

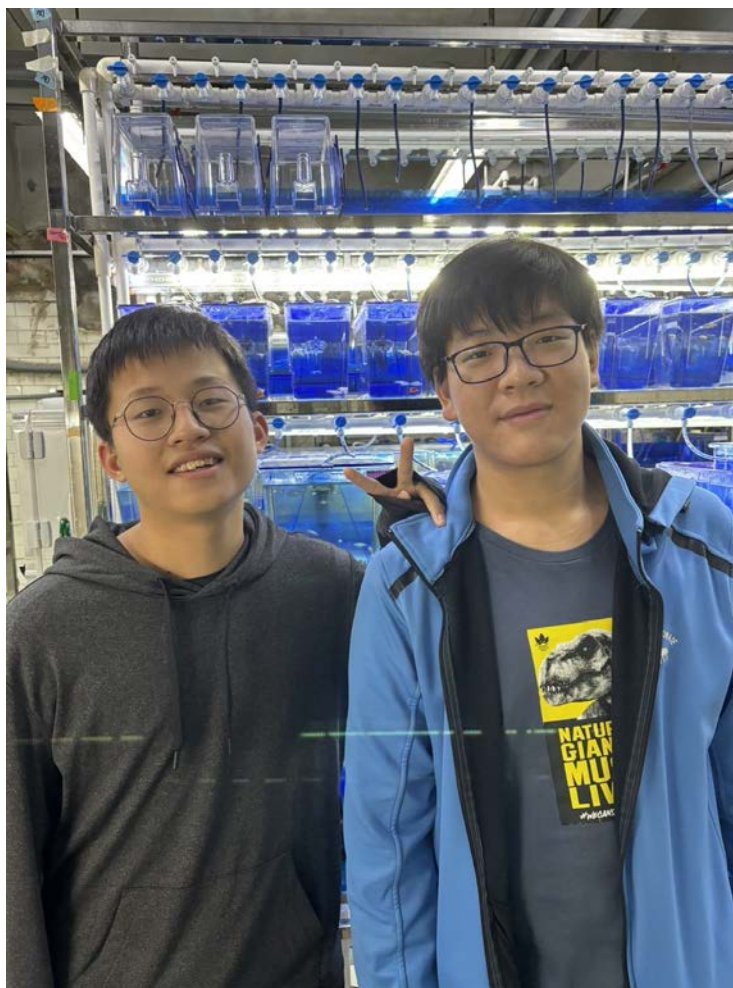
2024年臺灣國際科學展覽會 優勝作品專輯

作品編號	050002
參展科別	動物學
作品名稱	硬骨魚鰓上用以適應淡水酸化獨特的產氨與排 氨機制
得獎獎項	四等獎

就讀學校	國立臺灣師範大學附屬高級中學
指導教師	黃鵬鵬、謝慧齡
作者姓名	葉星玧、王培聿

關鍵詞	<u>斑馬魚、環境酸化、產氨作用</u>
-----	----------------------

作者簡介



我們是來自師大附中高二數資班的學生王培聿、葉星昶，在豐富的高一課程中，我們發現了各自對於生物科知識的興趣與認知能力，並在專題研究的選擇中選擇了生物專題，而我們又因對於魚類研究的熱愛聯繫了中研院細生所黃鵬鵬教授的實驗室，並有幸在其中學習許多相關實驗，並且受益繁多。

摘要

環境酸化為地球面臨的危機之一。面對酸逆境時，產氨及排氨為脊椎動物保守的適應策略，而本研究致力於探討脊椎動物之一的斑馬魚 (*Danio rario*) 在面對酸逆境時適應的特殊機制。首先，斑馬魚在pH值4.0環境下酸處理6小時後，水體及血液中氨濃度顯著上升。透過qRT-PCR，負責產氨的麩醯胺酸酶 (GLS, *gls*) 基因在鰓、肝、肌肉、腎中皆被誘發，顯示他們皆貢獻於排氨的過程。比較不同器官發現，鰓最早在6小時便啟動 *gls* 基因，可知鰓除了負責魚類的排氨，也是面對急性酸逆境時最初的產氨器官。在斑馬魚的鰓上，我們也發現了硬骨魚特有的富含GLS的細胞 (GLS細胞)，再次應證了硬骨魚面對酸逆境時，鰓上獨特的適應機制。本研究為氣候變遷議題提供了非常有價值及參考性的資訊，也協助預測未來持續環境酸化下硬骨魚類的未來。

Abstract

Acidified environment was the crisis that Earth was facing. When facing acidic stress, ammonia production and excretion was a strategy for vertebrates to adapt to the environment, our research will be focused on zebrafish's (*Danio rario*) special mechanism to overcome acidic stress. First the ammonia excretion and blood ammonia will increase significantly after six of acidic treatment. Through qRT-PCR, we can see that glutamine (*gls*), which was a kind of gene used for ammonia production, was triggered in gills, liver, kidney, muscle, it shows that these organs are related to ammonia excretion. By comparing different organs, we can see that the gills activated *gls* gene at 6 hour of time point, which was the fastest in all organs, as a result, we are able to know that apart from being responsible for the main ammonia production, gills are also the first organ to produce ammonia when facing acidic stress. We also find a cell that is rich in GLS (GLS cell) on zebrafish's gill, which is also a particular cell found in teleost, that once again, proves the unique mechanism of teleost while facing acidic stress. This research provides valuable and informative information, and also assists to predict the future of the teleosts living in an acidic environment.

壹、前言

一、關於未來之環境酸化與研究動機

自十八世紀起，工業革命對整個地球大環境所帶來的影響逐年增加，過量的人類活動排放各種酸性物質（硝酸、硫酸和碳酸等）污染了大自然、改變氣候狀況，造成了「氣候變遷（climate change）」。氣候變遷進一步造成了許多自然環境的改變，其中「環境酸化（environmental acidification）」是最受關注的議題之一。環境酸化同時威脅著淡、海水水域，然而相較於海水，淡水是個離子含量（content）及強度（strength）都相當弱的環境，因此淡水的酸鹼度（acidity）極容易被外在的酸性物質擾動。同為地球中的水域，海洋酸化（ocean acidification）總是能獲得的不少的關注，淡水酸化（freshwater acidification）相關的議題卻是鮮少被提起，是因為它並未被酸化嗎？顯然不是，淡水域所受到酸化的程度（pH值小於5.0）其實相較海水要嚴重許多。這是否會對淡水域中的水生生物造成危害？在酸化的淡水環境中，水生生物究竟能不能適應？本研究將透過常見的水生脊椎動物斑馬魚（*Danio rario*）解答這些問題，並嘗試預測在氣候變遷持續影響的未來，水生的脊椎動物們的適應情形。

二、硬骨魚對於酸的耐受性

淡水水域雖然只佔了地球水體的30%，環境卻有極高的多樣性，棲息於其中的淡水魚也具有各種強韌且彈性的生理適應能力。根據前人研究，淡水硬骨魚（teleost）對酸的耐受力或許遠超越我們的預期：在實驗室環境中，日本青鱗魚（Japanese medaka）能夠在pH 4.1的環境中存活甚至產卵（Yada and Ito., 1998）；日本鯪魚（Japanese dace）原棲於一封閉的酸性湖泊（Osorezan lake）中，該地的pH值可低至3.4 - 3.8（Hirata et al., 2003）；大蓋巨脂鯉（Amazonian tambaqui）生活於雅馬遜流域的黑水河域中，因為過多有機質沉積的緣故，其水域呈酸性（pH < 5.1）（Wilson et al., 1994）。以上物種展現了淡水硬骨魚對於酸性環境的適應性，他們一定有著高效率的酸鹼平衡機制，且這些機制可能不同於以往人類在哺乳類上的認知。

三、脊椎動物的酸鹼平衡機制

在面對酸逆境（acidic stress）時，脊椎動物通常會刺激排氨（ammonia excretion）

以增加個體的淨排酸量 (net acid secretion) 以清除體內過多的酸性物質。關於為了支持大量的排酸, 哺乳類腎臟的近曲小管 (the proximal tubule) 是主要進行產氨作用 (ammoniogenesis) 的地方, 而麩醯胺酸 (glutamine) 為主要產氨作用的前趨物。在產氨作用的過程中, glutamine被麩醯胺酸酶 (glutaminase, GLS) 裂解、釋放出氨 (NH_3)。產出的氨再由鈉/氫交換蛋白3 (Na^+/H^+ exchanger 3) 和Rh醣蛋白 (Rh glycoprotein) 排出 (Tseng et al., 2020)。過去的文獻中發現, 許多淡水硬骨魚在酸化的環境下也會刺激排氨 (Chuang et al., 2022), 如同人類在面對酸逆境時的生理反應。然而, 不同於哺乳類, 硬骨魚的鰓而非腎臟為主要排氨的器官, 負責了將近80%的總排氨量。再者, 硬骨魚為排氨動物 (ammonotelism), 相較於排尿素的 (ureotelic) 哺乳類, 對於排氨有更高的需求和能力。目前, 產氨作用如何在酸性環境下幫助淡水硬骨魚刺激排氨仍不清楚。根據以上所述, 硬骨魚在酸逆境下可能有著不同於哺乳類的產氨與排氨機制。這也成為本研究主要探討的科學問題。

四、硬骨魚獨特的排氨機制

2022年末, 硬骨魚在淡水酸化下獨特的產氨與排氨機制首次透過日本青鱗魚的研究被發表 (Chuang et al., 2022), 鰓上獨特的產氨細胞GLS細胞 (Glutaminase-rich cell) 和NKA細胞 (Na^+/H^+ exchanger) 合作產氨、排氨以達到快速刺激鰓上排酸的目的。我們因此推測, 硬骨魚在面對酸逆境時可能都有這樣特殊的產氨與排氨機制。在日本青鱗魚的研究中, 多個器官 (鰓、肝、肌肉、腎) 參與了由*gls*基因調控的產氨作用。其中, 鰓的產氨作用在酸處理後最快被啟動 (酸處理後6小時), 而排氨相關通道蛋白也在酸處理初期 (酸處理後9小時) 被活化 (Tseng et al., 2020)。這樣精緻且即時的調控可能也存在於其他硬骨魚類當中。因此, 我們使用常見的模式物種斑馬魚來驗證在日本青鱗魚中發現的適應酸逆境的獨特機制。

五、使用斑馬魚作為淡水酸化研究的模式生物

斑馬魚是一原棲熱帶的淡水魚, 原生於喜馬拉雅地區, 是一種受歡迎的觀賞性魚類、也是種常見的實驗動物。牠們體型小、容易飼養、繁殖, 具有明顯的社會行為, 適合用於藥物測試、探討脊椎動物生物機制、觀察神經科學、動物 (社會) 行為、甚至進行基因編輯等研究。全基因組已解序, 用於基因編輯相當方便。

六、研究目的

由於硬骨魚獨特的產氨與排氨機制已在日本青鱗魚中被發現，然而，這種獨特的制酸機制是否存在於大部分的硬骨魚？在硬骨魚的演化史中，斑馬魚屬於較為古老的魚種，為了探究古老的硬骨魚中的產氨與排氨機制，本研究目的為使用斑馬魚 (*Danio rario*) 為研究動物，再次印證酸逆境下硬骨魚獨特的產氨與排氨機制。

貳、研究設備與器材

一、斑馬魚 (*Danio rario*)

為本次實驗之模式生物，我們將其飼養於28°C ($\pm 1^\circ\text{C}$)的曝氣水中，並給予固定的光照週期 (光照14小時、黑暗10小時)

二、餵養飼料

1. 斑馬魚食物: 豐年蝦、海豐牌熱帶魚飼料 (浮上性)

三、實驗藥劑、溶液:

1. 核糖核酸 (RNA) 萃取相關藥劑、溶液:

- (1). TRIzol (DNA、RNA、蛋白質分離試劑)
- (2). Chloroform (氯仿)
- (3). Isopropanol (異丙醇)
- (4). Nuclease free water (ddH₂O)
- (5). 75% C₂H₅OH (EtOH)

2. 互補 (cDNA) 合成相關藥劑:

- (1). oligo dT
- (2). dNTP
- (3). SSIV buffer

- (4). DTT
- (5). RNase out
- (6). SSIVase

3. qRT-PCR相關藥劑:

- (1). SYBR Green I master mix

四、實驗基因與其引子 (primer)

1. *gls*基因:與產氨相關基因, 包含*gls1a*, *gls1b*, *gls2a*, *gls2b*
2. 通道蛋白基因:與排氨相關基因, 包含*rhcg1*、*rhcg2*、*rhbg*、*nhe 3b*、*atp6v0c*
3. *rpl13a*:本實驗的管家基因
4. 引子 (primer)

z_gls1a_F	z_gls1a_R	Dr_gls1b_F 1984	Dr_gls1b_R 2135	z_gls2a_F	z_gls2a_R
z_gls2b_F	z_gls2b_R	Dr_rpl13a_F	Dr_rpl13a_R	Dr_nhe3b_F	Dr_nhe3b_R
Dr_atp6v0c_F	Dr_atp6v0c_R	Dr_rhbg_F	Dr_rhbg_R	Dr_rhcg2_F	Dr_rhcg2_R
Dr_rhcg1_F1100	Dr_rhcg1_R1211				

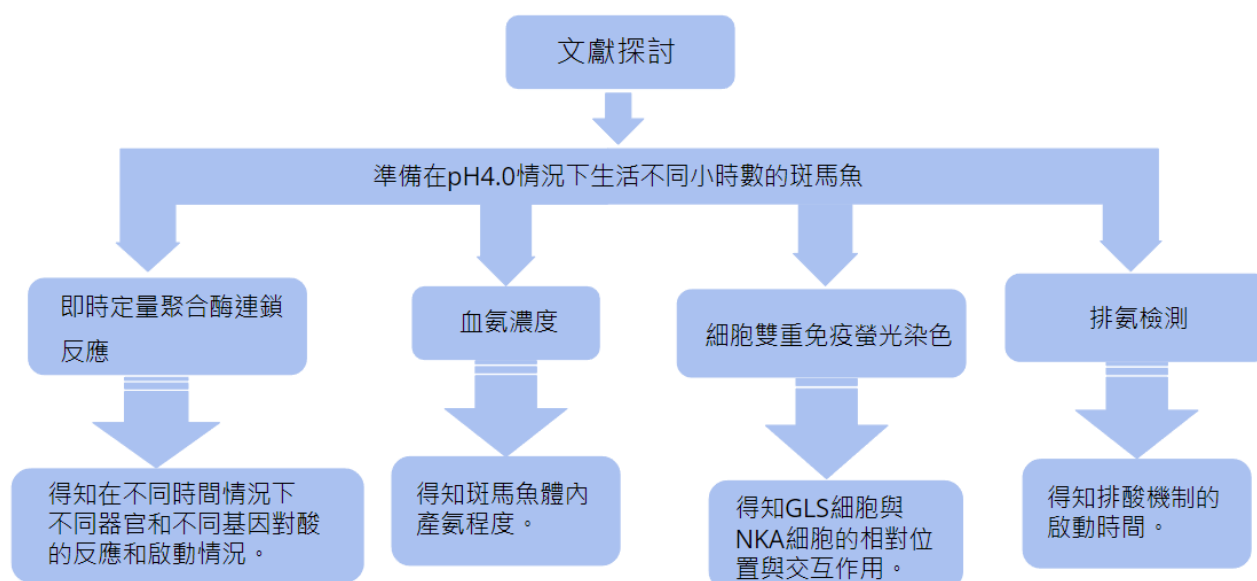
五、儀器設備

LightCycler 480 real-time PCR 系統	離心機	烘箱 (培養箱)
Pipette (微量滴管)	Eppendorf 1.5 ul (離心管)	96和384孔盤
8連排eppendorf 0.2 ml	TissueLyser II (組織研磨儀)	3mm鋼珠
加熱器	聚合酶連鎖反應器	Pipette tips
Nano drop QC (分光光度計)	共軛焦顯微鏡 (Zeiss LSM 880)	

六、電腦軟體

Microsoft Excel 工作表	LightCycler 480程式
繪圖軟體:GraphPad Prism	

參、研究過程與方法



圖一 實驗流程圖

一、斑馬魚淡水酸化處理

斑馬魚作為模式動物已行之有年 (Miklósi and Andrew, 2006)。自然環境下，成年斑馬魚的生長於中性 (pH值6-7)、溫暖 (28 ± 1 °C) 的淡水環境。在過去文獻中我們發現，斑馬魚對酸的最大耐受度能達到pH 4.0 (Tseng et al., 2020)。因此，為了確定成年斑馬魚 (adult) 的排酸機制有顯著被誘發，我們也將實驗用的斑馬魚直接放置在以硫酸 (H_2SO_4) 配置的酸性淡水中 (pH 4.0)，並另外放置一組同樣環境，但是被放置於中性淡水 (pH 7.0) 的斑馬魚作為對照組 (圖一)。所有的成年斑馬魚在進行處理前，會先禁食24小時，以確保排氨的誘導不是來自進食的影響。

二、排氨 (ammonia excretion) 的測量

為了量測魚在中性與酸化環境中的和排氨生理表現，並驗證我們對於於對抗酸的

機制啟動情形的預測是否正確，我們測量魚隻在單位時間下、單位重量所排出的氨。經過特定時間的酸處理 (0、3、6、9、24、168 小時) 後，斑馬魚於充分曝氣的淡水中、被置入一體積為150 mL的密封玻璃盒中，使其排氨累積15分鐘後，取水樣、測定水中的氨濃度，即可換算出單位時間下、單位重量所排出的氨莫耳數 ($\mu\text{mol} \cdot \text{h}^{-1} \text{g}^{-1}$)。

測定水中氨濃度時，以氯化銨 (NH_4Cl) 作為標準品，25 μL 的水樣與標準品和100 μL 呈色劑於避光96孔盤中在室溫下反應至少2小時，即可使用酵素免疫分析儀 (ELISA reader) 透過激發/收光條件 ex 350 / em 420 檢測相對標準線的氨濃度。因此可透過以下公式計算：

$$\text{排氨濃度 } (\mu\text{M}) \times \text{水體積 (mL)} / \text{累積時長 (hr)} \times \text{魚之重量 (g)}$$

三、血氨 (blood ammonia) 濃度測量

斑馬魚經麻醉後，血液將透過27 G針頭取出，靜置血樣10分鐘使其凝血，即可以2000 x g、4°C、10分鐘條件離心，取得上清液 (血清)。血清樣本經200倍稀釋後，以氯化銨 (NH_4Cl) 作為標準品，25 μL 的水樣與標準品和100 μL 呈色劑於避光96孔盤中在室溫下反應至少2小時，即可使用酵素免疫分析儀 (ELISA reader) 透過激發/收光條件 ex 350 / em 420 檢測相對標準線的氨濃度，即可得血氨濃度 (μM)。

四、核糖核酸 (RNA) 萃取

在實驗中，將先前準備好的組織樣本以500 μL 的TRIzol充分研磨，至於室溫下反應5分鐘，加入氯仿 (chloroform) 100 μL 充分混勻，再置於室溫下反應3分鐘，然後以13000 x g、4°C、15分鐘條件離心以取出上清液。取出200 μL 上清液後，加入500 μL 的異丙醇 (isopropanol) 反應使RNA片段沉降析出，離心13000 x g、4°C、10分鐘沉降RNA片段。倒掉上清以1 mL的75 %酒精沖洗pellet，離心13000 x g、4°C、5分鐘，重複以上動作3次以清除鹽類，最後將容器內的酒精倒乾並放入37°C的烘箱烘乾燥RNA片段直至片段呈現透明狀。以60°C的水 (nuclease free water) 回溶至完全溶解，即可以超微量分光光度計 (Nano drop) 測定RNA濃度，同時也以水平電泳膠確認RNA的完整性。

五、互補去氧核糖核酸 (cDNA) 合成

每個樣本以總量2.5 μg 、總體機5.5 μL 的RNA進行cDNA合成。cDNA合成使用

ASuperScript IV套組進行反應，首先加入適量的oligo dT (50 μ M) 與濃度的dNTP (10 μ M)，後於65°C的環境反應5分鐘，反應結束置入冰上1分鐘以上。再加入適量的SSIV緩衝液、DTT (0.1 M)、RNAase out與SSIVase 酵素於55°C反應10分鐘，而後再以80°C反應10分鐘，得cDNA。

六、即時定量聚合酶連鎖反應 (qRT-PCR)

使用LightCycler 480 real-time PCR 系統，各處理和組織的cDNA與特定的引子對 (primer pair) 和SYBR Green I master mix，以總體機10 μ L反應。所有反應皆做二重複 (duplicate) 以減低人操作誤差。反應透過以下過程進行：95°C反應5分鐘、再重複45個循環的95°C 10秒鐘、60°C 10秒鐘、72°C 10秒鐘複製過程。Ribosomal protein L13a (*rpl13a*) 作為管家基因，計算目標基因的相對表現量，melting-curve analysis和Sanger sequencing也確認了引子對的專一性。參考前人研究，相對表現量以公式： $2^{(-\Delta\Delta C(t))}$ 計算。

七、雙重免疫螢光染色 (double-immunofluorescent staining)

在斑馬魚被麻醉後，溫柔小心地取下幾根鰓絲固定於4%多聚甲醛 (PFA) 固定液中，待魚隻在正常淡水中恢復游動後，單獨休養。於4°C固定隔夜 (overnight, 約16-20小時) 後，以磷酸鹽緩衝生理實驗水 (phosphate-buffering solution, PBS) 潤洗數次，再以10%和30%蔗糖 (sucrose) 漸進式脫水。經30% sucrose 脫水後的樣本置於冷凍包埋劑 (OCT) 中浸潤 overnight，再於-20°C 中包埋樣本得樣本塊。冷凍切片 (crostection) 以10 μ m 厚度切片，切片樣本首先以PBS Tween-20 緩衝液 (含有1% tween-20 PBS, PBST) 潤洗數次，再以3%小牛血清 (Bovine Serum Albumin, BSA) 進行阻斷反應 (blocking)。樣本接著與 Glutaminase (GLS) 與鈉鉀幫浦 (NKA) 的初級抗體 (primary antibody) 培養隔夜後，在使用相對應的次級抗體 (secondary antibody) 進行螢光呈色。樣本以共軛焦顯微鏡 (Zeiss LSM 880) 拍攝，得到影像。

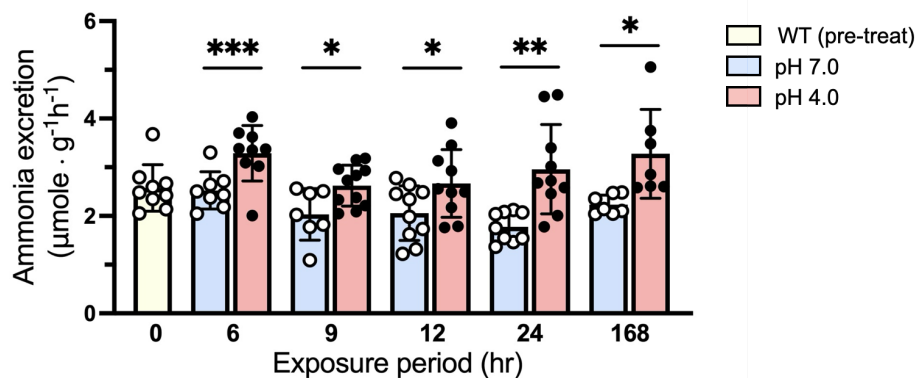
八、統計方法

本研究使用GraphPad Prism 9作為統計及繪圖的軟體。所有數據皆以平均 (mean) $\pm$ 標準差 (SD) 來表現。各組的變異數差異將由 F 檢定分析，處理組與對照組的之間的差異由Student's t 檢定 (雙尾) 分析。 p 值小於0.05則達顯著差異標準。

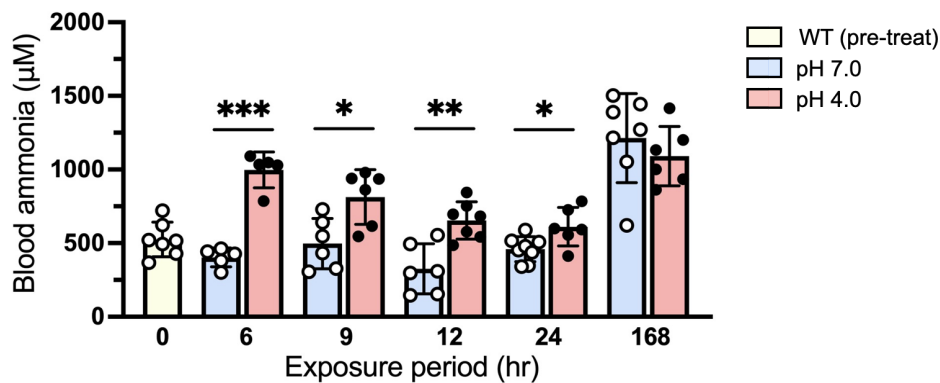
肆、研究結果

一、斑馬魚在酸性環境下排氨相關生理變化

在經過7天的酸處理後，實驗組的氨排放量自6小時起顯著上升，此升高持續到酸處理的7天（圖二）。血氨也於酸處理後6小時後開始顯著上升，然而在酸處理的第7天則沒有顯著的變化（圖三）。



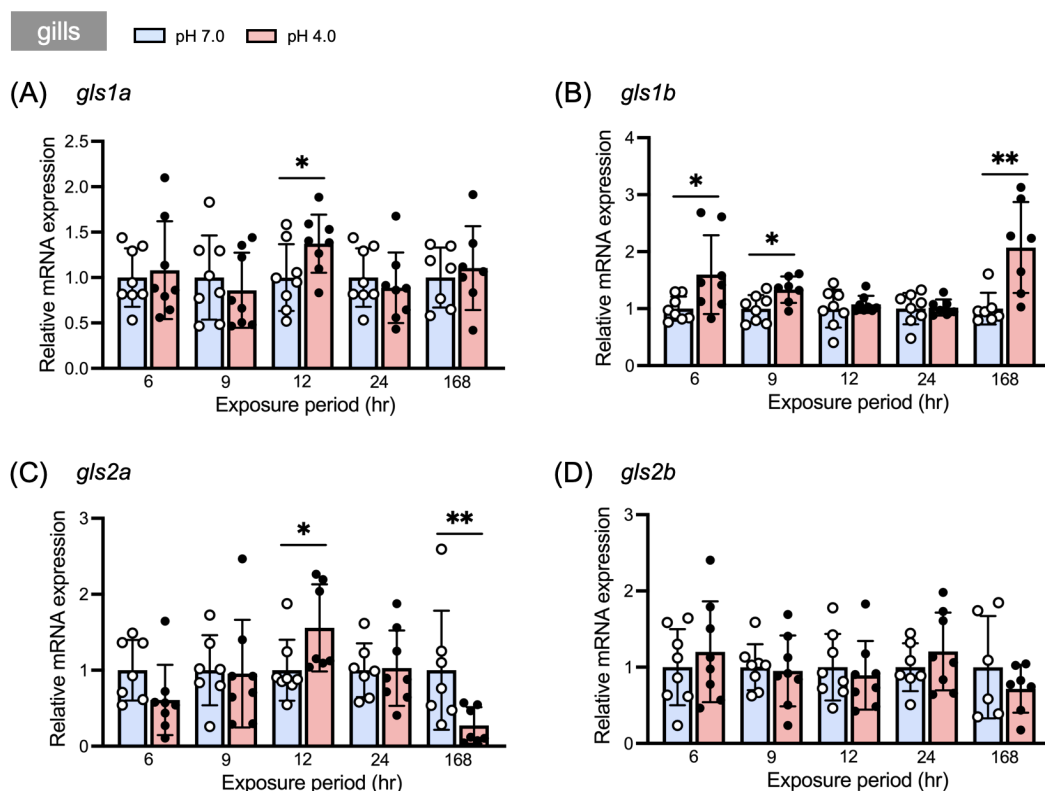
圖二、斑馬魚在酸逆境下的排氨表現。黃色、藍色及紅色柱狀圖分別代表處理前、pH 7.0處理及pH 4.5處理的組別。各圓點代表來自每隻魚的結果。星號表示有統計差異 (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$)。



圖三、斑馬魚在酸逆境下的血氨濃度。黃色、藍色及紅色柱狀圖分別代表處理前、pH 7.0處理及pH 4.5處理的組別。各圓點代表來自每隻魚的結果。星號表示有統計差異 (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$)。

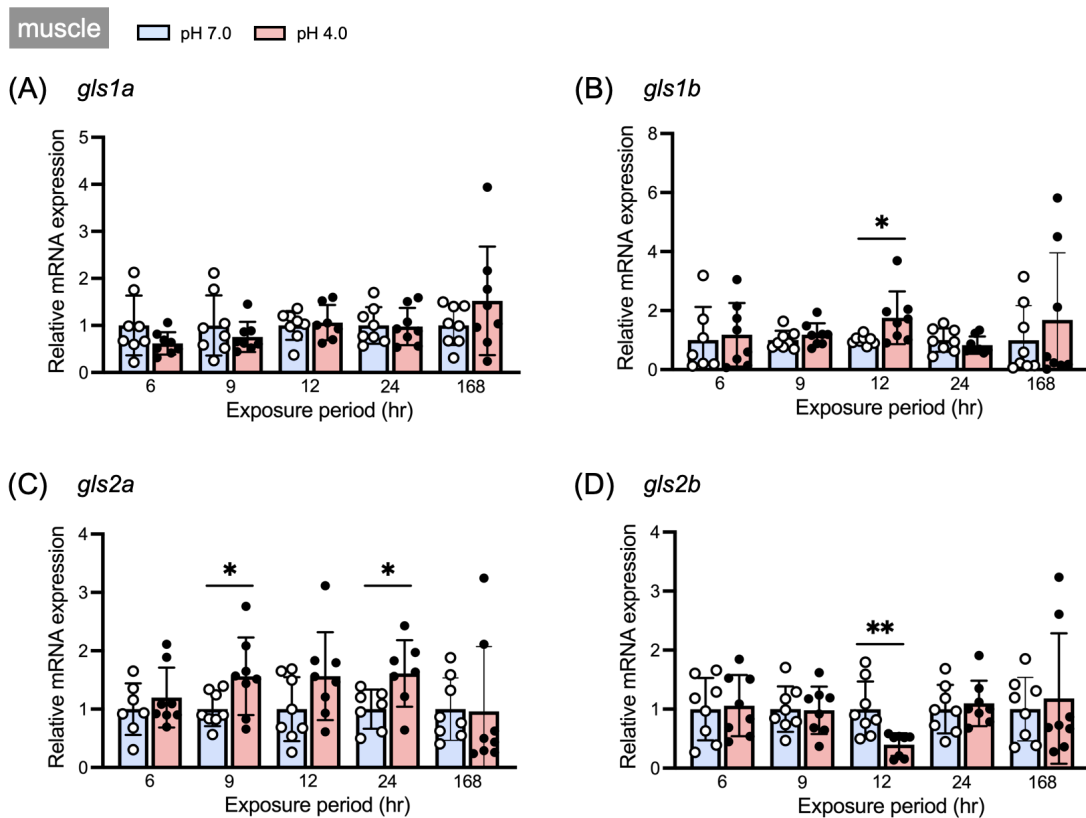
二、酸性環境對於*gls*基因的影響

為了瞭解酸性環境下斑馬魚產氨的調節，我們在不同時間點將斑馬魚的鰓、肝、肌肉與腎臟以qRT-PCR分析量化其中*gls*家族的基因表現量 (圖四)。根據實驗我們得知在酸處理下，鰓中的*gls1b*最早於6小時被誘發 (圖四B)，接著*gls1a*和*gls2a*於酸處理後12小時被刺激 (圖四A與 C)。鰓中的*gls1b*在酸處理7天後仍維持顯著增加 (圖四B)，其他*gls*基因表現量則是沒變化或下降 (圖四A、C與D)。



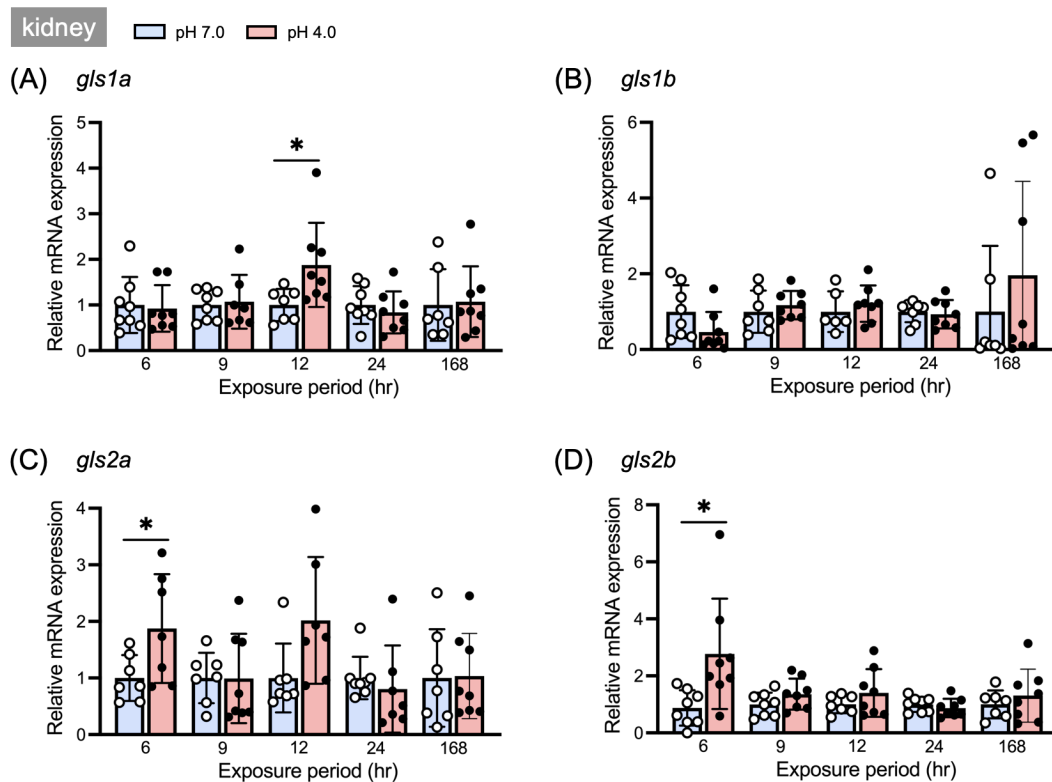
圖四、斑馬魚酸處理下鰓上*gls*基因表現量變化。圖中藍色與紅色柱狀圖分別代表pH 7.0與pH 4.0.0，橫軸為不同分組之斑馬魚所經過酸處理的時間，縱軸為基因的相對表現量 (以pH 7.0基因表現量為1，並與之比較的基因相對表現量)。

在斑馬魚的肝臟中，*gls2a*在12小時有顯著的上升，並在168小時顯著下降 (圖五C)，*gls1a*、*gls1b*、*gls2b*在此器官中隨著時間推進並無明顯變化 (圖五A、B與D)。



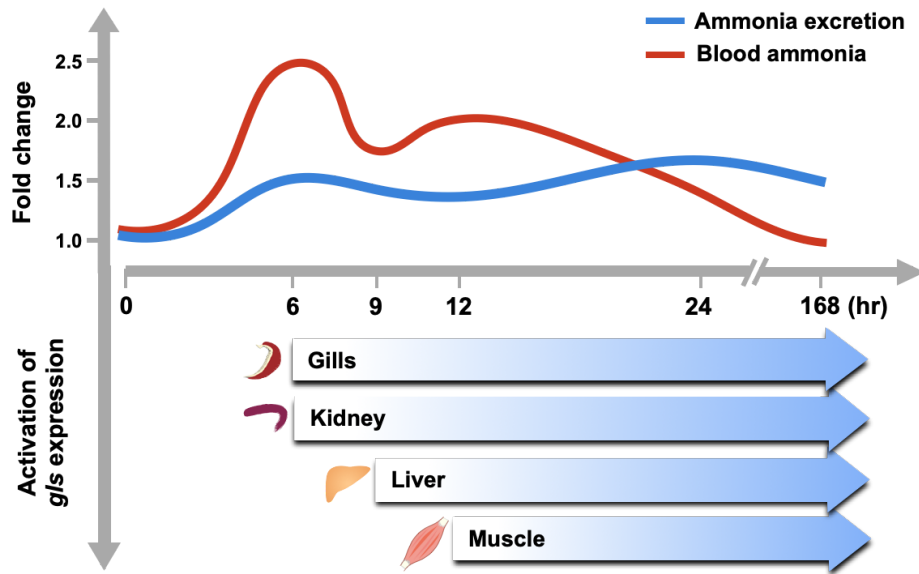
圖六、斑馬魚酸處理下肌肉中*gls*基因表現量變化。圖中藍色與紅色柱狀圖分別代表pH 7.0與pH 4.0，橫軸為不同分組之斑馬魚所經過酸處理的時間，縱軸為基因的相對表現量 (以pH 7.0基因表現量為1，並與之相較的基因相對表現量)。

最後看到斑馬魚的腎臟，腎臟的*gls2a*與*gls2b*最早於6小時就被刺激 (圖七C與D)，接著*gls1a*在12小時也受到刺激 (圖七A)，*gls1b*在此器官無明顯變化 (圖七B)。藉由以上結果，我們能夠畫出一張圖表以表現在魚體中，血氨、排氨的濃度變化與各器官在不同時間下的啟動情形 (圖八)。



圖七、斑馬魚酸處理下腎臟中*gls*基因表現量變化。圖中藍色與紅色柱狀圖分別代表pH 7.0與pH 4.0, 橫軸為不同分組之斑馬魚所經過酸處理的時間, 縱軸為基因的相對表現量 (以pH 7.0基因表現量為1, 並與之比較的基因相對表現量)。

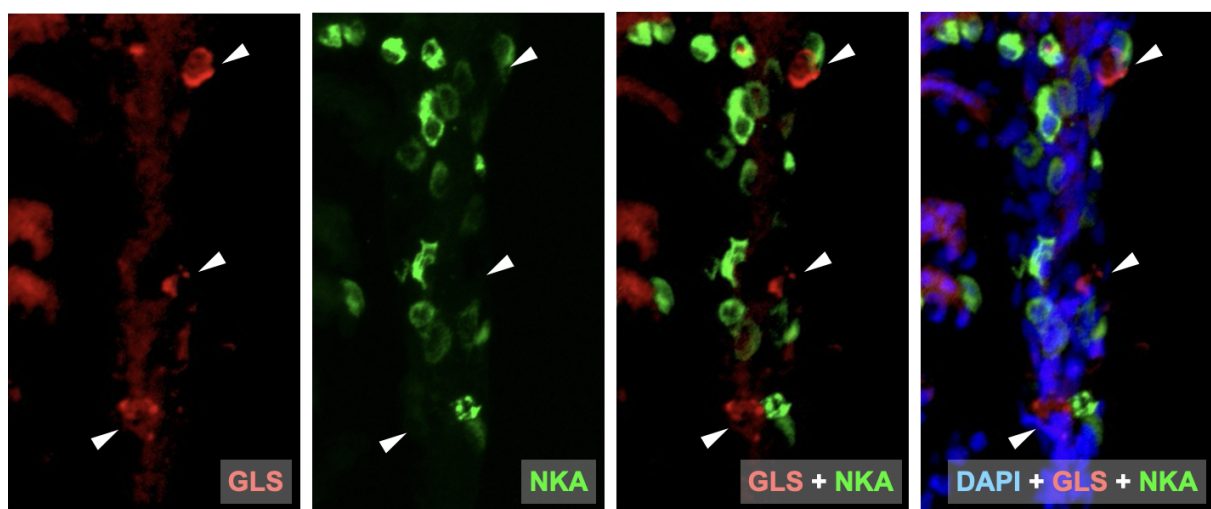
在總結了三種對於斑馬魚面對酸逆境之實驗後, 在圖八中, 我們能夠同時比對斑馬魚在排氨、血氨濃度與*gls*基因濃度的結果。在六小時時, 我們能發現血氨濃度和排氨量都有顯著的上升, 而*gls*基因的濃度在6小時時是由鰓和肝臟先啟動。



圖八、斑馬魚排氨與產氨示意圖。此圖總結了斑馬魚在酸處理後排氨、血氨與產氨基因在不同器官的表現變化。

三、斑馬魚鰓上的富含GLS細胞

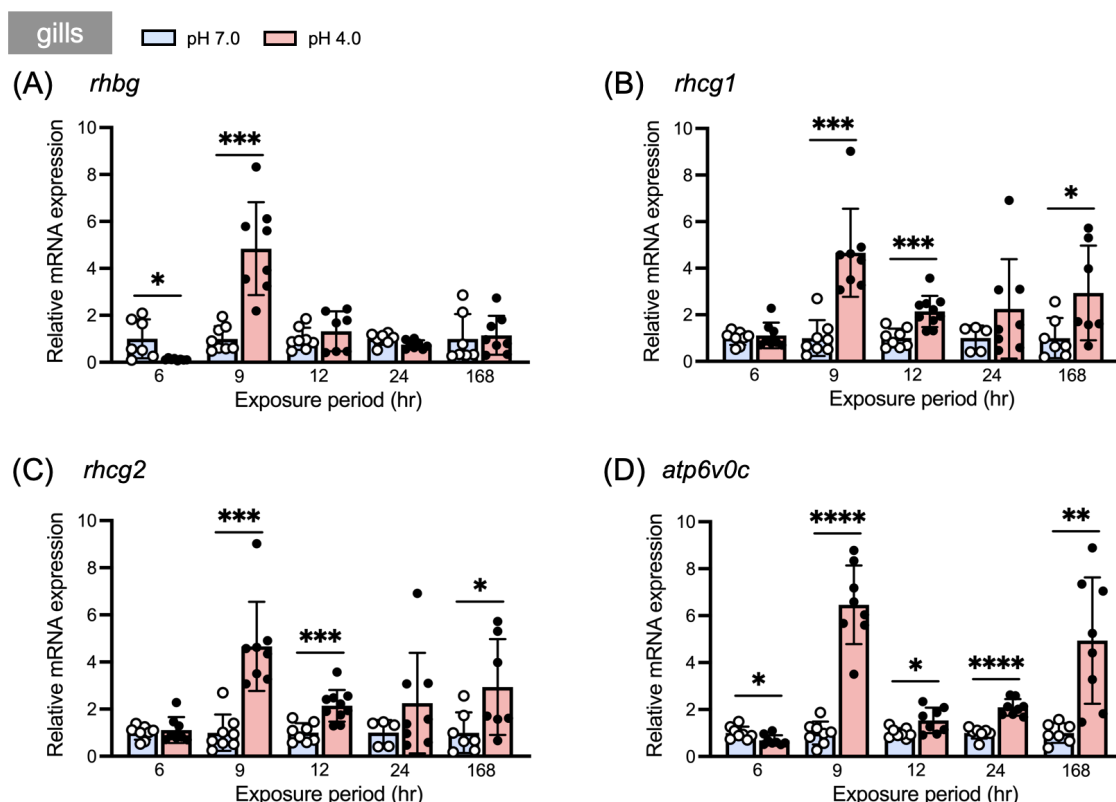
GLS相關的產氨在斑馬魚鰓上被證明，但在鰓上作用的位置，目前仍不明。透過雙重免疫螢光染色，我們發現紅色的GLS訊號並未表現於綠色的NKA細胞中，顯示產氨作用發生的位子和排氨的細胞並不相同。這些紅色的訊號中皆有藍色DAPI細胞和的表現，顯示其為某種尚未發現的細胞型態。由於此種細胞富含GLS酵素，因此我們命名為GLS細胞。GLS細胞表現於NKA細胞附近，且似乎不直接接觸外在環境 (圖九)。



圖九、雙重免疫螢光染色圖。紅色訊號為GLS細胞，綠色訊號為NKA細胞，DAPI的藍色部分為細胞核染色。

四、斑馬魚排氮基因的變化

接著我們仍好奇產氮作用和排氮作用是如何協調並應對酸性環境的。透過 qRT-PCR 結果, 多個和排氮相關的通道蛋白的基因表現已被定量。Rh 醣蛋白 (Rhbg; *rhbg* 與 *Rhcg1/2*; *rhcg1/2*) 與氫離子幫浦幫浦 (HA; *atp6v0c*) 在酸處理 9 小時後皆顯著上升 (圖十)。然後在酸處理的第七天, 只有 *rhcg1/2* 與 *atp6v0c* 和仍維持顯著上升的表現 (圖十 B、C 與 D)。

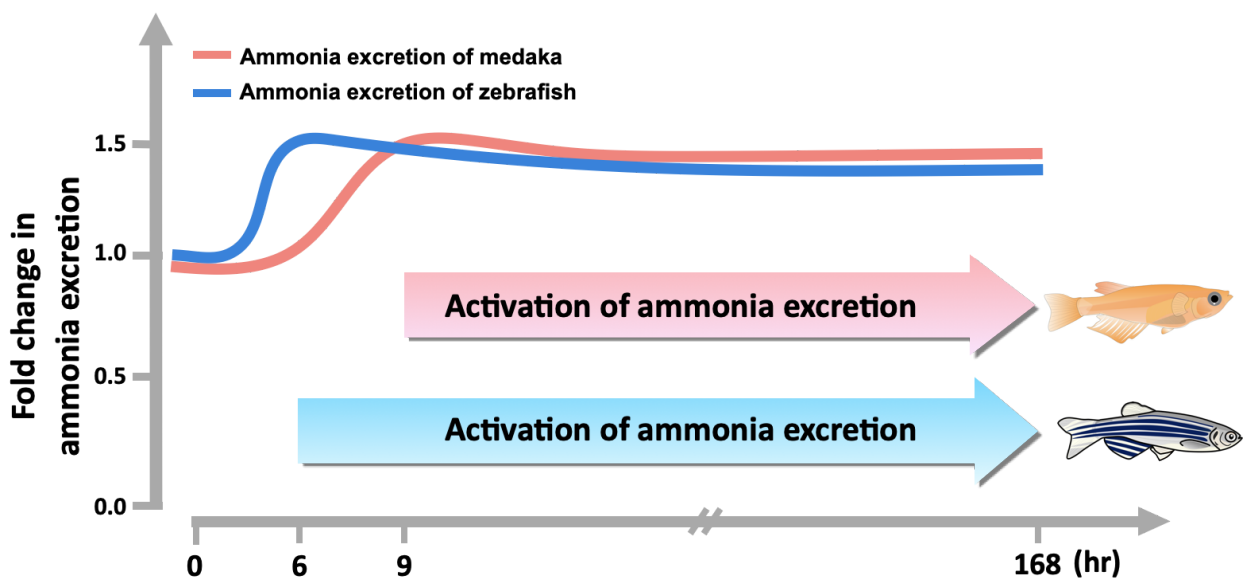


圖十、斑馬魚酸處理下排氮通道蛋白的基因變化。圖中藍色與紅色柱狀圖分別代表 pH 7.0 與 pH 4.0, 橫軸為不同分組之斑馬魚所經過酸處理的時間, 縱軸為基因的相對表現量 (以 pH 7.0 基因表現量為 1, 並與之比較的基因相對表現量)。

伍、討論

一、排氮在硬骨魚身上的重要性與各器官在排氮時的參與情況

相對於哺乳類，排氮的 (ammonotelic) 硬骨魚有著極高的排氮量，在日本青鱗魚的研究中，硬骨魚面對酸逆境獨特且快速的反應機制已經被發現 (Chuang et al., 2022)。本研究透過另一種常見的硬骨魚--斑馬魚再次應證了這個發現 (圖八)。當面對到酸逆境時，斑馬魚的排氮與血氮快速地在處理後6小時顯著提升 (圖二、三)，再次展現了硬骨魚快速的應對能力。而在這個同樣的時間點，鰓中的 *gls1b* 基因也即時地被啟動 (圖四)，而在於產氮的時間點，我們將此結果與青鱗魚的排氮結果圖相比 (圖十一)，發現斑馬魚開始產氮的時間點較青鱗魚早了三個小時，由此我們得知硬骨魚雖然皆有相似的產氮面對酸逆境的方式，但是每個魚種在基因啟動時間和排氮量、血氮濃度都各有所差異。這些結果除了再次應硬骨魚獨特的機制外，也凸顯了硬骨魚的鰓在急性排氮的需求上扮演著重要的角色 (圖八)。而在6小時後，其他器官也開始透過GLS增加產氮，持續地透過全身性的產氮支持著硬骨魚及大量的排氮需求。本研究透過這些結果，顯示了各器官中 *gls* 基因表現、血氮與排氮的密切相關性。



圖十一、斑馬魚與日本青鱗魚排氮刺激時間點之比較。圖中橫軸為時間 (小時)。縱軸為排氮的倍數變化 (以pH 7.0數值為1計算)。紅色與藍色的線條與箭頭分別代表日本青鱗魚與斑馬魚的排氮表現 (Chuang et al., 2022)。

二、qRT-PCR結果的詮釋

本研究選用斑馬魚主要的產氨器官探討產氨的機制。鰓為魚類主要的排氨器官、肝臟則為魚類中較主要的產氨器官。肌肉富含蛋白質，因此提供了大量的氨基酸來源。腎臟在哺乳類中為主要適應酸逆境的重要所在。qRT-PCR的實驗中，我們檢測斑馬魚在酸處理各時段 (6、9、12、24、168小時) 的斑馬魚主要產氨組織 (鰓、肝、肌肉、腎) 中，進行*gls*和通道蛋白基因濃度測量，以此方式，得出斑馬魚在面對酸環境時，魚體開始產生排氨反應的時間點、最先開始應對的器官，與最先啟動的基因，在各器官的qRT-PCR結果圖中 (圖四~七)，我們能得知各種基因在酸處理之後的活躍情形，再搭配上斑馬魚排氨生理的表現 (圖八)，讓我們對於硬骨魚產氨與排氨的機制可以得出更多解析。

三、GLS細胞的啟動與功能

在哺乳類的文獻中，腎臟近曲小管中產氨與排氨的模型已被詳細記載 (Negiin Pourafshar et al., 2018)。以Glutamine 作為主要的氨原料，產氨作用在近曲小管細胞中被GLS進行，產生的氨再經由同一細胞的NHE3進行排除，總和上述，人類腎臟的產氨和排氨甚至於同一細胞中被完成。然而排氨的淡水硬骨魚，可能已經發展出了不同的機制，斑馬魚的產氨作用特別表現於不與外界環境相連的GLS細胞中 (圖八)，意味著產生出來氨得被運送到相鄰的NKA細胞中，以順利排出。在日本青鱈魚的研究中，可能的氨傳送路徑已經被描述 (Chuang et al., 2022)，氨可能經由氣態直接擴散或經由Rh蛋白運送到NKA細胞。

硬骨魚的酸鹼平衡機制中，GLS細胞的主要職責為產氨，是整個機制中最為重要的細胞，而在上述研究中我們觀察到，在6小時的酸處理下，鰓的GLS率先被刺激 (圖四)，也再次應證了我們想法。在血氨、排氨與qRT-PCR結果 (圖二~圖七) 中我們得知血氨濃度和排氨量與*gls*基因濃度呈現正相關，這也顯示了在GLS細胞啟動後，開始產氨進而使血氨濃度與排氨的上升，也可以說明GLS細胞的啟動，推動了酸逆境下整體排酸機制的作用。青鱈魚的研究中 (Chuang et al., 2022)，我們得知NKA細胞和GLS細胞具有十分精細的合作。這樣的合作機制，可能因為硬骨魚是排氨動物而被發展，也為青鱈魚及斑馬魚等硬骨魚類帶來優勢，可以更快更有效率的達到酸鹼平衡。

陸、結論

一、斑馬魚透過增加產氨及排氨適應淡水酸化

與先前對於青鱈魚的研究相同，斑馬魚在面對酸環境時，和青鱈魚一樣利用增加產氨與升高體內血氨濃度以應对外界環境的酸。

二、遇酸逆境時，斑馬魚可以透過產氨作用快速且即時的提高排氨與血氨濃度

在斑馬魚所有產氨器官(鰓、肝、肌肉、腎)中，如同青鱈魚，鰓在酸處理6小時後迅速的增加產氨以使血氨濃度上升和促進排氨。

三、鰓上GLS細胞是硬骨魚應對酸的重要關鍵

根據此次斑馬魚和先前對於青鱈魚的研究，我們推論鰓中的GLS細胞可能是淡水魚類應對淡水酸化的特有且重要的應對方式。利用GLS細胞促進排氨，又有*gls*基因調在多個器官的誘導展現了硬骨魚類適應酸性環境的優勢。

柒、未來展望

此次研究藉由斑馬魚，我們得以窺探硬骨魚類對抗水域酸化的獨特策略，未來研院，我們希望將研究中的實驗在各種魚類上進行探究，確定這樣獨特的機制保守地被所有硬骨魚類使用。再者，產氨作用是代謝的一環，產氨作用的刺激必定牽連著代謝被影響，因此硬骨魚在酸化環境下的代謝也是一個需要被解答的議題。以上資訊能夠對持續酸化的未來進行預測，先行發現對酸環境應對力不佳的魚類加以保護，以防止其滅絕的可能甚至保護生態的多樣性。最後，這項研究的起因是來源於世界各國工業化的空氣汙染，導致水域被不斷的酸化，我們用此方式得知人類活動對於地球生態與環境的影響，而魚類也是人類主要的蛋白質的來源，藉由此研究，我們能夠更了解人類活動與生態環境所產生的交互作用，並時刻提醒自己友善環境與其中的生物們。

捌、參考文獻資料

一、Chuang H.J., Chiu L., Yan J.J., Chang C.J., Tang Y.H., Chou M.Y., Yu H.T., Hwang P.P., (2023) Responses of medaka (*Oryzias latipes*) ammonia production and excretion to overcome acidified environments. Journal of Hazardous Materials 445:130539

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304389422023330#sec0100>

二、Tseng Y.C., Yan J.J., Fumiya Furukawa., Hwang P.P., (2020) Did Acidic Stress Resistance in Vertebrates Evolve as Na⁺/H⁺ Exchanger-Mediated Ammonia Excretion in Fish? Bioessays 42:5

<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/bies.201900161>

三、Takashi Yada., Fuminari Ito., (1998) Sexual Difference in Acid Tolerance in Medaka *Oryzias latipes*. Fisheries Science 386-0031

https://www.jstage.jst.go.jp/article/fishsci1994/64/5/64_5_694/_pdf

四、Hirata., Toyoji Kaneko., Toshihiro Ono., Takeru Nakazato., Norihisa Furukawa., Sanae Hasegawa., Shigeo Wakabayashi., Munekazu Shigekawa., Chang M.H., Michael F Romero., Shigehisa Hirose (2003) Mechanism of acid adaptation of a fish living in a pH 3.5 lake. Pubmed 284(5):R1199-212.

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12531781/>

五、Negiin Pourafshar., Shirin Pourafshar., Manoocher Soleimani (2018) Urine Ammonium, Metabolic Acidosis and Progression of Chronic Kidney Disease. Karger 138(3):222-228

<https://karger.com/nef/article/138/3/222/211920/Urine-Ammonium-Metabolic-Acidosis-and-Progression>

【評語】 050002

這項研究聚焦於斑馬魚 (Danio rerio) 在酸逆境下的適應機制，尤其是在氨的產生和排放方面，對於理解氣候變遷對水生生態系統的影響具有重要意義，並驗證在日本青鱈魚中發現的適應酸逆境的獨特機制，大多數研究通常著重於溫度或其他環境因素對生物的影響，這項研究特別關注於酸化環境對斑馬魚的影響，提供了環境酸化研究的新視角。

試驗建議：

1. 應於文獻中說明目前硬骨魚酸適應機制，突顯以斑馬魚探討酸逆境時的新穎性。
2. 除了酸度改變，實驗條件與自然環境的差異：實驗中人工設置的酸逆境條件可能與自然環境中的條件有所不同，這可能影響結果的外推性。
3. 長期影響的不確定性：研究可能未能充分考量長期酸逆境對斑馬魚或其他生物的影響，長期適應機制可能與短期反應有所不同。