

# 花身鷄魚 (*Therapon jarbua* FORSKÅL) 鰭細胞株及其特性研究

## A Cell Line from Jarbua (*Therapon jarbua* FORSKÅL) Fin

溫秋明 · 陳秀男 · 郭光雄

Chiou Ming Wen, Shiu Nan Chen and Guang Hsiung Kou

### Abstract

A continuous cell-line was established from the pectoral fin of a jarbua, *Therapon jarbua* FORSKÅL. The cell, designated JF, have been passed for 90 times during 9 months in Leibovitz's L-15 plus 10% foetal bovine serum under a temperature of  $28 \pm 1^\circ\text{C}$ . The cell line consists of fibroblastic cells with dipolar or polypolar. Chromosome analysis indicates the cells are heteroploid and show a modal numbers of 48. A low plating efficiency of approximately 1.7% was recorded for JF cell at  $28 \pm 1^\circ\text{C}$ . The temperature ranged from 18 to  $37^\circ\text{C}$ , the pH from 6 to 8 or the osmolarity from 200 to 600 mmol/kg could support the growth of JF cell line.

JF cells were also demonstrated to be susceptible to Infectious Pancreas Necrosis Virus (IPNV) AB, Sp, VR-299 serotypes and Chum Salmon Virus (CSV).

### 緒 言

從 WOLF (1962) 建立出第一個由虹鱒來源的細胞株 RTG-2 後，魚類細胞株陸續相繼建立，而至今約有一百個細胞株 (王, 1985; Bowser & Plumb, 1980a; Chen *et al.*, 1983; Chen & Kou, 1981; Chen *et al.*, 1982; Fryer *et al.*, 1980; Nicholson *et al.*, 1987; Noga & Hartman, 1977; Watanabe *et al.*, 1980; Wolf & Mann, 1980)。在臺灣據 Chen 和 Kou (1987) 的報告，已建立了 14 種不同來源的細胞株。這些細胞株廣泛的應用在魚類病毒的研究上 (Bowser & Plumb, 1980b; Hedrick *et al.*, 1984; Kimyra *et al.*, 1981; Pfitzner, 1965; Winton *et al.*, 1987; Winton *et al.*, 1981; Winton *et al.*, 1985; Wolf & Quimby, 1965; Wolf & Mann, 1980)；毒物學及污染生物學上 (周, 1988; 徐, 1989; Wang & Yew, 1987) 以及細胞遺傳學研究上 (Chen & Yew, 1988; Hayushi *et al.*, 1976)。

魚類細胞株除了用來研究魚類的病毒外，還被用來分離研究海產無脊椎動物的病毒，如 Hill (1976) 利用 BF-2 (bluegill fry) 細胞株自櫻蛤 (*Tellina tenuis*) 的消化腺，Hong (1984) 利用吳郭魚來源的細胞株 TO-2 自文蛤的鰓；分別分離出屬於二段核酸病毒 (Birnavirus) 的 TV 及 CV。Meyers (1979) 也利用 BF-2 細胞從美國牡蠣 (*Crassostrea virginica*) 的幼苗中分離出 reo-like virus，而 Nagbayashi 和 Mori (1983) 也利用魚類細胞株，從日本牡蠣 (*Crassostrea gigas*) 分

離出 reo-like virus (JOV-1)。隨後這些病毒的物理及生化等特性的研究也都是利用魚類細胞株。雖然說病毒的研究以原寄主的細胞來增殖研究最為適當，但由於水產無脊椎動物的細胞株不易建立，目前只有一淡水蝸牛的細胞株 (Hansen, 1974)，因此想要用水產無脊椎動物的細胞增殖研究水產無脊椎動物的病毒幾不可能。退而求其次，魚類細胞株是目前研究水產無脊椎動物病毒最實際最利便的工具。

雖然目前已有許多細胞株；但來自溫水海產魚類的只有少數。本實驗的目的即在建立一溫水海產魚的細胞株，研究其各種生物特性，作為此細胞株在各種應用上的參考。

## 材 料 與 方 法

### 初級培養 (primary culture)

將長約 15 公分的花身鷄魚 (*Therapon jarbur*; FORSKÅL) 擊昏後，用酒精棉擦拭消毒體表，剪下胸鱗，用含 Streptomycin 200  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ，Penicillin 200 IU/ml 的磷酸緩沖鹽液洗三次後剪碎，再同樣地洗三次後倒入 25  $\text{cm}^2$  的培養瓶，用量管吸乾洗滌液後加入 2 ml 含胎牛血清 (FBS, Foetal Bovine Serum; GIBCO) 20%、Streptomycin 100 IU/ml、Penicillin 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  的 Leibovitz's L-15 (HAZLETON) 生長培養基後放入 28°C 恆溫箱中。此後每天觀察細胞生長的情形，在第三天添加培養基至 5 ml。

### 繼代培養 (subculture)

當細胞長成單層後可進行繼代培養，將欲繼代培養的培養瓶取出倒掉舊培養基，用磷酸緩沖鹽液 (PBS) 洗二次後再用含 0.05% Trypsin-EDTA 的 PBS 洗一次，加入些許的 Trypsin-EDTA 溶液。靜置 1~3 分後，輕輕拍打，細胞打散後加入新的含 10% FBS 的培養基。第一次繼代以 1→1 方式，第二次以後則以 1→2 方式分裝成二瓶，放至 28°C 恆溫箱中培養。

### 粒線體及內質網螢光染色

將細胞接種至內含 18×18  $\text{mm}^2$  蓋玻片的 6 孔培養盤中，次日取出蓋玻片按 Johnson 等 (1981) 的方法用 0.25% 的 glutaraldehyde 固定 2~3 分鐘，再用 2.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  DiOC<sub>6</sub>(3) (3,3-Dihexyloxycarbocyanine Iodide; SIGMA) 染色 30 秒，用 PBS 洗後甘油包埋，用 UV 以 BG-12 濾片暗視野下觀察螢光。

### 掃描式電子顯微鏡技術

將細胞接種在 10×10  $\text{mm}^2$  的蓋玻片上，次日用 2.5% 的 glutaraldehyde 固定 30 分鐘後再用 1% OsO<sub>4</sub> 固定 30 分鐘，經連續脫水，臨界點乾燥 (Critical Point Dry)，鍍金 (Gold Coating) 後用掃描式電子顯微鏡 (HITACHI S-520) 觀察。

### 穿透式電子顯微鏡技術

將培養在 25  $\text{cm}^2$  培養瓶的細胞用橡皮刮刀 (rubber policeman) 刮下後在 4°C 離心 1,000 rpm 10 分鐘，倒掉上清液並加入 2.5% glutaraldehyde 固定一小時，再用 1% OsO<sub>4</sub> 固定一小時，經連續脫水後，再經丙酮兩次，以 spurr resin 逐漸取代後以超微切片機 (Lkb-2088) 切片。經醋酸鉍 (Uranyl Acetate) 染色 20 分及檸檬酸 (Lead Citrate) 染色 4 分鐘後，用穿透式電子顯微鏡 (HITACHI H-600) 在 75 KV 下觀察照像。

### 染色體分析

將指數期的細胞加入 colcemid 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  處理 4 小時，把細胞用胰蛋白酶解離下來後連同舊的培養基一同以 1,000 rpm, 4°C 離心 10 分鐘，倒掉上澄液，拍散細胞，加入低張液 (0.04 MKCl) 放至

37°C 的恒溫箱，30 分鐘後加入等量的 Carnoy's 固定液固定 15 分鐘，離心再加入新鮮固定液固定，反覆固定及離心三次後加入適量的新鮮固定液，搖勻以適當的高度滴在載玻片上，風乾後用 Giemsa 染色並包埋。在顯微鏡下計算 100 個細胞的染色體數目，照相並繪其分佈圖。

#### 生長曲線的測定

將培養在 28°C 及 20 代後即在 37°C 繼代培養的細胞以繼代培養的方式解離下來後，將細胞懸浮液倒入含有磁石的血清瓶中攪拌，用 Coulter counter 計算細胞數且並把細胞懸浮液稀釋到  $2 \times 10^4$  cells/ml 及  $2 \times 10^5$  cells/ml。以 1 ml/well 孔接種至 24 孔的培養盤中，每種濃度三盤。經 12 小時後每種濃度取 4 孔用 Coulter Multisizer 算細胞數目，以後每天算細胞數目，每隔四天換生長培養基。

#### 溫度對細胞生長的影響

將細胞以  $5 \times 10^5$  cells/ml-well 及  $2 \times 10^5$  cells/ml-well 接種至 24 孔的培養盤，在 28°C 培養一天後取出 4 孔算細胞數目平均後當起始值，將培養盤分別放在 37°C、28°C、24°C、18°C、8°C 五種溫度，依所定的時間每次每種溫度取出四孔用 Coulter Multisizer 算細胞數目及分析細胞大小的分佈。其間每四天換一次生長培養基。

#### 溫度對種植效率 (seeding efficiency) 的影響

細胞懸浮後以  $2 \times 10^5$  cells/ml-well 接種至 24 孔的培養盤並即放至各種溫度，37°C、28°C、24°C、18°C、8°C，每種溫度 2 盤。前 3 個小時每小時每種溫度取 4 孔計算已附著的細胞數目，之後每 2 個小時算一次。以原接種的細胞數目為 100% 視附著的細胞數目決定其百分比。

#### pH 對細胞生長的影響

將細胞懸浮液以  $2 \times 10^5$  cells/ml-well 及  $1 \times 10^5$  cells/ml-well 分別接種至 24 孔的培養盤放入 28°C 的恒溫箱隔天倒掉培養基，依次每行分別加入不同 pH 值 (pH 5.0, 6.0, 6.5, 7.5, 8.0, 9.0) 的生長培養基，放入 28°C 的恒溫箱中培養，依所定的時間每次取出一盤用 Coulter Multisizer 算各種 pH 值培養環境的細胞數目及分析細胞大小的分佈，每四天換一次生長培養基。

#### pH 對種植效率的影響

細胞懸浮後用 Coulter Multisize 算細胞數目，將定量的細胞懸浮液分裝至 50 ml 的離心管中用 1,000 rpm, 4°C 離心 5 分鐘，再分別加入不同 pH 值 (pH 5.0, 6.0, 6.5, 7.5, 8.0, 9.0) 的 10% 胎牛血清的生長培養基將細胞稀釋成  $2 \times 10^5$  cells/ml，每孔接種 1 ml，每種 pH 每盤種 4 孔，每盤均包含上述 6 種 pH，立即放入 28°C 的恒溫箱中，依所定時間取出一盤用 Coulter Multisizer 算各 pH 值下附著的細胞數目。

#### 血清對細胞增殖或種植效率的影響

做法同前改以不含血清、含 1%、5%、10%、20%、30% 胎牛血清的生長培養基進行。

#### 滲透壓對細胞生長或種植效率的影響

做法同前改以不同的滲透壓，200 mmol/kg、400 mmol/kg、450 mmol/kg、550 mmol/kg、650 mmol/kg、850 mmol/kg 含 10% 胎牛血清的培養基進行。

#### 細胞羣落形成率 (plating efficiency)

將細胞懸浮液用下列的培養基：含 10%、20%、30% 胎牛血清的生長培養基，10% 胎牛血清的培養基添加 20%、40%、60%、80% 用  $0.2 \mu\text{m}$  的濾膜過濾過的條件培養基及 100% 的條件培養基。稀釋成  $2 \times 10^2$  cells/ml 及  $4 \times 10^2$  cells/ml 以每瓶 5 ml 分別接種至 25 cm<sup>2</sup> 的培養瓶中，每種接種

8 瓶，對半分至 28°C 及 37°C 的恆溫箱中培養 7 天後換一次培養基並在第 15 天用 10% 的中性福馬林固定及 10% 的結晶紫染色，計算羣落的數目以及每個羣落所含的細胞數目。

#### 病毒感染受性

將各類病毒，包括傳染性胰臟壞死病毒 (Infectious Pancreas Necrosis Virus IPNV) AB 株 (丹麥)、SP 株 (丹麥) 及 VR-299 株及室鮭病毒 (Chun Salmon Virus, CSV; 由 WINTON 贈) 以原液用不含血清的培養基稀釋成  $10^{-1}$ 、 $10^{-2}$ 、 $10^{-3}$ 、 $10^{-4}$ 、 $10^{-5}$  的濃度分別接種至 24 孔培養皿的細胞，TO-2 細胞做對照組，次日起觀察 CPE 出現的情況連續 10 天。將出現 CPE 的最低濃度的病毒挑出同法重覆接種三次。

#### 病毒效價的測定

利用  $TCID_{50}$  (50% tissue culture infectious dose) 的方法將欲測定的溶液 (病毒液) 以 10 倍連續稀釋，0.1 ml/well 接種至事先接上細胞的 96 孔培養盤中，以 TO-2 細胞做對照組，18°C 恆溫箱中培養 10 天後用 Reed 和 Muench (1938) 的終點計算法計算病毒效價。

#### 細胞冷凍

細胞以繼代培養的方式解離後計算細胞數目，細胞懸浮液以 1,000 rpm 4°C，離心 5 分鐘，倒掉培養基，拍散細胞，用含 10% 甘油的生長培養稀釋成  $1 \times 10^7$  cells/ml，分裝至 2 ml 的冷凍小瓶中放入保溫盒。經 4°C 30 分鐘，-20°C 二小時，-70°C 過夜之後迅速移入液態氮中保存。

#### 細胞解凍及存活率

經冷凍保存的細胞在不同時間取出放入 28°C 水浴快速解凍，加入定量的培養基後取出 1 ml 加入等量的 1% 中性紅染色其餘分裝至 25 cm<sup>2</sup> 的培養瓶。同時放入 28°C 恆溫箱中。30 分鐘後取出染色的細胞用血球計數器 (haemocytometry) 計算活細胞數目，12 小時後取出在 25 cm<sup>2</sup> 培養瓶的細胞計算附著的細胞數目，比較細胞存活率及回收率。

#### 污染檢驗

細胞用不含抗生素的生長培養基繼代培養二天後，將此培養基取一部分加到 TSA 培養基上，28°C 培養一星期後觀察是否有菌產生。

同上把培養基加至 PDA 培養基上在 28°C 及 37°C 培養一星期觀察是否有菌落產生。

細胞懸浮液 2 ml 接種至直徑 35 mm 含 18×18 mm<sup>2</sup> 蓋玻片的培養皿中，隔天取出用冰的 Carnoy's 固定液固定後用 50 ng/ml Hoechst 33258 染色 10 分鐘，水洗後包埋，用螢光顯微鏡以 BG-12 濾鏡觀察。

細胞的培養液 (cultured fluid) 過濾後和 TO-2 細胞共同培養，觀察是否有 CPE 出現。

## 結 果

#### 永久細胞株

胸鰭的組織經培養一天後即有細胞游離出來，鰭細胞的生長速率在前 7 天較慢但 7 天後生長速率有顯著增加約第 10 天可形成密集單層。細胞的形態為雙極性或多極性纖維狀細胞並可見到色素細胞 (Fig. 1)。胸鰭來源的細胞則在第 14 天進行 1→1 繼代，細胞隔天又再度形成密集的單層，再以 1→2 的繼代持續至今已繼代了 90 次，一般以 2~4 天繼代一次。命名為 jarbua fin (JF) 細胞株。

經相差倒立顯微鏡的觀察顯示，JF 細胞株的細胞雙極性或多極性纖維狀細胞，當細胞長的很密時，纖維狀的細胞此時可呈非常具方向性的排列生長形成非常緻密的細胞層。H-E 染色的細胞，細胞

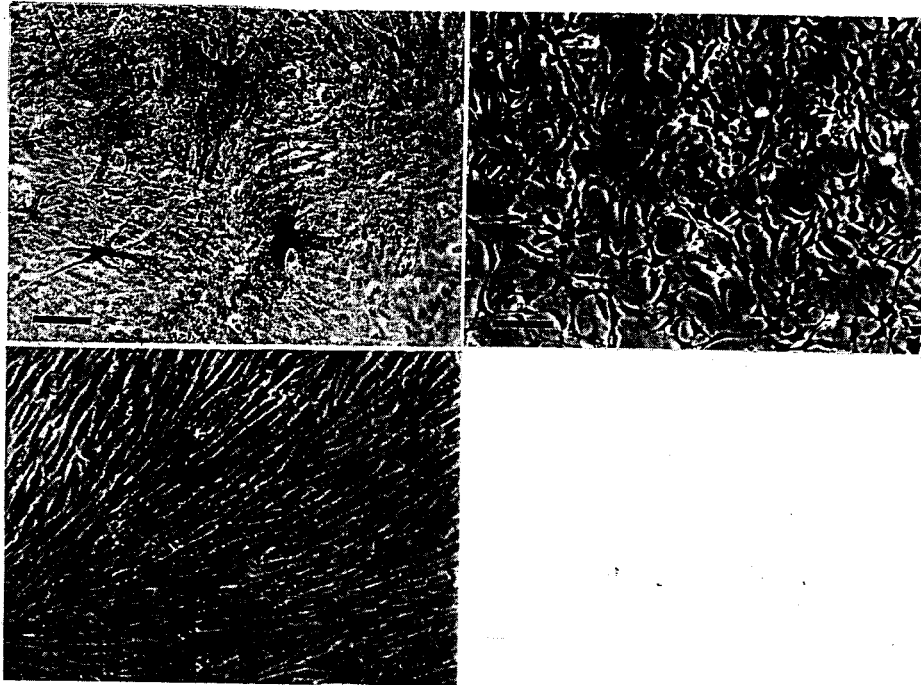


Fig. 1. Phase contrast micrographs of JF cells. (A) Primary culture. Note melanocytes (arrows). (B) Subconfluent monolayer. Note polypolar cells (arrows), dipolar cells (arrowheads). (C) Confluent monolayer. Note the arrange. Bar, 100  $\mu$ m.

核內有 3~8 個核仁，而其細胞質內沒有嗜鹼性的顆粒，細胞質被 Eosin 淡染，而進行分裂的細胞的細胞質有逐漸嗜鹼的現象，細胞漸漸變圓。在分裂期，細胞膜形成不規則的泡狀突起，而至分裂末期，兩個子細胞的外圍都變成泡突起 (Fig. 2)。經 DiOC<sub>6</sub>(3) 染色的細胞可見條狀長短不一的粒線體及網狀成扁平的內質網，粒線體的分佈在核週圍較密且偏向一側 (Fig. 3)。

掃描電子顯微鏡觀察細胞表面發現，細胞平貼在蓋玻片上表面光滑，細胞彼此間都可用絲狀或葉狀偽足相互連繫。當細胞進行分裂時，伸展的偽足以細胞核為中心逐漸斷裂，細胞厚度逐漸增加進行蹼化 (webbing) 作用。隨着偽足的減少，細胞漸漸變圓，細胞表面的小泡狀突起也逐漸增加，而小泡逐漸癒合成較大的突起 (Fig. 4)。穿透式電子顯微鏡觀察顯示，細胞核表面多褶皺，纖維板 (fibrous lamina) 明顯，內質網內含許多顆粒性的物質，顯示此細胞的代謝旺盛 (Fig. 5)。

#### 染色體數目的分佈

細胞所含染色體的數目從 12 條至 98 條都有，而含 48 條染色體的細胞個數最多 (Fig. 6, 7)。

#### 生長曲線

28°C 培養的細胞，無論在高密度 ( $1 \times 10^5/\text{cm}^2$ ) 或較低密 ( $1 \times 10^4/\text{cm}^2$ ) 其細胞增倍的天數約 3 天左右；而在 37°C 繼代的細胞在 28°C 培養時，細胞密度較低 ( $10^5$  cells/well) 以下時生長較好，倍增時間約 2 天左右為 28°C 時生長速率的 1.5 倍。28°C 培養的細胞其飽和的密度  $2.6 \times 10^6$  cells/cm<sup>2</sup>。而 37°C 培養的細胞則約為  $1.4 \times 10^6$  cells/cm<sup>2</sup> (Fig. 8)。

#### 溫度的影響

細胞密度較低 ( $1.5\text{--}4.0 \times 10^5$  cells/well) 時，培養在 37°C 比 28°C 的生長速率快。然而在較高濃度時 28°C 培養的要比 37°C 的生長速率快在 8°C 以下時細胞呈現負成長 (Fig. 9)。細胞的直徑不

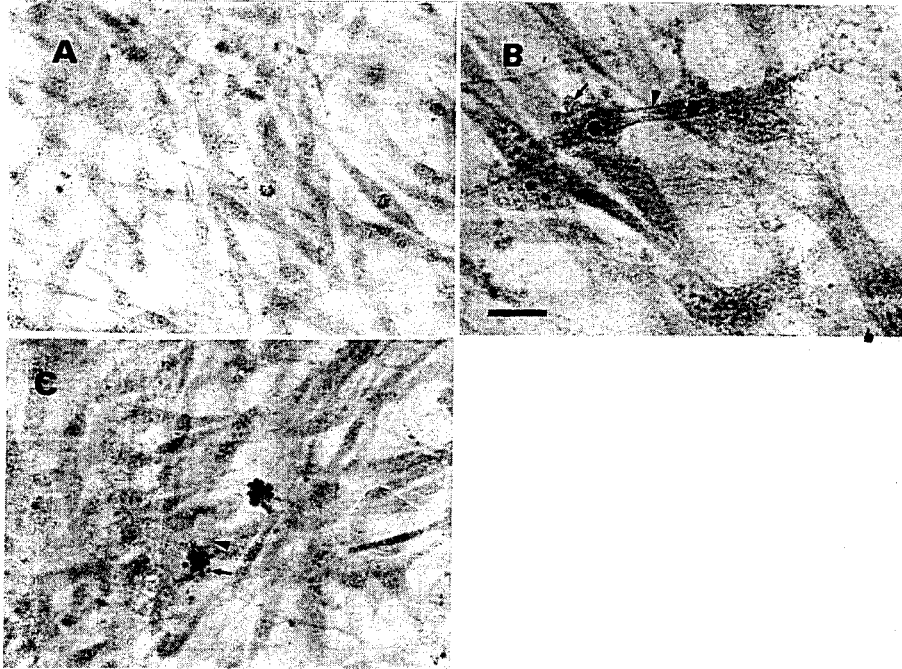


Fig. 2. H-E stain of JF cells. Note mitotic cells in different stages. (A) Cells in prometaphase. (B) Cleaving cell. Note bleb like process (arrow), fiber structure (arrowhead). (C) Note two daughter cells are round and their surface covered with many blebs (arrow). Fiber remains between the two daughter cells (arrowhead). Bar in A, C = 100  $\mu\text{m}$ ; B = 50  $\mu\text{m}$ .

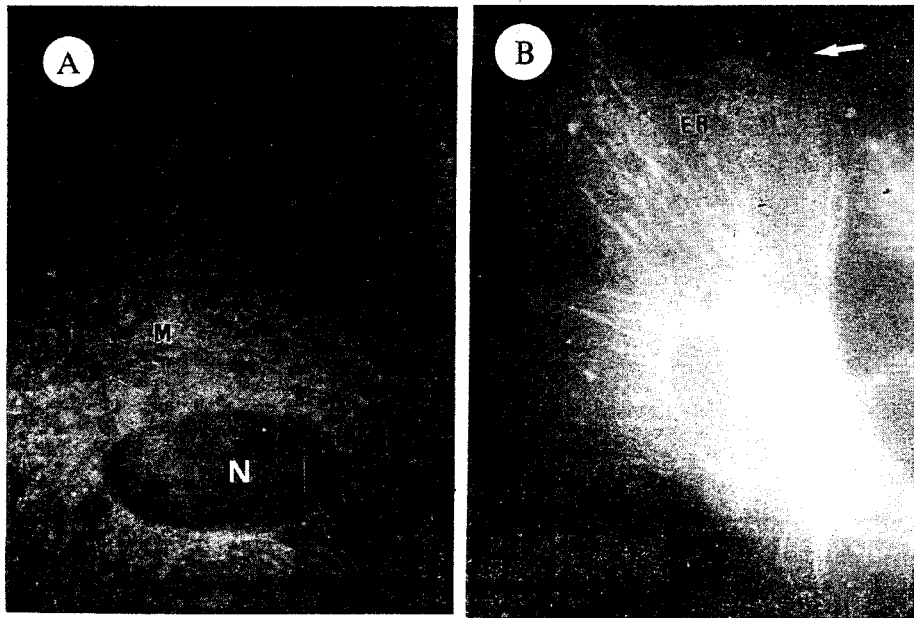


Fig. 3. Fluorescent micrographs. JF cells stained with DiOC<sub>6</sub>. (A) A number of tubular like mitochondria and cloudy endoplasmic reticulum. (A) Polar spread of mitochondria. M: mitochondria, N: Nucleus. (B) Well spread mitochondria and endoplasmic reticulum. Cytoplasmic membrane are hardly observed (arrow). Bar, 15  $\mu\text{m}$ .

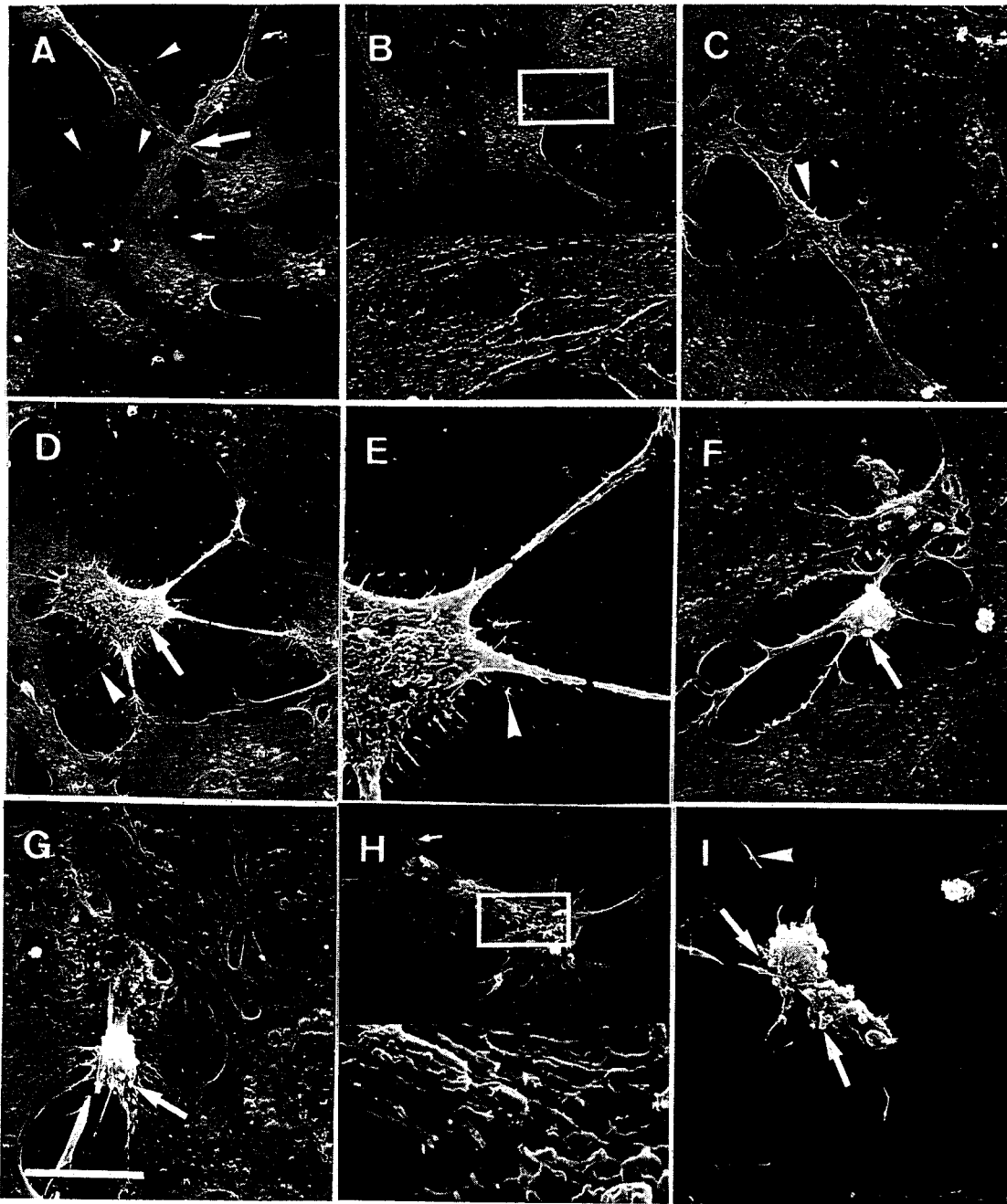


Fig. 4. Scanning electron micrographs of JF cells. (A) Highly asymmetric cells in form, many lamellipodia (small arrowhead) and filopodia (small arrow). Cell also showing cross over other cell (large arrow). (B) Tightly connection between cells. (C) Some filopodia break (arrowhead). (D) Focal contact fragments remain on substratum (arrowhead). Cell surface had many microvilli and some blebs (arrow). (E) Higher magnification of (D). (F) & (G) Cleaving cells cells showing with blebs (arrows). (H) Two cleavage daughter cells. Note cytoplasm webbing and long filopodia (arrow). (I) Note the blebs (arrows). Focal contact fragment remain on substratum (arrowhead). Bar in A=43  $\mu\text{m}$ ; D=20  $\mu\text{m}$ ; E=7.5  $\mu\text{m}$ ; F, G, H, I=15  $\mu\text{m}$ .

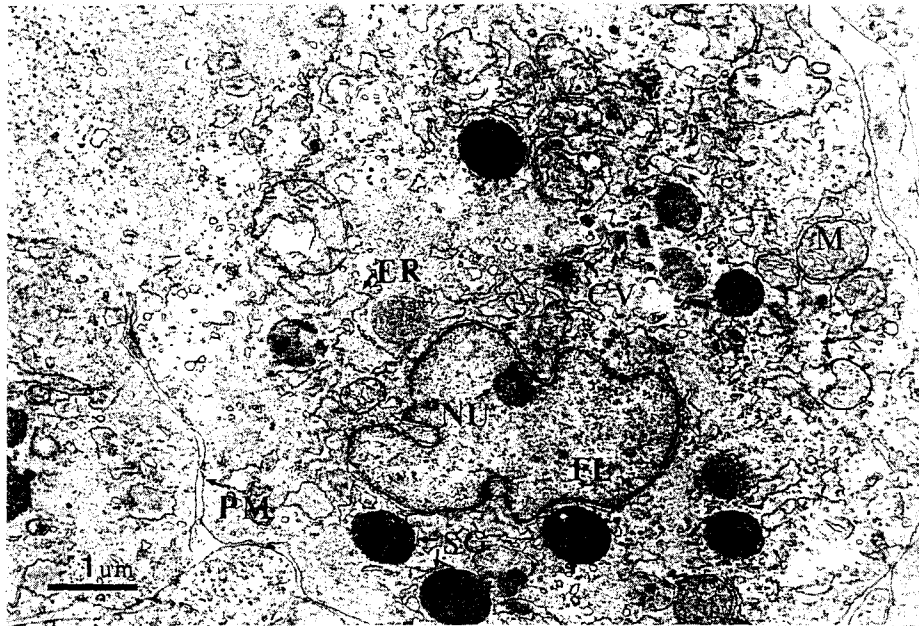


Fig. 5. Transmission electron micrograph of JF cells. Note the irregular nuclear. CV: condensing vacuole, ER: endoplasmic reticulum, FL: fibrous lamina, M: mitochondria, Nu: nucleolus, PM: plasma membrane, SG: secretory granules. CV: condensing vacuole.



Fig. 6. Metaphase chromosomes of JF cells. Bar, 9  $\mu$ m.

管溫度高 (37°C) 或低 (8°C) 其分佈均在 8~18  $\mu$ m 之間，但細胞的直徑在 28°C 的正常培養狀況或 28°C 以下時，其分佈尖峯約在 11  $\mu$ m 而 37°C 培養的細胞，細胞直徑的分佈尖峯增大 18% 為 13  $\mu$ m (Fig. 10)。細胞附著率在一小時內即達 50% 以上，且隨溫度增高而增加，7 小時後，37°C 培養的細胞可達 100%，28°C 培養的細胞在 11 小時後也將近 100%，而 24°C 及 20°C 培養的細胞則約在 80% 左右，8°C 培養的細胞僅達 62% (Fig. 11)。



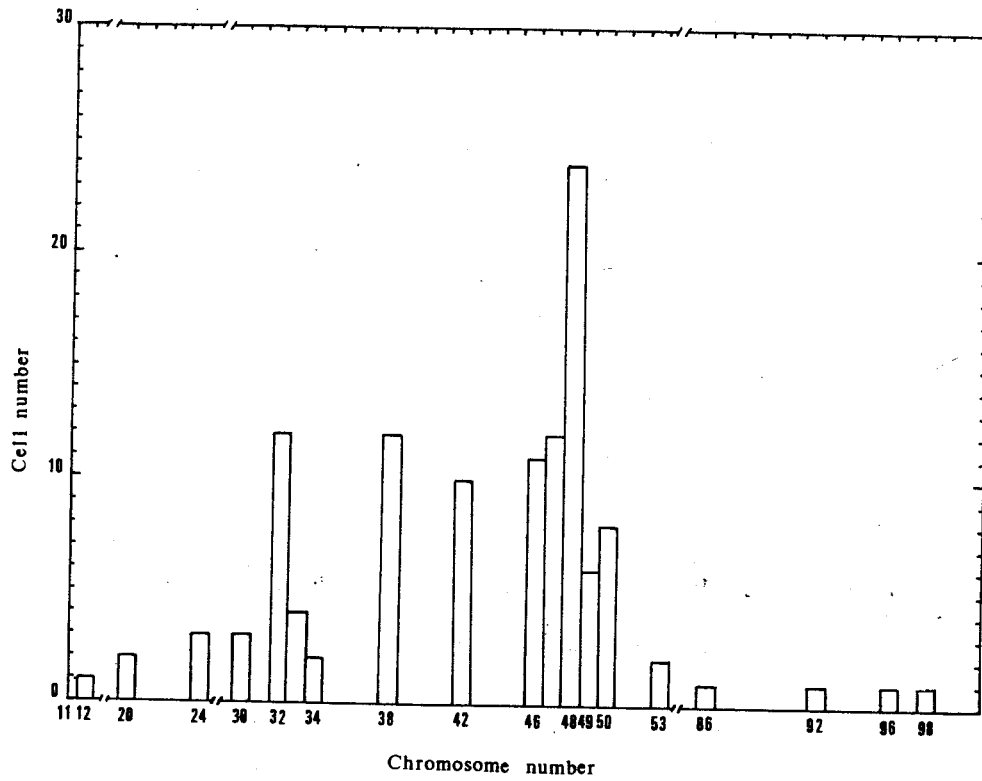


Fig. 7. Distribution of chromosome number of JF cells at 32 subculture.

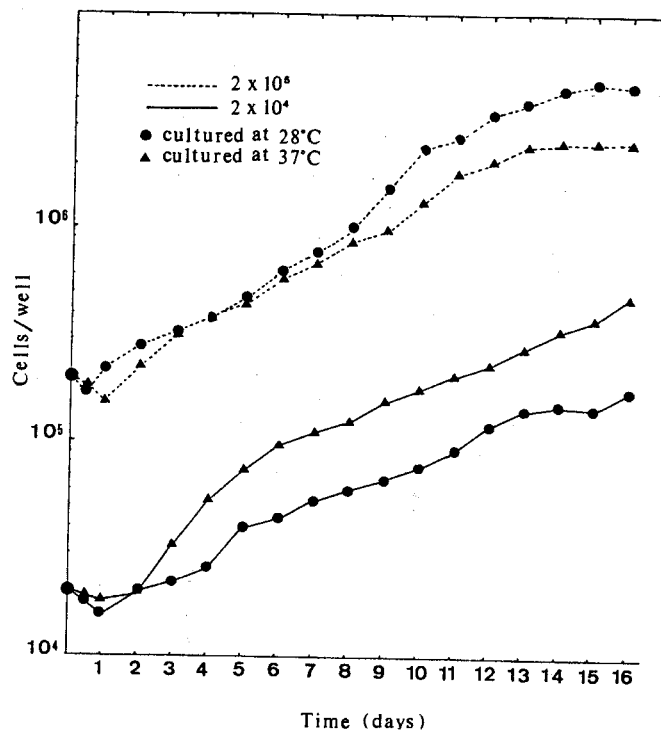


Fig. 8. Growth curve of JF cells subcultured at 28°C and 37°C. The cells were inoculated in 24-well plates at initial seeding number of  $2 \times 10^4$ ,  $2 \times 10^5$  cells per well and incubated at 28°C.

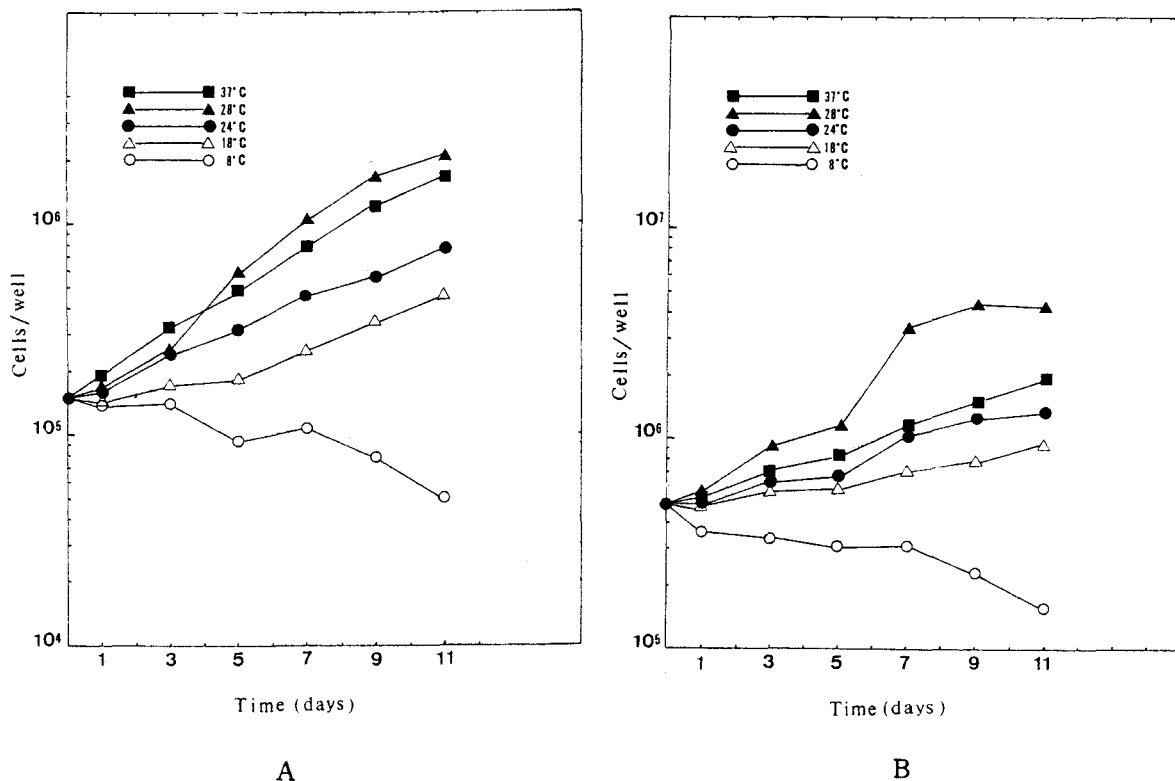


Fig. 9. Growth curve of JF cell at different temperature. The cell were inoculated in 24-well plates. (A) Initial seeding no. of  $2 \times 10^5$  cells per well. (B) Initial seeding no. of  $5 \times 10^5$  cells per well.

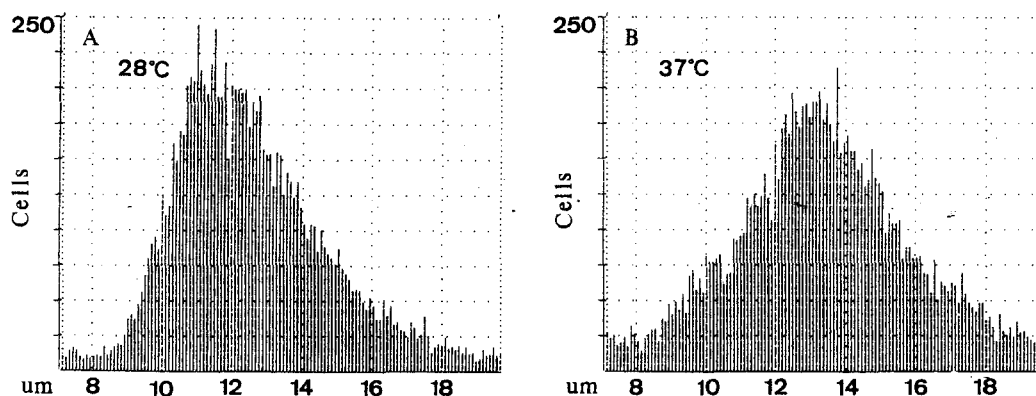


Fig. 10. Distribution of cell diameter of JF cells. (A) Cultured at 28°C. (B) Cultured at 37°C.

### pH 值的影響

對於細胞的生長，pH 值在 6~8 影響不很大，而 pH 值小於 5 或高於 9 時，細胞不能生長甚至呈現負成長，細胞密度較高時對低 pH 值的環境較有耐性 (Fig 12)。而且細胞在酸性環境中；其細胞大小的分佈有隨 pH 值下降而往左移的現象，但其範圍並不大。至 pH 5 時才下降約  $0.5 \mu\text{m}$ 。在鹼性環境中，細胞大小的分佈則隨 pH 值的增加而往右移，其差異範圍遠較酸性環境大，在 pH 值 9 時約比在 pH 7.5 之細胞大  $5 \mu\text{m}$  (Fig. 13)。環境過酸或過鹼也會降低細胞附著的能力，尤其在

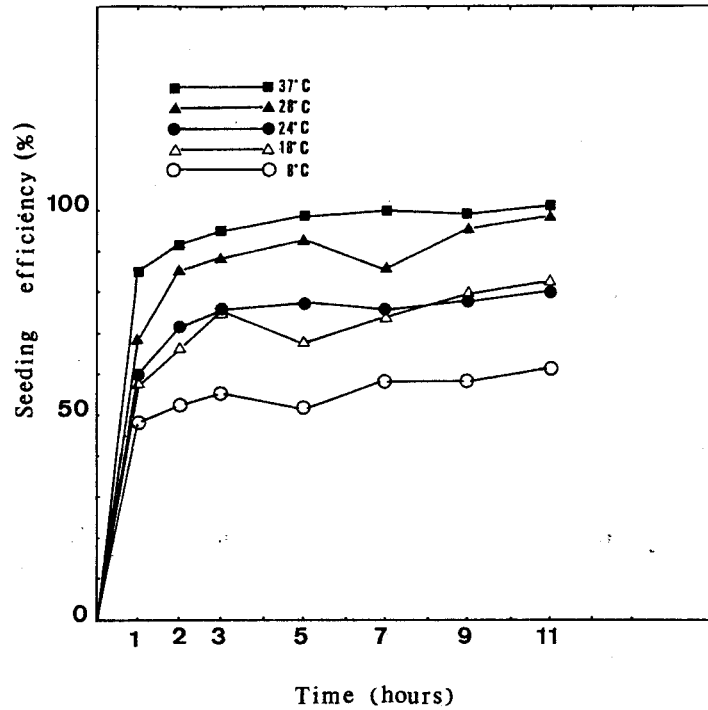


Fig. 11. Seeding efficiency of JF cells at different temperature. The cells were inoculated in 24-well plates at an initial seeding number of  $2 \times 10^5$  cells per well.

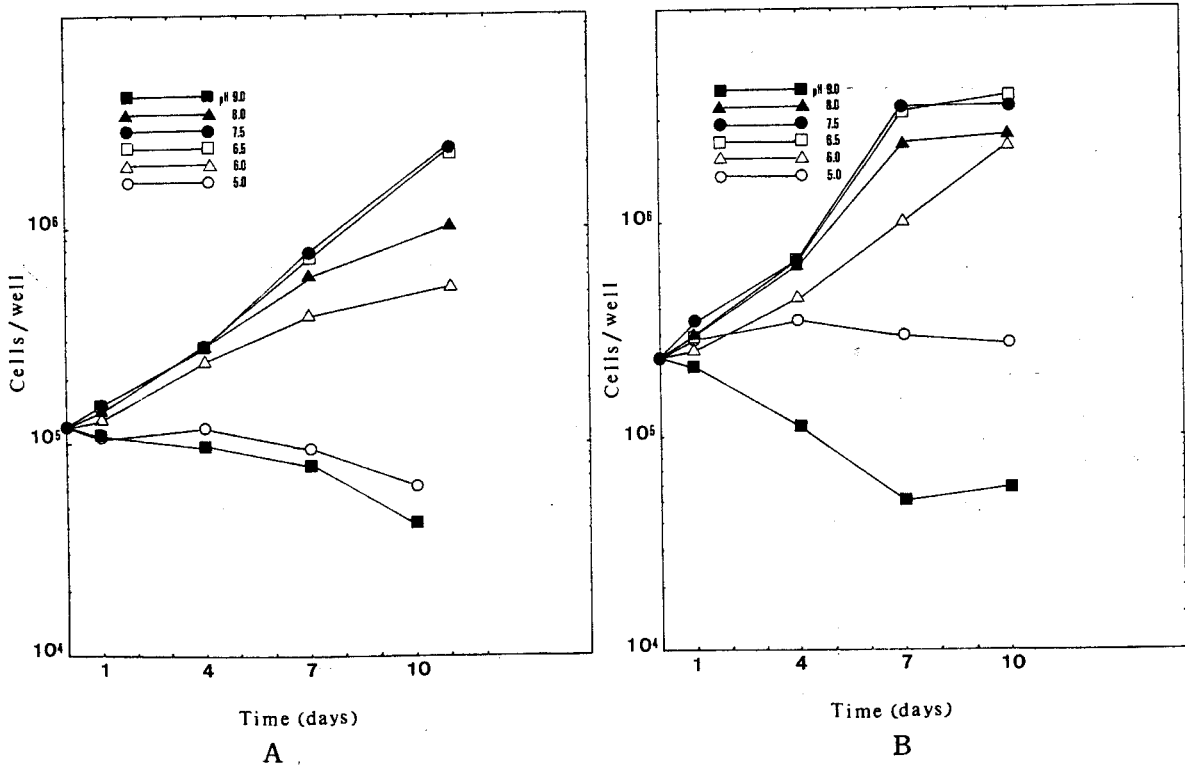


Fig. 12. Growth curve of JF cells at different pH. The cells were cultured in 24 well plates. (A) An initial seeding number of  $1 \times 10^5$  cells per well. (B) An initial seeding number of  $2 \times 10^5$  cells per well.

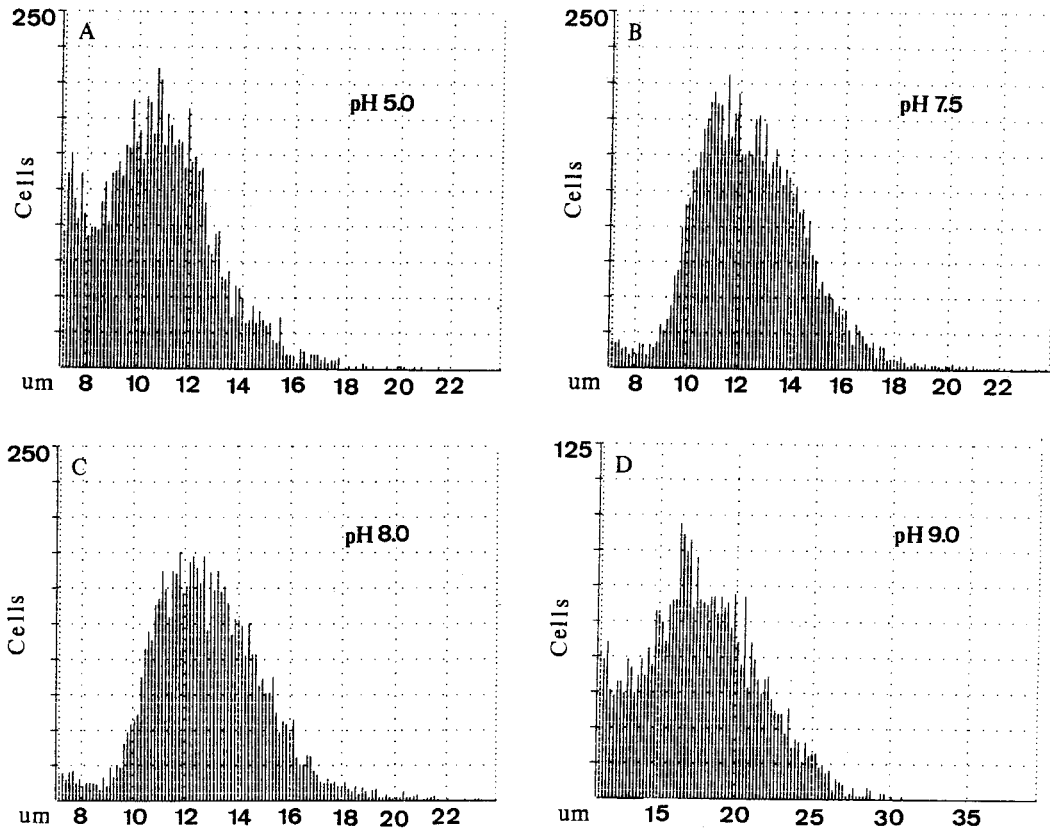


Fig. 13. Distribution of cell diameter of JF cells cultured in different pH at 7 days. (A) pH 5.0. (B) pH 7.5. (C) pH 8.0. (D) pH 9.0.

pH 9 時，細胞只能有 50% 的附著率 (Fig. 14)。就整體來說，此細胞株對環境中酸鹼值的改變忍受力很強，而對酸性環境的忍受力比鹼性來得強。將培養在 pH 9 或 pH 5 的生長培養基培養的細胞取出以 DiOC<sub>6</sub> (3) 染色時發現，細胞的粒線體及內質網均已瓦解 (Fig. 15)。

#### 血清濃度的影響

細胞生長的速率隨血清濃度增加而增加，血清濃度和細胞的生長速率並無顯著的比例關係，細胞密度無論高或低對血清的需求度都相同 (Fig. 16)。細胞的附著率在一小時以 10% 的血清最好 (81%) 而 20% 及 30% 血清培養的細胞僅有 54%，但至 3 小時後 10% 及 30% 血清培養的細胞均達 100%，而 7 小時後細胞的附著率隨血清濃度增加而增加 (Fig. 17)。血清濃度的高低對細胞大小並沒有顯著影響。

#### 滲透壓的影響

細胞對不同滲透壓的生長速率約可分為 450~550 mmol/kg; 650, 200 mmol/kg; 850 mmol/kg 三區。滲透壓在 550 mmol/kg 以下時，在培養一天內生長速率隨滲透壓降低而降低，培養 11 天後以 450 mmol/kg 生長速率最快。在 850 mmol/kg 的培養的細胞培養一天後細胞數目急速下降，顯示細胞在環境下所受的衝擊很大，而且細胞的密度較高死亡率也較大 (Fig. 18)。但滲透壓對細胞大小並沒有顯著的影響，細胞附著率在 650 mmol/kg 以下時隨滲透壓增加而增加，滲透壓在 650 mmol/kg 的生長培養基培養的細胞 5 小時後附著率即達 100%，而在 550 mmol/kg 的培養基培養的細胞，在 7 小時後附著率也達 100%，但在滲透壓 850 mmol/kg 的培養基培養的細胞其附著率在 7 小時後僅達 48% (Fig. 19)，顯示滲透壓在短時間內就對細胞造成影響。在滲透壓 200 mmol/kg 環境培養

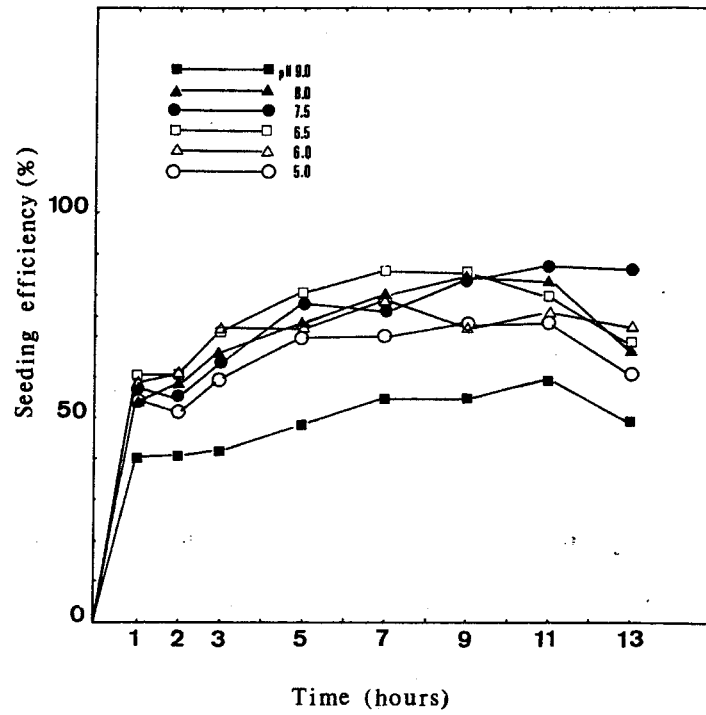


Fig. 14. Seeding efficiency of JF cells at different pH. The cells were inoculated in 24-well plates at initial seeding number of  $2 \times 10^5$  cells per well.

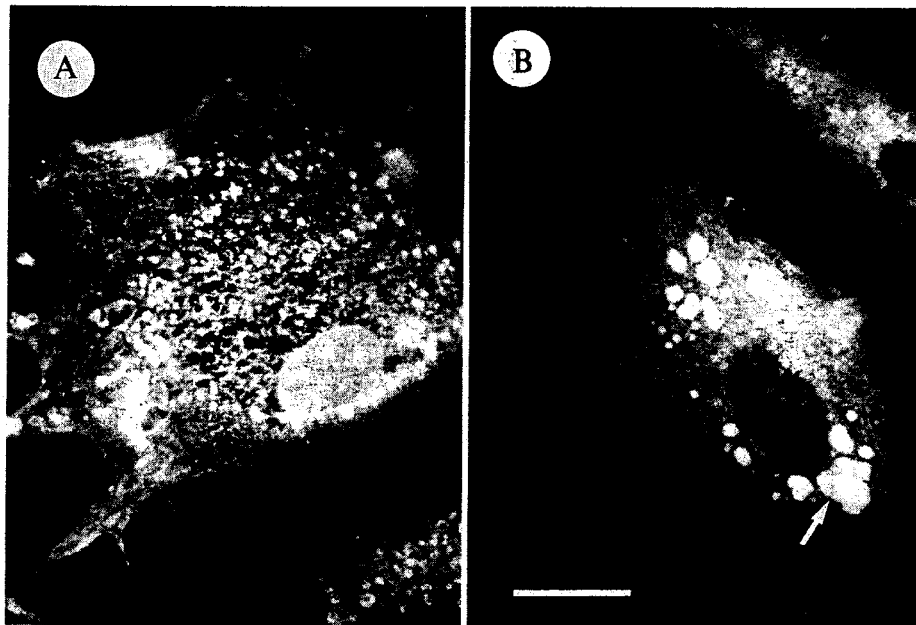
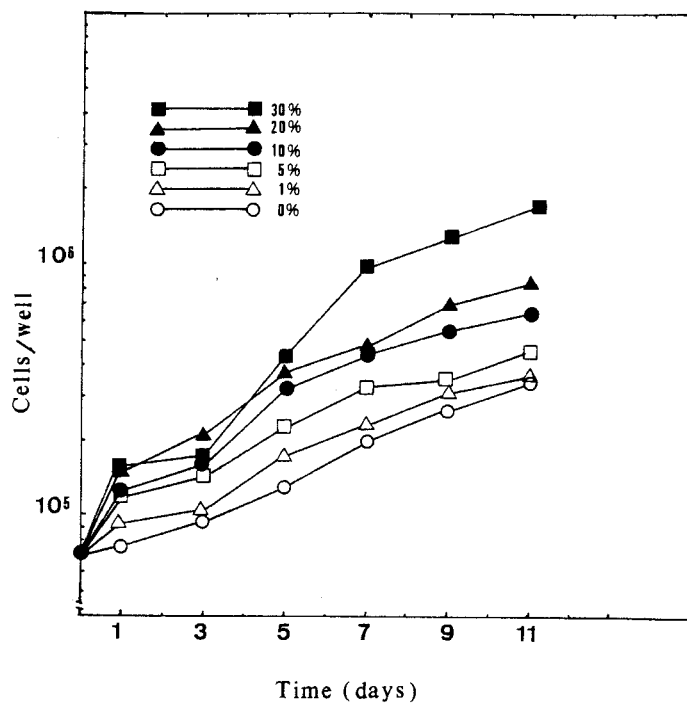
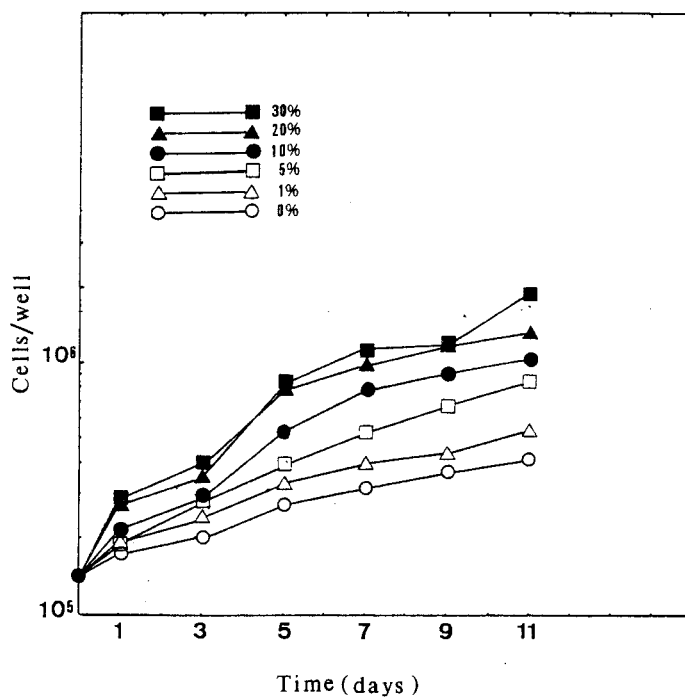


Fig. 15. Fluorescent micrographs of high or low pH damages of JF cells. Cells were treated with pH 5 or pH 9 growth medium and stain with  $\text{DIOC}_6(3)$ . (A) pH 5, 5h. Granular mitochondria, Borken ER. (B) pH 9, 30 h. High membrane potential inclusion body (arrow). Bar,  $15 \mu\text{m}$ .



A



B

Fig. 16. Growth curve of JF cells at different FBS concentration. The cells were inoculated in 24-well plates. (A) An initial seeding number  $1 \times 10^5$  cells per well. (B) An initial seeding number  $2 \times 10^5$  cells per well.

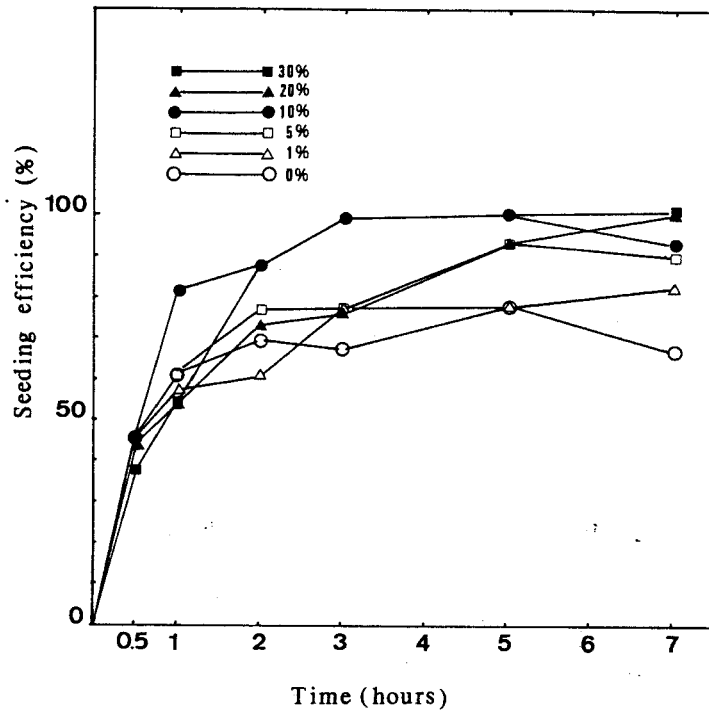


Fig. 17. Seeding efficiency of JF cells at different FBS concentration. The cells were inoculated in 24-well plate at initial seeding number of  $2 \times 10^5$  cells per well.

的細胞經 DiOC<sub>6</sub>(3) 染色後發現，細胞內具有許多空泡，粒線體及內質網的分佈均受侷限；850 mmol/kg 環境下粒線體成球狀，內質網也瓦解 (Fig. 20)。

#### 細胞羣落形成率

細胞在各種條件下的羣落形成率以 100% 條件培養基 28°C 培養下細胞羣落最多，但最高也只達 1.7% 其它條件下羣落的形成率甚至低於 1% 或根本無法形成羣落。

#### 病毒的感受性

細胞對二段核酸病毒 (birnavirus) 的 IPNV (AB 株, SP 株, VR-299 株) 和具十一段核酸病毒的 CSV 都有感受性，且會出現明顯的病變。二段核酸病毒每 300 萬個細胞平均可產生具有感染力的毒病約  $10^{9.1} - 10^{9.6}$  TCID<sub>50</sub> (420-1327 TCID<sub>50</sub>/cell)，而 CSV 約  $10^{7.4}$  TCID<sub>50</sub> (9 TCID<sub>50</sub>/cell)。

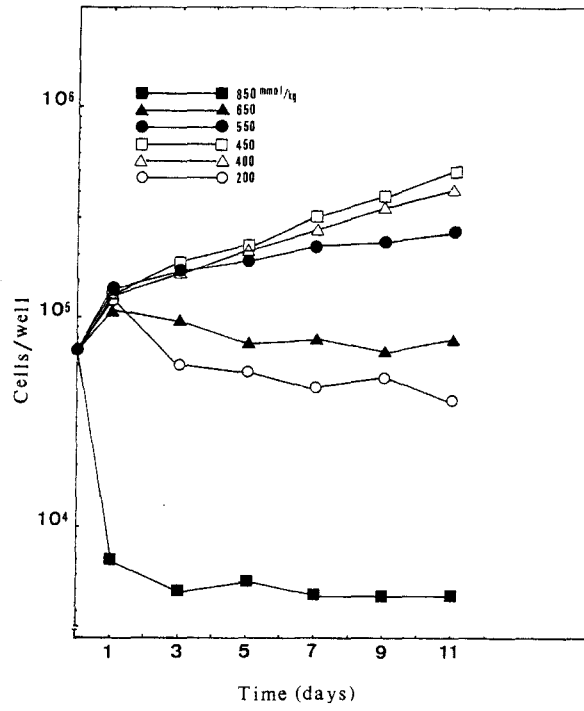
#### 細胞保存

繼代 15 次的細胞保存 8 個月後仍有 95% 以上的存活率，存活的細胞也有 85% 以上的回收率。

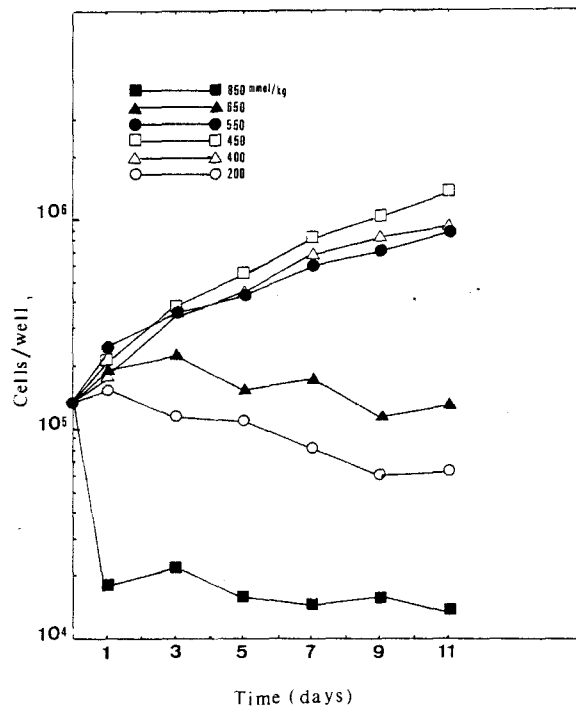
經 TSA 培養基及 PDA 培養基培養 cultured fluid 並未發現有細菌或黴菌的菌落產生，而 Hoechst 染色並未發現有額外的螢光，cultured fluid 培養 TO-2 細胞也未出現 CPE，顯示 JF 細胞並未受到細菌、黴菌、黴漿菌或病毒的感染。

## 討 論

本實驗利用 L-15 培養基培養溫水海產魚的細胞，結果和 MEM 培養基一樣也可以建立出細胞株，顯示 L-15 培養基不僅可用來培養淡水魚細胞。JF 細胞株為停泊依賴性和王 (1985) 建立的大肚魚尾



A



B

Fig. 18. Growth curve of JF cells at different osmolarity. The cells were culture in 24-well plate. (A) An initial seeding number of  $1 \times 10^5$  cells per well. (B) An initial seeding number of  $2 \times 10^5$  cells per well.



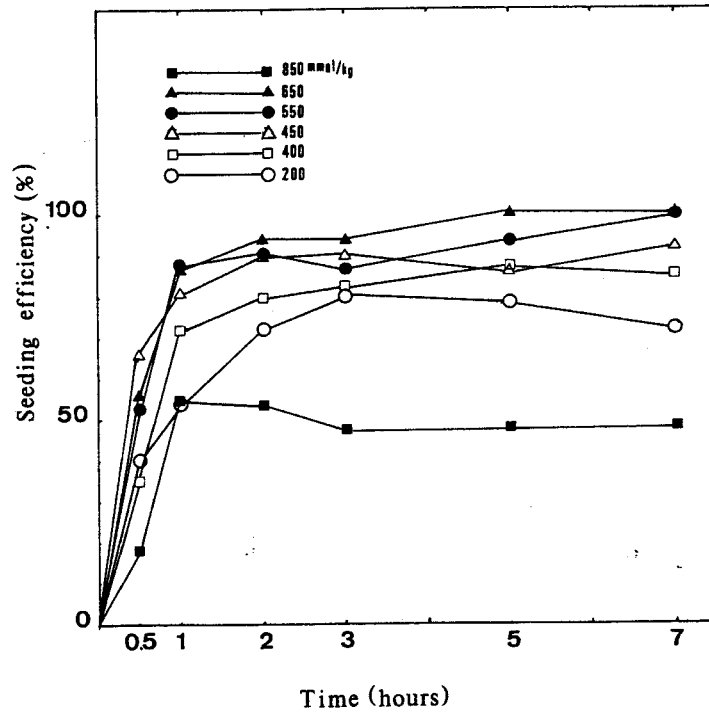


Fig. 19. Seeding efficiency of JF cells at different osmolarity. The cells were inoculated in 24-well plates at initial seeding number of  $2 \times 10^5$  cells per well.

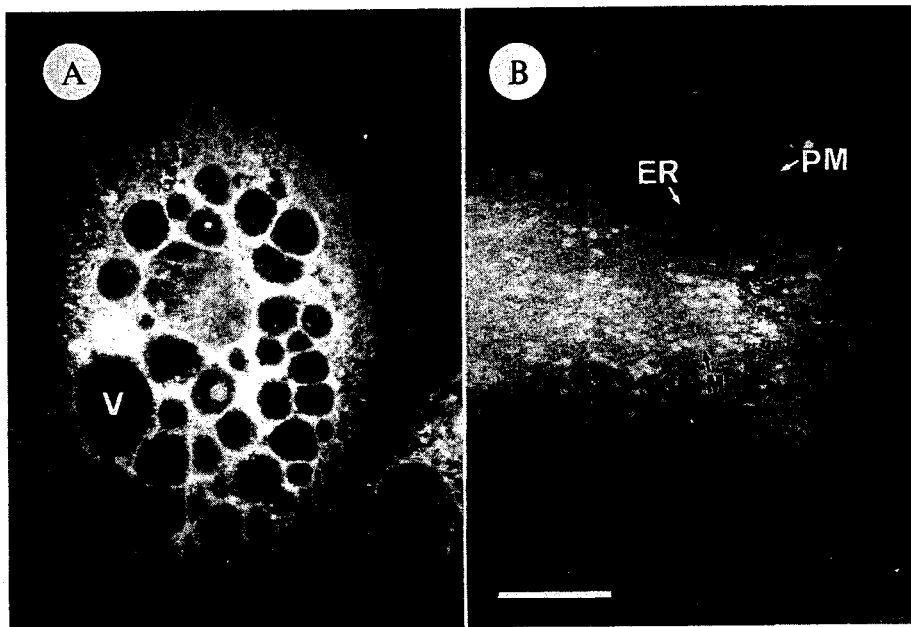


Fig. 20. Fluorescent micrographs of high or low osmolarity damages of JF cell. Cells were treated with 850 or 200 mmol/kg growth medium at 28°C (A) 200 mmol/kg growth medium, 24 h. Cells vacuolization. V=vacuole. (B) 850 mmol/kg growth medium, 2 h. Endoplasmic reticulum are broken & mitochondria are roundness. ER: endoplasmic reticulum. M: mitochondria. Bar, 15  $\mu$ m.

鰭來源細胞株 (TM) 類似但細胞在 SEM 下的形態及鋪展面積 (能力) 却有很大的差距。TM 細胞在 SEM 下的形態和 Chen 等 (1986) 建立的鯉魚尾鰭細胞株 (CF-1) 類似，細胞表面有許多微絨毛且細胞在基質上的伸展範圍小、片狀胞質少，鋪展能力較弱，細胞與細胞間沒有緊密接觸和弱變性的細胞 BHK (baby hamster kidney) 細胞相差不遠 (Boyde *et al.*, 1972)。但 JF 細胞在 SEM 下細胞扁平地鋪展在基質上且表面平滑，細胞與細胞可形成緊密的接觸 (Fig. 5)。此現象和 Porter (1973) 對中國倉鼠正常初代培養的肺臟細胞及 Rajaramam (1974) 對正常具雙套染色體的細胞 (WI-38) 所做的觀察研究結果相似。當細胞進行分裂時，胞質行蹠化作用及偽足逐漸斷裂，細胞隆起，細胞表面微絨毛和泡狀突起增加，懸浮等現象 (Fig. 5) 也和 WI-38 細胞類似，亦即為細胞附著鋪展的逆反應 (Erichson & Trinkaus, 1976)。比較分裂的細胞和經胰蛋白酶處理的細胞可發現許多相似性，如偽足的斷裂和細胞表面突起增多等，顯示細胞的分裂有蛋白酶參與的可能性 (Dalen & Todd, 1971)。Hatcher 等 (1976) 報告指出蛋白酶具有刺激細胞生長的作用，鋪展不良的變性細胞的形態和分裂能力的改變和蛋白酶有密切的關係。此類蛋白酶和 JF 細胞的關係值得探討。

從培養環境來看，培養條件如離子濃度 (pH、滲透壓)，血清濃度，溫度及細胞密度等的變異均會影響 JF 細胞的生長。在 28°C 和 37°C 等不同溫度條件繼代的細胞，其細胞的大小和生長曲線都有明顯的不同。魚類細胞一般均無法長期處在 37°C 的高溫環境，而在 37°C 培養的 JF 細胞的直徑以比低溫培養 (28°C 以下) 時的直徑要大 (Fig. 12) 且細胞的生長速率在低密度時也比在 28°C 培養的快 (Fig. 11)。類似此種現象也在 TO-2 細胞發現；Chen 和 Yew (1987) 研究發現 TO-2 細胞經 37°C 處理後不僅可使細胞變大，處理初期雖會使 DNA 合成下降，但 8 小時後却使 DNA 合成率提高為 180%。然而細胞密度較高時生長速率却比 28°C 培養的慢，追究原因可能是由於細胞變大導致接觸抑制較早發生的結果，此點亦可由細胞飽和密度在 37°C 繼代的比在 28°C 繼代的低 (Fig. 10) 證實。溫度提高除了會使細胞變大，生長速率增加也會使細胞附著在基質上的速率及鋪展速率加快，在低溫時 (8°C) 細胞附著率甚至不及 60% (Fig. 13)。溫度對細胞的影響可能是提高細胞內酵素的活性，導致各種機制運作的速度加快 (Chen & Yew, 1987)。有關溫度的適應性和細胞變性的關係還有待進一步研究。

JF 細胞適合的 pH 值範圍在 6.5~8.0 左右 (Fig. 12)。正常人體的纖維狀細胞最適合的 pH 值在 7.5~7.8、pH 7.6 時生長飽和的細胞數目最高 (Eagle, 1973，而 pH 7.1 時的飽和密度為 pH 7.7 時的 2~4 倍，但在稀疏培養時其間的起始生長却是相同的 (Froehlich & Anastassiades, 1974)。Rubin (1971) 的實驗也發現稀疏培養的鰻纖維狀細胞在 pH 6.7 時和高 pH 條件下培養的細胞生長一樣好，但密集培養的細胞在 pH 7.4 以下時，生長就會受到限制。由這些結果可看出環境的 pH 值變異會影響高等脊椎動物細胞的生長且對其變異的敏感性會隨細胞密度增加而增加。有關體外培養的魚類細胞最適合的 pH 範圍和對 pH 變化的敏感性和細胞密度的關係，鮮有報告。在本實驗所得的結果，JF 細胞對 pH 變異的適應範圍遠較高等脊椎動物廣，且細胞密度和 pH 值敏感性的影響也不如想像的大。有關魚類正常細胞的 pH 適應範圍尚不得知，但一般相信有很廣的適應範圍。造成各種動物細胞間對 pH 適應範圍及敏感性差異的因子還有待探討。此外，實驗也發現細胞的大小會隨 pH 值的增高而增大 (或隨 pH 降低而減小) (Fig. 17)，而某些哺乳動物細胞的蛋白質合成速率會隨 pH 增高而增加的現象 (Froehlich & Anastassiades, 1974)，或許可用來表示其原因。pH 的作機制至目前為尚未完全清楚，細胞膜的運動，通透性都會受到 pH 改變的影響，Ceccarini (1971) 及 Rubin (1971) 均證實核酸的吸收率會隨 pH 提高而增加。

一般哺乳類動物體外培養的細胞在滲透壓 260~320 mmol/kg 均可適應生長，兩生類的細胞則可在 120~320 mmol/kg 生長 (Ball & Worley, 1973)，而魚類的細胞則尚未見到相關的報告。已知淡水魚的細胞在體外可以用培養哺乳類動物細胞的培養基進行培養且生長良好，顯示對滲透壓的適應範圍也和哺乳類動物的細胞類似。關於海水魚細胞的體外培養，有報告指出需額外添加約 4 g/L 的 NaCl

才能使細胞生長良好 (Clem *et al.*, 1961)，但也有報告表示沒有加鹽細胞也可以生長良好 (Nicholson *et al.*, 1987)，其間的差異或許是由於不同種別的關係。JF 細胞經實驗顯示，滲透壓在 400~550 mmol/kg 細胞的生長都旺盛 (Fig. 20)，但在不加鹽的生長培養基 (10% FBS. ~350 mmol/kg) 生長也很好而加了鹽之後以滲透壓 450 mmol/kg 生長最好，顯示加鹽更能促進細胞的生長，也說明了 JF 細胞有很廣的適應範圍。在各種滲透壓下觀察細胞的大小並沒因低張或高張培養環境導致細胞顯著變大或變小 (結果未出示)。造成此種現象的原因可能和細胞的胞飲作用 (pinocytosis)，離子的運送或產生靜水壓 (hydrostatic pressure) 等需能的調節機制有關 (Hoffmann & Simonsen, 1989; Olson, 1986)，維持其細胞形態。研究顯示 JF 細胞在滲透壓 650 mmol/kg 以下的培養環境，其附著率及附著速度會隨滲透壓增加而增加 (Fig. 21)，造成此種現象的原因還沒有被探討，由於細胞的伸展可能和細胞內的靜水壓有關 (Stroimeier & Bereiter, 1987)，因此細胞內靜水壓或許是造成上述差異的因子之一，而真正的影響因子及機制仍有待研究。雖然實驗顯示細胞附著的能力有隨著滲透壓增長的趨勢，但滲透壓高達 850 mmol/kg 時細胞的附著率却顯著降低 (不及 50%) 且會造成已附著生長的細胞大量死亡。細胞培養在過高 (pH 9) 或過低 (pH 5) 的滲透壓環境均會造成細胞內粒線體和內質網正常形狀及分佈嚴重破壞 (Fig. 22) 其原因或機制可能是上述的調節制無法發揮，離子濃失衡，酵素活性喪失等引起，然而確切詳實的機制仍有待深入研究。

JF 細胞經實驗證明其生長速率和血清濃度息息相關，血清含量愈高生長愈快，且對血清的敏感性細胞密度低時比密度高時強 (Fig. 19)。這些現象和一般細胞相同，但在低血清 (1%) 或不含血清的培養中，JF 細胞仍能持續生長和一般正常細胞在低血清 (0.5~1%) 時增殖停止的結果不同。此項差異除可能是因實驗設計差異造成的外，完全鋪展的細胞對血清的要求較低，殘存的血清未能完全清除及細胞分泌的生長因子 (Larrson *et al.*, 1986) 也可能是造成此差異的原因。血清除了促進細胞生長外，也會使細胞附著在基質上的比例提高 (Fig. 19)，此點和哺乳類細胞的特性相同。但血清濃很高時 (20% 以上)，細胞附著的速率比低濃度低，其原因可能和培養液的粘稠度提高有關。

綜合上述幾項比較的結果，JF 細胞為停泊依賴性，具有正常的形態，血清依賴性和密度依賴抑制性，顯示還未變性。在病毒研究上，此株化細胞對二段核酸類的 IPNV Sp, AB, VR-299 株，都有感受性，其病毒產量和 CPE 出現的時間和 TO-2 相似；且對 TO-2 不能接受屬呼吸道腸道病毒的 CSV 也具感受性，其病毒產量和 chum salmon (CHH-1) 細胞株在伯仲間 (Winton *et al.*, 1981)。在水產疾病的防治方面，此株化細胞對好幾種病毒具感受性，可作為研究病毒的材料。

### 摘 要

本實驗建立了花身鰱魚 (*Therapon jarbua* FORSÅKL) 胸鰭來源的永久細胞株。此株化細胞培養在添加 10% 胎牛血清的 Leibovitz's L-15 培養基和  $28 \pm 1^\circ\text{C}$  中，在 9 個月的培養時間已繼代了 90 次並命名為 JF。細胞形態為雙極性或多極性的纖維狀，染色體分析顯示為異倍體，含 48 條染色體的細胞最多。羣落形成率在條件培養基、 $28 \pm 1^\circ\text{C}$  下為 1.7%。培養溫度在  $18 \sim 37^\circ\text{C}$  或 pH 6~8 或滲透壓 200~650 mmol/kg 均能生長。

JF 細胞也被證明對傳染性胰臟壞死病毒 (IPNV) 及鮭魚的呼吸道腸道病毒 (CSV) 均有接受性。

### 參 考 文 獻

- 王聖予 (1985) 大肚魚細胞株之建立及其生物學特性之研究。國立臺灣大學動物學研究所碩士論文。  
 周西平 (1988) 鎳對魚類細胞株和哺乳類細胞之作用。國立臺灣大學動物學研究所碩士論文。  
 徐肇謙 (1989) 溫度與鎳對魚類細胞株影響之研究。國立臺灣大學動物學研究所碩士論文。  
 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.

- Bower, P.R. and J.A. Plumb (1980a) Fish cell line: establishment of a cell line from ovaries of channel catfish. *In Vitro* 16: 365-368.
- Bower, P.R. and J.A. Plumb (1980b) Growth rates of a new cell line from channel catfish ovary and channel catfish virus replication at different temperatures. *Can. J. Fish. Aqua. Sci.* 37: 871-873.
- Boyde, A., R.A. Weiss and P. Vesely (1972) Scanning electron microscopy of cell in culture. *Exp. Cell Res.* 71: 313-324.
- Ceccarini, C. and H. Eagle (1971) pH as a determinant of cellular growth and contact inhibition. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 68: 229-233.
- Chen, J.D. and F.H. Yew (1988) DNA replication and repair of *Tilapia* cell. II. Effect of temperature on DNA replication and ultraviolet repair in tilapia ovary cells. *J. Cell Sci.* 89: 263-272.
- Chen, S.N., S.C. Chi, Y. Ueno and G.H. Kou (1982) Establishment of a cell line from ovary of *Tilapia*. *Bull. Eurp. Assu. Fish Pathol.* 3: 1-4.
- Chen, S.N. and G.H. Kou (1987) Establishment characterization and application of 14 cell lines from warm water fish. In "Invertebrate and fish culture" Y. Kuroda, E. Kurstak and K. Maramorosch (eds.) pp. 218-227. Japan Scientific Societies Press.
- Chen, S.N. and G.H. Kou (1981) A cell line derived from Japanese eel (*Anguilla japonica*) ovary. *Fish Pathol.* 16: 129-137.
- Chen, S.N., Y. Ueno and G.H. Kou (1982) A cell line derived from Japanese eel (*Anguilla japonica*) kidney. *Proc. Nat. Sic. Con., Part B, Basic Science* 6: 93-100.
- Clem, L.W., L. Moewus and M.M. Sigel (1978) Studies with cells from marine fish in tissue culture. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 108: 762-766.
- Dalen, H. and P.W. Todd (1971) Surface morphology of trypsinized human cells *in vitro*. *Exp. Cell Res.* 66: 353-361.
- Eagle, H. (1973) The effect of environment pH on the growth of normal and malignant cells. *J. Cell. Physiol.* 82: 1-8.
- Erichson, C.A. and J.P. Trinkaus (1976) Microvilli and bleb as sources of reserve surface membrane during cell spreading. *Exp. Cell Res.* 99: 375-384.
- Froehlich, J. and T.P. Anastassiades (1974) Role of pH in fibroblast proliferation. *J. Cell. Physiol.* 84: 253-260.
- Fryer, J.L., B.B. McCain and J.C. Leong (1980) A cell line derived from rianbow trout (*Salmo gairdneri*) hepatoma. *Fish Pathol.* 15: 193-200.
- Hansen, E.L. (1974) A cell line from the freshwater snail *Biomphalaria glabrata*. *Int. Res. Commun. Syst.* 2: 1703.
- Hatcher, V.B., M.S. Werthheim, C. Rhee and P.G. Burk (1976) Relationship between cell surface proteas activity and doubling time in various normal and transformed cells. *Biochem. Biophys. Acta.* 451: 499-510.
- Hayushi, M., Y. Ogima and N. Asano (1976) A cell line from teleost fish; establishment and cytogenetical characterization of the cells. *J. Genetics, Japan.* 51: 65-68.

- Hedrick, R. P., R. Rosemark, D. AroOstein, J. R. Winton, T. McDowell and D. F. Amend (1984) Characteristics of a new reovirus from channel catfish (*Ictaluru punctatus*). J. Gen. Virol. 65: 1527-1534.
- Hoffmann, E. K. and L. O. Simonsen (1989) Membrane mechanism in volume and pH regulation in vertebrate cells. Physiol. Rev. 69: 315-382.
- Hong, Y. W. (1984) The characterization of the virus isolated from the gill of clam, *Meretrix lusoria*. Master thesis. Fu-Jen Catholic University, Taiwan, R. O. C.
- Johnson, L. V., M. L. Walsh, B. J. Bockus and L. B. Chen (1981) Monitoring of relative mitochondria membrane potential in living cells by fluorescence microscopy. J. Cell Biol. 88: 526-545.
- Kimura, T., M. Yoshimizu, M. Tanaka and H. Scannohe (1981) Studies on a new virus (OMV) from *Oncorhyncus mason* I. characteristic and pathogenicity. Fish Fish Pathol. 15: 143-147.
- Lannan, C. N., J. R. Winton and J. L. Fryer (1984) Fish cell lines: establishment and characterization of nine cell line from Salmonids. In Vitro. 20: 671-676.
- Larrison, O., E. Dafgrd, W. Engstron and A. Zetterberg (1986) Immediate effect of serum depletion on dissociation between growth in size and cell division in proliferation 3T3 cells. J. Cell Physiol. 127: 267-273.
- Meyers, T. R. (1979) A reolike virus isolated from juvenile American oysters (*Crassostrea virginica*). J. Gen. Virol. 43: 203-212.
- Nagahayashi, T. and S. Mori (1983) Characterization of a virus (JOV-1) isolated from Japanese oysters (*Crassostrea gigas*). In Program and Abstracts, p. 56. Society for Invertebrate Pathology XVI Annual Meeting.
- Nicholson, B. L., D. J. Danner and J. L. Wu (1987) Three new continuous cell lines from marine fish of Asia. In Vitro. 23: 199-204.
- Noga, E. J. and J. H. Hartman (1977) Establishment of cell lines from the walking catfish virus (*Clarias batrachus*) and their infection with the channel catfish virus. In Vitro. 13: 160.
- Olson, J. E. (1986) Energy dependent volum regulation in primary culture cerebral astrocytes. J. Cell Physiol. 128: 209-215.
- Pfitzner, I. (1950) Cell and tissue of fresh water fish in virus research. Ann. N. Y. Acad. Sci. 126: 547-554.
- Rajaraman, R., D. E. Round, S. P. S. Yen and A. Rembaum (1974) A scanning electron microscope study of adhesion and spreading *in vitro*. Exp. Cell Res. 88: 327-339.
- Rubin, H. (1971) pH, and population density in the regulation of animal cell multiplication. J. Cell Biol. 51: 686-702.
- Stroiimeier, R. and H. J. Bereiter (1987) Hydrostatic pressure in epidermal cells is dependent on Ca-mediated concentrations. J. Cell Sci. 88: 631-640.
- Wang, H. C. and F. H. Yew (1987) Effects of buatachlor, paraquat, saturn and azo-drin on the killing and biochemistry of cell lines from Tilapia, Loach and Top minow. Bull. Inst. Zool. Acad. Sin. ROC. 26: 95-106.

- Watanabe, T., M. Sano, Y. Ishzda, Y. Mizusawa and M. Michikawa (1980) Establishment and properties of the continuous cell line derived the embryonated egg of chum salmon, *Oncorhynchus keta*. Bull. Jap. Soc. Sci. Fish **46**: 1203-1209.
- Winton, J. R., C. N. Lannan, J. L. Fryer, R. P. Hedrick, T. R. Myer, J. A. Plumb and Yamamoto (1987) Morphological and biochemical property of four members of a novel group of reoviruses isolated from aquatic animals. J. Gen. Virol. **68**: 353-364.
- Winton, J. R., C. N. Lannan, J. L. Fryer and T. Kimura (1981) Isolation of a new reovirus from chum salmon in Japan. Fish Pathol. **15**: 155-162.
- Winton, J. R., C. N. Lannan, D. P. Pason and J. L. Fryer (1985) Isolation of a new virus from chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) in Oregon USA. Fish Pathol. **20**: 373-380.
- Wolf, K. and M. C. Quimby (1966) Lymphocystis virus: isolation and propagation in centrarchid fish cell lines. Science **151**: 1004-1005.
- Wolf, K. and J. A. Mann (1980) Poikilotherm vertebrate cell lines and viruses: a current listing for fishes. In Vitro. **16**: 168-179.