

毒理（斑马鱼）研究文献专辑

非 损 伤 微 测 技 术

获取更多分类文献专辑

神经研究、毒理（斑马鱼）研究、重金属胁迫、盐胁迫、IAA 研究、极性生长、温度胁迫、
水旱胁迫、植物免疫、植物-微生物互动、植物营养

[>>点击获取](#)

中关村 NMT 产业联盟

nmtia.org.cn

扫码获取 2021 最新文献



目 录

台湾师范林豊益：纳米铜颗粒对斑马鱼皮肤离子细胞毒性的影响	1 -
台北医学大学 Carbohydrate Polymers: 评估低分子壳聚糖对斑马鱼的毒性为分子壳聚糖属性提供新认识.....	4 -
台医大 Chemosphere: NMT 揭示以斑马鱼为研究对象的氨毒理机制	6 -
Part Fibre Toxicol: NMT 钙流为纳米硅通过钙-ROS 诱导器官损伤提供关键证据	9 -
台大：抗利尿激素调节离子和酸碱平衡的机制.....	11 -
AQUAT TOXICOL: 银铜纳米颗粒抑制斑马鱼胚胎侧线毛细胞钙吸收.....	13 -
台湾中研院：谷氨酸/谷氨酰胺循环是维持斑马鱼离子稳态的关键之一.....	16 -
台湾师大林豊益：TRPV4（一种 NSCC）通过硬骨鱼催产素途径调节斑马鱼离子平衡	19 -

台湾师范林豐益：纳米铜颗粒对斑马鱼皮肤离子细胞毒性的影响

1. 基本信息

期刊：Chemosphere

主题：纳米铜颗粒对斑马鱼皮肤离子细胞毒性的影响

标题：Exposure to copper nanoparticles impairs ion uptake, and acid and ammonia excretion by ionocytes in zebrafish embryos

影响因子：5.778

作者：台湾师范大学林豐益、Chih-Ying Lee

2. 中文摘要

铜纳米颗粒（CuNPs）对鱼类早期阶段的潜在毒性尚不清楚，关于其对离子细胞及相关功能的影响也知之甚少。本研究使用斑马鱼胚胎作为模型来研究 CuNPs 对两种亚型离子细胞的毒性作用。斑马鱼胚胎暴露在 0.1、1 和 3 mg L⁻¹ CuNPs 中 96 h。暴露后，≥0.1mg L⁻¹ 时全身 Na⁺和 Ca²⁺含量显著降低，而≥1 mg L⁻¹时 K⁺含量降低。当≥1 mg L⁻¹时，皮肤分泌的 H⁺和 NH₄⁺明显减少。用≥0.1mg L⁻¹ CuNPs，用若丹明-123 标记的活离子细胞数量显著减少。用免疫组织化学法标记富含 H⁺-ATPase（HR）和富含 Na⁺/K⁺-ATPase（NaR）的离子细胞亚型在≥1 mg L⁻¹时呈下降趋势。通过扫描电子显微镜发现离子细胞的顶端开口的收缩。功能损伤还反映在基因表达的变化上，包括离子转运蛋白/通道和 Ca²⁺调节激素。该研究表明，CuNP 暴露可损害斑马鱼胚胎中两种亚型的离子细胞及其相关功能，包括 Na⁺/Ca²⁺吸收和 H⁺/NH₄⁺分泌。

3. 检测离子/分子指标

H⁺, NH₄⁺

4. 样品信息

斑马鱼胚胎皮肤离子细胞

5. 离子/分子流实验处理方法

纳米铜颗粒（CuNPs）处理斑马鱼胚胎96 h

6. 离子/分子流实验结果

使用 NMT 技术检测斑马鱼胚胎皮肤离子细胞对 H⁺和 NH₄⁺的分泌。如图 1A 所示，H⁺

和 NH_4^+ 分泌水平通过计算卵黄囊和背景溶液之间（距离 10 mm）的浓度梯度（ $\Delta[\text{H}^+]$ 和 $\Delta[\text{NH}_4^+]$ ）来测量。先前的研究表明卵黄囊皮肤中有丰富的离子细胞，其测量值可以反映离子细胞的功能。胚胎暴露于 CuNPs 96 h 后，1 和 3 mg L^{-1} CuNP 组的 H^+ 和 NH_4^+ 分泌水平被显著抑制（图 1B, C）。 H^+ 分泌减少了 29%（1 mg L^{-1} ）和 30%（3 mg L^{-1} ）。 NH_4^+ 分泌减少了 47%（1 mg L^{-1} ）和 61%（3 mg L^{-1} ）。

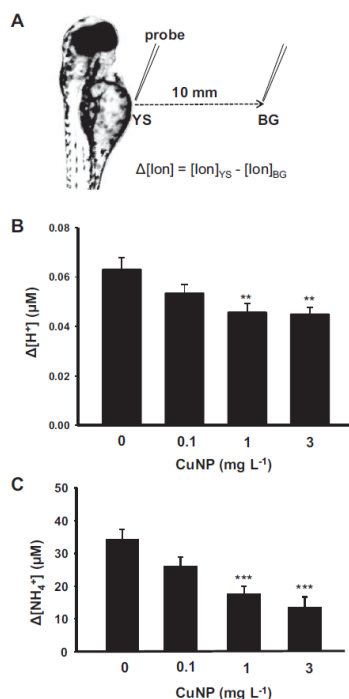


图 1. 斑马鱼胚胎暴露于 CuNPs 96 h 后的 H^+ 和 NH_4^+ 分泌

7. 其它实验结果

- CuNPs 处理会使斑马鱼胚胎 Na^+ 、 K^+ 、 Ca^{2+} 含量下降，但 0.1 mg L^{-1} 的 CuNPs 处理没有改变 K^+ 含量。
- CuNPs 处理后斑马鱼皮肤离子细胞密度显著下降。
- 免疫组织化学方法观察 HR 和 NaR 细胞亚型的密度发现，CuNPs 处理会导致 HR 和 NaR 细胞密度下降。
- 用扫描电镜分析了细胞顶端表面的超微结构，对照组 HR 细胞顶膜呈碎屑状，CuNPs 处理组却发现了小凹坑。通过对细胞顶端表面的面积分析后发现，1 和 3 mg L^{-1} CuNPs 处理使细胞顶端表面的尺寸明显减小。

8. 结论

本研究表明，CuNPs 处理对鱼类的早期阶段具有潜在的风险。CuNPs 可损伤离子细胞中离子通道/转运蛋白的功能，破坏离子细胞的顶端结构，甚至导致离子细胞死亡，进一步导致离子严重流失，代谢酸/氨积累，最终导致鱼类死亡。

9. 测试液

AFW, 300 mM 3-(n-morpholino) propanesulfonic acid (MOPS) buffer, 0.1 mg L^{-1} ethyl

3-aminobenzoate methanesulfonate (tricaine)

台北医学大学 Carbohydrate Polymers: 评估低分子壳聚糖对斑马鱼的毒性为分子壳聚糖属性提供新认识

1. 基本信息

期刊: Carbohydrate Polymers

主题: 评估低分子壳聚糖对斑马鱼的毒性为分子壳聚糖属性提供新认识

标题: Characterization and toxicology evaluation of low molecular weight chitosan on zebrafish

影响因子: 7.182

作者: 台北医学大学郑嘉雄、周志铭

2. 中文摘要

壳聚糖被认为是无毒或低毒、生物相容性好的生物材料。然而, 低分子量壳聚糖 (LMWCS) 对淡水鱼的毒性尚未得到很好的评估。因此, 本研究利用斑马鱼肝脏 (ZFL) 细胞系、斑马鱼幼体 (larvae) 和成鱼报道了 LMWCS 的毒性机制。LMWCS 能迅速诱导 ZFL 细胞的细胞毒性和斑马鱼的死亡。LMWCS 会损伤细胞膜降低细胞活力。斑马鱼幼体皮肤细胞膜受损导致卵黄受损。由于 LMWCS 的多重损伤, 成鱼在死亡前表现出缺氧的症状。虽然在斑马鱼模型中发现了 LMWCS 的毒性, 但其毒性只存在于 pH<7 的情况下, 且容易被其他负离子中和。总体而言, 这些数据提高了人们对 LMWCS 特性的新认识。NMT 技术通过监测 Na^+ 流为 LMWCS 破坏斑马鱼皮肤细胞膜提供了有力证据。

3. 检测指标

Na^+

4. 样品信息

斑马鱼幼鱼皮肤离子细胞

5. 离子流实验处理方法

斑马鱼幼鱼被浸泡在 10 $\mu\text{g/mL}$ 低分子壳聚糖 (LMWCS) 和 10 $\mu\text{g/mL}$ LMWCS+10 mM Na_2HPO_4 中 5 min

6. 离子/分子流实验结果

采用 NMT 技术对斑马鱼幼鱼皮肤离子细胞释放的 Na^+ 进行实时检测。用 10 $\mu\text{g/mL}$ 的

LMWCS 孵育后, 3 只斑马鱼幼鱼的皮肤离子细胞迅速释放出 Na^+ 。用 10 mM Na_2HPO_4 中和可显著逆转 Na^+ 的流出。总的来说, 这些数据表明 LMWCS 破坏了斑马鱼幼鱼的皮肤离子细胞。

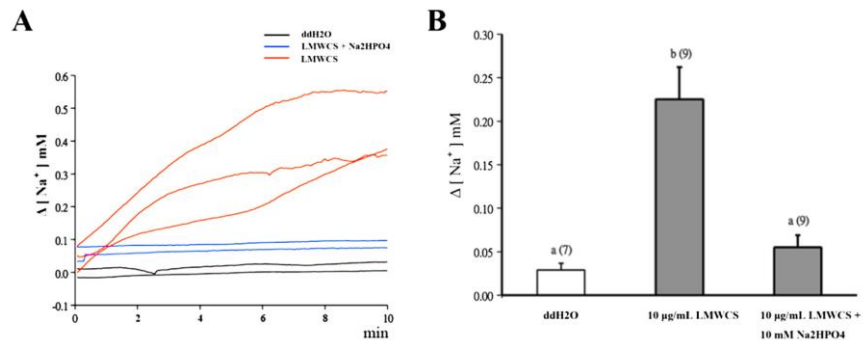


图 1. LMWCS 损伤皮肤离子细胞膜诱导斑马鱼幼鱼离子外排

7.其它实验结果

- LMWCS 对斑马鱼幼鱼具有一定的毒性, PBS 和 Na_2HPO_4 缓冲液均能有效地中和这种毒性。
- LMWCS 导致斑马鱼幼鱼的皮肤离子细胞严重受损, 最终导致其死亡。
- 在斑马鱼幼鱼死亡前, 可能引起卵黄上皮损伤和行为异常。
- LMWCS 对斑马鱼肝脏细胞膜损伤具有细胞毒性。
- LMWCS 破坏了成年斑马鱼的组织, 鳃瓣损伤是成年斑马鱼死亡的主要原因。
- LMWCS 在河水中也可导致斑马鱼死亡。

8.结论

LMWCS 可迅速导致斑马鱼幼鱼和成鱼在水中死亡, 即使在正常的河水中也是如此。LMWCS 靶向并破坏皮肤离子细胞膜和鳃瓣, 诱导斑马鱼幼鱼和成鱼死亡。此外, LMWCS 对斑马鱼肝细胞、斑马鱼幼鱼和成鱼的毒性可以用 Na_2HPO_4 缓冲液中和。即使在斑马鱼模型中也发现了 LMWCS 的毒性, 但由于 LMWCS 的水不溶性和易被其它负离子中和, 其毒性只存在于 $\text{pH} < 7$ 的环境中这些结果提供了对 LMWCS 特性的新理解。

台医大 Chemosphere: NMT 揭示以斑马鱼为研究对象的氨毒理机制

1. 基本信息

期刊: Chemosphere

主题: NMT 揭示以斑马鱼为研究对象的氨毒理机制

标题: Ammonia exposure impairs lateral-line hair cells and mechanotransduction in zebrafish embryo

影响因子: 5.778

作者: 台北医学大学洪君琳、台湾师范大学林豊益

2. 中文摘要 (谷歌机翻)

氨(包括 NH_3 和 NH_4^+) 是淡水环境的主要污染物。但是, 氨对鱼类早期阶段的毒性作用尚未完全了解, 对感官系统的影响知之甚少。研究假设氨气暴露会对胚胎发育产生不利影响, 并损害鱼的侧线系统。将斑马鱼胚胎暴露于高氨水 (10、15、20、25 和 30 mM NH_4Cl , pH 7.0) 中 96 h (受精后 0~96 h)。≥15 mM NH_4Cl 时, 体长, 心率和耳泡大小显著降低, 而 ≥10 mM NH_4Cl 时, 侧线毛细胞的数量和功能降低。用非损伤微测技术 (NMT) 测量了机电转导 (MET) 通道介导的 Ca^{2+} 内流, 以揭示毛细胞的功能。研究发现 NH_4^+ (≥5 mM NH_4Cl) 进入毛细胞并抑制了 Ca^{2+} 流入毛细胞。新霉素和 La^{3+} (MET 通道阻滞剂) 抑制了 NH_4^+ 的流入, 这表明 NH_4^+ 通过发束中的 MET 通道进入毛细胞。总之, 这项研究表明, 氨暴露 (≥10 mM NH_4Cl) 可能对斑马鱼胚胎产生不利影响, 并且侧线毛细胞对氨暴露敏感。

3. 检测指标

Ca^{2+} , NH_4^+

4. 样品信息

斑马鱼侧线毛细胞

5. 离子流实验处理方法

- 胚胎在浓度的 NH_4Cl (0、5、10、20 mM) 中孵育 96 h
- 受精后 96 h 的胚胎在不同浓度的 NH_4Cl (0、1、5、10 mM) 中孵育 0.5 h
- 受精后 96 h 的胚胎在 5 mM NH_4Cl 或 5 mM NH_4Cl 加阻滞剂 (10 μM 新霉素或 10 μM La^{3+}) 中 0.5 h

6. 离子/分子流实验结果

用 NMT 分析毛束处 Ca^{2+} 内流, 评价毛细胞功能 (图 1A 显示了流速微传感器检测 L1 神经丘毛束的图像)。10 mM 组和 20 mM 组的 Ca^{2+} 内流分别减少了 33% 和 43% (图 1B)。

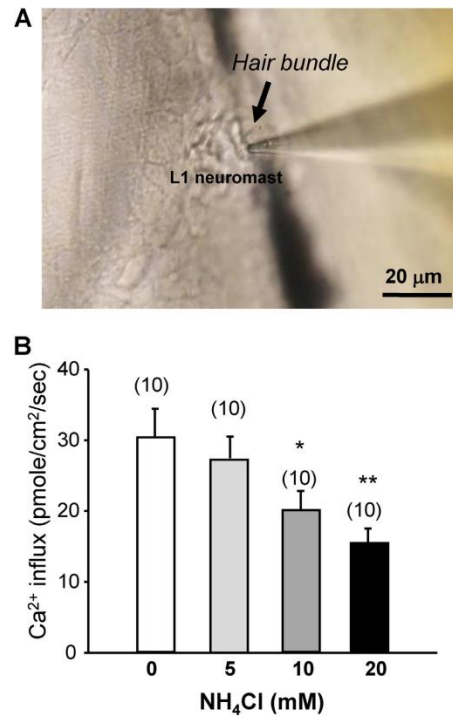


图 1. 受精后 (hpf) 0~96 h 高氨水暴露对毛细胞功能的影响

胚胎在 NH_4Cl 暴露 30 min 后, 1、5 和 10 mM NH_4Cl 组的 Ca^{2+} 内流分别显著减少 45%、65% 和 75% (图 2A)。0 和 1 mM NH_4Cl 组毛细胞的 NH_4^+ 流速非常低, 而在 5 和 10 mM NH_4Cl 组中测量到显著的 NH_4^+ 内流 (图 2B)。

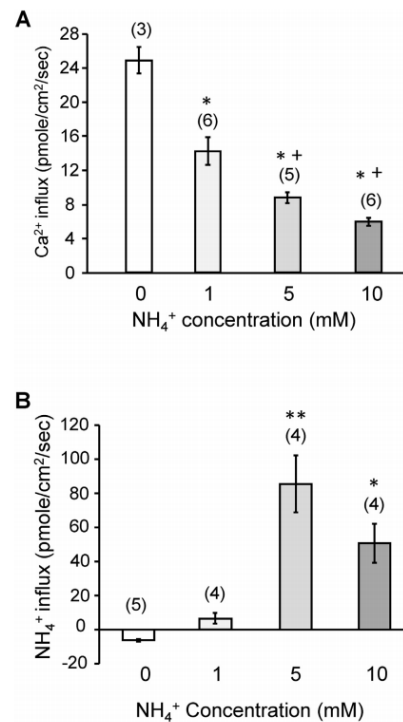


图 2. 高氨水暴露 30min 对毛细胞 Ca^{2+} 和 NH_4^+ 流速的影响

用 La^{3+} 和新霉素来验证 NH_4^+ 在毛细管的内流是通过 MET 通道介导的。将胚胎预暴露于 5 mM NH_4Cl (含或不含阻断剂) 30 min 后, 记录 NH_4^+ 在神经丘毛细管的内流。结果表明, 新霉素 (10 μM) 和 La^{3+} (10 μM) 组的 NH_4^+ 内流分别减少了 60% 和 50% (图 3)。

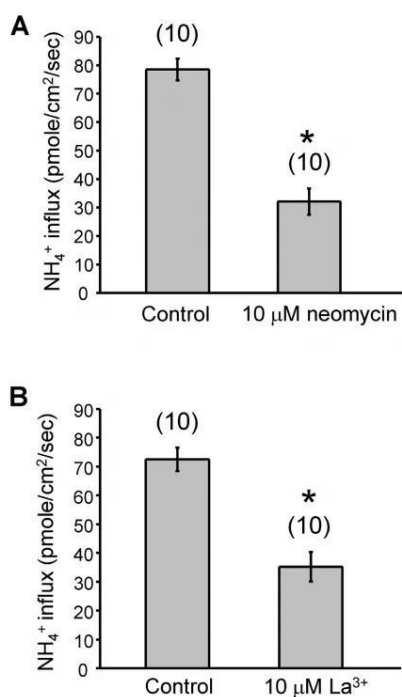


图 3.新霉素和 La^{3+} 对毛细管 NH_4^+ 内流的影响

7.其他实验结果

- 氨暴露后, 斑马鱼胚胎的体长、心率和耳泡大小均减小。
- 氨暴露后, 侧线毛细管的数量和功能下降。
- 外侧毛细管对氨暴露敏感。

8.结论

综上所述, 本研究综述了亚致死氨暴露对斑马鱼胚胎早期发育和侧线毛细管的毒性作用。数据表明, 氨通过干扰 MET 通道介导的 Ca^{2+} 内流而损害毛细管。氨对鱼类侧线系统存在不利影响, 可能影响鱼类的行为, 对自然生态系统中的鱼类生存造成严重威胁。

9.测试液

0.5 mM NaCl, 0.2 mM CaSO_4 , 0.2 mM MgSO_4 , 0.16 mM KH_2PO_4 , 0.16 mM K_2HPO_4 , pH 7.0

Part Fibre Toxicol: NMT 钙流为纳米硅通过钙-ROS 诱导器官损伤提供关键证据

1.基础信息

期刊: Particle and Fibre Toxicology

主题: NMT 钙流为纳米硅通过 Ca^{2+} -ROS 诱导器官损伤提供关键证据

标题: Silica nanomaterials induce organ injuries by Ca^{2+} -ROS-initiated disruption of the endothelial barrier and triggering intravascular coagulation

影响因子: 7.546

作者: 山西医科大学曹济民、王昭君

2.中文摘要

二氧化硅纳米颗粒 (SiNPs) 在许多领域的使用越来越多, 引起了对人类毒性的关注。本文研究了 SiNP-20 (颗粒直径 20 nm) 和 SiNP-100 (100 nm) 的对体外和体内的内皮细胞的毒性及其潜在机制。该研究是使用多种技术在培养的人脐静脉内皮细胞 (human umbilical vein endothelial cells, HUVEC) 和成年雌性 Balb/c 小鼠中进行的。结果表明, 在体外, SiNP-20 和 SiNP-100 均能降低 HUVECs 的存活率并破坏其质膜。纳米颗粒还以浓度依赖的方式抑制 HUVECs 迁移和管腔 (tube) 的形成。两种 SiNPs 均能诱导明显的钙动员和活性氧 (ROS) 的产生, 增加血管内皮钙粘连蛋白 (vascular endothelial(VE)-cadherin) 在酪氨酸 731 残基位点 (pY731-VEC) 的磷酸化, 降低 VE-cadherin 的表达, 破坏 VE-cadherin 的连续性, 诱导 HUVECs 中纤维形肌动蛋白 (F-actin) 重组。通过用 YM58483 阻断 Ca^{2+} 释放激活的 Ca^{2+} (CRAC) 通道或用 N-乙酰半胱氨酸 (N-acetyl cysteine, NAC) 消除 ROS 来逆转损伤。在体内, SiNP-20 和 SiNP-100 均以剂量、粒径和暴露时间依赖的方式诱导 Balb/c 小鼠多器官损伤。SiNPs 暴露后, 所有观察到的器官组织均发生巨噬细胞浸润 (Macrophage infiltration)。SiNPs 还降低了 VE-cadherin 的表达, 并改变了 VE-cadherin 在体内多个器官组织的空间分布。最大的 SiNP (SiNP-100) 和最长的暴露时间在体外和体内都产生了最大的毒性。综上, 在体内施用 SiNP 会引起多器官损伤, 包括内皮损伤, 血管内凝血和继发性炎症。损伤可能是由上游的 Ca^{2+} -ROS 信号和下游的 VE-cadherin 磷酸化和破坏以及 F-actin 重组引起的。这些变化导致了内皮屏障的破坏和接触性凝血途径的触发。

3.检测指标

Ca^{2+}

4.样品信息

脐带静脉内皮细胞

5.离子流实验处理方法

内皮细胞 100 $\mu\text{g/mL}$ 的 SiNP 实时处理

6.离子/分子流实验结果

SiNPs暴露后360 s的总 Ca^{2+} 流速如图1d所示，SiNPs诱导HUVECs中的 Ca^{2+} 显著内流。暴露于SiNP-20或SiNP-100(均为100 $\mu\text{g/mL}$)后， Ca^{2+} 内流速率在360 s内几乎恢复到基线水平。SiNP-100可以比SiNP-20诱导更多的 Ca^{2+} 内流 ($P<0.001$, 图1e)。

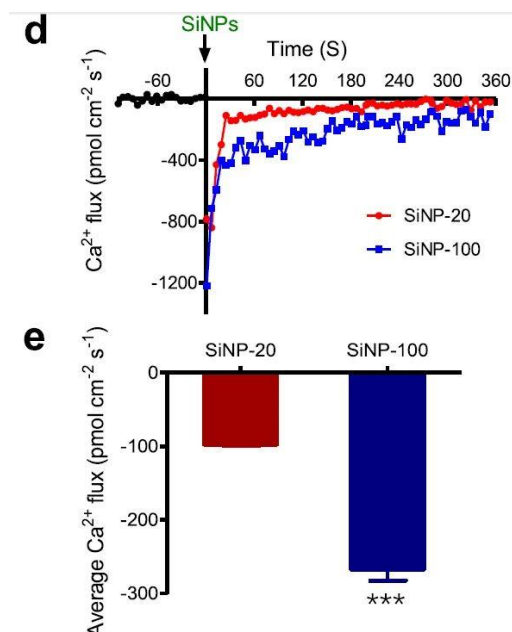


图 1. Ca^{2+} 在 HUVECs 中的动态变化

7.测试液

120 mM NaCl, 3 mM KCl, 2.5 mM CaCl_2 , 1 mM MgCl_2 , 1.25 mM NaH_2PO_4 , 25 mM NaHCO_3 , 10 mM glucose

台大：抗利尿激素调节离子和酸碱平衡的机制

1. 基础信息

期刊：International Journal of Molecular Sciences

主题：抗利尿激素调节离子和酸碱平衡的机制

标题：Arginine Vasopressin Modulates Ion and Acid/Base Balance by Regulating Cell Numbers of Sodium Chloride Cotransporter and H^+ -ATPase Rich Ionocytes

影响因子：4.556

作者：台湾大学周铭翊、中研院细胞与个体生物研究所黄鹏鹏

2. 中文摘要（谷歌机翻）

精氨酸加压素（Avp）是一种保守的多能激素，可调节水的重吸收和离子平衡，但是，影响其作用的许多机制仍不清楚。本研究使用斑马鱼胚胎来研究 Avp 如何调节离子和酸碱平衡。胚胎在双蒸水中孵育 24 h 后，*avp* mRNA 表达水平明显上调。通过反义吗啉代寡核苷酸（MO）敲低 Avp 蛋白表达可减少离子细胞相关基因的表达，并下调全身 Cl^- 含量和 H^+ 分泌，而 Na^+ 和 Ca^{2+} 水平不受影响。Avp 拮抗剂 SR49059 的孵育也下调了 NaCl 协同转运蛋白 2b (*ncc2b*) 的 mRNA 表达，该转运蛋白是负责 Cl^- 吸收的转运蛋白。相应地，*avp* 突变体显示出较低的 NCC 和富含 H^+ -ATPase (HR) 的细胞数，但富含 Na^+/K^+ -ATPase (NaR) 的细胞数保持不变。*avp* MO 也下调了 *foxi3a*-和 p63 表达细胞的数量。最后，*cgrp* 及其受体 *crlr1* 的 mRNA 表达水平在 *avp* 突变体中下调，表明 Avp 可能影响 Cgrp 和 Crlr1 调节 Cl^- 平衡。本研究结果共同揭示了 Avp 调节离子和酸碱平衡的分子/细胞途径，为其功能提供了新的见解。

3. 检测指标

H^+

4. 样品信息

斑马鱼胚胎皮肤离子细胞

5. 离子流实验处理方法

斑马鱼胚胎在 1-2 细胞期

① 对照组

② 精氨酸加压素（Avp）敲低组

6.离子/分子流实验结果

Avp敲低组斑马鱼胚胎离子细胞， H^+ 分泌较对照组弱。

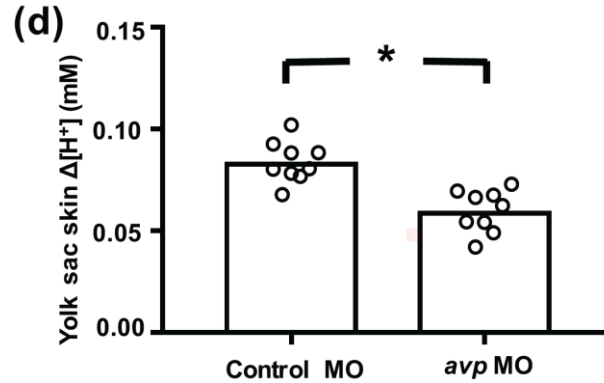


图1. 下调Avp对受精后3天的斑马鱼胚胎离子细胞 H^+ 外排的影响

7.其他实验结果

- Avp 及其受体在斑马鱼组织中广泛表达。
- *avp* 敲低下调 Avp 蛋白表达。
- Avp 调节离子细胞的功能。
- Avp 调节斑马鱼胚胎皮肤上的离子细胞数量。
- Avp 敲低组显示 *Cgrp* 及其受体 *Crlr1* 的表达减少。

8.结论

斑马鱼胚胎在双蒸水中孵育 24 h 后，*avp* mRNA 表达水平显著上调。通过反义吗啉寡核苷酸 (MO) 敲低 Avp 蛋白表达，降低了离子细胞相关基因的表达，降低了全身 Cl^- 含量和 H^+ 分泌，而 Na^+ 和 Ca^{2+} 水平不受影响。Avp 拮抗剂 SR49059 的孵育也下调了氯化钠共转运蛋白 2b (*ncc2b*) 的 mRNA 表达，该转运蛋白是一种负责 Cl^- 吸收的转运蛋白。相应地，*avp* 敲低组的 NCC 和富含 H^+ -ATPase (HR) 细胞数较低，但富含 Na^+ / K^+ -ATPase (NaR) 细胞数保持不变。Avp 敲低组中 *foxi3a* 和 p63 表达细胞的数量也有下调。最后，*cgrp* 及其受体 *crlr1* 的 mRNA 表达水平在 Avp 敲低组中下调，表明 Avp 可能影响 *Cgrp* 和 *Crlr1* 调节 Cl^- 平衡。

9.测试液

300 μ M 3-(N-morpholino)propanesulfonic acid (MOPS) buffer (Sigma), 0.1 mg/L ethyl 3-aminobenzoate (Tricaine, pH 7.0)

AQUAT TOXICOL: 银铜纳米颗粒抑制斑马鱼胚胎侧线毛细胞钙吸收

1.基础信息

期刊: Aquatic Toxicology

主题: 银铜纳米颗粒抑制斑马鱼胚胎侧线毛细胞钙吸收

标题: Toxic effects of silver and copper nanoparticles on lateral-line hair cells of zebrafish embryos

影响因子: 4.346

作者: 作者: 台湾师范大学林豊益、Hsiu-Ju Yen

2.中文摘要（谷歌机翻）

纳米粒子（NPs）对鱼类早期的潜在毒性仍不清楚。本研究调查了银（AgNPs）和铜纳米颗粒（CuNPs）对斑马鱼胚胎侧线毛细胞的毒性作用。在受精后 0~96 h（hpf），将不同浓度的 AgNPs 和 CuNPs 孵育斑马鱼胚胎。发现 AgNPs 和 CuNPs 都以剂量依赖的方式在斑马鱼胚胎中引起毒性作用。AgNP 和 CuNP 的 96 h 50%致死浓度（LC₅₀）值分别为 6.1 ppm（56.5 μM）和 2.61 ppm（41.1 μM）。AgNPs [≥1ppm(9.3μM)]和 CuNPs [≥0.01 ppm(0.16 μM)]严重损害了 FM1-43 标记的毛细胞数量和发束的微观结构。用非损伤微测技术（NMT）测量在毛细胞的发束处的 Ca²⁺流入，以评估毛细胞的功能。发现 AgNPs [≥0.1 ppm(0.9 μM)]和 CuNPs [≥0.01 ppm(0.16 μM)]均能显著减少 Ca²⁺的流入。在暴露于 AgNPs 和 CuNPs 4 小时（96~100 hpf）的孵化胚胎中也发现了类似的毒性作用。这项研究表明，斑马鱼的侧线毛细胞对 AgNPs 和 CuNPs 敏感，而这些污染物在水生环境中可能对鱼类的生存构成威胁。

3.检测指标

Ca²⁺

4.样品信息

斑马鱼胚胎侧线毛细胞

5.离子流实验处理方法

斑马鱼胚胎在受精后（hpf）0~96 h，0、0.9、9.3、27.8 μM 的 AgNPs，和 0、0.16、1.6、15.8 μM 的 CuNP 分别进行处理

6.离子/分子流实验结果

在 AgNP 或 CuNP 暴露 96 h 的胚胎中发现毛细胞的功能损伤。用 NMT 技术检测斑马鱼胚胎 L1 神经丘发束 Ca^{2+} 流速（图 1A），0.1、1、3 ppm（0.9、9.3、27.8 μM ）AgNP 处理组 Ca^{2+} 内流速率分别显著降低 26%、46% 和 91%（图 1B）。0.01 ppm（0.16 μM ）CuNP 处理组 Ca^{2+} 内流速率减少 38%，0.1 和 1 ppm（1.6 和 15.8 μM ）CuNP 处理组几乎检测不到 Ca^{2+} 内流（图 1C）。

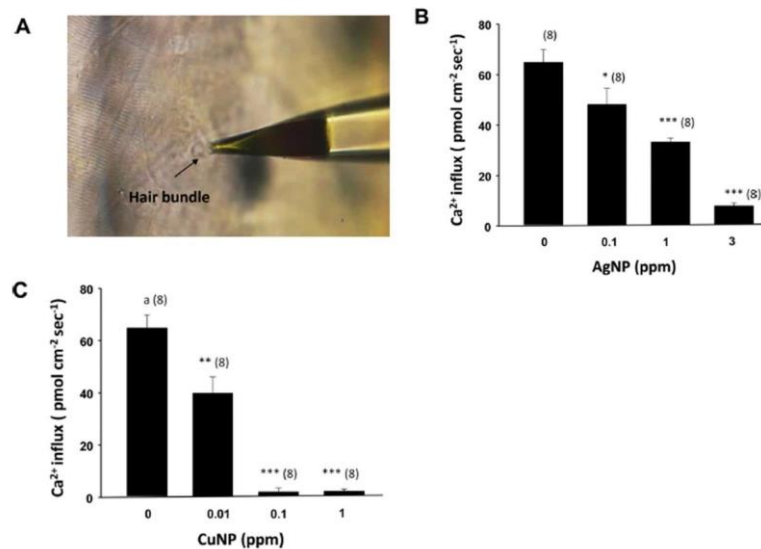


图 1. Hpf 0~96 h 纳米颗粒（NP）暴露对毛细胞功能的影响

在 96~100 hpf 期间，在短期 AgNP 或 CuNP 暴露下可以观察到斑马鱼胚胎毛细胞的功能变化。根据 NMT 的结果，0.01、0.1 和 1 ppm（0.16、1.6 和 15.8 μM ）AgNP 组 L1 神经丘毛束 Ca^{2+} 内流分别减少 30%、73% 和 100%（图 2A）。0.1 和 0.3 ppm（1.6 和 4.7 μM ）CuNP 组 Ca^{2+} 内流减少 31% 和 50%，而 0.5 ppm（7.9 μM ）CuNP 组几乎检测不到 Ca^{2+} 内流（图 2B）。

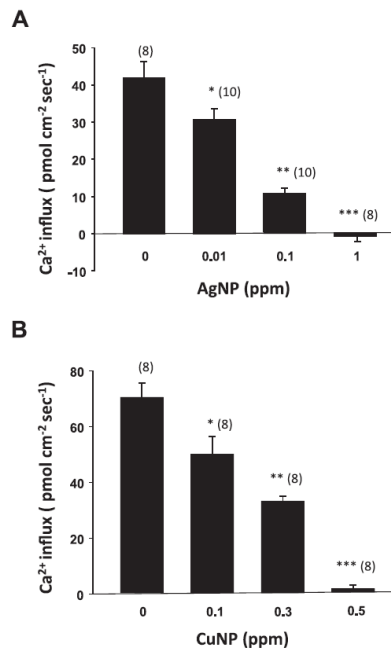


图 2. 纳米颗粒（NP）暴露 4 h 对毛细胞功能的影响

7.其他实验结果

- AgNPs 和 CuNPs 浓度越高，斑马鱼胚胎成活率越低。
- AgNPs 会增加斑马鱼胚胎的孵化率， ≥ 0.1 ppm ($1.6 \mu\text{M}$) 的 CuNPs 暴露可能会导致胚胎孵化受到严重干扰。
- AgNPs 和 CuNPs 处理会使斑马鱼体长缩短。
- 用 FM1-43 标记斑马鱼胚胎毛细胞，结果显示在 AgNPs 和 CuNPs 暴露 96 h 后，斑马鱼 L1 神经丘中的毛细胞数量显著减少。
- SEM 结果表明，1、3 ppm AgNP 处理后斑马鱼 L1 神经丘表面动纤毛的正常形态被破坏，成融合或缠结状。在 CuNP 组中也出现了类似的形态学变化。
- 96 hpf 后暴露 4 h 后，在 0.5 和 1 ppm AgNP 组中，L1 神经丘细胞中荧光 FM1-43 标记的毛细胞数量显著减少，1.5 ppm AgNP 组中未发现毛细胞。0.1 和 0.3 ppm CuNP 组 L1 神经丘中 FM1-43 阳性毛细胞减少，而 0.5 ppm CuNP 组胚胎中未检测到 FM1-43 阳性毛细胞。

8.测试液

0.5 mM NaCl, 0.2 mM CaSO_4 , 0.2 mM MgSO_4 , 0.16 mM KH_2PO_4 , 0.16 mM K_2HPO_4 , 300 μM MOPS, 0.1 mg/l tricaine, pH 7.0

台湾中研院：谷氨酸/谷氨酰胺循环是维持斑马鱼离子稳态的关键之一

1. 基础信息

期刊：Scientific Reports

主题：谷氨酸/谷氨酰胺循环是维持斑马鱼离子稳态的关键之一

标题：Energy and nitrogenous waste from glutamate/glutamine catabolism facilitates acute osmotic adjustment in non-neuroectodermal branchial cells

影响因子：3.998

作者：中央研究院细胞与个体生物学研究所曾庸哲

2. 中文摘要（谷歌机翻）

维持体内平衡是动物对渗透性扰动最重要的生理反应之一。鳃上皮的离子细胞是负责主动离子转运的主要细胞类型，主要由能量消耗型离子泵（如 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$, NKA）和次级活性转运体介导。因此，除了渗透压调节外，充足和及时的能量补充对于适应渗透性变化至关重要。研究提出谷氨酸/谷氨酰胺分解代谢和含氮废物的跨上皮转运可能有助于广盐硬骨鱼（*Oryzias latipes*）在适应渗透变化过程中。在 72 小时的驯化过程中，鳃中谷氨酸族氨基酸的含量随着高渗胁迫的增加而增加。氨基酸的这种变化伴随着假定的谷氨酸/谷氨酰胺转运体（Eaats, Sat）和合成酶（Gls, gll）的刺激，这些酶参与调节鳃上皮细胞在高渗条件下的谷氨酸/谷氨酰胺循环。谷氨酰胺酶和谷氨酰胺合成酶的原位杂交与免疫细胞化学相结合显示 *olglsl1a* 和 *olglsl2* 部分共定位，但没有 *olglul* 与富含 $\text{Na}^+\text{/K}^+\text{-ATPase}$ 的离子细胞共定位。此外，对于谷氨酸和谷氨酰胺转运体，*oleaat1*、*oleaat3* 和 *olslc38a4* 与离子细胞共定位，但 *oleaat2* 不存在。Morpholino 敲除 Sat 降低了幼虫上皮细胞 Na^+ 流速，表明谷氨酸/谷氨酰胺转运在渗透调节中的重要性。除了作为能量底物的作用外，谷氨酸脱氨基产生 NH_4^+ ，这可能有助于渗透压的产生；编码尿素生产循环组成部分的基因，包括氨甲酰磷酸合成酶（CPS）和鸟氨酸转氨酶（OTC）在高渗条件下上调。基于这些发现，目前的研究表明，谷氨酸/谷氨酰胺循环和随后的含氮废物在鳃上皮的跨上皮转运是维持高渗胁迫下离子稳态的重要组成部分。

3. 检测指标

Na^+

4. 样品信息

青鳉鳃上皮表面

5. 离子流实验处理方法

对 6-dpf 青鳉注射 1 ng SAT-吗啉修饰反义寡核苷酸 (MOs)

6. 离子/分子流实验结果

在 20‰BW 环境中, 与 Wt 和 Sham 组相比, 谷氨酰胺转运蛋白突变体组 (Sat-MO) 的鳃上皮 Na^+ 流速, 显著下降 (67%)。

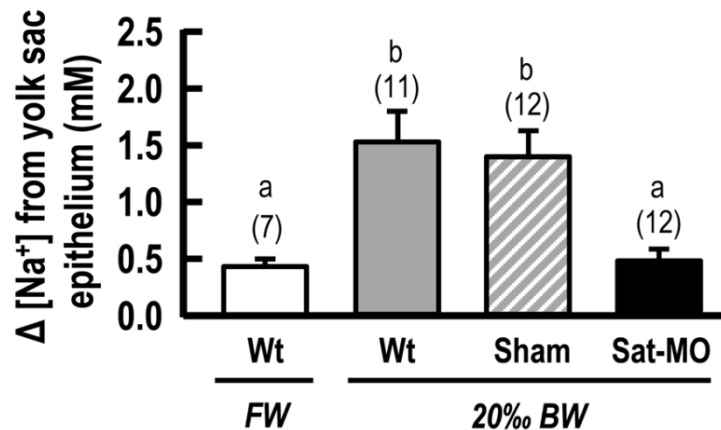


图 1. MOs 对 6 dpf 青鳉卵黄囊上皮细胞 Na^+ 流速的影响

7. 其他实验结果

- 与 FW 对照组相比, 用 20‰ BW 处理 72 h 的青鳉的 O: N 比发生了明显变化。
- 与 FW 对照组相比, 20‰BW 处理后, 青鳉鱼鳃中谷氨酸、谷氨酰胺、脯氨酸和氨含量都有所增加。
- 20‰BW 处理后, 鳃组织中的尿素含量显著增加。
- 20‰BW 处理后, *olcps1*、*olotc* 上调表达, 但是 20‰ BW 在任何一个处理时间都没有明显诱导 *olcps2* 的表达; 另外, Rh 蛋白均下调表达。
- 72 h 处理后, 20‰BW 暴露显著刺激 *olglsl1a* 和 *olglsl2* 的表达。然而, 20‰的 BW 在任何一个处理时间都没有诱导 *olglsl1b* 的表达 (图 4D); 另外, 20‰BW 处理 6 h 和 72 h 后, *olglul* 的转录表达显著上调。
- *olglsl1a*、*olglsl2* 和 *olglul* 三个基因都表现得卵黄囊鳃上皮细胞的典型特征。
- 谷氨酸转运体 (Eaats)、*olslc1a1*、*olslc1a2a*、*olslc1a2b* 和 *olslc1a3*, 以及谷氨酰胺转运体 (SAT)、*olslc38a4* 和 *olslc38a5* 均在青鳉鳃中表达。
- *olslc1a1*, *olslc1a2b*, *olslc1a3* 和 *olslc38a4* 在卵黄囊的表皮细胞中表达, 并表现出典型的“盐和胡椒样”模式表皮离子细胞染色。谷氨酸转运体直向同源物 Eaats 部分与 NKA 信号共定位。此外, 发现所有 Eaats 的 mRNA 信号均与卵黄囊鳃上皮中的 NKA 阳性细胞和邻近的鳃上皮细胞共定位
-

8. 结论

这项研究首次阐明了非必需的 AAs, 谷氨酸和谷氨酰胺是如何参与鳃内 $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$ 生成和尿素积累的, 为渗透调节的能量学提供了新的见解。此外, 谷氨酸/谷氨酰胺转运体和分解代谢调节剂 Eaats、Sat、Gls 和 Glul 在青鳉鳃上皮细胞中的表达模式不仅为研究功能不同

的鳃上皮细胞之间潜在的 AA 转运途径提供了新的见解，同时也开始阐明谷氨酸/谷氨酰胺在鱼类渗透调节中的分子和细胞利用。此外，目前的研究表明谷氨酸-谷氨酰胺循环的特征可能通常来源于表皮的发育，因为在脊椎动物的神经外胚层衍生的中枢神经系统和非神经外胚层衍生的鳃上皮中都有发现。这些发现强调了通过谷氨酸/谷氨酰胺代谢产生基于 NH_4^+ 的尿素的重要性，这有助于在广盐硬骨鱼中建立良好的渗透调节能力。

9.测试液

0.5 mM NaCl, 0.2 mM CaSO_4 , 0.2 mM MgSO_4 , 300 μM MOPS buffer, $0.3\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ethyl 3-aminobenzoate methanesulfonate

台湾师大林豊益：TRPV4（一种 NSCC）通过硬骨鱼催产素途径调节斑马鱼离子平衡

1.基础信息

期刊：American Journal of Physiology-Regulatory Integrative and Comparative Physiology

主题：TRPV4（一种 NSCC）通过硬骨鱼催产素途径调节斑马鱼离子平衡

标题：Transient receptor potential vanilloid 4 modulates ion balance through the isotocin pathway in zebrafish (*Danio rerio*)

影响因子：3.026

作者：台湾师范大学林豊益、刘咸台

2.中文摘要（谷歌机翻）

瞬态受体电位香草酸 4 通过斑马鱼 (*Danio rerio*) 中的同位素途径调节离子平衡。同位素通过调节离子细胞（也称为富线粒体细胞或氯化物细胞）的功能来控制离子调节。但是，关于同位素蛋白系统的上游分子知之甚少。本文确定了瞬态受体电位香草酸 4 (TRPV4)，其调节同位素的 mRNA 和蛋白质表达并通过同位素途径影响离子调控。双重免疫组织化学结果显示，TRPV4 在成年斑马鱼脑下丘脑的同种异能神经元中表达。为了进一步阐明 TRPV4 的作用，作者操纵了 TRPV4 蛋白的表达并评估了其在斑马鱼胚胎中的离子调节功能。用吗啉代寡核苷酸敲除 TRPV4 基因可降低整个幼虫的离子含量 (Na^+ ， Cl^- 和 Ca^{2+})，并降低斑马鱼幼体皮肤的 H^+ 分泌功能。在 *trpv4* 突变体中，也抑制了离子细胞相关转运蛋白的 mRNA 表达，包括 H^+ -ATPase、上皮 Ca^{2+} 通道和 Na^+ - Cl^- 共转运蛋白。 *trpv4* 敲除后，斑马鱼幼虫皮肤中的离子细胞（富含 H^+ -ATPase 的细胞和富含 Na^+ - K^+ -ATPase 的细胞）和表皮干细胞的数量也减少了。本研究结果表明，TRPV4 通过同位素途径调节离子平衡。

3.检测指标

H^+

4.样品信息

斑马鱼卵黄囊的 H^+ -ATPase 富集细胞 (HR 细胞)

5.离子流实验处理方法

对受精后 3 d 的斑马鱼进行 *trpv4* 敲除

6.离子/分子流实验结果

通过 NMT 分析了斑马鱼幼体卵黄囊的酸分泌。在卵黄囊表面记录到了代表酸分泌的 H^+ 外排。在 TRPV4 突变体中酸分泌分别下降了 21.9% 和 67.6%，这表明卵黄囊（图 1 左）和 HR 的细胞（图 1 右）的酸分泌受到抑制。

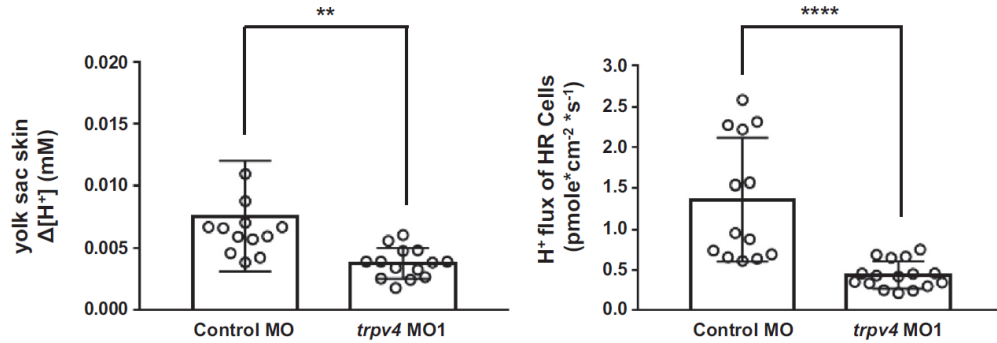


图 1. 对照组和 *trpv4* MO1 突变组卵黄囊皮肤（左）的 H^+ 梯度 ($\Delta[H^+]$) 和富含 H^+ -ATPase (HR) 细胞（右）的 H^+ 流速

7. 其他实验结果

- TRPV4 是由斑马鱼大脑中的同位素（isotocinergic）神经元表达的。
- Western blot 分析表明，在对照组中，抗 TRPV4 抗体识别出一条 98kda 的 TRPV4 蛋白带。在 0.5 ng *trpv4*-吗啉修饰反义寡核苷酸 1 (MO1) 突变体中，该条带较微弱。表明 TRPV4 蛋白表达受 *trpv4* MO1 的抑制。
- 在 *trpv4* 突变体中，同位素的 mRNA 和蛋白质表达均显著降低。
- 注射 *trpv4* MO 可显著降低斑马鱼胚胎的离子含量。
- 用 RT-qPCR 法检测了 *trpv4* 突变体中 H^+ -ATPase (HA)、上皮 Ca^{2+} 通道 (ECaC) 和 Na^+ - Cl^- 共转运体 (NCC) 的 mRNA 表达，发现 HA、ECaC 和 NCC 基因表达分别下降了 39%、42% 和 62%。
- *trpv4* 突变体中 HR、 Na^+ - K^+ -ATPase-rich (NaR) 细胞和 P63 细胞的细胞密度均降低，表明 *trpv4* 基因敲除降低了表皮干细胞的数量。

8. 结论

在本研究首次证明，TRPV4 由斑马鱼下丘脑中的同位素神经元表达。TRPV4 表达功能的丧失降低了同位素 mRNA 和蛋白表达，并减少了表皮干细胞和离子细胞的数量。本研究还观察到在 *trpv4* 突变体中离子细胞的功能被下调。研究结果表明 TRPV4 充当调节硬骨鱼催产素功能的上游分子。

9. 测试液

Normal water, 300 μ M MOPS buffer, 0.1 mg/L ethyl 3-aminobenzoate methanesulfonate, pH7.0