

中華民國第 59 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

052009

尼古丁戒斷效應-以斑馬魚為模式之探討

學校名稱：國立鳳山高級中學

作者： 高二 鄭至榮 高二 程致瑜 高二 黃崇維	指導老師： 林昱君
---	------------------

關鍵詞：尼古丁、斑馬魚、焦慮行為

摘要

研究發現尼古丁具高成癮性及產生戒斷症狀，為了觀察除了人類以外的生物是否也有類似的現象，我們採用適合作為藥物測試的生物—斑馬魚作為實驗對象，測試斑馬魚在浸泡尼古丁溶液一週及兩週後，以及戒斷後的行為反應，並藉由錄影並觀察個體運動情形，加以量化進行數據分析。結果顯示：經過處理的個體上層總時間明顯低於對照組，顯示其對尼古丁的確有戒斷反應，從其他數據的趨勢亦可看出其差異。將實驗的時間與濃度提升或許差異會更明顯，但斑馬魚對尼古丁之耐受性也有極限。實驗中亦觀察到公魚對尼古丁的耐受性較母魚高，藥物反應也比母魚明顯，在有性別差異的情形下，公、母魚應分開進行實驗及分別探討比較。

壹、研究動機

在專題研究課程中，我們到高雄醫學大學生物科技系參訪，與教授的對談中，我們了解到斑馬魚做為脊椎動物篩藥平台的潛能，斑馬魚與人類和哺乳類模型在毒理和藥理測試方面有許多相似的生理結構與機轉，並且展現出類似於哺乳動物睡眠行為的晝夜規律，美國 FDA 於 2013 年證實：斑馬魚適合當作藥物測試、環境污染物測試的實驗對象。且斑馬魚具有容易飼養、成本低廉、操作容易、胚胎透明、繁殖數量多、有利於操作及觀察等優點，若能做為替代小鼠的模式生物，也許能使科學進展更快速。

因此我們蒐尋了相關資料，發現斑馬魚也有使用在藥物成癮及戒斷的研究上，這件事情引發了我們的興趣。在生活中，我們不一定會接觸到吸毒者，但許多人都有酒癮或菸癮，研究也已發現酒精與尼古丁對斑馬魚胚胎發育的影響（蔡旻臻等，2005），我們遇到的吸菸者，有些人戒斷困難，總是反覆吸菸，但也有些人下定決心很快就戒斷了，究竟菸癮戒斷的過程中會有哪些身體或精神上的不適，導致難以戒除呢？也許我們可以在斑馬魚上找到解答，甚至開發新藥物來緩解這些戒斷症狀，使戒菸更容易、更輕鬆。

貳、研究目的

- 一、 探討浸泡於尼古丁溶液中的斑馬魚之行為模式
- 二、 探討浸泡於尼古丁中的斑馬魚，進行單次戒斷後之行為模式
- 三、 探討浸泡於尼古丁中的斑馬魚是否出現耐藥性
- 四、 探討尼古丁對斑馬魚行為之影響是否有性別差異

參、研究設備與器材

一、 實驗生物：

斑馬魚(*Danio rerio*)。由高雄醫學大學生物科技系及國立海洋科技大學水產養殖系提供 46 隻，由邨港科技全球實驗魚公司購買 106 隻，飼養於本校生物實驗室循環水流飼養系統，光照週期 14 小時日照、10 小時黑暗，每日餵食 3 次。

二、 實驗藥物：

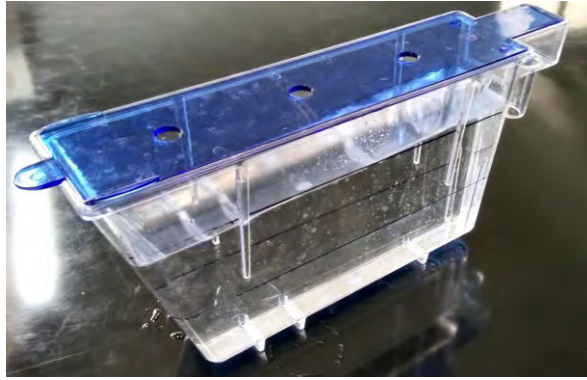
尼古丁(nicotine)，俗稱菸鹼-乙醯膽鹼，是一種強效擬副交感神經生物鹼，具有毒性、成癮性，是香菸的主要化學成分，屬於興奮劑的一種。研究顯示，其可作用於中樞神經，與菸鹼型乙醯膽鹼受體結合，人類吸入後平均只需 7 秒即可到達腦部，且尼古丁能影響腦內的關鍵神經傳遞物——多巴胺，藉由提高其含量，影響獎賞路徑，而產生藥物成癮 (Benowitz, 2010)。

三、 Novel Tank：

1.5L 飼養槽，長 33cm、寬 5.5cm、高 15.2cm，由邨港科技全球實驗魚公司購買。用於斑馬魚的垂直潛水行為焦慮測試實驗，狹窄的水箱可以最大限度地減少斑馬魚於 X-Y 平面之水平運動，進而最大限度地提高行為評估能力。



圖一、濃度 95%尼古丁



圖二、Novel Tank







四、斑馬魚循環水流飼養系統

用於斑馬魚的培育、飼養、繁殖繁育，養殖盒(3L)獨立供水，可單獨抽出，循環水量可控制，底部過濾集水槽內含粗過濾墊、活性炭過濾棉及魚缸過濾生化石保持良好水質，UV 紫外線殺菌確保飼養箱中無細菌滋生，四組可調式定時日光燈照明，可依照實驗需求調控照光週期。



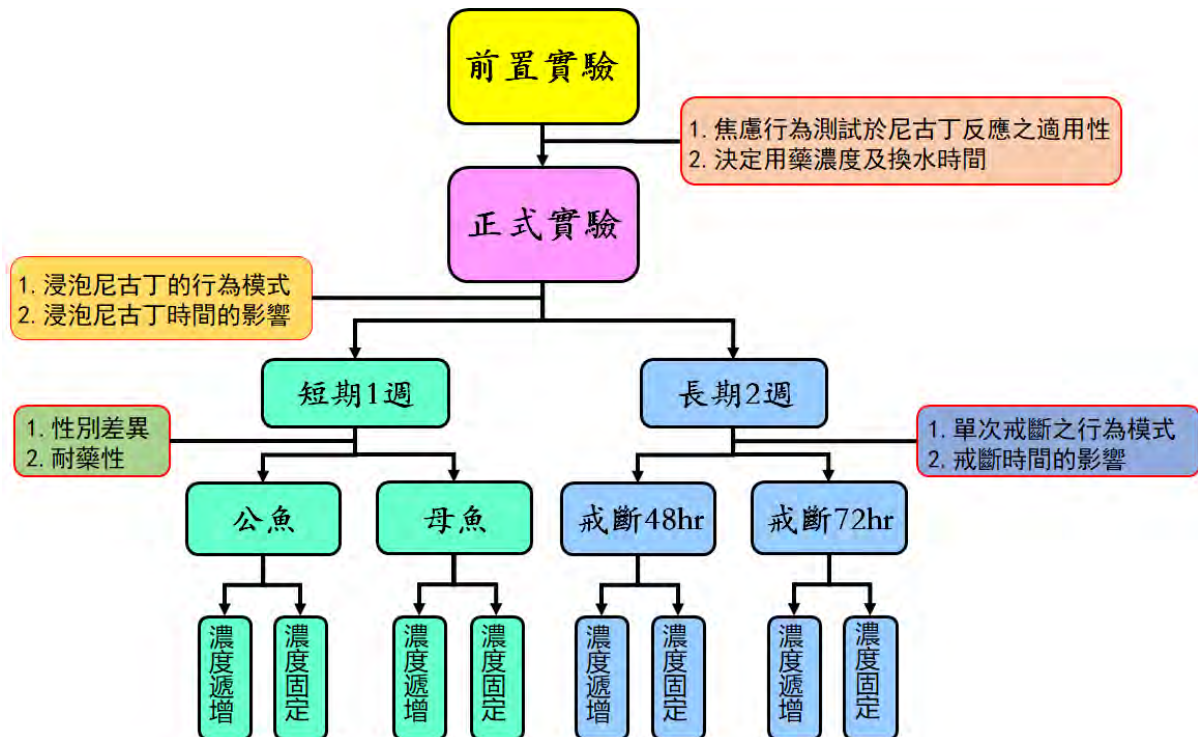
圖三、斑馬魚循環水流飼養系統

五、 其他器材

燒杯	量筒	微量移液器、槍頭	撈網
			
手機	手機用腳架	白色紙板	
			

肆、研究過程與方法

一、 研究流程



二、 尼古丁的使用

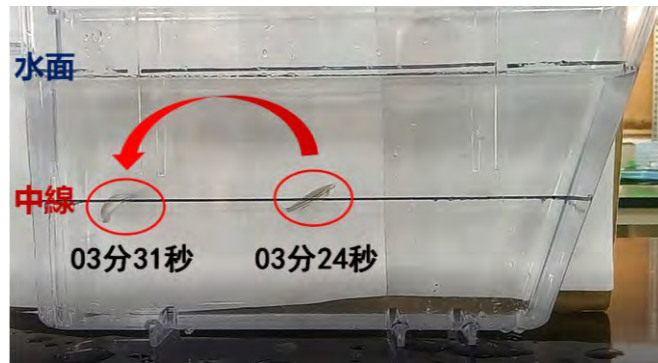
將尼古丁溶液配製成所需濃度後，直接放入 3L 飼養槽中，再將實驗魚置入。實驗過程中，換水及餵食時間均統一，無循環水流。飼養槽均個別加蓋靜置於系統架上，並使用一般魚缸過濾用的白棉，將上蓋的餵食孔塞住，避免實驗過程中因水分蒸發而影響溶液濃度。

三、 Novel Tank Test

用於測試斑馬魚的焦慮程度。進行測試時，將待測斑馬魚置入 Novel Tank 下層，錄影記錄其在 6 分鐘內的行為反應。分析 6 分鐘內，斑馬魚在上層的總時數、首次過線時間、上浮次數及停滯時間。實驗光週期固定為 14 小時開燈，並且只於開燈期間進行測試。若斑馬魚在上層的總時數愈低、首次過線時間愈長、上浮次數愈少及停滯時間愈多，代表斑馬魚有較高的焦慮程度，各項數據定義如下。

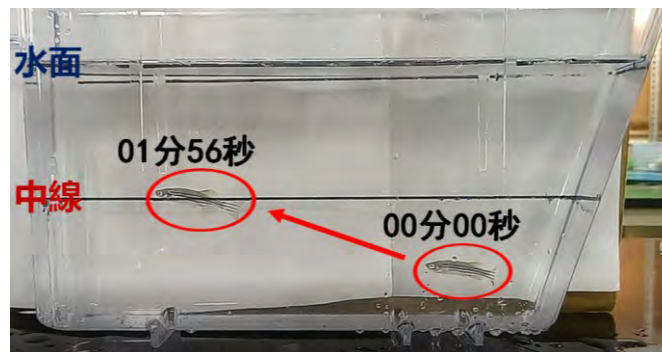
(一)上層總時數(秒)

6 分鐘內，斑馬魚在 Novel Tank 上層停留的總時數，計算方式為個體向上移動並穿越中線的瞬間開始，到個體向下移動穿越中線的瞬間之時間間隔總和。
範例如下圖，本次時間間隔為 7 秒。



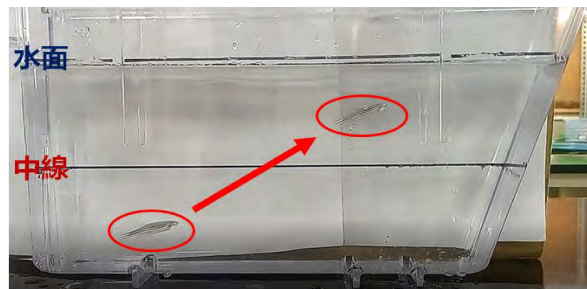
(二)首次過線時間(第 x 秒)

從開始拍攝時間到受試個體第一次通過中線的時間間隔。
範例如下圖，個體首次過線時間為第 116 秒。



(三)上浮次數(次)

個體從下層移動到上層的次數(向上穿越中線次數)。
範例如下圖。



(四)停滯時間(秒)

受試個體停止移動的時間總合，停止移動是指斑馬魚停留在原位超過 2 秒以上。

四、前置實驗

(一)焦慮行為測試的適用性

1. 實驗說明：

短期(3 分鐘)的尼古丁處理，已被發現能使斑馬魚的焦慮行為立即降低，並增強認知學習能力 (Levin et al., 2007)，但戒斷後的行為反應仍不清楚，而許多成癮性藥物的戒斷，已被報導會引發斑馬魚的焦慮行為 (Cachat, 2010)，且 Novel Tank Test 是目前普遍用來測試斑馬魚焦慮行為的方法，因此我們想了解此種行為測試在尼古丁戒斷中的適用性。

2. 實驗步驟：

(1)將斑馬魚分別浸泡於不同濃度的尼古丁溶液 3 分鐘。

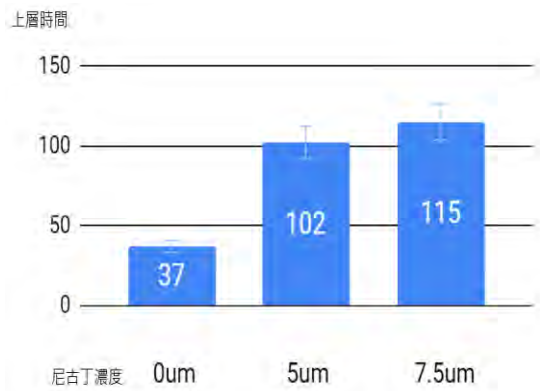
(2)將斑馬魚由尼古丁溶液中取出，並浸泡於清水中 5 分鐘以洗去多餘藥劑。

(3)立即測試組：進行 Novel Tank Test，記錄斑馬魚位於上層的總時數。

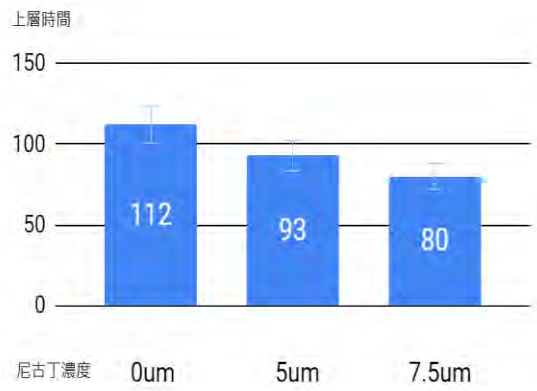
戒斷測試組：分為戒斷 6 小時、10 小時、24 小時及 48 小時組，持續浸泡於清水中，到達對應的戒斷時間後，進行 Novel Tank Test，記錄斑馬魚位於上層的總時數。

3. 實驗結果：

圖四為浸泡不同濃度尼古丁溶液 3 分鐘後，立即進行測試，發現用尼古丁處理的斑馬魚在上層總時數較長，表示較不焦慮，與文獻資料相符。而戒斷 48 小時後(圖五)，則有完全相反的趨勢，且 $7.5 \mu\text{M}$ 處理組比 $5 \mu\text{M}$ 處理組之上層總時數更短，可能代表戒斷後會引發的焦慮行為，且其強度與尼古丁濃度相關，因此我們認為 Novel Tank Test 可以用於尼古丁戒斷反應之測試。戒斷 6hr、10hr、24hr 的組別與對照組($0 \mu\text{M}$)間均無明顯差別或趨勢，表示尼古丁的戒斷反應可能需要 48 小時以後才會出現。



圖四、立即測試組的斑馬魚在上層總時數 (n=3)



圖五、戒斷 48hr 組的斑馬魚在上層總時數 (n=3)

(二)探討斑馬魚對尼古丁的可承受濃度

1. 實驗說明：

由圖四、圖五可知，尼古丁的使用與戒斷均可能引發斑馬魚焦慮程度的改變，然而，各組間在統計上並無顯著差異，因此，我們想提高尼古丁的使用濃度，找到對斑馬魚傷害最小，但又能觀察到組間差異的適合濃度。

2. 實驗步驟：

(1)取數隻斑馬魚分別放入不同濃度的尼古丁溶液中。

(濃度範圍 10~100 μM ，每增加 10 μM 為一個區間)

(2)觀察斑馬魚在尼古丁溶液中的反應，及浸泡 1 天後的行為變化。

3. 實驗結果：

(1) 斑馬魚置入尼古丁溶液中，會出現鰓變紅、游泳速度加快等反應，濃度越高反應越快，且較高濃度時會靠近水面、身體不斷抽搐，甚至數秒後就翻肚不動、接著死亡。

(2) 尼古丁濃度為 30 μM 時，斑馬魚剛開始反應激烈，但約 5~10 分鐘後(會個體差異)便恢復平靜，唯鰓蓋仍發紅，且浸泡一天後仍不會死亡，所以選用此濃度進行後續實驗。

(三)尼古丁溶液維持有效濃度的時間

1. 實驗說明：

頻繁的換水會影響斑馬魚的行為反應，但尼古丁可能於環境中自然氧化分解導致濃度改變，因此我們想知道尼古丁溶液放置幾天後是否仍能維持有效濃度。

2. 實驗步驟：

(1)配製 $30\ \mu\text{M}$ 尼古丁溶液，分別靜置 1、2、3 天。

(2)取數隻斑馬魚，分別放入靜置 1、2、3 天的尼古丁溶液。

(3)觀察其反應，是否有明顯變化。

3. 實驗結果：

與剛配製的尼古丁溶液比較，靜置 3 天後斑馬魚放進去還是會有明顯的反應，但仍無法確定溶液濃度是否已有略微降低，且實驗中無循環水流的情況下，飼養槽中溶氧量可能不足，斑馬魚的殘餌及排泄物會累積，藻類也會開始滋生，所以我們決定在長期浸泡實驗中，統一 2 天換水一次，對照組換清水，實驗組則會換入對應濃度的尼古丁溶液中。

五、正式實驗步驟

(一)長期浸泡尼古丁溶液及進行單次戒斷 48 小時之行為模式

1. 將斑馬魚分成五組，均為公魚：

(1)對照組($0\ \mu\text{M}$) 3 隻

(2)固定濃度單次戒斷組(簡稱固定-戒斷組) 5 隻

(3)固定濃度持續浸泡組(簡稱固定-持續組) 5 隻

(4)遞增濃度單次戒斷組(簡稱遞增-戒斷組) 5 隻

(5)遞增濃度持續浸泡組(簡稱遞增-持續組) 5 隻

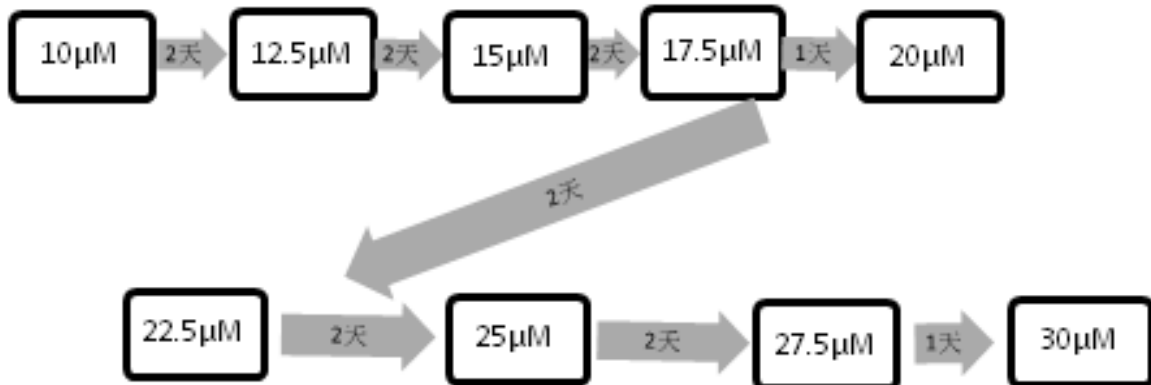
固定濃度為 $30\ \mu\text{M}$ ，遞增濃度如圖六。但直接浸泡 $30\ \mu\text{M}$ 尼古丁溶液，可能會因個體差異而導致斑馬魚死亡，所以固定濃度組均以 $20\ \mu\text{M}$ 為初始濃度，浸泡一天後才換成 $30\ \mu\text{M}$ 。

2. 分別放入對應濃度溶液中浸泡 2 週後，固定-戒斷組、遞增-戒斷組換成清水 ($0\ \mu\text{M}$)，其餘維持對應濃度($30\ \mu\text{M}$)。

3. 48 小時後，進行 Novel Tank Test。

(二)長期浸泡尼古丁溶液及進行單次戒斷 72 小時之行為模式

步驟 1、2 與正式實驗(一)相同，步驟 3：經 72 小時後，進行 Novel Tank Test。



圖六、長期遞增組浸泡濃度變化圖

(三)短期浸泡尼古丁溶液及進行單次戒斷 72hr 之行為模式

1. 將斑馬魚分成五組：

- (1)對照組(0 μ M) 3 隻
- (2)固定-戒斷組-公魚 5 隻，母魚 5 隻
- (3)固定-持續組-公魚 5 隻，母魚 5 隻
- (4)遞增-戒斷組-公魚 5 隻，母魚 5 隻
- (5)遞增-持續組-公魚 5 隻，母魚 5 隻

固定濃度為 30 μ M，遞增濃度如圖七。但直接浸泡 30 μ M 尼古丁溶液，可能會因個體差異而導致斑馬魚死亡，所以固定濃度組均以 20 μ M 為初始濃度，浸泡一天後才換成 30 μ M。

2. 分別放入對應濃度溶液中浸泡 1 週後，固定-戒斷組、遞增-戒斷組換成清水 (0 μ M)，其餘維持對應濃度。

3. 72 小時後，進行 Novel Tank Test。



圖七、短期遞增組浸泡濃度變化圖

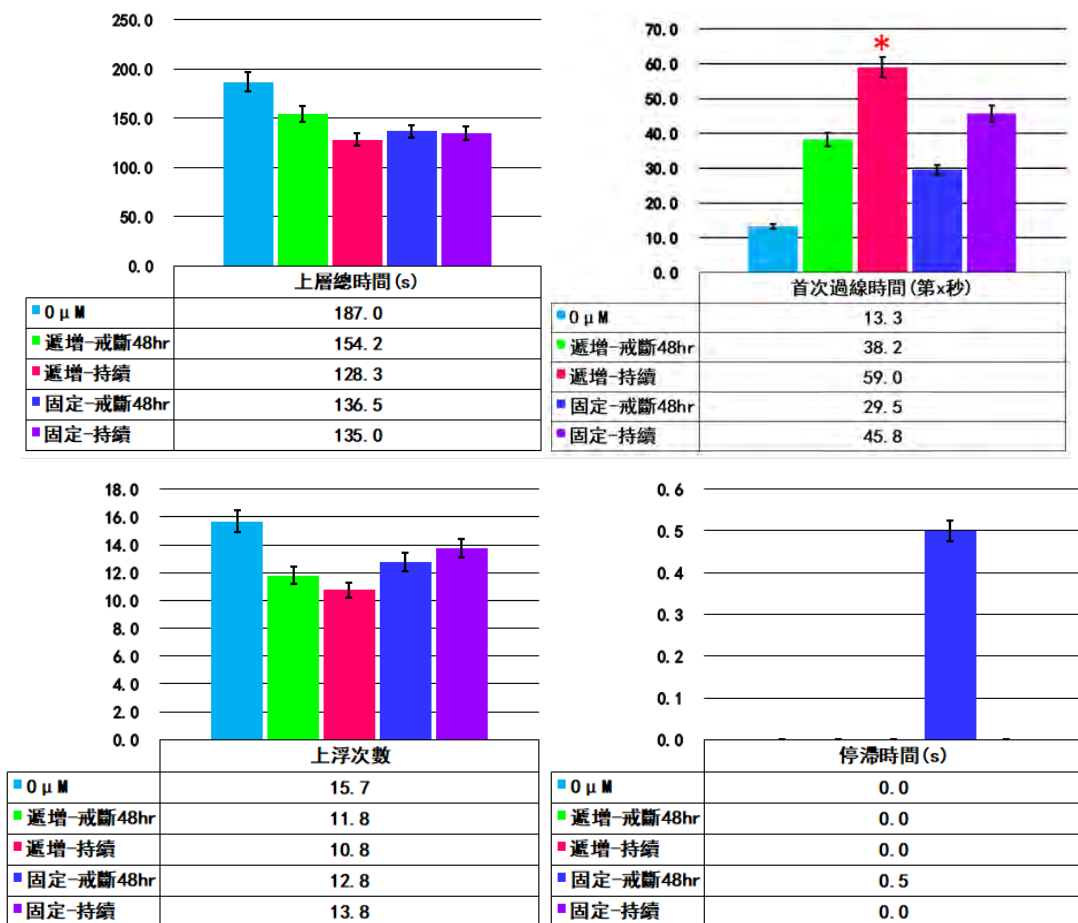
伍、研究結果

一、長期浸泡尼古丁溶液及進行單次戒斷 48 小時之行為模式

(一)實驗結果如圖八。

(二)說明：

1. 有浸泡尼古丁的各組斑馬魚，在上層的總時間皆低於 $0 \mu\text{M}$ 組，但無顯著差異。
2. 首次過線時間，遞增-持續組與固定-持續組之平均值均較高，但個體差異也較大，只有遞增-戒斷組與 $0 \mu\text{M}$ 組之間有顯著差異($p < 0.05$)。
3. 上浮次數各組皆低於 $0 \mu\text{M}$ 組，而遞增組皆低於固定組。
4. 停滯時間只有固定-戒斷組出現，但時間極短。



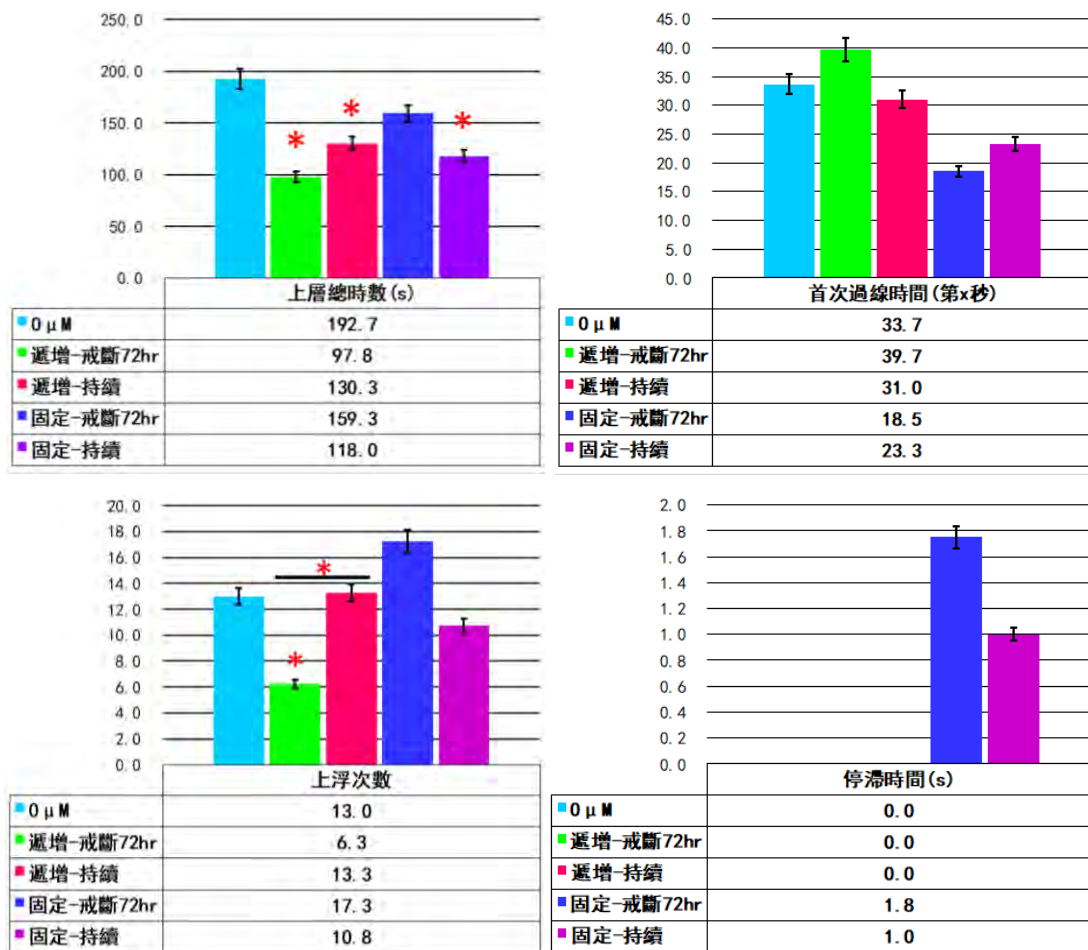
圖八、長期浸泡尼古丁溶液及進行單次戒斷 48 小時(* $P < 0.05$)

二、長期浸泡尼古丁溶液及進行單次戒斷 72 小時之行為模式

(一)實驗結果如圖九。

(二)說明：

- 1.有浸泡尼古丁的各組斑馬魚，在上層的總時間皆低於 $0\mu\text{M}$ 組，且除固定-戒斷組之外，均有顯著差異。
- 2.首次過線時間只有遞增-戒斷組較長，但均無顯著差異。
- 3.遞增-戒斷組的上浮次數顯著低於 $0\mu\text{M}$ 組與遞增-持續組。
- 4.只有固定濃度的兩組有停滯，但個體差異大。



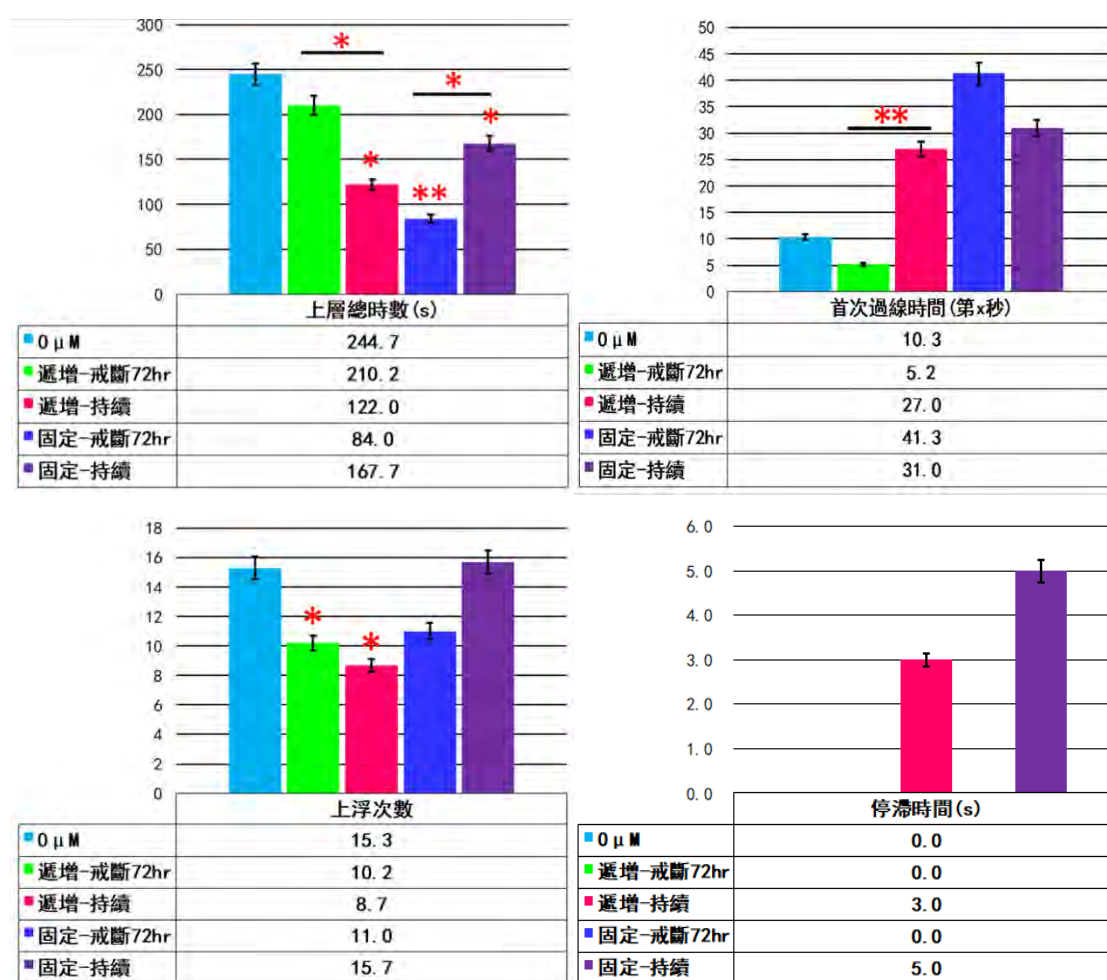
圖九、長期浸泡尼古丁溶液及進行單次戒斷 72 小時(* $P < 0.05$)

三、短期浸泡尼古丁溶液及進行單次戒斷 72 小時之公魚行為模式

(一)實驗結果如圖十。

(二)說明：

1. 所有浸泡尼古丁的組別上層時間都低於 $0 \mu\text{M}$ 組，且遞增-戒斷組與遞增-持續組之間有顯著差異，固定-戒斷組與固定-持續組間亦有顯著差異。
2. 除遞增-戒斷 72 小時首次過線時間低於 $0 \mu\text{M}$ 組，其他浸泡尼古丁的組別首次過線時間皆高於 $0 \mu\text{M}$ 組，且遞增-戒斷組與遞增-持續組之間有顯著差異。
3. 只有固定濃度-持續的上浮次數略大於 $0 \mu\text{M}$ 組，遞增-戒斷組與遞增-持續組則顯著低於 $0 \mu\text{M}$ 組。
4. 只有遞增-持續與固定濃度-持續有停滯時間。



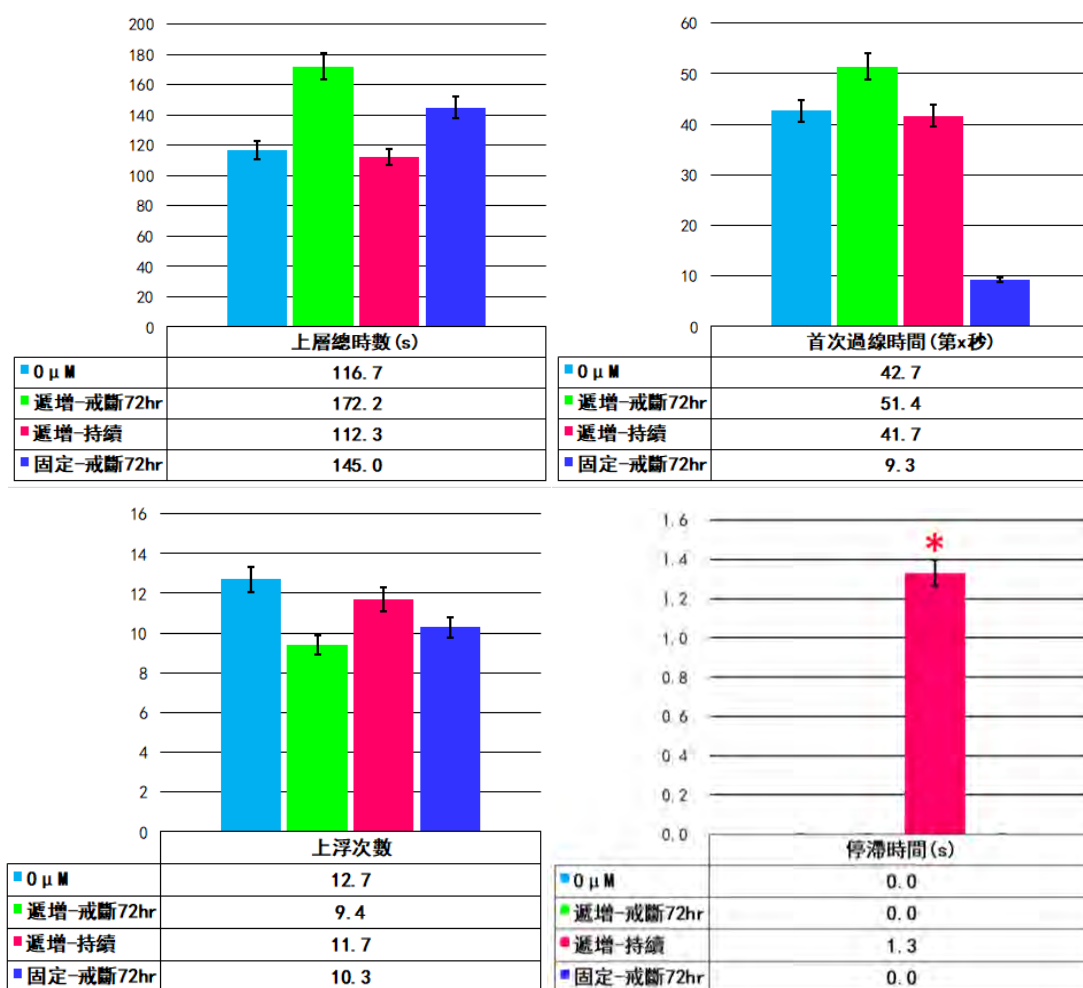
圖十、短期浸泡尼古丁溶液及進行單次戒斷 72hr 公魚(* $P<0.05$; ** $P<0.01$)

四、短期浸泡尼古丁溶液及進行單次戒斷 72 小時之母魚行為模式

(一)實驗結果如圖十一。

(二)說明：

1. 固定濃度-持續組之母魚只有 1 隻存活，所以不列入討論。
2. 上層總時數戒斷組別均較高，但各組無顯著差異。
3. 首次過線時間只有固定-戒斷組特別低，但各組無顯著差異。
4. 上浮次數各組間均無顯著差異。
5. 只有遞增-持續有停滯時間，且該組之母魚均有出現停滯現象，其他組別皆無。



圖十一、短期浸泡尼古丁溶液及進行單次戒斷 72hr 母魚(*P<0.05)

陸、討論

一、 浸泡於尼古丁溶液中的斑馬魚之焦慮反應

持續浸泡於尼古丁溶液中的斑馬魚，與浸泡清水的組別相比，公魚普遍出現上層總時數較短、上浮次數少及首次過線時間長等行為，顯示有焦慮反應；而母魚和對照組則無顯著差異，且母魚在實驗期間死亡數量較多，性別差異明顯！

二、 浸泡於尼古丁中的斑馬魚，進行單次戒斷後之焦慮反應

(一)浸泡二週後單次戒斷 48hr(圖八)：

只有遞增-戒斷組的首次過線時間較長，其餘均無顯著差異，推測其原因應為在 $30\ \mu\text{M}$ 的濃度與二週的浸泡時間下，斑馬魚體內的尼古丁或其代謝產物無法在 48 小時內完全分解或排出體外，需要更長的時間才會產生戒斷反應。

(二)浸泡二週後單次戒斷 72hr(圖九)：

遞增-戒斷組的上層總時數與上浮次數均顯著低於 $0\ \mu\text{M}$ 組，亦均低於遞增-持續組，且首次過線時間長，顯示有焦慮反應出現。但固定-戒斷組與固定-持續組之間相比，卻發現完全相反的趨勢，固定-持續組的焦慮反應較多，而固定-戒斷組則與 $0\ \mu\text{M}$ 組較接近。

也就是說，尼古丁用量遞增時，戒斷所引發的焦慮反應較明顯，且可以在戒斷 72 小時後觀察到；尼古丁用量固定時，戒斷則沒有太大的影響，我們認為這個現象可能與尼古丁會產生耐藥性有關。

(三)浸泡一週後單次戒斷 72hr，公魚(圖十)：

遞增-戒斷組的上層總時數與上浮次數均低於 $0\ \mu\text{M}$ 組，但均高於遞增-持續組，且首次過線時間明顯較遞增-持續組短。而固定-戒斷組與固定-持續組之間相比，卻發現完全相反的趨勢。

也就是說，在浸泡尼古丁溶液一週後，有用藥的組別，遞增-持續組和固定-戒斷組的焦慮反應較多，這個趨勢和浸泡尼古丁兩週後(圖六)是完全相反的。

(四)浸泡一週及兩週後單次戒斷 72hr 之比較：

浸泡一週和兩週後，我們預測戒斷 72 小時都會產生焦慮行為，而我們看到只有長期的遞增-戒斷組跟短期的固定-戒斷組有產生焦慮行為，所以我們推測長期固定組尚未到達產生焦慮的時間，而短期遞增組尚未成癮。我們曾經在文獻中看到，腦部的尼

古丁受器接觸到尼古丁時，會發生數量改變，用藥時間愈長，尼古丁受器數量會增加，推測一星期時為改變的關鍵時間。關於長期攝取尼古丁及其戒斷反應出現的時間變化，仍需要更多實驗來探討。

(五)浸泡一週後單次戒斷 72hr，母魚(圖十一)：

母魚戒斷組的焦慮反應較不明顯，但與公魚相比，各處理組的表現並無顯著差異。但若從死亡率來看，固定濃度組的母魚，在浸泡 $30 \mu\text{M}$ 尼古丁兩天後便有 6 隻死亡，其餘各組均存活，我們推測當濃度漸增時耐受性也會增加，因此存活的母魚較多，而公魚的耐受性可能較高，但公魚對尼古丁產生的焦慮反應也較明顯。

三、 Novel Tank 用於尼古丁使用及戒斷的反應測試

Novel Tank 測試已被廣泛用於測試斑馬魚的焦慮程度(Kysil et al., 2017)，此測試可以利用錄影分析，減少當場計算的實驗誤差，且可同時分析多種行為表現。本次選用的觀察目標為斑馬魚在上層的總時數、首次過線時間、上浮次數及停滯時間，在我們的實驗中發現，上層的總時數在不同處理組之間有最多的差異性，最適合用來判斷尼古丁的使用或戒斷所引發之焦慮程度，但個體差異大，若搭配其他觀察目標綜合討論則會更準確，例如停滯時間雖有極大的個體差異，但出現停滯的均為有使用尼古丁的組別，仍然有其意義。

我們在觀察的過程中也發現，斑馬魚的游泳速度及激烈轉向等行為在各處理組之間也有差異，若能透過電腦軟體進一步分析，也許可以提高本實驗的準確性。另外，尼古丁的持續使用及戒斷症狀可能有各種不同的行為表現，不只限於焦慮行為，因此，開發新的行為測試方法也是未來可以發展的方向。

四、 未來展望

(一) 此次實驗並未考量斑馬魚在 Novel Tank 測試中泳速的變化，因其統計方式目前

我們無法使用，如要續做此實驗，則此為一項可加入判斷的數據。

(二) 斑馬魚的中樞神經結構與人類相似，可應用於探討尼古丁對神經系統之影響及其作用的分子機制。

(三) 此實驗可以搭配其他藥物，實驗其作為戒菸藥物的可能性。

柒、結論

- 一、 浸泡於尼古丁中的斑馬魚，不論持續浸泡或單次戒斷均普遍出現焦慮反應。
- 二、 持續浸泡與單次戒斷所觀察到的焦慮反應出現時間不同，關於尼古丁使用過程所產生的生理或行為變化仍待進一步探討。
- 三、 持續浸泡固定濃度與浸泡濃度遞增之尼古丁，出現焦慮反應的時機不同，可能與耐藥性的產生有關。
- 四、 公魚和母魚在浸泡尼古丁後的死亡率與行為反應均有差異，顯示藥物對斑馬魚的影響可能有性別差異。
- 五、 Noval tank 測試可應用於斑馬魚在尼古丁之用藥及戒斷後所產生的焦慮行為，其中，在上層總時數為較佳的觀察指標，但仍要綜合各項觀察指標才能有較精確的分析。
- 六、 根據以上實驗，我們觀察到尼古丁之用藥及戒斷，會使斑馬魚產生焦慮行為。所以我們認為斑馬魚可做為尼古丁實驗之模式生物。

捌、參考資料

1. 蔡旻臻 等。2005。酒精和尼古丁對斑馬魚胚胎發育的影響。中華民國第四十五屆中小學科學展覽會作品說明書。
2. 尼古丁 (2019 年 4 月 7 日) 維基百科 · 取自 <https://zh.wikipedia.org/zh-tw/尼古丁>
3. Benowitz, N. L. (2010). Nicotine Addiction. *N Engl J Med*.362(24): 2295 - 2303.
4. Cachat j., Canavelloa P., Elegantea M., Bartels B., Hart P., Bergner C., Eganb R., Duncana A., Tiena D., Chunga A., Wonga K., Goodspeeda J., Tana J., Grimes C., Elkhayat S., Suciua C., Rosenberga M., Chunga K. M., Kadri F., Roya S., Gaikwada S., Stewart A., Zapolskya I., Gilder T., Mohnot S., Beesona E., Amri H., Zukowska Z., Soignier R. D., Kalueff A. V. (2010). Modeling withdrawal syndrome in zebrafish. *Behavioural Brain Research*. 208, 371 - 376.
5. Kysil, E. V., Meshalkina, D. A., Frick, E. E., Echevarria, D. J., Rosemberg, D. B., Maximino, C., Lima, M. G., Abreu, M. S., Giacomini, A. C., Barcellos, L. J. G., Song C., and Kalueff A. V. (2017). Comparative Analyses of Zebrafish Anxiety-Like Behavior Using Conflict-Based Novelty Tests. *Zebrafish*. 14, 197 - 210.
6. Levin, E.D., Bencan, Z., and Cerutti, D. T. (2007). Anxiolytic effects of nicotine in zebrafish. *Physiol.Behav.* 90, 54-58.
7. Neal L. Benowitz (2010). Nicotine Addiction.*N Engl J Med*.362(24): 2295 - 2303.
8. Zebrafish Make a Splash in FDA Research (2017, December 18). U.S. Department of Health and Human Services. Retrieved April 7, 2019, from <https://www.fda.gov/ForConsumers/ConsumerUpdates/ucm343940.htm>

【評語】 052009

本實驗測試斑馬魚在浸泡尼古丁溶液一週及兩週後，及戒斷後的行為反應，以錄影並來觀察個體運動情形，加以量化進行數據分析，斑馬魚作為模式生物已有非常多之報導，應詳加比較，尼古丁戒斷後的行為反應在人體亦有研究，也可加以比較來說明斑馬魚在浸泡尼古丁模式研究是否適合日後延伸至人體研究，團體研究之分工精神值得嘉許，惟在實驗結果之表達整理及實驗記錄本記載可以再加強。

摘要

研究發現尼古丁具高成癮性及產生戒斷症狀，為了觀察除了人類以外的生物是否也有類似的現象，我們採用適合作為藥物測試的生物——斑馬魚作為實驗對象，測試斑馬魚在浸泡尼古丁溶液一週及兩週後的行為反應，以及戒斷後的行為反應。並藉由錄影並觀察個體運動情形，加以量化並進行數據分析。結果顯示：經過處理的個體上層總時間明顯低於對照組，顯示其對尼古丁的確有戒斷反應，從其他數據的趨勢亦可看出其差異。將實驗的時間與濃度提升或許差異會更明顯，但斑馬魚對尼古丁之耐受性也有極限。實驗中亦觀察到公魚對尼古丁的耐受性較母魚高，藥物反應也比母魚明顯，性別差異頗大。

壹、研究動機

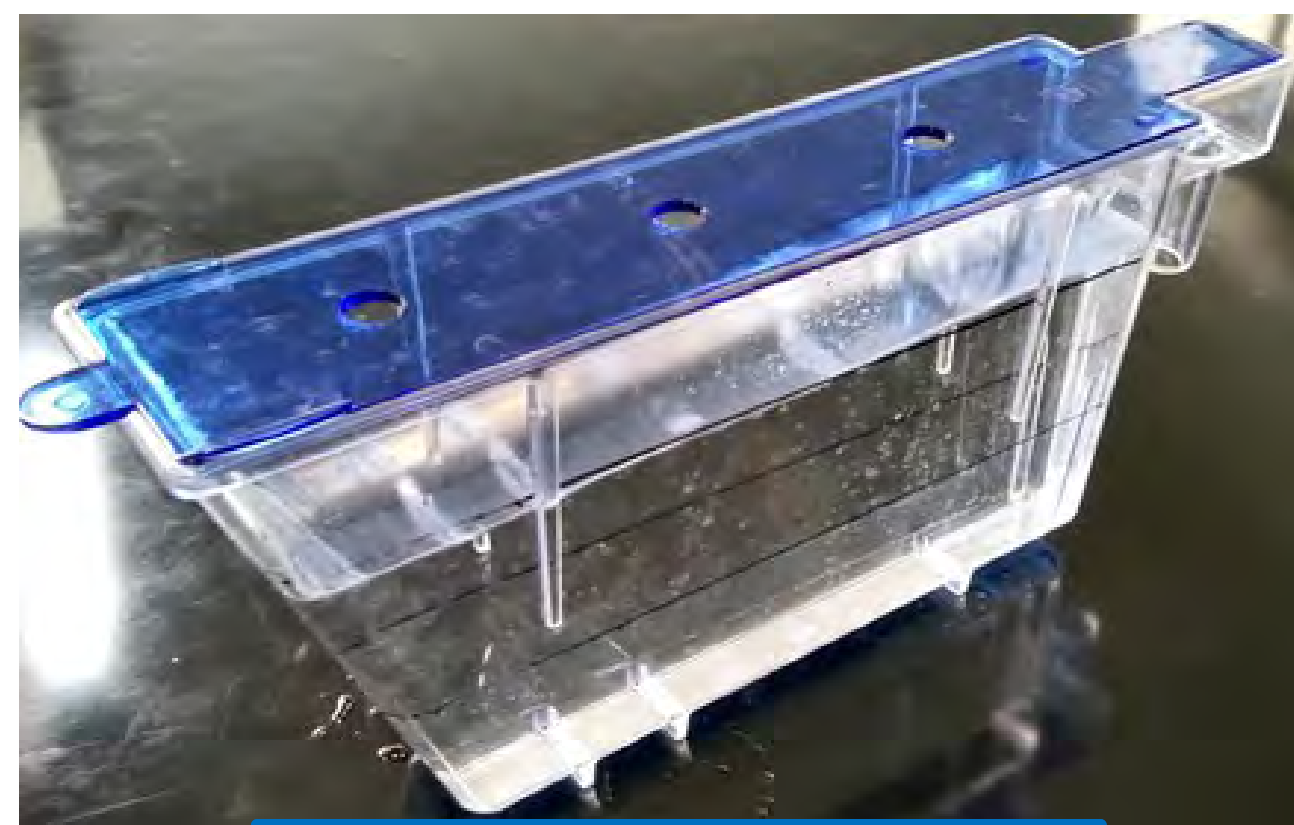
在一次高雄醫學大學生物科技系參訪中，我們了解到斑馬魚作為脊椎動物篩藥平台的潛能，斑馬魚與人類和哺乳類模型在毒理和藥理測試方面有許多相似的生理結構與機轉，並且展現出類似於哺乳動物睡眠行為的晝夜規律，美國FDA於2013年證實：斑馬魚適合當作藥物測試、環境污染物測試的實驗對象。且斑馬魚具有利於操作及觀察等優點，若能作為替代小鼠的模式生物，也許能使科學進展更快速。在生活中，許多人都有酒癮或菸癮，研究也已發現酒精與尼古丁對斑馬魚胚胎發育的影響(蔡旻臻等, 2005)，我們遇到的吸菸者，許多人戒菸困難，總是反覆吸菸，究竟菸癮戒斷的過程中會有哪些身體或精神上的不適，導致難以戒除呢？也許我們可以在斑馬魚上找到解答，甚至開發新藥物來緩解這些戒斷症狀，使戒菸更容易、更輕鬆。

貳、研究目的

- 一、探討浸泡於尼古丁溶液中的斑馬魚之行為模式
- 二、探討浸泡於尼古丁中的斑馬魚，進行單次戒斷後之行為模式
- 三、探討浸泡於尼古丁中的斑馬魚是否出現耐藥性
- 四、探討尼古丁對斑馬魚行為之影響是否有性別差異

參、研究設備與器材

- 一、斑馬魚(Danio rerio)：飼養於本校生物實驗室循環水流飼養系統，光照週期14小時日照、10小時黑暗，每日餵食3次。
- 二、尼古丁(nicotine)：是一種強效擬副交感神經生物鹼，具有毒性、成癮性，香菸的主要化學成分，尼古丁能影響腦內的關鍵神經傳遞物——多巴胺，藉由提高其含量，影響獎賞路徑，而產生藥物成癮(Benowitz, 2010)。
- 三、Novel Tank(圖一)
- 四、斑馬魚循環水流飼養系統(圖二)
- 五、錄影器材：手機、手機用腳架、白色紙板



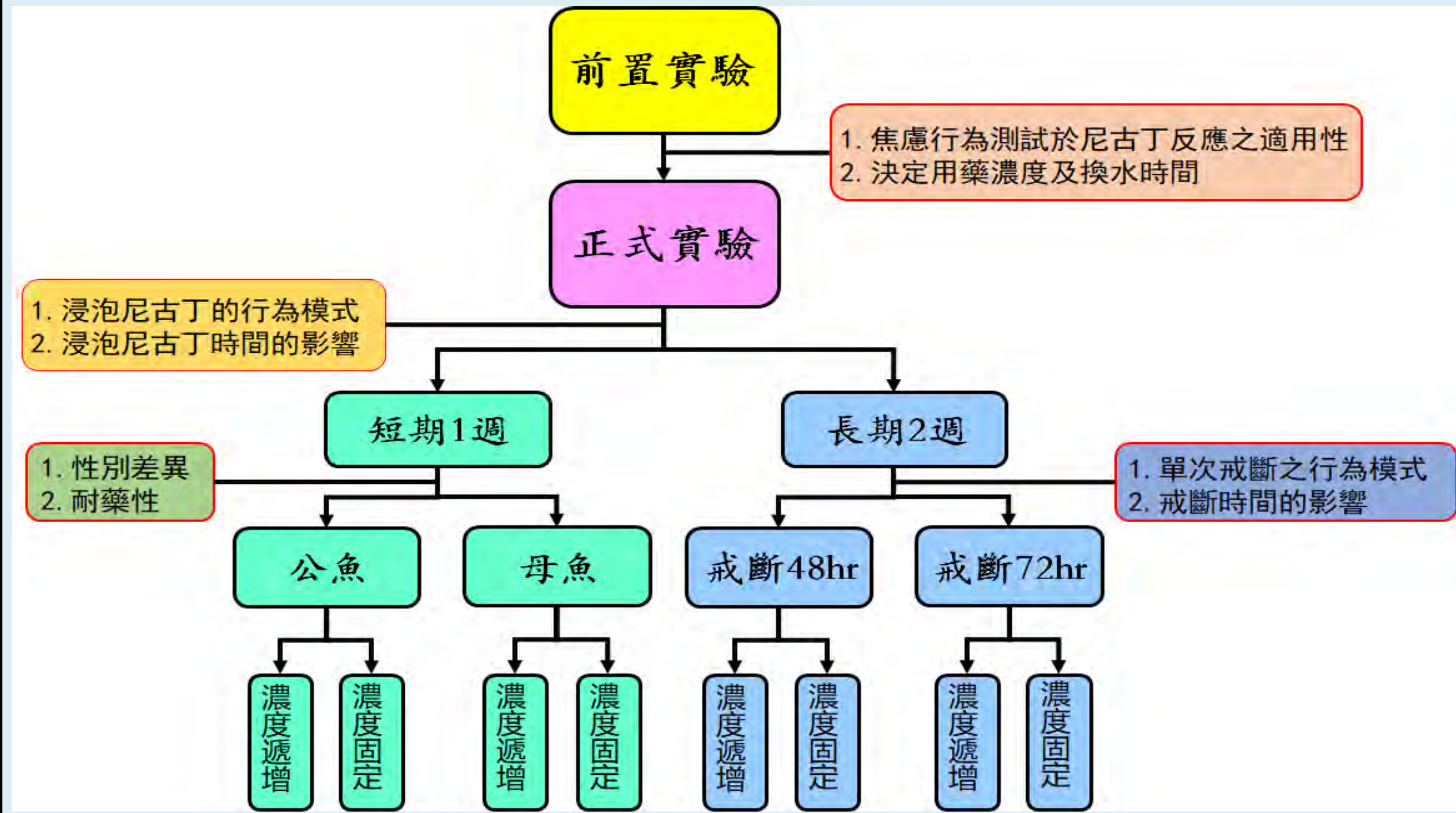
圖一、Novel Tank



圖二、循環水流飼養系統

肆、研究流程與方法

一、研究流程：



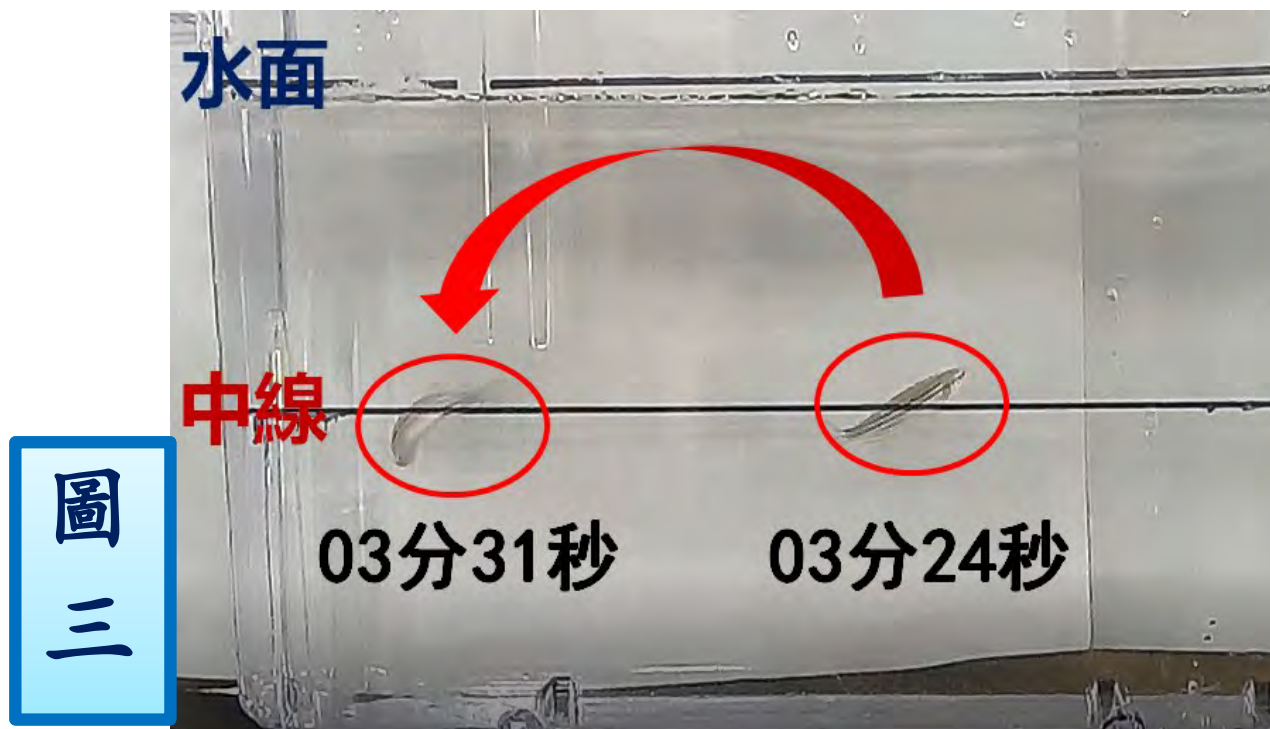
二、Novel Tank Test：

用於測試斑馬魚的焦慮程度，進行測試時，將待測斑馬魚置入Novel Tank下層，錄影記錄其在6分鐘內的行為反應。分析6分鐘內，斑馬魚在上層的總時數、首次過線時間、上浮次數及停滯時間。若斑馬魚在上層的總時數愈低、首次過線時間愈長、上浮次數愈少及停滯時間愈多，代表斑馬魚有較高的焦慮程度。

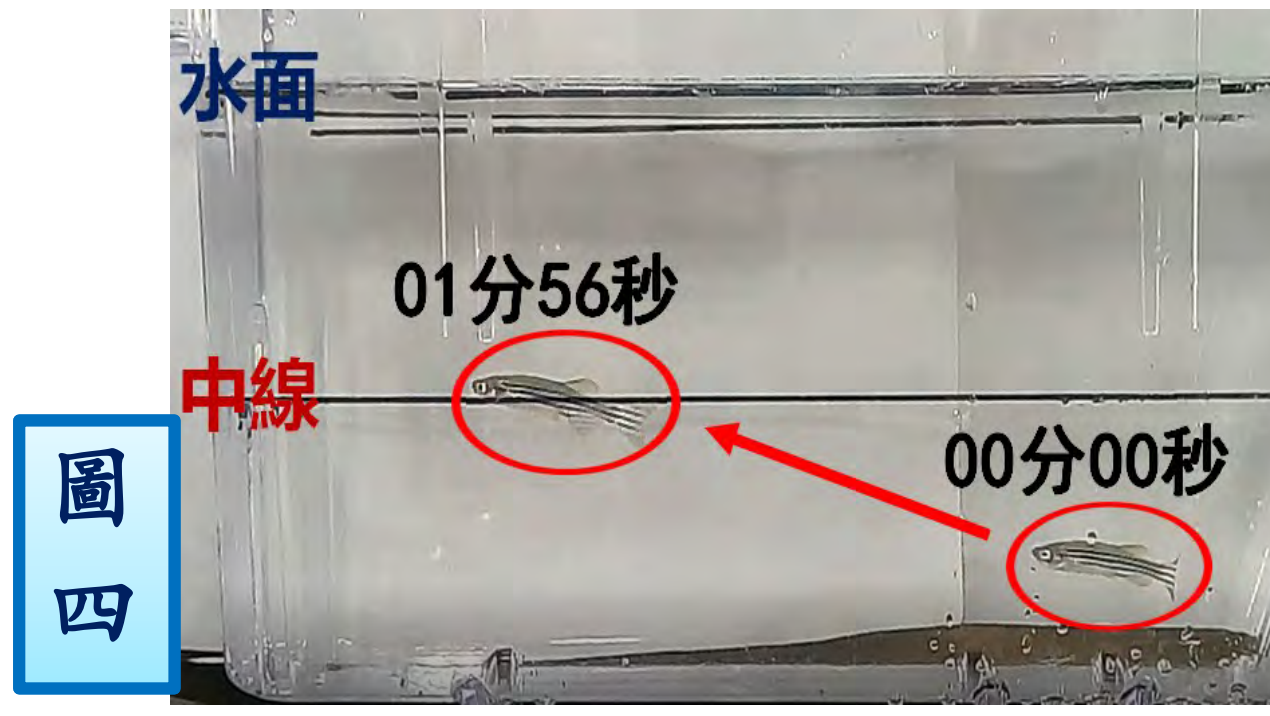
三、各項數據定義：

- (一)上層總時數(秒)：6分鐘內，斑馬魚在上層停留的總時數，計算方式為個體向上移動並穿越中線瞬間開始，到個體向下移動穿越中線瞬間之間時間間隔總和。(範例如圖三、時間間隔為7秒)
- (二)首次過線時間(第x秒)：從開始拍攝時間到受試個體第一次通過中線的時間間隔。(範例如圖四、首次過線時間為第116秒)
- (三)上浮次數(次)：個體從下層移動到上層的次數(向上穿越中線次數)。(範例如圖五)
- (四)停滯時間(秒)：受試個體停止移動的時間總合，停止移動是指斑馬魚停留在原位超過2秒以上。

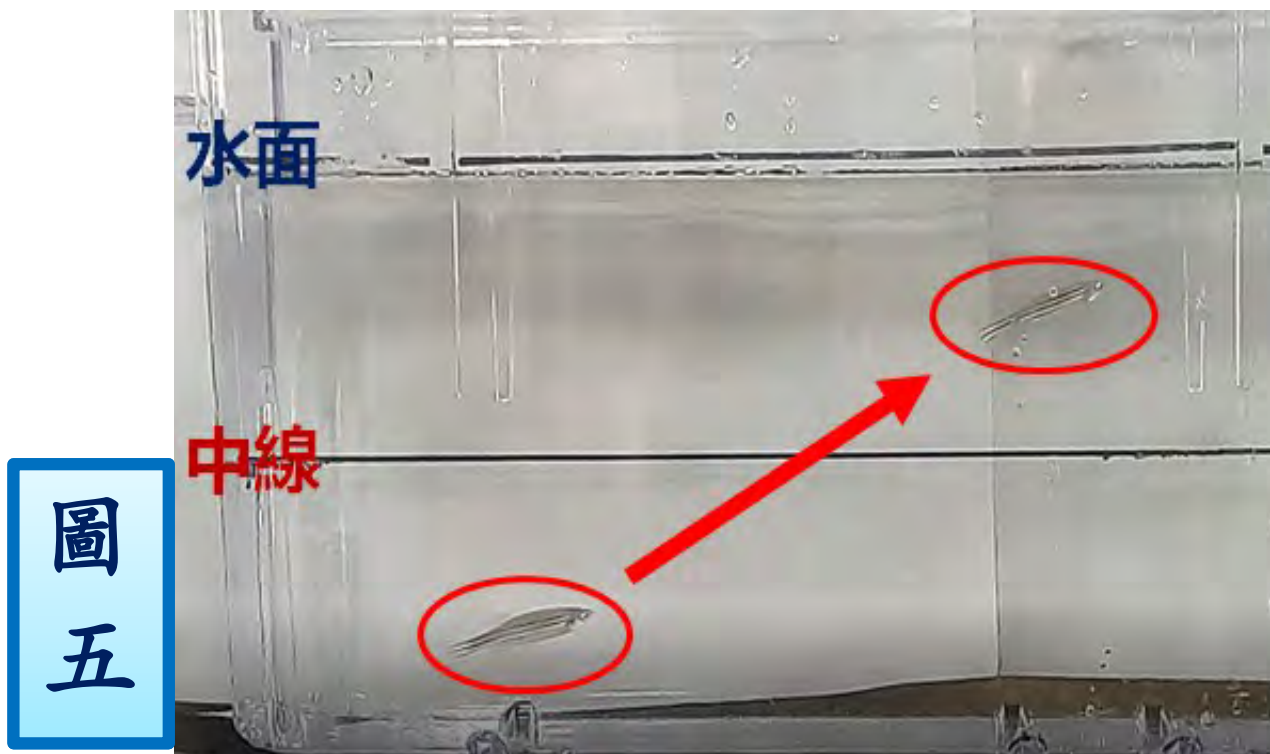
四、遞增組濃度變化流程：長期遞增組尼古丁濃度變化如(圖六) 短期遞增組尼古丁濃度變化如(圖七)



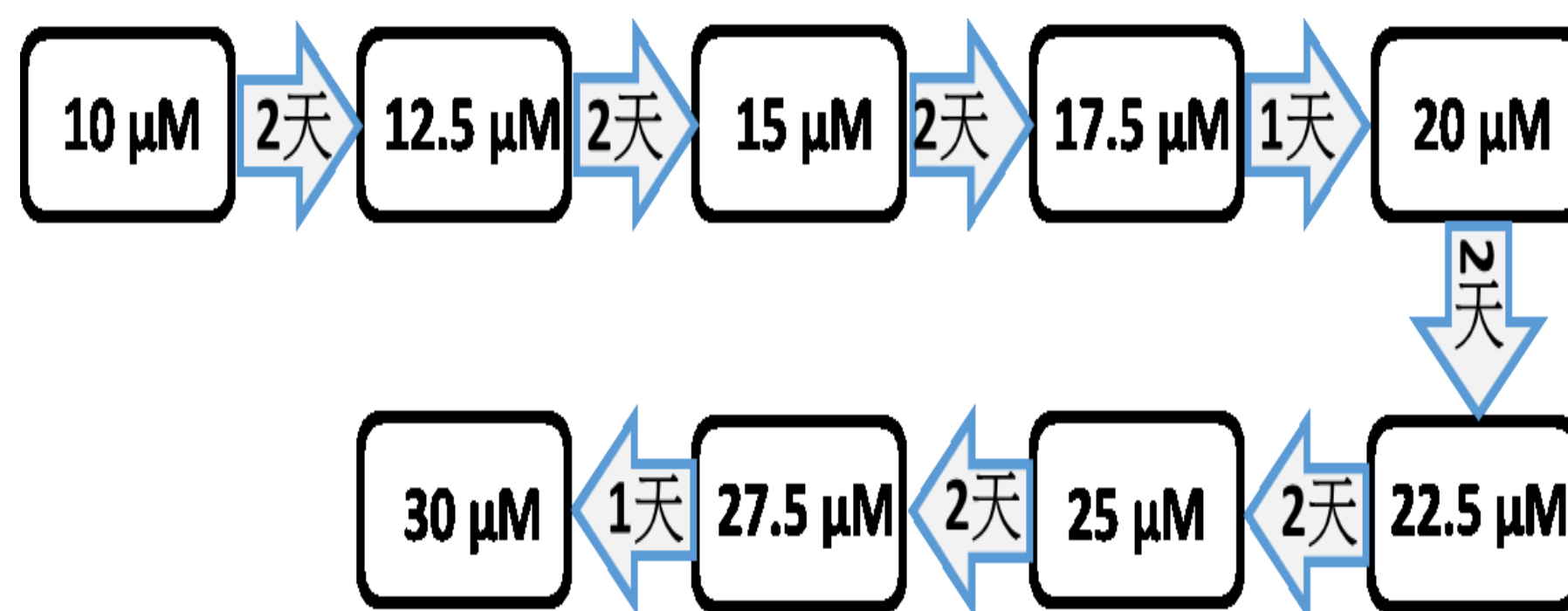
圖三



圖四



圖五



圖六、長期遞增組浸泡濃度變化



圖七、短期遞增組浸泡濃度變化

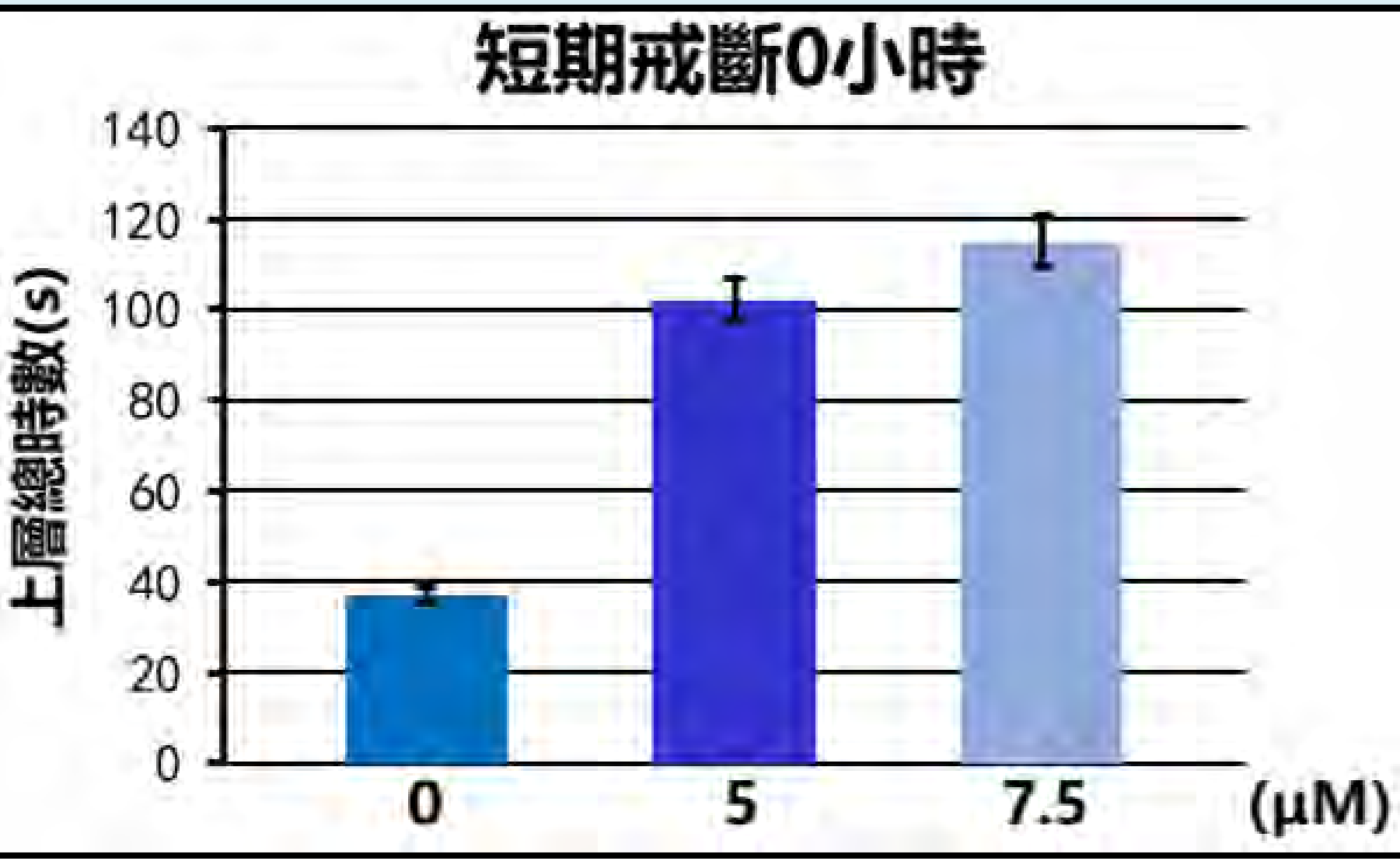
前置實驗：

一、焦慮行為測試的適用性

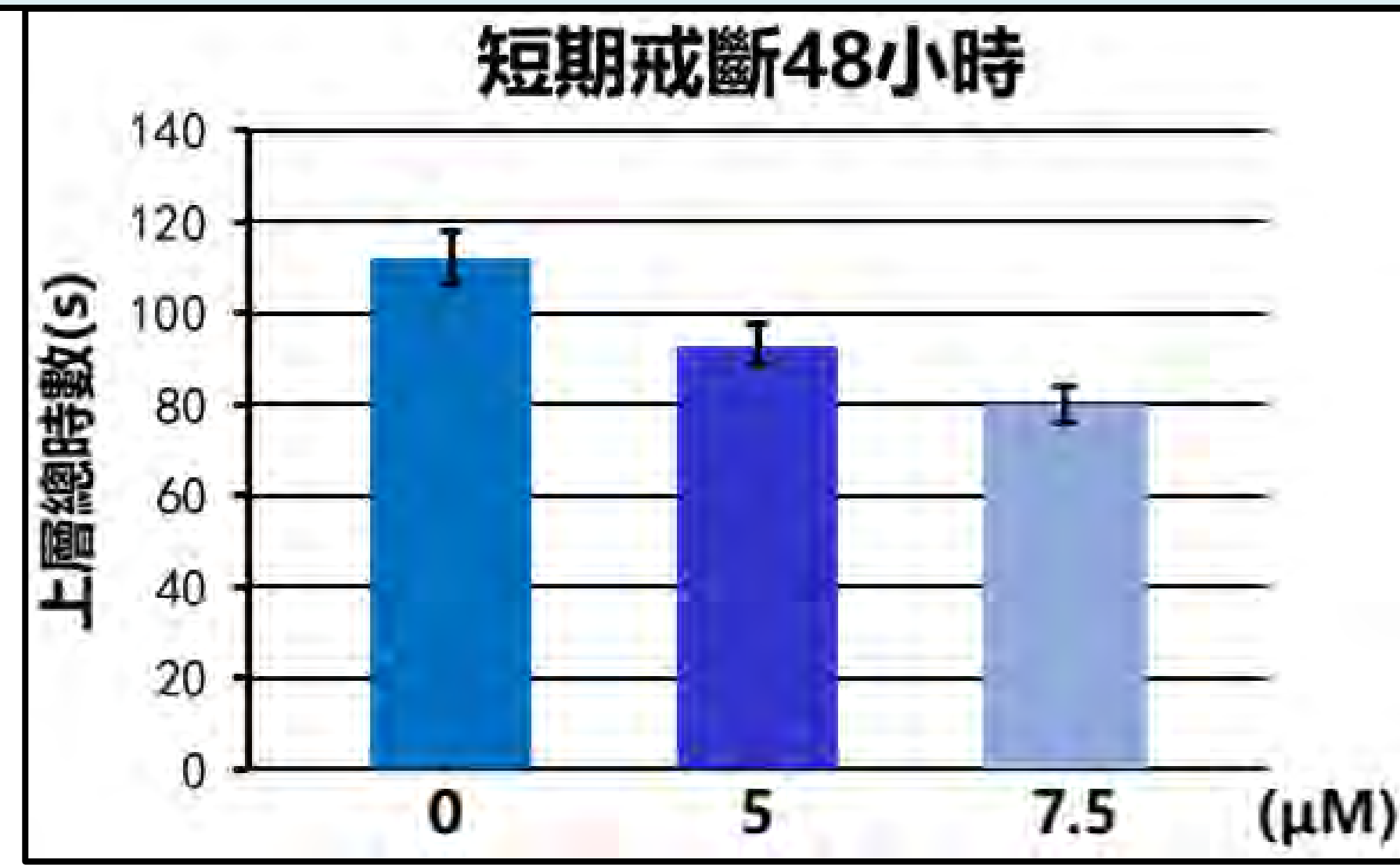
經處理的斑馬魚在上層總時數較長，表示較不焦慮，與文獻資料相符。而戒斷48小時後，則有完全相反的趨勢，且7.5 μM 處理組比5 μM 處理組之上層總時數短，可能代表戒斷後會引發的焦慮行為，且其程度與尼古丁濃度相關。戒斷6 hr、10 hr、24 hr的組別與對照組(0 μM)間均無明顯差別或趨勢，表示尼古丁的戒斷反應可能需要48小時以後才會出現。(圖八、圖九)

二、斑馬魚對尼古丁的可承受濃度

尼古丁濃度為30 μM 時，斑馬魚剛開始反應激烈，但約5~10分鐘後(會有個體差異)便恢復平靜，唯鰓蓋仍發紅，且浸泡一天後仍不會死亡，所以選用此濃度進行後續實驗。



圖八：立即測試組斑馬魚在上層總時數

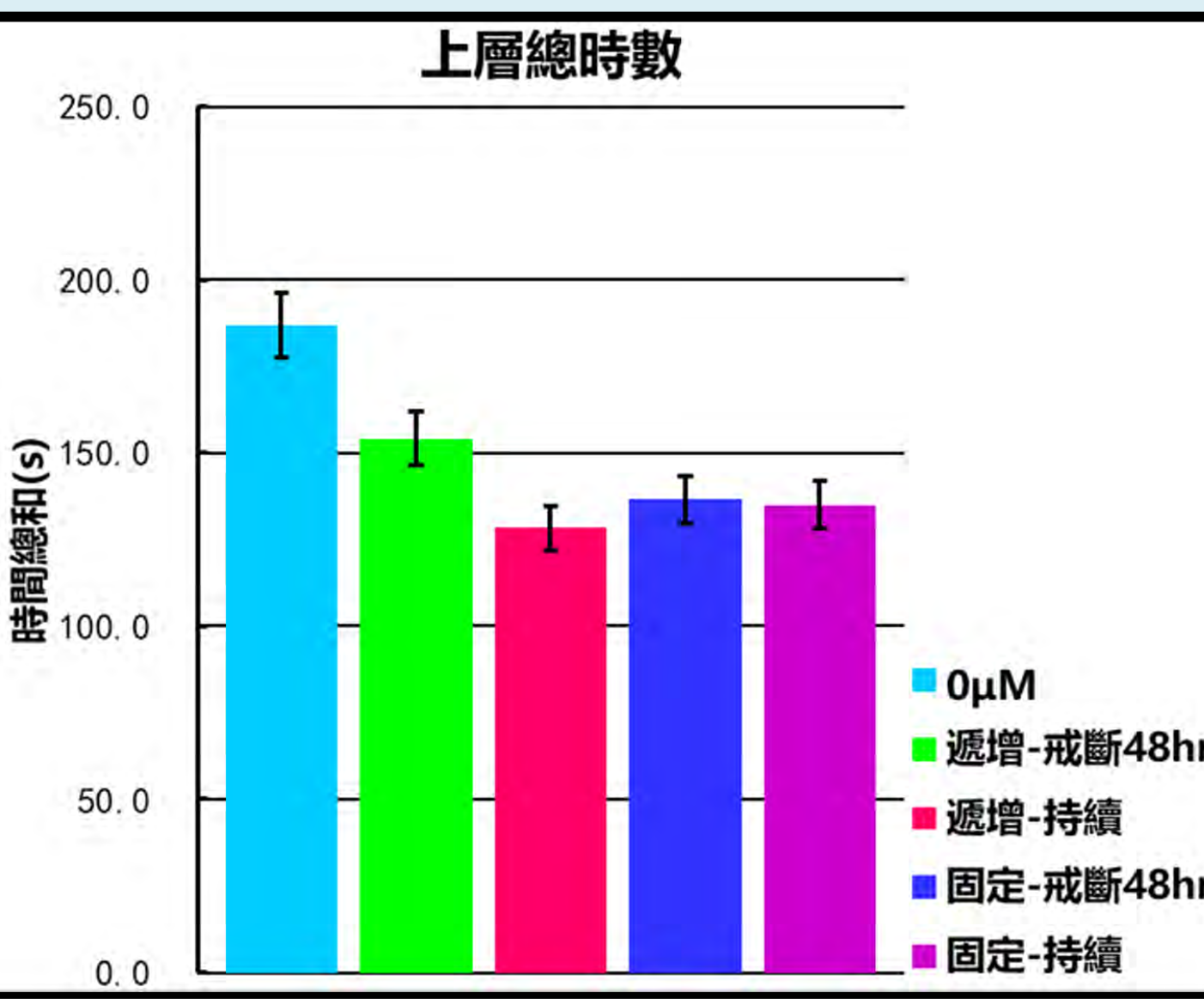


圖九：戒斷48hr組斑馬魚在上層總時數

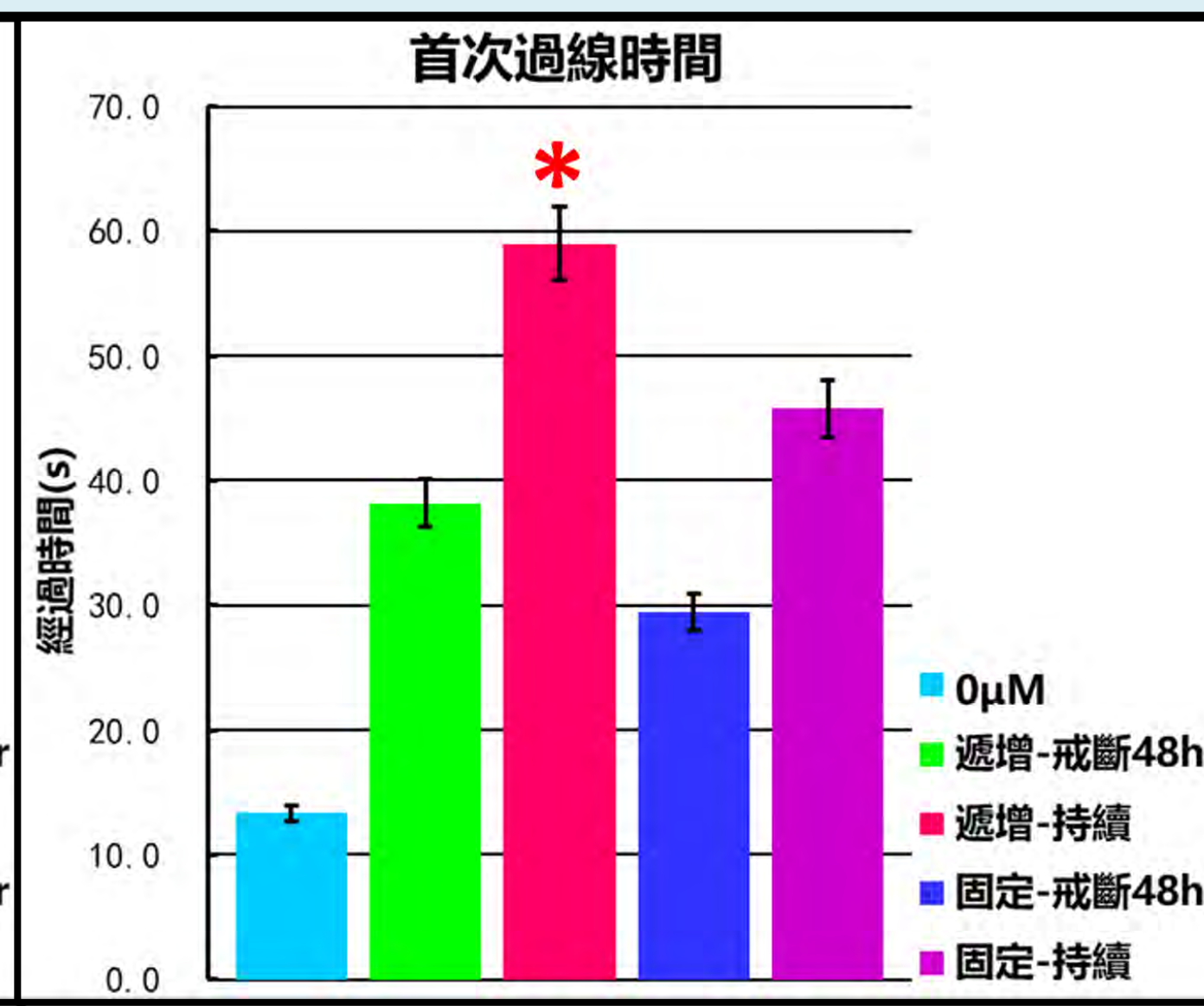
正式實驗(* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$ ，表示與對照組之間有顯著差異，橫線表兩組間有顯著差異)：

一、長期浸泡尼古丁溶液及進行單次戒斷48小時之行為模式(圖十~圖十三)：

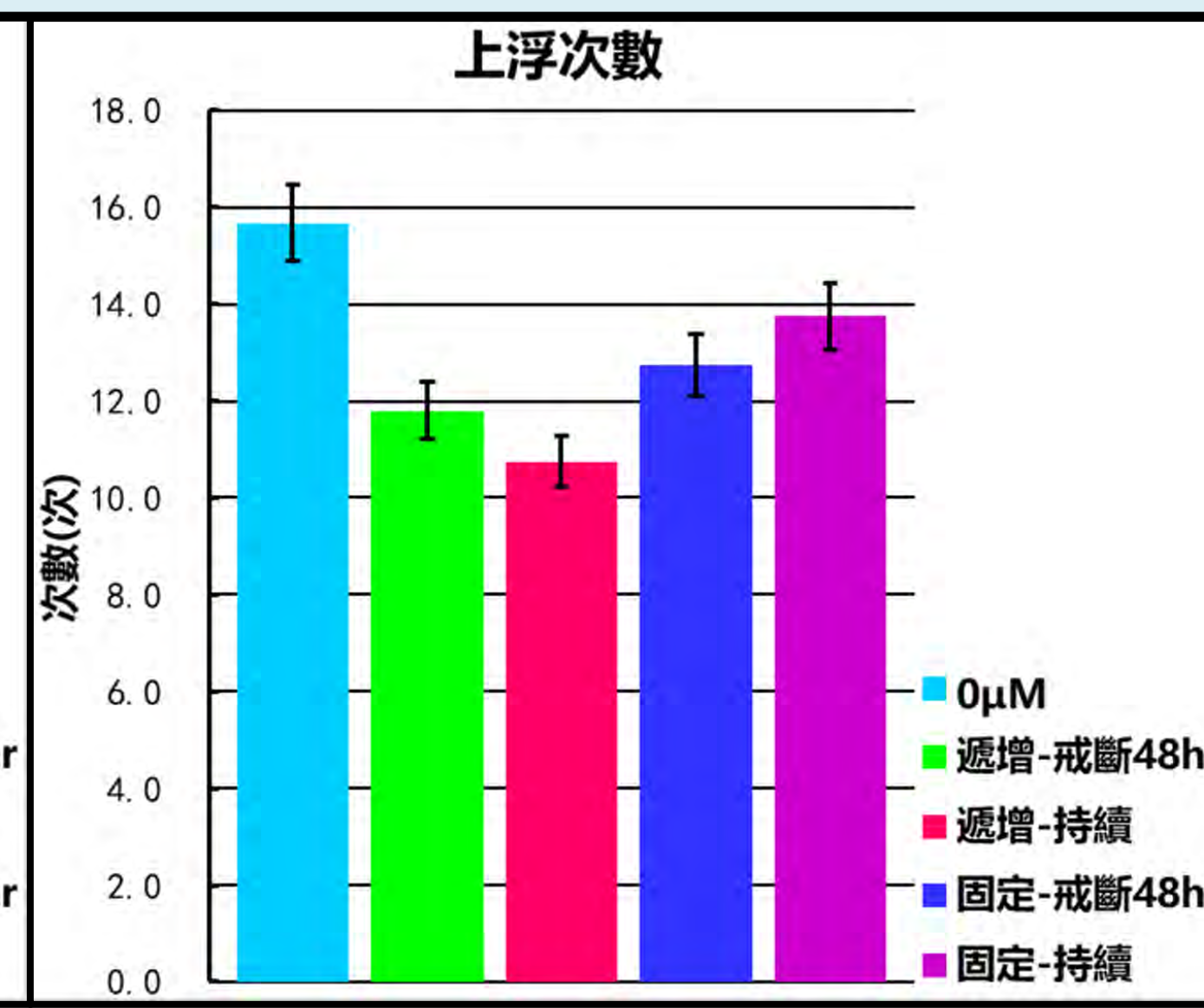
- (一)有浸泡尼古丁的各組斑馬魚，在上層的總時間皆低於0 μM 組，但無顯著差異。
- (二)首次過線時間，遞增-持續組與固定-持續組之平均值均較高，但個體差異也較大，只有遞增-戒斷組與0 μM 組之間有顯著差異。
- (三)上浮次數各組皆低於0 μM 組，而遞增組皆低於固定組。
- (四)停滯時間只有固定-戒斷組出現，但時間極短。



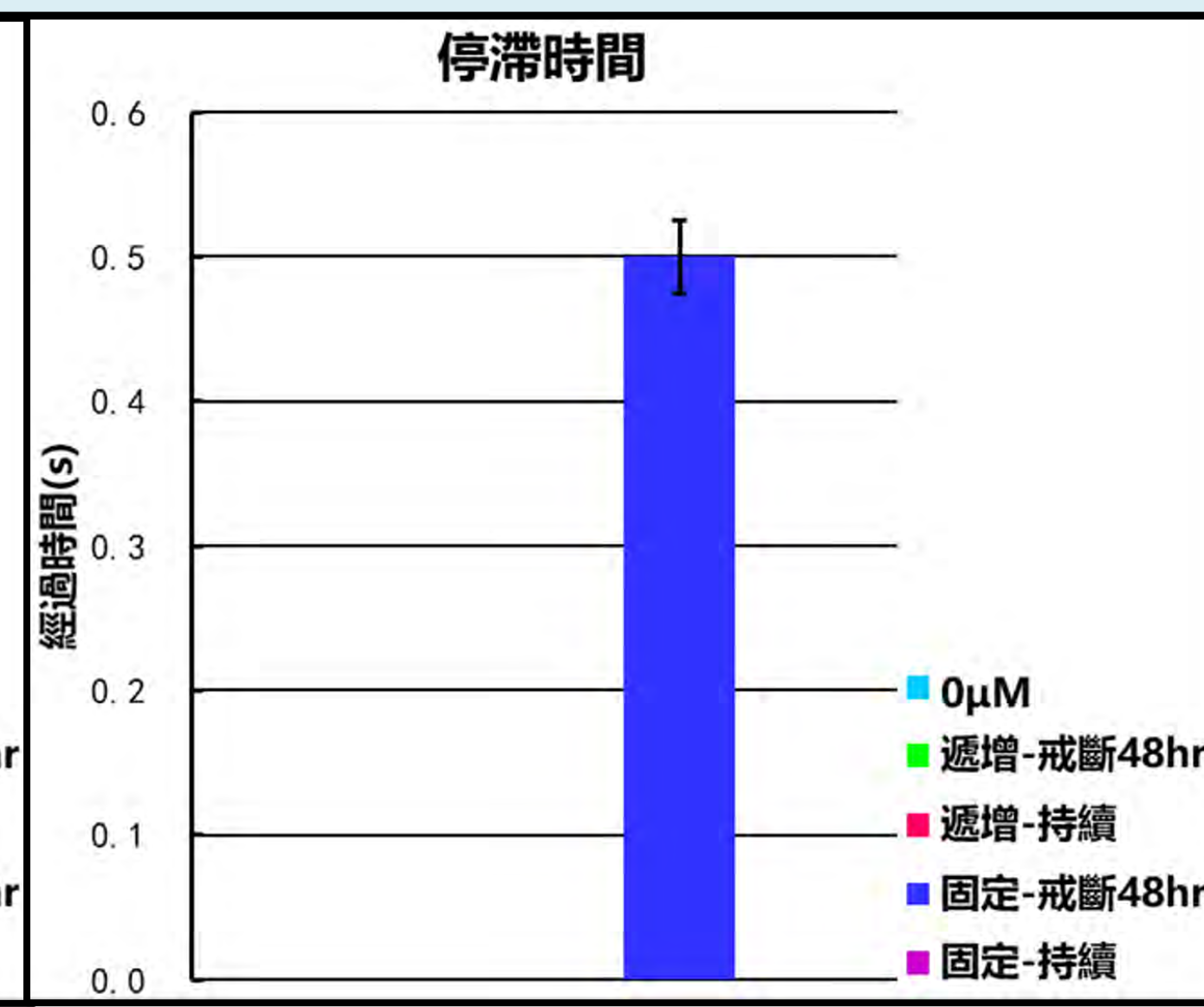
圖十



圖十一



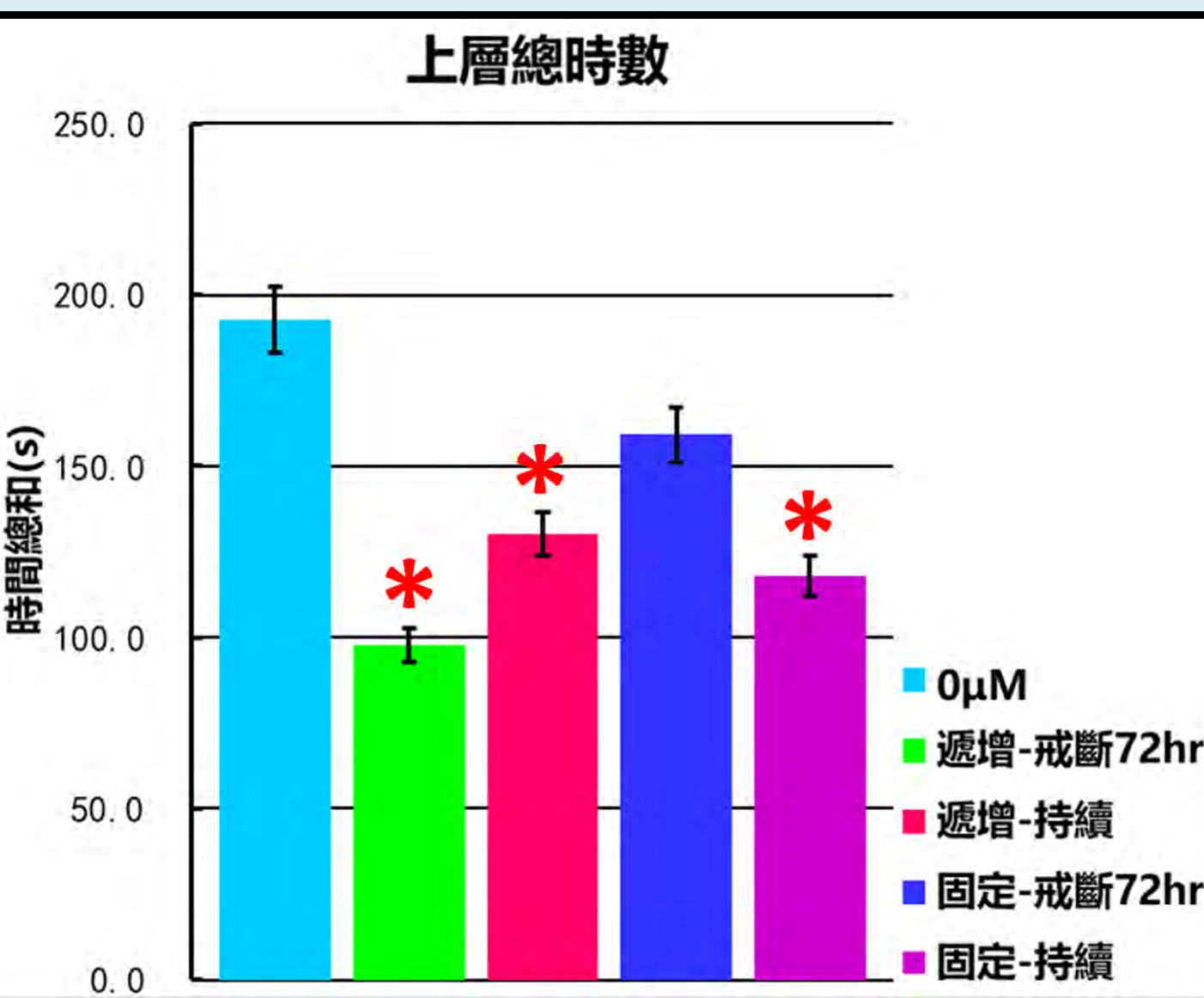
圖十二



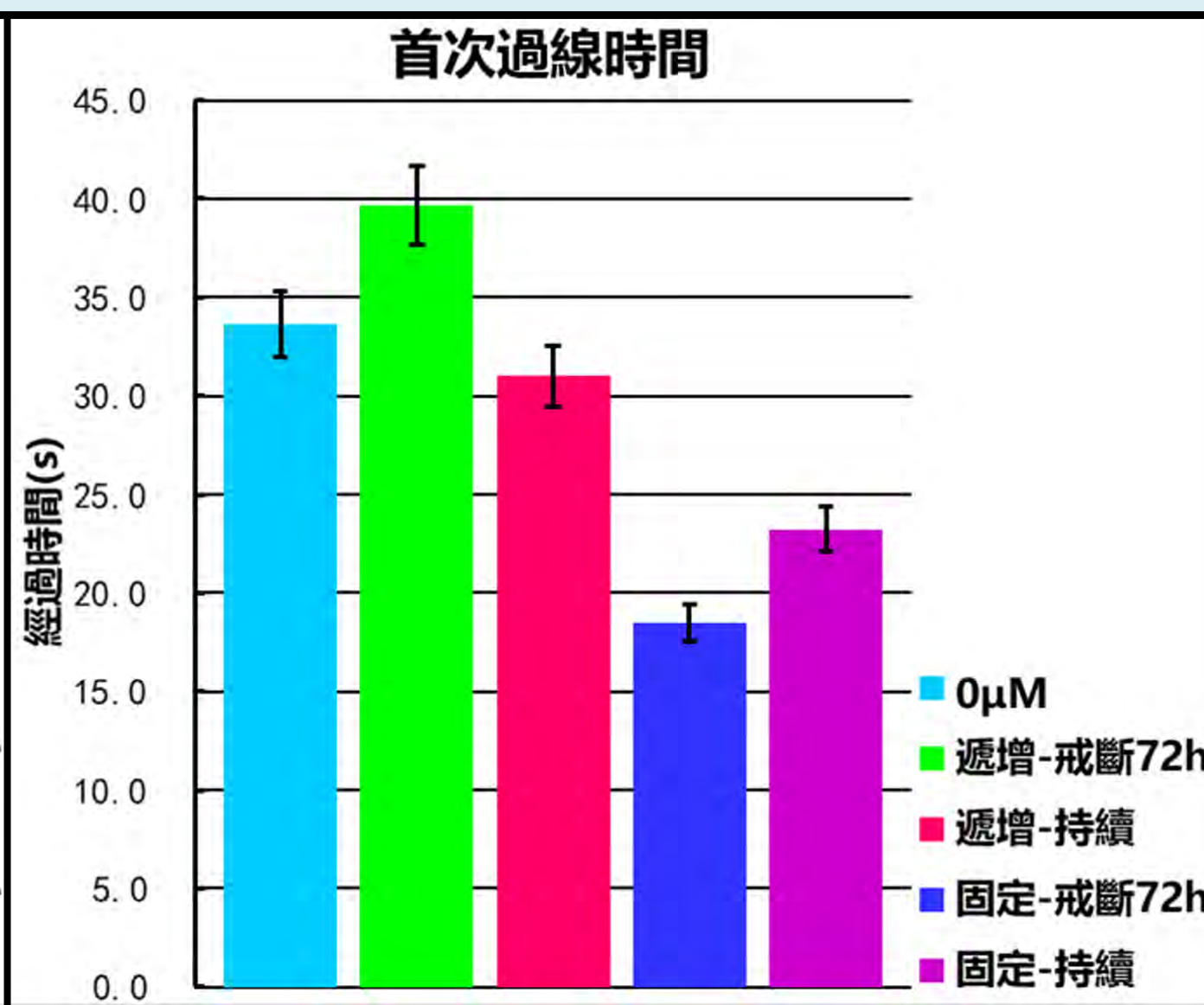
圖十三

二、長期浸泡尼古丁溶液及進行單次戒斷72小時之行為模式(圖十四~圖十七)：

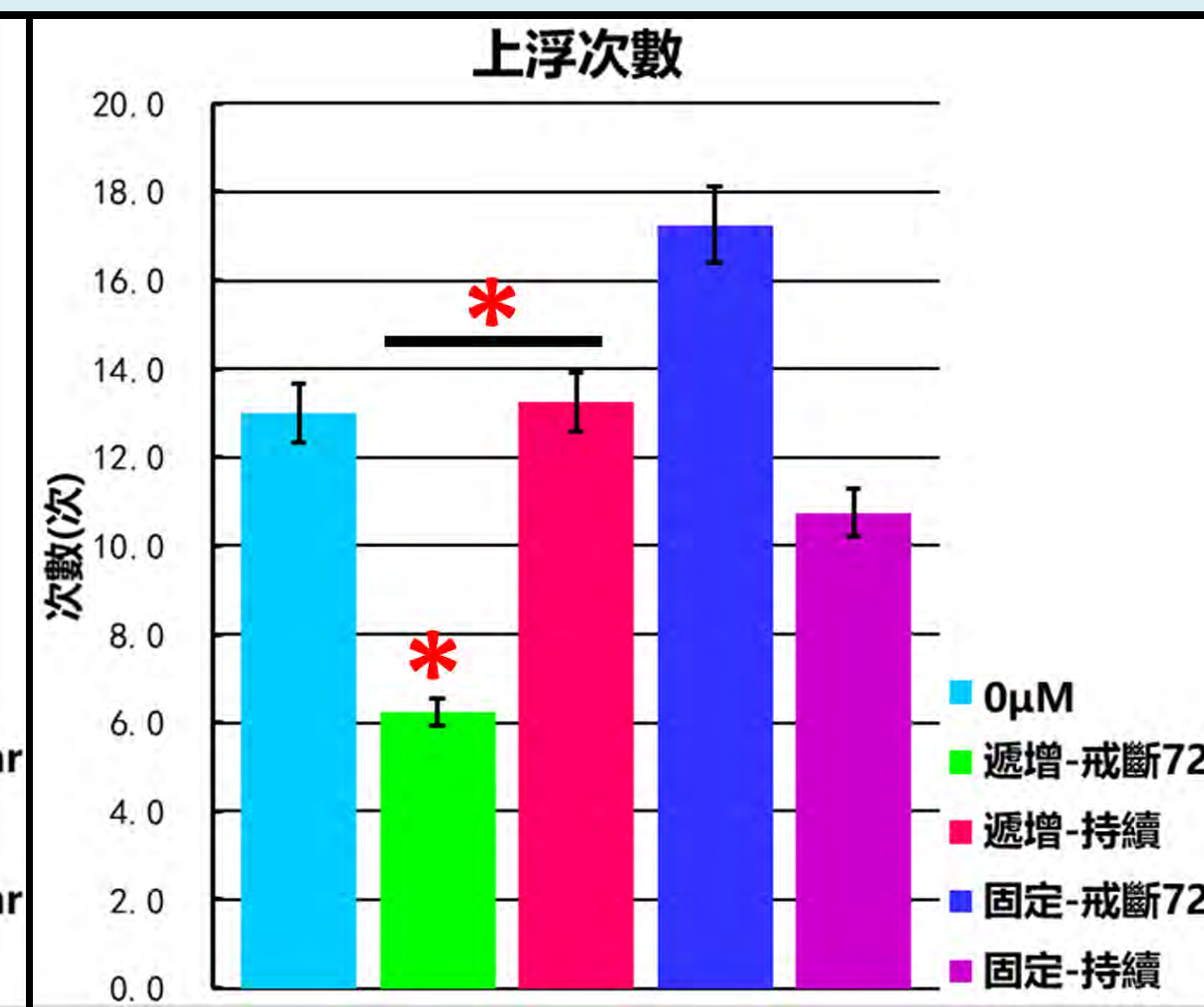
- (一)有浸泡尼古丁的各組斑馬魚，在上層的總時間皆低於0 μM 組，且除固定-戒斷組之外，均有顯著差異。
- (二)首次過線時間只有遞增-戒斷組較長，但均無顯著差異。
- (三)遞增-戒斷組的上浮次數顯著低於0 μM 組與遞增-持續組。
- (四)只有固定濃度的兩組有停滯，但個體差異大。



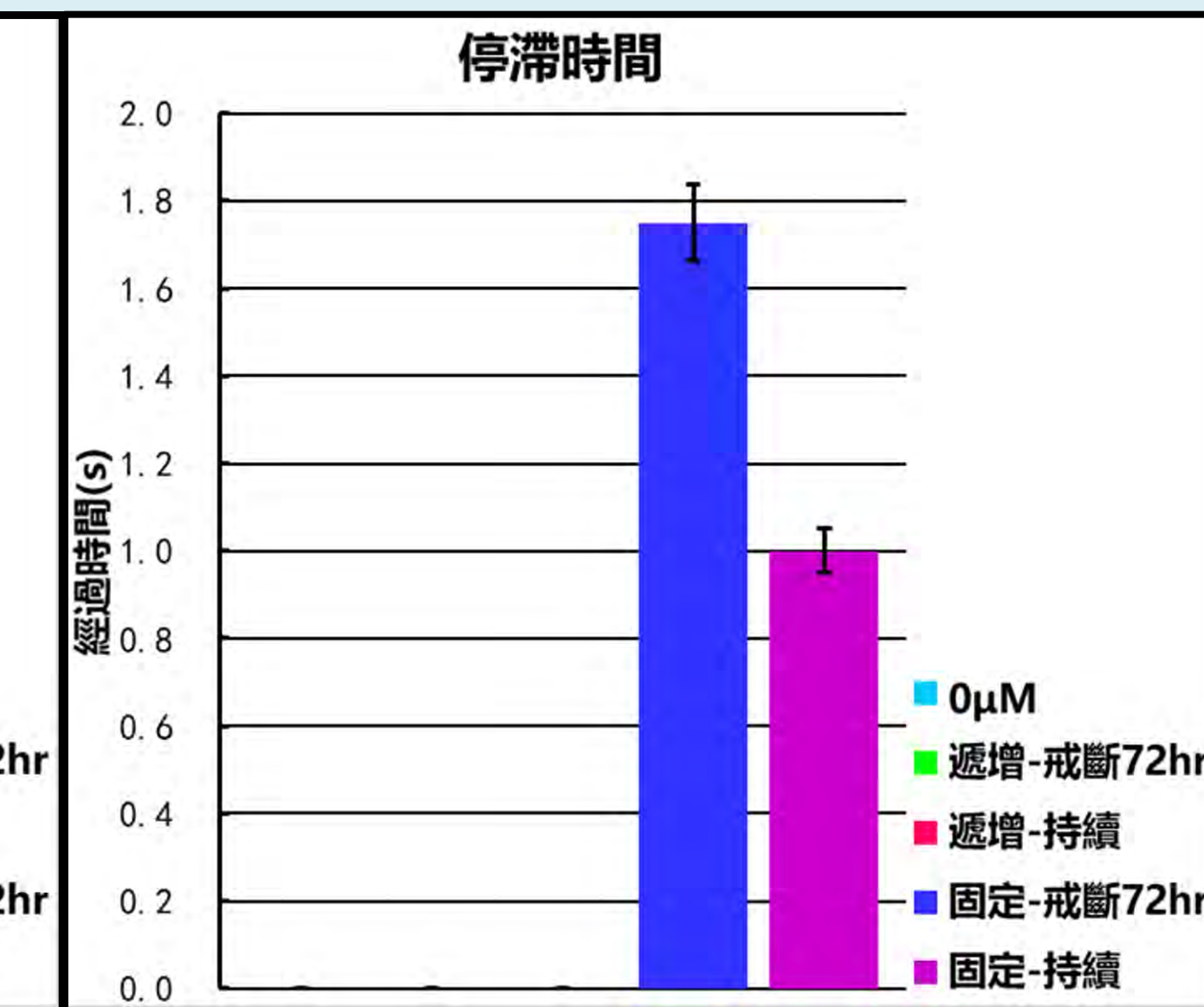
圖十四



圖十五



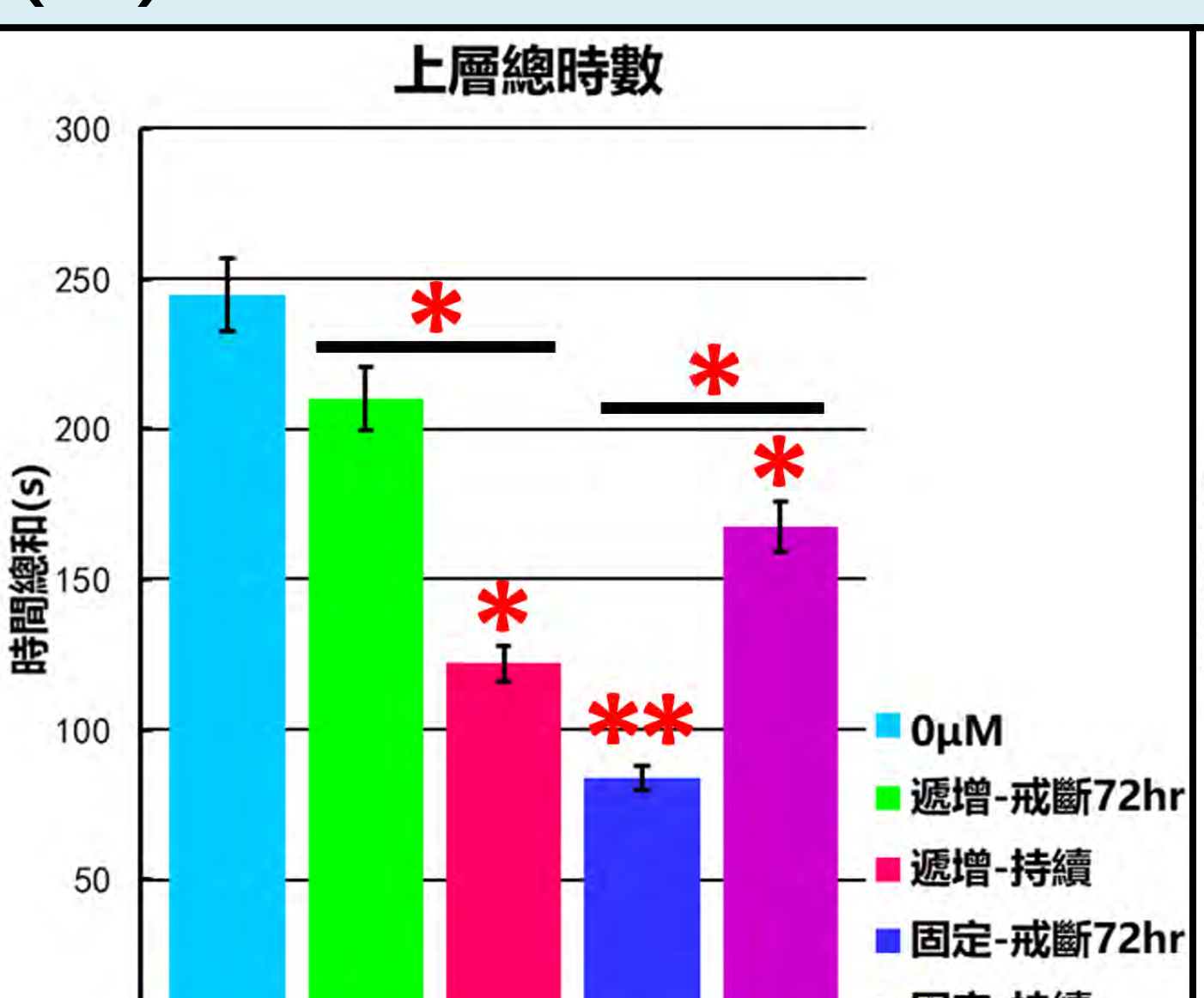
圖十六



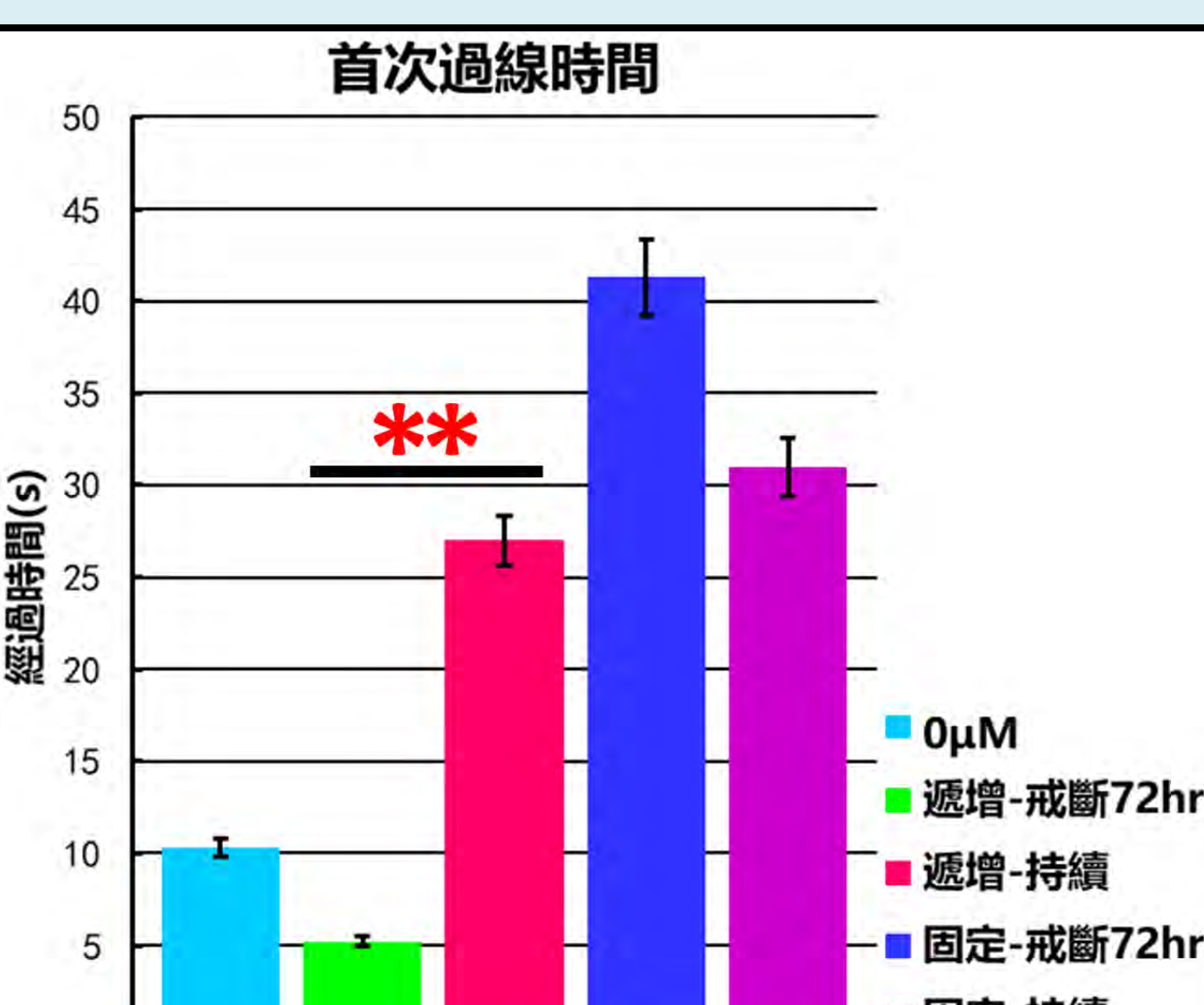
圖十七

三、短期浸泡尼古丁溶液及進行單次戒斷72小時之公魚行為模式(圖十八~圖二十一)：

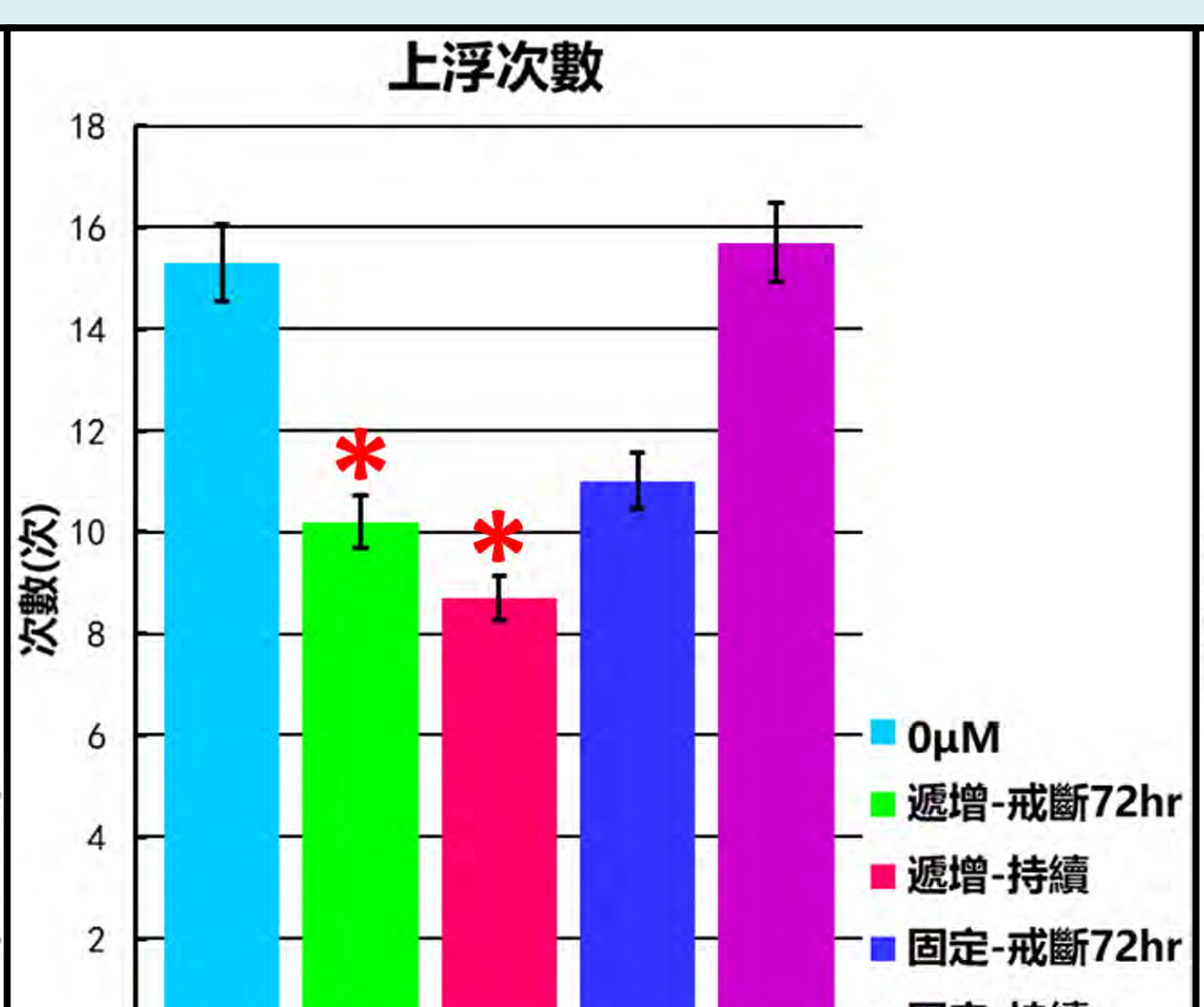
- (一)所有浸泡尼古丁的組別上層時間都低於0 μM 組，且遞增-戒斷組與遞增-持續組之間有顯著差異，固定-戒斷組與固定-持續組織間亦有顯著差異。
- (二)除遞增-戒斷72小時首次過線時間低於0 μM 組，其他浸泡尼古丁的組別首次過線時間皆高於0 μM 組，且遞增-戒斷組與遞增-持續組之間有顯著差異。
- (三)只有固定濃度-持續的上浮次數略大於0 μM 組，遞增-戒斷組與遞增-持續組則顯著低於0 μM 組。
- (四)只有遞增-持續與固定濃度-持續有停滯時間。



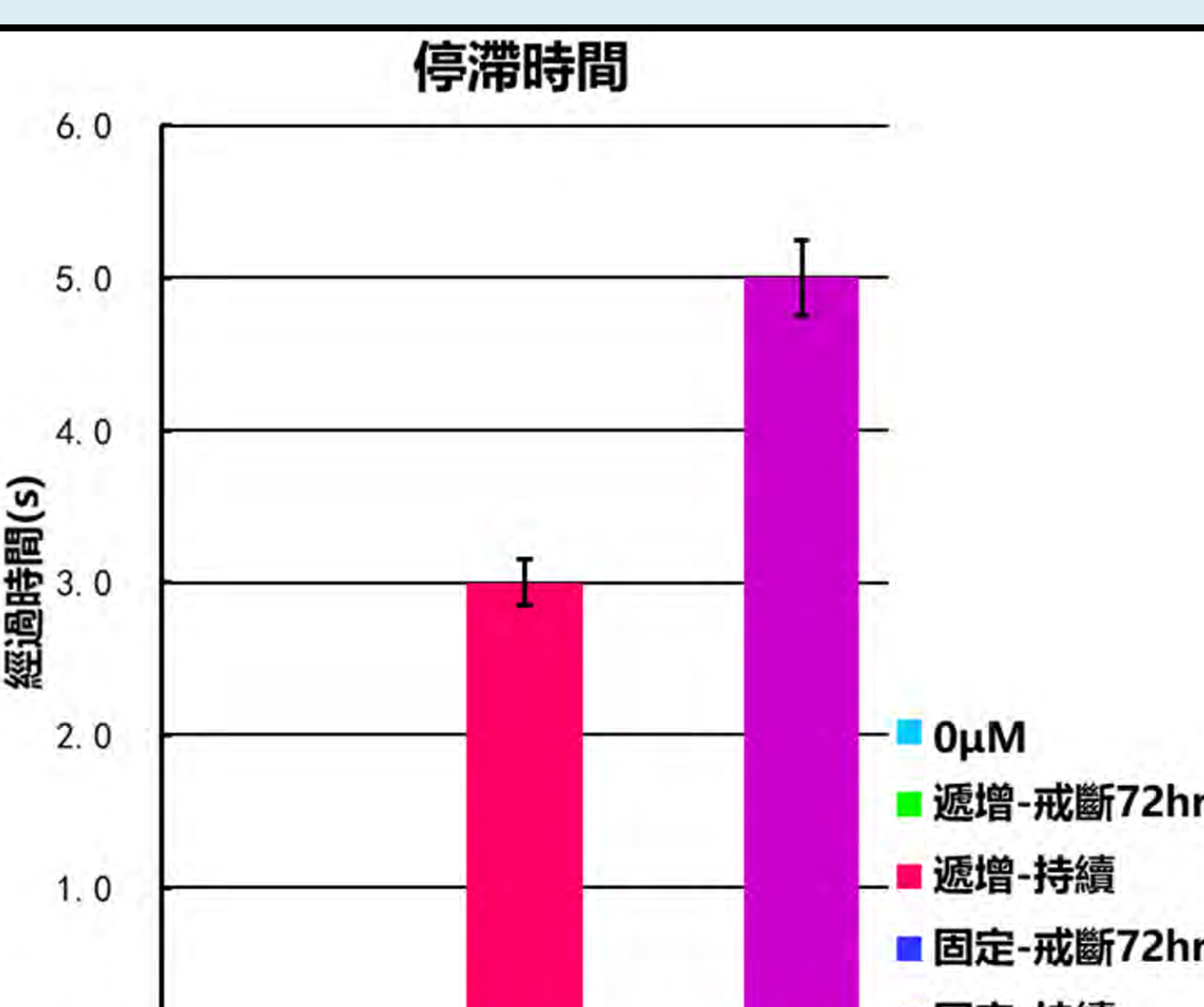
圖十八



圖十九



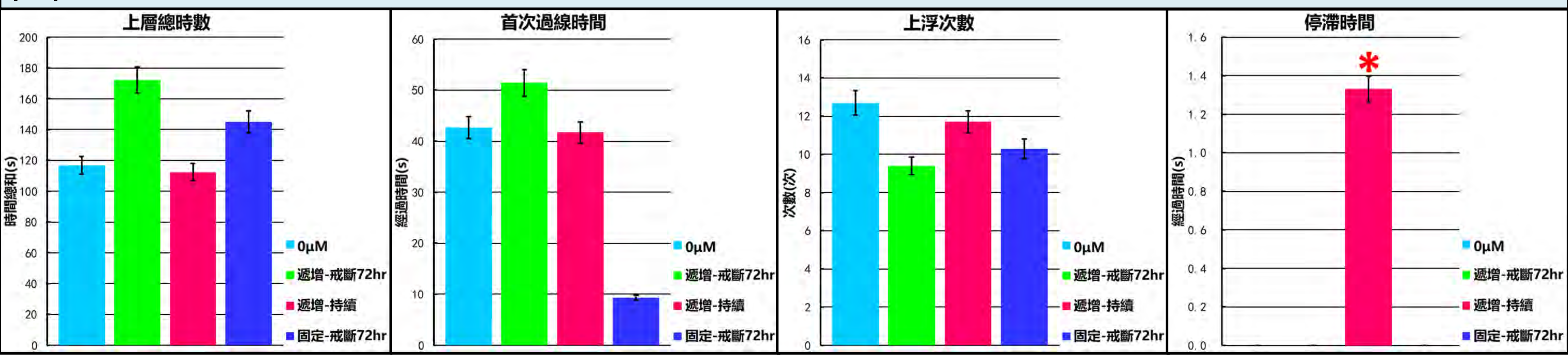
圖二十



圖二十一

四、短期浸泡尼古丁溶液及進行單次戒斷72小時之母魚行為模式(圖二十二~圖二十五):

- (一)固定濃度-持續組之母魚只有1隻存活，所以不列入討論。
- (二)上層總時數戒斷組別均較高，但各組無顯著差異。
- (三)首次過線時間只有固定-戒斷組特別低，但各組無顯著差異。
- (四)上浮次數各組間均無顯著差異。
- (五)只有遞增-持續有停滯時間，且該組之母魚均有出現停滯現象，其他組別皆無。



▲ 圖二十二

▲ 圖二十三

▲ 圖二十四

▲ 圖二十五

陸、討論

一、浸泡於尼古丁溶液中的斑馬魚之焦慮反應

持續浸泡於溶液中的斑馬魚，與浸泡清水的組別相比，公魚普遍出現有焦慮反應的行為；而母魚和對照組則無顯著差異，且母魚在實驗期間死亡數量較多，性別差異明顯。

二、浸泡於尼古丁中的斑馬魚，進行單次戒斷後之焦慮反應

(一)浸泡二週後單次戒斷48小時：

只有遞增-戒斷組的首次過線時間較長，其餘均無顯著差異，推測其原因應為在30 µM的濃度與二週的浸泡時間下，斑馬魚體內的尼古丁或其代謝產物無法在48小時內完全分解或排出體外，需要更長的時間才會產生戒斷反應。

(二)浸泡二週後單次戒斷72小時：

遞增-戒斷組的上層總時數與上浮次數均顯著低於0 µM組，亦均低於遞增-持續組，且首次過線時間長，顯示有焦慮反應出現。但固定-持續組、固定-戒斷組之間相比，卻發現完全相反的趨勢，前者的焦慮反應較為明顯，而後者則與0 µM組較接近。亦即尼古丁用量遞增時，戒斷所引發的焦慮反應較明顯，且可以在戒斷72小時後觀察到；尼古丁用量固定時，戒斷則沒有太大的影響，這個現象可能與尼古丁會產生耐藥性有關。

(三)浸泡一週後單次戒斷72小時，公魚：

遞增-戒斷組的上層總時數與上浮次數均低於0 µM組，但均高於遞增-持續組，且首次過線時間明顯較短。而固定-戒斷組、固定-持續組之間相比，卻發現完全相反的趨勢。亦即在浸泡尼古丁溶液一週後，有用藥的組別—遞增-持續組和固定-戒斷組的焦慮反應較明顯，這個趨勢和浸泡尼古丁兩週後是完全相反的。

(四)浸泡一週後單次戒斷72小時，母魚：

母魚戒斷組的焦慮反應較不明顯，但與公魚相比，各處理組的表現並無顯著差異。但若從死亡率來看，固定濃度組之母魚，在浸泡30 µM尼古丁兩天後死亡率大魚50%，其餘各組均存活，我們推測當濃度漸增時耐受性也會增加，因此存活的母魚較多，而公魚的耐受性可能較高，對尼古丁產生的焦慮反應也較明顯。

柒、結論及未來展望

結論：

- 一、浸泡於尼古丁中的斑馬魚，不論持續浸泡或單次戒斷均普遍出現焦慮反應。
- 二、持續浸泡與單次戒斷所觀察到的焦慮反應出現時間不同，關於尼古丁使用過程所產生的生理或行為變化仍待進一步探討。
- 三、持續浸泡固定濃度與浸泡濃度遞增之尼古丁，出現焦慮反應的時機不同，可能與耐藥性的產生有關。
- 四、公魚和母魚在浸泡尼古丁後的死亡率與行為反應均有差異，顯示藥物對斑馬魚的影響可能有性別差異。
- 五、使用Novel Tank來測試尼古丁使用或戒斷所產生的焦慮行為是可行的，在上層總時數有較明顯的差異，但仍要綜合各項觀察指標才能有較精確的分析。

未來展望：

- 一、在Novel Tank測試中，可能有其他方式能更精確的分析斑馬魚的行為，例如：泳速的變化。
- 二、長期用藥的斑馬魚在不同時段的行為改變是否有特定模式，及其與神經系統的關聯，值得探討。
- 三、此實驗可以搭配其他藥物，實驗其作為戒菸藥物的可能性，例如：GABA、魚腥草等.....。

捌、參考資料

- 一、蔡旻臻 等。2005。酒精和尼古丁對斑馬魚胚胎發育的影響。中華民國第四十五屆中小學科學展會作品說明書。
- 二、尼古丁 (2019) 維基百科。取自<https://zh.wikipedia.org/zh-tw/尼古丁>
- 三、Benowitz, N. L. (2010). Nicotine Addiction. N Engl J Med.362(24): 2295–2303.
- 四、Cachat j., Canavellio P., Elegantea M., Bartels B., Hart P., Bergner C., Eganb R., Duncana A., Tiena D., Chunga A., Wonga K., Goodspeeda J., Tana J., Grimes C., Elkhayat S., Suciua C., Rosenberga M., Chunga K. M., Kadri F., Roya S., Gaikwada S., Stewart A., Zapolskya I., Gilder T., Mohnot S., Beesona E., Amri H., Zukowska Z., Soignier R. D., Kalueff A. V. (2010). Modeling withdrawal syndrome in zebrafish. Behavioural Brain Research. 208, 371–376.
- 五、Kysil, E. V., Meshalkina, D. A., Frick, E. E., Echevarria, D. J., Rosemberg, D. B., Maximino, C., Lima, M. G., Abreu, M. S., Giacomini, A. C., Barcellos, L. J. G., Song C., and Kalueff A. V. (2017). Comparative Analyses of Zebrafish Anxiety-Like Behavior Using Conflict-Based Novelty Tests. Zebrafish. 14, 197 - 210.
- 六、Levin, E.D., Bencan, Z., and Cerutti, D. T. (2007). Anxiolytic effects of nicotine in zebrafish. Physiol.Behav. 90, 54-58.
- 七、Neal L. Benowitz (2010). Nicotine Addiction.N Engl J Med.362(24): 2295–2303.
- 八、Zebrafish Make a Splash in FDA Research (2017). U.S. Department of Health and Human Services. Retrieved April 7, 2019, from <https://www.fda.gov/ForConsumers/ConsumerUpdates/ucm343940.htm>