

中華民國第 58 屆中小學科學展覽會
作品說明書

高級中等學校組 動物與醫學科

佳作

052005

魚「藥」龍門

-探討百合對斑馬魚各個階段的影響

學校名稱：國立鳳山高級中學

作者： 高二 陳博淵 高二 徐碩謙	指導老師： 林琬亭
-------------------------	--------------

關鍵詞：斑馬魚、百合、行為能力

摘要

百合具安心安神的功效，使我們想觀察百合是否對其他脊椎動物也有相同的作用，本實驗想藉觀察斑馬魚的發育及行為，探討百合對脊椎動物的影響。最初假設百合的濃度會影響魚卵存活率，經實驗發現浸泡在 12.5%的百合溶液之溶液較其他濃度存活率及曝氣水高，但在胚胎的發育速率上則沒有差異；行為觀察上，浸泡百合後，斑馬魚由「沉底」狀態之恢復時間較未服用減少約 40 ± 5 秒，符合我們的假設。除此之外，我們又做了空間學習，但發現百合添加並沒有太大的影響。最後我們總結濃度 12.5%的百合溶液是目前對斑馬魚而言最適合的濃度，可有效改變斑馬魚的沉底行為，但在空間學習和成長速率目前則沒有差異。未來希望能更深入探討百合作用於斑馬魚間腦的機制。

壹、研究動機

在國內外研究皆有證實百合對人體有清心安神的作用，因此使用與人類基因有 87%相同的斑馬魚進行測試，而近年來的研究中發現，斑馬魚除了與人類的基因有高度的相似性，對環境也有非常靈敏的反應(農委會,2010)，魚類在適應環境衝擊時，會發生瞬間的反應，如沉底行為，長期下來還表現了生存所需的學習本領，如:空間學習及逃避學習等(楊明興、呂國棟,2006)，顯示斑馬魚是合適的觀察對象。除此之外，我們認為百合使用量不能無限制的增加，否則其藥性可能會對斑馬魚的存活產生威脅；為了確認百合是否會使斑馬魚產生藥物不良反應，我們利用斑馬魚卵的存活率尋找適合生存的環境濃度，接著在固定環境濃度下，觀察卵的發育、空間學習和沉底行為的改變。

貳、研究目的

觀察百合對斑馬魚的影響主要分為四個部分：

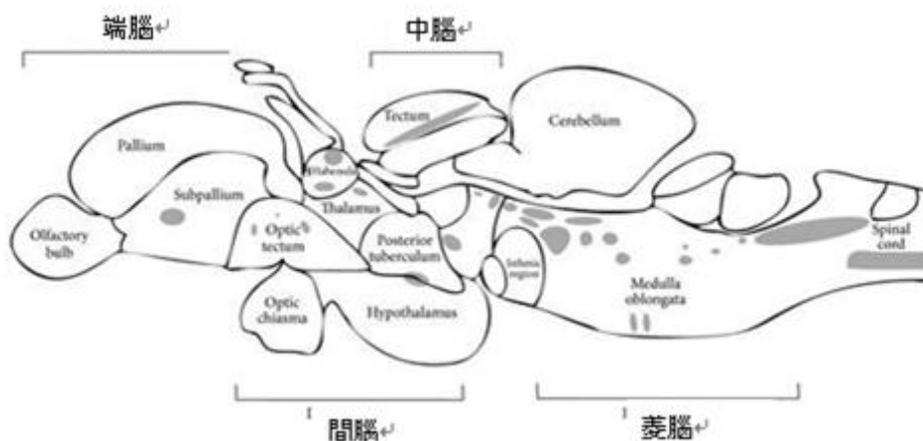
第一部分和第二部分是藉由觀察魚卵存活率以及卵的發育，確認百合用藥的合適濃度範圍，減低斑馬魚生理上有藥物不良反應。評估標準如存活率下降、發育不完全或是發育速度上的落差等等。

第三部分和第四部份是觀察百合的鎮靜效果是否會影響成魚的空間學習行為，以及成魚在解除驚嚇造成的沉底狀態時，花費的時間長度並藉由這四個部分研究，探討百合對於斑馬魚間腦之影響。

參、研究設備及器材

一、實驗生物:

斑馬魚(*Danio rerio*)，性情溫和，有極強生命力，每次最多可下大約 3000 顆卵，至多 3 天便可以孵出仔魚，約兩個月可辨識雌雄，五個月可行生殖行為。斑馬魚的腦部組織分為端腦、間腦、中腦、菱腦等(圖一)，根據資料顯示，間腦可對環境刺激做出立即性的反應；除此之外端腦發達，與其生活習性相關(陳微，2015)。



▲ 圖一:斑馬魚腦構造(取自 www.researchgate.net)

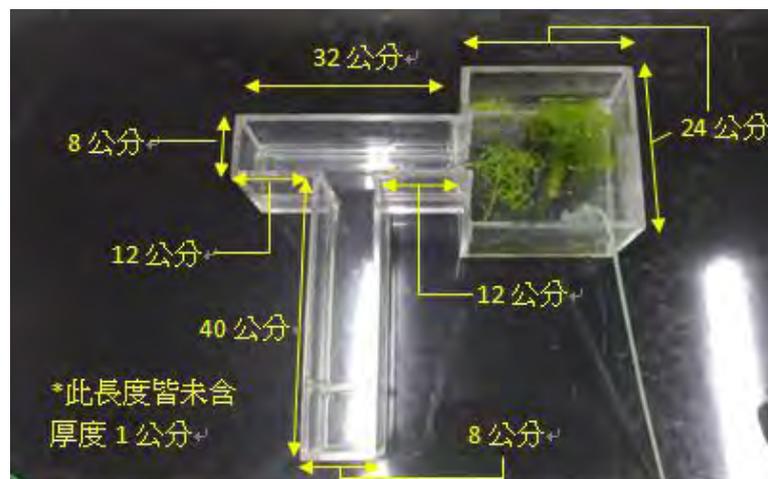
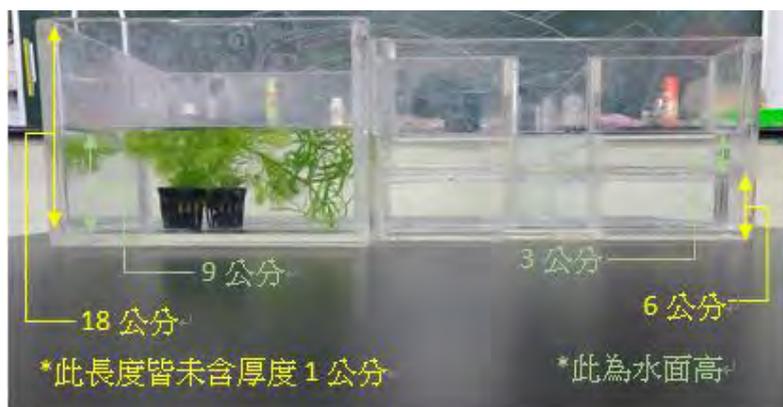
二、實驗藥品:

百合(*Lilium*)，近年來研究表明，在止咳化痰、抗疲勞與耐缺氧、增加白血球數目、降血糖、抑制遲發過敏性反應、助眠安神等方面均具有顯著效果。近一步研究發現，其成分中有微量維生素(ex:核黃素)，甾體生物鹼，甾體糖苷、酚酸甘油酯.....等；其中在前人的研究中甾體生物鹼和甾體糖苷會具有降壓的作用(FENG Ya-bin, 2017.)。

三、實驗器材

(一)T 型迷宮(圖二)

根據行政院國家科學委員會公佈之斑馬魚情緒行為研究用量測系統之設計，採用其規格製作，分為通道區與安全區，通道長臂(包含起始區)長度 48 公分、短臂長度 32 公分、寬及高均為 12 公分，安全區域為 24*24*18 立方公分，厚度皆為 1 公分並放置水草及給予打氣裝置使溶氧量提高。(楊明興、呂國棟,2006)



▲(圖二上)T型迷宮側視圖

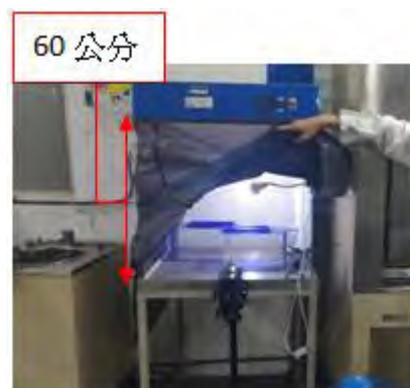
(圖二下)T型迷宮俯視圖

(二)光刺激實驗暗室(圖三、四)

根據哈爾濱工業大學深圳研究生院等公佈之光照刺激識別斑馬魚異常行為在水質預警中的真偽研究之暗室設計，改良其規格製作，長 55 公分、寬 65 公分、高 60 公分，蓋上黑布使得周圍不透光，且於外部架設攝影機，並在內部裝設一盞燈(功率 261lux)，開關從內部延伸至外部以方便控制。(HAN Xiao-bo, 2017)



▲(圖三)暗室外觀



▲(圖四)暗室內部

肆、研究過程及方法

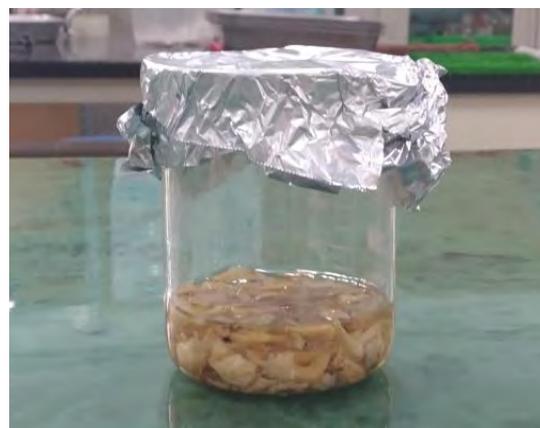
一、斑馬魚藥浴流程

(一)製備原液

在攝氏 25 度的條件下，在 100 毫升水中加入 30 公克的百合後(圖五)，以錫箔紙包裹著瓶口以防止蒸發(圖六)，浸泡 80 分鐘得到 80 毫升的原液，用濾網過濾較大之雜質(圖七)，放入冰箱冷藏。



▲(圖五)秤量 30 公克百合



▲(圖六)浸泡百合

(二)藥浴過程

藥浴，是將魚浸泡在由藥物配置成的溶液中，以達到治療或保健的作用。我們使用當天配製的百合溶液以避免變質，並使用藥浴的方式將三隻成魚放入 500 毫升的燒杯中浸泡 3 小時後撈出。設定 3 小時則是為了避免藥物在經過更久時間後產生顆粒沉澱導致魚吸入後死亡。

(圖八)(王渭賢,2011)



▲(圖七)用濾網過濾百合



▲(圖八)藥浴中的成魚

二、受精卵發育觀察

(一)斑馬魚飼養

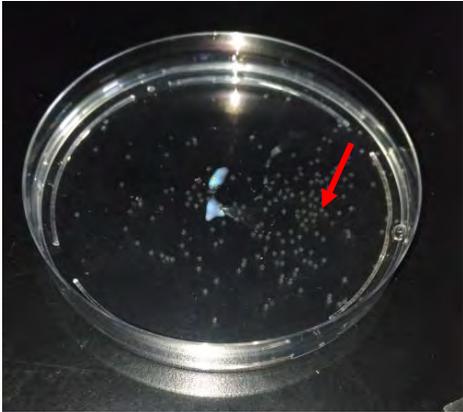
使用 7~20 個月大的斑馬魚作為產卵用魚，飼養於具有漏滴式篩檢程式循環系統壓克力水缸(長 28cm、寬 12cm、高 15cm)，水位高 13 公分，水溫控制在攝氏 28 度，以光照 12 小時，黑暗 12 小時的週期飼養。每日餵食三次飼料(海豐)。雄性斑馬魚的體型較小、體色為淡黃色並且腹部較平坦，而雌性斑馬魚的體色略為藍色、體型較大，在性成熟時，腹部會明顯脹大(農委會，2010)。

(二)收集斑馬魚受精卵

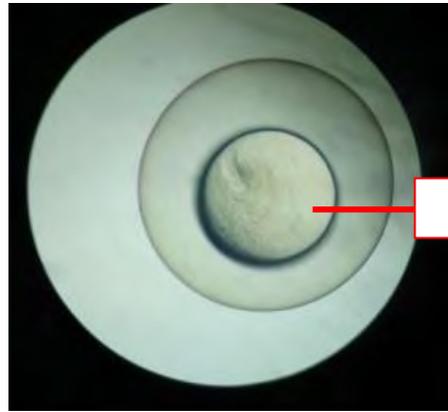
在準備投藥於斑馬魚卵的前一天，將雄性成魚與雌性成魚(三個月大)置入產卵箱中，並以隔板區隔開，經歷一個光週期後抽開隔板，使其進行追尾行為。等待約 30 分鐘左右，將魚撈出產卵箱後，過濾雜質並且挑出魚卵，移至培養皿。

(三)辨別健康魚卵

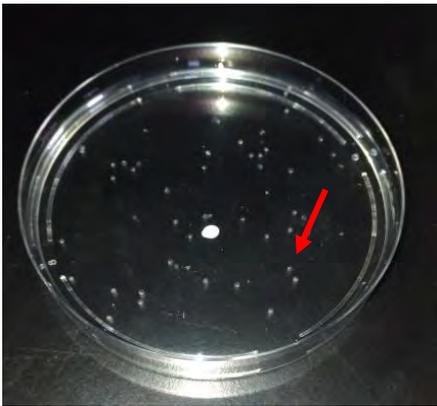
當受精時，用肉眼即可觀察其中的卵黃(圖九、十)。魚卵死亡時，卵的中心部分則會受到黴菌侵入，以肉眼觀看時變為白色(圖十一、十二)。而魚卵為無受精狀態時，從外觀可以明顯觀察出魚卵中無卵黃。(圖十三)



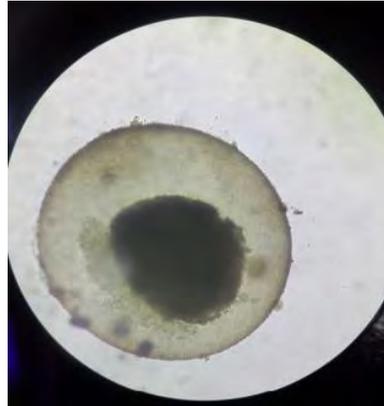
▲(圖九)肉眼下受精卵



▲(圖十)顯微鏡下之受精卵



▲(圖十一)肉眼下死卵



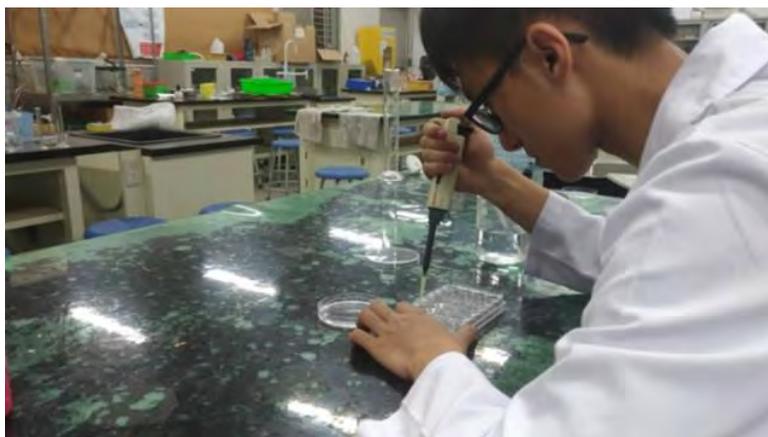
▲(圖十二)顯微鏡下死卵



▲(圖十三)顯微鏡下之無受精卵

三、百合毒性測試

由於一開始並不確定此藥物的毒性是否過強，故將曝氣水和配置成濃度 50.00%、25.00%、12.50%、6.25%、3.13%、1.56% 的百合原液並各挑選 8 顆或 10 顆健康魚卵(依照當天產卵的數量)一同置入 24 孔盤中，進行三次重複(簡稱三重復)，記錄存活率並比較曝氣水與其他濃度存活率的比值，比較在何種濃度中與曝氣水的關係能夠使浸泡於百合溶液之魚卵存活率升至最高。(圖十四)



▲(圖十四)吸取魚卵並置於孔盤中

四、百合濃度對卵的成長速率之觀察

另外，我們也想要觀察魚卵的發育程度是否有差異，故挑選剛受精的 10 顆或 8 顆的斑馬魚卵分別置於純水以及含量為 12.5% 百合溶液中，在其受精後 2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、24、30、42、48hr 拍攝照片，互相比對發育情形。

五、沉底行為

(一)準備過程

利用毒性測試的結果推測出適合斑馬魚卵的濃度，將其投入成熟斑馬魚的環境中，將經過百合溶液藥浴的成魚和過去無任何服藥經驗的普通成魚各三隻，一同放入暗室，使其適應黑暗環境，為期一小時。

(二)沉底行為介紹

斑馬魚遭受突發刺激時(ex:光，震動，聲音)，會下降到水缸底部並產生呆滯反應，直到重新適應環境中的刺激後才會恢復離開底部。

(三)呆滯反應介紹

若斑馬魚受到的驚嚇太大時，會在開始沉底行為後，再進入待在同一地點不進行任何移動的狀態直到稍微適應刺激，表現呆滯行為。

(四)實驗過程

我們想要觀察百合溶液對斑馬魚產生的鎮靜效果之影響程度，故利用突然開啟的光源給予刺激，在其適應黑暗一小時後開啟光源，測量魚受到刺激之後產生的沉底行為直到恢復成一般狀態(離開魚缸底部)的時間、單位以秒紀錄。

六、空間學習

(一)準備過程

將經過百合溶液藥浴的雄性成魚和過去無任何服藥經驗的普通雄性成魚，一同進行記憶學習實驗。實驗總共分為三個階段，分別為一次的適應期，兩次的訓練，過程為兩天。適應期結束後一小時進行第一次的訓練，而在抵達安全區後使其待在空中適應半小時後撈出，而在適應期結束後二十四小時後再進行第二次訓練，並再使其待在空中半小時。

(二)實驗過程

預期藉此百合溶液使魚冷靜，進而提升空間學習能力而縮短秒數。在適應期時，給予兩分鐘的馴化，不給予任何刺激，也不開啟迷宮 T 字右側的水槽口，只讓動物在 T 字型部分自由的移動(圖十五)。在接下來第二到第三次的測試中，魚先是被放置於開始區，並開啟 T 字形右側的水槽後抵達安全區(圖十六)，記錄斑馬魚抵達安全區時的所耗費秒數。



▲(圖十五)適應期之斑馬魚(紅色畫圈處)



▲(圖十六)抵達安全區之魚(紅色畫圈處)

伍、研究結果

一、魚卵的存活率和發育

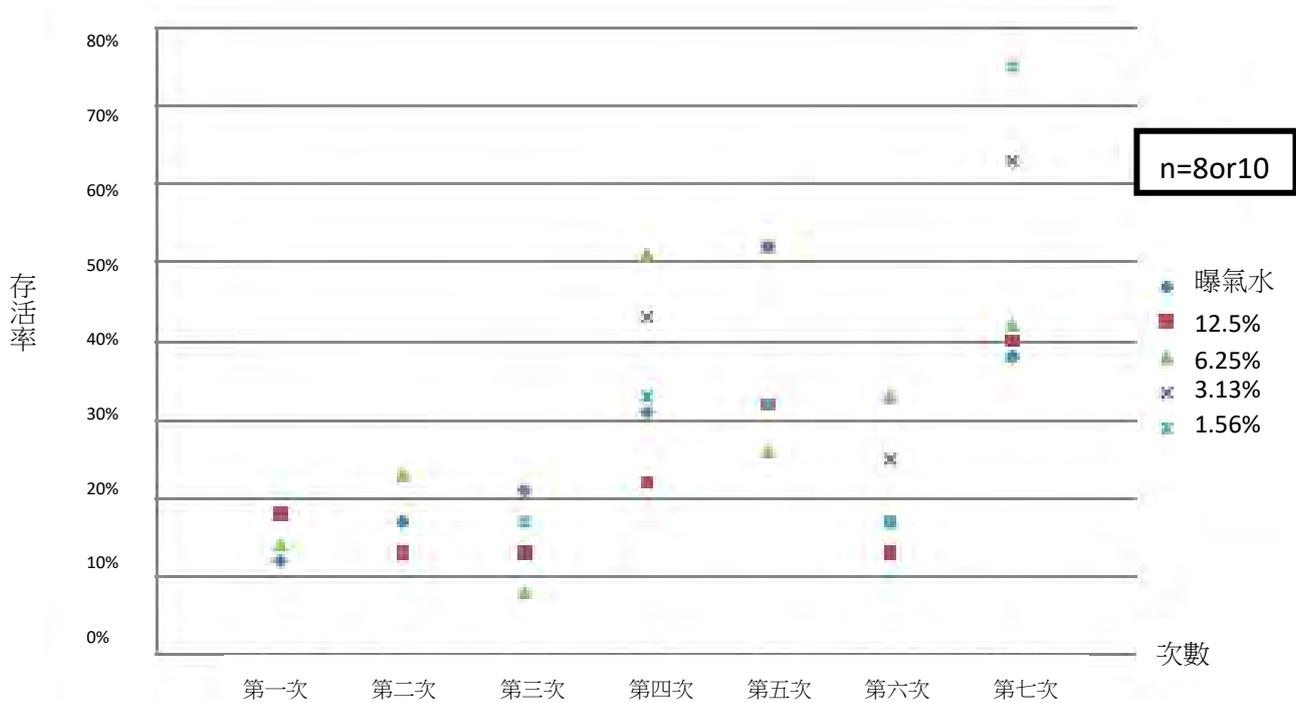
利用不同稀釋濃度的百合溶液 50%、25%、12.5%、6.25%、3.13%、1.56% 中發現 12.5% 的百合濃度較適合斑馬魚卵的生長。(表 1、2、3、4)

斑馬魚卵存活率						
10 顆	百合稀釋濃度	0%	50%	25%	12.50%	6.25%
三 重 覆	第一組	0%	25%	25%	43%	29%
	第二組	25%	0%	20%	10%	0%
	第三組	11%	17%	25%	0%	14%
	平均	12%	14%	23%	18%	14%
三 重 覆	第一組	20%	60%	20%	30%	30%
	第二組	20%	40%	50%	0%	10%
	第三組	10%	40%	20%	10%	30%
	平均	17%	47%	30%	13%	23%
三 重 覆	第一組	20%	0%	40%	20%	20%
	第二組	0%	0%	0%	20%	0%
	第三組	40%	0%	0%	0%	40%
	平均	20%	0%	13%	13%	20%
10 顆	百合稀釋濃度	0%	12.50%	6.25%	3.13%	1.56%
三 重 覆	第一組	40%	20%	10%	50%	50%
	第二組	70%	60%	20%	20%	40%
	第三組	30%	50%	20%	10%	40%
	平均	47%	43%	17%	27%	43%

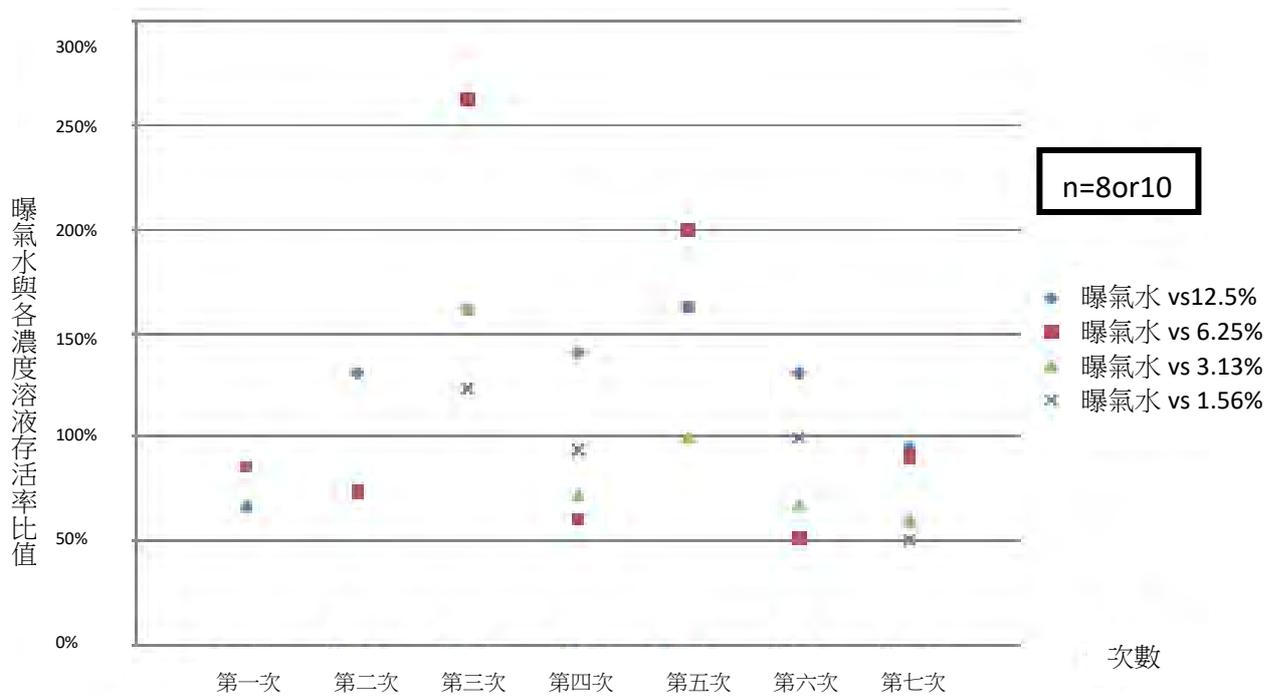
8 顆	百合稀釋濃度	0%	12.50%	6.25%	3.13%	1.56%
三 重 覆	第一組	13%	0%	0%	0%	13%
	第二組	13%	0%	25%	25%	25%
	第三組	38%	38%	0%	13%	13%
	平均	21%	13%	8%	13%	17%
三 重 覆	第一組	33%	25%	80%	80%	50%
	第二組	60%	17%	40%	50%	50%
	第三組	0%	25%	33%	0%	0%
	平均	31%	22%	51%	43%	33%
三 重 覆	第一組	57%	50%	38%	38%	14%
	第二組	20%	25%	17%	33%	67%
	第三組	80%	20%	25%	86%	14%
	平均	52%	32%	26%	52%	32%
8 顆	百合稀釋濃度	0%	12.50%	6.25%	3.13%	1.56%
三 重 覆	第一組	47%	43%	17%	27%	43%
	第二組	21%	13%	8%	13%	17%
	第三組	42%	29%	25%	46%	25%
	平均	17%	13%	33%	25%	17%
三 重 覆	第一組	38%	50%	50%	38%	63%
	第二組	38%	33%	13%	88%	88%
	第三組	38%	38%	63%	63%	75%
	平均	38%	40%	42%	63%	75%

8 顆	百合稀釋濃度	0%	12.50%	6.25%	3.13%	1.56%
三 重 覆	第一組	40%	25%	25%	40%	0%
	第二組	0%	17%	14%	0%	0%
	第三組	20%	20%	0%	0%	0%
	平均	20%	21%	13%	13%	0%

▲(表 1)卵的存活率



▲(表 2)斑馬魚卵於各濃度存活率點散佈圖



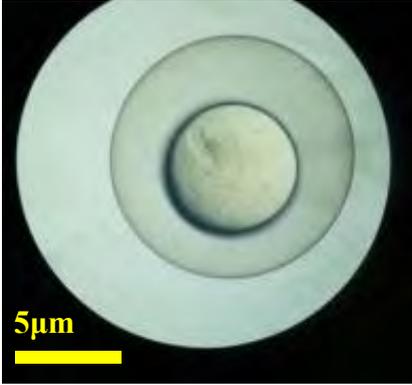
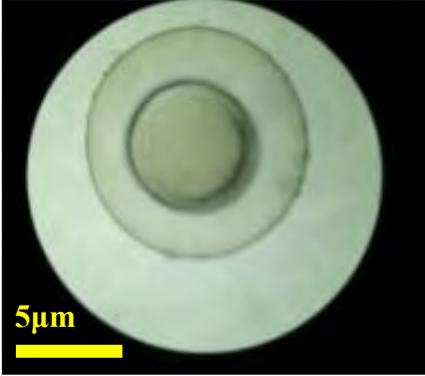
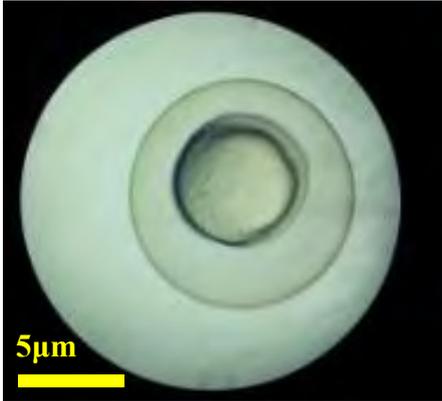
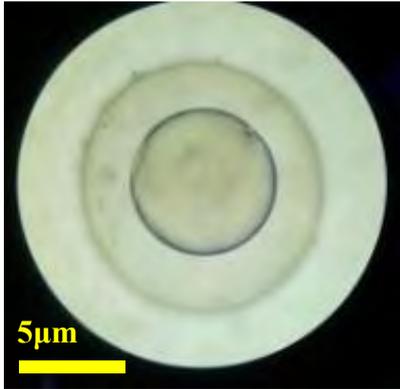
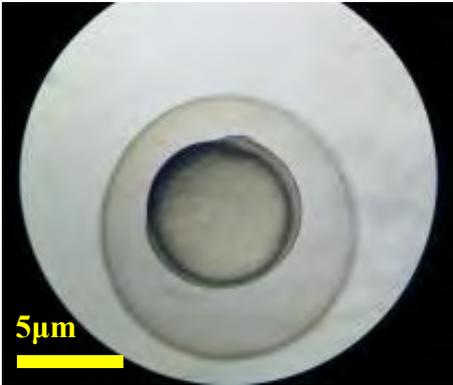
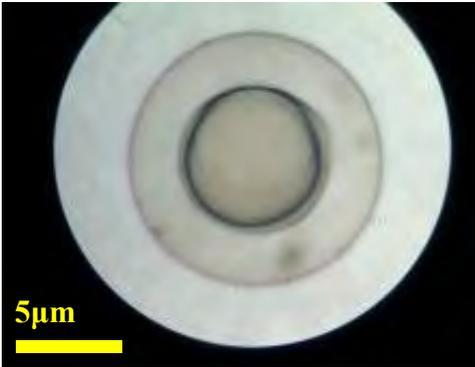
▲(表 3)曝氣水與各濃度溶液存活率比值點散佈圖

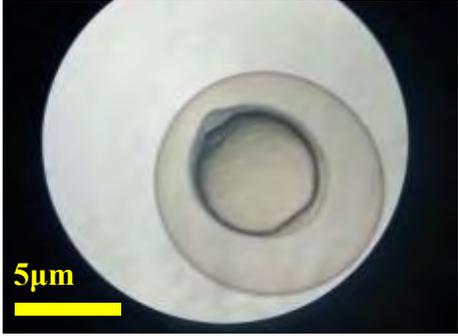
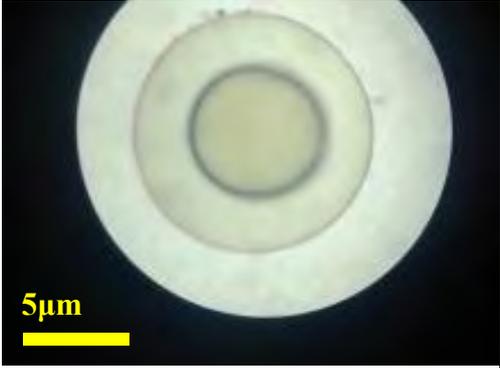
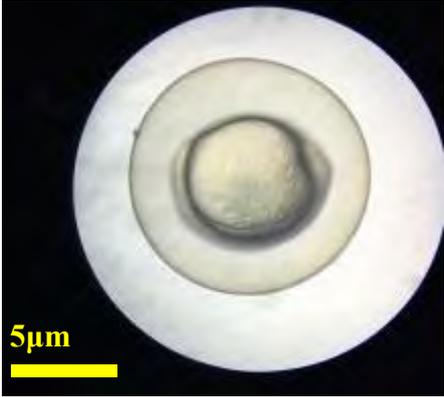
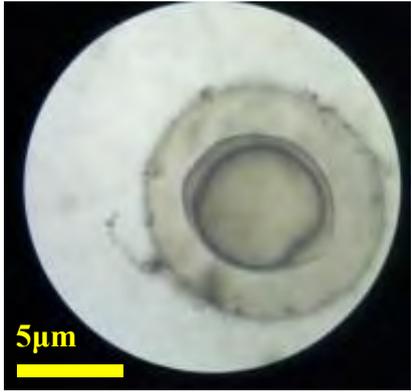
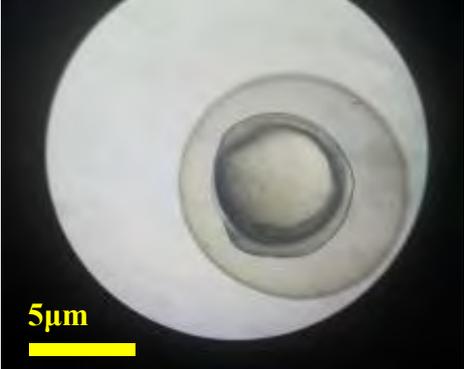
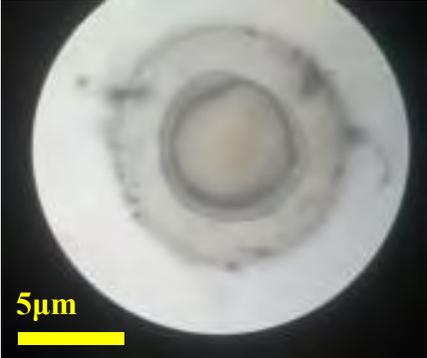
進行各濃度百合溶液存活率的 t-test 發現濃度 12.5%與曝氣水的存活率有顯著關聯。

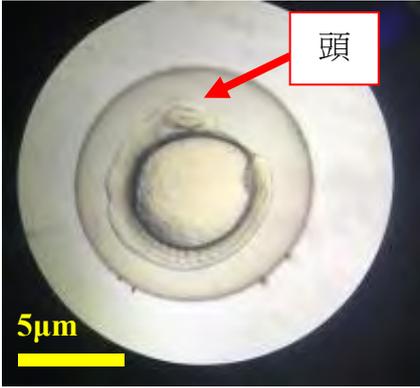
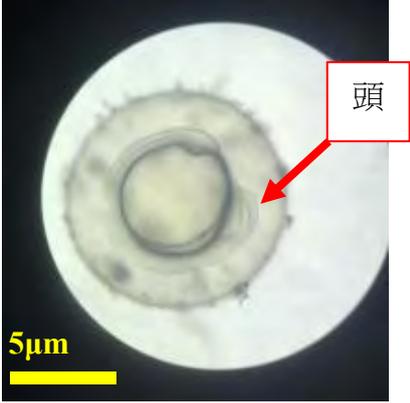
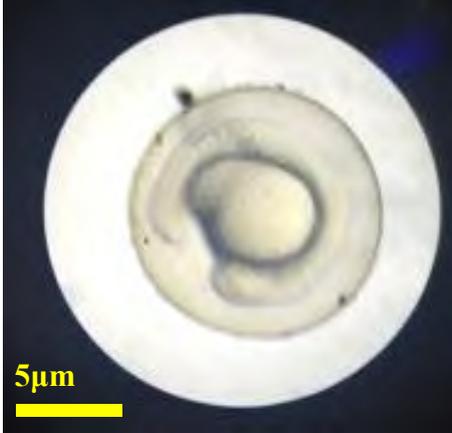
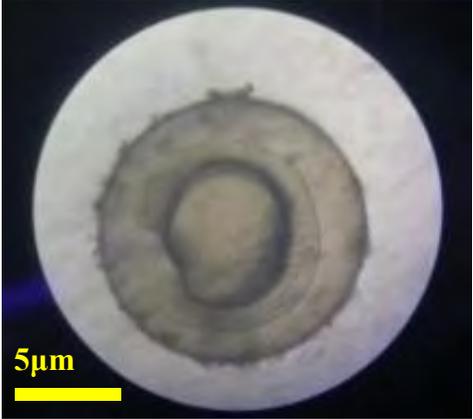
t-test(百合含量 12.5%vs0%)	0.419945
t-test(百合含量 0%vs25%)	0.515167
t-test(百合含量 0%vs50%)	0.534179
t-test(百合含量 0%vs6.25%)	0.653903
t-test(百合含量 0%vs3.13%)	0.45065
t-test(百合含量 0%vs1.56%)	0.707053

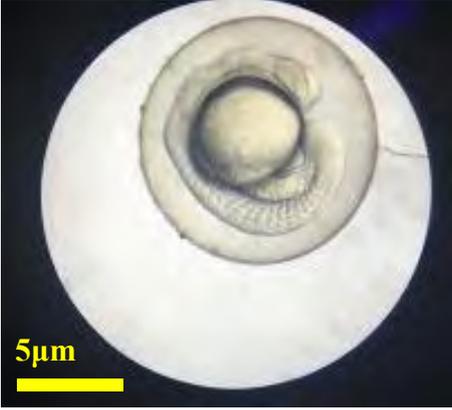
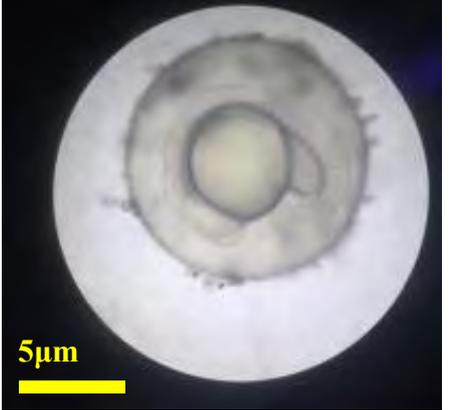
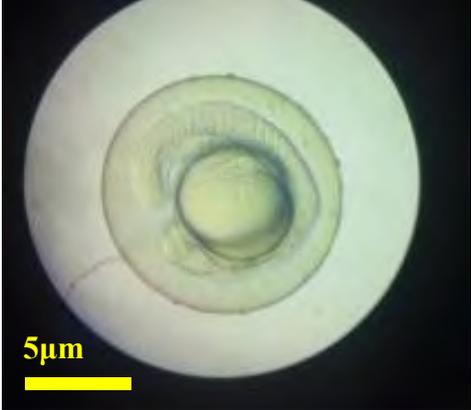
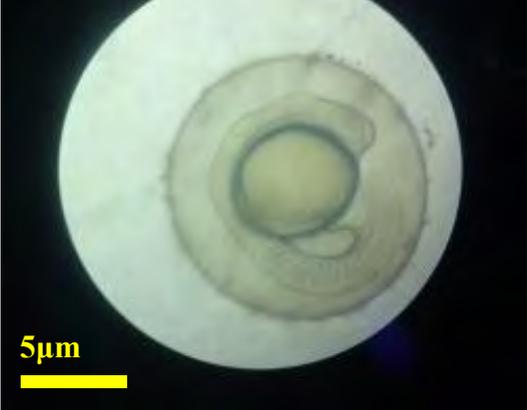
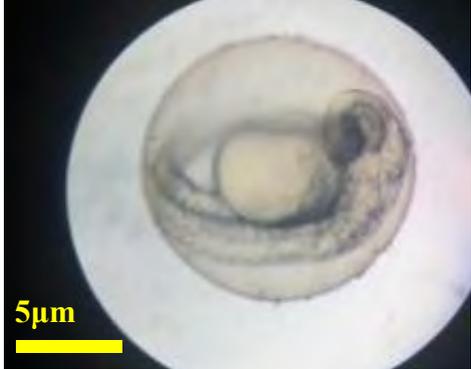
▲(表 4)卵的發育結果 t-test

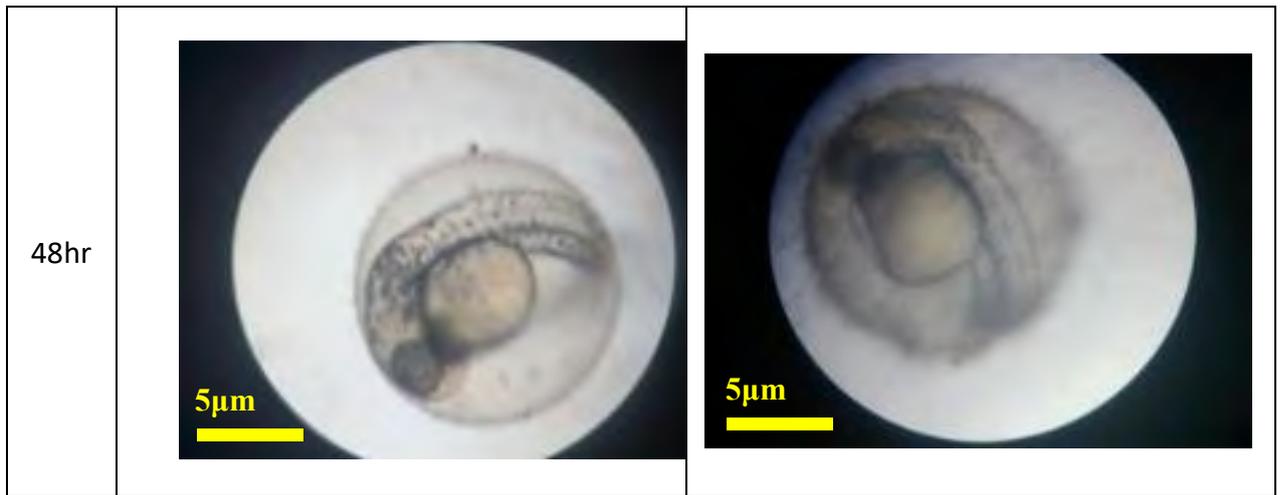
卵在曝氣水與濃度 12.5%的發育並沒有明顯的差異(表 5)。

時間	曝氣水	百合(濃度 12.5%)
2hr		
4hr		
6hr		

8hr		
12hr		
14hr		
16hr		

18hr		
20hr		
22hr		

24hr		
30hr		
42hr		



▲(表 5)卵的發育情形

二、沉底行為

大約 20 秒左右時，明顯觀察到百合雄性成魚比普通雄性成魚皆已從沉底行為中恢復。(表 6)

沉底行為恢復時間				
			百合雄性成魚	普通雄性成魚
時間 (s)	Type1 (第一次)	1 號	11.16s	55.62s
		2 號	10.07s	64.41s
		3 號	13.24s	60.08S
	Type2 (第二次)	4 號	8.78s	45.98s
		5 號	0.00s	52.04s
		6 號	9.42s	54.75S
	Type3 (第三次)	7 號	9.72s	62.62s
		8 號	6.85s	42.36s
		9 號	10.76s	60.58s
	Type4 (第四次)	10 號	12.72s	55.14s
		11 號	5.10s	65.55s
		12 號	15.83s	56.88S

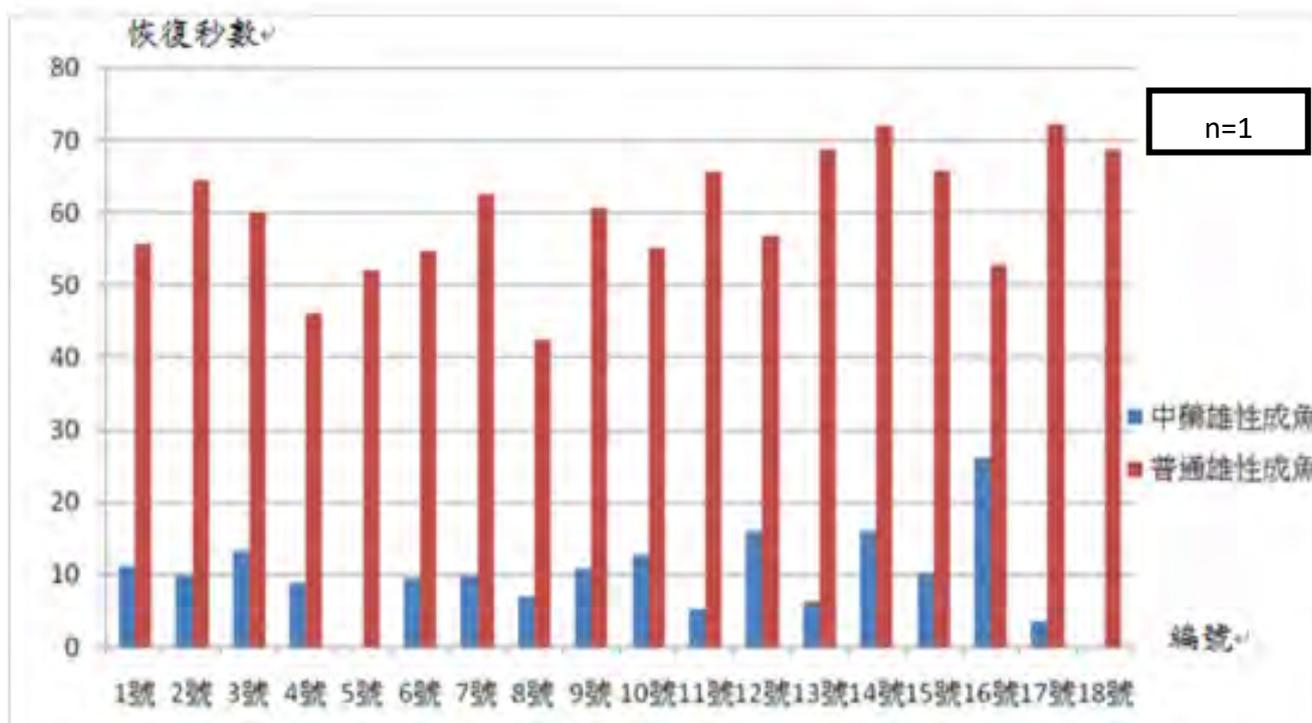
時間 (s)	Type5 (第五次)	13 號	6.32s	68.59s
		14 號	15.90s	72.00s
		15 號	10.17s	65.72
	Type6 (第六次)	16 號	26.12s	52.74s
		17 號	3.37s	72.18s
		18 號	0.00s	68.71s

▲(表 6)沉底行為恢復時間(標示 0 代表無沉底行為發生)

進行濃度 12.5%百合溶液與普通雄性成魚沉底行為恢復秒數 t-test 發現有顯著關聯(表 7、8)。

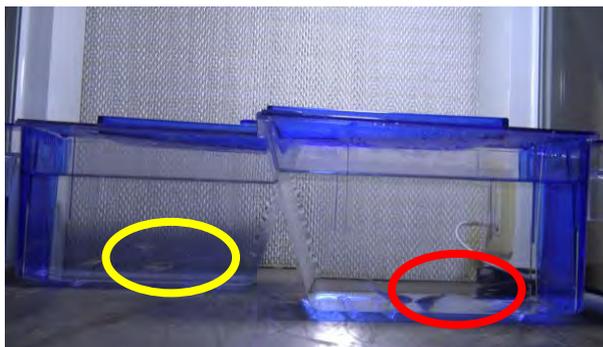
t-test(百合含量 12.5%vs0%)	$1.61904593027936 \times 10^{-20}$
------------------------	------------------------------------

▲(表 7)沉底行為 t-test

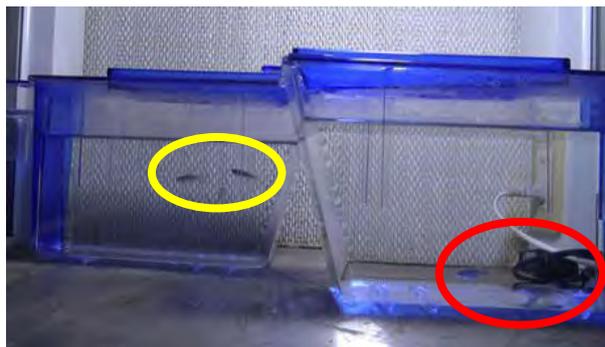


▲(表 8)沉底恢復直線圖

▼黃色畫圈處為中藥濃度斑馬魚，紅色畫圈處為普通雄性斑馬魚(以 Type1 做舉例)。



▲(圖十七) Type1 中開燈瞬間斑馬魚沉底行為(畫圈處)情況對比



▲(圖十八)Type1 中開燈 20 秒後百合雄性成魚和普通雄性成魚的沉底行為恢復

三、空間學習

觀察相差時間並沒有發現百合使斑馬魚冷靜的效果有助於減少抵達安全區時間的效果。

(表 9、10、11)

空間學習		
次數	普通雄性成魚	中藥雄性成魚
Type1(第一次測量空間學習)		
第 1 次	451s	344s
第 2 次	8s	81s
相差時間	443s	263s
Type2(第二次測量空間學習)		
第 1 次	307s	359s
第 2 次	26s	232s
相差時間	281s	127s
Type3(第三次測量空間學習)		
第 1 次	240s	113s
第 2 次	135s	88s
相差時間	105s	25s

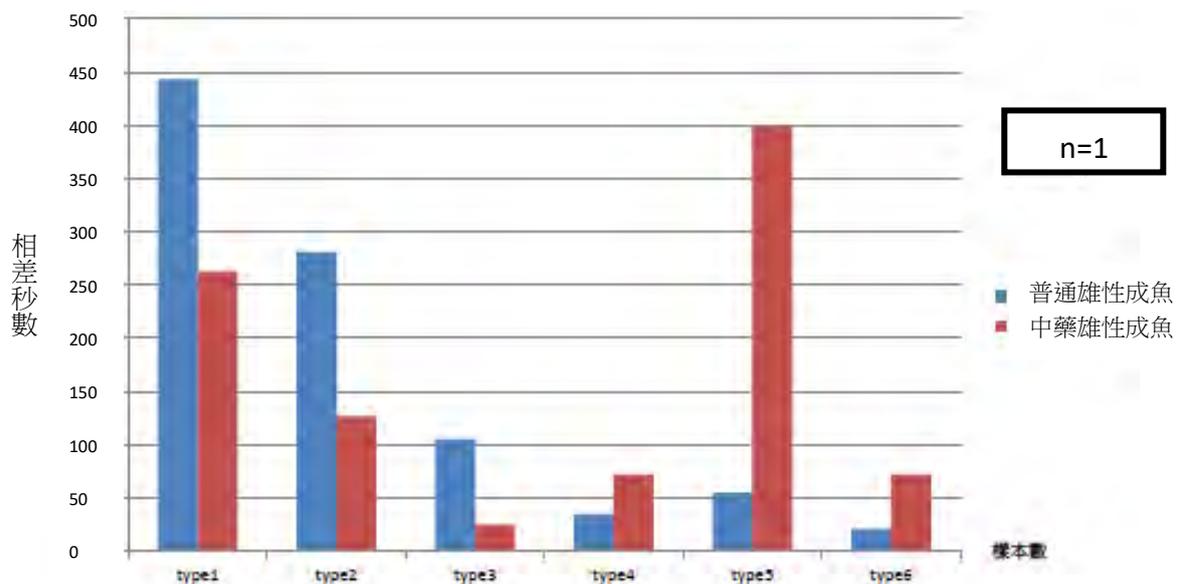
Type4(第四次測量空間學習)		
第 1 次	55s	83s
第 2 次	20s	11s
相差時間	35s	72s
Type5(第五次實驗)		
第 1 次	376s	499s
第 2 次	321s	100s
相差時間	55s	399s
Type6(第六次測量空間學習)		
第 1 次	323s	118s
第 2 次	302s	46s
相差時間	21s	72s

▲(表 9)抵達時間

進行濃度 12.5%百合溶液與普通雄性成魚相差秒數的 t-test 發現沒有顯著關聯。

t-test(百合含量 12.5%vs0%)	0.974233
------------------------	----------

▲(表 10)空間學習 t-test



▲(表 11)空間學習直條圖

陸、討論

一、斑馬魚卵存活率和發育

(一)百合毒性濃度測試

我們利用不同稀釋濃度的百合溶液 50%、25%、12.5%、6.25%、3.13%、1.56% 去測試對於斑馬魚卵存活率的影響，發現 12.5% 的百合濃度較適合斑馬魚卵的生長。我們覺得可能是 12.5% 的溶液較偏鹼性，使菌類無法順利生長，降低濃度時會使菌類再次生長，而增加濃度會使溶液過於鹼性而導致魚卵死亡並利用比值且以 t-test 佐證後，能明顯表現出有顯著關係。藉由此結果，我們利用較適合斑馬魚卵的百合濃度應用於後續成魚行為實驗上。

(二)百合濃度對卵的成長速率之觀察

在此次實驗中，利用曝氣水以及 12.5% 的百合溶液對於斑馬魚卵生長的速率進行測試，透過拍攝之照片發現並無顯著差異。之前文獻中得知百合中含有的核黃素能促進細胞的成長(編生素工作室, 2000)，因此，我們推測可能的原因是核黃素的含量不足導致其無法造成影響；但是，根據第一個實驗卻並沒發現在百合溶液濃度高於 12.5% 時，對於魚卵的存活率有較高的影響，因此，我們推測溶液的酸鹼度對於斑馬魚卵應該具有較大的影響。另外在針對斑馬魚卵的介紹中提到溫度差異會使卵的發育速度減慢(Gendanio, 2011)，所以推測第二可能原因是溫度，因為我們在拍攝卵的照片時雖然將樣本放置於恆溫箱，但我們每次拍攝大約需要 30 分鐘，且當時正好有冷氣團南下導致溫度在十五度左右，所以我們懷疑也可能是溫度導致兩者並無顯著差異。

二、沉底行為

在錄製的影片中發現，從燈一亮開始進行測試，百合雄性成魚與普通雄性成魚總共有百分之九十四發生沉底行為，而每組數據在大約 20 秒左右時，可以明顯觀察到百合雄性成魚比普通雄性成魚皆已從沉底行為中恢復。下表所呈現的數據為三隻實驗魚所記錄的秒數並依序給予編號。在探討記錄的實驗資料後，可以得知普通雄性成魚所需要的恢復時間與百合雄性成魚需要的時間有明顯的差異，並透過 t-test 佐證。另外根據前人的研究發現，斑馬魚的間腦控制遭受到刺激時的反射行為，如沉底行為(陳微, 2015)，故推測百合中甾體生物鹼的降低壓力功能會影響到斑馬魚的間腦，進而提高斑馬魚處理來自於光線刺激壓力的能力並導致其縮短從沉底行為中恢復的時間。

三、空間學習

本實驗中的行為分成三個階段，在三個階段中，皆會觀察到服用百合和普通雄性成魚會在探索結束或是探索期間產生呆滯反應，但在觀察第二階段初次抵達安全區以及第三階段第二次抵達安全區時並沒有發現百合使斑馬魚冷靜的效果有助於減少抵達安全區的時間。圖表中的 **Type** 代表的是各次實驗的編號。在 **t-test** 中也顯示出中藥雄性成魚和普通雄性成魚的恢復時間並無顯著的相關差異。在沉底行為的實驗中推論出百合對間腦有鎮靜效果，並且從前人的研究得知空間學習是由端腦控制(吳耀如, 2008)，可能是百合中影響空間學習的成分太少或無此成分導致對於斑馬魚的空間學習能力無觀察出明顯影響。

柒、結論

藉由四個部分之實驗，我們從數據分析以及討論可以做出以下結論:在毒性測試實驗，不同稀釋濃度 50%、25%、12.5%、6.25%、3.13%、1.56%的百合溶液中 12.5%百合溶液對於斑馬魚卵具有較高的存活率，並且發現其存活率和曝氣水的比值差異最小；斑馬魚卵的成長速率由實驗所拍攝的照片做對照，發現斑馬魚卵在濃度 12.5%百合以及曝氣水中的發育情形並無顯著的差異，而我們懷疑溫度對其實驗結果有一定的影響；行為方面，濃度 12.5%百合溶液所造成的鎮靜效果在斑馬魚受光刺激造成的沉底行為上，其所需要的恢復時間具低 40 ± 5 秒的效果。而在空間學習的數據結果顯示，濃度 12.5%百合溶液對於端腦的空間學習行為並無顯著的影響。由以上二實驗可知，濃度 12.5%百合溶液對斑馬魚間腦在沉底上有影響，在空間上無。

在實驗中，胚胎存活率的部分雖然已經在 12.5%中發現有比較好的存活率，但由於各濃度以二分之一的比例等比下降，在濃度的調配無法更加精確，所以我們認為能夠找到更準確的濃度使魚卵有更良好的存活率。而我們希望觀察其他濃度及同濃度不同溫度下的發育情形。空間學習的部分，雖然此次無法利用百合看到成效，但我們後來發現另一種名為天麻的中藥，此中藥除了能幫助記憶外也有鎮靜的效果(邱銘章, 2004)，所以我們希望能嘗試利用天麻觀察其影響空間學習的程度。另外因為百合沉底行為有顯著的影響，想要在之後找出更低但有相同效果的藥浴濃度並且觀察三維移動路徑。未來可推廣至養殖漁業中，藉由百合降低運送時魚受到驚嚇的程度來提高其存活率。

捌、參考資料及其他

- 一、農委會(2010)《實驗動物管理與實驗指南-第二十二章斑馬魚與牛蛙實驗動物》(181-183 頁)
臺北市：行政院農業委員會。
- 二、楊明興、呂國棟(2006)《行政院國家科學委員會公佈之斑馬魚情緒行為研究用量測系統之設計》
臺北市：行政院國家科學委員會。
- 三、許竣博(2009)《探討斑馬魚恐懼記憶之神經機制》(碩士論文) 臺北市：國立臺灣師範大學
生命科學研究所。
- 四、FENG Ya-bin、ZHUANG Xin-chen、SHEN Xiao-xia、JIANG Jian-ming、WANG Zhong-hua(2017).
Pharmacological Effects and Biosynthetic Pathway of Steroidal Alkaloids of Medicinal Plant.
- 五、HAN Xiaobo、HUANG Yi、LING Rui、ZHANG Jinsong(2017).*Research on recognition of abnormal
fish behavior in water quality warning by light simulation.*
- 六、王渭賢(2011)《觀賞魚類用藥介紹》
台中：國立中興大學獸醫學院獸醫學系
- 七、陳微(2015)《斑馬魚腦組織結構特性研究》(碩士論文) 中國：南京農業大學
- 八、編生素工作室(2000)《維生素全書》
台北：商業周刊
- 九、Gendanio(2011)《實驗斑馬魚繁殖和飼育》
取自
<http://www.gendanio.com/zh/zebrafish-systems/388-zebrafish-care.html>
- 十、吳耀如(2008)《斑馬魚空間記憶學習作業不對稱之行為表現》(碩士論文) 臺北市：國立臺灣
師範大學生命科學研究所。

十一、台灣中藥典(2011)‘天麻’取自

<https://www.cmdhi.mohw.gov.tw/dhi/herbsSearchCheck>

十二、Hilary J(2003). *Riboflavin and health* .

十三、Hans Maaswinkel. *Spatio-temporal frequency characteristics of the optomotor response in zebra fish Lei li 2003 January.*

十四、邱銘章(2004)‘天麻對記憶力改善之研究- 臨床及正子射出斷層攝影研究’*中醫藥年報*，

22，5

【評語】 052005

本實驗同學藉由百合具有鎮定效果為發想構思出對斑馬魚生存及環境適應相當有創意。利用百合抽取液分析其對斑馬魚卵之存活率，並用固定濃度下，觀察其發育和沉底行為的影響，研究計畫具體可行，在日後應用於養殖業的運送也具前瞻性。然而，實驗過程有許多地方不夠嚴謹，圖表的表示方式及圖說應更加清楚，實驗統計結果應加入標準偏差。此外，如能用 HPLC 等分析百合主成分及其功能，則成果更佳。參考文獻整理宜加強，各個引用文獻的表達方式應具一致性，與過往研究之間的關係宜再清楚陳述，對於行為測試與驚嚇反應的測量理由宜清楚說明。

摘要

百合具安心安神的功效，使我們想觀察百合是否對其他脊椎動物也有相同的作用，本實驗想藉觀察斑馬魚的發育及行為，探討百合對脊椎動物的影響。最初假設百合的濃度會影響魚卵存活率，經實驗發現浸泡在6.25%及12.5%間的百合溶液較其他濃度存活率及曝氣水高，但在胚胎的發育速率上則沒有差異；行為觀察上，浸泡百合後，斑馬魚由「沉底」狀態之恢復時間較未服用減少約40±5秒，符合我們的預期。除此之外，我們又做了空間學習，但發現百合添加並沒有太大的影響。最後我們總結濃度12.5%的百合溶液是目前對斑馬魚而言最適合的濃度，可有效改變斑馬魚的沉底行為，但在空間學習和成長速率目前則沒有差異。未來希望能更深入探討百合作用於斑馬魚間腦的機制。

壹、研究動機

在國內外研究皆有證實百合對人體有清心安神的作用，因此使用與人類基因有87%相同的斑馬魚進行測試，而近年來的研究中發現，斑馬魚除了與人類的基因有高度的相似性，對環境的刺激也非常敏感。魚類在適應環境衝擊時，會發生瞬間的反應，如沉底行為，長期下來還表現了生存所需的學習本領，如：空間學習及逃避學習等(楊明興、呂國棟,2006)，顯示斑馬魚是容易觀察的對象。除此之外，我們認為百合使用量不能無限制的增加，否則其藥性可能會對斑馬魚的存活產生威脅；為了確認百合是否會使斑馬魚產生藥物不良反應，我們利用斑馬魚卵的存活率尋找適合生存的環境濃度，接著在固定環境濃度下，觀察卵的發育、空間學習和沉底行為的改變。

貳、研究目的

觀察百合對斑馬魚的影響主要分為四個部分：

第一部分和第二部分是藉由觀察魚卵存活率以及卵的發育，確認百合用藥的合適濃度範圍，減低斑馬魚生理上有藥物不良反應。評估標準如存活率是否下降、發育是否完全或是發育速度上的差異等等。

第三部分和第四部份是觀察百合的鎮靜效果是否會影響成魚的空間學習行為，以及成魚在解除驚嚇造成的沉底狀態時所花費的時間長度。並藉由這四個部分研究，探討百合對於斑馬魚間腦之影響。

參、研究設備及器材

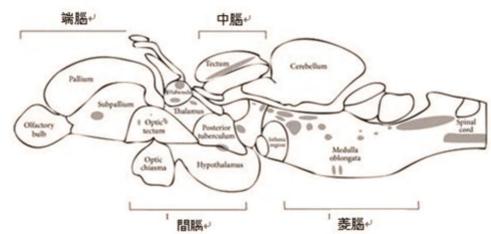
斑馬魚(圖一)、百合

T型迷宮(圖二、圖三)

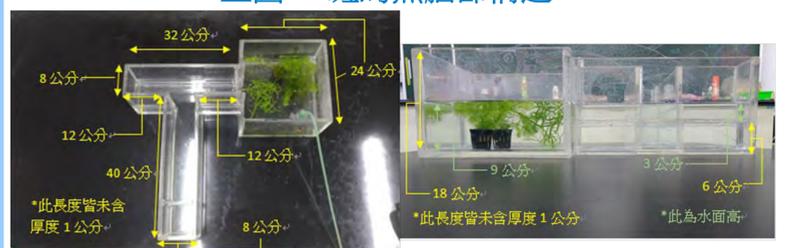
根據行政院國家科學委員會公佈之斑馬魚情緒行為研究用量測系統之設計，採用其規格製作，分為通道區與安全區，通道長臂(包含起始區)長度48公分、短臂長度32公分、寬及高均為12公分，安全區域為24*24*18立方公分，厚度皆為1公分並放置水草及給予打氣裝置使溶氧量提高。

光刺激實驗暗室(圖四、圖五)

根據哈爾濱工業大學深圳研究生院等公佈之光照刺激識別斑馬魚異常行為在水質預警中的真偽研究之暗室計，改良其規格製作，長55公分、寬65公分、高60公分，蓋上黑布使得周圍不透光，且於外部架設攝影機，並在內部裝設一盞燈，開關從內部延伸至外部以方便控制。



▲圖一：斑馬魚腦部構造



▲圖二：T型迷宮俯視圖

▲圖三：T型迷宮側視圖

肆、研究過程及方法(圖六)

一、斑馬魚藥浴流程

(一)製備原液

在100毫升水中加入30公克的百合浸泡80分鐘得到約80毫升的原液，用濾網過濾較大之雜質，放入冰箱。

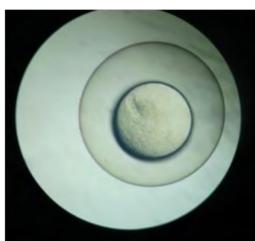
(二)藥浴過程

我們使用當天配製的百合溶液以避免變質，並使用藥浴的方式將三隻成魚放入500毫升的燒杯中浸泡3小時後撈出。

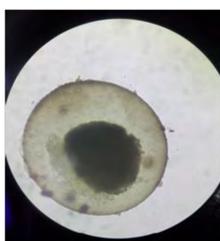
二、受精卵發育

(一)斑馬魚飼養與收集斑馬魚受精卵

(二)辨別健康魚卵(圖七、圖八、圖九)



▲圖七：顯微鏡下之受精卵



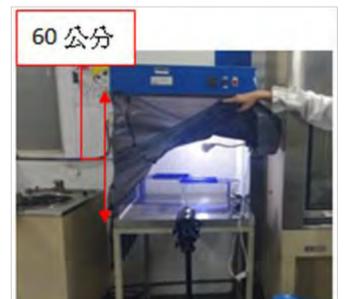
▲圖八：顯微鏡下死卵



▲圖九：顯微鏡下之無受精卵

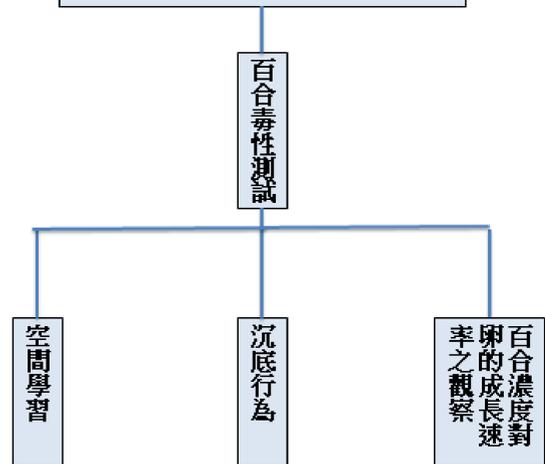


▲圖四：暗室外觀



▲圖五：暗室內部

百合對斑馬魚各個階段的影響



▲圖六：實驗架構圖

三、百合毒性測試

配置百合原液，挑選健康魚卵一同置入孔盤中並進行三次重複觀察其存活率並記錄，比較在何種濃度中能夠使浸泡於百合溶液之魚卵存活率最合適。

四、百合濃度對卵的成長速率之觀察

挑選剛受精的8顆或10顆的斑馬魚卵分別置於純水以及含量為12.5%百合溶液中，放入保溫箱並拍攝照片，互相比對發育情形。

五、沉底行為

(一)沉底行為與呆滯反應介紹

斑馬魚遭受突發刺激時，會下降到水缸底部並產生呆滯反應，進入待在同一地點不進行任何移動的狀態，直到重新適應環境中的刺激後才會恢復離開底部。

(二)實驗過程

將經過藥浴成魚和無服藥成魚各三隻，一同放入暗室，使其適應黑暗環境一小時。一小時後利用突然的光源給予刺激，測量魚受到刺激之後產生沉底行為直到恢復成一般狀態的時間。

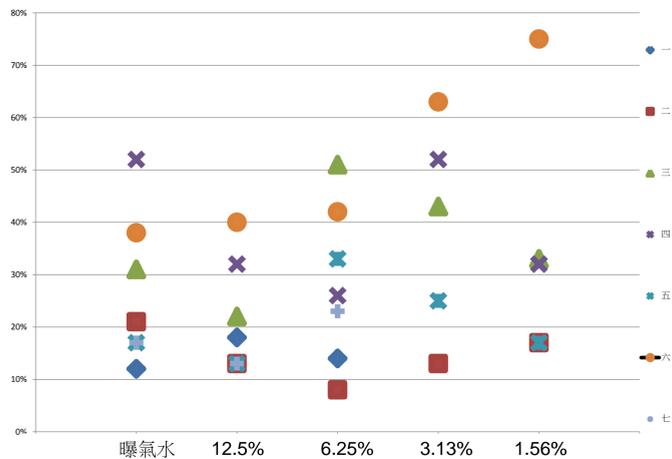
六、空間學習

觀察百合溶液是否能使魚冷靜，進而提升空間學習能力而縮短秒數。斑馬魚在適應期時，給予兩分鐘的馴化，不給予任何刺激，也不開啟迷宮T字右側的水槽口，只讓魚在T字型部分自由的移動。而在接下來的測試中，魚先被放置於開始區，並開啟T字形右側的水槽後抵達安全區，並藉以紀錄抵達安全區的秒數。

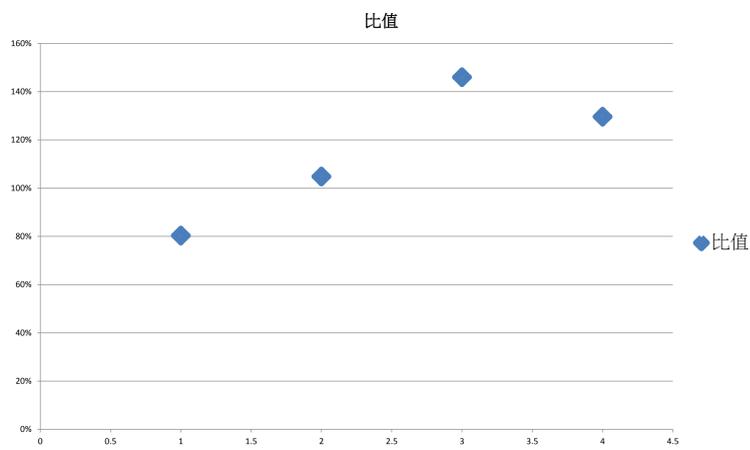
伍、研究結果

一、魚卵的存活率

在利用不同稀釋濃度的百合溶液50%、25%、12.5%、6.25%、3.13%、1.56%後所記錄的數據(表一)，發現適合斑馬魚卵的生長的百合濃度介於6.25%及12.5%之間(表二)。



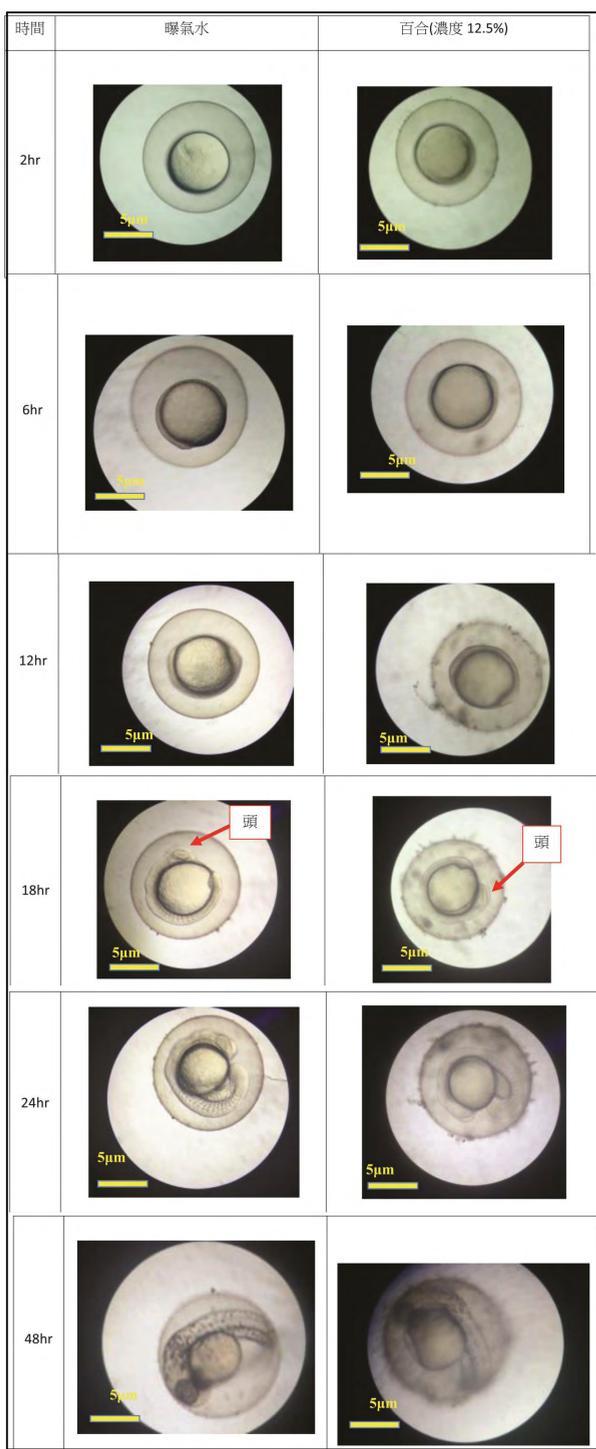
▲表一:斑馬魚卵於各濃度存活率點散佈圖



▲表二:曝氣水與各濃度溶液存活率比值點散佈圖

二、魚卵的發育

卵在曝氣水與濃度12.5%的溶液中藉由觀察各個發育期發現並沒有明顯的差異(表三)。

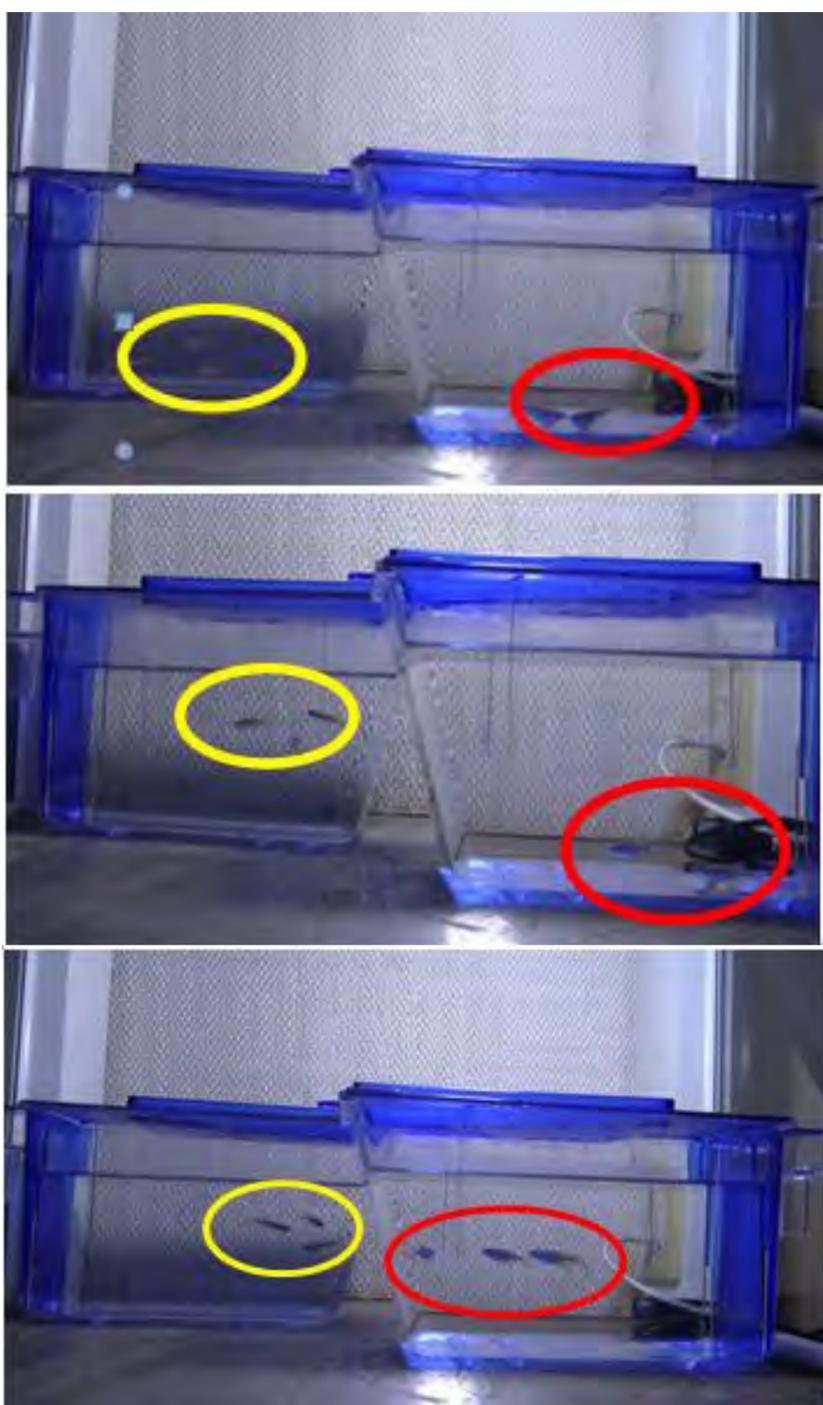


▲表三:卵的發育情形

三、沉底行為

一開始皆有發生沉底行為(圖十)，大約20秒左右時(圖十一)，明顯觀察到百合雄性成魚(黃圈)比普通雄性成魚(紅圈)皆已從沉底行為中恢復，直到60秒普通雄性成魚完全恢復(圖十二)。降低濃度後仍可看出影響(表四、表五、表六)。

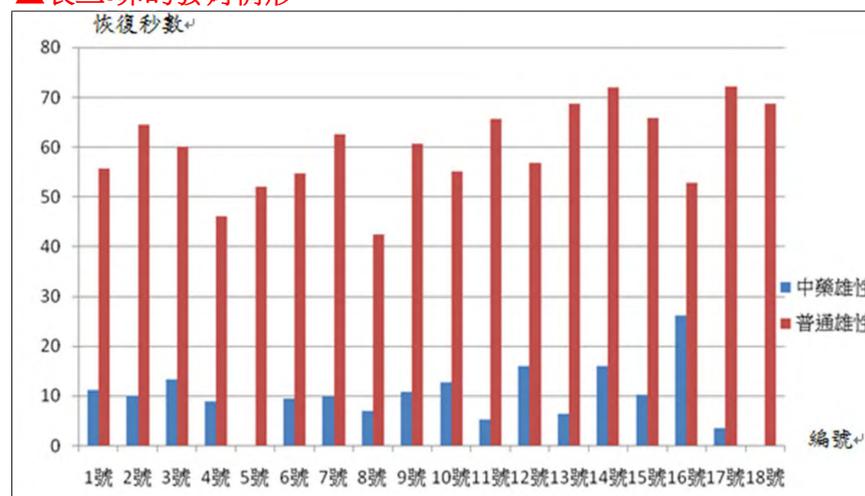
開燈瞬間
20秒
60秒



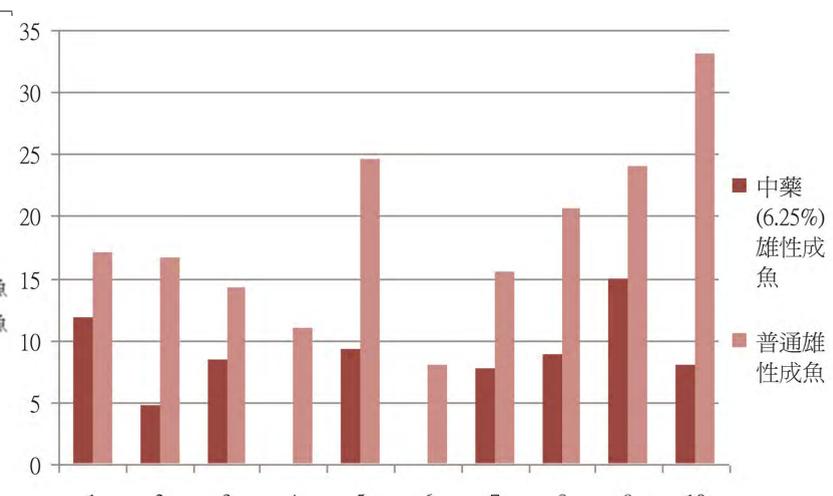
▲圖十:Type 1 中開燈瞬間斑馬魚沉底行為(畫圈處)情況對比

▲圖十一:Type 1 中開燈 20 秒後百合雄性成魚和普通雄性成魚的沉底行為恢復情形

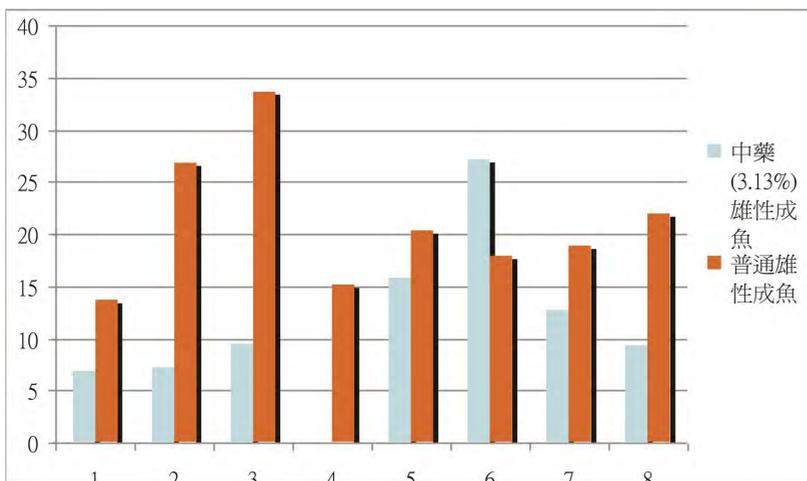
▲圖十二:Type 1 中開燈 60 秒後百合雄性成魚和普通雄性成魚的沉底行為恢復情形



▲表四:中藥(12.5%)雄性成魚與普通雄性成魚沉底恢復時間直條圖



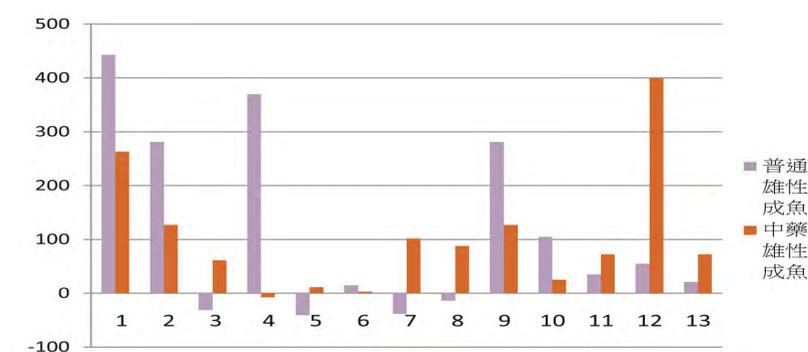
▲表五:中藥(6.25%)雄性成魚與普通雄性成魚沉底恢復時間直條圖



▲表六:中藥(3.13%)雄性成魚與普通雄性成魚沉底恢復時間直條圖

四、空間學習

觀察相差時間發現百合使斑馬魚冷靜的效果有些微助於減少抵達安全區時間的效果。(表七)



▲表七:空間學習時間差直條圖

陸、討論

一、百合毒性濃度測試

發現6.25%及12.5%間的百合濃度較適合斑馬魚卵的生長。認為可能是其濃度較偏鹼性，使菌類無法順利生長，降低濃度時會使菌類再次生長，而增加濃度會使溶液過鹼而導致魚卵死亡，之後利用比值且以t-test佐證後，能表現出有關係。藉由此結果，我們選擇12.5%較適合斑馬魚卵的百合濃度應用於後續之行為實驗上。

二、百合濃度對卵的成長速率之觀察

利用曝氣水以及12.5%的百合溶液對於斑馬魚卵生長的速率進行測試，透過拍攝之照片觀察並無顯著差異。我們推測可能的原因是阻礙胚胎發育的成分含量無法造成影響；且在百合溶液濃度高於12.5%時，魚卵的存活率將會降低，因此，我們推測溶液的酸鹼度對於斑馬魚卵應該具有較大的影響。另外在針對斑馬魚卵的介紹中提到溫度差異會使卵的發育速度減慢，所以推測第二可能原因是溫度，因為我們在拍攝卵的照片時雖然將樣本放置於恆溫箱，但我們每次拍攝大約需要30分鐘，且當時正好有冷氣團南下導致溫度在十五度左右，所以我們懷疑也可能是溫度導致兩者並無顯著差異。

三、沉底行為

在錄製的影片中發現每組實驗在大約20秒左右時，可以明顯觀察到中藥雄性成魚皆已從沉底行為中恢復。在分析比較的實驗資料後，可以得知普通雄性成魚所需要的恢復時間與百合雄性成魚明顯較高，並透過t-test佐證。另外根據前人的研究發現，斑馬魚的間腦負責調控遭受到刺激時的反射行為，如沉底行為，故推測百合中甾體生物鹼(steroid alkaloid)的降低壓力功能會影響到斑馬魚的間腦，進而提高斑馬魚處理來自於光線刺激壓力的能力並導致其縮短從沉底行為中恢復的時間。而之後在浸泡6.25%和3.13%的溶液後之實驗數據可以觀察到沉底行為較之前12.5%時不明顯。

四、空間學習

在綜合實驗結果後並發現百合使斑馬魚冷靜的效果可些許地助於減少抵達安全區的時間。雖在t-test中中藥雄性成魚和普通雄性成魚的恢復時間並無顯著的差異，但在沉底行為的實驗中推論出百合對間腦有鎮靜效果，並且從前人的研究得知空間學習是由端腦控制，可能是百合縮短了斑馬魚適應環境的時間但對增強記憶無功效。

柒、結論及未來展望

一、結論

- 1.在毒性測試實驗，不同稀釋濃度50%、25%、12.5%、6.25%、3.13%、1.56%的百合溶液中6.25%及12.5%百合溶液對於存活率的比值差異相對較小。
- 2.斑馬魚卵的成長速率由實驗所拍攝的照片做對照，發現斑馬魚卵在濃度12.5%百合以及曝氣水中的發育情形並無差異，而我們懷疑溫度對其實驗結果有一定的影響。
- 3.濃度12.5%百合溶液所造成的鎮靜效果在斑馬魚受光刺激造成的沉底行為上，其所需要的恢復時間具低40±5秒的效果。
4. 6.25%和3.13%的溶液影響無12.5%明顯但還是可以看出其效果
- 5.濃度12.5%百合溶液對於端腦的空間學習行為有些微影響。

二、未來展望

- 1.在實驗中，胚胎存活率的部分雖然已經在12.5%中發現有比較好的存活率，但由於各濃度以二分之一的比例等比下降，在濃度的調配無法更加精確，所以我們認為能夠找到更準確的濃度使魚卵有更良好的存活率。
- 2.希望觀察其他濃度及同濃度不同溫度下的發育情形。
- 3.希望能藉由天麻觀察其影響空間學習的程度。
- 4.未來可推廣至養殖漁業中，藉由百合降低運送時魚受到驚嚇的程度來提高其存活率。

捌、參考資料

- 一、農委會(2010)《實驗動物管理與實驗指南-第二十二章斑馬魚與牛蛙實驗動物(181-183頁)》臺北市:行政院農業委員會。
- 二、楊明興、呂國棟(2006)《行政院國家科學委員會公佈之斑馬魚情緒行為研究用量測系統之設計》臺北市:行政院國家科學委員會。
- 三、許竣博(2009)《探討斑馬魚恐懼記憶之神經機制》碩士論文。臺北市:國立臺灣師範大學生命科學研究所。
- 四、FENG Ya-bin、ZHUANG Xin-chen、SHEN Xiao-xia、JIANG Jian-ming、WANG Zhong-hua(2017). *Pharmacological Effects and Biosynthetic Pathway of Steroidal Alkaloids of Medicinal Plant*.
- 五、HAN Xiaobo、HUANG Yi、LING Rui、ZHANG Jinsong(2017). *Research on recognition of abnormal fish behavior in water quality warning by light simulation*.
- 六、王渭賢(2011)《觀賞魚類用藥介紹》台中:國立中興大學獸醫學院獸醫學系
- 七、Gendanio(2011)《實驗斑馬魚繁殖和飼育》取自 <http://www.gendanio.com/zh/zebrafish-systems/388-zebrafish-care.html>
- 八、吳耀如(2008)《斑馬魚空間記憶學習作業不對稱之行為表現》(碩士論文)臺北市:國立臺灣師範大學生命科學研究所。