

私立東海大學生物學系

碩士論文

指導教授：林 惠 真 博士

Dr. Hui-Chen Lin

論文題目：廣鹽性螃蟹鹽度馴養時鰓上 H^+ -ATPase 與

Na^+ , K^+ -ATPase 的角色

The Role of H^+ -ATPase and Na^+ , K^+ -ATPase in the
Gills of Euryhaline Crabs during Salinity Acclimation



研究生：蔡 宜 潔

Yi-Jie Tsai

中華民國九十三年六月二十三日

目錄

摘要.....	1
Abstract.....	3
前言.....	5
一、蟹類滲透壓調節總論.....	5
二、滲透壓調節器官及調節功能的轉變.....	7
(一) 滲透壓調節器官的種類與構造.....	7
(二) 鰓部特化構造及輔助呼吸器官的出現.....	8
(三) 輔助滲透壓調節功能的方法.....	10
三、鰓部離子調節酵素與離子調節模式.....	11
(一) 離子調節酵素.....	11
(二) 離子調節機制的兩種模式.....	17
四、實驗目的.....	19
五、物種的選擇.....	21
材料與方法.....	22
一、實驗動物及馴養.....	22
二、研究方法.....	23
(一) 鰓部組織埋蠟切片及免疫組織化學染色.....	23
(二) 鰓部蛋白質萃取.....	25
(三) 酵素活性測定.....	26
(四) 西方墨點法.....	29
三、實驗設計與步驟.....	31
結果.....	34
討論.....	41
結語.....	53
參考文獻.....	54
表.....	66
圖.....	68

摘要

螃蟹由水域到陸地為連續性的分佈，棲地類型廣泛，非常適合用來研究由水生環境到陸生環境的結構變化及生理適應。十足目的螃蟹為海生起源，在往陸地發展的同時，面臨要適應淡海水或是純淡水環境，體液滲透壓的調節對生存是很重要的關鍵。一般而言，螃蟹在面臨環境鹽度變化時，主要是藉由主動的吸收或排除離子維持體液滲透壓，負責調節的器官是鰓；滲透壓的調節是由多種酵素共同作用完成，主要包括 Na^+ , K^+ -ATPase 以及 H^+ -ATPase 等。以功能上來看， Na^+ , K^+ -ATPase 能夠形成細胞內外 Na^+ 離子濃度差，使離子能夠進入細胞內；但在對能夠適應淡水的螃蟹物種的研究中，發現在淡水或淡海水環境生活的螃蟹，離子調節機制和海生螃蟹有所差異，適應淡水的螃蟹發展出藉由 H^+ -ATPase 形成 H^+ 離子濃度差帶動整個機制。本論文選擇的物種包括有 2 科 12 種的螃蟹。實驗第一部分，探討的問題是 12 種潮間帶螃蟹在面臨淡水適應時，其鰓部 H^+ -ATPase 的位置。藉由免疫組織染色法，對離子調節細胞上的 H^+ -ATPase 定位做確認。結果發現潮間帶螃蟹其 H^+ -ATPase 的分佈位置可以分為兩種形式：分佈於細胞質區域以及集中在頂膜區域。並且 12 種螃蟹可被分為三種類型： H^+ -ATPase 的位置在各對鰓全位於細胞質區域的第 1 類群、 H^+ -ATPase 的位置在各對鰓間，或單一

鰓薄板中不同細胞間不一致的第 2 類群、以及 H^+ -ATPase 的位置在各對鰓均位於頂膜區域的第 3 類群。第二部分的實驗，針對 H^+ -ATPase 在上皮細胞的分佈位置與其 Na^+ , K^+ -ATPase 活性在鹽度間的變化幅度做整理。分析三種類群間 Na^+ , K^+ -ATPase 活性變化幅度，發現第 1 類群螃蟹的活性變化，顯著高於第 2 及第 3 群螃蟹。在 Na^+ , K^+ -ATPase 活性變化劇烈的第 1 類群螃蟹，有分佈在細胞質區域的 H^+ -ATPase；而活性在鹽度間變化幅度較小的第 2 及第 3 群螃蟹中，其 H^+ -ATPase 分佈會出現在上皮細胞頂膜的位置。第三部分針對 Na^+ , K^+ -ATPase 活性在高低鹽度間沒有顯著差異的台灣招潮蟹 (*Uca formosensis*)，測量第六對鰓上 H^+ -ATPase 活性。結果發現在鹽度間活性的差異幾乎達顯著，而 H^+ -ATPase 蛋白質量在鹽度間則是沒有顯著差異。由本實驗結果可以推論， H^+ -ATPase 在能夠適應淡水的潮間帶螃蟹鰓上，功能可能是參與滲透壓調節的角色，並與淡水模式相符。

Abstract

Crabs widely distribute through aquatic to terrestrial habitats. They are excellent experimental species to study the morphological changes and physiological adaptation during their terrestrial invasion. Decapod crabs are species of marine ancestor. The hemolymph osmoregulation in brackish water is crucial for a successful terrestrial invasion. Generally speaking, crabs can actively uptake or excrete ions upon salinity change, and the gills play a major role among the osmoregulatory organs. There are several enzymes involved in the osmoregulatory process, including at least Na^+ , K^+ -ATPase and H^+ -ATPase. Na^+ , K^+ -ATPase provides the driving force to establish an ion gradient across the epithelial cell membrane in marine crabs. It has been reported that the osmoregulatory mechanisms in the freshwater crabs are different from those of the marine ones and suggested that the driving force may come from H^+ -ATPase by generating the H^+ ion gradient to facilitate the ion flow. I chose 12 species from two families for my experiment. In the first part of my study, I used the immunohistochemistry method to clarify the distribution of H^+ -ATPase in 12 euryhaline crabs. According to the distribution of H^+ -ATPase, these 12 crab species can be separated into 3 different groups. The crabs of 1st group had the cytoplasmic H^+ -ATPase in each gill. The crabs of 2nd group didn't have a uniform localization of H^+ -ATPase in each gill or cells in single gill lamellae. The crabs of 3rd group had the apical H^+ -ATPase in each gill. In the second part of this study, I correlated the location of H^+ -ATPase with the variation of Na^+ , K^+ -ATPase activity among 12 crab species between salinities. The 1st group had a significantly greater Na^+ , K^+ -ATPase activity difference than the 2nd and

3rd groups. The crabs from the 1st group that had a greater Na⁺, K⁺-ATPase activity differences between salinities were found to have the cytoplasmic H⁺-ATPase. Those species that had a relatively stable Na⁺, K⁺-ATPase activity during salinity fluctuation tended to have an apical distribution of H⁺-ATPase. The third part of my study is to estimate the H⁺-ATPase activity of *Uca formosensis*, the crab that is known to have a stable Na⁺, K⁺-ATPase activity. The difference in H⁺-ATPase activity between salinities was almost significant. The protein level of H⁺-ATPase was not significantly different between salinities. In conclusion, my results supported the hypothesis that H⁺-ATPase plays a crucial role in the freshwater adaptation in branchyuran crabs.

前言

一、蟹類滲透壓調節總論

一般而言,滲透壓調節指的是在動物體面臨低張或是高張環境,會採取主動或被動方式調整,使動物體得以在此環境下生存。在 Péqueux 1995 年,整理甲殼類的滲透壓調節方式,將之分為兩大類:滲透順應者(osmoconformer)與滲透調節者(osmoregulator)。滲透順應者在面對環境變化時,採用的方式是調整細胞的體積,並且利用 organic osmolytes 來改變體液的滲透壓,而非主動的吸收或是排除離子;但是滲透調節者則是利用主動耗能的方式來吸收或是排除外界離子。滲透調節者又可分為三種形式:hyper-osmoregulator hypo-osmoregulator 以及 hyper-hypo osmoregulator;其中 hyper-osmoregulator 以及 hypo-osmoregulator 分別代表的是動物體會在面臨環境變化時,保持體內的滲透壓高或低於環境滲透壓。hyper-hypo osmoregulator 則有一個體液與環境的等滲點,在等滲點之下採 hyper-osmoregulation,但在等滲點之上則採 hypo-osmoregulation。

潮間帶的螃蟹多屬於甲殼綱十足目短尾類(Branchyuran),棲地類型多樣化,分佈也相當廣,由深海到高山溪流都有分佈,不同棲地的螃蟹有不同的滲透壓調節機制或策略,多數的短尾類

螃蟹是屬於需要主動耗能調節的 hyper-osmoregulator 或是 hyper-hypo osmoregulator。根據文獻，分子演化的證據顯示十足目的螃蟹為海生起源，演化出適應陸生生活物種，也僅是最近 400 萬年的事件（Schubart *et al.* 1998）。在海生到陸生的過程上，最主要的變化在於環境乾燥程度的增加和必須面對淡水低張環境。要克服這些環境上的改變，螃蟹是否有新的機制及策略的產生，值得進一步去探討。這些適應上的改變，又可分為生理部分以及型態部分。生理部分包括有：如何從低張（低離子濃度）環境下，主動從環境吸收所需要的離子以保持體液滲透壓恆定、減少排出的尿液中離子的濃度、以及行為上避免接觸淡水等改變。型態部分則是針對呼吸及離子調節功能的妥協（trade-off），這包括了有鰓部功能的分工、鰓部呼吸功能轉移到其他位置，讓鰓可以專門用來進行離子調節、以及特化構造的產生（Farrelly and Greenaway 1992; 1994）。

二、滲透壓調節器官及調節功能的轉變

(一) 滲透壓調節器官的種類與構造

螃蟹用以參與滲透壓調節的器官有很多，包括有：鰓(gill)、觸角腺(antennal gland)、部分腸道(intestine) 以及肝胰腺(hepatopancreas)，在以上各個器官中，最主要也佔最大體積的調節器官是鰓(鍾 2002)。螃蟹的鰓位於背甲下方的鰓腔中，對數則會因棲地類型的不同而有變化。在海生型的螃蟹會有完整的九對，但是隨著陸生性的增加，鰓的對數會有減少的現象(Péqueux 1995)，如：招潮蟹屬(*Uca sp.*) 的螃蟹只具有 4 對主要的鰓以及 3 對不明顯的鰓，不像海生型螃蟹有完整的 9 對鰓(Lin *et al.* 2002)。螃蟹鰓部的功能為氣體交換以及離子調節，其基本構造如圖一所示，每對鰓有許多平行於中軸的鰓薄板(lamellae)，每一片鰓薄板是由一層的上皮細胞外覆一層角質層(cuticle) 所組成，而中央形成的空腔即為體液流動的地方，此處多半會伴隨有屬於結締組織的隔膜(septum) 出現，可隔開空腔形成許多小室，整片鰓薄板的最外側具有一個供血液快速流通的邊緣通道(marginal channel)；而角質層到上皮細胞基底膜(basolateral membrane) 的距離則稱為 diffusion barrier，其厚度越厚對氣體的交換就越不利。

研究指出在潮間帶的螃蟹中，鰓部的功能並不是每對鰓都相同，位於體節前側的鰓稱為前鰓（anterior gills），以型態來看，此類鰓具有較薄的上皮細胞（2-4 μm ），功能被認為與氣體交換相關；體節後側的鰓稱為後鰓（10-20 μm ），具有厚的上皮細胞，並在細胞中具有複雜的褶皺以及大量粒線體的存在，此類鰓因為有較厚的 diffusion barrier，功能上不利於氣體交換，所以被認為是進行離子交換的主要位置（Barra *et al.* 1983; Péqueux 1995; Takeda *et al.* 1996; Luquet *et al.* 2000）。針對這類增厚的上皮細胞進行超微結構的觀察以及離子調節酵素位置的標定，進一步證實了複雜的褶皺與大量的粒線體都是為了要增加表面積並提供大量 ATP 給離子調節酵素，以獲得更良好的主動運輸離子的能力（Luquet 1997; Lignot and Charmantier 2001; Luquet *et al.* 2002）。故鰓部功能前後分工，此種現象在短尾類的螃蟹中，是已被證實的。

（二）鰓部特化構造及輔助呼吸器官的出現

Henry 在 1994 年將螃蟹主要棲地依陸生程度分為四種：水生、潮間帶、兩棲、以及陸生。隨著陸生程度的升高，為了能夠適應陸生的乾燥環境，在一些陸生性較強的螃蟹，包括沙蟹科（Family: Ocypodidae）的部分蟹種、方蟹科（Family: Grapsidae）

的陸方蟹屬 (Order: Geograpsus) 圓軸蟹屬 (Order: Cardisoma) 以及一些地蟹科 (Family: Gecarcoidae) 的螃蟹，其鰓薄板與鰓腔上皮出現了一些特化結構，用以適應陸生缺水的環境。在鰓薄板方面，不僅擁有增厚的角質層，並衍生出特化的節結 (nodule)，這兩種構造都能使鰓薄板在缺水的環境，不至於塌陷而影響鰓的功能；特化構造的複雜程度會依物種及陸生程度的差異而不同。報告指出，甚至連一些沙蟹科的潮間帶螃蟹均有較簡單的結節出現 (Farrelly and Greenaway 1992)。

另一結構則是特化的鰓腔構造 (extrabranchial structure)，特徵是在鰓腔的內面形成複雜的褶皺，並有大量血管通過，通稱為似肺構造 (lung-like structure)。研究指出，此構造可以增加呼吸效率，尤其是在氧氣的吸收 (Taylor and Greenaway 1979; Innes and Taylor 1986)。測量此構造發現具有較高的 carbonic anhydrase (CA) 活性，故推斷也與 CO₂ 的排除有關 (Henry and Cameron 1983; Farrelly and Greenaway, 1994)。這個似肺構造的出現，目前的研究多推論其代表的意義，在於將呼吸功能由鰓轉移到這個位於鰓腔中的似肺構造上，暗示鰓部功能主要是離子調節 (Innes and Taylor 1986; Santos *et al.* 1987)。甚至 Morris 在 2002 年的報告中直接指出，此似肺構造上 CA 活性的有無是螃蟹能否適應陸生生

活環境的關鍵。但是由於資料不足，並無直接證據說明這些輔助呼吸器官的出現，確實幫助了呼吸功能，使鰓部能更專注於進行離子調節。

（三）輔助滲透壓調節功能的方法

輔助滲透壓調節功能大致上可以分為兩個部分：間接的輔助調節行為或是直接的離子調節功能的提升。間接的輔助是指物理性或是行為上的轉變，而直接的輔助則是參與調節的器官或部位增加。物理性的機制就像是增加角質層（cuticle）厚度，或是降低其鰓的表皮細胞對水的通透性。如 Rainbow 與 Black 在 2001 年時，針對三種不同典型棲地（海水、潮間帶、及淡水）的螃蟹 *Necora puber*、*Carcinus maenas* 和 *Eriocheir sinensis*，測量其鰓的表皮細胞對水的通透性實驗中指出，淡水及潮間帶的螃蟹要比海水棲地的螃蟹有較低的通透性；所以推論不管是上陸還是遇到淡水的情況，螃蟹會藉著降低對水的通透性以減少水分的流失。而行為上的改變，可能是會藉著上陸的行為，減少持續浸泡在低鹽度的海水或是純淡水中的情形（Cooper and Morris 1997）。

直接的輔助是增加參與離子調節的器官，在 Mañanes 等人 2002 的文獻中，發現對淡水有良好適應的方蟹科螃蟹

Cyrtograpsus angulatus 的前鰓，在鹽度轉移 3 小時後， Na^+ ， K^+ -ATPase 活性有顯著的升高，進而推測前鰓在短期鹽度變化時也有輔助離子調節的作用，而不是原本認為的僅有呼吸的功能。此外，本實驗室對淡水適應良好的台灣厚蟹 (*Helice formosensis*) 研究發現，將螃蟹從高鹽度轉移到低鹽度環境的時候，前鰓的 Na^+ ， K^+ -ATPase 的活性的確有顯著提高的現象 (李等 2004)。除了以上描述的增加吸收離子器官，還有另外一種方法是對將要排出的尿液進行再吸收，這部分的相關實驗很多，從海生型的潮間帶螃蟹，如：*Carcinus maenas*、*Callinectes sapidus*，一直到陸生型的 *Gecarcoidea natalis* 都做過實驗，結果皆證明在低離子濃度的情況下，觸角腺 (antennal gland) 的 Na^+ ， K^+ -ATPase 活性會顯著提高，以增加離子回收的效率 (Greenaway 1994; Varley and Greenaway 1994; Morris and Adamczewska 1996; Dela-Cruz and Morris 1997; Morris and Callaghan 1998)。以上的輔助滲透壓調節方法，並不會與後鰓為主要離子調節區域有抵觸。

三、鰓部離子調節酵素與離子調節模式

(一) 離子調節酵素

A、 Na^+ ， K^+ -ATPase

Na^+ ， K^+ -ATPase 是一個與離子調節有關的初級主動運輸幫

浦，此酵素屬於膜蛋白（membrane-bound protein）的一種，廣泛出現在每個生物體，結構上是由 2 個 α subunits 與 2 個 β subunits 所組成，分子量分別為 110 kDa 與 55 kDa，功能為每水解一個 ATP，就可以將 3 個 Na^+ 打出細胞外，交換 2 個 K^+ 離子進入細胞，是控制離子進出細胞膜最主要的酵素，在 ATPase 分類上屬於 P-type（Lodish *et al.* 2000）。在脊椎動物體內，此酵素集中出現在腎臟時，代表了此器官功能和鹽類的再吸收或是排除有關。在水生的脊椎動物如魚類，此酵素也大量出現在鰓上的富含粒線體細胞（mitochondria-rich cell, 簡稱 MRC）中，功能則和維持體液滲透壓穩定，及離子的吸收或排除有關（Lee *et al.* 1996; Hwang *et al.* 1999）。在甲殼類動物如 spiny lobster (*Palinurus elephas*) 的研究，發現 Na^+ , K^+ -ATPase 在鹽類的吸收扮演重要的角色，尤其在鹽度變化的時候，環境離子濃度下降時， Na^+ , K^+ -ATPase 活性上升，使得細胞內呈現比環境的 Na^+ 濃度還低的狀態，環境中的 Na^+ 就會進入細胞內，在如此重複的作用下，可以達到維持體液滲透壓穩定的目的（Lucu *et al.* 2000）。

Na^+ , K^+ -ATPase 與滲透壓調節的關係，在螃蟹體內同樣被證實。由免疫螢光染色實驗，證實在螃蟹的鰓部細胞基底膜（basolateral membrane）的位置，擁有大量的 Na^+ , K^+ -ATPase 蛋白

質表現，尤其在後鰓的部分，每一個上皮細胞都擁有大量的 Na^+ , K^+ -ATPase 酵素存在 (Towle and Kays 1986; Towle *et al.* 2001), 進一步分析其 mRNA 的含量，結果也同樣發現後鰓有較前鰓高的表現量 (Towle *et al.* 2001)。不同鹽度下的表現，發現低鹽度環境會使 Na^+ , K^+ -ATPase 的活性提高，證實了此酵素能維持體液滲透壓恆定的功能 (Towle 1993; Piller *et al.* 1995; Lucu and Flik 1999; Castilho *et al.* 2001; Lin *et al.* 2002; Mañanes *et al.* 2002)。若要深入討論 Na^+ , K^+ -ATPase 活性上升的現象，是因為新的蛋白質合成或是單一酵素的效率提高，研究物種不多，目前僅發現在 *Carcinus maenas* 中，短期的調節是提高單一酵素的活性，或是使原本沒有參與作用的酵素全部加入調節的行列，而在長期馴養的狀況下，則是會再合成新的蛋白質以提高整體 Na^+ , K^+ -ATPase 的蛋白質量以參與調節 (Lucu and Flik 1999)。

B、 H^+ -ATPase

H^+ -ATPase 在過去被認為是與細胞內的酸鹼平衡有關，由多個基因片段組成，序列保守，由酵母菌到昆蟲及哺乳動物的相似度都很高，屬於 Vacuolar-type H^+ -ATPase，其與粒線體的 F-type ATPase (F_1F_0 ATPase, ATP synthase) 在功能上及結構上略有不同

(Perzov *et al.* 2001) V-type H^+ -ATPase 結構由一個 transmembrane 的 V_0 domain 與一個膜外的 V_1 domain 組成。其中 V_1 domain 有 8 個次單元 (subunit) (A-H) , 又可細分為 headpiece (3 個 A、 3 個 B、 1 個 E subunits) 與 stalk (C、 D、 F、 3 個 G、 以及 H subunits) 兩部分 ; 而 V_0 domain 則由 4 個部分構成 , 分別是 M100、 M40、 M17 與 M9.7 (其中數字代表分子量的大小) , 其中 M9.7 subunit 為 mature H^+ -ATPase 必備的部分。在功能上 , H^+ -ATPase 會水解 ATP 並將 H^+ 打出細胞外 , 其 catalytic site 位在 V_1 domain 上 , 當 V_1 domain 存在時 , H^+ -ATPase 才有功能 (Forgac 1998; Wiczorek *et al.* 2000) , 調節方式是藉由 V_0 domain 與 V_1 domain 的組成 (assembling) 與拆解 (disassembling) 來控制 (Wiczorek *et al.* 2000) 。

以往有關 H^+ -ATPase 的研究報告 , 多半認為 H^+ -ATPase 在一般生物體的細胞內負責基本生理酸鹼平衡功能 , 但是後來在哺乳動物腎臟的 intercalated cells (ICs) 與 MDCK (madin-darby canine kidney) cell line、 昆蟲馬氏管及腸道杯狀細胞 (goblet cells)、 青蛙表皮 MRC、 還有魚類及甲殼類的滲透壓調節機制上 , 發現 H^+ -ATPase 可能有其他功能存在。在哺乳動物的研究中 , 指出在活體大白鼠腎臟或是體外培養的 MDCK cell , H^+ -ATPase 會參與滲透

壓調節 (Feifel et al. 1997; Silver *et al.* 2000)。在昆蟲的研究中，馬氏管的功能相當於哺乳類動物的腎臟，實驗發現數種昆蟲馬氏管上的 H^+ -ATPase 會與 K^+ 的吸收有關 (Klein 1992; Maddrell and O' Donnell 1992; Wiczorek *et al.* 1999)。在水生脊椎動物的研究方面，不管是魚類或是甲殼類， H^+ -ATPase 同樣也被發現與滲透壓的調節有關，並且證實在淡水環境或是極端低離子濃度下， H^+ -ATPase 取代 Na^+ , K^+ -ATPase 帶動離子流動(Ehrenfeld and Klein 1997; Klein *et al.* 1997; Wiczorek *et al.* 1999; Jensen *et al.* 2002)。

綜合不同物種針對 H^+ -ATPase 的研究，尤其是在能夠適應淡水的水生無脊椎動物方面，目前提出的假設是：當 H^+ -ATPase 位於頂膜上，它的功能就會與低離子濃度下吸收離子以維持滲透壓平衡有關聯；若不是分佈頂膜，而是均勻分佈在細胞質中，則功能就會與一般細胞內相同，是參與酸鹼平衡(Wiczorek *et al.* 1999; Weihrauch *et al.* 2001; Jensen *et al.* 2002)。此外，根據這一系列的實驗，Morris 在 2001 年針對螃蟹的離子調節機制提出了兩種模式假說，並且推論在能夠適應淡水環境的物種中，有沒有參與滲透壓調節的 H^+ -ATPase 將是一個決定性的改變(詳細說明見 18 頁)。若加上分子演化的證據來看，五種不同的螃蟹中， H^+ -ATPase 的分子序列親緣關係已經有分群的現象產生。適應淡水環境的

Eriocheir sinensis 與 *Chasmagnathus granulatus*, 在序列上已和海生型的 *Carcinus maenas* 及 *Callinectes sapidus* 有顯著的分群產生 (Weihrauch *et al.* 2001)。因此, 推論螃蟹在由海水往淡水棲地演化的路徑上, 擁有參與滲透壓調節的 H^+ -ATPase 或許是能否適應淡水環境的關鍵。

C、Carbonic anhydrase

Carbonic anhydrase (CA), 原本被認為是與呼吸作用中 CO_2 的排除較相關, 在脊椎動物的紅血球上首先被發現, 並且長期被研究與氣體交換的關係。在近十年的研究中, 發現 CA 是第一個非代謝相關酵素, 但卻參與了滲透壓調節的酵素 (Kirschner 2004)。報告中指出, 不僅在魚類鰓部發現有高濃度的 CA 存在, 並且在甲殼類的鰓部同樣有大量表現。CA 主要功能是將 CO_2 分解為 HCO_3^- 以及 H^+ , 以提供 apical membrane 上 H^+ -ATPase 與 HCO_3^-/Cl^- exchanger (Band III exchanger) 做離子交換 (Henry *et al.* 2002)。測量甲殼類鰓部鹽度轉變後, CA 活性的變化, 結果發現在 *Carcinus maenas*、*Callinectes sapidus*、*Homarus gammarus* 與 *Uca lactea* 這些物種中, 低鹽度會誘使鰓部的 CA 活性增加 (Henry 2001a; 李 2001; Pavicic-Hamer *et al.* 2003), 進而推測

CA 可能也參與甲殼類鰓上滲透壓調節的機制，並且在能夠適應淡水的物種中更為重要。在這一系列的實驗中，發現 CA 有兩種形式：membrane-bound CA 與 cytoplasmic CA 兩種，能夠參與滲透壓調節機制的，是屬於 cytoplasmic CA，而 membrane-bound CA 則與 CO₂ 的排除功能相關。

此外，因為 CA 作用的速度十分快速，所以 short-term modulation 很少被討論，而其長期馴養下的活性變化，被發現是由增加新的 CA 蛋白質所致 (Henry *et al.* 2002)。

D、其他參與滲透壓調節的蛋白質

前述三種酵素是屬於能夠主動參與調節的酵素，除了這些耗能的酵素之外，還有一些蛋白質在整個滲透壓調節機制中，也是不可或缺的，包括有 Na⁺/H⁺ exchanger (Shetlar and Towle 1989; Towle *et al.* 1997)、HCO₃⁻/Cl⁻ exchanger (Wheatly *et al.* 2001)、Na⁺ channel、Cl⁻ channel 以及 Na⁺/K⁺/2Cl⁻ cotransporter (McCormick *et al.* 2003)、甚至 Arginine kinase (Kotlyar *et al.* 2000) 等。雖然這些都不是能夠主動增加整體離子交換的速率，但仍有部分實驗證實其與鹽度轉變下的離子調節機制有密切相關。

(二) 離子調節機制的兩種模式

前面簡述了各個離子調節酶的功能及作用，而整體來看這些酶在螃蟹總部的離子調節模式，可以分為兩種：海水型及淡水型 (Morris 2001)。海水型的模式是由海生型的螃蟹如 *Carcinus maenas* 與 *Callinectes sapidus* 的研究整理而得。在這種調節模式中，外界離子進入細胞的動力來源，來自細胞基底膜 (basolateral membrane) 的 Na^+ , K^+ -ATPase。海生型螃蟹面臨淡海水環境時，基底膜的 Na^+ , K^+ -ATPase 開始作用，將 Na^+ 打出細胞外進入體液中，使上皮細胞內的 Na^+ 低於環境中的 Na^+ ，所以外界的 Na^+ 可以經由細胞頂膜上的 Na^+ channel 以及 Na^+/H^+ exchanger 進入細胞中；而 Cl^- 則是由 CA 提供大量的 HCO_3^- 來交換 Cl^- 進入細胞，並由細胞基底膜上的 Cl^- channel 送入體液中。此時，海水型離子調節模式中，離子流動原動力是由基底膜的 Na^+ , K^+ -ATPase 所帶動。但是在淡水型離子調節模式中，卻是由藉由頂膜上的 H^+ -ATPase 來提供原動力，此為兩種模式的最大不同之處。而這個淡水型的離子調節模式，主要是研究 *Eriocheir sinensis* (俗稱大閘蟹) 這種對淡水適應良好的洄游性螃蟹而得。但是在這個淡水型的離子調節機制中，仍有很多尚未證明的地方，如 Na^+ channel 的存在與否、 Na^+/H^+ exchanger 或是 $2\text{Na}^+/\text{H}^+$ exchanger，

有待後續的研究。

在 Morris 提出的淡水型滲透壓調節模式裡，由於淡水環境的 Na^+ 非常低，若仍是藉由 Na^+ , K^+ -ATPase 來形成離子濃度梯度差，以耗能的觀點來看，十分沒有效率 (Kirschner 2004)；藉由細胞頂膜上的 H^+ -ATPase 來作用，將 H^+ 打出細胞外，則可以形成細胞頂膜內外的膜電位差，使細胞內帶負電，這樣就可以使帶正價的離子進入細胞。而整體的離子流動過程，是外界的 Na^+ 可以經由頂膜上的 Na^+ channel 以及 Na^+/H^+ exchanger 進入細胞中，而 Cl^- 則是由 CA 提供大量的 HCO_3^- 來交換 Cl^- 進入細胞，並由基底膜上的 Cl^- channel 送入體液中 (Morris 2001; Jensen *et al.* 2002; Kirschner 2004)。

四、實驗目的

以往針對 H^+ -ATPase 的研究，多採用極端偏向海生或是偏向淡水生的螃蟹如：海水的 *Carcinus maenas*, *Callinectes sapidus* 以及淡水的 *Eriocheir sinensis*。在海生型的螃蟹中，其 H^+ -ATPase 的表現並不會隨著鹽度的變化而有提升的情形，主要調節方式仍是藉由改變 Na^+ , K^+ -ATPase 的活性 (Weihrauch *et al.* 2002)；但在淡水型的螃蟹中，則變成倚賴 H^+ -ATPase 大過於 Na^+ , K^+ -ATPase

(Onken and Putzenlechner 1995; Morris 2001)。由於海水型以及淡水型的螃蟹分佈屬於兩個極端，海生型的螃蟹物種，因為研究較豐富，所以調節機制的論述也較詳盡，但是針對能夠適應淡水的螃蟹物種而言，還有需多值得探討的部分。其中最有趣的部分，就是能否證明適應淡水環境的螃蟹，確實以 H^+ -ATPase 來取代 Na^+ , K^+ -ATPase 在滲透壓調節上扮演的角色。

本實驗藉由選取多種潮間帶螃蟹（包含有能適應淡水的物種以及對淡水耐受度較差的物種），利用 H^+ -ATPase 分佈位置判別其功能。當 H^+ -ATPase 分佈在頂膜，代表 H^+ -ATPase 參與了滲透壓調節功能；當 H^+ -ATPase 分佈在細胞質區域，表示 H^+ -ATPase 不參與滲透壓調節功能。其次是要討論 H^+ -ATPase 分佈位置與 Na^+ , K^+ -ATPase 活性在高低鹽度間的變化幅度，也就是說，當 Na^+ , K^+ -ATPase 活性變化劇烈，表示在低鹽度的環境下， Na^+ , K^+ -ATPase 活性上升，主導離子調節的機制；若 Na^+ , K^+ -ATPase 活性變化小，則表示這些物種能適應低鹽度環境不是藉由改變 Na^+ , K^+ -ATPase 活性。最後挑選台灣招潮蟹（*Uca formosensis*），測量其第六對鰓（屬於離子調節鰓）上 H^+ -ATPase 活性的變化，直接測量 H^+ -ATPase 活性是否會隨著環境鹽度的降低而升高。

五、物種的選擇

潮間帶螃蟹的分佈相當廣泛，尤其在棲地類型上，又有相當大的歧異度，並且潮間帶的海水鹽度變化，越趨向高潮線，海水鹽度越低。在本實驗中，主要討論的是能夠適應淡水與不能適應淡水物種間的差異，所以在物種選擇上，選擇偏向低潮線區海生型的 4 種螃蟹、高潮線區能適應淡水的 4 種物種、高潮線區以上的 3 種物種以及 1 種淡海兩棲的洄游性物種。

偏向海生型並不能適應淡水的物種，包括有分佈在較低潮線的短身大眼蟹 (*Macrophthalmus abbreviatus*)、萬歲大眼蟹 (*Macrophthalmus banzai*)，以及石礫堆的肉球近方蟹 (*Hemigrapsus sanguineus*)、絨毛近方蟹 (*Hemigrapsus penicillatus*)；分佈在高潮線區的清白招潮蟹 (*Uca lactea*)、台灣招潮蟹 (*Uca formosensis*)、台灣厚蟹 (*Helice formosensis*)、雙齒近相手蟹 (*Perisesarma bidens*)；以及生活在高潮線之上的沙灘、樹林或土堤的無齒螳臂蟹 (*Chiromantes dehaani*)、痕掌沙蟹 (*Ocypode stimpsoni*)、隆背張口蟹 (*Chasmagnathus convexus*)。最後還有淡海兩棲的洄游性蟹類：中華絨螯蟹 (*Eriocheir sinensis*)。

材料與方法

一、實驗動物及馴養

本實驗選用甲殼類十足目方蟹科 (Family: Grapsidae) 螃蟹 7 種以及沙蟹科 (Family: Ocypodidae) 螃蟹 5 種；其中屬於方蟹科的物種包括中華絨螯蟹 (*Eriocheir sinensis*)、隆背張口蟹 (*Chasmagnathus convexus*)、台灣厚蟹 (*Helice formosensis*)、肉球近方蟹 (*Hemigrapsus sanguineus*)、絨毛近方蟹 (*Hemigrapsus penicillatus*)、雙齒近相手蟹 (*Perisesarma bidens*) 以及無齒螳臂蟹 (*Chiromantes dehaani*)；沙蟹科之萬歲大眼蟹 (*Macrophthalmus banzai*)、短身大眼蟹 (*Macrophthalmus abbreviatus*)、痕掌沙蟹 (*Ocypode stimpsoni*)、清白招潮蟹 (*Uca lactea*) 以及台灣招潮蟹 (*Uca formosensis*)。其中除了中華絨螯蟹由市場購得外，其餘均由台中縣清水鎮高美溼地及彰化縣伸港鄉沿岸採集而得。實驗動物帶回實驗室後，馴養在 60×40×50 公分的塑膠採集箱，水溫維持在 28 (僅中華絨螯蟹馴養在 20 以下)，光照週期 14 小時光照/10 小時黑暗，馴養的海水鹽度為 25 ppt (parts per thousand, ‰)，讓螃蟹可以自由進出水面一星期後，轉移到不同鹽度海水 (35、5 ppt) 或淡水進行實驗。35 ppt 海水滲透壓大約 1000 mOsm/Kg，與螃蟹體液滲透壓較接近，屬於較不需要耗能調節的

等滲環境；而 5 ppt 海水滲透壓約為 150-200 mOsm/Kg，屬於低張環境，螃蟹需要耗能主動吸收離子，以維持體液滲透壓穩定。

馴養海水均由人工海鹽（Coralife scientific grade marine salt, USA）配置而成。實驗動物每兩天餵食一次冷凍紅蟲或冷凍豐年蝦，每星期換水一次。

二、研究方法

（一）鰓部組織埋蠟切片及免疫組織化學染色

選取馴養在低鹽度海水（5 ppt）或淡水 7 天之後的螃蟹，將螃蟹置於碎冰中，待其失去活動力後，解剖螃蟹，取下鰓部組織，以固定液（P₄G₅, 4% paraformaldehyde and 5% glutaraldehyde in 0.1M PB）在 4℃ 下固定 12-15 小時，以 PBS（phosphate buffer solution）清洗，依序列濃度酒精脫水，再以二甲苯（xylene）置換酒精之後，以石蠟（paraffin）包埋組織。包埋後的組織以厚度 5 μm 切片（LEICA, RM2125RT）。

在進行免疫組織化學染色法時，先將組織切片置於覆有 poly-L-lysine solution（Sigma）的載玻片上，以 Xylene 脫蠟 2 次各 3 分鐘，100% 及 95% 酒精置換各 2 分鐘，二次水清洗 10 分鐘，再以 3% H₂O₂（in 100% methanol）浸泡 10 分鐘以去除

內生性抗原反應，PBS 清洗 2 分鐘 3 次，依序以一級抗體（稀釋 200 倍）在 4 °C 下反應 12-18 小時、PBS 清洗 2 分鐘 3 次、二級抗體（HRP/Fab polymer conjugate, Zymed）在室溫下反應 45 分鐘、PBS 清洗 2 分鐘 3 次、呈色劑（aminoethyl carbazole (AEC) single solution chromogen, Zymed）呈色 30 分鐘，最後以 Hematoxylin（Zymed）染色 3 分鐘做為背景值；最後以封片膠（GVA mounting solution, Zymed）封片。每個樣本均以光學顯微鏡（Nikon）在 600 倍或 1000 倍下觀察（Nikon, Plan Apo 60x/100x），最後以數位相機拍照（Nikon D1）存檔。另外取同組織樣本的切片，不加一級抗體，其他染色過程相同，做為對照組。本實驗使用的一級抗體為 H⁺-ATPase β-subunit 的單株抗體（Molecular Probes）。

其中選用 P₄G₅ 作為固定液的理由，是由於其滲透壓約為 750 mOsm/Kg，比較接近螃蟹的體液滲透壓（700-900 mOsm/Kg），避免組織在固定過程中有變形的情形發生。

藥品配置

P₄G₅ 固定液：4% Paraformaldehyde (Sigma), 5% Glutaraldehyde (Wako),
0.1 mM NaH₂PO₄ (Merck), 0.1 mM Na₂HPO₄ (Merck), pH=7.2,
Osmolality = 750 mOsm/Kg

PBS (Phosphate Buffer Solution)：136.9 mM NaCl (Merck), 2.68 mM

KCl (Merck), 10.15 mM Na₂HPO₄ (Merck), 1.76 mM KH₂PO₄ (Merck), pH=7.4

(二) 鰓部蛋白質萃取

將螃蟹置於碎冰中，待其失去活動力後，解剖螃蟹，取下兩側的第六對鰓，放入塑膠離心管中，加入含有蛋白質分解酶抑制劑 (proteinase inhibitor) 的均質液 (Homogenizing medium)，並利用超音波組織均質機 (Ultrasonic processor, SONICS)，將鰓均質化至看不見鰓薄板後，在 4℃ 下分別依序以 6000 g 離心 15 分鐘，20160 g 離心 20 分鐘，得到去除細胞核、粒線體及未均質組織的蛋白質萃取液；將得到的蛋白質萃取液分裝成為兩部分：第一部分的蛋白質萃取液，不經過冷凍過程，以新鮮的蛋白質萃取液進行 Na⁺, K⁺-ATPase 或是 H⁺-ATPase 的活性測定；第二部份將保存在 -75℃ 以下，以便日後進行蛋白質電泳分析。

蛋白質萃取液的蛋白質含量測定，是將萃取液稀釋後，取體積 800 μL 加上 200 μL Protein Assay (Bio-Rad)，利用呈色比色法以分光光度計 (U-2001 Spectrophotometer, HITACHI) 在波長 595 nm 的可見光下，測量濃度萃取液所含的蛋白質濃度。

藥品配置

Homogenizing medium : 25 mM Tris-HCl (Bio-Rad), 0.25 mM Sucrose (Merck), 20 mM EDTA (Sigma), 0.4% Sodium deoxycholate (Sigma), pH=7.4

Proteinase inhibitor : 3.31 mM Antipain (Sigma), 2.16 mM Leupeptin (Sigma), 63.86 mM Benzamidine (Sigma), 100% Aprotinin (Sigma)

PBS (Phosphate Buffer Solution) : 136.9 mM NaCl (Merck), 2.68 mM KCl (Merck), 10.15 mM Na₂HPO₄ (Merck), 1.76 mM KH₂PO₄ (Merck), pH=7.4

PBST (Phosphate Buffer Solution with Tween 20) : 136.9 mM NaCl (Merck), 2.68 mM KCl (Merck), 10.15 mM Na₂HPO₄ (Merck), 1.76 mM KH₂PO₄ (Merck), 0.2 % Tween 20 (Merck), pH=7.4

(三) 酵素活性測定

(A) Na⁺, K⁺ -ATPase

取等體積的蛋白質萃取液，分組進行 Na⁺, K⁺ -ATPase 的活性測定後，再利用呈色比色法，在 700 nm 的光波下觀察 Pi 濃度。Na⁺, K⁺ -ATPase 活性測定的原理是利用一組有加入 Na⁺, K⁺ -ATPase 專一性抑制劑 ouabain 的 reaction medium (Ouabain Group)，抑制 ATP 分解成 ADP 與 Pi，與另一組未加入專一性抑制劑 ouabain 的 reaction

medium (Ouabain Free Group) 兩組之差值做比較。主要流程是先將 400 μ L reaction medium 與蛋白質萃取液混合均勻，加入 100 μ L ATP stock solution 起始反應，置入 30 $^{\circ}$ C 恆溫水浴槽反應 15 分鐘，以 200 μ L TCA stock solution 終止反應，以 4000 rpm 在 4 $^{\circ}$ C 離心去除沉澱物後，取出上清液 500 μ L 加入 1 mL 的 Bonting's color reagent 與硫酸亞鐵混合而成的顯色劑 (Colormetry Solution)，冷水浴 20 分鐘，接著以分光光度計 (U-2001 Spectrophotometer, HITACHI) 在波長 700 nm 下，測量溶液中 Pi 的含量。計算公式如下：

Enzyme Specific Activity of NKA =

[兩組 Pi 差值(μ M)] \div [加入的蛋白質量(mg)] \div [反應時間(hr)]

藥品配置

Ouabain Group : 20 mM Imidazole (Sigma), 130 mM NaCl (Merck), 10 mM MgCl₂ (Merck), 5 mM Na₂ATP (Sigma), 1 mM Ouabain (Sigma), pH=7.4

Ouabain Free Group : 20 mM Imidazole (Sigma), 100 mM NaCl (Merck), 30 mM KCl (Merck), 10 mM MgCl₂ (Merck), 5 mM Na₂ATP (Sigma), pH=7.4

ATP Stock Solution : 25 mM Na₂ATP (Sigma)

TCA Stock Solution : 30 % Trichloroacetic acid (Merck)

(約為 1.8 mM)

Bonting's Color Reagent : 560 mM H₂SO₄ (Sigma), 8.1 mM Ammonium molybdate tetrahydrate (Sigma)

Colormetry Solution : 176 mM FeSO₄ (Sigma) in Bonting's Color Reagent

(B) H⁺-ATPase

流程上與 Na⁺, K⁺ -ATPase 大致相同，也是取等量的蛋白質 (50-100 μg) 分組進行活性測定。在此組實驗中，先將所有 reaction medium 利用 1 mM 的 Ouabain、1 mM 的 Sodium azide 與 1 mM 的 Sodium ortho-vanadate 抑制 Na⁺, K⁺ -ATPase P-type 與 F-type ATPases 反應 (Bafilomycin Free Group) 之後，於其中一組中再加入 1 μM H⁺-ATPase 專一抑制劑 Bafilomycin A₁ (Sigma) 來抑制 V-type H⁺-ATPase 的表現 (Bafilomycin Group)。因 Bafilomycin A₁ 不溶於水，反應前必須先溶在 DMSO (Dimethyl sulfoxide) 中。同樣也以兩組的差值代表 H⁺-ATPase 活性的表現。活性計算公式如下：

Enzyme Specific Activity of HA =

[兩組 Pi 差值(nM)] ÷ [加入的蛋白質總量(mg)] ÷ [反應時間(hr)]

藥品配置

Bafilomycin Free Group : 20 mM Imidazole (Sigma), 130 mM NaCl (Merck), 10 mM MgCl₂ (Merck), 5 mM Na₂ATP (Sigma), 1 mM Ouabain (Sigma), 1 mM Sodium azide (Sigma), 1 mM Sodium

ortho-vanadate (Sigma), 10 μ L DMSO (Sigma), pH=7.4

Bafilomycin Group : 20 mM Imidazole (Sigma), 130 mM NaCl (Merck),
10 mM $MgCl_2$ (Merck), 5 mM Na_2ATP (Sigma), 1 mM ouabain
(Sigma), 1 μ M Bafilomycin A_1 (in DMSO) (Sigma), 1 mM Sodium
azide (Sigma), 1 mM Sodium ortho-vanadate (Sigma), 10 μ L
DMSO (Sigma), pH=7.4

ATP stock solution : 25 mM Na_2ATP (Sigma)

TCA stock solution : 30 % Trichloroacetic acid (Merck) (約為 1.8 mM)

Bonting's Color Reagent : 560 mM H_2SO_4 (Sigma), 8.1 mM Ammonium
molybdate tetrahydrate (Sigma)

Colormetry solution : 176 mM $FeSO_4$ (Sigma) in Bonting's Color
Reagent

(四) 西方點墨法

在本部分實驗，取等量純化後的蛋白質 (20 μ g/ Lane) 兩
組，分別以 H^+ -ATPase 與 β -actin 染色。電泳分析步驟如下：以
直立式電泳膠 (5% 上層膠與 12% 下層膠) 分離 (上層膠 50 伏
特、下層膠 100 伏特)，轉漬到 PVDF 膜 (NEN life science) 上
(20 伏特 25 分鐘)，以 5% 脫脂奶粉溶液 (以 PBST 作為溶劑)
阻斷 (室溫 1 小時，或 4 \times 15-18 小時) 後，以 PBST 清洗 3
次各 5 分鐘，再依序以一級及二級抗體染色，顯色後以多功能

影像分析系統 (Intelligent Dark Box II with Fujifilm LAS-1000 digital camera) 確定各酵素的表現狀況 , 將各酵素表現影像以數位相機拍照存檔後 , 以影像分析軟體 (Image Gauge 4.0, Fujifilm) 分析得到 H^+ -ATPase β -subunit 與 β -actin 的強度 , 最後以比值方式呈現 (HA β -subunit/ β -actin) , 同時會將 PVDF 膜用 Coomassie Brilliant Blue 溶液染色 , 以確定酵素表現位置是否正確。在此部分實驗中 , 一級抗體為 anti-yeast vacuolar H^+ -ATPase β -subunit monoclonal antibody (Molecular Probes) Anti- β -actin monoclonal antibody (Sigma)。二級抗體為接上 HRP (Horseradish Peroxidase) 的 goat anti-mouse IgG (Zymed) , 冷光呈色劑為 Western Blot chemiluminescence reagent plus (NEN life science)。

藥品配置

Loading Dye : 10 % SDS (Bio-Rad), 10 % Glycerol (BDH), 0.1 %

Bromophenol blue (Sigma), 0.5 M Tris-HCl (pH=6.8) (Bio-Rad), 5 % β -mercaptoethanol (BDH)

Running Buffer : 27.5 mM Tris-base (Bio-Rad), 191.8 mM Glycine (Bio-Rad), 3.5 mM SDS (Bio-Rad)

Transfer Buffer : 48 mM Tris-base (Bio-Rad), 40 mM Glycine (Bio-Rad), 0.13 mM SDS (Bio-Rad), 20 % Methanol (Merck)

Coomassie Brilliant Blue : 1.21 mM Coomassie Blue (Merck), 40 %
methanol (Merck), 1 % Acetic acid (聯工)

PBS (Phosphate Buffer Solution) : 136.9 mM NaCl (Merck), 2.68 mM
KCl (Merck), 10.15 mM Na₂HPO₄ (Merck), 1.76 mM KH₂PO₄
(Merck), pH=7.4

PBST (Phosphate Buffer Solution with Tween 20) : 136.9 mM NaCl
(Merck), 2.68 mM KCl (Merck), 10.15 mM Na₂HPO₄ (Merck),
1.76 mM KH₂PO₄ (Merck), 0.2 % Tween 20 (Merck), pH=7.4

三、實驗設計與步驟

(一) 觀察不同種的潮間帶螃蟹，鰓上 H⁺-ATPase 的位置。

目的是測試 Morris 在 2001 年提出的淡水型離子調節模式。在此部分的實驗，是將螃蟹馴養到低鹽度（5 ppt 或淡水）環境中至少 4 天，取下最後四對鰓進行組織埋蠟切片及免疫組織化學染色，觀察各種螃蟹鰓上 H⁺-ATPase 的位置，是屬於分佈在細胞質或細胞頂膜的類型。H⁺-ATPase 表現位置的判定，是依據抗體呈色位置集中在上皮細胞靠近外界環境的頂膜區域，或是出現在整個細胞中的方式，來界定是頂膜區域（apical region）或者是細胞質區域（cytoplasmic region）（圖一）。

(二) 比較不同螃蟹在高鹽度 (35 ppt) 及低鹽度 (5 ppt) 環境下 ,
 Na^+ , K^+ -ATPase 活性表現的差異。

本實驗的目的是要比較在不同種的潮間帶螃蟹間, 低鹽度環境對 Na^+ , K^+ -ATPase 活性提升程度的差異。在這個部分的實驗, 會先將螃蟹分別馴養到 35 ppt 及 5 ppt 環境下至少 7 天, 然後測量第六對鰓上的 Na^+ , K^+ -ATPase 活性, 並以低鹽度下的活性表現值除以高鹽度環境下的活性表現值, 以比值的方式呈現, 若比值接近 1, 則表示該種螃蟹在環境鹽度變化時, Na^+ , K^+ -ATPase 活性值沒有顯著變化。此部分的實驗, 將會針對各種螃蟹在不同鹽度下 Na^+ , K^+ -ATPase 的比值, 與其鰓上的 H^+ -ATPase 分佈位置 (頂膜區域或是細胞質區域) 將螃蟹分群, 並且將不同分群的 Na^+ , K^+ -ATPase 活性比值用 one-way ANOVA 分析, 來觀察在不同分群下的螃蟹, 是否有著不同的 Na^+ , K^+ -ATPase 使用策略。

(三) 針對台灣招潮蟹 (*Uca formosensis*) 觀察其 H^+ -ATPase 在高鹽度與低鹽度環境的活性表現。

本實驗目的為接續第二部分的實驗, 更進一步去探討在非利用 Na^+ , K^+ -ATPase 來調節的物種, 是否為利用 H^+ -ATPase 來

參與滲透壓調節。在這個部分的實驗，選取台灣招潮蟹作為實驗物種，先將螃蟹分別馴養到 35 ppt 及 5 ppt 環境下至少 7 天，然後測量第六對鰓上的 H^+ -ATPase 活性。在 Lin 等人 2002 年的報告中，發現台灣招潮蟹在環境鹽度變化時， Na^+ , K^+ -ATPase 活性沒有顯著的差異，但在該實驗中，沒有針對海水環境（35 ppt）測量，本實驗將會同時測量台灣招潮蟹在 5 及 35 ppt 海水中，鰓上 Na^+ , K^+ -ATPase 及 H^+ -ATPase 活性及 H^+ -ATPase 蛋白質的表現，並分別以 t-test 分析兩組鹽度處理間是否有顯著差異。

結果

一、12 種潮間帶螃蟹，鰓上 H^+ -ATPase 分佈位置

本實驗針對螃蟹鰓薄板上的上皮細胞進行實驗，並且切片方向選擇與螃蟹每對鰓的中軸垂直，並靠近入鰓血管(afferent vessel) 的部位進行切片(入鰓血管位置見圖一)，原因是此部位有密度較高的離子調節細胞(Taylor and Taylor 1992)。針對鰓部上皮細胞以 H^+ -ATPase 專一性抗體染色，實驗結果發現在 12 種螃蟹鰓上 H^+ -ATPase 的位置，確實可以分為 H^+ -ATPase 分佈在在細胞質區域(cytoplasmic region) 及 H^+ -ATPase 分佈在細胞頂膜區域(apical region) 兩種類型出現。

在針對萬歲大眼蟹 (*M. banzai*) 後鰓 (Gill 6-8) 的切片，發現鰓薄板上的上皮細胞都是增厚的上皮細胞，而抗體染上的位置，每對鰓的結果相同， H^+ -ATPase 均勻分佈在上皮細胞的細胞質中，以 Gill 6 作為代表(圖二)。在短身大眼蟹 (*M. abbreviatus*) 後鰓 (Gill 6-8) 的切片，結果與萬歲大眼蟹相同，同樣具有增厚的上皮細胞， H^+ -ATPase 染色位置也均勻分佈在細胞質中，以 Gill 6 作代表(圖三)。在清白招潮蟹 (*U. lactea*) 中，針對後鰓 (Gill 6, 7) 切片，結果發現此物種的 cuticle 外還有一層毛狀物 (fuzzy layer)，而 H^+ -ATPase 抗體染色的結果也是每對鰓的 H^+ -ATPase 均

分佈在細胞質中，以 Gill 7 作為代表；但是在此物種的控制組切片中，發現毛狀物上會殘留有呈色劑 (AEC chromogen) 的紅色出現 (圖四)。以上三個物種，每一對離子調節鰓上的 H^+ -ATPase 均分佈在細胞質中。在台灣招潮蟹 (*U. formosensis*) 中，發現與清白招潮蟹有相同現象，角質層外有一層毛狀物，但是在台灣招潮蟹中，每一對後鰓 (Gill 6, 7) H^+ -ATPase 抗體染色的位置分佈在上皮細胞的頂膜，並且細胞基底膜的位置則是淡染的情況，以 Gill 6 作代表；而控制組的毛狀物上也是有呈色劑殘留的情況 (圖五)。在痕掌沙蟹 (*O. stimpsoni*) 的切片結果中，發現這種陸生性較強的物種，鰓薄板上 pillar cell 數量較多，並且 subcellular space 與隔膜也比其他物種明顯，而 H^+ -ATPase 的分佈位置，在每對後鰓上同樣分佈在頂膜區域，以 Gill 6 作代表 (圖六)。以上五種沙蟹科的螃蟹，可以發現在大眼蟹屬的兩種螃蟹 (*M. banzai*, *M. abbreviatus*)， H^+ -ATPase 的分佈在細胞質中；招潮蟹屬的兩種螃蟹，則有不同趨勢，*U. lactea* 分佈在細胞質，但 *U. formosensis* 分佈在頂膜區域；而陸生性較強的 *O. stimpsoni* 則是分佈在頂膜。

在肉球近方蟹 (*H. sanguineus*) 中，針對 Gill 6 與 Gill 7 切片，結果發現此物種鰓薄板上的毛狀物同樣有呈色劑殘留的情形，並且在 Gill 6 的切片中，由於角質層剛好掀起，可以清楚的看到某些

上皮細胞 H^+ -ATPase 抗體染色結果在頂膜，但是在另外的一些細胞中，則是分佈在細胞質中，並且分佈在細胞質的細胞數量較多（圖七、A 與 B）；Gill 7 的切片結果看到 H^+ -ATPase 抗體染色結果與第六對鰓不同，此對鰓上的上皮細胞，染色區域全都分佈在細胞質中（圖七、C 與 D）。在絨毛近方蟹（*H. penicillatus*）中，針對 Gill 6 與 Gill 7 切片，發現此物種的角質層上毛狀物不明顯， H^+ -ATPase 抗體染色結果在 Gill 6 是位於細胞質（圖八、A 與 B），但 Gill 7 則是分佈在頂膜多於細胞質中（圖八、C 與 D）。在雙齒近相手蟹（*P. bidens*）中，針對後鰓的 Gill 6 與 Gill 7 切片，結果發現此物種的角質層上毛狀物不明顯，而 H^+ -ATPase 抗體染色結果在不同對鰓上不一致，在 Gill 6 的抗體染色區域集中在頂膜（圖九、A 與 B），而 Gill 7 則是分佈在細胞質中（圖九、C 與 D）。在無齒螳臂蟹（*C. dehaani*）中，針對後鰓（Gill 6-8）切片，結果發現此物種的毛狀物不明顯， H^+ -ATPase 抗體染色位置在 Gill 6 是分佈在細胞質中（圖十、A 與 B），而 Gill 7 與 Gill 8 分佈在頂膜，並且由 Gill 7 掀起的角質層，也可以清楚看到大部分上皮細胞其 H^+ -ATPase 抗體染色位置在頂膜，以 Gill 7 切片作代表（圖十、C 與 D）。在隆背張口蟹（*C. convexus*）的後鰓（Gill 6-8）切片中，結果顯示角質層外有毛狀物出現，而 H^+ -ATPase 抗體染色結果發

現在 Gill 6-8 的上皮細胞中，均分佈在頂膜區域，以 Gill 7 作代表（圖十一）。在台灣厚蟹（*H. formosensis*）中，發現此物種具有較厚的毛狀物， H^+ -ATPase 抗體染色結果發現在後鰓（Gill 6-8）上，抗體染色位置均位在頂膜，以 Gill 8 作代表（圖十二）。在中華絨螯蟹（*E. sinensis*）中，切片結果發現此物種後鰓（Gill 6-8）上毛狀物不明顯，並且此物種有直徑較大的上皮細胞（非厚度）以及明顯的隔膜，在 H^+ -ATPase 抗體染色結果發現 Gill 6-8 的上皮細胞，其 H^+ -ATPase 染色位置均在頂膜區域，以 Gill 8 作代表（圖十三）。以上 7 種方蟹科螃蟹的結果中，可以發現 H^+ -ATPase 的分佈在近方蟹屬、近相手蟹屬、螳臂蟹屬中，有各對鰓間分佈不一致的現象出現；而 H^+ -ATPase 的分佈在厚蟹屬、張口蟹屬以及絨螯蟹屬，則是分佈在頂膜位置。

綜合以上 12 種潮間帶螃蟹的 H^+ -ATPase 抗體染色結果來看，可以將 12 種螃蟹分為三個類群，第 1 類群的螃蟹其 H^+ -ATPase 分佈在不同對鰓中，均分佈在細胞質區域；第 2 類群的螃蟹各對鰓上的 H^+ -ATPase 分佈不一致（如：*P. bidens* 的第六對鰓 H^+ -ATPase 分佈在細胞質區域，但第七對鰓則是分佈在頂膜區域。圖九）或是同一對鰓中不同區域分佈不一致（如 *H. sanguineus* 的第六對鰓中，大部分的細胞其 H^+ -ATPase 分佈在細胞質區域，但少數的細

胞其 H^+ -ATPase 分佈在頂膜區域。圖七、A) ; 第 3 類群的螃蟹則是各對鰓上的 H^+ -ATPase 分佈均在頂膜區域 (表一)

二、12 種螃蟹鰓上 Na^+ , K^+ -ATPase 活性，在不同環境鹽度下的差異

本實驗的目的是要去比較在不同種的潮間帶螃蟹間，低鹽度環境對 Na^+ , K^+ -ATPase 活性提升程度上的差異。這個部分的實驗，除去已經有做過相關實驗的四個物種 (*M. banzai*, *U. lactea*, *P. bidens* 及 *H. formosensis*) 後，分別測量另外 8 種潮間帶螃蟹的離子調節鰓 (Gill 6) 在不同鹽度 (高鹽度為 35 ppt 低鹽度為 5 ppt) 下的 Na^+ , K^+ -ATPase 活性，活性單位為 $\mu\text{mol Pi/mg protein/hr}$ ，結果以平均值 \pm 標準偏差表示如下：*M. abbreviatus* 在低鹽度下活性值為 7.88 ± 0.28 ，高鹽度下活性值為 1.42 ± 0.27 ；*U. formosensis* 在低鹽度下活性值為 13.56 ± 2.09 ，高鹽度下活性值為 14.72 ± 1.66 ；*O. stimpsoni* 在低鹽度下活性值為 4.48 ± 2.82 ，高鹽度下活性值為 6.17 ± 3.05 ；*H. sanguineus* 在低鹽度下活性值為 4.86 ± 2.30 ，高鹽度下活性值為 3.72 ± 0.07 ；*H. penicillatus* 在低鹽度下活性值為 7.27，高鹽度下活性值為 5.16；*C. dehaani* 在低鹽度下活性值為 5.85 ± 3.57 ，高鹽度下活性值為 3.80；*C. convexus* 在低鹽度下活性值為 3.48 ± 0.19 ，高鹽度下活性值為 1.76 ± 0.83 ；*E. sinensis* 在低鹽度下

活性值為 7.17 ± 1.62 ，高鹽度下活性值為 12.66 ± 6.25 。並以低鹽度下的活性平均值除以高鹽度環境下的活性平均值的比值呈現（表二）。

依照其 H^+ -ATPase 分佈位置的分群方式，對這三群螃蟹第六對鰓的 Na^+ , K^+ -ATPase 活性比值做 one-way ANOVA 分析，結果發現不同類群與其呈現出來的 Na^+ , K^+ -ATPase 活性比值有顯著差異（ $F_{2,10}=7.28, P=0.0112$ ），進一步以 Duncan's Multiple Range Test 分析，得到第 1 類群螃蟹的螃蟹 Na^+ , K^+ -ATPase 活性比值比另外兩類群螃蟹高（ $P < 0.05$ ），自成一組，而第 2 及第 3 類群的螃蟹間，其 Na^+ , K^+ -ATPase 活性比值則無顯著差異。

三、針對台灣招潮蟹（*U. formosensis*），觀察其 H^+ -ATPase 與 Na^+ , K^+ -ATPase 在高低鹽度環境下的活性及蛋白質表現。

本實驗測量了台灣招潮蟹馴養在 5 及 35 ppt 海水中，第六對鰓上 H^+ -ATPase 及 Na^+ , K^+ -ATPase 活性表現及 H^+ -ATPase 蛋白質量的表現。結果發現在 H^+ -ATPase 活性方面，高低鹽度間以 t-test 分析，幾乎達顯著差異（ $t = 2.182, P=0.054, n=6$ ），而 Na^+ , K^+ -ATPase 活性則無顯著差異（ $t = 0.488, P=0.636, n=6$ ）（圖十四）。另外， H^+ -ATPase 蛋白質量的表現是藉由與 β -actin 蛋白質相對表現量呈

現，藉由影像分析軟體將兩種蛋白質分別定量後，以 H^+ -ATPase 蛋白質量除以 β -actin 蛋白質量得到 relative intensity，並利用 t-test 分析，發現高鹽度與低鹽度處理間， H^+ -ATPase 的相對蛋白質表現量無顯著差異 ($t=0.558$, $P=0.590$, $n=6$) (圖十五)。

討論

水生動物藉由上皮細胞吸收離子的現象，從 1938 年 Krogh 的研究開始已有 70 多年 (Krogh 1938 cited in Kirschner 2004)，從最開始的結構變化一直到生理上的機制都被廣泛討論。以結構來看，本實驗所選取的潮間帶螃蟹，全部都有前後鰓分工的現象，前鰓的上皮細胞屬於較薄的呼吸鰓；後鰓則是增厚的離子調節鰓。在招潮蟹屬的兩種螃蟹 *Uca lactea* 與 *U. formosensis*，還有陸生性較強的 *Ocypode stimpsoni* 三種螃蟹中，鰓的總對數也由 9 對減為 7 對。針對鰓薄板的細微結構，發現在部分螃蟹的角質層外側，也就是靠近環境的一邊，有一層毛狀物的存在，此構造在前人的研究中已被發現，但是是否為螃蟹鰓的結構物或是屬於附生物，以及此構造的功能都仍是未知的 (Taylor and Taylor 1992)。

根據 Taylor and Taylor 在 1992 的研究，以及個人的前置實驗觀察，發現在螃蟹的後鰓的鰓薄板上，離子調節細胞並非均勻分佈，大部分的離子調節細胞位於鰓薄板上靠近入鰓血管的位置。這樣的分佈趨勢可能與螃蟹的循環系統相關，螃蟹屬於開放式循環系統，當血液經由心臟進入鰓部時，鰓薄板的血液流動方向是由入鰓血管經過 pillar cell 構成的腔室，最後循著重力回到出鰓血管。這樣的離子調節細胞分佈現象，與魚類鰓部的離子調節細胞，也就是 MRC

(Mitochondria-rich cell) 的分佈類似，魚類的 MRC 也是集中在入鰓動脈區 (Perry and Laurent 1993)。所以本實驗的鰓部組織切片，挑選靠近入鰓血管的部位來進行，能夠確保切片中的上皮細胞，大多數屬於離子調節細胞。

除了討論前後鰓的分工外，本實驗發現在部分物種鰓上 H^+ -ATPase 分佈呈現各對鰓不一致的現象，並且同時有不同對後鰓間不一致 (*P. bidens*、*C. dehaani*) (圖九、十) 或是同一條鰓薄板上不同細胞間 (*H. sanguines*、*H. penicillatus*) (圖七、八) 不一致，似乎暗示了各對鰓的分工存在。這樣的鰓部分工情形同樣出現在 Na^+ 、 K^+ -ATPase 的活性測定上，Mañanes 等人在 2002 年的實驗報告中，針對鹽度轉移後，在短期與長期時間點個別取樣，測量鰓上 Na^+ 、 K^+ -ATPase 活性上升的情形，發現在短期調節中，以往認為主要負責氣體交換的前鰓 (Gill 4) 活性有顯著上升，推測 *Cyrtograsus angulatus* 短期鹽度調節會有前鰓參與調節來輔助。而在以電生理的方法分別測量同一個鰓薄板上兩側的上皮細胞，發現在 *Dilocarcinus pagei* 第七對鰓上鰓薄板的兩側厚度不同，並且在” thin epithelium ”負責 Cl^- 的吸收，而” thick epithelium ”負責 Na^+ 的吸收 (Onken and McNamara 2002)。但是在本實驗中，是否不同對鰓間有不同的離子調節模式或功能，則需要更進一步的實驗才能證明。

在過去研究中，要能完整陳述離子調節機制，就必須知道各個酵素在上皮細胞的位置，其中用來界定酵素分佈位置的方法，大致上有電生理以及抗體標定等兩種。利用電生理研究離子流動的方法在 Ussing-chamber 發明之後，配合抑制劑的使用，使研究細胞離子流動有重大的突破及進展。這個方法的限制在於實驗對象的大小，螃蟹的鰓部若要直接分離一層完整的上皮細胞比較困難。因此，研究的種類多半都是青蛙的表皮，或是體型較大螃蟹如：海生型經濟物種 *Carcinus maenus*、*Callinectes sapidus* 及淡水型的經濟物種 *Eriocheir sinensis* (Weihrauch *et al.* 2001; Jensen *et al.* 2002; Onken and Riestenpatt 2002)。一般潮間帶物種體型小，很難利用 Ussing chamber 進行相關實驗，以致於目前提出完整調節模式的物種，是處於海水與淡水的兩個極端。

本研究利用 H^+ -ATPase 的單株抗體來標定不同潮間帶螃蟹鰓上 H^+ -ATPase 的位置，結果發現在不同種類螃蟹中有不同的分佈位置。分佈在高潮線以上的 *O. stimpsoni*、*C. convexus*、*C. dehaani* 以及淡、海水兩棲的 *E. sinensis*，在棲地中面臨淡水環境的機率很高，另外還有 *U. formosensis*、*H. formosensis*，這些物種均能良好的適應淡水環境，其 H^+ -ATPase 多半分佈在頂膜區域，推測屬於參與滲透壓調節功能；反觀低潮線區的四個物種中，*M. banzai*、*M. abbreviatus* 擁有分

佈於細胞質區域的 H^+ -ATPase，推測屬於參與酸鹼平衡形式；而 *H. sanguineus*、*H. penicillatus* 則是大部分的上皮細胞傾向於分佈在細胞質區域。回顧過去同樣以抗體偵測 H^+ -ATPase 位置的研究，針對不能適應淡水的海生型螃蟹 *C. maenas*，發現了擁有分佈在細胞質區域的 H^+ -ATPase (Weihrauch *et al.* 2001)。若將電生理與抗體染色結果相比較，電生理結果發現在海生型螃蟹 *C. maenus* 中 Na^+ 與 Cl^- 的吸收是同步的，這個結果表示了在海生型螃蟹中，利用 Na^+ , K^+ -ATPase 來進行鹽度變化下的離子調節作用 (Onken and Riestenpatt 2002)，將此物種鰓部上皮細胞以抗體標定 H^+ -ATPase 分佈，結果發現是位於細胞質區域 (Weihrauch *et al.* 2001)。而在 *E. sinensis* 研究報告中，發現 Na^+ 與 Cl^- 的吸收為各自獨立，推測此物種主要是利用 H^+ -ATPase 來進行滲透壓調節 (Onken and Putzenlechner 1995)，並且在本論文的抗體染色結果，清楚顯示 H^+ -ATPase 位在頂膜區域 (圖十三)。還有在 *Uca tangeri* 這種招潮蟹，鹽度變化時體液滲透壓維持不變，並且在低鹽度時擁有良好的離子調節能力，電生理實驗證實此螃蟹鰓上 H^+ -ATPase 位在頂膜區域 (Drews and Graszynski 1987; Krippeit-Drews *et al.* 1989)。

若依著鰓上 H^+ -ATPase 分佈，將本實驗中的 12 種潮間帶螃蟹分成了三大類群：第 1 類群的螃蟹，各對鰓擁有全部分佈在細胞質區域

的 H^+ -ATPase；第 2 類群的螃蟹則是各對鰓中 H^+ -ATPase 分佈有不一致現象的物種；第 3 類群的螃蟹則是各對鰓擁有全部分佈於頂膜區域的 H^+ -ATPase。在這部分的實驗中，利用間接的方法來看不同分佈的螃蟹物種間，可能利用的滲透壓調節方式。在表二中，測量不同分群的螃蟹，面臨高鹽度與低鹽度下的 Na^+ , K^+ -ATPase 活性上升幅度的表現，結果發現在第 1 類群中，活性上升的幅度顯著的較其他兩類群高，這表示鹽度變化時， Na^+ , K^+ -ATPase 在滲透壓調節機制所佔比重顯著的上升，並且統計分析有達顯著差異（*M. banzai*, 蔡 2001; *U. lactea*, 李 2002）而在第 3 類群，比值趨近於 1 或小於 1 的幾個物種，被發現在鹽度變化下，鰓上 Na^+ , K^+ -ATPase 沒有顯著的活性變化的（*U. formosensis*, 圖十四、B; *O. stimpsoni*, 表二; *H. formosensis*, 范 2002 及李等人 2004）。這樣的結果暗示當鰓部有分佈在頂膜的 H^+ -ATPase，鹽度變化時， Na^+ , K^+ -ATPase 的重要性減少，而轉變成使用 H^+ -ATPase 進行調節。以海水棲地往淡水棲地的角度來看， H^+ -ATPase 分佈位置的不同，暗示負責不同的生理機制。

過去 H^+ -ATPase 的研究，多半是討論其酸鹼平衡的功能，離子調節機制被認為是由 Na^+ , K^+ -ATPase 主導，但後來發現 H^+ -ATPase 可能也參與了滲透壓調節。例如在哺乳動物腎臟的 intercalated cells (ICs) 中，當 ICs 在低 K^+ 環境下， H^+ -ATPase 活性會提高以維持離子平衡

(Silver *et al.* 2000); 而離體實驗中, 利用培養成單層的 MDCK cell, 放置到高張及低張溶液, 發現僅在培養到低張溶液會使 H^+ -ATPase 大量表現, 結論是 H^+ -ATPase 在低張環境下, 表現量增加以維持離子平衡 (Feifel *et al.* 1997)。有關昆蟲的研究中, 實驗發現數種昆蟲馬氏管上的 H^+ -ATPase 會與 K^+ 的吸收有關 (Klein 1992; Maddrell and O' Donnell 1992; Wiczorek *et al.* 1999); 並且在 tobacco hornworm *Manduca sexta* 實驗中, 以腸道 (midgut) goblet cells 為實驗材料, 直接指出離子流動原動力為 H^+ -ATPase 取代了 Na^+ , K^+ -ATPase (Wiczorek *et al.* 1991; Wiczorek 1992; Wiczorek *et al.* 1999)。

在水生無脊椎動物中, 討論甲殼類的螃蟹 H^+ -ATPase 與滲透壓調節的關係, 在針對能夠適應淡水的洄游性螃蟹 *E. sinensis* 中, 以電生理的方法發現 H^+ -ATPase 分佈在上皮細胞的頂部區域, 並且和 Cl^- 的吸收有關 (Onken and Putzenlechner 1995)。潮間帶廣鹽性螃蟹 *Uca tangeri*, 以電生理方法也同樣測量出在極端低 Cl^- 的環境中, H^+ -ATPase 會被引發並主導了離子的吸收 (Krippeit-Drews *et al.* 1989)。Weihrauch 等人在 2001 年針對海生型的螃蟹 *C. maenas* 首次以 H^+ -ATPase β -subunit 抗體標定其位置, 發現在此物種中, H^+ -ATPase 分佈在細胞質的小泡 (vesicles) 內, 但是在該種螃蟹中, 研究結果推論 H^+ -ATPase 功能與細胞內的酸鹼平衡有關, 而非參與離子的調

節。除了十足目的螃蟹之外，淡水的 crayfish *Cherax destructor* 也有相同的現象，當 crayfish 先進行 Na depletion 處理，則會使 H^+ -ATPase 活性升高，但是這個實驗中沒有證據可以證明 H^+ -ATPase 位於細胞頂膜上，只是推測而已 (Zare and Greenaway 1998)。所以，綜觀水生無脊椎動物的研究中，目前一致的推論支持：擁有滲透壓調節功能的 H^+ -ATPase 為水生無脊椎動物適應淡水環境的關鍵。

在水生的脊椎動物如魚類及兩生類中，同樣也發現了兩種不同功能的 H^+ -ATPase 存在。在水生脊椎動物的研究方面，利用淡水青蛙 (*Rana esculenta*) 皮膚作為實驗材料，發現 H^+ -ATPase 分佈在表皮 MRC 的頂膜區域，功能是負責低 Na^+ 環境下 Na^+ 的吸收；並且同樣也提出，在淡水環境中 H^+ -ATPase 能帶動離子流動，而非利用 Na^+ ， K^+ -ATPase (Ehrenfeld and Klein 1997; Klein *et al.* 1997; Wieczorek *et al.* 1999; Jensen *et al.* 2002)。進一步利用共軛焦螢光顯微鏡，觀察表皮 MRC 中， H^+ -ATPase 的分佈，發現在此類型的 MRC 中，apical crypt 有大量的 H^+ -ATPase，同時在細胞核以外的部分也有零星分佈，與本實驗結果中發現頂膜區域染色較深但是細胞質中仍有少許分佈是同樣的情形 (Klein *et al.* 1997)。這樣的情形，代表即使在離子調節細胞中，不僅有大量集中在頂膜區域的 H^+ -ATPase 參與滲透壓調節，可能同時也參與細胞內的酸鹼平衡的 H^+ -ATPase 存在 (Klein *et al.*

1997)。

在魚類的研究中，由於棲息地的歧異度大，可以分為一級（窄鹽性）與二級（廣鹽性）淡水魚、週緣性淡水魚（洄游性）以及海水魚，大部分的研究是針對廣鹽性的魚種，觀察其適應環境不同鹽度下，滲透壓調節機制的變化。魚類的滲透壓調節部位是在鰓上的 MRC，整理一系列研究討論魚類鰓上 MRC 在鹽度適應下變化的文獻，發現在低離子濃度的環境的處理下， H^+ -ATPase 是主導被動的 Na^+ 吸收的原動力 (Caliborne *et al.* 2002)。研究發現廣鹽性軟骨魚 stingray *Dasyatis sabina* 鰓上以 H^+ -ATPase 抗體標定，發現鰓上有兩種形式的 MRC， Na^+ , K^+ -ATPase rich 以及 H^+ -ATPase rich 兩種，並且推論這兩種形式的 MRC 分別負責了 Na^+ 與 Cl^- 的吸收，並且在淡水環境下， H^+ -ATPase rich 形式的 MRC 會大量增加 (Piermarini and Evans 2000; 2001)。廣鹽性的 Mudskipper *Periophthalmodon schlosseri* 的 MRC 上，也發現大量 apical H^+ -ATPase 的存在 (Wilson *et al.* 2000)。但因魚種不同，則有不同的情形出現，在 killifish *Fundulus heteroclitus* 轉移到低 Na^+ 環境下， H^+ -ATPase 位在 Na^+ , K^+ -ATPase rich 細胞的基底膜上 (Kato *et al.* 2003)。所以 H^+ -ATPase 在魚類滲透壓調節機制中，扮演角色及分佈位置為何，需要更多的研究來證明。

若能直接測量 H^+ -ATPase 其環境鹽度變化下的活性變化，可以直接證明其功能與淡水適應的關係，但是相關的文獻很少，大部分的研究都是藉由電生理的方式來做推論，並且沒有文獻是針對位置與功能同時研究。潮間帶螃蟹的主要研究集中在 *E. sinensis* 這種淡海兩棲的螃蟹，唯一一篇針對螃蟹鰓上 H^+ -ATPase 活性的研究，指出 H^+ -ATPase 活性表現在後鰓會高於前鰓，並且利用分離不同區域細胞膜的技術，間接發現 H^+ -ATPase 是集中在頂膜上 (Onken and Putzenlechner 1995)，但是此實驗並沒有針對環境鹽度變化做探討，所以無法推論 H^+ -ATPase 活性的變化在環境適應上的重要性。在本實驗中，利用 Bafilomycin A_1 作為抑制劑，直接測量不同鹽度下，*U. formosensis* 鰓上 H^+ -ATPase 活性的變化，發現在 *U. formosensis* 這種非利用 Na^+ ， K^+ -ATPase 參與滲透壓調節的螃蟹中， H^+ -ATPase 活性在低鹽度下會有幾乎達顯著標準的上升情形 (圖十四 A)，由這個結果可以證明 *U. formosensis* 在低鹽度環境下，是藉由提高 H^+ -ATPase 活性來吸收環境中低濃度的離子進入細胞內。

本實驗使用的抑制劑 Bafilomycin A_1 在許多研究中已被證實為 H^+ -ATPase 的專一性抑制劑 (Bowman *et al.* 1988)，但是在活性測定的濃度方面，則是有相當大的差異存在，其 I_{50} 與 K_i 歧異度很大。在一般針對微生物或是昆蟲腸道的 goblet cell，其 I_{50} 大約是 $20 \text{ nmol } \Gamma^1$

(Drose and Altendorf 1997), 並且當測試的蛋白質濃度越高時, 所需的抑制劑濃度也越高, 在沒有純化酵素而使用粗萃取的蛋白質均質液中, 濃度要達到 1 μM 才能有抑制效果, 如兩生類的 *Rana esculenta* 需要 10 μM 才能抑制約 70 % 的 H^+ -ATPase 活性 (Klein *et al.* 1997), 甲殼類的 *E. sinensis* 的 1 μM (Onken and Putzenlechner 1995), 以及 crayfish *Cherax destructor* 的 0.16 μM (Zare and Greenaway 1998)。在部分的文獻中, 使用了 NEM (*N*-ethylmaleimide) 這種抑制劑來取代 Bafilomycin A_1 , 但是 NEM 並不是一個專一性的抑制劑, 得到的數據也只能說是 NEM-sensitive H^+ -ATPase activity 而不能直接代表 H^+ -ATPase 活性 (Lin and Randall 1993)。在本實驗前置實驗中, 以 1 mM NEM 為抑制劑, 測量 *U. formosensis* 的 NEM-sensitive H^+ -ATPase 活性, 結果發現 NEM-sensitive H^+ -ATPase 活性趨近於 Na^+ , K^+ -ATPase 活性, 推論 NEM 在螃蟹中, 並非 H^+ -ATPase 專一性的抑制劑, 所以在後續的實驗中, 選用 Bafilomycin A_1 作為抑制劑。但是在部分的報告中又指出, 當 Bafilomycin A_1 濃度超過 1 μM , 對 P-type ATPase 也就是 Na^+ , K^+ -ATPase 可能也會有抑制的效果存在 (Drose and altendorf 1997)。本實驗中實驗物種為甲殼類的 *U. formosensis*, 故選用與 *E. sinensis* 實驗中相同的濃度 1 μM 作為 reaction medium 中的濃度, 但是本實驗的結果中, 高低鹽度間 H^+ -ATPase 活性表現, 只有接近顯著

的差異，推測可能是因為抑制劑濃度不足所致。

以蛋白質量來看，分別針對不同環境鹽度馴養的 *U. formosensis* 進行相對蛋白質含量的測量，結果發現高鹽度與低鹽度間沒有顯著差異（圖十五），這與 H^+ -ATPase 活性變化趨勢不相符， H^+ -ATPase 活性在低鹽度下有較高表現（圖十四）。這可能是因為 H^+ -ATPase 本身在調節上是藉由已存在的 V_0 domain 與 V_1 domain 進行 assembly/disassembly 來調控，直接測量 H^+ -ATPase 蛋白質的量則會同時偵測到 active form 與 inactive form 的存在，所以在蛋白質量的部分無法看出差異（Kane 1995; Sumner *et al.* 1995; Wiczorek *et al.* 2000）。若比較 H^+ -ATPase 與 Na^+ , K^+ -ATPase 的調控機制， Na^+ , K^+ -ATPase 被發現在短期的活性調節上，是利用活化原本已存在的蛋白質，長期調節時才會提高酵素的蛋白質量（Lucu and Flik 1999）； H^+ -ATPase 調控是否具有相同情形，則待進一步的研究證實。

綜合以上所述，利用一系列的潮間帶螃蟹，觀察每一種螃蟹，鰓上 H^+ -ATPase 位置與其 Na^+ , K^+ -ATPase 活性變化，可以發現一個趨勢，若螃蟹鰓上的 H^+ -ATPase 出現在頂膜區域時（不管是部份後鰓或是全部的後鰓），其 Na^+ , K^+ -ATPase 活性變化幅度較小，可以間接證明螃蟹在適應淡水環境時，滲透壓調節機制確實不同於海生型的螃蟹。並且在 *U. formosensis* 這種螃蟹中， Na^+ , K^+ -ATPase 活性不隨鹽

度變化，但 H^+ -ATPase 活性有幾乎達顯著差異的結果，應該可以支持淡水型調節機制的存在。未來若能改進實驗條件，或是有新的測試 H^+ -ATPase 活性的方法，將可以有更明確的結論。

結語

- 一、本實驗中發現，不同棲地環境的潮間帶螃蟹，有兩種 H^+ -ATPase 存在。分別是分佈在上皮細胞的細胞質中，功能為酸鹼平衡的形式，以及分佈在上皮細胞頂膜的滲透壓調節形式。
- 二、在高鹽度與低鹽度處理下， Na^+ , K^+ -ATPase 活性變動較小的物種，趨向於擁有參與滲透壓調節的 H^+ -ATPase。
- 三、在 Na^+ , K^+ -ATPase 活性不隨鹽度變化而改變的 *Uca formosensis* 中， H^+ -ATPase 活性似乎會在低鹽度環境下，有升高的趨勢。

基於以上研究，未來可望繼續發展的方向有：

- 一、研究在不同分群螃蟹中， H^+ -ATPase 序列是否有差異存在。
- 二、研究純粹淡水生的螃蟹物種，觀察是否是屬於淡水型的離子調節機制，或者是有其他未發現的調節模式存在。

參考文獻

- 李文、黃馨瑩。2002。鹽度及不同乾燥環境對雙齒近相手蟹滲透壓調節的影響。私立東海大學第44屆學士論文。
- 李思誼、曾姿萍、蔡妘怡、潘曉涵。2004。台灣厚蟹體液組成及各對鰓上 Na^+ , K^+ -ATPase活性探討。私立東海大學第46屆學士論文。
- 李彥志。2001。廣佈型清白招潮蟹 Na^+ , K^+ -ATPase與carbonic anhydrase活性與鹽度變化的關係。私立東海大學碩士論文。
- 范家豪。2002。台灣厚蟹之體液滲透壓調節。私立東海大學第44屆學士論文。
- 蔡宜潔。2001。萬歲大眼蟹之滲透壓調節。私立東海大學第43屆學士論文。
- 鍾桂芳。2002。鋸緣青蟳 (*Scylla serrata*) 滲透壓調節器官之 Na^+ , K^+ -ATPase活性與蛋白質表現。私立東海大學碩士論文。
- Barra, J. A., Péqueux, A. and Humbert, W.** (1983). A morphological study on gills of a crab acclimated to fresh water. *Tissue Cell*. **15**, 583-596.
- Bowman, E. J., Sieber, A. and Altendorf, K.** (1988). Bafilomycins: a class of inhibitors of membrane ATPases from microorganisms, animal cells and plant cells. *Proc. natn. Acad. Sci. U.S.A.* **85**, 7972-7976.

- Castilho, P. C., Martins, I. A. and Bianchini, A.** (2001). Gill Na^+ , K^+ -ATPase and osmoregulation in the estuarine crab, *Chasmagnathus granulata* Dana, 1851 (Decapoda, Grapsidae). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* **256**, 215-227.
- Cooper, A. R. and Morris, S.** (1997). Osmotic and ionic regulation by *Leptograpsus variegatus* during hyposaline exposure and in response to emersion. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* **214**, 263–282.
- Claiborne, J. B., Edwards, S. L. and Morrison-Shetlar, A. I.** (2002). Acid-base regulation in fishes: cellular and molecular mechanisms. *J. Exp. Zool.* **293**, 302-319.
- Dela-Cruz, J. and Morris, S.** (1997). Water and ion balance and nitrogenous excretion as limitations to terrestrial excursion in the Christmas Island blue crab, *Cardisoma hirtipes* (Dana). *J. Exp. Zool.* **279**, 537–548.
- Drews, G. and Graszynski, K.** (1987). The transepithelial potential difference in the gills of the fiddler crab, *Uca tangeri*: influence of some inhibitors. *J. Comp. Physiol. B* **157**, 345-353.
- Drose, S. and Altendorf, K.** (1997). Bafilomycins and concanamycins as inhibitors of V-ATPases and P-ATPases. *J. Exp. Biol.* **200**, 1-8.
- Ehrenfeld, J. and Klein, U.** (1997). The key role of the H^+ V-ATPase in acid-base balance and Na^+ transport processes in frog skin. *J. Exp. Biol.* **200**, 247-256.
- Farrelly, C. A. and Greenaway, P.** (1992). Morphology and ultrastructure of the gills of terrestrial crabs (Crustacea, Gecarcinidae and Grapsidae): adaptations for air-breathing. *Zoomorphology* **112**, 39-49.

- Farrelly, C. A., and Greenaway, P.** (1994). Gas exchange through the lungs and gills in air-breathing crabs. *J. Exp. Biol.* **187**, 113-130.
- Feifel, E., Krall, M., Geibel, J. P. and Pfaller, W.** (1997). Differential activities of H⁺ extrusion systems in MDCK cells due to extracellular osmolality and pH. *Am. J. Physiol.* **273**, F499-F506.
- Forgac, M.** (1998). Structure, function and regulation of the vacuolar (H⁺)-ATPase. *FEBS Lett.* **440**, 258-263.
- Greenaway, P.** (1994). Salt and water balance in field populations of the terrestrial crab *Gecarcoidea natalis*. *J. Crust. Biol.* **14**, 438–453.
- Henry, R. P. and Cameron, J. N.** (1983). The role of branchial carbonic anhydrase in respiration, ion regulation and acid-base balance in the aquatic crab, *Callinectes sapidus* and the terrestrial crab, *Gecarcinus lateralis*. *J. Exp. Biol.* **103**, 205–223.
- Henry, R. P.** (1994). Morphological, behavior, and physiological characterization of bimodal breathing crustaceans. *Am. Zool.* **34**, 250-215.
- Henry, R. P.** (2001a). Branchial and branchiostegite carbonic anhydrase in decapod crustaceans: The aquatic to terrestrial transition. *J. Exp. Zool.* **259**, 294-303.
- Henry, R. P.** (2001b). Environmentally mediated carbonic anhydrase induction in the gills of euryhaline crustaceans. *J. Exp. Biol.* **204**, 991-1002.
- Henry, R. P., Garrelts, E. E., McCarty, M. M. and Towle, D. W.** (2002). Differential induction of branchial carbonic anhydrase and Na⁺/K⁺ ATPase activity in the euryhaline crab, *Carcinus maenas*, in response to low salinity exposure. *J. Exp. Zool.* **292**, 595–603.

- Hwang, P. P., Lee, T. H., Weng, C. F., Fang, M. J. and Cho, G. Y.** (1999). Presence of Na-K-ATPase in mitochondria-rich cells in the yolk-sac epithelium of larvae of the teleost *Oreochromis mossambicus*. *Physiol. Biochem. Zool.* **72**, 138-144.
- Innes, A. J. and Taylor, E. W.** (1986). The evolution of air-breathing in crustaceans: a functional analysis of branchial, cutaneous and pulmonary gas exchange. *Comp. Biochem. Physiol.* **85**, 621-637.
- Jensen, L. J., Willumsen, N. J. and Larsen, E. H.** (2002). Proton pump activity is required for active uptake of chloride in isolated amphibian skin exposed to freshwater. *J. Comp. Physiol. B* **172**, 503-511.
- Kane, P. M.** (1995). Disassembly and reassembly of the yeast vacuolar H⁺-ATPase *in vivo*. *J. Biochem. Chem.* **270**, 17025-17032.
- Katoh, F., Hyodo, S. and Kaneko, T.** (2003). Vacuolar-type proton pump in the basolateral plasma membrane energizes ion uptake in branchial mitochondria-rich cells of killifish *Fundulus heteroclitus*, adapted to a low ion environment. *J. Exp. Biol.* **206**, 793-803.
- Kirschner, L. B.** (2004). The mechanism of sodium chloride uptake in hyperregulating aquatic animals. *J. Exp. Biol.* **207**, 1439-1452.
- Klein, U.** (1992). The insect V-ATPase, a plasma membrane proton pump energizing secondary active transport: immunological evidence for the occurrence of a V-ATPase in insect ion-transporting epithelia. *J. Exp. Biol.* **172**, 345-354.
- Klein, U., Timme, M., Zeiske, W. and Ehrenfeld, J.** (1997). The H⁺ pump in frog skin (*Rana esculenta*): Identification and localization of a V-ATPase. *J. Membr. Biol.* **157**, 117-126.

- Kotlyar, S., Weihrauch, D., Paulsen, R. S. and Towle, D. W.** (2000). Expression of arginine kinase enzymatic activity and mRNA in gills of the euryhaline crabs *Carcinus maenas* and *Callinectes sapidus*. *J. Exp. Biol.* **203**, 2359-2404.
- Krippeit-Drews, P., Drews, G. and Graszynski, K.** (1989). Effects of ion substitution on the transepithelial difference of the gills of the fiddler crab *Uca tangeri*: evidence for a H⁺-pump in the apical membrane. *J. Comp. Physiol. B* **159**, 43-49.
- Krogh, A.** (1938). The active absorption of ions in some freshwater animals. *Zeit. Vergl. Physiol.* **25**, 335-350.
- Lee, T. H., Hwang, P. P., Lin, H. C. and Huang, F. L.** (1996). Mitochondria-rich cells in the branchial epithelium of the teleost, *Oreochromis mossambicus*, acclimated to various hypotonic environments. *Fish Physiol. Biochem.* **15**, 513-523.
- Lin, H. C., Su, Y. C. and Su, S. H.** (2002). A comparative study of osmoregulation in four fiddler crabs (Ocypodidae: *Uca*). *Zool. Sci.* **19**, 643-650.
- Lin, H. and Randall, D.** (1993). H⁺-ATPase activity in crude homogenates of fish gill tissue: inhibitor sensitivity and environmental and hormonal regulation. *J. Exp. Biol.* **180**, 163-174.
- Lignot, J. H. and Charmantier, G.** (2001). Immunolocalization of Na⁺, K⁺-ATPase in the branchial cavity during the early development of the European lobster *Homarus gammarus* (Crustacea, Decapoda). *J. Histochem. Cytochem.* **49**, 1013-1023.
- Lodish, H., Berk, A., Zipursky, S. L., Matsudaira, P., Baltimore, D. and Darnell, J.** (2000). Transport across cell membrane. pp.

578-615 in Molecular Cell Biology. 4th Ed. W. H. Freeman and Company, New York, USA.

- Lucu, C., Devescovi, M., Skaramuca, B. and Kožul, V.** (2000). Gill Na,K-ATPase in the spiny lobster *Palinurus elephas* and other marine osmoconformers: Adaptiveness of enzymes from osmoconformity to hyperregulation. *J. Exp Mar. Biol. Ecol.* **246**, 163-178.
- Lucu, C. and Flik, G.** (1999). Na⁺-K⁺-ATPase and Na⁺/Ca²⁺ exchanger activities in gills of hyperregulating *Carcinus maenas*. **276**, R490-R499.
- Luquet, C. M., Pellerano, G, and Rosa, G.** (1997). Salinity-induced changes in the fine structure of the gills of the semiterrestrial estuarine crab *Uca uruguayensis*. *Tissue Cell.* **29**, 495-501.
- Luquet, C. M., Postel, U., Halperin, J., Urcola, M. R., Marques, R. and Siebers, D.** (2002). Transepithelial potential differences and Na⁺ flux in isolated perfused gills of the crab *Chasmagnathus granulatus* (Grapsidae) acclimated to hyper- and hypo-salinity. *J. Exp. Biol.* **205**, 71-77.
- Luquet, C. M., Rosa, G. A., Ferrari, C. C., Genovese, G. and Pellerano, G. N.** (2000). Gill morphology of the intertidal estuarine crab *Chasmagnathus granulatus* Dana, 1851 (Decapoda, Grapsidae) in relation to habitat and respiratory habits. *Crustaceana* **73**, 53-67.
- Maddrell, S. H. P. and O'Donnell, M. J.** (1992). Insect malpighian tubules: V-ATPase action in ion and fluid transport. *J. Exp. Biol.* **172**, 417-429.

- Mañanes, A. A. L., Meligeni, C. D. and Goldemberg, A. L.** (2002). Response to environmental salinity of Na^+ - K^+ ATPase activity in individual gills of the euryhaline crab *Cyrtograpsus angulatus*. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* **293**, 320-335.
- McCormick, S. D., Sundell, K., Bjornsson, B. T., Brown, C. L. and Hiroi, J.** (2003). Influence of salinity on the localization of Na^+ , K^+ -ATPase, $\text{Na}^+/\text{K}^+/2\text{Cl}^-$ cotransporter (NKCC) and CFTR anion channelin chloride cells of the Hawaiian goby (*Stenogobius hawaiiensis*). *J. Exp. Biol.* **206**, 4575-4583.
- Morris, S.** (2001). Neuroendocrine regulation of osmoregulation and the evolution of air-breathing decapod crustaceans. *J. Exp. Biol.* **204**, 979-989.
- Morris, S.** (2002). The ecophysiology of air-breathing in crabs with special reference to *Gecarcoidea natalis*. *Comp. Biochem. Physiol. B* **131**, 559-570.
- Morris, S. and Adamczewska, A. M.** (1996). Respiratory, acid-base and ion status during voluntary immersion of the air-breathing crab *Cardisoma carnifex* assessed in situ. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* **206**, 149-164.
- Morris, S. and Callaghan, J.** (1998). Respiratory and metabolic responses of the Australian Yabby *Cherax destructor* to progressive and sustained environmental hypoxia. *J. Comp. Physiol.* **168**, 377-388.
- Onken, H. and McNamara, J. C.** (2002). Hyperosmoregulation in the red freshwater crab *Dilocarcinus pagei* (Brachyura,

- Trichodactylidae): structural and functional asymmetries of the posterior gills. *J. Exp. Biol.* **205**, 167-175.
- Onken, H. and Putzenlechner, M.** (1995). A V-ATPase drives active, electrogenic and Na⁺-independent Cl⁻ absorption across the gills of *Eriocheir sinensis*. *J. Exp. Biol.* **198**, 767-774.
- Onken, H. and Riestenpatt, S.** (1998). NaCl absorption across split lamellae of hyperregulating crabs: transport mechanisms and their regulation. *Comp. Biochem. Physiol. A* **119**, 883-893.
- Onken, H. and Riestenpatt, S.** (2002). Ion transport across posterior gills of hyperregulating crabs (*Carcinus maenas*), amiloride blocks the cuticular Na⁺ conductance and induces current-noise. *J. Exp. Biol.* **205**, 883-893.
- Pavicic-Hamer, D., Devescovi, M. and Lucu, C.** (2003). Activation of carbonic anhydrase in branchial cavity tissues of lobster (*Homarus gammarus*) by dilute seawater exposure. *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.* **287**, 79-92.
- Péqueux, A.** (1995). Osmotic regulation in crustaceans. *J. Crustac. Biol.* **15**, 1-60.
- Perry, S. F. and Laurent, P.** (1993). Environmental effects on fish gill structure and function. Pp. 231-263. Rankin, J. C. and Jensen, F. B. ed. Fish ecophysiology. Chapman and Hall, New York, USA.
- Perzov, N., Padler-Karavani, V., Nelson, H. and Nelson, N.** (2001). Features of V-ATPases that distinguish them from F-ATPases. *FEBS Lett.* **504**, 223-228.

- Piermarini, P. M. and Evans, D. H.** (2000). Effects of environmental salinity on Na^+/K^+ -ATPase in the gills and rectal gland of a euryhaline elasmobranch (*Dasyatis sabina*). *J. Exp. Biol.* **203**, 2957-2966.
- Piermarini, P. M. and Evans, D. H.** (2001). Immunochemical analysis of the vacuolar proton-ATPase B-subunit in the gills of a euryhaline stingray (*Dasyatis sabina*): effects of salinity and relation to Na^+/K^+ -ATPase. *J. Exp. Biol.* **204**, 3251-3259.
- Piller, S. C., Henry, R. P., Doeller, J. E. and Kraus, D. W.** (1995). A comparison of the gill physiology of two euryhaline crab species, *Callinectes sapidus* and *Callinectes similes*: energy production, transport-related enzymes and osmoregulation as a function of acclimation salinity. *J. Exp. Biol.* **198**, 349-258.
- Rainbow, P. S. and Black, W. H.** (2001). Effects of changes in salinity on the apparent water permeability of three crab species: *Carcinus maenas*, *Eriocheir sinensis* and *Necora puber*. *J. Exp. Mar. Biol Ecol.* **264**, 1-13.
- Santos, E. A., Baldisseroto, B., Bianchini, A., Colares, E. P., Nery, L. E. M. and Manzoni, C.** (1987). Respiratory mechanisms and metabolic adaptations of an intertidal crab, *Chasmagnathus granulata* (Dana, 1851). *Comp. Biochem. Physiol.* **88**, 21-25.
- Schubart, C. D., Dissel, R. and Hedges, S. B.** (1998). Rapid evolution to terrestrial life in Jamaican crabs. *Nature* **393**, 363-365.
- Shetlar, R. E. and Towle, D. W.** (1989). Electrogenic sodium-proton exchange in membrane vesicles from crab (*Carcinus maenas*) gill. *Am. J. Physiol.* **257**, R924-R931.

- Silver, R. B., Breton, S. and Brown, D.** (2000). Potassium depletion increase proton pump (H^+ -ATPase) activity in intercalated cells of cortical collecting duct. *Am. J. Physiol.* **279**, F195-F202.
- Sumner, J. –P., Dow, J. A. T., Earley, F. G. P., Klein, U. and Jager, D.** (1995). Regulation of plasma membrane V-ATPase activity by dissociation of peripheral subunits. *J. Biol. Chem.* **270**, 5649-5653.
- Takeda, S., Matsumasa, M., Kikuchi, S., Poovachiranon, S. and Murai, M.** (1996). Variation in the branchial formula of semiterrestrial crabs (Decapoda: Branchyura: Grapsidae and Ocypodidae) in relation to physiological adaptation to the environment. *J. Crustac. Biol.* **16**, 472-486.
- Taylor, H. H. and Greenaway, P.** (1979). The structure of the gills and lungs of the arid-zone crab, *Holthuisana (Austrothelphusa) transversa* (Branchyura: Sundathelphusidae) including observations on arterial vessels within the gills. *J. Zool. Lond.* **189**, 359-387.
- Taylor, H. H. and Taylor, E. W.** (1992). Gill and lungs: the exchange of gases and ions. pp. 203-293. Harrison, F. W. and Humes, A. G. Eds. *Microscopic Anatomy of Invertebrate*. Vol. 10. Wiley-Liss, New York. USA.
- Towle, D. W.** (1993). Ion transport systems in membrane vesicles isolated from crustacean tissues. *J. Exp. Zool.* **265**, 387-396.
- Towle, D. W. and Kays, W. T.** (1986). Basolateral localization of Na^+K^+ -ATPase in gill epithelium of two osmoregulating crabs, *Callinectes sapidus* and *Carcinus maenas*. *J. Exp. Zool.* **239**, 311-318.

- Towle, D. W., Paulsen, R. S., Weihrauch, D., Kordylewski, M., Salvador, C., Lignot, J. H. and Spanings-Pierrot, C.** (2001). Na⁺, K⁺-ATPase in gills of the blue crab *Callinectes sapidus*: cDNA sequencing and salinity-related expression of a-subunit mRNA and protein. *J. Exp. Biol.* **204**, 4005-4012.
- Towle, D. W., Rushton, M. E., Heidysch, D., Magnani, J. J., Rose, M. J., Amstutz, A., Jordan, M. K., Shearer, D. W. and Wu, W. S.** (1997). Sodium/proton antiporter in the euryhaline crab *Carcinus maenas*: molecular cloning, expression and tissue distribution. *J. Exp. Biol.* **200**, 1003-1014.
- Varley, D. G. and Greenaway, P.** (1994). Nitrogenous excretion in the terrestrial carnivorous crab *Geograpsus grayi*: site and mechanism of excretion. *J. Exp. Biol.* **190**, 179-193.
- Weihrauch, D., Ziegler, A., Siebers, D. and Towle, D. W.** (2001). Molecular characterization of V-type H⁺-ATPase (B-subunit) in gills of euryhaline crabs and its physiological role in osmoregulatory ion uptake. *J. Exp. Biol.* **204**, 25-37.
- Weihrauch, D., Ziegler, A., Siebers, D. and Towle, D. W.** (2002). Active ammonia excretion across the gills of the green shore crab *Carcinus maenas*: participation of Na⁺/K⁺-ATPase, V-type H⁺-ATPase and functional microtubules. *J. Exp. Biol.* **205**, 2765-2775.
- Wheatly, M. G., Zhang, Z., Weil, J. R., Rogers, J. V. and Stiner, L. M.** (2001). Novel subcellular and molecular tools to study Ca²⁺ transport mechanisms during the elusive moulting stages of crustaceans: flow cytometry and polyclonal antibodies. *J. Exp. Biol.*

204, 959-966.

Wieczorek, H. (1992). The insect V-ATPase, a plasma membrane proton pump energizing secondary active transport: molecular analysis of electrogenic potassium transport in the tobacco hornworm midgut. *J. Exp. Biol.* **172**, 335-343.

Wieczorek, H., Brown, D., Grinstein, S., Ehrenfeld, J. and Harvey, W. R. (1999). Animal plasma membrane energization by proton-motive V-ATPases. *BioEssays*. **21**, 637-648.

Wieczorek, H., Gruber, G., Harvey, W. R., Huss, M., Merzendorfer, H. and Zeiske, W. (2000). Structure and regulation of insect plasma membrane H⁺ V-ATPase. *J. Exp. Biol.* **203**, 127-135.

Wieczorek, H., Putzenlechner, M., Zeiske, W. and Klein, U. (1991). A vacuolar-type proton pump energizes K⁺/H⁺ antiport in an animal plasma membrane. *J. Biol. Chem.* **266**, 15340-15347.

Wilson, J. M., Randall, D. J., Donowitz, M., Vogl, A. W. and IP, A. K. Y. (2000). Immunolocalization of ion-transport proteins to branchial epithelium mitochondria-rich cells in the mudskipper (*Periophthalmodon schlosseri*). *J. Exp. Biol.* **203**, 2297-2310.

Zare, S. and Greenaway, P. (1998). The effect of moulting and sodium depletion on sodium transport and the activities of Na⁺K⁺-ATPase and V-ATPase in the freshwater crayfish *Cherax destructor* (Crustacea: Parastacidae). *Comp. Biochem. Physiol. A* **119**, 739-745.

表一、12 種潮間帶螃蟹鰓上 H⁺-ATPase 分佈位置

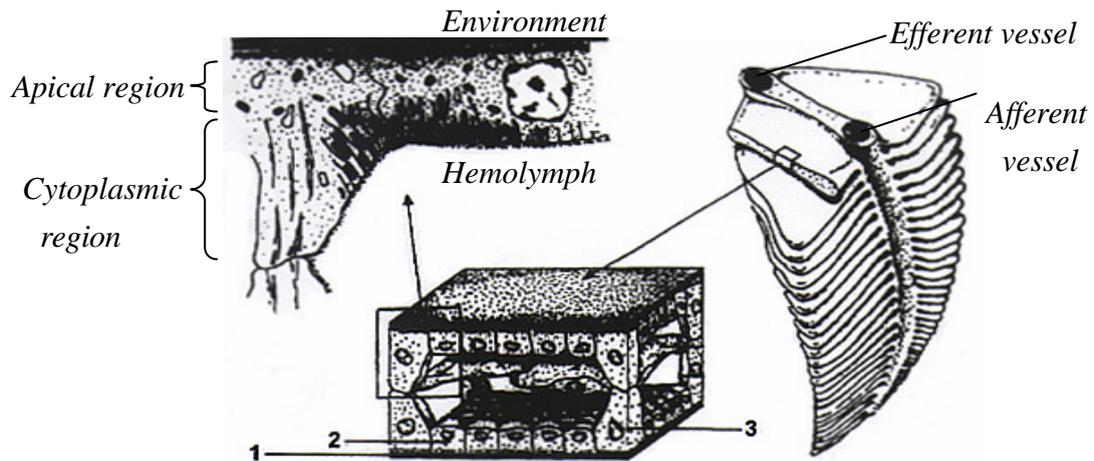
科	物種	Habitat	Gill 6	Gill 7	Gill 8	分群	n
Ocypodidae	<i>Macrophthalmus banzai</i>	IT	C	C	C	1	4
	<i>Macrophthalmus abbreviatus</i>	IT	C	C	C	1	3
	<i>Uca lactea</i>	IT/BI	C	×	—	1	3
	<i>Uca formosensis</i>	BI/T	A	A	—	3	4
	<i>Ocypode stimpsoni</i>	T	A	A	—	3	4
Grapsidae	<i>Hemigrapsus sanguineus</i>	IT/BI	A<C	C	×	2	2
	<i>Hemigrapsus penicillatus</i>	IT/BI	C	A>C	×	2	4
	<i>Perisesarma bidens</i>	IT/BI	A	C	×	2	4
	<i>Chiromantes dehaani</i>	BI/T	C	A	A	2	2
	<i>Chasmagnathus convexus</i>	BI/T	A	A	A	3	3
	<i>Helice formosensis</i>	BI/T	A	A	A	3	4
	<i>Eriocheir sinensis</i>	FW	A	A	A	3	4

註:在 12 種螃蟹中, Gill 6 至 Gill 8 均屬於離子調節鰓(後鰓) C, 代表該對鰓上的 H⁺-ATPase 位於細胞質區域(cytoplasmic region); A, 代表該對鰓上的 H⁺-ATPase 位於頂膜區域(apical region); —, 代表該蟹不具有這一對鰓; ×, 代表沒有取樣; A<C, 切片中多數細胞的 H⁺-ATPase 位置分佈在細胞質區域; A>C, 切片中多數細胞的 H⁺-ATPase 位置分佈在頂膜區域。依照鰓上的 H⁺-ATPase 分佈位置又可分為三群, 第 1 群代表各對鰓都分佈在細胞質區域; 第 2 群代表各對鰓或是鰓內各細胞的分佈不一致; 第 3 群代表各對鰓都分佈在頂膜區域。

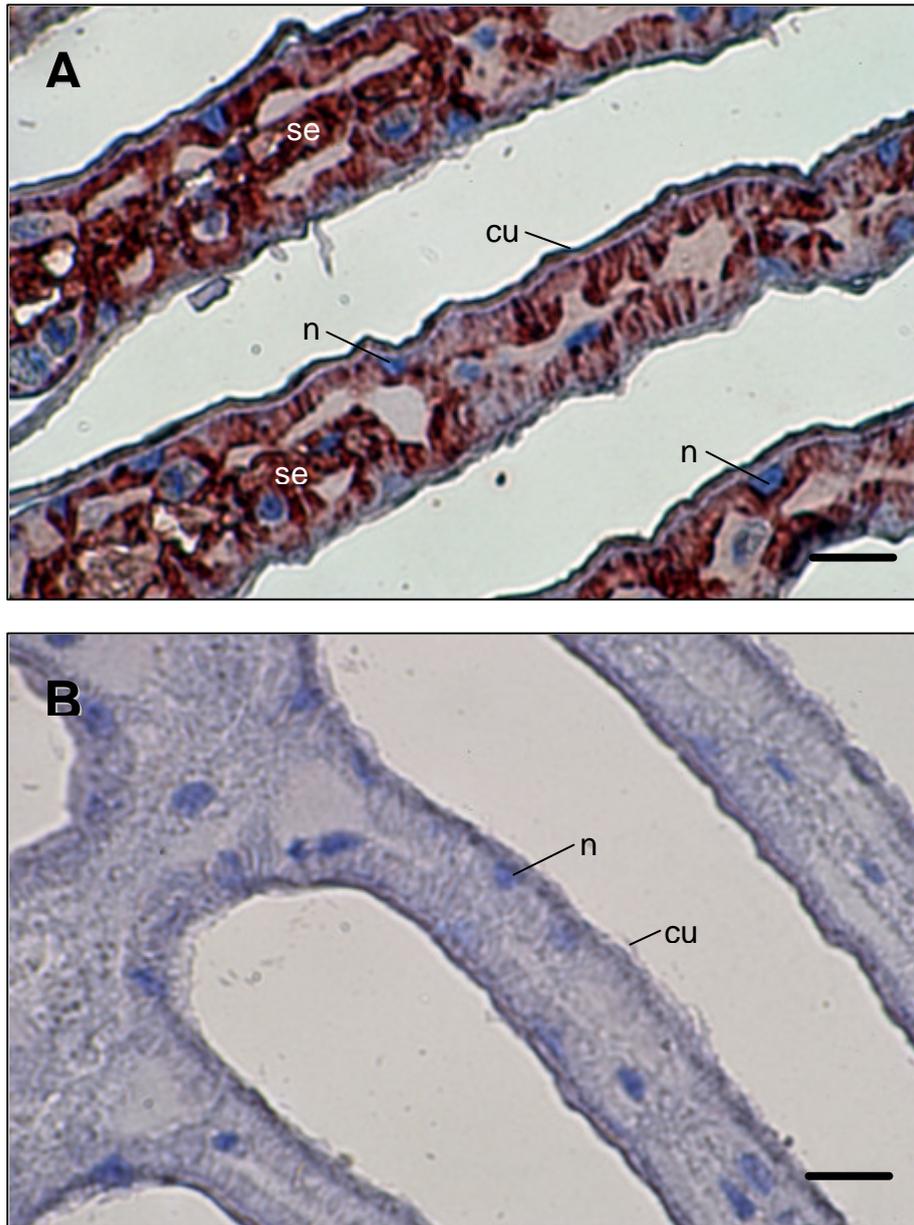
表二、12種螃蟹第六對鰓，鰓上 Na⁺, K⁺-ATPase 活性表現在不同環境鹽度下的差異之比值及統計分析。

科	物種	低鹽度		高鹽度		比值	分群	Reference
		(5 ppt)	n	(35 ppt)	n			
Ocypodidae	<i>Macrophthalmus banzai</i>	10.69 ± 1.47	5	1.15 ± 1.18	3	9.27	1 †	蔡 2001
	<i>Macrophthalmus abbreviatus</i>	7.88 ± 0.28	2	1.42 ± 0.27	2	5.54	1 †	
	<i>Uca lactea</i>	28.63 ± 4.49	5	16.62 ± 5.38*	5	1.72	1 †	李 2002
	<i>Uca formosensis</i>	13.56 ± 2.09	13	14.72 ± 1.66	8	0.92	3	
	<i>Ocypode stimpsoni</i>	4.48 ± 2.82	4	6.17 ± 3.05	7	0.73	3	
Grapsidae	<i>Hemigrapsus sanguineus</i>	4.86 ± 2.30	2	3.72 ± 0.07	2	1.31	2	
	<i>Hemigrapsus penicillatus</i>	7.27	1	5.16	1	1.40	2	
	<i>Perisesarma bidens</i>	12.6 ± 1.14	4	11.26 ± 0.28	3	1.12	2	李與黃 2002
	<i>Chiromantes dehaani</i>	5.85 ± 3.57	2	3.80	1	1.54	2	
	<i>Chasmagnathus convexus</i>	3.48 ± 0.19	3	1.76 ± 0.83	2	1.97	3	
	<i>Helice formosensis</i>	8.04 ± 3.22	3	9.21 ± 1.33	3	0.87	3	范 2002
		4.81 ± 3.28§	9	3.62 ± 1.12	9	1.33	3	李等人 2004
	<i>Eriocheir sinensis</i>	7.17 ± 1.62	4	12.66 ± 6.25	4	0.57	3	

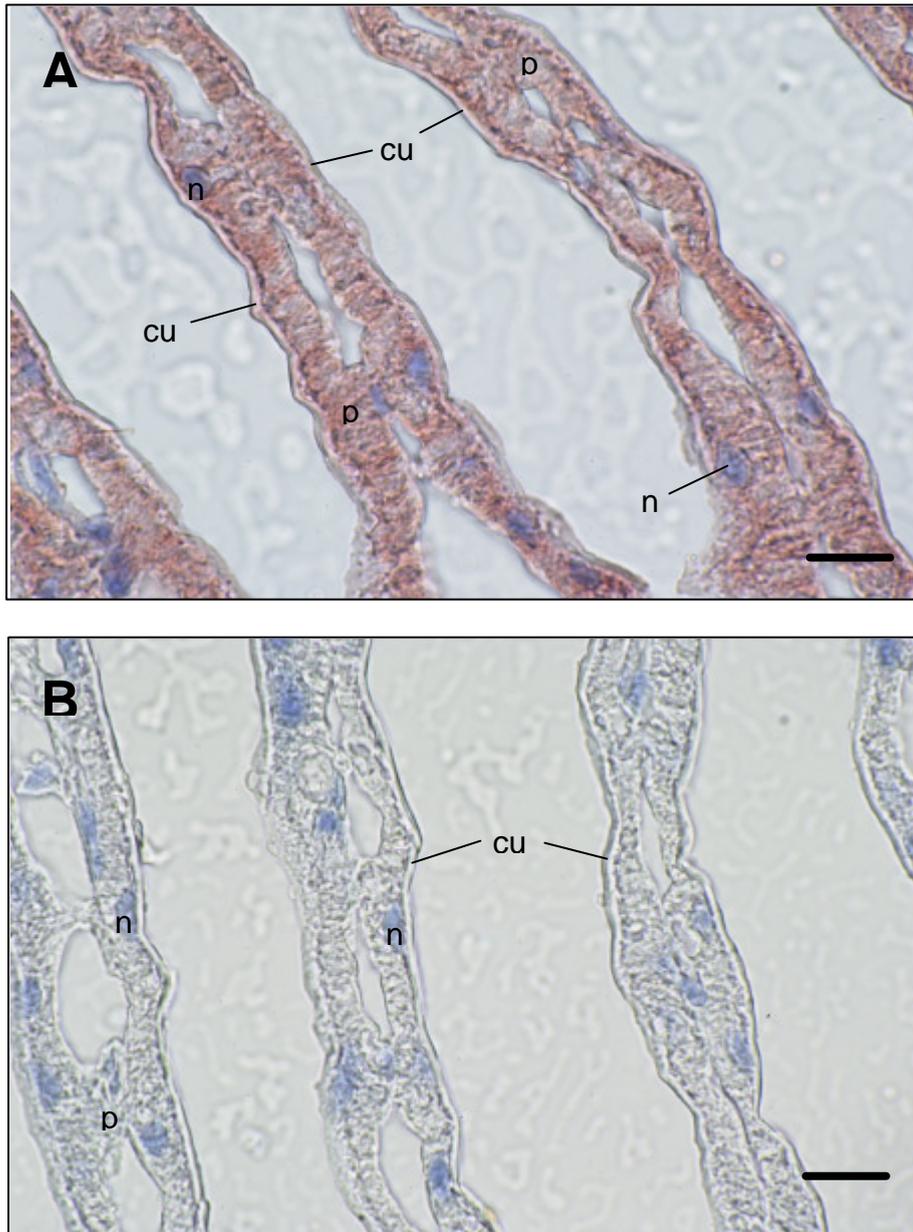
註：比值的計算方式是利用低鹽度(5 ppt)活性的平均值與高鹽度(35 ppt)活性的平均值相除而得。*，代表馴養鹽度為 45 ppt。
§，代表馴養鹽度為 3 ppt。†，代表 Na⁺, K⁺-ATPase 的比值用在第 1 分群顯著高於第 2 及第 3 類群 (F_{2,10} = 7.28, P = 0.01)，
但第 2 及第 3 類群間無顯著差異。



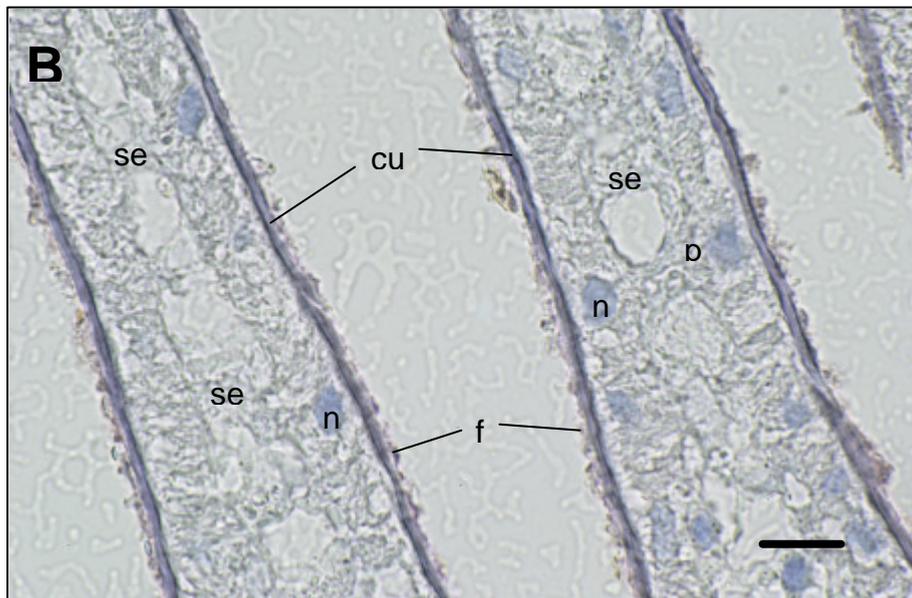
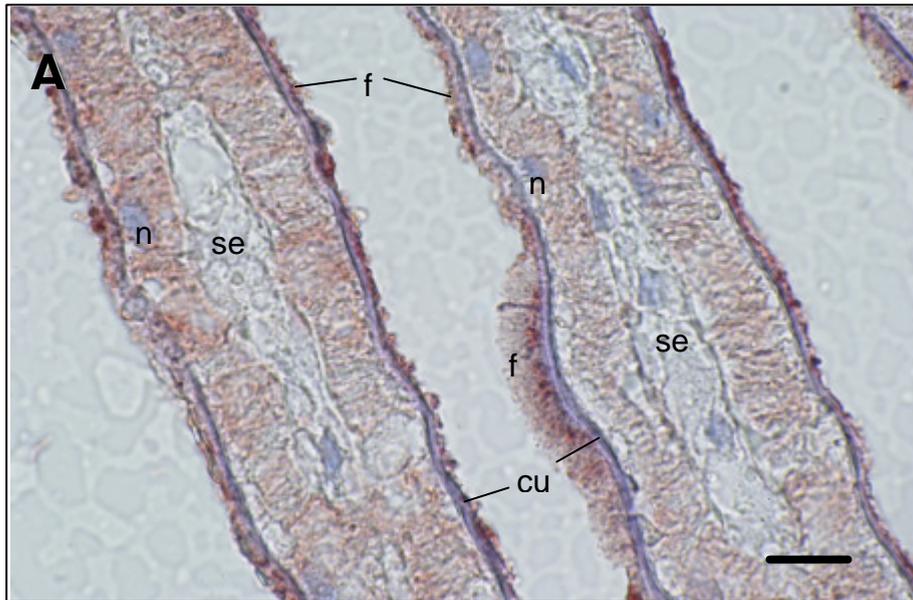
圖一、螃蟹鰓部結構示意圖(Modified from Onken and Riestenpatt, 1998)。由右至左分別是一條完整的鰓、單一片鰓薄板結構。鰓薄板是由cuticle (1) 與epithelial cell (2) 和pillar cell (3) 所組成。左上方的小圖代表放大比例的鰓部上皮細胞。以一個pillar cell來看，在本實驗中，將靠近environment side的部分稱為頂膜區域(apical region)，而靠近hemolymph side的稱為細胞質區域 (cytoplasmic region)。鰓上有兩條大血管，分別是靠近背側的入鰓血管 (afferent vessel) 與靠近腹側的出鰓血管 (efferent vessel)。



圖二、萬歲大眼蟹 (*Macrophthalmus banzai*) 鰓部免疫組織化學染色。Gill 6。(A) 利用抗體標定H⁺-ATPase位置，表現出紅色的位置即為染上抗體的位置。(B) 不加一級抗體的Negative control。Scale bar為10 μm。n, 細胞核。cu, cuticle。se, septum。

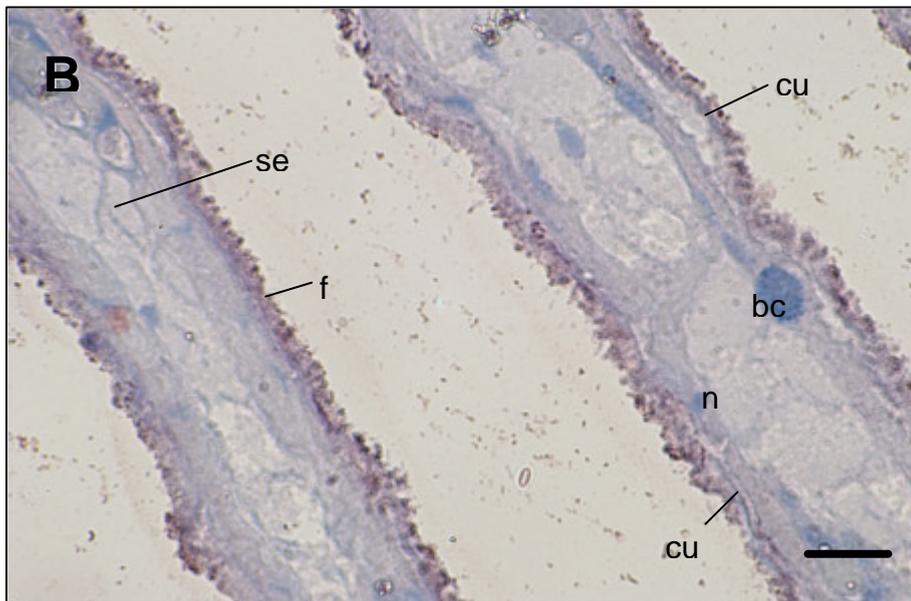
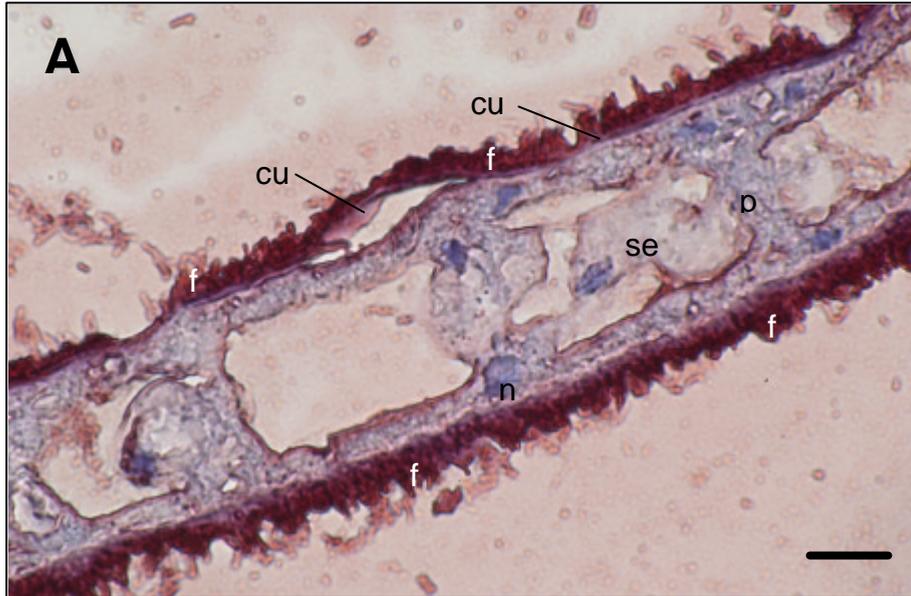


圖三、短身大眼蟹 (*Macrophthalmus abbreviatus*) 鰓部免疫組織化學染色。Gill 6 (A) 利用抗體標定 H^+ -ATPase 位置，表現出紅色的位置即為染上抗體的位置。(B) 不加一級抗體的 Negative control。Scale bar 為 $10 \mu m$ 。n, 細胞核。cu, cuticle。p, pillar cell。

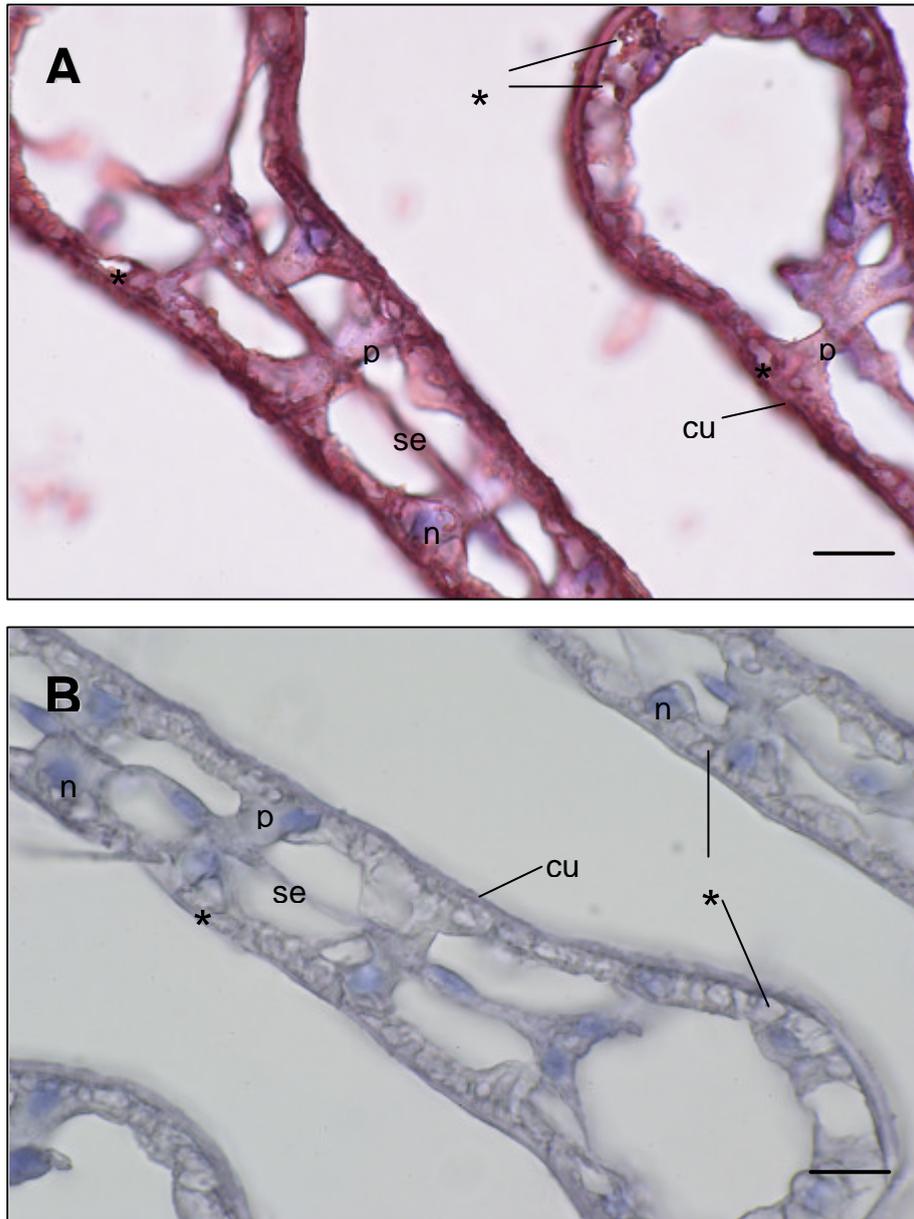


圖四、白扇招潮蟹 (*Uca lactea*) 鰓部免疫組織化學染色。

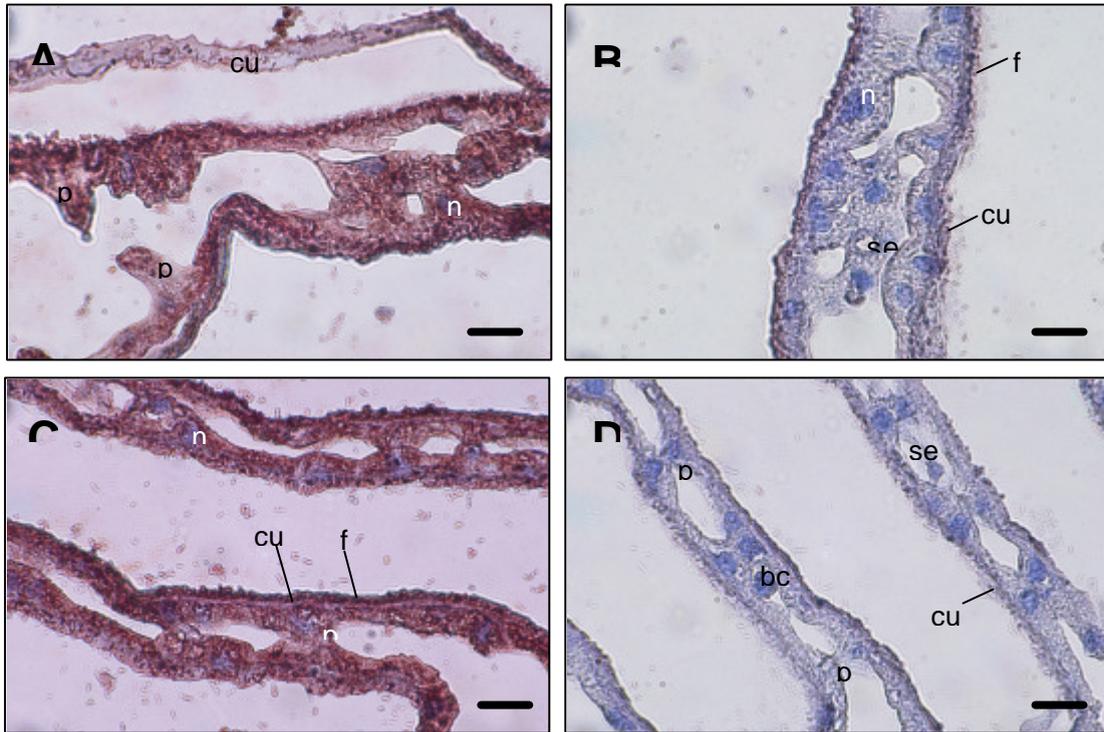
Gill 7。 (A) 利用抗體標定 H^+ -ATPase位置，表現出紅色的位置即為染上抗體的位置。(B) 不加一級抗體的 Negative control。 Scale bar為 $10 \mu m$ 。 n, 細胞核。 cu, cuticle。 se, septum。 p, pillar cell。 f, fuzzy layer。



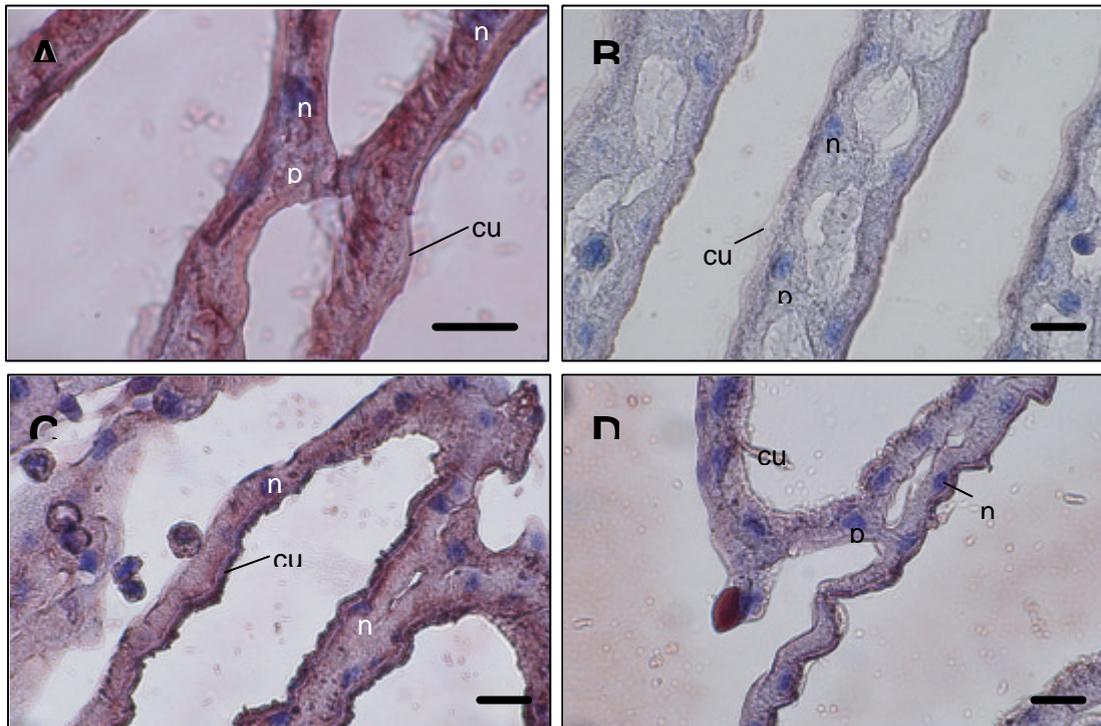
圖五、台灣招潮蟹 (*Uca formosensis*) 鰓部免疫組織化學染色。Gill 6。(A) 利用抗體標定 H^+ -ATPase位置，表現出紅色的位置即為染上抗體的位置。(B) 不加一級抗體的Negative control。Scale bar為 $10 \mu m$ 。n, 細胞核。cu, cuticle。se, septum。bc, blood cell。f, fuzzy layer。



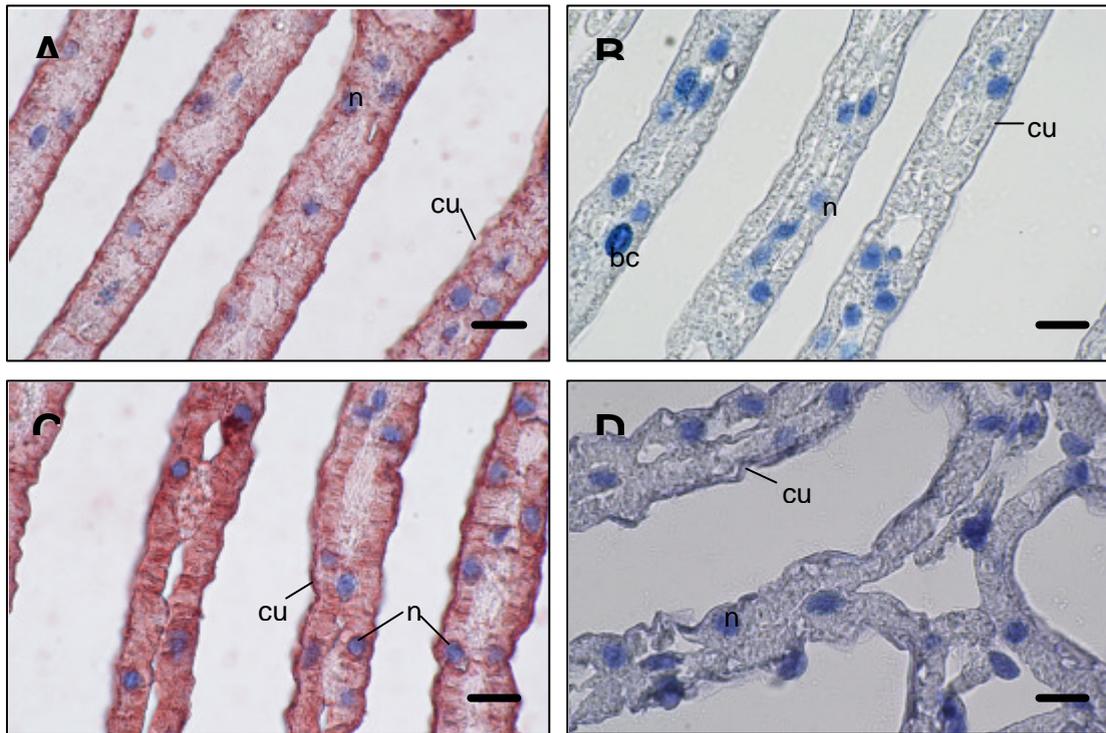
圖六、痕掌沙蟹 (*Ocypode stimpsoni*) 鰓部免疫組織化學染色。Gill 6。(A) 利用抗體標定 H^+ -ATPase位置，表現出紅色的位置即為染上抗體的位置。(B) 不加一級抗體的Negative control。Scale bar為 $10 \mu m$ 。n, 細胞核。cu, cuticle。se, septum。p, pillar cell。*, subcellular space。



圖七、肉球近方蟹 (*Hemigrapsus sanguineus*) 鰓部免疫組織化學染色。Gill 6與Gill 7。(A) Gill 6。利用抗體標定 H^+ -ATPase位置，表現出紅色的位置即為染上抗體的位置。(B) Gill 6。不加一級抗體的Negative control。Scale bar為 $10 \mu m$ 。(C) Gill 7。利用抗體標定 H^+ -ATPase位置，表現出紅色的位置即為染上抗體的位置。(D) Gill 7。不加一級抗體的Negative control。Scale bar為 $10 \mu m$ 。n, 細胞核。cu, cuticle。se, septum。p, pillar cell。bc, blood cell。f, fuzzy layer。

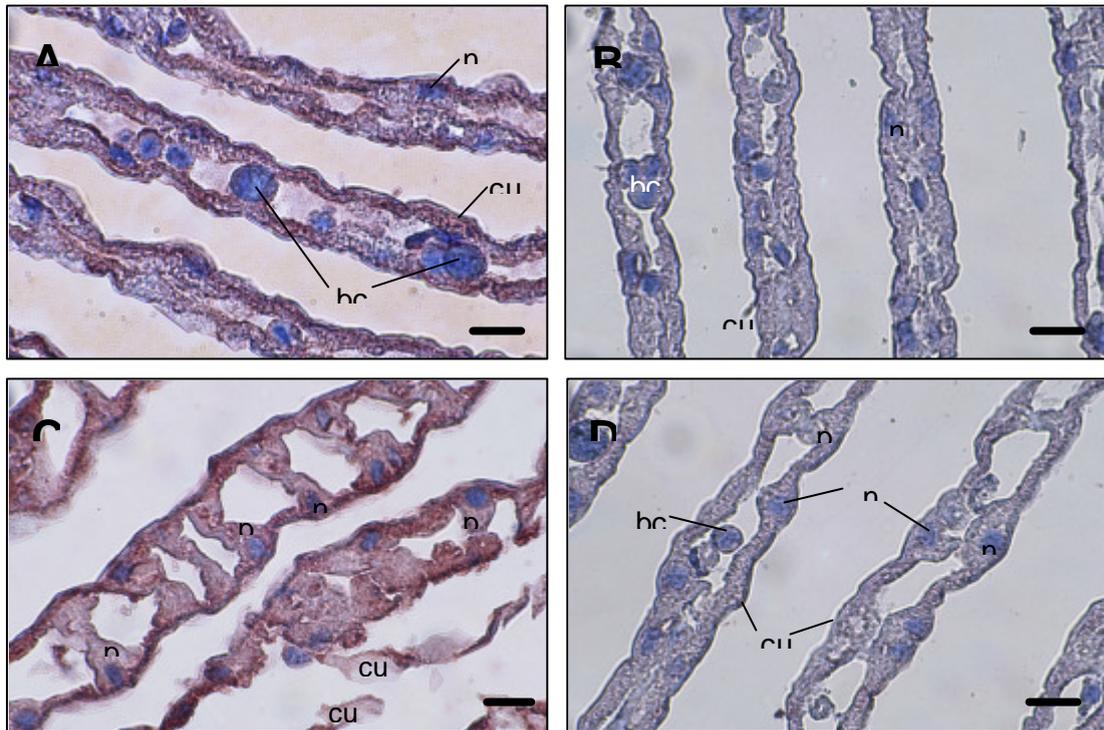


圖八、絨毛近方蟹 (*Hemigrapsus penicillatus*) 鰓部免疫組織化學染色。Gill 6與Gill 7。(A) Gill 6。利用抗體標定 H^+ -ATPase位置，表現出紅色的位置即為染上抗體的位置。(B) Gill 6。不加一級抗體的Negative control。Scale bar為 $10 \mu m$ 。(C) Gill 7。利用抗體標定 H^+ -ATPase位置，表現出紅色的位置即為染上抗體的位置。(D) Gill 7。不加一級抗體的Negative control。Scale bar為 $10 \mu m$ 。n, 細胞核。cu, cuticle。se, septum。p, pillar cell。



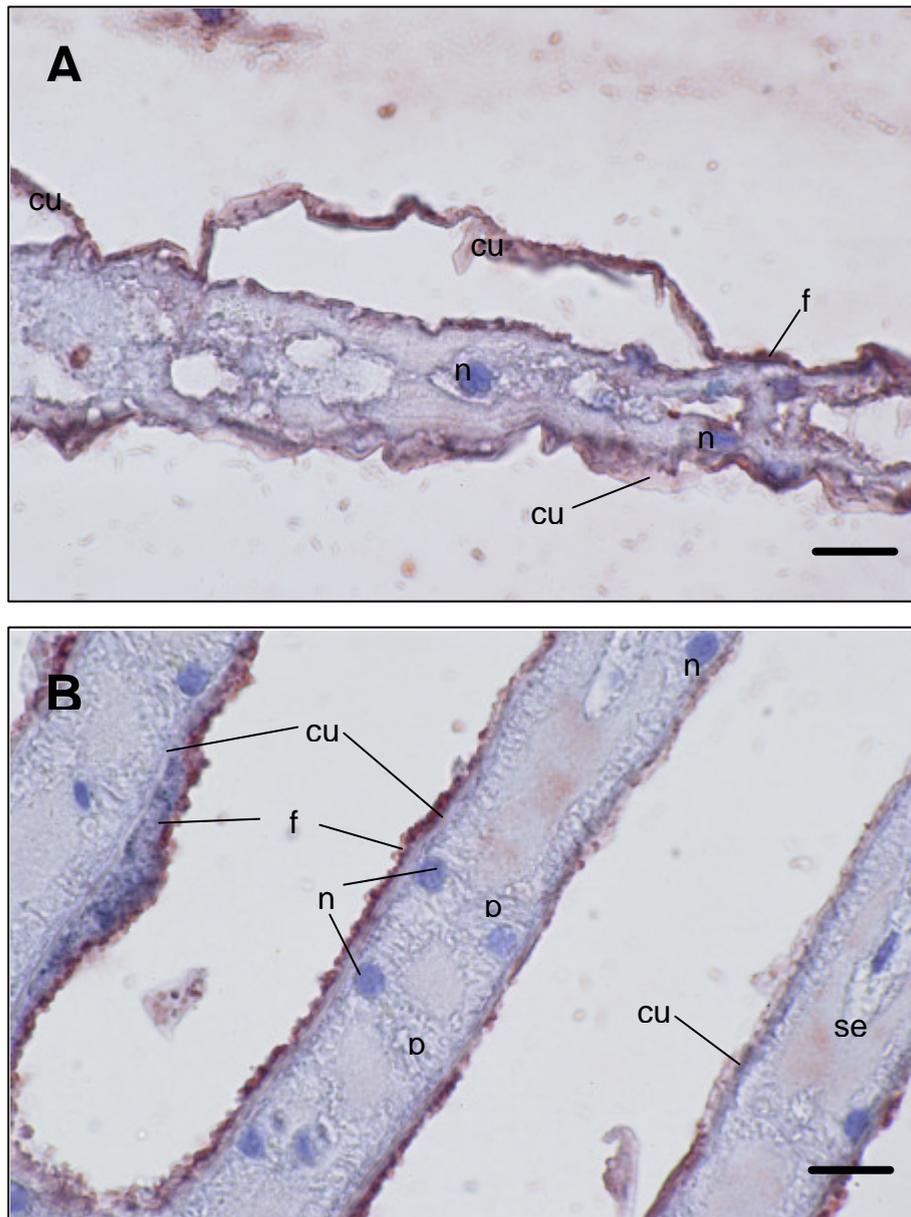
圖九、雙齒近相手蟹 (*Perisesarma bidens*) 鰓部免疫組織化學染色。

Gill 6與Gill 7。(A) Gill 6。利用抗體標定 H^+ -ATPase位置，表現出紅色的位置即為染上抗體的位置。(B) Gill 6。不加一級抗體的Negative control。Scale bar為10 μm 。(C) Gill 7。利用抗體標定 H^+ -ATPase位置，表現出紅色的位置即為染上抗體的位置。(D) Gill 7。不加一級抗體的Negative control。Scale bar為10 μm 。n, 細胞核。cu, cuticle。bc, blood cell。

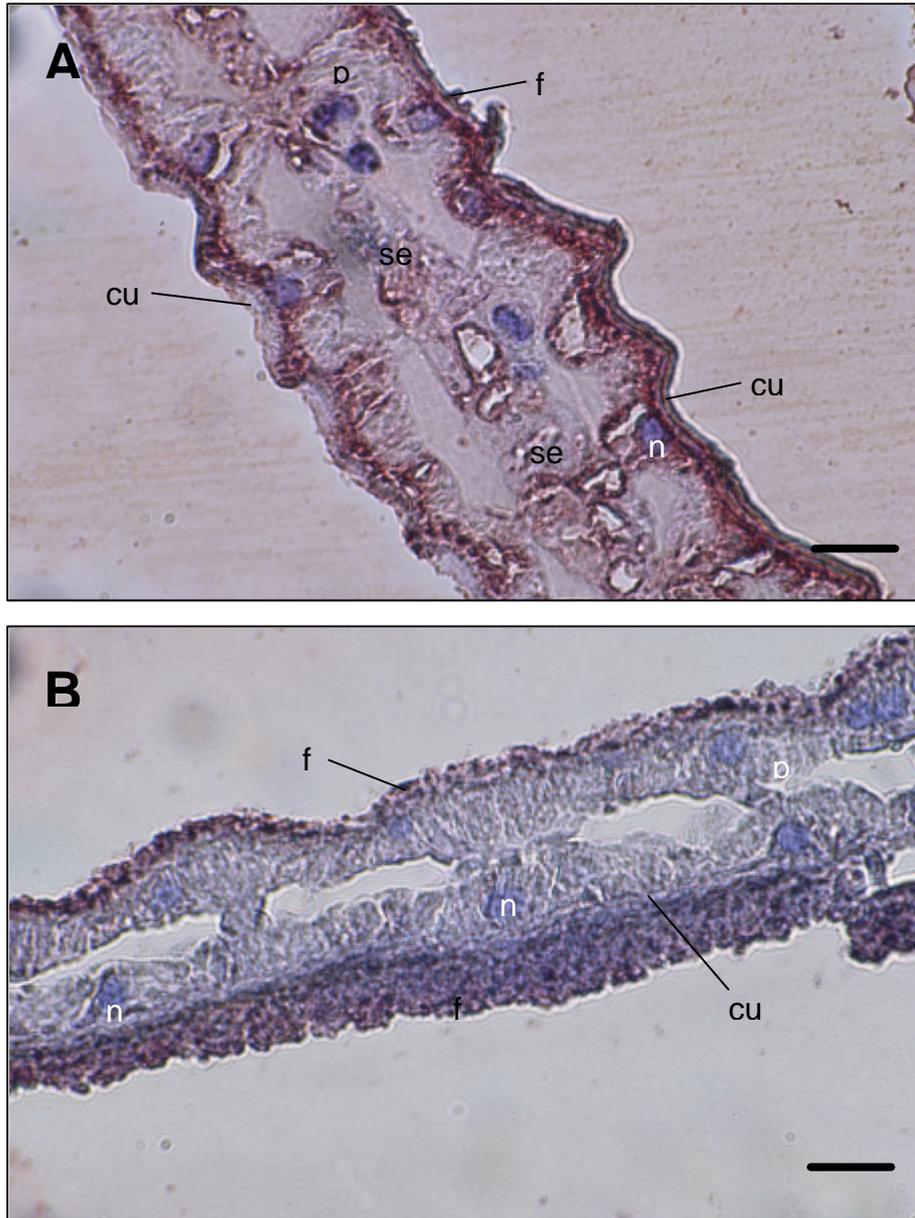


圖十、無齒螳臂蟹 (*Chiromantes dehaani*) 鰓部免疫組織化學染色。

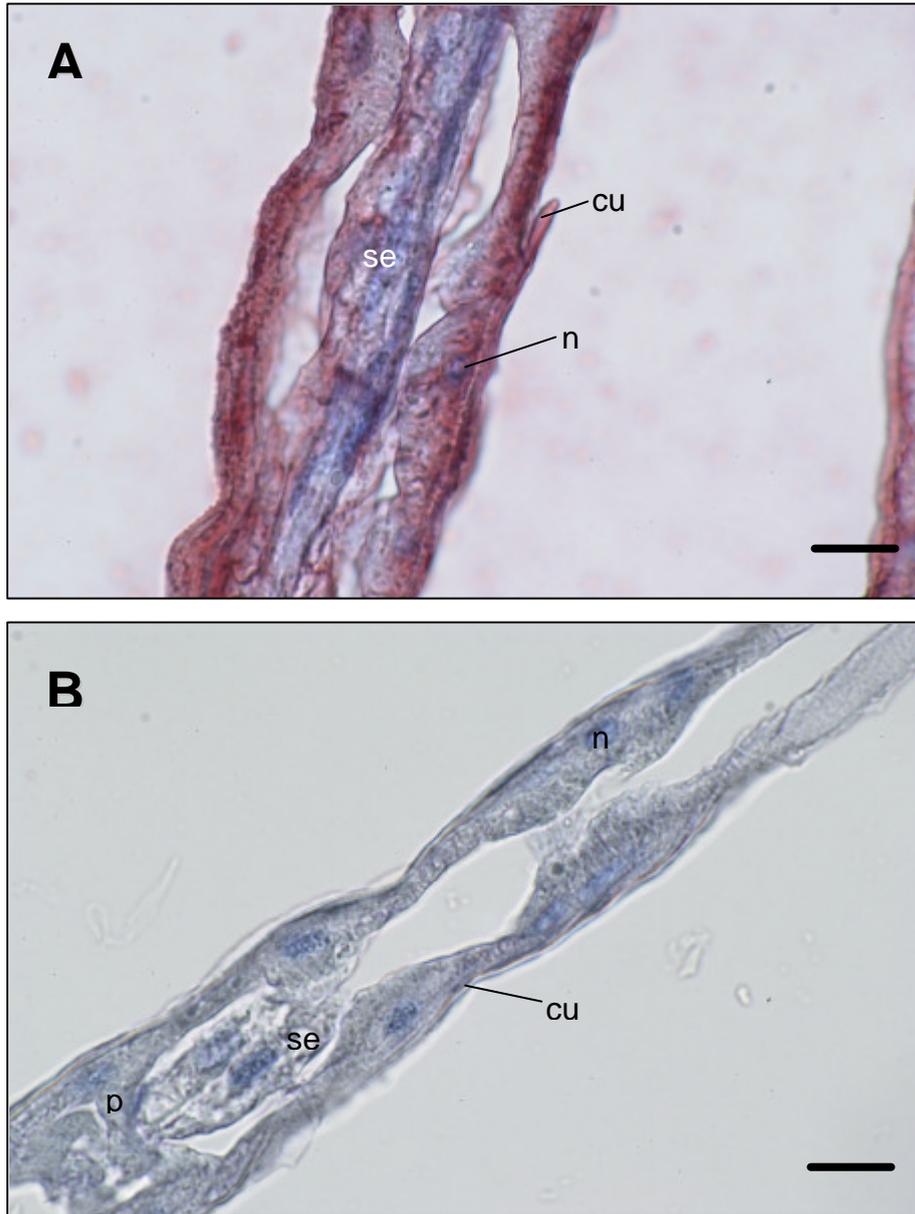
Gill 6與Gill 7。(A) Gill 6。利用抗體標定 H^+ -ATPase位置，表現出紅色的位置即為染上抗體的位置。(B) Gill 6。不加一級抗體的Negative control。Scale bar為10 μm 。(C) Gill 7。利用抗體標定 H^+ -ATPase位置，表現出紅色的位置即為染上抗體的位置。(D) Gill 7。不加一級抗體的Negative control。Scale bar為10 μm 。n, 細胞核。cu, cuticle。p, pillar cell。bc, blood cell。



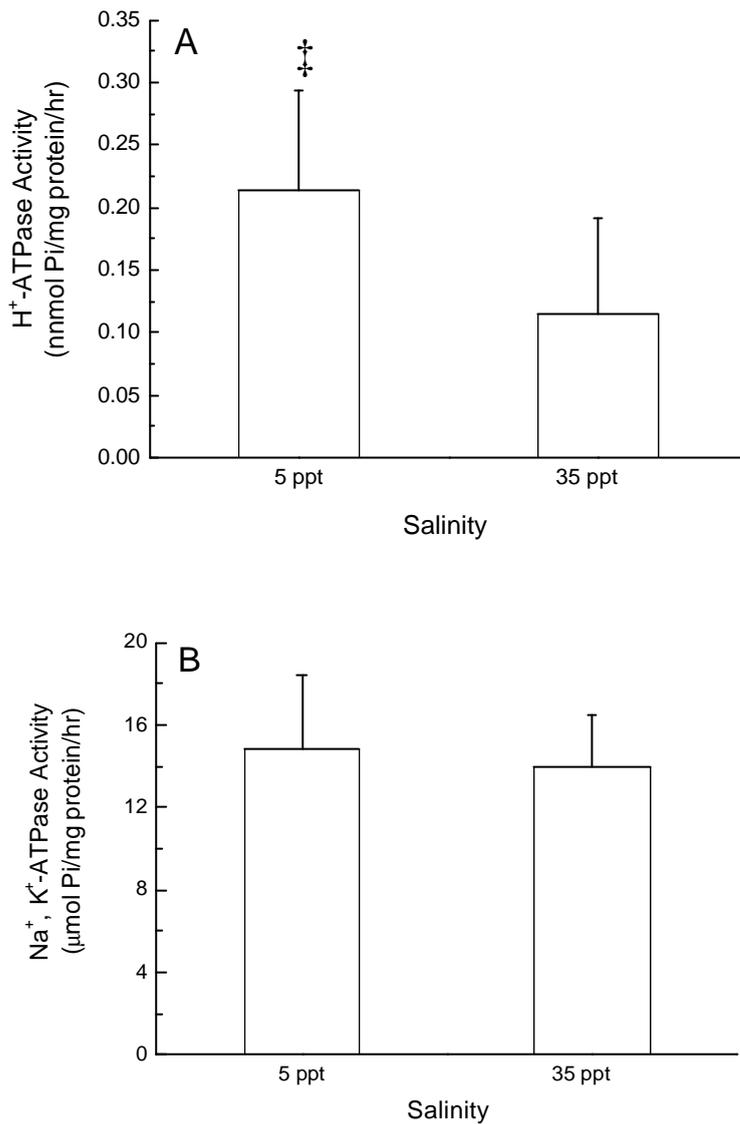
圖十一、隆背張口蟹 (*Chasmagnathus granulatus*) 鰓部免疫組織化學染色。Gill 7。(A) 利用抗體標定 H^+ -ATPase 位置，表現出紅色的位置即為染上抗體的位置。(B) 不加一級抗體的 Negative control。Scale bar 為 10 μm 。n, 細胞核。cu, cuticle。se, septum。p, pillar cell。f, fuzzy layer。



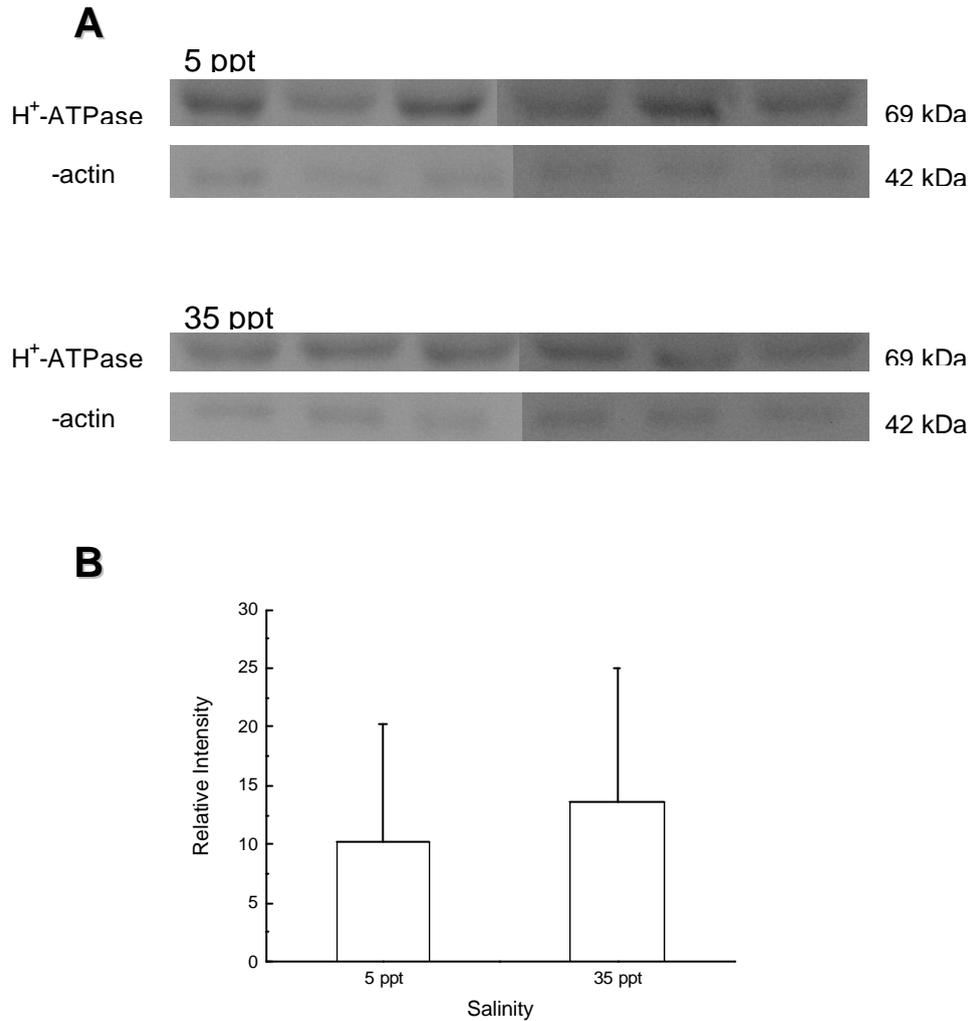
圖十二、台灣厚蟹 (*Helice formosensis*) 鰓部免疫組織化學染色。Gill 8。(A) 利用抗體標定 H^+ -ATPase位置，表現出紅色的位置即為染上抗體的位置。(B) 不加一級抗體的Negative control。Scale bar為 $10 \mu m$ 。n, 細胞核。p, pillar cell。cu, cuticle。se, septum。f, fuzzy layer。



圖十三、中華絨螯蟹 (*Eriocheir sinensis*) 鰓部免疫組織化學染色。Gill 8。 (A) 利用抗體標定 H^+ -ATPase位置，表現出紅色的位置即為染上抗體的位置。(B) 不加一級抗體的Negative control。Scale bar為 $10 \mu m$ 。n, 細胞核。cu, cuticle。se, septum。



圖十四、台灣招潮蟹 (*U. formosensis*) 在5 ppt與35 ppt 環境下，H⁺-ATPase與Na⁺, K⁺-ATPase活性。
 (A) H⁺-ATPase活性表現。不同鹽度下，活性接近顯著差異。‡P = 0.054, t = 2.182, n = 6。 (B) Na⁺, K⁺-ATPase活性。高低鹽度間，活性值無顯著差異。P = 0.636, t = 0.488, n = 6。



圖十五、台灣招潮蟹 (*U. formosensis*) 鰓部H⁺-ATPase在5 ppt以及35 ppt環境下的相對蛋白質量。(A)不同鹽度下, H⁺-ATPase -subunit與 -actin的蛋白質質量影像。(B)經影像軟體分析計算後, H⁺-ATPase -subunit與 -actin的相對表現強度, 以量化後比值呈現。鹽度間無顯著差異。 $t = 0.558$, $P = 0.590$, $n = 6$ 。