

不同甾醇类物质对河蟹眼柄神经 分泌细胞 I_{Ca} 的影响*

孙 金 生

(中国科学院海洋研究所 青岛 266071, 天津市水产研究所 天津 300221)

刘安西 贺秉军 陈家童

(南开大学生物系 天津 300074)

相 建 海

(中国科学院海洋研究所 青岛 266071)

提要 采用膜片钳技术测定了不同甾醇类物质对河蟹眼柄视神经节端髓 X 器官(MTXO)神经分泌细胞钙离子通道电流(I_{Ca})的作用,探讨河蟹眼柄神经肽类激素分泌和养殖河蟹性早熟的调控机制。结果表明,河蟹眼柄 MTXO 三种类型神经分泌细胞均表达高电压激活 L 型钙通道,激活电压为 -30mV , $+10\text{mV}$ 达到峰值。甾醇类物质中,只有胆固醇对河蟹眼柄 B 型神经内分泌细胞的钙电流存在抑制作用,其作用具有浓度依赖性,抑制强度不随时间的延长而加强。 $1\mu\text{mol/L}$ 的胆固醇作用 4h 可抑制 B 型细胞 $50.49\% \pm 5.98\%$ 的钙电流。

关键词 河蟹, MTXO, 神经分泌细胞, 甾醇类激素, 钙电流, 早熟

中图分类号 Q45

眼柄 X 器官- 窦腺复合体(XO-SG)一直是甲壳动物内分泌的重点研究内容,它是一个仅含肽能神经原的神经血管器。由于受培养细胞材料和研究手段的限制,过去对这一系统的研究只限于在活体及组织水平上进行(Keller *et al.*, 1994; Ollivaux *et al.*, 2000),尚未在单细胞水平进行神经肽类激素的分泌调控研究。我国对甲壳动物内分泌的研究刚刚开始(蔡生力, 1998),仅对锯缘青蟹(*Scylla serrata*)、罗氏沼虾(*Macrobrachium rosenbergii*)、中国对虾(*Penaeus chinensis*)进行了组织学和细胞学研究(上官步敏等, 1994, 1995; 姚泊, 1995; 康现江等, 1998)。以前对河蟹的研究局限于胚胎发育、幼体形态和二秋龄河蟹性腺的组织学和细胞学等方面(顾志敏等, 1997; 堵南山等, 1992; 陈柄良等, 1992),缺乏对河蟹生殖内分泌的了解,甚至一些基础问题尚不清楚,对早熟河蟹的研究还停留在生产性调查分析水平,至今尚未确定早熟河蟹的形成原因和调控机制。作者在对河蟹(*Eriocheir sinensis*)眼柄 X 器官神经内分泌细胞进行离体培养和细胞膜离子通道特征研究的基础上(孙金生等, 2000),首次采用膜片钳技术测定不同甾醇类物质对河蟹眼柄神经内分泌细胞 I_{Ca} 的

* 国家 973 重点基础研究项目资助, G1999012007 号; 天津市农业攻关项目资助, 003120511 号。孙金生, 男, 出生于 1965 年 4 月, 博士后, E-mail: jinshengsun@263.net

收稿日期: 2000-09-18, 收修改稿日期: 2001-05-08

作用,为进一步研究河蟹眼柄神经肽类激素的分泌调控机制和早熟河蟹的形成原因打下基础。作用,为进一步研究河蟹眼柄神经肽类激素的分泌调控机制和早熟河蟹的形成原因打下基础。

1 材料与方法

1.1 动物解剖和神经分泌细胞的体外分离与培养

实验动物为取自天津市宁河县仁凤乡河蟹养殖场的正常一龄蟹种,壳宽为 2.1—2.4 cm。动物解剖和细胞培养方法详见孙金生等(2000)。简述如下:实验蟹经 1□30 碘伏浸泡消毒 20 min 后,在 TJ-1 型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,并沿鼻窦的轴路,在视神经节端髓取出 X 器官(MTXO)。MTXO 于 24℃ 振动消化 1.5 h 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 倍河蟹生理盐水配制的 L-15 培养基(pH=7.5),临用前加入 0.1 mg/ml 庆大霉素、150 mmol/L 葡萄糖和 1 mmol/L 谷氨酰胺。选取低密度、轴突再生完整的培养了 48 h 的 A、B、C 三种类型河蟹眼柄 MTXO 神经内分泌细胞进行全细胞膜片钳测定。

1.2 膜片钳实验和数据的采集、处理

用高阻封接全细胞膜片钳技术记录电信号。信号由膜片钳放大器(PC-II B,华中理工大学生物化学与生物物理研究所)输出至计算机。电刺激脉冲的给出及信号采入均通过计算机程序 IBBClamp 及 ADDA 接口完成。低通 Bessel 滤波为 5 kHz。电极电阻为 3—5 MΩ。记录 I_{Ca} 外液为(mmol/L): 150 CsCl, 50 CaCl₂, 2.6 MgCl₂, 120 Glucose, 10 HEPES, 30 TEA, 3.4 AP, 0.001 TTX; 记录 I_{Ca} 内液为(mmol/L): 200 CsCl, 5 NaCl, 5 MgCl₂, 20 HEPES, 5 ATP—2Na⁺, 5 BAPTA, 10 TEA, CsOH 调 pH=7.5。TTX、CdCl₂、4-AP 和 TEA 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。

1.3 药品及给药方法

β-蜕皮酮(β Ecdysone)和雌二醇(17β Estradiol)为 Sigma 公司产品,由河北师范大学生物系刘敬泽先生赠送,大豆黄酮(Daidzein)由南京农业大学动物科学系韩正康教授赠送。河豚毒素(Tetrodotoxin TTX)、氯化镉(CdCl₂)、4-氨基吡啶(4- Aminopyridine 4- AP)、四乙胺(Tetrathylammonium TEA)、胆固醇(Cholesterol Sigma)、保幼激素-III(Juvenile hormone)均为 Sigma 公司产品。其他试剂为国产分析纯。胆固醇、β-蜕皮酮、保幼激素-III用丙酮,大豆黄酮用二甲基亚砜(DMSO)配成母液存于冰箱,使用前用记录钙电流外液在超声波下配成所需浓度,最终丙酮或 DMSO 含量不超过 1%。

实验采用两种给药方法,分别观察不同甾醇类激素对河蟹眼柄 MTXO 细胞钙离子通道电流的快速作用和缓慢作用。第一种方法:形成全细胞构型后,采用微操纵器操纵尖端直径 50 μm 的加药管进行加药,记录同一细胞吹加药物前后数分钟内全细胞钙电流的变化。第二种方法:记录同一 35 mm 培养皿细胞与甾醇类激素长时间孵育后全细胞 I_{Ca} 的变化,观察不同甾醇类物质对河蟹 MTXO 细胞钙电流的影响。每一个 35 mm 培养皿的细胞仅由一只正常蟹种的一个 MTXO 于体外分离而得,并只用于一个浓度激素一个时间的实

验, 每个实验重复 3 次。记录细胞均为培养 48h、轴突已完全再生完整的细胞, 每次记录的细胞数均为 5。在 40 倍镜下, 通过测微尺挑选大小一致的三种类型细胞进行全细胞钙电流记录, 即每个实验中记录的 A、B、C 型细胞的胞体直径均分别为 $34\mu\text{m}$ 、 $25\mu\text{m}$ 、 $15\mu\text{m}$, 以消除不同细胞大小对记录 I_{Ca} 结果的干扰。正常蟹种 $34\mu\text{m}$ 、 $25\mu\text{m}$ 、 $15\mu\text{m}$ 的 A、B、C 三种类型细胞平均 I_{Ca} 分别为 $-695 \pm 37\text{pA}$ 、 $-979 \pm 64\text{pA}$ 、 $-467 \pm 27\text{pA}$ 。全细胞 I_{Ca} 的记录均在形成全细胞构型后 5min 进行, 每次记录的保持电压均为 -50mV , 在 $-50\text{mV} \rightarrow +50\text{mV}$ 范围内给予 10mV 的阶跃去极化电压刺激, 记录结果以峰值电流与 80ms 记录结束时电流的平均 I_{Ca} 表示。

2 结果

2.1 河蟹眼柄神经分泌细胞钙离子通道种类和特征

河蟹眼柄 MTXO 由 A、B、C 三种类型细胞组成。在细胞外液中添加 3mmol/L 4-AP 和 50mmol/L TEA 消除外流钾电流 I_A 和 I_K 的干扰并添加 $0.5\mu\text{mol/L}$ TTX 阻断 I_{Na} 条件下, 将膜电位钳制在 -50mV , 给予一系列以 10mV 步幅递增的去极化刺激, A、B、C 三种类型细胞均可记录到一系列失活缓慢的持续内向电流(图 1a), 激活阈值约在 -30mV , $0 \sim 20\text{mV}$ 达到最高峰值, 其达到峰值时间比 I_{Na} 缓慢, 在 0mV 去极化电压刺激下约需 $6 \sim 8\text{ms}$ 。将膜电位分别钳制在 -70mV 与 -40mV , 记录的 I_{Ca} 的激活阈值、初始峰值和持续内向电流的幅值上没有明显差别, 在 -40mV 保持电压下几乎可以记录到 100% 的 I_{Ca} (图 1b)。该电流对钙离子通道阻断剂 CdCl_2 敏感, 在细胞外液中吹加 0.5mmol/L CdCl_2 可使其在 5min 内完全被阻断(图 2)。由于低电压激活、快速失活的 T 型钙通道电流一般在膜电位为 -60mV 时激活, -10mV 达峰值(Narahashi *et al.*, 1987), -40mV 时失活(潘胜军等, 1995), 因此上述结果表明河蟹眼柄 MTXO 神经分泌细胞主要表达高电压激活、缓慢失活的 L 型钙通道。A 型细胞 I_{Ca} 的峰值电流为 $400 \sim 1200\text{pA}$, B 型细胞为 $500 \sim 1500\text{pA}$, C 型细胞为 $150 \sim 500\text{pA}$ 。

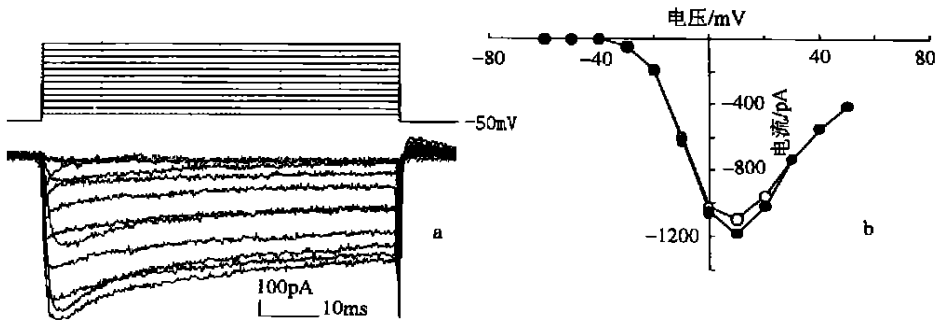


图 1 河蟹眼柄 $25\mu\text{m}$ B 型神经分泌细胞全细胞钙电流(a)

及保持电压分别为 -70mV (●) 与 -40mV (○) 条件下记录的全细胞钙电流-电压关系曲线(b)

Fig. 1 I_{Ca} resolved from the neurosecretory cell type B ($25\mu\text{m}$) of MTXO in the eyestalk of *Eriocheir sinensis* (a) and $I-V$ curves $V_h = -70\text{mV}$ (●) and -40mV (○) (b)

在全细胞方式下记录的 L 型钙电流随时间的推移而逐渐减小的现象称钙电流的 Rundown(或 Washout/Dropout)。Rundown 的有关机制尚未澄清, 可能涉及透析所引起的胞

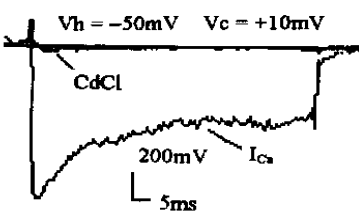


图2 氯化镉对钙电流的阻断作用
Fig.2 The blocking effect of CdCl₂ on I_{Ca}

浆成分的丢失, 以及与胞内钙、钙激活的胞浆磷酸酶、膜结合的磷酸酶或蛋白酶等多种因素有关。作者采用在记录钙电流的电极内液中添加钙的高亲和力螯合剂 BAPTA, 并补充能量物质(ATP)的方法, 有效的消除了全细胞钙电流的 Rundown 现象, 三种类型细胞 I_{Ca} 在 5—25min 内记录的结果均无明显的变化, 衰减不超过 5%, 符合药理学实验的要求, 药物的快速作用实验均在此段时间内进行。

2.2 甾醇类激素对河蟹眼柄 MTXO 细胞 I_{Ca} 无快速作用

得到全细胞构型后, 置保持电压于 - 50mV, 给予 - 40—+ 50mV 范围内 10mV 的阶跃去极化电压刺激, 稳定记录 I_{Ca} 5min, 最后一次记录作为对照, 然后分别吹加 10 μ mol/L 的胆固醇、 β 蜕皮酮、保幼激素 III、雌二醇、大豆黄酮, 在 5—25min 内每隔 5min 记录一次全细胞 I_{Ca}, 每个细胞只用于一种药物浓度实验。结果表明, 上述各种药物在 20min 内对河蟹三种类型神经分泌细胞 I_{Ca} 均无明显影响(表 1), 在 20min 内三种类型细胞 I_{Ca} 降低率均不超过 5%, 无显著性差异。这一结果表明, 无论内源或外源甾醇类激素对河蟹眼柄神经分泌细胞 I_{Ca} 均无快速作用。

表 1 不同甾醇类激素对河蟹眼柄神经分泌细胞 I_{Ca} 快速作用

Tab.1 The rapid effects of some kinds of steroid on I_{Ca} from neurosecretory cells

全细胞 I _{Ca} 变化率(%)	A 型细胞		B 型细胞		C 型细胞	
	1min	20min	1min	20min	1min	20min
胆固醇	0.18+ 0.01(3)	4.23 $\pm$ 0.54(3)	0.23 $\pm$ 0.06(3)	3.12 $\pm$ 1.08(4)	0.08 $\pm$ 0.01(3)	2.38 $\pm$ 0.21(3)
保幼激素	0.28+ 0.09(4)	3.59 $\pm$ 0.83(3)	0.16 $\pm$ 0.05(3)	4.08 $\pm$ 0.91(3)	0.19 $\pm$ 0.02(4)	3.12 $\pm$ 0.69(3)
蜕皮激素	0.15+ 0.05(3)	4.32 $\pm$ 0.76(5)	0.19 $\pm$ 0.08(5)	9.72 $\pm$ 1.11(3)	0.66 $\pm$ 0.09(3)	3.78 $\pm$ 0.63(3)
雌二醇	0.38+ 0.19(4)	4.69 $\pm$ 1.13(3)	0.23 $\pm$ 0.05(4)	4.03 $\pm$ 0.61(3)	0.35 $\pm$ 0.13(4)	6.28 $\pm$ 1.89(3)
大豆黄酮	0.21+ 0.05(3)	3.95 $\pm$ 0.19(4)	1.39 $\pm$ 1.01(5)	6.98 $\pm$ 1.91(3)	0.33 $\pm$ 0.11(3)	2.88 $\pm$ 0.68(3)

注: 括号内数字为样本数

2.3 甾醇类激素对河蟹眼柄 MTXO 细胞 I_{Ca} 的缓慢作用

在预实验的基础上, 分别用 0.01、0.1、1、10 μ mol/L 的胆固醇、 β 蜕皮酮、保幼激素 III、雌二醇、大豆黄酮, 与培养 48h 的河蟹眼柄三种类型神经分泌细胞分别孵育 2h、4h、6h, 于 - 50mV 保持电压下记录细胞平均全细胞钙电流变化率。结果表明, 上述甾醇类激素中, 只有胆固醇处理的正常蟹种眼柄 B 型神经分泌细胞全细胞平均 I_{Ca} 发生明显变化。

胆固醇不影响 B 细胞通道电流的电压特性, 对平均全细胞 I_{Ca} 的抑制表现明显的浓度依赖性, 0.01、0.1、1、10 μ mol/L 的胆固醇处理 4h 后, B 型细胞全细胞 I_{Ca} 的峰值电流分别有 12.26% $\pm$ 4.30%、35.56% $\pm$ 3.51%、50.49% $\pm$ 5.45%、59.27% $\pm$ 5.98% 被抑制。T 检验结果均为差异显著(图 3a)。

胆固醇对正常蟹种 B 型细胞 I_{Ca} 的调制作用不存在时间依赖性。图 3b 是在含有

14μmol/L 的胆固醇外液中, 分别于 2h、4h、6h 记录的正常蟹种 B 型细胞全细胞 I_{Ca} 的平均电流-电压关系曲线。用 14μmol/L 胆固醇分别处理正常蟹种眼柄 B 型神经分泌细胞 2h、4h、6h 后, B 型细胞全细胞平均 I_{Ca} 于 4h 左右开始受到抑制, 峰值电流的幅值降低为对照的 52%, 至 6h 后胆固醇的抑制作用并未明显增强, 峰值电流的变化率约为 53%。 T 检验结果进一步表明, 对照与 2h 的结果无明显差异, 与 4h、6h 表现为极显著性差异, 而 4h 与 6h 未表现显著性差异。这一结果表明胆固醇对 B 型细胞 I_{Ca} 的抑制作用在近 4h 左右发生, 其抑制 B 型细胞 I_{Ca} 的作用不随时间的延长而增强。

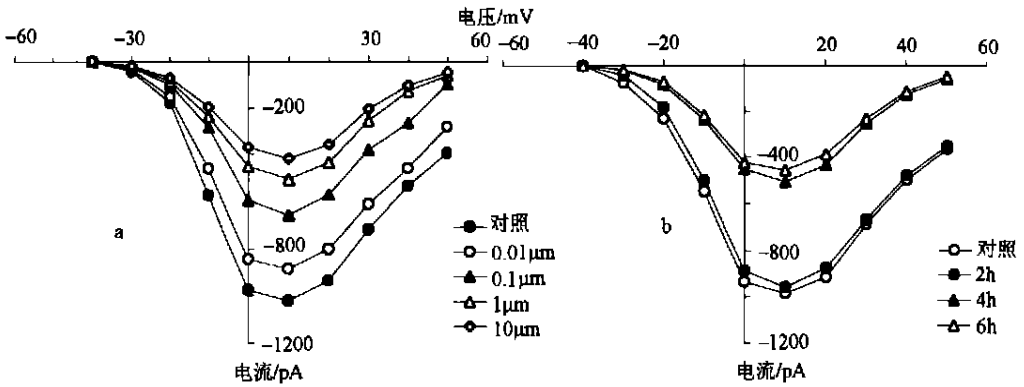


图 3 胆固醇不同浓度(a) 和不同处理时间(b) 对 B 型细胞 I_{Ca} 的影响

Fig. 3 The effects of different concentration (a) and lasting duration (b) of cholesterol on the I_{Ca} resolved from the cell type B

由于甾醇类激素对细胞的作用多为可逆性的调制过程, 每次实验结束后, 将含有胆固醇的外液换为正常的标准外液, 重新记录细胞的 I_{Ca} , 并与对照比较, 检验胆固醇抑制正常蟹种 B 型神经分泌细胞 I_{Ca} 实验的可靠性, 还可进一步观察胆固醇对 B 型细胞的可逆性调制作用。结果表明, 更换正常的标准外液后数分钟, 胆固醇对 B 型细胞 I_{Ca} 的抑制便消失。有趣的是: 实验中发现少数细胞更换外液后全细胞平均 I_{Ca} 达到 1500pA 以上(正常蟹种 24μmB 型细胞平均 I_{Ca} 为 1000pA 左右), 此时吹加 10μmol/L 胆固醇, 3min 内约抑制 50% 的 I_{Ca} (图 4)。

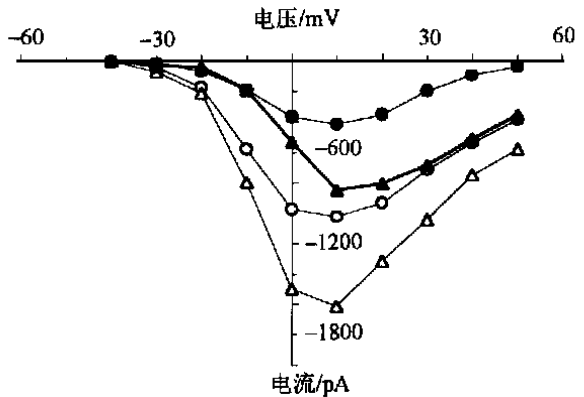


图 4 胆固醇对 B 型细胞 I_{Ca} 的缓慢作用和快速作用

Fig. 4 The slow and rapid effects of cholesterol on I_{Ca} resolved from the cell type B

—○— 对照; —●— 胆固醇 4h; —△— 正常外液;
—▲— 吹加胆固醇 3min

这种现象是否说明胆固醇对河蟹眼柄神经分泌细胞 I_{Ca} 存在非基因组调制的快速作用还有待进一步详细观察。

3 讨论

3.1 胆固醇对河蟹眼柄 MTXO 细胞钙离子通道的作用机制

甾醇类激素存在基因组和非基因组两种作用机制。通过基因组作用一般时间较长, 又称缓慢作用。通过非基因组机制的作用特点是潜伏期极短, 在数秒到数分钟发生效应, 撤除激素后作用迅速消失, 因此也称甾体激素作用的非基因组机制为快速作用, 其作用机理目前尚不清楚。本文结果表明, 胆固醇与河蟹眼柄神经分泌细胞经过一个较长时间的孵育作用后, 抑制了钙电流的幅值, 通过对钙离子内流的缓慢抑制, 调制神经肽激素的分泌。但另外一些现象表明, 吹加胆固醇 3min 后可使河蟹眼柄神经分泌细胞 50% 的钙电流受到抑制, 似乎表明胆固醇又可通过非基因组作用机制调控河蟹眼柄神经分泌细胞钙电流。虽然这种作用机制尚需进一步研究, 但已有实验证实甲壳动物眼柄神经分泌细胞能对体内外环境的变化在数分钟内作出反应并调整其激素的分泌过程。如将乳酸注射至动物体内, 30min 内就可以在血淋巴中检测到 CHH 和葡萄糖的升高, 而处在应激状态下的蟹数分钟内 CHH 就升高了, 随即血糖浓度升高。

3.2 养殖河蟹性早熟的调控机制

动物的性腺发育规律决定于遗传本质, 直接受内分泌激素的调控是一个不争的事实。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。钙离子的内流是动物激素刺激-分泌偶联的关键, 激素释放的胞吐作用遵循量子释放规律(黄卫华等, 1999)。胞内记录和活体灌流实验亦证明, 甲壳动物 RPCH 和 CHH 族神经肽类激素亦为 Ca^{2+} 依赖性分泌(Cooke *et al.*, 1984; Keller *et al.*, 1994)。因此, I_{Ca} 的大小反映了眼柄神经肽类激素分泌的变化。

同一地区的养殖河蟹与自然种群河蟹的外部环境条件一致, 主要区别在于所食饵料不同, 而饲料中与河蟹性腺发育相关的成分主要是甾醇类物质。本文结果表明, 雌二醇和植物雌激素-大豆黄酮等外源甾醇类激素均不影响河蟹眼柄神经内分泌细胞 I_{Ca} , 只有胆固醇对 B 细胞 I_{Ca} 存在明显的浓度依赖性抑制作用。这一结果表明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, 影响河蟹的一些内分泌活动。由于河蟹眼柄 B 细胞与热带地蟹(*Cardisoma carnifex*) 和淡水螯虾(*Panulirus marginatus*) 体外培养的分泌 CHH/MH/GH 族神经肽类激素细胞的大小、形态和体外生长方式相似(Cooke *et al.*, 1989; Grau *et al.*, 1992), 而且胆固醇既是蜕皮激素又是性激素合成的前体, 高浓度的胆固醇(14mol/L 以上) 将尤其促进 Y 器官和性器官合成和分泌蜕皮激素和性激素的活动。河蟹自身不能合成胆固醇, 只能吸收和利用饵料中的胆固醇, 合成蜕皮激素和性激素, 而养殖河蟹饵料中的胆固醇含量往往偏高, 导致养殖河蟹经常摄食过量的胆固醇并在体内过量积累。这一方面可能造成了河蟹蜕皮激素(MH) 的分泌活动异常增强, 使养殖河蟹的蜕皮、发育过程过快, 影响了河蟹性腺的正常发育; MH 也可能直接作用于性腺, 促进性腺发育。这与生产中观察到早熟河蟹蜕皮、发育过快, 个体一般稍大于正常蟹种而远小于正常成熟河蟹的结果相吻合(金刚等, 1999)。早熟河蟹个体大于正常蟹种的原因是同期内蜕皮次数多的结果, 其个体远小于正常成熟河蟹的原因是由于缩短蜕皮周期造成每次蜕皮增重的比例太低, 这可能也是目前养殖河蟹规格偏小的原因。另一方面, 胆固醇在体内过量积累也可能直接促进了性腺促进激素(GSH) 和法尼酸甲酯及 17β 雌二醇、睾酮

等甾醇类性激素的合成和分泌,造成性腺发育过快,成熟过早。生产中经常观察到投喂动物性饵料过多(摄取胆固醇多)的养殖河蟹性早熟的比例偏高似与此相关,前期投喂动物性饵料占体重 1.5 倍的比约占体重 3.0 倍早熟河蟹发生的比例低 11.6 个百分点(李岫, 1999)。

养殖河蟹性早熟是一个复杂的调控过程,受多种激素的调控和综合环境因素的影响。阐明性早熟机制尚需大量的基础研究工作,特别是对河蟹眼柄神经内分泌细胞的功能和神经肽类激素的分泌调控机制研究,以进一步探讨胆固醇在养殖河蟹性早熟中的作用和营养过剩、有效积温和盐度偏高等一些或综合养殖环境因素对河蟹内分泌活动和早熟过程的影响。

参 考 文 献

- 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. 锯缘青蟹窦腺显微和超微结构研究. 动物学报, 41(4): 341—346
- 孙金生, 刘安西, 陈家童等, 2000. 河蟹眼柄 MTXO 细胞离体培养和细胞学研究. 水生生物学报, 24(4): 375—381
- 李 岫, 1999. 稻田养殖一龄河蟹性早熟的原因及防止技术. 辽宁农业科学, (1): 43—44
- 陈炳良, 堵南山, 1992. 中华绒螯蟹幼体中肠的超微结构. 海洋与湖沼, 23(5): 533—536
- 金 刚, 李钟杰, 1999. 一秋龄成熟中华绒螯蟹的生物学. 湖泊科学, 11(1): 52—56
- 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
- 顾志敏, 何林岗, 1997. 中华绒螯蟹卵巢发育周期的组织学细胞学观察. 海洋与湖沼, 28(2): 138—145
- 堵南山, 陈炳良, 赖 传, 1992. 中华绒螯蟹幼体消化系统发育的研究. 海洋与湖沼, 23(1): 79—82
- 黄卫华, 胡 深, 庞代文等, 1999. 单个细胞释放时空监测. 科学通报, 44: 2129—2135
- 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
- 蔡生力, 1998. 甲壳动物内分泌学研究展望. 水产学报, 22(2): 154—161
- 潘胜军, 周兆年, 1995. 急性低氧对豚鼠心肌细胞 L 型钙通道的影响. 生理学报, 47(5): 435—440
- Cooke I M, Grau M R, Haylett B *et al*, 1989. Crustacean peptidergic neurons in culture show immediate outgrowth in simple medium. Proc Natl Acad Sci USA, 86: 402—406
- Cooke I M, Haylett B A, 1984. Ionic dependence of secretory and electrical activity evoked by elevated K^+ in a peptidergic neurosecretory system. J Exp Biol, 113: 289—321
- Grau M R, Cooke I M, 1992. Peptidergic neurons of the crab, *Cardisoma armifex*, in defined culture maintain characteristic morphologies under a variety of conditions. Cell Tissue Res, 270: 303—317
- Keller R, Haylett B, Cooke I M, 1994. Neurosecretory of crustacean hyperglycemic hormone evoked by axonal stimulation or elevation of saline K^+ concentration quantified by a sensitive immunoassay method. J Exp Biol, 188: 293—316
- Narahashi T, Tsunoo A, Yoshii M, 1987. Characterization of two types of calcium channels in mouse neuroblastoma cells. J Physiol, 383: 231—249
- Ollivaux C, Soye D, 2000. Dynamics of biosynthesis and release of crustacean hyperglycemic hormone isoforms in the X-organ-sinus gland complex of the crayfish *Orconectes limosus*. Eur J Biochem, 267: 5106—5114

EFFECTS OF SEVERAL STEROIDS ON I_{Ca} FROM NEUROSECRETORY CELLS IN THE EYESTALK OF *ERIOCHEIR SINENSIS*

SUN Jin-Sheng

(Institute of Oceanology, The Chinese Academy of Sciences, Qingdao, 266071,
Tianjin Fishery Institute, Tianjin, 300221)

LIU An-Xi, HE Bing-Jun, CHEN Jia-Tong

(Department of Biology, Nankai University, Tianjin, 300074)

XIANG Jia-Hai

(Institute of Oceanology, The Chinese Academy of Sciences, Qingdao, 266071)

Abstract The whole-cell patch clamp technique was used to examine the effects of several steroids on the I_{Ca} resolved from the neurosecretory cells dissociated from the X-organ terminalia (MTXO) of optic ganglion in the eyestalk of Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*). When solution that suppressed the outward currents was used, a slow (time to peak current 6–8ms at +10mV), Cd^{2+} -sensitive Ca^{2+} current (I_{Ca}) was resolved in three cell types. In the presence of TTX, I_{Ca} was activated at potential -40mV, was maximal at +10mV, and the form of the Ca^{2+} current $I(V)$ was unchanged by changes of holding potential between -40mV and -70mV. The size and feature of I_{Ca} evoked from cell types A, B, C dissociated from MTXO in the eyestalk of cultured juvenile crabs were unchanged in the presence or absence of β -ecdysone, β -estradiol, daidzein, juvenile hormone (JH III), but only in the presence of cholesterol, the size of I_{Ca} evoked from cultured cell type B decreased depending on concentrations. In the presence of 14 μ mol/L cholesterol, 50.49% $\pm$ 5.98% of I_{Ca} was inhibited after 4h, the releasing amounts of neuropeptide were also inhibited. The result suggest that Cholesterol was excessive accumulated in the body of cultured crabs due to the high content of Cholesterol in the feeds. Over-dose Cholesterol promote the synthesis and the release of MH in the Y-organ by inhibiting the neuropeptide secretion from the neurosecretory cells in the XO-SG complex. Furthermore, MH shorten molting period and accelerating the gonadal development. This is the major cause giving rise to precocious mature in the cultured Chinese mitten crab.

Key words *Eriocheir sinensis*, MTXO, Neurosecretory cells, Steroids, I_{Ca} , Precocity