

2017 年臺灣國際科學展覽會 優勝作品專輯

作品編號 050012
參展科別 動物學
作品名稱 內皮素對稻田魚(*Oryzias latipes*)胚胎適應
酸環境之調節
得獎獎項 大會獎：三等獎

就讀學校 臺北市立第一女子高級中學
指導教師 陳怡旻、黃鵬鵬
作者姓名 鄭安琪、陳韻如

關鍵字 內皮素、稻田魚、酸調節

作者簡介



陳韻如(左)

我是陳韻如，我覺得我很幸運在上高中以來經歷了許多和別人不一樣的體驗，從進入北一女中的數理資優班、選擇生物做為專研主題、在中研院的實驗室做專研到參加這次的國際科展，都為我的人生增添許多色彩，尤其是在實驗室做專研，從採集蛋到操作許多精密儀器，都是十分難得的經歷，而我也樂在其中。我自認自己是個執著的人，從小我對於喜歡的事物總會抱著一股熱情執著到底，而我也非常喜歡生物和我們的專研，因此對於這份專題，我也會抱著最大的熱情，努力把它做好。

鄭安琪(右)

我是鄭安琪～對於探索動物的世界與生物的奧妙自小就抱著高度的熱忱，並對實驗室裡的工作懷著憧憬。目前就讀北一女中數理資優班三年級的我，有幸參與中研院生命科學人才培育計畫，開啟我實現夢想的扉頁。前年寒假，感謝黃鵬鵬教授給予我們如此特別的機會進入實驗室做我們喜愛的專題研究，在學長姊們的帶領之下，我們體驗了不同於一般高中課程的實驗室生活，從精密的儀器、專業的魚房到實驗的操作與設計，都使我為之驚艷、讚嘆不已！謝謝國際科展提供交流和觀摩的機會拓展我的視野，我們會保有對研究的熱情繼續努力！！！！

摘要

哺乳類的內皮素(**endothelin-1 ; EDN1**)與其受體 **endothelin receptor B** 已知可共同參與腎臟排酸功能之調節，在魚類的表現上，亦有研究指出 **EDN1** 會影響到斑馬魚的排酸。本研究中以廣鹽性魚種稻田魚(*Oryzias latipes*)仔魚為實驗對象，經 6 小時以上時間酸處理後其體表排酸量皆顯著增強，且經 6 小時酸處理後，仔魚 **rhcg1** 及內皮素受體 **EDNRA2** 的基因表現量也顯著增加，並發現當弱化(**knockdown**)仔魚的 **endothelin-1** 基因後，其體表排酸量顯著下降，證實 **endothelin-1** 對仔魚排酸作用有直接的影響。而當仔魚 **endothelin-1** 的基因表現被抑制後，其離子細胞密度以及離子通道蛋白基因表現不受影響，推測內皮素並非以增加離子細胞的方式影響排酸，而是藉由轉譯後調控途徑，使其排酸功能增強。另外本研究中再將 6 小時及 7 天酸處理實驗結果比對後，推測當稻田魚仔魚面臨短期或長期酸環境刺激時，內皮素調節機制亦略有不同。

Abstract

In aquaculture ponds, fish feces cause environmental acidification. Also, acid rain and other industrial pollution result in more comprehensive and serious acidification. To study how fish develop acclimation mechanisms not only is a scientifically important topic but also provides basic information for improvement of aquaculture operation and environmental assessment. We studied the mechanisms of H⁺ secretion in medaka, one type of euryhaline fish which possess several advantages as an experimental organism, including the applicability of molecular tools, ease of in vivo cellular observation and functional analysis, and rapid embryonic development. Endothelin-1 has recently emerged as a critical factor for acid-base regulation by the mammalian kidney, through a mechanism mediated primarily via endothelin receptor B. Therefore, we were searching for the pathways of endothelin controlling the H⁺ secretion regulatory mechanisms.

The study indicated that the H⁺ secretion in embryos of medaka were up-regulated after exposure to acidic water (pH4.5) for more than 6 hours. In the real-time quantitative PCR analysis, the gene of Rhcg1 and Endothelin receptor A2 were significantly higher than the control group. In addition, in comparison with the 7-day acclimated embryos, we discovered that it was not the endothelin receptor A2 but that increased endothelin-1, endothelin-2, endothelin receptor B1 and endothelin receptor B2 increased significantly. This finding suggested that there were differences between the short-term and long-term regulation of H⁺ secretion in medaka. On the other hand, knockdown of *edn1* decreased H⁺ secretion in 7-dpf embryos, suggesting that endothelin is a crucial factor as medaka adapts to the acidification of environment. However, knockdown of *edn1* did not affect the level of transporter genes mRNA and the cell density of ionocytes, which implied that Endothelin influences the regulation of H⁺ secretion by post-translational modification.

壹、研究動機

一. 研究動機

自工業革命後，由於人類大量燃燒石化燃料，使得大氣中的二氧化碳含量上升，進而造成海洋中二氧化碳濃度的提高以及酸雨的形成，引起水域環境酸鹼值降低，另一方面，隨著水產養殖技術的發達，高集約養殖造成水中累積大量有機酸，水中的酸鹼值可能降至 pH4 甚至更低。這讓我們不禁好奇當一場突如其來的酸雨落下，魚類在面臨水中酸鹼值急遽降低的同時，牠們究竟是如何調節呢？我們聯想到高中選修生物下冊——排泄作用介紹了動物體內的酸鹼調節，另外高中選修生物下冊——激素的功能更提到神經內分泌系統為感受體外環境變化並啟動體內生理反應的重要媒介，然而其在魚類酸鹼適應中的調節角色尚未完全釐清。由於稻田魚(*Oryzias latipes*)在分子生物學、發育學及基因體學資訊上另有研究優勢，以及其離子細胞模型與相關調控機制亦已有完整的研究，因此本研究利用探討稻田魚在面臨酸環境下的分子生理學變化，找出可能與魚類的酸性調節有關的機制。另外，藉由研究身為廣鹽性魚類的稻田魚的排酸機制，進而推廣至因海洋酸化而深受影響的海水魚類，我們期待能透過探索稻田魚排酸的相關調控機制，有望作為育種選拔、養殖策略及生態保育上的參考依據。

二、研究背景

(一) 實驗動物

稻田魚(*Oryzias latipes*)(圖一)又稱為青鱗魚(medaka)，為廣鹽性魚類，主要分布在臺灣、日本、東亞大陸，稻田魚(*Oryzias latipes*)在分子生物學、發育學、基因體學以及其離子細胞模型與相關調控機制皆已有完整的研究，其優勢整理如下：

- 1、基因資料庫完整
- 2、其生殖特性便於實驗操作，母魚的產卵時段能藉由光照長短控制，魚卵及仔魚皆為透明，方便觀察。魚卵易採集，且其魚卵 7 天即孵化。



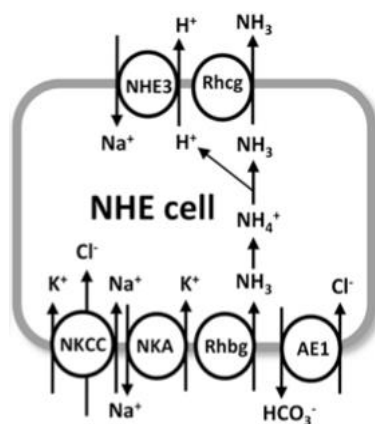
圖一、稻田魚(*Oryzias latipes*)
a.成魚 b.卵

3、在基因過度表現實驗、反義嗎啉寡核苷酸(antisense morpholino oligonucleotide；antisense MO)基因失活實驗、基因轉殖魚等方面已有前人的相關研究(Briggs, 2002；Cheng 等人，2004)。

4、稻田魚成魚鰓上及胚胎皮膚上的離子細胞模型與相關調控機制經一系列的分子生理學實驗，目前已知在稻田魚(*Oryzias latipes*)中主要存在的離子細胞分別為 ECaC 細胞、NCC 細胞、NHE 細胞等 (Hsu 等人，2014)。

(二) 稻田魚(*Oryzias latipes*)的排酸機制

稻田魚(*Oryzias latipes*)的氫離子排出主要經由鰓(成魚)或卵黃囊(仔魚)上 NHE 細胞上的鈉氫交換蛋白(Na^+/H^+ exchanger)所執行。氫離子的排出作用也受氨通道蛋白(Rh protein)的影響，當氨通道蛋白排出氨的同時會促使氫離子排出，以維持外界氨的低濃度，利於氨的擴散作用(圖二)。



圖二、稻田魚的排酸細胞作用機轉(Hsu 等人，2014)

(三) 內皮素(Endothelin)

內皮素是一種由 21 個氨基酸所組成的胜肽、屬於非固醇類激素，主要由血管內皮細胞產生，但其他如上皮細胞、神經元細胞、平滑肌細胞、腎間質細胞、網狀內皮細胞、單核球及多形核白血球細胞、造骨細胞、及副甲狀腺細胞等也會產生內皮素。而在人類各種體液中，以乳汁中之內皮素濃度最高，其次為尿液、唾液、血漿、脊髓液。內皮素所具有的功能包含：透過細胞內鈣離子與鉀離子的進出控制平滑肌收縮與舒張、活化激酶(Protein Kinase C)促進 DNA 合成及細胞分裂、做為腸激素調節動物腸子生理功能、作為人體之中樞神經系統中的神經傳導物質及神經修飾物等。目前內皮素在稻田魚中已知有 3 種異構物：

Endothelin-1(EDN1)、Endothelin-2(EDN2)、Endothelin-3(EDN3)以及 5 種不同亞型之受體：Endothelin receptor(EDNR)、Endothelin receptor typeA1(EDNRA1)、Endothelin receptor

typeA2(EDNRA2)、Endothelin receptor typeB1(EDNRB1)、Endothelin receptor typeB2(EDNRB2)。

(四) 內皮素與排酸作用

在哺乳類中已有多篇研究指出內皮素(endothelin-1 ; EDN1)與腎臟的排酸功能有關。Laghmani 等人(2001)發現餵食弱酸飲水之小鼠其腎臟之 prepro endothelin-1 mRNA 表現量顯著增加，且腎臟中 NHE3 活性亦增加 42~46%，而 Endothelin receptor B 基因剔除小鼠之 NHE3 活性無顯著改變。注射 EDN1 也使得兔子腎臟皮質中 NHE3 活性顯著提高(Somchai 等人，1992)。另外，在硬骨魚方面，斑馬魚經酸性水馴養，其體內 EDN1 與其中之受體 EDNRA1 表現量增加，且將斑馬魚 *edn1* 過量表現後造成其體表排酸量提高(Guh 等人 2014)。

貳、研究目的及研究問題

- 一、內皮素是否參與稻田魚(*Oryzias latipes*)之排酸作用，如果有，與何型內皮素及內皮素受體有關？
- 二、內皮素對稻田魚(*Oryzias latipes*)面臨酸性刺激之適應調節及其可能之機制為何？

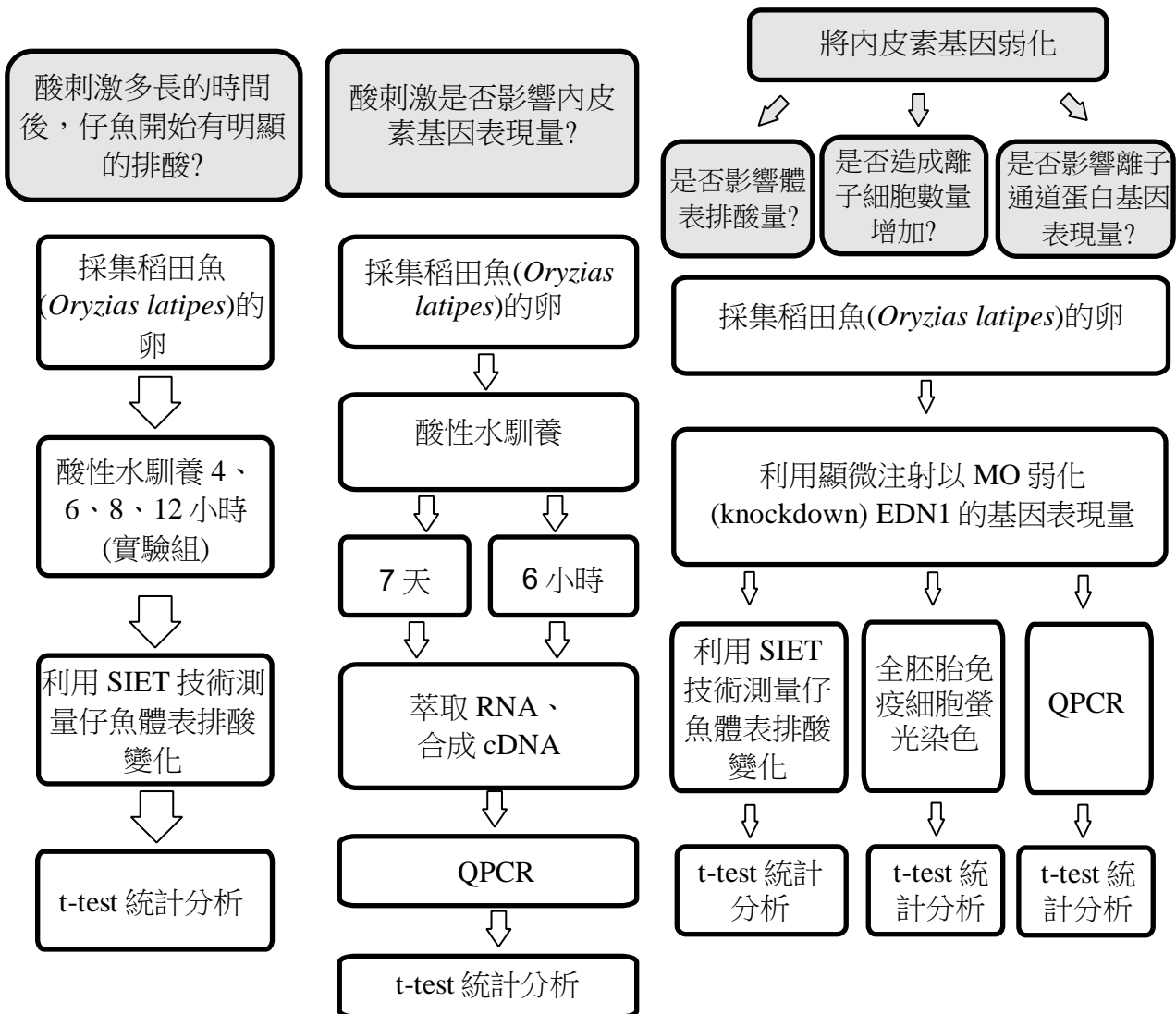
參、研究設備及器材

2720 Thermal Cycler、IM 300 Microinjector、Ion/Polarographic Amplifier、LightCycler 480

II、Nanodrop、pH 檢測儀器、TissueLyser II、離心機

肆、研究過程或方法

實驗流程圖：



一、酸性水馴養

我們將採收到的卵飼養在 28°C 曝氣水中，並每天換水兩次，以下稱稻田魚(*Oryzias latipes*)剛孵化的魚為仔魚。

我們將其分為長時間與短時間馴養：

- (一) 長時間：在將魚卵收集後分為實驗組與對照組，並立刻把實驗組馴養於 pH4.5(以硫酸稀釋至 pH4.5)的水中，待其約 7 天後孵化。
- (二) 短時間：待飼養於曝氣水中的魚卵受精後第 6 天時(dpf)，利用砂紙摩擦去除卵表面的纖毛及污物，浸泡 pronase 並放置於 28 度培養箱 50 分鐘使卵殼產生破洞，再經由孵

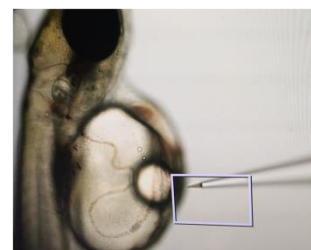
化酵素(hatching enzyme)使其提早同時孵化，再將孵化後的仔魚馴養在 pH4.5 的水當中 6 小時，並以沒有浸泡在 pH4.5 的水中的仔魚作為對照組。

二、掃描式離子選擇電極技術(scanning ion selective electrode technique,SIET)

(一) 利用配置的標準溶液 pH6、7、8，透過 $\log[H^+]$ 所得到的電壓輸出值，再經由線性迴歸產生該離子的涅斯特斜率(Nernstian slope)，即可將測量的樣本電壓值換算成該離子所對應的濃度。

(二) 以 MS-222 麻醉數隻仔魚，讓仔魚靜置 3 分鐘。

(三) 以探針測量仔魚卵黃囊表面的電壓(mV)，再將探針移動到距離仔魚約 1 公分處測量水體的電壓(mV)當作背景值(圖三)。



圖三、SIET 實驗照片

(四) 把所測得的卵黃囊表面電壓(mV)和背景值相減套入公式，即可得到氫離子的流量。

三、RNA 萃取

將稻田魚(*Oryzias latipes*)先以 MS-222 麻醉後，取適當數量的仔魚加入 Trizol 試劑中，並利用組織研磨機將魚體組織均勻打碎，隨後加入 0.2ml 三氯甲仿(chloroform)混和均勻，接著放入離心機以 12000xg 4°C 離心三十分鐘，隨後取出上清液並加入等量的異丙醇混和均勻後放置於-20°C 儲存等待使用。

四、反轉錄聚合酶連鎖反應

取 1~5 μ g RNA 加入 2.5 μ M Oligo(dT)、0.5mM dNTPs，並以 DEPC 水加至 11 μ l，以 65°C 加熱 5 分鐘後立刻放置冰上冷卻 2 分鐘，再依序加入 2 μ l 10x First strand buffer、5mM DTT、40 units RNase inhibitor 和 200 units SuperScript III RT，均勻混和後先以 50°C 反應 1 小時，接著以 70°C 加熱 15 分鐘，再以 4°C 冷卻 2 分鐘，互補 DNA(complementary DNA;cDNA)即製備完成。

五、使用即時定量聚合酶連鎖反應(Real-time quantitative polymerase chain reaction,QPCR)測基因表現量

取 20~30ng cDNA 作為模板，加入 5 μ l 2x SYBR Green I Master Mix、0.5 μ M primer，再加入先前的 cDNA，融和成總體積 10 μ l 的反應物，以 Lighter Cycler real-time PCR system 進行螢光反應的偵測。該結果表示方法採用相對於 *rpl7* 基因表現量。

六、顯微注射(microinjection)

雖然內皮素有可能會影響到仔魚的排酸，但其是透過什麼樣的途徑影響以及其是否會經由增加離子細胞數量進而增強稻田魚(*Oryzias latipes*)仔魚排酸尚未釐清，因此我們藉由全胚胎免疫細胞螢光染色確認離子細胞數量是否受內皮素的表現量所影響。反義嗎啉寡核苷酸(antisense morpholino oligonucleotide；antisense MO)由 Gene Tool(Philomath)設計與合成，EDN1 morpholino 序列為 5'-GAAGCTCACGCTCGTTTGGGATC-3'。反義嗎啉寡核苷酸以 1xDanieau solution(58mM NaCl, 0.7mM KCl, 0.4mM MgSO₄, 0.6mM Ca(NO₃)₂, and 5mM HEPES;pH7.6)配置，在測試各種施打劑量並觀察其發育及外表型態是否正常後，最後決定施打的劑量：8ng/embryo。使用 IM-300 microinjector system(Nerishige Scientific Instrument Laboratory, Tokyo, Japan)將反義嗎啉寡核苷酸於稻田魚胚胎 1 到 2 細胞時期注入，結合目標基因起始子上游，達到抑制該基因表現的目的。

七、統計分析

實驗數據以平均值正負標準差(mean \pm SD)表示，實驗所得之資料由 Student's t-test 作為統計檢定方法

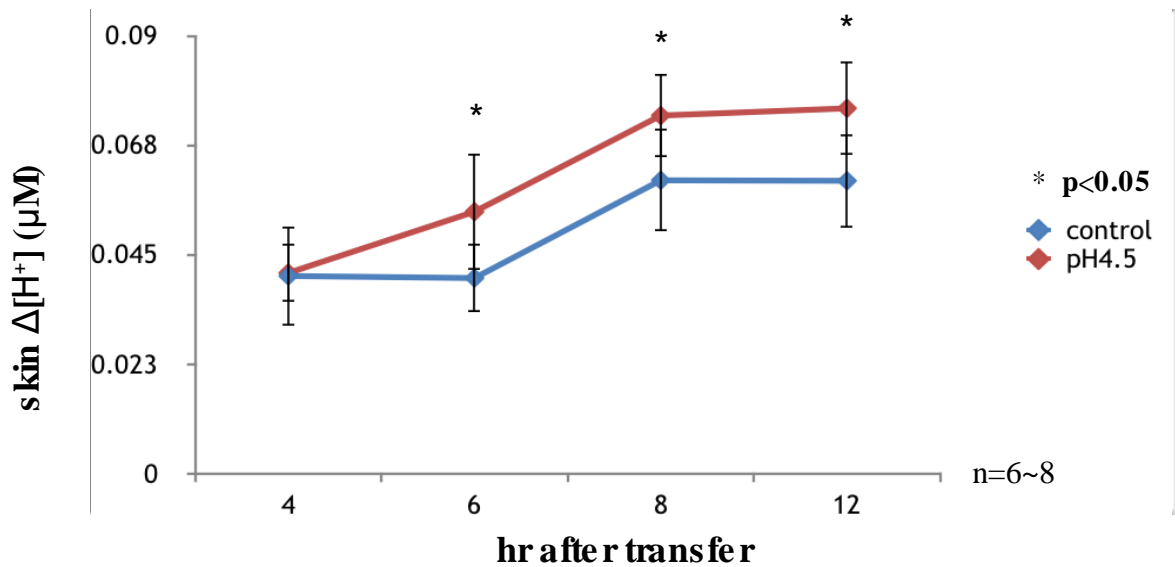
八、全胚胎免疫細胞螢光染色(whole-mount immunocytochemistry)

將仔魚先以 MS-222 麻醉後，再使其經 4% 甲醛固定後，以 3% 小牛血清蛋白(bovine serum albumin)處理兩小時以結合抗體非特異性區，接著分別以抗 Na⁺-K⁺ ATPase α 次單元的 α 5 單株抗體(Developmental Studies Hybridoma Bank, University of Iowa, Ames, IA, USA)處理後，再以 phosphate buffer saline(1.4mM NaCl, 0.2mM KCl, 0.1mM Na₂HPO₄, 0.002mM KH₂PO₄; pH7.4)洗去剩餘的抗體，最後利用 Alexa Flour 488 goat anti-rabbit immunoglobulin(IgG)抗體(Molecular Probes, Carlsbad, CA, USA)進行螢光成色。影響以 Leica TCS-SP5 共軛交雷射顯微鏡(Leica Lasertechnik, Heidelberg, Germany)或正立螢光顯微鏡(Axioplan 2 imaging, Carl Zeiss, Oberkochen, Germany)觀察及拍攝。細胞密度計算以卵黃囊表面作為計數範圍。

伍、研究結果

一、短時間酸處理後稻田魚(*Oryzias latipes*)仔魚體表排酸量的測量

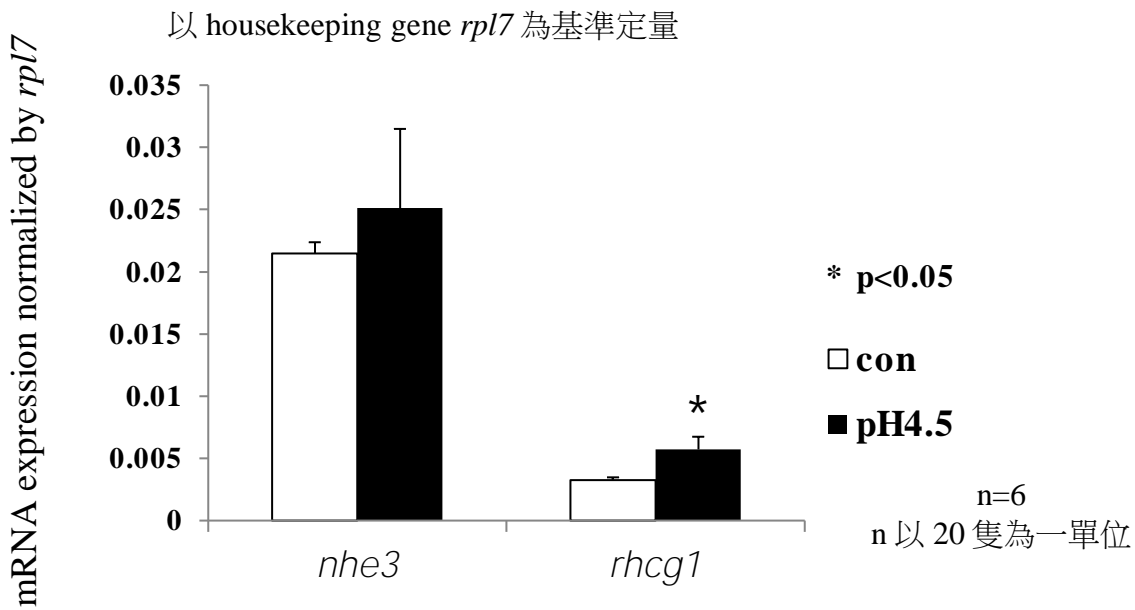
我們將仔魚置於酸性水中 4、6、8、12 小時後測定其體表排酸量，結果顯示稻田魚(*Oryzias latipes*)仔魚經 6 小時以上的酸處理後，其體表排酸量皆顯著高於對照組(圖四)。



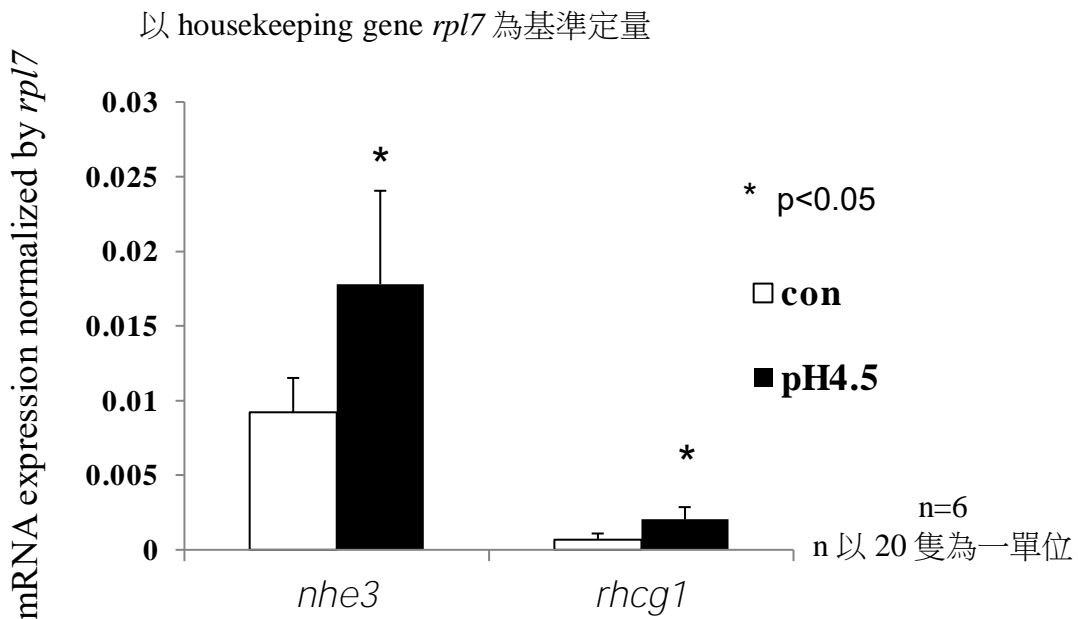
圖四、稻田魚(*Oryzias latipes*)仔魚 4 至 12 小時的酸處理後體表排酸量

二、短時間酸處理對稻田魚(*Oryzias latipes*)仔魚之與排酸細胞相關之基因的表現量之影響

以即時定量聚合酶連鎖反應(QPCR)偵測酸處理 6 小時及 24 小時後 *nhe3* 和 *rhcgl* 之表現量，實驗結果顯示當稻田魚(*Oryzias latipes*)仔魚經 6 小時酸處理後其 *rhcgl* 表現量即顯著增加(圖五)，而 *nhe3* 表現量則須 24 小時酸處理才有顯著增加(圖六)。



圖五、稻田魚(*Oryzias latipes*)仔魚 6小時酸處理後 *nhe3*、*rhcg1* 表現量

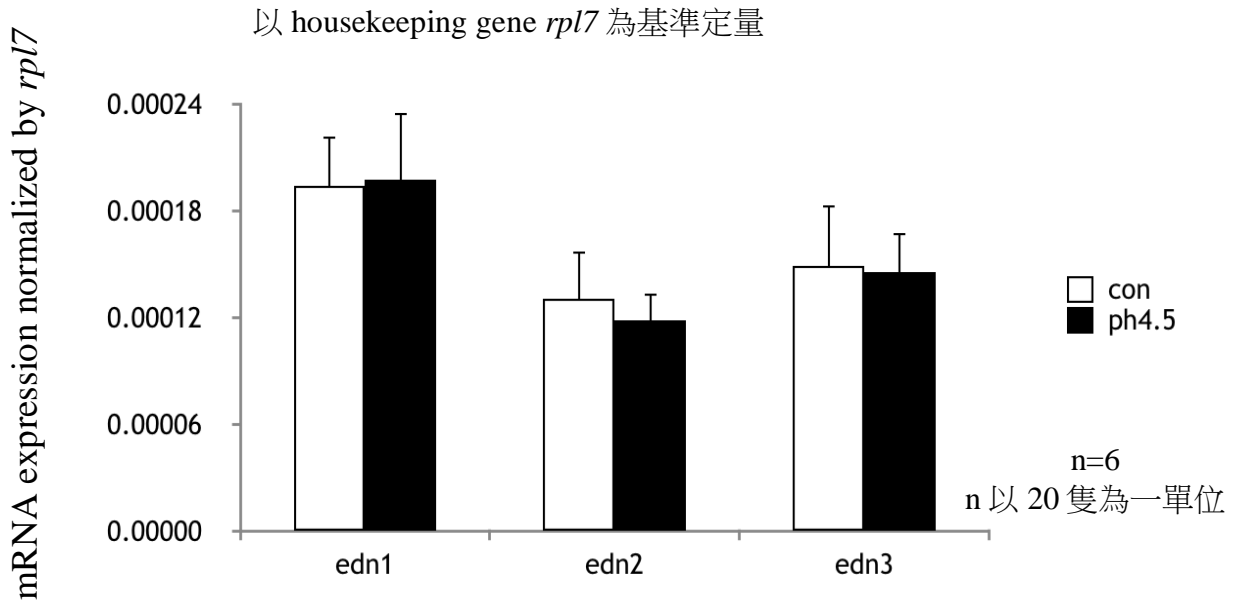


圖六、稻田魚(*Oryzias latipes*)仔 24 小時酸處理後 *nhe3*、*rhcg1* 表現量

三、短時間酸處理後對稻田魚(*Oryzias latipes*)仔魚內皮素及其受體表現量的影響

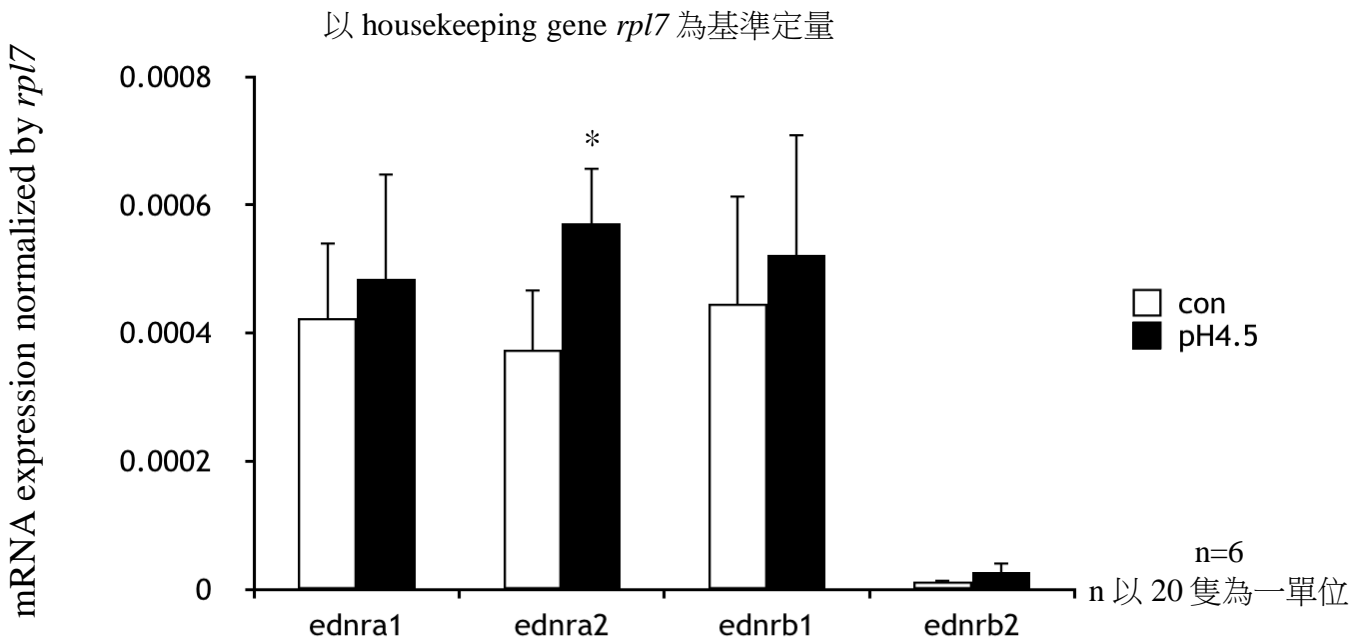
同樣以即時定量聚合酶連鎖反應(QPCR)偵測經酸性水處理 6 小時後之稻田魚(*Oryzias latipes*)仔魚其內皮素(EDN1、EDN2、EDN3)及內皮素受體(EDNRA1、EDNRA2、EDNRB1、EDNRB2)的基因表現量。實驗結果顯示稻田魚(*Oryzias latipes*)仔魚經酸性水處理

6 小時後，EDN1、EDN2、EDN3、EDNRA1、EDNRB1、EDNRB2 基因表現量無顯著提高(圖七)，但 EDNRA2 的基因表現量則有顯著上升(圖八)



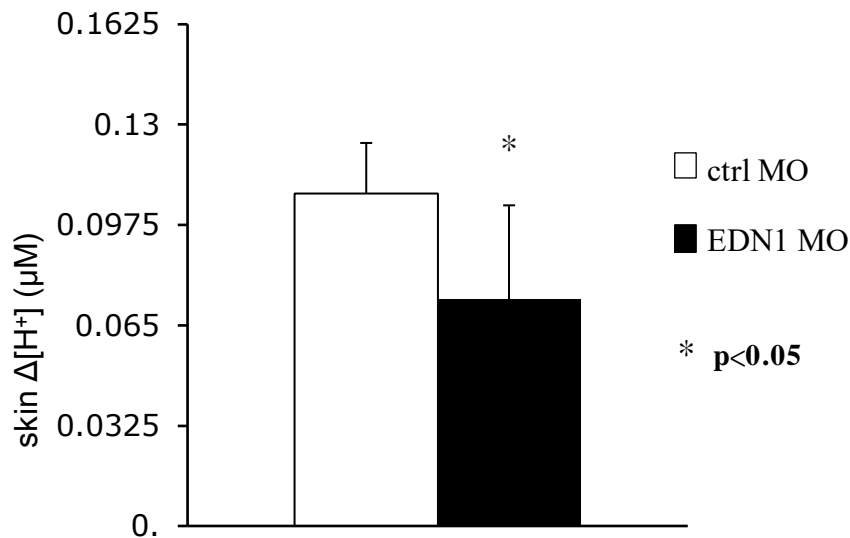
圖七、稻田魚(*Oryzias latipes*)仔魚六小時酸處理後 EDN1、EDN2、EDN3 表現量

四、弱化稻田魚(*Oryzias latipes*)仔魚 EDN1 基因對體表排酸的影響

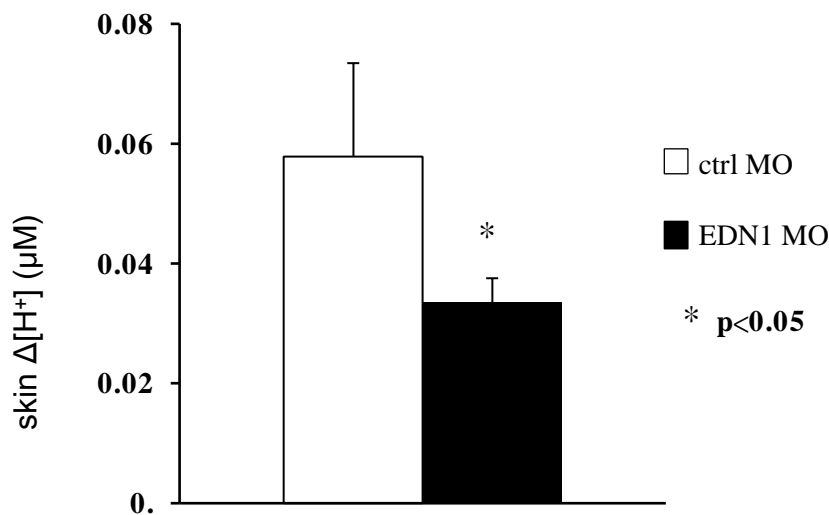


圖八、稻田魚(*Oryzias latipes*)仔魚六小時酸處理後 EDNRA1、EDNRA2、EDNRB1、EDNRB2 表現量

以顯微注射技術將 EDN1 MO 注入稻田魚(*Oryzias latipes*)胚胎，使其結合 EDN1 基因起始子上游，抑制稻田魚(*Oryzias latipes*)仔魚 EDN1 的表現，將一部分仔魚孵化後直接進行體表排酸測量(圖九)，另一部分則先以酸性水馴養六小時後再進行體表排酸測量(圖十)，結果顯示不論酸馴養與否，經 EDN1 基因弱化之仔魚其體表排酸量皆顯著下降，更加證實了內皮素對稻田魚(*Oryzias latipes*)仔魚排酸的影響。



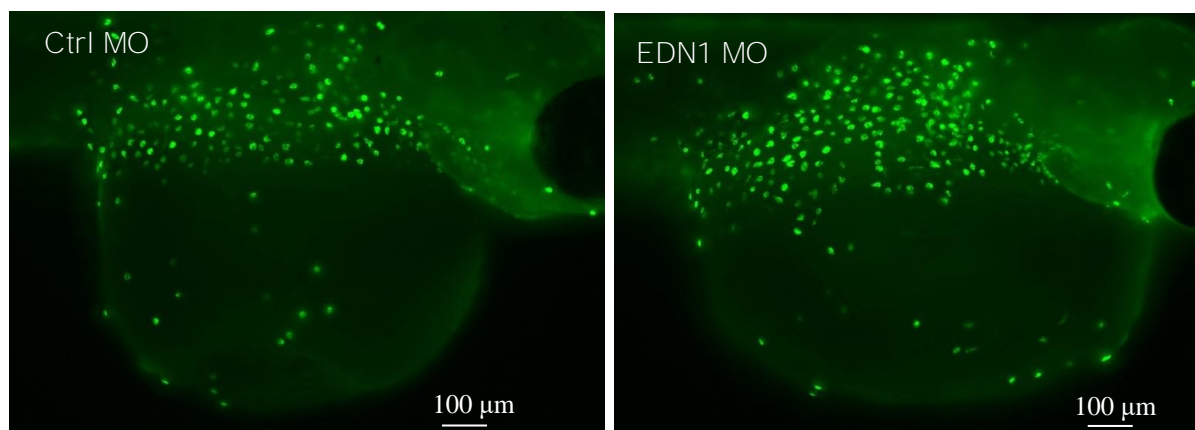
圖九、經 MO 弱化(knockdown) EDN1 基因表現後的稻田魚(*Oryzias latipes*)仔魚體表排酸量(n=3~5)



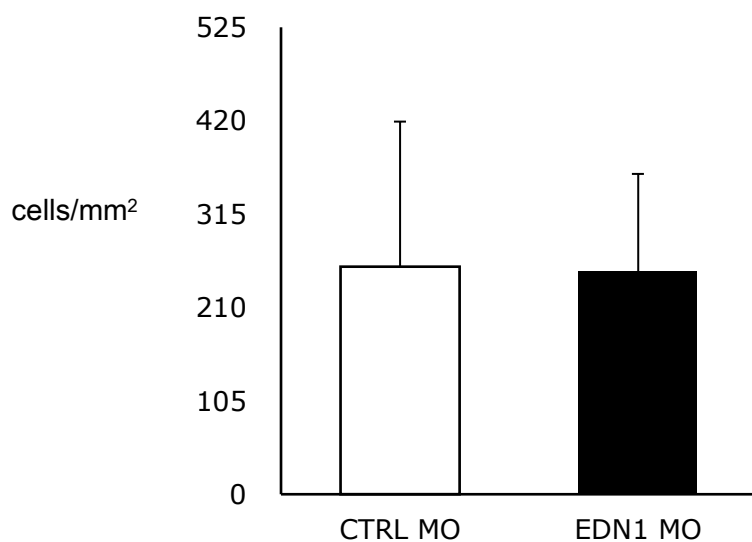
圖十、經 6 小時酸馴養後，EDN1 基因弱化(knockdown)之稻田魚(*Oryzias latipes*)仔魚體表排酸量(n=3~8)

五、稻田魚(*Oryzias latipes*)仔魚 EDN1 基因弱化對離子細胞數量之影響

將經 EDN1 基因弱化的稻田魚(*Oryzias latipes*)仔魚馴養於酸性水六小時後，進行細胞免疫螢光染色標定離子細胞（圖十一）並計算其細胞密度，結果發現 EDN1 基因弱化之仔魚其離子細胞數目與控制組相比並無顯著差異（圖十二）。



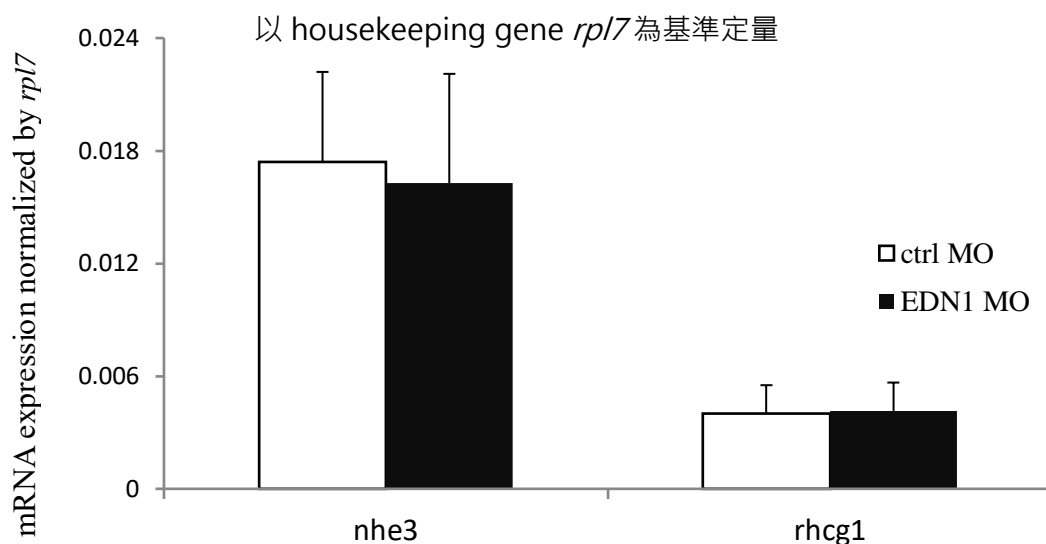
圖十一、經 translational 弱化(knockdown) EDN1 基因表現後的稻田魚(*Oryzias latipes*)仔魚離子細胞螢光染色



圖十二、經 translational 弱化(knockdown) EDN1 基因表現後的稻田魚(*Oryzias latipes*)仔魚離子細胞密度(n=3~6)

六、稻田魚(*Oryzias latipes*)仔魚 EDN1 基因弱化對離子通道蛋白基因表現量之影響

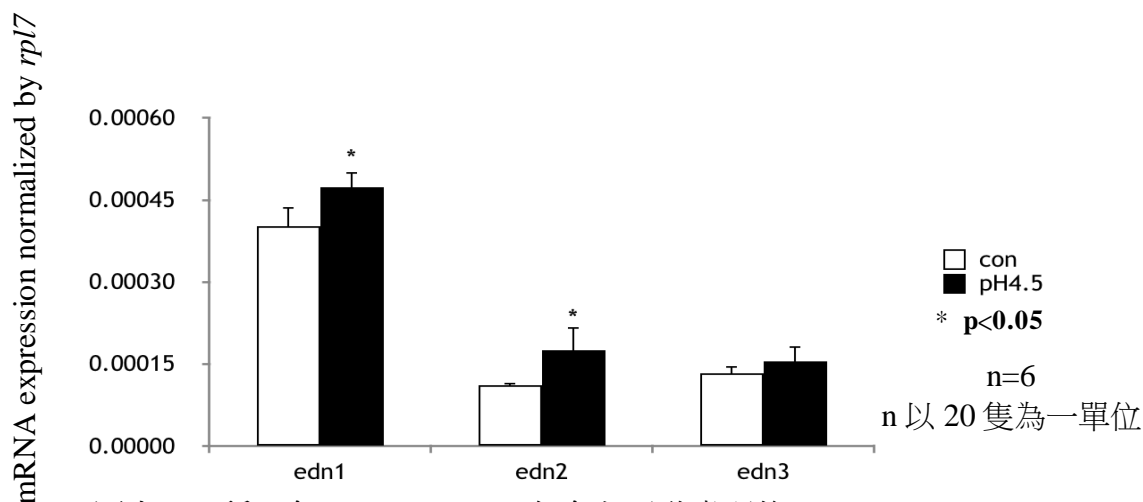
將經 EDN1 基因弱化的稻田魚(*Oryzias latipes*)仔魚飼養 7 天後，以即時定量聚合酶連鎖反應(QPCR)檢測 *nhe3* 及 *rhcg1* 表現量，實驗結果顯示當稻田魚(*Oryzias latipes*)仔魚經 EDN1 基因弱化後其 *nhe3* 及 *rhcg1* 表現量皆無顯著增加。



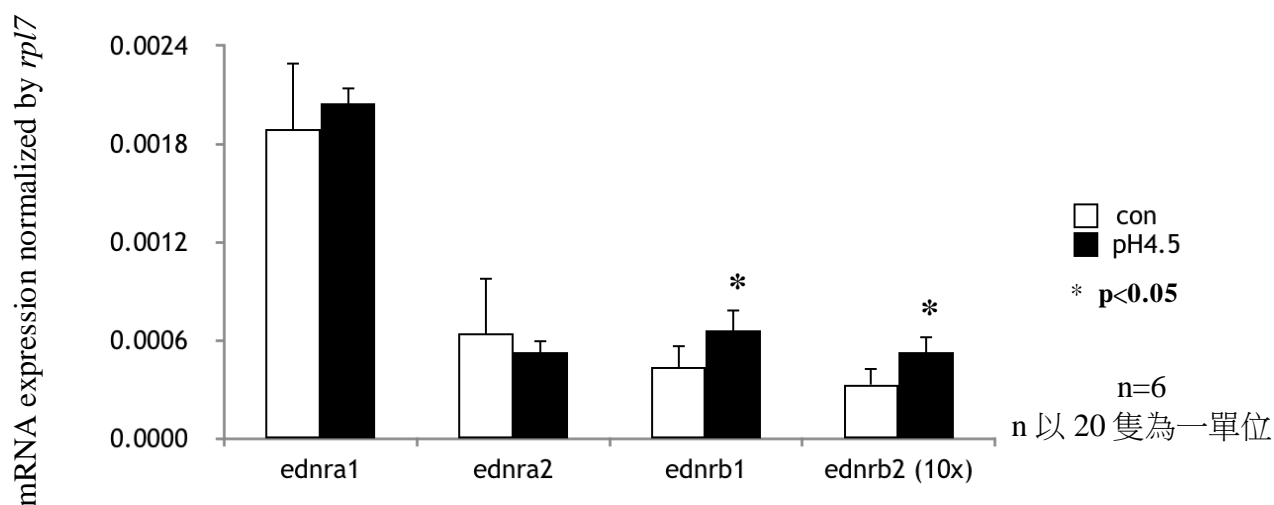
圖十三、經 translational 弱化(knockdown) EDN1 基因表現後的稻田魚(*Oryzias latipes*)仔魚 *nhe3*、*rhcg1* 表現量(n=3~6)

七、長時間酸處理對稻田魚(*Oryzias latipes*)仔魚內皮素及其受體基因表現量的影響

以 QPCR 測量經酸性水處理 7 天後之稻田魚(*Oryzias latipes*)仔魚其內皮素及內皮素受體基因表現量，實驗結果顯示稻田魚(*Oryzias latipes*)仔魚經 7 天酸處理後，其內皮素(EDN1、EDN2)及內皮素受體(EDNRB1、EDNRB2) 的基因表現量皆有顯著上升(圖十四、圖十五)。



圖十四、稻田魚(*Oryzias latipes*)仔魚七天酸處理後 EDN1、EDN2、EDN3 的基因表現量



圖十五、稻田魚(*Oryzias latipes*)仔魚七天酸處理後 EDNRA1、EDNRA2、EDNRB1、EDNRB2 的基因表現量

陸、討論

在藉由 SIET 測量其 4,6,8,12 小時酸馴養後的體表排酸後我們得知仔魚經 6 小時以上的酸處理後，其體表排酸量皆顯著高於對照組，確認經 6 小時酸處理後其排酸作用即顯著增強，使體內多餘的氫離子排除，以維持體內的酸鹼恆定。

我們更進一步探討在體表排酸量提高的同時，與排酸有關之離子通道蛋白基因 *nhe3*、*rhcgl* 及內皮素(EDN1、EDN2、EDN3)與內皮素受體(EDNRA1、EDNRA2、EDNRB1、EDNRB2)之表現量是否也會同時增加。我們以 QPCR 檢測各個基因表現量後發現 *Oryzias latipes* 仔魚經 6 小時酸處理後，其與排酸有關之離子通道基因 *nhe3* 並未增加，而 *rhcgl* 顯著增加，然而在內皮素及內皮素受體的部分，實驗結果顯示稻田魚(*Oryzias latipes*)仔魚經酸性水處理 6 小時後，其內皮素基因表現量均無顯著提高，但其內皮素受體(EDNRA2)的基因表現量則有顯著上升(圖十六)。綜合以上結果可知，在短時間酸刺激的作用下，並非藉由提高內皮素的分泌量，而是藉由內皮素受體的增加，使細胞可以接收到更多的內皮素，以增強內皮素對細胞調控的作用。

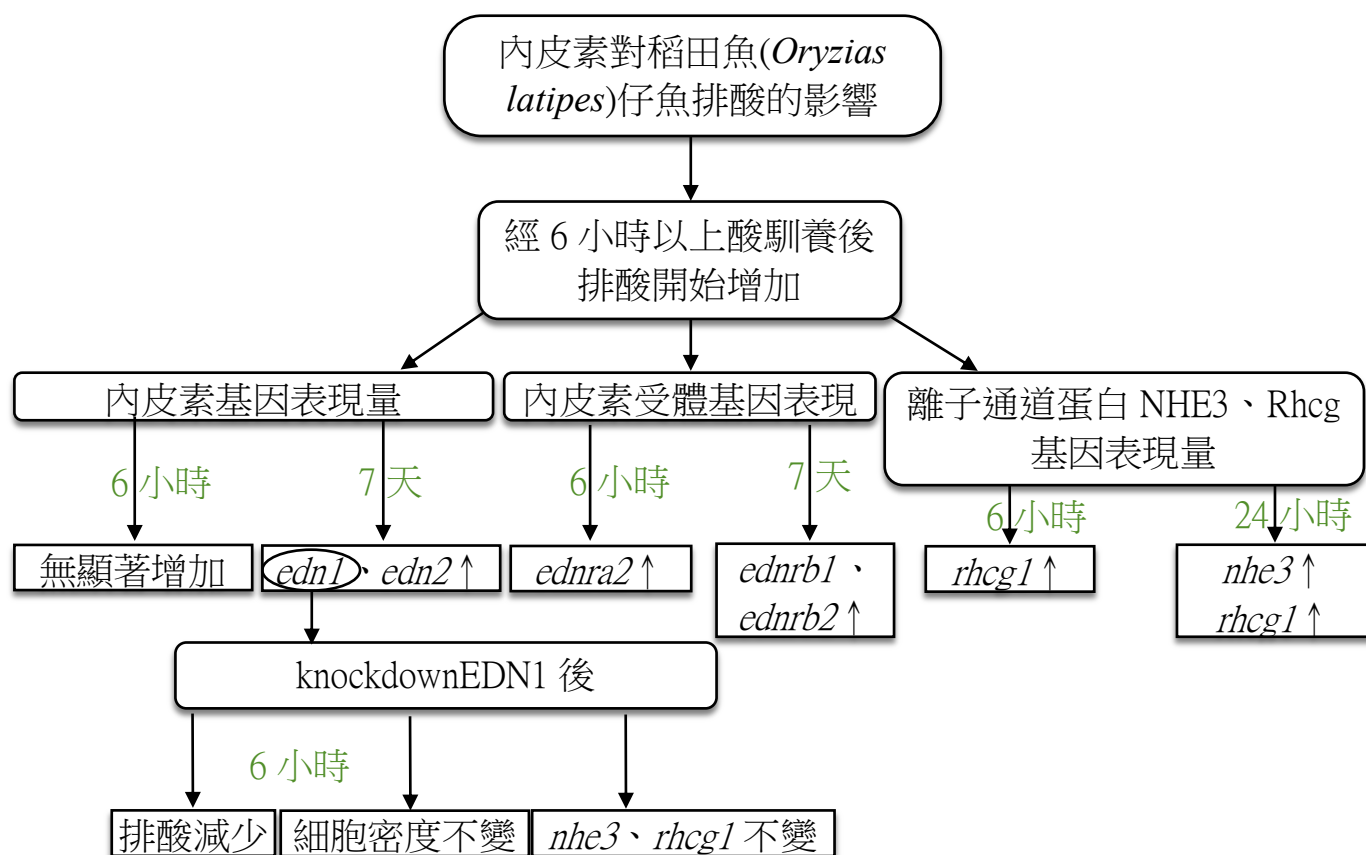
為更直接確定內皮素確實影響了稻田魚(*Oryzias latipes*)仔魚的排酸作用，我們使用顯微注射技術將 EDN1 反義嗎啉寡核苷酸注入稻田魚(*Oryzias latipes*)胚胎，使其結合 EDN1 基因上游，抑制稻田魚(*Oryzias latipes*)仔魚 EDN1 基因的表現，再分別經 7 天曝氣水飼養或孵化後經酸馴養 6 小時，發現其體表排酸量顯著下降，更加證實了內皮素確實影響了稻田魚(*Oryzias latipes*)仔魚的排酸作用。再藉由全胚胎免疫細胞螢光染色標示仔魚表皮的離子細胞

後，發現經 knockdown EDN1 基因表現的稻田魚(*Oryzias latipes*)仔魚其離子細胞數量與控制組相比並無顯著差異。且以 QPCR 檢測經 knockdown EDN1 基因表現的稻田魚(*Oryzias latipes*)仔魚後，*nhe3* 及 *rhcg1* 的表現量皆無顯著增加。

根據目前的實驗結果可推測當稻田魚(*Oryzias latipes*)仔魚面臨急性酸刺激時，在短短 6 小時內即有反應，而且 EDN1 對其排酸作用的調控並非藉由增加通道蛋白的基因表現量以及離子細胞的生成來達成。我們推測當稻田魚(*Oryzias latipes*)仔魚面臨急性酸刺激時，內皮素對其排酸作用的調控屬於轉譯後調控，因若是經由增加細胞的生成來進行生理反應的調控，所需花費之時間較長，不足以應付急性酸刺激，轉譯後調控為較能適應短時間環境改變的調控機制，使其能在短時間內增加排酸作用，維持體內酸鹼平衡。

稻田魚(*Oryzias latipes*)仔魚經長時間(7 天)酸處理後，結果與短時間酸處理不同。以 QPCR 測量經酸性水處理 7 天後之稻田魚(*Oryzias latipes*)仔魚，其內皮素(EDN1、EDN2)及內皮素受體(EDNRB1、EDNRB2)的基因表現量皆有顯著上升。推測由於長時間酸刺激對稻田魚(*Oryzias latipes*)仔魚的生理作用影響甚大，僅增加內皮素受體不足以應付，因此內皮素分泌量亦增加，使得稻田魚(*Oryzias latipes*)仔魚更能因應長時間的酸刺激。

柒、結論



圖十六、實驗結果示意圖

一、結論

(一) 稻田魚(*Oryzias latipes*)仔魚在六小時酸刺激時，*rhcgl* 表現量提高，但 *nhe3* 表現量尚未增加;24 小時酸刺激後兩者皆顯著上升，推測 *rhcgl* 受酸刺激表現增加較 *nhe3* 快。

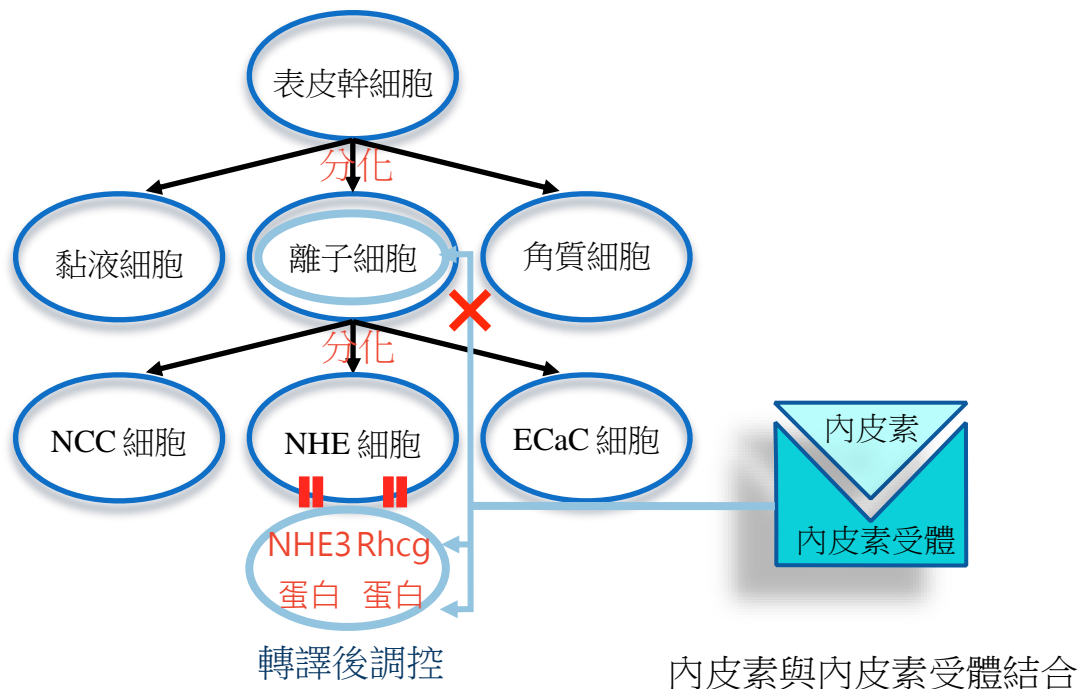
(二) 稻田魚(*Oryzias latipes*)仔魚之排酸作用在酸馴養六小時後增強，此時內皮素受體(EDNRA2)基因表現量已增加，但內皮素基因表現量皆無變化。

(三) 利用 morpholino 抑制稻田魚(*Oryzias latipes*)仔魚的 EDN1 基因表現後，其體表排酸量顯著下降，進一步證實內皮素(EDN1)對稻田魚(*Oryzias latipes*)仔魚排酸作用的影響。

(四) 稻田魚(*Oryzias latipes*)仔魚的 EDN1 基因表現受抑制後，其體表排酸量下降但離子細胞數量與 *nhe3*、*rhcgl* 表現量不變，因此推測當稻田魚(*Oryzias latipes*)仔魚面臨急性酸刺激時，EDN1 對其排酸作用的調控可能為經由調控蛋白質表現量或為轉譯後調控，並不影響細胞的生成(圖十七)。

(五) 稻田魚(*Oryzias latipes*)仔魚面臨短時間(六小時)酸刺激時，其內皮素受體(EDNRA2)的基因表現量顯著增加；但是經長時間(七天)酸處理後，其內皮素(EDN1、EDN2)及內皮素受體(EDNRB1、EDNRB2)基因表現量則皆顯著提高。推測當稻田魚(*Oryzias latipes*)仔魚面對短時間或長時間酸刺激不同時，內皮素對其排酸調節機制略有不同。

下圖為內皮素調控稻田魚仔魚排酸假設機制：



圖十七、內皮素調控稻田魚仔魚排酸假設機制

二、未來展望

- (一) 利用西方墨點法研究抑制內皮素表現對離子通道蛋白(NHE3,Rhcg)表現量的影響。
- (二) 經由測量經弱化內皮素受體表現之稻田魚(*Oryzias latipes*)仔魚的排酸量，確認內皮素是經由何型受體進行排酸調控。
- (三) 更進一步探討以及確認短時間(急性)與長時間(慢性)酸刺激時排酸機制的差異。
- (四) 利用全胚胎原位雜合實驗，確認離子細胞與內皮素受體是否表現在同一個位置上

捌、參考資料與其他

DE Wesson,2006.Regulation of kidney acid excretion by endothelins.Kidney International.70:2066~2073

Donald E.Wesson,2011.Endothelins and Kidney Acidification.Contrib Nephrol.Basel, Karger, 172:84~93

Hao-Hsuan Hsu,Li-Yih Lin,Yung-Che Tseng, Jiun-Lin Horng and Pung-Pung Hwang,2014. A new model for fish ion regulation: identification of ionocytes in freshwater- and seawater-acclimated medaka (*Oryzias latipes*) Cell Tissue Res. 357:225–243

Jung-Hsuan Wang,2014.The role of Endothelin-1 in acute regulation of acid secretion upon acid challenge in zebrafish

Kamel Laghmani,Patricia A.Preisig,Orson W.Moe,Masashi Yanagisawa,and Robert J.Alpern,2001.Endothelin-1/endothelin-B receptor-mediated increases in NHE3 activity in chronic metabolic acidosis.The Journal of Clinical Investigation,10

Somchai Eiam-Ong, Shirley A. Hilden, Andrew J. King, Conrado A. Johns and Nicolaos E. Madias, 1992. Endothelin-1 stimulates the Na⁺/H⁺ and Na⁺/HCO₃⁻ transporters in rabbit renal cortex. Kidney International 42: 18-24

Yan Peng, Morimasa Amemiya, Xiaojing Yang, Lingzhi Fan, Orson W. Moe, Helen Yin, Patricia A. Preisig, Masashi Yanagisawa, Robert J. Alpern, 2001. ET(B) receptor activation causes exocytic insertion of NHE3 in OKP cells. American Journal of Physiology-Renal Physiology 280(1):F34–F42.

Ying-Jey Guh, Yung-Che Tseng, Chao-Yew Yang, and Pung-Pung Hwang, 2014. Endothelin-1 Regulates H⁺-ATPase-Dependent Transepithelial H⁺ Secretion in Zebrafish. *Endocrinology* 155:1728-1737

林家正(2009)。日本種稻田魚鈉吸收及酸鹼平衡機制之分子生理學研究

科技部高瞻自然科學教學資源平台—海洋酸化—溫室效應的另一大隱憂

<http://highscope.ch.ntu.edu.tw/wordpress/?p=34382>

PMEL Carbon Program— Ocean Acidification: The Other Carbon Dioxide Problem

<http://www.pmel.noaa.gov/co2/story/Ocean+Acidification>

【評語】 050012

本研究係應用稻田魚來探討魚類可能的酸鹼調節機制。酸鹼度是水質變化最重要的指標係數，所以酸鹼度調節是魚類賴以為生最重要的機制，本實驗運用基因表現之測定而了解 endothelin-1 對稻田魚排酸作用的程序、實驗步驟合理有邏輯。但仍有許多後續的實驗有待完成，希望能再接再厲的完成。