

盐度变化对克氏原螯虾渗透调节影响机制的初步研究

金彩霞 潘鲁青

(中国海洋大学海水养殖教育部重点实验室, 青岛 266003)

摘要: 本文研究了克氏原螯虾在盐度变化下血淋巴渗透压、鳃丝 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ 活力和生物胺的变化过程和特征。结果显示: 盐度变化 (0‰—20‰) 对克氏原螯虾血淋巴渗透压、鳃丝 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ 活力和生物胺含量影响显著 ($p < 0.05$), 而对照组无明显变化。在实验时间内各处理组血淋巴渗透压随盐度变化增大而升高, 1—2d 后趋于稳定, 鳃丝 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ 活力逐渐降低, 6d 后保持稳定, 且与渗透压正相关性, 酶活力与盐度呈负相关性; 各处理组在实验时间内血淋巴和鳃丝多巴胺、去甲肾上腺素、5-羟色胺含量均呈峰值变化, 血淋巴中多巴胺、5-羟色胺含量分别在 1d 和 3d 时达到最小值和最大值, 且变化过程分别与盐度变化值呈负和正相关性, 并分别在 6d 和 9d 后趋于稳定, 而各处理组的 NE 含量 (除盐度为 4 的处理组) 在 0.5d 内迅速升高, 0.5—3d 内略有波动, 然后呈下降趋势, 至 15d 时保持稳定; 各处理组鳃丝多巴胺、去甲肾上腺素和 5-羟色胺含量均于 2d 时达到最大值, 且变化过程均与盐度变化值呈正相关性, 均在 9d 后趋于稳定; 稳定后各处理组血淋巴和鳃丝生物胺含量均与对照组无显著性差异。这些结果表明, 在外界盐度变化下生物胺作为一种神经内分泌因子, 在甲壳动物的渗透压调节过程中发挥重要作用, 可引发甲壳动物产生的渗透调节过程, 如激活鳃丝已有的 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ 活力、调节血淋巴渗透压效应物含量以适应外界环境的变化。

关键词: 克氏原螯虾; 盐度; 渗透压; $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ 生物胺

中图分类号: Q469 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3207(2008)06-0894-06

我国盐碱土地约 5 亿多亩, 研究、开发利用盐碱地资源, 使其逐步成为粮食和水产品的供应基地, 是目前国家面临的迫切需要解决问题。克氏原螯虾 (*Procambarus clarkii*) 具有优良的养殖属性, 对环境适应能力强, 适宜于各种淡水水域养殖, 目前国内大多采取粗放型养殖方式。近几年, 盐碱地克氏原螯虾养殖业逐渐兴起, 由于盐碱地水质具有盐度较高、碱度较大和难于调控等特点, 常导致克氏原螯虾存活率下降。因此, 盐碱地养殖面临的主要问题是克氏原螯虾对养殖水环境的生理适应性, 这些都与克氏原螯虾的渗透调节生理直接相关, 而有关这方面的研究往往被忽视。

水生甲壳动物的渗透调节机制一直是国内外学者研究的热点, 近年在渗透调节的离子转运调控^[1-4]和神经内分泌调控^[5-6]方面取得突出成果, 证实了 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ 和生物胺对渗透压的调节作用, 而有关甲壳动物渗透生理适应性方面的研究甚少。本文研究了在盐度变化下克氏原螯虾血

淋巴渗透压、鳃丝 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ 活力和生物胺的变化过程和特征, 旨在探讨克氏原螯虾渗透生理适应机制, 为盐碱地克氏原螯虾养殖水环境调控提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料 实验所用克氏原螯虾于 2005 年 8 月购自青岛市南山水产品市场, 生物学体长为 (9.9 ± 0.4) cm, 肢体完整, 健康活泼。采用经充分曝气的自来水暂养 7d 温度为 $(24 \pm 0.5)^\circ\text{C}$, pH 为 7.7, 连续充气, 日换水 1/2, 并投喂河蟹用的配合饲料。

1.2 实验方法

1.2.1 盐度梯度的设置 实验盐度 (S) 梯度为 0‰、4‰、8‰、12‰、16‰、20‰, 各盐度梯度采用经充分曝气的自来水 ($S = 0$ ‰) 和自然海水 ($S = 31$ ‰) 来调节, 实验在 $50\text{cm} \times 40\text{cm} \times 30\text{cm}$ 的塑料水槽内进行, 每个梯度均设三个平行组, 每个水槽放健康克氏原螯虾 10 尾, 实验期间的养殖管理同暂养期

收稿日期: 2006-09-25 修订日期: 2007-06-12

基金项目: 山东省优秀中青年科学家科研奖励基金项目 (2006BS07005) 山东省科技兴海项目 (2001-3-6) 资助

通讯作者: 潘鲁青, E-mail: pank@ouc.edu.cn

间。实验的取样时间为 0、0.5、1、2、3、6、9、15 d。

1.2.2 样品制备 各水槽随机取健康克氏原螯虾 1 尾, 采用 1 mL 注射器从围心室内抽取血淋巴置 1.5 mL 离心管中, 迅速取其鳃丝, 置 1.5 mL 离心管中, -80°C 保存。血淋巴样品在 $0-4^{\circ}\text{C}$ 冰箱内过夜, 3000 r/min 离心 20 min, -80°C 保存蓝色上清液。

1.2.3 渗透压的测定 采用 Fiske210 微型冰点渗透压仪测定渗透压。

1.2.4 鳃丝 $\text{Na}^{+}-\text{K}^{+}-\text{ATPase}$ 活力的测定 $\text{Na}^{+}-\text{K}^{+}-\text{ATPase}$ 活力的测定主要参考 Whealy 和 Henry^[7] 的方法。酶蛋白浓度参考 Bradford^[8] 方法, 以牛血清白蛋白为标准, 采用考马斯亮蓝法测定。

1.2.5 生物胺含量的测定

(1) 血淋巴中生物胺含量的测定 取血淋巴 0.1 mL, 超纯水 1:10 稀释, 加正丁醇 2 mL、0.05 mol/L pH 9.0 的硼酸缓冲液 0.5 mL 和氯化钠晶体 10 mg, 剧烈震荡 30 s, 3000 r/min 离心 10 min, 弃下层水相, 加正庚烷 3 mL、0.1 mol/L 盐酸 1.0 mL, 同上法振荡, 离心。溶液分为两层, 下层水相含多巴胺 (Dopamine, DA)、去甲肾上腺素 (Norepinephrine, NE) 和 5-羟色胺 (5-hydroxytryptamine, 5-HT)。

DA、NE 含量的测定 空白管内加超纯水 1 mL; 标准管分别取 NE、DA 标准应用液 (0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 0.1 mL, 加超纯水 0.9 mL; 测定管内取下层水相 0.5 mL, 补超纯水至 1 mL。各管均加入 0.01 mol/L EDTA 溶液 2.4 mL、0.5 mol/L 碘溶液 0.1 mL, 混匀, 静置 2 min, 加入 0.7 mol/L 碱性亚硫酸钠溶液 0.2 mL, 混匀放置 4 min, 加预冷醋酸 0.2 mL, 摇匀, 避光置 80°C 水浴 5 min, 冷却后在激发波长 385 nm, 发射波长 480 nm 下测定 NE 荧光强度。将 NE 测定后的溶液倒回原玻璃管内, 加 7.25 mol/L 磷酸 0.1 mL, 混匀, 沸水浴 15 min, 冷却后在激发波长 325 nm, 发射波长 375 nm 下测定 DA 荧光强度。

5-HT 含量的测定 空白管、标准管、测定管内所加药品类同上述 DA、NE, 然后各管加 0.5% 半胱氨酸 0.1 mL、0.9 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 过碘酸钠溶液 0.1 mL 和浓盐酸 2 mL, 混匀, 加 0.004% 邻苯二甲醛溶液 0.1 mL, 混匀, 沸水浴 10 min, 冷却后在激发波长 365 nm, 发射波长 480 nm 下测定 5-HT 荧光强度。

血淋巴中生物胺含量以微克生物胺/毫升血淋巴 ($\mu\text{g}/\text{mL}$) 表示, 按以下公式计算:

血淋巴生物胺 ($\mu\text{g}/\text{mL}$) = $\frac{F(t) - F(b)}{F(s) - F(b)} \times \text{标准应用液浓度}$

$F(t)$: 样品管荧光读数; $F(b)$: 空白管荧光读数; $F(s)$: 标准管荧光读数。

(2) 鳃丝中生物胺含量的测定 将鳃丝样品加少量预冷酸化正丁醇, 冰水浴 2000 r/min 匀浆, 匀浆液置于具塞带刻度的离心管, 酸化正丁醇补足至 4 mL, 剧烈震荡 30 s, 3000 r/min 离心 5 min, 取上清液 2.5 mL 置另离心管, 同 (1) 方法继续处理, 得下层水相含 NE、DA、5-HT。

DA、NE 含量的测定 吸取下层水相 0.5 mL 于小试管中, 将 (1) 中 0.01 mol/L EDTA 溶液 2.4 mL 换为 1/15 mol/L pH 7.2 的磷酸盐缓冲液 1.5 mL, 其余同 (1) 中测 DA、NE 法。

5-HT 含量的测定 吸取下层水相 0.5 mL 于小试管中, 加入 0.5% 半胱氨酸 0.1 mL、0.004% 邻苯二甲醛 3 mL, 混匀, 沸水浴 10 min, 冷水浴冷却。同 (1) 中相同的方法测 5-HT 荧光强度。

标准管、空白管处理 标准管取标准应用液 (0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 0.2 mL, 空白管取超纯水 0.2 mL, 分别用酸性正丁醇补足至 4 mL, 其余操作同样品管处理。

鳃丝中生物胺含量以微克生物胺/毫克蛋白 ($\mu\text{g}/\text{mg pr}$) 表示, 按以下计算:

鳃丝生物胺 ($\mu\text{g}/\text{mg pr}$) = $\frac{F(t) - F(b)}{F(s) - F(b)} \times \text{标准应用液体} \times \frac{\text{样品液体积}}{\text{蛋白含量 (mg)}}$

$F(t)$ 、 $F(b)$ 、 $F(s)$ 指代内容同 (1)。

1.3 数据处理 所有数据均以 3 个平行组数据的平均值 $\pm$ 标准差 (Means $\pm$ SD) 表示, 并采用单因素方差分析 (ANOVA) 和 Duncan 检验法统计分析, Excel、SPSS 对做相关性分析。

2 结果

2.1 克氏原螯虾在盐度变化下渗透生理指标变化情况

由图 1 可知, 盐度变化 (0‰—20‰) 对克氏原螯虾血淋巴渗透压和鳃丝 $\text{Na}^{+}-\text{K}^{+}-\text{ATPase}$ 活力影响显著 ($p < 0.05$)。在盐度变化 1—2 d 内, 各处理组血淋巴渗透压逐渐升高, 1 d 后盐度为 4‰、8‰、12‰ 的处理组趋于稳定, 而盐度为 16‰、20‰ 的处理组 2 d 后保持稳定, 稳定后的各处理组血淋巴渗透压与盐度值呈正相关性; 在盐度变化 6 d 内, 各处理组鳃丝 $\text{Na}^{+}-\text{K}^{+}-\text{ATPase}$ 活力呈下降趋势, 6 d 后酶活力趋于稳定, 而且酶活力与盐度呈负相关性。

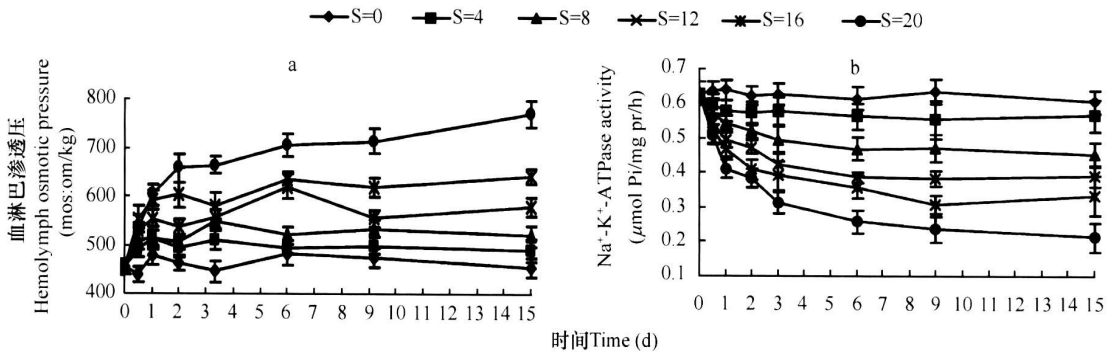


图 1 盐度对克氏原螯虾血淋巴渗透压 (a)和鳃丝 Na⁺-K⁺-ATPase活力 (b)的影响

Fig 1 Effect of salinity on hemolymph osmotic pressure (a) and gill Na⁺-K⁺-ATPase activity (b) of *Procambarus clarkii*

2.2 克氏原螯虾在盐度变化下血淋巴和鳃丝生物胺的表达

图 2表明,盐度变化 (0‰—20‰)对克氏原螯虾血淋巴 DA、NE 和 5-HT 含量影响显著 ($p < 0.05$)。在实验时间内,各处理组血淋巴 DA 呈现先降低后升高的趋势,于 9d 时基本恢复到正常水平; NE 含量除盐度为 4‰ 的处理组,其余处理组均在 0.5d 内迅速升高,0.5—3d 内略有波动,然后呈下降趋势,至 15d 时恢复至对照水平。5-HT 含量在 0—3d 内逐渐升高,3d 时达到最大值,且最大值与盐度变化值呈正相关性,3d 后降低,9d

时基本恢复到正常水平。各处理组生物胺含量稳定后均与对照组无显著性差异。

由图 3可见,盐度变化 (0‰—20‰)前 9d 对克氏原螯虾鳃丝 DA、NE 和 5-HT 含量均有显著影响 ($p < 0.05$)。在实验时间内各处理组鳃丝 DA、NE 和 5-HT 含量均呈峰值变化,均在 2d 时达到最大值,且变化过程均与盐度变化值呈正相关性,然后均呈下降趋势,均在 9d 后趋于稳定,稳定后各处理组生物胺含量与对照组无显著性差异。

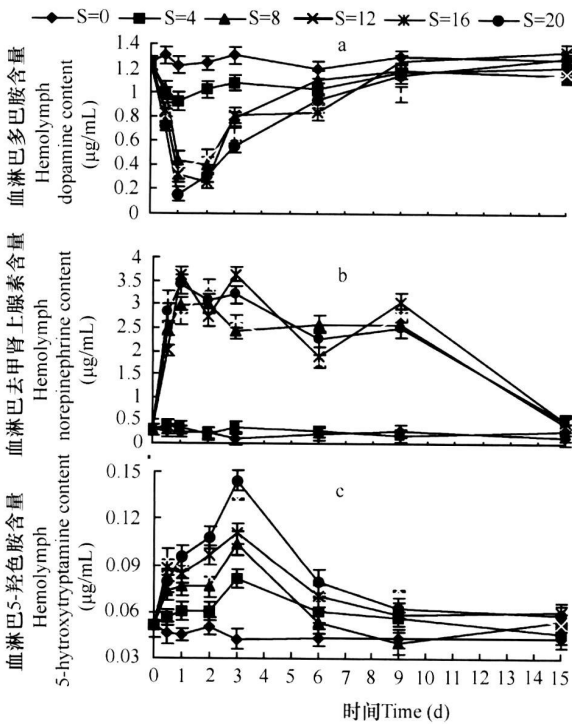


图 2 盐度对克氏原螯虾血淋巴中多巴胺 (a)、去甲肾上腺素 (b)、5-羟色胺 (c) 含量的影响

Fig 2 Effect of salinity on haemolymph dopamine (a), norepinephrine (b) and 5-hydroxytryptamine (c) of *Procambarus clarkii*

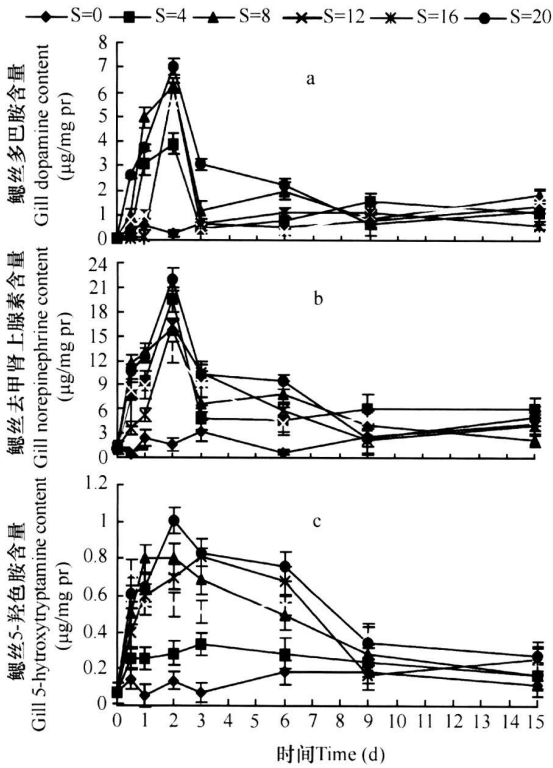


图 3 盐度对克氏原螯虾鳃丝多巴胺 (a)、去甲肾上腺素 (b)和 5-羟色胺 (c) 含量的影响

Fig 3 Effect of salinity on gill dopamine (a), norepinephrine (b) and 5-hydroxytryptamine (c) of *Procambarus clarkii*

3 讨论

3.1 克氏原螯虾在盐度变化下渗透生理的适应性

甲壳动物具适应外界盐度变化的能力, 主要通过血淋巴渗透压调控来维持机体的正常生命活动, 血淋巴渗透压调节主要依赖于无机离子 (Na^+ 、 Cl^- 、 K^+ 等) 的通透性以及自由氨基酸等渗透压效应物含量的变化, 其中 Na^+ 和 Cl^- 是形成血淋巴渗透压的最主要贡献者, 约占 80%—90% 左右^[9]。甲壳动物离子调控主要通过鳃上皮细胞膜上的 $\text{Na}^+-\text{K}^+-\text{ATPase}$ 、 V-ATPase 和 $\text{HCO}_3^--\text{ATPase}$ 等离子转运酶的作用来完成^[6], 其中 $\text{Na}^+-\text{K}^+-\text{ATPase}$ 约占总 ATPase 活性的 70%^[10]; Towle^[11] 研究发现甲壳动物鳃丝 $\text{Na}^+-\text{K}^+-\text{ATPase}$ 在维持机体离子调节和细胞水分平衡 (Cellular water balance) 上起主要作用, 并认为 $\text{Na}^+-\text{K}^+-\text{ATPase}$ 活力大小与渗透调节能力是显著相关的。这说明 $\text{Na}^+-\text{K}^+-\text{ATPase}$ 在甲壳动物离子调控中占主导地位, 能反映甲壳动物对外界环境变化的渗透生理的适应能力。

已有研究证明广盐性甲壳动物如斑节对虾 (*Penaeus monodon*)、印度明对虾 (*Fenneropenaeus indicus*) 和白滨对虾 (*Litopenaeus setiferus*) 在盐度变化范围分别为 32‰→8‰、32‰→(8—40)‰和 10‰→5‰时, 渗透调节时间分别为 1—2d、0.25—0.5d 和 3—4d^[12—14]; 据 Neufeld *et al.*^[15] 报道美洲真蟹 (*Callinectes sapidus*) 从 100‰ 海水转移到 20‰ 海水中渗透调节的时间为 12—24h 左右, 而 $\text{Na}^+-\text{K}^+-\text{ATPase}$ 活力 8—12d 才趋于稳定, 同时鳃丝 $\text{Na}^+-\text{K}^+-\text{ATPase}$ 活力在低盐度环境中比在高盐度中的要高; Lima^[16] 将淡水沼虾从淡水转移到 21‰ 和 28‰ 海水中, 20d 后测得的鳃丝 $\text{Na}^+-\text{K}^+-\text{ATPase}$ 活力下降 35%。本研究表明克氏原螯虾血淋巴渗透压在盐度变化 1—2d 后趋于稳定, 而鳃丝 $\text{Na}^+-\text{K}^+-\text{ATPase}$ 活力在盐度变化 6d 后趋于稳定, 且酶活力与盐度呈负相关性, 这与上述研究结果基本一致。作者认为在盐度变化后克氏原螯虾短时间内达到渗透调节平衡, 而鳃丝 $\text{Na}^+-\text{K}^+-\text{ATPase}$ 活力变化滞后, 且具有明显的时间规律性, 与盐度变化值无关, 这充分体现了克氏原螯虾渗透调节的生理过程和特征, 也说明鳃丝 $\text{Na}^+-\text{K}^+-\text{ATPase}$ 活力可以作为评价甲壳动物对外界环境渗透生理适应性的指标。

3.2 克氏原螯虾在盐度变化下生物胺的表达与调节机制

无论是广盐性还是狭盐性的水生甲壳动物, 随

着养殖水环境的改变, 在神经内分泌系统的调控下, 血淋巴渗透压和鳃上皮离子转运等都会发生一系列的变化以适应外界环境, 维持正常的生理代谢活动。许多学者研究认为甲壳动物主要由神经内分泌器官包括 X-器官/窦腺复合体、胸腺和围心腺等分泌激素, 作用于 $\text{Na}^+-\text{K}^+-\text{ATPase}$ 等相关离子转运酶, 调节鳃和血淋巴中离子的转运、渗透压效应物的含量等^[6, 17, 18]; Cooke 和 Sullivan^[19] 研究发现围心腺匀浆提取液可增加进入甲壳动物鳃丝的 Na^+ 通量, 并认为围心腺激素可能通过调节生物胺、血淋巴中的效应物和水流经过鳃丝表面的速度, 进行渗透压平衡和离子交换的调控; 一些学者将 DA 和已经适应稀释水环境的美洲真蟹围心器官的匀浆提取液分别注入到在自然海水中的甲壳动物体内, 其 $\text{Na}^+-\text{K}^+-\text{ATPase}$ 活力显著地提高^[20—22]; Morris 和 Edwards^[3] 给杂色瘦方蟹 (*Libinia emarginatus*) 注射 DA 或 cAMP 后, 发现鳃丝 $\text{Na}^+-\text{K}^+-\text{ATPase}$ 活力迅速升高, 指出生物胺与鳃丝细胞膜上 Na^+/K^+ 泵的激活相关; 另有研究^[23, 24] 表明外界盐度变化可引起甲壳动物血淋巴中多巴胺 (DA)、去甲肾上腺素 (NE) 和 5-羟色胺 (5-HT) 含量的变化。本研究表明在盐度变化后克氏原螯虾血淋巴和鳃丝中 3 种生物胺含量均在 1—3d 内出现峰值变化, 在 6d 或 9d 后恢复至正常水平, 而血淋巴渗透压和鳃丝 $\text{Na}^+-\text{K}^+-\text{ATPase}$ 活力分别在 1—2d 和 6d 后趋于稳定。由此说明在盐度变化下甲壳动物神经内分泌激素可通过生物胺进行渗透平衡的调节, 而且生物胺的变化过程与血淋巴渗透压、鳃丝 $\text{Na}^+-\text{K}^+-\text{ATPase}$ 活力具有明显的时间效应性、规律性, 与盐度变化值无关。作者认为生物胺广泛分布于甲壳动物的中枢神经系统和外周器官内, 可作为神经递质或激素传递各种信息, 在外界环境变化下生物胺作为一种神经内分泌因子, 引发甲壳动物产生不同的渗透调节过程和生理适应性, 具有明显的生理调控特征。

Zatta^[23] 研究证实三叶真蟹 (*Carcinus maenas*) 由海水移到 50‰ 的海水中后, 血淋巴中 DA 含量出现了迅速的升高, 同时 NE 和 5-HT 降低; Pequeux *et al.*^[24] 将中华绒螯蟹 (*Eriocheir sinensis*) 移入海水中适应 10d 后, 发现血浆中 NE 和 DA 含量显著升高, 前鳃和后鳃的 5-HT 的含量也显著升高。本实验表明在盐度变化后克氏原螯虾短时间内血淋巴和鳃丝中 3 种生物胺出现显著变化, 除血淋巴中的 DA 呈下降趋势外, 其他均为升高趋势, 而且变化过程均与盐度变化值呈正相关, 与渗透调节指标表现为明显的

相关性,这与上述研究结果不完全相同。由此说明甲壳动物在环境变化下生物胺的表达有差异,可能存在不同的调节机制,有关这方面还有待于进一步研究。已有研究表明在甲壳动物中生物胺介导途径主要通过跨膜蛋白与各种三磷酸鸟苷结合蛋白(G蛋白)相互作用导致不同的第二信使途径(包括G蛋白、环状腺苷酸和效应物等)的活化,实现调节机体生理功能的作用^[25];Tausch *et al.*^[26]研究表明甲壳动物鳃丝上具有DA和5-HT的结合位点,能通过一系列级联反应改变鳃丝 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ 活力。作者同其他许多学者赞同的观点基本一致,认为甲壳动物鳃丝离子转运酶在神经内分泌系统调控下大致经历短、长期两个阶段,短期调节是生物胺(如5-HT、DA等)通过刺激腺苷酸环化酶使cAMP的浓度升高,从而诱导激活已有的离子转运酶进行渗透调节^[21, 26];长期调节一方面是生物胺系统刺激离子转运型鳃上皮细胞膜产生重要的褶皱系统,增加了质膜上 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ 位点和离子通道的数量,另一方面则是神经内分泌因子cAMP等刺激靶酶的蛋白磷酸化,并合成新酶的结果^[18, 21, 26]。因此作者认为在盐度变化后克氏原螯虾体内生物胺含量短时间内出现明显变化,从而激活鳃丝已有的 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ 活力和调节血淋巴渗透压效应物含量,迅速调节体内的离子浓度和血淋巴渗透压适应外界环境变化,达到渗透平衡,然后主要通过神经内分泌系统和生物胺的调节,增加 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ 位点和刺激新酶的合成,最终经过一段时间渗透调节生理适应, $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ 活力趋于稳定。

参考文献:

- [1] Onken H, Riesenpatt S. NaCl absorption across split gill lamellae of hyperregulating crabs: Transport mechanisms and their regulation [J]. *Comp. Biochem. Physiol.*, 1998, **119A**: 883—893
- [2] Lucu C, Devescovi M. Osmoregulation and branchial $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ in the lobster *Homarus gammarus* acclimated to dilute seawater [J]. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 1999, **234**: 291—304
- [3] Lucu C, Devescovi M, Skaramuca B *et al.* Gill $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ in the spiny lobster *Palinurus elephas* and other marine osmoconformers: Adaptiveness of enzymes from osmoconformity to hyperregulation [J]. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 2000, **246**: 163—178
- [4] Castiño P C, Martins I A, Bianchini A. Gill $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ and osmoregulation in the estuarine crab *Chasmagnathus granulata* Dana 1851 (Decapoda: Grapsidae) [J]. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 2001, **256**: 215—227
- [5] Freire C A, McNamara J C, Rosa J C, *et al.* Neuroendocrine control of osmotic regulation in the freshwater shrimp *Macrobrachium olfersii* (Wiegmann) (Crustacea: Decapoda): free amino acid concentrations in the hemolymph [J]. *Gen. Comp. Endocrinology*, 1995, **100**: 83—91
- [6] Morris S. Neuroendocrine regulation of osmoregulation and the evolution of air-breathing in decapod crustaceans [J]. *J. Exp. Biol.*, 2001, **204**(5): 979—989
- [7] Whealy M G, Hentry R P. Branchial and antennal $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ and carbonic anhydrase activity during salinity acclimation of the euryhaline crayfish *Pacifastacus lenisus* [J]. *J. Exp. Biol.*, 1987, **133**: 73—86
- [8] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding [J]. *Anal. Biochem.*, 1976, **72**: 248—254
- [9] Chen J C, Chia P G. Osmotic and ionic concentrations of *Scylla serrata* (Forsk.) subjected to different salinity levels [J]. *Comp. Biochem. Physiol.*, 1997, **117**(2a): 239—244
- [10] Furiel R P M. Characterization of ($\text{Na}^+ - \text{K}^+$)-ATPase in gill microsomes of the freshwater shrimp *Macrobrachium olfersii* [J]. *Comp. Biochem. Physiol.*, 2000, **126b**: 303—315
- [11] Towle D W. Role of $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ in ionic regulation by marine and estuarine animals [J]. *Mar. Biol. Lett.*, 1981, **2**: 107—122
- [12] Ferraris R P, *et al.* Effect of salinity on the osmotic chloride total protein and calcium concentrations in the hemolymph of the prawn *Penaeus monodon* [J]. *Comp. Biochem. Physiol.*, 1986, **83a**: 701—708
- [13] Parado-Estepa F D, *et al.* Responses of intermolt *Penaeus indicus* to large fluctuations in environmental salinity [J]. *Aquaculture*, 1987, **64**: 175—184
- [14] Castillo F J, Lawrence A. The effect of salinity on the osmotic sodium and chloride concentrations in the hemolymph of euryhaline shrimp of the genus *Penaeus* [J]. *Comp. Biochem. Physiol.*, 1981, **168**(a): 75—80
- [15] Neufeld G J, Holliday C W, Prichard J B. Salinity adaptation of Gill $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ in the blue Crab *Callinectes sapidus* [J]. *J. Exp. Zool.*, 1980, **211**: 215—224
- [16] Lima A G, McNamara J C, Terra W R. Regulation of hemolymph osmolytes and gill $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ activities during acclimation to saline media in the freshwater shrimp *Macrobrachium olfersii* (Wiegmann, 1836) (Decapoda: Palaemonidae) [J]. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 1997, **215**: 81—91
- [17] Fingeman M. Endocrine mechanism of crustacean [J]. *Journal of Crustacean Biology*, 1987, **7**(1): 1—24
- [18] Cai S L. A review of crustacean endocrinology [J]. *Journal of Fisheries of China*, 1998, **22**(2): 154—161 [蔡生力. 甲壳动物内分泌学研究与发展. 水产学报, 1998, **22**(2): 154—161]
- [19] Cooke I M, Sullivan R E. Hormones and neurosecretion [J]. *The Biology of Crustaceans*, 1982, **3**: 205—290
- [20] Mo J L, Devos P, Tausch G. Dopamine as a modulator of ionic transport and $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ activity in the gills of the Chinese

- crab *Eriocheir sinensis* [J]. *J. Crust. Biol.*, 1998, (18): 442—448
- [21] Sommer M, J Mantel L H. Effect of Dopamine cyclic AMP and pericardial organs on sodium uptake and $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ activity in gills of the green crab *Carcinus maenas* [J]. *J. Exp. Zool.*, 1988, **248**: 272—277
- [22] Savage J P, Robinson G D. Inducement of increased gill $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ activity by a hemolymph factor in hyperosmoregulating *Callinectes sapidus* [J]. *Comp. Biochem. Physiol.*, 1983, **75** (A): 65—69
- [23] Zatta P. Dopamine, noradrenaline and serotonin during hypo-osmotic stress of *Carcinus maenas* [J]. *Mar. Biol.*, 1987, **96**: 479—481
- [24] Piquet P, Le Bras C, Cam-Moisan J *et al*. Polyamines, indolamines and catecholamines in gills and haemolymph of the euryhaline crab *Eriocheir sinensis*. Effects of high pressure and salinity [J]. *Crustaceana.*, 2002, **75**: 567—578
- [25] Fingerman M, Nagabhushanan R, Sarojini R, *et al*. Biogenic amines in crustaceans: identification, localization and roles [J]. *Crust. Biol.*, 1994, **14**(3): 413—437
- [26] Trausch G, Forget M C, Devos P. Biogenic-stimulated phosphorylation and $\text{Na}^+ / \text{K}^+ - \text{ATPase}$ in the gills of the Chinese crab *Eriocheir sinensis* [J]. *Comp. Biochem. Physiol.*, 1989, **94b**: 487—492

PRELIMINARY STUDIES ON PHYSIOLOGICAL ADAPTIVE MECHANISM OF *PROCAMBARUS CLARKII* OSMOREGULATION UNDER DIFFERENT AMBIENT SALINITIES

JIN Cai-Xia and PAN Lu-Qing

(The Key Laboratory of Mariculture, Ministry of Education, Ocean University of China, Qingdao 266003)

Abstract Process of changeable characteristic of *Procambarus clarkii* hemolymph osmotic pressure, gill $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ activity and three biogenic amines: dopamine, noradrenaline and 5-hydroxytryptamine were investigated in this paper. The results showed that changes of salinity (0‰—20‰) had significant influences on hemolymph osmotic pressure, gill $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ activity and three biogenic amines ($p < 0.05$). Along with the increase of salinity, the hemolymph osmolality ascended sharply and stabilized after 1—2 d, having positive correlation with salinity. While gill $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ activity declined and came to steady on 6 d, having negative correlation with salinity. The gill $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ have dominant action in the crustacean osmoregulation, which accounting for 70% of the ion transport and can be taken as an index of osmoregulation. During the experiment, both the biogenic amines contents of hemolymph and gill presented peak values. Dopamine and 5-hydroxytryptamine in hemolymph reached the maximal and minimum values on 1 d and 3 d, and arrived at stable levels on 6 d and 9 d respectively. Moreover, dopamine had negative correlation with salinity while 5-hydroxytryptamine had positive correlations with salinity. Hemolymph noradrenaline ascended sharply in 0.5 d, and took on genital fluctuation during 0.5—3 d, then decreased and reached to the control's level. All gill dopamine, noradrenaline and 5-hydroxytryptamine contents gained the maximal values on 2 d and all achieved stable levels at the same time, and they had positive correlations with salinity. It is generally believed that the crustacean osmoregulation is controlled by neuroendocrine factors which were released fromcretory organ and distributed rapidly to hemolymph. Many scholars considered that salinity changed in short time, biogenic amines could stimulate phosphorylation of the former enzyme in the gill containing the $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$, and then ATPase could regulate the ion concentrations *in vivo* and *in vitro*. With a long time of adoption, penetrability of gill epithelium to water and ions changed and then the gill $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ activity came to a steady state. The authors thought that biogenic amines played important role in osmoregulation when salinity altered. Biogenic amines induced action of osmoregulation by activating ion transport enzyme $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$, acclimating hemolymph osmotic pressure to environment.

Key words *Procambarus clarkii*, Salinity, Hemolymph osmotic pressure, $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$, Biogenic amines