

魚類耳石形成之生理機制

張至維¹、曾萬年²

1. 國立臺灣大學漁業科學研究所

2. 國立臺灣大學動物學系

摘 要

魚類的耳石是一種生物礦化作用所形成的霏石結晶，存在於內耳膜性迷路系統內，其主要功能為平衡及聽覺。耳石的主要成份為碳酸鈣與有機基質，其沉積速率呈二十四小時的週期性節律，有明顯的日週輪可用來查定魚類的口齡。

耳石中的鈣是從血液經由細胞膜的離子通道進入耳石囊壁細胞內，再由鈣幫浦或是鈉鈣交換體的作用由細胞內釋出至耳石囊腔中，與碳酸根離子結合而成耳石的。

關鍵詞：耳石，日週輪，鈣離子輸送，鈣離子通道，鈣幫浦，鈉鈣交換體

前 言

魚類的耳石 (otolith) 是由碳酸鈣 (CaCO_3) 與有機基質 (organic matrix) 交互形成的霏石 (aragonite) 結晶 (Degens et al., 1969)。耳石存在於內耳膜性迷路系統 (labyrinth systems) 內 (圖 1)。膜性迷路可分為典型硬骨魚類 (typical teleost) 的非骨鰾型 (non-ostariophysean) 及鯉科魚類 (cyprinoid) 的骨鰾型 (ostariophysean) 兩大類型，兩型迷路系統中的各囊相對位置與構造大致相同，唯一的區別是骨鰾魚類有韋伯氏器 (Weberian apparatus) 與泳鰾相連，可增加聽覺的敏感度。膜性迷路分為上、下兩部份。上部由三個互相垂直的半規管 (semicircular canals) 及通囊 (utricle vestibule) 所構成，其生理功能為運動平衡。下部由小囊 (sacculus vestibule) 與壺 (lagena vestibule) 所構成，其生理功能為聽覺。

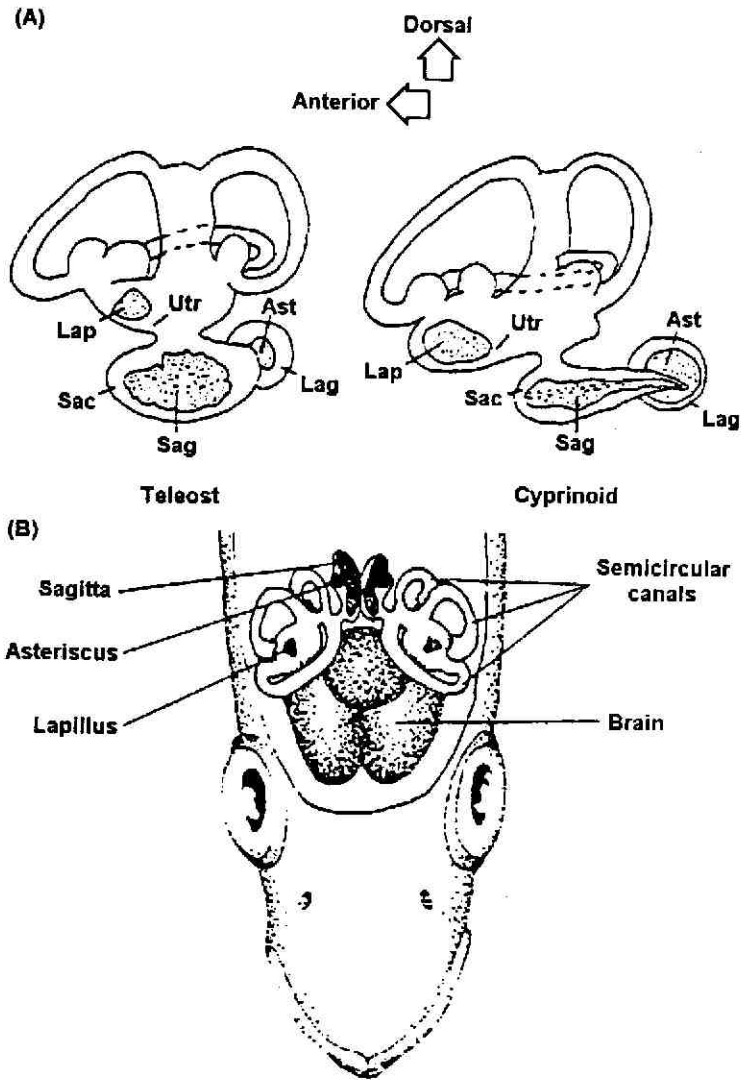


Fig 1. Anatomy of vestibular apparatus. (A) Otoliths within the labyrinth systems of representative teleost and ostariophysyan (cyprinoid) fishes. (B) Dorsal view of the vestibular apparatus as it sits in a typical teleost. Top of head is cut away. Ast: asteriscus, Lap: lapillus, Sag: sagitta, Lag: lagena vestibule, Sac: saccular vestibule, Utr: utricular vestibule. (after Secor *et al.*, 1992)

Fig 1. 魚類聽囊解剖圖。A. 耳石在內耳膜性迷路系統中的位置（左圖：典型硬骨魚類，右圖：鯉科魚類）。B. 硬骨魚類聽囊的背面觀。Ast：星狀石，Lap：礫石，Sag：扁平石，Lag：壺，Sac：小囊，Utr：通囊。（仿 Secor *et al.*, 1992）

耳石有三對，即礫石（lapillus）、扁平石（sagitta）與星狀石（asteriscus），分別位於迴囊、小囊及壺內。耳石的功能除了平衡及聽覺外，還可以紀錄魚類的日齡（或年齡）、環境的變化（Campana & Neilson, 1985），以及當作族群鑑定和分類的依據（Moksness & Fossum, 1991; Gago, 1993）。至目前為止有關耳石形成的機制，所知非常有限。本文的主要目的在闡述有關耳石的構造、形成機制、鈣離子的輸送路徑以及耳石的生態應用等。

耳石形成的日週性

耳石的沉積速率受光週期的控制，呈現二十四小時的週期性節律現象，於是出現可以辨識的日週輪（daily growth increment）（Mugiya *et al.*, 1981）。每一個日週輪包括兩層，其一為寬而半透明的成長帶（hyaline zone 或 incremental zone），主要成份為碳酸鈣；另一層為窄而暗的不連續帶（opaque zone 或 discontinuous zone），主要成份為有機基質（圖2）。

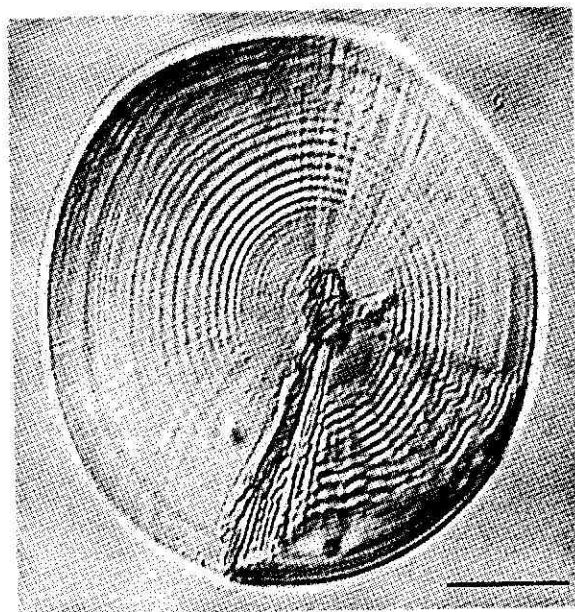


Fig 2. Daily growth increments in a sagitta otolith of Pacific tarpon, *Megalops cyprinoides*, 28.3 mm TL. Scale bar = 30 μ m. (Tzeng *et al.*, unpublished)

Fig 2. 全長 28.3 mm 的大眼海鯉 (*Megalops cyprinoides*) 耳石上的日週輪。比例尺 - 30 μ m。(Tzeng *et al.*, 未發表)

耳石形成的生理條件

耳石的主要成份，鈣離子（ Ca^{2+} ）與碳酸根離子（ CO_3^{2-} ），是在什麼條件下進入耳石囊腔形成碳酸鈣結晶的呢？Mugiya（1986）利用放射性鈣45的標定，以離體培養（*in vitro*）進行實驗，發現耳石有耳石囊包裹與否，其鈣的沉積速率相差6倍之多，可見在耳石形成過程中，耳石囊壁的細胞扮演著非常重要的角色。耳石的沉積速率與耳石囊壁內、外淋巴液的鈣離子濃度呈正比，當培養液中添加 ionophore A23187 使鈣離子濃度增加時，耳石的沉積速率明顯上升。培養液中增加氧（ O_2 ）與磷酸根離子（ PO_4^{3-} ）的濃度，耳石沉積速率也會明顯上升，表示耳石形成過程中需要能量。

在碳酸根離子部份，若添加 Diamox（acetazolamide）導致 carbonic anhydrase 的活性受到抑制時，耳石沉積速率明顯下降，表示耳石形成過程中需要 carbonic anhydrase 的參與，才能使二氧化碳與水結合形成碳酸（ H_2CO_3 ），然後解離為碳酸氫根離子（ HCO_3^- ），碳酸氫根離子再解離成碳酸根離子，最後與鈣離子結合成碳酸鈣（Mugiya, 1977）。

鈣離子的輸送路徑

圖3是鈣離子從血液中通過細胞膜進入耳石囊腔（lumen）形成耳石的輸送途徑之示意圖（Mugiya & Yoshida, 1995）。首先是鈣離子必須先通過耳石囊近端的基側細胞膜（basolateral membrane）進入囊壁細胞內。實驗證明，若添加鐳（ La^{3+} ）與釷（ Gd^{3+} ）導致細胞膜的離子通道（ion channel）受阻時，血液中的鈣離子便無法進入細胞，於是耳石的沉積速率會明顯降低，此表示鈣離子是經由細胞膜的離子通道進入耳石囊壁細胞的。離子通道的開啓機制有二，其一為利用膜電位去極化（depolarization）而開啓的電位控制型（voltage-gated），其二為與特定物質結合而開啓的配基控制型（ligand-gated）（Ganong, 1995）。當電位控制機制受到抑制時（如添加 verapamil 或 diltiazem），耳石的沉積速率無明顯變化。但是，配基控制機制受到抑制時（如添加 reactive blue），耳石的沉積速率則明顯下降，表示鈣離子是經由配基控制型的鈣離子通道進入囊壁細胞。

其次是鈣離子必須從囊壁細胞中通過遠端細胞膜（distal membrane）進入囊腔，才能與碳酸根離子結合形成耳石結晶。而鈣離子從細胞中釋出有兩種途徑，其一為耗能的主動運輸（active transport），亦即三磷酸腺苷（ATP, adenosine triphosphate）水解後產生的能量將鈣離子送出細胞。所以當鈣幫浦（ Ca^{2+} ATPase pump）受到抑制而無法啟動時（如添加 chlorpromazine），耳石的沉積速率會明顯下降。同時，在

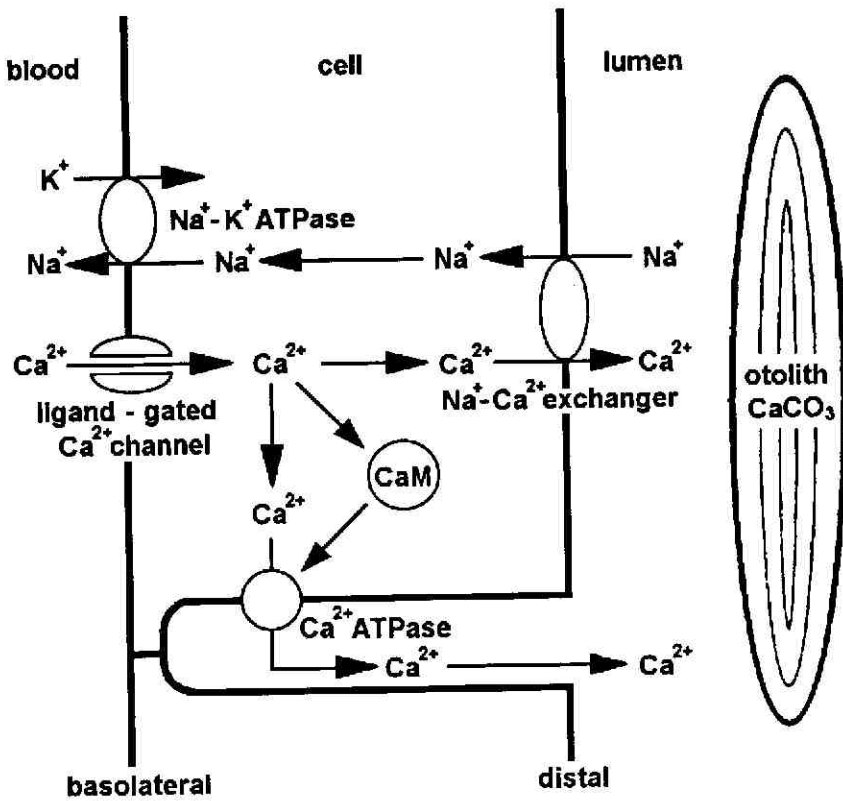


Fig 3. Schematic representation of working hypothesis proposing mechanisms by which blood calcium is translocated to otoliths across the saccular membrane. CaM: calmodulin. (after Mugiya & Yoshida, 1995)

Fig 3. 鈣離子從血液通過耳石囊細胞膜形成耳石之過程。CaM：calmodulin。(仿 Mugiya & Yoshida, 1995)

運輸過程中，鈣幫浦需要受體蛋白複合體（calcium - calmodulin complex）的活化才會起作用。其二為繼發性主動運輸（secondary active transport），也就是基側細胞膜上的鈉鉀幫浦（ $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ATPase pump）進行主動運輸時，連動遠端細胞膜上的另一組鈉鈣離子交換體（ $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$ exchanger）進行離子輸送。所以當鈉鉀幫浦受到抑制而無法啟動時（如添加 ouabain），細胞內的鈉離子濃度會升高，連帶地遠端細胞膜上的鈉鈣離子交換體也無法進行鈣離子與鈉離子的交換，以致鈣離子無法由細胞內進入囊腔形成耳石結晶。

綜上所述，血液中的鈣離子由配基控制型的鈣離子通道進入囊壁細胞內，再由鈣

幫浦或是鈉鈣交換體釋出至耳石囊腔內，與碳酸根離子結合形成耳石結晶。

耳石的生態應用

利用耳石日週輪進行魚類的定齡時，可以準確到以天為單位（Pannella, 1971）。在正常情況下耳石一天形成一輪，但是當外在環境如光週期、水溫與攝餌量變動時，會導致魚類的生理條件和新陳代謝率的改變，而在耳石上留下記號（check）（Brother & McFarland, 1980; Radtke *et al.*, 1988）。由這些記號及日週輪的計數，可回推生活史中某些特殊事件所發生的時間，例如魚類的變態時間、陸海迴游的轉換時機等（Cheng & Tzeng, 1996）。

耳石形成過程中，當鈣與碳酸根離子結合時，有少量的鈣離子會被原子價相同、離子半徑相似的鋇（Sr）所取代。取代的量與環境中鋇含量呈正比（Odum, 1951），與水溫及成長率呈反比（Kalish, 1990; Sadovy & Severin, 1992）。而海水中鋇含量比淡水高很多，所以由耳石的鋇鈣比（Sr / Ca ratio）的變化情形，可了解魚類迴游的環境歷史（Tzeng, 1995）。

結 語

關於耳石形成過程中，鈣離子的輸送途徑，以及耳石在魚類的初期生活史及迴游環境的應用上，已經有了初步的認識。但有關耳石的礦化過程（biomineralization）及其調控機制仍然不清楚，這是未來研究的重要課題。

參考資料

- Brothers, E. B. and W. N. McFarland (1980). Correlations between otolith microstructure, growth and life history transitions in newly recruited french grunt (*Haemulon flavolineatum* (Desmarest), Haemulidae). *Rapp. P.-v. Reun. Cons. Perm. Int. Explor. Mer.*, 178: 369 - 374.
- Campana, S. E. and J. D. Neilson (1985). Microstructure of fish otoliths. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 42: 1014 - 1032.
- Cheng, P. W. and W. N. Tzeng (1996). Timing of metamorphosis and estuarine arrival across the dispersal range of the Japanese eel *Anguilla japonica*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 131: 87 - 96.
- Degens, E. T., W. G. Deuser and R. L. Haedrich (1969). Molecular structure and composition of fish otoliths. *Mar. Biol.*, 2: 105 - 113.
- Gago, F. J. (1993). Morphology of the saccular otoliths of six species of lanternfishes of the genus *Symbolophorus* (Pisces: Myctophidae). *Bull. Mar. Sci.*, 52(3): 949 - 960.

- Ganong, W. F. (1995). Review of medical physiology, 17th ed. Appleton and Lange Publ., Norwalk, 1 - 42.
- Kalish, J. M. (1990). Use of otolith microchemistry to distinguish the progeny of sympatric anadromous and non -anadromous salmonids. *Fish. Bull.*, 88: 657 - 666.
- Moksness, E. and P. Fossum (1991). Distinguishing spring -and autumn - spawned herring larvae (*Clupea harengus* L.) by otolith microstructure. *ICES J. Mar. Sci.*, 48: 61 - 66.
- Mugiya, Y. (1977). Effect of acetazolamide on the otolith growth of goldfish. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, 43(9): 1053 - 1058.
- Mugiya, Y. (1986). Effects of calmodulin inhibitors and other metabolic modulators on *in vitro* otolith formation in the rainbow trout, *Salmo gairdnerii*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 84A: 57 - 60.
- Mugiya, Y. and M. Yoshida (1995). Effects of calcium antagonists and other metabolic modulators on *in vitro* calcium deposition on otoliths in the rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Fish. Sci.*, 61(6): 1026 - 1030.
- Mugiya, Y., N. Watabe, J. Yamada, J. M. Dean, D. G. Dunkelberger and M. Carassius (1981). Diurnal rhythm in otolith formation in the goldfish, *Carassius auratus*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 68(A): 659 - 662.
- Odum, H. T. (1951). Biogeochemical deposition of strontium. *Publ. Inst. Mar. Sci., Univ. Texas*, 4(2): 38 - 114.
- Pannella, G. (1971). Fish otolith: daily growth layers and periodical patterns. *Science*, 173: 1124 - 1127.
- Radtke, R. L., R. A. III Kinzie and S. D. Folsom (1988). Age at recruitment of Hawaiian freshwater gobies. *Environ. Biol. Fish.*, 23: 205 - 213.
- Sadovy, Y. and K. P. Severin (1992). Trace elements in biogenic aragonite: correlation of body growth rate and strontium levels in the otoliths of the white grunt, *Haemulon plumieri* (Pisces: Haemulidae). *Bull. Mar. Sci.*, 50: 237 - 257.
- Secor, D. H., J. M. Dean and E. H. Laban (1992). Otolith removal and preparation for microstructural examination. In Stevenson, D. K. and S. E. Campana eds., *Otolith microstructure examination and analysis. Can. Spec. Publ. Fish. Aquat. Sci.*, 117: 19 - 57.
- Tzeng, W. N. (1995). Migratory history recorded in otoliths of the Japanese eel, *Anguilla japonica*, elvers as revealed from SEM and WDS analysis. *Zool. Studies*, 34(1): 234 - 236.

Physiological mechanisms of otolith formation in teleost fishes

Chin-Wei Chang¹ · Wann-Nian Tzeng²

¹Institute of Fisheries Science, National Taiwan University

²Department of Zoology, National Taiwan University

abstract

Fish otolith is an aragonitic crystal which is composed of calcium carbonate (CaCO_3) and non-collagenous organic matrix. It is located in the endolymphic membranous labyrinth and functions as equilibrium and hearing. The deposition of CaCO_3 in otolith is a circadian rhythm, resulting in the formation of daily growth increment, which is used to determine the daily age of fish.

Plasma calcium is the source of otolith. It is essentially translocated to otoliths via a transcellular route. First, Ca^{2+} passes a ligand-gated Ca^{2+} channel of the basolateral cell membrane, binds with calmodulin in the cell and then moves out via the distal cell membrane to deposit on otolith by two different pathways controlled by a Ca^{2+} ATPase pump and a Na^+ - Ca^{2+} exchanger. The former is activated by a calcium-calmodulin complex and the latter maintained by Na^+ - K^+ ATPase.

Key words: otolith, daily growth increment, Ca^{2+} translocation, Ca^{2+} channel, calmodulin, Ca^{2+} ATPase pump, Na^+ - Ca^{2+} exchanger