

无脊椎动物细胞原代培养方法

周 婵 朱 勇 徐 水*
(西南大学生物技术学院,重庆 400715)

摘 要: 细胞原代培养是科学研究中获得足够数量的细胞的基本方法。无脊椎动物包括水生无脊椎动物和陆生无脊椎动物,虽然它们均属于变温动物,但在生物学特性上具有显著的差异,故,对于来自不同类群动物的细胞的原代培养应采用不同的方法。本文对无脊椎动物细胞原代培养中的培养条件、培养基成分、培养方法进行了比较,并对常见问题和策略进行了阐述,以期对相关研究提供参考。

关键词: 无脊椎动物;细胞;原代培养;方法

中图分类号: S852 **文献标识码:** A **文章编号:** 1006-267X(2011)02-0203-07

无脊椎动物(invertebrata)主要包括原生动物、多孔动物、腔肠动物、扁形动物、线形动物、环节动物、节肢动物、软体动物、棘皮动物类群,其种类数占动物总种类数的95%。目前,对无脊椎动物细胞的培养主要是对节肢动物门昆虫纲、甲壳纲(对虾、螯虾、龙虾、蟹)、蛛形纲(蜘蛛),软体动物门瓣鳃纲(牡蛎、文蛤、贝)、腹足纲(螺)以及多孔动物海绵的细胞的培养。最具代表性的是对节肢动物门昆虫纲的家蚕细胞的培养,其培养方法相对较为成熟。随着人们对无脊椎动物中的模式动物、经济动物、生物矿化理论、细胞免疫学、病毒学等方面的研究不断深入,越来越多种类的无脊椎动物的细胞培养将会成为必然。

无脊椎动物细胞的培养主要包括原代培养和传代培养。将直接来自动物机体的细胞放置在体外生长环境中持续培养,中途不分割细胞的培养过程称为原代培养^[1]。原代培养是所有细胞培养的基石,同时,对于同一种细胞而言,与细胞株相比,原代培养的细胞的各项生物学特性与在体时的状况更为接近,利用原代培养的细胞进行相关研究更能够揭示生命科学的内在规律。由于无脊椎动物种类繁多,生物学特性迥异,在细胞原代培养的方法上既体现出了其特殊性,也有共性可循。

所以,本文对目前所报道的无脊椎动物细胞的原代培养方法进行介绍,探讨其内在规律,以期对相关研究提供参考。

1 细胞原代培养所涉及到的无脊椎动物类群

在无脊椎动物中,从单细胞的原生动物到结构复杂的节肢动物,它们在经济价值上的差别导致了在科学研究中所受到的重视程度的不同。因此,节肢动物中的虾类和家蚕的研究最为充分,在细胞的原代培养中也体现出了这一现象。

原生动物为单细胞动物,作为医学寄生虫在疾病防治领域的研究中受到关注,它们中的很多种类被体外培养。腔肠动物和海绵动物为结构简单、组织分化不显著的多细胞动物,在物质的交换过程中基本是以细胞为单位直接与生境中的水相介质直接进行交换,因此,在它们的细胞的原代培养中,一般是模拟其生境中的主要条件如盐度、pH、温度等自行配制培养基^[2-6]。也有利用现有培养基进行此类细胞的原代培养的报道,如 Frank 等^[7]以 L-15 为基础培养基,系统研究了 10 种腔肠动物的细胞的原代培养。

涡虫属于扁形动物,由于其具有很强的再生能力而受到生物发育研究领域的重视。目前,涡虫的细胞的原代培养相当于器官培养,是利用其较强的再生能

收稿日期:2010-07-23

基金项目:重庆市科技攻关计划项目(cstc2009ac1006)资助

作者简介:周 婵(1982—),女,云南昆明人,硕士,主要从事动物遗传研究。E-mail:chanzhoum@163.com

* 通讯作者:徐 水,副教授,硕士生导师,E-mail:xushui@swu.edu.cn

力将其切割为 2~4 份,按照涡虫的饲养方法进行培养^[6]。对于扁形动物、线性动物和环节动物的细胞的原代培养的研究目前鲜有报道,这主要是由于这些类群的动物的研究价值还没有引起人们的重视。

软体动物是人工培养珍珠的材料,同时,软体动物贝壳的形成机理还是生物矿化研究领域的热点。因此,对于本类群动物的细胞的原代培养的研究较为成熟^[8]。

节肢动物是无脊椎动物中动物种类最多的类群。其中,甲壳纲中的虾类及昆虫纲中的家蚕是经济价值很高的种类,对本类群动物细胞的原代培养方法的研究已很完善^[9-12]。

2 无脊椎动物细胞原代培养中对生长条件的需求

细胞生长期间同周围环境进行着源源不断的物质交换,模拟细胞内环境的各项理化指标是进行无脊椎动物细胞原代培养的出发点。

2.1 温度

任何细胞的生长都受到温度变化的影响,并且其耐受温度的范围很窄。大多数无脊椎动物的细胞在 25~30℃ 温度范围内生长最迅速,但不同类群的动物又各有具体的要求。对于节肢动物门昆虫纲动物,其细胞生长的适宜温度在 25~28℃,以 27℃ 最佳;温度在 37℃ 以上细胞形态会发生变化,在 20℃ 以下则生长缓慢^[1]。各种昆虫细胞生长的适宜温度变化不大。家蚕丝腺细胞生长的最适温度为 28℃,在此温度下原代培养的家蚕丝腺细胞得到传代细胞^[13]。白纹伊蚊细胞适宜在 (29±1)℃ 下生长^[14],斜纹贪夜蛾细胞则适宜在 27℃ 下生长^[15]。对于蜘蛛细胞的原代培养温度,报道的文献很少,大多参照其他节肢动物的原代培养温度,即 (27±2)℃^[16]。一般来说,对虾细胞在 22~28℃ 时生长较快^[1],但由于不同类群动物的生活环境和适应范围不同,适宜温度的区间也有不同的报道。Tong 等^[17]报道中国对虾细胞原代培养的适宜温度是 22℃,王立平等^[18]、胡珂等^[19]也报道中国对虾细胞原代培养的适宜温度为 22℃,并得到了连续传代的细胞。对于斑节对虾,Chen 等^[20]报道,其细胞原代培养的适宜温度为 28~31℃;Hsu 等^[21]报道其类淋巴器官细胞原代培养的适宜温度为 28℃,并能在此温度下连续传代。同样是日本对虾类淋巴器官细胞的原代培养,Itami 等^[22]报道的适宜温度为 30℃,而 Lang 等^[23]报道

的适宜温度为 25℃,且其卵巢细胞原代培养的适宜温度为 26℃。出现不同学者报道的原代培养温度不同的现象可能与虾的种类、生活的水域范围、细胞适应范围不同有关。软体动物门中唯一的细胞系 BGE[淡水蜗牛 (*Bromphalaria glabrata*) 胚胎细胞系]的原代培养温度为 25℃^[24]。孙振兴等^[25-26]报道,原代培养菲律宾蛤仔鳃组织和外套膜细胞的适宜温度为 26~27℃。姜德勋等^[27]在 37℃ 下原代培养福寿螺足和外套膜细胞,并得到 8~9 代的传代细胞;陈颀等^[28]原代培养文蛤外套膜细胞也是使用 37℃,并指出与一般贝类细胞原代培养适宜温度 (26~27℃) 相比,其细胞分裂生长呈现更为快速的特点。多孔动物海绵的细胞大多使用 16℃ 进行原代培养^[29-30]。

2.2 气体环境

理想的气体环境是体外细胞生存的必需条件之一。无脊椎动物细胞不是在碳酸盐缓冲体系中培养,无需二氧化碳 (CO₂),可在正常大气压环境下培养,并采用封闭式培养方法^[1]。由于无脊椎动物的种类众多,也存在特殊情况,如软体动物门。姜德勋等^[27]报道,在原代培养福寿螺足和外套膜组织细胞时均使用了 5% 的 CO₂ 与 95% 空气的混合气体,并得到 8~9 代的传代细胞。在对褶皱冠蚌外套膜表皮细胞的原代培养中,魏育红等^[31]首次使用光照培养,并于 20 d 后传代,在培养第 3 代细胞时开始发现培养瓶中有结晶出现,得出光照对该细胞的成功培养和结晶分泌有一定的促进作用。

2.3 平衡盐溶液

平衡盐溶液是许多完全培养基的基液,可用于稀释浓缩的氨基酸、维生素溶液,也可作为漂洗或分离用液体。在进行细胞的原代培养前,通常需要对所取材料进行漂洗。如果漂洗液的渗透压与材料在体条件下的内环境差别太大,则会导致细胞脱水或者吸水,从而导致细胞死亡。无脊椎动物的生存环境差别很大,陆生、水生、寄生、淡水生、咸水生等生活方式导致了其内环境的理化特性及其稳定方式具有很大差异。因此,对取材于不同的物种的组织要选择合适的平衡盐溶液作为漂洗液。Huang 等^[32]通过对中国对虾肝胰腺细胞原代培养确定了所用平衡盐溶液的最适 pH 和渗透压,在此基础上研制出了 PPB(对虾生理缓冲液)的配方。目前,大多数无脊椎动物的细胞原代培养都选择无 Ca²⁺、Mg²⁺ 的 D-Hanks 液或是磷酸盐缓冲液作为平衡盐溶液。多

孔动物海绵的细胞在无 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 的海水中以单个离散的状态存在,在含有高浓度 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 的海水中才会聚集成团,因此海绵动物细胞的原代培养需根据试验目的选择是否采用含有高浓度 Ca^{2+} 、

Mg^{2+} 的平衡盐溶液^[33]。

由于类群不同,无脊椎动物细胞原代培养的条件也有差异,表 1 综合以上内容列出了部分无脊椎动物细胞原代培养的条件。

表 1 部分无脊椎动物细胞原代培养的条件
Table 1 primary culture condition of part invertebrate cells

项目 Items	多孔动物门 Porifera	节肢动物门 Arthropod		软体动物门 Mollusca
	海绵 Sponge	昆虫 Insects	虾 Prawn	贝 Shellfish
适宜温度 Suitable temperature/℃	16	25 ~ 28	22 ~ 30	25 ~ 37
CO ₂ 浓度 CO ₂ concentration/%				5
平衡盐溶液 Balanced salt solution	高浓度 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} (悬浮离散培养)/ 无 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} (细胞团培养)		无 Ca^{2+} 、 Mg^{2+}	无 Ca^{2+} 、 Mg^{2+}

3 培养基

3.1 渗透压

高渗或低渗溶液都会使细胞发生皱缩或肿胀、破裂。260 ~ 320 mOsm/kg 的渗透压在实际应用中适合大多数细胞,但昆虫细胞的渗透压要比此值高,一般为 300 ~ 400 mOsm/kg,果蝇细胞的渗透压为 332 mOsm/kg^[1],家蚕细胞的渗透压为 316 mOsm/kg^[34]。海产虾细胞的渗透压一般在 720 ~ 760 mOsm/kg^[19],但也有不同的报道。王立平等^[18]报道中国对虾上皮细胞适宜在渗透压为 470 mOsm/kg 的培养基中生长,而 Tong 等^[17]则认为其上皮细胞原代培养适宜的渗透压为 800 ~ 900 mOsm/kg。同样是对虾,Huang 等^[32]认为其肝胰脏细胞适宜在 780 ~ 1 100 mOsm/kg 的渗透压环境中生长,而其血淋巴细胞则适宜在 870 mOsm/kg 的渗透压环境中生长。不同的学者都成功进行了对虾细胞的原代培养并传代,但研究结果有很大的差别,这可能与对虾生活水域广泛有直接原因,广泛的生活水域导致了对虾细胞体外培养适用的渗透压范围较广。软体动物血淋巴细胞的渗透压一般为 154 ~ 185 mOsm/kg^[35]。

3.2 pH

大多数哺乳动物的细胞适宜在 pH 为 7.2 ~ 7.4 的环境中生存,而节肢动物中昆虫的大多数细胞生长的最适 pH 为 6.2^[36-37],要低于哺乳动物,家蚕胚胎细胞生长的最适 pH 则为 6.8^[38]。胡朝曦等^[16]报道,蜘蛛神经细胞适宜在 pH 7.4 的培养基中生长。海产虾细

胞生长的适宜 pH 范围一般为 7.0 ~ 7.5^[18-19]。Huang 等^[32]报道,中国对虾肝胰脏细胞适合生长的 pH 为 6.5;而 Hsu 等^[21]报道,斑节对虾类淋巴组织体外培养的适宜 pH 为 7.63 ~ 7.90。同物种间适宜 pH 不同的原因可能与物种差异、组织来源差异有关。软体动物的细胞生长适宜 pH 范围变化不大,基本是 7.2 ~ 7.4^[33]。海绵的细胞培养液适宜 pH 在 7.0 左右^[29]。

3.3 基础培养基

基础培养基由已知化学成分的人工合成物配成,组成成分是各种氨基酸、无机盐、维生素和糖等。无脊椎动物细胞原代培养中培养基种类以昆虫细胞培养基最多,有 60 余种。其中以 1962 年 Grace 建立的 Grace 培养基应用最为广泛,它是模仿家蚕血淋巴液的化学成分设计而成的。Grace 培养基已成功用于培养伊蚊、家蚕、柞色卷叶虫、谷实夜蛾、苹果小卷蛾、舞毒蛾、森林天幕毛虫、烟夜蛾、粉纹夜蛾、埃及伊蚊、刺扰伊蚊和脉毛蚊等多种昆虫的细胞^[1]。其他比较常用的昆虫细胞培养基有 TC-100、IPI-41、IPL-41、TNM-FH、MGM-448、MGM-450 和经改良的哺乳动物细胞培养基 TC199-MK 等。目前在虾细胞的原代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、L-15、M-199、GIM、Grace 培养基等。其中,使用较普遍、评价较高的有 L-15、M199 和 GIM 等。Tong 等^[17]设计了一种新的合成培养基 MPS,比较 GIM、MPS 和 2 × L-15 3 种培养基后发现效果最好的是 MPS,2 × L-15 效果较好,而 GIM 相对最差。软体动物细胞的原代培养也大多使用哺乳动物或是昆虫细胞的培

培养基,如 M-199、MEM、PRMI-1640 等。

3.4 完全培养基

进行无脊椎动物细胞的原代培养需要在基础培养基中添加某些成分配成完全培养基。添加的成分通常为 5% ~ 20% 的胎牛血清、水解乳蛋白以及酵母提取物等,目的是配合不同无脊椎动物细胞原代培养的要求。尽管许多学者在培养基选择和优化方面做了大量的工作,但除部分昆虫细胞外,大多数无脊椎动物细胞体外培养仍缺少理想的培养基。

血清是体外培养中使用最广泛的天然培养基因,血清中含有的生长因子可促进细胞的繁殖,其中附着因子可促进细胞贴壁,同时也是矿物质、脂类和激素的来源。绝大部分动物的体外培养都要使用血清,但血清同样带来不少影响细胞生长繁殖的物质,如补体、免疫球蛋白、生长抑制剂等^[39]。因此,无血清培养基的研制开发成为研究的热点。

水解乳蛋白 (lactalbumin hydrolysate, LH) 和酵母提取物 (yeastolate, YL) 是昆虫细胞培养基中最常用的添加物。YL 是维生素和嘌呤的主要来源,而 LH 是不定成分氨基酸的主要来源^[40]。在昆虫细胞悬浮培养中还需添加一些多聚物如甲基纤维素、PVP-40 (聚乙烯吡咯烷酮) 和 Pluronic 多聚醇 (聚丙二醇与环氧乙烯的加聚物),以保护细胞免受剪切应力的损伤和降低细胞结团^[40-41]。

除了血清外,软体动物和节肢动物还需在基础培养基中添加自制的体液或组织提取液等。虾组织与细胞培养研究中常用到的天然培养基成分还有甲壳动物血淋巴液,如龙虾血淋巴液 (lobster hemolymph medium, LHM)^[21]、对虾肌肉或卵巢等组织

提取液^[17],这些成分可以起到促进虾细胞生长的作用。据报道,孙振兴等^[25]在 E-MEM 培养基中添加 L-谷氨酰胺、小牛血清、水解乳蛋白、氯化钠、双抗,在体外培养菲律宾蛤仔外套膜组织,3 d 后组织块周围迁出细胞。魏育红等^[31]在 PRMI-1640 培养基的基础上添加水解乳蛋白、胎牛血清、蚌围心腔液成功培养出褶皱冠蚌外套膜外表皮细胞,并于 20 d 后得到传代细胞。陈颀等^[28]在文蛤外套膜组织与细胞培养中,于 M-199 培养基中添加水解乳蛋白、外套膜组织液、小牛血清、硫酸庆大霉素、头孢拉定。Cen 等^[42]在培养马氏珠母贝外套膜组织细胞时,先用多聚赖氨酸预先处理培养皿,于 M-199 培养基中添加 10 ng/mL 角质细胞生长因子、10% 自制的经过滤除菌的珍珠贝体液,促进了细胞分裂增殖。多孔动物海绵在进行细胞培养时分为悬浮离散培养和细胞团培养。采用悬浮离散培养海绵细胞时细胞在培养过程中需要保持分散状态,因此需要在培养基中要加入不含 Ca²⁺、Mg²⁺ 的人工海水,以提供海绵细胞生长所需的高渗透压^[29]。采用细胞团培养则需要在培养基内添加高浓度 Ca²⁺、Mg²⁺ 的海水,目的是让海绵细胞自发聚集,形成细胞团,以提高端粒酶活性,使其具有 DNA 合成和细胞增殖的能力^[33]。

为了减少污染的机会,抗生素也是培养基中补充的常规物质,一般都使用青霉素和链霉素的双抗。添加的剂量一般为 200 U/mL。海绵细胞的培养需要高剂量的抗生素^[43]。

综合以上内容,表 2 列出了部分无脊椎动物细胞原代培养所用培养基的组成。

表 2 部分无脊椎动物细胞原代培养所用培养基的组成
Table 2 Composition of medium in primary culture of part invertebrate cells

项目 Items	多孔动物门 Porifera	节肢动物门 Arthropod		软体动物门 Mollusca
	海绵 Sponge	昆虫 Insects	虾 Prawn	贝 Shellfish
适宜渗透压 Suitable osmotic pressure/ (mOsm/kg)	同海水	300 ~ 400	720 ~ 760	154 ~ 185
适宜 pH Suitable pH	7.0	6.2	7.0 ~ 7.5	7.2 ~ 7.4
基础培养基 Basal medium	M-199	Grace 培养基	L-15、 M-199、GIM	M-199、MEM、 PRMI-1640
添加物 Additive	不含 Ca ²⁺ 、Mg ²⁺ 的 人工海水 (悬浮离散培养)/ 高浓度 Ca ²⁺ 、Mg ²⁺ 的 海水 (细胞团培养)	水解乳蛋白、 酵母提取物	血淋巴液	组织液

4 制备细胞培养物

无脊椎动物的细胞原代培养研究没有脊椎动物开展的深入,所以材料来源也没有脊椎动物广泛。取材的组织主要是昆虫的卵、血液、精巢、卵巢,家蚕的丝腺等,软体动物的外套膜和血液。节肢动物的细胞原代培养研究主要集中在类淋巴和血液上。

细胞的取材是细胞原代培养成功的首要条件,其中严格无菌是最关键也是最难做到的一点,因为无脊椎动物细胞较脊椎动物细胞易污染。由于是活组织,因此可供选择的灭菌方式非常有限。在家蚕细胞原代培养时,取下的组织采用 75% 的酒精进行少于 30 s 的浸泡,并迅速漂洗去除酒精,结果证明在保持细胞活力的前提下,有很好的消毒灭菌效果^[34]。同时,采用较高浓度的双抗浸泡也可以达到较好的效果^[44]。

动物组织是由细胞和细胞外基质构成的,为了获得更多的游离细胞,对所取材料进行酶处理是一种有效的方法,胰蛋白酶和胶原蛋白酶是最常用的酶类。在大多数情况下,采用 25.00% ~ 0.50% 的胰蛋白酶在 37 ℃ 消化 10 ~ 30 min 是较常用的方法。对家蚕细胞的消化方式是机械剪碎后,用吸管反复吹打,并在传代的时候去除组织块。试验证明,这样的方法虽可以得到较多细胞,但不可避免的存在细胞的分化,难以得到纯净的目的细胞^[13,34,38,44]。

5 培养方法

现有的大部分无脊椎动物细胞培养技术也是由脊椎动物细胞培养方法改进而来。无脊椎动物细胞大多采用封闭式贴壁培养^[1]。

昆虫细胞的培养与哺乳动物一样,普遍运用培养瓶培养法、旋转管培养法、灌注小室培养法、克隆培养法、中空纤维培养法、微载体培养法以及微囊培养法等不同的组织培养技术,同时经历了组织的培养系统从二维到三维的过程。其中,与组织工程技术联系最紧密的是三维细胞培养技术^[45],只有少数昆虫细胞在悬浮培养上开展研究。彭建新等^[46]对斜纹夜蛾细胞系(SL-1)和家蚕细胞系(BmN)进行微载体培养的研究,结果表明 SL-1 和 BmN 的微载体培养与常规静止培养无差异,两者的最高密度分别为 8.2×10^5 和 7.6×10^5 个/mL。对于某些昆虫细胞如家蚕细胞,更多的是采用组织块培

养法^[13,34,38,44]。

多孔动物海绵由于具有强大的再生能力,故现研究的核心是采用细胞团培养法体外培养海绵细胞。这种培养方法采用组织离散而来的混合细胞,在含有较高浓度 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 的培养基中自发的聚集形成 1 ~ 3 mm 的团块直接培养,这样的团块称为细胞团。细胞团的形成能使细胞恢复较高的端粒酶活性,因而具有增殖的潜能^[29]。

6 常见问题及策略

大量的研究表明,无脊椎动物的营养要求和生存条件与脊椎动物是有本质区别的,在无脊椎动物细胞的原代培养中套用现有的脊椎动物的培养条件显然是不能满足要求的。具有强大再生能力的海绵在海水中能再生成完整的个体,但在实验室却不能存活^[29]。这也许与培养基和添加的血清有关,高等动物的血清在低等动物生存环境中或许起到毒害的作用。因此,笔者认为开发无脊椎动物细胞原代培养专用的培养基是解决无脊椎动物细胞原代培养发展缓慢的根本方法,甚至需要针对不同的无脊椎动物研制不同的培养基和培养方法。在开发过程中,脊椎动物细胞培养的成果可以作为参考。

昆虫的血淋巴和血细胞中含有酚氧化酶原,在离体的情况下容易被激活为酚氧化酶,使培养物变黑,毒害细胞。昆虫细胞中的微孢子虫也是污染体外培养的难题。因此,关于昆虫细胞培养污染的问题是今后研究中需要解决的重点问题。某些无脊椎动物,如海绵,它们与微生物是共生的关系,还有着合胞体现象^[43],因此防止污染的方法还需要深入的研究探索。此外,动物自身特有的某些微量元素也与污染密切相关^[47]。

7 展 望

无脊椎动物从经济角度来看有着巨大的开发价值,许多水生无脊椎动物如刺参等,自身蕴含丰富的营养^[48]。无脊椎动物细胞原代培养的历史要早于脊椎动物细胞,但研究的速度及深度却远远不及脊椎动物。笔者根据以往试验总结认为无脊椎动物的生物学基础研究是突破其原代培养的关键。只有生物学的不断深入才能从根本上找到无脊椎动物原代培养的关键所在。此外,还应大力开发新型的具有广泛性的无脊椎动物细胞原代培养技术体系,寻找适合无脊椎动物的完全培养基以取代动物血

清,并从技术和科研力量上给予大力的支持。

参考文献:

- [1] 薛庆善. 体外培养的原理与技术[M]. 北京: 科学出版社, 2001.
- [2] 蔺玉华. 变形鞭毛虫的细胞培养和内共生甲烷菌的变化[J]. 动物学报, 1995, 41(4): 425-431.
- [3] ROSA S D, CARO S D, IODICE C, et al. Development in primary cell culture of demosponges[J]. Journal of Biotechnology, 2003, 100(2): 119-125.
- [4] DUCKWORTH A R, SAMPLES G A, WRIGHT A E, et al. *In vitro* culture of the tropical sponge *Axinella corrugata* (Demospongiae): effect of food cell concentration on growth, clearance rate, and biosynthesis of stevensine [J]. Marine Biotechnology, 2002, 5(6): 519-527.
- [5] SIPKEMA D, HEILIG H G, AKKERMANS A D, et al. Sponge-cell culture? A molecular identification method for sponge cells[J]. Marine Biotechnology, 2003, 5(5): 443-449.
- [6] 马金生, 闫安. 涡虫培养与再生的研究[J]. 山东教育学院学报, 2001, 83: 69-71.
- [7] FRANK U, RABINOWITZ C, RINKEVICH B. *In vitro* establishment of continuous cell cultures and cells lines from ten colonial cnidarians[J]. Marine Biotechnology, 1994, 120: 491-499.
- [8] 郎刚华, 王勇, 刘万顺, 等. 贝类组织培养及其应用研究[J]. 海洋科学, 2000, 24(4): 15-18.
- [9] ANNATHUR G V, PIERCE J L, COMBS R G, et al. Improvements in spinner-flask designs for insect-cell suspension culture[J]. Biotechnology and Applied Biochemistry, 2003, 38: 15-18.
- [10] IKONOMOU L, SCHNEIDER Y J, AGATHOS S N. Insect cell culture for industrial production of recombinant proteins[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2003, 62(1): 1-20.
- [11] SAITO T, IWABUCHI K. Effect of bombyxin- II, an insulin-related peptide of insects, on *Bombyx mori* hemocyte division in single-cell culture[J]. Applied Entomology and Zoology, 2003, 38(4): 583-588.
- [12] SUDEEP A B, MOURYA D T, MISHRA A C. Insect cell culture in research: Indian scenario [J]. Indian Journal of Medical Research, 2005, 121(6): 725-738.
- [13] 田志强. 家蚕丝腺细胞系 BmsG-SWU1 与丝腺组织部分基因的表达差异研究[D]. 硕士学位论文. 重庆: 西南大学, 2007: 1-61.
- [14] 潘李珍, 孙德芳, 王凤云, 等. 白纹伊蚊细胞系的建立[J]. 实验生物学报, 1980, 13(2): 147-153.
- [15] 谢伟东, 曲士芮, 庞义, 等. 斜纹贪夜蛾细胞系的建立及病毒感染研究[J]. 中山大学学报, 1988(4): 113-116.
- [16] 胡朝曦, 颜亨梅. 蜘蛛神经节的解剖与神经细胞的分离培养[J]. 动物学杂志, 2007, 42(2): 63-67.
- [17] TONG S, MIAO H. Attempts to initiate cell cultures from *Penaeus chinensis* tissues [J]. Aquaculture, 1996, 147: 151-157.
- [18] 王立平, 张晓华, 刘镁, 等. 中国对虾上皮样细胞培养研究[J]. 海洋水产研究, 1997, 18(1): 16-20.
- [19] 胡珂, 王立平, 段爱梅. 中国对虾的组织培养[J]. 水产学报, 1991, 15(4): 328-331.
- [20] CHEN S, KOU G. Infection of cultured cells from the lymphoid organ of *Penaeus monodon* Fabricius by monodon-type baculovirus (MBV) [J]. Journal of Fish Diseases, 1989, 12: 73-76.
- [21] HSU Y L, YANG Y H, CHEN Y C, et al. Development of an *in vitro* subculture system for the oka organ (Lymphoid tissue) of *Penaeus monodon* [J]. Aquaculture, 1995, 136: 43-55.
- [22] ITAMI T, MAEDA M, KONDO M, et al. Primary culture of lymphoid organ cells and haemocytes of kuruma shrimp, *Penaeus japonicus* [J]. Methods in Cell Science, 1999, 21(4): 237-244.
- [23] LANG G, NOMURA N, MATSUMURA M. Growth by cell division in shrimp (*Penaeus japonicus*) cell culture[J]. Aquaculture, 2002, 213: 73-83.
- [24] HANSEN E. A cell line from embryos of *Biomphalaria glabrata* (Pulmonata): establishment and characteristics [C]. MARAMOROSCH K. Invertebrate tissue culture: research applications. New York: Academic Press, 1976: 75-97.
- [25] 孙振兴, 张暄, 郝丽红, 等. 菲律宾蛤仔鳃组织的原代培养[J]. 水产科学, 2004, 23(2): 12-14.
- [26] 孙振兴, 张暄, 刘雪, 等. 菲律宾蛤仔外套膜组织原代培养的初步研究[J]. 海洋科学, 2004, 28(3): 79-81.
- [27] 姜德勋, 许璞, 沈爱国, 等. 福寿螺足组织和外套膜组织细胞培养的初步研究[J]. 淡水渔业, 2008, 38(2): 54-59.
- [28] 陈颀, 许璞, 沈爱国, 等. 文蛤外套膜组织与细胞培养[J]. 海洋科学, 2007, 31(6): 60-64.
- [29] 张晓英. 海绵细胞团离体培养方法的建立及其成团增殖和代谢规律研究[D]. 博士学位论文. 大连: 中国科学院大连化学物理研究所, 2003.

- [30] 曹旭鹏,张卫. 繁茂膜海绵原细胞富集细胞团培养过程中的细胞迁移规律[J]. 生物工程学报,2008,24(12):2133-2134.
- [31] 魏育红,薛仁宇,贡成良,等. 褶纹冠蚌外套膜表皮细胞培养研究[J]. 水利渔业,2001,21(6):9-10.
- [32] HUANG J, SONG X L, YU J, et al. The components of an inorganic physiological buffer for *Penaeus chinensis*[J]. Methods in Cell Science, 1999, 21(4): 225-230.
- [33] 郭荣华,林瀚智,殷立成. 海洋无脊椎动物细胞培养概况[J]. 海洋科学,2007,31(10):82-86.
- [34] 潘敏慧,刘敏,蔡秀娟,等. 家蚕脂肪体细胞原代培养及其细胞分化的研究[J]. 蚕业科学,2007,33(3):403-408.
- [35] 石安静,邱安东,唐敏,等. 圆背角无齿蚌血细胞培养[J]. 水生生物学报,2001,25(2):116-122.
- [36] 周亚竞,张志芳,张元兴,等. 昆虫细胞培养研究进展[J]. 蚕业科学,2000,26:74-78.
- [37] 张寰,张永安,秦启联,等. 昆虫细胞系的培养和建立技术[J]. 昆虫学报,2007,50(8):834-839.
- [38] 潘敏慧,陈敏,丁裕斌,等. 家蚕胚胎细胞系 BmE-SWU2 的建立及其生物学特性研究[J]. 2006,49(5):719-725.
- [39] 常韶华,孙洪亮,李佐虎. 降低血清用量对昆虫细胞培养增殖杆状病毒的影响[J]. 中国生物防治,1998,14(2):62-64.
- [40] 曹翠平,吴小锋,鲁兴萌. 昆虫细胞无血清培养[J]. 细胞生物学杂志,2005,27:127-132.
- [41] 宋德伟,马燕,冯颖,等. 昆虫细胞工程研究进展[J]. 林业科学研究,2004,17(1):116-124.
- [42] CEN Y H, LIN J, HE G Z, et al. *In vitro* modified cell culture from the mantle tissue of *Pinctada martensii* and application of keratinocyte growth factor in cell culture[J]. Journal of Clinical Rehabilitative Tissue Engineering Research, 2009, 13(37):7397-7400.
- [43] 方丽驹. 繁茂膜海绵细胞培养中的污染分析与控制方法初探[D]. 博士学位论文. 大连:中国科学院大连化学物理研究所,2003.
- [44] 蔡秀娟. 家蚕卵巢细胞系 BmN-SWU1 的建立及其生物学特性的研究[D]. 硕士学位论文. 重庆:西南大学,2007.
- [45] 胡康洪,姚颖. 三维细胞培养技术的研究与应用[J]. 医学分子生物学杂志,2008,5(2):185-188.
- [46] 彭建新,陈曲候. 两种昆虫细胞的微载体培养[J]. 昆虫知识,1993,30(2):118-120.
- [47] 罗辉,周小秋. 硒与水生动物免疫功能的关系[J]. 动物营养学报,2006,18(增刊):378-382.
- [48] 孙伟红,冷凯良,林洪,等. 刺参不同部位中主要营养成分分析与评价[J]. 动物营养学报,2010,22(1):212-220.

Primary Culture Methods for Invertebrate Cells

ZHOU Chan ZHU Yong XU Shui*

(College of Biotechnology, Southwest University, Chongqing 400715, China)

Abstract: Primary cell culture is a fundamental method to obtain enough amounts of cells for scientific researches. Invertebrates including aquatic and terrestrial, and both are ectotherm with significant differences in their biological characteristics. Therefore, different methods should be carried out for different invertebrate primary cell culture. Factors of primary cell culture such as culture conditions, medium composition and culture methods are compared, and problems met in the process of primary cell culture and their solutions are also mentioned in this paper in order to provide a reference for related researches. [*Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2011, 23(2):203-209]

Key words: invertebrates; cells; primary culture; methods

* Corresponding author, associate professor, E-mail: xushui@swu.edu.cn