2013 臺灣國際科學展覽會
優勝作品專輯

作品編號 **090010**

參展科別 **醫學與健康科學**

作品名稱 **妊娠禁忌中藥對斑馬魚胚胎發育之影響**

得獎獎項 **四等獎**

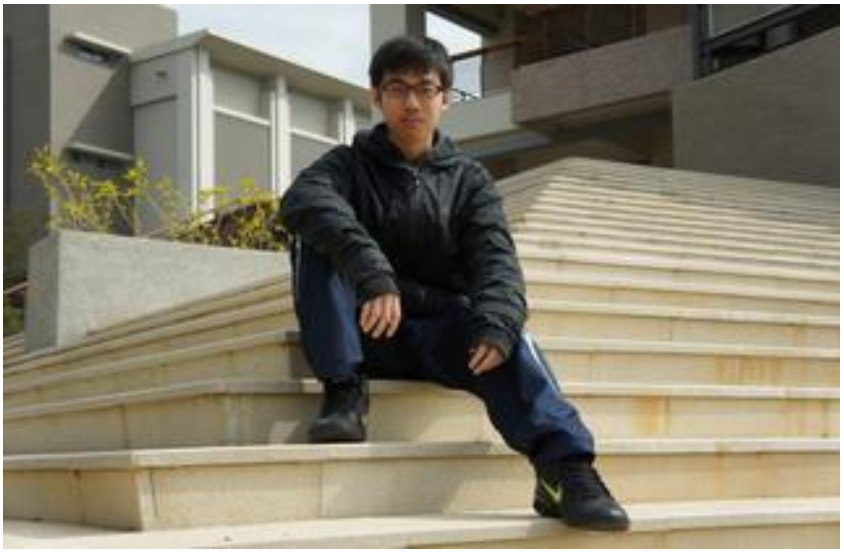
就讀學校　國立中科實驗高級中學

指導教師　胡裕仁

作者姓名　王翰霖、鍾郁瑄

關 鍵 字　妊娠中藥、斑馬魚、胚胎發育

作者簡介



我是王翰霖，目前就讀中科實中二年級數理實驗班。學校每星期有三小時的專題研究，讓我培養了做生物實驗的熱忱與態度。在實驗的過程需要細心與耐心，因為隨時會有許多奇妙的可能發現，同時也使我認知知識是沒有邊界的。雖然有時會面臨到挫折，但我堅定的意志告訴自己，就算失敗了一百次、一千次，持之以恆，總有一天一定會成功！



對自然的好奇心、敏銳的觀察力還有旺盛的求知慾，把一切綜合起來就會變成我—目前就讀中科實中數理實驗班二年級的鍾郁瑄。對我來說，研究是為了滿

足旺盛的好奇心以及對知識的渴求。而從實驗過程中，我更學到了謹慎的重要，無論是配藥、測量，為了結果精確可是不能有任何一絲一毫的差錯。當然，我也希望研究結果有益於社會。很高興有這個機會能夠參與這次的科學展覽會，讓我能與更多人交流彼此的成果，也讓我有一個展現成果的舞台。

摘要

本研究探討斑馬魚胚胎發育的不同時期，妊娠中藥對胚胎及仔魚的影響。在受精後第 0 小時（初期）、12 小時（中期）或 24 小時（晚期）加入不高於人類用量的保產無憂方、當歸芍藥散與芎歸膠艾湯。每 12 小時觀察胚胎發育的情形；待仔魚孵化，比較其差異。結果顯示：(1)初期給予當歸芍藥散、芎歸膠艾湯不會造成胚胎死亡，但保產無憂方隨濃度增加而死亡率增加。(2)晚期給予保產無憂方，胚胎發育略有延遲，但全數存活，且劑量越高效果與控制組越相近。(3)三味藥均使發育延遲，尤以初期加入高劑量最為明顯。(4)中期或晚期給予安胎方皆造成仔魚體型縮短。(5)低劑量當歸芍藥散和芎歸膠艾湯使孵化後第四天仔魚運動總距離增加。我們建議，當歸芍藥散和芎歸膠艾湯在初期可用，但保產無憂方為胚胎發育後期之安胎順產藥劑，不適於早期之使用。

Abstract

The effect of the contraindicated Chinese Medicine in Zebrafish embryo development

The purpose of this study is to demonstrate the effects of tocolysis Chinese medicine in different embryo developing stages of zebrafish. Three kinds of Chinese medicine were applied in this study. The drugs were added at one of the follow time courses that after fertilization 0 hour, 12 hour, or 24 hour. The drug dosage was conversion lower/equal to the human dosage. It is found that (1) Xiong Gui Jiao Ai Tang(XGJAT) and Dang Gui Shao Yao San(DGSYS) could not lead to embryo dead, but the higher dose of Bao Chan Wu You Fang(BCWYF) would increase lethal rate. (2) Giving the drugs at 12h, all the dosage of BCWYF could keep the embryo life; and the higher dose had rose the higher hatchling rate, like the control group. (3) All the three kind drugs would delay the embryo development, especially at 0h. (4) Giving the drugs at 12h or 24h that would short the body length of lava. (5) After fertilization 120 hours, it is showed that low dose groups of XGJAT and DGSYS could increase the move distance than other groups. It is suggested that XGJAT and DGSYS could use at the embryo early stage, but the application of BCWYF should be very cautiously at the early stage.

壹、前言

近年來,隨著中草藥的應用日趨普及,世界各國對於另類醫療的接受度提高，因此孕婦或哺乳期的婦女因生病而需要服用中藥，或是婦女接受中藥治療期間不慎懷孕的情形也就相當常見，因此對於中草藥在懷孕期間的使用也有研究去關注。

我們去請教中醫師，知道古代文獻就有記載一些孕婦用藥及禁忌：中醫的第一部醫學專書《黃帝內經》首先記載了婦人妊娠期間的用藥法則，現存第一部藥學專著－秦漢南北朝時期《神農本草經》中註明“墮胎”的 6 種藥物,隋唐時期《產經》中最早記載孕婦不可服藥 82 種的妊娠禁忌藥，而《本草經集注.序例. 諸病通用藥》更收錄墮胎藥 41 種。及至宋金元時期,《衛生家寶產科備要》收錄盧醫周鼎《產前所忌藥物歌》,是最早的妊娠禁忌藥歌訣。之後的《婦人大全良方》、《指南總論》、《妊娠用藥禁忌歌》、《胎產救急方》,和《珍珠囊補遺藥性賦妊娠服藥禁忌歌》等書更加以補充記載。明清以後,《本草綱目》除專列《妊娠禁忌》藥外，“諸病通用藥”中有關於妊娠禁忌者即有 247 種，並有其科學的分類。近代醫家秦伯未等人對《金匱要略》、《千金方》、《經效產寶》和《濟陰綱目》等書中有關胎前用藥，訂出妊娠禁用藥、忌用藥物和慎用藥物三大類。然而，歷代文獻中對於妊娠禁忌中藥雖然累積了豐富的臨床經驗,但其中的記載內容互不統一或有出入,缺乏標準化的定義。

雖然兩千多年前中醫藥的典方即有記載會妨礙妊娠的藥，但是其禁用的確實原因究竟是對母體不好，還是會影響胚胎發育，則沒有明確的記載及證明，甚至還有兩相衝突的部分。這樣前後矛盾的記載，在安胎部份，亦有類似的狀況。早期妊娠的婦女約有 1/5 會發生陰道出血現象，稱為先兆性流產(Sotiriadis, Papatheodorou, & Makrydimas, 2004)。它是婦女懷孕時最常發生的併發症之一，先

兆性流產西醫並無特效療法，黃體素和休息是兩個治療重點。在中醫屬於「胎動不安」或「胎漏」的範圍。一般中醫臨床或民間中藥店，不論胎齡多少，大多喜歡以「保產無憂方」治療（楊仁鄰，2004）。在清代產科著作「達生篇」中記載：「保胎神效方(即保產無憂方)...有胎即能安胎，臨產即能催生。懷孕者不拘月數，偶傷胎氣，腰酸腹痛，一服即安...。再懷孕者，於七個月服起，七月服一劑，八月服二劑，九月服三劑，十月亦服三劑，臨產服一劑，其效如神。」因此，此方在民間的口耳相傳中，又稱為十三味安胎飲，為常用安胎方。

然而，張山雷『沈氏女科輯要箋正』中敘述的『保產無憂散』，卻是孕婦臨盆前催生順產所用方，而非安胎方：「近世所傳催生諸方，以保產無憂散為佳，貌識之，方極雜亂，而程鍾齡醫學心悟解之極妙，用之者亦恆應驗，但非臨盆時必不可早投。而達生篇中竟以為安胎之用，適得其反，...。保產無憂散亦作保生無憂散，其為催生之意明甚，乃達生篇中則名為保胎神效方，真是大謬！」（張山雷，1933），故目前有多位中醫師在網路為文建議懷孕初、中期最好不要使用，以免流產（楊仁鄰，2001）。

其他諸方如當歸芍藥散（周仲貴與席文勝，1996）、芎歸膠艾湯（夏桂成，2003）等安胎方劑對於胎動不安的母體情形是否有緩解，雖有醫家根據自己看診的經驗給予看法外，究竟安胎方劑使用的時程為何，它們對於胚胎發育過程有無影響，迄今仍無相關的實證研究證據。以上述為例子，中醫多以醫書記載、孕婦反應或經驗來用藥，並無確實探討胚胎發育的影響，但在懷孕過程就可能有不完美的受精卵，以胚胎異常和染色體異常造成的流產最為常見，故自然流產的發生約佔 25%。因此我們想要瞭解這類妊娠常用藥方如芎歸膠艾湯、當歸芍藥散及保產無憂方對於胚胎發育的影響。

在研究的動物模式上，我們放棄一般所選用的實驗白鼠，改採用斑馬魚生物模式。這是因為哺乳動物在發育期間不容易觀察，必須給母老鼠餵藥、犧牲，取

出小老鼠胚胎才能進一步知道牠們的發育狀況，小老鼠胚胎在取出母體觀察後也無法存活。而斑馬魚具有光週期誘發產卵，體外受精，一次排出的卵數甚多。胚胎發育時間相當快速，受精卵於 72 小時後脫卵而出，即發育成為幼魚，而且卵及胚胎透明，在光學顯微鏡下容易觀察發育過程，故可做連續性的觀察不需犧牲。此外，斑馬魚胚胎發育上的機制與調控蛋白表現與哺乳類動物非常相似，近來已成為研究脊椎動物胚胎發育的重要模式動物（中華實驗動物學會，2010）。因此，我們選擇斑馬魚做為此次研究的模式動物，觀察在不同的胚胎發育時期使用中藥，是否會產生形態改變、發育異常甚至死亡等情形，還有孵化後的仔魚活動情形，這樣可以測知胚胎發育時期用藥的安全，也希望本研究能為妊娠用藥提供科學的實驗數據，提供用藥人及醫師開方的參考根據。

貳、研究方法

一、斑馬魚養殖及受精卵取得

斑馬魚(*Danio rerio,* AB)成魚飼養於循環過濾系統缸，每天光照 14 小時、水溫控制在 26~29℃。每天早、晚餵食兩次，餵食飼料（福壽牌）及豐年蝦（美國紅牌），每次餵食的量約為 5 分鐘內可食完。

成熟雌雄種魚於傍晚取出，在產卵槽以隔板隔開。隔天亮燈 30 分鐘後抽開隔板，30 分鐘後收集產下的受精卵。以清水沖洗受精卵兩次後將受精卵放置於 24 孔盤，每小孔盤放入 5 個受精卵，加入 1 ml 的待測藥物或清水，置於 26~28℃的培養箱中，觀察其發育情形。

二、 中藥

我們選用的妊娠中藥有芎歸膠艾湯、當歸芍藥散及保產無憂方。藥物的劑量則將人類劑量換算成比照小鼠的斑馬魚用量(表 1-1)，實驗中我們選用 1000ppm、750ppm、500ppm 及 250ppm 等四個小於人類用量的濃度，溶於滅

菌的水中，於 4℃保存，配製好的藥物於一星期內使用。中藥的來源是委託 GMP 港香蘭藥廠股份有限公司製備並鑑定，其成份如表 1-2。

表 1-1 妊娠藥物換算用量

藥品	LD50		人體常用劑量	小鼠劑量
	斑馬魚（ppm)	鼠(g/kg)	(g/70kg)	(g/kg)
當歸芍藥散	>1000	3-10	6	1.089
芎歸膠艾湯	>1000	-	6	1.089
保產無憂方	>1000	17.6	6	1.089

表 1-2 芎歸膠艾湯、當歸芍藥散及保產無憂方成份表

Botanic family	Oriental medicines	Pharmacognostic nomenclature	Botanical nomenclature	Amount(g)
芎歸膠艾湯 Xiohg Gui Jiao Ai Tang (XGJAT)	川芎	Chuanxiong Rhizoma	*Ligusticum chuanxiong* Hortorum	6
	當歸	Angelicae Sinensis Radix	*Angelica sinensis* (Olive.) Diels	9
	阿膠	Asini Gelatinum	*Equus asinus* I.	6
	艾葉	Artemisiae Argyi Folium	*Artemisia argvi* level. Et Vant.	9
	甘草	Glycyrrhizae Radix	*Glycyrrhiza glabra* L.	6
	白芍	Paconiae Alba Radix	*Paconia lactiflora* Pall.	12
	生地	Rchmanniae Radix et Rhizoma	*Rehmannia glutinosa* (Gacrtner) Libosch.	15
當歸芍藥散 Dang Gui Shao Yao San (DGSYS)	川芎	Chuanxiong Rhizoma	*Ligusticum chuanxiong* Hortorum	9
	當歸	Angelicae Sinensis Radix	*Angelica sinensis* (Olive.) Diels	9
	白芍	Paconiae Alba Radix	*Paconia lactiflora* Pall.	30
	茯苓	Poria	*Poria cocos* (Schw.) Wolf	12
	白术	Atrctylodus Macrocephalac Rhizoma	*Atractylodes macrocephala* Koidz.	12
	澤瀉	Alismatis Rhizoma	*Alisma orientalis* (Sam.) Juzep.	15
保產無憂方 Bao Chan Wu You Fang (BCYYF)	川芎	Chuanxiong Rhizoma	*Ligusticum chuanxiong* Hortorum	3
	當歸	Angelicae Sinensis Radix	*Angelica sinensis* (Olive.) Diels	3
	厚朴	Magnoliac Cortex	*Magnolia officinolis* Rehd. et Wils.	1.6
	艾葉	Artemisiae Argyi Folium	*Artemisia argvi* level. Et Vant.	1.4
	甘草	Glycyrrhizae Radix	*Glycyrrhiza glabra* L.	1
	白芍	Paconiae Alba Radix	*Paconia lactiflora* Pall.	4
	黃耆	Astragali Radix	Astragatus membranaceus (Fisch.) Bge.	1.6
	荊芥	Schizonepetae Herba	*Schizoncepeta tenuifotia* Briq.	1.6
	川貝梅	Fritillariae Cirrhosac Bulbus	*Fritillaria cirrhosa* D. Don	2
	菟絲子	Cuscutae Semen	*Cuscuta chienesis* Lam.	2
	羌活	Notopterygii Rhizoma et Radix	*Notopterygium incisum* Ting ex H. T. Chung	1
	枳殼	Citri Immaturus Fructus	*Citrus aurantium* L.	1.2
	生薑	Zingiberis Recens Rhizoma	*Zingiber officinale* Rose.	8

資料來自港香蘭藥廠股份有限公司

三、實驗分組及流程

1. 分組及給藥

實驗分組為控制組及實驗組。受精卵分於 24 孔盤，每盤內有 5 個卵。每一受精卵只給藥一次，給藥的時間分別為受精後 0 小時、12 小時、24 小時給藥的三個給藥時間點。控制組在加藥的時候更換成清水，每次 120 個卵。實驗組又分芎歸膠艾湯、當歸芍藥散及保產無憂方三種方劑，每組 30 個卵。分別以滅菌清水配好 1000 ppm、750 ppm、500 ppm 及 250 ppm 等四個小於相當人類用量的濃度，在不同的時間點給藥(圖 2-1)。

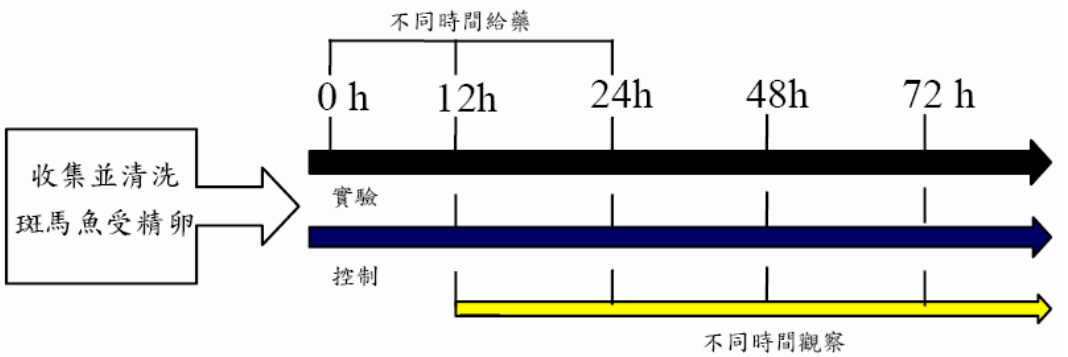


圖 2-1 斑馬魚胚胎給藥及觀測時間之實驗流程圖

2. 觀測方法

自受精後 12 小時起,每 12 小時不論有無加藥均置於解剖顯微鏡下觀測，於 15X 下檢視胚胎存活情形，並於放大 80X 後用單眼相機拍攝胚胎發育情形，於放大 40X 時拍攝仔魚體長，並於同條件下拍攝標準尺規，以為觀測體長的基準。

3. 斑馬仔魚活動性及可能機制的量測

(1) 斑馬仔魚活動量測

在仔魚孵化後的第 1 天及第 4 天觀測其活動情形，將仔魚置於 24 孔盤中，1 孔 1 隻。以動物行為監測系統（天勝）進行情運動軌跡測

量。測量時間均在光照時間進行。實驗過程中可即時查看軌跡，每隻仔魚進行 10 分鐘運動測量，室溫保持在 26~28℃。實驗結束後可立即查看並分析該次實驗的各項數據，結果數據包括各個象限的時間/路徑長度，平均運動速度，軌跡可輸出為標準的圖文件，所有數據可以保存或進入 Excel 分析。

(2) Na^+-K^+ ATPase 活性的測量

本實驗使用 Adenosine 5´-Triphosphatase (A7510 SIGMA)來測量複藥中藥及單方對於 ATPase 的影響。先以標準溶液稀成 0、12.5、25、50、100 uM 5 個不同對照濃度、中藥也稀釋成 62.5、125、250、500、750、1000ppm 等濃度，每一濃度重複兩管。先加入 ATP buffer 在 37℃作用 10 分鐘，再加入 MESG 均勻混合後，先以 96 孔光比色計以 360nm 測量背景值，然後加入作用效素 PNP，於 37℃作用 1 小時。再以 96 孔光比色計以 360nm 測量作用後吸光值。

將作用後吸光值與背景值相減可得該次作用吸光值。將標準溶液畫成作用曲線，求得其相關系數及二元一次方程式，如此就可求得中藥作用後對 ATPase 影響的百分比。

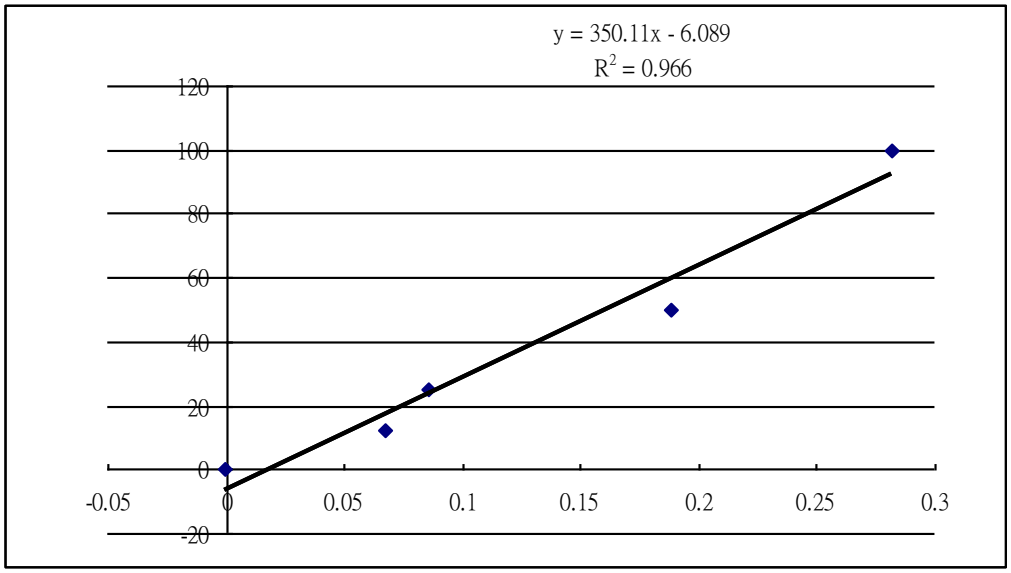


圖 2-1 Pi 濃度標準曲線圖

4. 數據統計及分析

孵化率及死亡率以觀察的總體為母數，進行百分統計，並以卡方檢定比較其差異。其餘實驗數據如體長則先以 ANOVA 先行檢測有無顯著差異，再用杜凱法 *事後比較*(Tukey method)檢測其組間差異。

參、研究結果與討論

一、安胎中藥對斑馬魚胚胎的影響

首先我們想確認三種方劑是否真的對胚胎發育造成影響，因此先在受精後 0 小時加入分別加入不同濃度的芎歸膠艾湯、當歸芍藥散及保產無憂方，於 48 小時觀測。結果發現不同濃度的芎歸膠艾湯、當歸芍藥散均尚未孵化、但無死亡現象。而保產無憂方隨著濃度變化的反應就不同了，隨著加入的濃度上升，孵化延遲越多、且死亡率增加(表 3-1、表 3-2)。

因此得知，在受精後 0 小時給予當歸芍藥散、芎歸膠艾湯不會造成胚胎死亡，但保產無憂方隨著濃度增加造成胚胎死亡率增加。

表 3-1.不同安胎方濃度影響胚胎孵化的情形

孵化率 濃度(ppm)	安胎方		
	當歸芍藥散	芎歸膠艾湯	保產無憂方
1000	0	0	0
750	0	0	33.33
500	0	0	46.67
250	0	0	83.33
0	100	100	90

孵化率的數值是以 %呈現。本組的實驗為 0 小時加藥，48 小時觀察。

表 3-2.不同藥物濃度造成胚胎死亡的情形

死亡率 濃度(ppm)	安胎藥		
	當歸芍藥散	芎歸膠艾湯	保產無憂方
1000	0	0	23.33
750	0	0	13.33
500	0	0	16.66
250	0	0	3.33
0	0	0	0

死亡率的數值是以 %呈現。本組的實驗為 0 小時加藥，48 小時觀察。

二、不同給藥的時間，安胎方對斑馬魚胚胎孵化的影響

第一個實驗結果顯示，在受精後 0 小時加藥均會造成胚胎延遲孵化。但相較之下，保產無憂方的反應雖沒有如芎歸膠艾湯、當歸芍藥散延遲的時間長，但卻有較高的死亡率。因此我們想要確認在不同的時間點加藥是不是對孵化及死亡現象有同樣的影響，同時也想了解此三帖安胎方除了延遲孵化之外，究竟該批胚胎能不能順利孵化，仔魚能否順利生存。

所以除了受精後 0 小時給藥外，我們也觀察在受精後 12 小時或 24 小時給藥，斑馬魚胚胎孵化的情形。結果顯示在同一藥量不同加入時間的當歸芍藥散反應，其孵化率是 24h > 12h > 0h。以 12h 加藥時間點來看，1000 ppm 的孵化率在前 72 小時內稍高於 250ppm，而於 24h 加藥時間點來看，1000 ppm 的孵化率僅在前 48 小時內稍高於 250ppm，且略高控制組（表 3-2）。這表示在 12 小時或 24 小時雖有延遲，但當歸芍藥散不影響其孵化。

芎歸膠艾湯的反應與當歸芍藥散並不完全相似。在同一藥量不同加入時間的芎歸膠艾湯反應，其孵化率也是 24h > 12h > 0h，這是和當歸芍藥散類似。但以 12h 及 24h 加藥時間點來看，250 ppm 的孵化率在前 72 小時內稍高於 1000ppm，但仍少於控制組（表 3-3）。值得一提的是在 1000 ppm 組，不論是 12h 或是 24h 加藥，仔魚或未孵化的卵有逐漸凋亡的現象，但 250 ppm 則無。表示雖然 1000 ppm 仍在常用的劑量範圍內，但對斑馬魚的胚胎發育來說，藥量則嫌太重。

保產無憂方在同一藥量不同加入時間的孵化率也是 24h> 12h>0h，而且不論濃度高低。以加入的時間來看，在 24h 加藥雖仍有延遲但幾乎全部孵化，可是若是在 0h 加藥則隨濃度增加而死亡增加(表 3-4)。這表示在發育的初期(0 h)加入保產無憂方對斑馬魚胚胎有很大的傷害性；中期(12 h)加入保產無憂方，在第 48 小時觀察時有較多的斑馬魚胚胎尚未孵出：然而在後期(24 h)加入保產無憂方，對斑馬魚胚胎除了延遲孵化外，均可順利孵出，且越高劑量的效果與控制組越相近。

表 3-3. 當歸芍藥散及芎歸膠艾湯對斑馬魚胚胎孵化的影響

發育時間	當歸芍藥散						芎歸膠艾湯						控制組 0 ppm
	1000 ppm			250 ppm			1000 ppm			250 ppm			
	0h	12h	24h	0h	12h	24h	0h	12h	24h	0h	12h	24h	
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
12	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
24	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
36	0	0	13.33	0	0	0	0	0	23.33	0	0	0	35.00
48	0	0	90.00	0	0	53.33	0	0	43.33	0	10.00	33.33	90.00
60	ND	56.67	93.33	ND	35.43	96.67	ND	40.00	36.67	ND	25.82	86.67	96.67
72	ND	36.67	93.33	ND	86.67	96.67	ND	90.00	60.00	ND	93.33	90.00	98.33
84	ND	90.00	93.33	ND	96.67	96.67	ND	76.67	46.67	ND	93.33	90.00	100
96	ND	96.67	90.00	ND	96.67	93.33	ND	56.67	26.67	ND	90.00	93.33	100

每一組均為 30 顆受精卵，對照組為 120 顆；孵化率的數值是以 %呈現。

表 3-4. 保產無憂方對斑馬魚胚胎孵化的影響

發育時間	保產無憂方												控制組 0 ppm
	1000 ppm			750 ppm			500 ppm			250 ppm			
	0 h	12 h	24 h	0 h	12 h	24 h	0 h	12 h	24 h	0 h	12 h	24 h	
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
12	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
24	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
36	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	35.00
48	0	0	4.17	33.33	0	6.67	46.67	0	3.33	83.33	6.67	10.00	90.00
60	33.33	76.67	90.00	74.67	56.67	80.00	73.33	60.00	70.00	93.33	63.33	73.33	96.67
72	73.33	86.67	96.67	86.67	90.00	100	83.33	96.67	93.33	93.33	86.67	90.00	98.33
84	76.67	83.33	96.67	86.67	93.33	100	83.33	100	96.67	93.33	93.33	96.67	100

每一組均為 30 顆受精卵，對照組為 120 顆；孵化率的數值是以 %呈現。

三、安胎方對仔魚身長的影響

除了能不能順利孵外化，我們也關心仔魚的形態有沒有受到藥物的影響。由圖 3-1 可以看到受精 12 後加藥的仔魚，其外型、色素並沒有很大的差別，但控制組的體長（圖 3-1）明顯較長。接著我們再以同一拍照條件的標準刻度尺測量其體長，結果發現在受精後 12 小時或 24 小時給予安胎方確實皆會造成仔魚不同程度的體長縮短（圖 3-2、圖 3-3、圖 3-4）；但受精後 0 小時即給予保產無憂方並未造成仔魚體長縮短（圖 3-4）。

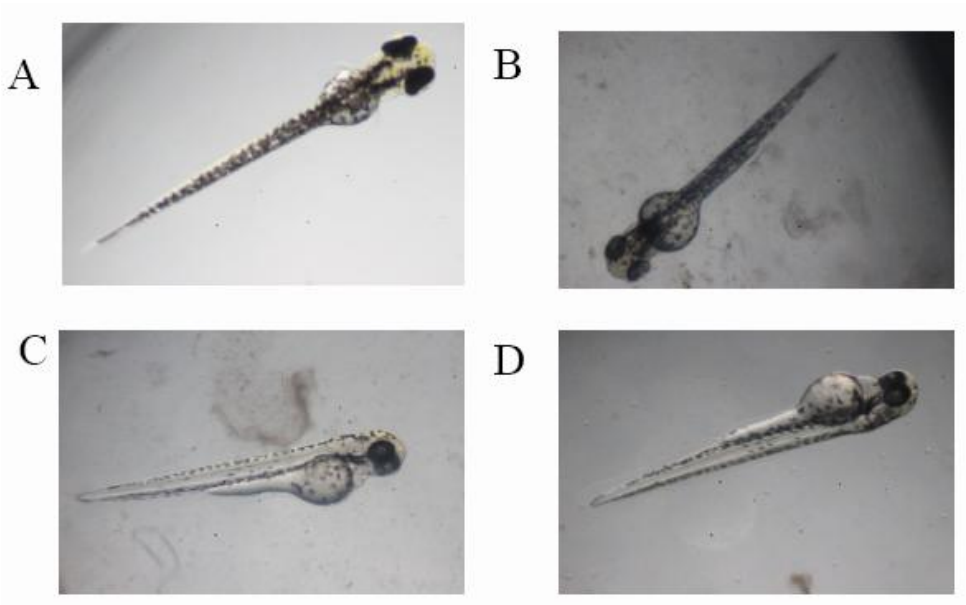


圖 3-1. 第 60 h 仔魚的身形

實驗組為受精後 12h 加藥。A.控制組　B. 當歸芍藥 1000 ppm　C.芎歸膠艾湯 1000 ppm　D.保產無憂方 1000 ppm

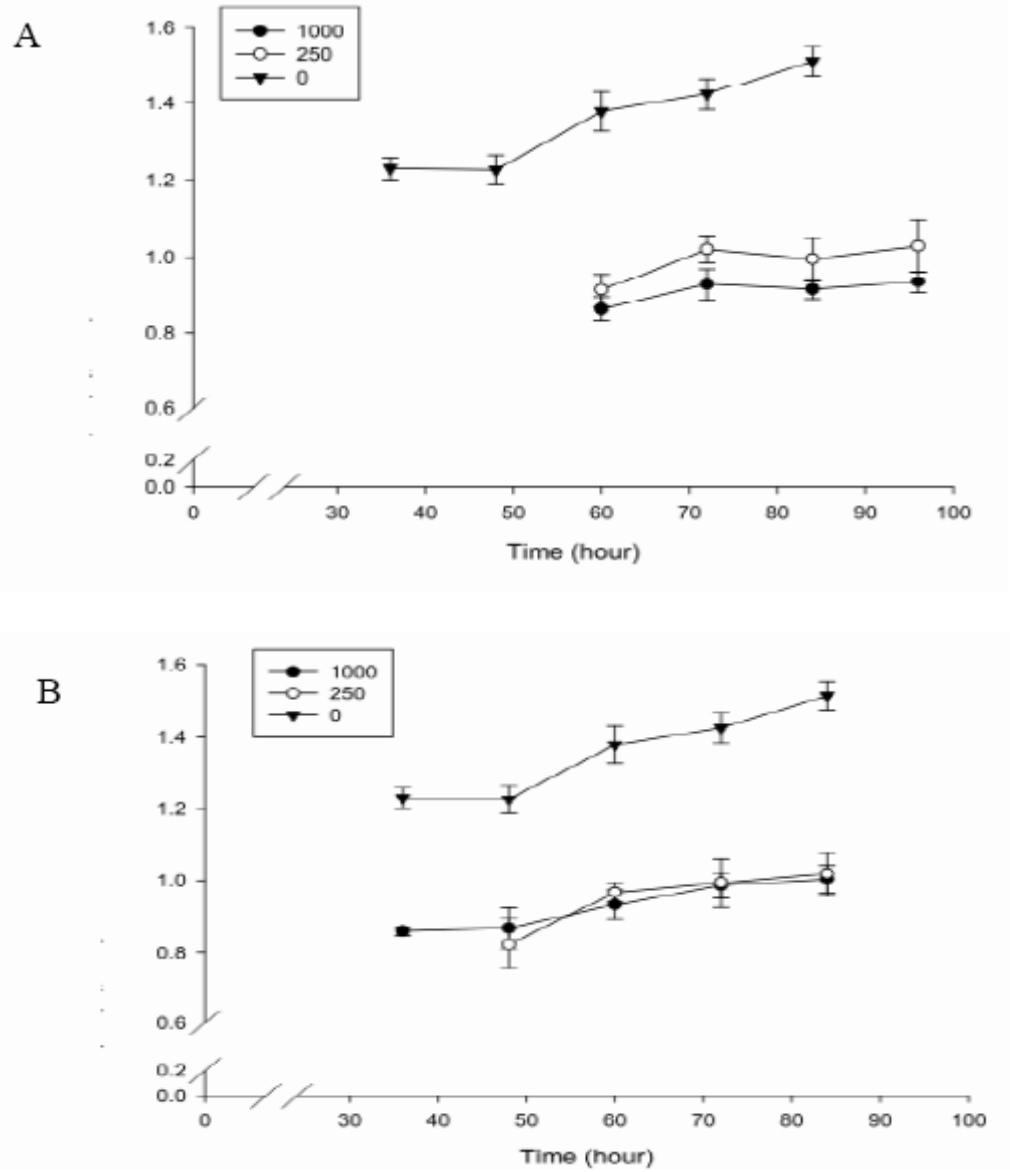


圖 3-2 當歸芍藥散對仔魚身長的影響
A 受精後 12 小時加藥。B 受精後 24 小時加藥。

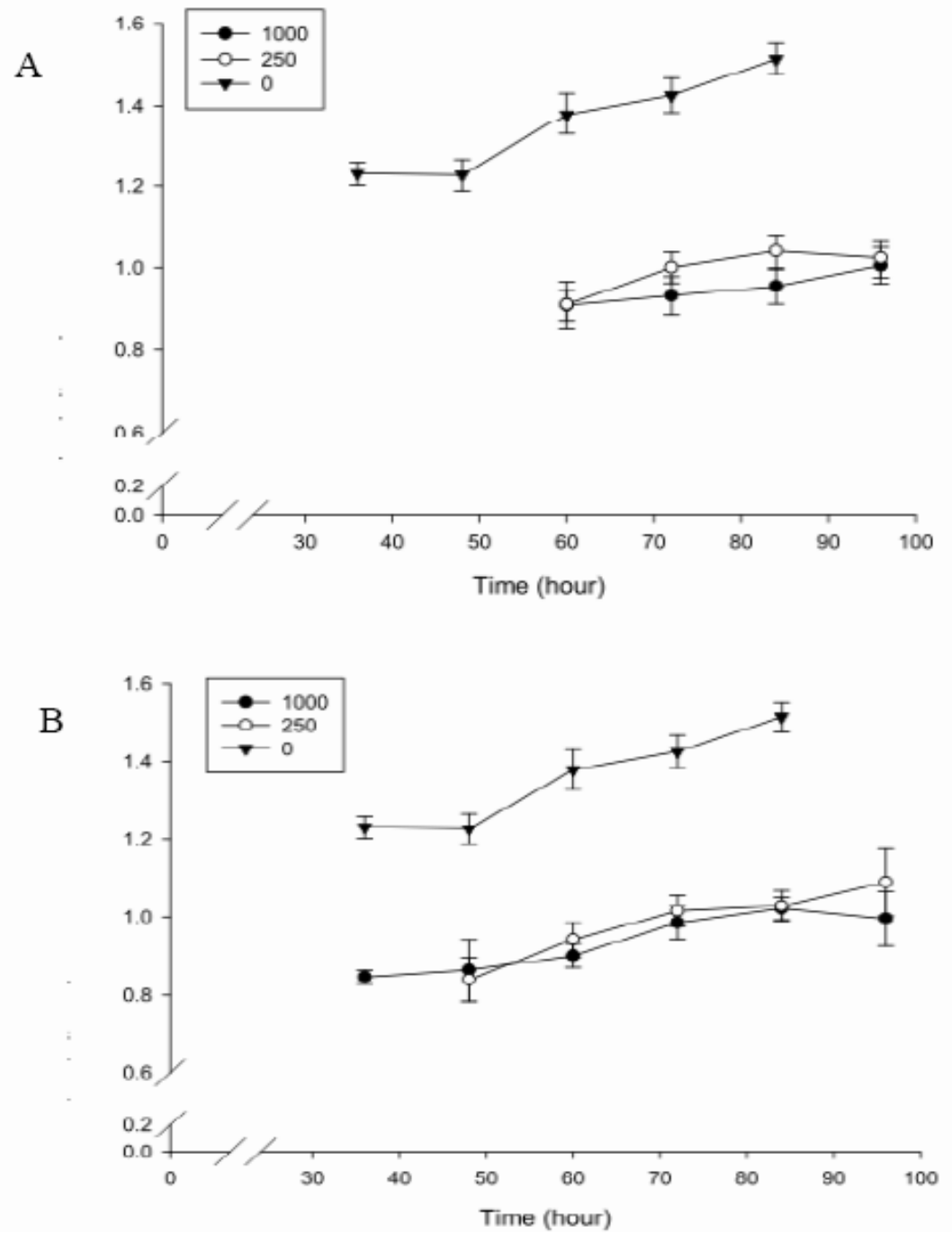


圖 3-3 芎膠艾湯對仔魚身長的影響

A 受精後 12 小時加藥。B 受精後 24 小時加藥。

C

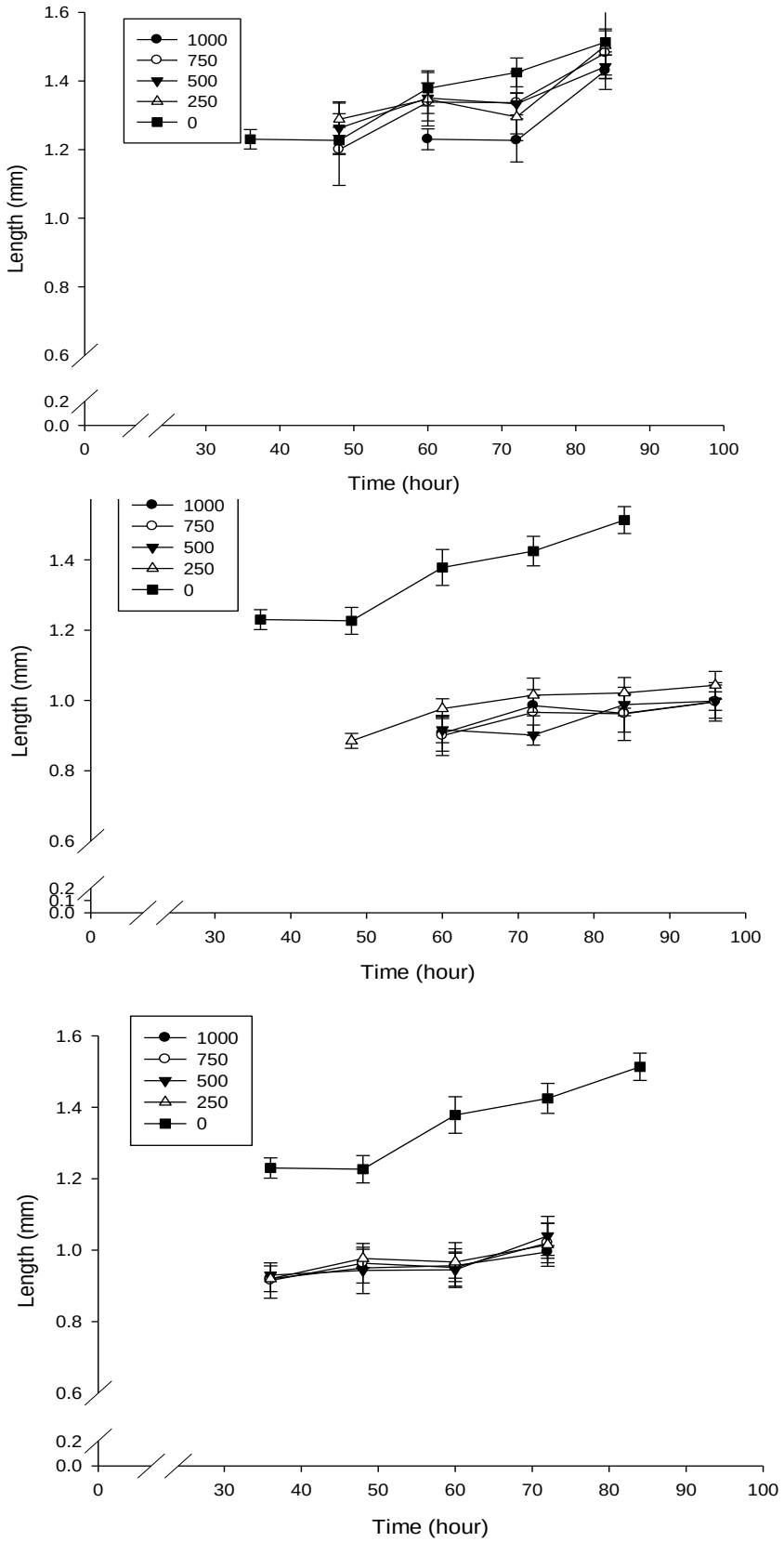


圖 3-4 保產無憂方對仔魚身長的影響

A 受精後 0 小時加藥。B 受精後 0 小時加藥。 C 受精後 0 小時加藥。

四、安胎方對於斑馬仔魚行為的影響

我們在量測班馬魚身長時，發現加入安胎方的斑馬魚比較活潑，因此使用動物運動軌跡分析的技術，測量仔魚的活動路徑的長短。初步結果發現受精後 0 小時加入芎歸膠艾湯 250 ppm，其孵出後第四天的活動情形要遠高於控制組及 1000 ppm (圖 3-5)。

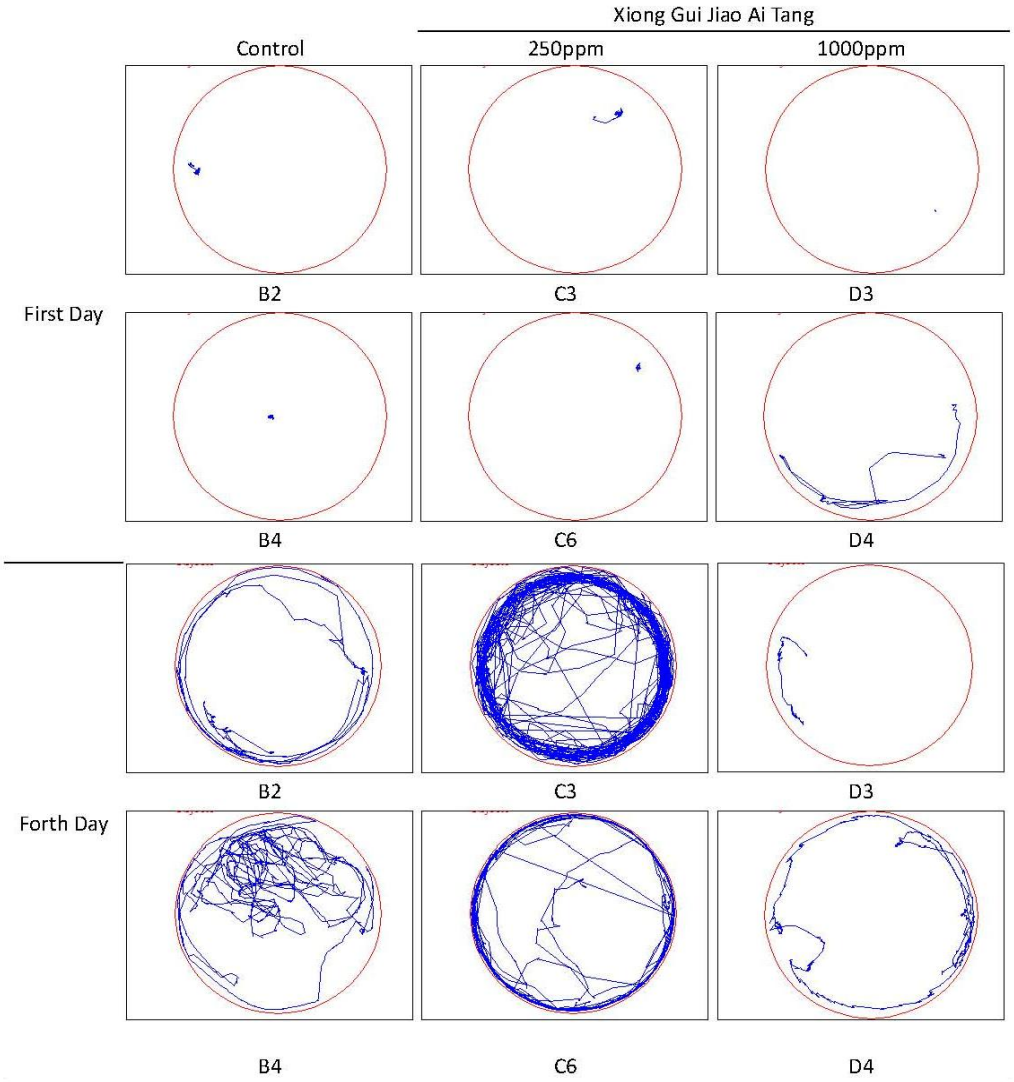


圖 3-5 受精後 0 小時加入芎歸膠艾湯的仔魚運動軌跡

B2、B4 為控制組，C3、C6 為加入芎歸膠艾湯 250ppm，D3、D4 加入芎歸膠艾湯 1000ppm。藍線代表仔魚在 10 分鐘內的所有運動軌跡

由我們的結果可知，在受精後 0 小時、12 小時或 24 小時加藥，高劑量及低劑量的當歸芍藥散雖造成孵化時間的延遲，但不影響其孵化成功的個數。這表示以孵化成功為目標來說，在斑馬魚胚胎發育初、中、後三期來說，當歸芍藥散在 1000ppm 以下的用藥是可行的。

在受精後 0 小時、12 小時或 24 小時加藥，高劑量及低劑量的芎歸膠艾湯也會造成孵化時間的延遲。但值得一提的是在 1000 ppm 組，不論是 12h 或是 24h 加藥，仔魚或未孵化的卵在 72 小時之後有逐漸凋亡的現象，但 250 ppm 則不影響其孵化成功的個數。表示雖然 1000 ppm 仍在常用的劑量範圍內，但對斑馬魚的胚胎發育來說，藥量則嫌太重。因此以孵化成功為目標來說，芎歸膠艾湯在 1000ppm 的用藥是不可行的，應選用較低劑量為宜。

保產無憂方在同一藥量不同加入時間的孵化率也是 24h> 12h>0h。以加入的時間來看，在 24h 加藥雖仍有延遲但不論濃度高低，受精卵幾乎全部孵化，可若是在 0h 加藥則有受精卵死亡，甚至 1000 ppm 高達近 1/4。這表示在發育的初期(0 h)加入保產無憂方對斑馬魚胚胎有很大的傷害性；中期(12 h)加入保產無憂方，在第 48 小時觀察時，斑馬魚胚胎幾乎尚未孵出，且 1000 ppm 死亡率較高：然而在後期(24 h)加入保產無憂方，對斑馬魚胚胎除了延遲孵化外，均可順利孵出。因此以孵化成功為目標來說，不建議早期使用保產無憂方，這個實驗數據可提供做為中醫用藥的參考。

另外，我們發現在受精後 12 小時或 24 小時給予安胎方皆會造成仔魚不同程度的體長縮短，不過並不影響其活動情形。以芎歸膠艾湯為例，0 小時加入芎歸膠艾湯 250 ppm，其孵出後第四天的活動情形要遠高於控制組及 1000 ppm。不過因為芎歸膠艾湯在 1000 ppm 作用下，有逐漸凋亡，也可能造成不太活動的可能。而芎歸膠艾湯 250 ppm 的存活情形及活動情形都很好，以此來說，芎歸膠艾湯在胚胎發育初期的用藥應選用較低劑量為宜。

若是 0 小時加入保產無憂方，不論是高濃度或低濃度，仔魚在孵化的第一天幾乎不動，到了第四天開始有活動的情形，但遠遜於芎歸膠艾 250ppm。由於在 24 小時加入保產無憂方時，高濃度的孵化率及存活情形反而比較良好，因此我們也特別做了 24 小時加入保產無憂方，仔魚孵化後的活動情形，結果

發現 1000ppm 組的仔魚活動情形最為活潑。這表示在胚胎發育後期加入高劑量的保產無憂方，雖孵化時間略有延遲，但不僅可以孵化率與對照組相似，且敷出的仔魚在地四天的活動性還高過於對照組，這也表示保產無憂方的確是適於胚胎發育後期才添加的安胎方。

目前當歸芍藥散被發現可促進黃體素增加、血液循環改善-明顯改善腦缺血一再灌注小鼠血腦屏障通透性、提高腦組織內 Na+-K+ ATP 酶及 Ca2+-ATP 酶的活力（楊喬，2008），0 小時加入 250ppm 芎歸膠艾湯使得胚胎及仔魚孵化後第四天的運動情形變得比較活潑，當歸芍藥散在初步的觀察也有類似的情形。因此我們推測可能的機轉與安胎方造成胚胎及仔魚腦部 Na+-K+ ATPase 或 Ca2+-ATPase 量的改變有關。因此，我們參考前人所提及研究斑馬魚神經活性物質的方法(Hung, at al, 2012)，先測定安胎方是否對於 ATPase 的活性有所影響。

五、安胎方對於 ATPase 活性的影響

我們共測了當歸芍藥散、芎歸膠艾湯及保產無憂方三味安胎藥，發現當歸芍藥散在 500ppm 及 1000ppm 時會使得 ATPase 的活性升高，而芎歸膠艾湯在 250ppm 以上的濃度，活性驟降至一半。保產無憂方抑制的效果則不太明顯（圖 3-6）。然而當歸芍藥散組並沒有因濃度提高而有運動特別活躍的情形；可是芎歸膠艾湯 250ppm 組比較無抑制 ATPase 活性，但是此濃度的仔魚活潑性較大。保產無憂方卻是因後期加入，反而仔魚行為比較活潑。因此初步的結果看來，ATPase 的活性應不是影響其行為表現的主要原因。

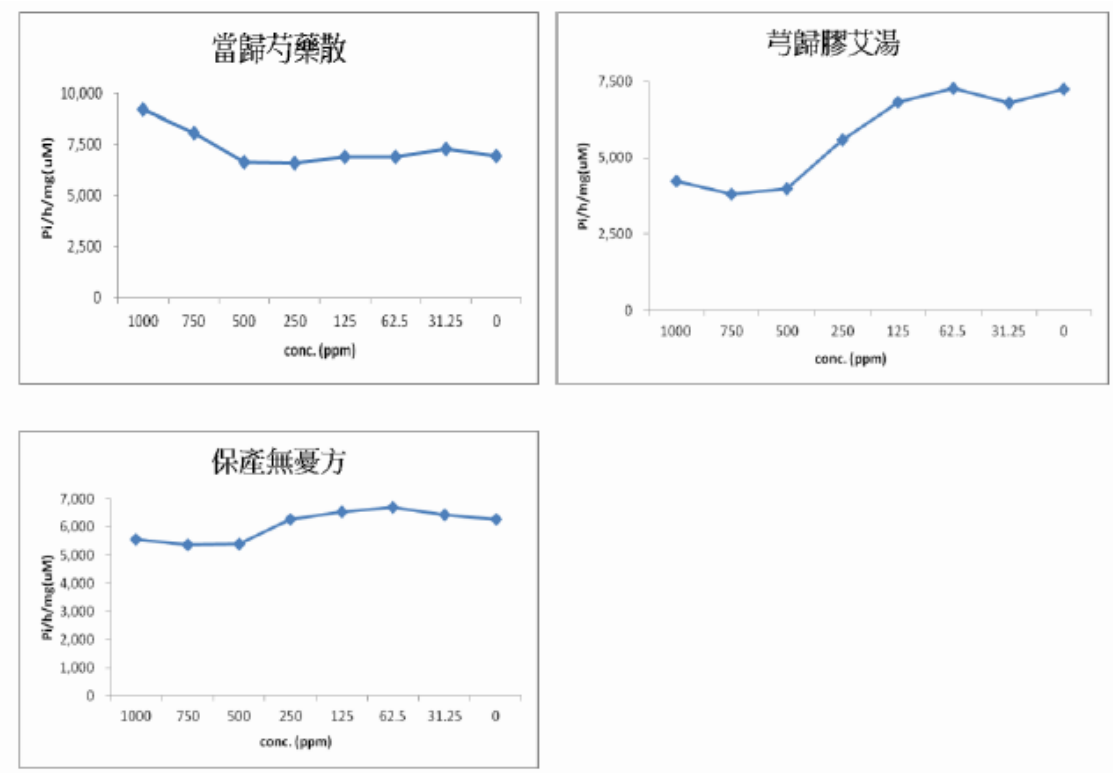


圖 3-6 安胎方對於 ATPase 活性的影響

六、目前所得的結果:

1. 胚胎死亡率改變：

(1) 受精後 0 小時即給予當歸芍藥散、芎歸膠艾湯不會造成胚胎死亡，而保產無憂方隨著濃度增加造成胚胎死亡率增加。

(2) 受精後 24 小時給予當歸芍藥散、低劑量芎歸膠艾湯及保產無憂方不會造成胚胎死亡。

2. 孵化速率改變：

(1) 給予高劑量或低劑量當歸芍藥散皆會造成胚胎延遲至 72h 才孵化，並且孵化率與對照組無明顯差異。

(2) 給予低劑量芎歸膠艾湯能延遲胚胎孵化，但生存狀況良好。而

高劑量給予芎歸膠艾湯雖能延遲孵化，但會造成胚胎孵化後不久就死亡。

(3) 保產無憂方亦延遲胚胎孵化，受精後 0 小時即給予保產無憂方(>250 ppm)會造成胚胎孵化率下降 15~20%。而受精後 24 小時給予保產無憂方，僅延遲胚胎孵化但孵化率與對照組相似，且越高劑量越快孵化。

3. 仔魚發育情形

(1) 體型縮短—在受精後 12 或 24 小時給予安胎方皆會造成仔魚不同程度的體型縮短。而 受精後 0 小時 給予保產無憂方並未造成仔魚體型縮短。

(2) 神經發育—低劑量芎歸膠艾湯使得胚胎及孵出第四天仔魚運動情形變得比較活潑，或是 24 小時才加入保產無憂方也會使得孵出第四天仔魚運動情形變得比較活潑。然而這數據並無法用 ATPase 活性做出完整的解釋，我們推測可能的機轉與安胎方造成胚胎及仔魚腦部 Na+-K+ ATPase 或 Ca2+-ATPase 活性的改變並不是直接相關。

七、未來將進行的研究

1. 利用已轉殖螢光基因的斑馬魚來觀察腦部發育。
2. 擬利用抗體以西方點墨法量得該酵素蛋白在腦區的含量，進一步探測安胎方影響神經活動的可能機轉。

肆、結論與應用

在斑馬魚胚胎發育初、中、後三期來說，當歸芍藥散在 1000ppm 及其以下

的用藥雖有延遲但不影響孵化率，仔魚第四天活動情形也不錯，亦增進 ATPase 活性，故以我們的數據而言，當歸芍藥散是可行的。

芎歸膠艾湯在胚胎發育初、中期的用藥應選用較低劑量為宜，因為高劑量雖有孵出，卻會陸續死亡；另外，低劑量組的活動情形也較高劑量組活潑，故以我們的數據而言，芎歸膠艾湯以低劑量施用是可行的

若以斑馬魚胚胎孵化成功為目標來說，保產無憂方確實是胚胎發育後期之安胎順產藥劑，因為後期加藥的孵化率不僅與對照組相似，且高劑量組的仔魚活動情形也明顯增加；但初期加藥反而胚胎死亡率隨濃度增加而增加，因此不建議早期使用保產無憂方。這個實驗數據可提供做為後續哺乳類實驗用藥量評估及中醫在斟酌孕婦用藥的參考。

伍、參考文獻

1. 中華實驗動物學會。(2010) 實驗動物管理與使用指南。第 22 章 斑馬魚與牛蛙。廖欽峰、廖有地。181-186。行政院農業委員會，台北。
2. 周件貴與席文勝。(1996) 當歸芍藥散的組方和藥理藥效研究。中醫藥信息， (5): 224-25。
3. 夏桂成。中醫婦科理論與實踐。北京，人民衛生出版社：318-302。
4. 張山雷。沈氏女科輯要箋正。台灣。旋風出版社；354-5。(1933)。
5. 楊仁鄰。(2004) 先兆性流產的中西醫治療中國中醫臨床醫學雜誌。 10 (4) 308-315
6. 楊仁鄰。(2001.4.25) 對於『保產無憂方』（十三味，十三太保方，安胎飲）適應症及使用時機的建議。台北榮民總醫院傳統醫學科。 http://wd.vghtpe.gov.tw/ctm/site.jsp?id=7313
7. 楊喬。(2008) 當歸芍藥散治療作用的研究進展。醫學縱述(14): 1545-1547.
8. Hung, MW., Zhang, ZJ., Li, S., Lei, B., Yuan, S., Cui, GZ., Hoi, PM., Chan, K., & Yuen Lee, SM. (2012) From omics to drug metabolism and high content screen of natural product in zebrafish: anew model for discovery of neuroactive compound. Evidence-based complementary and alternative medicine. ID 605303, 1-20. (doi:10.1155/2012/605303)

9. Sotiriadis, A., Papatheodorou, S., & Makrydimas, G. (2004): Threatened miscarriage: evaluation and management. BMJ, 329:152-5.

評語

利用斑馬魚胚胎發育探討三種妊娠中藥影響：

1.利用複方，不知有效成份；

2.結果是否能延伸到人類上有待進一步證實；

3.數據並無統計分析。