

國立臺灣師範大學理學院生命科學系

碩士論文

Department of Life Science

College of Science

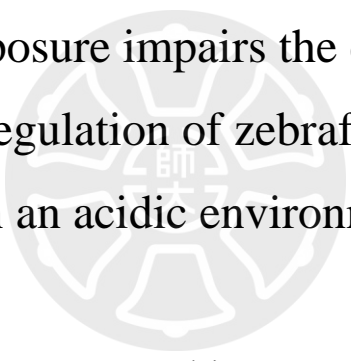
National Taiwan Normal University

Master's Thesis

銀離子於酸性環境中對斑馬魚胚胎

發育及離子調控之危害

Silver exposure impairs the development  
and ion regulation of zebrafish embryos  
in an acidic environment



孔耕心

Kung, Geng-Xin

指導教授：林豐益 博士

Advisor: Lin, Li-Yih, Ph.D.

中華民國 110 年 8 月

August 2021

## 致謝

還記得剛到實驗室時，每周三早上的 meeting 總是讓我很緊張，到後面可以較清楚的講解實驗數據，這中間的進步要謝謝林豐益老師的督促與指教。我也要謝謝林老師給我很多實驗設計以及數據分析的指導，令我受益良多！另外，謝謝洪君琳老師，不僅在 meeting 時會給我實驗上的建議，在我去北醫做實驗時也給予很大的協助。

謝謝阿台哥、GB 哥、巧羚跟健安在我剛進實驗室時帶我熟悉環境、做各樣的實驗，有你們的幫忙我才可以順利上手。謝謝佳柔、愷霆跟旭證，有同期的同學真的很重要，讓我遇到問題可以先找你們討論，更在後期準備論文時期能夠互相照應，祝福你們畢業後都可以找到理想的方向！謝謝清華，在我重複做 ICP-MS 的時候給予實驗的建議，還要幫忙預約跟操作儀器。謝謝實驗室的 Phun、亞珊、元廷、彥成、阿吉、凡暄，還有大學部的冠儀、欣儀跟柏翔，你們為實驗室帶來許多歡笑。謝謝詠馨陪伴我的碩士生活，一起去各種地方吃東西、打球跟玩耍，有妳真好！

謝謝我的好室友家瑛，在我各種沒動力、心情差的時候陪伴我，還做飯給我吃，跟妳聊天很療癒。謝謝珍美姊時常的關心，讓我備感溫暖。感謝我的摯友朱恩揚、鍾呈跟朱 Bo，雖然在不同地方還是常常聯絡、互相講垃圾話跟鼓勵，讓我可以撐過低潮期。謝謝林昇跟聖柔，每個月的聚餐都讓我能重新充電，也帶給我很多笑聲(很大聲的那種)。謝謝甜貴家的療癒動態跟代禱，還有遠在高雄的朋朋們，我愛你們！

最後要謝謝我的家人們，在我選擇生科的道路給予最大的支持，雖然中間有過不同的想法，但還是尊重我的選擇。謝謝你們的代禱跟關心，雖然有時只是很簡短的通話或視訊，都給我很大的鼓勵跟力量，我愛你們！最後要謝謝上帝，為我預備道路，祂是我的幫助、我的高臺！

## 目錄

摘要 .....	1
Abstract .....	2
研究背景 .....	3
奈米銀汙染 .....	3
銀離子對魚類的危害 .....	4
水環境酸化現象 .....	5
魚類的酸適應機制 .....	6
斑馬魚模式生物 .....	6
斑馬魚毛細胞 .....	7
斑馬魚離子細胞 .....	7
氧化壓力與細胞死亡機制 .....	8
研究目的 .....	10
實驗設計流程圖 .....	11
實驗設計 .....	12
實驗一：96 小時處理對斑馬魚胚胎死亡及發育之影響 .....	12
1-1：觀察 7 天處理對各組斑馬魚胚胎死亡率之影響 .....	12
1-2：觀察 96 小時處理對各組斑馬魚胚胎發育指標影響之差異 ...	12
1-3：觀察 96 小時處理對各組斑馬魚胚胎內耳系統影響之差異 ...	12
1-4：觀察 96 小時處理對各組斑馬魚胚胎側線系統影響之差異 ...	12
實驗二：96 小時處理對斑馬魚胚胎離子調控之影響 .....	13
2-1：觀察 96 小時處理對各組斑馬魚胚胎離子細胞變化之影響 ...	13
2-2：觀察 96 小時處理後各組斑馬魚胚胎離子調節差異 .....	13
實驗三：探討銀離子損害斑馬魚胚胎離子細胞之機制 .....	13
3-1：觀察 30 分鐘處理後斑馬魚胚胎離子細胞數目、氧化壓力程 度及細胞凋亡訊號變化 .....	14

3-2：觀察 2 小時處理後斑馬魚胚胎離子細胞數目、氧化壓力程度 及細胞凋亡訊號變化.....	14
材料與方法 .....	15
一、實驗動物.....	15
二、馴養水體.....	15
三、斑馬魚胚胎死亡率計算.....	16
四、斑馬魚胚胎發育指標分析.....	16
五、斑馬魚胚胎活體螢光染色.....	16
六、免疫細胞組織染色 (Whole mount immunocytochemistry, ICC) .	17
七、電感耦合電漿體質譜法 (Inductively coupled plasma mass spectrometry, ICP-MS) .....	18
八、掃描式電子顯微鏡 (Scanning electron microscopy, SEM) .....	18
九、實驗數據分析.....	18
結果.....	20
結果一：96 小時處理對斑馬魚胚胎死亡率及發育之影響 .....	20
1-1：斑馬魚胚胎累積死亡率 .....	20
1-2：斑馬魚胚胎體長及卵黃囊面積 .....	20
1-3：斑馬魚胚胎耳石囊及耳石面積 .....	21
1-4：斑馬魚胚胎側線神經丘及 L1 毛細胞數目.....	22
結果二：96 小時處理對斑馬魚胚胎離子調控之影響 .....	23
2-1：斑馬魚胚胎離子細胞頂膜開口面積.....	23
2-2：斑馬魚胚胎離子細胞型態及數目 .....	23
2-3：斑馬魚胚胎 NaRC 細胞型態及數目 .....	24
2-4：斑馬魚胚胎 HRC 細胞數目 .....	25
2-5：斑馬魚胚胎體內銀、鈉及鈣離子含量 .....	25
結果三：30 分鐘及 2 小時處理胚胎離子細胞之變化 .....	26
3-1：30 分鐘處理對斑馬魚胚胎離子細胞之變化.....	26

3-2：2 小時處理對斑馬魚胚胎離子細胞之變化.....	27
討論.....	29
銀離子對斑馬魚胚胎死亡率之影響.....	29
銀離子對斑馬魚胚胎發育之影響.....	29
銀離子對斑馬魚胚胎聽覺系統及側線系統之影響.....	30
銀離子降低斑馬魚胚胎的酸適應功能.....	30
不同酸鹼值環境中銀離子累積量的差異.....	31
銀離子對 NaRC 及 HRC 影響之差異.....	32
銀離子阻礙斑馬魚胚胎的鈉及鈣離子吸收功能.....	33
銀離子增加離子細胞氧化壓力誘導細胞凋亡.....	33
環境的意義.....	34
結論.....	36
參考文獻.....	37



## 摘要

奈米銀在近年來被廣泛地運用於醫療及化妝品產業，其廢棄材料表面釋放出的銀離子會危害水生生物。然而，目前對於銀離子在不同酸鹼值環境中的毒性差異並不瞭解。本研究利用斑馬魚胚胎為水生生物模式，將其暴露於含有 0、0.1 及 0.25 ppm AgNO<sub>3</sub> 之 pH 5 或 pH 7 環境中，以評估銀離子毒性的差異。在暴露 96 小時的結果中可以得知銀離子的胚胎發育影響程度隨著濃度升高而增加。在銀離子的暴露後胚胎體長顯著下降，而卵黃囊面積則會增加。銀離子亦導致胚胎耳石囊面積及耳石面積下降，影響胚胎的內耳系統。另外，側線神經丘及毛細胞數目下降也反映出銀離子對胚胎側線的影響。值得注意的是：酸環境(pH 5)中會增加銀離子在體長、卵黃囊、耳石囊以及耳石上的影響。另一方面，銀離子降低離子細胞開口面積及數目，阻礙胚胎的離子調節功能，並且導致 NaRC 及 HRC 數目顯著降低，增加胚胎適應酸環境的困難性。另外，30 分鐘及 2 小時的實驗中可發現：銀離子會藉由增加離子細胞的氧化壓力程度，進而誘發細胞凋亡機制。總結以上結果，本研究認為酸環境會增加銀離子對魚類的危害。

關鍵字: 銀離子、酸環境、斑馬魚、離子細胞、氧化壓力

## Abstract

Silver nanoparticles are widely used in medical treatments and cosmetic industries.  $\text{Ag}^+$  released from the particles causes physiological damages to aquatic organisms. However, it is still unclear how environmental pH influences the toxicity of  $\text{Ag}^+$ . In this study, zebrafish embryos were incubated in pH 5 or pH 7 water containing different concentrations of  $\text{AgNO}_3$  (0, 0.1 and, 0.25 ppm) to examine the toxic effect of  $\text{Ag}^+$ . After 96 h exposure,  $\text{Ag}^+$  influenced embryonic development in a dose-dependent manner. The body length, otic vesicle size, and saccular otolith size were significantly decreased, yet the yolk sac size was increased. Moreover, the neuromast and L1 hair cell numbers were reduced by  $\text{Ag}^+$ . Acidic water (pH 5) enhanced the toxic effects of  $\text{Ag}^+$  on body length, size of yolk sac, otic vesicle, and saccular otolith.  $\text{Ag}^+$  also impaired ion regulation of embryos by reducing the apical opening size and cell number of ionocytes. The cell numbers of both NaRC and HRC were significantly decreased by  $\text{Ag}^+$ . After shorter exposures (30 min and 2 h),  $\text{Ag}^+$  increased the oxidative stress of ionocytes and induced cell apoptosis. In conclusion, this study suggests that acidified environments might intensify the  $\text{Ag}^+$  toxicity to fish.

Keywords: Silver ions, Acidic freshwater, Zebrafish, Ionocyte, Oxidative stress

## 研究背景

### 奈米銀汙染

奈米銀為最常見的奈米材料(Vance et al., 2015)，因其具有抗菌、除臭等功能(Yoon et al., 2007)，被廣泛運用於醫療(Alexander, 2009; Tian et al., 2007)、農業(Mishra and Singh, 2015)及化妝品(Gajbhiye and Sakharwade, 2016)等產業中。隨著需求上升，相關產品被大量製造。根據估計，每年製造的奈米銀相關產品重量高達 500 噸之多(Fabrega et al., 2011; Mueller and Nowack, 2008)，而這些產品在製造、洗滌及丟棄時，會導致奈米銀進入環境(Franca et al., 2020)。目前在美洲、歐洲(Blaser et al., 2008; Markus et al., 2016; Musee, 2011)及亞洲(Syafiuddin et al., 2018)的河川內皆有偵測到奈米銀存在的紀錄，且其劑量落在 5 ng/L 至 20.02 mg/L 之間。

奈米銀不僅僅是最常見的材料，其毒性更勝於其餘的奈米材料(Griffitt et al., 2008)。在哺乳類實驗中，奈米銀在生殖、神經內分泌、肝臟及腎臟相關系統中皆具顯著損害(Ahamed et al., 2010)。而在吸入含有奈米銀的空氣後，會影響實驗鼠的神經以及免疫相關基因表現(Lee et al., 2010)。

而以水生生物觀察奈米銀毒性的研究更是不勝枚舉，先前研究指出暴露於奈米銀環境中會造成斑馬魚胚胎死亡率顯著提升、發育遲緩及胚胎畸形(Bar-Ilan et al., 2009)，在心臟方面出現心包膜水腫及心律失常(Asharani et al., 2008)。另外，也有研究指出奈米銀會影響斑馬魚胚胎側線發育(Yen et al., 2019)以及離子細胞功能(Lee et al., 2019)。除此之外，魚類的行為在暴露奈米銀之後也有所改變，例如對於活動力、學習能力及社交行為等(Fu et al., 2021; Powers et al., 2011)，進而影響魚類適應環境的能力，顯示其對魚類之危害。

先前研究指出奈米銀會累積在魚類成魚的腦、肝臟以及鰓，並且藉由增加氧化壓力造成器官損傷(Ale et al., 2018; Bacchetta et al., 2017)，並影響魚類氧化壓力相關的基因表現(Bilberg et al., 2010; Chae et al., 2009; Choi et al., 2010)。而目前認為藉由增加氧化壓力，進而破壞 DNA 以及脂質結構，是奈米銀造成組織或器官損傷的主要原因(Ahamed et al., 2010; Khan et al., 2017)。

## 銀離子對魚類的危害

在潮濕的環境中的奈米銀材料表面結構較不穩定(Kaegi et al., 2011)，容易導致其表面的銀離子釋放至環境中造成汙染(Sakamoto et al., 2015; Yang et al., 2012)。目前認為奈米銀可能藉由「特洛伊木馬型機制」(Trojan-horse type mechanism)造成毒性，也就是銀離子以奈米材料作為載體，通過組織障礙後釋放出並造成傷害(Lubick, 2008; Park et al., 2010)。也有另一理論表示銀離子及奈米銀對生物體皆具有傷害(Chae et al., 2009; Kawata et al., 2009)，且生物體與奈米銀的交互作用可能會增加銀離子釋放的濃度(Navarro et al., 2008)。不論奈米銀的危害機制是如何，這些理論皆認為銀離子是奈米銀污染的主要來源。

根據先前研究發現污水處理廠平均可以清除廢水中 75 % 的銀離子，然而，在下游流域中仍然可以偵測到微量的銀離子殘留(Lytle, 1984)。而目前有研究在歐洲萊茵河中發現 4 到 320 ng/L 的銀(Blaser et al., 2008)，表示銀離子確實會存在於水域環境。另外，世界衛生組織指出在人類飲用的水中具有微量的銀離子，且人類每年由飲用攝入的銀離子量約為 0.025 mSv (Edition, 2011)。因此，了解銀離子的性質與潛在危害是非常重要的。

一般認為銀離子會經由魚類的皮膚以及鰓進入魚體(Ratte, 1999)，主要累積在魚類的肝臟以及鰓(Hogstrand et al., 1996; Yamazaki et al., 1996)。而 Bury 及 Wood 的研究發現(Bury and Wood, 1999)，加入鈉離子以及氫離子通道阻斷劑 Phenamil 以及 Bafilomycin 後，能有效降低 62 % 以及 79 % 的銀離子吸收量，證實離子通道是銀離子的暴露途徑之一。

在海水魚的研究中，9  $\mu\text{M}$   $\text{AgNO}_3$  會抑制眉鯨(English sole, *Parophrys vetulus*) 成魚腸道內鈉及氯離子吸收，且在置換回正常水體 1 天後，仍無法恢復功能(Grosell et al., 1999)。而在淡水中銀離子對生物的傷害更為明顯(Hogstrand and Wood, 1996)，有研究證實短期暴露  $\text{AgNO}_3$  會損害虹鱒魚鰓上離子細胞的鈉鉀幫浦( $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase, NKA)(Goss et al., 2011)，並阻礙其離子吸收功能(Brauner and Wood, 2002; Morgan et al., 1997)。除此之外， $\text{AgNO}_3$  也會使魚類血液中的碳酸氫

根( $\text{HCO}_3^-$ )濃度顯著下降(Wood et al., 1996)，導致其無法維持血液酸鹼值恆定(Webb and Wood, 1998)，這些研究都證實銀離子對於魚類的離子調節具有危害。

## 水環境酸化現象

大氣中的硫化物及氮化物等，會經由降雨、降雪等途徑，進入土壤、海洋和河川，是造成環境酸化主要原因之一(Bouwman et al., 2002; Rodhe, 1989; Singh and Agrawal, 2007)。相較於陸地，海洋及河川酸汙染的影響規模更大(Singh and Agrawal, 2007)，而水域的酸化也被視為全球性環境危害(Gobler and Baumann, 2016; Schindler, 1988)。許多研究皆指出長期的水質酸化會導致海洋、湖泊及河川內物種數量下降甚至消失，衝擊環境內的生態多樣性(Beamish and Harvey, 1972; Moiseenko, 2005; Munday et al., 2010)。

在海洋研究中發現環境酸化會影響魚類神經感覺系統(Heuer and Grosell, 2014)，包含嗅覺(Cripps et al., 2011; Devine et al., 2012)、聽覺(Bignami et al., 2013; Simpson et al., 2011)及視覺系統(Chung et al., 2014; Ferrari et al., 2012)等。除此之外，海洋酸化會影響魚類能量分配(Hurst et al., 2012)，進而反映在幼魚的生長速度上(Munday et al., 2009; Rossi et al., 2015)。而目前有研究認為海洋環境酸化對於早期發育階段的生物影響較大，尤其是需要大量鈣質攝取的物種(Kurihara, 2008; Ross et al., 2011; Thorson, 1950)。

在淡水方面，有研究指出由酸化的雨或是雪下降至水域中，可能會導致淡水環境的 pH 值下降 4.5 至 5.5 之間(Beamish and Harvey, 1972; Raddum and Fjellheim, 1984)，這樣的環境會降低斑馬魚胚胎的存活率並影響其發育(Lin et al., 2019)。而酸化環境亦會影響魚類的離子調控功能，由 Kwong 等人整理的文獻中(Kwong et al., 2014)指出酸環境會造成魚類離子吸收減弱，導致鈉離子(Freda and McDonald, 1988; Gonzalez and Wilson, 2001; Gonzalez and Dunson, 1987)及鈣離子流失(Horng et al., 2009)。

先前研究發現酸環境會影響奈米材料性質，增加表面離子釋放到環境的速率(Bhang et al., 2015; Zhai et al., 2020)，且環境 pH 值會影響金屬的毒性(Schubauer-

Berigan et al., 1993)。另外，有研究指出酸環境會增加銅對藻類及魚類的危害 (Carvalho and Fernandes, 2006; Lüderitz and Nicklisch, 1989)。然而，目前對於酸環境對銀離子毒性的影響並不清楚。

## 魚類的酸適應機制

在正常的狀況下，人體血液的 pH 值會落在 7.35 至 7.45 之間(Hopkins et al., 2020)。血液酸鹼值的變化會影響酵素的活性及許多生理現象，因此維持體液酸鹼值恆定是非常重要的。然而，在食物的攝取及正常的生理代謝功能下，皆會產生 CO<sub>2</sub>，因此需要經由各樣的機制調節血液酸鹼。哺乳類可利用改變呼吸頻率，進而調整血液中的 CO<sub>2</sub> 分壓達到酸鹼調節，另外，腎臟亦能幫助調節血液酸鹼值 (Pitts, 1950)。

而魚類可藉由體表、直腸腺、腎臟及鰓進行酸鹼調節。其中又以鰓最為重要，在鰓的表皮上有離子細胞能夠進行跨表皮的離子運輸。海水魚的生存環境中有大量的鈉離子，因此傾向利用鈉氫交換蛋白(Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>-exchanger, NHE)將氫離子排出體外(Liu et al., 2016; Wu et al., 2010)。而淡水魚則有氫離子幫浦(H<sup>+</sup>-ATPase, HA)及 NHE 等蛋白協助排酸(Dymowska et al., 2012)。另外，恆河猴醣蛋白(Rhesus glycoproteins, Rhcg)也透過排氫參與氫離子的排出(Hwang et al., 2011)。先前研究發現：魚類會藉由刺激幹細胞分化成不同型離子細胞，或擴大離子細胞的開口面積，進而增加排酸功能以適應環境(Horng et al., 2009)。

## 斑馬魚模式生物

斑馬魚是常見的模式動物，因為與人類的基因相似度高，可用於建立各樣的疾病模式(Howe et al., 2013)。除此之外，斑馬魚也常被使用於生理、行為及毒理實驗(Briggs, 2002; Orger and de Polavieja, 2017; Sipes et al., 2011)。斑馬魚卵的產量高，常用於需要大量實驗動物的研究，如：初步藥物篩檢、毒性測試等(MacRae and Peterson, 2015)。而其胚胎表面透明的特性，使研究者容易觀察其形態及發育狀況(Truong et al., 2011)。

## 斑馬魚毛細胞

斑馬魚胚胎側線毛細胞能感應機械波(Mechanical wave)，用於偵測水波的頻率及方向(Favre-Bulle et al., 2020)，使斑馬魚能快速逃跑或幫助其社交行為(Butler and Maruska, 2016; Mirjany et al., 2011)，為其生存不可或缺之功能。

在毛細胞上具有纖毛束，外力撥動纖毛時，上面的機械性感測傳導通道(Mechanotransducer channel, MET channel)會開啟，導致毛細胞去極化，進而釋放神經傳導物質，將訊息傳遞至大腦(LeMasurier and Gillespie, 2005; Ottersen et al., 1998)。另外，先前研究認為由奈米銀會經由 MET 通道或藉由內吞作用進入魚體，是奈米銀暴露的途徑之一(Yen et al., 2019)。

而毛細胞直接暴露在水體中的性質，使其能被使用在偵測水體中由環境變化(Lin et al., 2019; Scholik and Yan, 2001)、藥物(Ou et al., 2009; Thomas et al., 2013; Yen et al., 2019)或汙染物(McNeil et al., 2014; Yen et al., 2019)帶來的危害。

## 斑馬魚離子細胞

斑馬魚具富含粒腺體細胞(Mitochondria-rich cell, MRC)又稱為離子細胞(Perry et al., 1992)，能幫助魚類離子吸收及排酸(Hwang, 2009; Lin et al., 2006; Yan and Hwang, 2019)。為了維持魚體內滲透壓，離子細胞分布於魚鰓或胚胎體表，導致其直接暴露於水體之中。因此，可用於觀察環境汙染物對魚類之影響(Hung et al., 2019; Lee et al., 2019)。

在斑馬魚具有五型離子細胞，因細胞表現不同的運輸蛋白，使其具有不同的功能。其中，以 HRC( $H^+$ -ATPase-rich cell)為主要的排酸細胞(Horng et al., 2009; Lin et al., 2006)，斑馬魚可藉由調控其細胞數目幫助自身適應酸環境。在 HRC 的細胞頂膜上具有 HA、NHE 及 Rhcg 蛋白協助運送氫離子離開魚體(Lin et al., 2006; Yan et al., 2007)。在青鱒魚(Medaka, *Oryzias latipes*)、虹鱒(Rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*)及吳郭魚等物種中，HA 已被證實與魚類的排酸功能相關(Galvez et al., 2002; Hiroi et al., 2008; Lin et al., 2012)。也有研究發現利用

bafilomycin 抑制 HA 蛋白功能(Kumai and Perry, 2011)，或利用基因減弱(Gene Knockdown)技術減低 *atp6v1a* 基因表現量後，皆會顯著抑制其排酸功能(Horng et al., 2007)。

而 NaRC ( $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase-rich cell}$ )為另一型離子細胞，此細胞主要與斑馬魚的鈣離子吸收有關(Lin and Hwang, 2016)。在此細胞頂膜上有鈣離子通道蛋白(Apical epithelial  $\text{Ca}^{2+}$  channel, ECaC)，能吸收水體中的鈣離子(Pan et al., 2005)，再藉由表現於基部的 PMCA (Plasma membrane  $\text{Ca}^{2+}\text{-ATPase}$ )及 NCX ( $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  exchanger)蛋白將鈣離子運輸進入魚體(Liao et al., 2007)。

## 氧化壓力與細胞死亡機制

活性氧類(Reactive oxygen species, ROS)是細胞進行有氧代謝過程中的副產物，其包含了氧離子、過氧化物和含氧自由基等。ROS 在正常的細胞中能用於訊號傳導(Apel and Hirt, 2004; Mittler, 2017)，以維持細胞的正常功能或汰換老舊細胞。然而，過多的 ROS 會導致細胞的氧化壓力程度提高，造成 DNA、脂質及蛋白質等結構破壞，進而導致細胞的損傷或死亡(Finkel, 2003; Schieber and Chandel, 2014)。

細胞死亡的原因有很多，可大致分為細胞壞死(Necrosis)、吞噬作用(Autophagy)以及細胞凋亡(Apoptosis)，其導致死亡的機制與細胞死亡的型態有所不同(Galluzzi et al., 2007; Hotchkiss et al., 2009; Majno and Joris, 1995)。其中，吞噬作用與細胞凋亡機制皆為計畫性細胞死亡(Programmed cell death)，會受到基因調控影響(Elmore, 2007)。

細胞凋亡這個詞最早是由 Kerr、Wyllie 與 Currie 在 1972 年所運用，用於區分與細胞壞死不同的細胞死亡型態。除此之外，他們也認為在胚胎發育與組織、細胞更新過程中，細胞凋亡是非常重要的機制(Kerr et al., 1972)。細胞凋亡的過程中，染色質及細胞質濃縮會導致細胞型態變得不規則(Elmore, 2007)，而凋亡小體(Apoptosome)的形成也是細胞凋亡的特色(Riedl and Salvesen, 2007)。目前 ROS 被

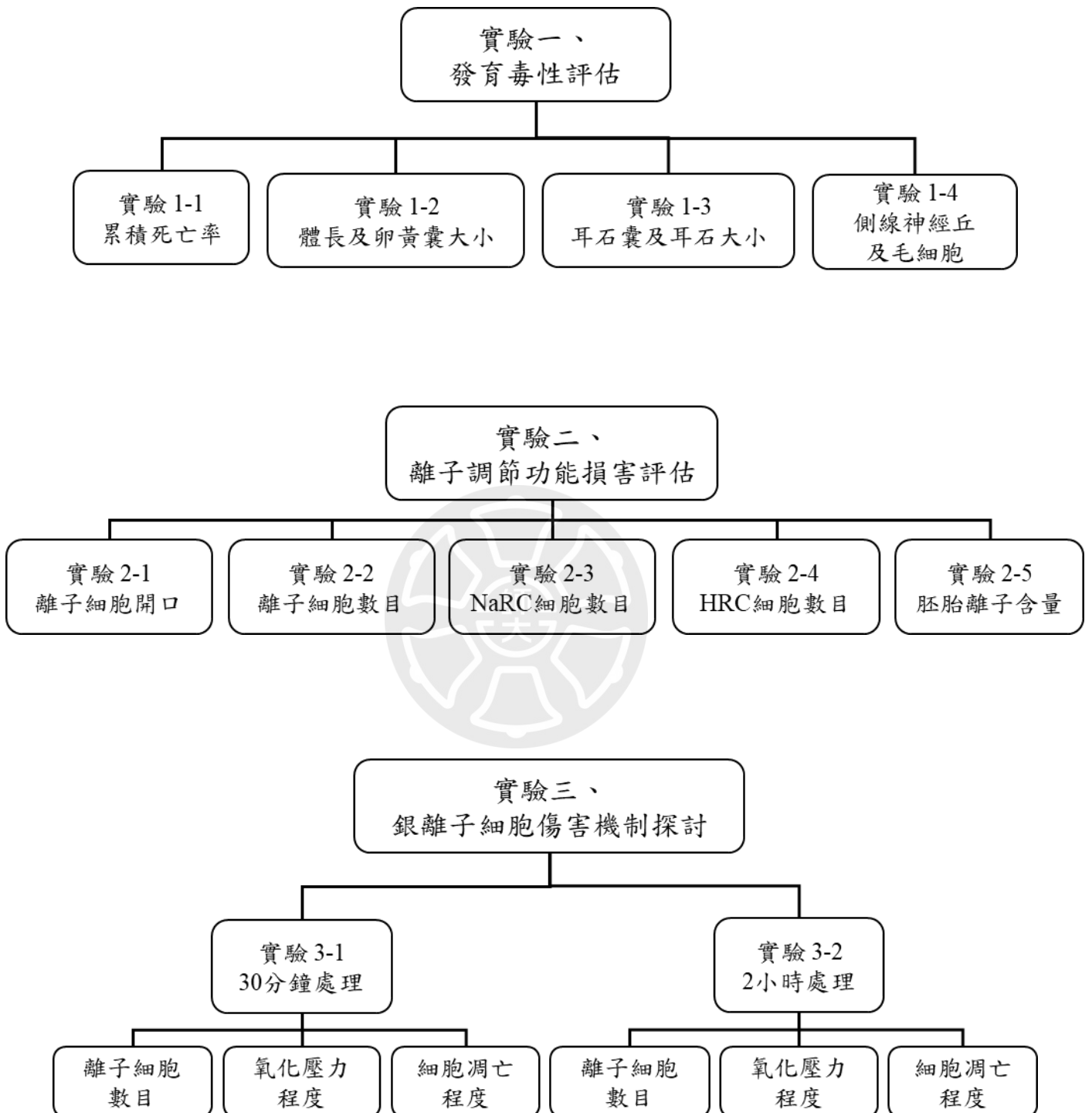
認為會誘導細胞凋亡(Kannan and Jain, 2000)，在癌症治療中也有利用增加 ROS 誘發癌細胞進行細胞凋亡的案例(Perillo et al., 2020; Zou et al., 2017)。



## 研究目的

奈米銀材料被廣泛使用，相關產品於製造、清洗及丟棄後會導致奈米銀釋放至環境中。而其材料表面銀離子會造成環境汙染，為奈米銀主要毒性來源。另外，環境 pH 值低於 5 的淡水酸化現象趨於普遍，造成淡水魚可能同時暴露於銀及酸的共汙染環境。而目前對於銀離子是否影響魚類適應酸環境，以及酸環境是否會加劇銀離子之毒性並無研究進行深入探討。本研究預期：1. 酸環境會對斑馬魚胚胎發育造成壓力，導致與銀離子共處理後對胚胎的影響更加明顯。2. 銀離子會損害離子細胞的調節功能，導致胚胎在適應酸環境時更加困難。3. 銀離子會藉由增加氧化壓力誘導細胞凋亡，導致離子細胞損害。為了驗證此假說，本研究以斑馬魚為水生生物模式，藉由觀察不同的發育指標，評估銀離子在不同酸鹼值環境中對胚胎發育影響的差異，並利用染劑、抗體以及偵測胚胎內離子含量的技術，觀察離子細胞損傷及離子調節情形，藉以評估銀離子是否會影響胚胎適應酸環境。另外，本研究也設計暴露 30 分鐘或 2 小時的連續性實驗，以理解銀離子對離子細胞之損害機制。

## 實驗設計流程圖



## 實驗設計

### 實驗一：96 小時處理對斑馬魚胚胎死亡及發育之影響

本實驗將斑馬魚胚胎暴露於含有 0、0.1 及 0.25 ppm AgNO<sub>3</sub> 之 pH 5 或 pH 7 溶液中。觀察暴露 96 小時後對於斑馬魚胚胎發育毒性指標之損傷程度，藉以評估 AgNO<sub>3</sub> 於不同 pH 值環境中之毒性差異。

#### 1-1：觀察 7 天處理對各組斑馬魚胚胎死亡率之影響

每日更換馴養斑馬魚胚胎之溶液，以避免代謝物或死亡個體影響水質，並記錄當日累積死亡率至第 7 天(0~7 dpf)。

#### 1-2：觀察 96 小時處理對各組斑馬魚胚胎發育指標影響之差異

為了評估 AgNO<sub>3</sub> 於 pH 5 及 pH 7 環境中對斑馬魚胚胎發育之影響差異，本實驗觀察各組胚胎型態，並測量各組胚胎體長及卵黃囊面積。

#### 1-3：觀察 96 小時處理對各組斑馬魚胚胎內耳系統影響之差異

本實驗將斑馬魚胚胎暴露於含有 0、0.1 及 0.25 ppm AgNO<sub>3</sub> 之 pH 5 或 pH 7 溶液中。藉由觀察暴露 96 小時後對於斑馬魚胚胎耳石及耳石囊面積，評估銀離子對斑馬魚胚胎內耳系統的影響。

#### 1-4：觀察 96 小時處理對各組斑馬魚胚胎側線系統影響之差異

為比較 AgNO<sub>3</sub> 於 pH 5 或 pH 7 環境中對於斑馬魚胚胎側線發育的影響，本實驗以 FM1-43 染劑進行活體螢光染色，觀察其側線神經丘數以及 L1 神經丘上的毛細胞數量。

## 實驗二：96 小時處理對斑馬魚胚胎離子調控之影響

本實驗將斑馬魚胚胎暴露於含有 0、0.1 及 0.25 ppm AgNO<sub>3</sub> 之 pH 5 或 pH 7 溶液中。觀察暴露 96 小時對於斑馬魚胚胎卵黃囊表面離子細胞之影響，並探討胚胎於不同組別中離子調控功能之差異。

### 2-1：觀察 96 小時處理對各組斑馬魚胚胎離子細胞變化之影響

為了探討 AgNO<sub>3</sub> 於不同 pH 值環境下對斑馬魚胚胎離子細胞之傷害差異，本實驗先利用 SEM 技術觀察各組胚胎離子細胞開口面積大小，再利用 Rhodamine 123 染劑進行活體染色以觀察其形態及數目變化。

### 2-2：觀察 96 小時處理後各組斑馬魚胚胎離子調節差異

為了探討 AgNO<sub>3</sub> 於不同 pH 值環境下對斑馬魚胚胎離子調節功能之損害，本研究利用免疫細胞組織染色法觀察 NaRC 及 HRC 之型態及數目變化。再利用 ICP-MS 技術分析各組胚胎體內銀離子累積量及鈉、鈣離子含量。

## 實驗三：探討銀離子損害斑馬魚胚胎離子細胞之機制

為理解銀離子損害離子細胞之機制，本實驗將 72 hpf 斑馬魚胚胎暴露於含有 0、0.1 及 0.25 ppm AgNO<sub>3</sub> 之 pH 5 或 pH 7 溶液中，觀察暴露 30 分鐘及 2 小時內各組胚胎離子細胞數目、細胞氧化壓力程度及細胞凋亡訊號的連續性變化。

### 3-1：觀察 30 分鐘處理後斑馬魚胚胎離子細胞數目、氧化壓力程度及細胞凋亡訊號變化

短期暴露 30 分鐘後，以 Rhodamine 123 標定具粒線體之離子細胞，觀察離子細胞型態及數目變化。除此之外，以 CellROX 訊號評估各組離子細胞氧化壓力程度差異。而 AO 可標定進行細胞凋亡之細胞，以評估離子細胞狀態。

### 3-2：觀察 2 小時處理後斑馬魚胚胎離子細胞數目、氧化壓力程度及細胞凋亡訊號變化

短期暴露 2 小時後，以 Rhodamine 123 標定具粒線體之離子細胞，觀察其形態及數目變化。另外，以 CellROX 評估各組胚胎離子細胞氧化壓力程度差異。而 AO 可標定進行細胞凋亡之細胞，以評估離子細胞狀態。



## 材料與方法

### 一、實驗動物

本次實驗動物為斑馬魚仔魚(*Danio rario*, AB strain)。親代飼養於光週期為白日 14 小時與黑暗 10 小時之 28 °C 水域中。每日產卵，取成功受精的卵放置於 24 孔盤中(JET Biofil)，每一孔放入十顆卵與 1 mL 馴養液體，每日換水以保持孔內環境。仔魚馴養時間為：一天內(暴露階段：72~96 hpf, hour post fertilization)或四天(暴露階段：4~100 hpf)後觀察各項指標，期間均無餵食。本實驗所使用之斑馬魚仔魚並不列入動物保護或福利之相關規範，但所有實驗程序皆參考台灣《動物保護法》相關規定。

### 二、馴養水體

本實驗銀離子之來源為硝酸銀(Silver nitrate, Sigma-Aldrich)，其在水中會解離出銀離子( $\text{Ag}^+$ )與硝酸根( $\text{HNO}_3^-$ )。實驗暴露濃度為 0、0.1 及 0.25 ppm。各組別暴露溶液配置方法為：以含有 0.5 mM NaCl、0.2 mM  $\text{CaSO}_4$ 、0.2 mM  $\text{MgSO}_4$ 、0.16 mM  $\text{KHPO}_4$ 、0.16 mM  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  之人工馴養水(Normal water, NW)做為控制組馴養水體。配置 1000 ppm  $\text{AgNO}_3$  溶液後，序列稀釋至所需濃度。酸組別與正常環境分別以 4-morpholineethanesulfonic acid (MES, Sigma，稀釋倍率為 1:100)或 4-morpholinepropanesulfonic acid (MOPS, Sigma，稀釋倍率為 1:100)做為緩衝溶液，以維持其環境 pH 值。最後以硝酸( $\text{HNO}_3$ )或氫氧化鈉( $\text{NaOH}$ )調整溶液酸鹼值至 pH 5 或 pH 7。

### 三、斑馬魚胚胎死亡率計算

斑馬魚胚胎暴露於含有 0、0.1 及 0.25 ppm AgNO<sub>3</sub> 之 pH 5 或 pH 7 環境七天 (0~7 dpf)，每日觀察其死亡率，並記錄其累積死亡率。本實驗以心跳停止評估個體是否死亡。

### 四、斑馬魚胚胎發育指標分析

斑馬魚胚胎進行體長及卵黃囊面積測量前，皆以 0.1 mg/L ethyl 3-aminobenzoate methanesulfonate (MS222) (tricaine, Sigma-Aldrich) 麻醉，利用裝有相機(ILCE-6300, Sony)之顯微鏡(Stemi 508 Oberkochen, Zeiss)拍攝。體長測量標準：由斑馬魚胚胎嘴連接至尾部末端；卵黃囊面積測量標準：以卵黃棒加上卵黃囊之區域，並不包含魚鰓。

耳石囊及耳石面積測量前，也先以 0.1 mg/L MS222 麻醉斑馬魚胚胎，再以裝有相機( $\alpha$  6300, Sony)之顯微鏡(BX51, Olympus)進行觀測。耳石囊(Otic vesicle)面積測量標準：斑馬魚耳石囊外圍，且皆以胚胎左側內耳之耳石囊進行觀察；耳石面積測量標準：測量矢狀耳石(Saccular otolith)之面積。

### 五、斑馬魚胚胎活體螢光染色

斑馬魚胚胎側線毛細胞及神經丘數量測量前，先浸泡於含有 3  $\mu$ M 之 FM1-43 (以 DMSO 配置 3 mM stock，使用前以 NW 稀釋 1000 倍，Molecular Probes, Eugene)進行染色 1.5 分鐘。

斑馬魚胚胎卵黃囊表皮離子細胞以 52  $\mu$ M Rhodamine 123 (以酒精配置 2.6 mM stock，使用前以 MS222 稀釋 50 倍，Sigma-Aldrich)進行染色 15 min。

離子細胞之氧化壓力程度以 5  $\mu$ M CellROX Green (CellROX, Thermo Fisher Scientific)與 1  $\mu$ M MitoTracker Red CM-H2Xros (MitoTracker, Thermo Fisher

Scientific)共染 15 分鐘。其 stock 濃度分別為 2.5 mM 以及 1 mM，使用前以 NW 稀釋 500 及 1000 倍。

斑馬魚胚胎卵黃囊之細胞凋亡訊號以 Acridine Orange hemi (zinc chloride) salt (AO, Sigma-Aldrich)為染劑。先配置成 27 mM stock 再以 NW 稀釋 1000 倍使用，染色 15 分鐘。

斑馬魚胚胎染色全程於室溫下避光操作，利用染劑染色後先以 NW 清洗三次後以 MS222 麻醉，再放置於玻片上觀察，並利用裝有相機(EOS 550D, Canon)之螢光顯微鏡(BX51, Olympus)進行拍攝。

## 六、免疫細胞組織染色 (Whole mount immunocytochemistry, ICC)

免疫細胞組織染色前須先以 PBST (PBST: 0.2 % Tween-20, 1.4 mM NaCl, 0.2 mM KCl, 0.1 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, and 0.002 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; pH 7.4)將胚胎表面清洗乾淨後，將斑馬魚胚胎放置於 Paraformaldehyde 4 % (P4, Sigma-Aldrich)固定 2 h，後序列遞增 25 %、50 %、75 % 至 95 % 乙醇。接著樣品以濃度梯度置換至 PBST 後清洗一次，並以 100 ml/L blocking solution (Roche)浸泡 2 h 以避免非專一性拮抗。再以 PBST 清洗一遍後加入 NKA 一級抗體(Mouse monoclonal anti-5 $\alpha$ , PBST 1:200 稀釋)或 HA 一級抗體(Killifish polyclonal anti-A subunit of H<sup>+</sup>-ATPase, PBST 1:200 稀釋)並且放置於 4 °C 冰箱至隔夜。接著以 PBST 清洗表面排除多餘一抗，後加入二級抗體 2 小時。NKA (Anti-mouse IgG H+L conjugated with Alexa Fluor 568, PBST 1:200 稀釋)，HA (Anti-rabbit IgG H+L conjugated with Alexa Fluor 488, PBST 1:200 稀釋)。實驗全程皆須放置於 shaker 搖晃，二抗後實驗步驟全程需避光操作。最後將樣本放置玻片上，利用裝有相機(EOS 550D, Canon)之螢光顯微鏡(BX51, Olympus)進行拍攝。

## 七、電感耦合電漿體質譜法 (Inductively coupled plasma mass spectrometry, ICP-MS)

將 4 dpf 斑馬魚胚胎以 Deuterium-depleted water (DDW) 清洗過後，每樣本內放置 3 隻胚胎。以 50  $\mu$ l 100 % 硝酸(J.T Baker)將樣本放置於 60°C 硝化。隔日加入 2450  $\mu$ l 之 DDW 稀釋至 2 %，再以 2 % 硝酸稀釋至不同濃度樣本(鈉、鈣稀釋比例為 10:25；銀離子組並無再稀釋)以維持其濃度於標準曲線內，且不會超過上機濃度上限(200 ppb)。上機標準曲線製備以鈉、鈣、銀離子校正液(Sigma-Aldrich)以 2 % 硝酸配置成 1000 ppb 濃度，再稀釋至 0、25、50、100 及 200 ppb(鈉、鈣校正曲線)或 0、0.001、0.1、1 及 10 ppb(銀校正曲線)。裝取各樣本之試管皆以 2 % 硝酸浸泡一周，以清除試管管壁上之鈉、鈣離子。最後以 ICP-MS 機器(Agilent 7800 ICP-MS)進行液體內離子濃度測定。

## 八、掃描式電子顯微鏡 (Scanning electron microscopy, SEM)

將樣本洗淨後浸泡於 P<sub>4</sub>G<sub>5</sub> (PBS-buffered 4 % paraformaldehyde-5 % glutaraldehyde) 中固定至隔日後以 PBS 洗淨，接下來浸泡於含有 2 % osmium tetroxide 之 0.1 M cacodylate buffer 中固定 2 h。再以 cacodylate buffer 沖洗後以乙醇將樣本脫水，接下來利用 K850 critical point drier (Quorum Technologies) 中液態二氧化碳進行乾燥。乾燥後樣本排列整齊並利用 vacuum evaporator (IB-2, Hitachi) 將其表層鍍上金-鈹絡合物，最後以 SEM 機器(S-2400, Hitachi) 做表皮細胞開口之觀察。

## 九、實驗數據分析

所有相片皆以 ImageJ 軟體(<http://imagej.nih.gov/ij/>)進行測量，包含長度、面積、細胞密度、螢光亮度等。測量後數值以 GraphPad Prism 7 軟體(<https://www.graphpad.com/>)進行統計。統計圖表皆以平均值 $\pm$ 標準誤差(Standard error of the mean, SEM)標示，以 Two-way ANOVA 進行分析。不同 pH 值環境間

比較達到統計顯著差異為  $p$  value 小於 0.05(#)、0.01(##)及 0.001(###)；同酸鹼值環境中不同  $\text{AgNO}_3$  濃度相較控制組達到統計顯著差異為  $p$  value 小於 0.05 (\*)、0.01(\*\*)及 0.001(\*\*\*)。



## 結果

### 結果一：96 小時處理對斑馬魚胚胎死亡率及發育之影響

#### 1-1：斑馬魚胚胎累積死亡率

每日累積死亡率紀錄於圖 1A 及 B。控制組在不同 pH 值環境中每日累積死亡率皆小於 20%。在 pH 7 環境的 0.1 ppm AgNO<sub>3</sub> 組別死亡率與控制組相近(圖 1A)，而 0.25 ppm AgNO<sub>3</sub> 組別在暴露 2 天後，其死亡率開始顯著上升，在第 4 天達到 40%，且在之後提升至 100%。

而 pH 5 環境下與 0.1 ppm AgNO<sub>3</sub> 在共暴露的前 4 天，其死亡率亦無顯著上升情形(圖 1B)。然而，在第 5 天後累積死亡率有隨時間顯著增長的趨勢，且在第 7 天達到 80%。而 0.25 ppm AgNO<sub>3</sub> 共處理組別，其累積死亡率上升幅度更大也更快，在暴露第 2 天即顯著增加，並持續到第 4 天。而第 5 天之後，其累積死亡率提升至接近 100%。

由此結果可知：斑馬魚胚胎可以順利地適應 pH 5 的環境，而死亡率會隨著銀離子濃度增加而升高。另外，在酸環境下較低濃度的銀離子暴露即可顯著增加胚胎死亡率。

#### 1-2：斑馬魚胚胎體長及卵黃囊面積

暴露 96 h 後觀察各組胚胎型態(圖 2A)，並測量體長(圖 2B)及卵黃囊面積(圖 2C)。由圖 2A 的型態圖片觀察，可發現控制組在不同酸鹼值環境下的體長及卵黃囊型態差異不大，而銀離子暴露後胚胎的體長有縮減以及卵黃囊增大的趨勢，且在 0.25 ppm AgNO<sub>3</sub> 組別最明顯。

由統計結果可得知 pH 7 環境中控制組的平均體長為 3.41 mm (圖 2B)，0.1 ppm AgNO<sub>3</sub> 之組別與控制組相比，體長有稍微下降的趨勢，而 0.25 ppm AgNO<sub>3</sub> 共暴露後使胚胎的平均體長顯著下降至 3.26 mm ( $p < 0.001$ )。相較之下，pH 5 控制組的平均體長為 3.48 mm，有較 pH 7 長的趨勢(圖 2B)。在 0.1 ppm AgNO<sub>3</sub> 共暴露

後導致體長顯著下降至 3.4 mm ( $p=0.0481$ )，而 0.25 ppm 組別下降幅度更為明顯，其平均體長下降至 3.18 mm ( $p<0.001$ )。總體來說，體長主要受到銀離子的影響(圖 2B)。而酸組別中胚胎體長下降的幅度較大，且在較低濃度之組別即達到顯著差異，表示酸環境會增加銀離子對斑馬魚胚胎體長的影響。

胚胎卵黃囊面積在統計後的結果顯示在圖 2C，其趨勢與體長不同。從統計圖可以得知 pH 7 環境中，控制組的卵黃囊平均面積為  $0.27 \text{ mm}^2$ ，在 0.1 ppm  $\text{AgNO}_3$  共暴露後其面積有稍微增加的趨勢，然並無達到顯著，而 0.25 ppm  $\text{AgNO}_3$  組別則有顯著增加( $p<0.001$ )。在 pH 5 環境卵黃囊面積變化趨勢與 pH 7 相似(圖 2C)，其控制組的平均面積為  $0.24 \text{ mm}^2$ ，在 0.1 ppm  $\text{AgNO}_3$  共暴露後導致胚胎卵黃囊面積顯著增加( $p=0.0176$ )，而 0.25 ppm  $\text{AgNO}_3$  共暴露後的增加幅度更大 ( $p<0.001$ )。有趣的是，在不同濃度硝酸銀組別中，酸環境的卵黃囊面積皆顯著小於 pH 7(圖 2C)。此結果表示銀離子濃度以及環境酸鹼值皆會影響卵黃囊。另外，酸環境中較低濃度的銀離子共暴露後即達到顯著差異，表示酸環境會增加銀離子對卵黃囊的影響。

### 1-3：斑馬魚胚胎耳石囊及耳石面積

在暴露 96 h 後觀察胚胎左側內耳型態(圖 3A)，並測量其耳石囊(圖 3B)及矢狀耳石面積(圖 3C)。由圖 3A 的型態照片可發現控制組在不同酸鹼值環境中的耳石囊及矢狀耳石型態差異不大，然而在銀離子暴露後，其耳石囊以及矢狀耳石的面積有縮小的趨勢，在 0.25 ppm  $\text{AgNO}_3$  組別最明顯，且耳石囊結構出現較鬆散的情形。

耳石囊面積量化後顯示於圖 3B。pH 7 環境下控制組的耳石囊平均面積為  $0.03 \text{ mm}^2$ ，在 0.1 ppm  $\text{AgNO}_3$  共處理後其面積有稍微下降的趨勢，然並無顯著差異，而 0.25 ppm  $\text{AgNO}_3$  組別則顯著下降至  $0.02 \text{ mm}^2$  ( $p<0.001$ )。相較之下，pH 5 組別的控制組耳石囊面積有較 pH 7 組別大的趨勢，然並無達到顯著差異。而 0.1 ppm  $\text{AgNO}_3$  共處理之面積顯著下降至  $0.029 \text{ mm}^2$  ( $p=0.0518$ )，在 0.25 ppm  $\text{AgNO}_3$  組別下降之趨勢更加明顯，其平均面積低至  $0.02 \text{ mm}^2$  ( $p<0.001$ )。在結果中可以發

現，耳石囊面積主要受到銀離子濃度之影響，而不同濃度硝酸銀組別中的 pH 5 及 pH 7 間並無顯著差異，顯示環境酸鹼值對耳石囊的影響較低。而值得注意的是，酸組別中胚胎的耳石囊面積在較低濃度之組別即顯著下降，表示酸環境會增加銀離子對斑馬魚胚胎耳石囊發育的影響。

在耳石的結果標示於圖 3C。在 pH 7 環境中的控制組面積約為  $0.003 \text{ mm}^2$ ，加入  $0.1 \text{ ppm AgNO}_3$  後導致面積顯著縮小，而  $0.25 \text{ ppm AgNO}_3$  組縮小的幅度更加明顯，其面積下降至  $0.001 \text{ mm}^2$ 。而 pH 5 環境中矢狀耳石的變化趨勢與 pH 7 類似，其控制組耳石面積與 pH 7 相比有稍大的趨勢，然並無顯著差異。在加入  $0.1 \text{ ppm AgNO}_3$  後矢狀耳石顯著縮小，而  $0.25 \text{ ppm AgNO}_3$  共暴露後導致縮小趨勢更加顯著，其面積甚至低於  $0.001 \text{ mm}^2$ 。由此結果可得知銀離子對耳石的影響較環境酸鹼值大。除此之外， $0.25 \text{ ppm AgNO}_3$  濃度中 pH 5 組的耳石面積顯著小於 pH 7 組 ( $p=0.0428$ )，顯示酸環境會加劇銀離子對於矢狀耳石的影響。

#### 1-4：斑馬魚胚胎側線神經丘及 L1 毛細胞數目

胚胎側線上的神經丘以 FM1-43 染劑進行標記(圖 4A 白色箭頭)，並觀察 L1 神經丘之毛細胞型態後(圖 4A L1 標示，放大後為圖 4B)，分別計算各組胚胎在暴露 96 h 後的側線神經丘數目(圖 4C)以及 L1 毛細胞數(圖 4D)。由圖 4B 可以觀察到控制組在酸環境中毛細胞數目較 pH 7 組低，而銀離子濃度亦會影響毛細胞數量。

而圖 4C 統計結果顯示 pH 7 環境中控制組的側線神經丘平均數目約為 10 個，在  $0.1 \text{ ppm AgNO}_3$  共暴露後顯著下降，而  $0.25 \text{ ppm AgNO}_3$  組別下降幅度更大 ( $p<0.001$ )。相較之下，pH 5 環境中控制組的側線神經丘數目低於 pH 7 ( $p=0.0161$ )，在  $0.1 \text{ ppm AgNO}_3$  共處理後有稍微降低的趨勢，然並無達到顯著。而  $0.25 \text{ ppm AgNO}_3$  共暴露後達到顯著。

而 L1 毛細胞數目的統計結果顯示於圖 4D。在 pH 7 環境之控制組 L1 毛細胞數目約為 10 顆， $0.1 \text{ ppm AgNO}_3$  共處理後並無顯著影響，而  $0.25 \text{ ppm AgNO}_3$  共暴露後其數目顯著下降 ( $p<0.001$ )。在 pH 5 環境中的控制組與 pH 7 相比有稍低之

趨勢，但並無顯著差異。而  $\text{AgNO}_3$  共處理之後皆導致毛細胞數目顯著下降 ( $p < 0.001$ )，值得注意的是，在 0.25 ppm  $\text{AgNO}_3$  與酸環境共暴露的組別，相較 pH 7 組別有稍低之趨勢。

由結果可得知銀離子會影響胚胎側線發育，而酸環境對側線神經丘的影響較毛細胞明顯。值得注意的是，在 pH 5 環境下較低濃度的銀離子即造成毛細胞數量顯著下降，表示酸環境會增加銀離子對毛細胞的影響。

## 結果二：96 小時處理對斑馬魚胚胎離子調控之影響

### 2-1：斑馬魚胚胎離子細胞頂膜開口面積

利用 SEM 技術觀察胚胎卵黃囊表面離子細胞開口型態(圖 5A)，並計算其開口面積(圖 5B)。在圖 5A 的型態照片中可以觀察到控制組在酸環境中開口面積較 pH 7 大，且開口變大的細胞皆為篩狀。然而在銀離子加入後，其開口面積有縮小的趨勢。

而圖 5B 的統計結果可得知：在 pH 7 環境中控制組開口面積約為  $20 \mu\text{m}^2$ ，而 0.1 及 0.25 ppm  $\text{AgNO}_3$  共處理後使開口面積顯著下降至 33 % 及 53 %。pH 5 環境中控制組的離子細胞開口面積為  $37.5 \mu\text{m}^2$ ，顯著較 pH 7 大 ( $p = 0.0019$ )，然而 0.1 及 0.25 ppm  $\text{AgNO}_3$  暴露使離子細胞開口顯著縮小至 22 % 及 21 % ( $p < 0.001$ )，且與 pH 7 組相近。

此結果可推知在酸環境中離子細胞頂膜開口會變大，而銀離子暴露後迫使開口縮小，影響離子細胞的排酸或離子調節功能。另外，酸組別的開口面積縮小幅度較多，表示銀離子在酸環境中造成的影響更大。

### 2-2：斑馬魚胚胎離子細胞型態及數目

利用 Rhodamine 123 染劑標定斑馬魚胚胎離子細胞，在觀察其型態(圖 6A)後以白色箭頭標示部分變形離子細胞，並計數各組細胞數目(圖 6B)及計算變形細胞

之比例(圖 6C)。在圖 6A 的部分，可以觀察到控制組的細胞型態為圓形，且在不同酸鹼值環境中的數目相近。而銀離子加入後，有部分離子細胞型態出現變異。且隨著濃度增加，離子細胞數目有減少的趨勢。

離子細胞數目計算結果顯示於圖 6B。數據顯示控制組的離子細胞數目在不同環境酸鹼值中並無顯著差異，且不論 pH 5 或 pH 7 環境中加入 0.1ppm 及 0.25 ppm AgNO<sub>3</sub> 皆會導致離子細胞數目顯著下降。而從圖 6C 可以得知控制組並無離子細胞型態變異，而隨著 AgNO<sub>3</sub> 濃度增加，其變形比例有顯著增高之趨勢，在不同酸鹼值環境中，0.1 ppm 及 0.25 ppm AgNO<sub>3</sub> 的變形比例皆接近 20% 及 50%。此結果表示離子細胞的數目及型態變化主要受到銀離子影響，而酸環境中對銀離子影響並無增加的趨勢。

### 2-3：斑馬魚胚胎 NaRC 細胞型態及數目

利用免疫細胞組織染色法標記 NaRC 後，觀察其細胞型態(圖 7A)並以紅色箭頭標示變形之細胞，再計算各組 NaRC 細胞數目(圖 7B)。從圖 7A 染色結果照片可以發現，控制組的細胞型態在不同酸鹼值環境中皆接近圓形，而 AgNO<sub>3</sub> 暴露會造成 NaRC 型態變異以及對細胞數目產生影響。

量化後結果顯示於圖 7B。pH 7 環境下 NaRC 數目在 0.1 ppm AgNO<sub>3</sub> 共暴露後顯著增加，而 0.25 ppm AgNO<sub>3</sub> 組別 NaRC 數目與控制組相近。在 pH 5 環境中控制組的 NaRC 細胞數目顯著高於 pH 7，而 0.1 ppm AgNO<sub>3</sub> 共暴露也會刺激其分化，且增加幅度更勝 pH 7 ( $p=0.0013$ )。然而，在 0.25 ppm AgNO<sub>3</sub> 共處理後其數目顯著下降，且較 pH 7 組更低( $p<0.001$ )。

由此結果可以推斷出：斑馬魚胚胎能藉由增加 NaRC 以適應酸環境，且低濃度銀離子亦會刺激 NaRC 的分化。然而，胚胎無法適應 0.25 ppm AgNO<sub>3</sub> 環境，導致其數目顯著下降，且此現象在酸環境中更加明顯，凸顯胚胎在酸及銀離子共暴露環境中適應的困難。

## 2-4：斑馬魚胚胎 HRC 細胞數目

利用免疫細胞組織染色技術標記 HR 細胞，觀察其形態(圖 8A)並測量其細胞數目(圖 8B)。由圖 8A 的型態結果可以發現，在酸環境中 HRC 的數目有較多的趨勢，而在不同酸鹼值環境中加入銀離子皆會導致 HRC 數目下降，且出現訊號破碎情形(白色箭頭)，然並無細胞型態變異之狀況出現。

而圖 8B 量化的結果顯示，pH 7 環境中 0.1 ppm 與 0.25 ppm  $\text{AgNO}_3$  共暴露後，皆導致細胞數目顯著下降。而 pH 5 環境中控制組的 HRC 細胞數目顯著較 pH 7 多( $p < 0.001$ )，在 0.1 ppm  $\text{AgNO}_3$  共處理後，其細胞數有降低的趨勢，然並無達到顯著差異。然而，在 0.25 ppm  $\text{AgNO}_3$  共暴露後其數目顯著下降，且較 pH 7 組更少( $p = 0.0049$ )。此結果指出酸環境會刺激斑馬魚胚胎 HRC 分化，而銀離子濃度會影響其細胞數目，且在酸環境下產生的危害更大。

## 2-5：斑馬魚胚胎體內銀、鈉及鈣離子含量

以 ICP-MS 技術測量各組胚胎體內銀(圖 9A)、鈉(圖 9B)及鈣離子(圖 9C)含量。銀離子含量結果顯示控制組中並無銀離子的存在，而在不同酸鹼值環境中加入 0.1 ppm 及 0.25 ppm  $\text{AgNO}_3$  後，胚胎體內銀離子累積量隨之上升。值得注意的是，在 pH 7 環境中胚胎銀離子的累積量有較高的趨勢。

鈉離子含量結果則呈現於圖 9B。pH 7 環境中的鈉離子含量在 0.1 ppm  $\text{AgNO}_3$  共暴露後顯著減少，且 0.25 ppm  $\text{AgNO}_3$  組別下降的幅度更大( $p < 0.001$ )。而 pH 5 環境中控制組的鈉離子含量與 pH 7 組相比並無顯著差異，在加入 0.1 ppm  $\text{AgNO}_3$  共暴露後並無顯著影響，然而，0.25 ppm  $\text{AgNO}_3$  共處理後導致鈉含量顯著減少( $p < 0.001$ )，且較 pH 7 有稍低的趨勢。

而鈣離子含量結果呈現於圖 9C。pH 7 環境的鈣含量在  $\text{AgNO}_3$  暴露後皆有下降的趨勢，然與控制組比並無顯著差異。而 pH 5 環境中控制組鈣含量較 pH 7 稍低，在 0.1 ppm  $\text{AgNO}_3$  暴露後亦出現下降的趨勢，值得注意的是：在 0.25 ppm

AgNO<sub>3</sub> 共暴露後，造成鈣離子含量顯著下降，且相較 pH 7 組別顯著更低 (p=0.0072)。

由 ICP-MS 結果可以推知：胚胎體內銀離子累積量會隨 AgNO<sub>3</sub> 濃度增加，且在 pH 7 環境下更為明顯。而胚胎鈉離子含量會受到銀離子濃度的影響而降低。最後，銀離子對胚胎鈣離子含量之影響較不明顯，但在酸環境中有加劇的情形。

### 結果三：30 分鐘及 2 小時處理胚胎離子細胞之變化

#### 3-1：30 分鐘處理對斑馬魚胚胎離子細胞之變化

將 72 hpf 斑馬魚胚胎暴露於各組別 30 分鐘，以 Rhodamine 123 標定卵黃囊離子細胞，觀察其型態及數目變化；以 CellROX 與 MitoTracker 共染，以標定具氧化壓力之離子細胞，並由 CellROX 螢光訊號數目及強度評估其氧化壓力程度；以 AO 標定細胞凋亡訊號，並計算其細胞凋亡訊號數目。圖 11A 的 CellROX 及 MitoTracker 共染照片可以發現，CellROX 訊號(綠色)皆與 MitoTracker 訊號(紅色)重疊(Merge 圖片中之白色箭頭)。為避免圖片過於雜亂，所有氧化壓力相關照片皆以 CellROX 染色結果呈現。

結果顯示，斑馬魚胚胎離子細胞型態於 30 分鐘暴露後並無明顯變化，而銀離子會造成其數目下降(圖 10A)。量化後的結果顯示於圖 10B。在 pH 7 環境中加入 0.1 ppm AgNO<sub>3</sub> 會使其數目有減少的趨勢，但與控制組相比並無顯著差異。而 0.25 ppm AgNO<sub>3</sub> 共暴露後細胞數目顯著下降，且較酸組別更低(p=0.0024)。在 pH 5 環境下控制組的細胞數目有較 pH 7 組高之趨勢，然而，在 0.1 ppm AgNO<sub>3</sub> 共暴露後即顯著減少，且下降幅度在 0.25 ppm AgNO<sub>3</sub> 組別更加明顯(p<0.001)。

暴露 30 分鐘後 CellROX 染色結果顯示於圖 11B，隨著銀離子濃度增加，其訊號的亮度及數目有上升之趨勢。而將各組離子細胞的氧化壓力程度量化後呈現於圖 11C。由結果可知暴露 30 分鐘後，控制組於不同酸鹼值環境中的平均氧化壓力程度相近。在 pH 7 環境中加入 0.1 ppm AgNO<sub>3</sub> 顯著增加離子細胞的氧化壓力程度(p=0.0015)，而 0.25 ppm AgNO<sub>3</sub> 共處理後增加趨勢更加明顯(p<0.001)。而在 pH

5 環境中的結果與 pH 7 組相似，0.1 及 0.25 ppm AgNO<sub>3</sub> 共暴露後，離子細胞的氧化壓力程度皆顯著上升。

圖 12A 呈現暴露 30 分鐘後 AO 染色結果。由圖片可知在銀離子共處理後，有增加細胞凋亡訊號數目的趨勢。而在量化後發現控制組 AO 訊號數目在不同酸鹼值環境間差異不大，且在 AgNO<sub>3</sub> 共處理後 pH 5 及 pH 7 組都沒有顯著增加(圖 12B)。

由以上結果可得知：暴露於銀離子環境 30 分鐘已經導致離子細胞氧化壓力程度顯著增加(圖 11B)，雖然無明顯細胞凋亡的訊號(圖 12B)，但已造成離子細胞損傷(圖 10B)。而在 30 分鐘內，環境酸鹼值對離子細胞數目、氧化壓力及細胞凋亡程度並無顯著影響，也沒有加劇銀離子影響的趨勢。

### 3-2：2 小時處理對斑馬魚胚胎離子細胞之變化

將 72 hpf 斑馬魚胚胎暴露於各組別 2 小時，以 Rhodamine 123 標定離子細胞，並觀察其型態(圖 13A)及數目變化(圖 13B)；以 CellROX 標定具氧化壓力之細胞(圖 14A)並量化氧化壓力程度(圖 14B)；以 AO 標定細胞凋亡訊號(圖 15A)並計算其數目(圖 15B)。

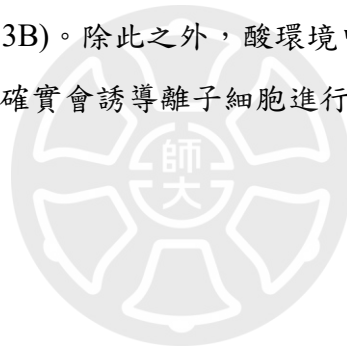
結果顯示，2 小時暴露後胚胎離子細胞型態並未產生變異(圖 13A)，而 0.25 ppm AgNO<sub>3</sub> 組胚胎卵黃囊表面出現破損的情形(圖 13A 白色箭頭)。而量化後呈現於圖 13B，由結果可知：暴露於酸環境 2 小時即會刺激離子細胞數目增加，導致其顯著較 pH 7 組別多( $p < 0.001$ )。在 pH 7 環境中加入 0.1 及 0.25 ppm AgNO<sub>3</sub> 皆使其細胞數目顯著下降，且在 0.25 ppm 組別中細胞數目較 pH 5 組低。而 pH 5 環境中之趨勢與 pH 7 相似，加入 0.1 及 0.25 ppm AgNO<sub>3</sub> 共暴露皆使其細胞數目顯著下降。

CellROX 染色結果呈現於圖 14A。在銀離子共暴露的組別，訊號數目及訊號亮度有減低的情形。而其量化結果呈現於圖 14B。從結果可得知：控制組的氧化壓力程度在不同酸鹼值環境中並無顯著差異。pH 7 環境中加入 0.1 ppm 及 0.25

ppm AgNO<sub>3</sub> 後，其氧化壓力有下降的趨勢。而 pH 5 環境下氧化壓力程度變化與 pH 7 相似，在 0.1 ppm 及 0.25 ppm AgNO<sub>3</sub> 共處理後，其氧化壓力程度皆顯著下降。

AO 染色結果顯示於圖 15A，在銀離子共暴露後細胞凋亡訊號有增加的趨勢。而量化後的結果呈現於圖 15B。由結果可知控制組的細胞凋亡程度在不同酸鹼值環境中並無顯著差異，在 pH 7 環境中 AgNO<sub>3</sub> 共處理並無顯著影響。而 pH 5 環境中 AgNO<sub>3</sub> 共處理後，AO 訊號有增加的趨勢，且在 0.25 ppm AgNO<sub>3</sub> 達到顯著( $p < 0.001$ )。

由以上結果可知：暴露於銀離子環境 2 小時後，離子細胞的氧化壓力程度已下降(圖 14B)，且細胞凋亡訊號尚未增加(圖 15B)，然而，其離子細胞損害程度較暴露 30 分鐘更加明顯(圖 13B、10B)。另外，在這個時間點，酸環境已經刺激斑馬魚胚胎離子細胞分化(圖 13B)。除此之外，酸環境中率先出現細胞凋亡程度顯著上升的情形，顯示銀離子確實會誘導離子細胞進行細胞凋亡，並且在酸環境中更加明顯。



## 討論

### 銀離子對斑馬魚胚胎死亡率之影響

本研究證實銀離子會造成斑馬魚胚胎死亡，且其影響程度隨著銀離子濃度上升而增加。其中，可以發現 0.25 ppm AgNO<sub>3</sub> 組別的死亡率在受精後第 2 天開始顯著增加，並第 5 天大幅上升。此結果表示暴露前 4 天內銀離子的影響會隨時間增加，且在暴露過程中胚胎受損程度會持續累積，導致第 5 天的胚胎無法繼續適應環境而死亡。而從結果中亦可以得知：酸環境(pH 5)並不會顯著增加胚胎死亡，但在酸環境中加入較低濃度的銀離子共暴露時，在受精後第 5 天胚胎死亡率顯著增加的情形，表示酸環境會增加銀離子對斑馬魚胚胎的致死性影響。

而 0.25 ppm AgNO<sub>3</sub> 組別的胚胎在暴露第 4 天後大量死亡，因此本研究的實驗設計著重於前 4 天內銀離子對胚胎的影響，試圖解釋銀離子可能的致死原因。另外，為了訂定實驗濃度，本研究亦嘗試 0.5 ppm AgNO<sub>3</sub> 的暴露濃度，發現在受精後第 1 天的死亡率已超過 40 % 且在第 4 天全數死亡，導致無法收取胚胎樣本。因此，本研究挑選 0.1 及 0.25 ppm AgNO<sub>3</sub> 作為銀離子的暴露濃度，觀察暴露 4 天對胚胎的影響。

### 銀離子對斑馬魚胚胎發育之影響

胚胎體長是重要的發育指標，較短的體長代表胚胎的發育速度較慢，可能導致胚胎趨於劣勢(Hoare et al., 2000; Polverino et al., 2016)。而本研究結果發現暴露銀離子環境組別的胚胎體長較短，且隨著濃度增加有更短的趨勢，表示銀離子會減低胚胎發育速度。先前研究顯示，當環境酸鹼值降至 pH 4 時會顯著降低斑馬魚胚胎體長(Lin et al., 2019)。而本研究將胚胎暴露於 pH 5 環境，發現胚胎體長並無顯著變化。然而，在酸環境中較低濃度銀離子組別即出現體長較短的情形，意味著酸環境會增加銀離子對胚胎發育的影響。

而卵黃囊是魚類在胚胎時期主要的營養來源(Gawlicka et al., 2000; Moran Jr, 2007)，其吸收速率會影響胚胎發育(Fraher et al., 2016)，且卵黃囊異常可能會導致

魚類疾病(Sant and Timme-Laragy, 2018)。在本研究中發現銀離子暴露組別的卵黃囊較大，且其面積隨著濃度升高而增加。此結果表示銀離子會降低胚胎的卵黃吸收速率，進而減緩胚胎發育。特別的是：卵黃囊大小面積在 pH 5 組中皆比較小，表示酸環境可能會增加胚胎的代謝速率，但此推測尚無直接證據，需進行進一步的驗證。而在酸環境中加入銀離子後，較低濃度的銀即可顯著增加卵黃囊面積，表示酸環境中會加重銀離子對胚胎發育的影響。

### 銀離子對斑馬魚胚胎聽覺系統及側線系統之影響

斑馬魚的耳石與許多生理功能有關，包含感覺聲音、重力及維持肌肉協調等。耳石是由碳酸鈣和膠狀基質沉澱形成的生化礦物結晶(Pannella, 1971)，其體積會持續增加至特定的年紀，並會隨著魚類的年齡而改變形狀(Whitfield et al., 2002)。在本研究中銀離子暴露組別的耳石囊及耳石面積較小，表示銀離子會阻礙胚胎內耳的發育。而在酸環境中會增加低濃度銀離子對耳石囊的影響，且耳石縮小的幅度較 pH 7 環境更加明顯，這些結果皆支持酸環境會增加銀離子對胚胎內耳系統的危害。

斑馬魚側線系統與魚類的聽覺有關，和魚類的內耳系統相同，皆能感受水波(Higgs and Radford, 2013)。在斑馬魚側線上有神經丘，而這些神經丘是由毛細胞組成。神經丘及毛細胞數量的減少會降低斑馬魚對於環境的偵測能力，進而影響生存。本研究結果發現銀離子暴露導致胚胎神經丘及毛細胞數目顯著下降，表示銀離子會阻礙胚胎側線發育。而 pH 5 環境也會造成胚胎的神經丘數目下降，且增加低濃度銀離子對毛細胞的損害，證實酸環境與銀離子共處理對胚胎側線系統有加成性危害。

### 銀離子降低斑馬魚胚胎的酸適應功能

本研究發現酸環境會刺激胚胎離子細胞開口面積增加，表示胚胎會透過調節開口面積增加排酸功能。然而，銀離子暴露導致離子細胞開口面積顯著縮減，雖

然在暴露後 pH 5 及 pH 7 組間面積的並無顯著差異，但與控制組相比酸環境中開口面積下降的幅度更大，表示酸環境中銀離子對胚胎的影響更嚴重。而酸環境中斑馬魚胚胎也會藉由刺激離子細胞分化，以增加相關的排酸及離子調節功能。然而，銀離子暴露後會導致離子細胞損傷，造成細胞數目下降，進而降低胚胎在酸環境中的適應力。

而藉由免疫細胞抗體染色法結果可以得知酸環境會刺激 NaRC 分化，表示胚胎需要增加鈣離子吸收。在低濃度的銀暴露後，NaRC 也有增加的情形，且在酸環境中增加的幅度更大，表示胚胎需要分化出更多的 NaRC 以適應環境。然而，在 0.25 ppm AgNO<sub>3</sub> 組別中 NaRC 的數目不僅沒有上升，更在酸環境中顯著下降，代表胚胎已經無法藉由增加 NaRC 適應此濃度銀離子所造成的傷害。

另外，本研究也證實酸環境中胚胎會藉由刺激 HRC 的分化以增加排酸，驗證 Horng 等人的研究結果(Horng et al., 2009)。而銀離子暴露會導致 HRC 數目減少，造成胚胎的排酸功能降低，進而阻礙胚胎適應酸環境。

### 不同酸鹼值環境中銀離子累積量的差異

根據先前的研究，銀離子會藉由虹鱒魚鰓上的鈉氫交換蛋白進入魚體內(Bury and Wood, 1999)。斑馬魚胚胎 HRC 上表現的 NHE 為鈉離子通道蛋白，在本研究中發現銀離子會導致 HRC 數目顯著下降，且其下降幅度比 NaRC 大，表示銀離子可能是藉由 NHE 進入魚體，並連帶造成 HRC 的損害。

先前研究發現酸環境中 HRC 頂膜上 HA 的增加會伴隨著 NHE 表現量下降(Yan et al., 2007)，因此酸環境中 NHE 表現量可能較低，加上銀離子導致的 HRC 數目下降與頂膜開口大幅度縮減，會導致離子細胞上的鈉離子通道數量減少，降低酸環境組別中銀離子進入的機會，造成其銀離子累積量較低。另外，酸環境也可能會刺激胚胎的金屬代謝速率，導致銀離子的排出量增加，但此推測尚無直接的證據，需要日後研究進行更深入的探討。

本研究發現酸環境中銀離子累積量較低，但在各項發育指標及離子調節功能結果，酸與銀離子共暴露組別的影響有較嚴重的趨勢，且在死亡率結果中，酸環境會增加銀離子的致死性。表示酸環境下對胚胎已經造成壓力，與銀離子共暴露的環境更不利於胚胎生存，也顯示出體內銀累積量的多寡，不能直接代表胚胎實際的損害程度。

## 銀離子對 NaRC 及 HRC 影響之差異

離子細胞是由幹細胞(Ionocyte progenitor cell)分化而成(Chang and Hwang, 2011)，在發育前期 *foxi3a* (*Forkhead-box I transcription factor*) 基因的表現是離子細胞幹細胞的特徵之一(Hsiao et al., 2007)，而 *gcm2* (*Glial cell missing 2*) 基因的表現與否影響了 HRC 或 NaRC 的特化(Chang et al., 2009)。在本實驗中發現銀離子會使離子細胞數目顯著下降，表示銀離子可能會抑制離子細胞的分化，但詳細的機制目前尚不清楚。

本研究中發現銀離子對於 NaRC 及 HRC 的影響程度不同。從結果可以得知 pH 7 環境中低濃度銀離子共暴露後，HRC 的數目即大幅減少，表示 HRC 對於銀離子的敏感度高。有趣的是，HRC 在酸環境中與低濃度銀離子共暴露後，對 HRC 數目並無造成影響，顯示酸環境刺激 HRC 分化的路徑，與銀離子造成 HRC 損害的路徑可能是不同的。另外，這些暴露在銀離子環境中的 HRC 是否仍然具有排酸或離子調節的功能，仍須進一步的驗證。

先前研究指出奈米銀會導致斑馬魚胚胎離子細胞變形(deformed) (Lee et al., 2019)。本研究發現銀離子亦會刺激離子細胞變形，且其變形比例會隨銀離子濃度增加而上升，表示銀離子是奈米銀造成細胞變形的主因。另外，本研究也利用免疫細胞組織染色法證實變形的細胞為 NaRC。這些細胞變異的情形可能是為了增加 NaRC 的接觸面積，以彌補銀離子造成的鈣離子流失。然而，在銀離子暴露的組別中，胚胎鈣離子含量有下降的趨勢，表示這些變形的細胞可能喪失了部分的鈣吸收功能。

## 銀離子阻礙斑馬魚胚胎的鈉及鈣離子吸收功能

本研究發現銀離子會降低胚胎鈉離子含量，且下降的程度隨著銀離子濃度升高而增加，而 pH 5 的酸環境對胚胎的鈉離子含量並無顯著影響，且並無增加銀離子影響的趨勢。斑馬魚胚胎 HRC 上表現的 NHE 蛋白為鈉離子吸收的途徑之一。因此，銀離子導致的 HRC 細胞減少，會導致鈉離子通道數目下降，可能是暴露銀離子後胚胎鈉離子含量降低的原因。

胚胎的鈣離子含量在銀離子暴露後也有下降的趨勢，且在酸環境中達到顯著，表示酸環境會增加銀離子對胚胎鈣離子調節功能的損害。斑馬魚胚胎的 NaRC 是負責吸收鈣的離子細胞，銀離子暴露會導致 NaRC 細胞數目減少，可能是胚胎鈣離子含量下降的原因。而魚體內鈣離子含量下降，會導致胚胎耳石形成不易，呼應耳石的實驗結果。從結果中可以推知，藉由損害離子調節功能造成離子失衡，會是銀離子導致胚胎死亡的主因之一。

## 銀離子增加離子細胞氧化壓力誘導細胞凋亡

CellROX 常用於偵測離體細胞內的 ROS，包含氧離子、過氧化物和含氧自由基等(Davison et al., 2013; Liu et al., 2014; Okamura et al., 2014)。由 CellROX 與 MitoTracker 共染結果中可觀察到 ROS 訊號主要位於離子細胞的細胞核，且大量與 MitoTracker 訊號重疊，表示氧化壓力確實由離子細胞產生。而在實驗過程中，不同時間點下控制組的 CellROX 染色數目及螢光強度不一致，表示絕對定量結果無法直觀地比較不同時間點的變化差異。因此本實驗採取相對定量的方式，以 pH 7 控制組為基準進行比較，可較客觀地觀察各組氧化壓力程度變化。

AO 則是常用的細胞凋亡染劑(Mirrett, 1982)，其能鑲嵌在鹼基對之間。當細胞進行細胞凋亡時，其細胞核的 DNA 會斷裂(Bortner et al., 1995)，因此可以利用 AO 標定正在進行細胞凋亡的細胞。目前 AO 使用的範圍很廣，從植物、癌細胞到病毒等實驗都可以運用(Ciniglia et al., 2010; Liu et al., 2015; Mirrett, 1982; Vasconcelos and Lam, 1994)。

本研究探討 30 分鐘及 2 小時的銀離子暴露對離子細胞的連續性變化，發現在 30 分鐘內細胞氧化壓力程度顯著增加，並造成離子細胞數目下降，然而並未觀察到 AO 訊號增加的情形。而 2 小時暴露後細胞數目下降幅度更大，且細胞凋亡訊號有增加的趨勢。此結果表示胚胎剛暴露到銀離子環境中，會立刻導致氧化壓力上升，並造成細胞粒線體受損，而細胞凋亡訊號需要更久的時間才會逐漸增加，證實銀離子導致的氧化壓力確實會誘導離子細胞進行細胞凋亡。

本研究預期隨著時間增加，細胞的氧化壓力程度以及細胞凋亡訊號皆會上升，然而實驗結果顯示 CellROX 訊號在暴露 2 小時後下降，與本研究的預期不符，可能是細胞為了避免受損而啟動抗氧化機制以抗衡，或是部分細胞已經死亡導致無法偵測其氧化壓力訊號。儘管如此，此結果仍可證實銀離子會導致細胞氧化壓力程度增加。

從免疫細胞組織染色的結果中可知 HRC 在暴露銀離子後，其數量會大幅下降，而 NaRC 則會先增加再減少，表示銀離子對兩型離子細胞的損害機制可能不同。而從本研究結果中，並無法得知銀離子所造成的氧化壓力是否在不同型離子細胞上具有差異，因此需要後續的實驗證實：由銀離子所增加的氧化壓力是否會在特定一型離子細胞上出現，以做更深入的理解。

在暴露 2 小時後，酸組別出現細胞凋亡訊號顯著上升的情形，表示短時間暴露下，酸環境與銀離子會導致更多離子細胞進行凋亡。而銀離子累積量在此暴露時間內，不同酸鹼值環境下可能尚未出現差異。另外，在本研究中 AO 訊號的增加幅度較小，可能因為此染劑標定的是早期凋亡細胞，無法代表所有正在進行細胞凋亡的離子細胞，導致 AO 訊號數目無法符合離子細胞的減少量，但仍符合銀離子會誘導離子細胞進行細胞凋亡之假說。

## 環境的意義

奈米銀材料在近年來被大量使用，有研究估計從 2010 開始，每年產生的奈米銀產品至少超過三百噸，且有逐年上升的趨勢(Pulit-Prociak and Banach, 2016)，表示隨著時間增加，銀離子在環境中的汙染狀況會更加嚴重。Blaser 等人在 2008

年的調查指出：河川內的河床及水中皆有銀存在(Blaser et al., 2008)，代表淡水水域環境已經遭到銀離子汙染。而目前大多是針對工業廢水中的銀進行排除，阻止其進入環境，且因為銀並不容易從環境中移除，導致水生生物可能長期暴露於有銀存在的環境中。而本研究結果顯示水域環境中的銀會影響水生生物的發育，並且損害魚類離子調節功能，凸顯討論銀離子環境汙染議題的急迫性。

另外，因應全球環境變化，本研究觀察酸環境(pH 5)對魚類胚胎的影響。研究結果發現斑馬魚胚胎發育指標大多正常，表示胚胎可以順利地適應此環境。然而，酸環境會增加銀離子的發育危害，且銀離子的存在會嚴重影響魚類的酸適應機制，造成胚胎難以順利成長。而此結果顯示環境危害具有加成性，表示未來的環境監測可能需要考慮多個環境變因是否會互相影響，及對生物是否有加成危害性，以訂定更嚴謹、周全的標準。



## 結論

綜上所述，本研究利用斑馬魚為水生生物模式，觀察 pH 5 及 pH 7 環境中銀離子毒性的差異。本研究發現銀離子影響魚類胚胎的體長及卵黃囊大小，且影響程度在酸環境中會更加明顯。此外，銀離子損害胚胎內耳系統及側線系統，造成胚胎對環境的偵測能力下降，且在酸環境中的損害程度更加明顯。另外，斑馬魚胚胎為了適應環境酸化，會增加離子細胞開口及數目，然而銀離子暴露造成離子頂膜開口縮減及細胞數目下降，阻礙胚胎排酸及離子調節，進而增加胚胎酸適應的困難性。本研究亦發現酸環境下會刺激 NaRC 及 HRC 數目增加，而銀離子會導致這兩型細胞的傷害，導致胚胎體內的鈉與鈣離子含量降低，進而造成危害。最後，本研究藉由連續性的觀察發現暴露 30 分鐘後離子細胞氧化壓力程度上升，而細胞凋亡訊號在 2 小時才增加，證實銀離子會藉由增加氧化壓力誘導細胞凋亡。



## 參考文獻

- Ahamed, M., AlSalhi, M.S., Siddiqui, M., 2010.** Silver nanoparticle applications and human health. *Clinica chimica acta* 411, 1841-1848.
- Ale, A., Bacchetta, C., Rossi, A.S., Galdopórpora, J., Desimone, M.F., Fernando, R., Gervasio, S., Cazenave, J., 2018.** Nanosilver toxicity in gills of a neotropical fish: Metal accumulation, oxidative stress, histopathology and other physiological effects. *Ecotoxicology and environmental safety* 148, 976-984.
- Alexander, J.W., 2009.** History of the medical use of silver. *Surgical infections* 10, 289-292.
- Apel, K., Hirt, H., 2004.** Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu. Rev. Plant Biol.* 55, 373-399.
- Asharani, P., Wu, Y.L., Gong, Z., Valiyaveetil, S., 2008.** Toxicity of silver nanoparticles in zebrafish models. *Nanotechnology* 19, 255102.
- Bacchetta, C., Ale, A., Simoniello, M.F., Gervasio, S., Davico, C., Rossi, A.S., Desimone, M.F., Poletta, G., López, G., Monserrat, J.M., 2017.** Genotoxicity and oxidative stress in fish after a short-term exposure to silver nanoparticles. *Ecological Indicators* 76, 230-239.
- Bar-Ilan, O., Albrecht, R.M., Fako, V.E., Furgeson, D.Y., 2009.** Toxicity assessments of multisized gold and silver nanoparticles in zebrafish embryos. *Small* 5, 1897-1910.
- Beamish, R.J., Harvey, H.H., 1972.** Acidification of the La Cloche Mountain Lakes, Ontario, and resulting fish mortalities. *Journal of the Fisheries Board of Canada* 29, 1131-1143.
- Bhang, S.H., Han, J., Jang, H.-K., Noh, M.-K., La, W.-G., Yi, M., Kim, W.-S., Kwon, Y.K., Yu, T., Kim, B.-S., 2015.** pH-triggered release of manganese from MnAu nanoparticles that enables cellular neuronal differentiation without cellular toxicity. *Biomaterials* 55, 33-43.
- Bignami, S., Enochs, I.C., Manzello, D.P., Sponaugle, S., Cowen, R.K., 2013.** Ocean acidification alters the otoliths of a pantropical fish species with implications for sensory function. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110, 7366-7370.
- Bilberg, K., Malte, H., Wang, T., Baatrup, E., 2010.** Silver nanoparticles and silver nitrate cause respiratory stress in Eurasian perch (*Perca fluviatilis*). *Aquatic Toxicology* 96, 159-165.
- Blaser, S.A., Scheringer, M., MacLeod, M., Hungerbühler, K., 2008.** Estimation of cumulative aquatic exposure and risk due to silver: contribution of nano-functionalized plastics and textiles. *Science of the total environment* 390, 396-409.

- Bortner, C.D., Oldenburg, N.B., Cidlowski, J.A., 1995.** The role of DNA fragmentation in apoptosis. *Trends in cell biology* 5, 21-26.
- Bouwman, A.F., Van Vuuren, D.P., Derwent, R.G., Posch, M., 2002.** A Global Analysis of Acidification and Eutrophication of Terrestrial Ecosystems. *Water, Air, and Soil Pollution* 141, 349-382.
- Brauner, C., Wood, C., 2002.** Ionoregulatory development and the effect of chronic silver exposure on growth, survival, and sublethal indicators of toxicity in early life stages of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Journal of Comparative Physiology B* 172, 153-162.
- Briggs, J.P., 2002.** The zebrafish: a new model organism for integrative physiology. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 282, R3-R9.
- Bury, N.R., Wood, C.M., 1999.** Mechanism of branchial apical silver uptake by rainbow trout is via the proton-coupled Na<sup>+</sup> channel. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 277, R1385-R1391.
- Butler, J.M., Maruska, K.P., 2016.** The mechanosensory lateral line system mediates activation of socially-relevant brain regions during territorial interactions. *Frontiers in behavioral neuroscience* 10, 93.
- Carvalho, C., Fernandes, M., 2006.** Effect of temperature on copper toxicity and hematological responses in the neotropical fish *Prochilodus scrofa* at low and high pH. *Aquaculture* 251, 109-117.
- Chae, Y.J., Pham, C.H., Lee, J., Bae, E., Yi, J., Gu, M.B., 2009.** Evaluation of the toxic impact of silver nanoparticles on Japanese medaka (*Oryzias latipes*). *Aquatic toxicology* 94, 320-327.
- Chang, W.-J., Horng, J.-L., Yan, J.-J., Hsiao, C.-D., Hwang, P.-P., 2009.** The transcription factor, glial cell missing 2, is involved in differentiation and functional regulation of H<sup>+</sup>-ATPase-rich cells in zebrafish (*Danio rerio*). *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 296, R1192-R1201.
- Chang, W.J., Hwang, P.P., 2011.** Development of zebrafish epidermis. *Birth Defects Research Part C: Embryo Today: Reviews* 93, 205-214.
- Choi, J.E., Kim, S., Ahn, J.H., Youn, P., Kang, J.S., Park, K., Yi, J., Ryu, D.-Y., 2010.** Induction of oxidative stress and apoptosis by silver nanoparticles in the liver of adult zebrafish. *Aquatic Toxicology* 100, 151-159.
- Chung, W.-S., Marshall, N.J., Watson, S.-A., Munday, P.L., Nilsson, G.E., 2014.** Ocean acidification slows retinal function in a damselfish through interference with GABAA receptors. *Journal of Experimental Biology* 217, 323-326.

- Ciniglia, C., Pinto, G., Sansone, C., Pollio, A., 2010.** Acridine orange/Ethidium bromide double staining test: A simple In-vitro assay to detect apoptosis induced by phenolic compounds in plant cells. *Allelopathy J* 26, 301-308.
- Cripps, I.L., Munday, P.L., McCormick, M.I., 2011.** Ocean acidification affects prey detection by a predatory reef fish. *Plos one* 6, e22736.
- Davison, C.A., Durbin, S.M., Thau, M.R., Zellmer, V.R., Chapman, S.E., Diener, J., Wathen, C., Leevy, W.M., Schafer, Z.T., 2013.** Antioxidant enzymes mediate survival of breast cancer cells deprived of extracellular matrix. *Cancer research* 73, 3704-3715.
- Devine, B.M., Munday, P.L., Jones, G.P., 2012.** Homing ability of adult cardinalfish is affected by elevated carbon dioxide. *Oecologia* 168, 269-276.
- Dymowska, A.K., Hwang, P.-P., Goss, G.G., 2012.** Structure and function of ionocytes in the freshwater fish gill. *Respiratory physiology & neurobiology* 184, 282-292.
- Edition, F., 2011.** Guidelines for drinking-water quality. *WHO chronicle* 38, 104-108.
- Elmore, S., 2007.** Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicologic pathology* 35, 495-516.
- Fabrega, J., Luoma, S.N., Tyler, C.R., Galloway, T.S., Lead, J.R., 2011.** Silver nanoparticles: behaviour and effects in the aquatic environment. *Environment international* 37, 517-531.
- Favre-Bulle, I.A., Taylor, M.A., Marquez-Legorreta, E., Vanwalleghem, G., Poulsen, R.E., Rubinsztein-Dunlop, H., Scott, E.K., 2020.** Sound generation in zebrafish with Bio-Opto-Acoustics. *Nature communications* 11, 1-8.
- Ferrari, M.C., McCormick, M.I., Munday, P.L., Meekan, M.G., Dixon, D.L., Lönnstedt, O., Chivers, D.P., 2012.** Effects of ocean acidification on visual risk assessment in coral reef fishes. *Functional Ecology* 26, 553-558.
- Finkel, T., 2003.** Oxidant signals and oxidative stress. *Current opinion in cell biology* 15, 247-254.
- Fraher, D., Sanigorski, A., Mellett, N.A., Meikle, P.J., Sinclair, A.J., Gibert, Y., 2016.** Zebrafish embryonic lipidomic analysis reveals that the yolk cell is metabolically active in processing lipid. *Cell reports* 14, 1317-1329.
- Franca, R.D.G., Pinheiro, H.M., Lourenço, N.D., 2020.** Recent developments in textile wastewater biotreatment: dye metabolite fate, aerobic granular sludge systems and engineered nanoparticles. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology* 19, 149-190.
- Freda, J., McDonald, D., 1988.** Physiological correlates of interspecific variation in acid tolerance in fish. *Journal of Experimental Biology* 136, 243-258.

**Fu, C.-W., Horng, J.-L., Tong, S.-K., Cherng, B.-W., Liao, B.-K., Lin, L.-Y., Chou, M.-Y., 2021.** Exposure to silver impairs learning and social behaviors in adult zebrafish. *Journal of Hazardous Materials* 403, 124031.

**Gajbhiye, S., Sakharwade, S., 2016.** Silver nanoparticles in cosmetics. *Journal of Cosmetics, Dermatological Sciences and Applications* 6, 48-53.

**Galluzzi, L., Maiuri, M., Vitale, I., Zischka, H., Castedo, M., Zitvogel, L., Kroemer, G., 2007.** Cell death modalities: classification and pathophysiological implications. *Cell death and differentiation* 14, 1237.

**Galvez, F., Reid, S.D., Hawkings, G., Goss, G.G., 2002.** Isolation and characterization of mitochondria-rich cell types from the gill of freshwater rainbow trout. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 282, R658-R668.

**Gawlicka, A., Parent, B., Horn, M.H., Ross, N., Opstad, I., Torrissen, O.J., 2000.** Activity of digestive enzymes in yolk-sac larvae of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*): indication of readiness for first feeding. *Aquaculture* 184, 303-314.

**Gobler, C.J., Baumann, H., 2016.** Hypoxia and acidification in ocean ecosystems: coupled dynamics and effects on marine life. *Biology letters* 12, 20150976.

**Gonzalez, R., Wilson, R., 2001.** Patterns of ion regulation in acidophilic fish native to the ion-poor, acidic Rio Negro. *Journal of Fish Biology* 58, 1680-1690.

**Gonzalez, R.J., Dunson, W.A., 1987.** Adaptations of sodium balance to low pH in a sunfish (*Enneacanthus obesus*) from naturally acidic waters. *Journal of Comparative Physiology B* 157, 555-566.

**Goss, G., Gilmour, K., Hawkings, G., Brumbach, J.H., Huynh, M., Galvez, F., 2011.** Mechanism of sodium uptake in PNA negative MR cells from rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* as revealed by silver and copper inhibition. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology* 159, 234-241.

**Griffitt, R.J., Luo, J., Gao, J., Bonzongo, J.C., Barber, D.S., 2008.** Effects of particle composition and species on toxicity of metallic nanomaterials in aquatic organisms. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal* 27, 1972-1978.

**Grosell, M., De Boeck, G., Johannsson, O., Wood, C., 1999.** The effects of silver on intestinal ion and acid-base regulation in the marine teleost fish, *Parophrys vetulus*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology* 124, 259-270.

**Heuer, R.M., Grosell, M., 2014.** Physiological impacts of elevated carbon dioxide and ocean acidification on fish. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 307, R1061-R1084.

**Higgs, D.M., Radford, C.A., 2013.** The contribution of the lateral line to ‘hearing’ in fish. *Journal of Experimental Biology* 216, 1484-1490.

**Hiroi, J., Yasumasu, S., McCormick, S.D., Hwang, P.-P., Kaneko, T., 2008.** Evidence for an apical Na–Cl cotransporter involved in ion uptake in a teleost fish. *J. Exp. Biol.* 211, 2584-2599.

**Hoare, D., Krause, J., Peuhkuri, N., Godin, J.G., 2000.** Body size and shoaling in fish. *Journal of Fish Biology* 57, 1351-1366.

**Hogstrand, C., Galvez, F., Wood, C.M., 1996.** Toxicity, silver accumulation and metallothionein induction in freshwater rainbow trout during exposure to different silver salts. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal* 15, 1102-1108.

**Hogstrand, C., Wood, C.M., 1996.** The toxicity of silver to marine fish, *Proc. 4th Int. Conf. Transport, Fate and Effects of Silver in the Environment, Madison, Wisconsin*, pp. 109-112.

**Hopkins, E., Sanvictores, T., Sharma, S., 2020.** Physiology, acid base balance. *StatPearls* [Internet].

**Horng, J.-L., Lin, L.-Y., Huang, C.-J., Katoh, F., Kaneko, T., Hwang, P.-P., 2007.** Knockdown of V-ATPase subunit A (*atp6v1a*) impairs acid secretion and ion balance in zebrafish (*Danio rerio*). *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*.

**Horng, J.-L., Lin, L.-Y., Hwang, P.-P., 2009.** Functional regulation of H<sup>+</sup>-ATPase-rich cells in zebrafish embryos acclimated to an acidic environment. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* 296, C682-C692.

**Hotchkiss, R.S., Strasser, A., McDunn, J.E., Swanson, P.E., 2009.** Cell death. *New England Journal of Medicine* 361, 1570-1583.

**Howe, K., Clark, M.D., Torroja, C.F., Torrance, J., Berthelot, C., Muffato, M., Collins, J.E., Humphray, S., McLaren, K., Matthews, L., 2013.** The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. *Nature* 496, 498-503.

**Hsiao, C.-D., You, M.-S., Guh, Y.-J., Ma, M., Jiang, Y.-J., Hwang, P.-P., 2007.** A positive regulatory loop between *foxi3a* and *foxi3b* is essential for specification and differentiation of zebrafish epidermal ionocytes. *PloS one* 2, e302.

**Hung, G.-Y., Wu, C.-L., Chou, Y.-L., Chien, C.-T., Horng, J.-L., Lin, L.-Y., 2019.** Cisplatin exposure impairs ionocytes and hair cells in the skin of zebrafish embryos. *Aquatic Toxicology* 209, 168-177.

**Hurst, T.P., Fernandez, E.R., Mathis, J.T., Miller, J.A., Stinson, C.M., Ahgeak, E.F., 2012.** Resiliency of juvenile walleye pollock to projected levels of ocean acidification. *Aquatic Biology* 17, 247-259.

**Hwang, P.-P., 2009.** Ion uptake and acid secretion in zebrafish (*Danio rerio*). *Journal of Experimental Biology* 212, 1745-1752.

**Hwang, P.-P., Lee, T.-H., Lin, L.-Y., 2011.** Ion regulation in fish gills: recent progress in the cellular and molecular mechanisms. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 301, R28-R47.

**Kaegi, R., Voegelin, A., Sinnet, B., Zuleeg, S., Hagendorfer, H., Burkhardt, M., Siegrist, H., 2011.** Behavior of metallic silver nanoparticles in a pilot wastewater treatment plant. *Environmental science & technology* 45, 3902-3908.

**Kannan, K., Jain, S.K., 2000.** Oxidative stress and apoptosis. *Pathophysiology* 7, 153-163.

**Kawata, K., Osawa, M., Okabe, S., 2009.** In vitro toxicity of silver nanoparticles at noncytotoxic doses to HepG2 human hepatoma cells. *Environmental science & technology* 43, 6046-6051.

**Kerr, J.F., Wyllie, A.H., Currie, A.R., 1972.** Apoptosis: a basic biological phenomenon with wideranging implications in tissue kinetics. *British journal of cancer* 26, 239-257.

**Khan, M.S., Qureshi, N.A., Jabeen, F., 2017.** Assessment of toxicity in fresh water fish *Labeo rohita* treated with silver nanoparticles. *Applied Nanoscience* 7, 167-179.

**Kumai, Y., Perry, S.F., 2011.** Ammonia excretion via Rhcg1 facilitates Na<sup>+</sup> uptake in larval zebrafish, *Danio rerio*, in acidic water. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 301, R1517-R1528.

**Kurihara, H., 2008.** Effects of CO<sub>2</sub>-driven ocean acidification on the early developmental stages of invertebrates. *Marine Ecology Progress Series* 373, 275-284.

**Kwong, R.W., Kumai, Y., Perry, S.F., 2014.** The physiology of fish at low pH: the zebrafish as a model system. *Journal of Experimental Biology* 217, 651-662.

**Lüderitz, V., Nicklisch, A., 1989.** The effect of pH on copper toxicity to blue-green algae. *Internationale Revue der gesamten Hydrobiologie und Hydrographie* 74, 283-291.

**Lee, C.-Y., Horng, J.-L., Chen, P.-Y., Lin, L.-Y., 2019.** Silver nanoparticle exposure impairs ion regulation in zebrafish embryos. *Aquatic Toxicology* 214, 105263.

**Lee, H.-Y., Choi, Y.-J., Jung, E.-J., Yin, H.-Q., Kwon, J.-T., Kim, J.-E., Im, H.-T., Cho, M.-H., Kim, J.-H., Kim, H.-Y., 2010.** Genomics-based screening of differentially expressed genes in the brains of mice exposed to silver nanoparticles via inhalation. *Journal of Nanoparticle Research* 12, 1567-1578.

**LeMasurier, M., Gillespie, P.G., 2005.** Hair-cell mechanotransduction and cochlear amplification. *Neuron* 48, 403-415.

**Liao, B.-K., Deng, A.-N., Chen, S.-C., Chou, M.-Y., Hwang, P.-P., 2007.** Expression and water calcium dependence of calcium transporter isoforms in zebrafish gill mitochondrion-rich cells. *BMC genomics* 8, 1-13.

**Lin, C.-C., Lin, L.-Y., Hsu, H.-H., Thermes, V., Prunet, P., Horng, J.-L., Hwang, P.-P., 2012.** Acid secretion by mitochondrion-rich cells of medaka (*Oryzias latipes*) acclimated to acidic freshwater. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 302, R283-R291.

**Lin, C.-H., Hwang, P.-P., 2016.** The control of calcium metabolism in zebrafish (*Danio rerio*). *International journal of molecular sciences* 17, 1783.

**Lin, L.-Y., Horng, J.-L., Kunkel, J.G., Hwang, P.-P., 2006.** Proton pump-rich cell secretes acid in skin of zebrafish larvae. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* 290, C371-C378.

**Lin, L.-Y., Hung, G.-Y., Yeh, Y.-H., Chen, S.-W., Horng, J.-L., 2019.** Acidified water impairs the lateral line system of zebrafish embryos. *Aquatic Toxicology* 217, 105351.

**Liu, K., Liu, P.-c., Liu, R., Wu, X., 2015.** Dual AO/EB staining to detect apoptosis in osteosarcoma cells compared with flow cytometry. *Medical science monitor basic research* 21, 15.

**Liu, S.-T., Horng, J.-L., Chen, P.-Y., Hwang, P.-P., Lin, L.-Y., 2016.** Salt secretion is linked to acid-base regulation of ionocytes in seawater-acclimated medaka: new insights into the salt-secreting mechanism. *Scientific reports* 6, 1-13.

**Liu, Y., Lü, L., Hettinger, C.L., Dong, G., Zhang, D., Rezvani, K., Wang, X., Wang, H., 2014.** Ubiquilin-1 protects cells from oxidative stress and ischemic stroke caused tissue injury in mice. *Journal of Neuroscience* 34, 2813-2821.

**Lubick, N., 2008.** Nanosilver toxicity: ions, nanoparticles or both? ACS Publications.

**Lytle, P.E., 1984.** Fate and speciation of silver in publicly owned treatment works. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal* 3, 21-30.

**MacRae, C.A., Peterson, R.T., 2015.** Zebrafish as tools for drug discovery. *Nature reviews Drug discovery* 14, 721-731.

**Majno, G., Joris, I., 1995.** Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. *The American journal of pathology* 146, 3.

- Markus, A., Parsons, J., Roex, E., De Voogt, P., Laane, R., 2016.** Modelling the transport of engineered metallic nanoparticles in the river Rhine. *Water research* 91, 214-224.
- McNeil, P.L., Boyle, D., Henry, T.B., Handy, R.D., Sloman, K.A., 2014.** Effects of metal nanoparticles on the lateral line system and behaviour in early life stages of zebrafish (*Danio rerio*). *Aquatic toxicology* 152, 318-323.
- Mirjany, M., Preuss, T., Faber, D.S., 2011.** Role of the lateral line mechanosensory system in directionality of goldfish auditory evoked escape response. *Journal of Experimental Biology* 214, 3358-3367.
- Mirrett, S., 1982.** Acridine orange stain. *Infection Control & Hospital Epidemiology* 3, 250-253.
- Mishra, S., Singh, H., 2015.** Biosynthesized silver nanoparticles as a nanoweapon against phytopathogens: exploring their scope and potential in agriculture. *Applied microbiology and biotechnology* 99, 1097-1107.
- Mittler, R., 2017.** ROS are good. *Trends in plant science* 22, 11-19.
- Moiseenko, T., 2005.** Effects of acidification on aquatic ecosystems. *Russian journal of ecology* 36, 93-102.
- Moran Jr, E.T., 2007.** Nutrition of the developing embryo and hatchling. *Poultry science* 86, 1043-1049.
- Morgan, I.J., Henry, R.P., Wood, C.M., 1997.** The mechanism of acute silver nitrate toxicity in freshwater rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) is inhibition of gill Na<sup>+</sup> and Cl<sup>-</sup> transport. *Aquatic Toxicology* 38, 145-163.
- Mueller, N.C., Nowack, B., 2008.** Exposure modeling of engineered nanoparticles in the environment. *Environmental science & technology* 42, 4447-4453.
- Munday, P.L., Dixon, D.L., McCormick, M.I., Meekan, M., Ferrari, M.C., Chivers, D.P., 2010.** Replenishment of fish populations is threatened by ocean acidification. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107, 12930-12934.
- Munday, P.L., Donelson, J.M., Dixon, D.L., Endo, G.G., 2009.** Effects of ocean acidification on the early life history of a tropical marine fish. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 276, 3275-3283.
- Musee, N., 2011.** Simulated environmental risk estimation of engineered nanomaterials: a case of cosmetics in Johannesburg City. *Human & experimental toxicology* 30, 1181-1195.

- Navarro, E., Piccapietra, F., Wagner, B., Marconi, F., Kaegi, R., Odzak, N., Sigg, L., Behra, R., 2008.** Toxicity of silver nanoparticles to *Chlamydomonas reinhardtii*. *Environmental science & technology* 42, 8959-8964.
- Okamura, D.M., Bahrami, N.M., Ren, S., Pasichnyk, K., Williams, J.M., Gangoiti, J.A., Lopez-Guisa, J.M., Yamaguchi, I., Barshop, B.A., Duffield, J.S., 2014.** Cysteamine modulates oxidative stress and blocks myofibroblast activity in CKD. *Journal of the American Society of Nephrology* 25, 43-54.
- Orger, M.B., de Polavieja, G.G., 2017.** Zebrafish behavior: opportunities and challenges. *Annual review of neuroscience* 40, 125-147.
- Ottersen, O.P., Takumi, Y., Matsubara, A., Landsend, A.S., Laake, J.H., Usami, S.-i., 1998.** Molecular organization of a type of peripheral glutamate synapse: the afferent synapses of hair cells in the inner ear. *Progress in neurobiology* 54, 127-148.
- Ou, H.C., Cunningham, L.L., Francis, S.P., Brandon, C.S., Simon, J.A., Raible, D.W., Rubel, E.W., 2009.** Identification of FDA-approved drugs and bioactives that protect hair cells in the zebrafish (*Danio rerio*) lateral line and mouse (*Mus musculus*) utricle. *Journal of the Association for Research in Otolaryngology* 10, 191-203.
- Pan, T.-C., Liao, B.-K., Huang, C.-J., Lin, L.-Y., Hwang, P.-P., 2005.** Epithelial Ca<sup>2+</sup> channel expression and Ca<sup>2+</sup> uptake in developing zebrafish. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 289, R1202-R1211.
- Pannella, G., 1971.** Fish otoliths: daily growth layers and periodical patterns. *Science* 173, 1124-1127.
- Park, E.-J., Yi, J., Kim, Y., Choi, K., Park, K., 2010.** Silver nanoparticles induce cytotoxicity by a Trojan-horse type mechanism. *Toxicology in vitro* 24, 872-878.
- Perillo, B., Di Donato, M., Pezone, A., Di Zazzo, E., Giovannelli, P., Galasso, G., Castoria, G., Migliaccio, A., 2020.** ROS in cancer therapy: The bright side of the moon. *Experimental & Molecular Medicine* 52, 192-203.
- Perry, S., Goss, G., Laurent, P., 1992.** The interrelationships between gill chloride cell morphology and ionic uptake in four freshwater teleosts. *Canadian Journal of Zoology* 70, 1775-1786.
- Pitts, R.F., 1950.** Acid-base regulation by the kidneys. *The American journal of medicine* 9, 356-372.
- Polverino, G., Bierbach, D., Killen, S., Uusi-Heikkilä, S., Arlinghaus, R., 2016.** Body length rather than routine metabolic rate and body condition correlates with activity and risk-taking in juvenile zebrafish *Danio rerio*. *Journal of Fish Biology* 89, 2251-2267.

**Powers, C.M., Slotkin, T.A., Seidler, F.J., Badireddy, A.R., Padilla, S., 2011.** Silver nanoparticles alter zebrafish development and larval behavior: distinct roles for particle size, coating and composition. *Neurotoxicology and teratology* 33, 708-714.

**Pulit-Prociak, J., Banach, M., 2016.** Silver nanoparticles—a material of the future...? *Open Chemistry* 14, 76-91.

**Raddum, G.G., Fjellheim, A., 1984.** Acidification and early warning organisms in freshwater in western Norway: With 5 figures and 1 table in the text. *Internationale Vereinigung für theoretische und angewandte Limnologie: Verhandlungen* 22, 1973-1980.

**Ratte, H.T., 1999.** Bioaccumulation and toxicity of silver compounds: a review. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal* 18, 89-108.

**Riedl, S.J., Salvesen, G.S., 2007.** The apoptosome: signalling platform of cell death. *Nature reviews Molecular cell biology* 8, 405-413.

**Rodhe, H., 1989.** Acidification in a global perspective. *Ambio*, 155-160.

**Ross, P.M., Parker, L., O'Connor, W.A., Bailey, E.A., 2011.** The impact of ocean acidification on reproduction, early development and settlement of marine organisms. *Water* 3, 1005-1030.

**Rossi, T., Nagelkerken, I., Simpson, S.D., Pistevos, J.C., Watson, S.-A., Merillet, L., Fraser, P., Munday, P.L., Connell, S.D., 2015.** Ocean acidification boosts larval fish development but reduces the window of opportunity for successful settlement. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 282, 20151954.

**Sakamoto, M., Ha, J.-Y., Yoneshima, S., Kataoka, C., Tatsuta, H., Kashiwada, S., 2015.** Free silver ion as the main cause of acute and chronic toxicity of silver nanoparticles to cladocerans. *Archives of environmental contamination and toxicology* 68, 500-509.

**Sant, K.E., Timme-Laragy, A.R., 2018.** Zebrafish as a model for toxicological perturbation of yolk and nutrition in the early embryo. *Current environmental health reports* 5, 125-133.

**Schieber, M., Chandel, N.S., 2014.** ROS function in redox signaling and oxidative stress. *Current biology* 24, R453-R462.

**Schindler, D.W., 1988.** Effects of acid rain on freshwater ecosystems. *Science* 239, 149-157.

**Scholik, A.R., Yan, H.Y., 2001.** Effects of underwater noise on auditory sensitivity of a cyprinid fish. *Hearing research* 152, 17-24.

**Schubauer-Berigan, M.K., Dierkes, J.R., Monson, P.D., Ankley, G.T., 1993.** pH-dependent toxicity of Cd, Cu, Ni, Pb and Zn to *Ceriodaphnia dubia*, *Pimephales promelas*, *Hyalella azteca* and *Lumbriculus variegatus*. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal* 12, 1261-1266.

**Simpson, S.D., Munday, P.L., Wittenrich, M.L., Manassa, R., Dixon, D.L., Gagliano, M., Yan, H.Y., 2011.** Ocean acidification erodes crucial auditory behaviour in a marine fish. *Biology letters* 7, 917-920.

**Singh, A., Agrawal, M., 2007.** Acid rain and its ecological consequences. *Journal of Environmental Biology* 29, 15.

**Sipes, N.S., Padilla, S., Knudsen, T.B., 2011.** Zebrafish—As an integrative model for twenty-first century toxicity testing. *Birth Defects Research Part C: Embryo Today: Reviews* 93, 256-267.

**Syafiuddin, A., Salmiati, S., Hadibarata, T., Kueh, A.B.H., Salim, M.R., Zaini, M.A.A., 2018.** Silver nanoparticles in the water environment in Malaysia: inspection, characterization, removal, modeling, and future perspective. *Scientific reports* 8, 1-15.

**Thomas, A.J., Hailey, D.W., Stawicki, T.M., Wu, P., Coffin, A.B., Rubel, E.W., Raible, D.W., Simon, J.A., Ou, H.C., 2013.** Functional mechanotransduction is required for cisplatin-induced hair cell death in the zebrafish lateral line. *Journal of Neuroscience* 33, 4405-4414.

**Thorson, G., 1950.** Reproductive and larval ecology of marine bottom invertebrates. *Biological reviews* 25, 1-45.

**Tian, J., Wong, K.K., Ho, C.M., Lok, C.N., Yu, W.Y., Che, C.M., Chiu, J.F., Tam, P.K., 2007.** Topical delivery of silver nanoparticles promotes wound healing. *ChemMedChem: Chemistry Enabling Drug Discovery* 2, 129-136.

**Truong, L., Harper, S.L., Tanguay, R.L., 2011.** Evaluation of embryotoxicity using the zebrafish model, *Drug safety evaluation*. Springer, pp. 271-279.

**Vance, M.E., Kuiken, T., Vejerano, E.P., McGinnis, S.P., Hochella Jr, M.F., Rejeski, D., Hull, M.S., 2015.** Nanotechnology in the real world: Redeveloping the nanomaterial consumer products inventory. *Beilstein journal of nanotechnology* 6, 1769-1780.

**Vasconcelos, A.C., Lam, K.M., 1994.** Apoptosis induced by infectious bursal disease virus. *Journal of General Virology* 75, 1803-1806.

**Webb, N.A., Wood, C.M., 1998.** Physiological analysis of the stress response associated with acute silver nitrate exposure in freshwater rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal* 17, 579-588.

- Whitfield, T.T., Riley, B.B., Chiang, M.Y., Phillips, B., 2002.** Development of the zebrafish inner ear. *Developmental dynamics: an official publication of the American Association of Anatomists* 223, 427-458.
- Wood, C.M., Hogstrand, C., Galvez, F., Munger, R., 1996.** The physiology of waterborne silver toxicity in freshwater rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) 1. The effects of ionic Ag<sup>+</sup>. *Aquatic Toxicology* 35, 93-109.
- Wu, S.-C., Horng, J.-L., Liu, S.-T., Hwang, P.-P., Wen, Z.-H., Lin, C.-S., Lin, L.-Y., 2010.** Ammonium-dependent sodium uptake in mitochondrion-rich cells of medaka (*Oryzias latipes*) larvae. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* 298, C237-C250.
- Yamazaki, M., Tanizaki, Y., Shimokawa, T., 1996.** Silver and other trace elements in a freshwater fish, *Carasius auratus langsdorfii*, from the Asakawa River in Tokyo, Japan. *Environmental Pollution* 94, 83-90.
- Yan, J.-J., Chou, M.-Y., Kaneko, T., Hwang, P.-P., 2007.** Gene expression of Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger in zebrafish H<sup>+</sup>-ATPase-rich cells during acclimation to low-Na<sup>+</sup> and acidic environments. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* 293, C1814-C1823.
- Yan, J.-J., Hwang, P.-P., 2019.** Novel discoveries in acid-base regulation and osmoregulation: a review of selected hormonal actions in zebrafish and medaka. *General and comparative endocrinology* 277, 20-29.
- Yang, X., Gondikas, A.P., Marinakos, S.M., Auffan, M., Liu, J., Hsu-Kim, H., Meyer, J.N., 2012.** Mechanism of silver nanoparticle toxicity is dependent on dissolved silver and surface coating in *Caenorhabditis elegans*. *Environmental science & technology* 46, 1119-1127.
- Yen, H.-J., Horng, J.-L., Yu, C.-H., Fang, C.-Y., Yeh, Y.-H., Lin, L.-Y., 2019.** Toxic effects of silver and copper nanoparticles on lateral-line hair cells of zebrafish embryos. *Aquatic Toxicology* 215, 105273.
- Yoon, K.-Y., Byeon, J.H., Park, J.-H., Hwang, J., 2007.** Susceptibility constants of *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis* to silver and copper nanoparticles. *Science of the Total Environment* 373, 572-575.
- Zhai, Y., Wang, Z., Wang, G., Peijnenburg, W.J., Vijver, M.G., 2020.** The fate and toxicity of Pb-based perovskite nanoparticles on soil bacterial community: Impacts of pH, humic acid, and divalent cations. *Chemosphere* 249, 126564.
- Zou, Z., Chang, H., Li, H., Wang, S., 2017.** Induction of reactive oxygen species: an emerging approach for cancer therapy. *Apoptosis* 22, 1321-1335.

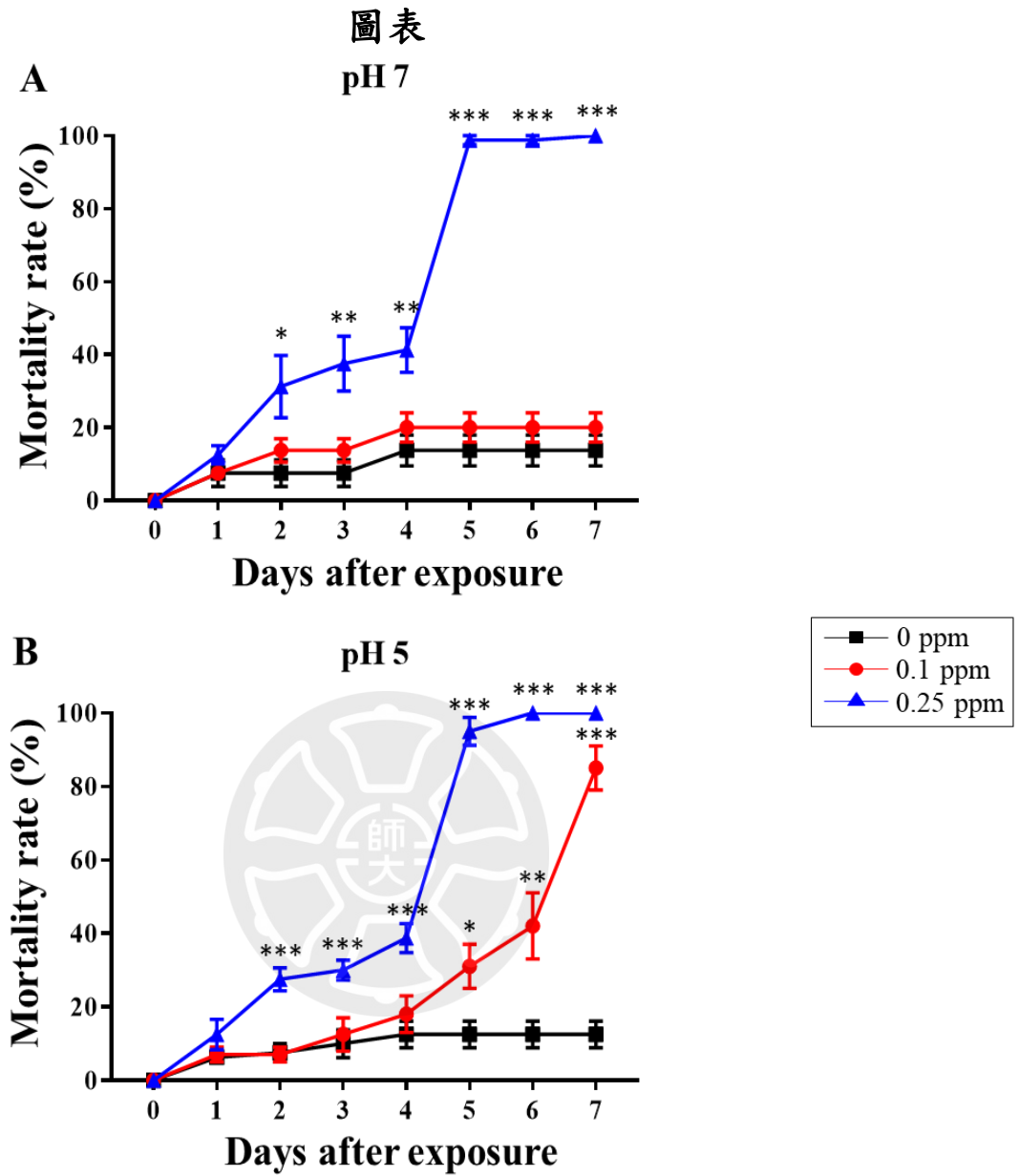


圖 1：7 天處理不同濃度 AgNO<sub>3</sub> 於不同 pH 值環境中之斑馬魚胚胎累積死亡率。紀錄各天數斑馬魚胚胎累積死亡率。每組樣本皆為 N=8。不同 AgNO<sub>3</sub> 濃度間比較以 One-way ANOVA 進行分析，達到統計顯著差異為 p value 小於 0.05(\*)、0.01(\*\*)及 0.001(\*\*\*)。

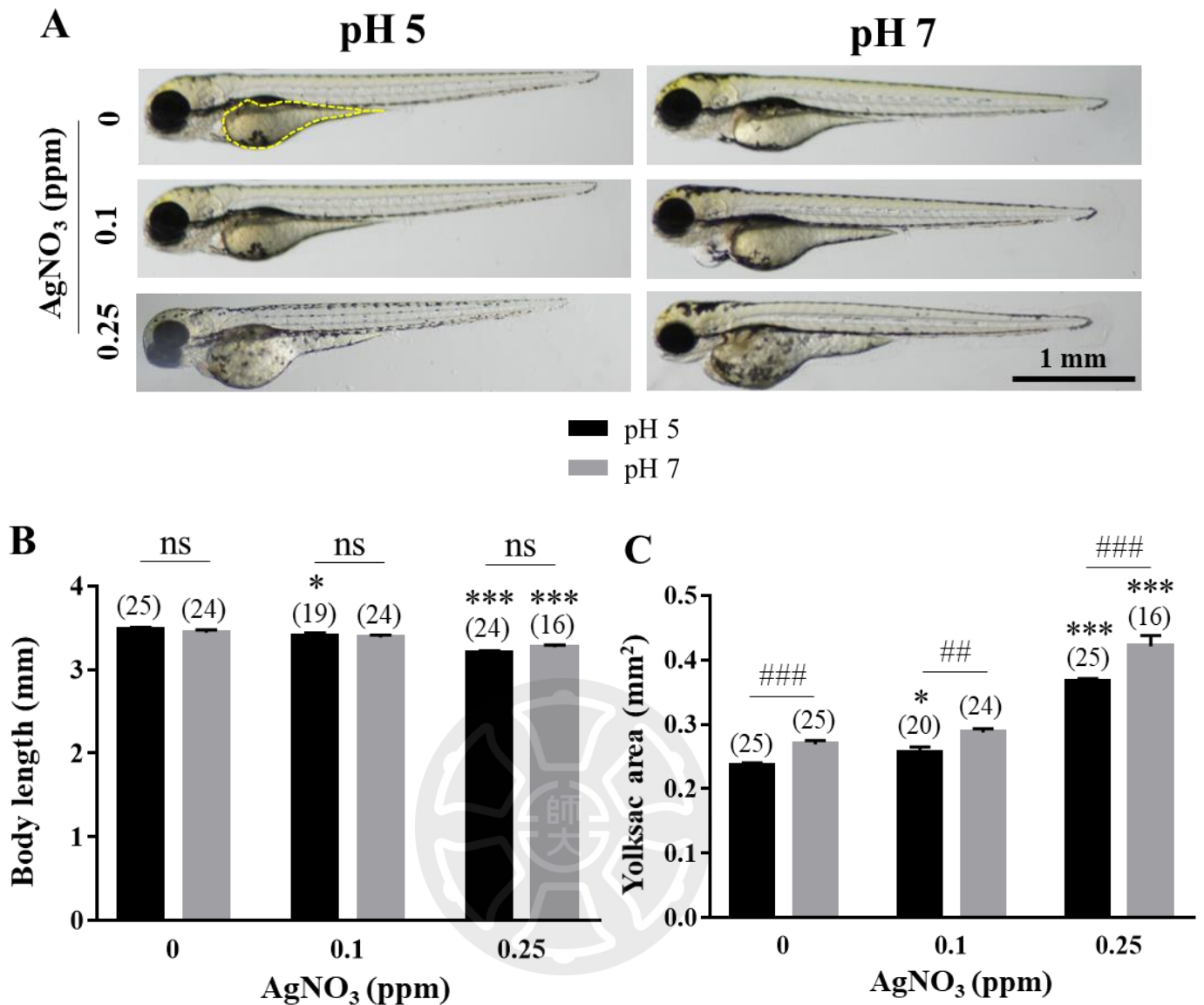


圖 2：96 小時處理  $\text{AgNO}_3$  於不同 pH 值環境對斑馬魚胚胎體長及卵黃囊之傷害。觀察斑馬魚胚胎型態(A)，計算各組體長(B)及卵黃囊面積(C)，卵黃囊圈選範圍：圖 A 黃色虛線。每組樣本數標示於括號內，統計結果圖表皆以平均值 $\pm$ 標準誤差 (Standard error of the mean, SEM)標示。不同 pH 值環境間數據以 Student's *t*-test (two-tailed)進行分析，達到統計顯著差異為 *p* value 小於 0.01(##)及 0.001(###)。不同  $\text{AgNO}_3$  濃度之比較則以 One-way ANOVA 進行分析，達到統計顯著差異為 *p* value 小於 0.05(\*) 及 0.001(\*\*\*)。

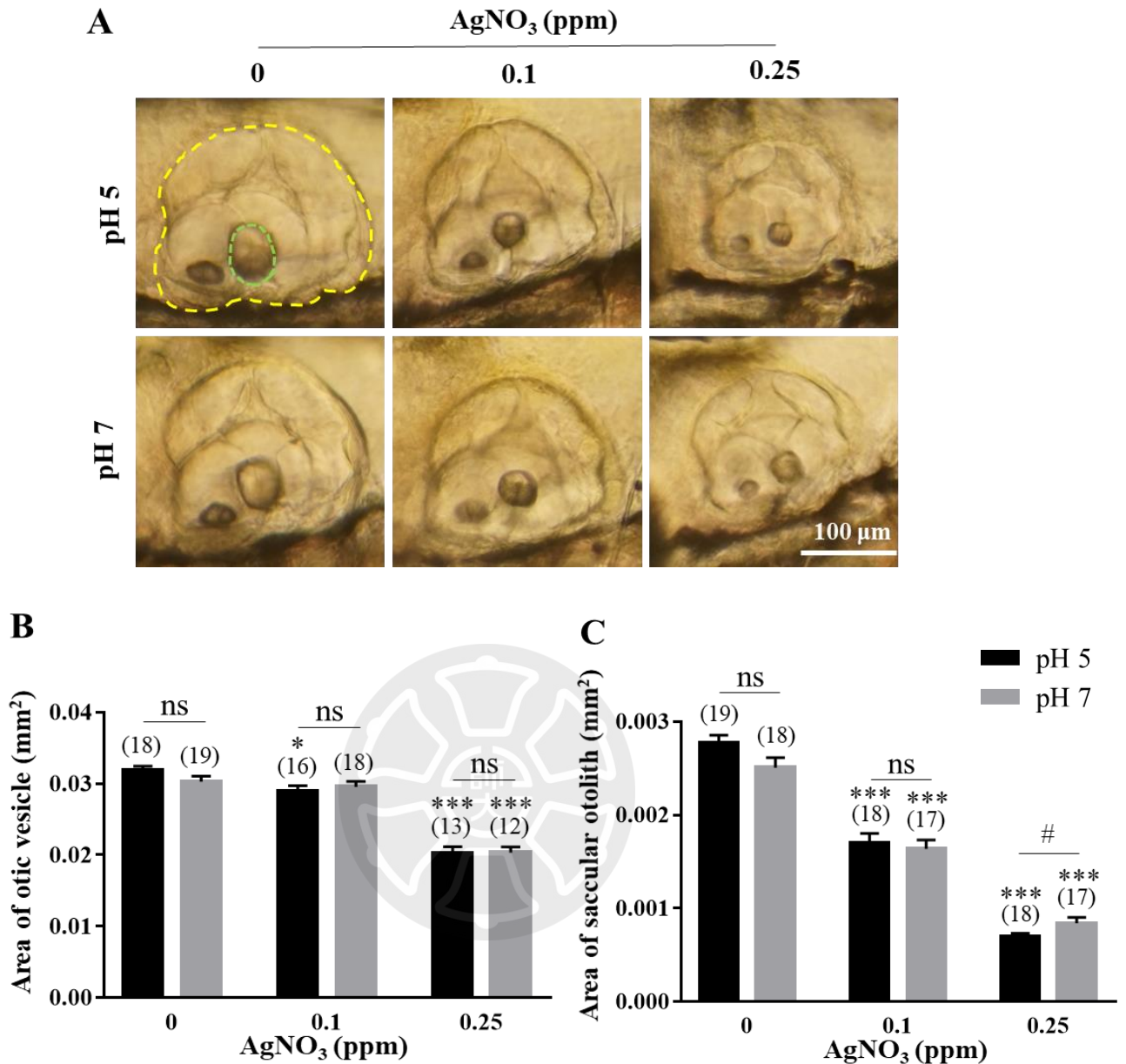


圖 3：96 小時處理  $\text{AgNO}_3$  於不同 pH 值環境中對斑馬魚胚胎耳石發育之毒性。觀察胚胎耳石囊及耳石型態(A)後，測量面積(B、C)。耳石囊圈選範圍如圖 A 黃色虛線：矢狀耳石圈選範圍則為綠色虛線。每組樣本數標示於括號內，統計結果圖表皆以平均值±標準誤差(Standard error of the mean, SEM)標示。不同 pH 值環境間數據以 Student's *t*-test (two-tailed) 進行分析，達到統計顯著差異為 *p* value 小於 0.05(#)。不同  $\text{AgNO}_3$  濃度間比較則以 One-way ANOVA 進行分析，達到統計顯著差異為 *p* value 小於 0.05(\*) 及 0.001(\*\*\*)。

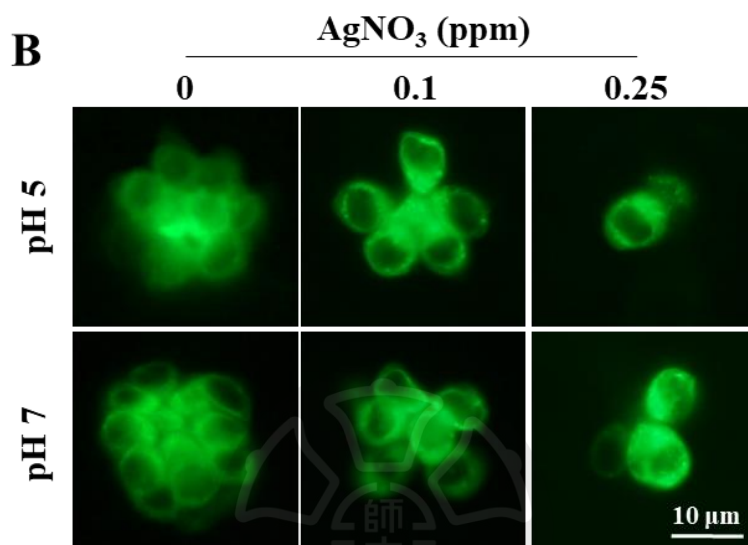
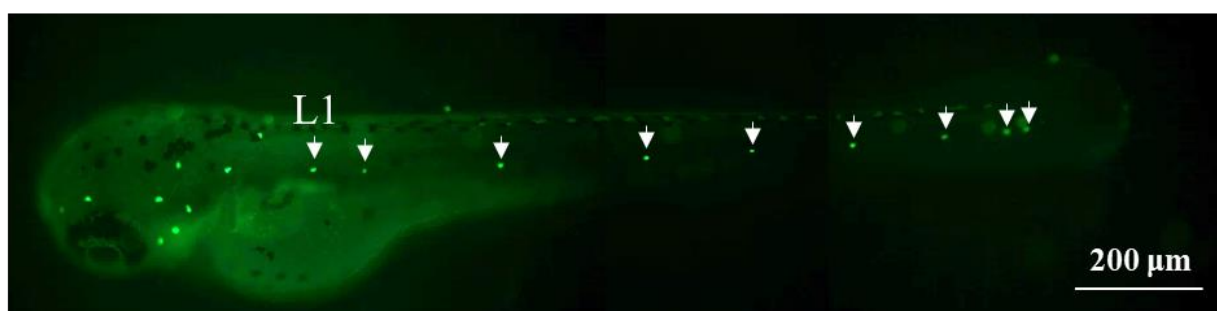
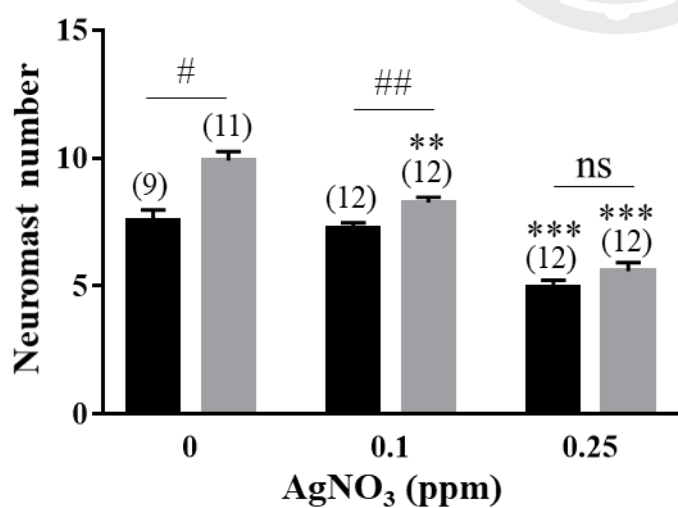
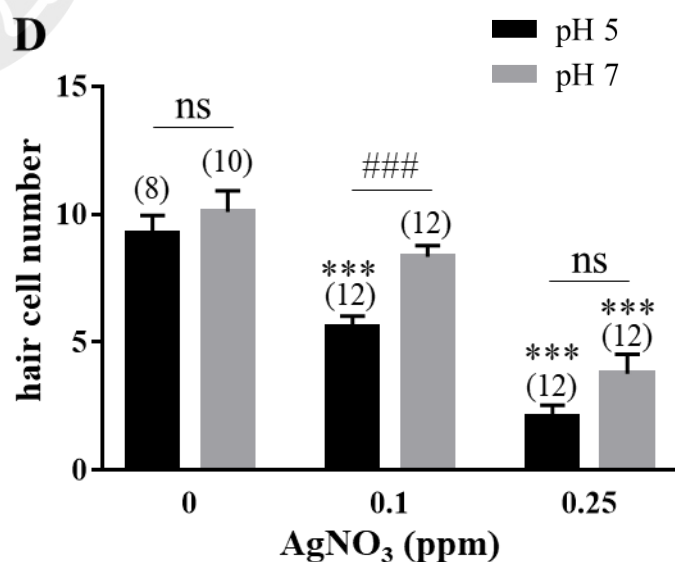
**A****C****D**

圖 4：96 小時處理  $\text{AgNO}_3$  於不同 pH 值環境中對斑馬魚胚胎側線毛細胞發育之毒性。以 FM1-43 染劑標定胚胎側線神經丘(A，白色箭頭)以及 L1 毛細胞(B)後，計數其數目(C、D)。每組樣本數標示於括號內，統計結果圖表皆以平均值 $\pm$ 標準誤差(Standard error of the mean, SEM)標示。不同 pH 值環境間數據以 Student's *t*-test (two-tailed)進行分析，達到統計顯著差異為 *p* value 小於 0.05(#)、0.01(##)及 0.001(###)。不同  $\text{AgNO}_3$  濃度間比較則以 One-way ANOVA 進行分析，達到統計顯著差異為 *p* value 小於 0.01(\*\*)及 0.001(\*\*\*)。



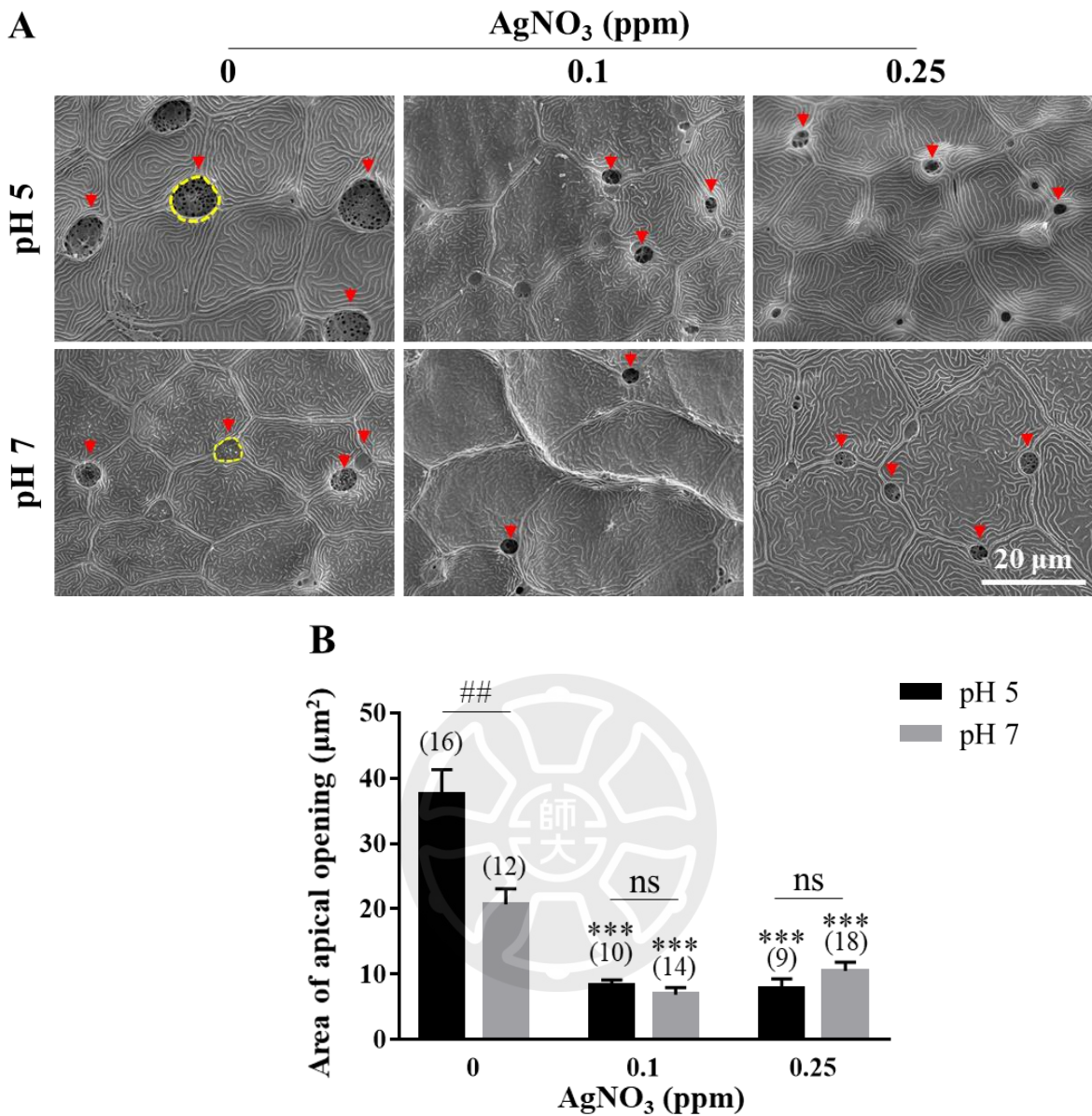


圖 5：96 小時處理 AgNO<sub>3</sub> 於不同 pH 值環境中對斑馬魚胚胎離子細胞頂膜開口之影響。利用 SEM 技術觀察胚胎卵黃囊表皮上離子細胞開口型態(A)並計算其面積(B)。頂膜開口圈選範圍為圖 A 黃色虛線範圍面積，紅色箭頭標示為篩狀細胞。每組樣本數標示於括號內，統計結果圖表皆以平均值±標準誤差(Standard error of the mean, SEM)標示。不同 pH 值環境間數據以 Student's *t*-test (two-tailed) 進行分析，達到統計顯著差異為 *p* value 小於 0.01(##)。不同 AgNO<sub>3</sub> 濃度間比較則以 One-way ANOVA 進行分析，達到統計顯著差異為 *p* value 小於 0.001(\*\*\*)。

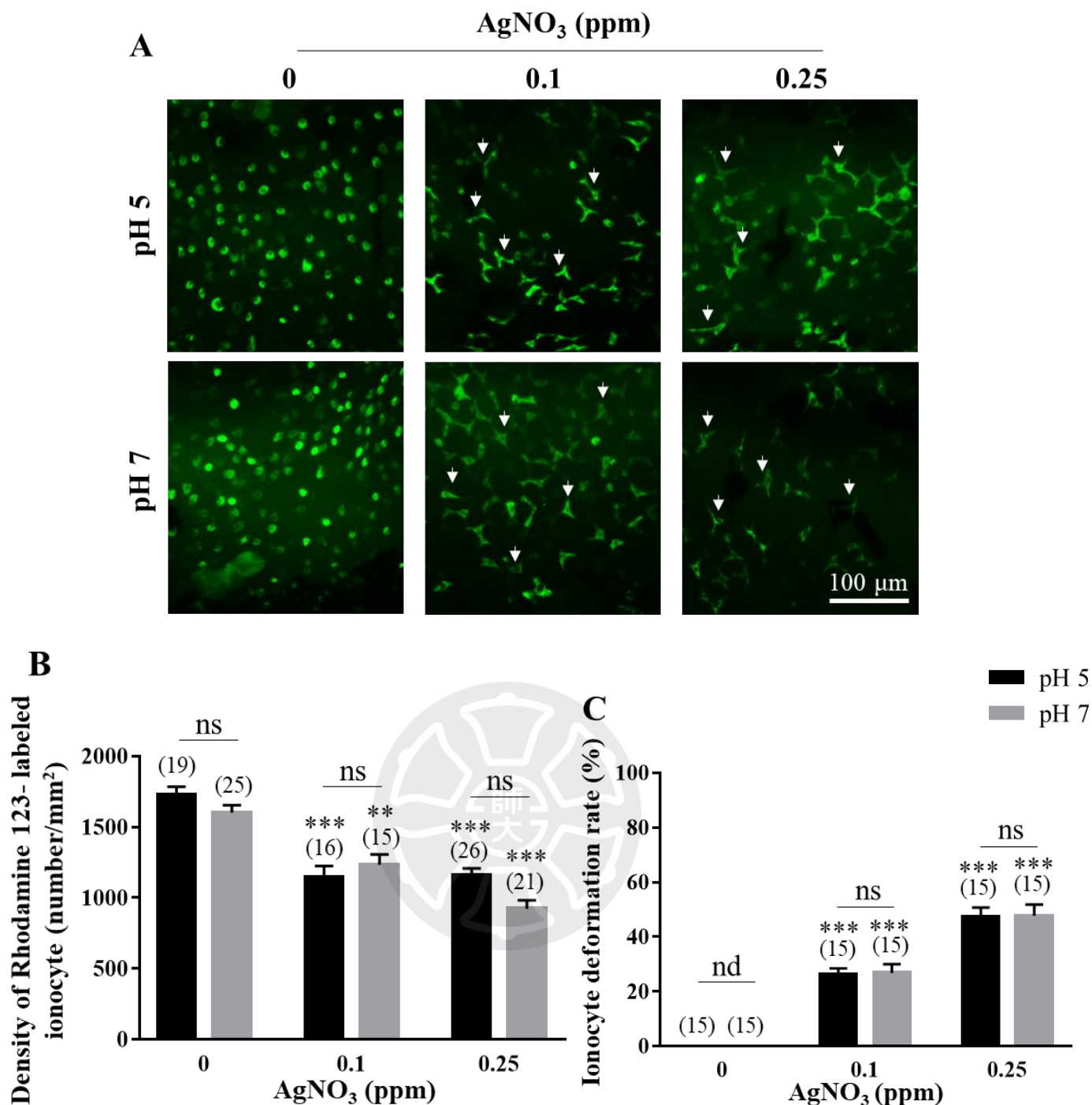


圖 6：96 小時處理 AgNO<sub>3</sub> 於不同 pH 值環境中對斑馬魚胚胎離子細胞型態及數目之影響。利用 Rhodamine 123 標定離子細胞，觀察各組型態(A)並計算數目(B)及變形細胞比例(C)。白色箭頭為變形的離子細胞。每組樣本數標示於括號內，統計結果圖表皆以平均值±標準誤差(Standard error of the mean, SEM)標示。不同 pH 值環境間數據以 Student's *t*-test (two-tailed) 進行分析；不同 AgNO<sub>3</sub> 濃度間比較則以 One-way ANOVA 進行分析，達到統計顯著差異為 *p* value 小於 0.01(\*\*)及 0.001(\*\*\*)。

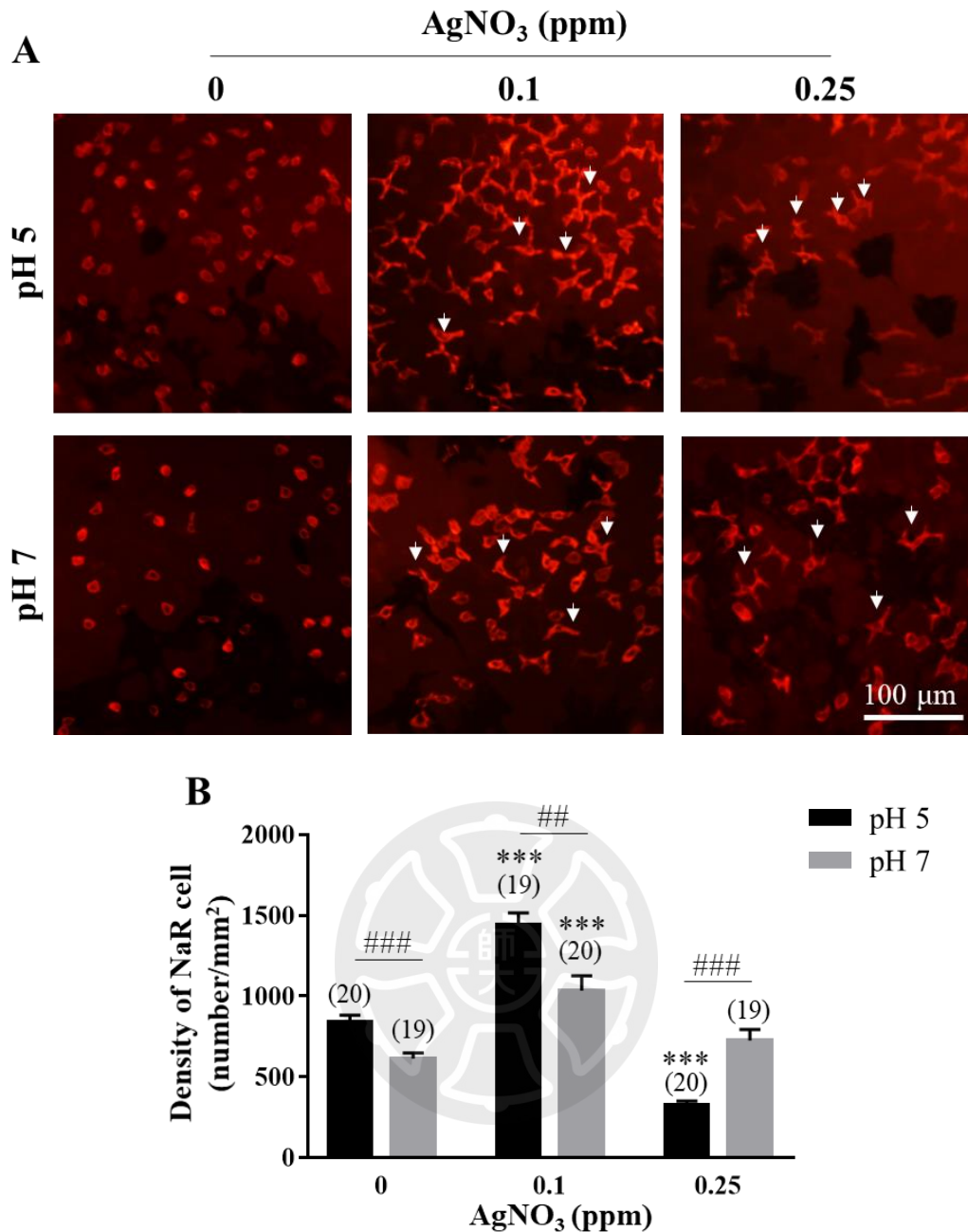


圖 7：96 小時處理 AgNO<sub>3</sub> 於不同 pH 值環境中對斑馬魚胚胎 NaRC 型態及數目之影響。利用免疫細胞組織染色法標定 NaRC，觀察各組別 NaRC 型態(A)及數目(B)，變形之細胞以白色箭頭標示。每組樣本數標示於括號內，統計結果圖表皆以平均值±標準誤差(Standard error of the mean, SEM)標示。不同 pH 值環境間數據以 Student's *t*-test (two-tailed) 進行分析，達到統計顯著差異為 *p* value 小於 0.01(##)及 0.001(###)。不同 AgNO<sub>3</sub> 濃度間比較則以 One-way ANOVA 進行分析，達到統計顯著差異為 *p* value 小於 0.001(\*\*\*)。

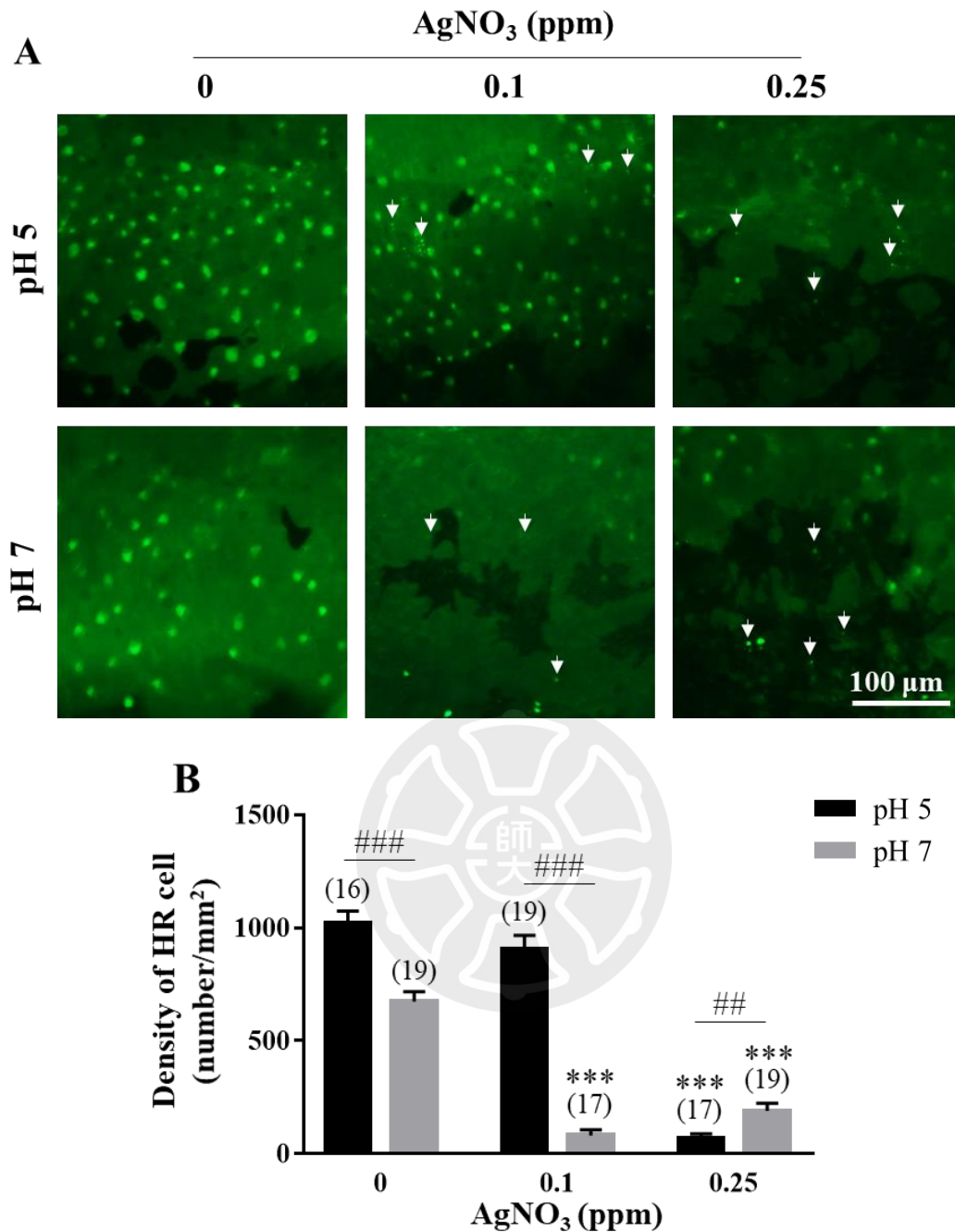


圖 8：96 小時處理 AgNO<sub>3</sub> 於不同 pH 值環境中對斑馬魚胚胎 HRC 數目之影響。利用免疫細胞組織染色法標定 HRC，觀察各組細胞型態(A)並計算數目(B)。白色箭頭標示為破碎訊號。每組樣本數標示於括號內，統計結果圖表皆以平均值±標準誤差(Standard error of the mean, SEM)標示。不同 pH 值環境間數據以 Student's *t*-test (two-tailed) 進行分析，達到統計顯著差異為 *p* value 小於 0.01(##)及 0.001(###)。不同 AgNO<sub>3</sub> 濃度間比較則以 One-way ANOVA 進行分析，達到統計顯著差異為 *p* value 小於 0.001(\*\*\*)。

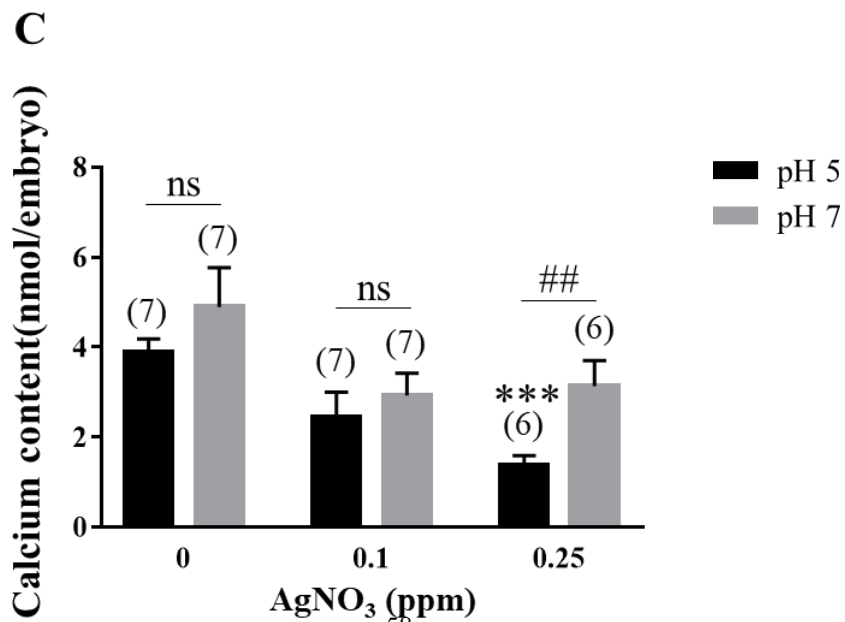
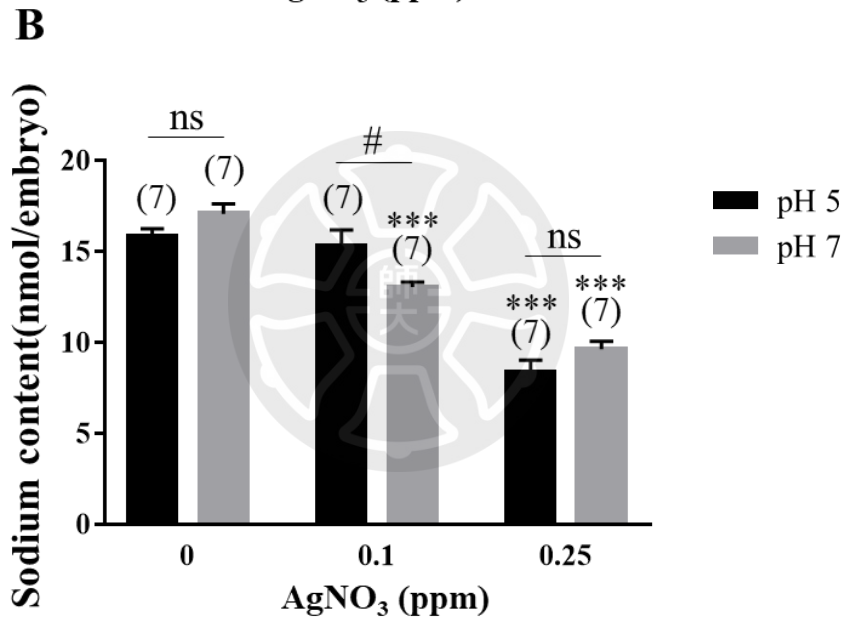
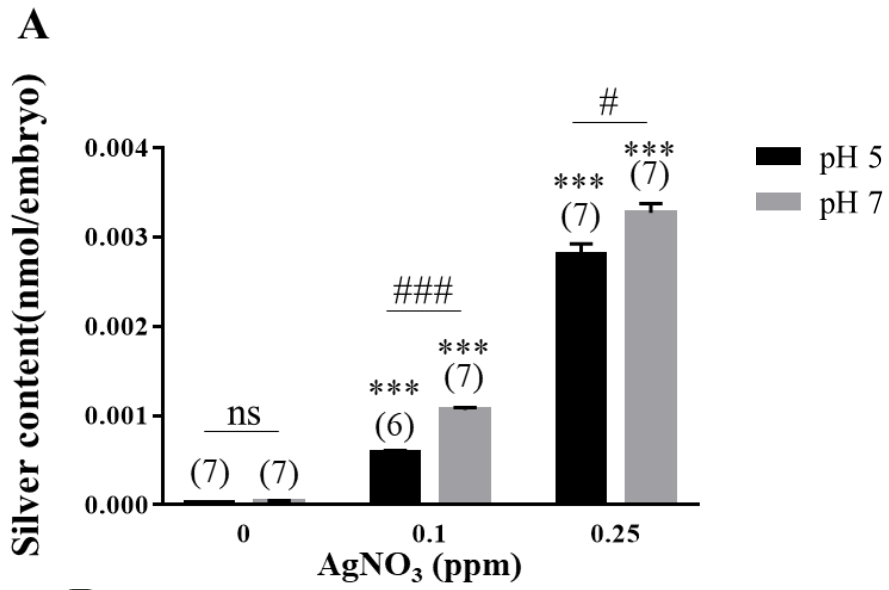


圖 9：96 小時處理  $\text{AgNO}_3$  於不同 pH 值環境中對斑馬魚胚胎銀、鈉及鈣離子含量之影響。以 ICP-MS 技術測量胚胎體內銀(A)、鈉(B)及鈣(C)離子含量。每組樣本數標示於括號內，統計結果圖表皆以平均值 $\pm$ 標準誤差(Standard error of the mean, SEM)標示。不同 pH 值環境間數據以 Student's *t*-test (two-tailed) 進行分析，達到統計顯著差異為 *p* value 小於 0.05(#)及 0.01(##)。不同  $\text{AgNO}_3$  濃度間比較則以 One-way ANOVA 進行分析，達到統計顯著差異為 *p* value 小於 0.01(\*\*)及 0.001(\*\*\*)。



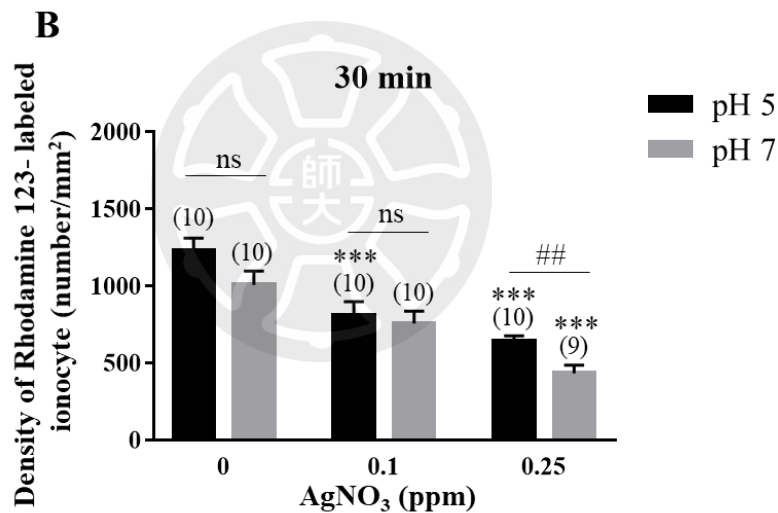
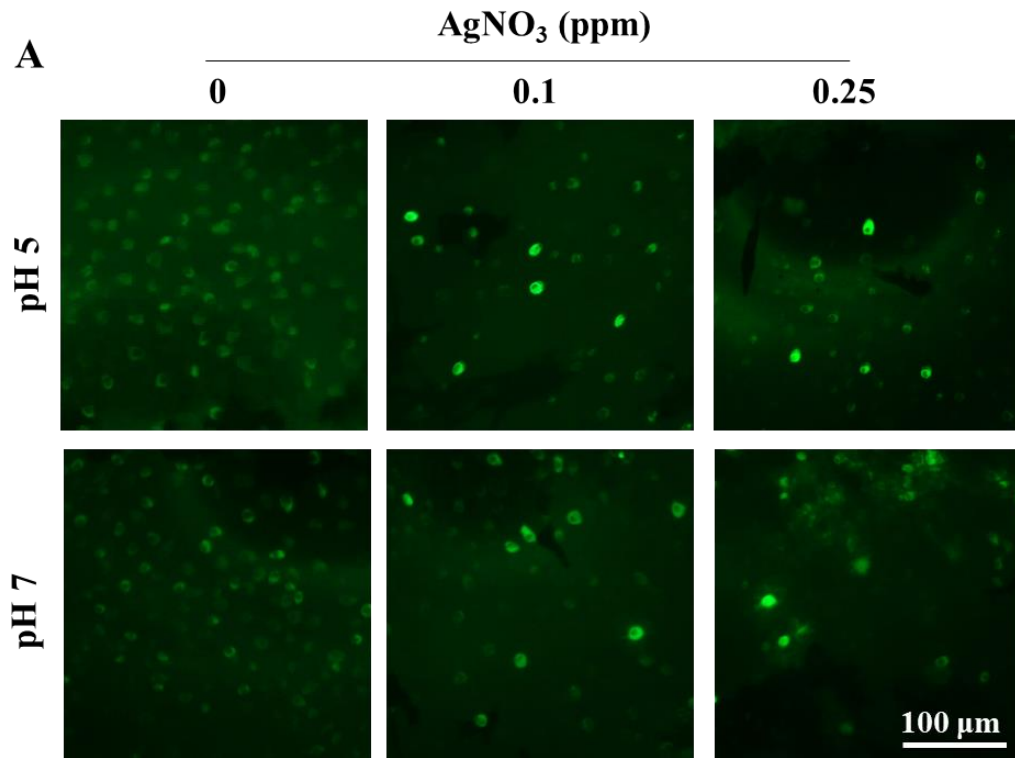


圖 10：30 分鐘處理 AgNO<sub>3</sub> 於不同 pH 值環境中對斑馬魚胚胎離子細胞型態及數目之影響。將 72 hpf 斑馬魚胚胎暴露 30 分鐘後，以 Rhodamine 123 標定各組離子細胞，以觀察形態(A)並計算數目(B)。每組樣本數標示於括號內，統計結果圖表皆以平均值±標準誤差(Standard error of the mean, SEM)標示。不同 pH 值環境間數據以 Student's *t*-test (two-tailed)進行分析，達到統計顯著差異為 *p* value 小於 0.01(##)。不同 AgNO<sub>3</sub> 濃度間比較則以 One-way ANOVA 進行分析，達到統計顯著差異為 *p* value 小於 0.001(\*\*\*)。

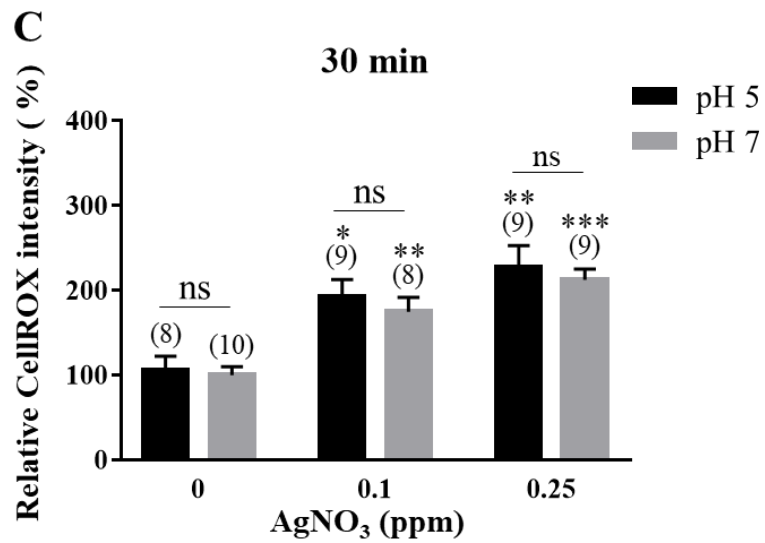
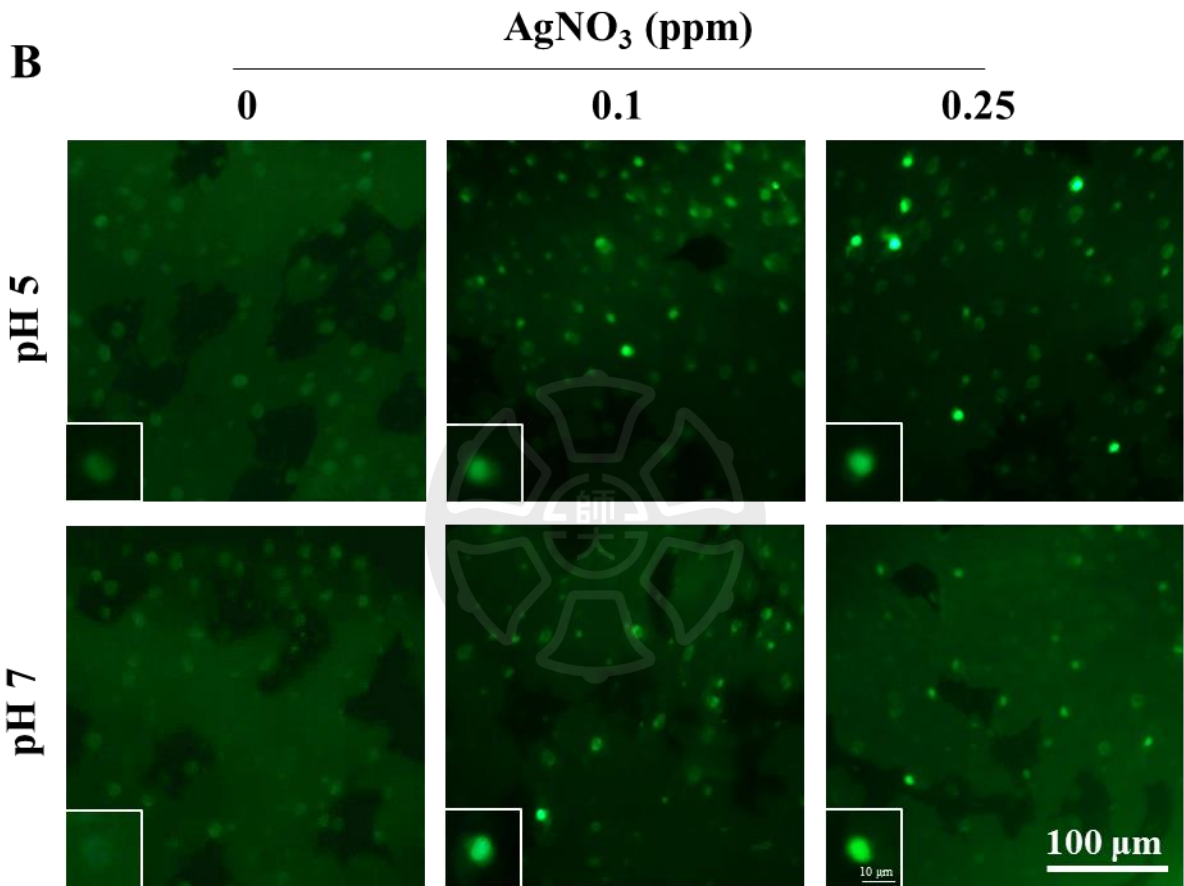
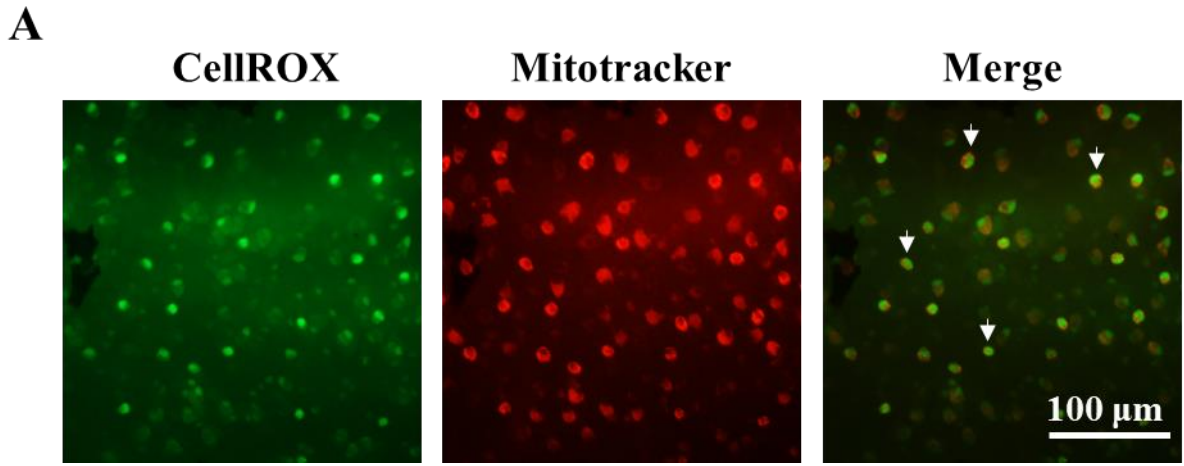


圖 11：30 分鐘處理  $\text{AgNO}_3$  於不同 pH 值環境中對斑馬魚胚胎離子細胞氧化壓力程度之影響。將 72 hpf 斑馬魚胚胎暴露 30 分鐘後，以 CellROX 及 MitoTracker 共染(A)，觀察離子細胞氧化壓力訊號(B)並量化其氧化壓力程度 (C)。圖 A 白色箭頭為 CellROX 及 MitoTracker 訊號重疊之區域。每組樣本數標示於括號內，統計結果圖表皆以平均值±標準誤差(Standard error of the mean, SEM)標示。不同 pH 值環境間數據以 Student's *t*-test (two-tailed)進行分析；不同  $\text{AgNO}_3$  濃度間比較則以 One-way ANOVA 進行分析，達到統計顯著差異為 *p* value 小於 0.05(\*)及 0.01(\*\*)。



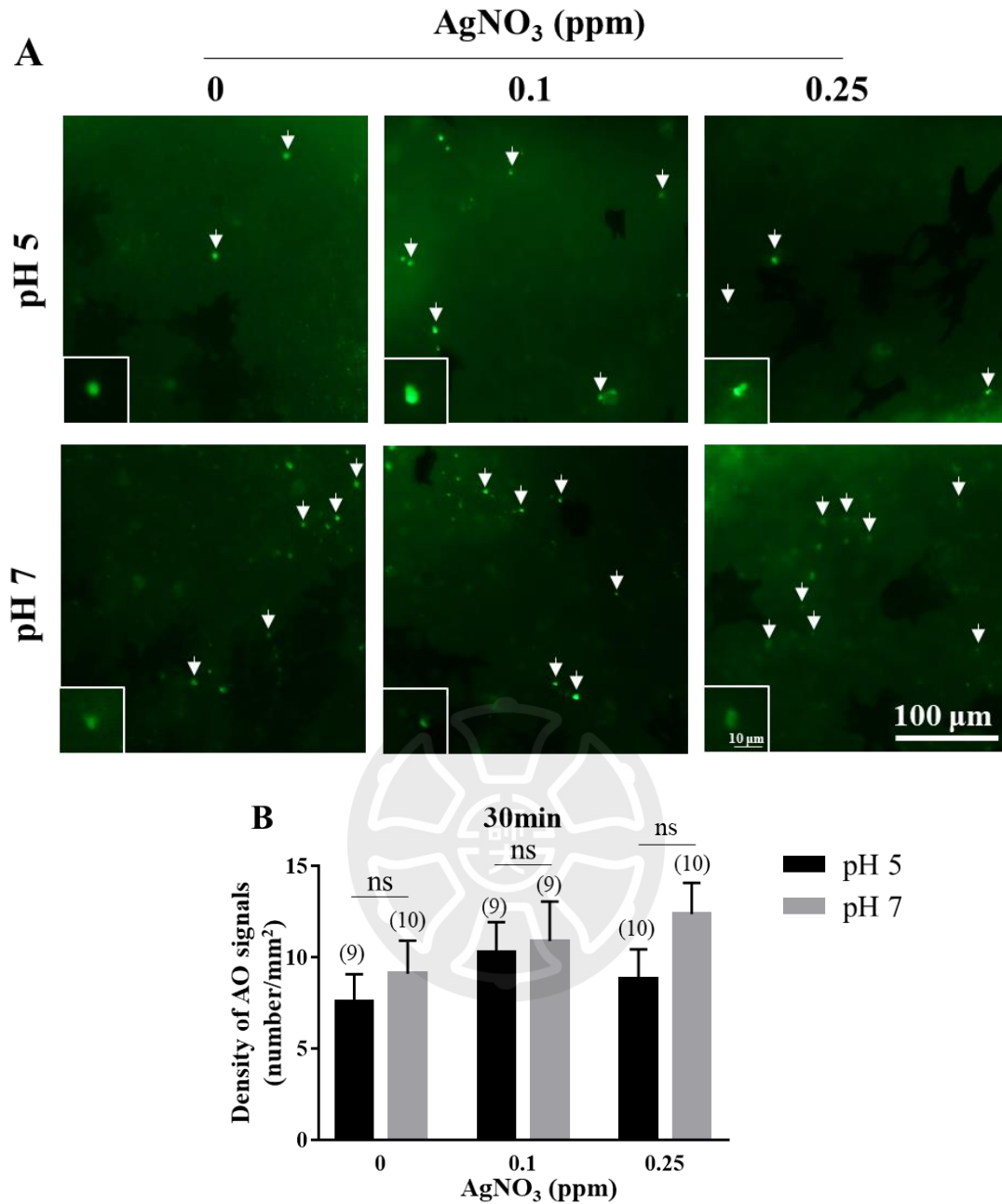


圖 12：30 分鐘處理 AgNO<sub>3</sub> 於不同 pH 值環境中對斑馬魚胚胎離子細胞細胞凋亡程度之影響。將 72 hpf 斑馬魚胚胎進行暴露 30 分鐘後，以 AO 標定進行細胞凋亡的細胞，觀察細胞凋亡訊號(A)並計算其數目(B)，AO 訊號以白色箭頭標示。每組樣本數標示於括號內，統計結果圖表皆以平均值±標準誤差(Standard error of the mean, SEM)標示。不同 pH 值環境間數據以 Student's *t*-test (two-tailed)進行分析，達到統計顯著差異為 *p* value 小於 0.05(#)。不同 AgNO<sub>3</sub> 濃度間比較則以 One-way ANOVA 進行分析。

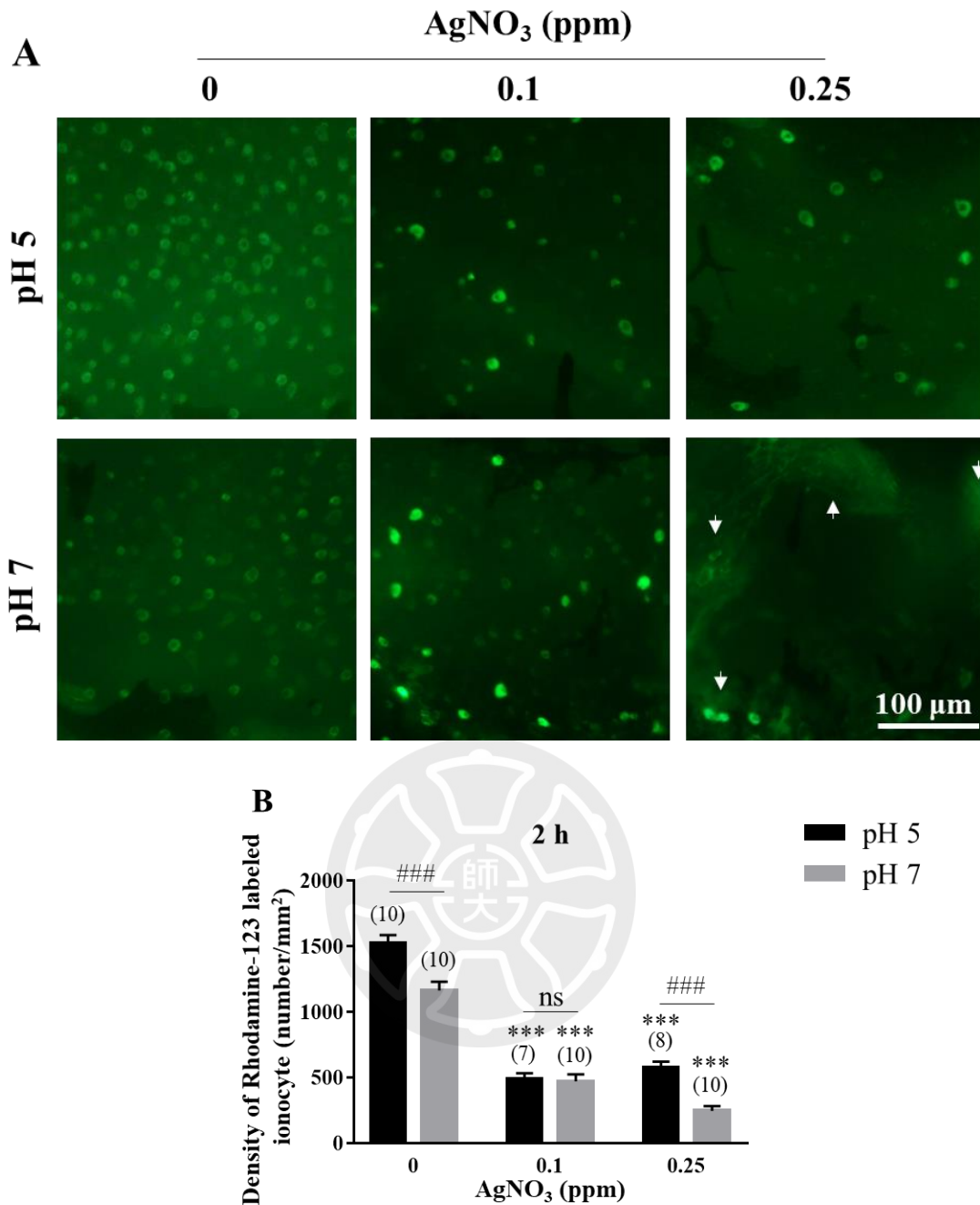


圖 13：2 小時處理 AgNO<sub>3</sub> 於不同 pH 值環境中對斑馬魚胚胎離子細胞形態及數目之影響。以 Rhodamine 123 標定離子細胞，觀察 72 hpf 胚胎暴露 2 小時後離子細胞型態(A)並計算其數目(B)。白色箭頭標示卵黃囊表面破損位置。每組樣本數標示於括號內，統計結果圖表皆以平均值±標準誤差(Standard error of the mean, SEM)標示。不同 pH 值環境間數據以 Student's *t*-test (two-tailed)進行分析，達到統計顯著差異為 *p* value 小於 0.001(###)。不同 AgNO<sub>3</sub> 濃度間比較則以 One-way ANOVA 進行分析，達到統計顯著差異為 *p* value 小於 0.001(\*\*\*)。

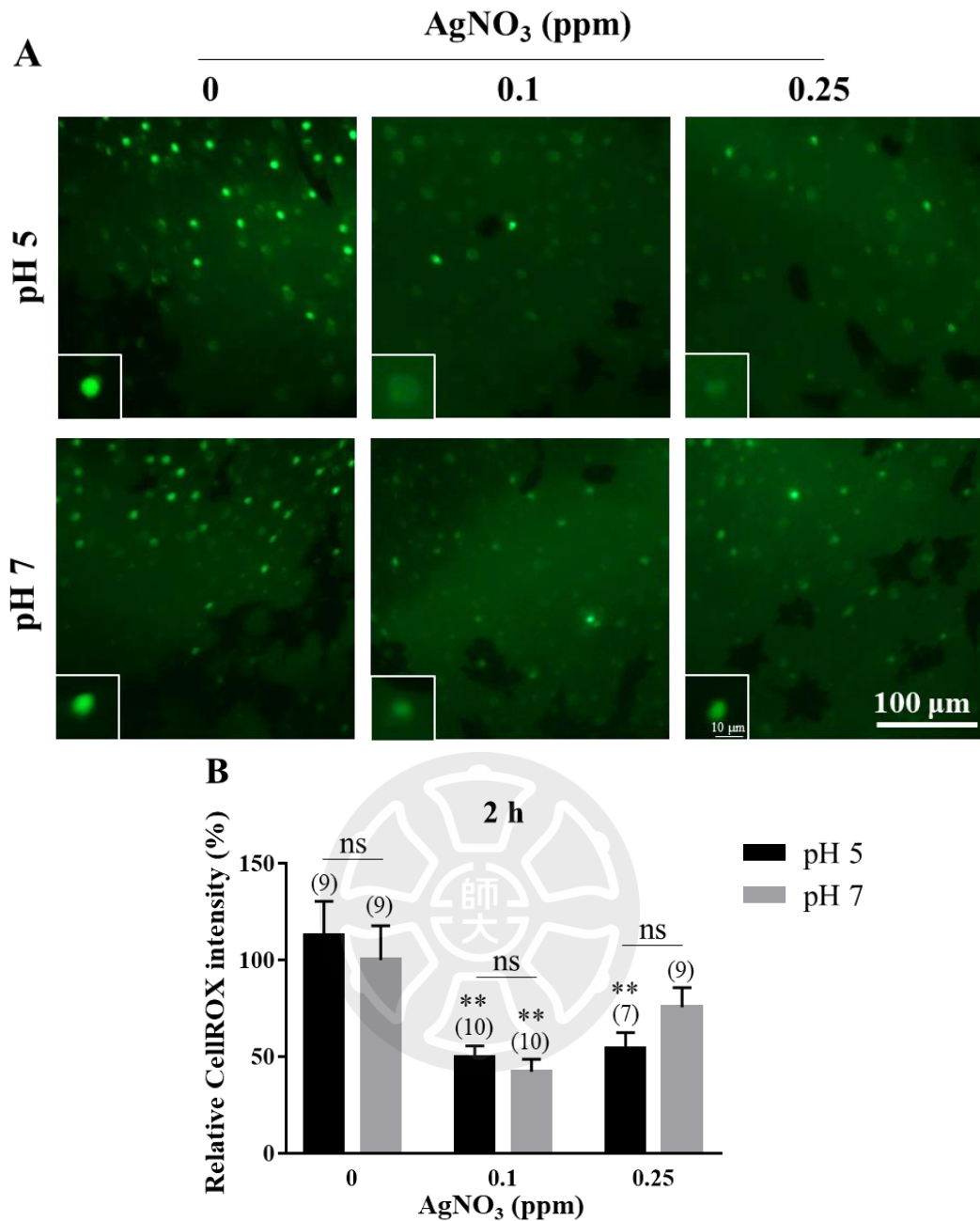


圖 14：2 小時處理 AgNO<sub>3</sub> 於不同 pH 值環境中對斑馬魚胚胎離子細胞氧化壓力程度之影響。以 CellROX 標定氧化壓力訊號，觀察 72 hpf 胚胎暴露 2 小時後離子細胞的氧化壓力訊號(A)並量化氧化壓力程度(B)。每組樣本數標示於括號內，統計結果圖表皆以平均值±標準誤差(Standard error of the mean, SEM)標示。不同 pH 值環境間數據以 Student's *t*-test (two-tailed)進行分析。不同 AgNO<sub>3</sub> 濃度間比較則以 One-way ANOVA 進行分析，達到統計顯著差異為 *p* value 小於 0.01(\*\*)及 0.001(\*\*\*)。

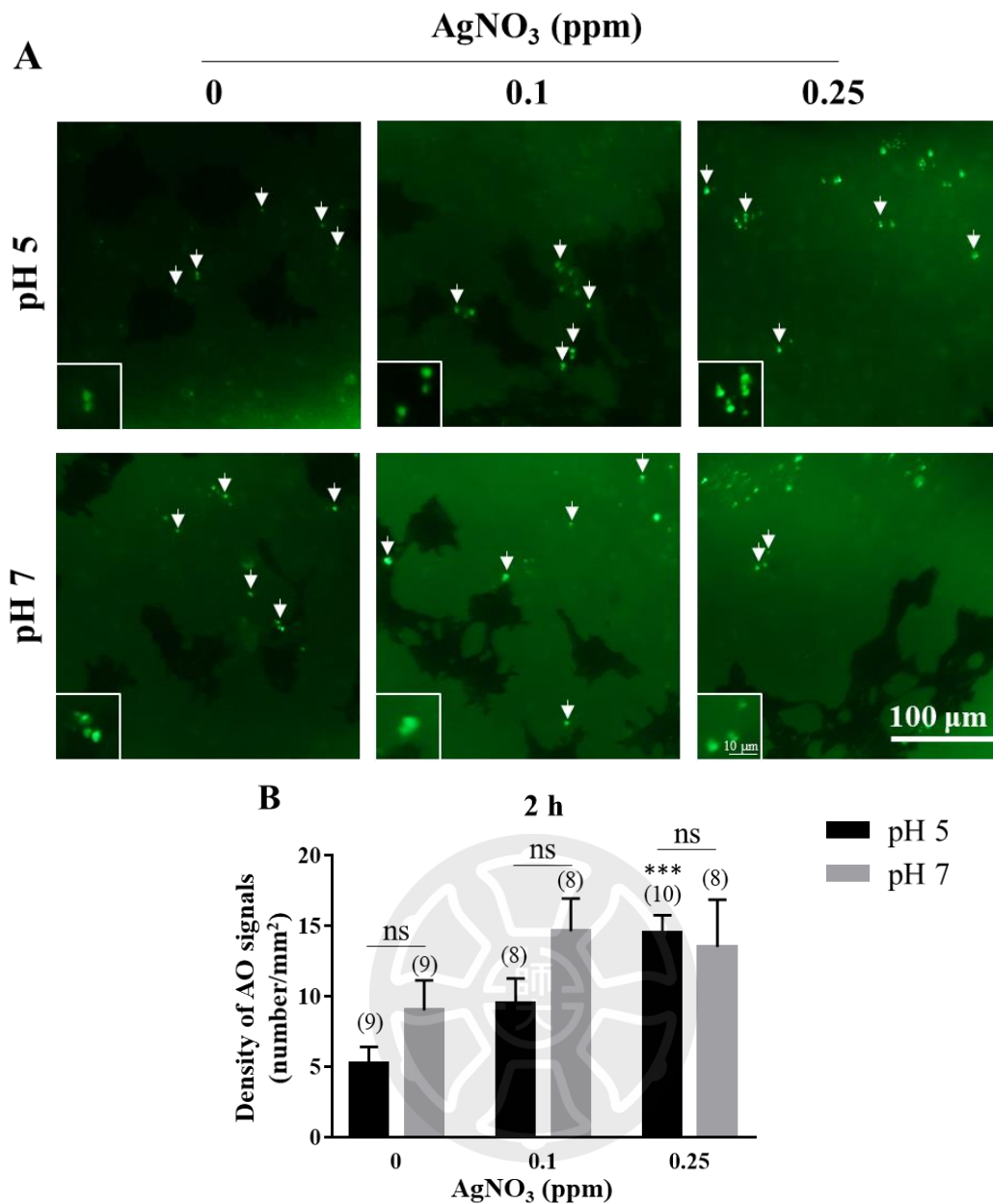


圖 15：2 小時處理 AgNO<sub>3</sub> 於不同 pH 值環境中對斑馬魚胚胎離子細胞細胞凋亡程度之影響。以 AO 標定細胞凋亡訊號，觀察 72 hpf 胚胎暴露 2 小時後卵黃囊離子細胞細胞凋亡訊號(A)並計算訊號數目(B)。每組樣本數標示於括號內，統計結果圖表皆以平均值±標準誤差(Standard error of the mean, SEM)標示。不同 pH 值環境間數據以 Student's *t*-test (two-tailed)進行分析：不同 AgNO<sub>3</sub> 濃度間比較則以 One-way ANOVA 進行分析，達到統計顯著差異為 *p* value 小於 0.001(\*\*\*)。