

# 中华绒螯蟹血淋巴细胞钙激活钾通道研究

段 虎<sup>1</sup>, 王雪惠<sup>2</sup>, 孙金生<sup>1,2</sup>

(1. 天津师范大学 生命科学学院, 天津 300387; 2. 天津市水产养殖病害防治中心, 天津 300221)

**摘要:** 利用膜片钳技术之内面向外式, 对培养 2~24 h 不同类型的中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)血淋巴细胞表达的钙激活钾 ( $K_{Ca}$ )通道进行种类鉴别和特征研究。结果表明: 在高对称钾溶液 (200 mmol/L) 中, 只有小颗粒细胞表达大电导钙激活钾 ( $BK_{Ca}$ )通道和中电导钙激活钾 ( $IK_{Ca}$ )通道。其中  $BK_{Ca}$  通道电导为 396 pS, 通道的开放活动表现为矩形方波。同一钳制电压下, 当溶液中  $[Ca^{2+}]$  在 0.3~3.0  $\mu\text{mol/L}$  范围内, 通道开放概率和开放数目随  $Ca^{2+}$  浓度增加而增加, 当溶液中  $[Ca^{2+}]$  达到 100.0  $\mu\text{mol/L}$ , 通道开放受到抑制, 表现明显的钙依赖性失活; 当溶液中  $Ca^{2+}$  浓度为 3.0  $\mu\text{mol/L}$ , 钳制电压分别为 -40 mV 和 -80 mV 时, 通道平均开放时间分别为 (0.032 33±0.007 41) s 和 (0.055 85±0.012 99) s ( $P<0.01$ ), 平均开放概率分别为 0.596±0.125 和 0.961±0.012 ( $P<0.01$ ), 说明通道开放具有电压依赖性。 $IK_{Ca}$  通道电导为 88 pS, 开放活动也表现为矩形方波。当溶液中  $Ca^{2+}$  浓度为 0.3、1.0  $\mu\text{mol/L}$  时, 通道不开放; 而  $Ca^{2+}$  浓度为 3.0  $\mu\text{mol/L}$  时通道开放, 说明通道具有明显的钙依赖性, 钳制电压分别为 -40 mV 和 -80 mV 时, 通道平均开放时间分别为 (0.017 36±0.004 03) s 和 (0.022 62±0.016 16) s ( $P>0.05$ ), 平均开放概率分别为 0.699±0.065 和 0.790±0.114 ( $P>0.05$ ), 说明通道开放不具有明显的电压依赖性。药理学研究结果表明, 40 mmol/L 四乙铵 (TEA) 灌流 15 min 能完全阻断  $K_{Ca}$  通道活动。这提示钙激活钾通道在甲壳动物细胞免疫中发挥重要作用。

**关键词:** 中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*); 血淋巴细胞; 钙激活钾通道; 膜片钳; 内面向外式

中图分类号: Q424, Q915.819

文献标识码: A

文章编号: 1000-3096(2010)05-0055-07

细胞膜上的离子通道是离子进出细胞的必经之路, 对细胞功能及功能调节有十分重要的作用<sup>[1]</sup>。迄今, 在红细胞、T 和 B 淋巴细胞、巨噬细胞、肥大细胞及中性粒细胞上已经发现有很多种离子通道的存在, 引起一系列对淋巴细胞离子通道特性和作用的深入研究。淋巴细胞属于非兴奋性细胞, 当细胞受刺激时,  $K^+$  通道和其他离子通道协同作用, 通过控制离子跨膜流动对胞内离子浓度和膜电位水平发挥调节作用, 参与淋巴细胞的分化、增殖及免疫应答等重要生理过程。在众多的  $K^+$  通道中, 钙激活钾 (Calcium activated  $K^+$  channel,  $K_{Ca}$ ) 通道首先发现于红细胞中, 可被细胞内游离  $Ca^{2+}$  所激活, 起调节细胞体积的作用, 另外还包括血压的调控<sup>[2]</sup>; 在神经细胞中,  $K_{Ca}$  通道还参与神经细胞兴奋的调节等功能。 $K_{Ca}$  通道具有较多的特点, 主要包括单通道的电导, 钙离子的敏感性以及药理学特性<sup>[3~5]</sup>等。 $K_{Ca}$  通道包含三类, 即小电导 (small conductance,  $SK_{Ca}$ )、中电导 (intermediate conductance,  $IK_{Ca}$ ) 和大电导 (large conductance,  $BK_{Ca}$ ) 通道。 $BK_{Ca}$  通道的主要特点是通道能被电压和

$Ca^{2+}$  激活, 而  $SK_{Ca}$  和  $IK_{Ca}$  通道都属于非电压依赖性的<sup>[6]</sup>。

近年来, 高等生物非兴奋性细胞中离子通道的研究取得了很大的进展, 但却未见有关甲壳动物血淋巴细胞离子通道研究的报道。免疫学研究表明: 甲壳动物的免疫反应主要依靠血淋巴细胞完成。中华绒螯蟹 (*Eriocheir sinensis*) 属甲壳纲, 为中国重要的水产养殖品种之一, 在水产养殖业中占有重要地位, 然而随着养殖规模的不断扩大, 其病害发生日益频繁, 由于血淋巴细胞在先天免疫过程中扮演着重要角色, 因此研究血淋巴细胞上的离子通道具有重要的生理学及病理学意义。作者采用膜片钳技术对中华绒螯蟹血淋巴细胞电生理特征进行研究, 以

收稿日期: 2009-12-12; 修回日期: 2010-02-15

基金项目: 国家自然科学基金项目(30571421, 30871907); 国家科技支撑计划项目(2006BAD09A11)

作者简介: 段虎(1979-), 男, 山东威海人, 硕士研究生, 主要从事甲壳动物电生理研究, 电话: 13854225603, E-mail: duanhxh@163.com; 孙金生, 通信作者, 电话: 022-88250781, E-mail: jssun1965@yahoo.com.cn

期为阐明甲壳动物血淋巴细胞表达的离子通道在先免疫过程中的重要作用及作用机制奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 血淋巴细胞的分离与培养

实验蟹为取自天津市宁河县七里海河蟹养殖场的一龄河蟹,壳宽 3 cm。置室内暂养一周后,选取体征健康的实验蟹,碘伏消毒 15 min 后置于超净工作台中,用医用纱布吸干表面残余碘伏,再用 75%酒精棉球仔细擦拭其第四步足基部,用 1 mL 一次性注射器自此部位抽取血淋巴,与抗凝剂按 1:1 体积迅速混匀。血淋巴细胞的培养按照本实验室建立的方法,简述如下:按 $(1.0\sim 1.2)\times 10^6$  cells/mL 接种到 35 mm 细胞培养皿 (Costar, USA)中,置生化培养箱 23°C 培养 60 min,镜检确定大部分细胞已经贴壁后,

小心吸弃所有培养基,换入 1.2 mL 新培养基继续培养。培养基为添加 15%胎牛血清的改良 L-15 (GIBCO, USA, pH7.5),通过添加 NaCl 调节培养基渗透压,使之与血淋巴细胞渗透压相近,经 0.22  $\mu$ m 微孔滤膜 (Millipore, USA)过滤除菌。选取培养 2~24 h 且形态特征典型、完整的血淋巴细胞进行膜片钳单通道记录。

### 1.2 电极内外液

记录中华绒螯蟹血淋巴细胞钙激活钾离子通道电流的电极内、外液 (表 1)经 0.22  $\mu$ m 微孔滤膜过滤,4°C 保存备用。EGTA (ethylene glycol-bis(2-aminoethyl ether)-N, N, N', N'-tetracetic acid)和四乙铵 (Tetraethylammonium, TEA)为 Sigma 产品。TEA 配成 4 mol/L 母液 4°C 保存备用,使用时按 1:100 添加到电极外液中,使 TEA 终浓度为 40 mmol/L。

表 1 记录钙激活钾通道电流的电极内、外液成分

**Tab. 1 Composition of solutions for  $K_{Ca}$  channel experiments** (mmol/L)

溶液	KCl	HEPES	EGTA	CaCl <sub>2</sub>	自由[Ca <sup>2+</sup> ]*	pH**
内液	200	10				7.4
外液	200	10	5	3.33	0.3	7.2
	200	10	5	4.31	1.0	7.2
	200	10	5	4.76	3.0	7.2
	200	10	2	2.10	100	7.2

注: \*: Ca<sup>2+</sup> 的浓度单位为  $\mu$ mol/L; \*\*: 溶液 pH 用 6 mol/L KOH 调节

### 1.3 膜片钳实验和数据的采集、处理

采用 EPC-10 膜片钳放大器 (HEKA Elektronik, Germany),以膜片钳的内面向外式记录中华绒螯蟹血淋巴细胞钙激活钾 ( $K_{Ca}$ )通道活动。玻璃电极毛坏为 WPI 公司 (美国)生产的薄壁毛细管 (1B150F-4),经微电极拉制仪 (HEKA Elektronik, Germany)两步拉制,拉制后电极尖端直径小于 1  $\mu$ m,热抛光仪抛光。充灌电极内液后电极入水电阻 8~10 M $\Omega$ ,待电极尖端与选定细胞形成吉欧 (G $\Omega$ )封接后,将微电极提起,使其与细胞分离,电极端形成密封小泡,空气中短暂暴露后,再回到溶液中以形成内面向外式<sup>[7]</sup>。实验环境温度保持在 22~25°C。

电刺激脉冲的给出及电信号采集通过 PULSE 程序及 AD/DA 接口完成。快、慢电容为自动补偿,串联电阻补偿至最佳。采样频率为 2 kHz,输出滤波频率一般取 2.9 kHz。TAC+TACfit X4.1.3 软件 (Bruxon

Corp, USA)进行单通道电导、通道开放概率、平均开放时间等单通道数据分析。通道电流幅值通过高斯曲线拟合得到,并通过 I-V 曲线得斜率电导。对不同游离 Ca<sup>2+</sup>浓度的通道分析选取 5 个细胞,每一膜片、同一钳制电压选择连续记录的 10 条曲线进行统计分析,实验数据以平均值 $\pm$ 标准差 (mean $\pm$  SD)表示,单因素方差分析 (one-way ANOVA)对组间均值进行比较。

## 2 结果

### 2.1 小颗粒细胞表达 2 种电导钙激活钾通道

在高对称钾溶液 (电极内、外液 K<sup>+</sup>浓度为 200 mmol/L)条件下形成内面向外记录模式后,分别灌流含游离 Ca<sup>2+</sup>浓度为 0.3、1.0、3.0 和 100.0  $\mu$ mol/L 的细胞浴液,施加不同的去极化电压 (-80mV~

+80mV), 观察中华绒螯蟹 3 种血淋巴细胞, 即透明细胞 (Hyaline cell, H)、小颗粒细胞 (Small granule cell, SG)和大颗粒细胞 (Large granular cell, LG)的单通道活动。结果表明, 只有小颗粒细胞表达钙激活钾通道( $K_{Ca}$ ), 通道的开放活动均表现出明显的钙依赖性。当溶液中游离  $Ca^{2+}$ 浓度  $3.0 \mu\text{mol/L}$  时, 通过对不同钳制电压 ( $-80\text{mV} \sim -50\text{mV}$ ) 下单通道的电流幅度进行拟合, 做出电流-电压 ( $I-V$ ) 关系曲线, 并进行斜率电导计算发现, 小颗粒细胞表达 2 种电导钙激活钾通道 (图 1), 大电导钙激活钾通道 ( $BK_{Ca}$ ) 的电导为  $396\text{pS}$  (图 2a, 图 3a), 中电导钙激活钾通道 ( $IK_{Ca}$ ) 的电导为  $88 \text{pS}$  (图 2b, 图 3b)。

## 2.2 小颗粒细胞表达 $BK_{Ca}$ 和 $IK_{Ca}$ 的电生 理特征

灌流不同浓度  $Ca^{2+}$  溶液,  $BK_{Ca}$  和  $IK_{Ca}$  表现出不同的  $Ca^{2+}$  浓度依赖性。在相同钳制电压下,  $BK_{Ca}$  通道开放概率和平均开放时间在  $0.3 \sim 3.0 \mu\text{mol/L}$   $Ca^{2+}$  浓度范围内, 随着  $Ca^{2+}$  浓度的增加而增大 (图 4, 表 2); 而对于  $IK_{Ca}$  通道, 当溶液中  $Ca^{2+}$  浓度为  $0.3 \sim 1.0 \mu\text{mol/L}$  时, 通道不开放, 而当  $Ca^{2+}$  浓度达到  $3.0 \mu\text{mol/L}$  时, 通道才开放。

在不同的去极化电压刺激条件下,  $BK_{Ca}$  和  $IK_{Ca}$  表现出不同的电压依赖性。当膜电位为  $0 \text{mV}$  时,  $BK_{Ca}$  和  $IK_{Ca}$  通道均不开放, 钳制在正电位时, 通道

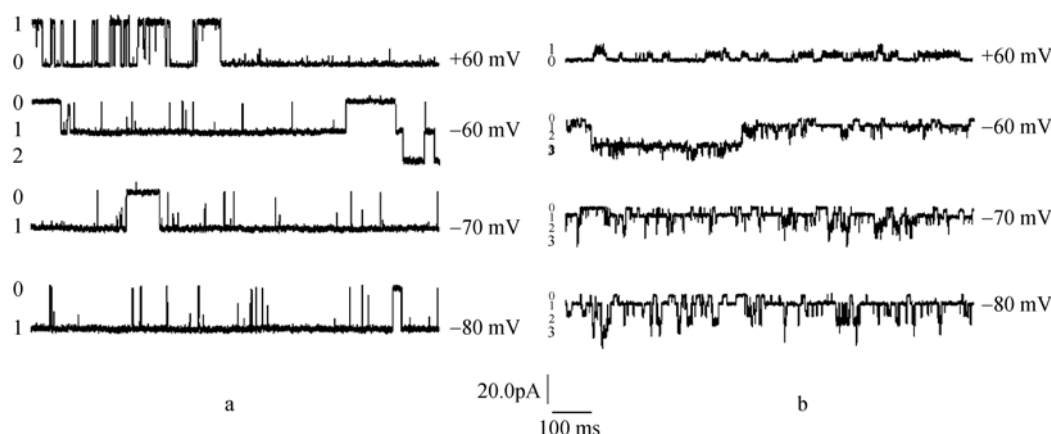


图 1 不同钳制电压下记录的中华绒螯蟹小颗粒细胞钙激活钾通道电流图

Fig.1  $K_{Ca}$  channel currents recorded from SG of *E. sinensis* under at different holding potentials 浴液中游离  $Ca^{2+}$  浓度为  $3.0 \mu\text{mol/L}$ ; 0 : 通道关闭; 1-3 : 通道开放; a : 大电导钙激活钾通道; b : 中电导钙激活钾通道 Incubated with Bathed with free  $3.0 \mu\text{mol/L}$  free  $Ca^{2+}$  concentration  $3.0 \mu\text{mol/L}$ ; 0 : close; 1-3 : open; a:  $BK_{Ca}$  channels; b:  $IK_{Ca}$  channels

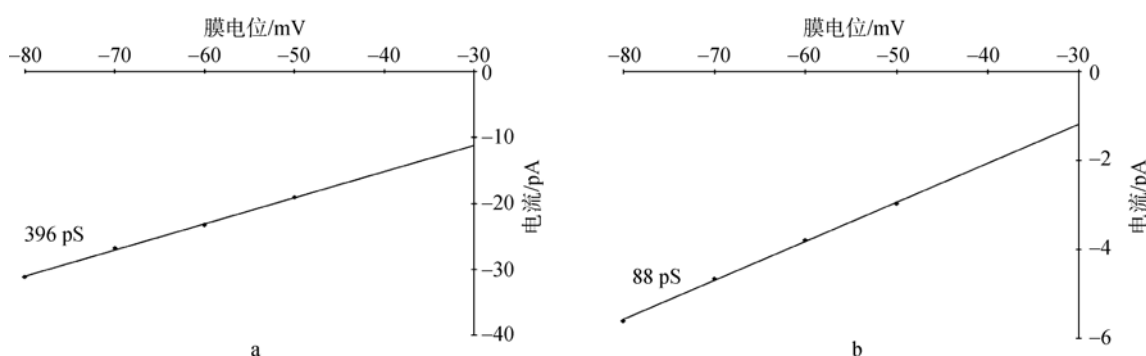


图 2 中华绒螯蟹小颗粒细胞表达的钙激活钾通道电流-电压曲线

Fig.2 Current-Voltage curves of  $K_{Ca}$  channels recorded from SG of *E. sinensis* 浴液中游离  $Ca^{2+}$  浓度为  $3.0 \mu\text{mol/L}$ ; a : 大电导钙激活钾通道电流-电压曲线, 拟合电导为  $396\text{pS}$ ; b : 中电导钙激活钾通道电流-电压曲线, 拟合电导为  $88 \text{pS}$  Incubated Bathed with free  $3.0 \mu\text{mol/L}$  free  $Ca^{2+}$  concentration  $3.0 \mu\text{mol/L}$ ; a: Current-Voltage curve of  $BK_{Ca}$  channels, fitted conductance was  $396 \text{pS}$ ; b: Current-Voltage curve of  $IK_{Ca}$  channels, fitted conductance was  $88 \text{pS}$

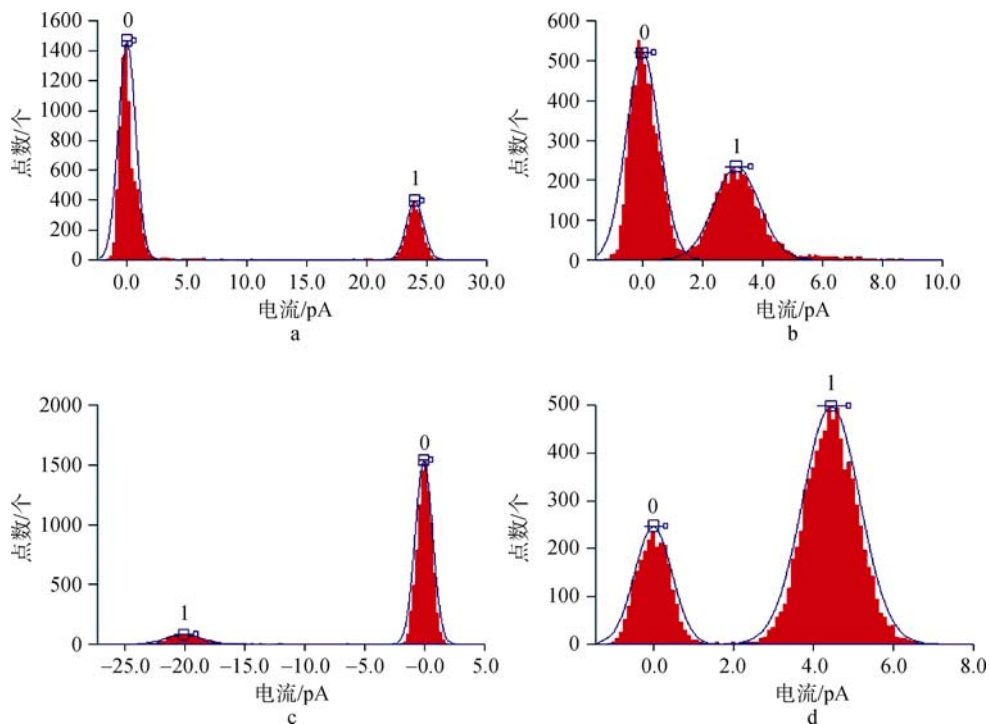


图3 中华绒螯蟹小颗粒细胞表达  $K_{Ca}$  通道电流直方图

Fig.3 Current histograms of  $K_{Ca}$  channels recorded from SG of *E. sinensis*

0. 通道关闭, 1. 通道开放; a 和 b. 钳制电压为+60mV, 浴液中  $Ca^{2+}$ 浓度为 3.0 $\mu$ mol/L, a 为  $BK_{Ca}$ 通道, b 为  $IK_{Ca}$ 通道; c 和 d :钳制电压分别为-80mV 和+80mV, 浴液中  $Ca^{2+}$ 浓度为 100.0 $\mu$ mol/L, 均为  $BK_{Ca}$ 通道; a、b、c、d 通道电流幅值分别为 24.00pA, 3.13pA, 20.00pA 和 4.45pA

0. close; 1. open; a & b were  $BK_{Ca}$  and  $IK_{Ca}$ , respectively, holding potential was +60 mV, bathed incubated with 3.0  $\mu$ mol/L free free  $Ca^{2+}$  concentration 3.0 $\mu$ mol/L; c and d. both were  $BK_{Ca}$  channels, holding potentials were -80mV and +80mV, respectively, incubated bathed with free 100.0  $\mu$ mol/L free  $Ca^{2+}$  concentration 100.0 $\mu$ mol/L; current amplitudes for from a, b, c, and to d were 24.00pA, 3.13pA, 20.00pA, and 4.45 pA, respectively

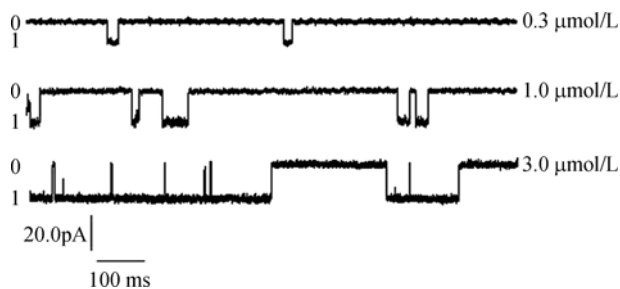


图4 相同电压不同  $Ca^{2+}$ 浓度记录的中华绒螯蟹小颗粒细胞大电导钙激活钾通道电流图

Fig.4  $BK_{Ca}$  channel currents recorded from SG of *E. sinensis* under at the same constant holding potential but bathed incubated with different concentrations of free free  $Ca^{2+}$  concentrations

钳制电压为-60mV; 0. 通道关闭, 1. 通道开放  
Holding potential: -60mV; 0. close; 1. open

为外向开放, 在负电位时, 通道为内向开放。形成稳定记录 (5 min)后, 在同一钳制电压下, 通道的电流幅度基本保持同一水平。当钳制电压分别为-40

表2 不同  $Ca^{2+}$ 浓度下  $BK_{Ca}$ 通道的开放特点

Tab.2 The characteristics of  $BK_{Ca}$  channel bathed incubated with different concentrations of  $Ca^{2+}$

$Ca^{2+}$ 浓度 ( $\mu$ mol/L)	细胞数 (个)	平均开放概率	平均开放时间 (s)
0.3	5	0.168 $\pm$ 0.001	0.03293 $\pm$ 0.02728
1.0	5	0.686 $\pm$ 0.007	0.07383 $\pm$ 0.01512
3.0	5	0.971 $\pm$ 0.007	0.06689 $\pm$ 0.02142
100.0	5	0.257 $\pm$ 0.117	0.02909 $\pm$ 0.02440

注: 钳制电压为-60 mV

mV 和-80 mV 时,  $BK_{Ca}$  随着钳制电压绝对值逐渐增加, 通道的电流幅度逐渐增大, 通道开放概率增加 ( $P < 0.05$ ,  $n = 5$ ), 平均开放时间延长 ( $P < 0.01$ ,  $n = 5$ ), 表现出明显的电压依赖性 (表 3);  $IK_{Ca}$  通道平均开放时间分别为(0.017 36 $\pm$ 0.004 03)s 和(0.022 62 $\pm$ 0.016 16)s, 平均开放概率分别为 0.70 $\pm$ 0.06 和 0.79 $\pm$ 0.11, 不存在显著差异 ( $P > 0.05$ ,  $n = 5$ ), 表明  $IK_{Ca}$  通道开放

表 3 不同电压下不同类型钙激活钾通道开放特点

Tab.3 The characteristics of different types of  $K_{Ca}$  channels types under at different holding potentials

通道类型	钳制电压(mV)	细胞数(个)	平均开放概率	平均开放时间(s)
$BK_{Ca}$	-40	5	0.596±0.125	0.03233±0.00741
	-80	5	0.961±0.012	0.05585±0.01299
$IK_{Ca}$	-40	5	0.699±0.065	0.01736±0.00403
	-80	5	0.790±0.114	0.02262±0.01616

活动不具有明显电压依赖性。不同电压下  $BK_{Ca}$  和  $IK_{Ca}$  通道开放有如下特点 (表 3): 相同钳制电压下 (-40mV 或-80mV),  $BK_{Ca}$  通道比  $IK_{Ca}$  通道平均开放时间长 ( $P<0.01$ ,  $n=5$ ); 当钳制电压为 -80mV 时,  $BK_{Ca}$  通道比  $IK_{Ca}$  通道开放概率大 ( $P<0.05$ ,  $n=5$ )。

另外, 作者观察到  $BK_{Ca}$  具有钙依赖失活现象。在  $Ca^{2+}$  浓度为  $3.0 \mu\text{mol/L}$  的溶液中, 当钳制在正电位时, 常出现  $BK_{Ca}$  通道的逐步开放, 全部开放后很快又逐步关闭, 而后又开放, 如此交替进行 (图 5a~d); 通道在逐步关闭和开放交替过程出现亚开放状态 (图 5a, c), 当钳制电压为+80mV 时通道出现了簇开放状态 (图 5e)。溶液中  $Ca^{2+}$  浓度为  $0.3$  和  $1.0 \mu\text{mol/L}$  时, 通道多为一级开放, 即通道开放数目 (N) 为 1, 而溶液中  $Ca^{2+}$  浓度  $3.0 \mu\text{mol/L}$  时, 常出现二、三级开放。当溶液中  $Ca^{2+}$  浓度达到  $100.0 \mu\text{mol/L}$  时, 随钳制电压绝对值增加, 通道开放概率降低 (图 6); 在大小相同、极性相反的钳制电压 (-80mV 和+80mV) 下, 通道内向开放的电流幅度大于外向开放的电流幅度 (图 3c, d, 图 6), 表明通道具有内向整流现象。且和溶液中  $Ca^{2+}$  浓度为  $3.0 \mu\text{mol/L}$  时相比, 相同钳制电压通道开放概率降低, 通道开放时间缩短 (表 2), 偶尔会出现通道短暂完全关闭, 这说明通道在高  $Ca^{2+}$  浓度下的开放受到抑制。

### 2.3 中华绒螯蟹小颗粒细胞表达钙激活钾通道的药理学特征

在游离  $Ca^{2+}$  浓度为  $3.0 \mu\text{mol/L}$  的溶液中添加  $40 \text{ mmol/L}$  四乙铵 (TEA), 可完全阻断通道, 阻断过程中, 多级开放逐渐消失, 通道电导不断变小。灌流 TEA 后  $10 \text{ min}$ , 中华绒螯蟹小颗粒细胞钙激活钾通道的开放概率和平均开放时间显著降低,  $15 \text{ min}$  后通道完全被阻断 (图 7)。

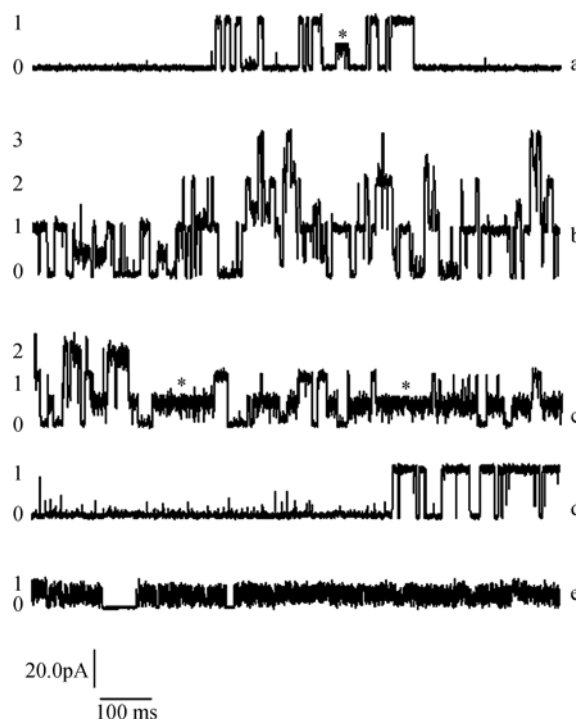


图 5 溶液中  $Ca^{2+}$  浓度为  $3.0 \mu\text{mol/L}$  通道开关的变化  
Fig.5 Changes of channel switching incubated bathed with free  $3.0 \mu\text{mol/L}$  free  $Ca^{2+}$  concentration  $3.0 \mu\text{mol/L}$   
\*代表通道的亚开放状态; 0. 通道关闭; 1-3. 通道开放; a-d. 依次间隔时间为 4s, 钳制电压为+60mV; a. 通道尚未完全开放; b. 通道完全开放, 出现二、三级开放状态; c. 二、三级通道逐步关闭并出现亚开放状态; d. 通道二、三级关闭仅剩一级开放状态; e. 钳制电压为+80mV, 通道出现簇状开放  
\*: substate; 0. close; 1-3. open; a-d. interval followed by 4 s, holding potential was +60 mV; a. channels were had not yet fully open; b. channels were had fully opened with at Llevel two and three open state; c. level two and three of channels had gradually closed with the appearance of and occurred substate; d. Llevel two and three of channels had were closed, and left Llevel one channel open; e. holding potential was at +80 mV, and channels appeared cluster open

### 3 讨论

甲壳动物不具备类似哺乳动物的特异性免疫系统, 免疫反应主要依靠细胞免疫(如血细胞的吞噬、包裹和凝集)以及体液免疫来完成, 属于非特异性免



图 6  $Ca^{2+}$ 浓度为  $100\mu\text{mol/L}$  不同钳制电压下小颗粒细胞大电导钙激活钾通道开放特点

Fig.6 Characteristics of  $BK_{Ca}$  channel recorded from SG of *E. sinensis* incubated bathed with  $100\mu\text{mol/L}$  free free  $Ca^{2+}$  concentration  $100\mu\text{mol/L}$ , under at different holding potentials

0. 通道关闭; 1. 通道开放  
0. close; 1. open

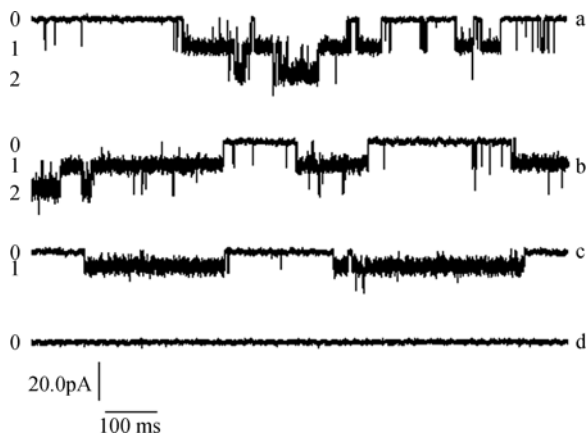


图 7 四乙铵(TEA)对小颗粒细胞钙激活钾通道的阻断作用  
Fig.7 Bathed Incubated with  $3.0\mu\text{mol/L}$  free free  $Ca^{2+}$  concentration  $3.0\mu\text{mol/L}$ , holding

浴液中游离  $Ca^{2+}$ 浓度为  $3.0\mu\text{mol/L}$ ; 钳制电压为  $-70\text{mV}$ ; 0. 通道关闭; 1-2. 通道开放; a. 未添加 TEA; b. TEA 作用 5min; c. TEA 作用 10min; d. TEA 作用 15min

potential:  $-70\text{mV}$ ; 0. close; 1-2. open; a. no TEA; b. TEA effected for 5 min; c. TEA effected for 10 min; d. TEA effected for 15 min

疫。不同于高等动物血细胞的高度分化, 甲壳动物血细胞仅有血淋巴细胞, 它们在先天免疫过程中担负着重要功能, 一直是甲壳动物免疫学研究的重点内容。依据细胞的形态、颗粒的有无等划分为透明细胞、小颗粒细胞和大颗粒细胞三类。其中, 颗粒细胞具有免疫和吞噬功能<sup>[8,9]</sup>。作者以我国重要的经济甲壳动物河蟹为研究对象, 首次采用膜片钳技术开展甲壳动物血淋巴细胞钙激活钾通道研究, 并发现只有具备吞噬功能的小颗粒细胞表达钙激活钾通道, 这提示钙激活钾通道在甲壳动物细胞免疫中发挥着重要作用, 为进一步研究甲壳动物血淋巴细胞的免

疫应答机制奠定了基础。

对淋巴细胞离子通道及其在先天免疫中的作用研究主要集中在哺乳动物, 但迄今只在人类淋巴细胞中发现  $IK_{Ca1}$ <sup>[10]</sup>, 该通道在 T 淋巴细胞的活化(转化)中起重要作用; Jurkat cell 中主要是  $SK_{Ca2}$ <sup>[11]</sup>, B 淋巴细胞和小鼠胸腺细胞中主要存在  $SK_{Ca3}$ <sup>[12]</sup>; 嗜中性粒细胞中发现  $BK_{Ca}$  的表达, 当  $BK_{Ca}$  通道被阻断后, 抗原递呈过程和微生物的杀死与消化过程也随之停止<sup>[13]</sup>。我们记录到中华绒螯蟹小颗粒细胞表达 2 种电导, 且电生理特征不同的钙激活钾通道, 即  $BK_{Ca}$  和  $IK_{Ca}$  通道, 其中  $BK_{Ca}$  通道电导大于高等哺乳动物的电导<sup>[14]</sup>, 另外观察到的  $BK_{Ca}$  通道亚开放状态<sup>[15]</sup>, 都可能提示了通道的亚单位组成在不同物种之间的差异。由于四乙铵(TEA)可以作为  $K_{Ca}$  通道的阻断剂, 因此我们用 TEA 来进行  $K_{Ca}$  通道的药理学研究。有关这 2 种通道在甲壳动物细胞免疫中的作用和功能以及亚开放状态在通道功能上的重要性还有待进一步研究。

参考文献:

- [1] 肖兰, 傅红焱, 宋德懋, 等. T 淋巴细胞上的离子通道[J]. 生理科学进展, 2003, 34(2): 105-110
- [2] Ledoux J, Werner M E, Brayden J E, et al. Calcium-Activated potassium channels and the regulation of vascular tone[J]. *Physiol*, 2006, 21: 69-79.
- [3] Latorre R, Oberhauser A, Labarca P, et al. Varieties of calcium-activated potassium channels[J]. *Annu Rev Physiol*, 1989, 51: 385-399.
- [4] Shieh, C C, Coghlan M, Sullivan J P, et al. Potassium channels: molecular defects, diseases, and therapeutic opportunities [J]. *Pharmacol Rev*, 2000, 52(4): 557-594.
- [5] Stocker M.  $Ca^{2+}$ -activated  $K^{+}$  channels: molecular determinants and function of the SK family[J]. *Nat Rev Neurosci*, 2004, 5(10): 758-770.
- [6] Gutman G A, Chandy K G, Adelman J P, et al. International union of pharmacology. XLI. Compendium of voltage-gated ion channels: potassium channels[J]. *Pharmacol Rev*, 2003, 55(4): 583-586.
- [7] Hamill O P, Marty A, Neher E, et al. Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches [J]. *Pfligers Arch*, 1981, 391(2): 85-100.
- [8] 周玉, 穆占昆, 杨振国. 三疣梭子蟹血淋巴的形态、分类及计数[J]. 上海水产大学学报, 2001, 10(3): 279-281.
- [9] 朱宁宁, 王文, 顾志峰, 等. 中华绒螯蟹血淋巴细胞的超微结构[J]. 中国水产科学, 2002, 9(2): 114-116.
- [10] Grissmer S, Nguyen A N, Cahalan M D. Cal-

- cium-activated potassium channels in resting and activated human T lymphocytes. Expression levels, calcium dependence, ion selectivity, and pharmacology [J]. **J Gen Physiol**, 1993, **102**(4): 601-630.
- [11] Grissmer S, Lewis R S, Cahalan M D. Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels in human leukemic T cells[J]. **J Gen Physiol**, 1992, **99**(1): 63-84.
- [12] Alizadeh A A, Staudt L M. Genomic-scale gene expression profiling of normal and malignant immune cells[J]. **Curr Opin Immunol**, 2000, **12**: 219-225.
- [13] Ahluwalia J, Tinker A, Clapp L H, *et al.* The large-conductance Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channel is essential for innate immunity [J]. **Nature**, 2004, **427**(6977): 853-858.
- [14] Ghatta S, Nimmagadda D, Xu X, *et al.* Large-conductance, Calcium-activated potassium channels: structural and functional implications [J]. **Pharmacol Ther**, 2006, **110**(1): 103-116.
- [15] Ascher P, Bregestovski P, Nowak L. N-Methyl-D-aspartate-activated channels of mouse central neurones in magnesium-free solutions [J]. **J Physiol**, 1988, **399**: 207-226.

## Calcium-activated potassium channels expressed by the haemocytes of *Eriocheir sinensis*

Duan Hu<sup>1</sup>, Wang Xue-hui<sup>2</sup>, Sun Jin-sheng<sup>1,2</sup>

(1. College of Life Science, Tianjin Normal University, Tianjin 300387, China; 2. Tianjin Aquiculture Center for Disease Prevention, Tianjin 300221, China)

**Received:** Dec., 12, 2009

**Key words:** *Eriocheir sinensis*; Haemocytes; Calcium-activated potassium channel; Patch clamp; Inside-out recording

**Abstract:** Inside-out patch clamp technique was used to identify and characterize Calcium-activated potassium channels (K<sub>Ca</sub>) from cultured *Eriocheir sinensis* haemocytes 2~24 h after plating. Calcium-activated potassium channels were observed in high symmetrical potassium solutions (200 mmol/L). Only small granule cell (SG) expressed BK<sub>Ca</sub> and IK<sub>Ca</sub> channels. The conductance of BK<sub>Ca</sub> channel was 396 pS with open rectangle waves. At constant potential, the open-rate and open-number of this channel were increased with [Ca<sup>2+</sup>] from 0.3 to 3.0 μmol/L, but decreased when [Ca<sup>2+</sup>] was increased up to 100.0 μmol/L, manifesting Ca<sup>2+</sup>-dependent inactivation of BK<sub>Ca</sub> channel. When the potential was held at -40 or -80 mV in the presence of 3.0 μmol/L [Ca<sup>2+</sup>], the mean open-duration were (0.032 33±0.007 41) s or (0.055 85±0.012 99) s (*P*<0.01), respectively and the mean open probability were 0.596±0.125 or 0.961±0.012 (*P*<0.01), respectively, indicating that BK<sub>Ca</sub> channel is voltage-dependent. The conductance of IK<sub>Ca</sub> channel was 88 pS, with open rectangle waves. IK<sub>Ca</sub> channel was open when [Ca<sup>2+</sup>] was kept at up to 3.0 μmol/L, showing that IK<sub>Ca</sub> channel is Ca<sup>2+</sup>-dependent. When the potential was held at -40 or -80 mV, the mean open-duration were (0.017 36±0.004 03)s or (0.022 62±0.016 16) s (*P*>0.05), respectively and the mean open probability were 0.699±0.065 and 0.790±0.114 (*P*>0.05), respectively, indicating that IK<sub>Ca</sub> channel is not obviously voltage-dependent. In addition, the Calcium-activated potassium channel could be completely be blocked by a 15-min perfusion of tetraethylammonium (40 mmol/L), suggesting that the K<sub>Ca</sub> channels have a pivotal function in cellular immunity of crustacean.

(本文编辑: 梁德海)