

不同钙离子浓度对日本沼虾感光器细胞超微结构的影响

罗永婷* 盛春 张赫蕾 钱忠英 张慧绮

(上海师范大学生命与环境科学学院, 上海 200234)

摘要 为了进一步研究细胞外钙离子浓度变化对甲壳动物感光细胞超微结构的影响, 应用透射电子显微镜显示了日本沼虾感光细胞, 在暗适应时高钙离子浓度中温育的感光器细胞的感杆束直径下降, 微绒毛排列零乱; 多囊体、板膜体数量增加; 色素颗粒散布在细胞质中, 呈现出光适应的结构特征。而温育在低钙离子溶液和生理溶液中的感光器细胞结构相同, 呈现出暗适应的结构特征。另外, 细胞器中储存的钙离子也受细胞外钙离子浓度的影响, 在高钙离子溶液中温育后细胞器储存的钙离子量增加, 膜下储泡囊、多囊体、线粒体、色素颗粒等细胞器中的焦磷酸钙结晶颗粒比温育在低钙溶液中的细胞明显增多。结果显示, 细胞外钙离子浓度变化引起细胞内钙离子浓度变化, 从而影响感光器细胞的结构而影响其生理功能。

关键词 日本沼虾; 感光器; 钙离子; 超微结构

在无脊椎动物的感光器细胞中, 钙离子在光适应和兴奋中起了重要的作用^[1]。钙离子被认为是感光器细胞内部的信使, 同时在光刺激激发的反应链中, 细胞质中的钙离子浓度升高成为一个必需的步骤^[2,3]。在一个感光细胞中的细胞内外钙离子浓度决定了细胞的功能状态及对光刺激的敏感性, 研究发现感光细胞内外钙离子浓度上升时细胞对光刺激的反应下降, 细胞处于光适应状态, 反之细胞对光刺激敏感, 处于暗适应状态^[4,5]。另外, 感光细胞的亚显微结构也受到钙离子浓度的影响^[6,7]。一般认为造成感光细胞内钙离子浓度的升高主要是细胞中储存的钙离子在光刺激下的释放, 另外细胞外溶液中的钙离子通过电压门控的钙离子通道或受体门控的钙离子通道穿过细胞膜进入细胞质也是一个途径^[8]。

有关钙离子在动物光感觉生理中作用的研究主要集中在对有关酶反应链的活性、离子通道活性的调节以及对电生理反应影响等方面。我们通过改变日本沼虾感光器细胞外钙离子浓度的方法, 从而达到改变细胞内钙离子浓度, 以研究感光细胞的结构以及钙离子储存器中钙离子浓度的变化。从而可以进一步解释感光细胞的光适应和细胞内外钙离子浓度变化的关系, 进一步确证钙离子是参与了甲壳动物的光电转导, 并探讨钙离子在感光器兴奋的调控机制中的作用。

1 材料与方法

1.1 材料

实验所用的日本沼虾(*Macrobrachium nipponense*)为购自农贸市场的健康成体活虾, 在实验室中于全暗环境下静养 6 h, 下午 14:00 在微弱红光下取下复眼, 剥去角质层并去除神经等杂物。

1.2 方法

1.2.1 研究不同钙离子条件下感光细胞内超微结构变化的材料 将日本沼虾复眼材料分别放在生理溶液(400 mmol/L NaCl, 10 mmol/L KCl, 2 mmol/L CaCl₂, 2 mmol/L MgSO₄, 50 mmol/L 葡萄糖, 10 mmol/L Hepes, pH 7.4)、高钙溶液(在生理溶液中加入 50 mmol/L 钙离子)和低钙溶液(在生理溶液中加入 50 mmol/L EGTA)中培养 24 h。

1.2.2 研究不同钙离子条件下感光细胞内钙离子储存器中 Ca²⁺ 定位的材料 将日本沼虾复眼材料先后按以下步骤处理: 放在生理溶液、高钙溶液及低钙溶液中培养 24 h; 在加有 β-皂角素(50 μg/ml)的生理溶液、高钙溶液及低钙溶液中透化 10 min; 在生理溶液、高钙溶液和低钙溶液中培育 1 h; 用加了 90 mmol/L 草酸钾的 4% 戊二醛(pH 7.4 的磷酸缓

收稿日期: 2006-01-13 接受日期: 2006-02-09

上海市教委基金资助项目(No.03DZ05)

*通讯作者。Tel: 021-57122541, E-mail: lyt@shnu.edu.cn

冲液配制)固定 2 h, 冰浴(在放入戊二醛溶液中进行前固定期间的所有步骤都在微红光下进行); 洗涤 24 h (7.5% 蔗糖、90 mmol/L 草酸钾, 用 pH 7.4 的磷酸缓冲液配制), 冰浴; 用 0.04% 醋酸配制的 2% 六羟基锶酸钾于密闭塑料容器中溶解, 80 °C 水浴; 1% 锶酸后固定 2 h, 冰浴; 用蒸馏水洗涤 15 min(以上所有溶液用 KOH 调节, 使 pH 值为 7.4)。

将上述处理的材料经过梯度酒精脱水后再用纯丙酮脱水两次, 用环氧树脂(Epon812)包埋, 钻石刀切成超薄切片, 经醋酸铀和柠檬酸铅染色后, 在高压(75 kV)下用 Hitachi-600 透射电镜观察和照相。

2 结果

2.1 外界钙离子浓度对暗适应时的日本沼虾感光器超微结构的影响

组成复眼的小眼由 8 个小网膜细胞构成, 呈“1+7”的模式排列, 远端一个细胞与晶锥的近端有部分重叠, 近端的 7 个细胞围成圆柱状。在生理溶液温育后, 日本沼虾感光器感杆束直径较大, 平均达到了 5 μm , 组成的微绒毛除了边缘有部分的膨大外, 其余的都结构紧密, 排列整齐。小网膜细胞的细胞质中有较多的小空泡, 形状大小差异很大。另外在感杆束周围和胞质中还有许多小囊泡, 其形态和多囊体所含的小囊泡相似(图 1)。膜下储泡囊小而且少, 与光滑内质网相似; 光滑内质网膨大呈网状, 散布于细胞质中; 线粒体分布较多, 大多数为椭圆形, 也有一些不规则的线粒体存在, 其嵴突较少, 基质为电子透明物质(图 2)。颗粒内质网数量较少, 散布在胞质中; 多囊体数量少, 直径也较小, 里面所含的小囊泡多数为圆形; 色素颗粒接近圆形, 呈电子致密质, 较均匀分布于细胞质中(图 3)。

在高钙离子浓度的生理盐水中温育后日本沼虾感光器的超微结构与在生理盐水中温育的相比较有一些不同(表 1)。暗适应的感光器结构显示出, 感杆束的直径明显减小, 约在 3.6 μm 左右, 组成感杆束的微绒毛大部分膨大, 排列很凌乱(图 4)。细胞质中的颗粒内质网长且多, 呈平行线状整齐排列, 遍布整个细胞, 色素颗粒大量分布在感杆束周

围的胞质中。细胞质中线粒体较少, 而多囊体数量很多, 大小变化较大。里面包含的小囊泡大多数是圆形(图 5)。在细胞质中也有与这种小囊泡类似的结构, 但数量比较少, 另外可见到许多板膜体, 形态变化较大, 但都为膜结构, 在感杆束中也可发现(图 6)。

降低生理盐水中的钙离子对暗适应的日本沼虾感光器的超微结构影响不大, 显示出与生理溶液中基本相似的结构(表 1)。其感杆束直径增大, 平均达到了 7.8 μm , 除远端的感杆束有部分微绒毛直径膨大, 排列凌乱外(图 7), 其余的感杆束排列还是比较整齐。颗粒内质网排列凌乱, 散布在胞质中。光滑内质网为扁平的膜囊状, 主要集中于感杆束的周围(图 8)。细胞质中线粒体较多, 直径较大, 大多数为不规则形, 基质为透明物质, 集中在细胞的中段和近端(图 9)。色素颗粒分布在整个胞质中, 在胞质中还有少量板膜体, 多囊体的数量较少, 直径也较小。

2.2 不同钙离子浓度对感光器细胞细胞器中钙离子的影响

在高钙离子浓度的生理盐水中温育后, 从日本沼虾复眼小网膜细胞的远端到中段都有很多的多囊体, 在组成多囊体的小囊泡中有焦锶酸钙结晶沉淀存在, 呈黑色电子致密小颗粒, 但是在所观察的多囊体中大约有 15% 的小囊泡中没有这种沉淀结晶存在。同时, 色素颗粒中也存在大量钙离子沉淀(图 10, 图 11)。在感杆束周围的部分膜下储泡囊中也有焦锶酸钙结晶, 呈块状沉淀于膜的边缘(图 12)。但是未观察到含有钙离子沉淀的线粒体。

而经过低钙溶液温育后的日本沼虾感光器小网膜细胞中, 除了线粒体外, 焦锶酸钙结晶沉淀在其他细胞器中的数量大量减少。从小网膜细胞的远端到近中部, 大部分线粒体中都含有焦锶酸钙结晶沉淀(图 13)。特别是在小网膜细胞中段细胞质中, 线粒体很多, 直径也较大, 而且几乎 95% 以上的线粒体中都存在焦锶酸钙结晶沉淀, 沉淀数量也很多(图 14)。在一些变形的多囊体中也存在着焦锶酸钙结晶沉淀, 但是每个多囊体中只有几粒沉淀颗粒, 量非常少(图 15)。无论是什么部位, 膜下储泡囊中

表 1 不同钙离子浓度感光器超微结构的比较($n=6$)

实验溶液	感杆束直径(μm)	多囊体数量	板膜体数量	线粒体数量
生理盐水	5 \pm 1.3	较少	较少	较多
高钙溶液	3.6 \pm 0.7	较多	较多	较少
低钙溶液	7.8 \pm 1.5	较少	较少	较多

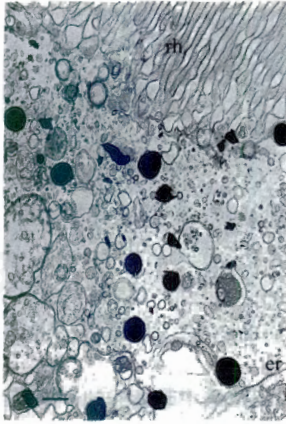


图1 在生理溶液中暗适应的小网膜细胞横切
rh: 感杆束; er: 光滑内质网。bar=0.5 μm。

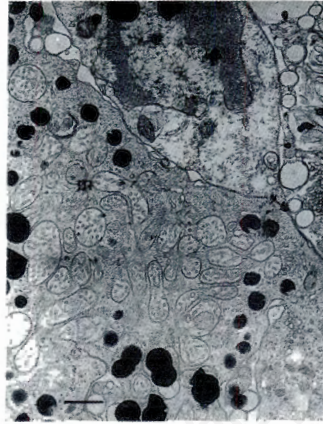


图2 在生理溶液中暗适应的小网膜细胞横切
m: 线粒体。bar=0.5 μm。

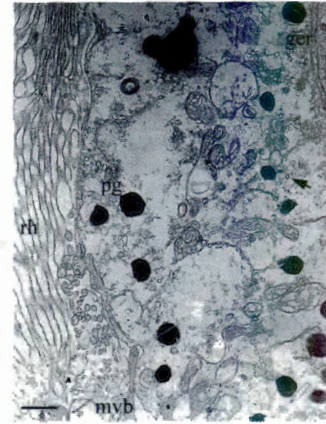


图3 在生理溶液中暗适应的小网膜细胞横切
rh: 感杆束; mvb: 多囊体; pg: 色素颗粒; ger: 颗粒内质网; 箭头: 细胞质中的小囊泡。bar=0.5 μm。

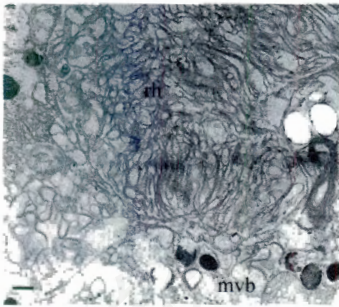


图4 在高钙溶液中暗适应的小网膜细胞横切
rh: 感杆束; mvb: 多囊体。bar=0.5 μm。

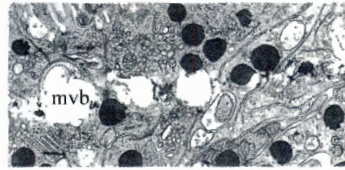


图5 在高钙溶液中暗适应的小网膜细胞横切
mvb: 多囊体。bar=0.5 μm。

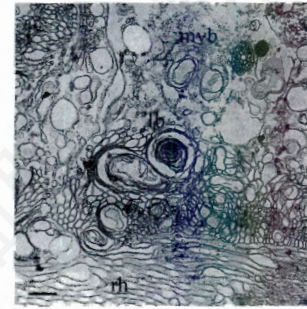


图6 在高钙溶液中暗适应的小网膜细胞横切
rh: 感杆束; lb: 板膜体; mvb: 多囊体。bar=0.5 μm。

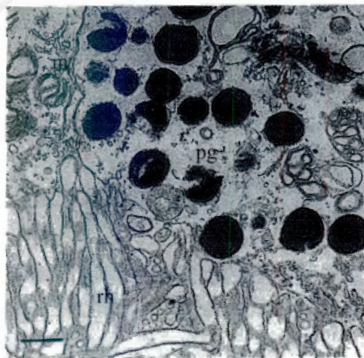


图7 在低钙溶液中暗适应的小网膜细胞横切
rh: 感杆束; pg: 色素颗粒; m: 线粒体。bar=0.5 μm。

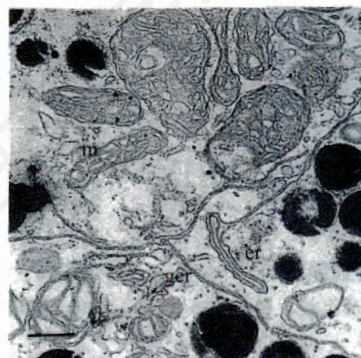


图8 在低钙溶液中暗适应的小网膜细胞横切
m: 线粒体; ger: 颗粒内质网; er: 光滑内质网。bar=0.5 μm。

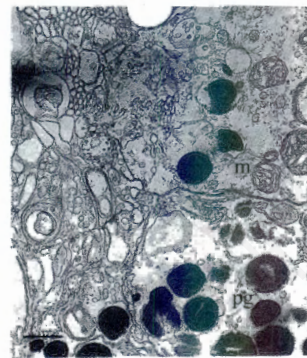


图9 在低钙溶液中暗适应的小网膜细胞横切
m: 线粒体; pg: 色素颗粒。bar=0.5 μm。

均未观察到有焦磷酸钙结晶沉淀出现。到了小网膜细胞的核下切面，几乎观察不到任何有钙离子沉淀结晶的细胞器(图16)。

用生理盐水培育的小网膜细胞中的钙离子沉淀情况和经过低钙溶液培育过的细胞中钙离子沉淀情况基本相似。从小网膜细胞的远端到中部，很多线

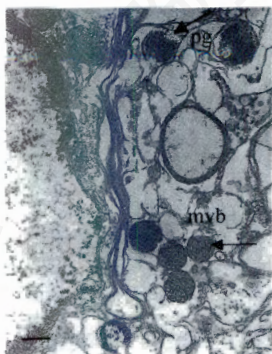


图 10 在高钙溶液中暗适应的小网膜细胞横切

pg: 色素颗粒; mvb: 多囊体; 箭头: 焦磷酸钙结晶沉淀。bar=0.5 μm 。

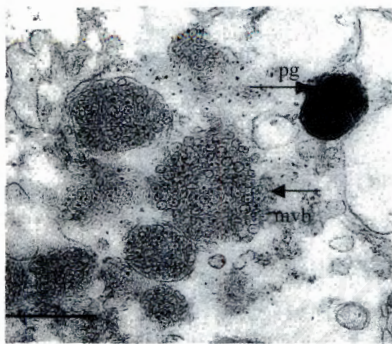


图 11 在高钙溶液中暗适应的小网膜细胞横切

pg: 色素颗粒; mvb: 多囊体; 箭头: 焦磷酸钙结晶沉淀。bar=0.5 μm 。

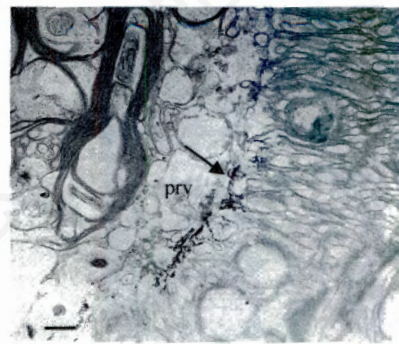


图 12 在高钙溶液中暗适应的小网膜细胞横切

prv: 膜下储泡囊; 箭头: 焦磷酸钙结晶沉淀。bar=0.5 μm 。

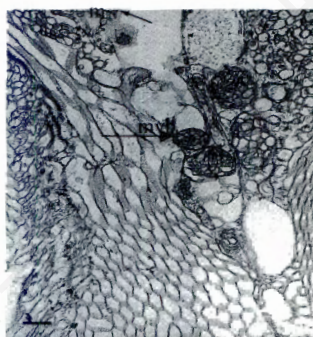


图 13 在生理溶液中暗适应的小网膜细胞横切

m: 线粒体; mvb: 多囊体; 箭头: 焦磷酸钙结晶沉淀。bar=0.5 μm 。

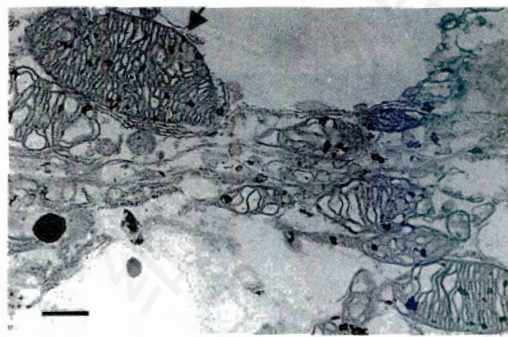


图 14 在低钙溶液中暗适应的小网膜细胞横切

箭头: 线粒体中焦磷酸钙结晶沉淀。bar=0.5 μm 。

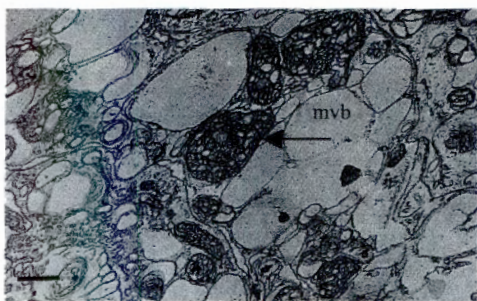


图 15 在低钙溶液中暗适应的小网膜细胞横切

mvb: 多囊体; 箭头: 多囊体中的焦磷酸钙结晶沉淀。bar=0.5 μm 。



图 16 在低钙溶液中暗适应的小网膜细胞核下横切

m: 线粒体; 示无焦磷酸钙结晶沉淀。bar=0.5 μm 。

粒体中存在钙离子沉淀, 多囊体较少, 但是在其中也有一些焦磷酸钙结晶沉淀存在。

3 讨论

感光器外的钙离子浓度可影响其暗适应的程度, 而对光适应没有明显的影响^[1], 因此本实验是在暗适应的状态下进行。实验所用的溶液按照

Stowe 等^[1]的配方配制, 高钙溶液和低钙溶液中的渗透压大于生理溶液的渗透压。温育在高钙溶液和低钙溶液中的感光器显示出截然不同的结构特征, 而且细胞器中储存的钙离子也存在着变化。但是在生理溶液和低钙溶液中温育的感光器的结构相似, 且它们的细胞器中的钙离子浓度也很相似。这些结果说明, 日本沼虾感光器结构的变化是细胞外钙离子

浓度变化引起的, 与实验溶液中渗透压的改变无关。

3.1 细胞外钙离子浓度与细胞内钙离子浓度的关系

细胞外钙离子可通过细胞膜上的 $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交换而进出细胞, 从而影响细胞内的钙离子浓度。用钙离子敏感的电极测量发现, 当细胞外的钙离子浓度改变时, 细胞内的钙离子浓度也会随之发生变化。降低细胞外的钙离子浓度可使细胞内的钙离子浓度下降^[9,10]。

3.2 细胞外钙离子浓度变化和感光器超微结构变化的关系

我们的研究结果显示, 排除光照因素细胞外钙离子浓度的变化可直接影响感光器的超微结构。近来研究发现, 细胞外钙离子浓度会影响感光器对光刺激的敏感性, 在高钙溶液中细胞对单个光子的刺激反应变小^[11]。当钙离子浓度升高时, 处于黑暗中的感光器细胞结构表现出一些光适应的结构特征, 感杆束的微绒毛明显膨大, 排列凌乱, 感杆束直径缩小。感光器在低钙溶液中提高了对微弱光刺激的兴奋性, 降低细胞外钙离子浓度, 使得感杆束的直径增加, 这样的结果在中华绒螯蟹的感光细胞中也发现^[6]。感杆束被认为是感光器的感光部分, 光电转换在感杆束中实现。感杆束直径和结构与钙离子浓度的这种关系, 可从结构上解释在暗适应时感光器为什么会在高钙溶液中对光刺激的反应下降。另外, 在电生理学研究发现, 在一个强光刺激后感光器中的钙离子浓度回复快于细胞的光敏感性回复的现象, 也可用本实验结果来解释。

3.3 细胞内钙离子储存器与钙离子浓度的调节

钙离子储存器被看作是细胞内的钙离子浓度的调节器, 通过向胞质中释放钙离子或储存钙离子, 调节了细胞中的钙离子浓度。不同钙离子溶液温育后感光器细胞中的另一个变化是细胞器中储存的钙离子浓度, 这种变化与细胞自身的生理调节有关。钙离子从储存器中释放可能受酶控制的, 而酶的活性与细胞内的钙离子浓度有关^[11]。当外界溶液中的钙离子浓度升高时, 细胞内的钙离子浓度也会受到影响, 而钙离子的变化激活了有关酶反应链的活性, 为了维持细胞内环境的稳定以及细胞内外溶液的离子浓度梯度, 细胞器中储存的钙离子量会增

加。因此, 在膜下储泡囊、多囊体、色素颗粒中出现了大量的焦磷酸钙结晶沉淀。反之, 当外界溶液中的钙离子浓度降低时, 细胞内的钙离子浓度也降低, 所以细胞中的钙离子储存器就释放出钙离子, 故钙离子储存器中的沉淀就大大减少, 这与在光适应时观察到的结果一致。

除了膜下储泡囊和多囊体外, 线粒体和色素颗粒中储存的钙离子可以和细胞质中的钙相互交换, 因此, 这些细胞器可能起到钙离子缓冲系统的作用^[12-14]。然而, 还没有证据显示它们直接参与了视觉转导的过程。在螯腹神经感光器甚至不存在色素颗粒^[15], 但是却存在致密的物质^[16], 但不知道它们是否包含钙离子。而线粒体并不调节细胞质中钙离子浓度的这个观点一直有争议, 有人认为它们只有在细胞质中的钙离子浓度比生理钙离子浓度还要低很多的情况下才释放钙离子^[17], 而且在本实验中, 经低钙溶液中培育的细胞中也依然显示出线粒体中有很多钙离子沉淀。因此, 线粒体是否参与调节细胞质中的钙离子浓度这一观点还有待于进一步验证。而已显示, 色素颗粒可以在有 ATP 存在的情况下, 非常活跃地积累钙离子^[14]。在本实验中, 经低钙溶液培育后的细胞中, 也未在色素颗粒中观察到沉淀, 这可以说明色素颗粒也可能参与了日本沼虾感光器细胞中胞质钙离子浓度的调节。

参考文献 (References)

- [1] 袁维佳等. *动物学研究*, 1998, **19**: 367
- [2] Deckert A et al. *J Physiol*, 1991, **433**: 467
- [3] Stieve H et al. *Z Naturforsch*, 1994, **49c**: 372
- [4] 袁维佳等. *动物学报*, 1998, **44**: 413
- [5] Dorlochter M et al. *Z Naturforsch*, 1999, **54c**: 446
- [6] 袁维佳等. *动物学研究*, 1999, **20**: 32
- [7] Stowe S et al. *J Comp Physiol*, 1983, **153**: 365
- [8] Stommel G et al. *Z Naturforsch [C]*, 1996, **51**: 101
- [9] Levy S et al. *J Gen Physiol*, 1985, **85**: 805
- [10] O'Day PM A et al. *J Gen Physiol*, 1989, **93**: 473
- [11] Rack M et al. *Exp Eye Res*, 1994, **58**: 659
- [12] Schroder W et al. *Scan Electron Microsc*, 1980, (Pt 2): 647
- [13] Jarminowski H et al. *Comp Biochem Physiol B*, 1993, **105**: S389
- [14] Jarminowski H et al. *Z Naturforsch*, 1995, **50C**: 581
- [15] Calman BG et al. *J Gen Physiol*, 1982, **80**: 839
- [16] Herman KG et al. *J Comp Neurol*, 1991, **303**: 11
- [17] Meldolci J et al. *Biochim Biophys Acta*, 1990, **1055**: 130

Effects of Different Calcium Concentration on the Retinular Cell in the Shrimp *Macrobrachium nipponense*

Yong-Ting Luo*, Chun Sheng, Cheng-Lei Zhang, Zhong-Ying Qian, Hui-Qi Zhang
(College of Life and Environment Sciences, Shanghai Normal University, Shanghai 200234, China)

Abstract In order to further study the effects of Crustacea's retinular cells under different calcium concentration, the dark adapted retinular cells of the photoreceptors in the shrimp (*Macrobrachium nipponense*), that were incubated in physiological saline and in presence of different calcium concentrations, were studied with electron microscopy. The results showed that in presence of 50 mmol/L calcium, the fine structure of the retinular cells had the characters of the cells in light adaptation. The diameter of the rhabdoms reduced extremely. The microvillus that composed the rhabdoms arranged in disorder. Cells contained more multivesicular bodies and more lamellar bodies. The pigment granules were more and located in the whole cells. The retinular cells that were incubated in physiological saline (10 mmol/L) or in low calcium saline (50 mmol/L EGTA and 2 mmol/L) had same fine structures that showed the characters in dark adaptation. The calcium concentrations out of cells effected not only on the fine structures of the retinular cells but also on the calcium deposited in the organelles. In higher calcium solution that deposited more calcium in the organelles. The number of the deposits of calcium antimonate that were found in the organelles such as perirhabdomal vacuole, mitochondria, multivesicular body and pigment granule were more in higher calcium solution than in low calcium solution. Our studies concluded that the calcium out of retinular cells influenced the calcium in retinular cells, and those influence the function of the retinular cells by effects on the fine structure of the cells.

Key words *Macrobrachium nipponense*; retinular cell; calcium; ultrastructure

Received: January 13, 2006 Accepted: February 9, 2006

This work was supported by the Foundation of Shanghai Municipal Education Commission (No.03DZ05)

*Corresponding author. Tel: 86-21-57122541, E-mail: lyt@shnu.edu.cn