维普资讯 http://www.cqvip.com

海洋节肢动物细胞及组织培养研究进展

Research advances of cell and tissue cultures of marine Arthropoda

金 刚[1]，程 文[1]，代建国[1]，张 燕[1]，谢海伟[1]，沈建忠[2]

(1. 深圳职业技术学院 化生学院，深圳 518055；2. 华中农业大学 水产学院，湖北 武汉 430070)

中图分类号: Q2　　文献标识码: A　　文章编号: 1000-3096(2007)11-0091-06

细胞培养是生物工程中重要手段和常用方法之一，已广泛应用于染色体分析、细胞代谢、基因表达、免疫、癌变机制、病毒培养、分离、鉴定和药物筛选等研究领域。作为生物学领域中的一项重要技术,动物组织和细胞培养已广泛应用于哺乳动物和鱼类的研究中,并取得了丰硕成果。但由于海洋节肢动物的细胞培养较困难，难以进行传代，因此至今未得到海洋节肢动物的连续性细胞系。细胞培养做为一种潜在的工具在虾蟹类疾病的诊断及探针技术的应用开发方面已受到日益广泛的关注。

在无脊椎动物的细胞培养方面，自 Grace1982 年从鳞翅目昆虫(*Antheraea eucalypti*) 建立细胞株以来，昆虫组织的细胞培养技术已发展得相当成熟。但是在海洋节肢动物细胞培养方面，细胞系的建立问题至今仍是全世界所面临的挑战性课题，虽已积累了一些原代和传代培养方面的经验，但至今仍无建系的报道。如果能够建立起虾蟹等的细胞系，就可应用于节肢动物的病毒培养、分离、鉴定和药物筛选等重要方面，尤其是为深入研究甲壳类动物的发病机理，探索防病措施提供极大方便。另外，细胞培养可以为节肢动物染色体研究以及分类、遗传育种、种质资源保护提供一定的帮助，促进海洋节肢动物的基础研究和生产的发展。此外，节肢动物的细胞培养可为其它海洋生物的细胞培养提供参考模式，为开发海洋药物奠定基础。海洋节肢动物中有许多种类因为体内含有生物活性物质而具有很高的药用价值，一旦细胞培养技术成熟，就可利用细胞的大规模培养，生产有商业价值的生物大分子产品用于造福人类。

1 海洋节肢动物的研究现状

海洋节肢动物细胞培养的组织来源以虾类最为主要，国外也有对鲎细胞培养的报道。近年来为了寻求虾蟹类疾病防治的新途径，解决长期困扰虾蟹类养殖业发展的有关病害问题，对虾蟹类的免疫机理方面的研究空前活跃[1]。在免疫机理方面，血淋巴的免疫防御功能是最基础、最重要的研究方向。细胞培养做为一种潜在的工具在虾蟹类疾病的诊断及探针技术的应用开发方面受到日益广泛的关注[2]。在日本对虾细胞培养方面，报道了肝胰脏[3]、血细胞[4]的体外培养，及对血淋巴和肌肉组织[5]进行了原代培养。Hsu[6]利用碱性成纤维细胞生长因子等，使斑节对虾(*Penaeus monodon*)淋巴器官的细胞在 L-15 培养基中传了 90 代，第 90 代后，细胞不能继续传代生长，因而只建立了有限细胞系。对于同一对虾品种不同作者报道的培养条件不同，但结果均显示原代培养的成功率较低，体外组织细胞存活的时间较短，细胞传代次数较少。因此节肢动物细胞培养的条件仍须继续探索。

有的研究者也做过节肢动物门肢口纲动物鲎的鳃组织和血细胞的培养。鲎的血细胞可以用来生产细菌内毒素检测试剂(LAL)，通过体外适宜条件下培养鳃组织来持续获得血细胞已有报道。Joshi[7]在体外长

收稿日期：2006-02-12；修回日期：2007-08-18
基金项目：广东省自然科学基金项目（04011209，05300281）
作者简介：金刚（1965-），男，湖北当阳人，研究员，研究方向：海洋生物技术，E-mail:jingang@oa.szpt.net

维普资讯 http://www.cqvip.com

期培养南方鲎(*Tachypleus gigas*)的鳃组织以获得血细胞。Hurton[8]进行了体外培养美洲鲎(*Limulus polyphemus*)血细胞所用培养基的选择实验。

2 海洋节肢动物细胞培养方法

2.1 组织来源

据研究目的不同培养的组织也不相同。在病毒研究方面，以几种组织最为主要，例如肝胰脏[1]、卵巢[9]及造血组织[10,11]等。原代培养主要为应用目的，如病理学研究方面。另外研究还包括鳃[7]、肌肉[12]等各种组织。

作为组织来源的个体越年轻，其细胞一般保持较强的分裂能力，体外培养成功的可能性就越大。因此，胚胎或幼体应该是细胞传代的很好材料。已有罗氏沼虾（*Macrobrachium rosenbergii*）胚胎（发育7~13 d）[13]和中国明对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)[14]胚胎（发育到晚期）细胞培养成功的报道。

2.2 无菌处理方法的选择

海洋节肢动物生活在海水中，表面带一些弧菌类微生物或原生动物，培养前须进行灭菌处理，除菌彻底与否是培养成功的关键之一。用高浓度的抗生素还不能将其彻底除去，必须用二氯化汞或双氯苯双胍己烷或其他消毒剂等进行处理。

在虾的细胞培养中，从理论上讲虾的胚胎和幼体应是最易培养的材料，但是其胚胎和幼体是体外发育，受酵母、真菌和原生动物的污染十分严重，目前还没有理想的消毒方法，这也是用早期发育阶段的海洋甲壳类动物进行组织和细胞培养不易成功的主要原因。近来随着消毒方法的改进，如 Frerichs[13]和 Fan[14]采用孔雀绿和 Iodophore 消毒虾类胚胎并成功进行胚胎细胞的体外培养，解决了虾类胚胎细胞体外培养中污染严重的问题。笔者在实验中采用如下方法，在分离组织前先用 100 g/L 的次氯酸钠或 700 mL/L 的乙醇将虾体浸泡 10 min，也可在无菌室内用2%的碘酒擦拭体表，然后用无菌生理盐水冲洗干净，再用灭菌解剖器械剖取所需组织。此种方法也可较有效杀菌。

鲎的鳃组织暴露在海水中，上面附有一层粘液，单纯冲洗液很难除菌，所以如何彻底除菌还需进一步研究。鲎的血液中生活有许多的原生动物，在培养鲎血细胞时，经常出现原生动物污染的现象。为解决原生动物的污染问题，可以在冲洗液中加入消毒液，但可能影响细胞的生长速度，结果不令人满意。因此抑制原生动物的药物种类和用量的选择对海洋节肢动物的组织培养非常重要。

在除菌过程中使用高锰酸钾溶液和乙醇溶液对组织有较大损伤作用，致使细胞迁出甚少或没有细胞迁出。有的研究中虽采用高浓度的青链霉素进行除菌，但仍能发生污染，这可能是因为海洋弧菌类对抗生素有抗性所致。作者认为可以借鉴贝类研究，向青链霉素溶液中补加 5%复方洗必泰溶液后处理组织块。双抗在常规细胞培养中用来抑制细菌的生长，Joshi[7]在对鲎鳃组织培养的实验中也使用两性霉素 B 来抑制真菌。但是抗生素的使用是否会影响细胞的生长状态，对细胞是否有负作用还需要进一步的研究。

2.3 培养基

动物细胞培养基是细胞赖以体外生长、增殖、分化的重要因素。对于海洋节肢动物细胞培养所用的培养基及其添加成分不同研究都有不同的选择（表 1）。

海产虾类的细胞培养先后尝试过的培养基有：MEM，DM，NCTC-135，RPMI1640，L-15，GIM，ACM，M 199，TC-199，Eagle，TC-100 等，但是大部分培养效果极差，只有少数几种培养基能够有较好的培养效果，如 L-15[15]，GIM[9]，TC-199[10]等。在虾的专用培养基的研究上 Machii[16]用 Pf35 对珍珠龙虾和日本囊对虾(*Marsupenaeus japonicus*)的中肠腺细胞进行了培养研究。在对虾细胞培养的研究工作中，不同研究者在各种虾的细胞培养中使用不同的培养基，甚至对同一种虾各研究者所用的培养基及其培养条件也不尽相同。许多研究者采用 L-15 培养基,并取得了很好的成果，但 Rosenthal 等[17]报道短沟对虾(*Penaeus scmisulcatus*)的最适培养基为 199 培养基。Itami 等[18]研究发现 199 培养基比 L-15 培养基更利于日本对虾淋巴器官原代细胞培养的维持。199 培养基是较早设计的一种培养基，其营养丰富但成分复杂，在虾类细胞培养中应用效果好于哺乳动物的细胞培养。葡萄糖作为能源物质加入培养基中，24 h 后细胞显示出良好的贴壁和生长效果[19]。借鉴此研究成果，王宏伟[3]对日本对虾肝胰腺的基础培养基也采用 199 培养基，并在其基础上又加入了 NaCl，$CaCl_2$，$MgCl_2$，$NaHCO_3$ 和葡萄糖等成分。童裳亮和苗宏志在系统研究了中国明对虾细胞的营养需求后，设计了一种对虾的专用细胞培养基 MPS，可在 3 d 内使培养细胞形成单层[20]。

维普资讯 http://www.cqvip.com

表 1 海洋节肢动物细胞培养所用培养基及血清量

作者	实验对象	组织	培养基	血清添加量（%）	文献
胡珂	中国明对虾	肝胰腺传代	TC199	小牛血清 15～20	[1]
Joshi	南方鲶	鳃组织	2×L-15	鲶血清 10	[7]
Hurton	美洲鲶	血细胞	Grace 昆虫培养基	鲶血清 10	[8]
Luedeman	凡纳滨对虾	卵巢上皮样细胞原代	Grace 昆虫培养液	胎牛混合血清 10	[9]
Hsu	斑节对虾	Oka 器官	L-15	胎牛血清 10	[11]
张晓华	中国明对虾	肌肉组织培养	TC199	胎牛混合血清 20	[12]
Chen	斑节对虾	淋巴器官原代	2×L-15	胎牛血清 20	[21]
Toullec	普通滨蟹	Y-器官	M199	胎牛血清 10	[22]

注：Hsu 建立了世界上第一个对虾细胞系,培养液中还加有 NaCl 5 g/L，葡萄糖 1 g/L，碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)20 μg/L，pH 为 7.63～8.10，培养液的最终渗透压为 470～500 μmol/g

2.4 血清的作用和用量

血清中不但含有比较全面的营养物质，而且含有多种能促进细胞分裂的生长因子，因而是细胞培养中十分重要的添加物。在细胞培养中最常使用的血清是胎牛血清，添加量在虾的细胞培养中为 10%～15%之间，超过 15%反而会抑制其细胞的贴壁和生长[6]。除胎牛血清外，也有使用其它动物血清或类似物的研究。如 Chen 等[23]在培养草虾的生殖腺细胞时配合使用 15%的小牛血清和 5%的马血清也能较好地促进细胞的贴壁和生长；而童裳亮、苗宏志则对小牛血清、对虾肌提取液、虾蛄血淋巴做了对比研究，结果 20%的小牛血清和 20%的对虾肌提取液配合使用取得了最好的培养效果，但肌提取液不能完全取代小牛血清；虾蛄虽然和对虾种缘关系相近，但添加之后会抑制对虾的细胞生长[20]。因此，从目前的研究结果来看，小牛血清仍是虾类细胞培养不可缺少的成分，而另外添加同物种肌提取液或血淋巴液能更好地促进细胞的生长（表 1）。

2.5 渗透压

海产虾类生活环境盐度较高，因而其细胞的渗透压也较陆生和淡水生动物要高，这已为现有的研究所证明。然而不同的研究者所认为不同的虾种类其适宜渗透压却并不一致。Luedeman 等[9]研究认为对虾淋巴细胞培养的适宜渗透压为 750 mmol/kg；Chen 等[23]在斑节对虾生殖腺细胞培养上的研究结果约为 720 mmol/kg，与之接近。但 Hsu 等[6]在对虾细胞培养上的研究结果则和 Luedeman 等以及 Chen 等相差甚远，仅为 472 mmol/kg，张晓华等[12]在培养对虾肌肉细胞时也在渗透压为 470 mmol/kg 时取得了良好的培养效果。形成较大差异的原因可能和不同研究者使用的虾的种类以及利用的组织不同有关，具体结果尚需进一步研究。

海洋甲壳类动物虽然生活环境的渗透压变化极其剧烈，但其血淋巴液渗透压一般维持在 600～800 mmol/kg 之间。刘凯于[15]发现，培养基渗透压远低于斑节对虾血淋巴液渗透压时，一些组织细胞也能生长，培养基渗透压偏高时却明显不利于斑节对虾离体组织细胞的生长。淋巴器官的组织细胞原代培养较易成功。培养基中过高的离子浓度对维持细胞的活性不利。对虾细胞内无机盐离子的浓度只有血淋巴液的 5/8 左右。此外，对虾细胞可能适应环境的变化而具有较强的低离子调节功能，使细胞在外界环境低渗的条件下仍能维持正常的功能。总之，从世界一些实验室的报道来看(表 2)，对虾组织培养的难点还在于缺少理想的培养基，今后还需努力探索。

2.6 pH

根据所培养动物体液的 pH 来决定培养基的酸碱度。从已有报道来看，海产虾类细胞培养液的 pH 值宜在 6.8～7.4 之间[9,20,23]，pH 过高或过低时，细胞生长率显著下降。具体可通过测定所要培养的虾的体液的 pH 值来确定。王宏伟[9]在日本对虾血细胞的培养中，设计培养基的 pH 值梯度为 6.8，7.2，7.6，发现血细胞在 3 种 pH 值条件下都可生长,在 pH 值 7.2 时生长最好。细胞开始多呈圆形，培养 24 h 后逐渐贴

维普资讯 http://www.cqvip.com

壁，部分细胞开始变形，有梭形、三角形和多角形等。需注意的是，虾的细胞主要以氨基酸代谢为主，在培养过程中培养液的 pH 值呈逐渐上升的趋势，故培养时应放入 CO_2 培养箱中。

不同的组织来源所需培养条件也是不同的。实际上，不同组织有其不同的结构和生理功能，使其有各自不同的生长环境，它们的细胞生存条件也有差异。因而对于不同的组织细胞进行培养时也应有不同的 pH 值。

2.7 温度

虾、蟹等海产无脊椎动物属于变温动物，进行细胞培养时温度一般都设定在成体生活的最适温度。从现有的研究来看，培养温度从 22～30℃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℃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[4]。

表 2 海洋节肢动物细胞培养的温度、pH 和渗透压

作者	实验对象	组织	温度（℃）	pH	渗透压(μmol/g)	文献
Joshi	南方蟹	鳃组织	28	7.4	720	[7]
Hurton	美洲蟹	血细胞	21±1	5.17	407（盐度 34±1）	[8]
Luedeman	蓝对虾和凡纳滨对虾	卵组织	25～28	—	700～750	[9]
Hsu	斑节对虾	Oka 器官	—	7.6～8.1	472	[11]
张晓华	中国明对虾	肌肉组织培养	25～28	6.8～7.2	470	[12]
Chen	斑节对虾	淋巴器官原代	—	—	728	[21]
Chen	斑节对虾	卵巢	28～31	—	—	[23]

2.8 生长因子

生长因子有促进离体细胞贴壁和生长的作用，在哺乳动物的特殊细胞培养中常被使用。研究表明，EGF(epidermal growth factor)、TGF β (transforming growth factor)以及 Insulin(胰岛素)对哺乳动物和昆虫的培养细胞有很强的促生长作用[24, 25]。因此 Hsu 等[6]对 EGF、TGF β 以及 Insulin 等生长因子在虾细胞培养中的作用进行了对比研究，发现 0.5～1 mg/L 的 EGF 在 24 h 内能够提高对虾培养细胞的贴壁率；而 TGF β 和 Insulin 对对虾细胞的贴壁和生长没有作用，这和 Czech[25]的研究结果相反，说明对不同的物种来说相同的生长因子的作用是不同的。

2.9 营养补充

为了完善虾的细胞培养方法，一些研究者还对可能改善和促进虾的细胞生长的一些营养物质进行了研究，如葡萄糖[19]、精氨酸和甲硫氨酸[26]、维生素 C[27]、BRL(Buffalo rat liver)[28]。Hsu 等[6]以 L-15 为培养基对以上物质进行了梯度试验表明，在基础培养基中添加 1 g/L 葡萄糖，细胞贴壁和生长率比对照组提高了 20%，这和 Hink[29]在昆虫细胞培养上的研究结果相似；添加 0.1 mg/L 的维生素 C 也能有效提高细胞的贴壁和生长率，但随维生素 C 浓度升高细胞的生长反而受到抑制，且细胞在 2 d 内死亡；添加 10%～20%的 BRL(Buffalo rat liver)条件培养基和 1 g/L 的葡萄糖，细胞贴壁率比对照组提高了 25%；至于精氨酸和甲硫氨酸，由于 L-15 中含量充足，因而另外添加无明显效果。

2.10 其它影响细胞培养的因素

2.10.1 接种

接种操作也是尤为重要的影响因素：(1) 在切组织块及接种时要尽量减少细胞损伤，如细胞碎片过多，细胞生长状态差，致使细胞自溶。(2) 组织块尽量切小，以使其有更多的切面与培养液接触，从而有利于组织块贴壁和新生细胞迁出。(3) 组织块接种后，贴壁时间应合适。时间短，组织块易悬浮，细胞不能生长；时间长，组织块干涸，细胞受损伤。

2.10.2 组织培养的季节性

虾蟹类在春季、秋季细胞培养较难，冬季几乎不能成功。这可能与其体内的激素分泌和细胞的基因调控有关。

维普资讯 http://www.cqvip.com

3 存在的问题

海洋节肢动物中虾类细胞原代培养目前虽已有成功的报道,但由于种种原因,其细胞培养的方法还不成熟,培养难度较大,难以长期培养和传代,更不能形成细胞株。主要原因在于海洋节肢动物细胞培养中的一些基础研究尚不完善,具体表现在:(1)缺乏海洋节肢动物营养和细胞生理方面的细致研究。海洋节肢细胞培养一直套用哺乳动物的方法,但二者分类和生理生化特点相去甚远,对营养和一些特殊生长因子的需要大不相同。另外,海洋节肢动物的血清和一些特异调节因子不易获得,因而细胞培养难以获得满意的效果;(2)待培养组织的消毒灭菌非常困难。海洋节肢动物的组织器官大多暴露于外界,带有较多的微生物,特别是酵母菌和寄生虫,即使是健康个体体内也存在一些微生物,使得培养易受污染而失败。因而,尽快找到一种既有效而又不损伤细胞的灭菌方法,也是完善细胞培养的一个关键环节;(3)各种培养条件有待进一步优化。另外,中国在整个细胞培养技术支持上也存在许多问题。例如,细胞培养基完全靠进口。至于细胞培养容器,国外早已改用高效能塑料细胞培养瓶、板。而中国至今还沿用古老的玻璃细胞培养瓶。

4 应用前景

尽管海洋节肢动物细胞培养方法还不完善,但已取得的成就和应用成果都表明其应用前景十分广阔,具体表现在以下几个方面。首先,细胞培养技术可用于研究动物的病毒性疾病。自1993年以来,中国的对虾养殖业一直受到病毒性爆发病的威胁,国外关于虾类病毒性疾病的报道也较多。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。其次,通过细胞培养可获得大量同步分裂的中期分裂相,用于染色体研究。节肢动物成体组织分裂能力差,很难获得中期分裂相,尤其给虾蟹类的染色体研究以及分类、遗传育种、种质资源保护带来了很大的困难。针对节肢动物细胞难于分裂和传代的困难,我们除了在筛选和优化基本培养条件、筛选供培养的组织方面做出努力,还应加大细胞周期和刺激的细胞分裂因子的研究和筛选,以及细胞诱导转化的研究。

参考文献:

[1] 胡珂,王立平,段爱梅.中国对虾的组织培养[J].水产学报,1990,**15**(4):328-331.

[2] Toullec J Y. Crustacean primary cell culture: A technical approach[J]. **Meth Cell Sci** , 1999,21:193-198.

[3] 王宏伟,林瑞年,张晨,等. 日本对虾肝胰腺的细胞培养[J]. 河北大学学报(自然科学版),2004,**24**(2):175-179.

[4] 王宏伟,王安利,王维娜,等. 日本对虾(*Penaeus japonicus*)血细胞的培养[J].河北大学学报(自然科学版),2002,**22**(2):154-157.

[5] 王军霞,王维娜, 王安利,等. 日本对虾血淋巴和肌肉的原代培养[J]. 海洋科学,2003,**27**(3):61-63.

[6] Hsu Y L,Yang Y H,Chen Y C. Development of an *in vitro* subculture for the oka organ (lymphoid tissue) of *Penaeus monodon*[J]. **Aquac**,1995,136: 43-55.

[7] Joshi B, Chatterjlf A, Bhonde R, *et al*. Long-term *in vitro* generation of amoebocytes form the Indian Horseshoe crab *Tachypleus gigas* (MÜLLER) [J]. **Vitro Cell Dev Biol-Animal**, 38:255-257.

[8] Hurton L. Reducing post-bleeding mortality of Horseshoe crabs(*Limulus polyphemus*) used in the biomedical industry[R]. America, Virginia, Town of Blacksburg: Master's thesis submitted to the Faculty of the Virginia Polytechinc Institstute and State University, 2003.

[9] Luedeman R A, Lightner D V. Development of an *in vitro* primary cell culture system from the penaeid shrimp,*Penaeus vannamei*[J]. **Aquac**,1992,101:205-211.

[10] Hu K. Studies on a cell culture from the hepatopancreas of the oriental shrimp, *Penaeus orientalis* Kishinouye[J]. **Asian Fish Sci**, 1990,**3**(3): 299-307.

[11] Hsu Y E. Development of an *in vitro* subculture systerm for prawn tissues[J]. **Asian Fisheries Society Special Publication**,1995, 10:161- 170.

[12] 张晓华,宋晓玲,王立平. 中国对虾肌肉组织原代细胞培养初探[J]. 海洋科学,1997,1 :13- 14.

[13] Frerichs G N. *In vitro* culture of embryonic cells from the freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*[J]. **Aquac**, 1996,**143**(3):227-232.

[14] Fan F J, Wang X F. *In vitro* culture of embryonic cells from the shrimp, *Penaeus chinensis*[J]. **J Exp Mar Bio Eco**, 2002,**267**(2):175-184.

[15] 刘凯于,杨凯,余泽华. 斑节对虾组织的原代培养[J]. 华中师范大学学报(自然科学版),1998, **32**(2) :210-214.

[16] Machii A, Wada K T, Awaji M,*et al*. Some characters of the

维普资讯 http://www.cqvip.com

midgut gland and chytrids from primary cultures of the prawn *Penaeus japonicus*[J]. **Tissue Cult Res Comm,** 1986,9:11-14.

[17] Rosenthal J,Diamnt A.*In vitro* primary cell culture from *Penaeus semisulcatus*[A].Perkins F O, Cheng G T C. Pathology in Marine Science[C]. New York,London: Academic Press Inc ,1990.7-13.

[18] Itami T. *In vitro* maintanance of cells of lymphoid organ in kuruma shrimp *Penaeus japonicus*[J]. **Nippon Suisan Gakkaishi Bull Jap Soc Sci Fish** ,1989 , **55**(12):2205.

[19] Alava U R, Pascual F P. Carbohydrate requirements of *Penaeus monodon* (Fabricius) javeniles[J]. **Aquac**, 1987, 61: 211–217.

[20] 童裳亮,苗宏志.中国对虾的细胞培养研究[R].青岛：中国海洋大学, 1996.

[21] Chen S N, Kou G H. Infection of cultured cells from the lymphiod organ of *Penaeus monodon* Fabricius by monodon-type baculovirus(MBV)[J]. **J Fish Dis**,1989,12: 73-76.

[22] Toullec J Y, Dauphin-Villemant C. Dissociated cell suspensions of *Carcinus maenas* Y-organs as a tool to study ecdysteroid production and its regulation[J]. **Cell Mol Life Sci (CMLS)**, 1994, **50**(2): 153-158.

[23] Chen S N, Chi S C, Kou G H, *et al*. Cell culture from tissues grass prawn, *Penaeus monodon*[J].**Fish Pathol**, 1986,**21**(3): 161-166.

[24] Kawamoto T, Sato J D, Le A,*et al*. Growth stimulation of A431 cells by epidermal growth factor: identification of high-affinity receptors for epidermal growth factor by an anti-receptor monoclonal antibody[J]. **Proc Natl Acad Sci USA**,1983,80:1 337-1 341.

[25] Czech M P. The nature and regulation of the insulin receptor:structure and function[J]. **Ann Rev Physiol**,1985, 47:357 -381.

[26] Deshimaru O, Kuroki K, Mazid M A,*et al*.Nutritional quality of compounded diets for Prawn *Penaeus monodon*[J].**Bull Jpn Soc Sci Fsh**,1985,51:1 037-1 044.

[27] Lightner D, Colvin L B, Brand C,*et al.* Black death,a disease syndrome of penaeid shrimp related to a dietary deficiency of ascorbicacid[J]. **Proc World Mariculture Soc**,1977,8:611-623.

[28] Hooper S. Buffalo rat liver cells produce a diffusible activity which inhibits the differentiation of nurine embryonal carcinoma and embryonic stem cells[J]. **Devel Biol**,1987, 121:1-9.

[29] Hink. A complication of invertebrate cell lines and culture media[A]. Maramorosch K. Invertebrate Tissue Culture, Research Application[C]. New York: Academic Press,1976. 67-68

(本文编辑：刘珊珊)