

水生无脊椎动物细胞培养

刘万磊*

(山东理工大学生命科学院, 淄博 255049)

摘要 目前水生无脊椎动物的细胞培养研究远远落后于哺乳动物和昆虫的培养研究, 其培养方法基本仍是套用哺乳动物或昆虫的细胞培养模式。尽管在几十年中进行了一些探索, 而且原代培养也取得了一些进展, 但到目前为止除了淡水蜗牛胚胎 BGE 细胞系外, 其他动物都还没有成功的建立长时间持续传代的细胞系。现对水生无脊椎动物细胞培养的研究进行综述, 并对所面临的主要困难进行了总结, 对水生无脊椎动物细胞培养的前景提出了一些看法。

关键词 水生无脊椎动物; 细胞培养; 原代培养; 细胞系

自从上世纪初 Harrison 和 Carrel 创立动物组织和细胞的体外培养方法以来, 细胞培养技术得到了长足的发展, 在基础理论研究和应用研究中都起到了不可替代的重要作用。然而, 到目前为止, 对于细胞培养技术本身的研究主要集中于脊椎动物(特别是哺乳动物)和昆虫, 对于水生无脊椎动物细胞培养的关注却相对较少。在公开刊物发表的有关细胞培养问题的论文中, 绝大多数是脊椎动物和昆虫的; 目前世界上几个主要的细胞库 ATCC、ECACC、RCB 所收集的细胞系只有一例来自于淡水蜗牛; 2004 年 3 月在美国旧金山召开了第十一届国际无脊椎动物细胞与组织培养大会, 大会讨论的主题仍然是昆虫的细胞培养问题(<http://www.sivb.org/InVitroReport/38-3/SciNews.htm>)。

从 20 世纪 60 年代开始, 少数研究团体和个人开始关注水生无脊椎动物的细胞培养问题。半个世纪以来, 研究者一直致力于建立长时间持续传代的细胞系。遗憾的是, 付出的努力大多以失败告终。到目前为止, 除了淡水蜗牛胚胎(*Biomphalaria glabrata* embryonic, BGE)细胞系外, 其他动物都还没有建立细胞系。但就其原代培养方面还是取得了一些进展, 初步建立了一些细胞的培养方法, 并成功的将细胞在体外长时间保持活性。

尽管水生无脊椎动物所涉及的门类及物种数很多, 但基于基础理论和应用的实际需要, 报道主要集中于几个有限的种类, 其中相对比较多的为虾、软体动物、海绵和其他几种门类。

1 虾

虾属于节肢动物门甲壳纲, 是重要的经济水产养殖动物。上个世纪 80 年代以来, 世界范围内掀起了养虾高潮, 并且发展迅速, 到上世纪末时产量仅次于鱼类, 年产值几十亿美元^[1]。但虾养殖业受到各类疾病特别是病毒的巨大威胁, 一些疾病曾经导致中国大陆、台湾省、菲律宾等国家和地区的虾养殖业基本崩溃^[1]。细胞培养技术是研究病毒学的基础, 可用于病毒的分离、纯化、疫苗和单克隆的制备以及病毒敏感药物的筛选, 这种方法在哺乳动物病毒性疾病的研究和治疗上已非常普遍。

在过去的几十年中, 很多研究团体和个人致力于建立持续的虾细胞系, 但均未获得成功。但是, 在摸索虾细胞原代培养的条件方面积累了一些经验, 这些研究为虾细胞系的建立打下了基础。而且, 在细胞培养的基础上分离病毒和病理的研究也取得了初步的成功。

1.1 虾细胞的培养方法

1.1.1 培养基 目前在虾细胞培养中主要还是采用改良的哺乳动物或昆虫细胞培养基, 如 MEM、RPMI、L15、M199、Grace 液等。其中有一些能很好的支持虾细胞的生长, 用的最多的是 L15^[2]。部分报道涉及到虾细胞专用培养基的开发问题, 在这些培养基中进行原代培养细胞生长良好, 但还不能支持细胞的长期培养^[3,4]。

收稿日期: 2005-09-05 接受日期: 2005-10-26

* 通讯作者。Tel: 0533-2781329, Fax: 0533-2781832, E-mail:

wlliu@sdut.edu.cn

在基本培养基的添加物方面,大量的报道证实添加 10%~20% 的胎牛血清(FBS)是虾细胞培养所必需的^[3,5,6]。有时可添加一些甲壳类动物或虾自身的组织提取液或淋巴液,但对细胞生长的影响不太稳定,部分研究发现组织液对生长帮助不大甚至对生长有害^[3,6,7]。而且大多数研究表明添加各类生长因子和促有丝分裂原对细胞的分裂都没有明显的帮助,甚至抑制细胞的生长^[2,3,5,6]。

1.1.2 渗透压、pH 值和温度 海产虾细胞培养的渗透压一般都在 720~760 mOsm/L 之间^[2]。但由于不同虾生活环境相差较大,而且还涉及一些淡水虾类,所以部分报道也存在较大的差异^[2,8]。

而对于 pH 值,一般范围为 7.0~7.5,具体可通过测定所要培养的虾的体液的 pH 值来确定^[2]。

虾属于变温动物,进行细胞培养时的温度一般都设定在成体生活的最适温度段。从现有的研究来看,培养温度从 22~30 °C 都有比较好的培养结果,说明变温动物离体细胞对温度的耐受能力较强。不过温度控制在 25~28 °C 之间被认为是培养虾细胞的适宜温度,过高或过低都会影响细胞的生长速度^[2,8]。

1.1.3 接种方法 大量研究表明,通过酶水解分散细胞对虾细胞的体外贴壁和存活能力损伤很大^[2,3,5,6]。所以虾细胞培养一般采用外植体培养。此方法关键之处就在细胞能否从组织块迁移出来并快速贴壁,虾组织被证明有非常强的贴壁能力,不用胶原等细胞外基质成分的促进就可以很好的贴壁^[2]。Fraser 等^[7]发现在 Hanks 平衡盐溶液(HBSS)中,细胞可从组织块中快速移出,并在两天内形成单层,然后再可换上培养基进行培养。而在某些原代培养中如需将单层细胞传代,一般采用机械刮取法^[5,7]。

1.1.4 防菌方法 为了防止在虾细胞培养过程中感染微生物,除了常规的无菌操作需求外,通常还要在培养中添加抗生素“鸡尾酒”。因为在虾的淋巴液中通常会发现细菌或真菌等微生物,如没有必要的抗生素处理,培养物通常在短时间内就会被微生物感染^[2]。在众多的光谱性抗生素中,添加青霉素和链霉素被证明是防止污染的有效方法^[2]。

1.2 培养结果

由于不能建立持续传代的细胞系,虾细胞培养的研究仍然处于原代培养阶段。很多组织或器官都被尝试用于细胞培养,如神经、上皮、心脏、淋巴、鳃、肝胰腺、卵巢、造血组织、胚胎等^[2,3,5,6]。尽管大部分组织都有较成功的原代培养的报道,但

目前的研究表明,比较容易培养的组织主要为心脏、淋巴、卵巢等^[2,3,5,6]。而肝胰腺、卵巢、造血组织等较适合做病理分析,研究的相对较多^[2]。

对于体外存活能力较强的组织,原代培养一星期内一般都有细胞从组织迁移到培养基中,并进行增殖。如培养结果较为理想,在一星期内可形成连续的单层。有时可传三代,但经过几次传代后,细胞的增殖能力便大大减弱,如果保持更换培养基,可在体外长时间保证细胞的活性,Fraser 等^[7]报道体外存活的最长时间为 17 个月。

在原代培养的基础上,一些细胞已经用于对细胞病理的分析,并取得了初步的成果^[5,9]。

2 软体动物

软体动物细胞培养最大的特点就是其应用的广泛性,无论是在无脊椎动物免疫学、神经生物学、肿瘤生物学等基础理论方面,还是在环境检测、水产养殖、珍珠生产等实践应用方面都起着重要的作用。正因为此,软体动物细胞培养所涉及的动物种类也相应比较广泛。

软体动物细胞培养的另一个显著的特点就是在早期便取得了很大的进展,1979 年便有保持牡蛎阿米巴细胞的活性长达 6 个月的报道,而且在 1976 年成功的从淡水蜗牛的胚胎细胞培育出持续的 BGE 细胞系^[10]。

2.1 软体动物细胞培养的应用

2.1.1 在免疫学中的应用 利用软体动物血细胞与病原菌体外共培养的方法已经广泛应用于研究免疫的细胞和分子机制^[11]。而且,很多软体动物是人类寄生虫的中间宿主,如淡水蜗牛-血吸虫寄生系统等。由于血吸虫病是曾一度流行比较广泛的严重疾病,所以对于血吸虫在软体动物血细胞寄生阶段其宿主的免疫机制关注的比较多^[12]。

2.1.2 在神经生物学中的应用 软体动物较哺乳动物具有更为简单的神经系统,而且容易鉴定并适于机械和电生理操作,其神经细胞的培养已广泛用于神经轴突生长和再生的研究^[13]。近几年来,基于软体动物神经细胞培养发展出一套用于突触研究的简单模式系统,直接从淡水蜗牛(*Lymnaea stagnalis*)分离出一对神经元(RPeD1 和 VD4)的胞体在体外培养,神经细胞不但能再生出各自的轴突,而且可形成与在体内一样的化学突触连接。这样不但可直接检测各种生物活性物质如神经生长因子、营养因

子、离子及各种生物活性因子对轴突再生和形成突触的作用，还可直接测量电生理参数以方便研究麻醉剂对化学突触的影响等^[14]。

2.1.3 在肿瘤生物学中的应用 从上个世纪60年代开始，相继发现美国海岸双壳类软体动物，特别是软壳蛤(*Mya arenaria*)容易产生各类肿瘤，如性腺瘤、造血细胞瘤等，而且有着很高的发病率^[15]。由于考虑到化学致癌物等对人类可能造成同样的威胁，对于其诱因和发生机制研究的比较多。而在软体动物肿瘤细胞的体外培养方面，肿瘤细胞和正常细胞一样也很难在体外长时间存活，没有表现出很强的增殖能力^[10]。最近对于体外培养的报道却比较少，可能是因为在培养方面还没有根本性的进展。

2.1.4 应用于环境检测 因为双壳类软体动物分布广泛，容易采集，而且呈固着式生长和过滤性摄取食物，很容易在体内聚集多种高浓度的污染物，所以一直是水污染检测的良好材料，在上个世纪70年代Goldberg就提出广泛应用于世界各国环境监测的贻贝观察工程(mussel watch program)。最近几年，利用培养的细胞进行环境污染物的检测得到越来越多的关注。分散的细胞较动物个体来说不仅操作简单、检测周期短、灵敏度高，而且可以进行细胞毒性机制的研究。对于环境污染物的检测不仅可以在细胞水平进行，如利用心肌细胞的搏动频率、血细胞的聚集能力等作为检测参数，还能利用酶活性、DNA断裂指数等作为参数进行分子和生化水平的分析^[16]，显示出广泛的应用价值。

2.1.5 应用于水产养殖 同虾一样，软体动物的一些种类如贝类、牡蛎等都是重要的经济养殖动物，而且一些感染性的病原不仅直接影响养殖动物的生产，还带来严重的食品安全问题。很多报道已经开始利用培养的细胞研究病原感染细胞病理机制及防治疾病措施，特别是原代培养的血细胞经常用于病理分析^[17]。

2.1.6 应用于珍珠生产 在可产珍珠的贝类中，外套膜上皮细胞分泌主要由文石CaCO₃组成的珍珠质包裹进入体内的沙子等颗粒便形成银白色的珍珠。目前对于分泌珍珠质的细胞生物学机制还了解不多，而基于个体或组织水平分析又有很多不便，所以对于外套膜上皮细胞培养的研究对于珍珠产生机制的揭示有重大意义。已有大量报道成功的对一些产珍珠贝类的外套膜细胞进行成功的原代培养并检测到部分CaCO₃文石的形成，而且这些成功预示

着可以通过建立分泌珍珠质细胞系的方法进行珍珠的生产，这样不仅方面生产材料的保存，还可以通过选择不同细胞系或改良细胞系的方法来控制珍珠的质量^[18,19]。

2.2 软体动物细胞培养概况及最新进展

由于软体动物细胞培养有着广泛的应用前景，所以对于其培养的研究较其他水生无脊椎动物开展的更早更广泛，而且在上个世纪70年代便建立了水生无脊椎动物中唯一的BGE细胞系。

2.2.1 BGE细胞系 BGE细胞系是Hansen为了研究血吸虫胞蚴感染细胞机制于1976年从淡水蜗牛的胚胎(*Biomphalaria glabra* embyo, BGE)建立的，后由Bayne等^[20]完善了冻存方法并提交给ATCC(CRL-1494)。BGE细胞系的培养基组成为22%Schneider果蝇培养基、20%胎牛血清、58%双蒸水，另加乳白蛋白水解物(4.5 g/L)和半乳糖(1.3 g/L)。值得注意的是BGE细胞系对血清成分极度敏感，需要经过多次尝试。形成单层后经过胰蛋白酶水解后即可传代(ATCC)。

BGE细胞系在体外表现出血细胞的一些特征，如底物黏附特性、吞噬作用、特征酶的组成等，利用BGE细胞与血吸虫胞蚴共培养已广泛用于研究寄生的细胞和分子机制^[21]。而且由于BGE细胞系是目前唯一的水生无脊椎动物细胞系，经常用于水生无脊椎动物细胞基础理论的研究^[22]。

2.2.2 软体动物细胞培养最新进展 尽管在软体动物细胞培养的早期便获得如此可喜的成就，但令人遗憾的是，几十年过去后软体动物的细胞培养相对于上个世纪70年代没有大的进展，其细胞培养和虾类遭遇着同样的失败^[10]。到目前为止，除了BGE细胞系，还没有成功建系的报道，大部分细胞培养通常在体外只能存活比较短的时间，虽然有些报道细胞可存活数月但只能分裂几代便不再分裂，整个培养最后也因微生物污染而告终^[10]。

而对于目前软体动物的基本培养方法，与虾细胞培养基本类似。在培养基方面，用的最多也比较适合软体动物细胞的也是L15，而其他各种添加成分对于细胞的影响基本也与虾细胞培养类似。就接种方法来说，呈报道用胶原蛋白酶处理组织后，细胞仍能很好的贴壁，5天后形成单层，但传代后便不再增殖^[23]。

3 海绵

海绵属于动物界多孔动物门,是最低等的多细胞海洋动物。近几十年来,在海绵中发现了大量的具有抗肿瘤、抗真菌、甚至抗 HIV 的活性物质。现在,每个月都有数篇从海绵中发现活性物质的报道公开发表,相关的专利也有上百个之多^[24]。尽管海绵活性物质的利用显现出巨大的市场前景,但绝大部分活性物质都还不能进行商业化生产,其主要限制因素就是“药源供给不足”问题:(1)大多数生物活性物质在海绵中的含量非常低。(2)大部分野生海绵个体偏小而且生长缓慢。(3)大量采集海绵对海洋生态环境存在极大的破坏作用^[25]。

随着细胞和组织培养技术的发展,利用海绵组织和细胞的培养来获取这些具有生物活性的代谢产物成为目前研究的主流。目前对海绵组织和细胞的体外培养主要有三种方法:组织培养、细胞培养和细胞团培养。但值得注意的是,海绵的组织培养与一般意义的组织培养有根本性的不同。海绵具有高度的细胞全能性和再生能力,在适当的条件下组织块不会解体成细胞,而重新生长成完整的个体。所以海绵动物的组织培养实际是在人工条件下的海绵养殖,通常在循环封闭式水族缸中培养^[25]。

3.1 细胞培养

虽然海绵组织块具有生长成为个体的能力,但分散的海绵细胞在体外表现出很弱的增殖能力,到目前为止仍然只能将海绵细胞保持一定时间的存活而不能持续分裂,其细胞培养建系均以失败告终,所以同样还是停留在原代培养的初级阶段^[10,25]。但海绵细胞的原代培养还是取得了一定的进展,比如开发出针对海绵细胞的培养基^[24],而且最近还检测到体外培养的海绵细胞产生次生代谢产物^[24,25]。

3.1.1 培养方法 目前获取分散的海绵细胞悬液的方法一般为化学分离法和机械分离法的组合。将切下的海绵块置于不含 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 的无菌海水进行机械搅拌或震荡,再通过细筛网挤压使之分散,一般都可以得到浓度较高的细胞悬液^[25,26]。

分散好的细胞悬液便可接种于培养基。目前海绵细胞原代培养所用的培养基一般是用不含 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 的人工海水(CMFSW)配制商业培养基而成,另外在此基础上添加胎牛血清、缓冲剂和其它成分,其中 CMFSW 的主要作用就是让细胞在培养过程中保持分散状态^[25]。在此培养基的基础上,大量报道尝试添加脂类、糖类、无机盐、有丝分裂原等促进细胞生长的物质,取得一定的效果^[26,27]。

由于大多数海绵与微生物存在共生现象,所以对于海绵的细胞培养,防止微生物污染是一个较大的困难。目前所采用的方法仍然是添加大量的抗生素,De Rosa 等^[26]在培养基中一共添加了五种抗生素:氨苄青霉素、庆大霉素、卡那霉素、泰乐菌素、四环素,抗菌效果良好。

3.1.2 培养结果 尽管海绵细胞在组织中表现较强的增殖能力和全能性,但体外培养的分散的海绵细胞却不能进行良好的增殖。虽然利用凝集素刺激可诱导培养的海绵细胞进行分裂,但分裂几次后便停止了^[25]。De Rosa 等^[26]报道培养后第 4 天细胞便不再增殖,其他培养结果也基本类似,目前这是妨碍海绵细胞建系的最根本的原因。而海绵细胞体外增殖能力的丧失很可能与细胞相互失去接触有关,Kozioł 等^[28]人发现在海绵个体中细胞表现出很强的端粒酶活性,但解离后的游离细胞则丧失了该酶的活性,且迅速转入死亡期。

虽然没有建立持续的细胞系,但长时间保持细胞活性的原代培养已获成功。来自于成体的细胞培养最大存活时间为 25 个星期,来自于胚胎细胞则为 41 个星期^[10]。

另外还有一个值得注意的问题,在过去的几年中发现大量报道所培养的海绵细胞实际上是原生动物的,而且在形态上很难将两者区分开来^[10,25,27]。考虑到极容易受到微生物的影响,为确保培养的细胞是海绵细胞,可用特异 DNA 探针杂交的方法进行鉴定^[27]。

3.2 细胞团培养

由于分散的细胞在体外表现出极弱的增殖能力,近几年来,细胞团培养得到越来越多的关注。Custodio 等^[29]首次对海绵 *Suberites donucncul* 的组织建立了以海绵细胞团为培养对象的体系。如果在培养基中添加较高浓度的 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} ,原代培养物中的海绵细胞在几小时内就会自发的聚集,在几天内形成直径 1~3 mm 左右的小团,称为 *primmorph*。通过切片观察发现 *primmorph* 是一个有高度组织的结构,外面由一单层扁平上皮细胞构成,而内层由球形细胞构成。而且如果原代培养中存在共生菌,这些菌类也会参与形成 *primmorph*,但细胞碎片和非共生物在 *primmorph* 中却不存在^[25]。

Primmorph 表现出极强的生存能力,在海水中不添加培养基可维持活性达 5 个月以上^[29]。离散的海绵细胞在形成了 *primmorph* 后其端粒酶活性很快

由阴性转为阳性, 并且具有 DNA 合成和细胞增殖的能力^[25]。目前已有大量的报道表明很多种类的海绵都可形成 primmorph^[25]。而且在 primmorph 中检测到活性代谢产物^[28]。目前对于 primmorph 形成的细胞和分子机制仍处于研究之中^[30]。

4 其他动物

4.1 腔肠动物

海绵动物通常被认为是进化中的一个侧枝, 而腔肠动物是具有一定组织结构的最原始的多细胞后口动物。腔肠动物细胞培养与海绵有些相似之处: (1)分散的细胞表现出很弱的增殖能力, 并倾向于重新聚集; (2)个体表现出极强的再生能力和细胞全能性; (3)很多种类和单细胞藻类存在共生现象, 为无菌培养带来很多困难; (4)细胞培养仍然处于原代培养的初始阶段^[10]。Frank 等^[31]于 1994 年系统研究了 10 种腔肠动物的细胞培养, 并成功的在体外长时间保持细胞的活性。所用的培养基为修改的 L15, 接种细胞后 7~20 天开始增殖, 被传代几次, 最长的存活时间达 1 年左右, 并进行了冻存, 但进行复苏时被单细胞原生动动物污染^[10]。另外基于细胞培养还可以更好的分析两个关注比较多的问题: 中胶层与细胞的相互作用^[12]以及珊瑚虫细胞分泌产生珊瑚的机制^[32]。

4.2 棘皮动物

一些棘皮动物曾一度是研究胚胎发育与细胞分化的模式生物, 所以对于其胚胎细胞体外培养分化的问题关注比较多。不同的报道曾对海胆、海星、海参等棘皮动物的胚胎细胞的体外培养进行了研究, 因为研究者所关注的主要问题是胚胎细胞的体外分化, 对其长时间培养和建系没有过多的关注, 所以通常培养的细胞在体外存活时间相对较短(几天到 40 天)^[10]。

另外也有一些研究者致力于细胞培养建系的问题, 但发现棘皮动物细胞在体外表现出非常低的增殖能力, 而且培养的不同细胞容易聚集, 到目前为止还没有在体外长时间保持细胞活性的报道^[10,33]。

4.3 海鞘

海鞘属于脊索动物门尾索动物亚门, 是典型的被囊类动物。作为脊索动物门中最原始的一类动物, 海鞘在免疫、胚胎发育、遗传学、细胞学等各个领域对研究脊椎动物的系统发生都有着重要的作用。由于海鞘作为模式动物的重要性, 对于

其细胞培养的关注也相对比较多, 但主要集中在对血细胞的培养以揭示尾索动物的免疫机制^[10]。目前对血细胞培养面临的主要困难就是成熟血细胞的寿命较短, 只能存活几个星期, 还不能长时间的在体外保持活性^[10]。另外, 大量的报道证实海鞘的血细胞具有全能性, 个体中分离的外周血管片段能再生出芽形成一个新的个体^[34], 但目前在体外还不能实现^[10]。另外部分报道涉及海鞘上皮细胞的原代培养, 也只能在体外存活较短的时间^[35]。

5 小结

5.1 水生无脊椎动物细胞培养面临的主要困难

尽管付出了不少努力, 水生无脊椎动物细胞培养现状离普遍建立持续细胞系的目标还有相当的差距, 现在虽然还不能解释为什么细胞在体外不能持续的分裂, 但总结起来目前面临的困难主要存在于 3 个方面。

5.1.1 培养基的制备 水生无脊椎动物细胞对营养和培养条件的需求与哺乳动物应该有很大的差异, 特别是对一些低等的无脊椎动物(如海绵等), 其细胞培养与哺乳动物截然不同。但目前还缺乏水生无脊椎动物营养和细胞生理方面的细致研究, 直接套用哺乳动物或昆虫的培养基显然没有取得最佳培养效果。另外, 对水生无脊椎动物细胞分裂所需要的促进因子还了解甚少。

5.1.2 防菌问题 对于绝大多数水生无脊椎动物的细胞培养来说, 防止微生物污染都是一件相当困难的事情, 大部分原代培养最后都以微生物污染而告终。一些培养采用稀释培养基、密度梯度离心去除、添加抗生素等方法都还不能解决根本问题。而且对于一些本身就与微生物共生的动物, 在细胞培养中如何处理共生菌与细胞的关系还是一个问题。

5.1.3 接种方法 利用外植体直接培养还存在一些弊端, 如获取的分散细胞的数量过少, 而且能从组织块迁移的细胞种类有限, 极大的限制了接种细胞的数量和质量, 而通过酶水解分散对细胞损伤较大, 所以需要寻求一种能获取大量分散细胞的有效方法。

5.2 水生无脊椎动物细胞培养的发展前景

就像 Rinkevich^[10]所说, 来自于多细胞动物的任何一种细胞都会表现出独立性, 能在体外建立一个新的实体而不受整个机体体液或神经的调节。尽管目前在建立持续的水生无脊椎动物细胞方面所做

的努力都面临着失败,但广泛建立细胞系是可以实现的。目前在陆生无脊椎动物细胞培养方面已取得了巨大的成功,而且已经建立了一例水生无脊椎动物细胞系,所以只要在目前原代培养所取得的成功的基础上进行更加广泛的研究,便可以开创一个水生无脊椎动物细胞培养研究的新局面。

但是必须看到,水生无脊椎动物细胞培养的研究仍然是任重而道远。水生无脊椎动物包括 20 多个不同的门,物种数占整个动物物种数的 95%^[10],不同的物种之间在其细胞和组织组成方面表现出相当大的差异性,所以相对于哺乳动物来说细胞多样性特别强,特别是一些低等的水生无脊椎动物没有稳定的内环境,细胞直接与环境相互作用。从以上的论述就可以看出,不同门类动物的细胞培养研究各有自身独特的特点,尽管从一定意义不同种类细胞具有一定的相似性,但仅仅从哺乳动物细胞培养借鉴的经验还远远不能满足不同水生无脊椎动物的需要,各类动物的细胞培养都还需要系统和透彻的研究。

参考文献 (References)

- [1] Crane M *et al. Methods Cell Sci*, 1999, **21**: 171
- [2] Toullec JY. *Methods Cell Sci*, 1999, **21**: 193
- [3] Tong SL *et al. Aquaculture*, 1996, **147**: 151
- [4] Shimizu C *et al. In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 2001, **37**: 322
- [5] Chen SN *et al. Methods Cell Sci*, 1999, **21**: 199
- [6] Itami T *et al. Methods Cell Sci*, 1999, **21**: 237
- [7] Fraser CA *et al. Methods Cell Sci*, 1999, **21**: 213
- [8] 王立新等. *动物医学进展*, 2002, **5**: 7
- [9] Maeda M *et al. J Virol Methods*, 2004, **116**: 89
- [10] Rinkevich B. *J Biotechnol*, 1999, **70**: 133
- [11] Canesi L *et al. Mar Environ Res*, 2002, **54**: 547
- [12] Davids BJ *et al. Dev Comp Immunol*, 1998, **22**: 39
- [13] Cohan CS *et al. Methods Cell Biol*, 2003, **71**: 157
- [14] Feng ZP *et al. J Neurosci*, 1997, **17**: 7839
- [15] Van Beneden RJ. *Environ Health Perspect*, 1994, **102**(Suppl): 81
- [16] Le Pennec G *et al. Aquat Toxicol*, 2003, **64**: 131
- [17] Villena AJ. *Rev Fish Biol Fish*, 2003, **13**: 111
- [18] Barik SK *et al. Curr Sci*, 2004, **86**: 730
- [19] Suja CP *et al. Tissue Cell*, 2005, **37**: 1
- [20] Bayne CJ *et al. J Invertebr Pathol*, 1977, **29**: 332
- [21] Coppin JF *et al. Parasitol Res*, 2003, **89**: 113
- [22] Laursen JR *et al. J Invertebr Pathol*, 1997, **70**: 226
- [23] Chen SN *et al. Methods Cell Sci*, 1999, **21**: 183
- [24] 张晓英等. *生物工程学报*, 2002, **18**: 10
- [25] Belarbi el H *et al. Biotechnol Adv*, 2003, **21**: 585
- [26] De Rosa S *et al. J Biotechnol*, 2003, **100**: 119
- [27] Sipkema D *et al. Mar Biotechnol (NY)*, 2003, **5**: 443
- [28] Koziol C *et al. Mech Ageing Dev*, 1998, **100**: 107
- [29] Custodio MR *et al. Mech Ageing Dev*, 1998, **105**: 45
- [30] Sipkema D *et al. J Biotechnol*, 2003, **100**: 127
- [31] Frank U *et al. Mar Biol*, 1994, **120**: 491
- [32] Domart-Coulon IJ *et al. Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, **98**: 11885
- [33] Bulgakov VP *et al. Mar Biotechnol (NY)*, 2002, **4**: 480
- [34] Rinkevich B *et al. Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, **92**: 7695
- [35] Rabinowitz C *et al. Methods Cell Sci*, 2003, **25**: 137

Cell Culture of Aquatic Invertebrate

Wan-Lei Liu*

(Department of Life Science, Shandong University of Technology, Zibo 255049, China)

Abstract Studies on cell culture of aquatic invertebrate get far behind ones of the mammalian and the insect. Moreover, the culture methods come from the ones of the mammalian and the insect. Many efforts were spent in the studies in recent decades and progress on the primary culture were gained. However, no continuous cell line was established besides of BGE cell line from freshwater snail. Cell culture of aquatic invertebrate was summarized here. Besides, the main problems and the future of the studies on cell culture of aquatic invertebrate were discussed.

Key words marine invertebrate; cell culture; primary culture; cell line

Received: September 5, 2005 Accepted: October 26, 2005

*Corresponding author. Tel: 86-533-2781329, Fax: 86-533-2781832, E-mail: wlliu@sdut.edu.cn