

不同防冻剂对兔胚胎干细胞慢速冷冻保存的影响

袁晓华^{1,2}, 王淑芬^{1,2}, 杨世华¹, 李亚辉³, 陈洪伟^{1,2}, 季维智^{1,*}

(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, 云南 昆明 650223)

摘要: 干细胞冷冻保存是干细胞研究和临床应用中的必需技术。为提高兔胚胎干细胞在慢速冻存过程中的保存效果, 比较了二甲基亚砜 (DMSO) 和乙二醇 (ethylene glycol, EG) 对兔胚胎干细胞冷冻保护效果。对冷冻复苏后的细胞进行台盼蓝染色, 并研究其胚胎干细胞分子特性, 结果表明 DMSO 比 EG 具有更好的冷冻保护效果。再在以 10% DMSO 为基础的防冻液中添加膜稳定剂海藻糖 (trehalose) 或谷氨酰胺 (glutamine), 细胞冷冻复苏后结果显示, 谷氨酰胺对兔胚胎干细胞有明显的冷冻保护作用, 使细胞存活率从 71% 提高到 83.7%。当谷氨酰胺浓度为 0、5、10、20、40 mmol/L 分别加入防冻液中后, 20 mmol/L 的谷氨酰胺具有最佳的冷冻保护效果。以上结果得出兔胚胎干细胞慢速冷冻的防冻液改进配方为: 在胚胎干细胞培养液中添加 10% DMSO + 20 mmol/L 谷氨酰胺。

关键词: 兔胚胎干细胞; 慢速冷冻; 防冻液; 谷氨酰胺

中图分类号: TB64; Q813; S829.1 文献标识码: A 文章编号: 0254–5853 (2007) 01–0081–07

The Effects of Different Cryoprotectants on the Cryopreservation of Rabbit Embryonic Stem Cells

YUAN Xiao-hua^{1,2}, WANG Shu-fen^{1,2}, YANG Shi-hua¹, LI Ya-hui³,
CHEN Hong-wei^{1,2}, JI Wei-zhi^{1,*}

(1. Kunming Institute of Zoology, the Chinese Academy of Sciences, Kunming, Yunnan 650223, China;
2. Graduate School, the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039, China;
3. Yunnan Agriculture University, Kunming, Yunnan 650223, China)

Abstract: An effective freezing-thawing technique is crucial for the clinical application of newly derived rabbit embryonic stem (ES) cells. The aim of this study was try to find an optimal cryopreservation protocol for rabbit embryonic stem cells using slow freezing-rapid thawing without a programmable freezer. We tested the effects of the following cryoprotective agents (CPAs) on the post-thaw survival, proliferation and differentiation capacity of rabbit embryonic stem cells: ethylene glycol (EG), dimethyl sulphoxide (Me₂SO, DMSO), trehalose and glutamine. Trypan blue exclusion tests showed that, among the CPA treatments in this study, EG was more toxic to rabbit embryonic stem cells than DMSO. The highest survival rate (83.7%) was obtained when the rabbit embryonic stem cells was cryopreserved with 10% DMSO and 20 mmol/L glutamine in the ES cell culture media. Thawed ES cells kept their pluripotency and differentiation potential.

Key words: Rabbit embryonic stem cells; Slow-rate cooling; Cryoprotectants; Glutamine

胚胎干细胞 (embryonic stem cells, ES cells) 是从囊胚的内细胞团 (inner cell mass, ICM) 或原始生殖细胞 (primordial germ cells) 中分离出来的具有全能性和高度未分化的细胞, 有广阔的应用前

景。现已建成小鼠、兔、猪、猴、马、牛和人等多株胚胎干细胞或胚胎干细胞样的细胞系, 已成为生物医学研究的关键工具 (Sung et al, 2005)。

兔作为一种重要的实验动物, 在生理上比小鼠

* 收稿日期: 2006–11–14; 接受日期: 2006–12–11

基金项目: 国家重点发展项目 (2004CCA01300, 2006CB701500); 国家自然科学基金资助项目 (30370166, 30570906); 中国科学院重大方向项目 (KSCX1-05)

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

更接近人。其较大的体积,使实验操作更易进行,因此,兔胚胎干细胞在临床研究中较小鼠胚胎干细胞具有更大的优越性。本实验室从兔体外受精胚的内细胞团成功分离出胚胎干细胞系(rabbit *in vitro* fertilized, RF)(Wang et al, 2006)。安全高效的胚胎干细胞冻存方法是广泛用于研究和临床过程中的必要条件,因在建系过程中,需在ES细胞早期传代中冻存一定数量的细胞作为种子细胞,以避免长期体外培养时可能发生的细胞变异或污染,同时ES细胞应用于临床治疗研究时,需要建立细胞库,以确保有低温保存的丰富细胞来源,但采用目前的方法冻存RF细胞的效率不高。

目前胚胎干细胞的冻存主要采用两种方法:慢速降温快速解冻法(slow freezing-rapid thawing)和玻璃化冷冻法(vitrification)(Boon et al, 2005b)。慢速降温法最初应用于小鼠胚胎干细胞上获得成功:即将含10% DMSO与血清的防冻液加入细胞悬液后转入冻存管,再将冻存管置于程序降温盒中并放入-80℃冰箱过夜后再转入液氮保存。此过程实现了细胞的两步降温,即先将细胞以约-1℃/min的速率降温至-80℃,以减少冰晶的形成并使未冻部分溶液浓度逐步提高;而后,将其投入液氮以较快的冷却速率使高浓度的防冻液实现非晶态固化。这种方法的优点在于操作简便、易行,且适用于大量细胞的冻存,但对于小鼠以外的,如兔、灵长类的许多ES细胞系,此方法的保存效率不高。近年来,对于灵长类,尤其是人的胚胎干细胞曾进行过玻璃化冷冻的尝试,虽可提高ES集落存活率(Reubinoff et al, 2001; Zhou et al, 2004; Tsuyoshi et al, 2004),但此方法增加了操作难度,尚有可能增加ES细胞分化率,而且不适于大量细胞的冻存。

本实验以兔胚胎干细胞的冻存为研究内容,采用慢速冷冻方法,并对防冻液成分进行比较优化:比较了慢速冷冻中乙二醇(EG)与二甲基亚砜(DMSO)的保护作用,以及在防冻液中添加膜稳定剂海藻糖或谷氨酰胺对兔ES细胞的冷冻保护作用,建立了一种对兔ES细胞简单高效的冻存方法。

1 材料和方法

1.1 兔ES细胞株RF的培养和传代

兔ES细胞株RF是由兔IVF囊胚中分离培养而来(Wang et al, 2006)。RF细胞培养液由10%

胎牛血清(FCS, Hyclone, Logan, Utah)和90% DMEM高糖培养基(Gibco)组成,并在其中添加2 mmol/L谷氨酰胺(Sigma)、1%的非必需氨基酸(Gibco)和0.1 mmol/L的 β -巯基乙醇(Sigma)溶液。在经 Co^{60} 照射处理的小鼠成纤维细胞的饲养层细胞上保持未分化状态增殖,形成密集的大集落后,每3—5天用5 mg/mL的dispase(Gibco)进行消化,将细胞吹打成单细胞悬液后以1:10比例传代。

1.2 冷冻保护液优化和实验设计

实验一:本实验按防冻液成分分5组,防冻液的基础液为胚胎干细胞培养液除对照组外,在其余4组,中分别添加(1)10% DMSO,(2)10% EG,(3)10% DMSO + 0.1 mol/L Trehalose,(4)10% DMSO + 20 mmol/L Glutamine溶液;实验二:在实验一优化的防冻液成分的基础上分别再添加不同浓度的谷氨酰胺溶液(0.5、10、20、40 mmol/L),研究其最佳的冷冻保护浓度。

1.3 细胞冻存和复苏

收集ES细胞约 1×10^6 /mL,以0.5 mL防冻液悬浮细胞,转入1.8 mL冻存管,将冻存管置于程序降温盒(freezing container, Nalgene, USA)内放入-80℃冰箱过夜后再转入液氮保存。待细胞在液氮中保存一周以上后,自液氮中取出置于40℃水浴中快速解冻后,转入至6 mL含10%血清的培养基中,以200 g离心5 min洗去防冻液,加入胚胎干细胞培养液,将细胞接种于准备好的饲养层上培养。

1.4 复苏后细胞存活能力检测

复苏后取出部分细胞进行台盼蓝染色计数,计算细胞存活率。其余细胞接种于饲养层已铺板的24孔板中,培养3天后观察细胞集落形态的结果并计算集落分化率。在未分化的ES细胞集落细胞较小,集落较紧且立体感强(图3a);分化的细胞较大而扁平,集落松散(图3b)。

1.5 ES细胞全能性鉴定

对复苏培养一段时间的细胞用4%的多聚甲醛室温固定20 min。再用NBT/BCIP染色试剂盒(中国洛阳),按使用说明进行碱性磷酸酶染色。免疫组化染色时,固定处理的细胞分别加入以下抗体:SSEA-1、SSEA-3、SSEA-4、TRA-1-60、TRA-1-81和OCT-4(Chemicon International, Temecula CA)反应,用10%羊血清封闭后加入FITC-(fluorescein

isothiocyanate) 或 PE- (phycoerythrin) 连接的二抗 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) 定位, 细胞核用 Hoechst 33342 (Sigma) 定位。在激光共聚焦显微镜 (Zeiss, LSM 510 META) 下观察结果。

用 TRIZOL RNA 提取试剂盒 (Invitrogen, Carlsbad, CA) 提取细胞总 RNA。基因引物序列见表 2。RT-PCR 检测 ES 细胞中 Sox-2、Nanog 基因及悬浮培养 6 天的拟胚体中代表 3 个胚层的基因: 即 AFP (内胚层)、PAX-6 (外胚层)、BMP-4 (中胚层) 的表达 (Wang et al, 2006)。

1.6 统计方法

采用 SPSS10.0 软件, 百分率经平方根的反正弦转换, 通过单因素方差分析和最小显著差数法 (least significant difference, LSD) 比较数据之间的显著性差异 ($P < 0.05$)。

2 结果

2.1 几种防冻剂对兔 ES 细胞冷冻复苏后的细胞存活率的影响

由表 1 显示: DMSO 具有更好的冷冻保护效

果, 冷冻复苏后细胞存活率为 71%, EG 的细胞存活率为 57.4%, 两者有显著差异 ($P < 0.05$)。在 10% DMSO 防冻液基础上添加海藻糖或谷氨酰胺后, 细胞存活率分别为 67.6% 和 83.7%, 后者与其他各组有显著差异 ($P < 0.05$)。与对照相比, 冷冻复苏培养的胚胎干细胞分化率显著增加 ($P < 0.05$), 但各实验组之间没有显著差异。

2.2 不同浓度谷氨酰胺对 RF 细胞的冷冻保护效果

当以谷氨酰胺浓度分别为 0、5、10、20 和 40 mmol/L 的溶液添加到含 10% DMSO 的防冻液中, 复苏后细胞存活率分别为 68.4%、72.6%、77.9%、86.2% 和 76.8% (图 1)。20 mmol/L 的谷氨酰胺则表现出最佳冷冻保护效果, 与其余各组差异显著 ($n = 6, P < 0.05$)。但各组细胞集落分化率均没有显著差异 (图 2)。

2.3 复苏后 ES 细胞分子鉴定

2.3.1 胚胎干细胞表面标记蛋白的表达 所有组复苏后, 经过恢复培养。每一组观察的未分化 RF 细胞集落均表达强的碱性磷酸酶活性, 免疫组化

表 1 几种防冻液对兔胚胎干细胞 RF 的冷冻保护效果

Tab. 1 Effects of different cryoprotectants on the cryopreservation of rabbit ES cells

实验组 (防冻液成分) Cryoprotectant composition	重复次数 Repeats	细胞存活率 Survival rate (%)	集落分化率 Differentiation rate (%)
对照组 Fresh control	5	97 ± 1.1 ^a	5.1 ± 1.2 ^a
10% DMSO	5	71.0 ± 9.7 ^b	31.7 ± 7.73 ^b
10% EG	5	57.4 ± 6.7 ^c	28.0 ± 5.4 ^b
10% DMSO + 0.1 mol/L trehalose	5	67.6 ± 9.2 ^{bc}	31.7 ± 6.5 ^b
10% DMSO + 20 mmol/L glutamine	5	83.7 ± 5.2 ^d	28.5 ± 6.0 ^b

不同上标字母表示两两比较差异显著 ($P < 0.05$, LSD 检验)。

The different superscripts showed significant differences between every two groups ($P < 0.05$, LSD test).

表 2 PCR 基因引物序列和扩增条件

Tab. 2 PCR primers and conditions for gene analysis

基因 Gene	引物序列 Primer sequences	退火温度 Annealing temperature (°C)	产物 Products
Nanog	5'-AGCAGAAGATGCGGACTG-3'	56	350
	5'-GGTCTGGCTGCTCCAAGT-3'		
SOX2	5'-AGCATGATGCAGGAGCAG-3'	56	270
	5'-GGACTGGGAGGAAGAGCT-3'		
BMP4	5'-AAAGTCGCCGAGATTCAGG-3'	58	634
	5'-GAGTCTGATGGAGGTGAGT-3'		
PAX6	5'-CATGCAGAACAACCTCACAGCGG-3'	60	414
	5'-CCCATCTGTTGCTTTTCGCTA-3'		
AFP	5'-AAATACATCCAGGAGAGCCA-3'	55	416
	5'-CTGAGCTTGGCACAGATCCT-3'		
GAPDH	5'-GGAGCCAAACGGGTCATCATCTC-3'	62	233
	5'-GAGGGCCATCCACAGTCTTCT-3'		

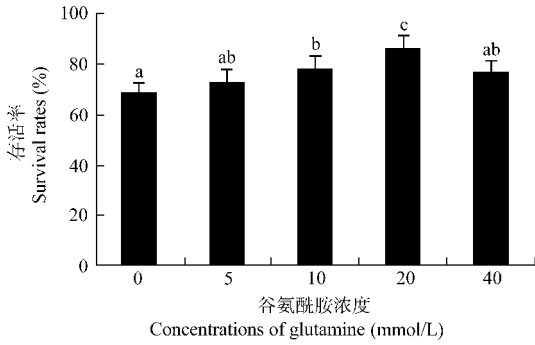


图 1 含不同浓度谷氨酰胺的防冻剂下兔胚胎干细胞冷冻复苏后的细胞存活率

Fig. 1 The survival rates of cryopreserved-thawed RF cells in different concentrations of glutamine. 柱上不同字母表示两两比较差异显著 ($P < 0.05$, LSD 检验)。The different letters on the bars showed significant differences between every two groups ($P < 0.05$, LSD test).

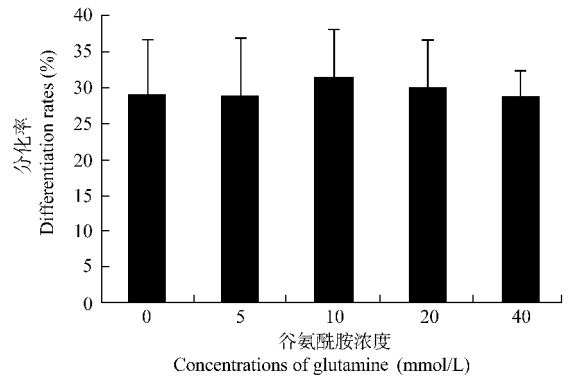


图 2 含不同浓度谷氨酰胺的防冻剂下兔胚胎干细胞冷冻复苏后的细胞集落分化率

Fig. 2 The differentiation rates of cryopreserved-thawed RF cell clones in different concentrations of glutamine. 各组之间无显著差异 ($P < 0.05$, LSD 检验)。There was no significant difference among the groups ($P < 0.05$, LSD test).

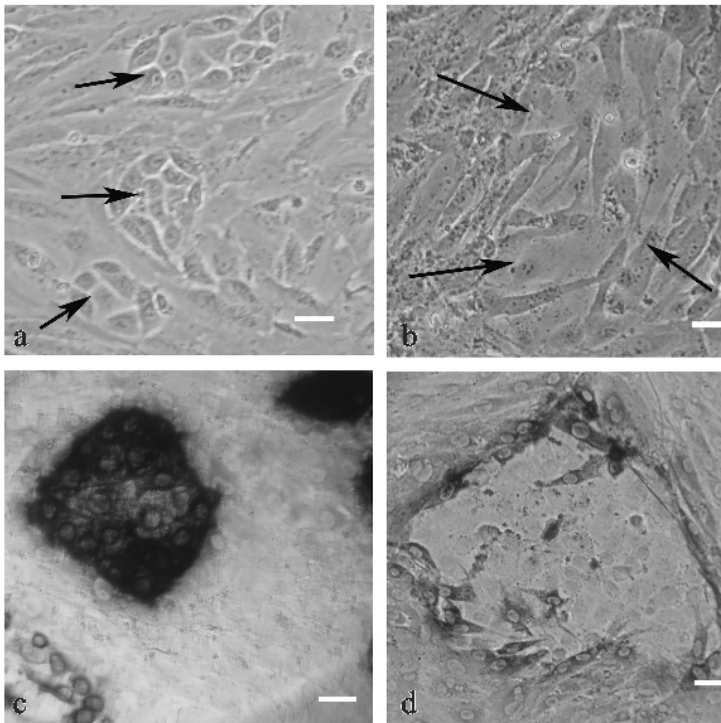


图 3 复苏培养的 RF 细胞集落形态和碱性磷酸酶染色结果

Fig. 3 Morphological characteristics of cryopreserved-thawed rabbit ES cell colonies and the results of alkaline phosphatase activity tests

a: 复苏后培养 36 h 未分化的集落 (黑色箭头指示了 3 个 ES 细胞小集落); b: 复苏后培养 36 h 明显分化的集落 (黑色箭头指示了分化的细胞集落); c: 未分化集落的碱性磷酸酶染色为阳性; d: 分化集落的碱性磷酸酶染色为阴性。图中标尺 (Scale bar) = 50 μm 。

a: morphological characteristics of undifferentiating RF cell clones from 36 hours of culturing after thaw; b: the morphological characteristics of differentiating RF cell clones from 36 hours of culturing after thaw; c: the Alkaline phosphatase activity was positive in undifferentiating RF cell clones; d: the Alkaline phosphatase activity was negative in differentiating RF cell clones.

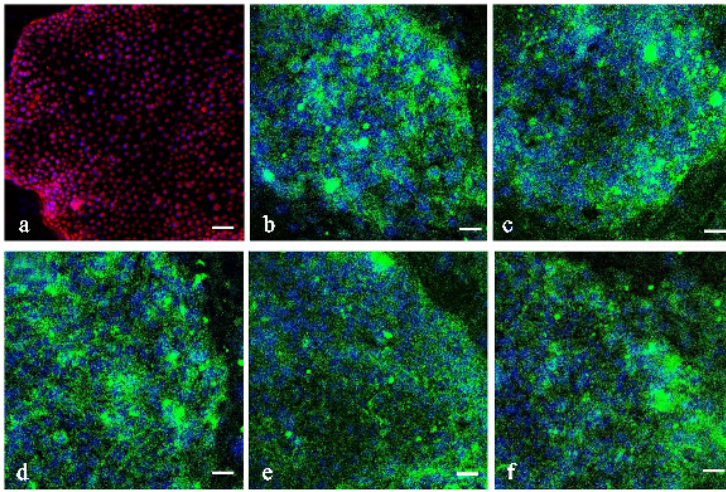


图 4 冷冻复苏培养的 RF 细胞免疫组织化学染色结果

Fig. 4 Marker expression of cryopreserved-thawed RF cells

a: Oct-4 阳性; b: SSEA-1 阳性; c: SSEA-3 阳性; d: SSEA-4 阳性; e: TRA-1-60 阳性; f: TRA-1-81 阳性。(蓝色部分为 Hoechst 33342 定位的细胞核)。图中标尺 (Scale bar) = 50 μm 。

Cells were positive for: a: Oct-4; b: SSEA-1; c: SSEA-3; d: SSEA-4; e: TRA-1-60; f: TRA-1-81. Cell nuclei were counterstained with Hoechst 33342 (blue).

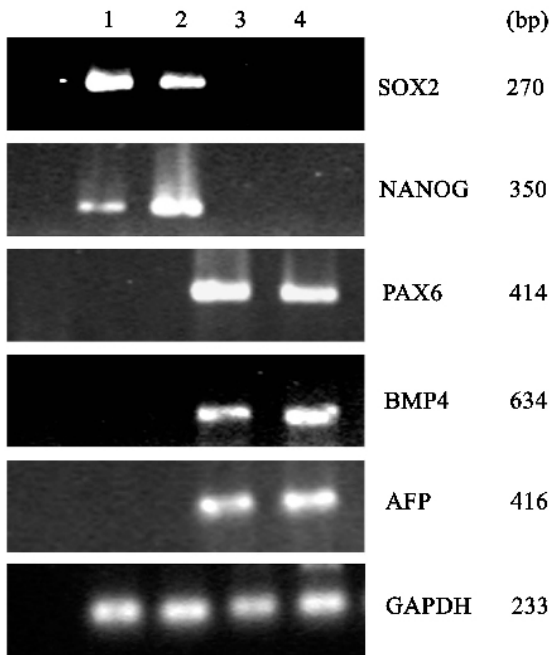


图 5 RT-PCR 分析未分化 RF 细胞的特征基因及悬浮培养 6 天 EB 中 3 个胚层代表基因的表达

Fig. 5 RT-PCR analysis of gene expressions related to the non-differentiation and differentiation of cryopreserved-thawed rabbit ES cells and rabbit embryoid bodies (EB)

1: 正常培养的未冷冻 RF ES 细胞; 2: 冷冻复苏培养的 RF ES 细胞; 3: 正常培养细胞 EB; 4: 冷冻复苏培养细胞的 EB。

Lane 1: normally cultured rabbit ES cells; Lane 2: cryopreserved-thawed rabbit ES cells; Lane 3: rabbit EB from control cultured rabbit ES cells; Lane 4: rabbit EB from cryopreserved-thawed rabbit ES cells.

化染色结果显示 OCT-4、SSEA-1、SSEA-3、SSEA-4、TRA-1-60、TRA-1-81 阳性, 证明了 ES 细胞可保持未分化状态。

2.3.2 复苏细胞的体外分化能力 所有组别的细胞经过冷冻复苏后的传代过程, 制作拟胚体。收集悬浮培养 6 天的拟胚体, 提取 RNA, 经 RT-PCR, 检测到分别代表 3 个胚层的基因: 即 AFP (内胚层)、PAX-6 (外胚层)、BMP-4 (中胚层) (图 5), 从而证明复苏培养的细胞仍然具有向 3 个胚层分化的潜能。

3 讨论

胚胎干细胞成功冻存是其应用于研究和临床的重要前提。成功冻存是指在冷冻、解冻和复苏培养过程中, 细胞具有较高的存活率, 且仍能保持胚胎干细胞的自我更新和全能性的特性。目前除了小鼠 ES 细胞用常规慢速冷冻方法可达到 95% 以上的未分化集落复苏率外 (Yao & Yuan, 2005), 在其他物种, 尤其是灵长类的许多 ES 细胞系中采用常规慢速冷冻方法的复苏率极低, 细胞复苏后需在细胞的扩增和纯化培养上花大量时间, 因此极大地限制了其在 ES 细胞上的应用。目前关于 ES 细胞冻存的研究主要以人的 ES 细胞为主, 由于人 ES 细胞以岛团状方式生长, 紧密的细胞连接和细胞旁分泌因子对维持人 ES 细胞体外未分化生长至关重要, 所

以细胞冻存必须以含 100—200 个细胞的团块形式进行,但这样会影响细胞与防冻液的接触,使慢速冷冻时更易形成冰晶,从而造成细胞团块离散,死亡或分化。另外,冷冻过程会损伤细胞连接,造成复苏后恢复能力下降。人 ES 细胞冻存方法的改进集中在降温速率和防冻液配方上,如慢速冷冻时在防冻液中添加海藻糖、乙二醇等 (Wu et al, 2005; Sung et al, 2005),可在一定程度上可提高细胞冷冻复苏率;或采用玻璃化冷冻方法避免冰晶的形成,这样有助于维持细胞团块的完整性,从而提高存活率,但此方法增加了操作难度,且不适用于大量细胞的冻存,在实际应用中尚存有一定的局限性 (Boon et al, 2005b)。

本实验用慢速降温两步法冷冻兔胚胎干细胞,对几种防冻液成分的冷冻保护效果进行了比较。兔胚胎干细胞不同于一般的体细胞,其具有胚胎干细胞的典型特征:即细胞体积小、胞浆少而核大、有多个核仁。在体外培养的生长特性上,兔胚胎干细胞更接近于小鼠胚胎干细胞而不同于灵长类,其细胞增殖速度快,对细胞连接依赖性低,传代培养和冻存时一般可以将细胞吹打成单细胞悬液 (Wang et al, 2006),因此,在常规慢速冷冻过程中,细胞可与防冻液充分接触;而兔 ES 细胞无法达到如小鼠胚胎干细胞的冷冻效率,这可能是由于不同细胞系的细胞膜对防冻液的通透性不同所致。因此,我们通过选择对 RF 细胞膜的渗透性防冻剂以及在胞外对细胞膜有保护作用的非渗透性防冻剂来改善细胞的冻存效果。

DMSO 是在细胞冷冻中被广泛使用的渗透性防冻剂,但对于胚胎干细胞,必须考虑到其对细胞可能产生的诱导分化作用 (Katkov et al, 2006; Adler et al, 2006),EG 被认为是高效低毒的渗透性防冻剂,近来应用于人胚胎干细胞的玻璃化冷冻及慢速冷冻中 (Tsuyoshi et al, 2005; Sung et al, 2005)。然而在本实验中对于兔胚胎干细胞,与 DMSO 相比,EG 并没有表现出更低的细胞毒性和更好的冷冻保护效果。

参考文献:

Adler S, Pellizzer C, Paparella M, Hartung T, Bremer S. 2006. The effects of solvents on embryonic stem cell differentiation [J]. *Toxicol In Vitro*, **20**: 265 - 271.

Amadeu KS, Roland F, Juan JP. 2003. Molecular simulation study of

在防冻液中添加海藻糖和谷氨酰胺其主要目的是在细胞膜外起冷冻保护作用,这样可降低胞外盐浓度的损害,同时可与细胞膜磷脂中的磷酸基团结合成稳定质膜结构 (Amadeu et al, 2003)。海藻糖与 DMSO 联合多次应用于干细胞的低温保存 (Buchanan et al, 2004; Lin et al, 2005; Wu et al, 2005)。一定浓度范围内的谷氨酰胺作为细胞膜稳定剂在一些物种精子的低温保存中也发挥作用 (Kruuv & Glofcheski, 1990; Jack & David, 1992; Renard et al, 1996; Trimeche et al, 1999; Li et al, 2003; Maissa et al, 2005)。本实验结果表明,20 mmol/L 的谷氨酰胺溶液对 RF 细胞具有最佳保护作用,而 0.1 mol/L 海藻糖溶液并不能提高细胞冻存效率,这可能与 RF 细胞对防冻组分有不同的保护依赖性有关。

胚胎干细胞冻存效率的提高除了需提高细胞存活率外,降低分化率也很重要。冷冻复苏过程的渗透压、自由基、防冻液及低温等各种因素均可能是干细胞分化的诱因。最近报道的人 ES 细胞在用 10% DMSO 液进行慢速低温冻存后细胞的死亡主要是因为凋亡而不是坏死 (Boon et al, 2005a) 且复苏后大部分干细胞失去多能性因子 OCT-4 的表达 (Katkov et al, 2006)。本实验中 20 mmol/L 的谷氨酰胺液对 RF 细胞具有一定的冷冻保护作用,但没有降低复苏后细胞分化率的作用。目前关于 ES 细胞冻存后的全能性的研究主要以人的 ES 细胞为主,集中在改进降温速率和防冻液配方上,但各种方法均有种种不足,无法达到令人满意的效果,这或许是由于对冻融过程中胚胎干细胞面对压力如何产生应激反应从而导致分化或死亡这一环节的不了解所致。

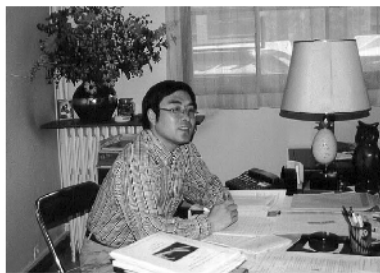
由本实验结果所示,对于 RF 细胞, DMSO 比 EG 具有更好的冷冻保护效果;在以 10% DMSO 溶液为基础的防冻液中添加浓度为 20 mmol/L 的膜稳定剂谷氨酰胺液,在一定程度上可降低防冻液的细胞毒性作用并提高复苏后的细胞存活率。

phospholipids bilayer and insights of the interactions with disaccharides [J]. *Biophys J*, **85**: 2830 - 2844.

Boon CH, Chao PY, Hua L, Wei ST, Abdul JR, Zheng Y, Boon HB, Zigang G, Hong WO, Eng HL, Tong C. 2005a. Loss of viability

- during freeze-thaw of intact and adherent human embryonic stem cells with conventional slow-cooling protocols is predominantly due to apoptosis rather than cellular necrosis [J]. *J Biomed Sci*, **13** (3): 433–45.
- Boon CH, Lilia L, Kuleshova, Soren MB, Hua L, Tong C. 2005b. The cryopreservation of human embryonic stem cells [J]. *Biotechnol Appl Biochem*, **41**: 97–104.
- Buchanan SS, Gross SA, Acker JP, Toner M, Carpenter JF, Pyatt DW. 2004. Cryopreservation of stem cells using trehalose: Evaluation of the method using a human hematopoietic cell line [J]. *Stem Cell Dev*, **13** (3): 295–305.
- Jack K, David JG. 1992. Protective effect of amino acid against freeze-thaw damage in mammalian cells [J]. *Cryobiology*, **29**: 291–295.
- Katkov II, Kim MS, Bajpai R, Altman YS, Mercola M, Loring JF, Terskikh AV, Snyder EY, Levine F. 2006. Cryopreservation by slow cooling with DMSO diminished production of Oct-4 pluripotency marker in human embryonic stem cells [J]. *Cryobiology*, **53** (2): 194–205.
- Kruuv J, Glofcheski DJ. 1990. Survival of mammalian cells following multiple freeze-thaw cycles. II. Independence of cryoprotection using glutamine with dimethyl sulfoxide, hydroxyethyl starch, propylene glycol or glycerol [J]. *Cryo Lett*, **11**: 215–226.
- Li YH, Si W, Zhang XZ, Dinnyes A, Ji WZ. 2003. Effect of amino acids on cryopreservation of cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*) sperm [J]. *Am J Primatol*, **59** (4): 159–1165.
- Lin J, Juan JP, Sean PP. 2004. Cryopreservation of adherent human embryonic stem cells [J]. *Biotechnol Bioengng*, **88**: 299–312.
- Maissa K, Isabelle B, Jean FB, Gerard C, Abdesselame T, Daniel T. 2005. Effects of glutamine on post-thaw motility of stallion spermatozoa: An approach of the mechanism of action at spermatozoa level [J]. *Theriogenology*, **63** (1): 138–149.
- Renard P, Grizard G, Griveau JF, Sion B, Boucher D, Le Lannou D. 1996. Improvement of motility and fertilization potential of postthaw human sperm using glutamine [J]. *Cryobiology*, **33** (3): 311–319.
- Reubinoff BE, Pera MF, Vajta G, Trounson AO. 2001. Effective cryopreservation of human embryonic stem cells by the open pulled straw vitrification method [J]. *Hum Rep*, **16**: 2187–2194.
- Sung YH, Byung CJ, Chang SS, Hee SK. 2005. Cryopreservation of human embryonic stem cells without the use of a programmable freezer [J]. *Hum Rep*, **20** (7): 1779–1785.
- Trimeche A, Yvon JM, Vidament M, Palmer E, Magistrini M. 1999. Effects of glutamine, proline, histidine and betaine on post-thaw motility of stallion spermatozoa [J]. *Theriogenology*, **52** (1): 181–191.
- Tsuyoshi F, Kentaro Y, Yukio N, Norio N, Hirofumi S. 2004. A simple and efficient cryopreservation method for primate embryonic stem cells [J]. *Int J Dev Biol*, **48**: 1149–1154.
- Wang SF, Tang XH, Niu YY, Chen HW, Li B, Li TQ, Zhang XZ, Hu ZX, Ji WZ. 2006. Generation and characterization of rabbit embryonic stem cells [J]. *Stem Cells*, (published on line)
- Wu CF, Tsung HC, Zhang WJ, Wang Y, Lu JH, Tang ZY, Kuang YP, Jin W, Cui L, Liu W, Cao YL. 2005. Improved cryopreservation of human embryonic stem cells with trehalose [J]. *Rep Biomed Online*, **11** (6): 733–739.
- Yao DD, Yuan CH. 2005. Influence of different polyols on the forming rates of colonies and embryoid bodies of mouse embryonic stem cells after cryopreservation [J]. *J Med Theor & Prac*, **18** (4): 375–377. [姚丹丹, 苑春慧. 2005. 不同多羟基化合物对小鼠胚胎干细胞低温贮存的影响. 医学理论与实践, **18** (4): 375–377.]
- Zhou CQ, Mai QY, Li T, Zhuang GL. 2004. Cryopreservation of human embryonic stem cells by vitrification [J]. *Chn Med J*, **117**: 1050–1055.

本刊编委王小明教授简介



王小明教授

1963年生, 1993年获法国 LANGUEDOC 理工科技大学, 生物种群和生态学博士学位。现任华东师范大学党委副书记兼副校长, 华东师范大学生命科学学院终身教授, 博士生导师。目前还兼任上海市动物学会理事长, 中国动物学会副理事长, 中国兽类学会理事, 英国国际动植物区系学会 (FFI) 成员, 国际自然保护同盟 (IUCN) 的鳄鱼专家组成员等多个国内、国际组织的职务。

主要从事濒危动物的保护生物学、野生动物流行病学、种群生物学、分子生态学研究。从宏观和微观水平相结合来研究生态学的基本问题, 物种进化机理等具有重要学术价值的问题。其成果不仅反映了对珍

稀濒危动物的种群特征、数量变化及遗传机制等最基础的生态学理论的研究, 同时, 也为我国加强生物多样性保护和可持续利用提供了科学依据。到目前为止, 在国内外刊物上共发表 114 篇科学论文, 研究所涉及到的国家保护物种达 20 种。