

第十八屆旺宏科學獎成果報告書

參賽編號：SA18-106

作品名稱：建立行為模式探討尼古丁對行為和中樞神經機制的改變

姓名：廖佳玟

關鍵字：尼古丁、斑馬魚、中樞神經

摘要

本研究建立高效能且低成本的行為模式，來檢驗 Nicotine 對行為以及中樞神經機制的影響：用斑馬魚幼魚及成魚來模擬不同年齡層人類中的行為，觀察其行為的改變、標定 Nicotine 所引起之腦區活化、分子表現。本研究參考環境污染中的 Nicotine 濃度，與實際收集煙蒂測量尼古丁溶出量。研究發現，Nicotine 能降低焦慮行為達 10 倍以上、攻擊性下降約 50%、和抑制群體偏好性引起類自閉的行為；對幼魚的中樞神經系統有多約 30% 以上的影響，刺激 griseum centrale 腦區活化，由 p-ERK—c-FOS 訊息傳遞路徑影響下游基因的表現及行為；使 periventricular nucleus posterior tuberculum 和 diencephalic ventricle 腦區的 tyrosine hydroxylase 表現量大幅提升；也刺激 vascular postrema 腦區，使 GABA 表現量上升，並對應到哺乳類中可能的中樞神經及行為改變。結果顯示此新發展出的行為模式平台，能檢測環境 Nicotine 對脊椎動物中樞神經及行為之影響，可提供 Nicotine 在環境毒性與人類行為和整體健康風險評估之參考。

壹、研究動機

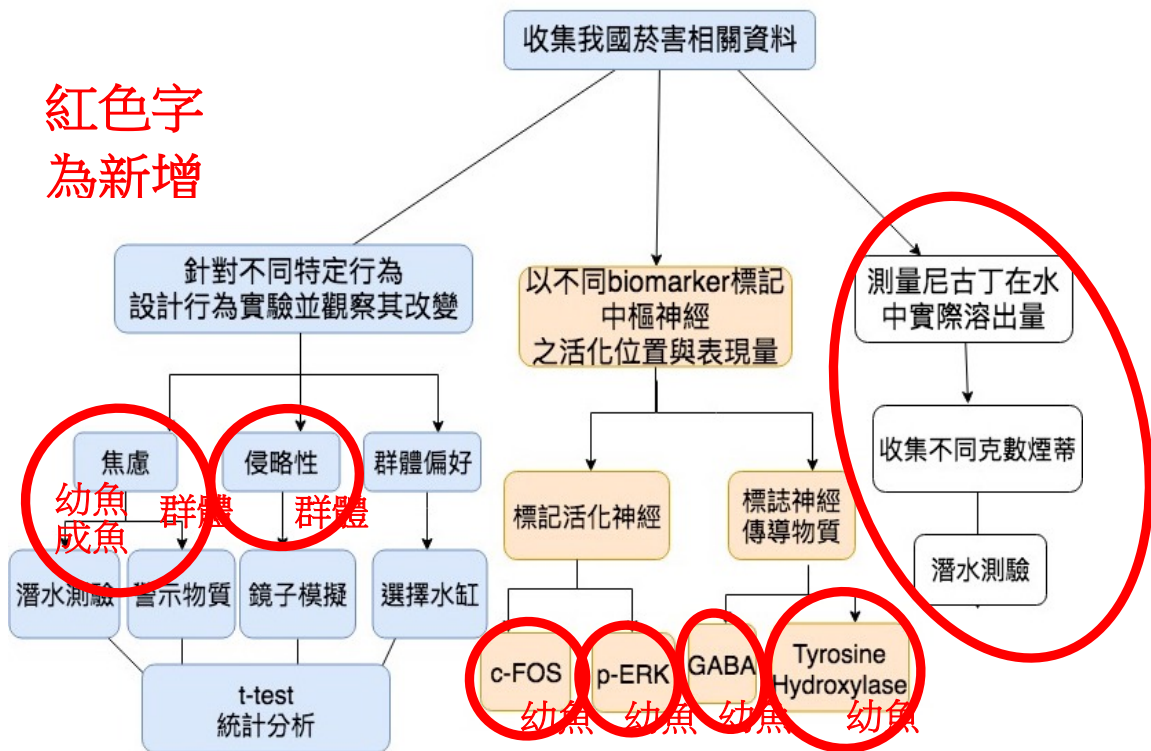
尼古丁因分子結構的特殊形狀可與中樞神經中尼古丁接受器結合，在青少年大腦還未發展完全下特別容易受到尼古丁的侵害。這正能導致各種有關情緒和行為的問題。據統計每年被隨手丟棄的菸蒂每年超過 4.5 兆個，已對海灘、海洋及整個水域帶來嚴重的污染，因為香菸的毒素都集中在塑膠濾嘴上，藉由流水便進入到水循環，對人類及海洋生物造成極大的威脅。

因為以人類當實驗對象會有許多限制以及道德上的問題，我們想找尋一種實驗對象，可以用低成本高效率的方法觀察尼古丁對中樞神經及行的影響，因為脊椎動物斑馬魚與人類許多構造有關，所以能藉由斑馬魚找出人類對應的發生位置和基因點。還有，因為我們希望能從斑馬魚的腦部與行為與人類做連結，而斑馬魚的小身形和準確地追蹤系統，提供了做許多不同行為實驗的機會。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，來評估尼古丁對人類的行為影響。

貳、研究目的

- 一、建立斑馬魚行為模式來檢驗尼古丁對不同年齡層人類行為之影響。
- 二、探討環境尼古丁污染中對中樞神經的活化神經傳導物的生成。
- 三、比較尼古丁對斑馬魚中樞神經和行為之影響與哺乳類不同處
- 四、探討使尼古丁造成行為改變的中樞神經機制。
- 五、模擬尼古丁對人類行為及中樞神經的影響。

實驗設計



參、研究過程方法

一、器材

尼古丁 (N3876-25ML Sigma)、PBS、PBSTr、PFA、blocking reagent、glycerol、2%agarose、一級抗體、二級抗體、封片膠、曝氣水、vibratome、24 格孔盤、微量吸管、分注器 (Pipette)、離心管、離心機、無菌操作台、直徑 10cm 培養皿、直徑 6cm 培養皿、微量離心管、4°C 冰箱、搖晃盤、螢光顯微鏡、蓋玻片、顯微鏡、飼養斑馬魚水缸、攝影機、石蠟紙、水缸：長 (23/20) 深 (11/9) 高 12 cm、水缸：長 27*深 9*高 18cm、透明隔板、鋁箔紙、不透明隔板、鏡子

二、實驗動物

斑馬魚由中研院斑馬魚核心中心提供，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，每日餵食(小蝦或魚飼料)三次並測量水溫使其維持在 26-28°C。我們用斑馬魚作為主要研究動物因為馬魚有許多先天特徵，像是較小的身體尺寸、高繁殖率和快速的循環時間等特性，允許斑馬魚成為具有高效益的模式生物 (Zon, 1999)。斑馬魚四個月大進入成熟期，本實驗使用兩種年齡範圍斑馬魚：2-4個月幼魚、5-8個月斑馬魚成魚，選取為隨機。

三、建立斑馬魚攝入尼古丁方法

在進行實驗前先將斑馬魚放置到水缸中待三小時，確保不會因到新環境的而影響實驗結果。收集關於環境中殘留尼古丁的濃度，特別是菸草與煙蒂對水的污染，根據文獻污染環境中尼古丁含量為 0.3 ppm、在受污染地表水含量為 1.2 ppm (已轉換為 ppm)。本研究的暴露濃度決定動機考量是：尼古丁暴露組濃度 0.3 ppm、0.6 ppm、1.2 ppm，為模擬我們的真實環境尼古丁污染並使實驗結果對人類有應用 (Song, 2009)。在加尼古丁到水缸時，先用離心管倒入蒸餾水再用微量吸管將尼古丁加入其中，確保尼古丁在倒入水缸時的平均分散。並使用 10 分鐘、3 天的尼古丁處理時間。

再確定使用 0.3 ppm、0.6 ppm、1.2 ppm，先抽血收集血液樣本檢測是否含有尼古丁，確定三種濃度都足夠使尼古丁進到斑馬魚血液循環中。

四、免疫組織化學染色法(Immunohistochemistry, IHC)

免疫組織化學染色法是指在抗體上結合螢光或可呈色的化學物質，利用免疫學原理中抗原和抗體間專一性的結合反應，檢測細胞或組織中是否有目標抗原的存在，此方式不只可以用來測知抗原的表現量，也可偵測組織或細胞中目標抗原的表現量及位置。本實驗取樣本由中研院實驗室受訓人員取得魚腦樣本，取得時有先經過麻醉等步驟確保將傷害減至最低，實驗程序均符合中研院動物實驗管理小組之規範。

實驗步驟：

在培養皿上用 PBSTr 清洗樣本兩次，利用微量吸管吸出 24 孔盤的廢液時，避免任何一個切片流失。用 1-2% blocking reagent (Roche) 阻斷非特異性抗原結合位兩小時之後，每孔加入一級抗體，並放置在 4 °C 過夜。隔夜後，再將一級抗體吸出，用 PBSTr 清洗三次，每次各十分鐘。再培養於二級抗體 4 °C，要用鋁箔紙避光並放置兩個小時，吸出二級抗體後，用 PBSTr 清洗三次，再用 PBS 取代。

將 glycerol(with PBS)以 25%,50%,75% 的濃度取代標本內的 PBS，為了進行封片。封片時，保留些許 glycerol 於載玻片上，於載玻片有組織的那面塗上封片膠(Mounting Medium)，取適當大小蓋玻片，以 45 度角慢慢蓋上，於螢光顯微鏡下觀察抗體在樣本上的表現量及區域。

1. 以 p-ERK 偵測及定位神經活化位置和表現量。
2. 以 c-FOS 確認 p-ERK 所標記之區域確實為活化區域且探討其中之訊息傳遞路徑。
3. 以 anti-tyrosine hydroxylase 標定 tyrosine hydroxylase 的區域及表現量，此為製造多巴胺的酵素。
4. 以 anti-GABA 偵測被抑制之神經及腦區。

表一、一級抗體的名稱、稀釋比例、廠牌

抗體名稱	稀釋比例	廠牌
Rabbit anti-p-ERK	1:500	Cell Signaling
Mouse-anti-tyrosine hydroxylase	1:500	Cell Signaling
Mouse anti-c-FOS	1:500	Santa Cruz
Rabbit anti-GABA	1:500	Sigma

表二、二級抗體的名稱、稀釋比例、廠牌

抗體名稱	稀釋比例	廠牌
Goat anti-rabbit IgG Alexa Fluor 568	1:500	Invitrogen
Goat anti-mouse IgG Alexa Fluor 488	1:500	Invitrogen

五、測量煙蒂在水中實際溶出濃度

實驗步驟：

因為煙蒂溶在水中的濃度不一定，需要透過實際將煙蒂放入水中才能測出實際的尼古丁溶出量，本研究先進行收集煙蒂，至附近咖啡廳、公共場合收集煙蒂。再使用濾網分別裝置：5 g、10 g、15 g、20 g、25 g，在進行潛水實驗前將濾網放置實驗組而十分鐘，進行實驗便觀察斑馬魚行為。

六、行為實驗—潛水測驗 (novel tank diving test)

實驗目的：利用斑馬魚的位質的偏好，觀察加入尼古丁後是否會影響焦慮行為



圖一、潛水測驗行為實驗魚缸擺設；右為對照組、左為實驗組

(一)、實驗步驟:

實驗組

1. 將斑馬魚放入加入尼古丁的水缸中三十分鐘
2. 準備長 27*深 9*高 18cm 的水缸加水至 8cm
3. 將攝入尼古丁的斑馬魚放置實驗組水缸
4. 架設攝影機並觀察其游泳位置偏好與整體活動行為

對照組

1. 加設攝影機並觀察其游泳位置偏好與整體活動行為
2. 重複以上步驟，第 3 步驟改為放置未經任何處理的斑馬魚

七、行為實驗—警示物質 (alarm substance)

實驗目的：探討加入警示物質會如何引響斑馬魚的腦部，而加入尼古丁後是否能改善此斑馬魚焦慮的行為。



圖二、警示物質行為實驗魚缸擺設

(一)、實驗步驟：

收集斑馬魚魚鱗抽取物質：取得自然死之斑馬魚並用紙巾擦乾其身體。在斑馬魚各面淺切 10

~15 刀，並用蒸餾水清洗傷口在微量離心管中清洗魚的傷口，在管內中上下移動斑馬魚總共十次。警示物質由斑馬魚皮上的表面割痕就能被釋出。將傷口清洗的過程中，要確認血液不污染到此溶液，整個實驗收集過程都在冰塊上進行，總共會收集 10 cc 魚皮抽取物。

實驗組

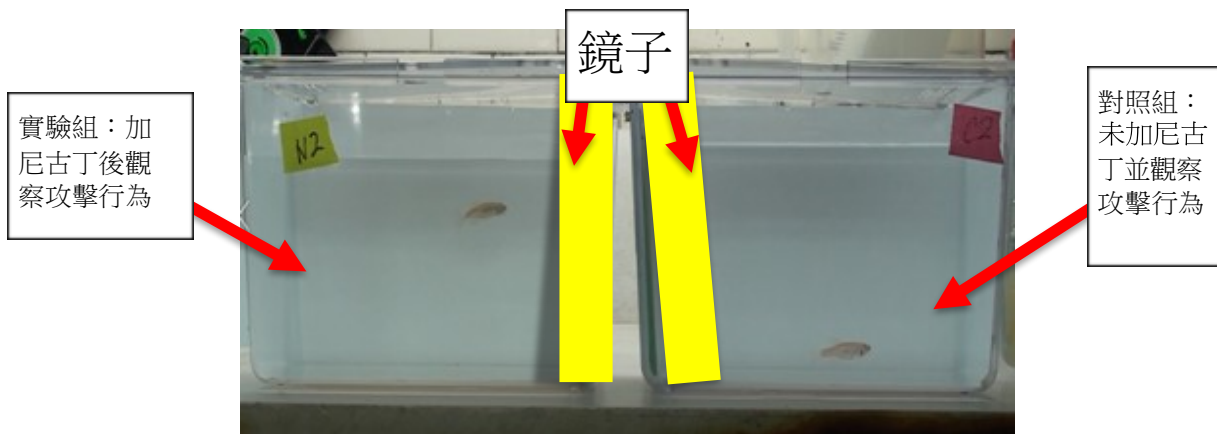
1. 將斑馬魚放入加入尼古丁的水缸中三十分鐘
2. 準備一個水缸長 27*深 9*高 18cm 水缸加水到 8 cm ；準備 50 ml 離心管並加入 1.5 cc 的警示物質，其餘加入蒸餾水到 50 cc
3. 倒入離心管內的溶液在水缸中
4. 架設攝影機，並等待 30 分鐘，分析斑馬魚對此警示物質的焦慮行為

對照組

1. 重複以上步驟 (2)、(4.)，步驟 (3.) 為放置未經任何處理的斑馬魚
2. 架設攝影機並觀察其游泳位置偏好與整體活動行為

八、行為實驗—模擬造成攻擊情境

實驗目的：觀察在不同形成攻擊性的情境中，加入尼古丁是否能降低斑馬魚的攻擊性。



圖三、模擬入侵者行為實驗魚缸擺設

(一)、實驗步驟：實驗組

1. 先將實驗使用的 12 cm 水缸放入鏡子和白色塑膠片蓋住，加水至 8 公分將斑馬魚獨立放進各水缸，並在水缸與水缸間夾入泡棉紙避免看到其他魚，放過夜
2. 讓斑馬魚攝入三十分鐘的尼古丁
3. 將擋住鏡子的白色塑膠片拿開，以攝影機紀錄過程以便分析斑馬魚攻擊性的程度

對照組

1. 重複其 (1)、(2)、(4) 步驟，本組未加尼古丁所以跳過(3)步驟

九、行為實驗—群體偏好

實驗目的：觀察在加入尼古丁後，斑馬魚的天性—群體偏好造成群游行為是否會被影響



圖四、群體偏好行為實驗魚缸擺設，黑線圍住區域為放置被測驗魚處，將此區分成三個區域：鄰近同類、中間、遠離同類；紅線圍住區域為放置「同類魚」三隻，呈現為一群

體，隨機放入左或右觀察被測魚之群體偏好性。觀察其待在各區域的時間。

(一)、實驗步驟

實驗組

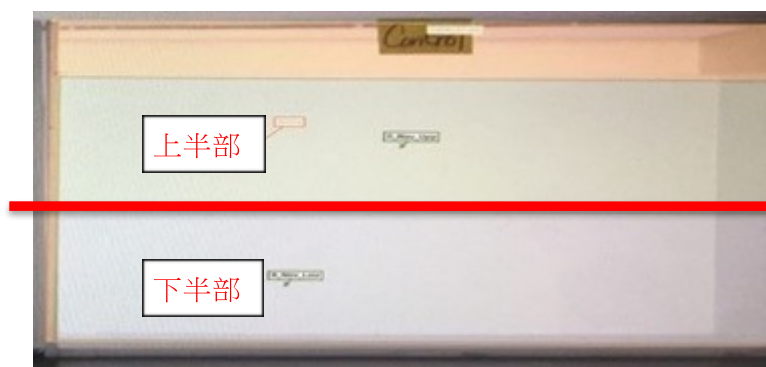
1. 將尼古丁加到待測魚水缸中靜置三十分鐘
2. 在大水缸中放入隔板，將此水缸平分成五格並裝滿水至八公分
3. 將「同類魚群」放置最右或左，計時一分鐘。選擇將「同類魚群」放置左還右為隨機分配，這樣才能使實驗更準確
4. 將測驗魚放入中間隔層，待一分鐘讓魚適應環境
5. 將兩邊隔板同時小心拉出，用攝影機錄製並觀察魚是否有群體偏好行為

對照組

1. 以上實驗步驟皆相同，除了步驟(1)

十、數據分析方法

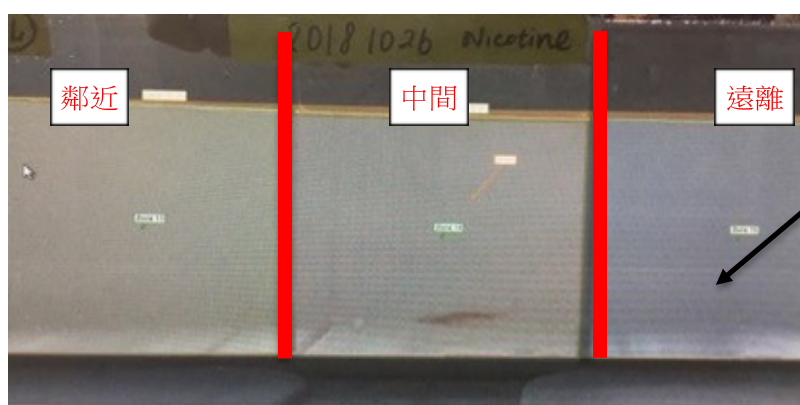
把各項行為實驗用分析軟體（ethovision）進行分析，由劃分區域並追蹤斑馬魚游動位置與在特定區域所花時間，將結果先量化，將各次重複的實驗做平均值，在計算標準誤差。



圖五、在潛水行為實驗中用分析軟體中劃分水缸上半部及下半部水域，計算在各區域所待時間



圖六、在入侵者行為實驗中用分析軟體劃分上半部及下半部水域和臨近鏡子區域，計算在各區域所待時間



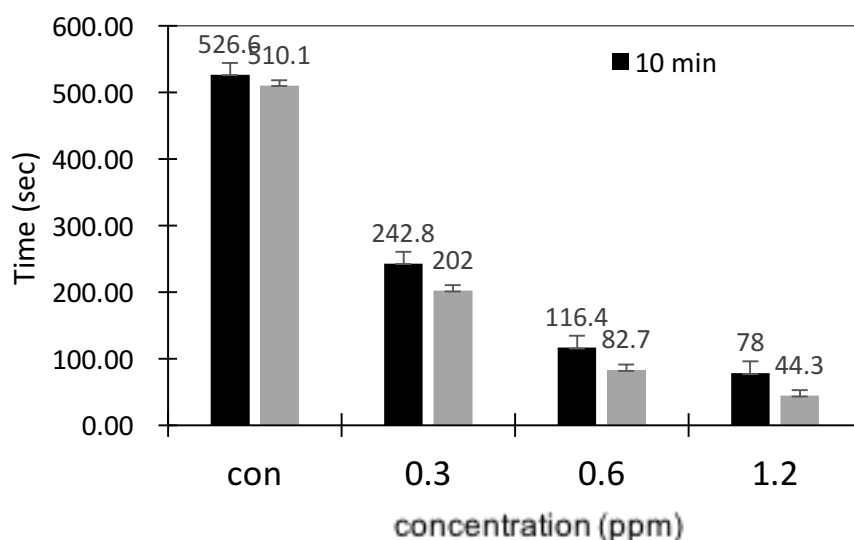
圖七、在群體偏好行為實驗在分析軟體中劃分不同選擇水缸（choice chamber 區域）；紅線劃分成三區域分別為：鄰近、中間、遠離，計算在各區域所待時間。

肆、研究結果

一、潛水測驗 (novel tank diving test) 行為實驗結果

我們以潛水測驗觀察尼古丁是否會對斑馬魚造成焦慮的行為，在老鼠中有實驗得知尼古丁會造成焦慮之相關行為 (Larbarca, 2001)，透過潛水測驗我們想知道在斑馬魚中的結果是否會與老鼠相同。

魚類透過改變游泳行為：增加在水缸底部的時間並降低對開放水域的偏好來顯示焦慮行為。將魚放入水缸時，他們因為處於一個新的環境所以經歷焦慮，而游在水缸底部。我們將水缸透過分析軟體分成上、下區域，並計算斑馬魚在各區所累積的總時間，來得知斑馬魚焦慮行為程度。先用成魚比較，短期與長期尼古丁暴露的焦慮效果，再比較幼魚與成魚差別，更再進一步觀察如將個體數增加是否有差別。

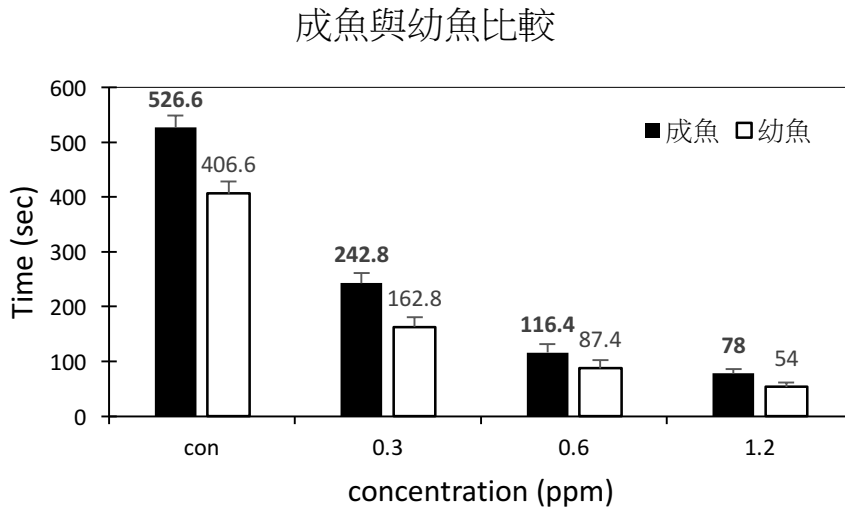


圖八、對照組和實驗組（經尼古丁處理）在下半水域的所待總時間（十分鐘內）。本結果是n=15，並以平均值±標準差的方式呈現。對照組與實驗組之數據以 t test 統計方法分析後呈現顯著差異(p<0.001)。

可以從圖八中發現尼古丁處理過後的斑馬魚，平均在下半部水域所花時間相較於對照組在下半部水域所花時間明顯變少。經過 t test 統計 (p<0.001) 證明此實驗結果差異顯著。所以我們可以從中得知，尼古丁能降低斑馬魚到了新的環境後的焦慮行為，而且此魚游到上半部也就是開放水域位置的時間相對於對照組也明顯提升，顯示此魚的焦慮行為為降低。這個結果與先前提到文獻的尼丁在老鼠中影響不同，我們可推測，關於焦慮行為，微量尼古丁可能會在魚類造成降低焦慮的效果，但在哺乳類中多餘微量或長期的尼古丁暴露會造成增加焦

慮的影響。也隨者尼古丁除理時間變長和濃度變高，焦慮行為也更下降。本實驗在 10 分鐘、和 48 小時都做行為分析，想觀察短期及長期尼古丁的影響，可看出10分鐘與三天沒有特別顯著差異，發現尼古丁是有些微劑量依賴性的藥物，隨著尼古丁處理時間和濃度的增加行為也減少更多。

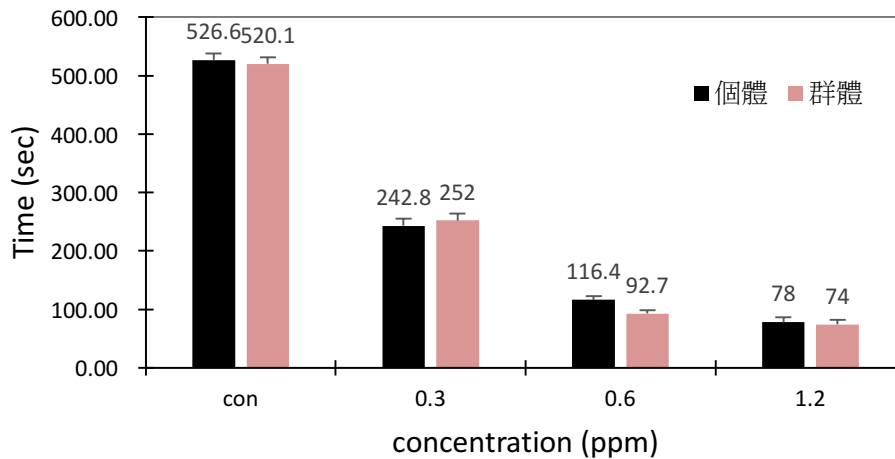
因10 分鐘與三天尼古丁處理無顯著差異，實驗用十分鐘尼古丁處理比較幼魚與成魚的差別。



圖九、成魚與幼魚潛水測驗中比較下半部水域所待時間

為了得知尼古丁對成魚及幼魚是否有不同影響，也用幼魚做實驗，圖九結果顯示在幼魚中，尼古丁抗焦慮的效果更大，幼魚在加入尼古丁後下半部水域所待時間減少，圖九說明尼古丁在幼魚中有更明顯的降低焦慮效果，更容易受到尼古丁影響。

個體與群體比較

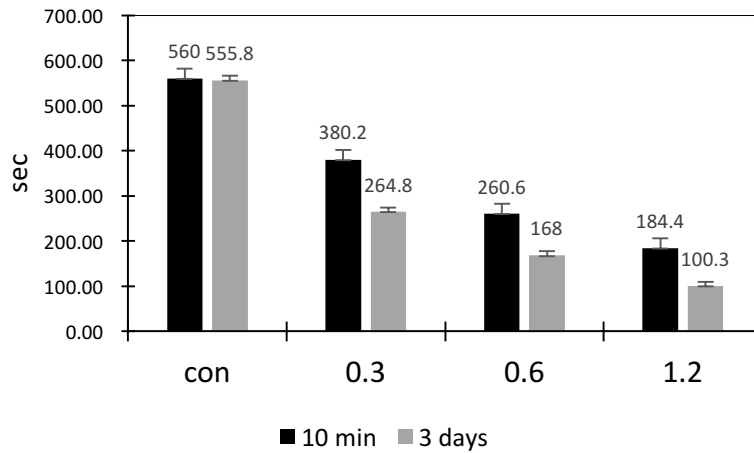


圖十、比較群體與個體潛水實驗差別

除了做個體實驗，還想知道此現象在群體中是否會發生，我們增加個體讓水缸至五隻斑馬魚，一樣用分析軟體偵測斑馬魚在上下水域所待時間，圖十結果顯示，在潛水實驗中，群體一樣會有抗焦慮的效果，結果與個體實驗無顯著差異。

二、尼古丁對加入警報物質(alarm pheromone)斑馬魚行為影響

目前研究對於異常增加的恐懼和焦慮之機制仍然不清楚，所以我們以斑馬魚來模擬人類行為中的腦部疾病。但我們非使用斑馬魚的天敵來製造恐懼，而是以表皮細胞中製造的警報物質引起焦慮推斷出人類異常的自然傾向。警報物質的釋放將引起魚類的警報反應，而使用敏感的化學感受器，偵測（吸收）該物質（Speedie, N., & Gerlai, R. 2008）。本測試斑馬魚焦慮的方法是在魚缸中給予警示物質，並觀察對照組（未經尼古丁處理）和實驗組（經尼古丁處理）的斑馬魚在下半部水域所待時間，來測驗斑馬魚的焦慮行為。

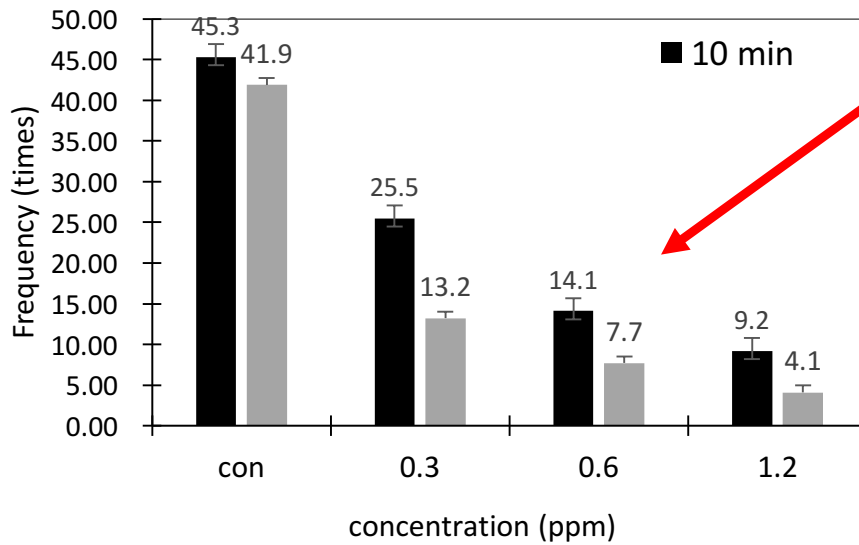


圖十一、對照組和實驗組（經尼古丁處理）加入警示物質後在下半水域的所待總時間（十分鐘）。本結果是 n=15 實驗分析而得，並以平均值±標準差的方式呈現。對與實驗組之數據以 ttest 統計方法分析後呈現顯著差異(p<0.001)。

可以從圖十一中發現尼古丁處理過後的斑馬魚，在加入警示物質後平均在下半部水域所花時間相較於對照組在下半部水域所花時間變少。經過 t test 統計 (p<0.001) 證明此實驗結果差異顯著。所以我們可以從中得知，尼古丁能降低斑馬魚受到警示物質後的焦慮行為，在加入警示物質後，尼古丁在下半部水域時間升高，表示依舊會受到警示物質影響，不過焦慮行為已被大幅降低。可得知，尼古丁在斑馬魚受到恐懼時仍然能降低焦慮行為。

三、尼古丁對斑馬魚看到鏡中反射時攻擊性的影響

斑馬魚先天擁有能夠表現攻擊性行為和建立領域的特性，在看到敵人或侵略其領域的入侵者時斑馬魚會以追逐入侵者及作出咬的動作來表示攻擊 (Larson, 2006) 在此實驗中我們用鏡子製造出斑馬魚看到外來者的假象，並透過觀察對照組和實驗組（經尼古丁處理）斑馬魚做出咬的動作的頻率和在臨近鏡子區域所待時間，來測驗尼古丁對斑馬魚攻擊性行為的影響。

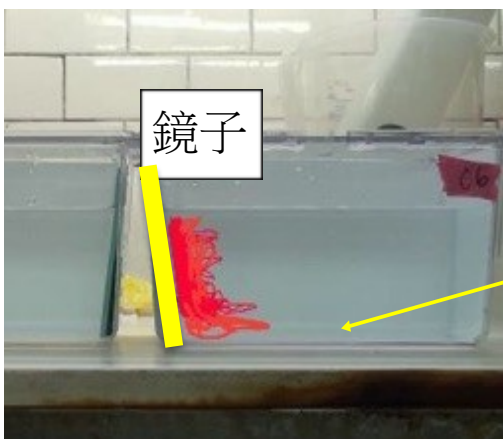


尼古丁處理後，斑馬魚在看到鏡中的入侵者時，靠近入侵者的時間變少，也就是待在臨近鏡子區域的時間，可得**尼古丁可降低攻擊性行**

圖十二、對照組和實驗組（經尼古丁處理）在鏡中看到外來者作出咬的動作之頻率（十分鐘內）。本結果是 n=15 實驗分析而得，並以平均值±標準差的方式呈現。對照組與實驗組之數據以 t test 統計方法分析後呈現顯著差異(p<0.001)。

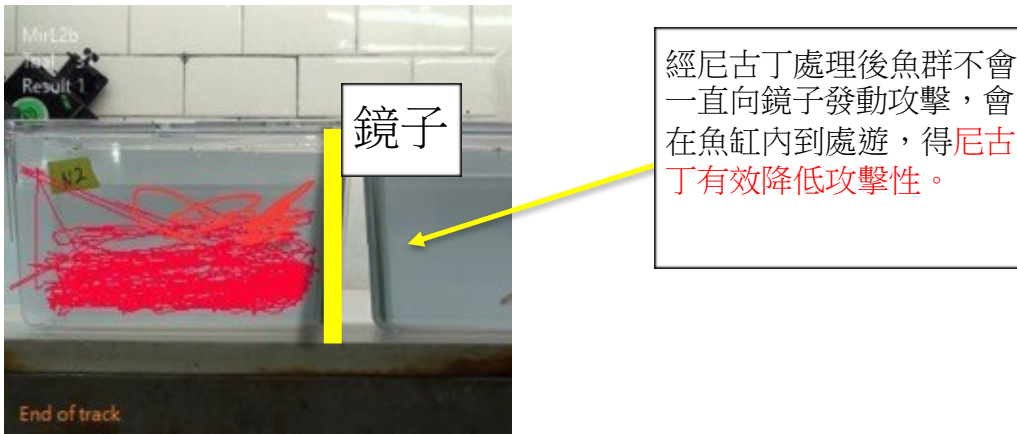
在圖十二中可看到經尼古丁處理過後的斑馬魚，在看到鏡中的外來者時對鏡子試圖做出咬的動作的頻率，相較於對照組做出此動作的次數明顯的下降。經過 t-test 統計（p<0.001）證明此實驗結果差異顯著。所以可得知，尼古丁能有效降低當斑馬魚在遇到外來者入侵自己領域時所表現之攻擊性行為。

Control

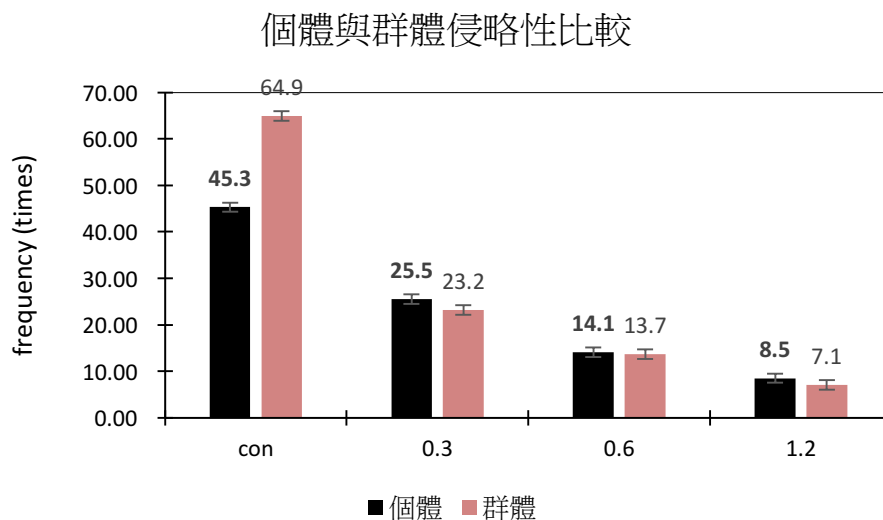


未加尼古丁的魚，不斷地往鏡子中的入侵者發動攻擊。

Nicotine



圖十三、【情境一】對照組和經尼古丁處理組在鏡中看到入侵者發動攻擊行為之游動路徑圖。用行為分析軟體的追蹤功能，可追蹤對照組和實驗組（經尼古丁處理）斑馬魚的游動路徑並從圖十三中明顯看出對照組的游動路線都在臨近鏡子區域，相對的在尼古丁處理後的斑馬魚游動路線明顯的比較分散在水缸各處，由此可得加入尼古丁能使斑馬魚的攻擊性下降。

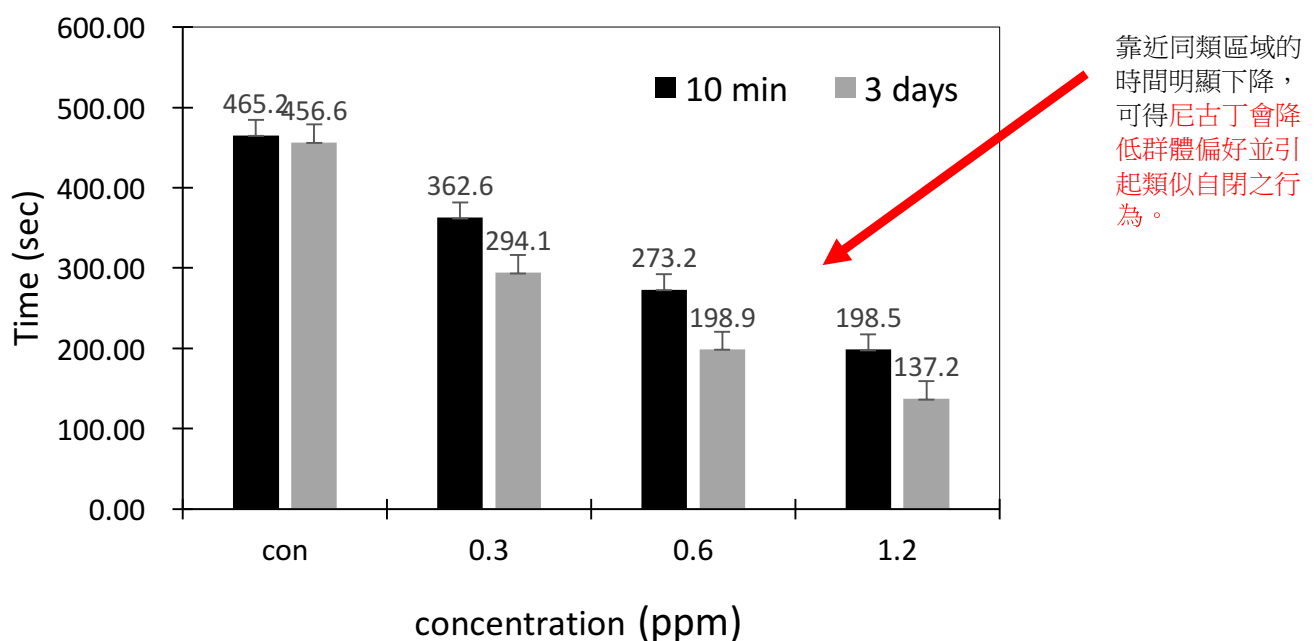


圖十四、個體與群體在警示物質實驗中的比較

我們也增加個體數，想測試群體在加入尼古丁後看到鏡中反射的反應是否有改變，根據圖十四發現在對照組，群體撞擊鏡子的次數明顯增加，表示在未加尼古丁的情況下群體再一起時會更想去攻擊鏡中入侵者。但是加入尼古丁後，發現群體的攻擊型下降並和個體的結果無顯著差異。

四、尼古丁對斑馬魚群體偏好特性之影響

斑馬魚天生就有偏向群體群游的特性 (Savernio & Gerlai, 2008)，我們想觀察加入尼古丁後的魚是否也有這種行為。我們參考群體偏好行為，自行設計五格水缸，用透明隔板把水缸隔成五格，最右側或左側是用來放同類魚群，中間放入被測驗的魚。當限制中間魚的隔板移開後，魚能選擇在 Proximal：靠近同類區域、Neutral：中間區域、Distal：遠離同類區域三個區域游動，觀察魚會往有同類的方向游或是另一個沒有同類存在的方向。

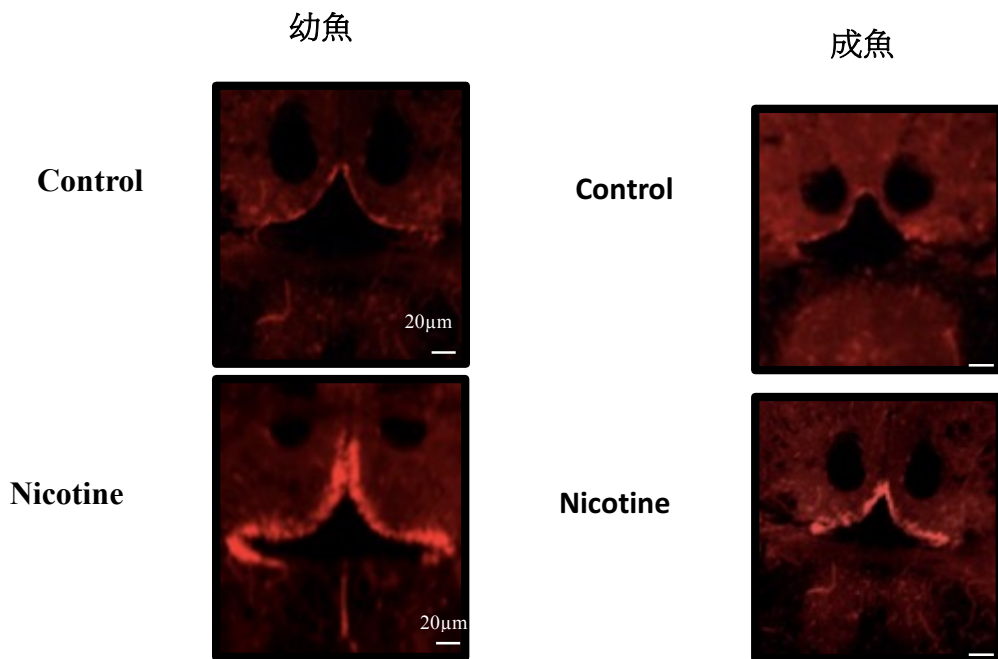


圖十五、對照組（左）和實驗組（經尼古丁處理）在 Proximal：靠近同類區域所待總時間。本結果 n=17 實驗分析而得，並以平均值±標準差的方式呈現。對照組與實驗組之數據以 t test 統計方法分析後呈現顯著差異(p<0.001)。

在圖十五中發現尼古丁處理過後的斑馬魚，在與同類相近區域的時間相較於對照組在與同類相近區域中所花時間明顯下降。經過 t test 統計 (p<0.001) 證明此實驗結果差異顯著。可從中得知，尼古丁能夠降低斑馬魚選擇游至靠近同類區域的機會，得知尼古丁將低斑馬魚本身的群體偏好特性，提升類似自閉行為的表現。

五、以 p-ERK 標記被尼古丁活化之 GC 腦區

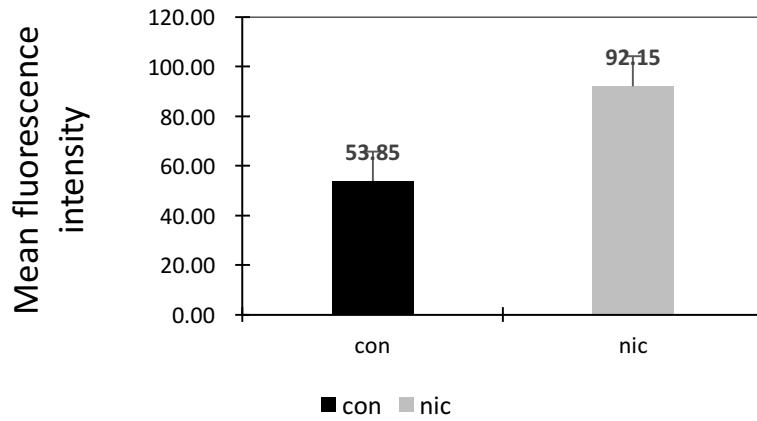
有文獻指出可用 p-ERK 偵測受刺激後活化的神經 (Owen, 2015)，因為 ERK 為激酶，nAChRs 對於 ERK/MAPK 會產生傳訊級聯反應所以 p-ERK 的表現區域代表活化之神經，所以我們利用經尼古丁處理與未經尼古丁處理的斑馬魚腦部切片進行 p-ERK 的染色，確認尼古丁活化之腦區。本研究對幼魚及成年於進行中樞神經切片，想要觀察加入尼古丁後對大腦的影響，以斑馬魚為動物模型藉此模擬尼古丁對青少年及成年人中樞神經的影響。



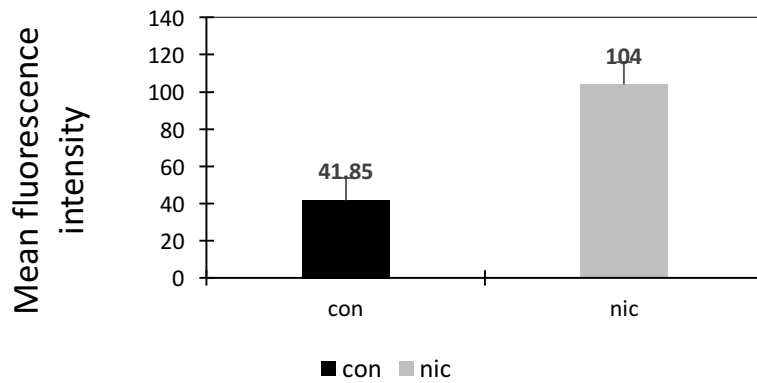
圖十六、在尼古丁處理後 幼魚GC 腦區可觀察到 p-ERK 表現量上升(Up-regulation)。本項染色實驗共在 8 對斑馬魚的腦部切片執行，圖中取其中 1 次染色結果做為代表。

我們將切片結果用image-J 定量，便挑選一次染色結果為代表放在說明書上。在成魚中，經尼古丁處理，在 GC 腦區的Rhodamine 螢光增強，表示 p-ERK 表現量上升。對照組在 GC 腦區的 Rhodamine 螢光訊號微弱，表示 p-ERK 表現量小。幼魚經尼古丁處理，在 GC 腦區的Rhodamine 螢光增強比成魚中強。

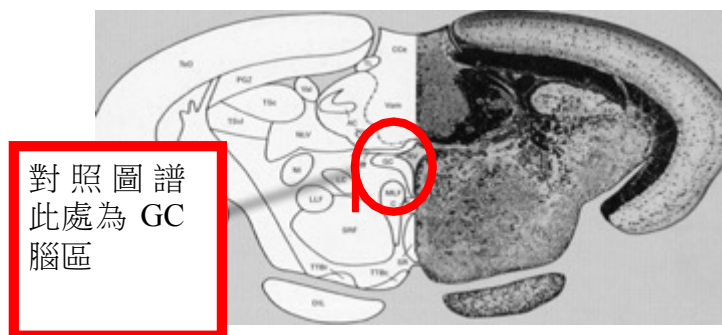
染色結果顯示加入尼古丁後，幼魚與成年斑馬魚的GC腦區有活化的現象，但是在幼魚中的反應比較顯著，螢光更明顯，我們猜測結果是因為在幼魚的腦還未完全發展的情況下，幼魚會對尼古丁這種能直接影響中樞神經的藥物有較劇烈的反應。結果可與人類青少年做連結，表示在青少年中尼古丁有較強影響。



幼魚螢光染色量化



圖十七、將幼成魚 p-ERK 染色結果定量圖，測量螢光強度 (n=8,p<0.001)



section 204

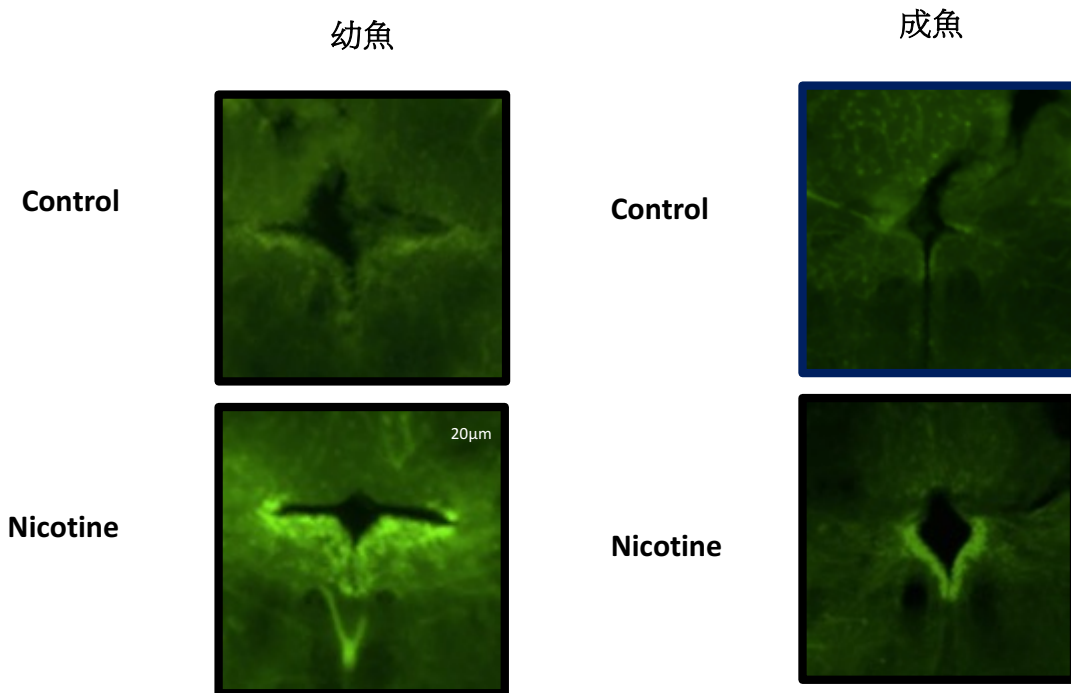
圖十八、在圖譜中找到 Section 204 的斑馬魚腦切片中 GC 對應位置 (摘自 Rupp, 1995)

圖十六是以 p-ERK 抗體進行腦部切片螢光得結果，發現在處理尼古丁與未經尼古

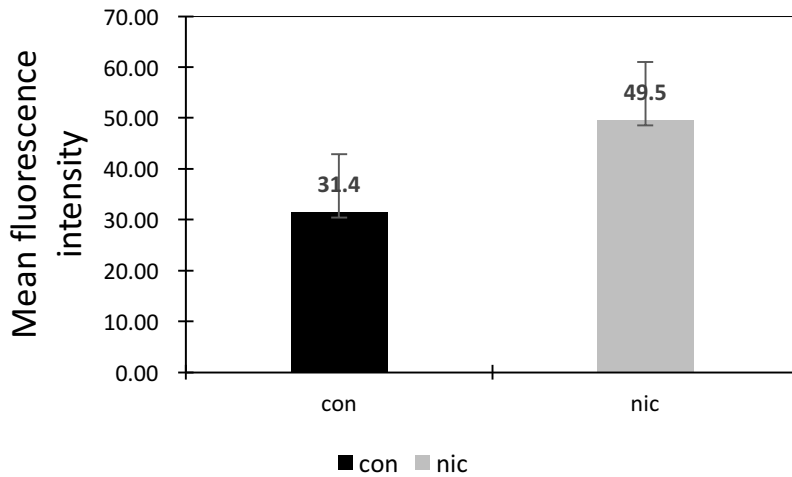
丁處理之斑馬魚腦部切片中 p-ERK 不同的表現量，將此結果對應到圖十八可知道是在斑馬魚Griseum Centrale (GC)腦區。在尼古丁處理後，有 p-ERK 上升。由此可見攝入尼古丁會在 GC 腦區產生 p-ERK 的正調控，且使用 p-ERK 當生物標誌物能有效地標記活化之神經。為了使結果更準確，我們將螢光強度定量，也看到螢光強度明顯增強，p-ERK 表現增強。根據圖十六及十七，可從初步結果看到幼魚的ERK 表現量大於成魚，表示幼魚對尼古丁會有更劇烈的反應，原因可能是幼魚大腦尚未發展完成。

六、以 c-FOS 標記被尼古丁活化之 GC 腦區

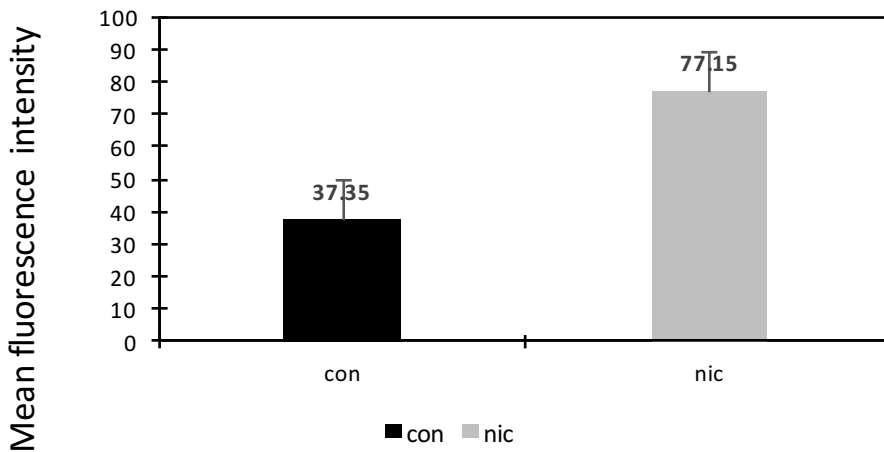
p-ERK 是能活化下游 c-FOS 表現量的傳遞分子激素，而 c-FOS 為可開啟後續下游基因的轉錄因子 (Monje et al., 2005); 這些基因表現的改變可能會影響斑馬魚後續的行為，因此我們要藉由斑馬魚的腦部切片並用 c-FOS 抗體做染色來了解其表現區域得知活化腦區。本染色實驗也使用幼魚與成魚。



圖十九、在尼古丁處理後 GC 腦區可觀察到 c-FOS 表現量上升(Up-regulation)。本項染色實驗共在 8 對斑馬魚的腦部切片執行，圖中取其中 1 次染色結果做為代表。



幼魚螢光染色量化

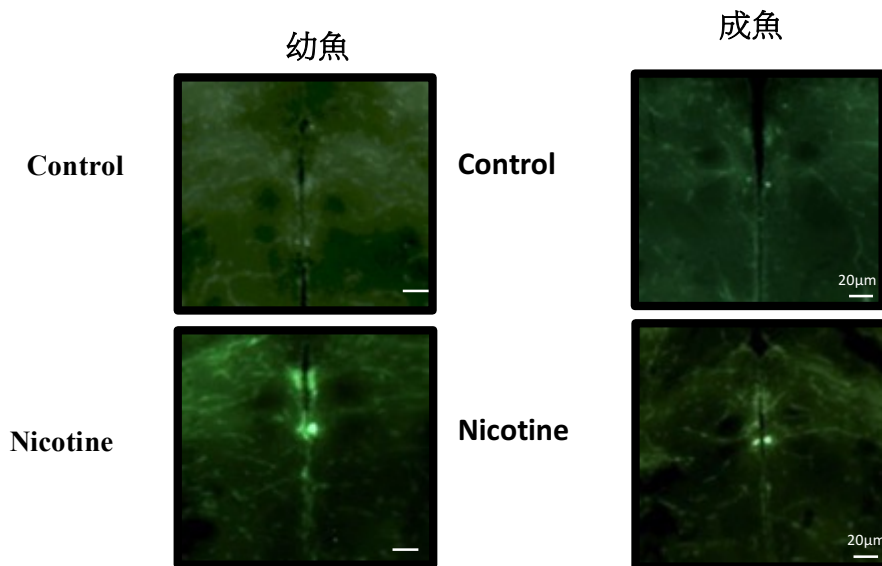


圖二十、將幼成魚染色結果定量圖，測量螢光強度 (n=8, p<0.001)

圖十九是以 c-FOS 抗體進行腦部切片螢光得結果，發現在處理尼古丁與未經尼古丁處理之斑馬魚腦部切片中 c-FOS 表現量的不同。我們將螢光強度定量，也從圖十九中發現經尼古丁處理後，螢光強度明顯增強，c-FOS 表現增強。由此可見攝入尼古丁會在 GC 腦區產生 c-FOS 的正調控，且使用 c-FOS 當生物標誌物能有效地標記活化之神經區域及表現量。又因 p-ERK 是活化 c-FOS 表現的傳遞分子 (transducer)，在經尼古丁處理後的 GC 腦區會被活化，我們可知是透過 p-ERK—c-FOS 訊息傳遞路徑影響下游基因的表現。比較兩張圖幼魚與成魚的結果發現，在幼魚中的螢光強度較大，表示年幼斑馬魚對尼古丁有較大的反應，腦區活化更顯著。

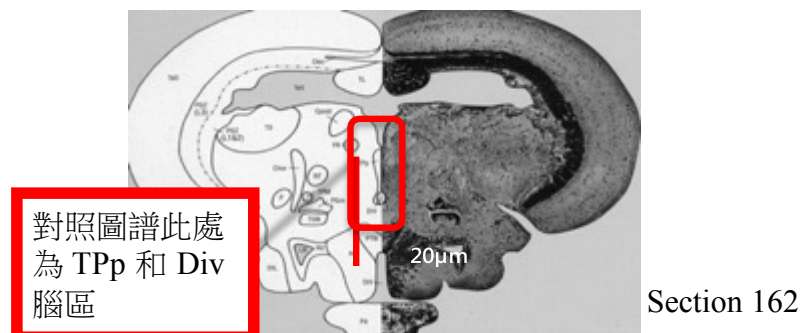
七、Tyrosine hydrolase 的表現量與對應位置：

TH 酵素是製造多巴胺重要的分子之一，而在尼古丁刺激後，多巴胺也會隨之增加表現，我們利用斑馬魚的腦部切片了解尼古丁刺激 TH 的表現量及區域，並可推得多巴胺表現量上升的腦區。因為多巴胺為興奮性的神經傳導物質，所以我們用 TH 來觀察多巴胺可能表現之區域和表現量。本染色實驗也使用幼魚與成魚。

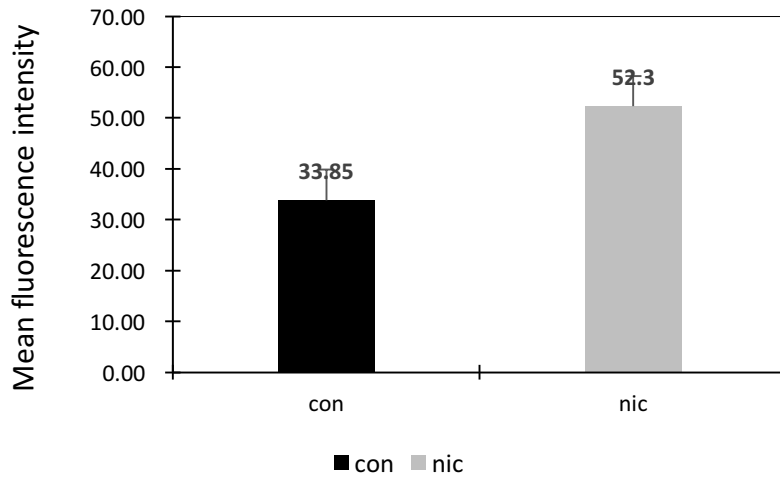


圖二十一、在尼古丁處理後在 TPp 和 Div 腦區可觀察到 TH 表現量上升(Up-regulation)。本項染色實驗共在 8 對斑馬魚的腦部切片執行，圖中取其中 1 次染色結果做為代表。

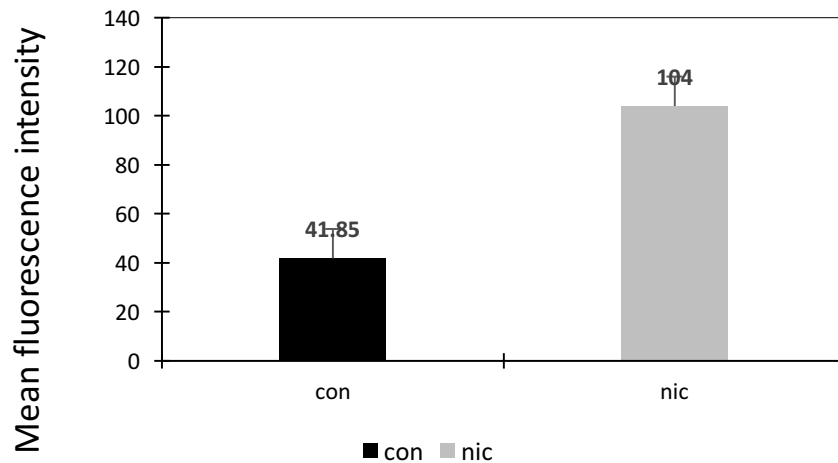
成魚中，對照組在 TPp 和 Div 腦區的 GFP 螢光訊號微弱，表示 TH 表現量小，尼古丁處理在 TPp 和 Div 腦區的螢光訊號增強，TH 表現量上升，在幼魚中，螢光強度更明顯。



圖二十二、在圖譜中找到 Section 162 的斑馬魚腦切片中 TPp 和 Div 對應位置（摘自 Rupp, 1995）



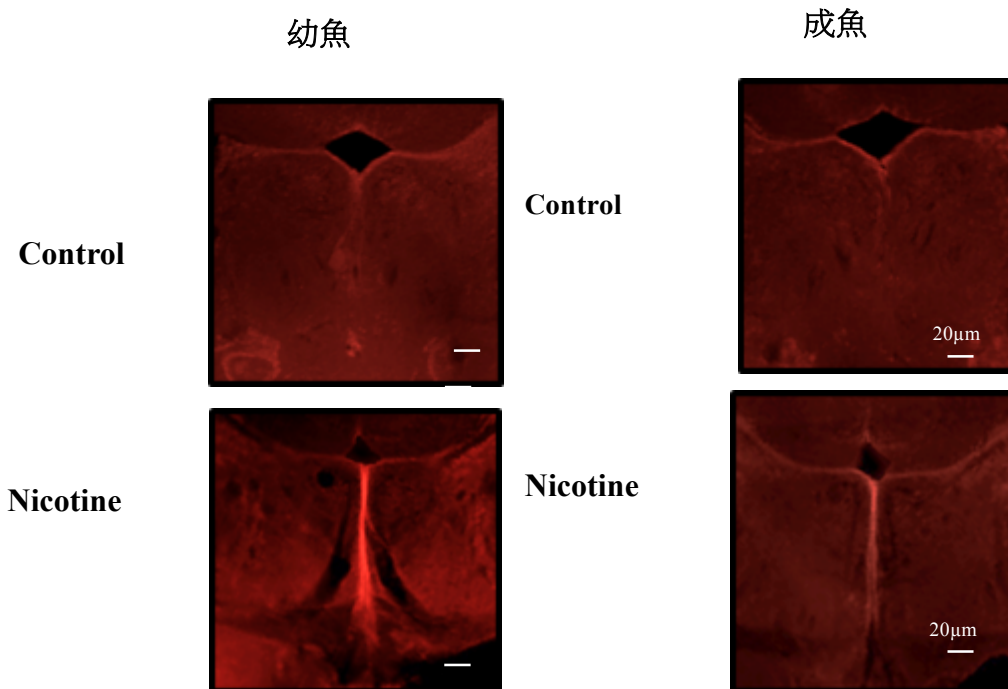
幼魚螢光染色量化



圖二十三、將幼成魚染色結果定量圖，測量螢光強度 (n=8,p<0.001)

圖二十一及二十二是以 TH 抗體進行腦部切片螢光得結果，可發現在經尼古丁處理與未經尼古丁處理之斑馬魚腦部切片中 TH 表現量的明顯訊號差異，將此結果對應到圖二十可觀察到此腦區是斑馬魚 TPp 腦區 (periventricular nucleus of the posterior tuberculum)和在下面的 Div 腦區(diencephalic ventricle)。在尼古丁處理後，有顯著的 TH 上升現象，螢光強度增強，而對照組沒有。由此可見攝入尼古丁會在 TPp 和 Div 腦區產生 TH 的正調控，且使用 TH 當生物標誌物能有效地標記多巴胺表現區域及表現量。比較幼魚與成魚的結果，發現幼魚的TPp 和Div 腦區螢光強度較大，表示幼魚對尼古丁有較大影響，可能原因為中樞神經發展未成熟。

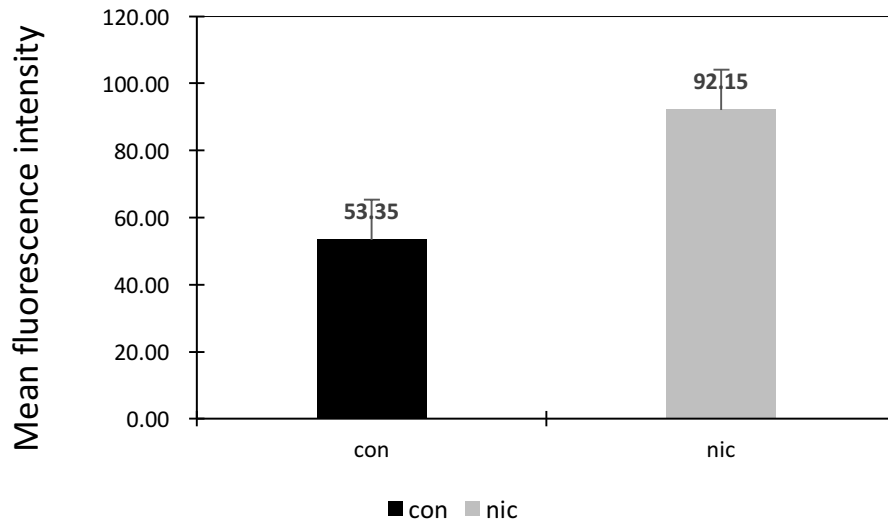
八、GABA 的表現量與對應位置



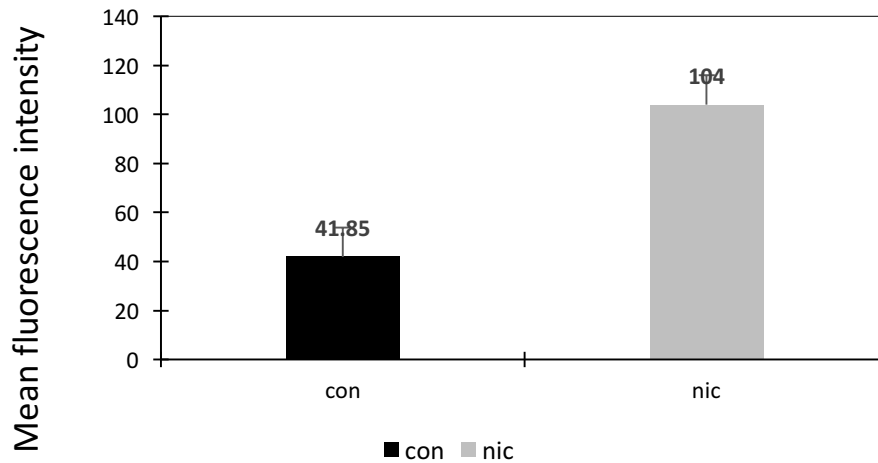
圖二十四、在尼古丁處理後，負責分泌 GABA 的神經元在 VAS 腦區大量表現 GABA 分子。本項染色實驗共在 5 對斑馬魚的腦部切片執行，圖中取其中 1 次染色結果做為代表。



圖二十五、在圖譜中找到 Section 173 的斑馬魚腦切片中 Vas 對應位置（摘自 Rupp, 1995）



幼魚螢光染色量化

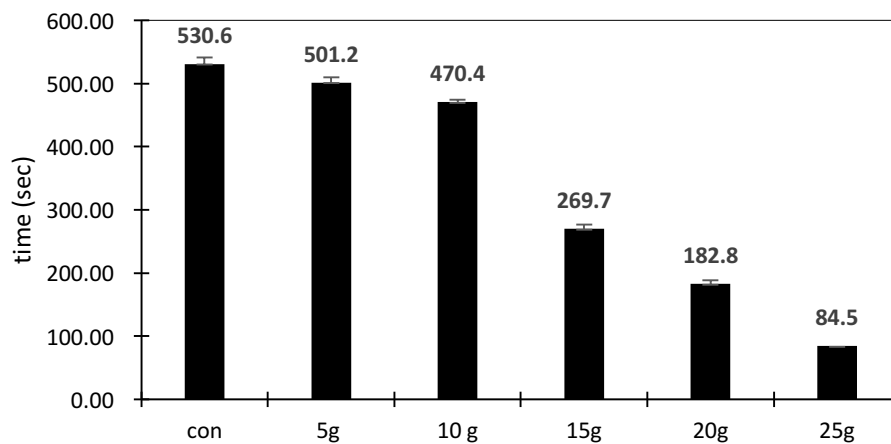


圖二十六、將幼成魚染色結果定量圖，測量螢光強度 (n=8,p<0.001)

從圖二十四中可看到經尼古丁處理過後的斑馬魚，Rhodamine 螢光訊號增強，表示GABA被刺激且表現量上升，對回圖二十五可找出負責分泌 GABA會在 Vascular lacuna of area postrema (VAS) 腦區表現，並在那腦區刺激 GABA 分子。相較於對照組，可明顯看出對照組在 GABA 神經元的訊號和刺激的分子表現較弱，可推測尼古丁會在 Vas 腦區刺激 GABA 神經元，螢光強度也更強。成魚中對照組在VAS腦區的Rhodamine 螢光微弱，表示GABA 表現量很小，尼古丁處理腦區的螢光訊號增強，GABA 表現量上升，幼魚結果更明顯。比較幼魚與成魚，發現幼魚Vas 腦區螢光強度較小，可能因為又於大腦發展未成熟。

九、測驗實際尼古丁溶出量潛水測驗結果

實際尼古丁溶出量



圖二十七、煙蒂克數與成魚停留在下半部水域時間

將煙蒂裝進濾網放入水缸中二十分鐘後的潛水實驗結果，根據圖表顯示，在加入5g 煙蒂的時候沒有太大影響，10g 有稍微降低在下半部水域所待時間，不過差異不顯著，但是到了15g 時，有明顯的降低焦慮效果，到了20g與 25g 煙蒂，下半部水域時間大幅下降，表示從15g 後的煙蒂濃度就能大幅改變斑馬魚的行為表現。

伍、討論

一、將加入尼古丁後影響之腦區位置對應回人類腦區

(一)、GC 腦區

用 p-ERK 和 c-FOS 定位最顯著神經活化區域，得知攝入尼古丁後 GC 腦區會有異常活化的表現。根據文獻得知斑馬魚的 GC 腦區對應到了大鼠中 Periaqueductal Gray (PAG) 腦區，而此 PAG 腦區與焦慮行為、疼痛控制相關 (Watson, 2016); 而這跟此研究的行為實驗結果相符，推測尼古丁與中樞神經接受器結合後會影響 GC 的活化，而此腦區的活化與行為實驗的結果有相關性，可能造成了降低焦慮和攻擊性的影響。

(二)、TPp 和 Div 腦區

用 TH 來觀察多巴胺可能表現之區域和表現量，得知攝入尼古丁後會在斑馬魚 TPp 和 Div 腦區有顯著的 TH 表現上升。由此可推測在尼古丁活化 p-ERK 和 c-FOS 兩分子後，神經細胞會將這個活化訊號經過訊息傳遞訊號傳到 TPp 和 Div 這兩個區域，促進生成多巴胺。在先前的文獻中，可對應出斑馬魚的 TPp 和 Div 腦與大鼠的腦區位置相似 (Parker, 2013); 可得這些腦區在哺乳類中也會被尼古丁活化。我們將螢光強度定量，也從圖十六中發現經尼古丁處理後，螢光強度明顯增強，TH 表現增強。這些腦區在解剖學與功能上有高度的相似，表示在哺乳類和魚類中尼古丁的影響類似，都會影響 TPp 和 Div 腦區並刺激 TH 也就是多巴胺的製造。而文獻中得出，TPp 和 Div 與哺乳類中的 Ventral tegmental area (VTA) 相似，VTA 在哺乳類中與獎勵回饋、認知有關。帕金森疾病也是當此腦區缺少 Dopamine，從中得知尼古丁可作為治療帕金森疾病的藥物，也解釋尼古丁和獎勵回饋有關的機制 (Beier, 2019)。從中推測尼古丁是經由改變 VTA 腦區的活化，改變認知、獎勵回饋系統，導致行為表現的改變。

(三)、VAS 腦區

在本研究中，觀察到在 VAS 腦區會有 GABA 表現量上升。在文獻中有指出 GABA 和 VAS 腦區確實有相關 (Song et al., 2017); 這與我們的實驗結果相似，便更能確認尼古

丁能影響 VAS 腦區和促進 GABA 表現量。根據文獻在大鼠中，GABA 可調控尼古丁相關的焦慮行為 (Varani, 2012); 此文獻與本實驗中一發現尼古丁能降低斑馬魚焦慮行為的結果相符，

可得造成焦慮行為下降與 GABA 表現量上升有相關性。又因，GABA 是抑制性神經傳導物質，可推測 GABA 可能抑制了焦慮相關行為。此腦區對應到哺乳類中的 Area Postrema，此腦區與當訊息進入中樞神經後的整合有關，表示尼古丁會影響人類對傳至中樞神經訊號整合的能力，也可從我們的行為實驗中得知，斑馬魚表現出了異常之行為 (Price, 2007)。

二、建立斑馬魚模式來檢測環境尼古丁對生物中樞神下游行為之影響

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，受污染環境尼古丁濃度造成 GC 腦區異常活化、在 TPp 和 Div 腦區有多巴安異常生成、在 VAS 腦區有 GABA 表現上升。此新發展出高效率且低成本的斑馬魚模式平台，避免使用人類或是小鼠做相關研究，能檢測環境尼古丁污染對脊椎動物中樞神經與行為之影響，未來將可提供尼古丁在環境毒性與健康風險評估之參考。

三、尼古丁對不同年齡層人類之影響

模擬實際尼古丁濃度後，發現環境濃度中微小的尼古丁含量的尼古丁含量就能對斑馬魚的行為以及中樞神經系統造成影響，又因為我們新增了幼魚與成年魚，發現在幼魚中反應較強，表示尼古丁對於青少年大腦未完全發育的情況下需要更注意。

四、環境尼古丁濃度影響

根據發表於2017年11月的室內空氣 (Indoor Air)》，尼古丁可以通過皮膚攝入人體，皮膚與其接觸上幾小時後，對尼古丁的攝入量會與吸二手菸相當：這種香菸接觸方式是「二手煙」。我們的研究更加證實在環境中即使是微小濃度的尼古丁含量如0.3ppm：都能造成中樞神經活化的改變，進而引起多項行為變化，因為我們的實驗對象是斑馬魚，從中可以看出尼古丁對於人體中中樞神經改變的機制，也更加呼籲青少年煙品防治的重要性。

陸、應用

本研究建立了一套快速、高效並低成本的斑馬魚動物模式平台，確認尼古丁所引起之腦區活化、分子表現及動物行為的改變。未來可利用此研究平台進行尼古丁對環境影響的評估，藉由測驗某水域魚類是否也產生與本研究所發現尼古丁會改變的行為，如減少焦慮、減少攻擊性、降低群體偏好等，判斷此水域是否有受尼古丁污染的可能。透過模擬人類中的精神疾病行為，找出人類在這些情況中可能的表現，觀察加入尼古丁後對其行為及中樞神經的表現，結果可應用於研究抗憂鬱之藥物。本研究所建立的試驗平台，亦可應用於篩選戒除煙癮的藥物，若某藥物可降低尼古丁對斑馬魚行為的影響，則該藥物有應用於戒除煙癮的潛力，可望加速相關醫藥領域的發展。研究結果顯示此新發展出的斑馬魚行為模式平台，能從結果推得尼古丁對人類行為的改變以及中樞神經的機制；也能用於檢測環境尼古丁污染對脊椎動物中樞神經與行為之影響。未來可應用於「針對不同種類的环境污染物，開發不同斑馬魚模式平台」，將極具創新性與前瞻性。除了生物學的探討外，未來可將延伸至分子醫學，以此動物模式探究尼古丁影響的結果探究是否有可逆性，可加強尼古丁成癮的防治，篩選藥物治療受損的組織器官等，以上可進一步分析探討。

柒、參考文獻

- 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
- Beier, K., Steinberg, E., DeLoach, K., Xie, S., Miyamichi, K., Schwarz, L., Gao, X., Kremer, E., Malenka, R. and Luo, L. (2019). *Circuit Architecture of VTA Dopamine Neurons Revealed by Systematic Input- Output Mapping*.
- Benowitz, N. L. (2009). Pharmacology of Nicotine: Addiction, Smoking-Induced Disease, and Therapeutics. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 49(1), 57-71.
doi:10.1146/annurev.pharmtox.48.113006.094742
- Chaturvedi, P., Mishra, A., Datta, S., Sinukumar, S., Joshi, P., & Garg, A. (2015). Harmful effects of nicotine. *Indian Journal of Medical and Paediatric Oncology*, 36(1), 24. doi:10.4103/0971-5851.151771
- Chowdhury, P. (2006). Nicotine as a mitogenic stimulus for pancreatic acinar cell Proliferation. *World Journal of Gastroenterology*, 12(46), 7428. doi:10.3748/wjg.v12.i46.7428
- Dani, J. A. (2003). Roles of dopamine signaling in nicotine addiction. *Molecular Psychiatry*, 8(3), 255-256. doi:10.1038/sj.mp.4001284
- Labarca, C., Schwarz, J., Deshpande, P., Schwarz, S., Nowak, M. W., Fonck, C., Lester, H. A. (2001). Point mutant mice with hypersensitive 4 nicotinic receptors show dopaminergic deficits and increased anxiety. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(5), 2786-2791.
doi:10.1073/pnas.041582598
- Larson, E. T., O' Malley, D. M., & Melloni, R. H. (2006). Aggression and vasotocin are associated with dominant – subordinate
- Monje, P., Hernández-Losa, J., Lyons, R. J., Castellone, M. D., & Gutkind, J. S. (2005). Regulation of the Transcriptional Activity of c-Fos by ERK. *Journal of Biological Chemistry*, 280(42), 35081-35084.
doi:10.1074/jbc.c500353200
- Parker, M. O., Brock, A. J., Walton, R. T., & Brennan, C. H. (2013). The role of zebrafish (*Danio rerio*) in dissecting the genetics and neural circuits of executive function. *Frontiers in Neural Circuits*, 7. doi:10.3389/fncir.2013.0006

