

中华绒螯蟹眼柄 MTXO 细胞 GABA 受体通道研究*

孙金生^{1,2)} 高春蕾¹⁾ 相建海¹⁾**

(¹⁾中国科学院海洋研究所, 青岛 266071; ²⁾天津师范大学化学与生命学院, 天津 300074)

摘要 采用全细胞膜片钳技术测定了中华绒螯蟹 (*Eriocheir sinensis*) 眼柄视神经节端髓 X 器官 (MTXO) 三种类型神经内分泌细胞对 0.01~5 mmol/L γ -氨基丁酸 (γ -aminobutyric acid, GABA) 的反应, 并结合选择性拮抗剂和激动剂的使用进行了 GABA 受体研究. 在电流钳模式下, 依据不同 Nernst Cl^- 电位, 三种类型细胞均对 GABA 产生去极化或超级化反应. 在电压钳模式下, GABA 激活 Cl^- 通道电流 (I_{GABA}). I_{GABA} 在灌流 GABA 后约 1 200 ms 内激活, 800 ms 内达到峰值, 没有明显的脱敏反应, 反转电位接近 Nernst Cl^- 电位. I_{GABA} 幅值呈浓度依赖性, 激活阈值为 0.01 mmol/L, 约在 0.5 mmol/L 达到饱和. 药理学实验结果表明, 中华绒螯蟹眼柄神经内分泌细胞 GABA 受体是 Cl^- 通道蛋白, 对 Cl^- 离子通道阻断剂 Picrotoxin 和 Niflumic acid 敏感, 但是对 GABA_A 受体拮抗剂 Bicuculline 和 GABA_C 受体激动剂 *cis*-4-aminocrotonic acid (CACA) 和 *trans*-4-aminocrotonic (TACA) 均不敏感.

关键词 中华绒螯蟹, MTXO, 神经内分泌细胞, γ -氨基丁酸, 全细胞膜片钳技术

学科分类号 Q424, Q26

γ -氨基丁酸 (γ -aminobutyric acid, GABA) 是哺乳动物和一些无脊椎动物中枢神经系统、肌肉及腺体组织中主要抑制性神经递质或神经调质. 在哺乳动物中, GABA 主要通过细胞膜上存在的 A、B、C 三种类型受体发挥作用. GABA_B 受体通过 G 蛋白和细胞内第二信使与钙离子通道或钾离子通道偶联^[1]; GABA_A 和 GABA_C 受体是配体门控氯离子通道^[2,3]. 近年来, GABA 在甲壳动物中的分布和作用也受到人们的普遍关注^[4]. 一些研究结果表明, 不同的物种或不同的组织对 GABA 的反应不同. 如黄道蟹 (*Cancer borealis*) 胃上神经节大部分细胞对 GABA 产生兴奋性反应, 少数细胞产生抑制性反应^[5].

眼柄视神经节 X 器官-窦腺复合体 (XO-SG) 是甲壳动物的内分泌调控中心, 类似于哺乳动物的下丘脑-垂体系统, 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^[6]. 对这一系统生理活动和细胞分泌调控的研究, 不仅可丰富甲壳动物内分泌学理论, 还将使人们在生产上控制甲壳动物的生长和繁殖成为可能. 虽然 GABA 作为递质或调质物质广泛地存在于甲壳动物体内, 由于受细胞培养材料的限制, 至今仅观察了克氏原螯虾 (*Procambarus clarkii*) 分泌红色素聚集激素 (RPCH) 细胞和热带地蟹 (*Cardisoma carnifex*)

分泌 CHH 细胞对 GABA 的反应^[7,8]. 关于 GABA 对甲壳动物眼柄神经内分泌细胞的调控作用尚缺乏全面了解, 更不清楚 GABA 受体特性. 中华绒螯蟹 (*Eriocheir sinensis*) 俗称河蟹, 是我国主要养殖经济蟹类之一. 我们在对河蟹眼柄 XO-SG 神经内分泌系统组织学、细胞培养和电生理特征研究的基础上^[9-11], 采用全细胞膜片钳技术观察河蟹眼柄 MTXO 神经内分泌细胞对 GABA 的反应, 为进一步研究眼柄神经肽类激素的分泌调控机制打下基础.

1 材料和方法

1.1 动物解剖、免疫细胞化学和细胞培养

实验动物为取自天津和山东的养殖蟹种, 壳宽为 2.1~2.4 cm. 置室内水泥池暂养. 选取附肢健全的健康蟹种, 经低温“麻醉”后, 取下眼柄. 供免疫细胞化学实验的样品先于 4℃ 固定 2 h (固定液为含 0.35 mol/L 蔗糖, 0.1 mol/L 磷酸缓冲液配制的 4% 多聚甲醛), 然后在无菌河蟹生理盐水中剥离外骨骼、肌肉和连接组织, 取出视神经节, 于 4℃ 固定 24 h. PBS 缓冲液 (含 0.35 mol/L 蔗糖和

* 国家自然科学基金资助项目 (30271019) 和国家重点基础研究资助项目 (G1999012007).

** 通讯联系人.

Tel: 0532-2862223, E-mail: jhxiang@ms.qdio.ac.cn

收稿日期: 2002-08-16, 接受日期: 2002-09-28

1% Triton X-100 的 0.1 mol/L PBS) 冲洗后, 进行抗体染色. 一抗为 1: 5 000 稀释的兔抗 CHH 和 MIH 抗体, 二抗为 1: 40 稀释的 FITC 标记的羊抗兔 IgG. 实验设阳性和阴性对照, 用激光共聚焦显微镜进行连续光学切片观察, 切片厚度 5 μm . 细胞培养方法详见文献 [10]. 选取培养 2 天细胞, 按上述免疫细胞化学染色方法进行不同类型培养细胞的功能鉴定.

1.2 膜片钳实验和数据的采集、处理

本文采用 EPC9 膜片钳放大器 (HEKA Elektronik, Germany), 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 GABA 的反应. 实验在室温 (22~26 $^{\circ}\text{C}$) 下进行, 用高阻封接全细胞膜片钳技术记录电信号. 数据的采集和储存均通过 PULSE 软件完成, 用 Igor 软件进行数据分析. 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. 标准高浓度 Cl^- 电极内液为: 200 mmol/L KCl, 5 mmol/L NaCl, 5 mmol/L MgCl_2 , 20 mmol/L HEPES, 5 mmol/L ATP-2 Na^+ , 5 mmol/L BAPTA, KOH 调至 pH 7.5. 用 K_2SO_4 部分取代 KCl 配制不同 Nernst Cl^- 电位 (E_{Cl}) 的低浓度 Cl^- 电极内液. 标准细胞外液为添加 20 mmol/L 葡萄糖的无菌河蟹生理盐水.

1.3 药品及加药方法

GABA、Picrotoxin (PTX)、Niflumic acid (NIA)、Bicuculline、*cis*-4-Aminocrotonic acid (CACA) 和 *trans*-4-aminocrotonic (TACA) 为 Sigma 公司产品, 用细胞外液于实验前配成所需浓度. 其他试剂为国产分析纯. 实验采用美国 ALA 科学仪器公司生产的 16 通道快速加药系统进行加药. 加药过程由计算机控制, 用操纵器操纵尖端直径为 50 μm 的加药头至细胞约 50 μm 处, 压力加药 (68.9 kPa), 可在数毫秒内快速将 16 个储液槽中的任何一种药品浸浴整个选定细胞.

2 结 果

2.1 河蟹神经内分泌细胞对 GABA 的反应

河蟹眼柄视神经节自上而下分为外髓、内髓、端髓 (图 1a). 眼柄神经内分泌细胞聚集在端髓腹面基部外侧, 构成了 X 器官 (MTXO). 这些细胞均为单轴突细胞, 发出的轴突形成一条轴路, 进入

端髓与内髓交接处背侧的窦腺 (图 1b). 依据大小、形态和体外生长方式, 河蟹眼柄 MTXO 细胞分为 A、B、C 三种类型^[10]. 免疫标记结果显示, A、B 型细胞分别对抗 CHH 抗体和抗 MIH 抗体呈免疫阳性反应. C 型细胞的功能尚需进一步确定. 电生理特征比较结果表明, A 型细胞膜电容 (21 ± 6) pF ($n=5$) 显著高于 B 型细胞 (15 ± 4) pF ($n=5$) 和 C 型细胞 (11 ± 5) pF ($n=5$) ($P < 0.01$). 三种类型细胞的静息电位无明显区别 ($P > 0.5$). A 型细胞为 (-52 ± 3) mV ($n=8$), B 型细胞为 (-49 ± 4) mV ($n=5$), C 型细胞为 (-54 ± 6) mV ($n=6$). 在 5 min 的记录时间内, 未观察到三种类型细胞的自发放电现象, 但三种细胞均对去极化电流刺激产生超射动作电位, A 型细胞的诱发放电频率 (17 ± 9) Hz ($n=5$) 显著高于 B 型细胞 (9 ± 5) Hz ($n=5$) 和 C 型细胞 (6 ± 3) Hz ($n=5$) ($P < 0.01$).

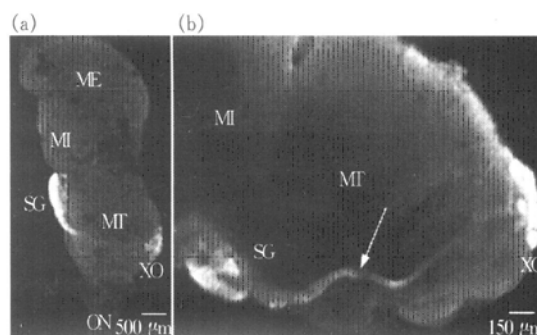


Fig. 1 The whole mount immunolocalization of XO-SG system in the eyestalks of *Eriocheir sinensis* with anti-CHH serum

(a) Optic ganglion was composed of ME, MI, MT. (b) X-organ neurosecretory somata were located on the proximal surface of MT, their axons comprised an axon tract running to the sinus gland situating dorso-laterally at the transition of MI and MT. MT: medulla terminalis; MI: medulla interna; ME: medulla externa; XO: X organ; SG: sinus gland; ON: optic nerve; Arrow: axon tract.

在全细胞电流钳模式下, 将膜电流钳制在 0 pA, 使细胞处于静息不活动状态. 选取培养 2 天, 形态特征典型的 A、B、C 三种类型细胞, 灌流 0.1 mmol/L GABA, 观察河蟹眼柄神经内分泌细胞对 GABA 的反应. 实验结束后, 再经免疫细胞化学染色进一步确定细胞的类型和功能. 结果表明, 使用高浓度 Cl^- 内液, 灌流 GABA 后约 1 300 ms, 三种类型细胞均对 GABA 产生去极化反应, 并引发动作电位. 由图 2 可见, A 型细胞产生的去极化电压为 (36 ± 3) mV ($n=8$), B 型细胞为 (35 ± 2) mV ($n=5$), C 型细胞为 (34 ± 5) mV ($n=6$). 将标准

高浓度 Cl^- 的细胞内液更换为含不同浓度 Cl^- 的低浓度 Cl^- 细胞内液, 进一步观察河蟹眼柄神经内分泌细胞对 GABA 的反应. 对 15 个 A 型细胞、12 个 B 细胞和 12 个 C 型细胞的观察结果表明, 当 E_{Cl} 小于 -60 mV , 灌流 GABA 均使三种类型细胞产生超级化反应 (图 2d). 这一结果提示, GABA 的生理作用为抑制河蟹眼柄神经内分泌细胞的兴奋和分泌活动.

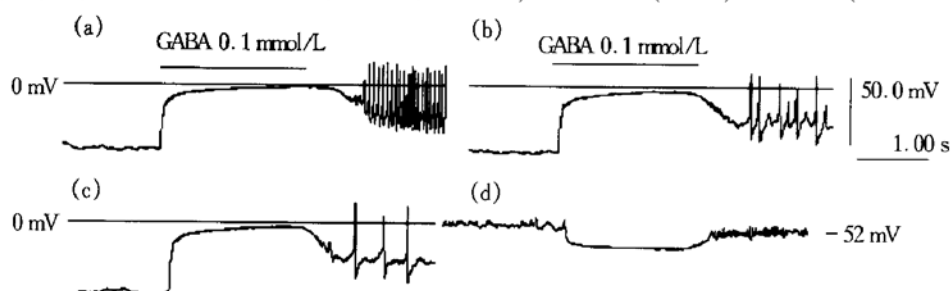


Fig. 2 The depolarization and hyperpolarization were evoked from the three types of neurosecretory cells in response to the GABA (0.1 mmol/L) depending on the Nernst Cl^- potential

(a), (b), (c) revealed the responses of cell type A, B, C to the GABA respectively, when the standard intracellular solution ($E_{\text{Cl}} = -4 \text{ mV}$) was used. (d) revealed the response of cell type A to GABA when the low Cl^- intracellular solution ($E_{\text{Cl}} = -65 \text{ mV}$) was used.

2.2 GABA 激活 Cl^- 通道电流

形成全细胞电压钳构型后, 将保持电压钳制在 -50 mV , 分别灌流 $0.01 \sim 5 \text{ mmol/L}$ GABA, 观察河蟹眼柄 MTXO 三种类型细胞对 GABA 的反应. 结果表明, 使用标准高浓度 Cl^- 细胞内液, 三种类型细胞均激活内向电流 (I_{GABA}). 电流特征无明显区别, 在灌流 GABA 后约 1200 ms 内开始出现, 约 800 ms 内达到峰值, 无明显的脱敏反应 (图 3a). 量效关系曲线呈“S”型, 产生阈值电流反应的 GABA 浓度为 0.01 mmol/L , 饱和浓度接

近 0.5 mmol/L (图 3b). 由电流电压关系曲线 (图 4A) 可知, I_{GABA} 没有整流特征, 反转电位为 -2 mV , 接近 Nernst Cl^- 电位 (-4 mV). 通过使用不同 E_{Cl} 的低浓度 Cl^- 细胞内液, 进一步证明 I_{GABA} 的反转电位与电极内外液中氯离子的比例相关 (图 4B). 又由于 I_{GABA} 对氯离子通道阻断剂 PTX 和 NIA 敏感 (详见 2.3), 而且 Na^+ 和 Ca^{2+} 没有参与 GABA 诱导的去极化过程, 证明 GABA 激活河蟹眼柄神经内分泌细胞 Cl^- 通道电流.

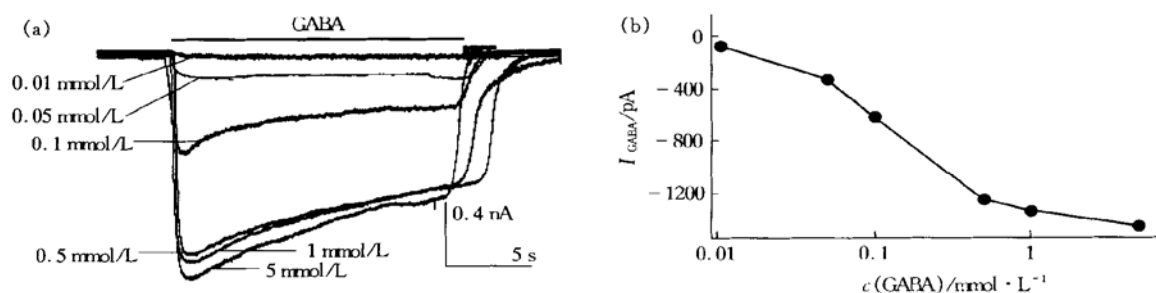


Fig. 3 Responses of cultured type A neurons in the eyestalk of *Eriocheir sinensis* to a series of GABA at the holding potential of -50 mV under whole cell patch clamp

(a) Inward currents recorded in the type A neurosecretory cell in the MTXO of *Eriocheir sinensis* in response to a series of GABA concentration ($0.01 \sim 0.05 \text{ mmol/L}$). (b) plot of peak GABA current versus GABA concentration (log scale).

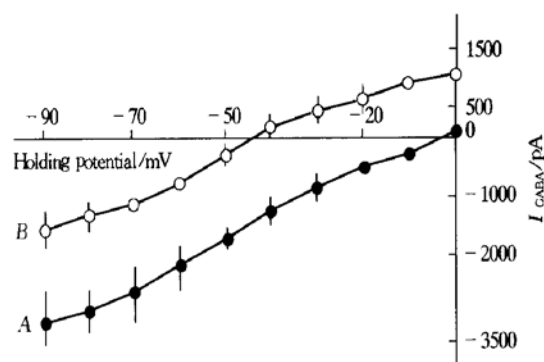


Fig. 4 The corresponding $I-V$ curves of GABA currents recorded from cell type A at the holding potential from 0~ 90 mV

The high Cl^- intracellular solution (A, $E_{\text{Cl}} = 4$ mV) and low Cl^- intracellular solution (B, $E_{\text{Cl}} = 45$ mV) were used. It was revealed that reversal potentials followed Nernst Cl^- potentials.

2.3 GABA 受体的药理学特征

上述结果表明, 河蟹眼柄 MTXO 神经内分泌细胞 GABA 受体是氯通道蛋白. 为进一步鉴定 MTXO 细胞 GABA 受体的特征和类型, 我们观察了在哺乳动物和其他无脊椎动物中鉴定的典型 GABA_A 和 GABA_C 受体的激动剂和拮抗剂对河蟹眼柄 MTXO 细胞 I_{GABA} 的影响. 结果表明, 河蟹眼柄 MTXO 三种类型神经内分泌细胞 GABA 受体均对 PTX 和 NIA 敏感. 0.5 mmol/L 的 PTX 和 NIA 分别抑制 A 型细胞 I_{GABA} (41 ± 8)% ($n = 8$) 和 (17 ± 3)% ($n = 8$), B 型细胞 (57 ± 5)% ($n = 5$) 和 (28 ± 2)% ($n = 6$). 另外, 甚至在细胞外液中添加 GABA_A 受体拮抗剂 Bicuculline 的浓度达到 100 $\mu\text{mol/L}$, 河蟹眼柄 MTXO 神经内分泌细胞 GABA 电流的幅值也没有受到明显的影响. CACA 和 TACA 是典型的 GABA_C 受体激动剂, 但河蟹眼柄 MTXO 三种细胞均未对 TACA (1 mmol/L) 和 CACA (1 mmol/L) 产生反应.

3 讨 论

眼柄 XO-SG 神经内分泌系统一直是甲壳动物内分泌研究的重点内容. Iwasaki 等^[12]首先报道克氏原螯虾眼柄 X 器官神经细胞存在 PTX 抑制性突触后电位. 通过充灌 KCl 的胞内电极记录, Nagano^[13]发现 GABA 抑制热带地蟹眼柄 XO 细胞的自发性电活动. Garcia^[7]发现 GABA 仅对初始静息电位在 -60 mV 以下的淡水螯虾眼柄 XO 细胞产生兴奋作用. 河蟹眼柄 XO 神经内分泌细胞主要分布在眼柄视神经节端髓腹面基部外侧. GABA 通过

激活 MTXO 细胞的氯离子通道蛋白受体, 调控河蟹眼柄神经内分泌的兴奋性和分泌活动. 虽然 GABA 电流能明显地被氯离子通道阻断剂 PTX 抑制, 但它对 PTX 的亲合力明显低于哺乳动物的 GABA_A 受体, 而且对典型的 GABA_A 受体的竞争性拮抗剂 Bicuculline 不敏感. 另外, 典型的 GABA_C 的选择性激动剂 CACA 和 TACA 未能诱导河蟹眼柄 MTXO 细胞产生去极化或超级化反应. 这些药理学特征表明, 河蟹眼柄神经内分泌细胞 GABA 受体在结构上明显不同于哺乳动物 GABA Cl^- 通道蛋白受体, 不存在与 GABA_A 和 GABA_C 受体一些典型的激动剂和拮抗剂的敏感结合位点, 其电生理学和药理学特征与其他一些无脊椎动物 GABA 的 Cl^- 通道蛋白受体相似. 在作者掌握的文献范围, 这是首次全面观察 GABA 对甲壳动物眼柄神经内分泌细胞的作用. Duan 等^[8]认为, GABA 可能作为激素性的调节因子调控甲壳动物 XO 的活动, 其根据是热带地蟹血淋巴中 GABA 的含量高于阈值, 并且高于神经和肌肉组织. 另一些实验观察结果表明^[13, 14], GABA 作为突触递质调控甲壳动物眼柄 XO-SG 系统的生理活动. 在组织、细胞学研究方面, 作者未在河蟹眼柄 XO-SG 中发现 GABA 活性的突触结构, 而且 GABA 对河蟹眼柄 MTXO 细胞的作用存在很强的浓度依赖性. 这似乎支持 Duan 等的观点, 但关于 GABA 是作为递质还是作为激素性因子调节河蟹眼柄 XO 的活动还需进一步研究.

致谢 承蒙美国夏威夷大学 Chang 教授和香港大学 Chen 教授馈赠抗血清, 特此致谢.

参 考 文 献

- 1 Bowery N G. GABA_B receptor pharmacology. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 1993, **33**: 109~ 147
- 2 Bormann J, Feigenspan A. GABA_C receptors. *Trends Pharmacol Sci*, 1995, **18** (12): 515~ 519
- 3 Sieghart W. Structure and pharmacology of aminobutyric acid_A receptor subtypes. *Pharmacol Rev*, 1995, **47** (2): 181~ 224
- 4 Jackel C, Krenz W D, Nagy F. Bicuculline/baclofen insensitive GABA response in crustacean neurons in culture. *J Exp Biol*, 1994, **191** (1): 167~ 193
- 5 Swensen A M, Golowasch J, Christie A E, et al. GABA and responses to GABA in the stomatogastric ganglion of the crab *Cancer borealis*. *J Exp Biol*, 2000, **203** (14): 2075~ 2092
- 6 Keller R. Crustacean neuropeptides structure, function and comparative aspects. *Experimentia*, 1992, **48** (5): 439~ 448
- 7 Garcia U, Onetti C, Valdiosera R, et al. Excitatory action of aminobutyric acid (GABA) on crustacean neurosecretory cells. *Cell*

- Mol Neurobiol, 1994, **14** (1): 71~ 78
- 8 Duan S M, Cooke I M. Glutamate and GABA activate different receptors and conductances in crab peptide-secreting neurons. J Neurophysiol, 2000, **83** (1): 31~ 37
 - 9 孙金生, 刘安西, 陈家童, 等. 河蟹眼柄 MTXO 神经分泌细胞的培养和细胞学研究. 水生生物学报, 2000, **24** (4): 374~ 379
Sun J S, Liu A X, Chen J T, *et al.* Acta Hydrobiologica Sinica, 2000, **24** (4): 374~ 379
 - 10 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. 动物学报, 2001, **47** (1): 27~ 31
Sun J S, Liu A X, Du Y Z, *et al.* Acta Zoologica Sinica, 2001, **47** (1): 27~ 31
 - 11 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. 生物物理学报, 2001, **17** (2): 231~ 238
Sun J S, Liu A X, He B J, *et al.* Acta Biophysica Sinica, 2001, **17** (2): 231~ 238
 - 12 Iwasaki S, Satow Y. Sodium- and calcium-dependent spike potentials in the secretory neuron soma of the crayfish. J Gen Physiol, 1971, **57** (2): 216~ 237
 - 13 Nagano M. Regional inhibitory effects of 5-HT and GABA on the spontaneous electrical activity of a crab neurosecretory system. Biomed Res, 1986, **7** (3): 267~ 277
 - 14 Arechiga H, Garcia U, Martinez Millan L. Frontiers in Crustacean Neurobiology. Basel: Birkhauser, 1990. 373~ 380

Study on The GABA Gated Channels in The Neurosecretory Cells of MTXO in The Eyestalks of *Eriocheir sinensis**

SUN Jin-Sheng^{1,2)}, GAO Chun-Lei¹⁾, XIANG Jiar-Hai^{1)**}

¹⁾ Institute of Oceanology, The Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China;

²⁾ College of Chemistry and Life Sciences, Tianjin Normal University, Tianjin 300074, China)

Abstract The responses to rapid application of γ -aminobutyric acid (GABA) and the GABA receptor characteristics of MTXO neurosecretory cells in the eyestalks of Chinese mitten-handed crab (*Eriocheir sinensis*) were examined by whole-cell patch clamp. Under current clamp mode, the depolarization and hyperpolarization were evoked from the three types of neurosecretory cells in response to the GABA (0.1 mmol/L) depending on the Nernst Cl^- potential. Under voltage clamp mode, the inward Cl^- channel currents (I_{GABA}) were resolved from all three types of neurosecretory cells in response to GABA (0.01~ 5 mmol/L). The GABA currents were activated within 1 200 ms and peaked within 800 ms. No obviously desensitization was observed during GABA application. The dose-response curve showed usual S-shape, with a just-discernible effect at 0.01 mmol/L and near-saturation at 0.5 mmol/L. The GABA currents had reversal potentials that followed Nernst Cl^- potentials when $[\text{Cl}^-]$ was varied. The pharmacological results revealed that the GABA receptor of the crab neurosecretory cells was sensitive to the Cl^- channel blockers picrotoxin and niflumic acid (0.5 mmol/L), insensitive to GABA_A receptor antagonist bicuculline and GABA_C receptor agonist *cis*-4-aminocrotonic acid (CACA 1 mmol/L) and *trans*-4-aminocrotonic (TACA 1 mmol/L).

Key words *Eriocheir sinensis*, MTXO, neurosecretory cells, γ -aminobutyric acid (GABA), whole-cell patch clamp technique

* This work was supported by grants from The National Natural Sciences Foundation of China (30271019) and The National Key Fundamental Research Program (G1999012007).

** Corresponding author. Tel: 86-532-2862223, E-mail: jhxiang@ms.qdio.ac.cn

Received: August 16, 2002 Accepted: September 28, 2002