糖类保护剂在组织低温保存中的研究进展

任丹丹 王 成

摘要 组织的低温保存在辅助生殖和再生医学领域中非常重要,但组织结构复杂,冻存后的完整性和功能不尽如意。添加合适的冷冻保护剂是组织低温保存成功的关键一环。糖类保护剂可抑制细胞组织内冰晶形成、保护质膜及蛋白质结构完整性、稳定渗透体积、抗氧化损伤等,近年来在组织低温保存中取得了令人鼓舞的结果。因此,更好地了解糖类保护剂的作用,能够为提高更多不同类型组织的冷冻保存提供一定参考价值。

关键词 糖 冷冻保护剂 组织

中图分类号 R318

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2023.07.036

低温保存是一种利用零下温度将活细胞、组织和器官等生物样品长期保存的方法^[1]。低温保存方法有玻璃化冷冻和慢速冷冻。慢速冷冻是指使用可编程冷冻机,低速度降低冷冻含有活细胞或组织的液体。玻璃化冷冻是快速冷却,添加高浓度冷冻保护剂,使活细胞或组织的液体转化为玻璃样无定形固体,避免形成有害的冰。玻璃化冷冻因操作更为简便、耗时更短、费用更低、冻融效果更好等优势,常被用于组织的低温保存。

生物样品的冷冻通常伴随着许多不良后果,如细胞内和细胞外的冷冻损伤和渗透应激。冷冻保护剂(cryoprotective agents, CPA)的添加可以防止这些不利影响。冷冻保护剂分为渗透性和非渗透性两大类^[2]。常用的渗透性 CPA,如乙二醇(ethylene glycol, EG)、二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)和甘油,是能够穿透质膜并与水分子形成氢键以降低冰点而防止细胞内外结冰的小分子。对组织进行玻璃化冷冻时,高浓度的渗透 CPA 具有极强的毒性。为了降低这种毒性带来的损伤风险,通常使用两个或更多渗透 CPA 的组合来冷冻保存组织。尽管通过以上方式进行优化取得了一定积极的结果,但研究发现解冻后组织的活性和功能欠佳^[3]。非渗透性 CPA 是一种大分子,包括糖类和高分子量聚合物。与渗透性 CPA 比较,它们的细胞毒性相对较小。在冷却过程中不会穿透质膜,留在细胞和组织外的隔室中,以促

进玻璃的形成。而非渗透性和渗透性 CPA 的组合可能会因减少渗透性 CPA 的细胞毒性作用,改善组织玻璃化冷冻的结果^[4]。

糖类作为主要的非渗透性冷冻保护剂,已单独或者添加在冷冻保护液中用于不同类型的细胞或组织的冷冻保存中。本文将简述常用不同糖类保护剂的理化性质,重点从糖类保护剂机制的研究及不同糖类保护剂在胚胎、卵巢、睾丸等组织冷冻保存中的应用展开综述。

一、糖类的理化特性

糖类一般分为单糖、双糖及多糖,主要由碳、氢、氧 3 种元素组成,是多羟基醛或多羟基酮及其缩聚物和某些衍生物的总称。因化学分子式可写成 $C_x(H_2O)_x$, 被称为碳水化合物。在生命活动过程中起着重要的作用,是一切生命体维持生命活动所需能量的主要来源^[5]。

1. 单糖:葡萄糖、果糖是目前常被作为冷冻保护剂的六碳单糖,分子通式为 $C_6H_{12}O_6$ 。葡萄糖是自然界分布最广的一种单糖,它是一种多羟基醛,易溶于水,微溶于乙醇,不溶于乙醚,是活细胞的能量来源和新陈代谢的中间产物,为生物的主要供能物质^[2,5]。果糖是葡萄糖的同分异构体,通常为黏稠性液体,易溶于水、乙醇和乙醚。渗透性好,能较快地穿透细胞组织,同时溶解度高,难结晶,防腐性能好,具有较好的保藏效果。30%的果糖溶液冰点是 $-5^{\circ}C$,其冷冻性能与易控制冰晶生成的特性,使它常应用于冰淇淋和其他冷饮加工^[6]。

2. 双糖:Kim 等^[7]研究认为,蔗糖和海藻糖是所有双糖中最有效的低温保护剂。蔗糖和海藻糖都是天然的非还原糖,具有相同化学式 $C_{12}H_{22}O_{11}$,但具有

基金项目:国家自然科学基金资助项目(81960824)

作者单位:519100 遵义医科大学第五附属(珠海)医院整形手外科

通信作者:王成,硕士生导师,副主任医师,电子信箱:906090860@

qq.com

不同几何结构的双糖分子。蔗糖由1分子葡萄糖和1分子果糖组成,化学性质稳定,水溶解度高,一般不发生反应,除非酶的催化水解,是光合产物运输的主要形式。而海藻糖分子由2个糖苷键连接的葡萄糖环组成,广泛分布于细菌、真菌和动植物的体内,由于其结构稳定,无毒性,以及抗低温、耐干燥和稳定的化学性质,常作为保护剂应用于各种生物材料的低温保存^[8]。棉子糖是一种由果糖、葡萄糖和半乳糖组成的三糖,也被应用在组织的冷冻保存^[9]。

3. 多糖:多糖是由糖苷键结合的糖链,至少要超过10个单糖组成的聚合糖高分子碳水化合物。由相同的单糖组成的多糖称为同多糖,如葡聚糖。以不同的单糖组成的多糖称为杂多糖,如胞外多糖(exopolysaccharides, EPS)、枸杞多糖(lycium barbarum polysaccharides, LBP)、附子多糖(fuzi-polysaccharides, FPS)等。多糖分子属于极性大分子,呈弱酸性,易溶于水、乙醇,且无毒、无害等。天然广泛存在于动植物、真菌和微生物体中,因此也容易获取^[10]。

二、糖类抗冷冻机制

Maximow在1912年发现糖可能是冷冻前使用的第1种保护性添加剂,单糖和双糖都能被用于低温保存,但蔗糖、海藻糖等双糖比单糖应用更广泛^[2]。根据糖类糖苷键的相对分子质量、组成、结构和大小影响其穿透细胞膜的能力,糖类属于非渗透性冷冻保护剂,其相关的保护机制总结如下。

1. 糖可减少冰晶形成,提高玻璃化转变温度。冰晶通常在一定的温度范围内即 $-60^{\circ}\text{C} \sim 0^{\circ}\text{C}$ 形成。这种过度会使细胞内和细胞外冰晶形成,冰晶会对多种生物膜产生机械或者生物化学应力,导致细胞组织结构和功能损伤。添加冷冻保护剂和玻璃化能解决这一问题^[1]。糖类非渗透CPA补充到冷冻介质中不能透过质膜,而是在质膜之间浓缩形成缓冲层,或吸附在质膜表面形成黏层防止冰晶的产生。在冻存过程中使细胞组织部分脱水,而不直接与质膜发生反应^[11]。玻璃化在降温过程中能以极快的速度越过冰晶形成的温度区,使水分子来不及形成冰结晶而造成水分子无次序地排列形成均匀的团块。糖类CPA通过增加玻璃化溶液的黏度,提高玻璃化溶液所需的玻璃化转变温度,使玻璃态的体系稳定,不容易发生物理和化学变化^[12]。例如,200g/L蔗糖溶液(-30°C)的玻璃化转变温度高于含有200g/L EG(-85°C)或200g/L甘油(-65°C)的溶液。

2. 糖能保护组织细胞质膜及蛋白质稳定性。这

些包括还原双糖,如麦芽糖、乳糖,以及非还原双糖,如海藻糖、蔗糖。单糖有果糖、葡萄糖^[13]。用于低温保存的几种糖中,海藻糖最适合在低温保存过程中稳定蛋白质和细胞膜。与水和水的作用比较,海藻糖与水的相互作用紧密,冷却时与细胞磷脂的极性头基团相互作用,形成围绕细胞的玻璃壳,防止细胞膜双层结构的破坏,同时海藻糖的羟基能结合蛋白质分子表面部分,减缓蛋白质聚集的速度可防止蛋白质变性^[14]。在低温保护介质中,部分还原糖结合细胞膜的碳水化合物结构——糖萼,供特定细胞适应某些温度和化学物质。如麦芽糖具有半缩醛羟基,在溶液中以环状和醛两种形式存在。而精子膜表面的糖萼是一层致密的碳水化合物层,在精子冷冻/解冻过程中糖萼的变化会影响精子的存活率和活力。使用麦芽糖在公鸡精液冷冻/解冻培养基中,可稳定精子质膜糖萼,提高精子存活率和活力^[15]。

3. 糖可维持组织细胞升温时的渗透体积,避免过度膨胀和渗透性休克。在变暖期间,细胞外CPA浓度迅速降低,导致渗透失衡,使细胞过度膨胀,最终细胞溶解。单糖和双糖在温水溶液中增加了黏度,被用作渗透反作用力,以限制水渗透到细胞,防止肿胀损伤。例如,Angel-Velez等^[16]在等渗保存介质溶液中加热马卵母细胞,发现与含有0.4mol/L海藻糖的基础溶液比较,等渗培养基的囊胚率明显下降。

4. 与渗透性冷冻保护剂比较,糖类冷冻保护剂最大的优势是毒性小或无毒。在辅助渗透性CPA形成玻璃化时,糖类有助于增加玻璃化溶质的黏度和张力,减少渗透性CPA的用量而降低细胞毒性。DMSO作为广泛使用的渗透性保护剂,具有一定的生物毒性,在移植冻存的组织前需快速洗脱,而这一步耗时且较困难。海藻糖无毒性,不同浓度海藻糖对于生殖组织具有保护作用。将海藻糖与DMSO联用能够显著提高羊睾丸组织冷冻保存后的总细胞活力^[17]。

5. 冷冻保护剂抗氧化能力也是保存组织成功的要素。离体组织细胞在缺血缺氧期间会导致活性氧成分的增加,并可通过多种途径导致细胞损伤或死亡。糖类抗氧化的主要机制有清除自由基、增强抗氧化酶活性、抑制脂质过氧化物产生、抑制细胞凋亡等^[18,19]。抗氧化多糖在家禽精子冷冻保存的研究相对较多,如海带多糖和LBP联合对山羊精液冷冻保存,提高了精子的活力,以及精子质膜、顶体、脱氧核糖核酸的完整性^[20]。

三、单糖 - 双糖在组织保存中的应用

1. 胚胎: 胚胎冷冻是辅助生殖的核心技术之一, 胚胎的冷冻保存有利于不孕症或因自身疾病暂时不能生育的人群。其次, 保存遗传资源, 有利于解决面临灭绝威胁的动物的繁殖。胚胎的冷冻保存时, 玻璃化冷冻优于慢速冷冻, 目前已应用于许多物种, 包括人类、鱼类、家禽。

用于胚胎玻璃化冷冻保护的糖类保护剂中, 常用的单糖有果糖、葡萄糖, 双糖有海藻糖与蔗糖。Lin 等^[21]用浓度均为 1mol/L 的海藻糖、蔗糖、乳糖、果糖和葡萄糖 5 种非渗透性冷冻保护剂处理座头石斑鱼胚胎。结果显示, 经海藻糖、蔗糖和乳糖处理后的胚胎存活率均 >86.97%, 正常胚胎发育率均 >86.01%。在相同浓度下, 海藻糖、蔗糖和乳糖的毒性水平低于果糖和葡萄糖。李振通等^[22]比较分析了相同浓度的葡萄糖、果糖、蔗糖和海藻糖对胚星斑川鲷胚胎的保护作用, 发现含有蔗糖和海藻糖的玻璃化液对胚胎的保护效果优于另外两种单糖, 胚胎的成活率与孵化率相对较高, 最高可达到 80% 左右。因此, 双糖更适用于鱼类胚胎的玻璃化冷冻。

含有蔗糖的玻璃化冷冻液和加温介质可以提高胚胎解冻后的存活率、囊胚的再扩张率和孵化率。玻璃化冷冻液中蔗糖的浓度范围为 0.4 ~ 1.0mmol/L。加温介质中蔗糖的浓度范围为 0.13 ~ 1.00mol/L, 在此浓度范围内的蔗糖在玻璃化冷冻后的非人类胚胎中获得了 80% 以上的存活率和 48% 的孵化率。而人类胚胎的临床应用显示出 95% 以上的存活率、25% 的妊娠率。代替蔗糖, 玻璃化冷冻液中海藻糖的浓度范围为 0.25 ~ 1.00mol/L。在此浓度范围内, 玻璃化冷冻后非人胚胎的存活率和孵化率分别达到 68% 和 47%。其中 1mol/L 的海藻糖在玻璃化冷冻的人类胚胎的临床应用中显示出 96% 以上的存活率、25% 的妊娠率^[4, 12, 21]。

糖类保护剂和渗透性 CPA 结合起来, 可以降低渗透性 CPA 的浓度, 减小玻璃化冷冻液的毒性, 改善胚胎解冻后存活率和功能。Bartolac 等^[4]用含有 0.4mol/L 蔗糖与 17% 的 DMSO 和 EG 玻璃化冷冻液冷冻猪囊胚时, 提高了复温后囊胚的存活率, 降低了单独使用 EG 和 DMSO 产生的毒性效应。总体而言, 在胚胎组织的冷冻保存和复温过程中添加糖类保护剂, 特别是蔗糖, 有利于提高不同物种胚胎冻存后的活力和功能特性。

2. 卵巢和睾丸: 生殖组织冷冻保存对于保存哺乳

动物的生育能力至关重要。生殖组织的冻存方法存在争议, 因为生殖组织的冷冻保存与种类、CPA 浓度、冷冻载体选择等因素相关。对于卵巢组织, 目前认为玻璃化冷冻比慢速冷冻更有利。

(1) 卵巢: 与胚胎类似, 在玻璃化冷冻液中添加蔗糖和海藻糖可显著提高卵巢组织解冻后卵泡的活力。玻璃化冷冻液中蔗糖的浓度范围为 0.25 ~ 0.75mol/L, 最常用的为 0.50mol/L。加温介质中蔗糖的浓度范围为 0.125 ~ 1.000mol/L, 而浓度通常从 1mol/L 开始递减。在这样的浓度范围内, 蔗糖使卵泡存活率超过 85%, 并保持了哺乳动物卵巢组织的功能特性。玻璃化冷冻液中海藻糖的浓度范围为 0.1 ~ 0.5mol/L。在这样的浓度范围内, 海藻糖使卵泡存活率超过 75%^[9, 12]。将双糖与高分子量聚合物相结合, 也可进一步提高卵巢组织解冻后卵泡的活力。例如: 在含有蔗糖的玻璃化冷冻液中添加 2.5% 聚乙烯吡咯烷酮^[23]。

在比较双糖对猫卵巢组织玻璃化冷冻后卵泡活力的影响研究中发现, 相同浓度的海藻糖比蔗糖更适合于猫卵巢组织的玻璃化冷冻^[9]。而 Tian 等^[23]用 0.2mol/L 的蔗糖和海藻糖玻璃化冷冻液保存人卵巢组织, 通过比较冻存后卵巢组织卵泡形态和应力松弛行为。结果显示, 蔗糖作为冷冻保护剂在人卵巢组织冷冻保存中的效果与海藻糖无显著差异。

糖类 CPA 与渗透性 CPA 组合, 可以提高卵巢组织冷冻保存后的功能和活性。例如, 40% EG 与 0.1mol/L 或者 0.5mol/L 的蔗糖和海藻糖、0.1mol/L 的棉子糖组合或不组合玻璃化冻存猫卵巢碎片。结果显示, EG 与海藻糖组合的冷冻液, 使卵巢组织解冻后的正常卵泡的百分占比最高^[9]。杜天奇等^[18]将海藻糖与渗透保护剂 DMSO 对比研究发现, 海藻糖冷冻复苏后羊完整卵巢中卵泡形态结构, 基质细胞密度的维持更好, 并且海藻糖具有一定的抗凋亡活性。总之, 在卵巢玻璃化冷冻液中, 糖类 CPA 无论是单独使用还是作为辅助添加剂, 都有利于保留卵巢组织冻存后的形态和功能。

(2) 睾丸: 葡萄糖、蔗糖、海藻糖被应用于睾丸组织的低温保存。张啸龙等^[19]研究证明, 分别添加 0.1mol/L 蔗糖或海藻糖对睾丸生精细胞低温冷冻均具有保护作用, 而同时添加可显著提高睾丸组织冷冻复苏后生精细胞活率和复苏率, 降低细胞凋亡率及低温冻存对细胞线粒体膜电位的损伤。

玻璃化冷冻保存睾丸组织近年来被尝试。玻璃

化冷冻液中蔗糖的浓度范围为 0.5 ~ 0.6 mol/L。加温介质中蔗糖的浓度范围为 0.25 ~ 1.00 mol/L。在这样的浓度范围内,蔗糖使鼠睾丸组织的存活率超过 84.0%,并保持了功能。睾丸组织在含有 0.5 mol/L 海藻糖的培养液中玻璃化冷冻,存活率为 73.6%^[12,17,19]。

四、多糖在组织保存中的应用

葡聚糖在冷冻过程中的主要作用是改变溶液的黏度以适应温度,降低组织解冻后破裂的倾向。通过减轻冷冻保存过程中产生的机械应力,并在胚胎周围建立黏性基质,防止升温过程中固体和液体之间的过渡阶段结晶。从而保护胚胎免受冷冻损伤。在单独含有 10% 葡聚糖的培养液中玻璃化冷冻的兔胚胎解冻后,94% ~ 99% 的玻璃化胚胎未受损伤,在扩张囊胚时的发育率达到 76% ~ 79%。

EPS 是由微生物合成和分泌的糖基聚合物。假单胞菌产生的 EPS ID1 是一种以葡萄糖、半乳糖和岩藻糖为主,含有少量糖醛酸和氨基酸的高分子杂多糖。EPS ID1 对产生菌具有显著的冷冻保护作用,这意味着它可以单独或与其他 CPA 联合用作细胞冷冻保存的试剂。因此,Tania 等在玻璃化冷冻液中添加 EPS ID1 用于冷冻保存牛胚胎^[24]。结果显示,在玻璃化冷冻液和加温介质中添加 10 μg/ml 的 EPS ID1,可以保护牛卵母细胞免受冷冻损伤,并且对细胞凋亡有正向调节作用。推测 EPS ID1 可能抑制冰再结晶活性、抗氧化损伤而对牛囊胚提供冷冻保护作用。

LBP 是来源于枸杞子的主要化学活性成分,由有半乳糖醛酸、葡萄糖和阿拉伯糖三大单糖聚合而成,具有调节激素、控制氧化应激及抑制细胞凋亡而保护生殖组织。蔡玉芳等^[25]研究发现,400 mg/L 的 LBP 有利于卵巢组织的保存,并可显著提高冷冻卵巢组织移植后的存活率。FPS 是附子的主要活性成分之一,由葡萄糖和阿拉伯糖聚合而成,无毒,具有调节血糖、血脂,抗氧化应激及保护血管的平滑肌和内皮细胞的作用。本课题组前期将 FPS 引入血管的深低温保护研究中发现,10 mg/ml 的 FPS 对大鼠腹主动脉具有保护作用,对机制进一步探索发现,FPS 可通过改善线粒体功能障碍并减轻组织氧化损伤,保护了深低温保存中腹主动脉线粒体结构和功能的稳定,为后期血管生存保存体例^[26]。

目前多糖对组织冷冻保存的作用在国内外鲜有报道,但通过以上相关研究表明,多糖相对分子质量过大,不能穿过质膜,使组织内外渗透压不同而脱水。同时,多糖具有一定的黏稠性,可包围于组织周围使

组织内冰晶数量减少,提高组织保存的效果。中药多糖抗氧化应激的能力强、安全性大的特点对于提高组织冻存后的活力起着很重要的作用。

五、展 望

糖类属于非渗透性保护剂,不同糖类的理化性质、冷冻保护机制存在一定差别。同一类组织冻存中用不同糖有着不同的保存效果,而同一种糖在不同组织冷冻保存中也存在明显的差异。玻璃化冷冻液和复温时的加温介质中,糖的选择和糖的浓度都应得到优化,以最大限度地减少冷冻对组织细胞的伤害,保持生物组织的高活性和功能性。目前添加糖 CPA 玻璃化冷冻的生殖组织的体外培养和异种移植被证明可以产生用于体外受精的功能性生殖细胞。人类胚胎、卵巢的玻璃化冷冻后移植的活产病例已有报道,但由于目前临床数据较少,玻璃化冷冻的临床意义尚无法估计,还需要开展更多临床研究确定其安全性和有效性。因此,含有糖类非渗透性 CPA 介质的玻璃化冷冻液对于组织解冻后,进一步的体内研究还很欠缺。另外,多糖对于组织细胞的冷冻保存有很好的应用前景,需要开展进一步的探索,以适用于更多不同类型组织的冷冻保存。

参考文献

- Jang TH, Park SC, Yang JH, *et al.* Cryopreservation and its clinical applications[J]. *Integr Med Res*, 2017, 6(1): 12 - 18
- Rajan R, Matsumura K. Development and application of cryoprotectants[J]. *Adv Exp Med Biol*, 2018, 1081: 339 - 354
- 张源,曾敏,翟博. 组织玻璃化冻存技术: 优势与尚未完全解决的问题[J]. *中国组织工程研究*, 2020, 24(23): 3751 - 3755
- Bartolac LK, Lowe JL, Koustas G, *et al.* Effect of different penetrating and non - penetrating cryoprotectants and media temperature on the cryosurvival of vitrified in vitro produced porcine blastocysts[J]. *Anim Sci J*, 2018, 89(9): 1230 - 1239
- 于海林. 糖类分子都是由 C、H、O 三种元素构成的吗[J]. *生物学教学*, 2017, 42(2): 68 - 69
- 邢庆洋, 庞明利. 结晶果糖在饮料领域的应用优势[J]. *食品安全导刊*, 2016, 7: 50 - 51
- Kim KJ, Lee YA, Kim BJ, *et al.* Cryopreservation of putative pre - pubertal bovine spermatogonial stem cells by slow freezing[J]. *Cryobiology*, 2015, 70(2): 175 - 183
- Olsson C, Swenson J. Structural comparison between sucrose and trehalose in aqueous solution[J]. *J Phys Chem B*, 2020, 124(15): 3074 - 3082
- Brito DCC, Domingues SFS, Rodrigues APR, *et al.* Vitrification of domestic cat (*Felis catus*) ovarian tissue: effects of three different sugars[J]. *Cryobiology*, 2018, 83: 97 - 99
- 张淑杰, 康玉凡. 天然活性多糖研究进展[J]. *食品工业科技*, 2017, 38(2): 379 - 389

(下转第 187 页)

- female infertility: a pilot study[J]. *Metabolomics*, 2019, 15(2): 19
- 11 Chen M, Zhang B, Cai S, *et al.* Metabolic disorder of amino acids, fatty acids and purines reflects the decreases in oocyte quality and potential in sows[J]. *J Proteomics*, 2019, 200: 134 - 143
- 12 Sun Z, Song J, Zhang X, *et al.* SWATH^{HM} - based metabolomics of follicular fluid in patients shows that progesterone adversely affects oocyte quality[J]. *Biomed Res Int*, 2018, 2018: 1780391
- 13 Mirabi P, Chaichi MJ, Esmailzadeh S, *et al.* The role of fatty acids on ICSI outcomes: a prospective cohort study[J]. *Lipids Health Dis*, 2017, 16(1): 18
- 14 Shibahara H, Ishiguro A, Inoue Y, *et al.* Mechanism of palmitic acid - induced deterioration of in vitro development of porcine oocytes and granulosa cells[J]. *Theriogenology*, 2020, 141: 54 - 61
- 15 Liu L, Yin TL, Chen Y, *et al.* Follicular dynamics of glycerophospholipid and sphingolipid metabolisms in polycystic ovary syndrome patients[J]. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2019, 185: 142 - 149
- 16 Montani DA, Braga DPAF, Borges E Jr, *et al.* Understanding mechanisms of oocyte development by follicular fluid lipidomics[J]. *J Assist Reprod Genet*, 2019, 36(5): 1003 - 1011
- 17 Agarwal A, Sengupta P, Durairajanayagam D. Role of L - carnitine in female infertility[J]. *Reprod Biol Endocrinol*, 2018, 16(1): 5
- 18 Kitano Y, Hashimoto S, Matsumoto H, *et al.* Oral administration of l - carnitine improves the clinical outcome of fertility in patients with IVF treatment[J]. *Gynecol Endocrinol*, 2018, 34(8): 684 - 688
- 19 Wen R, Gan X, Hu S, *et al.* Evidence for the existence of de novo lipogenesis in goose granulosa cells[J]. *Poult Sci*, 2019, 98(2): 1023 - 1030
- 20 姜文晶, 孙振高, 王丹丹, 等. 脂质代谢组学与多囊卵巢综合征发病及 IVF - ET 结局的相关性研究进展[J]. *生殖医学杂志*, 2021, 30(5): 683 - 686
- 21 Chen X, Lu T, Wang X, *et al.* Metabolic alterations associated with polycystic ovary syndrome: a UPLC Q - exactive based metabolomic study[J]. *Clin Chim Acta*, 2020, 502: 280 - 286
- 22 Porter FD, Herman GE. Malformation syndromes caused by disorders of cholesterol synthesis[J]. *J Lipid Res*, 2011, 52(1): 6 - 34
- 23 Ferchaud - Roucher V, Barner K, Jansson T, *et al.* Maternal obesity results in decreased syncytiotrophoblast synthesis of palmitoleic acid, a fatty acid with anti - inflammatory and insulin - sensitizing properties[J]. *FASEB J*, 2019, 33(5): 6643 - 6654
- 24 Zhang XX, Yu Y, Sun ZG, *et al.* Metabolomic analysis of human follicular fluid: potential follicular fluid markers of reproductive aging[J]. *J Pak Med Assoc*, 2018, 68(12): 1769 - 1781
- 25 Chen X, Lu T, Wang X, *et al.* Metabolic alterations associated with polycystic ovary syndrome: a UPLC Q - Exactive based metabolomic study[J]. *Clin Chim Acta*, 2020, 502: 280 - 286
- 26 Antunes RA, Mancebo ACA, Reginatto MW, *et al.* Lower follicular fluid vitamin D concentration is related to a higher number of large ovarian follicles[J]. *Reprod Biomed Online*, 2018, 36(3): 277 - 284
- 27 贾新转, 王聪敏, 刘二缓, 等. 继发性不孕患者卵泡液 25 - (OH)D 水平与 IVF 卵母细胞发育关系的研究[J]. *天津医药*, 2020, 48(12): 1187 - 1192

(收稿日期: 2022 - 07 - 28)

(修回日期: 2022 - 08 - 11)

(上接第 183 页)

- 11 Gore M, Narvekar A, Bhagwat A, *et al.* Macromolecular cryoprotectants for the preservation of mammalian cell culture: lessons from crowding, overview and perspectives[J]. *J Mater Chem B*, 2022, 10(2): 143 - 169
- 12 Yong KW, Laouar L, Elliott JAW, *et al.* Review of non - permeating cryoprotectants as supplements for vitrification of mammalian tissues [J]. *Cryobiology*, 2020, 96: 1 - 11
- 13 Naing SW, Wahid H, Mohd Azam K, *et al.* Effect of sugars on characteristics of Boer goat semen after cryopreservation[J]. *Anim Reprod Sci*, 2010, 122(1 - 2): 23 - 28
- 14 Tian Y, Visser JC, Klever JS, *et al.* Orodispersible films based on blends of trehalose and pullulan for protein delivery[J]. *Eur J Pharm Biopharm*, 2018, 133: 104 - 111
- 15 Stanishevskaya O, Silyukova Y, Pleshanov N, *et al.* Role of mono - and disaccharide combination in cryoprotective medium for rooster semen to ensure cryoresistance of spermatozoa[J]. *Molecules*, 2021, 26(19): 5920
- 16 Angel - Velez D, De Coster T, Azari - Dolatabad N, *et al.* New alternative mixtures of cryoprotectants for equine immature oocyte vitrification[J]. *Animals (Basel)*, 2021, 11(11): 3077
- 17 张小刚, 王臻, 李浩, 等. 不同浓度海藻糖对奶山羊睾丸组织冷冻保存效果的影响[J]. *畜牧与兽医*, 2016, 48(4): 25 - 29
- 18 杜天奇, 迟令龙, 赵淑芹, 等. 不同冷冻保护剂在羊卵巢整体冻存中的效果比较[J]. *解剖学报*, 2015, 46(3): 415 - 421
- 19 张啸龙, 张杰平, 王金玉, 等. 不同冻存保护剂对未性成熟小鼠睾丸生精细胞冻存的影响[J]. *生殖医学杂志*, 2022, 31(3): 366 - 372
- 20 李方舟, 王艳华, 温飞, 等. 海带多糖和枸杞多糖对山羊精液冷冻保存效果的影响[J]. *家畜生态学报*, 2018, 39(3): 48 - 52
- 21 Linlin L, Yongsheng T, Zhentong L, *et al.* Cryopreservation of embryos of humpback grouper (*Cromileptes altivelis*) using combinations of non - permeating cryoprotectants[J]. *Aquaculture*, 2022, 548: 737524
- 22 李振通, 田永胜, 唐江, 等. 星斑川鲷胚胎的玻璃化冷冻保存[J]. *安徽农业大学学报*, 2020, 47(3): 373 - 379
- 23 Fujihara M, Kaneko T, Inoue - Murayama M. Vitrification of canine ovarian tissues with polyvinylpyrrolidone preserves the survival and developmental capacity of primordial follicles[J]. *Sci Rep*, 2019, 9(1): 3970
- 24 Ordóñez - León EA, Martínez - Rodero I, García - Martínez T, *et al.* Exopolysaccharide ID1 improves post - warming outcomes after vitrification of in vitro - produced bovine embryos[J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(13): 7069
- 25 蔡玉芳, 王燕蓉, 孔斌, 等. 枸杞多糖对胎儿卵巢组织冷冻保存的影响[J]. *中国组织工程研究*, 2012, 16(40): 7475 - 7479
- 26 周树兰, 王成. 附子多糖对深低温保存腹主动脉线粒体结构和功能的影响[J]. *山西医科大学学报*, 2022, 53(2): 221 - 226

(收稿日期: 2022 - 07 - 24)

(修回日期: 2022 - 08 - 19)