

# 钙激活钾通道在中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*) 血淋巴细胞免疫中的作用研究\*

张亦陈<sup>1</sup> 高雪微<sup>1</sup> 孙妍<sup>2</sup> 耿绪云<sup>2</sup> 刘逸尘<sup>1</sup> 孙金生<sup>1,2</sup>

(1. 天津市动植物抗性重点实验室 天津师范大学生命科学院 天津 300387;

2. 天津市水生动物疫病预防控制中心 天津 300221)

**提要** 采用膜片钳技术解析了中华绒螯蟹血淋巴细胞表达的大电导钙激活钾通道(BK<sub>Ca</sub>),研究了中华绒螯蟹 BK<sub>Ca</sub>对血淋巴细胞吞噬和杀菌作用的影响,并探讨了其机制。结果表明,当Ca<sup>2+</sup>浓度在0.3—3.0μmol/L范围时,中华绒螯蟹血淋巴细胞表达的钙激活钾通道的开放表现出明显的钙依赖性;培养液中游离Ca<sup>2+</sup>的添加显著增强了血淋巴细胞的杀菌能力和呼吸爆发活性,但对其吞噬率和吞噬指数的影响不显著;在6mmol/L[Ca<sup>2+</sup>]浓度条件下,加入不同浓度的K<sub>Ca</sub>阻断剂四乙胺(Tetraethylammonium, TEA)后,血淋巴细胞的杀菌能力和呼吸爆发活性均显著降低,但其吞噬率和吞噬指数并未受到影响。这提示钙激活钾通道可能通过间接调节细胞内的钙离子浓度而在血淋巴细胞杀菌过程中发挥重要作用。

**关键词** 中华绒螯蟹, 血淋巴细胞, 钙激活钾通道, 吞噬, 杀菌, 呼吸爆发

**中图分类号** Q955

血淋巴系统是甲壳动物抵御外界侵染的重要屏障,在病原侵染引发的免疫应答反应中发挥着识别、吞噬、包囊、结节、杀菌等多重防御功能(Söderhäll *et al*, 1992)。血淋巴细胞在吞噬过程中常伴随着呼吸爆发现象,产生多种活性氧自由基,如超氧阴离子、过氧化氢、单线态氧和羟自由基等以杀灭细菌等外来异物(Klebanoff, 1975; 王宝杰等, 2003)。Bell等(1993)最先证实了甲壳动物血淋巴细胞存在呼吸爆发现象,随后,一些研究人员陆续报道了斑节对虾(*Penaeus monodon*)(Sung *et al*, 1996)、凡纳滨对虾(*Penaeus vannamei*)(Campa-Córdova *et al*, 2002; Wang *et al*, 2005)等血淋巴细胞在吞噬过程中伴随着呼吸爆发现象。中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)俗称河蟹(本文中以下称“河蟹”),属甲壳纲(Crustacea)、十足目(Decapoda),是我国重要经济蟹类之一,日益频繁的危害问题制约着河蟹养殖业的健康发展(陆宏达等, 1999; 徐海圣等, 2002; Wang *et al*, 2004)。研究表明,

河蟹血淋巴细胞对外界病毒和细菌的侵染具有较强吞噬能力(刘凯等, 2007)及体内清除细菌能力(陆宏达等, 2008),且本实验室已经利用膜片钳技术的内面向外模式发现了河蟹血淋巴细胞表达高电压钙激活钾通道(段虎等, 2010)。本文深入研究了钙激活钾通道的电生理特征及对细胞吞噬过程的影响,为阐明血淋巴细胞的免疫防御机制奠定了基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

实验蟹为养殖一龄蟹,取自天津市宁河县七里海河蟹养殖场,壳宽2—3cm。置室内水族箱暂养一周后,选择健康河蟹用于本实验。血淋巴细胞吞噬实验所用菌株为携带绿色荧光蛋白基因质粒的大肠杆菌。

### 1.2 血淋巴细胞的分离与培养

选择健康一龄蟹,经1—30碘伏浸泡消毒20min后置于超净台中。用医用纱布吸干表面残余碘伏,并

\* 国家高技术发展计划项目, 2012AA10A401号; 天津市应用基础研究计划项目, 10JCZDJC18200号; 国家科技支撑计划项目, 2012BAD13B07号; 农业部淡水水产种质资源重点开放实验室课题资助。张亦陈, E-mail: cnzhangyc@yahoo.com.cn

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

收稿日期: 2012-02-21, 收修改稿日期: 2012-03-30

经 75%酒精棉球擦拭其第四步足基部后,用一次性注射器自此部位抽取血淋巴,与抗凝剂等体积迅速混匀。4℃, 250g, 8min 离心收集血细胞,调整血淋巴细胞密度在 $(1.0-1.2)\times 10^6$  cells/ml,接种到 35mm 培养皿中(Costar), 23℃培养 60min。镜检确定大部分细胞已经贴壁后,换入 1.8ml 新鲜培养基。培养基为含 15%胎牛血清(HyClone)的改良 L-15 培养基(GIBCO, pH 7.5), 加 NaCl 调节培养基渗透压。临用前加入 1% 的双抗, 4mmol/L 谷氨酰胺, 0.20 $\mu$ m 微孔滤膜(Millipore)过滤除菌。选取培养 2—24h 形态特征典型的血淋巴细胞进行膜片钳测定。

### 1.3 膜片钳实验和数据的采集、处理

实验采用 EPC-10 膜片钳放大器(HEKA), 以膜片钳的内面向外式记录河蟹血淋巴细胞钙激活钾通道的活动。实验在室温(22—26℃)条件下进行。用 PULSE 软件完成数据的采集和储存,用 TAC+TACfit X4.1.3 软件(Bruyton Corp, USA)进行单通道数据分析。在对不同游离  $Ca^{2+}$  浓度的通道分析时,分别选取 5 个细胞,对每一膜片、同一钳制电压选择记录的 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。

电极内液为: 200mmol/L KCl, 10mmol/L HEPES, KOH 调 pH 至 7.4; 电极外液为 200mmol/L KCl, 10mmol/L HEPES, 5mmol/L EGTA[ethylene glycol-bis(2-amino-ethyl ether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid, Sigma]; 在溶液中分别添加 3.33、4.31、4.76mmol/L 的  $CaCl_2$  时得到游离 $[Ca^{2+}]$ 分别为 0.3、1.0、3.0 $\mu$ mol/L (Lara *et al.*, 1999)。当溶液中 EGTA 浓度为 2mmol/L,  $CaCl_2$  浓度为 2.1mmol/L 时,游离 $[Ca^{2+}]$ 为 100 $\mu$ mol/L, KOH 调 pH 至 7.2。电极内、外液经 0.20 $\mu$ m 微孔滤膜过滤除菌, 4℃保存备用。

### 1.4 吞噬实验

取 100 $\mu$ l 血细胞悬液滴于处理过的盖玻片上, 23℃ 孵育 3h; 分组及药物处理如下: 0mmol/L TEA 组、20mmol/L TEA 组、40mmol/L TEA 组, 其中每个 TEA 浓度组又包括添加  $Ca^{2+}$  组和无  $Ca^{2+}$  组; TEA 孵育 20min, 每组 4 个平行; 各组加菌孵育 2h(菌液浓度:  $1\times 10^7$  cells/ml 菌液); 经 PBS 清洗后 4%多聚甲醛室温固定 10min, 封片镜检, 随机选取 100 个细胞, 计算吞噬率、吞噬指数, 判断吞噬的标准参照宋林生等(2004)和饶小珍等(2007)的方法。

吞噬率 = (吞噬大肠杆菌的血淋巴细胞数/100 个被计数的血淋巴细胞)  $\times$  100%

吞噬指数 = 被吞噬的大肠杆菌数/100 个被计数的血淋巴细胞

### 1.5 杀菌实验

血淋巴细胞分离与培养, 实验分组与菌孵育等步骤同 1.4。处理因素干预结束后, 经 PBS 清洗用 1% Triton-X 100 裂解细胞, 吸取 10 $\mu$ l 裂解液加入到 75mm 培养皿中, 并向培养皿中补加 15ml LB 培养基(含 100 $\mu$ g/ml 氨苄青霉素), 混匀, 凝固后, 37℃过夜培养, 计数菌落形成单位(CFU)。

### 1.6 呼吸爆发活性分析

将河蟹血淋巴细胞接种于 96 孔细胞培养板[(1—2) $\times 10^5$  cells/孔], 23℃培养 4h; 分组及药物处理: 空白组(无  $Ca^{2+}$ , 无 TEA, 无菌刺激), 0mmol/L TEA, 10mmol/L TEA, 20mmol/L TEA 和 40mmol/L TEA 处理组, 其中每个 TEA 浓度组又包括添加  $Ca^{2+}$  组和无  $Ca^{2+}$  组; TEA 孵育 20min, 每组 4 个平行; 除了空白组外, 其余各组加入大肠杆菌孵育 2h ( $1\times 10^7$  cells/ml 菌液); 处理因素干预结束后, 参照 Chung 等(1988)的方法进行呼吸爆发活性分析, 反应完成后使用酶标仪(Bio-Rad)在波长 630nm 处测定各孔的吸光度(A)值。

### 1.7 统计分析

使用 SPSS17.0 统计软件进行数据统计及分析。钙激活钾通道( $K_{Ca}$ )对血淋巴细胞吞噬、杀菌能力和呼吸爆发的影响, 采用二元方差分析(ANOVA)、LSD 多重比较( $P<0.05$ )及  $t$  检验; 对不同游离  $Ca^{2+}$  浓度的通道分析作单因素方差分析(One-way ANOVA); 吞噬率在统计分析前作反正弦函数转换。

## 2 结果

### 2.1 钙激活钾通道( $K_{Ca}$ )特征

在高对称钾溶液(电极内、外液  $K^+$  浓度为 200mmol/L)条件下形成内面向外记录模式后, 分别灌流含不同浓度  $Ca^{2+}$  溶液(0.3、1.0、3.0 和 100 $\mu$ mol/L), 在 -60mV 钳制电压下, 观察河蟹血淋巴细胞上  $K_{Ca}$  的活动。结果显示, 随溶液中  $Ca^{2+}$  浓度的增加(0.3、1.0 和 3.0 $\mu$ mol/L),  $BK_{Ca}$  通道开放概率明显增大[分别为 (0.1639 $\pm$ 0.0022)、(0.6285 $\pm$ 0.0080)和(0.9496 $\pm$ 0.0106),  $P<0.01$ ], 平均开放时间显著延长[分别为 (0.0295 $\pm$ 0.0207)s、(0.0724 $\pm$ 0.0149)s 和 (0.0613 $\pm$ 0.0137)s,  $P<0.01$ ], 表明在 0.3—3.0 $\mu$ mol/L  $Ca^{2+}$  浓度范围内, 河蟹血淋巴细胞表达的  $BK_{Ca}$  通道具有显著的钙依赖活性。但当溶液中  $Ca^{2+}$  浓度达到 100 $\mu$ mol/L 时,  $BK_{Ca}$  通道开放时间缩短[(0.0207 $\pm$ 0.0041)s], 开放概率降低

( $0.2154 \pm 0.0372$ ), 显示高浓度  $\text{Ca}^{2+}$  在一定程度上抑制通道的开放。

## 2.2 钙激活钾通道( $\text{K}_{\text{Ca}}$ )对血淋巴细胞吞噬能力的影响

根据钙激活钾通道( $\text{K}_{\text{Ca}}$ )的电生理特征, 采用  $\text{K}_{\text{Ca}}$  激活剂  $6\text{mmol/L}$   $[\text{Ca}^{2+}]$  及不同浓度梯度的  $\text{K}_{\text{Ca}}$  阻断剂 TEA 作用于河蟹血淋巴细胞, 观察  $\text{K}_{\text{Ca}}$  通道对该类细胞吞噬活性的影响, 结果如图 1 所示: 向溶液中添加  $6\text{mmol/L}$   $[\text{Ca}^{2+}]$ , 用不同浓度的 TEA 抑制血淋巴细胞上  $\text{K}_{\text{Ca}}$  的开放, 测得其对大肠杆菌的吞噬率分别为  $8.897\% \pm 0.664\%$ 、 $8.747\% \pm 1.068\%$  和  $8.417\% \pm 1.098\%$ , 吞噬指数分别为  $0.030 \pm 0.009$ 、 $0.025 \pm 0.005$  和  $0.022 \pm 0.006$ ; 在无  $\text{Ca}^{2+}$  添加的情况下, 用不同浓度的 TEA 抑制血淋巴细胞上  $\text{K}_{\text{Ca}}$  的开放, 测得其对大肠杆菌的吞噬率分别为  $8.690\% \pm 0.970\%$ 、 $8.827\% \pm 0.756\%$  和  $8.677\% \pm 1.134\%$ , 吞噬指数分别为  $0.023 \pm 0.0050$ 、 $0.023 \pm 0.004$  和  $0.026 \pm 0.006$ , 统计分析显示:  $\text{K}_{\text{Ca}}$  通道阻断剂 TEA 对血淋巴细胞吞噬大肠杆菌的吞噬率 ( $P > 0.05$ ) 和吞噬指数 ( $P > 0.05$ ) 的影响不显著; 有无  $\text{Ca}^{2+}$  的添加不影响血淋巴细胞吞噬大肠杆菌的吞噬率 ( $P > 0.05$ ) 和吞噬指数 ( $P > 0.05$ ), 可见  $\text{K}_{\text{Ca}}$  通道对血淋巴细胞的吞噬过程影响并不显著。

## 2.3 钙激活钾通道( $\text{K}_{\text{Ca}}$ )对血淋巴细胞杀菌能力的影响

分析  $\text{K}_{\text{Ca}}$  对血淋巴细胞杀菌能力的影响, 血淋巴细胞的处理与上述相同, 结果如图 2 所示: 在不添加 TEA 的情况下, 向溶液中添加  $6\text{mmol/L}$   $[\text{Ca}^{2+}]$  组的血

淋巴细胞杀菌能力最强, 胞内活菌存活数最小为  $5755\text{CFU/ml}$ , 远小于未添加  $\text{Ca}^{2+}$  的处理组  $9300\text{CFU/ml}$  ( $P < 0.01$ ); 在溶液中存在  $6\text{mmol/L}$   $[\text{Ca}^{2+}]$  的条件下, 随着  $\text{K}_{\text{Ca}}$  通道阻断剂 TEA 添加浓度的不断增加, 杀菌能力逐渐减弱, 胞内活菌数从  $7433\text{CFU/ml}$  逐渐增加到  $8722\text{CFU/ml}$  ( $P < 0.01$ ); 由此可见,  $\text{Ca}^{2+}$  刺激了  $\text{K}_{\text{Ca}}$  通道的开启, 极显著地增强了血淋巴细胞的杀菌能力; 而阻断剂 TEA 的加入, 能极显著地抑制血淋巴细胞的杀菌能力。

## 2.4 钙激活钾通道( $\text{K}_{\text{Ca}}$ )对血淋巴细胞呼吸爆发的影响

通过病原菌刺激, 分析  $\text{K}_{\text{Ca}}$  通道的关闭与开放对河蟹血淋巴细胞呼吸爆发强度的影响, 利用 NBT 还原法检测河蟹血淋巴细胞的呼吸爆发强度, 结果如图 3 所示: 与空白组还原 NBT 的能力 ( $0.171 \pm 0.003$ ) 相比, 只受到细菌刺激后的血淋巴细胞 ( $0\text{mmol/L}$  TEA,  $0\text{mmol/L}$   $\text{Ca}^{2+}$  组) 还原 NBT 能力为  $0.372 \pm 0.0557$ , 说明细菌的刺激诱发了呼吸爆发的产生; 在不添加 TEA 的情况下, 向溶液中加入  $6\text{mmol/L}$   $[\text{Ca}^{2+}]$ , 河蟹血淋巴细胞还原 NBT 的能力极显著提高, 由  $0.372 \pm 0.0557$  增长到  $0.597 \pm 0.0371$  ( $P < 0.01$ ), 在溶液中存在  $6\text{mmol/L}$   $[\text{Ca}^{2+}]$  的条件下, 随着  $\text{K}_{\text{Ca}}$  通道阻断剂 TEA 添加浓度的不断增加, 血淋巴细胞还原 NBT 的能力极显著降低, 由  $0.509 \pm 0.0627$  降低到  $0.372 \pm 0.0412$  ( $P < 0.01$ )。可见,  $\text{Ca}^{2+}$  刺激了  $\text{K}_{\text{Ca}}$  通道的开启, 极显著地增强了血淋巴细胞的呼吸爆发强度, 而阻断剂

TEA 的加入极显著地抑制了血淋巴细胞的呼吸爆发强度。

## 3 讨论

目前通过血淋巴细胞上的离子通道来探讨甲壳动物先天性免疫机制的研究还未见报道, 相关研究主要集中在哺乳动物中。已有实验证明  $\text{KV1.3}$  通道和  $\text{IK}_{\text{Ca}}$  通道在巨噬细胞和 T 淋巴细胞的活化和增殖过程中起到了重要的作用 (Grissmer

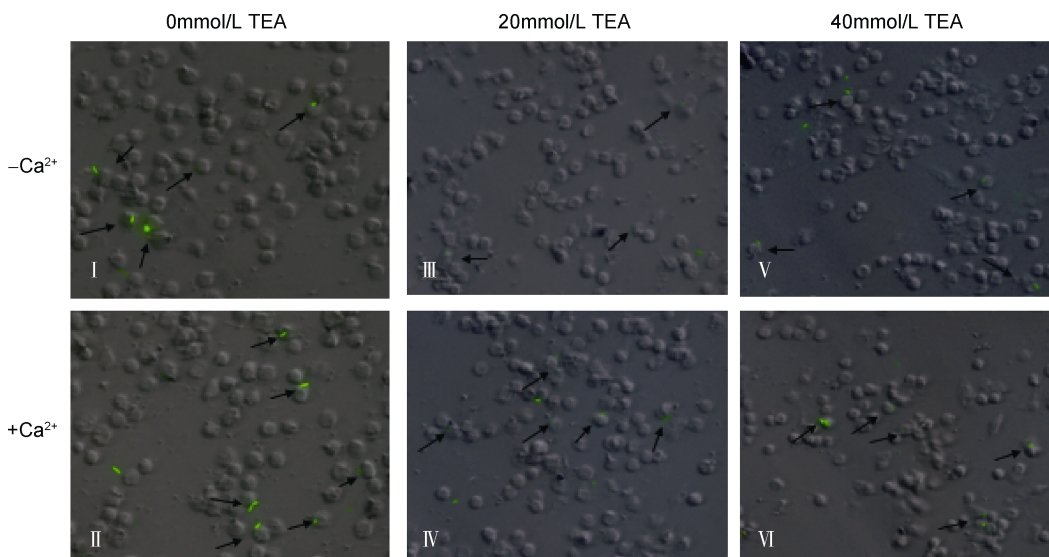


图 1 TEA 和钙离子对血淋巴细胞吞噬能力的影响

Fig.1 The effect of TEA and  $\text{Ca}^{2+}$  on the phagocytosis of haemocytes from *E. sinensis*  
 : 对照组(无  $\text{Ca}^{2+}$  和 TEA); : 添加  $6\text{mmol/L}$  游离  $\text{Ca}^{2+}$ ; : 添加  $20\text{mmol/L}$  TEA; : 添加  $6\text{mmol/L}$  游离  $\text{Ca}^{2+}$  和  $20\text{mmol/L}$  TEA; : 添加  $40\text{mmol/L}$  TEA; : 添加  $6\text{mmol/L}$  游离  $\text{Ca}^{2+}$  和  $40\text{mmol/L}$  TEA

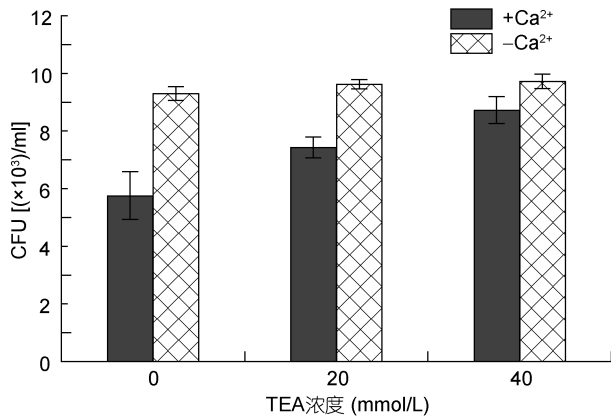


图2 TEA及钙离子对河蟹血淋巴细胞杀菌能力的影响  
Fig.2 The effect of TEA and Ca<sup>2+</sup> on the bactericidal activity of haemocytes from *E. sinensis*

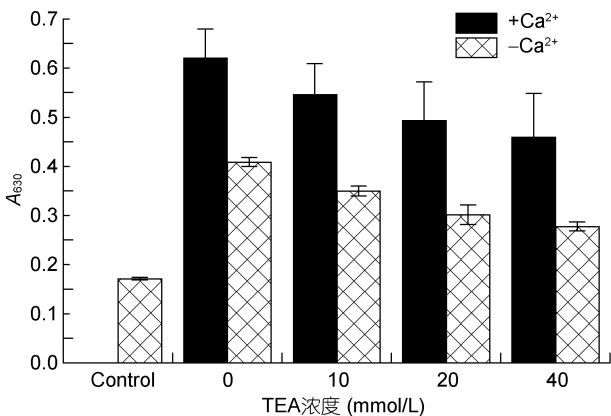


图3 TEA和钙离子对河蟹血淋巴细胞呼吸爆发活性的影响  
Fig.3 The effect of TEA and Ca<sup>2+</sup> on the respiratory burst activity of haemocytes from *E. sinensis*

*et al.*, 1993; Qiu *et al.*, 2002)。Ahluwalia 等(2004)研究发现, 当中性粒细胞的 BK<sub>Ca</sub> 通道被阻断后, 抗原呈递、病原微生物的杀灭和消化过程也随之停止, 因此本文尝试以河蟹血淋巴细胞为研究对象探究甲壳动物的先天免疫机制。作者首先采用膜片钳技术发现了血淋巴细胞上表达 BK<sub>Ca</sub> 和 IK<sub>Ca</sub> 通道, 且它们都具有不同程度的钙依赖性。同时, 对体外培养的血蟹血淋巴细胞施以 Ca<sup>2+</sup> 和不同浓度的 TEA 处理后, 来检测其应对病原菌刺激时的免疫学活性。结果发现 Ca<sup>2+</sup> 显著提升了血淋巴细胞的杀菌能力和呼吸爆发活性, 这表明胞外 Ca<sup>2+</sup> 通过 Ca<sup>2+</sup> 通道进入胞内, 开启 K<sub>Ca</sub> 通道的同时, 也作为第二信使激活了淋巴细胞, 增强了免疫杀菌作用。而添加阻断剂 TEA 后, 这种增强作用明显受到抑制, 表明 K<sub>Ca</sub> 通道的关闭, 削弱了血淋巴细胞对病原菌的杀伤能力, 这与 Jensen 等(1999)选择性地阻断 K<sub>Ca</sub> 通道后发现 T 淋巴细胞的增殖受到抑

制的结论相类似。由此可以推测: 在河蟹体内, 当病原菌入侵时, 血淋巴细胞内 Ca<sup>2+</sup> 浓度的升高, 可激活 K<sub>Ca</sub> 通道, 促使 K<sup>+</sup> 流向胞外, 导致膜电位发生变化, 这有利于胞外 Ca<sup>2+</sup> 顺电位梯度进入胞内。这种正反馈调节作用, 促使胞内 Ca<sup>2+</sup> 进一步升高, 进而来激活淋巴细胞, 发挥免疫功能。而 Ca<sup>2+</sup> 和 TEA 处理后血淋巴细胞的吞噬率和吞噬指数并没有受到影响, 作者认为由于血淋巴细胞对病原微生物的吞入过程主要与细胞膜的流动性有关, 而 K<sub>Ca</sub> 通道的开关状态可能对该过程的影响不大。

## 参 考 文 献

- 王宝杰, 王 雷, 2003. 中国对虾血细胞吞噬活动中超氧阴离子(O<sub>2</sub><sup>-</sup>)的产生. 中国水产科学, 10(1): 14—18
- 刘 凯, 陆宏达, 2007. 中华绒螯蟹血细胞体外吞噬能力的研究. 南方水产, 3(6): 47—51
- 宋林生, 季延宾, 蔡中华等, 2004. 温度骤升对中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)几种免疫化学指标的影响. 海洋与湖沼, 35(1): 74—77
- 陆宏达, 刘 凯, 2008. 中华绒螯蟹对体内细菌的清除作用. 中国水产科学, 15(1): 113—121
- 陆宏达, 范丽萍, 薛 美, 1999. 中华绒螯蟹小核糖核酸病毒病及其组织病理学. 水产学报, 23(1): 61—68
- 段 虎, 王雪惠, 孙金生, 2010. 中华绒螯蟹血淋巴细胞钙激活钾通道研究. 海洋科学, 34(5): 55—61
- 饶小珍, 陈寅山, 林 岗等, 2007. 九孔鲍血细胞吞噬能力的研究. 海洋水产研究, 28(2): 56—62
- 徐海圣, 舒妙安, 占秀安等, 2002. 养殖河蟹弧菌病原菌分离鉴定及其胞外产物的致病性. 水产学报, 26(4): 357—362
- Ahluwalia J, Tinker A, Clapp L H *et al.*, 2004. The large-conductance Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channel is essential for innate immunity. *Nature*, 427(6977): 853—858
- Bell K L, Smith V J, 1993. *In vitro* superoxide production by hyaline cells of the shore crab *Carcinus maenas* (L.). *Developmental and Comparative Immunology*, May—Jun, 17(3): 211—219
- Campa-Córdova A I, Hernández-Saavedra N Y, De Philippis R *et al.*, 2002. Generation of superoxide anion and SOD activity in haemocytes and muscle of American white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) as a response to β-glucan and sulphated polysaccharide. *Fish & Shellfish Immunology*, 12(4): 353—366
- Chung S, Secombes C J, 1988. Analysis of events occurring within teleost macrophages during the respiratory burst. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry*, 89: 539—544
- Grissmer S, Nguyen A N, Cahalan M D, 1993. Calcium-activated potassium channels in resting and activated human T lym-

- phocytes. Expression levels, calcium dependence, ion selectivity, and pharmacology. *The Journal of General Physiology*, 102(4): 601—630
- Jensen B S, Odum N, Jorgensen N K *et al*, 1999. Inhibition of T cell proliferation inhibition of T cell proliferation by selective block of  $\text{Ca}^{2+}$ -activated  $\text{K}^+$  channels. *Physiology*, 56: 10917—10921
- Klebanoff S J, 1975. Antimicrobial mechanisms in neutrophilic polymorphonuclear leukocytes. *Seminars in Hematology*, 12: 117—142
- Lara J, Acevedo J J, Onetti C G, 1999. Large-conductance  $\text{Ca}^{2+}$ -activated potassium channels in secretory neurons. *Journal of Neurophysiology*, 82(3): 1317—1325
- Qiu M R, Campbell T J, Breit S N, 2002. A potassium ion channel is involved in cytokine production by activated human macrophages. *Clinical & Experimental Immunology*, 130: 67—74
- Söderhäll K, Cerenius L, 1992. Crustacean immunity. *Annual Review of Fish Diseases*, 2: 3—23
- Sung H H, Yang Y L, Song Y L, 1996. Enhancement of microbicidal activity in the tiger shrimp *Penaeus monodon* via immunostimulation. *Journal of Crustacean Biology*, 16: 285—297
- Wang L U, Chen J C, 2005. The immune response of white shrimp *Litopenaeus vannamei* and its susceptibility to *Vibrio alginolyticus* at different salinity levels. *Fish & Shellfish Immunology*, 18(4): 269—278
- Wang W, Wen B H, Gasparich G E *et al*, 2004. A spiroplasma associated with tremor disease in the Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*). *Microbiology*, 150: 3035—3040

## EFFECTS OF CALCIUM-ACTIVATED POTASSIUM CHANNELS ON IMMUNE ACTIVITIES OF HAEMOCYTES IN CHINESE MITTEN CRAB *ERIOCHEIR SINENSIS*

ZHANG Yi-Chen<sup>1</sup>, GAO Xue-Wei<sup>1</sup>, SUN Yan<sup>2</sup>, GENG Xu-Yun<sup>2</sup>,  
LIU Yi-Chen<sup>1</sup>, SUN Jin-Sheng<sup>1, 2</sup>

(1. Tianjin Key Laboratory of Animal and Plant Resistance, College of Life Science, Tianjin Normal University, Tianjin, 300387; 2. Tianjin Aquatic Animal Infectious Disease Control and Prevention Center, Tianjin, 300221)

**Abstract** Inside-out patch clamp technique was used to study the calcium sensitivity of calcium-activated potassium channel ( $\text{BK}_{\text{Ca}}$ ) on haemocytes from Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*). Effects and mechanism of  $\text{BK}_{\text{Ca}}$  on phagocytosis and bactericidal activity of haemocytes were also analyzed. The results showed that the opening probability of  $\text{BK}_{\text{Ca}}$  channel had significant calcium-dependent activity in the concentration of  $\text{Ca}^{2+}$  at the range of 0.3—3.0  $\mu\text{mol/L}$ . Though there were no significant effects on the phagocytosis of haemocytes with  $\text{Ca}^{2+}$  or TEA adding ( $P > 0.05$ ), the bactericidal and respiratory burst activities were enhanced with appropriate  $\text{Ca}^{2+}$  (activator of  $\text{K}_{\text{Ca}}$  channel) adding and decreased significantly with 6mmol/L [ $\text{Ca}^{2+}$ ] and different concentration of TEA (inhibitor of  $\text{K}_{\text{Ca}}$  channel) adding ( $P < 0.01$ ). It could be deduced that  $\text{K}_{\text{Ca}}$  channels play an essential role in innate immunity of crustacean, by regulating the intracellular [ $\text{Ca}^{2+}$ ] indirectly.

**Key words** *Eriocheir sinensis*, Haemocytes, Calcium-activated potassium channel, Phagocytosis, Bactericidal activity, Respiratory burst