

河蟹眼柄神经分泌细胞离子通道的膜片钳研究

孙金生^{1,3} 刘安西², 陈家童², 贺秉军², 马维林³, 相建海¹

(1. 中国科学院海洋研究所海洋生物开放实验室, 山东 青岛 266071;

2. 南开大学生物学系, 天津 300071; 3. 天津市水产研究所, 天津 300221)

摘要: 采用全细胞膜片钳技术对培养 12~24 小时不同形态河蟹眼柄视神经节端髓 X 器官 (MTXO) 神经分泌细胞离子通道进行了研究。结果表明, 河蟹眼柄 MTXO 中分布的 A、B、C 三种类型神经分泌细胞均可记录到由内向电流和外向电流组成的正常全细胞电流。内向电流由高电压激活钙离子通道电流 (I_{Ca}) 和对 TTX 敏感钠离子通道电流 (I_{Na}) 组成。 I_{Ca} 的激活电压为 -30mV , 在 $0\sim+20\text{mV}$ 电压下达到峰值, 在 -40mV 和 -70mV 保持电压下记录的 I_{Ca} 激活阈值、初始峰值及 $I-V$ 曲线无明显差别。外向电流明显, 幅值较大, 包括对 4-AP 敏感的快速激活、快速失活钾离子通道电流 (I_K) 和对 TEA 敏感的缓慢激活、缓慢失活钾离子通道电流 (I_{Ks})。正常蟹种、二龄成蟹和早熟蟹种 MTXO 神经分泌细胞均表达电压门控钠、钾、钙离子通道, 通道电流和电压特征无明显区别。

关键词: 甲壳动物; 中华绒螯蟹; MTXO; 神经分泌细胞; 离子通道

中图分类号: Q73 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-6737(2001)02-0235-06

眼柄视神经节 X 器官-窦腺复合体 (XO-SG) 是甲壳动物重要神经内分泌器官, 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) 等多种神经肽类激素, 调控甲壳动物的生殖、发育和蜕皮等重要生理功能^[1,2]。中华绒螯蟹 (*Eriocheir sinensis*) 俗称河蟹, 是我国重要经济蟹类之一, 我们已对河蟹眼柄 XO-SG 复合体超微结构进行了较全面观察, 同时进行了眼柄视神经节端髓 X 器官 (MTXO) 神经分泌细胞离体培养和细胞学研究, 并依据大小、形态、超微结构和体外生长方式等特征区分出 A、B、C 三种类型细胞^[3]。鉴于细胞膜的电活动是神经细胞信号传导和神经激素分泌活动的基础, 尤其钙离子内流是启动神经肽类激素分泌的关键, 我们进行了河蟹眼柄 MTXO 神经分泌细胞电压门控离子通道的膜片钳研究, 以期认识这一系统的活动规律和进一步研究神经分泌的调控机制打下基础, 同时为河蟹养殖生产实践研究提供科学依据。

1 材料和方法

1.1 MTXO 神经分泌细胞的分离与培养

一龄蟹种、早熟蟹种和二龄成蟹取自天津市宁河县仁凤乡河蟹养殖场, 壳宽分别为 2.1~2.3cm、3.8~4.3cm 和 5.1~5.4cm。实验蟹经 1:30 碘伏浸泡消毒 20 分钟后, 在 TJ-1 型超净工作台中心切下眼柄。经酒精消毒和无菌河蟹生理盐水 (210mmol/L NaCl; 13.6mmol/L

收稿日期: 2000-09-11

作者简介: 孙金生, 1965 年生, 博士后, 电话: (0532)2879062-5211, E-mail: jinshengsun@263.net.

实验海洋生物学开放研究实验室研究报告第 261 号

KCl; 3.8mmol/L MgCl₂; 2.6mmol/L Na₂SO₄; 10mmol/L Hepes; 1mg/ml 庆大霉素, pH7.5。按 Van Harreveld^[4] 配方改进) 冲洗三遍后, 剥离外骨骼和肌肉, 取出视神经节, 并沿窦腺的轴路^[5], 在视神经节端髓取出 MTXO。于 24°C 振荡消化 1.5 小时后, 在 0.5ml 的培养液中搅动打散细胞, 分散的细胞于 24°C~26°C、黑暗、潮湿条件下培养。消化酶液为溶解于无 Ca²⁺、Mg²⁺ 生理盐水的 0.3% 胰蛋白酶 (Sigma 产品), 生理盐水中的 CaCl₂ 和 MgCl₂ 由 NaCl 代替。培养液为 1.75 倍河蟹生理盐水配制的 L-15 培养基 (pH7.5), 临用前加入 0.1mg/ml 庆大霉素、150mmol/L 葡萄糖和 1mmol/L 谷氨酰胺。选取低密度、轴突再生完整的培养了 12~24 小时的神分泌细胞进行全细胞膜片钳测定。

1.2 电生理记录

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-IIB, 华中理工大学生物物理与生物化学研究所) 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 IBBClamp 及 ADDA 接口完成。记录结果经 t-检验, 数据 $\bar{X} \pm SE$ 表示。低通 Bessel 滤波为 5 kHz。电极电阻 3~5 MΩ。根据河蟹生理盐水设计细胞内外液, 经 0.22μm 微孔滤膜过滤后使用。记录正常全细胞电流外液为添加 120mmol/L 葡萄糖的生理盐水; 内液为 (mmol/L): KCl 100, 葡萄糖酸钾 110, NaCl 5, MgCl₂ 5, ATP-2Na 5, EGTA 5, Hepes 50, NaOH 调 pH 至 7.5。记录钠电流 (I_{Na}) 的细胞外液为 (mmol/L): NaCl 100, Choline-Cl 100, CaCl₂ 13.3, MgCl₂ 2.6, Hepes 10, Glucose 120, TEA-Cl 20, 4-AP 3, CdCl₂ 0.5, NaOH 调 pH 值至 7.5; 电极内液为 (mmol/L): CsF100, CsCl 50, MgCl₂ 5, EGTA 5, Hepes 50, ATP-2Na 5, CsOH 调 pH 值至 7.5。记录钾电流的外液为添加 120mmol/L D-glucose、0.5mmol/L CdCl₂、1μmol/L TTX 的河蟹生理盐水; 电极内液为 (mmol/L): 葡萄糖酸钾 200, NaCl 5, MgCl₂ 5, ATP-2Na 5, EGTA 5, Hepes 50, KOH 调 pH 值至 7.5。记录钙电流 (I_{Ca}) 的细胞外液为 (mmol/L): CsCl 150, CaCl₂ 50, MgCl₂ 2.6, Hepes 10, Glucose 120, TEA-Cl 20, 4-AP 3, TTX 1μmol/L。电极内液为 (mmol/L): CsCl 150, MgCl₂ 5, Na₂-ATP 5, BAPTA 5, Hepes 50, CsOH 调 pH 值至 7.5。

1.3 药品及加药方法

河豚毒素 (Tetrodotoxin TTX)、氯化镉 (CdCl₂)、4-氨基吡啶 (4-Aminopyridine 4-AP) 和四乙铵 (Tetrathylammonium TEA) 均为 Sigma 产品, 用细胞外液配成母液存于冰箱, 使用前用细胞外液稀释成终浓度后加入尖端直径为 50 微米玻璃管中, 在显微镜下用显微操纵器操纵加药管加药, 加药时施加压力使药喷出, 镜下可见药体流过选定细胞。

2 结 果

2.1 正常全细胞电流

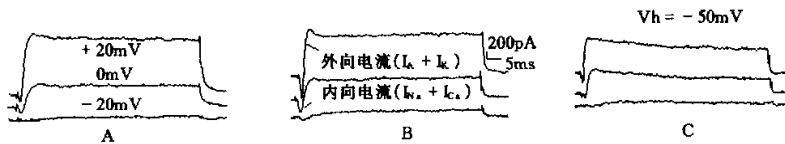


Fig.1 Whole-cell net currents recorded from neurosecretory cells in MTXO of juvenile crab (A, B, C: type A, B, C cell)

在膜片钳全细胞模式下，体外培养的正常蟹种眼柄 MTXO 三种类型神经分泌细胞 均观察到快速的内向电流，随后是明显的外向电流。B 型细胞的内向电流幅值较大，在 +20mV 指令电压下可达 500~700pA (-617 ± 68.31pA, n=5) (图 1B)，而 A、C 型细胞的内向电流幅值较小，仅为 -193 ± 28.8(n=7) 和 -136 ± 33.08(n=6)(图 1A、C)。早熟蟹种和二龄成蟹眼柄 MTXO A、C 型细胞的正常全细胞电流与正常蟹种无明显区别，但 B 型细胞内向电流幅值明显低于正常蟹种 (P<0.01)，V_c = +20mV 时的 25μm B 型细胞正常全细胞电流内向电流幅值分别为 -192 ± 13.95 pA(早熟河蟹, n=5) 和 -177.2 ± 9.71 pA(二龄成蟹, n=5)。在记录正常全细胞电流外液中添加 1μmol/L TTX 和 0.5mmol/L CdCl₂，内向电流消失，换为 3mmol/L 4-AP 和 50mmol/L TEA 后，外向电流被阻断，表明河蟹眼柄神经分泌细胞主要表达钠、钾、钙离子通道。三种河蟹眼柄三种类型神经分泌细胞通道电流特征未见明显区别。

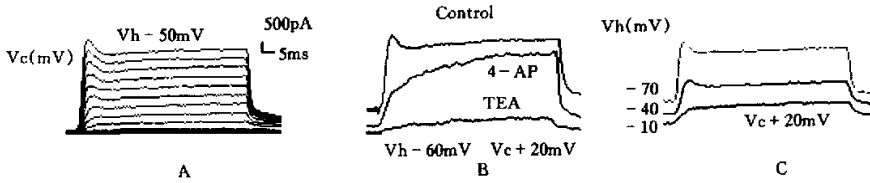


Fig.2 Potassium channel currents recorded from neurosecretory cells in MTXO of juvenile crab

2.2 河蟹眼柄 MTXO 神经分泌细胞钾离子通道电流特征

在细胞外液中添加 1μmol/L TTX 和 0.5mmol/L CdCl₂ 阻断内向钠、钙离子电流，将膜电位分别钳制在 -10~-70 mV，给予 10mV 阶跃去极化电压刺激，记录到一系列外向钾离子通道电流(图 2A、C)。在细胞外液中添加 3mmol/L 4-AP 后，早钾通道电流被阻断，记录到一系列慢钾通道电流，此时在细胞外液中吹加 50mmol/L TEA 后，大部分电流(90%)被阻断，但最终不能完全阻断慢钾电流(图 2B)。电流-电压关系曲线结果表明，早钾通道电流的激活电压约为 -40mV，峰电流随刺激电压的增加而快速增加(图 3A)，其达到峰值的平均时间为 2.5 ± 0.6ms(n=20)，这些特征与软体动物神经细胞的瞬时钾电流 I_k(rapid outward potassium current, I_k^[5])一致，而且对 4-AP 敏感，证明为 I_k。慢钾通道电流的激活阈值为 -40 mV，峰值亦随刺激电压的增加而明显提高(图 3A)。由于慢钾电流特征与典型的延迟整流钾

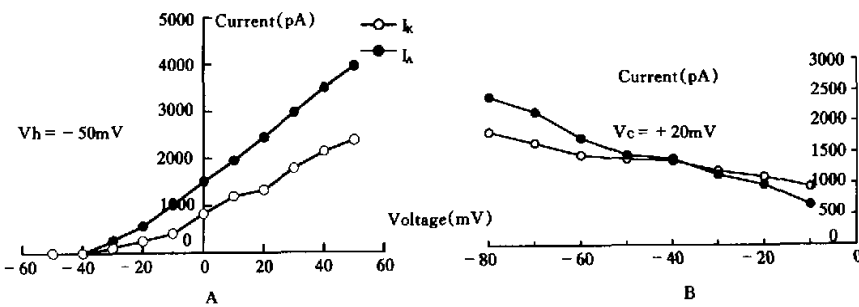


Fig.3 Current - command potential (A) and current - holding potential (B)relations for potassium currents

电流 (delayed rectifier potassium current, I_k) 特征^[6]一致, 而且对 TEA 敏感, 说明河蟹 MTXO 神经分泌细胞慢钾通道电流为 I_k 。保持电压-电流关系曲线结果表明, I_k 峰值受保持电压的影响较大, 保持电压越趋于负值, 早钾通道电流的峰值越高, 尖峰越明显。相反, I_k 受保持电压的影响相对较小(图 3B)。将膜电位钳制在 -50mV , 给予 $+20\text{mV}$ 的去极化电压刺激, 记录到的正常蟹种 60 个 A、B、C 型细胞 (各 20 个) I_k 的幅值分别为 $2769 \pm 257\text{pA}$ 、 $2353 \pm 212\text{pA}$ 、 $1834 \pm 165\text{pA}$, I_k 的幅值分别为 $1989 \pm 179\text{pA}$ 、 $1512 \pm 103\text{pA}$ 、 $1250 \pm 109\text{pA}$ 。

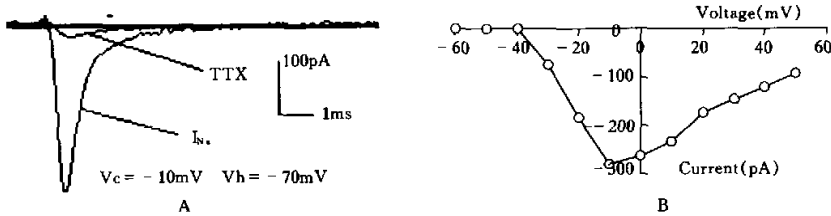


Fig. 4 TTX-sensitive sodium current(A) and the corresponding I-V curve (B)

2.3 河蟹眼柄 MTXO 细胞钠离子通道电流特征

得到全细胞记录构型后, 置维持电压于 -70mV , 给予波宽为 60ms , 试验脉冲从 -60 到 50 , 以 10mV 步幅递增的去极化电压刺激, 三种类型细胞均可记录到一系列快速激活与失活的电流。由于细胞内、外液中无钾离子并加有 TEA-Cl, 电极外液中有 4-AP 和 CdCl_2 , 钾电流和钙电流已被完全阻断。此时向外液中加入 $1\mu\text{mol/L TTX}$, 该电流被取消, 证实其为 TTX 敏感的钠电流(图 4A)。从电流-电压关系曲线知钠电流在 -40mV 左右激活, -10mV 左右达峰值(图 4B)。A、B、C 三种类型神经分泌细胞的峰电流幅值分别为 $-701 \pm 198\text{pA}$ ($34\mu\text{m}$, $n=10$)、 $-393 \pm 103\text{pA}$ ($25\mu\text{m}$, $n=15$)、 $-198 \pm 78\text{pA}$ ($15\mu\text{m}$, $n=10$)。

2.4 河蟹眼柄 MTXO 神经分泌细胞钙离子通道电流

在细胞外液中添加 3mmol/L 4-AP 和 50mmol/L TEA 消除外流 I_k 和 I_{Ca} 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, 记录到一系列失活缓慢、最终在 500ms 记录时间内未完全失活的持续内向电流(图 5), 在细胞外液中吹加 0.5mmol/L CdCl_2 可使其在 5min 内完全被阻断。从电流-

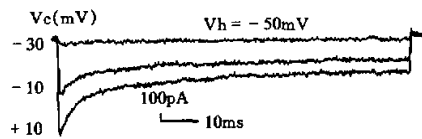


Fig. 5 High-voltage activated Ca currents recorded from the neurosecretory cells in MTXO of juvenile crab

电压关系曲线(图 6A)可以看出, 峰电流(\circ)和记录结束时电流(\triangle)具有相同的电压依赖性, 激活阈值约在 -30mV , $0\sim 20\text{mV}$ 达到最高峰值(常在 $+10\text{mV}$)。图 6B 结果表明, 将膜电位分别钳制在 -70mV (\triangle)与 -40mV (\circ), 记录不同保持电压下测得的钙电流激活阈值、初始峰值和持续内向电流的高度上没有明显差别, 在 -40mV 保持电压下几乎可以记录到 100% I_{Ca} 。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^[7], -40mV 时失活^[8], 河蟹眼柄 MTXO 神经分泌细胞主要表达高电压激活、缓慢失活的钙通道。将膜电位钳制在 -50mV , 给予 $+20\text{mV}$ 的去极化电压刺激, 正常蟹种胞体直径为

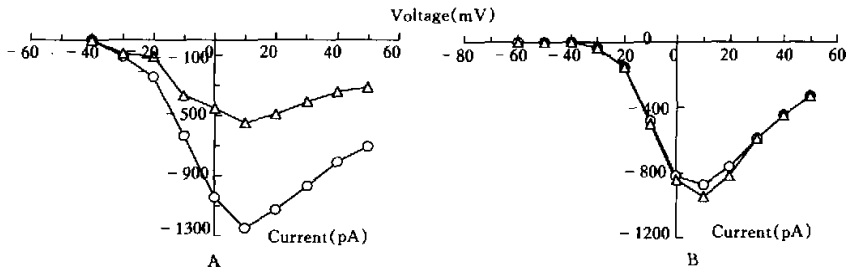


Fig. 6 Current - voltage [I(V)] relations for high - voltage activated Ca currents recorded from the neurosecretory cells in MTXO of juvenile crab

35 μm 、25 μm 、15 μm 的 A、B、C 型细胞全细胞钙电流幅值分别为 $-895 \pm 37.05 \text{ pA}$ ($n=10$), $-979 \pm 64.31 \text{ pA}$ ($n=10$), $-467 \pm 27.79 \text{ pA}$ ($n=10$)。

3 讨 论

甲壳动物 XO - SG 神经分泌系统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,因此一直作为模型研究神经肽类激素的分泌调控。膜片钳自诞生以来一直是研究离子通道和单个细胞分泌最有效的方法,但限于培养细胞材料的限制,目前仅见关于热带地蟹 (*Cardisoma carnifex*)^[9,10]和淡水龙虾 (*Panulirus marginatus*)^[10]眼柄神经分泌细胞离子通道的膜片钳研究报告。离体培养的河蟹眼柄 MTXO 神经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。三种形态细胞均可记录到外向钾离子通道电流 (I_K 和 I_{K1}) 和内向钠通道电流 (I_{Na}) 及高电压激活钙通道电流 (I_{Ca}),与热带地蟹眼柄神经分泌细胞表达离子通道电压特征^[11]一致,但其电流幅值较大,约为河蟹的 2~3 倍,而淡水龙虾的眼柄神经分泌细胞未记录到 I_{Na} 。早熟河蟹、正常蟹种和二龄成蟹电压门控钠、钾、钙离子通道电流特点和电压特征无明显区别,说明蟹种的神经分泌细胞已发育完全。

参考文献:

- [1] Cooke I M, Sullivan R E. *Hormones and neurosecretion*[A]. In: *Biology of crustacea*[C]. (Bliss, D. E. eds), 1982, 3:205 - 209.
- [2] Keller R. *Crustacean neuropeptides structure, function and comparative aspects*[J]. *Experientia*, 1992, 48:439 - 448.
- [3] 孙金生, 刘安西, 贺秉军. 河蟹眼柄 MTXO 神经分泌细胞的离体培养和细胞学研究[J]. *水生生物学报*, 2000, 24:374 - 379.
- [4] Van Harreveld A. *A physiological solution for freshwater crustaceans*[J]. *Proc Soc Exp Biol Med*, 1936, 34:428 - 432.
- [5] Connor J A, Stevens C F. *Voltage clamp studies of a transient outward membrane current in gastropod neural somatol*[J]. *J Physiol Lond*, 1971a, 213:21 - 30.
- [6] Rudy B. *Diversity and ubiquity of K channels*[J]. *Neuroscience*, 1988, 25:729 - 749.
- [7] Narahashi T, Tsunoo A, Yoshii M. *Characterization of two types of calcium channels in mouse neuroblastoma cells*[J]. *J Physiol*, 1987, 383:231 - 249.
- [8] 潘胜军, 周兆年. 急性低氧对豚鼠心室肌细胞 L 型钙通道的影响[J]. *生理学报*, 1995, 47:435 - 440.

- [9] Cooke I M, Grau R A, Haylett B. *Crustacean peptidergic neurons in culture show immediate outgrowth in simple medium*[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1989,86:402-406.
- [10] 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*, 1992,270:303-317.
- [11] Meyers D E R, Graf R A, Cooke I M. *Ionic currents of morphologically distinct peptidergic neurons in defined culture*[J]. *J Neurophysiology*, 1992,67:1301-1305.

PATCH CLAMP STUDY ON THE ION CHANNELS IN THE CULTURED MTXO NEURONS IN ERIOCHEIR SINENSIS

SUN Jin-sheng^{1,3}, LIU An-xi², HE Bing-jun²,
CHEN Jia-tong², MA Wei-lin³, XIANG Jian-hai¹

- (1. Institute of Oceanology, Chinese Academy of Science, Qingdao 266071, China;
2. Department of Biology, Nankai University, Tianjin 300071, China;
3. Tianjin Fishery Institute, Tianjin 300221, China)

Abstract: The whole-cell patch clamp technique was used to study the properties of the voltage-gated ion channels expressed by the cultured types A, B, C neurosecretory cells dissociated from MTXO of Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis* 12~24 hours after plating. Most neurons showed immediately outgrowth and readily formed seals with patch pipettes, allowing stable, whole-cell patch-clamp recordings. Under voltage clamp, net current consisted of outward and inward current. When solution that suppressed the outward current was used, a tetrodotoxin-sensitive Na^+ current (I_{Na}) and a slow, Cd^{2+} -sensitive Ca^{2+} current (I_{Ca}) were resolved in three cell types. In TTX, I_{Ca} was activated at potential -30mV , was maximal at $0\sim+20\text{mV}$, and the form of the Ca current $I(V)$ was unchanged by changes of holding potential between -40mV and -70mV . In the presence of $1\mu\text{mol/L}$ TTX and 0.5mmol/L Cd^{2+} , three cell types expressed a 4-AP-sensitive transient current, analogous to I_{A} , and a slower-rising, TEA-sensitive current, analogous to I_{K} . Obvious distinguish was not observed on the ion channel properties in the neurosecretory cells of MTXO from juvenile, precocious and matured crabs.

Key Words: Crustacean; *Eriocheir sinensis*; MTXO; Neurosecretory cell;
Ion channel