

# 中華民國第 51 屆中小學科學展覽會 作品說明書

---

高中組 生活與應用科學科

040806

「剪」尾？「檢」尾？！

—利用斑馬魚尾再生模式作為中草藥開發工具

學校名稱：國立金門高級中學

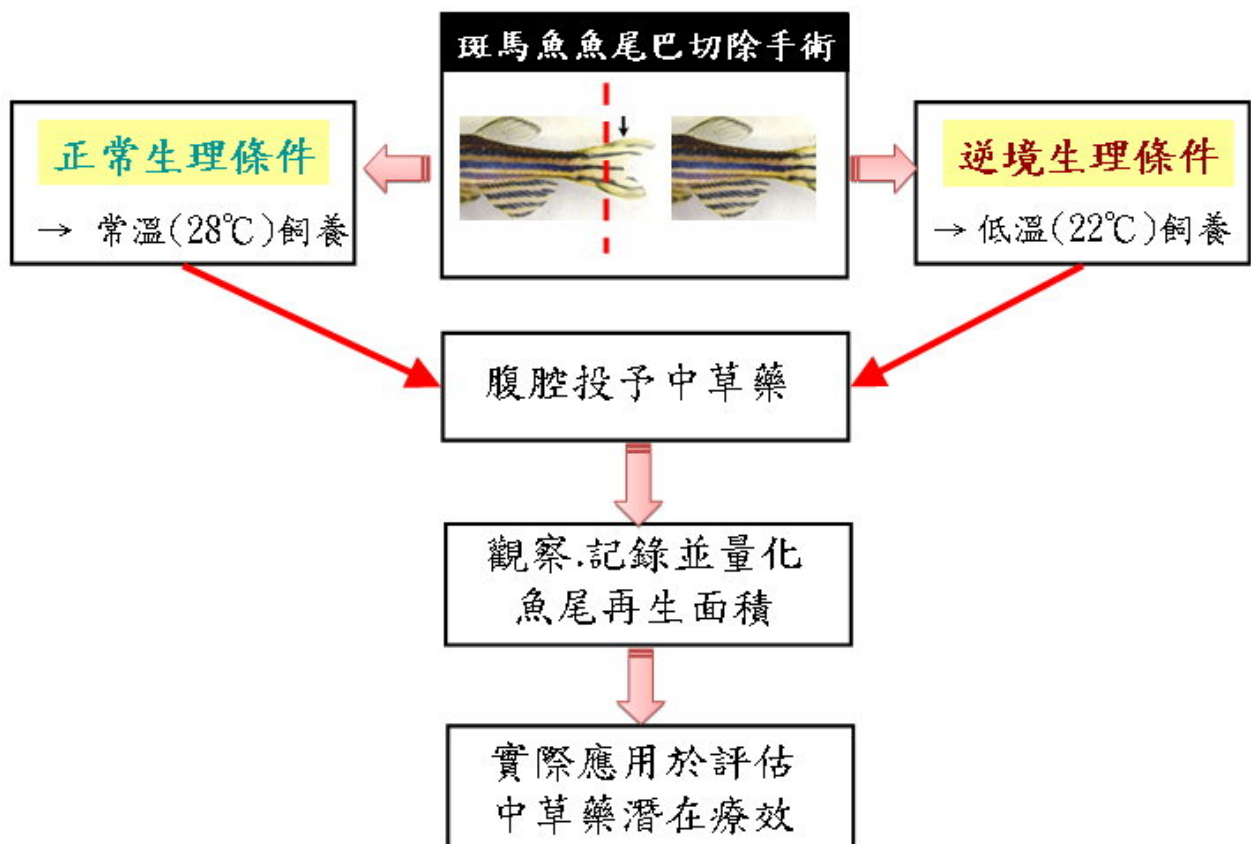
作者：  高二 陳羽湘  高二 李芝霖  高二 陳品君	指導老師：  蘇詠晴  呂世璋
---	-----------------------------

關鍵詞：斑馬魚、銀杏、闊葉大豆(一條根)

## 摘要

醫療的發展與人類的的生活密不可分，而中醫藥學更是中華文化博大精深的表現，但過去因中草藥多為複方，療效溫和緩慢，故相關活體藥物試驗常費時費力，故本研究希望利用再生力強、代謝快且擁有與人類相似基因的模式生物—斑馬魚，作為快速篩選開發新穎中草藥的工具，在不犧牲動物的情況下，探討中草藥是否對斑馬魚魚尾再生能力有所影響，以建立一套藥物開發的模式，為中草藥研究提供可實際運用的試驗方法。研究中我們首先探討溫度的高低是否會影響魚尾的再生，並作為實驗的基礎紀錄，再以腹腔注射中草藥進行測試，發現在常溫或低溫環境下，銀杏均能夠促進魚尾巴的再生。最後，實際應用以斑馬魚作為中草藥藥物開發工具之構想(如下圖)，利用此模式檢測我們家鄉特產—金門一條根，實驗結果發現無論在常溫或低溫環境下，一條根均具有促進斑馬魚尾再生的現象，為一條根的醫療價值提供一個新的研究開發方向。

### 以斑馬魚尾再生作為中草藥開發工具SOP圖



## 壹、研究動機

幾千年來，中醫和中草藥對中國文化有著很深的影響與貢獻，中國歷史曾遭遇無數次疫病的侵襲，但從未像歐洲那樣一死就是上千萬人，這也彰顯了中醫藥在防病治病上具有獨特的優勢，但過去中草藥之治療較少以科學病理報告方式呈現，因此近年來吾人開始加速中醫藥之科學化與現代化。然而，當中草藥變成藥物前必須先於老鼠或著其他模式生物身上進行藥物測驗，進而開發成人體藥物。

近年來「斑馬魚」為重要的模式動物，常出現在許多關於組織再生的實驗中，小小的一隻魚，卻有著與人類相似的基因，因此我們想利用斑馬魚魚尾再生能力強的特性，在不犧牲動物的情況下，建立一套藥物開發的模式，為中草藥研究提供可實際運用的試驗方法。

## 貳、研究目的

藉由斑馬魚活體實驗，探討中草藥是否對斑馬魚魚尾再生能力有所影響，用以發展斑馬魚成為藥物開發之工具。

為此，本實驗著重於以下三點：

- 一、探討於不同水溫下斑馬魚尾再生之情形
- 二、探討常溫、低溫下施打**銀杏**對於斑馬魚尾再生之影響
- 三、探討常溫、低溫下施打**一條根**對於斑馬魚尾再生之影響

## 參、研究設備及器材

### 一、實驗動物：

斑馬魚 (Zebrafish, *Danio rerio*) 原產於東印度，為廣溫性魚類，屬於鯉科。成熟斑馬魚體長大約 3-4 公分，有相間水平的條紋，故稱「斑馬魚」。

雌雄斑馬魚的區分主要在於：雄魚體型較小、腹部較平坦，在燈光下呈現淡黃色，而雌魚體型通常較大、腹部較鼓脹。



圖一、斑馬魚外型

近年來「斑馬魚」為重要的模式動物，具有近似人類的生理器官，而胚胎在發育時期的訊號傳遞路徑和哺乳類動物也有很高的同源性，常被生物學家做為胚胎實驗的對象，此外近來斑馬魚也常被應用於許多關於組織再生的實驗中，因其具有特出的再生能力，受到損傷的器官都能完全再生。最早的研究乃是由尾鰭的再生做起。迄今，研究發現幼魚擁有鰭、鱗、心臟以及大腦的再生能力，成魚則包括鰭、鱗、脊髓和部分心臟的再生能力。

除了再生能力之外，斑馬魚成熟快，且繁殖能力強，成本低廉，適合進行誘發突變、突變篩選以及藥物篩選等研究用途，因此在再生醫學方面上具有優質的研究條件。

## 二、實驗藥品與器材：

### (一) 實驗藥品：

#### 1. 銀杏簡介：

銀杏 (*Ginkgo biloba*) 為銀杏科銀杏屬的中型落葉闊葉喬木。

可促進血液循環，其科學實證的檢驗如下：德國的學者從銀杏葉萃取菁華分析其成份，發現銀杏葉中的黃酮體、雙黃酮體、銀杏內酯類化合物等成份，能活化血小板功能，使血液不會凝結成塊，它同時能使血管擴張，促進動脈與靜脈的血液循環，因此能預防心血管疾病、腦血栓與中風。

本實驗所使用的銀杏注射藥劑為拜爾肯注射液 (Bilokan® Injection)，其成份為每毫升含有銀杏葉萃取物 (*Ginkgo biloba* extract) 3.5 毫克。萃取物中，主要含有 ginkgo flavonoglycosides 0.84 毫克 (其中主要包含 quercetin, kaempferol 和 isorhamnetin 三種成分)。

#### 2. 麻醉劑：

MS-222 (TRICAIN METHANE SULPHONATE, Sigma) 於 1920 年由瑞士 Sandoz 藥廠研發合成此藥劑，適用於麻醉鎮靜魚類及其他冷血動物，具有良好的麻醉效果，作用快恢復快，而且毒性低，副作用少，為美國食品藥物管理局 (FDA) 及國內唯一准許用於魚類及其他冷血動物的專用麻醉藥品。使用方式：先配置 150 mg/l，再以藥浴方式將魚進行麻醉，作用時間約 1-3 分鐘。

#### 3. 一條根：

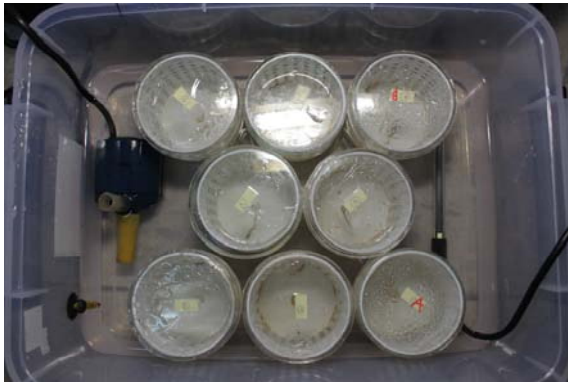
金門產一條根，為闊葉大豆 *Glycine tomentella* Hayata (*Glycine tomentosa* Benth)。  
一條根是我們家鄉特有的中藥藥材，因為具有細長的主根直伸入土生長，挖出的根部

大都單一細長，少有分岔，因此俗稱一條根。在金門特殊的地理、水質、土壤與氣候之下必須野生三年以上的時間方可採收，據藥書記載，一條根味辛、性溫，可祛風利濕、消癥解毒、補血氣，一般多於種後三年採收。金門市售的一條根以「闊葉大豆」根部藥材為主，民間用來治療風濕關節痛，經本縣農試所推廣栽培以及業者開發成爲保健產品，現已發展成爲本地特有的一項產業。

## (二) 實驗器材：

### 1. 飼養器材：

水缸、流動馬達、打氣裝置、過濾裝置、時間控制器、斑馬魚獨立飼養裝置（筆筒、濾網和培養皿）



圖二、斑馬魚飼養水缸俯視圖



圖三、斑馬魚獨立飼養裝置

### 2. 手術器材：

解剖顯微鏡、解剖器具、海綿、化妝棉、注射針筒和燒杯、培養皿等



圖四、解剖顯微鏡（OLMPUS SZ61）



圖五、手術操作器材

## 肆、研究方法與過程

### 一、實驗方法：

#### (一) 斑馬魚的飼養：

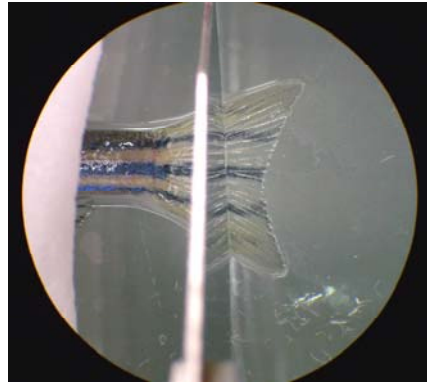
- 1.光週期：早上 8 點燈亮，晚上 10 點燈暗。控制在 14 小時光照，10 小時黑暗。
- 2.水溫：攝氏 22 度 和 28 度。

#### (二) 斑馬魚的魚尾切除手術：

- 1.將 8 隻魚依其體型大小平均分配於兩組。
- 2.配製麻醉劑，將魚麻醉後，準備進行魚尾切除手術（如圖六）。
- 3.於解剖顯微下進行魚尾切除手術，並於顯微鏡下將魚尾切除前後拍照紀錄（如圖七）。
- 4.拍攝完成，確認魚甦醒後，放回原飼養缸。



圖六、手術操作情形



圖七、顯微鏡下切除魚尾

#### (三) 斑馬魚的腹腔投藥手術：

- 1.進行魚尾切除手術，將完成手術之兩組魚置於飼養箱休養一天後再予以投藥。
- 2.投藥時，先將魚麻醉，置於海綿操作台且魚腹部朝上（如圖八），以 0.3 ml 注射針，垂直戳入腹部，進行投藥（如圖九）。
- 3.於魚尾切除後第二天開始進行投藥，每兩天投藥一次，對照組以注射針戳一次；實驗組每次授予 0.01 ml 銀杏萃取物或一條根藥劑。



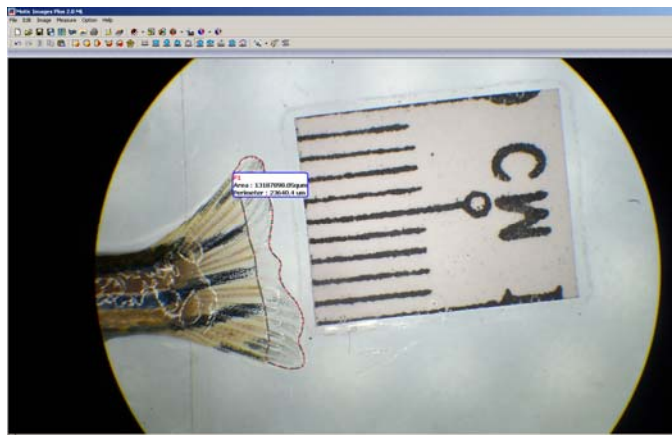
圖八、魚麻醉置於海綿操作台



圖九、腹腔注射投藥

(四) 斑馬魚的魚尾再生記錄分析：

- 1.於顯微鏡下每兩天拍攝一次，以觀察紀錄魚尾再生情形。
- 2.最後使用 Motic Images Plus 軟體，量化斑馬魚魚尾再生之面積變化情形。



圖十、以軟體量化斑馬魚魚尾再生之面積

## 二、實驗過程：

### (一) 實驗一：探討不同水溫(22°C vs 28°C)對斑馬魚尾再生之影響

- 1.將魚依其體型大小性別平均分配兩組。一組浸泡水溫為 22°C，另一組水溫為 28°C。
- 2.待魚麻醉後，開始進行魚尾切除手術，切除後拍攝一張剛切除好的照片。
- 3.各自放回原飼養魚缸裡，並確認魚已甦醒。
- 4.拍照次數為兩天一次。

### (二) 實驗二：探討常溫 28°C 下施打銀杏是否會影響斑馬魚尾再生之能力

- 1.將 8 隻魚依其體型大小性別平均分配兩組置於常溫 28°C。一組給予腹腔注射銀杏藥物，而另一組則為對照組，只讓腹腔接受針戳。
- 2.待魚麻醉後，開始進行魚尾切除手術，切除後拍攝一張剛切除好的照片。
- 3.各自放回原飼養魚缸裡，並確認魚已甦醒。
- 4.腹腔注射於切除後第三天開始進行。
- 5.每兩天投藥和拍攝一次。

### (三) 實驗三：探討低溫 22°C 下施打銀杏是否會影響斑馬魚尾再生之能力

- 1.將 8 隻魚依其體型大小性別平均分配兩組置於低溫 22°C。一組給予腹腔注射銀杏藥物，而另一組則為對照組，只讓腹腔接受針戳。
- 2.以下步驟同實驗二步驟 2.~5.，但將實驗操作溫度改為 22°C。

### (四) 實驗四：探討常溫 28°C 下施打一條根是否會影響斑馬魚尾再生之能力

- 1.先將 250ml 的水倒入燒杯煮沸，之後把一條根的茶包放入煮半個小時，等待它降溫之後，使用過濾器把雜質過濾，呈現出實驗所要使用的一條根藥劑。
- 2.將 6 隻魚依其體型大小性別平均分至二組至於常溫 28°C。一組給予腹腔注射一條根藥劑，而另一組為對照組，給予腹腔注射生理食鹽水。
- 3.待魚麻醉後，開始進行魚尾切除手術，切除後拍攝一張剛切除好的照片。
- 4.各自放回原飼養魚缸裡，並確認魚已甦醒。
- 5.腹腔注射一條根於切除後第三天開始進行。
- 6.每兩天投藥和拍攝一次。

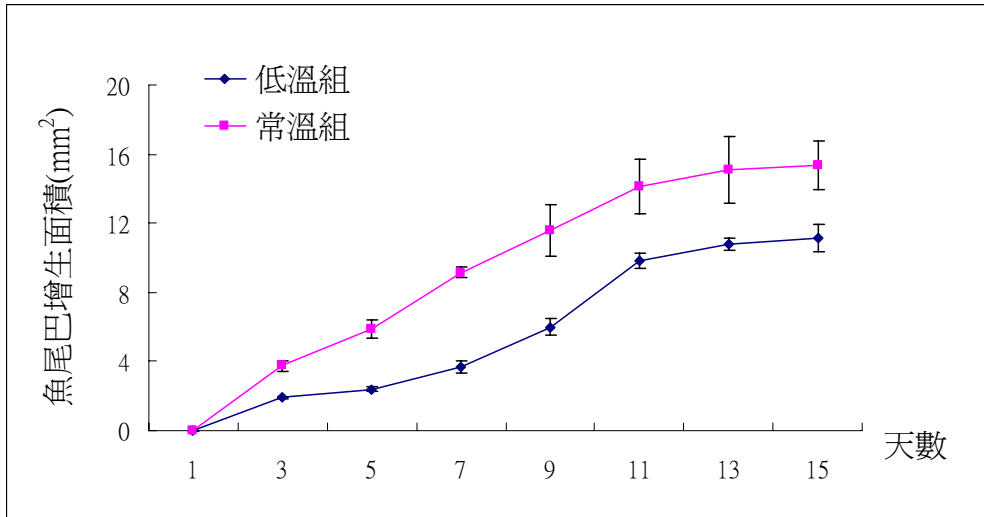
### (五) 實驗五：探討低溫 22°C 下施打一條根是否會影響斑馬魚尾再生之能力

- 1.將 6 隻魚依其體型大小性別平均分配兩組置於低溫 22°C。一組給予腹腔注射一條根藥物，而另一組則為對照組，給予腹腔注射生理食鹽水。
- 2.以下步驟同實驗四步驟 3.~6.，但將實驗操作溫度改為 22°C。



## 伍、研究結果

(一) 探討不同水溫(22°C vs 28°C)對斑馬魚尾再生之影響

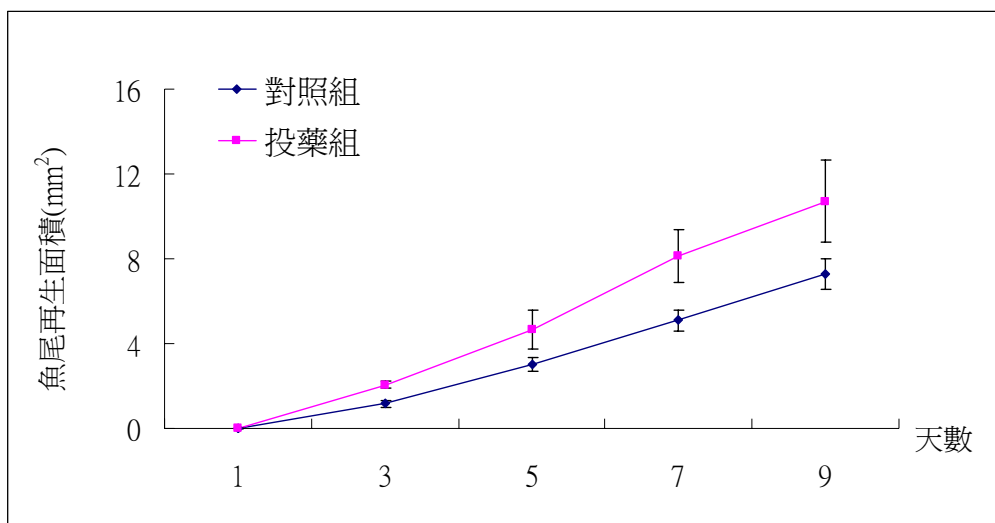


圖十一、斑馬魚在低溫（22°C）和常溫（28°C）環境下魚尾再生情形。

◆ 數據分析：

1. 斑馬魚在 28°C 環境下魚尾再生速度明顯快於 22°C 的環境。
2. 前面 1-11 天魚尾再生速度較快，第 11 天後魚尾再生情形趨緩。

(二) 探討常溫 28°C 下施打『銀杏』是否會影響斑馬魚尾再生之能力

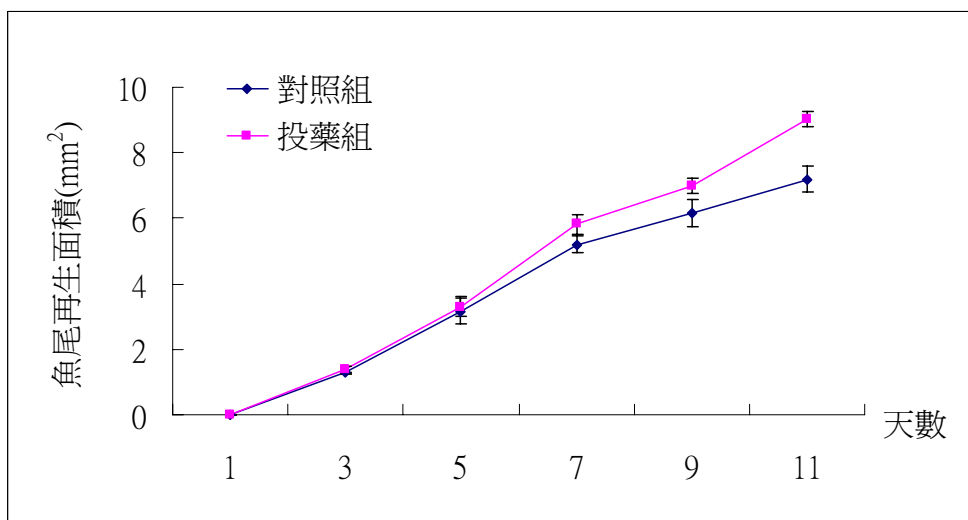


圖十二、斑馬魚在常溫環境下腹腔注射銀杏之魚尾再生情形。

◆ 數據分析：

1. 腹腔注射銀杏的斑馬魚魚尾再生速度明顯快於對照組。
2. 從第 3 天起，即可見投藥組再生情形明顯優於對照組。

(三) 探討低溫 22°C 下施打『銀杏』是否會影響斑馬魚尾再生之能力

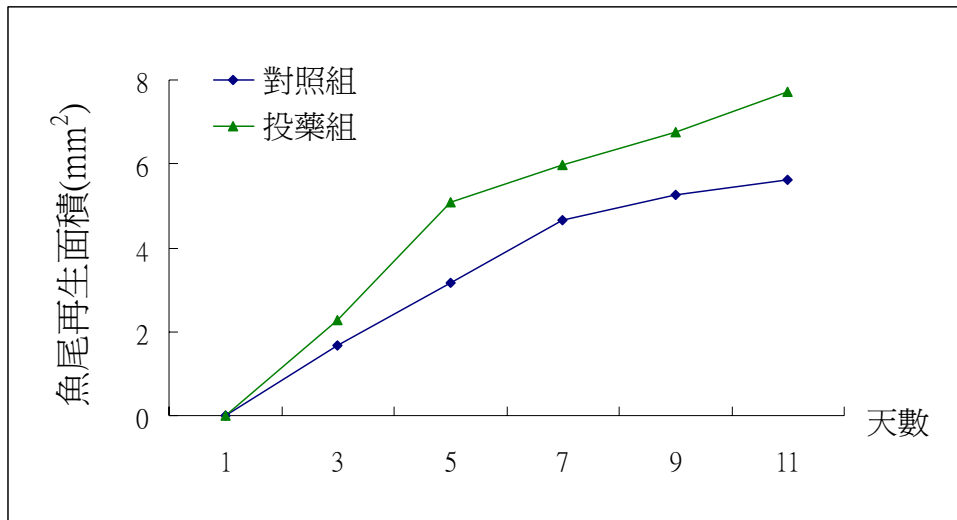


圖十三、斑馬魚在低溫環境下腹腔注射銀杏之魚尾再生情形。

◆ 數據分析：

1. 腹腔注射銀杏的斑馬魚魚尾再生速度快於對照組。
2. 前 5 天兩組魚尾再生速度接近，自第 7 天起投藥組逐漸明顯優於對照組。

(四) 探討常溫 28°C 下施打『一條根』是否會影響斑馬魚尾再生之能力

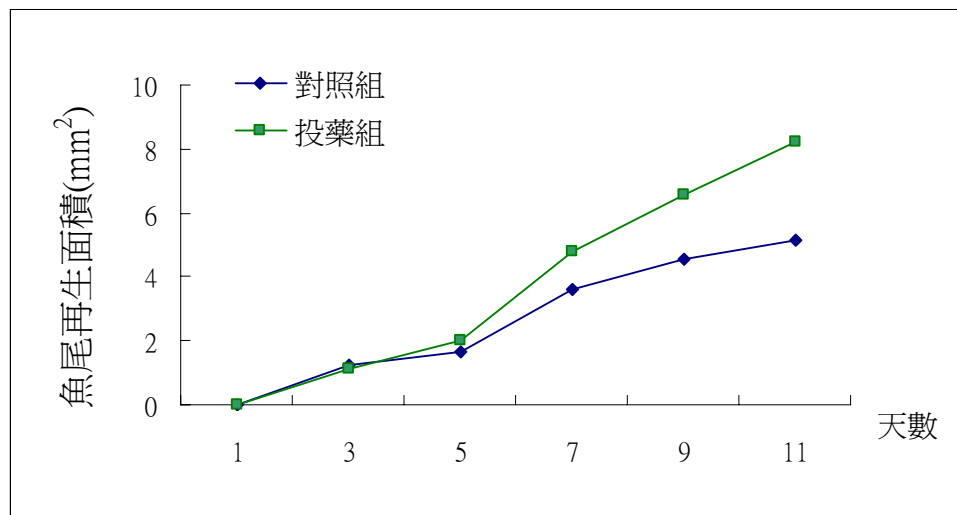


圖十四、斑馬魚在常溫環境下腹腔注射銀杏之魚尾再生情形。

◆ 數據分析：

1. 腹腔注射一條根的斑馬魚魚尾再生速度較快於對照組。
2. 從第 3 天起，即可見投藥組再生情形明顯優於對照組。

(五) 探討低溫 22°C 下施打『一條根』是否會影響斑馬魚尾再生之能力



圖十五、斑馬魚在低溫環境下腹腔注射銀杏之魚尾再生情形。

◆ 數據分析：

1. 腹腔注射一條根的斑馬魚魚尾再生速度較快於對照組。
2. 前 3 天兩組魚尾再生速度接近，自第 5 天起投藥組逐漸明顯優於對照組。

## 陸、討論

近二十多年來，斑馬魚已逐漸成爲學術研究中非常重要的實驗模式物種，其原因是因爲牠具備了許多優越的條件，例如：容易飼養、飼養空間及設備要求不高、基因資訊透明化以及魚身透明等，使得胚胎發育過程容易觀察。斑馬魚雖然與人類有著天壤之別的外觀差異，但是，兩者之間的基因相似度卻有高達 70% 的相似性，許多在人體內扮演重要角色的基因功能，也都能夠在斑馬魚體內找到。在脊椎動物中，魚類組織的再生現象，較哺乳類動物發達。魚類常見的再生部位主要位於中樞系統、肝臟以及魚鰭等構造，其中以魚鰭組織的再生以及修復過程最爲容易觀察。本研究藉由斑馬魚魚尾巴切除實驗，在不犧牲動物的情況下，探討中草藥的投予是否會影響魚尾巴的再生現象。

本研究分爲三大項主題進行討論：

### 一、溫度變化是否會影響斑馬魚魚尾巴的再生現象？

- (一) 斑馬魚爲小型熱帶性魚類，雖爲廣溫性魚類，但是最適合飼養的溫度約爲 28°C。目前的研究顯示，當水溫下降時，斑馬魚會產生生理以及行爲的改變。當溫度約爲 17°C 時，斑馬魚的運動能力會顯著的下降，若持續下降至 12°C 時，則會使魚體產生低溫麻醉的效果。因此，溫度對於斑馬魚生理功能的影響，是否會改變魚尾再生的能力，是實驗一所關注的重點。
- (二) 實驗結果顯示，生長在 22°C 環境的魚，魚尾的再生速度較 28°C 來得緩慢。因此，當環境溫度降低時，會造成尾部組織的再生能力受到抑制。推測其原因是因爲斑馬魚爲變溫動物，使其生理功能易受到環境溫度的變化，特別是在較爲低溫的環境下，體內新陳代謝的速率會隨之下降。
- (三) 經由實驗結果發現，在 11 天後，魚尾的再生速率會呈現漸趨緩的現象。綜合上述發現，實驗一的數據紀錄爲後續的實驗提供了在高低溫下，斑馬魚尾再生過程的基礎紀錄。
- (四) 溫度操作對於建立斑馬魚中草藥開發之技術平台有著重要的意義，低溫處理能夠模擬細胞處於逆境的狀態，觀察新穎中草藥的療效是否可改善細胞處於逆境之生理功能。再配合利用常溫操作，便能更清楚知道藥物的特性，瞭解其效果適用於正常生理狀態、低溫逆境狀態亦或兩者皆可。
- (五) 對於經切除再生後的新生魚尾之觀察，我們發現除顏色較淡、大小相似之外部型態變化外，我們亦設計簡易魚游泳運動裝置，觀察再生魚尾之游泳擺動功能是否正常，是否影響魚的游泳能力，檢測結果顯示再生之魚尾仍具有和剪尾手術前之相似泳動能力，確認再生之魚尾已具備和手術前相同的運動功能。

二、『銀杏』藥物的施打，是否會促進在常溫 28°C；亦或是低溫 22°C 下魚尾巴的生長？

- (一) 實驗二利用藥理學實驗操作，嘗試建立斑馬魚魚尾再生之藥物開發平台，以達到協助國內中草藥開發之目的。
- (二) 銀杏是市面上常見的保健食品，已有許多相關臨床醫療報導，其主要的醫療功能可改善血液循環作用以及具有抗氧化作用（清除自由基）的效果等。由於上述功效都能有助於提高受損組織的新陳代謝以及修復功能，因此本實驗選用銀杏作為探討之對象。
- (三) 無論是在常溫 28°C；亦或是低溫 22°C，銀杏的施打都能有助於魚尾再生速率的提升。推測此現象可能與前人研究提出銀杏有助於末梢血液循環有關，當斑馬魚尾末梢血管循環獲得提升後，組織獲得氧氣、養分以及生長荷爾蒙的效能隨之提升，有助於魚尾的再生。
- (四) 由銀杏藥物的實驗結果證實，利用斑馬魚尾再生速率之觀察，可以初估新穎中草藥是否對活體具有前瞻性的療效。綜合實驗一至實驗三之結果，我們相信斑馬魚魚尾再生實驗之操作，具有成為中草藥藥物篩選平台之應用潛力。

三、檢測『一條根』的施打，是否會促進在常溫 28°C；亦或是低溫 22°C 下魚尾巴的生長？

- (一) 家鄉的金門一條根是重要特產商品，常見製成保健用的藥膏和茶包等，但查閱相關的療效報告卻顯缺乏。因此本研究實際應用以斑馬魚作為中草藥藥物開發工具之構想，即是希望能透過科學性實驗來探究一條根之療效，檢測一條根是否具有促進斑馬魚尾再生的療效，進而有助生物體受損組織的新陳代謝和修復之功效。
- (二) 實驗結果顯示，無論是在常溫 28°C；亦或是低溫 22°C，施打一條根確實有助於斑馬魚魚尾再生。且比較實驗三和實驗五的結果，在低溫環境下注射一條根自第 5 天起投藥組逐漸明顯優於對照組，比實驗三低溫環境注射銀杏是從第 7 天起才開始明顯促進再生速度，一條根作用所需時間更短，推測一條根對於斑馬魚尾再生可能具有比銀杏更好的療效，但因一條根對於新陳代謝和組織修復相關研究甚少，故在此無法確切的指出一條根促進斑馬魚尾再生之生理機制，但已經為一條根的療效提供一個新的研究開發方向，未來可再進行更深入的探討與研究！

## 柒、結論

- 一、斑馬魚尾再生現象會受到水溫之影響，低溫時生長情況較常溫受到抑制。
- 二、在低溫逆境和正常環境下，銀杏確實均能促進斑馬魚尾的再生。
- 三、在低溫逆境和正常環境下，金門一條根亦具有促進斑馬魚尾再生之功效，為一條根的療效提供一個新的研究開發方向！
- 四、利用斑馬魚尾再生能力強之特性，使吾人能在不犧牲動物的情況下，利用斑馬魚尾再生實驗之操作，實際應用於檢測和開發具有潛力之中草藥物。

## 捌、參考資料及其他

### 一、參考文獻：

陳品融、張瑋芸（2001）。**香煙之煙萃取物及咖啡因對斑馬魚胚胎發育之影響探討**。台北市立第一女子高級中學校內科展作品說明書。

陳榮才（2002）。**中藥材一條根的成分分離**。嘉南藥理科技大學專題研究計畫成果報告書。

蔡旻臻、朱育欣、尤嘉倫（2005）。**酒精和尼古丁對斑馬魚胚胎發育的影響**。中華民國第45屆全國中小學科學展覽會中學組生物（生命科學）科第一名作品說明書。

斑馬魚與牛蛙實驗動物。動物保護資訊網。2011年2月10日，取自

[http://animal.coa.gov.tw/html/?main=13h&page=13\\_labaratory\\_c18](http://animal.coa.gov.tw/html/?main=13h&page=13_labaratory_c18)

銀杏-維基百科，自由的百科全書。2011年3月15日。取自

<http://zh.wikipedia.org/wiki/%E9%93%B6%E6%9D%8F>

金門縣農業試驗所。2011年4月20日，取自

[http://www.kinmen.gov.tw/Layout/sub\\_F/ArtHtml\\_Show.aspx?ID=9b937839-313f-4d29-afb7-40ec075245d1&path=2030](http://www.kinmen.gov.tw/Layout/sub_F/ArtHtml_Show.aspx?ID=9b937839-313f-4d29-afb7-40ec075245d1&path=2030)

### 二、致謝：

- （一）感謝臺灣師範大學生命科學系神經藥理學實驗室提供斑馬魚及相關實驗操作指導。

## 【評語】 040806

本研究運用斑馬魚尾再生模式探討中藥材的促進功效，確實值得鼓勵繼續探討，惟亦必須同時瞭解抑制增生相關機制，可望更進一步發現。