

甲壳动物蜕皮抑制激素调控机制的研究进展

亓一舟 朱冬发* 杨济芬 苏青

(宁波大学应用海洋生物技术教育部重点实验室 宁波 315211)

摘要:甲壳动物的蜕皮过程主要是由 Y 器 (Y-organ) 分泌的蜕皮类固醇激素与 X 器-窦腺复合体 (X-organ-sinus gland, XO-SG) 分泌的蜕皮抑制激素 MIH 相互拮抗而进行调控的。而 MIH 调控机制较为复杂,且存在争议。本文就 MIH 调控机制的研究进展,包括研究方法,以及目前调控机制中争议最大的 3 个问题:MIH 受体、cAMP 与 cGMP 功能以及 Ca^{2+} 功能作一综述。

关键词:甲壳动物;蜕皮抑制激素;调控机制

中图分类号:Q955 文献标识码:A 文章编号:0250-3263(2010)02-165-06

Cellular Mechanism of Molt-Inhibiting Hormone Action in the Crustacean

QI Yi-Zhou ZHU Dong-Fa* YANG Ji-Fen SU Qing

(Key Laboratory of Applied Marine Biotechnology of Ministry of Education, Ningbo University, Ningbo 315211, China)

Abstract: Molting in decapod crustaceans is coordinated by endocrine cues, and the primary axis of endocrine regulation comprises a steroid-producing epithelioid gland termed the Y-organ (YO) and a neurosecretory center termed the X-organ/sinus gland complex (XO/SG). The signaling pathway activated by MIH, however, remains a controversy. This paper has summarized cellular mechanisms of the MIH regulation, including research methods and current three controversial issues: MIH receptors, functions of cAMP and cGMP, and functions of Ca^{2+} .

Key words: Crustacean; MIH; Regulation; Cellular mechanism

甲壳动物的生长伴随着周期性的蜕皮过程,而这一过程是由位于甲壳动物头胸部前端的 Y 器所分泌 C-27 类固醇的蜕皮激素所控制^[1]。而位于眼柄的 X 器窦腺复合体分泌的蜕皮抑制激素 (molt-inhibiting hormone, MIH) 对于蜕皮过程又有着明显的抑制作用^[2]。因此,蜕皮过程主要是由 Y 器分泌的蜕皮激素以及 X 器分泌的 MIH 相互拮抗而进行调控^[3]。

国内,王在照等^[4]和邱高峰等^[5]采用 RT-PCR 技术分别获得了中华绒螯蟹 (*Eriocheir sinensis*) MIH cDNA 特异性片段和锯缘青蟹 (*Scylla serrata*) MIH 成熟肽 cDNA 序列及部分信号肽序列;宋霞等^[6]运用 RT-PCR 和 3'-RACE 技

术克隆了中华绒螯蟹 MIH1 cDNA 片段,并运用 IPCR 技术获得其 MIH1 基因组 DNA 序列^[7]。朱冬发等^[8]应用 5'与 3'RACE 技术也克隆获得了三疣梭子蟹 (*Portunus trituberculatus*) MIH 基因的全长 cDNA 序列。另外,姚燕等^[9]和张继泉等^[10]利用大肠杆菌表达系统分别获得了中华绒螯蟹和中国明对虾 (*Fenneropenaeus chinensis*)

基金项目 国家自然科学基金项目 (No. 40976098),浙江省科技计划项目 (No. 2008C22048);

* 通讯作者, E-mail: zhudongfa@nbu.edu.cn;

第一作者介绍 亓一舟,男,硕士研究生;研究方向:甲壳动物内分泌学研究;E-mail: teqyz@163.com。

收稿日期:2009-08-20,修回日期:2009-12-29

MIH 重组蛋白,并成功对其进行了分离纯化。但国内尚未见关于 MIH 调控机制研究的文献。

MIH 调控机制相对较为复杂,至今仍无定论,且存在种间差异。然而 Covi 等人认为至少整个机制的核心内容是高度保守的^[11]。

本文将重点介绍探究 MIH 调控机制的研究方法,并对 MIH 调控机制的研究现状与存在问题作一概述。

1 研究方法

1.1 Y 器的组织培养与眼柄切除

MIH 作用的靶器官是 Y 器,因此 Y 器的组织培养对于探究 MIH 的调控机制显得尤为重要。为了尽量去除实验动物本身分泌的 MIH 对研究结果带来的影响,在组织培养前,通常将实验动物双侧眼柄去除。

Nakatsuji 等取蜕皮间期的克氏原螯虾 (*Procambarus clarkii*) 个体切除眼柄,两天后(进入蜕皮前期的早期)取其双侧 Y 器进行组织培养,在培养液中加入重组 MIH 蛋白至终浓度为 4 nmol/L 时,对 Y 器蜕皮激素的分泌的抑制相当明显;而后分阶段加入 IBXM(环化核苷酸磷酸二酯酶(PDE)抑制剂)至终浓度为 1 mmol/L,发现当组织培养的 Y 器进入蜕皮前期的中间阶段时,MIH 单独作用对于 Y 器蜕皮激素分泌的抑制作用已明显减弱,而添加 IBMX 后蜕皮激素的分泌又再次被明显抑制。这说明 PDE 与 MIH 可能存在拮抗作用^[12]。

1.2 活体注射法

活体注射法作为一种直接并且行之有效的办法,在甲壳动物 MIH 的调控机制研究中经常被应用。注射的物质可以是蜕皮类固醇激素、原核表达蛋白、抗体或是其他在调控过程中可能产生影响的化学物质。Lee 以切除眼柄的侧向地蟹 (*Gecarcinus lateralis*) 作为研究对象,从其游泳足注射 20-羟基蜕皮酮(溶于 10% 的酒精中),对照组注射 10% 酒精 4 h、8 h、12 h 后观察其蜕皮激素水平以及鸟苷酸环化酶(GL-GC)在肝胰腺、精巢、螯肌肉组织、胸肌肉组织的表达情况,发现 4 h 后蜕皮激素水平短暂上升,随后逐渐回落,相应的 GL-GC- β

(GL-GC 的一种构型)在各组织的表达被短暂且明显地抑制,而对照组无影响。这说明蜕皮类激素和 GC 的表达存在交互作用^[13]。

1.3 纯化方法和浓度测定

MIH、CHH 等物质的纯化可以通过高效液相色谱(HPLC)完成^[14],其定量分析则可利用氨基酸分析软件完成。蜕皮激素的测定可以通过放射免疫测定法,而其他物质浓度的测量还可以通过实时定量 PCR 来(Real Time-PCR)完成^[15]。

2 研究现状

2004 年 Kim 等提出一个较为完整的模型来解释 MIH 调控机制,认为 MIH 的受体是一个 G 蛋白偶联受体,MIH 与其受体的结合受到由 G 蛋白调控的腺苷酸环化酶活性的影响。而后使得细胞内 cAMP 增加,从而激活了细胞膜上的 Ca^{2+} 通道, Ca^{2+} 从胞外进入胞内,结合并激活了钙调蛋白(CaM),CaM 使一氧化氮合酶(NOS)去磷酸化,激活了 NOS,然后 NOS 以精氨酸为底物产生一氧化氮(NO),NO 激活了 NO 敏感的鸟苷酸环化酶 I 型(GC-I),GC-I 使三磷酸鸟苷(GTP)转化为 cGMP,cGMP 激活细胞内的 cGMP 依赖性蛋白激酶(cGPK),具有活性的 cGPK 进入细胞核抑制了蜕皮激素合成蛋白的表达,从而导致蜕皮激素水平的降低(图 1)。这个机制说明作为第二信使的 cAMP、cGMP 和 NO 都参与了调控,并且 GC-I 是位于细胞内的^[16]。而这一模型在很多物种中并不适用,尤其在 MIH 受体、cAMP 与 cGMP 的功能以及 Ca^{2+} 的功能上的争议较大,因此本文着重就这三点的研究进展作一概述。

2.1 MIH 受体

Webster 以普通滨蟹 (*Carcinus maenas*) 作为研究物种,用 [¹²⁵I]MIH 作为配体进行实验,发现 MIH 结合点位于 Y 器的质膜上^[17]。后来 Asazuma 等用 ¹²⁵I 标记的重组 MIH 加入日本囊对虾 (*Marsupenaeus japonicas*) 的 Y 器中,却并未发现 MIH 的蛋白活性^[18]。说明 MIH 受体可能具有物种特异性。关于 MIH 受体,目前主要的观点有两种:一种认为受体为鸟苷酸环化酶,而另一种认为

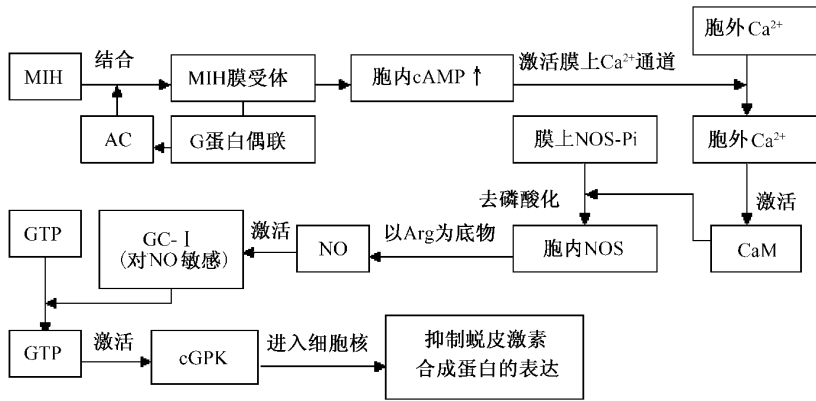


图1 假定的MIH调控机制模式图(参照Kim^[16]修改)

Fig.1 Hypothetical signaling pathway inhibiting ecdysteroidogenesis in the crustacean Y-organ

AC:腺苷酸环化酶;CaM:钙调蛋白;NOS:一氧化氮合酶;GC-I:鸟苷酸环化酶I型;

GTP:三磷酸鸟苷;cGPK:依赖性蛋白激酶。

AC: Adenylyl cyclase; CaM: Calmodulin; NOS: Nitric oxide synthase; GC-I: Guanylyl cyclase-I;

GTP: Guanosine triphosphate; cGPK: cGMP-dependent protein kinase.

受体为G偶联蛋白。

2.1.1 受体为鸟苷酸环化酶(receptor guanylyl cyclase, rGC) Zheng等从可口美青蟹(*Callinectes sapidus*)的Y器中克隆rGC(CsGC-YO1)的cDNA来编码假定的rGC,将得到的氨基酸序列与其他物种的rGC进行同源性比对,发现其与克氏原螯虾肌肉组织的rGC序列PcGC-M2有着58.4%的同源性,尤其在环化酶接触域的序列高度保守(61.4%~93.2%同源);组织表达研究表明,CsGCYO1在Y器以及其他组织中都有所表达,因此认为这种cDNA编码MIH受体^[19]。

在后续的实验中,Zheng利用Western blotting将抗CsGC-YO1的抗体结合到Y器的膜蛋白上,表明CsGC-YO1的免疫学活性严格位于细胞外围区域,而并没有出现在细胞质或是在核内,这就表明CsGC-YO1是一个膜关联蛋白。而受过抗体处理的Y器中,MIH对于蜕皮的抑制作用受到抑制;而且,利用实时定量PCR对CsGC-YO1的含量进行测定,发现其在蜕皮间期含量上升,而进入蜕皮前期含量下降^[15]。这些结果也表明CsGC-YO1即为MIH受体。

2.1.2 受体为G蛋白偶联受体且存在胞内GC-I参与调控 Han等通过对普通滨蟹的研究发现,Y器中蛋白质的分泌受G蛋白偶联受体的调控;用霍乱毒素活化G蛋白,可以通过抑制蛋氨酸与Y器的结合,从而显著减少Y器蛋白的分泌量^[20]。

Lee等在对于侧向地蟹的研究中发现了GC蛋白的3种构型,分别是对于NO敏感的含有β亚基的GC蛋白(GI-GC-Iβ),膜受体GC蛋白(GI-GC-II),以及对于NO不敏感的可溶性GC蛋白(GI-GC-III)。他们对切除眼柄后Y器中3种GC蛋白mRNA水平进行观测,发现GI-GC-Iβ和GI-GC-III表达水平上升,而GI-GC-II水平不变。他们认为这是由于动物血淋巴组织对于眼柄神经肽含量过低的一种补偿^[13]。

MIH能够促使Y器中cGMP含量的大量增加,而NO合酶在Y器中的磷酸化表明,由MIH引起的cGMP的大量增加是由NO敏感的GC调控。这也证明了细胞内GC-I参与了MIH的细胞调控^[16,21]。

2.2 cAMP与cGMP在调控中的功能 现有资料表明细胞内的信号传导可能涉及了cAMP

或是 cGMP 或是两者都参与了由 MIH 调控的蜕皮抑制作用。

2.2.1 cAMP 在调控中起主导作用 Mattson 等在早期的研究中以太平洋石蟹 (*Cancer antennarius*) 作为研究对象,通过眼柄切除-Y 器的组织培养实验发现 cAMP 在 MIH 的调控机制中起主导作用^[22]。

cAMP 对于蜕皮激素的合成和分泌的抑制可能通过两个方面:一方面对于 Y 器蛋白合成的抑制。Toullec 和 Dauphin 对普通滨蟹的研究表明,从蜕皮间期进入蜕皮前期,Y 器的细胞并没有显著的变化,但其 Y 器中蛋白含量却增加了 63%^[23]。Mattson 等在太平洋石蟹中发现 dbcAMP 和腺苷酸环化酶激活剂 (forskolin) 的结合能够显著减少 [³H]亮氨酸进入 Y 器蛋白质的量,从而对 Y 器蛋白的合成产生抑制。forskolin 单独作用对蛋白合成也有作用。这些数据也说明腺苷酸环化酶对于囊腺切除的蟹类 Y 器中的蛋白合成抑制有着明显的作用。相反,cGMP 对此却并没有抑制作用。但在可口美青蟹中,cAMP 类似物对于 Y 器蜕皮激素的产生却没有明显的作用^[24]。这可能是由于可口美青蟹 Y 器本身存在一种蛋白库,足够提供蜕皮激素产生时所需要的蛋白^[25]。

另一方面,Y 器中蜕皮类固醇的产生还依赖于由受体调控的高密度脂蛋白胆固醇的内吞作用^[26],因此 Covi 认为 Y 器中胆固醇的内吞和眼柄中神经中枢调控的神经肽的产生有关,而 cAMP 可能参与了此信号系统^[11]。

2.2.2 cGMP 在调控中起主导作用 Sedlmeier 等以利莫斯螯虾 (*Orconectes limosus*) 作为研究对象,进行了与 Mattson 等相同的实验,结果却恰恰相反。因此他们认为甲壳动物中由 MIH 引起的对于蜕皮作用的抑制是由 cGMP 调控的,而非先前所说的 cAMP。研究表明,不论是 8-Br-cGMP 还是 db-cGMP (cGMP 类似物) 的抑制作用更多是在于活化了某些蛋白激酶^[27]。

Watson 实验室也认为蜕皮调控主要是以 cGMP 主导的,cAMP 作用很小或者几乎不起作用。Nakatsuji 等以可口美青蟹和克氏原螯虾两

个物种作为研究对象,也进行了眼柄切除-Y 器组织培养实验,而后向培养液中加入重组蛋白 MIH,发现可口美青蟹 Y 器中的 cGMP 水平显著上升,而 cAMP 却没有明显的变化。同时也发现了 cGMP 类似物 (8-Br-cGMP) 对于蜕皮抑制有着明显的作用,而不管是 cAMP 类似物 (db-cAMP or 8-Br-cAMP) 还是 forskolin 对于蜕皮抑制都没有明显的作用。而克氏原螯虾中也发现了相似的结果。因此他们认为 cGMP 作为第二信使对于 MIH 所起的蜕皮抑制作用进行调控^[28-29]。

Saïdi 等以普通滨蟹作为研究对象,取蜕皮间期中的普通滨蟹的双侧 Y 器进行组织培养,而后向培养液中加入纯化的 MIH,发现胞内 cGMP 含量显著增加 (20 倍),且持续时间较为长久 (>60 min),而 cAMP 却没有明显的变化。后续实验中,他们又采用蜕皮前期的普通滨蟹进行了相同的实验,cGMP 显著增加 (60 倍),仍然持续了较长的时间 (>60 min),而 cAMP 也有较小 (2 倍) 且短暂 (1~4 min) 的增加。因此他们认为 cAMP 的增加可能是伴随 cGMP 的增加产生的^[30]。

Covi 等认为 cAMP 是合成分解代谢,运输过程中最重要的调控者,从而也能够对 Y 器制造蜕皮类固醇的过程进行调控;而 cGMP 是首要的信号分子,通过神经肽进行调控。只是两者对于调控的作用究竟是协同调控还是单独进行调控还不清楚^[11]。

2.3 Ca²⁺ 功能研究 从 Kim 的模式图上看, Ca²⁺ 的流入对于 MIH 的表达具有促进作用。而事实上除了在螯虾中, Ca²⁺ 活化的蛋白激酶 C (PKC) 对于蜕皮激素蛋白的合成产生抑制以外^[30],在大多数甲壳动物中, Ca²⁺ 与 MIH 具有相互拮抗作用,并能够刺激蜕皮激素的分泌,而这两者很大程度上是相辅相成的。

Ca²⁺ 与 MIH 具有相互拮抗作用主要通过对于 cAMP 的调控。Ca²⁺ 能够通过钙调蛋白的结合,从而激活环核苷酸磷酸二酯酶 (PDE) 的活性,而这使得 cAMP 变为 AMP。MIH 与 Ca²⁺ 的拮抗作用也是通过增加 cAMP 的产生从

而减少细胞内 Ca^{2+} 的浓度来完成的^[31]。

Ca^{2+} 对于蜕皮类激素分泌的促进作用主要是通过活化蜕皮激素分泌所需要的蛋白。 Ca^{2+} 能够通过活化 PKC 从而磷酸化其他蛋白,通常来说活化的 PKC 能够激活佛波脂,从而增加 Y 器中其他蛋白的合成,并与 cAMP 水平有着拮抗作用。可是在螯虾中,这种情况却恰恰相反,PKC 的活化对于其他蛋白的合成反而具有抑制作用。仅从这点上来说, Ca^{2+} 对于蜕皮激素存在着抑制作用。而产生这种现象的原因可能是因为,在螯虾中与蜕皮激素分泌相关的蛋白由于被磷酸化而失活,而在蟹中,至少部分是因为 Ca^{2+} 与钙调蛋白的结合激活了 PDE 的活性,从而使得 cAMP 下降,除此之外可能还有别的 Ca^{2+} 参与的机制共同作用,导致蜕皮激素分泌的增加^[30]。

现有资料表明,胞内 Ca^{2+} 对于蜕皮激素的刺激作用至少是通过两种酶 PKC 和 PDE 的活性产生。PKC 对于蜕皮激素的作用因种群不同而有所差异,而 PDE 对于蜕皮激素的产生始终保持促进作用。PDE 的活性依赖于 Ca^{2+} 的浓度而且被 Ca^{2+} 抑制剂所抑制^[30]。

Nakatsuji 等认为 MIH 对于蜕皮的调控,部分依赖于 Ca^{2+} 从 Y 器的流出,而细胞内 Ca^{2+} 的提高促进了 PKC 或 PDE 或是两者皆有的活性^[32]。

3 展 望

随着现代生物技术的不断发展,甲壳动物 MIH 的调控机制将会得到不断地验证与完善。针对甲壳动物更多的物种进行研究对于完善整个调控机制是至关重要的。关于 MIH 的受体研究,cGMP 与 cAMP 的功能分析以及 Ca^{2+} 的功能研究将会是很好的切入点。例如对于 MIH 受体结构的研究;观测不同蜕皮期 Y 器中 cAMP、cGMP 浓度的变化情况;测量在 MIH 存在与否的条件下,Y 器细胞内 Ca^{2+} 富集的程度等都会是探究 MIH 调控机制的有效手段。

参 考 文 献

- [1] Spaziani E. Morphology, histology, and ultrastructure of the ecdysial gland (Y-organ) in Crustacea// Gupta A P. Morphogenetic Hormones of Arthropods, vol. 1. New Brunswick: Rutgers Univ. Press, 1990, 233 - 267.
- [2] Lachaise F, Le Roux A, Huber M, et al. The molting gland of crustaceans: localization, activity, and endocrine control (a review). *Crustacean Biol*, 1993, 13: 198 - 234.
- [3] Watson R D, Lee K J, Qiu S, et al. Molecular cloning, expression, and tissue distribution of crustacean molt-inhibiting hormone. *Amer Zool*, 2001, 41: 407 - 417.
- [4] 王在照, 相建海, 崔朝霞. 编码中华绒螯蟹蜕皮抑制激素基因的 cDNA 片段克隆和序列分析. *海洋与湖沼*, 2002, 33(4): 432 - 438.
- [5] 邱高峰, 张爱萍, 楼允东. 锯缘青蟹蜕皮抑制激素 cDNA 的分子克隆及其表达分析. *水产学报*, 2003, 27(3): 207 - 212.
- [6] 宋霞, 周开亚, 马长艳. 中华绒螯蟹蜕皮抑制激素 1 (MIH1) 基因的 DNA 片段克隆和 Northern 印迹分析. *中国水产科学*, 2003, 10(5): 353 - 358.
- [7] 宋霞, 周开亚, 马长艳. 中华绒螯蟹蜕皮抑制激素 1 (Ers-MIH1) 基因组 DNA 的分子克隆和序列分析. *动物学报*, 2004, 50(1): 83 - 90.
- [8] 朱冬发, 沈建明, 杨济芬, 等. 三疣梭子蟹蜕皮抑制激素 cDNA 的克隆与序列分析. *动物学报*, 2008, 54(6): 1112 - 1118.
- [9] 姚燕, 周开亚, 宋大祥. 中华绒螯蟹蜕皮抑制激素基因的表达及抗体制备. *动物学报*, 2006, 52(1): 209 - 214.
- [10] 张继泉, 李富花, 王在照, 等. 中国明对虾蜕皮抑制激素在大肠杆菌中的表达与分离纯化. *高科技通讯*, 2006, 16(3): 301 - 306.
- [11] Covi J A, Chang E S, Donald L, et al. Conserved role of cyclic nucleotides in the regulation of ecdysteroidogenesis by the crustacean molting gland. *Comparative Biochemistry and Physiology: Part A*, 2009, 152: 470 - 477.
- [12] Nakatsuji T, Sonobe H, Watson R D. Molt-inhibiting hormone-mediated regulation of ecdysteroid synthesis in Y-organs of the crayfish (*Procambarus clarkii*): Involvement of cyclic GMP and cyclic nucleotide phosphodiesterase. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 2006, 253: 76 - 82.
- [13] Lee S G, Bader B D, Chang E S, et al. Effects of elevated ecdysteroid on tissue expression of three guanylyl cyclases in the tropical land crab *Gecarcinus lateralis*: possible roles of neuropeptide signaling in the molting gland. *The Journal of Experimental Biology*, 2007, 210, 3245 - 3254.
- [14] Chung J S, Webster S G. Moulting cycle-related changes in

- biological activity of moult-inhibiting hormone (MIH) and crustacean hyperglycaemic hormone (CHH) in the crab, *Carcinus maenas* from target to transcript. *Biochem* 2003, 270:3280 – 3288.
- [15] Zheng J Y, Nakatsuji T, Roer R D, et al. Studies of a receptor guanylyl cyclase cloned from Y-organs of the blue crab (*Callinectes sapidus*), and its possible functional link to ecdysteroidogenesis. *General and Comparative Endocrinology* 2008, 155:780 – 788.
- [16] Kim H W, Batista L A, Hoppes J L, et al. A crustacean nitric oxide synthetase in nerve ganglia, Y-organ, gill, and gonad of the tropical land crab: *Gecarcinus lateralis*. *Exp Biol* 2004, 207:2845 – 2857.
- [17] Webster S G. High-affinity binding of putative moult-inhibiting hormone (MIH) and crustacean hyperglycaemic hormone (CHH) to membrane-bound receptors on the Y-organ of the shore crab, *Carcinus maenas*. *Proc R Soc Lond B* 1993, 251:53 – 59.
- [18] Asazuma H, Nagata S, Katayama H, et al. Characterization of a molt-inhibiting hormone (MIH) receptor in the Y-organ of the kuruma prawn, *Marsupenaeus japonicus*. *Ann NY Acad Sci* 2005, 1049:215 – 218.
- [19] Zheng J Y, Lee C Y, Watson R D. Molecular cloning of a putative receptor guanylyl cyclase from Y-organs of the blue crab, *Callinectes sapidus*. *General and Comparative Endocrinology* 2006, 146: 329 – 336.
- [20] Han D W, Watson R D. Trimeric G proteins in crustacean (*Callinectes sapidus*) Y-organs: occurrence and functional link to protein synthesis. *Exp Zool A* 2005, 303:441 – 447.
- [21] Lee S G, Mykles D L. Proteomics and signal transduction in the crustacean molting gland. *Integr Comp Biol* 2006, 46:965 – 977.
- [22] Mattson M P, Spaziani E. Cyclic AMP mediates the negative regulation of Y-organ ecdysteroid production. *Mol Cell Endocrinol* 1985, 42:185 – 189.
- [23] Toullec J Y, Dauphin-Villemant C. Dissociated cell suspensions of *Carcinus maenas* Y-organs as a tool to study ecdysteroid production and its regulation. *Experientia*, 1994, 50:153 – 158.
- [24] Han D W, Watson R D. Cell signaling pathways for ecdysteroidogenesis in blue crab Y-organs. *Amer Zool*, 2001 41:1465
- [25] Han D W, Patel N, Watson R D. Regulation of protein synthesis in Y-organs of the blue crab (*Callinectes sapidus*): involvement of cyclic AMP. *Exp Zool A* 2006, 305:328 – 334.
- [26] Kang B K, Spaziani E. Uptake of high-density lipoprotein by Y-organs of the crab *Cancer antennarius*: III. Evidence for adsorptive endocytosis and the absence of lysosomal processing. *Exp Zool* 1995, 273:425 – 433.
- [27] Sedlmeier D, Fenrich R. Regulation of ecdysteroid biosynthesis in crayfish Y-organs. I. Role of cyclic nucleotides. *Exp Zool* 1993, 265:448 – 453.
- [28] Nakatsuji T, Sonobe H, Watson R D. Molt-inhibiting hormone-mediated regulation of ecdysteroid synthesis in Y-organs of the crayfish (*Procambarus clarkii*): involvement of cyclic GMP and cyclic nucleotide phosphodiesterase. *Mol Cell Endocrinol* 2006, 253:76 – 83.
- [29] Nakatsuji T, Han D W, Jablonsky M J, et al. Expression of crustacean (*Callinectes sapidus*) molt-inhibiting hormone in *Escherichia coli*: characterization of the recombinant peptide and assessment of its effects on cellular signaling pathways in Y-organs. *Mol Cell Endocrinol*, 2006, 253: 96 – 104.
- [30] Mattson M P, E Spaziani. Regulation of crab Y-organ steroidogenesis *in vitro*: Evidence that ecdysteroid production increases through activation of cAMP-phosphodiesterase by calciumcalmodulin. *Mol Cell Endocrinol* 1986, 48:135 – 151.
- [31] Spaziani E, Mattson M P, Wang W L, et al. Signaling pathways for ecdysteroid hormone synthesis in Crustacean Y-organs. *Amer Zool*, 1999, 39:496 – 512.
- [32] Nakatsuji T, Lee C Y, Watson R D. Crustacean molt-inhibiting hormone: Structure, function, and cellular mode of action. *Comparative Biochemistry and Physiology: Part A* 2009, 152: 139 – 148.