

虎皮蛙細胞培養及其特性之研究

Studies on the Characteristics of Cell Cultures Derived from Tissues of Tiger Frog, *Rana tigrina rugulosa*

舒佩雲* · 郭光雄* · 陳秀男*

Pai-Yuan Shu, Guang-Hsiung Kou and Shiu-Nan Chen

Abstract

This study attempts to establish and characterize cell cultures derived from various tissues including heart, tongue, lung, liver, kidney and spleen of tiger frog, *Rana tigrina rugulosa*.

The results showed that all the tissue cells of tiger frog could form a confluent cell sheet following 7 to 21 days incubation in Leibovitz's L-15 medium (L-15) plus 20% foetal calf serum (FCS). The heart and lung or tongue cells have been subcultured for 20 or 7-8 times within a period of 6 months, respectively. However, no subcultures were obtained for kidney, spleen and liver cells.

Optimal temperature for heart cells of tiger frog was 24-31°C. Osmotic pressure between 130 and 240 mosm/kg were demonstrated to be suitable for cultivation of heart cells *in vitro*. The growth rate for tiger frog tissue cells varied with different serum concentrations in medium. At low culture density, the plating efficiency was 13-16%.

All the primary cell cultures revealed epitheloid and fibroblastic morphology. After several passages in L-15+20% FCS, fibroblastic cells became predominant in tongue and lung cell cultures. In contrast, only epitheloid cells were observed in heart and lung cells at a passage level of 10.

緒 言

早自 1907 年 Ross Harrison 即以青蛙胚胎為實驗材料，開組織培養學之先河。他首次提供無菌培養的技術，並發現一些可供培養細胞利用的營養物質，自此以後，許多有關兩棲類動物組織培養的報告，相繼出現。但是當時的研究範圍，都只限於器官的培養。至 1961 年 Auclair 提出兩棲類動物單層細胞大量培養的技術後，才有許多人致力於細胞的初級培養及永久細胞株之建立。

有關兩棲類動物的組織培養，歷史雖早，但永久細胞株之建立，却較哺乳類、鳥類、魚類細胞為遲，至 1964 年 Wolf 和 Quimby 才首次發表，以牛蛙 (*Rana catesbeiana*) 舌部組織所建立的永久細胞株，定名為 FT 細胞株。此後 Rafferty (1969) 及 Freed 與 Mezger-Freed (1970) 等人也分別以兩棲類動物為材料，建立一系列之永久細胞株。

* 國立臺灣大學動物學系 (Department of Zoology, National Taiwan University, Taipei, Taiwan, Republic of China)

一般而言，以兩棲類動物細胞為實驗材料之優點為：細胞易培養，對溫度與培養液之滲透壓之適應範圍很廣，培養液不需時常更換，細胞較一般脊椎動物大，生長速率快，DNA 合成量多，適宜做遺傳學及細胞學 (Rafferty, 1976; Horner and MacGregor, 1983; Freed *et al.*, 1979; Kondo and Ito, 1983) 之研究。且兩棲類動物組織塊，在初級培養時，表皮樣細胞極易由組織塊游離出，形成單層細胞層，此種現象與大多數鳥類及哺乳類之組織培養均不相同，所以兩棲類動物之組織培養，通常在短期內即可培養出，並加以應用 (Rafferty, 1969; Duryee, 1965)。

本實驗所用之虎皮蛙 (*Rana tigerina rugulosa*) 繁殖力強且味美，是本省最普遍之食用蛙類，產於臺灣全省，由於取材容易，細胞易培養，具有一般兩棲類動物細胞之優點，可應用於遺傳及細胞學之研究。近年因河川嚴重污染，野生蛙類產量銳減，引起人們養殖興趣，但在養殖期間常發生不明原因之死亡，故虎皮蛙細胞之培養，當可助益於蛙類病毒之研究。

本研究室自 1983 年開始進行虎皮蛙心臟細胞之培養至今已培養至第 20 代，亦陸續建立腎臟、肺臟、脾臟、肝臟及舌細胞之初級培養系統，上述之組織細胞均能在短期內 (7~20 天) 形成密集之單層細胞層，其中舌及肺臟細胞在繼代培養至第 7~8 代時，細胞生長情況仍維持良好外，其餘各組織細胞，則在培養至第 3~4 代，即生長緩慢。本實驗並進行虎皮蛙心臟細胞之特性研究，包括不同溫度、滲透壓及血清濃度對細胞生長速率的影響，細胞直徑之大小，多核細胞所佔之比例，以及細胞形態之電子顯微鏡觀察。

材料與方法

實驗材料：

實驗虎皮蛙：

本實驗所採用的青蛙是臺灣所產赤蛙科中，體型最大的虎皮蛙 (*Rana tigerina rugulosa*)。亦俗稱「田雞」或「水雞」，是本省最名貴之食用蛙類。實驗用虎皮蛙乃由市場購得。

實驗用液體及培養基的製備：

本實驗用之溶液包括林格試液 (Ringer solution)，組織洗滌液，胰蛋白酶溶液及組織培養液。同時為測試組織細胞之適應性而配製不同滲透壓及不同牛犢血清之培養基，其製備方法及成分分別敘述如下：

1. 林格試液 (Ringer solution)：

本溶液用於配製組織洗滌液及胰蛋白酶溶液。其製備乃將 6.5 g 之 NaCl, 0.14 g 之 KCl, 0.12 g 之 CaCl₂, 0.2 g 之 NaHCO₃ 及 2.0 ml 之 0.5% 濃度之酚紅 (Phenol red) 溶於 998 ml 之二次蒸餾水中。

2. 組織洗滌液 (Washing solution)：

本溶液為抑制組織上殘餘之細菌及黴菌之用，本溶液含 0.25 g 之 Versene (EDTA) 1×10^5 I. U. 之 Penicillin, 1×10^6 μ g 之 Streptomycin, 1×10^5 μ g 之 Fungizone 及 1000 ml 之 Ringer solution。

製作方法乃將 Ringer solution/Versene 先以高壓高溫器 (Autoclave) 滅菌後，再加入其他物。

實驗用 Penicillin 係購自 German Remedies Taiwan Ltd. R. O. C.。Streptomycin 係購自 China Chemical and Pharmaceutical Co., Ltd. Fungizone 係購自 GIBCO Laboratories, Grand Island, N. Y., U. S. A.，此溶液在使用前才進行配製。

3. 胰蛋白酶溶液 (Trypsin solution)：

本溶液為細胞繼代培養時，游離細胞之用，其濃度為 0.125%。其成分含 0.25 g 之 Versene

(EDTA), 50 ml 之 2.5% Trypsin solution 及 950 ml 之 Ringer solution。將混合溶液以滅菌之 0.45 μm Millipore filter (Millipore Co., Bedford, Massachusetts, U. S. A.) 過濾，貯存在 4°C 下備用。Trypsin (1:250) 係購自 M. A. Bioproducts walkersville, Maryland。

4. 組織培養液 (Tissue culture medium) :

本實驗所採用之培養基為 Leibovitz's L-15 medium (L-15) 及 Minimum essential medium (MEM) 之混合液，此二者皆購自 Flow Laboratories, Mclean Virgin, 22102 U. S. A.。

培養液之配製方法如下述：

將上述 L-15 及 MEM 之粉狀培養基，分別溶解於 1 ℓ 之二次蒸餾水後，將 300 ml 之 L-15 medium, 300 ml 之 MEM 及 200 ml 之二次蒸餾水混合，以滅菌之 0.45 μm Millipore filter 過濾，再添加 200 ml 之犢牛血清 (Foetal Calf Serum, FCS, Flow Laboratories, North Ryde, N. S. W. Australia), 100 I. U./ml 之 Penicillin 及 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 之 Streptomycin。同時以滅菌之 1 N 的 HCl 溶液或 NaOH 溶液調整培養液之 pH 值至 7.0~7.5。此培養液之滲透壓為 $235 \pm 5 \text{ m Osm}/\text{kg}$ 。配製後將此溶液貯存於 4°C 下備用。繼代細胞培養用之培養液，其犢牛血清之添加量可減為 10%。

5. 不同滲透壓培養液之製備方法：

將等量不含血清之 L-15 及 MEM 培養液混合後連續加水稀釋，使成低張溶液，或混合後加入不同量之 NaCl 使成高張溶液，最後加入犢牛血清 10% 及抗生素，並以滲透壓器 (Vapor Pressure Osmometer, Wescor, Inc., Logan, Utah, U. S. A.) 測培養液之滲透壓值。配好之溶液以 0.45 μm 之 Millipore filter 過濾並儲存於 4°C 下備用。

6. 不同犢牛血清濃度培養液之製備方法：

將等量不含血清之 L-15 及 MEM 培養液混合後，加入二次蒸餾水稀釋至原來濃度之 75%，最後再加入 30%, 20%, 10%, 5%, 2% 之犢牛血清。這些溶液皆以 0.45 μm 之 Millipore filter 過濾並儲存於 4°C 下備用。

組織細胞之培養：

本實驗乃究明虎皮蛙細胞之初級培養，繼代培養，不同溫度、血清濃度之結果。與滲透壓對細胞生長速率之影響，細胞表面附著效應，細胞大小之測量及掃描式電子顯微鏡觀察等。茲將其方法分別簡述如下：

初級培養：

將重約 160 公克的健康蛙，以脊柱穿刺法或乙醚麻醉，使之昏迷後，先用 5% Clorex 清洗體表數分鐘，再以 70% 酒精仔細擦拭全身。在無菌操作臺上，以滅菌之解剖儀器，取出蛙體內各器官 (心臟、肺臟、舌頭、肝臟、脾臟、腎臟) 後，立刻浸於組織洗滌液中。並以組織洗滌液清洗三次，每次十分鐘，然後將各器官剪成 1 mm^3 之小塊，再用組織洗滌液清洗數次，加入培養液，等組織碎塊與培養液混合均勻後，將混合液倒入 5 ml/25 cm^2 的培養瓶，靜置於 28°C 或 31°C 之定溫培養箱中培養。48 小時後，以倒立顯微鏡 (Inverted microscope, IM, Olympus, Japan) 觀察細胞之生長情形。

繼代培養：

當初級培養細胞長成密集細胞層 (Confluent cell sheet) 後，倒掉培養液，以 0.125% 之胰蛋白酶溶液處理，使細胞由培養瓶壁脫離，加入新的培養液，等細胞混合均勻後，將其中一半的細胞懸浮液倒入一新的培養瓶中，於 31°C 下繼續培養。

溫度對心臟細胞生長速率之影響：

將蛙心臟細胞以 2.0×10^4 cells/cm² 的密度接種於 6 個具有 24 個凹槽的微量培養盤 (Microplate) 中，分別將培養盤置於 4°C, 18°C, 24°C, 28°C, 31°C, 37°C 的培養箱中培養，每隔一段時間，分別取培養盤中三個凹槽的細胞，用血球計數器，計算細胞數目，求其平均值。比較不同溫度對細胞生長速率的影響。

心臟細胞生長情形，較其他內臟細胞穩定，故除溫度外，下述不同滲透壓及血清濃度對細胞生長速率之影響，亦均採用繼代培養至第十代之心臟細胞為材料。

滲透壓對心臟細胞生長速率之影響：

將經胰蛋白酶溶液處理而脫離培養瓶壁之細胞，加入不同滲透壓之培養液中，做成細胞濃度均為 2.0×10^4 /cm² 之懸浮液。再分別接種於具有 24 個凹槽微量培養盤，置於 31°C 下培養，每隔一段時間，取培養盤內三個凹槽的細胞，以血球計數器計算細胞數目，求其平均值。比較不同滲透壓對細胞生長速率之影響。

積牛血清濃度對心臟細胞生長速率之影響：

如上述繼代培養之步驟，改以加入不同血清濃度之培養液培養細胞。比較不同血清濃度培養液，對細胞生長速率之影響。

心臟細胞之表面附着效應：

將細胞量稀釋至 $10^2 \sim 10^3$ cells/ml 後，接種於培養瓶 (5 ml/25 cm² flask) 內，置於 31°C 培養，一星期後更換新的培養液，再經一星期，倒掉培養液，以林格試液清洗細胞兩次後，用 70% 酒精固定 15 分鐘。倒掉固定液，以 Sørensen 緩衝液 (1/15 M KH₂PO₄ 加入 1/15 M Na₂HPO₄, pH=6.8) 洗兩次。然後以 10% Giemsa stain/Sørensen buffer 染色 12 小時以上，染完後倒掉染劑，以 Sørensen 緩衝溶液清洗，陰乾，計算細胞羣落 (Colony) 的數目。

本實驗細胞羣落的計算標準：①直徑 2 mm 以上的羣落。②染色後細胞生長緊密且具有深紫色中心者。

細胞大小的測量：

以胰蛋白酶溶液將細胞自培養瓶壁上游離後，於倒立顯微鏡下以 Micrometer 測量細胞的直徑，至少觀察並記錄 100 個以上之細胞。再求其平均值。

掃描式電子顯微鏡之觀察：

將細胞接種於 Leighton tube 內之蓋玻片上培養，至形成 80% 之密集細胞層後，移出玻片至小試管中，以林格試液清洗兩次，再以 2.5% Glutaldehyde/Phosphate 緩衝溶液於 4°C 下固定 30 分鐘後，倒掉固定液，用 0.1 M Phosphate buffer 內含 5% Sucrose 之溶液清洗兩次，每次各 15 分鐘，再以 1% OsO₄/0.1 M Phosphate buffer 固定 15 分鐘。(上述清洗及固定過程，均於 4°C 下進行。) 等固定完畢，倒掉固定液，以 0.1 M Phosphate buffer 內含 5% Sucrose 之溶液於室溫下清洗兩次，每次各 15 分鐘。而後，以酒精及丙酮進行連續脫水步驟。先以 50% → 70% → 80% → 90% → 95% 之酒精脫水，每一步驟各作用 10 分鐘。再以 100% 酒精 → 100% 酒精 → 100% 丙酮進行完全脫水，每一步驟各作用 15 分鐘。脫水之標本再用臨界點乾燥機 (HCP-2, HITACHI, Japan) 乾燥後，用雙面膠帶黏在標本盤 (Stub) 上，再以金屬蓋鍍器 (Ion coater, IB-2, Eiko Engineering, Japan) 鍍金，而後，在掃描電子顯微鏡 (SEM, S-520, HITA-CH1, Japan) 下觀察並照像。

結 果

心臟細胞之初級培養及繼代培養：

心臟組織移植塊，在 31°C 及 28°C 下培養 2~3 天後，即有細胞自組織塊游離，並附着於培養瓶壁上。在 24°C 下培養，亦可見有細胞自組織塊游離出，但速度不及在 31°C 時為快。在 37°C 及 18°C 下培養一星期，則仍無細胞附着現象發生。

心臟初級培養細胞之形狀有表皮樣細胞 (Epithelioid cells) 及纖維樣細胞 (Fibroblast-like cells)，兩者同時存在。具大型細胞核者中，有半數以上細胞核之核仁數為 2 (Figs. 1a, b)。具 3 核或 3 核以上之細胞約佔細胞總數之 6%，雙核細胞則佔 7% (Fig. 1c)。細胞在 31°C 下培養約 12 天後，可形成密集細胞層 (Confluent cell sheet)。

繼代培養之細胞，其形狀為表皮樣細胞 (Fig. 2a)。初級培養時之纖維樣細胞，在培養至第 3 代已漸漸退化。以掃描電子顯微鏡觀察其形態，可知細胞表面平滑，所含微絨毛 (Microvilli) 數目很少，在行有絲分裂時，細胞表面有大量的泡狀突起 (Blebs) 出現。(Figs. 2b, c)

繼代培養時之接種密度與形成密集細胞層所需的時間有很大的關係，接種密度愈高，則每一代所間隔的時間愈短。虎皮蛙心臟細胞在 31°C 下接種密度為 2×10^4 cells/cm² 時，在 25 cm²/5 ml 的培養瓶中，約經 7 天培養，可形成密集細胞層。目前至多培養至第 20 代，細胞有漸呈退化之趨勢。

腎臟細胞之初級培養及繼代培養：

腎臟組織移植塊，在 31°C 下，培養 2~3 天後，有細胞自組織塊游離，且附着於培養瓶壁上。細胞的游離速度很快，在培養約 7 天後，即可形成密集之細胞層。初級培養細胞以形狀均一，且互相緊密連接之多角形表皮樣細胞為主，另有少數較小之紡錘形細胞在其間 (Figs. 3a, b)。其多核細胞之比例，具 3 核或 3 核以上之細胞約佔細胞總數 1%，雙核細胞則約佔 8%。

初級培養細胞的壽命很長，在 31°C 下培養一個月，而不更換培養液的情況下，細胞仍能維持其原有形態，無退化現象。

腎臟細胞在繼代培養時，由於細胞不易由培養瓶壁上脫離，故需延長胰蛋白酶溶液處理時間，且細胞脫離時，多是整片剝落，而非單獨細胞脫離，脫落之細胞，再次附着之能力很差。少數附着之細胞，形狀變大、扁平，且出現空泡 (Fig. 4a)。

以掃描式電子顯微鏡觀察，其細胞形態與心臟細胞類似，為表皮樣細胞，微絨毛之數目極少 (Fig. 4b, c)。

舌細胞之初級培養及繼代培養：

舌組織移植塊，培養於 31°C，兩天後，即可見有細胞自組織塊游離，且附着於培養瓶壁上。初級培養之細胞，以多角形表皮樣細胞為主 (Fig. 5a, b)。其中部份細胞並富含分泌顆粒 (Fig. 5c)。檢查多核細胞數目，發現 3 核及 3 核以上細胞約佔 22%，雙核細胞約佔 12%。

初級細胞培養約 7 天後，即可形成密集細胞層。繼代培養以 1:2 方式進行，繼代培養之細胞形狀呈紡錘形 (Figs. 6a-c)。其細胞分裂速度甚快，培養至第 6 代時，生長情況仍佳。

肺臟細胞之初級培養及繼代培養：

肺臟組織移植塊，在 31°C 下培養 3~4 天，即有細胞自組織塊游離出，且附着於培養瓶壁上。初級培養之細胞，其形狀有多種，以多角形之表皮樣細胞 (Fig. 7a) 及紡錘形細胞 (Figs. 7b, c) 為主，且以後者佔多數。其中 3 核及 3 核以上細胞約佔總數之 6%，雙核細胞則約佔 4%。

初級細胞培養約 10 天後，可形成密集細胞層。繼代培養以 1:2 的方式進行，繼代培養之細胞，其形狀呈紡錘形 (Figs. 8a, b)。培養時間若過久，則會產生細胞聚集現象 (Fig. 8c)。

脾臟細胞之初級培養及繼代培養：

脾臟組織移植塊，在 31°C 下培養 3~4 天後，有細胞自組織塊游離出，並附着於培養瓶壁上。培養約 7 天，可見到呈卵圓形表皮樣細胞，大量出現 (Figs. 9a, b)。同時亦有細胞邊緣不規則之較大型細胞存在 (Fig. 9c)，但數量不多。

在培養約兩星期後，卵圓形表皮樣細胞漸退化，脫離瓶壁，而前述較大型不規則形狀之細胞則生長良好。培養約 3~4 星期後，整個培養瓶壁漸為此大型細胞所佔滿，形成密集細胞層，此時檢查其多核細胞所佔比例，可發現 3 核及 3 核以上細胞約佔 12%，雙核細胞約佔 10%。

細胞長成密集細胞層後，繼代培養之細胞生長情形不佳，細胞附着能力低，再次附着之細胞，大部分為大型、扁平且生長緩慢之多核細胞 (Fig. 10a)。

以掃描式電子顯微鏡觀察，可發現細胞表面微絨毛甚少，有少許泡狀突起存在 (Figs. 10b, c)。

肝臟細胞之初級培養及繼代培養：

肝臟組織移植塊，在 31°C 下培養 2~3 天後，可見有細胞自組織塊游離出，並附着於培養瓶壁上。其初級培養之細胞 (Figs. 11a, b)，為大型、扁平且形狀極不規則之表皮樣細胞。其中 3 核及 3 核以上細胞約佔細胞總數之 11%，雙核細胞則約佔 8% (Fig. 11c)。

培養約 20 天後，可形成密集細胞層。繼代培養之細胞，亦為形狀不規則之表皮樣細胞，但於培養期間，細胞質內易出現空泡 (Figs. 12a, b) 顯示其生長情形不甚良好，此可能由於培養液不適合所致。

溫度對心臟細胞生長速率之影響：

心臟細胞於 31°C 下培養時，生長速率最快，細胞數之倍增時間約為 3~4 天 (Fig. 13)。在 28°C 及 21°C 下，細胞數倍增之時間則較長。於 18°C 培養時，細胞外形變大且扁平，分裂速度極慢，在 37°C 培養時，細胞初時分裂速度與在 24°C 培養時相似，但約經 3 天後，細胞變大且扁平，有空泡出現，繼之退化死亡。在 4°C 下培養，細胞之附着能力差，形狀仍維持圓形，且不分裂。

滲透壓對心臟細胞生長速率之影響：

細胞在滲透壓為 240 mOsm/kg 之培養液中，生長情形最佳 (Fig. 14)。200 mOsm/kg 時次之。在 130 mOsm/kg 時生長速率變慢。滲透壓低至 80 mOsm/kg 時，細胞脹大脫落。滲透壓為 290 mOsm/kg 時，細胞生長速率亦變慢，當滲透壓高至 350 mOsm/kg 以上，細胞生長則停滯。培養液之滲透壓愈高，細胞之空泡產生也愈快，其形狀亦易變大變薄 (Fig. 15)。

血清濃度對心臟細胞生長速率之影響：

如 Fig. 16 所示，細胞在含 30%，20%，10% 犢牛血清濃度之培養液內，生長狀況均良好，在 5% 及 2% 犢牛血清濃度之培養液中，細胞生長速率遲緩。

心臟細胞之表面附着效應：

如 Table 1 所示，細胞在培養至第 10 代時，其附着效應約為 14.5% (12.9~15.9%)。

細胞大小之測量：

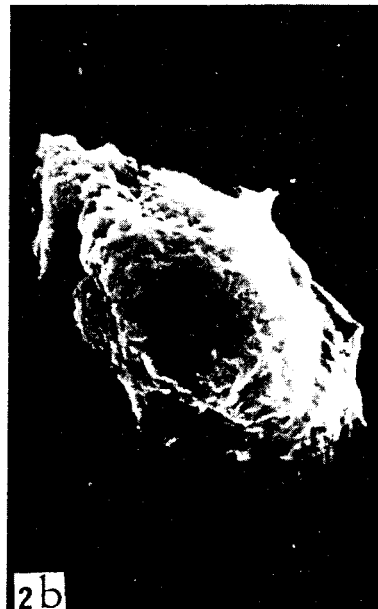
如 Table 3 所示，各細胞之直徑大小在 20~30 μm 之間，以脾臟細胞最大 (30.2 μm) 舌細胞最小 (21.5 μm)。

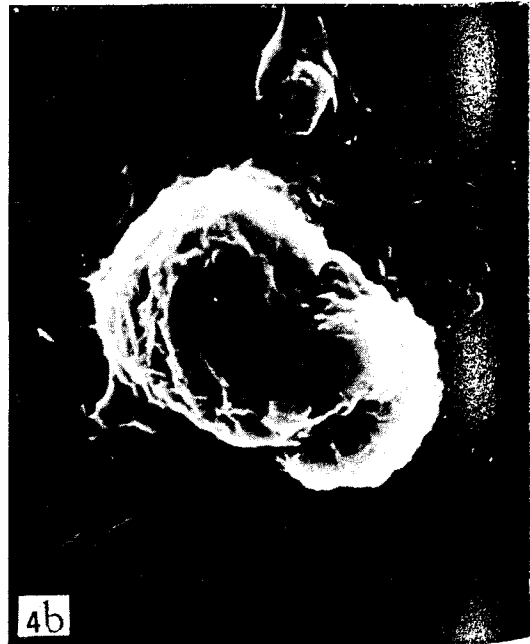
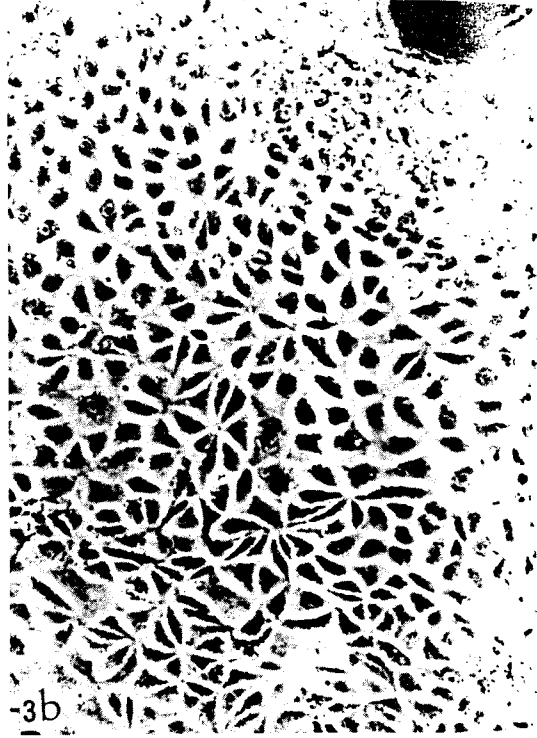
討 論

現存之兩棲類動物，可分為三大類：無足類 (Apoda)、無尾類 (Anura) 及有尾類 (Caudata)。

Explanation for Figures

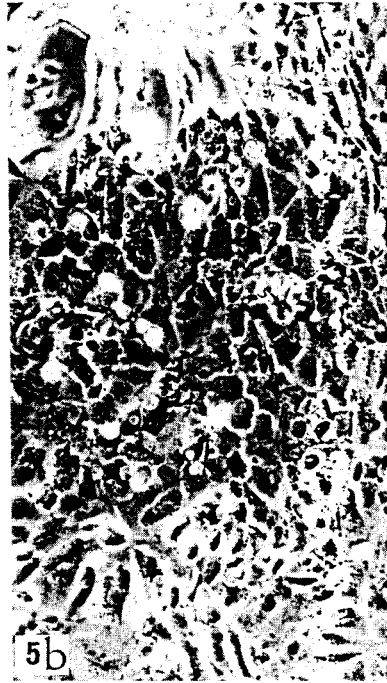
- Figs. 1a-c. Primary cell cultures of tiger frog heart.
a. 5 days in culture. Note the fibroblastic (black arrow) and epithelioid (white arrow) cell growing out of the explant was observed. Phase contrast. $\times 133$.
b. 10 days in culture. Note the formation of confluent cell sheet. Phase contrast. $\times 133$.
c. Polynucleated cells. Giemsa staining. 267.
- Figs. 2a-c. Tiger frog heart cells at the 10th passage level.
a. Cells showing the epithelioid morphology. Giemsa staining. $\times 133$.
b. Scanning electron micrograph. $\times 5000$.
c. Cells in the late stage of mitosis. Scanning electron micrograph. $\times 5000$.
- Figs. 3a, b. Primary cell cultures of tiger frog kidney.
a. Cells showing mixed morphology. Phase contrast. $\times 133$.
b. Cells showing characteristic epithelioid morphology. Phase contrast. $\times 133$.
- Figs. 4a, b. Tiger frog kidney cells at the 3rd passage level.
a. Subcultured cells become flat and vacuous. Giemsa staining. $\times 267$.
b. Scanning electron micrograph. $\times 5000$.
- Figs. 5a-c. Primary cell cultures of tiger frog tongue.
a and b. Cells showing the epithelioid morphology. Phase contrast. $\times 133$.
c. Polynucleated cells (arrows). Note the cells with numerous granules. Phase contrast. $\times 267$.
- Figs. 6a-c. Tiger frog tongue cells at the 3rd passage level.
a. 2 days after incubation. Giemsa staining. $\times 133$.
b. 5 days after incubation. The cell shows the fibroblastic morphology. Phase contrast. $\times 133$.
c. Polynucleated cell (arrow). Giemsa staining. $\times 533$.
- Figs. 7a-c. Primary cell cultures of tiger frog lung.
a. Cells of epithelioid morphology. Phase contrast. $\times 133$.
b. Fibroblastic cells were seen in the culture. Phase contrast. $\times 133$.
c. Polynucleated cells (arrows). Phase contrast. $\times 267$.
- Figs. 8a-c. Tiger frog lung cells at the 3rd passage level.
a. Confluent monolayer culture of frog lung cells showing characteristic fibroblastic morphology. Giemsa staining. $\times 133$.
b. Note the cell in the mitotic stage (arrow). Giemsa staining. $\times 533$.
c. 14 days after incubation. Giemsa staining. $\times 133$.
- Figs. 9a-c. Primary cells of tiger frog spleen.
a. 7 days post-incubation, only the ovoid-shaped cells were observed in culture. Phase contrast. $\times 133$.
b. Phase contrast. $\times 267$.
c. 10 days post-incubation. The irregularly epithelioid cells were observed in the culture. Phase contrast. $\times 267$.
- Figs. 10a-c. Tiger frog spleen cells at the 3rd passage level.
a. Cells showing epithelioid morphology. Giemsa staining. $\times 133$.
b. Scanning electron micrograph. $\times 4000$.
c. Cells in the late stage of mitosis. Scanning electron micrograph. $\times 5000$.
- Figs. 11a-c. Primary cells of tiger frog liver. 15 days post-incubation.
a. Giemsa staining. $\times 133$.
b. Phase contrast. $\times 133$.
c. Polynucleated cells. Giemsa staining. $\times 267$.
- Figs. 12a, b. Tiger frog liver cells at the 3rd passage level following 10 days post-incubation.
a. Vacuolization of frog liver cells. Giemsa staining. $\times 133$.
b. Giemsa staining. $\times 533$.



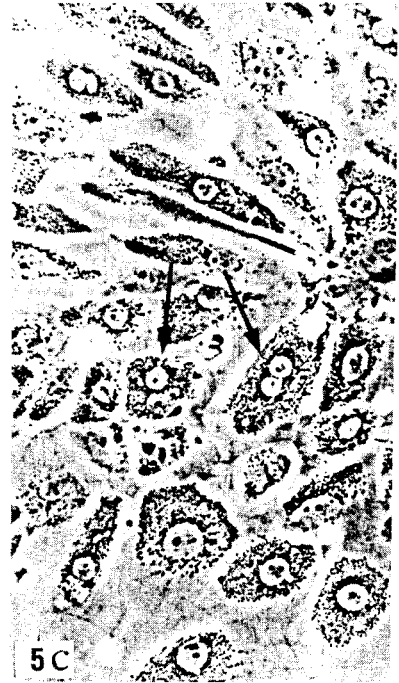




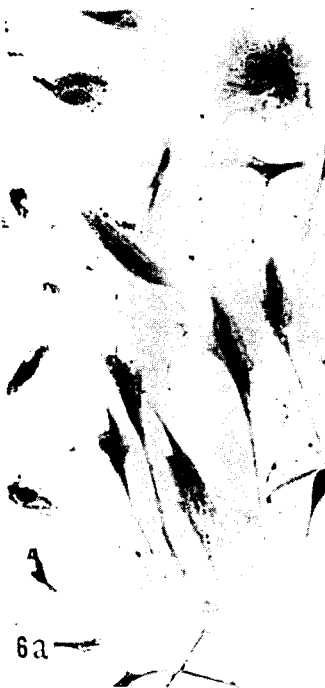
5a



5b



5c



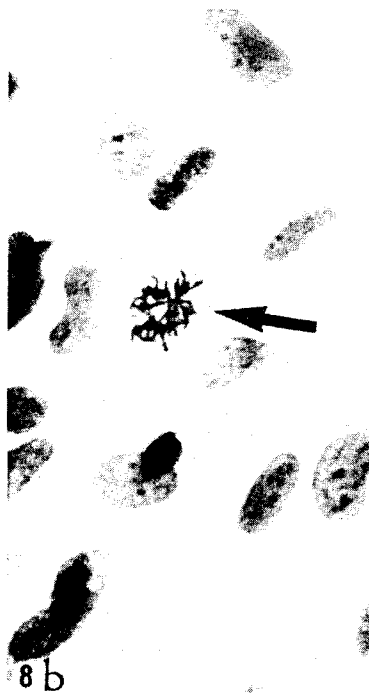
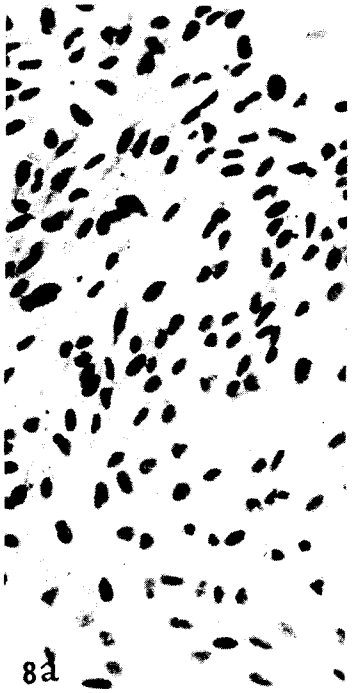
6a

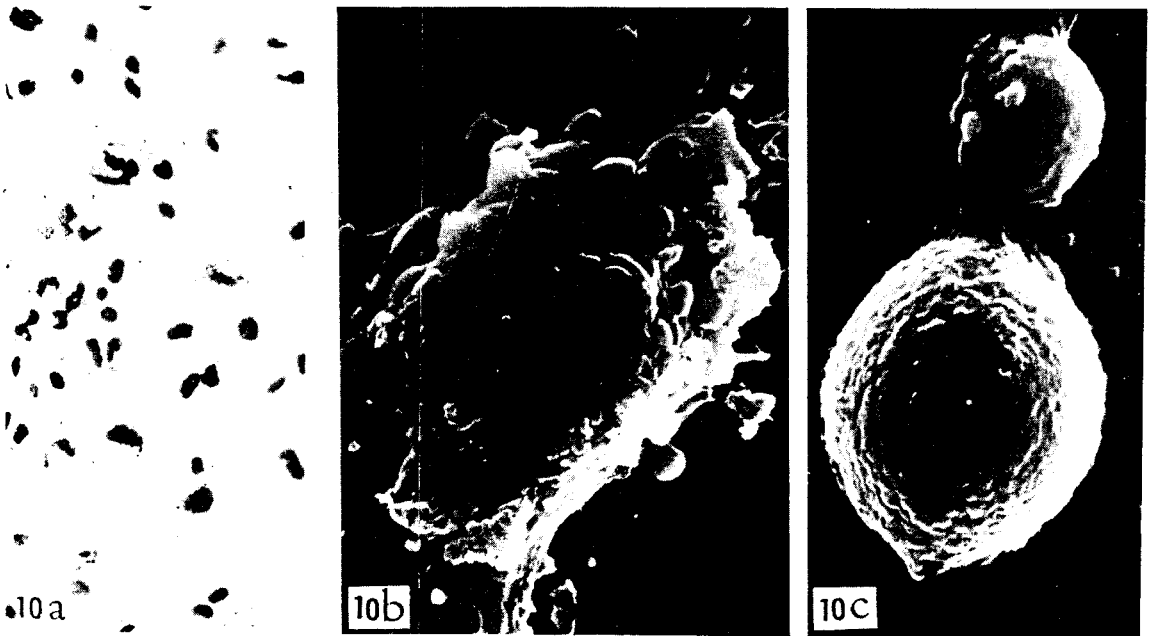
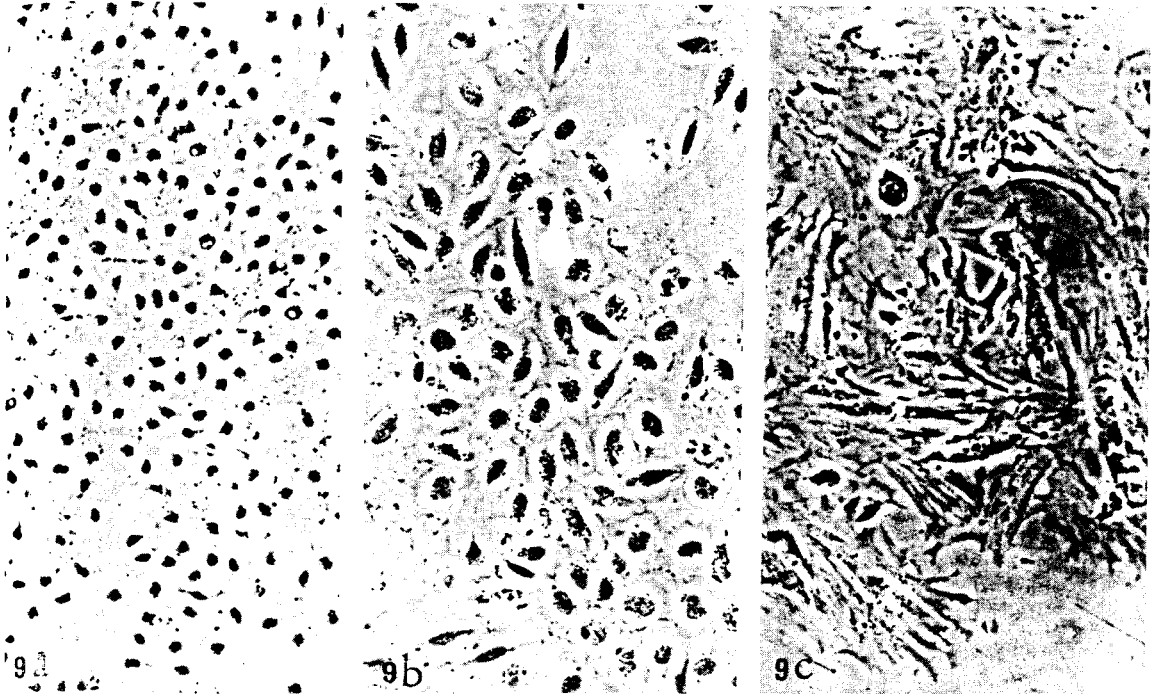


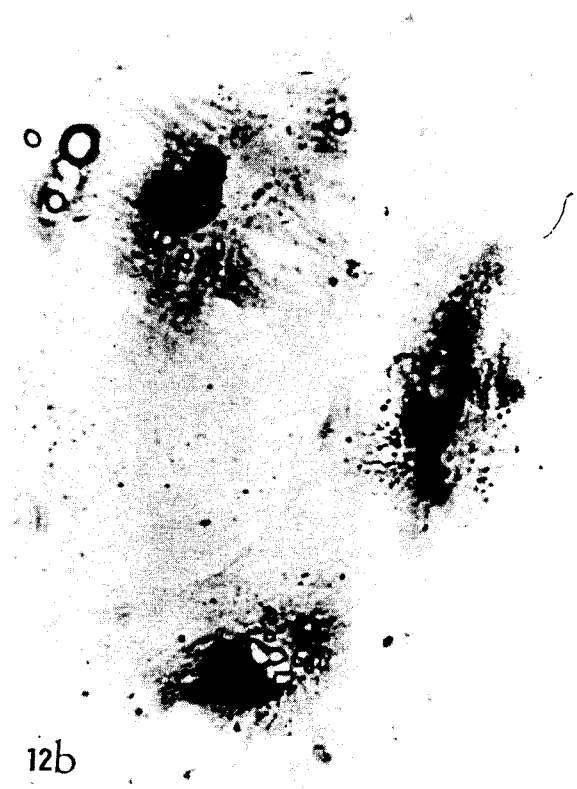
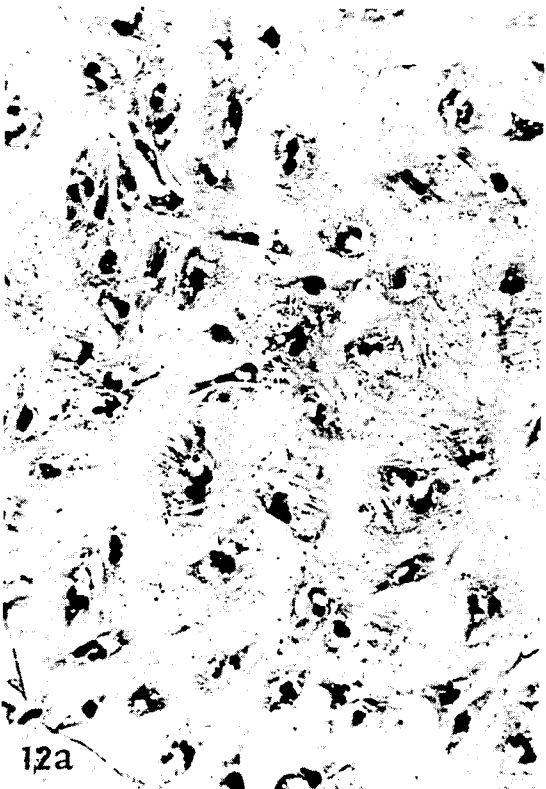
6b



6c







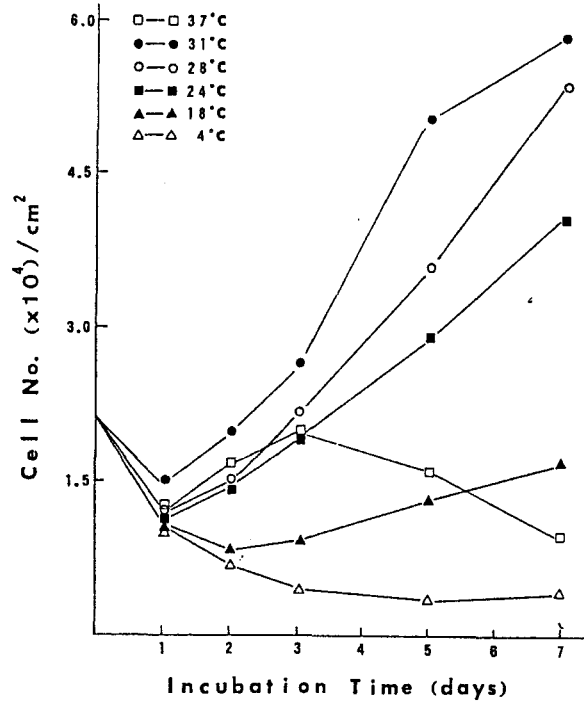


Fig. 13. Growth curves of tiger frog (*Rana tigerina rugulosa*) heart cells at different temperatures. The cells were inoculated in 24 well-microplates. Cell counts were determined with a haemocytometer. Each point was obtained from 3 wells.

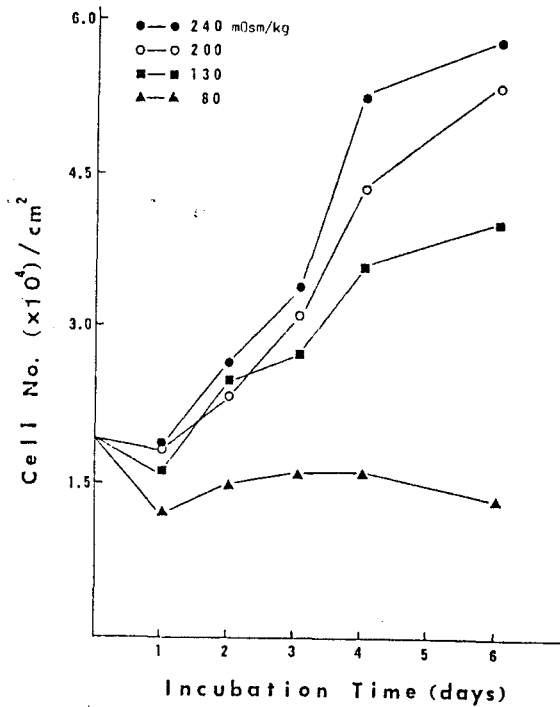


Fig. 14. Growth curves of tiger frog (*Rana tigerina rugulosa*) heart cells at different osmolarities. The cells were inoculated in 24-well microplates at 31°C. Cell counts were determined with a haemocytometer. Each point was obtained from 3 wells.

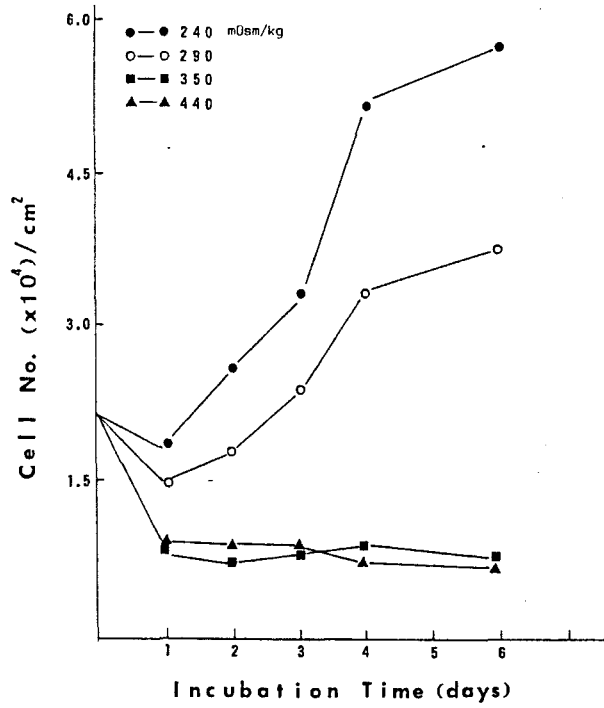


Fig. 15. Growth curves of tiger frog (*Rana tigerina rugulosa*) heart cells at different osmolarities. The cells were inoculated in 24-well microplates at 31°C. Cell counts were determined with a haemocytometer. Each point was obtained from 3 wells.

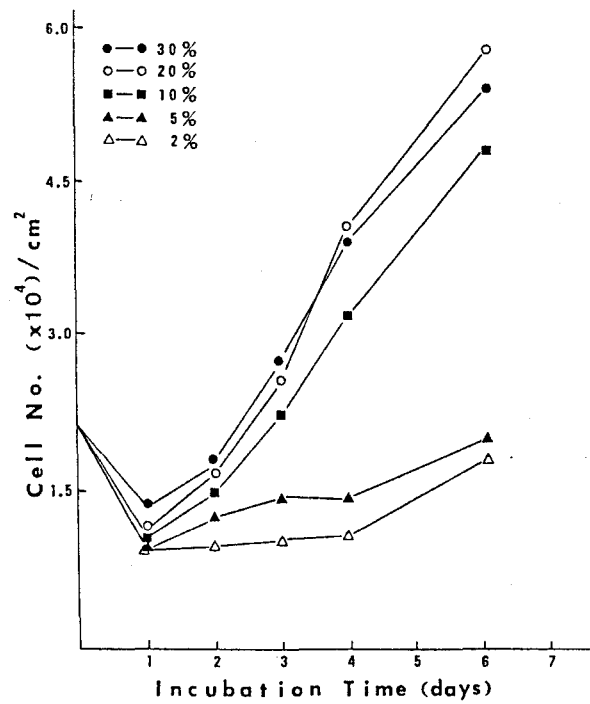


Fig. 16. Growth curves of tiger frog (*Rana tigerina rugulosa*) heart cells at different concentrations of fetal calf serum. The cells were inoculated in 24-well microplates at 31°C. Cell counts were determined with a haemocytometer. Each point was obtained from 3 wells.

Table 1. Plating efficiency obtained from tiger frog (*Rana tigerina rugulosa*) heart cells of passage 10

Cell seed/25 cm ² flask	No. of colonies	Efficiency of plating percent
213	31	14.6
132	17	12.9
126	20	15.9

Cells were cultivated in 25 cm² flask at 31°C. Cell counts were determined with a haemocytometer. Efficiency of plating is (colonies/cell seeded) × 100.

Table 2. Characteristics of tiger frog (*Rana tigerina rugulosa*) cells in successive primary cultures

Cell derivation	Morphology	Polynucleated cell (%) 2-nu.	poly-nu.	Cultivation time ³ (days)
Heart	Epi. ¹ +Fib. ²	6	7	12
Kidney	Epi.	1	8	7
Tongue	Epi.	22	12	7
Lung	Epi.	6	4	10
Spleen	Epi.	12	10	20
Liver	Epi.	11	8	21

1. Abbreviation of epithelium-like cells.

2. Abbreviation of fibroblast-like cells.

2-nu.: The percentages of cells with double nuclei in culture.

poly-nu.: The percentages of cells with 3 or more nuclei in culture.

3. Days for the formation of confluent monolayers in primary cultures.

Table 3. Morphological characteristics of tiger frog (*Rana tigerina rugulosa*) cells of passage 3

Cell derivation	Morphology	Mean cell diameter (μm)
Heart	Epi.	27.0
Kidney	Epi.	26.4
Tongue	Fib.	21.5
Lung	Fib.	29.4
Spleen	Epi.	30.2
Liver	Epi.	27.7

Cells were trypsinized from confluent monolayer and their diameter values were calculated from direct measurements of 100 cells on phase contrast microscope with a micrometer.

其中無尾類所佔之種類及數量最多。目前約已培養出 10 種兩棲類動物之 30 個細胞株 (Rafferty, 1976; Ide, 1978; Prezbelski and Tweedell, 1978; Rosenstein and Ohlsson-Wilhelm, 1979) 都應用於遺傳及病毒之研究，而以無尾類細胞為主。其中許多細胞株來自於同種蛙，如豹皮蛙 (*Rana pipiens*) (Freed and Mazger-Freed, 1979; Przybelski and Tweedell, 1978; Rosenstein and Ohlsson-Wilhelm, 1978; Freed *et al.*, 1969; Wong and Tweedell, 1974) 及非洲爪蟾 (*Xenopus laevis*) (Jafferty, 1969; Arthus and Balls, 1977)，均發展出一系列之細胞株。目前有關於虎皮蛙之細胞培養，則尚未有報告發表。

兩棲類動物細胞培養時，因血液張力 (Tonicity) 較哺乳類動物為低。故許多研究者將哺乳類動物細胞所用之培養液，加以稀釋後，用以培養兩棲類之細胞，而得良好效果。如 Balls 及 Worley (1973)，將 L-15 培養液以蒸餾水稀釋成 70% 濃度，供非洲爪蟾 (*Xenopus laevis*) 細胞使用。虎皮蛙細胞，以 L-15 medium 及 MEM 的混合液稀釋後，再加入血清，比單獨使用稀釋之 L-15 medium 或 MEM 培養液培養，細胞生長效果較佳。通常兩棲類動物細胞對滲透壓之適應範圍很廣，本實驗之虎皮蛙，其體液滲透壓值為 240 mOsm/kg，而細胞在滲透壓值為 120~280 mOsm/kg 時，生長狀況均極良好。故可藉之以研究細胞內外電解質與非電解質之濃度關係，及細胞膜主動運輸之機制。

虎皮蛙最適宜生長之溫度在 25°~28°C 左右 (丁及朱，1979) 與細胞培養時最適宜之生長溫度 28°~31°C 類似。兩棲類細胞之培養溫度常比哺乳類細胞低 (Wolf and Quimby, 1964)，虎皮蛙細胞在 37°C 時，72 小時內雖可維持正常的生長速率，但若於此時將之移至 31°C 或室溫下培養，則細胞生長速率仍無法恢復，在 37°C 培養 72 小時後，細胞生長速率迅速下降，且退化死亡。

虎皮蛙心臟細胞之表面附着效應約為 15%，在低血清濃度 (2%, 5%) 培養液中，細胞生長速率雖緩慢，但培養至第 20 代時，細胞乃無堆積現象，顯示細胞並未變性，此與過去研究結果一致 (Paul, 1975; Sack and Obie, 1981)。

接種密度與形成密集層的時間有關。以虎皮蛙心臟細胞而言，細胞直徑之平均大小為 27.0 μm ，當接種密度為 2×10^4 cells/cm² 時，7~10 天可形成密集細胞層，而接種密度低於 1.5×10^4 /cm² 時，則不易形成密集細胞層。一般而言，細胞之大小與 DNA 的含量有關，較大的細胞所含 DNA 量較多，虎皮蛙的六種不同器官所培養之細胞，其直徑在 20~30 μm 之間，較一般哺乳類動物細胞為大。其中舌細胞所含之多核細胞比例甚高，可做為研究遺傳學之良好材料 (Goin *et al.*, 1968; Burns, 1977)。

比較培養細胞與生物體內細胞之形狀可知，兩者間有很大的差異存在，造成此種差異，主要的原因之一，是生物體內細胞形狀受細胞間的立體結構之影響很大。而體外培養細胞之形狀，却受其所依附生長之介質種類及成分的影響很大 (Folkman and Moscona, 1978; O'Neill *et al.*, 1979)。此外，溫度、酸鹼度、滲透壓、激素 (Hormone) 及細胞代謝活動等，亦可影響細胞的形狀。但初級培養時，剛由組織游離出之細胞，則仍保留一部份原有細胞之形狀及功能，如本實驗中虎皮蛙腎臟、肺臟及舌細胞之初級培養，均以表皮樣細胞佔多數，而構成這類器官的細胞亦以表皮樣細胞為主。且其中肺臟及舌細胞之初級培養，仍可見有纖毛細胞及富含顆粒之細胞，其形狀與在體內時相似。細胞在繼代培養後，除脾臟、腎臟及肝臟細胞仍維持原來之表皮樣細胞外形外，心臟細胞經 5~6 代之繼代培養後，却成為典型的表皮樣細胞，舌及肺臟細胞則由原來的表皮樣外形，漸變為紡錘形。而腎臟及肝臟細胞變大、扁平，且有空泡出現，此可能是培養液不適合所致。

據 Porter 等人報告 (Porter *et al.*, 1973)，CHO 細胞在 G1 期時細胞分裂剛完成，細胞正開始附着及展開，微絨毛及泡狀突起亦隨細胞膜之伸展而漸消失。在 S 期時細胞膜會充分展開，形狀變薄，細胞表面平滑或有微絨毛存在。而在 G2 期及有絲分裂期間，細胞變成球形，且表面完全被微絨毛或泡狀突起所覆蓋。此現象亦可在本實驗中對虎皮蛙細胞之觀察得到證實。以掃描式電子顯微鏡觀察心臟、腎臟及脾臟等繼代培養細胞之形狀，顯示此三種細胞形狀很相似，其共同特徵是：展開的細胞 (Spreading cell) 表面所含微絨毛數目極少，有少數泡狀突起存在，細胞的形狀與 BHK21 及 CHO 細胞 (Erickson and Trinkaus, 1976; Gershman and Rosen, 1978) 類似。

在蛙類病毒中，除 Fv-4 (Rafferty, 1969) 僅在蛙類細胞中才能繁殖外，其餘 Fv-3 與 Papova-like virus 等雖可在哺乳類 (BHK or CHO cells) Elliott and Kelley, 1980; Elliott *et al.*, 1980; Drillien *et al.*, 1977) 或魚類細胞 (FHM) (Willis *et al.*, 1979) 內生長，但仍需在蛙細胞內才能大量增殖 (Elliott *et al.*, 1979)。虎皮蛙細胞之培養，對未來蛙類病毒之研究應有所助益。

摘 要

本實驗之目的，乃在探討適合虎皮蛙細胞生長之環境因子，諸如溫度、滲透壓及犢牛血清濃度等，以期建立虎皮蛙之永久細胞株。

實驗結果顯示虎皮蛙之心臟、腎臟、舌、肺臟、脾臟及肝臟細胞，均可在短期（7~21 天）內於 Leibovitz's L-15 medium (L-15)+minimal essential medium+20%牛犢血清之培養基中形成密集細胞層。而繼代培養之細胞以心臟，舌及肺臟細胞之生長情形最佳，其他腎、脾及肝臟細胞之生長情形却不佳。初級培養細胞多為上皮樣細胞，而繼代培養細胞之形狀則略有變化，其中舌及肺臟細胞以紡錘形細胞佔優勢。

心臟細胞最適宜生長之溫度為 24°~31°C，滲透壓值為 150~250 mOsm/kg。細胞之生長速率隨培養液之血清濃度增高而變快。在 2%及 5%犢牛血清之培養液內，其生長極為緩慢。細胞表面附著效應約為 13~16%。

參 考 文 獻

- Arhuter, E. and M. Balls (1971). Amphibian cells *in vitro*. I. Growth of *Xenopus* cells in a soft agar medium and in an agar surface. *Exp. Cell Res.* **64**: 113-118.
- Auclair, W. (1961). Cultivation of monolayer cultures of frog renal cells. *Nature* (London) **192**: 467-468.
- Balls, M. and R. S. Worley (1973). Amphibian cells *in vitro*. II. Effects of variations in medium osmolarity on a permanent cell line isolated from *Xenopus*. *Exp. Cell Res.* **76**: 333-336.
- Burns, E. R. (1971). Synchronous and asynchronous DNA synthesis in multinucleated ehrlich ascites tumor cells compared with multinucleated cells cultured from frog lung. *Exp. Cell Res.* **66**: 152-156.
- Drillien, R., D. Spehner and A. Kirn (1977). Cell killing by FV-3 evidence for cell killing by single viral particles or single viral subunits. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **79**: 105-111.
- Duryee, W. R. (1965). Factors influencing development of tumors in frogs. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **126**: 58-85.
- Elliott, R. M., M. K. Arnold and D. C. Kelly. (1979). The replication of FV-3 in an amphibian cell line XTC-2 derived from *Xenopus laevis*. *J. Gen. Virol.* **44**: 89-98.
- Elliott, R. M., R. Bravo and D. C. Kelly (1980 a). Frog virus 3 replication analysis of structural and nonstructural polypeptides in infected BHK cells by acidic and basic 2 dimensional gel electrophoresis. *J. Virol.* **33**: 18-27.
- Elliott, R. M. and D. C. Kelly (1980). Frog virus 3 replication induction and intra cellular distribution of polypeptides in infected cells. *J. Virol.* **33**: 28-51.
- Erickson, C. A. and J. P. Trinkaus (1976). Microvilli and blebs as sources of reserve surface membrane during cell spreading. *Exp. Cell Res.* **99**: 375-384.
- Freed, J. J., R. H. Hoess, F. A. Angelosanto and H. C. Massey Jr. (1979). Survival and DNA repair in UV irradiated haploid and diploid cultured frog *Rana pipiens* cells. *Mutat. Res.* **62**: 325-240.
- Freed, J. J. and Mezger-Freed, L. (1970). Stable haploid cultured cell lines from frog embryos.

- Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **65**: 337-344.
- Folkman, J. and A. Hoscona (1978). Role of vell shape in growth control. *Nature* **273**: 345-349.
- Freed, J. J., L. Mezger-Freed and S. A. Schatz (1969). Characteristics of cell lines from haploid and diploid anuran embryos. In: "*Biology of amphibian tumors*" (M. Mizell, ed.) pp. 101-111. Springer-Verlag, New York.
- Gershman, H. and J. J. Rosen (1978). Cell adhesion and cell surface topography in aggregates of 3T3 and SV40-virus-transformed 3T3 cells. *J. Cell Biol.* **76**: 639-651.
- Goin, O. B., C. J. Goin and K. Bachmann (1968). DNA and amphibian life history. *Copeia* **3**: 532-540.
- Harrison, R. G. (1907). Observations of the living developing nerve fiber. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **4**: 140-143.
- Horner, H. A. and H. C. MacGregor (1983). C value and cell volume: their significance in the evolution and development in amphibians. *J. Cell Sci.* **63**: 135-146.
- Ide, H. (1978). Transformation of amphibian xanthophores into melanophores in clonal culture. *J. Exp. Zool.* **203**: 287-294.
- Kondo, H. and H. Ide (1983). Long-term cultivation of amphibian melanophores. *Exp. Cell Res.* **149**: 247-256.
- O'Neill, C. H., P. N. Riddle and P. W. Jordan (1975). The relation between surface area and anchorage dependence of growth in hamster and mouse fibroblasts. *Cell* **16**: 909-918.
- Paul, J. (1975). *Cell and Tissue Culture* (5th ed.) Churchill Livingstone Edinburgh London.
- Porter, K. R., D. M. Prescott and J. J. Frye (1973). *J. Cell Biol.* **57**: 815.
- Przybelski, R. J. and K. S. Tweedell (1978). Karyotype analysis of a frog pronephric tumor cell line. *Exp. Cell Biol.* **46**: 287-297.
- Rafferty, K. A., Jr. (1976). The physiology of amphibian cells in culture. In "Physiology of the amphibian" (B. Lofts, ed.), pp. 101-162. Academic Press, New York.
- Rafferty, K. A., Jr. (1969). Mass culture of amphibian cells: Methods and observations concerning stability of cell type. In "*Biology of Amphibian Tumors*" (M. Mizell, ed.), pp. 52-81. Springer-Verlag, New York.
- Rosenstein, B. and B. M. Ohlsson-Wilhelm (1979). Isolation of UV sensitive clones from a haploid frog cell line. *Somatic Cell Genet.* **5**: 117-128.
- 丁雲源、朱耀明 (1979)。青蛙養殖，中國水產第 339 期，pp. 6-10。
- Sack, G. H., Jr. and C. Obie (1981). Human cell transformation by simian virus 40. *Exp. Cell Res.* **134**: 425-432.
- Willis, D. B., R. Goorha and A. Granoff (1979). Macromolecular synthesis in cells infected by frog virus 3. *Virology* **98**: 328-335.
- Wolf, K. and Quimby, M. C. (1964). Amphibian cell culture: Permanent cell line from bullfrog (*Rana catesbeiana*). *Science* **144**: 1578-1580.
- Wong, W. Y. and K. S. Tweddell (1974). Two viruses from the lucke tumor isolated in a frog pronephric cell line. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **145**: 1201-1206.