

2025年臺灣國際科學展覽會

優勝作品專輯

作品編號

090018

參展科別

醫學與健康科學

作品名稱

利用 Verapamil 引發斑馬魚胚胎心衰竭模式並探討
臨床心衰竭用藥 Dapagliflozin 和 Valsartan 之成
效與機制

就讀學校

國立基隆高級中學

指導教師

洪君琳

周以欣

作者姓名

林瑞宏

關鍵詞

Cardiac dysfunction、Edema、Mitochondria-rich
cell

作者簡介



感謝洪君琳教授收我為徒，謝謝老師及耕心學姐細心的糾正與鼓勵，並總是在百忙之中願意撥空輔導。同時感謝周以欣老師、蘇友寬老師、青培計劃的教授及北醫解剖學科的師長們，在研究路上給予建議與諮詢。讀書和做學問是種別無所求的心滿意足，這些日子得以享受這個極有門檻的幸福並完成研究，對我來說似乎是種冥冥中的使命。

2025 年臺灣國際科學展覽會

研究報告

區別：北區

科別：醫學與健康科

作品名稱：利用 Verapamil 引發斑馬魚胚胎心衰竭模式並探討臨床心衰竭用藥 Dapagliflozin 和 Valsartan 之成效與機制

關鍵詞：Cardiac dysfunction、Edema、Mitochondria-rich cell

編號：

摘要

本研究利用 Verapamil 誘導斑馬魚胚胎心衰竭模式，並探討 Dapagliflozin 對斑馬魚胚胎表皮離子細胞的調控機制，以加深對 SGLT2 inhibitors 機制的了解。受精後第四天的斑馬魚在暴露於 Verapamil 24小時後，除了抑制卵黃囊吸收以及造成心包膜水腫以外，對心臟整體功能(HR, EDV, ESV, SV, EF, CO)具負面影響。以粒線體染料標記離子細胞，發現Verapamil使其密度上升，使用掃描式電子顯微鏡觀察，則可看到離子細胞頂端開口有明顯的萎縮，影響到正常功能。以抗體標記染色的方式檢測不同離子細胞亞型，顯示 Dapagliflozin 使富含 $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPase 的 HR 細胞和富含 $\text{H}^+\text{-ATPase}$ 的 NaR 細胞密度上升。同時，心臟功能診斷標誌物的 mRNA 水平(*naap*, *nppb*, *gata4*, *vmhc*)暴露於Verapamil後上升，促進離子細胞代償性上調。

Abstract

This study utilized a Verapamil-induced zebrafish embryonic heart failure model to investigate the regulatory mechanisms of Dapagliflozin on epithelial ionocytes, aiming to deepen understanding of the mechanisms underlying SGLT2 inhibitors. After 24 hours of exposure to Verapamil on day four post-fertilization, zebrafish embryos exhibited not only inhibited yolk sac absorption and pericardial edema but also showed impaired overall cardiac function (HR, EDV, ESV, SV, EF, CO). Mitochondrial staining of ionocytes indicated an increase in ionocyte density after Verapamil treatment, and scanning electron microscopy revealed a noticeable shrinkage in the apical openings of these cells, affecting normal function. Antibody labeling of different ionocyte subtypes demonstrated that Dapagliflozin increased the density of HR cells ($\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPase-Rich Cells) and NaR cells ($\text{H}^+\text{-ATPase}$ -Rich Cells). Additionally, the mRNA levels of cardiac function biomarkers (*naap*, *nppb*, *gata4*, *vmhc*) were elevated after Verapamil exposure, promoting compensatory upregulation of ionocytes.

壹、前言

一、研究背景

目前，全世界有 6430 萬人患有心臟衰竭(Heart failure)。在已開發國家，心臟衰竭的盛行率一般估計為成年人口的 1 % 至 2 %，其中 70 歲或以上族群的盛行率上升至 $\geq 10\%$ ，且隨著人口老化，盛行率還會增加(Groenewegen et al., 2020)。心臟衰竭主要由冠狀動脈疾病（如心臟病發作）引起，但其他原因包括瓣膜性心臟病、心肌病變、心律不整以及酒精或對心臟有毒的藥物(Kemp and Conte, 2012)。心臟衰竭會導致肺部和其他組織充血或體液積聚，因過多水分滯留體內，使腎功能惡化，造成鬱血症狀出現呼吸困難、容易疲勞倦怠與下肢水腫等症狀(Kemp and Conte, 2012)。

心臟與腎臟兩者會相互影響，關係相當密切。心臟衰竭患者有高機率會出現心腎綜合徵，心腎綜合症被定義為由於急性/慢性心臟功能不全而導致的急性/慢性腎功能不全(Ronco et al., 2018)。當心臟功能障礙，導致心臟無法提供充足的血量供應至腎臟，影響腎臟因血量不足而無法將水分和鈉排出時，滯留造成體液與電解質失衡，就會進一步增加心臟負擔，加劇心臟過度負荷，形成一種週期性模式，最終導致心臟和腎臟健康受損(Ronco et al., 2018)。

心衰竭的起始用藥會考量病人的血壓、心率、是否有慢性疾病等狀況，以決定最適當的用藥組合，並依治療效果調整藥物種類及劑量。目前臨床常使用的心衰竭藥物有: Angiotensin-converting enzyme inhibitors(ACEI)、Angiotensin II receptor blockers(ARB)、Angiotensin receptor-neprilysin inhibitors(ARNI), β -blockers、Mineralocorticoid receptor antagonists(MRA)和 Sodium-glucose Cotransporter-2 Inhibitors(SGLT2i) ;其中，Dapagliflozin 是一種 SGLT2i，原適應症用於治療 Type 2 diabetes mellitus(T2DM)，而近期，許多臨床試驗發現 SGLT2i 具保護心血管功能，但臨床試驗皆為同時具糖尿病、腎臟病、心血管疾病等共病症下所得的結果，此外藥品臨床試驗須符合醫藥法規與倫理，以相同狀況，必須給予病人合併藥物使用，以達更佳效果，無法僅以單一藥物測試進行臨床試驗，因此無法得知 Dapagliflozin 單一藥物對人類心衰竭之療效。

Renin-angiotensin-aldosterone system(RAAS)在心腎綜合症的病理生理學中發揮核心作用(Ronco et al., 2018)。在心臟衰竭中，心輸出量減少導致腎臟灌注減少，進而觸發腎臟釋放 renin。Renin 將angiotensin 轉化為 angiotensin I，然後再轉化為 angiotensin II。Angiotensin II 會引起血管收縮並增加 aldosterone 分泌，導致血壓升高和液體滯留。這些影響會加劇心臟衰竭和腎功能障礙，造成心臟和腎功能惡化的惡性循環。而 Valsartan 是一種 ARB，能減少腎絲球血管的灌注壓力及減少蛋白尿而達到保護腎臟的效果，常用作治療心衰竭、高血壓、糖尿病腎病變（改善蛋白尿），可以阻斷某些化學物質在血管的作用，使血管放鬆而達到降壓的效果。因此本研究以 Valsartan 作為合併使用藥物的評估，測試 Valsartan 與 Dapagliflozin 在斑馬魚模型中是否具相互作用。

心衰竭是糖尿病患者常見的併發症，也因此臨用藥過程中發現降低血糖的藥物對於心衰竭有不同程度的影響。臨床研究發現 SGLT2i 是一種能夠顯著降低心衰竭風險的降血糖藥物。Dapagliflozin 是 SGLT2i 的一種，用於治療 T2DM，機轉是透過抑制 SGLT2 降低腎臟對腎絲球過濾液中葡萄糖的再吸收，促進葡萄糖從尿中排出，同時也會降低 Na⁺的再吸收，增加 Na⁺的排出。而 Thiazolidinediones (TZD) 則相反，在過去 TZD 相關研究中發現心衰竭住院風險上升。這些臨床試驗讓醫師注意到，同時患有心衰竭和糖尿病的患者就不適合用 TZD 控制血糖。過去臨床試驗發現服用 SGLT2i 的糖尿病患者因心衰竭住院的比例較無服用來得低，這個結果讓醫學界意外發現 SGLT2i 對於心衰竭的治療效果，然而 Dapagliflozin 對心衰竭的機轉卻尚未有明確定論，因此本研究旨在探討 Dapagliflozin 對心衰竭的作用機制。

Verapamil 是一種 cardiac L-type calcium channel blocker，臨床上用於治療心律不整、高血壓和心絞痛，主要作為降低血壓的藥物，作用是使血管舒張，心跳下降，可能導致低血壓、心搏過慢、心衰竭等副作用(Hofer et al., 1993)。因其對心臟的副作用，根據先前實驗，以 200 μ M 處理 4 dpf(days post fertilization)斑馬魚胚胎 24 小時，胚胎經此處理之下，其中處理 30 分鐘誘導 100 % 斑馬魚出現心臟衰竭症狀，表現出心臟擴張、靜脈充血、心輸出量和血流動力降低，及發生心室肥大的結果，產生心衰竭症狀。故本研究以 Verapamil 建立斑馬魚疾病模型。

近十年來，國際保育動物聯合會(IFAW)和經濟組織等組織合作暨發展組織(OECD)推動了動物實驗的監管，目標是減少實驗動物的使用。根據歐盟指令 2010/63/EU，5 dpf 內斑馬魚胚胎被認為是傳統實驗動物的替代品(Strahle et al., 2012)。除了倫理考量之外，斑馬魚胚胎相對於小鼠和大鼠等傳統實驗動物還有一個關鍵優勢，即它們可以用於大規模藥物測試(Ali et al., 2012; Zon and Peterson, 2005)。因此，利用斑馬魚胚胎創建替代模型可以作為心腎綜合症相關藥物療效的評估。

斑馬魚心臟在結構、功能以及參與心臟發育和調節的分子途徑上與人類心臟相似(Genge et al., 2016)。斑馬魚胚胎的心臟發育迅速，並在 2 dpf 時發揮完全功能。大量研究表明，臨床上對心臟有毒性的藥物會損害斑馬魚胚胎的心臟，揭示斑馬魚胚胎可以作為測試心臟毒性藥物的模型(Kithcart and MacRae, 2017)。斑馬魚胚胎的透明度易透過顯微鏡直接觀察並使用影像分析技術評估心臟功能(Yalcin et al., 2017)。

斑馬魚表皮具富含粒腺體細胞 (Mitochondria-rich cell, MRC) 又稱為離子細胞，能幫助魚類吸收離子及排酸 (Hwang, 2009; Lin et al., 2006; Yan and Hwang, 2019)，生活在低滲透壓的淡水環境中，為了維持魚體內滲透壓，斑馬魚和其他淡水魚，它們的腎臟透過滲透作用可以排出多餘的水分，同時重新吸收必需離子，類似於人類腎臟的利尿功能(Pouretezadi and Wingert, 2016)。胚胎階段的斑馬魚腎臟由一對前腎管 (pronephros) 組成，在 1 dpf 時開始發育，並在 2 dpf 時具完整功能(Drummond, 2005)。此外，胚胎階段的斑馬魚主要透過皮膚和卵黃囊表面 (Horng et al.,

2015; Horng et al., 2017) 的離子細胞從水中獲取離子。這些離子細胞的功能與人類腎臟中的腎小管細胞類似，並具有運輸 Na^+ 等離子的機制用來運輸離子，如吸收 Na^+ 、 Cl^- 、 Ca^{2+} 和分泌 H^+ 、 NH_4^+ 、 K^+ (Hwang et al., 2011; Hwang and Lin, 2013)。斑馬魚依靠離子細胞和腎小管以調節體液的離子濃度、pH 平衡及維持滲透壓的恆定(Hwang et al., 2011)。

Nppa 表現的蛋白質為 ANP (atrial natriuretic peptide)，而 nppb 表現的蛋白質為 BNP(B-type natriuretic peptide)，這兩種激素都是由心臟分泌。心肌壓力誘導心肌細胞釋放 ANP 和BNP，因此這兩種 peptide 的血漿濃度在臨床上用作 diagnostic markers 以監測心臟肥厚和衰竭的嚴重程度，除此之外，心臟壓力會誘導 nppa 和nppb 的基因在心室的表達更為強烈，也因此其被用作斑馬魚動物模型中心臟肥大和衰竭相關疾病的發展(Irina A. Sergeeva et al., 2013)。

Gata4 是一種 zinc finger-containing transcription factors，在不同發育階段的心肌細胞中高度表達，調節多種結構和基因的轉錄，包括 ANP、BNP、 α - myosin heavy chain 和 β - myosin heavy chain(Perrino et al., 2006)。同時 gata4 也是心臟基因表現、肥大、壓力補償和心肌細胞活力的必要調節因子(Oka et al., 2006)。心臟壓力超負荷後，gata4 調節心肌細胞肥大的模式並保護心臟免受負荷引起的衰竭(Bisping et al., 2006)。

由於心室和心房在形態、生理上皆有所不同，為了適應這些不同的特性，心室和心房表現出不同的肌節基因，例如 myosin heavy chains(MHC) 和 myosin light chains(MLC)。哺乳動物中有兩種心肌肌球蛋白重鏈基因， α - MHC 和 β - MHC，而在斑馬魚中，已鑑定出多種 MHC，其中Atrial myosin heavy chain(Amhc) 在心房中表現，而 Ventricular myosin heavy chain(Vmhc) 在心室中表現(Zhang et al., 2009)。且研究結果顯示，Vmhc 和Vmhc1 (ventricle myosin heavy chain like) 分別作為人類 MYH6(Myosin heavy chain 6)和MYH7(Myosin heavy chain 7)的功能性斑馬魚直系同源物，它們是心臟重塑的分子標記(Shih et al, 2015)。

二、研究動機與目的

先前的研究利用基因操作建立了斑馬魚心臟衰竭模型(Narumanchi et al., 2021)。最近的研究利用 Verapamil 誘導斑馬魚胚胎心臟衰竭，並使用該模型進行藥物測試(Li et al., 2022; Zhu et al., 2018)。然而，儘管有研究確認了 2 dpf 斑馬魚胚胎暴露於 Verapamil 30 分鐘後，會對其心臟具影響，但仍缺乏進一步的研究來探討對腎臟之影響，可能需要更長時間暴露於 Verapamil 中評估。如果離子細胞受損，將對特定亞型離子細胞以及生理功能造成影響，使體內離子和 pH 值失去平衡狀態，進而引發心腎綜合症。

本研究旨在解決這些知識差距，特別是研究表皮離子細胞如何調節心腎功能障礙。我們假設長期暴露於 Verapamil 可能會導致心臟和腎臟衰竭的發生，從而促進離子細胞的代償性離子調節，而使用 Dapagliflozin 可以藉由排出體內多餘水分與離子調節，使體液與電解質平衡，進而改善心臟衰竭。並探討與 Valsartan 併用是否能夠透過改善腎臟功能具更佳療效，使預後更加良好。

本研究使用斑馬魚胚胎作為模式生物，探討 Dapagliflozin 對其表皮離子細胞的機制。將 4 dpf 的斑馬魚胚胎暴露於各組藥物溶液 24 小時後，在心臟功能方面，使用 Verapamil 評估心臟功能指標 heart rate(HR)、end-diastolic volume(EDV)、end-systole volume(ESV)、stroke volume(SV)、ejection fraction(EF)和cardiac output(CO)，在腎臟方面，以 body length、pericardium area、yolk sac area 發育指標來評估水腫狀況。同時，檢測了心臟衰竭診斷標誌物的基因(nppa, nppb, gata4 and vmhc)，用以了解心臟和腎臟衰竭的病理發展。此外，藉由螢光染色的方法測定離子細胞的整體數量、特定亞型細胞 (HR 細胞和 NaR 細胞) 的密度和形態變化。藉由此實驗，我們想知道 Dapagliflozin 的暴露影響離子細胞調控之機制，並如何導致離子細胞的形態和功

能產生異常，最終使得體內離子失衡，造成心腎衰竭。也由此了解，Dapagliflozin 治療的效果過程中，與 Valsartan 合併使用，是否會跟 RAAS 相互影響，對人類的腎臟細胞可能造成的影響，以揭示表皮離子細胞影響心臟和腎臟衰竭之作用機制。

貳、研究方法與過程

一、實驗動物

本研究使用的模式動物為 4 dpf 之斑馬魚胚胎(Danio rerio, AB strain)。取自於臺北醫學大學斑馬魚核心實驗室，每週使用水產養殖系統(AZ24010; AZOO, Taipei, Taiwan) 評估水箱水中的氨和亞硝酸鹽水平，其必需離子濃度與當地自來水中的濃度相似(Horng et al., 2017; Lin et al., 2019)，讀數始終低於建議閾值。早上，將 5 對成熟斑馬魚放入 2 公升的繁殖池中進行交配。交配後 2 小時內收集受精卵，並按照既定程式(Horng et al., 2022; Yen et al., 2021)在人工淡水(AFW)中清洗受精卵並孵化。我們將其親代飼養於 28°C ($\pm 1^\circ\text{C}$)的曝氣水中，並給予固定的光照週期，光週期為白晝時間 14 小時 (9 a.m. ~ 11 p.m.)，黑夜時間為 10 小時 (11 a.m. ~ 9 p.m.)，酸鹼值控制於 pH 6.8~8.5，餵養飼料包括豐年蝦、熱帶魚飼料(浮上性)，每日餵兩次。

二、原液配製及給藥處理

將 Verapamil 粉末 (verapamil hydrochloride; cat. no.: HY-A0064; purity: 99.98 %; MedChemExpress; Monmouth Junction, NJ, USA) 溶於 dimethyl sulfoxide (DMSO, Sigma-Aldrich; Burlington, MA, USA) 中，製成 100 mM stock solution，然後用 AFW 稀釋以達到 200 μM (含有 0.2% DMSO)。Verapamil 濃度根據初步測試確定，以確保胚胎在暴露後仍能存活而不會顯著死亡。本實驗藥物溶液皆與 normal water(含有 0.5 mM NaCl, 0.2 mM CaSO_4 , 0.2 mM MgSO_4 、0.16 mM KHPO_4 , 0.16 mM K_2HPO_4)進行比較。於 24 孔盤中的每一孔置入 10 隻 4 dpf 的胚胎，隨後浸入 Verapamil 溶液 24 小時，最後加入 1 mL 各組之藥物溶液 (如圖一)。使用 growth incubator (PGC- 600C, Jaan-Yuh Instrument, Taipei, Taiwan)，將胚胎在 28°C 的培養皿中以 light/dark cycle of 14 h light and 10 h dark 進行培養。

三、體長、心包膜和卵黃囊水腫之測量

使用形態測量分析來評估體長、心包腔和卵黃囊區域作為發育以及水腫的指標。暴露於 Verapamil 後，從每組中隨機選擇 15 個胚胎進行分析($n=15$ from three experiments)。將環境溫度維持在 28°C 操作，使用 tricaine (100 mg/L; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) 麻醉以便固定魚體，待魚麻醉後將其置於凹槽載玻片上，並給予少許水分保持魚體濕潤；將載玻片置於裝有相機 (A5000, Sony, Tokyo, Japan)之光學顯微鏡 (Stemi 508, Zeiss, Oberkochen, Germany)下，並將魚側翻以便觀察紀錄體長(body length)、心包膜面積 (pericardium area)和卵黃囊面積(yolk sac area)。使用 NIH ImageJ software 對體長、心包膜面積和卵黃囊面積進行量化。

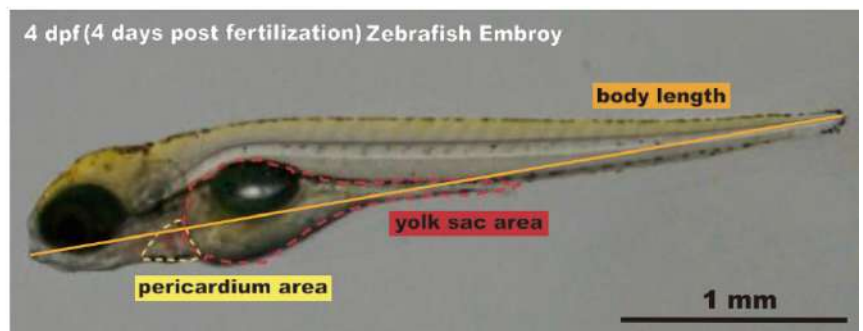


圖1、藥物配置圖(由作者拍攝、繪製) 圖2、發育測量標準 (由作者拍攝、繪製)

四、心臟功能指標之測量

斑馬魚胚胎心臟功能的評估通常是基於 HR 監測。然而，僅依靠 HR 可能無法準確反映心臟衰竭。為了全面性評估心臟功能，需要考慮 EDV、ESV、SV、EF、CO 等參數。以顯微鏡錄製心室舒張(ED)和心室收縮(ES)並分析可更好地檢測斑馬魚胚胎心血管系統

的潛在缺陷。在這項研究中，我們以 20 倍物鏡觀測胚胎心臟的影像，20 倍物鏡可產生理想的景深，用於捕捉清晰的心室影像。高解析度剪輯(3840×2160)在相同的放大倍率下利於更準確的心臟參數測量。高幀速率剪輯(120 fps)使我們能夠暫停快速移動的血液影像和精確追蹤。顯微鏡影片技術檢查斑馬魚胚胎心血管功能的實用性在幾項研究獲得證實(Christensen et al., 2016； Kim et al., 2017； Perrichon et al., 2017； Shin et al., 2010)。這些研究假設心室的形狀為橢球體，並使用橢球體公式($V = 4/3\pi ab^2$)估計心室的體積。

測量心血管參數的方法修改自之前的一項研究(Shin et al., 2010)。在培養皿中以麻醉斑馬魚胚胎，接著將玻片移至裝有相機(ILCE-6300, Sony)之複式顯微鏡(TH4-100, Olympus)下以高倍物錄製ED和ES。使用Tracker軟體逐幀預覽錄製的影片並擷取ED和ES的心室影像，以分析心血管參數，接著以ImageJ軟體量化。為了估計心室體積，假設心室是橢球體，我們使用以下橢球體公式($V = 4/3\pi ab^2$)來估計ED和ES的心室體積，其中“a”和“b”分別是半長軸(semi-major axis)和半短軸(semi-minor axis)。我們測量了心室的半長軸(a)，使用以下公式從測量的心室面積(EDA or ESA)計算了半短軸(b)： $b = A/(\pi a)$ ；其中A是測量的心室面積(EDA or ESA)，“a”是半長軸。對三個心臟週期的資料進行了平均，以代表個體的數值(如圖五)。為了透過影片分析計算HR，我們使用Tracker軟體量化心臟搏動時心室壁的影像之15秒變化，並將HR換算成每分鐘跳動頻率(bpm)。在獲得EDV、ESV和HR後，使用以下公式計算其他參數(SV、EF、CO)： $SV = EDV - ESV$ 、 $EF = SV/EDV$ 和 $CO = SV \times HR$ 。

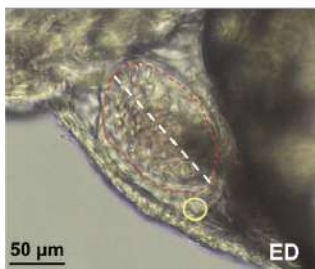


圖3、心室舒張(ED)

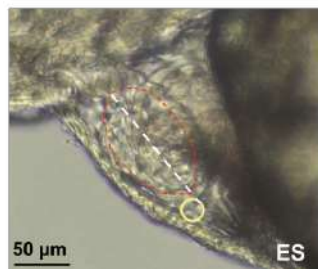
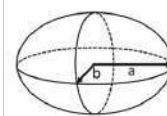


圖4、心室收縮(ES)



Ellipse area:

$$A = \pi ab$$

Ellipsoid volume:

$$V = \frac{4}{3} \pi ab^2 = \frac{4}{3} A^2 / \pi a$$

$$\text{Volume}(\mu\text{M}^3) = V = 4/3 * 3.14 * (a/2)^2 * (b/2)^2$$

$$\text{Volume}(\text{pL}) = V/1000 = \text{EDV} - \text{ESV}$$

$$\text{HR} = (\text{beats}/\text{min})$$

$$\text{SV}(\text{pL}) = \text{EDV} - \text{ESV}$$

$$\text{EF}(\%) = (\text{SV}/\text{EDV}) * 100\%$$

$$\text{CO}(\text{nL}/\text{min}) = (\text{SV} * \text{HR})/1000$$

圖5、體積計算方式 圖6、心臟指標計算公式

(由作者自行拍攝繪製) (由作者自行拍攝繪製) (Hsiao et al., 2024) (由作者自行繪製)

五、使用 Scanning electron microscopy(SEM) 觀測表皮離子細胞

在接觸藥物 24 小時後，斑馬魚胚胎用滴管吸至微量離心管，接著以 pipette 將微量離心管中的溶液完全抽出，再以 1000 ul DDW 置換 2 次洗淨後浸泡於 200 ul PBS-buffered 4% paraformaldehyde-5 %glutaraldehyde 中固定，隔日以 PBS 洗淨，再浸泡於含有 2% osmium tetroxide 之 0.1 M cacodylate buffer 中固定 2h。再以 cacodylate buffer 沖洗後以乙醇將樣本脫水，接下來利用 K850 critical point drier (Quorum Technologies) 中液態二氧化碳進行臨界點乾燥。乾燥後樣本排列整齊並利用離子濺鍍儀 (E-1010, Hitachi) 將其表層鍍上金-鈹絡合物。最後，用 SEM (Hitachi S-3500; Tokyo, Japan) 檢查樣品卵黃囊表皮細胞開口，並捕捉數位影像。使用 ImageJ 軟體對離子細胞的頂端開口面積進行量化。

六、粒線體染色標記表皮離子細胞數量

MitoTracker Red CMXRos 染劑可對活細胞中的粒線體的膜電位進行染色，以便在成像中進行標記和定位。使用 MitoTracker Red (ThermoFisher Scientific) 藥劑以 AFW 稀釋至濃度 3 μM。胚胎在 25 °C 下浸入 1 mL MitoTracker 溶液中 20 分鐘，接著以 AFW 洗滌染色的胚胎，再用 tricaine 麻醉，最後放置於玻片上利用裝有相機(EOS 550D, Canon) 之螢光顯微鏡(BX60, Olympus, Tokyo, Japan) 下以綠光觀察並進行拍攝。為了定量離子細胞的密度，在胚胎的卵黃囊皮膚上，選擇一個 150×150 μm 的區域進行細胞計量，並將數量計算呈現細胞密度 (number/mm²)。

七、Immunocytochemistry(ICC)標記特定亞型離子細胞

我們使用 immunocytochemistry 來標記斑馬魚胚胎卵黃囊皮膚上的 HR 和 NaR 細胞。將胚胎在 4°C 下用溶於 phosphate-buffered saline (PBS) 的 4% paraformaldehyde 固定 2 小時。接著用 PBS 洗滌 20 分鐘後，將樣品與 3% bovine serum albumin (BSA) 在 4°C 孵育 1 小時。此後，將胚胎與 polyclonal antiserum against killifish H⁺-ATPase (diluted 1:100) 或 α 5-monoclonal antiserum (diluted 1:200; Developmental Studies Hybridoma Bank, University of Iowa, Ames, IA, USA) 於 4°C 再孵育 12 小時。接著用 PBS 洗滌後，將樣品再與 goat anti-mouse immunoglobulin G (IgG) conjugated with Alexa Fluor 568 (diluted 1:200 with PBS; Molecular Probes, Eugene, OR, USA) 或 goat anti-rabbit IgG conjugated with Alexa Fluor 488 (diluted 1:200 with PBS; Molecular Probes) 在 28°C 下放置 2 小時。圖像採集和細胞密度分析與上述的 Rhodamine 123 染色方法相同。我們使用 Image J 軟體來計算胚胎卵黃囊 150×150 μ m 區域內的細胞密度。

八、透過 real-time polymerase chain reaction (PCR) 測量相對轉錄水平

我們檢查心臟衰竭相關基因的診斷標誌物轉錄水平，包括 *nppa*, *nppb*, *gata4* 和 *vmhc*，這 4 種基因在心血管系統的發育和功能中都發揮著關鍵的作用。暴露於各組藥物後，每一組收集 15 個胚胎作為一份樣品，使用 Roche LightCycler® 480 (LC480) real-time PCR system，以 PCR 方法來檢測心臟衰竭的診斷標誌物 (*nppa*, *nppb*, *gata4* 和 *vmhc*) 目標基因 mRNA 的表現量。我們使用 TOOLSsmart RNA extractor kit (TOOLS Biotech, New Taipei City, Taiwan)，將 15 隻胚胎匯集在一起，構成一份用於 mRNA 萃取的樣本。將從六個樣本中收集的 mRNA 樣本 ($n = 6$) 使用 TOOLSQuant II Fast RT Kit (TOOLS Biotech) 轉化為 cDNA。cDNA 合成後，使用 Roche LightCycler® 480 (LC480) real-time PCR system (Roche, Basel, Switzerland) 適當稀釋樣品並進行分析。

九、數據分析

所有相片皆以 ImageJ 軟體進行測量，包含長度、面積、細胞密度等，測量後數值使用 GraphPad Prism 軟體 (版本 9.0.1) 對記錄的數據進行繪圖和統計分析。結果數據的表示，皆以 mean $\pm$ standard error (SE) 分析。在統計分析之前，該軟體用於識別和排除異常值，然後檢查資料分佈。Shapiro-Wilk test 用於驗證資料的常態性，Levene test 用於檢定同方差性。三組以上的數值，使用 one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's multiple comparisons 檢定。當 *p* value 小於 0.05(*), 0.01(**), 0.001(***) 表示比較被認為有達到統計上的顯著差異。

參、研究結果

一、胚胎發育型態之評估

共處理 24 小時後觀察各組胚胎型態，並測量體長、心包膜面積及卵黃囊面積。從研究數據發現 Dapagliflozin 和 Valsartan 共處理後與 control group (Normal Water) 的體長、心包膜面積、卵黃囊面積型態皆無顯著差異，而 200 μ M Verapamil 處理後胚胎的心包膜明顯出現積水及卵黃囊增大的趨勢。

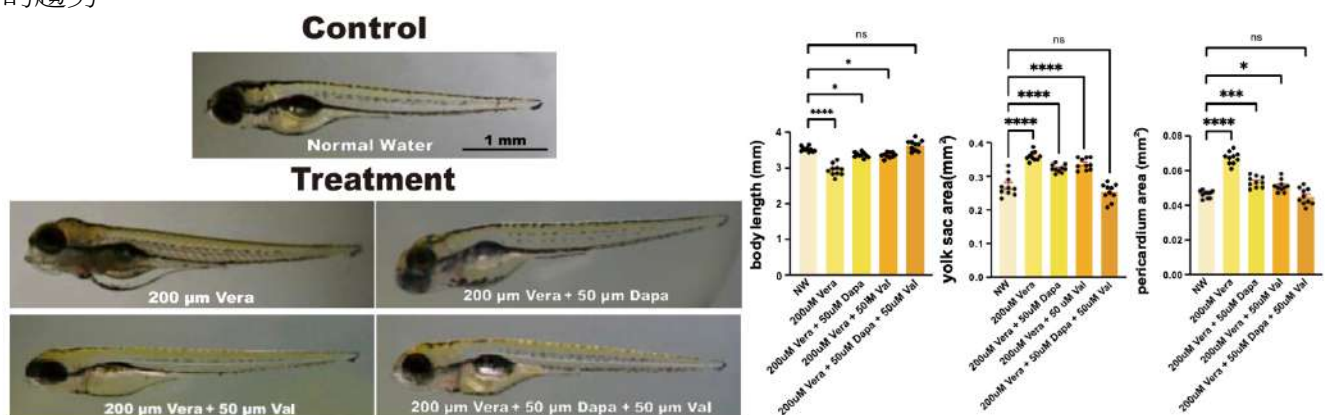


圖7: 24 小時處理對斑馬魚胚胎發育型態之影響。數據為 mean $\pm$ SEM，利用 One-way ANOVA 以及 Tukey's multiple comparisons test 分析，*表示 $p < 0.05$ ，***表示 $p < 0.001$ ，****表示 $p < 0.0001$ ，ns

表示 $p>0.05$ (皆與 control 組比較)。圖片來源:作者自行拍攝與繪製

二、胚胎心臟功能之評估

實驗結果發現，經 Verapamil 處理 24 小時後，心率(HR)有由 184.9 bpm 減少至 38.25 bpm 的趨勢，另外，舒張末期容積(EDV)、收縮末期容積(ESV)皆有增加的趨勢，套用公式計算後，會發現心搏量(SV)及心輸出量(CO)的數值下降。實驗也發現，單獨使用 Dapagliflozin 或 Valsartan 無法達到顯回復效果。而在經 Dapagliflozin 與 Valsartan 共處理後，各項數值可以回復至對照組(NW)的狀態。

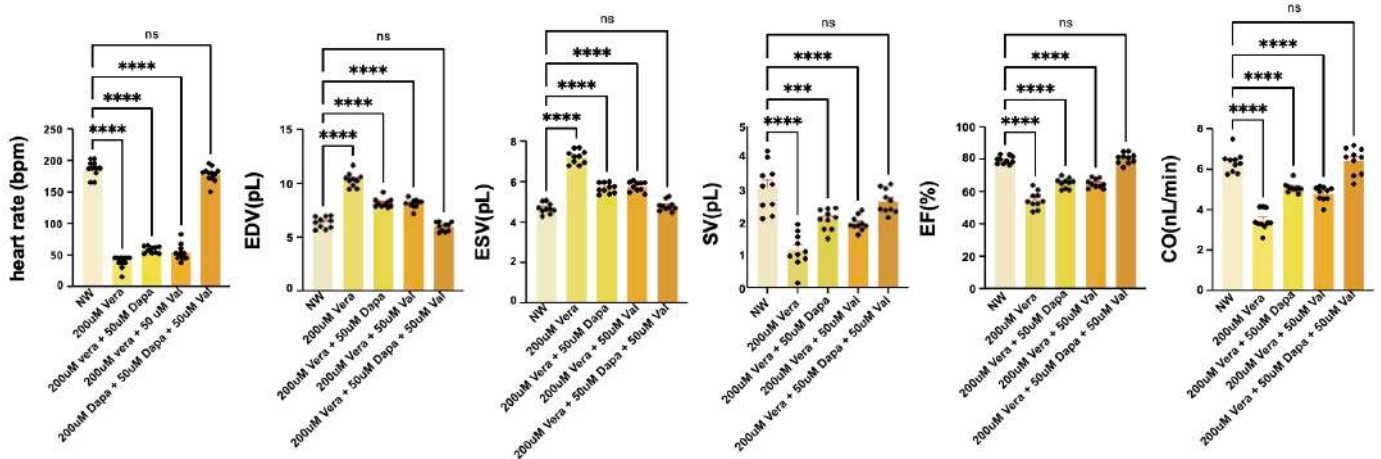


圖8:24 小時處理對斑馬魚心臟功能指標之影響。數據為 mean±SEM，利用 One-way ANOVA 以及 Tukey's multiple comparisons test 分析，****表示 $p<0.0001$ ，ns 表示 $p>0.05$ (皆與 control組比較)。圖片來源:作者自行繪製

三、離子細胞的表皮頂膜開口調控

在 Dapagliflozin、Valsartan 單一處理及共處理後，開口面積與 control group(NW)皆趨勢皆無顯著差異。由統計結果可得知，在 control group 中開口面積為 $10.78 \mu\text{m}^2$ ，而在 Verapamil group，開口面積為 $18.38 \mu\text{m}^2$ ，顯著上升了 70.5%。

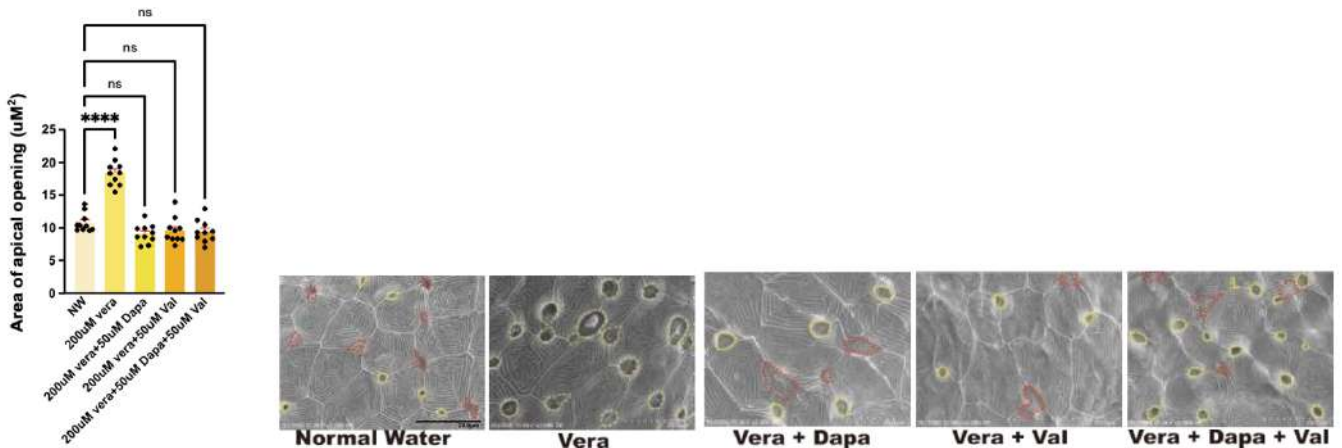


圖9:24 小時處理對斑馬魚胚胎離子細胞頂膜開口之影響。數據為 mean±SEM，利用 One-way ANOVA 以及 Tukey's multiple comparisons test 分析，****表示 $p<0.0001$ ，ns 表示 $p>0.05$ (皆與 control group 比較)。圖片來源:作者自行拍攝與繪製。

四、Verapamil對斑馬魚胚胎離子細胞數量之影響

斑馬魚胚胎暴露於 Verapamil 24 小時後，以 MitoTracker 標記卵黃囊表皮中的離子細胞(圖十)。其中在 200 μM Verapamil 處理 24 小時後之 4 dpf 斑馬魚胚胎的卵黃囊區域離子細胞密度有明顯上升的趨勢。

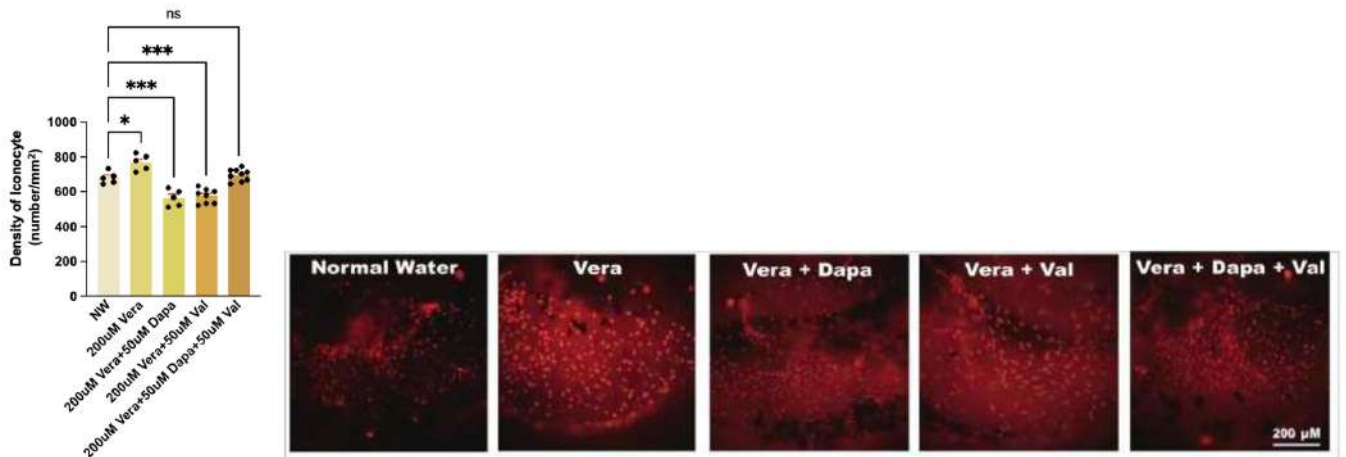


圖10: 24 小時處理對斑馬魚胚胎卵黃囊區域離子細胞染色數目之變化。數據為mean±SEM (樣本數目標示於圖中括號處)。利用 One-way ANOVA 以及 Tukey's multiple comparisons test 分析，ns 表示 $p>0.05$ (皆與 control group 比較)。圖片來源:作者自行拍攝與繪製

五、表皮離子細胞亞型

藉由免疫細胞化學方法，針對 H^+ pump(H^+ ATPase)和 Na^+ pump ($Na^+/K^+ -ATPase$) 的抗體標記，測量包括 HR 和 NaR 細胞在內的亞型離子細胞的密度。經過 Dapagliflozin 暴露後，HR 細胞密度上升；且其 NaR 細胞密度同時上升。而 Verapamil 不會顯著改變兩種離子細胞的密度。

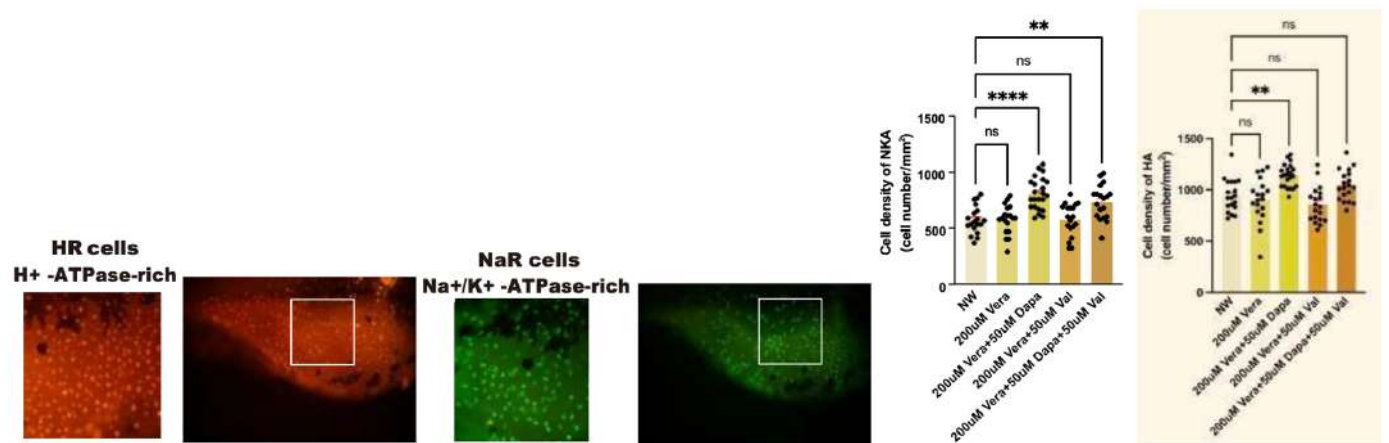


圖11: 24 小時處理對斑馬魚胚胎表皮離子細胞亞型之變化。數據為 mean±SEM。利用 One-way ANOVA 以及 Tukey's multiple comparisons test 分析，*表示 $p<0.05$ ，**表示 $p<0.01$ ，ns表示 $p>0.05$ (皆與 control group 比較)。圖片來源:作者自行繪製

六、診斷標誌物相關基因的 mRNA 水平

在 200 μM Verapamil 的處理下，會發現 *nppa* 和 *nppb* 的表現量皆大幅上升，顯示 Verapamil 會引發斑馬魚胚胎心衰竭。

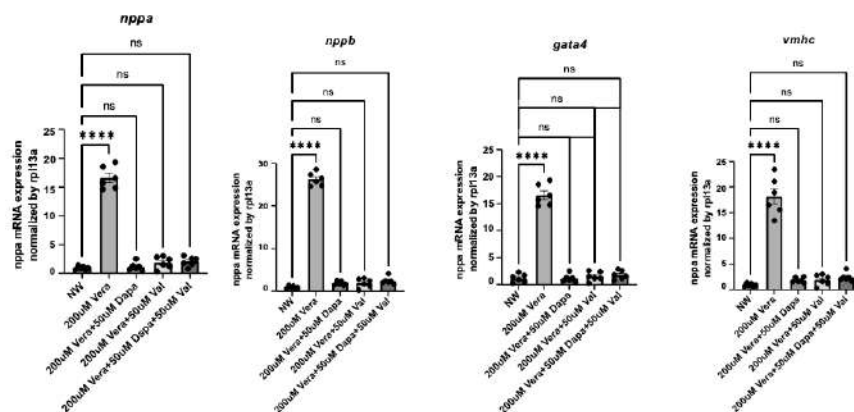


圖12: 24 小時處理對斑馬魚胚胎心衰竭診斷標誌物基因表現量之變化。數據為mean±SEM。利用 One-way ANOVA 以及 Tukey's multiple comparisons test 分析, *表示 $p < 0.05$, **表示 $p < 0.01$, ns 表示 $p > 0.05$ (皆與 control group 比較)。圖片來源:作者自行繪製

肆、討論

斑馬魚胚胎暴露於 200 μM Verapamil 24 小時導致心包腔和卵黃囊水腫，顯示腎臟排水受到影響。斑馬魚胚胎具有高滲透壓體液 (240 mOsm/L) (Charmantier et al., 2022)，當腎功能受損時，導致外部水分灌注並積聚在體腔內(Hentschel et al., 2005; Hill et al., 2004)。心包腔僅被薄薄的皮膚層覆蓋並且缺乏堅實的組織連接，故成為水腫形成的部位。由於卵黃在胚胎發育過程中逐漸被消耗，卵黃囊消耗緩慢揭示胚胎可能受到疾病所影響其發育。

腎功能與灌注壓力成正比，因此也與心輸出量成正比。當心輸出量最佳時，腎灌注維持在支持有效腎過濾和充分清除廢物和多餘物質的水平。然而，當心輸出量減少時，如心臟衰竭等情況，腎灌注壓就會降低(Thomas et al., 1993)。本研究中的心臟評估顯示 Verapamil 有效抑制心率，從而抑制心輸出量。心輸出量抑制的強度與水腫的嚴重程度有關。斑馬魚胚胎發育過程中，心包膜積水常被用作心臟毒性的指標，因為它通常會降低心輸出量，並隨後影響 Glomerular filtration rate(GFR)，導致腎衰竭和心包膜或卵黃囊水腫。

Verapamil 抑制了心率，在其他心臟參數 (EDV、ESV 和 EF) 中發現發現 EDV 顯著增加，顯示已誘導了心臟肥大。增加的 EDV 和相應的 SV 部分補償了心率的抑制。然而，ESV 顯著增加，顯示心室肌的收縮力受到抑制，這反映在 EF 下降上。由於代謝需求、器官發育和生理系統成熟的增加，斑馬魚胚胎在胚胎後期的循環需求和腎功能也增加 (Barrionuevo and Burggren, 1999)。例如，鰓的發育逐漸增加了氣體交換的表面積，並且還將多餘的水分引入體液中，而這些水分必須透過腎臟有效地排出體外(Shadrin and Ozerniuk, 2002)。

臨床上，atrial natriuretic peptide (ANP; encoded by nppa) 和 brain natriuretic peptide (BNP; encoded by nppb) 是心臟衰竭的 biomarkers。ANP 由心房影響心房壓力升高而釋放，並透過促進血管舒張以及鈉和水的排泄來調節血壓和液體平衡。BNP 由心室合成，隨著心室壁壓力的增加而釋放，並具有類似的功能。ANP 和 BNP 水平升高揭示存在心臟衰竭，可用於診斷、評估嚴重程度、監測治療反應和預測結果(Mair et al., 2001)。此外，nppa, nppb, gata4, vmhc 基因在斑馬魚心臟發育中扮演關鍵角色(Becker et al., 2014; Grassini et al., 2018)。這些基因在後期表現量大幅增加可能與 Verapamil 處理胚胎心臟肥大有關。

此外，本研究觀察顯示表皮離子細胞的活性增加，表皮離子細胞是負責從水中吸收離子的特殊細胞，有助於離子保存。Verapamil 誘導 MitoTracker 標記的離子細胞密度增加、離子細胞頂膜增大。頂膜是指離子細胞面向外在環境的膜域。透過位於頂膜的離子轉運蛋白，離子細胞從水中吸收離子或將離子分泌到水中。頂膜的增大與離子細胞的活化密切相關(Horng et al., 2022; Horng et al., 2009)。魚體內代謝的氨和酸可經由皮膚擴散、離子細胞分泌、腎臟排泄等方式消除(Hwang and Chou, 2013; Shih et al., 2013)。然而，它們在魚類胚胎中各自的比例仍然未知。Verapamil 引起的腎功能障礙可能會損害很大一部分氨/酸排泄。因此，離子細胞被活化以補償這種功能障礙。

本研究中，斑馬魚胚胎可以耐受 Verapamil 暴露 24 小時，暴露會抑制其 CO。這可能是因為即使沒有完全建立的血紅素依賴性氧氣運輸機制，光是氧擴散就可以滿足發育中胚胎的代謝需求(Pelster and Burggren, 1996)。此外，長期接觸 Verapamil，會導致收縮力降低和心臟肥大。這兩種症狀都是心臟衰竭診斷和治療的重要臨床指標。結合心包膜、卵黃囊水腫、離子滯留等腎衰竭症狀，此模型可用於進一步研究此心腎症候群的分子機制並測試該疾病的藥物。

使用斑馬魚模擬人類心臟衰竭的主要限制是明顯缺乏慢性心臟纖維化(Narumanchi et al., 2021)。在人類中，心臟纖維化涉及心臟纖維母細胞的增殖、細胞外基質過度沉積和巨噬細胞活性，導致心肌僵硬。這個過程與損傷後的心臟重塑密切相關，例如心肌梗塞，並導致心臟衰竭的發展。相較之下，斑馬魚表現出最基本的心臟纖維化，並具有心臟再生能力，降低了它們模擬慢性心臟纖維化的有效性，我們將會再針對這方面去做更進一步的實驗探討，使研究更加準確及完整。

伍、結論與應用

根據本實驗結果，我們發現 **Dapagliflozin** 能夠改善心衰竭所造成的心室腫大、心輸出量減少和心包膜積水的問題。此外，因血液中的鈉離子濃度減少，滲透壓下降，導致水分離開組織，會造成積水、血壓下降，實驗結果顯示離子細胞的密度經 **Dapagliflozin** 處理後離子細胞的密度顯著上升，以維持滲透壓的平衡，增加水分在腎臟的再吸收，進而改善積水問題。

本實驗結果表示經 **Verapamil** 處理後，心包膜有積水的趨勢，而在 **Dapagliflozin** 或 **Valsartan** 個別處理時無法達到顯著回復效果。但 **Dapagliflozin** 與 **Valsartan** 共處理下，能夠有效改善因心衰竭所造成的心室肥大、心輸出量降低和心包膜積水。在心臟功能方面，除了 **EDV**, **ESV**, **EF** 上升外，**HR**, **SV**, **CO** 皆下降。在離子細胞調控及數目觀測中，也發現頂膜開口的平均面積上升，且離子細胞密度高於其餘組別。也發現心包膜面積與 **control group** 無顯著差異，推測其機制可能是藉由排除水分、離子及降低血壓，使心包膜積水的狀況得以改善。

本實驗成功以 **Verapamil** 引發斑馬魚疾病模式，並發現 **Dapagliflozin** 和 **Valsartan** 合併使用具更佳療效，藉由探討 **Dapagliflozin** 對斑馬魚離子細胞的生理機制，了解其對我們可能造成的病理機轉。離子細胞內因富含粒線體，過度的損害離子細胞會導致魚體離子流失，此外魚類離子細胞和人類腎臟細胞在功能及細胞特性上有高度相似之處，因此 **SGLT2i** 也透過腎臟細胞相關機制運作。最後，期盼透過本研究，更深入了解 **Dapagliflozin** 對心衰竭的機轉，並助於識別哪些心衰竭患者能夠從 **Dapagliflozin** 治療中受益，提供患者更好的治療選擇。

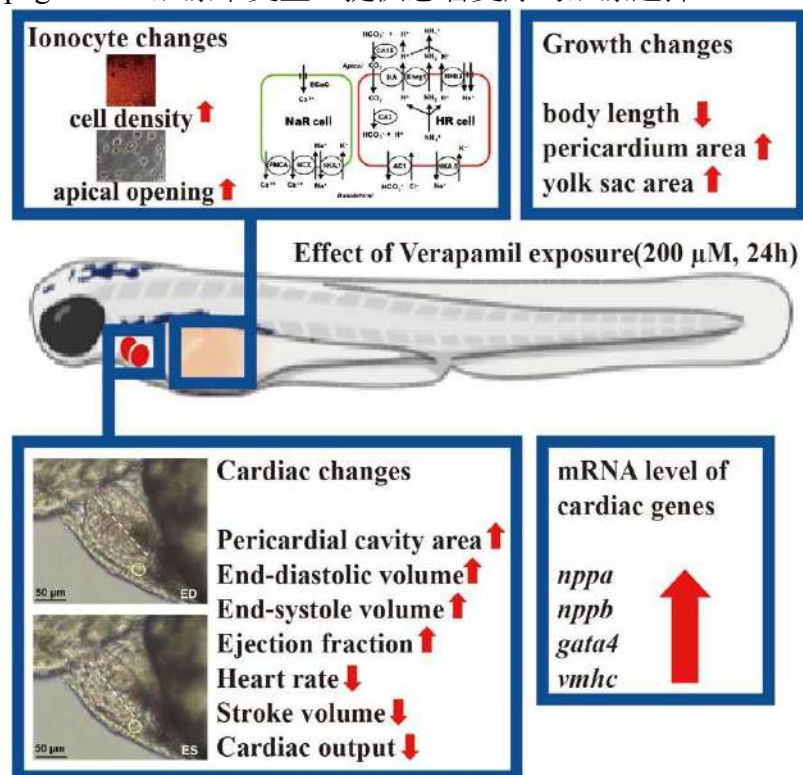


圖13、本實驗結果圖(由作者拍攝繪製)

陸、參考文獻

- Ali, S., Champagne, D.L., Richardson, M.K., 2012. Behavioral profiling of zebrafish embryos exposed to a panel of 60 water-soluble compounds. *Behav. Brain Res.* 228, 272–283.
- Barrionuevo, W., Burggren, W., 1999. O₂ consumption and heart rate in developing zebrafish (*Danio rerio*): influence of temperature and ambient O₂. *Am. J. Phys.* 276, R505–R513.
- Becker, J.R., Chatterjee, S., Robinson, T.Y., Bennett, J.S., Panakova, D., Galindo, C.L., Zhong, L., Shin, J.T., Coy, S.M., Kelly, A.E., Roden, D.M., Lim, C.C., MacRae, C.A., 2014. Differential activation of natriuretic peptide receptors modulates cardiomyocyte proliferation during development. *Development* 141, 335–345.
- Bisping, Bisping, E., Ikeda, S., Kong, S.W., Tarnavski, O., Bodyak, N., McMullen, J.R., Rajagopal, S., Son, J.K., Ma, Q., Springer, Z., Kang, P.M., Izumo, S., & Pu, W.T., 2006. Gata4 is required for maintenance of postnatal cardiac function and protection from pressure overload-induced heart failure. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(39), 14471–14476.
- Chang WJ, Hwang PP. Development of zebrafish epidermis. *Birth Defects Res C Embryo Today*. 2011 Sep;93(3):205-14.
- Charmantier, G., Nguyen-Chi, M., Lutfalla, G., 2022. Ontogenetic changes in blood osmolality during the postembryonic development of zebrafish (*Danio rerio*). *Zebrafish* 19, 1–6.
- Christensen, A.H., Chatelain, F.C., Huttner, I.G., Olesen, M.S., Soka, M., Feliciangeli, S., Horvat, C., Santiago, C.F., Vandenberg, J.I., Schmitt, N., Olesen, S.P., Lesage, F., & Fatkin, D., 2016. The two-pore domain potassium channel, TWIK-1, has a role in the regulation of heart rate and atrial size. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 97, 24–35.
- Christou-Savina, S., Beales, P.L., Osborn, D.P., 2015. Evaluation of zebrafish kidney function using a fluorescent clearance assay. *J. Vis. Exp.* 96, e52540.
- Drummond, I.A., 2005. Kidney development and disease in the zebrafish. *J. Am. Soc. Nephrol.* 16, 299–304.
- Forte, M., Marchitti, S., Di Nonno, F., Stanzione, R., Schirone, L., Cotugno, M., Bianchi, F., Schiavon, S., Raffa, S., Ranieri, D., Fioriniello, S., Della Ragione, F., Torrasi, M.R., Carnevale, R., Valenti, V., Versaci, F., Frati, G., Vecchione, C., Volpe, M., Rubattu, S., & Sciarretta, S., 2023. NPPA/atrial natriuretic peptide is an extracellular modulator of autophagy in the heart. *Autophagy*, 19(4), 1087–1099.
- Fraher, D., Sanigorski, A., Mellett, N.A., Meikle, P.J., Sinclair, A.J., & Gibert, Y., 2016. Zebrafish embryonic lipidomic analysis reveals that the yolk cell is metabolically active in processing lipid. *Cell Reports*, 14(6), 1317–1329.
- Gawlicka, A., Parent, B., Horn, M.H., Ross, N., Opstad, I., & Torrissen, O.J., 2000. Activity of digestive enzymes in yolk-sac larvae of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*): Indication of readiness for first feeding. *Aquaculture*, 184(3–4), 303–314.
- Grassini, D.R., Legendijk, A.K., De Angelis, J.E., Da Silva, J., Jeanes, A., Zettler, N., Bower, N.I., Hogan, B.M., & Smith, K.A., 2018. Nppa and Nppb act redundantly during zebrafish cardiac development to confine AVC marker expression and reduce cardiac jelly volume. **Development**, 145.
- Genge, C.E., Lin, E., Lee, L., Sheng, X., Rayani, K., Gunawan, M., Stevens, C.M., Li, A.Y., Talab, S.S., Claydon, T.W., Hove-Madsen, L., Tibbits, G.F., 2016. The zebrafish heart as a model of mammalian

cardiac function. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 171, 99–136.

Grassini, D.R., Lagendijk, A.K., De Angelis, J.E., Da Silva, J., Jeanes, A., Zettler, N., Bower, N.I., Hogan, B.M., Smith, K.A., 2018. Nppa and Nppb act redundantly during zebrafish cardiac development to confine AVC marker expression and reduce cardiac jelly volume. *Development* 145, dev160739.

Groenewegen, A., Rutten, F.H., Mosterd, A., Hoes, A.W., 2020. Epidemiology of heart failure. *Eur. J. Heart Fail.* 22, 1342–1356.

Hentschel, D.M., Park, K.M., Cilenti, L., Zervos, A.S., Drummond, I., Bonventre, J.V., 2005. Acute renal failure in zebrafish: a novel system to study a complex disease. *Am. J. Physiol. Ren. Physiol.* 288, F923–F929.

Hill, A.J., Bello, S.M., Prasch, A.L., Peterson, R.E., Heideman, W., 2004. Water permeability and TCDD-induced edema in zebrafish early-life stages. *Toxicol. Sci.* 78, 78–87.

Hofer, C.A., Smith, J.K., Tenholder, M.F., 1993. Verapamil intoxication: a literature review of overdoses and discussion of therapeutic options. *Am. J. Med.* 95, 431–438.

Horng, J.L., Lin, L.Y., Hwang, P.P., 2009. Functional regulation of H⁺-ATPase-rich cells in zebrafish embryos acclimated to an acidic environment. *Am. J. Phys. Cell Phys.* 296, C682–C692.

Horng, J.L., Yu, L.L., Liu, S.T., Chen, P.Y., Lin, L.Y., 2017. Potassium regulation in medaka (*Oryzias latipes*) larvae acclimated to fresh water: passive uptake and active secretion by the skin cells. *Sci. Rep.* 7, 16215.

Horng, J.L., Lee, C.Y., Liu, S.T., Hung, G.Y., Lin, L.Y., 2022. Differential effects of silver nanoparticles on two types of mitochondrion-rich ionocytes in zebrafish embryos. *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.* 252, 109244.

Horng, J.L., Kung, G.X., Lin, L.Y., 2024. Acidified water promotes silver-induced toxicity in zebrafish embryos. *Aquat. Toxicol.* 268, 106865.

Hsiao, B.Y., Horng, J.L., Yu, C.H., Lin, W.T., Wang, Y.H., Lin, L.Y., 2024. Assessing cardiovascular toxicity in zebrafish embryos exposed to copper nanoparticles. *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.* 277, 109838.

Huang, M., Jiao, J., Wang, J., Xia, Z., & Zhang, Y., 2018. Exposure to acrylamide induces cardiac developmental toxicity in zebrafish during cardiogenesis. *Environmental Pollution*, 234, 656–666.

Hung, G.Y., Wu, C.L., Motoyama, C., Horng, J.L., Lin, L.Y., 2022. Zebrafish embryos as an in vivo model to investigate cisplatin-induced oxidative stress and apoptosis in mitochondrion-rich ionocytes. *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.* 259, 109395.

Hwang, P.P., Chou, M.Y., 2013. Zebrafish as an animal model to study ion homeostasis. *Pflugers Arch.* 465, 1233–1247.

Hwang, P.P., Lin, L.Y., 2013. Gill ionic transport, acid-base regulation, and nitrogen excretion. *Physiol. Fish.* 4, 205–233.

Hwang, P.P., Lee, T.H., Lin, L.Y., 2011. Ion regulation in fish gills: recent progress in the cellular and molecular mechanisms. *Am. J. Phys. Regul. Integr. Comp. Phys.* 301, R28–R47.

Jin, D., Ni, T.T., Hou, J., Rellinger, E., & Zhong, T.P., 2009. Promoter analysis of ventricular myosin

- heavy chain (vmhc) in zebrafish embryos. *Developmental Dynamics*, 238(7), 1760-1767.
- Kemp, C.D., Conte, J.V., 2012. The pathophysiology of heart failure. *Cardiovasc. Pathol.* 21, 365–371.
- Kerkhof, P.L., Heyndrickx, G.R., & Li, J.K., 2016. Hemodynamic determinants and ventriculo- arterial coupling are sex-associated in heart failure patients. *Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society*, 2016, 3286-3289.
- King, J., & Lowery, D.R., 2023. Physiology, cardiac output. In *StatPearls*. StatPearls Publishing.
- Kithcart, A., MacRae, C.A., 2017. Using zebrafish for high-throughput screening of novel cardiovascular drugs. *JACC Basic Transl. Sci.* 2, 1–12.
- Kotb, A.M., Muller, T., Xie, J., Anand-Apte, B., Endlich, K., Endlich, N., 2014. Simultaneous assessment of glomerular filtration and barrier function in live zebrafish. *Am. J. Physiol. Ren. Physiol.* 307, F1427–F1434.
- Kosiborod, M., Cavender, M.A., Fu, A.Z., Wilding, J.P., Khunti, K., Holl, R.W., Norhammar, A., Birkeland, K.I., Jørgensen, M.E., Thuresson, M., Arya, N., Bodegård, J., Hammar, N., Fenici, P., & CVD-REAL Investigators and Study Group., 2017. Lower risk of heart failure and death in patients initiated on sodium-glucose cotransporter-2 inhibitors versus other glucose-lowering drugs: The CVD-REAL study (comparative effectiveness of cardiovascular outcomes in new users of sodium-glucose cotransporter-2 inhibitors). *Circulation*, 136(3), 249-259.
- Kraut, J.A., Kurtz, I., 2005. Metabolic acidosis of CKD: diagnosis, clinical characteristics, and treatment. *Am. J. Kidney Dis.* 45, 978–993.
- Lee, C.Y., Horng, J.L., Liu, S.T., Lin, L.Y., 2020. Exposure to copper nanoparticles impairs ion uptake, and acid and ammonia excretion by ionocytes in zebrafish embryos. *Chemosphere* 261, 128051.
- Li, K., Wu, J.Q., Jiang, L.L., Shen, L.Z., Li, J.Y., He, Z.H., Wei, P., Lv, Z., & He, M.F., 2017. Developmental toxicity of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid in zebrafish embryos. **Chemosphere**, 171, 40-48.
- Li, J., Zhu, Y., Zhao, X., Zhao, L., Wang, Y., Yang, Z., 2022. Screening of anti-heart failure active compounds from fangjihuangqi decoction in verapamil-induced zebrafish model by anti-heart failure index approach. *Front. Pharmacol.* 13, 999950.
- Lin, L.Y., Horng, J.L., Kunkel, J.G., Hwang, P.P., 2006. Proton pump-rich cell secretes acid in skin of zebrafish larvae. *Am. J. Phys. Cell Phys.* 290, C371–C378.
- Lin, L.-Y., Hung, G.-Y., Yeh, Y.-H., Chen, S.-W., Horng, J.-L., 2019. Acidified water impairs the lateral line system of zebrafish embryos. *Aquat. Toxicol.* 217, 105351. Mair, J., Hammerer-Lercher, A.,
- Lossner, M.R., Bernard, C., Beaudeau, J.L., Pison, C., & Payen, D., 1997. Glucose modulates hemodynamic, metabolic, and inflammatory responses to lipopolysaccharide in rabbits. *Journal of Applied Physiology*, 83, 1566-1574.
- Puschendorf, B., 2001. The impact of cardiac natriuretic peptide determination on the diagnosis and management of heart failure. *Clin. Chem. Lab. Med.* 39, 571–588.
- Man, J., Barnett, P., & Christoffels, V.M., 2018. Structure and function of the Nppa-Nppb cluster locus during heart development and disease. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 75(8), 1435-1444.
- Narumanchi, S., Wang, H., Perttunen, S., Tikkanen, I., Lakkisto, P., Paavola, J., 2021. Zebrafish heart

failure models. *Front. Cell Dev. Biol.* 9, 662583.

Nemtsas, P., Wettwer, E., Christ, T., Weidinger, G., & Ravens, U., 2010. Adult zebrafish heart as a model for human heart? An electrophysiological study. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 48, 161-171.

Oka, T., Maillet, M., Watt, A.J., Schwartz, R.J., Aronow, B.J., Duncan, S.A., & Molkentin, J.D., 2006. Cardiac-specific deletion of Gata4 reveals its requirement for hypertrophy, compensation, and myocyte viability. *Circulation Research*, 98(6), 837-845.

Pan, T.C., Liao, B.K., Huang, C.J., Lin, L.Y., Hwang, P.P., 2005. Epithelial Ca²⁺ channel expression and Ca²⁺ uptake in developing zebrafish. *Am. J. Phys. Regul. Integr. Comp. Phys.* 289, R1202–R1211.

Pelster, B., Burggren, W.W., 1996. Disruption of hemoglobin oxygen transport does not impact oxygen-dependent physiological processes in developing embryos of zebra fish (*Danio rerio*). *Circ. Res.* 79, 358–362.

Perrino, C., & Rockman, H.A., 2006. GATA4 and the two sides of gene expression reprogramming. *Circulation Research*, 98(6), 715-716.

Perrichon, P., Grosell, M., & Burggren, W.W., 2017. Heart performance determination by visualization in larval fishes: influence of alternative models for heart shape and volume. *Frontiers in Physiology*, 8, 464.

Pouretezadi, S.J., Wingert, R.A., 2016. Little fish, big catch: zebrafish as a model for kidney disease. *Kidney Int.* 89, 1204–1210.

Prahash, A., & Lynch, T., 2004. B-type natriuretic peptide: a diagnostic, prognostic, and therapeutic tool in heart failure. *American Journal of Critical Care*, 13(1), 46-55.

Ronco, C., Bellasi, A., Di Lullo, L., 2018. Cardiorenal syndrome: an overview. *Adv. Chronic Kidney Dis.* 25, 382–390.

Sant, K.E., & Timme-Laragy, A.R., 2018. Zebrafish as a model for toxicological perturbation of yolk and nutrition in the early embryo. *Current Environmental Health Reports*, 5(1), 125-133.

Schlesinger, J., Schueler, M., Grunert, M., Fischer, J.J., Zhang, Q., Krueger, T., Lange, M., Tonjes, M., Dunkel, I., & Sperling, S.R., 2011. The cardiac transcription network modulated by Gata4, Mef2a, Nkx2.5, Srf, histone modifications, and microRNAs. **PLoS Genetics**, 7, e1001313.

Sergeeva, I.A., Hooijkaas, I.B., Van Der Made, I., Jong, W.M.C., Creemers, E.E., & Christoffels, V.M., 2014. A transgenic mouse model for the simultaneous monitoring of ANF and BNP gene activity during heart development and disease. *Cardiovascular Research*, 101(1), 78-86.

Shadrin, A.M., Ozerniuk, N.D., 2002. Development of the gill system in early ontogenesis of *Danio* and nine spike stickleback. *Ontogenez* 33, 118–123.

Shih, T.H., Horng, J.L., Liu, S.T., Hwang, P.P., Lin, L.Y., 2012. Rhcg1 and NHE3b are involved in ammonium-dependent sodium uptake by zebrafish larvae acclimated to low-sodium water. *Am. J. Phys. Regul. Integr. Comp. Phys.* 302, R84–R93.

Shih, T.H., Horng, J.L., Lai, Y.T., Lin, L.Y., 2013. Rhcg1 and Rhbg mediate ammonia excretion by ionocytes and keratinocytes in the skin of zebrafish larvae: H⁺-ATPase- linked active ammonia excretion by ionocytes. *Am. J. Phys. Regul. Integr. Comp. Phys.* 304, R1130–R1138.

- Shih, Y.H., Zhang, Y., Ding, Y., Ross, C.A., Li, H., Olson, T.M., & Xu, X., 2015. Cardiac transcriptome and dilated cardiomyopathy genes in zebrafish. *Circulation: Cardiovascular Genetics*, 8(2), 261-269.
- Strahle, U., Scholz, S., Geisler, R., Greiner, P., Hollert, H., Rastegar, S., Schumacher, A., Selderslaghs, I., Weiss, C., Witters, H., 2012. Zebrafish embryos as an alternative to animal experiments—a commentary on the definition of the onset of protected life stages in animal welfare regulations. *Reprod. Toxicol.* 33, 128–132.
- Thomas, S.G., Paterson, D.H., Cunningham, D.A., McLellan, D.G., Kostuk, W.J., 1993. Cardiac output and left ventricular function in response to exercise in older men. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 71, 136–144.
- Wang, Y.F., Tseng, Y.C., Yan, J.J., Hiroi, J., Hwang, P.P., 2009. Role of SLC12A10.2, a Na-Cl cotransporter-like protein, in a Cl uptake mechanism in zebrafish (*Danio rerio*). *Am. J. Phys. Regul. Integr. Comp. Phys.* 296, R1650–R1660.
- Yalcin, H.C., Amindari, A., Butcher, J.T., Althani, A., Yacoub, M., 2017. Heart function and hemodynamic analysis for zebrafish embryos. *Dev. Dyn.* 246, 868–880.
- Zhu, X.Y., Wu, S.Q., Guo, S.Y., Yang, H., Xia, B., Li, P., Li, C.Q., 2018. A zebrafish heart failure model for assessing therapeutic agents. *Zebrafish* 15, 243–253.
- Zon, L.I., Peterson, R.T., 2005. In vivo drug discovery in the zebrafish. *Nat. Rev. Drug Discov.* 4, 35–44.

【評語】 090018

1. 創新性與重要性:

本研究利用斑馬魚胚胎心衰竭模型探討 SGLT2 抑制劑 Dapagliflozin 的作用機制，具有重要的創新性和臨床意義。研究通過 Verapamil 誘導斑馬魚胚胎心衰竭，並深入分析 Dapagliflozin 對表皮離子細胞的調控作用，為理解 SGLT2 抑制劑在心衰竭治療中的機制提供了新的視角。這種利用斑馬魚模型研究心衰竭藥物機制的方法，不僅創新地結合了發育生物學和藥理學，還為心衰竭治療策略的開發提供了重要的實驗基礎。研究結果顯示 Dapagliflozin 能夠影響特定離子細胞亞型的密度，這一發現為理解 SGLT2 抑制劑在心衰竭治療中的作用機制提供了新的線索。

2. 優點:

該研究採用了多角度的實驗方法，包括心臟功能評估、離子細胞密度分析、電子顯微鏡觀察以及基因表達分析，全面評估 Verapamil 和 Dapagliflozin 對斑馬魚胚胎的影響。其次，研究不僅關注了心臟功能的變化，還深入探討了表皮離子細胞的變化，這種全面的分析方法有助於更深入地理解藥物作用機制。特

別是，研究發現 Dapagliflozin 能夠增加富含 $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPase 的 HR 細胞和富含 $\text{H}^+\text{-ATPase}$ 的 NaR 細胞密度，這為理解 SGLT2 抑制劑的作用機制提供了新的視角。此外，研究還考慮了 Valsartan 的使用，雖然摘要中未詳細描述，但這種多藥物組合的研究方法為臨床治療策略的優化提供了重要參考。

3. 待改進的部分:

該研究對臨床應用潛力的討論較少，建議進一步探討 Dapagliflozin 在臨床心衰竭患者中的應用及其對水腫等症狀的改善效果，以突顯研究的臨床價值。其次，雖然研究考慮了 Valsartan 與 Dapagliflozin 的組合使用，但缺乏對兩者在斑馬魚模型中具體交互作用的全面評估。建議進行更多實驗來確認兩者的協同效應、對心臟功能的綜合影響及潛在的副作用。此外，研究結果顯示，與控制組相比，Verapamil/Dapagliflozin 或 Verapamil/Valsartan 處理後斑馬魚胚胎卵黃囊區域離子細胞數目反而減少，而 Verapamil/Dapagliflozin/Valsartan 組合又使其恢復到與控制組相當的水平，這一現象需要進一步解釋。最後，研究摘要應該提到使用 Valsartan 後的成效，以全面呈現研究結果。這些改進將有助於增強研究的完整性和臨床相關性。