

2016 年臺灣國際科學展覽會 優勝作品專輯

作品編號 050001

參展科別 動物學

作品名稱 「蟑」冠「裡」戴

—蟑螂免疫系統之敵我辨識與記憶性等性質的探討

得獎獎項 大會獎：一等獎

就讀學校 臺北市立中山女子高級中學

指導教師 蔡任圃

作者姓名 吳季昀

關鍵字 蟑螂、包囊作用、記憶性

作者簡介



嗨，我是吳季昀，目前就讀中山女高高三數理資優班，從高一開始投入研究蟑螂。我們學校的公假沒有其他學校那麼好請，為了我的全勤，做實驗的時間除了專題課外幾乎都是周末及寒暑假，但假日也泡在實驗室的感覺其實蠻好的。做科展真的佔據了不少時間，但我樂在其中。當看到自己的實驗有個完整的結果時，那種喜悅更是無法言傳。專題研究是一段血淚交織、喜樂參雜的旅程。多少個爆肝的夜晚、多少個報廢的假日，才能得到最後的成果。一路走來，感謝老師辛苦的指導、家人的支持和鼓勵、以及同學的幫忙。未來的我也會繼續努力，期許自己能用更認真嚴謹的態度，去學習、去研究、去探索科學未知的領域。

中文摘要

本研究建立蟑螂(*Periplaneta Americana*)之包囊作用(encapsulation)的觀察與測量方法，探討二氧化碳麻醉、植入物表面蛋白分子結構、可逆性與性別等因子，對免疫反應程度的效應，並研究敵我辨識與免疫的記憶性等特性。我們發現當異體的觸角被植入時，蟑螂體內所產生的包囊作用較自體觸角強烈，顯示具有辨識敵我的能力，且不同的生物性與非生物性植入物，所引發之包囊作用的反應程度亦不同。若分別先植入少量自體或異體組織，三日後再比較自體與異體觸角所引發的包囊作用程度，發現自體與異體組織的記憶效應不盡相同，我們證實蟑螂不但具免疫記憶性，且記憶性質具有促進性與抑制性兩種。另外我們也發現，雌蟲的免疫反應會大於雄蟲。

Abstract

We established a method for observing and quantifying the encapsulation of the American cockroach (*Periplaneta Americana*), to investigate the effects of anesthesia with carbon dioxide, the protein molecular structure of the implant surface, genders, and other factors on the immune response. We studied also characters of immunological reversibility, self/non-self recognition and immunological memory. We verified encapsulation induced by inserted non-self antennae is stronger than self one, which indicates the performance of self/non-self recognition in insect immune system. The intensity of encapsulation induced by different biological and non-biological implants is varied. If self or non-self tissue have been implanted. After three days, self or non-self antennae was inserted to investigate the effect of immunological memory. We confirmed that cockroaches not only display enhancing affect of immunological memory, but also inhibitory affect. In addition, we also found that the immune response of females is greater than males'.

一、前言

(一)、研究動機

我們曾在生物課學習動物的免疫作用(基礎生物第 5 章「動物體的構造與功能」第 4 節「防禦」; 選修生物第 10 章「人體的防禦」第 3 節「免疫作用」), 瞭解到人類除了先天性免疫外, 亦具有「後天性免疫」, 其中, 先天性免疫與後天性免疫皆有「辨識敵我」的特性, 可針對外來物質予以防禦, 而避免自體免疫。而後天免疫具有專一性與記憶性等性質, 能夠產生記憶性 T 細胞或 B 細胞, 以便於在病原體第二次入侵時, 針對同樣的抗原進行迅速的免疫反應。幼兒時我們都曾打過預防針, 目的是為了讓人體在接種疫苗後, 能夠產生對抗特定種類病原體的抗體及記憶性細胞, 以便於在病原體下一次入侵時, 產生更迅速有效的免疫反應, 這正是人體後天免疫所具有的「專一性」及「記憶性」。

另一方面, 昆蟲僅有「先天性免疫力」(Hoffmann, 1995; Ottaviani, 2005), 可透過血淋巴細胞的吞噬作用與包囊作用(encapsulation)等過程, 將外來物消除或包覆以避免病原體擴散。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, 以避免外來物擴散至體內的其他地方, 此過程稱為包囊作用(Pech and Strand, 1996; Ottaviani, 2005)。對沒有後天免疫系統的昆蟲而言, 包囊作用是不可或缺的重要防線(Pech and Strand, 1996)。包囊作用的發生共有三個步驟, 首先, 顆粒細胞接觸到外來物質, 再來, 漿細胞會附著在外來物上, 最後, 當顆粒細胞在外來物表面形成一層包覆的膜時, 包囊作用完成(Pech and Strand, 1996)。由此可知, 人體與昆蟲的免疫機制存在著許多不同之處(表一), 其中對具長久演化歷史的蟑螂而言, 其免疫機制應具效率以協助蟑螂抵禦病原體, 若蟑螂如一般認知及教科書所言, 無法產生後天免疫作用, 那牠們如何有效率的阻擋病原體或外來物? 蟑螂的免疫系統是否具有類似人體專一性防禦的記憶性? 這些問題引起我們的好奇與興趣。

(二)、研究目的

許多科學家對於昆蟲的免疫機制已有研究, 昆蟲依賴先天性免疫以防禦外來物, 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。包囊作用是一種昆蟲對於微生物或寄生蟲入侵時的細胞聚集反應，可包覆入侵物形成包囊(Pech and Strand, 1996)，避免入侵物擴散與使其被去活化(Hoffmann, 1995)。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，例如：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)；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(Faulhaber and Karp, 1992)；若將美洲蟑螂(*Periplaneta americana*)與蝗蟲(*Schistocerca gregaria*)的組織作異種移植，兩者的包囊作用皆展示具辨識敵我的免疫特性(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)。但上述的各種研究的結果並無一致性的結論，例如：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？對同種自體的組織植入物真的無法產生免疫反應嗎？此外，昆蟲實驗常使用的麻醉手段是否會影響免疫作用、昆蟲的免疫反應是否具可逆性、自體與異體組織所產生的免疫記憶性是否具有差異等問題仍無相關研究，我們擬以此為題，深入探討昆蟲免疫系統的相關性質。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，本研究亦擬以美洲蟑螂的包囊作用作為免疫反應的動物模式，進行相關探討。

美洲蟑螂雄蟲與雌蟲的外型不同(圖一)，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)。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，故我們推測，雌蟲的免疫功能可能與雄蟲不同。

目前高中教科書內關於免疫系統的實驗只有選修生物的探討活動 10-1—抗原抗體反應，此實驗運用採血針採集人體血液後，將 Anti-A 及 Anti-B 兩種抗體分別滴入，並觀察人體血液的凝集反應。此實驗常因血液凝集結果不明顯造成結果不易判讀，且有感染風險、不亦操作等缺點，學生透過血液凝集判斷實驗結果，無法直接觀察免疫反應的過程，而是記錄看不見之「分子(抗體)」作用後的巨觀表現(凝血)，對瞭解免疫相關機制、過程，助益不大。若本研究可建立觀察蟑螂包囊作用的動物模式，並且可探討免疫作用的相關性質，也許可開發成容易觀察、操作簡便、實驗結果明顯的探討活動，可於中學的免疫實驗相關課程中推廣。

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、各種腺體)
吞噬作用	嗜中性白血球、巨噬細胞、樹突細胞等	由漿血細胞、粒血細胞等細胞執行 (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	由漿血細胞、粒血細胞等細胞 (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)

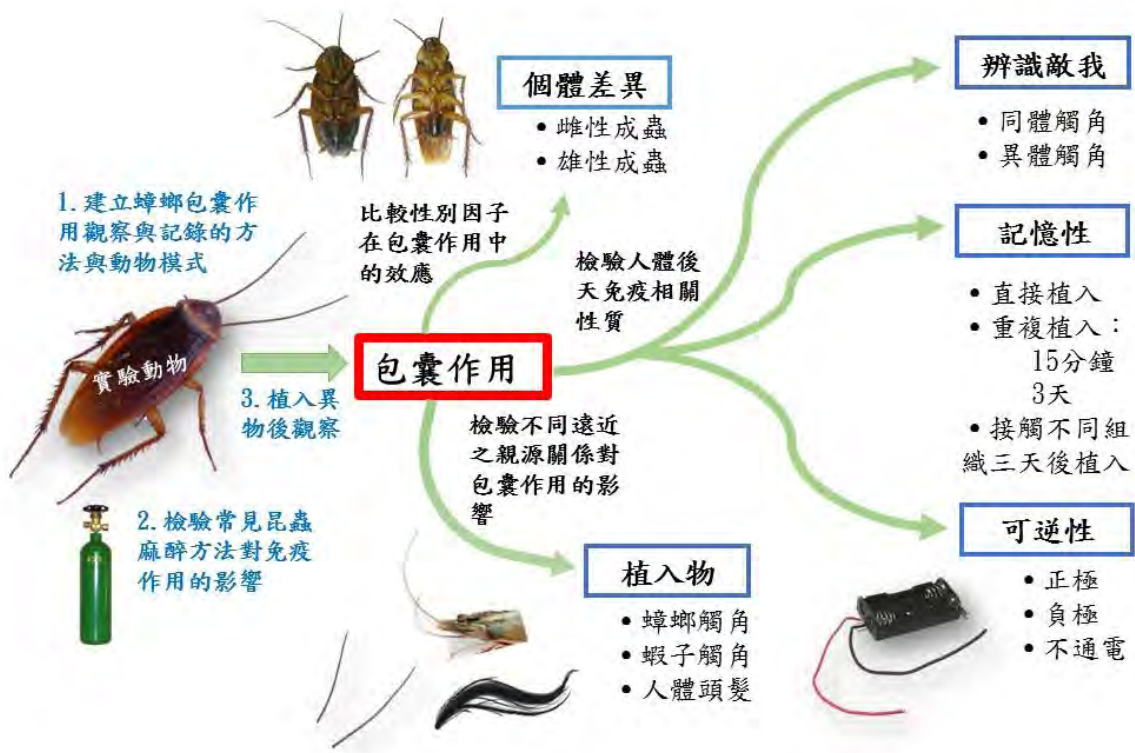


圖一 雌性蟑螂及雄性蟑螂的體型比較，雌蟲體重較重、體型較大。

圖中黑線代表 1 公分長。

基於上述的未解之謎，本研究之目的如下(研究架構請見圖二)：

- 一、建立蟑螂包囊作用的觀察與記錄的方法與動物模式，嘗試開發可於中學推廣的探討活動
- 二、檢驗常見昆蟲麻醉方法對免疫作用的影響
- 三、探討昆蟲免疫反應是否具有辨識敵我的特性
- 四、探討植入物表面蛋白分子結構在昆蟲免疫系統之辨識敵我特性的角色
- 五、探討昆蟲免疫反應是否對植入物具有記憶特性
 - (一)、短期內重複植入對包囊作用程度的效應
 - (二)、接觸自體或異體組織三日後，再比較自體或異體植入物引起的包囊作用程度
- 六、檢驗植入物的電荷對包囊作用的影響，並利用此性質探討包囊作用是否具可逆性
- 七、探討不同遠近之親源關係的生物組織與非生物組織對包囊作用的影響
- 八、比較性別因子對包囊作用中的效應



圖二 本研究的實驗架構圖。

二、研究方法或過程

(一)、研究設備及器材(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		
9	載玻片、蓋玻片	76*26mm 1.2-1.5mm	

(二)、實驗動物

美洲蟑螂(American cockroach, 學名: *Periplaneta americana*)飼養於室內昆蟲箱, 為本校自行飼養繁殖。飼養之環境溫度約 25~28°C, 定期換水、提供充足飼料(玉米、大麥磨成粉製成)。實驗的進行皆以色澤明亮、身體外表無破損之雄性成蟲作為實驗動物(除探討性別因子的實驗), 以避免母蟲生殖週期或攜夾卵鞘的干擾, 且實驗過的動物不再進行實驗。若以雌蟲進行實驗, 則挑選未攜夾卵鞘的個體。成蟲體長約 3-4 公分, 大小適中且背部透明, 於顯微鏡下容易觀察及操作, 蟑螂背部的背板骨片間具薄膜, 方便植入不同植入物。本研究為了方便植入異物以觀察蟑螂體內包囊作用的進行, 皆先進行蟲體麻醉以利操作。

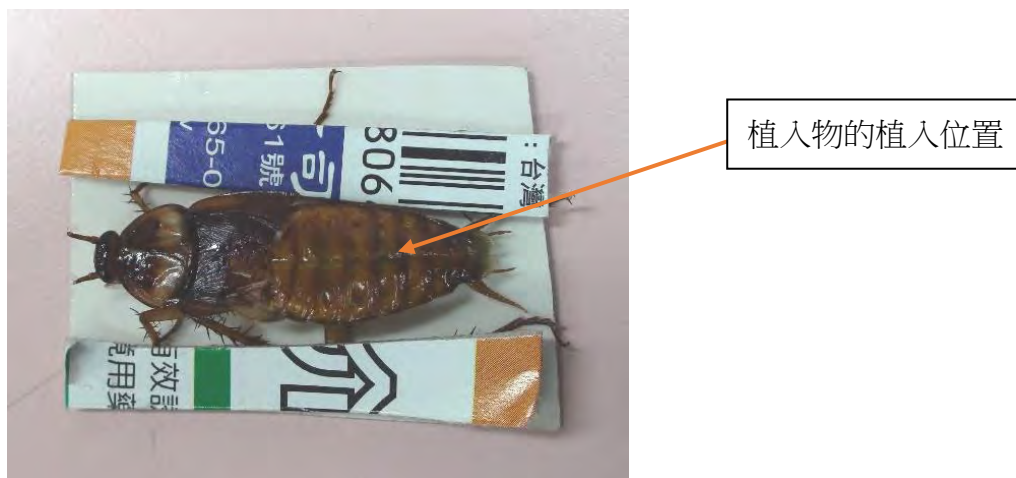
(三)、研究過程及方法

1. 建立蟑螂包囊作用的觀察與記錄方法與動物模式

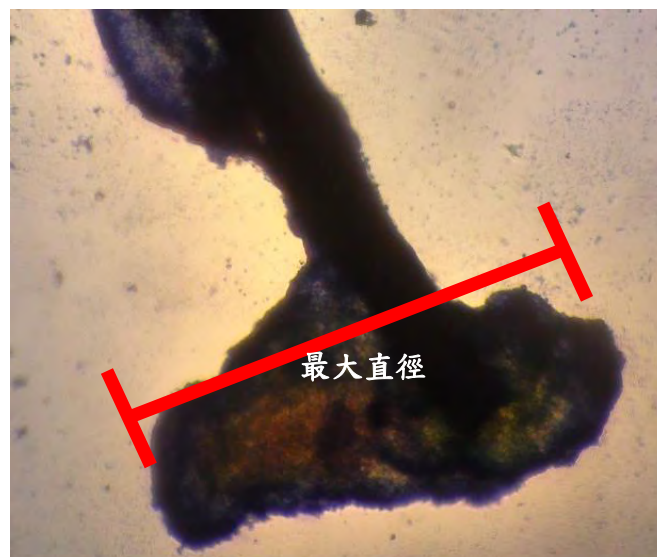
一開始我們嘗試將蟑螂步足前肢植入蟲體腹部, 但由於死亡率過高(死亡率達 90%), 因此後續實驗我們皆改用蟑螂的觸角樣本(造成傷口較小)做為植入物進行實驗。

本研究以蟑螂的觸角作為植入物, 觀察、測量觸角所引起的包囊作用程度, 作為免疫反應程度的指標。將蟑螂的觸角自基部(柄節)剪下, 放置於載玻片上(不以蓋玻片覆蓋, 以避免

觸角被壓迫變形所造成的誤差)，利用複式光學顯微鏡的目鏡側微器，測量其柄節與鞭節的直徑寬度(單位為 μm)。美洲蟑螂的腹部背板骨片共有 8 片，而本研究將植入物於腹部背側第 5 與第 6 片背板骨片之間的縫隙薄膜植入進入血體腔內(圖三)。待觸角植入蟲體引發包囊作用後，再由上述方式測量觸角之柄節(切口處)處的包囊寬度，與鞭節上包囊的最大直徑寬度(圖四)(單位為 μm)，以比較包囊作用的程度。由於本實驗中柄節直徑或鞭節直徑在各組蟑螂(雄蟲)間不具差異(單尾 t 檢定， $p > 0.05$)，故直接以包囊的直徑(包囊+植入物的直徑)作為免疫反應程度的指標。



圖三 探討蟑螂包囊作用時，植入物所植入的位置。



圖四 測量包囊的最大直徑(蔡，2014)。

2. 檢驗二氧化碳麻醉對免疫系統的影響

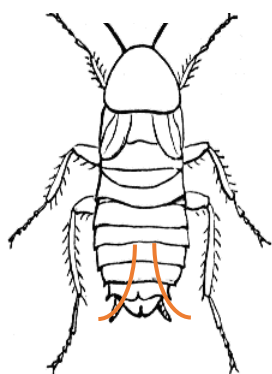
昆蟲實驗常以二氧化碳麻醉作為麻醉手段，為了驗證麻醉過程不會影響昆蟲的免疫作用，以確保植入觸角所引發的免疫反應與蟑螂麻醉與否無關，故探討二氧化碳麻醉對包囊作用的效應。實驗流程如實驗一的植入觸角流程，但分成兩組，分別在蟑螂麻醉與未麻醉的狀況下進行植入與測量。

3. 檢驗蟑螂是否具有類似人體後天免疫的相關性質

本研究的目的是在於研究蟑螂有無類似人體免疫的相關性質，即”辨識敵我”與”記憶性”。

(1).探討”辨識敵我”性質的實驗流程：

先將蟑螂兩兩分組放入錐形瓶中，以二氧化碳麻醉。再將蟑螂腹面朝下固定於蟑螂貼紙上，將觸角剪下並測量其寬度。將自體與異體觸角樣本植入蟲體腹部背側體內(由背板骨片的縫隙插入)(圖五)。15 分鐘後以鑷子將骨片翻開並取出觸角，以複式光學顯微鏡觀察，利用目鏡測微器測量觸角基部(柄節切口處)的包囊寬度與觸角上的最大包囊直徑。



圖五 觸角植入蟲體腹部背側體內(由背板骨片的縫隙插入)示意圖與照片。

(2).探討”記憶”性質的實驗流程：

為檢驗蟑螂的免疫反應是否具有記憶性，我們進行了兩個實驗，分別檢驗蟑螂的免疫系統記憶性的短期和長期效應。

a.記憶性的短期效應(數十分鐘)

如上所述將蟑螂固定好後，將自體與異體觸角植入，15 分鐘後取出測量觸角基部的包囊

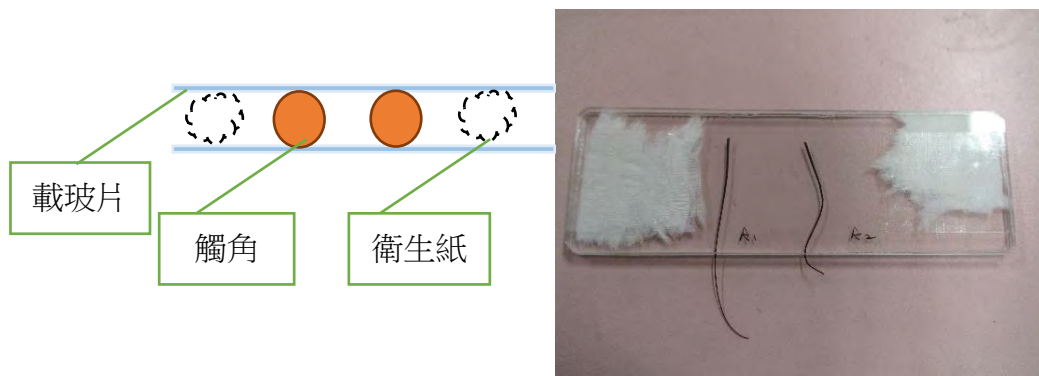
寬度與最大包囊寬度。將實驗過的觸角清潔(去除前一次免疫反應的包囊組織，並以清水沖洗)後，在顯微鏡下測量觸角寬度以確保包囊組織已去除，靜置 15 分鐘待其乾燥。為檢驗其記憶性，再次將觸角樣本植入蟲體中，等待 15 分鐘後再以鑷子將骨片翻開並取出觸角，並於顯微鏡下測量觸角基部的包囊寬度與觸角上的最大包囊寬度，以上步驟共進行三次，以比較短期內重複植入時(相隔 15 分鐘)，第二次與第三次植入所引發的包囊作用，是否會因免疫之記憶性質而與第一次相比有所不同。

b. 記憶性的長期效應(三天)

將蟑螂兩兩分組放入錐形瓶中，以二氧化碳麻醉後，將觸角由柄節剪下，測量觸角的寬度。由步足中腳之腿節與脛節交界處以剪刀將脛節與跗節剪下，形成一個小傷口，並將自體、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(如圖六)。將餘下的觸角，以目鏡測微器測量觸角基部與鞭節的直徑後保存(圖七)。待蟑螂清醒後放回錐形瓶，並給予三天份的飼料。三天後，以二氧化碳麻醉。再將蟑螂腹面朝下固定於貼紙上。將自體與異體觸角樣本植入蟲體腹部背側體內，15 分鐘後以鑷子將骨片翻開並取出觸角，於顯微鏡下測量觸角基部的包囊直徑與觸角上的最大包囊直徑。透過上述步驟探討接觸自體、異體、或自體與異體觸角三日的蟲體，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。



圖六 植入物(觸角前端組織)植入蟑螂中腳內的實驗照片。



圖七 剪下之觸角保存方式示意圖與照片。

4. 檢驗植入物表面蛋白質對包囊作用的影響

我們懷疑上述引發蟑螂免疫系統表現“敵我辨識”性質的現象，可能是免疫細胞偵測觸角表面的“異體”蛋白質所引發。因此在此實驗中，我們利用酒精使觸角表面蛋白質變性，再植入蟲體中，經測量後與未經酒精浸泡處理過的觸角比較其包囊作用的程度。

實驗流程如實驗一，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，並測量其寬度。將酒經處理後的自體與異體觸角樣本植入蟲體腹部背側體內，**15** 分鐘後以鑷子將骨片翻開並取出觸角，於顯微鏡下測量觸角基部的包囊直徑與觸角上的最大包囊直徑，與對照組(觸角樣本未經酒精處理)比較。

5. 檢驗正負電極對包囊作用的影響

本實驗的目的在於檢驗植入物的電荷性質對於蟑螂產生包囊作用的影響，並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等性質。我們設計了以下三組實驗：

(1). 建立對照組以供比較

將蟑螂兩兩分組放入錐形瓶中，以二氧化碳麻醉。再將蟑螂腹面朝下固定於蟑螂貼紙上，將沒有通電的兩條銅絲於顯微鏡下測量寬度後，分別插入蟑螂背部左、右側(圖八)，**10** 分鐘後以鑷子將骨片翻開並取出銅絲，於顯微鏡下觀察並測量其包囊的最大直徑。

(2). 比較正極與負極銅絲所引發的包囊作用

步驟同上，但植入的銅絲各自連接正負電極並通入 **1.5V** 的電壓 **10** 分鐘或 **20** 分鐘(圖九)，再以鑷子將骨片翻開並取出銅絲，測量其包囊的最大直徑。

(3).正極與負極互換以探討參與包囊作用的細胞是否可轉移(是否具有可逆性)

步驟同(一)，但連接正負電極的銅絲並通入 1.5V 的電壓 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。最後以鑷子將骨片翻開並取出銅絲，於顯微鏡下測量包囊的最大寬度。



圖八 銅絲插入背側情形。



圖九 正負電極之銅絲插入背側情形。

6. 不同遠近之親源關係的生物組織與非生物組織對包囊作用的影響

實驗五的植入物(銅絲)是無機物，我們好奇，若是植入親源關係較遠之生物的組織(屬於有機物)，蟑螂的免疫反應程度是否不同(是否可辨識)?於是我們以同樣為細長型的人體頭髮與蝦子觸角作為關係較遠(相對於蟑螂觸角)及中間(介於蟑螂觸角及人體頭髮之間)之生物的組織樣本，探討其引發包囊作用的程度，並與銅絲與蟑螂觸角的包囊程度進行比較。實驗流程同實驗一，以兩根人體頭髮分別植入蟑螂腹部背面的左、右兩側，15 分鐘後，取出觀察並測量最大包囊的寬度。另將蟑螂觸角、蝦子觸角及人體頭髮同時植入蟑螂體內，一樣於 15 分鐘後取出測量。由於蟑螂觸角、蝦子觸角、人體頭髮與銅絲的直徑不同，無法以包囊的直徑大小作為免疫程度的比較指標，故需計算包囊組織本身的截面積(不含植入物)，作為包囊程度的指標，其計算方式為：

$$\text{包囊組織的截面積} = \pi(\text{包囊外徑}^2 - \text{植入物外徑}^2)$$

7. 比較雄、雌蟲免疫反應的強弱

由於以上實驗皆是以雄蟲作為實驗動物，我們懷疑性別的不同會不會影響免疫反應的強度，因此我們也以雌蟲做實驗，實驗流程同實驗一。由於雌、雄蟲的觸角直徑不同，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：

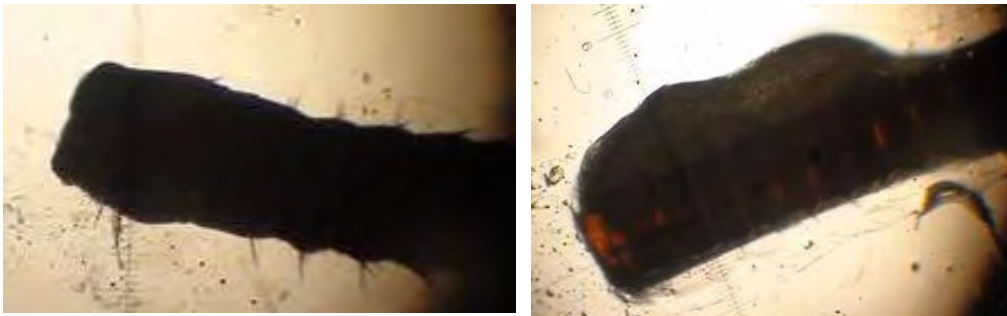
$$\text{包囊本身的截面積} = \pi(\text{包囊外徑}^2 - \text{觸角外徑}^2)$$

三、研究結果與討論

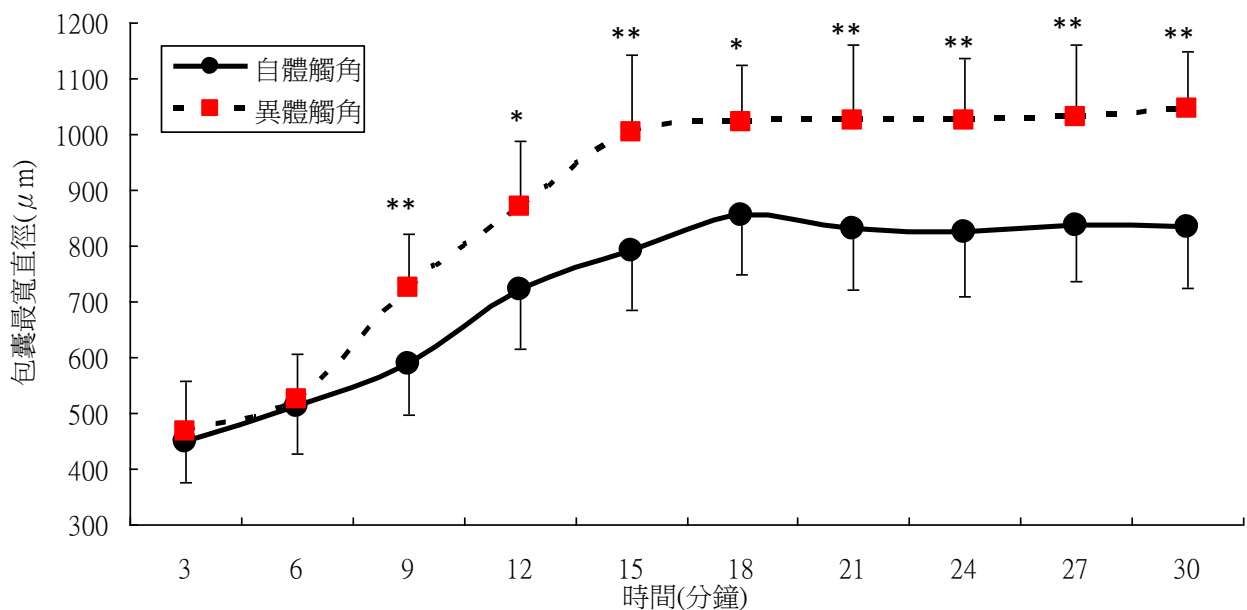
(一)、研究結果

1. 自體與異體植入物所引發之包囊大小隨時間的變化

將自體與異體觸角植入蟑螂後，每三分鐘取出部分蟲體的植入物進行測量(圖十)，可觀察到包囊的形成隨時間越來越大(圖十一)，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。



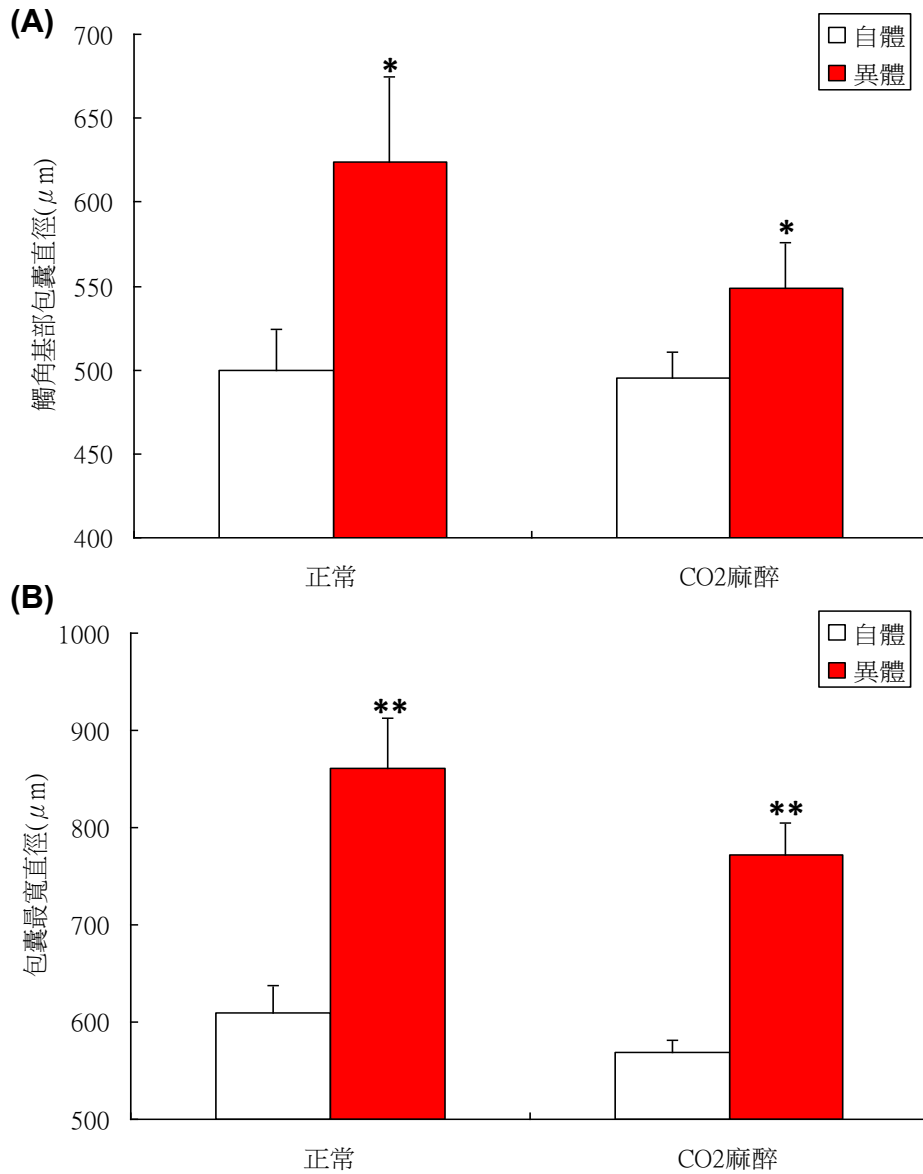
圖十 自體觸角(左)與異體觸角(右)於蟑螂體內引發的包囊作用照片。



圖十一 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)：* : $p < 0.05$; ** : $p < 0.01$

2. 二氧化碳麻醉對包囊作用的影響

將自體與異體觸角植入未麻醉與二氧化碳麻醉狀態的蟑螂，其所引發包囊作用強度沒有差異(圖十二)。



圖十二 自體與異體植入正常與 CO₂ 麻醉蟲體所引發包囊作用的包囊直徑

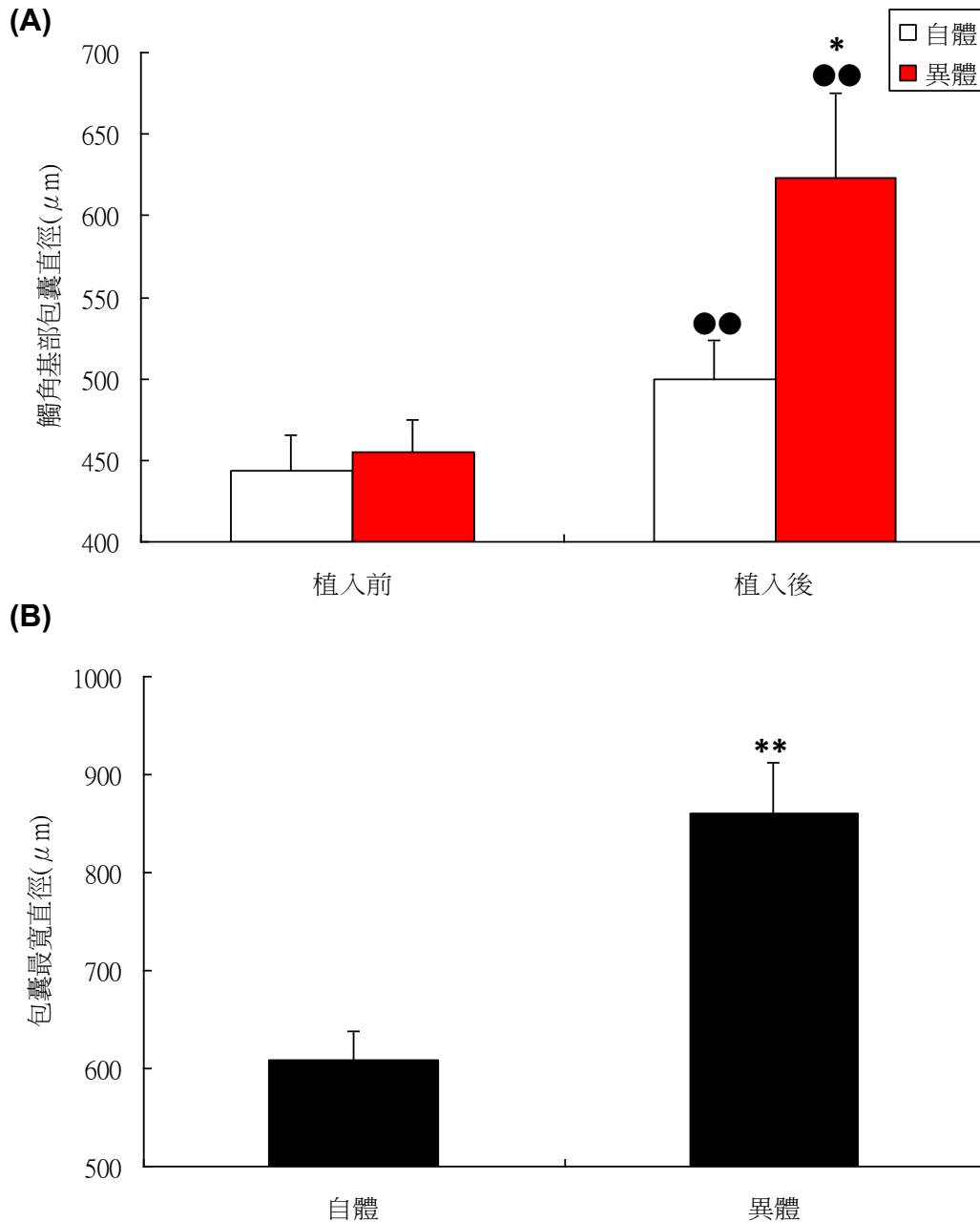
(平均 ± 標準誤, n = 16, 16)。(A)觸角基部的包囊直徑。(B)觸角最大的包囊直徑。

與自體觸角相比(單尾配對 t 檢定)：* : $p < 0.06$; ** : $p < 0.01$

與正常相比(單尾配對 t 檢定)：未達統計差異

3. 昆蟲的免疫系統是否可辨識敵我？

觀察自體組織與異體組織所以引發的包囊作用(圖十)，並經量化比較，發現無論是比較觸角基部的包囊直徑(圖十三 A)或是觸角上的最大包囊直徑(圖十三 B)，異體觸角所引發的包囊作用接大於自體觸角，證實蟑螂的免疫系統具有敵我辨識的能力。



圖十三 自體與異體觸角植入蟲體後引發包囊作用的包囊直徑(平均 ± 標準誤，n = 16)。

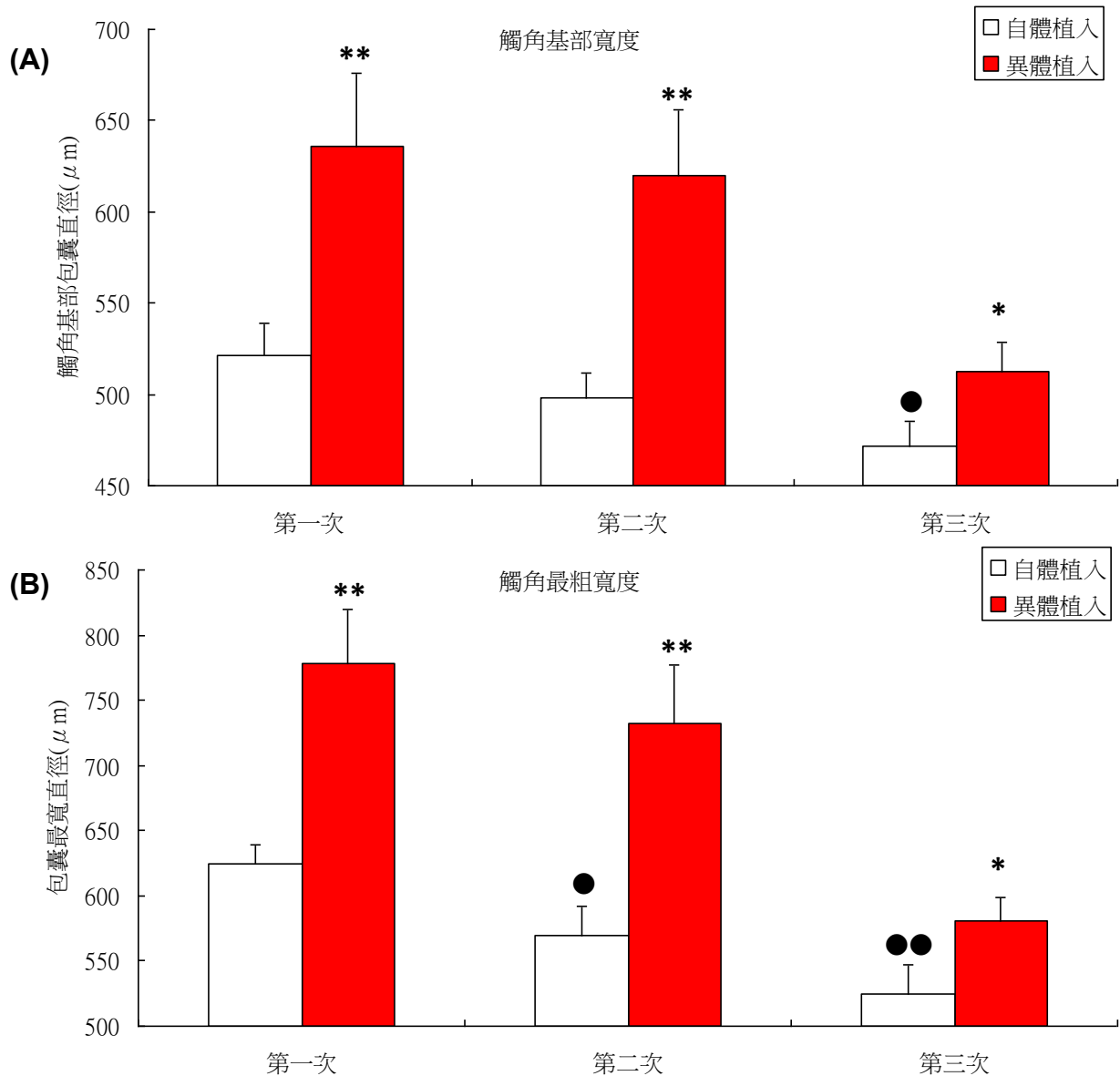
(A)觸角基部的包囊直徑。(B)觸角最大的包囊直徑。

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

與植入前相比(單尾配對 t 檢定)：●● : $p < 0.01$

4. 記憶性的短期效應

重複植入觸角後，第一次到第三次植入的包囊作用皆是異體觸角引發的包囊作用大於自體觸角，但隨著重複植入越多次，自體與異體觸角所引發的包囊作用皆逐漸減弱(圖十四)。



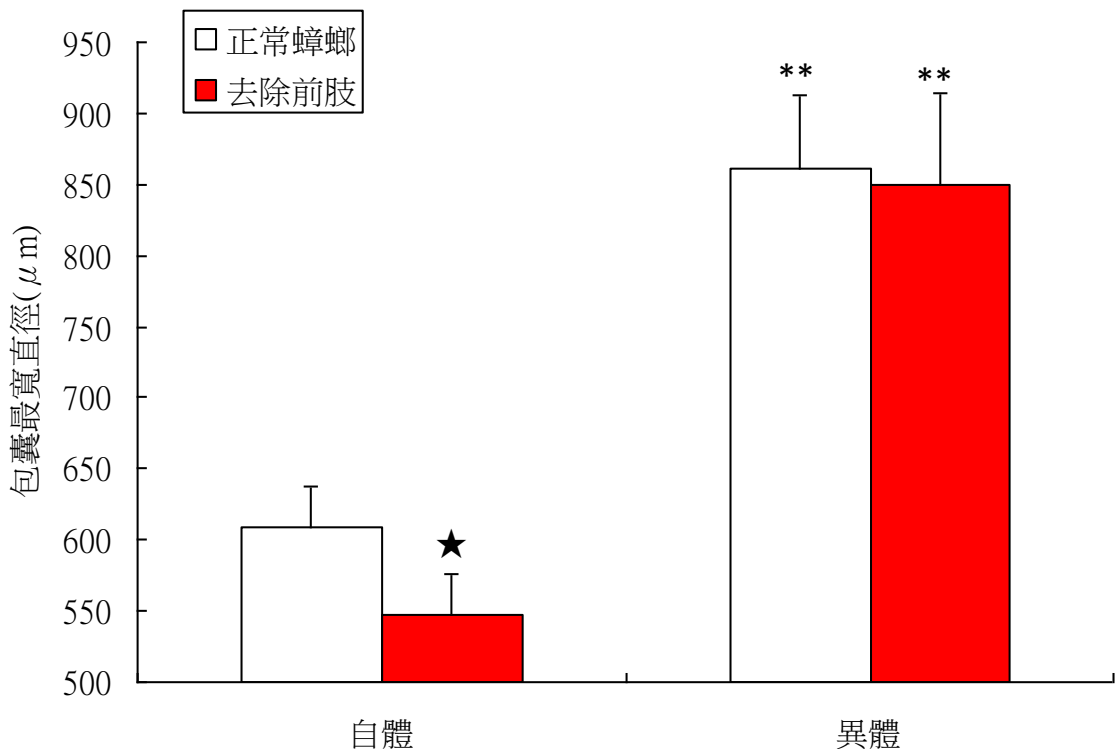
圖十四 自體與異體觸角於短期內重複植入蟲體所引發包囊作用的包囊直徑(平均 ± 標準誤，n = 14)。(A)觸角基部的包囊直徑。(B)觸角最大的包囊直徑。

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

與第一次植入相比(單尾配對 t 檢定)：● : $p < 0.05$; ●● : $p < 0.01$

5 記憶性的長期效應

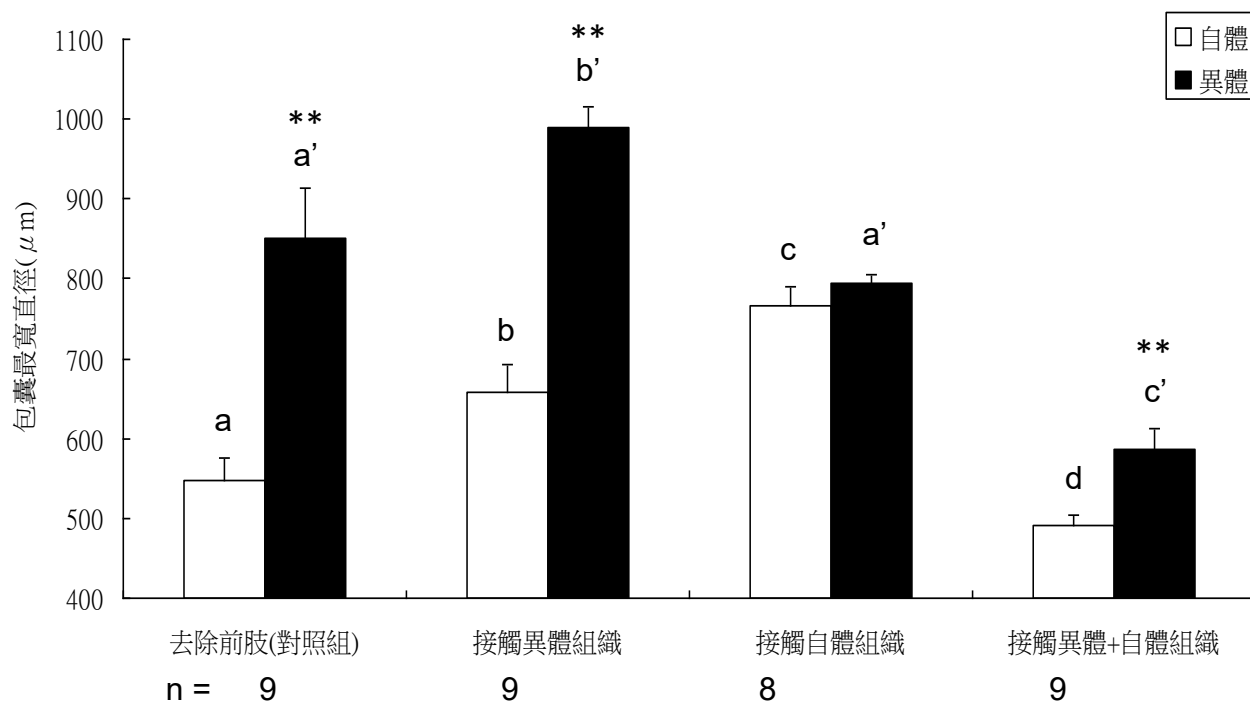
若只去除中腳步足，三日後除了略為減弱自體觸角的包囊作用外，對觸角引發包囊作用的相關性質影響不大(圖十五)。接觸異體組織三天後可增加自體與異體觸角所引發的包囊作用；接觸自體組織三天後可增加自體觸角所引發的包囊作用，但不影響異體觸角的包囊作用；若同時接觸自體與異體組織三天後，可減弱自體與異體觸角所引發的包囊作用(圖十六)。若與正常組(未作任何處理)相比，則可更明顯觀察出此現象(圖十七、圖十八、圖十九)。



圖十五 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)：★ : $p = 0.065$

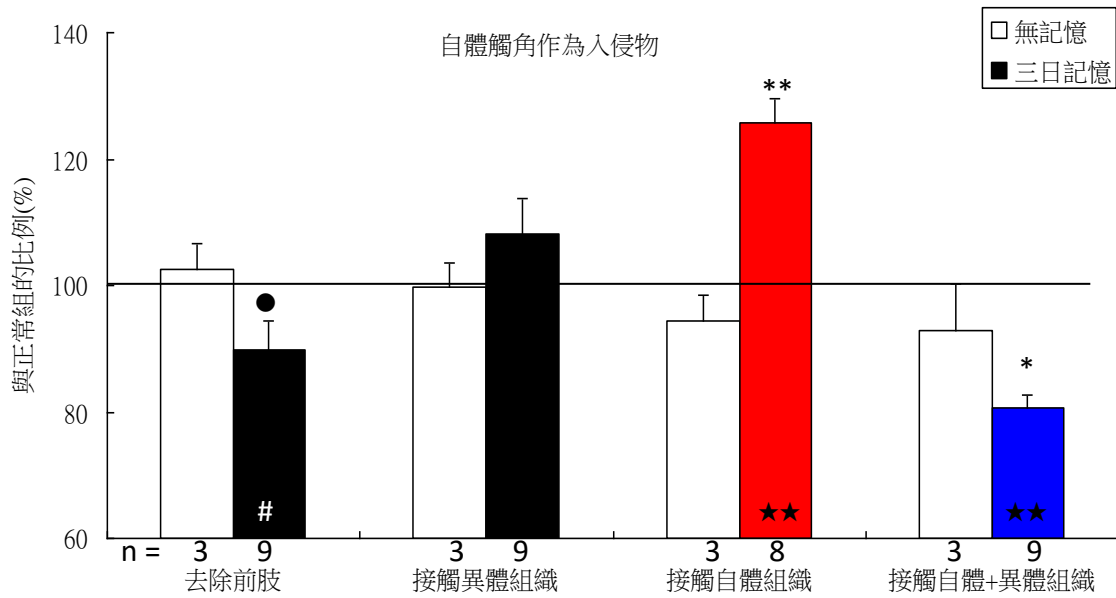


圖十六 體內細胞接觸自體或異體觸角三天後，對自體或異體觸角引發包囊作用的最寬包囊直徑(平均 \pm 標準誤，n = 取樣數)。

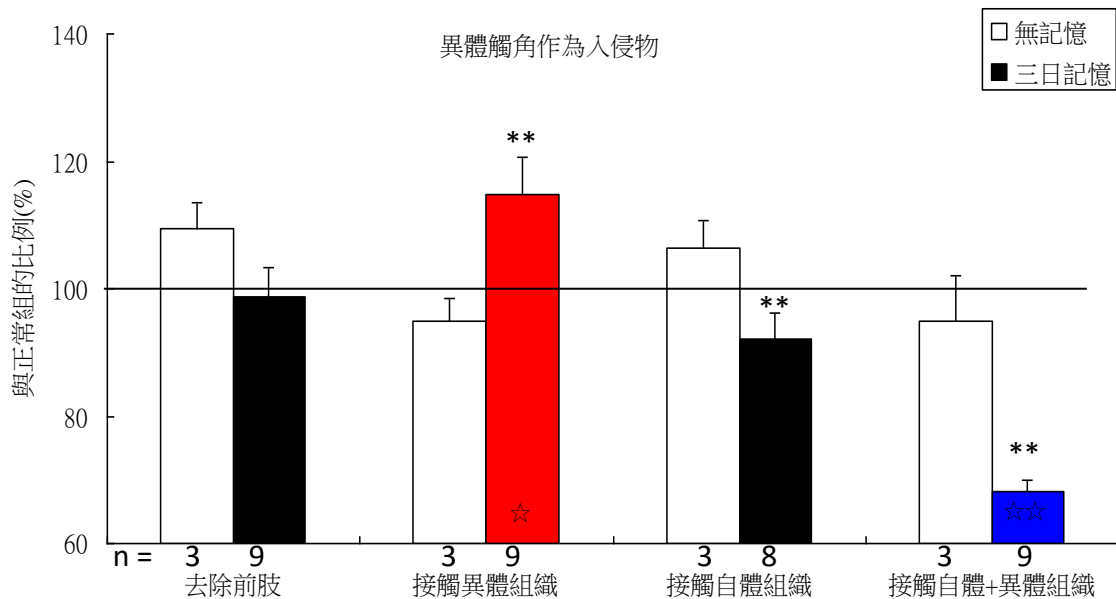
a、b、c、d：自體觸角引發包囊作用之各組間達統計之顯著水準($\alpha = 0.05$)

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($\alpha = 0.05$)

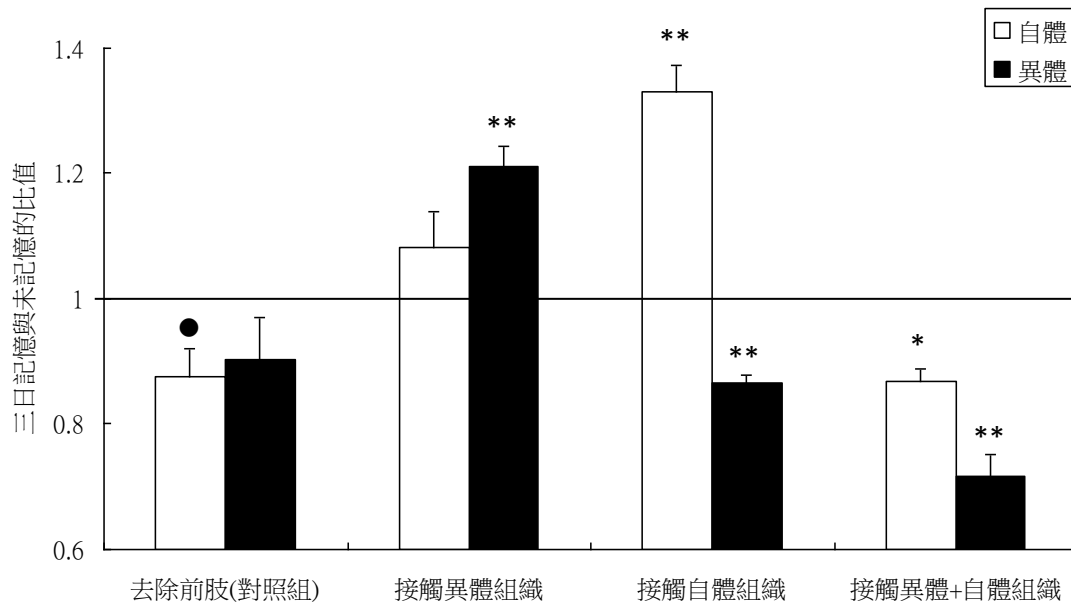
與自體觸角相比(單尾配對 t 檢定)：**： $p < 0.01$



圖十七 蟲體接觸自體或異體組織三天後，對自體觸角引發之最寬包囊直徑的百分比 (與 16 隻正常個體對自體觸角的包囊作用相比，平均 \pm 標準誤，n = 取樣數)。與正常個體組(即圖中之 100%)相比(單尾 t 檢定)：# : $p = 0.08$ ；** : $p < 0.01$ 與“無記憶”組相比(單尾 t 檢定)：• : $p = 0.08$ ；* : $p < 0.05$ ；** : $p < 0.01$



圖十八 蟲體接觸自體或異體組織三天後，對異體觸角引發之最寬包囊直徑的比例 (與 16 隻正常個體對異體觸角的包囊作用相比，平均 \pm 標準誤，n = 取樣數)。與正常個體組(即圖中之 100%)相比(單尾 t 檢定)：☆ : $p < 0.05$ ；☆☆ : $p < 0.01$ 與“無記憶”組相比(單尾 t 檢定)：* : $p < 0.05$ ；** : $p < 0.01$



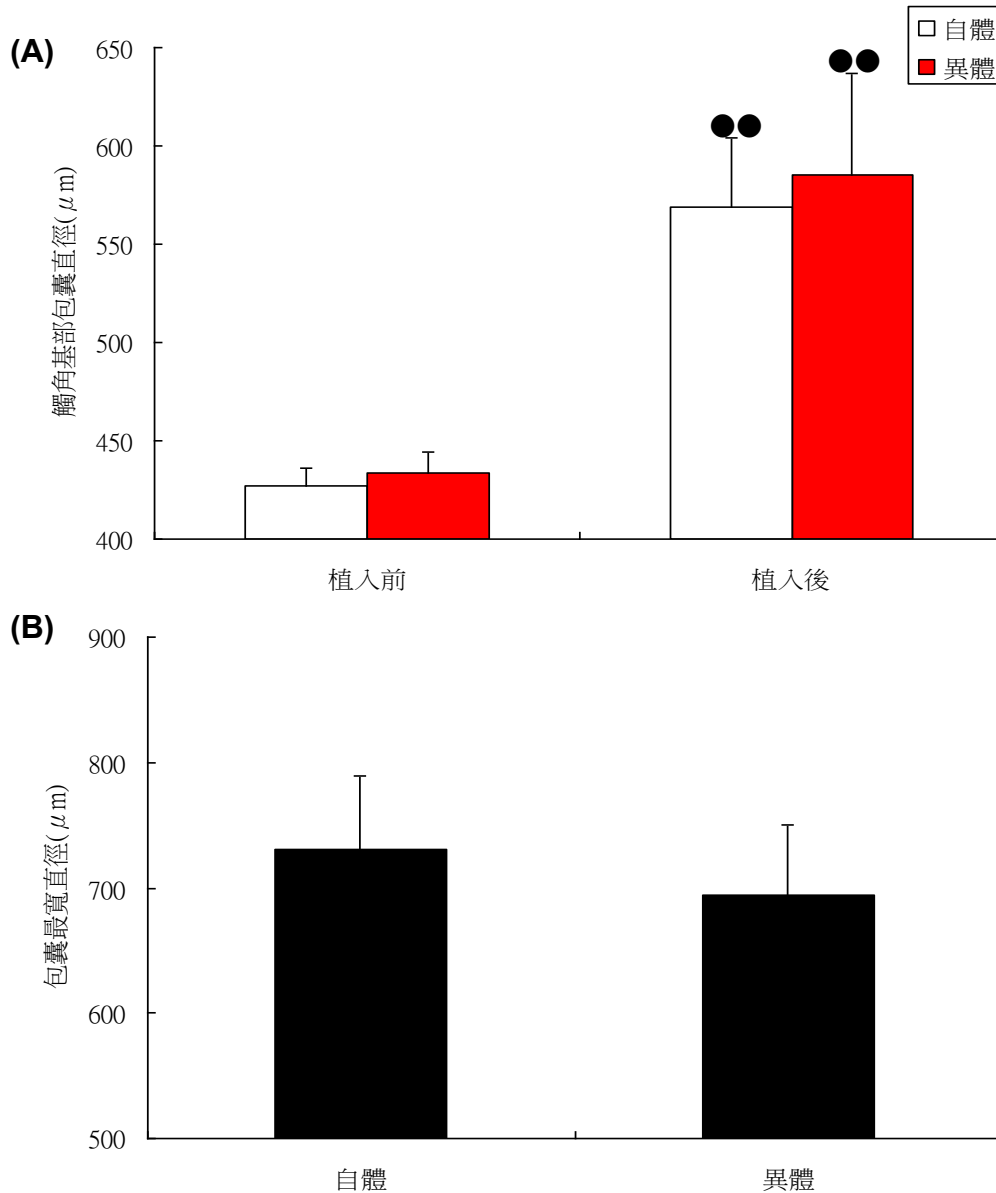
圖十九 記憶效應與無記憶時之包囊程度比值(最大包囊直徑的比值)。

(平均 \pm 標準誤，取樣數如上述)。

記憶效應與無記憶時相比(單尾 t 檢定)：• : $p = 0.08$; * : $p < 0.05$; ** : $p < 0.01$

6. 植入物表面蛋白質對包囊作用的影響

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(圖二十)，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。

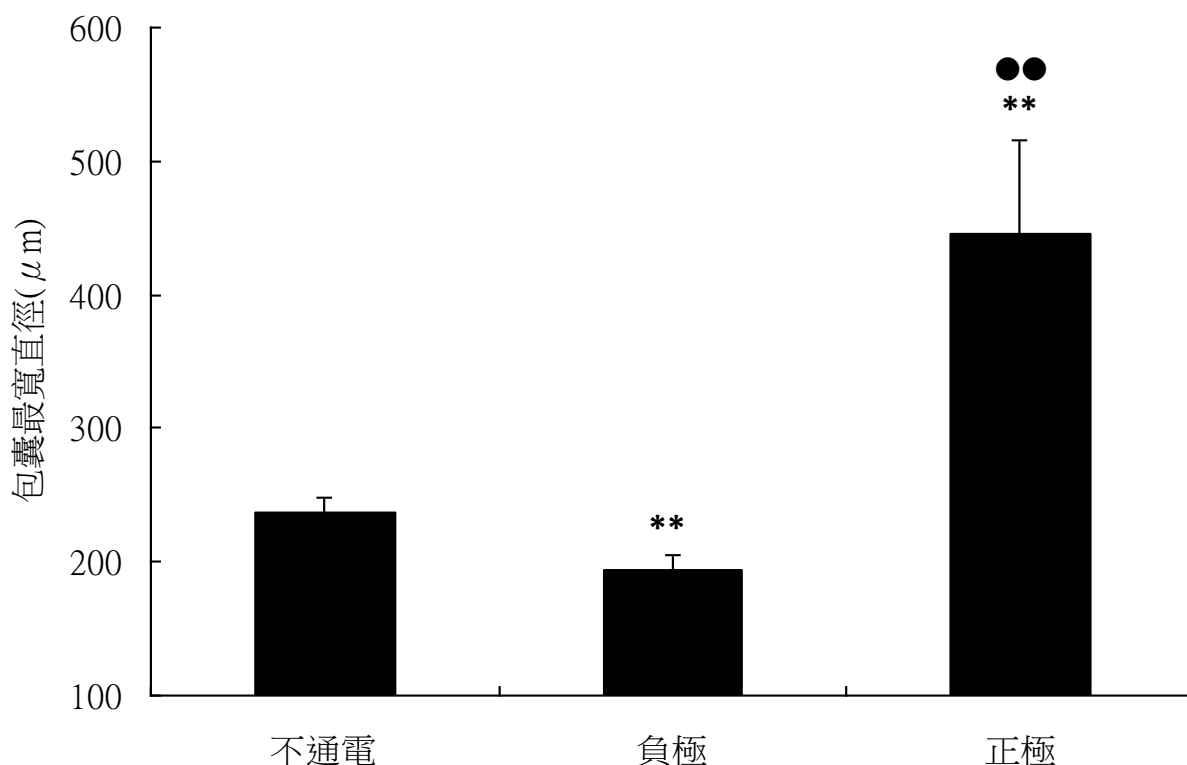


圖二十 自體與異體觸角經酒精處理後，植入蟲體後引發包囊作用的包囊直徑 (平均 \pm 標準誤， $n = 12$)。(A)觸角基部的包囊直徑。(B)觸角最大的包囊直徑。
與自體觸角相比(單尾配對 t 檢定)：未達統計差異
與植入前相比(單尾配對 t 檢定)：●●： $p < 0.01$

7. 植入物的電荷性質對包囊作用的影響

連接電源正極的銅絲可增加包囊作用(大於不通電的銅絲)，而連接電源負極的銅絲可抑制包囊作用(小於不通電的銅絲)(圖二十一)。

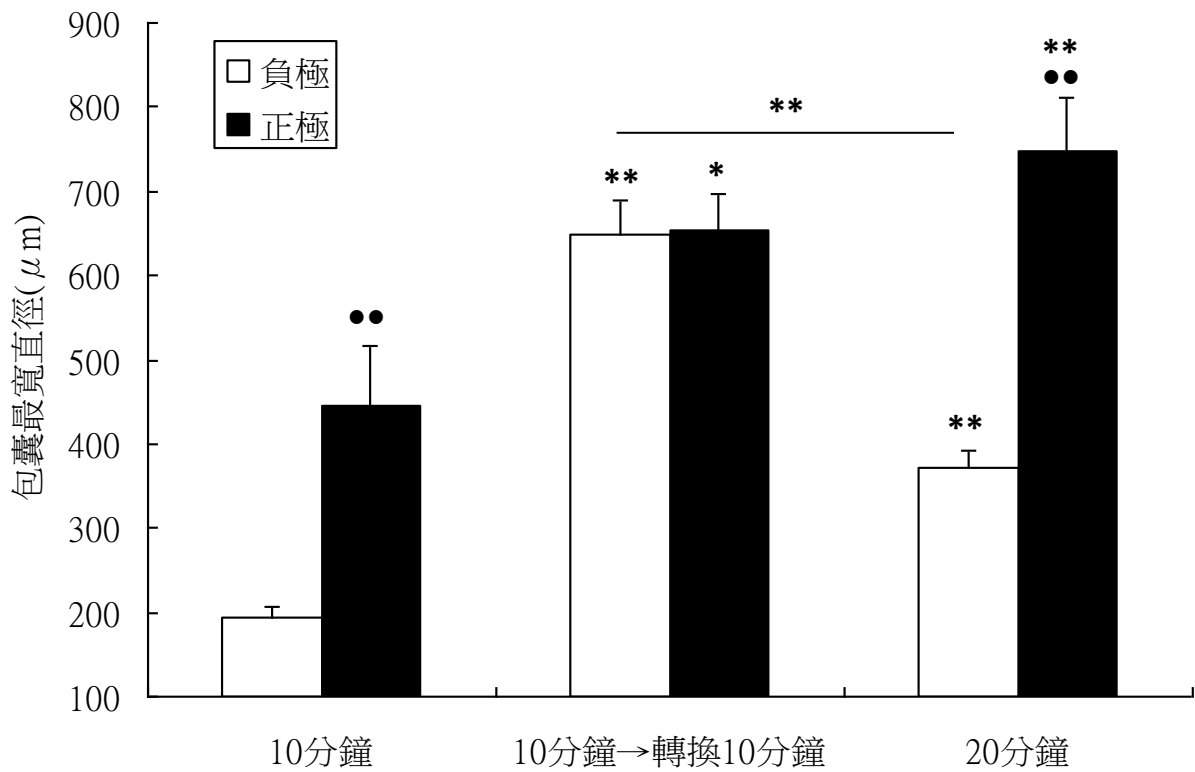
若先通電 10 分鐘後交換正負電極，再繼續通電 10 分鐘後，則此兩銅絲的包囊程度不具差異，且大於通電 10 分鐘的正電銅絲，小於通電 20 分鐘的正電銅絲(圖二十二)，顯示包囊細胞形成包囊後不會散去(不具可逆性)。



圖二十一 不通電與正、負極銅絲植入蟲體 10 分鐘所引發包囊作用的最大包囊直徑(平均 \pm 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)：•• : $p < 0.01$



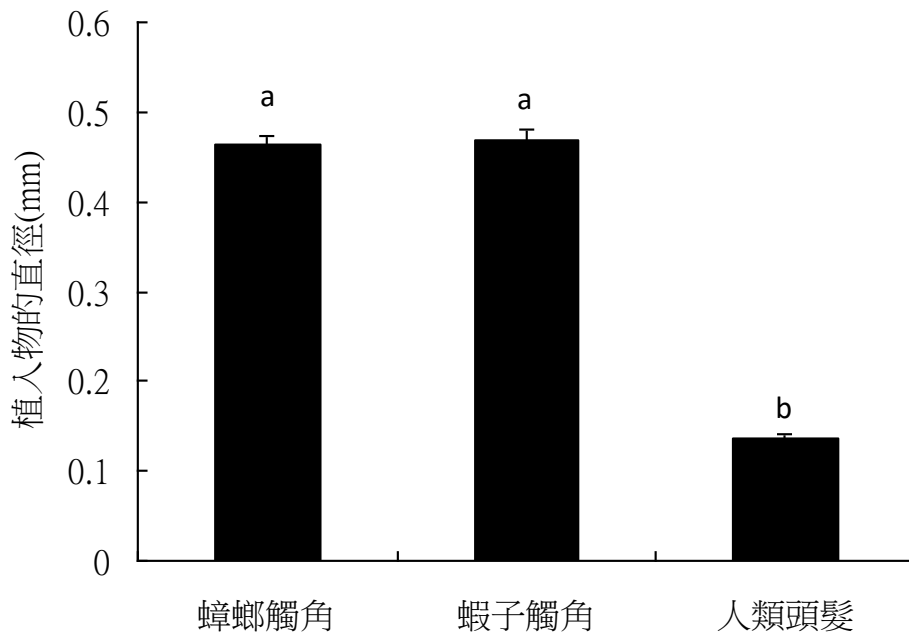
圖二十二 負極與正極銅絲植入蟲體 10 分鐘、10 分鐘後轉換 10 分鐘、20 分鐘所引發包囊作用的最大的包囊直徑(平均 ± 標準誤，n = 10, 10, 10)。

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)：•• : $p < 0.01$

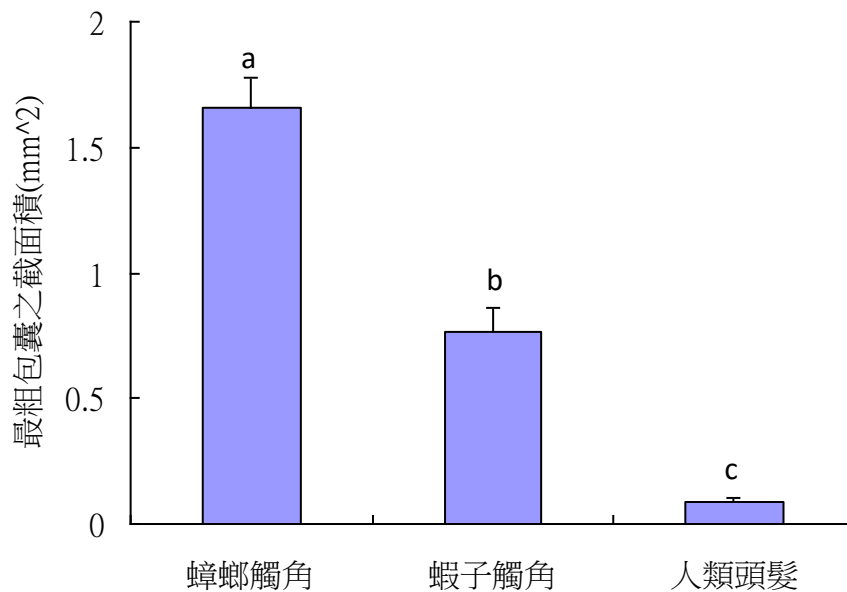
8. 不同親源關係遠近的生物組織與非生物組織對包囊作用的影響

比較植入自體觸角、異體觸角、蝦子觸角、人類頭髮、未通電的銅絲引發的包囊作用，發現其原始寬度不一，因此採用測量截面積之方法(圖二十三)。我們發現蟑螂對蟑螂觸角所引發的包囊作用較蝦子觸角及人體頭髮強(圖二十四)，三者皆又強於銅絲(圖二十五)。



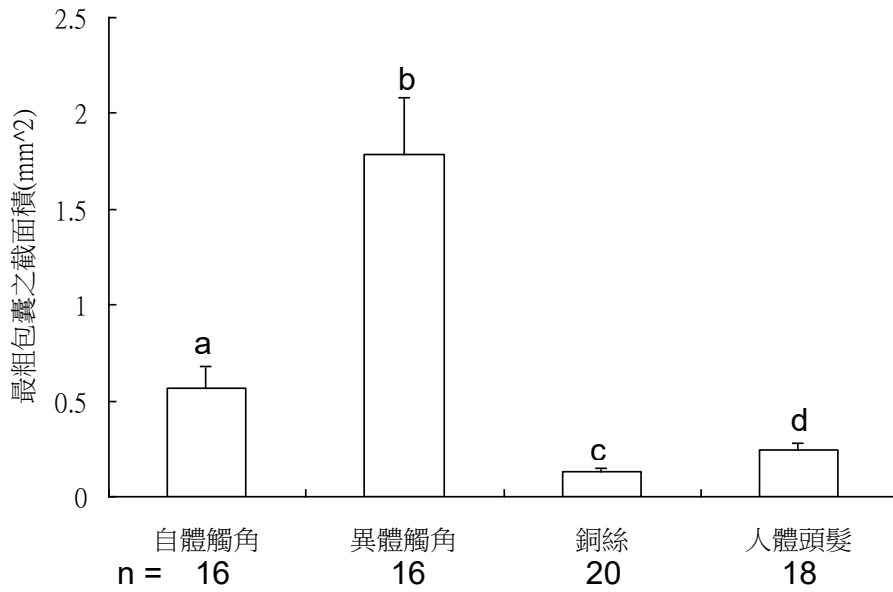
圖二十三 異體蟑螂觸角(n = 12)、蝦子觸角(n = 12)、人體頭髮(n = 12)的直徑(平均 ± 標準誤)。

a、b：各組間達統計之顯著水準($\alpha = 0.001$)。



圖二十四 異體蟑螂觸角(n = 12)、蝦子觸角(n = 12)、人體頭髮(n = 12)於蟑螂體內引發包囊作用的最寬包囊截面積(平均 ± 標準誤)。

a、b、c：引發包囊作用之各組間達統計之顯著水準($\alpha = 0.001$)

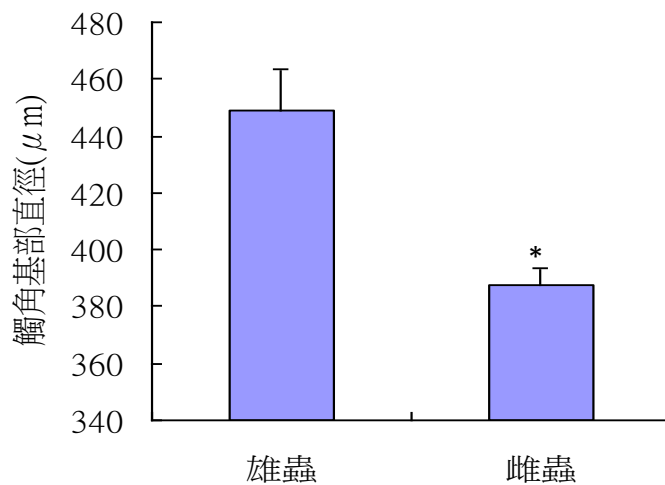


圖二十五 自體觸角、異體觸角、銅絲、人體頭髮於蟑螂體內引發包囊作用的最寬包囊截面積(平均 ± 標準誤，n = 取樣數)。

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

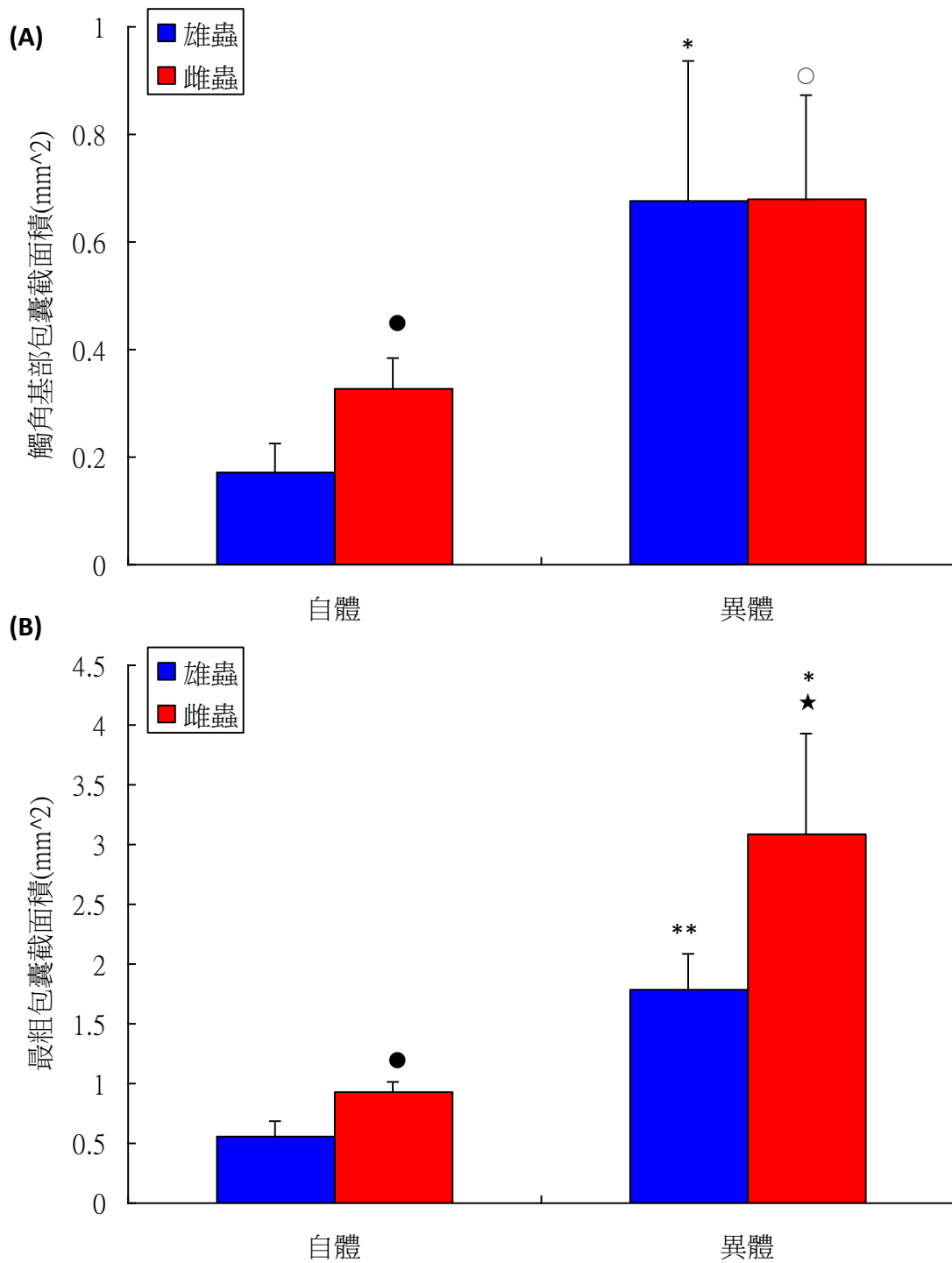
9. 比較性別因子在包囊作用中的效應

雄蟲的觸角基部直徑大於雌蟲(圖二十六)，故比較雌雄的包囊作用時，需換算成“最寬包囊截面積”方可比較包囊的程度。我們發現雌蟲的異體觸角的包囊作用大於雄蟲；若最大包囊的截面積，無論是異體或自體觸角，皆是雌蟲大於雄蟲(圖二十七)。



圖二十六 不同性別之蟑螂成蟲之觸角基部寬度直徑(平均 ± 標準誤，n = 16, 10)。

與雄蟲相比(單尾 t 檢定)：**：p < 0.01



圖二十七 雄性(n = 16)與雌性(n = 10)之蟑螂成蟲對自體與異體觸角引發包囊作用的包囊直徑(平均 ± 標準誤)。

(A)觸角基部的包囊截面積。(B)觸角上最大包囊之包囊截面積。

與自體觸角相比(單尾配對 t 檢定)：○：p = 0.057；*：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)、討論

本研究已建立一個觀察、量化蟑螂包囊作用的動物模式，可用於探討免疫系統的各项性質，也證實了美洲蟑螂的免疫系統具有辨識敵我與記憶性等性質，其免疫反應也具有性別差異，對不同性質的生物性與非生物性的植入物亦有不同的程度的免疫反應。

二氧化碳麻醉法是普遍用於昆蟲研究的操作手段，為了確定此操作步驟不影響對免疫反應的正確觀察，我們實驗發現二氧化碳麻醉不影響包囊作用強度(圖十二)。因此，本研究多以標準麻醉程序進行實驗，以避免蟲體過度掙扎而影響正常的生理反應。

本研究探討昆蟲是否具有人體免疫功能的部分性質，包含能否辨識敵我，以及是否具有記憶性。研究初期我們將蟑螂步足前肢植入蟲體腹部，希望能觀察、量化包囊作用，但由於死亡率過高(死亡率達 90%)，經討論、檢討後認為是因植入物過大，植入所造成的傷口亦過大，容易致死或影響正常生理功能，因此改良由蟑螂的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%。

本研究發現自體和異體觸角所引發的包囊作用強度具有明顯差異：異體觸角引發的包囊作用明顯大於自體觸角(圖十三)，且雄蟲與雌蟲皆然(圖二十七)。代表蟑螂的免疫系統具有辨識自體與異體入侵物的能力。

此外，我們也嘗試探討蟑螂免疫系統是否具有記憶性，我們將自體、異體觸角重複插入三次，每組相隔 15 分鐘，從實驗結果(圖十四)中可以發現其引發的包囊作用強度一次比一次弱，不過異體觸角引發的包囊作用仍然明顯大於自體，然而相較於人體後天免疫而言(應愈來愈強)，不符合預期，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。故我們認為本實驗的植入物植入於血體腔，可引發程度較大的包囊作用，但也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，故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)可能過度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度消耗。蟲體接觸外來物三日後，再檢驗觸角植入物所引發的包囊作用反應程度，我們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：接觸異體組織所建立的免

疫記憶性可增加對自體與異體觸角的免疫程度；接觸自體組織所建立的免疫記憶性可增加對自體觸角的免疫程度；若同時接觸自體與異體組織而建立的免疫記憶性，可減弱對自體與異體觸角的免疫程度(圖十六、圖十七、圖十八、圖十九)。本研究發現美洲蟑螂不但具有類似人體免疫系統的記憶性質，也發現了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(表三)。

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	+21.09 ^{**}
接觸自體組織	+33.15 ^{**}	-13.41 ^{**}
接觸自體+異體組織	-13.24 [*]	-28.23 ^{**}

註：本表為與無記憶效應(蟲體同時接觸組織與入侵物引發包囊作用)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」與「接觸異體組織後對異體觸角」

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」與「接觸自體組織後對異體觸角」

的免疫反應相比(單尾 t 檢定)： $p < 0.01$

為了探討植人物(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現象，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(圖二十)。這意味包囊作用的敵我辨識性質在酒精處理植人物後消失，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是有差異的，而經酒精處理後(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，我們也有一致的發現(圖二十一)，但我們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，結果我們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沒有差異(圖二十二)，故推測蟑螂的包囊作用不具有可逆性。

我們也發現自體觸角、異體觸角、蝦子觸角，人體頭髮與銅絲所引發的包囊作用程度不同，其中有機物質(頭髮、觸角)比無機物(銅絲)更容易引起包囊作用(圖二十五)，推測應是其物質表面的蛋白質帶來的影響，而人體頭髮所引發的包囊作用弱於蟑螂觸角，可能是由於親緣關係所致，目前的實驗結果為蟑螂觸角>蝦子觸角>人體頭髮>銅絲(圖二十四)，我們推論親緣關係越遠的植人物，所引發的包囊作用越弱；也就是蟑螂的寄生蟲，常常是與蟑螂親緣關係較近的生物，故引發的免疫反應較強。

我們發現雄蟲的觸角較雌蟲來的粗(圖二十六)，我們認為這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。而從圖二十七的結果中，我們得知雌蟲的包囊作用較雄蟲來的強烈，我們認為因為雌蟲較需要懷孕、保護卵以傳宗接代，且體型較大，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。

四、結論與應用

- (一)、我們已建立蟑螂包囊作用的觀察與記錄的方法，非常適合作為高中生物課程中免疫相關章節的探討活動。
- (二)、二氧化碳的麻醉與否並不影響蟑螂體內的免疫反應(即包囊作用)的進行。
- (三)、我們證實蟑螂的免疫系統具有辨識敵我的能力。
- (四)、植入物表面的蛋白分子結構扮演免疫系統之辨識敵我特性的重要角色。
- (五)、短期內重複植入外來物，會消耗蟲體內的免疫細胞，使包囊作用的反應程度逐漸下降。
- (六)、美洲蟑螂的包囊作用具有記憶性質，且可能包含活化性與抑制性兩種不同的記憶效應。
- (七)、蟑螂的包囊作用只具加成性，不具可逆性。
- (八)、親緣關係越遠的植入物，所引發的包囊作用可能越弱。
- (九)、雌蟲與雄蟲的包囊作用皆具有敵我辨識的性質，其中雌蟲的免疫反應大於雄蟲。

五、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.
- 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.
- 李家維，2008。選修生物(下)。出版商:龍騰文化
- 凌爾軍、吳姍，2009。昆蟲細胞免疫反應中的吞噬、集結和包囊作用。昆蟲學報 52(7)，791-798。
- 甯媛媛、尤民生、王成樹，2009。昆蟲免疫識別與病原物免疫逃避機理研究進展。昆蟲學報 52(5)，567-575。
- 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。

【評語】 050001

研究內容有趣有新意，對實驗結果的解釋應仔細考慮，建議利用其他蟲卵或綠蟲卵代替蟑螂觸角當作異物。