrin-alginate and matrigel-alginate for mouse follicle development in three-dimensional culture systems[J]. Biopreservation and Biobanking, 2018, 16(2): 120-127.
- [44] SUN WZ, ALEXANDER GREGORY D, TOMEH MA, ZHAO XB. Silk fibroin as a functional biomaterial for tissue engineering[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2021, 22(3): 1499.
- [45] CHITI MC, DOLMANS MM, MORTIAUX L, ZHUGE F, OUNI E, SHAHRI PAK, van RUYMBEKE E, CHAMPAGNE SD, DONNEZ J, AMORIM CA. A novel fibrin-based artificial ovary prototype resembling human ovarian tissue in terms of architecture and rigidity[J]. Journal of Assisted Reproduction and Genetics, 2018, 35(1): 41-48.
- [46] WU T, GAO YY, SU J, TANG XN, CHEN Q, MA LW, ZHANG JJ, WU JM, WANG SX. Three-dimensional bioprinting of artificial ovaries by an extrusion-based method using gelatin-methacryloyl bioink[J]. Climacteric: the Journal of the International Menopause Society, 2022, 25(2): 170-178.
- [47] CHEN HX, XUE LQ, GONG GD, PAN JZ, WANG XL, ZHANG YY, GUO JL, QIN L. Collagen-based materials in reproductive medicine and engineered reproductive tissues[J]. Journal of Leather Science and Engineering, 2022, 4(1): 1-15.
- [48] JIANG F, XU XW, CHEN FQ, WENG HF, CHEN J, RU Y, XIAO Q, XIAO AF. Extraction, modification and biomedical application of agarose hydrogels: a review[J]. Marine Drugs, 2023, 21(5): 299.
- [49] HASSANPOUR A, TALAEI-KHOZANI T, KARGAR-ABARGHOUEI E, RAZBAN V, VOJDANI Z. Decellularized human ovarian scaffold based on a sodium lauryl ester sulfate (SLES)-treated protocol, as a natural three-dimensional scaffold for construction of bioengineered ovaries[J]. Stem Cell Research & Therapy, 2018, 9(1): 1-13.
- [50] JAMALZAEI P, VALOJERDI MR, MONTAZERI L, BAHARVAND H. Applicability of hyaluronic acid-alginate hydrogel and ovarian cells for *in vitro* development of mouse preantral follicles[J]. Cell Journal, 2020, 22(suppl 1): 49-60.
- [51] JAFARI H, DADASHZADEH A, MOGHASSEMI S, ZAHEDI P, AMORIM CA, SHAVANDI A. Ovarian cell encapsulation in an enzymatically crosslinked silk-based hydrogel with tunable mechanical properties[J]. Gels, 2021, 7(3): 138.
- [52] TOMASZEWSKI CE, CONSTANCE E, LEMKE MM, ZHOU H, PADMANABHAN V, ARNOLD KB, SHIKANOV A. Adipose-derived stem cell-secreted factors promote early stage follicle development in a biomimetic matrix[J]. Biomaterials Science, 2019,



- 7(2): 571-580.
- [53] RAFFEL N, DITTRICH R, BÄUERLE T, SEYLER L, FATTAHI A, HOFFMANN I, LEAL-EGAÑA A, BECKMANN MW, BOCCACCINI AR, LIVERANI L. Novel approach for the assessment of ovarian follicles infiltration in polymeric electrospun patterned scaffolds[J]. PLoS One, 2019, 14(4): e0215985.
- [54] REDDY MSB, PONNAMMA D, CHOUDHARY R, SADASIVUNI KK. A comparative review of natural and synthetic biopolymer composite scaffolds[J]. Polymers, 2021, 13(7): 1105.
- [55] ZHANG JP, YANG SB, YANG X, XI ZH, ZHAO L, CEN L, LU EY, YANG Y. Novel fabricating process for porous polyglycolic acid scaffolds by melt-foaming using supercritical carbon dioxide[J]. ACS Biomaterials Science & Engineering, 2018, 4(2): 694-706.
- [56] ASADUZZMAN M, CUI XL, ZHANG H, YOUNG F. Three dimensional *in vitro* culture of murine secondary follicles in a defined synthetic matrix[J]. Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology, 2018, 9(3): 244-262.
- [57] XIAO S, COPPETA JR, ROGERS HB, ISENBERG BC, ZHU J, OLALEKAN SA, McKINNON KE, DOKIC D, RASHEDI AS, HAISENLEDER DJ, MALPANI SS, ARNOLD-MURRAY CA, CHEN KW, JIANG MY, BAI L, NGUYEN CT, ZHANG JY, LARONDA MM, HOPE TJ, MANIAR KP, et al. A microfluidic culture model of the human reproductive tract and 28-day menstrual cycle[J]. Nature Communications, 2017, 8: 14584.
- [58] CHOI JK, AGARWAL P, HUANG HS, ZHAO ST, HE XM. The crucial role of mechanical heterogeneity in regulating follicle development and ovulation with engineered ovarian microtissue[J]. Biomaterials, 2014, 35(19): 5122-5128.
- [59] HE XM. Microfluidic encapsulation of ovarian follicles for 3D culture[J]. Annals of Biomedical Engineering, 2017, 45(7): 1676-1684.
- [60] AZIZ A, FU MJ, DENG J, GENG CY, LUO Y, LIN BC, YU XH, LIU B. A microfluidic device for culturing an encapsulated ovarian follicle[J]. Micromachines, 2017, 8(11): 335.
- [61] PICTON HM. Therapeutic potential of *in vitro*-derived oocytes for the restoration and treatment of female fertility[J]. Annual Review of Animal Biosciences, 2022, 10: 281-301.
- [62] BABALIARI E, RANELLA A, STRATAKIS E. Microfluidic systems for neural cell studies[J]. Bioengineering, 2023, 10(8): 902.
- [63] 杨加敏, 胥义, 党航宇, 韩恒鑫. 组织器官脱细胞支架的制备及研究进展[J]. 生物工程学报, 2022, 38(6): 2169-2186.
- YANG JM, XU Y, DANG HY, HAN HX. Preparation of tissue and organ decellularized scaffolds: a review[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2022, 38(6): 2169-2186 (in Chinese).
- [64] LARONDA MM, JAKUS AE, WHELAN KA, WERTHEIM JA, SHAH RN, WOODRUFF TK. Initiation of puberty in mice following decellularized ovary transplant[J]. Biomaterials, 2015, 50: 20-29.
- [65] LIU WY, LIN SG, ZHUO RY, XIE YY, PAN W, LIN XF, SHEN FX. Xenogeneic decellularized scaffold: a novel platform for ovary regeneration[J]. Tissue Engineering Part C, Methods, 2017, 23(2): 61-71.
- [66] WU T, GAO YY, TANG XN, ZHANG JJ, WANG SX. Construction of artificial ovaries with decellularized porcine scaffold and its elicited immune response after xenotransplantation in mice[J]. Journal of Functional Biomaterials, 2022, 13(4): 165.
- [67] CHITI MC, DOLMANS MM, DONNEZ J, AMORIM CA. Fibrin in reproductive tissue engineering: a review on its application as a biomaterial for fertility preservation[J]. Annals of Biomedical Engineering, 2017, 45(7): 1650-1663.
- [68] FELDER S, MASASA H, ORENBUCH A, LEVAOT N, SHACHAR GOLDENBERG M, COHEN S. Reconstruction of the ovary microenvironment utilizing macroporous scaffold with affinity-bound growth factors[J]. Biomaterials, 2019, 205: 11-22.
- [69] ZMORA S, GLICKLIS R, COHEN S. Tailoring the pore architecture in 3-D alginate scaffolds by controlling the freezing regime during fabrication[J]. Biomaterials, 2002, 23(20): 4087-4094.
- [70] LARONDA MM, RUTZ AL, XIAO S, WHELAN KA, DUNCAN FE, ROTH EW, WOODRUFF TK, SHAH RN. A bioprosthetic ovary created using 3D printed microporous scaffolds restores ovarian function in sterilized mice[J]. Nature Communications, 2017, 8: 15261.
- [71] ZHENG JH, LIU YB, HOU CX, LI ZK, YANG SP, LIANG X, ZHOU L, GUO JB, ZHANG JK, HUANG XH. Ovary-derived decellularized extracellular matrix-based bioink for fabricating 3D primary ovarian cells-laden structures for mouse ovarian failure correction[J]. International Journal of Bioprinting, 2022, 8(3): 597.

(本文责编 陈宏宇)