

中国对虾 (*Fenneropenaeus chinensis*) 视神经节 神经内分泌细胞电生理特征*

高春蕾 孙金生[†] 相建海^{††1)} 朱明远^{†††}

(中国科学院海洋研究所 青岛 266071; 中国科学院研究生院 北京 100039;

国家海洋局第一海洋研究所 青岛 266061)

[†](天津水产研究所 天津 300221)

^{††}(中国科学院海洋研究所 青岛 266071)

^{†††}(国家海洋局第一海洋研究所 青岛 266061)

提要 利用膜片钳技术对体外培养 24—48h 中国对虾的视神经节端髓 A 型和 B 型神经内分泌细胞进行电生理特征研究。电流钳的结果表明, A 型细胞具有自发和诱发放电活动; B 型细胞没有记录到明显放电活动。在电压钳模式下, 中国对虾视神经节神经内分泌细胞表达 TTX 敏感 Na⁺ 通道、高电压激活 L 型 Ca²⁺ 通道、TEA 敏感晚钾通道、早钾通道。Ca²⁺ 通道电流在 -40—-30mV 被激活, 在 -10—0mV 时达到峰值; Ca 电流受钳制电压的影响。一定电压范围内, 钳制电压越负, Ca 电流就越大。外向的钾通道电流均在 -40mV 左右被激活。晚钾通道电流对 TEA 敏感, 但 TEA 不能完全阻断晚钾通道电流。

关键词 中国对虾, XO-SG 复合体, 神经内分泌细胞, 电生理特征

中图分类号 Q45

甲壳动物眼柄 X 器官-窦腺 (XO-SG) 复合体是甲壳动物神经内分泌研究的模式结构 (Stuenkel *et al.*, 1988), 在结构和功能方面相当于哺乳动物的垂体-下丘脑系统。这一系统分泌多种神经肽类激素, 如甲壳动物高血糖激素 (CHH)、蜕皮抑制激素 (MIH) 和性腺抑制激素 (GIH) 等, 调控甲壳动物血糖水平、生长蜕皮和性腺发育等多种重要的生理活动 (Grau *et al.*, 1992), 是甲壳动物的神经内分泌调控中心。这一系统一直是甲壳动物内分泌研究的热点。从细胞和分子水平上对甲壳动物眼柄 XO-SG 复合体进行研究可以较深入地了解甲壳动物眼柄神经肽类激素的分泌调控机制。1976 年由德国的 Neher 和 Sakmann 建立的膜片钳技术为在单细胞水平研究激素的分泌调控提供了可能。随着膜片钳技术的不断完善, 它已经广泛地应用于哺乳动物细胞分泌的研究。在甲壳动物中, 由于受到细胞培养材料的限制, 利用膜片钳技

术研究眼柄神经内分泌细胞电生理特征及其分泌还仅限于热带地蟹 (Meyers *et al.*, 1992, 1997; Richmond *et al.*, 1995)、淡水龙虾 (Onetti *et al.*, 1990) 和中华绒螯蟹 (孙金生等, 2001)。

我国对甲壳动物内分泌的研究起步较晚。中国对虾 (*Fenneropenaeus chinensis*) 是我国重要的经济养殖对象, 目前仅对中国对虾视神经节神经内分泌系统 (中国对虾的眼尚未进入眼柄, 严格来说, 应称为“视神经节神经内分泌系统”) 进行了一些组织学和细胞学研究 (康现江等, 1998; 孙金生等, 2001); 对视神经节神经内分泌细胞兴奋和分泌调控机制的研究报道极少 (孙金生等, 2003); 从细胞水平上研究中国对虾视神经节神经内分泌系统 XO-SG 的活动在国内外尚未见到报道。作者利用体外培养的中国对虾视神经节端髓神经内分泌细胞, 采用膜片钳技术首次对中国对虾视神经节 A 型和 B 型分泌细胞的电活动和电生理特

* 国家自然科学基金资助项目, 30271019 号。高春蕾, 博士, E-mail: gchunlei@hotmail.com

1) 通讯作者

收稿日期: 2003-04-21, 收修改稿日期: 2004-04-02

征进行了初步研究。

1 材料与方 法

1.1 实验动物及其解剖与细胞培养

实验用中国对虾 (*Penaeus chinensis*) 购于青岛南山市场, 置于中国科学院海洋研究所水族楼 1t 水池中暂养。实验采用体长为 8—10cm 体征健康的对虾。动物解剖和细胞培养方法详见 Gao 等(2003) 的描述。选取培养 24—48h 后的形态特征典型的 A 型(veil) 细胞和 B 型(brancher) 细胞(图 1) 用于膜片钳研究。

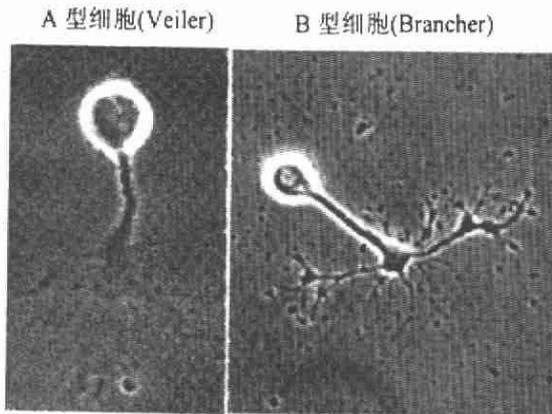


图 1 A 型和 B 型细胞的体外生长形态

Fig.1 The morphologies of type A and B in vitro

注: A 型细胞轴突末端形成一膜状结构——veil, 从 veil 边缘再生出许多次级突起; B 型细胞贴壁后, 轴突末端膨大形成一致密的生长核, 从生长核上再生出许多丝状突起, 继而逐渐形成一个复杂的网状分枝系统

1.2 电生理实验

实验采用 EPC-9 膜片钳放大器(HEKA Science Instronik, 德国), 玻璃电极毛坯为 WPI 公司(美国)生产的薄壁毛细管(1B150F-4)。用垂直拉制仪(HEKA Science instronik, 德国)两步拉制成尖端直径为 1—2 μ m 的玻璃电极。充灌电极内液后, 电极电阻为 5—8M Ω , 电极尖端涂敷硅酮树脂。快、慢电容均为自动补偿, 串联电阻补偿至最佳。刺激的输出由 ITC-16 数据集系统产生(Instrtech 公司, 美国), 以 PULSE + PULSEFIT7.63 软件(HEKA Electronics, 德国)采样并储存。采样频率为 2kHz, 输出滤波频率一般取 2.9kHz。实验在室温条件下进行, 结果以平均值 \pm SE 表示, 差异显著性用 *T* 检验。

根据培养对虾神经细胞用的生理盐水设计膜片钳实验的电极内外液。所需的电极内外液见表 1, 所有溶液均经 0.22 μ m 微孔滤膜过滤除菌后使用。

1.3 药物的施加

河豚毒素(Tetrodotoxin, TTX)、氯化镉(CdCl₂)、4-氨基吡啶(4-Aminopyridine, 4-AP)和四乙胺(Tetrathylammonium, TEA)均为 Sigma 产品, 用蒸馏水配成母液后存于 4 $^{\circ}$ C 冰箱, 使用前用细胞外液稀释成实验所需终浓度。加药过程由美国 ALA 科学仪器公司生产的 16 通道 superfusion system 完成。用操纵器操纵尖端直径为 50 μ m 的加

表 1 记录中国对虾神经节神经分泌细胞离子通道电流的细胞外液和细胞内液成分及浓度

Tab.1 The extracellular and intracellular solutions used to record the ion currents on the membrane of ganglion cells of *F. chinensis*

外液成分	细胞外液浓度 (mmol/L)				内液成分	细胞内液浓度 (mmol/L)			
	I_{Na}	I_K	I_{Ca}	正常全细胞电流		I_{Na}	I_K	I_{Ca}	正常全细胞电流
NaCl	100	225		225	葡萄糖酸钾		200		110
KCl		5.3		5.3	KCl				100
CsCl			150		NaCl	5	5	10	5
Choline-Cl	100				CsCl	200		150	
CaCl ₂	13.3	13.6	53	13.6	MgCl ₂	5	5	5	5
MgCl ₂	2.6	3.8	2.6	3.8	HEPES	50	50	50	50
Na ₂ SO ₄		2.6		2.6	EGTA	5	5	5	5
Glucose	20	20	20	20	ATP	5	5	5	5
HEPES	10	10	10	10	BAPTA			20	
TEA-Cl	20		20		TEA-Cl	10		10	
4-AP	3		3						
TTX		0.001	0.001						
CdCl ₂	0.5	0.5							

注: 电极内、外液 pH 值均为 7.4。记录正常细胞电流内、外液用 NaOH 调 pH, 记录 I_K 的内、外液用 KOH 调 pH, 记录 I_{Ca} 的内、外液和记录 I_{Na} 内液用 CsOH 调 pH

药头至细胞约 0.5cm 处,压力加药,可在数 ms 内快速将 8 个储液槽中的任何一种药品浸浴整个选定细胞。

2 结果

2.1 A 型和 B 型细胞电生理特征

在全细胞电流钳模式下,中国对虾视神经节 A 型和 B 型神经内分泌细胞的静息膜电位差异明显($P < 0.05$),分别为 $(-51 \pm 6) \text{mV}$ ($n = 7$) 和 $(-40 \pm 4) \text{mV}$ ($n = 8$)。兴奋性研究结果表明,约半数 A 型细胞出现自发放电活动,平均放电频率为 $(2.5 \pm 1.3) \text{Hz}$,此时给予细胞 3pA 的去极化电流刺激,均出现超射动作电位,平均放电频率为 $(21 \pm 14) \text{Hz}$ 。在具有自发放电的 A 型细胞中,部分细胞自发放电频率较高,大约在 2—2.5Hz 之间,电位幅值也较高,最大可接近于 0mV;诱发动作电位中超射成分达 20—30mV,而且在 500ms 的刺激时间内,诱发动作电位的幅值不随刺激时间的延长而有所下降(图 2a、b)。无自发动作电位的 A 型细胞的诱发放电频率也较低,为 $(6 \pm 2) \text{Hz}$,超射成分很小或无超射成分。对 A 型细胞表面灌流 0.5mmol/L 的 CdCl_2 ,发现 0.5mmol/L 的 CdCl_2 几乎全部消除了细胞的诱发动作电位,这说明 A 细胞动作电位的产生主要是由于钙离子的内流形成的。从 B 型细胞中没有记录到明显的自发和诱发放电活动。

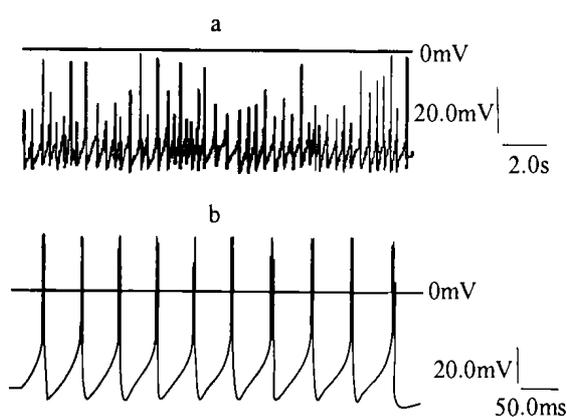


图 2 具有自发动作电位的 A 型细胞的自发动作电位(a)和诱发动作电位(b)

Fig.2 The spontaneous (a) and induced (b) action potential of the type A cell with spontaneous activity

2.2 细胞膜离子通道的种类和特征

2.2.1 正常全细胞电流 在电压钳记录模式下,将膜电位钳制在 -50mV ,并给予 10mV 阶跃去

极化电压刺激,在细胞稳定后,记录中国对虾视神经节 A 型和 B 型神经内分泌细胞的正常全细胞电流。结果表明,两类细胞均记录到快速的内向电流和随后出现的幅值较大的外向电流(图 3a、b)。

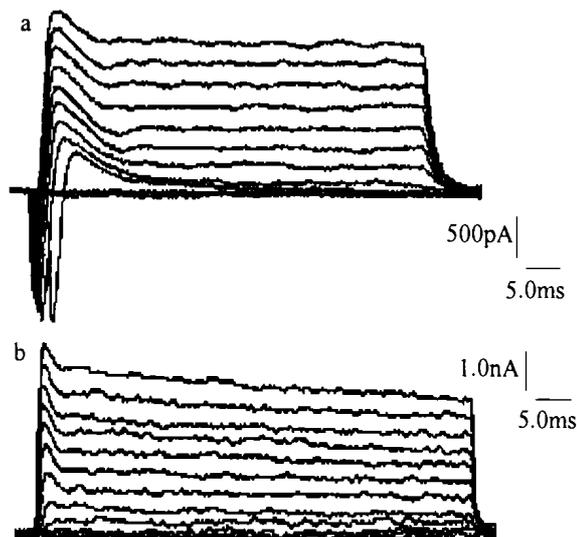


图 3 在 -50mV 的保持电压(V_h)下,从 -60 — 50mV ,给予 10mV 的阶跃去极化电压(V_c)刺激记录的 A 型和 B 型细胞的正常全细胞电流

Fig.3 The whole-cell currents of type A and type B when they are held at -50mV and given stepped 10mV depolarizing voltage from -60mV to 50mV

a. A 型细胞的全细胞电流;b. B 型细胞的全细胞电流

向细胞表面灌流 0.5mmol/L 的 CdCl_2 溶液,大约 70%—90%的内流成分消失,此时向细胞表面灌流 $1 \mu\text{mol/L}$ 的 TTX,内流成分几乎全部消失。这些结果说明,中国对虾 A 型和 B 型神经内分泌细胞的全细胞内流成分主要由钙离子和钠离子通道电流组成。另外一个值得注意的现象是,0.5mmol/L 的 CdCl_2 灌流细胞时,发现外向电流有一定幅度的增大,尤其是缓慢激活、缓慢失活外流成分。继续向细胞表面灌流 50mmol/L 的 TEA-Cl 和 10mmol/L 的 4-AP,30min 后只有大约 70%—85%的缓慢外流成分消失。这表明中国对虾视神经节 A 型和 B 型神经内分泌细胞表达 Na^+ 、 K^+ 、 Ca^{2+} 离子通道。

2.2.2 钾离子通道的种类和特征 在全细胞电压钳模式下,用记录钾通道电流内、外液,对 10 个 A 型细胞和 10 个 B 型细胞的记录结果表明,两类细胞均表达快速激活、快速失活的早钾通道电流和缓慢激活、缓慢失活的晚钾通道电流(图 4a)。早钾和晚钾通道的激活电压均在 -40mV —

-30mV 之间,峰电流随着激活电压的升高而快速升高。早钾通道电流达到峰值的平均时间为(2.4 ± 0.3)ms,快速失活平均时间为(3.3 ± 1.6)ms(图4c)。晚钾通道电流对 TEA 敏感,向细胞表面吹加 50mmol/L 的 TEA 30min 后约阻断 85% 的晚钾通道电流,同时早钾通道电流保持不变或略有增大(图4b)。此时,向细胞表面吹加 3mmol/L 4-AP,30min 内无法阻断早钾通道电流。将 4-AP 的浓度增加到 30mmol/L 仍然无法阻断早钾通道电流。

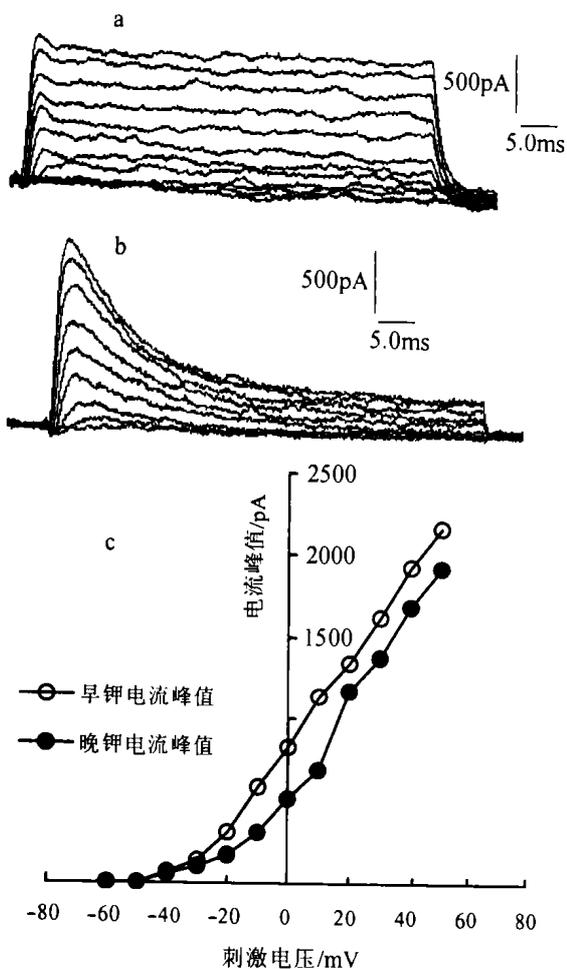


图4 中国对虾视神经节神经内分泌细胞的钾离子通道电流的种类、特征及峰值电流和刺激电压之间的关系

Fig.4 Potassium current types, characteristics and relationship between peak current and stimulating voltage of endosecretory neurons of optic ganglion of Chinese shrimp
a. 中国对虾视神经节神经内分泌细胞的钾离子通道电流, $V_h = -50\text{mV}$; b. 向细胞表面吹加 50mmol/L 的 TEA, 30min 后大约 85% 的晚钾通道电流被阻断; c. 早钾和晚钾通道峰值电流与刺激电压的关系

2.2.3 钙离子通道电流的种类和特征 将电极内外液换成记录钙通道电流的内外液,分别记录了 10 个 A 型细胞和 10 个 B 型细胞,结果两类

细胞中均记录到明显的钙电流。将膜电位钳制在 -50mV, 给予一系列以 10mV 步幅递增的去极化刺激, 记录到一系列失活缓慢的持续内向电流(图5a)。从电流电压关系曲线(图5b)可以看出, 钙电流的激活电压在 -30mV 左右, 在 -10mV—-20mV 时达到峰值。此后, 随电压的增大, 钙电流逐渐减小。A 型细胞的峰值钙电流在 1000—1600pA, B 型细胞的峰值钙电流大约为 400—650pA。钙电流达到峰值时间随刺激电压的增大而缩短, 在 -10mV 去极化电压刺激下约需 10—16ms, 而在 40mV 时达到峰值只需要 3—5ms。当刺激电压达到 +50mV 时, 未出现反转现象。当向细胞表面吹加 0.5mmol/L 的 CdCl_2 后, 5—10min 内可将钙电流完全阻断。

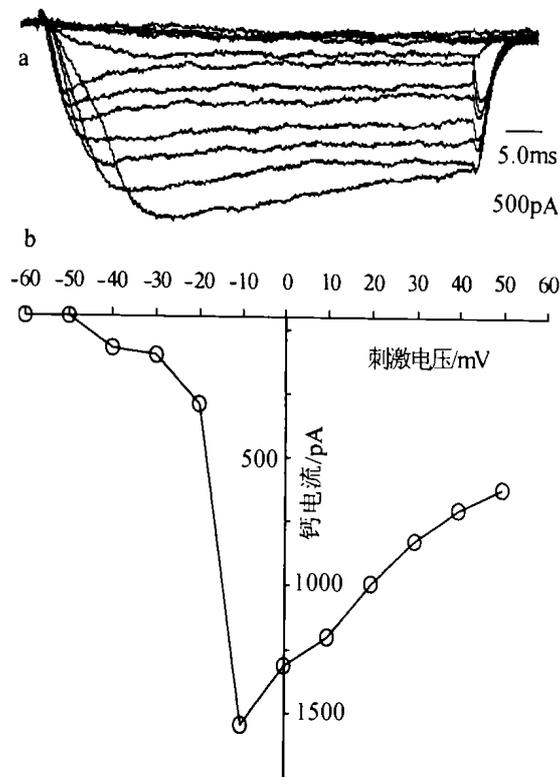


图5 A 型细胞的钙电流(a)以及钙电流(峰值电流)-电压关系曲线(b)

Fig.5 Calcium currents (a), relationship (b) between calcium currents (peak current) and stimulating voltage of type A
 $V_h = -50\text{mV}$, 刺激电压为 -60—50mV

2.2.4 钠离子通道电流的种类和特征 将电极内外液换成记录钠通道电流的内外液,分别记录了 10 个 A 型细胞和 10 个 B 型细胞,结果两类细胞中只有一个细胞记录到明显的钠电流,峰值电流在 300pA 左右, 1 $\mu\text{mol/L}$ 河豚毒素在 8min 内能将钠电流全部阻断。

3 讨论

关于甲壳动物神经内分泌系统 XO-SG 的细胞电生理活动的报道目前仅集中于 3 种动物:热带地蟹、淡水龙虾和中华绒螯蟹。中国对虾视神经节 XO-SG 复合体不像蟹类和龙虾那样集中分布于端髓基部。康现江等(1998)采用组织切片方法观察发现神经内分泌细胞散布于中国对虾视神经节的端髓(MT)、内髓(MI)和外髓(ME),作者在进行中国对虾视神经节神经内分泌细胞的免疫组织化学实验中也得出同样的结果,而且大多数 CHH 和 MIH 免疫阳性细胞位于端髓部。体外细胞培养和单细胞免疫结果发现,呈 CHH 阳性反应的细胞再生生长时轴突末端形成一大的膜片结构(Veiler)(Grau *et al*, 1992),作者将其命名为 A 型细胞;呈 MIH 阳性反应的细胞呈分枝生长(Brancher)(Grau *et al*, 1992),作者将其命名为 B 型细胞。

3.1 体外培养的中国对虾视神经节神经内分泌细胞的兴奋性

所有可兴奋细胞均能响应外界信号的刺激,产生和传播动作电位使细胞处于兴奋状态。典型的神经细胞动作电位是由于钠离子通道开放,钠离子内流使细胞膜去极化形成的。

在电流钳模式下,A 型细胞具有自发的动作电位,而 B 型细胞无自发的兴奋活动。给予 30pA 的电流刺激后,A 型分泌细胞均产生诱发的超射动作电位,但在 B 型细胞中没有记录到明显的诱发动作电位。实验中分析全细胞内向电流发现,钠离子电流的丰度很低,主要是钙离子电流,而且向细胞表面中灌注 0.5mmol/L 的 CdCl₂ 后,记录不到自发的动作电位,给予 30pA 的电流刺激后也无诱发的动作电位产生。由此可见,中国对虾视神经节神经内分泌细胞动作电位的产生主要是由于钙离子的内流引起的,这不同于典型的神经细胞动作电位的产生。B 型分泌细胞中记录的内向钙电流要远小于 A 型分泌细胞中记录到的钙电流,这可能是在 B 型分泌细胞中记录不到明显的动作电位的原因。这些结果说明,A 型和 B 型分泌细胞的分泌活动主要与钙离子和细胞膜上钙离子通道有关,钙离子内流引发了细胞的兴奋性活动,从而引起了细胞的分泌;这也说明了中国对虾视神经节神经肽类激素的节律性分泌和刺激诱发

分泌是受精确调控的。

3.2 中国对虾视神经节神经内分泌细胞的全细胞电流

A 型分泌细胞比 B 型分泌细胞的全细胞电流更具多样性。通常情况下,两种细胞全细胞电流最大的差别在于内向电流,A 型细胞的内向电流比 B 型细胞的要明显得多,B 型细胞的内向电流很小有时甚至记录不到;两者的外向电流无太大差异,均由快速激活、快速失活,缓慢激活、缓慢失活两部分外向成分组成,而且峰电流的幅值也无显著差异,但在约 5% 的 A 型细胞中,记录不到明显的快速激活快速失活的外向电流成分。另外值得注意的是,相当一部分 A 型细胞的全细胞电流非常有特点:在某一个刺激电压下,细胞频繁地去极化-复极化,导致胞外离子不断内流,形成功作电位,这类 A 型细胞的兴奋性特征与前面记录的典型的 A 型细胞兴奋性特征无太大差异,可能这是同一类 A 型细胞,但细胞处于不同的生理时期,记录的全细胞电流图形有差异。

3.3 中国对虾视神经节神经内分泌细胞的内向电流——Na 电流和 Ca 电流

在全细胞电压钳模式下,通过记录到的全细胞电流的特点和电压特征,结合特异性阻断剂的运用,确定中国对虾视神经节 A 型和 B 型神经内分泌细胞均表达高电压激活 L 型钙通道电流(I_{Ca})及快速激活快速失活并对 TTX 敏感钠通道电流(I_{Na}),但两类细胞内向电流的峰值有些差异:A 型分泌细胞的内向电流比 B 型分泌细胞的内向电流显著得多;B 型分泌细胞中经常记录不到明显的内向电流。

Na 电流具有快速激活、快速失活的特性,很难记录到高质量的电流图形,作者在实验中没有对 Na 电流进行详细的分析。

Ca 电流在 A 型分泌细胞中很明显(大小一般在 600—2000pA)。在中国对虾视神经节神经内分泌细胞中记录的 Ca 电流有两点不同于以前所研究的其他甲壳动物(Bruner *et al*, 1989; Meyers *et al*, 1992; 孙金生, 2001; Meyers, 1993):(1) 钳制电压影响 I_{Ca} 。钳制电压在 -70mV 时的 I_{Ca} 较在 -40mV 时的电流增加 15%—20%。(2) 钙电流达到峰值的时间随刺激电压的增大而缩短。尽管有这些不同,但钙电流的激活电压和达到峰值时

的电压并不随钳制电压的变化而变化,所以中国对虾视神经节神经内分泌细胞的 Ca 电流仍然是高电压激活 L 型钙通道电流,它被 0.5mmol/L 的 CdCl₂ 完全阻断。由于电压激活的钙通道在细胞分泌、代谢调控和细胞生长等许多方面具有关键作用,因此, Ca²⁺ 通道电流的其他特征仍需要进一步的研究。

3.4 中国对虾视神经节神经内分泌细胞的外向电流——早钾通道电流和晚钾通道电流

中国对虾视神经节神经内分泌细胞的早钾通道电流和晚钾通道电流与以往研究的甲壳动物的有所不同:(1) 早钾通道电流对 4-AP 不敏感;(2) Ca²⁺ 通道阻断剂 CdCl₂ 能使外向电流有一定幅度的增大。许多甲壳动物的早钾通道电流在 3mmol/L 的 4-AP 下就可被阻断,而中国对虾的早钾通道电流即使在 30mmol/L 的 4-AP 下也不受影响;50mmol/L 的 TEA 可以阻断部分晚钾通道电流, Meyers 等 (1992) 将 TEA 的浓度升高到 300mmol/L 后,也不能完全阻断晚钾通道电流。这些说明,晚钾通道电流中可能还含有对 TEA 不敏感的成分,而且可以肯定的是这部分 TEA 不敏感的成分一定不是 Ca 或 Na-依赖性钾通道电流,因为在记录钾通道电流时,细胞外液中始终存在 TTX 和 CdCl₂。Grau 等 (1992) 在对热带地蟹眼柄神经内分泌细胞外向电流的研究中发现,添加 CdCl₂ 后能引起外向电流的减小,他认为这是由于 Ca 依赖的钾电流的减少所致;而在中国对虾的视神经节神经内分泌细胞中, CdCl₂ 的加入能一定幅度的增大外向电流,能否推测是由于 Ca 抑制的钾电流的增多引起的呢? 有待进一步研究。

致谢 实验室全体老师和同学们给予了热情帮助和大力支持,开放室的郭晓林、邓涪老师在仪器安装调试过程中给予了大力帮助,谨致谢忱。

参 考 文 献

- 孙金生, 刘安西, 陈家童等, 2001. 河蟹眼柄 MTXO 细胞离子通道的膜片钳研究. 生物物理学报, 17(2): 231—238
- 孙金生, 相建海, 2002. 中国对虾 XO-SG 复合体及其分泌物的初步研究. 海洋科学集刊, 45: 111—117
- 康现江, 王所安, 1998. 中国对虾眼柄神经内分泌结构. 河北大学学报, 18(1): 45—48
- Bruner J, Czternasty G, 1989. Arsenazo III transients and Ca current in a normally non-spiking neuroal soma of crayfish. J Physiol Lond, 374: 571—583
- Gao C L, Sun J S, Xiang J H, 2003. Primary culture and characteristic morphologies of medulla terminalis neurons in the eyestalks of Chinese shrimp, *Fenneropenaeus chinensis*. J Exp Mar Bio Ecol, 290: 71—80
- Grau S M, Cooke I M, 1992. Peptidergic neurons of the crab *Cardisoma carnifex*, in defined culture maintain characteristic morphologies under a variety of conditions. Cell Tissue Res, 270: 303—317
- Meyers D E, Graf R A, Cooke I M, 1992. Ionic currents of morphologically distinct peptidergic neurons in defined culture. J Neurophysiol, 67: 1301—1315
- Meyers D E R, 1993. Distribution of ionic currents in the soma and growing region of an identified peptidergic neuron in defined culture. J Neurophysiol, 69(2): 406—415
- Meyers D E R, Cooke I M, 1997. Comparison of Ca²⁺ currents of peptidergic neurons developing differing morphology with time in culture. J Exp Biol, 200: 723—733
- Onetti C G, Valdiosera G U, 1990. Ionic currents in crustacean neurosecretory cells. J Neurophysiol, 64: 1514—1526
- Richmond L E, Sher E, Cooke I M, 1995. Characterization of the Ca²⁺ current in freshly dissociated crustacean peptidergic neuronal somata. J Neurophysiol, 6: 2357—2368
- Stuenkel E L, Cooke I M, 1988. Electrophysiological Characteristics of Peptidergic Nerve Terminals Correlated with Secretion. In: Ganten D, Pfaff D ed. Current Topics in Neuroendocrinology. Berlin: Springer-Verlag, Vol.9: 123—150

ELECTROPHYSIOLOGICAL STUDY OF NEUROSECRETORY NEURONS IN EYESTALK OF SHRIMP *FENNEROPENAEUS CHINENSIS*

GAO Chun-Lei, SUN Jin-Sheng[†], XIANG Jian-Hai^{††}, ZHU Ming-Yuan^{†††}

(Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao, 266071; Graduate School, Chinese Academy of Sciences, Beijing, 100039; First Institute of Oceanography, State Oceanic Administration, Qingdao, 266061)

[†](Tianjin Fisheries Institute, Tianjin, 300221)

^{††}(Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao, 266071)

^{†††}(First Institute of Oceanography, State Oceanic Administration, Qingdao, 266061)

Abstract X-organ-sinus gland (XO-SG) complex is an important neurosecretory organ in nervous system of Crustaceans. This complex produces and secretes neuropeptidergic hormones, including crustacean hyperglycemic hormone (CHH), molting-inhibiting hormone (MIH), gonad-inhibiting hormone (GIH), mandibular organ-inhibiting hormone (MOIH), pigment concentrating hormone (PCH) and pigment dispersing hormone (PDH). These neuropeptides play a key role in the regulation of a variety of important physiological processes, such as molting, reproduction, carbohydrate metabolism, pigment migration and osmoregulation. Due to importance of this complex, it has become a model structure in crustacean endocrinology research. Due to limited knowledge on this system, especially no single neuron, studies on this complex have still stopped at tissue level, many basic problems of this system have yet to be clarified.

Chinese shrimp, *Fenneropenaeus chinensis*, with great commercial value, is a major aquaculture species in China. It also provides a source of cell and tissue types for basic research and biotechnological application. In this study the medulla terminalis neurons in Chinese shrimp eyestalk were used to carry out the culture. The neurons showed immediate outgrowth in the culture medium. The gain of single neurons makes it possible to carry out research on secretion mechanisms and hormone regulation at cellular and molecular level.

The patch clamp recording technique developed by Neher and Sakmann in 1976. This technique is an invaluable tool for determination of currents biophysical properties, and can be easily combined with other techniques such as fluorescence microscopy and flash photolysis. In recent years, whole cell patch pipette has been used to introduce into the cell ion selective fluorophores for quantitative measurements of calcium, magnesium, sodium and proton concentrations. Similarly, various caged compounds have been introduced into the cell to study the role of second messengers in the cell by flash photolysis.

In this paper, the whole-cell patch clamp technique was used to study properties of voltage-gated ion channels expressed by the cultured *in vitro* secretory neurons (24—48h after plating) of medulla terminalis in the eyestalks of *F. chinensis*. The study focused on the type A and B cells. Under current clamp, spontaneous and inducing excitability and secretion were observed in type A neurons, no excitability was observed in type B cells. Overshooting action potential could be recorded in type A neurons when given a 30pA stimulus. Under voltage clamp, net current consisted of inward and outward currents. When solutions that suppressed the outward currents were used, a tetrodotoxin (TTX)-sensitive Na^+ current (I_{Na}) and Cd^{2+} -sensitive Ca^{2+} current (I_{Ca}) were resolved in two cell types. When holding potential (V_h) was -50mV , I_{Ca} was activated at potential -40 — -30mV and maximal at -10 — 0mV . I_{Ca} was altered by change of holding potential, the peak value increased about 15%—20% when V_h changed from -40mV to -70mV . In the presence of $1\mu\text{mol/L}$ TTX and 0.5mmol/L Cd^{2+} , two cell types expressed a slower-rising, TEA-sensitive current and a 4-AP-insensitive transient current. Two kinds of outward current were activated at the same potential of -40mV .

Key words *Fenneropenaeus chinensis*, X-organ-sinus gland (XO-SG) complex, Endosecretory neurons of optic ganglion, Electrophysiological characteristics