

光对红剑鱼红色素细胞色素颗粒运动的影响及其机制

刘丽, 梁兰清, 赵会宏, 孙际佳, 王海芳, 赵典惠, 李桂峰

(华南农业大学 动物科学学院, 广东 广州 510642)

摘要: 为了研究光对色素细胞色素颗粒运动的影响机制, 以红剑鱼 (*Xiphophorus helleri*) 鳞片上红色素细胞为材料, 体外培养后在显微镜下观察色素颗粒对不同波长光刺激的应答, 并利用药理学手段研究色素颗粒对光应答的信号通路。结果表明: 1) 紫外光 (350 nm, WU)、蓝光 (450 nm, WB)、绿光 (550 nm, WG) 对红色素细胞色素颗粒的运动有不同影响; WB 使色素颗粒聚集, WG 使色素颗粒分散, 而 WU 使红色素细胞剧烈收缩, 色素颗粒聚集于细胞中心。2) 双信使通路中的 IP_3 通路可抑制色素颗粒的聚集反应; 蛋白激酶 C (PKC) 的抑制子星孢素 (ST) 和 H-7 不影响 WU 引起的色素颗粒聚集反应, 而 IP_3 的抑制剂 W-7 可使色素颗粒聚集反应加快。3) 色素颗粒运动反应与细胞内环腺苷酸 (cAMP) 水平有关; 腺苷酸环化酶激活剂佛司可林 (FSK) 和 cAMP-PDE 阻断剂茶碱可抑制色素颗粒聚集反应, 而蛋白激酶 A (PKA) 特异抑制子 H-89 可抑制色素颗粒的分散反应。以上结果提示, 光对红色素细胞色素颗粒运动的影响可能是通过信号通道 cAMP 路径和 IP_3 路径的共同作用。[中国水产科学, 2007, 14 (4): 523-531]

关键词: 红剑鱼; 红色素细胞; 色素颗粒; 光应答; 信号通道

中图分类号: Q959

文献标识码: A

文章编号: 1005-8737-(2007)04-0523-09

对于动物来说, 体色、着色模式以及体色的改变对于它们自我保护和物种存亡有着重要作用。冷血脊椎动物无论是色调还是着色模式的改变, 或导致特定皮肤的色素细胞运动性的改变——生理学颜色改变, 或导致这些细胞数量的增加或减少——形态学颜色改变。总的来说, 生理学颜色改变意味皮肤颜色或色斑形状的快速改变, 就是星形的色素细胞内色素颗粒的聚集或分散^[1]。低等脊椎动物, 特别是鱼类, 它们体表的色素细胞—黑色素细胞、黄色素细胞和红色素细胞, 以及白色素细胞和虹彩细胞多分布于真皮层。低等动物对光线的直接反应分别表现为色素颗粒聚集、色素颗粒分散或反光板内嘌呤晶体距离间的变化^[2-4]。

光是水产养殖中必不可少的要素, 在生产实践中, 控制鱼的体色和/或使鱼的体色按照人们需要的方向发展是非常重要和有意义的。本研究以红剑鱼 (*Xiphophorus helleri*) 鳞片上红色素细胞为材料, 通过体外培养和显微镜下观察其色素颗粒对不同波长光刺激的应答, 并利用药理学手段研究色素颗粒对

光应答的信号通路, 旨在深入了解光对色素细胞色素颗粒运动的影响机制。

1 材料与方法

1.1 材料

红剑鱼购自广州市花地湾花鸟鱼市场。参照 Ozato 的方法^[5]制作鳞片, 然后采用含 0.25% 胰蛋白酶、0.06% 胶原酶 II、0.05% 透明质酸酶和 2% 的牛血清白蛋白的 CMF-PBS 联合消化鳞片 30 min, 获得高活力和较高纯度的红色素细胞。

1.2 光对红色素细胞色素颗粒运动的影响

对培养第 2 天、3 天、4 天、5 天、6 天的红剑鱼红色素细胞, 用倒置荧光显微镜的紫外光 (350 nm, WU)、蓝光 (450 nm, WB)、绿光 (550 nm, WG) 分别作用, 最长达 50 min, 间断拍照。色素散布程度采用杨秀平^[6]的 5 级色素细胞指数表示。

1.3 光对红色素细胞色素颗粒运动的影响的信号通道

1.3.1 蛋白激酶 C (PKC) 抑制剂和钙调蛋白抑制

收稿日期: 2006-11-20; 修订日期: 2007-01-11.

基金项目: 广东省科技计划项目资助 (2004B20301007); (2005A20105001).

作者简介: 刘丽 (1964-), 女, 博士, 副教授, 研究方向为生物技术和鱼类资源开发与利用. E-mail: liuli@scau.edu.cn

剂对光诱导的色素聚集反应的影响 用生理盐水分别配制 1 nmol/L、10 nmol/L、100 nmol/L 浓度梯度的 PKC 抑制剂星孢素 (ST)、H-7 [(±)-1-(5-isoquinolinesulfonyl)-2-methylpiperazine·2HCl]、钙调蛋白抑制剂 W-7 [N-(6-aminoethyl)-5-chloro-1-naphthalenesulfonamide·HCl] 溶液。红色素细胞按 $2 \times 10^4 \sim 5 \times 10^4$ 个/mL 的密度接种于 96 孔培养板, 设定 3 个平行。待红色素细胞培养到第 4 天, 去除培养孔中的完全培养液, 分别加入 100 μ L 不同浓度的 ST、H-7 和 W-7 溶液洗涤 1 次培养孔, 再分别加入 200 μ L 上述溶液。ST 和 H-7 的处理时间为黑暗 3 min、WB 20 min、WU 10 min。W-7 的处理时间为黑暗 5 min、WB 20 min、WU 5 min。

1.3.2 腺苷酸环化酶 (AC) 激活剂和磷酸二酯酶 (PDE) 阻断剂在色素聚集反应中的作用 AC 激活剂佛司可林 (FSK) 用生理盐水配制成 1 nmol/L、10 nmol/L、100 nmol/L 的浓度梯度, PDE 阻断剂茶碱用生理盐水配制成 0.1 mmol/L、1 mmol/L、10 mmol/L 的浓度梯度。红色素细胞的培养和处理方法同上。FSK 和茶碱的处理时间均为黑暗 5 min、WB 20 min、WU 5 min。

1.3.3 蛋白激酶 A (PKA) 抑制子在光诱导的色素分散反应中的作用 PKA 抑制子 H-89 [N-[2-(p-bromocinnamylamino) ethyl]-5-isoquinoline-sulfonamide·2HCl] 用生理盐水配制成 1 μ mol/L、10 μ mol/L、100 μ mol/L 的浓度梯度。红色素细胞的培养和

处理方法同上。H-89 的处理时间为黑暗 20 min、WB 20 min。

2 结果与分析

2.1 不同波长光对红剑鱼红色素细胞色素颗粒运动的影响

WB 作用 0~10 min 时, 导致红色素细胞收缩, 色素颗粒向细胞中央移动。色素颗粒分散级别可定为 1 级。将作用的时间延长至 20 min 时, 细胞继续收缩, 但收缩程度不大。且 WB 对细胞色素颗粒的移动影响不是很大, 只能导致色素分散指数变化 1 至 2 个级别 (图 1)。

与 WB 的影响不同, 经 WG 处理, 使得较分散状态的色素细胞的色素颗粒进一步分散, 但是变化比较轻微, 即使将 WG 的作用时间增加至 70 min, 色素颗粒分散程度也不会达到级别差。

WU 对红剑鱼红色素细胞色素颗粒运动的影响非常明显。作用 10 min 内就可以看见色素颗粒向细胞中央聚集, 细胞中央颜色加深, 细胞收缩。而长时间的 WU 作用则会令色素细胞整体颜色变浅, 逐渐无法区分细胞外周, 本来颜色较浅的细胞甚至会在视野中消失。WU 作用 20 min, 所有细胞都有明显的向心收缩, 此时若转为 WB 作用, 色素细胞仍会继续收缩, 某些色素细胞伸出的伪足甚至会断裂 (图 2)。

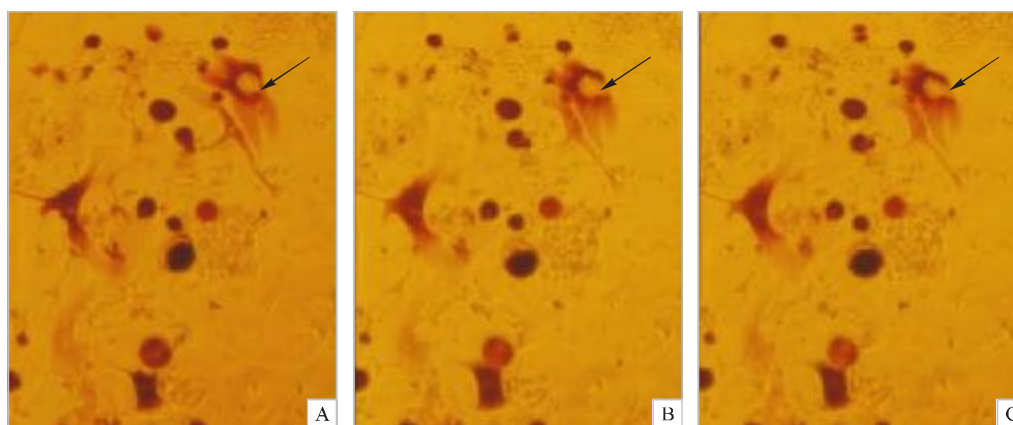


图 1 WB 对色素细胞色素颗粒运动的影响 ($\times 10$)

A: WB 0 min; B: WB 10 min, 色素颗粒聚集; C: WB 20 min, 色素颗粒进一步聚集; 箭头示色素颗粒。

Fig.1 Effect of WB on the movement of pigment granule in erythrophores ($\times 10$)

A: Under WB 0 min; B: Under WB 10 min, pigment granule aggregated; C: Under WB 20 min, pigment granules aggregated constantly; arrows show pigment granules.

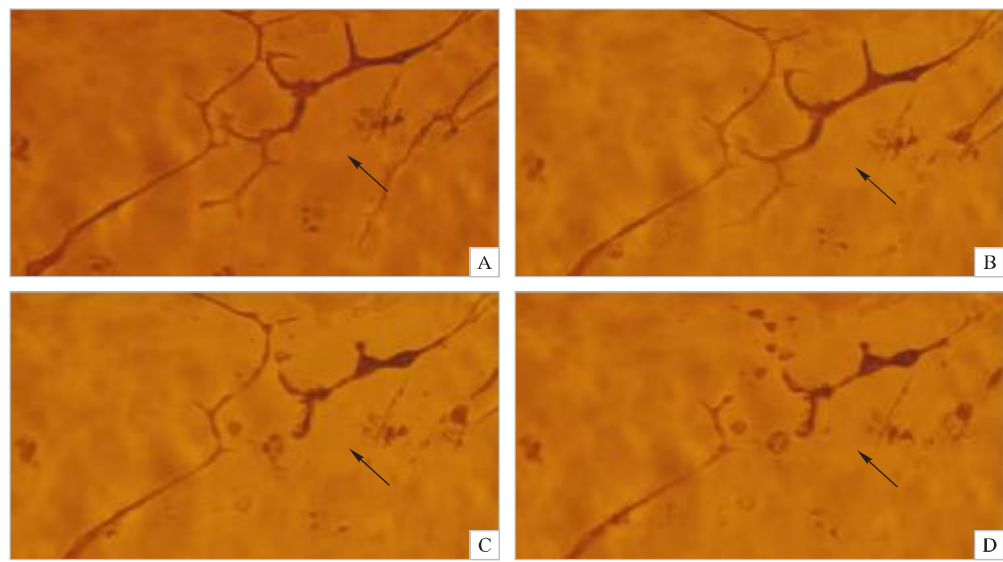


图 2 WU 对色素细胞色素颗粒运动的影响(×20)
A: WU 0 min; B: WU 10 min, 色素细胞收缩; C: WU 20 min, 色素细胞伪足收缩并断裂; D: WB 10 min, 色素细胞伪足进一步断裂; 箭头示色素颗粒.

Fig.2 Effect of WU on the movement of pigment granule in erythrophores(×20)
A: Under WU 0 min; B: Under WU 10 min erythrophores constricted; C: Under WU 20 min, pseudopod of erythrophores constricted and ruptured; D: Under WB 10 min, erythrophores pseudopod ruptured constantly; arrows show pigment granules.

2.2 光影响红剑鱼红色素细胞色素颗粒运动的信号通道

2.2.1 在光诱导色素颗粒聚集反应中化学物质对 DAG-IP₃路径的影响 ST 和 H-7 是 PKC 的抑制子,被用于研究二酰基甘油(DAG)是否参与色素聚集反应。结果显示,ST 和 H-7 都不影响 WU 引起的色素颗粒聚集反应(图 3)。推测 DAG 可能不参

与色素聚集反应。
W-7 是一种钙离子/钙调蛋白抑制子,被用于检测 IP₃ 是否参与光诱导的色素聚集反应。结果显示,添加了 W-7 的细胞色素颗粒聚集明显,细胞收缩;而且细胞收缩的速度与 W-7 的浓度有关,浓度越高,细胞收缩越快(图 4、图 5)。

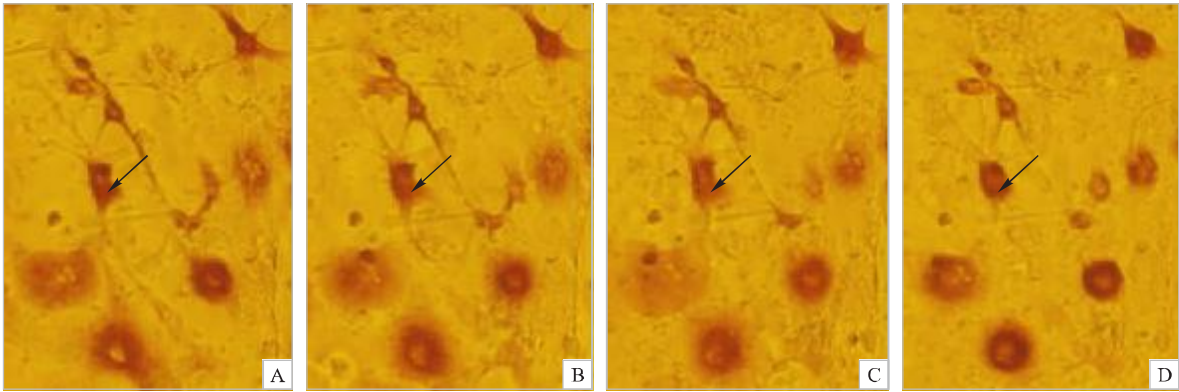


图 3 10 nmol/L ST 对色素细胞色素颗粒运动的影响(×15)
A: 黑暗预处理 3 min; B: WB 5 min, 色素颗粒聚集; C: WB 20 min, 色素颗粒进一步聚集; D: WU 5 min, 色素颗粒聚集, 细胞收缩; 箭头示色素颗粒.

Fig.3 Effect of 10 nmol/L ST on the movement of pigment granule in erythrophores(×15)
A: In dark 3 min; B: Under WB 5 min, pigment granule aggregated; C: Under WB 20 min, pigment granules aggregated constantly; D: Under WU 5 min, pigment granule aggregated constantly and erythrophores constricted; arrows show pigment granules.

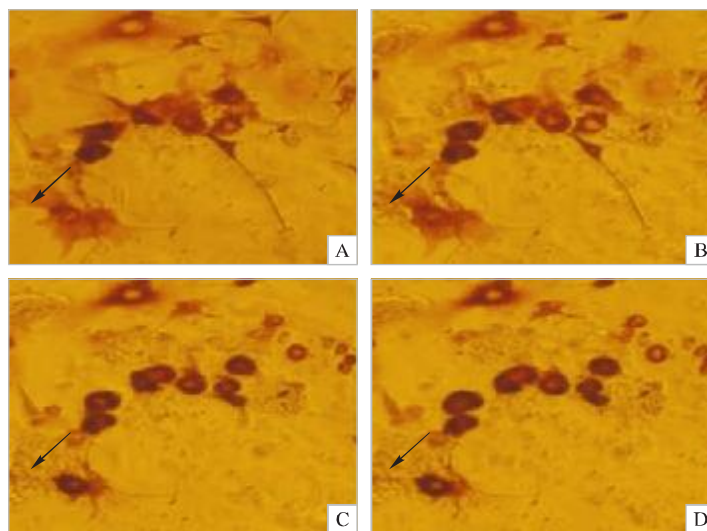


图4 10 nmol/L W-7 对色素细胞色素颗粒运动的影响($\times 15$)

A: 添加 10 nmol/L W-7; B: 黑暗 5 min, 色素颗粒聚集, 细胞收缩; C: WB 5 min, 大部分细胞完全收缩; D: WB 10 min, 细胞形态与 WB 5 min 无差别; 箭头示色素颗粒。

Fig.4 Effect of 10 nmol/L W-7 on the movement of pigment granule in erythrophores ($\times 15$)

A: 10 nmol/L W-7 was added; B: In dark, 5 min, pigment granule aggregated and erythrophores constricted; C: Under WB 5 min, most erythrophores constricted completely; D: Under WB 10 min, erythrophores didn't change; arrows show pigment granules.

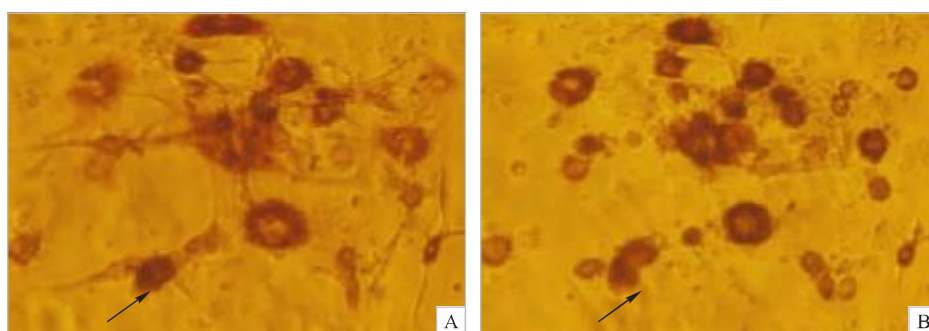


图5 100 nmol/L W-7 对色素细胞色素颗粒运动的影响($\times 15$)

A: 添加 100 nmol/L W-7; B: 黑暗 5 min, 色素颗粒聚集于细胞中央, 细胞完全收缩; 箭头示色素颗粒。

Fig.5 Effect of 100 nmol/L W-7 on the movement of pigment granule in erythrophores ($\times 15$)

A: 100 nmol/L W-7 was added; B: In dark, 5 min, pigment granule aggregated and erythrophores constricted completely; arrows show pigment granules.

2.2.2 FSK 和茶碱在色素颗粒聚集反应中的作用

FSK 是一种腺苷酸环化酶激活剂, 可提高细胞内的 cAMP 水平。添加 1 nmol/L FSK 黑暗预处理红色素细胞 5 min, 用 WB 处理 5 min 后色素颗粒分散, 分散程度很小; WB 处理 10 min 和 20 min 后分散程度不变。添加 10 nmol/L 的 FSK 处理红色素细胞, 黑暗作用 5 min 时个别细胞有一定程度收缩, WB 作用 5 min 后色素颗粒分散, 继续作用至 15 min 时色素颗粒分散程度增加, 而在 20 min 时细胞发生收缩,

色素聚集, 改用 WU 作用 2 min, 细胞再度剧烈收缩, 绝大多数细胞变成圆形(图 6)。添加 100 nmol/L FSK 黑暗预处理 5 min, 在 WB 作用 5 min 后色素颗粒分散, 分散程度比低剂量组大, WB 作用 10 min 色素颗粒继续分散, WB 作用 20 min 体积小的细胞收缩聚集而体积较大的细胞则依然分散。WU 处理 1 min 可使细胞大大收缩变圆, WU 处理 2 min 细胞完全收缩, WU 3 min 跟 WU 2 min 时候细胞状态一致。这表明 FSK 可以抑制 WB 引起的色素颗粒聚

集反应,而且抑制作用有剂量依赖性,提示 WB 引起的色素颗粒聚集可能与 cAMP 水平的下降有关,而 cAMP 水平的下降则有可能是由于 Gi 蛋白的作用抑制了 AC 的活性而引起的。

茶碱是一种 cAMP-PDE 阻断剂,能抑制 PDE 降解 cAMP。添加 0.1 mmol/L 的茶碱黑暗处理 5 min,然后 WB 处理 5 min、10 min 色素颗粒出现分散,但不明显,WB 处理 20 min 后细胞开始收缩。WU 处理 2 min 可有效引起细胞收缩。添加 1 mmol/L 的茶碱黑暗处理 5 min 后 WB 处理 5 min

色素颗粒分散,WB 10 min 进一步分散,WB 20 min 细胞收缩。转用 WU 处理 2 min 可有效引起细胞收缩(图 7)。添加 10 mmol/L 的茶碱黑暗处理 5 min,再用 WB 处理 5 min 后色素颗粒分散,WB 处理 10 min、20 min 色素颗粒继续分散,转用 WU 2 min 几乎不引起色素颗粒聚集。这表明茶碱可抑制 WB 引发的色素颗粒聚集反应,对于 WU 诱发的色素颗粒聚集反应的抑制也有剂量依赖性,高水平的 cAMP 有利于色素颗粒的分散作用。

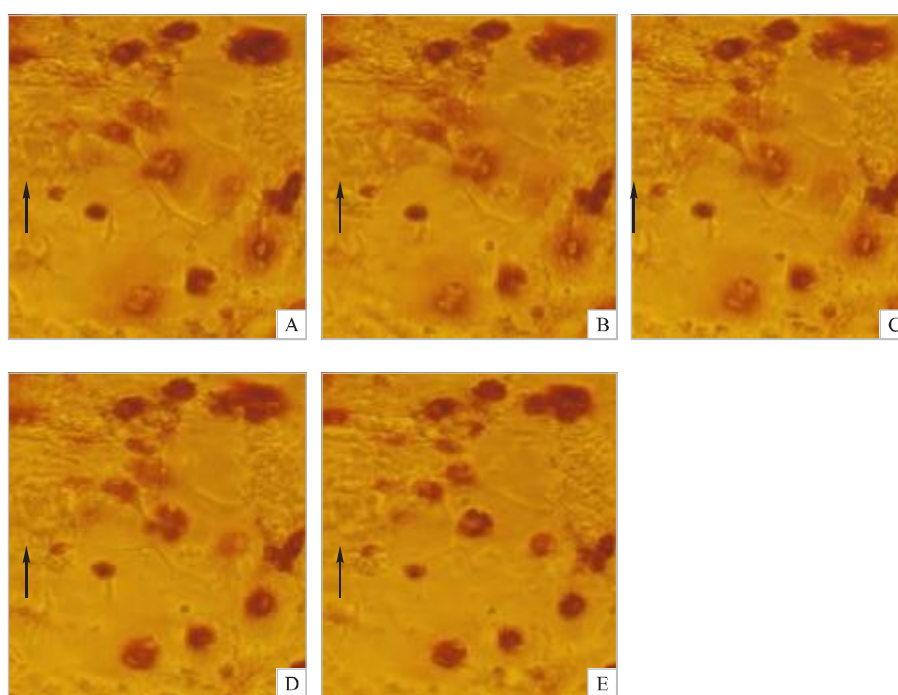


图 6 10 nmol/L FSK 对色素细胞色素颗粒运动的影响($\times 15$)

A: 黑暗 5 min; B: WB 5 min, 色素颗粒分散; C: WB 10 min, 色素颗粒发生聚集; D: WB 20 min, 色素颗粒进一步聚集; E: WU 2 min, 色素颗粒聚集, 细胞收缩; 箭头示色素颗粒。

Fig.6 Effect of 10 nmol/L FSK on the movement of pigment granule in erythrophores($\times 15$)

A: In dark, 5 min; B: Under WB 5 min, pigment granule dispersed; C: Under WB 10 min, pigment granule aggregated; D: Under WB 20 min, pigment granule aggregated constantly; E: Under WU 2 min, pigment granule aggregated and erythrophores constricted; arrows show pigment granules.

2.2.3 H-89 在色素颗粒分散反应中的作用 H-89 是一种 PKA 特异抑制子,而 PKA 由 cAMP 激活。培养 4 d 的色素细胞,在未加入 H-89 时,黑暗处理 10 min 只有个别细胞聚集,大部分细胞形态不变,WG 处理 10 min 色素分散,WG 处理 20 min 细胞颜色变浅。在加入 1 μ mol/L H-89 后,黑暗处理 10 min,色素颗粒聚集,细胞收缩,黑暗处理 20 min 无明显变化,

改用 WG 处理 10 min 色素颗粒呈现轻微分散,细胞颜色略为变淡(图 8)。而添加 100 μ mol/L H-89 的色素细胞,在黑暗处理 5 min 时就出现色素细胞收缩,色素颗粒聚集,细胞全部变圆(图 9)。黑暗处理 10 min、20 min,细胞出现分散,但仍是圆形。WG 处理 5 min、10 min 细胞大小不变,20 min 后细胞颜色变浅。这表明在黑暗中,H-89 可以正常诱导色素颗

粒聚集,而且诱导聚集的速度与其浓度成正比;而对于WG导致的色素颗粒分散反应,H-89则可以产生

抑制,而且其反应有剂量依赖性,高浓度的H-89在WG作用相同时间下,色素颗粒分散的程度减少。

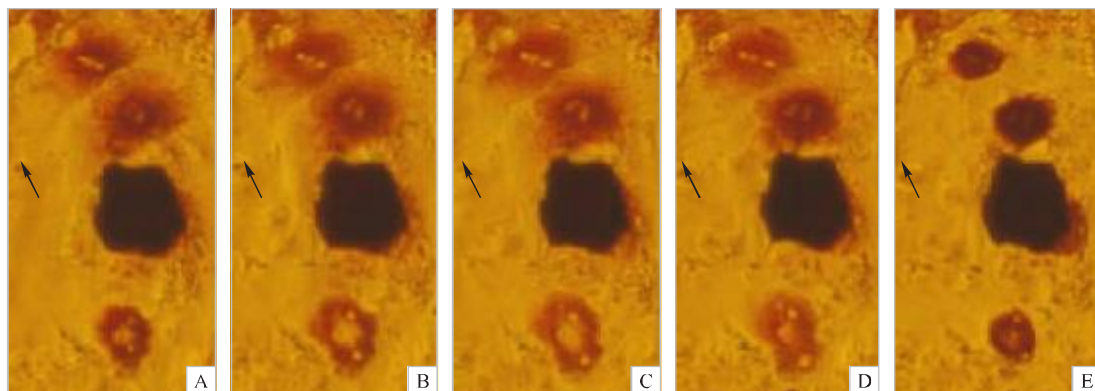


图7 1 mmol/L 茶碱对色素细胞色素颗粒运动的影响($\times 15$)

A: 黑暗预5 min; B: WB 5 min, 色素颗粒分散; C: WB 15 min, 色素颗粒进一步分散; D: WB 20 min, 色素颗粒轻度聚集; E: WU 2 min, 色素完全聚集, 细胞收缩; 箭头示色素颗粒。

Fig.7 Effect of 1 mmol/L theophylline on the movement of pigment granule in erythrophores ($\times 15$)

A: In dark, 5 min; B: Under WB 5 min, pigment granule dispersed; C: Under WB 15 min, pigment granule dispersed constantly; D: Under WB 20 min, pigment granules aggregated lightly; E: Under WU 2 min, pigment granule aggregated completely and erythrophores constricted; arrows show pigment granules.

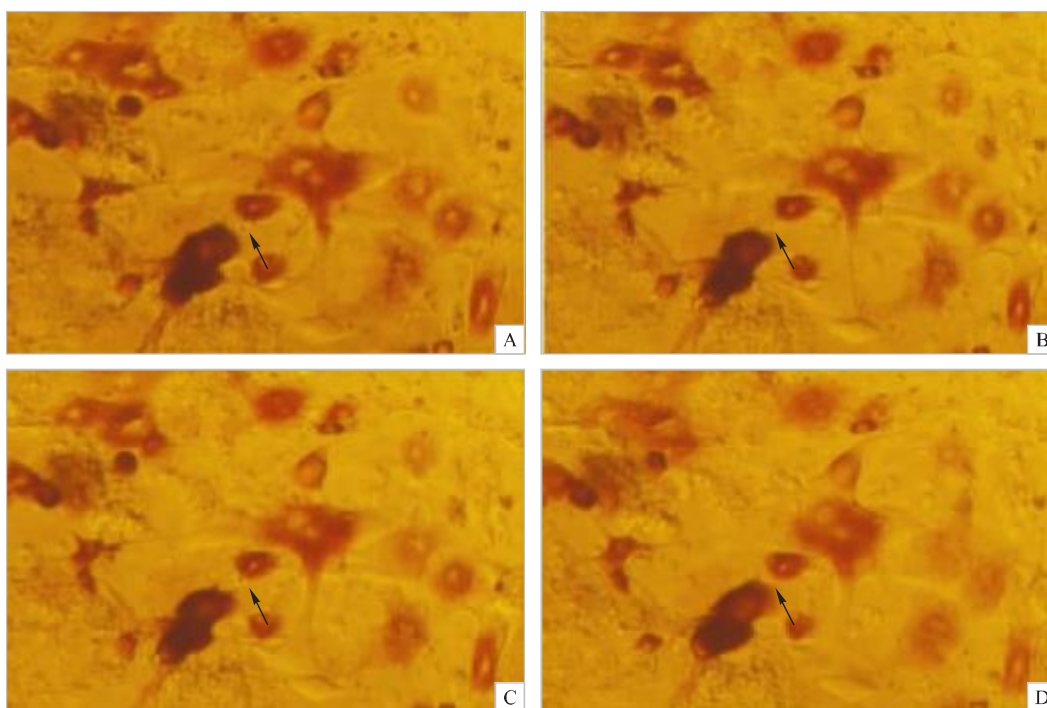


图8 1 $\mu\text{mol/L}$ H-89 对色素颗粒运动的影响($\times 15$)

A: 添加 H-89 1 $\mu\text{mol/L}$, 色素颗粒分散; B: 黑暗 10 min, 色素颗粒聚集, 细胞收缩; C: 黑暗 20 min, 细胞形态与 10 min 无差别; D: WG 10 min, 色素颗粒轻度分散; 箭头示色素颗粒。

Fig.8 Effect of 1 $\mu\text{mol/L}$ H-89 on the movement of pigment granule in erythrophores ($\times 15$)

A: 1 $\mu\text{mol/L}$ H-89 was added, pigment granule dispersed; B: In dark 10 min, pigment granule aggregated and erythrophores constricted; C: In dark 20 min, erythrophores didn't change. ; D: Under WG 10 min, pigment granule dispersed lightly; arrows show pigment granules.

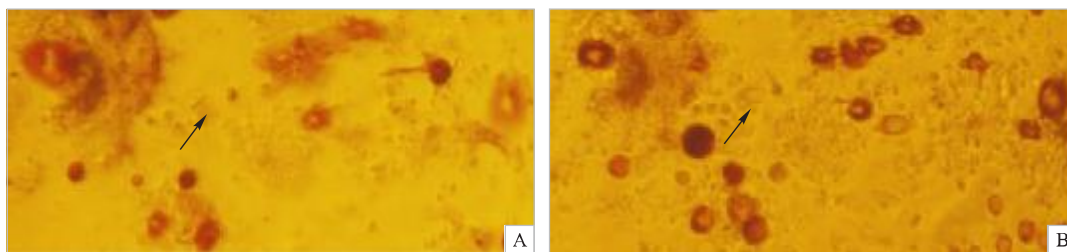


图9 100 $\mu\text{mol/L}$ H-89 对色素颗粒运动的影响($\times 15$)

A: 添加 H-89 100 $\mu\text{mol/L}$, 色素颗粒分散; B: 黑暗 5 min 色素颗粒聚集, 色素细胞完全收缩; 箭头示色素颗粒.

Fig.8 Effect of 100 $\mu\text{mol/L}$ H-89 on the movement of pigment granule in erythrophores($\times 15$)

A: 100 $\mu\text{mol/L}$ H-89 was added, pigment granule dispersed; B: In dark 5 min, pigment granule aggregated and erythrophores constricted completely; arrows show pigment granules.

3 讨论

3.1 光对红剑鱼色素细胞的影响

在 1948 年就已发现光线对低等脊椎动物的体色产生直接影响^[1]。从胚胎或 2 月龄的新月鱼 (*Platyocilus maculatus* Günther) 分离的黑色素细胞培养 5 d 有 20% 色素细胞由光引起色素聚集, 在光波长为 400 nm、420 nm 出现高度反应, 在光波长 410 nm 左右出现峰值, 而对波长大于 500 nm 的光敏感性很低^[7]。高体鰮 (Rhodeus ocellatus) 仔鱼鳞片的皮肤上黑色素细胞在光照情况下出现色素颗粒分散, 有效波长大约为 420 nm^[8]。南极硬骨鱼伯氏豚虎鱼 (*Trematomus bernacchii*) 鳞片真皮黄色素细胞在光照下色素分散^[9]。除了在可见光下, 紫外线也可引起色素细胞的反应。光波长为 365 nm 的紫外线可使尼罗罗非鱼 (*Tilapia nilotica*) 红色素细胞发生色素聚集^[10]。

本实验观察了黑暗、多种波长的可见光、紫外线等不同条件对色素细胞的影响。结果表明, 在这些条件下, 红剑鱼红色素细胞都会产生运动, 色素颗粒也会产生收缩或聚集反应, 但是反应的程度会有差异。黑暗情况下, 大多色素细胞出现色素聚集, 而在低波长 (350 nm、450 nm) 光作用下, 色素细胞也会出现色素聚集, 特别是紫外线引起的聚集反应非常明显, 长时间的紫外线作用还可直接对色素细胞的伪足造成损害。而在普通光照和可见光的高波长作用下 (550 nm), 色素颗粒出现分散, 但是分散作用不是十分明显, 无法引起色素的完全分散。类似现象在其他鱼类的色素细胞对光的应答中也有发现, 如青 (Orizias latipes) 在 410~420 nm 下也会出现黄色

素细胞的色素聚集^[11], 组织培养的尼罗罗非鱼红色素细胞在光波长为 400~440 nm 和 550~600 nm 出现色素聚集, 当光波长在 470~530 nm 之间, 色素分散速度加快^[12]。已在罗非鱼鳍条的红色素细胞中发现有编码视锥内视色素的 mRNA 的表达^[12], 因此, 色素细胞对光的应答反应与色素细胞可能含有的视色素物质相关, 这些视色素物质在一定波长下有其特有的光吸收曲线^[13]。

3.2 光对红剑鱼色素细胞影响的信号转导路径研究

关于胞外信号对鱼类色素细胞色素颗粒运动的影响已有较多的报道。在激素对色素细胞颗粒运动的研究方面, 都表明色素颗粒的分散伴随着 cAMP 水平的上升^[14-16]。本实验观察到, AC 的激活剂 FSK 可以抑制 WB 引起的色素颗粒聚集反应, 使得色素颗粒分散, PDE 的抑制剂茶碱也有利于色素颗粒的分散。这提示 cAMP 水平的升高伴随着色素颗粒的分散, 与 Oshima^[17]报道的结果相似, 青的黄色素细胞对光引起的色素颗粒聚集反应可能是通过降低细胞的 cAMP 水平来实现的。同时, 本实验中 PKA 的抑制子 H-89 可抑制 WG 引起的色素颗粒分散, 而且抑制分散的强度与剂量成正比。这表明 PKA 参与色素颗粒的分散反应, 升高的 cAMP 水平激活 PKA, 从而引起色素颗粒的分散, 与 Ban^[12]在罗非鱼红色素细胞的试验结果是一致的。Ban 报道光诱导尼罗罗非鱼红色素细胞色素颗粒运动是通过 Gi 蛋白或 Gs 蛋白改变细胞内的 cAMP 水平来实现的。以上结果提示, 红剑鱼色素颗粒的分散作用应该是通过与细胞膜上的特定受体结合, 激活 AC 的活性, 导致 cAMP 水平升高, 激活 PKA, 从而引起色素的分散。

对于第二信使 cGMP、IP₃ 和 DAG 在光作用下的色素颗粒运动中的作用也已有研究。脊椎动物视细胞对光线的反应就是通过 Gt 蛋白激活 cGMP 特异的磷酸二酯酶。细胞内 cGMP 水平的下降关闭了细胞膜上 cGMP 依赖阳离子通道,从而导致细胞膜超极化^[18]。本实验中观察到,PKC 的抑制子 ST 和 H-7 都不抑制光引起的色素颗粒聚集反应。表明第二信使 DAG 在色素颗粒聚集反应中不发挥作用,与罗非鱼红色素细胞对光的应答反应结果相同^[12]。而钙调蛋白 W-7 可加快色素颗粒聚集的速度,而且色素颗粒聚集的速度与 W-7 的浓度有剂量依赖性。因而,IP₃ 应该参与抑制色素颗粒的聚集反应中,跟 Isoldi^[19]报道的光能激发磷酸肌醇信号路径是一致的。

综上所述作者认为,光对红色素细胞色素颗粒运动的影响可能是通过信号通道 cAMP 路径和 IP₃ 路径的共同作用,其具体机制还有待从分子水平上的深入研究。

参考文献:

- [1] Laurens H. The reactions of the melanophores of *Ambystoma larvae* [J]. J Exp Zool, 1915, 18: 577 – 638.
- [2] Parker G H. Animal color changes and their neuohumours [M]. Cambridge: Cambridge University Press, 1948: 1 – 377.
- [3] Fujii R, Oshima N. Control of chromatophore movements in teleost fishes [J]. Zool Sci, 1986, 3: 13 – 47.
- [4] Fujii R. The regulation of motile activity in fish chromatophores [J]. Pigment Cell Res, 2000, 13: 300 – 319.
- [5] Ozato K. Mitotic activity of differentiated goldfish erythrophores in culture [J]. J Cell Sci, 1977, 26: 93 – 99.
- [6] 杨秀平. 动物生理学实验 [M]. 北京: 高教出版社, 2004: 234.
- [7] Wakamatsu Y. Light sensitive fish melanophores in culture [J]. J Exp Zool, 1978, 204: 299 – 304.
- [8] Ohta T, Muramatsu K. Spectral sensitivity of melanophores in the primary color response of the rose bitterling *Rhodeus ocellatus* [J]. Jpn J Ichthyol, 1988, 34: 483 – 487.
- [9] Obika M, Meyer-Rochow V B. Dermal and epidermal chromatophores of the Antarctic teleost, *Trematomus bernacchii* [J]. Pigment Cell Res, 1990, 3: 33 – 37.
- [10] Sato M, Ishikura R, Oshima N. Direct effects of visible and UVA light on pigment migration in erythrophores of Nile Tilapia [J]. Pigment Cell Research, 2004, 17: 519 – 524.
- [11] Oshima N, Nakata E, Ohta M, et al. Light-induced pigment aggregation in xanthophores of the medaka *Oryzias latipes* [J]. Pigment Cell Res, 1998, 11: 362 – 367.
- [12] Ban E, Oshima N. Light-sensitive iridophores in tetrafish [J]. Zool Sci, 2000, 17 (suppl): 110.
- [13] Naora H, Takabatake I, Iga T. Spectral sensitivity of melanophores of a freshwater teleost, *Zacco temminckii* [J]. Comp Biochem Physiol, 1988, 90A: 147 – 149.
- [14] Chhajlani V, Wikberg J E. Molecular cloning and expression of the human melanocyte stimulating hormone receptor cDNA [J]. FEBS Lett, 1992, 309 (3): 417 – 20.
- [15] Oshima N. Chromatosome-dispersing action of melanin-concentrating hormone (MCH) [J]. Zool Sci, 1996, 13 (suppl): 117.
- [16] Oshima N, Goto M. Prolactin signaling in erythrophores and xanthophores of Teleost Fish [J]. Pigment Cell Res, 2000, 13 (suppl. 8): 35 – 40.
- [17] Oshima N. Direct Reception of Light by Chromatophores of Lower Vertebrates [J]. Pigment Cell Res, 2001, 14: 312 – 319.
- [18] Yarfitz S, Gurley JB. Transduction Mechanisms of Vertebrate and Invertebrate Photoreceptors [J]. J Bio Chem, 1994, 269 (20): 14 329 – 14 332.
- [19] Isoldi M C, Rollag M D, Castrucci A M, et al. Rhabdomeric photo-transduction initiated by the vertebrate photopigment melanopsin [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2005, 102, 1 217 – 1 221.

Effects of photoresponses on the movement of pigment granule in erythrophores of *Xiphophorus helleri* and the mechanism

LIU Li, LIANG Lan-qing, ZHAO Hui-hong, SUN Ji-jia, WANG Hai-fang, ZHAO Dian-hui, LI Gui-feng

(College of Animal Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract: It is well known that long-term adaptation to a background induces morphological color changes in fish skin, which result from changes in the density and morphology of pigment cells. The migration of pigment granules within chromatophores is under the control of both the nervous and the endocrine systems, although these cells often respond directly to light. To study the mechanism of erythrophores in photoreponse, the effect of photoresponses on the movement of pigment granule in erythrophores were determined by fluorescent microscope and pharmacological techniques were mainly adopted. Firstly, erythrophores in scales from *Xiphophorus helleri* were dissociated and cultured at 25 °C in a water-jacketed CO₂ incubator in medium Leibovitz L-15. The movement of pigment granule in erythrophores were observed under dark condition, wave length 350 nm (WU), 450 nm (WB) and 550 nm (WG). Then, staurosporine (ST), H-7, W-7, forskolin (FSK), theophylline and H-89 were applied respectively to exam the signaling pathway in photoreponses. The results indicated that the movement of pigment granule in erythrophores was influenced under wave length 350 nm, 450 nm and 550 nm. Light at 550 nm could induce pigment granule dispersion in most erythrophores, however, pigment granule aggregated at 350 nm and 450 nm. Neither ST nor H-7, inhibitors of protein kinase C, affected the pigment aggregation induced by light at 350 nm, it suggested that DAG didn't take part in the reaction of pigment granule aggregation. However, W-7, a calmodulin antagonist, increased pigment granule aggregation in a dose-dependent manner: pigment granule aggregated and erythrophores constricted completely at 100 nmol/L W-7 within 5 min in dark. The result that W-7 did not inhibit the response also lends support to the irrelevance of calcium in the light-induced aggregation of pigment granules within xanthophores, which suggested that IP₃ could inhibit pigment granule aggregation. Pigment aggregation caused by light at 450 nm was inhibited by forskolin, an activator of adenylate cyclase, in a time-dependent manner: in the case of 10 nmol/L forskolin, pigment granule dispersed at 450 nm within 5 min and then pigment granule aggregated. Theophylline blocked erythrophores response to light in a dose-dependent manner: 10 mmol/L theophylline abolished the response completely. It suggested that the level of intracellular cAMP was related to the movement of pigment granule, low level of cAMP induced pigment aggregation, *vice versa*. cAMP seems to function as a second messenger in the photoreponse. H-89, an inhibitor of protein kinase A, could block pigment dispersion induced by light at 550 nm. These results implied that stimulation of erythrophores by light at 350 nm and 450 nm is followed by a decrease in intracellular cAMP levels and inhibited AC, which in turn inactivate PKA, leading to the pigment granule aggregation. Moreover, an increase in intracellular IP₃ levels mediate by G and activate PKC, which in turn activate Ca²⁺/calmodulin, leading to pigment granule dispersion. [Journal of Fishery Sciences of China, 2007, 14 (4): 523 – 531]

Key words: *Xiphophorus helleri*; erythrophores; pigment granule; photoresponses; signaling pathway