國立臺灣師範大學生命科學系

碩士論文

系統農藥芬普尼對斑馬魚神經系統的影響

Effects of the system pesticide of fipronil on neural system of the zebrafish

研究生：徐代軒

Hsu, Tai-Hsuan

指導教授：吳忠信 博士

Wu, Chung-Hsin, Ph.D.

中華民國 109 年 10 月

論文目錄

論文目錄	2
附圖清單	3
誌謝	4
中文摘要	6
ABSTRACT	7
第一章 緒言	8
第二章 研究目的	20
第三章 材料方法	22
第四章 實驗結果	28
第五章 討論	35
第六章 結論	40
參考文獻	42
附錄	51

附圖清單

表 1	實驗使用抗體	53
圖 1	斑馬魚成魚浸泡在含有芬普尼水域環境的存活率變化	54
圖 2	斑馬魚成魚浸泡在不同濃度芬普尼水域環境的運動改變	56
圖 3	斑馬魚胚胎浸泡在含有芬普尼水域環境的側線毛細胞變化	58
圖 4	斑馬魚成魚浸泡在含有芬普尼水域環境後腦組織的氧化壓力表現	60
圖 5	斑馬魚成魚浸泡在含有芬普尼水域環境後腦組織的發炎作用表現	62
圖 6	斑馬魚成魚浸泡在含有芬普尼水域環境後腦組織的細胞凋亡表現	64
圖 7	斑馬魚成魚浸泡在含有二甲基亞碸(DMSO)水域環境不改變運動表現	66
圖 8	系統農藥芬普尼誘發斑馬魚腦組織損傷的可能分子機制	68

誌 謝

本論文得以順利完成，承蒙諸位師友的協助與鼓勵。首先就是在論文的進行過程中最辛苦的指導教授，恩師 吳忠信老師。讓我在學術知識以及個人發展都獲得許多充實與成長，若是沒有您對論文苦心的指導、在觀念上的充實、待人處世的教誨，將不會有這一篇論文的產生。高山仰止，謹此獻上無盡、由衷的敬意。期間也承蒙口試委員林豊益老師、陳麗文老師百忙之中撥空審閱此論文，並於口試時提供許多寶貴的意見，使得本論文得以更加完整，在此致上最深的謝意。以及鄭劍廷院長適時給予的提點與指導，令我裨益良多。

隨著論文的完成，也為六載多師大生涯暫時劃下句點，這一路上峰迴路轉，屢屢強渡關山。感謝很多人的幫助及鼓勵，感謝家人全力支持我所做的決定與鼓勵，並在我面臨重大抉擇時伸出援手，更要感謝父母為我所做的犧牲與苦心栽培，讓我無後顧之憂的完成學業，希望我的努力及成長能讓你們感到欣慰及驕傲。

人恆過，然後能改；困於心，衡於慮，而後作；徵於色，發於聲，而後喻。《孟子·告子下》。我實乃魯鈍之人，懶散犯錯拖延之處無可勝數，也曾重蹈覆轍。皆要感謝 D315A 實驗室成員一路的的耐心關懷、指導與幫助，尤其是睿芝姊與珍妏學姊，您們的支援與關照是我能夠導向正軌的重要助力，更讓我有在錯誤中成長與自我修復的空間。兩年讓您們平添許多困擾與白髮，真是愧不敢當。也必須對我的實驗體們致上深沉的謝意，不管是細胞、小鼠，蝙蝠還是斑馬魚。

謝謝長久以來的十方大德、好朋友們，為我加油打氣，在最低落的時期給予無限的支持與鼓勵；在不同地方卻在相同時期連袂畢業的正軒，笑點和譯云；從八九年前讀同本課本開始，一路走上截然不同的生涯，直到披上各自相異的學院領巾，追逐你們的步伐一直是我的動力。還有無可取代的同儕---曾經歷過同樣磨練薰陶的妤涵、威龍、欣漢。一直以來互相支持、用信念及勇氣度過的歲月，是我永恆的珍寶。另外特別感謝與我的師大生涯高度重合的張馨學姊，我會永遠永遠懷念您的言行舉止、一舉一動。

青青子衿，悠悠我心，珍貴的還有那無數夜晚的心靈談話，對出現在我旅途的所有過客們懷抱感謝之情。每位都給了我一點、也削去了我一點，一切緣分在在使我成為現在的樣子。此去經年，仰望星空，心之所向，無問西東，與諸君共勉。

辭窮理微，未敢稱凌雲之作。殺青之時，僅將這份完成碩士學業的喜悅獻給所有關心、愛護、協助及鼓勵我的你們，謝謝總是包容我的一切，給我的支持與鼓勵，感謝你們；這感恩之心如滔滔江水連綿不絕，一發不可收拾，謝天謝地!

中文摘要

芬普尼 (fipronil) 是一種苯基吡唑類殺蟲劑，可選擇性抑制昆蟲中的γ-氨基丁酸（GABA）受體。儘管芬普尼已成為在水生環境中使用最廣泛的藥物，但很少有研究評估芬普尼的神經毒性對於水生脊椎動物的感覺和運動系統的影響。在本碩士論文的研究中，我們選擇斑馬魚（*Danio rerio*）實驗動物來探討芬普尼對感覺與運動系統的神經毒理作用。我們評估了急性芬普尼暴露對斑馬魚存活率，側線毛細胞數量以及神經毒性的影響，此外，我們比較了正常與芬普尼處理下斑馬魚的游泳軌跡熱圖、速度和距離的差異。我們的實驗結果發現成年斑馬魚暴露在 0.5、1.0 和 2.0 ppm 芬普尼的水中環境 24 小時，與正常處理斑馬魚比較，存活率隨著芬普尼濃度顯著遞減。而斑馬魚胚胎暴露在 0.1、0.5 和 1.0 ppm 芬普尼的水中環境 24 小時，與正常處理斑馬魚比較，側線毛細胞數量也是隨著芬普尼濃度顯著遞減。透過組織病理學和西方墨點法研究發現，成年斑馬魚暴露於 1.0 ppm 芬普尼的水中環境 24 小時，大腦組織的氧化壓力、發炎與細胞凋亡，與正常處理斑馬魚比較，則是顯著增加。通過影像追蹤觀察，成年斑馬魚暴露在 0.1 和 0.5 ppm 芬普尼的水中環境 24 小時，游泳軌跡的速度和距離隨著芬普尼濃度顯著遞減，儘管芬普尼的神經毒性主要針對無脊椎動物昆蟲的 GABA 受體而開發，但我們的研究結果發現，芬普尼不但會減低斑馬魚的存活率，還會透過損傷側線的毛細胞數量以及產生氧化壓力、發炎與細胞凋亡來損傷大腦組織來影響斑馬魚的感覺和運動系統。這結果推論系統農藥芬普尼誘導的神經毒性會損傷水生脊椎動物的感覺與運動系統。

關鍵字：系統農藥、芬普尼、毛細胞、側線、運動行為、氧化壓力、發炎、細胞凋亡、斑馬魚

Abstract

Fipronil is a phenylpyrazole insecticide that may selectively inhibit gamma-aminobutyric acid (GABA) receptors in the insect. Although fipronil have become the most widely used in aquatic environments, few studies have evaluated neurotoxicity of fipronil in sensory and motor systems of the aquatic vertebrates. In the research of this master thesis, the zebrafish (Danio rerio) experimental model system was selected to explored the neurotoxicological effects of fipronil in sensory and motor systems. We assessed effects of acute fipronil exposure in the survival rate, the number of hair cell of lateral lines, and the brain neurotoxicity in the zebrafish, In addition, heat maps, speed, and distance of swimming trajectory were compared between the zebrafish with sham and fipronil treatments. Our results showed the survival rates of the adult zebrafish exposed to fipronil at 0.5, 1.0 and 2.0 ppm were significantly decreased from 24 hours of exposure. The number of hair cell of lateral lines of the zebrafish embryos exposed to fipronil at 0.1, 0.5 and 1.0 ppm were significantly decreased. As the fipronil concentration increased, the degree of reduction was enhanced in both of the survival rate of the adult zebrafish and the number of hair cell of the zebrafish embryos. Through histopathological and western blots observations, significant oxidative stress, inflammation, and apoptosis were observed in the brain of the adult zebrafish exposed to fipronil at 1.0 ppm. Through video tracking observations, the speed, and distance of swimming trajectory in the adult zebrafish exposed to fipronil at 0.1, and 0.5 ppm were significantly decreased from 24 hours of exposure. Although fipronil neurotoxicity specifically developed to target insect GABA receptors with low vertebrate toxicity, our results suggest that fipronil impairs sensory and motor systems in zebrafish by reducing the number of hair cell of lateral lines, and damaging neurons in the brain tissue via oxidative stress, inflammation, and apoptosis. Therefore, neurotoxicity of fipronil can reduce survival rate and movement in the zebrafish. The results also imply that fipronil-induced neurotoxicity could damage sensory and motor systems in the aquatic vertebrates.

Keywords: system pesticide, fipronil, hair cell, lateral line, motor behavior, oxidative stress, inflammation, apoptosis, zebrafish

第一章

緒言

1. 系統農藥芬普尼之文獻探討

芬普尼 (Fipronil，IRAC 2B)，化學式 C12H4C12F6N4OS。為一環境農藥，具接觸及胃毒性，中度系統性，為廣效性殺蟲劑，原型於 1996 年正式在美國核准上市，並廣泛利用於殺蟑、滅蟻及防治跳蚤、蟋蟀、蝗蟲、白蟻和啃食植物的寄生昆蟲。芬普尼的作用效果類似除蟲菊、有機磷或氨基甲酸鹽製之殺蟲劑 (Kidd 等人，1991; Bobe 等人，1997)。芬普尼主要作用機制為阻礙 γ-氨基丁酸調節 (γ-Aminobutyric acid，GABA)。實驗證實芬普尼可干擾 GABA 通道中的氯離子平衡 (Cole 等人，1993)。GABA 是種神經傳遞物質，為麩氨酸的衍生物，為氨基酸神經訊息傳遞家族之一。作用是與神經突觸前後特定的膜蛋白受體結合使離子通道開啟：帶負電的氯離子流入細胞，帶正電的鉀離子流出細胞，這個現象稱為過極化。過極化時，神經元的膜電位比靜止時有更大負值，距離產生動作電位的去極化閾值較遠，而使軸丘無法產生動作電位，神經元受到短暫抑制，此反應稱為抑制性突觸後電位（Inhibitory postsynaptic potential, IPSP）。GABA 可以透過此抑制性作用以調節下視丘-腦垂腺-腎上腺軸（Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis，HPA），抑制促腎上腺皮質激素釋放激素（corticotropin releasing hormone，CRH）的分泌、降低促腎上腺皮質激素（Adrenocorticotropic hormone，ACTH）的濃度，故 GABA 與個體免疫、抗應激能力、抗焦慮等皆有關聯 （Fritschy 等人，2014）。

當芬普尼作用時，會與 GABA 選擇性競爭膜蛋白上的受器結合位點，當芬普尼和神經上位於突觸後神經元細胞膜上配體閘控的離子通道(ligand-gated ion channels) GABA 受器 ($GABA_A$ Receptor)結合時，會阻斷氯離子通道流入，讓神經系統訊號傳遞發生紊亂，使得神經細胞膜電位無法達到 IPSP，而造成蟲體神經元過度興奮，進而導致個體死亡 (Gant 等人，1998; Kidd 等人，1991)。由於脊椎動物的 $GABA_A$ 受體與昆蟲不同，而且芬普尼對昆蟲特定 $GABA_A$ 受體之親和力優於對脊椎動物(Stehr 等人，2006)，因此早期研究認為芬普尼對哺乳動物的神經系統傷害輕微(Narahashi 等人，2007 及 2010)。

由於 $GABA_A$ 受體與甘氨酸 (Glycine) 受體在氨基酸序列和結構上有很高相似性，在離子調節上等生理功能也有類似的機轉（Chua 等人，2017）。除昆蟲外，芬普尼在動物中對於甘氨酸受體也具抑制效果，特別是在小型水生動物上（Monesson 等人，2018）。甘氨酸是另一種中樞神經系統的抑制性神經傳導物質，當由突觸後神經元囊泡釋放出來時，與專一性受體結合可促進細胞膜對氯離子通透性，類似 GABA 的生理作用（吳東川，2018)，並抑制細胞膜去極化作用，短暫維持一個相對略高的膜電位，稱為興奮性的突觸後電位 (Excitatory postsynaptic potential, EPSP)。

若甘氨酸受體被芬普尼抑制，會阻斷氯離子通道使得 EPSP 無法產生，結果在中樞神經中會干擾脊髓、腦幹的神經訊息傳遞，導致肌肉抽蓄痙攣、呼吸肌受損等（Monesson 等人，2018）。由上述文獻可知，芬普尼對於神經膜電位具廣

泛的影響，且更多研究顯示，芬普尼對神經元上離子通道之傷害對水生生物及脊椎動物皆有程度不同的影響，並藉由調控 GABA 離子通道的神經刺激，可以影響斑馬魚之視丘等中樞神經系統，進而影響生理表徵等（Kim 等人，2004; Monesson 等人，2018; Ramaswamy 等人，2020）。

2. 系統農藥芬普尼之生物毒性

芬普尼除前述神經毒性外，也有眾多研究描繪出系統農藥芬普尼之生物毒性與危害。當芬普尼作用於生物其他器官組織、細胞時也會產生毒性效果。例如芬普尼影響果蠅體細胞之粒線體凋亡 (Zhang 等人，2015)，影響小鼠的腦與腎組織之氧化壓力 (Roques 等人，2013) 或產生腫瘤前期突變 （Tingle 等人，2003）；對日本鵪鴣 (*Coturnix japonica*)心肺組織之炎性反應與氧化壓力傷害 (Khalil 等人，2019)；在鯉魚的腦、肝、腎、肌肉組織中的丙二醛 (Malondialdehyde, MDA) 等自由基指標表現量大幅上升 (Clasen 等人，2012)。在細胞模式平台上，芬普尼也顯示具調控細胞凋亡因子 (Park 等人，2020; Zhang. 等人，2015; Vidau 等人，2011)，和胞內氧化壓力反應及代謝途徑的的效果 (Wang 等人，2016)。

在市場上，芬普尼以「法台寶」、「特滅多」、「氟蟲腈」等名稱銷售。芬普尼為長效型的殺蟲劑，且具有需用濃度低、無忌避性等優勢，可有 4 至 6 個月的除蟲效果，對節肢動物具強大的功效，防治家庭害蟲如白蟻、蟑螂時同具良好效果。另外在寵物用藥上芬普尼商品名為「蚤不到」，使用在貓狗身上約可維持

一個月的體表驅蟲效用 (林孟汝，2017)。然而，芬普尼之環境污然及對人體之危害相關研究逐漸受到矚目 (Jackson 等人，2009)。早期動物實驗已證實大鼠長期暴露於芬普尼中，會引起甲狀腺良性及惡性的腫瘤產生 (Tingle 等人，2003)。2005 年時，美國環境保護署 (United States Environmental Protection Agency, USEPA) 已將芬普尼列為可能致癌物質(USEPA, 2005)。

在台灣，曾發生野生鳥類芬普尼中毒、手搖茶驗出芬普尼農藥殘留等新聞。根據報導，2017 年芬普尼雞蛋污染事件，涉及殺蟲劑污染的雞蛋和蛋製品蔓延、擴及全球，逾 40 國的雞蛋遭到芬普尼殘留污染。我國農委會也公布境內數個養雞場之產品芬普尼含量超標。芬普尼污染雞蛋之成因，除作為雞舍環境除蟲用藥殘留外，皆指向疑似蛋農不當使用農藥：蛋雞身上常有雞蝨或寄生蟲，導致產蛋率下降。因此蛋農將原用於農作物之芬普尼略為稀釋後，對蛋雞羽毛進行直接噴灑，希望達到驅蟲效果。芬普尼具脂溶性，進入雞隻體內便會代謝並儲存於脂肪中，因此芬普尼不僅會殘留在雞隻身上，也可能殘留在所產出的蛋及相關農產品中，導致產品驗出芬普尼殘留超標 (張珍珍，2018)。近年台灣蜜蜂也屢傳異常大量死亡，蜂蜜產量只剩下二成，使蜂農損失慘重，專家研判是芬普尼環境殘留導致蜜蜂中毒死亡：工蜂在外採蜜，接觸到植物帶有芬普尼的花蜜或花粉時會導致神經中毒；蜜蜂呈現興奮狀態直至衰竭而死。若中毒未立即死亡之成體回巢後餵養幼蜂，間接沾染芬普尼之幼蜂因耐受度較差，將導致整群幼蜂死亡而滅巢（Kairo 等人，2016; Holder 等人，2018）。相關研究證實芬普尼使蜜蜂體內過氧

化氫酶 (Catalase)與羧酸酯酶體 (Carboxylesterase)等抗氧化與解毒相關蛋白表現異常 (Carvalho 等人，2013)。

迫使政府正式對外公告將芬普尼列為禁用農藥，不得再製造生產或持有 (行政院農委會防檢局公告，2015)。研究文獻更指出，部分芬普尼代謝物的毒性大於芬普尼 (Weston 等人，2014)。

芬普尼主要代謝物為硫醚 (Sulfide)，在好氧或厭氧含水的環境中易產生。硫醚經氧化反應及光降解作用後最終可產生碸 (Sulfone)，此化合物對鳥類具急毒性，也易透過生物累積進入到高級消費者的體內。相對於芬普尼而言，其光解代謝產物 Sulfone 更易和昆蟲 GABA 受體結合，進而造成神經中毒，並經由生物鏈的傳遞累積於高等生物之中。並對水生生物、魚類有極高的毒性 (Hainzl 等人，1998)。此外，Sulfone 也提供強大的氧化壓力，產生之活性氧物質（Reactive oxygen species, ROS）可調控細胞凋亡 (Zhang 等人， 2015)。

據實驗報告，Sulfone 對魚類的毒性達到芬普尼原產物的 6.3 倍（Tong 等人，2019）。有些研究亦表示芬普尼暴露環境約七天之後，產生的代謝產物還足以對昆蟲產生毒性，在第 60 天仍能測得殘留，直至 12 個月後才完全無法偵測到芬普尼及相關代謝物殘留。芬普尼亦可長期殘留在土壤或地下水體中，對於不特定接觸到之生物造成慢性傷害，後續恐產生對芬普尼帶抗藥性的族群，惡性循環下將使環境更難以控制 (Wu 等人，2015)。

綜上所述，諸多文獻回顧指出芬普尼及相關產物除神經毒性外，也具有肝腎毒性、生殖毒性以及細胞毒性。其中神經傳遞物質的抑制與氧化壓力上升是芬普尼的主要毒性來源 (Badgujar 等人，2015; Wang 等人，2016)，透過動物模式研究，則有助我們更進一步評估芬普尼對生物及環境之影響。

3. 斑馬魚作為模式動物之優點

斑馬魚 (*Brachydanio rerio*) 原為常見一熱帶魚。由於全身具有斑馬樣之相間條紋而得其名。近年來逐漸成為重要的模式動物。由於斑馬魚孵化約 90 天即性成熟。精卵行體外受精、體外發育，胚胎孵育速度快且透明，又對水質要求不高。因此有易於觀察其發育變化過程、成長快速、繁殖力高、飼養簡易且成本低等優點（Westerfield 等人，1995）。此外，胚胎發育機制與哺乳動物相似、有近似人體的各種器官系統、神經系統、代謝途徑、藥理病理特性等 (Lieschke 等人，2007)。其基因組也與人類有約 80%之相似性，且已建立完整的基因資料庫。

因此斑馬魚模式廣泛應用於毒性試驗中 (Hill 等人， 2005)。因此斑馬魚模式廣泛應用於毒性試驗中（Hill 等人， 2005），並且在神經訊息傳遞物質相關的毒理、藥理研究中用作試驗平台（Rico 等人，2011）。因此現今除常見的以斑馬魚胚胎進行各項試驗外，成魚亦為合適的多功能研究平台。斑馬魚更成為水生生態毒理學上非常重要的指標生物。當斑馬魚受到環境污染物質的影響，能敏感地反應微量環境污染物的毒性，並調控斑馬魚體內各生理系統，導致斑馬魚成體出

現在行為體態上如變色、立鱗、脫鱗、鰓蓋打開、脊柱側彎、衝撞、沉底、痙攣、浮游、仰游，甚至警戒、激動、爭鬥、恐懼、厭食、或是死亡等表現 (廖常凱、邱彥璋，2012)；並在聽覺、視覺、心臟功能、腎功能、消化道功能等各項生化指標上表現顯著改變 (彭蘊如，2017)，以上各種指標均具有相對應之生理意義，可供評估試驗物質對淡水脊椎動物毒性的影響。

根據行政院農委會發布之指南，以斑馬魚生理變化偵測水中毒性物質技術研發以及歐盟經濟合作發展組織（Organisation for Economic Co-operation and Development[OECD], 1992）之魚類急毒性試驗（Acute Toxicity Test）指南皆推薦斑馬魚作為測試魚種，目前已有許多斑馬魚偵測水中毒物研究關於農漁牧用藥 (除草劑、殺蟲劑和抗生素)、工業廢水 (重金屬)、民生污水 (界面活性劑)、塑化劑、人工雌激素和人造奈米顆粒等。過去文獻回顧顯示斑馬魚模式已經驗證、測試超過 1000 種有毒化學物質與廢水成分檢驗 (吳蕙如，2013)，近年更應用於作為中藥藥理及藥毒性之測試平台 (彭蘊如，2017)。

4. 斑馬魚側線毛細胞模式於聽覺及行為研究上之回顧

魚類具有哺乳動物所沒有的感覺器官：側線系統 (Lateral line system)，魚之側線與兩棲類的毛細胞皆具有感受低頻振動的功能，為聽覺器官的雛型，可表現聽覺受器的特性：如感測體表周遭水體的變化，區別水流方向、強弱及辨識在水中游動的物體（Whitfield 等人，2002）。斑馬魚之側線因其位於體表，具有容易

觀察操作等優點，近年逐漸做為耳毒性藥物模式發展 (Owens 等人，2007)。斑馬魚的側線系統是具發展潛力的毛細胞研究平台，因魚類側線神經丘內的側線毛細胞與哺乳類內耳的毛細胞在發生上與型態、功能皆相似 (Ghysen 等人，2004)。

由於哺乳類之毛細胞位在內耳顳骨內不易取得；而魚類毛細胞位於體表的側線上易於操作，可直接模擬耳蝸毛細胞的聽覺生理功能 （Wangemann 等人，2006;Teixeira 等人，2015; Kindt 等人，2018）。因此許多毛細胞相關研究使用活體斑馬魚側線系統取代以哺乳類耳蝸毛細胞體外培養的方式，以觀察刺激對毛細胞之影響 (Lin 等人，2006)。同時斑馬魚側線相關的動物行為模式也可提供相關證據，如交配，掠食，逆流等行為表現。當毛細胞受損導致側線系統失效時魚體感知受限，會表現出運動上的異常窘迫。則此行為模式方法可用來輔助評估側線毛細胞受損程度，或作為觀測毛細胞在聽覺生理途徑與行為反應的平台 (Bhandiwad 等人，2013; Kalueff 等人，2013; Barcellos 等人， 2018)。

為數眾多的研究以斑馬魚之側線毛細胞為動物模式平台，應用於聽覺保護及耳毒性藥物研究（Williams 等人， 2000; Michel 等人， 2017），如應用在氨基糖苷類抗生素或順鉑等化療藥的藥物劑量耳毒性試驗上（Ou 等人，2007 及 2012; Owens 等人，2007; Rybak 等人，2007; Warchol 等人，2010; Hung 等人，2019）。此類藥物主要與內耳中鉀離子及聽覺神經誘發電位之平衡有密切關係，其中通道蛋白的鉀離子再循環、耳蝸內離子平衡在聽力形成的過程中扮演重要的生理功能。而部分抗生素(如新黴素、鏈黴素和慶大黴素等)則為常見的耳毒性藥物，臨

床上副作用易誘發耳毒性而導致聽力損傷：因干擾核糖體使提前終止蛋白質合成；提供錯誤的胺基酸使得合成出的蛋白無法行使應有的功能，異常蛋白進而影響細胞膜的通透性，從而又加速氨基糖苷類物質進入細胞內 (He 等人，2017)。而膜的通透性改變也影響到機械性離子傳導通道之活性與電位平衡，而斑馬魚毛細胞正提供一個便利實驗細胞離子通透性的平台。例如以此平台研究發現新黴素(neomycin)會造成斑馬魚仔魚神經丘的毛細胞死亡 (Williams 等人，2000)。

也有報導胺基酸甘醣類藥物或順鉑處理後，側線神經丘上數個特定位點的活體螢光染色訊號減弱，顯示側線上毛細胞已受到傷害甚至誘發細胞凋亡（Trump 等人，2008; Hung 等人，2019）。另外部分文獻指出，耳毒性的機轉也可能為藥物產生自由基使粒腺體失去功能，進而造成毛細胞失去再生能力所致(吳庭青等人，2017)，以及藥物進入毛細胞內產生大量 ROS，導致細胞凋亡。也有文獻認為主要傷害來源為斑馬魚毛細胞凋亡相關之訊息傳遞途徑受到藥物影響，如 caspase 9, MAPK, JNK, Bcl-2 等蛋白誘發之損傷。

毛細胞藉由運動開啟毛束上的通道使得鈣離子流入，以此為主要通透離子的孔道，此系列被稱為毛細胞機械性傳導通道 (mechanotransducer channel, MET channel)。而魚類毛細胞組成的側線系統，基本感覺單位稱為神經丘(neuromast)；側線上的毛細胞與支持細胞聚集成神經丘並與感覺神經連接，其上排列毛細胞，露出於體表外以偵測聲波水波等細微震動。此外，側線系統毛細胞可分為靜纖毛與動纖毛兩類。當靜纖毛向動纖毛方向彎曲時引起毛細胞去極化使膜電位減小。

與其相連結的傳入神經衝動增加，表現興奮性效應。當靜纖毛背離動纖毛彎曲時，引起毛細胞超極化，膜電位增大而傳入衝動減少，表現抑制效應。毛細胞由細胞本體與感覺纖毛束(sensory hair bundle)兩部分組成。

纖毛的頂端分布許多機械性傳導通道。當機械性刺激使纖毛相互拉扯，頂端的通道因而開啟，外界的鈣離子就會流入使毛細胞內電位升高，造成極化反應，並釋出神經傳遞物質乙醯膽鹼(acetylcholine)以刺激突觸後的傳入神經元，將神經衝動傳至中樞（Lin 等人，2006）。

5.斑馬魚模式應用於芬普尼檢測

毛細胞之運動機制與側線感覺神經機制調控，皆仰賴毛細胞中纖毛之機械性通道產生的刺激以開啟電訊號傳遞路徑；而神經電訊號傳遞又取決於膜電位的升降與極化，同時前述芬普尼之機轉藉由對 GABA 等神經傳遞物質受體之抑制而可改變細胞通透性、干涉離子平衡，影響膜電位極化反應。因此認為芬普尼可作用於毛細胞上，進而調控感覺神經乃至於中樞神經從而影響魚類之行為表現。此外，芬普尼對於毛細胞與神經細胞的氧化壓力也是有顯著影響。目前已有數篇文獻發表以斑馬魚幼體應用於偵測環境芬普尼、探討芬普尼對胚胎發育、仔魚行為之影響。例如在行為 (Wang 等人，2016)、器官發育(Stehr 等人，2006)、血管壓力與血管新生 (Park 等人，2020)、DNA 甲基化 (Qian 等人，2017)、氧化壓力 (Wu

等人， 2015)等研究上，芬普尼皆有明顯之調控功能。並且在斑馬魚側線毛細胞上，GABA 等神經傳遞物質受體受芬普尼之調控。

但目前尚未有觀測芬普尼對斑馬魚成體之危害，以及綜合各項傷害指標與毛細胞損傷之合併研究，因此在探討系統性農藥芬普尼作為環境毒物對水生生物之急毒性傷害上仍有待整合之處。

第二章

研究目的

在本碩士論文的研究中，我們選擇斑馬魚實驗動物來探討芬普尼對感覺與運動系統的神經毒理作用。我們評估了急性芬普尼暴露對斑馬魚存活率，游泳軌跡熱圖、胚胎側線毛細胞發育、以及神經毒性的影響，此外，我們也利用免疫組織化學染色與西方墨點法分析比較芬普尼對斑馬魚大腦組織的氧化壓力，發炎、與細胞凋亡的蛋白質表現變化。

第三章

材料方法

1. 實驗動物

斑馬魚使用成年野生種 (pronounced star-AB)斑馬魚(*Danio rerio*)，母系來自台灣班馬魚中心—中央研究院分支 (Taiwan Zebrafish Core Facility at Academia Sinica)，以除氯曝氣水飼養在實驗室裡 50×25×25cm 的魚缸中，光暗周期為 14/10 小時，魚飼料每日餵食一次並測量水溫使其維持在 26-28℃。實驗進行時斑馬魚週齡皆為 16 週，取體型相近之成年公魚分組在光週期中進行實驗。

2. 芬普尼之實驗準備

純芬普尼粉末由 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)購得。以 0.5g 的芬普尼粉末，與助溶劑 50mL 的 DMSO (Dimethyl sulfoxide;0.5%)並加入二次水混合直到體積 5L 以配製成 1 ppm 的芬普尼原液 (含 0.1%之 DMSO)，再分別以二次水稀釋成 0.5 ppm、0.2 ppm、0.1 ppm 的實驗用芬普尼水溶液備用。每缸使用一公升芬普尼水溶液。將斑馬魚飼養於不同濃度中(0.5, 0.2, 0.1, 0 ppm)至 96 小時結束以供行為與病理試驗。

3. 行為實驗方法

根據指南，活體行為實驗方法如下：

(1) 挑選試驗魚隻：使用足齡且體長約 2±1 公分之健康斑馬魚。

(2) 試驗物質之配製：依照該物質之使用方法先以有機溶劑 (DMSO) 溶解，再以養殖水配製。

(3) 魚隻置入含試驗物質之試驗缸中：每個試驗缸中分配 10 尾斑馬魚，且含藥試驗液之總體積為 1 公升。

(4) 暴露於含藥試驗液中 96 小時：投藥之後每 24 小時更換含藥試驗液並請清理排泄物，直到第 96 小時試驗結束。

(5) 臨床觀察記錄：在投藥後第 12、24、48、72 和 96 小時記錄斑馬魚之死亡數與觀察存活魚隻行為。

(6) 統計死亡率並計算 LC_{50}：統計各處理濃度於 96 小時試驗期間之魚隻死亡總數，再分析估算 LC_{50} 值。

(7) 行為軌跡追蹤分析：利用動物行為軌跡追蹤分析系統 (Noldus Ethovision XT, Noldus, Wageningin, The Netherlands) 做為主要觀察記錄工具。行為實驗中半致死量實驗將斑馬魚飼養在固定體積的魚缸 (20 cm×10 cm×20 cm)，於不同濃度(0.5, 0.2, 0.1, 0 ppm)之芬普尼水溶液，每 24 小時觀察一次，至 96 小時結束。每一個濃度組別均分別觀察錄影，加入新曝氧水後每次放入一條魚觀察，待魚適應 1 分鐘後啟動軟體攝影紀錄 10 分鐘，並連續觀察斑馬魚暴露芬普尼後每隔 24 小時之活動力變化。每一組別之斑馬魚群體數量約 8 ~10 隻。此外，DMSO 也進行同樣處理作為預實驗，以驗證助溶劑成分是否有顯著影響行為實驗。

4. 斑馬魚胚胎側線毛細胞的螢光染色

以 MitoTracker Green FM_{1-43} 染劑在活體中標定側線毛細胞上之神經丘中 MET channels 並測量其數目。將仔魚(4dpf)以 FM_{1-43} (Invitrogen) 3μM 處理 15 秒，接著再以麻醉劑(MS 222, Sigma)麻醉後進行以 400x 螢光顯微鏡拍攝 (Olympus BX60 Microscope, Canon DS126271)。

5. 免疫組織化學染色

行為實驗完後取下斑馬魚腦組織，再以 10%中性福馬林 (formalin) 浸泡固定，目的在於防止腐敗並保持生前原來構造。固定完成後以石蠟(paraffin)包埋，並利用旋轉式精密切片機 (Leica RM2135, Wetzlar, Germany)切製成 5 μm 之組織切片，接著將組織切片貼片保存。在攝氏 60 度加熱進行脫蠟：經數次甲醇、95%酒精、二次水以洗淨石蠟後，浸於 epitope retrieval buffer 中水浴加熱二十分鐘進行抗原修復，並加入 peroxidase block 及 protein block (abcam, Cambridge, United Kingdom)；其次分別加入適當濃度之一級抗體反應一小時，再加入含有 horseradish peroxidase (HRP)之適當濃度 Novelink^{tm} polymer detection system 1 二級抗體標定。實驗使用抗體如表 1。經 substrate buffer 稀釋之 3,3´-Diaminobenzidine chromogen (DAB; abcam, Cambridge, United Kingdom)相對應作為呈色系統，呈色後共染 hematoxylin solution (Leica, polymer detection

system)。上述每一步驟間皆經磷酸鹽緩衝生理食鹽水 (phosphate-buffered saline; PBS) 清洗。最後浸泡二次水、95%酒精、甲醇數次以進行脫水、封片。使用光學顯微鏡在可見光下以 40 倍至 100 倍間拍攝 (Olympus BH2 Microscope, Canon DS126271)。

6. 西方墨點法分析

將斑馬魚的全腦新鮮取出，經完全相同芬普尼處理方法之斑馬魚腦組織 6-7 顆置於同一微量離心管在冰浴中研磨，磨碎後以攝氏 4 度，13200 RPM 離心 15 分鐘以取組織上清液。其次，利用二喹啉甲酸測定法 (Bicinchoninic acid assay, BCA assay; Pierce^{TM}; ThermoFisher Scientific，USA) 藉由微量光電比色計 (Microplate Spectrophotometer, uQuant, Biotek Intruments, Inc., Vermont, USA) 於 562 nm 波長定量上清液中蛋白質。加入等體積的 2x sample buffer 至組織樣品中，煮沸 3 分鐘後定量分裝保存於冰庫。三重複的定量樣本透過自製之十二烷基硫酸鈉聚合膠體 (Discontinuons sodium dodecylsuifate-polyacrylamide gel, SDS-PAGE)進行電泳：將 25μ g 之蛋白質隨不同分子量大小電泳分離，隨即轉印於聚二氯亞乙烯膜 (polyvinylidene difluoride membrane, PVDF; GE Healthcare Life Science, Barrington,Illinois, USA) 上。以脫脂奶粉進行印漬封閉 (Blocking) 一小時。後續以含界面活性劑之酸鹽緩衝生理食鹽水 (phosphate-buffered saline with 0.1% Tween-20; PBST) 清洗後接合一級抗體，一抗反應時間為 12-16 小時；

回收一抗後與二級抗體反應一小時，再以冷光呈色劑 (Enhanced chemiluminescence, ECL; GE Healthcare Life Science, Barrington,Illinois, USA) 試劑組偵測特定抗原-抗體複合物。並且上開每步驟間皆經 PBST 洗滌數次。最後利用攝像系統 LAS-4000 (Fujifilm; Tokyo, Japan) 予以數位化，數位影像以 Image-J 軟體 (Version 1.48t, Wayne Rasnabd, Washing DC, USA) 進行定量分析：以像素密度方式分析各組蛋白質條帶光密度並比較。實驗使用抗體如表 1。

7. 統計分析

各組檢測出來的數值均由平均值±平均值標準誤差（standard error of the mean, SEM）來表示，且用單因子變異數分析 (one-way analysis of variance, one-way ANOVA)以及 S-N-K (Student-Newman-Keuls multiple range test)多重差距檢定來分析是否有顯著誤差，若有顯著誤差則用$^{**}P<0.01$ 以及$^{*}P<0.05$ 表示。

第四章

實驗結果

1. 斑馬魚成魚浸泡在含有芬普尼水域環境的存活率變化

圖 1 顯示不同濃度芬普尼(0, 0.5, 1.0, 2.0 ppm)投予後第 24、48、72 和 96 小時記錄斑馬魚之平均存活率。實驗結果顯示在含 2.0 ppm 芬普尼的水域中，第 24 小時紀錄斑馬魚平均存活率只有剩下 10%；在含 1.0 ppm 芬普尼的水域中，斑馬魚存活率則逐步遞減，第 96 小時紀錄斑馬魚平均存活率只剩 50%；在含 0.5 ppm 芬普尼的水域中，從 24 至 96 小時紀錄斑馬魚平均存活率均為 90%；在乾淨水域中(sham 組)的斑馬魚平均存活率則均維持在 100%。由斑馬魚成魚浸泡在含有芬普尼水域環境的存活率變化的結果可以顯示斑馬魚成魚的存活率會隨著水域投予芬普尼濃度的增加而遞減，換言之，芬普尼的毒性越強則斑馬魚成魚的存活率越低。

2. 斑馬魚成魚浸泡在不同濃度芬普尼水域環境的運動改變

圖 2A 顯示單一斑馬魚在乾淨水域 (sham 空白處理組)；與含有 0.1 與 0.5 ppm 芬普尼的水域環境中處理 0、48、72 小時後的運動軌跡熱點圖，每組斑馬魚運動記錄時間為 10 分鐘。從動軌跡熱點圖可觀察到，在乾淨水域 sham 處理組的斑馬魚，不論是靜置 0 小時，還是 48 小時或是 72 小時，運動軌跡均相當的雷同；而芬普尼 0.1 ppm 與 0.5 ppm 實驗處理組的斑馬魚，靜置 0 小時的運動軌跡與乾淨水域 sham 處理組的斑馬魚類似，然而隨著靜置時間的增長，則運動軌跡變得

侷限在特定的區域。特別在較高濃度 0.5 ppm 實驗處理組的斑馬魚，運動軌跡侷限的行為變得更加明顯。

圖 2B 實驗統計斑馬魚在乾淨水域(sham 組)；與含有 0.1 與 0.5 ppm 芬普尼的水域環境中處理 0、48、72 小時後的 (a)運動平均速度、(b)運動平均距離。斑馬魚在乾淨水域(Sham)中靜置 0、24、48、72 小時後的運動平均速度約為 280~320 cm/min，各組間並無差異性(P>0.05)；而斑馬魚在含有 0.1 ppm 芬普尼的水域環境中靜置 0、24、48、72 小時後的運動平均速度從 311 cm/min 逐步減慢為 247、228、180 cm/min，各組間存在統計上的顯著差異(P<0.01-0.05)，而斑馬魚在含有 0.1 ppm 芬普尼的水域環境中靜置 0、24、48、72 小時後的運動平均速度則從 331 cm/min 逐步減慢為 164、156、114 cm/min，各組間存在統計上的顯著差異(P<0.01)；此外，斑馬魚在乾淨水域 (Sham)中靜置 0、24、48、72 小時後的每運動 10 分鐘的平均距離約為 2743~2914 cm，各組間並無差異性 (P>0.05)；而斑馬魚在含有 0.1 ppm 芬普尼的水域環境中靜置 0、24、48、72 小時後每運動 10 分鐘的平均距離從 2807 cm 逐步縮短為 2572、2358、1887 cm，各組間存在統計上的顯著差異(P<0.01-0.05)，而斑馬魚在含有 0.1 ppm 芬普尼的水域環境中靜置 0、24、48、72 小時後每運動 10 分鐘的平均距離則從 2901 cm 逐步縮短為 1968、1588、1074 cm/min，各組間存在統計上的顯著差異 (P<0.01-0.05)。

由上述的實驗結果，可以發現斑馬魚在含有芬普尼的水域環境，會明顯減低游動的速度與距離，隨著暴露在芬普尼水域環境的時間增長，或是芬普尼濃度的增加，斑馬魚游動的速度與距離均呈現明顯的降低。

在圖 7 中顯示，當仿照圖 2 之實驗設計進行行為實驗下，在含有實驗操作濃度的助溶劑 DMSO (0.1 ppm)水域環境中處理 0、48、72 小時後，圖 7A 的斑馬魚的運動平均速度、及圖 7B 的斑馬魚移動平均距離皆顯示斑馬魚不論在乾淨水域，或是含有 DMSO 的水域環境中，運動平均速度與平均距離表現均無比較出顯著差異(P>0.05)，且實驗途中無任何死亡產生。由上述實驗結果可推定助溶劑 DMSO 在本論文進行之實驗中所導致的影響可初步忽略。

3. 斑馬魚胚胎浸泡在含有芬普尼水域環境的側線毛細胞變化

圖 3A 顯示單一斑馬魚胚胎在乾淨水域 (sham 組)以及含有 0.1、 0.5 與 1.0 ppm 芬普尼的水域環境靜置 12 小時後，利用 FM_{1-43} 染色的側線毛細胞螢光影像。實驗結果發現隨著芬普尼濃度增加則斑馬魚胚胎的側線毛細胞數目則變得逐步遞減，圖 3B 統計斑馬魚胚胎的側線毛細胞數目，結果顯示斑馬魚胚胎靜置在乾淨水域(Sham)，側線毛細胞平均數目為 11.2 最佳；將斑馬魚胚胎靜置在 0.1 ppm 芬普尼的水域環境 12 小時後，側線毛細胞平均數目為 8.8，顯著小於斑馬魚胚胎靜置在乾淨水域側線毛細胞的平均數目 (P<0.01)；將斑馬魚胚胎靜置在 0.5 ppm 芬普尼的水域環境 12 小時後，側線毛細胞平均數目為 6.3，顯著小於斑馬魚胚胎

靜置在乾淨水域以及在0.1 ppm芬普尼水域環境12小時後側線毛細胞的平均數目(P<0.01)；將斑馬魚胚胎靜置在 1.0 ppm 芬普尼的水域環境 12 小時後，側線毛細胞平均數目為 5.1，顯著小於斑馬魚胚胎靜置在乾淨水域以及在 0.1 以及 0.5 ppm 芬普尼水域環境 12 小時後側線毛細胞的平均數目 (P<0.01)。

由上述的實驗結果，可以發現斑馬魚胚胎在含有芬普尼的水域環境，會明顯損傷側線毛細胞的發育，而且隨著暴露在芬普尼水域環境的芬普尼濃度增加，斑馬魚胚胎側線毛細胞的數目呈現明顯的降低。

4. 斑馬魚成魚浸泡在含有芬普尼水域環境後腦組織的氧化壓力表現

圖 4A 顯示單一斑馬魚在乾淨水域、以及含有 0.1、 0.5 與 1.0 ppm 芬普尼的水域環境中處理 12 小時後的腦組織抗氧化壓力相關的超氧化物歧化酶-2 蛋白 (Superoxide dismutase 2, SOD2) 表現，結果顯示芬普尼實驗處理組腦組織的 SOD2 蛋白表現較正常控制組明顯減弱，而且隨著芬普尼濃度的增加，SOD2 蛋白表現呈現逐步減弱的趨勢；圖 4B 利用西方墨點法分析實驗結果顯示芬普尼實驗處理組腦組織的 SOD2 蛋白表現較正常控制組明顯減弱；統計分析結果顯示芬普尼實驗處理組斑馬魚腦組織的 SOD2 蛋白平均表現值較正常控制組顯著減少 (P<0.01)。由上述的實驗結果，可以發現斑馬魚成魚浸泡在含有芬普尼水域環境後，會明顯增加腦組織的氧化壓力。

5. 斑馬魚成魚浸泡在含有芬普尼水域環境後腦組織的發炎作用表現

圖 5A 顯示單一斑馬魚在乾淨水域、以及含有 0.1、 0.5 與 1.0 ppm 芬普尼的水域環境中處理 12 小時後的腦組織發炎相關的腫瘤壞死因子 α (TNFα) 蛋白表現，結果顯示芬普尼實驗處理組腦組織的 TNFα 蛋白表現較正常控制組明顯增強，而且隨著芬普尼濃度的增加，TNFα 蛋白表現呈現逐步增強的趨勢；圖 5B 利用西方墨點法分析實驗結果顯示芬普尼實驗處理組腦組織的 TNFα 蛋白表現較正常控制組明顯增強；統計分析結果顯示實驗處理組斑馬魚腦組織的 TNFα 蛋白平均表現值較正常控制組顯著增強(P<0.01)。由上述的實驗結果，可以發現斑馬魚成魚浸泡在含有芬普尼水域環境後，會明顯增加腦組織的發炎反應。

6. 斑馬魚成魚浸泡在含有芬普尼水域環境後腦組織的細胞凋亡表現

圖 6A 顯示單一斑馬魚在乾淨水域、以及含有 0.1、 0.5 與 1.0 ppm 芬普尼的水域環境中處理 12 小時後的腦組織細胞凋亡相關的半胱天冬酶原 3 (Caspase 3) 蛋白表現，結果顯示芬普尼實驗處理組腦組織的 Caspase 3 蛋白表現較正常控制組明顯增強，而且隨著芬普尼濃度的增加，Caspase 3 蛋白表現呈現逐步增強的趨勢；圖 5B 利用西方墨點法分析實驗結果顯示芬普尼實驗處理組腦組織的 Caspase 3 蛋白表現較正常控制組明顯增強；統計分析結果顯示實驗處理組斑馬魚腦組織的 Caspase 3 蛋白平均表現值較正常控制組顯著增強 (P<0.05)。由上述的實驗結

果，可以發現斑馬魚成魚浸泡在含有芬普尼水域環境後，會明顯增加腦組織的細胞凋亡表現。

7. 芬普尼誘發斑馬魚腦組織損傷的可能分子機制

斑馬魚會因為芬普尼實驗處理造成腦組織產生氧化壓力(oxidative stress)、發炎作用(inflammation)、以及細胞凋亡(apoptosis)，圖 8 簡略說明利用芬普尼實驗處理斑馬魚的動物模式下可能的傷害途徑與分子機轉。

第五章

討論

農藥毒性的篩檢與食品安全議題息息相關，尤其是日前爆發多起食安風暴案件後，引起台灣社會大眾對於食安議題的重視與討論。為探討系統農藥芬普尼急毒性的篩選與評估，在本論文中，我們選擇斑馬魚（Danio rerio）實驗動物來探討芬普尼對感覺與運動系統的神經毒理作用。我們將斑馬魚暴露於含有不同濃度藥芬普的水域中，評估斑馬魚暴露在芬普尼急性毒性後對存活率，側線毛細胞數量以我們比較了正常與芬普尼處理下斑馬魚的游泳軌跡熱圖、速度和距離的差異。結果顯示，在活體試驗中，芬普尼的有無在斑馬魚存活率、游泳軌跡熱圖、泳速、泳距上都表現顯著差異。此外，暴露芬普尼的個體體表也部分出現脫鱗、掉色、鰓蓋紅腫、呼吸窘迫等現象，這與急性中毒之表徵類似 (廖常凱、邱彥璋，2012)。

二甲基亞碸 Dimethyl sulfoxide（DMSO）是給藥時常用的助溶劑，雖然有研究指出高濃度之 DMSO 可能影響化療藥誘發斑馬魚仔魚側線毛細胞的死亡（Coffin 等人，2018）。但也有實驗表明在 0.1%濃度下的 DMSO 不會影響仔魚側線毛細胞和離子細胞的發育與功能 (鄒宜玲，2013)。我們以相同濃度之 DMSO 單獨測試，結果發現 DMSO 死亡率及活動率皆無明顯變化 (參見圖 7 結果)，這結果證實助溶劑應該不會影響芬普尼活體行為試驗結果。在存活率測驗中，給予高劑量系統農藥芬普尼 (2.0 ppm) 之組別幾乎於 24 小時內死亡；中間劑量 (1.0 ppm) 則在 96 小時內達到半致死率 (LC_{50})，此結果與前人研究劑量換算推論相近，與對照組和低劑量組統計也具顯著差異。因此後續活體實驗皆以 1.0 ppm 芬

普尼為作為實驗最大濃度；低濃度組別在存活率實驗中並無大量死亡，然而於後續的活動力測試中則有明顯活動力下降之情形。利用斑馬魚行為軌跡追蹤分析技術，檢視系統農藥芬普尼對於成年斑馬魚的運動行為，從熱區圖可清楚判斷從芬普尼給予後 24 小時開始，斑馬魚有明顯沉底之現象。而在 24 小時之後，給藥組別運動能力明顯下降，在泳速跟泳距統計上也有顯差。且較高劑量組有較多衝撞或停留在邊角，兩種極端之現象認為均是因神經傷害導致的窘迫、焦慮反饋 (Stehr 等人，2006)。唯後續可實施進一步行為實驗及觀察魚類的行為: auditory-evoke responses、seeker response，以及逆流行為實驗等，以分析以確認激烈環境下毛細胞傷害所導致的運動能力差異與感覺系統受損（Colwill 等人，2011）。

以 FM_{1-43} 螢光處理下胚胎側線毛細胞之損傷樣態，與過去研究非常類似 (Owens 等人，2007)。可明顯觀察出螢光表現量隨藥物濃度成反比。並且在不同濃度中損傷與濃度呈現正相關。側線是位於斑馬魚體表感知水流和壓力變化的機械感受器,它是由一組相對獨立的神經丘組成,位於神經丘中央的機械感受器毛細胞，以及位於周邊的非感覺支援細胞構成神經丘的基本結構。由於斑馬魚側線器位於體表，便於活體觀察毛細胞，成為了研究水域環境毒物損傷毛細胞再生的經典模型。側線對斑馬魚而言，是相當重要的感覺器官，兼具嗅覺、感應水溫與水壓，查覺水流速度，甚至定向輔助等功能。側線器官位於鱗上成小孔狀，小孔裏面含有神經末梢，把外界信息通過與其相連的感覺器官傳至腦神經。

魚的側線也是一種聽覺器官，在水中運動時，側線可感受到所產生的水流，感覺水中各種頻率的振動音波，並能感覺出音波來自哪個方位，因此在魚類許多行為中(群游、追獵、躲避等)扮演重要角色。側線構造上由許多微小的聽覺細胞組成的，其單位是神經丘(neuromast)。神經丘的組成則是由毛細胞與支持細胞所構成。當水中壓力波產生，斑馬魚側線的毛細胞就能感覺到（Chiu 等人，2008）。本實驗結果顯示當水域中含有芬普尼的毒性，會損傷斑馬魚側線的毛細胞，結果就有可能影響到斑馬魚對水流的感覺與定向功能。

農藥芬普尼（fipronil）是白色粉末，為一種殺蟲劑，被認為會使中樞神經失控，導致昆蟲死亡。芬普尼對昆蟲而言具毒性，對哺乳動物也有干擾 GABA 接受器的情形。其光解物的毒性和芬普尼相似，而代謝物的毒性則比芬普尼更大。人體如何排除芬普尼?目前並無相關資料可供評估，但由動物試驗推估，芬普尼容易蓄積於脂肪組織。由胃腸道進入芬普尼會於脂肪及腎上腺積聚。其次為肝臟、胰臟、甲狀腺、卵巢；最低為肌肉、大腦、心、冠狀血管。糞便是其主要的排泄路徑，約佔劑量的 45-75%；尿液則佔 5-25%。一般認為，芬普尼對斑馬魚腦組織可能會產生氧化壓力與細胞凋亡 (Wu 等人，2015 及 2020)。本論文利用免疫組織化學染色以及西方墨點法技術，結果顯示芬普尼會引發斑馬魚腦組織的氧化壓力、發炎、以及細胞凋亡，隨著芬普尼濃度的遞增，斑馬魚腦組織的抗氧化壓力指標蛋白 SOD2 表現逐步減弱;發炎指標蛋白 TNF-α 以及細胞凋亡指標蛋白 caspase 3 表現則逐步增加。

芬普尼對於斑馬魚成魚的影響，過去研究中主要著重發育的部分，於毛細胞傷害及神經毒性尚未有深入研究，本論文顯示芬普尼對於斑馬魚可能的傷害機轉，但有部分機轉尚未完全揭露，例如農藥芬普尼對於 GABA 接受器的神經路徑阻斷機制（McCarroll 等人，2019），更有待未來更深入研究。

前述文獻探討有提出，芬普尼對於活體細胞之傷害來源中，氧化壓力上升是主要毒性來源之一 (Wang 等人，2016)。因而未來探討芬普尼之毒理、生理機轉時可再增加自由基的測定，以期更細部去探討毛細胞與神經損傷程度與相關分子機制。

芬普尼人類長期吸收的話可能傷害肝、腎和甲狀腺，促發腫瘤；而若意外短暫大量攝取會出現頭暈、噁心、嘔吐、胃痛、皮膚不適等。美國環境保護署（EPA）已將芬普尼列為致癌物質。且芬普尼會讓胎兒的發育延緩，也會影響動物的生育能力。(Tingle 等人，2003、USEPA，2005)。但芬普尼作為環境用藥或寵物用藥累積於生態系食物鏈中由生產者傳遞至消費者，其對人體的長期危害與對可能的人類或寵物毛細胞之損害的程度、長期暴露對族群聽力的影響等，尚缺進一步探討與長期監測。

第六章

結論

本論文檢視數種模式下的芬普尼對斑馬魚之損傷。並利用斑馬魚行為軌跡追蹤分析技術，檢視系統農藥芬普尼對於成年斑馬魚的運動行為的影響。實驗結果顯示斑馬魚暴露在不同濃度芬普尼的水域環境中，均會顯著降低運動平均距離、運動平均速度。而且隨著系統農藥芬普尼濃度的增加或是浸泡時數的增加，斑馬魚的運動能力也會而呈現逐步降低的趨勢。而成年斑馬魚暴露於芬普尼的水體中，大腦組織的氧化壓力，發炎、與細胞凋亡，與正常處理斑馬魚比較顯著增加。此外，本論文也針對系統農藥芬普尼影響斑馬魚胚胎側線毛細胞發育的現象進行探討，實驗結果顯示系統農藥芬普尼確實會影響並且損傷胚胎側線毛細胞的發育。利用斑馬魚胚胎與成魚的動物模式，未來應該可以作為探討環境系統農藥影響水中生物發育的實驗動物平台。

參考文獻

外文文獻

Badgujar, C., & Bhanage, B. M. (2015). Thermo-chemical energy assessment for production of energy-rich fuel additive compounds by using levulinic acid and immobilized lipase. *Fuel Processing Technology, 138*, 139-146.

Barcellos, H. H., Koakoski, G., Chaulet, F., Kirsten, K. S., Kreutz, L. C., Kalueff, A. V., & Barcellos, L. J. (2018). The effects of auditory enrichment on zebrafish behavior and physiology. *PeerJ, 6*, 51-62.

Bhandiwad, A. A., Zeddies, D. G., Raible, D. W., Rubel, E. W., & Sisneros, J. A. (2013). Auditory sensitivity of larval zebrafish (Danio rerio) measured using a behavioral prepulse inhibition assay. *Journal of Experimental Biology, 216*(18), 3504-3513.

Bobé, A., Coste, C. M., & Cooper, J. (1997). Factors Influencing the Adsorption of Fipronil on Soils. Journal of Agricultural and Food Chemistry, *45*(12), 4861–4865.

Carvalho, T. R., & Giaretta, A. A. (2013). Bioacoustics reveals two new syntopic species of Adenomera Steindachner (Anura: Leptodactylidae: Leptodactylinae) in the Cerrado of central Brazil. *Zootaxa, 3731*(3), 533-551.

Chiu, L. L., Cunningham, L. L., Raible, D. W., Rubel, E. W., & Ou, H. C. (2008). Using the zebrafish lateral line to screen for ototoxicity. *Journal of the Association for Research in Otolaryngol*ogy, *9*(2), 178.

Chua, H. C., & Chebib, M. (2017). $GABA_A$ Receptors and the Diversity in their Structure and Pharmacology. *Advances in Pharmacology, 79*, 1-34.

Clasen, B., Loro, V. L., Cattaneo, R., Moraes, B., Lopes, T., de Avila, L. A., ... & Baldisserotto, B. (2012). Effects of the commercial formulation containing fipronil on the non-target organism Cyprinus carpio: Implications for rice− fish cultivation. *Ecotoxicology and Environmental Safety, 77*, 45-51.

Coffin, A. B., Xu, J., & Uribe, P. M. (2018). Zebrafish hair cell mechanics and physiology through the lens of noise-induced hair cell death. *AIP Conference Proceedings, 1965*(1), 160001-1-160001-8.

Cole, L. M., Nicholson, R. A., & Casida, J. E. (1993). Action of phenylpyrazole insecticides at the GABA-gated chloride channel. *Pesticide Biochemistry and Physiology, 46*(1), 47-54

Colwill, R. M., & Creton, R. (2011). Locomotor behaviors in zebrafish (Danio rerio) larvae. *Behavioural Processes, 86*(2), 222-229.

Fritschy, J. M., & Panzanelli, P. (2014). $GABA_A$ receptors and plasticity of inhibitory neurotransmission in the central nervous system. *European Journal of Neuroscience, 39*(11), 1845-1865.

Gant, D. B., Chalmers, A. E., Wolff, M. A., Hoffman, H. B., & Bushey, D. F. (1998). Fipronil: action at the GABA receptor. *Reviews in Toxicology, 2*(1), 147-156.

Ghysen, A., & Dambly-Chaudiere, C. (2004). Development of the zebrafish lateral line. *Current Opinion in Neurobiology, 14*, 67-73.

Hainzl, D., Cole, L. M., & Casida, J. E. (1998). Mechanisms for selective toxicity of fipronil insecticide and its sulfone metabolite and desulfinyl photoproduct. *Chemical Research in Toxicology, 11*(12), 1529-1535.

He, Z., Guo, L., Shu, Y., Fang, Q., Zhou, H., Liu, Y., ... & Liu, D. (2017). Autophagy protects auditory hair cells against neomycin-induced damage. *Autophagy, 13*(11), 1884-1904.

Hill, A. J., Teraoka, H., Heideman, W., & Peterson, R. E. (2005). Zebrafish as a model vertebrate for investigating chemical toxicity. *Toxicological Sciences, 86*(1), 6-19.

Holder P. J., Jones, A., Tyler, C. R., & Cresswell, J. E. (2018). Fipronil pesticide as a suspect in historical mass mortalities of honey bees. *Proceedings of the National Academy of Sciences, 115*(51), 13033-13038.

Hung, G. Y., Wu, C. L., Chou, Y. L., Chien, C. T., Horng, J. L., & Lin, L. Y. (2019). Cisplatin exposure impairs ionocytes and hair cells in the skin of zebrafish embryos. *Aquatic Toxicology, 209,* 168-177.

Jackson, D., Cornell, C. B., Luukinen, B., Buhl, K., Stone, D. (2009). *Fipronil General Fact Sheet*. National Pesticide Information Center, Oregon State University Extension Services. Retrieved from http://npic.orst.edu/factsheets/fipronil.html.

Kairo, G., Provost, B., Tchamitchian, S., Abdelkader, F. B., Bonnet, M., Cousin, M., ... & Brunet, J. L. (2016). Drone exposure to the systemic insecticide Fipronil indirectly impairs queen reproductive potential. *Scientific Reports, 6*(1), 1-12.

Kalueff, A. V., Gebhardt, M., Stewart, A. M., Cachat, J. M., Brimmer, M., Chawla, J. S., ... & Gaikwad, S. (2013). Towards a comprehensive catalog of zebrafish behavior 1.0 and beyond. *Zebrafish, 10*(1), 70-86.

Khalil, S. R., Mohammed, W. A., Zaglool, A. W., Elhady, W. M., & Farag, M. R. (2019). Inflammatory and oxidative injury is induced in cardiac and pulmonary tissue following fipronil exposure in Japanese quail: mRNA expression of the genes encoding interleukin 6, nuclear factor kappa B, and tumor necrosis factor-alpha. *Environmental pollution, 251,* 564-572.

Kidd, H., & James, D.R. (1991). *The Agrochemicals Handbook*. London, England: Royal Society of Chemistry.

Kim, Y. J., Nam, R. H., Yoo, Y. M., & Lee, C. J. (2004). Identification and functional evidence of GABAergic neurons in parts of the brain of adult zebrafish (Danio rerio). *Neuroscience letters, 355*(1-2), 29-32.

Kindt, K. S., & Sheets, L. (2018). Transmission disrupted: modeling auditory synaptopathy in zebrafish. *Frontiers in cell and developmental biology, 6*, 114.

Lieschke, G. J., & Currie, P. D. (2007). Animal models of human disease: zebrafish swim into view. *Nature Reviews Genetics, 8*(5), 353-367.

Lin, L. Y., Horng, J. L., Kunkel, J. G., & Hwang, P. P. (2006). Proton pump-rich cell secretes acid in skin of zebrafish larvae. *American Journal of Physiology-Cell Physiology, 290*(2), C371-C378.

McCarroll, M. N., Gendelev, L., Kinser, R., Taylor, J., Bruni, G., Myers-Turnbull, D., ... & Gong, J. H. (2019). Zebrafish behavioural profiling identifies GABA and serotonin receptor ligands related to sedation and paradoxical excitation. *Nature Communications, 10*(1), 1-14.

Michel, V., Booth, K. T., Patni, P., Cortese, M., Azaiez, H., Bahloul, A., ... & Dégardin, J. (2017). CIB2, defective in isolated deafness, is key for auditory hair cell mechanotransduction and survival. *EMBO Molecular Medicine, 9*(12), 1711-1731.

Monesson-Olson B., McClain, JJ., Case, A. E., Dorman, H.E., Turkewitz, D.R., et al. (2018) Expression of the eight $GABA_A$ receptor α subunits in the developing zebrafish central nervous system. *PLOS ONE* 13(4): e0196083.

Narahashi, T., Zhao, X., Ikeda, T., Nagata, K., & Yeh, J. Z. (2007). Differential actions of insecticides on target sites: basis for selective toxicity. *Human & Experimental Toxicology, 26*(4), 361-366.

Narahashi, T., Zhao, X., Ikeda, T., Salgado, V. L., & Yeh, J. Z. (2010). Glutamate-activated chloride channels: unique fipronil targets present in insects but not in mammals. *Pesticide Biochemistry and Physiology, 97*(2), 149-152.

Organisation for Economic Co-operation and Development [OECD] (1992). *Test guideline No. 203: Fish, acute toxicity test.* Archives of OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2. OECD Publishing, Paris.

Ou, H. C., Raible, D. W., & Rubel, E. W. (2007). Cisplatin-induced hair cell loss in zebrafish (Danio rerio) lateral line. *Hearing Research, 233*(1-2), 46-53.

Ou, H., Simon, J. A., Rubel, E. W., & Raible, D. W. (2012). Screening for chemicals that affect hair cell death and survival in the zebrafish lateral line. *Hearing Research, 288*(1-2), 58-66.

Owens, K. N., Cunningham, D. E., Macdonald, G., Rubel, E. W., Raible, D. W., Pujol,

R. (2007). Ultrastructural analysis of aminoglycoside-induced hair cell death in the zebrafish lateral line reveals an early mitochondrial response. *The Journal of Comparative Neurology, 502*, 522-543.

Park, H., Leeb, J. Y., Park, S., Song, G., Lim, Y. (2020). Developmental toxicity of fipronil in early development of zebrafish (Danio rerio) larvae: Disrupted vascular formation with angiogenic failure and inhibited neurogenesis. *Journal of Hazardous Materials, 385*, 121531.

Qian, Y., Wang, C., Wang, J., Zhang, X., Zhou, Z., Zhao, M., & Lu, C. (2017). Fipronil-induced enantioselective developmental toxicity to zebrafish embryo-larvae involves changes in DNA methylation. *Scientific Reports, 7*(1), 1-11.

Ramaswamy, M., Cheng, R. K., & Jesuthasan, S. (2020). Identification of GABAergic neurons innervating the zebrafish lateral habenula. *European Journal of Neuroscience, 00,* 1–11.

Rico, E. P., Rosemberg, D. B., Seibt, K. J., Capiotti, K. M., Da Silva, R. S., & Bonan, C. D. (2011). Zebrafish neurotransmitter systems as potential pharmacological and toxicological targets. *Neurotoxicology and Teratology, 33*(6), 608-617.

Roques, B. B., Leghait, J., Lacroix, M. Z., Lasserre, F., Pineau, T., Viguie, C., & Martin, P. G. (2013). The nuclear receptors pregnane X receptor and constitutive androstane receptor contribute to the impact of fipronil on hepatic gene expression linked to thyroid hormone metabolism. *Biochemical pharmacology, 86*(7), 997-1039.

Rybak, L. P., & Ramkumar, V. (2007). Ototoxicity. *Kidney International, 72*(8), 931-935.

Stehr, C. M., Linbo, T. L., Incardona, J. P., & Scholz, N. L. (2006). The developmental neurotoxicity of fipronil: notochord degeneration and locomotor defects in zebrafish embryos and larvae. *Toxicological Sciences, 92*(1), 270-278.

Teixeira, F. P., Viader-Llargués, O., Torres-Mejía, E., ... & López-Schier, H. (2015). Inexhaustible hair-cell regeneration in young and aged zebrafish. *Biology Open*, *4*: 903-909.

Tingle, C. C., Rother, J. A., Dewhurst, C. F., Lauer, S., & King, W. J. (2003). Fipronil: environmental fate, ecotoxicology, and human health concerns. In G. W. Ware (Eds.), *Reviews of environmental contamination and toxicology* (Vol. 176, pp. 1-66). New York, NY: Springer.

Tong, Q. L., Fan, Z. F., Yang, J. W., Li, Q., Chen, Y. X., Cheng, M. S., & Liu, Y. (2019). The selective oxidation of sulfides to sulfoxides or sulfones with hydrogen peroxide catalyzed by a dendritic phosphomolybdate hybrid. *Catalysts*, *9*(10), 791.

Trump, V., W. J., & McHenry, M. J. (2008). The morphology and mechanical sensitivity of lateral line receptors in zebrafish larvae (Danio rerio). *Journal of Experimental Biology*, *211*(13), 2105-2115.

United States Environmental Protection Agency (2005). *Section 18 Ecological Risk Assessment for Fipronil Use to Control Cabbage–Maggot in Turnip and Rutabaga.* Washington, D.C.

Vidau, C., González-Polo, R. A., Niso-Santano, M., Gómez-Sánchez, R., Bravo-San Pedro, J. M., Pizarro-Estrella, E., ... & Fuentes, J. M. (2011). Fipronil is a powerful uncoupler of oxidative phosphorylation that triggers apoptosis in human neuronal cell line SHSY5Y. *NeuroToxicology*, *32(*6), 935-943.

Wang, C., Qian, Y., Zhang, X., Chen, F., Zhang, Q., Li, Z., & Zhao, M. (2016). A metabolomic study of fipronil for the anxiety-like behavior in zebrafish larvae at environmentally relevant levels. *Environmental Pollution*, *211*, 252-258.

Wang, X., Martínez, M. A., Wu, Q., Ares, I., Martinez-Larranaga, M. R., Anadón, A., & Yuan, Z. (2016). Fipronil insecticide toxicology: oxidative stress and metabolism. *Critical Reviews in Toxicology*, *46*(10), 876-899.

Wangemann, P. (2006). Supporting sensory transduction: Cochlear fluid homeostasis and the endocochlear potential. T*he Journal of Physiology*, *576*, 11-21.

Warchol, M. E. (2010). Cellular mechanisms of aminoglycoside ototoxicity. *Current opinion in otolaryngology & head and neck surgery*, *18*(5), 454-458.

Westerfield, M. (1995). *The Zebrafish Book: A guide for the laboratory use of zebrafish (Danio rerio).* Oregon: University of Oregon Press.

Weston, D. P., & Lydy, M. J. (2014). Toxicity of the insecticide fipronil and its degradates to benthic macroinvertebrates of urban streams. *Environmental Science & Technology*, *48*(2), 1290-1297.

Williams, J. A. & Holder, N. (2000). Cell turnover in neuromasts of zebrafish larvae. *Hear. Res*. 143, 171-181.

Whitfield, T. T. (2002). Zebrafish as a model for hearing and deafness. *Journal of Neurobiology*, *53*(2), 157-171.

Wu, C. H., Lin, C. L., Wang, S. E., & Lu, C. W. (2020). Effects of imidacloprid, a neonicotinoid insecticide, on the echolocation system of insectivorous bats. *Pesticide biochemistry and physiology*, *163*, 94-101.

Wu, J., Lu, J., Lu, H., Lin, Y., & Wilson, P. C. (2015). Occurrence and ecological risks from fipronil in aquatic environments located within residential landscapes. *Science of the Total Environment*, *518*, 139-147.

Zhang, B., Xu, Z., Zhang, Y., Shao, X., Xu, X., Cheng, J., & Li, Z. (2015). Fipronil induces apoptosis through caspase-dependent mitochondrial pathways in Drosophila S2 cells. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, *119*, 81-89.

中文文獻

行政院農業委員會（2015）。**公告「限制 4.95% 芬普尼水懸劑之使用方法及其範圍」**。取自 https://www.baphiq.gov.tw/ws.php?id=12905

吳東川（2018）。***Glycine 和 GABA$_A$ 受體上保守型色氨酸及其相鄰區域：在受體調節和中樞神經系統內突觸抑制中的作用***。科技部補助專題研究計畫成果報告（編號：MOST 104-2320-B-039-045-MY3），未出版。

吳庭青、高啟蘭、黃婉翠、陳立羣（2017 年 9 月 30 日）。Gentamicin 同時造成耳與腎毒性的案例討論。**藥學雜誌電子報**。取自 https://jtp.taiwan-pharma.org.tw/132/073-078.html

吳蕙如（2013）。**以斑馬魚胚胎評估半導體廢水之生物毒性**（未出版之碩士論文）。國立交通大學，新竹市。

林孟汝（2017 年 8 月 22 日）。芬普尼小百科。**Yahoo 奇摩理財網**。取自 https://tw.money.yahoo.com/%E8%8A%AC%E6%99%AE%E5%B0%BC%E5%B0%8F%E7%99%BE%E7%A7%91-033323090.html

張珍珍（2018）。氟蟲腈的危害及其在禽蛋中殘留檢測方法。**河北農業**，9，859-884。

彭蘊如、韋英杰、丁永芳、段金廒（2017）。基於斑馬魚模型的藥物毒性研究進展與中藥毒性研究新策略。**中草藥**，48(1)，17-30。

廖常凱、邱彥璋（2012）。以斑馬魚生理變化偵測水中毒性物質技術研發。**農政與農情**，236，76-78。

鄒宜玲（2013）。**順鉑對班馬魚仔魚側線毛細胞和皮膚離子細胞之影響**（未出版之碩士論文）。國立臺灣師範大學，臺北市。

附錄

實驗圖表

表 1 實驗使用抗體

抗體名稱	稀釋倍數	分子量 kDa	抗體來源	供應廠商
SOD2	1:1500	28	rabbit	Millipore
Caspase-3	1:500	17-35	rabbit	Cell-s
iNOS	1:500	130	rabbit	Cell-s
β-tubuilin	1:3000	50	rabbit	Abcam
Dopamin βHydrolease	1:5000	69	rabbit	Gene Tex
TNF-a	1:500	35	mouse	Santa-C
PARP	1:1500	80	rabbit	Cell-s
GAPDH	1:1000	45	rabbit	Cell-s

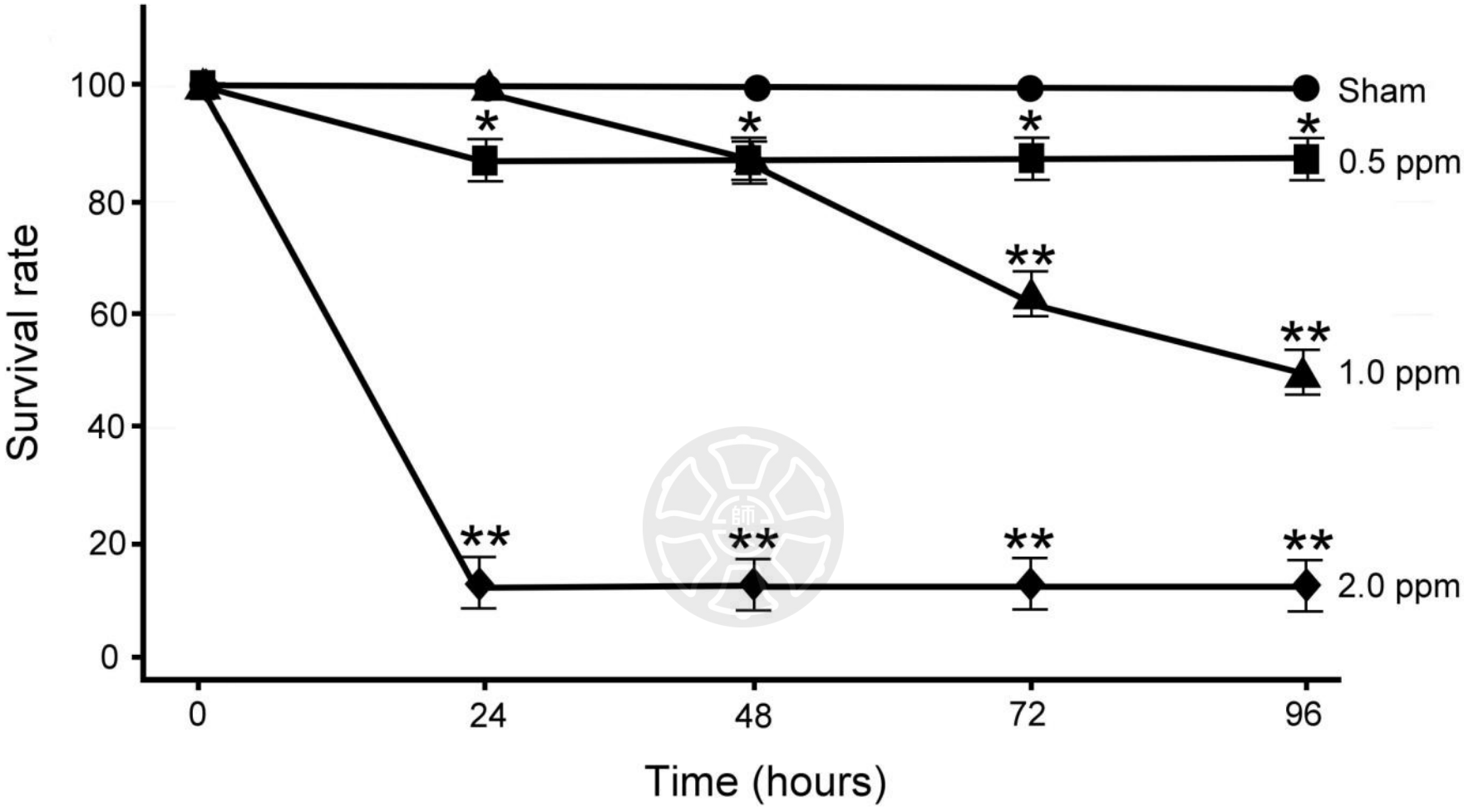

Survival rate
100
80
60
40
20
0
0
24
48
72
96
Time (hours)
Sham
0.5 ppm
1.0 ppm
2.0 ppm
*
**

圖 1　斑馬魚成魚浸泡在含有芬普尼水域環境的存活率變化

不同濃度芬普尼(0, 0.5, 1.0, 2.0 ppm)投予後第 24、48、72 和 96 小時記錄斑馬魚之平均存活率，結果顯示在含 2.0 ppm 芬普尼的水域中，第 24 小時紀錄斑馬魚存活率只有剩下 10%；在含 1.0 ppm 芬普尼的水域中，斑馬魚存活率則逐步遞減，第 96 小時紀錄斑馬魚存活率只剩 50%；在含 0.5 ppm 芬普尼的水域中，從 24 至 96 小時紀錄斑馬魚存活率均為 90%；在乾淨水域中(sham 組)的斑馬魚存活率則均維持在 100%。平均樣本數=3，實驗數值以平均值±平均值標準誤差(standard error of the mean, SEM)表示，且用且單因子變異數檢定，以及 Student-Newman-Keuls 多重差距檢定來分析是否有顯著誤差，**代表顯著誤差 $P<0.01$，*代表顯著誤差 $P<0.05$。

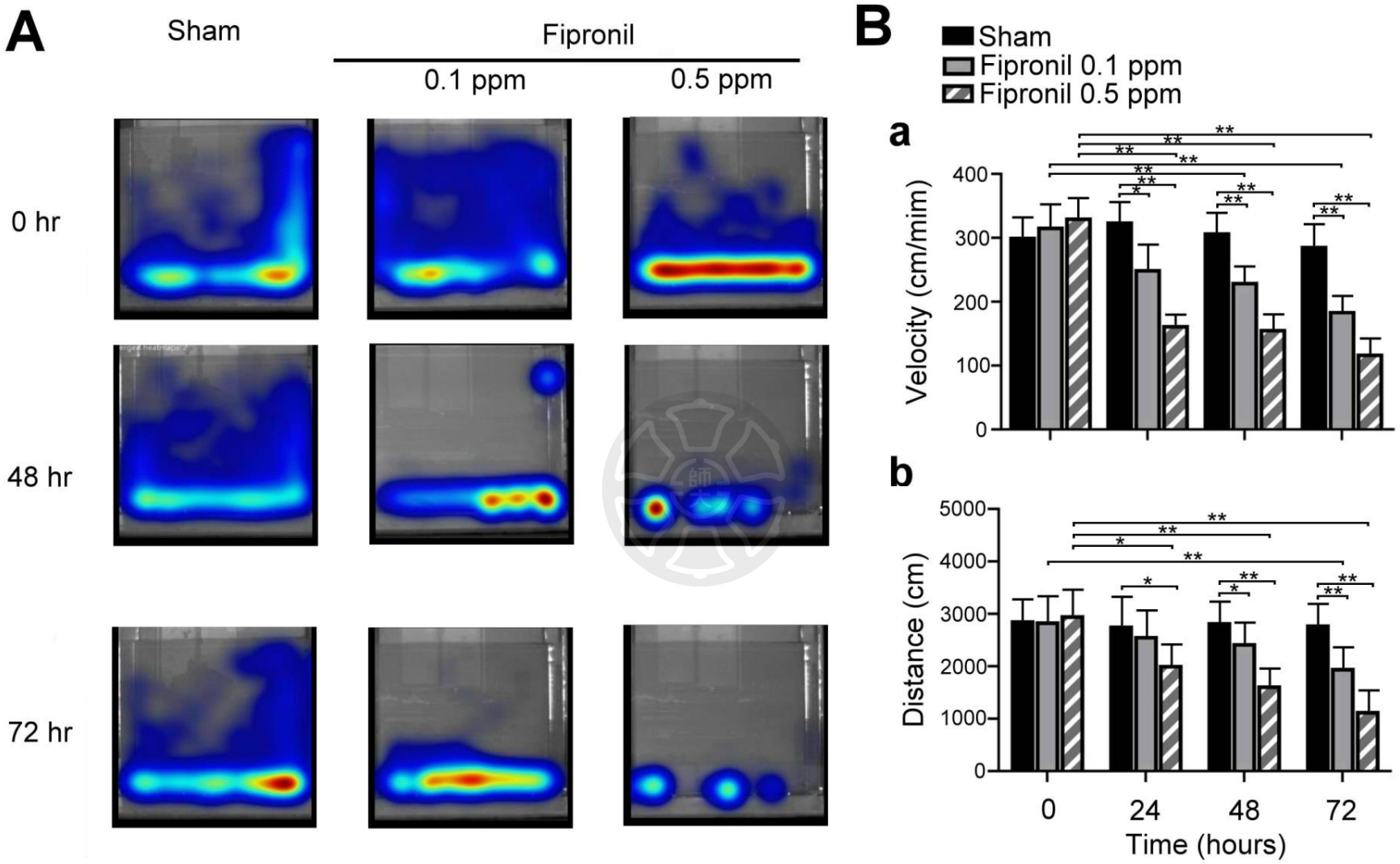

A
Sham
Fipronil
0.1 ppm
0.5 ppm
0 hr
48 hr
72 hr
B
Sham
Fipronil 0.1 ppm
Fipronil 0.5 ppm
a
Velocity (cm/mim)
400
300
200
100
0
b
Distance (cm)
5000
4000
3000
2000
1000
0
0
24
48
72
Time (hours)

圖 2　斑馬魚成魚浸泡在不同濃度芬普尼水域環境的運動改變

圖 A：單一斑馬魚在乾淨水域(sham 組)；與含有 0.1 與 0.5 ppm 芬普尼的水域環境中處理 0、48、72 小時後的運動軌跡熱點圖，每組斑馬魚運動軌跡的分析時間為 10 分鐘。圖 B：實驗統計結果顯示斑馬魚的(a)運動平均速度、(b)運動平均距離。從第 24 小時開始，在乾淨水域(Sham)數值均為最佳；而在含有芬普尼的水域環境則隨著濃度增加而顯著遞減。平均樣本數=5，實驗數值以平均值±平均值標準誤差(SEM)表示，且用且單因子變異數檢定，以及 Student-Newman-Keuls 多重差距檢定來分析是否有顯著誤差，**代表顯著誤差 $P<0.01$，*代表顯著誤差 $P<0.05$。

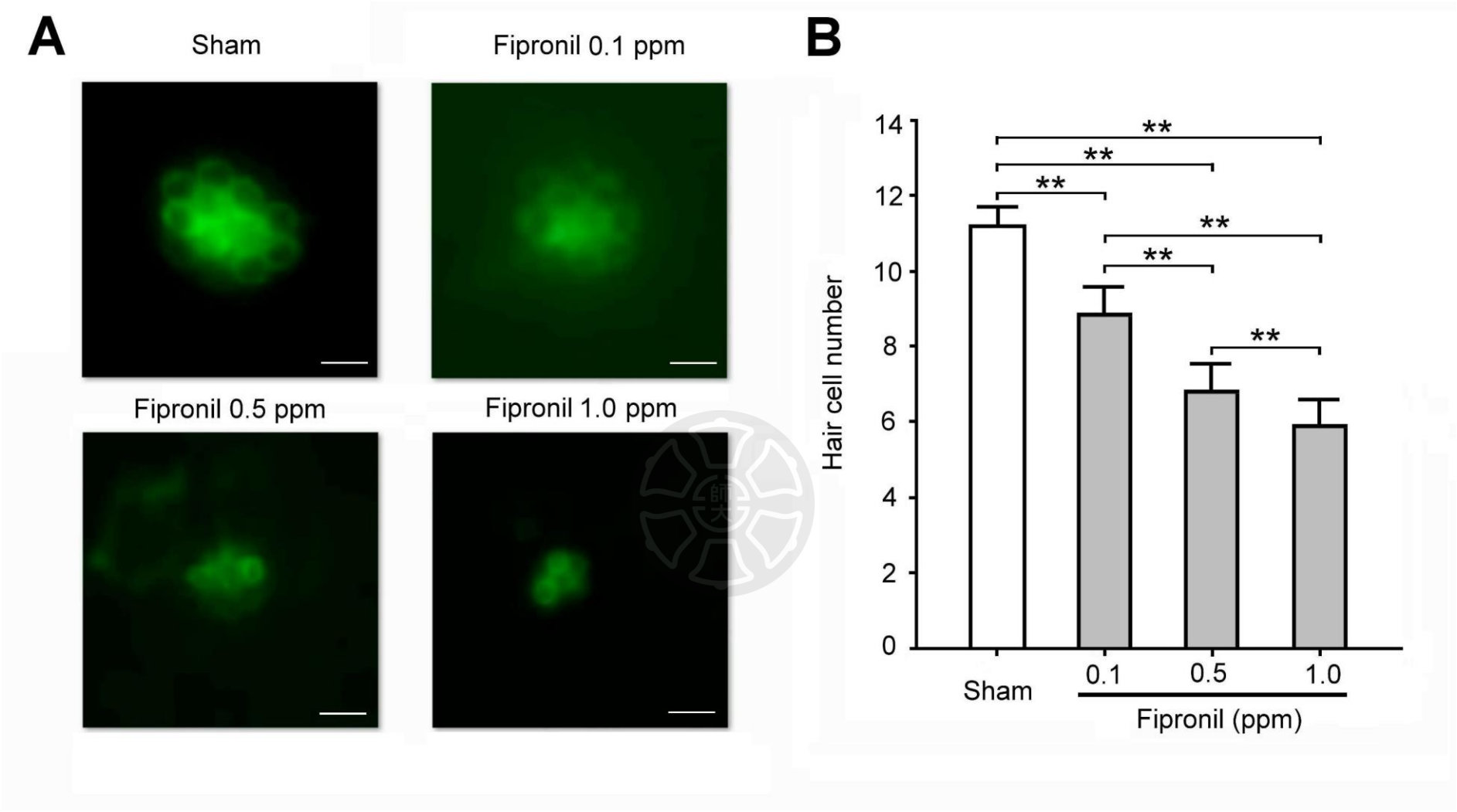
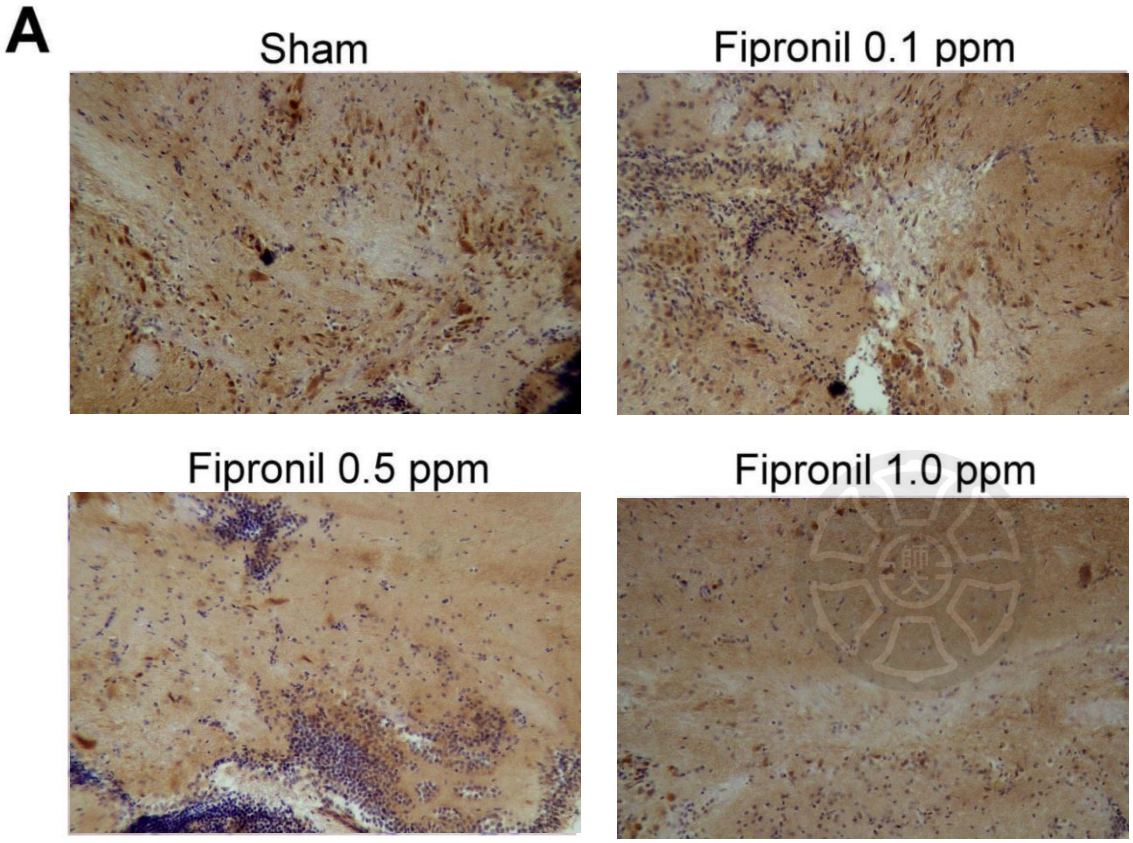

A
Sham
Fipronil 0.1 ppm
Fipronil 0.5 ppm
Fipronil 1.0 ppm
B
Hair cell number
14
12
10
8
6
4
2
0
**
Sham
0.1
0.5
1.0
Fipronil (ppm)

圖 3　斑馬魚胚胎浸泡在含有芬普尼水域環境的側線毛細胞變化

圖 A：單一斑馬魚胚胎在乾淨水域(sham 組)；與含有 0.1、 0.5 與 1.0 ppm 芬普尼的水域環境中處理 12 小時後，利用 FM_{1-43} 染色的側線毛細胞螢光影像。圖 B：實驗統計結果顯示斑馬魚胚胎的側線毛細胞數目，在乾淨水域(Sham)數值均為最佳；而在含有芬普尼的水域環境則隨著濃度增加而側線毛細胞數目顯著遞減。平均樣本數=3，實驗數值以平均值±平均值標準誤差(SEM)表示，且用且單因子變異數檢定，以及 Student-Newman-Keuls 多重差距檢定來分析是否有顯著誤差，**代表顯著誤差 $P<0.01$。


A
Sham
Fipronil 0.1 ppm
Fipronil 0.5 ppm
Fipronil 1.0 ppm

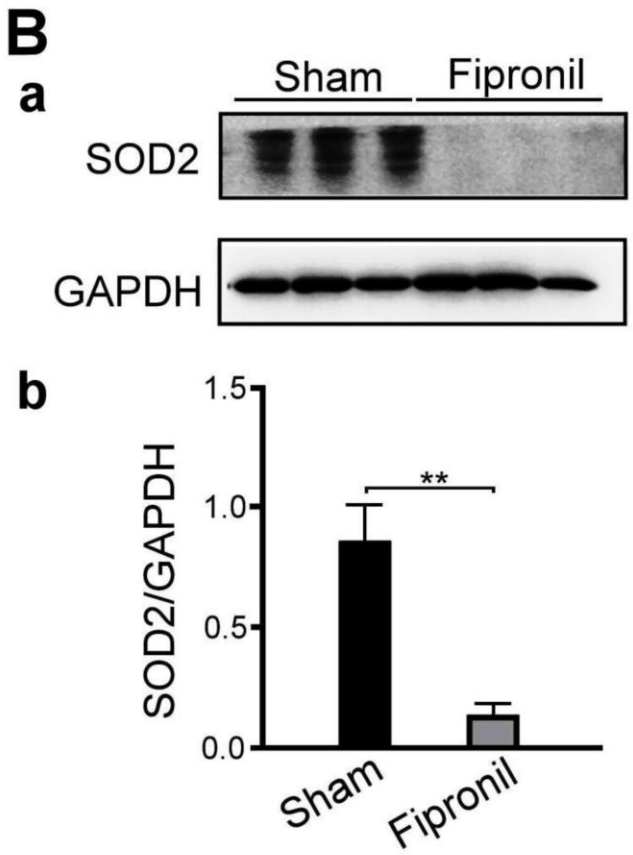

B
a
Sham
Fipronil
SOD2
GAPDH
b
SOD2/GAPDH
1.5
1.0
0.5
0.0
**
Sham
Fipronil

圖 4　斑馬魚成魚浸泡在含有芬普尼水域環境後腦組織的氧化壓力表現

圖 A：單一斑馬魚在乾淨水域(sham 組)、以及含有 0.1、 0.5 與 1.0 ppm 芬普尼的水域環境中處理 12 小時後的腦組織抗氧化壓力相關的超氧化物歧化酶-2 蛋白(Superoxide dismutase 2, SOD2)表現，結果顯示芬普尼實驗處理組腦組織的 SOD2 蛋白表現較正常控制組明顯減弱，刻度線長度＝30μm。圖 B：利用西方墨點法分析實驗結果顯示：芬普尼實驗處理組腦組織的 SOD2 蛋白表現較正常控制組明顯減弱；統計分析結果顯示：實驗處理組斑馬魚腦組織的 SOD2 蛋白平均表現值較正常控制組(Sham)顯著減少。平均樣本數=3，實驗數值以平均值±平均值標準誤差(SEM)表示，且用且單因子變異數檢定，以及 Student-Newman-Keuls 多重差距檢定來分析是否有顯著誤差，**代表顯著誤差 $P<0.01$。

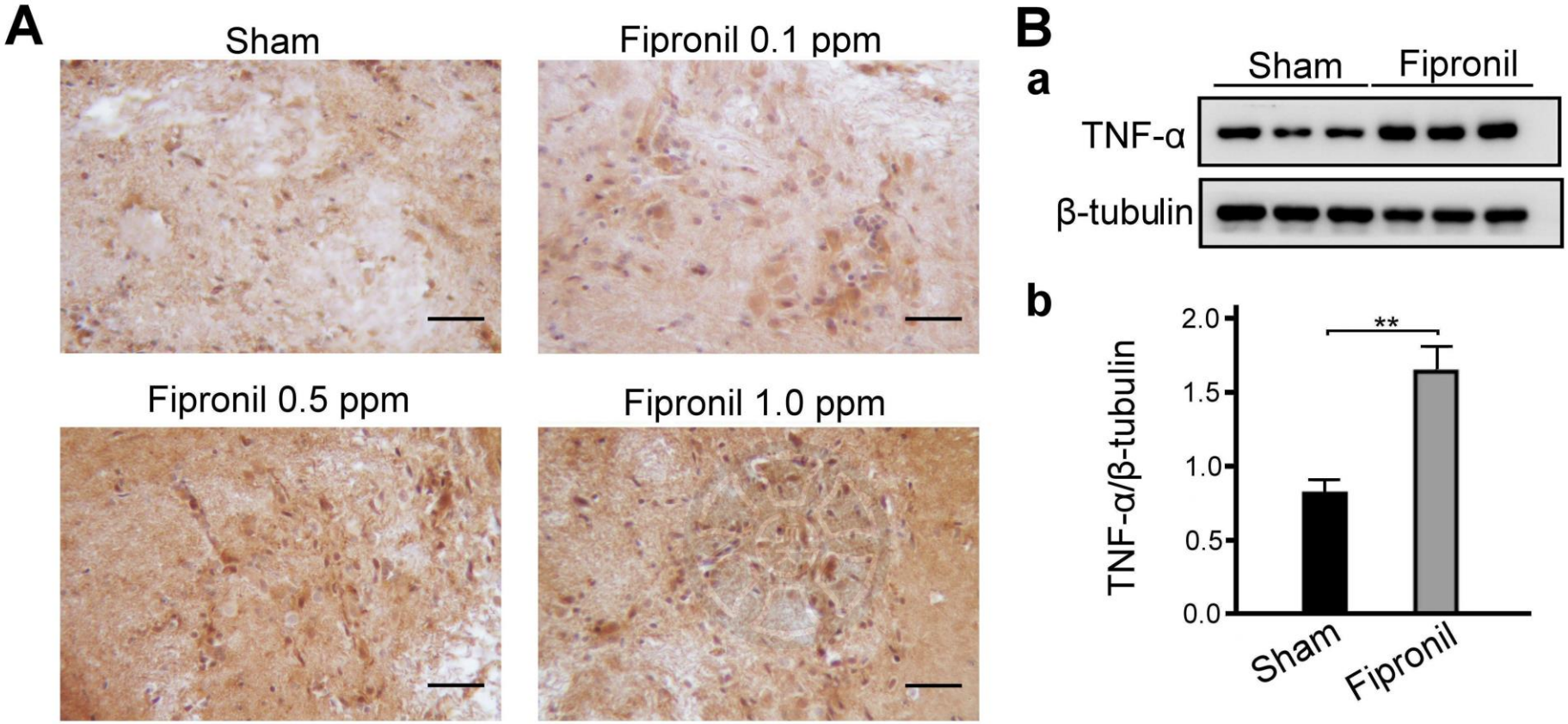
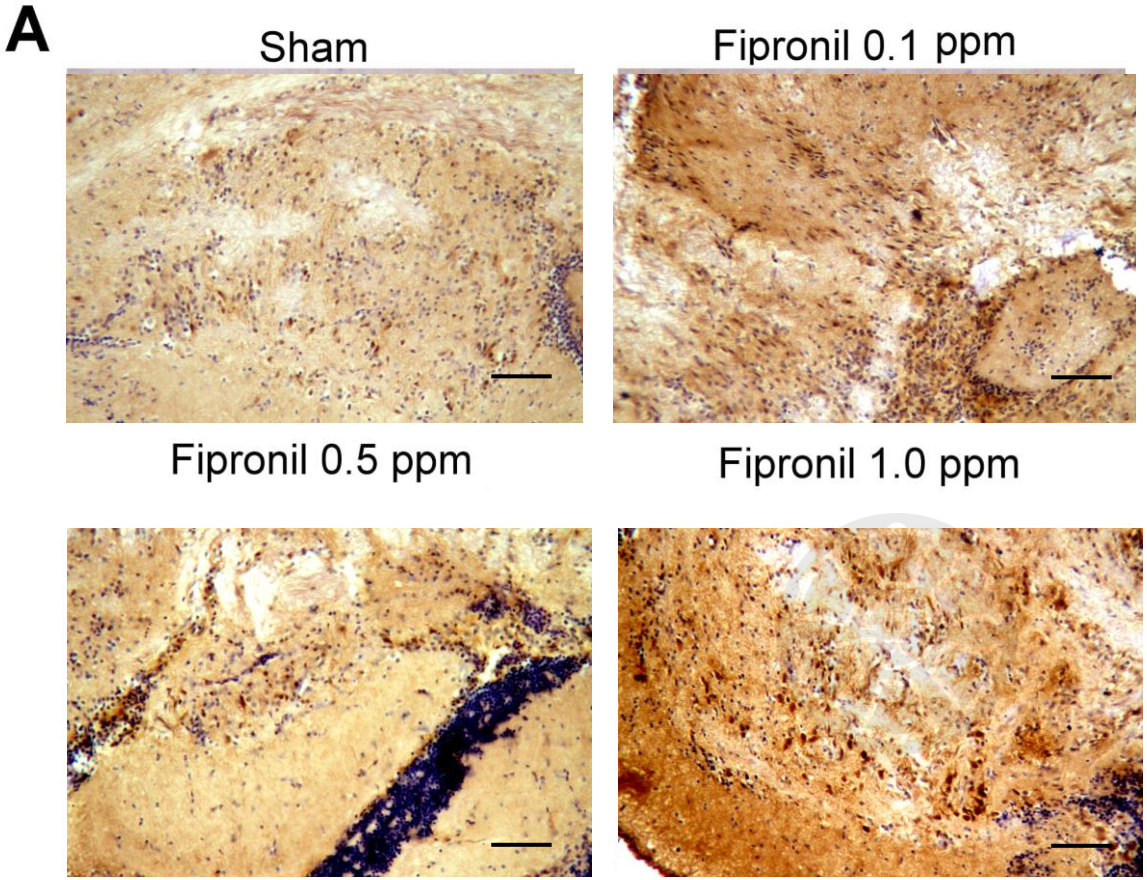

A
Sham
Fipronil 0.1 ppm
Fipronil 0.5 ppm
Fipronil 1.0 ppm
B
a
Sham
Fipronil
TNF-α
β-tubulin
b
TNF-α/β-tubulin
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
**
Sham
Fipronil

圖 5　斑馬魚成魚浸泡在含有芬普尼水域環境後腦組織的發炎作用表現

圖 A：單一斑馬魚在乾淨水域(sham 組)、以及含有 0.1、 0.5 與 1.0 ppm 芬普尼的水域環境中處理 12 小時後的腦組織發炎相關的腫瘤壞死因子 α(TNFα)蛋白表現，結果顯示芬普尼實驗處理組腦組織的 TNFα 蛋白表現較正常控制組明顯增強，刻度線長度＝30μm。圖 B：利用西方墨點法分析實驗結果顯示：芬普尼實驗處理組腦組織的 TNFα 蛋白表現較正常控制組明顯增強；統計分析結果顯示：實驗處理組斑馬魚腦組織的 TNFα 蛋白平均表現值較正常控制組(Sham)顯著增強。平均樣本數=3，實驗數值以平均值±平均值標準誤差(SEM)表示，且用且單因子變異數檢定，以及 Student-Newman-Keuls 多重差距檢定來分析是否有顯著誤差，**代表顯著誤差 $P<0.01$。


A
Sham
Fipronil 0.1 ppm
Fipronil 0.5 ppm
Fipronil 1.0 ppm

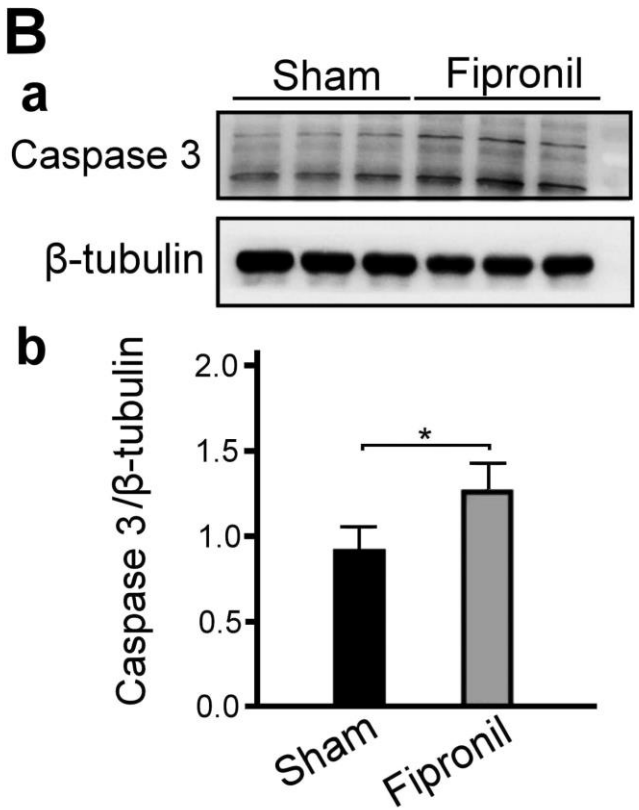

B
a
Sham
Fipronil
Caspase 3
β-tubulin
b
Caspase 3/β-tubulin
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
*
Sham
Fipronil

圖 6　斑馬魚成魚浸泡在含有芬普尼水域環境後腦組織的細胞凋亡表現

圖 A：單一斑馬魚在乾淨水域(sham 組) 、以及含有 0.1、 0.5 與 1.0 ppm 芬普尼的水域環境中處理 12 小時後的腦組織細胞凋亡相關的半胱天冬酶原 3 (Caspase 3)蛋白表現，結果顯示芬普尼實驗處理組腦組織的 Caspase 3 蛋白表現較正常控制組明顯增強，刻度線長度＝30μm。圖 B：利用西方墨點法分析實驗結果顯示：芬普尼實驗處理組腦組織的 Caspase 3 蛋白表現較正常控制組明顯增強；統計分析結果顯示：實驗處理組斑馬魚腦組織的 Caspase 3 蛋白平均表現值較正常控制組(Sham)顯著增強。平均樣本數=3，實驗數值以平均值±平均值標準誤差(SEM)表示，且用且單因子變異數檢定，以及 Student-Newman-Keuls 多重差距檢定來分析是否有顯著誤差，*代表顯著誤差 $P<0.05$。

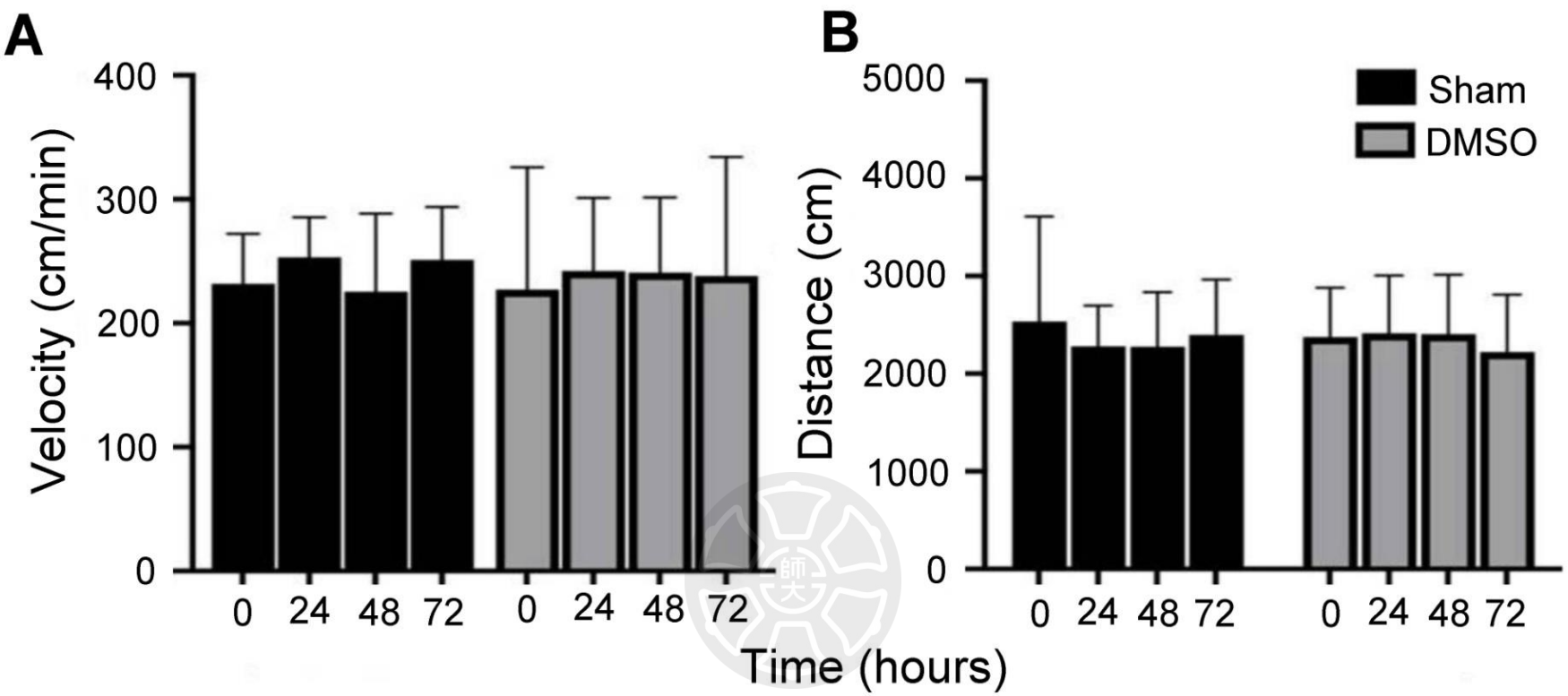

A
B
Velocity (cm/min)
400
300
200
100
0
Distance (cm)
5000
4000
3000
2000
1000
0
Sham
DMSO
0 24 48 72 0 24 48 72
0 24 48 72 0 24 48 72
Time (hours)

圖 7　斑馬魚成魚浸泡在含有 DMSO 水域環境後不會改變運動表現

實驗統計結果顯示斑馬魚在乾淨水域(sham 組)；與含有 DMSO (0.1 ppm)的水域環境中處理 0、48、72 小時後的運動(A)平均速度、(B)平均距離。結果顯示斑馬魚不論在乾淨水域，或是含有 DMSO 的水域環境中，運動平均速度與平均距離表現均無顯著差異(P>0.05)。平均樣本數=5，實驗數值以平均值±平均值標準誤差(SEM)表示，且用且單因子變異數檢定，以及 Student-Newman-Keuls 多重差距檢定來分析是否有顯著誤差。

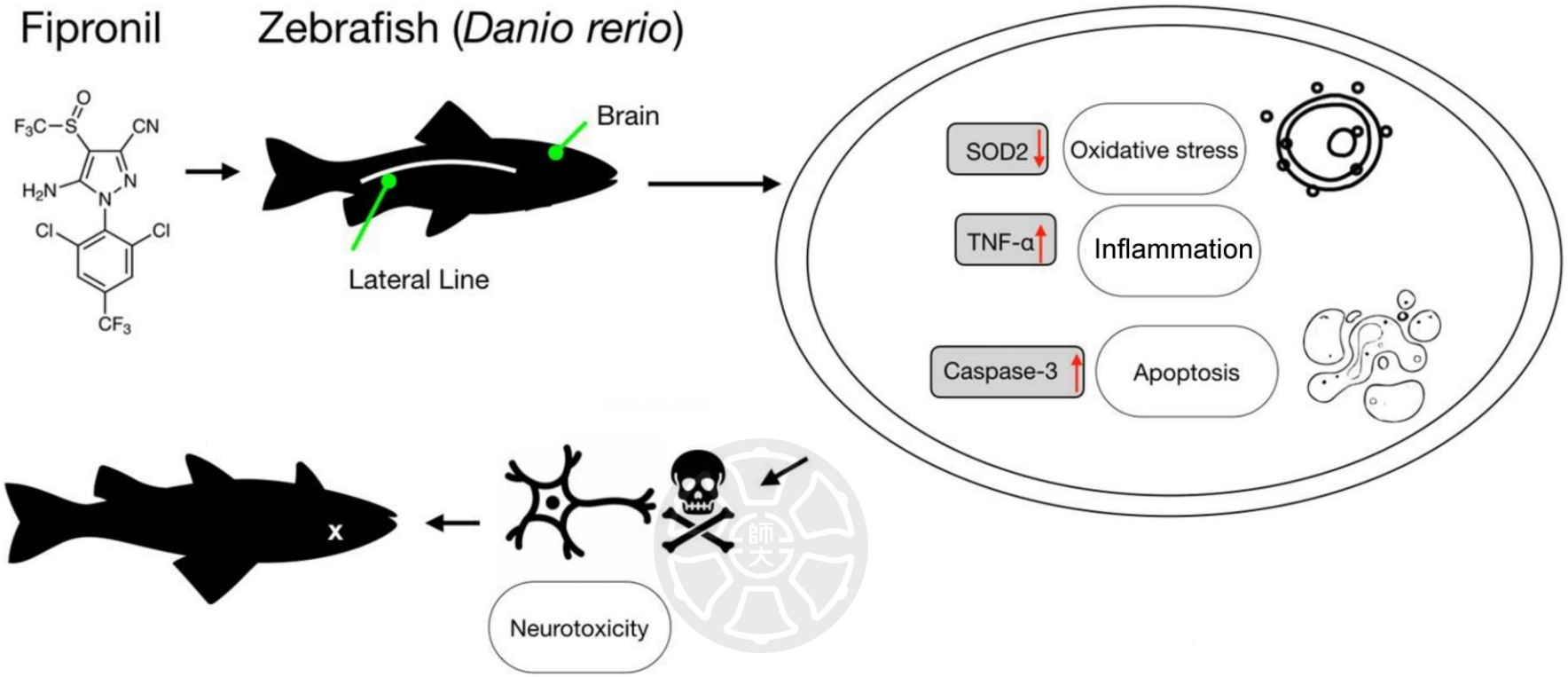

Fipronil
Zebrafish (Danio rerio)
Brain
Lateral Line
SOD2
Oxidative stress
TNF-α
Inflammation
Caspase-3
Apoptosis
Neurotoxicity

圖 8　系統農藥芬普尼誘發斑馬魚腦組織損傷的可能分子機制

斑馬魚會因為芬普尼實驗處理造成腦組織產生氧化壓力(oxidative stress)、發炎作用(inflammation)、以及細胞凋亡(apoptosis)，這結果說明利用芬普尼實驗處理斑馬魚的動物模式，未來應該可以作為探討系統農藥相關研究的實驗動物平台。