

文章编号 :1000 - 0615(2006)04 - 0450 - 04

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

孙金生^{1,2}, 赵景霞¹, 相建海³

(1. 天津师范大学生物系, 天津 300074;

2. 天津市水产研究所, 天津 300221; 3. 中国科学院海洋研究所, 山东 青岛 266071)

摘要 :采用全细胞膜片钳技术,通过检测膜电容变化的方法实时监测细胞的分泌活动,在单个细胞水平观察了 5-羟色胺(5-HT)对中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)眼柄视神经节端髓 X 器官(MTXO)3 种类型神经内分泌细胞兴奋性和分泌活动的调控作用。在电流钳模式下,5-HT 使河蟹眼柄 MTXO A 型和 B 型细胞产生去极化反应,并诱导细胞兴奋,出现不同频率的动作电位;相反,5-HT 诱导 C 型细胞产生超级化反应,抑制细胞的兴奋活动。在全细胞电压钳记录模式下,5-HT 明显地引起 A 型和 B 型神经内分泌细胞的膜电容增加,C 型细胞的膜电容没有明显的变化。这表明 5-HT 通过调控河蟹眼柄神经内分泌细胞的兴奋性诱导 CHH 和 MIH 的释放,抑制 C 型细胞的分泌活动。

关键词 :中华绒螯蟹;神经内分泌;兴奋性;5-羟色胺;全细胞膜片钳技术

中图分类号:Q 424;Q 26 文献标识码:A

Effects of 5-HT on excitability and secretion activity of MTXO cells in eyestalks of *Eriocheir sinensis*

SUN Jin-sheng^{1,2}, ZHAO Jing-xia¹, XIANG Jian-hai³

(1. Department of Biology, Tianjin Normal University, Tianjin 300074, China;

2. Tianjin Fishery Institute, Tianjin 300221, China;

3. Institute of Oceanology, Chinese Academy of Science, Qingdao 266071, China)

Abstract :The X-organ sinus gland is a major peptidergic neurosecretory system in crustacean, analogous to the vertebrate hypothalamoneurohypophyseal system. Chinese mitten-handed crab (*Eriocheir sinensis*) X-organ is located on the ventral surface of terminalia in the eyestalk, named MTXO. Three types of neurosecretory cell dissociated from MTXO had been identified on the basis of shape, size and outgrowth fashion. The cell type A and cell type B were immunoactive to anti-CHH and anti-MIH serum respectively. In the present paper, the whole-cell patch clamp technique was used to examine the effects of 5-HT on the excitability and neurosecretion of MTXO cells. The depolarization was evoked from the cell type A and cell type B and hyperpolarization from cell type C in response to the rapid application of 5-HT (50 μ mol). The different frequency overshooting action potential could be recorded after depolarization in the cell type A and cell type B when the 5-HT had been washed out. Under voltage clamp mode, the increase of cell capacitance was observed in the cell type A and type B in response to the application of 5-HT. This suggests that the excitability and releases of CHH and MIH could be induced by 5-HT in the cell type A and type B.

Key words : *Eriocheir sinensis*; neuroendocrinology; excitability; 5-HT; whole-cell patch clamp technique

收稿日期:2005-11-02

资助项目:国家自然科学基金资助项目(30271019、30571421);天津市自然科学基金资助项目(05YFJMJC00100)

作者简介:孙金生(1965-),男,天津市人,教授,从事甲壳动物内分泌学研究。Tel:022-8825078;E-mail:jssun1965@yahoo.com.cn

眼柄 X 器官 - 窦腺复合体 (XO-SG Complex) 类似于哺乳动物的下丘脑 - 垂体系统, 是甲壳动物重要神经内分泌器官。它合成和分泌甲壳动物高糖激素 (CHH)、蜕皮抑制激素 (MIH)、性腺抑制激素 (GIH) 等多种神经多肽激素, 调控着甲壳动物的蜕皮、性腺发育、代谢、色素反应、渗透压调节等重要生理功能, 一直被称为甲壳动物的内分泌调控中心^[1, 2]。对这一系统眼柄神经多肽激素的分泌规律和调控机制的研究不仅具有广泛的理论意义, 还使人们在生产上控制甲壳动物的繁殖和生长成为可能。

在组织细胞学和免疫化学研究中, 发现在甲壳动物眼柄 XO-SG 复合体中有多种神经递质类物质, 和来自中枢神经系统 (CNS) 的突触结构, 表明甲壳动物眼柄神经多肽激素的分泌受到 CNS 的精确调控。由于受激素分泌检测技术的限制, 过去主要通过注射完整和切除眼柄的动物或与激素的靶器官共同孵育, 比较观察血糖水平、蜕皮、性腺发育、色素变化等, 间接观察多巴胺 (DA)、5-羟色胺 (5-HT) 等神经递质类物质对 CHH、MIH、GIH、RPGH 等神经多肽激素分泌活动的影响。由于受复杂生理因素的影响, 不同的作者在同种或不同种动物中得到的结果差异甚大, 更不清楚这是否直接作用在眼柄神经分泌细胞, 还是通过其它因子的介导^[3, 4]。由于在甲壳动物中缺少象鱼类使用的催产素等激素类物质, 对一些重要的经济甲壳动物还不能进行全人工繁殖。过去人们也曾试图在生产上利用 5-HT、DA 等控制动物的性腺发育和蜕皮, 但由于不了解这些递质的作用效果和作用机制而未能推广应用^[5]。中华绒螯蟹 (*Eriocheir sinensis*) 俗称河蟹, 是我国重要经济甲壳动物之一。组织、细胞学和免疫标记研究结果表明, 河蟹 X 器官神经内分泌细胞主要集中在眼柄视神经节端髓, 被称为端髓 X 器官 (MTXO), 主要包括 3 种类型细胞^[6]。免疫标记结果表明, A 型和 B 型细胞分别合成和分泌 CHH 和 MIH^[7]。我们利用膜片钳技术, 通过观察细胞膜电容变化的方法, 实时监测河蟹眼柄神经内分泌细胞单个细胞的胞吐分泌活动, 阐明了中枢神经系统神经递质 γ -氨基丁酸 (γ -GABA) 和谷氨酸 (Glu) 对河蟹眼柄神经多肽激素分泌的调控作用^[7, 8]。本文拟观察 5-HT 对河蟹眼柄神经内分泌细胞兴奋和分泌活动的影响, 在单个细胞水平阐述 5-HT 对河蟹眼

柄神经多肽激素分泌的调控作用, 为进一步阐明眼柄神经多肽激素的分泌调控机制和实现人工控制甲壳动物的繁殖和生长奠定基础。

1 材料与方法

1.1 动物解剖和细胞培养

实验动物取自天津市宁河县仁凤乡和山东东营河蟹养殖场的正常 1 龄蟹种, 壳宽为 2.1 ~ 2.4 cm, 置室内水泥池暂养。动物解剖和细胞培养方法参考文献^[6]。膜电容检测实验选用贴壁 2 h 的河蟹眼柄神经内分泌细胞。其它试验采用培养 2 d 的形态特征典型的细胞。膜片钳实验结束后, 细胞功能鉴定参考文献^[7]的方法。

1.2 膜片钳实验和数据的采集、处理

实验采用全细胞膜片钳技术, 在电流钳和电压钳两种模式下测定河蟹眼柄神经内分泌细胞对 5-HT 的反应。实验在室温 (22 ~ 26 °C) 下进行。数据的采集、处理参考文献^[7, 8]的方法。电极内液为 ($\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$): 200 KCl, 5 NaCl, 5 MgCl_2 , 20 HEPES, 5 ATP-2 Na^+ , 5 BAPTA, KOH 调 pH 7.5。细胞外液为添加 20 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 葡萄糖的无菌河蟹生理盐水。因实验修改电极内外液的成份在文中另行说明。膜片钳系统由 EPC9 型膜片钳放大器 (HEKA Science instronik, 德国) PCI-16 数据采集接口板和双位锁相放大器组成。玻璃电极毛坯为 WPI 公司生产的薄壁毛细管 (1B150F-4), 充灌内液后电极电阻为 3 ~ 5 M Ω 。用硅酮树脂涂敷电极尖端以减低噪声干扰。快、慢电容为自动补偿, 串联电阻补偿至最佳。

1.3 细胞膜电容检测

按 Lindau-Neher 技术进行全细胞膜电容测量^[9], 使用 PULSE 的 Lock-in 扩展软件。简述如下: 形成标准的全细胞记录模式后, 将膜电位保持在静息膜电位 (-50 mV), 增益为 5 mV/pA。此时向细胞施加频率为 1 000 Hz、峰峰值为 50 mV 的正弦波信号, 刺激的输出由 ITC-16 数据集系统产生 (Instrtech 公司, 美国), 以 PULSE + PULSEFIT 7.63 软件 (HEKA Electronics, 德国) 采样并储存。采样频率为 2 kHz, 输出滤波频率一般取 2.9 kHz。用 Igor 软件 (Wavemetrics 公司, 美国) 进行图形处理和数据分析。结果以平均值 \pm SE 表示。该技术可以在 10 ms 时间内捕捉细胞内一个分泌囊泡与细胞膜的融合事件。

1.4 药品及加药方法

实验采用 16 通道快速加药系统(ALA Sci. Instruments N Y)进行加药。加药过程由计算机控制,用操纵器操纵尖端直径为 $100\ \mu\text{m}$ 的加药头至细胞约 $50\ \mu\text{m}$ 处,压力加药($10\ \text{p.s.i.}$),可在 $10\ \text{ms}$ 内将 16 个储液槽中的任何一种药品或冲洗液快速地加到细胞表面并浸浴整个选定细胞。

2 结果

2.1 5-HT 对河蟹眼柄 MTXO 细胞兴奋性的调控作用

眼柄神经内分泌细胞既是神经细胞,又有分泌的功能。兴奋是细胞分泌活动的基础。为探讨 5-HT 对河蟹眼柄神经内分泌细胞的分泌调控机制,我们首先观察了 5-HT 对河蟹眼柄 3 种类型神经内分泌细胞兴奋性活动的影响。在全细胞电流钳模式下,将膜电流钳制在 $0\ \text{pA}$,使细胞处于静息不活动状态,3 种类型的神经内分泌细胞的膜电位均在 $-50\ \text{mV}$ 左右。此时,对离体培养 2 天的形态特征典型的 3 种类型河蟹眼柄神经内分泌细胞分别灌流 $50\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 5-HT,观察河蟹眼柄 MTXO 细胞对 5-HT 的反应。结果表明,5-HT 引起 A 型细胞和 B 型细胞去极化反应,并诱发动作电位。A 型细胞的平均去极化电压是 $(28 \pm 7)\ \text{mV}$ ($n=3$),B 型细胞的平均去极化电压是 $(14 \pm 6)\ \text{mV}$ ($n=3$)。对 C 型细胞灌流 5-HT 的结果与 A 型和 B 型细胞的结果相反,5-HT 诱导 C 型细胞产生超级化反应,平均超级化电压为 $(12 \pm 3)\ \text{mV}$ ($n=3$) (图 1)。通过灌流正常的细胞外液洗去 5-HT 后,5-HT 对河蟹眼柄神经内分泌细胞的作用还持续 $2\sim 7\ \text{min}$ 。重复对同一个细胞灌流 5-HT,3 种类型神经内分泌细胞都降低了对 5-HT 的反应强度,表明河蟹眼柄神经内分泌细胞对 5-HT 产生了脱敏反应,但是,对 5-HT 的敏感性并未完全消失。

2.2 5-HT 对河蟹眼柄 MTXO 细胞分泌活动的影响

形成全细胞膜片钳构型后,将膜电位钳制在 $-50\ \text{mV}$ 。稳定记录 $5\ \text{min}$ 后,在保持电压上叠加 $50\ \text{mV}$ 的正弦波进行膜电容检测。膜电容 C_m 用 $1\ \text{kHz}$ 采样,进行高时间分辨率测量。对 20 个 A 型细胞、18 个 B 型细胞和 3 个 C 型细胞灌流 50

$\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 5-HT 的结果表明,5-HT 明显地引起 A 型和 B 型神经内分泌细胞的膜电容增加,C 型细胞的膜电容无明显变化,这与兴奋性的检测结果一致,表明 5-HT 刺激 A 型和 B 型细胞分泌 CHH 和 MIH,并通过调控河蟹眼柄神经内分泌细胞的兴奋活动刺激眼柄 MTXOA 型和 B 型细胞分泌 MIH 和 GIH,抑制 C 神经内分泌细胞的分泌活动。5-HT 诱导的河蟹眼柄神经内分泌细胞的分泌活动随着浓度的增加而加强(图 2)。

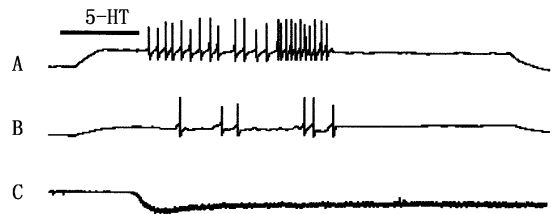


图 1 灌流 $50\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 5-HT 引起 A 型细胞(A)和 B 型细胞(B)产生去极化反应,引起 C 型细胞(C)产生超级化反应

Fig. 1 Depolarization was evoked in the type A and type B neurosecretory cells and hyperpolarization in type C neurosecretory cells in response to the rapid applying of $50\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 5-HT

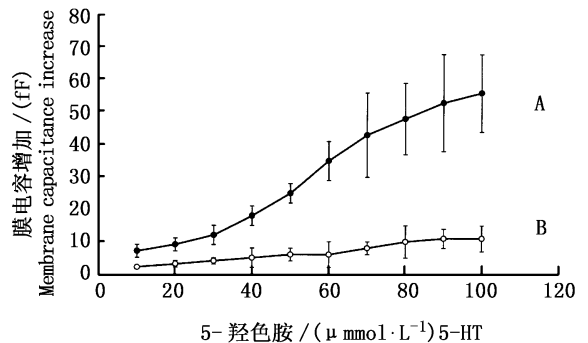


图 2 5-HT 对河蟹眼柄 A 型(A)和 B 型(B)细胞分泌活动的调控作用

Fig. 2 The effects of 5-HT on the secretory activity in the cell type A and cell type B cells in the eyestalks of *E. sinensis*

分别灌流 $10\sim 100\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 5-HT,A 型细胞的全细胞膜电容随着 5-HT 浓度的增大,膜电容显著增加。灌流 $10\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 5-HT,A 型细胞膜电容增加 $(7 \pm 2)\ \text{fF}$,5-HT 灌流浓度达到 $100\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,A 型细胞膜电容增加 $(56 \pm 12)\ \text{fF}$ (图 2 -

A)。B 型细胞膜电容随着 5-HT 灌流浓度的增大,膜电容增加的变化较小。当 5-HT 的灌流浓度达到 $70 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 后,膜电容增加较明显,达到 $(13 \pm 2) \text{fF}$ (图 2-B)。

3 讨论

如前所述,5-HT 广泛地分布在甲壳动物中枢和外周神经组织,作为神经递质或神经调质或激素物质调控许多重要的生理功能^[10]。其中,甲壳动物的眼柄神经内分泌系统是 5-HT 的一个重要的靶标,在多种甲壳动物眼柄神经内分泌系统观察到 5-HT 免疫阳性细胞和神经末梢^[11]。由于细胞培养材料和激素检测方法的限制,过去主要通过注射完整和切除眼柄的动物或与激素的靶器官共同孵育,比较观察血糖水平、蜕皮、性腺发育、色素变化等,间接观察 5-HT 对 CHH、MIH、GIH、RPCH 等神经肽类激素分泌的影响。由于整体动物和组织生理调节的复杂性,不同的作者对不同的甲壳动物得出不同的结果。Lueschen 等^[12]给完整的和切除眼柄的滨蟹(*Carcinus maenas* L.)注射 5-HT,发现 5-HT 调节血糖的作用与 CHH 的分泌无关,而 Lee 等^[13]的结果表明,注射 5-HT 不能使切除眼柄的克氏原螯虾血糖水平升高,并认为,5-HT 同样通过刺激眼柄 CHH 的分泌诱导血糖升高。过去人们也曾试图在生产上利用 5-HT 控制动物的性腺发育和蜕皮,但由于不了解这些递质的作用效果和作用机制而未能推广应用^[5]。

Figerman^[2]首次报道了通过注射 5-HT 诱导了凡纳对虾的性腺成熟和产卵。Vaca 等^[5]也相继对这一方法进行了应用研究。但注射 5-HT 的效果不如切除眼柄的效果好。这提示 5-HT 直接或通过其它途径调控甲壳动物的性腺发育。我们采用全细胞膜片钳技术,通过检测膜电容变化的方法,首次在单个细胞水平观察了 5-HT 对河蟹眼柄神经内分泌细胞兴奋性和分泌活动的影响。结果表明,5-HT 能引起河蟹眼柄 A 型和 B 型神经内分泌细胞的去极化反应,并诱发细胞的兴奋性活动,从而影响细胞的分泌活动。河蟹眼柄 A 型和 B 型神经内分泌细胞分别合成和分泌甲壳动物高糖激素(CHH)和蜕皮抑制激素(MIH)。这提示 5-HT 通过眼柄神经内分泌系统调控河蟹血淋巴的血糖水平和蜕皮活动。

参考文献:

- [1] Bliss D E. Biology of Crustacea :Neurobiology :structure and function[M]. Academic Press , New York , 1982. 205 - 209.
- [2] Figerman M. Roles of neurotransmitters in regulating reproductive hormone release and gonadal maturation in decapod crustaceans [J]. Inver Rep Dev , 1997 , 31(1 - 3) : 47 - 54.
- [3] Sarojini R R , Figerman M. *In vivo* effects of dopamine and dopaminergic antagonist on testicular maturation in the red swamp crayfish , *Procambarus clarkii* [J]. Biol Bull , 1995 , 189 : 340 - 346.
- [4] Kuo C M , Hsu C R , Lin C Y. Hyperglycemic effects of dopamine in tiger shrimp , *Penaeus monodon* [J]. Aquaculture , 1995 , 135 : 161 - 172.
- [5] Vaca A A , Alfaro J. Ovarian maturation and spawning in white shrimp , *Penaeus vannamei* , by serotonin injection [J]. Aquaculture , 2000. 182 : 373 - 385.
- [6] 孙金生,刘安西,陈家童,等.河蟹眼柄 MTXO 细胞的离体培养和细胞学研究 [J]. 水生生物学报, 2000, 24(4) : 374 - 379.
- [7] Sun J S , Gao C L , Xiang J H. Study on the GABA gated channels in the neurosecretory cells of MTXO in the eyestalks of *Eriocheir sinensis* [J]. Pro Biochem Biophy , 2003 , 30(1) : 197 - 182.
- [8] 孙金生,高春蕾,相建海.中华绒螯蟹眼柄 MTXO 神经内分泌细胞 Glu 受体通道的膜片钳研究 [J]. 水生生物学报, 2004, 28 : 218 - 225.
- [9] Heinemann C , Chow R H , Neher E. Kinetics of the secretory responses in bovine chromaffin cells following flash photolysis of caged Ca^{2+} [J]. Biophys J , 1994 , 67 : 2546 - 2557.
- [10] Sloley B D , Juorio A V. Monoamine neurotransmitters in invertebrates and vertebrates : an examination of the diverse enzymatic pathways utilized to synthesize and inactivate biogenic amines [J]. Int Rev Neurobiol , 1995 , 38 : 253 - 304.
- [11] Escamilla-Chimal E G , Herp F , Fanjul-Moles M L. Daily variations in crustacean hyperglycaemic hormone and serotonin immunoreactivity during the development of crayfish [J]. J Exp Biol , 2001 , 204 : 1073 - 1081.
- [12] Lueschen W , Willig A , Jaros P P. The role of biogenic amines in the control of blood glucose level in the decapod crustacean *Carcinus maenas* L [J]. Com Biol Physiol , 1993 , 105(2) : 291 - 296.
- [13] Lee C Y , Yau S M , Liao C S , et al. Serotonergic regulation of blood glucose levels in the crayfish , *Procambarus clarkii* : site of action and receptor characterization [J]. J Exp Zool , 2000 , 286 (6) : 596 - 605.