

Advances in the Tissue and Cell Culture of Corals

Qiongxuan Lu, Shijun Ni, Huarong Guo*

College of Marine Life Sciences, Ocean University of China, Qingdao Shandong
Email: *huarongguo@ouc.edu.cn

Received: May 15th, 2016; accepted: Jun. 5th, 2016; published: Jun. 8th, 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

In vitro cultured tissues and cells of corals can provide a useful tool for studies on the symbiosis between coral and zooxanthellae, cytotoxicology, environmental stress and biomineralization in corals. This paper has reviewed the progress in the dissociation and culture of coral cells, preparation of cell aggregates and tissue balls of corals and their application. The future prospect of the tissue and cell culture of corals is also predicted.

Keywords

Coral, Cell Culture, Symbiosis

珊瑚的组织 and 细胞培养研究进展

陆琼选, 倪世俊, 郭华荣*

中国海洋大学海洋生命学院, 山东 青岛
Email: *huarongguo@ouc.edu.cn

收稿日期: 2016年5月15日; 录用日期: 2016年6月5日; 发布日期: 2016年6月8日

摘 要

珊瑚的组织 and 细胞的体外培养可为研究珊瑚的互惠共生、细胞毒理、环境胁迫和生物矿化等方面提供有
*通讯作者。

效的研究工具和手段。本文综述了珊瑚细胞的分离与培养、珊瑚细胞团和组织球的制备及其应用，并对珊瑚的组织 and 细胞培养的研究前景进行了展望。

关键词

珊瑚细胞, 细胞培养, 共生作用

1. 引言

珊瑚是一类低等海洋无脊椎动物, 属于腔肠动物门(Coelenterata)珊瑚纲。珊瑚的生长在珊瑚礁的形成过程中起着重要作用。珊瑚礁具有极其丰富的生物多样性, 被誉为“海洋中的热带雨林”。但近几十年来, 随着全球气候变暖以及人类活动的影响加剧, 导致珊瑚礁的生态功能和生物多样性出现明显退化趋势[1]。已有研究表明, 全球范围内频繁发生的珊瑚白化事件与海水温度上升息息相关[2]。珊瑚与虫黄藻的互惠共生是珊瑚礁发育的最基本生态特征。这种共生关系一旦遭到破坏, 就会引起虫黄藻从珊瑚体内流失, 造成珊瑚白化[3]。但目前, 有关共生作用影响珊瑚白化的细胞学机制尚不清楚。

珊瑚的组织 and 细胞的体外培养可为研究珊瑚的互惠共生、细胞毒理、环境胁迫和生物矿化等方面提供有效的研究工具和手段。腔肠动物的组织和细胞培养始于 19 世纪 60 年代, 在过去的几十年间, 人们不断探索和优化珊瑚组织和细胞的体外培养技术, 但目前仅停留在原代培养水平上, 至今仍没有成功建立永生性珊瑚细胞系[4]。本文主要从珊瑚的细胞培养基、组织和细胞的分离与培养以及应用等方面综述珊瑚的组织 and 细胞培养研究进展, 并对珊瑚的组织 and 细胞培养的研究前景进行了展望。

2. 珊瑚的组织 and 细胞培养基

合适的培养基是组织和细胞培养能否成功的关键。早期的珊瑚细胞培养主要使用过滤海水或人工海水, 但仅能短期维持细胞的存活, 未观察到珊瑚细胞的增殖[5]。Frank *et al.* (1994)最早将添加不同比例(10%~95%)的 Leibovitz's L-15、DMEM 和 M199 培养基的灭菌过滤海水用于 10 种腔肠动物包括 9 种珊瑚和 1 种水螅的体外细胞培养, 对培养效果进行比较, 发现添加比例为 10%的培养基更有利于所培养细胞的贴壁和存活, 而更高添加比例的培养基不利于原代培养细胞的贴壁和存活, 但有利于传代细胞的分化[6]。作者推测, 这可能与以上三种商业化培养基的添加量降低的同时, 降低了糖类等成分的含量, 从而减少了细胞毒性, 抑制了微生物的过度生长有关。随后, Helman *et al.* (2008)在开展软珊瑚(*Xenia elongata*)的细胞培养中又发现, 降低培养基中葡萄糖的水平(0.1 mM)有利于抑制珊瑚共生虫黄藻中叶绿素的降解, 而高葡萄糖水平(3 mM)则会导致虫黄藻细胞中叶绿素的大量降解[7]。珊瑚的细胞培养中, 添加 5%~10%的胎牛血清也是必须的, 为细胞提供生长需要的一些生长因子以及胞外基质成分。微生物和原生动物的污染也是珊瑚的组织 and 细胞培养常遇到的棘手问题, 为了减少污染, 在珊瑚细胞的培养基中通常需要加入 1%青霉素和 1%链霉素。但抗生素并不能彻底消除微生物污染, 更无法有效对抗真菌和原生动物的污染。因此, 今后亟需建立有效的珊瑚组织无菌处理技术。

3. 珊瑚的细胞、细胞团和组织球的制备与培养

3.1. 珊瑚细胞的分离与培养

已报道的珊瑚细胞的分离方法有三种: 机械法、化学法和自发震荡法。细胞的分离方法依据珊瑚的种类、培养细胞的类型和培养用途等会有所不同。Frank *et al.* (1994)采用以上三种方法分离珊瑚细胞, 并进行了原代培养。结果发现, 自发震荡法的解离效果最好, 具有明显的减轻细胞机械损伤的优势, 可

观察到细胞增殖迹象[6]。而 Khalesi *et al.* (2008)在分离软珊瑚(*Sinularia flexibilis*)的细胞进行原代培养时,却得到完全不同的结果。他采用机械分离法不仅可以获得较高的细胞密度,还可观察到细胞增殖现象;而通过自发震荡法获得的细胞没有观察到分裂现象[8]。这表明,珊瑚细胞的分离方法是否得当严重影响活细胞的得率、存活和增殖能力。

目前,有关珊瑚的细胞培养研究报道很少,仍停留在原代培养阶段。Frank *et al.* (1994)成功实现了10种腔肠动物(9种珊瑚和1种水螅)细胞的分离和培养。细胞于体外培养7~20 d内开始增殖,但最终由于破囊弧菌(*Thraustochytrium sp.*)的污染,导致细胞培养失败[6]。珊瑚的早期胚胎或幼体的细胞具有大量的未分化细胞,细胞分裂能力旺盛,将其作为原代细胞培养的组织来源可能是解决珊瑚的体外培养细胞不易增殖的突破口。Reyes-Bermudez and Miller (2009)以珊瑚(*Acroporamillepora*)的五个关键发育时期(原肠作用前期、中期和后期,以及浮浪幼虫早期和后期)的细胞进行原代培养,发现仅有浮浪幼虫期的原代培养细胞可存活4周以上。尽管由于破囊弧菌(*Thraustochytrium sp.*)的污染而导致细胞培养失败,但却提示了以早期胚胎或幼虫的细胞为材料,实现珊瑚细胞体外长期培养的可能性[9]。

3.2. 珊瑚细胞团的制备与培养

Frank *et al.* (1994)在珊瑚细胞培养过程中,最早发现体外贴壁生长的珊瑚细胞有聚集形成多细胞团(Cell aggregate)的现象[6]。Domart-Coulon *et al.* (2001)通过酶解法分离得到造礁珊瑚(*P. damicornis*)细胞后,发现当以 1×10^6 cells/ml的高密度接种珊瑚细胞进行悬浮培养时,1~3 d后,可观察到珊瑚细胞在培养过程中自发聚集形成悬浮生长的多细胞球体[10]。随后,Helman *et al.* (2008)在石珊瑚(*M. digitata*)和软珊瑚(*X. elongata*)的体外培养1周后的原代培养细胞中,也观察到细胞团的形成,并发现这是由于所培养细胞分泌的有利于加强细胞间粘附的胞外基质所致[7]。Huete-Stauffer *et al.* (2015)以五种地中海柳珊瑚(*Paramuricea clavata*、*Corallium rubrum*、*Eunicella singularis*、*Eunicella cavolinii*和*Eunicella verrucosa*)为材料,采用无钙镁离子的人工海水处理,成功获得了珊瑚的细胞悬液,然后以 1×10^6 cells/ml密度接种培养,12 h后可观察到细胞团的形成。但细胞团的存活能力具有种特异性,其中珊瑚(*E. singularis*)的存活能力最好,长达3个月以上,*P. clavata*可存活2个月,而其他三种珊瑚仅能存活1个月。以5-溴尿嘧啶(BrdU)对细胞团进行核染色,分析细胞的分裂能力,结果发现所培养的细胞团的细胞都具有分裂增殖的能力,而且以珊瑚(*E. singularis*)的细胞分裂能力最强。这些细胞团的表层细胞覆盖有大量不停摆动的纤毛,推动细胞团在培养基中做旋转运动,这个特点可以作为鉴定细胞团是否具有活性的依据。同时在整个培养过程中,珊瑚细胞和虫黄藻的共生关系仍然维持[11]。

分离的珊瑚细胞在体外培养过程中分裂相很低,且难以维持长期存活。但是,当珊瑚细胞以细胞团的形式悬浮培养时,可以长期维持其细胞活性,并有分裂的现象。因此,从单细胞贴壁培养到细胞团悬浮培养的转变可能是今后珊瑚细胞培养的一个明智的选择。

3.3. 珊瑚组织球的制备与培养

不规则的珊瑚组织小块在体外悬浮培养时,具有变圆并形成球体的自组织能力。形成组织球(Tissue ball)是珊瑚组织体外培养的一个重要特征。珊瑚的组织球制备是很容易实现的。Gates and Muscatine (1992)首次使用无钙人工海水处理珊瑚(*Pocillopora damicornis*)1~4 h后,成功将珊瑚组织从珊瑚体骨骼孔中分离出来。这些珊瑚组织在培养过程中很快形成组织球,组织球由活的珊瑚细胞和虫黄藻构成,表层细胞覆盖有大量不断摆动的纤毛[12]。随后,Kopecky and Ostrander (1999)使用无钙人工海水处理珊瑚(*Acropora microphthalmia*)的组织也取得了类似的结果[13]。Vizel *et al.* (2011)和 Gardner *et al.* (2015)以体积较大的珊瑚(*Fungia sp.*)为材料制备组织球时,直接使用镊子将珊瑚虫组织从珊瑚体上剥落,然后将组织

切碎, 悬浮培养, 获得了大量的组织球[14] [15]。我们在宝石花软珊瑚(*Goniopora lobata*)的组织球制备中发现, 从珊瑚虫头部切下的触手(tentacle)外植体培养于灭菌海水中, 可在 12~24 h 内形成组织球。并且将形成的组织球进一步切成不规则的小块后, 这些小块可以很快于 2.5 h 内形成新的组织球(未发表)。

已有研究表明, 体外培养的组织球具有再生能力。Sammarco *et al.* (1982)首次报道, 将珊瑚(*Seriatopora hystrix* Dana)的离体组织固着在培养基质上, 可再生形成新的珊瑚虫个体[16]。Kramarsky-Winter and Loya (1996) 也发现珊瑚(*F. granulosa*)离体培养的组织球可最终发育成新的珊瑚虫[17]。但组织球的再生过程依赖于合适的培养条件, 可通过改变温度和光照等条件来控制组织球的发育[14]。

4. 应用

珊瑚的细胞、细胞团和组织球培养虽然仍停留在原代培养水平, 而且能维持的培养时间较短, 但仍是许多研究的理想材料。主要体现在以下几个方面: 1) 生物矿化。石珊瑚具有很强的钙化能力, 但钙化的细胞机制并不完全清楚。Domart-Coulon *et al.* (2001)在培养了一周的珊瑚原代培养细胞中, 观察到了 CaCO_3 的形成过程[10]。随后, Helman *et al.* (2008)和 Mass *et al.* (2012)分别从两种珊瑚(*Montipora digitata* 和 *Stylophora pistillata*)的培养细胞中观察到了生物矿化的现象[7] [18]。因此, 珊瑚的细胞培养将有助于钙化机制的研究。2) 环境胁迫和毒理学研究。Nesa *et al.* (2009) 在培养珊瑚(*Fungia* sp.和 *P. divaricata*)的细胞团时, 发现提高温度会促使虫黄藻产生超氧阴离子, 导致珊瑚细胞团降解[19]。Down *et al.* (2010)将分离培养的不同珊瑚细胞用于细胞毒理学检测, 发现这些细胞对高温胁迫的反应以及对环境污染物如氧化铜和硫化物等的毒性敏感性具有显著差异[20]。珊瑚的组织球培养同样可用于研究珊瑚对于环境胁迫的响应机制。我们比较研究了高温、酸化以及高温与酸化共同作用条件下, 对宝石花珊瑚的组织球形成的影响。结果表明酸化条件对珊瑚组织球的形成没有明显的影响, 但高温可抑制珊瑚组织球的形成, 而高温与酸化的共同作用可加剧这种破坏性影响(未发表)。3) 珊瑚-虫黄藻共生作用。珊瑚与虫黄藻的互惠共生与珊瑚的白化密切相关, 但其细胞机制尚不清楚。珊瑚的组织球具有与珊瑚活体组织相似的结构和内部微环境, 组织球内的虫黄藻与珊瑚细胞保持正常的共生关系, 可作为研究珊瑚与虫黄藻共生关系的实验模型[15]。

5. 前景展望

与其它海洋无脊椎动物的细胞培养一样, 珊瑚的细胞建系的难点也主要在于体外培养过程中细胞不易增殖, 以及容易受到各种原生动物和微生物污染两个方面。由于珊瑚的组织球易制备, 易培养, 近年来有取代细胞培养的趋势。随着指状鹿角珊瑚(*Acropora digitifera*)和虫黄藻(*S. kawagutii*)的基因组测序陆续完成[21] [22], 从基因组水平上揭示珊瑚与共生藻共生作用的机制成为可能, 将促进珊瑚细胞的建系, 反过来, 珊瑚细胞的建系也将有利于从细胞水平上解析共生作用中的关键基因。因此, 要实现珊瑚细胞系的建立还有很长一段路要走, 需克服一系列的瓶颈问题, 但相信经过不断地探索和努力, 最终一定能够建立珊瑚细胞系。

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] 赵美霞, 余克服, 张乔民. 珊瑚礁区的生物多样性及其生态功能[J]. 生态学报, 2006, 26(1): 186-194.
- [2] Bellwood, D.R., Hughes, T.P., Folke, C., *et al.* (2004) Confronting the Coral Reef Crisis. *Nature*, **429**, 827-833.

- <http://dx.doi.org/10.1038/nature02691>
- [3] Lesser, M.P. (2006) Oxidative Stress in Marine Environments: Biochemistry and Physiological Ecology. *Annual Review of Physiology*, **68**, 253-278. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.physiol.68.040104.110001>
- [4] 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>
- [5] Rannou, M. (1971) Cell Culture of Invertebrates Other than Mollusks and Arthropods. In: Vago, C., Ed., *Invertebrate Tissue Culture*, Academic Press, New York, 385-410. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-709901-9.50019-3>
- [6] Frank, U.R.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>
- [7] Helman, Y., Natale, F., Sherrell, R.M., et al. (2008) Extracellular Matrix Production and Calcium Carbonate Precipitation by Coral Cells *in Vitro*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **105**, 54-58. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0710604105>
- [8] Khalesi, M.K. (2008) Cell Cultures from the Symbiotic Soft Coral *Sinularia flexibilis*. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal*, **44**, 330-338. <http://dx.doi.org/10.1007/s11626-008-9128-7>
- [9] Reyes-Bermudez, A. and Miller, D.J. (2009) *In Vitro* Culture of Cells Derived from Larvae of the Staghorn Coral *Acropora millepora*. *Coral Reefs*, **28**, 859-864. <http://dx.doi.org/10.1007/s00338-009-0527-3>
- [10] Domart-Coulon, I.J., Elbert, D.C., Scully, E.P., et al. (2001) Aragonite Crystallization in Primary Cell Cultures of Multicellular Isolates from a Hard Coral, *Pocillopora damicornis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, **98**, 11885-11890. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.211439698>
- [11] Huete-Stauffer, C., Valisano, L., Gaino, E., et al. (2015) Development of Long-Term Primary Cell Aggregates from Mediterranean Octocorals. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal*, **51**, 815-826. <http://dx.doi.org/10.1007/s11626-015-9896-9>
- [12] Gates, R.D. and Muscatine, L. (1992) Three Methods for Isolating Viable Anthozoan Endoderm Cells with Their Intracellular Symbiotic Dinoflagellates. *Coral Reefs*, **11**, 143-145. <http://dx.doi.org/10.1007/BF00255468>
- [13] Kopecky, E.J. and Ostrander, G.K. (1999) Isolation and Primary Culture of Viable Multicellular Endothelial Isolates from Hard Corals. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal*, **35**, 616-624. <http://dx.doi.org/10.1007/s11626-999-0101-x>
- [14] Vize, M., Loya, Y., Downs, C.A., et al. (2011) A Novel Method for Coral Explant Culture and Micropropagation. *Marine Biotechnology*, **13**, 423-432. <http://dx.doi.org/10.1007/s10126-010-9313-z>
- [15] Gardner, S.G., Nielsen, D.A., Petrou, K., et al. (2015) Characterisation of Coral Explants: A Model Organism for Cnidarian-Dinoflagellate Studies. *Coral Reefs*, **34**, 133-142. <http://dx.doi.org/10.1007/s00338-014-1240-4>
- [16] Sammarco, P.W. (1982) Polyp Bail-Out: An Escape Response to Environmental Stress and a New Means of Reproduction in Corals. *Marine Ecology-Progress Series*, **10**, 57-65. <http://dx.doi.org/10.3354/meps010057>
- [17] Kramarsky-Winter, E. and Loya, Y. (1996) Regeneration versus Budding in Fungiid Corals: A Trade-Off. *Marine Ecology-Progress Series*, **134**, 179-185. <http://dx.doi.org/10.3354/meps134179>
- [18] Mass, T., Drake, J.L., Haramaty, L., et al. (2012) Aragonite Precipitation by "Proto-Polyps" in Coral Cell Cultures. *PLoS ONE*, **7**, e35049. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0035049>
- [19] Nesa, B. and Hidaka, M. (2009) High Zooxanthella Density Shortens the Survival Time of Coral Cell Aggregates under Thermal Stress. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, **368**, 81-87. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jembe.2008.10.018>
- [20] Downs, C.A., Fauth, J.E., Downs, V.D. and Ostrander, G.K. (2010) *In Vitro* Cell-Toxicity Screening as an Alternative Animal Model for Coral Toxicology: Effects of Heat Stress, Sulfide, Rotenone, Cyanide, and Cuprous Oxide on Cell Viability and Mitochondrial Function. *Ecotoxicology*, **19**, 171-184. <http://dx.doi.org/10.1007/s10646-009-0403-5>
- [21] Shinzato, C., Shoguchi, E., Kawashima, T., et al. (2011) Using the *Acropora digitifera* Genome to Understand Coral Responses to Environmental Change. *Nature*, **476**, 320-323. <http://dx.doi.org/10.1038/nature10249>
- [22] Lin, S., Cheng, S., Song, B., et al. (2015) The *Symbiodinium kawagutii* Genome Illuminates Dinoflagellate Gene Expression and Coral Symbiosis. *Science*, **350**, 691-694. <http://dx.doi.org/10.1126/science.aad0408>