
認識身旁的小傢伙(19)--探討昆蟲免疫系統之敵我辨識與記憶效應等性質的實驗方法

吳季昀 蔡任圃*

臺北市立中山女子高級中學

壹、前言

高中生物課程中，關於「免疫系統」的探討活動為「抗原抗體反應」，運用採集血液與抗體凝集等步驟檢測血型，蔡(2014)提出此實驗的若干缺點，並開發觀察昆蟲包囊作用的方法，以銅絲作為入侵物，探討電荷對包囊程度的效應。但若能利用「包囊作用」易觀察、量化的特性，探討教材中所介紹的人體免疫系統特性，則更具成效與價值。

昆蟲依賴「先天性免疫」以防禦入侵物(Hoffmann, 1995; Ottaviani, 2005)。當異物入侵時，可引起昆蟲「體液性」與「細胞性」的免疫反應，前者例如：血淋巴中蛋白質的凝固和黑化；後者例如：吞噬作用與包囊作用等。昆蟲具有多種血淋巴細胞，其中漿血細胞與顆粒細胞除了參與吞噬異物的作用外，也可透過細胞伸展、扁平化後將異物層層包覆，以避免入侵物擴散至體內的其他地方，或使其被去活化(Hoffmann, 1995)，此過程稱為包囊作用(Pech and Strand, 1996; Ottaviani, 2005)。包囊作用共有三個步驟：首先，顆粒細胞接觸到外來物質，發出訊息。接著，漿血

細胞會附著在外來物上，發出訊息。最後，顆粒細胞在外來物表面形成一層包覆的膜，包囊作用即完成(Pech and Strand, 1996)。

人體與昆蟲的免疫機制存在著許多不同之處(表一)，一般認為昆蟲的免疫系統不具有記憶性及專一性，是一種與生俱來的先天性免疫反應。但科學界已發現許多昆蟲的免疫特性，性質上類似人體的免疫作用(見下述)。包囊作用的反應明顯、容易觀察、量化，可做為昆蟲免疫反應程度的指標。本文介紹如何以蟑螂的包囊作用作為免疫反應模式，來操作、探討其相關因子。

一、性別因子

美洲蟑螂雄蟲與雌蟲的外型不同。雄蟲成蟲體重較輕，體型一般較為細長、扁瘦，前翅的長度超過腹部末端；而雌性成蟲體重較重，身軀較為短胖，前翅的長度約與腹部末端切齊(蔡, 2006)。尤其是，雌蟲的脂肪體較多，血淋巴細胞較多，也具懷孕、孕育下一代的任務。我們推測，雌蟲的免疫功能可能與雄蟲不同。

*為本文通訊作者

表一 人體及昆蟲免疫作用與性質之比較。

免疫作用 或相關性質	人體	昆蟲
第一道防線	皮膜組織(角質層)及其分泌物 (淚液、唾液、消化液)	皮膜組織(幾丁質外骨骼) 及 其分泌物(唾液、消化液、腺體分泌物)
吞噬作用	嗜中性白血球、 巨噬細胞、樹突細胞等	漿血細胞、顆粒細胞等(Ottaviani, 2005)
發炎反應	受傷組織、嗜中性白血球 分泌組織胺所引發	相關研究甚少
包囊作用	例子甚少，如肺結核的結節	漿血細胞、顆粒細胞等 (Ottaviani, 2005)
組織黑化 (malanization)	相關研究甚少	類絳色細胞(oenocytoids)具有酚氧化酶 (phenoloxidase)的活性與黑化過程有關 (Ottaviani, 2005)
排斥反應	主要由 T 淋巴球執行	可 (Carton, 1976、Ottaviani, 2005)
可辨識敵我	可	可 (Lackie, 1979、Lavine and Strand, 2002)
具專一性	由 T 淋巴球與 B 淋巴球的受 體或抗體執行	相關研究甚少 (Faulhaber and Karp, 1992)
具記憶性	由記憶細胞執行	相關研究甚少 (Faulhaber and Karp, 1992)

二、敵我辨識(自我/非我的辨識)

若將美洲蟑螂(*Periplaneta americana*)與蝗蟲(*Schistocerca gregaria*)的組織作異種間移植，兩者的包囊作用皆展示具辨識敵我(non-self or self)的免疫特性(Lackie, 1979)。蟑螂具有排斥異體移植組織的現象，而對自體組織則無(Carton, 1976)。蟑螂已知可辨識異種生物的組織植入物，但對同種異體的組織植入物的反應為何？可否展現自我/非我的辨識能力？

三、入侵物表面蛋白

免疫細胞常是透過受體偵測入侵物的表面醣蛋白，以作為入侵物是否為「非我組織」的依據。生活中常見的酒精，具有使蛋白質變性的作用。若將上述敵我辨識的實驗操作，事先以酒精處理，使植入物表面蛋白變性，是否有會影響敵我辨識的免疫效應？此實驗可驗證表面蛋白在免疫辨識過程中的角色。

四、記憶效應

無脊椎動物個體先前的免疫經驗，可增加之後對同樣病原體的免疫反應(具有

預防性)，此現象被稱為免疫誘發 (immunological priming)(Little and Kraaijeveld, 2004)；Faulhaber and Karp(1992)發現，若事先於蟑螂體內注射殺死的細菌，可有效提高之後再注射活菌之個體的存活率，而在昆蟲免疫的研究領域中，鮮少探討昆蟲的免疫系統是否具記憶效應。利用包囊作用的模式，亦可探討記憶效應的相關性質。

五、包囊作用是否具可逆性？

包囊形成後，包覆於入侵物表面的細胞還會散出嗎？也就是包囊作用是否具可逆性？這些問題可利用電荷對包囊作用的影響(蔡，2014)作為研究基礎進行探討。

貳、研究方法或過程

一、研究設備及器材

如表二。

表二 實驗裝置與器材

編號	名稱	型號或規格	備註
1	複式顯微鏡		
2	照相機	Super Steady Shot DR-SR11	Sony
3	75%乙醇溶液		
4	蟑螂屋貼紙與膠帶		上黏蟑螂屋
5	錐形瓶		
6	解剖器材	解剖刀(小剪)、鑷子	
7	蟲針		
8	二氧化碳鋼瓶		麻醉用二氧化碳
9	載玻片、蓋玻片	76*26mm 1.2-1.5mm	

二、實驗動物

美洲蟑螂 (*Periplaneta americana*) 成蟲，為本校自行飼養繁殖。飼養方式與實驗動物篩選參考自蔡(2014)。

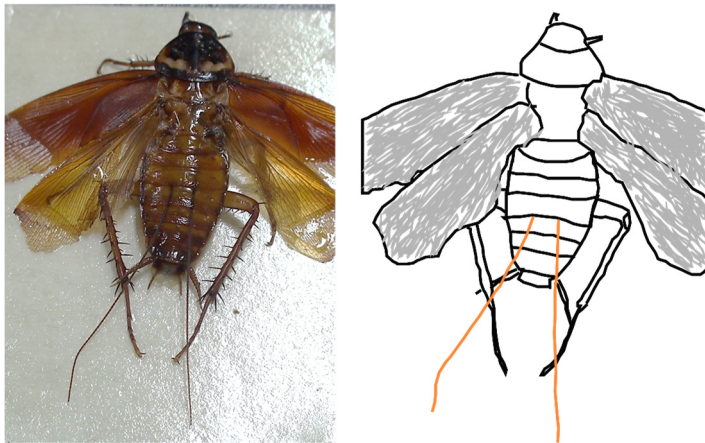
三、研究過程及方法

(一) 以蟑螂觸角為作為植入物，觀察包囊作用的方法

蟑螂以二氧化碳麻醉後，將觸角自基部(梗節與鞭節之間)剪下，置於載玻片上(不覆蓋蓋玻片以避免觸角因壓迫變形)，利用顯微測微器測量觸角鞭節基部區域的直徑(單位為 μm)。以觸角作為植入物，以觸角基部做為前端，由蟑螂腹部背側第 5 與第 6 片背板骨片之間的縫隙薄膜穿入(蟑螂腹部背板骨片共有 8 片)，使觸角進入蟲體體腔內(圖一)。

若因觸角過軟難以插入，可先用 00 號蟲針先穿出孔洞，觸角再順著孔洞插入。待觸角植入蟲體引發包囊作用(約 15 分鐘)後，以鑷子將骨片翻開並小心取出觸角(避免觸角上所形成的包囊組織剝落)，再由目鏡測微器測量觸角上最大的包囊直徑(單位為 μm) (圖二)，以比較包囊作用的程度。由於本實驗中鞭節直徑在各組蟑螂(雄蟲)間不具差異(單尾 t 檢定, $p > 0.05$)，故可直接以最大包囊直徑(包囊+觸角的直徑)作為免疫反應程度的指標。

我們已證實二氧化碳麻醉時，對植入的自體觸角所產生的最大包囊直徑(平均 \pm 標準差)為 $568.75 \pm 51.23 \mu\text{m}$ ，與未麻醉時的 $609.38 \pm 111.01 \mu\text{m}$ 未達統計上的顯著差異(單尾 t 檢定, $n = 16$)；對植入的異體觸角所產生的最大包囊直徑為 $771.86 \pm 129.38 \mu\text{m}$ ，與未麻醉時的 $860.94 \pm 207.16 \mu\text{m}$ 也未達統計上的顯著差異(單尾 t 檢定, $p > 0.05$, $n = 16$)，代表二氧化碳麻醉過程，不會影響包囊作用。



圖一 探討蟑螂包囊作用時，植入物所植入的位置。



圖二 測量包囊的最大直徑，實線為觸角的直徑，虛線為包覆於觸角的最大包囊直徑。

(二) 以蟑螂觸角為作為植入物，觀察包囊作用的方法

分別以雄性與雌性成蟲作為實驗動物，以探討性別因子的效應。由於雌、雄蟲的觸角直徑不同，雄蟲為 $449.22 \pm 82.18 \mu\text{m}$ (平均 \pm 標準差, $n=16$)，雌蟲為 $387.50 \pm 27.51 \mu\text{m}$ ($n=10$)，故比較其包囊作用的免疫反應程度時，需以包囊本身的截面積作為比較的指標，其計算方式為：

包囊本身的截面積 =

$$\pi(\text{包囊外徑}^2 - \text{觸角外徑}^2)$$

(三) 敵我辨識性質的探討

操作步驟如上述，將自體與異體觸角植入同一蟲體腹部背側體內，15 分鐘後以鑷子將骨片翻開並取出觸角，以目鏡測微器測量觸角最大包囊直徑。

(四) 入侵物表面蛋白

操作步驟如上述，實驗組將觸角剪下後，放入 75% 酒精溶液靜置 15 分鐘後取出，再靜置 5 分鐘待其乾燥後測量直徑。將酒經處理後的自體與異體

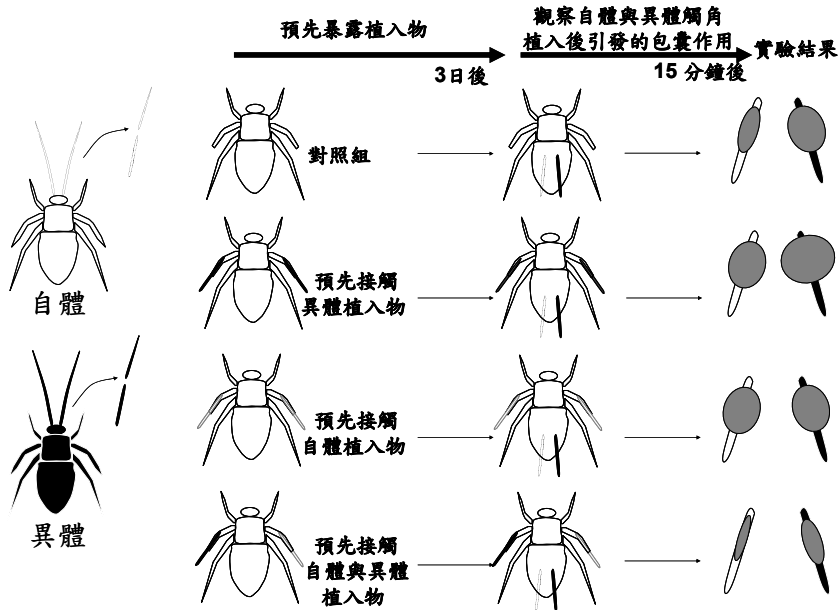
觸角植入蟲體體內，15 分鐘後取出測量，最後與對照組(觸角樣本未經酒精處理)的數據比較。

(五) 記憶效應

將實驗動物中腳之腿節與脛節交界處剪斷，形成一個傷口，將自體、異體、或自體與異體之觸角末端(鞭節末端較細之處，長度約 0.5 至 1 公分)樣本植入中腳剪開的傷口中(圖三)，使蟲體預先接觸植入物。將餘下的觸角，以目鏡測微器測量觸角直徑後妥善保存。待蟑螂清醒後放回錐形瓶，並給予妥善照顧。三日後，依上述包囊作用的觀察步驟，將自體與異體觸角植入腹腔，15 分鐘取出觀察、測量。本實驗的各組設計操作如圖四，探討接觸自體、接觸異體或同時接觸自體與異體觸角三日後的個體，其對自體與異體觸角包囊作用的反應程度，並與對照組(步足中腳剪開傷口，但未接觸觸角組織)相比。



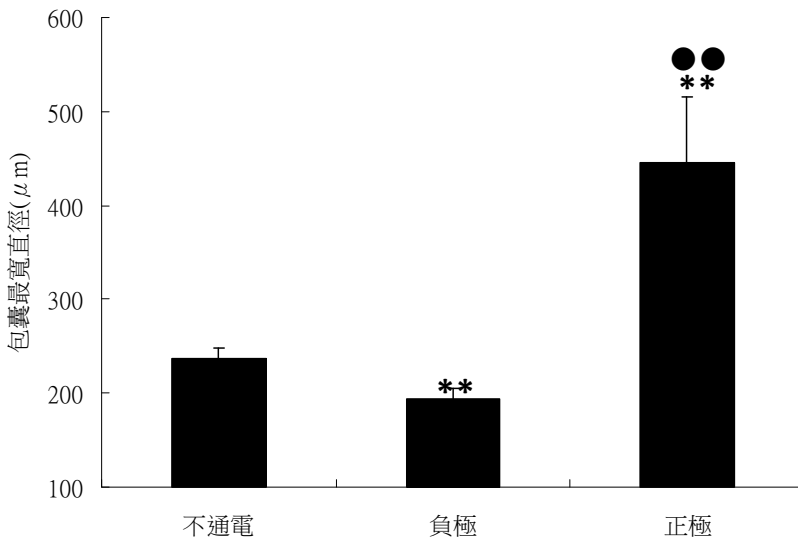
圖三 植入物(觸角前端組織)植入蟑螂中腳內的實驗照片(左)與手繪圖(右)。



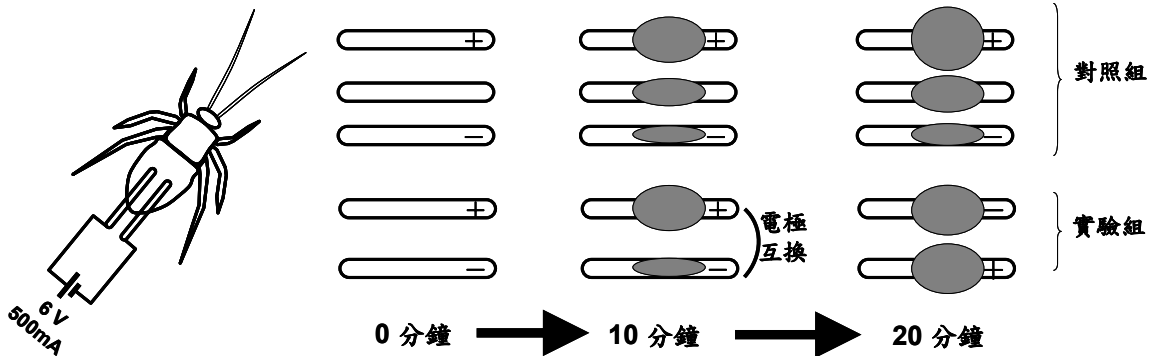
圖四 探討免疫系統之記憶效應的各組設計與操作，以對照組、接觸自體、接觸異體、接觸自體與異體觸角四組，探討預先暴露的免疫記憶性質。白色長條物代表自體觸角，黑色長條物代表異體觸角，灰色橢圓物代表包囊。

(六) 包囊作用是否具可逆性？

經我們的前測，發現植入蟑螂體內的銅絲連接電池的正極，可增加包囊作用的程度。反之，若銅絲連接電池的負極，則會抑制包囊作用(與未接電極的銅絲相比)(圖五)。我們利用此性質探討免疫細胞進行包囊作用時是否具有可逆性。實驗設計與操作如圖六。



圖五 不通電與正、負極銅絲植入蟲體 10 分鐘後所引發包囊作用的最大包囊直徑 (平均 ± 標準誤, n = 20, 10, 10)。與不通電相比(單尾 t 檢定): **: $p < 0.01$ 與負極相比(單尾配對 t 檢定): ••: $p < 0.01$



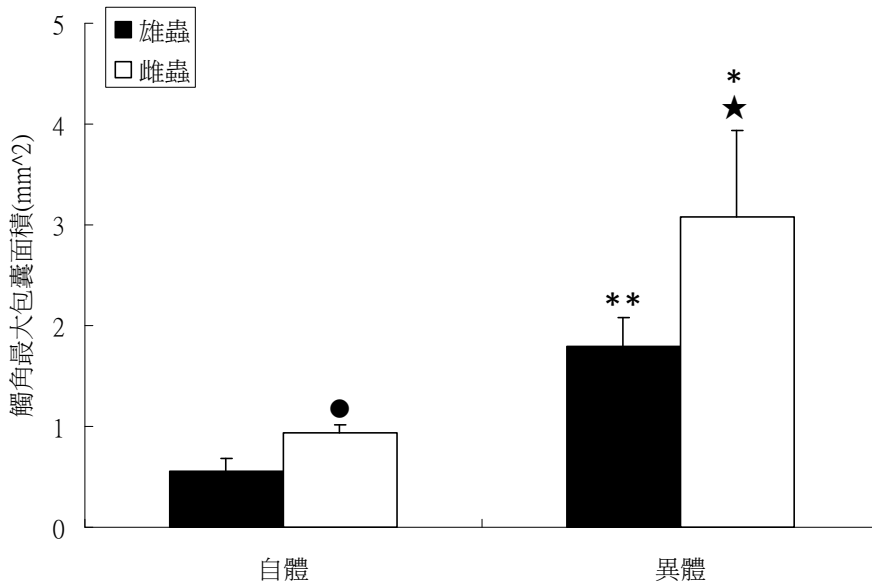
圖六 利用電荷對包囊作用的效應，探討免疫細胞進行包囊作用時是否具有可逆性的實驗設計與操作示意圖。

將銅絲植入蟲體，各自連接正負電極(1.5V)，分別於通電後 10 分鐘與 20 分鐘取出銅絲測量最大包囊直徑，作為對照組。實驗組的步驟如上，但於通電 10 分鐘後，在不取出銅絲的狀況下，交換正負極電源，再繼續通電 10 分鐘，最後取出銅絲測量最大包囊直徑，與對照組比較。

參、研究結果

一、性別因子

無論是異體或自體觸角，最大包囊截面積皆是雌蟲大於雄蟲(圖七)。



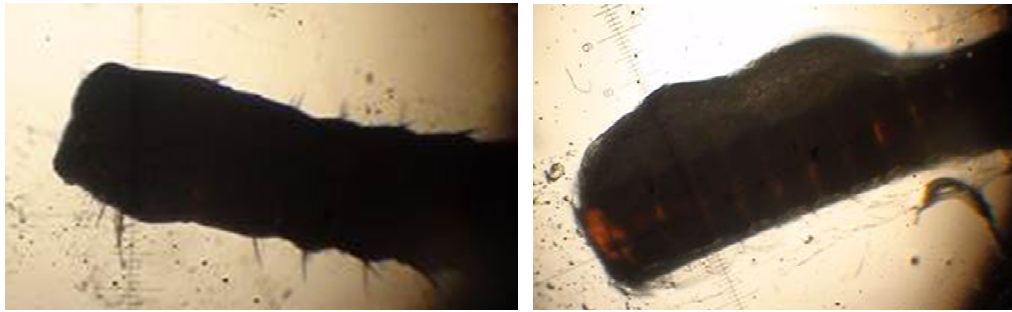
圖七 雄性(n = 16)與雌性(n = 10)之蟑螂成蟲對自體與異體觸角植入物，引發最大包囊作用的包囊截面積(平均 ± 標準誤)。

與自體觸角相比(單尾配對 t 檢定)：* : $p < 0.05$; ** $p < 0.01$

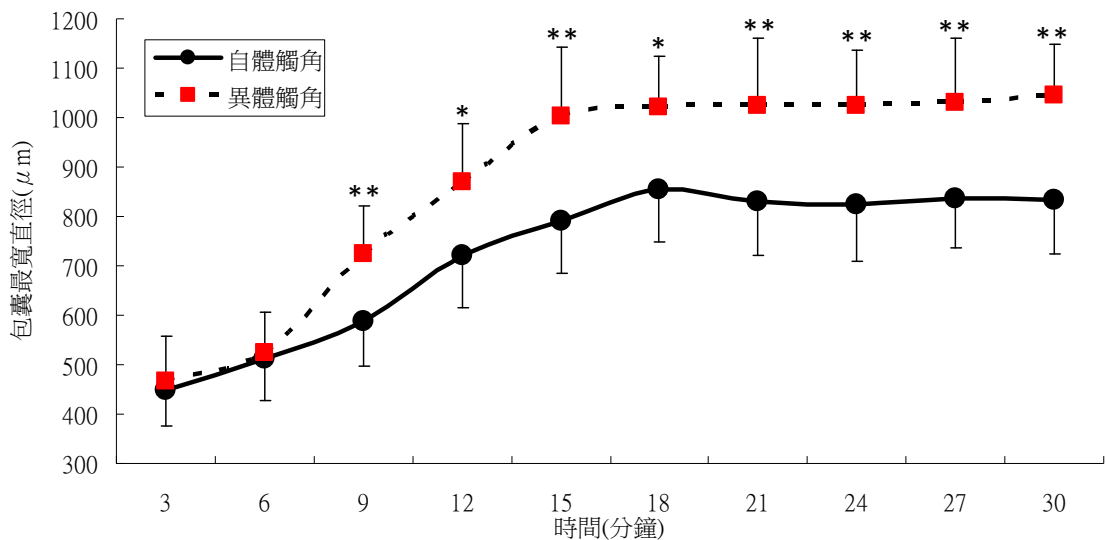
與雄蟲相比(單尾配對 t 檢定)：★ : $p = 0.087$; ● : $p < 0.05$

二、敵我辨識

將自體與異體觸角植入蟑螂後，每三分鐘取出部分個體的植入物進行測量(圖八)，可觀察到包囊的形成隨時間越來越大(圖九)，其中異體植入物引發的包囊作用強度大於自體植入物，且皆於第 15 分鐘時達到飽和，故後續實驗以 15 分鐘作為植入物引發包囊作用的反應時間。

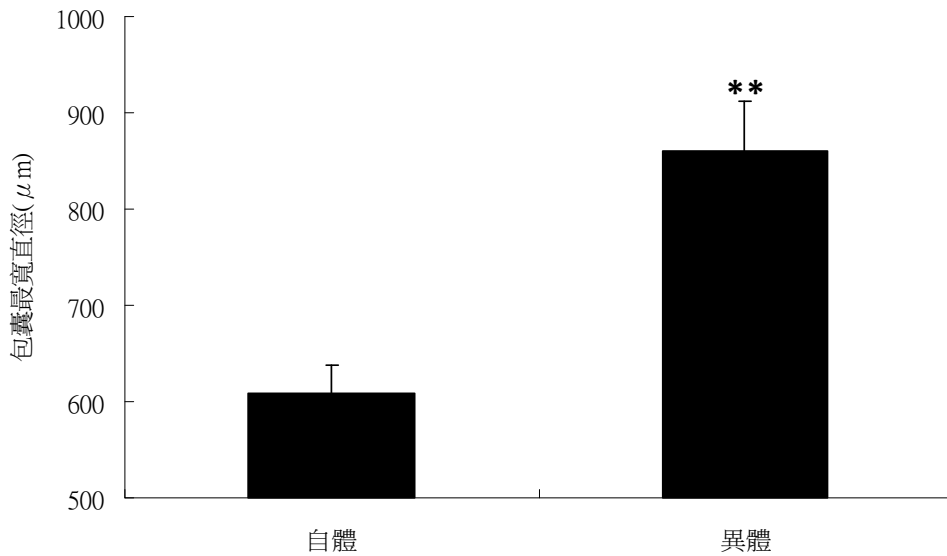


圖八 自體觸角(左)與異體觸角(右)於蟑螂體內引發的包囊作用照片。



圖九 自體與異體觸角植入蟲體後隨時間所引發的最大包囊直徑(平均 ± 標準誤，每個數據取樣數為 6，共使用 60 隻蟲體)。與自體觸角相比(單尾配對 t 檢定)：*： $p < 0.05$ ；**： $p < 0.01$

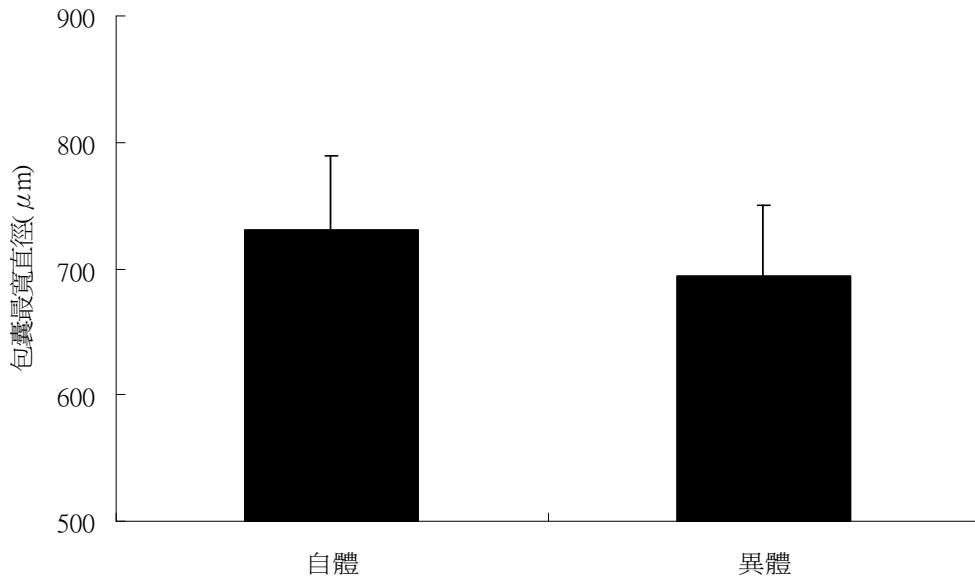
觀察自體組織與異體組織所以引發的包囊作用，我們發現異體觸角所引發的包囊作用大於自體觸角，證實蟑螂的免疫系統具有敵我辨識的能力(圖十)。



圖十 自體與異體觸角植入蟲體後引發的最大的包囊直徑(平均 ± 標準誤, n = 16)。與自體觸角相比(單尾配對 t 檢定): ** : $p < 0.01$

三、入侵物表面蛋白

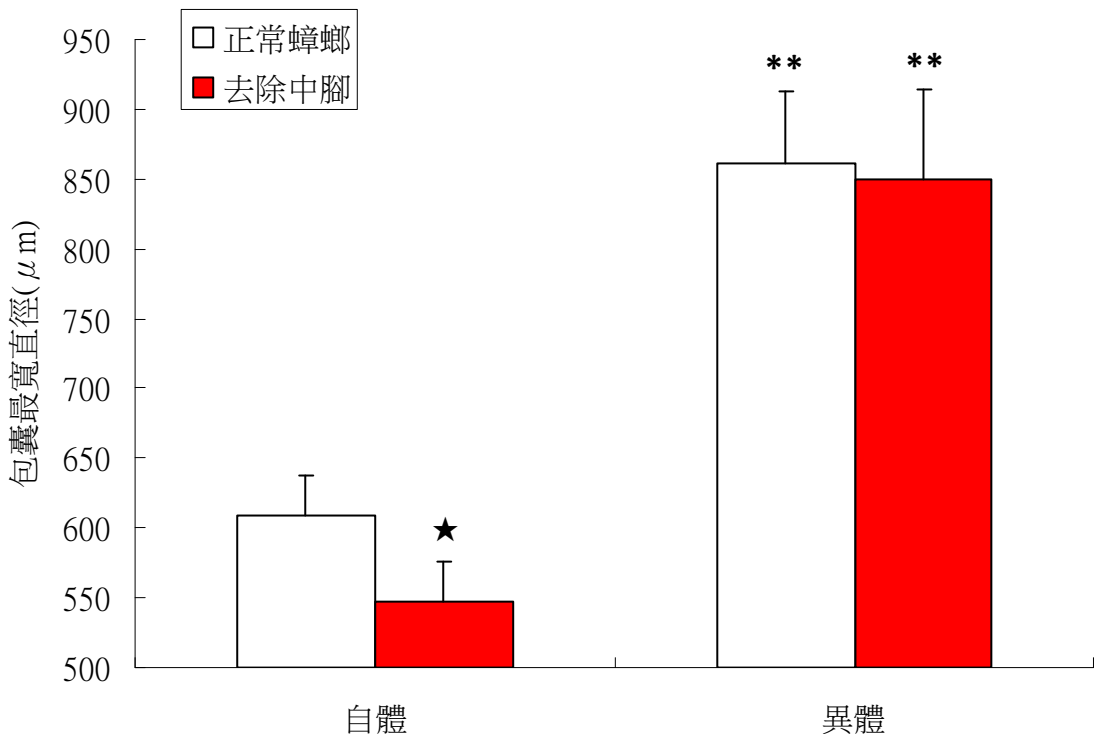
自體與異體觸角樣本經酒精處理(使表面蛋白變性),再植入蟲體後比較其包囊作用的程度,發現自體與異體觸角樣本所引發的包囊作用沒有差異(圖十一),也就是若植入物經酒精處理後,可削弱甚至去除蟑螂免疫系統的辨識敵我現象。



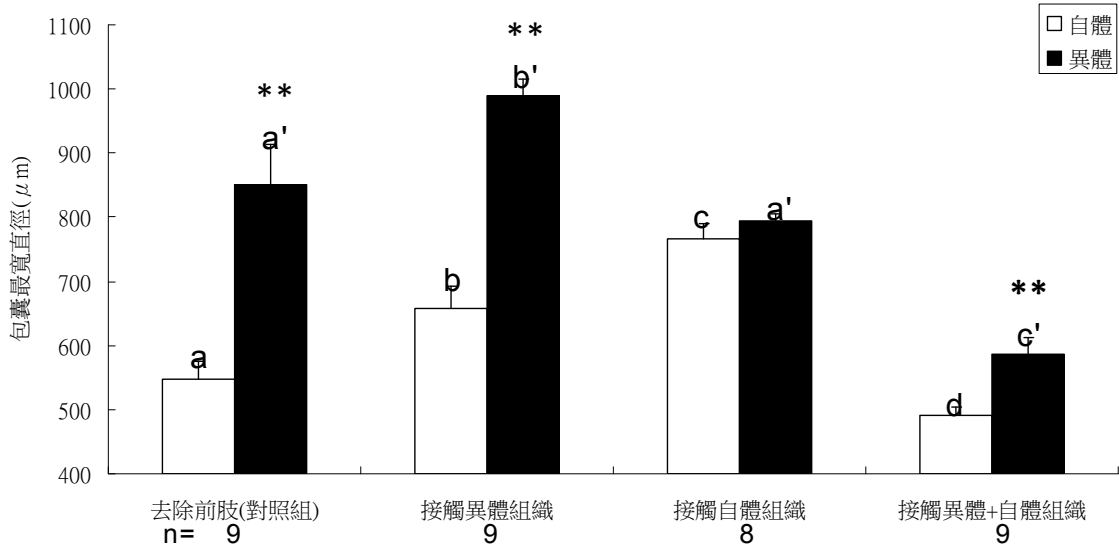
圖十一 自體與異體觸角經酒精處理後,植入蟲體後引發的最大的包囊直徑(平均 ± 標準誤, n = 12)。與自體觸角相比(單尾配對 t 檢定): 未達統計差異

四、記憶效應

若只去除中腳步足，則三日後除了略為減弱自體觸角的包囊作用外，對觸角引發包囊作用的相關性質影響不大(圖十二)。接觸異體組織三天後可增加自體與異體觸角所引發的包囊作用；接觸自體組織三天後可增加自體觸角所引發的包囊作用，但不影響異體觸角的包囊作用。若同時接觸自體與異體組織三天後，則可減弱自體與異體觸角所引發的包囊作用(圖十三)。若以未預先接觸入侵物之蟲體的包囊作用作為對照組，將實驗數據轉變成改變百分比(表三)，則可比較出各種預先暴露入侵物的處理，對包囊作用的效應。其中，若預先接觸異體組織，則三天後該蟲體對異體入侵物的包囊作用增加(增加 21.09%)，但對自體入侵物的包囊則無影響；若預先接觸自體組織，則三天後該蟲體對自體入侵物的包囊作用增加(增加 33.15%)，但對異體入侵物的包囊作用卻減少(減少 13.41%)；若預先接觸自體與異體組織，則三天後該蟲體對自體與異體入侵物的包囊作用皆減少(各減少 13.24%與 28.23%)。由以上數據可知，美洲蟑螂不但具有類似人體免疫系統的記憶性質，且其免疫的記憶機制可能會表現抑制性的調節。換句話說，昆蟲免疫系統可能包含活化性與抑制性兩種不同的記憶性質。



圖十二 正常蟑螂(n = 16)與去除中腳蟑螂(n = 9)對自體或異體觸角引發包囊作用的最寬包囊直徑(平均 ± 標準誤)。
與自體觸角相比(單尾配對 t 檢定)：**：p < 0.01
與正常蟑螂相比(單尾 t 檢定)：★：p = 0.065



圖十三 體內細胞接觸自體或異體觸角三天後，對自體或異體觸角引發包囊作用的最寬包囊直徑(平均 ± 標準誤，n = 取樣數)。

a、b、c、d：自體觸角引發包囊作用之各組間達統計之顯著水準($\alpha = 0.05$)

a'、b'、c'：異體觸角引發包囊作用之各組間達統計之顯著水準($\alpha = 0.05$)

與自體觸角相比(單尾配對 t 檢定)：**： $p < 0.01$

表三 對自體或異體組織的記憶性質對蟑螂包囊作用的效應。

預先接觸的組織	記憶效應	
	對自體組織的免疫反應	對異體組織的免疫反應
去除前肢	-12.44*	-9.73
接觸異體組織	+8.22 ^c	+21.09** ^b
接觸自體組織	+33.15** ^a	-13.41** ^d
接觸自體+異體組織	-13.24*	-28.23**

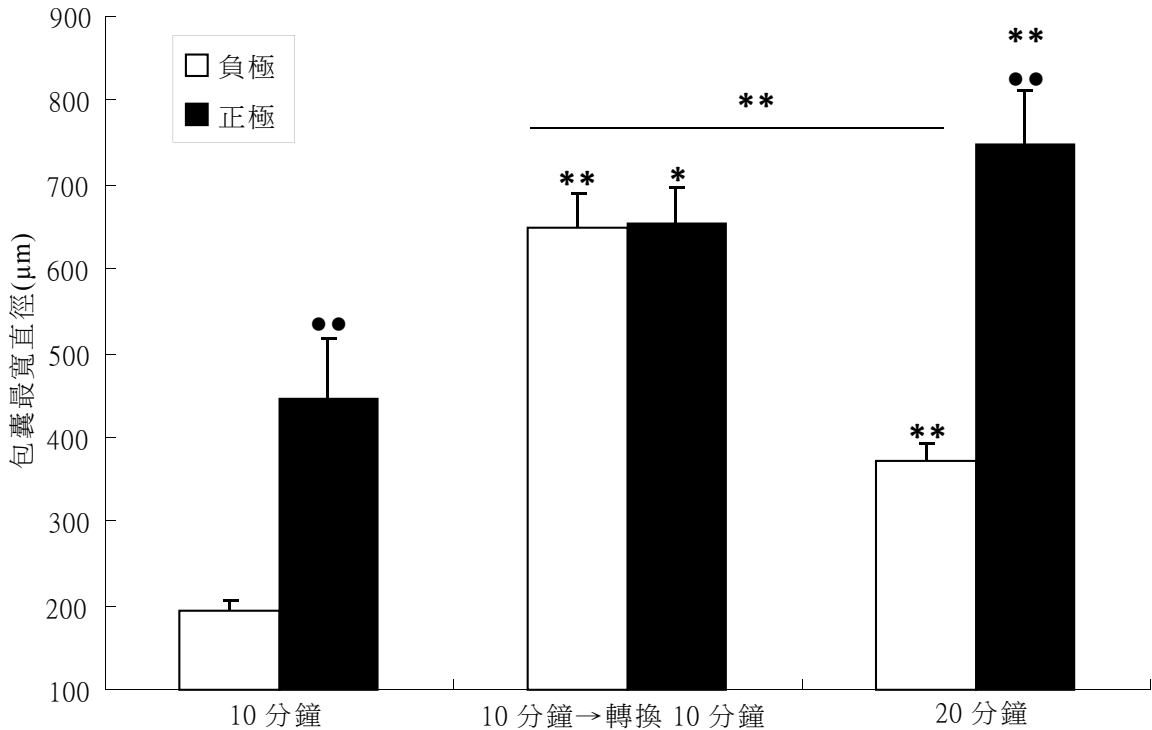
註：本表為與無記憶效應(蟲體未預先接觸入侵物)的組別相比，所增加或減少的百分比。記憶效應與無記憶時相比(單尾 t 檢定)：●： $p = 0.08$ ；*： $p < 0.05$ ；**： $p < 0.01$

「接觸自體組織後對自體觸角^a」與「接觸異體組織後對異體觸角^b」的免疫反應相比(單尾 t 檢定)： $p < 0.05$

「接觸異體組織後對自體觸角^c」與「接觸自體組織後對異體觸角^d」的免疫反應相比(單尾 t 檢定)： $p < 0.01$

五、包囊作用是否具可逆性？

若先通電 10 分鐘後交換正負電極，再繼續通電 10 分鐘後，則此兩銅絲的包囊程度不具差異，且大於通電 10 分鐘的正電銅絲，小於通電 20 分鐘的正電銅絲(圖十四)，顯示包囊細胞形成包囊後不會散去。也就是說，包囊作用不具可逆性。



圖十四 負極與正極銅絲植入蟲體 10 分鐘、10 分鐘後轉換 10 分鐘、20 分鐘所引發包囊作用的最大的包囊直徑(平均 ± 標準誤, n = 10, 10, 10)。
 與 10 分鐘組相比(單尾 t 檢定): ** : $p < 0.01$
 與負極相比(單尾配對 t 檢定): •• : $p < 0.01$

肆、討論

本文介紹一個觀察、量化蟑螂包囊作用的模式，可用於探討昆蟲免疫系統的各項性質。證實了美洲蟑螂的免疫系統具有辨識敵我與記憶性等特性，且辨識敵我的特性與植入物的表面蛋白有關。此外，免疫反應也具有性別差異。我們發現雄蟲的觸角較雌蟲粗，這可能是因為雄蟲的觸角需用來偵測性費洛蒙，所以有較發達的觸角。我們也發現雌蟲的包囊作用較雄蟲來的強烈，可能因雌蟲體型較大，具有較多血淋巴細胞，因此對於外來物的免疫反應較為顯著。

透過這個模式，可觀察到自體和異體

觸角所引發的包囊作用具有明顯差異：異體觸角引發的包囊作用明顯大於自體觸角(圖十)，且雄蟲與雌蟲皆然(圖七)。代表蟑螂的免疫系統具有辨識自體與異體入侵物的能力。

在探討免疫記憶特性方面，研究初期我們將蟑螂前腳剪下，植入蟲體腹部，作為預先暴露的植入物，但死亡率過高(死亡率達 90%)。我們認為是因植入物過大，植入過程所造成的傷口易致死或影響正常生理功能，因此改用觸角作為植入物樣本(體積小、植入過程造成的傷口較小)進行研究，實驗過程中死亡率小於 1%。我們也曾嘗試將自體、異體觸角重複插入同一個

體三次，每組相隔 15 分鐘並測量每次包囊作用的程度。結果發現其引發的包囊作用強度一次比一次弱(表四)，不過異體觸角引發的包囊作用仍然明顯大於自體。Pech and Strand(1996)認為在包囊作用過程中，血球細胞通常容易被消耗且無法在短時間內恢復。本實驗的植入物也會消耗了體內的免疫細胞，故於第二、三次植入時沒有足夠的免疫細胞進行包囊作用，導致第二與第三次的包囊作用程度逐漸下降。

為了克服接觸外來物時(以建立記憶性)可能過渡消耗免疫細胞的問題，我們將實驗設計改良成將觸角末梢(體積較小)植入步足肌肉內。由於免疫細胞較不易大量進入肌肉組織內形成包囊，故此設計不但可達到使蟲體接觸外來物的目的，亦能避免免疫細胞的過渡消耗。透過這個改良後的實驗方法，發現美洲蟑螂的免疫系統確實具有記憶性，但對自體與異體組織的記憶效應不同：預先接觸異體組織可增加對自體與異體觸角的免疫程度；預先接觸自體組織只增加對自體觸角的免疫程度。若預先同時接觸自體與異體組織，則可減弱對自體與異體觸角的免疫程度(圖十三、表三)。

為了探討植入物(觸角)表面的蛋白質

結構，是否為包囊作用所辨識的對象，我們利用酒精可使蛋白質變性的性質，同時處理異體與自體觸角，結果發現兩者所引發包囊作用程度沒有差異(圖十一)。這意味著在酒精處理植入物後，包囊作用的敵我辨識性質消失，。我們推論作為敵我辨識的分子可能是觸角表面的蛋白質，而不同個體的觸角表面蛋白具有差異，但經酒精處理後(使蛋白質變性)，個體間的蛋白質結構差異即消失了。

蔡(2014)曾發現美洲蟑螂對帶正電之銅絲，所引發的包囊作用明顯大於帶負電的銅絲。本實驗更進一步發現，帶正電之銅絲可增加包囊作用(大於不通電的銅絲)，而帶負電的銅絲可抑制包囊作用(小於不通電的銅絲)。我們好奇參與包囊作用的細胞是否可轉移，即是否具有可逆性？於是我們在「帶正電銅絲可增加包囊作用，而帶負電銅絲可抑制包囊作用」的基礎下，將正極與負極互換，結果發現先通正電之銅絲所包覆的包囊細胞並沒有因為改變成負極銅絲而離散，而連接負極而後改變成正極的銅絲，其包囊作用強度與先通正極銅絲的包囊作用，也沒有差異(圖十四)，因此推測蟑螂的包囊作用不具有可逆性。

表四 入侵物於短時間內連續植入所引發的包囊大小比較。

(以自體觸角第一次植入引發的包囊最大直徑定義為 100%，n = 14)。

植入順序	自體植入	異體植入
第一次	100.0 ± 2.3%	124.6 ± 6.5%
第二次	*91.1 ± 3.6%	117.1 ± 7.2%
第三次	**84.0 ± 3.5%	**92.9 ± 2.9%

與第一次相比(單尾配對 t 檢定)：*：p < 0.05；**：p < 0.01。

參考文獻

- Carton, Y. 1976. Isogenic, allogenic, and xenogenic transplants in an insect species. *Transplantation*. 21(1):17-22.
- Faulhaber, L. M. and Karp, R. D. 1992. A diphasic immune response against bacteria in the American cockroach. *Immunology*. 75(2): 378-381.
- Hoffmann, J. A. 1995. Innate immunity of insects. *Curr. Opin. Immunol.* 7(1): 4-10.
- Lackie, A. M. 1979. Cellular recognition of foreign-ness in two insect species, the American cockroach and the desert locust. *Immunol.* 36(4): 909-914.
- Lavine, M. D. and Strand, M.R. 2002. Insect hemocytes and their role in immunity. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 32: 1295-1309.
- Little, T. J. and Kraaijeveld, A. R. 2004. Ecological and evolutionary implications of immunological priming in invertebrates. *Trends. Ecol. Evol.* 19(2): 58-60.
- Ottaviani, E. 2005. Insect immunorecognition. *Inv. Surv. J.* 2: 142-151.
- Pech, L. L. and Strand, M. R. 1996. Granular cells are required for encapsulation of foreign targets by insect haemocytes. *J. Cell Sci.* 109: 2053-60.
- 蔡任圃，2006。認識身旁的小傢伙(2)－美洲蟑螂外部型態與內部器官的初步觀察。科學教育月刊，290，43-47
- 蔡任圃，2014。認識身旁的小傢伙(14)－昆蟲包囊作用的觀察。科學教育月刊，371，41-47。