

**科技部補助**  
**大專學生研究計畫研究成果報告**

計 畫 名 稱	： 利用動物模式探討南非葉萃取物對聽覺毛細胞之保護作用
------------	-----------------------------

執行計畫學生：楊馥安

學生計畫編號：MOST 107-2813-C-040-040-B

研究期間：107年07月01日至108年02月28日止，計8個月

指導教授：楊建洲

處理方式：本計畫涉及專利或其他智慧財產權，2年後可公開查詢

執行單位：中山醫學大學生物醫學科學學系（所）

中華民國 108年04月01日

## (一)摘要

胺基糖苷類抗生素在臨床上主要被用於治療需氧革蘭氏陰性桿菌的感染、結核桿菌的感染，但是這種抗生素經常導致許多的副作用包含耳毒性、腎毒性還有神經肌肉阻斷，而其中耳毒性包括內耳毛細胞損傷，嚴重甚至會導致聽力損失。斑馬魚的側線毛細胞是一種機械性接受器，與哺乳動物的內耳毛細胞功能以及構造相似。為了找出能保護毛細胞免受破壞的藥物，我們利用先前本實驗室所建立的阿魏酸(Ferulic acid)耳毒性保護試驗為基礎，對藥用植物—扁桃斑鳩菊(*Vernonia amygdalina*)做試驗。耳毒性保護試驗的結果發現受精後四天大之斑馬魚經扁桃斑鳩菊葉水萃取物前處理的情況下，其側線毛細胞會受到保護而免受耳毒性藥物的損傷。我們利用兩種不同水萃取方式的扁桃斑鳩菊葉水萃取物進一步做試驗，結果顯示兩種萃取方式的保護效果差異不大；而在斑馬魚行為分析的部分，兩種萃取物試驗的結果趨勢也是一致的。因此，我們認為只要是使用水萃取的扁桃斑鳩菊葉，其保護毛細胞免受破壞的效果是沒有太大差異的。

## (二)前言

近年來，斑馬魚(zebrafish, *Danio rerio*)成為醫學研究上常用的一種模式生物，其具有許多研究上的優勢，如：體型小、單次產卵數量眾多、胚胎發育期短、透明胚胎方便觀察，而被廣泛利用於各種研究。斑馬魚內耳聽覺毛細胞及側線毛細胞在發育、構造型態及功能皆與哺乳動物相似，其屬於一種機械性接受器，負責偵測外在水流的振動。胺基糖苷類抗生素是臨床上一種常見的耳毒性藥物，主要用於治療細菌性之感染，但易誘發耳毒性而導致聽力損傷之副作用。先前本實驗室利用基因轉殖魚做藥物阿魏酸(Ferulic acid)耳毒性保護試驗，結果顯示阿魏酸(Ferulic acid)可有效保護毛細胞免受新黴素的破壞，因此，我們想要找出更多能使毛細胞免受耳毒性藥物損傷之保護性藥物，藉由文獻資料找到藥用植物—扁桃斑鳩菊(*Vernonia amygdalina*)，被研究證實具有藥理作用，其中包含抗氧化之作用。初步耳毒性保護試驗的結果顯示受精後四天大之斑馬魚經扁桃斑鳩菊水萃取物前處理的情況下，其側線毛細胞會受到保護而免受新黴素耳毒性藥物的損傷。因此本研究計畫主要目的是將探討不同萃取方式同樣對斑馬魚進行試驗，比較其保護效果，並進一步探討藥物作用機制及斑馬魚行為之影響。

## (三)研究目的

胺基糖苷類抗生素(如：新黴素、鏈黴素和卡那黴素等)在臨床上為一種常見的耳毒性藥物，主要被用於治療需氧革蘭氏陰性桿菌的感染、結核桿菌的感染以及綠膿桿

菌的感染，其在臨床用藥上易誘發耳毒性而造成毛細胞損傷導致永久性的聽力受損。斑馬魚和人類的基因體具有高度的同源性，其中斑馬魚內耳的聽覺毛細胞在發育、構造型態以及聽覺功能皆具有高度保留性。斑馬魚的側線系統的感覺器官--神經丘，其內的毛細胞與內耳的毛細胞相似，其毛細胞為一種機械性接受器，在功能上類似於哺乳動物內耳毛細胞，負責偵測外在水流的振動，因此本實驗將以斑馬魚作為抗生素耳毒性保護藥物測試的模式動物。先前本實驗室利用 Tol2 基因轉殖系統建立一個毛細胞螢光斑馬魚品系 Tg(pvalb3b:TagGFP)，其專一性在內耳聽斑及側線神經叢的毛細胞表現綠色螢光蛋白，並利用其基因轉殖魚做藥物阿魏酸(Ferulic acid)耳毒性保護試驗，結果顯示阿魏酸(Ferulic acid)可有效保護毛細胞免受新黴素的破壞，且斑馬魚對於外界環境的刺激仍具有高度的敏感度。本實驗室希望將此模式作為一個藥物篩選平台以快速篩選可預防耳毒性聽力缺失的藥物。透過文獻資料發現，扁桃斑鳩菊已被證明為一種抗氧化物，具有抗氧化活性，降低細胞內的活性氧化物質含量，防止細胞氧化，進而抑制細胞凋亡之現象。我也同樣透過 Tol 2 基因轉殖系統建立以專一性啟動子 pvalb3b 表現 TagGFP 融合基因之轉殖基因斑馬魚作為模式生物，觀察斑馬魚側線毛細胞螢光蛋白之表現，以確認扁桃斑鳩菊之水萃取物是否可減緩新黴素的耳毒性傷害。初步耳毒性保護試驗的結果顯示受精後四天大之斑馬魚胚胎經扁桃斑鳩菊水萃取物前處理的情況下，其側線毛細胞會受到扁桃斑鳩菊水萃取物的保護而免受新黴素耳毒性藥物的損傷。利用計數斑馬魚側線固定六點之毛細胞總數作為統計數值，以及萃取物之濃度梯度，進一步找出可保護毛細胞免受新黴素的耳毒性傷害之最佳濃度。我們利用兩種不同方式萃取出扁桃斑鳩菊葉之萃取物，欲得知扁桃斑鳩菊葉不同之萃取方式，對於斑馬魚側線毛細胞之耳毒性傷害的保護效果是否相同。期望未來此藥用植物能被做後續一系列的動物實驗，還有人體試驗，最後應用於預防及治療人類耳毒性聽力缺失相關的疾病，對臨床醫學應用有所貢獻。

#### (四)研究問題

- 1.利用扁桃斑鳩菊葉片之水萃取物進行斑馬魚之抗生素耳毒性保護藥物試驗。
- 2.經過初步測試結果顯示其萃取物對於斑馬魚之抗生素耳毒性保護有效，進一步探討不同之萃取方式對斑馬魚抗生素耳毒性保護效果是否有所影響，比較兩者結果。
3. 對耳毒性保護藥物試驗的斑馬魚進行行為分析，藉以探討扁桃斑鳩菊葉的水萃取物對斑馬魚的行為影響。

## (五)文獻回顧與探討

斑馬魚 zebrafish (*Danio rerio*)是目前科學研究上常用的一種模式生物，為一種體型約 3~5 公分的熱帶淡水魚，常在脊椎動物發育研究中被使用，其具有許多研究上的優勢，例如：體型小、方便飼養、所占空間小、生命週期較短、光週期可誘發產卵，單次產卵數量眾多(約 100-200 顆)、胚胎發育期短(約 2-3 天即孵化)、透明胚胎方便觀察等等【1-3】。近年來，隨著基因體的解碼，發現斑馬魚與人類的基因體具有高度同源性，重要的調控蛋白其表現位置和時間也都和哺乳類動物類似，因此，我們可以利用人為突變的方法，包括物理、化學和分子生物學方式，來改變特定基因的表現以及建立基因轉殖魚的動物模式，以研究基因與發育和疾病之間的相關機制【4】。目前研究顯示，一些斑馬魚的突變已在一些器官組織上可發現，如：眼睛、耳朵、心臟、肌肉、血管、胰臟及腎臟等所產生的缺陷，與人類這些器官所產生的一些疾病之病理特徵相似，且為相同基因或同源基因之突變所造成。因此，斑馬魚可進一步被用於作為人類疾病相關研究的模式動物。目前，斑馬魚的動物模式已被運用在各類癌症、心血管病、器官發育、神經發育、脊椎動物之胚胎發育、細胞凋亡及聽覺疾病等等相關研究，而在藥物篩檢的部分也同樣扮演著重要角色【5】。

斑馬魚的聽覺主要是藉由內耳(inner)和側線(lateral line)來偵測水中聲波的振動而產生【6】。雖然斑馬魚的內耳在構造及功能上與脊椎動物不完全相同，但在內耳的發育形成上，基因的機轉原理與脊椎動物相當類似【3、7、8】。在斑馬魚的內耳構造中，經由顯微分析後發現，在內耳聽斑區(macula)及側線(lateral line)的毛細胞構造與人類耳蝸內感覺受器的毛細胞構造是相似的【9】。先前有研究文獻指出，活性氧化物質 ROS (reactive oxygen species) 參與聽覺組織的細胞凋亡及細胞壞死等路徑，而這些路徑也是造成神經性聽力損失的主因。神經性聽力損失包含跟老化有關的聽覺受損、遺傳基因變異的聽覺受損、外界噪音造成的聽覺受損及耳毒性藥物誘導的聽覺缺失等，皆會造成毛細胞損傷而導致永久性的聽力缺失。當異常的粒線體氧化磷酸化會造成活性氧化物質的產量累積，進而導致細胞凋亡、結構組織壞死，使得聽力受損【10、11】。本實驗主要著重在耳毒性藥物誘導的聽覺損傷【12】，有研究文獻指出胺基糖苷類抗生素(如：新黴素、鏈黴素和卡那黴素等)會造成耳毒性【13、14】，使得活性氧化物質累積過多造成毛細胞損傷，進一步影響聽覺。因此我們在篩選藥物的過程中，也不斷的以抗活性氧化物質為出發點在找尋其他具有潛力的藥物，不論是臨床上已使用的藥物，或是一般生活中可取得的藥用植物。

藥用植物又稱藥草、草藥，是指含有可用於治療或用於生產藥物的物質之植物，用於減輕疾病症狀，許多這樣的植物已經被篩選出具有藥用價值，這些植物的藥用價

值在於一些在人體內產生一定生理作用的化學物質。這些藥用植物主要所含有的生物活性成分有：生物鹼、鞣質、類黃酮和酚類化合物等。而其中葉子又是藥用植物中最被廣為使用的部分，因此本實驗使用扁桃斑鳩菊葉片之水萃取物進行斑馬魚抗生素耳毒性保護藥物測試。扁桃斑鳩菊是一種菊科類植物，主要生長在非洲熱帶地區，2-5米的小灌木，葉片呈橢圓形，葉緣呈疏鋸齒狀，因苦味而俗稱苦葉，其萃取物與其所分離出的化學成分已被研究證實具有藥理作用，例如生物鹼，皂素，糖苷和單寧。扁桃斑鳩菊是一種在西非廣泛流傳的藥用植物，其根及葉常用於民族醫藥治療發燒、腎臟問題、腸胃不適、腹瀉等等【15、16】。而扁桃斑鳩菊葉之萃取物在奈及利亞被用於治療高血壓，也可被用於抗癌、抗菌等，更有文獻指出，扁桃斑鳩菊葉之萃取物具有抗氧化的作用，藉由清除自由基，誘導解毒，抑制反應蛋白及干擾一些 DNA 轉錄因子的結合能力【17、18】。以上這些研究文獻佐證扁桃斑鳩菊是具有抗氧化的能力，本實驗先針對扁桃斑鳩菊葉之萃取物利用 Tg(pvalb3b:TagGFP)毛細胞綠螢光轉殖基因魚進行斑馬魚之抗生素耳毒性保護之藥物試驗。

綜合上述，本實驗將以斑馬魚作為模式生物，期望找出新的藥物能保護因使用耳毒性藥物所產生的聽力損傷。目前臨床醫學上有許多具有耳毒性的藥物，例如胺基糖苷類抗生素和抗癌藥物順鉑(cisplatin)，這類藥物在臨床上極為常見，在無法以其他藥物替代的情況之下，病人往往需要承擔耳毒性的風險以對抗可能致命的感染和疾病，造成臨床上的兩難困境。本實驗的目的要驗證這種藥物是否真的能保護耳毒性的聽力損害，研究結果或許能進一步應用於內耳保護機制之研究上，期望能對人類聽障疾病有所貢獻。

## (六)研究方法及步驟

### 1.斑馬魚(*Danio rerio*)基因轉殖系統

本實驗室之斑馬魚的基因轉殖主要是利用 MultiSite Gateway Technology (Tol2 system)，此系統可以快速以及準確的將異源性基因(heterologous)建構在多位點的載體並且去進行蛋白質表現和功能分析。整個質體建構包含基因選殖的方法和步驟，主要依據 MultiSite Gateway® Three-Fragment Vector Construction Kit(Catalog no. 12537-032)的操作手冊進行。將建構好的質體利用顯微注射 (Microinjection) 的方式打入 1-2cell 時期的斑馬魚胚胎 (不要超過 8 cell 時期)，方法和步驟如前所述。斑馬魚體內有 Tol2 酵素，其酵素是一種 transposase，因此可以將欲轉殖的基因插入斑馬魚的染色體內，建立起毛細胞螢光斑馬魚品系 Tg(pvalb3b:TagGFP)的基因轉殖魚。此基因轉殖魚可以

利用螢光顯微鏡和 RT-PCR 的方式來加以確認。

## 2. 顯微注射(microinjection)

利用顯微注射技術將質體轉殖至斑馬魚胚胎。以拉針器製作注射所需的毛細管針，條件為 heat:330、pull:150、vel:150、time:150。用高度密合鎳子將拉好的毛細管針前端以 45 度斜口切斷，再以針筒灌入礦物油以平衡注射時的壓力，將準備好的毛細管針架置顯微注射器(Drummondsc, Nanoject II)上，把欲注射之液體吸入毛細管中，再注射至 1~2 cell 時期胚胎之卵黃內，每次注入 2-3nl。將注射過的胚胎加入 egg water (60 µg instant salt/ml distilled water) 置於 28°C 恆溫培養箱培育觀察。

## 3. 斑馬魚(*Danio rerio*)之飼養

本實驗室將綠色螢光斑馬魚品系 Tg(pvalb3b:TagGFP)及野生型斑馬魚 (AB strain)，一同飼養於 28°C 恆溫系統中，日夜週期為光週期 14 小時與暗週期 10 小時，並以適量人工飼料與豐年蝦餵食。

## 4. 斑馬魚(*Danio rerio*)交配

將螢光基因轉殖魚進行交配，並將發育狀態良好的胚胎留下來，胚胎分盤收集，將其放置 28°C 培養箱養至四天大，待之後做耳毒性保護實驗。

## 5. 斑馬魚(*Danio rerio*)耳毒性保護實驗

本實驗利用綠色螢光斑馬魚品系 Tg(pvalb3b:TagGFP)轉殖魚做扁桃斑鳩菊萃取物之耳毒性保護實驗，以六孔盤作為實驗容器，每孔放入固定數量的斑馬魚，將加藥盤內殘餘的蛋水吸乾後，將事先配好的扁桃斑鳩菊萃取物水溶液加入相對應之組別作用 1 小時，其作用濃度分別為控制組 (不加預測性保護藥物及 neomycin)、0 mg/ml (只加 neomycin)、1 mg/ml、2 mg/ml 及 2.5 mg/ml，體積均為 5C.C。再加入新黴素(50µM)作用 30 分鐘(控制組除外)後，將盤內藥物混合液吸出，以蛋水反覆清洗四次，使其無藥物殘留。

## 6. 斑馬魚(*Danio rerio*)包埋

先取 50c.c 的燒杯加 40c.c 的二次水，再取稱量紙稱量 agarose 粉末 0.2 克，小心將粉末倒入二次水中，取適當大小的保鮮膜蓋住燒杯，在保鮮膜上戳幾個洞，再放進微波爐微波，直到杯內液體呈透明澄清沒有膠狀物即可，微波完，放入 60°C 定溫箱持

續保溫。取數個新的 eppendorf 放入定溫加熱器中，其溫度定在 55°C 左右，並把 eppendorf 內倒入剛微波好的膠。將小魚一隻一隻放置於顯微鏡載物台上的包埋盤(96 孔盤上蓋)上，並將蛋水吸乾，吸取適量膠至包埋處，用鈍的針頭將小魚調整到適當位置，使其在倒立螢光顯微鏡下方便觀察，等其凝固即完成。

### 7. 斑馬魚(*Danio rerio*)側線毛細胞分析方式

毛細胞螢光轉殖斑馬魚經扁桃斑鳩菊萃取物和 neomycin 分別作用後，以倒立螢光顯微鏡觀察其側線毛細胞的螢光表現情形，其萃取物作用後之斑馬魚螢光初篩結果顯示具有保護耳毒性的效果，固定計數 3 點前側線(O、OC、MI)以及 3 點後側線(P1、P2、P3)的毛細胞數目，經個體平均化後即可得到各組毛細胞的總平均數，最後利用統計分析網頁 GraphPad Prism 5，以 anova 計算各組之間的差異性而得到 P value 及統計圖。

### 8. 扁桃斑鳩菊葉片之萃取方式

(1)方法一：取 30 g 乾燥(自然風乾)的葉子，每次以 1000 mL 煮沸之二次水沖泡，每次沖泡約 5 分鐘，反覆沖泡四次，取上清液冷凍乾燥。(以下簡稱水萃取物一)

(2)方法二：取新鮮葉子 100 g，加水 500 ml，放入高速絞碎機絞碎 1 分鐘，過濾後，取上清液冷凍乾燥。(以下簡稱水萃取物二)

### 9. 斑馬魚行為分析

過去文獻大多使用 touch-response 的方式分析斑馬魚胚胎對於周邊環境刺激的反應，然而此方式並無法精準的數據化，因此我們實驗室採用 Noldus EthoVision 平台軟體建立斑馬魚行為分析的模式。由於受精後 4 天大的斑馬魚胚胎屬於 beat-and- glide swimming 時期而不易在此平台進行操作，因此我們選用受精後 7 天大的斑馬魚胚胎進行測試分析。受精後 7 天大的斑馬魚胚胎經藥物處理過後，將胚胎分別置放於 24 孔盤中(一孔置放一隻斑馬魚胚胎)並靜置 20 分鐘，隨即將 24 孔盤置放於平台上進行敲擊測試(tapping test)以分析斑馬魚胚胎對於敲擊刺激的反應。目前我們實驗室設定敲擊測試的條件為強度 8，自開始每隔 15 秒敲擊一次共敲擊四次，持續測試時間為 1 分 15 秒，同時利用攝影系統記錄胚胎的移動軌跡，最後利用軟體統計分析不同藥物處理之胚胎的移動距離，以比較斑馬魚胚胎加藥前後對外在刺激反應的差異而探討藥

物對斑馬魚胚胎行為的影響。

## (七) 結果與討論

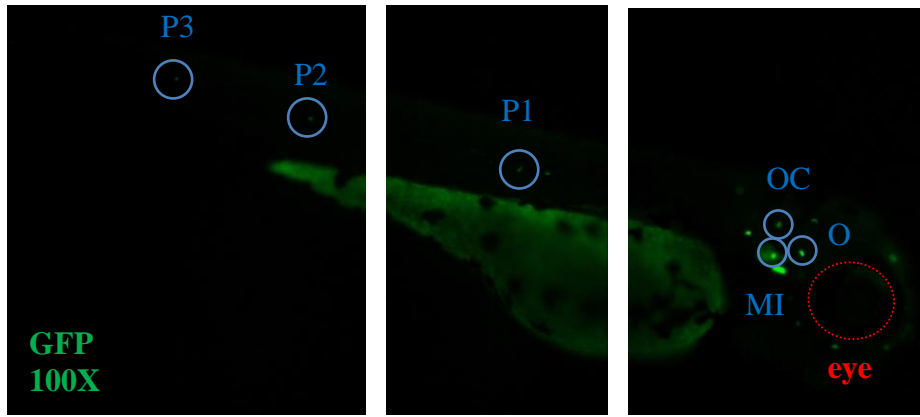
先前有研究文獻顯示出 neomycin 會使活性氧化物質 ROS 增加，進一步造成毛細胞損傷，而扁桃斑鳩菊之萃取物被發現具有抗氧化之作用，因此，我們利用扁桃斑鳩菊葉片之萃取物對 neomycin 之耳毒性進行保護性試驗。並且利用先前本實驗室所建立出專一性在內耳聽斑及側線神經叢的毛細胞表現綠色螢光蛋白之螢光斑馬魚品系 Tg(pvalb3b:TagGFP) 進行實驗。受精後四天大之斑馬魚經過水萃取物一處理，作用一小時後，再直接加入 neomycin 作用 30 分鐘後，發現不同濃度對於毛細胞耳毒性之保護效果亦不同，我們利用多次實驗找出不使斑馬魚死亡又可保護毛細胞免於 neomycin 之耳毒性破壞的濃度範圍，最後以控制組（不加扁桃斑鳩菊葉片之水萃取物及 neomycin）、0 mg/ml(只加 neomycin)、1 mg/ml、2 mg/ml 及 2.5 mg/ml 五組濃度進行實驗。我們以固定計數 3 點前側線(O、OC、MI)以及 3 點後側線(P1、P2、P3)的毛細胞數目【圖一】，經個體平均化後即可得到各組毛細胞的總平均數，最後利用統計分析軟體 GraphPad 5 Prism，以 anova 計算各組之間的差異性而得到，P value 及統計圖，希望藉此找到藥物在斑馬魚起保護耳毒性的最有效濃度，研究結果顯示，2.5mg/ml 之濃度保護效果最接近控制組，其他組隨濃度降低保護效果遞減【圖二】，由此結果可以確定扁桃斑鳩菊葉片之水萃取物確實具有抗氧化作用，可降低 ROS，抑制細胞凋亡，進而達到保護毛細胞受損的效果。透過倒立螢光顯微鏡拍攝可以清楚地看出不同作用濃度之毛細胞數目的變化【圖三】。另外，受精後四天大之斑馬魚經過水萃取物二處理，為了有效比較水萃取物一以及水萃取物二的差異，因此我們利用與水萃取物一相同的濃度，分別是控制組（不加扁桃斑鳩菊葉片之水萃取物及 neomycin）、0 mg/ml(只加 neomycin)、1 mg/ml、2 mg/ml 及 2.5 mg/ml 五組濃度，步驟及方法與水萃取物一相同，結果顯示 2.5mg/ml、2mg/ml 兩組與控制組最接近，表示具有保護毛細胞免受新黴素破壞的效果，而 1mg/ml 這組保護效果則較弱【圖四】，由倒立螢光顯微鏡下可清楚地看出不同濃度之毛細胞數量的差異【圖五】。

在確認扁桃斑鳩菊葉片之水萃取物可保護毛細胞後，我們進一步利用先前本實驗室所建立出的斑馬魚行為分析平台 Noldus EthoVision，對加藥後的斑馬魚進行行為分析，探討此藥物對斑馬魚行為之影響。由於受精後 4 天大的斑馬魚屬於 beat-and- glide swimming 時期而不易在此平台進行操作，因此我們使用受精後 7 天大的斑馬魚進行行為分析。受精後 7 天大的斑馬魚經藥物處理過後，將胚胎分別置放於 24 孔盤中(一

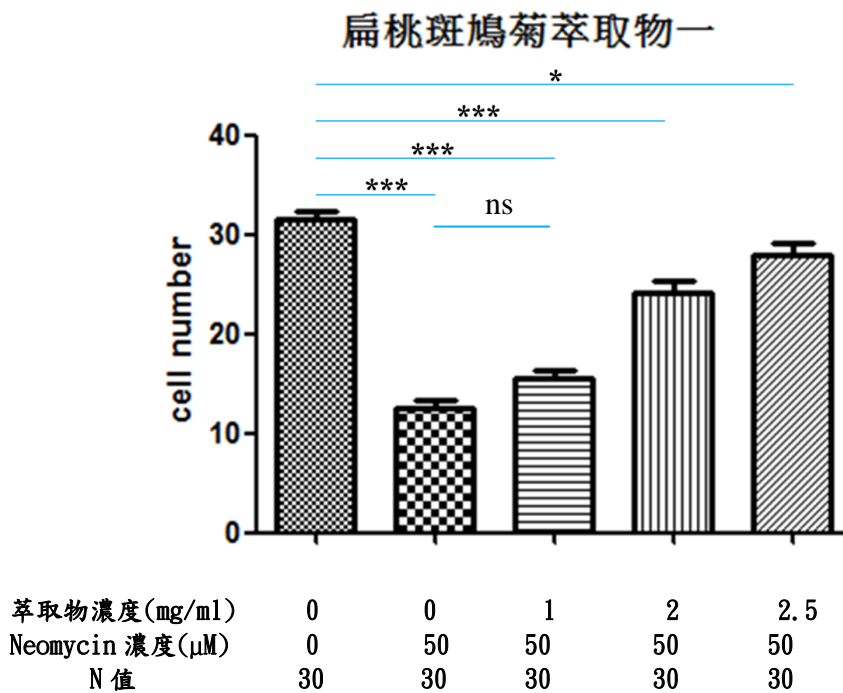


孔放置一隻斑馬魚)並靜置 20 分鐘,隨即將 24 孔盤置放於平台上進行敲擊測試(tapping test)以分析斑馬魚對於敲擊刺激的反應。根據實驗結果,我們發現經過水萃取物一處理後的斑馬魚【圖六】,我們可以看到只有 neomycin 處理過(0mg/ml)的斑馬魚在 Distance moved【圖六 A】、Mobility【圖六 C】、Rotation【圖六 E、F、G】等項目,明顯比控制組高出許多,我們認為可能是毛細胞受破壞後,失去聽覺及平衡,使斑馬魚感到慌亂,進而造成不知所措的游動;turn angle【圖六 D】的部分,0mg/ml 這組則是比 control 組低,由此我們認為斑馬魚失去平衡後,雖然有較大幅度的游動,但每次所旋轉的角度卻變小;而經過水萃取物一前處理的組別(1mg/ml、2mg/ml、2.5mg/ml)在各項分析中與控制組相比是幾乎沒有差異的,表示水萃取物一是能夠保護斑馬魚的毛細胞免受耳毒性破壞,使毛細胞可以維持原本的功能,不影響斑馬魚的聽覺及平衡等行為。由水萃取物二處理的斑馬魚行為分析結果【圖七】,我們一樣能看到與水萃取物一相似的結果,水萃取物二亦能保護斑馬魚之毛細胞,避免 neomycin 的破壞,使斑馬魚行為不受影響。

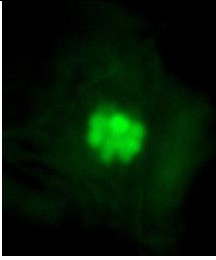
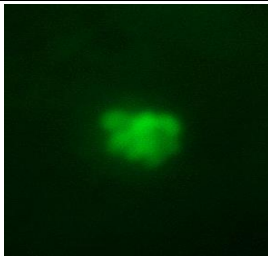
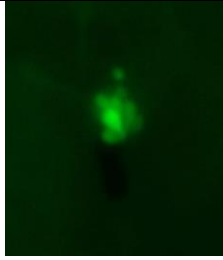
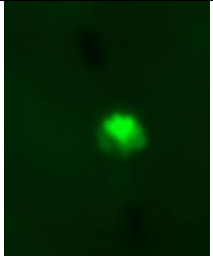
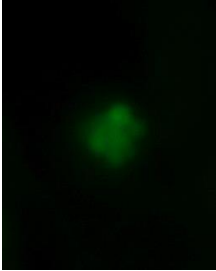
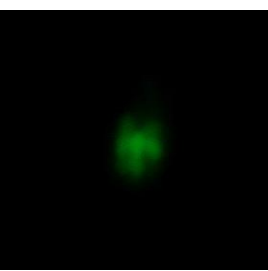
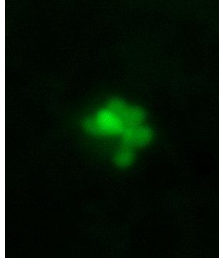

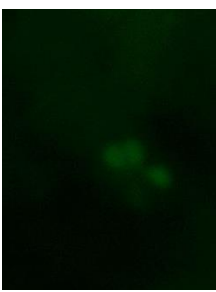
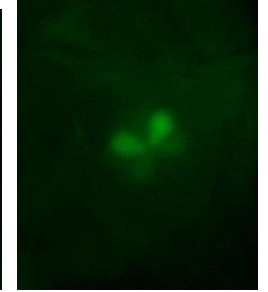
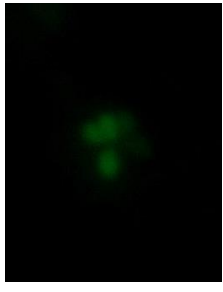

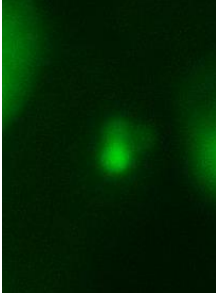
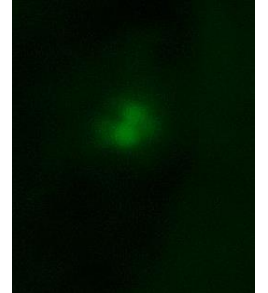
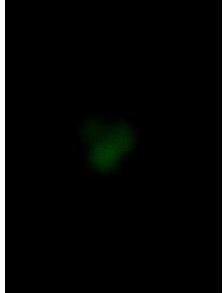
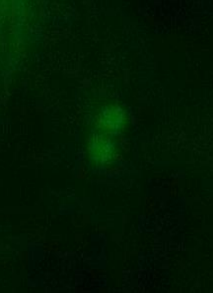
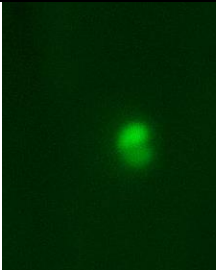
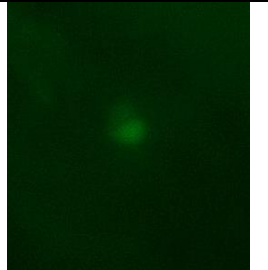
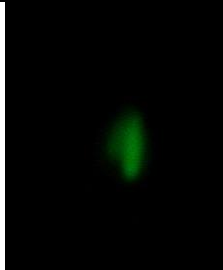
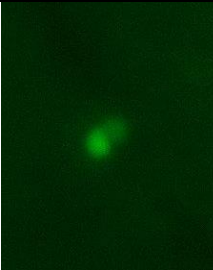
透過水萃取物一以及水萃取物二的斑馬魚毛細胞保護試驗與行為分析的結果,我們發現水萃取物一或是水萃取物二對於毛細胞的保護或是斑馬魚的行為影響是差不多的,表示不論是哪一種方式,只要是利用水萃取的方式,實際的效果是沒有差異的,也就是說,這兩種方式都具有保護毛細胞避免受新黴素耳毒性藥物的效力,且對於斑馬魚的游動行為也是能夠與正常斑馬魚相同的。



**【圖一】** Tg(pvalb3b:TagGFP)轉殖螢光斑馬魚 4dpf 所觀察之螢光影像。  
 在扁桃斑鳩菊水萃取物(方法一)對 neomycin 作用的耳毒性加藥保護試驗中，我們取六個定點作為數據統計，分別是 O=the otic、OC=occipital、MI= middle、P1=posterior lateral line hair cells 1、P2= posterior lateral line hair cells 2、P3= posterior lateral line hair cells 3。



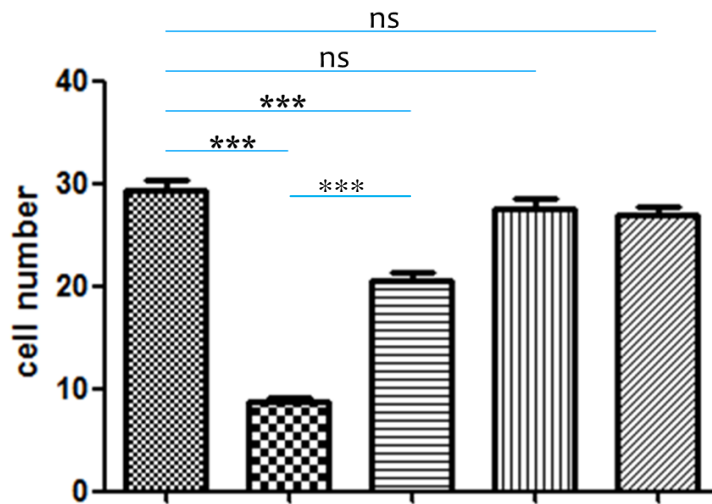
**【圖二】** 扁桃斑鳩菊葉片水萃取物(一)對於 Neomycin 耳毒性的保護試驗  
 由此圖顯示出，2.5mg/ml 之濃度保護效果最接近控制組，而 1mg/ml 與 0mg/ml(只加 neomycin)組比較，統計結果顯示 ns，表示 1mg/ml 幾乎無法保護斑馬魚毛細胞受 neomycin 之破壞。

萃取物之濃度 (mg/ml)	前側線		後側線	
Control				
2.5				
2				
1				
0				

**【圖三】** 各濃度之水萃取物(一)作用後的側線毛細胞

不論是前側線或是後側線，隨著作用濃度下降，保護性也隨之降低，每一叢毛細胞數目也越來越少，甚至完全消失。

### 扁桃斑鳩菊萃取物二



萃取物濃度(mg/ml)	0	0	1	2	2.5
Neomycin 濃度(μM)	0	50	50	50	50
N 值	30	30	30	30	30

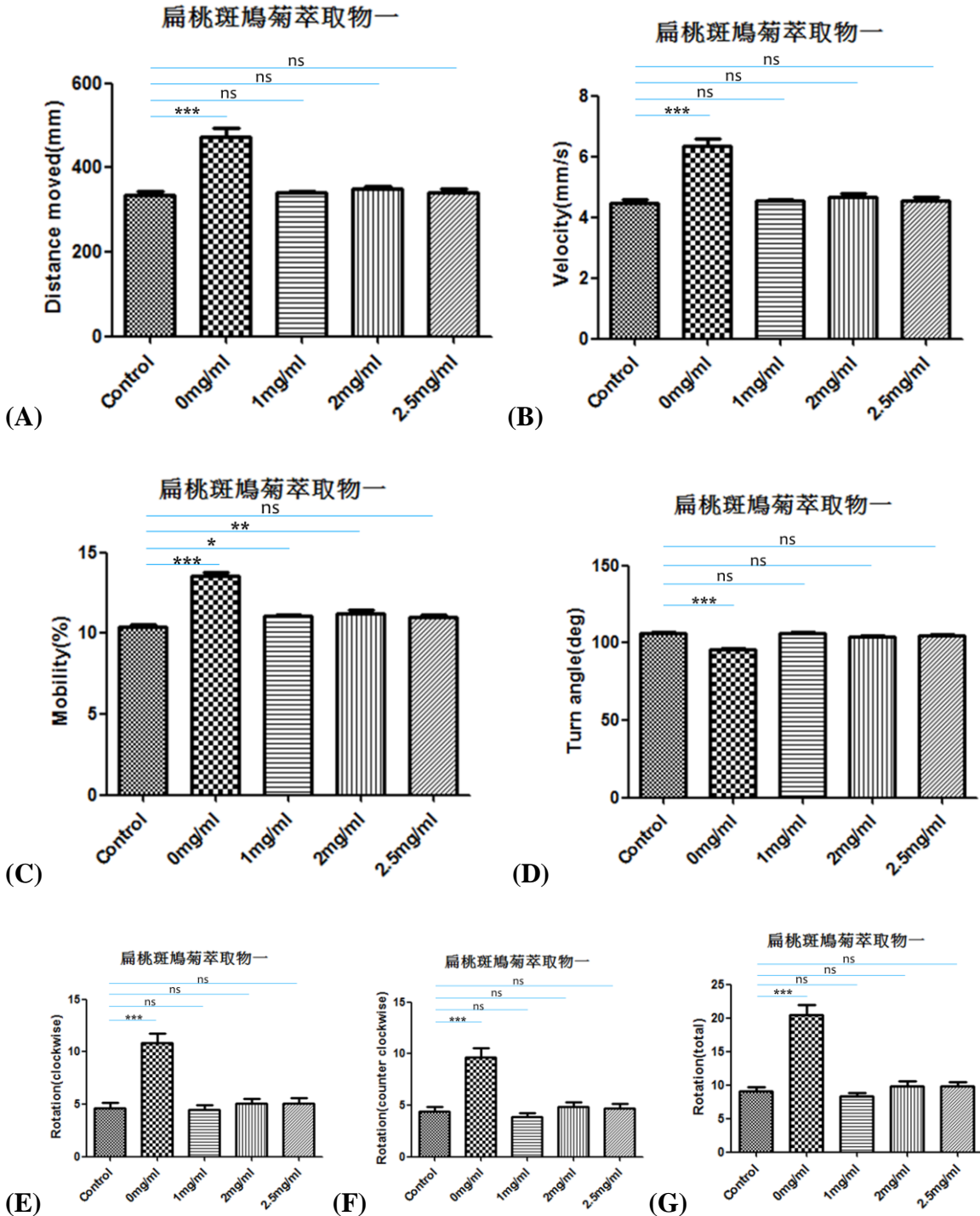
【圖四】扁桃斑鳩菊葉片水萃取物(二)對於 Neomycin 耳毒性的保護試驗

由上圖可知，以濃度 2mg/ml 以及 2.5mg/ml 這兩組保護效果較佳，1mg/ml 保護效果較差，但仍與 0mg/ml 這組有差異，表示還是有一定的保護力。

萃取物之濃度 (mg/ml)	前側線		後側線	
Control				
2.5				
2				
1				
0				

**【圖五】各濃度之水萃取物(二)作用後的側線毛細胞**

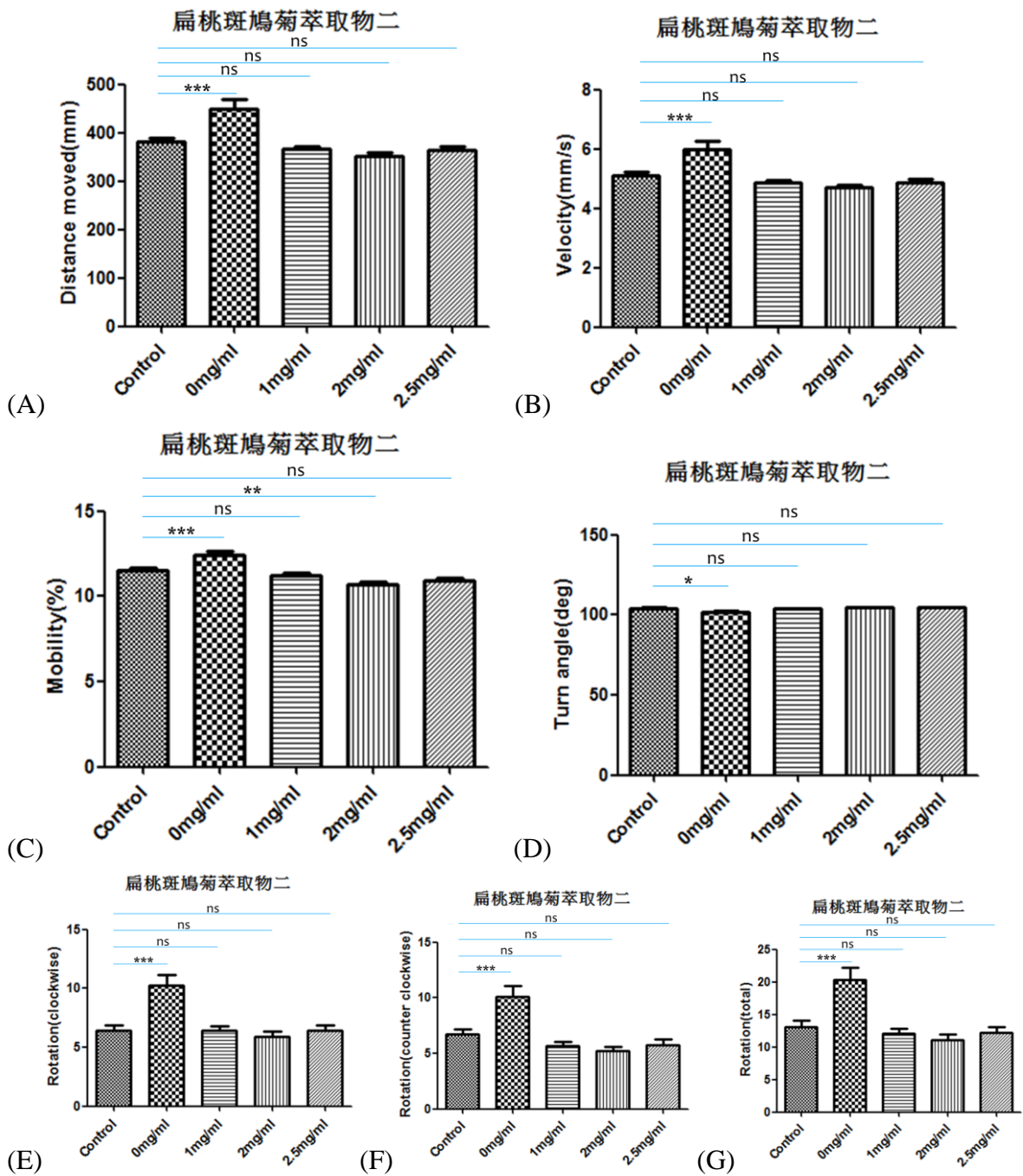
不論是前側線或是後側線，隨著作用濃度下降，保護性也隨之降低，每一叢毛細胞數目也越來越少，甚至完全消失。特別以濃度 2mg/ml 以及 2.5mg/ml 這兩組保護效果較佳。



**【圖六】扁桃斑鳩菊葉片水萃取物(一)之斑馬魚行為分析**

(A) Distance moved (B) Velocity (C) Mobility (D) Turn angle (E) Rotation(clockwise) (F) Rotation(counter clockwise) (G) Rotation(total)

各組 N 值 120(Control)、106(0mg/ml)、117(1mg/ml)、117(2mg/ml)、119(2.5mg/ml)



【圖七】扁桃斑鳩菊葉片水萃取物(二)之斑馬魚行為分析

(A) Distance moved (B) Velocity (C) Mobility (D) Turn angle (E) Rotation(clockwise) (F) Rotation(counter clockwise) (G) Rotation(total)

各組 N 值 208(Control)、185(0mg/ml)、207(1mg/ml)、209(2mg/ml)、208(2.5mg/ml)

## (八) 參考文獻

1. Kimmel, C.B., et al., Stages of embryonic development of the zebrafish. *Developmental dynamics*, 1995. 203(3): p. 253-310.
2. Postlethwait, J.H., et al., A genetic linkage map for the zebrafish. *Science*, 1994. 264(5159): p. 699-703.
3. Whitfield, T.T., Zebrafish as a model for hearing and deafness. *Journal of neurobiology*, 2002. 53(2): p. 157-171.
4. Ikegami, R., P. Hunter, and T.D. Yager, Developmental activation of the capability to undergo checkpoint-induced apoptosis in the early zebrafish embryo. *Developmental biology*, 1999. 209(2): p. 409-433.
5. Zon, L.I., Zebrafish: a new model for human disease. *Genome Research*, 1999. 9(2): p. 99-100
6. Moorman, S.J., Development of Sensory Systems in Zebrafish (*Danio rerio*). *ILAR Journal*, 2001. 42(4): p. 292-298.
7. Haddon, C. and J. Lewis, Early ear development in the embryo of the zebrafish, *Danio rerio*. *Journal of Comparative Neurology*, 1996. 365(1): p. 113-128.
8. Haffter, P., et al., The identification of genes with unique and essential functions in the development of the zebrafish, *Danio rerio*. *Development*, 1996. 123(1): p. 1-36.
9. Popper, A. and C. Platt, Inner ear and lateral line. *The physiology of fishes*, 1993: p. 99-136
10. Reactive Oxygen Species, Apoptosis, and Mitochondrial Dysfunction in Hearing Loss. *BioMed Research International* , 2015, 617207,
11. Age-related hearing impairment and the triad of acquired hearing loss. *Front Cell Neurosci*. 2015; 9: 276.
12. Drug-induced hearing loss. *Prescribe Int*. 2014 .23(155):290-4
13. Ototoxicity caused by aminoglycosides . *BMJ*. 2007 Oct ; 335(7624): 784–785.
14. Drug screening for hearing loss: using the zebrafish lateral line to screen for drugs that prevent and cause hearing loss. *Drug Discov Today*.2010 ; 15(7-8) : 265-271
15. PHYTOCHEMICAL ANALYSIS OF *Vernonia amygdalina* AND *Ocimum gratissimum* EXTRACTS AND THEIR ANTIBACTERIAL ACTIVITY ON SOME DRUG RESISTANT BACTERIA
16. Significance of Bitter Leaf (*Vernonia Amagdalina*) In Tropical Diseases and Beyond: A Review
17. Antiplasmodial, antioxidant and immunomodulatory activities of ethanol extract of *Vernonia amygdalina* del. Leaf in Swiss mice
18. Antioxidative and Chemopreventive Properties of *Vernonia amygdalina* and *Garcinia biflavonoid*