

葡萄糖对中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)眼柄 CHH 免疫阳性细胞 I_{Ca} 的影响*

范晓锐 孙金生

(天津师范大学化学与生命科学学院 天津 300387)

提要 依据中华绒螯蟹正常血糖水平和摄食、饥饿条件下的血糖变动范围 $[(0.43 \pm 0.06) - (0.73 \pm 0.08)\text{mmol/L}]$, 选择不同浓度葡萄糖, 采用全细胞膜片钳技术, 在单个细胞水平观察葡萄糖对中华绒螯蟹眼柄分泌 CHH 细胞高电压激活钙电流(I_{Ca})的调控作用, 探讨眼柄神经内分泌调控的生物物理机制。通过实时监测细胞膜电容的变化, 观察去极化电压诱导的分泌 CHH 细胞 I_{Ca} 对细胞分泌的影响, 发现 I_{Ca} 的大小与细胞的分泌强度呈明显的正相关; 灌流正常中华绒螯蟹生理浓度的葡萄糖(0.3、0.9、1mmol/L)对细胞 I_{Ca} 无明显影响, 高浓度葡萄糖(3、10mmol/L)灌流 10—20min, 对细胞 I_{Ca} 产生显著的抑制作用, 但对细胞膜通道的激活、失活电压等电生理特征无明显的影响。这表明血糖水平通过抑制细胞 I_{Ca} 对中华绒螯蟹眼柄 CHH 神经多肽激素分泌活动产生快速的负反馈调节, 以维持中华绒螯蟹的正常生理血糖水平。

关键词 中华绒螯蟹, 神经内分泌细胞, 葡萄糖, 钙电流, 膜片钳技术

中图分类号 Q45

眼柄 X 器官-窦腺复合体(X-organ Sinus Gland complex, XO-SG)类似于哺乳动物的下丘脑-垂体系统, 是甲壳动物的重要神经内分泌器官。它合成并分泌多种神经多肽激素, 如同开关一样调控甲壳动物的蜕皮、性腺发育、代谢等重要生理活动, 对这一系统的研究一直是甲壳动物内分泌学的重点内容(Cooke *et al.*, 1982; Keller, 1992)。在过去的 20 余年中, 由于一些眼柄神经多肽激素的相继被分离、纯化, 对这些激素的生理功能和作用机制等也有了较为深入的了解(Keller, 1992; 蔡生力, 1998; Lacombe *et al.*, 1999)。近年来, 研究的重点集中在调控甲壳动物血糖代谢、蜕皮和性腺发育的甲壳动物高糖激素(CHH)、蜕皮抑制激素(MIH)、性腺抑制激素(GIH)等神经多肽激素。由于这些神经多肽激素的氨基酸序列具有很高的同源相似性, 被称为 CHH 家族神经多肽激素。迄今, CHH 家族神经多肽激素只在甲壳动物中被发现。这些激素的合成和分泌量很微小, 每个细胞的储存量

只有几个 pg, 并且一个甲壳动物的 XO 仅有约 200 个细胞。这给神经多肽激素的检测造成了很大的困难。虽然人们已认识到对眼柄神经多肽激素分泌调控研究的重要性, 但由于缺乏神经肽类激素敏感的检测方法, 研究报道较少, 对甲壳动物神经肽类激素分泌的研究至今停留在活体和组织水平的间接观察上, 导致对神经多肽激素分泌规律和调控机制的了解甚少(Van Herp, 1998)。自 20 世纪 90 年代初开始, 我国也开始了甲壳动物眼柄神经内分泌系统的研究, 已对锯缘青蟹(*Scylla serrata*)、罗氏沼虾(*Macrobrachium rosenbergii*)、中国对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)等我国重要经济虾蟹类眼柄神经内分泌系统的组织学和细胞学进行了较全面的观察(上官步敏等, 1994, 1995; 康现江等, 1998; 姚泊, 1995), 并利用同源克隆方法对中国对虾和中华绒螯蟹 MIH 编码基因进行了克隆和序列分析(王在照, 2003; 宋霞等, 2003), 但迄今未见眼柄神经多肽激素分泌调控研究的报道。

* 国家自然科学基金项目, 30871907 号, 30451421 号。范晓锐, 硕士研究生, E-mail: fxr_313@163.com

通讯作者: 孙金生, 博士, 教授, E-mail: jssun1965@yahoo.com.cn

收稿日期: 2008-10-19, 收修改稿日期: 2008-12-30

眼柄 XO 神经内分泌细胞具有典型的神经细胞的兴奋性特征, 又具有内分泌功能。兴奋是细胞分泌活动的基础。了解该细胞的兴奋活动规律是研究眼柄神经内分泌系统兴奋-分泌偶联机制和神经多肽激素分泌调控的关键。但是, 由于受到细胞培养材料和激素分泌检测方法的限制, 仅将体外分离的 XO-SG 复合体置于灌流液中, 在组织水平观察了热带地蟹 (*Cardisoma carnifex*) 和克氏原螯虾 (*Procambarus clarkii*) 眼柄神经内分泌系统兴奋性和分泌活动, 发现电刺激和升高灌流液中钾离子浓度(正常浓度的 10 倍)均能诱导 CHH 和 RPCH 的分泌, 并证明这种分泌活动为钙依赖性分泌(Garcia, 1998)。目前未见眼柄神经内分泌细胞兴奋性和分泌活动调控研究报道。中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)是我国重要经济甲壳动物之一。组织学观察和免疫定位结果显示, 中华绒螯蟹眼柄 X 器官(XO)由一群单轴突神经内分泌细胞胞体聚集于视神经节端髓而成, 被称为端髓 X 器官(MTXO); 这些细胞发出的轴突汇集成束, 形成一条轴路, 并在血窦附近膨大, 包裹整个血窦形成窦腺(SG)。依据细胞的大小、体外培养形态和生长方式, 离体培养的中华绒螯蟹眼柄 MTXO 神经内分泌细胞可分为 A、B、C 三种类型, 免疫标记结果表明 A 型神经内分泌细胞合成和分泌甲壳动物高糖激素(CHH), 并具有典型的神经细胞特征和内分泌细胞特征(孙金生等, 2000, 2001a, b, 2003, 2006; 王雪惠等, 2006)。作者采用膜片钳技术, 结合细胞膜电容检测技术, 在单个细胞水平直接观察葡萄糖对眼柄分泌 CHH 神经内分泌细胞表达高电压激活钙电流的影响, 探讨眼柄 CHH 家族神经多肽激素分泌调控的生物物理机理, 为进一步全面了解甲壳动物眼柄神经多肽激素的分泌调控机制和在生产上控制甲壳动物繁殖和生长打下基础。

1 材料与方 法

1.1 动物解剖与细胞培养

实验动物为取自天津市宁河县七里海养殖场的中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)正常一龄蟹种, 壳宽为 2.1—2.3cm, 置室内水泥池暂养。动物解剖和细胞培养按文献(孙金生等, 2000)进行。简述如下: 实验蟹经 1:30 碘伏浸泡消毒 20min 后, 在超净工作台中切下眼柄。经酒精消毒和无菌生理盐水冲洗 3 遍后, 剥离外骨骼和肌肉, 取出视神经节, 并沿窦腺的轴路, 在视神经节端髓取出 X 器官(MTXO)。MTXO 于 24

振动消化 1.5h 后, 在培养液中搅动打散细胞, 分散的细胞于 24—26℃、黑暗、潮湿条件下培养。消化酶液为溶解于无 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 生理盐水的 0.3% 胰蛋白酶(Sigma)。培养液为 1.75 倍中华绒螯蟹生理盐水配制的 L-15 培养基(pH 7.5), 临用前加入 0.1mg/ml 庆大霉素、150mmol/L 葡萄糖和 1mmol/L 谷氨酰胺。选取低密度、轴突再生完整的培养了 12—24h 的 CHH 免疫阳性细胞用于细胞膜电容测定。选取培养 2—5 天、形态特征典型的分泌 CHH 族神经多肽激素细胞进行全细胞钙电流(I_{Ca})检测。实验结束后经免疫标记进一步鉴定细胞功能。

1.2 细胞免疫荧光标记

采用从中华绒螯蟹眼柄窦腺分离纯化的 CHH 家族神经多肽激素制备的抗血清, 用 FITC 标记的羊抗兔 IgG 作为第二抗体, 于每次实验结束后对实验细胞进行间接免疫荧光染色, 荧光显微镜观察, 进一步鉴定细胞类型和功能。

1.3 电生理记录

实验采用 EPC-10 膜片钳系统, 信号由膜片钳放大器输出至计算机。电刺激脉冲的给出及电信号采入均通过计算机程序 PULSE 及 ADDA 接口完成。玻璃电极毛坏为 WPI 公司生产的薄壁毛细管(1B150F-4), 经微电极拉制仪(PIP5, HEKA, Germany)两步拉制, 充灌电极内液后入水电阻 3—5M Ω 。快、慢电容为自动补偿, 串联电阻补偿至最佳。膜片钳实验在室温(21—24℃)下进行。根据中华绒螯蟹生理盐水设计细胞内外液, 经 0.22 μ m 微孔滤膜过滤后使用。细胞外液为: 150mmol/L CsCl, 50mmol/L $CaCl_2$, 2.6mmol/L $MgCl_2$, 120mmol/L 葡萄糖, 10mmol/L HEPES, 30mmol/L TEA, 3mmol/L 4-AP, 0.001mmol/L TTX, CsOH 调 pH=7.5; 细胞内液为: 200mmol/L CsCl, 5mmol/L NaCl, 5mmol/L $MgCl_2$, 20mmol/L HEPES, 5mmol/L ATP-2Na $^+$, 5mmol/L EGTA, 10mmol/L TEA, 0.5mmol/L $CdCl_2$, CsOH 调 pH 7.5。数据分析使用 Igor Pro 5.04 (Wavemetrics, Lake Oswego, OR, USA)和 Origin 7.5(Microcal Software, USA)软件, 进行数据分析。实验数据以平均值 \pm 标准差(mean \pm SD)表示, 参数比较用双尾成对 t 检验, $P < 0.05$ 为差异显著。

1.4 单细胞分泌定量检测

利用全细胞膜片钳技术对 MTXO 细胞进行全细胞记录。采用频域法对细胞膜电容进行动态监视。由于细胞膜电容正比于细胞膜表面积, 而分泌活动的强弱与细胞表面积存在一定的比例关系, 因此, 可以用细胞膜电容的变化过程反映细胞的分泌过程。采用

细胞膜电容的相对变化幅值 C_r 来表征细胞的分泌活性, 即: $C_r = \text{终结膜电容量} / \text{初始膜电容量}$ 。利用美国 ALA 公司产 DVD-8VCPsuperfusion system 灌流葡萄糖和添加药物。氯化镉 (CdCl_2)、河豚毒素 (Tetrodotoxin, TTX)、4-氨基吡啶 (4-Aminopyridine, 4-AP)、四乙胺 (Tetrathylammonium, TEA)、EGTA [ethylene glycol bis (beta-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid] 均为 Sigma 公司产品, 葡萄糖等其他试剂为国产分析纯。

2 结果

2.1 高电压激活 I_{Ca} 对 CHH 免疫阳性细胞分泌的影响

在正常生理状态下, 胞外的自由钙离子浓度约为 $2\text{--}3\text{mmol/L}$, 是 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 的 20000 倍, 而且胞内相对于胞外基质又呈负电位。故胞外钙离子应该很容易通过化学梯度进入胞内。中华绒螯蟹眼柄分泌 CHH 神经内分泌细胞只表达一种高电压激活钙离子通道, 对 CdCl_2 敏感。通过观察 CdCl_2 阻断钙离子通道前后去极化刺激诱导的膜电容的变化, 可以分析钙离子通道电流对细胞分泌的影响。实验所用 CdCl_2 为 Sigma 产品, 用正常的细胞外液配制成 50mmol/L 的母液储存在 4°C 冰箱, 临用前用正常细胞外液稀释到 0.5mmol/L 。

形成全细胞电压钳构型并稳定记录 5min 后, 灌流含有 0.5mmol/L CdCl_2 的细胞外液。5min 后施加 50ms 的 0mV 去极化电压刺激, 记录去极化前后细胞膜电容的变化。结果表明, 细胞平均膜电容增加 $(5 \pm 2)\text{fF}$ ($n=5$)。改用正常的细胞外液灌流细胞, 灌流 10min 后, 同样给细胞施加 50ms 的 0mV 去极化电压刺激, 诱导细胞的胞吐分泌活动, 记录去极化前后的细胞膜电容的增加。结果表明, 去极化刺激后细胞膜电容平均增加 $(63 \pm 5)\text{fF}$ ($n=5$)。这表明钙离子的内流启动了细胞的分泌活动。此时, 给细胞不同的去极化电压刺激诱导不同大小的钙电流, 观察钙电流的大小与细胞分泌的关系。结果表明, 随着钙电流的增加, 细胞膜电容的增加也加大, 钙电流与细胞的分泌强度存在明显的正相关, 相关系数 $R^2 = 0.9239$ (图 1)。

2.2 葡萄糖对中华绒螯蟹眼柄分泌 CHH 细胞 I_{Ca} 的影响

2.2.1 摄食和饥饿对中华绒螯蟹血糖水平的影响
为观察葡萄糖对分泌 CHH 细胞 I_{Ca} 和细胞分泌活动的影响, 作者预观察了中华绒螯蟹正常生理状态和摄食、饥饿条件下的血糖水平。实验设正常投饵组和饥

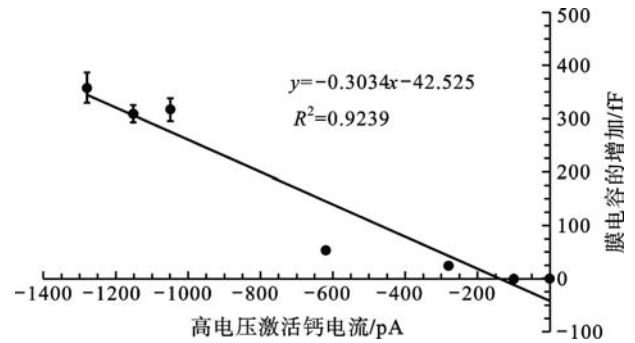


图 1 中华绒螯蟹眼柄分泌 CHH 神经内分泌细胞 I_{Ca} 与细胞膜电容增加的关系曲线

Fig.1 Relationship between I_{Ca} and cell membrane capacitance increments in CHH-secreting neurosecretory cells from the eyestalk of *E. sinensis*

注: 诱导细胞 I_{Ca} 和细胞分泌的去极化电压为 -50mV 至 $+10\text{mV}$, 细胞膜电容的增加为去极化刺激前后细胞膜电容的变化

饿组, 分别观察摄食 0h、0.5h、1h、2h、4h、8h 后和饥饿 0h、6h、12h、24h、36h、48h 后中华绒螯蟹的血糖水平。每次取样 6 只中华绒螯蟹, 用 BIOSEN 5040 葡萄糖分析仪进行血糖水平的测定。结果表明, 中华绒螯蟹在摄食后 0.5 小时, 血糖浓度达到最高, 为 $(0.73 \pm 0.08)\text{mmol/L}$ ($n=6$); 在投饵 2h 后, 基本回到投饵前水平 $(0.66 \pm 0.08)\text{mmol/L}$ ($n=6$) (图 2a); 中华绒螯蟹的血糖水平随着饥饿时间的延长, 逐渐降低, 再饥饿 48h, 血糖浓度达到最低 $(0.43 \pm 0.06)\text{mmol/L}$ ($n=6$) (图 2b)。上述结果表明: 在 48h 内, 中华绒螯蟹血糖浓度的正常范围是 $(0.43 \pm 0.06)\text{--}(0.73 \pm 0.08)\text{mmol/L}$, 其血糖浓度不受投饵和饥饿条件影响, 提示中华绒螯蟹的血糖水平受到了精确的调控。

2.2.2 不同浓度葡萄糖对 I_{Ca} 的影响 依据中华绒螯蟹正常血糖水平和变动范围 $(0.43 \pm 0.06)\text{--}(0.73 \pm 0.08)\text{mmol/L}$, 作者选择了 5 种浓度的葡萄糖 (0.3 、 0.9 、 1 、 3 、 10mmol/L), 观察不同浓度葡萄糖对离体培养的单个细胞表达高电压激活钙通道电生理特性和电流大小 (I_{Ca}) 的影响。

形成全细胞构型后, 置 -60mV 钳制电位下, 给予 $+10\text{mV}$ 、持续时间 80ms 的去极化电压刺激, 稳定记录 5min 作为初始对照值, 灌流不同浓度的葡萄糖, 用 PULSE (德国 HEKA) 软件每 30s 自动记录一次数据, 记录时程为 20min。对 I_{Ca} 的影响率按下式计算: 影响率 (effects) = $(\text{终结 } I_{\text{Ca}} / \text{初始对照 } I_{\text{Ca}}) \times 100\%$ 。观察结果表明, 在中华绒螯蟹正常生理范围的低浓度葡萄糖 (0.3 、 0.9 、 1mmol/L) 对中华绒螯蟹眼柄分泌 CHH

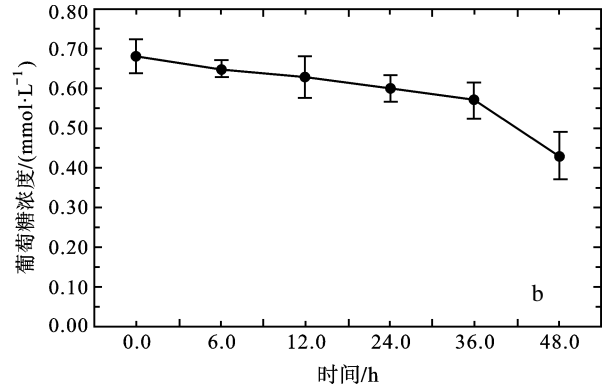
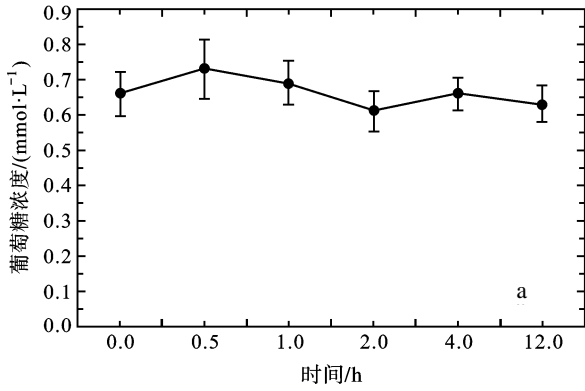


图2 投饵和饥饿条件对中华绒螯蟹血糖浓度影响

Fig.2 The effects of feeding and starvation on blood glucose in *E. sinensis*
a. 投饵条件; b. 饥饿条件

神经内分泌细胞表达的高电压激活钙通道的电生理特性和 I_{Ca} 幅值没有明显的影响; 而高浓度葡萄糖明显抑制了细胞 I_{Ca} , 但对钙通道的激活电压、失活电压和峰值电压等通道特征没有明显的影响(图3、图4)。

不同浓度的葡萄糖对中华绒螯蟹眼柄分泌 CHH 神经内分泌细胞 I_{Ca} 的抑制作用无显著差异, 灌流 3mmol/L 和 10mmol/L 葡萄糖 20min, 细胞 I_{Ca} 均受到明显的抑制, 抑制率分别达到 $49.40\% \pm 10.59\%$ 和 $45.95\% \pm 6.69\%$ (图5)。但是, 葡萄糖对细胞 I_{Ca} 的抑制作用存在明显的时间依赖性。灌流不同浓度的葡萄糖 5—10min, 细胞钙电流无明显的变化, 甚至增加了细胞钙通道的开放和细胞 I_{Ca} 的增大, 灌流 3mmol/L 葡萄糖的抑制率为 $16.02\% \pm 5.81\%$, 而灌流 10mmol/L 使细胞 I_{Ca} 增加 $7.58\% \pm 3.32\%$; 随着灌流时间的延长, 葡萄糖对细胞 I_{Ca} 的抑制作用逐渐增强, 至灌流 20min 时, 抑制率达到最大(图5)。

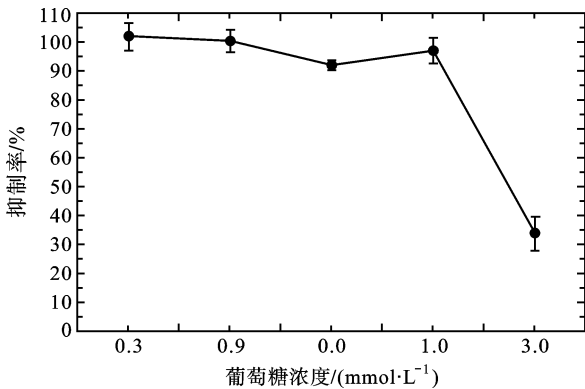


图3 灌流 0.3、0.9、1.0 和 3.0mmol/L 葡萄糖 20min 对 A 型细胞 I_{Ca} 的影响

Fig.3 The effect of glucose in different concentrations (0.3, 0.9, 1.0 and 3.0mmol/L) on I_{Ca} dissolved from type A cells in eyestalk of *E. sinensis* 20 min post-treatment

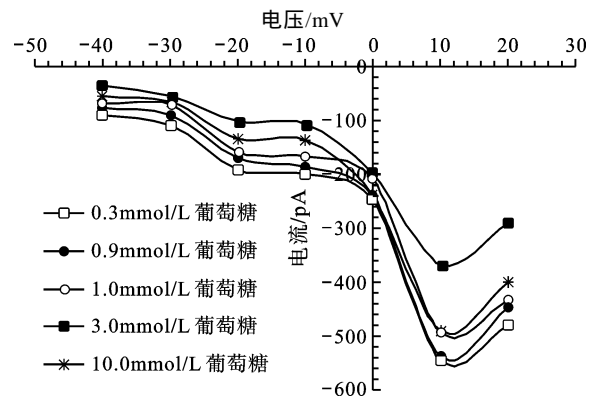


图4 灌流 0.3、0.9、1.0、3.0 和 10mmol/L 葡萄糖 20min 对钙通道 I-V 曲线的影响

Fig.4 The relation of glucose in different concentrations (0.3, 0.9, 1.0 and 3.0mmol/L) to I-V curves of I_{Ca} dissolved from type A cells in the eyestalk of *E. sinensis* 20min post-treatment

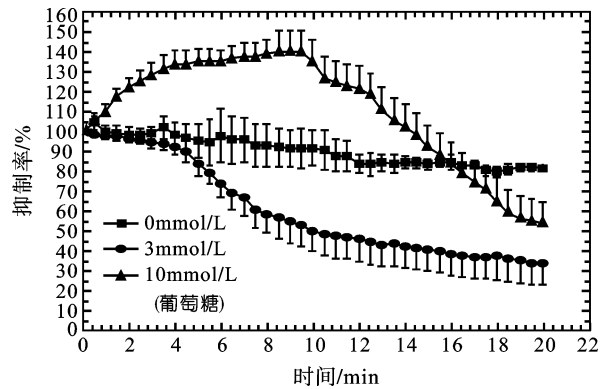


图5 灌流不同时间葡萄糖对中华绒螯蟹眼柄分泌 CHH 的 A 型细胞 I_{Ca} 影响

Fig.5 The inhibitory curves of different time of glucose on the I_{Ca} dissolved from type A cells in eyestalk of *E. sinensis* after treatment

注: 灌流葡萄糖浓度为 0、3 和 10mmol/L; 灌流时间为 0—20min, 每 30s 记录一次; 去极化电压为 +10mV, 80ms

3 讨论

离体培养的中华绒螯蟹眼柄分泌 CHH 神经内分泌细胞(A 型)的大小和形状与在体相似,胞体直径远大于 B 型和 C 型细胞,贴壁和生长速度快,1 天内神经元的形态已基本形成,易于辨别,并与玻璃微电极能够形成紧密封接,适于膜片钳研究(孙金生等,2000)。利用膜片钳技术,结合细胞膜电容的检测,可以在单个细胞水平实现对细胞兴奋和分泌活动的实时监测,并精确测量到每一次的囊泡分泌。对中华绒螯蟹眼柄神经内分泌细胞的研究结果显示,其细胞分泌 CHH 神经内分泌细胞只表达一种高电压激活钙通道,细胞内游离钙的升高启动了细胞的分泌过程(孙金生等,2003)。但是,钙离子通道不仅控制着钙离子的内流,还控制着流入细胞内钙离子的多少。开放的钙离子通道越多,形成的钙电流就越大,流入的钙离子就越多。本文结果表明,中华绒螯蟹眼柄 CHH 免疫阳性细胞 I_{Ca} 的大小与细胞的分泌强度呈明显的正相关,伴随 I_{Ca} 的增加,细胞膜电容的增加幅度也加大,细胞的分泌量也明显增强。这提示钙离子不仅启动了中华绒螯蟹眼柄 CHH 免疫阳性细胞的分泌过程,还调控者细胞分泌 CHH 神经多肽激素活动的强度和激素分泌量。

中华绒螯蟹的代谢活动和血糖水平受到眼柄神经内分泌系统合成和分泌的甲壳动物高糖激素(CHH)的精确调控,其血糖水平不受体内外环境变化的影响,在饥饿或摄食条件下仍然维持在 (0.43 ± 0.06) — (0.73 ± 0.08) mmol/L 的正常生理范围。作者给甲壳动物注射葡萄糖、乳酸及氨基酸等代谢相关因子的实验结果均显示,30min 内就可以在血淋巴中检测到 CHH 和葡萄糖的升高,并提出眼柄 CHH 的分泌活动存在快速调控机制的假设(孙金生等,2001a, b)。但是,这些研究受到复杂生理因素的干扰,虽然体内外环境因子通过调制 CHH 的合成和分泌影响甲壳动物的代谢和血糖水平,但对血糖等代谢产物对 CHH 合成和分泌的反馈调节作用还不清楚。作者通过实时监测中华绒螯蟹眼柄 MTXO 分泌 CHH 神经内分泌细胞的兴奋和分泌活动,发现高浓度血糖对高电压激活钙通道的开放活动和 I_{Ca} 产生明显的抑制作用,并影响细胞的分泌活动,且抑制作用在较短的时间内出现,并有明显的时间依赖性,随着灌流的时间越长,抑制作用逐渐增强,在 20min 内达到 $49.40\% \pm 10.59\%$ (3mmol/L)和 $45.95\% \pm 6.69\%$ (10mmol/L)。这进一步证

明中华绒螯蟹的代谢活动和代谢产物通过影响高电压激活钙通道的开放活动,对眼柄分泌 CHH 神经内分泌细胞的分泌活动产生快速调节作用,保障了中华绒螯蟹血糖水平维持在恒定的生理范围。高浓度血糖仅对高电压激活钙通道 I_{Ca} 产生抑制作用,但对通道的电生理特征没有影响,表明血糖对高电压激活钙通道抑制作用是间接产生的,关于血糖对中华绒螯蟹眼柄神经内分泌细胞高电压激活钙通道的调制过程和机制尚待进一步研究。

参 考 文 献

- 蔡生力, 1998. 甲壳动物内分泌学研究展望. 水产学报, 22(2): 154—161
- 康现江, 王所安, 1998. 中国对虾眼柄神经分泌结构. 河北大学学报, 18(1): 45—48
- 上官步敏, 李少菁, 1994. 锯缘青蟹 X 器官神经分泌细胞的细胞学研究. 海洋学报, 16(6): 116—121
- 上官步敏, 李少菁, 1995. 锯缘青蟹腺腺显微和超微结构研究. 动物学报, 41(4): 341—346
- 宋 霞, 周开亚, 马长艳, 2003. 中华绒螯蟹蜕皮抑制激素 1(MIH1)基因的 cDNA 片段克隆和 Northern 印迹分析. 中国水产科学, 10(5): 353—358
- 孙金生, 高春蕾, 相建海, 2003. 河蟹眼柄神经内分泌细胞胞吐分泌活动的实时监测. 海洋与湖沼, 34(5): 552—557
- 孙金生, 刘安西, 陈家童, 2000. 河蟹 MTXO 细胞的离体培养和细胞学研究. 水生生物学报, 24(4): 374—379
- 孙金生, 刘安西, 陈家童等, 2001a. 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, 刘安西, 贺秉军等, 2001b. 不同甾醇类物质对河蟹眼柄神经分泌细胞 I_{Ca} 的影响. 海洋与湖沼, 32(6): 627—634
- 孙金生, 赵景霞, 相建海, 2006. 5-羟色胺对中华绒螯蟹眼柄 MTXO 细胞兴奋和分泌活动的影响. 水产学报, 30(4): 450—453
- 王雪惠, 孙金生, 杨卫军, 2006. 中华绒螯蟹眼柄神经多肽激素(CHH)的分离纯化及活性鉴定. 水产学报, 30(2): 150—155
- 王在照, 2003. 中国对虾蜕皮抑制激素全长 cDNA 的克隆和序列分析. 遗传学报, 30: 128—134
- 姚 泊, 1995. 罗氏沼虾眼柄神经分泌细胞的超微结构. 中山大学学报论丛, (3): 64—67
- Cooke I M, Sullivan R E, 1982. Hormones and neurosecretion. In: Bliss D E ed. Biology of crustacea. New York: Academic Press, 3: 205—209
- Garcia U, 1998. Regulation of crustacean neurosecretory cell activity. Cell Mol Neurobiol, 18: 81—99
- Keller R, 1992. Crustacean neuropeptides structure, function and comparative aspects. Experimentia, 48: 439—448
- Lacombe C, Greve P, Martin G, 1999. Overview on the

sub-grouping of the crustacean hyperglycemic hormone family. *Neuropeptides*, 33: 71—80
Van Herp F, 1998. Molecular, cyclogical, and physiological as-

pects of the crustacean hyperglycemic hormones family. In: Coast G M, Webster S G ed. *Recent Advances in Arthropod Endocrinology*, 53—70

EFFECTS OF GLUCOSE ON I_{Ca} DISSOLVED FROM CHH-IMMUNOREACTIVE CELLS IN EYESTALKS OF CRAB *ERICHEIR SINENSIS*

FAN Xiao-Rui, SUN Jin-Sheng

(College of Chemistry and Life Sciences, Tianjin Normal University, Tianjin, 300387)

Abstract Chinese mitten crabs (*Eriocheir sinensis*) is one of the important economical valuable crustacean in China. Its X-organ-sinus gland (XO-SG) complex is an important neurosecretory organ analogous to vertebrate hypothalamo-neurohypophyseal system, from which some peptide hormones are produced, including crustacean hyperglycemia hormone (CHH), molt-inhibiting hormone (MIH), gonad-inhibiting hormone (GIH), and so on. These neuropeptides play a key role in regulating various important physiological processes, such as molting, reproduction, carbohydrate metabolism, pigment migration, and osmoregulation. Immunocytochemical localization and immunoblotting showed that the anti-CHH immunoreactive cells were located on the proximal surface of X-organ. The secretion activity stimulated by depolarized voltage was real-time monitored using whole cell patch clamp technique, and combined with membrane capacitance measurement in single cell after cell plating. CHH that regulated the metabolism and blood glucose level of organism was synthesized and secreted by type A neurosecretory cells dissociated from the MTXO in the eyestalks. At blood glucose of (0.43 ± 0.06) — (0.73 ± 0.08) mmol/L, the crabs were fed or starved in five concentrations of glucose, during which the effect of blood glucose on the I_{Ca} dissolved from the CHH-immunoreactive cells in the eyestalks was observed in whole cell patch clamp technique with real-time monitoring of cell membrane capacitance. The results show that the I_{Ca} is positively correlated with the secretion of CHH. In response to rapid application of varies glucose concentrations (0.3, 0.9, 1, 3, and 10mmol/L), I_{Ca} was inhibited by higher concentrations above 3mmol/L in 10—20min, and the electrophysiological characteristics of calcium channels, such as activation and inactivation potential, were not obviously altered. Therefore, the blood glucose could play negative feedback at the secretion of CHH to normal level by quickly reducing I_{Ca} from type A cells in the MTXO dissociated in the eyestalks.

Key words *Eriocheir sinensis*, Neurosecretory cell, Glucose, I_{Ca} , Patch clamp technique