

血清素對甲殼類 X—器官／血竇腺分泌 升血糖因子之調節作用

高中組生物科第三名

彰化縣私立精誠高級中學

作者：陳亞雯

指導教師：李奇英、黃振淳

一、研究動機

X—器官／血竇腺 (X-organ/sinus gland) 是甲殼類動物眼柄裡一個重要的神經內分泌系統。¹ 製造，分泌數種荷爾蒙調節許多生理機制，如生殖腺發育、體色改變、蛻殼、醣類代謝、滲透調節等。²⁻³ X—器官是一群神經分泌細胞的細胞核周體 (perikaryon)，負責合成荷爾蒙。這些荷爾蒙經由神經細胞的軸突運送到軸突末端貯存起來。血竇腺是這些神經分泌細胞腫大的軸突末端 (圖一，二)。在分泌訊息刺激下，貯存的荷爾蒙從血竇腺被釋放至緊鄰的血竇，經由循環系統運輸到被調節的目標組織。

甲殼類的眼柄裡含有升血糖因子 (hyperglycemic factor) 最早是由 Abramowitz 等人在五十幾年前所提出。他們發現螃蟹 (*Libinia emarginata*) 的眼柄萃取液有升高血糖的作用。⁴ 在這之後大量的研究投注在了解升血糖因子 (後來被命名為甲殼類升血糖荷爾蒙, crustacean hyperglycemic hormone) 的生理功能。³⁻⁵ 根據這些研究，甲殼類升血糖荷爾蒙最主要的生理功能是藉由影響醣原移動來調節醣類代謝。許多的組織都受甲殼類升血糖荷爾蒙的影響調節。譬如肌肉、肝胰臟、生殖腺的醣類代謝都曾被證實受甲殼類升血糖荷爾蒙 (或眼柄萃取液) 的影響。⁶⁻⁹

二、研究目的

甲殼類升血糖荷爾蒙的分泌可能受多種神經調節物質 (neuroregulator) 的調控。¹⁰ 利用免疫組織化學的技術，已有研究發現眼柄的神經節具有血清素性 (Serotonergic) 神經纖維然其功能並不清楚。^{11,12} 本研究的目的是探討血清素 (Serotonin, 一種生物胺) 對螯蝦 (*Procambarus clarkii*) 血糖含量的影響；並進一步釐清血清素是否是間接地透過控制 X—器官／血竇腺分泌升血糖因子而達成對血糖的調節，以及血清素在此一作用途徑所活化的接受體 (receptor) 型式。

三、研究設備器材

- (一) 微量注射器 (Eppendorf)
- (二) 立體解剖顯微鏡 (Olympus)
- (三) 二氧化碳保溫培養箱 (NuAire)
- (四) ELISA測量儀 (Molecular Devices)
- (五) 微量吸管 (Eppendorf)
- (六) 微量天平 (Mettler)

四、研究方法

(一) 實驗動物之取得與飼養

本計劃所使用之動物為螯蝦 (*P.Clarkii*)。實驗所需之動物，自蝦販購得。動物被飼養於恆溫 (26°C) 之淡水槽中，光照週期為12D/12L (光照開始時間為6:00a.m.)，每日餵與成蝦飼料 (大富牌)。

(二) 活體注射

所有接受活體注射之螯蝦在注射實驗48小時前即予斷食，有些實驗需要使用無眼柄的動物亦在實驗前48小時接受去除眼柄的處理。所抽取之血淋巴液的80 μ l 皆以20 μ l 0.1M EDTA生理食鹽水稀釋之 (以防止凝血產生)，經離心後 (2000g, 10分鐘) 取上清液冰凍保存 (-20°C) 以供血糖分析。【見 (四) 血糖分析】

1. 血清素對血糖含量的依特劑量 (dose-dependent) 效應：將螯蝦分成七組 (每組八隻)，第一組注射甲殼類生理食鹽水 (van Harreveld saline, 10 μ l/隻) 第二~七組注射血清素 (10 μ l/隻)，濃度依次為 10^{-5} , 10^{-7} , 10^{-9} , 10^{-11} , 10^{-13} moles/隻。注射後一小時抽取血淋巴液，以供血糖分析。
2. 血清素升血糖效應與眼柄的關係：將螯蝦分成四組 (每組八隻)，其中兩組去除眼柄，分別接受10 μ l/隻的血清素 (10^{-7} moles/隻) 或螯蝦生理食鹽水之注射；另外兩組保有眼柄，亦分別接受血清素 (10^{-7} moles/隻) 或螯蝦生理食鹽水之注射，注射後一小時抽取血淋巴液，以供血糖分析。
3. 血竇腺研磨液對螯蝦升血糖效應的時程反應：血竇腺自眼柄神經組織解剖獲得，置於生理食鹽水中在冰浴上研磨十分鐘，離心後取其上清液即為血竇腺研磨液。將去除眼柄的螯蝦分成五組 (每組八隻)，分別接受

10 μ l的生理食鹽水或血竇腺研磨液（1血竇腺／隻）的活體注射。注射後立即（注射生理食鹽水之螯蝦）或注射後0.5，1，1.5，2小時（注射血竇腺研磨液之螯液）抽取血淋巴液，以供血糖分析。

4. 保溫培養液的升血糖效應：將去除眼柄的螯蝦分成三組（每組八隻），分別接受生理食鹽水注射或X—器官／血竇腺保溫培養之培養液【見（三）離體保溫培養】的注射，注射後一小時進行抽血，以供血糖分析。
5. 血清素接受體的探討：將螯蝦分成三組（每組八隻），第一組接受生理食鹽水（10 μ l／隻）的注射，第二、三組分別接受 10^{-6} 及 10^{-7} moles的5-HT3 receptor agonist，1-(3-chlorophenyl) biguanide，之注射（10 μ l／隻）。注射後一小時抽取血淋巴液，以供血糖分析。

（三）離體保溫培養

為了了解血清素對於X—器官／血竇腺分泌升血糖因子之影響，X—器官／血竇腺在解剖顯微鏡下自螯蝦取得。實驗組之X—器官／血竇腺置於含有血清素（ 10^{-5} M）的生理食鹽水（保溫培養液），在26°C，5% CO₂下保溫培養四小時。適當的控制組（X—器官／血竇腺在無外加的血清素下培養）將一起進行。

保溫培養後，收集培養液於-20°C保存，並用於活體注射【是（二）四】，以便了解血清素是否刺激X—器官／血竇腺分泌升血糖因子於培養液中。

（四）血糖分析

血液中葡萄糖之含量將以Trinder glucose assay kit (Sigma)分析。簡單的敘述血糖含量分析之實驗操作過程：將定量體積之血液巴液或葡萄糖標準液加入96孔盤的小槽，再加入定量體積之測試劑。搖晃之後，在室溫下靜置10分鐘後，以ELISA測量儀在波長400nm下讀取吸光值。不同濃度葡萄糖標準液之吸光值以回歸分析法求得濃度對吸光值之標準曲線。樣品中血糖含量將由此標準曲線計算而來。

（五）統計分析

不同處理組別的血糖含量利用電腦軟體（Stat View, Abucus）以t-test比較；回歸分析亦使用相同軟體。

五、研究結果

活體注射的實驗顯示血清素有依時劑量的效應（圖三）。注射 10^{-9} ~ 10^{-5} moles／隻（圖三D~F）的血清素至保有眼柄之螯蝦中，與只注射生理食鹽水的螯蝦（圖三A，血糖含量： 29.72 ± 6.67 mg/dL）相比，有明顯的升血糖效應（ $P < 0.05$ ），增加血糖含量約3.3~5.5倍。但注射 10^{-13} ~ 10^{-11} moles／隻（圖三B，C）

的血清素至保有眼柄的螯蝦中（血糖含量： $24.63 \pm 4.88 \sim 27.63 \pm 4.57 \text{mg/dL}$ ），與只注射生理食鹽水的螯蝦相比，則無明顯的升血糖效應（ $P > 0.05$ ）。

為了測試血清素的升血糖效應與眼柄的關係，二組去除眼柄的螯蝦分別接受生理食鹽水或 10^7 moles/隻的血清素注射（圖四A，B），另二組保有眼柄的螯蝦亦分別接受生理食鹽水或 10^7 moles/隻的血清素注射（圖四C，D）。結果顯示注射血清素對保有眼柄之螯蝦（血糖含量： $77.24 \pm 10.32 \text{mg/dL}$ ）有非常明顯之升血糖效應（比較圖四C與D， $p < 0.01$ ），但相同劑量的血清素注射對去除眼柄之螯蝦血糖含量（血糖含量： $15.12 \pm 3.50 \text{mg/dL}$ ）則無顯著的影響（比較圖四A與B），顯示血清素的升血糖效應是經由作用在眼柄內的組織，促使後者分泌升血糖因子而達成的。

圖五顯示活體注射血竇腺研磨液於去除眼柄的螯蝦中升血糖效應的時程反應。與控制組相比較（圖五A）一個血竇腺/隻的注射在30分鐘後（圖五B）即有非常明顯的升血糖效應（血糖含量： 2.90 ± 1.27 vs. $31.95 \pm 5.73 \text{mg/dL}$ ， $P < 0.01$ ），且血竇腺研磨液的升血糖效應持續至注射後1~2小時（圖五C~E），血糖含量： $66.35 \pm 6.45 \sim 80.33 \pm 15.63 \text{mg/dL}$ ）。這個結果顯示血竇腺研磨液中含有升血糖因子。

為了驗證血清素於螯蝦的升血糖效應是經由刺激眼柄內的X—器官/血竇腺分泌升血糖因子而達成的，我們取離體保溫培養之實驗組與控制組【見四（三）離體保溫培養】的X—器官/血竇腺保溫培養液，分別注射至去除眼柄之螯蝦中。結果顯示，與注射生理食鹽水的螯蝦（血糖含量： $4.58 \pm 1.88 \text{mg/dL}$ ，圖六A）比較，注射無血清素處理的X—器官/血竇腺培養液（血糖含量： $9.07 \pm 2.95 \text{mg/dL}$ 圖六B）無明顯的升血糖效應（ $P > 0.05$ ），但注射血清素處理的X—器官/血竇腺培養液則有升高血糖含量的效應（血糖含量： 4.58 ± 1.88 vs. $31.00 \pm 11.49 \text{mg/dL}$ ， $P < 0.05$ ）。

為了了解血清素促進血糖因子分泌作用所活化的接受體，三組保有眼柄的螯蝦，分別接受生理食鹽水，與5-HT₃接受體活化劑（agonist）之注射（圖七A，B，C）。結果顯示，注射 10^{-6} moles 1-B=Chlorophenyl biguanide（血糖含量： $40.27 \pm 6.94 \text{mg/dL}$ ）與注射生理食鹽水（血糖含量： $20.34 \pm 5.44 \text{mg/dL}$ ）的螯蝦相比有明顯的升糖效應（ $P < 0.05$ ）。此結果顯示血清素是經由活化5-HT₃而引起升血糖反應的。

六、討論及應用

本計劃的結果顯示螯蝦（*P.clarkii*）的血糖受血清素性的神經調節。血清素的

升血糖效應有依劑量的效果（圖三）。此外，根據本計劃的結果，血清素在去除眼柄的動物則無升血糖效應（圖四），顯示其作用並不是直接作用於釋放葡萄糖的組織，如肝胰臟、肌肉；⁷⁻⁹ 而是作用於眼柄的組織，促使其釋放升血糖因子。先前對於其他甲殼類動物的研究也支持相同的結論。¹³⁻¹⁴ 但是，這些研究都是採取活體注射來檢測血清素的升血糖效應（加實驗的圖三，四），因此無法驗證血清素是否作用於眼柄的組織，促使其釋放升血糖因子。

甲殼類動物的眼柄有一個相當重要的神經內分泌系統，X—器官／血竇腺（圖一，二）。這個系統製造與分泌的數種激素之一是所謂的甲殼類升血糖荷爾蒙。³ 甲殼類升血糖荷爾蒙作用於肝胰臟，肌肉，促使其釋放葡萄糖。⁷⁻⁹ 圖五的結果顯示螯蝦的血竇腺研磨液也有升血糖因子存在。雖然我們沒有作進一步的純化，但此一升血糖因子應是血竇腺分泌的甲殼類升血糖荷爾蒙。為了檢證血清素對於X—器官／血竇腺分泌升血糖因子的影響，我們進行在離體下保溫培養X—器官／血竇腺的實驗（圖六），並證實血清素有刺激X—器官／血竇腺分泌升血糖因子的效應。加上述，先前的研究都沒有直接的數據支持這個結論，¹³⁻¹⁴ 因此本實驗是第一個證實血清素有促進X—器官／血竇腺分泌升血糖因子的實驗報告。此外，圖七證實5-HT₃接受體的活化劑，與血清素一樣具有升血糖的效應。此結果顯示血清素促進升血糖因子分泌的作用是經由活化5-HT₃接受體而達成的。綜合本研究與先前的報告⁶⁻⁹，我們提出以下的模式來解釋血清素升血糖效應的途徑（圖八）。血清素活化X—器官／血竇腺的5-HT₃接受體，而促使其分泌升血糖因子。此升血糖因子再作用於肝醣貯存組織（肌肉、肝胰臟等），促使肝醣分解，與葡萄糖釋放。

甲殼類的血糖代謝受多種神經調節物質的影響。¹⁰ 除了血清素外，多巴胺（dopamine）、正腎上腺素（norepinephrine）、腦啡肽（enkephalin）也有調節血糖的效應。^{13, 16-18} 與血清素相同，正腎上腺素有升血糖的效應。^{13, 16} 正腎上腺素的升血糖效應在具有及去除眼柄的動物都可見，顯示正腎上腺素有兩個作用途徑；但是其作用的目標組織尚不清楚。^{13, 16} 腦啡肽與多巴胺則有降低血糖的作用。^{15, 17} 與血清素相同的是腦啡肽與多巴胺的作用也是經由控制X—器官／血竇腺的甲殼類升血糖荷爾蒙的分泌而達成（腦啡肽與多巴胺抑制分泌）。^{15, 17} 綜合對於血清素、多巴胺、腦啡肽的研究，甲殼類升血糖荷爾蒙的分泌同時受刺激性與抑制性的神經調節。

七、結論

本計劃證實血清素在甲殼類動物確實有升血糖效應。最重要的是我們的結果

是第一個實驗證實血清素對於 X—器官／血竇腺分泌升血糖因子有刺激的效應。此外，我們的結果也顯示血清素對升血糖因子分泌的作用是經由活化 5-HT₃ 接受體而引起的。往後的實驗將進一步的檢證此升血糖因子是否是甲殼類升血糖荷爾蒙。針對這方面的研究，我們將從螯蝦的血竇腺分離純化出甲殼類升血糖荷爾蒙，用於製造抗甲殼類升血糖荷爾蒙抗體，並利用此抗體以酵素連接免疫吸咐的技術 (ELISA) 來檢證血清素促使 X—器官／血竇腺分泌於保溫培養液的升血糖因子 (加本研究的圖六的實驗) 是甲殼類升血糖荷爾蒙。

本研究建立之 X—器官／血竇腺離體保溫培養將是往後非常有用的研究方法，可以提供研究生物胺釋放升血糖因子的第二信使系統 (second messenger)，和不同的神經調節物質對於其他 X—器官／血竇腺神經荷爾蒙神經調節等問題。

甲殼類升血糖荷爾蒙主要功能為醣類代謝，但有研究發現此荷爾蒙另有調節蛻殼、生殖之功能。¹⁹⁻²⁰ 因此甲殼類升血糖荷爾蒙為一調節代謝、生長發育、生殖的多功能荷爾蒙。我們希望在這方面的研究將甲殼類的養殖應用。

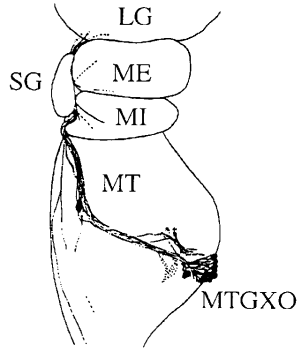
八、參考資料及其它

1. Andrew, R.D. (1983) Neurosecretory pathways supplying the neurohemal organs in Crustacea. In: Neurohemal Organs of Arthropods: Their Development, Evolution, Structure, and Functions, A.P. Gupat, ed., pp. 90-117.
2. Fingerman, M. (1987) The endocrine mechanisms of crustaceans. *Journal of Crustacean Biology* 7:1-24.
3. Keller, R. (1992) Crustacean neuropeptides: Structures, functions, and comparative aspects. *Experientia*:439-448.
4. Abramowitz, A.A., Hisaw, F.L. and Panandrea, D.N., (1944) The occurrence of a diabetogenic factor in the eyestalk of crustaceans. *Biological Bulletin* 86 :1-5.
5. Newcomb, R.W. (1983) Peptides in the sinus gland of *Carisomma carnifex*: Isolation and amino acid analysis. *Journal of Comparative Physiology* 153:207- 221.
6. Parvathy, K. (1972) Endocrine regulation of carbohydrate metabolism during the molt cycle in crustaceans. I. Effect of eyestalk removal in *Ocypode platytarsis*. *Marine Biology* 14. 58-62.
7. Keller R. and Andrew, E.M. (1973) The site of action of the

- crustacean hyperglycemic hormone. *General and Comparative Endocrinology* 20:572-578.
8. Sedlmeier D. and Keller R. (1981) The mode of action of the crustacean neurosecretory hyperglycemic hormone. I. Involvement of cyclic nucleotides. *General and Comparative Endocrinology* 45: 82-90.
 9. Sedlmeier, D. (1987) The role of hepatopancreatic glycogen in the action of the crustacean hyperglycemic hormone (CHH). *Comparative Biochemistry and Physiology* 87A: 423-425.
 10. Fingerman, M., Nagabhusanam, R. (1992) Control of the release of crustacean hormones by neuroregulators. *Comparative Biochemistry and Physiology* 102C:343-352.
 11. Elofsson, R. (1983) 5-HT-like immunoreactivity in the central nervous system of the crayfish, *Pacifastacus leniusculus*. *Cell and Tissue Research* 232: 221-236.
 12. Atlas of serotonin-containing neurons in the optic lobes and brain of the crayfish, *Cherax destructor*. *Journal of Comparative Neurology* 269:465-478.
 13. 林仲彥 (1993) 草蝦高血糖激素之純化與特性研究，國立台灣大學漁業科學研究所碩士論文。
 14. Keller, R., and Beyer, J., (1968) Zur hyperglykämischen Wirkung von Serotonin und Augensteinextrakt beim Flusskrebs *Orconectes limosus*. *Z. Vergl. Physiol.* 59:78-85.
 15. Sarojini, R., Nagabhushanam, R., and Fingerman, M. (1995) Dopaminergic and enkephalinergic involvement in the regulation of blood glucose in the red swamp, crayfish, *Procambarus clarkii*. *General and Comparative Endocrinology* 97:160-170.
 16. Luschen, W., Willig, A., and Jaros, P.P. (1993) The role of biogenic amines in the control of blood glucose level in the decapod crustacean, *Carcinus maenas* L. *Comparative Biochemistry and Physiology* 105C:291-296.
 17. Rothe, H., Luschen, W., Asken, A., Willig, A., and Jaros, P.P. (1991) Purified crustacean enkaphalin inhibits release of hyperglycemic hormone in the crab, *Carcinus maenas* L. *Comparative Biochemistry and Physiology* 99C:57 - 62.
 18. Kuo, C.M. Hsu, C.J. and Lin, C.Y. (1995) Hyperglycemic effects of dopamine in tiger shrimp, *Penaeus monodon*. *Aquaculture* 135:161-172.
 19. Chang E.S. Prestwich, G.D., and Bruce, M.J. (1990) Amino acid sequence of a

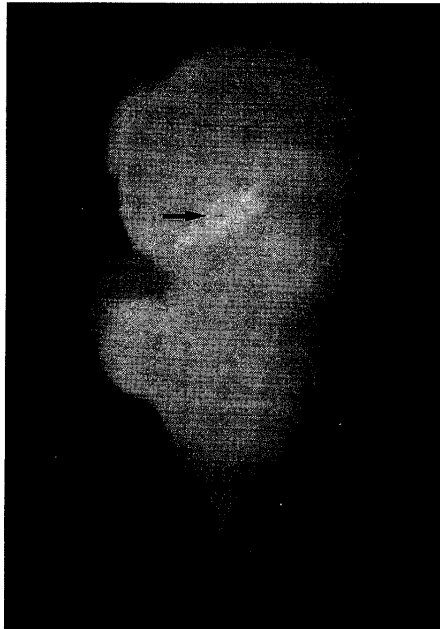
peptide with both molt-inhibiting and hyperglycemic activities in the lobster, *Homarus americanus*. *Biochemical and Biophysical Research Communication* 171:816-826.

20. Tensen, C.P., Janssen, K.P.C., van Herp, F. (1989) Isolation, characterization and hyperglycemic factors from the sinus gland of the lobster, *Homarus americanus* (Milne-Edwards). *Invertebrate Reproduction and Development* 16:155-164.



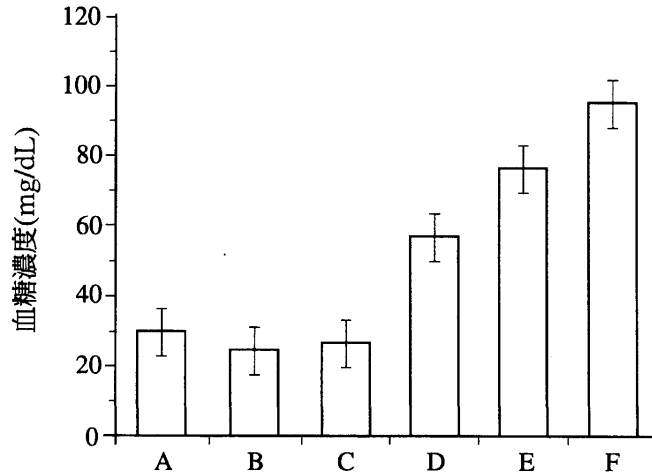
圖一·螯蝦 (*P. clarkii*) 眼柄的神經組織。

LG：層狀神經節，ME：外髓，MI：內髓，MT：終髓，SG：血竇腺，MTGXO (medulla terminalis ganglionaric X-organ)：X-器官。



圖二·螯蝦未染色的眼柄神經節，血竇腺（箭頭）位於外髓與內髓之間。

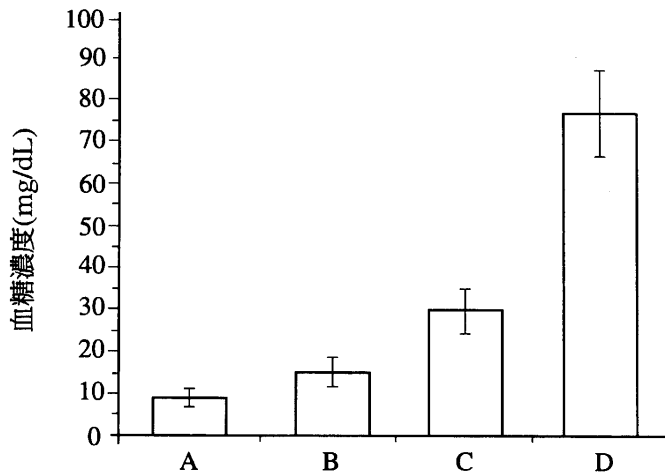
血清素有升血糖的效應



圖三·血清素對螯蝦血糖含量的依特劑量(dose-dependent)效應。

具有眼柄的螯蝦接受 $10 \mu\text{l}$ 的生理食鹽水 (A) 或含血清素 (B-F) 的生理食鹽水活體注射。注射1小時後抽取血淋巴液供血糖分析。血清素濃度：B, 10^{-13} ；C, 10^{-11} ；D, 10^{-9} ；E, 10^{-7} ；F, 10^{-5} moles/隻動物。每一組有8隻螯蝦。

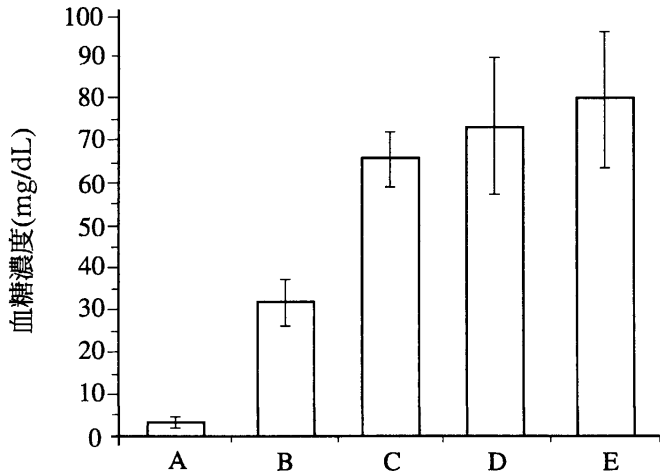
具有眼柄的動物對血清素才有升血糖效應



圖四·血清素對螯蝦升血糖效應與眼柄之關係。

在四組螯蝦 (每組8隻) 中兩組在實驗48小時前接受去除眼柄的處理 (A-B)，另兩組則為具眼柄完整的動物 (C-D)。其中兩組 (A, C) 接受 $10 \mu\text{l}$ 的生理食鹽水，另兩組 (B, D) 接受含血清素 (10^{-7} moles/隻動物) 生理食鹽水活體注射。注射1小時後抽取血淋巴液供血糖分析。

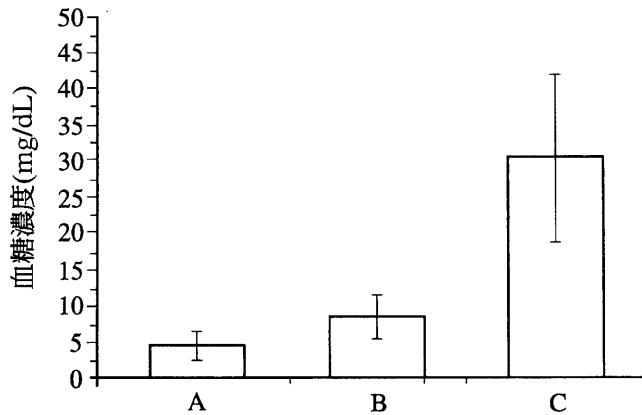
血竇腺含有升血糖因子



圖五·血竇腺研磨液對螯蝦升血糖效應的時程反應。

五組（每組8隻）去除眼柄（實驗48小時前接受處理）螯蝦分別接受 $10\ \mu\text{l}$ 的生理食鹽水（A），或血竇腺研磨液（1血竇腺/隻動物）（B-E）的活動注射。注射後立即（A），或注射0.5(B)，1(C)，1.5(D)，2(E)小時後抽取血淋巴液供血糖分析。

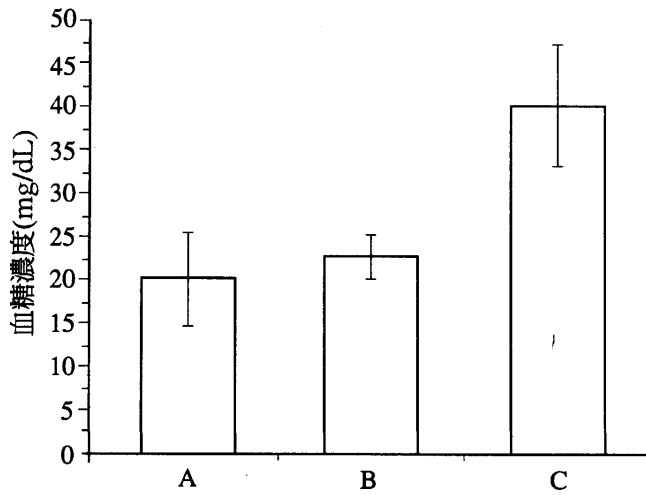
血清素促使血竇腺分泌升血糖因子



圖六·血清素對螯蝦X—器官/血竇腺分泌升血糖因子的效應。

X—器官/血竇腺在離體下分別於無血清素，或含血清素（ 10^{-5}M ）的生理食鹽水保溫培養（5% CO_2 ， 26°C ）4小時。三組（每組8隻）去除眼柄（實驗48小時前接受處理）的螯蝦分別接受 $10\ \mu\text{l}$ 的生理食鹽水注射（A），或X—器官/血竇腺保溫培養的培養液（無血清素，B；含血清素，C）的活體注射。注射1小時後抽取血淋巴液供血糖分析。

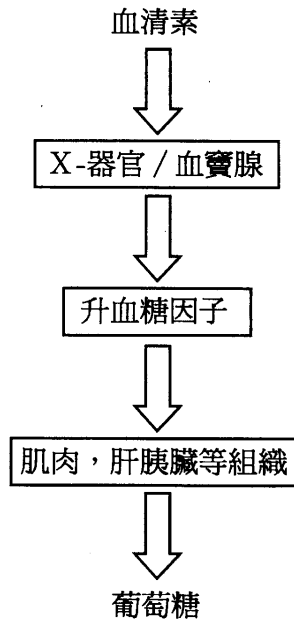
5-HT₃ 接受體活化劑有升血糖的效應



圖七·血清素接受體的探討。

三組螯蝦（每組8隻）接受10 μ l的生理食鹽水(A)或1-(3-chlorophenyl) biguanide (10^{-7} moles, B ; 10^{-6} moles, C)之注射。注射後一小時抽取血淋巴液以供血糖分析。

血清素之作用途徑



圖八·血清素作用途徑之模式圖

評語

甲殼類的 X 一器官在過去的研究結果顯示它是一個重要的神經內分泌有關之器官，它可能主導許多甲殼動物的生理現象。

本研究經由簡易的分析方法，了解 X 一器官之內含物對蝦體血醣變化之影響，而明顯的表現出其正面的影響，相對的亦說明 X 一器官在甲殼類之代謝所扮演的角色。本報告化繁為簡，對未來甲殼類的研究提供了一項良好的方向，為一項優秀的作品。