

不同冻存液对长江鲟鳍条细胞冷冻效果的影响

刘娟娟, 刘雪清, 胡亚成, 王彬忠, 杜合军

(中国长江三峡集团公司中华鲟研究所, 三峡工程鱼类资源保护湖北省重点实验室, 湖北 宜昌 443100)

摘要:为了探究不同浓度配比冻存液对长江鲟(*Acipenser dabryanus*)鳍条细胞(Dabry's sturgeon fin-derived cells, DSFCs)冷冻效果的影响,选择传代培养处于对数生长期的 DSFCs,将第 8 代 DSFCs 置于液氮(-196℃)中冻存。根据冻存液中培养基(MEM)、胎牛血清(Fetal bovine serum, FBS)及二甲亚砜(Dimethyl sulfoxide, DMSO)的配比不同,分为 8 个实验组:①含不同浓度 DMSO 配比实验组:5% DMSO+45% MEM+50% FBS, 10% DMSO+40% MEM+50% FBS, 20% DMSO+30% MEM+50% FBS;②含不同浓度 FBS 配比实验组:10% DMSO+90% FBS+0% MEM, 10% DMSO+70% FBS+20% MEM, 10% DMSO+50% FBS+40% MEM, 10% DMSO+30% FBS+60% MEM, 10% DMSO+10% FBS+80% MEM, 对各组分采用形态学观察、CCK-8 法、流式细胞仪检测细胞凋亡和细胞周期,综合分析不同冻存液组分对 DSFCs 冻存后活力的影响。结果显示,不同浓度 DMSO 配比实验组中,DMSO 的浓度为 20% 时,细胞复苏后难以贴壁,存活率下降非常明显,仅为 38.3%;而 5% 和 10% DMSO 细胞生长状态良好,存活率分别为 80.2% 和 78.7%。不同浓度 FBS 配比实验组中,90%、30% 和 10% 实验组细胞活力显著高于 70% 和 50% 实验组。FBS 浓度为 30% 和 10% 的冻存组细胞凋亡率显著高于 90% 的冻存组(8.24%, 15.35% vs 3.54%),3 组之间相互比较有明显差异($P < 0.05$);细胞周期结果显示,与 FBS 浓度为 90% 的冻存组比较,FBS 浓度为 30% 和 10% 冻存组 G_0/G_1 期细胞比例均明显增加($P < 0.05$),S 期和 $G_2 + M$ 期细胞比例均显著降低($P < 0.05$),FBS 浓度 30% 与 10% 冻存组比较差异不明显($P > 0.05$)。研究表明,长江鲟细胞的长期冷冻保存宜采用稍低浓度的 DMSO(5%~10%)和高浓度的 FBS。

关键词:长江鲟;鳍条细胞;超低温保存;细胞凋亡;细胞周期

中图分类号:Q132 **文献标志码:**A **文章编号:**1674-3075(2021)02-0079-07

长江鲟又称达氏鲟(*Acipenser dabryanus*),是我国长江上游特有品种,在研究地球气候变化和鱼类演化等方面具有重要的科学价值。近年来,由于过度捕捞、河流建坝等原因,长江鲟的资源急剧减少,已成为极危级(CR)物种,濒临灭绝。因此,如何保护长江鲟遗传资源显得十分迫切和必要(Zhuang et al, 1997; Zhang et al, 2011; 周波等, 2014)。超低温保存(-196℃液氮)作为储存濒危物种种子细胞的重要方法之一(Cabrita et al, 2010),可以有效降低甚至完全抑制细胞活力及基因变异的可能性,使其复苏后能保持良好的遗传稳定性,在保存和抢救物种等方面有重要意义(Fickel et al, 2007; Psenicka et al, 2016)。尽管如此,由于不同物种对不同的防冻剂和冷冻过程反应不同,迄今为

止还不能找到一种普遍的模式或冷冻程序对相似的细胞或有机体进行冻存(Chen et al, 2004; Magalhaes et al, 2017)。因此,很有必要对濒危珍稀动物种质资源的低温保存方法进行深入研究,试图找到一种能有效减少细胞冻存凋亡的方法,使其活性最大程度接近正常水平。

本研究以长江鲟鳍条细胞系(dabry's sturgeon fin-derived cells, DSFCs)为实验材料,运用形态学观察、CCK-8 法、流式细胞术检测细胞凋亡等实验手段,探究不同浓度配比冻存液对 DSFCs 冻效果的影响,以期在细胞水平上更加完整地保存长江鲟的遗传信息,为其体细胞系应用研究提供技术保障。

1 材料与方 法

1.1 试剂及仪器

试剂及仪器包括胎牛血清、MEM 培养基、0.25% 胰酶、无菌 PBS 均为 Gibco 产品。FITC-Annexin V Apoptosis Detection Kit I (BD)、CCK-8 (Dojindo, 日本)、PI (碧云天)、Rnase A (Takara)、细胞培养瓶(Corning)、二甲基亚砜(DMSO,

收稿日期:2019-04-19

基金项目:国家自然科学基金(C190303);中国长江三峡集团公司三峡环境基金(XN270)。

作者简介:刘娟娟,1985年生,女,高级工程师,主要从事濒危鱼类保护研究。E-mail:05juanjuan@163.com

通讯作者:杜合军。E-mail: du_hejun@ctg.com.cn

Sigma)、二氧化碳培养箱(Thermo Forma 3111)、倒置荧光显微镜(Olympus IX71)、高速离心机(Eppendorf)、流式细胞仪(Beckman Coulter);酶标仪(Bio-Rad)、生物安全柜(Thermo)。

1.2 实验材料

实验材料第8代长江鲟鳍条细胞 DSFCs 由中华鲟研究所、三峡工程鱼类资源保护湖北省重点实验室分离获得。

1.3 实验方法

1.3.1 细胞原代及传代培养 取1龄左右的长江鲟尾鳍组织,经70%的乙醇消毒,采用组织块贴壁法进行原代培养,培养液为含20%胎牛血清的MEM,置于25℃、5%的二氧化碳培养箱中进行培养,每隔2d进行换液,培养至第7天后,显微镜下观察有细胞迁出,待培养瓶中的迁出细胞覆盖率达70%以上,以0.25%胰酶消化传代。最终取传代至第8代的DSFCs细胞作为本实验材料。

1.3.2 细胞冻存与复苏 取第8代处于对数生长期、生长状态良好的DSFCs细胞进行冻存。

不同浓度DMSO的冻存液组分包括5%DM-SO+45%MEM+50%FBS、10%DMSO+40%MEM+50%FBS、20%DMSO+30%MEM+50%FBS共计3个实验组;

不同胎牛血清浓度配比的冻存液组分包括10%DMSO+90%FBS+0%MEM、10%DMSO+70%FBS+20%MEM、10%DMSO+50%FBS+40%MEM、10%DMSO+30%FBS+60%MEM、10%DMSO+10%FBS+80%MEM共计5个实验组。细胞冻存密度为 1×10^6 个/mL,每组3个重复。每个实验组的DSFCs细胞在冻存30d后取出,进行复苏和传代培养。

1.3.3 形态学观察 不同冻存液组分处理的DSFCs细胞复苏培养24h后,在倒置光学显微镜下观察细胞生长贴壁效率。

1.3.4 CCK-8法检测 细胞铺板:对照组为无细胞的培养基,实验组为不同冻存组分保存的细胞,检测时间为24h。取对数生长的细胞,根据不同的时间以合适的密度铺板,每孔细胞悬液为100 μ L。25℃、5%CO₂条件下培养,待细胞贴壁后,培养相应的时间。CCK-8检测:待培养到相应时间后,向每孔培养液中加入10 μ L的CCK-8溶液,充分混合,保证孔中颜色均一性;继续培养4h后,用酶标仪测定450nm处的吸光度值(D)。

细胞相对活力=($D_{\text{实验组}}/D_{\text{对照组}}$) $\times 100\%$

1.3.5 细胞凋亡检测 选择冻存组中活力较好的实验组DSFCs细胞,取对数生长期,用不含EDTA的胰酶消化细胞,并收集细胞,800r/min离心5min,弃上清,再用预冷的1 \times PBS重悬细胞团,800r/min离心5min,弃上清,重复2次;每管细胞加100 μ L 1 \times Binding Buffer重悬,加入5 μ L Annexin V-FITC和5 μ L PI,充分混匀,室温下避光孵育15min;加入300 μ L 1 \times Binding Buffer重悬细胞,混匀避光,样品上流式细胞仪检测。

1.3.6 细胞周期检测 细胞周期(cell cycle)是指细胞从一次分裂完成开始、到下一次分裂结束所经历的全过程,分为间期与分裂期两个阶段。间期又分为3期,即DNA合成前期(G₁期)、DNA合成期(S期)与DNA合成后期(G₂期)。M期是指细胞分裂期,G₀期指暂时离开细胞周期,停止细胞分裂,去执行一定生物学功能的细胞所处的时期。细胞周期检测步骤为消化细胞,取悬浮细胞液于流式管中;加入预冷的1 \times PBS重悬细胞团,1000r/min离心5min,弃上清,重复2次;逐滴加入5mL或更多预冷的70%的乙醇,涡旋混匀细胞,4℃避光过夜(>18h)。取出固定好的细胞,PBS清洗;加入PI染料,室温下避光孵育30min,PBS清洗;加入300 μ L PBS重悬细胞,混匀避光,样品上流式细胞仪检测。

1.4 数据处理

所有数据结果采用SPSS 20.0软件进行分析,两组间比较使用独立样本t检验,多组间比较使用双因素方差分析(Two-way analysis of variance),结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示; $P < 0.05$ 为差异显著, $P > 0.05$ 为无显著性差异。

2 结果

2.1 不同浓度冻存液的DSFCs贴壁状态比较

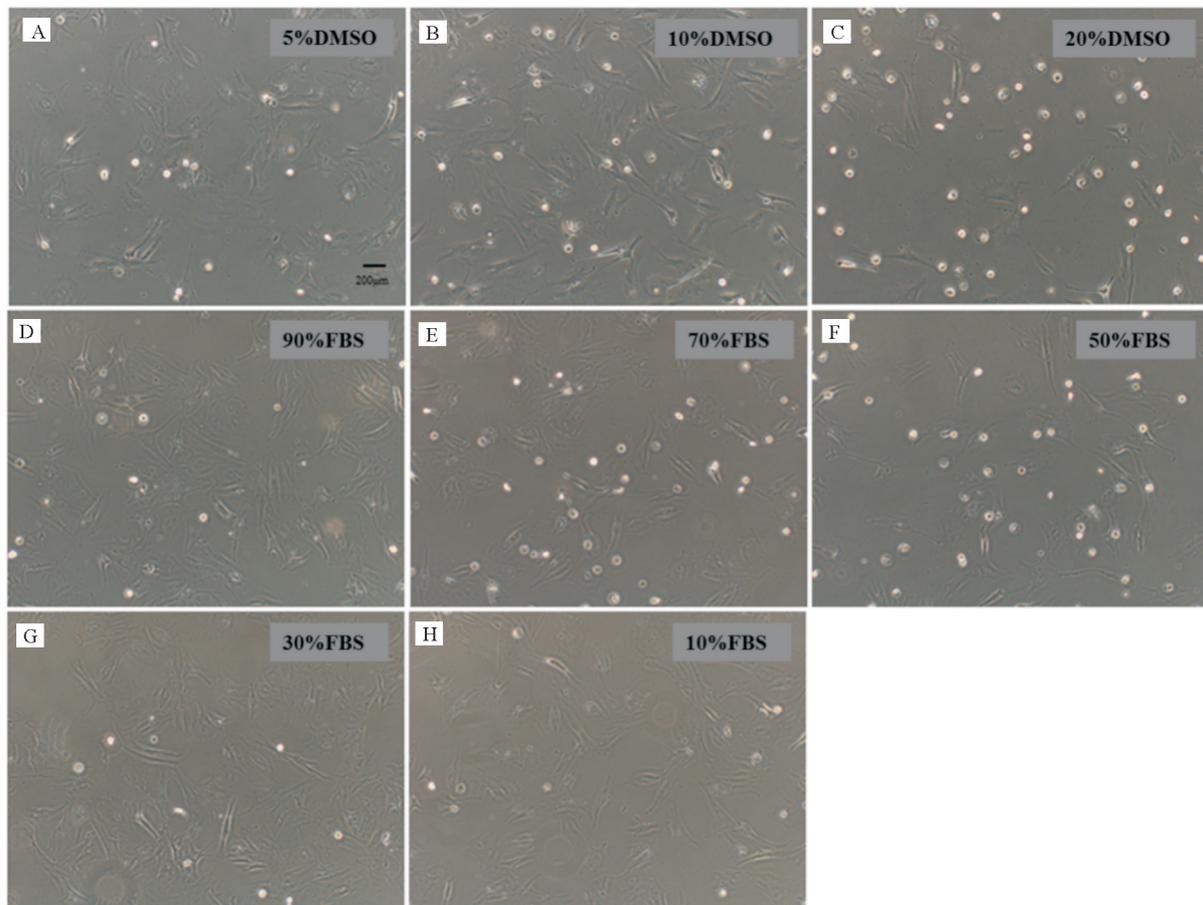
在不同浓度DMSO配比冻存的细胞实验组中,随着DMSO浓度的增加,复苏细胞在培养24h后的贴壁数量大量减少,细胞体积明显缩小变圆,透亮度差,尤其是20%DMSO冻存的细胞复苏后,可见大量的细胞崩解碎片。在相同DMSO浓度,不同FBS浓度配比的实验组中,90%、30%及10%的实验组细胞复苏后的活力较好,大部分细胞能够贴壁生长;而70%和50%实验组中,细胞复苏后的活力较差,悬浮且无法贴壁的细胞较多(图1)。

2.2 不同浓度配比冻存液的DSFCs活力比较

CCK-8法检测5%、10%以及20%DMSO实

验组长江鲟的细胞活力。结果表明,20%DMSO实验组(36.5%)与5%DMSO(80.2%)和10%DMSO(78.7%)实验组细胞活力相比较,活力下降非常明显,具有显著性差异(图2-A);5%DMSO和10%DMSO两个实验细胞活力比较差异不明显;而不同

浓度FBS冻存液组分冻存的细胞经CCK-8法检测结果表明,FBS浓度为90%、30%和10%的实验组细胞活力(88.7%、90.3% vs 91.5%)显著高于70%和50%的实验组(80.8% vs 70.3%)(图2-B)。



(A-H: 各冻存组细胞的贴壁状态图,比例尺=200 μm)

图1 不同浓度配比冻存液冻存DSFCs的贴壁状态比较

(A-H: Morphology of adherent cells in each cryopreserved group, scale bar=200 μm)

Fig.1 Morphological comparison of DSFCs cryopreserved in different concentrations of freezing solutions after recovery

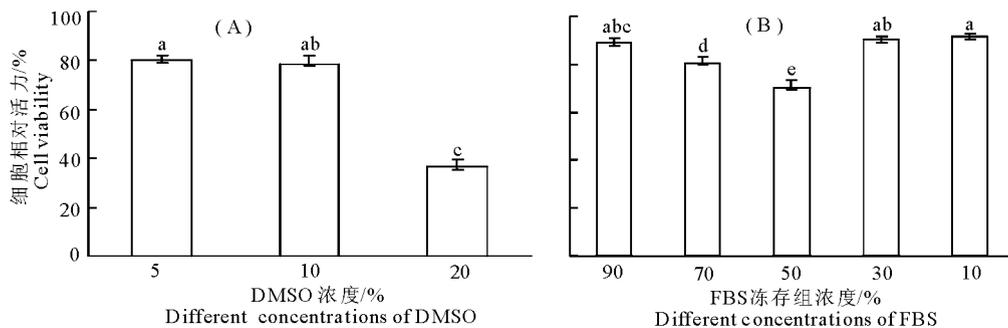


图2 不同浓度DMSO(A)和FBS(B)冻存DSFCs复苏后的活力比较

Bar charts with different lowercase letters indicate significant differences $P < 0.05$

Fig.2 Comparison of cell viability of DSFCs cryopreserved at different concentrations of DMSO(a) and FBS(b) after recovery

2.3 不同浓度 FBS 配比冻存 DSFCs 的凋亡率比较

根据 CCK-8 法检测结果得知, FBS 浓度为 90%、30% 和 10% 实验组的细胞活力较高, 应用流式细胞仪分析对这 3 个实验组中 DSFCs 细胞进行总凋亡率分析(图 3)。结果发现, 浓度为 30% FBS 和 10% FBS 冻存组细胞总凋亡率显著高于浓度为 90% FBS 的冻存组(8.24%, 15.35% vs 3.54%)。3 个冻存组细胞的总凋亡率两两之间相互比较, 其结果均呈现显著性差异(图 4)。

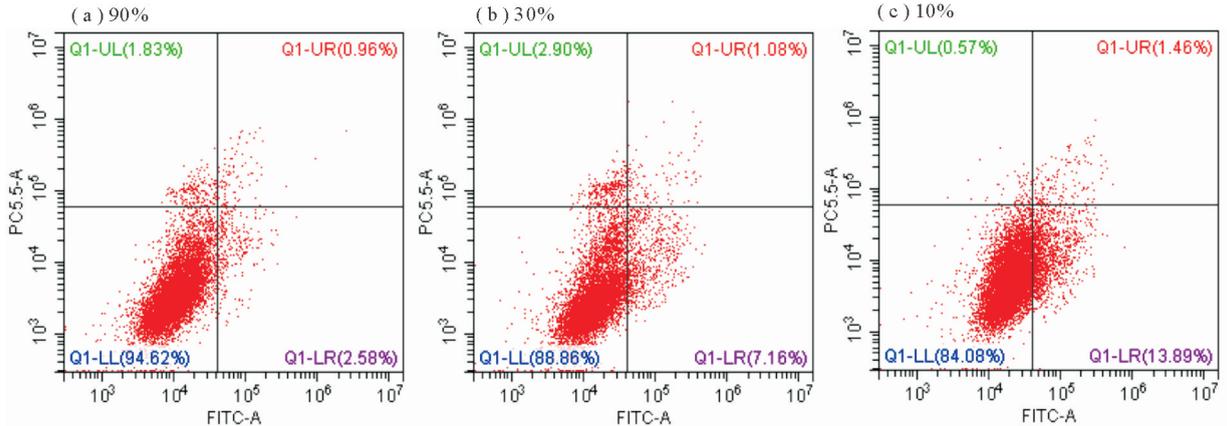
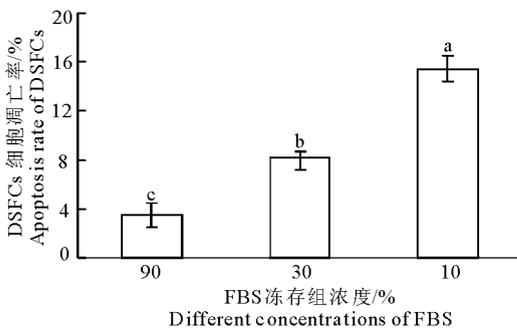


图 3 不同浓度 FBS 冻存组 DSFCs 细胞凋亡

Fig.3 Flow chart of apoptosis of DSFCs at different FBS concentrations



各实验组标注不同小写字母数据代表差异显著($P < 0.05$)

图 4 不同浓度 FBS 冻存组细胞凋亡率比较

Bar charts with different lowercase letters indicate significant differences $P < 0.05$

Fig.4 Comparison of apoptosis rates of DSFCs at different FBS concentrations

2.4 不同浓度 FBS 冻存的 DSFCs 细胞周期比较

从不同浓度 FBS 配比冻存液对细胞周期的影响(表 1)及图 5 可以看出, 与 FBS 浓度 90% 冻存组相比较, 30% 和 10% 冻存组 G_0/G_1 期细胞比例均明显增加($P < 0.05$), S 期和 G_2/M 期细胞比例均显著降低($P < 0.05$), 30% 冻存组与 10% 冻存组之间比较, 差异并不显著($P > 0.05$)。90% 冻存组中细胞处于 G_0/G_1 期比率小, 处于 S 期和 G_2/M 期比率大时, 表明增殖中的细胞多。

3 讨论

3.1 超低温冷冻在物种保护中的应用

保护生物资源是维护生物多样性的重要战略措施。特别是对面临灭绝威胁的野生物种而言, 应用冷冻保存技术将其配子、胚胎、性腺组织以及体细胞和组织长期保存起来, 再与辅助生殖技术相结合, 则可为濒危物种的恢复和复壮提供重要的技术手段(Mandawala et al, 2016; Praxedes et al, 2018)。在超低温(-196°C)条件下, 几乎所有的细胞代谢活动和生长过程都停止, 若将生长状态良好的组织或细胞进行冻存, 可避免细胞因长期培养与反复传代而失去其良好的生物学特性(Ramos et al, 2014)。目前, 多种植物的器官(Ulrich et al, 1979; Wilkinson et al, 2003)、组织(Psenicka et al, 2016)和细胞培养物(马艳等, 2010; Perezmarin et al, 2018)的超低温保存获得成功。然而, 不同物种的细胞来源、冻存前细胞的预处理、细胞的冻存代数、冷冻保护剂、冻存液组分的配比以及超低温冻存程序等都会直接影响细胞的冻存质量(Leonquinto et al, 2014; Martinez-paramo et al, 2017)。

表 1 不同浓度 FBS 配比冻存液对细胞周期的影响

Tab.1 Effects of different FBS concentrations on the cell cycle phase of DSFCs

组别	细胞期		
	G_0/G_1	G_2/M	S
90% FBS	74.07 ± 5.02	4.83 ± 0.52	24.14 ± 3.52
30% FBS	91.09 ± 3.77	3.61 ± 0.74	11.78 ± 4.95
10% FBS	90.64 ± 5.38	3.33 ± 0.52	10.93 ± 2.51

3.2 不同配比 DMSO 对 DSFCs 冷冻效果的影响

本次实验结果显示,当 DMSO 为较低浓度 5% 或 10% 时,复苏后细胞活力较好,当浓度增大到 20% 时,细胞活力仅有 36.5%,且复苏后的细胞难以贴壁甚至呈现大量的细胞崩解碎片现象,说明该条件下冻存的细胞已经受到极大损伤。这可能是由于高浓度的 DMSO 对 DSFCs 形成了较强的毒副作用,

影响了细胞的存活和增殖;而浓度为 5% 的 DMSO 冻存细胞在复苏后,平均成活率虽然较 10% DMSO 的平均成活率要高,但两组数据间差异并不显著,且 DMSO 浓度为 5% 的组内数据偏差较 10% 组要大一些。因此,在冻存达氏鲟鳍条细胞系过程中,采用 10% 的 DMSO 进行下一步实验,可以保证细胞复苏后有较稳定的活力。

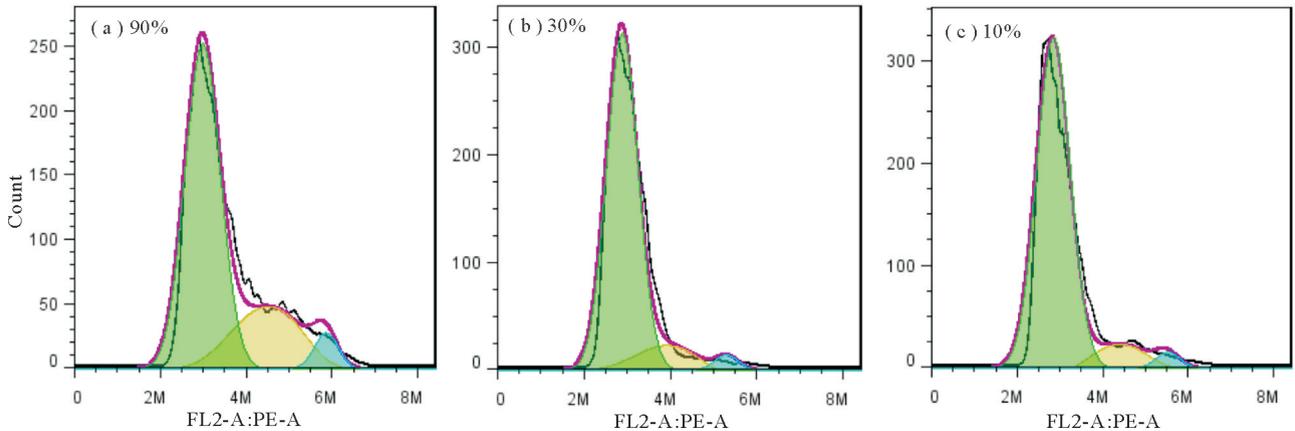


图5 不同浓度 FBS 冻存 DSFCs 细胞周期的改变

Fig.5 Changes of cell cycle phase of DSFCs in different FBS concentrations

3.3 不同配比 FBS 对 DSFCs 冷冻效果的影响

在不同浓度配比的 FBS 实验组中,浓度居中的 70% 和 50% FBS 组的细胞活力 (80.8% vs 70.3%) 显著低于高浓度 90% FBS 组和低浓度 30% 及 10% FBS 组的细胞活力 (88.7%, 90.3% vs 91.5%)。进一步对细胞活力相对较高的 90%、30% 和 10% FBS 的实验组进行细胞凋亡率分析,发现随着 FBS 浓度的降低,FBS 浓度为 30% 和 10% 的两个冻存组的总凋亡率均显著增加;同时,细胞周期也表明,FBS 浓度 30% 和 10% 两个冻存组 G_0/G_1 期细胞百分比增加,S 期和 G_2/M 期细胞比率降低,表明增殖中的细胞较少,而 FBS 浓度为 90% 的冻存组中大部分细胞处于 S 期和 G_2/M 期,处于 G_0/G_1 期百分比降低,表明增殖中的细胞较多。从细胞凋亡和细胞周期来看,随着冻存液中 FBS 浓度的增加,细胞冻存复苏后的凋亡率逐渐降低,细胞的增殖活性逐步增加,原因可能是胎牛血清可以中和 DMSO 的毒性,高浓度的 FBS 在深低温冻存时对细胞有保护作用。血清中的纤维粘连素能促进细胞的附着,血清蛋白增强了血清的粘度,可保护细胞免受机械损伤,从而抑制细胞的凋亡,增加细胞的存活率(章静波,2002; Mitchell et al, 2015)。因此,在细胞冻存过程中,针对珍贵稀有的动物细胞,可以采用含全血清的冻存液进行冻存;而对于一般的普通类研究用细胞,则采

用含较低浓度(10%~30%)的 FBS 冻存液保存,是比较经济和理想的选择。

本实验从濒危物种种质资源的有效保存考虑,筛选了一种较为适合 DSFCs 低温冻存方法,为解决鲟类其它物种细胞的超低温保存提供了技术参考,但还有许多问题需进一步细致的研究,如含有中等浓度的 FBS 冻存液冻存的细胞活力较差,细胞的冻存程序、细胞器的超微结构等与细胞抗寒力的关系,较长时期的冷冻保存对细胞活力和形态建成过程的影响等等。

参考文献

- 马艳,丁伟峰,冯颖,等,2010. 保护剂和冻存时间对昆虫细胞系 NIAS-MaBr-85 冻后活性的影响[J]. 中国细胞生物学学报, 32(1):154-158.
- 章静波,2002. 组织和细胞培养技术[M]. 北京:人民卫生出版社:11-13.
- 周波,龚全,卢华,等,2014. 达氏鲟亲鱼培育池浮游植物初级生产力的研究[J]. 水生态学杂志, 35(1):39-45.
- Cabrita E, Sarasquete C, Martinezparamo S, et al, 2010. Cryopreservation of fish sperm: applications and perspectives[J]. Journal of Applied Ichthyology, 26(5): 623-635.
- Chen S, Ji X, Yu G, et al, 2004. Cryopreservation of sperm from turbot (*Scophthalmus maximus*) and application

- to large-scale fertilization[J]. *Aquaculture*, 236(1): 547 - 556.
- Fickel J, Wagener A, Ludwig A, et al, 2007. Semen cryopreservation and the conservation of endangered species [J]. *European Journal of Wildlife Research*, 53(2): 81 - 89.
- Leonquinto T, Simon M A, Cadenas R, et al, 2014. Different cryopreservation requirements in foetal versus adult skin cells from an endangered mammal, the Iberian lynx (*Lynx pardinus*) [J]. *Cryobiology*, 68(2): 227 - 233.
- Magalhaeslivia C, Bhatmaajid H, Freitasjeferson L S, et al, 2017. The Effects of Cryopreservation on Different Passages of Fibroblast Cell Culture in Brown Brocket Deer (*Mazama gouazoubira*) [J]. *Biopreservation and Biobanking*, 15(5): 463 - 468.
- Mandawala A A, Harvey S C, Roy T K, et al, 2016. Cryopreservation of animal oocytes and embryos: Current progress and future prospects [J]. *Theriogenology*, 86(7): 1637 - 1644.
- Martinezparamo S, Horvath A, Labbe C, et al, 2017. Cryobanking of aquatic species [J]. *Aquaculture*: 156 - 177.
- Mitchell A, Rivas K A, Smith R, et al, 2015. Cryopreservation of equine mesenchymal stem cells in 95% autologous serum and 5% DMSO does not alter post-thaw growth or morphology in vitro compared to fetal bovine serum or allogeneic serum at 20 or 95% and DMSO at 10 or 5 [J]. *Stem Cell Res Ther*, 6:231.
- Perezmarin C C, Vizuete G, Vazquezmartinez R, et al, 2018. Comparison of different cryopreservation methods for horse and donkey embryos [J]. *Equine Veterinary Journal*, 50(3): 398 - 404.
- Praxedes E A, Borges A A, Santos M V, et al, 2018. Use of somatic cell banks in the conservation of wild felids [J]. *Zoo Biology*, 37(4): 258 - 263.
- Psenicka M, Saito T, Rodina M, et al, 2016. Cryopreservation of early stage Siberian sturgeon *Acipenser baerii* germ cells, comparison of whole tissue and dissociated cells [J]. *Cryobiology*, 72(2): 119 - 122.
- Ramos T V, Mathew A J, Thompson M L, et al, 2014. Standardized Cryopreservation of Human Primary Cells [J]. *Current Protocols in Pharmacology*, 64(1): 311 - 318.
- Ulrich J M, Finkle B J, Moore P H, et al, 1979. Effect of a mixture of cryoprotectants in attaining liquid nitrogen survival of callus cultures of a tropical plant [J]. *Cryobiology*, 16(6): 550 - 556.
- Wilkinson T, Wetten A, Prychid C, et al, 2003. Suitability of cryopreservation for the long-term storage of rare and endangered plant species: a case history for *Cosmos atrosanguineus* [J]. *Annals of Botany*, 91(1): 65 - 74.
- Zhang H, Wei Q, Du H, et al, 2011. Present status and risk for extinction of the Dabry's sturgeon (*Acipenser dabryanus*) in the Yangtze River watershed: a concern for intensified rehabilitation needs [J]. *Journal of Applied Ichthyology*, 27(2): 181 - 185.
- Zhuang P, Ke F, Wei Q, et al, 1997. Biology and life history of Dabry's sturgeon, *Acipenser dabryanus*, in the Yangtze river [J]. *Environ Biol Fish*, 48(1): 257 - 264.

(责任编辑 万月华)

Efficacy of Different Cryoprotectants on the Cryopreservation of Dabry's Sturgeon Fin Cells

LIU Juan-juan, LIU Xue-qing, HU Ya-cheng, WANG Bin-zhong, DU He-jun

(Hubei Key Laboratory of Three Gorges Project for Conservation of Fishes, Institute of Chinese Sturgeon Research, China Three Gorges Corporation, Yichang 443000, P.R.China)

Abstract: The cryopreservation of cells from endangered species plays an important role in the preservation and rescue of germplasm resources. In this study, the effect of freezing solution composition on the cryopreservation of Dabry's sturgeon fin-derived cells (DSFCs) was investigated. The objectives were to completely preserve the genetic information of Dabry's sturgeon at the cellular level and provide technical support for continued applications of somatic cell lines. Eighth passage DSFCs in the logarithmic phase were cryopreserved in liquid nitrogen (-196°C) with eight different formulations of the freezing solution. The freezing solution ingredients were culture media (MEM) with dimethyl sulfoxide (DMSO) at three concentrations and bovine serum (FBS) at five concentrations. The concentration ratios were prepared as follows: (1) 5%DMSO+45%MEM+50%FBS; (2) 10%DMSO+40%MEM+50% FBS; (3) 20%DMSO+30%MEM+50%FBS; (4) 10% DMSO+90% FBS+0% MEM; (5) 10% DMSO+70% FBS+20% MEM; (6) 10% DMSO+50% FBS+40% MEM; (7) 10% DMSO+30% FBS+60% MEM; (8) 10% DMSO+10% FBS+80% MEM. Apoptosis and cell cycle phase were detected using morphological observations, CCK-8 assays and flow cytometry. The DSFCs treated with 20% DMSO did not adhere well and the survival rate was low (38.3%), but the survival rates were significantly higher when the DMSO concentration was reduced to 10% DMSO (78.7%) or 5% DMSO (80.2%). At the different FBS concentrations, cell viability was significantly higher at FBS concentrations of 90% FBS, 30% FBS and 10% FBS than at 70% FBS and 50% FBS. Furthermore, the rates of cell apoptosis at 30% FBS (8.24%) and 10% FBS (15.35%) were significantly higher than that at 90% FBS (3.54%), and the differences were significant among all three groups ($P < 0.05$). The cell cycle phase results showed that the proportion of cells in the G_0/G_1 phase at 30% FBS and 10% FBS were significantly higher ($P < 0.05$) than at 90% FBS, while the proportion of cells in the S phase and G_2+M phase were significantly lower ($P < 0.05$). There was no significant difference in the cell cycle of DSFCs between the 30% FBS group and the 10% FBS group ($P > 0.05$). Our results show that a low concentration of DMSO (5%-10%) and high concentration of FBS should be used for the long-term cryopreservation of Dabry's sturgeon cells.

Key words: *Acipenser dabryanus*; Dabry's sturgeon fin-derived cells (DSFCs); cryopreservation; cell apoptosis; cell cycle phase