

文章编号:1000-0615(2009)03-0424-06

## 中华绒螯蟹眼柄神经内分泌细胞表达 ATP 敏感钾通道

张子怡<sup>1</sup>, 宇克莉<sup>1</sup>, 孙金生<sup>1,2</sup>

(1. 天津师范大学化学与生命科学学院, 天津 300387;

2. 天津市水产研究所, 天津 300221)

**摘要:**采用膜片钳技术之内面向外记录模式观察了中华绒螯蟹(河蟹)眼柄视神经节端髓 X 器官(MTXO)神经内分泌细胞对 0~1 mmol/L ATP 的反应,发现河蟹眼柄 MTXO 细胞表达 ATP 敏感钾通道( $K_{ATP}$ )。电生理特征研究结果表明,在细胞膜内外两侧的  $K^+$  浓度均为 200 mmol/L 时, $K_{ATP}$  呈弱的内向整流性,电导为 68 pS,有翻转电位。灌注 ATP 对  $K_{ATP}$  通道的开放产生浓度依赖性抑制作用,当细胞外液中 ATP 浓度超过 0.1 mmol/L 后,去极化刺激不能诱发  $K_{ATP}$  电流,并且 1 mmol/L ATP 可明显阻断  $K_{ATP}$  开放活动。胆固醇等甾醇类物质对河蟹眼柄 MTXO 细胞  $K_{ATP}$  无明显的影响,但 0.1 mmol/L 优降糖可完全阻断  $K_{ATP}$  的单通道开放。 $K_{ATP}$  受内源性 ATP 的调控,在细胞代谢与兴奋性耦联中起重要作用,提示河蟹眼柄 MTXO 细胞的代谢活动对神经多肽激素的分泌产生了反馈调节作用,胆固醇等甾醇类物质未通过调节  $K_{ATP}$  的活动调控细胞的分泌活动。结果为阐明甲壳动物眼柄神经多肽激素分泌的调控机制提供了新认识。

**关键词:**中华绒螯蟹;视神经节端髓 X 器官;神经内分泌细胞;ATP 敏感钾通道;膜片钳技术

**中图分类号:**S 917

**文献标识码:**A

眼柄视神经节 X 器官-窦腺复合体(XO-SG)类似于哺乳动物下丘脑-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)、性腺发育抑制激素(GIH)等多种神经多肽激素,调控甲壳动物的生殖、发育和蜕皮等重要生理功能<sup>[1-2]</sup>。对这一系统的研究一直是甲壳动物内分泌学的重点内容,了解神经多肽激素分泌的调控机制有助于实现人工控制甲壳动物的繁殖和生长。ATP 敏感钾通道( $K_{ATP}$ )受内源性 ATP 的强烈抑制,从而将细胞的新陈代谢状态与其兴奋性耦联起来。对河蟹眼柄神经内分泌细胞  $K_{ATP}$  通道的研究将有助于了解神经多肽激素的分泌调控机制。

$K_{ATP}$  通道最早在心肌中被发现,后来证实该通道广泛存在于垂体、骨骼肌、脑、平滑肌、胰腺等多种可兴奋组织细胞<sup>[3]</sup>。关于分泌细胞  $K_{ATP}$  通道的研究主要集中在哺乳动物胰腺  $\beta$  细胞,并对

$K_{ATP}$  在葡萄糖诱导的胰岛素分泌过程中所起的生理作用做过很好的阐述<sup>[4]</sup>。由于采用细胞的来源和发育水平不同加上记录方式各异,所报道的  $K_{ATP}$  通道在激活条件、单通道电导、通道的整流性、药物作用等方面存在着很大的差异。受细胞培养材料的限制,迄今尚未见到关于甲壳动物眼柄神经内分泌细胞  $K_{ATP}$  通道的研究报告。中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)俗称河蟹,是我国重要经济蟹类之一。河蟹眼柄 XO-SG 神经内分泌系统组织学和细胞学方面已经有了全面观察<sup>[5]</sup>,并进行了眼柄视神经节端髓 X 器官(MTXO)神经内分泌细胞离体培养和电生理特征研究<sup>[6]</sup>,发现离体培养的河蟹眼柄 MTXO 神经内分泌细胞与玻璃微电极间极易形成高阻封接,适用于膜片钳研究<sup>[7-8]</sup>。本文通过对河蟹眼柄 MTXO 神经内分泌细胞 ATP 敏感性钾离子通道的研究,为认识这一系统的活动规律和进一步研究眼柄神经肽类

收稿日期:2008-09-27

修回日期:2009-01-18

资助项目:国家自然科学基金(30571421,30871907);国家科技支撑计划(2006BAD09A11)

通讯作者:孙金生, Tel: 022-88250781, E-mail: jssun1965@yahoo.com.cn

激素的合成和释放活动打下基础。

## 1 材料与方 法

### 1.1 MTXO 细胞的分离与培养

实验动物为取自天津市宁河县仁凤养殖场的正常一龄蟹种,壳宽为 2.1~2.4 cm,置室内水泥池暂养。细胞分离和培养方法参考文献[6],选取附肢健全的健康蟹种,经低温“麻醉”和碘伏浸泡消毒后,在超净工作台中切下眼柄。经酒精消毒和无菌河蟹生理盐水(210 mmol/L NaCl,13.6 mmol/L KCl,3.8 mmol/L MgCl<sub>2</sub>,2.6 mmol/L Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>,10 mmol/L Hepes;1 mg/mL 庆大霉素,pH 7.5。按 van Harrevelde<sup>[9]</sup>配方改进)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 MTXO,于 24 °C 振荡消化 1.5 h 后,在 0.5 mL 培养液中搅动打散细胞,分散的细胞于 24~26 °C、黑暗、潮湿条件下培养。消化酶液为溶解于无 Ca<sup>2+</sup>、Mg<sup>2+</sup>生理盐水的 0.3% 胰蛋白酶(Sigma 产品),生理盐水中的 CaCl<sub>2</sub>和 MgCl<sub>2</sub>由 NaCl 代替。培养液为 L-15 培养基与等量 1.75 倍河蟹生理盐水的混合物(pH 7.5),临用前加入 0.1 mg/L 庆大霉素、150 mmol/L 葡萄糖和 1 mmol/L 谷氨酰胺。

### 1.2 膜片钳实验和数据的采集、处理

采用 EPC-10 膜片钳系统,信号由膜片钳放大器(HEKA)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。玻璃电极毛坯为 WPI 公司生产的薄壁毛细管(1B150F-4),经微电极拉制仪(HEKA)两步拉制,抛光仪抛光后,充灌电极液后入水电阻 5~8 MΩ。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。根据河蟹生理盐水设计细胞内外液,经 0.22 μm 微孔滤膜过滤后使用。细胞浴液为 200 mmol/L KCl,10 mmol/L Hepes, KOH 调 pH 至 7.4;电极内液为 200 mmol/L KCl,10 mmol/L HEPES,5 mmol/L EGTA,4.31 mmol/L CaCl<sub>2</sub>,0.5 mmol/L CdCl<sub>2</sub>,KOH 调 pH 至 7.2。ATP 以蒸馏水配成母液存于冰箱,使用前用细胞外液稀释成所需终浓度。其中 EGTA [ethylene glycol bis(β-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid] 为 Sigma 产品。

实验在室温(22~26 °C)下进行,采用膜片钳

技术的内面向外式方法记录河蟹眼柄 MTXO 神经内分泌细胞 ATP 敏感钾通道活动。以 TAC + TAC fit X 4.1.3 软件(Bruyton Corp. USA)进行单通道数据分析。通道电流幅值通过高斯曲线拟合后得到,实验数据以平均值 ± 标准差(mean ± SD)表示,参数比较用 *t* 检验,*P* < 0.05 为差异显著。

## 2 结果

### 2.1 河蟹眼柄 MTXO 细胞对不同浓度 ATP 的反应

实验在对称性高钾溶液(电极液和细胞浴液中 K<sup>+</sup>浓度为 200 mmol/L)中进行。形成膜片钳的内面向外记录模式后,将细胞膜片电压钳制在 -80 mV ~ +80 mV,记录到一系列开放概率不同的单通道钾电流。由于内面向外记录模式中细胞膜内面变成了外面,细胞浴液也变为细胞内液,通过灌流含 ATP 的细胞浴液可模拟正常生理状态下细胞内 ATP 的作用。形成内面向外记录模式后,依次灌流 ATP 浓度分别为 0.001,0.01,0.1,1 mmol/L 的细胞浴液,观察河蟹眼柄神经内分泌细胞对胞内 ATP 的反应。若有通道电流出现,则继续灌流 1 mmol/L ATP,观察通道活动情况。结果表明,ATP 对通道的抑制作用主要表现在通道开放概率的减少上,并存在明显的浓度依赖性,而对通道的电流幅度并没有影响。灌流 0.001 mmol/L ATP 对通道的活动的影响不明显,但随 ATP 浓度的继续增大,ATP 对通道的抑制作用逐渐增强(图 1,表 1),1 mmol/L ATP 可将所有钳制电压下通道电流的活动完全阻断。这表明高浓度的 ATP 可抑制 K<sub>ATP</sub>通道的活动并影响细胞的兴奋性。ATP 敏感钾通道(K<sub>ATP</sub>)的主要鉴定特征是激活及失活受细胞内 ATP 浓度的调控<sup>[10]</sup>。另外,本实验中内面向外式浴槽液中完全没有 Ca<sup>2+</sup>时该通道仍然激活,可排除钙激活钾通道。由于电极液和细胞浴液中均不含 Na<sup>+</sup>,并用 CdCl<sub>2</sub>阻断了膜片上 Ca<sup>2+</sup>流通,所以该通道不是 Na<sup>+</sup>,Ca<sup>2+</sup>通道。而 Cl<sup>-</sup>通道电流一般不易记录到<sup>[11]</sup>,且电导极大(约 400~430 pS),所以也不会是 Cl<sup>-</sup>通道。本实验膜片内外 K<sup>+</sup>相等,其 K<sup>+</sup>平衡电位应为 0 mV,与实验所记录到的通道翻转电位基本一致,证明河蟹眼柄 MTXO 细胞表达 ATP 敏感钾通道(K<sub>ATP</sub>)。

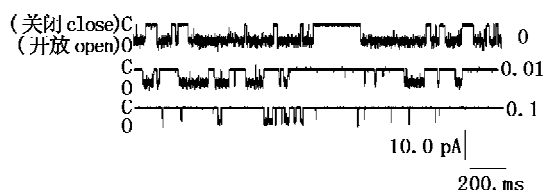


图1 溶液中 ATP 浓度分别为 0,0.01,0.1 mmol/L, 钳制电压在  $-80$  mV 时的电流图形  
图形右侧标出 ATP 浓度,左侧标出的 C 为通道关闭,O 为通道开放

Fig.1  $K_{ATP}$  channel currents recorded from an inside-out patch at  $-80$  mV bathed with three different ATP concentration indicated at the right of recordings. Closed (C) and open (O) current levels are indicated to the left of the traces

## 2.2 河蟹眼柄 MTXO 细胞表达 $K_{ATP}$ 的电生理特征

内面向外式记录模式形成后,将细胞膜维持在保持电位,由膜片钳放大器在  $\pm 80$  mV 范围内递级 ( $\pm 10$  mV) 输出去极化电压,记录到一系列开放概率和开放时间不同的  $K_{ATP}$ 。

在所记录的 32 例通道中,有 7 例呈二级开放,其余均呈一级开放状态。当膜电位为零时,未见有通道开放;通道电流的幅度随超极化或去极化程度加大而增大,通道开放概率明显增加,平均开放时间延长,平均关闭时间缩短,表现出明显的电压依赖性(图 2,表 2)。通道电流幅度在同一钳制电压下基本相同,呈波宽不等的矩形方波,其

表 1 溶液中 ATP 浓度分别为 0,0.01,0.1 mmol/L,钳制电压在  $-80$  mV 时通道的开放概率、平均开放时间和平均关闭时间

Tab.1 The open state probability, the mean opening time and the mean closing time of the single channel at  $-80$  mV bathed with three different ATP concentration

溶液中 [ATP] (mmol/L)	细胞数 no. of cell	开放概率 open state probability	平均开放时间 (s) mean opening time	平均关闭时间 (s) mean closing time
0	5	$0.8652 \pm 0.0317$	$0.1792 \pm 0.2016$	$0.0265 \pm 0.0552$
0.01	5	$0.6740 \pm 0.0274$	$0.1552 \pm 0.1757$	$0.0491 \pm 0.0794$
0.1	5	$0.4180 \pm 0.0251$	$0.1196 \pm 0.1027$	$0.0863 \pm 0.0549$

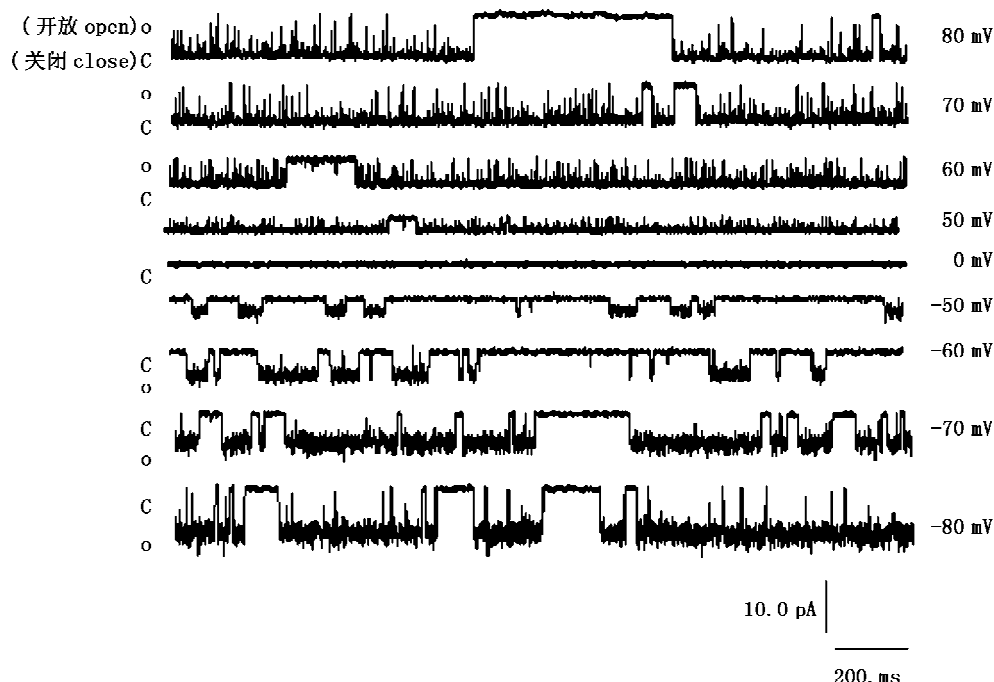


图 2 溶液中 ATP 浓度为 0 mmol/L 时,钳制电压在  $-80$  mV ~  $+80$  mV 下记录 ATP 敏感钾通道的电流图形  
图形右侧标出钳制电压,左侧标出的 C 为通道关闭,O 为通道开放

Fig.2  $K_{ATP}$  channel currents recorded from an inside-out patch at different membrane potentials  $-80$  mV -  $+80$  mV indicated at the right of recordings bathed with 0 mmol/L ATP, closed (C) and open (O) current levels are indicated to the left of the traces

表 2 溶液中 ATP 浓度为 0 mmol/L 时,不同钳制电压下 ATP 敏感钾通道的  
开放概率、平均开放时间、平均关闭时间和平均电流幅度

Tab.2 The open state probability, the mean opening time, the mean closing time and the mean  
current amplitude of the single channel at different membrane potentials( -80 mV - +80 mV)  
bathed with free ATP concentration(0 mmol/L)

钳制电位(mV) membrane potential	细胞数 no. of cell	开放概率 open state probability	平均开放时间(s) mean opening time	平均关闭时间(s) mean closing time	平均电流幅度(pA) mean current amplitude
-80	5	0.8652 ± 0.0317	0.1792 ± 0.2016	0.0265 ± 0.0552	-5.73 ± 0.34
-70	5	0.7763 ± 0.0183	0.1673 ± 0.1439	0.0371 ± 0.0545	-4.97 ± 0.31
-60	5	0.5237 ± 0.0233	0.0584 ± 0.0459	0.0612 ± 0.1023	-4.16 ± 0.27
-50	5	0.3822 ± 0.0417	0.0472 ± 0.0215	0.1872 ± 0.1315	-3.42 ± 0.29
50	5	0.1354 ± 0.0421	0.0024 ± 0.0019	0.1794 ± 0.1016	3.52 ± 0.23
60	5	0.1943 ± 0.0376	0.0037 ± 0.0042	0.1549 ± 0.1421	4.23 ± 0.26
70	5	0.3514 ± 0.0235	0.0078 ± 0.0034	0.0768 ± 0.0642	4.61 ± 0.31
80	5	0.4271 ± 0.0437	0.0235 ± 0.0041	0.0921 ± 0.0679	4.85 ± 0.42

幅度分布直方图呈对称的单峰状,并能很好地进行正态拟合。在某一钳制电压下进行长时程观察,未见通道有明显的时间依赖性失活。钳制在负电位时,单通道为内向开放,电流-电压(I-V)曲线为直线;钳制在正电位时,单通道为外向开放,电流幅度较钳制电位为负时略有减小的曲线,表明通道呈弱的内向整流性(图 3)。在钳制电压为负时,单通道的电导为(68.03 ± 4.31) pS( $n=7$ ),翻转电位为(1.18 ± 0.52) mV( $n=7$ )。

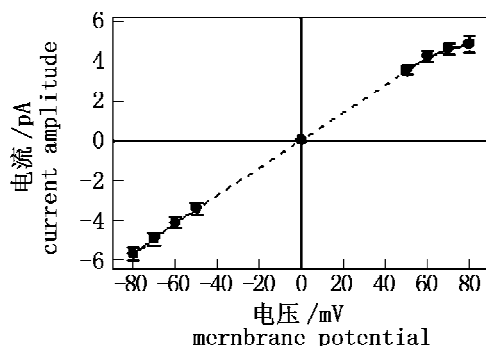


图 3 溶液中 ATP 浓度为 0 mmol/L 时,ATP 敏感钾通道电流-电压关系曲线

钳制电压为负时,单通道的电导为(68.03 ± 4.31) pS( $n=7$ )

Fig.3 Current-voltage relations curve of  $K_{ATP}$  channels bathed with 0 mmol/L ATP

The single-channel conductance at negative potentials were (68.03 ± 4.31) pS

### 2.3 优降糖和胆固醇对河蟹眼柄 MTXO 细胞 ATP 敏感钾通道的作用

优降糖是 ATP 敏感钾通道的特异性阻断剂,当细胞浴液中 ATP 浓度为 0 mmol/L 时,改变钳制电压即给予细胞膜不同程度的去极化刺激,当

出现明显通道电流后灌流 0.1 mmol/L 优降糖,7 min 后通道电流完全被阻断。结果表明,0.1 mmol/L 优降糖可明显阻断  $K_{ATP}$  开放活动(图 4)。这进一步证明河蟹眼柄神经内分泌细胞表达 ATP 敏感钾通道。



图 4 溶液中 ATP 浓度为 0 mmol/L 时,钳制电压在 -80 mV 下记录的  $K_{ATP}$  电流图形

和 0.1 mmol/L 优降糖对通道的阻断作用

图形右侧 A,B 分别表示添加 0 mmol/L ATP 和 0.1 mmol/L 优降糖作用下的电流图,左侧标出的 C 为通道关闭,O 为通道开放

Fig.4 currents with single-conductance of  $K_{ATP}$  channel recorded from an inside-out patch at potential of -80 mV bathed with 0 mmol/L ATP closed (c) and open (o) current levels are indicated to the left of the traces. A: 0 mmol/L ATP effecting on the  $K_{ATP}$  channel; B: 0.1 mmol/L glibenclamide effecting on the  $K_{ATP}$  channel

XO-SG 复合体是甲壳动物的内分泌调控中心,它分泌抑制性神经肽类激素的变化将导致动物蜕皮和性腺发育等重要生理活动规律的失常。胆固醇可通过抑制钙离子的内流调控眼柄抑制性神经肽类激素的分泌,进而影响河蟹的一些内分泌活动<sup>[12]</sup>。本实验记录了胆固醇对  $K_{ATP}$  通道活动的影响。结果表明,灌流 10  $\mu$ mol/L 胆固醇前后,河蟹眼柄神经内分泌细胞表达的 ATP 敏感钾通道的开放概率和平均开放时间没有明显变化,

通道活动没有受到抑制(表3)。表明胆固醇没有通过影响  $K_{ATP}$  这一途径来调控眼柄抑制性神经多肽激素的分泌。

表3 浴液中 ATP 浓度为 0 mmol/L, 钳制电压在 -80 mV 时, 灌流 10  $\mu$ mol/L 胆固醇前后通道的开放概率、平均开放时间和平均关闭时间

Tab.3 The open state probability, the mean opening time and the mean closing time of the single channel at -80 mV bathed with 0 mmol/L ATP before and after being added with 10  $\mu$ mol/L cholesterol

	细胞数 no. of cell	开放概率 open state probability	平均开放时间(s) mean opening time	平均关闭时间(s) mean closing time
灌流前 before	5	0.8652 $\pm$ 0.0317	0.1792 $\pm$ 0.2016	0.0265 $\pm$ 0.0552
灌流后 after	5	0.8357 $\pm$ 0.0444	0.1725 $\pm$ 0.2157	0.0301 $\pm$ 0.0653

### 3 讨论

XO-SG 是一个仅含肽能神经原的独立神经血管器,而且容易分离和维持生命状态,因此一直作为研究神经肽类激素的分泌调控的模型<sup>[8]</sup>。膜片钳自诞生以来就是研究离子通道和单个细胞分泌最有效的方法,但由于受培养细胞材料和研究手段的限制,对眼柄神经多肽激素分泌和调控机制的研究还停留在活体和组织水平<sup>[13-14]</sup>,仅对热带地蟹 (*Cardisoma carnifex*)<sup>[15]</sup>、淡水龙虾 (*Panulirus marginatus*)<sup>[16]</sup> 和中国对虾 (*Fenneropenaeus chinensis*)<sup>[17]</sup> 眼柄神经内分泌细胞进行了膜片钳研究。对甲壳动物眼柄神经内分泌细胞  $K_{ATP}$  通道的研究还未见报道。

本文结果直接证明了在河蟹眼柄 MTXO 神经内分泌细胞上  $K_{ATP}$  通道的存在。 $K_{ATP}$  通道具有多样性或异质性,电导变化很大,本研究发现河蟹眼柄 MTXO 神经内分泌细胞  $K_{ATP}$  通道电导为 (-68.03  $\pm$  4.31) pS ( $n=7$ ),具有弱的内向整流性,这与小鼠大脑皮层神经元<sup>[18]</sup>、成年大鼠海马 CA1 区锥体细胞<sup>[19]</sup>  $K_{ATP}$  通道性质基本相同。由于  $K_{ATP}$  通道具有受内源性 ATP 强烈抑制的特性,所以本实验采用膜片钳技术之内面向外式记录方法,当细胞浴液中完全不含或含有较低浓度 ATP (0.001 mmol/L) 时,可以较易观察到  $K_{ATP}$  通道电流开放的现象。但随 ATP 浓度增加,ATP 对通道的抑制作用增强,当细胞外液中 ATP 超过 0.1 mmol/L 后,去极化刺激不能诱发  $K_{ATP}$  电流。进一步的实验发现 1 mmol/L ATP 和 0.1 mmol/L 优降糖可明显阻断  $K_{ATP}$  开放活动,这表明高浓度的 ATP 可抑制  $K_{ATP}$  通道的活动并影响细胞的兴奋性。 $K_{ATP}$  的功能特点是将细胞的新陈代谢与电活动联系起来。河蟹眼柄 MTXO 细胞表达  $K_{ATP}$

通道,提示河蟹的代谢活动对眼柄神经多肽激素的分泌活动产生反馈调节作用。胆固醇既是蜕皮激素又是性激素合成的前体,但本实验中没有观察到胆固醇对  $K_{ATP}$  通道活动产生影响,说明胆固醇没有通过影响  $K_{ATP}$  通道这一途径来调控眼柄抑制性神经肽类激素的分泌。本文结果提示代谢活动和内分泌活动通过不同的途径调控着河蟹眼柄神经内分泌系统的分泌活动。

### 参考文献:

- [1] Cooke I M, Sullivan R E. Hormones and neurosecretion [C]// Bliss D E, eds. Biology of crustacea, 1982, 3: 205-209.
- [2] Keller R. Crustacean neuropeptides structure, function and comparative aspects [J]. Experimentia, 1992, 48: 439-448.
- [3] Wu S N, Adonis Z W, Ruey J S. Identification of two types of ATP-sensitive  $K^+$  channels in rat ventricular myocytes [J]. Life Science, 2007, (80): 378-387.
- [4] Seino S, Miki T. Physiological and pathophysiological roles of ATP-sensitive  $K^+$  channels [J]. Biophysics & Molecular Biology, 2003, (81): 133-176.
- [5] 孙金生, 刘安西, 杜育哲, 等. 中华绒螯蟹窦腺的显微和超微结构 [J]. 动物学报, 2001, 47(1): 27-31.
- [6] 孙金生, 刘安西, 陈家童. 河蟹 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] 孙金生, 刘安西, 陈家童, 等. 河蟹眼柄 MTXO 细胞离子通道的膜片钳研究 [J]. 生物物理学报, 2001, 17(2): 231-238.
- [8] 孙金生, 刘安西, 贺秉军, 等. 河蟹眼柄神经分泌细胞钾离子通道的种类和特征 [J]. 动物学报, 2001, 47(1): 97-91.

- [9] van Harreveld A. A physiological solution for freshwater crustaceans [J]. *Proc Soc Exp Biol Med*, 1936, 34: 428–432.
- [10] Lazdunski M. ATP-sensitive potassium channels: an over review [J]. *J Cardiovasc Pharmacol*, 1994, 24 (Suppl 4): S1.
- [11] Blatz A L. Properties of single fast chloride channels from rat cerebral cortex neurons [J]. *J Physiol*, 1991, 441: 1.
- [12] 孙金生, 刘安西, 贺秉军, 等. 不同甾醇类物质对河蟹眼柄神经分泌细胞 ICa 的影响 [J]. *海洋与湖沼*, 2001, 32(6): 627–634.
- [13] Keller R, Haylett B, Cooke I. Neurosecretion of crustacean hyperglycemic hormone evoked by axonal stimulation or elevation of saline  $K^+$  concentration quantified by a sensitive immunoassay method [J]. *J Exp Biol*, 1994, 188(1): 293–316.
- [14] Ollivaux C, Soyez D. Dynamics of biosynthesis and release of crustacean hyperglycemic hormone isoforms in the X-organ-sinus gland complex of the crayfish *Orconectes limosus* [J]. *Eur J Biochem*, 2000, 267(16): 5106–5114.
- [15] Grau S M, Cooke I M. Peptidergic neurons of the crab, *Cardisoma carnifex* in defined culture maintain characteristic morphologies under a variety of conditions [J]. *Cell Tissue Res*, 1992, 270(2): 303–317.
- [16] Onetti C G, García U, Valdiosera R F, *et al.* Ionic currents in crustacean neurosecretory cells [J]. *J Neurophysiol*, 1990, 64(5): 1514–1526.
- [17] 高春蕾, 孙金生, 相建海, 等. 中国对虾视神经节神经内分泌细胞电生理特征 [J]. *海洋与湖沼*, 2004, 35(6): 555–561.
- [18] Ohno-Shosaku T, Yamamoto C. Identification of an ATP-sensitive  $K^+$  channel in rat cultured cortical neurons [J]. *Pflugers Arch*, 1992, 422(3): 260–266.
- [19] 周英杰, 佟振清, 高天明. 成年大鼠海马 CA1 区锥体细胞  $K_{ATP}$  通道的特性 [J]. *生理学报*, 2001, 53(5): 344–348.

## **$K_{ATP}$ channels expressed in the neurosecretory cells of MTXO in the eyestalks of *Eriocheir sinensis***

ZHANG Zi-yi<sup>1</sup>, YU Ke-li<sup>1</sup>, SUN Jin-sheng<sup>1,2</sup>

(1. *College of Chemistry and Life Science, Tianjin Normal University, Tianjin 300387, China;*

2. *Tianjin Fishery Institute, Tianjin 300221, China*)

**Abstract:** Sensitivity to 0–1 mmol/L ATP of  $K_{ATP}$  channel in the neurosecretory cells of MTXO in the eyestalks of *Eriocheir sinensis* was observed with inside-out patch-clamp method and properties of  $K_{ATP}$  channels were studied with selective blocker and steroids. With symmetrical 200 mmol/L  $K^+$  on both sides of the excised membrane, the single-channel conductance was approximately 68 pS and the reversal potential was observed. These channels had a weak inward rectifying property. ATP applied inhibited channel activity in a concentration-dependent manner. The  $K_{ATP}$  currents can't be reduced by depolarized stimulation when concentration of ATP is greater than 0.1 mmol/L. Moreover, opening activity of  $K_{ATP}$  was blocked when 1 mmol/L ATP was applied. The  $K_{ATP}$  channels were not obviously affected by cholesterol, but they were completely blocked by 0.1 mmol/L glibenclamide. The adenosine triphosphate-sensitive potassium channel, termed  $K_{ATP}$  channel, is characterized by a strong inhibition of channel activity by intracellular ATP thereby coupling the metabolic state of cells to their excitability and regulating a variety of functions. These results indicate that metabolic state of MTXO has feedback regulation on the secretion of neuropeptides hormone. Cholesterol can't control secretion of eyestalks hormone by affecting  $K_{ATP}$  channels.

**Key words:** *Eriocheir sinensis*; MTXO; neurosecretory cell; ATP-sensitive  $K^+$  channel; patch clamp technique