

# 不同渗透压的稀释液对猕猴精子低温冷冻保存的影响

采克俊<sup>1,2</sup>, 李亚辉<sup>1,3</sup>, 李 剑<sup>1</sup>, 和协超<sup>1</sup>, 季维智<sup>1,\*</sup>

(1. 中国科学院昆明动物研究所, 云南 昆明 650223; 2. 中国科学院研究生院, 北京 100039;  
3. 云南农业大学 食品科学与技术学院, 云南 昆明 650201)

**摘要:**以稀释液 TTE (382 mOsm/kg) 为对照, 研究了 5 种渗透压 (688、389、329、166、43 mOsm/kg) 的 TEST 稀释液 (TEST、mTEST1、mTEST2、mTEST3、mTEST4) 在冷冻过程中对猕猴精子功能的影响。精液一步稀释于含甘油的防冻液中, 甘油的终浓度为 5% (v/v)。在冷冻前后分别检测精子的运动度和质膜完整性, 后者用 Hoechst 33342 和碘化丙锭双色标记流式细胞术分析。结果表明: 冷冻之前, 与鲜精相比, 用 TEST 和 mTEST4 稀释的精子运动度和质膜完整性显著降低 ( $P < 0.001$ ), 其余组中除 mTEST2 稀释的精子质膜完整性显著降低 ( $P < 0.05$ ) 外, 精子运动度无差异; 冷冻复苏后, TTE、mTEST3 和 mTEST1 冻存精子的运动度和质膜完整性最高, 其次是 mTEST2, TEST 和 mTEST4 冷冻效果最差 ( $P < 0.05$ )。提示等渗、适当高渗或低渗的稀释液适合猕猴精子的冷冻保存; 对精子产生高渗毒害作用是导致猕猴精子用 TEST 冷冻存活率低的主要原因。

**关键词:** 猕猴; 精子; 渗透压; 冷冻保存; 流式细胞术

中图分类号: Q959.848; Q492 文献标识码: A 文章编号: 0254–5853 (2005) 03–0305–06

## Effects of Extenders Varying in Osmolality on Rhesus Monkey (*Macaca mulatta*) Spermatozoa Cryopreservation

CAI Ke-jun<sup>1,2</sup>, LI Ya-hui<sup>1,3</sup>, LI Jian<sup>1</sup>, HE Xie-chao<sup>1</sup>, JI Wei-zhi<sup>1,\*</sup>

(1. Kunming Institute of Zoology, the Chinese Academy of Sciences, Kunming 650223, China;

2. Graduate School, the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039, China;

3. College of Food Science and Technology, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China)

**Abstract:** Effects of five TEST extenders varying in osmolality on rhesus monkey sperm cryopreservation were studied, using TTE as the control. These five extenders were designated as TEST, mTEST1, mTEST2, mTEST3 and mTEST4, and the corresponding osmolalities were 688, 389, 329, 166 and 43 mOsm/kg, respectively. Semen were diluted in one step into freezing media containing glycerol, and the final concentration of glycerol was 5% (v/v). Sperm survival was determined by assessment of sperm motility and membrane integrity prior to and after cryopreservation. Membrane integrity was evaluated using Hoechst 33342/propidium iodide dual staining procedure and flow cytometry. The results showed that, before freezing, motility and membrane integrity of spermatozoa diluted in TEST and mTEST4 were drastically reduced ( $P < 0.001$ ) compared with fresh sperm. In remaining groups, sperm function remained unaffected after equilibration except that the membrane integrity of spermatozoa diluted in mTEST2 was significantly lower than that of fresh semen ( $P < 0.05$ ). The sperm cryopreservation efficiency for these extenders, evaluated by post-thaw sperm motility and membrane integrity, is: TTE, mTEST3 and mTEST1 > mTEST2 > TEST and mTEST4 ( $P < 0.05$ ). The results suggest that isosmotic, moderately hyperosmotic or hypoosmotic extenders are favorable for the cryopreservation of rhesus monkey spermatozoa and the hyperosmotic stress of TEST accounts for the lower survival of rhesus monkey spermatozoa frozen in this medium.

**Key words:** Rhesus monkey; Spermatozoa; Osmolality; Cryopreservation; Flow cytometry

收稿日期: 2004–12–16; 接受日期: 2005–01–24

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30370166); 国家重点基础研究发展规划项目 (G2000016108); 中国科学院知识创新工程资助项目 (KSCX1-05)

\* 通讯作者 (Corresponding author), Tel: 0871–5139413, E-mail: wji@mail.kiz.ac.cn.

自从 1949 年甘油的冷冻保护作用被偶然发现以来,许多哺乳动物的精液已被成功地冷冻保存。然而目前精子冷冻的研究在很大程度上是经验性的,即使使用最成功的冷冻方法,也仅有约 50% 的精子能够存活下来。而灵长类动物精子成功冻存的报道仍然很少。猕猴 (*Macaca mulatta*) 是生物学和医学研究中使用最为广泛的实验动物之一。虽然最早的猕猴精子冷冻研究 (Roussel & Austin, 1967; Leverage et al, 1972) 距今已有 30 多年的历史,但是至今仅有一篇用冷冻精液人工授精生产出正常后代 (Sanchez-Partida et al, 2000) 的文献报道。其原因可能是由于灵长类动物的精子非常脆弱 (Gould & Styperek, 1989), 以及人们对多数物种精子的基本生物学特性及其冷冻的低温生物学机理缺乏足够的了解。因此,继续加强猕猴精子冷冻,特别是基础低温生物学特性的研究,建立一个更加优化的方法来提高猕猴冷冻精子的受精能力十分必要。这将有利于该物种的繁殖,促进基础胚胎学的研究,使得长期保存有价值的雄性猕猴的遗传基因成为可能,且成功的猕猴精子冷冻方法和经验还可以为其他珍稀濒危灵长类动物的精子冻存所借鉴。

本实验室曾经比较了两种基于卵黄 - Tris 的稀释液 (TTE 和 TEST) 对猕猴精子的冷冻保护效果,发现用 TEST 冻存的精子复苏后运动度很差 (20% 或更少),超微结构明显破坏;而 TTE 能较好地保护精子的结构和功能 (Si et al, 2000; Li et al, 2002)。先前推测这种差异的主要原因可能在于 TEST 稀释液中单一的糖成分不能完全保护精子避免低温损伤 (Li et al, 2002)。最近的研究表明猕

猴精子对高渗透压很敏感,对低渗透压有相当的耐受性 (Rutllant et al, 2003), 而用于猕猴精子冻存的 TEST (Tollner et al, 1990) 渗透压很高 (688 mOsm/kg)。是否因为该防冻液的渗透压超过了猕猴精子的耐受范围,从而造成对精子结构和功能的损伤?鉴于此,本文以 TTE 为对照,探讨不同渗透压的 TEST 稀释液对猕猴精子冷冻前后结构和功能的影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 精液采集

5 只 8~11 岁成年健康雄性猕猴由中国科学院昆明动物研究所实验动物中心提供。肌肉注射盐酸氯胺酮 (4 mg/kg 体重) 麻醉后,用阴茎电刺激法 (Yang et al, 1994) 采精,并将精液收集在 50 mL 的离心管中。其内含 2 mL 预热的 TALP-Hepes 洗精液 (Bavister et al, 1983)。37 °C 液化 30 min 后,收集液体部分于 200 g 离心两次,每次 10 min。去除上清,收集沉淀部分并轻柔地混匀,取少量样品检测鲜精的运动度和质膜完整性,以比较各组平衡后精子功能的变化情况。

### 1.2 防冻液的配制

两种稀释液 TTE 和 TEST 及 4 种改变的 TEST 稀释液 (mTEST) 的组成及其渗透压见表 1。按 6 种稀释液的组成和剂量,将各自称量好的药品和新鲜卵黄溶于 Milli-Q 纯水中混匀,于 10 000 g 离心 1 h 去除卵黄颗粒。上清液用 NaOH 或 HCl 调节 pH 至 7.0~7.2,分装并储存于 -30 °C 待用。各种稀释液(不含甘油)的渗透压为渗透压仪(Osmette A,

表 1 6 种稀释液的组成及渗透压

Tab. 1 Composition of 6 extenders for sperm freezing and their osmolalities

成分 Component (g/100 mL)	TTE	TEST	mTEST1	mTEST2	mTEST3	mTEST4
三羟甲基氨基甲烷 Tris	0.2	1.027	0.514	0.514	0.257	
N - 三 (羟甲基) 甲基 - 2 - 氨基乙磺酸 Tes	1.2	4.325	2.162	2.162	1.081	
葡萄糖 Glucose	2	1	1			
乳糖 Lactose	2					
棉籽糖 Raffinose	0.2					
卵黄 Egg Yolk (mL)	20	20	20	20	20	20
青霉素 Penicillin-G (IU)	10 000	10 000	10 000	10 000	10 000	10 000
硫酸链霉素 Streptomycin sulfate	0.005	0.005	0.005	0.005	0.005	0.005
渗透压 Osmolality (mOsm/kg)	382	688	389	329	166	43

5002, Precision System Inc., USA) 两次测量结果的平均值。所有稀释液储存时间不超过两周。使用前在 37 °C 水浴中解冻, 然后平衡至室温, 再分别加入 5.3% (v/v) 的甘油, 配成防冻液。所有化学药品均来自于 Sigma 公司。

### 1.3 精子冷冻保存与解冻复苏

每只猕猴取 2 份, 共 10 份精液样品用于冷冻实验。在室温下, 把洗过的精子分为 6 等份, 一步稀释于 19 倍体积、含甘油的相应防冻液中。稀释后精子密度大约为  $8 \times 10^7/\text{mL}$ , 甘油的终浓度为 5% (v/v)。稀释后的样品置于 4 °C 冰箱平衡 2 h 后, 分装入 0.25 mL 的冷冻麦管 (IMV, L'Aigle, France), 4 °C 继续平衡至 3 h。将麦管水平地置于液氮蒸汽上方 4 cm 处冷冻 10 min, 然后投入液氮保存。在进行冷冻的同时, 将完成 3 h 平衡后的剩余样品, 用 9 倍体积的 TALP-Hepes 洗精液稀释, 测定各组冷冻前的精子功能。

解冻时将麦管从液氮中迅速取出, 直接投入 37 °C 水浴中 2 min, 迅速搅动使精子解冻复苏。将解冻的样品收集到 15 mL 试管中, 加入 1 mL 37 °C 的 TALP-Hepes 洗精液, 200 g 离心两次, 每次 10 min; 洗去防冻剂后, 最终用 1 mL TALP-Hepes 混匀。

### 1.4 精子功能的检测

**1.4.1 精子运动度的检测** 在 4 °C 平衡以及解冻复苏后, 记数各种稀释液的精子的运动度。取 8  $\mu\text{L}$  精液滴加到 37 °C 预热的载玻片上, 在显微镜下记数前向运动精子所占的百分率。每个样品至少记数 200 个精子, 重复两次。

**1.4.2 精子质膜完整性的检测** 4 °C 平衡后以及解冻复苏后, 采用本实验室建立的 Hoechst 33342 (H342) 和碘化丙锭 (PI) 双重荧光染色法、流式细胞术 (flow cytometry, FCM) 检测各种稀释液的精子的质膜完整性。染色方法: 1 mL 样品中加入 H342 (1 mg/mL) 6  $\mu\text{L}$ 、PI (1 mg/mL) 8  $\mu\text{L}$ , 混匀后 37 °C 避光孵育 15 min。染色后的样品用流式细胞仪 FACS Vantage SE (Becton Dickinson) 检测。用 300 mW 的紫外激光同时激发 H342 和 PI, 前者发蓝色荧光, 后者发红色荧光。两种荧光经 560 SP 分光镜分开, 并分别用 390 LP、630/22 BP 收集。利用 H342 荧光作为触发信号 (Channel 200) 除去杂质。每个样品测试 10 000 个细胞。数据用 CellQuest 软件 (Becton Dickinson) 分析。活精子只被

H342 标记; 死精子为 PI 阳性, 同时也被 H342 标记 (Cai et al, 2003)。用 TTE 冻存样品质膜完整性的流式细胞术检测结果见图 1。

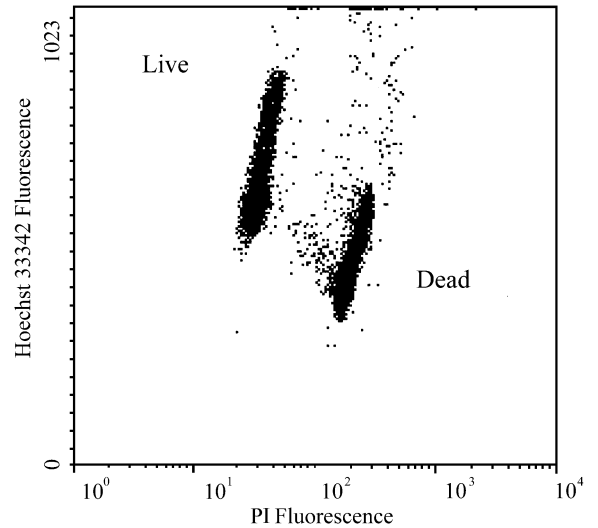


图 1 猕猴冷冻精液 PI/H342 双重染色流式细胞术检测的荧光点图

Fig. 1 Flow cytometric dot plot of rhesus monkey spermatozoa after stained with H342 and PI 显示两群细胞。只被 H342 标记的为活精子; PI 阳性、同时也被 H342 标记的为死精子。

Displaying two main populations. The living sperms were stained only with H342, whereas the dead sperms were stained with both H342 and PI.

### 1.5 统计分析

实验结果用平均值  $\pm$  标准差表示。百分率数值进行平方根的反正弦转换, 然后通过单因素方差分析, 用最小显著差数法 (least significant difference test) 比较两两数据间的差异显著性。

## 2 结果

### 2.1 不同渗透压的稀释液对冷冻前猕猴精子运动度和质膜完整性的影响

4 °C 平衡 3 h 后, 6 种稀释液精子的运动度和质膜完整性见图 2。与鲜精相比, TEST 和 mTEST4 稀释液精子的运动度和质膜完整性均极显著下降 ( $P < 0.001$ )。其他稀释液精子运动度无显著差异 ( $P > 0.05$ ), mTEST2 稀释液精子质膜完整性显著降低 ( $P < 0.05$ )。

### 2.2 不同渗透压的稀释液对冷冻复苏后猕猴精子运动度和质膜完整性的影响

6 种防冻液冻存精子复苏后的运动度和质膜完整性见图 3。与冷冻前精子相比, 6 种防冻液冻存

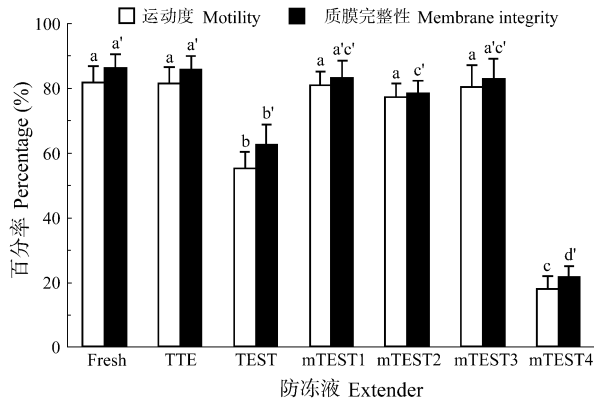


图2 不同渗透压的稀释液冷冻前对精子运动度和质膜完整性的影响

Fig. 2 Effects of different extenders of varying osmolality on sperm motility and membrane integrity before cryopreservation

柱上不同字母表示差异显著(最小显著差数法,  $P < 0.05$ )。Bars with different letters are significantly different (Least significant difference test,  $P < 0.05$ )。)

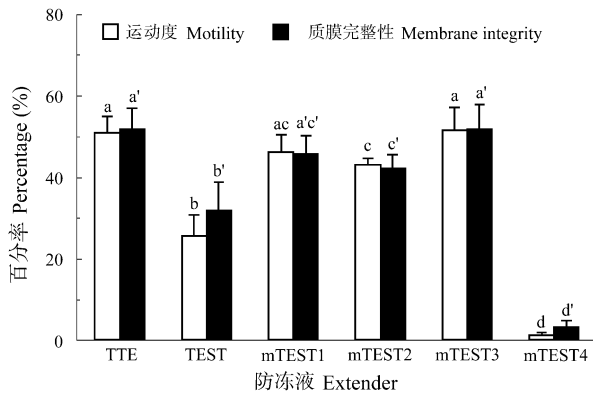


图3 不同渗透压的稀释液对冷冻复苏精子运动度和质膜完整性的影响

Fig. 3 Effects of different extenders of varying osmolality on post-thaw sperm motility and membrane integrity

柱上不同字母表示差异显著(最小显著差数法,  $P < 0.05$ )。Bars with different letters are significantly different (Least significant difference test,  $P < 0.05$ )。)

的精子复苏后运动度和质膜完整性均显著下降( $P < 0.05$ )。

6种稀释液冻存精子的运动度和质膜完整性相比较:  $TTE = mTEST3 > mTEST1 > mTEST2 > TEST > mTEST4$ , 前两者的运动度和质膜完整性与后三者有显著差异( $P < 0.05$ )。后三者间的精子运动度和质膜完整性也有显著差异( $P < 0.05$ )。

### 3 讨论

本文结果表明, 稀释液的渗透压对猕猴精子冷

冻效果影响很大, 对精子产生高渗毒害作用是导致猕猴精子用 TEST 冷冻存活率低的主要原因。即使在平衡过程中, 过高 (TEST, 688 mOsm/kg) 或过低 (mTEST4, 43 mOsm/kg) 的渗透压都会损伤精子的结构和功能, 对冷冻复苏后精子结构和功能的损伤更加剧烈。总的来说, 只要猕猴精子稀释于合适的防冻液, 冷冻过程中对精子功能损伤主要发生在冷冻—复苏这一步骤, 而在冷冻前平衡 3 h 对精子功能无明显伤害。

通常认为等渗或适当高渗的稀释液适合哺乳动物精子的冷冻保存 (Zeng et al, 2001)。本文接近等渗的 mTEST2 和适当高渗的 TTE、mTEST1 对猕猴精子结构和功能影响不大, 是较适合的稀释液。但适当低渗的 mTEST3 也有同样的效果, 这一点与以往报道不同。在以往渗透压对精子冷冻影响的研究实验中, 一般采用两步稀释法, 即样品首先用不含甘油的稀释液稀释, 冷却到 4 °C 后再加入含甘油的防冻液进行第 2 次稀释 (Zeng et al, 2001; Liu et al, 1998)。在第 1 次稀释后的低渗稀释液就会对精子结构和功能造成伤害, 因而不适合精子冻存。最近在猕猴精子成功冷冻的报道 (Si et al, 2000, 2004) 中也采用两步稀释法。我们前期的研究证明猕猴精子一步稀释于含甘油的防冻液与采用两步稀释法结果无显著差异 (资料待发表)。且一步稀释法更加简便适用, 故本文中采用了该方法。在确定稀释液的效果时, 不仅要考虑非渗透性成分对整个防冻液渗透压的贡献; 也要考虑渗透性防冻剂进入细胞内, 从而改变细胞内外渗透压平衡 (Salamon & Maxwell, 1995) 的问题。因而, 低渗的 mTEST3 取得同样好的效果的原因可能在于加入甘油提高了整个防冻液的渗透压, 有利于保持细胞内外的渗透压平衡, 缓解或消除了非渗透性成分对精子的低渗打击。在我们后续的研究中已再次证明了使用一步稀释法冻存猕猴精液时, 适当低渗的化学成分确定的稀释液同样有效 (资料待发表)。通过室温下耐渗透压特性的研究, 已发现猕猴精子对高渗打击尤其敏感, 而对低渗条件有相当的耐受性 (Rutllant et al, 2003)。本文的实验结果也支持这一结论。当然, 如果稀释液的渗透压过低, 即使加入甘油, 可能仍然会对精子造成低渗损伤。本文中稀释于 mTEST4 的猕猴精子冷冻前后很多精子尾部都卷曲肿胀 (资料未显示), 呈典型的低渗肿胀状态 (Jeyendran et al, 1984), 说明 mTEST4 过低的渗透

压已经超过猕猴精子的耐受范围。缺乏其他胞外成分的保护作用也可能加剧 mTEST4 对精子功能的损伤。采用一步稀释法,适当低渗的稀释液是否也适合其他哺乳动物精液的冷冻保存还有待于进一步研究。

本研究中作为对照的稀释液 TTE 已经成功地应用于食蟹猴 (Sankai et al, 1994)、猕猴 (Si et al, 2000) 以及日本猴 (Sankai et al, 1997) 精子的冷冻保存。稀释液 TEST 也成功地应用于食蟹猴 (Tollner et al, 1990) 精子的冷冻保存,但并不适合猕猴精子的冷冻保存 (Si et al, 2000)。这可能是因为猕猴精子比食蟹猴对高渗打击更加敏感。通过改变成分浓度,把渗透压降到适当高渗 (mTEST1) 或适当低渗 (mTEST3), TEST 可以取得与 TTE 相近的结果。有趣的是,猕猴精子用接近等渗的稀释液 mTEST2 稀释平衡后,质膜完整性显著降低;复苏后运动度和质膜完整性都显著低于用 TTE 和 mTEST3 冷冻的样品,也低于 (但差异不显著) mTEST1。稀释液 mTEST2 与 TTE、mTEST1 之间的主要区别在于后两者都含有糖类物质。而糖常常作为非渗透性防冻剂用于精子的冷冻保存,其作用是提供能源底物,维持渗透压,并能起到防冻剂的作用 (Yildiz et al, 2000)。含有一种或几种糖类的稀释液被广泛地用于多种灵长类动物精液的冷冻保存 (Morrell & Hodges, 1998)。猕猴精子也成功地冻存于适当高渗的以糖类为主要成分的稀释液中 (Si et al, 2004)。本研究的结果也进一步证实猕猴精子的冷冻过程中,糖类物质可能发挥着一定的保护作用;同时提示添加糖类后适当高渗的稀释液不会对精子结构和功能产生严重损伤,但此时

稀释液总的渗透压必须控制在精子的耐受范围之内。TEST 即使已含有 1% 的葡萄糖,但由于渗透压过高而不适合猕猴的精子冻存。至于不含糖的适当低渗的 mTEST3 取得与 TTE 一样好的效果,并优于等渗的 mTEST2,其原因可能在于适当低渗的 mTEST3 与 5% 的甘油结合有利于降低甘油对猕猴精子潜在的高渗毒害作用,而等渗的 mTEST2 既缺乏糖类的保护,又不能缓冲甘油的高渗毒性。

先前的关于非人灵长类精子冷冻保存的报道中,多是用常规的方法检测精子功能,如复苏运动度、透明带穿透试验、体外受精和超微结构检查等 (Leverage et al, 1972; Roussel & Austin, 1967; Sankai et al, 1994; Si et al, 2000; Li et al, 2002)。最近又应用荧光显微镜观察精子质膜和顶体的完整性 (Si et al, 2004)。这些方法虽然可以提供一些精子功能的信息,但费时费力,检测精子数量少,且易受操作者的主观影响,不能准确反映精子的功能。近年来,流式细胞术越来越广泛应用于精子功能的研究,为精子功能实验提供了快速、客观、多指标、大通量的检测手段,弥补了传统方法的缺陷,成为一种检测精液质量的新平台 (Cai et al, 2003)。本文首次将流式细胞术应用于灵长类动物冻精的功能检测,利用本研究室发展的 H342/PI 双重染色法检测了猕猴冻精的质膜完整性。检测结果表明,总的来说,质膜完整性要略高于精子运动度,两者同样都能反映出各组实验结果的差异,但利用流式细胞术检测质膜完整性更加客观快捷。

致谢:中国科学院昆明动物研究所司维博士审阅全文,并提出宝贵意见,谨致谢忱。

## 参考文献:

- Bavister BD, Leibfried ML, Lieberman G. 1983. Development of preimplantation embryos of the golden hamster in a defined culture medium [J]. *Biol. Reprod.*, **28** (1): 235-247.
- Cai KJ, Si W, Li YH, Ji WZ. 2003. Evaluation of mammalian semen quality by flow cytometry [J]. *Zool. Res.*, **24** (4): 311-317. [采克俊, 司维, 李亚辉, 季维智. 2003. 流式细胞术在哺乳动物精液质量检测中的应用. *动物学研究*, **24** (4): 311-317.]
- Gould KG, Steperek RP. 1989. Improved methods for freeze preservation of chimpanzee sperm [J]. *Am. J. Primatol.*, **18**: 275-284.
- Jeyendran RS, Vandervan HH, Perez-Pelaez M, Crabo BG, Zaneveld LJD. 1984. Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics [J]. *J. Reprod. Fert.*, **70** (1): 219-228.
- Leverage WE, Valerio DA, Schultz AP, Kingsbury E, Dorey C. 1972. Comparative study on the freeze preservation of spermatozoa, primate, bovine, and human [J]. *Laboratory Animal Science*, **22** (6): 882-889.
- Li XL, Si W, Wang H, Zou RJ, Ji WZ. 2002. Function of sugars during cryopreservation of rhesus macaque (*Macaca mulatta*) spermatozoa [J]. *Zool. Res.*, **23** (3): 205-209. [李喜龙, 司维, 王红, 邹如金, 季维智. 2002. 糖在猕猴精子低温冷冻保存中的作用. *动物学研究*, **23** (3): 205-209.]
- Liu ZS, Foote RH, Brockett CC. 1998. Survival of bull sperm frozen at different rates in media varying in osmolality [J]. *Cryobiology*, **37** (3): 219-230.
- Morrell JM, Hodges JK. 1998. Cryopreservation of non-human primate sperm: Priorities for future research [J]. *Anim. Reprod. Sci.*, **53** (1-4): 43-63.

- Roussel JD, Austin CR. 1967. Preservation of primate spermatozoa by freezing [J]. *J. Reprod. Fertil.*, **13** (2): 333–335.
- Rutllant J, Pommer A, Meyers S. 2003. Osmotic tolerance limits and properties of rhesus monkey (*Macaca mulatta*) spermatozoa [J]. *J. Androl.*, **24** (4): 534–541.
- Salamon S, Maxwell WM. 1995. Frozen storage of ram semen: I. Processing, freezing, thawing and fertility after cervical insemination [J]. *Anim. Reprod. Sci.*, **37** (3): 185–249.
- Sanchez-Partida LG, Maginnis G, Dominko T, Martinovich C, McVay B, Fanton J, Schatten G. 2000. Live rhesus offspring by artificial insemination using fresh sperm and cryopreserved sperm [J]. *Biol. Reprod.*, **63**: 1092–1097.
- Sankai T, Terao K, Yanagimachi R, Cho F, Yoshikawa Y. 1994. Cryopreservation of spermatozoa from cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*) [J]. *J. Reprod. Fertil.*, **101** (2): 273–278.
- Sankai T, Shimizu K, Cho F, Yoshikawa Y. 1997. *In vitro* fertilization of follicular oocytes by frozen thawed spermatozoa in Japanese monkeys [J]. *Lab. Anim. Sci.*, **47** (1): 58–62.
- Si W, Zheng P, Tang X, He X, Wang H, Bavister BD, Ji W. 2000. Cryopreservation of rhesus macaque (*Macaca mulatta*) spermatozoa and their functional assessment by *in vitro* fertilization [J]. *Cryobiology*, **41** (3): 232–240.
- Si W, Li YH, Guan M, Ji WZ. 2004. Cryoprotective effect of four penetrating cryoprotectants on rhesus monkey (*Macaca mulatta*) spermatozoa cryopreservation [J]. *Zool. Res.*, **25** (1): 32–36. [司维, 李亚辉, 关沫, 季维智. 2004. 四种渗透性防冻剂在猕猴精子低温冷冻保存中对精子功能状态的影响. *动物学研究*, **25** (1): 32–36.]
- Tollner TL, VandeVoort CA, Overstreet JW, Drobnis EZ. 1990. Cryopreservation of spermatozoa from cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*) [J]. *J. Reprod. Fertil.*, **90** (2): 347–352.
- Yang SC, Ji WZ, Chen JC, Shang EY, Zou RJ. 1994. The use of improved penile electroejaculation in rhesus, Tibetan and assamese macaques and study on the parameters of their semen [J]. *Zool. Res.*, **15** (1): 77–83. [杨上川, 季维智, 陈建春, 商恩缘, 邹如金. 1994. 一种改进的阴茎电刺激采精法和猕猴藏酋猴及熊猴的采精及其精液特征的初步研究. *动物学研究*, **15** (1): 77–83.]
- Yildiz C, Kaya A, Aksoy M, Tekeli T. 2000. Influence of sugar supplementation of the extender on motility, viability and acrosomal integrity of dog spermatozoa during freezing [J]. *Theriogenology*, **54** (4): 579–585.
- Zeng WX, Shimada M, Isobe N, Terada T. 2001. Survival of boar spermatozoa frozen in diluents of varying osmolality [J]. *Theriogenology*, **56** (3): 447–458.

## 2005 中国科学院 – 美国哥伦比亚大学学术交流在昆进行

为了增进国内与国外研究机构之间的交流和了解, 加强在前沿科学领域的对话, 应中国科学院陈竺副院长的邀请, 由来自美国哥伦比亚大学、洛克菲勒大学、俄勒冈大学、Wake Forest 大学、NIH, 以及 AstraZeneca、Wyeth 两家英美制药公司的 19 位著名脑与神经研究学者组成的代表团于 2005 年 5 月抵达昆明。5 月 16—18 日代表团成员与中国科学院昆明动物研究所的研究人员进行了广泛的学术交流。来访的代表中不乏该研究领域的领军人物, 如洛克菲勒大学的 C. Gilbert 教授, 哥伦比亚大学的 M. E. Goldberg 和 N. Graham 教授, NIH 的 B. J. Richmond 教授等。

“2005 中国科学院 – 美国哥伦比亚大学学术研讨会”于 5 月 16—17 日举行。9 位美国学者和 5 位昆明动物所的学者在会上做了报告, 双方就目前神经科学研究的前沿热点问题展开了讨论: 美方交流的主要内容是知觉学习、运动神经编码和控制、视觉机制, 还有情绪、恐惧、奖赏等方面研究取得的进展; 中国学者在脑进化分子机制、神经干细胞移植治疗脑疾病、前额叶认知功能、应激与海马的关系、脑衰老机制方面做了报告。

会议期间, 代表团一行参观了中国科学院昆明灵长类研究中心, Charles Gilbert 和 Michael E. Goldberg 教授均表示这是一个已达到国际水平的中心, 对中心的配套设施给予了高度评价, 认为其发展前景十分乐观。还参观了昆明动物所马原野、徐林、宿兵和季维智研究员的实验室。Norma Graham 教授对中方实验室提出了很多建设性意见, 并谈到双方合作研究的前景, 还提出学生到对方实验室做博士后的设想。AstraZeneca 和 Wyeth 公司认为昆明动物所灵长类神经研究非常具有特色, 希望进行抗精神病药物的合作研发。

代表团一行还将访问位于上海的中国科学院神经科学研究所, 并在神经科学领域展开讨论。