

認識身旁的小傢伙(27)－以誘發自噬行為 與熱刺激探討蟑螂步足之痛覺受體(上)

陳奕嫻 蔡任圃*

臺北市立第一女子高級中學

壹、前言

踩死蟑螂的過程，蟑螂受傷會痛嗎？昆蟲是否可感受痛覺，一直是科學未解之謎。

2021 年諾貝爾生理或醫學獎頒發給發現溫度感覺與觸覺受體分子的學者，其中溫度感覺受體屬於瞬時受體電位(transient receptor potential ion channels, TRP)離子通道家族，包含熱覺受體(如：TRPV1)與冷覺受體(如：TRPM8)等受體。這兩類受體也是痛覺的受體(蔡，2021)，而辣椒素(capsaicin)可作用於 TRPV1，同時使人產生熱與痛覺。這個研究成果證明痛覺與其他感覺(如：溫度感覺)有關，也可由特定的化學物質(如：辣椒素)引發，為痛覺的研究領域建立了分子機制與研究模式。

我們曾以辣椒粉加入橄欖油後加熱，製成辣椒油，透過辣椒素的刺激研究昆蟲的痛覺性質，進行兩項前測實驗：

- 一、將吸附橄欖油和辣椒油的棉花，分別置於蟑螂飼養箱內。我們發現蟑螂較偏好爬上吸附辣椒油的棉花，進食辣椒油的隻/次數明顯多於橄欖油(圖一)。
- 二、以棉花棒吸附辣椒油或橄欖油，碰觸蟑螂口器引誘攝食。我們發現蟑螂較常主動攝食辣椒油。

以上的前測實驗證明了無法以辣椒素作為痛覺刺激物，這個現象如同鳥類一般，鳥類食用辣椒素時也不會感受到痛覺。昆蟲的痛覺研究必須找尋其他的研究策略。



圖一：蟑螂取食橄欖油(左)或辣椒油(右)的偏好不同。

*為本文通訊作者

哺乳動物的痛覺研究已進展到分子受器的層級，而無脊椎動物的研究卻極少見，多數學者主觀認為無脊椎動物沒有痛覺。由於昆蟲的神經元比脊椎動物少很多，所以昆蟲的行為與生理反應常被認為反射性的現象。昆蟲的神經元數量較少，可塑性較低，因此受到傷害時，常是反射而非產生痛覺，透過反射產生趨避行為，減少受傷害，這樣的演化趨勢是受限於昆蟲過於簡單的神經系統(Eisemann, *et al.*, 1984; Adamo, 2019)。例如：若對美洲螳螂的腹壁進行實驗性穿刺，可引發個體對傷口部位的梳理、清潔行為，這可能歸因於來自傷口部位的機械感覺輸入所引發的反射(Eisemann, *et al.*, 1984)。有人觀察，即使被螳螂捕捉且正被啃食的蝗蟲，仍可持續進食(Tiffin, 2016)。另外的觀察包含：即使步足的跗節已受損，並不會減少昆蟲行走時對步足的施力；當蚜蟲在被瓢蟲吃掉、采采蠅被剖開、或是寄生蠅幼蟲鑽入毛毛蟲體內時，這些昆蟲仍同時持續進食；許多昆蟲被大型內部寄生蜂吃掉的同時，仍過著正常的生活；雄性螳螂頭部在被性伴侶吃掉後，依然繼續交配(Eisemann, *et al.*, 1984)。受傷的螳螂和蟋蟀會吃掉自己的內臟，即使在不飢餓的情形下，仍會對內臟的蛋白質刺激做出反射並吃掉它(Adamo, 2019)。這些例子顯示昆蟲無法改變正在發生的反射行為，也沒有產生保護受損部位而直到癒合的相關行為，因此學者推測昆蟲可能沒有痛覺，或是非常的微弱。

Abbracchio 等人於 2013 年撰寫的教科書《神經科學——從分子到行為》中描述：除了人類，能夠感受到疼痛的是那些能夠感受到恐懼、焦慮、痛苦等情緒的動物；體驗情緒的能力與疼痛的體驗是無法分開的，並且只有大腦能夠識別疼痛訊息並賦予其意義，而心智(mind)會評估疼痛的嚴重程度。Eisemann 等人(1984)也認為疼痛感覺需要意識的參與，並提出痛覺至少包含兩個系統：一個為疼痛提供了感官辨別基礎(感覺受器傳遞至大腦)；另一個則是附加的不愉快情感和動機驅動的基礎(與大腦意識有關)。痛覺包含新皮層過程(neocortical processes)：提供包含感覺知覺、情感、反應動機和認知功能的多維體驗，而非只是非反射性的退縮、保護、攻擊和習得的迴避或攻擊。但這樣的描述限制了昆蟲的相關研究，因為不容易證明昆蟲是否具有意識活動與行為動機。

許多學者透過行為學的研究嘗試研究昆蟲的痛覺。Zabala 與 Gómez(1991)使用高溫刺激研究蟋蟀的逃避反應時間(escape reaction time, ERT)，發現注射嗎啡後蟋蟀的 ERT 增加。若阻斷了嗎啡的作用則會恢復，甚至產生了成癮(addiction)的現象。Yarali 等人(2008)以果蠅研究，發現若於氣味刺激後給予電擊，這樣的訓練可使果蠅預測電擊而避開；但若先給予電擊再以氣味刺激，則氣味代表從逆境中解脫出來(relief from shock)，這樣的訓練會使果蠅偏好該氣味；前者稱為懲罰學習(punishment learning)，後者稱為緩解學習(relief learning)，代表果蠅可判斷同一刺激可能代表不同意義，並可將電擊歸類於不好的痛苦經驗。Tracey 等人(2003)透過高溫刺激可引發果蠅幼蟲產生滾動行為的現象，篩選出不會對

有害高溫產生反應的突變株與其基因- *painless*；*painless* 屬於編碼瞬時受體電位離子通道 (TRP)基因家族，與哺乳動物一樣表現在表皮下方神經元的樹突分支上，作為熱、機械傷害與痛覺的受器。

Khuong 等人(2019)以果蠅步足腿節截肢(amputation)後，研究在不同溫度的介質上產生跳躍反應(jumping reaction)的頻率變化。研究發現 42°C 以上的溫度刺激，會使果蠅產生明顯的跳躍反應，而在 38°C 時則不會。但 *TrpA1* 或 *painless* 突變株果蠅，即使在 42°C 以上仍不會產生逃避行為。此外，野生型果蠅在截肢後第五天，即使在 38°C 的介質上，也會產生明顯的跳躍反應，這代表在神經損傷後會導致痛覺閾值下降，而產生慢性神經性致敏(chronic neuropathic sensitization)現象，且會產生神經性的異常疼痛(neuropathic allodynia)。

疼痛通常分為神經性疼痛(neuropathic pain)和發炎性疼痛(inflammatory pain)，但都與免疫細胞與受傷細胞所釋放的細胞激素有關。這些細胞激素可作用於傷害感受器(nociceptors)或神經傳遞的迴路，以引發痛覺的致敏反應(Baral, *et al.*, 2019)，其中以前列腺素(prostaglandins)為最重要的痛覺致敏物質。若能抑制前列腺素的合成酶-環化酶(cyclooxygenase, COX)則可達到止痛的藥效(Kidd and Urban, 2001)，例如：常見的止痛藥-乙醯胺酚(acetaminophen)。乙醯胺酚除了可直接抑制環氧合酶(COX)產生止痛藥效，其代謝物「對胺基苯酚(p-aminophenol)」可穿過血腦屏障進中樞神經系統，再代謝產生「N-醯基酚胺(N-acylphenolamine, AM404)」。AM404 可作用於 TRPV1 和大麻素 1 (cannabinoid 1, CB1)等受體，進一步產生止痛作用(Ohashi and Kohno, 2020)。

在過去解剖昆蟲的經驗中，我們發現若將蟑螂的附肢觸碰其口器，會引發口器的咀嚼反射(圖二)。動物啃食自己身體的行為稱為自噬行為(self-cannibalism、autocannibalism 或 autosarcophagy)，目前已知短尾蟋蟀(short-tailed cricket)會吃自己的翅膀(Taber, 2005)；蟑螂和蟋蟀會吃掉自己外漏的內臟(Adamo, 2019)；而海鞘在蛻變時會把自己的大腦吃掉，由於海鞘行固著生活不需要大腦控制身體活動，因此將神經節養分重新吸收，有利於生存。自噬行為與獲得 2016 年諾貝爾生理或醫學獎的研究主題自噬作用(autophagy)的現象相似，但後者是指細胞透過溶體進行老舊胞器與分子的分解與回收。

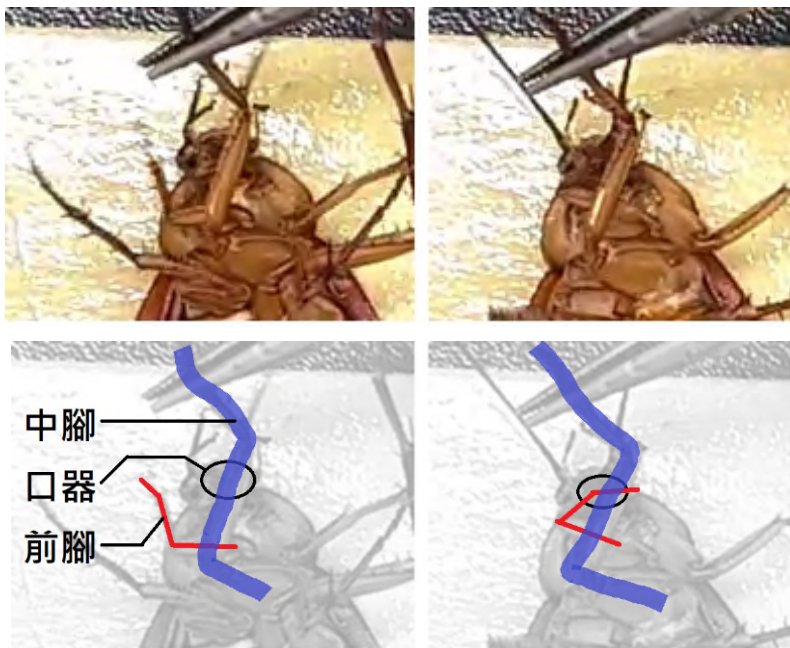


圖二：蟑螂啃食其右前步足的照片。

我們注意到蟑螂對不同步足表現出不同的自噬行為。部分個體在實驗的過程中，會自己舉起前足並將腿節咬斷，並開始啃咬、吃下離體的前足(圖三)。若強行以中足作為啃咬部位，有時會產生阻擋的行為(圖四)。我們推想這可能代表蟑螂體表的痛覺受器分布不均勻。我們的假說：前足不具有痛覺受體，但中足有，且中足受損可引發痛覺。我們擬以蟑螂的自噬行為作為動物模式研究昆蟲的痛覺，並探討痛覺受器的分布；也利用乙醯胺酚等止痛藥物，研究昆蟲產生痛覺的機制是否也是透過前列腺素或相似物質的致敏作用。此外，昆蟲的跳躍反應可做為研究痛覺的行為指標(Khuong, *et al.*, 2019)，也可用於證明痛覺的致敏(sensitization)性質。



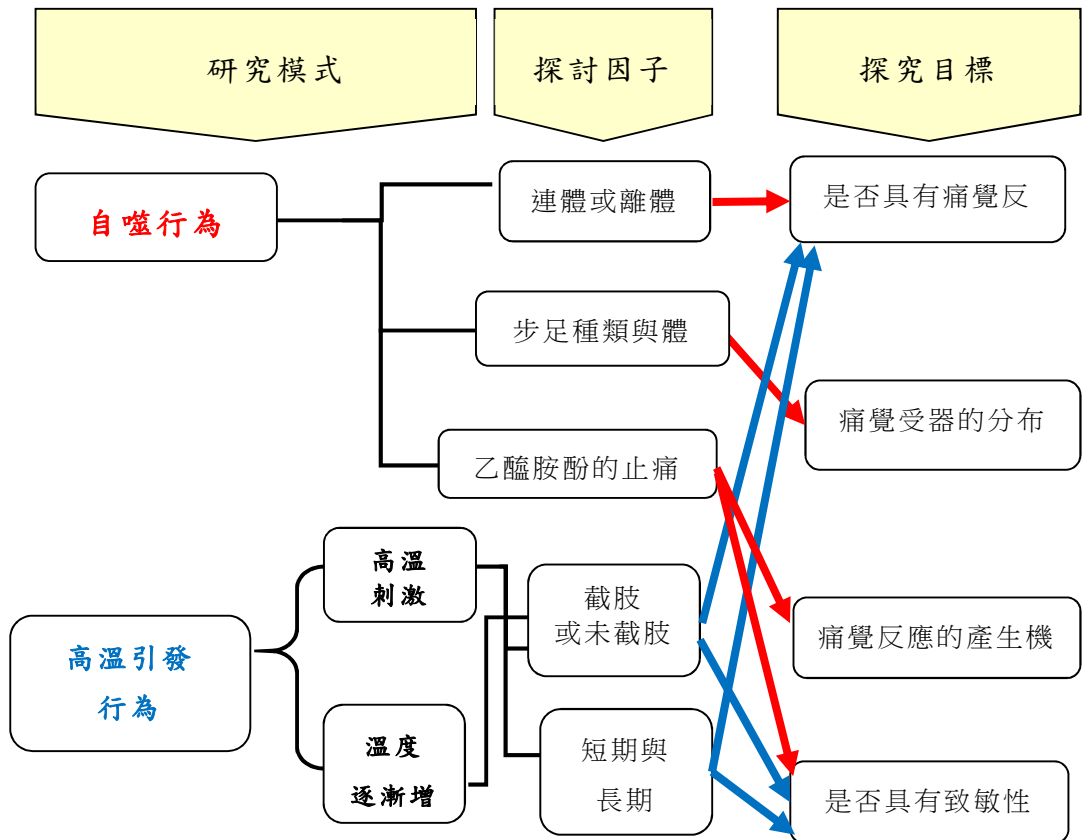
圖三：蟑螂舉起前足(左)並將腿節咬斷(中)，並開始啃咬(右)吃下離體的前足。



圖四：用鑷子強行拉近蟑螂中足放入口器(左)時，有時可觀察到前足會主動阻擋中足，而將中足推開(下圖為示意圖)。

本研究的實驗架構如圖五，研究目的如下：

- (一)、以蟑螂的自噬行為作為模式，檢驗蟑螂是否具有痛覺反應，並探討痛覺的分布。
- (二)、探討將中足強拉至口器附近的操作，是否會影響誘發性自噬行為的表現
- (三)、以乙醯胺酚抑制前列腺素之作用，探討對誘發式自噬行為的效應
- (四)、以高溫地板(hot plate)刺激步足截肢後的蟑螂，比較不同步足截肢處理對引發特定行為之頻率的效應。
- (五)、觀察步足截肢一陣子後，蟑螂對高溫刺激的反應，以探討截肢後的致敏性質。
- (六)、觀察截肢後的蟑螂在溫度逐漸增加之環境中的行為，以探討引發特定行為溫度閾值，比較截肢後的致敏性質。



圖五：本研究的實驗架構。

貳、研究過程或方法

一、實驗器材

編號	名稱	型號或規格	備註
1	手機	iPhone 8	
2	腳架		
3	鑷子		
4	貼紙		固定蟑螂
5	透明膠帶		固定蟑螂
6	棉花棒		
7	培養皿		
8	溫度計		
9	溫熱水		
10	影片播放器	QuickTime Player	
11	乙醯胺酚(Acetaminophen)	長安化學股份有限公司	
12	蔗糖	台糖	

二、實驗動物

本研究所使用的實驗動物為校內飼養的美洲蟑螂(*Periplaneta americana*)。飼養過程中定期換水並提供充足的飼料(乾狗糧)，環境溫度約 25~32°C。實驗皆選用體表無破損且體長約 3~4 公分的健康雄性成蟲。每隻動物僅進行一次實驗，不重複使用。

三、研究過程或方法

(一)、建立誘發自噬行為，比較蟑螂對連體或離體的步足產生自噬行為的反應率與時間

將蟑螂背部朝下、六足朝上的姿勢，貼於貼紙上，以膠帶將雙翅固定(圖六)。以鑷子輕夾其前足或中足，強行拉至口器附近觸碰口器，觀察是否引發自噬行為。由於這樣的自噬行為是透過人為方式產生，稱之為誘發自噬行為(induced self-cannibalism)。

初期的實驗只有將啃食的部位分成腿節、脛節與跗節，但發現在同一節中啃食中間處與啃食兩端的時間以及啃咬比率有差異。為實驗的精確度，統一誘發腿節的啃咬部位在靠近脛節處(較不易把蟑螂腳折斷)，脛節的啃咬部位在中央處，跗節的啃咬部位在末端處(圖七)。



圖六：雙翅固定之待實驗的蟑螂。



圖七：蟑螂的步足結構，與本實驗進行誘發自噬行為的啃咬部位(箭頭所指，由內而外為腿節、脛節與跗節)。

本研究參考 Khuong, *et al.*(2019)的果蠅實驗，以前足與中足作為誘發自噬行為的啃咬對象，並且分成連體與離體兩種不同的實驗組別。將攝影機固定於腳架上，以俯拍的角度錄製整個實驗過程。操作流程如下：將被二氧化碳麻醉過後的蟑螂黏在貼紙上並用膠帶固定，待其甦醒 10 分鐘後，以連體左前/中足的腿、脛、跗節分別嘗試誘發自噬行為，各節各嘗試 5~8 次。之後將其左前/中腳取下，並以離體的左前/中足嘗試誘發產生自噬行為，重複上述步驟。後足因距離口器較遠，容易在操作時發生自發截肢，故不採用。

本研究的數據量化，是透過實驗時連續錄影，記錄與計算連體及離體步足所引發的啃咬比率以及啃咬時間(開始啃咬到停止啃咬的時間)，作為蟑螂足部各部位是否有痛覺的指標。

(二)、將中足拉至口器附近的操作是否會影響誘發自噬行為的表現

上述的誘發自噬行為的操作中，操作組須將中足拉至口器附近，為確認「將中足拉至口器附近」的操作對誘發自噬行為是否具有影響。將固定的蟑螂單側中足以連體方式進行誘發自噬行為實驗，同時將另一側的中足以鑷子拉至口器附近；隨後將單側中足取下，以離體的中腳進行離體方式的誘發自噬行為實驗。另一側的中足仍維持被鑷子拉至口器附近的姿勢。最後測量此兩組中足之腿節、脛節、跗節的啃咬反應比率與啃咬時間。

(三)、乙醯胺酚對誘發自噬行為的效應

為避免注射藥劑過程對蟑螂的痛覺干擾，本實驗用餵食的方式投藥。用 10%蔗糖溶液配置 1%乙醯胺酚溶液。以餵食 10%蔗糖溶液為對照組，以餵食乙醯胺酚的蔗糖溶液為實驗組。以棉花棒沾附餵食藥劑，觸碰口器引發吸吮反射，蟑螂吸吮 30 秒。待食藥劑後 20

分鐘，以中足的腿節進行誘發自噬行為實驗，測量此蟑螂對中足腿節的啃咬反應比率與啃咬時間。

(四)、中足截肢後於溫熱介質上對各種行為發生頻率的效應

參考 Khuong 等人(2019)的果蠅截肢操作，分為中足的腿節中央或脛節中央截肢兩組，截肢後單獨放於培養皿中。每隻分別在截肢前、截肢後、截肢後一天、三天、五天、七天，將含蟑螂的培養皿漂浮於 42°C 溫水上。以攝影機連續記錄蟑螂在熱板上的行為 5 分鐘。由記錄的影片分析以下行為的次數：清潔其他步足、清潔斷肢、清潔觸角、其他步足舉起、斷肢舉起、身體抖動及身體跳躍等。

各指標皆是以截肢前的表現作對照組，每隻皆以截肢前的行為頻率作參照，計算行為頻率的變化率(%)，再比較各指標在截肢後、截肢後一天、三天、五天、七天的變化。

(五)、中足截肢後於逐漸升高溫度的介質上，引發各種行為所需的溫度改變量

類似第 4 點的實驗方法，將蟑螂中足的腿節中央截肢後，單獨放於培養皿中。每隻分別在截肢前、截肢後、截肢後二天、四天、七天，將含蟑螂的培養皿漂浮於室溫水上，並逐漸加溫，以攝影機連續記錄蟑螂的行為 5 分鐘。紀錄出現下列行為時的水溫：清潔其他步足、清潔斷肢、清潔觸角、其他步足舉起、斷肢舉起、身體抖動以及身體跳躍等。計算引發上述行為所需的「溫度增加量(°C)」。另以健康的個體進行作為對照組。

參、研究結果

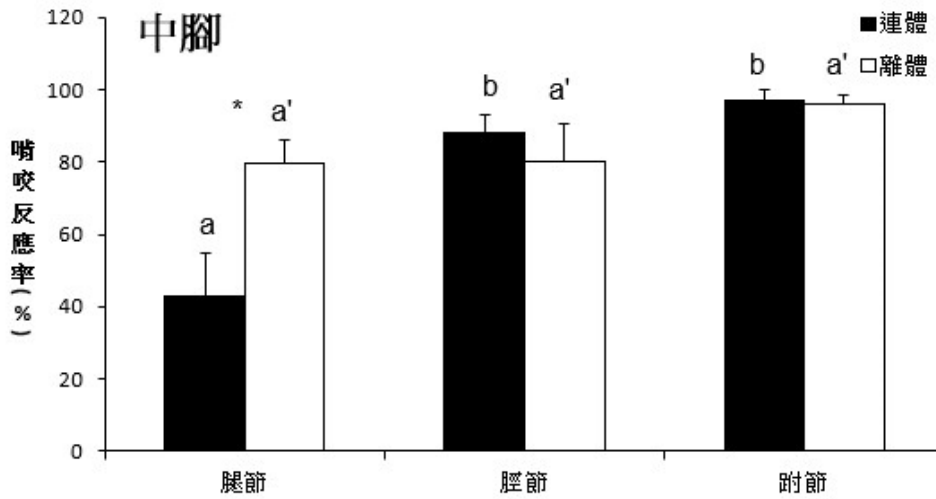
一、蟑螂對連體或離體的步足產生自噬行為的反應率與時間

(一)、前足各節的啃咬反應率

比較前腳的啃咬反應率，無論是連體還是連體，且無論是腿節、脛節或跗節，各組產生誘發性自噬行為的啃咬反應率皆超過九成，但各組之間不具統計上的顯著差異。

(二)、中足各節的啃咬反應率

比較中足的啃咬反應率，對連體腿節的啃咬反應率低於脛節與跗節。而離體的步足，無論是腿節、脛節或跗節，啃咬反應率皆較高。代表連體的中足腿節較為敏感，較不易產生誘發自噬行為(圖八)。



圖八：連體或離體中足之腿節、脛節、跗節的啃咬反應率(%) (平均 ± 標準誤，各為 12 隻)。

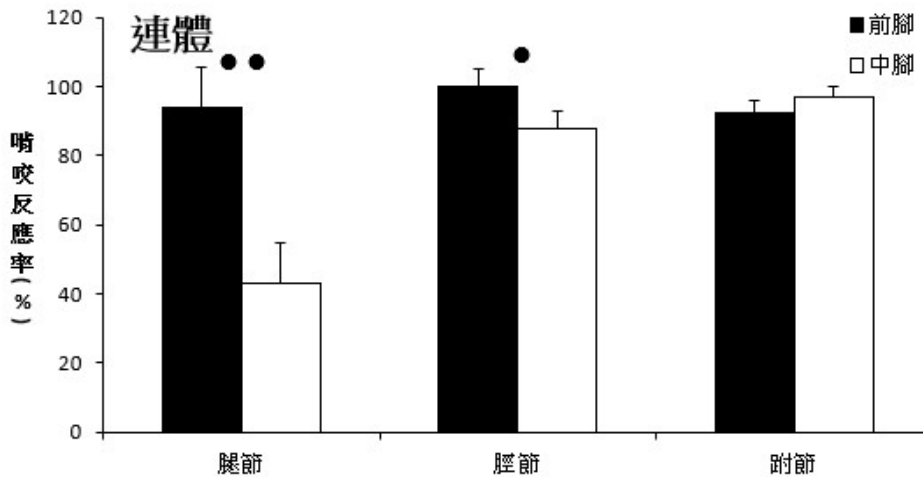
連體與離體比較：*： $p < 0.05$ (單尾配對 t 檢定)

與腿節組相比：a 與 b 之間達統計顯著差異 (單尾配對 t 檢定， $p < 0.05$)

與腿節組相比：a' 間未達統計顯著差異 (單尾配對 t 檢定)

(三)、比較連體的前足與中足各節的啃咬反應率

中足腿節與脛節的啃咬反應率皆低於前足，跗節則不具差異。中足腿節的啃咬反應率最低，表示中足腿節對於啃咬的刺激敏感(圖九)。



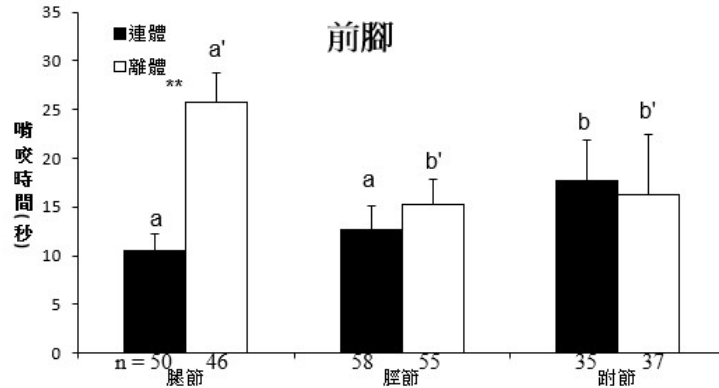
圖九：蟑螂對連體前足、中足之腿節、脛節、跗節的啃咬反應率(%)

(平均 ± 標準誤，各為 10、12 隻個體)。

前足與中足比較：●： $p < 0.05$ ；●●： $p < 0.01$ (單尾配對 t 檢定)

(四)、比較前足各節的啃咬時間

除了前足離體腿節的啃咬時間較長外，其他組的差異不大。若將離體前足作為對照組，只有腿節具有連體與離體兩組間的差異，代表前腳腿節具有一定的敏感度，使誘發自噬行為的時間較短(圖十)。



圖十：連體或離體前足腿節、脛節、跗節的啃咬時間比較(秒)(平均 ± 標準誤，各為 10 隻，n = 取樣數)。

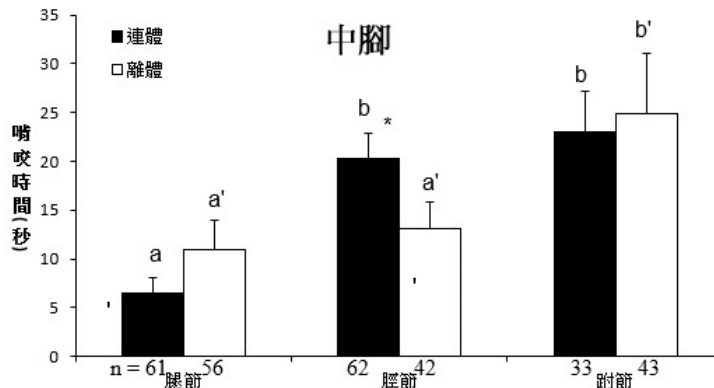
連體與離體比較：**： $p < 0.01$ (單尾配對 t 檢定)

與腿節組相比：a 與 b 之間達統計顯著差異(單尾配對 t 檢定， $p < 0.05$)

與腿節組相比：a' 與 b' 間達統計顯著差異(單尾配對 t 檢定， $p < 0.05$)

(五)、比較中足各節的啃咬時間

連體中足脛節與跗節，以及離體跗節的啃咬時間較長，其他各組啃咬時間較短。若將離體中足作為對照組，只有脛節具有連體與離體兩組間的差異，代表中腳脛節具有一定的敏感度，使誘發性自噬行為的時間較短(圖十一)。



圖十一：連體或離體中足之腿節、脛節、跗節的啃咬時間(秒)比較(平均 ± 標準誤，各為 12 隻，n = 取樣數)。

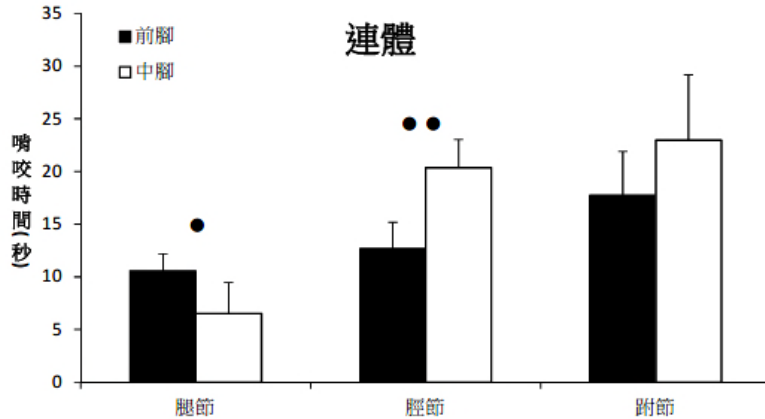
連體與離體比較：*： $p < 0.05$ (單尾配對 t 檢定)

與腿節組相比：a 與 b 之間達統計顯著差異(單尾配對 t 檢定， $p < 0.05$)

與腿節組相比：a' 與 b' 間達統計顯著差異(單尾配對 t 檢定， $p < 0.05$)

(六)、比較前足與中足連體各節的啃咬時間

比較連體前足與中足的啃咬時間，啃咬中足腿節的時間短於前足，啃咬前足脛節的時間短於中足，代表中足腿節的敏感度可能大於前足，前足脛節的敏感度可能大於中足脛節，而誘發自噬行為的時間較短(圖十二)。

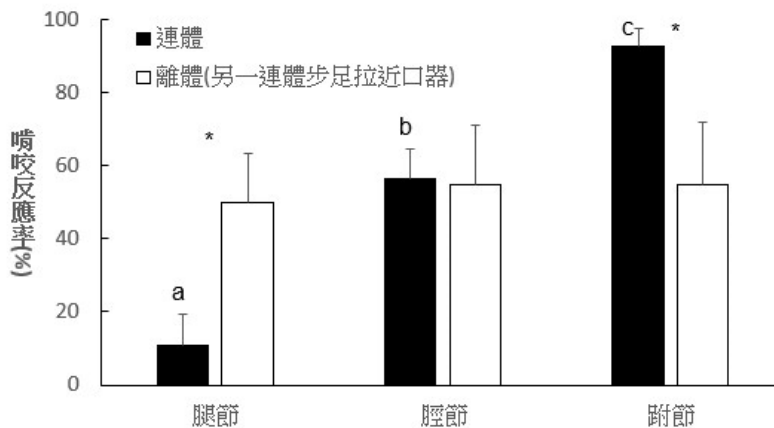


圖十二：連體前足、中足之腿節、脛節、跗節的啃咬時間(秒)比較(平均 ± 標準誤，取樣數如前圖)。

前足與中足比較：●： $p < 0.05$ ；●●： $p < 0.01$ (單尾配對 t 檢定)

二、將中足拉至口器附近對誘發自噬行為的效應

比較中足拉至口器附近，進行離體中足的誘發自噬行為，蟑螂對腿節與跗節的啃咬反應率大於連體組(圖十三)，與圖 8 中僅有腿節的啃咬反應率大於連體組略有不同；若比較啃咬時間，對腿節與跗節的啃咬時間長於連體組(圖十四，與圖十一中僅有連體脛節的啃咬時間長於離體組亦有不同。實驗結果顯示將中足拉至口器附近確實會影響誘發性自噬行為的表現。

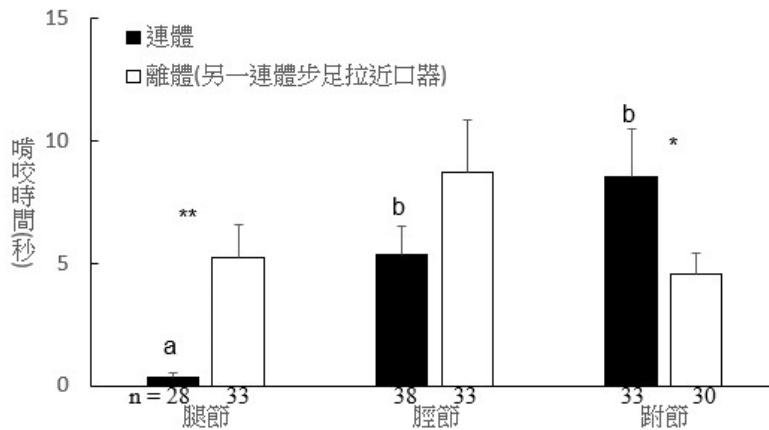


圖十三：比較對連體與離體(另一連體中腳拉近口器)中足之腿節、脛節、跗節的啃咬反應率(%) (平均 $\pm$ 標準誤, 8 隻個體)。

連體與離體比較：*： $p < 0.05$ (單尾配對 t 檢定)

連體組：a、b、c 之間達統計顯著差異(單尾配對 t 檢定, $p < 0.05$)

離體組：未達統計顯著差異(單尾配對 t 檢定)



圖十四：比較對連體或離體前足之腿節、脛節、跗節的啃咬時間(秒)(平均 $\pm$ 標準誤, 8 隻個體, n = 取樣數)。

連體與離體比較：*： $p < 0.05$ ；**： $p < 0.01$ (單尾 t 檢定)

連體組：a 與 b 之間達統計顯著差異(單尾 t 檢定, $p < 0.05$)

離體組：未達統計顯著差異(單尾 t 檢定)

【待 續】