

# 目錄

中文摘要.....	1
Abstract.....	3
前言.....	5
一. 呼吸空氣魚類.....	5
二. 魚類鰓部的構造及功能.....	7
三. MR 細胞.....	9
四. 實驗動物選擇的理由.....	13
五. 實驗目的與假說.....	14
材料與方法.....	16
一. 實驗動物.....	16
二. 研究方法.....	16
三. 實驗設計與步驟.....	22
實驗結果.....	25
討論.....	37
結語.....	47
參考文獻.....	48
表及圖目.....	53



## 中文摘要

魚類的鰓具有多種生理功能，如氣體交換、滲透壓調節、酸鹼平衡和含氮廢物的排除，這些功能之間可能有消長的現象。鰓部的上皮細胞主要由平鋪細胞與富含粒線體細胞（MR 細胞）組成，平鋪細胞主要功能為進行氣體交換，而 MR 細胞主要功能為進行離子調節。MR 細胞的分佈主要在鰓絲與鰓薄板間區，部分魚種在鰓薄板上亦有 MR 細胞的分佈。外界環境的改變，會直接影響 MR 細胞的增生與分化。近來有研究顯示，能直接利用空氣來進行氣體交換的呼吸空氣魚類，似乎都具有鰓薄板 MR 細胞。因此當同時面臨多種環境壓力時，鰓的各種生理功能之間會如何調整，有待釐清。鰓部上皮細胞的增生被描述為發生在鰓絲上，但當環境離子濃度降低時，MR 細胞數量卻在鰓薄板上大量增加，因此新產生的鰓薄板 MR 細胞的來源並不清楚。本實驗要測試兩個假說，首先，水生型呼吸空氣的魚類在面臨離子調節的壓力下，是否因其具有直接利用空氣進行氣體交換的能力，而能在鰓薄板上產生 MR 細胞；並且要探討，鰓絲上的 MR 細胞是否由鰓絲上增生再轉移到鰓薄板。本實驗以呼吸空氣窄鹽性的淡水魚——珍珠馬甲（*Trichogaster leeri*）作為實驗材料，並以組織切片與免疫組織染色法觀察以及標定鰓部上皮細胞。首先，將魚隻轉移到不同水中溶氧量以及呼吸空氣能力限制與否的處理下，以檢測鰓薄板 MR 細

胞的數目是否有變化。結果顯示，當轉移到去離子水環境使 MR 細胞數目增加後，在正常溶氧量的處理下，能夠行使呼吸空氣組的鰓薄板 MR 細胞數目顯著高於不能行使呼吸空氣組。在同樣能行使呼吸空氣的處理下，不同水中溶氧量的各處理組之間無顯著差異，顯示呼吸空氣能力能提高鰓薄板 MR 細胞的數目。在探討鰓薄板 MR 細胞來源的實驗，取樣本前 1 小時注射 BrdU，鰓薄板上具有新增生細胞，但此細胞並非 MR 細胞，表示鰓薄板具有未分化細胞。另外在量化新增生 MR 細胞的實驗，轉移到去離子水後，鰓薄板上所增加的 MR 細胞，僅有少部分為新增生細胞。因此，雖然無法完全排除是否有鰓薄板 MR 細胞從鰓絲增生再轉移到鰓薄板，鰓薄板 MR 細胞可能是由鰓薄板未成熟的細胞分化而來。

## Abstract

Fish gills perform a variety of physiological functions, including gas exchange, osmoregulation, acid-base balance and excretion of nitrogenous wastes. There may be trade-offs among these functions in gills. Gill epithelia consist of two main types of cells, including the pavement cells and mitochondria-rich cells (MR cells). The function of pavement cell is respiration and that of MR cell is ion regulation. MR cells are found especially in gill filament and the interlamellar region. In some species, MR cells are also observed in the gill lamellae. Change in external milieu can directly affect the proliferation and differentiation of MR cells. A recent study reported the likelihood of having lamellar MRCs ( $MRC_L$ ) in air-breathing fishes which can use air to exchange gas directly. It is interesting to study how the physiological modification in fish gills upon environmental changes. It is known that proliferation is mainly on the filament and the number of  $MRC_L$  would increase in response to a decrease in the environmental ion concentration. Nevertheless, the source of  $MRC_L$  is currently unclear. Therefore, there were two hypotheses in my study. First, upon facing the ionic stress those air-breathing fish can have more  $MRC_L$ s. Second, the  $MRC_L$ s are proliferated on filament and migrated to lamella. The experiment material was the air-breathing, stenohaline freshwater fish, pearl gourami (*Trichogaster leeri*). The paraffin method and immunohistological

staining were used to examine and identify the epithelial cells. First, *T. leeri* was transferred into different dissolved oxygen media and restrained from air-breathing behavior to examine the number of  $MRC_L$ s. My results indicated that the number of  $MRC_L$  in air-breathing group was significantly higher than non-air-breathing group in normoxia condition. However, the number of  $MRC_L$  were not significantly different between normoxia and hypoxia groups when both of the groups can perform air breathing behavior. These results supported the hypothesis that the air-breathing ability can increase the number of  $MRC_L$ . In the experiment of the source of  $MRC_L$ , there were newly differentiated cells on the lamellae when BrdU was injected at one hour before sampling. The results suggested that there were undifferentiated cells on the lamellae. In the experiment of the quantification of the newly proliferated MR cells, only few newly differentiated MR cells on lamellae was found when the fish were transferred into deionized water. In conclusion, although it cannot be excluded that some of the  $MRC_L$ s may be proliferated from filaments and migrated to lamellae, current results suggested that  $MRC_L$ s can be differentiated *in situ* from the immature cells of lamellae.

# 前言

## 一、呼吸空氣魚類

### (一) 呼吸空氣魚類的類型

魚類氣體交換的機制一般可分為水中呼吸 ( water-breathing ) 與呼吸空氣 ( air-breathing )。呼吸空氣的魚類，除了能用鰓在水中呼吸外，還能直接利用空氣來進行氣體交換。依據呼吸空氣的模式與棲地，可分為兩棲型呼吸空氣魚類 ( amphibious air-breathing fishes ) 與水生型呼吸空氣魚類 ( aquatic air-breathing fishes )。兩棲型的呼吸空氣魚類，棲息於海洋或潮間帶，適陸性強，具有短暫上陸的能力，在離開水體時進行呼吸空氣，通常以皮膚、鰓或鰓腔黏膜輔助呼吸空氣；而水生型的呼吸空氣魚類，大多棲息於淡水，不具上陸能力，多具有特化的器官來輔助呼吸空氣，例如：肺、腸或囊狀構造。水生型呼吸空氣魚類當中又可區分為偶發型 ( facultative ) 與連續型 ( continuous )，偶發型呼吸空氣魚類在正常溶氧量的水中並不呼吸空氣，但仍具有能夠行使呼吸空氣的能力以應付水中低溶氧量 ( hypoxia ) 與高二氧化碳含量 ( hypercapnia )，或需氧量的提升；連續型呼吸空氣魚類不論在何種溶氧量的環境中，皆會在一段時間內呼吸空氣，而呼吸空氣的頻率則會受到水中溶氧量、水溫以及活動狀態

的影響。連續型呼吸空氣魚類又可進一步區分為必須型 (obligatory) 以及非必須型 (non-obligatory), 必須型呼吸空氣魚類無法僅以水中呼吸來維持所需要的氧氣含量, 而必須倚賴呼吸空氣生存; 反之, 非必須型呼吸空氣魚類, 並不需倚賴呼吸空氣來維持生存 (Graham 1997; Brauner *et al.* 2004)。

## (二) 輔助呼吸空氣器官

呼吸空氣魚類具有輔助呼吸空氣的器官 (accessory air-breathing organ, ABO), 輔助呼吸空氣器官主要可以分為三種類型, 第一類型為肺或氣鰓, 使用這一類輔助呼吸空氣器官的魚種是屬於較為原始的硬骨魚類, 例如: 非洲肺魚屬 (*Protopterus*) 與南美肺魚屬 (*Lepidosiren*) 的魚類使用肺來進行呼吸空氣, 雀鱧屬 (*Lepisosteus*) 的魚類則是使用氣鰓。第二類型的輔助呼吸空氣器官, 分別為口 (buccal)、咽 (pharyngeal)、鰓腔與鰓蓋膜的上皮組織, 或者為鰓腔的衍生物等, 都具有輔助呼吸空氣的功能, 這類型的輔助呼吸空氣器官出現在較為進化的硬骨魚類頭部, 例如: 攀鱸屬 (*Anabantoids*) 的魚類具有由鰓腔所衍生的迷器 (labyrinth) 來輔助呼吸空氣, 而鱧屬 (*Channa*) 的魚類則以口與咽部的上皮組織來輔助呼吸空氣。第三種類型的輔助呼吸空氣器官是皮膚, 例如: 虎魚科 (*Gobiidae*) 的魚類以皮膚輔助

呼吸 (Graham 1997)。

隨著輔助呼吸空氣器官類型的不同，會有不同的特化循環系統。一般哺乳動物及鳥類的循環系統屬於雙循環系統，即具有肺循環以及體循環系統，而大部分的魚類則為單循環系統，即血液通過體循環之後未分流而直接進入鰓，並在鰓部進行二氧化碳排除與氧氣的吸收後，最後再回到體循環。呼吸空氣魚類因為具有輔助呼吸空氣器官的存在，因此循環系統十分接近雙循環系統，例如：攀鱸屬的魚類具有迷器，血液循環的過程當中，先經由心室流入第一與第二對鰓，再流入迷器進行氧氣的吸收，最後流入心房，完成第一次的循環，接著由心室流入第三與第四對鰓，再進入體循環，經過體循環之後再回到心房，即完成第二次的循環 (Ishimatsu *et al.* 1979 ; Graham 1997)。而輔助呼吸空氣器官的類型會對於循環系統的複雜度有所影響，例如具有迷器的呼吸空氣魚類的循環系統較接近雙循環系統，而使用皮膚呼吸空氣的？虎科魚類，循環系統則較接近一般魚類的單循環系統 (Graham 1997)。

## 二、魚類鰓部構造及功能

### (一) 基本構造與上皮細胞的種類



鰓由鰓弓、鰓耙、鰓絲及鰓薄板構成，鰓弓上有成對的鰓絲，每根鰓絲上有兩排鰓薄板。根據鰓上血管的分佈位置，鰓絲表皮可分為出鰓動脈區（efferent edge）、入鰓動脈區（afferent edge）及鰓薄板間區（interlamellar region）。鰓上皮組織主要有四種上皮細胞，包括平鋪細胞（pavement cell）、富含粒線體細胞（mitochondria-rich cell, MR 細胞）、黏液細胞（mucus cell）及未分化細胞（undifferentiated cell）（Laurent and Dunel 1980；Wilson and Laurent 2002）。平鋪細胞分佈在上皮組織的最外層，佔鰓部 90% 以上的面積，在鰓絲上為多層細胞，鰓薄板上為單層，細胞外型扁平，主要功能是氣體交換，近來有研究顯示平鋪細胞也有可能扮演離子以及酸鹼平衡的功能（Perry 1997）。MR 細胞在大部分魚種中，主要分佈在鰓絲的入鰓動脈區與鰓薄板間區上，但會隨物種以及環境的改變而有所不同，MR 細胞的特徵為富含粒線體，由細胞基底膜向內陷形成的複雜管狀系統，以及細胞頂端具有微絨毛的開口；管狀系統上分佈許多可驅動離子調節的酵素  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase，因此 MR 細胞的主要功能為離子調節。黏液細胞則是分佈在鰓絲的出鰓動脈區，細胞質內有分泌顆粒，能分泌黏性物質以幫助防禦疾病、減低魚游動時水流對鰓的衝擊。未分化細胞多位在表皮基部，細胞較小且形狀不規則。

## (二) 鰓的離子調節功能

魚類生活在水中，離子調節是重要的生理功能。在高張的海水環境中，水分從鰓以及魚體表面流失，故必須飲入大量海水，減少排尿等方式來補償水分流失，而過多的離子再由鰓與腎臟排出，因此鰓上 MR 細胞的功能在海水為氯、鈉離子的排除 (Zadunaisky 1996; Sasai *et al.* 1998)。在低張的淡水環境中，水分大量進入魚體，魚以腎臟過濾水份，大量排尿以排出多餘水分，並利用進食與鰓主動吸收離子來補充體內離子，因此在淡水環境，推測 MR 細胞的功能為負責氯、鈣離子以及氯化鈉的吸收 (Goss *et al.* 1994; Perry 1997; Sasai *et al.* 1998; Chang *et al.* 2001; Katoh and Kaneko 2002; Chang *et al.* 2003)。

## 三、MR 細胞

### (一) MR 細胞的分佈

在多數的魚種，MR 細胞都分佈在鰓絲的入鰓動脈區與鰓薄板間區上，某些魚種在鰓薄板上也具有 MR 細胞。外界環境鹽度與離子濃度改變，會直接影響 MR 細胞的增生與分化，以調節生理機能來適應環境改變 (Laurent *et al.* 1994)，例如：*Hypostomus plecostomus* 與 *Hypostomus tietensis* 轉移到去離子水中馴養 15 天，會使鰓絲與鰓薄

板上產生大量的 MR 細胞增生 ( Fernandes *et al.* 1998 ; Fernandes and Perna-Martins 2002 )。除了環境因素可以影響 MR 細胞分佈外 , 某些賀爾蒙亦可影響 MR 細胞的分佈( Laurent and Perry 1990; Sakamoto *et al.* 2001 )。例如將皮質醇與 ovine growth hormone 同時注射到虹鱒 ( *Oncorhynchus mykiss* ) 體內 , 能使 MR 細胞增大且數量增加( Bindon *et al.* 1994 )。因此離子濃度或鹽度的改變 , 以及賀爾蒙的注射都可以改變 MR 細胞的分佈與增生。

## (二) 鰓薄板 MR 細胞分佈對呼吸效率的影響

魚類的鰓為一種多功能的器官 , 具有氣體交換、滲透壓調節、酸鹼平衡和含氮廢物排除等功能( Perry and Laurent 1993; Evans *et al.* 2005 ) , 當多種功能同時在鰓上進行時 , 這些功能之間可能有消長的現象。過去有關氣體交換和離子調節 , 這兩種功能的研究發現 , 鰓薄板 MR 細胞增生對於離子調節有助益 , 但卻同時因鰓薄板上 MR 細胞增生使鰓薄板的平均厚度增加 , 當鰓薄板厚度增加則會使血水屏障( blood-to-water diffusion distance ) 增厚而降低呼吸效率( Bindon *et al.* 1994 ; Greco *et al.* 1995 ; Perry 1998 )。面臨呼吸效率降低的壓力下 , 不同的魚種有不同補償機制 , 例如 : 虹鱒 ( *Oncorhynchus mykiss* ) 會進行過度換氣 ( hyperventilation ) 以增加血液中氧氣分壓與降低血

液中二氧化碳分壓 ( Greco *et al.* 1995 ), 但是過度換氣會增加能量的消耗, 故只用於短期缺氧時的補償機制; 在長期低氧的情況下, 則是提高 hemoglobin-oxygen binding affinity 以增加鰓部的氧氣吸收, 或是分泌 catecholamine hormone 到循環系統來調整鰓部的氧氣吸收量與氧氣運送的方式 ( Randall and Perry 1992; Perry 1998 )。對於呼吸空氣魚類, 解決呼吸效率降低的補償機制即為利用輔助呼吸空氣的器官或行為 ( Graham 1997 )。

負責進行離子調節的 MR 細胞多位在鰓絲, 而鰓薄板上皮組織多為負責氣體交換的平鋪細胞, 因此對於一般的魚種, 鰓絲與鰓薄板分別進行不同的功能, 且功能之間未有互相消長的情形。但當負責氣體交換的鰓薄板出現 MR 細胞, 勢必在鰓薄板上有功能之間消長的情形。環境改變會使 MR 細胞分佈不同, 而導致鰓薄板 MR 細胞出現, 但為何某些魚種在原本棲息環境中即具有鰓薄板 MR 細胞呢? 近來發現, 鰓薄板上的 MR 細胞與呼吸空氣能力有相當程度的相關性, Lin 與 Sung ( 2003 ) 在 66 種魚類研究中發現, 不論在科 ( families ) 屬 ( genera ) 與種 ( speices ) 的分類階層下, 呼吸空氣魚類都較非呼吸空氣魚類容易有鰓薄板 MR 細胞, 顯示鰓薄板 MR 細胞與呼吸空氣能力有顯著正相關。

### (三) MR 細胞的增生與分化

在研究有關於 MR 細胞增生與分化的來源必須先找出未分化細胞的位置，因此必須對於鰓上皮細胞的組成做研究。Chretien and Pisam (1986) 以自動放射線照相法 (radioautographic study) 與穿透式電子顯微鏡 (transmission electron microscope, TEM) 觀察虹?

(*Lebistes reticulatus*) 鰓上皮細胞的組成，發現鰓絲上皮細胞的最內層與中層為未分化細胞，最外層則為已分化細胞，其中主要的細胞類型為平鋪細胞與 MR 細胞；而鰓薄板上皮細胞只由兩層細胞構成，內層為未分化細胞以及外層的平鋪細胞，因此，在此篇研究中認為在鰓絲與鰓薄板皆有未分化細胞。但部份學者對於鰓薄板上的細胞組成有不同的看法，他們認為未分化細胞大多位在鰓絲，但是鰓薄板上並不具有未分化細胞存在 (Laurent *et al.* 1994; Uchida and Kaneko 1996)。

### (四) MR 細胞的來源

目前，鰓薄板 MR 細胞的來源並不清楚。虹鱒 (*Onchorhynchus mykiss*) 轉移到去離子水環境 2 天後，只在鰓絲上有細胞增生的現象，而鰓薄板則無，因此鰓薄板 MR 細胞被推論為是由鰓絲增生，再轉移到鰓薄板上 (Laurent *et al.* 1994)。鮭魚 (*Oncorhynchus keta*) 的幼魚從淡水轉移到海水後，新增生細胞主要出現在鰓絲，因此也同樣推論

鰓薄板 MR 細胞是轉移自鰓絲 (Uchida and Kaneko 1996)。目前關於 MR 細胞來源的研究，所使用的魚種大多為不具有鰓薄板 MR 細胞或者為周緣性的魚類，例如：鮭魚與鱒魚在幼魚時期具有鰓薄板 MR 細胞，但接近成體且即將進入海水的時期，便不再具有鰓薄板 MR 細胞。因為物種選擇的關係，鰓薄板 MR 細胞是否源自鰓絲所增生並轉移而來，或許無法用以解釋其他的魚種。

#### 四、實驗動物選擇的理由

為了研究呼吸空氣能力對於鰓薄板 MR 細胞分佈的影響，必須控制呼吸空氣魚類的呼吸空氣能力，因而實驗動物的選擇則必須考慮呼吸空氣的類型。兩棲型的呼吸空氣魚類，因為具有短暫上陸的能力，所以呼吸方式以及滲透壓調節機制更加的複雜，且排氨的方式也與水生型呼吸空氣魚類有很大的不同。攀鱸亞目的呼吸空氣魚類具有特化輔助呼吸空氣器官，且具有在魚類中屬於較特殊的雙循環系統，因此能以限制呼吸空氣能力的實驗方法，測試呼吸空氣能力對鰓部的影響。故實驗選用水生型呼吸空氣魚類—珍珠馬甲 (*Trichogaster leeri*) 為實驗動物。

## 五、實驗目的與假說

### (一) 呼吸空氣能力對於鰓薄板 MR 細胞分佈的影響

多數的魚種，MR 細胞分佈在鰓絲表皮，但有些魚種在鰓薄板也有 MR 細胞的分佈。近來研究顯示，呼吸空氣魚類似乎都具有鰓薄板 MR 細胞。為何呼吸空氣魚類的鰓薄板能夠有 MR 細胞的分佈？本實驗先降低環境中離子濃度，再控制能否行使呼吸空氣與水中溶氧量作為處理，最後計算鰓薄板 MR 細胞數目。目的是要測試對水生型呼吸空氣魚類能夠具有鰓薄板 MR 細胞的變因。這部分的實驗假說是：水生型呼吸空氣魚類在面臨離子調節的壓力下，因其具有呼吸空氣的能力可輔助氣體交換，而使原本主要進行氣體交換的鰓薄板，能產生 MR 細胞以應付離子調節的壓力。

### (二) 鰓薄板 MR 細胞的來源

降低環境中離子濃度會造成鰓薄板 MR 細胞數目的增加，這些新出現的鰓薄板 MR 細胞的來源為何？首先，必須先瞭解未分化細胞在鰓上分佈的位置，是只分佈在鰓絲？或是在鰓薄板也有分佈？實驗觀察分為兩部份，首先將魚轉移到低離子濃度的環境下，取鰓部組織之前標定當時新增生的細胞，目的在測試鰓薄板上是否具有未分化細

胞。當確定未分化細胞的位置之後，其次探討 MR 細胞是否有從鰓絲轉移到鰓薄板的現象？這部分的實驗是將魚轉移到低離子濃度環境的同時，立即以 BrdU 標定新增生之細胞，並以免疫組織染色法標定新增生細胞與 MR 細胞，再分別計算鰓絲與鰓薄板上新增生 MR 細胞與 MR 細胞的數量，另外將魚隻轉移到正常離子濃度環境以同樣的方法進行實驗，以作為對照組。實驗目的在以鰓絲與鰓薄板新增 MR 細胞的數量變化，來判定是否有 MR 細胞由鰓絲轉移到鰓薄板。另外，計算實驗中各時間點，新增生 MR 細胞與 MR 細胞的比例，來判定 MR 細胞是否直接來自鰓薄板。



# 材料與方法

## 一、 實驗動物

本實驗選用珍珠馬甲 (*Trichogaster leeri*)，屬於鱸形目 (Perciformes) 攀鱸亞目 (Anabantoidei) 絲足鱸科 (Osphronemidae) 毛足鱸屬 (*Trichogaster*)，為窄鹽性 (stenohaline) 的淡水魚，亦是水生型的呼吸空氣魚類。在前人研究中，已知其鰓薄板上具有 MR 細胞 (Lin and Sung 2003)。珍珠馬甲主要分佈在東南亞地區，多棲息在叢林內的細流與黑水域的沼澤地，此種棲地因為腐植質沉積分解，容易造成水中低溶氧量的環境。本實驗所需之珍珠馬甲自水族館購得後，將其馴養在曝氣自來水中達一個星期以上再進行實驗，控制水溫  $28 \pm 1$ ，光週期 13 小時日照/11 小時黑暗，每天以適量魚飼料 (NOVO bits, JBL) 餵食一次。實驗中所使用的魚不分性別，體長 7-12 cm，體重 5-11 g。

## 二、 研究方法

### (一) 馴養與實驗水質控制

馴養水質使用加熱、過濾的曝氣自來水，控制水溫  $28 \pm 1$ ，採

循環過濾，並定期清洗及更換濾棉，實驗用去離子水採用 Water purification system ( PLATINUM, Taiwan ) 所製造，馴養以及實驗用水測定值如表一。

## (二) 馴養及實驗用水槽設置

### 1. 馴養水槽

將  $45 \times 25 \times 30 \text{ cm}^3$  加蓋之塑膠箱，加入約 25 cm 高的馴養水，以空氣幫浦打氣，置入加溫棒控制水溫在  $28 \pm 1$  ，用循環過濾，每週換水，定期清洗及更換濾棉。

### 2. 實驗用水槽

將  $45 \times 25 \times 30 \text{ cm}^3$  加蓋之塑膠桶箱，加入約 25 cm 高的實驗用水。以空氣幫浦打氣，置入加溫棒控制水溫在  $28 \pm 1$  ，每天更換 1/5 實驗用水。

### 3. 限制水面呼吸空氣處理

在實驗用水槽中加入  $25 \times 15 \times 15 \text{ cm}^3$  透明有大量孔洞的隔離箱，隔離箱放置在水面下 5 cm 處，使魚無法接觸水面而限制其進行呼吸空氣，並將隔離箱單邊底部加高，於另一側放入打氣石，如此可使打氣時所產生的氣泡快速離開隔離箱而不會停留在箱中。

### 4. 低含氧量處理

當氮氣溶解於水中時，會使水中溶氧降低，因此在實驗用水槽中打入 100% 氮氣 (N<sub>2</sub>)，並於風管出口加上細化器，以增加氮氣在水中的溶解速度，使水中溶氧量變成低氧 (hypoxia)，每日以溶氧測定儀 (Orion model 810, UK) 監測水中溶氧量。

### (三) 新增生 MR 細胞的觀察

先將珍珠馬甲以 MS-222 (3-aminobenzoic acid ethyl ester, Sigma) 麻醉後，再用注射針筒 (Terumo, U-100 insulin, Japan) 以腹腔注射方式施打 200 µg/g bw 的 BrdU (5-bromouracil-2'-deoxyribose) (Sigma)。BrdU 為 thymidine 的類似物，能夠在 DNA 複製時結合到 DNA 中並且保留在細胞核內，因此能夠用來標定與追蹤新增生的細胞，常被使用在研究細胞增生與分化的過程 (Laurent *et al.* 1994; Uchida and Kaneko 1996; Tsai and Hwang 1998)。取下樣本後，進行組織埋蠟切片，以免疫組織染色法同時標定出新增生細胞與 MR 細胞，最後在光學顯微鏡下觀察。

### (四) 鰓部埋蠟組織切片

將珍珠馬甲置於 P<sub>2</sub>G<sub>0.5</sub> (2% paraformaldehyde and 0.5% glutaraldehyde in 0.2M PB) 固定液中犧牲，此方法可以避免鰓組織有

過多黏液產生。取下第二對鰓，以 P<sub>2</sub>G<sub>0.5</sub> 固定液在 4℃ 下固定 12 小時，以 0.1 M PBS 清洗 6 小時後，以 30%、50%、70%、80%、90%、95% 酒精脫水，再以酒精與 100% 二甲苯 ( xylene ) 1 : 3、1 : 1、3 : 1 的比例進行置換，以石蠟 ( paraffin ) 包埋組織。包埋後的組織以切片機切片 ( RM2025RT, Leica )，切片厚度為 3 μm，進行連續切片，將組織置於覆以 poly-L-lysine solution ( Sigma ) 的玻片上。

## (五) MR 細胞的免疫組織染色

### 1. 標定 MR 細胞

染色方法使用 PicTure-Plus，以 AEC kit 進行染色。以 100% 二甲苯脫蠟，100% 與 95% 酒精置換各 2 分鐘。置入 3% 的過氧化氫溶液 ( H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in 100% methanol ) 10 分鐘，去除細胞內生性抗原反應。0.1 M PBS 清洗 3 次，用 anti-Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase monoclonal antibody ( 1:1000 )( Developmental Studio Hybridoma Bank, Iowa, USA ) 反應 1 小時，0.1 M PBS 清洗。二級抗體 ( HRP/Fab polymer conjugate, Zymed ) 在室溫下反應 30 分鐘，0.1 M PBS 清洗，以呈色劑 ( aminoethyl carbazole (AEC) single solution chromogen, Zymed ) 染色 15 分鐘。用去離子水清洗後，以 Mayer's hematoxylin 染色 10 分鐘作為背景值。最後，以水溶性封片膠 ( GVA mounting solution, Zymed ) 封片。樣本

以光學顯微鏡 ( Nikon, E600, Japan ) 觀察 , 再以數位相機 ( Nikon D1, Japan ) 拍照。

## 2. 標定新增生 MR 細胞

取連續的切片在同一玻片上將進行  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase 與 BrdU 的免疫組織染色。染色方法與上述方法相似。但在置入 3% 的過氧化氫溶液前 , 先置入 2 N 鹽酸 30 分鐘 , 將 DNA 分解並且利於 BrdU 抗體的結合。一級抗體的分別為 anti- $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase monoclonal antibody ( 1:1000 ) 與 anti-BrdU monoclonal antibody ( 1:500 ) ( Developmental Studio Hybridoma Bank, Iowa, USA ) 反應 1 小時 , 之後步驟與上述相同。

## (六) 各種藥品的配製

1. 0.1 M PBS 緩衝液—  $\text{NaCl}$  20 g、  $\text{KCl}$  0.5 g、  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  3.6 g 與  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0.6 g 加入去離子水 200 mL 將其溶解 , 調整 pH 值至 7.4 後 , 再加去離子水至 250 mL。使用時 , 再以去離子水稀釋 10 倍使用。

2. 0.2 M PB 緩衝液—先配製 0.2 M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  與 0.2 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  , 混合後在校正 pH 值至 7.2。

3.  $\text{P}_2\text{G}_{0.5}$  固定液—取聚甲醛 ( paraformaldehyde ) ( Sigma ) 1 g 加入去

離子水至 24 mL 後加熱，再滴入 1 N NaOH 至澄清，冷卻後加入戊二醛 (glutaraldehyde) (Wako) 1 mL 混合，最後加入 0.2 M PB 25 mL。保存於 4 °C，避光。P<sub>2</sub>G<sub>0.5</sub> 固定液的滲透壓約為 350 mOsm/Kg，與實驗物種—珍珠馬甲的體液滲透壓較為接近，故選用之。

4. 20 mg/mL BrdU—將 250 mg BrdU (5-bromo-2'-deoxyuridine) 溶於 12.5 mL 的 Ringer's solution，再利用超音波組織均質機 (Ultrasonic processor, SONICS)，將藥劑充分溶解於溶液中。

5. Ringer's solution—NaCl 3.25 g、KCl 0.1 g、CaCl<sub>2</sub> · H<sub>2</sub>O 0.1 g 與 NaHCO<sub>3</sub> 0.1 g 加入去離子水至 500 mL，滅菌後使用。

## (七) MR 細胞數量的計算

### 1. Image-Pro Plus 觀察鰓薄板上 MR 細胞的數量

組織進行石蠟切片，隨機選取 2 根鰓絲，計算每根鰓絲其鰓薄板上 MR 細胞的數量，為了區分鰓薄板間區的 MR 細胞，故只計算離鰓絲 5 μm 以上的 MR 細胞 (圖一)。利用 Image-Pro Plus 4.0 影像分析軟體 (Media Cybernetics, Silversprings, Md.) 測量鰓薄板長度，計算每 1 mm 單位長度中 MR 細胞的數量。

### 2. Image-Pro Plus 觀察鰓上 MR 細胞與新增生 MR 細胞的數量

組織以連續石蠟切片，同時進行 Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase 與 BrdU 染色，

隨機選取 2 根鰓絲,分別計算每根鰓絲上,鰓絲與鰓薄板上 MR 細胞  
新增生細胞與新增生 MR 細胞的數量。以影像分析軟體測量鰓絲寬  
度,計算每 1 mm 單位長度中 MR 細胞與新增生 MR 細胞的數量。計  
算鰓絲入鰓動脈區,以鰓絲最長徑為基準,超出最長徑範圍內的 MR  
細胞則不予以計算(圖二)。

### 三、實驗設計及步驟

#### (一) 限制呼吸空氣能力與否對鰓薄板 MR 細胞的影響

本實驗的目的在測試假說,水生型呼吸空氣魚類因為能夠使用輔  
助呼吸空氣的器官來協助氣體交換,因而使原本用來進行氣體交換的  
鰓薄板上皮細胞能負責更多離子調節的功能,因此在面臨離子調節壓  
力時,水生型呼吸空氣魚類可具有更多鰓薄板 MR 細胞。

將呼吸空氣魚類—珍珠馬甲,從曝氣自來水轉移到去離子水環境  
中,同時分為水中正常溶氧且可呼吸空氣、水中正常溶氧且不可呼吸  
空氣、水中低溶氧且可呼吸空氣與水中低溶氧量且不可呼吸空氣,四  
個處理組,每組 10 隻。一週後,取鰓絲組織固定,以免疫組織染色  
法標定再以光學顯微鏡觀察 MR 細胞,並計算鰓薄板上 MR 細胞的數  
目。

## (二) 鰓薄板上 MR 細胞的來源

### 1. 檢測鰓薄板上是否具有未分化細胞

將珍珠馬甲從曝氣自來水轉移到去離子水，在第 1、2、3、7 天，4 個時間點取鰓絲樣本，在取樣本前 1 小時注射 BrdU，樣本以免疫組織染色法標定新增生細胞。

### 2. 檢測鰓薄板 MR 細胞是否增生自鰓薄板

將珍珠馬甲從曝氣自來水轉移到去離子水後，在第 2 天取鰓絲樣本，在取樣本前 12 小時注射 BrdU，取下第二對鰓固定，以免疫組織染色法標定再以光學顯微鏡觀察新增生 MR 細胞。

### 3. 檢測鰓薄板 MR 細胞是否增生自鰓絲

將珍珠馬甲從曝氣自來水轉移到去離子水，轉移的同時注射 BrdU，並在 1、2、3、4、7 天，5 個時間點取鰓絲樣本，並以免疫組織染色法標定再以光學顯微鏡觀察新增生 MR 細胞，分別計算鰓絲以及鰓薄板上新增生 MR 細胞與 MR 細胞的數量。

## (三) 統計分析

實驗中所有的數據均以  $\text{mean} \pm \text{S. E.}$  表示。

? 比較限制呼吸空氣能力與否對鰓薄板 MR 細胞數量是有影



響,各處理組下所計算出的鰓薄板 MR 細胞數量,以 Mann-Whitney *U* test 來分析不同處理下是否有差異。

在轉移到曝氣自來水(控制組)與去離子水處理,所取樣的 5 個時間點,所計算出的 MR 細胞、新增生細胞以及新增生 MR 細胞的數量,以 two-way ANOVA 來分析。

以上分析均以  $P < 0.05$  為顯著水準,統計分析軟體為 SAS 8e 版。

## 結果

### 一、限制呼吸空氣能力後，改變水中溶氧量對於存活率的影響

限制呼吸空氣能力，且水中低溶氧量的處理組，在實驗進行時並無法存活。在不可呼吸空氣下，水中正常溶氧量的處理組，溶氧量為 5.50 mg/L，存活率為 88.9% (n = 9)；而水中低溶氧量處理組，溶氧量從 1.8 mg/L 提升到 3.05 mg/L，存活率依然為 0% (n = 3)(表二)。若再將溶氧量提升超過 3.05 mg/L，則水中溶氧量已非低溶氧量，因此，無法對不可呼吸空氣且水中低溶氧量的處理組進行實驗。

### 二、限制呼吸空氣能力與否對鰓薄板 MR 細胞分佈的影響

#### (一) 轉移到去離子水環境，鰓絲與鰓薄板 MR 細胞的分佈變化

在曝氣自來水中至少馴養一週的珍珠馬甲，轉移到曝氣自來水的處理組，MR 細胞零星分佈在鰓薄板上，數量並不多(圖三、A)，而轉移到去離子水處理組，MR 細胞大量出現在鰓薄板(圖三、B)。計算鰓薄板 MR 細胞的數目後，得出轉移到曝氣自來水處理組，其單位長度下的鰓薄板 MR 細胞為  $28.1 \pm 9.7$  個/mm (n = 5)，而轉移到去離

子水處理組，其單位長度下的鰓薄板 MR 細胞為  $70.1 \pm 6.9$  個/mm (  $n = 10$  )。轉移到去離子水處理組的鰓薄板 MR 細胞數量顯著高於轉移到自來水 ( 控制組 ) 的處理組 (  $U = 6.00$  ,  $Z = 2.32$  ,  $df = 1$  ,  $P < 0.05$  , Mann-Whitney  $U$  test ) ( 圖四 )。

## (二) 限制呼吸空氣與否對於鰓薄板 MR 細胞分佈的影響

在曝氣自來水中至少馴養一週的珍珠馬甲，轉移到去離子水並且水中為正常含氧量的處理時，又區分為不可呼吸空氣處理組 ( no access ) 與可自由呼吸空氣 ( free access ) 處理組。可呼吸空氣處理組，在經過轉移到去離子水一週後，有大量的鰓薄板 MR 細胞出現 ( 圖五、A )，而不可呼吸空氣處理組，則仍只有少量的鰓薄板 MR 細胞 ( 圖五、B )。經過計算鰓薄板 MR 細胞數目，得出不可呼吸空氣處理組 ( no access )，其單位長度下的鰓薄板 MR 細胞為  $35.5 \pm 6.0$  個/mm (  $n = 8$  )，而可呼吸空氣 ( free access ) 處理組，其單位長度下的鰓薄板 MR 細胞為  $70.1 \pm 6.9$  個/mm (  $n = 10$  )。不可呼吸空氣處理組的鰓薄板 MR 細胞數量顯著低於可呼吸空氣 ( free access ) 處理組 (  $U = 6.64$  ,  $Z = 2.96$  ,  $df = 1$  ,  $P < 0.05$  , Mann-Whitney  $U$  test ) ( 圖七、A )。

## (三) 水中溶氧量對於鰓薄板 MR 細胞分佈的影響

在曝氣自來水中至少馴養一週的珍珠馬甲，轉移到去離子水且不限制呼吸空氣的處理時，又區分為水中低溶氧量（hypoxia）處理組與正常溶氧量（normoxia）處理組。水中正常溶氧量處理組，在轉移到去離子水一週後，有大量的鰓薄板 MR 細胞出現（圖六、A），而水中低溶氧量處理組，亦有大量的鰓薄板 MR 細胞出現（圖六、B）。經過鰓薄板 MR 細胞數目計算後，水中正常溶氧量處理組，其單位長度下的鰓薄板 MR 細胞為  $70.1 \pm 6.9$  個/mm（ $n = 10$ ），而水中低溶氧量（hypoxia）處理組，其單位長度下的鰓薄板 MR 細胞為  $80.4 \pm 5.6$  個/mm（ $n = 10$ ）。水中低溶氧量處理組的鰓薄板 MR 細胞數量與水中正常溶氧量處理組無顯著差異（ $U = 1.96$ ， $Z = 3.63$ ， $df = 1$ ， $P = 0.16$ ，Mann-Whitney  $U$  test）（圖七、B）。

### 三、鰓薄板上 MR 細胞的來源

在轉移到去離子水處理，於各個時間點取下鰓部組織，並在取鰓前 1 小時注射 BrdU。新增生 MR 細胞的判定是取樣之後，進行連續切片，取連續的切片分別以 anti-BrdU monoclonal antibody 標定新增生細胞，與 anti- $\text{Na}^+$ ， $\text{K}^+$ -ATPase monoclonal antibody 標定 MR 細胞（圖八），若在相同位置標定到新增生細胞與 MR 細胞，此細胞即為新增

生 MR 細胞。

### (一) 鰓薄板上是否具有未分化細胞

發現在各時間點內，皆可以在鰓薄板上發現新增生細胞，但在連續切片的同一個位置上並無發現標定 MR 細胞（圖九）。在轉移到去離子水後第 2 天，鰓薄板間區的上皮組織內層可標定到新增生細胞，但在連續切片的同一位置並未標定 MR 細胞（圖十），至於鰓薄板上，亦可標定到新增生細胞，但在連續切片的同一位置同樣並未標定到 MR 細胞（圖十）。這些觀察顯示，鰓薄板上有產生新增生細胞。

### (二) 鰓薄板 MR 細胞是否增生自鰓薄板

？釐清在轉移到去離子水處理後，在鰓薄板上所標定到新增生細胞是否會分化成 MR 細胞，因此在取鰓部組織前 12 小時注射 BrdU，使新增生細胞有較長的時間分化。在轉移到去離子水處理 2 天後，於取鰓前 12 小時注射 BrdU，可標定到新增生細胞，但在連續切片的同一位置同樣並未標定到 MR 細胞（圖十一）。顯示，新增生細胞要發育為成熟的 MR 細胞需要超過 12 小時的時間。

### (三) 鰓薄板 MR 細胞是否增生自鰓絲，再轉移到鰓薄板

#### 1. 鰓絲 MR 細胞

在曝氣自來水中至少馴養一週的珍珠馬甲，轉移到曝氣自來水的處理下，鰓絲 MR 細胞的數目在轉移後第 1 天為  $28.9 \pm 3.9$  個/mm (n = 5)，第 2 天為  $33.9 \pm 4.6$  個/mm (n = 6)，第 3 天為  $24.6 \pm 4.6$  個/mm (n = 4)，第 4 天為  $32.4 \pm 6.3$  個/mm (n = 4)，第 7 天為  $22.4 \pm 1.2$  個/mm (n = 4)。轉移到去離子水處理下，鰓絲 MR 細胞的數目在轉移後第 1 天為  $16.2 \pm 5.1$  個/mm (n = 8)，第 2 天為  $21.2 \pm 2.7$  個/mm (n = 8)，第 3 天為  $27.5 \pm 6.1$  個/mm (n = 7)，第 4 天為  $23.7 \pm 4.6$  個/mm (n = 7)，第 7 天為  $25.6 \pm 2.7$  個/mm (n = 8)。以 two-way ANOVA 分析在轉移到不同水質（曝氣自來水與去離子水）的處理組，以及轉移不同天數下，鰓絲上 MR 細胞數目是否有差異。結果發現整體而言，不同水質在轉移不同天數下並無顯著差異 ( $F_{9,51} = 1.12$ ,  $P = 0.36$ ，水質,  $F_{1,51} = 3.91$ ,  $P = 0.05$ ，天數,  $F_{4,51} = 0.46$ ,  $P = 0.76$ ，水質  $\times$  天數,  $F_{4,51} = 1.07$ ,  $P = 0.38$ ) (圖十二)。顯示轉移到曝氣自來水與去離子水處理後，不同天數下，鰓絲 MR 細胞數目皆沒有改變。

而鰓絲新增生 MR 細胞與 MR 細胞數目的比例，轉移到曝氣自來水後第 1 天為 14%，第 2 天為 17%，第 3 天為 23%，第 4 天為 30%，第 7 天為 30% (圖十二)。轉移到曝氣自來水 7 天後，新增生 MR 細胞與 MR 細胞數目的比例提升了約 2 倍，顯示雖然轉移後鰓絲 MR 細胞總數量未改變，但其中有一部分的 MR 細胞被新增生 MR 細胞所取

代。鰓絲新增生 MR 細胞與 MR 細胞數目的比例，在轉移到去離子水後第 1 天為 0%，第 2 天為 14%，第 3 天為 16%，第 4 天為 11%，第 7 天為 7%（圖十二）。顯示在轉移去離子水後，第 3 天有最高比例的新增生 MR 細胞，到第 7 天後，新增生 MR 細胞的比例則下降為第 3 天的約 0.5 倍。

## 2. 鰓薄板 MR 細胞

在曝氣自來水中至少馴養一週的珍珠馬甲，轉移到曝氣自來水的處理下，鰓薄板 MR 細胞的數目在轉移後第 1 天為  $5.7 \pm 1.7$  個/mm ( $n = 5$ )，第 2 天為  $5.9 \pm 1.8$  個/mm ( $n = 6$ )，第 3 天為  $4.2 \pm 0.3$  個/mm ( $n = 4$ )，第 4 天為  $6.0 \pm 1.0$  個/mm ( $n = 4$ )，第 7 天為  $5.6 \pm 1.2$  個/mm ( $n = 4$ )。從曝氣自來水轉移到去離子水處理下，鰓薄板 MR 細胞的數目在轉移後第 1 天為  $7.1 \pm 1.1$  個/mm ( $n = 8$ )，第 2 天為  $5.6 \pm 1.2$  個/mm ( $n = 8$ )，第 3 天為  $10.3 \pm 3.2$  個/mm ( $n = 7$ )，第 4 天為  $12.7 \pm 1.7$  個/mm ( $n = 7$ )，第 7 天為  $19.4 \pm 5.5$  個/mm ( $n = 8$ )。以 two-way ANOVA 分析，結果發現不同水質在不同轉移天數，鰓薄板 MR 細胞數目有顯著差異 ( $F_{9,51} = 2.76$ ,  $P < 0.05$ )，不同水質下，鰓薄板 MR 數目有顯著差異，但在轉移不同天數下，鰓薄板 MR 細胞數目並無顯著差異（水質， $F_{1,51} = 7.99$ ,  $P < 0.05$ ，天數， $F_{4,51} = 1.43$ ,  $P = 0.24$ ，

水質 × 天數,  $F_{4,51} = 1.46$ ,  $P = 0.23$ )。進一步以 LSMEANS 分析, 同一轉移天數之下, 曝氣自來水與去離子水處理組的鰓薄板 MR 細胞數量, 結果發現只在轉移第 7 天, 去離子水處理組的鰓薄板 MR 細胞數量顯著高於轉移第 1 與第 2 天 (LSMEANS,  $P < 0.05$ ) (圖十三)。顯示轉移到曝氣自來水不會使鰓薄板 MR 細胞數目增加, 但轉移到去離子水後, 則使鰓薄板 MR 細胞數目增加。

鰓薄板新增生 MR 細胞與 MR 細胞數目的比例, 轉移到曝氣自來水後第 1 天為 3%, 第 2 天為 5%, 第 3 天為 11%, 第 4 天為 20%, 第 7 天為 27%。顯示雖然鰓薄板 MR 細胞總數目未改變, 但其中有一部分的 MR 細胞被新增生 MR 細胞所取代。鰓薄板新增生 MR 細胞與 MR 細胞數目的比例, 轉移到去離子水後第 1 天為 4%, 第 2 天為 9%, 第 3 天為 8%, 第 4 天為 6%, 第 7 天為 6% (圖十四)。顯示轉移到去離子水後, 鰓薄板上所增加的 MR 細胞只有極少部分為新增生 MR 細胞。

### 3. 鰓絲新增生 MR 細胞

鰓絲新增生 MR 細胞的數目在轉移到曝氣自來水後第 1 天為  $4.0 \pm 2.8$  個/mm ( $n = 5$ ), 第 2 天為  $5.8 \pm 2.1$  個/mm ( $n = 6$ ), 第 3 天為  $5.6 \pm 2.9$  個/mm ( $n = 4$ ), 第 4 天為  $9.7 \pm 5.9$  個/mm ( $n = 4$ ), 第 7 天為



6.8 ± 1.2 個/mm ( n = 4 )。鰓絲新增生 MR 細胞的數目在轉移到去離子水後第 1 天為 0.0 ± 0.0 個/mm ( n = 8 ) , 第 2 天為 3.0 ± 2.2 個/mm ( n = 8 ) , 第 3 天為 4.3 ± 2.3 個/mm ( n = 7 ) , 第 4 天為 2.7 ± 1.8 個/mm ( n = 7 ) , 第 7 天為 1.8 ± 1.2 個/mm ( n = 8 )。以 two-way ANOVA 分析, 結果發現不同水質在不同轉移天數下, 鰓絲新增生 MR 細胞無顯著差異 (  $F_{9,51} = 1.40, P = 0.21$  ) , 但在不同水質下, 鰓絲新增生 MR 細胞數目有顯著差異, 而轉移後不同天數的新增生 MR 細胞數目則無顯著差異 ( 水質,  $F_{1,51} = 7.56, P < 0.05$  , 天數,  $F_{4,51} = 0.88, P = 0.48$  , 水質 × 天數,  $F_{4,51} = 0.40, P = 0.81$  ) ( 圖十四 )。

#### 4. 鰓薄板新增生 MR 細胞

鰓薄板新增生 MR 細胞的數目, 在轉移到曝氣自來水後, 第 1 天為 0.2 ± 0.2 個/mm ( n = 5 ) , 第 2 天為 0.3 ± 0.2 個/mm ( n = 6 ) , 第 3 天為 0.4 ± 0.4 個/mm ( n = 4 ) , 第 4 天為 1.0 ± 0.5 個/mm ( n = 4 ) , 第 7 天為 1.2 ± 0.2 個/mm ( n = 4 )。而鰓薄板新增生 MR 細胞的數目, 在轉移到去離子水後, 第 1 天為 0.3 ± 0.2 個/mm ( n = 8 ) , 第 2 天為 0.5 ± 0.2 個/mm ( n = 8 ) , 第 3 天為 0.8 ± 0.3 個/mm ( n = 7 ) , 第 4 天為 0.7 ± 0.4 個/mm ( n = 7 ) , 第 7 天為 1.2 ± 0.4 個/mm ( n = 8 )。以 two-way ANOVA 分析, 不同水質在不同轉移天數下, 鰓薄板新增生 MR 細胞

數目無顯著差異 ( $F_{9,51} = 1.62$ ,  $P=0.13$ ), 而不同水質下鰓薄板新增生 MR 細胞數目無顯著差異, 但不同轉移天數下, 鰓薄板新增生 MR 細胞數目有顯著差異 (水質,  $F_{1,51} = 0.10$ ,  $P = 0.76$ , 天數,  $F_{4,51} = 3.25$ ,  $P < 0.05$ , 水質  $\times$  天數,  $F_{4,51} = 0.34$ ,  $P = 0.85$ )。因為轉移到曝氣自來水與去離子水處理並無顯著差異, 而為了增加樣本重複數, 進一步以 one-way ANOVA 分析時, 將水質的兩種處理合併分析, 僅測試不同轉移天數下鰓薄板新增生 MR 細胞是否有差異。結果發現轉移各天數下的鰓薄板新增生 MR 細胞有顯著差異 ( $F_{4,51} = 3.51$ ,  $P < 0.05$ ), 顯示轉移去離子水並未使鰓薄板增生較多 MR 細胞, 但鰓薄板上有 MR 細胞在進行增生 (圖十五)。

## 5. 鰓絲新增生細胞

轉移到曝氣自來水的處理下, 鰓絲新增細胞的數目在轉移後第 1 天為  $24.5 \pm 2.8$  個/mm ( $n = 5$ ), 第 2 天為  $25.4 \pm 5.4$  個/mm ( $n = 6$ ), 第 3 天為  $16.9 \pm 2.7$  個/mm ( $n = 4$ ), 第 4 天為  $31.9 \pm 2.6$  個/mm ( $n = 4$ ), 第 7 天為  $29.1 \pm 4.7$  個/mm ( $n = 4$ )。轉移到去離子水的處理下, 鰓絲新增細胞的數目在轉移後第 1 天為  $20.0 \pm 7.6$  個/mm ( $n = 8$ ), 第 2 天為  $20.9 \pm 4.9$  個/mm ( $n = 8$ ), 第 3 天為  $23.9 \pm 5.4$  個/mm ( $n = 7$ ), 第 4 天為  $21.4 \pm 7.5$  個/mm ( $n = 7$ ), 第 7 天為  $18.7 \pm 4.3$  個/mm ( $n =$

8)。以 two-way ANOVA 分析，結果發現不同水質在轉移不同天數下並無顯著差異 ( $F_{9,51} = 0.43$ ,  $P = 0.91$ , 水質,  $F_{1,51} = 1.21$ ,  $P = 0.28$ , 天數,  $F_{4,51} = 0.11$ ,  $P = 0.98$ , 水質  $\times$  天數,  $F_{4,51} = 0.54$ ,  $P = 0.70$ ) (圖十六)。顯示鰓絲新增生細胞數目在轉移到不同水質與不同轉移天數下，皆未改變。

而鰓絲新增生 MR 細胞與新增生細胞數目的比例，轉移到曝氣自來水後第 1 天為 16%，第 2 天為 23%，第 3 天為 23%，第 4 天為 30%，第 7 天為 23%。表示轉移到曝氣自來水後，未使新增生 MR 細胞數目增加。鰓絲新增生 MR 細胞與新增生細胞數目的比例，轉移到去離子水後第 1 天為 0%，第 2 天為 14%，第 3 天為 18%，第 4 天為 13%，第 7 天為 9% (圖十六)。表示轉移到去離子水，鰓絲新增生 MR 細胞數目除在轉移第 1 天未標定到外，其餘時間點下未增加。

## 6. 鰓薄板新增生細胞

轉移到曝氣自來水的處理下，鰓薄板新增細胞的數目在轉移後第 1 天為  $6.7 \pm 3.5$  個/mm ( $n = 5$ )，第 2 天為  $5.1 \pm 0.9$  個/mm ( $n = 6$ )，第 3 天為  $5.1 \pm 1.0$  個/mm ( $n = 4$ )，第 4 天為  $8.9 \pm 2.1$  個/mm ( $n = 4$ )，第 7 天為  $10.4 \pm 1.6$  個/mm ( $n = 4$ )。轉移到去離子水的處理下，鰓薄板新增細胞的數目在轉移後第 1 天為  $4.2 \pm 0.7$  個/mm ( $n = 8$ )，第 2

天為  $4.7 \pm 1.0$  個/mm (  $n = 8$  ), 第 3 天為  $7.5 \pm 1.3$  個/mm (  $n = 7$  ), 第 4 天為  $8.0 \pm 2.7$  個/mm (  $n = 7$  ), 第 7 天為  $9.4 \pm 1.5$  個/mm (  $n = 8$  )。以 two-way ANOVA 分析, 發現不同水質在不同轉移天數下, 鰓薄板新增生細胞數目無顯著差異 (  $F_{9,51} = 1.41, P = 0.21$  ), 而不同水質, 鰓薄板新增生細胞數目有顯著差異, 但在轉移不同天數下則無顯著差異 ( 水質,  $F_{1,51} = 0.28, P = 0.60$ , 天數,  $F_{4,51} = 2.70, P < 0.05$ , 水質  $\times$  天數,  $F_{4,51} = 0.45, P = 0.77$  )。因為轉移到曝氣自來水與去離子水處理並無顯著差異, 進一步以 one-way ANOVA 分析, 將水質的兩種處理合併分析, 測試不同轉移天數下鰓薄板新增生細胞是否有差異。結果發現轉移各天數下的鰓薄板新增生細胞有顯著差異 (  $F_{4,51} = 2.80, P < 0.05$  ), 顯示轉移去離子水並未使鰓薄板增生較多細胞, 但鰓薄板上細胞在進行增生 ( 圖十七 )。

鰓薄板新增生 MR 細胞與新增生細胞數目的比例, 轉移到曝氣自來水後第 1 天為 3%, 第 2 天為 5%, 第 3 天為 8%, 第 4 天為 11%, 第 7 天為 12% ( 圖十七 )。顯示在轉移到曝氣自來水之後, 新增生 MR 細胞所佔的比例逐漸上升, 到轉移第 7 天後, 新增生 MR 細胞所佔的比例約為轉移第 1 天的 4 倍。轉移到去離子水後, 鰓薄板新增生 MR 細胞與新增生細胞數目的比例, 第 1 天為 6%, 第 2 天為 11%, 第 3 天為 11%, 第 4 天為 9%, 第 7 天為 13% ( 圖十七 )。顯示轉移

去離子水後，新增生 MR 細胞的比例增加，到轉移後第 7 天增加為第 1 天的約 2 倍。

## 討論

### 一、限制呼吸空氣能力後，改變水中溶氧量對於存活率的影響

有關絲足鱸科魚類（除絲足鱸屬之外，其餘各屬在過去皆隸屬於鬥魚科）呼吸空氣能力的研究並不充足，除了瞭解絲足鱸科魚類與其他攀鱸亞目魚類一樣具有迷器，且為連續型（continuous）呼吸空氣魚類外，對於絲足鱸科之下各屬的呼吸空氣魚類，究竟是屬於必須型（obligatory）或是非必須型（non-obligatory）呼吸空氣魚類，則尚未確定。例如：*Colisa fasciata* 分別被不同的學者判定為必須型以及非必須型呼吸空氣魚類（Ojha *et al.* 1977 cited in Graham, 1997；Mustafa and Mubarak 1980 cited in Graham 1997），呼吸空氣類型判定的不同可能是因為物種鑑定，或者是實驗操作上所產生的差異（Graham 1997）。

珍珠馬甲屬於連續型呼吸空氣魚類，亦即不論在正常溶氧量或低溶氧量的水中，皆會在一段時間間隔內呼吸空氣，但珍珠馬甲屬於必須型或非必須型呼吸空氣魚類則尚未有研究探討。實驗中，限制呼吸空氣能力並改變水中溶氧量為低溶氧（3.05 mg/L）的處理組，珍珠馬甲的存活率為 0%，而水中溶氧量為正常溶氧（5.50 mg/L）的處理組，珍珠馬甲的存活率為 88.9%。顯示，具有特化的輔助呼吸空氣器官的

魚類，在氣體交換的功能上，輔助呼吸空氣器官與鰓的所扮演的角色同樣重要或更為重要，會影響存活率。因此，當限制珍珠馬甲無法到水面呼吸空氣時，迷器就無法發揮輔助氣體交換的能力，只能夠以鰓進行氣體交換，但因迷器的氣體交換能力極為重要，故當水中為正常溶氧量時，只有 88.9% 的存活率，而水中低溶氧量則會使珍珠馬甲死亡。根據存活率來判定呼吸空氣的類型，珍珠馬甲可能屬於介在必須型與非必須型之間的呼吸空氣魚類。

## 二、限制呼吸空氣能力與否對鰓薄板 MR 細胞分佈的影響

過去有許多研究顯示，將某些魚類轉移到低離子濃度的環境下，會使得 MR 細胞增生 (Laurent and Hebibi 1989; Greco *et al.* 1995; Lee *et al.* 1996 a、 b ; Perry 1998)。但對於原棲息環境即為低離子濃度的魚類，則必須轉移到去離子水中才会有 MR 細胞數量的變化 (Moron *et al.* 2003)。因此實驗所選用的珍珠馬甲為窄鹽性淡水魚，是將以曝氣自來水轉移到去離子水，較符合其野外生存環境。

有研究顯示，同屬於呼吸空氣魚類的 *Hypostomus CF. plecostomus* 和 *Hypostomus tietensis*，轉移到去離子水的環境下，皆會使 MR 細胞大量增加 (Fernandes *et al.* 1998 ; Fernandes and Perna-Martins 2001 ;

Fernandes and Perna-Martins 2002)。因此在轉移到去離子水的同時，控制呼吸空氣能力，就能夠瞭解呼吸空氣能力是否影響鰓薄板 MR 細胞的分佈。在實驗結果中，將珍珠馬甲自曝氣自來水轉移到去離子水中 1 週後，鰓薄板 MR 細胞數量明顯的比轉移到自來水中多，與前人的研究相符。

以往在呼吸空氣魚類方面的研究，大部份是針對鰓部的型態變化或者鰓部個別的生理功能進行探討，很少有研究針對呼吸空氣的特性進行氣體交換以及鰓上其他生理功能之間消長的情形做研究。Moron 等人（2003）將同樣屬於虎脂鯉科（Erythrinidae）的魚類，*Hoplias malabaricus* 與 *Hopleryhrinus unitaeniatus* 轉移到去離子水，觀察 MR 細胞的變化，*Hoplias malabaricus* 屬於非呼吸空氣魚類，而 *Hopleryhrinus unitaeniatus* 則屬於呼吸空氣魚類。轉移到去離子水後，*Hoplias malabaricus* 鰓絲與鰓薄板 MR 細胞數目增加，而 *Hopleryhrinus unitaeniatus* 鰓絲 MR 細胞數目未增加，但鰓薄板 MR 細胞數目大幅度增加，根據此結果，作者推論鰓薄板在 *Hopleryhrinus unitaeniatus* 上大量增加的原因是，對於呼吸空氣魚類而言，鰓絲上因有大量的 MR 細胞，因此不具有足夠的空間來產生新 MR 細胞，故當遭遇缺乏離子的環境後，所新產生的 MR 細胞只有出現在鰓薄板才能夠增加離子吸收的能力。這樣的推論仍無法直接說明呼吸空氣能力



與鰓薄板 MR 細胞的關係，而 Lin 與 Sung ( 2003 ) 在研究中發現，在科 ( families ) 屬 ( genera ) 與種 ( speices ) 的分類階層下，呼吸空氣魚類都較非呼吸空氣魚類容易有鰓薄板 MR 細胞。因此本實驗針對這個相關性，以呼吸空氣的魚類來測試，呼吸空氣魚類可以有鰓薄板 MR 細胞是否因為其呼吸空氣的能力。實驗結果顯示當呼吸空氣能力被限制時，的確會使得鰓薄板 MR 細胞的數量減少，並且鰓薄板 MR 細胞的分佈是不受水中含氧量的影響。因此在同樣面臨離子調節壓力時，呼吸空氣能力不受限制的珍珠馬甲，能夠產生更多鰓薄板 MR 細胞，而不受水中含氧量影響。

### 三、鰓薄板上 MR 細胞的來源

此部分的實驗將珍珠馬甲由曝氣自來水轉移到去離子水後，雖然鰓薄板 MR 細胞的數目有顯著高於控制組，但數量少於前一部分有關呼吸空氣能力是否影響鰓薄板 MR 細胞分佈的的實驗，造成此種現象的原因不明，可能因為季節性的因素或者養殖場的馴養環境改變所造成的影響。且有研究顯示缺乏空氣會使呼吸空氣器官的發育受到阻礙 ( Bader 1937 cited in Graham 1997 )，但由於每部分實驗皆採用同一時期的魚隻，因此並不會影響實驗結果。

過去在魚類關於鰓薄板 MR 細胞來源的探討並不多，而且所使用的實驗物種多為洄游性或廣鹽性的魚類（Chretien and Pisam 1986；Laurent *et al.* 1994；Uchida and Kaneko 1996；Tsai and Hwang 1998；Hirai *et al.* 1999），這些物種原本即不具有鰓薄板 MR 細胞，或者因在生活史不同時期的原因，即使有鰓薄板 MR 細胞，也是處於即將消失的階段。有些研究提到環境離子濃度改變會使鰓薄板 MR 細胞增生，則是未針對新增生 MR 細胞進行標定，僅觀察到 MR 細胞數量增加即解釋為 MR 細胞增生（Bindon *et al.* 1994；Perry 1998；Sakuragui *et al.* 2003）。早期針對魚類鰓部上皮組織細胞更新以及分化的研究，是使用重氫標定的 thymidine 注射到魚體以標定新增生細胞（Chretien and Pisam 1986），到近期則改以非放射性的 bromo-deoxyuridine 取代重氫標定的 thymidine（李與黃 1997）。以 BrdU 標定新增生細胞的方法被廣泛的運用在各種組織上，不但可信賴度高而且較傳統以重氫標定 thymidine 的方法省時（Laurent *et al.* 1994）。

欲探討鰓薄板 MR 細胞的來源，必須先釐清未分化細胞的位置。未分化細胞位在鰓絲或是鰓薄板。然而，在不同的研究有不一樣的結果，在此所指未分化細胞為具有增生能力的未分化幹細胞（undifferentiated stem cells）。Chretien 與 Pisam（1986）以穿透式電子顯微鏡觀察 *Lebistes reticulatus* 鰓部上皮組織，發現鰓薄板上具有

未分化細胞，而 Fernandes 與 Perna-Martins ( 2001 ) 同樣以穿透式電子顯微鏡觀察 *Hypostomus CF. plecostomus* 鰓部上皮組織，也發現鰓薄板上有未分化細胞。但是 Laurent 等人 ( 1994 ) 和 Uchida 與 Kaneko ( 1996 ) 分別以 *Oncorhynchus mykiss* 與 *Oncorhynchus keta* 進行實驗，提出未分化細胞位在鰓絲，而鰓薄板不具有未分化細胞。？釐清未分化細胞的位置，實驗中在轉移去離子水後取鰓部組織觀察，並在取鰓組織前 1 個小時注射 BrdU，因此所標定到的新增生細胞皆為注射 BrdU 後 1 個小時所增生的細胞，加上標定 BrdU 僅有 1 個小時，新增生細胞應不會有大幅度的移動。若鰓薄板具有未分化細胞在進行增生，則應會在鰓薄板上觀察到新增生細胞。本實驗的確在鰓薄板上觀察到新增生細胞，因此實驗結果支持鰓薄板上具有未分化細胞。但是這個實驗設計標定 BrdU 僅有 1 個小時，未能有足夠的時間使新增生細胞發育成為成熟的 MR 細胞，因此，在取鰓組織前 1 個小時注射 BrdU 只能夠標定新增生細胞。

Laurent 等人 ( 1994 )，將 *Oncorhynchus mykiss* 注射 cortisol 與 growth hormone 後轉移到去離子水中，並在不同時間點取鰓，取鰓前 1 個小時注射 BrdU 以標定新增生細胞，最後以免疫組織染色法，計算新增生細胞的數目。但因只標定新增生細胞，因此無法以實驗結果來代表 MR 細胞的變化，只能夠說明在各時間點下，有多少數量的新

增生細胞產生。他們以掃描式電子顯微鏡觀察鰓薄板 MR 細胞數目，在轉移到去離子水後，鰓薄板 MR 細胞數目大量增加，但是以免疫組織染色法卻只在鰓薄板標定到少量的新增生細胞，針對這個現象他們提出了兩個推論，第一個推論是新 MR 細胞為原本存在鰓薄板上的幹細胞 ( stem cell )，快速分化而來；第二個推論則是，新 MR 細胞是在鰓絲上增生，再轉移到鰓薄板基部。在本實驗中亦發現轉移到去離子水後，鰓薄板 MR 細胞大量增加，且新增生 MR 細胞並未大量增加的情形。根據本實驗的方法，再計算鰓薄板新增生 MR 細胞，佔轉移後所增加的鰓薄板 MR 細胞數目的比例，發現轉移到去離子水所大量增加的鰓薄板 MR 細胞中，僅有少量為新增生 MR 細胞。因此實驗結果顯示大量增加的鰓薄板 MR 細胞，可能主要是從原本即存在鰓薄板上未成熟的細胞分化而來。但使用 BrdU 進行新增生細胞的標定，需要考慮單次注射 BrdU 是否能夠一次即被魚體吸收 ( Tsai and Hwang 1998 )。根據本實驗結果顯示轉移到去離子水處理後，新增生細胞的數量在轉移各天數之間並沒有顯著差異，而並沒有以階段性逐漸增加新增生細胞的情形，因此表示單次注射 BrdU 可一次被魚體所吸收。單次注射 BrdU 且一次吸收，代表所標定的新增生細胞，可能只包含了轉移後立即進行增生的細胞，因此，目前無法完全排除轉移到去離子水後，新增生 MR 細胞是否有可能自鰓絲上增生再轉移到鰓薄板

上。

而 Uchida 與 Kaneko ( 1996 ) 使用 *Oncorhynchus keta* 進行鹽度轉移的實驗，在轉移的同時注射 BrdU，最後將鰓進行連續切片，進行免疫組織染色，同時標定新增生細胞與 MR 細胞。因此實驗結果能夠觀察到 MR 細胞的 turnover，並且能夠將 turnover 與因鹽度轉移所增生的細胞區分，但是 *Oncorhynchus keta* 為洄游性的魚類，所以並非在整個生活史中都具有鰓薄板 MR 細胞，實驗中的 *Oncorhynchus keta* 即將降海，鰓薄板 MR 細胞的數量逐漸減少，因此 BrdU 標定到的新增生細胞在鰓薄板上數量極少，故作者也未將新增生 MR 細胞在鰓絲與鰓薄板的數量分開計數。在 Uchida 與 Kaneko 的實驗結果中，在第 1 天即可標定到新增生 MR 細胞，且轉移到海水比轉移到淡水有更高的 MR 細胞更新率 ( turnover rate )，Uchida 與 Kaneko 對於鰓薄板 MR 細胞來源的推論是支持 Laurent 等人 ( 1994 )，認為鰓薄板 MR 細胞是增生自鰓絲再轉移到鰓薄板上，因為新增生細胞多在中央靜脈的靜脈竇 ( central venous sinus ) 被發現。

Hirai 等人 ( 1999 ) 將 *Lateolabrax japonicus* 從海水轉移到淡水，再以免疫組織染色法針對 MR 細胞內的  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase 進行標定，分別計算鰓絲與鰓薄板上 MR 細胞的數量，以及轉移後不同天數下鰓薄板 MR 細胞與鰓絲的距離。他們發現由海水轉移到淡水後，鰓絲 MR

細胞數目減少，而鰓薄板 MR 細胞數目增加，且隨著轉移的天數增加，鰓薄板 MR 細胞距離鰓絲越遠，因此他們也推論鰓薄板 MR 細胞是來自鰓絲上的新增生 MR 細胞轉移到鰓薄板上。

在本實驗中，鰓薄板新增生細胞與新增生 MR 細胞再進一步分析之後，皆發現隨轉移天數增加而數目有顯著的增加，顯示在鰓薄板上有細胞在進行增生，此與直接觀察鰓薄板上具有未分化細胞的結果有一致性，唯轉移至去離子水的環境並不影響新增生細胞與新增生 MR 細胞數目改變。

另外，本實驗中所觀察到新增生 MR 細胞出現的時間，除了轉移到去離子水第 1 天後，鰓絲未能觀察到新增生 MR 細胞外，其餘皆在轉移後 1 天即可觀察到新增生 MR 細胞，因此新增生 MR 細胞出現時間非常快速。但新增生 MR 細胞出現的時間，牽涉到新增生細胞在增生後需要多少的時間發育成為成熟的 MR 細胞，在過去不同的研究有不一樣的結果。在對 *Lebistes reticulatus* 的研究中發現，第 1 天即可發現新增生 MR 細胞，但其不具有完整功能，成熟並具有開口的 MR 細胞分化時間需要 4 天，輔助細胞( accessory cell )分化時間為 2 天，平鋪細胞的分化時間則為 1 天( Chretien and Pisam 1986 ); *Oreochromis mossambicus* 的 MR 細胞分化時間則需要 4 天 ( Tsai and Hwang 1998 ); 而 *Onchorhynchus keta* 僅 1 天就可以標定到新增生 MR 細胞

( Uchida and Kaneko 1996 )。各研究之間的差異，可能在於所用來判定成熟 MR 細胞的方式不同，*Lebistes reticulatus* 的新增生 MR 細胞是以重氫標記的 thymidine 來標定新增生細胞，再以穿透式電子顯微鏡觀察來判定細胞類型；*Oreochromis mossambicus* 的 MR 細胞判定方法為，以 wheat-germ agglutinin ( WGA ) 標定 MR 細胞表面開口的來判別成熟 MR 細胞；而 *Onchorhynchus keta* 的新增生 MR 細胞判定則是以 anti- $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase monoclonal antibody 標定 MR 細胞。對於 MR 細胞是否成熟，若以 MR 細胞表面開口是否具有功能是需要最長的時間，因為 MR 細胞表面開口又與 MR 細胞的類型有關 ( Pisam *et al.* 1995 ; Lee *et al.* 1996 a、 b ; Chang *et al.* 2001 )，而以抗體來標定 MR 細胞內的  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase，在 MR 細胞功能尚未完全成熟亦可以標定到，因此也有研究以 anti- $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase monoclonal antibody 進行免疫組織染色後，以染色的深淺與形狀推論有 MR 細胞轉型的情形出現 ( Shikano and Fujio 1998 a、 b )。

## 結語

- (一) 本實驗發現，水生型呼吸空氣魚類—珍珠馬甲的呼吸空氣類型介於必須型與非必須型之間。
- (二) 水生型呼吸空氣魚類—珍珠馬甲，可在鰓薄板產生 MR 細胞的原因是具有呼吸空氣的能力。
- (三) 因為在以 BrdU 標定短時間內，即可在鰓薄板上可發現新增生細胞，本實驗支持鰓薄板上具有未分化細胞的看法。
- (四) 以 BrdU 標定長時間後，鰓薄板上大量增加的 MR 細胞中只有少數為新增生 MR 細胞，而推論鰓薄板 MR 細胞是原本即存在鰓薄板的未成熟細胞所分化而來。

基於以上的研究，未來可延伸發展的方向包括：

- (一) 呼吸空氣魚類影響鰓薄板 MR 細胞分佈是否會因不同類型的呼吸空氣類型而不同？
- (二) 在轉移到去離子水後所新產生的鰓薄板 MR 細胞是由未成熟細胞發育，或是另種型態的 MR 細胞轉型？



## 參考文獻

- 李宗翰、黃鵬鵬。1997。硬骨魚類鰓表皮 MR 細胞之研究綜述。生物科學。 **40**(1), 53-62。
- Bader, R. (1937). Bau, entwicklung and funktion des akzessorischen atmungsorgans der labyrinthfische. *Z. Wiss. Zool.* **149**, 323-401. (In German)
- Bindon, S., Gilmour, K. M., Fenwick, J. C. and Perry, S. F. (1994). The effects of branchial chloride cell proliferation on respiratory function in the rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *J. Exp. Biol.* **197**, 47-63.
- Brauner, C. J., Matey, V., Wilson, J. M., Bernier, N. J. and Val, A. L. (2004). Transition in organ function during the evolution of air-breathing; insights from *Arapaima gigas*, an obligate air-breathing teleost from the Amazon. *J. Exp. Biol.* **207**, 1433-1438.
- Chang, I. C., Lee, T. H., Yang, C. H., Wei, Y. Y., Chou, F. I. and Hwang, P. P. (2001). Morphology and function of gill mitochondria-rich cells in fish acclimated to different environments. *Physiol. Biochem. Zool.* **74**, 111-119.
- Chang, I. C., Wei, Y. Y., Chou, F. I. and Hwang, P. P. (2003). Stimulation of Cl<sup>-</sup> uptake and morphological changes in gill mitochondria-rich cells in freshwater tilapia (*Oreochromis mossambicus*). *Physiol. Biochem. Zool.* **76**, 544-552.
- Chretien, M. and Pisam, M. (1986). Cell renewal and differentiation in the gill epithelium of fresh- or salt-water-adapted euryhaline fish as revealed by [<sup>3</sup>H]-thymidine radioautography. *Biol. Cell* **56**, 137-150.
- Evans, D. H., Piernarini, P. M. and Choe, K. P. (2005). The multifunctional fish gill: dominant site of gas exchange, osmoregulation, acid-base regulation and excretion of nitrogenous waste. *Physiol. Rev.* **85**, 97-177.
- Fernandes, M. N. and Perna-Martins, S. A. (2001). Epithelial gill cells in the armored catfish, *Hypostomus* CF. *plecostomus* (Loricaridae). *Rev. Brasil. Biol.* **61**, 69-78.

- Fernandes, M. N. and Perna-Martins, S. A. (2002). Chloride cell responses to long-term exposure to distilled and hard water in the gill of the armored catfish, *Hypostomus tietensis* (Loricariidae). *Acta. Zool.* **83**, 321-328.
- Fernandes, M. N., Perna, S. A. and Moron, S. E. (1998). Chloride cell apical surface changes in gill epithelia of the armoured catfish *Hypostomus plecostomus* during exposure to distilled water. *J. Fish Biol.* **52**, 844-849.
- Graham, J. B. (1997). Air-Breathing Fishes: Evolution, Diversity, and Adaptation. Academic Press, San Diego, CA, USA.
- Greco, A. M., Gilmour, K. M., Fenwick, J. C. and Perry, S. F. (1995). The effects of softwater acclimation on respiratory gas transfer in the rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *J. Exp. Biol.* **198**, 2557-2567.
- Goss, G. G., Laurent, P. and Perry, S. F. (1994). Gill morphology during hypercapnia in brown bullhead (*Ictalurus nebulosus*): role of chloride cells and pavement cells in acid-base regulation. *J. Fish Biol.* **45**, 705-718.
- Hirai, N., Tagawa, M., Kaneko, T., Seikai, T. and Tanaka, M. (1999). Distributional changes in branchial chloride cells during freshwater adaptation in Japanese sea bass *Lateolabrax japonicus*. *Zool. Sci.* **16**, 43-49.
- Ishimatsu, A., Itazawa, Y. and Takeda, T. (1979). On the circulatory systems of the snakeheads *Channa maculate* and *C. argus* with reference to bimodal breathing. *Jpn. J. Ichthyol.* **26**, 167-180.
- Katoh, F. and Kaneko, T. (2002). Effect of environmental Ca<sup>2+</sup> levels on branchial chloride cell morphology in freshwater-adapted killifish, *Fundulus heteroclitus*. *Fisheries Science* **68**, 347-355.
- Laurent, P. and Dunel, S. (1980). Morphology of gill epithelia in fish. *Am. J. Physiol.* **238**, R147-R159.
- Laurent, P., Dunel, S., Chevalier, C. and Lignon, J. (1994). Gill epithelial cells kinetics in a freshwater teleost, *Oncorhynchus mykiss* during adaptation to ion-poor water and hormonal treatments. *Fish Physiol. Biochem.* **13**, 353-370.

- Laurent, P. and Hebibi, N. (1989). Gill morphometry and fish osmoregulation. *Can. J. Zool.* **67**, 3055-3063.
- Laurent, P. and Perry, S. F. (1990). Effects of cortisol on gill chloride cell morphology and ionic uptake in the freshwater trout, *Salmo gairdneri*. *Cell Tiss. Res.* **259**, 429-442.
- Lee, T. H., Hwang, P. P. and Feng, S. H. (1996a). Morphological studies of gill and mitochondria-rich cells in the stenohaline cyprinid teleosts, *Crprinus carpio* and *Carassius auratus*, adapted to various hypotonic environment. *Zool. Stud.* **35**, 272-278.
- Lee, T. H., Hwang, P. P., Feng, S. H. and Huang, F. L. (1996b). The gill structure and branchial mitochondria-rich cells of the medaka, *Oryzias latipes*. *Acta. Zool. Taiwan* **7**, 43-50.
- Lin, H. C. and Sung, W. T. (2003). The distribution of mitochondria-rich cells in the gills of air-breathing fishes. *Physiol. Biochem. Zool.* **76**, 215-228.
- Moron, S. E., Oba, E. T., De Andrade, C. A. and Fernandes, M. N. (2003). Chloride cell responses to ion challenge in two tropical freshwater fish, the erythrinids *Hoplais malabaricus* and *Hoplerythrinus unitaeniatus*. *J. Exp. Zool.* **298**, 93-104.
- Mustafa, S. and Mubarak, K. V. A. (1980). Air breathing of *Colisa fasciata* (Schneider). *Proc. Indian Acad. Sci. (Ani. Sci.)* **89**, 21-24.
- Ojha, J., Dandotia, O. P. and Munshi, J. S. D. (1997). Oxygen consumption of an amphibious fish *Colisa fasciatus* in relation to body weight. *Polskie Arch. Hydrobiol.* **24**, 547-553.
- Perry, S. (1997). The chloride cell: structure and function in the gills of freshwater fishes. *Ann. Rev. Physiol.* **59**, 325-347.
- Perry, S. (1998). Relationships between branchial chloride cells and gas transfer in freshwater fish. *Comp. Biochem. Physiol.* **119A**, 9-16.
- Perry, S. F. and Laurent, P. (1993). Environmental effects on fish gill structure and function. In "Fish Ecophysiology" (Rankin, J. C. and Jensen, F. B. eds.) pp. 231-263. Chapman and Hall, New York. USA.
- Pisam, M., Le Moal, C., Auperin, B., Prunet, P. and Rambourg, A. (1995).

Apical structure of “mitochondria-rich”  $\alpha$  and  $\beta$  cells in euryhaline fish gill: their behaviour living conditions. *Anat. Rec.* **241**, 13-24.

- Randall, D. J. and Perry, S. F. (1992). Catecholamines. In “Fish Physiology” (Randall, D. J., Farrell, A. P. and Perry, S. F. eds) pp. 255-300. Academic Press. New York. USA.
- Sakamoto, T., Uchida, K. and Yokota, S. (2001). Regulation of the ion-transporting mitochondrion-rich cell during adaptation of teleost fishes to different salinities. *Zool. Sci.* **18**, 1163-1174.
- Sakuragui, M. M., Sanches, J. R. and Fernandes, M. N. (2003). Gill chloride cell proliferation and respiratory responses to hypoxia of the neotropical erythrinid fish *Hoplias malabaricus*. *J. Comp. Physiol.* **173**, 309-317.
- Sasai, S., Kaneko, T., Hasegawa, S. and Tsukamoto, K. (1998). Morphological alteration in two types of gill chloride cells in japanese eels (*Anguilla japonica*) during catadromous migration. *Can. J. Zool.* **76**, 1480-1487.
- Shikano, T. and Fujio, Y. (1998a). Immunolocalization of  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase in branchial epithelium of chum salmon fry during seawater and freshwater acclimation. *J. Exp. Biol.* **201**, 3031-3040.
- Shikano, T. and Fujio, Y. (1998b). Immunolocalization of  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase and morphological changes in two types of chloride cells in the gill epithelium during seawater and freshwater adaptation in a euryhaline teleost, *Poecilia reticulata*. *J. Exp. Zool.* **281**, 80-89.
- Tsai, J. C. and Hwang, P. P. (1998). The wheat germ agglutinin binding sites and development of the mitochondria-rich cells in gills of tilapia (*Oreochromis mossambicus*). *Fish Physiol. Biochem.* **19**, 95-102.
- Uchida, K. and Kaneko, T. (1996). Enhanced chloride cell turnover in the gills of chum salmon fry in seawater. *Zool. Sci.* **13**, 655-660.
- Van der Heijden, A. J. H., Verbost, P. M., Eygensteyn, J., Li, J., Wendelaar Bonga, S. E. and Flik, G. (1997). Mitochondria-rich cells in gills of tilapia (*Oreochromis mossambicus*) adapted to fresh water or sea water: quantification by confocal laser scanning microscopy. *J. Exp. Biol.* **200**, 55-64.

- Wilson, J. M., Kok, T. W. K., Randall, D. J., Vogl, W. A. and Ip, K. Y. (1999). Fine structure of the gill epithelium of the territorial mudskipper, *Periophthalmodon schlosser*. *Cell Tiss. Res.* **298**, 345-356.
- Wilson, J. M. and Laurent, P. (2002). Fish gill morphology: inside out. *J. Exp. Zool.* **293**, 192-213.
- Zadunaisky, J. A. (1996). The chloride cell: The active transport of chloride and the paracellular pathways. In "Fish Physiology Vol. XB" (Hoar, W. S. and Randall, D. J. eds.) pp. 129-176. Academic Press, New York. USA.



## 表及圖目

表一、馴養與實驗用水水質.....	55
表二、限制水面呼吸空氣能力，水中正常溶氧量與低溶氧量處理組的 存活率.....	55
圖一、鰓薄板上 MR 細胞與新增生細胞的計算方法.....	56
圖二、鰓絲上 MR 細胞與新增生細胞的計算方法.....	57
圖三、轉移到去離子水處理組，鰓薄板 MR 細胞數量的變化.....	58
圖四、轉移到曝氣自來水與去離子水處理組，鰓薄板 MR 細胞數目的 比較.....	59
圖五、水中正常溶氧量下，控制呼吸空氣能力時，鰓薄板 MR 細胞數 量的變化.....	60
圖六、可至水面呼吸時，水中正常含氧量與低含氧量處理組其鰓薄板 MR 細胞數量的變化.....	61
圖七、各種處理組下，鰓薄板 MR 細胞數目的比較.....	62
圖八、新增生 MR 細胞的判定.....	63
圖九、轉移到去離子水處理組，於取鰓前 1 小時注射 BrdU，轉移各 時間點下，觀察鰓薄板上新增生 MR 細胞.....	64
圖十、轉移到去離子水處理組，於取鰓前 1 小時注射 BrdU，鰓薄板 上新增生 MR 細胞.....	65
圖十一、轉移到去離子水處理組，取鰓前 12 小時注射 BrdU，鰓薄板 上新增生 MR 細胞.....	66
圖十二、鰓絲上，MR 細胞數目以及新增生 MR 細胞所佔比例.....	67
圖十三、鰓薄板上，MR 細胞數目以及新增生 MR 細胞所佔比例....	68
圖十四、鰓絲上，新增生 MR 細胞數目.....	69
圖十五、鰓薄板上，新增生 MR 細胞數目.....	70

圖十六、鰓絲上，新增生細胞數目與新增生 MR 細胞所佔的比例... 71

圖十七、鰓薄板上，新增生細胞數目與新增生 MR 細胞所佔的比  
例.....72

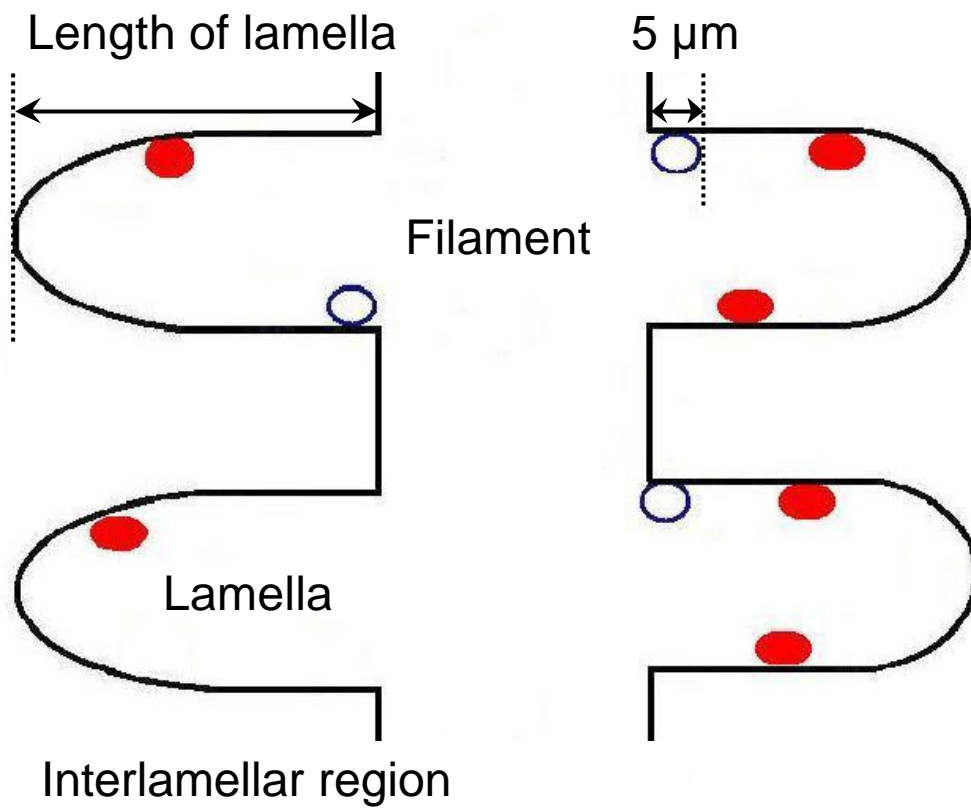
表一、馴養與實驗用水水質

	馴養水	實驗正常溶氧	實驗低溶氧
水溫 ( )	28.0 ± 1.0	28.0 ± 1.0	28.0 ± 1.0
溶氧 ( mg/L )	5.30 ± 0.21	5.40 ± 0.30	1.80 ± 0.22
pH 值	7.60 ± 0.11	6.70 ± 0.22	6.60 ± 0.26

表二、限制水面呼吸空氣能力，水中正常溶氧量與低溶氧量處理組，珍珠馬甲的存活率

	個數 ( n 值 )	水中溶氧量 ( mg/L )	存活率
正常溶氧 ( Normoxia )	9	5.50	88.9%
低溶氧 ( Hypoxia )	3	1.80-3.05	0%

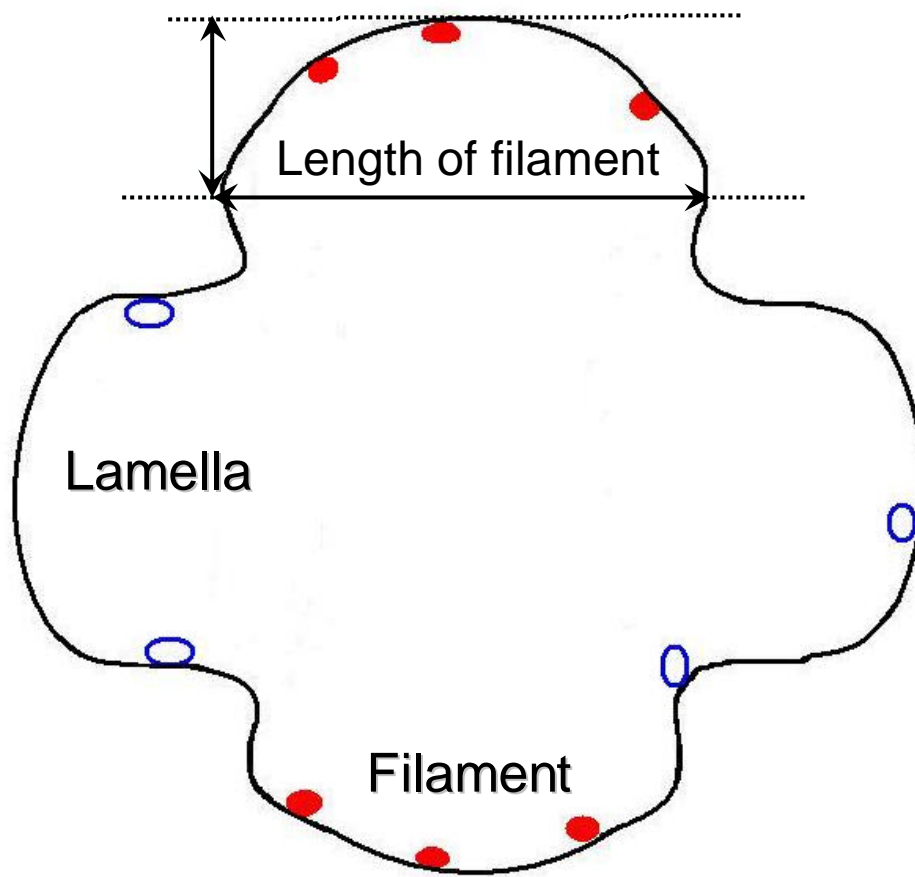




圖一、 鰓薄板上 MR 細胞與新增生細胞的計算方法。

- 表示列入計算的 MR 細胞與新增生細胞
- 表示不列入計算的 MR 細胞與新增生細胞

距離鰓絲 5 μm 以上的 MR 細胞才予以計算，以區分鰓薄板間區細胞

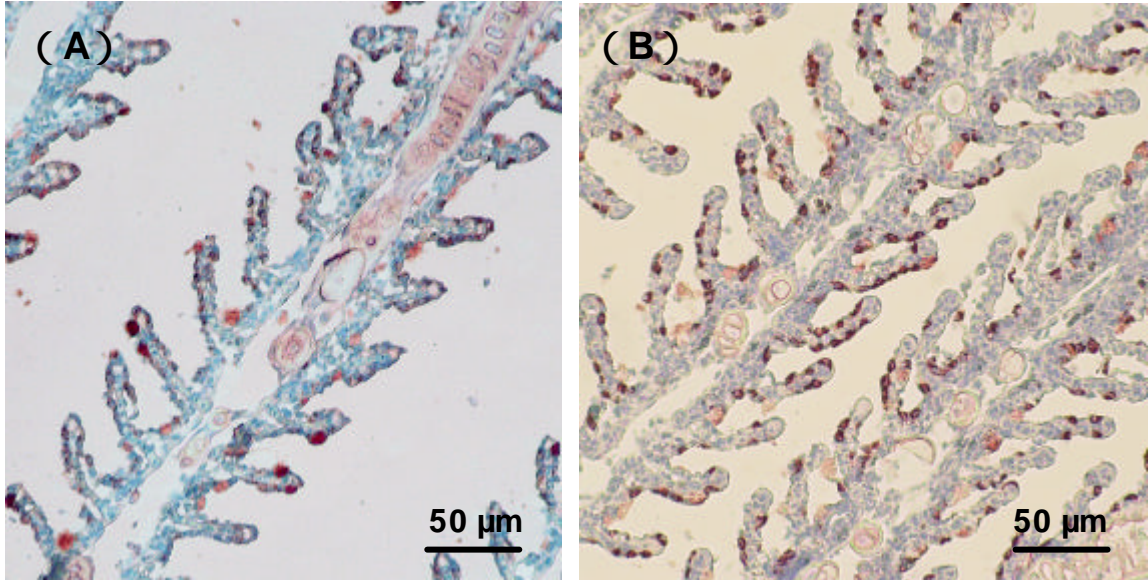


圖二、 鰓絲上 MR 細胞與新增生細胞的計算方法。

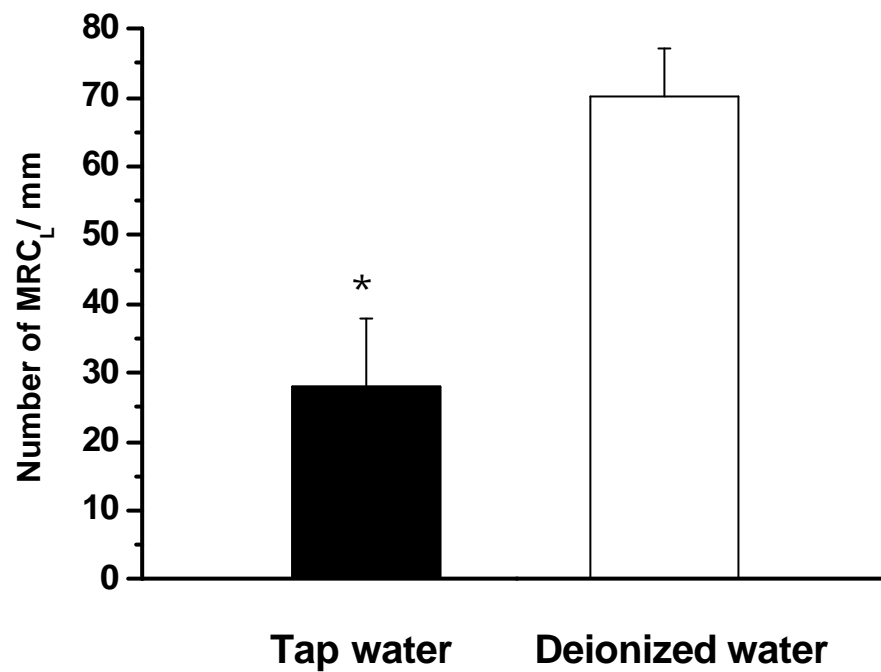
● 表示列入計算的 MR 細胞與新增生細胞

○ 表示不列入計算的 MR 細胞與新增生細胞

計算鰓絲入鰓動脈區，以鰓絲最長徑為基準，超出最長徑範圍內的 MR 細胞則不予以計算。

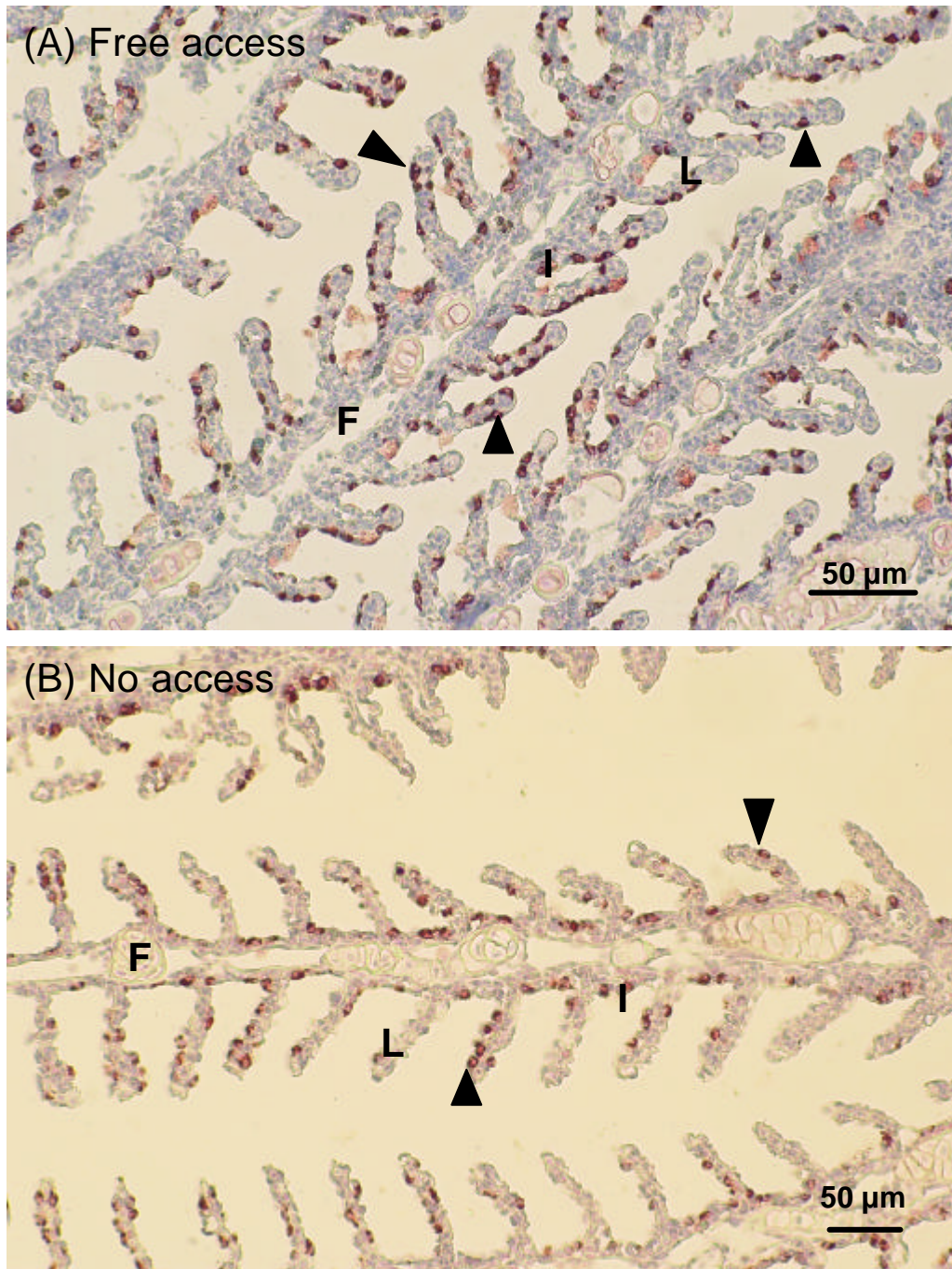


圖三、 轉移到去離子水環境下，鰓薄板 MR 細胞數量增加。從 (A) 曝氣自來水轉移到 (B) 去離子水的環境 7 天後，鰓薄板 MR 細胞的數目增加。



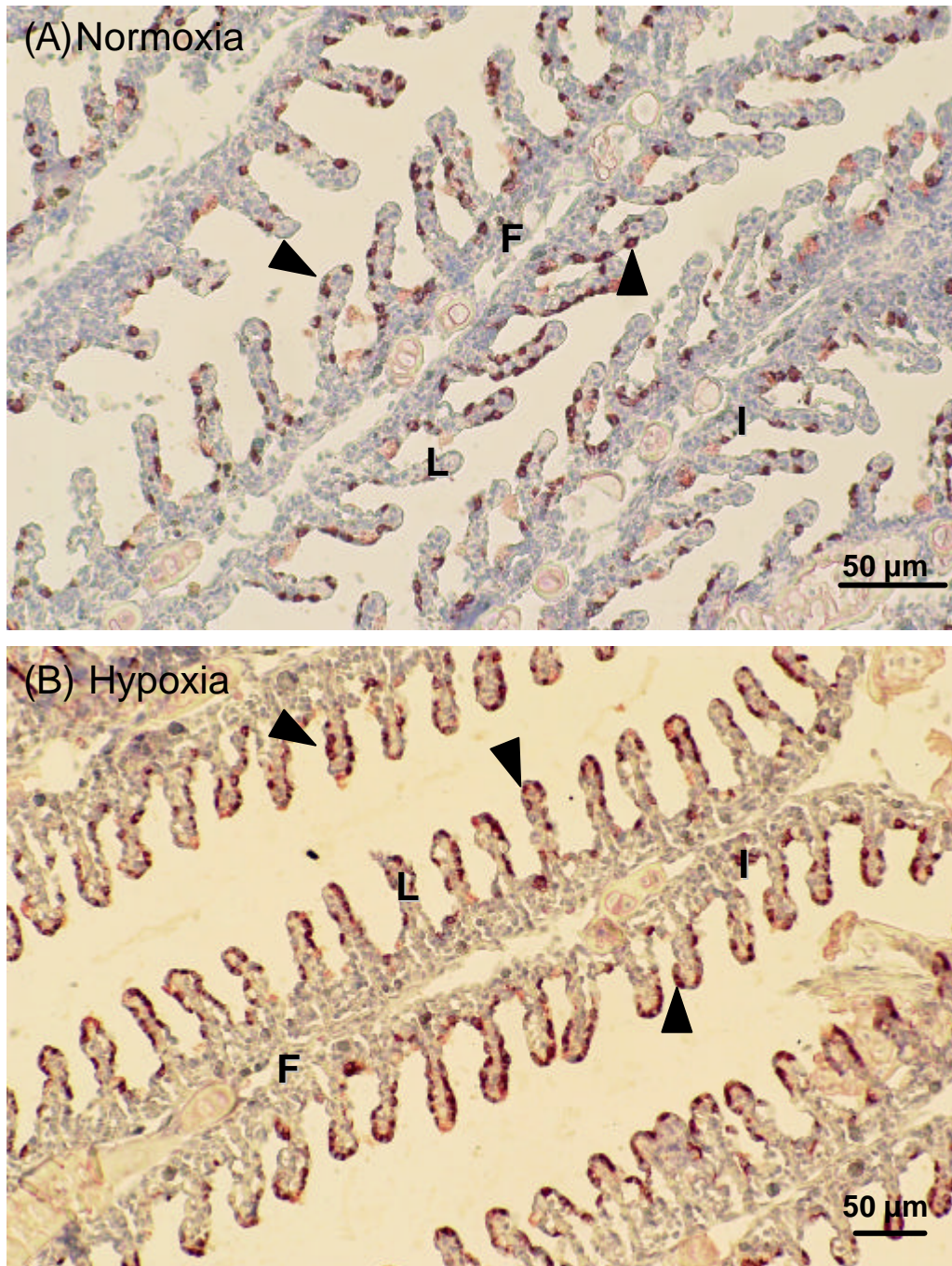
圖四、 轉移到去離子水處理組，鰓薄板 MR 細胞的消長。

去離子水處理組 (n = 10) 的鰓薄板 MR 細胞數量顯著高於控制組 (n = 5)。\* 表示在處理下鰓薄板 MR 細胞數目以 Mann-Whitney *U* test 分析有顯著差異， $p < 0.05$ 。

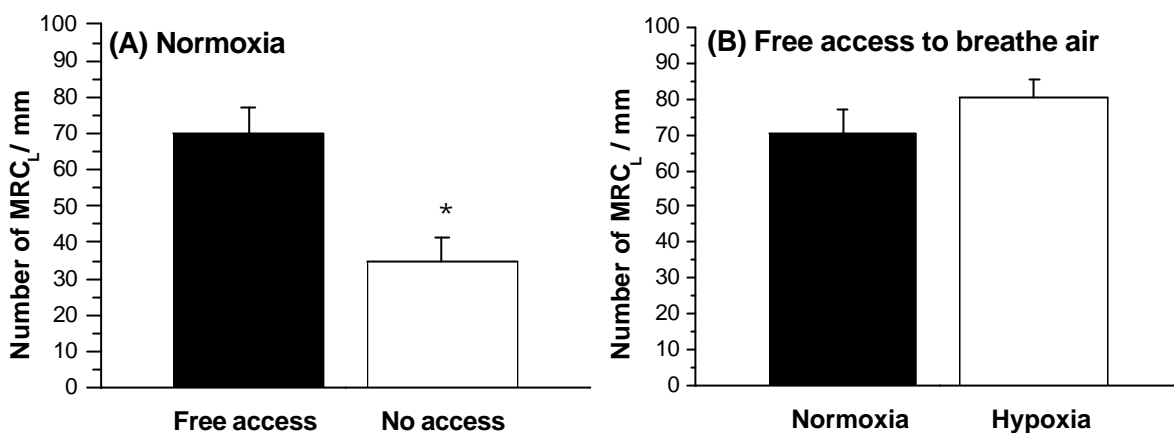


圖五、正常溶氧量下，控制呼吸空氣能力，鰓薄板 MR 細胞數目變化。  
利用免疫組織染色法，在光學顯微鏡觀察發現，在水中為正常溶氧量（normoxia）時，(A) 可至水面呼吸空氣（free access）處理組的鰓薄板 MR 細胞數量較 (B) 不可至水面呼吸空氣（no access）處理組多。F：鰓絲；I：鰓薄板間區；L：鰓薄板；箭頭所指為鰓薄板 MR 細胞。





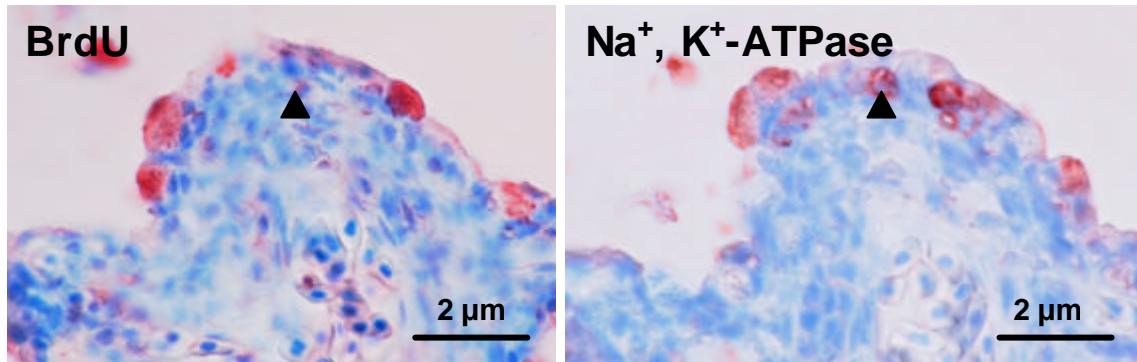
圖六、有呼吸空氣能力下，改變水中溶氧量，鰓薄板 MR 細胞數目變化。利用免疫組織染色法，在光學顯微鏡觀察發現，可至水面呼吸空氣 ( free access to breathe air ) 時，( A ) 水中正常溶氧量 ( normoxia ) 處理組與 ( B ) 水中低溶氧量 ( hypoxia ) 處理組的鰓薄板 MR 細胞數量沒有顯著差異。F：鰓絲；I：鰓薄板間區；L：鰓薄板；箭頭所指為鰓薄板 MR 細胞。



圖七、轉移去離子水後進行各種處理組下，鰓薄板 MR 細胞的數量。

(A) 在水中同樣為正常溶氧量 ( normoxia ) 時，可至水面呼吸空氣 ( free access ) 處理組 ( n = 10 ) 的鰓薄板 MR 細胞數量，顯著高於不可至水面呼吸空氣 ( no access ) 處理組 ( n = 8 )。 \* 表示在處理下鰓薄板 MR 細胞數目以 Mann-Whitney *U* test 分析有顯著差異，  $p < 0.05$ 。

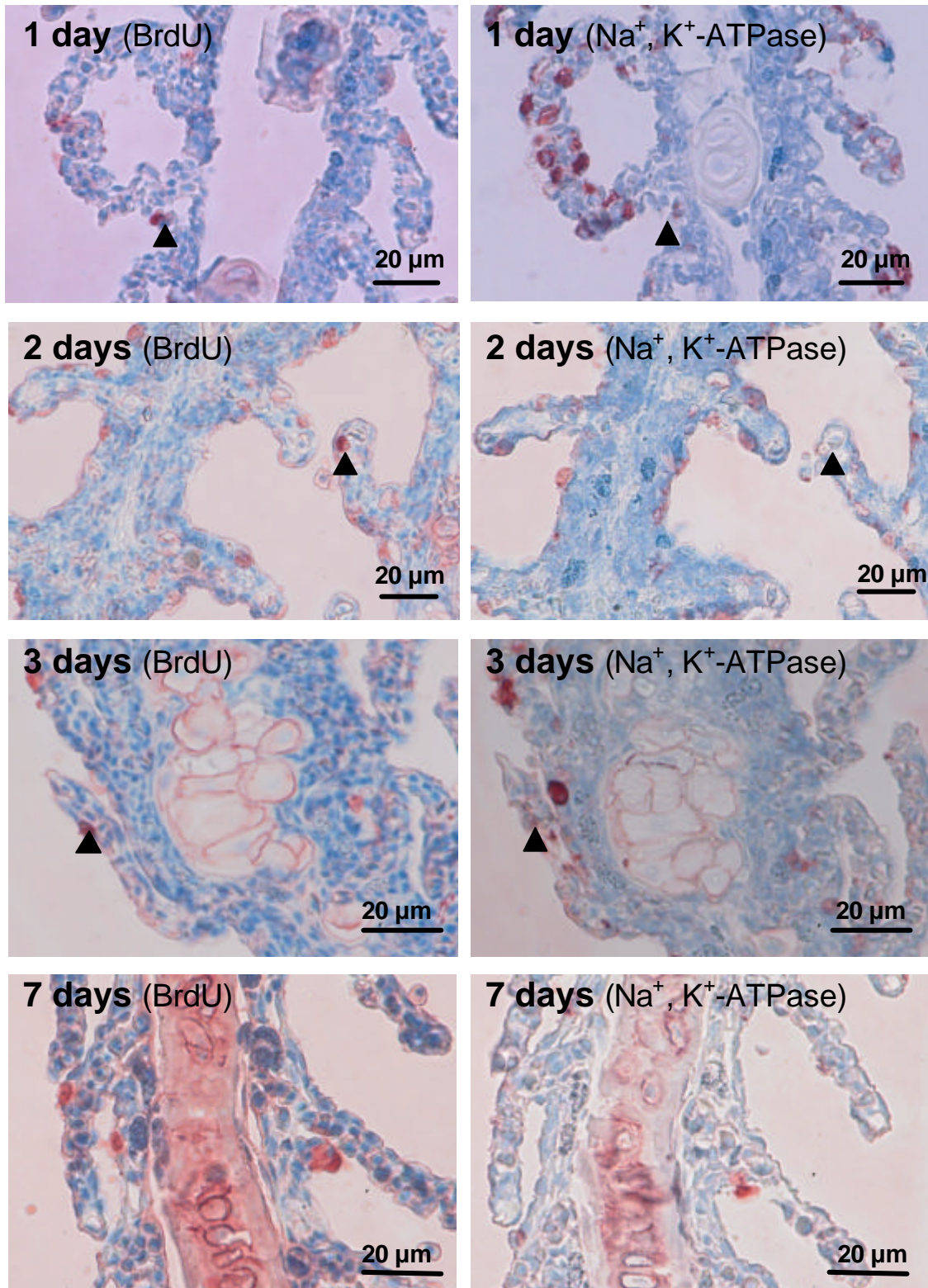
(B) 同樣可至水面呼吸空氣 ( free access to breathe air ) 時，水中正常溶氧量 ( normoxia ) 處理組 ( n = 10 ) 與水中低溶氧量 ( hypoxia ) 處理組 ( n = 10 ) 的鰓薄板 MR 細胞無顯著差異。



圖八、 新增生 MR 細胞的判定。

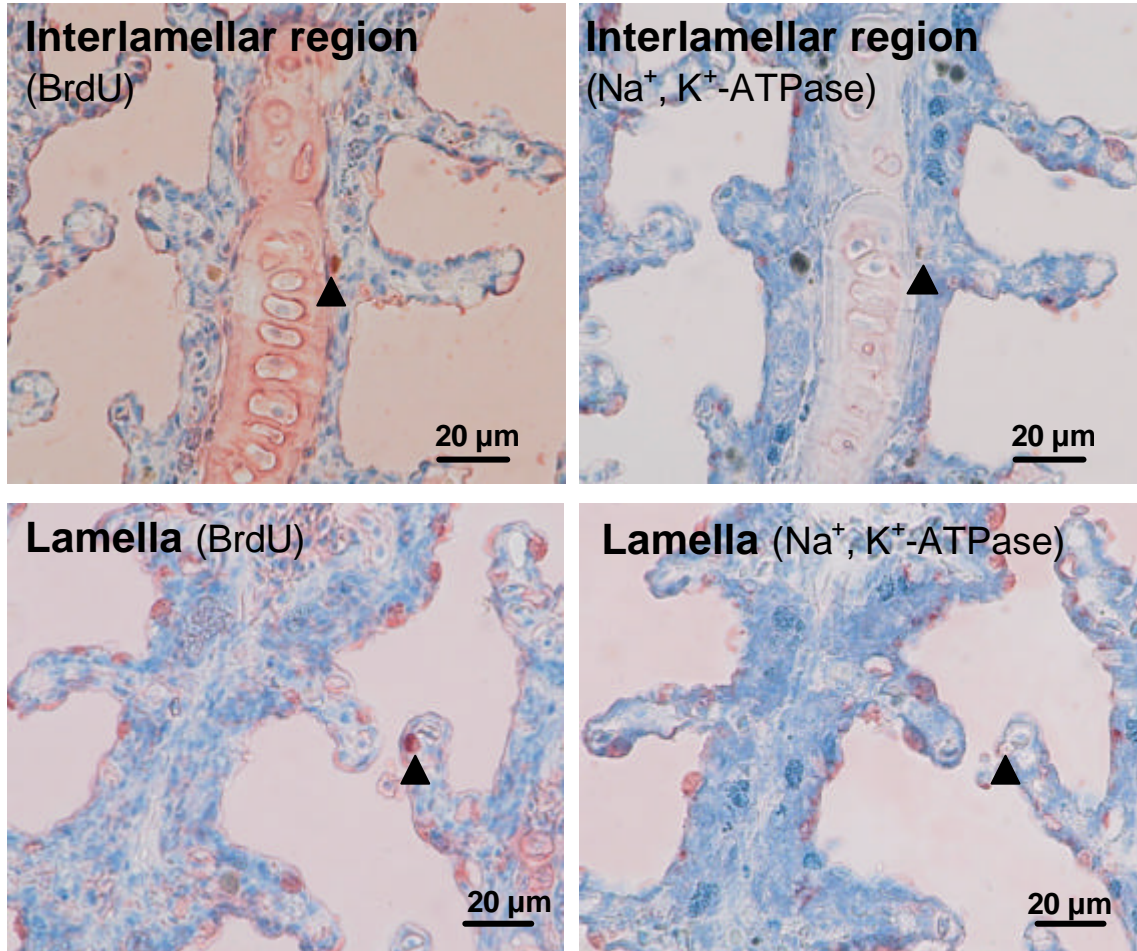
以 anti-BrdU monoclonal antibody 與 anti- $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase monoclonal antibody 標定分別標定新增生細胞與 MR 細胞，當在連續切片中的同一位置同時標定到，即代表此細胞為新增生 MR 細胞。



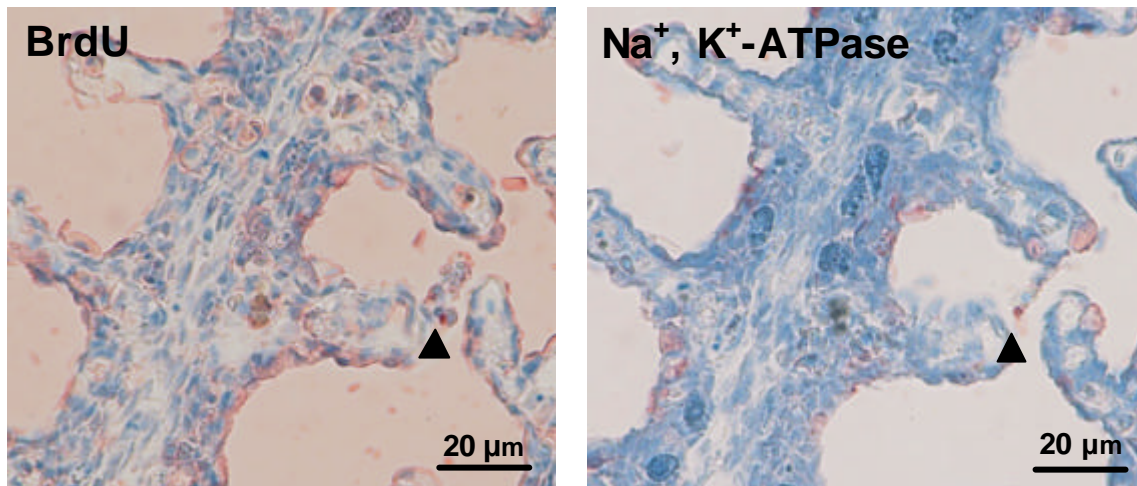


圖九、 轉移到去離子水處理組，各天數下鰓薄板新增生細胞。

轉移到去離子水環境第 1、2、3、4、7 天下，取鰓前 1 小時注射 BrdU，皆可在鰓薄板上發現被標定到 BrdU 的新增生細胞，相同位置上但無法觀察到被標定到  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase 的 MR 細胞。



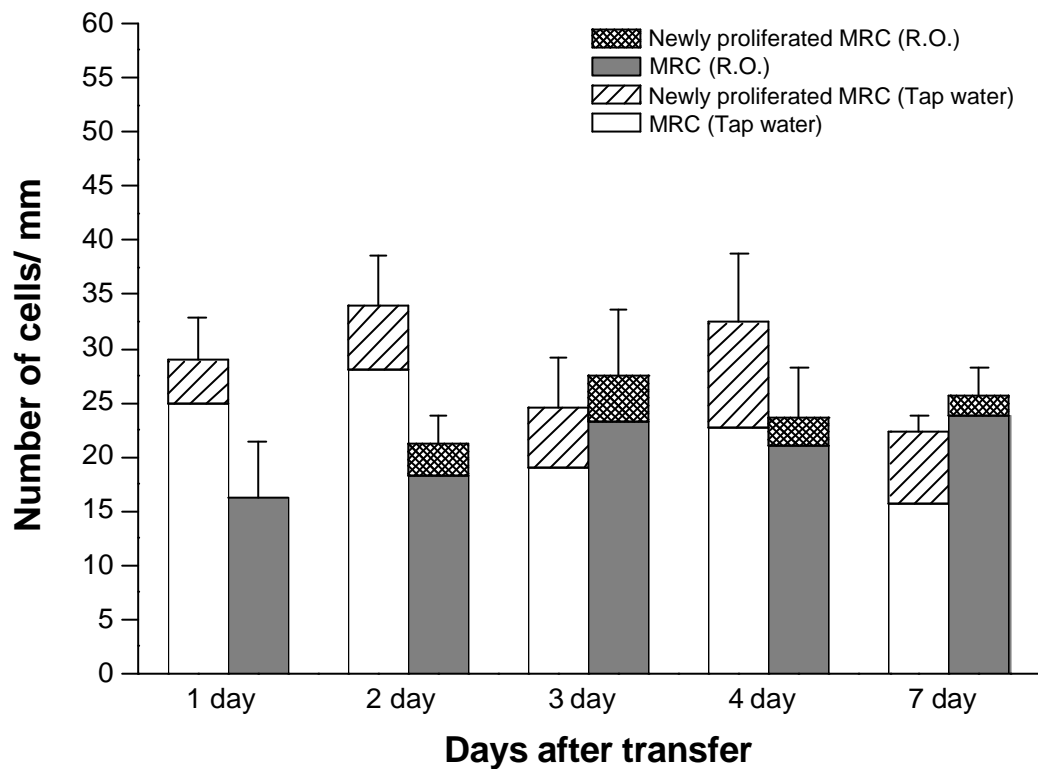
圖十、轉移到去離子水處理 2 天，新增生細胞在鰓薄板間區與鰓薄板上的分佈。轉移到去離子水中 2 天後，在取鰓前 1 小時注射 BrdU，觀察新增生細胞與 MR 細胞的分佈。在鰓薄板間區上皮細胞的內層可以發現被 anti-BrdU monoclonal antibody 標定的細胞，但連續切片的同一位置並沒有被 anti-Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase monoclonal antibody 標定。在鰓薄板同樣只有被 anti-BrdU monoclonal antibody 標定的新增生細胞，連續切片的同一位置沒有被 anti-Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase monoclonal antibody 標定。



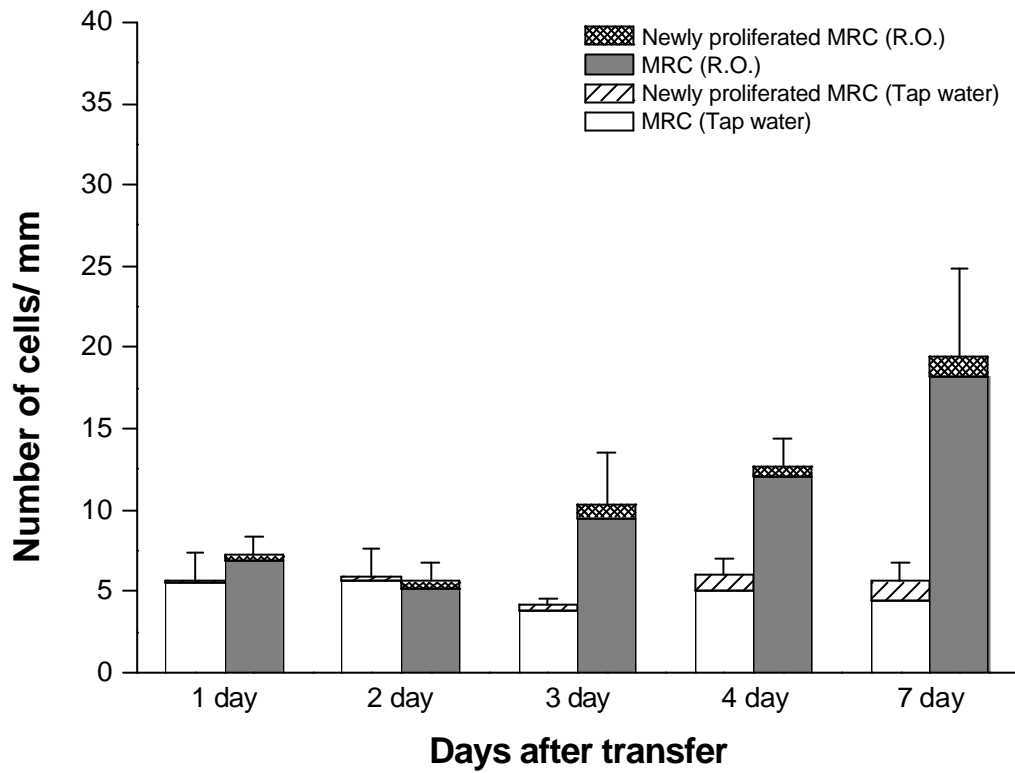
圖十一、在轉移去離子水環境 2 天後，於取鰓前 12 小時注射 BrdU，以標定新增生 MR 細胞。

鰓薄板上，具有被 anti-BrdU monoclonal antibody 標定的細胞，但連續切片中的同一位置不具有被 anti- $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase monoclonal antibody 標定的細胞。

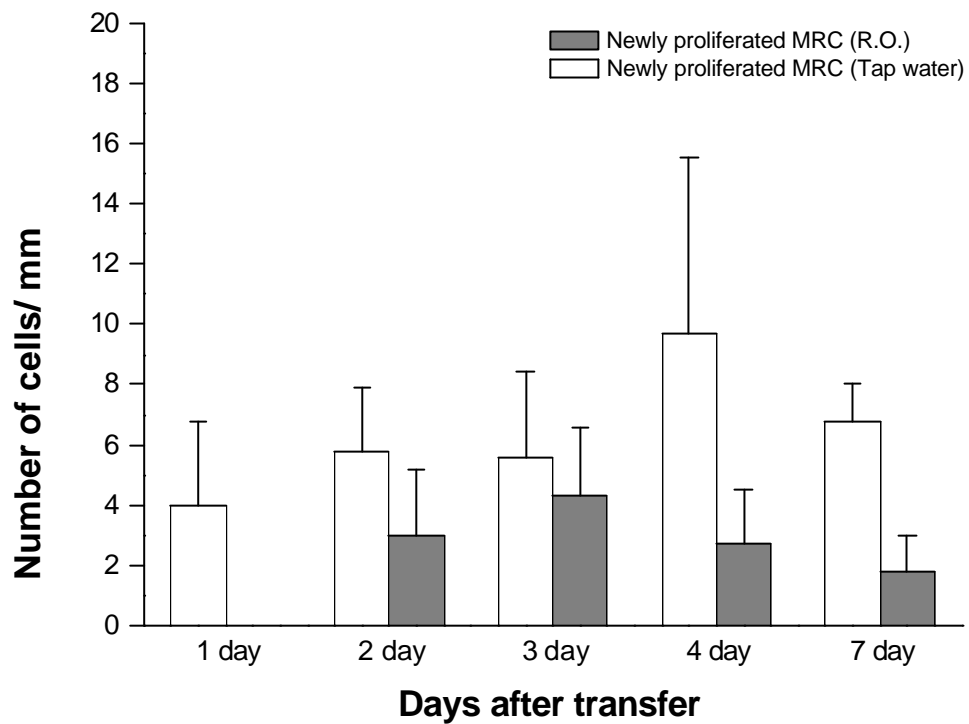




圖十二、 鰓絲上，MR 細胞數目以及新增生 MR 細胞與 MR 細胞數目的比例。不同水質在轉移不同天數下並無顯著差異 ( $F_{9,51}=1.12$  ,  $P > 0.05$  , two-way ANOVA )，顯示轉移到曝氣自來水與去離子水處理後，不同天數下，鰓絲 MR 細胞數目皆沒有改變。

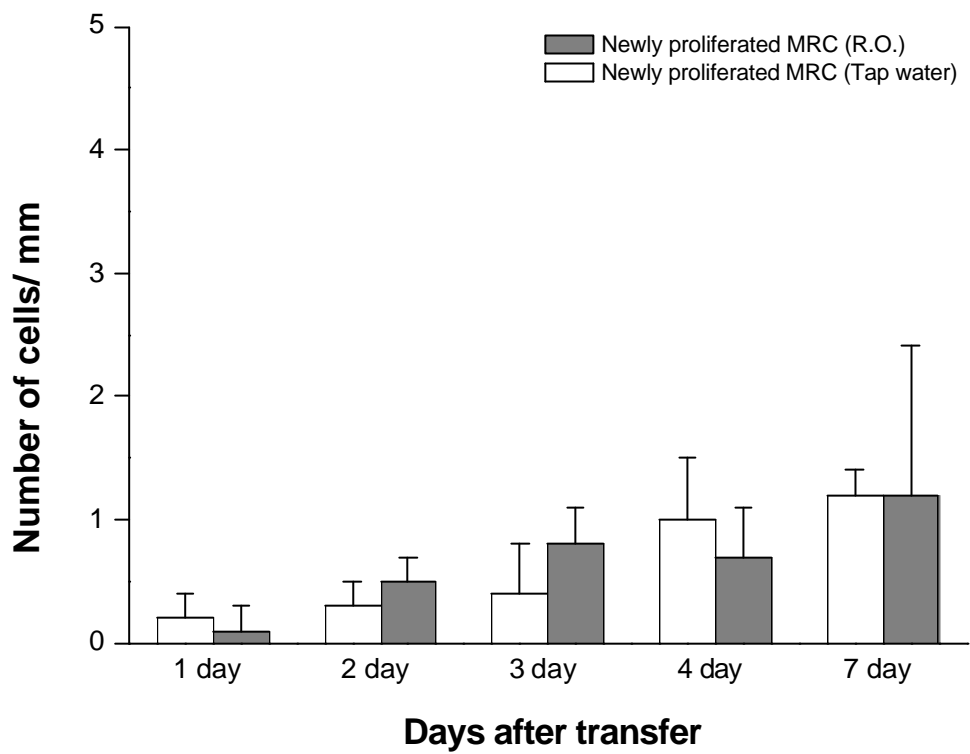


圖十三、 鰓薄板上，MR 細胞數目以及新增生 MR 細胞與 MR 細胞數目的比例。不同轉移天數之下，曝氣自來水與去離子水處理組的鰓薄板 MR 細胞數量有顯著差異 ( $F_{9,51} = 2.76$ ,  $P < 0.05$ , two-way ANOVA)。



圖十四、 鰓絲上，新增生 MR 細胞數目。

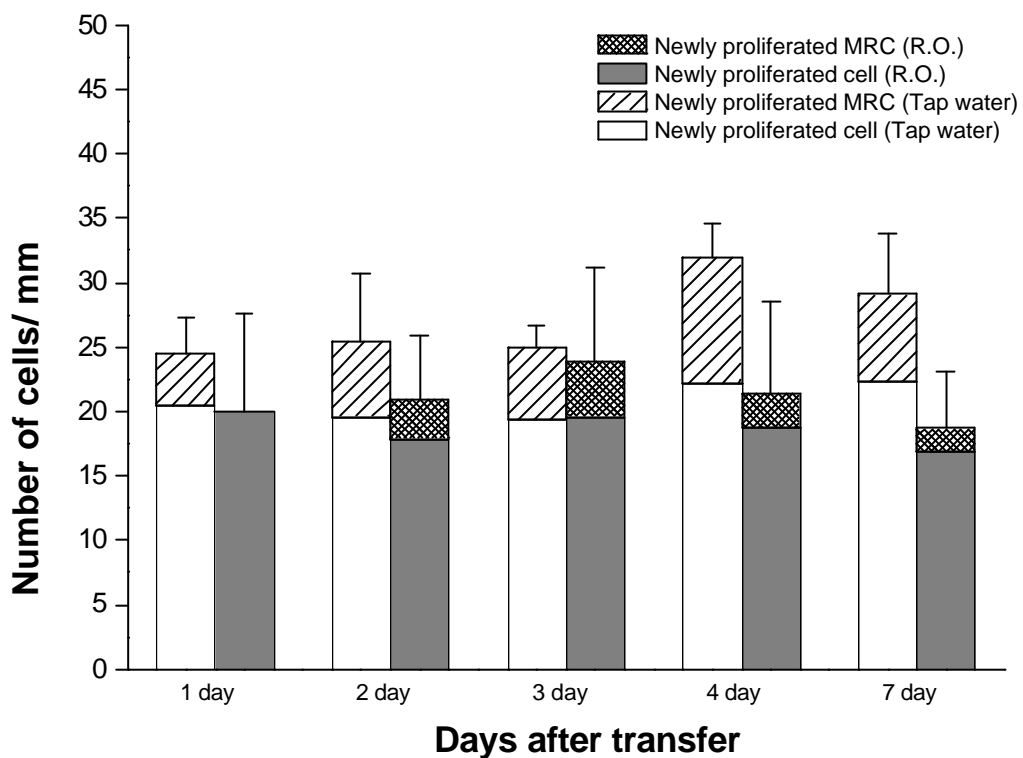
各轉移天數下，曝氣自來水與去離子水處理之間，鰓絲新增生 MR 細胞數目，結果發現皆無顯著差異 (LSMEANS,  $P > 0.05$ )。顯示鰓絲上新增生 MR 細胞在轉移到曝氣自來水處理，數目未增加，而轉移到去離子水處理後，數目增加。轉移後並未使新增生 MR 細胞數量改變。



圖十五、 鰓薄板上，新增生 MR 細胞數目。

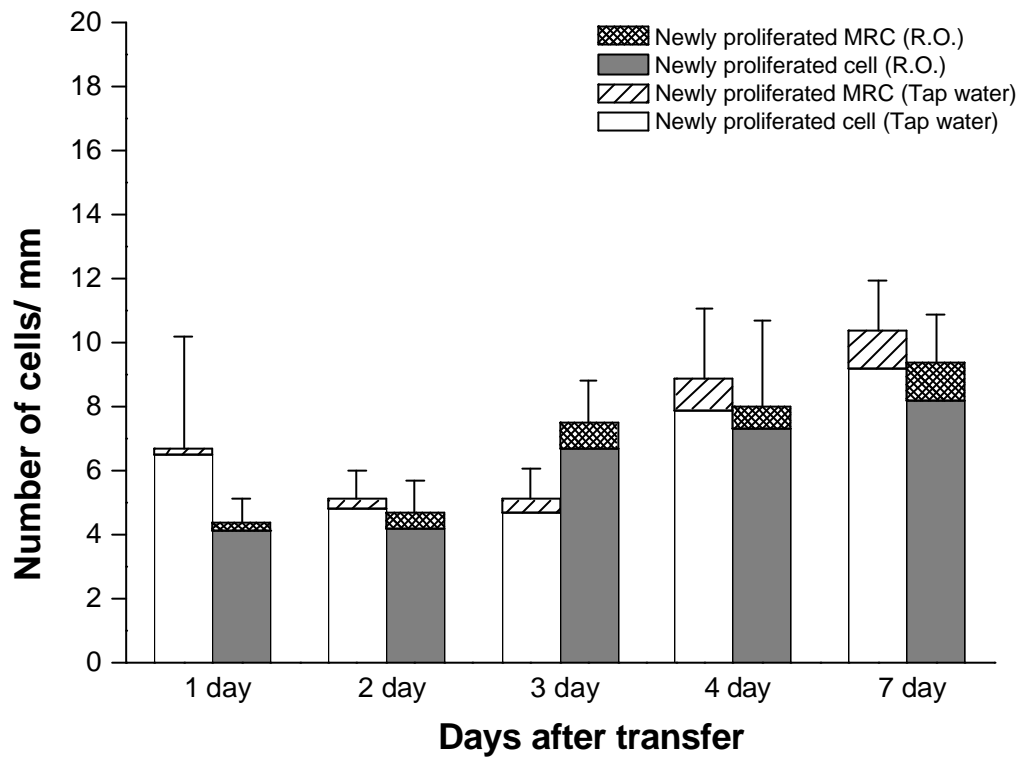
不同水質在不同轉移天數下，鰓薄板新增生 MR 細胞數目無顯著差異

(  $F_{9,51} = 1.62$  ,  $P=0.13$  , two-way ANOVA )。



圖十六、 鰓絲上，新增生細胞以及新增生 MR 細胞與新增生細胞數目的比例。不同水質在轉移不同天數下並無顯著差異 ( $F_{9,51} = 0.43$  ,  $P = 0.91$  , two-way ANOVA )。顯示鰓絲新增生細胞數目在轉移到不同水質與不同轉移天數下，皆未改變。





圖十七 鰓薄板上，新增生細胞以及新增生 MR 細胞與新增生細胞數目的比例。  
 不同水質在不同轉移天數下，鰓薄板新增生細胞數目無顯著差異(  $F_{9,51} = 1.41$  ,  $P = 0.21$  , two-way ANOVA )。