

# Advances in the Embryonic Cell Culture of Marine Invertebrates

Xiaojuan Zhang, Huarong Guo\*

College of Marine Life Sciences, Ocean University of China, Qingdao Shandong  
Email: [huarongguo@ouc.edu.cn](mailto:huarongguo@ouc.edu.cn)

Received: Apr. 29<sup>th</sup>, 2016; accepted: May 16<sup>th</sup>, 2016; published: May 19<sup>th</sup>, 2016

Copyright © 2016 by authors and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

---

## Abstract

Embryo cells with high potential in active proliferation and pluripotency are optimal cell sources for the establishment of continuous cell lines. However, due to the frequent occurrence of contamination by microorganisms and protozoans as well as the mitosis-arrestment of primary culture cells, only primary cell cultures and limited subculture are successful in the cell culture of invertebrates, and no immortalized cell line has been established from invertebrates. This paper has reviewed the advances in the embryonic cell culture of marine invertebrates including Porifera, Coelenterata, Arthropoda, Mollusca and Echinodermata, and predicted its future outlook.

## Keywords

Marine Invertebrate, Embryonic Cells, Cell Culture

---

# 海洋无脊椎动物胚胎细胞培养研究进展

张晓娟, 郭华荣\*

中国海洋大学海洋生命学院, 山东 青岛  
Email: [huarongguo@ouc.edu.cn](mailto:huarongguo@ouc.edu.cn)

收稿日期: 2016年4月29日; 录用日期: 2016年5月16日; 发布日期: 2016年5月19日

---

\*通讯作者。

## 摘要

胚胎细胞具有活跃的分裂增殖能力和多向分化潜能, 是建立细胞系的最佳组织来源。但是由于微生物和原生动物污染以及体外培养条件下细胞不分裂等原因, 海洋无脊椎动物的细胞培养研究目前仍停留在原代细胞培养和有限传代培养的水平上, 尚无永生性细胞系的成功报道。本文综述了海洋无脊椎动物中5个门类包括多孔动物门、腔肠动物门、节肢动物门、软体动物门和棘皮动物门的胚胎细胞培养工作的研究进展, 并对海洋无脊椎动物胚胎细胞培养的前景进行了展望。

## 关键词

海洋无脊椎动物, 胚胎细胞, 细胞培养

## 1. 引言

海洋无脊椎动物的细胞培养始于 20 世纪 70 年代, 尽管研究者们进行了不懈的探索和努力, 但是海洋无脊椎动物的细胞在解离后 24~72 小时内即停止分裂, 细胞处于静止状态, 其永生性细胞系一直未能成功建立[1]-[3]。一般来说, 用于细胞培养的组织或细胞来源越年轻, 其细胞分裂能力越旺盛, 越有利于细胞培养工作的开展, 胚胎或幼体无疑是细胞培养的最佳组织来源。尽管海洋无脊椎动物数量庞大、种类繁多, 但是基于理论研究和实际生产应用的需要, 有关报道只是集中在有限的几个种类。本文对海洋无脊椎动物的胚胎细胞培养的现状加以综述, 为建立海洋无脊椎动物永生性细胞系提供参考。

## 2. 多孔动物门(Porifera)

多孔动物又称海绵动物, 是最原始最低等的海洋多细胞动物, 营水生、固着生活。海绵动物有很强的再生能力, 甚至分离的单个细胞也能相互接合, 在良好的环境下, 几天后生长为小海绵, 这种巨大的再生能力也证明了海绵动物的原始性。海绵动物体内富含生物活性物质, 包括海绵毒素、防污剂、抗癌化合物和抗病毒成分[4]-[6], 然而这些活性成分的含量极低, 不能进行商业化大量生产。随着细胞培养技术的发展, 利用海绵细胞和组织培养来大量获取这些具有生物活性的代谢物已成为人们的研究热点。在 20 世纪 90 年代, 研究者们对海绵细胞进行原代培养, 并取得实质性的进展。Ilan *et al.* (1996)将成体来源的海绵(*Latrunculia magnificat*)细胞体外培养了 6 个月, 但随后被证实该细胞为污染的单细胞真核生物破囊壶菌(*Thraustochytrid*), 虽然没有建成海绵细胞系, 但是证明了机械法分离海绵细胞的可行性[7]。Rinkevich *et al.* (1996)通过 5 种解离方法获得分散的海绵胚胎细胞并进行原代培养。结果发现, 机械法分离得到的单个胚胎细胞培养效果最好, 体外可存活 9 个月; 搅拌法获得胚胎细胞悬液, 接种后胚胎细胞可存活 3 个月; 胰蛋白酶解离法获得的胚胎细胞体外培养效果最差, 存活时间小于两周。原代培养的海绵胚胎细胞可分为 4 种类型: 胚叶细胞(blastomere)、色素细胞(chromocyte)、小球细胞(spherulous)和环细胞(choanocyte)。虽然海绵动物具有较强的再生能力, 但是分散的海绵细胞体外培养表现出较弱的增殖能力。Rinkevich 将海绵胚胎细胞体外培养了 9 个月, 但是细胞不分裂, 未见增殖, 这成为制约海绵细胞建系的难题[8]。孙黎明(2006)以繁茂膜海绵(*Hymeniacicon perleve*)为材料, 建立了一种分离和纯化海绵全能干细胞: 原细胞(Archaeocytes)的方法。分离得到的原细胞具有活跃的增殖能力, 并能够连续传代培养两次, 但由于原细胞发生了分化, 其增殖速率下降, 最终没有建成海绵细胞系, 但却表明了以原细胞为基础建立细胞系的可能性[9]。

### 3. 腔肠动物门(Coelenterata)

腔肠动物和海绵动物一样,也是双胚层的原始多细胞动物。海绵动物被认为是原始多细胞动物的一个侧枝,而腔肠动物则是真正的后生动物,它主要包括水螅纲、钵水母纲和珊瑚纲。目前,腔肠动物细胞培养仍处于原始的培养阶段, Frank *et al.* (1994)通过机械法、化学法和自发震荡法分离了10种腔肠动物细胞并进行原代培养,接种后的细胞在7~20天内出现增殖,可传代几次,体外存活最长时间达1年。虽然对原代培养的细胞进行了冻存,但细胞复苏后被真核单细胞生物污染,最终导致培养失败[10]。迄今为止,还没有腔肠动物胚胎细胞培养的有关报道。

### 4. 节肢动物门(Arthropoda)

节肢动物是世界上种类最多、数量最大和分布最广的一类无脊椎动物。其中研究最为广泛的海洋节肢动物主要是甲壳纲的虾类。Pepionnet and Quiot (1971)首次报道了甲壳动物螯虾(*Homarus americanus*)和龙虾(*Panulirus versicolor*)的类淋巴器官、性腺和心脏等组织的体外培养,虾类细胞体外培养工作也随之广泛开展起来[11]。尽管在对虾细胞培养方面,国内外学者进行了大量的探索和努力,但对虾成体组织来源的体外培养细胞不分裂,难以被转化,其永生化细胞系一直未能成功建立。具有活跃增殖能力和多向分化潜能的胚胎或幼体组织可为对虾细胞培养提供更好的细胞来源。在对虾胚胎细胞培养方面, Toullec *et al.* (1996)以印度对虾(*Penaeus indicus*)发育到16细胞期的胚胎为材料,开展了胚胎细胞的分离与培养。结果发现,原代培养的胚胎细胞数量明显增多,但不能确定它们是源于胚胎细胞团还是细胞增殖。接种10小时后胚胎细胞分化为成纤维细胞、具有丝状伪足的类神经细胞和有节律收缩的肌细胞。令人遗憾的是,这些细胞体外存活的时间并不长[12]。Frerichs (1996)以发育7~13天的罗氏沼虾(*Macrobrachium rosenbergii*)胚胎为材料,比较分析了10种培养基对解离的胚胎细胞的培养效果。遗憾的是并没有得到细胞单层,传代培养也失败了[13]。Fan and Wang (2002)以MPS作为基础培养基,通过添加20 ng/mL碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)和80 ng/mL胰岛素样生长因子(insulin-like growth factor, IGF-II),对中国对虾(*Penaeus chinensis*)的胚胎细胞进行分离培养,得到了原代培养胚胎细胞单层,并将原代胚胎细胞传至数十代,但后续并无成功建系的研究报道[14]。余黎明(2004)比较分析了中国明对虾早期原胚细胞的解离方法,发现利用解剖法可获得活的胚胎细胞,且细胞的存活率可达20%~40%,但是该方法易污染;利用压片法分离得到的胚胎细胞的存活率可达70%,且该方法便于大批量的操作;过针法由于不易控制抽吸速率,过快或过慢抽吸效果都不理想,虽然存活率可大于70%,但是并不适宜大批量操作。过筛法和研磨法虽然可用于大批量操作,但细胞状态差,贴壁率低,存活率一般小于5% [15]。

### 5. 软体动物门(Mollusca)

海洋软体动物的细胞培养始于19世纪60年代,目前尚无永生性细胞系的成功报道,并且体外培养细胞不能长时间存活,阻碍了软体动物在疾病、营养和生化等方面的研究。Brewster and Nicholson (1979)报道了美国牡蛎(*Crassostrea oirginica*)不同组织的原代培养,发现胚胎或幼体是建立细胞系的最适材料。解离得到大的胚胎细胞团能够贴壁生长,然而并没有形成细胞单层,也没有观察到有丝分裂细胞的存在。尽管作者发现胚胎细胞在接种后的1~7天内数量明显增多,但最终原代培养的细胞被细菌污染而失败[16]。Odintsova and Khomenko (1991)报道了虾夷扇贝(*Mizuchopecten yessoensis*)的胚胎细胞培养,细胞可在体外存活4个月,虽然细胞数量没有明显增长,但可以检测到有丝分裂细胞的存在[17]。Odintsova *et al.* (2010)对油黑壳菜蛤(*Mytilus trossulus*)的幼体组织细胞进行了培养,发现原代培养的幼体细胞可分化为肌细胞和神经样细胞,并且在培养过程中始终存在具有收缩功能的细胞[18]。Merwe *et al.* (2010)对南非鲍螺(*Haliotismidae*)幼体细胞和血淋巴细胞进行培养,结果发现血淋巴细胞比幼体细胞更适合进行原代培养

[19]。晏萌(2013)对栉孔扇贝(*Chlamys farreri*)的担轮幼虫和成体组织细胞进行了原代培养。通过优化解离方法和添加合适的生长因子等方式,有效地促进了栉孔扇贝担轮幼虫细胞的增殖,实现了幼虫细胞在体外长期存活,将原代培养的幼虫细胞成功传代培养至19代[20]。

## 6. 棘皮动物门(Echinoderms)

棘皮动物是具有重要经济价值的海洋无脊椎动物,在无脊椎动物中的系统学地位仅次于脊索动物。现代棘皮动物包括海百合纲、蛇尾纲、海星纲、海胆纲和海参纲,以及新近发现的新纲—海菊纲。在实验胚胎学、细胞结构和受精机制等基础理论研究方面,海胆和海星的受精卵是很好的实验材料。Kaneko *et al.* (1995)以0.6 M甘氨酸处理对多棘海盘车(*Asterias amurensis*)间质迁移期(mesenchyme migration stage)胚胎,并进行胚胎细胞原代培养,发现当用0.6 M甘氨酸对多棘海盘车胚胎处理24小时后,原代培养的所有上皮样细胞死亡,而间质细胞存活,当0.6 M甘氨酸的处理时间缩短为12小时后,可得到上皮样细胞聚集体(aggregate of epithelial cells),并于接种后第3天形成细胞单层,细胞类型包括食管细胞(esophageal cells)、胃细胞(the stomach cells)、肠细胞(intestinal cell)和体腔囊细胞(coelomic pouch cells) [21]。Bulgakov *et al.* (2006)将三种海胆(*Strongylocentrotus intermedius*, *S. nudus* 和 *Scaphechinus mirabilis*)的胚胎与农杆菌共同培养后,海胆胚胎形成了畸胎瘤样结构,这表明农杆菌可以介导海胆胚胎细胞的转化[22]。Ageenko *et al.* (2014)对海胆(*S. intermedius*)的囊胚细胞进行原代培养,利用莽草酸(shikimic acid)成功诱导胚胎细胞分化成海胆色素细胞A(Echinochrome A)和棘色素细胞E(spinochrome E),这为今后开展海胆棘壳色素的生产研究提供了依据[23],为最终建立棘皮动物胚胎细胞系奠定了基础。

## 7. 前景展望

海洋无脊椎动物的胚胎细胞培养虽然已取得了一定的研究进展,但目前并没有海洋无脊椎动物胚胎细胞系建立的成功报道。究其原因,是缺乏海洋无脊椎动物细胞生理学、生物化学和生理学的重要相关信息。建立海洋无脊椎动物胚胎细胞系是一个长期探索的过程,如果仅靠套用哺乳动物细胞培养模式来培养海洋无脊椎动物细胞是远远不够的。为建立海洋无脊椎动物胚胎细胞系,研发专用培养基、筛选促分裂生长因子、优化培养条件和建立有效的传代方法可作为今后研究工作的努力方向。

总之,要实现海洋无脊椎动物胚胎细胞系的建立还需克服一系列的瓶颈问题,相信经过不断地探索和努力,最终一定能够建立海洋无脊椎动物胚胎细胞系。

## 基金项目

国家自然科学基金项目(No. 31472274 和 31172391)和海洋经济创新发展区域示范项目(No. 12PYY001SF08)资助。

## 参考文献 (References)

- [1] Rinkevich, B. (2011) Cell Cultures from Marine Invertebrates: New Insights for Capturing Endless Stemness. *Marine Biotechnology*, **13**, 345-354. <http://dx.doi.org/10.1007/s10126-010-9354-3>
- [2] Rinkevich, B. (1999) Cell Cultures from Marine Invertebrates: Obstacles, New Approaches and Recent Improvements. *Journal of Biotechnology*, **70**, 133-153. [http://dx.doi.org/10.1016/S0168-1656\(99\)00067-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0168-1656(99)00067-X)
- [3] Rinkevich, B. (2005) Marine Invertebrate Cell Cultures: New Millennium Trends. *Marine Biotechnology*, **7**, 429-439. <http://dx.doi.org/10.1007/s10126-004-0108-y>
- [4] Munro, M.H.G., Blunt, J.W., Dumdei, E.J., *et al.* (1999) The Discovery and Development of Marine Compounds with Pharmaceutical Potential. *Journal of Biotechnology*, **70**, 15-25. [http://dx.doi.org/10.1016/S0168-1656\(99\)00052-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0168-1656(99)00052-8)
- [5] Schmitz, F.J. (1994) Cytotoxic Compounds from Sponges and Associated Microfauna. Sponges in Time and Space:

- Biology, Chemistry, Paleontology. *Proceedings of the Fourth International Porifera Congress*, Rotterdam, 485-496.
- [6] Miki, W., Kon-Ya, K. and Mizobuchi, S. (1997) Biofouling and Marine Biotechnology: New Antifoulants from Marine Invertebrates. *Oceanographic Literature Review*, **3**, 282.
- [7] Ilan, M., Contini, H., Carmeli, S., *et al.* (1996) Progress towards Cell Cultures from a Marine Sponge That Produces Bioactive Compounds. *Journal of Marine Biotechnology*, **4**, 145-149.
- [8] Rinkevich, B., Ilan, M. and Blisko, R. (1998) Further Steps in the Initiation of Cell Cultures from Embryos and Adult Sponge Colonies. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal*, **34**, 753-756.  
<http://dx.doi.org/10.1007/s11626-998-0028-7>
- [9] 孙黎明. 繁茂膜海绵原细胞的鉴别, 分离纯化和体外培养研究[D]: [博士学位论文]. 大连: 中国科学院研究生院(大连化学物理研究所), 2006.
- [10] Frank, U., Rabinowitz, C. and Rinkevich, B. (1994) *In Vitro* Establishment of Continuous Cell Cultures and Cell Lines from Ten Colonial Cnidarians. *Marine Biology*, **120**, 491-499. <http://dx.doi.org/10.1007/BF00680224>
- [11] Peponnet, F. and Quiot, J.M. (1971) Cell Cultures of Crustacea Arachnida and Merostomacea. *Invertebrate Tissue Culture*, **1**, 341-359.
- [12] Toullec, J.Y., Crozat, Y., Patrois, J., *et al.* (1996) Development of Primary Cell Cultures from the Penaeid Shrimps *Penaeus vannamei* and *P. indicus*. *Journal of Crustacean Biology*, **16**, 643-649. <http://dx.doi.org/10.2307/1549183>
- [13] Frerichs, G.N. (1996) *In Vitro* Culture of Embryonic Cells from the Freshwater Prawn *Macrobrachium rosenbergii*. *Aquaculture*, **143**, 227-232. [http://dx.doi.org/10.1016/0044-8486\(96\)01281-1](http://dx.doi.org/10.1016/0044-8486(96)01281-1)
- [14] Fan, T.J. and Wang, X.F. (2002) *In Vitro* Culture of Embryonic Cells from the Shrimp, *Penaeus chinensis*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, **267**, 175-184. [http://dx.doi.org/10.1016/S0022-0981\(01\)00364-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0022-0981(01)00364-1)
- [15] 余黎明, 张晓军, 田丽萍, 张成松, 金松君, 相建海. 中国明对虾囊胚和原肠胚细胞的分离和培养[J]. 海洋科学, 2009(1): 58-62.
- [16] Brewster, F. and Nicholson, B.L. (1979) *In Vitro* Maintenance of Amoebocytes from the American Oyster (*Crassostrea virginica*). *Journal of the Fisheries Board of Canada*, **36**, 461-467. <http://dx.doi.org/10.1139/f79-064>
- [17] Odintsova, N.A. and Khomenko, A.V. (1991) Primary Cell Culture from Embryos of the Japanese Scallop *Mizuchopecten yessoensis* (Bivalvia). *Cytotechnology*, **6**, 49-54. <http://dx.doi.org/10.1007/BF00353702>
- [18] Odintsova, N.A., Dyachuk, V.A. and Nezhlin, L.P. (2010) Muscle and Neuronal Differentiation in Primary Cell Culture of Larval *Mytilus trossulus* (Mollusca: Bivalvia). *Cell and Tissue Research*, **339**, 625-637.  
<http://dx.doi.org/10.1007/s00441-009-0918-3>
- [19] van der Merwe, M., Auzoux-Bordenave, S., Niesler, C., *et al.* (2010) Investigating the Establishment of Primary Cell Culture from Different Abalone (*Haliotis midae*) Tissues. *Cytotechnology*, **62**, 265-277.  
<http://dx.doi.org/10.1007/s10616-010-9293-x>
- [20] 晏萌. 栉孔扇贝(*Chlamys farreri*)幼虫和成体组织细胞的体外培养体系建立和特征分析[D]: [博士学位论文]. 青岛: 中国海洋大学, 2013.
- [21] Kaneko, H., Kawahara, Y. and Dan-Sohkawa, M. (1995) Primary Culture of Mesodermal and Endodermal Cells of the Starfish Embryo. *Zoological Science*, **12**, 551-558. <http://dx.doi.org/10.2108/zsj.12.551>
- [22] Bulgakov, V.P., Kiselev, K.V., Yakovlev, K.V., *et al.* (2006) Agrobacterium-Mediated Transformation of Sea Urchin Embryos. *Biotechnology Journal*, **1**, 454-461. <http://dx.doi.org/10.1002/biot.200500045>
- [23] Ageenko, N.V., Kiselev, K.V., Dmitrenok, P.S., *et al.* (2014) Pigment Cell Differentiation in Sea Urchin Blastula-Derived Primary Cell Cultures. *Marine Drugs*, **12**, 3874-3891. <http://dx.doi.org/10.3390/md12073874>