

海洋无脊椎动物细胞培养概况

Advances in the cell culture of marine invertebrates

郭华荣, 林瀚智, 殷立成

(中国海洋大学 海洋生命学院, 山东 青岛 266003)

中图分类号: Q813.1 文献标识码: A 文章编号: 1000-3096(2007)10-0082-05

动物细胞培养技术萌芽于 1885 年 Roux 培养鸡神经板细胞的尝试, 创建于 1907 年 Harrison 进行的蝌蚪髓管神经细胞的培养实验。医学上对生产抗病毒疫苗和研究肿瘤成因的需要, 促进了细胞培养工作在人类和啮齿类动物中的广泛开展, 并于 1952 年建立了人类的第一个肿瘤细胞系(Hela)。目前, 哺乳动物细胞培养技术日臻完善, 并成为一种不可或缺的重要技术, 在医学和基础生物学领域中得到了广泛的应用, 同时也成为多种生物制品如单克隆抗体等的生产手段。目前, 全世界已建立的细胞系(株)至少有数千种, 其中包括人和动物的正常细胞、肿瘤细胞以及遗传缺陷型细胞等。随后, 农业发展和病虫害防治的需要又推动了细胞培养技术在昆虫毒理和病毒学研究方面的应用, 使得昆虫和蜘蛛网壁虱(tick)永生性细胞系的建立, 以及昆虫细胞专用培养基的开发也相继获得成功。但是与陆生动物相比, 水生动物的细胞培养只在鱼类中比较成功。在水生无脊椎动物中, 由于无脊椎动物细胞在形态、结构和功能以及营养需求等方面的特殊性, 自 20 世纪 70 年代以来, 虽然经过了近半个世纪的努力, 但仍没有建立起水生无脊椎动物的永生性细胞系, 其细胞培养多停留在原代培养和有限细胞系水平上^[1,2]。但随着对某些低等海洋无脊椎动物如海绵的天然活性产物的开发, 以及人工养殖虾贝类病害防治等研究的需要, 海洋无脊椎动物细胞培养日益受到关注。本文依次对海洋无脊椎动物的 6 个门类包括多孔动物门、腔肠动物门、环节动物门、节肢动物门、软体动物门和棘皮动物门的细胞培养现状和存在的问题进行了综述和展望。

1 多孔动物门(Porifera)

多孔动物又称海绵动物(Spongia), 是多细胞动物中最低等最原始的一类, 营固着生活。无固定体形, 只有细胞分化, 没有真正的组织。海绵体内含有多种具有抗肿瘤、抗病毒和抗真菌活性的活性物质, 但其自然资源量少、活性成分含量低且结构复杂, 因

而近年来海绵的细胞培养工作一度成为研究的热点。早在 1993 年 Klautau 等^[3]报道, 对海绵细胞进行了长时间的体外培养, 虽然后来被鉴定是污染的原生动物细胞。随后, 许多学者进一步完善了海绵的细胞培养方法, 并建立了海绵细胞的悬浮培养方法。Rinkevich 等^[4]将海绵胚胎细胞培养了 41 周, 大大提高了体外培养海绵细胞的存活时间。Richelle-Maurer 等^[5]在对桶状海绵的培养中发现, 体外培养的海绵细胞具有自发的聚集能力, 形成类似于成体海绵皮层细胞的网状结构。

这些早期的工作虽然使海绵细胞培养技术有了长足的进步, 但是由于海绵特殊的细胞结构和生理特点, 使得海绵细胞培养仍然面临很大的困难, 进展缓慢, 目前仍旧停留在原代培养的水平上。归结起来, 主要有以下两个原因: (1) 海绵动物多为合胞体(trabecular syncytium), 即整个生物体是由一个巨大的内有横隔片的多核细胞构成, 通过胞内隔片上的孔道来进行细胞内的物质交换。Leys^[6]发现, 体外培养的海绵细胞相互接触后, 会彼此融合, 形成一个大的多核体, 但结构与体内有着很大的不同, 因而对于海绵细胞建系的可行性, 受到很多科学家的质疑; (2) 海绵动物体内存在着多种内共生的微生物, 难以实现海绵细胞的无菌培养。如果在培养系统中加入抗生素进行抑菌处理的话, 同时会抑制海绵细胞的活性。但如果不使用抗生素的话, 培养又只能维持 1~3 d。

虽然海绵的单细胞培养物在体外表现出很弱的分裂能力, 但是由悬浮培养的海绵单细胞自发聚集形成的细胞团(primmorph 或 cell aggregate)却有极强的生存能力。Custodio 等^[7]首次建立了海绵的细胞

收稿日期: 2006-11-06; 修回日期: 2007-07-28

基金项目: 国家 863 计划青年基金项目(2001AA628130)

作者简介: 郭华荣(1970), 女, 山东荣成人, 副教授, 博士, 主要从事鱼类细胞培养和分子生物学研究, E-mail: huarongguo@ouc.edu.cn



团培养法。具体方法是在培养基中添加较高浓度的 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} , 则悬浮培养的海绵细胞在几小时内就会开始自发聚集, 在几天内形成直径 1~3 mm 左右的小团, 称为 *primmorph*。*primmorph* 是一个高度有组织的结构, 其外面覆盖一层单层扁平上皮细胞, 内部由球形细胞构成。端粒酶活性测定表明, 海绵的所有体细胞都具有端粒酶活性, 但分散的海绵单细胞培养物却检测不到端粒酶活性; 不过, 当其形成细胞团以后, 又可以检测到端粒酶活性。端粒酶活性的有无与细胞的寿命和永生性密切相关, 目前对于海绵中端粒酶的这种调控表达机制还知之甚少。近年来, 细胞团培养法已成为一种有效的海绵细胞体外培养方法, 其优点在于, 海绵细胞团的制备比较简单, 而且制备过程中, 增加了对污染的真菌和非共生细菌的清除几率。

2 腔肠动物门(Cnidaria)

腔肠动物门包括珊瑚、海葵和水螅等, 是真正的二胚层多细胞后生动物, 有了组织的分化, 但结构简单, 体壁仅由内、外胚层两层细胞以及中间无细胞结构的中胶层(*mesoglea*) 构成, 细胞类型少。许多腔肠动物内共生有虫黄藻和绿藻等单细胞藻类。有许多研究者进行了腔肠动物组织细胞的分离和培养, 但只有 Frank 等^[8]成功地得到了 10 种腔肠动物的长期培养物, 细胞于体外培养 7~20 d 后开始增殖, 仅能传代几次, 最长存活时间达 1 a 左右, 并被冻存。但细胞复苏后, 被真核单细胞生物(网粘菌门)所污染, 这些微生物在培养基中优势生长, 导致细胞培养失败。

随后的大量研究主要集中在腔肠动物的细胞分离技术和培养基质两个方面。研究表明, 细胞分散技术对存活细胞的数量、组织培养的好坏和培养时间的长短都有很大影响。在体外培养基质的研究中发现, 体外培养腔肠动物细胞的存活、贴壁和迁移对培养基有着很严格的要求。在培养时, 多数腔肠动物细胞都只有与细胞外基质相接触时才能存活^[9], 而且它们只有附着于由中胶层残片(*mesoglea pieces*) 构成的基质上, 才能很好地贴壁、铺展和迁移^[10]。因此, 寻找和制备可以替代腔肠动物中胶层的培养基质, 是保证今后腔肠动物细胞体外培养工作顺利开展所必须解决的关键技术问题之一。

3 环节动物门(Annelida)

环节动物分为 3 个纲: 多毛纲(沙蚕)、寡毛纲(蚯蚓)和蛭纲(水蛭), 其中只有沙蚕属海产。环节动物

身体出现分节, 具真体腔, 是比较高等的无脊椎动物。目前尚未见有沙蚕细胞培养的成功报道。水蛭的神经细胞培养也还停留在原代培养阶段。由于蚯蚓在无脊椎动物免疫学、环境污染和进化上的重要意义, 蚯蚓的细胞培养引起了人们的关注, 但是早期的许多尝试并不是很成功。近年来, 只有 Battaglia 和 Davoli^[11] 报道了对蚯蚓体外培养条件的研究结果, 成功得到了可以在体外存活 1 a 以上的蚯蚓细胞培养物, 该培养物中含有 3 种不同类型的细胞, 但是没有观察到细胞增殖的现象。其中一种悬浮生长的直径在 20 μm 左右的培养细胞, 在形态学上与蚯蚓的体腔细胞很相似。总的来说, 环节动物的细胞培养工作多年来几乎没有有什么进展。

4 节肢动物门(Crustacea)

节肢动物是动物界中数量最多的一类无脊椎动物, 以昆虫的数量最多, 占节肢动物的 94%。其中, 属海产的有甲壳纲动物如虾类。人工养殖虾类病毒检测和疫苗制备的需要, 推动了虾类细胞培养工作的开展, 并成为近年来海洋无脊椎动物细胞培养的研究热点。自 1971 年 Peponnet 和 Quiot^[12] 首次报道整虾和美洲龙虾的类淋巴组织的培养以来, 已开展了大量的虾类细胞培养工作。目前, 虾类的原代细胞培养已经成功, 并且在虾类病毒的检测和疫苗制备中得到了成功的应用^[13-15]。其中, 我国学者董裳亮在中国明对虾的原代细胞培养上取得了可喜的研究成果, 开发出了适合对虾生长的对虾专用培养基 MPS, 所培养的淋巴组织和心脏组织在 3 d 后就能形成连续的细胞单层^[14]。

虽然虾类的细胞培养目前仍停留在原代和传代培养阶段上, 还没有一个永生性细胞系建立起来, 但是在培养方法和技术上已积累了许多经验。研究表明, 海产虾类培养基的渗透压范围一般在 720~760 mOsmol/L 之间; pH 值范围一般为 7.0~7.5; 适宜温度为 25~28°C; 所用培养基最好使用虾的专用培养基(MPS), 并添加 15%~20% 的胎牛血清, 有时也可添加 20% 的虾肌提取液或淋巴液等; 比较容易培养的组织主要为心脏、卵巢和血淋巴等。

在以建立永生性细胞系为目标的虾类细胞培养中, Fraser 和 Hall^[16] 对斑节对虾卵巢组织和 Owens 和 Smith^[17] 对斑节对虾心脏组织的细胞培养取得了很大进展。Fraser 和 Hall 体外培养的卵巢组织细胞由形态不同的 4 种细胞组成: 上皮样细胞、成纤维样细胞、圆形细胞和含大细胞核的上皮样细胞。其中, 上皮样细胞在 Grace 培养基中生长最快, 但是存活时



间短,不到2个月;而成纤维样细胞在 $2 \times L-15$ 培养基中形成了连续性细胞单层,成功传代3次,共存活了17个月,并且在培养到3个月和9个月的时候,部分培养瓶中的成纤维样细胞转变为有大型细胞核的上皮样细胞,这些上皮样细胞聚集在一起,但是不能传代培养。而Owens和Smith体外培养的心脏组织细胞在体外存活了10个月,细胞的分裂能力在体外维持了40 d。

今后,要实现建立虾类永生性细胞系的研究目标,首先需要突破的是虾类细胞系的永生性转化问题^[18]。近年来,哺乳动物细胞永生性转化技术的不断进展,包括端粒酶研究和永生性相关基因及其转染研究,给这一目标的实现带来了希望^[19,20]。

5 软体动物门(Mollusca)

软体动物的数量仅次于节肢动物,为动物界中第二大类群,包括各种螺类、双壳类、乌贼和章鱼等。软体动物是细胞培养研究开展得最多的一类海洋无脊椎动物,主要源于以下5个方面的研究需要:(1)病毒性疾病的诊断和治疗;(2)软体动物的巨大神经元,是研究神经生物学的难得的实验材料;(3)珍珠的形成机制;(4)双壳类肿瘤的形成机理;(5)多种螺类是人类寄生虫的中间宿主,为研究寄生虫和宿主的相互作用,提供有效的实验工具。

软体动物细胞培养的对象主要是一些养殖的双壳类和腹足类,包括贻贝、珍珠贝、牡蛎、蛤蜊、螺和鲍等。所培养的组织细胞主要来源于胚胎、鳃、外套膜、神经细胞、血细胞、消化腺和心肌等。所培养的细胞已应用于神经生物学、生物监测、肿瘤生物学、免疫和寄生物学等方面。

19世纪70年代,软体动物细胞培养就已取得了可喜的进展。1974年,Machii^[21]在珍珠牡蛎外套膜组织培养中,成功观察到了体外培养的外套膜细胞能够分泌有机物和进行有丝分裂的现象。但在随后的30多年中,珍珠牡蛎的外套膜组织培养却一直没有什么很大的进展。1976年,Hansen等^[22]建立起了第一个也是迄今为止唯一一个软体动物细胞系:淡水蜗牛胚胎细胞系BGE。但是在建立海洋软体动物细胞系方面,目前尚无类似的成功报道。另外,1979年,Brewster和Nicholson等^[23]成功地将牡蛎的变形细胞在体外培养了6个月。

19世纪80年代之后,人们对海洋软体动物的细胞培养条件,包括细胞冻存、培养基添加物、培养基质和细胞分散方法等,做了大量的探索,积累了丰富经验,但仍然没有解决海洋软体动物细胞的体外长期

存活和成功传代建系的问题,即使是培养贝类的肿瘤组织也不例外。近年来,海洋软体动物原代细胞培养物的应用研究开始增多。Auffret和Oubella^[24]利用巨牡蛎的血细胞凝集实验来检测外源污染物的毒性效应。Cornet等^[25]利用牡蛎的原代培养鳃细胞研究染色体的复制。另外,在基因表达研究、病毒研究和生态毒理学研究等方面也有不少报道。

虽然海洋软体动物的细胞培养目前还是困难重重,但是只要我们今后在其原代培养组织的消毒处理、单细胞分离纯化、培养基、培养基质和细胞增殖等技术方面获得全面突破,就有可能实现海洋软体动物细胞建系的目标。

6 棘皮动物门(Echinodermata)

棘皮动物门包括海星、海胆、海参和海百合等,均为底栖海洋动物,种类不多,但具有了中胚层起源的真骨、后口和发达的真体腔等比较高等的进化特征,是向脊索动物进化中的无脊索动物。棘皮动物的细胞培养研究开展得很少,虽然棘皮动物具有无与伦比的再生能力,但是其细胞培养还是难获成功,目前仍然停留在原代培养的水平上。因而在细胞分离纯化、培养基、培养条件以及组织来源等方面都需要进一步的探索。海胆和海星的细胞培养主要是对胚胎细胞的原代培养。Ermak和Odintsova^[26]报道了贴壁因子对体外培养海胆胚胎细胞的生长和分化的影响。培养基质可影响海胆胚胎细胞的分化。体外培养海胆原肠期幼虫细胞1周后,开始有上皮细胞和间充质细胞的分化。不过,上皮细胞在多聚赖氨酸培养基质上优势生长,而间充质细胞则在添加有纤连蛋白和癌沉淀素A(oncoprecipitin A)的培养基质上优势生长,并形成合胞体或细胞团。棘皮动物某些细胞类型在培养过程中易聚集形成细胞团(aggregate),或相互融合形成单层的合胞体(syncytia),这一点与海绵动物相似。所以,以建立永生性细胞系为目标的棘皮动物细胞培养,选择适当的原代培养细胞来源就很重要了。

Hwang等^[27]通过体外培养海胆胚胎细胞来研究骨针(spiculae)和小分裂球的发育。Odintsova等^[28]研究了凝集素对原代培养海胆胚胎细胞贴壁和生长的影响。Kaneko等^[29]原代培养了海星的胚胎细胞和幼虫肌肉细胞。Bulgakov等^[30]和Odintsova等^[31]将酵母转录激活因子Gal4基因转染海胆和海钱(Sand Dollar)胚胎,发现转染后胚胎可以形成畸胎瘤(teratoma like)样结构。将Gal4基因转染海胆和海钱的原代培养胚胎细胞,可促进转染后细胞的

DNA 合成和增殖。这表明,通过遗传操作,提高一些重要生长控制基因的表达水平,是解决海胆等无脊椎动物原代培养细胞生长缓慢和实现永生性转化的一种有效手段。

海参具有神奇的吐脏再生能力,1993年,Blinova等^[32]最早开始了对海参再生组织的细胞培养,并且在培养至40d的时候,观察到再生肠组织来源的细胞团发生旋转和再生呼吸树来源的细胞团出现搏动现象。最近,Odintsova等^[33]对海参吐脏后不同再生阶段的肠组织进行了原代培养,发现只有吐脏后第14~16天的再生肠组织的原代培养物中,能观察到活跃的细胞增殖,细胞的数量于培养后第20天加倍,而在其他再生阶段的肠组织原代培养物中均未观察到细胞分裂现象。再生肠组织的原代培养物主要由肠细胞和体腔上皮细胞构成。肠细胞悬浮生长,而体腔上皮细胞贴壁生长,并且在多聚赖氨酸培养基上长成多层细胞团。因此,Odintsova等认为海参的再生肠组织是进行海参细胞长期培养以至建系很好的原代培养组织来源。

7 前景展望

海洋无脊椎动物的细胞培养研究虽然起步晚于鱼类和昆虫等,但至今也有30多年的历史,人们为此也投入了大量的努力,虽然在某些种类海洋无脊椎动物中已取得了可喜的进展,但是至今仍然没有得到一个永生性细胞系的现实,实在是令人困扰。如何改进培养条件如培养基和培养基质,解决海洋无脊椎动物细胞在体外的存活和分裂以及永生性转化的问题,是今后要努力的目标。

大量的研究结果提示我们,要充分认识到海洋无脊椎动物细胞的营养需求和生存条件与脊椎动物细胞是有着很大差别的。例如,海绵动物的合胞体现象和内共生微生物的特点,套用脊椎动物现有的培养基和培养方法显然是不够的。再者,很多海洋无脊椎动物都具有很强的再生能力,如海绵的碎片在海水中就能再生成完整的个体,以及棘皮动物中海星臂的再生和海参的吐脏再生等。但是令人困惑的是,分散培养的海绵细胞在现有的体外培养系统中却很难存活和分裂。这表明,海绵碎片中可能存在某些细胞因子是牛血清中所不存在的,或者高等脊椎动物血清中某些成分对低等无脊椎动物细胞的生长是不利的。因此,作者认为开发出海洋无脊椎动物细胞的专用培养基是非常必要的,甚至可能需要针对不同的海洋无脊椎动物,开发出不同的生长培养基。另外,在培养方法上采用悬浮培养或用合适的培养基

质(如胶原)包被培养,也很值得一试。

近年来,转永生性相关基因技术、物理和化学诱变技术以及细胞杂交技术在诱导细胞永生性转化方面的发展和运用,为解决海洋无脊椎动物培养细胞的永生性转化问题带来了新的希望。因此,寻找和克隆海洋无脊椎动物的永生性转化相关基因,探索物理和化学诱变海洋无脊椎动物细胞的方法和条件,都是今后需要进一步开展的工作内容。

另外,海洋无脊椎动物细胞培养中原生动物污染也是个很棘手的问题。目前尚无有效的可以杀死细胞培养物中原生动物的试剂。因此,开发出有效的杀原生动物药品将会大大促进水生动物细胞的培养工作。

总之,要实现海洋无脊椎动物细胞建系的目标,还有一系列瓶颈问题需要克服,要走的路可能会很长。

参考文献:

- [1] Rinkevich B. Marine invertebrate cell cultures: new millennium trends[J]. **Mar Biotechnol**, 2005, 7(5): 429-439.
- [2] Rinkevich B. Cell cultures from marine invertebrates: obstacles, new approaches and recent improvements [J]. **J of Biotechnol**, 1999, 70: 133-153.
- [3] Klautau M, Custodio M R, Borojevic R. Cell culture of sponges (*Clathrina* and *Polymastia*) [J]. **In Vitro Cell Dev Biol**, 1993, 29A: 97-99.
- [4] Rinkevich B, Blisko R, Ilan M. Further steps in the initiation of cell cultures from embryos and adult sponge colonies [J]. **In Vitro Cell Dev Biol**, 1998, 34: 753-756.
- [5] Richelle Maurer E, Gomez R, Braekman J C, et al. Primary cultures from the marine sponge *Xestospongia muta* (Petrosiidae, Haplosclerida) [J]. **J Biotechnol**, 2003, 100: 169-176.
- [6] Leys S P. Fusion and cytoplasmic streaming are characteristics of at least two hexactinellids: examination of cultured tissue from *Aphrocallis tesvastus* [A]. Watanabe Y, Fusetani N. *Sponge Sciences—Multidisciplinary Perspectives* [C]. Tokyo: Springer, 1998. 215-226.
- [7] Custodio M R, Prokic I, Steffen R, et al. Primorphs generated from dissociated cells of the sponge *Suberites domuncula*: a model system for studies of cell proliferation and cell death [J]. **Mechanisms of Ageing and Development**, 1998, 105: 45-59.
- [8] Frank U, Rabinowitz C, Rinkevich B. In vitro establishment of continuous cell cultures and cell lines from ten colonial cnidarians [J]. **Mar Biol**, 1994, 120: 491-499.

- [9] Schmid V, Ono S I, Reber Müller S. Cell substrate interaction in Cnidaria[J]. **Micros Res Tech**, 1999, 44: 254-268.
- [10] Frank U, Rinkevich B. Scyphozoan jellyfish's mesoglea supports attachment, spreading and migration of anthozoans' cells in vitro[J]. **Cell Biol Int**, 1999, 23: 307-311.
- [11] Battaglia M, Davoli C. Long-term culture of the earthworm *Eisenia foetida* (Annelida, Oligochaeta) [A]. Maramorosch K, Mitsunashi J. Invertebrate Cell Culture, Novel Directions and Biotechnology Applications[C]. USA: Science Publishers, NH, 1997. 261-268.
- [12] Peponnet F, Quiot J M. Cell cultures of crustacea, Arachnida and Merostomacea[A]. Vage C. Invertebrate tissue culture[C]. New York and London: Academic Press, 1971. 341-359.
- [13] Nadala E C, Lu Y, Loh P C. Primary culture of lymphoid, nerve and ovary cells from *Penaeus stylirostris* and *Penaeus vannamei*[J]. **In Vitro Cell Dev Biol**, 1993, 29A: 620-622.
- [14] Tong S-L, Miao H-Z. Attempts to initiate cell cultures from *Panaeus chinensis* tissues[J]. **Aquaculture**, 1996, 147: 151-157.
- [15] Chen S N, Wang C S. Establishment of cell culture systems from penaeid shrimp and their susceptibility to white spot disease and yellow head viruses[J]. **Methods Cell Sci**, 1999, 21: 199-206.
- [16] Fraser C A, Hall M R. Studies on primary cell cultures derived from ovarian tissue of *Penaeus monodon* [J]. **Methods Cell Sci**, 1999, 21: 213-218.
- [17] Owens L, Smith J. Early attempts at production of prawn cell lines[J]. **Methods Cell Sci**, 1999, 21: 207-211.
- [18] Tapay L M, Lu Y, Brock J A, *et al.* Transformation of primary cultures of shrimp (*Penaeus stylirostris*) lymphoid (Oka) organ with simian virus 40 (T) antigen [J]. **Proc Soc Exp Biol Med**, 1995, 209: 73-78.
- [19] Lang G H, Wang Y, Nomura N, *et al.* Detection of telomerase activity in tissues and primary cultured lymphoid cells of *Penaeus japonicus* [J]. **Mar Biotechnol**, 2004, 6: 347-354.
- [20] Puttmann S, Senner V, Braune S, *et al.* Establishment of a benign meningioma cell line by hTERT-mediated immortalization[J]. **Lab Invest**, 2005, 85(9): 1163-1171.
- [21] Machii, A. Organ culture of mantle tissue of the pearl oyster *Pinctata fucata* (Gould) [J]. **Bull Nat Pearl Res Lab**, 1974, 18: 211-217.
- [22] Hansen E. A cell line from embryos of *Biomphalaria glabrata* (Pulmonata): establishment and characteristics [A]. Maramorosch K. Invertebrate Tissue Culture: Research Applications [C]. New York: Academic Press, 1976. 75-97.
- [23] Brewster F, Nicholson B L. In vitro maintenance of amoebocytes from the American oyster (*Crassostrea virginica*) [J]. **J Fish Res Bd Can**, 1979, 36: 461-467.
- [24] Auffret M, Oubella R. Hemocyte aggregation in the oyster *Crassostrea gigas*: In vitro measurement of experimental modulation by xenobiotics [J]. **Comp Biochem Physiol**, 1997, 118A: 705-712.
- [25] Cornet M. Obtaining cell proliferation for chromosome preparation in gill tissue culture of the oyster *Crassostrea gigas* [J]. **Cytotechnology**, 2000, 32: 1-7.
- [26] Ermak A V, Odintsova N A. Effects of adhesive factors on differentiation and growth of embryonic sea urchin cells in primary cultures [J]. **Russ J Mar Biol**, 1996, 22: 338-343.
- [27] Hwang S P, Lin Y C, Su Y H, *et al.* Accelerated development of embryonic spicule and micromere derived primary mesenchyme cell culture of the sea urchin *Stomopneustes variolaris* (Lamarck) [J]. **Invert Reprod Dev**, 1999, 35: 89-93.
- [28] Odintsova N A, Belogortseva N I, Ermak A V, *et al.* Adhesive and growth properties of lectin from the ascidian *Didemnum ternetanum* on cultivated marine invertebrate cells [J]. **BBA**, 1999, 1448: 381-389.
- [29] Kaneko H, Kawahara Y, Dair Sokhawa M. Primary culture of mesodermal and endodermal cells of the starfish embryo [J]. **Zool Sci**, 1995, 12: 551-555.
- [30] Bulgakov V P, Odintsova N A, Plotnikov S V, *et al.* Gal4 dependent alternations of embryo development and cell growth in primary culture of sea urchins [J]. **Mar Biotechnol**, 2002, 4: 480-486.
- [31] Odintsova N A, Kiselev K V, Bulgakov V P, *et al.* Influence of the activator of transcription gal4 on growth and development of embryos and embryonic cells in primary cultures of sand dollar [J]. **Russ Dev Biol**, 2003, 34: 217-222.
- [32] Blinova M I, Goryunova L B, Leibson N L. Cell culture of regenerating tissues of the sea cucumber *Stichopus japonicus* [J]. **Biol Morya**, 1993, 2: 84-91.
- [33] Odintsova N A, Dolmatov I Y, Mashanov V S. Regenerating holothurian tissues as a source of cells for long-term cell cultures [J]. **Marine Biology**, 2005, 146: 915-921.

(本文编辑: 刘珊珊)