

·经济动植物·

DOI:10.16605/j.cnki.1007-7847.2022.06.0153

非人灵长类动物精子冻存技术的研究进展

范晓静^{1,2,3}, 魏雅岚^{2,3}, 王心睿^{2,3*}

(1. 福建省儿童医院(上海儿童医学中心福建医院)医学研究中心, 中国福建 福州 350011; 2. 福建省妇幼保健院 医学研究中心, 中国福建 福州 350001; 3. 国家卫生健康委员会非人灵长类生育调节技术评价重点实验室(福建省妇幼保健院), 中国福建 福州 350013)

摘要: 随着生物医学技术的发展, 应用非人灵长类动物模型进行基础科学研究日益广泛。与此同时, 由于栖息地破坏、狩猎和基因隔离, 许多非人灵长类动物濒临灭绝。因此, 改进非人灵长类动物精子冻存技术对物种遗传资源的保藏具有重要的意义。本文概述了非人灵长类动物的精液特征, 介绍了精液液化和冷冻精子质量评估的方法, 分析了冷冻保护剂、冷冻稀释液及冷冻方法等因素对精子冻存效果的影响, 总结了目前非人灵长类精子冷冻常用的冷冻保存液和冷冻方法, 并对相关精子参数进行了比较, 同时探讨了非人灵长类动物精子冻存研究面临的困境, 并提出了可行的方案。总之, 本文综述了近年来非人灵长类动物精子冻存的重要研究成果, 对开发新的冷冻保护剂及改进冷冻技术具有一定的参考价值。

关键词: 非人灵长类动物; 精液液化; 精子冻存; 冷冻保护剂; 冷冻稀释液

中图分类号: Q492, Q953

文献标志码: A

文章编号: 1007-7847(2023)04-0330-08

Research Advances in Cryopreservation of Non-human Primate Sperm

FAN Xiaojing^{1,2,3}, WEI Yalan^{2,3}, WANG Xinrui^{2,3*}

(1. Medical Research Center, Fujian Children's Hospital (Fujian Branch of Shanghai Children's Medical Center), Fuzhou 350011, Fujian, China; 2. Medical Research Center, Fujian Maternity and Child Health Hospital, Fuzhou 350001, Fujian, China; 3. NHC Key Laboratory of Technical Evaluation of Fertility Regulation for Non-human Primate (Fujian Maternity and Child Health Hospital), Fuzhou 350013, Fujian, China)

Abstract: With the development of biomedical technology, non-human primate (NHP) models become increasingly widely used in basic scientific research. Meanwhile, many NHP species are on the verge of extinction due to habitat destruction, hunting and genetic isolation. Thus, it is important to improve the sperm cryopreservation technology to conserve the genetic resources. This review mainly described the characteristics of NHP semen, introduced the methods of semen liquefaction and quality evaluation, and analyzed the effects of cryoprotectants, extenders and freezing methods on sperm cryopreservation. It also compared the relevant sperm parameters, discussed the puzzles and difficulties in sperm cryopreservation research, and proposed some feasible solutions. In conclusion, this paper reviewed the important research results of NHP sperm cryopreservation in recent years, which may have certain reference value for development of NHP sperm cryoprotectants and cryopreservation technology.

Key words: non-human primate; semen liquefaction; sperm cryopreservation; cryoprotectant; extender

(Life Science Research, 2023, 27(4): 330-337)

近年来, 全球非人灵长类物种的数量正在不断地下降。根据《中国灵长类动物濒危状况评估报

告 2022》, 我国分布的白掌长臂猿(*Hylobates lar*)、北白颊长臂猿(*Nomascus leucogenys*)已经野外灭

收稿日期: 2022-06-02; 修回日期: 2022-11-11; 网络首发日期: 2023-06-26

基金项目: 福建省自然科学基金面上项目(2023J011303, 2022J01423); 福建省卫生健康科研人才培养项目(2019-CXB-20)

作者简介: 范晓静(1984—), 女, 福建三明人, 硕士研究生, 技师, 主要从事遗传与生育调控研究; *通信作者: 王心睿(1990—), 男, 山西长治人, 博士研究生, 助理研究员, 主要从事复杂疾病的遗传和调控机制研究, Tel: 0591-87321083, E-mail: wanxiru@sjtu.edu.cn。

绝,现存28种灵长类物种中有80%受到威胁,15~18个物种的种群数量不足3000只,均属于国家二级以上保护动物。高效的精子冻存技术对于非人灵长类动物的生育繁殖和优良资源遗传基因的保存具有重要的意义。在非人灵长类动物中,食蟹猴(*Macaca fascicularis*)和恒河猴(*Macaca mulatta*)的精子冻存研究最为广泛;其他物种如狐猴(*Lemuridae*)、狨猴(*Callithrix jacchus*)、松鼠猴(*Saimiri sciureus*)、非洲绿猴(*Chlorocebus aethiops*)、藏酋猴(*Macaca thibetana*)等也有精子冻存的相关报道。大量证据表明,冷冻保存会因渗透应激、氧化损伤等造成精子活力丧失和功能损伤,仅极少数非人灵长类动物的冻存精子可以在人工受精后产生后代^[1-3]。因此在精子冻存的过程中,人们常加入冷冻保护剂以提高精子复苏率^[4]。

迄今为止,使用最广泛、最成功的非人灵长类精子冷冻保护剂是含甘油的卵黄防冻液,常规方法是液氮蒸汽冷冻法。影响精子冻存效果的因素有很多,包括采精质量、冷冻保护剂的组成、冷冻方法等。本文主要就非人灵长类动物精子冻存技术的最新研究进展进行综述,以期改进非人灵长类动物精子冷冻方法、提高精子冷冻效率提供基础资料。

1 非人灵长类动物的精液特征

非人灵长类动物射出的精液包括液体和固体两部分,其中固体成分被称为精液凝块,它是精子沉积物和精子运输的载体,并在生理上阻止其他雄性个体与同一雌性交配受精。精液凝块可以在精子和酸性阴道环境之间形成一道天然屏障,从而提高体内精子的存活率^[5]。射精产物中精液凝块的比例存在物种间差异,但是精子总数与射精体积和凝块体积没有明显相关性^[6]。基于凝块的比例,精液可分为4个等级,其中液体最多的精液为1级,而黏稠度最高的精液为4级,凝固的精液(3级或4级)不会在雌性生殖道以外的条件下进行自发液化^[7]。例如,恒河猴的精液属于3级,凝块致密不溶且含有50%~70%射出的精子,与液体部分分开排出^[8-9]。此外,一些物种的精液呈轻微凝胶状且无明显凝块(狨猴, *Callithrix jacchus*),或凝块在排放后20~30 min可完全液化(黑猩猩, *Pan troglodytes*)^[10];部分物种不会产生精液凝块(吼猴, *Alouatta caraya*)^[11-12]。对于黑手蜘蛛猴(*Ateles geoffroyi*)来说,精液凝块的排放还与季节有关。与雨

季相比,黑手蜘蛛猴在旱季会更频繁地排出凝块,且排放的精液浓度更高,线性运动精子比例更高^[13]。

精液凝固-液化转变的过程主要由精液凝固蛋白(semenogelin, Sg)、前列腺特异性抗原(prostate-specific antigen, PSA)及附睾蛋白酶抑制剂(epididymal protease inhibitors, Eppin)等共同作用调控。射精后, Sg I 蛋白特异性结合 Eppin 蛋白,并与 Sg II 及纤维结合蛋白共价交联形成网状结构,以抑制精子的运动。随后, Sg I 与 Zn^{2+} 结合激活 PSA, 促进精液液化。凝固因子和液化因子协调作用,促使精液先后发生凝固与液化两个变化过程。一旦这种协调关系被打破,精液就会发生液化异常。当机体发生前列腺炎或生殖道感染时,前列腺液中蛋白水解酶的含量或活性下降,导致精液不液化^[14]。

大多数非人灵长类动物射出的精液凝块不会自然液化,很可能是因为 PSA 缺乏或 Sg I 发生了糖基化修饰^[15]。利用基因组、转录组、蛋白质组等多组学技术比较人类与非人灵长类精液的不同之处,极有可能发现液化异常的机制,由此开发相应的方法进行精液凝块液化处理,有利于辅助生殖技术在非人灵长类动物的应用。

2 冷冻前精液的液化

常用的猕猴精液液化方法是将精液采集到含有 TALP-Hepes 洗精液的试管中,采用 37 °C 进行孵育^[4, 16-17]。随后对液化精液进行离心,收集的精子沉淀即可用于冷冻保存。TES-Tris 缓冲液和椰子水可用于新热带区灵长类的精液液化。研究证实,在卷尾猴(*Cebus apella*)精液中加入 TES-Tris 缓冲液或椰子水溶液后,采用 35 °C 进行孵育并辅助机械吹打,可促使凝块完全液化形成黏性液体,但冷冻后复苏精子的存活率和活力等参数显著下降^[18]。近期研究发现,在松鼠猴精液中以等比例加入 ACP-118® 溶液,结合 37 °C 孵育,可以促进凝块溶解,并释放出精子^[19]。对于倭黑猩猩(*Pan paniscus*)来说,凝块排放后直接孵育会使液化需要更长的时间(2~4 h),但超过 1 h 的孵育会对精子质量产生有害影响^[20]。

当前,针对非人灵长类精液凝块处理的研究较少,可能是因为电刺激采精辅助常规处理就可以获得足够的精子数量。然而,当射精的精子总量较低时,凝块处理方式成为提高游离精子数量的关键环节。根据凝块形成机制,可以通

过增加液化因子如胰蛋白酶促进精液液化。尽管添加胰蛋白酶会增加精子损伤的数量,但也增加了活动精子的总数量^[21]。为减少液化带来的损伤,一方面可以调整酶的浓度和作用时间,另一方面可以对胰蛋白酶进行化学修饰或寻找其他新的酶制剂。

3 精子冷冻的影响因素

3.1 冷冻保护剂

在精子冷冻过程中,添加冷冻保护剂可以显著降低细胞死亡率。根据能否自由通过细胞膜,冷冻保护剂可分为渗透性冷冻保护剂和非渗透性冷冻保护剂。渗透性冷冻保护剂包括甘油、二甲亚砷、乙二醇、丙二醇等;非渗透性冷冻保护剂包括卵黄、糖类、脂蛋白等物质,其作用是通过维持细胞膜的稳定来保护精子^[22]。渗透性冷冻保护剂有助于降低溶液的冰点,通过替换细胞内的水来减少渗透性休克,并降低细胞内冰晶的形成。但是,高浓度的渗透性冷冻保护剂会因化学毒性对细胞造成损害^[23]。因此,合适的冷冻保护剂浓度是冷冻保存成功的关键因素。研究表明,5%甘油适用于恒河猴和食蟹猴精子的冷冻保存,复苏后精子活力最高^[24-25]。近期,一项关于婆罗洲猩猩(*Pongo pygmaeus morio*)精子冷冻的研究发现,含6%甘油的TEST稀释液可以取得良好的冻存效果^[26]。

不同的冷冻保护剂对不同物种精子的冷冻保存效果也不同,这与冷冻保护剂在精子细胞中的渗透系数有关。对于食蟹猴精子来说,乙二醇和甘油的冷冻保存效果最好,二甲亚砷和乙酰胺次之,丙二醇最差^[27]。乙二醇对恒河猴精子细胞的渗透系数高于水、二甲亚砷、甘油、丙二醇,被认为是最合适的恒河猴精子冷冻保护剂^[28]。为避免冷冻保护剂与精子接触的时间过长而对其造成伤害,可以采用二次稀释法。研究报道,第一次稀释精液于25℃平衡后再进行第二次稀释,之后快速冷却,有助于提高精子活力,适合于日本猕猴(*Macaca fuscata*)精子的冷冻保存^[29]。

3.2 冷冻稀释液

冷冻稀释液是精子冷冻的介质,主要包括两性离子、柠檬酸盐、糖、三羟甲基氨基甲烷(trihydroxymethyl aminomethane, Tris)、Tris 乙磺酸(Tris)等成分。非人灵长类常用的冷冻稀释液为TTE和TEST,稀释液的物理性质和组成成分直接影响精子的冷冻成活率^[22]。

3.2.1 渗透压

渗透压对精子的冷冻效果影响很大,渗透应激会导致精子发生氧化应激,促使脂质过氧化,从而显著降低精子活力^[30]。食蟹猴精子可以耐受344~425 mOsm/kg 渗透压,渗透压在此范围内的TTE、DM、mDM、LG-DM、G-DM、TCG均适用于食蟹猴精子的冷冻保存^[27]。恒河猴精子在75~900 mOsm/kg 渗透压内表现出线性渗透反应,精子存活率>80%,精子活力和膜完整性对高渗透压更敏感^[4]。TEST因高渗毒害作用不适合食蟹猴和恒河猴精子的冷冻保存^[31]。

3.2.2 卵黄

卵黄中含有许多未被明确定义的化合物,其中低密度脂蛋白被认为对精子具有冷冻保护作用,具体机制尚不明确^[32]。在非人灵长类动物中,几乎所有成功的精子冷冻保存都需要添加卵黄,甚至在没有渗透性冷冻保护剂的情况下,单独使用卵黄也能够保护射精和附睾精子,使其免受精子冻融过程产生的损伤^[33]。研究证实卵黄具有重要的抗氧化作用,有观点认为卵黄中的低密度脂蛋白通过结合细胞膜防止脂质过氧化^[34]。卵黄的保护具有剂量依赖性,在恒河猴精子的快速冷冻过程中,含20%卵黄的TEST防冻液的效果最好,当卵黄含量超过40%时,精子活力反而下降^[35]。需要指出的是,卵黄来源于动物,有可能受到微生物的污染,具有将病原体引入冷冻保存精子样本的风险。因此,卵黄替代物如不饱和脂质,或商业化无卵黄稀释液如SC培养基(SpermCryo All-round),成为另一种选择^[32, 36]。

3.2.3 抗氧化剂

冷冻不仅会给细胞带来渗透压力,还会对精子造成氧化损伤,补充抗氧化剂可减轻冷冻带来的氧化应激^[30]。抗氧化剂通常可分为酶抗氧化剂和非酶抗氧化剂。酶抗氧化剂包括超氧化物歧化酶、过氧化氢酶、谷胱甘肽过氧化物酶和谷胱甘肽还原酶。非酶抗氧化剂包括维生素C、维生素E、谷胱甘肽、半胱氨酸、牛磺酸等。抗氧化剂的类型和剂量对解冻后精子的质量有很大影响。研究显示,在冷冻保护剂中添加维生素C、谷胱甘肽对解冻后精子的存活率没有显著影响,但是添加10 mmol/L 维生素E可以显著提高解冻后精子的存活率^[37]。2011年,McCarthy等^[34]首次证明,恒河猴精子的冷冻保存会诱导活性氧(reactive oxygen species, ROS)显著增加;补充抗氧化剂如超氧化物歧化酶、过

氧化氢酶、 α -生育酚等可显著降低 ROS 诱导的膜损伤程度。另有研究报道,在卷尾猴精子冷冻液中添加 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 过氧化氢酶可以减少精子膜脂质过氧化,保持精子质膜的完整性^[38]。

3.2.4 糖

一些精子冷冻剂含有糖成分,糖类可以提供能量,维持渗透压,保护精子使其免受冷冻损伤。糖的类型对冷冻精子的质量参数有显著影响。对于非人灵长类动物的精子保存,最广泛使用的是葡萄糖、乳糖和棉子糖。与棉子糖(三糖)相比,葡萄糖(单糖)和乳糖(双糖)在保护精子活力、质膜功能和顶体完整性方面更有效^[39]。在适当的浓度下单糖和双糖组合可以显著改善冷冻保存的哺乳动物精子质量^[40-41],例如:含有多种糖成分的 TTE 防冻液的冷冻保存效果明显好于仅含单一糖成分的 TEST 防冻液^[42]。除了乳糖外,另一种双糖——海藻糖也常被用于精子冷冻保存。海藻糖可以显著降低冷冻保存精子细胞内钙、环磷酸腺苷水平,导致蛋白质酪氨酸磷酸化减少,添加 50 mmol/L 或 100 mmol/L 海藻糖可抑制精子的顶体反应,提高其冷冻存活率^[43]。此外,羟丙基纤维素作为一种长度可变的多糖,其物理性质类似于人血清白蛋白,可在低温下形成黏性凝胶,具有很高的防冻性能,已被成功应用到人类精子的冷冻保存中^[44]。

3.2.5 氨基酸

氨基酸对精子有一定的冷冻保护作用,并且不同的氨基酸有不同的最佳浓度。在 TTE 防冻液中分别添加 5 mmol/L 脯氨酸、10 mmol/L 谷氨酰胺以及 10 mmol/L 或 20 mmol/L 甘氨酸可显著改善解冻后食蟹猴精子的活力以及膜和顶体的完整性;然而,当氨基酸浓度分别增加到脯氨酸和谷氨酰胺为 60 mmol/L、甘氨酸为 80 mmol/L 时,精子的活力以及膜和顶体的完整性显著下降^[45]。Feng 等^[46]首次证明,脯氨酸脱氢酶(proline dehydrogenase, PRODH)定位于顶体和精子尾部的中间部分,脯氨酸通过 PRODH 介导的代谢和吡咯烷的胺结构保护精子,使其免受氧化应激,因此在冷冻保护剂中添加一定浓度的脯氨酸有助于提高精子质量。谷氨酰胺、半胱氨酸和甘氨酸参与谷胱甘肽合成,可以作为抗氧化剂对抗 ROS,已经被用于不同物种精子的冷冻保存^[47]。有关人类精子的玻璃化冷冻研究显示,在冷冻稀释液中添加 5 mmol/L 半胱氨酸和 10 mmol/L 谷氨酰胺可以降低解冻后精子内的 ROS 水平和 DNA 损伤程度,显著提高

精子质膜完整性、线粒体膜电位和前向运动精子百分比^[48]。

3.3 冷冻方法

冷冻速率是影响精子深低温冻存的关键因素之一。冷冻速率过慢会引起胞内盐浓度升高,过快则容易形成冰晶,二者均能引起细胞损伤。常见的精子冷冻方法有程序降温法、液氮蒸汽冷冻法、玻璃化冷冻法和冷冻干燥法。

3.3.1 程序降温法

程序降温法通过程序冷冻仪控制降温速率,使精子逐步适应低温环境,以减少冷休克的发生。该方法温度可控,稳定性高,但是需要特殊的冷冻仪器,消耗液氮多且耗时长。常规的程序降温法是将精液与保护剂混合并分装后,室温平衡 10 min,然后以 1 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 降温至 4 $^{\circ}\text{C}$,以 2~3 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 降至 -30 $^{\circ}\text{C}$,以 10 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 降至 -80 $^{\circ}\text{C}$ 以下,最后投放至液氮保存^[14]。

3.3.2 液氮蒸汽冷冻法

传统的冷冻方法是液氮蒸汽冷冻法,即将精液与冷冻液等体积混合,装入冷冻麦管,悬挂在液氮面上方熏蒸,最终转入液氮保存。该方法简单快捷,不需要昂贵的仪器,但容易受人为操作及环境的影响^[22]。

3.3.3 玻璃化冷冻法

该方法通过快速降温使得细胞内外的液体固化成玻璃化状态,从而避免冰晶形成,减少细胞损伤^[49]。与传统的慢速冷冻方法相比,玻璃化冷冻的耗时更短,操作更安全,且成本更低^[48]。但是,经典的玻璃化技术不能用于精子冷冻保存,因为高浓度的渗透性冷冻保护剂会对精子造成致命的渗透性休克。近年来,无渗透性冷冻保护剂的精子玻璃化冷冻成为研究热点。有研究报道,选择 0.5 mol/L 海藻糖、100 mmol/L 甘氨酸和 1% 人血清白蛋白作为冷冻保护剂,以等比例加入人类精液标本中进行玻璃化冷冻,可实现更高的精子复苏率和精子活力^[50]。然而,按照人类精子玻璃化冷冻方法,恒河猴精子的玻璃化冷冻效果却不佳,复苏精子的活力为 0,表明恒河猴精子对玻璃化冷冻的反应与人类精子不同,恒河猴精子的玻璃化冷冻方案需要进一步探究^[51]。

3.3.4 冷冻干燥法

该方法将冷冻后的精子直接转入真空冷冻干燥机,经过干燥处理后精子中固态的玻璃化冰变为气态,降低了精子内形成的冰晶对精子的损

伤。冷冻干燥后的样品可以在 4 ℃ 储存并在室温运输,但是精子的复苏率很低,只适用于对精子活力要求较低的实验^[52]。恒河猴精子经冷冻干燥后,在室温下保存 1 个月仍保留有一些早期生殖潜能^[53]。冷冻干燥的精子经水化后虽然没有活性,但是近端中心粒和顶体内容物保存完整,通过胞浆内单精子注射技术(intracytoplasmic sperm injection, ICSI)进行受精,可以支持胚胎发育到桑椹胚期^[54]。

总的来讲,目前关于恒河猴和食蟹猴精子的冷冻研究较多,一般使用含 5% 甘油和卵黄的 TTE 溶液进行冷冻稀释,并在此基础上添加抗氧化剂,或通过改变氨基酸、糖类成分改进冷冻稀释液。值得一提的是,在人类精子冷冻研究过程中,研究者还会添加精浆微泡和外泌体,或者类似膜脂质的纳米胶束,以改善解冻后精子的功能^[55-56]。另外,由于卵黄成分较为复杂,可能携带潜在的病原微生物,并且不同来源的卵黄质量参差不齐,对精子的冷冻保护效果存在差异,难以实现试剂标准化,因此寻找合适的卵黄替代物成为研究趋势之一。抗冻蛋白(antifreeze protein, AFP)具有修饰冰晶形态、抑制冰晶生长和保护细胞膜等抗冻能力,在无卵黄培养基中加入 0.1 μg/mL AFP III 可以显著提高冻融后精子的活力^[57]。冷冻保护剂的选择及优化是亟待解决的问题。除了冷冻保护剂,冷冻方法也是影响精子冷冻效果的关键因素。其中,液氮蒸汽冷冻法使用最广泛,但是易受人为因素影响;程序降温法可严格控制降温速率,有利于方法的标准化;玻璃化冷冻、冷冻干燥法在非人灵长类的应用较少。目前,玻璃化冷冻着眼于冷冻载体的改进以提高降温速率,而冷冻干燥法聚焦于 DNA 完整性的保持、干燥及再水化培养程序的优化以提高 ICSI 成功率。除此之外,非人灵长类动物精子的冻存方案在一些细节上也还需要优化,如冷冻前处理(包括精液稀释、预冷平衡、精液分装、精子洗涤等)、解冻后精子的洗涤与孵化,从而最大限度减少冷冻损伤,提高精子活力及存活率^[58]。

4 评估精子冷冻损伤的方法

精子冻存会引起 25.3%~43.7% 的 DNA 损伤,影响质膜和顶体的完整性,因此冻存结束后人们常使用流式细胞术对精子结构的完整性进行检测^[59]。例如:McCarthy 等^[34]借助流式细胞术,采用

PI/Hoechst 33342 双重荧光染色法检测了猕猴精子质膜的完整性。此外,基于流式细胞术,精子染色质扩散试验(sperm chromatin dispersion test, SCD)、彗星试验法和 TUNEL 法也常被用于检测精子 DNA 完整性^[60]。

精子功能检测方法有精子运动度、透明带穿透试验、体外受精、精子肿胀试验等^[61]。其中,精子运动度是影响受精的一个重要指标。检测运动度的方法有手工计数法和计算机辅助精子分析(computer-assisted sperm analysis, CASA)。在筛选最佳冷冻方法时,研究人员常通过比较冷冻前后精子运动度、精子存活率,计算精子运动度复苏率^[27, 42, 62-68],如表 1 所示。

精子质量评价指标很多,并且同一种检测指标有多个检测方法,但目前尚未建立一套精子质量综合评估指标。除了对精子质膜完整性、顶体状态、DNA 完整性、线粒体活性、受精能力等进行整体评价,同时还可以开发 ROS、抗氧化等指标,以探索精子的冻伤机制。

5 总结与展望

非人灵长类动物射精时会出现精液凝块,大多数不能自然液化。胰蛋白酶可以释放凝块中的精子,但是会对精子造成一定的损伤。因此,利用基因组、转录组、蛋白质组等多组学技术研究液化异常机制,有助于开发新手段以改进精液液化。冻存精子质量与冷冻方法、冷冻保护剂、冷冻稀释液的组成和物理性质等密切相关。非人灵长类动物的精液形态、成分存在种属差异,需要针对性地开发合适的冷冻试剂和方法。根据非人灵长类动物的种属分类,本文归纳了相应的冷冻保存剂、冷冻稀释液及冷冻方法,详见表 1 和表 2。

在冷冻方法层面,液氮蒸汽冷冻法简单便捷,是目前精子冷冻保存的主要方法。玻璃化冷冻、冷冻干燥等新技术在非人灵长类研究极少,具有广阔的研发前景。其中,为提高降温速率,玻璃化冷冻大多采用开放性冷冻载体、限制冷冻体积等策略,因此面临着安全性、冷冻体积过小等问题,改进冷冻载体成为一个有效的途径。另外,冷冻干燥法虽然有利于精子在室温下运输,但是会造成精子活力丧失,可以利用 DNA 完整性使用 ICSI 进行辅助生殖。

目前,人类精子冻存具有较为完整的质量体系,我国出台了多项涉及人类精子冻存的技术规

表 1 非人灵长类精子的冻存
Table 1 Cryopreservation of non-human primate sperm

Species	Extender	Glycerol concentration/(%)	Cryopreservation method	Function detection			Reference
				Post-thaw sperm motility/(%)	Sperm motility recovery rate/(%)	Post-thaw sperm survival rate/(%)	
<i>Macaca mulatta</i>	TTE	5.0	Liquid nitrogen vapor	56.5	65.4	/	[42]
	TTE	5.0	Liquid nitrogen vapor	/	56.0	57.0	[62]
	TEST	3.0	Liquid nitrogen vapor	17.2	19.9	/	[42]
	HTF	10.0	Liquid nitrogen vapor	58.7	66.0	/	[63]
	HTF	/	Vitrification	0	/	/	[51]
	Trehalose buffer	/	Vacuum drying	0	0	/	[58]
<i>Macaca fascicularis</i>	TTE	5.0	Liquid nitrogen vapor	/	50.0	59.0	[62]
	TTE	5.0	Liquid nitrogen vapor	50.1	61.3	/	[27]
	TTE	5.0	Directional freezing	39.0	50.6	/	[64]
	TTE	5.0	Liquid nitrogen vapor	42.2	52.4	/	[65]
	Modified TTE	5.0	Programmable freezing	45.0	62.0	/	[66]
	TEST	5.0	Liquid nitrogen vapor	16.1	20.0	/	[27]
	Tris-egg yolk extender	6.0	Liquid nitrogen vapor	29.0	45.3	45.0	[67]
	SC medium	/	Liquid nitrogen vapor	25.5	30.7	/	[32]
	HTF	10.0	Liquid nitrogen vapor	58.7	66.0	/	[63]
	<i>Macaca thibetana</i>	FCS-G/TH	4.0	Programmable freezing	/	63.6	90.1
<i>Macaca assamensis</i>	TTE	5.0	Liquid nitrogen vapor	/	61.0	64.0	[62]
<i>Macaca fuscata</i>	TEST	5.0	Liquid nitrogen vapor	65.0	/	60.0	[69]
<i>Papio hamadryas</i>	TEST	3.0	Programmable freezing	42.5	/	46.5	[70]
<i>Pan troglodytes</i>	TEST	3.0	Programmable freezing	82.5	/	28.0	[70]
<i>Pongo pygmaeus morio</i>	TEST	6.0	Liquid nitrogen vapor	5.0	6.8	43.9	[26]
<i>Pan paniscus</i>	Two-step medium	5.0	Liquid nitrogen vapor	19.0	32.0	21.3	[20]
<i>Callithrix jacchus</i>	TEST	3.0	Programmable freezing	43.5	/	33.5	[70]
<i>Cebus apella</i>	CWS	2.5	Liquid nitrogen vapor	/	/	13.2	[18]
	TEST	3.5	Liquid nitrogen vapor	/	/	26.2	[18]

注: 精子运动度复苏率为复苏后精子运动度与新鲜精子运动度的比值。HTF: 人类输卵管液; FCS-G/TH: 含胎牛血清、甘油和 TALP-Hepes 缓冲液; CWS: 椰子水溶液。

Notes: Sperm motility recovery rate=(post-thaw sperm motility/pre-freeze sperm motility)×100%. HTF: Human tubal fluid; FCS-G/TH: A solution containing fetal calf serum, glycerol and TALP-Hepes buffer; CWS: Coconut water solution.

表 2 4 种冷冻稀释液的组成
Table 2 Composition of four extenders

Extender	Sugar	Protein	Antibiotics	Others	Reference
TTE	Glucose 2.0 g	Egg yolk	Penicillin 1.0×10 ⁴ IU	TES 1.2 g	[31]
	Lactose 2.0 g	20.0 mL	Streptomycin sulfate 5.0×10 ⁻³ g	Tris 0.2 g	
	Raffinose 0.2 g				
Modified TTE	Glucose 2.0 g	Egg yolk	Penicillin 1.0×10 ⁴ IU	TES 1.2 g	[66]
	Lactose 2.0 g	20.0 mL	Streptomycin sulfate 5.0×10 ⁻³ g	Tris 0.2 g	
	Sucrose 0.2 g				
TEST	Glucose 1.0 g	Egg yolk	Penicillin 1.0×10 ⁴ IU	TES 4.3 g	[31]
		20.0 mL	Streptomycin sulfate 5.0×10 ⁻³ g	Tris 1.0 g	
CWS	/	/	Penicillin 0.1 g	Citrate solution 5% 25.0 mL	[18]
			Streptomycin 0.2 g	Ultrapure water 25.0 mL	
				Coconut water 50.0 mL	

注: 以 100 mL 冷冻稀释液来计算各组分。

Note: Each component is calculated in 100 mL of extender.

范, 如《人类辅助生殖技术规范》《人类精子库基本标准和技术规范》, 并在不断修改和完善中。另

外, 《WHO 人类精液检查及处理实验室手册》推荐了一整套人类精子冻存方案, 其中, 甘油-卵黄-

柠檬酸盐(glycerol-egg yolk-citrate, GEYC)冷冻保护剂、液氮蒸汽冷冻法及程序降温法的标准程序,已形成共识并得到广泛的应用。然而,非人灵长类动物由于种群数量减少且射精质量易受生殖周期、采精方式等多因素影响,可供研究的精子样本数量少,其精子冻存研究还处于探索阶段,尚未达成共识并建立标准化的质量体系。因此,可以借鉴人类精子库的质量体系,筛选质量合格的精液标本,根据种属与精液样本的差异进行分类,研究其合适的冷冻保护剂及对应的冷冻程序,最终建立非人灵长类动物精子库,有效保护非人灵长类资源。

参考文献(References):

- [1] AMIDI F, PAZHOHAN A, SHABANI NASHTAEI M, *et al.* The role of antioxidants in sperm freezing: a review[J]. *Cell and Tissue Banking*, 2016, 17(4): 745-756.
- [2] LI M W, MEYERS S, TOLLNER T L, *et al.* Damage to chromosomes and DNA of rhesus monkey sperm following cryopreservation[J]. *Journal of Andrology*, 2007, 28(4): 493-501.
- [3] MEYERS S A. Dry storage of sperm: applications in primates and domestic animals[J]. *Reproduction, Fertility, and Development*, 2006, 18(1/2): 1-5.
- [4] RUTTLANT J, POMMER A C, MEYERS S A. Osmotic tolerance limits and properties of rhesus monkey (*Macaca mulatta*) spermatozoa[J]. *Journal of Andrology*, 2003, 24(4): 534-541.
- [5] GARCÍA GRANADOS M D, HERNÁNDEZ LÓPEZ L E, CORDOBA AGUILAR A, *et al.* Effect of photoperiod on characteristics of semen obtained by electroejaculation in stump-tailed macaques (*Macaca arctoides*)[J]. *Primates*, 2014, 55(3): 393-401.
- [6] 杨上川, 季维智, 陈建春, 等. 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[J]. *动物学研究*(YANG Shangchuan, JI Weizhi, CHEN Jianchun, *et al.* The use of improved penile electroejaculation in rhesus, Tibetan and Assamese macaques and study on the parameters of their semen[J]. *Zoological Research*), 1994, 15(1): 77-83.
- [7] DIXSON A L, ANDERSON M J. Sexual selection, seminal coagulation and copulatory plug formation in primates[J]. *Folia Primatologica*, 2002, 73(2/3): 63-69.
- [8] HOSKINS D D, PATTERSON D L. Prevention of coagulum formation with recovery of motile spermatozoa from rhesus monkey semen[J]. *Journal of Reproduction and Fertility*, 1967, 13(2): 337-340.
- [9] SETTLAGE D S, HENDRICKX A G. Observations on coagulum characteristics of the rhesus monkey electroejaculate[J]. *Biology of Reproduction*, 1974, 11(5): 619-623.
- [10] MARSON J, GERVAIS D, MEURIS S, *et al.* Influence of ejaculation frequency on semen characteristics in chimpanzees (*Pan troglodytes*)[J]. *Journal of Reproduction and Fertility*, 1989, 85(1): 43-50.
- [11] MORELAND R B, RICHARDSON M E, LAMBERSKI N, *et al.* Characterizing the reproductive physiology of the male southern black howler monkey, *Alouatta caraya*[J]. *Journal of Andrology*, 2001, 22(3): 395-403.
- [12] VALLE R R, GUIMARÃES M A B V, MUNIZ J A P C, *et al.* Collection and evaluation of semen from captive howler monkeys (*Alouatta caraya*)[J]. *Theriogenology*, 2004, 62(1/2): 131-138.
- [13] HERNÁNDEZ-LÓPEZ L, CERDA-MOLINA A L, PÁEZ-POINCE L D, *et al.* Seasonal emission of seminal coagulum and *in vivo* sperm dynamics in the black-handed spider monkey (*Ateles geoffroyi*)[J]. *Theriogenology*, 2008, 69(4): 466-472.
- [14] 熊承良, 商学军, 刘继红. 人类精子学[M]. 北京: 人民卫生出版社(XIONG Chengliang, SHANG Xuejun, LIU Jihong. *Human Spermatology*[M]. Beijing: People's Medical Publishing House), 2013: 618-619.
- [15] VALTONEN-ANDRÉ C, OLSSON A Y, NAYUDU P L, *et al.* Ejaculates from the common marmoset (*Callithrix jacchus*) contain semenogelin and beta-microseminoprotein but not prostate-specific antigen[J]. *Molecular Reproduction and Development*, 2005, 71(2): 247-255.
- [16] BAVISTER B D, LEIBFRIED M L, LIEBERMAN G. Development of preimplantation embryos of the golden hamster in a defined culture medium[J]. *Biology of Reproduction*, 1983, 28(1): 235-247.
- [17] STRELCHENKO N S, SCHMIDT J K, MEAN K D, *et al.* Cryopreservation of Mauritian cynomolgus macaque (*Macaca fascicularis*) sperm in chemically defined medium[J]. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science*, 2020, 59(6): 681-686.
- [18] OLIVEIRA K G, MIRANDA S A, LEÃO D L, *et al.* Semen coagulum liquefaction, sperm activation and cryopreservation of capuchin monkey (*Cebus apella*) semen in coconut water solution (CWS) and TES-TRIS[J]. *Animal Reproduction Science*, 2011, 123(1/2): 75-80.
- [19] DA CUNHA SOUSA P, LEÃO D L, SAMPAIO W V, *et al.* Morphological and ultrastructural changes in seminal coagulum of the squirrel monkey (*Saimiri collinsi* Osgood, 1916) before and after liquefaction[J]. *Animal Reproduction Science*, 2021, 226: 106710.
- [20] GERITS I, WYDOOGHE E, PEERE S, *et al.* Semen collection, evaluation, and cryopreservation in the bonobo (*Pan paniscus*)[J]. *BMC Zoology*, 2022, 7: 12.
- [21] FLORES-HERRERA H, ACUÑA-HERNÁNDEZ D G, RIVERA-REBOLLEDO J A, *et al.* Effect of increasing trypsin concentrations on seminal coagulum dissolution and sperm parameters in spider monkeys (*Ateles geoffroyi*)[J]. *Theriogenology*, 2012, 78(3): 612-619.
- [22] 平述煌, 杨世华. 精子冷冻保存技术及研究进展[J]. *中国比较医学杂志*(PING Shuhuang, YANG Shihua. *Progress on sperm cryopreservation*[J]. *Chinese Journal of Comparative Medicine*), 2011, 21(3): 67-71.
- [23] WHALEY D, DAMYAR K, WITEK R P, *et al.* Cryopreservation: an overview of principles and cell-specific considerations[J]. *Cell Transplantation*, 2021, 30: 1-12.
- [24] LI Y H, CAI K J, SU L, *et al.* Cryopreservation of cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*) spermatozoa in a chemically defined extender[J]. *Asian Journal of Andrology*, 2005, 7(2): 139-144.
- [25] SI W, ZHENG P, TANG X, *et al.* Cryopreservation of rhesus macaque (*Macaca mulatta*) spermatozoa and their functional assessment by *in vitro* fertilization[J]. *Cryobiology*, 2000, 41(3): 232-240.
- [26] ZAINUDDIN Z Z, TARMIZI R, CHEE Y K, *et al.* Preliminary findings of age and male sexual characteristics and potential effect to semen characteristics and cryopreservation of the critically endangered Bornean orangutan in Malaysia[J]. *Primates*, 2022, 63(4): 377-386.
- [27] LI Y H, CAI K J, KOVACS A, *et al.* Effects of various extenders and permeating cryoprotectants on cryopreservation of cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*) spermatozoa[J]. *Journal of Andrology*, 2005, 26(3): 387-395.
- [28] AGCA Y, MULLEN S, LIU J, *et al.* Osmotic tolerance and membrane permeability characteristics of rhesus monkey (*Macaca mulatta*) spermatozoa[J]. *Cryobiology*, 2005, 51(1): 1-14.
- [29] TAKAESU N, KANNO C, SUGIMOTO K, *et al.* Semen collection by urethral catheterization and electro-ejaculation with different voltages, and the effect of holding temperature and cooling rate before cryopreservation on semen quality in the Japanese macaque (*Macaca fuscata*)[J]. *Journal of Veterinary Medical Science*, 2022, 84(3): 429-438.
- [30] MCCARTHY M J, BAUMBER J, KASS P H, *et al.* Osmotic stress induces oxidative cell damage to rhesus macaque spermatozoa[J]. *Biology of Reproduction*, 2010, 82(3): 644-651.
- [31] 采克俊, 李亚辉, 李剑, 等. 不同渗透压的稀释液对猕猴精子低温冷冻保存的影响[J]. *动物学研究*(CAI Kejun, LI Yahui, LI Jian, *et al.* Effects of extenders varying in osmolality on rhesus monkey (*Macaca mulatta*) spermatozoa cryopreservation[J]. *Zoological Research*), 2005, 26(3): 305-310.

- [32] YAN Y P, AO L, WANG H, *et al.* Cryopreservation of cynomolgus macaque (*Macaca fascicularis*) sperm by using a commercial egg-yolk free freezing medium[J]. Journal of the American Association for Laboratory Animal Science, 2016, 55(6): 744-748.
- [33] DONG Q X, VANDEVOORT C A. Effect of egg yolk on cryopreservation of rhesus monkey ejaculated and epididymal sperm[J]. Journal of Andrology, 2009, 30(3): 309-316.
- [34] MCCARTHY M J, MEYERS S A. Antioxidant treatment in the absence of exogenous lipids and proteins protects rhesus macaque sperm from cryopreservation-induced cell membrane damage[J]. Theriogenology, 2011, 76(1): 168-176.
- [35] DONG Q X, CORREA L M, VANDEVOORT C A. Rhesus monkey sperm cryopreservation with TEST-yolk extender in the absence of permeable cryoprotectant[J]. Cryobiology, 2009, 58(1): 20-27.
- [36] PILLET E, LABBE C, BATELLIER F, *et al.* Liposomes as an alternative to egg yolk in stallion freezing extender[J]. Theriogenology, 2012, 77(2): 268-279.
- [37] DONG Q X, TOLLNER T L, RODENBURG S E, *et al.* Antioxidants, oxyrase, and mitochondrial uncoupler 2,4-dinitrophenol improved postthaw survival of rhesus monkey sperm from ejaculates with low cryosurvival[J]. Fertility and Sterility, 2010, 94(6): 2359-2361.
- [38] LEÃO D L, BRITO A B, MIRANDA S A, *et al.* Extender supplementation with catalase maintains the integrity of sperm plasma membrane after freezing-thawing of semen from capuchin monkey[J]. Zygote, 2017, 25(2): 231-234.
- [39] SI W, WANG H, REID C, *et al.* Effect of sugar type on the survival of frozen-thawed rhesus monkey (*Macaca mulatta*) sperm[J]. American Journal of Primatology, 2006, 68(1): 103-108.
- [40] NAING S W, WAHID H, MOHD AZAM K, *et al.* Effect of sugars on characteristics of Boer goat semen after cryopreservation[J]. Animal Reproduction Science, 2010, 122(1/2): 23-28.
- [41] MALO C, GIL L, GONZALEZ N, *et al.* Comparing sugar type supplementation for cryopreservation of boar semen in egg yolk based extender[J]. Cryobiology, 2010, 61(1): 17-21.
- [42] 李喜龙, 司维, 王红, 等. 糖在猕猴精子低温冷冻保存过程中的作用[J]. 动物学研究(LI Xilong, SI Wei, WANG Hong, *et al.* Function of sugars during cryopreservation of rhesus macaque (*Macaca mulatta*) spermatozoa[J]. Zoological Research), 2002, 23(3): 205-209.
- [43] AHMAD E, NASEER Z, AKSOY M, *et al.* Trehalose enhances osmotic tolerance and suppresses lysophosphatidylcholine-induced acrosome reaction in ram spermatozoon[J]. Andrologia, 2015, 47(7): 786-792.
- [44] TAKEUCHI H, NISHIOKA M, MAEZAWA T, *et al.* Carboxylated poly-L-lysine as a macromolecular cryoprotective agent enables the development of defined and xeno-free human sperm cryopreservation reagents[J]. Cells, 2021, 10(6): 1435.
- [45] LI Y H, SI W, ZHANG X Z, *et al.* Effect of amino acids on cryopreservation of cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*) sperm[J]. American Journal of Primatology, 2003, 59(4): 159-165.
- [46] FENG C W, ZHU Z D, BAI W J, *et al.* Proline protects boar sperm against oxidative stress through proline dehydrogenase-mediated metabolism and the amine structure of pyrrolidine[J]. Animals, 2020, 10(9): 1549.
- [47] KHIABANI A B, MOGHADDAM G, KIA H D. Effects of adding different levels of glutamine to modified Beltsville extender on the survival of frozen rooster semen[J]. Animal Reproduction Science, 2017, 184: 172-177.
- [48] KOOHESTANIDEHAGHI Y, TORKAMANPARI M, SHIRMOHAMADI Z, *et al.* The effect of cysteine and glutamine on human sperm functional parameters during vitrification[J]. Andrologia, 2021, 53(1): e13870.
- [49] 王佳慧, 陆金春, 梁元姣. 无渗透性冷冻保护剂的精子玻璃化冷冻研究进展[J]. 中国男科学杂志(WANG Jiahui, LU Jinchun, LIANG Yuanjiao. Research progress on vitrification of sperm without osmotic cryoprotectants[J]. Chinese Journal of Andrology), 2020, 34(5): 65-69.
- [50] ZHOU D, WANG X M, LI R X, *et al.* Improving native human sperm freezing protection by using a modified vitrification method[J]. Asian Journal of Andrology, 2021, 23(1): 91-96.
- [51] DE CARVALHO F M, RAMSEY C, HANNA C B, *et al.* Cryopreservation and preparation of thawed spermatozoa from rhesus macaques (*Macaca mulatta*) for *in vitro* fertilization[J]. Journal of the American Association for Laboratory Animal Science, 2021, 60(4): 396-406.
- [52] PATRICK J, COMIZZOLI P, ELLIOTT G. Dry preservation of spermatozoa: considerations for different species[J]. Biopreservation and Biobanking, 2017, 15(2): 158-168.
- [53] SÁNCHEZ-PARTIDA L G, SIMERLY C R, RAMALHO-SANTOS J. Freeze-dried primate sperm retains early reproductive potential after intracytoplasmic sperm injection[J]. Fertility and Sterility, 2008, 89(3): 742-745.
- [54] KLOOSTER K L, BURRUEL V R, MEYERS S A. Loss of fertilization potential of desiccated rhesus macaque spermatozoa following prolonged storage[J]. Cryobiology, 2011, 62(3): 161-166.
- [55] MAHDAVINEZHAD F, GILANI M A S, GHARAEI R, *et al.* Protective roles of seminal plasma exosomes and microvesicles during human sperm cryopreservation[J]. Reproductive BioMedicine Online, 2022, 45(2): 341-353.
- [56] HEZAVEHEI M, SHARAFI M, FATHI R, *et al.* Membrane lipid replacement with nano-micelles in human sperm cryopreservation improves post-thaw function and acrosome protein integrity[J]. Reproductive BioMedicine Online, 2021, 43(2): 257-268.
- [57] CHEN B B, WANG S N, INGLIS B M, *et al.* Improving sperm cryopreservation with type III antifreeze protein: proteomic profiling of cynomolgus macaque (*Macaca fascicularis*) sperm[J]. Frontiers in Physiology, 2021, 12: 719346.
- [58] DONG Q, RODENBURG S E, HUANG C, *et al.* Effect of pre-freezing conditions on semen cryopreservation in rhesus monkeys[J]. Theriogenology, 2008, 70(1): 61-69.
- [59] 采克俊, 司维, 李亚辉, 等. 流式细胞术在哺乳动物精液质量检测中的应用[J]. 动物学研究(CAI Kejun, SI Wei, LI Yahui, *et al.* Evaluation of mammalian semen quality by flow cytometry[J]. Zoological Research), 2003, 24(4): 311-317.
- [60] DUGUM M, SANDLOW J I, BRANNIGAN R E. Sperm DNA damage evaluation techniques[J]. Journal of Andrology, 2011, 32(3): 207-209.
- [61] MORRELL J M, HODGES J K. Cryopreservation of non-human primate sperm: priorities for future research[J]. Animal Reproduction Science, 1998, 53(1/4): 43-63.
- [62] 司维, 牛昱宇, 纪少璋, 等. 猕猴属灵长类动物精液超低温冷冻保存方法(SI Wei, NIU Yuyu, JI Shaohui, *et al.* Cryopreservation of semen of the genus *Macaca*): CN201010198716.9[P]. 2010-09-29.
- [63] 马开利, 黄璋琼, 鲁帅尧, 等. 非人灵长类动物的精子冷冻保存及复苏方法(MA Kaili, HUANG Zhangqiong, LU Shuaiyao, *et al.* Cryopreservation and resuscitation of non-human primate sperm): CN201710125218.3[P]. 2017-07-21.
- [64] 唐丹, 司晨洋, 严亚萍, 等. 低温定向冷冻法冻存食蟹猴精液的研究[J]. 安徽农业科学(TANG Dan, SI Chenyang, YAN Yaoping, *et al.* Study on the preservation of frozen sperm of *Macaca fascicularis* by directional freezing technique[J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences), 2014, 42(6): 1699-1701.
- [65] 陈衍, 高江梅, 赵世坤, 等. 无卵黄冷冻液冷冻食蟹猴精液方法的优化[J]. 中国实验动物学报(CHEN Yan, GAO Jiangmei, ZHAO Shikun, *et al.* Optimization of cryopreservation of cynomolgus monkey semen with yolk-free solution[J]. Acta Laboratorium Animalis Scientia Sinica), 2022, 30(1): 70-76.
- [66] 卢晟盛, 李林, 胡传活, 等. 不同甘油浓度与平衡时间对食蟹猴精液冷冻效果的影响[J]. 动物学杂志(LU Shengsheng, LI Lin, HU Chuanhuo, *et al.* Effects of glycerol concentration and equilibration time on cryopreservation of cynomolgus monkey spermatozoa[J]. Chinese Journal Zoology), 2008, 43(1): 50-55.
- [67] FERADIS A H, PAWITRI D, SUATHA I K, *et al.* Cryopreservation of epididymal spermatozoa collected by needle biopsy from cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*) [J]. Journal of Medical Primatology, 2001, 30(2): 100-106.
- [68] 陈建春, 季维智, 杨上川, 等. 藏酋猴精液深低温冻存的研究——不同的冷冻程序、冷冻稀释保存液冻存效果的比较[J]. 动物学报(CHEN Jianchun, JI Weizhi, YANG Shangchuan, *et al.* Semen cryopreservation in the Tibetan macaque (*Macaca thibetana*): comparison of different cooling programs and freezing media[J]. Current Zoology), 1994, 40(2): 174-181.
- [69] SANKAI T, SHIMIZU K, CHO F, *et al.* *In vitro* fertilization of follicular oocytes by frozen-thawed spermatozoa in Japanese monkeys (*Macaca fuscata*) [J]. Laboratory Animal Science, 1997, 47(1): 58-62.
- [70] O'BRIEN, J K, HOLLINSHEAD F K, EVANS K M, *et al.* Flow cytometric sorting of frozen-thawed spermatozoa in sheep and non-human primates[J]. Reproduction, Fertility, and Development, 2003, 15(7/8): 367-375.