

بررسی شرایط بهینه کشت سلولی اولیه از کلیه ماهی سفید (*Rutilus kutum*) به روش

کاشتن

چکیده

کشت سلولی شامل فرایندی است که سلول‌های حاصل از انواع مختلف بافت‌ها در شرایط آزمایشگاهی تکثیر می‌شوند. کشت بافت و توسعه‌ی رده‌ی سلولی از ماهی در جداسازی ویروس‌ها، سم‌شناسی، سرطان‌شناسی، فیزیولوژی سلولی و بیان ژن کاربرد دارد. در این مطالعه کشت اولیه از کلیه تعداد ۱۰ عدد ماهی سفید (*Rutilus Kutum*) به وزن 12 ± 1 گرم و میانگین طولی 11 ± 1 سانتی‌متر از طریق روش کاشتن انجام گرفت. قطعات بافتی در فلاکس‌های حاوی محیط کشت L-15 به همراه آنتی‌بیوتیک‌ها (پنی‌سیلین، استرپتومایسین) و در شرایط متفاوت دمایی ($24, 28$ و 31 درجه سانتی‌گراد) و میزان سرم جنین گاوی متفاوت ($5, 10$ و 20 درصد) و در دو محدوده pH ($6/8$ و $7/2$) کشت داده شدند. نتایج نشان داد که تهیه کشت سلولی اولیه از بافت کلیه ماهی سفید دریای خزر در دمای 24 درجه سانتی‌گراد و 20 درصد سرم جنین گاوی در مقایسه با تیمارهای دیگر بهتر انجام می‌شود؛ و همچنین میزان مهاجرت سلول $88/37$ درصد محاسبه گردید. تاکنون ۸ پاساژ از این سلول‌ها انجام شده است که می‌تواند به تولید رده سلولی از کلیه ماهی سفید دریای خزر در آینده نزدیک منتهی گردد.

واژگان کلیدی: کشت سلولی اولیه، بافت کلیه، ماهی سفید دریای خزر.

سمانه نیک قربان^۱

سمیه حقیقی کارسیدانی^{۲*}

محدث قاسمی^۳

۱ و ۲. گروه شیلات، واحد بندرانزلی، دانشگاه آزاد اسلامی، بندرانزلی، ایران
۳. پژوهشکده آبی‌پروری آب‌های داخلی، مؤسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، بندرانزلی، ایران

*مسئول مکاتبات:

haghighikarsidani@yahoo.com

کد مقاله: ۱۳۹۸۰۱۰۷۰۵

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۱۱/۲۹

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۰۲/۰۱

این مقاله برگرفته از طرح پژوهشی است.

مقدمه

شیوع بیماری‌ها در آبی‌پروری، افزایش آلودگی‌های آبی و پیشرفت‌های اخیر در مطالعات بر روی مواد فعال زیستی با منشأ آبی همه باهم، اشتیاق قابل توجهی را در میان پژوهشگران به کار کشت سلولی ماهی ایجاد کرده است. علاوه بر این، اهمیت کشت سلولی ماهی به دلیل کاربردهای بالقوه رده‌های سلولی ماهی در حوزه‌هایی مانند زیست‌شناسی تکاملی ماهی، ایمونولوژی ماهی (Clem et al., 1996)، ویروس‌شناسی (Ruiz et al., 2009؛ Kim et al., 2012)، سم‌شناسی (Oh et al., 2001؛ Kojima et al., 2011؛ Kienzler et al., 2001؛ Bols et al., 2001؛ Fan and Collodi, 2012)، فیزیولوژی (Rode et al., 1997)، مطالعات سرطان (Salinas et al., 2008)، کاربردهای تراریخته (Aluru and Vijayan, 2002)، مطالعات ایمونولوژی (Goswami et al., 2012؛ Bols et al., 2001)، غدد (Alok et al., 2000)، بیوتکنولوژی (Tafalla et al., 2006)، علاوه بر این استفاده (Thomas, 2012؛ 2009)، عملکرد ژنومیک (Laing and Hansen, 2011)، تنظیمات ژنتیکی (Maclean, 2011)، تنظیمات ژنتیکی (Castro et al., 2010؛ Holopainen et al., 2012) افزایش یافته است.

ماهی سفید دریای خزر (*Rutilus kutum*) (Kamensky ۱۹۰۱) (Esmaeili et al., 2018) از خانواده Cyprinidae مهم‌ترین و یکی از باارزش‌ترین ماهیان، دریای خزر است (خانی پور، ۱۳۶۸). ماهی سفید جزء ماهیان استخوانی و از لحاظ ارزش غذایی، تأمین‌کننده بخش عمده‌ای از پروتئین موردنیاز جامعه و همچنین از عوامل عمده اشتغال‌زایی و کسب درآمد بسیاری از مردم ساحل‌نشین شمال کشور است. میزان صید ماهیان استخوانی در سال ۹۵ در استان گیلان ۲۶۷۰ تن و به‌خصوص میزان صید ماهی سفید دریای خزر در سال ۹۵ در استان گیلان ۲۰۹۶ تن گزارش شده است (اداره کل شیلات، معاونت صید و بنادر و ماهی‌گیری، بخش آمار و اطلاعات صید). با توجه به اهمیت این گونه و کاهش جمعیت این گونه در اثر بهره‌برداری زیاد، وارد شدن سموم کشاورزی، خانگی و صنعتی، کاهش سطح آب دریا و از بین رفتن محل‌های تخم‌ریزی طبیعی و مقاومت پایین در برابر عوامل بیماری‌زای ویروسی و باکتریایی (رضوی صیاد، ۱۳۷۸) و اهمیت زیاد ایجاد رده‌های سلولی از گونه‌های اقتصادی و در معرض خطر در آبی‌پروری و مدیریت شیلاتی، بر آن شدیم تا با استفاده از تکثیر سلول‌های کلیه این ماهی ارزشمند به روش کشت اولیه در محیط آزمایشگاه بتوانیم گامی مهم جهت تشخیص بیماری‌های ویروسی این ماهی برداریم. از آنجاکه سموم محیطی تأثیر زیادی بر بافت کلیه ماهیان دارند و همچنین بافت کلیه به‌عنوان ارگان هدف اغلب ویروس‌ها است استفاده از تیره‌های سلولی و کشت‌های اولیه با منشأ بافت کلیه از ماهیان بومی در تشخیص سریع عوامل آلوده‌کننده محیط‌های آبی و عوامل بیماری‌زا کاربرد زیادی دارد.

از بین کشت‌های اولیه ایجادشده از کلیه می‌توان موارد زیر اشاره کرد: کشت اولیه ایجادشده از کلیه با استفاده از سرم ماهی *Clarias gariepinus* (Rathore et al., 2001) کشت اولیه از ماهی *rainbow trout* (Stafford et al., 2001) و همچنین از ماهی کپور (*Cirrhinus mrigala*) (Nanda et al., 2014) رده‌های سلولی ایجادشده از کلیه شامل موارد زیر هستند: تیره‌های جدادشده از ماهی سالمون *Salmo salar* (ASK) (Devold et al., 2000)، (SHK-1) (Dannevig et al., 1997)، (TO) (Wergeland and Jakobsen, 1997)، (fossilis) از ماهی *Heteropneustes fossilis* (Singh et al., 1995)، (KIK) از ماهی گربه‌ماهی آفریقایی *Clarias gariepinus* (Noga and Hartman, 1977)، (BPK) از ماهی *black porgy* (*Acanthopagrus schlegelii*) (Chen Tung et al., 1991) و همکاران (۱۹۸۷) نیز رده‌های از کلیه ماهیان زیر تهیه نمود که عبارت‌اند از: (TK-1) از ماهی تیلاپیا هیبرید (*Tilapia sparrmanii*)، (OK) از ماهی *Snakehead-Chana* (*Channa lucius*)، (BKG) از ماهی *Banded Grouper* (*Epinephelus awoara*)، (EK-1) از مارماهی ژاپنی (*Anguilla japonicas*) همچنین دیگر رده‌های ایجادشده از کلیه عبارت‌اند از: (CIK) از ماهی کپور علف‌خوار (*Ctenopharyngodon idella*) (Zuo et al., 1986)، (IEK) از ماهی *Indian Etroplus* (*E. suratensis*) (Sarath Babu et al., 2012)، (SISK) از باس دریایی (*L. calcarife*) (Sahul Hameed et al., 2006)، (CSK) از ماهی *Snakehead murrel* (*Channa striata*) (Abdul majeed et al., 2013)، (THK) از ماهی تیلاپیا (*Oreochromis niloticus*) (Wen, 2016)، (YTK) از عنبر ماهی ژاپنی (*Seriola quinqueradiata*) (Watanabe et al., 1981)، (SBK) از ماهی باس دریایی ژاپنی (*Lateolabrax japonicus*) (Watanabe et al., 1981)، (GK) از ماهی گروپر (*Epinephelus awoara*) (Lai et al., 2000)، (TSHKC) از ماهی half-smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*) (Zheng et al., 2012)، (SBK-2) از ماهی باس دریایی (Watanabe and Yoshimizu, 1999).

در این مطالعه با توجه به اهمیت حفظ ذخایر ژنتیکی آبزیان ایران و نیز لزوم تهیه کشت سلولی جانوران بومی برای مطالعات کاربردی، امکان تولید کشت سلولی اولیه از گونه ارزشمند ماهی سفید دریای خزر بررسی شده است و تا زمان تنظیم مقاله ۸ پاساژ تهیه گردید تا ضمن دستیابی به روش کار بتوان در آینده اقدام به تهیه تیره‌های سلولی بافت مذکور، انجماد و نگهداری آن به‌صورت بانک سلولی و استفاده از تیره‌های سلولی تهیه‌شده برای مقاصد گوناگون از جمله تشخیص بیماری‌های ویروسی استفاده نمود.

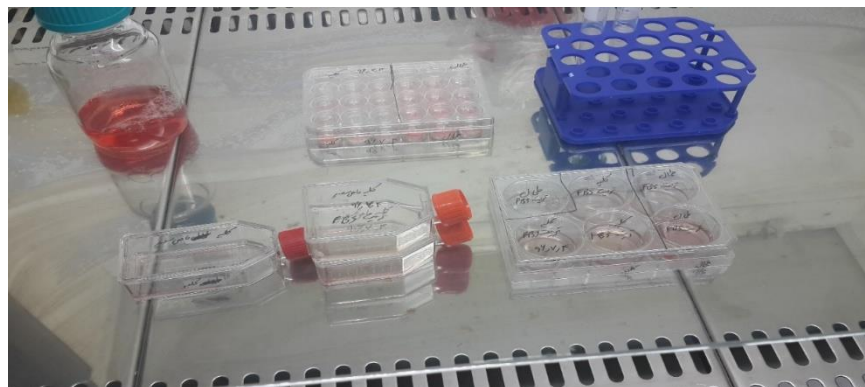
مواد و روش‌ها

تعداد ۱۰۰ عدد بچه ماهی سفید با وزن ۲-۱ گرم از مرکز تکثیر و بازسازی ذخایر ماهیان استخوانی شهید انصاری واقع در رشت تهیه گردید و به پژوهشکده آبروری آب‌های داخلی انتقال داده شد و به مدت ۴ ماه جهت تطابق با شرایط زندگی در محیط آزمایشگاه، افزایش اندازه و تأیید سلامت بچه ماهیان، در آکواریوم‌های ۸۰ لیتری نگهداری و غذادهی روزانه با استفاده از گرانول‌های ساخت شرکت Biomar با توجه به ساین دهانی ماهی انجام شده و تعویض آب روزانه انجام گرفت. در طی این مدت هیچ‌گونه تلفاتی وجود نداشت. سپس تعداد ۱۰ عدد ماهی جوان و سالم به وزن 12 ± 1 گرم و میانگین طولی 11 ± 1 سانتی‌متر برای جداسازی بافت کلیه انتخاب گردید.

محیط کشت Leibovitz's L-15 (L-15) ساخت شرکت Gibco از کشور آمریکا و سرم جنین گاوی ۲۰ درصد ساخت شرکت Gibco همراه با ضد قارچ آمفوتریسین B و پنی‌سیلین 1000 (Iu/ml) و استرپتومایسین $1000 \text{ (}\mu\text{g/ml)}$ ساخت شرکت Gibco با آب مقطر دو بار تقطیر دیونیزه استفاده شد. به‌منظور تهیه یک لیتر محیط کشت، $13/86 \text{ g}$ پودر L-15، ۲۰ درصد سرم جنین گاوی، $5/2 \text{ mg/ml}$ آمفوتریسین B، ۱۰ سی‌سی پنی‌سیلین استرپتومایسین را به آب مقطر ۲ بار تقطیر دیونیزه اضافه کرده و بر روی استیرر قرار داده تا حل شود و پس از حل شدن کامل، استریل گردید. فرآیند استریل کردن محیط کشت با استفاده از استری کاپ با فناوری وکیوم و خلأ ساخت شرکت Milipore آمریکا و در زیر هود لامینار انجام پذیرفت پس از تهیه محیط کشت آن‌ها را داخل بطری‌های درب دار ریخته و درب بطری‌ها به‌وسیله پارافیلیم بسته شد تا هیچ‌گونه تبادل هوایی برقرار نشود. محیط کشت مذکور جهت تهیه کشت سلولی تک لایه و پاساژ مورد استفاده قرار گرفت.

۱۰ عدد بچه ماهی به وزن متوسط ۱۰ گرم جدا شده و بعد از قرار دادن در آب یخ بیهوش شده (Kamalendra et al., 2010; Parameswaran et al., 2006) و پس از خشک کردن توسط گاز استریل برای حذف آلودگی موجود در لایه موکوسی، شست‌وشو به‌صورت غوطه‌ور کردن در محلول وایتکس ۵ درصد و الکل ۷۰ درصد در پایان در آب مقطر انجام گرفت. سپس بافت کلیه زیر هود لامینار در شرایط استریل جدا گردید و توسط تیغ اسکالپل و قیچی به قطعات کوچک‌تر تبدیل و با محلول PBS استریل شستشو گردید. پس از آن بافت موردنظر در داخل لوله فالکن حاوی محلول PBS ریخته شد و در دستگاه سانتریفیوژ با دور 1050 rpm در دمای ۵ درجه‌ی سانتی‌گراد قرار داده شد.

سپس محیط کشت Leibovitz's L-15 (L-15) ساخت شرکت Gibco از کشور آمریکا همراه با ضد قارچ اضافه گردید و مجدداً به مدت ۵ دقیقه با دور 1050 rpm در دمای ۵ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد. پس از اتمام مراحل فوق لوله‌های فالکن را به زیر هود منتقل کرده مقداری محیط کشت داخل لوله ریخته سپس به‌وسیله پیپت استریل بافت‌ها را برداشته و داخل پلیت ۲۴ خانه و فلاسک 25 cm^2 ، به‌صورت ۳ تیمار دمایی متفاوت شامل (۲۱، ۲۴ و ۲۸ درجه سانتی‌گراد) با غلظت‌های مختلف سرم جنین گاوی (۵، ۱۰ و ۲۰ درصد) در انکوباتور یخچال دار (Memmert, Germany company) کشت و نگهداری شد. بدین‌صورت که در ابتدا دماهای متفاوت را با غلظت سرم جنین گاوی ۲۰٪ بررسی کرده و سپس دمای بهینه را با مقادیر سرم ۵، ۱۰ و ۲۰ درصد مقایسه نمودیم و به مدت ۱۴ روز میزان مهاجرت سلول‌ها و افزایش تعداد سلول‌ها بررسی گردید. هر دو روز یک‌بار محیط کشت تعویض گردید (شکل ۱).



شکل ۱: کاشت قطعات بافتی در فلاسک و پلیت‌های ۶ خانه و ۲۴ خانه کشت سلولی.

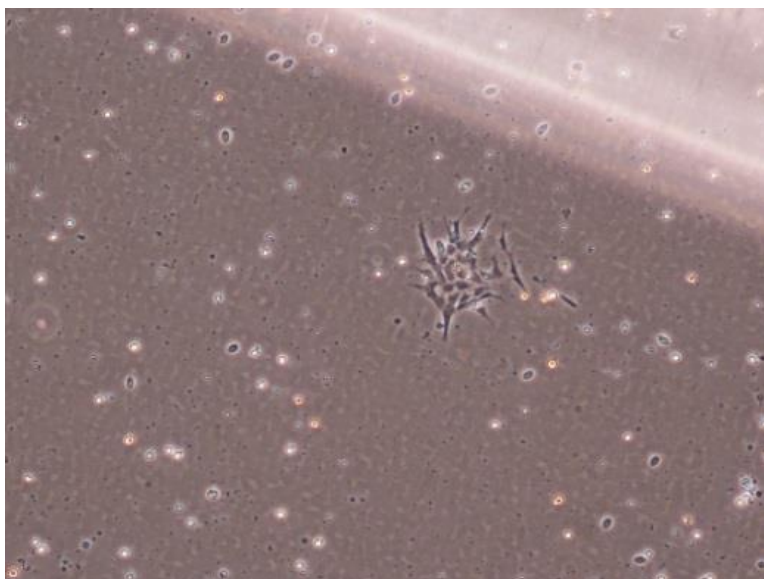
پس از پوشش حداقل ۷۰ درصد کف فلاسک پاساژ سلول‌ها انجام شد. سپس ابتدا ظرف کشت به زیر هود منتقل شده و محیط کشت درون ظرف تخلیه گردید و به‌منظور شست‌وشو و جدا کردن سلول‌های مرده و سرم جنین گاوی موجود در ظرف که عامل محدود کردن فعالیت آنزیم تریپسین است ۱ میلی‌لیتر PBS درون ظرف ریخته شد و به مدت ۲۰ ثانیه ظرف آرام تکان داده و بعد از خارج کردن PBS، ۳۰۰ میکرو لیتر آنزیم تریپسین بر روی سلول‌ها ریخته شد و اجازه داده شد تا سلول‌ها در معرض تماس با آنزیم باشند سپس ۱ میلی‌لیتر محیط کشت اولیه‌ی فاقد آنتی‌بیوتیک بر روی سلول‌ها ریخته تا تریپسین خنثی گردد و عملیات پیپتاژ چندین بار انجام گرفت تا سلول‌ها به‌طور کامل از کف ظرف جدا شوند. پلت سلولی حاصل در ۱ میلی‌لیتر محیط کشت اولیه به‌صورت سوسپانسیون درآمده و به فلاسک محیط کشت جدید منتقل گردید (Wolf and Quimby, 1976). سپس فاکتورهای چسبندگی سلول‌ها و میزان تقسیم سلولی و زمان و میزان سرعت رشد و پوشش کامل سلول‌ها روی کف به‌صورت روزانه بررسی شد و میزان مهاجرت سلول از بافت به روش (Moritz and Labbe, 2008) از طریق تعیین شاخص کارایی کاشت بافت (رابطه ۱) محاسبه شد.

$$\text{رابطه ۱:} \quad \text{تعداد قطعات بافتی که سلول از آن‌ها مهاجرت کرده است} \times 100 = \frac{\text{تعداد کل قطعات کاشته شده}}{\text{درصد کارایی کاشت بافت}}$$

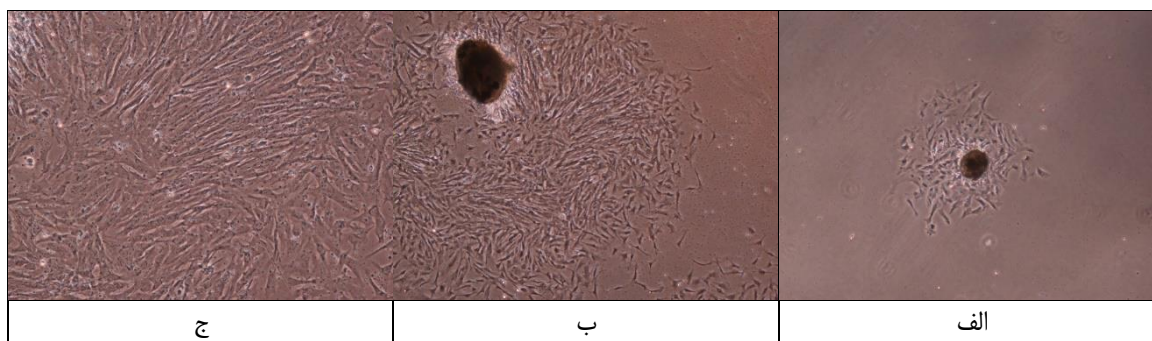
نتایج

نتایج نشان داد که جداسازی و تکثیر سلول‌های کلیه ماهی سفید با روش کشت سلولی اولیه امکان‌پذیر است. سلول‌ها در روز اول به کف فلاسک چسبیدند (شکل ۲) از روز دوم به بعد رشد و مهاجرت سلول‌ها روند خوبی را نشان داد که نشان‌دهنده محیط کشت مناسب بود. سلول‌ها در تمام گروه‌ها فیبروبلاستی بودند. اثر دمای ۲۱، ۲۴ و ۲۸ درجه‌ی سانتی‌گراد در طی روند مطالعات بر رشد سلول‌ها بررسی شد که نتایج نشان داد دمای ۲۱ درجه‌ی سانتی‌گراد برای رشد مناسب نبوده است و سلول‌ها در این دما تکثیر بسیار کندی داشتند و محیط کشت زیادی مصرف نشد و رشد قابل‌توجهی مشاهده نشد. همچنین در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد سلول‌ها تکثیر سریع داشته ولی زنده‌مانی کمی داشتند. سلول‌ها بعد از تکثیر سریع شروع به ریزش کردند. در صورتی‌که در دمای ۲۴ درجه سانتی‌گراد سریعاً محیط را اسیدی نموده که نشان‌دهنده مصرف محیط و تکثیر سلول‌ها است (شکل ۴). در مرحله بعد با دمای بهینه ۲۴ درجه سانتی‌گراد غلظت‌های متفاوت سرم جنین گاوی (۵، ۱۰ و ۲۰ درصد) بررسی شد که در غلظت‌های ۵ و ۱۰ درصد سرم جنین گاوی، رشد کمتری مشاهده گردید ولی در غلظت ۲۰ درصد سرم جنین گاوی رشد و تکثیر مناسب

دیده شد (شکل ۳؛ شکل ۵). دمای بهینه در این کشت ۲۴ درجه سانتی‌گراد و pH در دو حالت ۶/۸ و ۷/۲ بررسی شد که در pH ۶/۸ سلول‌ها پس از سه روز شروع به ریزش نمودند و از بین رفتند ولی در pH ۷/۲ سلول‌ها به رشد و تکثیر ادامه دادند. همچنین میزان مهاجرت سلول از قطعات کاشته شده (درصد کارایی کاشت بافت) در روز هفتم به میزان ۸۸/۳۷ درصد محاسبه گردید.

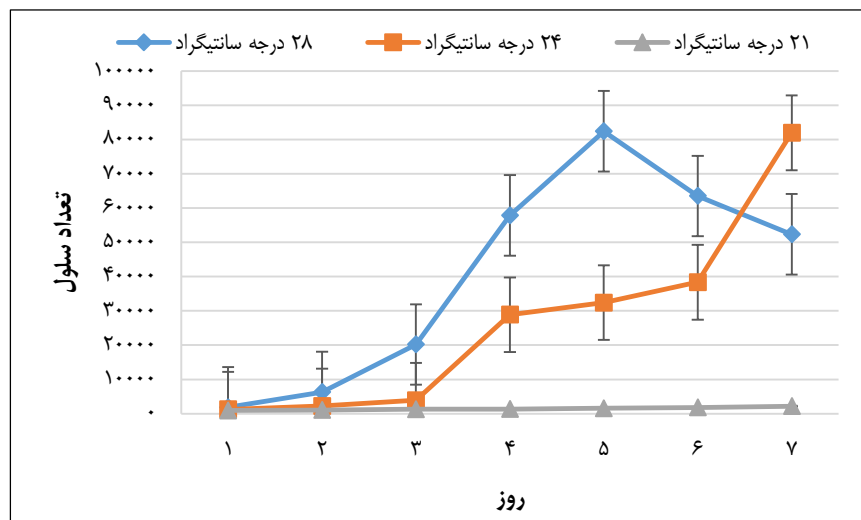


شکل ۲: کاشت سلول کلیه ماهی سفید دریای خزر (*Rutilus Kutum*) در ۲۴ ساعت اول با بزرگنمایی $\times 10$.

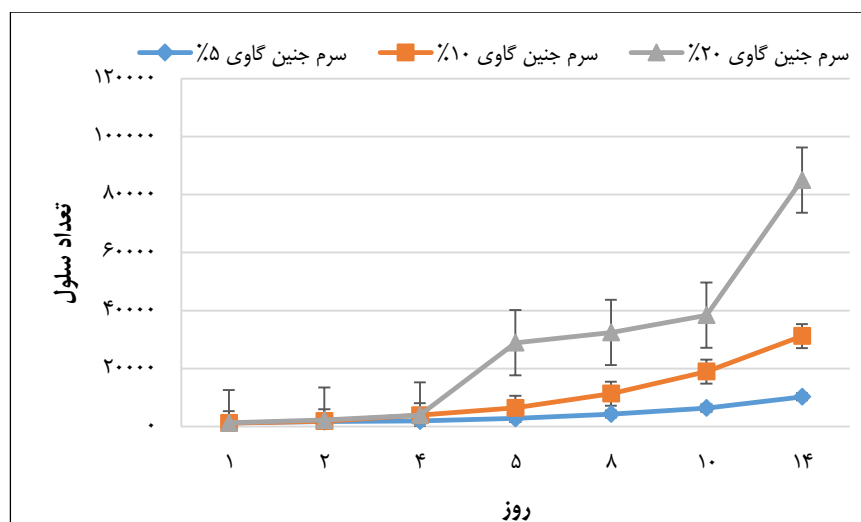


شکل ۳: رشد و تکثیر سلول‌های کلیه ماهی سفید دریای خزر (*Rutilus Kutum*) در روز دهم بعد از کاشت با غلظت‌های مختلف سرم جنین گاوی (۵، ۱۰ و ۲۰ درصد).

الف: غلظت ۵ درصد سرم جنین گاوی با بزرگنمایی $\times 40$ ، ب: غلظت ۱۰ درصد سرم جنین گاوی با بزرگنمایی $\times 40$ ، ج: غلظت ۲۰ درصد سرم جنین گاوی با بزرگنمایی $\times 10$



شکل ۴: تأثیر دما بر تعداد سلول‌های کلیه ماهی سفید دریای خزر (*Rutilus kutum*).



شکل ۵: مقایسه تعداد سلول‌های کلیه ماهی سفید دریای خزر (*Rutilus kutum*) در غلظت‌های مختلف سرم جنین گاوی (FBS).

بعد از گذشت ۱۴ روز (زمانی که سلول‌ها حداقل ۷۰ درصد کف را پوشانده بودند) اقدام به پاساژ آن‌ها شد. ابتدا ظرف کشت به زیر هود منتقل شد و محیط کشت درون ظرف تخلیه گردید پس از آن آنزیم تریپسین به میزان ۲/۵ درصد در هزار (۵CC) به فلاسک کشت سلول اضافه شد تا کلونی‌های سلولی که به کف فلاسک چسبیده‌اند از آن جدا گردند به مدت چند دقیقه سلول-ها در معرض تماس با آنزیم تریپسین قرار گرفتند تا سلول‌ها شروع به جمع شدن و جدا شدن از کف ظرف کشت نمایند بعد از این زمان ۱۰ میلی لیتر محیط کشت اولیه‌ی فاقد آنتی‌بیوتیک بر روی سلول‌ها ریخته می‌شود تا تریپسین خنثی گردد و عملیات پیپتاژ چندین بار انجام می‌گردد تا سلول‌ها به‌طور کامل از کف ظرف جدا شوند و پس از

مشاهده سلول‌های جداشده از کف توسط میکروسکوپ، پلت سلولی حاصل به فلاسک کشت جدید منتقل شدند و پاساژ صورت گرفت به همین ترتیب پاساژهای بعدی نیز انجام گرفت و تا زمان نوشتن مقاله، هشت پاساژ انجام گرفته است.

بحث و نتیجه‌گیری

برای به دست آوردن کشت اولیه دو روش وجود دارد: جداسازی آنزیمی از بافت و روش کشت بافت (Boles and Lee, 1991) که در این مطالعه روش کشت بافت از ماهی (*Rutilus kuutm*) بدون آنزیم موردبررسی قرار گرفت. روش کشت بافت به دلیل سرعت و سهولت و حفظ تعاملات سلولی و اجتناب از هضم آنزیمی که می‌تواند به سلول آسیب برساند نسبت به روش آنزیمی ترجیح داده می‌شود (Avella et al., 1994). در روش کاشت، محیط کشت به آرامی اضافه می‌گردد و تمام سطح سلول‌ها را می‌پوشاند. سلول‌ها رشد می‌کنند و کشت ایجاد می‌شود (Wolf and Ahne, 1982). چندین تیره سلولی با استفاده از روش کشت ایجادشده است. (Tong et al., 1997; Fernandez-Puentes et al., 1993; Bejar et al., 1997; Tong et al., 1998)

در مطالعه‌ای که Nanda و همکاران (۲۰۱۴) بر روی کشت سلول‌های کلیه، قلب، مغز، باله، تخمدان و سایر اندام‌های ماهی Major carp به دو روش کاشت بافت (Explant) و روش آنزیمی انجام دادند به این نتیجه رسیدند که در روش کاشتن در سلول‌های کلیه، تک لایه سلولی ۱۶ الی ۱۸ روز پس از کاشت ایجاد گردید و تا ۹ پاساژ نیز پیشرفت نمود. در مطالعه حاضر که از روش کاشتن بهره گرفته شد سلول‌های کلیه از ماهی سفید در روز ۱۴ تشکیل تک لایه دادند و تاکنون ۵ پاساژ صورت گرفته است که تقریباً با مطالعه حاضر مطابقت داشته است.

انواع مختلفی از محیط کشت پایه برای کشت سلول ماهی وجود دارد (Fernandez et al., 1993). این محیط کشت‌ها با توجه به مواد مغذی و محتویات آن و نوع نمک‌های متعادل و ظرفیت بافر آن‌ها به‌طور قابل توجهی متفاوت هستند (Freshney, 2000). محیط کشت‌های رایج استفاده‌شده جهت کشت سلول ماهی MEM، Leibowitz's L-15، محیط کشت MEM199 است. تفاوت اصلی بین این سه نوع محیط کشت بر اساس غلظت نمک‌ها و تغییرات در نوع و میزان اسیدهای آمینه آن است. در EMEM، بی‌کربنات بالا است درحالی‌که در H-MEM میزان بی‌کربنات پایین است. محیط کشت L-15 حاوی سدیم پیرووات بالا و فاقد بی‌کربنات است بنابراین این محیط کشت‌ها اثرات متفاوتی بر سلول‌ها خواهند گذاشت (Freshney, 2000). Nanda و همکاران (۲۰۱۴) از محیط کشت DMEM برای کشت اولیه بافت کلیه استفاده نمودند. در مطالعه Stafford و همکاران (۲۰۰۱) از محیط کشت EME استفاده شد. در این مطالعه از محیط کشت L-15 استفاده شد. در صورت استفاده از این محیط کشت نیاز به افزودن گاز Co2 به محیط کشت در نتیجه انکوباتور Co2 دار نیست. سلول‌های ماهی به‌خوبی در محیط کشت L-15 رشد می‌کنند (Leibovitz, 1963) و همچنین برخی از محققان دریافتند که این محیط به‌طور مؤثر pH را در شرایط طبیعی محیطی حفظ می‌کند (Wolf and Qumby, 1969) و این محیط کشت بهترین محیط کشت برای رشد سلول‌های ماهی است (Kumar et al., 2001, Chen et al., 2019).

سرم یک افزودنی ضروری در کشت سلولی است (Ham, 1981). سرم حاوی میزان زیادی پروتئین، پپتید، اسیدهای چرب، گلوکز و هورمون است که می‌تواند باعث ترویج رشد سلول و فعال‌سازی آنزیم‌ها شود و از DNA محافظت کند و از آسیب رادیکال‌های آزاد جلوگیری نماید سرم همچنین به‌عنوان یک بافر PH عمل می‌کند (Cheng et al., 1993). باین‌حال غلظت سرمی بالاتر همیشه نتایج بهتری را نشان نمی‌دهد انواع مختلف سلول‌ها نیاز به غلظت‌های سرمی متفاوت دارند علاوه بر این مکمل‌های دیگر عوامل رشد نیز غلظت سرمی موردنیاز را کاهش می‌دهند. در این مطالعه از سرم جنین گاوی به میزان ۲۰٪ استفاده شد که سلول‌ها سریع‌ترین رشد و بهترین شرایط را در خود نشان دادند. در مطالعه Rathore و همکاران (۲۰۰۱) از سرم ماهی استفاده شد. در تولید تیره سلولی (THK) از کلیه ماهی تیلاپیا از غلظت‌های متفاوت سرم جنین گاوی (۲-۱۵ درصد) استفاده‌شده است (Wen, 2016). همچنین در تهیه تیره سلولی (TSHKC) از کلیه ماهی (*Cynoglossus semilaevis*) از سرم

جینن گاوی با غلظت ۲۰ درصد استفاده شد (Zheng *et al.*, 2012) ولی در تولید تیره سلولی (SISK) از کلیه ماهی باس دریایی از غلظت ۲- ۲۰ درصد سرم جینن گوساله استفاده شد (Sahul Hameed *et al.*, 2006) و در تهیه تیره سلولی (BPK) از کلیه ماهی (*Acanthopagrus schlegelii*) سرم جینن گاوی با غلظت ۱۰ درصد استفاده گردید (Tung *et al.*, 1991) که از این تفاوت درصد در استفاده از سرم جینن گاوی (FBS) می‌توان نتیجه گرفت انواع مختلف سلول‌ها نیاز به غلظت‌های سرمی متفاوتی دارند. علاوه بر رشد سلول‌ها سرم ممکن است نقش کلیدی در چسبیدن سلول‌ها به بستر و تکثیر آن‌ها، همانند آنچه در مورد تیره‌های سلولی تاس ماهی چینی (*Acipenser sinensis*) مشاهده شد داشته باشد (Zhou *et al.*, 2008). چسبیدن سلول‌ها به کف ظرف کشت اولین ضرورت موفقیت‌آمیز بودن کشت سلولی است. عموماً رشد خوب سلول‌ها بستگی به چسبندگی خوب سلول‌ها به کف ظرف کشت دارد که بسته به نوع ماهی و نوع سلول از غلظت‌های مختلف سرم استفاده می‌گردد تا به بهترین نتیجه در چسبندگی و تکثیر سلول‌ها دست‌یابیم.

دما یکی از فاکتورهای مهم در کشت سلول است (Bols *et al.*, 1992). اکثر تیره‌های سلولی این قابلیت را دارند که در رنج گسترده‌ای از دما تهیه شوند. طبق تحقیقات Wolf و Mann (۱۹۸۰)، دمای کشت یک ماهی در رنج دمای بهینه رشد آن ماهی است. در این مطالعه برای کشت سلول‌های کلیه ماهی سفید دریای خزر (*Rutilus kutum*) از سه رنج دمایی ۲۱، ۲۴ و ۲۸ درجه‌ی سانتی‌گراد استفاده شد که سلول‌ها در دمای ۲۴ درجه‌ی سانتی‌گراد بهترین چسبندگی و تکثیر را نشان دادند ولی در کشت اولیه از کلیه ماهی (*Clarias gariepin*) دما ۲۸ درجه سانتی‌گراد بوده است (Rathore *et al.*, 2001). در کشت اولیه باله از ماهی کپور آینه‌ای که از خانواده کپور ماهیان است مانند مطالعه حاضر در دمای ۲۶ تا ۳۰ درجه انجام گرفت (Zhou *et al.*, 2013). دمای بهینه رشد سلول‌ها در تهیه تیره سلولی (SHK) از کلیه ماهی (*Verasper variegates*) ۲۴ درجه گزارش شده است (Wang *et al.*, 2010). در بررسی دیگر که توسط نوروزفشخامی و همکاران (۱۳۹۶) صورت گرفت کشت تک لایه از بافت باله‌ی دمی تاس ماهی ایرانی در دمای ۲۲ درجه‌ی سانتی‌گراد انجام شد. نوروزی و همکاران (۱۳۹۳) اقدام به کشت اولیه و تولید تیره‌ی سلولی از ماهی آزاد دریای خزر در دمای ۲۰ درجه‌ی سانتی‌گراد نمودند. نوروزفشخامی و همکاران (۱۳۹۴) به منظور بررسی عملکرد سلول‌های فولیکولی تخمک تاس ماهی استرلیاد بافت تخمدان را در دمای ۲۲ درجه‌ی سانتی‌گراد کشت دادند به نظر می‌رسد این تفاوت‌ها به دلیل تفاوت دمای رشد و پرورش ماهیان مختلف است.

در مطالعه Nanda و همکاران (۲۰۱۴)، سلول‌ها رشد فیبرو بلاستی داشتند این مسئله که سلول‌های فیبرو بلاستی شکل در ماهی‌ها نسبت به سلول‌های اپیتالی شکل غالب هستند در کشت بافت تعدادی از مطالعات دیگر هم صادق است (Singh *et al.*, 1995; Lakra and Bhonde, 1996; Lai *et al.*, 2003). به‌طور طبیعی رشد سلولی در سلول بستگی به ماهیت سلول، توانایی سلول برای اتصال و نیازهای مواد مغذی دارد (Part and Bergstrom, 1995). علاوه بر این، رشد و تکثیر سلول‌ها در طی کشت و پاساژ نیز ممکن است بسته به نوع سلول زمان کشت اولیه، میزان سلول و غلظت سرم و غیره متفاوت باشد (Melican *et al.*, 2005).

درمجموع با توجه به نتایج به‌دست‌آمده از این مطالعه، دمای بهینه برای رشد سلول‌های کلیه ماهی سفید، دمای ۲۴ درجه سانتی‌گراد با میزان ۲۰٪ سرم جینن گاوی و pH ۷/۲ است. از این‌رو این شرایط دمایی و غلظت سرم برای مطالعات آتی ماهی سفید دریای خزر پیشنهاد می‌گردد. همچنین روش کشت سلول‌های کلیه در خارج از بدن موجود زنده و در محیط آزمایشگاهی به دلیل اهمیت حفظ ذخایر ژنتیکی آبزیان ایران و نیز لزوم تهیه کشت سلولی جانوران بومی برای مطالعات کاربردی، امکان تولید کشت سلولی اولیه از گونه ارزشمند ماهی سفید دریای خزر باید بیشتر مورد مطالعه قرار گیرد تا بتوان در آینده اقدام به تهیه تیره‌های سلولی بافت مذکور، انجماد و نگهداری آن به‌صورت بانک سلولی و استفاده از تیره‌های سلولی تهیه‌شده برای مقاصد گوناگون از جمله تشخیص بیماری‌های ویروسی استفاده نمود.

سیاسگزاری

نویسندگان از ریاست و معاونت محترم تحقیقاتی پژوهشکده آبزی‌پروری آب‌های داخلی کشور و کارکنان محترم بخش بهداشت و بیماری‌های آبزیان پژوهشکده آبزی‌پروری آب‌های داخلی کشور کمال تشکر و قدردانی را دارند.

منابع

- اداره آمار و صید شیلات ایران، ۱۳۹۴. دفتر برنامه‌ریزی گروه آمار و مطالعات توسعه شیلاتی، سالنامه آماری سازمان شیلات ایران
- خانی پور. ع. ا.، ۱۳۶۸. بررسی لیمنولوژیکی رودخانه پلرود و خشک‌رود (از نظر مهاجرت ماهی سفید)، دانشگاه تهران، دانشکده منابع طبیعی، کرج، ۱۵۲ ص.
- رضوی صیاد. ب.، ۱۳۷۸. مقدمه‌ای بر اکولوژی دریای خزر. موسسه تحقیقات شیلات ایران. تهران.
- نوروز فشخامی، م. ر.، سوداگر، م.، بهمنی، م.، مازندرانی، م. و یزدانی ساداتی، م. ع.، ۱۳۹۴. کشت اولیه سلولهای فولیکولی و تخمک تاسماهی استرلیاد (*Acipenser ruthenus*) روشی مناسب برای انجام مطالعات کاربردی. مجله آبزیان زینتی، ۲(۳): صفحات ۸-۱.
- نوروز فشخامی، م. ر.، پورکاظمی، م.، حسن‌زاده صابر، م.، بهمنی، م.، برادران نویری، ش.، دلیری، م. و غروقی، ا.، ۱۳۹۶. کشت بافت باله دمی تاسماهی ایرانی *Acipenser persicus* مجله پژوهش‌های جانوری. انجمن زیست‌شناسی ایران، ۳۰(۴): صفحات ۴۶۵-۴۷۶.
- نوروزی، ک.، کلباسی، م.، فرزانه، پروانه. شاهزاده افصلی، س. ا.، فرقدان، م.، نسیمیان، ا.، ایزدپناه، م.، آشوری موثق، س.، محمدی، ش.، مرادمند، ز.، فرهنگ نیا، م.، ۱۳۹۳. تولید و ارزیابی رده‌ی سلولی اپیتلیالی شکل از بافت باله ماهی آزاد دریای خزر. فیزیولوژی و بیوتکنولوژی آبزیان. سال دوم، شماره سوم. صفحات ۶۹-۸۸.

Abdul Majeed, S., Nambi, K. S. N., Taju, G. and Sahul Hameed, A. S., 2013. Development, characterization and application of a new fibroblastic-like cell line from kidney of a freshwater air breathing fish *Channa striata* (Bloch, 1793). *Acta Trop.* 127:25-32.

Alok, D., Hassin, S., Sampath, K. R., Trant, J. M., Yu, K. and Zohar, Y., 2000. Characterization of a pituitary GnRH-receptor from a perciform fish, *Morone saxatilis*: Functional expression in a fish cell line, *Molecular and Cellular Endocrinology*. 168: 65-75.

Aluru, N. and Vijayan, M. M., 2009. Stress transcriptomics in fish: A role for genomic cortisol signaling, *General and Comparative Endocrinology*. 164: 142-150.

Avella, M., Berhaut, J. and Payan, P., 1994. Primary culture of gill epithelial cells from the sea bass *Dicentrarchus labrax*, *In Vitro Cell Dev Biol.* 30:41-9.

Bejar, J., Borrego, J. J., Alvarez, M. C., 1997. A continuous cell line from the cultured fish gilt-head seabream (*Sparus aurata* L.). *Aquaculture*. 150:143-153.

Bols, N. C., Mosser, D. D., Steels, G. B., 1992. Temperature studies and recent advances with fish cells in vitro. *Comp Biochem Physiol.* 103: 1-14.

Bols, N. C., Brubacher, J. L., Ganassin, R. C., Lee, L. E. J., 2001. Ecotoxicology and innate immunity in fish, *Dev. Comput. Immunol.* 25:853-873.

Castro, R., Martin, S. A., Zou, J. and Secombes, C. J., 2010. Establishment of an IFN-gamma specific reporter cell line in fish, *Fish and Shellfish Immunology*. 28: 312-319.

Chen, S. N, Jong, K. J. and Kou, G. H., 1987. *Invertebrate Tissue Culture*, J. Mitsuhashi, (ed.) CRC Press, INV. (In Press)

Chen, B., Zheng, Z., Yang, J., Chi, H. and Huang, H., 2019. Development and characterization of a new cell line derived from European eel *Anguilla anguilla* kidney, *Biology open*. 8:bio037507.

Cheng, L. L., Bowser, P. R. and Spitsbergen, J. M., 1993. Development of cell cultures derived from lake trout liver and kidney in a hormone-supplemented, serum reduced medium, *Journal of Aquatic Animal Health*. 5: 119-126.

- Clem, L.W., Bly, J.E., Wilson, M., Chinchar, V.G., Stuge, T., Barker, K., Luft, C., Ryczyn, M., Hogan, R.J., van Lopik, T., Miller, N.W., 1996. Fish immunology: the utility of immortalized lymphoid cells – a mini review, Vet. Immunol. Immunopathol. 54:137–144.
- Dannevig, B. H., Brudesth, B. E., Gj  en, T., Rode, M., Wergenland, H. I., Evensen,  . and Press, C. M., 1997. Characterisation of a long-term cell line (SHK-1) developed from the head kidney of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.), Fish and Shellfish Immunology. 7:213–226.
- Esmacili, H. R., Sayyadzadeh, G., Eagderi, S. and Abbasi, K., 2018. Checklist of freshwater fishes of Iran, FishTaxa. 3(3): 1-95.
- Fan, L. C. and Collodi, P., 2002. Progress towards cell-mediated gene transfer in zebrafish. Brief Funct Genomics 1(2):131–138.
- Fernandez R. D., Yoshimizu, M. Ezura, Y. and Kimura, T., 1993. Comparative growth response of fish cell lines in different media, temperatures and sodium chloride concentrations. Fish Pathology. 28: 27–34.
- Freshney, R. I., 2000. Culture of Animal Cells; A Manual of Basic Technique, 4th ed. Wiley-Liss, John Wiley and Sons, Inc. Publ., New York, USA. 577 p.
- Goswami, M., Sharma, B. S., Tripathi, A. K., Yadav, K., Bahuguna, S. N., Nagpure, N. S., Lakra, W. S. and Jena, J. K., 2012. Development and characterization of cell culture systems from *Puntius* (Tor) *chelyonoides* (McClelland). Gene, 500: 140-147.
- Ham R. G., 1981. Cell growth requirements-the challenge we face. In: Waymouth C.; Ham R. G.; Chapple P. J. (eds) The growth requirements of vertebrate cells in vitro. Cambridge University Press, Cambridge, pp 1–15.
- Holopainen, R., Tapiovaara, H. and Honkanen, J., 2012. Expression analysis of immune response genes in fish epithelial cells following ranavirus infection. Fish and Shellfish Immunology. 32: 1095-1105.
- Kamalendra, W. S., Lakra, J., Sharma, M., Goswami and Sharma, B. S., 2010. Development of cell culture from caudal fin and heart of Tor Tor (Hamilton Buchanan) Indian, Fish. Assoc., 37: 37-43.
- Kienzler, A., Tronch  re, X., Devaux, A. and Bony, S., 2012. Assessment of RTG-W1, RTL-W1, and PLHC-1 fish cell lines for genotoxicity testing of environmental pollutants by means of a Fpg-modified comet assay, Toxicology in Vitro: An International Journal Published in Association with BIBRA. 26:500-510.
- Kim, M. S., Jee, B. Y., Cho, M. Y., Kim, J. W., Jeong, H. D., Kim, K. H., 2012. KFugu double U6 promoter-driven long double-stranded RNA inhibits proliferation of viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV) in fish cell lines. Arch Virol. 157:1029–1038.
- Kojima, H., Takeuchi, S., Tsutsumi, T., Yamaguchi, K., Anezaki, K., Kubo, K., Iida, M., Takahashi, T., Kobayashi, S., Jin, K. and Nagai, T., 2011. Determination of dioxin concentrations in fish and seafood samples using a highly sensitive reporter cell line, DR-EcoScreen cells. Chemosphere, 83: 753-759.
- Kumar, G. S., Bright Singh, I. S. and Philip, R., 2001. Development of a cell culture system from the ovarian tissue of African catfish (*Clarias gariepinus*). Aquaculture. 194:51-32.
- Lai, Y. S., Murali, S., Ju, H. Y., Wu, M.F., Guo, L.C., Chen, S. C., Fang, K. and Chang, C. Y., 2000. Two iridovirus susceptible cell lines established from kidney and liver of grouper, *Epinephelus awoara* (Temminck & Schlegel), and partial characterization of grouper iridovirus. Journal of Fish Diseases. 23:379–388.
- Lai, Y. S., John, J. A. C., Un, C. H., Guo, I. C., Chen, S. C., Fang, I.C., Un, C. H. and Chang, C. Y., 2003. Establishment of cell lines from a tropical grouper, *Epinephelus awoara* (Temminck and Schlegel), and their susceptibility to grouper irido and nodaviruses. Journal of Fish Diseases. 26: 3142.
- Laing, K. J. and Hansen, J. D., 2011. Fish T cells: Recent advances through genomics, Developmental and Comparative Immunology. 35: 1282-1295.
- Lakra, W. S. and Bhondae, R. R., 1996. Development of primary cell culture from the caudal fin of an Indian major carp, *Labeo rohita* (Ham.). Asian Fisheries Science. 6: 149-152.
- Leibovitz, A., 1963. The growth and maintenance of tissue-cell cultures in free gas exchange with the atmosphere, Am.J. Hyg. 78:173-180.

- Maclean, N., 2011.** Cellular, molecular, genomics, and biomedical approaches, transgenesis and chromosome manipulation in fish, *Encyclopedia of Fish Physiology*. Elsevier. 1998-2008.
- Melican, D., Butler, R., Hawkins, N. and Chen, L. H., Hayden, E., Destrempes, M., Williams, J., Lewis, T., Behboodi, E., Ziomek, C., Meade, H., Echelard, Y., Gavin, W., 2005.** Effect of serum concentration, method of trypsinization and fusion/activation utilizing transfected fetal cells to generate transgenic dairy goats by somatic cell nuclear transfer. *Theriogenology*. 63:1549-1563.
- Moritz, C. and Labbe, C., 2008.** Cryopreservation of goldfish fins and optimization for field scale cryobanking. *Cryobiology*. 56(3): 181-188.
- Nanda, P. K., Swain, P., Nayak, S. K., Behera, T. and Dhama, K., 2014.** Comparative Study on Enzymatic and Explanet Method in Establishing Primary Culture from Different Cultivable Cells of Indian Major Carp, *Cirrhinus mrigala*. *Asian. Journal of Animal and Veterinary Advances*. 1683-9919.
- Noga, E. J. and Hartmann, J. X., 1977.** Establishment of cell lines from the walking catfish, *Clarias batrachus* (L.J) and their infection with channel catfish virus. *In Vitro Cell Dev. BioI*. 13:160.
- Oh, Y. B., Lee, J. S. and Park, E. H., 2001.** Fish cell line as an in vitro test system for analyzing chromosome aberrations. *Bull Environ Contam Toxicol*. 67(1):6-11.
- Parameswaran, V., Shukla, R., Bhonde, R. and Sahul Hameed, A. S., 2006a.** Establishment of embryonic cell line from sea bass (*Lates calcarifer*) for virus isolation, *Journal of Virological Methods* 137(2): 309-316.
- Parameswaran, V., Shukla, R., Bhonde, R. and Sahul Hameed, A. S., 2006b.** Splenic cell line from sea bass, *Lates calcarifer*: establishment and characterization, *Aquaculture* 261: 43-53.
- Rathore, G., Sood, N. and Swaminathan, R., 2001.** Primary Cell Culture From Fish gill and kidney using fish serum. *Indian Journal of Experimental Biology*. 39:936-938.
- Rode, M., Berg, T. and GjØen, T., 1997.** Effect of temperature on endocytosis and intracellular transport in the cell line SHK-1 derived from salmon head kidney. *Comp Biochem Physiol A*. 117(4):531-537.
- Ruiz, S., Schyth, B. D., Encinas, P., Tafalla, C., Estepa, A., Lorenzen, N. and Coll, J. M., 2009.** New tools to study RNA interference to fish virus: fish cell lines permanently expressing siRNAs targeting the viral polymerase of viral hemorrhagic septicemia virus. *Antiviral Res*. 82(3):148-156.
- Sahul Hameed, A. S., Parameswaran, V., Shukla, R., Bright Singh, L. S., Thirunavukkarasu, A. R. and Bhonde, R. R., 2006.** Establishment and characterization of India's first marine fish cell line (SISK) from the kidney of sea bass (*Lates calcarifer*), *Aquaculture*. 257. 92-103.
- Salinas, I., Meseguer, J. and Esteban, M. A., 2008.** Antiproliferative effects and apoptosis induction by probiotic cytoplasmic extracts in fish cell lines. *Vet Microbiol*. 126(1-3):287-294.
- Sarath Babu, V. S., Nambi, K. S. N., Chandra, V., Ishaq Ahmed, V. P., Bhonde, R., Sahul Hameed, A. S., 2012.** Establishment and characterization of a fin cell line from Indian walking catfish, *Clarias batrachus* (L.), *J Fish Dis*. 34:355-364.
- Singh, I. S. B., Rosamma, P., Raveendranath, M. and Shanmugam, J., 1995.** Development of primary cell cultures from kidney of fresh water fish *Heteropneustus fossilis*. *Indian J. Exp. Biol*. 33, 595-599.
- egner, H., 1998.** Fish cell lines as a tool in aquatic toxicology. *EXS* 86, 1-38.
- Stafford, J. L., Mclauchlan, P. L., Secombes, C. J., Ellis, A. E. and Belosevic, M., 2001.** Generation of primary monocyte-like cultures from rainbow trout head kidney leukocytes, *Developmental and Comparative Immunology*. 25:447-459.
- Tafalla, C., Estepa, A. and Coll, J. M., 2006.** Fish transposons and their potential use in aquaculture, *Journal of Biotechnology*. 123: 397-412.
- Thomas, P., 2012.** Rapid steroid hormone actions initiated at the cell surface and the receptors that mediate them with an emphasis on recent progress in fish models, *General and Comparative Endocrinology*. 175: 367-383.
- Tong, S. L., Lee, H. and Miao, H. Z., 1997.** The establishment and partial characterization of a continuous fish cell line FG-9307 from the gill of flounder *Paralichthys olivaceus*, *Aquaculture*. 156:327333.

- Tong, S. L., Miao, H. Z. and Li, H., 1998.** Three new continuous fish cell lines of SPH, SPS and RSBF derived from sea perch (*Lateolabrax japonicus*) and red sea bream (*Pagrosomus major*), *Aquaculture*. 169:143-151.
- Tung, L. C., Chen, S. N. and Kou, G. H., 1991.** Three cell lines derived from spleen and kidney of black porgy (*Acanthopagrus schlegelii*). *Fish Pathol.* 26:9-17.
- Wang, N., Wang, X. L., Sha, Z. X., Tian, Y. S. and Chen, S. L., 2010.** Establishment, characterization and virus susceptibility of a kidney-derived cell line from southern flounder, *Paralichthys lethostigma* Jordan & Gilbert. *Journal of Fish Diseases*. 34(1):81-5
- Watanabe, Y., Hanada, H. and Ushiyama, M., 1981.** Monolayer culture from marine fish, *Fish Pathol.* 15:201-205.
- Wen, C. M., 2016.** Development and characterization of a cell line from tilapia head kidney with melanomacrophage characteristics. *Fish & Shellfish Immunology*. 49:442-449.
- Wergeland, H. I. and Jakobsen, R. A., 2001.** A salmonid cell line (TO) for production of infectious salmon anaemia virus (ISAV). *Dis Aquat Organ*. 44: 183-190.
- Wolf, K. and Quimby, M. C., 1969.** Fish cell and tissue culture, In *Fish Physiology* (Eds. Hoar, W.S, Randall, P.J.), New York Academic Press. pp 253-305.
- Wolf, K. and Quimby, M. C., 1976.** Primary monolayer culture of fish cells initiated from minced tissues. *Methods in Cell Science* 2(4): 445-448.
- Wolf K. and Mann, J. A., 1980.** Poikilotherm vertebrate cell lines and viruses: a current listing for fishes, *In Vitro*. 16(2): 168-179.
- Wolf, K. and Ahne, W., 1982.** Fish Cell culture, In *Advances in cell culture Vol2.* (Ed. Maramorosch, K.) New York Academic Press. pp 305-328.
- Zheng, Y., Wang, N., Xie, M. S., Sha, Z. X. and Chen, S. L., 2012.** Establishment and characterization of a new fish cell line from head kidney of half-smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*). *Fish Physiol Biochem*. 38:1635-1643.
- Zhou, H. Y., Shin, E. M., Guo, L. Y., Youn, UJ., Bae, K., Kang, S. S., Zou, L. B. and Kim, Y. S., 2008.** Anti-inflammatory activity of 4-methoxyhonokiol is a function of the inhibition of iNOS and COX-2 expression in RAW 264.7 macrophages via NF-kappaB, JNK and p38 MAPK inactivation, *European Journal Pharmacology*. 586: 340-349.
- Zhou, J., Wang, H., Zhu, X., Li, X., Lv, W. and Zheng, D., 2013.** The primary culture of mirror carp snout and caudal fin tissues and the isolation of Koi herpesvirus, *In Vitro Cell Dev Biol Anim*. 49(9):734-42.
- Zuo, W. G., Qian, H. X., Xu, Y. F., Du, S.Y., Yang, X.L., 1986.** A cell line derived from the kidney of grass carp (*Ctenopharyngodon Idellus*). *Journal of Fisheries of China*. 1:11-17.