

以斑馬魚作為伴侶動物 機能性飼料添加物之 篩選與驗證模型

撰文/蔡佳惠·張卜介·黃志宏·劉逸軒

前言

隨著社會經濟的發展，伴侶動物的飼養非常普遍，且已被廣泛接受為親密的家庭成員。這些伴侶動物對現代核心家庭提供了極大的情感支持，特別是在空巢期的調整過程，有助於整個社會和諧之維護。隨著動物醫療的進步，伴侶動物的平均壽命與人類一樣越來越長，與熟齡人士一般，年長的伴侶動物其身體逐漸衰老，並增加慢性病的比例，例如退化性關節炎、白內障、乾眼症以及因肥胖造成的代謝性疾病，飼主的飼養管理費用也隨之增長。因此，就市場的成長性而言，寵物保健食品相關市場仍有強大的成長潛力，值得投入開發。

美國衛生和公共服務部在 2000 年發表的報告指出保持運動與合理的飲食有助於健康，並可降低罹患某種代謝性疾病風險。如同人類一般，這種正確的理念，也適用於伴侶動物。然而在繁忙的現實生活中，安排肥胖伴侶動物的規律運動與飲食控制，實為一大挑戰。因此，正如現代人一般，伴侶動物保健食品的需求也急遽增加。

斑馬魚作為伴侶動物健康食品開發之模式動物

一般伴侶動物保健食品之篩選，在試驗時，通

常使用哺乳動物，如：小鼠，作為篩選試驗模型。然而，隨著全球對動物福祉意識的興起，一般對於動物試驗的看法，亦逐漸對替代 (replacement)、減量 (reduction) 與精緻化 (refinement) 之要求越發看重，也因此，利用非哺乳動物之脊椎動物代替哺乳動物模型，在「完全取代」尚無法實現的今日，成為重要的發展趨勢。

斑馬魚 (*Danio rerio*) 為一種熱帶淡水魚，近年來成為受歡迎的脊椎實驗動物模式，並被普遍使用於發育生物學、轉譯腫瘤學、病理學及生物醫學等研究。雖然以序列相似度而言，斑馬魚遠不及小型哺乳動物與伴侶動物相近，但由於斑馬魚在實驗操作上有許多其他的優點，使得牠們越來越受青睞。首先，斑馬魚為體外受精，因此適合用於操作基因的調控；另外，斑馬魚配對一次可產 200 顆以上的受精卵，適合於同一批子代中收集多組的數據，降低實驗誤差；最後，維持斑馬魚系統所需的空間與費用，遠較等量的小鼠為低，再加上斑馬魚體型小，測試所需要的樣品量也遠較小鼠為低，因此，對於仍在測試階段或生產成本較高的原料而言，斑馬魚為最佳的實驗動物模式。

除了上述在研究上的優點，斑馬魚在操作上也易於達成更佳人道的動物福祉。一般而言，在

實驗動物的福祉考量中，有所謂的 3R 原則。替代 (replacement) 指的是，在其他可達成同樣實驗目的之前提下，可以避免利用實驗動物或者改採用演化上更低階的生物。雖然無脊椎動物對於痛覺的敏感度顯著較低，但是牠們的生理構造與伴侶動物差異過大，因此在建立疾病模式時有許多限制。本研究室於先前的研究中，成功建立多種斑馬魚試驗模型，而諸多相關證據，皆表示斑馬魚之生理分子作用機轉，與其他脊椎動物均十分相似，因此在研究特定的生理機制時適合以斑馬魚取代更高等的脊索動物。除此之外，斑馬魚具有體外快速發育的特性，再加上其在發育的過程中，負責認知痛覺的大腦神經構造較不成熟，因此，斑馬魚是目前認為取代高等哺乳類的動物模式之一。

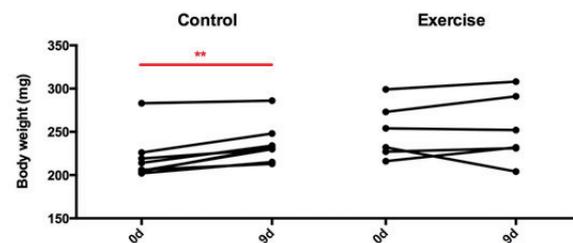
減量 (reduction) 指的是，在獲取相同的實驗結果的前提下，盡可能減少使用動物的數量，或使用等量的實驗動物情況下，能夠獲得更多的實驗數據。在使用相同動物數量的條件下，以斑馬魚為實驗動物者通常 2-3 週即能完成實驗結果，相較於小鼠需要 8 週才能得到相近的實驗結果。因此，以斑馬魚作為實驗動物可以縮短動物接受試驗操作的時間。此外，縮短試驗的時間，不但降低了商品開發的時間成本，也能降低人力以及飼養成本。

精緻化 (refinement) 指的是，使用更精緻的操作方式，免除或減輕動物在實驗中所造成的緊迫，例如良好的飼養管理及環境，可以降低實驗動物的緊迫。其中，使用適當的麻醉劑、止痛劑及安樂死都為精緻化 (refinement) 的一部分。斑馬魚是水生生物，可直接在水中處理麻醉劑 (如：現今廣泛使用的 MS-222)，實驗動物不需經歷保定及針頭侵入的緊迫。

因此，在得以維持相同研究目的之前提下，斑馬魚不論在替代 (replacement)、減量 (reduction) 和精緻化 (refinement) 上都有其優點，故相當推薦以斑馬魚代替更高的脊索動物。

斑馬魚試驗動物平臺

由於現今伴侶動物的飲食及生活習慣改變，普遍都有體重過重的情形。然而，如上述所言，伴侶動物的飲食控制及規律運動在現今高度都市化的社會中為一大挑戰，因此，保健食品對於伴侶動物來說，為重要健康控制之成分。在建立斑馬魚保健食品篩選平臺之前，本研究室已建立斑馬魚之運動模型：由於斑馬魚性喜逆流，原則上，利用可調控水流量之沈水馬達，接上適當長度與寬度之透明橡膠水管，置於水缸中，底部以纖維紗網封住，即可令斑馬魚在水管中進行高強度之運動，並同時予以觀察。運動試驗之斑馬魚開始於測試之水流速下進行為期兩週且每日六小時的急遽運動訓練，為了探討急遽的運動訓練是否能改變成年斑馬魚的生理狀態，年齡在 5-6 月齡的 AB 野生型雄性斑馬魚被隨機分配到運動訓練組與運動對照組，並在試驗開始後每三天，在空腹狀態下，進行體重之測量 (Jian *et al.*, 2018)。試驗期間斑馬魚每日餵飼 2 次，結果顯示，運動訓練組之體重並不會出現顯著的變化，而運動對照組在數日內，體重即有顯著的增長 (圖一)。為瞭解斑馬魚運動模型對於檢測體重控制相關物質之效度，我們進一步以已知在人與小鼠能夠有效減重並改善代謝症候群之益生菌 *Akkermansia muciniphila* (Hubert *et al.*, 2017)，進行模型檢測，並預期該益生菌能夠在「運動對照組」重現「運動訓練組」之結果。



註：我們分析運動訓練組運動對照組試驗前後體重之變化，可以發現在經過九日後，運動對照組有體增重的情況，而運動訓練組則保持相似的體重 ($p < 0.05$, paired-samples student's t-test)。

圖一 斑馬魚運動模型第9天的體重變化

美國食品藥物管理局於 2013 年首次批准於斑馬魚篩得之癌症輔助治療用藥物，直接進入藥物新用途之人體臨床試驗，歐盟的相關規範，近年來也傾向推廣利用斑馬魚模型進行先期篩選試驗。然而，在過去的研究技術中，成年斑馬魚藥物攝取之方式為一大挑戰 (Burns *et al.*, 2005; Berghmans *et al.*, 2008)，其中，將藥物直接投入飼養環境及將藥物混合其飼料等方法 (Sciarra *et al.*, 2014)，無法確保斑馬魚攝入之含量 (Mange *et al.*, 2015)，加上本研究室於預試驗中，發現將不同種類之測試物質 (果糖、蛋白質等)，直接投入飼養環境中，易造成水質優養化，進而提升成年斑馬魚之死亡率。而以腹腔注射藥物，雖然可以控制斑馬魚藥物之攝取，但長期之腹腔注射易造成斑馬魚損傷及傷口感染等問題。因此，管餵 (oral gavage) 提供一個良好的研究技術，避免斑馬魚長期注射之外傷，以及控制斑馬魚藥物之攝取量 (Dang *et al.*, 2016)。

為了建立斑馬魚保健食品篩選平臺，本研究室以管餵斑馬魚系統來檢測測試物之有效性 (圖二)。我們將 5-6 月齡成年斑馬魚，分為運動對照組、運動訓練組、管餵對照組 (牛血清白蛋白) 以及管餵益生

菌組。試驗期間，管餵組每尾魚每日早上 9 點，管餵 5.7×10^6 CFU 的益生菌液，或是溶於 $2 \mu\text{L}$ 10% glycerol in PBS 的 $3 \mu\text{g}$ 的牛血清蛋白，運動對照組則既沒有進行管餵，亦無運動訓練。每尾受試斑馬魚都飼養於內含 250 毫升飼養水的玻璃容器中，並於每日中午 12 點及下午 5 點餵飼豐年蝦 (Jian *et al.*, 2018)。並於第 0、3、6、9、10、12、13 天將斑馬魚進行秤重 (空腹體重)。

我們將管餵的結果與斑馬魚運動模型進行比對 (圖三)，管餵益生菌組與運動模型的體重變化相似度甚高，而管餵對照組則與運動對照組十分相似。進一步以統計分析檢測管餵對照組與管餵益生菌組，發現管餵益生菌組在管餵九日後，體重較管餵對照組顯著較低 (圖四) ($p < 0.05$, Mann-Whitney test)。表示益生菌在斑馬魚，如同在人體與小鼠一般，具有維持體重甚至有減重之功效；而空白對照組及管餵 BSA 組則會使斑馬魚體重上升。

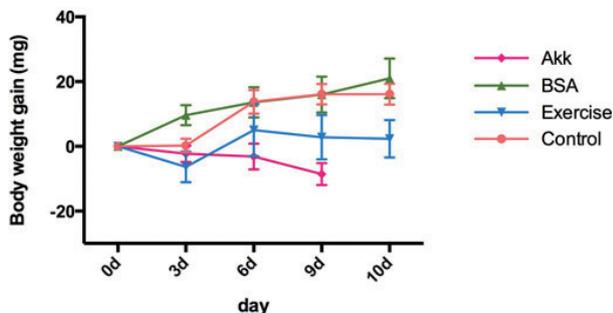
結語

斑馬魚為一良好的實驗動物，本研究室已針對體重控制，利用斑馬魚建立一套保健食品篩選平



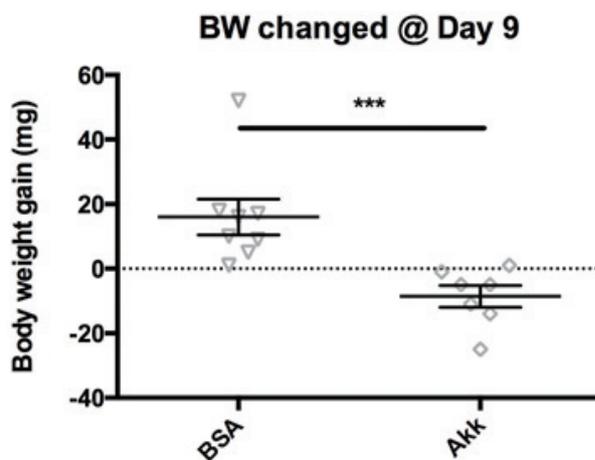
註：斑馬魚經由麻醉劑MS-222麻醉後，將斑馬魚放置在海綿都凹槽中固定，以22G的管餵管進行管餵，管餵完之斑馬魚放置系統水中甦醒並觀察。

圖二 斑馬魚管餵



註：圖中Y值為扣除試驗一開始的斑馬魚之體重變化；X為試驗的天數。橘色線為空白對照組；綠色線為管餵BSA組；藍色線為斑馬魚運動模型；粉紅色線圖為管餵益生菌組。標準偏差為平均值標準偏差(SEM)。

圖三 斑馬魚管餵後與空白對照組及運動模型之斑馬魚的體重變化



註：我們分析連續管餵九天牛血清白蛋白及益生菌的體重，可以發現兩組有顯著的差異($p < 0.05$, Mann-Whitney test)。

圖四 斑馬魚管餵後第9天的體重變化

臺，相較於一般常見的小鼠模型需時八週以上，本方法可在十天即達成效果之檢定，而且也成功地重現了人體與小鼠模型的效果。希望以實驗動物 3R 原則來篩選伴侶動物之保健食品，預期能對伴侶動物及社會帶來更好的保健效益。

AgBIO

蔡佳惠 臺灣大學 動物科學技術學系 專任研究助理
 張卜介 臺北科技大學 化學工程與生物科技系 博士班
 黃志宏 臺北科技大學 化學工程與生物科技系 助理教授
 劉逸軒 臺灣大學 動物科學技術學系 教授

參考文獻

1. 劉逸軒, 林美峰。「伴侶動物保健食品及飼料添加物之研發與認證推動策略規劃計畫」, 行政院農業委員會主管科技計畫。
2. 張家騰, 劉逸軒, 關懷生命協會, From www.lca.org.tw/column/node/6598.
3. Berghmans, S., Butler, P., Goldsmith, P., Waldron, G., Gardner, I., Golder, Z., Richards, F. M., Kimber, G., Roach, A., Alderton, W. et al. (2008). Zebrafish based assays for the assessment of cardiac, visual and gut function-potential safety screens for early drug discovery. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods* 58, 59-68.
4. Burns, C. G., Milan, D. J., Grande, E. J., Rottbauer, W., MacRae, C. A. and Fishman, M. C. (2005). High-throughput assay for small molecules that modulate zebrafish embryonic heart rate. *Nature Chemical Biology* 1, 263-264.
5. Dang, M., Henderson, R. E., Garraway, L. A. and Zon, L. I. (2016). Long-term drug administration in the adult zebrafish using oral gavage for cancer preclinical studies. *The Company of Biologists* 9, 811-820.
6. Plovier, H., Everard, A., Druart, C. et al. (2017). A purified membrane protein from Akkermansia muciniphila or the pasteurized bacterium improves metabolism in obese and diabetic mice. *Nature Medicine* 23, 107-113
7. Jian, Q. L., HuangFu, W.C., Lee, Y.H., Liu, I.H. (2018). Age, but not short-term intensive swimming, affects chondrocyte turnover in zebrafish vertebral cartilage. *PeerJ* 6:e5739.
8. Magno, L. D. D., Fontes, A., Goncalves, B. M. N. and Gouveia, A. (2015). Pharmacological study of the light/dark preference test in zebrafish (*Danio rerio*): waterborne administration. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 135, 169-176.
9. Sciarra, J. B., Tyler, A. and Kolb, A. (2014). A gelatin-based diet for oral dosing juvenile to adult zebrafish. *LAS Pro.* 32-35.