

文章编号: 1000- 0615(2001)02- 0175- 06

• 综述 •

甲壳动物 CHH 家族神经激素结构和功能研究进展

A review on the structure and function of crustacean hyperglycemic neurohormone family

王在照, 相建海

(中国科学院海洋研究所实验海洋生物学开放研究实验室, 山东 青岛 266071)

WANG Zai-zhao, XIANG Jian-hai

(*Experimental Marine Biology Laboratory Institute of Oceanology, CAS, Qingdao 266071, China*)

关键词: 甲壳动物; 神经激素; 甲壳动物高血糖激素; 性腺抑制激素; 蜕皮抑制激素; 大颚器官抑制激素

Key words: Crustacean; neurohormone; crustacean hyperglycemic hormone; gonad-inhibiting hormone; molt-inhibiting hormone; mandibular organ-inhibiting hormone

中图分类号: Q959. 223; Q57 文献标识码: A

甲壳动物主要利用温度、光照周期等外界因子调节其生理状态,使它们的生殖活动处于最适条件下,来自外界因子的这些信息作用于甲壳动物的中枢神经系统,后者将其传递到神经内分泌系统和内分泌系统,神经内分泌系统和内分泌系统能够分泌一些促进因子和抑制因子以实施对性腺活动的调控。由于甲壳动物成体的生殖和蜕皮常常交替出现,因此,神经内分泌系统和内分泌系统的精确调控非常重要。甲壳动物高血糖激素(CHH)家族神经激素是甲壳动物特有的多肽激素,它们主要由眼柄的 X-器官窦腺复合体合成,它们包括:甲壳动物高血糖激素(CHH)、性腺抑制激素(GIH)、蜕皮抑制激素(MIH)和大颚器官抑制激素(MOIH)。由于这一组神经肽的一级结构与 CHH 有许多相同之处,它们就被称作 CHH 家族神经激素。长期以来,由于实验手段的局限性,神经内分泌和内分泌的调控功能被理解得过于简单化,例如,过去人们一直认为参与雌性甲壳动物卵巢发育调控的只有两个相互拮抗的神经激素:性腺抑制激素(GIH)和性腺促进激素(GSH),但是现在人们普遍认为甲壳动物的生殖调控是在多激素的基础上进行的,它们直接或间接地影响性腺发育、性别分化和交配行为。

1 CHH 家族神经激素的分子结构和功能特征

在早期研究中人们从一些传统的生理学实验中认识了神经激素的生理功能,这些实验方法包括切除或移植神经内分泌组织和注射组织提取物或异源生物活性物质。近年来随着高效的化学分析方法包括反相高效液相色谱(RP-HPLC)、质谱分析、气相微量蛋白测序等,以及分子生物学方法包括 PCR、cDNA 克隆等的普遍采用,多种甲壳动物神经肽的一级结构已经测定。

甲壳动物的神经激素可以分为两大类:促色素细胞激素和 CHH 家族激素,前者主要包括红色素聚集激素(RPCH)和色素分散激素(PDH);CHH 家族神经肽各成员的结构特征又不尽相同,尽管 GIH 和 MIH 一级结构中形成二硫键的半胱氨酸的位置以及保守氨基酸序列绝大多数与 CHH 的相同,但是 CHH 的前激素原结构组成中比 GIH 和 MIH 多一个 CHH 前体相关肽(CPRP),它位于信号肽与神经激素之间,而 GIH 和 MIH 前激素原的神经激素前面直接连有信号肽^[1],因此

收稿日期: 2000-04-21

基金项目: 国家重点基础研究发展规划资助项目(G 1999012007)

第一作者: 王在照(1969-),男,山东蒙阴县人,博士生,现从事海洋生物学研究。Tel: 0532-2879062 转 5306, E-mail: xbyc@ms.qdao.

CHH 家族中的 GIH、MIH 与 CHH 属不同类型。

1.1 性腺抑制激素(GIH)

1991年 Soyez 等^[2]对美洲龙虾 *Homarus americanus* GIH 的一级结构进行了完整的序列测定。他们采用气相微量蛋白测序和快速原子轰击质谱分析(FAB-MS)的方法对其结构进行了研究。美洲龙虾 GIH 的性腺抑制活性是采用异种体内活性测定的方法确定的^[3]。应用 RP-HPLC 方法分离美洲龙虾眼柄提取物只得到一种有生物活性的多肽,这种多肽由 77 个氨基酸组成,它具有一个自由 N-末端和三个二硫键,分子量是 9135Da,等电点是 pH6.8。在其它的研究中 GIH 的一个异构体被确定,该异构体的氨基酸序列与 GIH 的相同,但没有生物活性。De Kleijn 等^[4]对编码美洲龙虾的 GIH 前激素原的 mRNA 进行了克隆和表达研究,该研究表明这种多肽的开放阅读框由一个编码信号肽的序列和它后面的编码 GIH 多肽的序列组成,编码 GIH 的 mRNA 序列与前面提及的 GIH 氨基酸的序列具有 98% 的相似性。美洲龙虾的 GIH 具有一种前激素原和两种多肽异构体,这种现象说明在其基因表达中可能存在翻译后调控。

1.2 甲壳动物高血糖激素(CHH)

CHH 主要参与甲壳动物血糖水平的调控,它对生殖活动也具有促进作用。目前已对下列甲壳动物的 CHH 进行了氨基酸序列测定:普通滨蟹(*Carcinus maenas*)^[5]、美洲龙虾^[6]、寻常平甲虫(*Armadillidium vulgare*)^[7]、泥污鲸螯虾(*Orconectes limosus*)^[8]、原螯虾(*Procambarus bowieri*)^[9]、克氏原螯虾(*Procambarus clarkii*)^[10]。甲壳动物的 CHH 氨基酸序列具有较高的保守性,不同种的 CHH 间的同源性比例均高于 55%,CHH 的主要特征有:(1)氨基酸残基数目相同(72 或 73);(2)肽链上 Cys 残基位置的保守性;(3)肽链核心部位存在保守氨基酸序列。

在多数种类都存在 CHH 多型性现象,在美洲龙虾的窦腺中的 CHH 有两种形式:CHH-A 和 CHH-B,它们的序列中有 6 个残基氨基酸存在差异,每种形式的 CHH 具有两种异构体,1994 年 Soyez 等^[11]报道这些异构体仅仅是由于一个氨基酸残基构象的不同而引起的:它们的第三个氨基酸是 L-Phe 或 D-Phe,因此它的 CHH 有 4 种:L-Phe³-CHH-A、D-Phe³-CHH-A、L-Phe³-CHH-B、D-Phe³-CHH-B。其中的 CHH-B 对生殖活动具有促进作用,对雌性无小长臂虾(*Palaeomonetes varians*)的非卵黄发生期卵进行异种体内活性检测证明 CHH-B 具有这种功能^[12]。用两种 CHH-B 异构体进行同种体外活性检测也发现它们具有相同的活性^[13],这一实验证明 CHH-B 能够促进卵巢对卵黄蛋白原的吸收。因此,美洲龙虾的 CHH 不仅能控制血糖代谢,而且对生殖调控也起重要作用。在其它甲壳动物同样存在 CHH 的结构多型性和功能多样性,泥污鲸螯虾具有两组 CHH 免疫活性的多肽^[14],第一组由两个异构体组成,其储存形式的神经肽的氨基酸序列及编码其前激素原的核苷酸序列已被测定^[4,8],这两种异构体具有高效的高血糖活性^[14];第二组 CHH 免疫活性的多肽可能具有抑制蛻皮的功能^[15]。在原螯虾也存在 4 种 CHH 异构体,其中包括占大多数的具有高血糖活性的一对异构体,还有两种占少数的具有抑制活性的多肽,其中一种抑制蛻皮另一种抑制性腺的成熟^[9]。此外克氏原螯虾同样存在 CHH 多型性和功能多样性的现象^[10]。因此,螯虾除了具有高效的高血糖活性的 CHH 异构体以外,还有参与蛻皮和生殖调节的异构体。而普通滨蟹只有一组 CHH 免疫活性的两种多肽,这两种多肽的氨基酸组成相同,但它们在体内的数量不同^[5],其唯一的前激素原的氨基酸序列也已经测定^[6]。

1.3 蛻皮抑制激素(MIH)

MIH 对 Y-器官蛻皮类固醇的合成有抑制作用。1991 年 Webster 和 Dirksen^[17]已经对普通滨蟹的 MIH 前激素原序列进行了测定。近些年来,有更多的甲壳动物的 MIH 序列被测定,这些动物包括:凡纳对虾(*Penaeus vannamei*)^[18]、优游蟹(*Callinectes sapidus*)^[19]、日本对虾(*Penaeus japonicus*)^[20]、刀额新对虾(*Metapenaeus ensis*)^[21]、黄道蟹(*Cancer migiaster*)^[22]和 *Charybdis feriatus*^[23]。通过对优游蟹蛻皮周期中眼柄内编码 MIH 的 mRNA 进行 Northern 印迹分析表明,在蛻皮前期 MIH 的 mRNA 水平逐渐降低,到蛻皮晚前期达到最低,蛻皮以后 MIH 的 mRNA 水平突然升高十倍,在蛻皮间期持续升高^[24],这在 mRNA 水平证实了 MIH 的生理功能。

1.4 大颚器官抑制激素(MOIH)

1993 年 Laufer 等^[25]发现大颚器官的分泌活动受眼柄因子的抑制,切除眼柄可引起大颚器官的增生和血淋巴中法尼酸甲酯(MF)的增加,窦腺提取物的体内和体外生物活性检测实验都证明它能够降低 MF 的分泌速度。1994 年 Laufer 等^[26]发现克氏原螯虾的一种 CHH 异构体对大颚器官 MF 的合成有抑制效应。而在蜘蛛蟹(*Libinia emarginata*)和美洲龙虾,对 MF 合成起调节作用并不是 CHH,而是眼柄中的另外一种神经肽^[27,28],目前具有这种活性的神经肽的结构还未研究清楚。而另外的两个研究表明 CHH 家族的某些神经肽能够在体外实验中抑制 MF 的分泌活动,因此可以把这些激素称作大颚器官抑制激素(MOIH)。Wainwright 等^[29]已经确定普通黄道蟹的两种 MOIH,它们都由 78 个氨基酸组成,它们之间只有一个氨基酸的差异,这两种多肽与蟹的 MIH 和龙虾的 GIH 在结构上非常相似。此外,Liu 和 Laufer^[30]从蜘蛛蟹(*L. emarginata*)的窦腺中纯化到了三种对 MF 合成有抑制作用的多肽,这些多肽由 72~76 个氨基酸组成,它们被看作

一组异构体, 其中一种 MOIH 的部分氨基酸序列与普通滨蟹的 CHH 相似。

2 CHH 家族神经肽在细胞水平的研究

在过去很长的一段时间内, 一些调控因子的合成部位主要是通过移植、切除、注射、提取等方法间接确定的。目前由于特异性抗血清制备技术和分子生物学探针技术的发展, 可以应用免疫细胞化学和原位杂交的方法在细胞水平研究 CHH 家族神经肽。在八十年代对蟹、螯虾、龙虾、对虾等进行免疫化学研究表明, CHH、MIH 和 GIH 等都在 X-器官腺复合体的同一区域合成。用同样的免疫化学方法研究龙虾的幼体和胚胎表明在无节幼体后期就已出现 CHH 和 GIH^[31, 32], 而 MIH 从蟹的第一期幼体开始出现^[17]。应用非放射性 cDNA 探针技术已经对有些种类的神经肽的表达进行了研究, 它们包括泥污鲸螯虾的 CHH、美洲龙虾的 GIH 和 CHH 及普通滨蟹的 MIH^[14, 33-35]。这些研究结果与免疫细胞化学定位的结果是一致的。另外, 原位杂交的方法与免疫细胞化学染色的方法结合能够同时在 mRNA 水平和蛋白质水平检测 X-器官腺复合体的分泌活动。例如, 有人对成体美洲龙虾的雌雄个体及其幼体的合成 CHH 和 GIH 的神经内分泌细胞做了这样的研究^[34, 31]。其研究结果表明从幼体发育到成体合成 CHH 的细胞数目加倍, 而合成 GIH 的细胞数目保持稳定^[31]。这说明 CHH 家族的神经肽在雌雄甲壳动物的整个生活史中对生殖和蜕皮的调控起重要作用。

为了研究编码甲壳动物神经激素 mRNA 的组织分布, 也可采用其它分子生物学方法如 Northern 印迹分析和 RNase 保护分析, 将这些方法与显微观察的方法结合, 能为研究生殖周期中不同阶段的神经肽表达提供强有力的工具。运用 Northern 印迹分析方法确定泥污鲸螯虾的 CHH 前激素原和美洲龙虾的 GIH 前激素原的特异性表达, 表明它们只在眼柄的端髓表达。但对美洲龙虾的 CHH 前激素原 mRNA 在不同组织中进行 Northern 印迹分析表明, 编码 CHH 的 mRNA 也在腹神经系统表达^[36]。目前, RNase 保护分析方法已成功地用来检测泥污鲸螯虾的 CHH 前激素原基因表达是否存在转录水平或翻译水平的调控^[37]。测量端髓内编码同一 CHH 多肽的 CHH-AmRNA 和 CHH-A* mRNA 的含量以及腺内 CHH 两个异构体 CHH^{iv} 和 CHH[Ⓢ] 的含量, 得到的数据表明 mRNA 和多肽的含量在不同的个体都不相同, 但 CHH^{iv} 和 CHH[Ⓢ] 之间的比例恒定; 而 CHH-AmRNA 和 CHH-A* mRNA 之间的比例在不同的个体有很大波动。因此, De Kleijn 等^[37] 认为在 CHH 基因表达中存在翻译或翻译后的调控。

3 CHH 家族神经肽对生殖和蜕皮的多因子调控

CHH 家族神经肽的各个成员都具有功能多样性, 生殖和发育是受多种神经激素和激素综合调控的。由于美洲龙虾的 CHH 家族神经肽研究较多^[1], 在此主要以它为例说明 CHH 家族神经肽对生殖和蜕皮的调控。根据 Aiken 和 Waddy^[38] 的描述, 美洲龙虾的生殖周期被划分为以下四个时期: 未成熟期、卵黄发生前期、卵黄发生期和成熟期。目前在美洲龙虾已经确定结构和功能的 CHH 家族多肽有三种, 它们分别是 CHH-A、CHH-B 和 GIH^[2, 4, 39]。为了更正确全面地认识美洲龙虾生殖周期中 CHH-A、CHH-B 和 GIH 的合成、储存、释放及其潜在的生理功能, De Kleijn 等^[36] 测量了雌性个体生殖周期中不同阶段的各种神经激素的 mRNA 水平及腺内和血淋巴内神经激素的水平。通过测定发现在卵黄发生前期 CHH-A 的 mRNA 水平较高, 而 CHH-B 的 mRNA 水平较高的时期是卵黄发生前期和成熟期, 在卵黄发生前期两种 CHH 都以较高水平储存在腺内, 在血淋巴中只有在成熟期较高。而 GIH 在 X-器官内的 mRNA 水平一直较低, 只有到未成熟期腺中才出现少量 GIH 异构体, 在未成熟期和卵黄发生前期血淋巴中的 GIH 水平较高。

雌性美洲龙虾在两年的生殖周期中血淋巴内 CHH-A、CHH-B 和 GIH 浓度水平变化显著。到卵黄发生期时, CHH-A 和 CHH-B 的血淋巴水平显著升高, 而 GIH 的血淋巴水平到卵黄发生期后却显著下降, 因此 CHH-A 和 CHH-B 能够诱发卵黄发生而 GIH 则起相反的作用。Chang 等^[40] 发现在美洲龙虾存在一种既有蜕皮抑制活性又有高血糖活性的 MIH, 最近已经证明这种 MIH 在生理功能上与 CHH 很相近^[39, 41]。众所周知, 眼柄的切除既能除去 GIH 又能除去 MIH, 但奇怪的是切除眼柄后的美洲龙虾只是卵黄发生加快, 而没有发生蜕皮现象, 这表明抑制蜕皮的因素不仅仅只有眼柄中的 MIH, 在其神经系统中可能存在其它的抑制因子^[38]。CHH 能够在胸神经节表达意味着它可能具有抑制蜕皮的功能^[39]。另外美洲龙虾成体的 GIH 和蟹的 MIH 的氨基酸序列具有较高的相似性, 它们的前激素原具有相同的结构组织形式, 这意味着 GIH 可能具有抑制蜕皮的功能。当雌性美洲龙虾的幼体孵化后, 它才开始蜕皮, 这时 CHH 和 GIH 的血淋巴水平都较低。在未成熟期具有蜕皮抑制功能的是 GIH, 而在性腺成熟期完成这种功能的是 CHH-A 和 CHH-B。因此在美洲龙虾两年的生殖周期中, 血淋巴内 CHH 和 GIH 的协调平衡才能够使生殖活动和蜕皮现象有规律地交替进行。

以美洲龙虾的 CHH 家族神经肽对生殖和蜕皮的作用模式为基础, 结合其它甲壳动物的研究结果, 可以总结出雌性甲壳动物的 CHH 家族神经肽调控生殖和蜕皮的功能模式, 如图 1 所示, MIH、GIH、CHH-A、CHH-B 都能通过阻止 Y-器官蜕皮酮的合成和释放而抑制蜕皮。参与卵巢调控的神经肽包括 GIH、CHH-A 和 CHH-B, GIH 在未成熟期和卵黄发生前期对卵巢发育具有直接抑制作用, 而 CHH-A 和 CHH-B 则在卵黄发生期和成熟期对卵巢有促进作用。MOIH 能够直接作用

于大颚器官 (MO) 抑制其 MF 的合成, 另外 CHH 也有类似 MOIH 的功能。

4 今后的研究方向和重点

近些年来, 由于生物化学和分子生物学技术的成功应用, 甲壳动物神经内分泌学的研究取得了很大进展。但目前其研究对象主要局限于几种模式动物, 例如, 普通滨蟹、美洲龙虾、泥污螯虾和原螯虾等, 而对其它动物研究较少。直到如今在生产上仍然采用传统的方法如切除眼柄、注射脊椎动物激素等调节一些经济种类的生殖活动, 人们一直期望着实验室技术能够应用到养殖生产中, 因此在今后的研究对象中应重点考虑一些经济种类, 以缩小甲壳动物神经内分泌基础研究与应用研究之间的差距。

虽然目前对多种甲壳动物的 CHH 家族神经肽的结构研究已取得很大进展, 但多数 CHH 家族神经肽真正的生理功能及它们的靶器官作用模式在雌性甲壳动物了解的还较少, 而在雄性甲壳动物则是一无所知。由于这些神经肽的不同异构体具有不同的生理效应, 应该进一步完善神经肽的体内和体外的生物活性检测方法。另外应该对不同 CHH 家族神经肽的作用模式及受体做进一步研究。Kummer 和 Keller^[42] 及 Webster^[43] 已经开始了 CHH 家族神经肽的膜结合受体方面的研究, 该研究表明 CHH 的受体广泛分布于不同的组织。为了进行这方面的研究, 需要利用生化分离制备的方法或利用表达载体合成重组多肽的方法获得具有生物活性的多肽, 用来确定它们在细胞水平的作用模式及它们的受体结合特征。

制备一些甲壳动物如蟹、螯虾、龙虾、对虾等的神经肽多克隆或单克隆抗体和分子生物学探针, 能够为进行这些神经肽免疫细胞化学定位和测定其血淋巴浓度提供有利的工具, 它们对生殖周期中胚胎及幼体神经激素的研究非常有用。进行这样的研究, 能够使我们准确理解在外界因子的作用下神经内分泌系统的活动对生殖和蜕皮的调控机制, 这样的研究对经济种类的养殖生产也具有重要的应用价值, 例如, 将实验数据用于开发检测养殖种类神经内分泌水平的试剂盒, 在生产上就可以根据试剂盒的检测结果, 人工控制动物的光周期、温度、营养等, 使其生殖和蜕皮处于最佳时机。

参考文献

- [1] De Kleijn D P V, Van Herp F. Molecular biology of neurohormone precursors in the eyestalk of crustacea[J]. Comp Biochem Physiol, 1995, 112B: 573- 579.
- [2] Soyce D, Le Caer J P, Noel P Y, et al. Primary structure of two isoforms of the vitellogenesis inhibiting hormone from the lobster *Homarus americanus*[J]. Neuropeptides, 1991, 20: 25- 32.
- [3] Soyce D, Van Deijnen J E, Martin M. Isolation and characterization of a vitellogenesis-inhibiting factor from sinus glands of the lobster *Homarus americanus*[J]. J Exp Zool, 1987, 244: 479- 484.
- [4] De Kleijn D P V, Seutels F J G T, Martens G J M, et al. Cloning and expression of mRNA encoding prepro-gonad-inhibiting hormone(GIH)

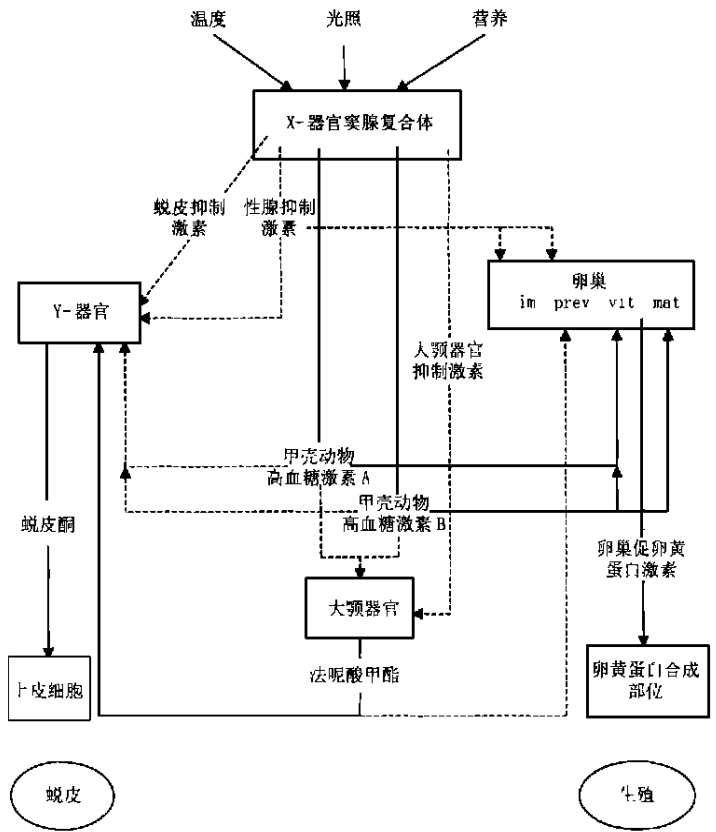


图 1 雌性甲壳动物 CHH 家族神经激素调控生殖和蜕皮的功能模式图 (仿 De Kleijn 和 Van Herp)

Fig. 1 Illustration of the proposed of the CHH-family in the regulation of molting and reproduction in the female crustean (from De Kleijn & Van Herp)

注: 实线表示对靶器官的促进作用, 而虚线表示对靶器官的抑制作用; 卵巢的 im、prev、vit、mat 分别代表卵巢未成熟期、卵黄发生前期、卵黄发生期和成熟期。

- in the lobster *Homarus americanus*[J]. FEBS Lett, 1994b, 353: 255– 258.
- [5] Kegel G, Reichwein B, Weese S, et al. Amino acid sequence of the Crustacean Hyperglycemic Hormone(CHH) from the shore crab *Carcinus maenas*[J]. FEBS Lett, 1989, 255: 10– 14.
- [6] Tensen C P, De Kleijn D P V, Van Herp F. Cloning and sequence analysis of cDNAs encoding two crustacean hyperglycemic hormone in the lobster, *Homarus americanus*[J]. Eur J Biochem, 1991b, 200: 103– 106.
- [7] Martin G, Sorokine O, Van Dorsselaer A. Isolation and molecular characterization of a hyperglycemic neuropeptide from the sinus gland of the terrestrial isopod, *Amadillidium vulgare* (Crustacea) [J]. Eur J Biochem, 1993, 211: 601– 607.
- [8] Kegel G, Reichwein B, Tensen C P, et al. Amino acid sequence of Crustacean Hyperglycemic Hormone (CHH) from the crayfish *Orconectes limosus*. Emergence of a novel neuropeptide family[J]. Peptides, 1991, 12: 909– 913.
- [9] Huberman A, Aguilar M B, Brew K, et al. Primary structure of the major isomorph of the Crustacean Hyperglycemic Hormone(CHH-iv) from the sinus gland of the Mexican crayfish *Procambarus bowyeri* (Ortmann): interspecies comparison[J]. Peptides, 1993, 14: 7– 16.
- [10] Yasuda A, Yasuda Y, Fujita T, et al. Characterization of crustacean hyperglycemic hormone from the crayfish (*Procambarus clarkii*): Multiplicity of molecular stereoisomerism and diverse functions[J]. Gen Comp Endocr, 1994, 95: 387– 398.
- [11] Soyuz D, Van Herp F, Rossier J, et al. Evidence for a conformational polymorphism of invertebrate neurohormone[J]. J Biol Chem, 1994, 269: 18295– 18298.
- [12] Tensen C P, Janssen K P C, Van Herp F. Isolation, characterization and physiological specificity of the crustacean hyperglycemic factors from the sinus gland of the lobster *Homarus americanus* (Milne Edwards)[J]. Invert Reprod Develop, 1989, 16: 155– 164.
- [13] Van Herp F. Inhibiting and stimulating neuropeptides controlling reproduction in crustacean[J]. Invert Reprod Develop, 1992, 22: 21– 30.
- [14] Tensen C P, Coenen T, Van Herp F. Detection of mRNA encoding Crustacean Hyperglycemic Hormone (CHH) in the eyestalk of the crayfish, *Orconectes limosus*, using non-radioactive in situ hybridization[J]. Neuroscience Letters, 1991a, 124: 178– 182.
- [15] Von Gliscynski U. Hautungshemmende Hormone des amerikanischen Flusskrebse *Orconectes limosus*[D]. Bonn: Hohen Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Facultat, Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universitat, 1994.
- [16] Weidemann W, Gromoll J, Keller R. Cloning and sequence analysis of cDNA for precursor of a crustacean hyperglycemic hormone[J]. FEBS Lett, 1989, 257: 31– 34.
- [17] Webster S G, Dirksen H. Putative molt inhibiting hormone in larvae of the shore crab *Carcinus maenas* L. An immunocytochemical approach [J]. Biol Bull, 1991, 180: 65– 71.
- [18] Sun P S. Molecular cloning and sequence analysis of a cDNA encoding a molt-inhibiting hormone-like neuropeptide from the white shrimp *Penaeus vannamei*[J]. Mol Mar Biol Biotech, 1994, 3: 1– 6.
- [19] Lee K J. Molecular cloning of a cDNA encoding putative molt inhibiting hormone from the blue crab, *Callinectes sapidus*[J]. Biochem Biophys Res Commun, 1995, 209: 1126– 1131.
- [20] Ohira T, Watanabe T, Nagasawa H, et al. Molecular cloning of a molt-inhibiting hormone cDNA from the kuruma prawn *Penaeus japonicus* [J]. Zool Sci, 1997, 14: 785– 789.
- [21] Gu P L, Chan S M. Cloning of a cDNA encoding a putative molt-inhibiting hormone from the eyestalk of the sand shrimp *Metapenaeus ensis*[J]. Mol Mar Bio Biotech, 1998, 7: 214– 220.
- [22] Umphrey H R, Lee K J, Watson R D, et al. Molecular cloning of a cDNA encoding molt-inhibiting hormone of the crab, *Cancer magister*[J]. Mol Cell Endocrinol, 1998, 136: 145– 149.
- [23] Chan S M, Chen X G. PCR cloning and expression of the molt-inhibiting hormone gene for the crab *Charybdis feriatus*[J]. Gene, 1998, 224: 23– 33.
- [24] Lee K J, Watson R D, Roer R D. Molt-inhibiting hormone mRNA levels and ecdysteroid titer during a molt cycle of the blue crab *Callinectes sapidus*[J]. Biochem Physiol Res Commun, 1998, 249: 624– 627.
- [25] Laufer H, Ahl J S B, Sagi A. The role of juvenile hormone in crustacean reproduction[J]. Amer Zool, 1993, 33: 365– 374.
- [26] Laufer H, Liu L, Van Herp F. A neuropeptide family that inhibits the mandibular organ of crustacean and may regulate reproduction[A]. Boca Raton, Borkovec A B, Loeb M J. Insect Neurochemistry and Neuropharmacology 1993[M]. CPC Press, 1994. 203– 206.
- [27] Boist D W, Martin M, Chang E S. Regulation of methyl farnesoate levels in hemolymph of *Homarus americanus*[J]. Amer Zool, 1988, 28 (82A).
- [28] Tsukumura B, Boist D W. Regulation of methyl farnesoate in the hemolymph and mandibular organ of the lobster, *Homarus americanus*[J]. Gen Comp Endocrinol, 1992, 86: 297– 303.
- [29] Wainwright G, Webster S G, Chung J S, et al. Neurohormonal control of methyl farnesoate synthesis in crustacean: Emergence of a neuropeptide family inhibiting growth and reproduction[R]. Woodshole: Proc 6th Intern Conference on the Juvenile Hormones, 1995, 126.
- [30] Liu L, Laufer H. Isolation and characterization of sinus gland neuropeptides with both mandibular organ-inhibiting and hyperglycemic effects from the spider crab, *Libinia emarginata*[R]. Woodshole: Proc 6th Intern Conference on the Juvenile Hormones, 1995, 10.

- [31] Rotllant G, De Kleijn D P V, Chamantier-Daures M, et al. Localization of Crustacean Hyperglycemic Hormone (CHH) and gonad inhibiting hormone (GIH) in the eyestalk of *Homarus gammarus* larvae by immunocytochemistry and in situ hybridization [J]. Cell Tissue Res, 1993, 271: 507– 512.
- [32] Rotllant G, Chamantier-Daures M, De Kleijn D P V, et al. Ontogeny of neuroendocrine centers in the eyestalk of *Homarus americanus* embryos: An anatomical and hormonal approach [J]. Invert Reprod Develop, 1995, 27: 233– 245.
- [33] Laverdure A M, Breuzet M, Soyez D, et al. Detection of the mRNA encoding vitellogenesis inhibiting hormone in neurosecretory cells of the X-organ in *Homarus americanus* [J]. Gen Comp Endocr, 1992, 87: 443– 450.
- [34] De Kleijn D P V, Coenen T, Laverdure A M, et al. Localization of mRNAs encoding the Crustacean Hyperglycemic Hormone (CHH) and Gonad-inhibiting Hormone (GIH) in the X-organ sinus gland complex of the lobster *Homarus americanus* [J]. Neuroscience, 1992, 51: 121 – 128.
- [35] Klein J M, De Kleijn D P V, Hunemeyer G, et al. Demonstration of cellular expression of genes for molting inhibiting and crustacean hyperglycemic hormone in the eyestalk of the shore crab *Carcinus maenas* [J]. Cell Tissue Res, 1993, 274: 515– 519.
- [36] De Kleijn D P V, Janssen K P C, Waddy S L, et al. Characterization and expression of lobster preprohormones involved in metabolism, molting and reproduction [J]. Neth J Zool, 1995b, 45: 238– 240.
- [37] De Kleijn D P V, Janssen K P C, Martens G J M, et al. Cloning and expressing of two Crustacean Hyperglycemic Hormone (CHH) mRNAs in the eyestalk of the crayfish *Orconectes limosus* [J]. Eur J Biochem, 1994a, 24: 623– 628.
- [38] Aiken D E, Waddy S L. Reproduction Biology [A]. Cobb J S, Philips B F. The Biology and Management of Lobster, Physiology and Behavior [M]. New York : Academic Press, 1980. 215– 276.
- [39] De Kleijn D P V, De Leeuw E P H, Van Den Berg M C, et al. Cloning and expression of two mRNAs encoding structurally different crustacean hyperglycemic hormone precursors in the lobster *Homarus americanus* [J]. Biochem Biophys Acta, 1995a, 1260: 62– 66.
- [40] Chang E S, Prestwich G D, Bruce M J. Amino acid sequence of a peptide with both molt-inhibiting and hyperglycemic activities in the lobster, *Homarus americanus* [J]. Biochem Biophys Res Comm, 1990, 171: 818– 826.
- [41] Chang E S. Chemistry of crustacean hormones that regulate growth and reproduction [A]. Fingeman M, Nagabhushanan R, Thompson M F. Recent advances in marine biotechnology [M]. Oxford and New Dehli IBH, 1997. 163– 178.
- [42] Kummer G, Keller R. High-affinity binding of Crustacean Hyperglycemic Hormone (CHH) to hepatopancreatic plasma membranes of the crab *Carcinus maenas* and the crayfish *Orconectes limosus* [J]. Peptides, 1993, 14: 103– 108.
- [43] Webster S G. High-affinity binding of putative molt-inhibiting hormone (MIH) and crustacean hyperglycemic Hormone (CHH) to membrane-bound receptors on the Y-organ of the shore crab *Carcinus maenas* [J]. Proc R Soc Lond, 1993, 251B: 53– 59.