

國立臺灣師範大學生命科學系 碩士論文



保護劑對斑馬魚側線機械性傳導通道之影
響

Effects of protective agents on mechano-
transduction channels in lateral-line hair cells of
zebrafish larvae

研 究 生：莊偉民

Wei-Min Chuang

指 導 教 授：林豐益 博士

Li-Yih Lin

中華民國一〇二年 元月

目錄

目錄.....	1
摘要.....	2
Abstract.....	4
前言.....	6
研究目的.....	17
材料與方法.....	21
實驗設計.....	19
結果.....	26
討論.....	34
總結.....	42
參考文獻.....	43
圖表.....	55

摘要

毛細胞的機械性傳導通道 (mechanotransducer channel, MET channel) 會受到機械性刺激而開啟。陽離子經由 MET 通道流入造成毛細胞發生去極化，而釋放神經傳遞物質。胺基糖苷類 (aminoglycosides, AGs) 抗生素在臨床上被用於治療革蘭氏陰性菌感染的疾病，但是 AGs 常導致許多副作用包括內耳毛細胞的損傷，甚至聽力喪失。魚類側線毛細胞為一種機械性接受器，負責感覺外在水體的流動。哺乳動物內耳與魚類側線的毛細胞，兩者不論是構造形態或功能特性都有相似之處，因此斑馬魚常被採用作為耳毒性藥物篩選的模式動物。然而對於毛細胞 MET 通道的特性目前仍沒有很好的驗證方式。本研究應用非侵入掃描式離子選擇電極技術 (scanning ion-selective electrode technique, SIET)，針對斑馬魚胚胎的 MET 通道進行特性分析。毛細胞的纖毛束經微電極的機械性刺激後，可記錄到鈣離子流入，但是鉀離子與鈉離子的通透並不顯著。並且鈣離子流入會被 AGs (neomycin 和 gentamicin) 的短時間 (30 分鐘) 處理所抑制，顯示 MET 通道可能被 AGs 所阻斷。將環境中鈣離子濃度從 0.2 mM 提高到 2 mM，可減少 neomycin 和 gentamicin 對 MET 通道的阻斷；而提高水中的鎂離子濃度到 5 mM，卻只能降低 gentamicin 對 MET 通道的阻斷。Amiloride 過去被認為是一種 MET 通道的阻斷劑。

本研究發現 **amiloride** 並無法阻斷側線毛細胞 MET 通道的鈣離子流入，但卻可降低 AGs 對 MET 通道的阻斷作用。

關鍵字：斑馬魚，側線，毛細胞，機械性傳導通道，胺基糖苷類抗生素，**amiloride**

Abstract

The mechanotransducer (MET) channel on hair cells is gated by mechanical stimulation. Cation influx via MET channels causes depolarization of hair cells and eventually releasing of neurotransmitters. Aminoglycosides (AGs) antibiotics are clinically used to treat gram-negative bacterial infections, but they often cause side effects including damage of inner ear hair cells or even hearing loss. Fish lateral-line hair cells are mechanoreceptors for ambient current sensation. Since the lateral-line hair cells share structural and functional properties with mammalian inner ear hair cells, zebrafish has been used as a model animal for hair cell and ototoxicity studies. However, the property of MET channel in zebrafish hair cells has not been well examined. In this study, a non-invasive scanning ion-electrode technique (SIET) was applied to analyze the properties of MET channels in intact zebrafish embryos. Inward Ca^{2+} but not K^+ and Na^+ fluxes were recorded at the base of hair bundles as they were deflected by the microelectrode. The Ca^{2+} influx was suppressed by short-term treatment (30 min) of AGs (neomycin and gentamicin), suggesting that MET channels were blocked by AGs. Elevating external Ca^{2+} level (0.2 to 2 mM) neutralized the blockade of neomycin and gentamicin. However, elevating the Mg^{2+} level up to 5 mM only neutralized the blockade of gentamicin but not neomycin. Amiloride was considered as a MET channel blocker in previous studies, however, we found that amiloride cannot block Ca^{2+} influxes of MET channels, but it can neutralize the blockade of AGs.

Keyword : zebrafish · lateral-line · hair cells · mechanotransducer channel · aminoglycoside antibiotics · amiloride

Abbreviations:

AG, aminoglycoside; DHS, dihydrostreptomycin; DMSO, dimethyl sulfoxide; dpf, days post-fertilization; Gd^{3+} , gadolinium; GTTR, Gentamicin conjugated Texas Red; HC, hair cell; LIX, liquid ion exchanger cocktail; KC, keratinocyte; NW, normal water; MET, mechanotransducer; SIET, scanning ion-electrode technique; TRP, transient receptor potential.

前言

內耳的機械性接受器 (Mechanoreceptor)

機械性接受器能將機械性的刺激轉變為神經電位訊號，而經神經纖維將訊號送入中樞，人體的聽覺、平衡覺和觸覺即屬於這類受器 (Schwander et al., 2010)。

人類的內耳中具有聽覺受器－耳蝸 (cochlea)。耳蝸呈螺旋形，管內被基膜 (basilar membrane) 及前庭膜 (vestibular membrane) 隔成三個管道，位於中間的管道稱為耳蝸管 (cochlea duct)，其內部充滿著淋巴液，耳蝸管內具有一個特別的構造稱為柯帝氏器 (organ of corti)，柯帝氏器覆於基膜，有四排毛細胞，其中三排為外毛細胞，一排為內毛細胞。毛細胞上具有彈性的覆膜 (tectorial membrane) 覆蓋毛細胞的尖端。當聲音的振動傳至內耳時，毛細胞被覆膜摩擦擠壓，此機械性的變化會刺激毛細胞，經由細胞底部釋放神經傳遞物質興奮感覺神經纖維末梢，神經衝動再沿著神經傳至大腦皮層顳葉之聽覺區 (Zenner and Plinkert, 1992; Lim and Kalinec, 1998)。

內耳除了耳蝸外尚有偵測平衡覺的半規管 (semicircular canals)、橢圓囊 (utricle) 和球囊 (sacculle)。半規管有三條分別為外管、前管及後管，三者互為垂直，管腔內充滿淋巴液。半規管基部連於膨大的壺腹，壺腹內的毛細胞頂部覆有塊膠狀的物質，毛細胞的纖毛伸入此

膠狀物質中。當頭轉向時，由於慣性作用，淋巴液不會跟著移動，壺腹頂膠狀體會彎至另一側。當頂膠狀體彎向某側時，會使毛細胞去極化而興奮，而產生神經衝動至中樞神經系統，以感覺頭部在空間中轉動的方向及速率(Colclasure et al., 2003; Ronca et al., 2000)。橢圓囊與球囊內面壁上有呈叢排列的毛細胞，約數千個，毛細胞表面覆蓋一層膠狀物質，薄膜毛細胞的纖毛會伸出到膠質膜中，膜上含有稱為耳石 (otolith) 的碳酸鈣結晶，比重大於內淋巴液，因而也有較大的慣性。靜止不動時，重力作用使耳石的膠狀膜壓在毛細胞上，與毛細胞連接的神經纖維持續產生動作電位，讓大腦感覺重力的所在。(Peusner, 2001; Colclasure et al., 2003)

魚類的側線系統

魚類的側線系統 (lateral-line system) 位於體表側面由頭部延伸到尾部，是一種特化的感覺器官，用來感受水中微小的活動，對水流及水壓非常敏感，在魚類許多行為中 (如群游、追捕獵物和逃避敵害等) 常扮演重要角色。側線的感覺單位是神經丘 (neuromast)，主要有兩種類型：一種是體表神經丘 (superficial neuromast) 位於魚體表皮內，可接收低頻率的訊號 (<30Hz)，主要偵測水流的加速度，另一型是管狀神經丘 (canal neuromast) 埋入真皮的管道內，透過側線孔偵測外界水體，可接收高頻率的訊號，主要偵測壓力梯度的變化(Coombs

and van Netten, 2006)。每個神經丘包含毛細胞、支持細胞及頂帽 (cupule)，型態會隨著年齡的增長而有所改變。仔魚時期神經丘表現在體表上，且不具頂帽，能直接接觸外界水體，隨著發育會逐漸包埋進表皮下(Ghysen et al., 2004, 2007)。

脊椎動物的毛細胞

脊椎動物的毛細胞由細胞體 (cell body) 與感覺纖毛束 (sensory hair bundle) 兩部分組成。感覺纖毛束通常包含了一根較長的動纖毛 (kinocilium) 及許多較短的靜纖毛 (stereocilia)。靜纖毛的頂端分布許多機械性傳導通道 (mechanotransducer channel, MET channel)，這類通道以 F-actin filament 的蛋白質與其他纖毛間連成一組系統，這種將纖毛間彼此連接的構造被稱為頂端連結 (tip links) (Fettiplace et al., 2001; Furness et al., 2010)。

先前研究指出當機械性的刺激發生時，因頂端連結使得纖毛間會相互拉扯，使各靜纖毛頂端的 MET 通道因而開啟，外界的陽離子就會進入毛細胞，使毛細胞內電位升高，造成去極化，並釋出神經傳遞物質—乙醯膽鹼 (acetylcholine) 興奮突觸後的傳入神經元，將神經衝動傳至中樞(Beurg et al., 2009 ; Wersinger and Fuchs, 2011; Marcotti, 2012)。

機械性傳導通道(MET channel)的特性

早期研究認為MET通道是一種非選擇性的陽離子通道(Ohmori, 1985; Corey and Hudspeth, 1979)。這類的通道能讓陽離子(例如： Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、 K^+ 、 Na^+)以及一些小分子有機物質(例如：fluorescent dye FM1-43)通過孔道進入毛細胞，通道孔徑約1.3~1.5 nm (Farris et al., 2004; Lumpkin and Caterina, 2007)。

前人利用分離的毛細胞以鈣離子螢光標定或patch-clamp進行實驗，結果認為MET通道應為一種鈣離子通道(Ricci and Fettiplace, 1998; Beurg et al., 2009; Fettiplace, 2009)。並有研究指出MET通道對鈣離子通透性高出鈉和鉀離子至少十倍(Ohmori, 1985; Marcotti et al., 2005; Beurg et al., 2008, 2009)。目前脊椎動物內耳與魚類側線毛細胞上的MET通道的分子組成仍具爭議性，主要認為transient receptor potential (TRP) channels家族的蛋白較可能是參與的分子，另外也有許多研究發現TRP通道對鈣離子有較高的通透性(Corey, 2006; Fettiplace, 2009)。

然而陸生脊椎動物的毛細胞位於充滿著內淋巴液的耳蝸管中，內淋巴液相對於一般胞外體液而言，其具有高濃度的鉀離子(150 mM)，反而鈣離子(<20 μM)和鈉離子(1 mM)的濃度低很多，因此多數的研

究相信內耳毛細胞的MET通道主要是通透鉀離子(Fettiplace, 2009; Zdebik et al., 2009)。

胺基糖苷類抗生素（aminoglycosides antibiotics）的副作用

胺基糖苷類抗生素（aminoglycosides, AGs）是一群由糖苷鍵（glycoside bonds）連接胺糖（amino sugar）的抗生素。臨床上主要是用於革蘭氏陰性菌 G（-）感染的治療，利用干擾細菌的蛋白質合成，而影響到細菌的基本生理功能，達到殺菌作用。這類抗生素由於水溶性佳、化學性質穩定及抗菌效果好，因此廣泛的被應用，但是，卻有耳毒性的缺點(Huth et al., 2011)。

在小鼠、人類與天竺鼠的研究中發現，AGs 注射到血液中後不久便會進入內耳中，但在內耳累積的濃度並不會高於血漿中。若數小時內從血液中將抗生素移除，卻發現在內耳中的抗生素會保留數個月之久(Stupp et al., 1973; Tran ba Huy et al., 1986; Dulon et al., 1993; Becvarovski et al., 2002)。一旦 AGs 進入到內耳中，便會透過胞吞方式(De Groot et al., 1991; Hashino and Shero, 1995; Richardson et al., 1997)或藉由 MET 通道(Coffin et al., 2009; Alharazneh et al., 2011)進入毛細胞。AGs 進入毛細胞後主要積聚部位是粒線體和溶體，研究發現該類抗生素引起的細胞內活性氧自由基（reactive oxygen species,

ROS) 數量增加，而造成毛細胞產生細胞凋亡，這也是發生聽力損害的主要因素，而 neomycin、gentamicin 和 streptomycin 均能刺激活性氧自由基的生成(Matsui et al., 2004; Warcho, 2010; Huth et al., 2011)。

最近有越來越多報告認為 AGs 是經由 MET 通道進入毛細胞。譬如利用聲音的刺激可以促進 MET 通道的開啟，因而增加了 AGs 的耳毒性(Hayashida et al., 1989; Ricci et al., 2005; Huth et al., 2011)。然而 AGs 藉由 MET 通道進入細胞，但卻也會阻斷 MET 通道的離子流(Ohmori, 1985; Kroese et al., 1989; Kros et al., 1992; Ricci, 2002; Kimitsuki et al., 2009)。Marcotti 等人(2005 年)利用 whole-cell voltage clamp 技術證明 dihydrostreptomycin (DHS, 一種 AGs) 對 MET 通道的阻斷能力，從細胞外側會比內側強。所以認為 MET 通道可能是一種單方向的匝道，因此會促進 AGs 在毛細胞內不斷累積。這或許可以用來解釋為何毛細胞比一般細胞更容易受到 AGs 的傷害，而發生聽力受損的情形(Waguespack and Ricci, 2005)。

Aminoglycosides antibiotics 對側線神經丘的影響

Williams 與 Holder (2000 年) 在實驗中首次發現 neomycin 會造成斑馬魚仔魚神經丘的毛細胞死亡，而在 Harris 等人的研究中(2003 年)也有類似的結果。接著 Owens 研究團隊(2008 與 2009 年)對 AGs 進行研究，發現高濃度的 neomycin 與 gentamicin 會對斑馬魚仔

魚的側線毛細胞造成損傷，neomycin 在 90 分鐘內就會引起快速且急劇的損傷並且與濃度有相關性，而 gentamicin 在 90 分鐘內會引起一半毛細胞損傷，並且在 24 小時內損傷程度會隨著時間持續加劇。而 gentamicin 對側線神經丘的傷害的相關實驗也在 Trump 等人（2010 年）利用墨西哥穴盲魚與斑馬魚為模式的實驗中，發現在 gentamicin 處理後，側線神經丘經 DASPEI 與 FM1-43 等的染色訊號都會消失，顯示側線神經丘中的毛細胞已受到 gentamicin 傷害而發生凋亡的現象。

二價陽離子對側線神經丘的影響

Coffin 等人（2009 年）將斑馬魚仔魚浸泡於無鈣離子（Ca²⁺-free）的馴養水中 90 分鐘後，經 YO-PRO-1 染色發現側線神經丘中的毛細胞數量明顯下降。若以含鎂離子的馴養水（試圖以鎂離子取代鈣離子）進行相同實驗，也無法保持原有的毛細胞數量，證實毛細胞對鈣離子有絕對的需求性。Coffin 等人（2009 年）也利用不同濃度的二價陽離子與 AGs 同時對仔魚進行處理，發現在高鈣和高鎂（2100 μM）環境中可減少 neomycin 與 gentamicin（抗生素濃度低於 300 μM）對側線毛細胞的傷害，但在 neomycin 的處理實驗中，高鎂對毛細胞傷害的保護性明顯較差。

阻斷劑對 MET 通道之影響

早期 Jorgensen 和 Ohmori (1988 年) 利用雞的內耳毛細胞進行實驗證實 amiloride 對 MET 通道具有阻斷的現象。之後, Rusch 等人(1994 年) 利用老鼠內耳的外毛細胞進行實驗, 也證明 amiloride 及其衍生物都可阻斷 MET 通道。另外, Nagata 等人(2005 年) 利用 gadolinium、amiloride 與 gentamicin 處理具有 TRPA1 (推測是一種 MET 通道) 表現的 HEK 293 cells, 在進行 patch-clamp 測量中都出現電流下降的趨勢, 所以作者認為這三種物質具有相似的親和力, 會藉由結合毛細胞上的 MET 通道, 而造成阻斷效果, 並認為 gadolinium 會阻斷多數種類的 TRP 通道。

Owens 等人 (2009 年) 將 5-6 dpf 的斑馬魚仔魚先經 amiloride 處理, 再浸泡於 AGs 中, 實驗結果顯示毛細胞損傷程度出現下降的趨勢, 作者推測若將 MET 通道阻斷, 可阻止 neomycin 與 gentamicin 進入毛細胞, 而使毒害降低, 於是提出這兩種抗生素進入毛細胞的路徑可能是相同的。之後, Alharazneh 等人(2011 年) 證明 curare、quinine 和 amiloride 這三種 MET 通道阻斷劑都可減少大鼠內耳的毛細胞對 Gentamicin conjugated Texas Red (GTTR) 的吸收。

掃描式離子選擇電極技術(scanning ion-selective electrode

technique, SIET)

掃描式離子選擇電極技術 (scanning ion-selective electrode technique, SIET) 具有非侵入性、即時與立體空間測量的特性，已被應用於多種領域之研究測量(Smith et al., 1999; Sun et al., 2009)。SIET 可用來測量細胞或組織附近通道蛋白的離子梯度變化，測量時將微電極管口填充能專一通透離子的選擇性離子交換膜 (liquid ion exchanger cocktail ; LIX) 並在管內加入欲測離子的電解液，即成為能專一通透特定離子的選擇性離子微電極，SIET 可測量許多種類的離子，包括 H^+ 、 K^+ 、 NH_4^+ 、 Na^+ 、 Cl^- 和 Ca^{2+} (Smith et al., 1999; Messerli et al., 2004; Donini and O'Donnell, 2005; Garber et al., 2005; Donini, 2007; Kreitzer et al., 2007; Sun et al., 2009; Li et al., 2012)。我們將這項技術應用於分析活體斑馬魚仔魚側線毛細胞上的 MET 通道對於離子通透的情形，試圖對脊椎動物毛細胞和 MET 通道的相關研究，建立一個新的且有力的研究方法。

利用 SIET 測量斑馬魚側線毛細胞的離子流量

過去研究毛細胞的實驗材料多來自於鳥類和哺乳類的內耳，傳統的脊椎動物實驗動物模型雖然已經回答了很多有關於毛細胞受損的問題，但多是以 *in vitro* 方式或是染劑試驗進行實驗(Malgrange et al., 2002; Avraham, 2003; Kalinec et al., 2003)。此外，若用於藥物篩選時

所需的成本和數量將會使人望之卻步。而斑馬魚側線神經丘的毛細胞是位於體表相較之下方便於觀察與實驗進行(Froehlicher et al., 2009)。並且側線毛細胞的結構和功能相似其他脊椎動物的內耳毛細胞，當然也包括人類在內(Williams and Holder, 2000; Owens et al., 2008; Froehlicher et al., 2009)。於是近年來，由於斑馬魚的生長週期短、產卵量大、胚胎體外發育且呈透明，與用藥方式較簡單等特質，目前已有許多關於耳毒性的研究報告都使用斑馬魚作為模式動物(Ton and Parng et al., 2005; Chiu et al., 2008; Owens et al., 2008; Ou et al., 2010)。

在我們早期的研究中，已陸續建立了 SIET 對斑馬魚和青鱗魚仔魚的離子通道之測量模式(Horng, 2009; Wu et al., 2010; Hwang et al., 2011; Shen et al., 2011; Shih et al., 2012)。利用 SIET 也可以針對單一顆神經丘進行活體的即時性測量，而獲得最直接的生理證據。先前我們對於斑馬魚仔魚側線相關之研究是以鈣離子流作為指標(未發表文章)，實驗發現毛細胞的感覺纖毛束在遭受機械性刺激時，MET 通道確實會開啟，若不推動或是遠離感覺纖毛束的情況下 MET 通道為關閉的情形，也發現機械性刺激必須與感覺纖毛束的底部接觸才能引發 MET 通道的開啟，僅接觸感覺纖毛束的中段或頂端，則無法刺激 MET 通道打開。利用相同的方式測量神經丘周圍的角化細胞(keratinocyte)發現不會有鈣離子流的產生。因此推測毛細胞上的 MET 通道可能是

位於靜纖毛而非動纖毛。

研究目的

儘管近年來新型的 AGs 毒性較小，但大劑量和長期療程使用時仍難避免其毒性影響。對人體所造成的耳毒性聽力損害一般是不可逆的，至今仍沒有較有效且安全的治療方法。本研究使用仔魚時期的斑馬魚，這時期神經丘分布於體表的側線上，且外尚未被包被，其毛細胞已發育完成並已具有功能，特別有利進行機械性感覺的功能研究，及活體染色和觀察檢測。從結構來看，斑馬魚側線神經丘內的毛細胞在生理功能與哺乳動物的內耳毛細胞非常相似，但畢竟兩者所處的環境有所差異。因此我們利用 SIET 進行活體斑馬魚胚胎側線毛細胞的分析，試圖想了解斑馬魚的側線毛細胞與哺乳動物的內耳毛細胞之離子通透差異，並希望找出能夠保護毛細胞免於抗生素傷害的藥物或方法。

雖已有實驗證實在高濃度鈣離子或鎂離子的環境下，可有效保護毛細胞，降低 AGs 對其的損傷(Richardson and Russell, 1991; Coffin et al., 2009)。亦有報告指出，有許多 MET 通道阻斷劑可降低 AGs 被毛細胞的吸收量(Owens et al. 2009; Alharazneh et al. 2011)。但過去這些實驗報告中多以 *in vitro* 方式或是染劑試驗進行毛細胞的損傷評估，因而無法觀測到機械性受器在凋亡前的生理變化。而本研究是利用 SIET 針對經藥物處理的毛細胞受到機械性刺激時，毛細胞上微量

的離子流有何差異性變化。主要是探討 AGs 對毛細胞的生理功能影響，並試圖找出預防 AGs 對毛細胞損害的可能對策，本篇報告的研究目標包括：

- (1) 探討側線毛細胞對鈣、氫、鈉和鉀離子的通透能力。
- (2) 探討胞外的二價陽離子 (Ca^{2+} 、 Mg^{2+}) 與 AGs 對側線毛細胞的 MET 通道功能之影響。
- (3) 探討 MET 通道阻斷劑(gadolinium、curare 和 amiloride)與 AGs 對側線毛細胞的 MET 通道功能之影響。

實驗設計

(一) 進行側線毛細胞對離子通透特性的分析

- (1) 以 SIET 來測量毛細胞上 MET 通道對 Ca^{2+} 、 H^+ 、 Na^+ 和 K^+ 的流量，試圖分析 MET 通道對不同陽離子的通透性。
- (2) 在提高單一陽離子濃度 (Mg^{2+} 、 Na^+ 或 K^+) 的人工水中，以 SIET 來測量毛細胞的鈣離子流量，試圖分析不同高濃度陽離子對於 MET 通道的影響。

(二) 探討 AGs 對側線毛細胞的離子流量影響

分析 MET 通道可通透毛細胞的離子種類後，藉由鈣離子流量作為指標，評估 AGs 處理對離子通道之影響。

(三) 探討二價陽離子對毛細胞的保護性

- (1) 以高濃度的二價陽離子 (Ca^{2+} 或 Mg^{2+}) 與 AGs 同時進行處理，藉由鈣離子流量作為毛細胞功能性指標，探討二價陽離子對毛細胞的保護性。
- (2) 先以高濃度的二價陽離子 (Ca^{2+} 或 Mg^{2+}) 進行前處理，再以 AGs 進行處理，藉由鈣離子流量作為指標，探討二價陽離子能否對毛細胞發生預防性保護。

(四) 探討通道阻斷劑對側線毛細胞的保護性

- (1) 以 MET 通道阻斷劑 (gadolinium、curare 和 amiloride) 進行處理，並測定阻斷劑對側線毛細胞的鈣離子流量之影響。
- (2) 以 MET 通道阻斷劑進行前處理，再以 AGs 進行處理，藉由鈣離子流量作為指標，探討通道阻斷劑能否對毛細胞發生預防性保護。

材料與方法

一、實驗動物

斑馬魚 (*Danio rerio*, AB strain) 一種經常使用於遺傳及胚胎發育等方面研究的模式動物，成魚飼養於 27 °C 的恆溫淡水中，光週期為 14 小時光照/10 小時黑暗。取得的受精卵後培育盛有正常人工淡水 (normal water, NW) 的培養皿 (10 cm) 中，NW 的成分為 0.5 mM NaCl、0.2 mM MgSO₄、0.2 mM CaSO₄、0.16 mM KH₂PO₄ 與 0.16 mM K₂HPO₄ 溶於 dH₂O，馴養水體 pH 值保持在 pH6.75~6.85 之間，其離子成分與自然界淡水相符。

二、SIET的測量方法

SIET是利用微小的毛細管電極，偵測單一種類的離子濃度差 (ionic gradient) 或組織細胞的單一離子流量 (flux)。以拉針器將直徑 1.5 mm 的毛細玻璃管 (World Precision Instruments, Sarasota, FL; no. TW 150-4) 拉製成口徑約 3-4 μm 的微電極，將微電極放置 120 °C 烘箱中去除水氣並加入 N,N-dimethyl-trimethylsilyl- amine (Fluka, Buchs, Switzerland)。微電極中填充能專一通透離子的選擇性離子交換膜 (liquid ion exchanger cocktail, LIX) 及待測離子的電解液 (H⁺: 40 mM KH₂PO₄ 和 15 mM K₂HPO₄; Na⁺: 100 mM NaCl; K⁺: 100 mM KCl;

Ca^{2+} :100 mM CaCl_2)，即成為能專一通透特定離子的選擇性離子微電極。將此微電極接上前極放大器，再接到訊號放大器，放大後的訊號（1000倍）再經由類比數位轉換器（A/D converter）後由電腦讀取並以ASET軟體分析。微電極的位置控制及掃描移動則是靠電腦驅動步進馬達來控制，做三度空間移動時，可測量到固定距離間單一種類的離子濃度差，進而計算出所測量該離子在細胞表面的流量與方向（吸收或排放）。利用標準溶液(H^+ :pH7, 8, 9; Na^+ :1, 10, 100 mM NaCl ; K^+ :1, 10, 100 mM KCl ; Ca^{2+} :1, 10, 100 mM CaCl_2)，經 $\log[\text{H}^+]$ 、 $[\text{Na}^+]$ 、 $[\text{K}^+]$ 和 $[\text{Ca}^{2+}]$ 所得到的電壓輸出值，再由線性迴歸產生該離子的涅斯特斜率（Nernstian slope），即可將其測量樣本的電壓值換算成該離子所相對應的濃度(Smith et al., 1999)。

三、側線神經丘離子流量測定

本研究所使用之測量樣本為受精後四天斑馬魚仔魚(4 dpf)，經馴養於NW。測量麻醉劑配製為2 ml NW中加入300 μM tricaine緩衝溶液(Sigma-Aldrich)和0.3 mg/l ethyl 3-aminobenzoate methanesulfonate (MS222, Sigma- Aldrich)，再以0.1 N NaOH或0.1 N HCl滴定至pH值為7。

實驗操作時，將麻醉後斑馬魚仔魚擺放至顯微鏡載台上，經由正立顯微鏡連接上CCD攝影系統，將電極與胚胎影像傳送至螢幕監控，以進行電極操控與分析。在60倍水鏡下找到側線上的神經丘（L1和L2），將探針移動到神經丘的感覺纖毛束底部，確定探針有壓迫到感覺纖毛束，並將此點設為原點（o），之後向上移動10 μm遠離毛細胞，並將此點設為（x），測量時電極於o和x點間擺動，得兩點之間的電位差值（mv）。重複五次擺動測量，取其記錄值之中位數，最後將測得的電位差值套入公式，即可得到神經丘所排放或吸收的離子流量。

計算離子流量的方法，參考前人已發表的研究（Donini and O'Donnell, 2005; Shih et al., Smith et al., 2009）。經由ASET軟體獲得電位差值，進而利用下列方程式轉換成濃度：

$$\Delta C = C_b \times 10^{(\Delta V/S)} - C_b; \quad (1)$$

ΔC （ $\mu\text{mole l}^{-1} \text{cm}^{-3}$ ）為兩點的濃度梯度； C_b （ $\mu\text{mole l}^{-1}$ ）為背景值的濃度； ΔV 為電位梯度； S 為涅斯特斜率。經由 Fick's 擴散定律，將已知濃度利用下列方程式換算成離子流量：

$$J = D (\Delta C) / \Delta X; \quad (2)$$

J ($\text{pmole cm}^{-2} \text{s}^{-1}$)為離子的淨流量； D 為離子的擴散常數(H^+ : $9.37 \times 10^{-5} \text{cm}^{-2} \text{s}^{-1}$; Na^+ : $1.55 \times 10^{-5} \text{cm}^{-2} \text{s}^{-1}$; K^+ : $1.96 \times 10^{-5} \text{cm}^{-2} \text{s}^{-1}$; Ca^{2+} : $7.9 \times 10^{-6} \text{cm}^{-2}$)

s^{-1}) ; ΔC (pmole cm^{-3}) 為離子濃度梯度 ; ΔX (cm) 為兩點距離。

四、Aminoglycosides antibiotics 之藥物處理

分別將 neomycin (10 mg/ml, Sigma) 及 gentamicin (10 mg/ml, Sigma) 以 NW 或高濃度鈣離子的人工水 (H-Ca, 以 CaSO_4 將 NW 中的 Ca^{2+} 提高至 2 mM, 其餘離子濃度固定) 稀釋至 1, 10, 100, 1000 μM 。將 4 dpf 的仔魚分別浸泡於不同濃度的藥物中 30 分鐘, 使用 MS-222 將仔魚麻醉後, 將仔魚移至不含藥物的 NW 中, 以 SIET 測量側線上神經丘的鈣離子流量。

加入 CaSO_4 將 NW 中的鈣離子濃度提高至 0.5, 1, 1.5, 2 mM (其餘離子濃度固定), 加入 MgSO_4 將 NW 的鎂離子濃度提高至 1, 2, 5, 10 mM (其餘離子濃度固定), 再將以上不同濃度的鈣或鎂離子所配製的人工水分別加入 100 μM neomycin 或 gentamicin, 並將 4 dpf 的仔魚浸泡於其中 30 分鐘, 使用 MS-222 將仔魚麻醉後, 將仔魚移至不含藥物的 NW 中, 以 SIET 測量側線上神經丘的鈣離子流量。

五、MET 通道阻斷劑的藥物處理

將 gadolinium (Gd^{3+} , Sigma) 溶解於 NW 中, 配製成 100, 500, 1000 μM 。將 curare (Sigma) 溶解於 dimethyl sulfoxide (DMSO, Sigma-Aldrich) 後, 再以 NW 稀釋成 100, 1000, 2000 μM 。將 amiloride (Sigma)

溶解於 DMSO 後，再以 NW 稀釋成，500, 1000 μM 。以 4 dpf 的仔魚分別浸泡各濃度的藥物中 30 分鐘，使用 MS-222 將仔魚麻醉後，將仔魚移至不含藥物的 NW 中，以 SIET 測量側線上神經丘的鈣離子流量。

以 1 mM amiloride 前處理 30 分鐘，再分別浸泡於 100 μM neomycin 和 gentamicin 30 分鐘取出，使用 MS-222 將仔魚麻醉後，將仔魚移至不含藥物的 NW 中，以 SIET 測量側線上神經丘的鈣離子流量。

六、統計分析

使用 MiniTab 軟體進行統計分析。實驗結果為平均值 \pm 標準機差 (SEM)。比較兩組平均值以 Student's *t*-test (two-tailed) 進行分析。三組以上數值以 one-way ANOVA 與 Tukey's *post-hoc* test 分析。達到統計上的顯著差異為 *p*-value 小於 0.05 ($p < 0.05$)。

結果

(一) 對側線毛細胞進行機械性刺激時，所造成的離子流量變化

圖 1 為斑馬魚仔魚 (4 dpf) 在 NW 中，以 SIET 測量側線神經丘外的陽離子 (Ca^{2+} 、 H^+ 、 Na^+ 和 K^+) 濃度梯度之結果。由圖 1A 和 1B 的結果顯示，毛細胞的鈣離子和氫離子流量分別為 $-31.6 \text{ pmol cm}^{-2} \text{ sec}^{-1}$ 與 $-0.19 \text{ pmol cm}^{-2} \text{ sec}^{-1}$ ，相較於角化細胞的離子流量變化，毛細胞上的鈣離子和氫離子都有顯著流入現象。而圖 1C 結果顯示，鈉離子在毛細胞 ($-11.1 \text{ pmol cm}^{-2} \text{ sec}^{-1}$) 和角化細胞 ($-9.5 \text{ pmol cm}^{-2} \text{ sec}^{-1}$) 都呈現流入現象，兩者流量無顯著差異。此外，圖 1D 結果顯示，毛細胞 ($4.8 \text{ pmol cm}^{-2} \text{ sec}^{-1}$) 和角化細胞 ($8.2 \text{ pmol cm}^{-2} \text{ sec}^{-1}$) 兩者的鉀離子流量雖無顯著差異，但卻都呈現正值，表示鉀離子從細胞內向外流出。

(二) 細胞外的其他陽離子對側線毛細胞所造成的鈣離子流量變化

圖 2 為斑馬魚仔魚 (4 dpf) 於高鈉 (H-Na, 5 mM Na^+)、高鉀 (H-K, 5 mM K^+) 和高鎂 (H-Mg, 2 mM Mg^{2+}) 人工水中，以 SIET 測量側線神經丘外的鈣離子流量之結果。在 H-Na 中，毛細胞對鈣離子流量為 $-35.4 \text{ pmol cm}^{-2} \text{ sec}^{-1}$ ，在 H-K 中，毛細胞對鈣離子流量為 $-32.7 \text{ pmol cm}^{-2} \text{ sec}^{-1}$ ，在 H-Mg 中，毛細胞對鈣離子流量為 $-35.1 \text{ pmol cm}^{-2} \text{ sec}^{-1}$ 。

sec^{-1} ，三者與 NW 的對照組 ($-31.6 \text{ pmol cm}^{-2} \text{ sec}^{-1}$) 比較均無顯著差異。

(三) **Aminoglycosides antibiotics** 對側線毛細胞所造成的離子流量變化

圖 3 為斑馬魚仔魚(4 dpf)在 NW 中,分別使用 $100 \mu\text{M}$ neomycin 和 gentamicin 浸泡 30 分鐘後,以 SIET 測量側線神經丘外的氫離子濃度梯度之結果。經 neomycin 浸泡處理組 ($-0.15 \text{ pmol cm}^{-2} \text{ sec}^{-1}$) 與對照組 ($-0.18 \text{ pmol cm}^{-2} \text{ sec}^{-1}$) 無顯著差異($p = 0.08$)，而經 gentamicin 浸泡處理組 ($-0.16 \text{ pmol cm}^{-2} \text{ sec}^{-1}$) 與對照組同樣無顯著差異($p = 0.26$)。圖 4 為斑馬魚仔魚 (4 dpf) 在 NW 中，分別使用 neomycin 和 gentamicin 浸泡 30 分鐘後,以 SIET 測量側線神經丘外的鈣離子流量之結果。由圖 4A 和 4B 的結果顯示,與對照組相比,經 $100 \mu\text{M}$ neomycin 和 gentamicin 浸泡處理後,毛細胞的鈣離子流量顯著下降。

(四) 不同濃度的 **neomycin** 和鈣離子相互處理,對側線毛細胞所造成的鈣離子流量變化

圖 4A 為斑馬魚仔魚(4 dpf)分別在 NW (0.2 mM Ca^{2+}) 及 H-Ca (2.0 mM Ca^{2+}) 水體中,使用不同濃度的 neomycin ($1, 10, 100, 1000 \mu\text{M}$) 浸泡 30 分鐘,以 SIET 測量側線神經丘外的鈣離子流量之結果。

在 NW 中，neomycin 處理濃度 1 和 10 μM 兩組，毛細胞的鈣離子流量分別為 -12.7 和 $-8.3 \text{ pmol cm}^{-2} \text{ sec}^{-1}$ ，與對照組 ($-23.2 \text{ pmol cm}^{-2} \text{ sec}^{-1}$) 比較，鈣離子流量已有顯著的下降。而 neomycin 處理濃度 100 和 1000 μM 兩組，毛細胞的鈣離子流量則接近完全被阻斷。在 H-Ca 水體中，neomycin 處理濃度 1, 10 和 100 μM 的三組，與 NW 組相比較，鈣離子流量都有顯著的增加，顯示具有保護性，而 1000 μM 組的鈣離子流量為 $-1.1 \text{ pmol cm}^{-2} \text{ sec}^{-1}$ ，與 NW 組 ($-0.4 \text{ pmol cm}^{-2} \text{ sec}^{-1}$) 相比較，無顯著差異。

選定 100 μM neomycin 處理為標準，並配合各種鈣離子濃度進行處理。圖 5.A 為斑馬魚仔魚(4 dpf)分別以不同濃度的鈣離子(0.2, 0.5, 1, 1.5 和 2 mM)和 100 μM neomycin 浸泡處理 30 分鐘，以 SIET 測量側線神經丘外的鈣離子流量之結果。鈣離子濃度從 0.2 mM 到 1.5 mM 的四組處理組與對照組 ($-31.3 \text{ pmol cm}^{-2} \text{ sec}^{-1}$) 比較，毛細胞的鈣離子流量有顯著受到 neomycin 抑制，但隨細胞外鈣離子濃度增加，毛細胞鈣離子流量有逐漸增加的趨勢，而鈣離子濃度 2 mM 的處理組 ($-28.6 \text{ pmol cm}^{-2} \text{ sec}^{-1}$) 與對照組比較，毛細胞的鈣離子流量則無顯著差異。

(五) 不同濃度的 **gentamicin** 和鈣離子相互處理，對側線毛細胞所造成的鈣離子流量變化

圖 4B 為斑馬魚仔魚 (4 dpf) 分別在 NW (0.2 mM Ca^{2+}) 及 H-Ca (2.0 mM Ca^{2+}) 水體中，使用不同濃度的 **gentamicin** (1, 10, 100, 1000 μM) 浸泡 30 分鐘，以 SIET 測量側線神經丘外的鈣離子流量之結果。在 NW 中，**gentamicin** 處理濃度 10 和 100 μM 兩組，毛細胞的鈣離子流量分別為 -14.3 和 $-4.3 \text{ pmol cm}^{-2} \text{ sec}^{-1}$ ，相較於對照組 ($-30.8 \text{ pmol cm}^{-2} \text{ sec}^{-1}$) 有顯著的下降，1000 μM 組的鈣離子流量 ($-0.95 \text{ pmol cm}^{-2} \text{ sec}^{-1}$) 甚至接近完全被阻斷；而 1 μM 組的鈣離子流量 ($-26.7 \text{ pmol cm}^{-2} \text{ sec}^{-1}$) 與對照組相比，則無顯著差異。在 H-Ca 水體中，**gentamicin** 處理濃度 1~1000 μM 的四組，與 NW 組相比較，鈣離子流量都有顯著的增加，顯示具有保護性。

圖 5B 為斑馬魚仔魚 (4 dpf) 分別以不同種濃度的鈣離子 (0.2, 0.5, 1, 1.5 和 2 mM) 和 100 μM **gentamicin** 浸泡處理 30 分鐘，以 SIET 測量側線神經丘外的鈣離子流量之結果。鈣離子處理濃度 0.2, 0.5, 1, 1.5 和 2 mM 組與對照組 ($-29.4 \text{ pmol cm}^{-2} \text{ sec}^{-1}$) 比較，毛細胞的鈣離子流量均有顯著的降低，但隨細胞外鈣離子濃度增加，毛細胞經機械性刺激後鈣離子流量有逐漸增加的趨勢，鈣離子濃度 2 mM 的處理組

($-22.8 \text{ pmol cm}^{-2} \text{ sec}^{-1}$) 與對照組相比，毛細胞的鈣離子流量僅下降 22.7%。

(六) 不同濃度鎂離子和 **aminoglycosides antibiotics** 處理，對側線毛細胞所造成的鈣離子流量變化

圖 6A 為斑馬魚仔魚 (4 dpf) 分別以不同濃度的鎂離子 (0.2, 1, 2, 5 和 10 mM) 和 100 μM neomycin 浸泡處理 30 分鐘，以 SIET 測量側線神經丘外的鈣離子流量之結果。鎂離子從低濃度 (0.2 mM) 到高濃度 (10 mM) 的處理組與對照組 ($-33.6 \text{ pmol cm}^{-2} \text{ sec}^{-1}$) 比較，毛細胞的鈣離子流量都有顯著的下降，在低濃度的處理組，鈣離子流量接近完全被阻斷。

圖 6B 為斑馬魚仔魚 (4 dpf) 分別以不同種濃度的鎂離子 (0.2, 1, 2 和 5 mM) 和 100 μM gentamicin 浸泡處理 30 分鐘，以 SIET 測量側線神經丘外的鈣離子流量之結果。鎂離子處理濃度 0.2 和 1 mM 組與對照組 ($-40.0 \text{ pmol cm}^{-2} \text{ sec}^{-1}$) 比較，毛細胞的鈣離子流量有顯著的降低；而 2 和 5 mM 組的鈣離子流量分別為 -35.2 和 $37.9 \text{ pmol cm}^{-2} \text{ sec}^{-1}$ ，與對照組則無顯著差異，顯示細胞外的鎂離子達 2 mM 以上時，對毛細胞具有保護性。

(七) 高濃度鈣、鎂離子前處理，對 **aminoglycosides antibiotics** 阻斷

側線毛細胞的鈣離子流量之影響

圖 7 為斑馬魚仔魚 (4 dpf) 分別經 H-Ca 和 H-Mg 人工水進行前處理 30 分鐘，再浸泡於 AGs 30 分鐘，以 SIET 測量側線神經丘外的鈣離子流量之結果。結果顯示經 H-Ca 前處理後，100 μM neomycin 和 100 μM gentamicin 處理組的鈣離子流量分別為 $-1.2 \text{ pmol cm}^{-2} \text{ sec}^{-1}$ 和 $-5.4 \text{ pmol cm}^{-2} \text{ sec}^{-1}$ ，兩組相較於對照組 ($-42.1 \text{ pmol cm}^{-2} \text{ sec}^{-1}$) 皆為顯著下降。而經 H-Mg 前處理後，100 μM neomycin 和 100 μM gentamicin 處理組的鈣離子流量分別為 $-1.9 \text{ pmol cm}^{-2} \text{ sec}^{-1}$ 和 $-5.8 \text{ pmol cm}^{-2} \text{ sec}^{-1}$ ，兩組相較於對照組 ($-49.4 \text{ pmol cm}^{-2} \text{ sec}^{-1}$) 皆為顯著下降。

(八) **Gadolinium (Gd³⁺)** 對側線毛細胞所造成的鈣離子流量變化

圖 8 為斑馬魚仔魚 (4 dpf) 分別以不同濃度的 gadolinium (100, 500, 1000 μM) 浸泡處理 30 分鐘，以 SIET 測量側線神經丘外的鈣離子流量之結果。結果顯示對照組 ($-41.4 \text{ pmol cm}^{-2} \text{ sec}^{-1}$) 與 100 μM gadolinium 處理組 ($-41.2 \text{ pmol cm}^{-2} \text{ sec}^{-1}$) 均有顯著的鈣離子流入毛細胞，兩組間無顯著差異。但是 500 和 1000 μM gadolinium 處理組和對照組比較，鈣離子流量則顯著減少，分別下降 69.8% 和 87.2%。

(九) **Curare** 對側線毛細胞所造成的鈣離子流量變化

圖 9 為斑馬魚仔魚 (4 dpf) 分別以不同濃度的 curare (0.1, 1, 2 mM) 浸泡處理 30 分鐘，以 SIET 測量側線神經丘外的鈣離子流量之結果。結果顯示對照組 ($-42.3 \text{ pmol cm}^{-2} \text{ sec}^{-1}$) 與 0.1 mM curare 處理組 ($-40.0 \text{ pmol cm}^{-2} \text{ sec}^{-1}$) 均有明顯的鈣離子流入毛細胞，兩組間無顯著差異。1 和 2 mM curare 處理組和對照組比較，鈣離子流量則顯著減少，分別下降 68.8% 和 92.8%。而 2mM 的處理組中，仔魚約有 2 成的死亡率。

(十) Amiloride 對側線毛細胞所造成的鈣離子流量變化

圖 10 為斑馬魚仔魚 (4 dpf) 分別以不同濃度的 amiloride (0.5, 1, 2 μM) 浸泡處理 30 分鐘，以 SIET 測量側線神經丘外的鈣離子流量之結果。結果顯示 0.5、1 和 2 mM amiloride 處理組的毛細胞鈣離子流量分別為 -41.7 、 -42.4 和 $-41.9 \text{ pmol cm}^{-2} \text{ sec}^{-1}$ ，與對照組 ($-44.2 \text{ pmol cm}^{-2} \text{ sec}^{-1}$) 之間均無顯著差異。

(十一) Amiloride 和 aminoglycosides antibiotics 處理，對側線毛細胞所造成的鈣離子流量變化

圖 11 為斑馬魚仔魚 (4 dpf) 以 1 mM amiloride 前處理 30 分鐘，再浸泡於 AGs 30 分鐘，以 SIET 測量側線神經丘外的鈣離子流量之結果。經 amiloride 前處理 30 分鐘後，再浸泡 100 μM neomycin 和

gnetamicin 的處理組測得毛細胞鈣離子流量分別為 $-8.6 \text{ pmol cm}^{-2} \text{ sec}^{-1}$ 和 $-26.24 \text{ pmol cm}^{-2} \text{ sec}^{-1}$ ，與對照組 ($-42.4 \text{ pmol cm}^{-2} \text{ sec}^{-1}$) 相比有顯著下降。而浸泡 neomycin 後，有 amiloride 前處理組相較於無 amiloride 前處理組 ($-4.3 \text{ pmol cm}^{-2} \text{ sec}^{-1}$)，鈣離子流量增加到 1.9 倍；浸泡 gnetamicin 後，有 amiloride 前處理組相較於無 amiloride 前處理組 ($-4.9 \text{ pmol cm}^{-2} \text{ sec}^{-1}$)，鈣離子流量增加到 5.4 倍。

討論

利用 SIET 測量 MET 通道的通透性

過去對於 MET 通道的研究常是以 patch-clamp 技術進行(Ricci and Fettiplace, 1998; Marcotti et al., 2005; Beurg et al., 2008, 2009; Fettiplace, 2009)，但此方式多屬於 in vitro 的實驗，無法完全反應真實生理狀況。而在研究機械性刺激對毛細胞的反應，以前常用的方法是以毛細管微電極插入受試動物的內耳或魚類側線毛細胞，利用聲波或水流刺激變化，紀錄電極的訊號改變(Chan and Hudspeth, 2005; Tanimoto et al., 2009,2011; Trapani and Nicolson, 2011)，如此雖然可以直接記錄到 MET 通道活動變化，但卻無法了解是何種離子所造成的電位改變。本研究以 SIET 對斑馬魚仔魚側線的 MET 通道進行偵測分析，相較於過去使用的方法，SIET 具有對特定離子的高敏感度及高專一性，同時此技術也是一種非侵入性的方法，可對活體進行即時性測量，所呈現的數據為直接的生理證據。

MET 通道的離子通透特性

許多研究指出 MET 通道是一種非選擇性的陽離子通道，這類的通道能讓鹼性陽離子(例如： Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、 K^+ 、 Na^+)(Corey and Hudspeth, 1979; Ohmori, 1985)以及小分子螢光染劑(例如：FM1-43)通過(Farris et al., 2004; Lumpkin and Caterina, 2007)。過去的研究發現雞和小鼠的

內耳毛細胞的 MET 通道對鈣離子的通透性至少是鈉離子和鉀離子的十倍以上(Ohmori, 1985; Marcotti et al., 2005)。但是鳥類和哺乳類內耳的內淋巴液中鉀離子濃度遠高於鈣離子，因此仍有許多研究都認為內耳毛細胞上的 MET 通道主要是通透鉀離子，而使細胞發生去極化，引起動作電位(Fettiplace, 2009; Zdebik et al., 2009)。本研究以 SIET 測量斑馬魚側線毛細胞後發現 MET 通道對鈣離子有明顯通透性，並呈現向細胞內流入的現象(圖 1A)。近年許多報告認為側線毛細胞上的 MET 通道可能是由 transient receptor potential (TRP) channels 所構成，TRP 通道的結構由六個穿膜蛋白區域圍繞而成，且對鈣離子具高通透性(Clapham, 2003)，因此我們的實驗也間接證實了側線毛細胞上的 MET 通道為 TRP 通道之可能性。在鉀離子的通透現象，本研究結果與一般陸生脊椎動物的內耳不同，實驗結果顯示側線毛細胞經機械性刺激後鉀離子流量變化與角化細胞無顯著差異，且均呈現正值(圖 1D)，表示鉀離子由細胞內向外流出，但流出量並不明顯。我們推測這可能因斑馬魚所處的環境為淡水水體 ($[K^+]: 0.32 \text{ mM}$)，不同於陸生脊椎動物內耳毛細胞所含高鉀低鈣 ($[K^+]: 150 \text{ mM}$, $[Ca^{2+}]: 20 \mu\text{M}$) 的內淋巴液(Fettiplace, 2009; Zdebik et al., 2009)，而使得側線毛細胞主要通透鈣離子。

通常在魚類的離子細胞的相關研究中指出，魚體為了調節呼吸作

用而產生的酸性代謝物，多利用氫離子幫浦（ H^+ -ATPas）將氫離子排出細胞外(Lin et al., 2011；Reid et al., 2003)，但本研究發現側線毛細胞經機械性刺激後卻有明顯的氫離子淨流入現象（圖 1B），但經過 AGs (neomycin 與 gentamicin) 處理後卻無法有效阻斷氫離子流入(圖 3)，所以我們認為氫離子可能並非經由 MET 通道通透。而鈉離子在細胞外液（水體）的濃度較細胞內高，但經機械性刺激後，鈉離子對毛細胞的流入量與周圍角化細胞比較卻無顯著差異（圖 1C），有此可見，側線毛細胞並非通透鈉離子。

綜合以上針對斑馬魚側線毛細胞的實驗結果，我們相信在經過機械性刺激後，側線毛細胞的 MET 通道對鈣離子具有高通透性，反而對鈉和鉀離子的通透性較低。因此本研究選定以鈣離子的通透性作為評估側線毛細胞的 MET 通道之功能性指標。

另外，本實驗也試圖提高其他離子（ K^+ 、 Na^+ 、 Mg^{2+} ）濃度，以了解側線毛細胞對鈣離子的通透是否受到其他離子的影響，由圖 2 的結果發現提高其他離子濃度，不會改變 MET 通道對鈣離子的流入量，如此看來側線毛細胞的 MET 通道對鈣離子具有相當高的選擇性，這與過去的研究發現 MET 通道對鈣離子的通透性至少是鈉離子和鉀離子的十倍以上符合的。

Aminoglycosides(AGs)對側線毛細胞的離子流量影響

應用 AGs 治療時，所造成耳毒性的副作用，過去大多的檢測方法仍是以藥物對小鼠或大鼠的內耳毛細胞損傷狀況來進行評估。近年有許多研究發現 AGs 不只會傷害哺乳類的內耳毛細胞，也會傷害斑馬魚神經丘的毛細胞，因此認為斑馬魚是一種適合應用於耳毒性相關研究的模式動物(Williams and Holder,2000; Murakami et al., 2003; Ou et al., 2007; Coffin et al., 2009; Froehlicher et al., 2009; Ou et al., 2010)。Williams 與 Holder (2000 年) 在實驗中首次發現 neomycin 會造成斑馬魚仔魚側線神經丘的毛細胞死亡，而在 Harris 等人的研究中 (2003 年) 也有類似的結果。接著 Owens 研究團隊 (2009 年) 對 5-6 dpf 的斑馬魚仔魚進行 AGs 的藥物實驗，發現 100 μM neomycin 與 gentamicin 浸泡 30 分鐘後，會使神經丘中的毛細胞受損率達三成，而 neomycin 濃度需達到 400 μM 才能造成毛細胞全部受損。

本研究以 SIET 測量後發現，1 μM neomycin 和 10 μM gentamicin 便會降低毛細胞對鈣離子的通透性，隨著藥物濃度的增加到 100 μM 以上，鈣離子的流入量幾乎接近完全抑制 (圖 4)，此時側線毛細胞外觀仍是完整。Marcotti 等人 (2005 年) 利用老鼠的內耳毛細胞以 whole-patch 技術進行實驗，證明 AGs 對 MET 通道具有阻斷性，這點與本篇研究的結果是相同的。因次我們認為 AGs 的濃度在達到毛細

胞發生凋亡之前，MET 通道的鈣離子流量就會被 neomycin 和 gentamicin 所阻斷。

二價陽離子對毛細胞的保護性

Coffin 等人（2009 年）利用不同濃度的二價陽離子與 AGs 同時進行處理，發現斑馬魚在高鈣（2100 μM ）環境中可減少 neomycin 與 gentamicin（抗生素濃度低於 300 μM ）對側線毛細胞的傷害，但在 neomycin 的處理實驗中，高鎂對毛細胞傷害的保護性明顯較差。本研究也有相似的結果，我們發現隨著細胞外的鈣離子濃度升高，可使側線毛細胞的鈣離子流量較不易受 neomycin 與 gentamicin 阻斷（圖 5）。而提高細胞外的鎂離子濃度則可明顯降低 gentamicin 阻斷性，但對 neomycin 卻無法達到同樣的保護效果（圖 6）。最近有關 TRPA1 研究報告指出，當細胞外的鈣離子濃度增加時會導致通道的開口縮小 (Banke et al., 2010)。我們推測側線毛細胞的 MET 通道上可能具有二價陽離子結合位，當與二價陽離子結合後，會改變 MET 通道結構使得通道開口縮小，使得 AGs 減少進入或是無法有效阻斷 MET 通道，又因提高鎂離子濃度並不會影響到毛細胞上的鈣離子流入，由此可見鎂離子應不會與鈣離子在 MET 通道上發生競爭，而此結合位對鈣離子應具有較高的親和性，亦或是鈣離子和鎂離子與 MET 通道有不同

的結合位。當然我們也不排除，neomycin 與 gentamicin 對 MET 通道有不同的阻斷結合位的可能性，甚至有可能是進入毛細胞內後在胞內發生阻斷結合。

另外，我們以 H-Ca 和 H-Mg 進行前處理後，毛細胞仍受到 neomycin 與 gentamicin 阻斷（圖 7），根據此實驗結果推測高濃度的二價陽離子對毛細胞可能無法產生預防性的保護，而必須要與 AGs 同時存在時才具有保護效力。

MET 阻斷劑對毛細胞的保護性

早期 Yang（1989 年）利用非洲爪蟾的卵進行研究時，發現 gadolinium (Gd^{3+}) 具有阻斷 MET 通道的功能。之後的研究利用表現 TRPA1 的 HEK 293 cells 進行 patch-clamp 測量，發現 $100\mu M Gd^{3+}$ 和可阻斷 TRPA1 (Nagata et al., 2005)。我們的研究中使用 Gd^{3+} 處理 4 dpf 斑馬魚仔魚後，發現在 Gd^{3+} 處理濃度 $100\mu M$ 的條件下，無法阻斷毛細胞的 MET 通道對鈣離子的通透，但在 500 、 $1000\mu M$ 的濃度中則有阻斷的現象發生（圖 8）。我們實驗結果顯示 Gd^{3+} 需較高濃度才具有阻斷現象，這點顯示斑馬魚側線的 MET 通道特性可能過去研究材料有所不同，Nagata 等人(2005 年)是選用表現 TRPA1 的 HEK 293 cells；在測量方式上，patch-clamp 的方法為測量通過 MET 通道的電

流量，而我們是以 SIET 測量整個神經丘毛細胞對鈣離子的通透量。

過去研究利用老鼠或雞的內耳毛細胞當作材料，發現 amiloride 可阻斷 MET 通道(Jorgensen and Ohmori, 1988；Rusch et al., 1994)。最近 Kindt 等人（2012 年）以細胞內鈣離子螢光標定的方式，發現以 1 mM amiloride 和 100 μ M curare 處理後，可降低斑馬魚側線毛細胞經刺激後的細胞內鈣離子濃度，推論 MET 通道可以被 amiloride 與 curare 所阻斷。但是我們研究發現在 curare 處理濃度達 2 mM 時才能夠阻斷毛細胞的鈣離子通透，此濃度已造成仔魚約兩成的死亡率（圖 9）。另外，本研究發現 amiloride 無法降低毛細胞對鈣離子流入（圖 10），這點與過去研究有所不同。因此推測 Kindt 等人（2012 年）的研究中指出的細胞內的鈣離子含量或許可能不只來至細胞外的流入，也有可能是因阻斷劑與膜受體結合後造成下游調控無法順利進行，而使得胞器的鈣離子無法被釋放出來。

Owens 等人（2009 年）將 5-6 dpf 的斑馬魚仔魚先經 amiloride 處理，再浸泡於 AGs 中，實驗結果顯示毛細胞損傷程度出現下降的趨勢，作者推測若將 MET 通道阻斷，可阻止 neomycin 與 gentamicin 進入毛細胞。之後，Alharazneh 等人（2011 年）發現 curare、quinine 和 amiloride 這三種藥物處理都可減少大鼠內耳毛細胞對 Gentamicin conjugated Texas Red (GTTR)的吸收。在本研究中，我們發現 amiloride

確實能夠降低 neomycin 與 gentamicin 對側線毛細胞鈣離子流的抑制性（圖 11），所以我們推測 amiloride 與 MET 通道作用後，並不會影響到通道對於鈣離子的流入情形，但或許對通道結構有所改變，而減少 AGs 進入毛細胞，因此 AGs 對於 MET 通道的鈣離子流量阻斷情況有下降的趨勢，其中又以 gentamicin 的阻斷能力下降較為明顯，這更增加了 neomycin 與 gentamicin 對 MET 通道的鈣離子流有不同的阻斷結合位的可能性。但我們尚無法確定 amiloride 與 MET 通道的結合情形，與其如何能夠使 AGs 降低對通道鈣離子流的阻斷現象，但以目前的結果看來，amiloride 或許可成為 MET 通道保護劑的研究對象之一。

總結

1. 斑馬魚側線毛細胞的 MET 通道對鈣離子具有高度通透性，且 AGs 可阻斷 MET 通道對鈣離子的通透性。
2. 提高細胞外的鈣離子濃度，可減緩 AGs 對 MET 通道所造成的阻斷現象，也可保持毛細胞的完整性。
3. 提高細胞外的鎂離子濃度，可減緩 gentamicin 對 MET 通道所造成的阻斷現象，但卻無法降低 neomycin 的阻斷現象。
4. 對於側線毛細胞而言，amiloride 並不會阻斷 MET 通道的鈣離子流量，但卻可減緩 AGs 對 MET 通道所造成的阻斷現象。

參考文獻

- Alharazneh, A., Luk, L., Huth, M., Monfared, A., Steyger, P.S., Cheng, A.G. and Ricci, A.J.** (2011) Functional hair cell mechanotransducer channels are required for aminoglycoside ototoxicity. *PLoS One*. 6: e22347.
- Avraham, K.B.** (2003) Mouse models for deafness: lessons for the human inner ear and hearing loss. *Ear Hear*. 24: 332-341.
- Banke, T.G., Chaplan, S.R. and Wickenden, A.D.** (2010) Dynamic changes in the TRPA1 selectivity filter lead to progressive but reversible pore dilation. *Am J Physiol Cell Physiol*. 298: C1457-C1468.
- Becvarovski, Z., Michaelides, E.M., Kartush, J.M., Bojrab, D.I. and LaRouere, M.J.** (2002) Rapid elevation of gentamicin levels in the human labyrinth following intravenous administration. *Laryngoscope*. 112: 1163-1165.
- Beurg, M., Fettiplace, R., Nam, J. H. and Ricci, A. J.** (2010) Localization of inner hair cell mechanotransducer channels using high-speed calcium imaging. *J Physiol*. 588.5:765–772.
- Chan, D.K. and Hudspeth, A.J.** (2005) Ca^{2+} current-driven nonlinear amplification by the mammalian cochlea in vitro. *Nat Neurosci*. 8(2):149-155.
- Chiu, L.L., Cunningham, L.L., Raible, D.W., Rubel, E.W. and Ou, H.C.** (2008) Using the zebrafish lateral line to screen for ototoxicity. *J Assoc Res Otolaryngol*. 9: 178-190.
- Clapham, D.E.** (2003) TRP channels as cellular sensors. *Nature*.

426:517-524.

Coffin, A.B., Reinhart, K.E., Owens, K.N., Raible, D. W. and Rubel, E. W. (2009) Extracellular divalent cations modulate aminoglycoside-induced hair cell death in the zebrafish lateral line. *Hear. Res.* 253:42-51.

Coffin, A.B., Ou, H., Owens, K. N., Santo, F., Simon, J. A. and Rubel, E. W. (2010) Chemical screening for hair cell loss and protection in the zebrafish lateral line. *Zebrafish.* 7: 3-11.

Colclasure, J.C. and Holt, J.R. (2003) Transduction and adaptation in sensory hair cells of the mammalian vestibular system. *Gravit Space Biol Bull.* 16(2):61-70.

Coombs, S. and van Netten, S.M. (2006) The hydrodynamics and structural mechanics of the lateral line system. In: Shadwick, R., Lauder, G. (Eds.), *Fish Biomechanics.* 103-139.

Corey, D.P. (2006) What is the hair cell transduction channel? *J Physiol.* 576: 23-28.

Corey, D. P., Overos, J. G., Holt, J. R., Kwan, K. Y., Lin, S. Y., Vollrath, M. A., Amalfitano, A., Cheung, E. L-M., Derfler, B. H., Duggan, A., Geleoc, G. S. G., Gray, P. A., Hoffman, M. P., Rehm, H. L., Tamasauskas, D. and Zhang, D. S. (2004) TRPA1 is a candidate for the mechanosensitive transduction channel of vertebrate hair cells. *Nature.* 432(7018):723-730.

Corey, D. P. and Hudspeth, A. J. (1979) Ionic basis of the receptor potential in a vertebrate hair cell. *Nature.* 281:675-677.

- De Groot, J.C., Huizing, E.H. and Veldman, J.E.** (1991) Early ultrastructural effects of gentamicin cochleotoxicity. *Acta Otolaryngol.* 111: 273-280.
- Donini, A., Gaidhu, M.P., Strasberg, D.R. and O'donnell, M.J.** (2007) Changing salinity induces alterations in hemolymph ion concentrations and Na⁺ and Cl⁻ transport kinetics of the anal papillae in the larval mosquito, *Aedes aegypti*. *J Exp Biol.* 210: 983-92.
- Donini, A. and O'Donnell, M.J.** (2005) Analysis of Na⁺, Cl⁻, K⁺, H⁺ and NH₄⁺ concentration gradients adjacent to the surface of anal papillae of the mosquito *Aedes aegypti*: application of self-referencing ion-selective microelectrodes. *J Exp Biol.* 208: 603-610.
- Dulon, D., Hiel, H., Aourousseau, C., Erre, J.P. and Aran, J.M.** (1993) Pharmacokinetics of gentamicin in the sensory hair cells of the organ of Corti: rapid uptake and long term persistence. *C R Acad Sci III.* 316: 682-687.
- Farris, H. E., LeBlanc, C. L., Goswami, J. and Ricci, A. J.** (2004) Probing the pore of the auditory hair cell mechanotransducer channel in turtle. *J Physiol.* 558:769-792.
- Fettiplace, R.** (2009) Defining features of the hair cell mechano-electrical transducer channel. *Pflugers Arch.* 458:1115-1123.
- Fettiplace, R., Ricci, A.J. and Hackney, C.M.** (2001) Clues to the cochlear amplifier from the turtle ear. *Trends Neurosci.* 24:169-175.
- Furness, D.N., Hackney, C.M. and Evans, M.G.** (2010) Localisation of the mechanotransducer channels in mammalian cochlear hair cells provides clues to their gating. *J Physiol.* 588: 765-772.

- Froehlicher, M., Liedtke, A., Groh, K.J., Neuhauss, S.C., Segner, H. and Eggen, R.I.** (2009) Zebrafish (*Danio rerio*) neuromast: promising biological endpoint linking developmental and toxicological studies. *Aquat Toxicol.* 95: 307-319.
- Garber, S.S., Messerli, M.A., Hubert, M., Lewis, R., Hammar, K., Indyk, E. and Smith, P.J.** (2005) Monitoring Cl⁻ movement in single cells exposed to hypotonic solution. *J Membr Biol.* 203: 101-110.
- Garcia-Anoveros, J., Corey, D.P.** (1997) The molecules of mechanosensation. *Annu Rev Neurosci.* 20:567-594.
- Ghysen, A. and Chaudière, C.D.** (2007) The lateral line microcosmos. *Genes Dev.* 21:2118-2130.
- Ghysen, A. and Chaudière, C.D.** (2004) Development of the zebrafish lateral line. *Curr Opin Neurobiol.* 14:67-73.
- Hamill, O.P. and McBride, D.W. Jr.** (1996) The pharmacology of mechanogated membrane ion channels. *Pharmacol Rev.* 48: 231-252.
- Harris, J. A., Cheng, A. G., Cunningham, L. L., Macdonald, G., Raible, D. W and Rubel, E. W.** (2003) Neomycin-Induced Hair Cell Death and Rapid Regeneration in the Lateral Line of Zebrafish (*Danio rerio*). *J Assoc Res Otolaryngol.* 04: 219-234.
- Hashino, E. and Shero, M.** (1995) Endocytosis of aminoglycoside antibiotics in sensory hair cells. *Brain Res.* 704:135-140.
- Hayashida, T., Hiel, H., Dulon, D., Erre, J.P., Guilhaume, A. and Aran, J.M.** (1989) Dynamic changes following combined

treatment with gentamicin and ethacrynic acid with and without acoustic stimulation. Cellular uptake and functional correlates. *Acta Oto-Laryngologica*. 108:5-6.

Horisberger, J.D.(1998) Amiloride-sensitive Na channels. *Curr Opin Cell Biol*. 10(4):443-9

Hornig, J.L., Lin, L.Y. and Hwang, P.P. (2009) Functional regulation of H⁺-ATPase -rich cells in zebrafish embryos acclimated to an acidic environment. *Am J Physiol Cell Physiol*. 296:C682-692.

Huth, M.E., Ricci, A.J. and Cheng, A.G. (2011) Mechanisms of aminoglycoside ototoxicity and targets of hair cell protection. *Int J Otolaryngol*. 2011: 937861.

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

Jorgensen, F. and Ohmori, H.(1988)Amiloride blocks the mechanoelectrical transduction channel of hair cells of the chick. *J Physiol*. 403:577-588.

Kalinec, G.M., Webster, P., Lim, D.J. and Kalinec, F. (2003) A cochlear cell line as an in vitro system for drug ototoxicity screening. *Audiol Neurootol*. 8(4):177-189.

Kindt, K.S., Finch, G. and Nicolson, T. (2012) Kinocilia mediate mechanosensitivity in developing zebrafish hair cells. *Dev Cell*. 23(2):329-341

Kimitsuki, T., Wakasaki, T., Nawate, A., Komune, N., Takaiwa, K., Ohashi, M. and Komune, S. (2009) Dihydrostreptomycin goes

through the mechano-electric transduction channel in chick cochlear hair cells. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec.* 71(3):57-62.

- Kreitzer, M.A., Collis, L.P., Molina, A.J., Smith, P.J. and Malchow, R.P.** (2007) Modulation of extracellular proton fluxes from retinal horizontal cells of the catfish by depolarization and glutamate. *J Gen Physiol.* 130:169-182.
- Kroese, A.B., Das, A. and Hudspeth, A.J.** (1989) Blockage of the transduction channels of hair cells in the bullfrog's sacculus by aminoglycoside antibiotics. *Hear Res.* 37:203-217.
- Kros, C.J., Rusch, A. and Richardson, G.P.** (1992) Mechano- electrical transducer currents in hair cells of the cultured neonatal mouse cochlea. *Proc Biol Sci.* 249:185-193.
- Li, S., Yu, J., Zhu, M., Zhao, F. and Luan, S.** (2012) Cadmium impairs ion homeostasis by altering K⁺ and Ca²⁺ channel activities in rice root hair cells. *Plant Cell Environ.* 35: 1998-2013.
- Lim, D.J. and Kalinec, F.** (1998) Cell and molecular basis of hearing. *Kidney Int Suppl.* 65:S104-113.
- Lin, C.C., Lin, L.Y., Hsu, H.H., Thermes, V., Prunet, P. Horng, J.L. and Hwang, P.P.** (2011) Acid secretion by mitochondrion-rich cells of medaka (*Oryzias latipes*) acclimated to acidic freshwater. *Am J Physiol Cell Physiol.* 302, R283-R291.
- Lumpkin, E. A. and Caterina, M.J.** (2007) Mechanisms of sensory transduction in the skin. *Nature.* 445:858-865.
- Malgrange, B., Belachew, S., Thiry, M., Nguyen, L., Rogister, B., Alvarez, M.L., Rigo, J.M., Van De Water, T.R., Moonen, G. and**

- Lefebvre, P.P.** (2002) Proliferative generation of mammalian auditory hair cells in culture. *Mech Dev.* 112: 79-88.
- Marcotti, W., Van Netten, S.M. and Kros, C.J.** (2005) The aminoglycoside antibiotic dihydrostreptomycin rapidly enters mouse outer hair cells through the mechano-electrical transducer channels. *J Physiol.* 567:505-521.
- Marcotti, W.** (2012) Functional assembly of mammalian cochlear hair cells. *Exp Physiol.* 97(4):438-451.
- Matsui, J.I., Gale, J.E. and Warchol, M.E.** (2004) Critical signaling events during the aminoglycoside-induced death of sensory hair cells in vitro. *J Neurobiol.* 61:250-266.
- Messerli, M.A., Smith, P.J., Lewis, R.C. and Robinson, K.R.** (2004) Chloride fluxes in lily pollen tubes: a critical reevaluation. *Plant J.* 40: 799-812.
- Murakami, S.L., Cunningham, L.L., Werner, L.A., Bauer, E., Pujol, R., Raible, D.W. and Rubel, E.W.** (2003) Developmental differences in susceptibility to neomycin induced hair cell death in the lateral line neuromasts of zebrafish (*Danio rerio*). *Hear Res.* 186: 47-56.
- Nagata, K., Duggan, A., Kumar, G. and Garcí'a-Anoveros, J.** (2005) Nociceptor and Hair Cell Transducer Properties of TRPA1, a Channel for Pain and Hearing. *J Neurosci.* 25(16): 4052- 4061.
- Ohmori, H.** (1985) Mechano-electrical transduction currents in isolated vestibular hair cells of the chick. *J Physiol.* 359:189-217.
- Owens, K.N., Santos, F. and Roberts, B.** (2008) Identification of genetic

and chemical modulators of zebrafish mechanosensory hair cell death. *PLoS Genet.* 4: e1000020

Owens, K. N., Coffin, A. B., Hong, L. S., Bennett, K. O. C., Rubel, E. W. and Raible, D. W. (2009) Response of mechanosensory hair cells of the zebrafish lateral line to aminoglycosides reveals distinct cell death pathways. *Hear Res.* 253:32-41.

Ou, H.C., Santos, F., Raible, D.W., Simon, J.A. and Rubel, E.W. (2010) Drug screening for hearing loss: using the zebrafish lateral line to screen for drugs that prevent and cause hearing loss. *Drug Discov Today.* 15: 265-271.

Ou, H.C., Raible, D.W. and Rubel, E.W. (2007) Cisplatin-induced hair cell loss in zebrafish (*Danio rerio*) lateral line. *Hear Res.* 233, 46–53.

Peusner, K.D. (2001) Development of the gravity sensing system. *J Neurosci Res.* 63(2):103-108.

Reid S.D., Hawkings G.S., Galvez F. and Goss G.G. (2003) Localization and characterization of phenamil-sensitive Na⁺ influx in isolated rainbow trout gill epithelial cells. *J Exp Biol.* 206: 551-559.

Ricci, A.J., Kennedy, H.J., Crawford, A.C. and Fettiplace, R. (2005) The transduction channel filter in auditory hair cells. *Journal of Neuroscience.* 25: 7831–7839.

Ricci, A. (2002) Differences in mechano-transducer channel kinetics underlie tonotopic distribution of fast adaptation in auditory hair cells. *J Neurophysiol.* 87:1738-1748.

Ricci, A.J. and Fettiplace, R. (1998) Calcium permeation of the turtle

hair cell mechanotransducer channel and its relation to the composition of endolymph. *J Physiol.* 506:159-173.

Richardson, G.P., Forge, A., Kros, C.J., Fleming, J., Brown, S.D. and Steel, K.P. (1997) Myosin VIIA is required for aminoglycoside accumulation in cochlear hair cells. *J Neurosci.* 17: 9506-9519.

Richardson, G.P. and Russell, I.J. (1991) Cochlear cultures as a model system for studying aminoglycoside induced ototoxicity. *Hear Res.* 53: 293-311.

Ronca, A.E., Fritsch, B., Alberts, J.R. and Bruce, L.L. (2000) Effects of microgravity on vestibular development and function in rats: genetics and environment. *Korean J Biol Sci.* 4(3):215-221

Rusch, A., Kros, C.J. and Richardson, G.P. (1994) Block by amiloride and its derivatives of mechano-electrical transduction in outer hair cells of mouse cochlear cultures. *J Physiol.* 474:75-86.

Schwander, M., Kachar, B. and Müller, U. (2010) Review series: The cell biology of hearing. *J Cell Biol.*190(1):9-20.

Shen, W.P., Horng, J.L. and Lin, L.Y. (2011) Functional plasticity of mitochondrion-rich cells in the skin of euryhaline medaka larvae (*Oryzias latipes*) subjected to salinity changes. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 300:R858-R68.

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

Smith, P.J., Hammar, K., Porterfield, D.M., Sanger, R.H. and

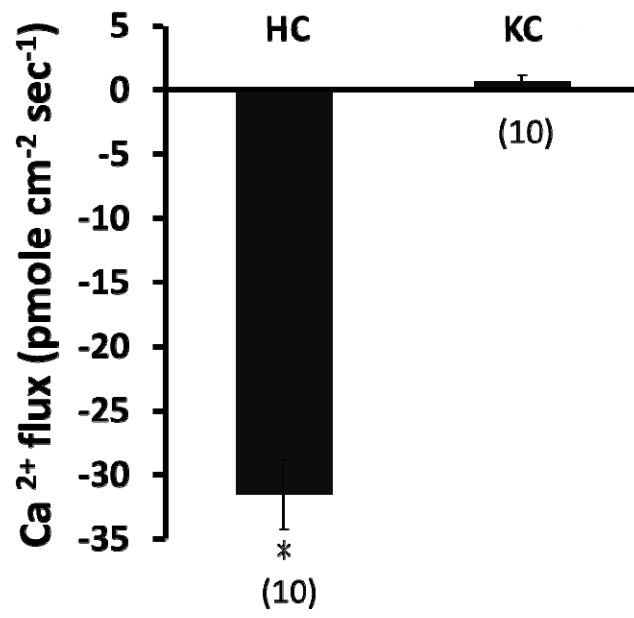
- Trimarchi, J.R.** (1999) Self-referencing, non-invasive, ion selective electrode for single cell detection of trans-plasma membrane calcium flux. *Microsc Res Tech.* 46:398-417.
- Sun, J., Chen, S., Dai, S., Wang, R., Li, N., Shen, X., Zhou, X., Lu, C., Zheng, X., Hu, Z., Zhang, Z., Song, J. and Xu, Y.** (2009) NaCl-induced alternations of cellular and tissue ion fluxes in roots of salt-resistant and salt-sensitive poplar species. *Plant Physiol.* 149:1141-1153.
- Stupp, H., Küpper, K., Lagler, F., Sous, H. and Quante, M.** (1973) Inner ear concentrations and ototoxicity of different antibiotics in local and systemic application. *Audiology.* 12:350-63.
- Tanimoto, M., Ota, Y., Horikawa, K. and Oda, Y.** (2009) Auditory input to CNS is acquired coincidentally with development of inner ear after formation of functional afferent pathway in zebrafish. *J Neurosci.* 29(9):2762-2767.
- Tanimoto, M., Ota, Y., Inoue, M. and Oda, Y.** (2011) Origin of inner ear hair cells: morphological and functional differentiation from ciliary cells into hair cells in zebrafish inner ear. *J Neurosci.* 31: 3784-3794.
- Trapani, J.G. and Nicolson, T.** (2011) Mechanism of spontaneous activity in afferent neurons of the zebrafish lateral-line organ. *J Neurosci.* 31: 1614-1623.
- Tran Ba Huy, P., Bernard, P. and Schacht, J.** (1986) Kinetics of gentamicin uptake and release in the rat: comparison of inner ear tissues and fluids with other organs. *J Clin Invest.* 77:1492-1500.

- Ton, C. and Parnig, C.** (2011) The use of zebrafish for assessing ototoxic and otoprotective agents. *Hear Res.* 208:79-88.
- Trump, W. J. V., Coombs, S., Duncan, K. and McHenry, M. J.** (2010) Gentamicin is ototoxic to all hair cells in the fish lateral line system. *Hear Res.* 261:42-50.
- Yang, X. C. and Sachs, F.** (1989) Block of stretch-activated ion channels in *Xenopus* oocytes by gadolinium and calcium ions. *Science.* 243:1068-1071.
- Waguespack, J.R. and Ricci, A.J.** (2005) Aminoglycoside ototoxicity: permeant drugs cause permanent hair cell loss. *Journal of Physiology.* 567: 359-360.
- Warchol, M.E.** (2010) Cellular mechanisms of aminoglycoside ototoxicity. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg.* 18: 454-458.
- Wersinger, E. and Fuchs, P.A.** (2011) Modulation of hair cell efferents. *Hear Res.* 279(1-2):1-12.
- Williams, J.A. and Holder, N.** (2000). Cell turnover in neuromasts of zebrafish larvae. *Hear Res.* 143:171-181.
- Wu, S.C., Horng, J.L., Liu, S.T., Hwang, P.P., Wen, Z.H., Lin, C.S. and Lin, L.Y.** (2010) Ammonium-dependent sodium uptake in mitochondrion-rich cells of medaka (*Oryzias latipes*) larvae. *Am J Physiol Cell Physiol.* 298:C237-C250.
- Zdebik, A.A., Wangemann P. and Jentsch T.J.** (2009) Potassium ion movement in the inner ear: insights from genetic disease and mouse models. *Physiology. (Bethesda)* 24:307-316.

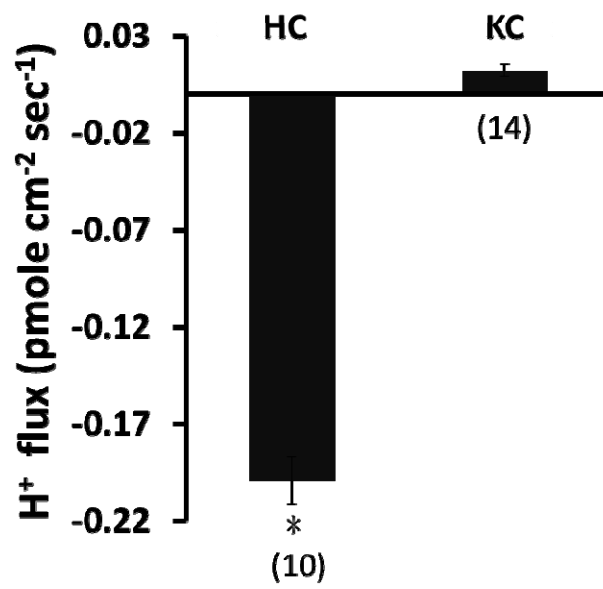
Zenner, H.P. and Plinkert, P.K. (1992) A.C. and D.C. motility of mammalian auditory sensory cells--a new concept in hearing physiology. *Otolaryngol Pol.* 46(4):333-349.

圖表

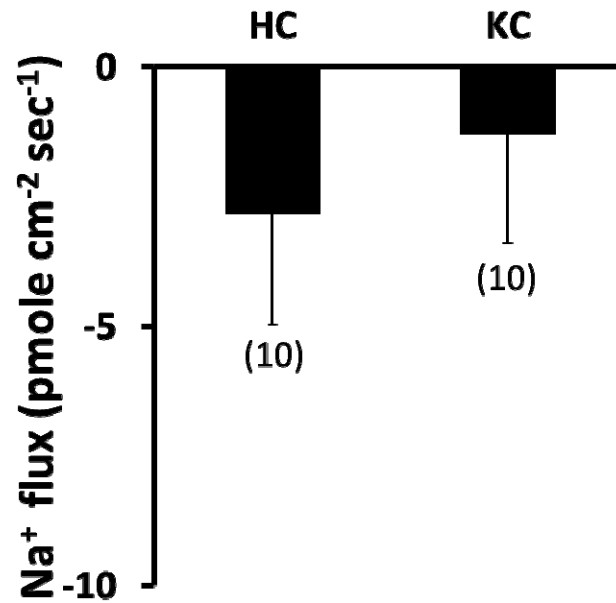
(A)



(B)



(C)



(D)

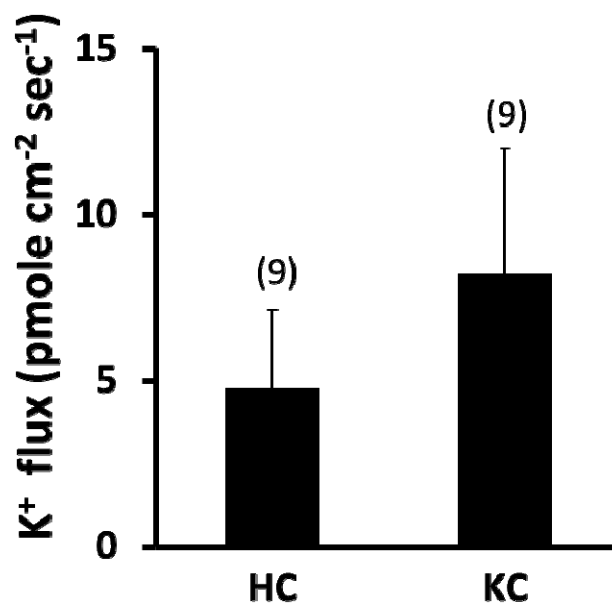


圖 1. 對斑馬魚仔魚 (4dpf) 的側線毛細胞 (HC) 和角化細胞 (KC) 進行機械性刺激所產生的鈣、氫、鈉和鉀離子的流量。* 表示側線毛細胞 (HC) 和角化細胞 (KC) 兩組間的離子流量有顯著差異 (Student's t-test, $p < 0.05$)。數據為 means \pm SEs (樣本數標示於圖中括號內)。

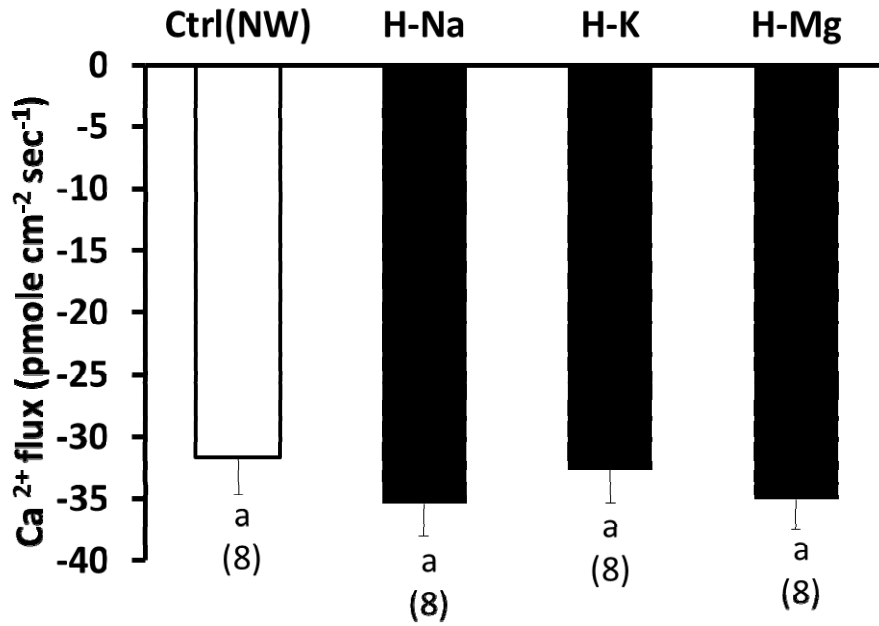


圖 2. 斑馬魚仔魚 (4 dpf) 於高鈉 (5 mM)、高鉀 (5 mM) 和高鎂 (2 mM) 人工水中，對側線毛細胞進行機械性刺激所產生的鈣離子流量。One-way ANOVA, Tukey's test, $p < 0.05$ 。數據為 means \pm SEs (樣本數標示於圖中括號內)。

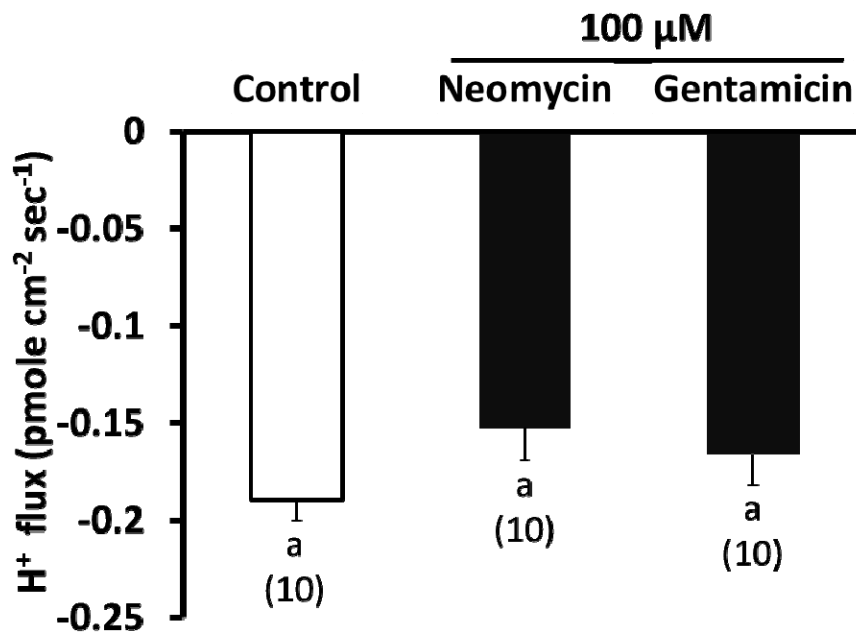
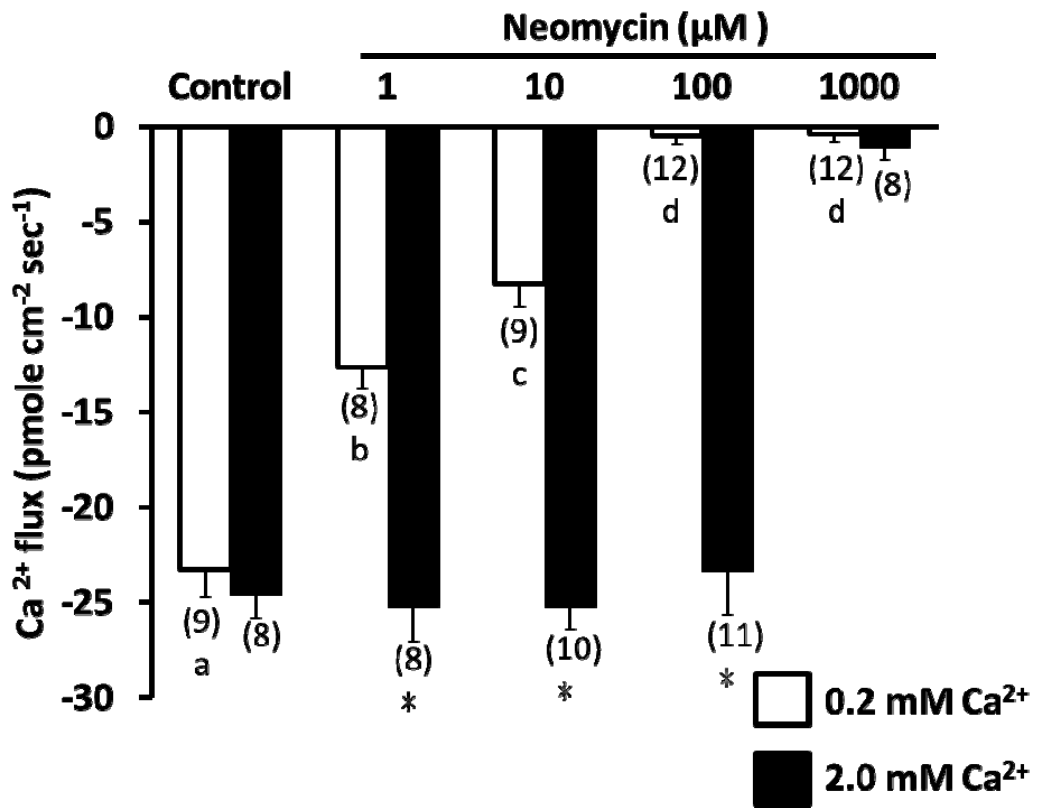


圖 3. 斑馬魚仔魚 (4 dpf) 經 AGs 處理 30 分鐘後，對側線毛細胞進行機械性刺激所產生的氫離子流量。One-way ANOVA, Tukey's test, $p < 0.05$ 。數據為 means \pm SEs (樣本數標示於圖中括號內)。

(A)



(B)

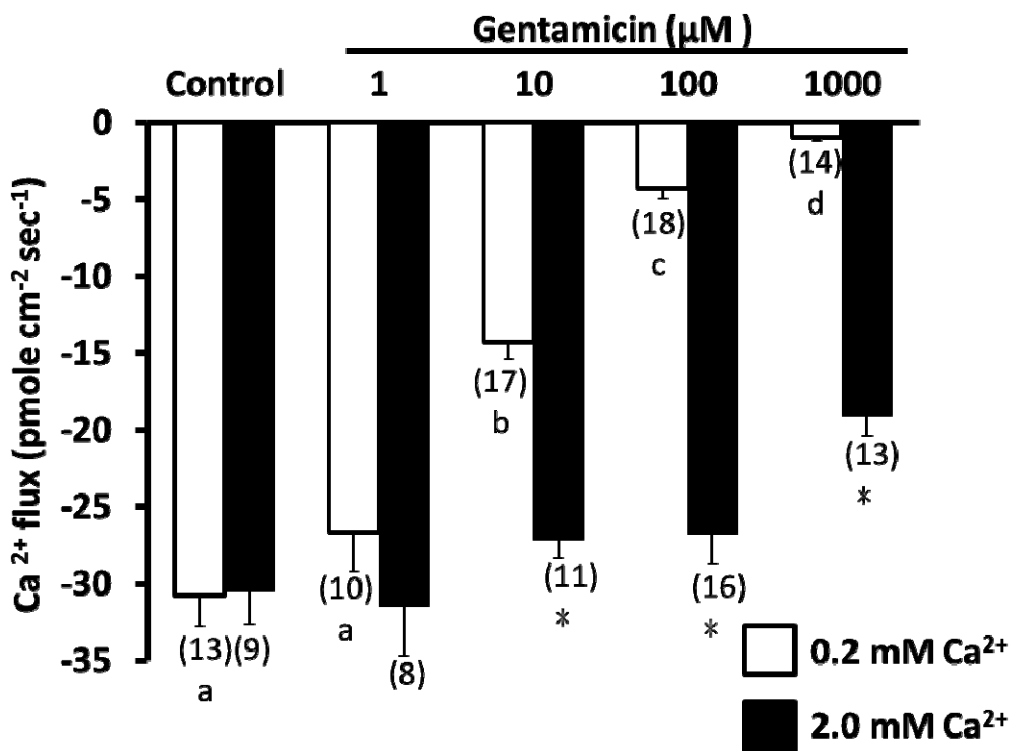
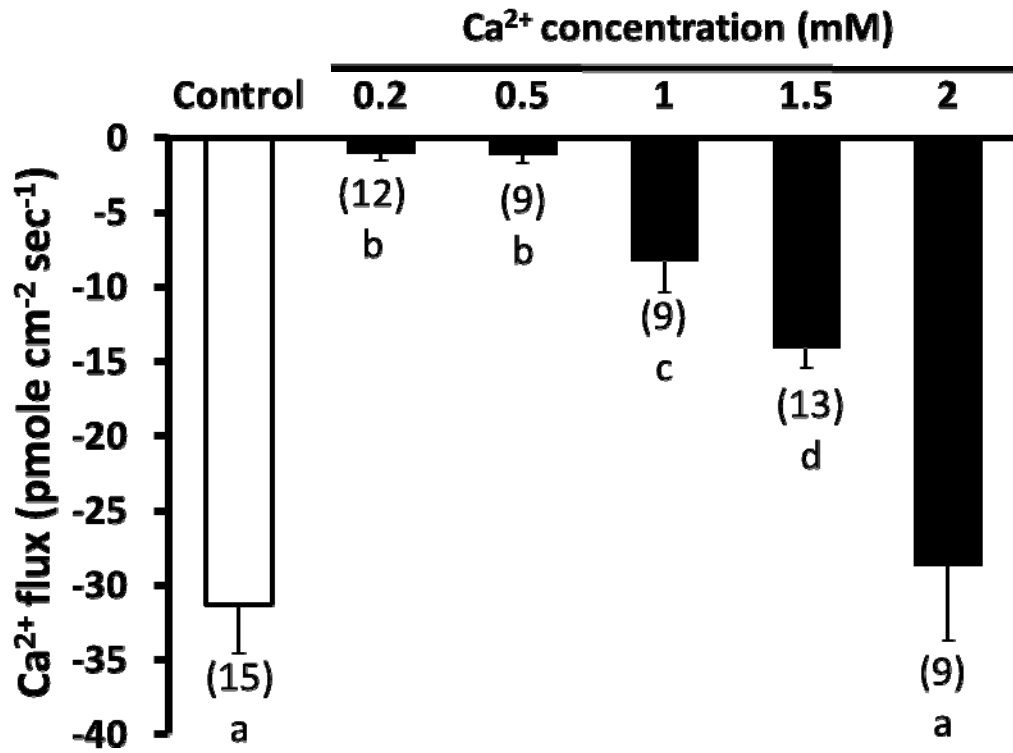


圖 4. 斑馬魚仔魚 (4dpf) 以不同濃度的 AGs 和鈣離子相互處理後，對側線毛細胞進行機械性刺激所產生的鈣離子流量。A：在含 neomycin (1, 10, 100, 1000 μM , 30 分鐘) 的 NW 或高鈣人工水 (2.0 mM) 浸泡 30 分鐘，斑馬魚仔魚 (4dpf) 側線毛細胞的鈣離子流量。B：在含 gentamicin (1, 10, 100, 1000 μM) 的 NW 或高鈣人工水 (2.0 mM) 浸泡 30 分鐘，斑馬魚仔魚 (4dpf) 側線毛細胞的鈣離子流量。^{abcd} 表示顯著差異 (One-way ANOVA, Tukey's test, $p < 0.05$)，* 表示高鈣人工水處理組與 NW 處理組有顯著差異。數據為 means \pm SEs (樣本數標示於圖中括號內)。

(A)



(B)

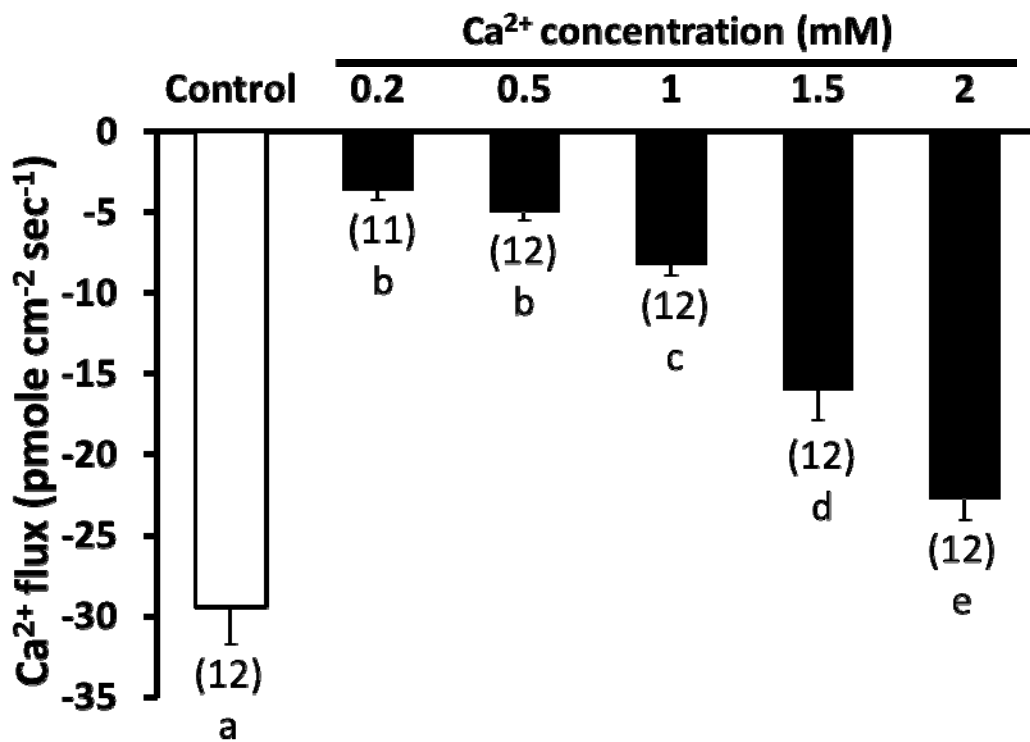
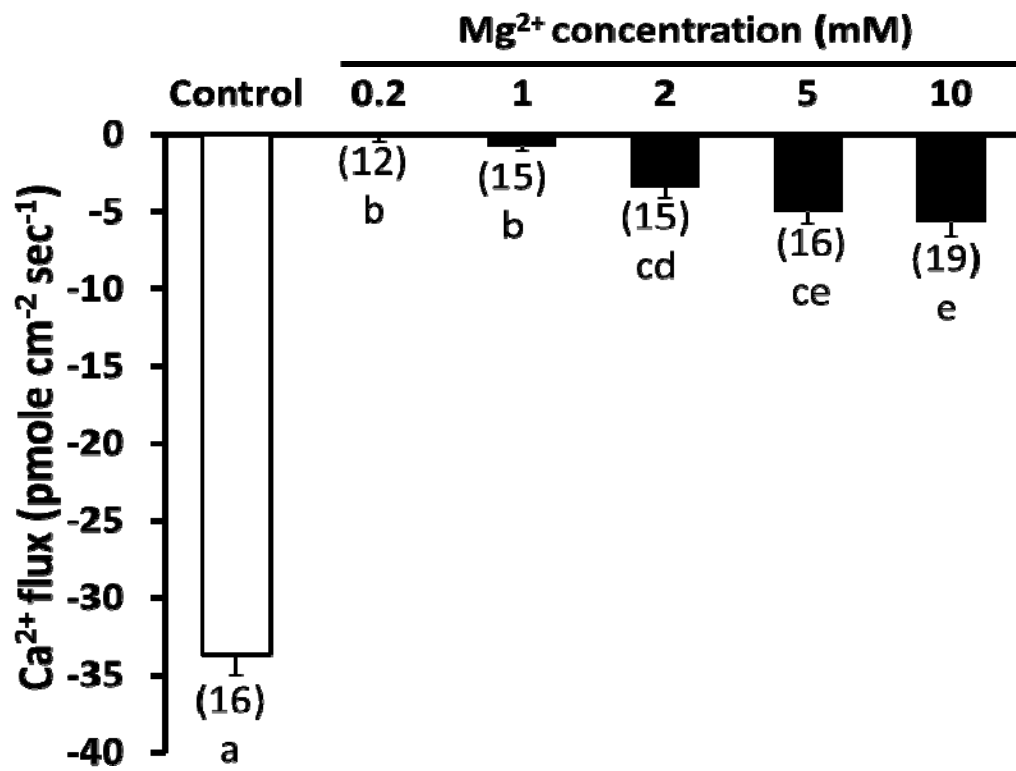


圖 5. 斑馬魚仔魚 (4 dpf) 以不同濃度鈣離子和 AGs 相互處理後，對側線毛細胞進行機械性刺激所產生的鈣離子流量 A: 仔魚浸泡於 0.2, 1, 1.5, 2 mM 鈣離子的人工水 (含 100 μ M neomycin) 30 分鐘後，側線毛細胞進行機械性刺激所產生的鈣離子流量。B: 仔魚浸泡於 0.2, 1, 1.5, 2 mM 鈣離子的人工水中 (含 100 μ M gentamicin) 30 分鐘後，側線毛細胞進行機械性刺激所產生的鈣離子流量。^{abcde} 表示顯著差異 (One-way ANOVA, Tukey's test, $p < 0.05$)。數據為 means \pm SEs (樣本數標示於圖中括號內)。

(A)



(B)

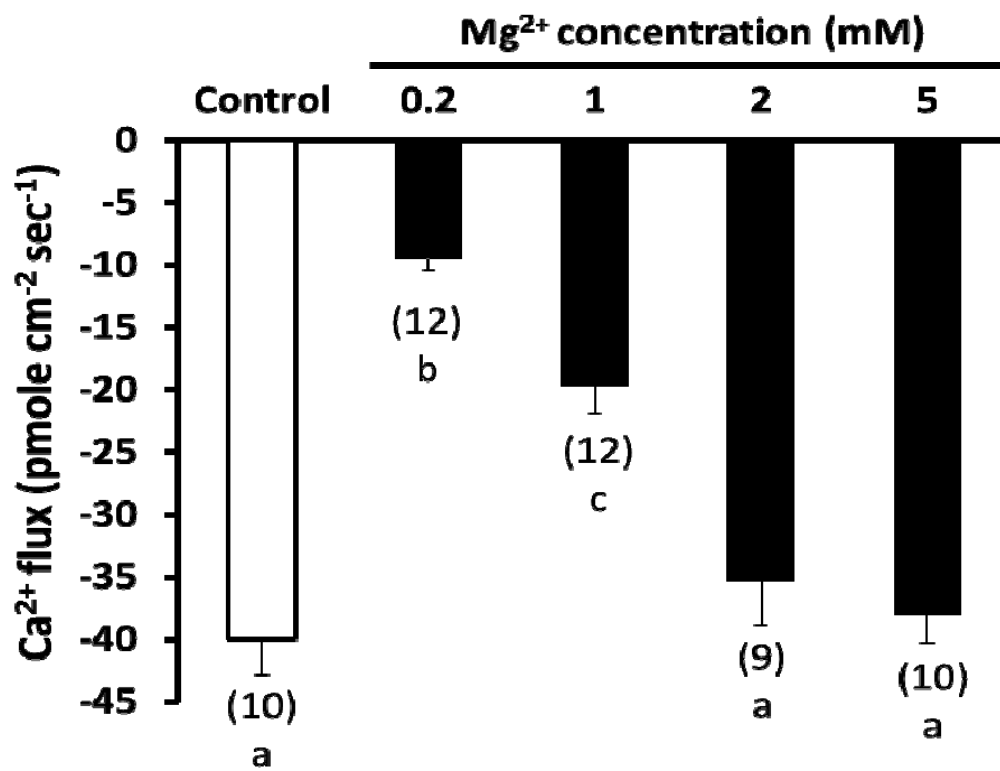
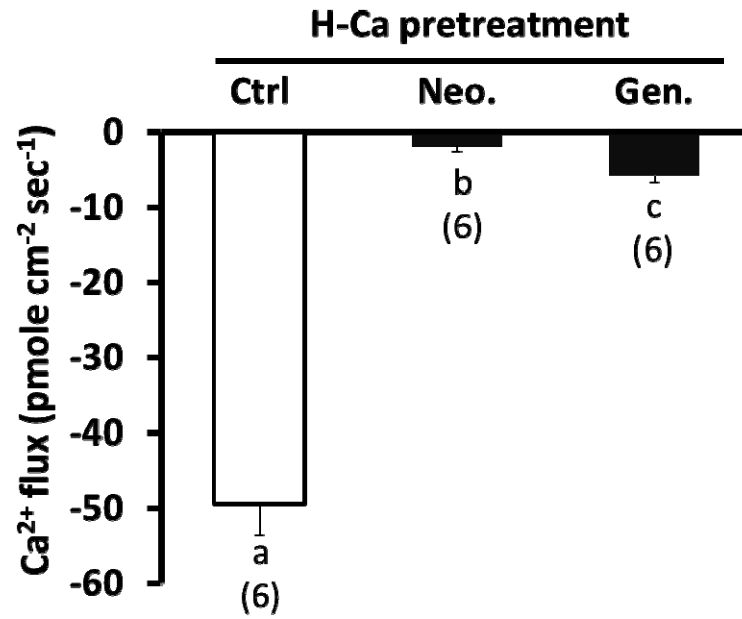


圖 6. 斑馬魚仔魚 (4 dpf) 以不同濃度鎂離子和 AGs 處理後，對側線毛細胞進行機械性刺激所產生的鈣離子流量。A：仔魚浸泡於 0.2, 1, 2, 5, 10 mM 鎂離子的人工水 (含 100 μ M neomycin) 30 分鐘後，側線毛細胞進行機械性刺激所產生的鈣離子流量。B：仔魚浸泡於 0.2, 1, 2, 5 mM 鎂離子的人工水中 (含 100 μ M gentamicin) 30 分鐘後，側線毛細胞進行機械性刺激所產生的鈣離子流量。^{abcde} 表示顯著差異 (One-way ANOVA, Tukey's test, $p < 0.05$)。數據為 means \pm SEs (樣本數標示於圖中括號內)。

(A)



(B)

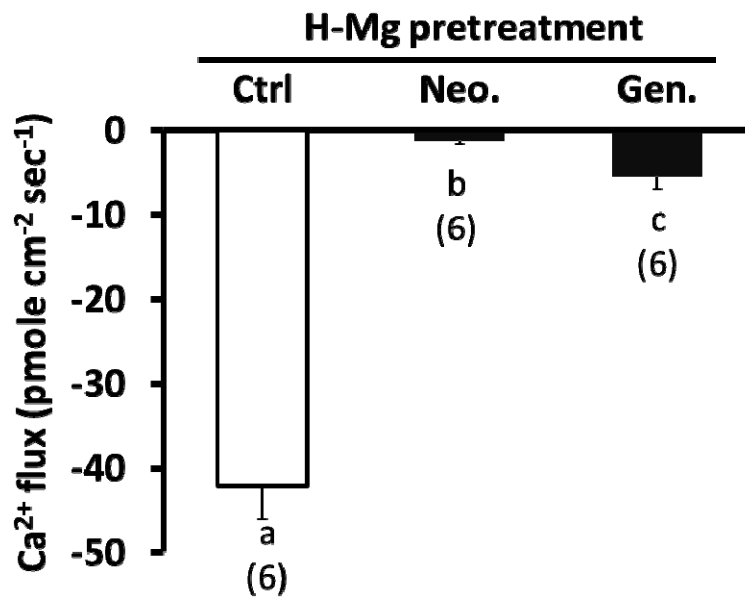


圖 7. 斑馬魚仔魚(4 dpf)經高濃度的二價陽離子(A:2 mM Ca²⁺;B:2 mM Mg²⁺)進行前處理 30 分鐘，再浸泡於 AGs30 分鐘後，對側線毛細胞進行機械性刺激所產生的鈣離子流量。^{abc}表示顯著差異(One-way ANOVA, Tukey's test, $p < 0.05$)。數據為 means \pm SEs (樣本數標示於圖中括號內)。

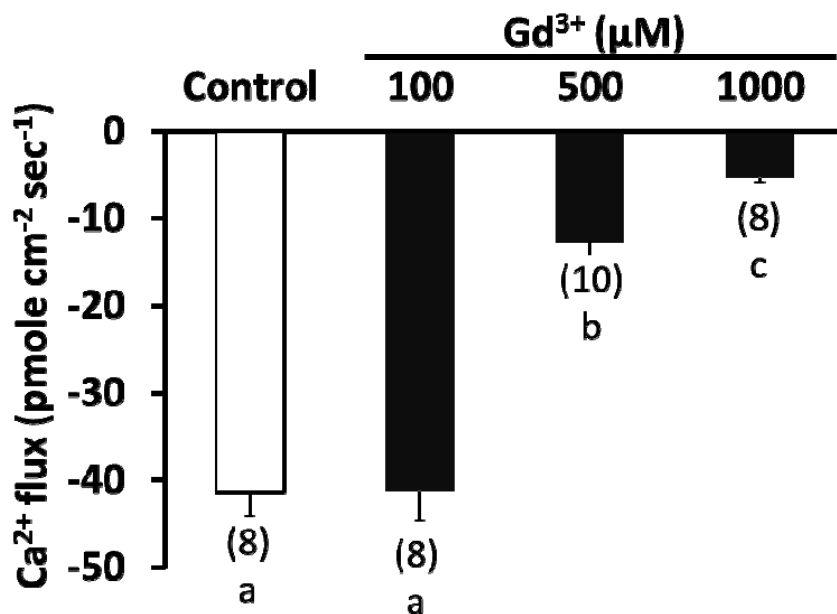


圖 8. 斑馬魚仔魚 (4 dpf) 經 gadolinium (Gd^{3+}) 處理 30 分鐘後，對側線毛細胞進行機械性刺激所產生的鈣離子流量。^{abc} 表示顯著差異 (One-way ANOVA, Tukey's test, $p < 0.05$)。數據為 means \pm SEs (樣本數標示於圖中括號內)。

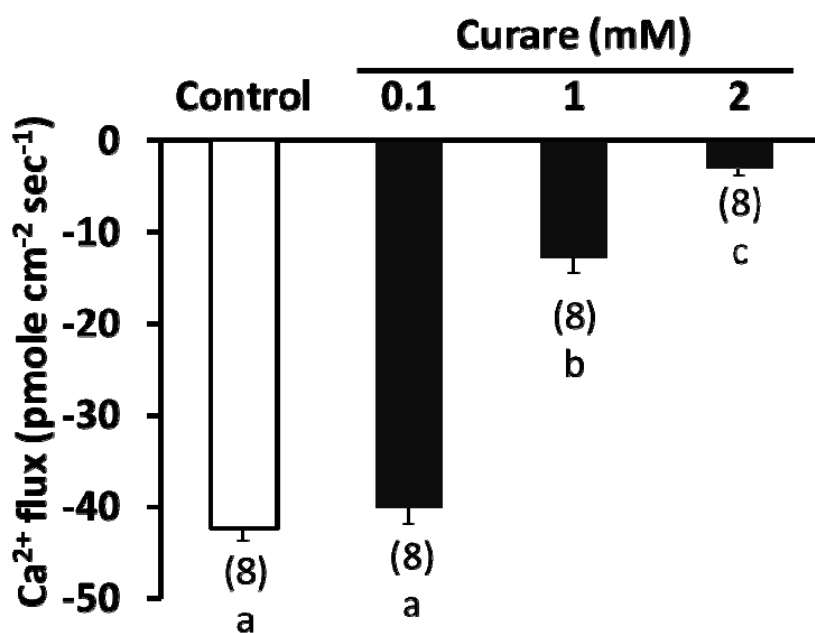


圖 9. 斑馬魚仔魚 (4 dpf) 經 curare 處理 30 分鐘後，對側線毛細胞進行機械性刺激所產生的鈣離子流量。^{abc} 表示顯著差異 (One-way ANOVA, Tukey's test, $p < 0.05$)。數據為 means \pm SEs (樣本數標示於圖中括號內)。

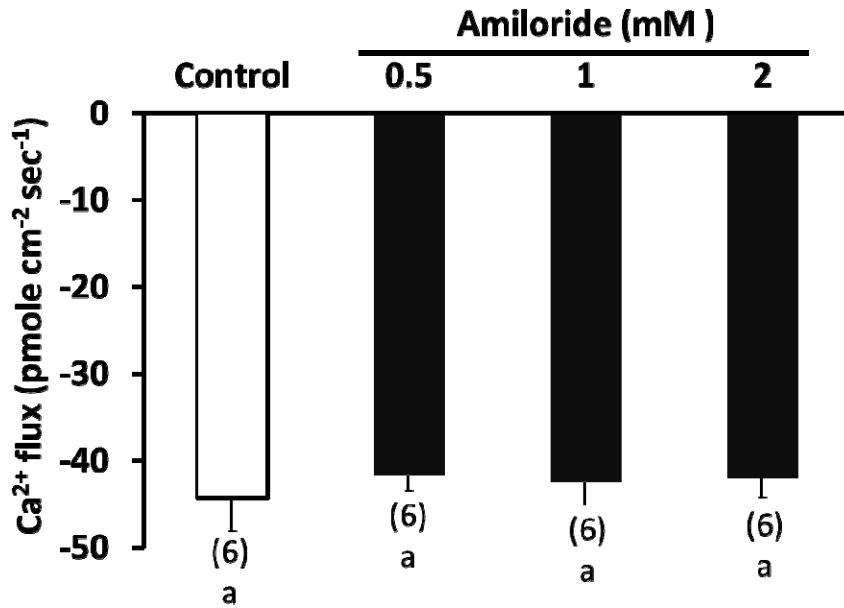


圖 10. 斑馬魚仔魚 (4 dpf) 經 amiloride 處理 30 分鐘後，對側線毛細胞進行機械性刺激所產生的鈣離子流量。One-way ANOVA, Tukey's test, $p < 0.05$ 。數據為 means \pm SEs (樣本數標示於圖中括號內)。

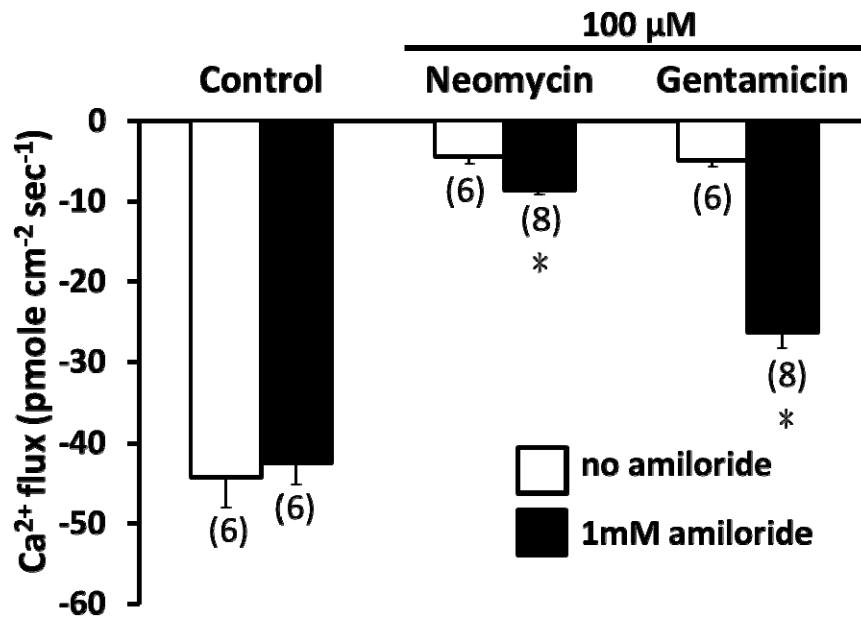


圖 11. 斑馬魚仔魚 (4 dpf) 以 amiloride 進行 30 分鐘的前處理，再浸泡於 AGs30 分鐘，對側線毛細胞進行機械性刺激所產生的鈣離子流量。* 表示有 amiloride 前處理與無 amiloride 前處理的兩組間，鈣離子流量有顯著差異 (Student's t-test, $p < 0.05$)。數據為 means \pm SEs (樣本數標示於圖中括號內)。