

# 2021 年臺灣國際科學展覽會 優勝作品專輯

作品編號 130014

參展科別 行為與社會科學

作品名稱 記憶猶新-Scopolamine 對斑馬魚記憶能力與  
社交行為的影響

得獎獎項 大會獎 三等獎

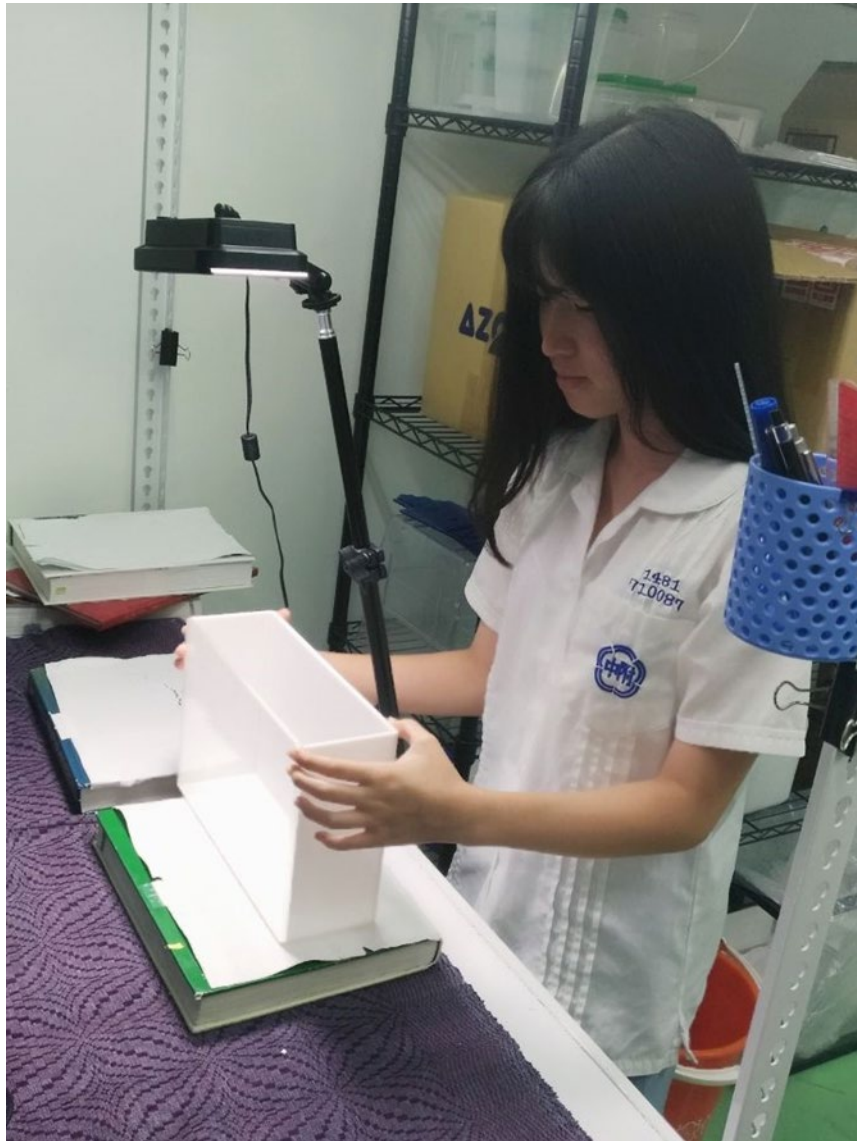
就讀學校 國立臺灣師範大學附屬高級中學

指導教師 周銘翊、謝育慈

作者姓名 俞仁恩

關鍵詞 斑馬魚、記憶、社交行為

## 作者簡介



我是俞仁恩，目前就讀於師大附中 1481 班。

很榮幸能夠入圍國際科展，讓我有機會與其他選手互相交流研究成果。從高一時開始做生物專題研究，在做實驗的過程中累積了不少寶貴的經驗和知識，更加確立了我對行為科學的興趣，並且讓我學會如何克服挫折，堅持到底。期許自己未來能保持著對科學的熱忱，在相關領域持續學習。

## 摘要

東莨菪鹼 (Scopolamine) 是一種乙醯膽鹼受體的拮抗劑，如果服用過量的 Scopolamine，可能產生記憶障礙的症狀，所以 Scopolamine 常作為讓實驗動物記憶能力下降的藥物。近年來全球人口老化速度快，像是阿茲海默症等疾病患者與日俱增，研究記憶的相關機制或能恢復記憶的治療方式成為重要課題。希望本研究能對 Scopolamine 的作用有更多了解，作為未來以此藥物當作前置實驗藥物的參考。斑馬魚 (*Danio rerio*) 是一種群居動物，牠們會依據對彼此的熟悉程度而調整未來的社交行為，所以能夠辨識並且記得曾經看過的魚對牠們十分重要。因此本研究選擇斑馬魚作為實驗動物，錄影觀察藥物對牠們記憶和社交行為的影響。

本研究將以斑馬魚的社交記憶 (Social recognition memory) 為主題，探討 Scopolamine 對斑馬魚學習與記憶能力的影響，以及受藥物影響後的社交行為改變。實驗藉由錄影觀察斑馬魚浸泡 Scopolamine 溶液後的行為改變，包括電擊、社交偏好，群游，攻擊性實驗，推測 Scopolamine 有降低學習能力並在學會的情形下增強記憶的效果，而且能改變斑馬魚的部分社交行為。

## Abstract

Scopolamine, an antagonist of the acetylcholine receptor, can produce the symptom of memory impairment if taken in excess, so it is often used as a drug to reduce the memory ability of animal subjects. In recent years, the global population has been aging rapidly, and the number of patients suffering from diseases which diminish memory and are especially prevalent among the elderly, such as Alzheimer's, has increased sharply, making the study of mechanisms related to memory and the search for therapies to help restore memory become popular subjects. Zebrafish (*Danio rerio*) are gregarious animals and will adjust their social behavior based on their familiarity with others, so it is important for them to be able to recognize and remember the fish they have seen. Therefore, in this study, zebrafish were selected as animal subjects to observe the effects of drugs on their memory and social behavior.

This study would investigate the effects of scopolamine on the learning and memory ability of zebrafish, and the changes in social behavior under the influence of drugs. Experiments were conducted to videotape and observe the behavior of zebrafish after they were immersed in scopolamine, including active avoidance, social preference, shoaling, and mirror biting experiments. It is estimated that scopolamine has the effect of reducing learning ability and enhancing the retrieval of previously stored memory, and can change part of the social behavior of zebrafish.

# 壹、前言

## 一、研究動機

在斑馬魚 (*Danio rerio*) 的記憶相關研究中，關於社交記憶 (Social recognition memory) 的研究並不多。作為群居動物，斑馬魚會根據和不同個體的互動而調整未來的社交行為，因此辨識同類並記憶的能力對斑馬魚十分重要。而目前有少數實驗證實斑馬魚的確有辨識同類的能力，並且會對陌生魚與熟悉魚產生不同反應 (Madeira & Oliveira, 2017)。因此本次實驗使用斑馬魚作為實驗動物，探討浸泡東莨菪鹼 (Scopolamine) 溶液後，學習與記憶能力受到藥物影響而改變，會對斑馬魚的社交行為產生什麼影響，希望此次研究能對 Scopolamine 如何影響斑馬魚的記憶能力和社交行為有進一步的了解。

## 二、研究背景

### (一) 東莨菪鹼 (Scopolamine)

東莨菪鹼 (Scopolamine) 是一種蕈毒鹼型乙醯膽鹼受體拮抗劑 (Muscarinic acetylcholine receptor antagonist)，對中樞神經系統作用明顯。極少量的 Scopolamine 可以阻斷人類運動神經的傳導，作為防止暈車、緩解腸胃痙攣引起的噁心、嘔吐的藥物。但如果服用過量的 Scopolamine，可能會導致副作用：產生記憶障礙等類似阿茲海默症 (Alzheimer's disease) 的症狀。因此 Scopolamine 常被用在測試記憶能力的實驗，作為前置實驗藥物，讓動物的記憶能力下降 (Kim, Lee, Kim, Jung, & Lee, 2010)。

### (二) 斑馬魚 (*Danio rerio*)

斑馬魚為常見的脊椎動物模式生物，以斑馬魚作為模式生物的優點多，例如體型小 (成魚體長約 2~3cm) 方便飼養、繁殖力強且胚胎透明方便觀察。斑馬魚全基因體已被定序完成，大約 70% 的人類基因在斑馬魚的基因組有對應的序列。因為基因和生理構造與人類相似，斑馬魚常被用於建立疾病模型、藥物篩選平台，研究腦部神經疾病等藥理學、神經學實驗，關於影響中樞神經系統的藥物也被大量研究。而斑馬魚是一種有高度社會性的動物，因為其行為較無脊椎動物複雜，和哺乳動物相比又有繁殖快速的特性，近年也常被用做為研究社交行為學的實驗動物 (Oliveira, 2013)。

### 三、研究目的與問題

- (一) 探討 Scopolamine 對斑馬魚學習與記憶能力的影響
- (二) 探討 Scopolamine 是否會影響斑馬魚的社交能力與社交偏好
- (三) 探討 Scopolamine 是否會影響斑馬魚的個別行為
- (四) 探討 Scopolamine 對斑馬魚社交行為的影響
  - 1. 探討 Scopolamine 是否會影響斑馬魚的群游行為
  - 2. 探討 Scopolamine 是否會影響斑馬魚的攻擊性

## 貳、研究方法或過程

### 一、研究設備及器材

#### (一) 生物材料

斑馬魚 (*Danio rerio*)

- 3. 品種：wild type AB strain
- 4. 來源：臺北醫學大學斑馬魚研究中心
- 5. 年齡：2018 年 3~5 月出生

#### (二) 藥品溶液

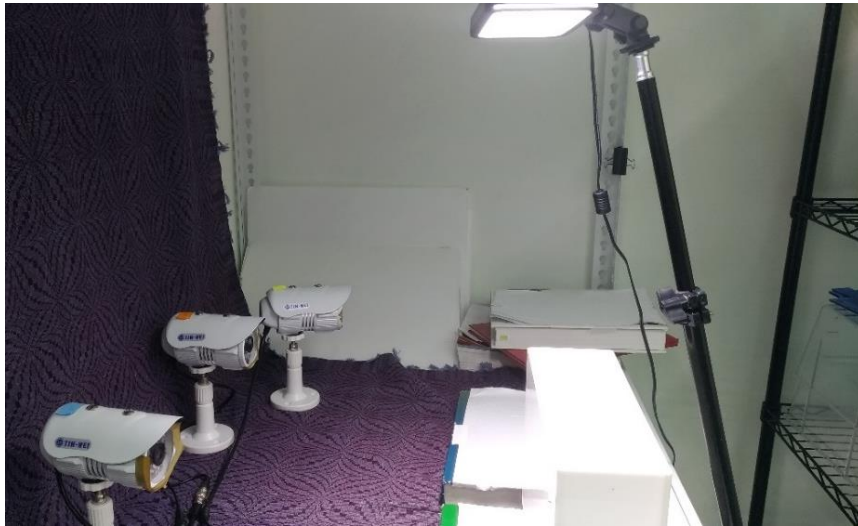
東莨菪鹼 (Scopolamine)

#### (三) 研究設備

- 1. 攝影機、燈
- 2. 軟體
  - (1) ActualTrack (追蹤魚位置)
  - (2) Avidemux (影片編輯)
  - (3) EthoVision (分析魚速率、路徑、位置)
  - (4) Excel (資料分析)
  - (5) LabVIEW (Active avoidance 實驗設定)
  - (6) Origin8 (繪製圖表)

#### (四) 研究器材

1. 100ml 燒杯
2. 100ml 量筒
3. 吸量管 (pipette)、滴管
4. 魚撈網 (7\*6cm)
5. Active avoidance 用魚缸  
(24\*9\*9.5cm)  
1.5cm 縫隙隔板 (9\*9cm)  
鐵網 (11\*8cm)、蓋子
6. Shoaling 用魚缸 (1.5 L)
7. Novel tank & Mirror biting 用魚缸  
(26\*8\*17.5cm)  
隔板 (7.5\*22cm)  
鏡子 (7.8\*17.7cm)
8. Social preference & Social memory  
用魚缸 (52\*10\*14cm)  
隔板 (9.8\*14.3cm)



▲ (圖一) 研究設備



▲ (圖二) 研究器材

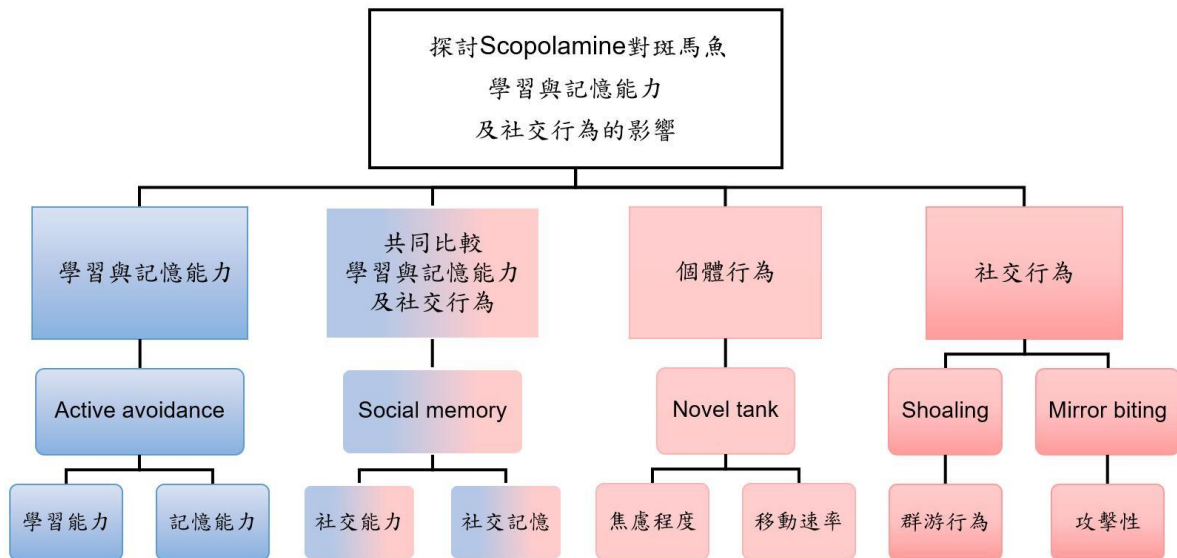
## 二、實驗動物照顧

(一) 光週期：每日 14 小時光照及 10 小時黑暗，上午 9 點到下午 11 點開燈

(二) 溫度：26~28°C

(三) 食物：一日餵食兩次飼料

## 三、實驗架構圖



本次實驗的斑馬魚分為控制組 (未經藥物處理)、浸泡 100 $\mu$ M Scopolamine 溶液 1 小時組、浸泡 200 $\mu$ M Scopolamine 溶液 1 小時組，探討 Scopolamine 藥物是否會影響斑馬魚的學習與記憶能力，或造成社交行為改變，並且推測可能的原因。Active avoidance 實驗主要測試的是斑馬魚的學習與記憶能力，Novel tank 實驗觀察的是斑馬魚到陌生環境的個別行為，Shoaling 實驗和 Mirror biting 實驗觀察的是斑馬魚的社交行為，Social memory 實驗則是結合記憶能力和社交行為共同比較。

## 四、研究方法

### (一) Active avoidance 實驗 (測試學習與記憶能力)

在可選擇待在紅光或藍光區的魚缸中，用電擊作為懲罰讓斑馬魚學習並記憶「待在藍光區會被電擊」而避開藍光區。藉由比較各組在不同階段 (session 3、short-term memory test (STM)、long-term memory test (LTM)) 中的第幾個 trail 達到標準，表示斑馬魚學習的效率 (Learning efficiency)；比較各組在 session 1、session 2、session 3、STM、LTM 達到標準的比例，表示每個階段學會並記得避開藍光區的斑馬魚比例。



## 1. 準備過程

(1) 準備底部透明的 Active avoidance 實驗用魚缸 (24\*9\*9.5cm)，裝上 1.5cm 縫隙隔板 (9\*9cm)、鐵網 (11\*8cm) 4 個，倒入 1.5L 曝氣水

(2) 100 $\mu$ M Scopolamine 組、200 $\mu$ M Scopolamine 組斑馬魚在 100ml 燒杯中 (裝 50ml Scopolamine 溶液)，單獨浸泡溶液 1 小時

\* Scopolamine 溶液可經由皮膚吸收或呼吸時進入斑馬魚體內

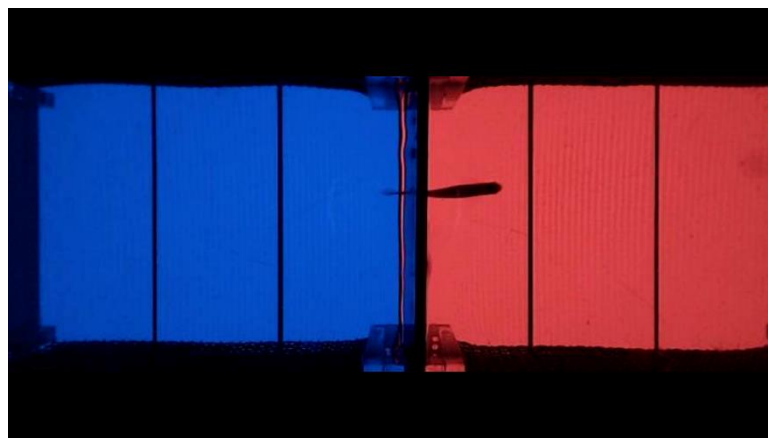
控制組斑馬魚在 100ml 燒杯中 (裝 50ml 曝氣水)，單獨隔離 20 分鐘

(3) 在軟體 (LabVIEW 2013) 中設定實驗條件，並調整攝影機設定，將斑馬魚用撈網放入魚缸後，把底部透明的魚缸放在螢幕上，放置遮光的紙板後開始實驗。



▲ (圖三) Active avoidance 實驗裝置

(實驗時會用紙板遮光，避免魚受到外界燈光影響)

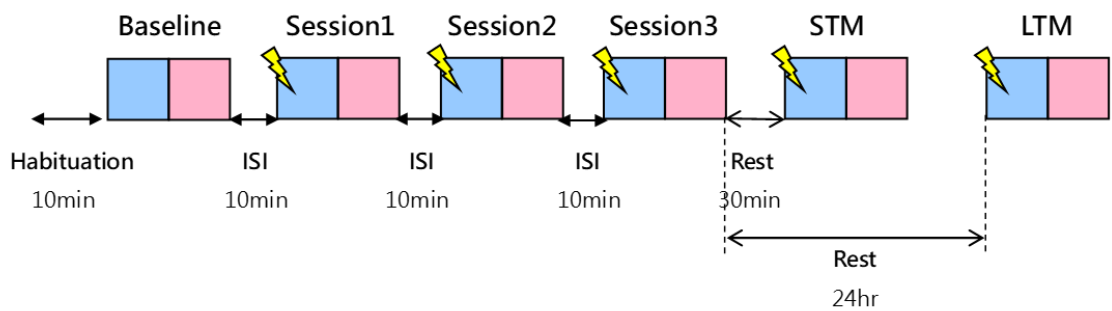


▲ (圖四) Active avoidance 實驗錄影畫面

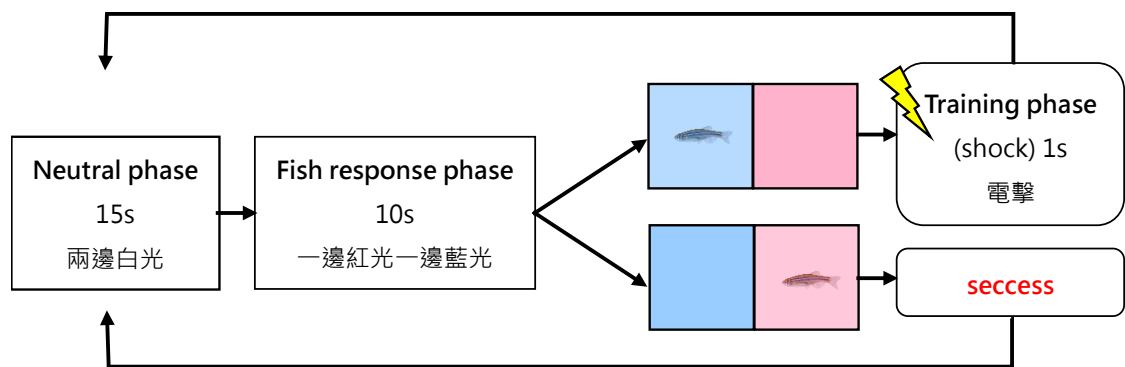


## 2. 實驗過程

在測試中的每個階段 (如圖五), 都會進行 Neutral phase (兩邊白光)→Fish response phase (隨機地一邊紅光一邊藍光)→Training phase (判定斑馬魚所在位置, 給予電擊或記為成功) 的循環 (如圖六), 在 Fish response phase 的第 10 秒, 機器會判定斑馬魚所在位置, 預設為若判定時斑馬魚質心位置在藍光區, 即給予 4 伏特電擊, 若斑馬魚在紅光區, 即記為成功。軟體會計算斑馬魚最後 10 次判定時在紅光區的次數作為 success rate, 一旦 success rate $\geq$ 0.9 則實驗停止, 代表斑馬魚學會避開藍光區以躲避電擊, 記錄斑馬魚在第幾個 trial 達到標準 (success rate $\geq$ 0.9), 代表學會躲避電擊所花費的時間。若第 40 個 trial 還未達標準即記錄為失敗 (fail), 代表斑馬魚未學會躲避電擊。



▲ (圖五) Active avoidance 實驗流程圖



▲ (圖六) Active avoidance 實驗中每個 session 進行的循環

(1) Baseline (無電擊)

測試斑馬魚對紅光或藍光有無特定偏好，若斑馬魚偏好紅光 (success rate $\geq$ 0.5) 則改成紅光區電擊，確定斑馬魚是藉由學習和記憶而避開會被電擊的區域，也讓魚隻習慣顏色變換以降低實驗時的壓力。

(2) Session 1~3

讓斑馬魚學習判定時若待在藍光區會被電擊，因此避開藍光區以躲避電擊。

(3) Short-term memory test (STM)、Long-term memory test (LTM)

測試 session 結束後，斑馬魚是否記得要避開藍光區。

3. 實驗數據

(1) 計算斑馬魚在 session 1、session 2、session 3、STM、LTM 達到標準的比例

(2) 記錄斑馬魚在 session 3、STM、LTM 中在第幾個 trial 達到標準

(二) Social memory 實驗 (測試社交能力、社交記憶)

社交偏好 (Social preference) 實驗比較各組斑馬魚待在靠近同類區的時間，代表各組的社交能力 (Sociability) 是否受藥物影響。待在某區時間越長，也就代表斑馬魚對某區的偏好程度較強。

社交記憶 (Social recognition memory) 分為兩個部分：依照對方的性別、年齡、位階等，對個體進行識別，以及能回想起先前遇到特定個體特質的能力 (Madeira & Oliveira, 2017)。比較各組測試的斑馬魚待在靠近陌生魚區域與待在靠近熟悉魚區域的時間，推測斑馬魚社交記憶的強弱。魚缸中的隔板透明而且有孔洞，位在魚缸中央的測試魚 (focal fish) 可藉由視覺及嗅覺辨識位於魚缸兩邊的熟悉魚或陌生魚，而表現出不同反應。

1. 準備過程

(1) 準備 Social preference & Social memory 實驗用魚缸 (52\*10\*14cm)，裝上隔板

(9.8\*14.3cm) 4 個，倒入 5L 曝氣水

(2)  $100\mu\text{M}$  Scopolamine 組、 $200\mu\text{M}$  Scopolamine 組斑馬魚在 100ml 燒杯中 (裝 50ml Scopolamine 溶液)，單獨浸泡溶液 1 小時

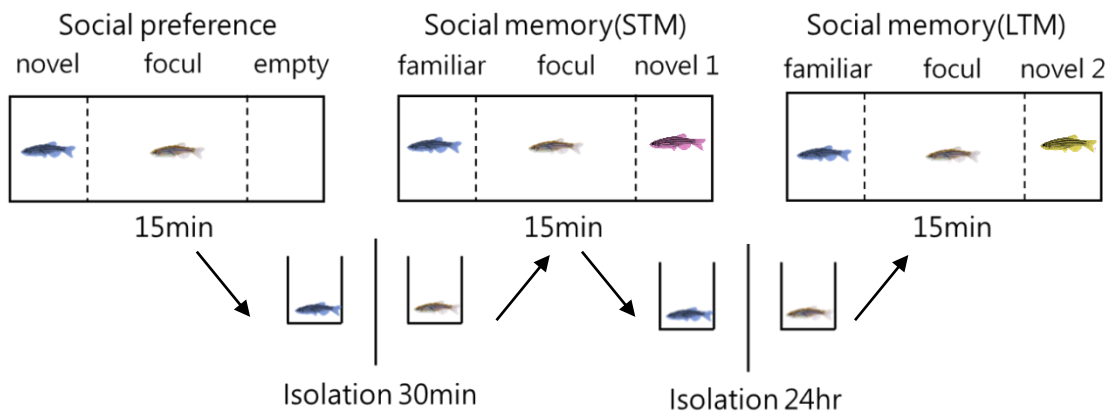
控制組斑馬魚在 100ml 燒杯中 (裝 50ml 曝氣水)，單獨隔離 10 分鐘

(3) 調整攝影機設定，將斑馬魚放入魚缸後將中間兩片隔板抽起開始實驗



▲ (圖七) Social preference & Social memory 實驗裝置

## 2. 實驗過程



▲ (圖八) Social preference & Social memory 實驗流程圖

### (1) Social preference

錄影觀察 15 分鐘

2 片隔板把魚缸分成 3 個區域，中間是主要觀察的測試魚 (focal fish)，一邊是和測試魚飼養在不同缸的陌生魚 (novel fish)，一邊是空魚缸

### (2) Isolation

2 隻斑馬魚在 100ml 燒杯中 (裝 50ml 曝氣水) 單獨隔離 30 分鐘

### (3) Social memory (short-term memory test)

錄影觀察 15 分鐘

2 片隔板把魚缸分成 3 個區域，中間是測試魚 (focal fish)，一邊是陌生魚 (novel fish)，一邊是測試魚在 Social preference 實驗見過的熟悉魚 (familiar fish)  
\*為了減少陌生魚和熟悉魚本身的差異對於測試魚的偏好產生影響，實驗中的陌生魚和熟悉魚都是體型差異不大，並且和測試魚飼養在不同缸的母魚

#### (4) Social memory (long-term memory test)

錄影觀察 15 分鐘

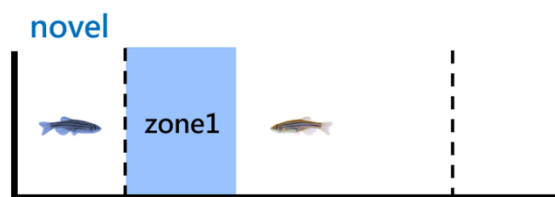
2 片隔板把魚缸分成 3 個區域，中間是測試魚 (focal fish)，一邊是陌生魚 (novel fish)，一邊是熟悉魚 (familiar fish)

測試 24 小時後，測試魚對於陌生魚和熟悉魚的反應是否會有差異

### 3. 實驗數據

用軟體 (EthoVision) 追蹤斑馬魚的位置 (只觀察測試魚)

Social preference

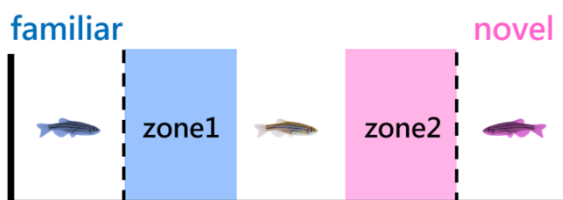


▲ (圖九) Social preference 實驗數據記錄

(1) 計算斑馬魚待在靠近同類區 (圖九中 zone1) 的時間

(2) 計算斑馬魚進出靠近同類區 (圖九中 zone1) 的次數

Social memory



▲ (圖十) Social memory 實驗數據記錄

(1) 計算斑馬魚待在靠近熟悉魚區 (圖十中 zone1) 的時間

(2) 計算斑馬魚待在靠近陌生魚區 (圖十中 zone2) 的時間

### (三) Novel tank 實驗 (測試到陌生環境的個別行為)

Novel tank 實驗是利用斑馬魚進入陌生環境通常會待在魚缸底部的天性，稱為底棲行為 (Bottom-dwelling behavior)，測試斑馬魚的焦慮程度，當焦慮程度越高，則待在底部的時間越長 (Levin, Bencan, & Cerutti, 2007)，Novel tank 實驗是一種常用來測試斑馬魚焦慮程度的實驗。而讓斑馬魚浸泡在人類和哺乳類身上被認為有抗焦慮效果的尼古丁 (Nicotine) 溶液後，在 Novel tank 實驗中斑馬魚待在魚缸下層的時間也顯著小於控制組 (Levin, et al., 2007)，說明斑馬魚待在魚缸下層的時間和焦慮程度呈正相關。而在 Novel tank 實驗中比較斑馬魚的移動距離，則是可以用來測試斑馬魚的活動力。

#### 1. 準備過程

(1)準備 Novel tank 實驗用魚缸 (26\*8\*17.5cm)，放入鏡子和隔板，倒入 3L 曝氣水

(2)100 $\mu$ M Scopolamine 組、200 $\mu$ M Scopolamine 組斑馬魚在 100ml 燒杯中 (裝 50ml Scopolamine 溶液)，單獨浸泡溶液 1 小時

控制組斑馬魚在 100ml 燒杯中 (裝 50ml 曝氣水)，單獨隔離 10 分鐘

(3)調整攝影機設定，將斑馬魚放入魚缸後開始實驗



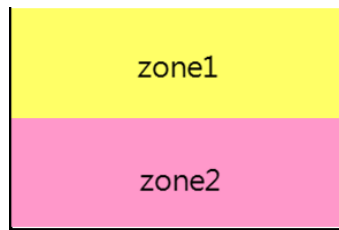
▲ (圖十一) Novel tank 實驗錄影畫面

#### 2. 實驗過程

(1)錄影觀察 15 分鐘

#### 3. 實驗數據

用軟體 (EthoVision) 追蹤斑馬魚的位置



▲ (圖十二) Novel tank 實驗數據記錄

- (1)計算斑馬魚待在魚缸上層 (圖十二中 zone1) 的時間
- (2)計算斑馬魚的移動速率

#### (四) Shoaling 實驗 (測試魚群的緊密程度)

斑馬魚群在自然情況下會跟隨群體游泳，稱為群游行為 (Shoaling)。群游可以增加斑馬魚覓食和交配的機會，並降低被捕食的風險。群游時個體之間的距離可代表魚群的緊密程度，群游時魚群的聚集力降低通常被解釋為個體間社交互動的減少，而比較最近距離則是更能代表個體之間的互動行為 (Pitcher, & Parrish, 1993)。

##### 1. 準備過程

- (1)準備 Shoaling 實驗用魚缸 (1.5L tank)，倒入 1.2L 曝氣水
- (2)100 $\mu$ M Scopolamine 組、200 $\mu$ M Scopolamine 組斑馬魚在 100ml 燒杯中 (裝 50ml Scopolamine 溶液)，單獨浸泡溶液 1 小時  
控制組斑馬魚在 100ml 燒杯中 (裝 50ml 曝氣水)，單獨隔離 20 分鐘
- (3)調整攝影機設定，將同組的 4 隻斑馬魚放入同一魚缸後開始實驗



▲ (圖十三) Shoaling 實驗錄影畫面

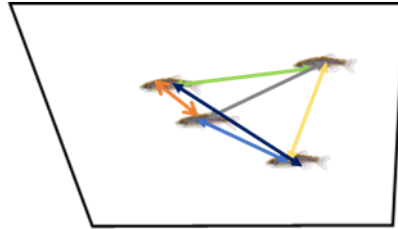
##### 2. 實驗過程

- (1)錄影觀察 15 分鐘

### 3. 實驗數據

用軟體 (ActualTrack) 追蹤每隻斑馬魚每 66 毫秒的分布位置

用軟體 (excel) 計算 4 隻斑馬魚間的距離 (如圖十四)



▲ (圖十四) Shoaling 實驗數據記錄

- (1) 各組之平均距離
- (2) 各組每 5 分鐘之平均距離
- (3) 各組每單位時間之距離最小值的平均
- (4) 各組每 5 分鐘每單位時間之距離最小值的平均

### (五) Mirror biting 實驗 (測試攻擊性)

在 Mirror biting 實驗中，斑馬魚會藉由與鏡像對接或啄鏡像 (Head-butting or Biting) 以顯示魄力 (Boldness phenotype)，或在靠近鏡子的區域不斷來回，類似於跟蹤鏡像的行為。碰撞鏡子次數越多，或待在靠近鏡子區域的時間越長，代表斑馬魚攻擊性越強。

#### 1. 準備過程

- (1) 準備 Mirror biting 實驗用魚缸 (26\*8\*17.5cm)，放入隔板 (7.5\*22cm) 擋住鏡子 (7.8\*17.7cm)，倒入 3L 曝氣水
- (2) 100 $\mu$ M Scopolamine 組、200 $\mu$ M Scopolamine 組斑馬魚在 100ml 燒杯中 (裝 50ml Scopolamine 溶液)，單獨浸泡溶液 1 小時  
控制組斑馬魚在 100ml 燒杯中 (裝 50ml 曝氣水)，單獨隔離 20 分鐘
- (3) 將斑馬魚放入魚缸適應 15 分鐘
- (4) 調整攝影機設定，將隔板抽起後開始實驗





▲ (圖十五) Mirror biting 實驗裝置 (有隔板/無隔板)



▲ (圖十六) Mirror biting 實驗錄影畫面

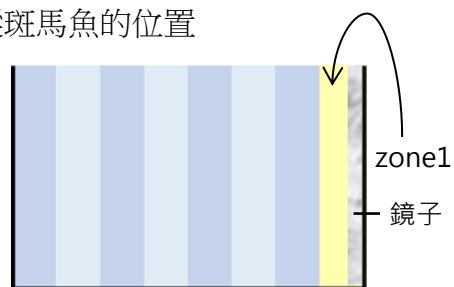
## 2. 實驗過程

(1) 錄影觀察 15 分鐘

## 3. 實驗數據

(1) 計算斑馬魚碰撞鏡子的次數

用軟體 (EthoVision) 追蹤斑馬魚的位置



▲ (圖十七) Mirror biting 實驗數據記錄

(2) 計算斑馬魚待在靠近鏡子區域 (圖十七中 zone1) 的時間

將魚缸分成 8 區，一個區域長約 3.25cm，大約為斑馬魚的體長

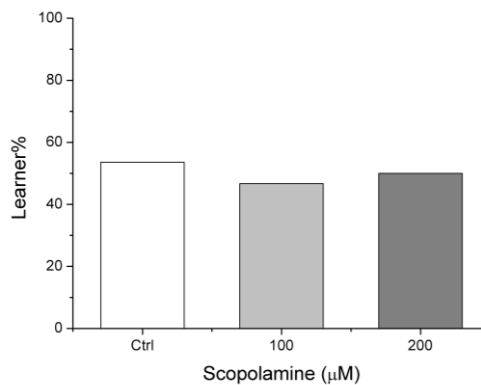
## 參、研究結果與討論

### 一、研究結果

#### (一) Active avoidance 實驗

##### 1. Learner 比例

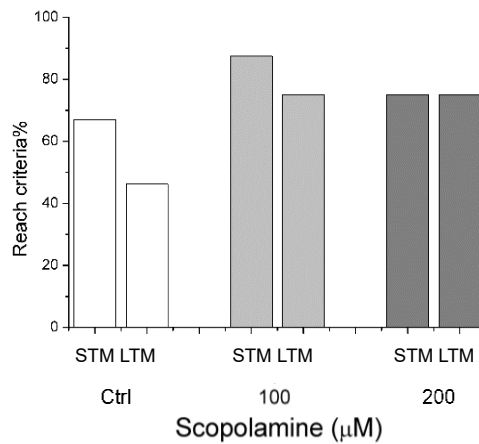
如圖十八，控制組與泡 100 $\mu$ M Scopolamine 溶液組、200 $\mu$ M組的 learner 比例 (session 3 的達到標準比例) 由卡方檢定未達到顯著差異 ( $p>0.05$ )，代表各組斑馬魚在 session 3 學會避開藍光區的比例無明顯差異。



▲ (圖十八) Learner 比例

##### 2. 達到標準比例 (STM、LTM)

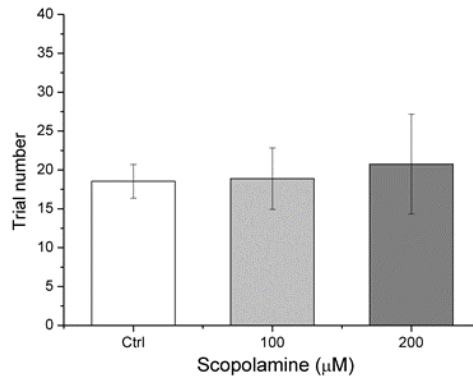
如圖十九，各組在 STM、LTM 時達到標準的比例由卡方檢定均未達到顯著差異 ( $p>0.05$ )。



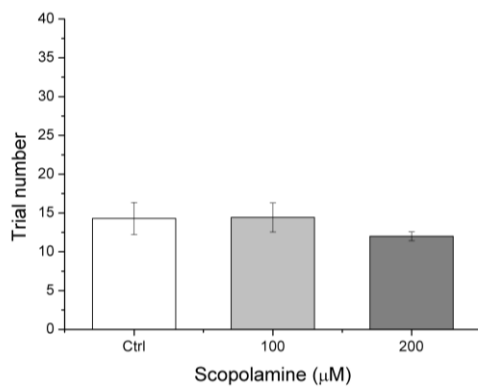
▲ (圖十九) 達到標準比例 (STM、LTM)

### 3. Trial number (session 3、STM、LTM)

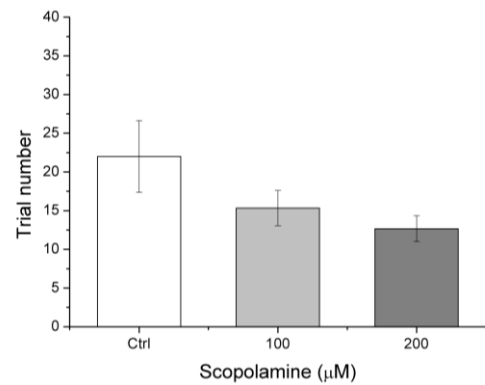
如圖二十、圖二十一、圖二十二，控制組與泡  $100 \mu\text{M}$  Scopolamine 溶液組、 $200 \mu\text{M}$  組在 session 3、STM、LTM 時的 Trial number 由 Dunn's multiple comparisons test 均未達到顯著差異 ( $p>0.05$ )，代表各組斑馬魚在學會避開藍光區所花費的時間無明顯差異。



▲ (圖二十) Trial number (session 3)



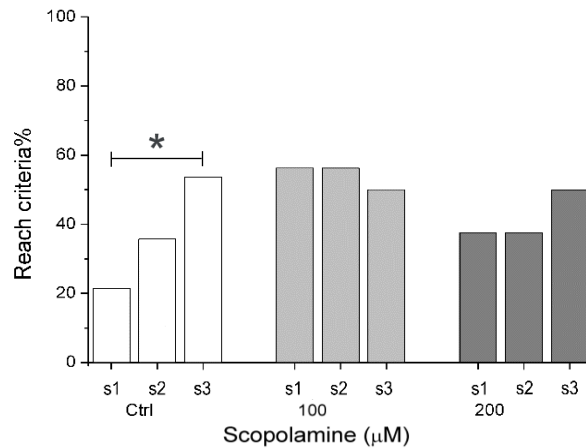
▲ (圖二十一) Trial number (STM)



▲ (圖二十二) Trial number (LTM)

4. 達到標準比例 (session 1、session 2、session 3)

如圖二十三，控制組 session 1 與 session 3 達到標準的比例由卡方檢定達到顯著差異( $p=0.013$ )，泡  $100\mu\text{M}$  Scopolamine 溶液組、 $200\mu\text{M}$ 組 session 1 與 session 3 達到標準的比例由卡方檢定未達到顯著差異 ( $p>0.05$ )，代表控制組達到標準的比例從 session 1 到 session 3 逐漸上升，而泡  $100\mu\text{M}$  Scopolamine 溶液組、 $200\mu\text{M}$ 組達到標準的比例從 session 1 到 session 3 幾乎不變。

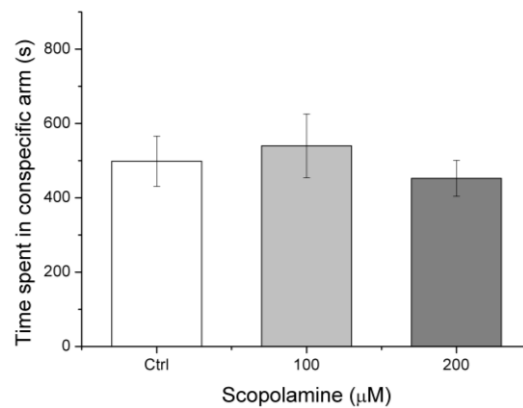


▲ (圖二十三) 達到標準比例 (session 1、session 2、session 3)

## (二) Social memory 實驗

### 1. 各組測試魚待在靠近同類區的時間

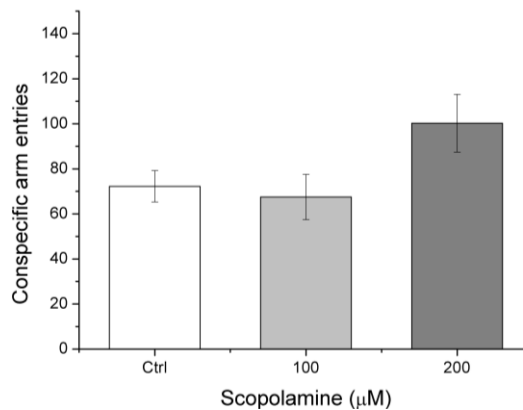
如圖二十四，控制組與泡 100 $\mu$ M Scopolamine 溶液組、200 $\mu$ M組待在靠近同類區域的時間由 Dunn's multiple comparisons test 均未達到顯著差異 ( $p>0.05$ )。代表控制組與泡 100 $\mu$ M Scopolamine 溶液組、200 $\mu$ M組的社交能力沒有顯著差異。



▲ (圖二十四) 各組測試魚待在靠近同類區的時間

### 2. 各組測試魚進出靠近同類區的次數

如圖二十五，各組測試魚進出靠近同類區的次數由 Dunn's multiple comparisons test 未達到顯著差異 ( $p>0.05$ )，代表社交能力沒有顯著差異。

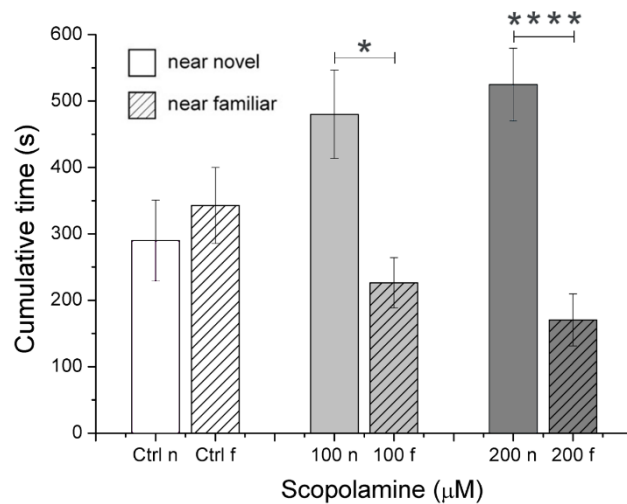


▲ (圖二十五) 各組測試魚進出靠近同類區的次數

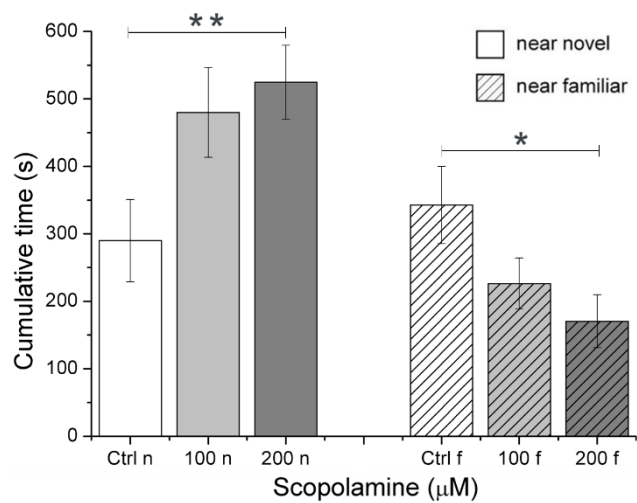
3. 各組測試魚待在靠近陌生魚區與靠近熟悉魚區的時間

如圖二十六，控制組待在兩邊的時間由 Sidak's multiple comparisons test 未達顯著差異 ( $p>0.05$ )，泡  $100\mu\text{M}$ 、 $200\mu\text{M}$  Scopolamine 溶液組待在兩邊的時間達到顯著差異 ( $p=0.0423$ 、 $p<0.0001$ )。代表控制組待在兩邊的時間差異不明顯， $100\mu\text{M}$ 、 $200\mu\text{M}$  Scopolamine 組待在陌生魚區的時間明顯大於熟悉魚區。

如圖二十七，控制組與泡  $200\mu\text{M}$  Scopolamine 溶液組待在靠近陌生魚區的時間由 Dunnett's multiple comparisons test 達到顯著差異 ( $p=0.0055$ )，靠近陌生魚區的時間達到顯著差異 ( $p=0.0242$ )。代表泡  $200\mu\text{M}$  Scopolamine 溶液組和控制組相比，待在靠近陌生魚區域的時間明顯較長，待在靠近熟悉魚區域的時間明顯較短。



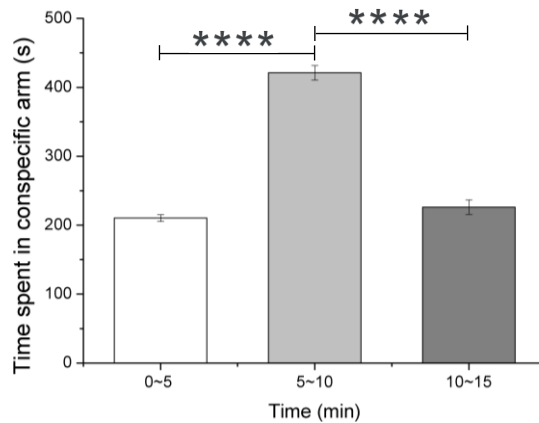
▲ (圖二十六) 各組測試魚待在靠近陌生魚區與靠近熟悉魚區的時間



▲ (圖二十七) 測試魚待在靠近陌生魚區與靠近熟悉魚區的時間

#### 4. 控制組測試魚每 5 分鐘待在靠近同類區的時間

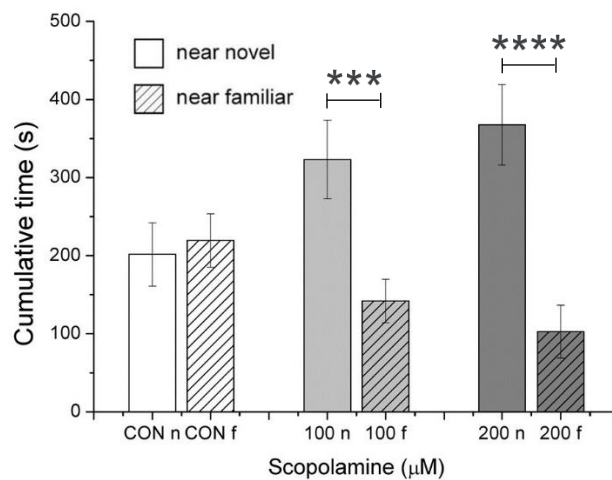
如圖二十八，控制組測試魚靠近陌生魚區的時間加上靠近熟悉魚區的時間為靠近同類區的時間，0~5 分鐘與 5~10 分鐘、5~10 分鐘與 10~15 分鐘待在靠近同類區的時間由 Tukey's multiple comparisons test 達到顯著差異 ( $p < 0.0001$ )，代表 5~10 分鐘測試魚待在靠近同類區的時間明顯大於 0~5 分鐘、10~15 分鐘。



▲ (圖二十八) 控制組測試魚每 5 分鐘待在靠近同類區的時間

#### 5. 5~10 分鐘各組測試魚待在靠近陌生魚區與靠近熟悉魚區的時間

如圖二十九，泡 100 $\mu\text{M}$  Scopolamine 溶液組、泡 200 $\mu\text{M}$  Scopolamine 溶液組 5~10 分鐘待在靠近陌生魚區與靠近熟悉魚區的時間由 Tukey's multiple comparisons test 達到顯著差異 ( $p = 0.0005$ ,  $p < 0.0001$ )，代表 100 $\mu\text{M}$ 組、200 $\mu\text{M}$ 組測試魚待在靠近陌生魚區的時間明顯大於待在靠近熟悉魚區的時間。



▲ (圖二十九) 5~10 分鐘各組測試魚待在靠近陌生魚區與靠近熟悉魚區的時間



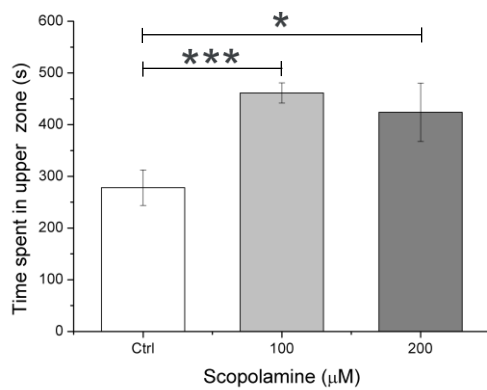
### (三) Novel tank 實驗

#### 1. 待在魚缸上層的時間

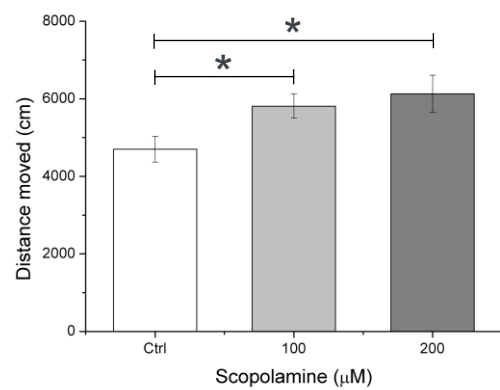
如圖三十，控制組與泡 100 $\mu$ M、200 $\mu$ M Scopolamine 溶液組待在魚缸上層的時間由 Dunnett's multiple comparisons test 達到顯著差異 ( $p=0.0003$ )、( $p=0.0187$ )，代表泡 100 $\mu$ M、200 $\mu$ M Scopolamine 溶液組待在上層的時間明顯大於控制組。

#### 2. 移動距離

如圖三十一，控制組與泡 100 $\mu$ M、200 $\mu$ M Scopolamine 溶液組的移動距離由 Dunnett's multiple comparisons test 達到顯著差異 ( $p=0.0484$ )、( $p=0.0285$ )，代表泡 100 $\mu$ M、200 $\mu$ M Scopolamine 溶液組的移動距離明顯大於控制組。



▲ (圖三十) 待在魚缸上層的時間



▲ (圖三十一) 移動距離

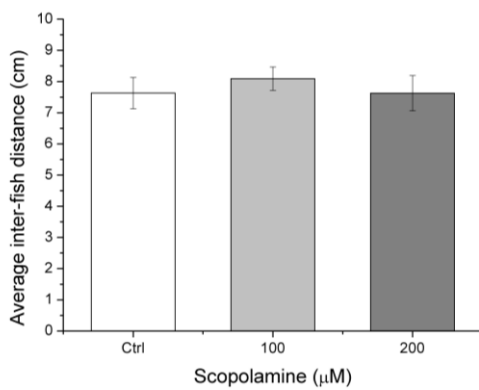
#### (四) Shoaling 實驗

##### 1. 各組之平均距離

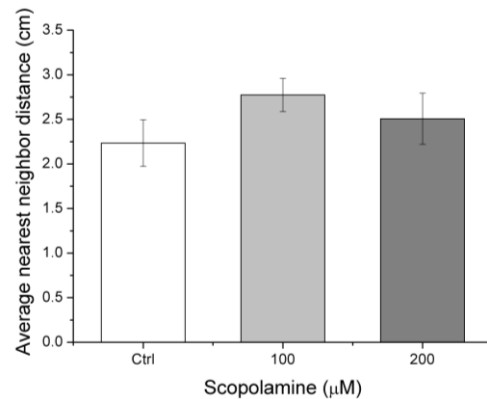
如圖三十二，控制組與泡 100 $\mu\text{M}$  Scopolamine 溶液組、200 $\mu\text{M}$ 組之平均距離由 Kruskal-Wallis test 均未達到顯著差異 ( $p>0.05$ )。

##### 2. 各組每單位時間之距離最小值的平均

如圖三十三，各組之每單位時間之距離最小值的平均由 Kruskal-Wallis test 均未達到顯著差異 ( $p>0.05$ )。



▲ (圖三十二) 平均距離



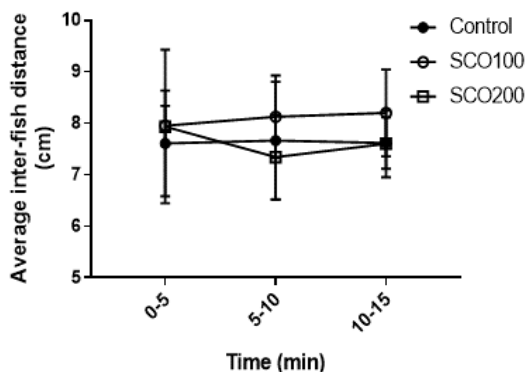
▲ (圖三十三) 每單位時間之距離最小值

##### 3. 各組每 5 分鐘之平均距離

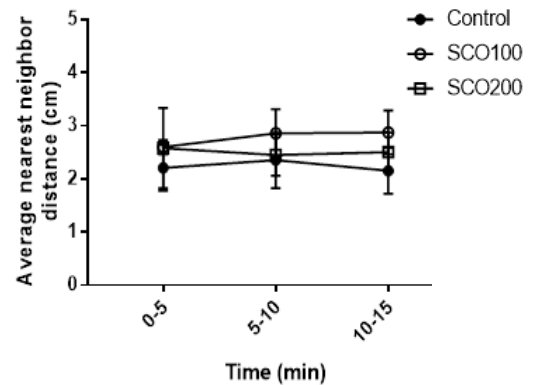
如圖三十四，各組距離由 Tukey's multiple comparisons test 未達顯著差異 ( $p>0.05$ )。

##### 4. 各組每 5 分鐘每單位時間之距離最小值的平均

如圖三十五，各組每 5 分鐘每單位時間之距離最小值的平均由 Tukey's multiple comparisons test 均未達到顯著差異 ( $p>0.05$ )。



▲ (圖三十四) 每 5 分鐘之平均距離



▲ (圖三十五) 每 5 分鐘之距離最小值

## (五) Mirror biting 實驗

### 1. 撞擊鏡子次數

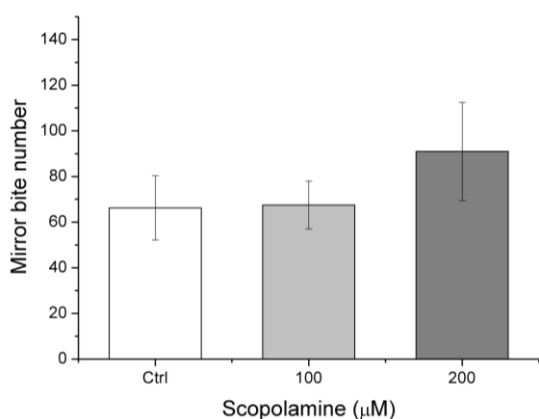
如圖三十六，控制組與泡 100 $\mu\text{M}$  Scopolamine 溶液組、200 $\mu\text{M}$ 組撞擊鏡子次數由 Dunn's multiple comparisons test 均未達到顯著差異 ( $p>0.05$ )，代表控制組與泡 100 $\mu\text{M}$  Scopolamine 溶液組、200 $\mu\text{M}$ 組的攻擊性無明顯差異。

### 2. 公、母魚分別撞擊鏡子次數

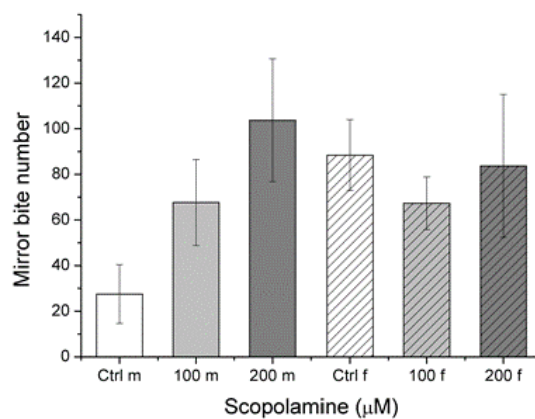
如圖三十七，各組撞擊鏡子次數由 Dunn's multiple comparisons test 均未達到顯著差異 ( $p>0.05$ )，代表不論性別，攻擊性均未受到 Scopolamine 明顯影響。

### 3. 待在靠近鏡子區域的時間

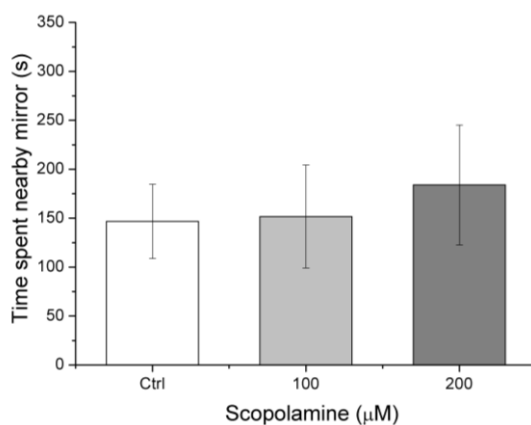
如圖三十八，各組待在靠近鏡子區域的時間由 Dunn's multiple comparisons test 均未達到顯著差異 ( $p>0.05$ )，代表控制組與泡 100 $\mu\text{M}$  Scopolamine 溶液組、200 $\mu\text{M}$ 組的攻擊性無明顯差異。



▲ (圖三十六) 撞擊鏡子次數



▲ (圖三十七) 公母魚分別撞擊鏡子次數



▲ (圖三十八) 待在靠近鏡子區域的時間

## 二、討論

### (一) Scopolamine 是否會讓斑馬魚的學習與記憶能力下降

目前大部分關於 Scopolamine 的研究顯示，浸泡 Scopolamine 溶液有讓斑馬魚產生記憶障礙的效果。但在我的實驗結果中，有些結果和 Scopolamine 會導致學習與記憶能力下降的假設不完全符合，因此我針對 Scopolamine 是否會讓斑馬魚的學習與記憶能力下降這個問題，以 Active avoidance 實驗和 Social memory 實驗結果作了討論。

#### 1. Active avoidance 實驗

我們通常會比較各組在學習階段結束後，session3 時各組達到標準的比例 (Lerner 比例) 代表斑馬魚的記憶能力。預期的結果是斑馬魚會因為泡了 Scopolamine 溶液後學習與記憶能力下降，所以泡 100 $\mu$ M Scopolamine 組和 200 $\mu$ M 組學會避開電擊的魚比較少，learner 比例會低於控制組。

但實驗結果顯示控制組和 100 $\mu$ M 組、200 $\mu$ M 組在 session3 時 Lerner 比例 (如圖十八)、Trial number (如圖二十) 均未達到顯著差異，STM、LTM 時 Lerner 比例 (如圖十九)、Trial number (如圖二十一、圖二十二) 也未達顯著差異。卻在學習階段 session 1 到 session 3 達到標準的比例 (如圖二十三)，控制組的斑馬魚從 session 1 到 session 3 學會避開藍光區的比例逐漸上升，100 $\mu$ M 組和 200 $\mu$ M 組斑馬魚 session 1 到 session 3 學會的比例則是沒有差異。代表控制組的斑馬魚經由多次練習學會避開藍光區，並且訓練越多次學會的比例就越高；浸泡 Scopolamine 的斑馬魚則是維持原本的表現，一開始會的就會，不會的還是不會，因此我推測 Scopolamine 會導致斑馬魚的學習能力下降，但從這個實驗結果，無法顯示藥物對記憶的影響。

#### 2. Social memory 實驗

Social memory 實驗前預期的結果是斑馬魚會對於陌生事物的探索時間較長 (novelty preference) (Madeira & Oliveira, 2017)，藉由比較位於中央的測試魚待在靠近熟悉魚的時間和待在靠近陌生魚的時間，判斷測試魚是否記得 Social preference 實驗時見過的熟悉魚。若測試魚記得 Social preference 實驗時見過的熟悉魚，則可能對刺激魚有不同反應：待在靠近陌生魚區域比較久，靠近熟悉魚區域時間比較

短，如果不記得熟悉魚則是待在兩邊的時間差不多。

我的實驗結果顯示控制組的測試魚待在靠近陌生魚區域和靠近熟悉魚區域的時間並沒有達到顯著差異，但浸泡 100 $\mu$ M Scopolamine 溶液組和 200 $\mu$ M組的斑馬魚明顯的在靠近陌生魚的區域停留時間較長 (如圖二十六)。

因為預期結果和我的實驗結果不完全相同，我認為控制組的斑馬魚待在靠近陌生魚區域和靠近熟悉魚區域的時間沒有明顯差異可能是因為陌生魚和熟悉魚對測試魚的刺激差異不大，又或者是在錄影的前期、中期、後期，測試魚對陌生魚和熟悉魚有不同反應。因此我針對錄影期間設定每 5 分鐘為一時間單位 (分為 0~5 分鐘、5~10 分鐘、10~15 分鐘) 再次進行分析。如圖二十八，控制組測試魚 5~10 分鐘待在靠近陌生魚區、靠近熟悉魚區的時間明顯大於 0~5 分鐘、10~15 分鐘，代表控制組測試魚 5~10 分鐘待在靠近兩邊的時間最多，5 到 10 分鐘是斑馬魚社交行為最活躍的時期。推測 0~5 分鐘為測試魚進入新環境的適應期，5~10 分鐘為探索期，10~15 分鐘測試魚已經習慣陌生魚和熟悉魚。比較 3 組 5 到 10 分鐘待在兩區的時間 (如圖二十九)，也得到和整段錄影期間相同的結果，Scopolamine 組靠近陌生魚的時間明顯大於靠近熟悉魚，表示 Scopolamine 組測試魚能分辨並記得熟悉魚。所以由 Social memory 的實驗結果，我推測 Scopolamine 會讓斑馬魚讀取已經儲存記憶的能力提升。

### 3. 綜合討論

根據文獻，我認為這種現象可能是乙醯膽鹼 (Acetylcholine) 對於記憶形成各個階段有不同影響所導致。記憶的形成過程分為 3 個階段 (3 processes of memory)：輸入 (Encoding)→儲存 (Storage)→讀取 (Retrieval) (Melton, 1963)。乙醯膽鹼是一種腦內重要的神經傳導物質，當腦內的乙醯膽鹼濃度下降會造成輸入新記憶的能力，也就是學習能力下降，而且提取先前儲存記憶的能力上升 (Hasselmo & McGaughy, 2004)。Scopolamine 作為乙醯膽鹼受體拮抗劑，當浸泡在 Scopolamine 溶液中，會使斑馬魚腦內的乙醯膽鹼無法接上受體而發揮不了作用，導致學習能力下降，讀取記憶能力上升。

對應到在 Active avoidance 的學習階段達到標準比例 (如圖二十三) 的結果，Scopolamine 組的斑馬魚因為學習能力降低，在測試剛開始就不會避開藍光區的斑馬魚，在訓練結束時學會的比例也沒有因為多次練習而提升，維持原本的狀態。而在 Social memory 實驗中，Scopolamine 組斑馬魚的確也因為讀取記憶能力上升，明顯能夠區分並且記得熟悉魚。

## (二) Scopolamine 是否會影響斑馬魚的社交能力與社交偏好

### 1. Social memory 實驗

由 Social memory 實驗的第一階段結果 (如圖二十四、圖二十五)，代表斑馬魚的社交能力不受 100 $\mu$ M、200 $\mu$ M Scopolamine 的影響，因此第二階段實驗不會因為社交能力改變受到影響。

Social memory 實驗的第二階段結果 (如圖二十六)，代表浸泡 Scopolamine 會導致斑馬魚親近陌生魚的偏好提升。

## (三) Scopolamine 對斑馬魚是否有減輕焦慮程度的效果

有研究表示，Scopolamine 作為乙醯膽鹼受體拮抗劑，對抑鬱症病患有減輕焦慮的作用 (Furey & Drevets, 2006)。如果 Scopolamine 有抗焦慮的效果，經過大量的研究後，或許未來能成為用在人類身上的抗焦慮藥物。

常見的測試斑馬魚焦慮程度的實驗有 Novel tank 實驗觀察斑馬魚的潛水反應 (Dive responses)，斑馬魚焦慮時因為其到底部躲避掠食者的天性，通常會待在魚缸下層，稱為底棲行為 (Bottom-dwelling behavior)。斑馬魚到陌生環境時通常也會停留在底部，因此待在底部的時間與焦慮程度呈正相關；明暗測試實驗 (Dark & Light preference) 比較斑馬魚在亮區和暗區的停留時間，斑馬魚是晝行性動物，一般情況下大部分時間會選擇待在亮區，當斑馬魚待在亮區的時間減少，即將其視為斑馬魚焦慮時的表現。但因為 Scopolamine 藥物有散瞳的效果 (Rosen, 1986)，若是採用明暗測試實驗斑馬魚的焦慮程度，斑馬魚可能是因為畏光而避開亮區，而不是因為焦慮造成。所以本實驗採用了 Novel tank 實驗來測試斑馬魚的焦慮程度。

## 1. Novel tank 實驗

在 Novel tank 實驗中泡 100 $\mu$ M、200 $\mu$ M Scopolamine 溶液組待在魚缸上層的時間顯著大於控制組 (如圖三十)，推測 Scopolamine 對斑馬魚有減輕焦慮效果。

## 2. Shoaling 實驗

在參考的論文中提到，當魚類皮膚受損時會釋放警報物質，周邊魚類接收到這種物質後會產生恐懼、焦慮並出現警報反應，例如逃竄、縮小群游範圍、遠離捕食者 (Speedie & Gerlai, 2008)。文中比較了控制組與浸泡高劑量警報物質溶液組別的個體間平均距離，浸泡警報物質溶液組的個體間平均距離顯著小於控制組。

斑馬魚的焦慮程度可能和群游時個體間的距離有關，當焦慮程度高，群游時個體間的平均距離變小。參考論文中將浸泡 800 $\mu$ M Scopolamine 溶液 30 分鐘的斑馬魚與控制組比較，Scopolamine 組斑馬魚待在魚缸底部的時間較短，而群游時個體間的平均距離和最小距離皆大於控制組，推測 Scopolamine 對斑馬魚有減輕焦慮程度的效果 (Hamilton et al., 2017)。

但我的實驗結果顯示，控制組的斑馬魚和泡 100 $\mu$ M Scopolamine 溶液組、200 $\mu$ M組的平均距離以及最小距離沒有達到顯著差異 (如圖三十二、圖三十三)。推測可能是因為本實驗中使用的 Scopolamine 溶液濃度較參考論文中低，斑馬魚浸泡 Scopolamine 溶液的時間也不同，使平均距離及最小距離沒有達到顯著差異。並且浸泡 Scopolamine 溶液後群游時個體間距離改變的原因可能不只是焦慮程度改變，也可能是因為環境因素、群體凝聚力等變數而影響群游行為。

### (四) Scopolamine 是否會影響斑馬魚的攻擊性

#### 1. Mirror biting 實驗

由 Mirror biting 實驗結果 (如圖三十六、圖三十八)，斑馬魚的攻擊性不受 Scopolamine 影響。即使將公母魚分開討論，排除性別差異 (如圖三十七)，公母魚各自的攻擊性也沒有因為浸泡 100 $\mu$ M、200 $\mu$ M Scopolamine 而達到顯著差異。



## 肆、結論與應用

### 一、結論

- (一) 浸泡 Scopolamine 溶液導致斑馬魚學習能力下降，但讀取記憶能力提升
- (二) 浸泡 Scopolamine 溶液使斑馬魚靠近陌生魚的偏好增強
- (三) 浸泡 Scopolamine 溶液對斑馬魚可能有抗焦慮的效果，並且使活動力提高
- (四) 浸泡 100 $\mu$ M、200 $\mu$ M Scopolamine 溶液 1 小時，對斑馬魚的社交能力、群游行為以及攻擊性無顯著影響

### 二、應用

我的實驗結果可以做為未來使用 Scopolamine 藥物的參考，Scopolamine 作為常用影響實驗動物記憶能力的前置實驗藥物，將來在實驗時若能考慮到 Scopolamine 藥物對記憶不同階段的不同影響，對於實驗結果就能有更完整的解釋。

### 三、未來展望

未來希望觀察斑馬魚浸泡更高濃度 Scopolamine 後的行為，以及針對 Scopolamine 對學習與記憶能力的影響、是否有抗焦慮的作用多加探討

- (一) 進行腦部電生理實驗，測試有無長期增益的現象，用來測試記憶是否形成
- (二) 測試斑馬魚體內皮質醇濃度代表焦慮程度，與其他焦慮行為相互比較，確認藥物是否有抗焦慮作用

## 伍、參考文獻

- Furey, M. L., & Drevets, W. C. (2006). Antidepressant efficacy of the antimuscarinic drug Scopolamine: a randomized, placebo-controlled clinical trial. *Arch. Gen. Psychiatry*, 63, 1121-1129.
- Hamilton, T. J., Morrill, A., Lucas, K., Gallup, J., Harris, M., Healey, M., et al. (2017). Establishing zebrafish as a model to study the anxiolytic effects of scopolamine. *Scientific Reports* 7, 15081. doi: 10.1038/s41598-017-15374-w
- Hasselmo, M. E., & McGaughy, J. (2004). High acetylcholine sets circuit dynamics for

- attention and encoding: low acetylcholine sets dynamics for consolidation. *Progress in Brain Research*, 145, 207-231.
- Kim, Y. H., Lee, Y., Kim, D., Jung, M. W., & Lee, C. J. (2010). Scopolamine-induced learning impairment reversed by physostigmine in zebrafish. *Neuroscience Research*, 67(2), 156 – 161. doi: 10.1016/j.neures.2010.03.003
- Levin, E. D., Bencan, Z., & Cerutti, D. T. (2007). Anxiolytic effects of nicotine in zebrafish. *Physiology & Behavior*, 90(1), 54-8.
- Madeira, N., & Oliveira, R. F. (2017). Long-term social recognition memory in zebrafish. *Zebrafish*, 14(4), 305 – 310. doi: 10.1089/zeb.2017.1430
- Melton, A. W. (1963). Implications of short-term memory for a general theory of memory. *Journal of Verbal Learning and Verbal Behavior*, 2, 1-21.
- Oliveira, R. F. (2013). Mind the fish: zebrafish as a model in cognitive social neuroscience. *Frontiers in neural circuits*, 7(131). doi: 10.3389/fncir.2013.00131
- Pitcher, T. J., & Parrish, J. K. (1993). Functions of shoaling behaviour in teleosts. *Behaviour of Teleost Fishes* (pp. 363 – 439). London: Chapman & Hall.
- Rosen, N. B. (1986). Accidental mydriasis from Scopolamine patches. *Journal of the American Optometric Association*, 57(7), 541-542.
- Speedie, N., & Gerlai, R. (2008). Alarm substance induced behavioral responses in zebrafish (*Danio rerio*). *Behavioural Brain Research*, 188, 168-177.

## 【評語】 130014

承接去年已得三等獎的研究主題，新增兩個研究子題，整體來說，實驗假設、設計、結果與討論都相當完整。

但經與先前作品的比對，相似度過高，因此不予考慮。