2014 年臺灣國際科學展覽會
優勝作品專輯

作品編號　120013

參展科別　環境科學

作品名稱　塑化劑對斑馬魚生長發育與活動力之影響

得獎獎項　大會獎：三等獎

就讀學校　國立臺南女子高級中學

指導教師　邱世寬

作者姓名　許沛恩、盧瑄

關鍵字　斑馬魚、塑化劑、生長發育

作者簡介－許沛恩

科展，是我每個求學階段的共同回憶。小四的黴菌實驗讓我在觀察五顏六色黴菌的過程中，悄悄開啟了對科學的興趣。小六的牙刷實驗是一個非常生活化的題目，對我來說也是一種截然不同的體驗，從實驗設計到報告呈現都讓我對科展有更深入的認識。進入國中後，課業的壓力讓我越來越沒有時間投入很多心力和時間在自然科學實驗，但我仍在國二的時候擠出了時間做一份有關碳黑層科展。這對我來說是全然不熟悉的領域，在實驗設計方面也遭受了很大的瓶頸，也更讓我了解實驗設計、實作和整理報告之間的重要性。現在我正就讀國立台南女中二年級，期待藉由國際科展，能在繁忙的高中生活中，再度享受科學實驗的樂趣。

作者簡介－盧瑄

六歲開始很嚮往科學家的工作，小三時第一次投入科展，探討各種水果在水中是浮起或沉入，四年級時利用顯微鏡觀察黴菌的生長參加科展，隔年順應台灣南部登革熱的傳染情形嚴重，研究天然防蚊液製作，第一次在評審面前談論自己的作品，小六科展研究市面上各種牙刷清潔牙齒效果的比較。國一協助果農解決芒果花和嫩葉被葉蟬吃掉的困擾，探討精油種類及濃度與驅趕葉蟬數量、距離、時間長短的關係。國二利用改變內外鍋水量來減少煮飯時間，以達到省電的功效。高中後以中研院研究水稻基因的余淑美院士為模範，往植物病理學的方向學習。

摘要

鄰苯二甲酸二(2-乙基己基)酯(di(2-ethylhexyl) phthalate, DEHP)是一種被廣泛使用的塑化劑，具內分泌干擾性質的環境污染物。研究目的是建立斑馬魚模式來檢驗 DEHP 對環境健康之衝擊。本研究區分為四組，包括 DEHP 暴露組(10 mg/L 與 100 mg/L 組)與控制組(Fish water 與 DMSO 組)。DEHP 暴露 10 mg/L 組與 100 mg/L 組的濃度選擇，是參考 DEHP 污染環境地下水濃度的 30 與 300 倍而決定。研究發現 DEHP 暴露組(100 mg/L)的幼魚身長與後端腹腔有明顯下降($P < 0.05$)，DEHP 對基因轉殖斑馬魚胚胎的身長與後端腹腔長比野生斑馬魚有顯著影響($P < 0.05$)；DEHP 對成魚游泳行為活動力具有明顯下降之影響($P < 0.05$)。研究結果顯示此新發展出的斑馬魚模式平台，能檢測環境 DEHP 污染對脊椎動物生長發育與行為之影響，未來將可提供塑化劑在環境毒性與健康風險評估之參考。

關鍵字：斑馬魚、塑化劑、生長發育

Effects of Plasticizers on Development and Swimming behavior in Zebrafish

Abstract

Di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP), one of the well known endocrine disruptors for environmental pollutants, is widely used as plasticizers in the manufacture of polyvinyl chloride to improve flexibility. The aim of this study was to establish a zebrafish model to detect the impact of DEHP in environmental health. In this study, the zebrafish embryo and adults were randomly divided into 4 groups of DEHP exposure (10 mg/L and 100 mg/L) and controls (fish water and DMSO). The selection of DEHP concentrations is approximately 30 and 300 times higher than the levels of DEHP-contaminated ground waters (300 μg/L). A significant decrease was observed in the body and post-abdominal cavity lengths in the group of embryo-larval exposed to 100 mg/L of DEHP ($P < 0.05$). We observed a significant effect on body and post-abdominal cavity lengths in transgenic zebrafish as compared to the wild-type zebrafish ($P < 0.05$). We observed that differences in swimming trajectory were significant; however, there were no significant changes among the adult wild-type zebrafish of 4 groups ($P < 0.05$). In conclusion, our results suggested that this new developed model can serve an alternative platform to assay and evaluate the environmental toxicity of DEHP on vertebrate for development and behavior. This study will provide significant implications of understanding the environmental impact and health risk assessments for the plasticizers.

Keywords: Zebrafish; Plasticizers; Development

壹、 前言

(Introduction)

一、 研究動機 (Motivation of Study)：

在各類聚氯乙烯產品製程前，通常會因所需柔軟度不同而加入不同比例的塑化劑，塑化劑中最多的一類便是磷苯二甲酸酯類，其中又以鄰苯二甲酸二(2-乙基己基)酯(簡稱 DEHP)用量最大。塑化劑含有類似女性荷爾蒙的物質，有些哺乳類動物實驗發現會造成內分泌之影響。2011 年 5 月，台灣曾爆發 DEHP 被非法充當起雲劑加入食品與飲料之事件，造成民眾之恐慌，也引起國際的關注。DEHP 在環境中污染濃度最高的地方有：塑膠產品工廠、工業及民生污水處理場、垃圾場、受污染之河川底泥及下水道污泥，顯示 DEHP 已流入河體環境中。一般而言，污染物釋放進入河川中，即使濃度不高，但是經由食物鏈濃縮之作用，亦可能會造成危害。

由於塑化劑對於人類造成的傷害層出不窮，我們想找尋一種實驗對象，可以從胎兒時期的發育便開始觀察它受到塑化劑的影響，因為斑馬魚具體外受精的特性，加上卵徑大且透明，可以在一般的光學顯微鏡下看到清楚的胚胎發育過程。除了使用一般野生種斑馬魚之外，我們也用一種在螢光顯微鏡激發下，在胚胎與身體特殊部位能發出螢光之基因轉殖斑馬魚($Tg(H^2A:dsRed)^{sd1+/(AB)}$)來進行實驗。

環境生態研究也發現斑馬魚的游泳行為會受污水影響，我們也嘗試新建立簡單卻準確的斑馬魚成魚游泳活動力指標，來評估 DEHP 是否對斑馬魚成魚行為造成影響。

有關暴露濃度之選擇，有研究發現在受污染地下水 DEHP 濃度可達到 300 μg/L，本研究的暴露濃度決定動機考量是：DEHP 暴露組濃度 10 mg/L 與 100 mg/L 約為受污染地下水 DEHP 濃度的 30 與 300 倍。

二、 研究目的 (Objectives of Study)：

(一) 建立斑馬魚模式來檢驗 DEHP 對環境健康之衝擊。

(二) 探討不同濃度的 DEHP 水溶液暴露對斑馬魚胚胎生長發育之影響。

(三) 比較基因轉殖之斑馬魚對 DEHP 之生長發育是否與野生種斑馬魚不同。

(四) 觀察 DEHP 是否對斑馬魚成魚游泳活動力造成影響。

貳、 研究方法或過程

(Materials and Methods)

一、研究設備及器材 (Experimental Facility and Equipment)

1. 避光盒
2. 產卵箱
3. 飼育箱
4. 12-孔盤
5. 微量吸管
6. 螢光顯微鏡
7. 魚體量測分析軟體(TSView 10.0)
8. 運動軌跡與速度分析軟體(Tracker-4.82)
9. 統計分析軟體(Excel 2010 及 JMP 4.0)

二、藥品清單 (Chemicals)

1. 鄰苯二甲酸二(2-乙基己基)酯 [Di(2-ethylhexyl) phthalate, DEHP]
2. 二甲基亞砜 (Dimethyl sulfoxide, DMSO)
3. 3-胺基苯甲酸

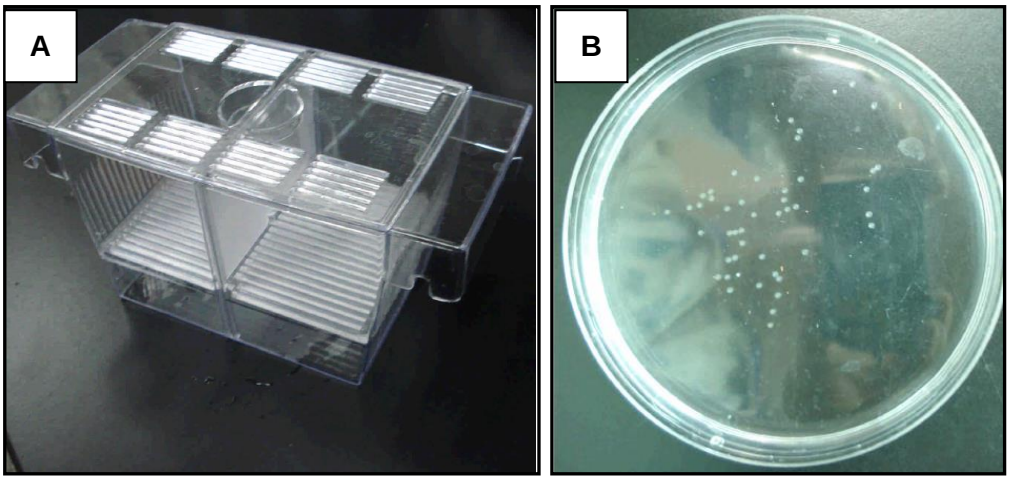
三、實驗動物照顧 (Experimental Animal Maintenance)

(一) 斑馬魚的飼養

斑馬魚魚種來自斑馬魚核心中心衛清分支以及中央研究院，取得魚種後以曝氣水飼養在實驗室裡 30*15*24.5 cm 的魚缸中，光：暗周期為 12 小時，使用魚舖子所購買的飼料每日餵食三次並測量水溫使其維持在 26-28°C。

(二) 斑馬魚受精胚胎收集

大約每星期使其產卵兩次，產卵前一晚將一定數量的雄、雌性斑馬魚放入產卵箱(圖一 A)，給予 12 小時的暗期(不照光)後再給予光線，刺激斑馬魚的追尾行為使其產卵，卵的特性為無黏性、沉降性，每次產卵數量 100-200 顆。我們分批由產卵箱收集受精卵，進行批次實驗(圖一 B)。



圖一：將雄、雌性斑馬魚放入產卵箱(A)；由產卵箱收集受精卵，進行批次實驗(B)。

四、研究設計 (Study Design)

(一) 暴露方式

有研究發現在受污染地下水 DEHP 濃度可達到 300 g/L，本研究的暴露濃度決定動機考量是：DEHP 暴露組濃度 10 mg/L 與 100 mg/L 約為受污染地下水 DEHP 濃度的 30 與 300 倍。

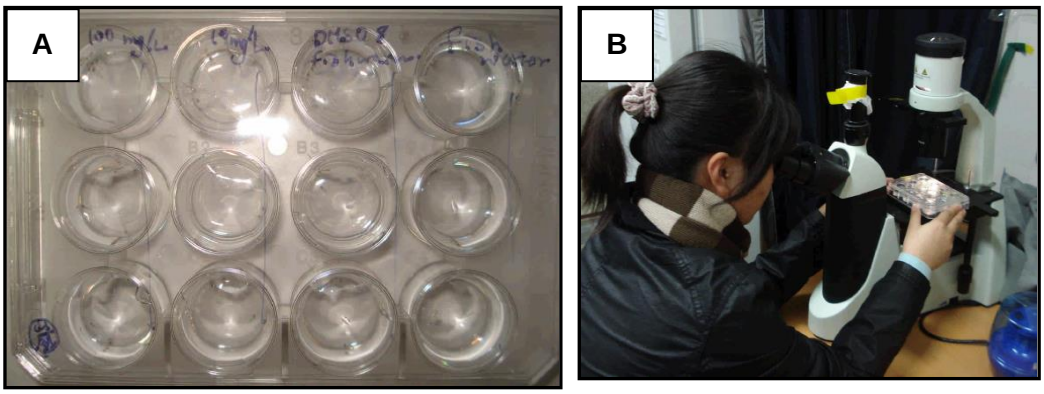
1. **實驗一**：胚胎暴露 DEHP 試驗 (Wild-type 斑馬魚)

使用倒立顯微鏡挑出確定已受精的卵進行 DEHP 暴露。DEHP 暴露使用 12 孔盤分別為控制組(Fish water)、控制組 (DMSO 1 ‰)、DEHP 暴露組(10 mg/L)、DEHP 暴露組(100 mg/L)，每組放置 5 顆卵做 3 重複，一組共 15 顆卵。於卵受精後第 0, 10, 34, 58, 82, 106, 130, 154, 178 小時(hour post-fertilization, hpf)進行「胚胎生長發育量測」(每 12 小時拍照量測卵黃囊直徑，第 3 天開始量身長、腹腔寬、前腹腔長、後腹腔長)。圖二為將胚胎暴露 DEHP 於 12 孔盤並以顯微鏡觀察與評估生長發育。

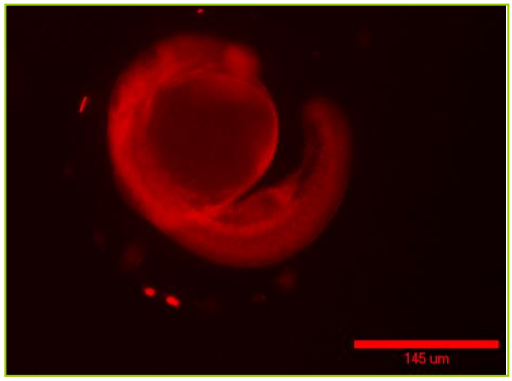
2. **實驗二**：胚胎暴露 DEHP 試驗(基因轉殖斑馬魚)

基因轉殖斑馬魚為由中研院所提供之魚種($Tg(H^2A:dsRed)^{sd1+/(AB)}$)，是一種在螢光顯微鏡激發下，在胚胎與身體特殊部位能發出螢光之斑馬魚(圖三)。使用倒立顯微鏡挑出基因轉殖斑馬魚，確定已受精的卵進行 DEHP 暴露。DEHP 暴露使用 12 孔盤分別為控制組(Fish water)、控制組 (DMSO 1 ‰)、DEHP 暴露組(10 mg/L)、DEHP 暴露組(100 mg/L)，每組放置 5 顆卵做 3 重複，一組共 15 顆卵。於胚胎-幼魚第 0, 10, 34, 58, 82, 106, 130, 154, 178 小時(hour post-fertilization, hpf)進行「胚胎生長發育量測」(每 12 小時拍照量測卵黃囊直徑，第 3 天開始量身長、腹腔寬、前腹腔長、後腹腔長)。實驗一與實驗二皆

使用倒立顯微鏡觀察斑馬魚生長發育和拍攝照片，然後使用電腦軟體量測卵黃囊直徑長、身長、腹腔寬、前腹腔長、後腹腔長五項生長發育特徵數據。



圖二：胚胎暴露 DEHP 於 12 孔盤(A)；胚胎發育之顯微鏡觀察與拍照(B)。



圖三：基因轉殖斑馬魚 ($Tg(H^2A:dsRed)^{sd1+/(AB)}$)胚胎在螢光顯微鏡激發下發出螢光。

(二) 鄰苯二甲酸二(2-乙基己基)酯(DEHP)水溶液製備

(1) 99.9% DEHP 密度計算：

1 mL DEHP 重量用實驗室中的天秤秤，DEHP 溶液：

重量(W)/體積(M) = 0.99 g /1 mL = 990 mg / 0.001 L

= 990,000 mg / 1 L = $9.9*10^5$ mg/L

(2) 由 99.9% DEHP → x mg/L DEHP 換算 89 mg DEHP/ 1 mL DEHP 溶液 → 10,000 mg DEHP/ 10.11 mL DEHP 溶液亦即取出 10.11 mL DEHP 溶液，加入 DMSO 到 1 L → 10,000 mg/L 的母液。即取出 2.528 mL DEHP 溶液，加入 DMSO 到 250 mL 將有 10,000 mg/L 的母液。

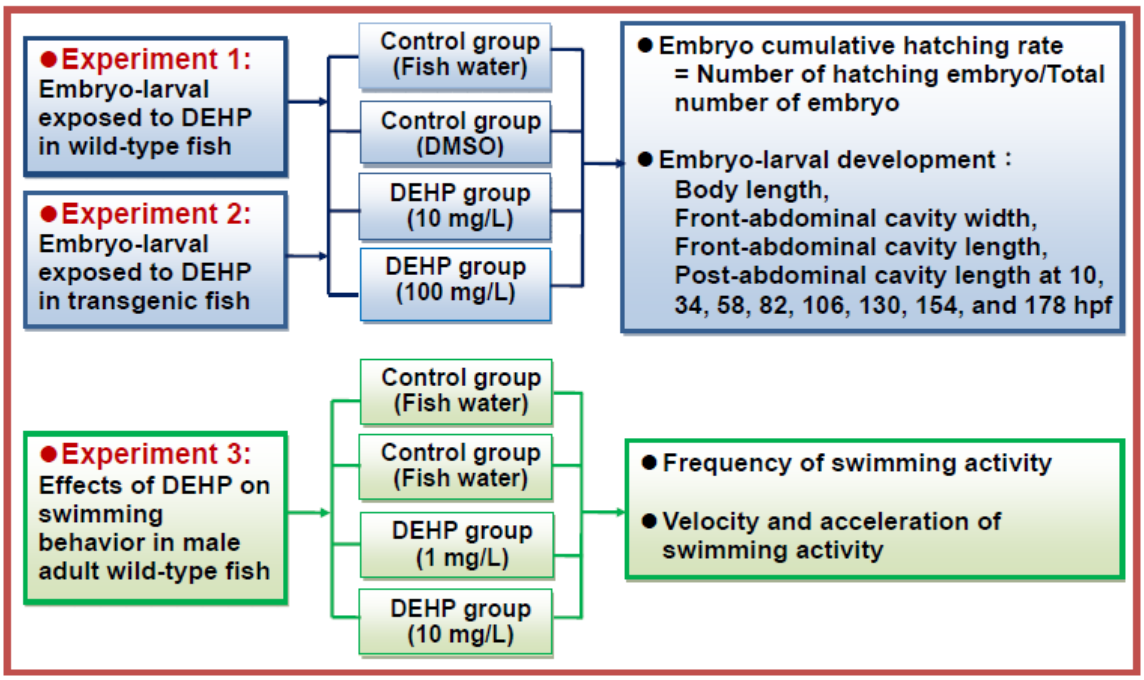
(3) 實驗一與實驗二胚胎暴露 DEHP 試驗的調配比例 (稀釋 1000 倍)

組別	DEHP 母液濃度	水體濃度	DEHP 母液體積	稀釋體積
控制組(Fish water)	---	---	3 μL fish water	2,997 L fish water
控制組(DMSO)	---	---	3 μL DMSO	2,997 L fish water
10 mg/L 組	10,000 mg/L	10 mg/L	3 μL stock solution	2,997 L fish water
100 mg/L 組	100,000 mg/L	100 mg/L	3 μL stock solution	2,997 L fish water

(4) 實驗三：成魚游泳活動力試驗的調配比例

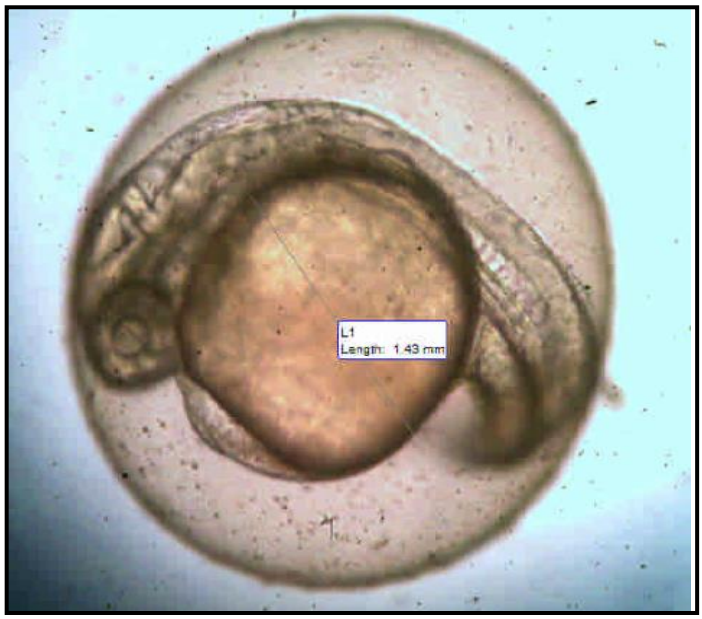
組別	DEHP 母液濃度	水體濃度	DEHP 母液體積	稀釋體積 (總體積)
控制組(Fish water)	---	---	3 mL fish water	297 mL fish water (300 mL)
控制組(DMSO)	---	---	3 mL DMSO	297 mL fish water (300 mL)
1 mg/L 組	10,000 mg/L	1 mg/L	30 μL (0.03 mL) stock solution + 970 μL DMSO (共 1 mL)	299 mL fish water (300 mL)
10 mg/L 組	100,000 mg/L	10 mg/L	300 μL (0.3 mL) stock solution + 9.7 mL DMSO (共 10 mL)	290 mL fish water (300 mL)

(三) 實驗流程 (Flow Chart of Experiments)

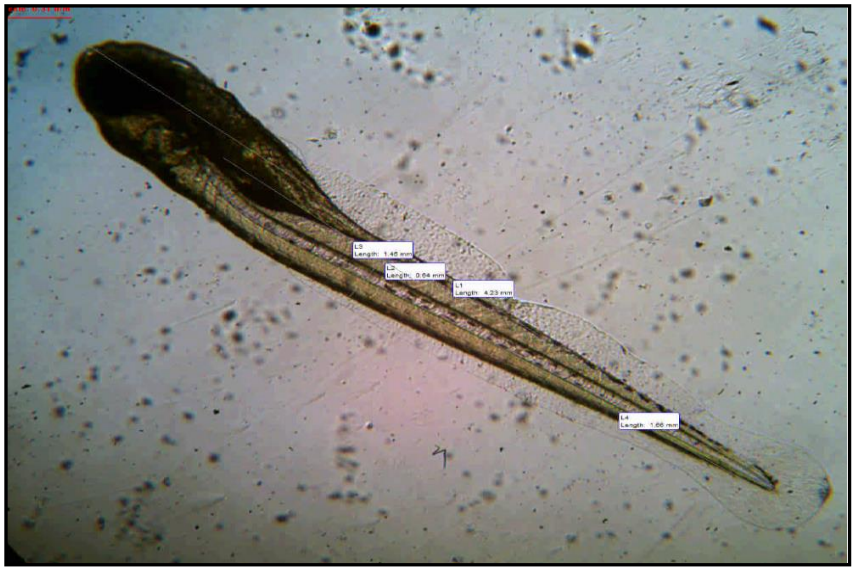


五、胚胎生長發育量測(Measurement of Embryo Growth and Development)

每 12 小時拍照卵黃囊直徑(圖五)，第 3 天開始量身長、腹腔寬、前腹腔長、後腹腔長，再以魚體量測分析軟體(TSView 10.0)於電腦中進行量測(圖六)。



圖四：卵黃囊直徑(L1)量測 (Measurement of the diameter of yolk sac)。



圖五：身長(body length)(L1)、前腹腔寬 (front-abdominal cavity width)(L2)、
前腹腔長(front-abdominal cavity length) (L2)、
後腹腔長(post-abdominal cavity length) (L4)量測。

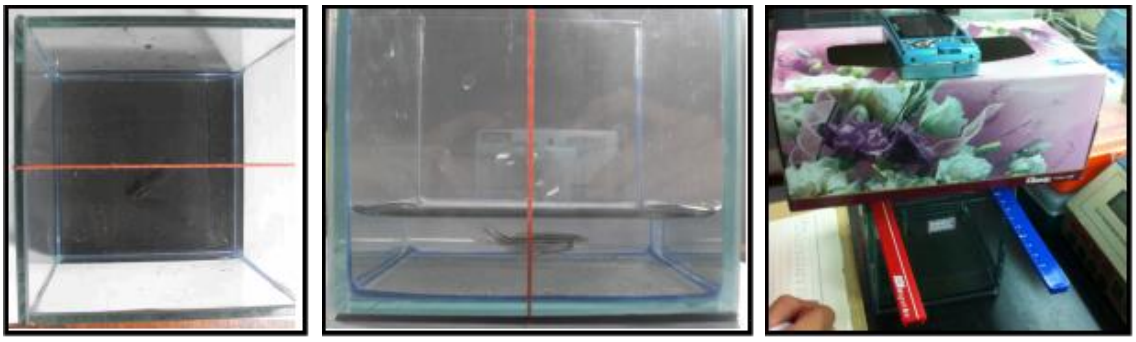
六、斑馬魚雄性成魚游泳行為之實驗(Experiment of Swimming Behavior in Male Adult Wild-type Zebrafish)

成魚活動力試驗，我們選擇野生種雄性斑馬魚成魚為觀察對象，避免因性別不同而影響成魚游泳活動力之結果。

(一) 成魚每分鐘游動通過觀察箱中心線次數計算

(Calculation of frequency for fish swimming across the central line)

由俯視觀察飼育箱之底部中心線，計算成魚每分鐘平均游動通過觀察箱中心線之次數，來評估斑馬魚雄性成魚之游泳活動力(次/分鐘)。圖六為觀察雄性成魚活動力之玻璃飼育箱之照片，其底部面積為 11 cm * 11 cm = 121 cm^2，飼育箱之總水量為 300 mL，水的高度約 2.5 cm。由於發現 100 mg/L 組濃度仍偏高，我們將 DEHP 暴露組濃度下修為 1 mg/L。每組的雄性成魚數量為 6 尾。



圖六：觀察野生種雄性斑馬魚成魚活動力之玻璃飼育箱(左圖為俯視、中圖為側視、右圖為游動路徑與速度拍攝裝置)。

Table 6. The frequency of swimming across the central line in adult male wild-type fish was observed from the top and beside of glass experimental chamber.

(二) 游動路徑與速度分析

(Analysis of swimming trajectories and computing swimming velocity)

由距離玻璃飼育箱底部約 20 cm 的高度，我們架設數位照相機，由俯視角度拍攝斑馬魚之游泳影片，再上網下載免費的速度分析軟體(Tracker-4.82)，分析斑馬魚游泳影片中的游動路徑與速度之表現。

七、統計分析 (Statistical Analysis)

本研究使用 Excel 2010 與 JMP 4.0 統計軟體分析 DEHP 暴露對斑馬魚(包括野生種與基因轉殖種)胚胎與幼魚生長發育與成魚(野生種)游泳活動力之影響。統計分析項目依照實驗順序說明如下：

(一) 胚胎暴露 DEHP 試驗：自變項為四組 DEHP 暴露條件及斑馬魚種(野生種與基因轉殖種)之類別變項；依變項為胚胎或幼魚生長發育量測結果(是否孵化、身長、腹腔寬、前腹腔長、後腹腔長)等類別變項或連續變項。

(二) 成魚游泳活動力實驗：自變項為四組 DEHP 暴露條件之類別變項；依變項為成魚游泳活動力之頻率(次/分鐘)、游動路徑速度與加速度之連續變項。

(三) 以卡方分析法(chi-square analysis)分析不同 DEHP 暴露條件是否影響斑馬魚胚胎之累積孵化率。以 Student’s *t*-test 分析野生種與基因轉殖種斑馬魚之間胚胎-幼魚生長發育量測結果之差異性。以單項變異數分析法(one-way analysis of variance, ANOVA)分析不同 DEHP 暴露條件是否影響斑馬魚幼魚生長發育量與雄性成魚游泳活動力。連續變項的數據皆以平均值 ± 標準偏差(mean ± SD)表示，並以 $P < 0.05$ 決定是否達到統計之顯著差異。

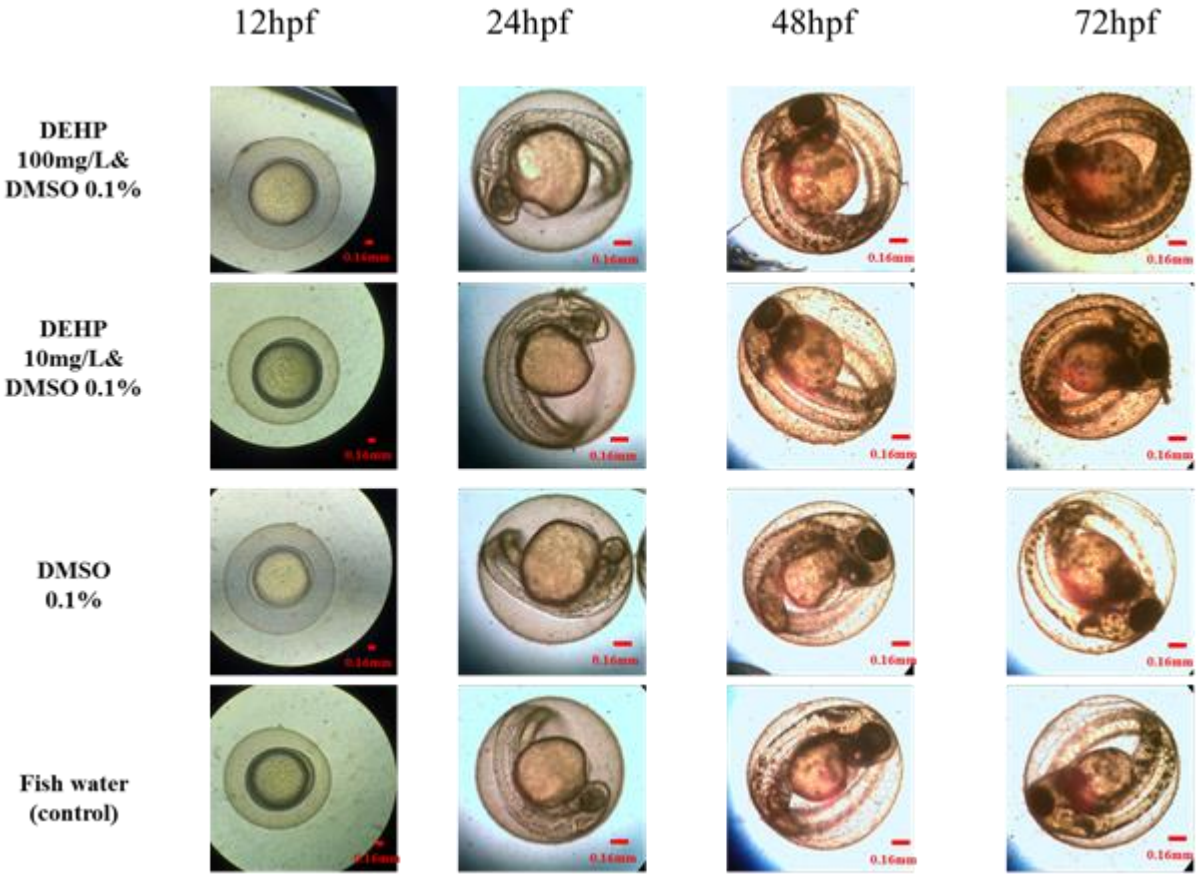
參、　研究結果與討論

(Results and Discussion)

一、斑馬魚胚胎發育顯微鏡觀察結果：

(The microscopic observation of embryo-larval growth and development)

圖七為斑馬魚胚胎暴露在 DEHP 藥物中，分為四組：DEHP 100 mg/L、DEHP 10 mg/L、DMSO 0.1%(控制組)與 Fish water(控制組)，並在不同 hpf 時間點(12hpf、24hpf、48hpf、72hpf)拍攝紀錄。



圖七、斑馬魚胚胎暴露不同濃度 DEHP，分四組：控制組(Fish water)、控制組(DMSO)、10 mg/L 組、100 mg/L 組，在不同 hpf 時間點拍攝斑馬魚胚胎型態發育。

二、DEHP 處理後不同時間對胚胎累積孵化率之影響：

(Effects of DEHP treatments on cumulative hatching rates)

我們發現 DEHP 處理 100 mg/L 組別有最低的累積孵化率(70.7%)，其次為 DEHP 處理 10 mg/L 組的 73.3%。而兩組控制組的胚胎累積孵化率分別為 86.7%(Fish water 組)與 85.3%(DMSO 組)，四組間達到統計之顯著差異(P = 0.029)(表一)。

三、不同濃度的 DEHP 水溶液暴露對斑馬魚胚胎的生長發育：

(Effects of DEHP treatments on embryo-larval development)

先將野生種與基因轉殖斑馬魚一起分析，發現 DEHP 暴露組(100 mg/L)的胚胎由 106 小時到 178 小時之身長與後端腹腔發育趨勢與控制組比較，有明顯下降的現象，可能是受到塑化劑 DEHP 影響而造成發育變慢(圖八)。將野生種與基因轉殖斑馬魚分開分析，發現野生種斑馬魚的身長發育趨勢比基因轉殖斑馬魚還高(圖九)。

四、野生種與基因轉殖斑馬魚的生長發育之比較：

(Comparisons of effects of DEHP exposure on development between wild-type and transgenic larvae)

為了探討在 DEHP 暴露下，基因轉殖之斑馬魚之生長發育是否與野生種斑馬魚不同，我們比較 DEHP 100 mg/L 暴露下，基因轉殖斑馬魚與野生種斑馬魚，在 178 小時的身長、前端腹腔長、後端腹腔長與後端腹腔寬之分析。結果發現基因轉殖斑馬魚在身長與後端腹腔長皆明顯小於野生種斑馬魚(圖十 A, C)，但基因轉殖斑馬魚之後端腹腔寬則明顯較野生種斑馬魚為寬(圖十 D)，兩組魚種在前端腹腔長則相似(圖十 B)。

五、DEHP 暴露對基因轉殖斑馬魚生長發育之影響：

(Effects DEHP exposure on development in transgenic zebrafish)

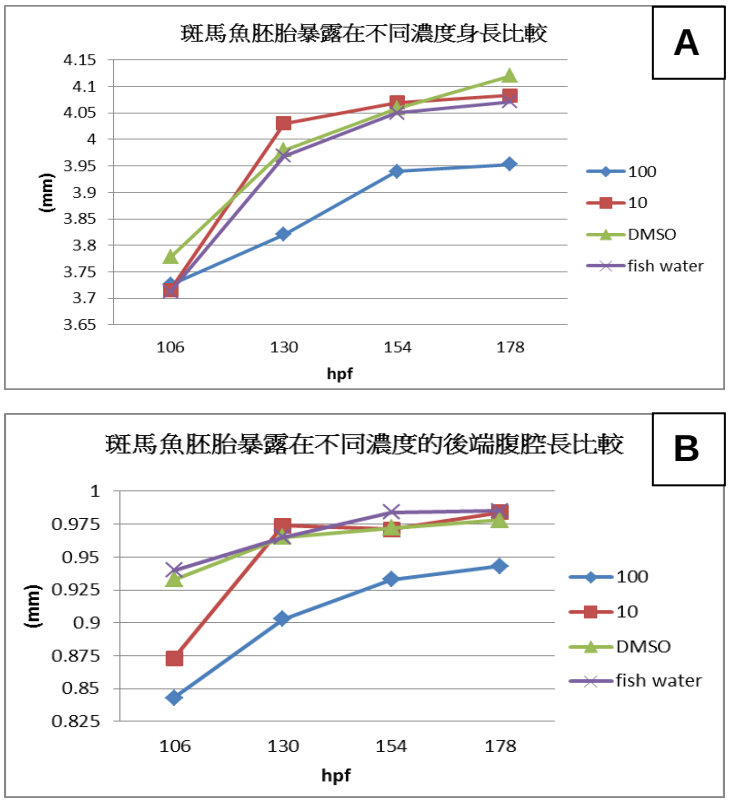
我們再分別分析野生種與基因轉殖斑馬魚，發現不同濃度的 DEHP 水溶液暴露，對基因轉殖斑馬魚胚胎(178 hpf)的身長與後端腹腔長有顯著影響。基因轉殖斑馬魚胚胎(178 hpf)的身長在 DEHP 暴露組(10 mg/L)與暴露組(100 mg/L)，皆顯著比兩組控制組還短(圖十一 A)。此外，基因轉殖斑馬魚胚胎(178 hpf)的後端腹腔長在 DEHP 暴露組(10 mg/L)、暴露組(100 mg/L)與 DMSO 控制組，皆顯著比 Fish water 控制組還短(圖十一 B)。然而野生種斑馬魚胚胎(178 hpf)的在各項生長發育指標，則較不受 DEHP 影響。

表一、DEHP 處理後不同時間對胚胎累積孵化率的影響

(Table 1. Effects of DEHP cumulative hatching rates at different hour post-fertilization, hpf)

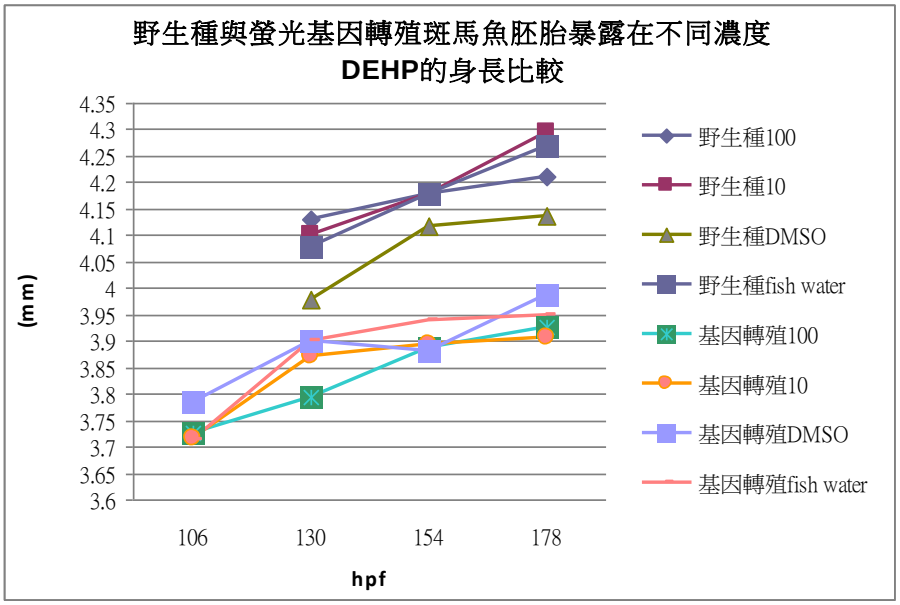
暴露組別 (Groups)	不同時間累積孵化數(隻)				累積孵化率(%)
	10 hpf	34 hpf	58hpf	82 hpf	*P* = 0.029
控制組 (Fish water)	0	0	65	65	65/75 (86.7%)
控制組 (DMSO)	0	0	63	64	64/75 (85.3%)
10 mg/L 組	0	0	48	55	55/75 (73.3%)
100 mg/L 組	0	0	46	53	53/75 (70.7%)

註：累積孵化率 = 孵化個數/總數



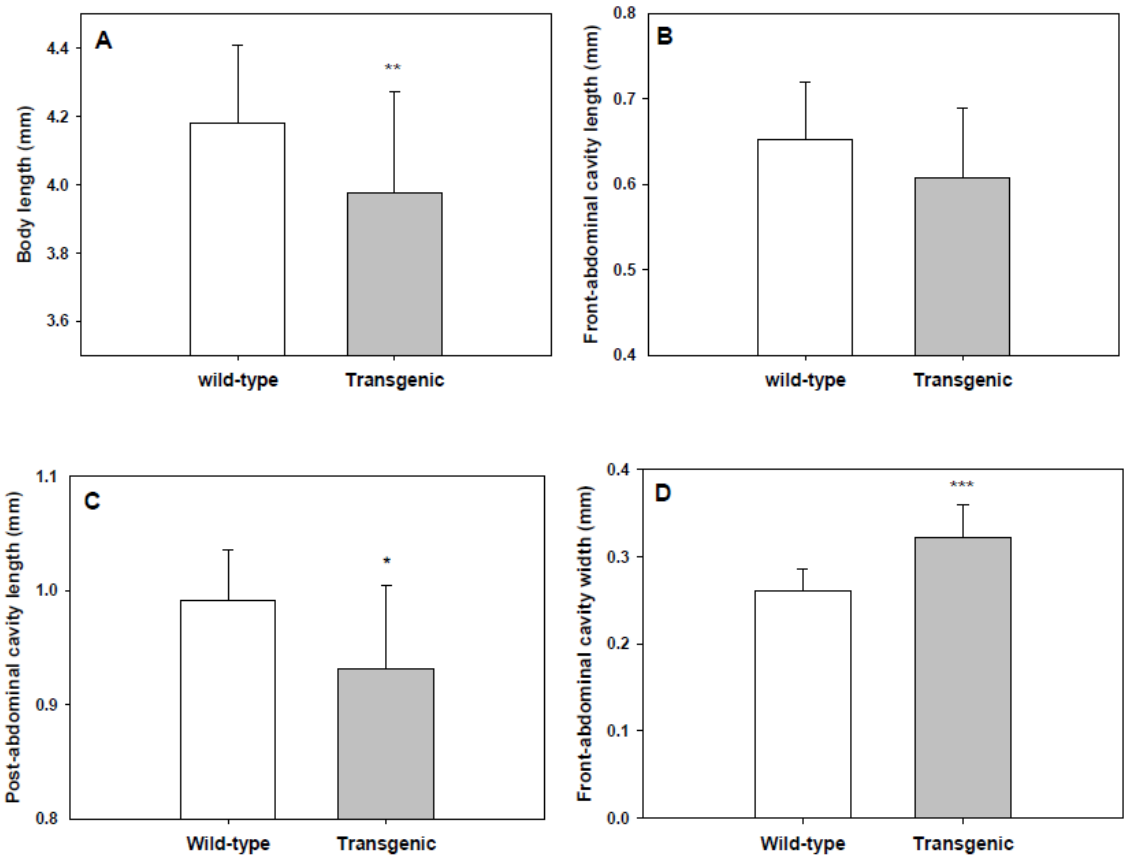
圖八：不同濃度的 DEHP 水溶液暴露對所有斑馬魚胚胎的身長與後端腹腔發育趨勢之影響。

(Figure 8. Effects of exposure of DEHP on development in all embryo-larval zebrafish)



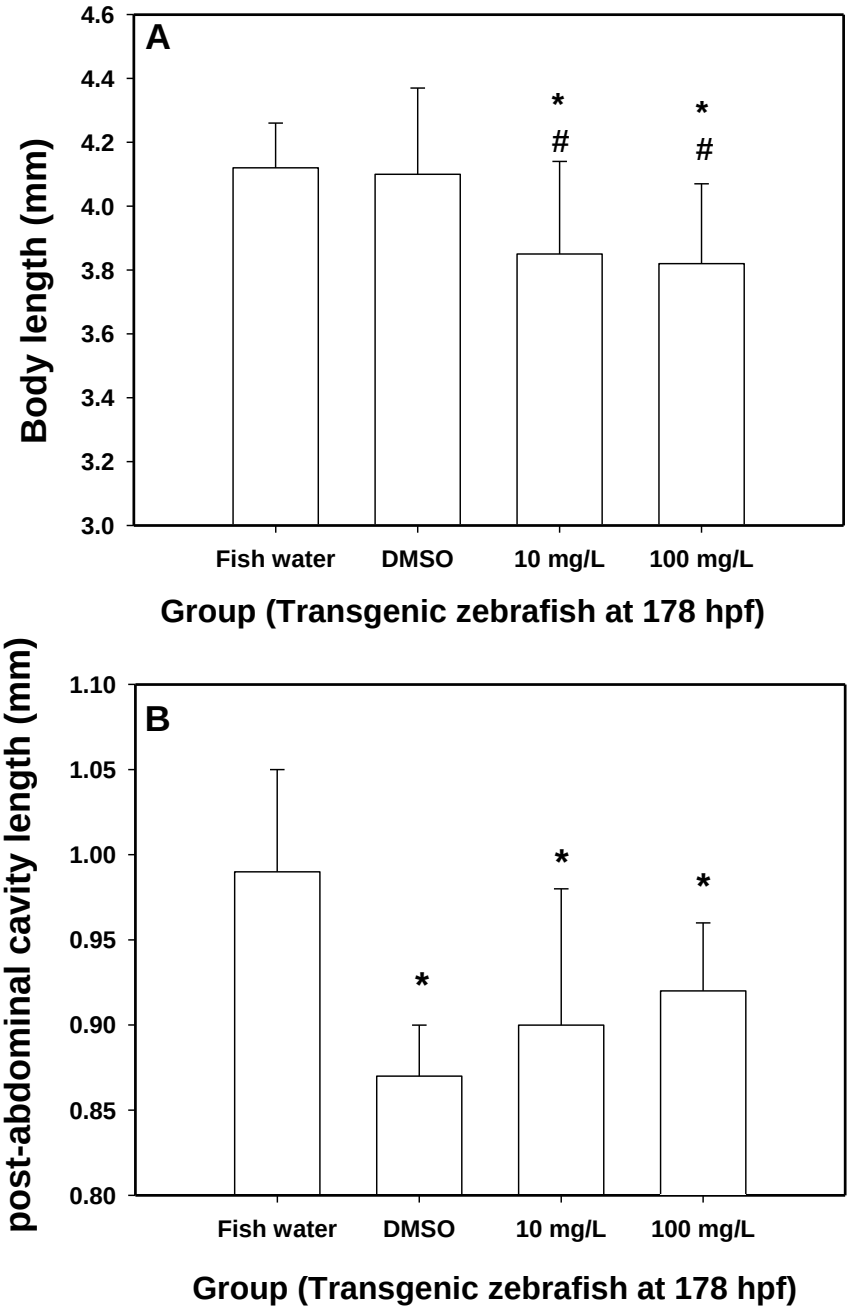
圖九：不同濃度的 DEHP 水溶液暴露對野生種與基因轉殖斑馬魚胚胎的身長發育趨勢之影響。

(Figure 9. Effects of DEHP exposure on body length of transgenic and wild-type larvae.)



圖十：暴露 DEHP 100 mg/kg 的野生種與基因轉殖斑馬魚幼魚在 178 hpf 的生長發育之比較。*與野生種斑馬魚組比較呈現顯著差異($p < 0.05$)；**與野生種斑馬魚組比較呈現顯著差異($p < 0.01$；***與野生種斑馬魚組比較呈現顯著差異($p < 0.001$)。

(Figure 10. Comparisons of effects of DEHP exposure on development between wild-type and transgenic larvae at 178 hpf.)



圖十一：不同濃度的 DEHP 水溶液暴露對基因轉殖斑馬魚胚胎(178 hpf)的身長(A)與後端腹腔長(B)之影響。*與 Fish water 組比較呈現顯著差異($p < 0.05$)；#與 DMSO 組比較呈現顯著差異($p < 0.05$)。

(Figure 11. Exposure to DEHP decreased body and post-abdominal cavity lengths in transgenic fish at 178 hpf.)

六、DEHP 對野生斑馬魚雄性成魚游泳行為之影響

(Effects of DEHP on swimming behavior in male adult wild-type zebrafish)

(一) 成魚每分鐘游動通過觀察箱中心線次數計算

(Calculation of frequency of swimming behavior in male adult wild-type zebrafish)

由俯視觀察飼育箱之底部中心線，計算成魚每分鐘平均通過觀察箱中心線之次數，來評估斑馬魚成魚之活動力(次/分鐘)。我們發現：

1. 對照組的結果很平均很穩定，魚很規律地在缸中游

2. DEHP 10 mg/L 暴露組的實驗中，觀察到魚一開始進入溶液，接觸到 DEHP 會很激動，游得很快速，在原地打轉，直線折返等等，游動速率很快，大約在計時四分半到五分半的時候，魚的活動開始漸趨緩慢，六分鐘後有時甚至停下來不動了，接下來至十分鐘，魚通過紅線的次數大概會是前五分鐘的一半。

3. 如表二所示，四組成魚之平均活動力(次/分鐘)分別為：控制組 (Fish water) 是 18.1 ± 8.4、控制組 (DMSO)是 17.1 ± 7.4、DEHP 1 mg/L 組是 11.2 ± 5.3、DEHP 10 mg/L 組是 7.8 ± 4.8。

   統計結果發現 DEHP 對成魚游動頻率具有明顯下降之影響。

表二、DEHP 對野生雄性斑馬魚成魚游泳行為之影響

(Table 2. Effects of DEHP exposure on swimming behavior in male adult wild-type zebrafish)

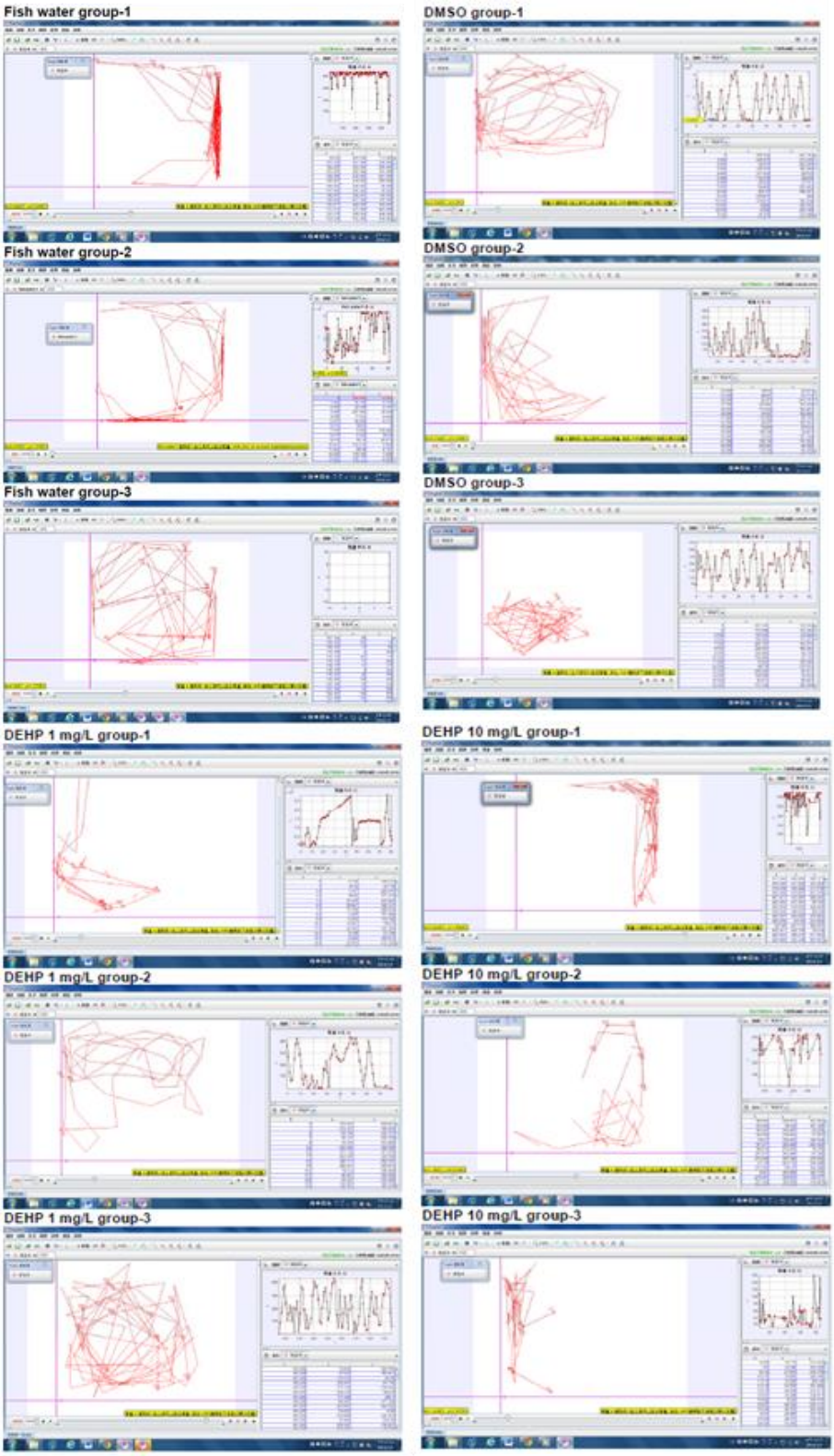
行為變項 (Parameters)	組別 (Groups)				*P*值
	控制組 (Fish water) (魚數目=6)	控制組 (DMSO) (魚數目=6)	DEHP暴露組 (1 mg/L) (魚數目=6)	DEHP暴露組 (10 mg/L) (魚數目=6)	
游泳活力頻率 (次/分鐘) Frequency of swimming activity(1/min)	18.1 ± 8.4	17.1 ± 7.4	11.2 ± 5.3	7.8 ± 4.8	0.043
游動速度 (毫米/秒) Swimming velocity (mm/sec)	138.7 ± 18.7	112.6 ± 14.5	105.4 ± 64.8	102.5 ± 15.5	0.603

(二) 游動路徑與速度分析

(Analysis of swimming trajectory and velocity)

我們以分析軟體(Tracker-4.82)，分析斑馬魚游動路徑與速度之表現，發現 DEHP 暴露組(1 mg/L)或 DEHP 暴露組(10 mg/L)分別與控制組(Fish water)比較，其游動路徑較為受到限制，可能與神經傳導功能受 DEHP 影響，而使斑馬魚在行為表現上出現異常(圖十二)。之後使用軟體分析斑馬魚游動速度，發現四組成魚之平均游泳速度(毫米/秒)分別為：控制組 (Fish water)是 138.7 ± 18.7 毫米/秒、控制組 (DMSO)是 112.6 ± 14.5 毫米/秒、DEHP 1 mg/L 組是 105.4 ± 64.8 毫米/秒、DEHP 10 mg/L 組是 102.5 ± 15.5 毫米/秒。統計結果發現 DEHP 暴露組(1 mg/L)與 DEHP 暴露組(10 mg/L)成魚平均游泳速度與控制組 (Fish water)相比，分別約下降 24%與 26%(表二)。但若以 ANOVA 分析四組差異，則未達統計上的顯著差異(表二)。我們推測可能是因樣本數較小所影響，因而在斑馬魚成魚之平均游泳速度(毫米/秒)指標上未達到統計上的顯著差異，但已觀察到 DEHP 暴露下有下降的趨勢，未來將增加觀察數目及開發更敏感的

魚類行為指標，如已初步建立 3D 影像分析系統，來分析斑馬魚的立體空間游泳分析，將使結果偏差性降低，而能更具科學上的代表性與客觀性。



圖十二：不同濃度的 DEHP 水溶液暴露與斑馬魚游動路徑圖。
(Figure 12. DEHP exposure and analysis of swimming trajectory)

七、綜合討論 (Discussion)

鄰苯二甲酸酯類的塑化劑在環境中之污染，雖然透過微生物作用或非生物性作用而能有效降解，但由於商業上的大量使用 DEHP 與其容易由塑膠製品中釋放出來的特性，因此 DEHP 對環境品質，特別在塑膠製品廢棄物對水污染上，仍有持續性的長期衝擊。有研究發現在受污染地表水 DEHP 濃度可達到 100 g/L，而地下水 DEHP 濃度高達 300g/L，在底泥 DEHP 濃度為 200 mg/kg (Fromee et al., 2002; Petrovic et al., 2001)。本研究的暴露濃度決定動機考量是：DEHP 暴露組濃度 1 mg/L、10 mg/L 與 100 mg/L 約為受污染地下水 DEHP 濃度的 3、30 與 300 倍。

環境荷爾蒙之所以危害生物體是因其與生物體中天然賀爾蒙類似，環境賀爾蒙仿照並代替天然賀爾蒙與賀爾蒙受器結合，雖然造成的效果是相同的，但在表現量可能不足或過多。目前已有流行病學研究與動物實驗模式發現暴露鄰苯二甲酸酯類與生殖與內分泌異常等問題有關(Lyche et al., 2009)。本研究建立斑馬魚模式來檢測環境荷爾蒙 DEHP 對生物體之生長發育的影響。發現 DEHP 暴露組(100 mg/L)有最低的累積孵化率。將野生種與基因轉殖斑馬魚一起分析，發現 DEHP 暴露組(100 mg/L)的幼魚由 154 小時到 178 小時之身長有明顯下降的趨勢。最近一篇以鄰苯二甲酸二丁酯(DBP)對斑馬魚不同生長階段影響的研究發現，斑馬魚暴露環境 DBP，耐受性大小為：成魚>仔魚>胚胎，DBP 可能嚴重影響到斑馬魚之生產能力，且死亡率隨 DBP 濃度而增加，但經一段時間的自我調適，仍可有小量產出(沈佳哲，2012)。

我們也發現野生種斑馬魚的身長發育趨勢比基因轉殖斑馬魚還高，野生種斑馬魚胚胎在各項生長發育指標，比基因轉殖斑馬魚較不受 DEHP 影響。因此基因轉殖斑馬魚是檢測 DEHP 的敏感魚種。雄性囓齒類實驗動物研究中，胚胎暴露塑化劑對睪丸功能造成傷害，以及縮短尿道至肛門口的距離(Swan et al., 2005)。胚胎

時期暴露高劑量之 DEHP 已被證實對子代雄性大鼠生殖系統具有顯著之睪丸毒性(Park et al., 2002)。

另一研究針對墾丁地區溪流污水對斑馬魚胚胎發育與行為之影響，該研究報告發現墾丁地區受污染的溪水，會使斑馬魚之平均泳速與活動時間下降，並提出以孵化、存活、心搏率及行為模式，是評估環境污染之敏感指標之觀點(陳怡伶，2011)。我們的結果發現斑馬魚成魚之平均游泳頻率(次/分鐘)在 DEHP 暴露下有統計上顯著下降的趨勢。

近年來，斑馬魚生物模式被積極發展為一種實驗用動物，我們也發現國內科學家們利用斑馬魚模式，進行環境污染評估(沈佳哲，2012；陳怡伶，2011)及藥物功能評估研究(林敬鈞，2010)。本研究則發現，基因轉殖斑馬魚對 DEHP 之影響在生長發育方面，比野生種斑馬魚更敏感。此新發展出的斑馬魚模式平台，能檢測環境 DEHP 污染對脊椎動物生長發育與行為之影響，未來將可提供塑化劑在環境毒性與健康風險評估之參考。

肆、　結論與應用

(Conclusion and Application)

一、暴露塑化劑 DEHP 可能影響斑馬魚胚胎生長發育，尤其基因轉殖斑馬魚對 DEHP 之生長發育，影響比野生種斑馬魚更敏感。

二、DEHP 暴露 1 mg/L 組、10 mg/L 組與 100 mg/L 組的濃度選擇，是參考 DEHP 污染環境地下水濃度的 3、30 與 300 倍而決定。具有與環境污染濃度可比較性的優點，未來將可提供塑化劑在環境毒性與健康風險評估之參考。

三、雖然因樣本數較少，因而在斑馬魚成魚之平均游泳速度(毫米/秒)指標上未達到統計上的顯著差異，但已觀察到 DEHP 暴露下有下降的趨勢，未來將增加觀察數目及開發更敏感的魚類行為指標，如已初步建立 3D 影像分析系統，來分析斑馬魚的立體空間游泳分析。

四、研究結果顯示此新發展出的基因轉殖斑馬魚模式平台，能檢測環境 DEHP 污染對脊椎動物生長發育與行為之影響。未來可應用於「針對不同種類的環境污染物，開發不同基因轉殖斑馬魚模式平台」，將極具創新性與前瞻性。

伍、 參考文獻 (References)

沈佳哲 (2012)。鄰苯二甲酸二丁酯(DBP)對斑馬魚不同生長階段之毒性影響，國立雲林科技大學環境與安全衛生工程系碩士班，未出版。P36-41；P55-56。取自：http://ndltd.ncl.edu.tw/cgi-bin/gs32/gsweb.cgi?o=dnclcdr&s=id=%22100YUNT5633048%22.&searchmode=basic

林敬鈞 (2010)。利用斑馬魚篩選抗黑色素之中草藥，國立台南大學生物科技學系碩士班，未出版。P23-30。取自：http://ndltd.ncl.edu.tw/cgi-bin/gs32/gsweb.cgi?o=dnclcdr&s=id=%22099NTNT5111002%22.&searchmode=basic

陳怡伶 (2011)。墾丁地區溪流污水對斑馬魚胚胎發育及行為之影響，國立東華大學海洋生物多樣性及演化研究所，未出版。P36-41；P25-37。取自：http://ndltd.ncl.edu.tw/cgi-bin/gs32/gsweb.cgi?o=dnclcdr&s=id=%22099NDHU5270028%22.&searchmode=basic

Fromme, H., Kuchler, T., Otto, T., Pilz, K., Muller, J., & Wenzel, A. (2002). Occurrence of phthalates and bisphenol A and F in the environment. *Water Research*. 36(6), 1429 – 1438.

Lyche, J.L., Gutleb, A.C., Bergman, A., Eriksen, G.S., Murk, A.J., Ropstad, E., Saunders, M., & Skaare, J.U. (2009). Reproductive and developmental toxicity of phthalates. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B: Critical Reviews*, 12(4), 225 – 249.

Park, J.D., Habeebu, S.S., & Klaassen, C.D. (2002). Testicular toxicity of di-(2-ethylhexyl) phthalate in young Sprague-Dawley rats. *Toxicology*, 171(2-3), 105-115.

Petrovic, M., Eljarrat, E., Lopez de Alda, M.J., & Barcelo, D. (2001). Analysis and environmental levels of endocrine-disrupting compounds in freshwater sediments. Trends in Analytical Chemistry. 20(11), 637 – 648.

Swan, S.H., Main, K.M., Liu, F., Stewart, S.L., Kruse, R.L., Calafat, A.M., Mao, C.S., Redmon, J.B., Ternand, C.L., Sullivan, S., & Teague, J.L. (2005). Decrease in anogenital distance among male infants with prenatal phthalate exposure. *Environmental Health Perspectives*, 113(8), 1056-1061.

評語

塑化劑、DEHP 為當前環境中的新興污染物，本作品以斑馬魚的發育與活動力觀察其影響，實驗完整且具創新性，對於斑馬魚的活動力評估，亦設計一套自創的方法，值得鼓勵。