

中華民國第 65 屆中小學科學展覽會

作品說明書

高級中等學校組 動物與醫學科
佳作

052008

以線蟲模式探討代糖調控宿主與腸道菌相交互
作用機制

學校名稱： 國立臺南女子高級中學

作者：	指導老師：
高二 蔡昀臻	林淑娟
高二 林家羽	

關鍵詞： 代糖、腸道共生菌、秀麗隱桿線蟲

摘要

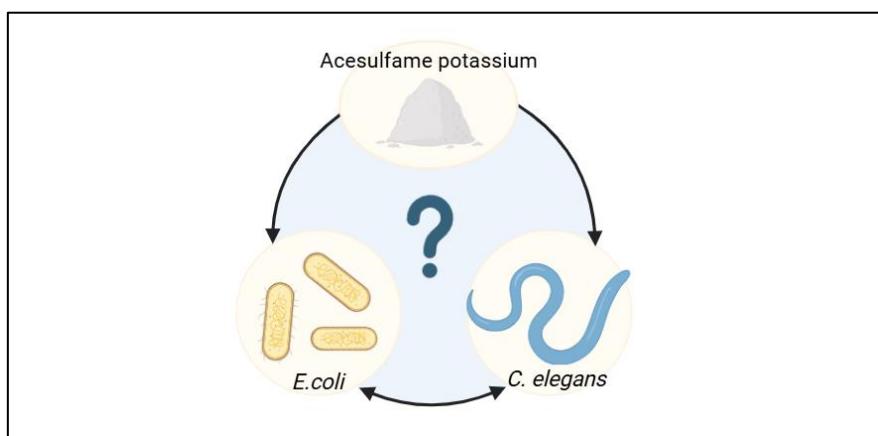
代糖是一種低熱量的甜味替代品，雖在過去被認為對人體無害，近年研究卻發現代糖會引起腸道菌相失衡，有害宿主健康，但其機制仍不明。秀麗隱桿線蟲的腸道上皮細胞與人類相似，且腸道共生菌易觀察，適合探討宿主與腸道菌相間的交互作用。本研究以代糖乙醯磺胺酸鉀(acesulfame potassium, AceK)餵食線蟲，發現AceK在腸道共生菌滅活狀況下，能夠藉由減少腸道粒線體自噬作用、上調抗氧化基因*sod-3*並增加線蟲體內的H₂O₂濃度，使線蟲壽命延長；但在腸道共生菌的交互作用下，上述效果皆減弱，AceK反倒促使線蟲腸道菌量增加，因此干擾宿主利用H₂O₂控制腸道菌量的能力，導致線蟲提早死亡。本研究發現AceK會使腸道菌量失衡，並進一步探討過量的腸道共生菌與宿主競爭AceK並影響宿主生理功能之機制。

壹、前言

一、研究動機

市面上常會看到各種不含糖分的甜食，取代糖分的甜味來源是「人工甜味劑」，也就是俗稱的代糖。由於代糖具有低熱量的特性，在過去被認為對人體無害，因此廣泛的應用於健康食品中。然而，近年越來越多研究指出，代糖會對包含人類在內的許多生物造成負面的影響，舉例來說：AceK會抑制鮑氏不動桿菌以及綠膿桿菌的致病力^[1]，也會導致小鼠和線蟲腸道脂肪過度堆積^[2, 3]；三氯蔗糖會使小鼠致癌^[4]；阿斯巴甜則會改變人類腸道菌落的組成^[5]。不過，關於代糖如何藉著改變腸道菌相，進一步影響宿主生理功能的機制，目前仍不清楚。

先前的研究指出^[6]，代糖乙醯礦胺酸鉀（acesulfame potassium, 又稱為醋礦內酯鉀，以下簡稱AceK）會促進大腸桿菌的生長，而大腸桿菌(*Escherichia coli*, *E. coli*)正是包含人類在內的許多生物體內重要的腸道共生菌。秀麗隱桿線蟲(*Caenorhabditis elegans*, *C. elegans*)為研究分子生物學的模式生物，而線蟲的腸道共生菌種可以被人為控制，又以大腸桿菌為主食，因此成為觀察腸道共生菌與宿主之間交互作用的絕佳模型。因此，我們決定利用線蟲作為宿主，觀察代糖—AceK會在什麼樣的機制作用之下，影響腸道共生菌與宿主的關係。



(圖1-1) 研究動機示意圖 (作者製圖)

二、研究背景

(一) 腸道菌相與宿主交互作用對宿主生理機能的影響

腸道共生菌（gut flora）為一群能夠在宿主腸道內長期定植並與宿主共生的細菌，能幫助宿主分解養分，並產生宿主所需的營養素供宿主使用，與宿主形成共生的關係。這些多樣的細菌在宿主腸道中組成腸道菌相（gut microbiota），而腸道菌相代謝養分後產生的代謝物會影響宿主的生理機能，舉例來說：大腸桿菌產生的colanic acid能調節粒線體基因轉錄以促進宿主壽命延長^[7]。

正常狀況下，腸道共生菌能透過控制營養代謝、抵抗病原體、向免疫細胞傳遞訊號等方式促進宿主的生理和免疫功能並影響宿主的健康^[8-10]。然而，若腸道菌相因為宿主的飲食習慣改變或是生病等原因而失衡，就會帶給宿主負面影響。影響腸道菌相的因素有很多，飲食便是其中一種，諸如醣類、纖維或脂肪的攝取量都會影響人類的腸道菌相^[11]。

(二) 代糖及其對生物體的負面影響

代糖，泛指人工合成能讓食物具甜味的化合物。跟代糖不同的是，醣類會被人體吸收並產生熱量，但是代糖大多在分解時並不會產生熱量，所以經常被用於健康食品中作為甜味來源。常見的代糖有：阿斯巴甜(aspartame)、三氯蔗糖(sucralose)、乙醯礦胺酸鉀(acesulfame potassium)...。

然而，食用某些種類的代糖會影響生物體的代謝功能。先前的研究指出，阿斯巴甜、乙醯礦胺酸鉀或是三氯蔗糖在小鼠體內會導致與血糖相關的代謝異常、使小鼠致癌，或是造成線蟲脂肪過度堆積等問題^[2-4]。

(三) 代糖促進細菌生長

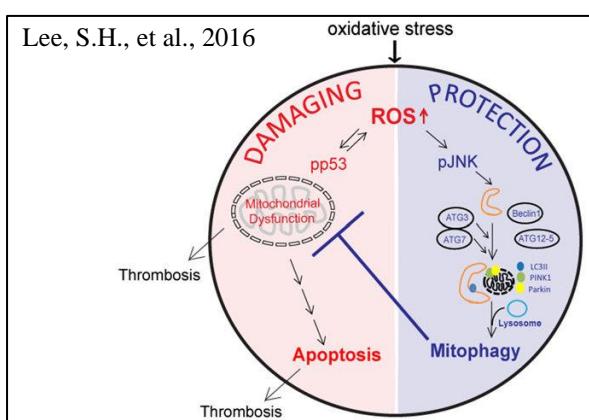
過去的研究中指出，各種不同的代糖會透過許多方式促進細菌的生長。阿斯巴甜會促進糞腸球菌（*Enterococcus faecalis*）生物膜（biofilm）的形成，而三氯蔗糖則會增強糞腸球菌的黏附力，進而增強毒力^[12]；糖精（saccharin）則會增加許多種革蘭氏陰性細菌鞭毛與抗藥性基因的表現；紐甜（neotame）會增進擬桿菌門細菌的葉酸合成能力^[13]。

本研究選擇的代糖為AceK。先前的研究中^[6]顯示，在大腸桿菌的菌液中添加AceK會改變大腸桿菌代謝途徑中某些基因的表達，例如：使pfkA表現量增加，能催化葡萄糖透過糖解途徑分解為丙酮酸的量增加，而糖解作用是大腸桿菌產生能量必須的途徑，因此可以促進大腸桿菌的生長。由此，我們推測AceK對於宿主腸道內共生的大腸桿菌也會有促進生長的效果，食用AceK可能會影響宿主的腸道菌量。

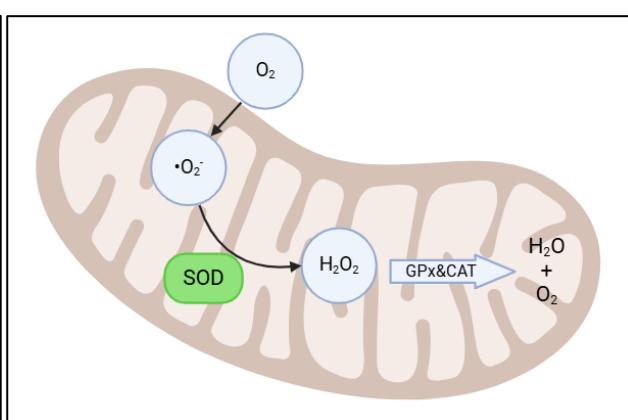
(四) 粒線體與氧化壓力

粒線體是細胞製造能量的場所，負責消耗養分和氧氣來製造ATP。然而，在消耗養分產生能量的同時也會產生以O₂⁻為主的活性氧化物(reactive oxygen species, ROS)，適量的ROS在細胞訊號傳遞中扮演重要角色，但過量時則會造成氧化壓力，使宿主加速老化。氧化壓力(oxidative stress)，即為ROS和抗氧化物之間的比值不平衡，當ROS過多時，會累積在粒線體中，促使自噬作用發生（如圖1-2），但是當生物體老化，細胞的自噬功能衰退後，ROS就會過度累積在粒線體內，使粒線體的電子傳遞鏈功能損壞，進而導致生物體代謝能力下降，因此老化、死亡^[14, 15]。因此，觀察粒線體自噬作用的程度可以表達細胞所遭受到的氧化壓力大小。

本研究中選擇觀察的*sod-3*基因是負責在線蟲粒線體中合成超氧化物岐化酶(superoxide dismutase, SOD)的主要基因^[16]，能催化2O₂⁻+2H⁺→H₂O₂+O₂此一反應進行（如圖1-3），將ROS轉化成對生物體危害較小的過氧化物(H₂O₂)並減緩氧化壓力，此基因亦與延長線蟲壽命有關^[17]。



(圖1-2) 粒線體自噬作用機制

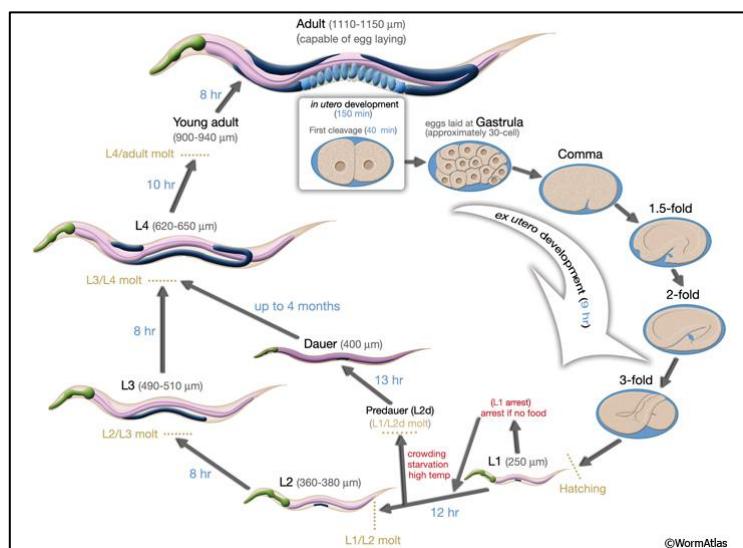


(圖1-3) SOD作用機制 (作者製圖)

(五) 模式生物：秀麗隱桿線蟲

秀麗隱桿線蟲(*Caenorhabditis elegans*, *C. elegans*)是常被用來研究老化、神經與遺傳科學的一種模式生物，具有體型小、壽命短、體腔透明等優勢，另外，線蟲的基因已完全定序完成，很適合進行分子機制的研究。通過自母體中分離蟲卵的技術，直到幼蟲接種於含有細菌的培養基上前皆是無菌的狀態^[18]，因此我們可用不同的細菌餵食線蟲，而細菌會定植於線蟲腸腔中，藉此可以控制線蟲的腸道內菌種^[19]；再加上線蟲與人類的腸道上皮細胞高度相似^[20, 21]，使線蟲成為觀察腸道共生菌與宿主交互作用的絕佳模型，因此我們選擇以線蟲為模式生物來進行研究。

線蟲的生命週期為三天（如圖1-5），其中L1~L4屬於幼蟲階段；自young adult（壯年期）後為成蟲，成蟲即具有生育能力，而生育能力隨老化逐漸衰退。成熟的線蟲的壽命約只有2~3星期，此特性造就線蟲實驗高通量與高再現性的優點，亦使線蟲的老化現象更容易觀察。



（圖1-4）線蟲的生命週期（圖片取自WormAtlas）

先前的研究中添加於大腸桿菌菌液的AceK濃度多介於0.05%~2%之間[6, 22]。不過，我們發現，根據衛生福利部食品藥物管理署之食品添加物規範，在臺灣，AceK在食品中的用量完全沒有限制，因此我們決定採用較高的濃度2%進行實驗。

另外，我們選擇了生物體中最常見的熱量來源—葡萄糖(Glucose)做為一般醣類的實驗組，取同樣2%的濃度，比較會產生熱量的醣類與不會產生熱量的代糖對線蟲的影響是否不同。

三、 研究目的

- (一) 研究添加AceK對宿主腸道共生菌生長狀況的影響。
- (二) 研究添加AceK對宿主控制腸道共生菌量能力的影響。
- (三) 研究添加AceK在活菌及死菌狀況下對宿主壽命的影響。
- (四) 研究添加AceK在活菌及死菌狀況下影響宿主調控體內氧化壓力能力的分子機制。

貳、研究設備及器材

一、 實驗器材

1.5mL微量離心管、3.5/6/9cm公分培養皿、解剖顯微鏡、玻璃毛細管、白金絲、20/37°C 培養箱、吸量管、玻片、UV crosslinker、96孔板、離心機、無菌操作臺、試管震盪機、分光光度計

二、 藥品與培養基配方

(一) NG培養基

用途：線蟲生長用。表中「添加物」為本研究所使用的代糖與醣類(AceK、Glucose)，控制組則不額外添加醣類或代糖。

滅菌前加入：

藥品	用量
NaCl	1.2g
Bactopeptone	1.0g
Agar粉	8g
添加物 (2% AceK、Glucose)	8g
ddH ₂ O	0.4L

滅菌後加入：

藥品	用量
1M CaCl ₂	0.4mL
1M MgSO ₄	0.4mL
1M phosphate buffer	1mL
Cholesterol	0.4mL

(二) ENG培養基

用途：在線蟲生長初期提供較多養分

滅菌前加入：

藥品	用量
NaCl	1.2g
Bactopeptone	1.0g
Agar粉	8g
yeast extracted	0.4g
ddH ₂ O	0.4L

滅菌後加入：

藥品	用量
1M CaCl ₂	0.4mL
1M MgSO ₄	0.4mL
1M phosphate buffer	1mL
Cholesterol	0.4mL

(三) M9溶液

用途：處理線蟲與進行各項實驗時使用，為線蟲的生理食鹽水

藥品	用量
KH ₂ PO ₄	0.6g
Na ₂ HPO ₄	1.132g
NaCl	1.0g
H ₂ O	200mL
MgSO ₄ (滅菌後加入)	0.2mL

(四) LB broth

用途：培養大腸桿菌

藥品	用量
tryptone	10g
yeast extract	5g
NaCl	10g
H ₂ O	1000mL

三、 實驗模型

(一) 使用生物

生物	品系
秀麗隱桿線蟲	N2 (WT)
	SJ4143
大腸桿菌	OP50
	OP50-GFP

(秀麗隱桿線蟲皆取自Caenorhabditis Genetics Center)

(二) qPCR引子序列

基因	序列
<i>act-1</i>	前置引子：5'-GCTGGACGTGATCTTACTGATTACC-3' 反置引子：5'-GTAGCAGAGCTTCTCCTTGATGTC-3'
<i>sod-3</i>	前置引子：5'-GGCTAAGGATGGTGGAGAAC-3' 反置引子：5'- ACAGGTGGCGATCTCAAG-3'

四、 數據分析軟體

(一) ImageJ

為一款影像分析軟體，本研究中用以測量線蟲長度及定量螢光強度。

(二) Microsoft Excel

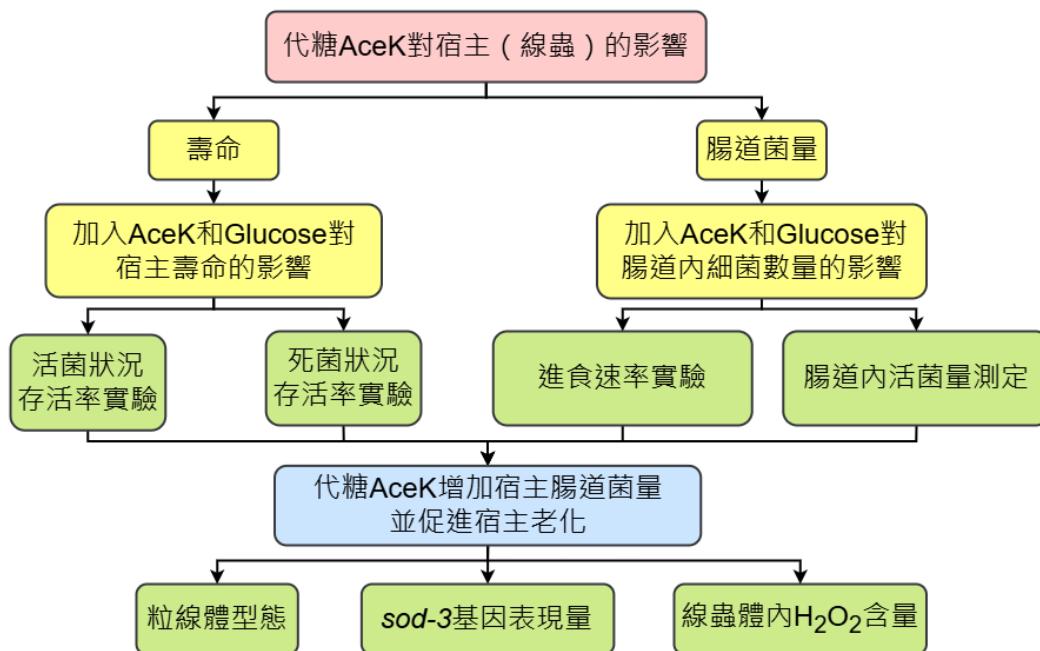
本研究中使用Excel進行實驗數據的分析與處理。

(三) GraphPad Prism

為一款統計分析繪圖軟體，本研究中用以將整理過後的數據繪製成圖表並使用變異數分析(ANOVA)計算統計差異，p值<0.05表示兩組數據間具有統計差異。其中，0.05<p值以ns表示(無統計差異);0.01≤p值<0.05以1顆星表示;0.001≤p值<0.01以2顆星表示;0.0001≤p值<0.001以3顆星表示;p值<0.0001以4顆星表示。為求圖表簡潔，本研究的實驗結果圖中未特別標示ns者即表示兩組數據間無統計差異。

參、研究過程或方法

一、研究流程圖



(圖3-1) 本研究流程圖 (作者製圖)

二、觀察添加AceK和Glucose對線蟲腸道內共生菌數量的影響

(一) 測定線蟲的咽部泵送速率 (進食量)

將100μL OP50接種至3種培養基 (無添加任何醣類或代糖的控制組、AceK、Glucose) 上生長16小時 (20°C) 後，將L4線蟲飼養於3種培養基上24小時直到day 1 adult。

1. 在顯微鏡下對準一隻線蟲，開始計時10秒鐘。
2. 計算線蟲在10秒鐘內的咽部抽動的次數。
3. 尋找15隻不同的線蟲並重複以上步驟。
4. 重複實驗三次，並將實驗結果繪製成圖表，計算統計差異。

(二) 利用帶有綠色螢光蛋白的大腸桿菌 (OP50-GFP) 餵食線蟲並以螢光強度定量線蟲腸道內的細菌含量

將100μL OP50-GFP菌液接種至3種培養基 (無添加任何醣類或代糖的控制組、AceK、Glucose)

上生長16小時（20°C）後，將線蟲飼養於3種培養基，每天視線蟲生長情況更換培養基，並在L4、day 2、5、10 adult時進行以下實驗（L4計為第0天，day 2 adult為第2天，以此類推）。

1. 將線蟲挑至滴有1% agarose (in M9) 的載玻片上排列整齊，5隻為一組，共挑3組。最後，蓋上蓋玻片以固定線蟲。
2. 將排列好線蟲的玻片放至螢光顯微鏡下拍照記錄。
3. 利用Image J定量線蟲體內的螢光強度。
4. 重複實驗三次，並將實驗結果繪製成圖表，計算統計差異。

（三）菌落形成單位實驗（colony-forming unit, CFU）

將100μL OP50接種至3種培養基（無添加任何醣類或代糖的控制組、AceK、Glucose）上生長16小時（20°C）後，將線蟲飼養於3種培養基，每天視線蟲生長情況更換培養基，並在L4、day 2、day 5、day 10 adult時進行以下實驗。

1. 預先配製溶液

A液：麻醉劑（左旋咪唑鹽酸鹽）+ M9

B液：麻醉劑（左旋咪唑鹽酸鹽）+ M9 + 抗生素(Gentamicin)

2. 將線蟲自培養基上沖下來，收集到eppendorf中，並用A液洗掉線蟲身上殘餘的細菌。
3. 換到另一eppendorf，用B液洗3次，最後一次放置1小時讓抗生素作用。
4. 再次用A液洗掉線蟲身上殘餘的抗生素。
5. 挑取10隻線蟲，放入已裝有M9的eppendorf。
6. 使用磨蟲器，重複將蟲體磨碎直到在顯微鏡底下看不到殘留的蟲體。
7. 序列稀釋。
8. 將稀釋液塗盤（LB broth agar）每盤100ul，每個稀釋液塗兩盤為兩重複。
9. 放置37°C過夜。隔天計算agar上長出的OP50單一菌落生成數量。
10. 重複實驗三次，並將實驗結果繪製成圖表，計算統計差異。

三、 觀察添加AceK和Glucose對線蟲壽命的影響

(一) 在活菌狀況下觀察

1. 將100 μ L OP50接種至3種培養基（無添加任何醣類或代糖的控制組、AceK、Glucose）上生長16小時（20°C）。
2. 分別挑取50隻L4階段的線蟲至3種培養基上，當天計為day 0 adult。
3. 隔天計為day 1 adult，以此類推，每天計算存活的線蟲數量直到線蟲全部死亡。
4. 視情況將線蟲轉移至新的培養基上，避免有新孵化的幼蟲出現導致計算有誤，或是培養基汙染。
5. 重複實驗三次，並將實驗結果繪製成圖表，計算統計差異。

(二) 在死菌狀況下觀察：利用紫外光將細菌殺死（去除細菌本身代謝功能）

1. 前一天將100 μ L OP50接種至3種培養基（無添加任何醣類或代糖的控制組、AceK、葡萄糖）上生長16小時（20°C）後，照射紫外光20分鐘以將細菌滅活。
2. 使用無菌接種環挖取一點點照過紫外光的盤子上的細菌，塗抹在乾淨的LB agar上。將LB agar置於37°C一個晚上。
3. 隔天若發現LB agar上有菌落形成，需重複步驟1~3直到將細菌完全滅活為止。
4. 分別挑取50隻L4的線蟲至上述三種滅過菌的培養基上，當天計為day 0 adult。
5. 隔天計為day 1 adult，以此類推，每天計算存活的線蟲數量直到線蟲全部死亡。
6. 視情況將線蟲轉移至新的培養基上。
7. 重複實驗三次，並將實驗結果繪製成圖表，計算統計差異。

四、 觀察加入AceK和Glucose對粒線體自噬作用的影響

本實驗使用之線蟲品系為SJ4143，其腸道內的粒線體帶有綠色螢光蛋白，可觀察粒線體的型態可知粒線體是否發生自噬作用。另外，也可觀察線蟲發出的螢光亮度：螢光較亮時表示粒線體自噬作用較弱^[23]。

(一) 利用共軛焦顯微鏡(confocal microscope)觀察粒線體型態

1. 將100 μ L OP50接種至3種培養基（無添加任何醣類或代糖的控制組、AceK、Glucose）上生長16小時（20°C）。
2. 將L4線蟲飼養於3種培養基上24小時（直到day 1 adult）。
3. 在培養基上加入M9並吸取數隻線蟲滴到有1% agarose (in M9)的載玻片上，並蓋上蓋玻片以固定線蟲。
4. 將排列好線蟲的玻片放至共軛焦顯微鏡下觀察並拍照記錄。

（二）利用螢光強度定量粒線體自噬作用程度

1. 將100 μ L OP50接種至3種培養基（無添加任何醣類或代糖的控制組、AceK、Glucose）上生長16小時（20°C）。
2. 將L4線蟲飼養於3種培養基上24小時（直到day 1 adult）。
3. 將線蟲挑至滴有 1% agarose (in M9)的載玻片上排列整齊，5 隻為一組，共挑 3 組。最後，蓋上蓋玻片固定線蟲。
4. 至螢光顯微鏡下拍照。
5. 利用ImageJ測量每組線蟲的平均長度以進行標準化，並定量螢光強度。

五、利用RT-qPCR (real-time quantitative reverse transcription polymerase chain reaction)

測定線蟲的*sod-3*基因表現量

將100 μ L OP50接種至3種培養基（無添加任何醣類或代糖的控制組、AceK、Glucose）上生長16小時（20°C）後，將1000隻L4線蟲於3種培養基上飼養24小時。

1. 利用M9洗去線蟲表面的殘留細菌，並使用珠子將線蟲震碎以獲得細胞裂解物。
2. 根據Qiagen RNA mini kit提供之說明書流程抽取線蟲的RNA。
3. 測量RNA的濃度，並將樣品加入不同量的ddH₂O稀釋成一致的濃度。
4. 將等量的樣品RNA利用Reverse Transcription PCR轉換為cDNA。
5. 利用qPCR分別獲取各樣品中管家基因與目標基因的Ct值(Cycle Threshold Value)與Tm值(Melting Temperature Value)。

6. 以管家基因(*act-1*)之Ct值作為標準換算出目標基因(*sod-3*)的相對表現量。
7. 重複實驗三次，並將結果繪製成圖表，計算統計差異。

六、 觀察加入AceK和Glucose對線蟲體內H₂O₂濃度的影響

(一) H₂O₂濃度測定(Amplex red)

本實驗之實驗流程與細節皆取自文獻^[24]。

將100μL OP50接種至3種培養基（無添加任何醣類或代糖的控制組、AceK、Glucose）上生長16小時（20°C）後，將300隻L4線蟲於3種培養基上飼養24小時。

1. 將線蟲收集至eppendorf中，以液態氮重複急凍3次。
2. 將線蟲分裝至不透光96孔板中，每組3重複。
3. 配製H₂O₂之標準濃度試劑（0、1.25、2.5、5μM），並加入96孔板中。
4. 配ampex red染劑並加入辣根過氧化物酶（horseradish peroxidase，HRP）呈色。
5. 將ampex red染劑加入96孔板，即放入光度計開始測量濃度，每30分鐘一次，共測量3次。
6. 取濃度最穩定之時間（60分鐘）時的濃度，利用標準濃度試劑及其吸光度算出標準曲線，並將各實驗組測得之吸光度帶入標準曲線，換算出各組之H₂O₂濃度。
7. 重複實驗三次，並將實驗結果繪製成圖表，計算統計差異。

(二) 蛋白質濃度（進行標準化）

本實驗流程根據biovision BCA protein assay kit protocol進行。

將100μL OP50接種至3種培養基（無添加任何醣類或代糖的控制組、AceK、Glucose）上生長16小時（20°C）後，將300隻L4線蟲於3種培養基上飼養24小時。

1. 將線蟲收集至eppendorf中，用M9洗3次。
2. 在eppendorf中加入珠子，加裝防爆夾後利用試管震盪機震15分鐘。
3. 離心15秒，吸取蛋白質樣品液至新的eppendorf中。
4. 配製標準濃度蛋白質液（0、0.025、0.125、0.25、0.5、1、1.5、2mg/mL），並加入96孔板中，每個孔25μL。

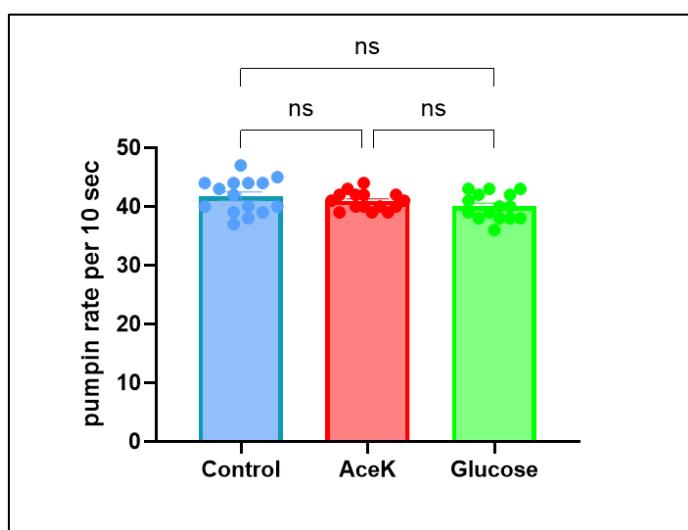
5. 配製working reagent (BCA reagent A : BCA reagent B = 50 : 1)。
6. 在每個孔中裝入25μL之蛋白質樣品液+200μL之working reagent。
7. 放置37°C培養箱30分鐘後，測量混和液之吸光度（波長562nm）。

肆、研究結果

一、代糖 AceK 會促進線蟲腸道共生菌生長

(一) AceK 不會改變線蟲的進食量

根據以往研究^[25]，線蟲的咽部泵送的頻率可以反映牠的進食量。因此，在觀察腸道菌量之前，我們必須先行確認我們所添加的 AceK、Glucose 是否會改變線蟲的進食速率，進而確認線蟲體內的菌量與進食的菌量是否有關連。我們首先確認了每次接種至培養基上的菌液濃度皆相同 (OD = 1)，接著再計數線蟲在 10 秒鐘內咽部泵送的次數以觀察線蟲在 3 種培養基 (無添加任何醣類或代糖的控制組、添加 AceK、添加 Glucose) 上的細菌食用量是否不同。

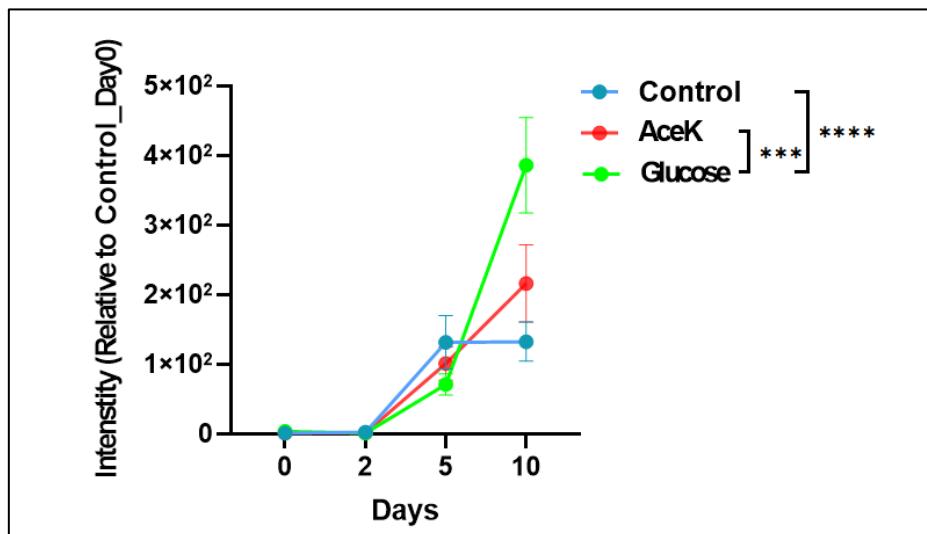


(圖 4-1) 線蟲在不同培養基條件下 10 秒內的咽部泵送次數(n=15) (作者製圖)

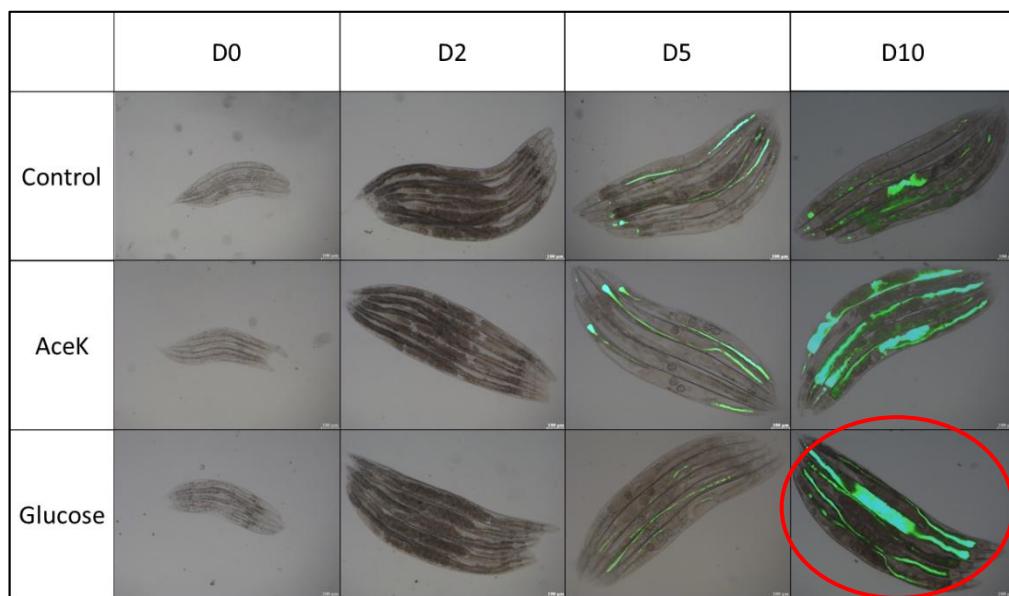
由圖 4-1 可以看出，AceK 組、葡萄糖組 (Glucose) 和無添加任何醣類或代糖的控制組 (Control) 互相比較的結果顯示，三組培養基條件都不會改變線蟲的進食速率，因此，進入每一組線蟲體內的細菌量基本上是一樣的。本實驗確認了在接下來的腸道菌量實驗中，線蟲腸道內細菌量的差異並非由於進食量不同所導致。

(二) 線蟲腸道內共生菌量觀察

基於線蟲進食量的結果，我們進一步觀察線蟲腸道內的細菌量。我們在3種培養基（無添加醣類或代糖、添加AceK、添加Glucose）上培養螢光大腸桿菌（OP50-GFP）後餵食給線蟲，再以螢光顯微鏡拍攝螢光照片，並以ImageJ定量螢光強度，再將各組的結果除以控制組（Control第0天）的平均後，得出結果如圖4-2，圖中標示的統計差異為第10天的實驗結果之分析。



(圖 4-2) 線蟲在不同培養基條件下的腸道內 OP50-GFP 螢光強度(n=3) (作者製圖)



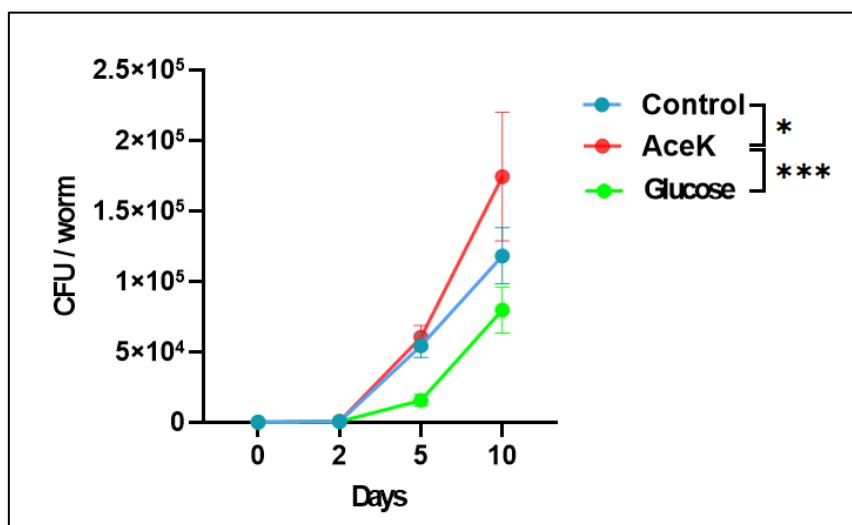
(圖4-3) 線蟲腸道內OP50-GFP螢光照片 (作者拍攝)

由圖4-2可以看出，添加Glucose相對於無添加醣類的控制組(Control)腸道菌量增多，而AceK組相對於Glucose組則減少。

不過，我們發現第10天時Glucose組的線蟲螢光照片看起來不太正常。如圖4-3所示，線蟲的腸道似乎有破裂的情況，導致螢光充滿整個蟲體。查詢文獻後，我們發現：Glucose會調節線蟲的腸道上皮基因，使衰老線蟲腸道的上皮細胞破裂，腸道破損，細菌溢出腸道之外^[26]，導致我們偵測到的之螢光分布區域超過腸道應有的範圍。因此我們認為，Glucose組的細菌量可能被我們高估，導致結果不準確。

(三) AceK 促進線蟲腸道內細菌生長

基於上述的實驗結果，我們更換實驗方法，利用菌落生成單位（colony-forming unit, CFU）的實驗確認線蟲的腸道內菌量。我們先將培養在3種條件（無添加醣類或代糖、添加AceK、添加Glucose）的培養基下的線蟲，麻醉後利用抗生素洗去體腔外多餘的細菌，再將線蟲磨碎以獲取腸道內的大腸桿菌（OP50），並將磨碎的汁液塗在LB agar上，置於37°C 16小時後，計數菌盤上的單一菌落生成數量，由此可以得知線蟲腸道內定植的活細菌數量。實驗結果如圖4-4，圖中標示的統計差異為第10天的實驗結果之分析。

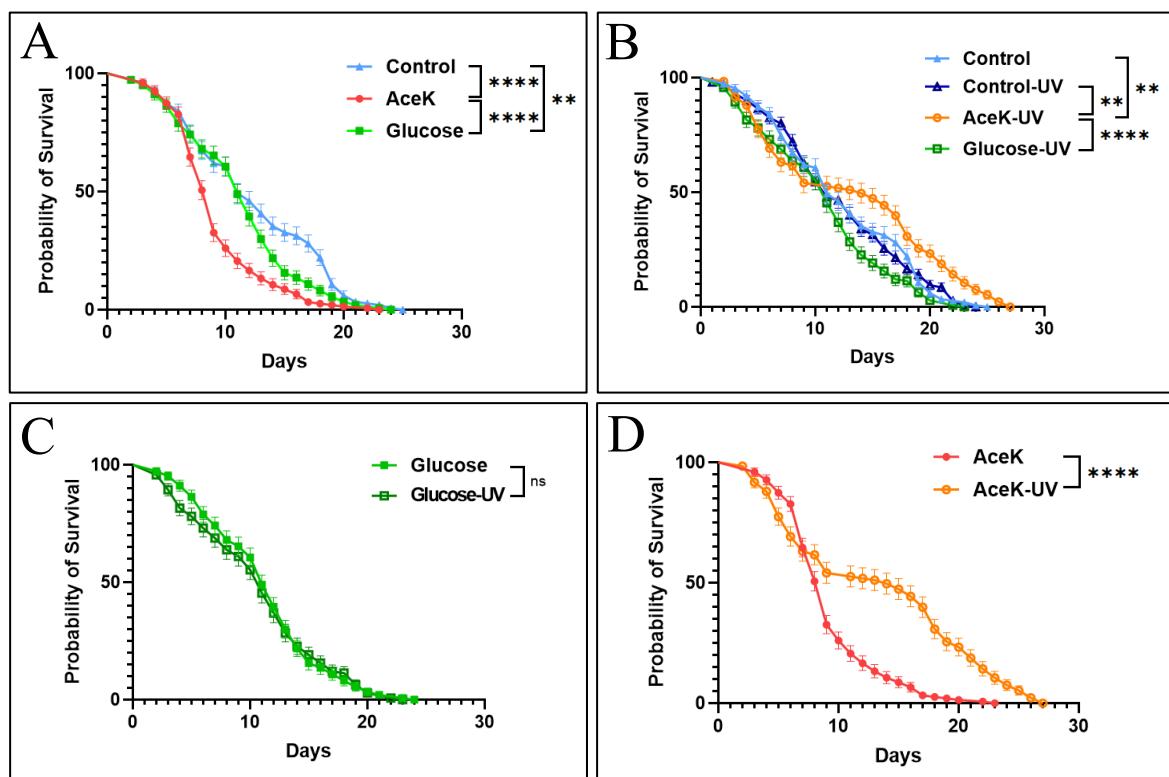


(圖4-4) 線蟲在不同培養基條件下的腸道內OP50菌落生成數量(n=3) (作者製圖)

由圖4-4可以看出，使用添加AceK的培養基養殖的線蟲腸道內的細菌量相較於控制組(Control)和Glucose而言都有提高，這表示AceK進入線蟲體內後能夠促進腸道內大腸桿菌的生長。

二、代糖AceK在活菌狀況下會使線蟲壽命縮短

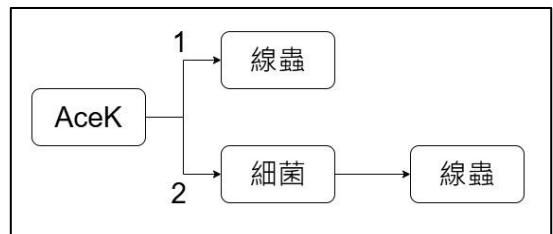
在進行腸道菌量的實驗過程中，我們觀察到約從第5天開始，AceK組培養基上存活的線蟲數量明顯減少。因此，我們假設腸道菌量上升可能會導致線蟲壽命變短，於是進行存活率實驗以確認。我們利用3種條件（無添加糖類或代糖、添加AceK、添加Glucose）的培養基培養線蟲，進行線蟲存活率的實驗。另外，為了確認細菌在影響線蟲壽命中扮演的角色，我們利用照射紫外光(UV)的方式將細菌殺死，進而阻斷細菌本身代謝對線蟲造成的影响，再將死細菌餵食給線蟲並觀察線蟲的存活率。實驗結果如圖4-5。



(圖4-5) 線蟲在不同培養基條件下的壽命曲線(n=3) (作者製圖)

綜合上述圖表，在圖4-5-B中，比較控制組(Control)的活菌與死菌狀況，得知細菌的死活本身並不會影響線蟲壽命。圖4-5-A顯示，添加Glucose時，在活菌狀況下，線蟲的壽命較控制組短；而在圖4-5-C中Glucose組的死菌和活菌狀況互相比較，曲線則趨於一致且無統計差異，可知線蟲的壽命不受添加Glucose的細菌死活影響。在圖4-5-A中，添加AceK時，線蟲在活菌的情況下的壽命相較於控制組明顯變短；而在圖4-5-B、4-5-D中互相比較的結果卻表明死菌狀況下AceK組線蟲的壽命反而較控制組長。此結果說明了在添加了AceK的情況下，細菌具有活性與否確實會造成不一樣的壽命結果。

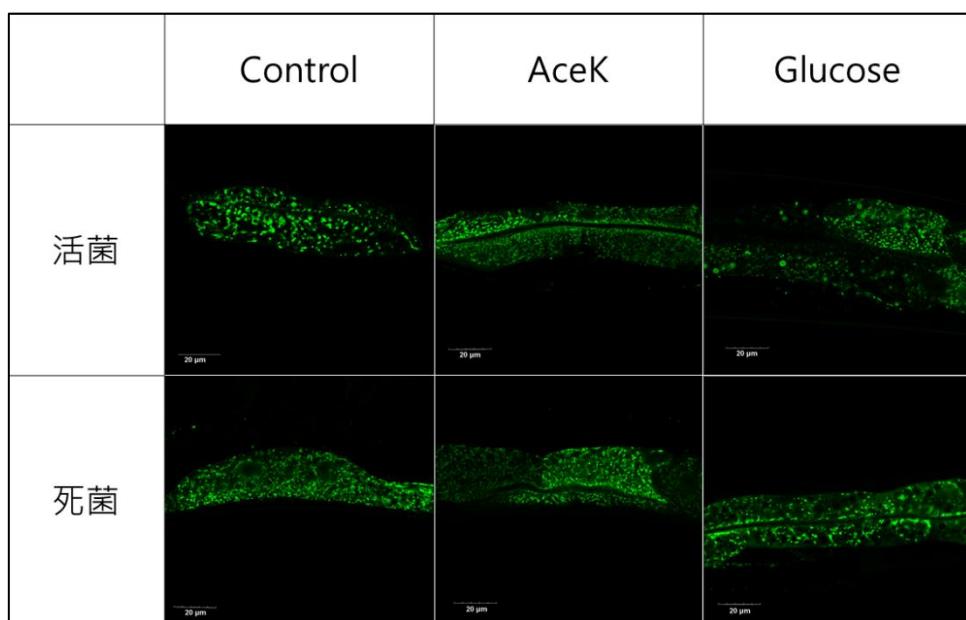
由線蟲存活率的實驗結果，我們推測代糖可能透過圖4-6中的兩種途徑影響線蟲。而在細菌滅活的實驗中可以看出，細菌的死活對線蟲的壽命會產生影響，因此初步猜測應為途徑2。



(圖4-6)代糖影響線蟲的途徑(作者製圖)

三、代糖AceK在死菌狀況下減緩線蟲粒線體自噬作用

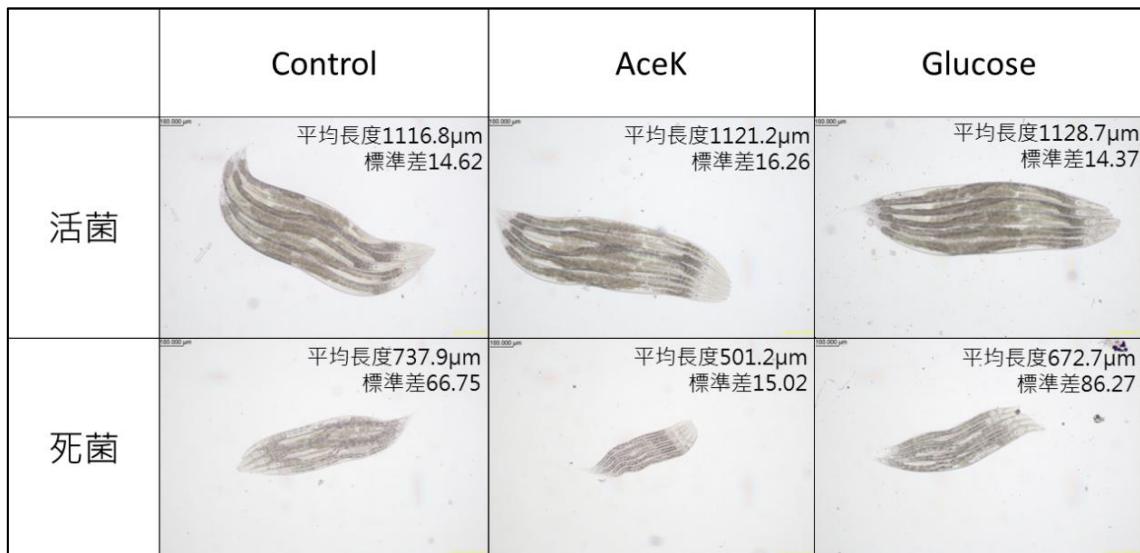
基於上述線蟲存活率實驗的結果，我們進一步探討AceK在死菌情況下是透過哪種途徑增加線蟲的壽命。由於粒線體是代謝能量重要的胞器，且會產生ROS使粒線體功能損壞，進而導致生物體老化，因此我們推測粒線體的功能很可能與我們所觀察到的壽命現象有關。我們依照文獻^[23, 27]所述，選擇蟲株SJ4143以觀察：SJ4143線蟲腸道內的粒線體帶有綠色螢光蛋白(GFP)。我們首先利用共軛顯微鏡(confocal microscope)拍攝螢光照片，觀察粒線體型態的改變。文獻指出^[27]，粒線體呈現絲狀者表示粒線體型態較完整，呈點狀則表示粒線體碎片化較嚴重。實驗結果如圖4-7。



(圖4-7) SJ4143線蟲粒線體型態(作者拍攝)

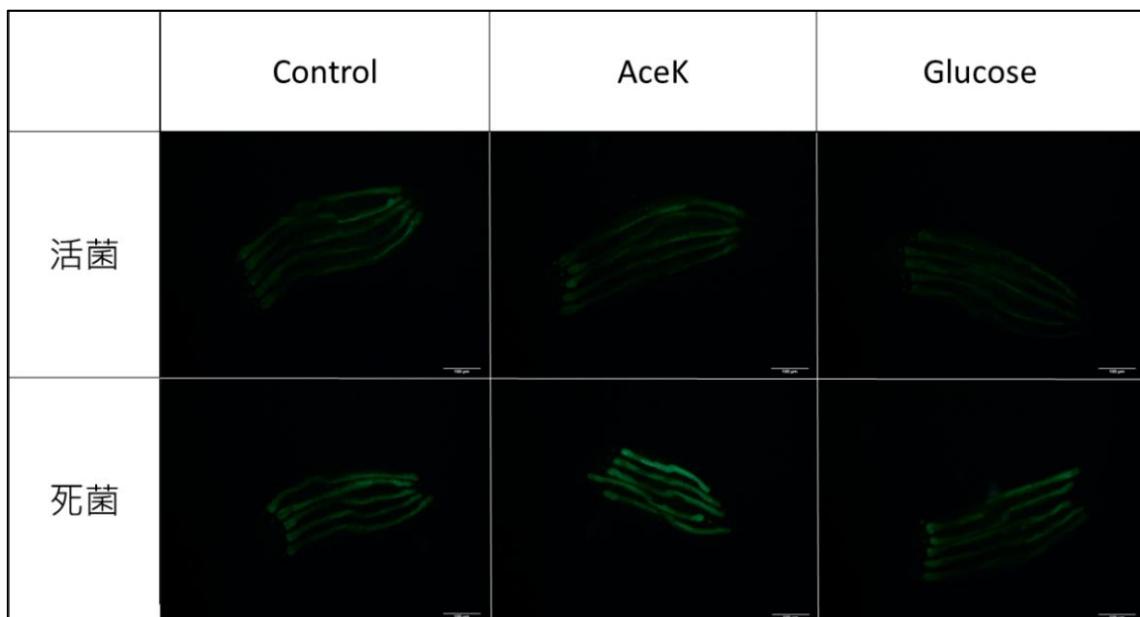
由圖中可以看出死菌狀況下的AceK組粒線體型態和其他組別具有明顯差異：死菌狀況下的控制組(Control)與AceK組的粒線體多呈現絲狀並且相互連結，其他組別則多呈現點狀並較為分散。

為了進一步量化粒線體自噬作用的程度，我們改用一般的螢光顯微鏡拍攝線蟲並定量螢光強度，根據文獻^[23]，當粒線體自噬作用強烈時，線蟲會表現出較弱的螢光。因此，我們利用此蟲株之螢光表現強度作為腸道粒線體自噬作用程度的指標。

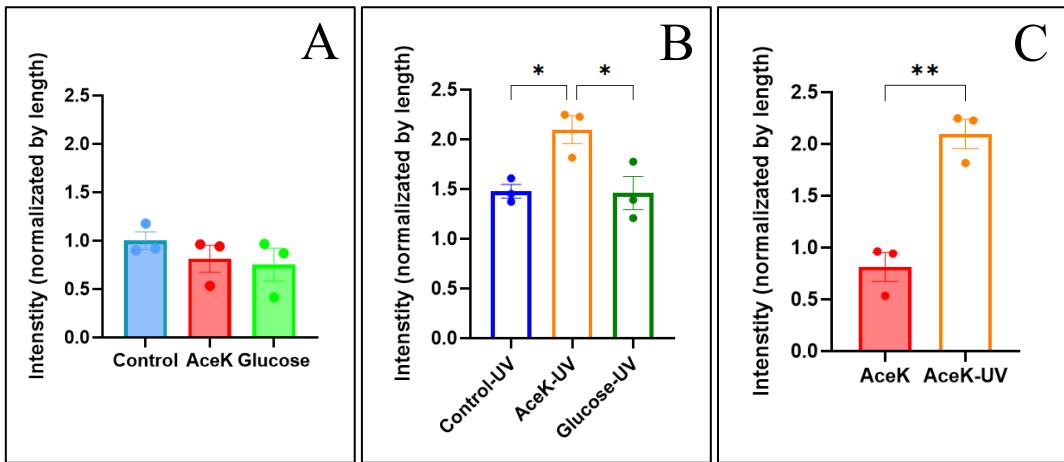


(圖4-8) 線蟲在不同培養基條件下的體長 (作者拍攝)

第一次進行實驗時，我們觀察到活菌組和死菌組之間的線蟲體型大小相差很大，於是我們為線蟲拍照並利用ImageJ測量長度，發現死菌組的線蟲體長確實較短，如圖4-8所見。我們懷疑由於活菌組的養分較充足，線蟲體型偏大，可能會影響實驗結果。因此，我們利用線蟲的體長來標準化螢光強度，實驗結果如圖4-9、圖4-10。



(圖4-9) SJ4143線蟲螢光照片 (作者拍攝)



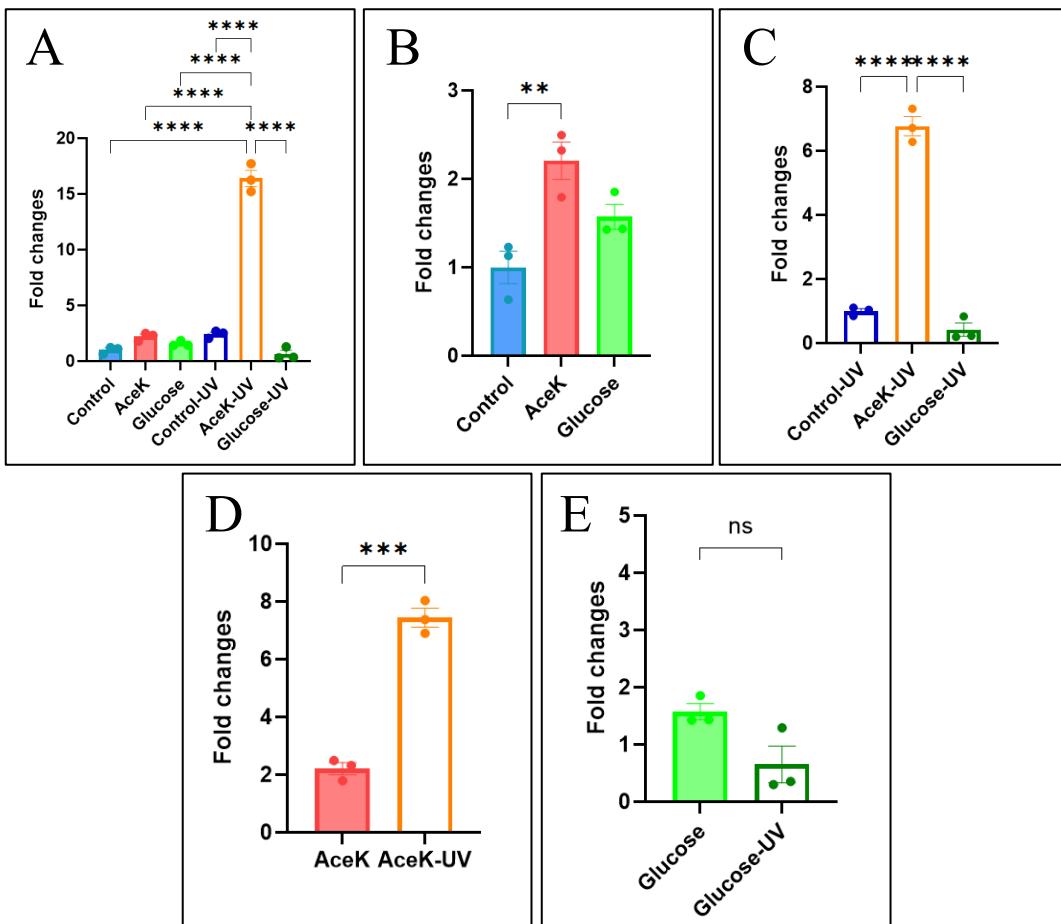
(圖4-10) SJ4143線蟲在不同培養基條件下之腸道粒線體螢光強度($n=3$) (作者製圖)

由圖4-10-A可以看出，在活菌狀況下，各組之間螢光強度無統計差異。由圖4-10-B、4-10-C可以看出，在死菌狀況下AceK組的線蟲腸道內粒線體發出較強螢光，表示AceK能夠減緩粒線體的自噬作用。

過去的研究^[28]指出，粒線體對於氧化壓力的調控功能與壽命長短有關，再加上本實驗之結果，我們推論，AceK在死菌狀況下對線蟲直接的影響是減緩粒線體的自噬作用，藉此延長線蟲壽命；在活菌狀況下，可能由於腸道共生菌利用了部分的AceK，使得AceK減緩粒線體自噬作用的功能受到抑制，因此粒線體的自噬作用相較於控制組並沒有減緩。

四、代糖AceK在死菌狀況下促進線蟲的*sod-3*基因表現量

由於在線蟲體內*sod-3*基因的功能是調控粒線體內的ROS轉換為H₂O₂，是粒線體調控氧化壓力的重要基因，亦與調控線蟲壽命有關^[17]，因此我們利用RT-qPCR測定線蟲體內*sod-3*的RNA轉錄量以得知*sod-3*基因在蟲體內的表現量。本實驗中，我們抽取線蟲的RNA，並將RNA濃度稀釋成一致，取等量RNA反轉錄成cDNA。接著我們利用目標基因(*sod-3*)扣除生物體內穩定表現的管家基因(*act-1*，為組成細胞骨架的基因)的Ct值作為標準，換算出*sod-3*相對表現量。*sod-3*相對於*act-1*之表現量結果如圖4-11。



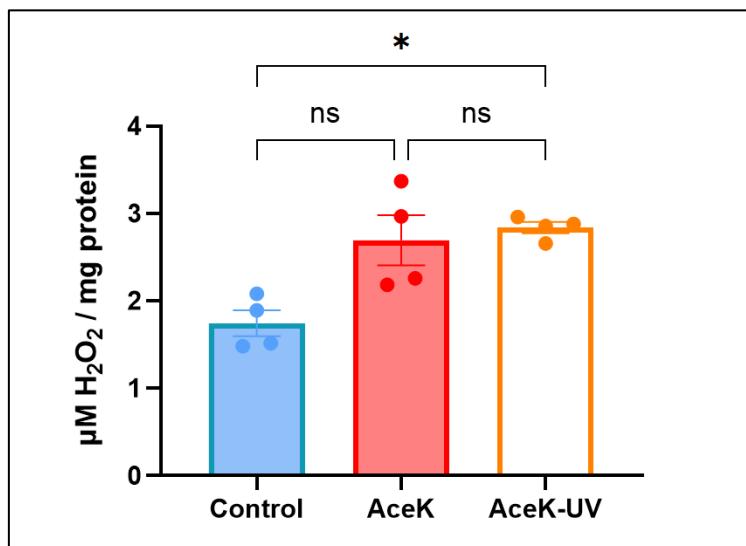
(圖4-11) 線蟲在不同培養基條件下的*sod-3*基因表現量(n=3) (作者製圖)

由圖4-11-A、4-11-C可以看出，死菌狀況下AceK組的*sod-3*含量顯然最高，可推論為AceK能夠直接促進線蟲的*sod-3*基因表現量提升。在圖4-11-B中，單獨比較活菌狀況下的*sod-3*表現量，也可以發現AceK組相較於控制組亦有上升，只是在圖4-11-D中顯示其上升幅度遠不及死菌組。由此，我們推測是腸道共生菌與宿主競爭並利用掉部分的AceK，使得AceK對宿主直接的影響效果弱化。

接著，觀察圖4-11-D、4-11-E，分別比較各組間死菌和活菌狀況下的*sod-3*表現量，AceK組的*sod-3*表現量在死菌狀況下有上升；Glucose組則沒有統計差異。根據上述結果，我們推論：AceK透過促進*sod-3*表現量以減緩粒線體的氧化壓力，進而使線蟲壽命延長。

五、代糖AceK在死菌狀況下使線蟲體內的H₂O₂產生量上升

線蟲的粒線體內的超氧化物岐化酶(SOD)主要由*sod-3*基因合成，負責將粒線體內的ROS分解為對生物體傷害較小的H₂O₂，以減少ROS對粒線體的傷害。藉由觀察H₂O₂的濃度，可以得知*sod-3*基因的作用效果。



(圖4-12) 線蟲在不同培養基條件下每mg蛋白質具有的H₂O₂濃度(n=4) (作者製圖)

根據先前的實驗結果，線蟲在活菌與死菌狀況下的體型大小有所差異。因此，除了H₂O₂濃度實驗之外，我們也另外測定了各種條件下固定數量的線蟲體內蛋白質含量，並以「每mg蛋白質具有的H₂O₂濃度」，進行標準化。

由圖4-12可以看出，死菌狀況下的AceK組線蟲體內每mg蛋白質中含有的H₂O₂濃度相較於控制組來得高，結果與前項*sod-3*基因表現量實驗結果相符，因此我們可以確定AceK透過*sod-3*促進了線蟲體內ROS轉換成H₂O₂的功能。

另外，由於H₂O₂在線蟲體內也具有抑制大腸桿菌在腸道內定殖的功能^[29-31]，是宿主控制腸道菌量不過度生長並維持腸道上皮屏障防禦能力的方法之一。圖4-12中觀察到AceK組在活菌狀況下的H₂O₂產生量的誤差偏大，與控制組和死菌組皆無統計差異。我們推論可能是因為測得的H₂O₂濃度會由於腸道菌生長狀況不一，而H₂O₂與細菌作用的多寡就會有所不同。這同時說明了細菌與宿主競爭腸道內物質的程度也會影響宿主控制腸道共生菌的能力，而腸道共生菌的與宿主競爭AceK的確會弱化*sod-3*基因的表達及其形成H₂O₂的功能。

伍、討論

一、代糖AceK調節宿主腸道菌量與壽命的機制

根據先前的文獻，在體外試驗中，在大腸桿菌的菌液中添加AceK會上調如pfkA、tdk等基因，催化大腸桿菌體內代謝反應，並促進其生長。本研究進一步發現，加入AceK確實會使大腸桿菌在宿主腸道內的生長狀況變好。根據我們的研究結果，我們推論：

- (一) 大腸桿菌會利用宿主腸道內的AceK，導致宿主腸道內共生菌量增加。
- (二) 腸道共生菌消耗掉部分AceK，因此會干擾AceK刺激宿主產生H₂O₂進而控制腸道菌量的能力。

由此，本研究提供了新的機制，證實在AceK作用之下，宿主腸道內的大腸桿菌會增生，進而與宿主競爭AceK，並干擾宿主產生H₂O₂以控制腸道菌量的能力，使腸道菌量失控；而當腸道菌量過多，宿主又無法有效抑制時，便會透過引發感染、產生毒素等方式，使宿主提早死亡^[32, 33]。

此外，在細菌滅活實驗中顯示，AceK本身能夠促進線蟲*sod-3*基因表現，進而增進線蟲調控氧化壓力的能力。比較活菌與死菌狀況下的實驗結果後，我們推論，在活菌狀況下，由於共生菌會與宿主競爭AceK，上述AceK對線蟲產生的效果受到抑制，使*sod-3*表現較不顯著，線蟲較無法抵抗氧化壓力，自然老化；再加上菌量過多、無法有效控制所造成的傷害，進而導致線蟲快速死亡。而在沒有活細菌與宿主競爭AceK的情況下，宿主能直接利用更多的AceK，使AceK作用於粒線體中，因此，我們可以觀察到*sod-3*基因表現量大幅增加，H₂O₂濃度亦隨之上升，粒線體的自噬作用也減緩，而線蟲壽命得以延長。

二、細菌滅活與否對線蟲生長的影響

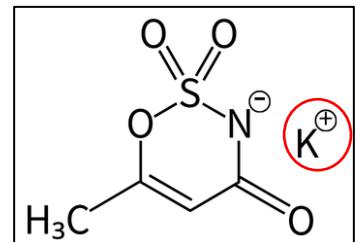
綜合本研究「腸道菌量實驗」以及「線蟲體長測量」之結果，我們認為，即使腸道菌量過多會致使線蟲較快死亡，腸道共生菌仍是線蟲的生長過程中所必須的。查詢文獻後，我們得知：大腸桿菌（OP50）的下游代謝物維生素B6是線蟲胚胎後發育階段中必需的營養因子^[34]；水生叢毛單胞菌（DA1877，另一種可存在於線蟲腸道內的共生菌）則會經由代謝產生維生素B12^[19]，亦是線蟲體內重要的微量營養素。因此我們認為，照射UV組的

線蟲體型較小的可能原因是因為缺乏某些細菌代謝產生的營養素，由此可知，腸道共生菌的存在對宿主的發育不可或缺。不過，如討論一中所述，腸道共生菌過度生長也會對宿主有負面影響，因此調控腸道菌相並在其中取得平衡對生物體的健康至關重要。

三、 AceK影響粒線體功能的可能原因

根據文獻，我們得知粒線體內膜上具有鉀離子通道，會影響粒線體的膜電位、電子傳遞鏈及ATP合成，而由細菌感染所引發的鉀離子異常外洩會使粒線體的膜電位失衡，造成粒線體損傷^[35]。

由圖5-1可以看出，AceK的結構中含有鉀離子，因此，我們推論AceK中的鉀離子可能會藉由鉀離子通道進入粒線體中，藉此影響粒線體的功能，可以做為未來探討的方向。



(圖5-1) AceK結構

四、 Glucose應另有其他影響線蟲腸道菌量的機制

添加Glucose並不會改變線蟲的腸道菌量，且會使線蟲的壽命減少，這說明了在此濃度下，具熱量的醣類也會對生物體造成負面影響。但是，在粒線體自噬作用和*sod-3*基因表現量的實驗中，Glucose組和控制組的結果互相比較之下並沒有統計差異。因此我們認為，Glucose調節線蟲壽命的機制並不是透過調節*sod-3*基因與粒線體自噬作用，應該另有其他的途徑。

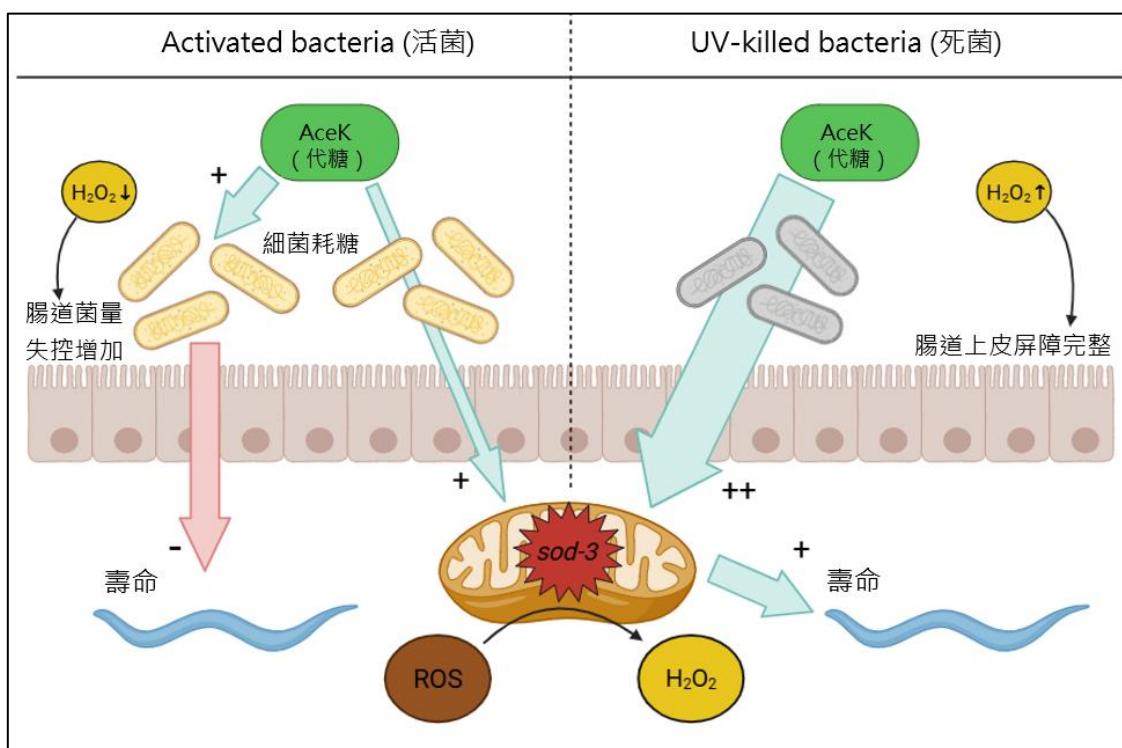
五、 線蟲模式的跨物種特性

首先，大腸桿菌是人類腸道中很重要的腸道共生菌；再來，根據NCBI基因資料庫，線蟲的*sod-3*基因在哺乳類動物中具有直系同源的基因—*sod-2*，而*sod-2*的功能也是在粒線體中做為超氧化物岐化酶，用以分解ROS；再加上線蟲腸道上皮細胞與人類的高度相似性，我們希望未來能夠將在線蟲模式中得到的結果擴展至哺乳類或甚至人類等更高等的生物身上，釐清AceK對人體的負面效果與其改變腸道菌相的機制。

陸、結論

根據本研究的結果，我們發現：在死菌狀況下，AceK能藉由上調*sod-3*基因的表現量，促進H₂O₂的產生，進而減緩粒線體受到的氧化壓力，使線蟲的壽命延長。但是，如果讓細菌正常生長，也就是腸道共生菌的代謝功能未被破壞，腸道共生菌就會與宿主競爭AceK，而當線蟲無法完全利用AceK，AceK對於線蟲本身的有利影響（減緩氧化壓力）就會不顯著，反倒會讓腸道共生菌生長狀況變好，再加上H₂O₂的濃度受到細菌競爭作用的影響，不足以控制過度生長的細菌，造成線蟲腸道菌量失控增加，導致線蟲提早死亡。

即使AceK在死菌狀況下對宿主看似有益，腸道共生菌和宿主仍是共生的關係，宿主需要依賴共生菌的代謝物以維持生理機能，在人體內亦是如此。在腸道共生菌不可能被移除的情況下，AceK很可能也會透過共生菌的競爭作用而對人體造成負面影響。在臺灣，AceK在食品中的添加量其實不受限制，因此我們更需要注意對AceK的攝取量，也期許未來更深入的研究能進一步訂定AceK使用量的上限，將它對人體的危害降到最小。



(圖6-1) 本研究之研究結果示意圖 (作者製圖)

柒、參考文獻資料

1. de Dios, R., et al., *Artificial sweeteners inhibit multidrug-resistant pathogen growth and potentiate antibiotic activity*. Embo Molecular Medicine, 2023. **15**(1).
2. Bian, X., et al., *The artificial sweetener acesulfame potassium affects the gut microbiome and body weight gain in CD-1 mice*. PLoS One, 2017. **12**(6): p. e0178426.
3. Zheng, J., et al., *Effects of three intense sweeteners on fat storage in the C. elegans model*. Chem Biol Interact, 2014. **215**: p. 1-6.
4. M, S., et al., *Sucralose administered in feed, beginning prenatally through lifespan, induces hematopoietic neoplasias in male swiss mice*. Int J Occup Environ Health, 2016. **22**(1): p. 7-17.
5. Frankenfeld, C.L., et al., *High-intensity sweetener consumption and gut microbiome content and predicted gene function in a cross-sectional study of adults in the United States*. Ann Epidemiol, 2015. **25**(10): p. 736-42 e4.
6. Shahriar, S., et al., *Aspartame, acesulfame K and sucralose- influence on the metabolism of Escherichia coli*. Metabol Open, 2020. **8**: p. 100072.
7. Han, B., et al., *Microbial Genetic Composition Tunes Host Longevity*. Cell, 2018. **173**(4): p. 1058.
8. Afzaal, M., et al., *Human gut microbiota in health and disease: Unveiling the relationship*. Front Microbiol, 2022. **13**: p. 999001.
9. Thursby, E. and N. Juge, *Introduction to the human gut microbiota*. Biochem J, 2017. **474**(11): p. 1823-1836.
10. Ribaldone, D.G., et al., *Modulation of the gut microbiota: opportunities and regulatory aspects*. Minerva Gastroenterol (Torino), 2023. **69**(1): p. 128-140.
11. Wu, G.D., et al., *Linking long-term dietary patterns with gut microbial enterotypes*. Science, 2011. **334**(6052): p. 105-8.
12. Shil, A. and H. Chichger, *Artificial Sweeteners Negatively Regulate Pathogenic Characteristics of Two Model Gut Bacteria, E. coli and E. faecalis*. Int J Mol Sci, 2021. **22**(10).
13. Basson, A.R., A. Rodriguez-Palacios, and F. Cominelli, *Artificial Sweeteners: History and New Concepts on Inflammation*. Front Nutr, 2021. **8**: p. 746247.
14. Wen, X., et al., *Role of Mitophagy in Regulating Intestinal Oxidative Damage*. Antioxidants (Basel), 2023. **12**(2).
15. Feng, J., F. Bussiere, and S. Hekimi, *Mitochondrial electron transport is a key determinant of life span in Caenorhabditis elegans*. Dev Cell, 2001. **1**(5): p. 633-44.
16. Wong, C.H., M.A. Haque, and H.C. Chang, *Superoxide dismutase SOD-3 regulates redox homeostasis in the intestine*. MicroPubl Biol, 2023. **2023**.
17. Doonan, R., et al., *Against the oxidative damage theory of aging: superoxide dismutases protect against oxidative stress but have little or no effect on life span in Caenorhabditis elegans*. Genes Dev, 2008. **22**(23): p. 3236-41.

18. Stiernagle, T., *Maintenance of C. elegans*. WormBook, 2006: p. 1-11.
19. Zhang, J., A.D. Holdorf, and A.J. Walhout, *C. elegans and its bacterial diet as a model for systems-level understanding of host-microbiota interactions*. Curr Opin Biotechnol, 2017. **46**: p. 74-80.
20. Cabreiro, F. and D. Gems, *Worms need microbes too: microbiota, health and aging in Caenorhabditis elegans*. EMBO Mol Med, 2013. **5**(9): p. 1300-10.
21. Kumar, A., et al., *Caenorhabditis elegans: a model to understand host-microbe interactions*. Cell Mol Life Sci, 2020. **77**(7): p. 1229-1249.
22. Mahmud, R., et al., *Non-Caloric Artificial Sweeteners Modulate the Expression of Key Metabolic Genes in the Omnipresent Gut Microbe Escherichia coli*. J Mol Microbiol Biotechnol, 2019. **29**(1-6): p. 43-56.
23. Martinez, B.A., et al., *Dysregulation of the Mitochondrial Unfolded Protein Response Induces Non-Apoptotic Dopaminergic Neurodegeneration in C. elegans Models of Parkinson's Disease*. J Neurosci, 2017. **37**(46): p. 11085-11100.
24. Karakuzu, O., et al., *Amplex Red Assay for Measuring Hydrogen Peroxide Production from Caenorhabditis elegans*. Bio Protoc, 2019. **9**(21).
25. Avery, L. and Y.J. You, *C. elegans feeding*. WormBook, 2012: p. 1-23.
26. Kingsley, S.F., et al., *Glucose-fed microbiota alters C. elegans intestinal epithelium and increases susceptibility to multiple bacterial pathogens*. Sci Rep, 2024. **14**(1): p. 13177.
27. Ju, S., et al., *C. elegans monitor energy status via the AMPK pathway to trigger innate immune responses against bacterial pathogens*. Commun Biol, 2022. **5**(1): p. 643.
28. Dancy, B.M., M.M. Sedensky, and P.G. Morgan, *Effects of the mitochondrial respiratory chain on longevity in C. elegans*. Exp Gerontol, 2014. **56**: p. 245-55.
29. Hyslop, P.A., et al., *Hydrogen peroxide as a potent bacteriostatic antibiotic: implications for host defense*. Free Radic Biol Med, 1995. **19**(1): p. 31-7.
30. Miller, B.M., et al., *Anaerobic Respiration of NOX1-Derived Hydrogen Peroxide Licenses Bacterial Growth at the Colonic Surface*. Cell Host Microbe, 2020. **28**(6): p. 789-797 e5.
31. Linley, E., et al., *Use of hydrogen peroxide as a biocide: new consideration of its mechanisms of biocidal action*. J Antimicrob Chemother, 2012. **67**(7): p. 1589-96.
32. Portal-Celhay, C., E.R. Bradley, and M.J. Blaser, *Control of intestinal bacterial proliferation in regulation of lifespan in Caenorhabditis elegans*. BMC Microbiol, 2012. **12**: p. 49.
33. Garigan, D., et al., *Genetic analysis of tissue aging in Caenorhabditis elegans: a role for heat-shock factor and bacterial proliferation*. Genetics, 2002. **161**(3): p. 1101-12.
34. Feng, M., et al., *Bacterial vitamin B6 is required for post-embryonic development in C. elegans*. Commun Biol, 2024. **7**(1): p. 367.
35. Lewandowska, J., et al., *Redox Regulation of Mitochondrial Potassium Channels Activity*. Antioxidants (Basel), 2024. **13**(4).

【評語】052008

本作品「以線蟲模式探討代糖調控宿主與腸道菌相交互作用機制」以秀麗隱桿線蟲 (*C. elegans*) 作為實驗模式，探討代糖乙醯礦胺酸鉀 (AceK) 如何影響腸道共生菌與宿主線蟲的交互作用。研究結合分子生物、細菌菌相、線蟲行為及生理解析。主要發現為：AceK 可直接促進腸道大腸桿菌 (OP50) 的生長，然而當腸道菌為活菌且能與宿主競爭 AceK 時，會造成宿主無法有效利用 AceK 提升抗氧化能力和調控菌量，進而提早老化與死亡。若細菌無活性（經滅活），AceK 則提升線蟲的抗氧化基因（如 sod-3）表現，降低粒線體自噬作用，增加 H₂O₂ 水平，延緩老化、延長壽命。作品深化了代糖—腸道菌相—宿主健康之間的多層次生物交互機制理解，並對食品添加物的健康風險提出警訊與政策應用方向。

1. 主題創新與時事結合：抓住人工甜味劑（代糖）健康議題，切入腸道共生菌與宿主交互作用，具有高度社會與科學關注度。
2. 實驗設計縝密：包括進食行為、定量菌量、活/死菌狀態、壽命分析、粒線體自噬、抗氧化基因 (H₂O₂/sod-3) 層層驗證。

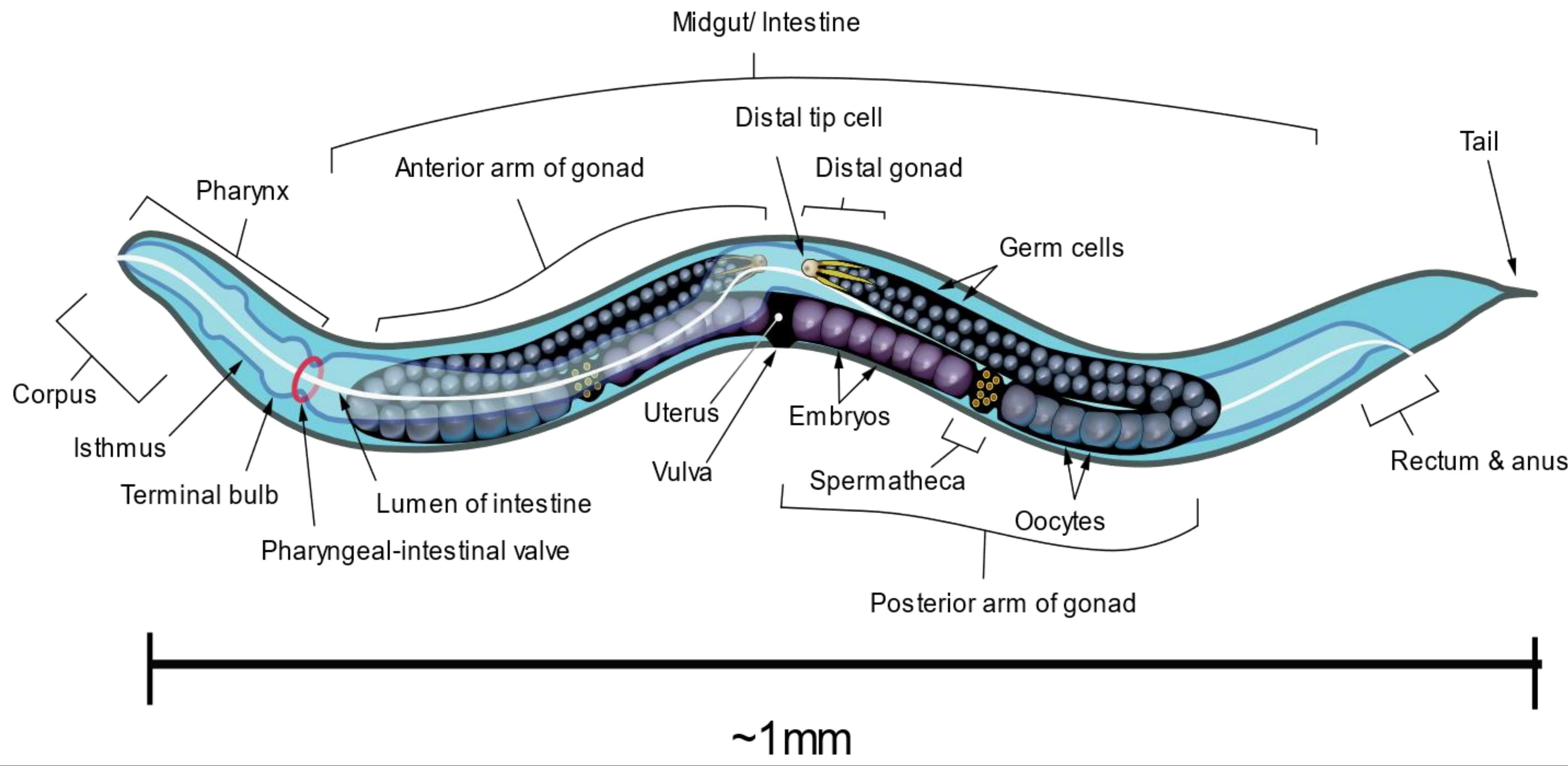
3. 整合分子生理與生態微生物：將微生物生態、宿主生理、分子生物的多項指標串接，提出實體証據鏈。
4. 物種外推仍有限：模型雖佳，但直接推論到哺乳類乃至人類健康、微生物組的多樣性及複雜性需多方驗證。本研究為單一代糖研究，僅針對代糖 AceK 進行探討。不同代糖可能具有不同的化學結構和代謝途徑，其對宿主和腸道菌相的影響機制可能存在差異，本研究的結論不能直接推廣到所有代糖。
5. 腸道菌僅以大腸桿菌為主：線蟲共生菌單純，不等同於人體複雜微生物群，未涵蓋不同物種競爭、拮抗或協作的因素。
6. 測量指標有限：以螢光、大腸桿菌數量和 sod-3 為主，未能更細緻地探討其他氧化壓力及免疫相關訊號、更多抗氧化酶的參與。光以 sod-3 基因表現與其途徑推論線蟲壽命長短，可能過份詮釋。

作品海報

以線蟲模式探討代糖調控 宿主與腸道菌相交互作用機制

壹、摘要

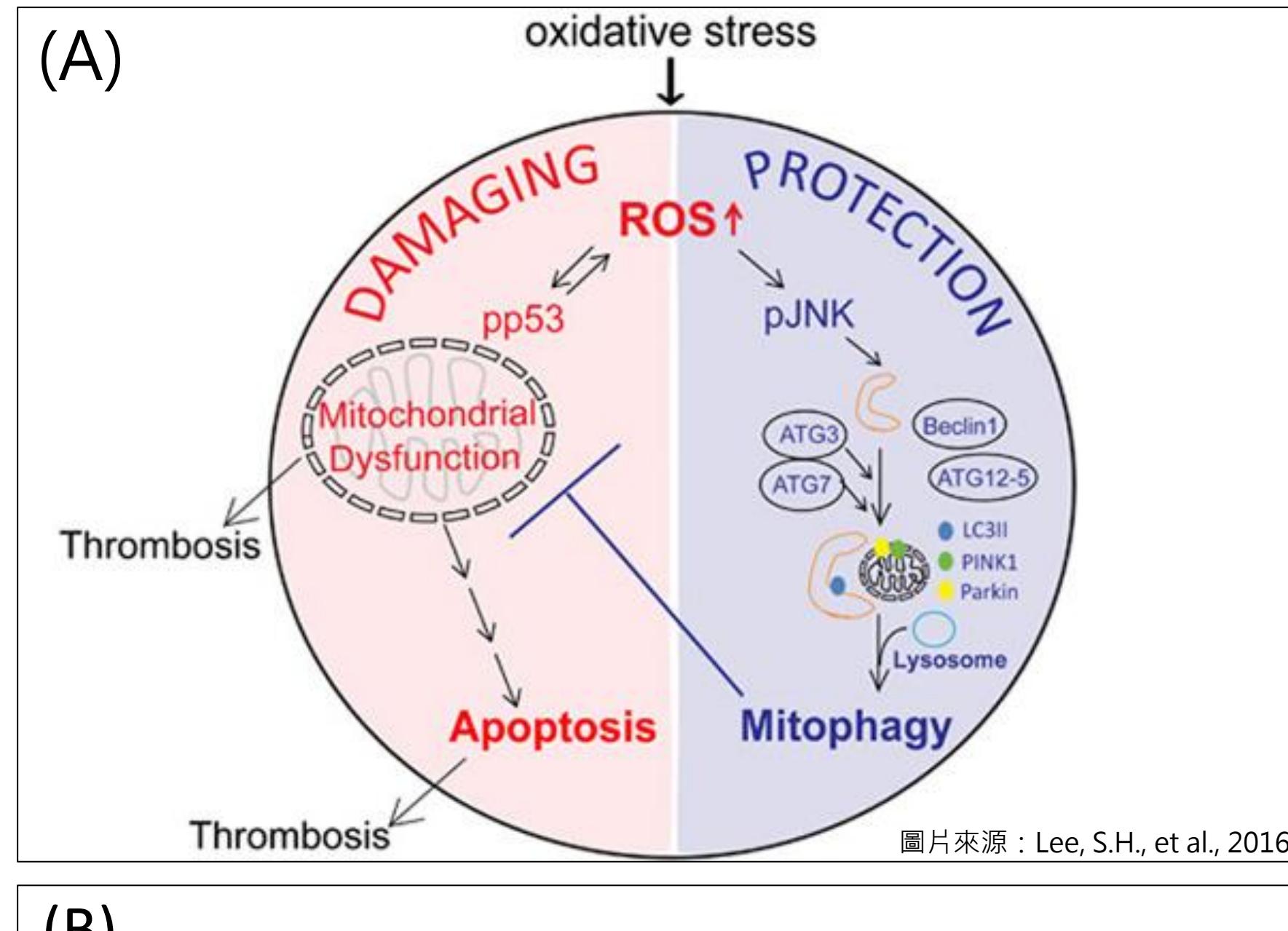
代糖是一種低熱量的甜味替代品，雖在過去被認為對人體無害，近年研究卻發現代糖會引起腸道菌相失衡，有害宿主健康，但其機制仍不明。秀麗隱桿線蟲的腸道上皮細胞與人類相似，且腸道共生菌易觀察，適合探討宿主與腸道菌相間的交互作用。本研究以代糖乙醯礦胺酸鉀(acesulfame potassium, AceK)餵食線蟲，發現AceK在腸道共生菌滅活狀況下，能夠藉由減少腸道粒線體自噬作用、上調抗氧化基因*sod-3*並增加線蟲體內的H₂O₂濃度，使線蟲壽命延長；但在腸道共生菌的交互作用下，上述效果皆減弱，AceK反倒促使線蟲腸道菌量增加，因此干擾宿主利用H₂O₂控制腸道菌量的能力，導致線蟲提早死亡。本研究發現AceK會使腸道菌量失衡，並進一步探討過量的腸道共生菌與宿主競爭AceK並影響宿主生理功能之機制。



圖片來源：K. D. Schroeder, 2013

貳、研究背景

- 一、宿主與腸道菌相交互作用對生理的影響
- 二、代糖對宿主與細菌交互作用的影響
- 三、AceK能在菌液中促進大腸桿菌生長
- 四、氧化壓力啟動粒線體自噬作用（如圖A）
 - *sod-3*基因功能： $2O_2^- + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$ （如圖B）
- 五、秀麗隱桿線蟲(*Caenorhabditis elegans*, *C. elegans*)：
 - 無菌模式：可餵食不同細菌以控制腸道內菌種
 - 腸道上皮細胞與人類高度相似：
適合觀察腸道菌相/宿主交互作用
- 六、控制組與實驗組選擇
 - 在臺灣，AceK在食品中的用量完全無限制→2%較高濃度
 - 控制組(Control)：不添加任何代糖或糖類
 - 實驗組：
 - 2% AceK
 - 2% Glucose：比較有無熱量的糖類與代糖之差異



圖片來源：Lee, S.H., et al., 2016

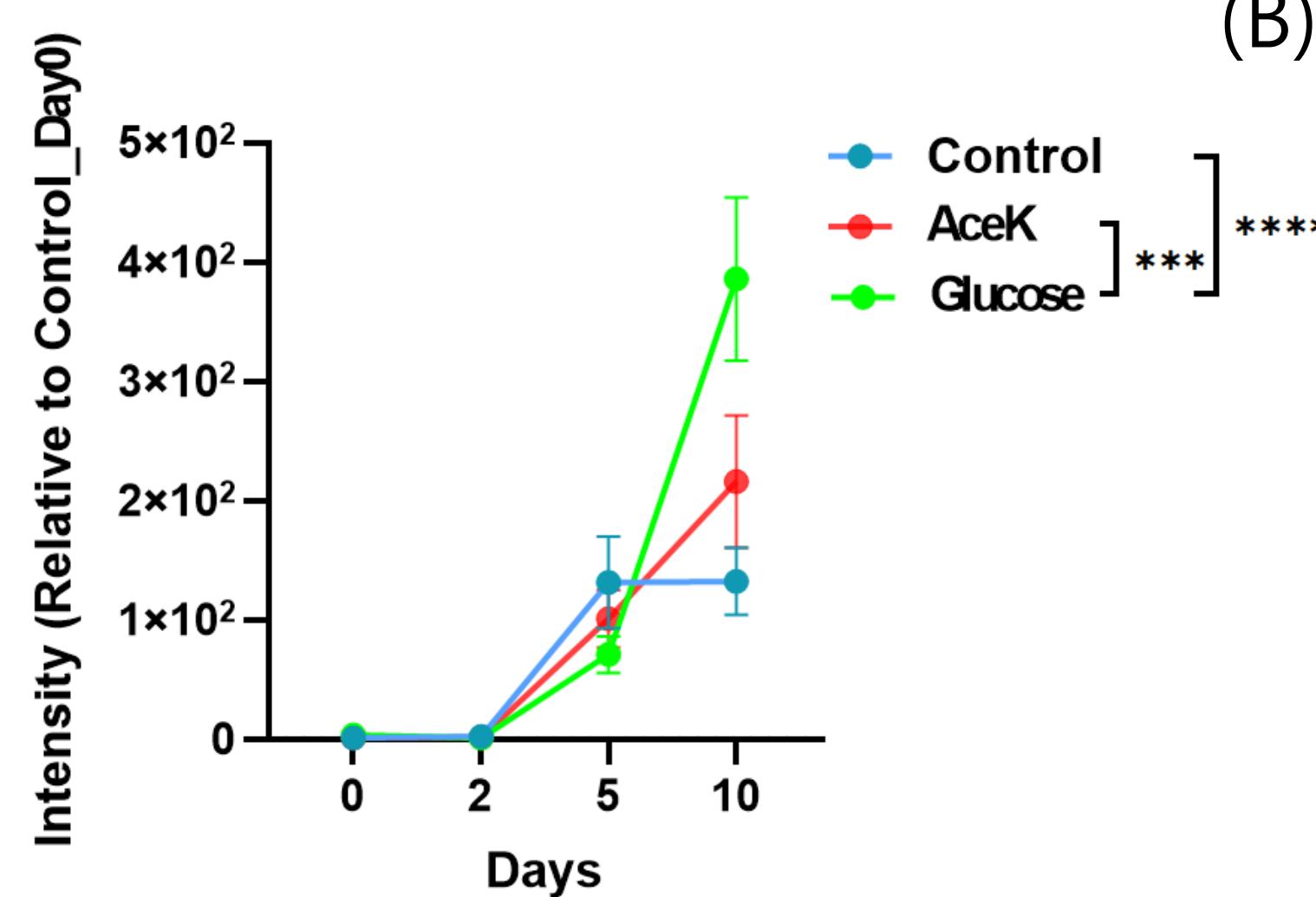
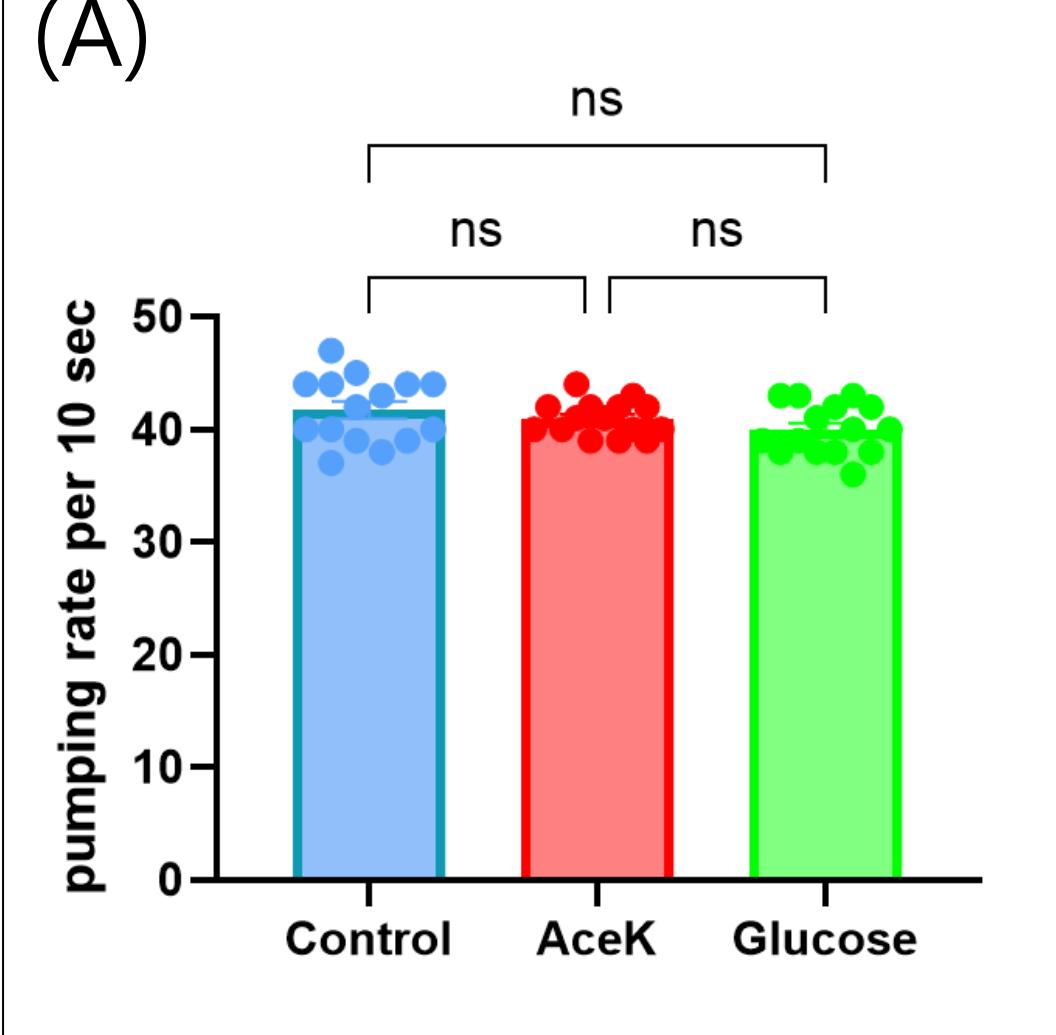
參、研究目的

- 一、研究添加AceK對宿主腸道共生菌生長狀況的影響。
- 二、研究添加AceK對宿主控制腸道共生菌量能力的影響。
- 三、研究添加AceK在活菌及死菌狀況下對宿主壽命的影響。
- 四、研究添加AceK在活菌及死菌狀況下影響宿主調控體內氧化壓力能力的分子機制。

肆、研究結果

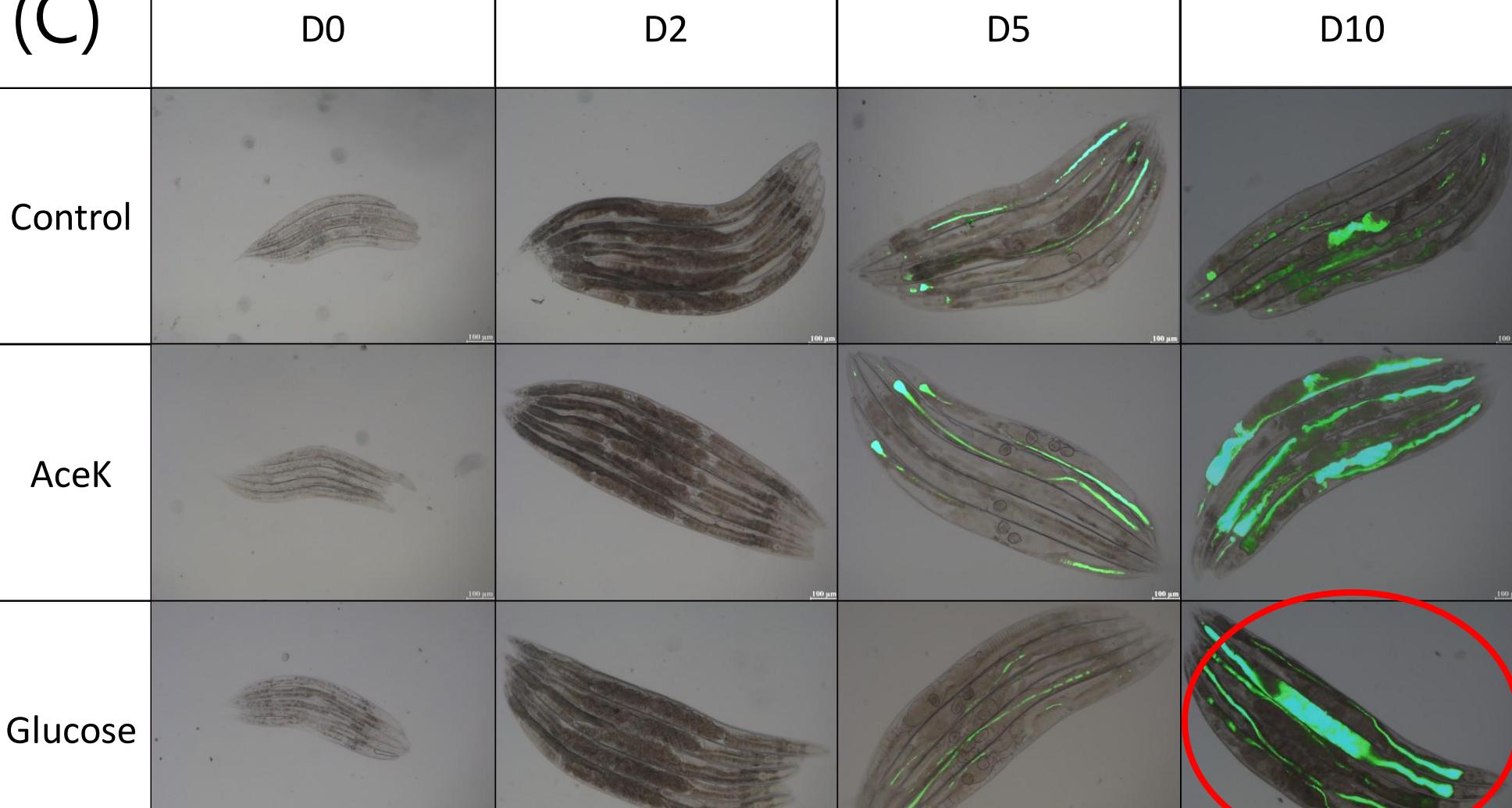
一、AceK增加線蟲的腸道內菌量

(一) 確認線蟲進食量不受影響



結果 (A) AceK、Glucose不改變線蟲的進食速率
→各組線蟲進食量皆相同

(B) Glucose使線蟲腸道菌量增加

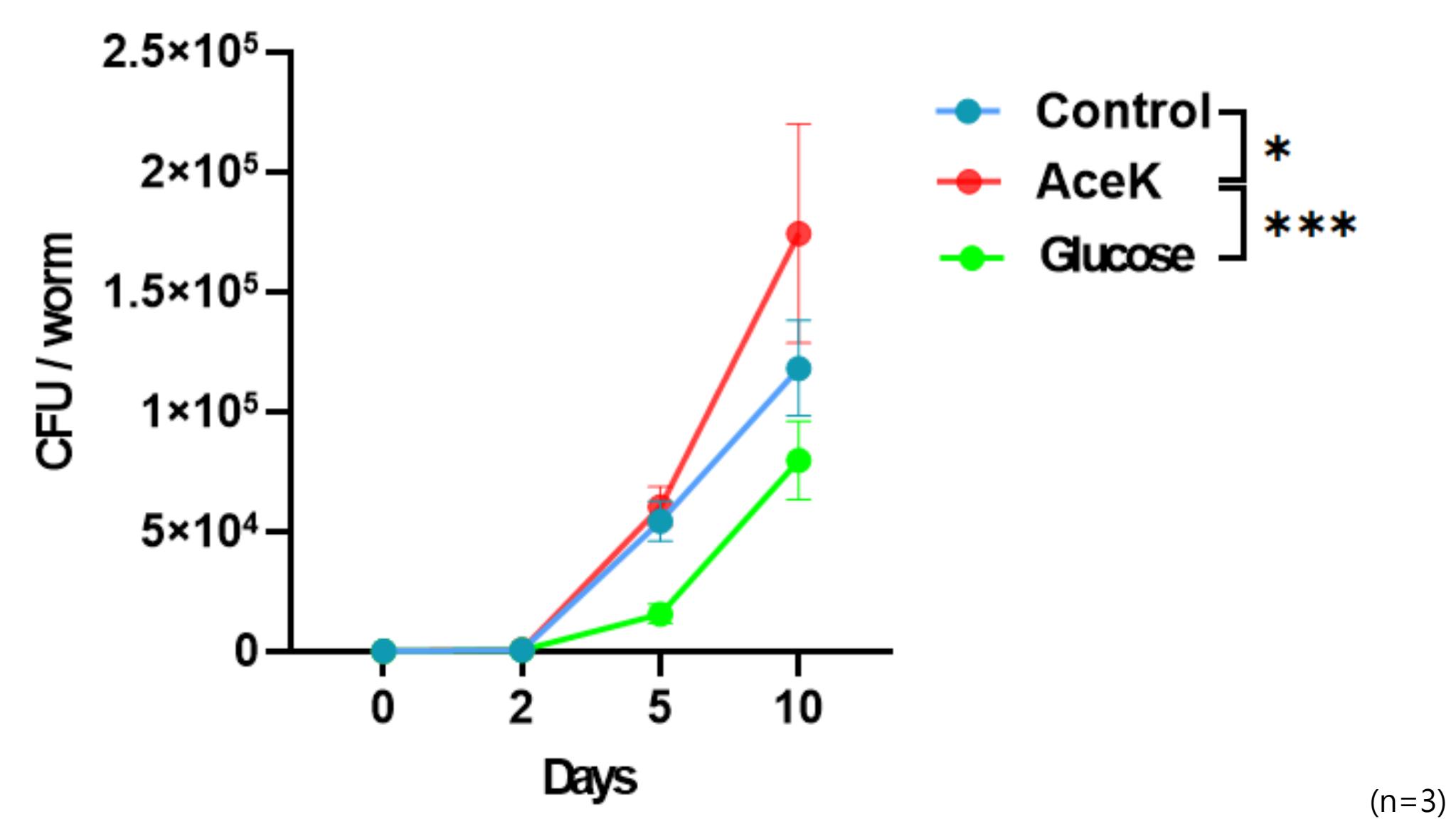


疑慮 (C) Glucose組線蟲腸道細菌溢出，可能造成螢光強度判讀錯誤

肆、研究結果

一、AceK增加線蟲的腸道內菌量

(三) 菌落生成數量實驗



方法

- 將線蟲飼養於不同添加物的培養基上
- 取下線蟲，麻醉後以抗生素洗去體外的細菌
- 將蟲體磨碎以取出腸道內細菌
- 將磨碎的汁液塗在培養基上，觀察單一菌落生成數量

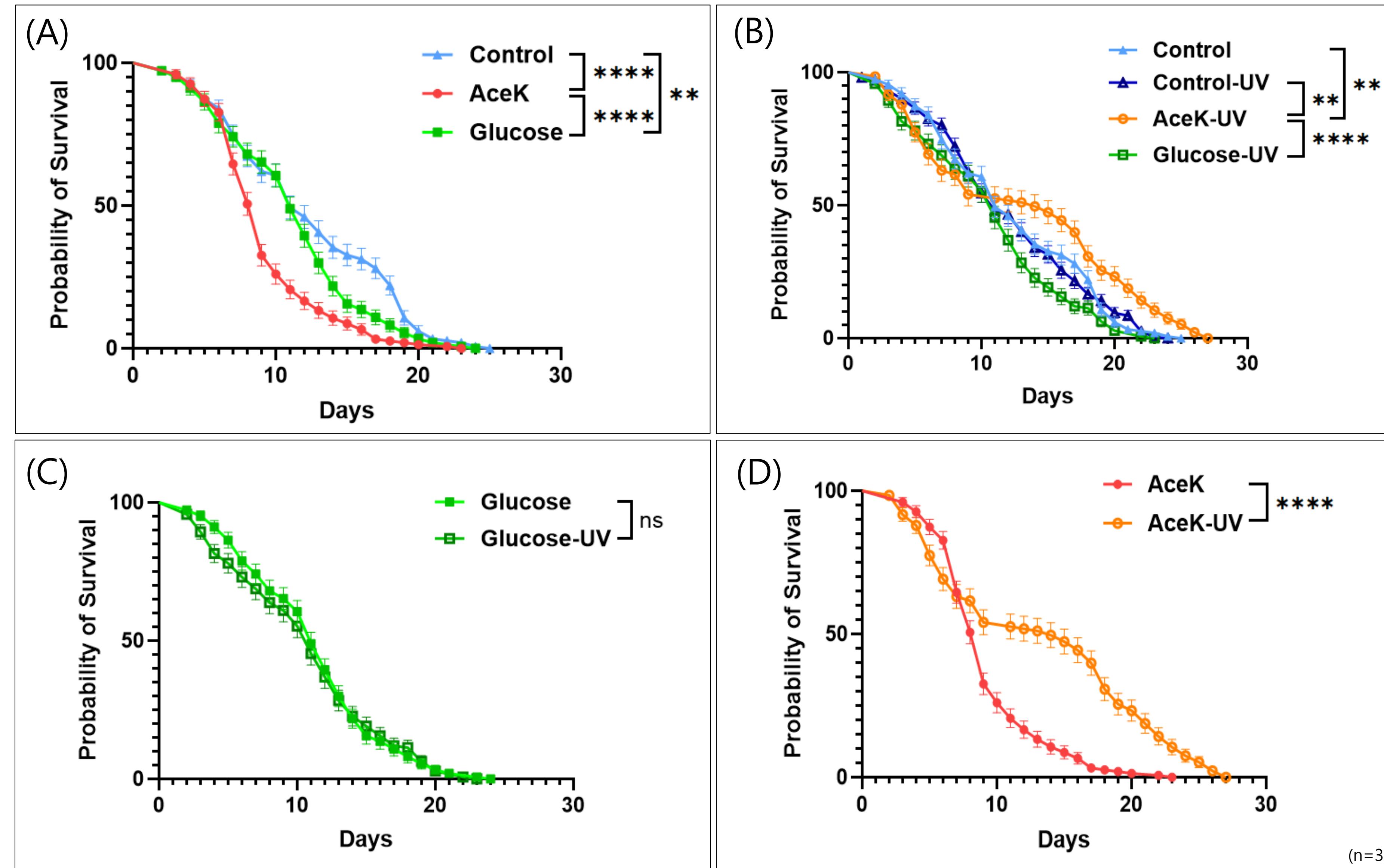
結果

AceK使線蟲腸道內定殖細菌量增加

改良

結果不受腸道上皮細胞破裂影響

二、AceK透過細菌使線蟲壽命減短



假設

線蟲腸道菌量與壽命長短有關

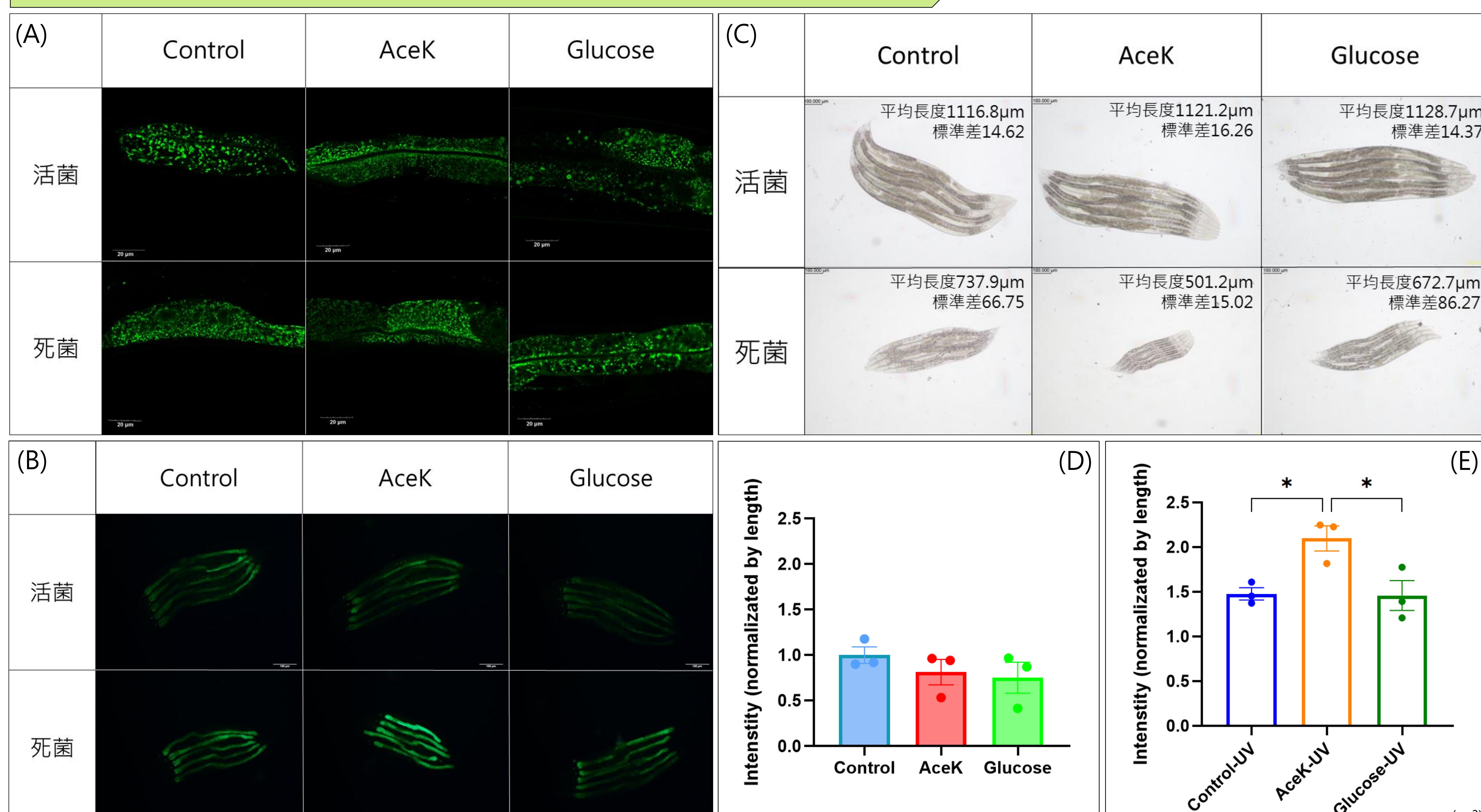
方法

死菌狀況：
將細菌照射紫外光(UV)以去除其代謝功能，排除細菌對線蟲的影響

結果

- AceK、Glucose在活菌狀況皆會使線蟲壽命縮短
- 控制組壽命不受細菌死活影響
- Glucose壽命不受細菌死活影響
- AceK組活菌時線蟲壽命縮短；死菌時線蟲壽命延長：
AceK透過細菌影響線蟲的壽命

三、AceK在死菌狀況使線蟲粒線體自噬作用減緩



假設

細菌在AceK作用下，透過增進粒線體氧化壓力使線蟲壽命縮短

標準化

(C) 發現活菌與死菌狀況下的線蟲體型大小差異
很大→利用螢光強度/體長，進行標準化

方法

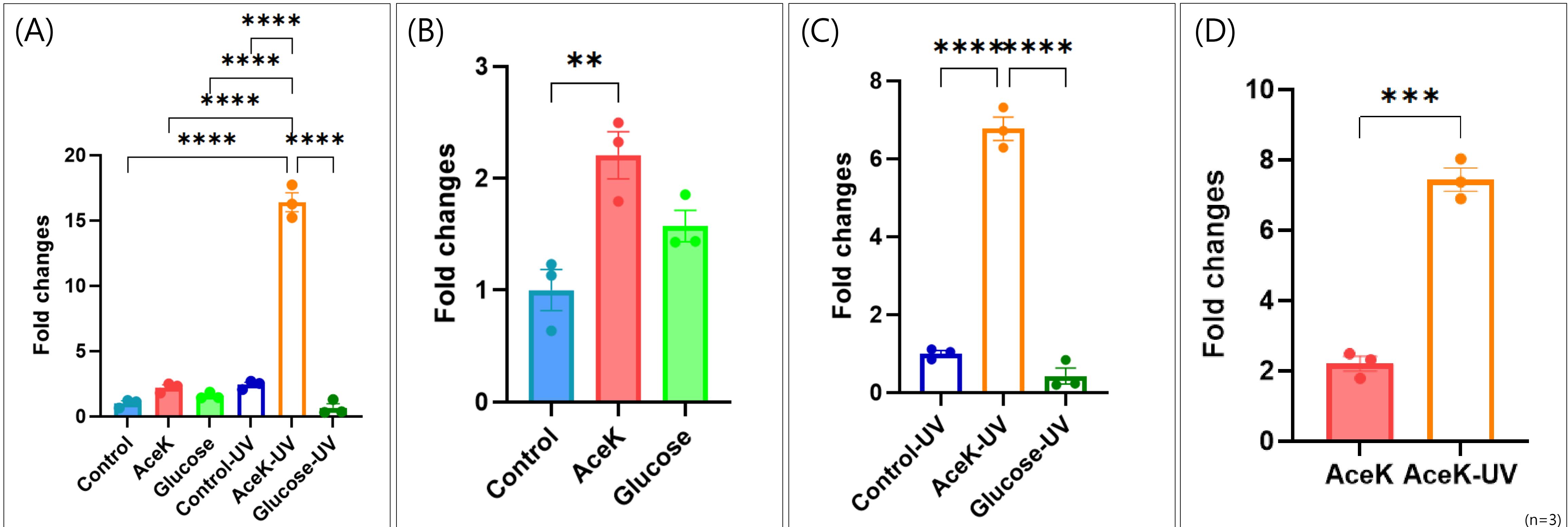
SJ4143蟲株—
線蟲的腸道細胞內粒線體帶有綠色螢光蛋白
(A) 實驗一：觀察粒線體型態 (有無自噬作用)
(B) 實驗二：觀察粒線體發出螢光強度

結果

- 活菌狀況下，AceK組螢光強度與控制組沒有差異
- 死菌狀況下，AceK組螢光強度最強
→AceK在死菌狀況下減緩粒線體自噬作用

肆、研究結果

四、AceK在死菌狀況下促進線蟲的*sod-3*基因表現量



假設 AceK藉由調節*sod-3*分解ROS以減緩腸道粒線體自噬作用

方法 RT-qPCR

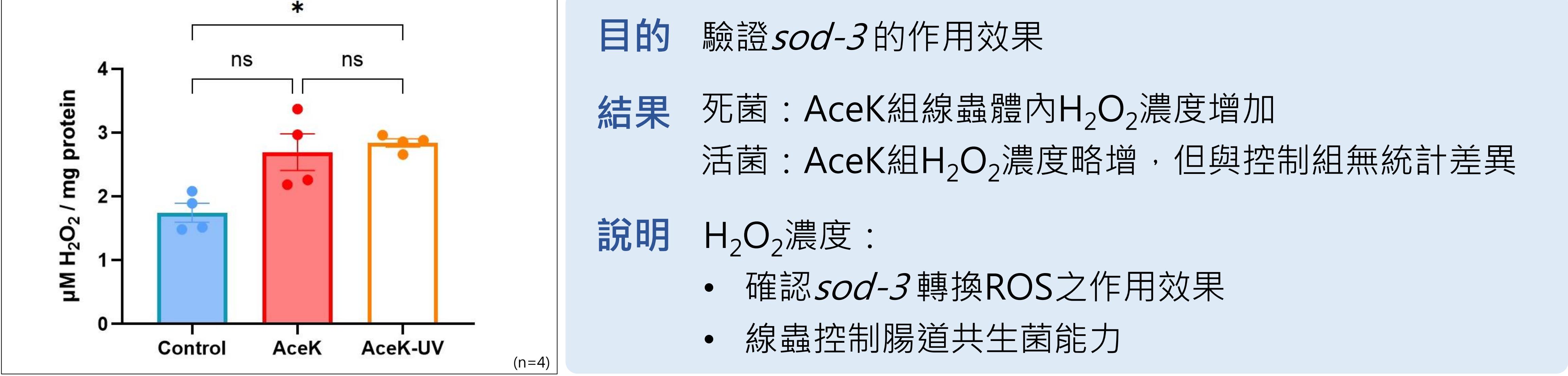
結果 (A) 死菌狀況下AceK組的*sod-3*表現量最高

(B)(D) 活菌狀況下AceK組的*sod-3*表現量相較於控制組亦有上升，但上升量不及死菌組

(B)(C) Glucose的*sod-3*表現量與控制組皆沒有差異

推論 活細菌的存在會與宿主競爭腸道內的AceK→AceK對於宿主的影響效果弱化

五、AceK使線蟲體內的H₂O₂產生量上升



伍、討論與結論

一、AceK調節宿主腸道菌量與壽命的機制

- 死菌狀況：AceK上調*sod-3*表現量→將ROS轉為H₂O₂→減緩粒線體自噬作用→宿主壽命增加
- 活菌狀況：
 - AceK促進腸道共生菌過度生長→菌相失衡
 - 細菌競爭AceK→使AceK上調*sod-3*、產生H₂O₂效果受抑制→宿主自然老化、控制腸道菌能力下降

二、細菌滅活與否對線蟲生長的影響

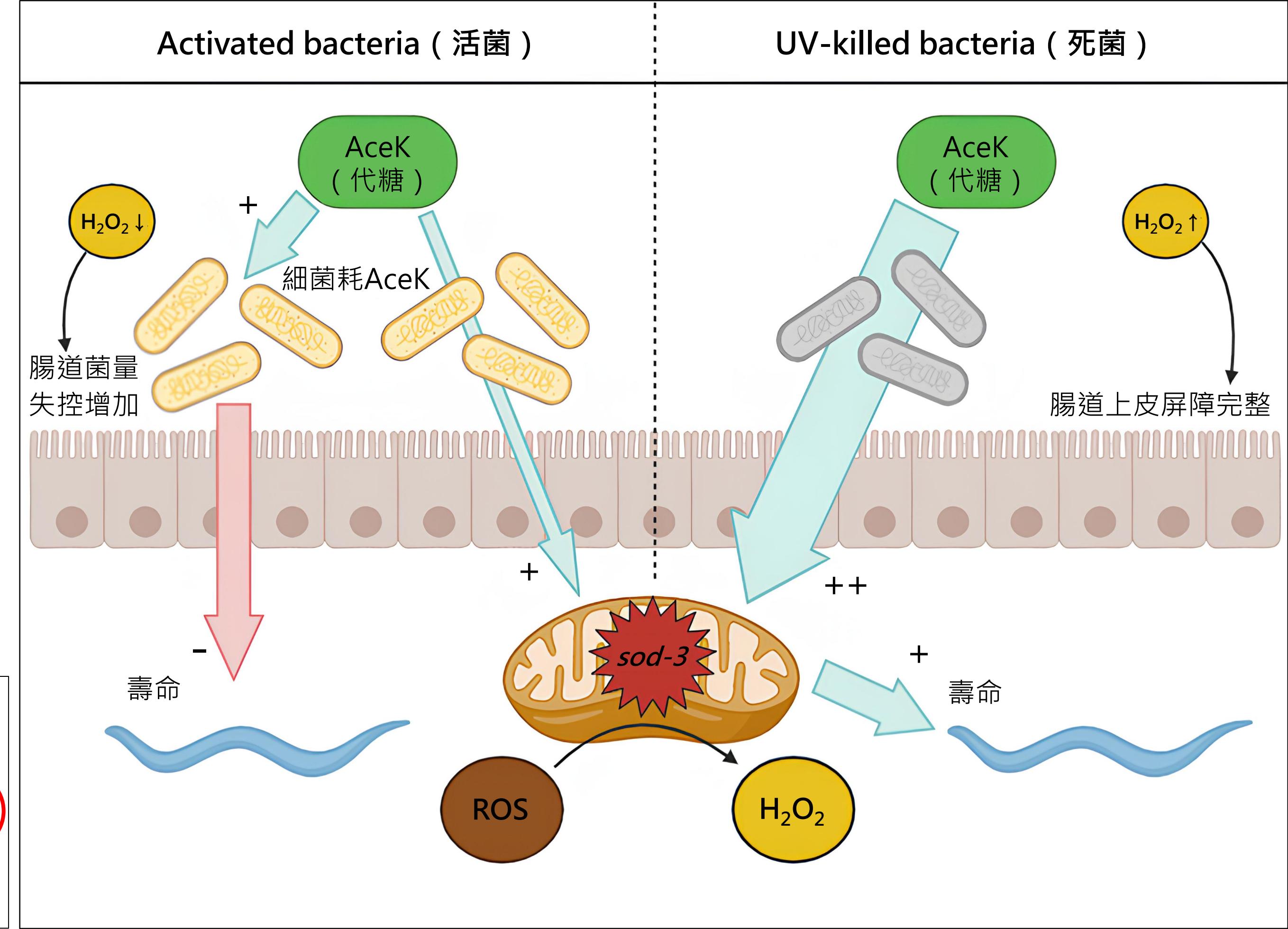
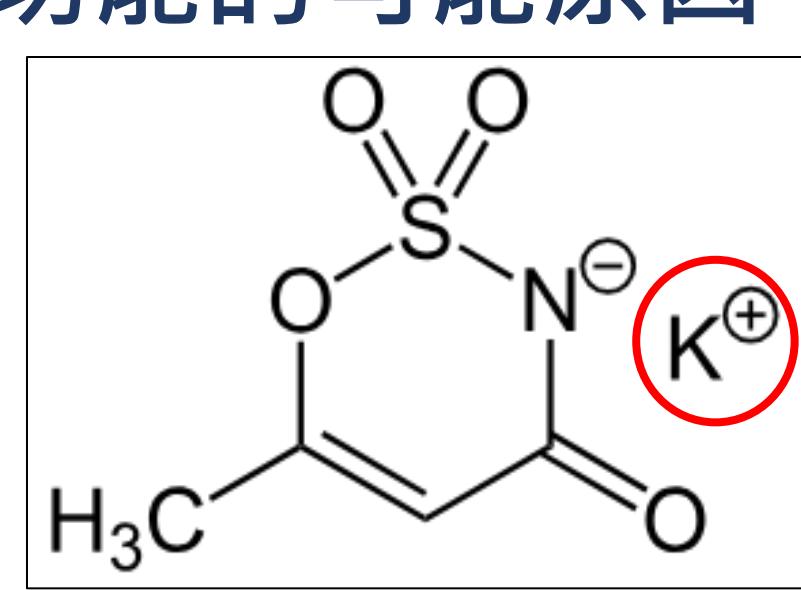
- 死菌飼養：線蟲發育狀況不佳，體型小
- 腸道共生菌的存在對宿主的發育很重要

三、Glucose影響線蟲的機制

- 腸道菌量、粒線體自噬作用、*sod-3*基因表現等與控制組無差異
- 亦會減少線蟲壽命，但非透過*sod-3*調節粒線體自噬作用，另有其他途徑

四、AceK影響粒線體功能的可能原因

- AceK結構中含有K⁺：
 - 可能影響粒線體膜上離子通道的功能



未來展望

- 線蟲模式的跨物種特性：*sod-3*在人體內具直系同源基因*SOD2*、腸道上皮細胞與人類相似
- 在腸道菌不可能被移除的情況下，代糖很可能也會透過影響共生菌對人體造成負面影響。在臺灣，AceK在食品中的用量其實不受限，因此更要注意AceK的攝取量，也期許未來的研究進一步訂出AceK使用量的上限，將它對人體的危害降到最小

陸、參考文獻

- Cabreiro, F. and D. Gems, Worms need microbes too: microbiota, health and aging in *Caenorhabditis elegans*. EMBO Mol Med, 2013. 5(9): p. 1300-10.
- Shahriar, S., et al., Aspartame, acesulfame K and sucralose- influence on the metabolism of *Escherichia coli*. Metabol Open, 2020. 8: p. 100072.
- Wen, X., et al., Role of Mitophagy in Regulating Intestinal Oxidative Damage. Antioxidants (Basel), 2023. 12(2).