

臺灣二〇〇三年國際科學展覽會

科 別：動物學

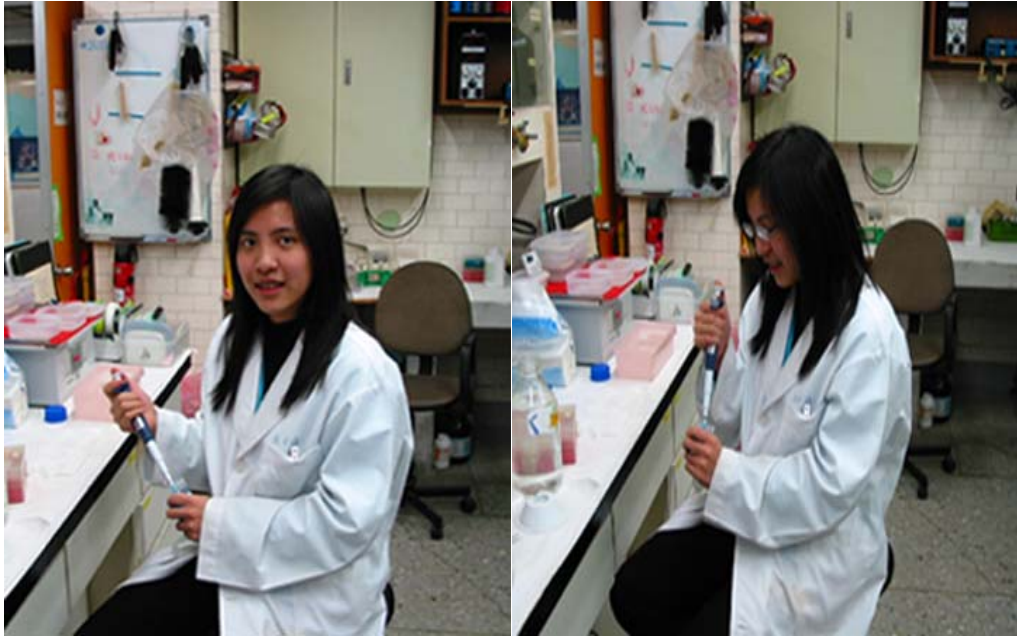
作品名稱：廣鹽性吳郭魚氯離子調節機制- - - NKCC 在氯細胞中扮演之角色

得獎獎項：動物學科第三名

學 校：臺北市立第一女子高級中學

作 者：林暉恩

作者簡介



我是個性格活潑充滿好奇心的女孩，興趣和嗜好更是廣泛，舉凡運動、音樂、閱讀等等，尤其喜愛在平凡的生活裡尋找一點新奇的事物，或許就因為從小爸媽常帶著我到處遊山玩水，所以對大自然有一份難以言喻的情感吧！此次能夠藉著實驗班的機會，順利進入實驗室認真探索這個迷人又蘊含許多奧秘的問題，永遠忘不了當中點點滴滴的歷程，不論歡笑、等待或是失落，我想都將替我的人生增添幾筆色彩，很高興自己的努力能被肯定，研究的日子不曾寂寞，那種大家就好像一家人般相互關心的感覺真的很棒，由衷感謝一路支持陪伴我的人，生物世界如此廣大，我又何其有幸能窺得一絲堂奧。

摘要

本實驗中我們利用廣鹽性吳郭魚進行氯離子調節機制的研究，探討廣鹽性吳郭魚如何能在不同環境中維持體內氯離子恆定，進而適應生存環境。我們想要探討：『是否 NKCC 這種蛋白質在淡水吳郭魚 MR 細胞中扮演吸收 Cl⁻的角色？如果是，吳郭魚又如何藉 NKCC 的調節適應環境中 Cl⁻的變化呢？』我們利用細胞免疫螢光染色法、西方墨點法和共軛焦顯微鏡觀察分析 NKCC 在不同 Cl⁻濃度人工淡水馴養的吳郭魚 MR 細胞上的表現量，結果發現 NKCC 分布於頂端細胞膜(又稱為細胞開口)，及其附近的細胞質內；環境中 Na⁺濃度的差異對 NKCC 在 MR 細胞上的表現影響不大，但低 Cl⁻環境馴養的吳郭魚，NKCC 表現量都高出其他組很多。顯示 NKCC 參與了氯吸收的機制。另一個實驗中，我們將吳郭魚由淡水中轉移至海水以分析它們在適應海水的過程中 NKCC 的表現變化。結果發現在馴養初期（16 小時內），圓點狀 NKCC 仍然可以在 MR 細胞的開口附近觀察到，但到了 24 小時後，NKCC 在開口的表現就明顯減少甚至消失，取而代之的是轉移到底側邊細胞膜上的 NKCC。此實驗證實了 NKCC 這一個與 Cl⁻運送相關的蛋白質，在廣鹽性吳郭魚氯離子調節中扮演了很重要的角色。

Abstract

Euryhaline tilapia (*Oreochromis mossambicus*) is capable of maintaining internal ion constant in either hypertonic or hypotonic environments (fresh water or seawater). MR cells in the gills of tilapia play critical role in absorbing Cl⁻ from fresh water or pumping redundant Cl⁻ from body fluid into seawater. Chloride transporter (NKCC) which distributed in basolateral membrane of MR cells is involved in Cl⁻ secretion of seawater teleost. However, the mechanism of Cl⁻ absorption in fresh water MR cells is still unclear. Whether NKCC is also involved in Cl⁻ absorption and how do tilapia regulate Cl⁻ absorption are the questions this study aim to answer. By using immunofluorescent staining, western blot, and confocal microscopy, the distribution and expression level of NKCC in fresh water MR cells were examined. We found that NKCC is distributed on the apical membrane of freshwater MR cells where is known to be the site for active Cl⁻ absorption of MR cells. We compared the expression level of NKCC in MR cells from tilapia acclimated in high, normal, and low Cl⁻ artificial water for 7 days. The results showed that NKCC is induced by ambient low Cl⁻, and in contrast suppressed by high Cl⁻ water, indicating NKCC might be involved in Cl⁻ absorption of freshwater MR cells and up- or down-regulated to maintain Cl⁻ uptake constant. In addition, we also examine the expression pattern of NKCC in MR cells from tilapia transferred from fresh water to seawater. Confocal images show that apical

expressed NKCC disappear gradually within 24h seawater acclimation and is substituted by basolateral expressed NKCC. This study provides a novel regulatory mechanism of NKCC in Cl^- transporter of MR cells.

壹、研究動機

大多數的魚都只能存活在一定鹽度範圍的環境之內(海水或淡水)，這類的魚稱為「狹鹽性魚類」；只有少數魚種能適應鹽度變化較大的環境(如：河口地區)，這類的「廣鹽性魚類」演化出獨特的能力以維持體內離子恆定。而他們藉由哪些機制來適應劇烈環境變化是我很感興趣的問題。因此我想利用廣鹽性吳郭魚進行氯離子調節機制的研究，探討廣鹽性魚類如何能在不同環境中維持體內氯離子恆定，進而適應生存環境。

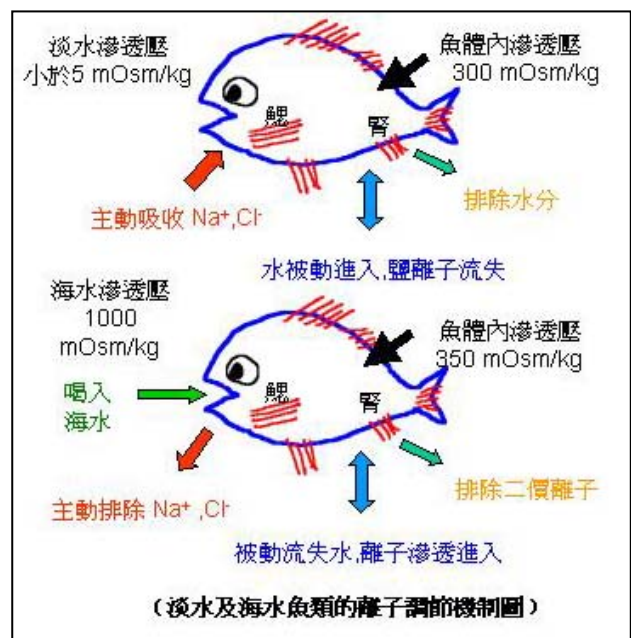
貳、研究目的

目前已知 NKCC 這種離子運輸蛋白在海水魚鰓上 MR 細胞中扮演排除 Cl^- 的角色，然而在淡水魚 MR 細胞中是藉由何種運輸蛋白來吸收 Cl^- 仍不清楚；前人的研究顯示，NKCC 在哺乳類的腎臟中位於細胞的頂端開口處，且參與 Cl^- 的再吸收作用，可將 Cl^- 主動吸收到細胞中，因此，本研究主要在探討：『是否 NKCC 在淡水吳郭魚 MR 細胞中也能扮演吸收 Cl^- 的角色？如果是的話，吳郭魚又如何藉 NKCC 的調節以適應環境中的 Cl^- 變化呢？』

參、文獻探討

(一) 廣鹽性魚類的離子調節

廣鹽性魚類為了適應淡水及海水等不同鹽度的環境，需要進行離子及滲透壓的調節以維持體內離子及滲透壓的恆定。在淡水環境中，由於魚體內滲透壓(約為 300 mOsm kg^{-1})高於外界，水分不斷進入體內，同時離子易流失到體外，所以需要不斷從鰓吸收水中離子(Na^+ 、 Cl^- 、 Ca^{2+} 為主)；相對地，在海水中滲透壓約為 $1000 \text{ mOsm kg}^{-1}$ ，遠高於魚



體內滲透壓 (350 mOsm kg^{-1})，因此會有過多的離子進入體內，同時流失水分，此時魚體除喝入大量海水以補充流失的水分外，鰓還會負責主動的排除體內過多的 Cl^- 及 Na^+ 等離子。由此可見，鰓除了呼吸作用外，在魚類滲透壓及離子調節過程中扮演了極重

要的作用 (黃仁德 2000; Evans 1979)。

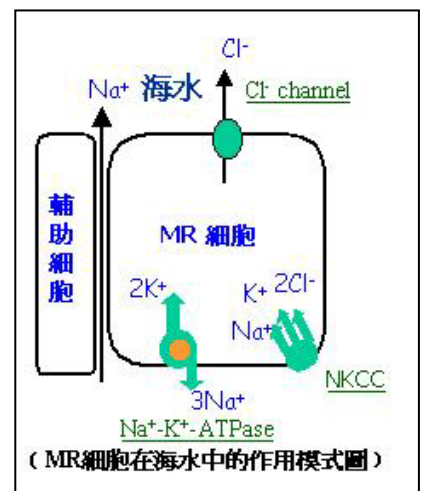
(二) 鰓上富含粒線體細胞的結構與功能

本實驗主要探討的富含粒線體細胞，簡稱 MR 細胞 (mitochondria-rich cell) 是魚類鰓表皮上進行離子與滲透壓調節的主要細胞。過去研究以穿透式電子顯微鏡 (TEM) 觀察 MR 細胞內的微細構造，其主要特徵如下：細胞質內佈滿豐富的粒線體，這也是 MR 細胞命名的由來；底側邊細胞膜 (basolateral membrane) 向內凹陷形成發達的微管系統 (tubular system)，此系統

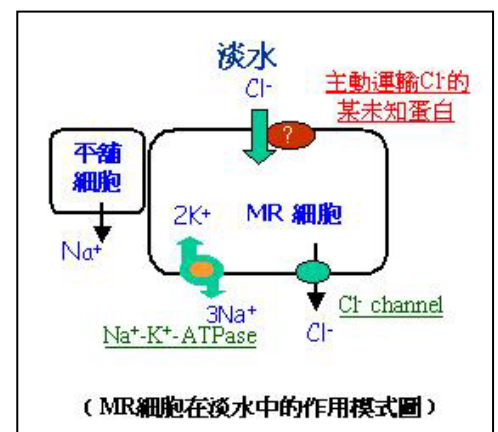


可增加與細胞質接觸的表面積以利於離子的運送；微管系統上分布許多的 Na⁺-K⁺-ATPase，可提供離子運送所需要的動力，也是 MR 細胞的重要特徵之一；此外頂端細胞膜又稱為細胞開口，特化出微絨毛，細胞藉由此處與外界環境接觸，進行離子吸收或排除 (李宗翰 1996; Perry and Laurent 1993)。

海水魚類的 MR 細胞主要負責排除體內過多的 Na⁺、Cl⁻，其作用機制是靠微管系統上分布的大量 Na⁺-K⁺-ATPase 主動的將 3 個 Na⁺ 排出細胞外，同時運送 2 個 K⁺ 進入細胞中，維持細胞內低 Na⁺ 高 K⁺ 的狀態，使細胞內帶負電，所造成的 Na⁺ 濃度梯度則可推動 Na⁺,K⁺,Cl⁻ 共同運輸蛋白 (簡稱為 NKCC) 用來運輸血漿中的 Cl⁻ 進入 MR 細胞內，以維



持細胞內較外界環境高的 Cl⁻ 濃度，過多的 Cl⁻ 再經由 MR 細胞開口的 Cl⁻ channel 送出細胞；在排 Cl⁻ 時，細胞頂端開口會帶負電，吸引組織中的 Na⁺ 經由輔助細胞和 MR 細胞的間隙 (paracellular pathway) 排出體外。這是目前被廣泛接受的離子排除機制 (馮馨慧



1999; Hwang 1988)。

相對的，淡水魚類的 MR 細胞主要負責吸收水中的離子進入體內。目前研究已知 MR 細胞在淡水中能夠吸收 Cl^- 及 Ca^{2+} ，而 Na^+ 的吸收是否也由 MR 細胞進行仍有爭論，也不是非常清楚其機制。(Perry 1997)但由於 MR 細胞能夠吸收 Cl^- ，從低濃度的淡水中往較高濃度的細胞內運送，所以許多學者推測淡水 MR 細胞的頂端細胞膜上至少有一種主動運輸蛋白能將 Cl^- 吸收入細胞內，再由底側邊膜上的 Cl^- channel 將 Cl^- 送入體內。此外 $\text{Na}^+-\text{K}^+-\text{ATPase}$ 在淡水魚 MR 細胞中也有大量的表現，然而其作用機制不是很清楚 (Perry 1997)。

(三) NKCC ($\text{Na}^+, \text{K}^+, \text{Cl}^-$ 共同運輸蛋白) 在 MR 細胞的研究

在哺乳類動物的研究中發現 NKCC 這種運輸蛋白是參與細胞 Cl^- 運送的一類重要蛋白質，NKCC 可大致分為二型：一型為吸收型，負責腎臟中 Cl^- 的再吸收作用，分布於腎臟上皮細胞的頂端細胞膜上；另一型為分泌型，負責 Cl^- 的排除，分布於腎臟、小腸及一些腺體中上皮細胞的底側邊細胞膜上 (Lytle 1995)。在魚類的研究中發現 NKCC 位於海水魚 MR 細胞底側邊細胞膜上，負責排除 Cl^- (Pelis et al. 2001; Pelis and McCormick 2001)；然而，NKCC 是否有吸收型表現在淡水魚 MR 細胞中，仍沒有被研究。

目前本研究的目的就是要探討『是否 NKCC 在淡水吳郭魚 MR 細胞中也能扮演吸收 Cl^- 的角色？如果是的話，吳郭魚又如何藉 NKCC 的調節以適應環境中的 Cl^- 變化呢？』

肆、材料與方法:

(一) 本實驗以廣鹽性的莫三比克吳郭魚(*Oreochromis mossambicus*)為實驗動物，因為吳郭魚易於在實驗室進行養殖、繁殖。此外，吳郭魚屬於廣鹽性魚類，能夠適應於海水及淡水中，適合進行滲透壓調節生理之研究。因此許多前人的研究以吳郭魚當材料，已有較多文獻可供參考。



廣鹽性吳郭魚成魚

(二) 實驗設計 (參考實驗設計流程圖)

實驗 1. 將吳郭魚馴養在各種不同 Na^+ 、 Cl^- 離子濃度的人工淡水中，藉以分析吳郭魚在面對環境裡 Na^+ 、 Cl^- 改變後，鰓上 MR 細胞的變異情形，再使用細胞

免疫螢光染色法標定鰓組織切片中 NKCC 之表現位置，並用共軛焦顯微鏡觀察分析 NKCC 是否表現於淡水 MR 細胞；同時亦可分析其表現的變化是否與環境中 Na^+ 、 Cl^- 濃度有關。此外，也採取不同 Cl^- 濃度馴養後吳郭魚的血液樣本測定其血清中的 Cl^- 濃度，藉以了解其適應 Cl^- 變化的能力。

實驗 2. 使用西方墨點法處理，分析鰓上皮細胞中 NKCC 表現量的變化，同時加以確定此蛋白質的分子特性，如分子量。

實驗 3. 將淡水吳郭魚直接轉移到 20‰海水中後，在適應海水的過程中進行採樣，再利用細胞免疫螢光染色，分析鰓上 NKCC 的表現變化，藉此以探討吳郭魚在海水適應的過程中 NKCC 所扮演的角色。

實驗 4. 利用免疫沉澱法將海水吳郭魚鰓組織中與 T4 抗體結合的蛋白質分離出來，以進行後續定序的工作。

(三) 吳郭魚的馴養

1、人工淡水馴養（實驗 1, 2）：

分別調配不同 Na^+ 、 Cl^- 離子濃度的人工淡水。a、b、c 組， $[\text{Na}^+]$ 一樣，可以比較 $[\text{Cl}^-]$ 改變的影響；再者 c、d、e 組， $[\text{Cl}^-]$ 相同，可以比較 $[\text{Na}^+]$ 改變的影響。馴養時在每個飼養箱中放入 20 升的人工水，及三隻 8~10cm 吳郭魚，水溫須控制在 26~28°C，馴養過程中不餵食以減少變因，並每隔一天換水一次，共養殖 7 天。

a 高鈉高氯水(H-Na-H-Cl): $[\text{Na}^+]=10 \text{ mM}$, $[\text{Cl}^-]=10 \text{ mM}$

b 高鈉低氯水(H-Na-L-Cl): $[\text{Na}^+]=10 \text{ mM}$, $[\text{Cl}^-]=0.005 \text{ mM}$

c 高鈉正常氯水(H-Na-N-Cl): $[\text{Na}^+]=10 \text{ mM}$, $[\text{Cl}^-]=0.5 \text{ mM}$

d 低鈉正常氯水(L-Na-N-Cl): $[\text{Na}^+]=0.005 \text{ mM}$, $[\text{Cl}^-]=0.5 \text{ mM}$

e 正常水(N-Na-N-Cl): $[\text{Na}^+]=0.5 \text{ mM}$, $[\text{Cl}^-]=0.5 \text{ mM}$

2、海水適應馴養（實驗 3）：

利用人工海鹽調配出 20‰鹽度的人工海水 60 升，經曝氣與過濾後，放 15 隻 8~10cm 淡水吳郭魚，在 4、8、16、24、48 小時後，各取出 3 隻進行實驗。

(四) 吳郭魚血清氯離子濃度之測定

將馴養魚由水箱中取出後，以 1ml 針筒抽取其尾動脈中的血液(約抽 100 μ l)。抽出的血液經離心後 (1200g, 2min)，取上清液，並以 RDW 稀釋。然後將 Cl⁻離子標準液以蒸餾水配製成各種濃度 (0、0.25、0.5、1、2ppm)，然後加入 Hg(SCN)₂ 的酒精溶液及 NH₄Fe(SO₄)₂ 的硝酸溶液，使其形成橙色錯合物，以分光光度計測量，繪製成標準線，再將血清加入同樣之溶液，依此標準線測定血清中 Cl⁻的濃度。

(五) 鰓組織冷凍切片

將組織輕微固定後，在低溫下進行切片，才能夠保留組織內蛋白質的特性，以利於免疫螢光染色中，抗體與抗原的結合。而切片的觀察有助於了解蛋白質在組織中的分布表現。首先採集魚的鰓組織，以 4%福



低溫冷凍切片機

馬林 (P4) 在 4°C 固定，再經過酒精、丙酮於 -20°C 固定並使得細胞膜通透，接下來就用冷凍包埋劑包埋鰓組織，使用冷凍切片機切出每片 15 μ m 厚度的組織標本，最後在載玻片上塗抹 poly-lysine，讓切片固定於玻片上。

(六) 細胞免疫螢光染色

由於抗體具有與專一性抗原結合的免疫特性，可對組織或細胞中特定的蛋白質進行標定，藉由抗體上所發出的螢光能在顯微鏡下觀察到所標定的蛋白質之表現訊號。此技術首先必須有專一的一級抗體，本實驗中所使用的 T4 和 Na⁺-K⁺-ATPase 多株一級抗體是能夠分別與 NKCC 和 Na⁺-K⁺-ATPase 結合的抗體，但這些一次抗體上並不帶有螢光，因此需要再藉由二次抗體的反應去標定使用的一級抗體。而二次抗體上能帶有不同顏色的螢光，亦可同時對兩種不同的一級抗體進行標定，也就是所謂的「雙重標定」。實驗過程即是為了同時標定 NKCC 和 Na⁺-K⁺-ATPase 兩種蛋白質以分析它們在組織上的分布。首先取鰓組織切片，先進行 NKCC 的標定。以一級抗體 T 4 與組織在室溫下進行反應 2 小時，再用二級抗體 goat anti-mouse conjugate FITC 或是 Texas Red 在室溫下和組織反應 1 小時。組織

在標定 NKCC 後可再利用一級抗體 ($\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ 多株抗體) 及二級抗體標定組織上的 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ ，進行雙重標定。

(七) 共軛焦點顯微鏡擷取影像

共軛焦點顯微鏡能夠以雷射激發組織切片上的螢光分子，同時對其螢光訊號進行數位化的擷取。利用此儀器可以將免疫染色後的標本進行影像的擷取，取得的影像以 Photoshop 軟體分析處理。



共軛焦顯微鏡

(八) 西方墨點法

利用抗體和抗原能專一性結合，去標定電泳膠上的特定蛋白質，稱為西方墨點法。其原理與免疫螢光染色法相近，不同之處在於必需將蛋白質由組織中萃取出來，以電泳分開不同分子量的蛋白質。再進行免疫反應以確定特定的蛋白質反應位置，藉此可以得知此蛋白質的分子量及其含量。首先配置 6% 的 SDS 電泳膠，將電泳膠裝置於直立式電泳槽上。把萃取自鰓上及組織的蛋白質注入電泳膠上。以 100 Volt 電壓使蛋白質在膠上依分子量跑開。跑開的電泳膠再置於轉移電泳槽上，通過電流使其上的蛋白質轉移到 PVDF 膜上，轉移後的 PVDF 膜就可以進行免疫標定。以 T4 為一級抗體反應 2 小時後，再以二級抗體反應 1 小時。二級抗體再經過 NBT 與 BGP 進行呈色反應，即可在 PVDF 膜上顯現出抗體反應的蛋白質。



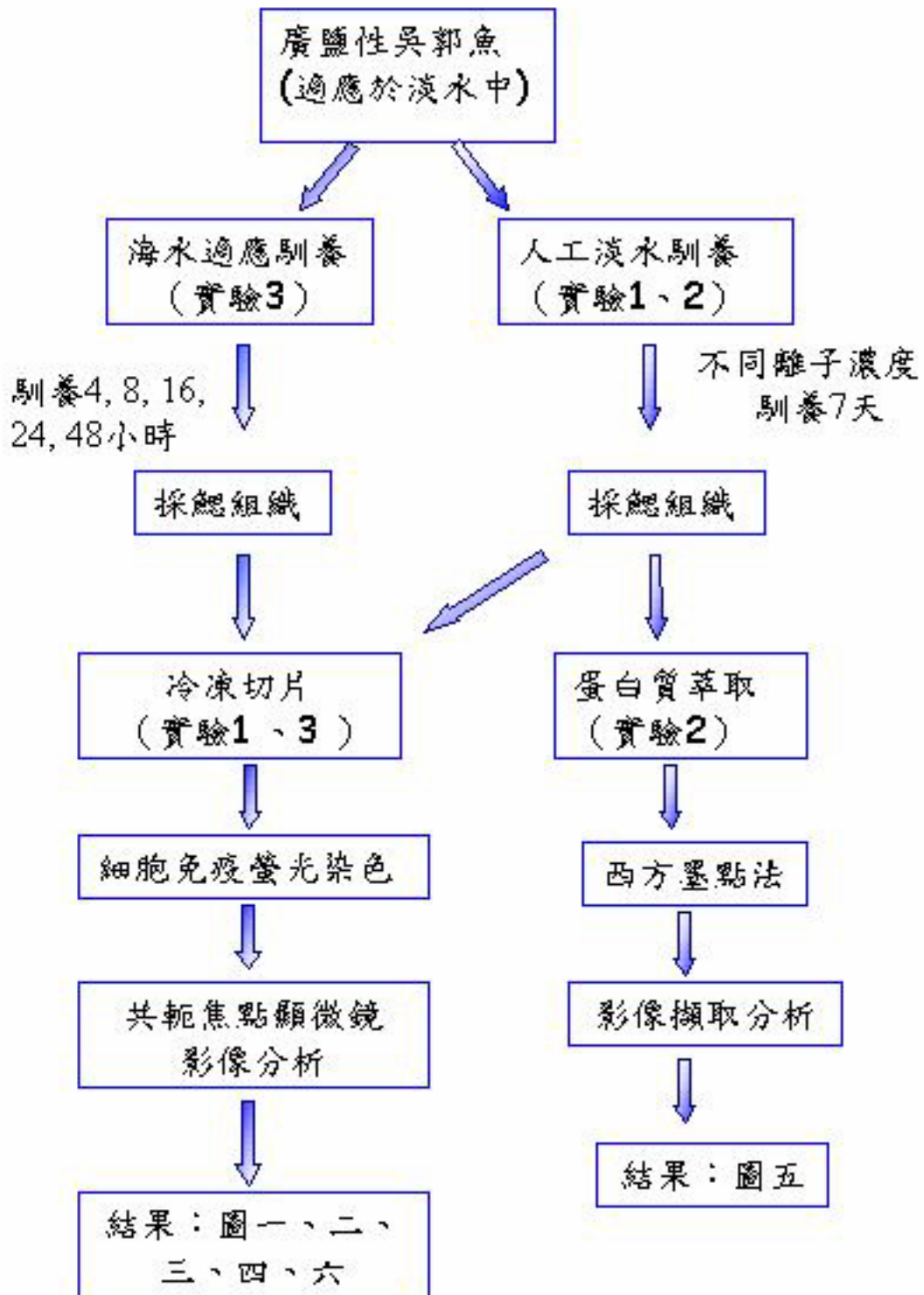
蛋白質電泳槽

(九) 免疫沉澱法

利用大分子的 "Sepharose-Protein G" 與 T4 抗體先進行結合反應，將由 gill 上萃取的蛋白質與 "Sepharose-Protein G-- T4" 的複合體進行反應，以將萃取出來的蛋白質結合到 T4 上，再利用離心的方法將與 T4 結合的蛋白質沉澱分析出來。接著將分離好的蛋白質進行西方墨點法，以 T4 進行免疫反應，確定分離出的蛋白質是與

T4 結合的蛋白質。首先在小離心管中加入 0.4ml 的”Sepharose-Protein G”，離心以分離上清液，保留 protein-G 在小試管中。加入 50 μ g T4 抗體至小試管中與 protein-G 結合，反應 30 min，再加入 500 μ l 的 PBS 清洗未結合的 T4 並分離出來。接著把由 gill 萃取出來的蛋白質加進小試管，在 4°C 中反應一個晚上，然後用 PBS 清洗掉沒有結合的蛋白質。把小試管中的物質離心後，加入 sample buffer 在 100°C 水中隔水加熱 10 min，最後將 sample 進行西方墨點法。

實驗設計流程圖



伍、研究結果

(一) 吳郭魚在人工水馴養過程中的觀察與血清 Cl 濃度的測定:

在吳郭魚馴養於各種人工水的過程中，不給予餵食以控制實驗的變因，而且

每隔一天換一次水以維持水中各離子濃度。七天的馴養過程裡，只有第一天及換水時，魚群會受到驚嚇而躲在水箱角落，此外，魚隻並無出現其他異常變化或死亡。馴養七天後，我們在不同 Cl 濃度處理組中，各取了四隻魚測定牠們血清中 Cl 濃度。結果(表一)顯示不同處理間沒有顯著差異，表示這些魚在不同 Cl 環境中也能夠適應良好，維持血液 Cl 濃度恆定。

表一、吳郭魚馴養於人工水 7 天後的血清 Cl 濃度 (mM)

人工水	血清 [Cl ⁻] (mM)	樣本數
H-Na-N-Cl	148.3 ± 9.4	(4)
H-Na-L-Cl	153.8 ± 7.6	(4)
H-Na-H-Cl	145.7 ± 15.4	(4)

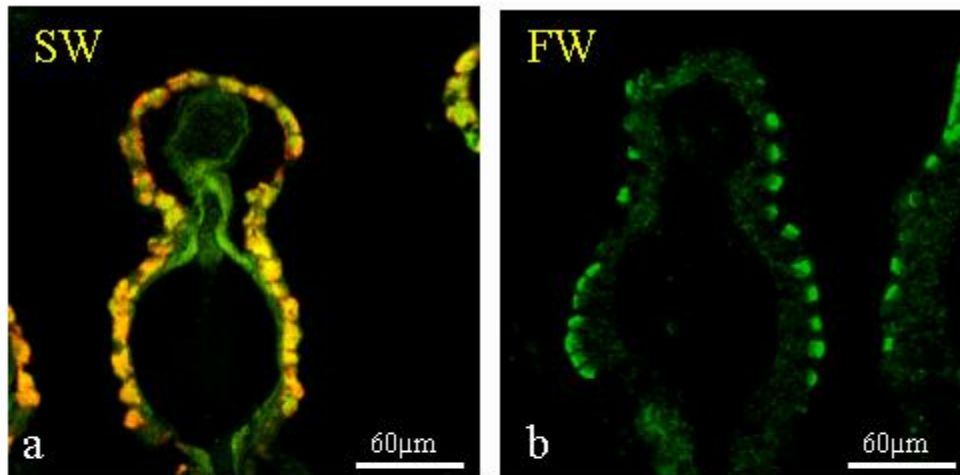
平均值±標準偏差，樣本數目為四，經過 One-way ANOVA 統計分析，三組間沒有統計上的差異。

(二) NKCC 在海水及淡水吳郭魚鰓上的分布比較:

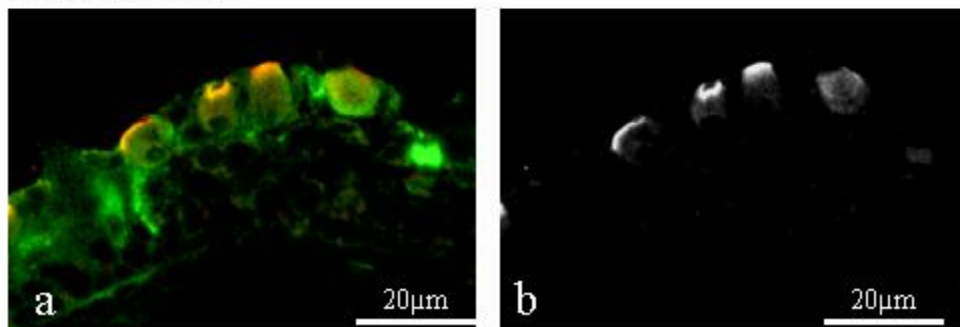
《圖一 a》是 NKCC 及 Na⁺-K⁺-ATPase 標定於海水吳郭魚的鰓組織切片。我們的處理是先以抗體去標定 MR 細胞上 Na⁺-K⁺-ATPase 的位置（綠色螢光）再用 T4 抗體進行雙重標定，結果發現標示出的 NKCC 蛋白質（紅色螢光）與 Na-K-ATPase 位置一致。紅色螢光是標定 NKCC 的分布，而綠色螢光標定了 Na⁺-K⁺-ATPase 的分布。我們發現，Na⁺-K⁺-ATPase 與 NKCC 的分布位置有重疊，所以會有黃色的訊號，而這些訊號也就是 MR 細胞的位置。因為 MR 細胞已知有大量 Na⁺-K⁺-ATPase 表現，所以我們可以判斷 NKCC 也是分布於海水 MR 細胞上。同時我們也用 T4 去標定馴養在淡水的吳郭魚的鰓組織切片（綠色螢光），發現它的表現位置與海水吳郭魚的切片有很大的不同，分布於偏向細胞開口的位置《圖一 b》。

為了確定這些 NKCC 是分布於 MR 細胞上，於是我們又作 Na⁺-K⁺-ATPase 的

雙重染色標定，結果很清楚的顯示 NKCC(紅色螢光)分布於 MR 細胞上(綠色螢光)，而且在高倍率(1000 倍)的觀察下可以很清楚的判斷其分布於頂端細胞膜(細胞開口)，及其附近的細胞質內《圖二》。



(圖一) NKCC在海水及淡水吳郭魚鰓切片上的分佈，圖a 為NKCC與Na-K-ATPase的雙重染色，NKCC與Na-K-ATPase的分佈有重疊。圖b 為NKCC之染色於淡水MR細胞上。

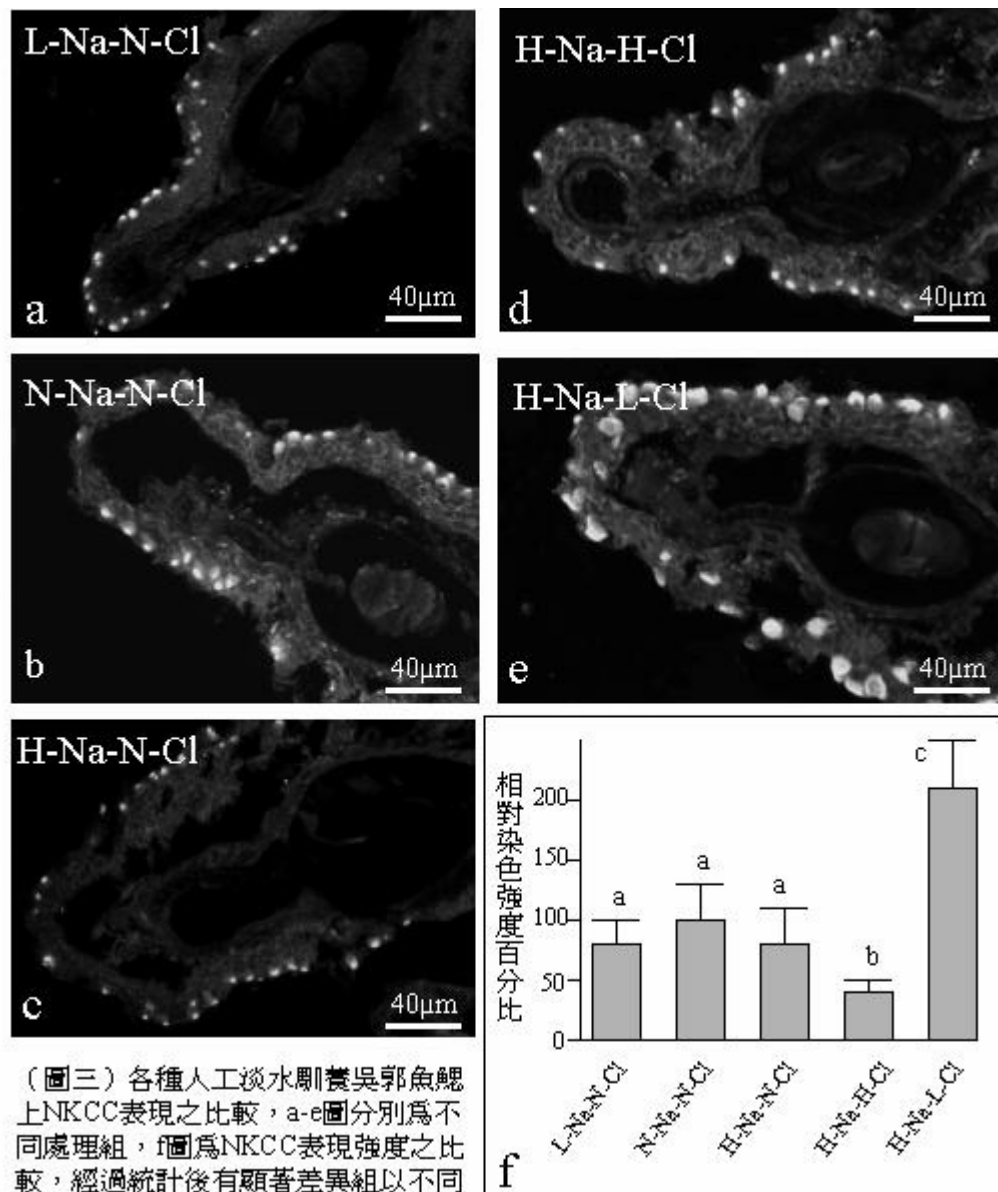


(圖二) NKCC在淡水吳郭魚鰓切片上的分佈，圖a 為NKCC與Na-K-ATPase的雙重染色，可以證明NKCC表現於淡水MR細胞頂端開口上。

(三) NKCC 在不同離子濃度人工水處理後的表現

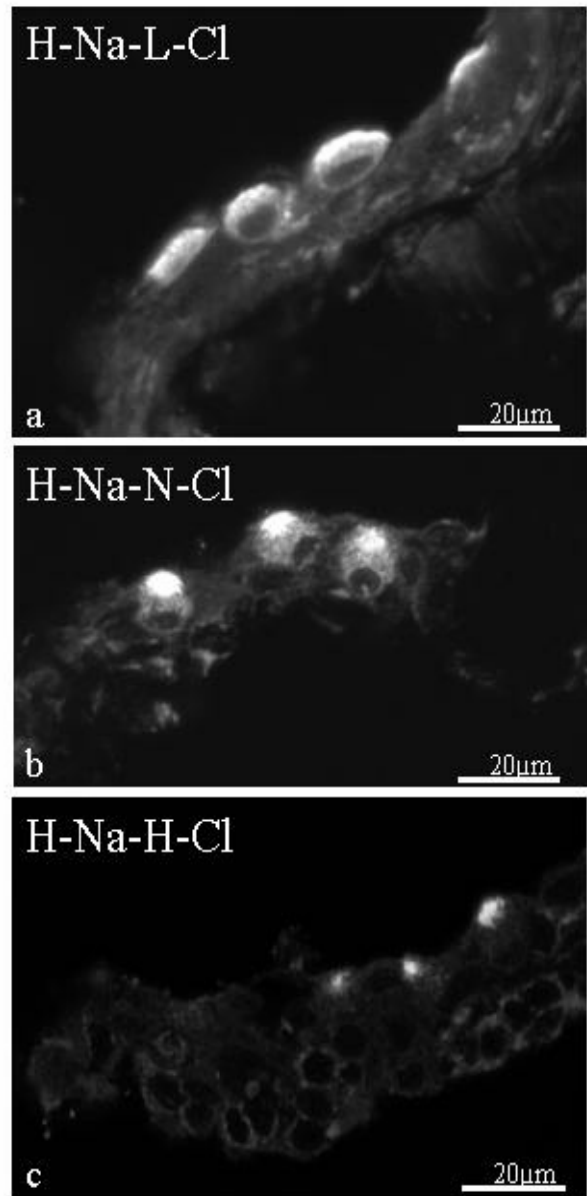
《圖三》、《圖四》是我們把吳郭魚養在五種不同的人工水中 7 天，之後作組織切片，利用 T4 抗體進行免疫螢光染色，標定 NKCC 的表現位置。我們先比較 L-Na-N-Cl 《圖三 a》、N-Na-N-Cl 《圖三 b》和 H-Na-N-Cl 《圖三 c》三種處理的結果（三組[Cl⁻]均為 0.5mM；[Na⁺]分別為 0.005，0.5，10 mM），結果發現染色的強度並沒有很明顯差別，表示環境中 Na⁺的濃度對 NKCC 在 MR 細胞上的表現影響不大。

接著我們比較 H-Na-N-Cl 《圖三 c》、H-Na-H-Cl 《圖三 d》和 H-Na-L-Cl 《圖三 e》三種處理的結果（三組 $[Na^+]$ 均為 10mM； $[Cl^-]$ 分別為 0.5，10，0.005mM），發現在 H-Na-L-Cl 的環境中 NKCC 的表現特別明顯《圖三 e、f》。<圖三 f>中我們將每一個影像中的 NKCC 訊號進行強度分析，並作成柱狀圖，以利比較。其中 H-Na-L-Cl 較其他組為高，而 H-Na-H-Cl 為低組。



同一切片組織 (H-Na-L-Cl) 利用高倍率觀察《圖四 a》，NKCC 除了很明顯表現在頂端開口之外，也有部分表現在細胞質中；相對地，在高倍率的 H-Na-H-Cl 組《圖四 c》則可發現表現的比其餘兩組微弱。

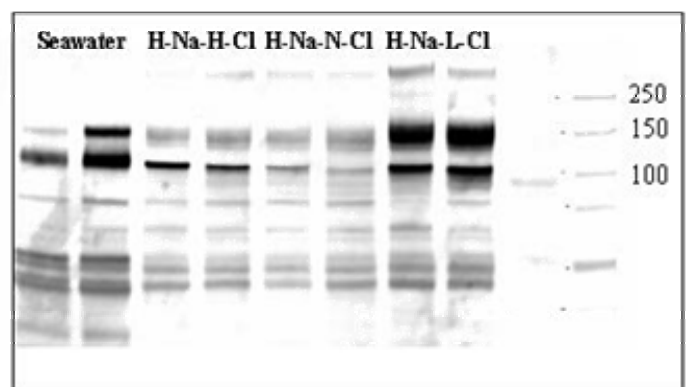
由此初步結果，我們可以判斷，環境中 Cl 的濃度會影響 NKCC 在 MR 細胞上的表現。當環境中 [Cl] 較低時，MR 細胞上 NKCC 表現會增加；相對的，環境中 [Cl] 增加時，NKCC 表現會下降。這意味著 NKCC 可能參與 Cl 的吸收，而吳郭魚在適應環境中氯離子的變動時會改變 MR 細胞開口上的 NKCC 表現量，以增加或降低其主動運送氯離子的效率。



(圖四) NKCC 在氯離子改變時的表現變化。圖 a 中當氯濃度較低時 NKCC 表現較多，相對的，當氯濃度較高時 NKCC 表現則較少。

(四) 西方墨點法測出的蛋白質表現量

用西方墨點法，我們發現 T4 抗體可以與鰓萃取蛋白質反應出兩個主要的蛋白質區域分別為 150 及 100 kDa。再比較不同處理組後，很明顯

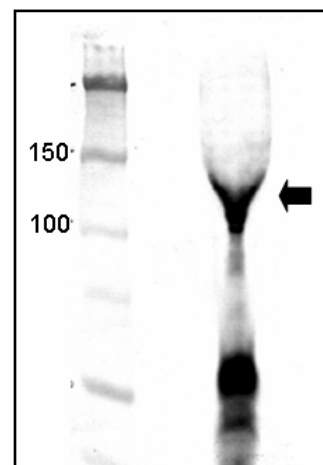


(圖五) 利用西方墨點法比較 NKCC 在不同氯離子處理組的表現

的可以發現 H-Na-L-Cl 組的表現量較其它組為高。而各種人工淡水組反應出的蛋白質區域與海水魚組的反應區域完全相同，顯示淡水與海水魚鰓上的 NKCC 是相同的蛋白質。

(五) 免疫沉澱法純化 NKCC

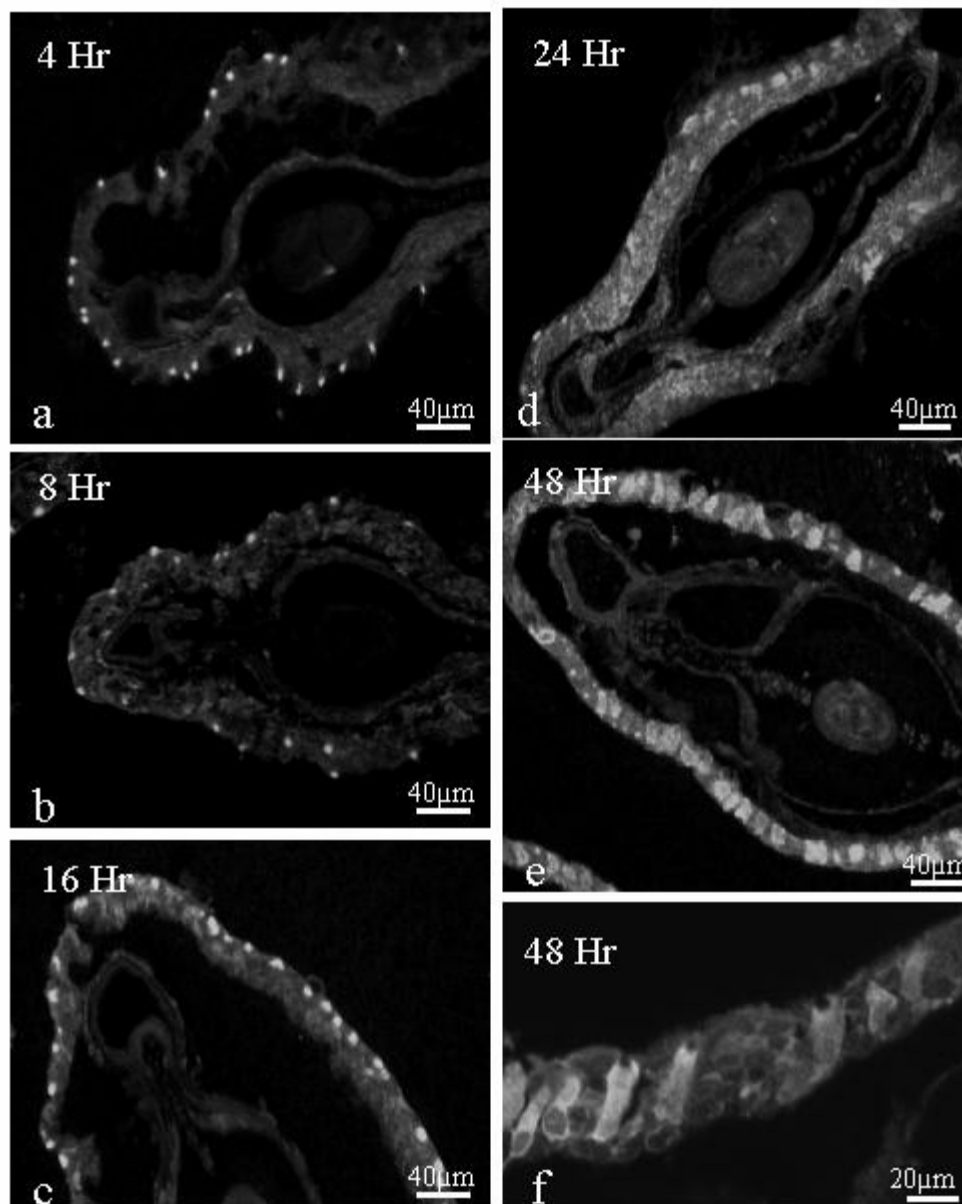
利用免疫沉澱法分離與 T4 結合的蛋白質，這些蛋白質經過西方墨點法可以在 PVDF 膜上顯現出與 T4 反映的區域，位置在 100~150 kDa (如右圖)。這些呈色的蛋白質就是與 T4 結合後被分離出來的 NKCC。



(六) NKCC 在海水適應過程中的變化

上述實驗中我們比較了 NKCC 在淡水和海水 MR 細胞上的分布，發現淡水 MR 細胞中 NKCC 分布於開口附近，而海水 MR 細胞中則是分布於底側邊膜上。因此在此實驗中，我們進一步將淡水吳郭魚轉移到海水中 4、8、16、24、48 小時後進行連續採樣，以分析 NKCC 在吳郭魚海水適應的過程中，表現位置的變化。

結果發現 (圖六)，在轉移到海水的初期(16 小時內)，NKCC 仍然可以在 MR 細胞的開口附近觀察到，而其表現的形狀為直徑 2~5 μ m 圓點。然而，在較長時間的海水適應後 (24 小時後)，這些圓點狀 NKCC 的表現就不容易在切片上觀測到。取而代之的是表現在 MR 細胞底側邊細胞膜上的 NKCC，顯示在此時 NKCC 的表現位置已經出現明顯的變化 (圖六)。



(圖六) 吳郭魚由淡水轉移至海水中48小時內鰓上NKCC的表現變化。在轉移16小時內，NKCC都有表現於頂端開口上，24小時後則由底側邊細胞膜上的NKCC所取代。48小時後已經表現出海水MR細胞的特性。

陸、討論

我們利用細胞免疫螢光染色標定 NKCC 在吳郭魚鰓上的表現位置。結果發現，NKCC 均勻的表現在海水 MR 細胞的底側邊細胞膜上，與前人在鮭魚的研究結果吻合 (Pelis et al. 2001)；但是最重要的是我們發現它在淡水吳郭魚鰓上則是表現在頂端細胞膜上，這是到目前還沒有研究指出的。而且 NKCC 表現的強度會受到水中 Cl^- 濃度的影響，顯示這個運輸蛋白與吳郭魚在淡水中吸收 Cl^- 的機制有直接關聯。此外，利用海水轉移模擬吳郭魚面

臨鹽度增加環境時，我們發現 NKCC 的表現在 24 小時後出現了顯著的變化，也就是由頂端細胞膜的表現轉變為底側邊細胞膜的表現。顯示 NKCC 這一個與 Cl 運送相關的蛋白質，在廣鹽性吳郭魚滲透壓與氯離子中扮演很重要的角色。藉由其在 MR 細胞中表現位置的不同，它就可以執行 Cl 吸收或是排出的功能。在淡水的環境中 NKCC 表現在頂端細胞膜，將環境中的 Cl 運送入細胞內，相對的，在海水環境中，NKCC 則表現在底側邊細胞膜上，將魚體內過多的 Cl 吸收到 MR 細胞中，再送出體外。

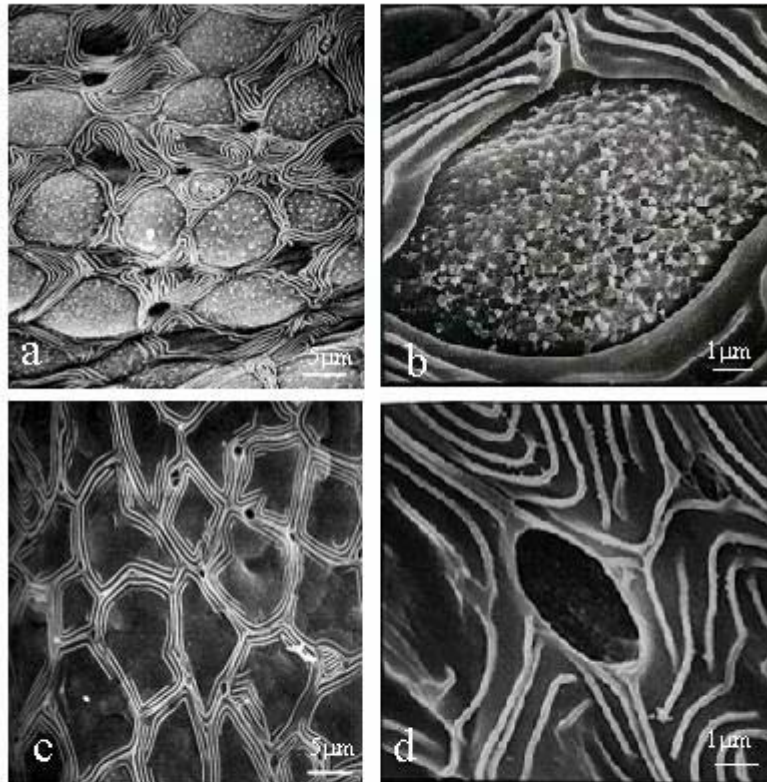
在人工淡水的馴養實驗中，我們分別改變水中的 Na⁺或 Cl 濃度，再分析 NKCC 的表現變化。我們發現當 Cl 濃度較低時，NKCC 的表現會大量增加，而且表現在頂端細胞膜上及附近的細胞質中，這顯示吳郭魚在面臨環境中 Cl 降低時，會向上調節(up-regulation) NKCC 表現，以增進其吸收 Cl 的效率。換言之，當環境中 Cl 濃度增高時，NKCC 表現則會向下調節(down-regulation)，只有在細胞開口處表現，細胞質中則表現很少。這種調節性的生理變化，反應了 NKCC 在淡水吳郭魚中與吸收 Cl 的機制是有關聯性的。

而利用西方墨點法，我們發現 T4 抗體可以與鰓萃取蛋白質反應出兩個主要的蛋白質區域分別為 150 及 100 kDa。過去文獻發現 NKCC 為醣蛋白，因此有不同程度的分子量會存在於細胞中，去除醣基後的 NKCC 分子量約為 100-130 kDa，而帶有醣基的分子量則在 150-200 kDa (Lytle et al. 1995; Pelis et al.2001)。因此與我們的結果相當符合。在比較不同處理組後，很明顯的可以發現 H-Na-L-Cl 組的表現量較其它組為高。這結果與細胞免疫染色所標定的蛋白質是符合的，也就更進一步可以證實 NKCC 是我們所標定到的蛋白質。

爲了要將吳郭魚 gill 上的 NKCC 蛋白質進行定序的工作，以了解此一蛋白質是否與人類的 NKCC 蛋白質相似，並進一步的確認本實驗中所用的 T4 抗體確實與吳郭魚的 NKCC 有所反應。我們利用免疫沉澱法試圖將與 T4 抗體結合的蛋白質由吳郭魚的鰓組織中分離出來，以進行後續的研究工作。本實驗進行到此步驟，已經能夠成功的將吳郭魚鰓上與 T4 抗體結合的蛋白質分離出來，這將對未來的研究有所幫助。

過去的研究學者(李宗翰 1996; Lin and Hwang 2001; Chang et al. 2001)利用掃描式電子顯微鏡觀察淡水吳郭魚鰓表面 MR 細胞開口時發現，當環境中 Cl 較低時，MR 細胞開口會呈現凸起型(圖七 a、b)，而且直徑可達 10 μ m 以上，其上分布絨毛狀突起。相對的當

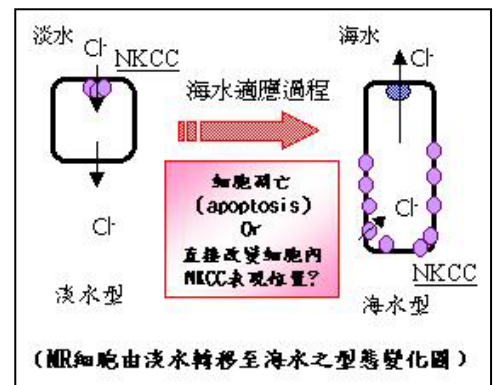
環境中 Cl 較高時，這種凸起型則會消失，取而代之的是向內凹陷的深洞型開口，這種開口直徑只有 2~4 μm ，沒有絨毛狀突起(圖七 c、d)。他們推測這兩種不同的細胞開口，分別代表離子運送效率較高(突起型)，與較低(深洞型)的 MR 細胞。因為較大的開口可以提供較大的表面積以及較多的運送蛋白進行離子的吸收。而在我們的實驗中，發現低 Cl 水馴養的吳郭魚也是有呈現出突起型的 MR 細胞開口(由免疫染色的切片上可以判斷)，並且其上也分布較多的 NKCC，相較之下，高 Cl 水中馴養的吳郭魚，MR 細胞則只有出現較少 NKCC 表現的深洞型細胞開口(2-4 μm 的圓點)。這個結果不但符合了前人的推論，同時我們又進一步的提出直接證據去證實此項論點。



(圖七)淡水吳郭魚鰓上MR細胞的型態變化，圖a,b為馴養於低氯人工水中的MR細胞開口，型態為向外突出的突起型。圖c,d則為馴養於高氯水中的MR細胞開口，型態為向內凹陷的深洞型。

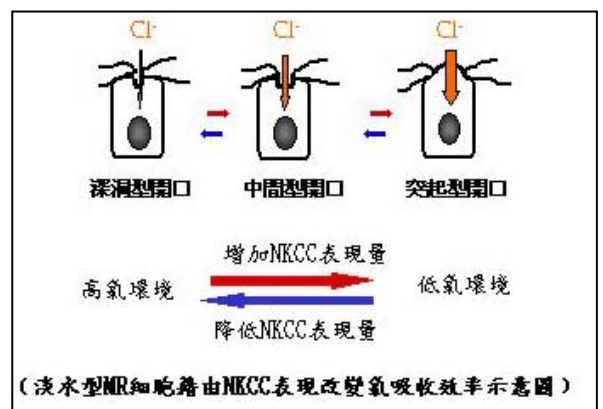
(此圖引用自 Chang et al. 2001)

這個研究的另一重要結果是我們記錄了吳郭魚由淡水轉移到海水環境後，MR 細胞中 NKCC 的表現變化。過去研究清楚指出，淡水與海水 MR 細胞具備不同的離子運送功能，前者為吸收離子，後者為排除離子。除了功能的差異外，這兩種細胞在型態上也有些差異，淡水型細胞較小且圓，管狀系統較不發達，海水型細胞較大並呈現長柱型狀，管狀系統較為發達 (Perry 1997)。然而對此兩種細胞在海水適應過程中的消長關係並不是很清楚，是否淡水型 MR 細胞能夠在海水適應的過程裡，轉變為海水型細胞也仍不是非常明確。在本實驗中，我們利用標定 NKCC 分析吳郭魚在海水適應過程中的表現變化，發現 NKCC 在細胞開口的表現 24 小時後已經有很明顯的減少，且此時 MR 細胞中 NKCC 的表現強度也有明顯之增加（轉移到底側邊細胞膜上）。而在 48 小時後，則完全沒有觀察到 NKCC 在細胞開口的表現，同時 MR 細胞中的表現已明顯較其他細胞為高。這個結果顯示，淡水型 MR 細胞(NKCC 表現開口)會在海水轉移 24 小時後消失，取而代之的是海水型的細胞。然而，要知道這些淡水 MR 細胞是經由細胞自裁 (apoptosis) 後消失，或是直接改變細胞內 NKCC 的表現位置以轉型為海水 MR 細胞，仍需要更進一步的研究。



柒、結論

廣鹽性的吳郭魚藉由鰓上的 MR 細胞進行離子調節以適應生存環境中的離子變化。我們發現 NKCC 這個蛋白質在 MR 細胞上扮演了調節氯的重要角色。尤其是在淡水 MR 細胞上，NKCC 可能參與了氯的吸收，這是以前的研究學者未曾提出的發現。藉由改變在細胞上的分布位置及表現量的多寡，MR 細胞能夠執行氯吸收或排除的功能。這種調節機制提供廣鹽性魚類適應環境離子變化的能力。



捌、參考文獻

- 1.李宗翰·1996·吳郭魚鰓表皮 MR 細胞的型態與功能研究·國立台灣大學動物學研究所博士論文。
- 2.馮馨慧·1999· $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ α 次單元在吳郭魚滲透壓調節中的角色：mRNA 和蛋白質的表現·國立台灣大學漁業科學研究所碩士論文。
- 3.黃仁德·2000·吳郭魚仔魚在海水適應過程中氯離子之調控·國立台灣大學漁業科學研究所碩士論文。
- 4.Chang, I. C., Lee, T. H., Yang, C. H., Wei, Y. Y., Chou, F.I., Hwang, P. P. 2001. Morphology and function of gill mitochondria-rich cells in fish acclimated to different environments. *Physiol. Biochem. Zool.* 74:111-119.
- 5.Evans, D. H. 1979. Fish. In: *Comparative physiology of osmoregulation in animals*, Vol. 1. pp. 305-390. Edited by Maloiy, G. M. O..Academic Press, London,
- 6.Hwang, P. P. 1988. Multicellular complex of chloride cells in the gills of freshwater teleosts. *J. Morphol.* 196: 15-22.
- 7.Lin, L.Y., Hwang, P. P. 2001. Modification of morphology and function of integument mitochondria-rich cells in tilapia larvae (*Oreochromis mossambicus*) acclimated to ambient chloride levels. *Physiol. Biochem. Zool.* 74: 469-476.
- 8.Lytle, C., Xu, J. C., Biemesderfer, D., and Forbush, B. 1995. Distribution and diversity of $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-Cl}^-$ cotransport proteins: a study with monoclonal antibodies. *Am. J. Physiol.* 269 : C1496-C1505.
- 9.Perry, S. F. and Laurent, P. 1993. Environmental effects on fish gill structure function. In: *Fish Ecophysiology*. pp. 231-263. Edited by J. C. Rankin and F. B. Jensen. Chapman and Hall, London.
- 10.Perry, S. F. 1997. The chloride cell: structure and function in the gills of freshwater fishes. *Annu. Rev. Physiol.* 59:325-47.
- 11.Pelis, R. M., Zydlewski, J.and, McCormick, S. D. 2001. Gill $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$ cotransporter

abundance and location in Atlantic salmon: effects of seawater and smolting. *Am. J. Physiol.* 280: R1844-1852.

12. Pelis, R. M., and McCormick, S. D. 2001. Effects of growth hormone and cortisol on $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - 2\text{Cl}^-$ cotransporter localization and abundance in the gills of Atlantic salmon. *Gen. Comp. Endocrinol.* 124:134-43.

評語

本作品針對吳郭魚的滲透壓的調節進行探討，研究之規劃及實驗之進行皆有良好的表現。本作品應是指導教授多年研究成果之一部分，如果作者能在從指導教授的成果中找出更能切入的點，會有更多意想不到的發現。