

中華民國第 65 屆中小學科學展覽會

作品說明書

高級中等學校組 行為與社會科學科

第二名

052708

「葛」仙釀「珠」，脫「酒」成仙。

學校名稱： 國立竹南高級中學

作者：	指導老師：
高二 林靖恩	李淑萍
高二 任哲鋒	

關鍵詞： 酒精、葛根、爆爆珠

摘要

本研究主要透過斑馬魚場地制約模型，使酒精與背景形成記憶聯結進而改變斑馬魚原本的背景偏好，先測試0.5%、1%、1.5%酒精，再看哪一種酒精濃度能夠產生最好的偏好改變。最後選擇效果最好的濃度並使用海藻酸鈉與葛根製成爆爆珠與普通爆爆珠比較能否加快消除酒精造成的記憶聯結。記憶消除後，再次訓練並比較再固化記憶後給予葛根爆爆珠的效果。

結果顯示葛根爆爆珠比普通爆爆珠消除記憶的時間更短，代表葛根具有加快消除酒精造成的記憶。因此，我們推測人類食用葛根能夠加快酒精成癮的戒除。

我們也探討爆爆珠作為藥物載體的可能性，與管餵的優缺點比較，經過統計後發現爆爆珠的適口性高達91.67%，在未來可當作一種可靠的藥物載體。

壹、前言

一、研究動機

新聞中時常可以看到許多人因為長期酗酒進而有暴力傾向的行為，導致了許多家庭破碎，根據統計台灣有超過100萬人有酒精成癮的問題，而長期飲酒也會造成許多生理上的疾病（例如：肝癌、記憶下降等），因為考慮到酒精成癮對個人、家庭及社會在健康上的重大危害，所以戒斷酒精成癮及減少復發的方式變得相當重要。於是我們尋找到黃連解酒湯可以有解酒效果，而葛根是黃連解酒湯中的一味藥材，所以我們從中藥材葛根(Kudzu) 做為發想，我們假設葛根能夠加快消除酒精造成的記憶。

二、目的

(一) 實驗 A: 探討斑馬魚對不同酒精濃度造成的偏好改變能力比較。

1. 0% 酒精 (RO 水)(對照組)
2. 0.5% 酒精
3. 1% 酒精
4. 1.5% 酒精

(二) 實驗 B:

觀察使斑馬魚產生酒精記憶之後，再餵食葛根爆爆珠，看其是否可以減少酒精記憶消除的時間，以及比較0.5%、1%、1.5%酒精的記憶消除速度。

1. 葛根爆爆珠
2. 空爆爆珠
3. 0.5% 酒精
4. 1% 酒精
5. 1.5% 酒精

(三) 實驗 C:

探討記憶消除後再受到藥物刺激，斑馬魚對酒精記憶的再固化(Reconsolidation)，再比較餵食葛根爆爆珠的效果。

(四) 適口性測試: 探討使用海藻酸鈉包覆中藥粉作為載體是否為一種可行的給藥方法。

三、文獻回顧

(一) 酒精成癮

根據衛福部推估，全台843萬飲酒人口中，就高達1百萬人有暴飲及酒癮的問題。長期的酗酒會造成心智的損傷(例如：記憶下降、反應遲鈍等)，而隨著成癮時間增加，耐受性增加，最後反而需要飲用更多酒精，同時也會增加罹患肝癌的機率，更有可能會有骨質疏鬆的情況(衛生福利部，2023)。

酒精會增加抑制性神經傳導物質 GABA(Gamma-aminobutyric acid)作用於 GABA_A 受體，並減少興奮性神經傳導物質谷氨酸(Glutamate)作用於 NMDA (N-methyl-D-aspartate)受體，此反應會減少興奮性刺激。酒精成癮者，腦中的 GABA_A 受體數目會代償性減少，並且增加 NMDA 受體數目，而提高對酒精的耐受性。當酒精成癮者突然戒酒時，會造成腦中 NMDA 接受器的刺激過強，而出現焦慮不安、興奮、易怒、失眠、噁心、心跳加速、血壓上升、冒冷汗等症狀，更嚴重的甚至會出現戒斷性癲癇(黃力偉，2016)。

過去也有相關文獻指出當酒精的使用量與罹患酒精成癮之間有指數正相關(Carr et al., 2024)。因此，應用到斑馬魚場地制約模型中，我們推測攝取酒精的濃度越高，產生的場地制約記憶就會越強。

(二) GABA_A 受體及葛根(Lobed Kudzuvine Root,Kudzu)成分&功效

GABA_A 受體是 GABA 受體亞型的一種，其組成由五個亞基，包括兩個 α 亞基($\alpha 1-\alpha 6$)、兩個 β ($\beta 1-\beta 3$)亞基和一個 γ ($\gamma 1-\gamma 3$)亞基所組成。GABA 受體在人體內扮演的角色是抑制中樞神經興奮狀態，與 NMDA 受體之間存在著拮抗作用。酒精作為中樞神經抑制劑，以短期來說是會增強 GABA 受體的數量，但飲酒成癮者會持續增強 GABA 的作用，大腦為了維持平衡會下調 GABA 受體的數量，一旦停止飲用酒精，GABA 反而沒有受到增強，加上長期的下調，反而會導致 GABA 無法發揮神經抑制作用的功能(黃力偉，2016)。

葛根(Lobed Kudzuvine Root)的主要化學成分包括葛根素、異黃酮類化合物、澱粉、膳食纖維、胺基酸，其中包含的葛根素(Puerarin)具有抗細胞凋亡、抑制促發炎介質、調節自噬作用、抗氧化、保護粒線體、抑制鈣內流和抗神經退化活性等作用(Liu et al.,

2023)。葛根在傳統中藥方裡的功能為解肌退熱、生津止渴、發表透疹、升陽止瀉還能解酒毒(李懿芸 等人，2018)。

過去有文獻指出酒精也會造成神經性發炎，其中介白素(Interleukin-1 beta.IL-1 β) 在大腦內側前額葉皮質 (mPFC) 前邊緣區域的 GABA 有著調節的功能，它可作為控制發炎或是神經保護作用的關鍵調節因子。在沒有酒精的情況下，它會表現保護神經的功能，但如果長期接觸酒精則會表現出發炎反應(Varodayan et al., 2023)。

過去文獻指出葛根素能夠在大腦皮質與海馬迴逆轉酒精造成的 GABA 受體下調，也能夠在大腦皮質及海馬迴中逆轉酒精導致的發炎因子 IL-1 β 的上調 (Cui et al., 2015)，進而改善神經傳遞的平衡，可見得葛根在酒精相關受體造成的症狀治療上有著相當的潛力。因此，我們假設葛根能夠有效縮短酒精造成的記憶消除時間。

(三) 斑馬魚對酒精場地制約偏好 (conditioned place preference, CPP)

1. 實驗設計

場地制約偏好被廣泛應用於測試有成癮性的藥物，透過在不偏好側背景(海軍藍與米黃色垂直相間條紋)給予成癮性藥物做聯結，再記錄在不同場地之間的偏好程度變化，可以用來評估藥物的成癮性或開發可以縮短戒斷成癮時間的相關藥物。

我們選擇斑馬魚的主要原因是因為斑馬魚的繁殖速度非常快，雌魚每次可產下數百粒卵，每年可繁殖多次。這讓研究人員能夠在短時間內獲得大量的實驗樣本。此外，斑馬魚對環境的適應性強，飼養成本低，且所需空間較小，這使其成為實驗室內便捷的模式生物。而斑馬魚主要是透過視覺來判斷環境，但小鼠不只會被視覺影響，環境的味道也會是偏好的原因之一，而使用斑馬魚測試的變因卻只有視覺因素。因此，我們使用斑馬魚作為實驗動物，藥物的因素占比較高，結果應該更能夠反映藥物的成效。

參考先前文獻是使用甲基安非他命(methamphetamine ,MA)建立的斑馬魚 CPP，使用相同的 CPP 盒，一側背景為海軍藍與米黃色垂直相間條紋；另一側背景為白色(Chen et al., 2023)。

在 Pretest 中斑馬魚會先在兩側背景自由移動，我們分別記錄斑馬魚在不同側的時間，測試結果發現在沒有給予任何藥物且斑馬魚未被限制的情況下，牠們大部分都會對白色背景有較高的偏好，我們會以此數據當作 Pretest 水準與後續實驗做比較。在訓練階段時給予酒精環境，並將其限制在不偏好側(即背景為海軍藍與米黃色垂直相間條紋)，讓斑馬魚對酒精的記憶與場地的顏色做連結。

2. 記憶再固化(Reconsolidation)

- (1) 第一次訓練後的記憶：斑馬魚經由藥物與特定背景的配對，形成穩定的 CPP 記憶，該記憶經過初步鞏固。
- (2) 記憶消除：經過時間消退或干擾後，該記憶表現可能減弱甚至消失，但記憶痕跡仍存在於神經迴路中。
- (3) 再次訓練（記憶再激活）：當斑馬魚再次接受相同的藥物-背景訓練，原有記憶會被提取並進入可塑不穩定狀態。
- (4) 再固化過程：此時記憶需依賴蛋白質合成等分子機制重新鞏固，穩定記憶痕跡，並可能整合新資訊以更新記憶內容。

(四) 分子料理-爆爆珠

我們使用海藻酸鈉溶液與要包覆的飲品結合之後，滴入乳酸鈣溶液中，當海藻酸鈉溶液滴入乳酸鈣溶液中，鈣離子會取代海藻酸鈉羧基上的鈉離子 (Na^+)，再結合另一醣醛酸分子上的羧基，形成離子架橋，這樣手拉手的結構，使海藻酸鈉分子間的連結性更強，形成一個三度空間的網狀組織結構，也就是凝膠的形成，並可將內容物包裹於凝膠結構中，形成半透膜 (Sophia, 2019)。

先前有文獻指出利用以2.5%海藻酸鈉、3%氯化鈣製成的爆爆珠形式包裹中藥粉能夠增加斑馬魚對中藥材的適口性(陳琦，2014)，加上使用飼料形式餵食，相較於傳統泡在萃取液中吸收的藥效會更加均勻，與管餵相比則是可以避免斑馬魚死亡的風險。我們使用不會影響效果的乳酸鈣替換了氯化鈣，但過程中我們發現單純使用海藻酸鈉包覆對斑馬魚的吸引力並不強，所以我們選擇在泡進乳酸鈣之前先包裹一層魚飼料粉，來增加對斑馬魚攝食的吸引力。

貳、研究設備與器材

一、斑馬魚（條紋）：共24隻

平均重量: 0.5g

飼養平均溫度: 25°C



圖1 所有的斑馬魚(作者實拍)



圖2 單隻斑馬魚(作者實拍)

二、爆爆珠飼料製作材料&設備



圖3 中藥葛根30g(作者實拍)



圖4 海藻酸鈉(作者實拍)



圖5 乳酸鈣(作者實拍)



圖6 研磨鉢(作者實拍)



圖7 5ml 注射器(作者實拍)



圖8 電子秤(作者實拍)

三、測試階段設備



圖9 單獨分隔盒(作者實拍)

獨立飼養盒(15*11*7.5cm)共24個
每盒加入100ml RO 水，每盒飼養一隻魚，並且放置在周圍白色背景中飼養至少兩天。



圖10 酒精訓練瓶(作者實拍)

酒精訓練瓶(容量250ml)共24瓶
每瓶裝入相對應的酒精濃度60ml。



圖11 CPP 測試盒(作者實拍)

CPP 測試盒共4盒
測試盒一側背景為海軍藍與米黃色垂直相間條紋；另一側背景為白色環境。



將90%酒精稀釋成0.5%、1%、1.5%的酒精濃度。

圖12 90%酒精(作者實拍)

四、平時飼養階段的養魚設備



圖13 魚缸(作者實拍)



圖14 漁網(作者實拍)



圖15 打氣泵(作者實拍)



圖16 水妖精過濾器(作者實拍)



圖17 過濾棉(作者實拍)

五、飼料



圖18 顆粒飼料(作者實拍)

參、研究過程與方法

一、測試方式

測試時間介於上午9:00~12:00之間，讓魚在盒內先適應5分鐘，再使用手機架拍攝15分鐘，並在後續計算比例時去掉15分鐘的前五分鐘，最後只需計算斑馬魚在10分鐘內自由游動的時間，再將實驗結果全部換算成總秒數來記錄，並且計算在藥物聯結側(條紋背景)的時間百分比。



圖19 測試環境(作者實拍)

二、測試流程

(一) 獨立飼養

將每隻魚獨立飼養，並且放置在環境為白色的區域，並標記每一盒所代表的組別及第幾隻，盒內使用100ml RO水，讓魚先適應2天的環境變化。

(二) 前測(Pretest)

1. 將測試環境顏色布置為白色，再將四組 CPP 測試盒兩個相疊以同時觀察到四隻魚在不同位置的變化。測試盒中間不放置隔板，從第一組開始，一次測試四隻魚，再將魚從兩種背景交界處放進盒內，並且確保魚是處於游動狀態。
2. 若 Pretest 測試結果，在條紋背景時間>50%，應刪除該隻魚，或是讓該隻魚在此環境適應更長時間，再測一次，也可直接更換。

(三) 訓練(Conditioning phase)

1. 將60ml 不同濃度的酒精分裝到單獨酒精訓練瓶，每種濃度有八瓶，使用兩次後便會更換酒精溶液。

2. 訓練持續2天，上午訓練在9:00~12:00之間，將魚放入 CPP 盒中白色部分並將中間使用隔板阻擋，將魚限制在偏好側(白色背景區域)20分鐘，下午訓練則在2:00~6:00之間，將每隻魚單獨放入相對應的酒精訓練瓶中並放置在條紋背景環境中持續20分鐘，之後將其放置到 RO 水中洗淨1分鐘，最後再放入 CPP 測試盒中，且將其限制在藥物聯結側(條紋背景區域)持續20分鐘。



圖20 訓練環境(作者實拍)

(四) 測試(Test)

在酒精訓練完後確認魚在藥物聯結側的時間 $>50\%$ ，這代表酒精有成功改變魚本來的偏好，使酒精與條紋側背景產生聯結的記憶，如果沒有達成則刪除該隻魚的資料。

(五) 記憶消除(Extinction)

在 Test 後每天上午讓魚自由在 CPP 盒內探索，並測試魚在藥物聯結側的時間並記錄比例，持續6天的時間。

(六) 記憶再固化(Reconsolidation)

使用在 Extinction 後的魚重複2天的訓練，並刪除 Test 未達標準的魚，一樣持續測試 Extinction 持續6天的時間。

三、實驗 A: 0.5%、1%、1.5% 酒精濃度 CPP 消除記憶時間的比較

- (一) Pretest。
- (二) 0.5%、1%、1.5% 酒精訓練持續兩天(Conditioning phase)的時間。
- (三) Test。
- (四) 記憶消除(Extinction)。

四、實驗 B:餵食葛根爆爆珠(kudzu balls)與空爆爆珠(vacant balls)的比較(以1.5%酒精訓練)

(一) Pretest。

(二) 1.5%酒精訓練持續兩天(Conditioning phase)的時間。

(三) Test。

(四) 記憶消除(Extinction)與餵食爆爆珠。

在測試前30分鐘餵食爆爆珠。

五、實驗 C: 酒精對斑馬魚記憶的再固化與葛根的關係(以1.5%酒精訓練)

(一) 1.5%酒精訓練持續兩天(Conditioning phase)的時間。

(二) Test。

(三) 記憶消除(Extinction)與餵食爆爆珠。

在測試前一天下午6:00餵食葛根爆爆珠。

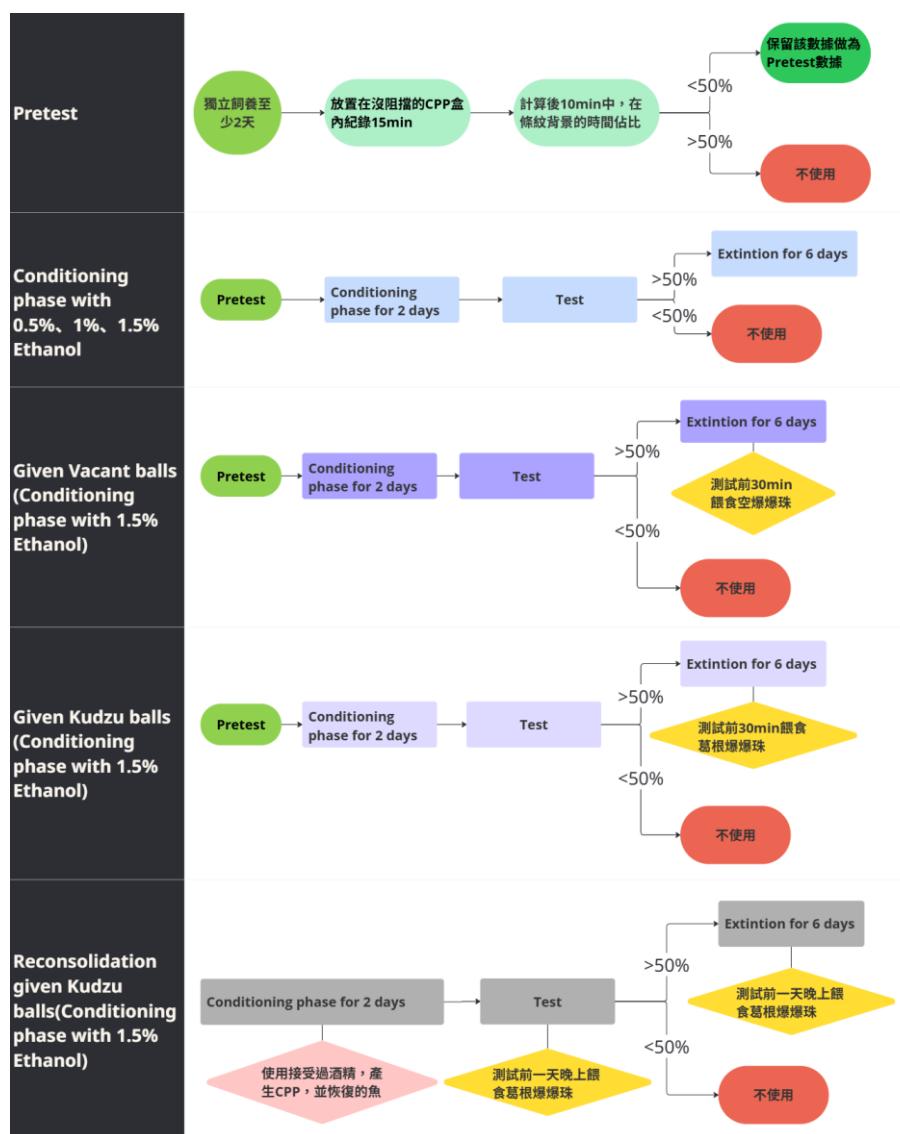


圖21 測試流程圖(作者自行繪製)

六、中藥飼料製作-葛根爆爆珠:適口性測試

(一) 葛根爆爆珠製作步驟

1. 取 98ml RO 水與 2g 海藻酸鈉粉混合，再使用酒精燈加熱到 35°C，一邊使用玻棒攪拌至全部溶解，再將 6g 葛根中藥粉末與其混合，並攪拌均勻。
2. 將 98ml RO 水與 2g 乳酸鈣粉末混合，加熱至 35°C，並攪拌至完全溶解為止。
3. 將一般飼料顆粒用研磨鉢研磨成極細粉末，再加入到海藻酸鈉溶液內。
4. 使用注射器吸取中藥海藻酸鈉水溶液，要注意吸取時粉末需均勻分布，才能確保整顆單位體積的劑量。
5. 將中藥海藻酸鈉水溶液從注射器中擠出，形成直徑為 1mm 的球體，使其在飼料粉末中滾動，直到整顆表面都能完整吸附飼料粉末，再泡入乳酸鈣溶液中旋轉幾圈，以確保表面的粉末脫落，只保留被海藻酸鈉固定的飼料，才不會導致魚只吃剝落的飼料，而不吃含有藥物的整顆爆爆珠。



圖22 葛根爆爆珠餵食(作者實拍)

(二) 不同中藥爆爆珠適口性測試

海藻酸鈉比例參考文獻為 2.5% 海藻酸鈉、3% 乳酸鈣(陳琦，2014)，測試結果後我們再加以改良，表1是不同藥物及是否包裹魚飼料以及乾溼的適口性測試結果。紅色代表適口性為0，代表吃進去後又馬上吐出來。

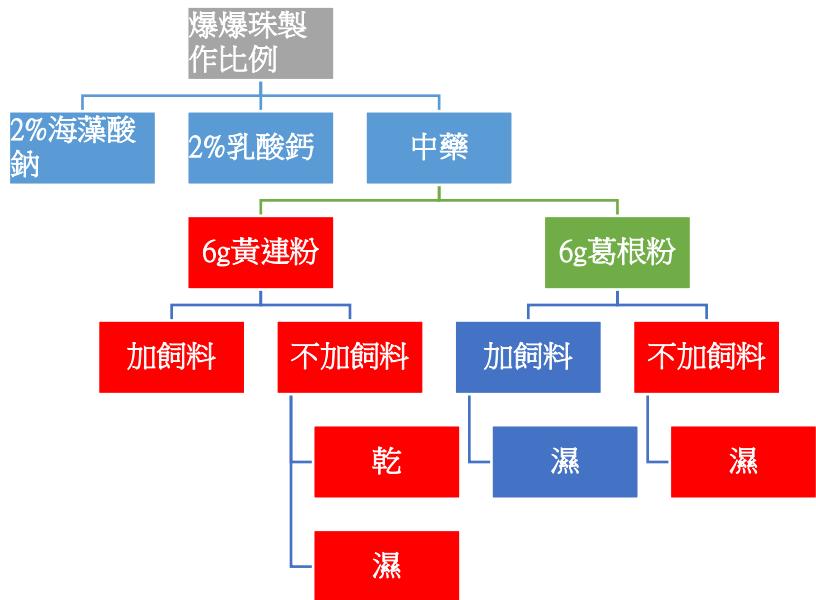


表1 不同中藥乾與濕的適口性比較(作者自行繪製)

(三) 斑馬魚藥物載體方式的優劣比較

表2是比較3種不同給藥方式的優缺點，給予爆爆珠比泡在溶液及管餵的方式更具有優勢。

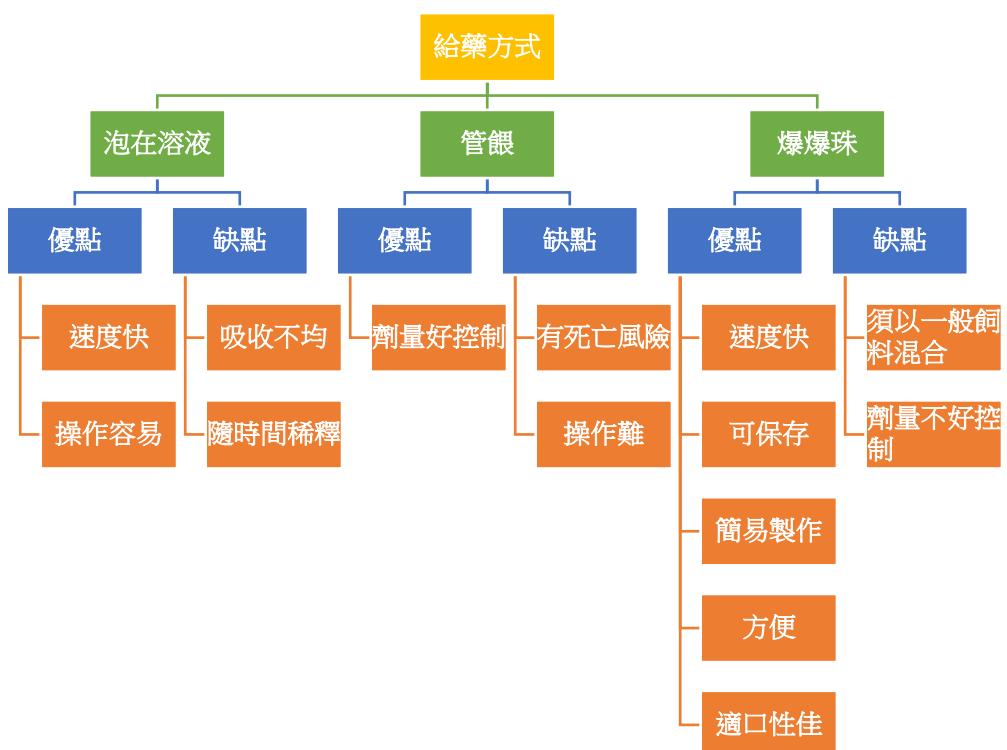


表2 斑馬魚藥物載體方式的優劣比較(作者自行繪製)

七、測試與統計

(一) 測試軟體(EthoVision XT)

測試軟體使用 EthoVision XT 追蹤斑馬魚，由於在白色背景追蹤的準確率較高，因此，我們先測試10分鐘內在白色區域的時間，再使用100%扣除，得到在條紋背景的時間比例。

(二) 統計軟體(Graphpad prism)

使用 Graphpad prism 分析此次所有實驗數據的軟體

1. 實驗 A

使用 two-way ANOVA 分析0%、0.5%、1%、1.5%酒精 Pretest 與 Test(不需刪除<50%的數據)之間是否具有顯著差異，並比較哪一種酒精濃度形成的場地制約記憶能力最為顯著。

2. 實驗 B 與實驗 C

使用 one-way ANOVA 分析 Test、Extinction 與 Pretest 之間的差異，記憶消除標準(Extinction criteria)為所有 Extinction 數據皆<50%，並且與 Pretest 之間沒有顯著差異，則可將該天 Extinction 視為消除記憶所需的時間。

- (1) 1.5%酒精+葛根爆爆珠(1.5% Ethanol+Kudzu balls)
- (2) 1.5%酒精+普通爆爆珠(1.5% Ethanol+Vacant balls)
- (3) 1.5%酒精+葛根爆爆珠 Reconsolidation (1.5% Ethanol+Kudzu balls Reconsolidation)
- (4) 0.5%酒精(0.5% Ethanol)
- (5) 1%酒精(1% Ethanol)
- (6) 1.5%酒精(1.5% Ethanol)

3. 適口性比較

統計資料選擇1.5% Ethanol+Kudzu balls Reconsolidation 中的8隻魚餵食6天，總共48次，以($\frac{\text{有吃次數}}{\text{餵食總次數}} \times 100\%$)計算爆爆珠的適口性比例，以 Yes 代表有吃的比例，No 代表沒吃的比例。

肆、研究結果

一、實驗 A

以0%酒精作為對照組與其餘三種不同的酒精濃度作為3組實驗組的比較(圖23)，0%酒精 Pretest 與 Test 之間未能產生顯著差異，代表無法改變偏好，其餘三種酒精濃度則皆能產生偏好的改變，這代表酒精是一種能夠有效運用在斑馬魚 CPP 模型中的成癮藥物。

三種含酒精的組別相互比較，可以發現1.5%酒精消除記憶所花費的時間是三種濃度中最久的。因此，我們推測若有酒精成癮的患者飲用的酒其所含的酒精濃度越高，要戒斷所需的時間也會較久。

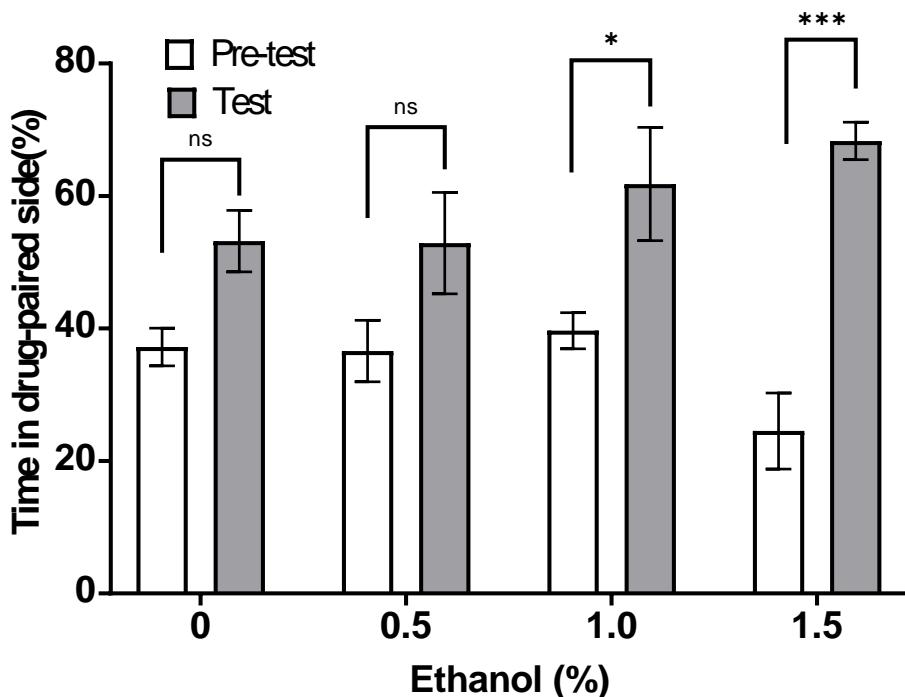


圖23 0%、0.5%、1%、1.5% Pretest 與 Test 比較(作者自行繪製)

二、實驗 B 與實驗 C

(一) Pretest、Test、Extinction 分析

根據(圖24)、(圖25)得知含有葛根的爆爆珠與不含葛根的爆爆珠兩組完全消除記憶的時間，葛根爆爆珠需要2天，普通爆爆珠則為4天。因此，我們推測葛根能夠作為加快酒精成癮患者戒除酒癮的藥物。

將第一次經過酒精訓練後餵食葛根爆爆珠與記憶再固化(Reconsolidation)後餵食葛根爆爆珠所需的時間做比較，分別需要2天(圖24)與1天(圖26)的時間，代表酒精的

記憶越強葛根的記憶消除效果也會更強。因此，我們推測給予重度酒精成癮患者食用葛根的效果可能會比輕度的患者效果更為顯著。

比較0.5%(圖27)、1%(圖28)、1.5%(圖29)三種濃度的酒精在不給予任何治療藥物的情況下，我們發現1.5%酒精訓練對於斑馬魚消除記憶所需時間最久。因此，我們推測酒精成癮患者中，他們所飲用的酒含有的酒精百分比越高，戒除時所需的時間應該也會較長。

圖30為統整每一組 Extinction 消除記憶所需的时间

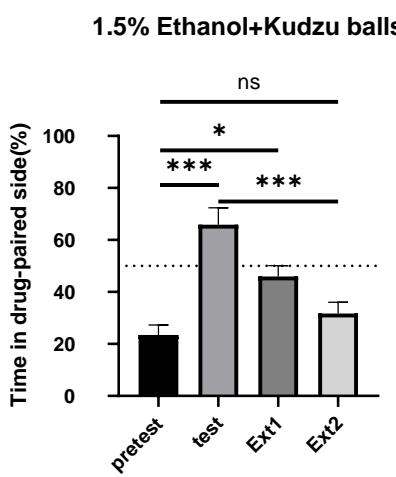


圖24 1.5%酒精+葛根爆爆珠(作者自行繪製)

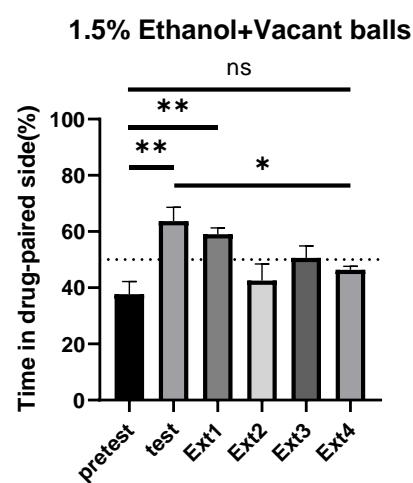


圖25 1.5%酒精+普通爆爆珠(作者自行繪製)

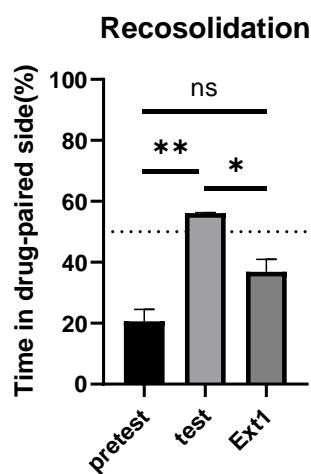


圖26 1.5%酒精+葛根爆爆珠 Reconsolidation(作者自行繪製)

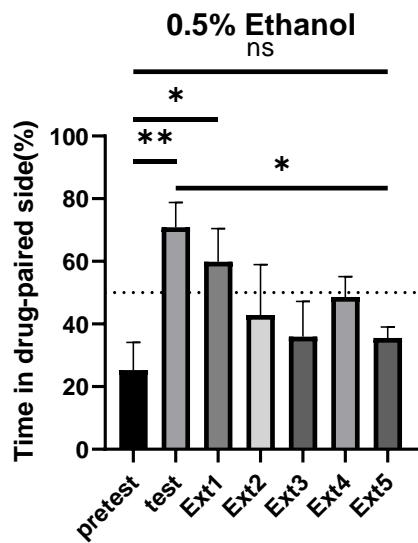


圖27 0.5%酒精(作者自行繪製)

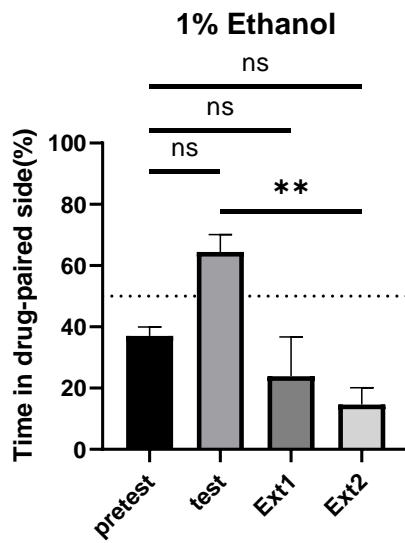


圖28 1%酒精(作者自行繪製)

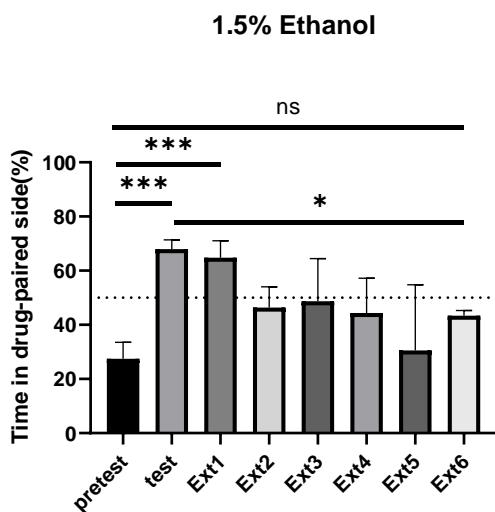


圖29 1.5%酒精(作者自行繪製)

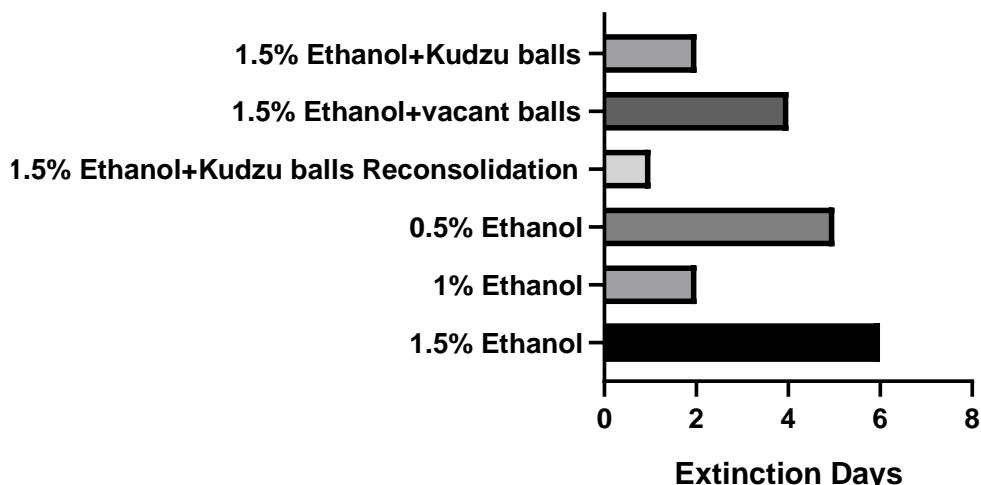


圖30 Extinction 時間比較(作者自行繪製)

三、適口性測試

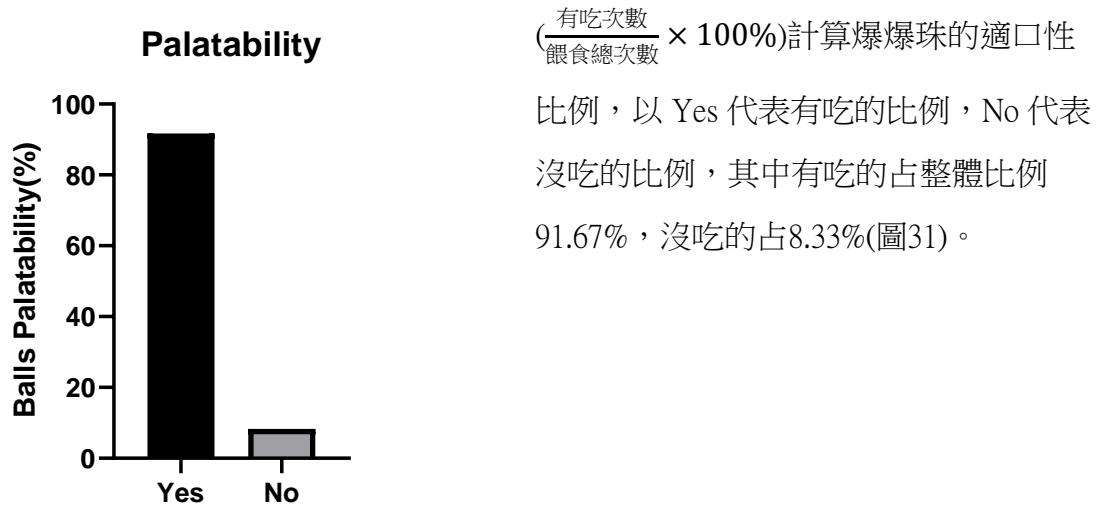


圖 31 適口性測試 (作者自行繪製)

伍、討論

一、實驗 A

根據三種酒精濃度產生的場地制約模型重現(Chen et al., 2023)的效果，我們發現酒精是一種可以有效應用在斑馬魚 CPP 模型中的藥物，其中以1.5%酒精產生的記憶最為顯著，與文獻相符合(Mathur et al., 2011)。另外，將0.5%、1%、1.5%酒精做比較，我們也發現1.5%酒精改變班馬魚的偏好能力最為顯著。

二、實驗 B 與實驗 C 記憶消除時間比較

根據葛根爆爆珠與普通爆爆珠記憶消除時間的比較，可以發現葛根能夠有效縮短酒精造成的記憶消除的時間，符合(Cui et al., 2015)的結果，它能夠有效降低酒精導致的 IL-1 β 發炎，也能夠逆轉酒精成癮導致的 GABA 受體下調。

在記憶再固化後，餵食葛根爆爆珠，與第一次酒精訓練後餵食葛根爆爆珠消除記憶的時間比較，我們發現再固化後給予葛根的治療效果比第一次接觸時效果更好。可能是基於再固化，會重塑記憶，這個時候給予葛根對記憶方面的效果較為顯著。

比較三種酒精濃度，我們發現濃度最高的1.5%酒精消除記憶所需的時間最久。因此，我們推測酒精成癮患者飲用的酒類其酒精含量越高，戒斷時間也會越長，酒精攝取量越多與酒精成癮嚴重程度呈正相關的結果(Carr et al., 2024)，同時在1%酒精時消除記憶所需時間最短，斑馬魚的恢復速度最快；而在0.5%與1.5%酒精時消除記憶所需時間較長，且斑馬魚的恢復速度較慢。

三、適口性測試

使用爆爆珠作為給予斑馬魚藥物的載體(陳琦，2014)是一個相當有效的方式，雖然要刪除少數未食用爆爆珠的個體，但整體來說風險相較管餵有著明顯的優勢，使用爆爆珠不僅上手容易，同時也不會導致斑馬魚的意外死亡，如果以管餵的死亡當作未食用，則會導致實驗數據不足的問題。

陸、結論

一、實驗 A

根據實驗的結果中可以得知，使用1.5%酒精訓練能夠最有效的改變斑馬魚原有的背景偏好，相較於使用 RO 水訓練則無法產生顯著的差異，這代表酒精可以當作斑馬魚 CPP 模型的記憶藥物，其中又以1.5%酒精效果為最佳。

二、實驗 B 與實驗 C

在餵食含有葛根的爆爆珠後，酒精產生的場地制約記憶消除的時間有明顯縮短。因此，我們推測葛根能夠有效縮短酒精成癮患者戒斷的時間，同時我們也比較記憶再固化後葛根的效果，發現效果比第一次接觸酒精效果更加顯著。因此，我們推測若給予重度酒精成癮患者食用葛根，效果應該會更好。

比較三種酒精濃度的記憶消除速度，我們證實酒精濃度越高，產生的場地制約記憶越強烈。因此，我們推測酒精成癮患者若飲用酒精濃度越高的酒，所需戒斷的時間也會愈久。

三、適口性測試

以爆爆珠作為斑馬魚藥物的載體是相當具有前景的方法，風險相較於管餵有著明顯的優勢，它並不會導致斑馬魚的意外死亡，再加上操作的簡易性，還能夠加快給藥的速度，同時也是一種更為人道的給藥方式。

柒、參考文獻資料

- 一、Bhutada, P., Mundhada, Y., Bansod, K., Rathod, S., Hiware, R., Dixit, P., Umathe, S., & Mundhada, D. (2010). Inhibitory effect of berberine on the motivational effects of ethanol in mice. *Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry*, 34(8), 1472 – 1479.
<https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2010.08.005>
- 二、Carr, T., Kilian, C., Llamosas-Falcón, L., Zhu, Y., Lasserre, A. M., Puka, K., & Probst, C. (2024). The risk relationships between alcohol consumption, alcohol use disorder and alcohol use disorder mortality: A systematic review and meta-analysis. *Addiction (Abingdon, England)*, 119(7), 1174 – 1187. <https://doi.org/10.1111/add.16456>
- 三、Chen, L. C., Chan, M. H., & Chen, H. H. (2023). Extinction and reinstatement of methamphetamine-induced conditioned place preference in zebrafish. *Addiction biology*, 28(12), e13351.
<https://doi.org/10.1111/adb.13351>
- 四、Collier, A. D., Khan, K. M., Caramillo, E. M., Mohn, R. S., & Echevarria, D. J. (2014). Zebrafish and conditioned place preference: a translational model of drug reward. *Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry*, 55, 16 – 25.
<https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2014.05.014>
- 五、Cui, S. Q., Wang, Q., Zheng, Y., Xiao, B., Sun, H. W., Gu, X. L., Zhang, Y. C., Fu, C. H., Dong, P. X., & Wang, X. M. (2015). Puerarin protects against damage to spatial learning and memory ability in mice with chronic alcohol poisoning. *Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas*, 48(6), 515 – 522. <https://doi.org/10.1590/1414-431X20144250>
- 六、Ford, M.M., George, B.E., Van Laar, V.S. *et al.* GDNF gene therapy for alcohol use disorder in male non-human primates. *Nat Med* 29, 2030 – 2040 (2023). <https://doi.org/10.1038/s41591-023-02463-9>

- 七、Liu, X., Huang, R., & Wan, J. (2023). Puerarin: a potential natural neuroprotective agent for neurological disorders. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*, 162, 114581. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2023.114581>
- 八、Lukas, S. E., Penetar, D., Berko, J., Vicens, L., Palmer, C., Mallya, G., Macklin, E. A., & Lee, D. Y. (2005). An extract of the Chinese herbal root kudzu reduces alcohol drinking by heavy drinkers in a naturalistic setting. *Alcoholism, clinical and experimental research*, 29(5), 756 – 762. <https://doi.org/10.1097/01.alc.0000163499.64347.92>
- 九、Lukas, S. E., Penetar, D., Su, Z., Geaghan, T., Maywalt, M., Tracy, M., Rodolico, J., Palmer, C., Ma, Z., & Lee, D. Y. (2013). A standardized kudzu extract (NPI-031) reduces alcohol consumption in nontreatment-seeking male heavy drinkers. *Psychopharmacology*, 226(1), 65 – 73. <https://doi.org/10.1007/s00213-012-2884-9>
- 十、Mallard, T. T., Ashenhurst, J. R., Harden, K. P., & Fromme, K. (2018). GABRA2, alcohol, and illicit drug use: An event-level model of genetic risk for polysubstance use. *Journal of abnormal psychology*, 127(2), 190 – 201. <https://doi.org/10.1037/abn0000333>
- 十一、Mathur, P., Berberoglu, M. A., & Guo, S. (2011). Preference for ethanol in zebrafish following a single exposure. *Behavioural brain research*, 217(1), 128 – 133. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2010.10.015>
- 十二、Morikawa, H., & Morrisett, R. A. (2010). Ethanol action on dopaminergic neurons in the ventral tegmental area: interaction with intrinsic ion channels and neurotransmitter inputs. *International review of neurobiology*, 91, 235 – 288. [https://doi.org/10.1016/S0074-7742\(10\)91008-8](https://doi.org/10.1016/S0074-7742(10)91008-8)
- 十三、Penetar, D. M., Toto, L. H., Farmer, S. L., Lee, D. Y., Ma, Z., Liu, Y., & Lukas, S. E. (2012). The isoflavone puerarin reduces alcohol intake in heavy drinkers: a pilot study. *Drug and alcohol dependence*, 126(1-2), 251 – 256. <https://doi.org/10.1016/j.drugalcdep.2012.04.012>

十四、 Sophia. (2019, August 9). 令人驚奇的分子料理是這樣來的：食品科學中的晶球技術（上）. 泛科學. <https://pansci.asia/archives/164992>

十五、 Varodayan, F. P., Pahng, A. R., Davis, T. D., Gandhi, P., Bajo, M., Steinman, M. Q., Kiosses, W. B., Blednov, Y. A., Burkart, M. D., Edwards, S., Roberts, A. J., & Roberto, M. (2023). Chronic ethanol induces a pro-inflammatory switch in interleukin-1 β regulation of GABAergic signaling in the medial prefrontal cortex of male mice. *Brain, behavior, and immunity*, 110, 125 – 139.
<https://doi.org/10.1016/j.bbi.2023.02.020>

十六、 Wang, F., Li, Y., Zhang, Y.-J., Zhou, Y., Li, S., & Li, H.-B. (2016). Natural Products for the Prevention and Treatment of Hangover and Alcohol Use Disorder. *Molecules*, 21(1), 64.
<https://doi.org/10.3390/molecules21010064>

十七、 Zhang, Z., Li, S., Jiang, J., Yu, P., Liang, J., & Wang, Y. (2010). Preventive effects of Flos Perariae (Gehua) water extract and its active ingredient puerarin in rodent alcoholism models. *Chinese medicine*, 5, 36. <https://doi.org/10.1186/1749-8546-5-36>

十八、 文芳方, 欣岱李, 千田蘇, 芸霏李, & 國軒鐘. (n.d.). 酒癮及酒精戒斷症候群. 家庭醫學與基層醫療, 25(7). <file:///C:/Users/jinge/Downloads/250703.pdf>

十九、 李懿芸. (2017, July 31). 中醫本草時間—葛根的食用及藥用. 農業知識入口網.
https://kmweb.moa.gov.tw/theme_data.php?theme=news&sub_theme=agri_life&id=55027#:~:text=%E6%AD%B8%E7%B4%8D%E6%AD%B7%E4%BB%A3%E6%9C%AC%E8%8D%89%E5%A0%B8%E8%91%97%E8%BF%B0,%E5%81%8F%E5%90%91%E5%8D%87%E9%99%BD%E6%AD%A2%E7%80%89%E3%80%82

二十、 陳琦, 2014(n.d.). 第十三屆旺宏科學獎 成果報告書:魚類藥物餵食載體之機制—以餵食斑馬魚為例. Retrieved from
<https://www.mxeduc.org.tw/scienceaward/history/projectDoc/13th/doc/SA13-027.pdf>

二十一、 黃力偉、董至剛 (2016)。酒癮及戒斷症候群。家庭醫學與基層醫療，31(10)，

335-342。<https://www.airitilibrary.com/Article/Detail?DocID=P20090727001-201610-201611030006-201611030006-335-342>

二十二、衛生福利部。(2023, November 24). 酒防中心即啟航 戒酒之路伴你行 首家「台灣戒酒暨酒癮防治中心」啟航，酒癮預防與治療邁入新里程碑. 衛生福利部.
<https://www.mohw.gov.tw/cp-16-76686-1.html>

二十三、魏述永 (Wei, S.). (2015). 葛根及葛根素腦保護作用的研究進展. *食品科學(Food Science)*, 17(05), 259-263.<https://doi.org/10.7506/spkx1002-6630-201517048>

【評語】052708

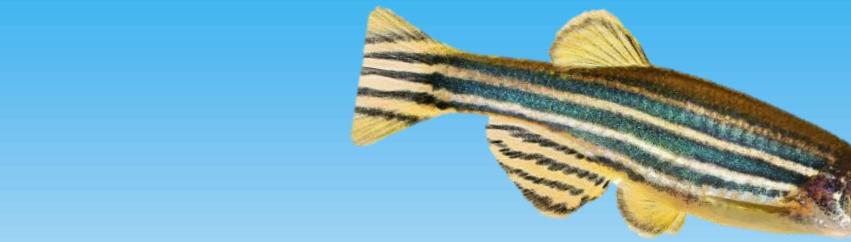
本作品以斑馬魚作為動物模型，利用場地制約偏好（CPP）實驗探討酒精成癮記憶的形成與消除，並評估葛根爆爆珠對酒精記憶消除的效果。

建議：

1. 對於 CPP 模型的侷限性（如與真正記憶行為模式的差異）可加以討論。酒精成癮行為和記憶之間的關聯、斑馬魚場地制約模型在過往文獻中的使用，建議有更清楚的鋪陳、論述。
2. 建議使用 pharmacological blockade 的方式，進一步了解其神經生理機制。
3. 呈現研究結果時，應報告出統計數據。除了採用 ANOVA，也可考慮採用迴歸分析。
4. 有些參考文獻資料未出現在作品的內容中。
5. 強化與現有藥物載體（如微膠囊、奈米載體等）的比較，突顯本研究的獨特性。

作品海報

「葛」仙釀「珠」，脫「酒」成仙



摘要

本研究主要透過斑馬魚場地制約模型，使酒精與背景形成記憶聯結進而改變斑馬魚原本的背景偏好，先測試0.5%、1%、1.5%酒精，再看哪一種酒精濃度能夠產生最好的偏好改變。最後選擇效果最好的濃度並使用海藻酸鈉與葛根製成爆爆珠與普通爆爆珠比較能否加快消除酒精造成的記憶聯結。記憶消除後，再次訓練並比較再固化記憶後給予葛根爆爆珠的效果。

結果顯示葛根爆爆珠比普通爆爆珠消除記憶的時間更短，代表葛根具有加快消除酒精造成的記憶。因此，我們推測人類食用葛根能夠加快酒精成癮的戒除。

我們也探討爆爆珠作為藥物載體的可能性，與管餵的優缺點比較，經過統計後發現爆爆珠的適口性高達91.67%，在未來可當作一種可靠的藥物載體。

壹、研究動機

新聞中時常可以看到許多人因為長期酗酒進而有暴力傾向的行為，導致了許多家庭破碎，根據統計台灣有超過100萬人有酒精成癮的問題，而長期飲酒也會造成許多生理上的疾病（例如：肝癌、記憶下降等），因為考慮到酒精成癮對個人、家庭及社會在健康上的重大危害，所以戒斷酒精成癥及減少復發的方式變得相當重要。於是我們尋找到黃連解酒湯可以有解酒效果，而葛根是黃連解酒湯中的一味藥材，所以我們從中藥材葛根（Kudzu）做為發想，我們假設葛根能夠加快消除酒精造成的記憶。

貳、目的

一、實驗A：探討斑馬魚對不同酒精濃度造成的偏好改變能力比較。

二、實驗B：使斑馬魚產生酒精記憶之後，再餵食葛根爆爆珠，觀察其是否可以減少酒精記憶消除的時間，以及比較0.5%、1%、1.5%酒精的記憶消除速度。

三、實驗C：探討記憶消除後再受到藥物刺激，斑馬魚對酒精記憶的再固化，再比較餵食葛根爆爆珠的效果。

四、適口性測試：探討使用海藻酸鈉包覆中藥粉作為載體是否為一種可行的給藥方法。

參、研究設備與器材



圖1 CPP測試盒



圖2 酒精訓練瓶

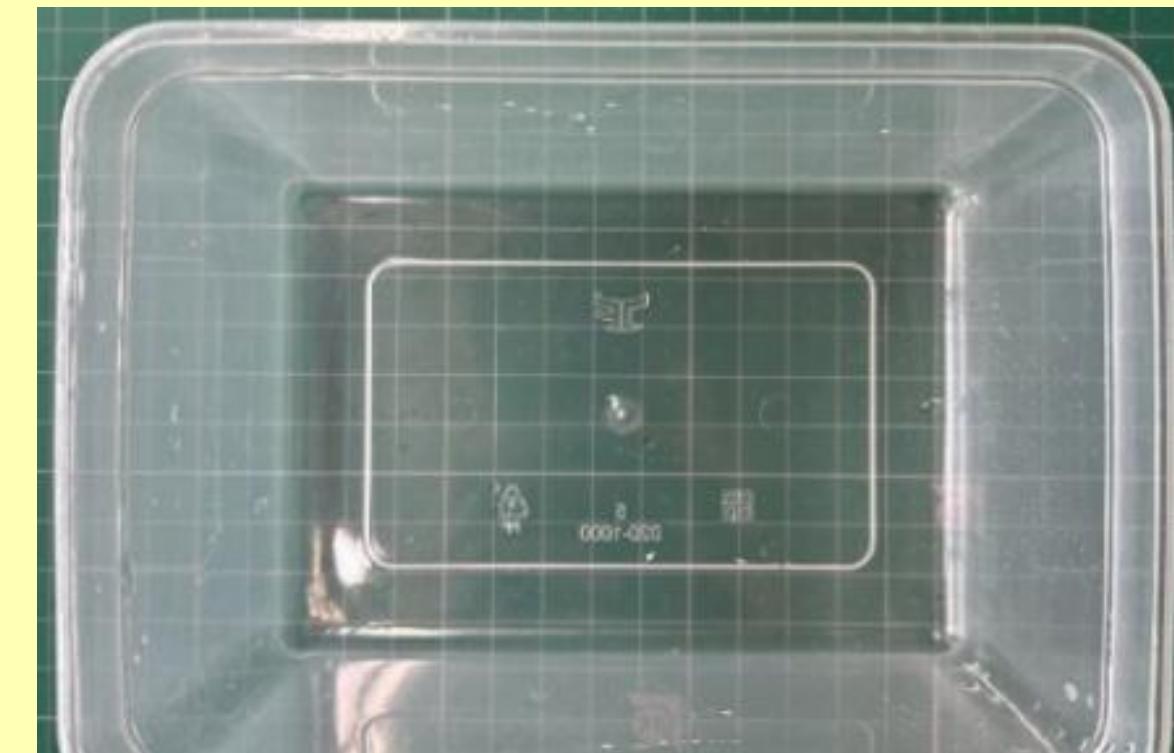


圖3 單獨隔離盒



圖4 90%酒精

肆、文獻回顧

一、GABA_A受體及葛根（Lobed Kudzuvine Root, Kudzu）成分&功效

葛根（Lobed Kudzuvine Root）的主要化學成分包括葛根素、異黃酮類化合物、澱粉、膳食纖維、胺基酸，其中包含的葛根素（Puerarin）具有抗細胞凋亡、抑制促發炎介質、調節自噬作用、抗氧化、保護粒線體、抑制鈣內流和抗神經退化活性等作用（Liu et al., 2023）。葛根在傳統中藥方裡的功能為解肌退熱、生津止渴、發表透疹、升陽止瀉還能解酒毒（李懿芸 等人, 2018）。

過去有文獻指出酒精也會造成神經性發炎，其中介白素（Interleukin-1 beta.IL-1 β ）在大腦內側前額葉皮質（mPFC）前邊緣區域的GABA有著調節的功能，它可作為控制發炎或是神經保護作用的關鍵調節因子。在沒有酒精的情況下，它會表現保護神經的功能，但如果長期接觸酒精則會表現出發炎反應（Varodayan et al., 2023）。

過去文獻指出葛根素能夠在大腦皮質與海馬迴逆轉酒精造成的GABA受體下調，也能夠在大腦皮質及海馬迴中逆轉酒精導致的發炎因子IL-1 β 的上調（Cui et al., 2015），進而改善神經傳遞的平衡，可見得葛根在酒精相關受體造成的症狀治療上有著相當的潛力。因此，我們假設葛根能夠有效縮短酒精造成的記憶消除時間。

二、場地制約偏好（conditioned place preference, CPP）

場地制約偏好被廣泛應用於測試有成癮性的藥物，透過在不偏好側背景（海軍藍與米黃色垂直相間條紋）給予成癮性藥物做聯結，再記錄在不同場地之間的偏好程度變化，可以用來評估藥物的成癮性或開發可以縮短戒斷成癮時間的相關藥物。

三、記憶再固化（Reconsolidation）

（一）第一次訓練後的記憶：

斑馬魚經由藥物與特定背景的配對，形成穩定的CPP記憶，該記憶經過初步鞏固。

（二）記憶消除：

經過時間消退後，該記憶表現可能減弱甚至消失，但記憶痕跡仍存在於神經迴路中。

（三）再次訓練（記憶再激活）：

當斑馬魚再次接受相同的藥物-背景訓練，原有記憶會被提取並進入可塑不穩定狀態。

（四）再固化過程：

此時記憶需依賴蛋白質合成等分子機制重新鞏固，穩定記憶痕跡，並可能整新資訊以更新記憶內容。

四、分子料理——爆爆珠

先前有文獻指出利用以2.5%海藻酸鈉、3%氯化鈣製成的爆爆珠形式包裹中藥粉能夠增加斑馬魚對中藥材的適口性（陳琦，2014），加上使用飼料形式餵食，相較於傳統泡在萃取液中吸收的藥效會更加均勻，與管餵相比則可以避免死亡的風險。

伍、研究過程與方法

一、測試流程

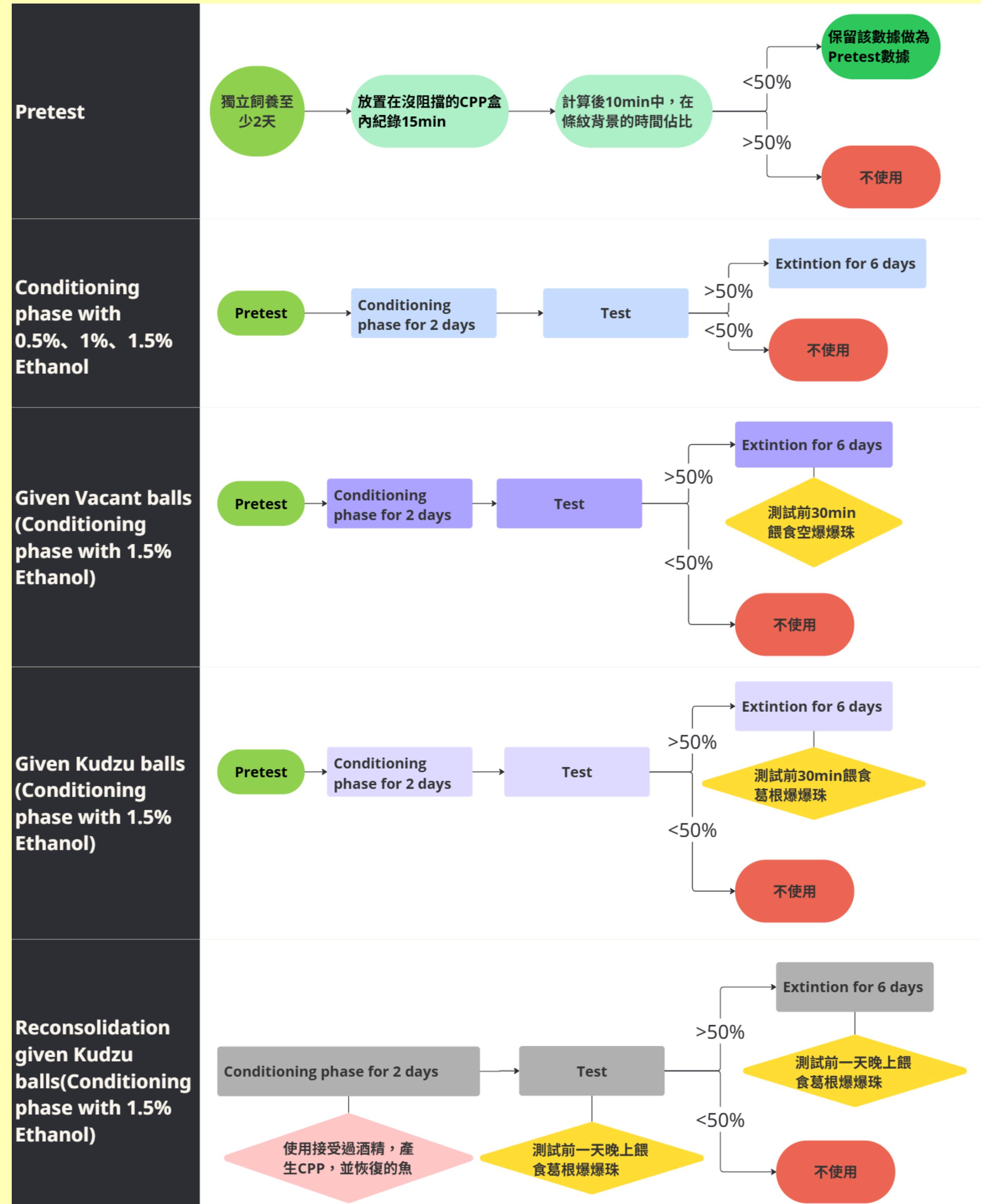


圖5 測試流程圖

二、中藥飼料製作——葛根爆爆珠：適口性測試

- (一) 取 98ml RO 水與 2g 海藻酸鈉粉混合，再使用酒精燈加熱到 35°C，一邊使用玻棒攪拌至全部溶解，再將 6g 葛根中藥粉末與其混合，並攪拌均勻。
- (二) 將 98ml RO 水與 2g 乳酸鈣粉末混合，加熱至 35°C，並攪拌至完全溶解為止。
- (三) 將一般飼料顆粒用研磨鉢研磨成極細粉末，再加入到海藻酸鈉溶液內。
- (四) 使用注射器吸取中藥海藻酸鈉水溶液，要注意吸取時粉末需均勻分布，才能確保整顆單位體積的劑量。
- (五) 將中藥海藻酸鈉水溶液從注射器中擠出，形成直徑為 1mm 的球體，使其在飼料粉末中滾動，直到整顆表面都能完整吸附飼料粉末，再泡入乳酸鈣溶液中旋轉幾圈，以確保表面的粉末脫落，只保留被海藻酸鈉固定的飼料，才不會導致魚只吃剝落的飼料，而不吃含有藥物的整顆爆爆珠。

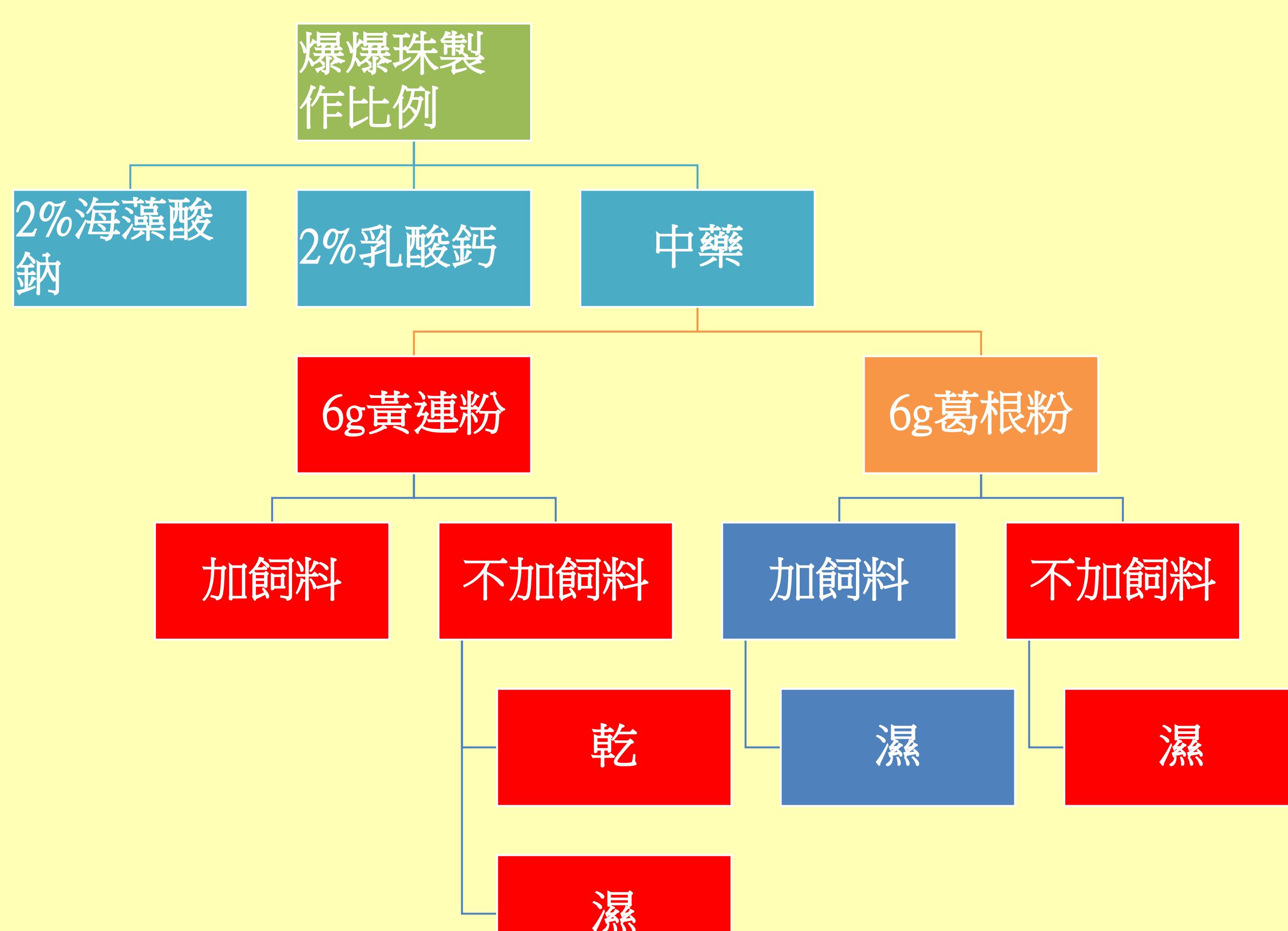


圖6 不同中藥乾與濕的適口性比較
紅色代表適口性為0，代表吃進去後又馬上吐出來

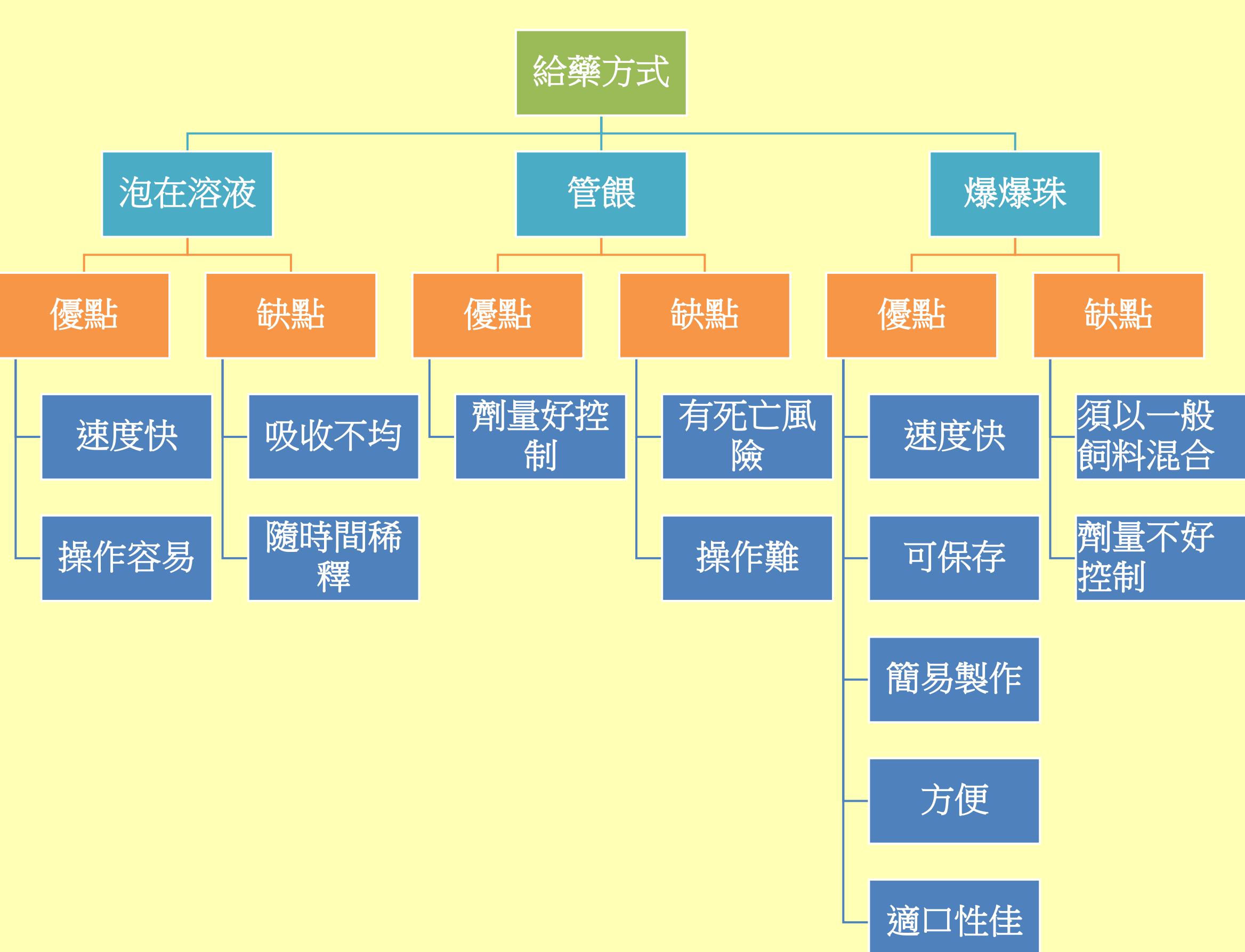


圖7 斑馬魚藥物載體方式的優劣比較

陸、研究結果

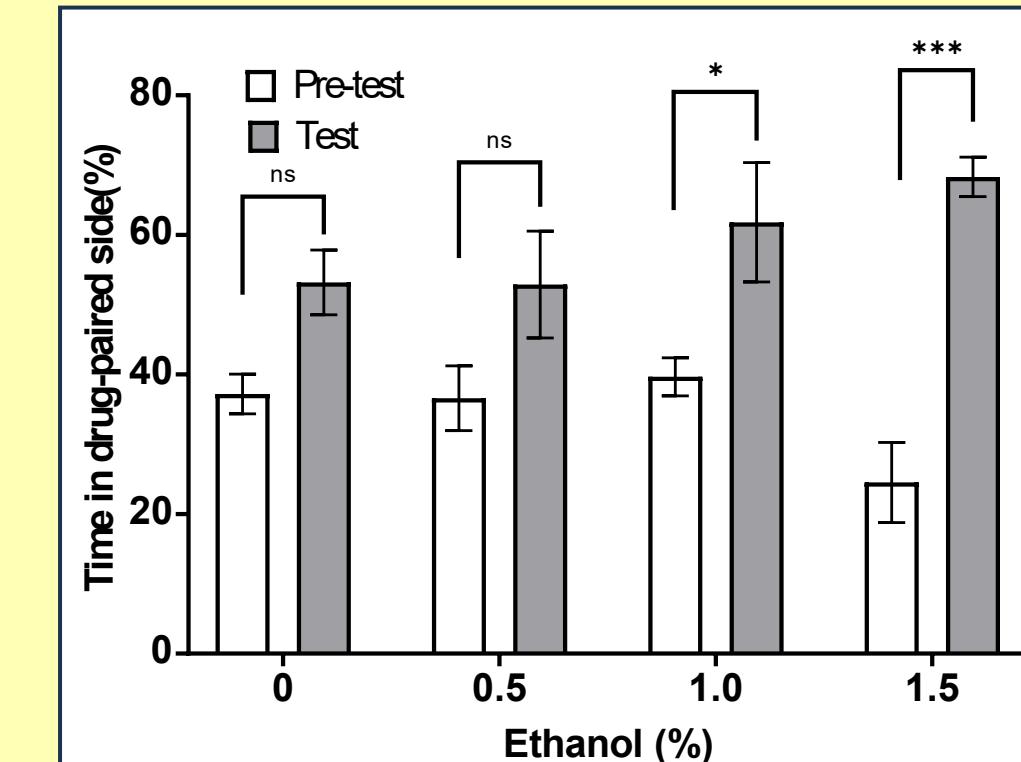


圖8 0%、0.5%、1%、1.5% Pretest 與 Test 比較

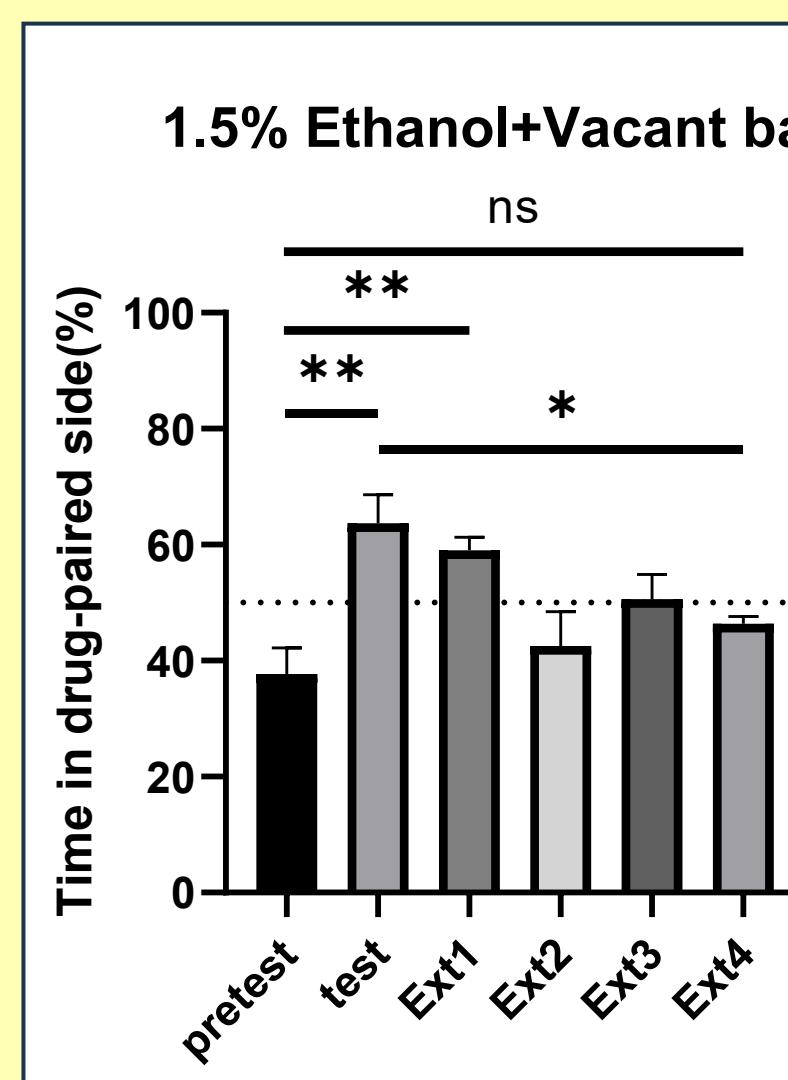


圖9 1.5% 酒精+普通
爆爆珠

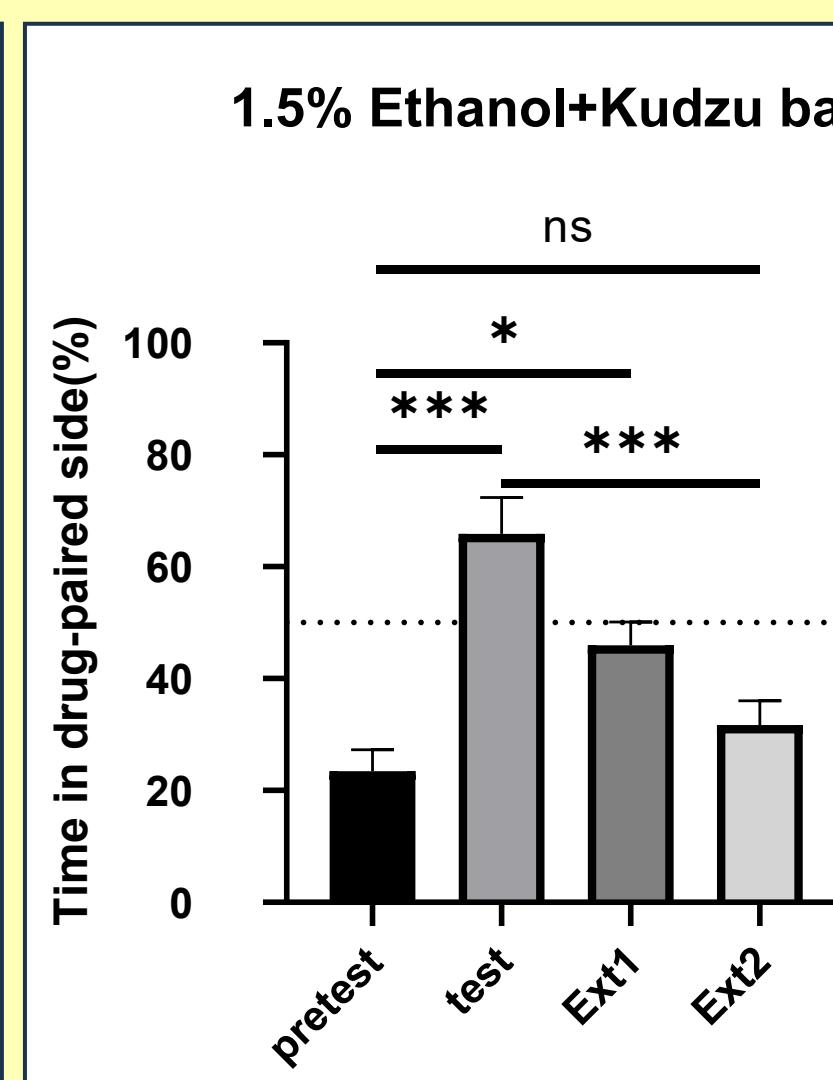


圖10 1.5% 酒精+葛
根爆爆珠

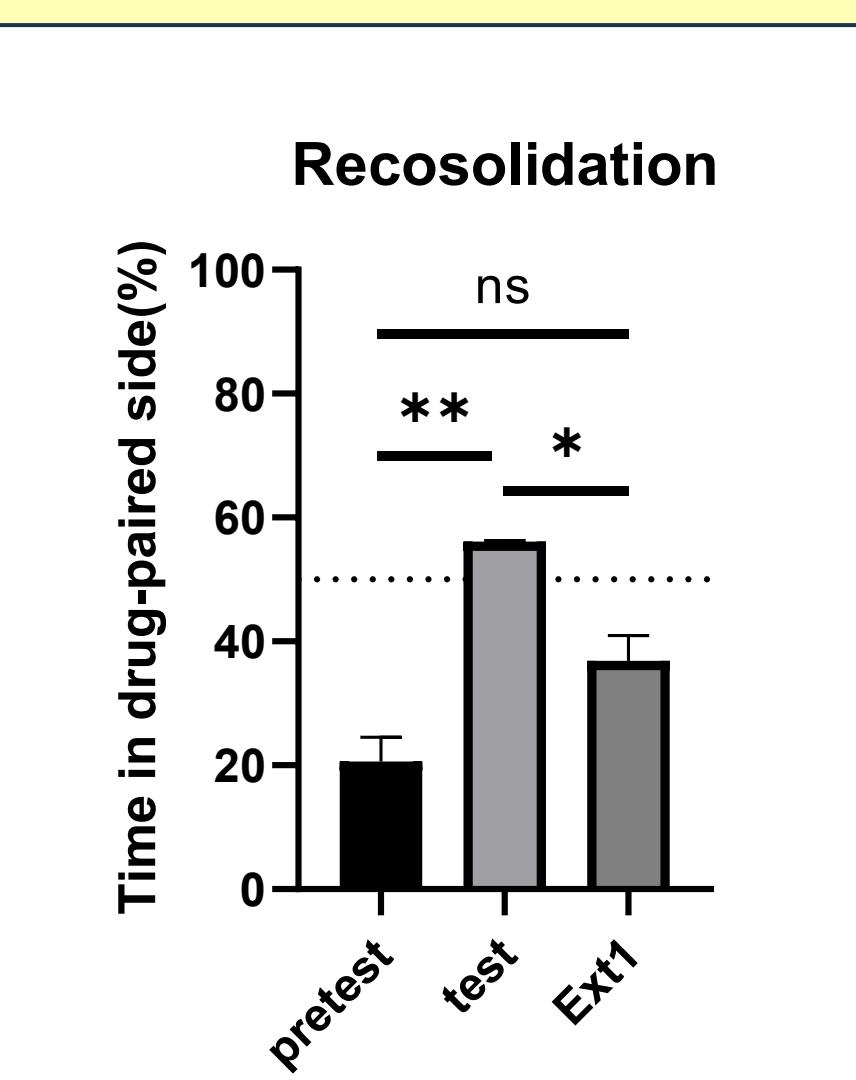


圖11 1.5% 酒精+葛
根爆爆珠
Reconsolidation

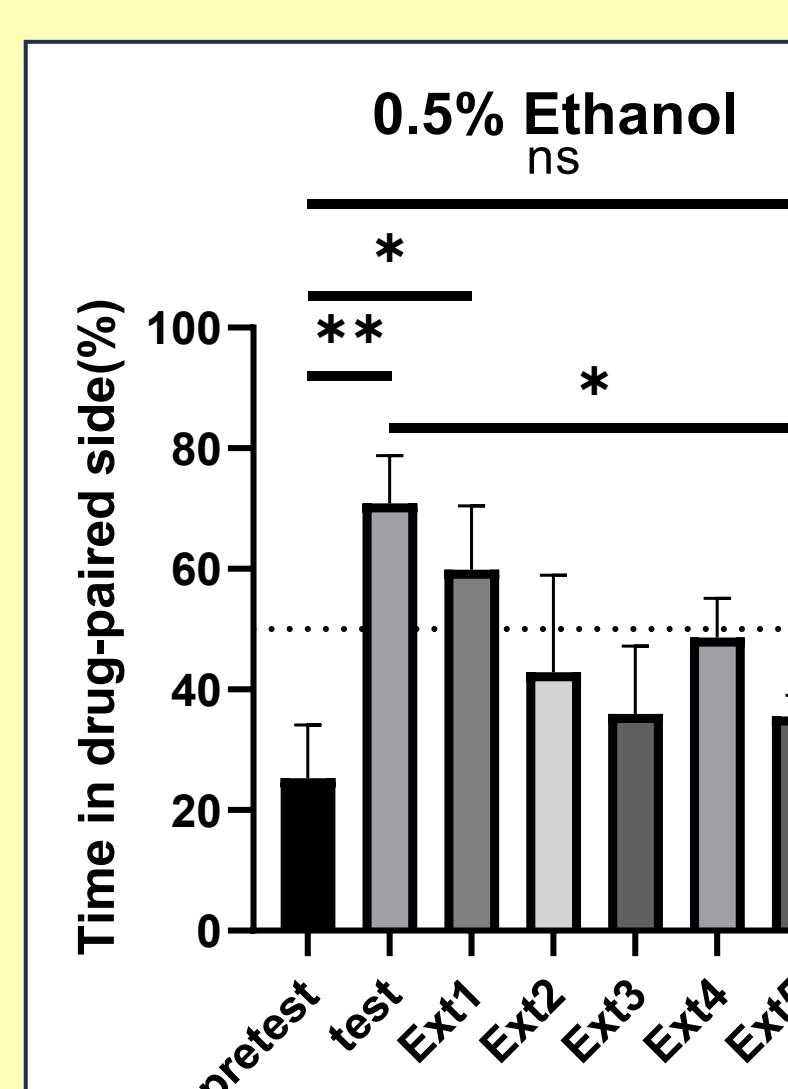


圖12 0.5%、1%、1.5%

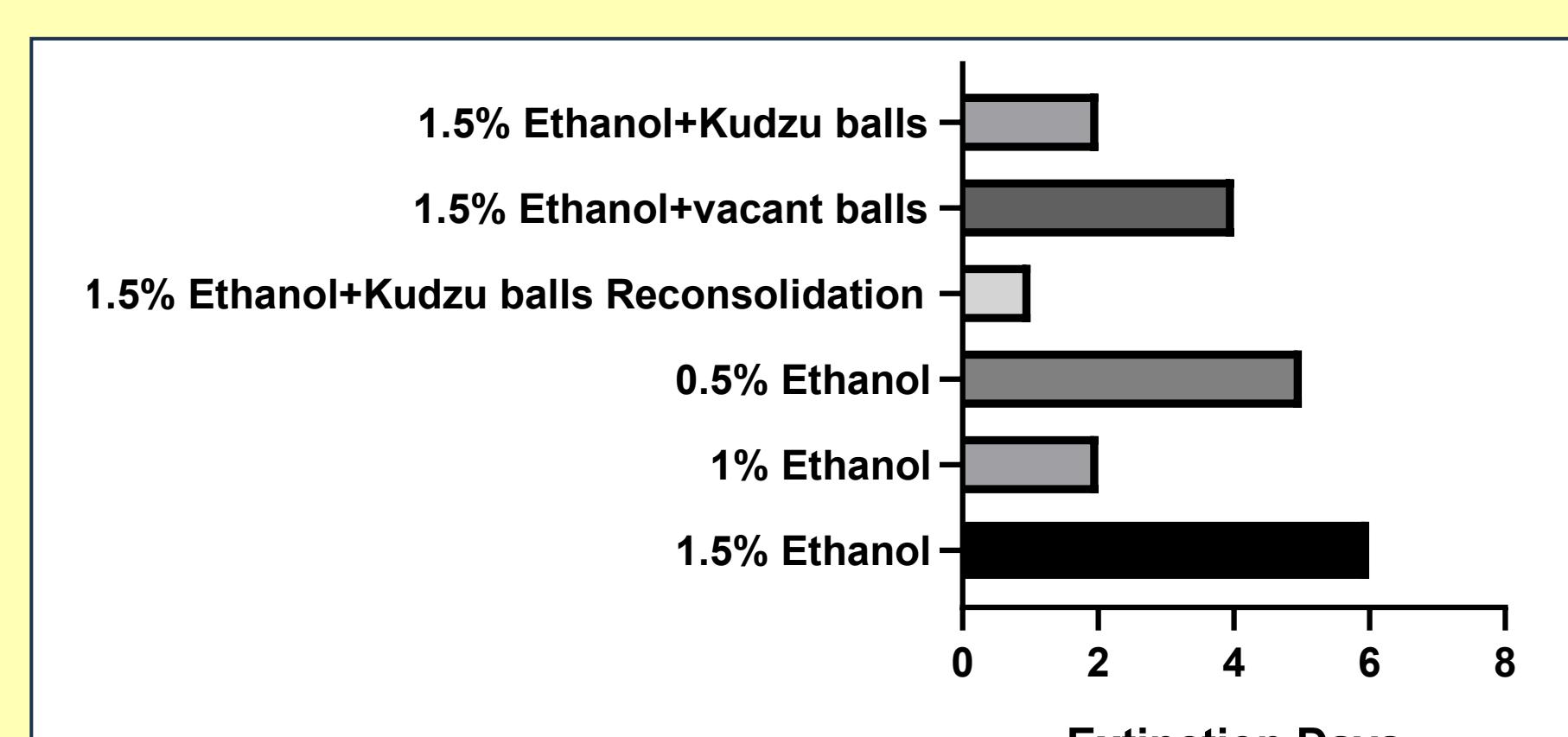


圖13 Extinction 時間比較

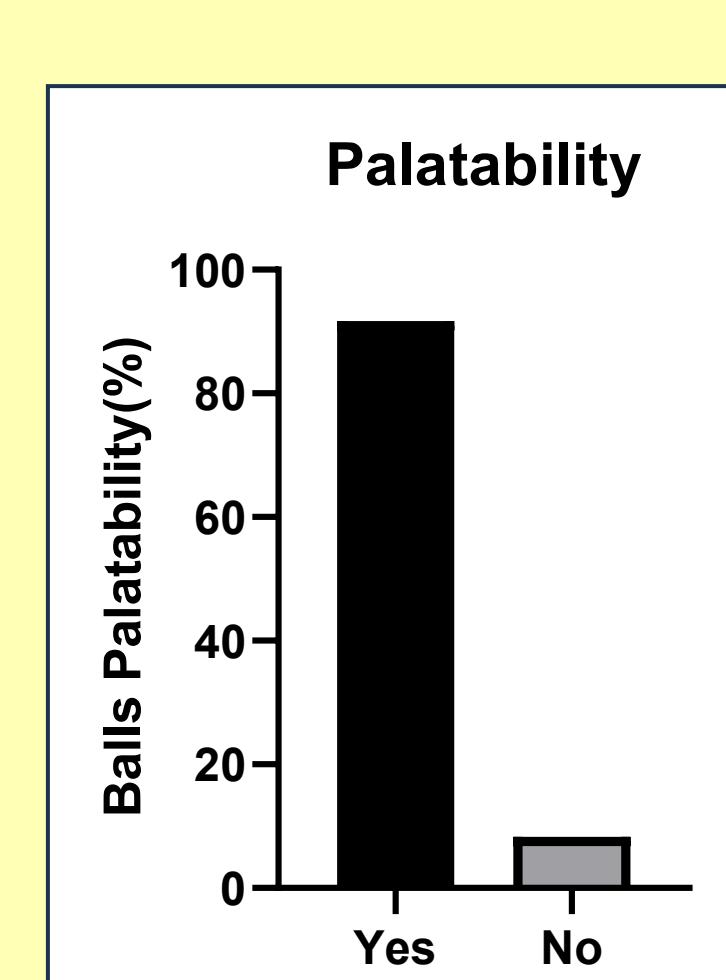


圖14 適口性

以公式「 $\frac{\text{有吃次數}}{\text{餵食總次數}} \times 100\%$ 」計算斑馬魚對爆爆珠的適口性比例，以 Yes 代表有吃的 percentage，No 代表沒吃的 percentage

一、實驗 A

以0%酒精作為對照組與其餘三種不同的酒精濃度作為3組實驗組的比較（圖8），0%酒精 Pretest 與 Test 之間未能產生顯著差異，代表無法改變偏好，其餘三種酒精濃度則皆能產生偏好的改變，這代表酒精是一種能夠有效運用在斑馬魚 CPP 模型中的成癮藥物。

三種含酒精的組別相互比較，可以發現1.5%酒精消除記憶所花費的時間是三種濃度中最久的。因此，我們推測若有酒精成癮的患者飲用的酒其所含的酒精濃度越高，要戒斷所需的時間也會較久。

二、實驗 B 與實驗 C

根據（圖9）、（圖10）得知普通爆爆珠與含葛根的爆爆珠兩組完全消除記憶的時間，葛根爆爆珠需要2天，普通爆爆珠則為4天。因此，我們推測葛根能夠作為加快酒精成癮患者戒除酒癮的藥物。

將第一次經過酒精訓練後餵食葛根爆爆珠與記憶再固化（Reconsolidation）後餵食葛根爆爆珠所需時間做比較，分別需要2天（圖10）與1天（圖11）的時間，代表酒精的記憶越強，葛根的記憶消除效果也會更強。因此，我們推測給予重度酒精成癮患者食用葛根的效果可能會比輕度的患者效果更為顯著。

比較0.5%、1%、1.5%（圖12）三種濃度的酒精在不給予任何治療藥物的情況下，我們發現1.5%酒精訓練對於斑馬魚消除記憶所需時間最久。因此我們推測酒精成癮患者中，他們所飲用的酒含有的酒精百分比越高，戒除時所需的時間應該也會較長。

柒、討論

一、實驗A

根據三種酒精濃度產生的場地制約模型重現（Chen et al., 2023）的效果，我們發現酒精是一種可以有效應用在斑馬魚CPP模型中的藥物，其中以1.5%酒精產生的記憶最為顯著，與文獻相符合（Mathur et al., 2011）。另外，將0.5%、1%、1.5%酒精做比較，我們也發現1.5%酒精改變班馬魚的偏好能力最為顯著。

二、實驗B與實驗C記憶消除時間比較

根據葛根爆爆珠與普通爆爆珠記憶消除時間的比較，可以發現葛根能夠有效縮短酒精造成的記憶消除的時間，符合（Cui et al., 2015）的結果，它能夠有效降低酒精導致的IL-1 β 發炎，也能夠逆轉酒精成癮導致的GABA受體下調。

在記憶再固化後，餵食葛根爆爆珠，與第一次酒精訓練後餵食葛根爆爆珠消除記憶的時間比較，我們發現再固化後給予葛根的治療效果比第一次接觸時效果更好。可能是基於再固化，會重塑記憶，這個時候給予葛根對記憶方面的效果較為顯著。

比較三種酒精濃度，我們發現濃度最高的1.5%酒精消除記憶所需的時間最久。因此，我們推測酒精成癮患者飲用的酒類其酒精含量越高，戒斷時間也就越長，酒精攝取量越多與酒精成癮嚴重程度呈正相關的結果（Carr et al., 2024）。

三、適口性測試

使用爆爆珠作為給予斑馬魚藥物的載體是一個相當有效的方式（陳琦，2014），雖然要刪除少數未食用爆爆珠的個體，但整體來說風險相較管餵有著明顯的優勢，使用爆爆珠不僅上手容易，同時也不會導致斑馬魚的意外死亡，如果以管餵的死亡當作未食用，則會導致數據不足的問題。

捌、結論

一、實驗A

根據實驗的結果中可以得知，使用1.5%酒精訓練能夠最有效的改變斑馬魚原有的背景偏好，相較於使用RO水訓練則無法產生顯著的差異，這代表酒精可以當作斑馬魚CPP模型的記憶藥物，其中又以1.5%酒精效果為最佳。

二、實驗B與實驗C

在餵食含有葛根的爆爆珠後，酒精產生的場地制約記憶消除的時間有明顯縮短。因此，我們推測葛根能夠有效縮短酒精成癮患者戒斷的時間，同時我們也比較記憶再固化後葛根的效果，發現效果比第一次接觸酒精效果更加顯著。因此，我們推測若給予重度酒精成癮患者食用葛根，效果應該會更好。

比較三種酒精濃度的記憶消除速度，我們也證實酒精濃度越高，產生的場地制約記憶也越強烈。因此，我們推測酒精成癮患者若飲用酒精濃度越高的酒，所需戒斷的時間也會愈久。

三、適口性測試

以爆爆珠作為斑馬魚藥物的載體是相當具有前景的方法，風險相較於管餵有著明顯的優勢，它並不會導致斑馬魚的意外死亡，再加上操作的簡易性，還能夠加快給藥的速度，同時也是一種更為人道的給藥方式。

玖、參考文獻資料

Chen, L. C., Chan, M. H., & Chen, H. H. (2023). Extinction and reinstatement of methamphetamine-induced conditioned place preference in zebrafish. *Addiction biology*, 28(12), e13351. <https://doi.org/10.1111/adb.13351>

Carr, T., Kilian, C., Llamosas-Falcón, L., Zhu, Y., Lasserre, A. M., Puka, K., & Probst, C. (2024). The risk relationships between alcohol consumption, alcohol use disorder and alcohol use disorder mortality: A systematic review and meta-analysis. *Addiction (Abingdon, England)*, 119(7), 1174 – 1187. <https://doi.org/10.1111/add.16456>

Cui, S. Q., Wang, Q., Zheng, Y., Xiao, B., Sun, H. W., Gu, X. L., Zhang, Y. C., Fu, C. H., Dong, P. X., & Wang, X. M. (2015). Puerarin protects against damage to spatial learning and memory ability in mice with chronic alcohol poisoning. *Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas*, 48(6), 515 – 522. <https://doi.org/10.1590/1414-431X20144250>

Liu, X., Huang, R., & Wan, J. (2023). Puerarin: a potential natural neuroprotective agent for neurological disorders. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*, 162, 114581. <https://doi.org/10.1016/j.bioph.2023.114581>

Mathur, P., Berberoglu, M. A., & Guo, S. (2011). Preference for ethanol in zebrafish following a single exposure. *Behavioural brain research*, 217(1), 128 – 133. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2010.10.015>

Varodayan, F. P., Pahng, A. R., Davis, T. D., Gandhi, P., Bajo, M., Steinman, M. Q., Kiosses, W. B., Blednov, Y. A., Burkart, M. D., Edwards, S., Roberts, A. J., & Roberto, M. (2023). Chronic ethanol induces a pro-inflammatory switch in interleukin-1 β regulation of GABAergic signaling in the medial prefrontal cortex of male mice. *Brain, behavior, and immunity*, 110, 125 – 139. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2023.02.020>

李懿芸. (2017, July 31). 中醫本草時間—葛根的食用及藥用. 農業知識入口網. https://kmweb.moa.gov.tw/theme_data.php?theme=news&sub_theme=agri_life&id=55027#:~:text=%E6%A D%8B%E7%84%8D%E6%AD%B7%E4%BB%A3%E6%9C%AC%E8%8D%89%E5%AD%B8%E8%91%97%E8%BF%B0,%E5%81%8F%E5%90%91%E5%8D%87%E9%99%BD%E6%AD%A2%E7%80%89%E8%80%82

陳琦,2014(n.d). 第十三屆旺宏科學獎 成果報告書:魚類藥物餵食載體之機制 一以餵食斑馬魚為例. Retrieved from <https://www.mxeduc.org.tw/scienceaward/history/projectDoc/13th/doc/SA13-027.pdf>