

泥鰍 (*Misgunus anguillicaudatus*) 及鯉魚 (*Cyprinus carpio*) 之鰭細胞株之特性研究

Characterization of Two Fin Cell Lines Derived from Loach
(*Misgunus anguillicaudatus*) and Common Carp (*Cyprinus carpio*)

郭光雄·陳家全·陳俊宏·古鎮鈞·陳秀男

Guang-Hsiung Kou, Chia-Chuen Chen, Chung-Hung Chen,
Chen-Chun Ku and Shiu-Nan Chen

Abstract

In the present study two cell lines designated CF and LF were established from fin of common carp (*Cyprinus carpio*) and loach (*Misgunus anguillicaudatus*). Using Leibovitz's L-15 medium plus 20% fetal calf serum at temperatures ranged 28-31°C. The biological and morphological properties for these two cell lines were investigated. The cells have been subcultured for more than 400 times since their initiation in 1982. The plating efficiency for LF and CF was 23-28% and 11-22% respectively. Both CF and LF cells were susceptible to EVEX and EVA. However, no susceptibility was obtained when IPNV, EVE, IHNV and VHSV were used.

The morphological change for LF cells after cultivation was also observed using scanning electron microscope.

緒 言

自從 1962 年 Wolf 和 Quimby 成功地培養出第一株魚類永久細胞株 (Wolf *et al.*, 1962) : 虹鱒生殖腺細胞 (Rainbow Trout Gonad cell; RTG-2) 以來, 近二十年間已有八十幾株的魚類細胞株 (fish cell line) 陸續被建立, 而這些細胞株中, 屬於鮭科 (Salmonidae) 的最多, 鯉科 (Cyprinidae) 細胞株的數量有 11 株 (Gravell *et al.*, 1965; Hayashi *et al.*, 1976; Ribeiro *et al.*, 1982; Rio *et al.*, 1973; Wolf *et al.*, 1980), 居第二位, 這些細胞株包含金魚 (*Carassius auratus*) 組織之細胞株 CAR, KGC-1, KGL-1 及 SJU-1; 鯉魚 (*Cyprinus carpio*) 組織之細胞株 KGCP-1, EPC 及鯉魚腦下垂體細胞株; 金魚和鯉魚雜交種 (*Carassius auratus/Cyprinus carpio*) 細胞株 KGCF-1, 另外尚有脂頭鯉 (*Pimephales promelas*) 之 FHM 細胞株; 丁加鯉 (*Tinca tinca*) 之 TG 細胞株及眼斑鱖 (*Rhodeus ocellatus*) 之 KGR-1 細胞株。上述十一株細胞株有五株的培養目的是做病毒研究 (FHM, EPC, SJU-1, CAR 及 TG) 而其他的則應用於遺傳 (KGC-1, KGL-1, KGCP-1, KGCF-1 及 KGR-1) 和內分泌的研究 (鯉魚腦下垂體細胞株)。鯉科之 11 株細

胞株中，細胞分別源自：腦下垂體、卵巢、鱗、尾柄及表皮乳頭狀腫瘤 (Epithelioma papilloma)。

鯉科魚類是一種全世界性的重要養殖魚種，其被病毒感染的可能性很大。除了可感染性胰臟壞死病毒 (Infectious pancreatic necrosis virus; IPNV) 外 (Pilcher *et al.*, 1980)，目前已從鯉科魚類身上分離出鯉魚春季病毒血症病毒 (Spring viremia of carp virus; SVCV) (Pilcher *et al.*, 1980)、鰓炎病毒 (Swim-bladder inflammation virus; SBIV) (Pilcher *et al.*, 1980)、草魚桿狀病毒 (Grass carp rhabdovirus; GRV) (Ahne W., 1975) 和黃小鯉病毒 (Golden shiner virus; GSV) (Plumb *et al.*, 1979) 等四種病毒。

爲了加強鯉科病毒性疾病之研究，從民國 70 年 10 月起著手鯉魚 (*Cyprinus carpio*) 及泥鰍 (*Misgurnus anguillicandatus*) 的細胞培養。鯉科爲魚類中種類最多的一科，共有 200 屬以上，原盛產於亞歐兩洲內陸水域。由於牠們的繁殖力強且味美，因而被引進到世界各地，成爲相當重要的養殖魚類，同時，牠們在觀賞淡水魚中也佔有相當的地位。本實驗所用之鯉魚 (Common carp; *Cyprinus carpio* L.) 爲最主要的鯉科魚種，在臺灣遍及全島，牠的變異性極大，分鱗鯉、革鯉及鏡鯉三種，在臺灣養殖者一般爲鱗鯉，也是本實驗所採用者。泥鰍 (Loach) 屬於鰍科 (Cobitidae) 和鯉科是近親，同爲鯉目 (Cypriniformes) 的魚類。鰍科亦爲歐亞兩洲棲息於河水、池沼或泥底的小魚；在臺灣則遍及全島各地水田及池塘。本實驗所採用的真泥鰍 (*Misgurnus anguillicandatus*) 是臺灣三種泥鰍中數量最多且是最主要的養殖品種。

從 1982 年 1 月細胞培養成功以來，鯉魚及泥鰍鰓細胞已有 400 代以上之繼代培養。本實驗並進行兩種細胞株之特性研究，包括溫度、牛犢血清濃度、培養液對細胞生長的影響；細胞表面附著效應 (cell plating efficiency)；細胞對溫度的忍受性及對魚類病毒之感受性等。牠們的生長情況相當穩定，已分別命名爲 CF (Carp Fin) 及 LF (Loach Fin) 細胞株。

本研究並同時利用掃描式電子顯微鏡，探討細胞於培養過程中表面微細構造的變化情形。

材料與方法

實驗鯉魚、泥鰍及培養基

本實驗所採用的鯉魚 (*Cyprinus carpio*)，是鯉魚變異種之一的鱗鯉，鱗鯉是臺灣最主要的養殖鯉魚。泥鰍則採用臺灣養殖數量最多的真泥鰍 (*Misgurnus anguillicandatus*)。

本實驗所應用的培養基 Leibovitz's L-15 of Eagles's Medium (DMEM) 及牛犢血清 (Fetal calf serum, FCS) 係購自 Flow Laboratories, Mclean, Virginia, U. S. A.。

實驗所用之胰蛋白酶、抗菌劑 (包括 streptomycin 及 penicillin) 及抗黴劑則購自 GIBCO, U. S. A.。

鯉魚及泥鰍鰓細胞之初級培養 (Primary culture)

將活的約 25 公分，300 公克左右的健康鯉魚及 25 公分之健康泥鰍，以鈍器從頭部擊昏後，在無菌操作台 (Laminar Flow) 內，以 70% 酒精仔細擦拭尾鰭，然後以滅過菌之解剖儀器小心剪下，立即浸於 EDTA/PBS (Chen *et al.*, 1982)，再將鰓組織剪成 1 cm² 左右，然後用 70% 酒精洗 15~30 秒，並用 5% Clorex (含赤氯酸鈉 10%) 泡 5 分鐘後，再用無菌磷酸緩衝液洗數分鐘，最後用無菌生理食鹽水洗三次 (每 5~10 次分鐘)。

經過上述處理過之組織塊，進一步剪成 0.1 cm² 之組織碎片後加入 0.375% 胰蛋白酶溶液，以電磁攪拌器在室溫攪拌 5 分鐘，再將組織碎片儘可能剪碎。連同組織碎片的胰蛋白酶溶液離心 (1,000 rpm, 10 分鐘) 後，倒掉上層液，加入含 20% FCS 的培養液，再用混合振盪器 (Mixer, K-550-G, VORTEX-GENIE, U. S. A.) 將組織碎屑、細胞及培養液充份混合均勻，倒入 25 cm² 的細胞培養瓶 (5 ml/flask)、最後靜置於 24°C、28°C 及 31°C 之定溫培養箱 (incubator) 中靜置培養，48 小

時後以 Olympus IM 倒立顯微鏡觀察。

細胞之繼代培養

由上述方法培養出的細胞則依 Chen 等 (1982) 所述之方法將長成密集細胞層之培養液倒掉，用 0.1% 胰蛋白酶溶液洗 2~3 次，然後以手掌拍擊培養瓶，使細胞從附着的培養瓶表面脫離，然後加入新的培養液，混合均勻後，平均分裝到新的培養瓶，標出繼代培養的代數及日期後，放回 28~30°C 培養箱中培養。依此方法每隔數日操作一次稱為一次的繼代。

溫度對 CF 及 LF 細胞生長速率的影響

溫度對 CF 及 LF 細胞之生長速率依 Chen 等 (1982) 所述之方法進行，先以 L-15 (20% FCS) 混合均勻的細胞懸浮液，以血球計數器 (haemocytometer) 計算細胞數量後，將細胞培養在 24 孔 (well) 的微量培養盤 (microplate)，每孔 0.5 ml，然後分別置於 4°C, 18°C, 24°C, 28°C, 31°C 及 37°C 中培養，在培養後第 12、24、36、48、72 及 96 小時後分別自上述溫度之培養箱中取出。每個培養盤，依次由右而左，每次處理最右邊四孔。處理方式是先吸掉培養液，再加入 1% 胰蛋白酶溶液，洗三次，所得的細胞懸浮液以血球計數器依計算白血球的計算法計算細胞數目。

牛犢血清濃度對 CF 及 LF 細胞生長速率之影響

培養在 75 cm² 培養瓶之細胞經胰蛋白酶處理後，等量分裝到離心管離心 (1,000 rpm)，離心 10 分鐘後去除上清液，分別以含 2%、5%、10%、20% 牛犢血清的 L-15 培養液混合均勻，用血球計數器計算細胞數量後，培養於 24 孔的微量培養盤中，置於 28°C 培養，間隔數小時至數日後以上述方法計算細胞數目。

不同培養液對 CF 及 LF 細胞生長的影響

用上述之步驟進行，但改以 pH 7.0 及 7.5 的 L-15 和 DMEM 四種培養液來培養細胞，比較 CF 及 LF 在不同培養中生長速率的差異。

CF 及 LF 細胞對溫度之忍受性

將細胞培養於 24 孔的微量培養盤後，置於 28°C 中培養。24 小時後計算細胞數目，然後實驗組移至 18°C 中培養，對照組仍放回 28°C 中培養，48 小時再取出計算細胞數目。計算後，實驗組再移至 4°C 中培養而對照組還是在 28°C 中培養。實驗組放入 4°C 後的第 12 小時，24 小時，72 小時及 264 小時也就是培養後第 14 天分別將實驗組及對照組取出，計算細胞存活數目。

細胞表面附著效應

兩種細胞株的細胞表面附著效應則依 Chen 等 (1982) 所述之方法進行，將計算過細胞數目的細胞懸浮液做十倍連續稀釋，將細胞稀釋到 10²~10³ cells/ml 後，培養在培養瓶中 (5 ml/25 cm² flask)，置於 28°C 中培養，一星期後更換新的培養液，再經一星期，倒掉培養液，以 PBS 洗兩次，然後用 70% 酒精固定，並計算細胞之羣落 (Colony) 數目。

CF 及 LF 對病毒之感受性

CF 及 LF 兩種細胞株對下列病毒：IPNV, EVE, EVEX, VHS 之接受性則依 Ueno 等 (1984) 所敘述之方法進行之。將細胞培養於 28°C, L-15 (20% FCS) 中，至 70% 單層細胞層時，倒掉培養液，接種待測之病毒溶液 (0.5 ml/25 cm² flask)。讓細胞吸附病毒一小時後，倒掉病毒溶液，加入含 5% FCS 之培養液，然後放在 18°C 中培養，接種後兩星期內，每天取出觀察是否有細胞病理變化 (Cytopathic effect; CPE) 之產生。

會使 CF 及 LF 細胞產生 CPE 的病毒，再進一步依 Ueno 等 (1984) 所敘述之方法進行，50% 細胞病毒感染劑量測定 (TCID₅₀; 50% Tissue Culture Infectious Dose)。

CF 及 LF 細胞之掃描電子顯微鏡觀察

經 37°C 培養 2~5 天的 CF 細胞或是在 4°C 經過一年以上貯存的 LF 細胞，先使其回溫至 18°C，48 小時後更換新鮮的培養液，再過 48 小時移至 28°C，在 28°C 中 48 小時後進行繼代培養，用來進行掃描電子顯微鏡之觀察。倒掉培養液後先用 PBS 洗兩次，再用 0.1 M phosphate buffer (pH 7.2) 洗，然後以 2.5% glutaraldehyde//phosphate buffer 於室溫固定 50 分鐘。而後再以 0.1 M phosphate buffer 洗兩次各 10 分鐘，接著用 1% OsO₄/phosphate buffer 做後固定 (post-fixation) 10 分鐘，吸掉 OsO₄/phosphate buffer 後用 0.05 M phosphate buffer 洗兩次，各 10 分鐘。然後以酒精或丙酮進行連續脫水 (30%→50%→70%→85%→95%→100%→100%)，每個濃度 10 分鐘，以丙酮脫水的標本在做臨界點乾燥 (critical point dry) 處理前，需先將標本浸在 isoamyl acetate 中 (Boyde *et al.*, 1972, Porter *et al.*; 1974)。本實驗是用二氧化碳，以臨界點乾燥機 (HCP-2, HITACHI, Japan) 乾燥，乾燥後之標本以雙面膠帶 (double scotch tape) 黏在標本盤 (stub) 上然後以金屬蓋鍍器 (Ion coater, IB-2, Eiko Engineering, Japan) 鍍金，最後在掃描電子顯微鏡 (SEM, S-520, HITACHI, Japan) 下觀察並照相。

污染檢驗

LF 及 CF 細胞分別以無添加抗生素之培養液培養五代及十代後再培養於含有 9×35 mm 載玻片之 Leighton tube，再以 Chen 等 (1981) 所述之方法來測試細胞是否已受到細菌、黴菌及黴漿菌的污染。

結 果

鯉魚及泥鰍鰓細胞之初級培養及繼代培養

鯉魚及泥鰍的鰓組織在 28°C 及 31°C 靜置培養 48 小時後，都可明顯從已附著的組織邊緣觀察到細胞游移 (cell migration) 的現象。也有少數細胞羣落是由單一細胞分裂而來，但它們的生長分裂速率遠不及游移細胞。然而培養在 24°C 中的培養瓶，雖經一星期的觀察，仍無組織或細胞附著，但移至 31°C 後 24 小時，即可看到附著和細胞游離的現象。

鯉魚尾鰓細胞 (CF) 在培養八天後形成密集細胞層 (Confluent cell sheet)。繼代培養一開始以 1:2 的方式進行，一直到第十代以後，細胞生長趨於穩定，才改為 1:3，但在第 24 代因覺得 31°C 中培養者，細胞容易產生液泡及漲大脫落，而 28°C 中的細胞生長較穩定，故以後 CF 細胞一直維持在 28°C 中培養，目前生長相當穩定，已有 400 代以上之繼代培養 (Fig. 1)。

泥鰍鰓細胞 (LF) 則在第十天才形成密集細胞層，生長較慢，一直以 1:2 的方式進行繼代培養，3~7 天可長成單層 (monolayer) 細胞層，目前亦達 450 代以上之繼代培養 (Figs. 2-a, b)。

鯉魚及泥鰍鰓組織塊在繼代培養第三代仍有相當好的分生能力。CF 及 LF 細胞株都是表皮樣細胞 (epitheloid)，CF 細胞的密度為 120,000 cells/cm²，經胰蛋白酶處理後之細胞直徑大致有 40 μm、10 μm 及 4 μm 三種，但以 10 μm 佔多數；LF 細胞的形態相當一致，直徑多為 10 μm，細胞密度為 48,000 cells/cm²。兩個細胞株都有多核的細胞 (Fig. 1, Fig. 2)。

溫度對 CF 及 LF 細胞生長速率之影響

鯉魚鰓細胞在 31°C 生長最快，28°C 次之。細胞族羣倍增的時間 (population doubling time)



Fig. 1. Micrography of CF cells.

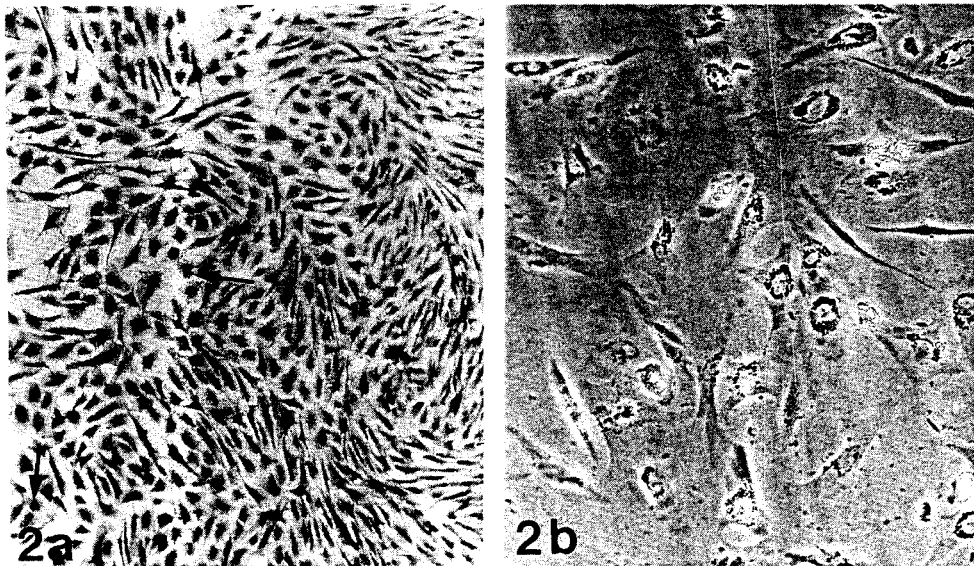


Fig. 2a. and b. Micrography of LF cells. a. Normal LF cells. The Multiple nuclei were observed (arrows). b. Vacuolization of LF cells.

爲 19~30 小時 (Fig. 3)。但以實驗長期觀察，CF 細胞在 31°C 培養，生長過快，較培養在 28°C 的細胞易產生液泡或空泡而退化，因此仍以 28°C 爲維持 CF 細胞存活的基養溫度；在 4°C 下 CF 細胞附著情形很差，直接導致細胞生長不良；而培養在 37°C 之 CF 細胞，前兩天生長快速，但第三天以後，細胞開始有脫落和漲大的現象發生。

LF 細胞的生長受溫度的影響如 Fig. 4 所示：31°C 和 28°C 的生長速率無明顯差異，而 4°C 中，雖然細胞能附著却無法分裂生長，因而細胞數目逐漸減少；在 37°C 中，LF 細胞呈多角形，生長較慢。

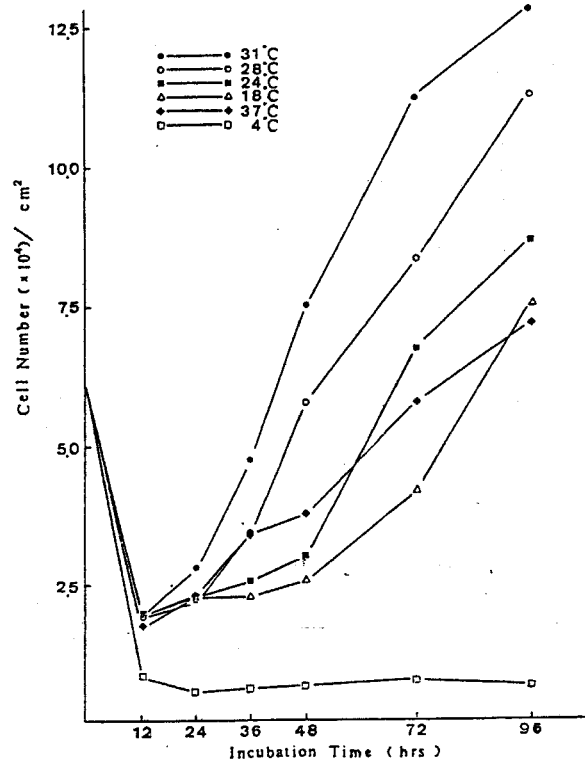


Fig. 3. Growth curve of CF Cells at different temperatures. The cells were cultured in L-15 (20% FCS) and inoculated in 24 wells microplate. Cell counts were determined using haemocytometer. Each point was obtained from 4 wells.

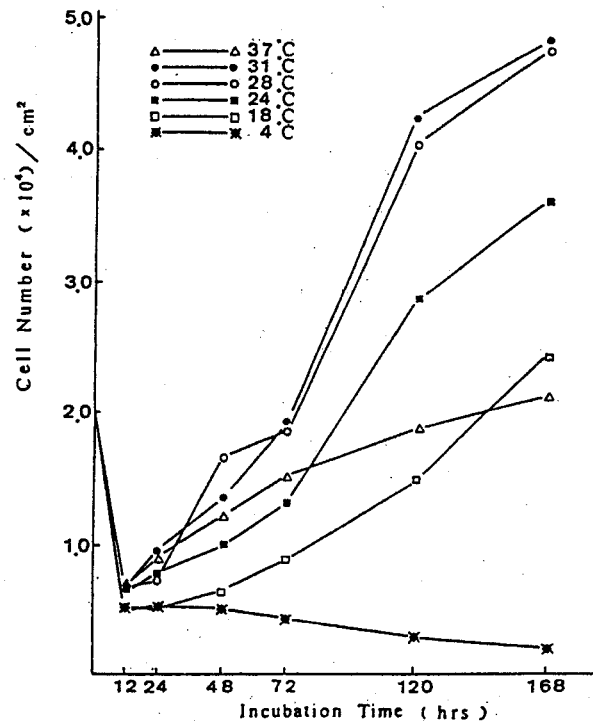


Fig. 4. Growth curve of LF Cells at different temperatures. The cells were cultured in L-15 (20% FCS) and inoculated in 24 wells microplate. Cell counts were determined using haemocytometer. Each point was obtained from 4 wells.

牛犢血清濃度對 CF 及 LF 細胞生長速率之影響

牛犢血清濃度對 CF 及 LF 細胞生長的影響如 Figs. 5, 6 顯示。CF 細胞以含 10% FCS 的培養液可得類似含 20% FCS 的結果，但對 LF 細胞而言 L-15 (20% FCS) 的培養效果較 L-15 (10% FCS) 的培養效果好。

不同培養液對 CF 及 LF 細胞生長速率之影響

如 Fig. 7 顯示 CF 細胞在 L-15 中的生長速率較在 DMEM 中好，依實驗觀察亦可發現 CF 細胞在 DMEM 中 12 小時，就有明顯的液泡或空泡產生，表示 DMEM 對 CF 細胞不適合。泥鰻在這四種培養液的生長情形並無明顯差異 (Fig. 8)。然以一年多的觀察，LF 較適宜以微鹼性的 L-15 培養液培養，而 CF 則則以中性的 L-15 培養液來培養較適宜。

CF 及 LF 對溫度的忍受性

經由實驗觀察和 Fig. 9 顯示，LF 細胞不論在 28°C 或 4°C 下，都能維持很穩定的細胞旋羣數目，在 28°C 中可四個月不換培養液而不死亡，貯存在 4°C 中，更可存活一年以上，雖然細胞外形多呈多角型，但繼代培養後，細胞可恢復原有的外形。

CF 細胞在培養過程會產生液泡或空泡，可能是一種老化現象。液泡形成或的時間不一定，有時在培養 2~4 天即形成，也有超過一個月才出現的情形。CF 細胞產生液泡是一種自發性的必然結果，如將細胞放在 4°C 中貯存，來降低細胞代謝，最長也只能維持四個月。CF 細胞一旦產生液泡，培養液會由黃變紫，即由酸變鹼，細胞如不進行繼代培養則會漸漸因自體溶蝕而死亡。LF 細胞在培養條件不良

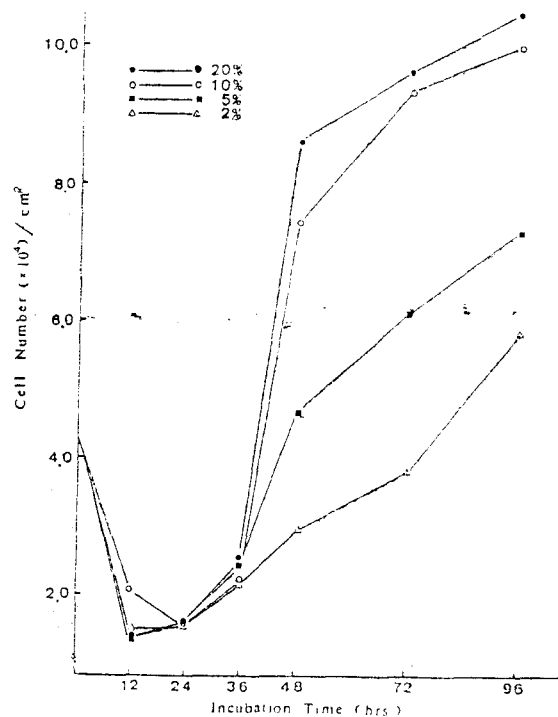


Fig. 5. Growth curve of CF cells at different concentrations of Fetal Calf Serum. The cells were cultured in L-15 medium and inoculated in 24 wells microplate at 28°C. Cell counts were determined using haemocytometer. Each point was obtained from 4 wells.

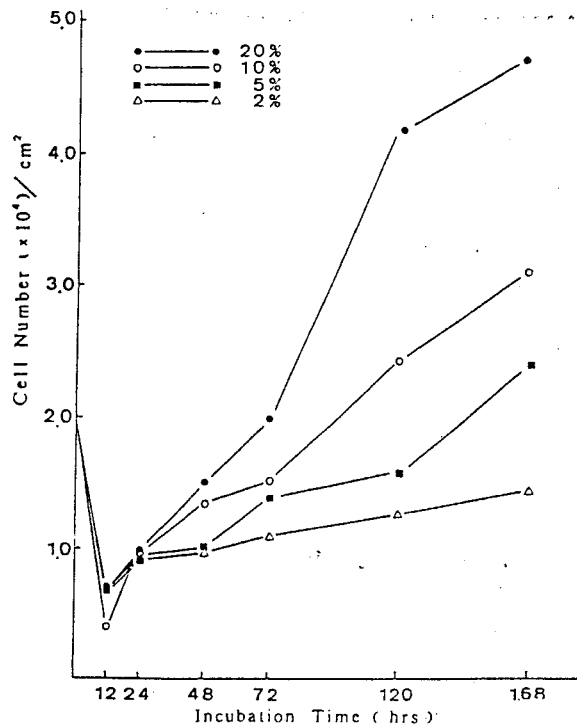


Fig. 6. Growth curve of LF cells at different concentrations of Fetal Calf Serum. The cells were cultured in L-15 medium and inoculated in 24 wells microplate at 28°C. Cell counts were determined using haemocytometer. Each point was obtained from 4 wells.

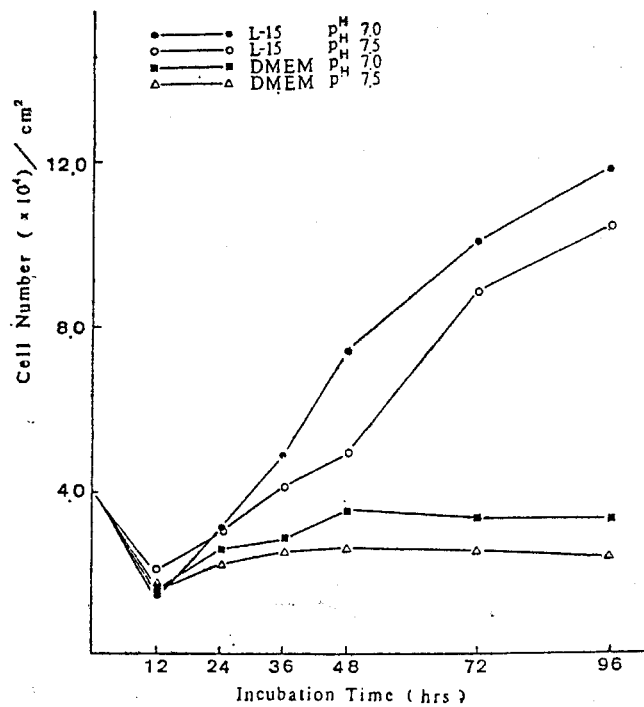


Fig. 7. Growth curve of CF cells in different media. The cells were inoculated in 24 wells microplate at 28°C. Cell counts were determined using haemocytometer. Each point was obtained from 4 wells.

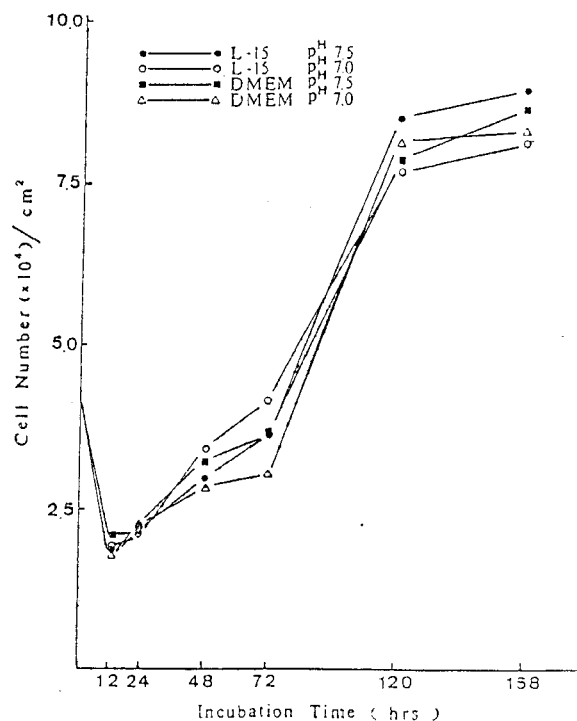


Fig. 8. Growth curve of LF cells in different media. The cells were inoculated in 24 wells microplate at 28°C. Cell counts were determined using haemocytometer. Each point was obtained from 4 wells.

時，也會產生液泡 (Fig. 2-b)，但這種情形只要改善培養條件，如換新的培養液，即可恢復。而 CF 及 LF 細胞皆不適宜在 37°C 中長期培養。

CF 及 LF 細胞表面附著效應

CF 細胞在 50 代、70 代、90 代各測過其附著效應，LF 細胞則在 20, 40, 50 代時測過。結果如 Table 1 顯示，分別為 11.8~22.1% 及 23.4~28.0%。這結果顯示這些細胞並未變性 (Transform)。

CF 及 LF 細胞對病毒之感受性

接種 11 種魚類病毒的試驗結果，CF 及 LF 皆只對 EVEX 及 EVA 有明顯的感受性。CF 及 LF 細胞在感染 10^3 TCID 50/ml 的 EVEX (每 25 cm^2 flask, 0.5 ml) 後，第十天所收集之病毒懸浮液依 Ueno (1982) 的方法所測得之 TCID 50/0.1 ml 分別為 $10^{4.7}$ 及 $10^{4.4}$ 。而同樣的方法測 EVA，對 CF 及 LF 細胞之 TCID 50/0.1 ml 分別為 $10^{4.2}$ 及 $10^{4.5}$ 。而 CF 及 LF 對 EVE, IPNV, IHN 及 VHS 則皆無接受性。

掃描電子顯微鏡觀察

A. CF 細胞的退化 (degeneration)

正常 CF 細胞多呈長形 (Fig. 10)，而表面有細長的足絲 (filopodia) 與鄰近細胞交錯相連。當細胞要進行有絲分裂時，細胞會變圓且足絲變得較粗、短，亦有泡狀突起 (bleb) 存在，細胞經長期培養後，會有自發性的自體溶蝕現象發生，原因尚不清楚，僅就觀察所得加以描述：首先細胞表面的足絲變少、變小，以致細胞表面變得較光滑，這時常會看到已縮成球形的老化細胞，時間再久，細胞漸漸產

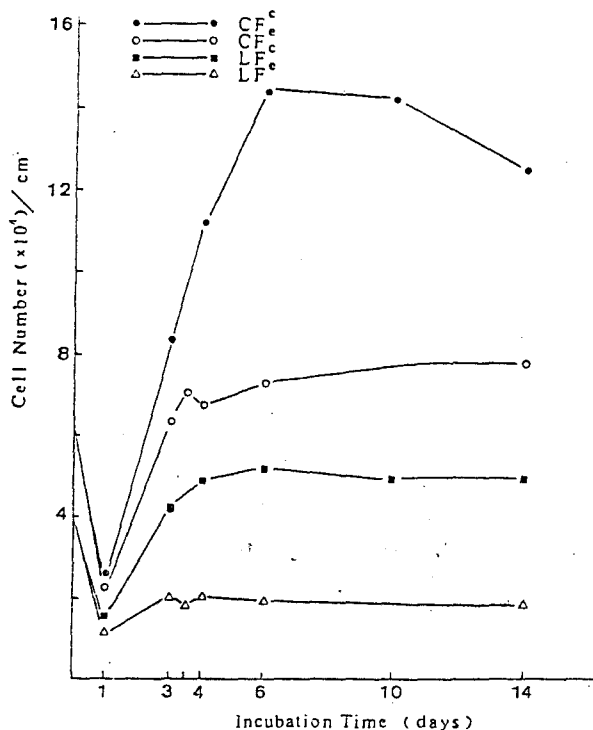


Fig. 9. Survival curve of CF and LF cells at 4°C long term Culture. The cells were inoculated in 24 wells microplate and cultured in L-15 (20% FCS). Cell counts were determined using haemocytometer. Each point was obtained from 4 wells. Note: c, control (cells were still cultivated at 28°C); e; experiment (cells were cultivated at 28→18→4°C.)

Table 1. Efficiency of plating values obtained for LF and CF cell lines

Cell line	Passage	Cell seeded/ 25 cm ² flask	No. of colonies	Efficiency of plating per cent
CF	50	187	22	1.18
	70	192	28	14.6
	90	77	17	22.1
LF	20	64	15	23.4
	40	75	21	28.0
	50	70	18	25.7

Cells were cultivated in 25 cm flask at 28°C. Cell counts were determined using haemocytometer. Each data was obtained from 3 flasks. Efficiency of plating is (colony/cell seeded)×100.

生大型液泡或空泡，有些呈塌陷狀或呈穿孔的現象，嚴重的則已縮成各式各樣不規則球形。

CF 細胞在 37°C 培養兩天後，細胞接觸抑制作用降低，可明顯觀察到細胞重疊 (over lap) 的現象，細胞表面的足絲縮短，但數量增加變得相當密，然後漸漸為泡狀突起所取代 (Figs. 11, 12)，培養四天以上則細胞漸漸退化脫落，只剩下一些扁平的大型細胞 (Fig. 13)。

B. LF 細胞經溫度處理後之變化

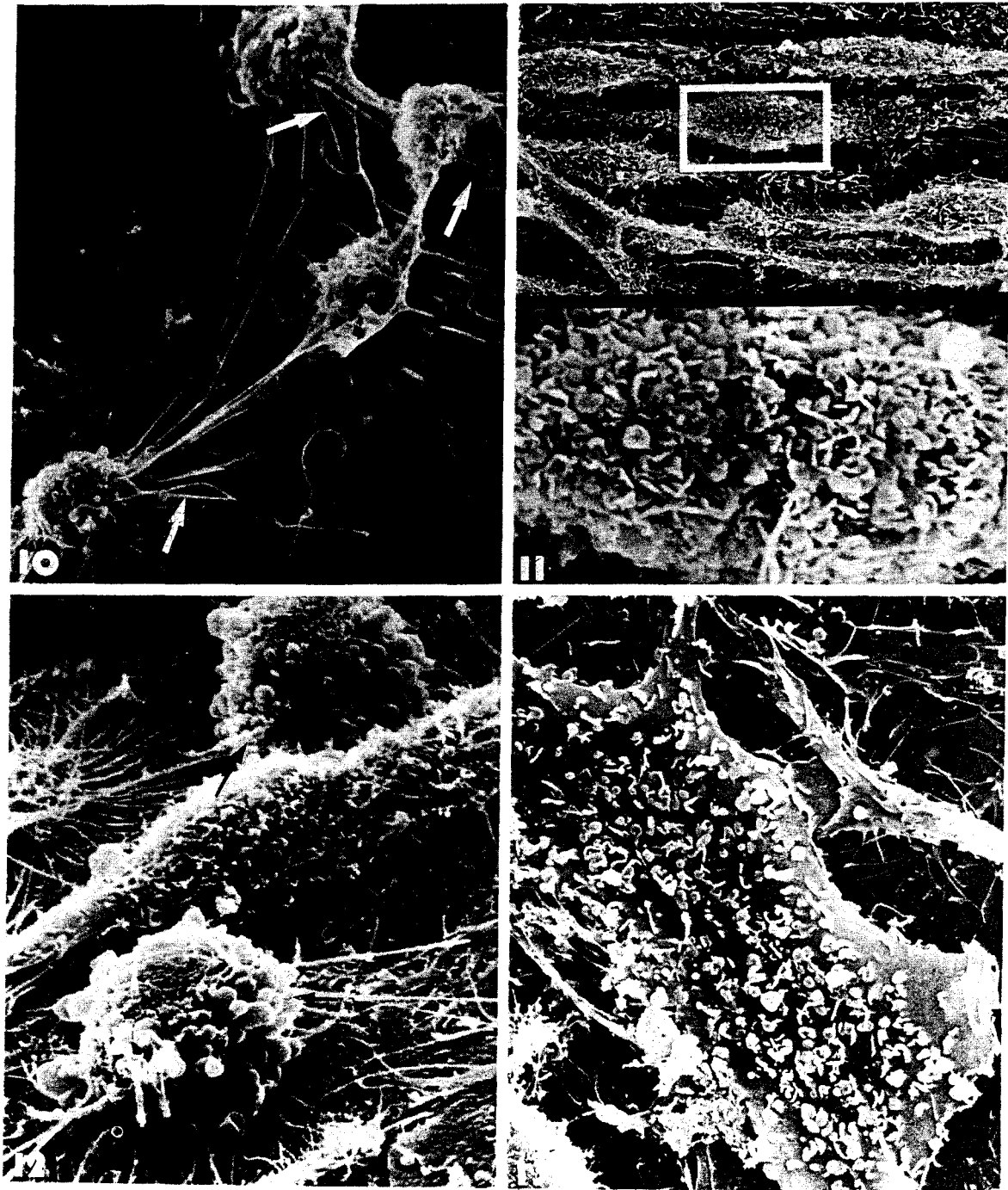


Fig. 10. Scanning electron micrography shows CF cells cultivated at 31°C. Filopodia located at the margin of membrane (arrows).

Fig. 11, 12 and 13. Scanning electron micrography show CF cells cultivated at 37°C for 3, 4, 5 days. 11. The blebs appear (arrows) instead of filopodia gradually. 12. The blebs were observed in most of cells. Tilt angle 60°. 13. The residue were flattened cells.

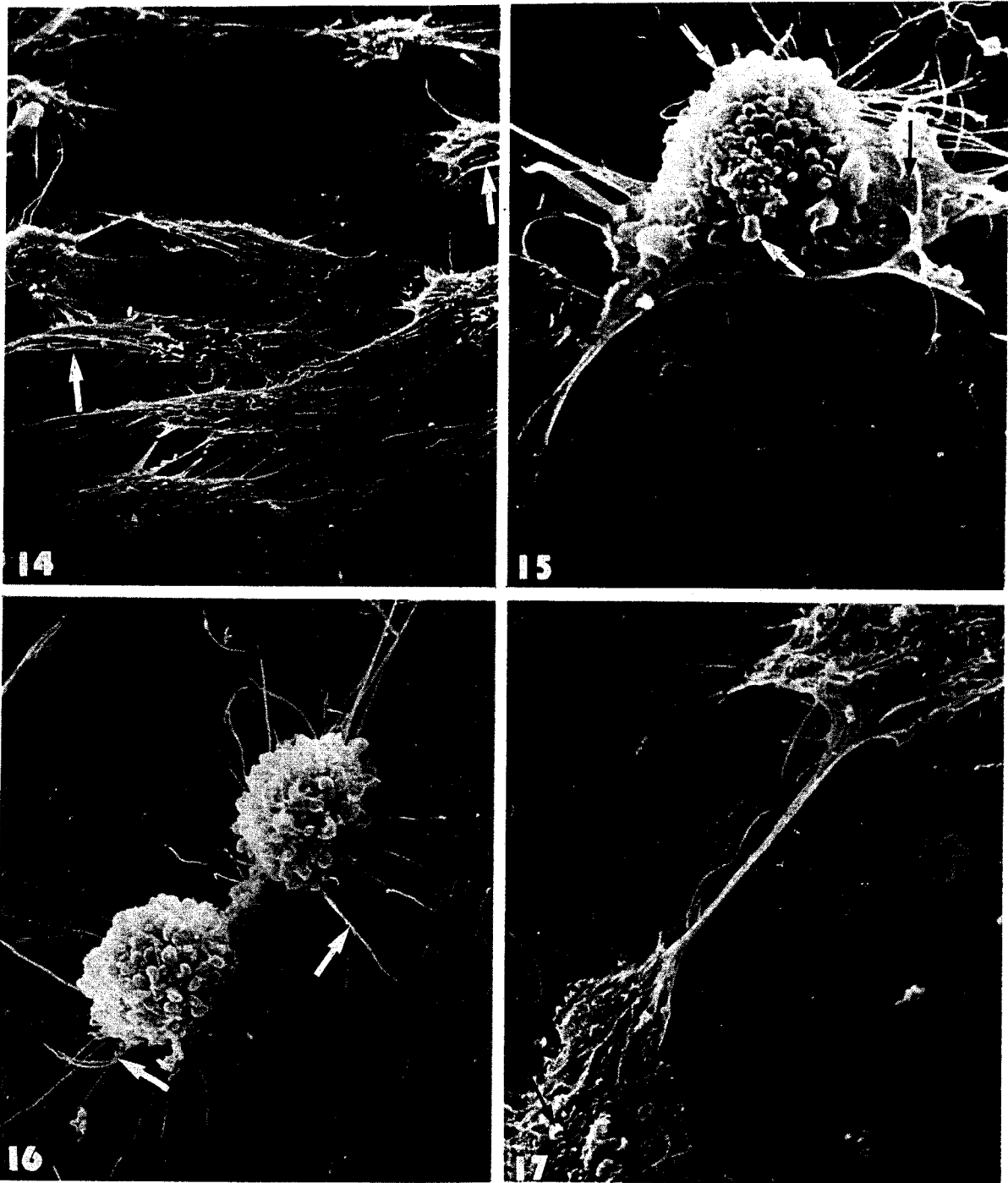


Fig. 14. Normal flatten-shaped LF cells. Filopodia located at the margin of membrane and the ruffled ends were observed (arrows).

Fig. 15. Scanning electron micrography of LF cells at prophase of cell division. The blebs (white arrow) and extension of cells (black arrow).

Fig. 16 and 17. The mitosis of LF cells. a. The cell surface was highly blebed with some enlargement of the attachment filopodia (arrow). 17. The late stage of mitosis of LF cells. The blebs disappear gradually (arrows). a. and b. tilt angle 60.

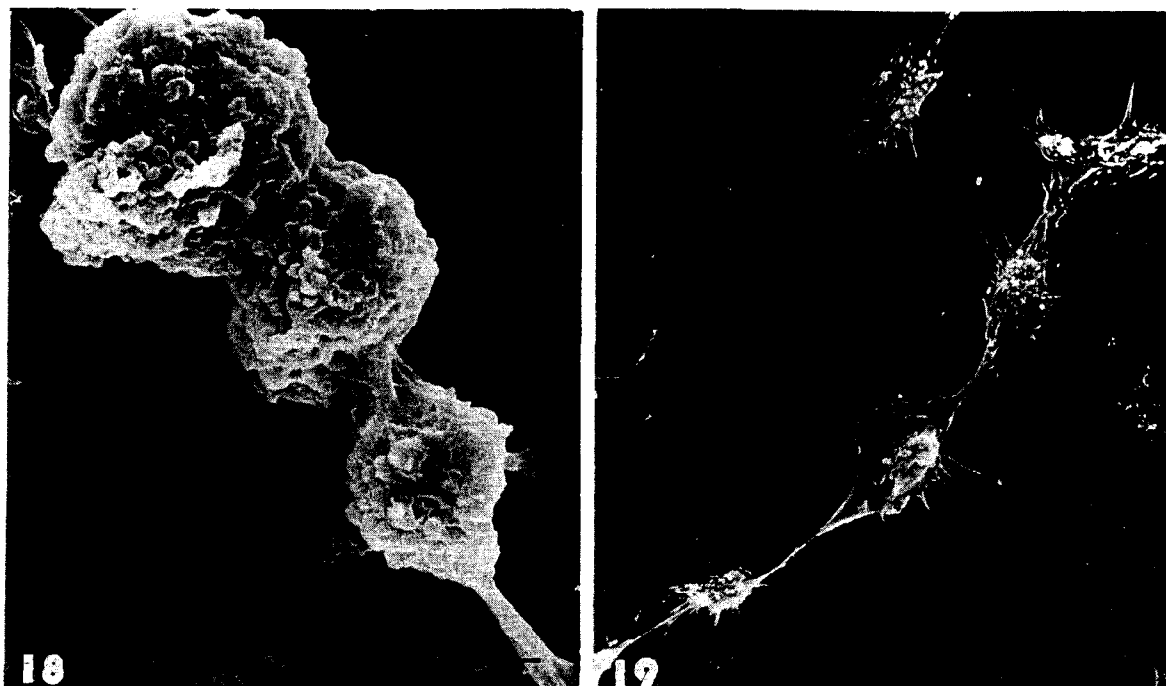


Fig. 18. Scanning electron micrography of LF cells maintained at 4°C for 12 months. When increased temperature from 4°C to 18°C, some cells had fused together.

Fig. 19. Scanning electron micrography of LF cells. Showing the line-form cells when subcultured following cells maintained at 4°C for 12 months.

正常 LF 細胞相扁當平，表面少有足絲或泡狀突起 (Fig. 14)，當進行有絲分裂時，細胞表面全為泡狀突起 (Fig. 15)，而細胞底部有細長足絲將細胞托起 (Fig. 16)，到了分裂末期，泡狀突起漸漸消失，又恢復扁平狀 (Fig. 17)。此觀察結果與 Rajaraman 等人在 1974 年所發表有關細胞在體外培養附着和展開 (cell adhesion and spreading in vitro) 的模式完全吻合。

LF 細胞在 4°C 中貯藏一年以上，取出放在 18°C 回溫 48 小時，結果發現有細胞癒合現象 (Fig. 18)，而同溫到 28°C 後 48 小時，再行繼代培養，則發現有細胞呈線狀分裂的情形 (Fig. 19)。

細胞污染檢驗

TSA 及 PDA 培養基觀察一星期，皆無任何細菌、黴菌的菌落形成。

以螢光顯微鏡觀察，結果除了細胞核外，細胞質中並無點狀的螢光亮點存在，所以 CF 及 LF 皆無受到細菌、黴菌、黴漿菌的污染。

討 論

自從 1961 年 Clem 等人成功地培養出藍紋石鱧的鱗細胞 GF-1 以來，八十幾株魚類細胞株中，細胞源自鱗組織的有 13 株，包括本研究發展成功的 CF 及 LF；另外源自尾柄 (caudal trunk) 或鱗基部的細胞株有 12 株，因之這些來源自鱗部位之細胞株多達 25 株，約佔細胞株總數的 1/3。這結果顯示鱗細胞是一種較易培養且應用也較廣的細胞。

雖然 Ojima 和 Ueda 在 1976 年曾經培養過鯉魚的鱗細胞株 KGCP-1，但是此細胞係來自鯉魚的胚胎。成魚的鱗細胞株則未曾有過報告；至於泥鰻之細胞株至今尚未有任何報告發表。

細胞株的細胞外形 (cell morphology)，一般可分為表皮樣 (epitheloid) 或纖維狀 (fibroblast-like) 細胞，然而也有混合型 (Mixed type) (Chen and Kou, 1981; Noga and Hartmann, 1981) 或多型態 (pleomorphism) (Noga and Hartmann, 1981) 的；另外 Pfitzner 將有大型液泡存在而把細胞核擠到邊緣之細胞，另外歸為一類 (Perum, 1982)。以一般動物組織培養的方式，是無法控制細胞的形態。但若在培養過程以表皮細胞生長物質 (epidermal growth factor; EGF) 或纖維細胞生長物質 (fibroblast growth factor; FGF) 及其他賀爾蒙如胰島素 (insulin) 和運鐵蛋白 (transferrin) 等來取代血清，不但可維持細胞生長，更可達到篩選的目的 (Hassell and Engelhardt, 1977; Holley, 1979; Hutchings and Sato, 1978; Serrero. *et al.*, 1979)。

初級培養的細胞在繼代培養的過程有可能被另一種形式的細胞族羣由於生長適應而漸漸取得優勢 (dominant) (Ahne, 1979; Chem *et al.*, 1961; Ribeiro and Ahne, 1982, Watanabe *et al.*, 1980)。在有關鯉科細胞株中，細胞型態並不一致，而本研究所發表的細胞株 LF 及 CF 皆為表皮樣細胞株。Wolf 和 Quimby (1962) 及 Li 和 Jordan (1969) 都曾提到細胞外型會受到培養液及培養的時間等的影響。於本研究中，LF 細胞的外型一般呈多樣化，有多角型三角型或長條型等等表皮樣細胞，但培養時間太長或培養條件不良時，細胞外型全呈多角型或近圓型或有小液泡產生。但培養情況改善或經繼代培養則可恢復上述之形態；而 CF 在培養條件不好的情況下會變成類似 Pfitzner 所述的第三類細胞，YNK (Watanabe *et al.*, 1978) 及 AS (Nicolson and Byrne, 1973) 細胞株也有這種現象，還有鯉魚生殖腺、及泥鰍生殖腺細胞之初級培養，分別培養到第五代及第三代時，細胞也會產生液泡而後退化死亡。

鯉魚及泥鰍均屬於溫水魚類，生長環境溫度分別為 5~30°C 及 6~35°C，而最適宜水溫為 25~28°C 之間 (水產養殖要覽)；CF 及 LF 細胞的培養溫度範圍在 4~37°C 之間，以 28~31°C 最適宜，這結果與鯉魚及泥鰍的生活環境相似。除了 SJU (Rio *et al.*, 1973) 外，其他鯉科細胞株的最佳培養溫度在 25~34°C，也和 LF 及 CF 相似。TG 及 FHM 以外的鯉科魚類細胞都無法在 4°C 生存，而 CF 可活存四個月左右；LF 更可存活一年以上而不用更換培養液，這種現象是其他魚類細胞株少有的現象。

LF 細胞在 L-15 及 DMEM 中皆可生長，然而 CF 只能在 L-15 中生長。根據 Ribeiro 和 Ahne (1982) 發表的鯉魚腦下垂體細胞株是用 EMEM (Eagle's Minimum Essential Medium) 添加胺基酸 (non-essential amino acid) 來培養，而 L-15 是一種富含胺基酸的培養液，因此推測鯉魚細胞的培養對胺基酸的需求量較 LF 細胞的需求量為高。

細胞表面附著效應，可視為細胞變性 (transformation) 與否的一個指標，因為剛由動物取得的細胞，附著效應都很低 (Paul, 1975)，正常哺乳類動物細胞的附著效應在~0.2%之間，已變性的則可高達 100% (Aaronson and Todaro, 1968)。魚類細胞株的附著效應應值由 RTH (Rainbow Trout Hepatoma) 的 0.1~1% (Fryer *et al.*, 1981) 到高達 51~63% 的 Omaka 細胞株 (Lee and Loh, 1975) 都有。LF 及 CF 之表面附著效應分別為 23.4~28.0% 及 11.8~22.1%。介於中間。其他判斷細胞變性的標準尚有細胞接觸抑制作用 (contact inhibition) 的喪失與否；附著生長 (anchorage dependence) 的減少；能否在極低濃度血清的培養液中生長等 (Sack *et al.*, 1981)。LF 和 CF 雖各經 67 代及 105 代的培養，但細胞並無堆積 (pile up) 的現象產生，且在低濃度血清的培養液中生長緩慢。由以上結果顯示 CF 及 LF 細胞株並未有變性的現象產生。

培養 CF 及 LF 細胞株的主要目的乃在於魚類病毒的研究，實驗結果顯示，此二細胞株對 EVA 及 EVEX 有感受性，而對於 EVE、IPNV、VHSV 及 IHNV 等病毒沒有感受性，所以此二細胞株是可接受自鰻魚分離出之桿狀病毒 (Rhabdovirus) 至於是否能接受從鯉科所分離的病毒，包括 SVCV、SBIV、GRV 及 GSV 等則有待進一步的探討。

正常之 LF 細胞在掃描式電子顯微鏡下所呈現之形態變化與 Rajaraman 等 (1974) 所發表有關

細胞體外培養附着和展開之模式完全一致。

摘 要

本研究之目的乃在於建立鯉魚及泥鰻之鱗細胞株，並探討此二細胞株之特性及細胞之表面顯微構造。

鯉魚及泥鰻鱗細胞在 15 個月間，各培養了 105 代和 67 代，並分別命名為 CF 及 LF。此二細胞株最適宜的生長條件為含 20% 牛犢血清之 Leibovitz's L-15 培養液，溫度在 28~31°C 之間。細胞表面附著效應值，LF 為 23~28%，CF 為 11~22%。LF 及 CF 細胞皆為表皮樣細胞，CF 細胞的細胞密度為 120,000 cells/cm²，而 LF 細胞則為 48,000 cells/cm²。CF 及 LF 細胞株對於魚類病毒 EVEX 和 EVA 有感受性，而對其他包括 EVE、IPNV、IHNV 和 VHSV 等病毒無感受性。

這兩個細胞株自 1982 年建立以來已分別繼代 400 次以上，細胞在培養過程中，LF 細胞外型會由多樣化的外型趨於單一的多角型。這些細胞表面微細構造之連續變化情形，已分別由掃描電子顯微鏡，得到具體的觀察。

參 考 文 獻

水產養殖要覽。漁牧科學叢書 5: 漁牧科學雜誌社編印。

Aaronson, S. A. and G. J. Todaro (1968): Basis for the definition of malignant potential by mouse cells cultivated in vitro. *Science*, **162**: 1024-1026.

Ahne, W. (1979): Fish cell culture: a fibroblastic line (PG) from ovaries of Juvenile Pike (*Esox lucius*). *In Vitro*, **15**(11): 839-840.

Ahne, W. (1975): A rhabdovirus isolated from grass carp (*Ctenopharyngodon idella* Val.). *archives of Virology*, **48**: 181-185.

Boyde, A., R. A. Weiss and P. Vesely (1972): Scanning electron microscopy of cells in culture. *Exp. Cell Res.*, **71**: 313-324.

Chen, S. N. and G. H. Kou (1981): A cell line derived from Japanese eel (*Anguilla japonica*) ovary. *Fish Pathology*, **16**(3): 129-137.

Chi, S. C. (1982): A Cell line derived from tilapia (*Tilapia mossambica* × *Tilapia nilotica*) ovary. *Fish Pathology*, **18**(1): 13-18.

Clem, L. W., L. Moewus and M. M. Sigel (1961): Studies with cells from marine fish in tissue culture. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **108**: 762-766.

Dingle, J. I. and H. B. Fell (1969): Lysosome in biology and pathology. North Holland Publ. Co., Amsterdam, London.

Fijan, N. (1976): Diseases of cyprinids in Europe. *Fish Pathology*, **10**(2): 129-134.

Fisher, R. W. and T. W. Cooper (1976): Electron microscope studies of the microvilli of HeLa cell. *J. Cell Biol.*, **34**: 569-576.

Fryer, J. L., B. B. McCain and J. C. Leong (1981): A cell line derived from rainbow trout (*Salmo gairdneri*) hepatoma. *Fish Pathology*, **15**(3/4): 193-200.

Gravell, M. and R. G. Malsberger (1965): A permanent cell line from the fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **126**(1/2): 555-565.

Hassell, J. and L. Engelhardt (1977): Factors regulating the multiplication of Animal cells in culture. *Exp. Cell Res.*, **107**: 159-167.

- Hayashi, M., Y. Ojima and N. Asano (1976): A cell line from teleost fish: establishment and cytogenetical characterization of the cells. *Jap. J. Genetics*, 51(1): 65-68.
- Holley, R. W. (1979): Control of growth of kidney epithelial cells in serum-free medium supplemented with hormones. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 75(2): 901-904.
- Hutchings, S.E. and G.H. Sato (1978): Growth and maintenance of hela cells in serum-free medium supplemented with hormones. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 75(2): 901-904.
- Lacy, M. L. and G. H. Bridgmon (1962): Potato-dextrose agar prepared from dehydrated mashed potatoes. *Phytopathology*, 52(1-6): 173.
- Lee, M.L. and P.C. Loh (1975): Some properties of an established fish cell line from marine fish, *Caranx mate* (Omrka). *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 150: 40-48.
- Lehninger, A.L. (1982): Principles of biochemistry (3rd ed.) worth publishers, Inc., New York.
- Li, M.F. and C. Jordan (1969): Factors affecting rainbow trout ovary cells cultivated in vitro. *J. Fish Res. Board Can.*, 26: 461-463.
- Lojda, Z., G. Gossran and T.H. Schiebler (1979): Enzyne histochemistry. Springer-Verlag Berlin Heideberg New York.
- Middlebrooks, B.L., D.L. Stout, R.D. Ellender and S. Safford (1981): Fish cell line: Two new cell lines derived from explants of trunk musculature of *Cynoscion arenarius*. *In Vitro*, 17(5): 427-430.
- Nicolson, B. L. and C. Byrne (1973): An established cell line from the atlantic salmon (*Salmon salar*). *J. Fish. Res. Board Can.*, 30: 913-916.
- Nishimura, T., M. Toba, F. Ban, N. Okamoto and T. Sano (1981): Eel rhabdovirus, EVA, EVEX and their infectivity to fishes. *Fish Pathology*, 15(3/4): 173-184.
- Noga, E. J. and J. X. Hartmann (1981): Establishment of walking catfish (*Clarias batrachus*) cell lines and development of a channel catfish (*Ictalurus punctatus*) virus vaccine. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 38: 925-930.
- Paul, J. (1975): Cell and tissue culture (5th ed.). Churchill livingstone edinburgh london.
- Pegrum, S.M. (1982): Contact relationships between chick embryo cells growing in monolayer culture after infection with rous sarcoma virus. *Exp. Cell Res.*, 138: 147-157.
- Pfitzner, I. (1965): Cell and tissue culture of fresh water fish in virus research. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 126(1/2): 547-554.
- Pilcher, K. S. and J.L. Fryer (1980): The viral diseases of fish: A review through 1978. part 1: Disease of Proven Viral Etiology. 287-363.
- Plumb, J. A., P.R. Bowser, J.M. Grizzle and A.J. Mitchell (1979): Fish viruses: A double-stranded RNA icosahedral virus from a North American cyprinid. *J. Fish. Res. Board Can.*, 36: 1390-1394.
- Porter, K.R., V. Fonte and G. Weiss (1974): A scanning microscope study of the topography of hela cells. *Cancer Res.*, 34: 1385-1394.

- Porter, K. R., D. Prescott and J. Frye (1973): Changes in surface morphology of chinese hamster ovary cells during the cell Cycle. *J. cell Biol.*, **57**: 815-836.
- Rajaraman, R., D. E. Rounds, S. P. S. Yen and A. Rembaum (1974): A scanning electron microscope study of cell adhesion and spreading in vitro. *Exp. Cell Res.*, **88**: 327-339.
- Ribeiro, L. and W. Ahne (1982): Fish cell culture: Initiation of a line of pituitary cells from carp (*Cyprinus carpio*) to study the release of gonadotropin in vitro. *In Vitro*, **18**(5): 419-420.
- Rio, G. J., F. J. Magnavita, J. A. Rubin and Wm H. Beckert (1973): Characteristics of an established goldfish *Carassius auratus* (L.) cell line. *J. Fish Biol.*, **5**: 315-321.
- Sack, G. H., S. Jr and C. Obie (1981): Human cell transformation by simian virus 40. *Exp. Cell Res.*, **134**: 425-432.
- Serrero, G. R., D. B. McClure and G. H. Sato (1979): Growth of mouse 3T3 fibroblasts in serum-free, hormone-supplemented Media. *Hormones and cell culture.* (Sato, G. H. and R. Ross ed.) Cold Spring Harbor Conference on Cell Proliferation. Book B, 523-530.
- Ueno, Y. (1982): Studies of virus isolated from japanese eel (*Anguilla japonica*) with nephroblastoma. Master Thesis, Taiwan Univ.
- Watanabe, T., N. Kobayashi, Y. Sato and Y. Ishizaki (1978): Continuous Cell line derived from the kidney of yamame, *Oncorhynchus masu*. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, **44**(5): 415-418.
- Watanabe, T., M. Sano, Y. Ishida, Y. Mizusawa and M. Michikawa (1980): Establishment and properties of the continuous cell line derived from the Embryonated eggs of chum salmon, *Oncorhynchus keta*. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, **46**(10): 1203-1209.
- Wolf, K. and C. E. Dunbar (1957): Cultivation of adult teleost tissues in vitro. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **95**: 455-458.
- Wolf, K. and J. A. Mann (1980): Poikilothermic vertebrate cell lines and viruses: A current listing for fishes. *In Vitro*, **16**(2): 168-179.
- Wolf, K. and M. C. Quimby (1962): Established eurythermic line of fish cells in vitro. *Sci.*, **135**: 1065-1066.