

中華民國第 57 屆中小學科學展覽會

作品說明書

高級中等學校組 動物與醫學學科

第二名

052011

飲食對線蟲神經老化的影響及其分子機制

學校名稱：臺北市立第一女子高級中學

作者： 高二 洪若淇	指導老師： 賴廷倫
-------------------	------------------

關鍵詞：秀麗隱桿線蟲、飲食、老化

摘要

秀麗隱桿線蟲有透明體腔、月餘的生命週期，為研究老化的極佳模式生物，和 *E. coli* OP50 相比，*Comamonas* DA1877 會加速線蟲生長並縮短壽命。本研究旨在探討 DA1877 飲食是否造成線蟲早衰。實驗中採用 *P_{mec-7}::mRFP* 線蟲比較不同飲食下感覺神經老化狀況，得知 DA1877 飲食使線蟲早衰。同時觀察擺尾速度以檢測線蟲老化趨勢，得知食用 DA1877 成蟲後相同天數的線蟲擺尾速度較低，顯示飲食差異影響線蟲老化及運動神經。同時使用 aldicarb 藥物探討線蟲癱瘓速率，確認運動神經也受飲食影響，並採用與氧化壓力相關的核心轉錄因子 *daf-16* 基轉種 *P_{daf-16}::DAF-16a/b::GFP*，比較不同飲食下細胞核螢光表現量，確認 DA1877 增加 DAF-16 在細胞核的表現量。未來希望觀察缺乏 SAM 合成酶之線蟲感覺神經型態與擺尾速度，了解 DA1877 飲食使線蟲早衰的路徑。

壹、研究動機

一、研究動機

對所有生物而言，老化是普遍發生的生命現象。生理機能衰弱之餘，老化亦連帶引起諸多疾病。其中飲食的差異一如高糖、高油、高鹽，導致血脂肪上升、腎臟機能衰弱，甚至縮短生物體的壽命，使我想要探究飲食與老化的關係。

由於 DA1877 飲食能使線蟲加速生長且縮短壽命 (MacNeil LT *et al.*, 2013)，其生命週期 (Fig. 1A) 的差異，使我好奇他們壽命的長短是否和線蟲的老化相關。可由 Fig. 1A 看出食用 OP50 的線蟲存活天數 (33 天) 大約是食用 DA1877 線蟲 (16 天) 的兩倍，因為這明顯的差距，故選擇利用這兩種飲食來研究線蟲的老化，探討 DA1877 飲食是否能造成線蟲早衰及其調控老化的過程。

線蟲的老化跡象繁多，有咽喉吞嚥速度、擺尾速度減緩，或在感應知覺、排泄、生殖腺和神經方面等也都能看到些許特徵。老化的神經展現圓圈空心狀 (bubble-like lesion) (Fig. 1B)、串珠狀 (beading) (Fig. 1C)、單邊凸起泡泡狀 (blebbing) (Fig. 1D) 還有分支狀 (branching) (Fig. 1E) (Pan CL *et al.*, 2011)，這些老化特徵都只能在正常的老化成蟲觀察到，因此皆為線蟲老化的證據。其中能觀察到這些現象的神經有 ALM、PLM 及 VNC (Fig. 1F)。但

因 ALM 和 PLM 出現老化特徵的時間和位置較 VNC 規律且較易觀察，故選擇 ALM 和 PLM 作為本實驗的觀察對象。同時我也觀察老化特徵之一的擺尾速度減緩現象，透過線蟲尾巴擺動次數的計算實驗，來觀察飲食是否會影響線蟲的活動能力，也可確認飲食引起的老化會影響運動神經。

Figure 1

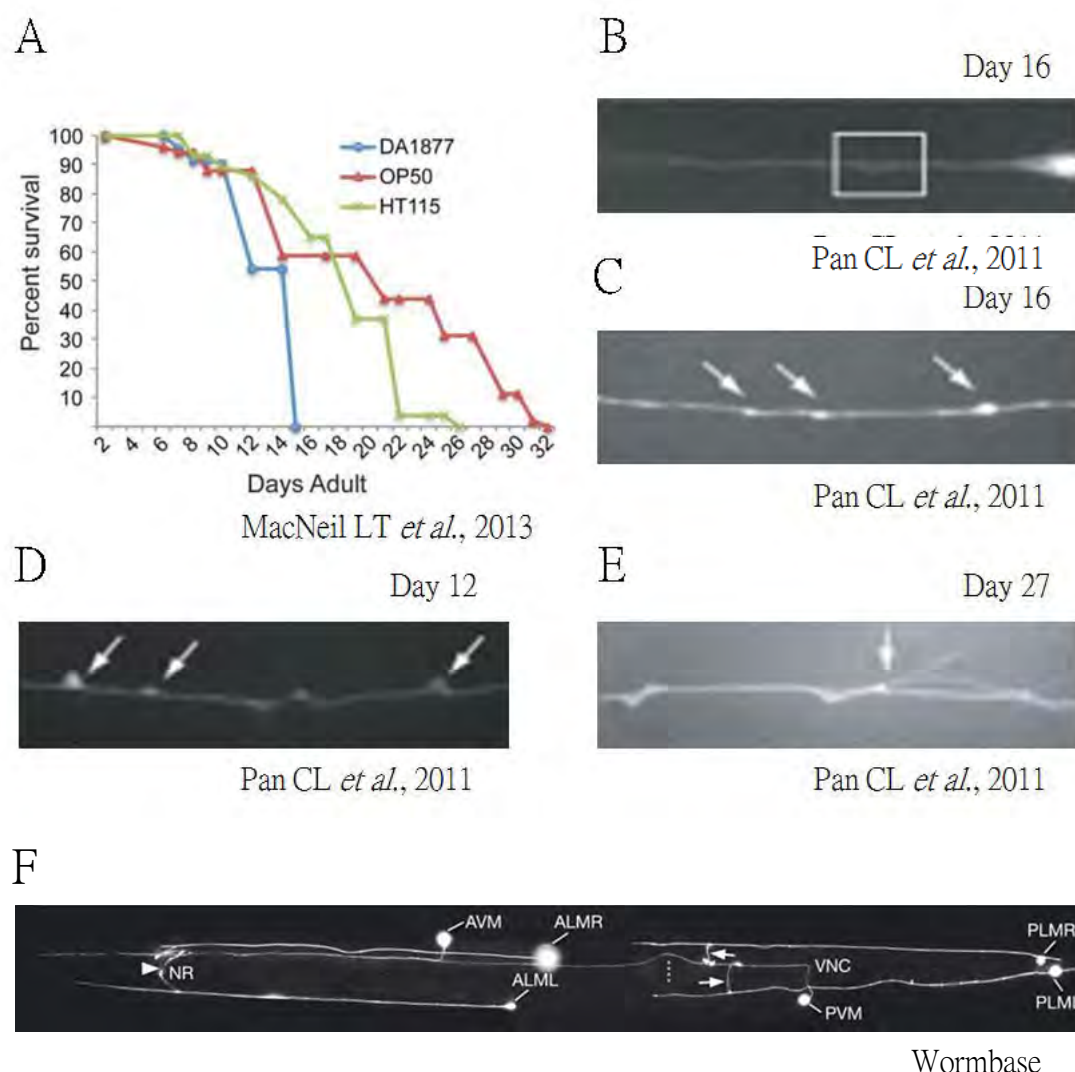


Fig. 1. 探討文獻資料

(A) 線蟲分別食用 DA1877 及 OP50 的成蟲後生命週期曲線圖，可由圖得知食用 OP50 線蟲的成蟲後存活天數大約比食用 DA1877 的線蟲多一倍。又食用 DA1877 的線蟲存活率 50% 時的天數（15 天）和食用 OP50 的線蟲存活率 50% 的天數（21 天）差六天，故說食用 DA1877 線蟲和食用 OP50 線蟲的生命週期有明顯差距 (MacNeil LT *et al.*, 2013)。其中 HT115 亦為線蟲的一種飲食，但在本實驗中並不會使用。(B) 方框中是於 ALM 中觀察到的 bubble-like lesion。(C)(D)(E) 箭頭所指分別為在 PLM 中觀察到的 beading、blebbing、branching (Pan CL *et al.*, 2011)，這些皆為老化線蟲的神經特徵。(F) 線蟲接觸機械性刺激神經的螢光圖，可清楚分辨 ALM、PLM 及 VNC。

二、研究背景

（一）模式生物—秀麗隱桿線蟲（*Caenorhabditis elegans*）野生株 N2

在研究飲食對於基因表達及其特徵影響的領域中，秀麗隱桿線蟲可謂分子生物學和發育生物學的最佳模式生物。生長於恆定溫度環境且只有 959 個細胞的秀麗隱桿線蟲，長約 1mm 體積小方便培養、擁有透明體腔更易觀察神經的螢光顯現、固定已知的細胞族譜使我們能掌握其細胞分裂的時間和狀態，加上不到一個月的生長週期、約兩天就能繁殖下一代且子代數多，所以決定以牠為實驗對象。

線蟲的生活史可以分為幼蟲第一期(L1)、幼蟲第二期(L2)、幼蟲第三期(L3)、幼蟲第四期(L4)和成蟲期(adult)(Fig. 2A)。其中能運用 L4 時期於生殖孔(vulva)附近的 white patch 加以區分出 L4 時期幼蟲。但當族群擁擠或食物不足時，秀麗隱桿線蟲會進入另一種幼蟲期(dauer stage)，dauer 能對抗逆境，此時牠們的口器及生殖器皆會封住，不進食長達約四個月。

一般的秀麗隱桿線蟲為雌雄同體，在 adult 期前精子已產生完畢，直到第一次排卵前精卵會一同儲存。待到 adult 時期產卵，精卵於體內結合進行基因重組，可產生約 300 個子代。

秀麗隱桿線蟲在野生環境的食物範圍很廣，加上生長在不同地區，其所食用的種類繁多，像是實驗室中最常見的是 *E. coli* OP50(以下簡稱 OP50)，此外 *Comamonas* DA1877(以下簡稱 DA1877)亦為其中一種。

（二）*Pmec-7::mRFP III*（jsIs973）

在此實驗中，採用 *Pmec-7::mRFP III*（jsIs973）作為觀察線蟲神經的線蟲品系。由於老化的線蟲對刺激比較不靈敏，故選用 *mec-7* 一種接收觸覺刺激的受器體基因（touch receptor neuron）來觀察。此品系利用 *mec-7* promoter 啟用紅色螢光，並於接受機械性刺激的神經中顯現，主要神經有 anterior lateral microtubule cell（ALM）、posterior lateral microtubule cell（PLM）及 ventral nerve cord（VNC）。其中 ALM 從線蟲頭部開始延伸至中間段，PLM 則由中間段延伸至尾部，兩神經不相交，且各分左右條：ALMR、ALML、PLMR、PLML。然而 VNC 是一條從頭部延伸至線蟲中後段的神經，為較早出現老化特徵的一條（Pan CL *et al.*, 2011），因此可藉由以上特徵和位置加以區分。

ALM 原分布於線蟲腸道區前端，直到胚胎出生才移至前體腔中部，本身由六個無纖毛觸摸神經接受器（non-ciliated touch receptor neurons）延伸。其功能有三：接受溫和（low threshold）機械性刺激，透過突觸連接及間隙連接（gap junctions），傳送命令至 PVC、AVB、AVD、AVA 神經元；藉由 MEC-10 和 DEGT-1，回應較為苛刻（high threshold）的刺激；培養因習慣而產生的記憶力（輕觸回應訓練，tap response）。

PLM 分布於線蟲腰部，主要傳送神經訊息至 VNC，功能與 ALM 相似，能接受溫和機械性刺激，亦可由輕觸回應訓練形成習慣性記憶。

（三）aldicarb 藥物

中文名為涕滅威，白色結晶固體，具輕微硫磺味，超過 100°C 即會分解，對金屬、塑膠材質為非腐蝕性。

aldicarb 是農藥 Temik 得滅克的主要成分，為一種膽鹼脂酶抑制劑，可以防止用於傳導動物神經訊息的乙醯膽鹼在突觸被分解，進而達到使生物痙攣死亡的功效。

先前的研究也顯示（Kowalski, Butler University website）（Fig. 2B 和 C）當線蟲分泌較多的神經傳導物質—乙醯膽鹼時，其對 aldicarb 藥物會較敏感，此時的癱瘓速率也會隨之增加，故可由線蟲的癱瘓速率來推知其神經傳導物質的分泌量。

依其作用模式而言，對寄生線蟲及軟體動物同樣有效。以往用於控制嚼吸類昆蟲，如蚜蟲、線蟲類，通常施用於室外或綠屋不可食的園藝植物。作物方面主要用於棉花，另亦施用於甜菜、草莓、馬鈴薯、洋蔥等可食農作物。

人類若短期暴露於此環境中，會出現噁心、腹瀉和相關輕微性的神經障礙症狀，長期暴露則會盜汗、瞳孔縮小、雙腿無力。D 級毒性的 aldicarb，只需 50 mg 就可以使一位 50 kg 的人死亡，所以不能直接用於作物上，否則農藥的殘留會對環境產生重大危害。

(四) *Pdaf-16:DAF-16a/b::GFP + rol-6* (TJ356)

daf-16 為時常研究老化作用機制 insulin/IGF pathway 的作用基因之一，可藉由調節此傳導途徑，進一步影響 dauer 時期的形成、壽命長短、脂肪代謝及抗壓性，也可和先天免疫的轉錄因子起作用，且多篇研究顯示其與帕金森氏症也有極大關聯 (Hamamichi *et al.*, 2008; Knight *et al.*, 2014; Cao, Gelwix, Caldwell, & Caldwell, 2005)。其中，DAF-16 為人類同源轉錄因子 FoxO 的同源物，遇細胞氧化壓力時，會進入細胞核中調節核內的 DNA 表現，啟動老化因子，促使線蟲老化 (Fig. 2D)。

當微顯微注射 DNA 質體於線蟲中，或是進行遺傳雜交實驗時，記號 (marker) 可以使我們得知 promoter 是否有確實表現基因。而 *rol-6* 為 *daf-16* 基轉種 TJ356 的記號，會使線蟲於原地 $\cap$ 字型轉動且自身扭轉。相較於正常的線蟲以腹側貼於培養基上，white patch 清楚可見，此基轉種的 $\cap$ 字型轉動和扭轉，使得較難辨認 L4 時期幼蟲，以致無法準確區分線蟲的成蟲後天數，故實驗中挑取較年輕的成蟲 (無蛋產生、vulva 處微凸)，且能表現綠色螢光蛋白的 *daf-16* 基轉種作為實驗對象。

Figure 2

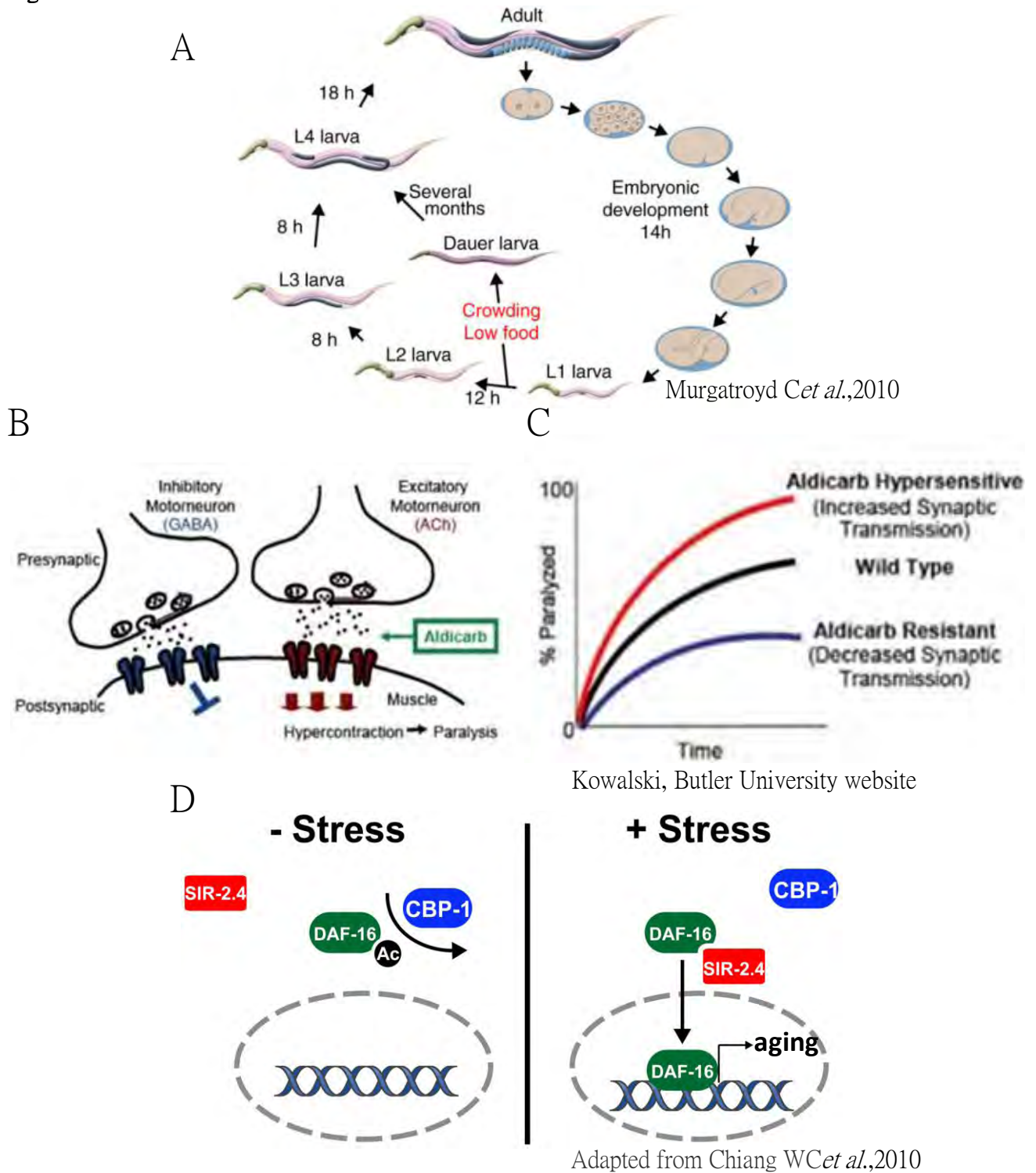


Fig. 2. 模式生物—秀丽隱桿線蟲的基本介紹

(A) 線蟲的生活史：embryo→L1→L2→L3→L4→ adult，約兩天即可成蟲，產生下一代；當生存壓力大時，線蟲會走 dauer 路徑：embryo→L1→dauer→(環境改善時)L4→adult (Murgatroyd *Cet al.*, 2010)。(B) aldicarb 藥物作用原理。(C) 線蟲在 aldicarb 作用下的可能結果。(D) DAF-16 於壓力下會於細胞核內調控 DNA 表現，進而調節老化因子 (Chiang *WCet al.*, 2010)。

貳、研究目的

- 一、利用 *Pmec-7::mRFP* 線蟲品系觀察紅色螢光神經型態，並比較分別食用 DA1877 和 OP50 的線蟲是否有老化差異。
- 二、量測 N2 線蟲定量時間內的擺尾次數，確認飲食加速運動行為方面的老化現象。
- 三、採用 aldicarb 藥物使線蟲癱瘓，得知飲食是否與神經傳導物質分泌量有關。
- 四、利用 *Pdaf-16::DAF-16a/b::GFP+rol-6* 線蟲觀察細胞核內的綠色螢光顯現量，探討 DA1877 飲食造成線蟲早衰的訊息傳導路徑。

參、研究設備及器材

一、藥品與培養基配置

(一) NGM agar plate (線蟲生長用) (total volume = 1 L)

滅菌前加入

名稱	用量
NaCl	3 g
Agar	17 g
Peptone	2.5 g
Cholesterol (5 mg/ml in EtOH)	1 L
dH ₂ O	975 ml

滅菌後加入 (若於滅菌前加入則會沉澱)

名稱	用量
0.5 M CaCl ₂	2 ml
0.5 M MgSO ₄	2 ml
1 M K phosphate	25 ml

(二) LB medium (養菌用) (total volume = 1 L)

名稱	用量
Tryptone	10 g
Yeast extract	5 g
NaCl	5 g
1 N NaOH	1 ml
dH ₂ O	add to 1 L

(三) 1xM9 buffer (線蟲的生理食鹽水) (total volume = 1 L)

名稱	用量
KH ₂ PO ₄ (P11)	3 g
Na ₂ HPO ₄ (S8)	6 g
NaCl	5 g
1 M MgSO ₄	1 ml
dH ₂ O	add to 1 L

(四) 使用顯微鏡看蟲用的 Agar Pad

4 % Agar in 1x M9 buffer

(秤取 0.4g agar 放入 10 ml 1x M9 buffer 中，煮沸後將一滴 agar 溶液滴於載玻片上，並以另一載玻片將其拉開)

(五) aldicarb 藥品

膽鹼脂酶抑制劑，防止乙醯膽鹼於突觸分解。

本研究採用此藥品使線蟲癱瘓，探討不同飲食下線蟲的神經傳導物質分泌多寡。

二、研究設備與輔助軟體

（一）Axio Imager 2

於本次研究所得之照片（可見光圖和螢光圖）皆是利用 Zeiss Axio Imager M2 正立式顯微鏡及 Photometrics Cascade 1KCCD 和 Axio 相關軟體取得。

DIC → 可見光觀察線蟲外型

Texas Red → 紅色螢光觀察 *Pmec-7::mRFP III* 的神經型態

FITC → 綠色螢光觀察 *Pdaf-16::DAF-16a/b::GFP + rol-6* 細胞核螢光顯現量

（二）Image J

Image J 是一個公開免費的 Java 圖像處理程式，可以計算選取範圍面積和統計像素質，除了一般標準的圖像處理，還可以量取距離、角度，並於空間校準提供真實世界的尺寸測量。

本研究運用此軟體定量 *Pdaf-16::DAF-16a/b::GFP* 細胞核的綠色螢光表現量。

（三）GraphPad Prism

GraphPad Prism 最初是為醫學院校和藥物公司的實驗生物學家而設計，特別運用在藥理學和生理學領域，此軟體可繪製各種科學圖形、組織並整理統計數據，現今被廣泛利用。

本研究運用此軟體繪製不同天數線蟲定量時間內的擺尾次數，並分析數據。

肆、研究過程或方法

一、做出於 20°C 下 N2 分別食用 DA1877 和 OP50 的成蟲後生命週期曲線。

- (一) 每次挑取 15~20 隻 L4 時期 N2 幼蟲，當天記為 day 0 adult。
- (二) 隔天記為 day 1 adult，以此類推，紀錄成蟲後偶數天天數之線蟲的存活數量、死亡數量和變異。
- (三) 第一週每天將其轉移至新的培養基，避免蛋和孵出的小蟲混淆視聽，一週後則取決於是否汙染或有無小蟲出現再決定轉移。
- (四) 重複實驗，繪出圖表。

二、觀察分別食用 DA1877 和 OP50 成蟲 (*Pmec-7::mRFP III*) 後 1~9 天的神經型態。

- (一) 將線蟲從培養基挑出，放上有看蟲用的 agar pad 和 30mm NaN₃ 的載玻片上，其中 NaN₃ 當作線蟲麻醉劑。
- (二) 使用 Axio Imager 2 顯微鏡的 DIC 先確認是否所挑之蟲為雌雄同體且其外表是否無損，再使用 Texas Red 觀察線蟲的 ALM 和 PLM 神經。
- (三) 確認能於此基轉種觀察到 ALM 和 PLM 神經。
- (四) 紀錄在 ALM、PLM 上出現 bubble-like lesion、beading、blebbing 和 branching 的次數及變異。
- (五) 繪製圖表。

三、比較分別食用 DA1877 和 OP50 成蟲後不同天數 N2 成蟲定量時間內的擺尾次數。

- (一) 將不同天數的線蟲從培養基挑至已滴上 20 μ l M9 溶液的載玻片上靜置一分鐘，使線蟲在無干擾下適應環境。
- (二) 一分鐘後計算線蟲在下一分鐘內的擺尾次數，因以同一批蟲觀察成蟲後一到五天的擺尾次數，故每次實驗結束後將其挑至新的培養基內，以待下次的實驗。
- (三) 以 GraphPad Prism 軟體分析統計數據，並繪製圖表。

四、比較分別食用 DA1877 和 OP50 的 N2 線蟲在 aldicarb 藥物作用下的癱瘓速率。

(一) 挑取 15~20 隻 day 1 adult 線蟲置於含有 aldicarb 藥物的培養基中。

(二) 每隔一小時紀錄癱瘓的線蟲隻數與變異。

(三) 製成圖表。

五、觀察分別食用 DA1877 和 OP50 年輕成蟲 (*daf-16* 基轉種) 的細胞核螢光顯現量。

挑取分別食用 DA1877 和 OP50 的體型似 L4 時期幼蟲的早期成蟲若干隻, 使用 Axio Imager 2 顯微鏡的 DIC 觀察是否體腔內無蛋、vulva 處是否凸起, 若皆為肯定則代表所挑取之蟲為年輕成蟲, 再使用 FITC 100 倍放大照下線蟲由咽喉部數來第一排細胞的細胞核螢光圖, 再使用軟體 Image J 比對其螢光表現量, 畫出圖表。

伍、研究結果

一、N2 和 *Pmec-7::mRFP III* 於 20°C 下分別食用 DA1877 及 OP50 的成蟲後生命週期曲線圖。

觀察 N2 的成蟲後生命週期曲線圖 (Fig. 3A) 可知, 食用 OP50 的線蟲成蟲後可活的天數比食用 DA1877 的線蟲多了 10 天, 且當存活率為 50% 時, 食用 OP50 的線蟲較食用 DA1877 的線蟲多了 8 天, 結果與已知 (MacNeil LT *et al.*, 2013) 相符—食用 DA1877 者的成蟲後壽命較食用 OP50 者短, 確認可以此圖為基礎, 且操作方式與實驗技巧無誤。

再來觀察 *Pmec-7::mRFP III* 的成蟲後生命週期曲線圖 (Fig. 3B), 發現食用 OP50 線蟲成蟲後存活天數較食用 DA1877 線蟲多 12 天, 又於約第十二天後藍線(食用 OP50 曲線)、綠線(食用 DA1877 曲線) 出現歧異, 且越分越開, 趨勢越趨明顯, 和 Fig. 3A 相似, 因此可說於 20°C 下食用 DA1877 和 OP50 的 *Pmec-7::mRFP III* 有生長差異, 且與 N2 有著相同的生命週期趨勢—食用 DA1877 者的壽命較食用 OP50 者短。接下來的實驗中將使用此基轉種代表 N2 進行神經型態分析實驗, 探討食用 DA1877 的線蟲是否有早衰現象發生。

Figure 3

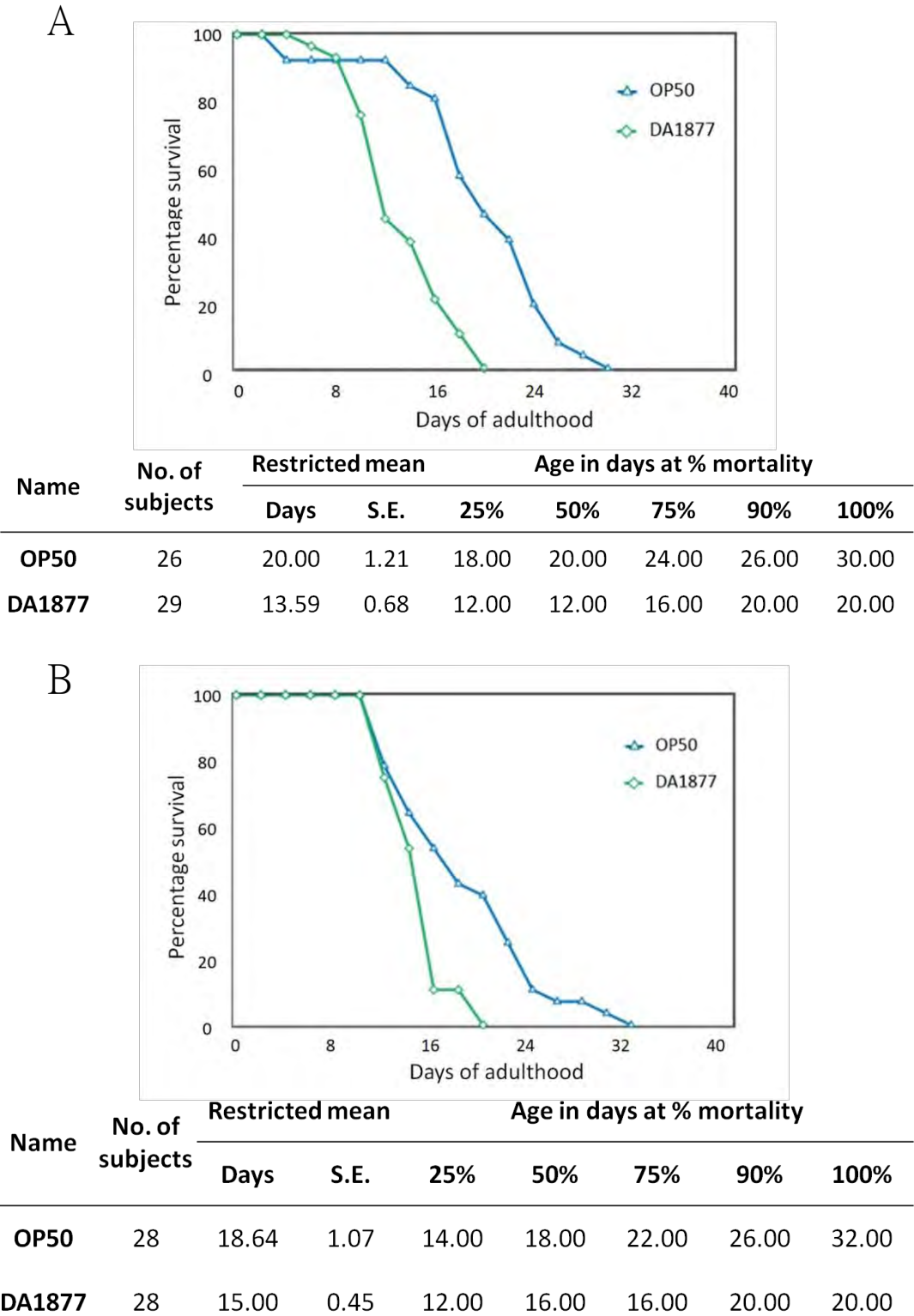


Fig. 3. 20°C 下 N2 及 *Pmec-7::mRFP III* 分別食用 DA1877 和 OP50 的成蟲後生命週期曲線圖及相關數據

(A) N2 的成蟲後生命週期曲線圖。(B) *Pmec-7::mRFP III* 的成蟲後生命週期曲線圖。

二、觀察不同飲食下 *Pmec-7::mRFP III* 成蟲後不同天數的 ALM 及 PLM 神經型態

首先確認在 *Pmec-7::mRFP III* 觀察的到 ALM 和 PLM，且在確定 L4 幼蟲的 ALM 及 PLM 100%尚未出現老化特徵後（ $n=30$ ），按照其成蟲後不同天數依序觀察，紀錄神經出現的老化特徵（bubble-like lesion、beading、blebbing、branching 等等），並拍下成蟲後不同天數線蟲的神經型態（Fig. 4A~4D），因前九天尚未出現 bubble-like lesion 和 branching，故只繪出出現 beading 和 blebbing 的比例圖（Fig. 4E）進行比對。

由 Fig. 4E 可以發現老化特徵（beading 和 blebbing）的比例隨著成蟲後天數上升而增加，且食用 DA1877 的線蟲出現 beading 和 blebbing 的比例大致高於食用 OP50 的線蟲。再以螢光圖參照（Fig. 4A~4D），第一天食用 DA1877 和 OP50 的線蟲並未出現明顯的老化特徵，而成蟲後第三天食用 DA1877 的線蟲神經已出現 triangle-like pattern，食用 OP50 的線蟲則保持似第一天的神經樣貌。成蟲後第七天、第九天分別食用 DA1877 和 OP50 的線蟲皆出現 beading 或 blebbing，但就 beading 和 blebbing 的大小和數量分析，食用 DA1877 者的老化特徵還是較大且較多。

Figure 4

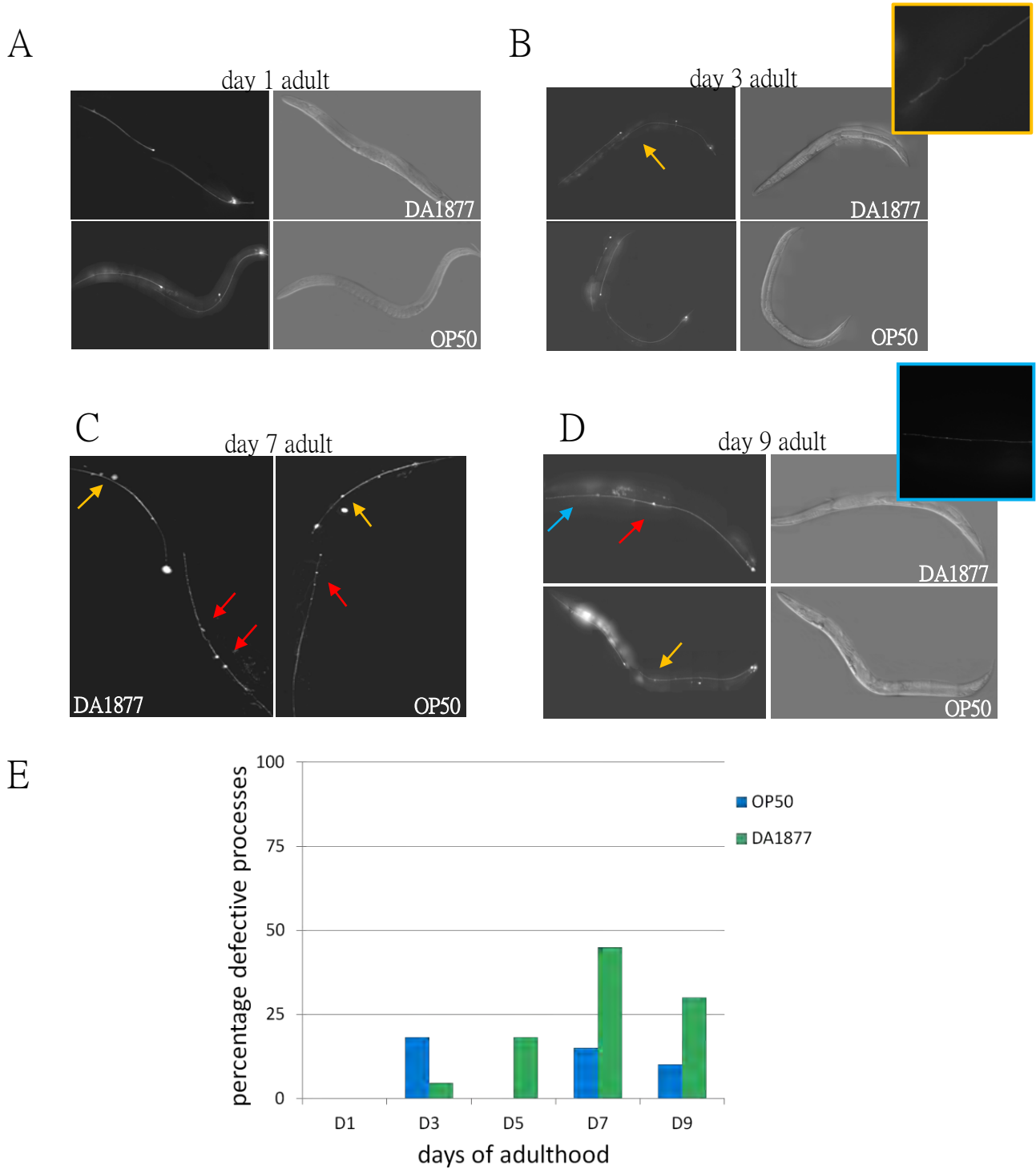


Fig. 4. 成蟲後不同天數的線蟲 ALM、PLM 神經螢光圖（部分螢光圖不清楚者附上可見光圖）及老化特徵出現次數比例圖（倍率：63 倍）（ $n>20$ ）。

（A）～（D）分別食用 DA1877 和 OP50 成蟲後第一、三、七、九天的神經螢光圖（橘黃色箭頭表 triangle-like pattern、紅色箭頭表 beading、淺藍色箭頭表 blebbing）。（E）線蟲成蟲後第一、三、五、七、九天出現 beading 或 blebbing 的比例圖。

又因在觀察神經老化特徵時，發現到文獻中無討論到的神經性狀，命名為三角形狀突起 (triangle-like pattern) (Fig. 5A)、電阻狀 (Fig. 5B)。其中 triangle-like pattern 和 beading、blebbing 相似，有著隨時間增加而數目和大小一同增加的趨勢，故納入老化特徵考量，製成 Fig. 5C 及 Fig. 5D。又其出現時間點和位置與 beading、blebbing 相似，故推測 triangle-like pattern 可能為 beading 或 blebbing 的前身。

確認 triangle-like pattern 亦為老化特徵後，比較 Fig. 4E、Fig. 5C 和 Fig. 5D，皆可得知老化特徵比例隨時間增加而上升及食用 DA1877 的線蟲較食用 OP50 的線蟲較早出現且出現較多老化性狀，故結論 DA1877 飲食造成線蟲神經早衰，並使感覺神經型態的病癥較早出現。

Figure 5

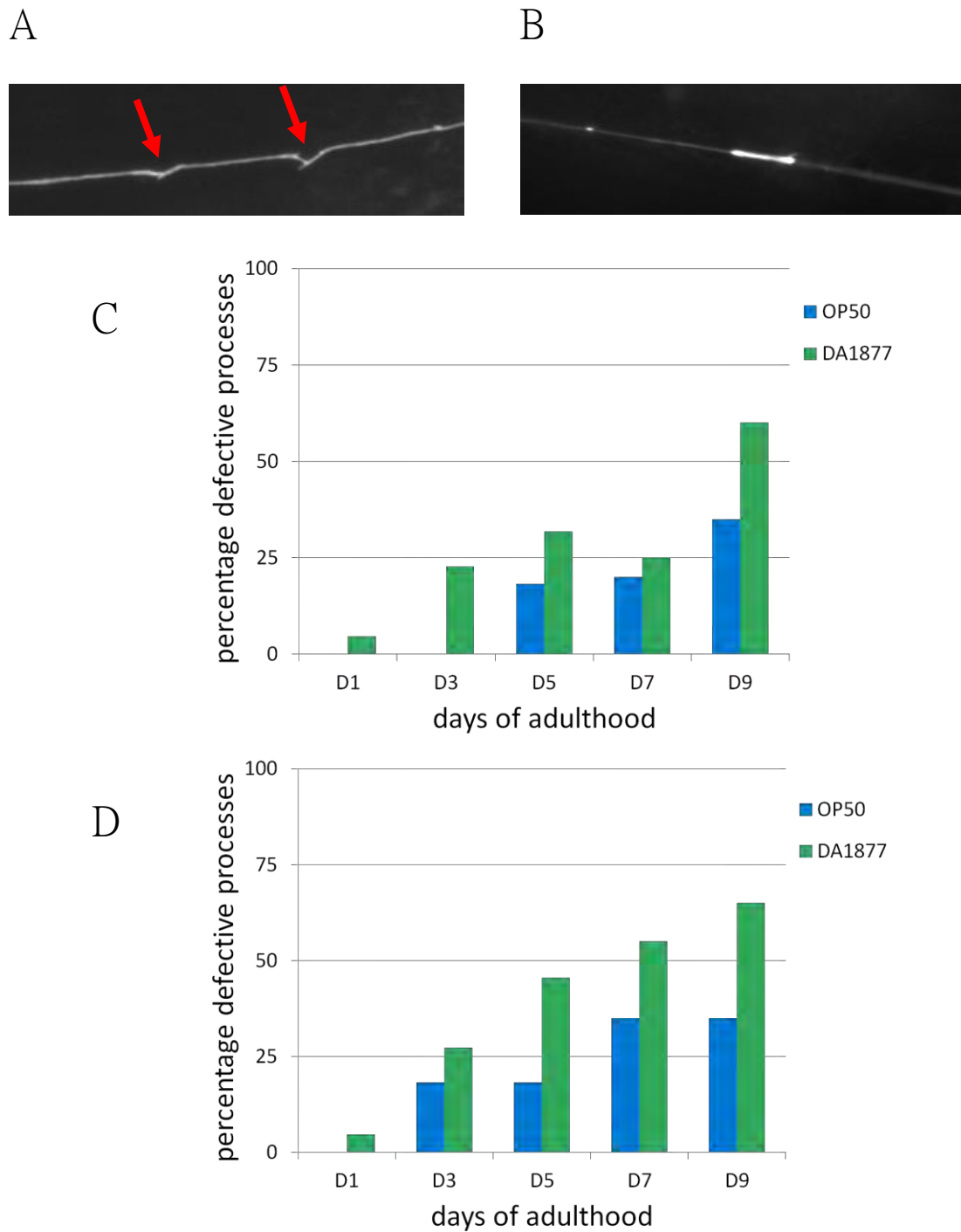


Fig. 5.於實驗中觀察到文獻中未提及的老化特徵 (n>20)

(A) 於神經上觀察到的 triangle-like pattern 螢光圖。(B) 神經電阻狀螢光圖。(C) 分別食用 DA1877 和 OP50，成蟲後不同天數線蟲神經出現 triangle-like pattern 的比例圖 (n>20)。(D) 分別食用 DA1877 和 OP50 成蟲後不同天數出現 beading、blebbing 或 triangle-like pattern 的比例圖，顯示食用 DA1877 者出現老化特徵的比例高於食用 OP50 者 (n>20)。

三、計算一分鐘內分別食用 DA1877 和 OP50 的成蟲後不同天數線蟲（N2）之擺尾次數

對線蟲而言，活動能力也是老化特徵之一，當線蟲老化時，其活動能力會降低，推測與運動神經功能衰退相關，所以希望以此老化行為量化的實驗來觀察 DA1877 飲食是否也會影響運動神經的衰退。將數據以 GraphPad Prism 軟體分析後得到如下統計圖(Fig. 6)，觀察此圖可看出 N2 成蟲自第三天起，食用 DA1877 者的擺尾次數明顯低於食用 OP50 者，且線蟲在不同飲食下的擺尾速度有著顯著差異，故結論 DA1877 飲食確實可使線蟲早衰，並影響運動神經。

Figure 6

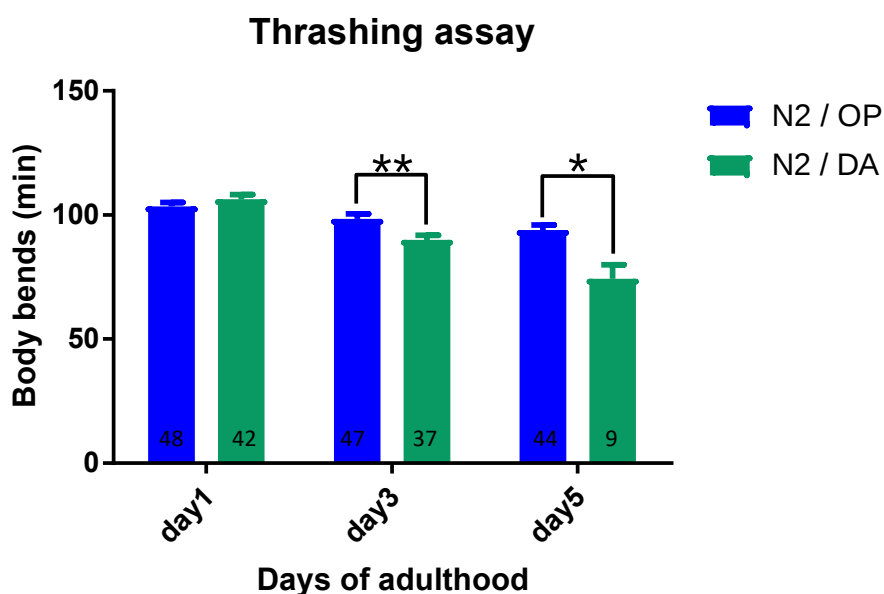


Fig. 6 分別食用 DA1877 和 OP50 的 N2 成蟲後不同天數，一分鐘內的擺尾次數統計圖。其中食用 DA1877 的線蟲擺尾速度於成蟲後第三、五天明顯低於食用 OP50 的線蟲，顯示 DA1877 飲食使線蟲的行動力減緩。

四、利用 aldicarb 藥物比較不同飲食下 N2 成蟲後第一天的癱瘓速率

觀察 Fig. 7 可知，食用 DA1877 線蟲的癱瘓速率較食用 OP50 者快，綠線（食用 DA1877 者）比例始終高於藍線（食用 OP50 者），且於第一、二、三小時的分別癱瘓速率，差異可約達 25%。因 aldicarb 藥物使乙醯膽鹼無法於突觸分解回收再利用，進而使線蟲癱瘓、死亡，故此結果可說明 DA1877 飲食增加線蟲的神經傳導物質分泌量，並改變了運動神經的功能，推測此與 DA1877 飲食使線蟲早衰現象相關。

Figure 7

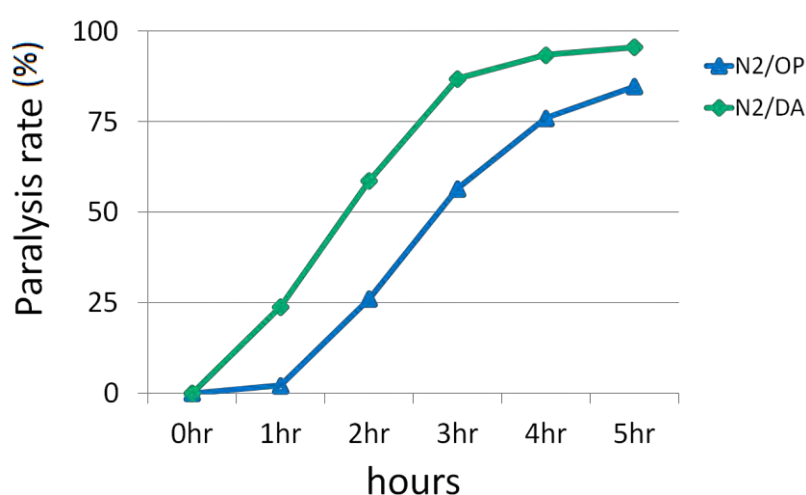


Fig. 7 在 aldicarb 藥物作用下 N2 成蟲後第一天分別食用 DA1877 和 OP50 不同時間點的癱瘓速率折線圖 (n>45)。食用 DA1877 線蟲的癱瘓速率較食用 OP50 線蟲快，說明 DA1877 增加線蟲的神經傳導物質分泌量。

五、比較不同飲食下年輕 *Pdaf-16:DAF-16a/b::GFP + rol-6* 成蟲細胞核的螢光顯現量

使用 Axio Imager FITC 觀察線蟲由咽喉部數來第一排細胞的細胞核 (Fig. 8A)，固定曝光時間 15ms 拍下螢光圖，再將此圖以 Image J 分析其螢光顯現平均值，並以食用 OP50 組為控制組，標準化數據後製成圖表(Fig. 8B)，可看出不同飲食下細胞核內的螢光顯現量達到顯著差異。因於氧化壓力中 *daf-16* 轉錄因子進核調控基因表現，加上食用 DA1877 的線蟲螢光進核量較食用 OP50 者高，說明 DA1877 飲食增加 DAF-16 的進核量，推測 DA1877 飲食使線蟲早衰與 *daf-16* 在受氧化壓力下的訊息傳遞路徑相關。

Figure 8

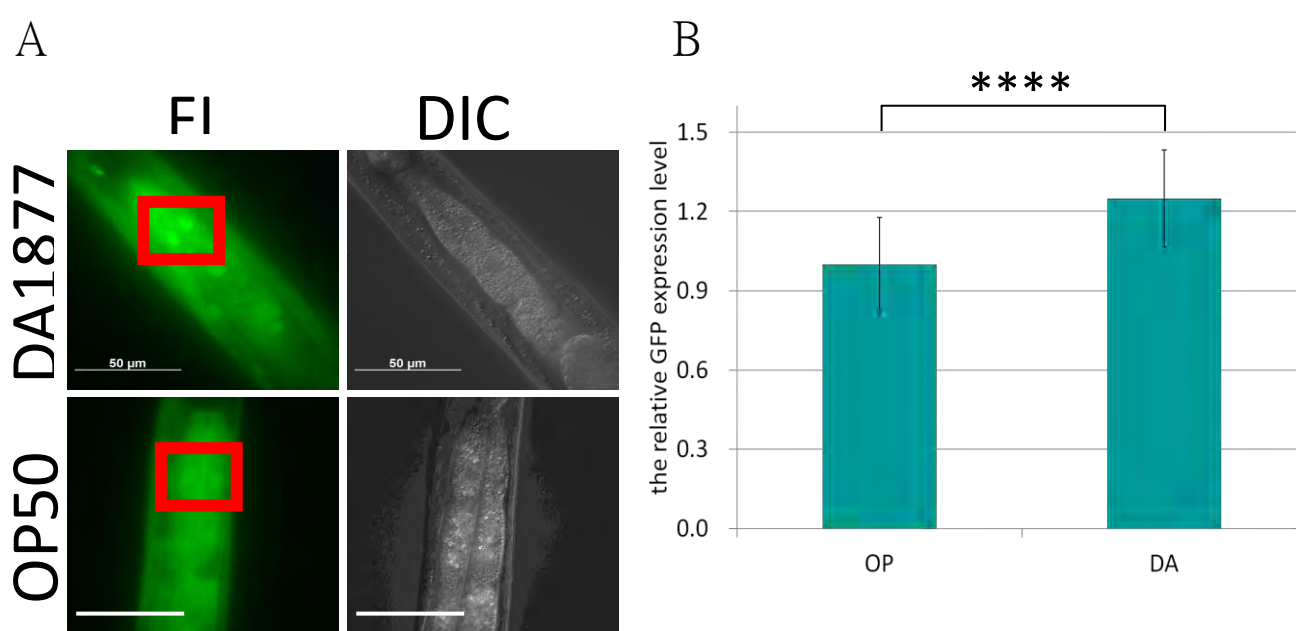


Fig. 8 以 FITC 觀察年輕 *Pdaf-16:DAF-16a/b::GFP + rol-6* 成蟲的細胞核螢光表現量。

(A) 分別在 FITC 和 DIC 下食用 DA1877 的年輕 *daf-16* 基轉種成蟲由咽喉部數來第一排的細胞核 (紅框處)。(B) 以食用 OP50 者為控制組，標準化數據後不同飲食下細胞核的螢光顯現量比例柱狀圖。

陸、討論

由研究結果得知，和 OP50 飲食相比下，DA1877 飲食可使線蟲早衰，並改變其感覺神經型態及運動神經功能，且此現象與 *daf-16* 於受壓下的訊息傳遞路徑相關。在我們實驗室尚未發表的結果中，DA1877 飲食可能含有較多的 SAM 分子(Our lab unpublished data)，SAM 分子為一種可以提供甲基的物質，會甲基化修飾 DNA/ RNA 或是蛋白質，因而改變基因的表現，所以推測線蟲的老化機制可能因此改變。這樣較高比例的 SAM 分子很可能是造成現蟲老化差異的原因，所以未來將使用遺傳雜交技術得到同時能在感覺神經顯現螢光和自身無法合成 SAM 分子的雜交突變種，進行老化特徵觀察實驗，以確認線蟲生命週期是否受此分子調控。若為肯定將使用液相質譜聯用技術（LC/MS mass）進一步分析其內含成分的差異，確認對線蟲而言，DA1877 飲食是否為一種氧化壓力。在兩種飲食間存在差異，接著將此差異成分與人類飲食相比較，進一步找出可能使人類早衰或減緩老化的飲食。已知外在氧化壓力的增加會啟動 DAF-16 在核內、核外與不同因子結合，進而調控下游對抗壓力、長壽等因子，又 *daf-16* 同源物—FoxO 轉錄因子為哺乳類之同源基因，所以未來期望使用含有此因子的細胞觀察對於不同物質、藥物作用下的生命週期，以探討此老化因子的作用機制及與不同物質成分的相關性。此外可利用人類應變壓力的同源基因，觀察在不同飲食下的老化情況，確認人類的早衰現象是否與細胞內的氧化壓力相關。

柒、結論

本研究顯示分別食用 DA1877 和 OP50 的線蟲成蟲，在神經（ALM、PLM）出現神經老化特徵（beading、blebbing、triangle-like pattern）的比例、程度和時間點皆不同。其中食用 DA1877 的線蟲出現以上神經老化特徵的時間較早，且比例及程度大多較食用 OP50 者高，並以線蟲擺尾速度的量測實驗中，確認食用 DA1877 線蟲的行動力減緩，故說明 DA1877 飲食使線蟲早衰。

因上述實驗顯示此早衰現象可改變線蟲感覺神經的型態，為了探討運動神經功能的改變與否，採用 aldicarb 藥物使線蟲癱瘓，並比較不同飲食下的線蟲癱瘓速率。由結果得知 DA1877 飲食增加線蟲神經傳導物質的分泌量，亦改變運動神經的功能，推測與早衰現象相關。

在許多調控線蟲或其他物種老化的分子機制中，*daf-16* 調控的老化途徑與外在氧化壓力相關，因此決定進一步測試 DA1877 飲食是否藉由調控此路徑而造成線蟲早衰。故利用 *daf-16* 基轉種的螢光報導蛋白，比較不同飲食下 DAF-16 的進核量。結果顯示食用 DA1877 的線蟲細胞核螢光顯現量較高，推測 DA1877 飲食使線蟲早衰現象與 *daf-16* 調控老化的特定路徑相關。未來希望使 *sams-1* 突變種與 *mec-7* 基轉種雜交，進一步比較此雜交種的感覺神經型態與擺尾速度，以精確地描繪出 DA1877 飲食使線蟲老化作用的途徑。

由此次研究結果得知飲食可能造成生物早衰或減緩老化，未來若可以發現飲食調控老化的機轉，進一步於人類的同源基因上實施相關研究。或許有一天我們將有科學證據可以說明，吃哪一類的食物可以幫助延緩老化及延長壽命。

Figure 9

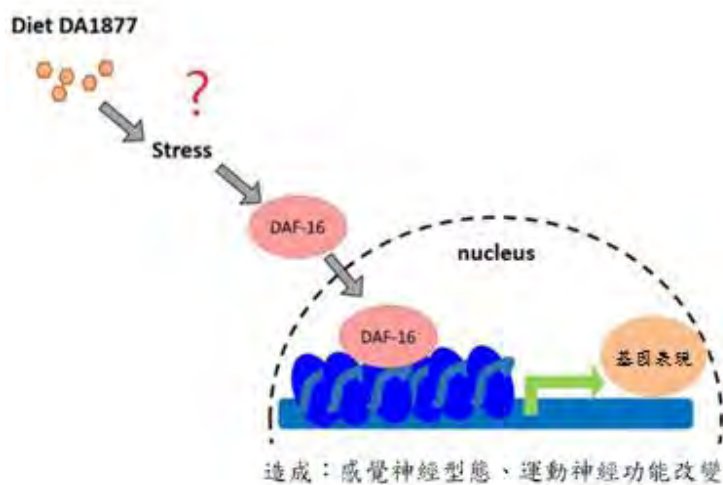


Fig. 9 研究結果模型圖。

已知 DA1877 飲食和氧化壓力皆可調控 DAF-16 進核啟動 DNA，未來將探討此飲食對線蟲而言是否為一種壓力，並更深入探討此老化作用的過程。

捌、參考資料及其他

1. MacNeil LT, Watson E, Arda HE, Zhu LJ, Walhout AJ (2013) Diet-induced developmental acceleration independent of TOR and insulin in *C. elegans*. *Cell*, **153**, 240-252.
2. Pan CL, Peng CY, Chen CH, McIntire S (2011) Genetic analysis of age-dependent defects of the *Caenorhabditis elegans* touch receptor neurons. *PNAS*, 9274-9279.
3. Hamamichi S, Rivas RN, Knight AL, Cao S, Caldwell KA, Caldwell GA (2008) Hypothesis-based RNAi screening identifies neuroprotective genes in a Parkinson's disease model. *PNAS*, **105**, 728-33.
4. M Uno, E Nishida (2016) Lifespan-regulating genes in *C. elegans*. *npj* doi:10.1038
5. Chiang WC, Tishkoff DX, Yang B, Wilson-Grady J, Yu X, Mazer T, Eckersdorff M, Gygi SP, Lombard DB, Hsu AL (2012) *C. elegans* SIRT6/7 Homolog SIR-2.4 Promotes DAF-16 Relocalization and Function during Stress. *PLoS Genet*, 8(9):e1002948. doi:10.1371/journal.pgen.1002948
6. Kowalski, Regulation of Neuronal Communication (a.k.a., Synaptic Transmission) by the Ubiquitin and SUMO systems in *C. elegans*. Undergraduated students on Butler University website

【評語】 052011

此參展作品利用線蟲模式來探究 DA1877 飲食是否造成線蟲早衰，利用線蟲的遺傳學，發現 DA1877 飲食造成降低線蟲擺尾速度，顯示其運動神經受到影響。並使用最新的方法，很迅速地檢測氧化壓力相關之轉錄因子 DAF-16 進入細胞核的量。發現 DA1877 可增加細胞核內 DAF16 的量上升。未來將分析 DA1877 飲食之成分 SAM 對線蟲擺尾速度之影響，本研究成果很新穎，讓人們了解食品與老化的關係，可做為參考。然而 DAF-16 是否參與 DA18877 飲食影響線蟲老化的機制，仍須進一步探討。

作品海報

「老化」是條不歸路，自古至今對所有生物而言是個亙古不變的自然定律。生理機能衰弱之餘，老化亦連帶引起了諸多疾病。其中飲食的差異一如高糖、高油、高鹽等，導致血脂肪上升、腎臟機能衰弱，甚至縮短生物體壽命。而即將步入超高齡化社會的台灣，隨著醫療普及和平均壽命的增長，國人漸趨注重養生之道，並在推動健康老化的呼籲聲中，更加重視飲食，故本實驗以此為出發點，除利用線蟲模式在分子遺傳研究的優勢及食用單一菌株的優點，探討不同飲食對於老化的影響及其分子機制。

摘要

已知和*E. coli* OP50（簡稱OP50）相比，*Comamonas* DA1877（簡稱DA1877）加速秀丽隱桿線蟲（*Caenorhabditis elegans*）野生株N2的生長並縮短壽命，故本實驗旨在探討DA1877飲食與線蟲早衰的關聯。實驗中觀察*Pmec-7::mRFP III*線蟲品系的神經螢光表現及N2線蟲的擺尾速度和於aldicarb藥物作用下的癱瘓速率，並測定*Pdaf-16:DAF-16a/b::GFP*基轉種的細胞核螢光顯現量，得知DA1877飲食可使線蟲早衰，且此飲食亦可改變感覺神經的型態和運動神經的功能。未來將進行DA1877和OP50的代謝體分析，並以*sams-1*突變種為研究對象，探究DA1877飲食使線蟲早衰的特定路徑。

研究動機

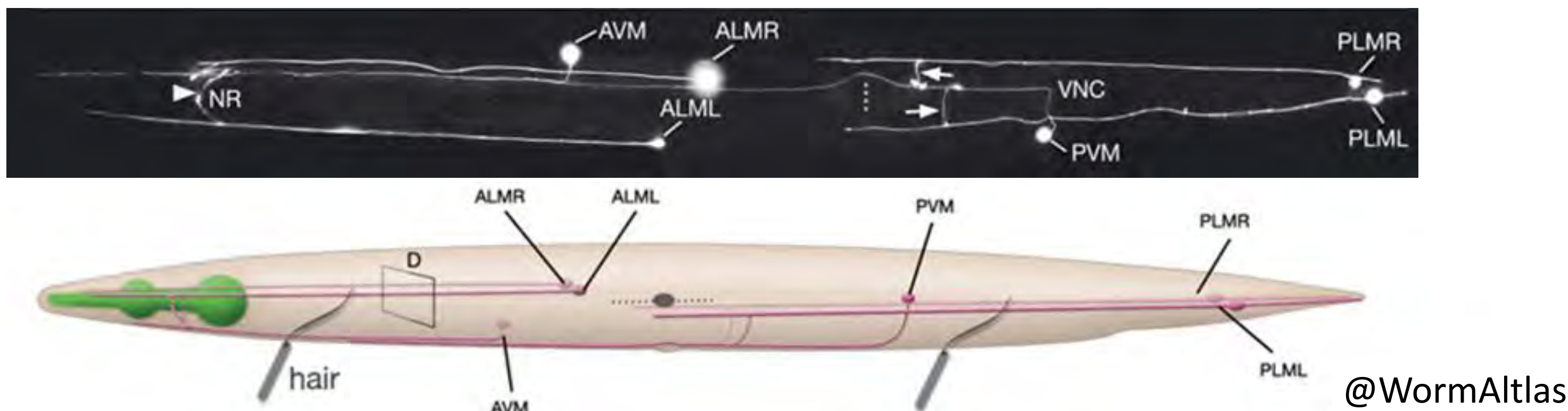
本實驗的研究對象為秀丽隱桿線蟲野生株N2。已知食用DA1877的線蟲生長速度較食用*E. coli* OP50者快，其中兩種飲食成分相異，DA1877較OP50含有較多提供甲基的分子SAM（如右表）。故探討食用DA1877的線蟲和食用OP50者相較下，是否影響線蟲老化，若為肯定，則進一步研究DA1877飲食是否調控神經傳導物質的分泌及其分子機制。

Metabolites	Diet type	
	OP50	DA1877
Homocysteine	n.d	18789.6
Cysteine	5215.8	n.d
Methionine	53773	254239
SAM	n.d	2639.6
SAH	n.d	48222

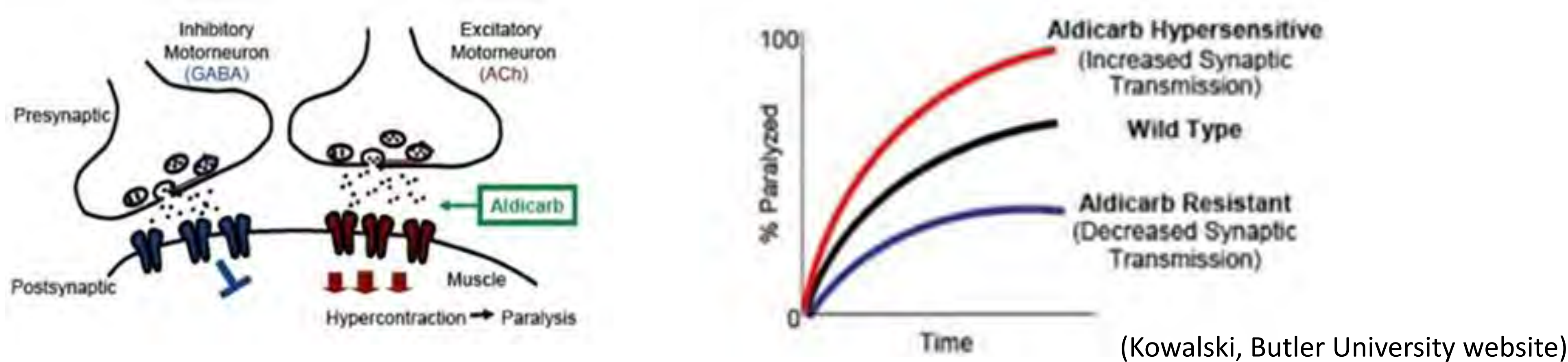
n.d: not detectable (Adapted from: Chun-Yen Teng)

研究背景

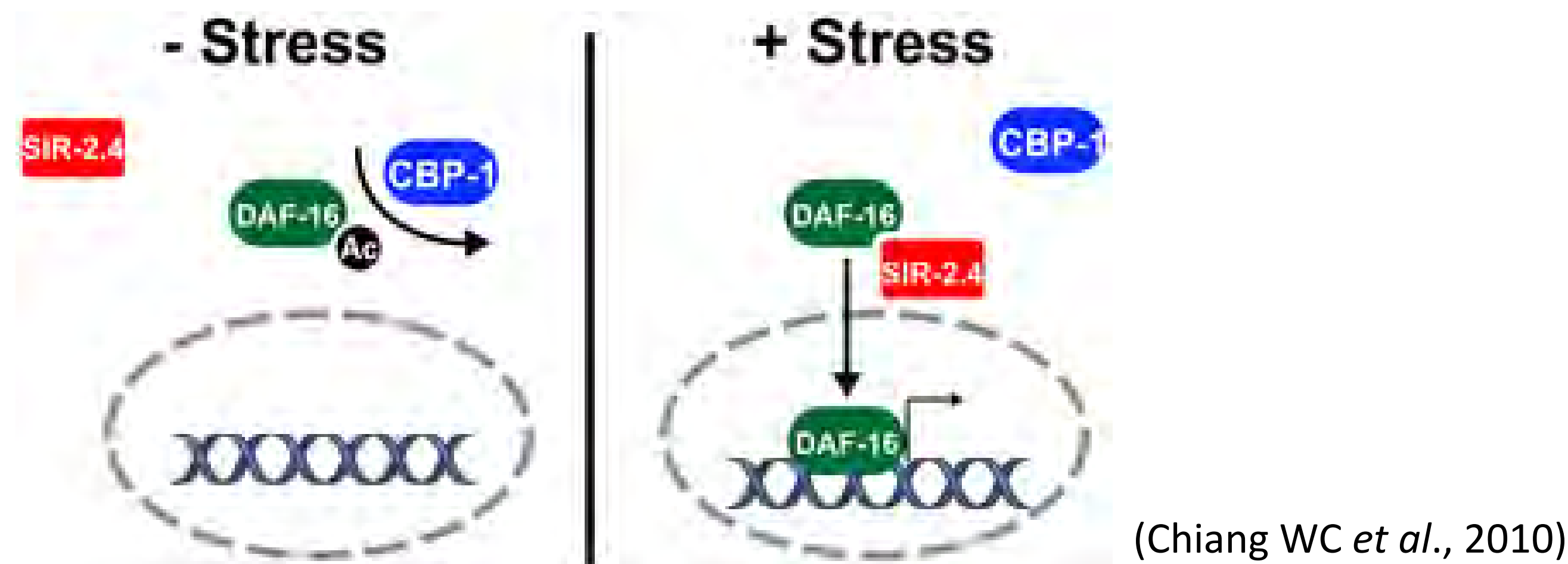
一、[*Pmec-7::mRFP III*] (jls973)品系一藉由紅色螢光觀察ALM及PLM神經型態



二、aldicarb藥物—膽鹼脂酶抑制劑，藉癱瘓速率可得知神經傳導物質分泌量的多寡



三、[*Pdaf-16:DAF-16a/b::GFP+rol-6*] (TJ356)品系一藉由綠色螢光測定DAF-16蛋白入核量



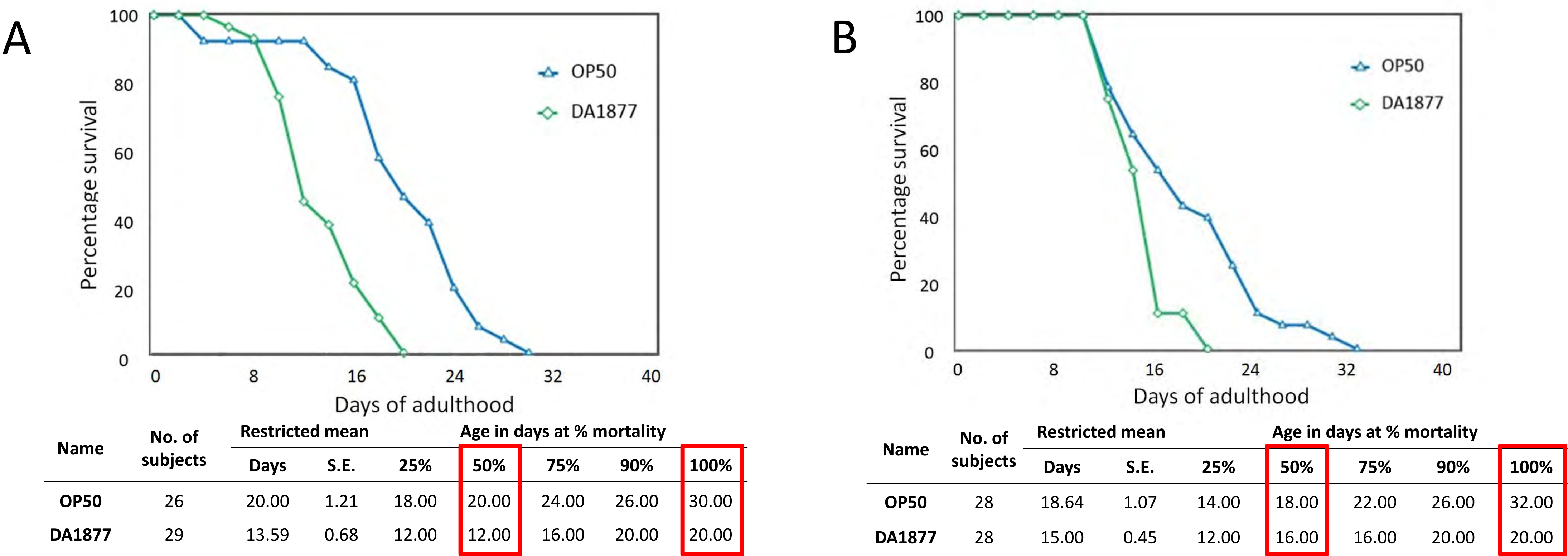
研究目的

- 一、比較DA1877飲食和OP50飲食的成蟲後壽命，並以*Pmec-7::mRFP III*線蟲品系觀察感覺神經型態，輔以頭部組織損害及擺尾速度測定，確認DA1877飲食引發的各種早衰現象。
- 二、以aldicarb藥物檢視DA1877飲食引發的早衰是否也影響運動神經的功能。
- 三、以*Pdaf-16:DAF-16a/b::GFP*線蟲品系觀察DAF-16的進核量，探討DA1877飲食引發的早衰是否與外在氧化壓力的訊息傳遞途徑相關。

研究結果

DA1877飲食使線蟲壽命縮短

Fig. 1 分別食用DA1877和OP50的N2與 *Pmec-7::mRFP III*成蟲於20°C下的生命週期曲線圖。

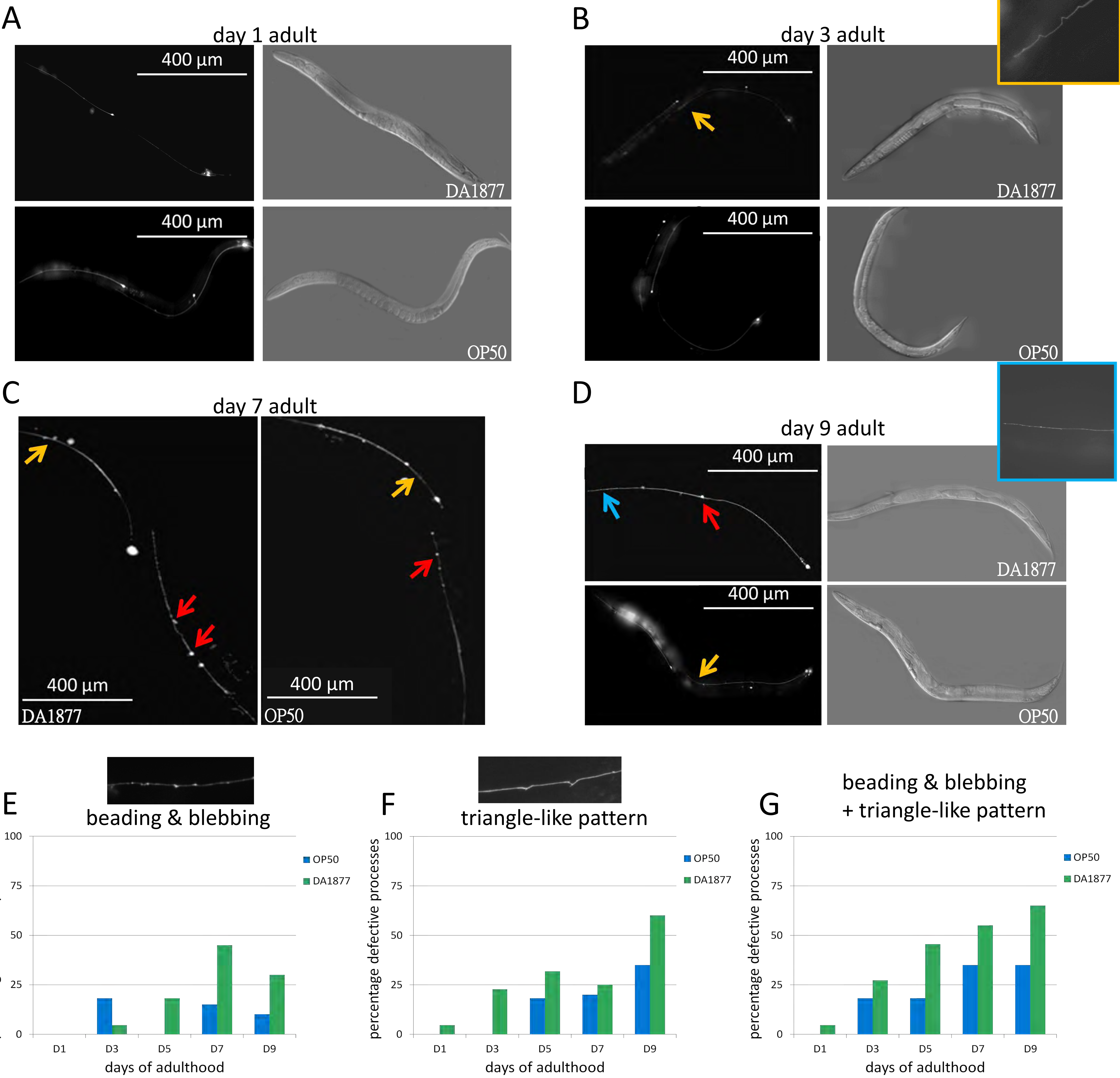


(A) N2成蟲的生命週期曲線圖。食用DA1877和食用OP50的線蟲相比，成蟲後存活天數分別為20天、30天，存活率為50%的存活天數則分別為12天、20天。

(B) *Pmec-7::mRFP III*成蟲的生命週期曲線圖。食用DA1877和食用OP50的線蟲相比，成蟲後存活天數分別為20天、32天，存活率為50%的存活天數則分別為16天、18天。

DA1877飲食使線蟲感覺神經老化特徵較早出現，並使線蟲早衰

Fig. 2 利用 *Pmec-7::mRFP III*線蟲觀察神經老化特徵。



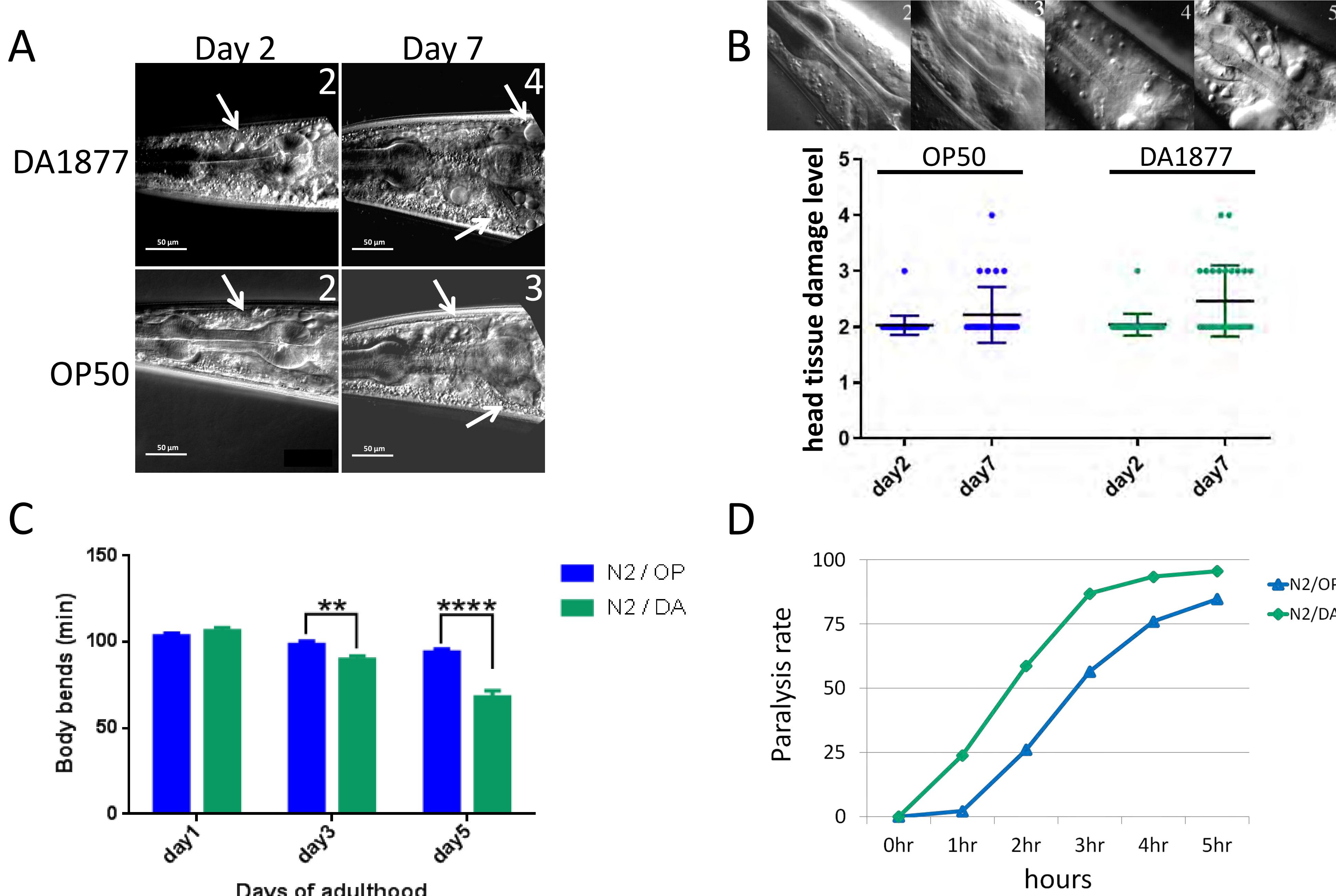
(A)-(D) *mec-7*品系於成蟲後第一、三、七、九天的神經型態螢光圖與可見光圖，其中黃色箭頭表 triangle-like pattern、紅色箭頭表beading、藍色箭頭表blebbing。

(E)-(G) *mec-7*品系於成蟲後不同天數出現老化特徵的比例統計圖。

DA1877飲食加速表現成蟲老化特徵

Fig. 3 線蟲在DA1877飲食下呈現的老化特徵。

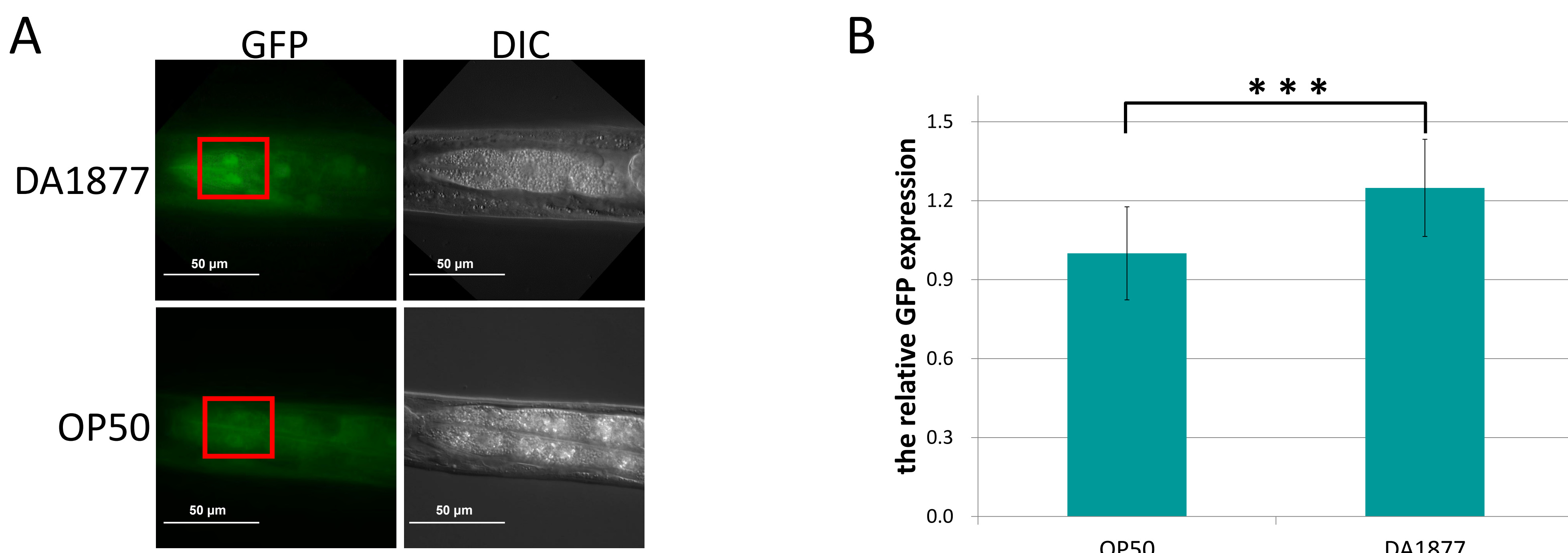
(D Garigan et al., 2002)



(A)(B) N2成蟲在不同飲食下，第二、七天的頭部損害情形。第一級為沒有損害，第五級為最嚴重。
(C) N2成蟲在不同飲食下，第一、三、五天的擺尾速度。食用DA1877線蟲在第三、五天時的運動速度明顯下降。
(D) N2成蟲後第一天在aldicarb作用下一至五個小時的癱瘓比例。食用DA1877線蟲的較快癱瘓。

DA1877飲食增加DAF-16蛋白進核量

Fig. 4 食用DA1877和OP50的Pdaf-16:DAF-16a/b::GFP + rol-6線蟲的細胞核螢光表現圖及其數值標準化後柱狀圖。（以食用OP50者為控制組）

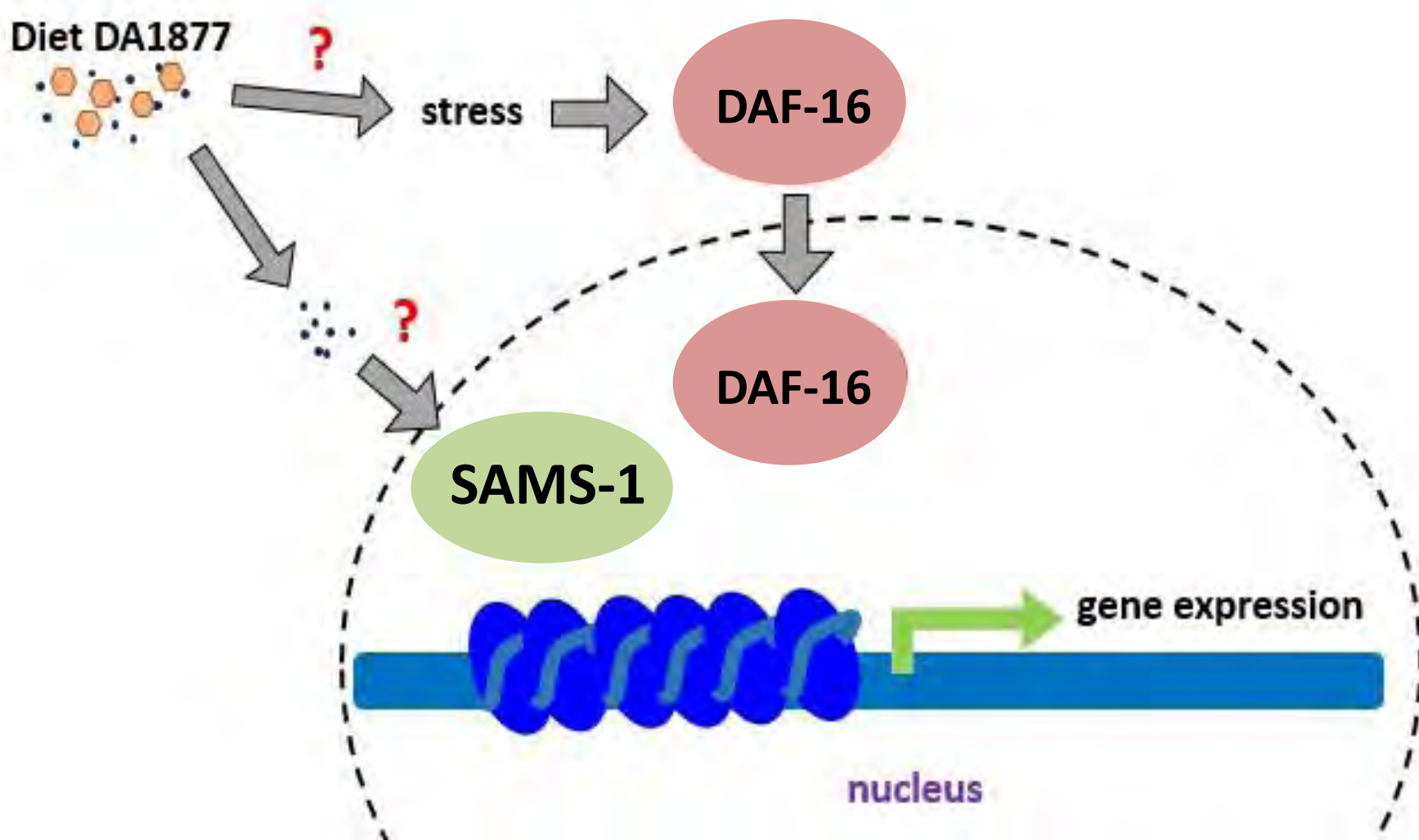


(A) *daf-16*基轉種在不同飲食下第一排腸道細胞核螢光表現與可見光圖（紅框處為細胞核）。
(B) 將細胞核螢光顯現量標準化後，以食用OP50的線蟲為控制組所繪出的比例圖。

結論與討論

DA1877飲食會造成線蟲早衰，除了生長加速和壽命減短之外，感覺神經的型態和運動神經的功能亦受影響。先前研究指出DAF-16的活化與外在氧化壓力相關，而DA1877飲食會使DAF-16的入核量增加，推測DA1877飲食對線蟲而言是一種氧化壓力，使DAF-16入核調控與衰老相關的基因表現，並改變感覺神經型態及運動神經功能。

已知OP50與DA1877在SAM分子的含量上有差異，因此未來會以*sams-1*突變種與*mec-7*基轉種的雜交種進行實驗，探討DA1877飲食造成的早衰是否與SAM分子相關，期待能運用於人類健康飲食的參照。



參考資料

一、MacNeil LT, Watson E, Arda HE, Zhu LJ, Walhout AJ (2013) Diet-induced developmental acceleration independent of TOR and insulin in *C. elegans*. *Cell*, **153**, 240-252.
二、Pan CL, Peng CY, Chen CH, McIntire S (2011) Genetic analysis of age-dependent defects of the *Caenorhabditis elegans* touch receptor neurons. *PNAS*, 9274-9279.
三、Hamamichi S, Rivas RN, Knight AL, Cao S, Caldwell KA, Caldwell GA (2008) Hypothesis-based RNAi screening identifies neuroprotective genes in a Parkinson's disease model. *PNAS*, **105**, 728-33.
四、M Uno, E Nishida (2016) Lifespan-regulating genes in *C. elegans*. *npj* doi: 10. 1038