

第二十一屆旺宏科學獎

成果報告書

參賽編號：SA21-407

作品名稱：以誘發性自噬行為與熱刺激
探討蟑螂步足之痛覺受體分布
與急性/慢性痛覺反應

姓名：陳奕嫚

關鍵字：自噬行為、痛覺、蟑螂

以誘發性自噬行為與熱刺激探討蟑螂步足之痛覺受體分布與急性/慢性痛覺反應

壹、研究動機

踩死蟑螂的時候，蟑螂會痛嗎？昆蟲是否可感受痛覺，一直是科學上未解之謎。

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，這兩類受體也可是痛覺的受體(蔡，2021)，而辣椒素(capsaicin)可作用於 TRPV1，同時使人產生熱覺與痛覺。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。

我曾先以辣椒粉加入橄欖油後加熱，製作辣椒油，期望透過辣椒素的刺激研究昆蟲的痛覺性質，並進行了兩項前測實驗：

- 一、分別將吸附橄欖油和辣椒油的棉花分開放置於蟑螂飼養箱內，結果發現蟑螂較偏好爬上吸附辣椒油的棉花，且蟑螂進食辣椒油的隻/次數明顯多於橄欖油(圖一)。
- 二、以棉花棒組吸附辣椒油或橄欖油，並碰觸蟑螂口器引誘攝食，結果發現相對於橄欖油，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 蟑螂選擇取食橄欖油或辣椒油的情形。

相對於對哺乳動物的痛覺研究已進展到分子受器的研究層級，無脊椎動物的痛覺研究卻仍停滯不前，因為大多數學者認為無脊椎動物並沒有痛覺。昆蟲常作為無脊椎動物的模式生物，由於昆蟲體內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多為反射性的現象。由於昆蟲神經系統的神經元數量較少，可塑性較低，因此當昆蟲受到傷害時，

常是引發反射而非產生痛覺，透過反射就可產生趨避行為，減少昆蟲受傷害的機會，因此不需要透過產生疼痛的感覺，與痛覺所衍生出的學習行為，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後，可引發個體對傷口部位的梳理、清潔行為，但可能歸因於來自傷口部位的機械感受輸入所引發的反射(Eisemann, et al., 1984)。也有前人觀察到即使已被螳螂捕捉並且正被啃食的蝗蟲，仍持續在進食(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；雄性螳螂在被夥伴吃掉後繼續交配(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，它們仍會對內臟的蛋白質刺激做出反射並吃掉它(Adamo, 2019)。這些例證明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》中作了以下定義：除了人類，唯一的能夠感受到疼痛的動物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。但這樣的定義對於研究昆蟲是否具有痛覺帶來了限制，因為不容易證明昆蟲是否具有意識活動與行為動機。

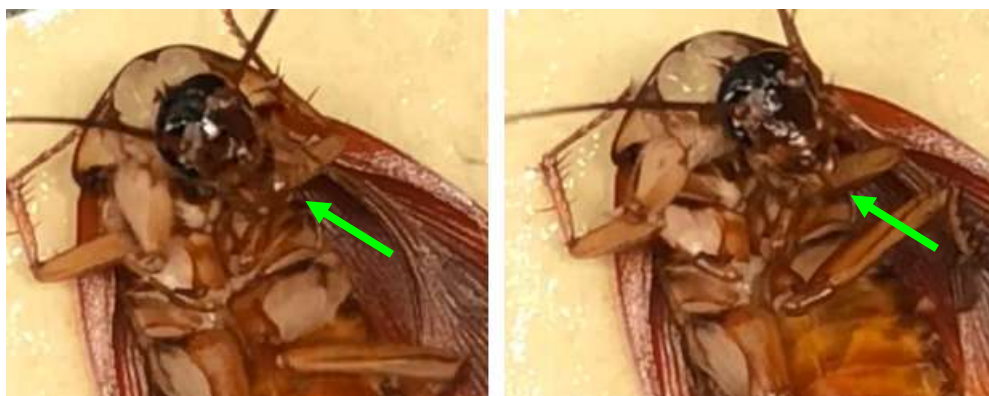
許多學者透過行為學的研究嘗試研究昆蟲的痛覺。Zabala 與 Gómez(1991)使用高溫刺激研究蟋蟀的逃逸反應時間(escape reaction time, ERT)，發現注射嗎啡後蟋蟀的 ERT 增加，若阻斷了嗎啡的作用則會恢復，甚至產生了成癮(addiction)的現象。Yarali 等人(2008)以果蠅作為研究對象，發現若於氣味刺激後給予電擊，這樣的訓練可使果蠅預測電擊而避開它；但若先給予電擊再以氣味刺激，則氣味代表從逆境中解脫出來(relief from shock)，這樣的訓練會使果蠅偏好該氣味；前者稱為懲罰學習(punishment learning)，後者稱為緩解學習(relief 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)更進一步以果蠅步足腿節進行截肢(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，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 時則不會出現逃逸反應，但 *TrpA1* 或 *painless* 突變株果蠅即使在 42°C 以上的溫度仍不會產生急性逃逸的行為。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)來產生止痛藥效，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後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)的名稱相似，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。

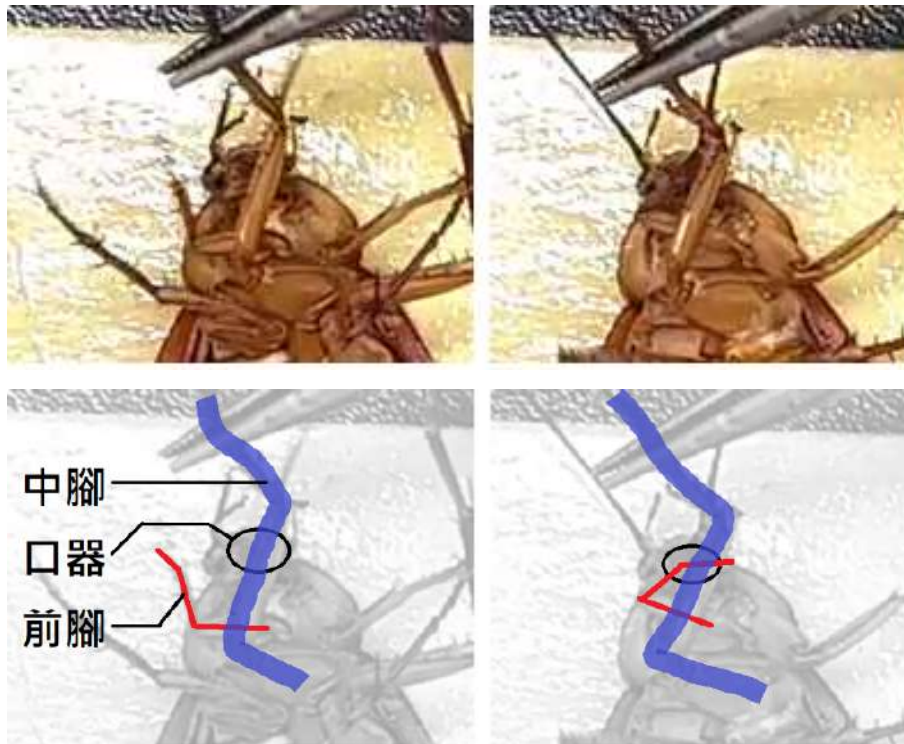


圖二 蟑螂啃食其右前步足的照片。

我們偶然注意到蟑螂對不同步足表現出不同的自噬行為頻率，部分個體在實驗的過程中，會自己舉起前肢並將腿節咬斷，並開始啃咬、吃下離體的前腳(圖三)，但若以中腳步足作為啃咬對象部位，有時會產生阻擋的行為(圖四)，我們想到這可能代表蟑螂體表的痛覺受器分布不均勻，我們的假說為：前腳不具有痛覺受體，但中腳有，且中腳受損可引發痛覺。我們擬以蟑螂的自噬行為作為動物模式，用於研究昆蟲的痛覺，並探討痛覺受器的分布性質；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 蟑螂舉起前肢並將腿節咬斷，並開始啃咬、吃下離體的前腳。

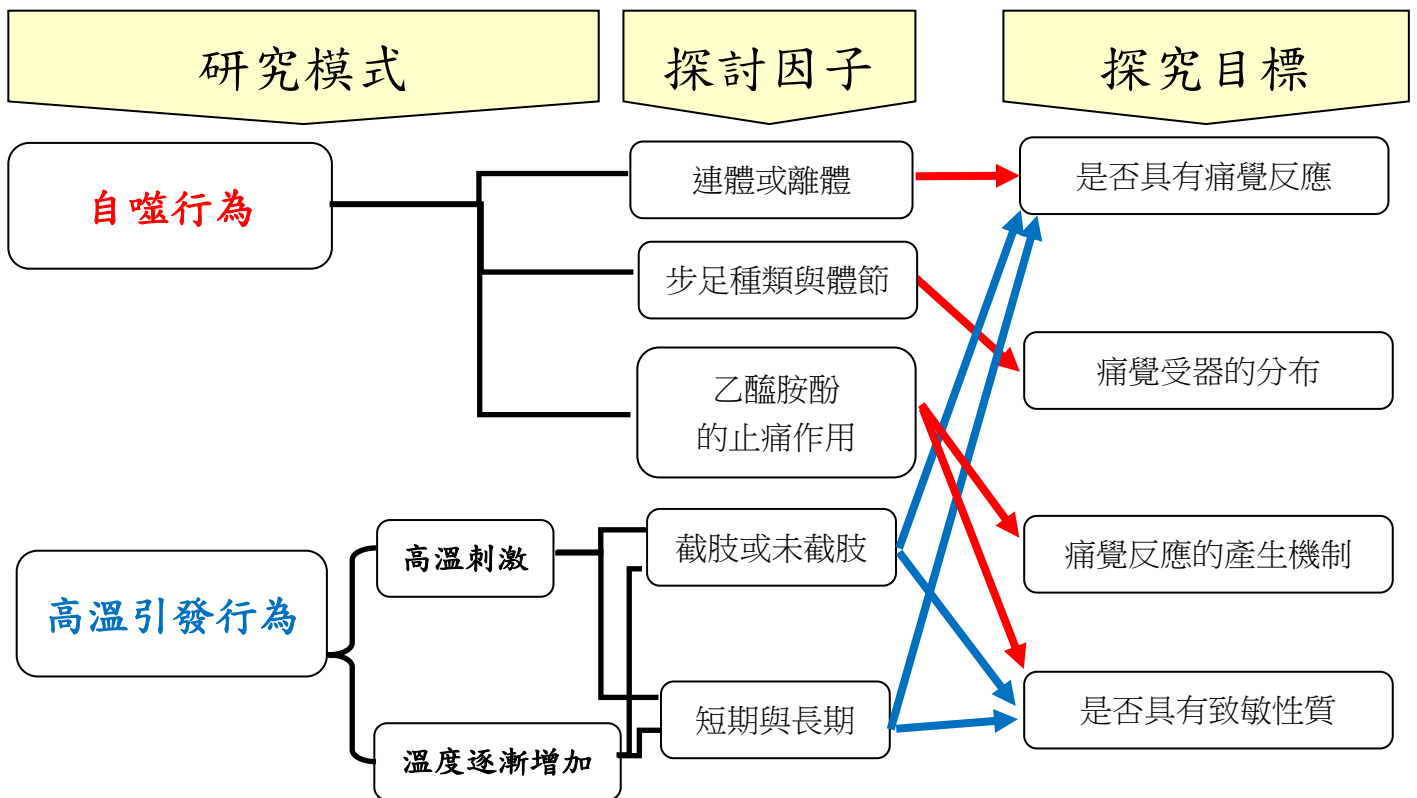


圖四 拉近蟑螂中腳放入口器時，有時可觀察到前腳阻擋中腳，而將中腳推開的行為。

貳、研究目的

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動物模式，檢驗蟑螂是否具有痛覺反應，並探討痛覺受器的分布情形。
- 二、探討將中腳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之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反應，以探討引發特定行為溫度閾值變化，進而比較截肢後的致敏性質。



圖五 本研究的實驗架構。

參、研究設備及器材

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	臺糖	

二、實驗動物

本研究所使用的實驗動物為於校園內飼養的美洲蟑螂(*American cockroach*，學名：*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 公分的雄性成蟲，每隻實驗動物皆僅進行一次實驗，實驗後不再重複使用。

肆、研究過程或方法

一、建立誘發性自噬行為，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

將蟑螂以背部朝下、六腳朝上的姿勢，貼附於貼紙上，並以膠帶將其雙翅固定(圖六)。以鑷子輕夾其前腳步足或中腳步足，拉至口器附近，並以其步足觸碰口器，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，所以稱之為誘發性自噬行為(**induced self-cannibalism**)。

初期的實驗是將只有將啃食的部位對象分成腿節、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些微差異。為了提高實驗的精確度，則設計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)，脛節的啃咬部位在其中央處，跗節的啃咬部位在末端處(圖七)。



圖六 固定蟑螂的方式。



圖七 蟑螂的步足結構，與本實驗進行誘發性自噬行為的啃咬對象部位。

本研究參考 *Khuong, et al.(2019)* 的果蠅實驗，以前腳與中腳步足作為誘發性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加強固定，待其甦醒並休息 10 分鐘後，以連體左前/中腳的腿、脛、跗節分別嘗試誘發產生自噬行為，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/中腳嘗試誘發產生自噬行為，重複上述步驟。後腳因距離口器較遠，容易在操作時發生自發性截肢，故不採用。

本研究的量化方式，是透過實驗時錄製的影片，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所花的時間)，作為蟑螂足部各部位是否有痛覺的指標。

二、將中腳拉至口器附近的操作是否會影響誘發性自噬行為的表現

上述的誘發性自噬行為的操作中，操作組須將中腳拉至口器附近，為確認「將中腳拉至口器附近」的操作對誘發性自噬行為是否具有效應，我做了以下實驗：將固定後的蟑螂，單側中腳以連體方式進行誘發性自噬行為實驗，同時將另一側的中腳以鑷子拉至口器附近，隨後將單側中腳取下，以離體的中腳進行離體方式的誘發性自噬行為實驗，另一側的中腳仍維持被鑷子拉至口器附近的姿勢。最後測量此兩操作組中腳之腿節、脛節、跗節的啃咬反應比率與啃咬時間。

三、餵食乙醯胺酚對誘發式自噬行為的效應

為避免注射藥劑對蟑螂的痛覺反應具有干擾，本實驗決定利用餵食的方式投藥。先配置 10% 蔗糖溶液，再用 10% 蔗糖溶液配置 1% 乙醯胺酚溶液。蟑螂分為對照組與實驗組兩組，以餵食 10% 蔗糖溶液作為對照組，以餵食含 1% 乙醯胺酚的蔗糖溶液作為實驗組，以棉花棒沾附餵食之藥劑，觸碰蟑螂口器引發吸吮反射使藥劑被蟑螂食入，使蟑螂吸吮 30 秒。待蟑螂食入藥劑後 20 分鐘，以中腳的腿節進行誘發性自噬行為實驗，並測量此兩組蟑螂對中腳腿節的啃咬反應比率與啃咬時間。

四、中腳步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，分為蟑螂中腳步足的腿節中央或脛節中央截肢兩組，截肢後將蟑螂單獨放於培養皿中。每隻個體分別在截肢前、截肢後、截肢後一天、截肢後三天、截肢後五天、截肢後七天，將含蟑螂的培養皿漂浮於在 42°C 的溫水上，並以攝影機記錄蟑螂在熱板(hot plate)上的行為反應(記錄 5 分鐘)。之後觀看記錄的影片，分析的量化指標包含計算以下行為的次數：清潔其他步足、清潔斷肢、清潔觸角、其他步足舉起、斷肢舉起、身體抖動以及身體跳躍等行為。

各行為指標皆是以截肢前的行為表現作為對照組，每隻個體皆以截肢前的行為表現頻率作為參照，計算出各行為頻率的變化比率(%), 再比較各行為指標在截肢後、截肢後一天、截肢後三天、截肢後五天、截肢後七天的變化程度。

五、中腳步足截肢後於溫度隨時間逐漸升高的介質上，引發各種行為所需的溫度改變量比較

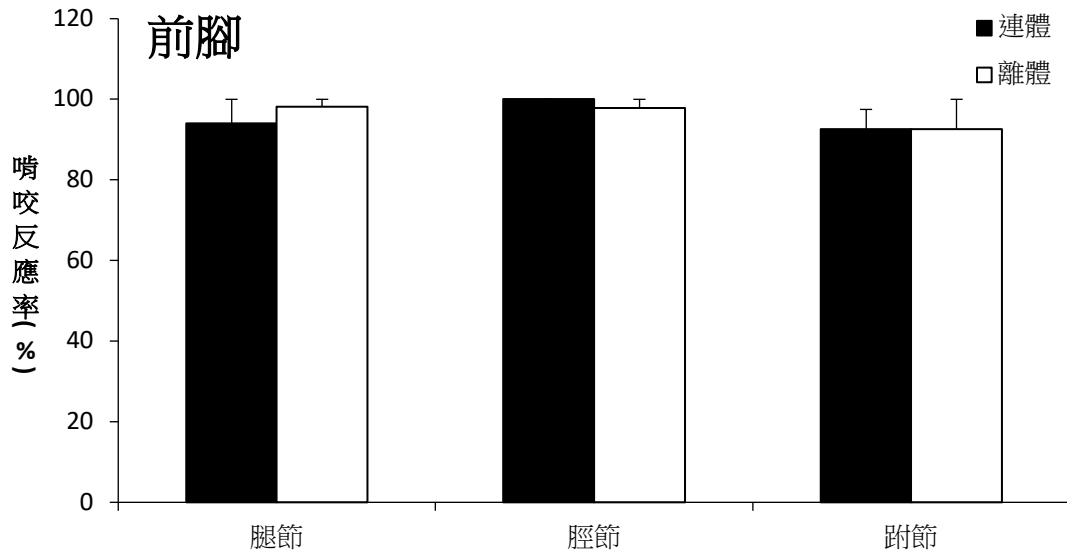
類似第三點的實驗方法，將蟑螂中腳步足的腿節中央截肢後，將蟑螂單獨放於培養皿中。每個個體分別在截肢前、截肢後、截肢後二天、截肢後四天、截肢後七天，將含蟑螂的培養皿漂浮於在室溫水上，並逐漸加溫，並以攝影機記錄蟑螂的行為反應(記錄 5 分鐘)。記錄個體產生以下行為時的水溫：清潔其他步足、清潔斷肢、清潔觸角、其他步足舉起、斷肢舉起、身體抖動以及身體跳躍等。最後計算引發上述行為所需的「溫度增加量(°C)」。另以完整健康的個體進行一樣的操作作為對照組，最後計算出：相對於對照組，引發特定行為所需的溫度增加量。

伍、研究結果

一、螳螂對連體或離體的步足產生自噬行為的反應率與時間

(一)、前腳步足各節的啃咬反應率(圖六)

比較前腳的啃咬反應率，無論是連體還是連體的步足，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，且各組之間不具差異。



圖六 螳螂對連體或離體前腳之腿節、脛節、跗節的啃咬反應率(%)(平均 ± 標準誤，取樣數各為 10 隻)。

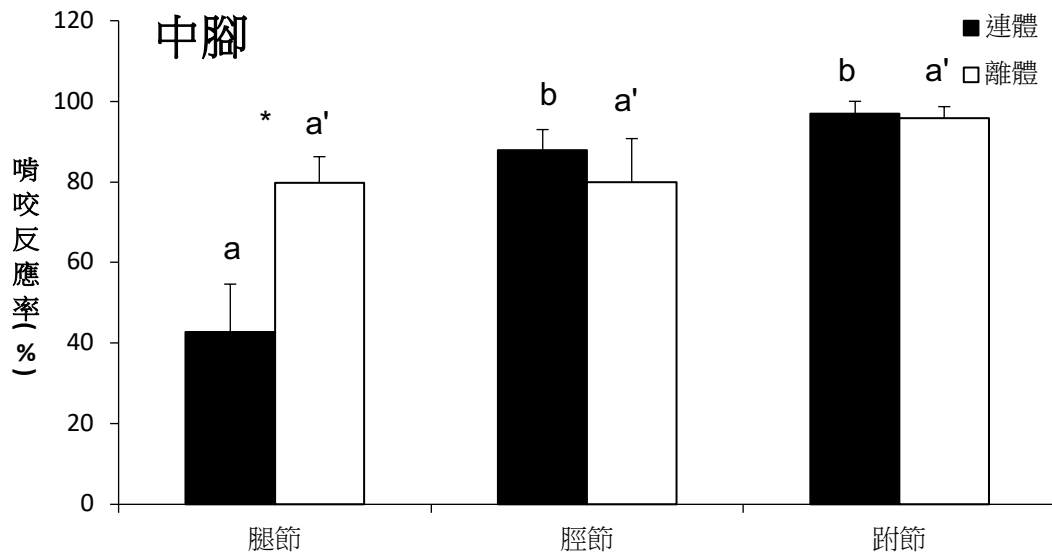
連體與離體比較：未達統計顯著差異(單尾配對 t 檢定， $\alpha=0.05$)

與腿節組相比：未達統計顯著差異(單尾配對 t 檢定， $\alpha=0.05$)

與脛節組相比：未達統計顯著差異(單尾配對 t 檢定， $\alpha=0.05$)

(二)、中腳步足各節的啃咬反應率(圖七)

比較中腳的啃咬反應率，連體的腿節明顯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。代表中腳腿節較為敏感，較不易產生誘發性自噬行為。



圖七 蟑螂對連體或離體中腳之腿節、脛節、跗節的啃咬反應率(%)(平均 ± 標準誤，取樣數各為 12 隻)。

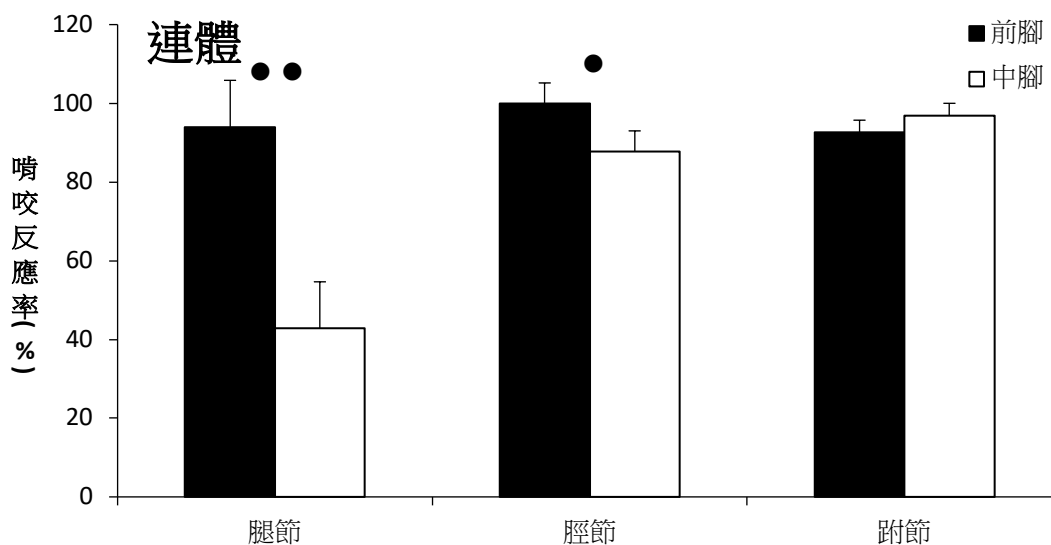
連體與離體比較：* : $p < 0.05$ (單尾配對 t 檢定)

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， $\alpha = 0.05$)

與腿節組相比：a'間未達統計顯著差異(單尾配對 t 檢定， $\alpha = 0.05$)

(三)、比較前腳與中腳連體步足各節的啃咬反應率(圖八)

比較前腳與中腳步足，可發現中腳腿節與脛節的啃咬反應率皆低於前腳，跗節則不具差異。其中中腳腿節的啃咬反應率是最低的，代表中腳腿節對於啃咬的刺激最敏感。

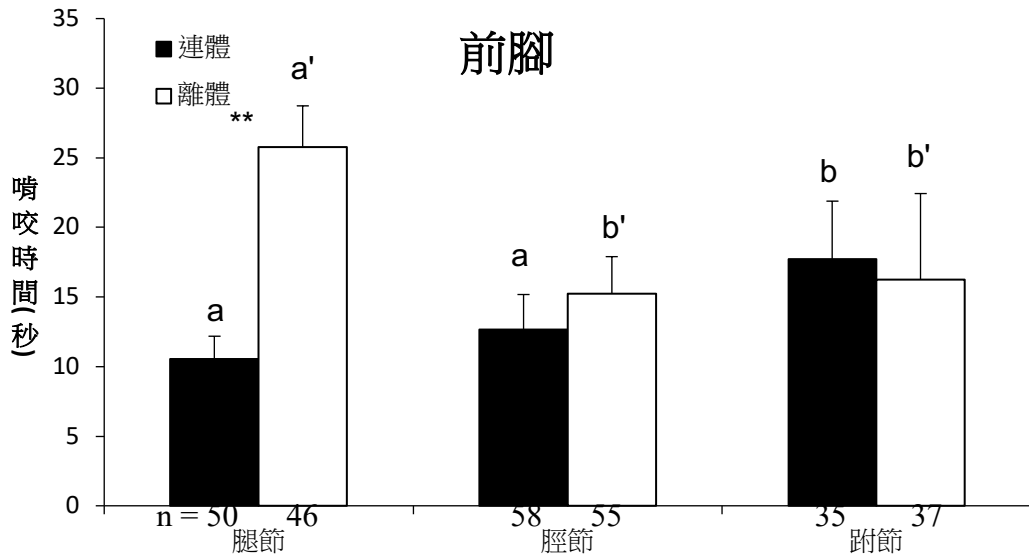


圖八 蟑螂對連體前腳、中腳之腿節、脛節、跗節的啃咬反應率(%)(平均 ± 標準誤，取樣數各為 10、12 隻個體)。

前腳與中腳比較：● : $p < 0.05$; ●● : $p < 0.01$ (單尾配對 t 檢定)

(四)、比較前腳步足各節的啃咬時間(圖九)

比較蟑螂啃咬前腳連體或離體步足的各節的啃咬時間，發現除了離體腿節的啃咬時間較長之外，其他各組差異不大。若將離體前腳作為對照組，以消除各節長度、厚度或外骨骼堅硬程度對啃咬實驗的效應，發現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，使誘發性自噬行為的時間較短。



圖九 蟑螂對連體或離體前腳之腿節、脛節、跗節的啃咬時間(秒)(平均 \pm 標準誤，各為 10，n = 取樣數)。

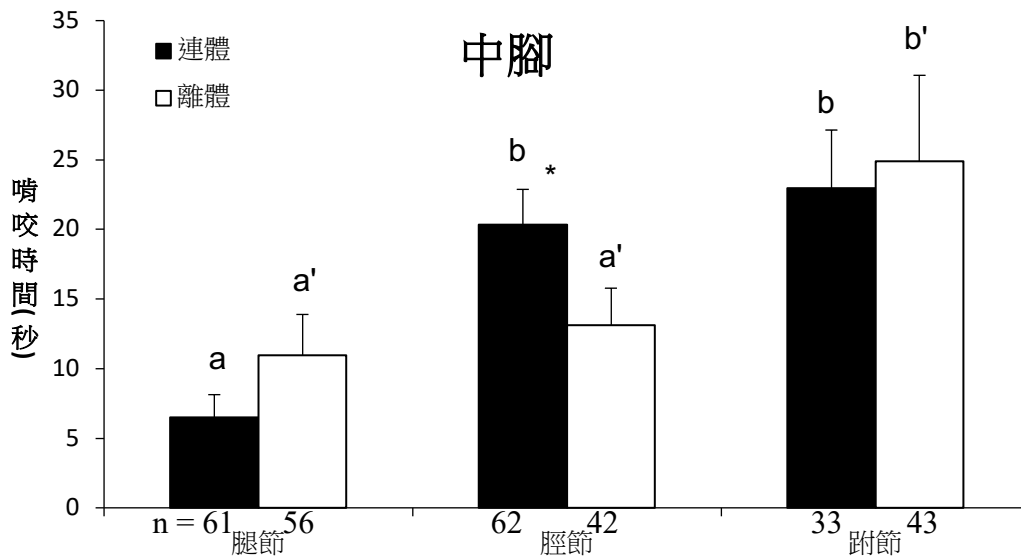
連體與離體比較：** : $p < 0.01$ (單尾配對 t 檢定)

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， $\alpha = 0.05$)

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

(五)、比較中腳步足各節的啃咬時間(圖十)

比較蟑螂啃咬中腳連體或離體步足的各節的啃咬時間，發現連體脛節與跗節，以及離體跗節的啃咬時間較長，其他各組啃咬時間較短。若將離體中腳作為對照組，以消除各節長度、厚度或外骨骼堅硬程度對啃咬實驗的效應，發現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 蟑螂對連體或離體中腳之腿節、脛節、跗節的啃咬時間(秒)(平均 ± 標準誤，各為 12 隻，n = 取樣數)。

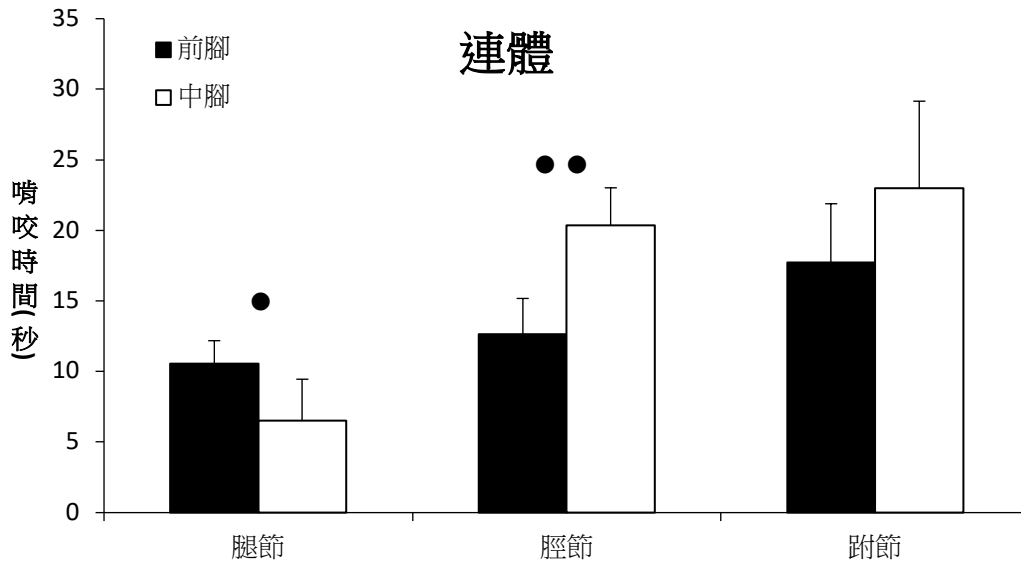
連體與離體比較：*： $p < 0.05$ (單尾配對 t 檢定)

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， $\alpha = 0.05$)

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

(六)、比較前腳與中腳連體步足各節的啃咬時間(圖十一)

若比較連體前腳與中腳的啃咬時間，發現啃咬中腳腿節的時間短於前腳，啃咬前腳脛節的時間短於中腳，代表中腳腿節的敏感度可能大於前腳前腳，前腳脛節的敏感度可能大於中腳脛節，而使得誘發性自噬行為的時間較短。

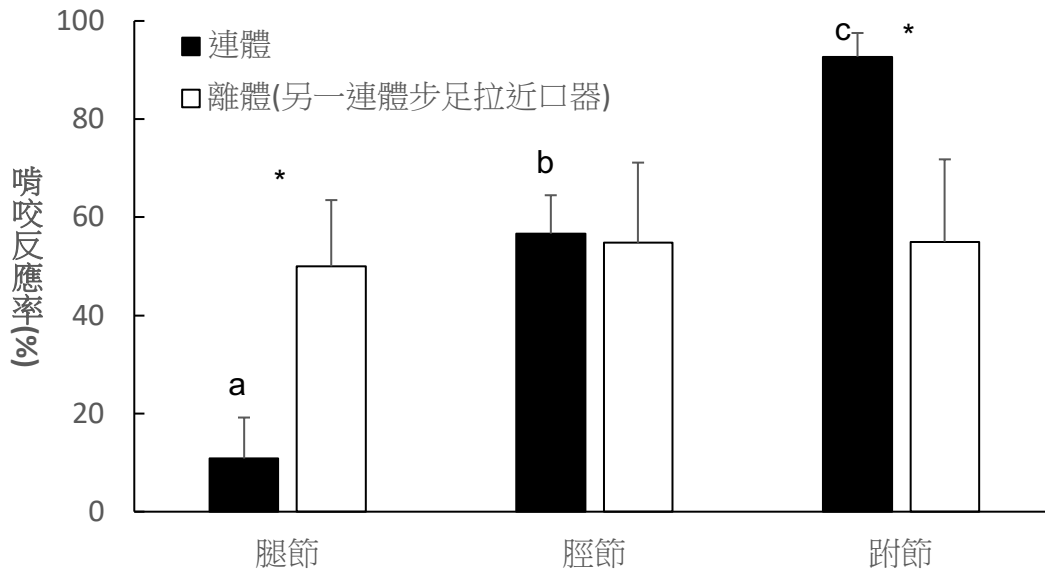


圖十一 蟑螂對連體前腳、中腳之腿節、脛節、跗節的啃咬時間(秒)(平均 ± 標準誤，取樣數如前圖)。

前腳與中腳比較：●： $p < 0.05$ ；●●： $p < 0.01$ (單尾配對 t 檢定)

二、將中腳拉至口器附近的操作對誘發性自噬行為的效應

若比較中腳拉至口器附近，同時進行離體中腳的誘發性自噬行為，其對腿節與跗節的啃咬反應率大於連體操作組(圖十二)，與圖七中僅有腿節的啃咬反應率大於連體操作組略有不同；若比較啃咬時間，對腿節與跗節的啃咬時間長於連體操作組(圖十三)，與圖十中僅有連體脛節的啃咬時間長於離體操作組亦有不同。上述實驗結果指出將中腳拉至口器附近確實會影響誘發性自噬行為的表現。

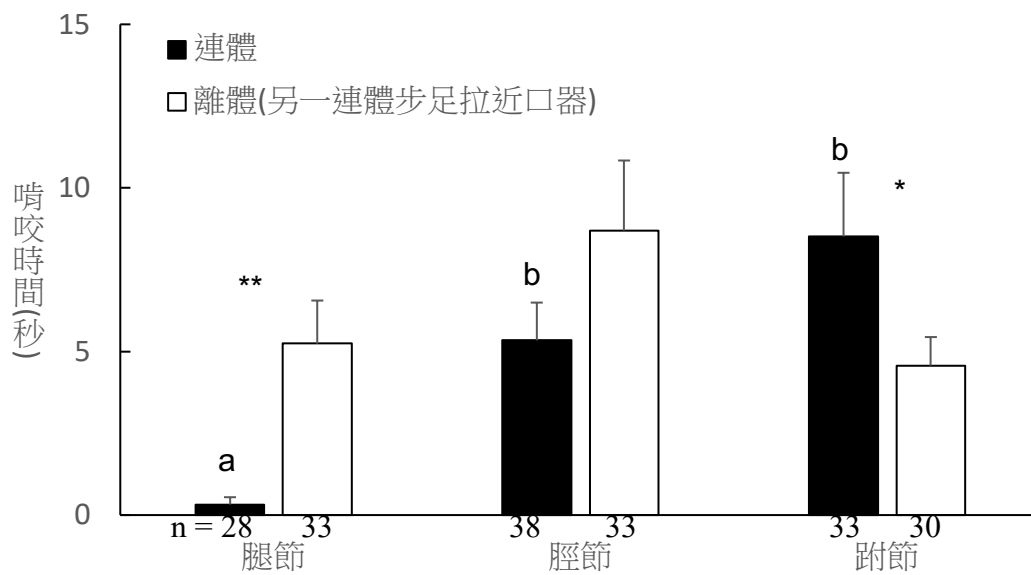


圖十二 蟑螂對連體與離體(另一連體中腳拉近口器)中腳之腿節、脛節、跗節的啃咬反應率(%) (平均 ± 標準誤, 8 隻個體)。

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, $\alpha = 0.05$)

離體組：未達統計顯著差異(單尾配對 t 檢定, $\alpha = 0.05$)



圖十三 蟑螂對連體或離體前腳之腿節、脛節、跗節的啃咬時間(秒)(平均 ± 標準誤, 8 隻個體, n = 取樣數)。

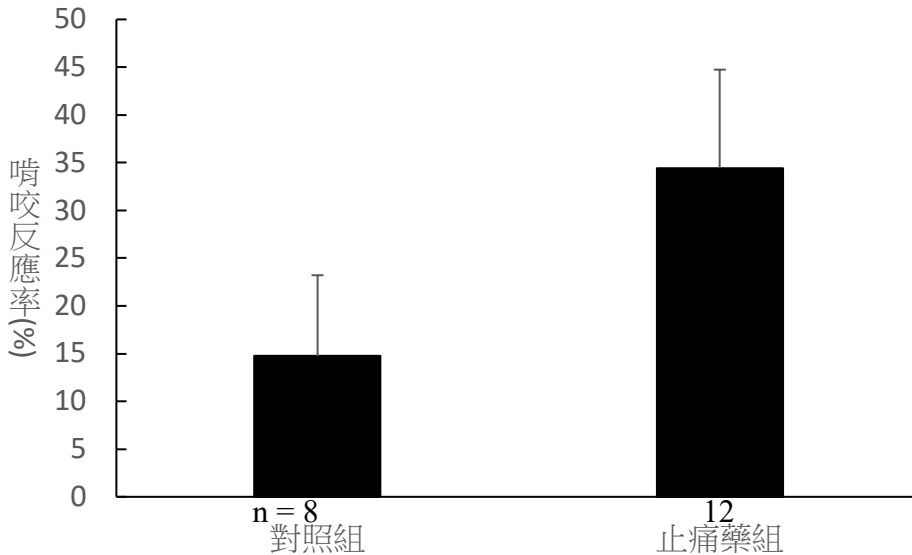
連體與離體比較：* : $p < 0.05$; ** : $p < 0.01$ (單尾 t 檢定)

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

離體組：未達統計顯著差異(單尾 t 檢定, $\alpha = 0.05$)

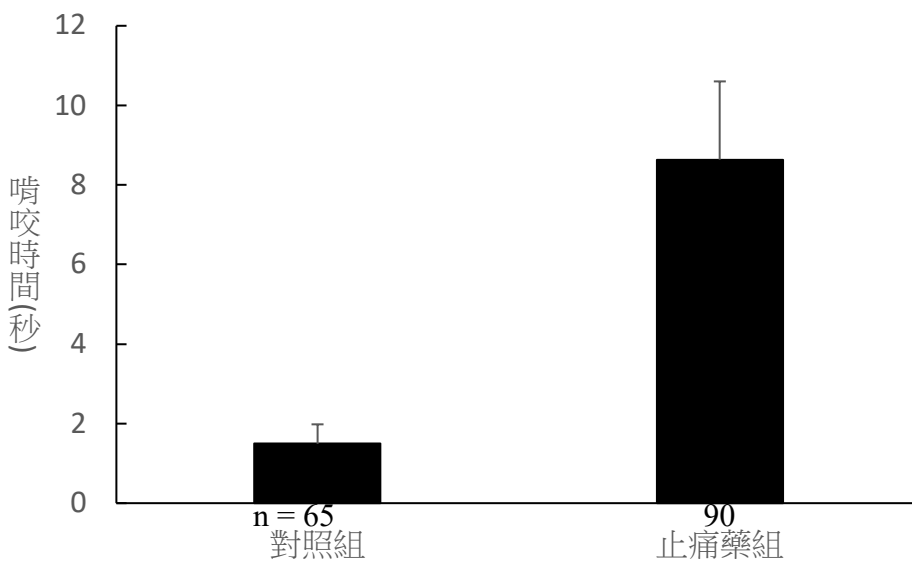
三、餵食乙醯胺酚對誘發式自噬行為的效應

餵食乙醯胺酚的蟑螂，對中腳腿節之誘發式自噬行為的啃咬反應率增加(圖十四)，也可增加啃咬時間(圖十五)，顯示乙醯胺酚可發揮止痛的效果，增加了誘發式自噬行為的程度。若分析單一誘發式自噬行為的表現，比較第 1 至第 7 次的啃咬反應率與啃咬時間，發現餵食乙醯胺酚後，啃咬反應率圖十六(a)與啃咬時間圖十六(b)皆逐漸增加，代表蟑螂在止痛藥效發揮後，在經過幾次自噬行為的嘗試，隨後會增加啃咬中腳腿節的意願。



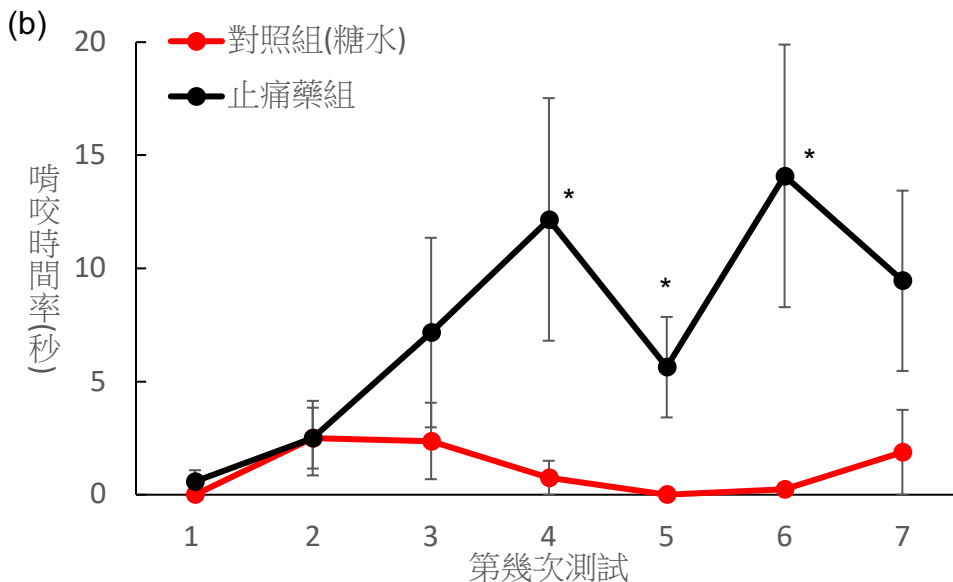
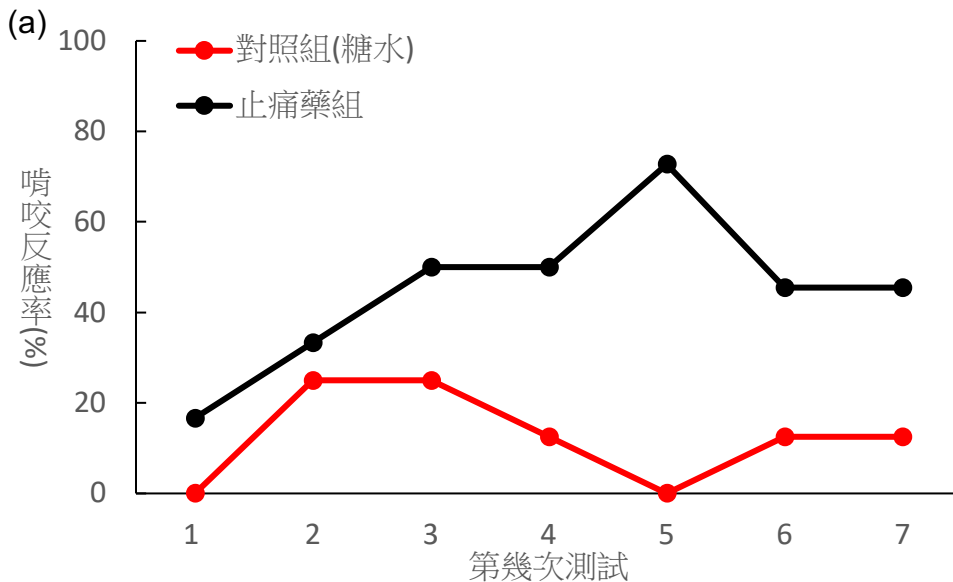
圖十四 餵食乙醯胺酚後對中腳腿節啃咬反應率的效應(平均 \pm 標準誤， n = 取樣個體數)。

卡方檢定， $p = 0.005$ (單尾 t 檢定， $p = 0.094$)



圖十五 餵食乙醯胺酚後對中腳腿節啃咬時間的效應(平均 \pm 標準誤， n = 取樣數)。

單尾 t 檢定， $p = 0.00033$



圖十六 餵食乙醯胺酚後對中腳腿節(a)啃咬反應率與(b)啃咬時間的效應(平均 \pm 標準誤，取樣數如圖十四、十五)。
與對照組相比(單尾 t 檢定)：* : $p < 0.05$ 。

四、中腳步足截肢後於溫熱介質上對各種行為發生頻率的效應

蟑螂進行中腳截肢後，切除脛節的「清潔其他步足」行為增加程度，多於切除腿節組，代表切除脛節會增加清潔其他步足的行為，切除腿節反而會減少。且這樣的趨勢在節肢後七天內皆為如此(圖十七)。

蟑螂進行中腳截肢後，切除腿節或脛節都會引發「清潔斷肢」的行為增加，但一天後就恢復發生頻率了，第七天切除腿節組「清潔斷肢」的行為又再度增加(圖十八)。

蟑螂進行中腳截肢後，切除脛節都會引發「清潔觸角」的行為增加，但切除腿節組則無(圖十九)。

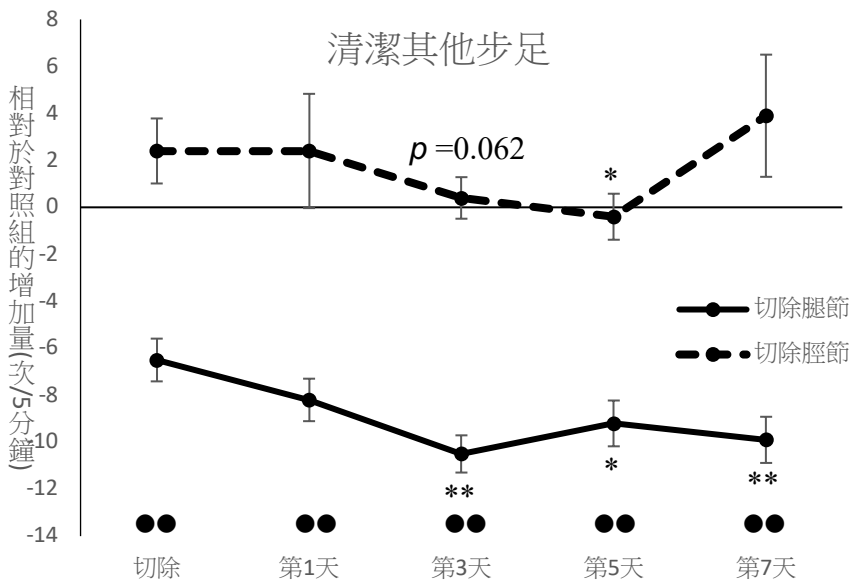
蟑螂進行中腳截肢後，切除脛節都會引發「其他步足舉起」的行為增加，但隨後就減少

了，切除腿節組的「其他步足舉起」行為在截肢後七天內皆為減少的狀態(圖二十)。

蟑螂進行中腳截肢後，切除腿節與脛節都會引發「斷肢舉起」的行為增加，但隨後就減少了(圖二十一)。

蟑螂進行中腳截肢後，切除腿節會引發「身體抖動」的行為增加，而切除脛節會引發「身體抖動」的行為增加。且在截肢後七天內皆維持這樣的狀態(圖二十二)。

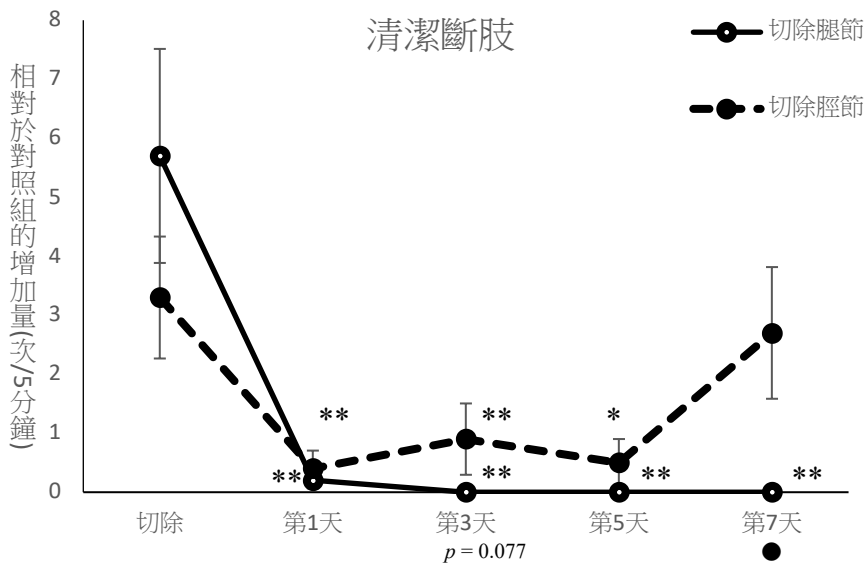
蟑螂進行中腳截肢後，切除腿節與脛節皆會引發「身體抖動」的行為增加，但在截肢後第三天，切除腿節組的「身體抖動」行為增加，同時切除脛節組減少，使得兩組之間出現差異(圖二十三)。



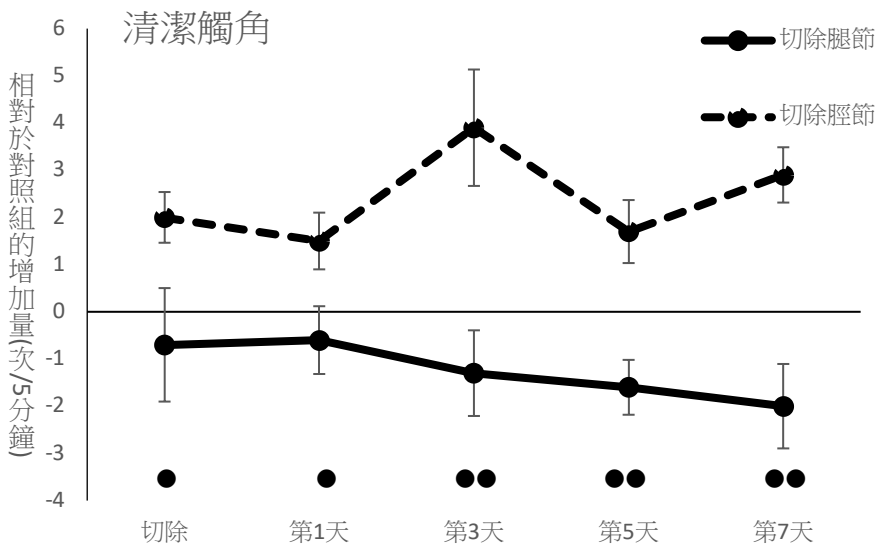
圖十七 切除蟑螂中腳腿節或脛節後，相對於對照組(切除前)在溫水上表現「清潔其他步足」的行為頻率的增加量(平均 ± 標準誤，各為 10 隻)。

與切除時比較：* : $p < 0.05$ 、** : $p < 0.01$ (單尾配對 t 檢定)

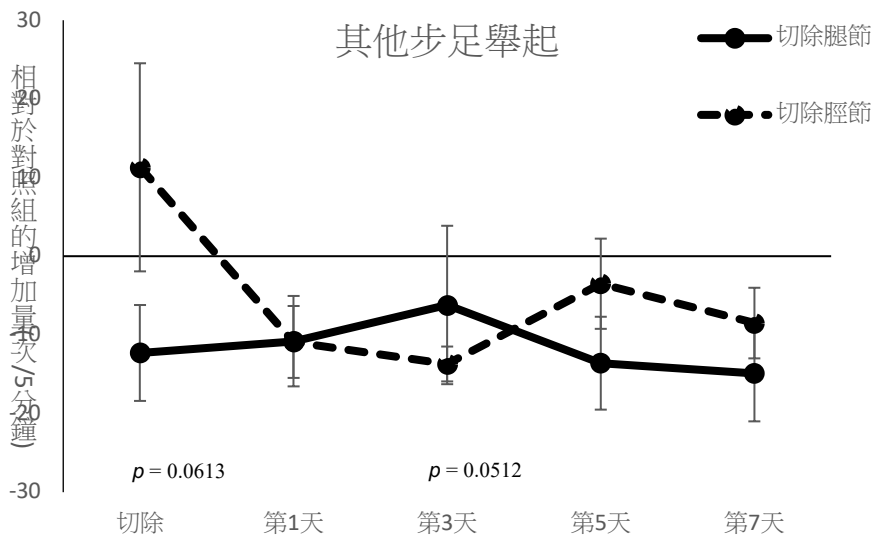
切除腿節與切除脛節組比較：● : $p < 0.05$ 、●● : $p < 0.01$ (單尾 t 檢定)



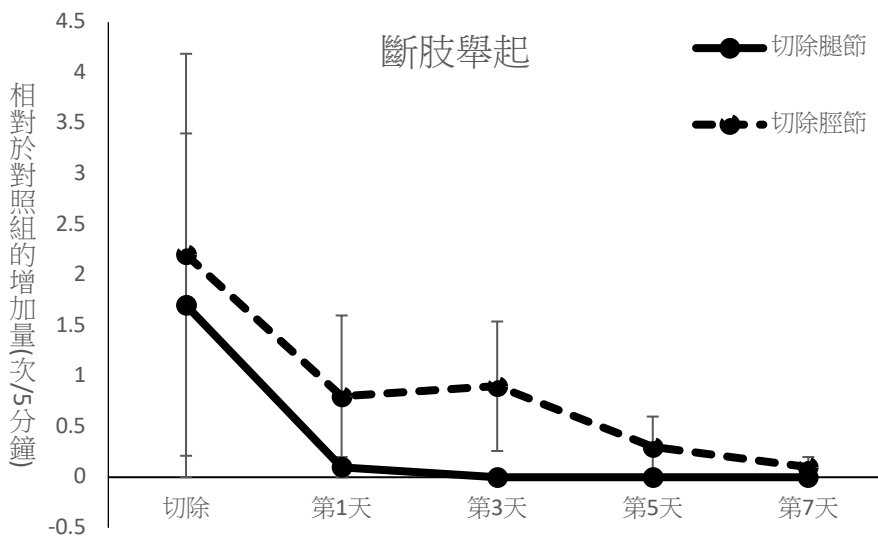
圖十八 切除蟑螂中腳腿節或脛節後，相對於對照組(切除前)在溫水上表現「清潔斷肢」的行為頻率的增加量(平均 ± 標準誤，各為 10 隻)。
 與切除時比較：* : $p < 0.05$ 、** : $p < 0.01$ (單尾配對 t 檢定)
 切除腿節與切除脛節組比較：● : $p < 0.05$ (單尾 t 檢定)



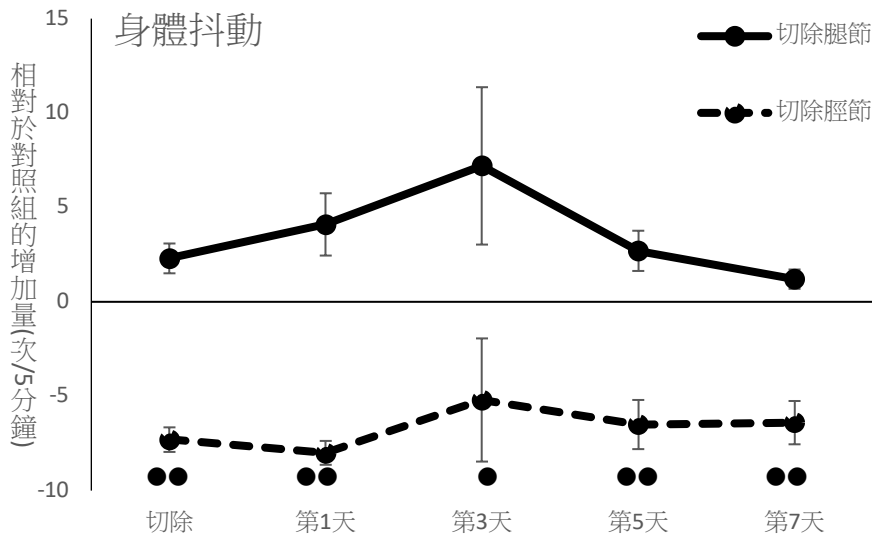
圖十九 切除蟑螂中腳腿節或脛節後，相對於對照組(切除前)在溫水上表現「清潔觸角」的行為頻率的增加量(平均 ± 標準誤，各為 10 隻)。
 與切除時比較：皆未達統計顯著差異(單尾配對 t 檢定)
 切除腿節與切除脛節組比較：● : $p < 0.05$ 、●● : $p < 0.01$ (單尾 t 檢定)



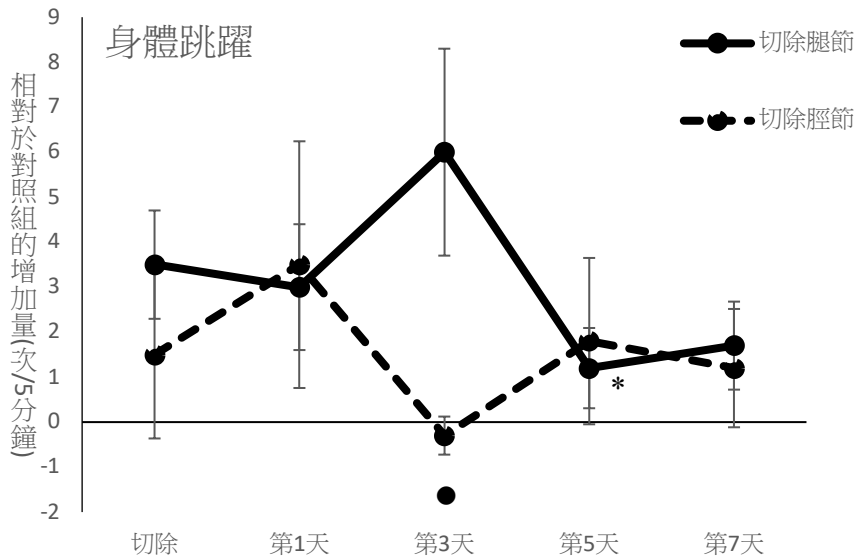
圖二十 切除蟑螂中腳腿節或脛節後，相對於對照組(切除前)在溫水上表現「其他步足舉起」的行為頻率的增加量(平均 ± 標準誤，各為 10 隻)。
 與切除時比較：皆未達統計顯著差異(單尾配對 t 檢定)
 切除腿節與切除脛節組比較：皆未達統計顯著差異(單尾 t 檢定)



圖二十一 切除蟑螂中腳腿節或脛節後，相對於對照組(切除前)在溫水上表現「斷肢舉起」的行為頻率的增加量(平均 ± 標準誤，各為 10 隻)。
 與切除時比較：皆未達統計顯著差異(單尾配對 t 檢定)
 切除腿節與切除脛節組比較：皆未達統計顯著差異(單尾 t 檢定)



圖二十二 切除蟑螂中腳腿節或脛節後，相對於對照組(切除前)在溫水上表現「身體抖動」的行為頻率的增加量(平均 \pm 標準誤，各為 10 隻)。
 與切除時比較：皆未達統計顯著差異(單尾配對 t 檢定)
 切除腿節與切除脛節組比較：●： $p < 0.05$ 、●●： $p < 0.01$ (單尾 t 檢定)



圖二十三 切除蟑螂中腳腿節或脛節後，相對於對照組(切除前)在溫水上表現「身體跳躍」的行為頻率的增加量(平均 \pm 標準誤，各為 10 隻)。
 與切除時比較：*： $p < 0.05$ (單尾配對 t 檢定)
 切除腿節與切除脛節組比較：●： $p < 0.05$ (單尾 t 檢定)

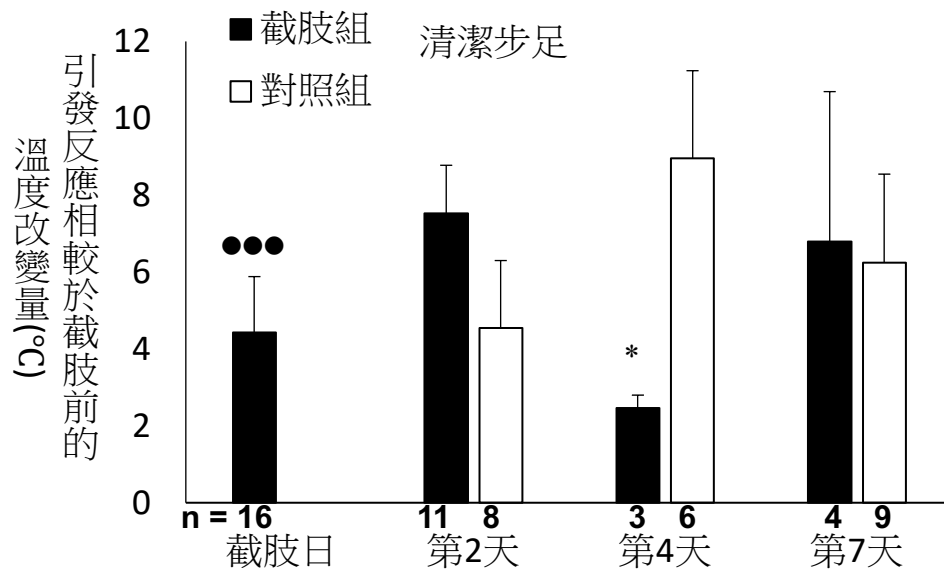
五、中腳步足截肢後於溫度隨時間逐漸升高的介質上，引發各種行為所需的溫度改變量比較
 螳螂進行中腳截肢後，在第 4 天時，螳螂清潔步足的行為對溫度的改變比未截肢時更為
 敏感(溫度增加的幅度小於對照組即引發行為反應)(圖二十四)。

螳螂進行中腳截肢後，在第 2 天時，螳螂清潔觸角的行為對溫度的改變比未截肢時更為
 敏感(溫度增加的幅度小於對照組即引發行為反應)(圖二十五)。

螳螂進行中腳截肢後，步足舉起的行為對溫度的改變與未截肢沒有明顯差異(圖二十
 六)。

螳螂進行中腳截肢後，在第 2、4 天時，螳螂執行較大動作的行為(身體抖動)動機下降
 (溫度增加的幅度需大於對照組，才引發行為反應)(圖二十七)。

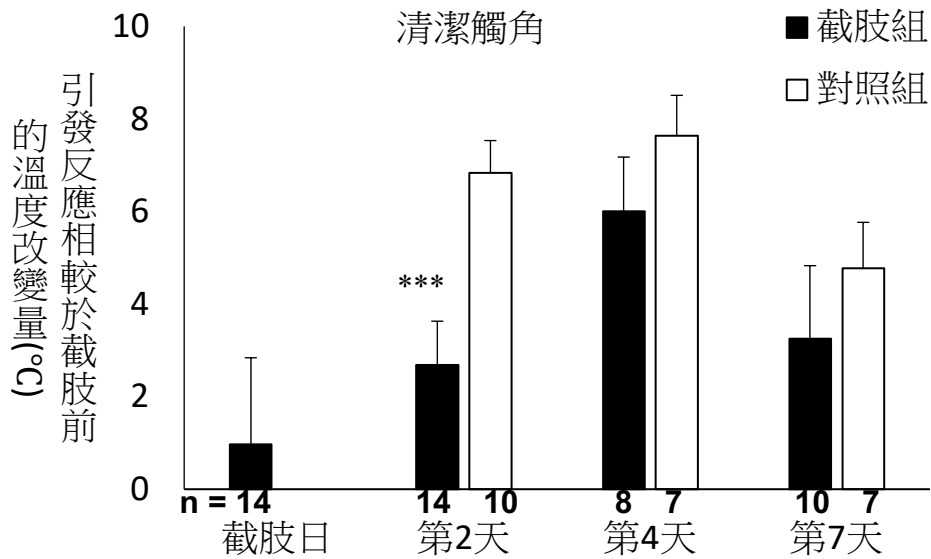
螳螂進行中腳截肢後，在第 2、4 天時，螳螂執行較大動作的行為(身體跳躍)動機下降
 (溫度增加的幅度需大於對照組，才引發行為反應)(圖二十八)。



圖二十四 相較於截肢前(第 0 天)的溫度增加量，溫度增加而可引發「清潔步足」的溫度增加幅度(°C，平均 ± 標準誤，截肢組為 30 隻，對照組為 20 隻，n = 收集到的資料筆數)。

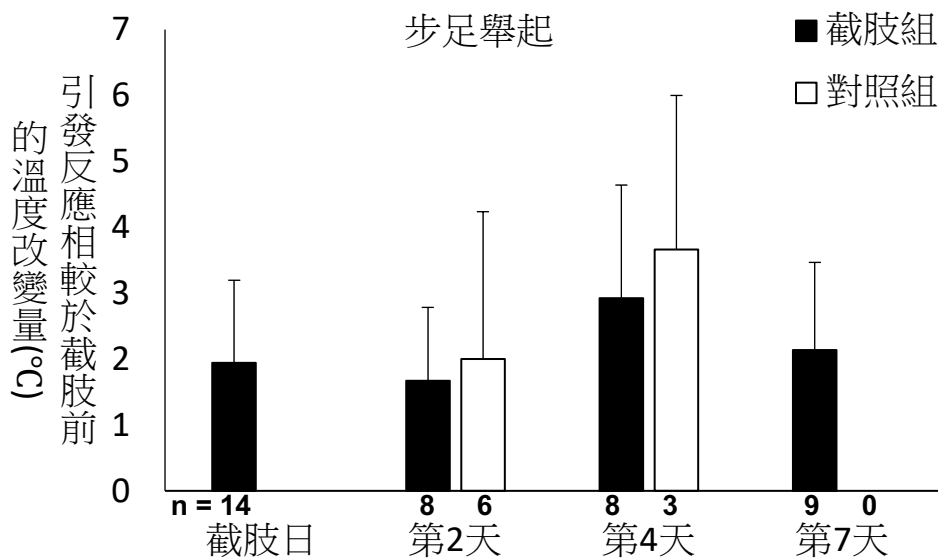
與對照組相比：* : $p < 0.05$ (單尾配對 t 檢定)

與 0 相比：●●● : $p < 0.005$ (單尾 z 檢定)



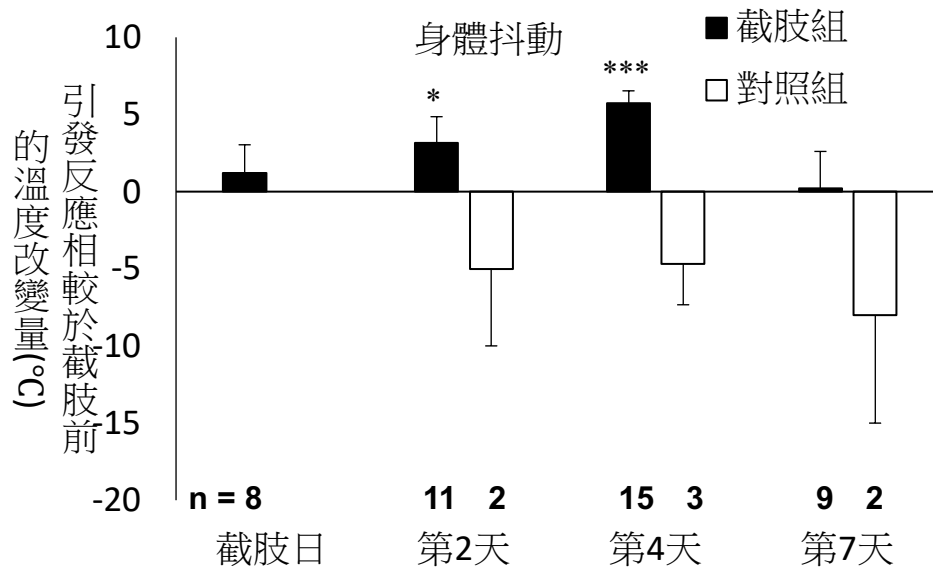
圖二十五 相較於截肢前(第0天)的溫度增加量，溫度增加而可引發「清潔觸角」的溫度增加幅度(°C，平均 ± 標準誤，截肢組為 30 隻，對照組為 20 隻，n=收集到的資料筆數)。

與對照組相比：*** : $p < 0.005$ (單尾配對 t 檢定)



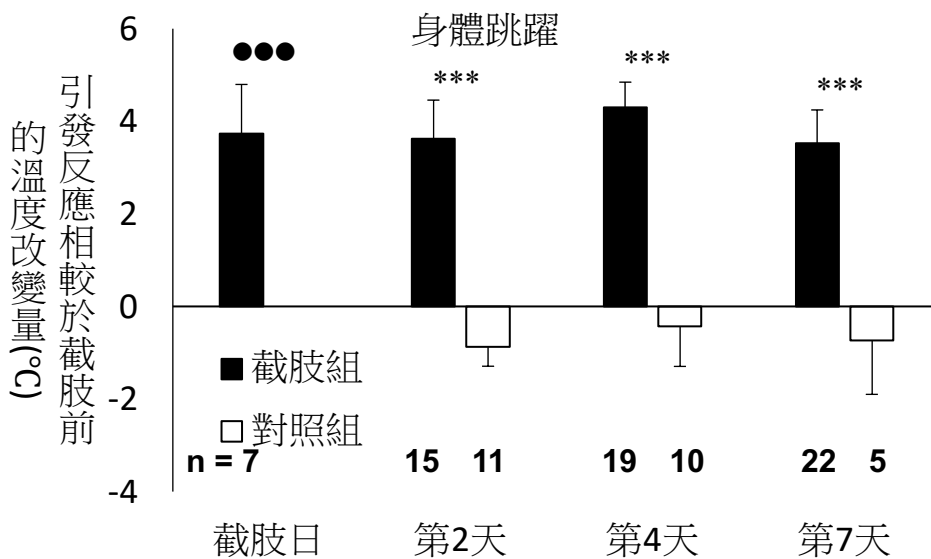
圖二十六 相較於截肢前(第0天)的溫度增加量，溫度增加而可引發「步足舉起」的溫度增加幅度(°C，平均 ± 標準誤，截肢組為 30 隻，對照組為 20 隻，n=收集到的資料筆數)。

與對照組相比：未達統計顯著差異 (單尾配對 t 檢定)



圖二十七 相較於截肢前(第 0 天)的溫度增加量，溫度增加而可引發「身體抖動」的溫度增加幅度(°C，平均 ± 標準誤，截肢組為 30 隻，對照組為 20 隻，n=收集到的資料筆數)。

與對照組相比：* : $p < 0.05$; *** : $p < 0.005$ (單尾配對 t 檢定)



圖二十八 相較於截肢前(第 0 天)的溫度增加量，溫度增加而可引發「身體跳躍」的溫度增加幅度(°C，平均 ± 標準誤，截肢組為 30 隻，對照組為 20 隻，n=收集到的資料筆數)。

與對照組相比：*** : $p < 0.005$ (單尾配對 t 檢定)

與 0 相比：●●● : $p < 0.005$ (單尾 z 檢定)

陸、討論

本研究成功建立以誘發性自噬行為(induced self-cannibalism)的動物模式，記錄前腳與中腳步足中腿節、脛節與跗節引發自體啃咬的反應率與時間，以探討痛覺受體分布的可能位置。另也參考 Khuong, *et al.*(2019)的果蠅實驗，建立步足截肢蟑螂置於溫熱(42°C)介質的急性與慢性行為反應，行為指標包含清潔其他步足、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行為。本研究發現誘發性自噬行為中，啃咬中腳腿節的反應率僅有約四成，遠低於前、中腳的其他各節，具「抑制造成身體損傷」性質，且在食入、吸收止痛藥劑(乙醯胺酚)後，可增加啃咬中腳腿節的反應率與時間，代表誘發性自噬行為的抑制現象應是由痛覺所引起的。中腳截肢步足後的蟑螂給予熱刺激時，產生「遠離可能造成身體損傷之刺激源的」行為；腿節截肢的個體產生身體抖動與身體跳躍等行為增強的現象，也表現出持續性或晚發性，顯示蟑螂步足應具急性與慢性疼痛的感覺。此外，在溫度漸增的實驗發現中腳截肢的個體，展現「敏感化」與「行為動機下降」等行為表現。

國際疼痛研究協會分類學小組委員會(International Association for the Study of Pain, IASP, 1979)於 1979 年將疼痛作出了以下定義：因實際或潛在的組織損傷，或因對傷害的陳述，所引發之相關的不愉快的感覺和情緒體驗(An unpleasant sensory and emotional experience associated with actual or potential tissue damage, or described in terms of such damage)。且疼痛是主觀的，可隨著個體的身體狀態和的精神狀態而變化(Merskey, 1991)。依據這個定義，因無法測量昆蟲的情緒反應，所以常以「負向的感覺」作為研究指標，而以「抑制造成身體損傷之行為」或促進「遠離可能造成身體損傷的刺激源」研究昆蟲痛覺時，作為行為量化的指標。

本研究發現蟑螂自體啃咬前腳步足中的腿節、脛節與跗節，各啃咬反應率皆超過九成，但中腳步足腿節僅有約四成，這可解釋成啃咬中腳步足的腿節，會產生「抑制造成身體損傷之行為」，也就是避免或停止啃咬。若比較各步足中腿節、脛節與跗節的啃咬時間，發現前腳步足腿節與中腳步足脛節具有連體與離體間的差異，代表具有一定程度的感覺輸入，使誘發性自噬行為的時間較短。

在操作的過程中，發現部分個體會產生自發性的自噬行為，例如：自發性地舉起前腳步足並將腿節咬斷(圖三)，這樣的現象只發生於前腳步足，而中腳步足不但沒有發生過自發性自噬行為，甚至會產生阻擋的行為(圖四)，也由實驗數據證實中腳步足的較無法產生誘導性自噬行為，這代表中腳步足可產生明顯的痛覺而前腳步足則無。也許在蟑螂的前腳步足在六足運動中的功能最為微弱，在飢餓狀態時可透過啃食前腳步足的自噬行為，暫時獲得食物以度過飢餓逆境，就像是細胞的自噬作用可回收胞內的大分子或胞器。若對前腳步足產生自噬行為的個體具有演化優勢，也許可以解釋前腳步足表現較弱之痛覺反應的現象；同樣的機制也可解釋為何較易受損或被自我啃咬的脛節與跗節，其痛覺反應較腿節微弱。

在蟑螂食入、吸收乙醯胺酚後，造成原本對中腳腿節的誘發性自噬行為的抑制現象減弱，這代表昆蟲產生痛覺的機制，可能包含類似脊椎動物的痛覺致敏(sensitization)機制，

且是透過前列腺素之作用，參與痛覺的產生過程。

本研究另以記錄步足截肢蟑螂置於溫熱(42°C)介質的急性與慢性行為反應，探討昆蟲的痛覺性質。我們將所記錄的各項行為指標結果整理成表一，發現中腳步足截肢後的蟑螂，無論是腿節還是脛節截肢皆會立即增加對斷肢的清潔行為，此行為與許多哺乳類動物的急性疼痛類似，例如：動物感到疼痛時，可能舔舐、咬、抓傷、搖晃或摩擦疼痛部位等行為 (Morton and Griffiths, 1985)，但隔一天後清潔斷肢行為的增強現象就消失了。類似的現象也出現在熱刺激時引發舉起斷肢的行為，也同樣於隔一天後，斷肢舉起行為的增強現象就消失了。清潔斷肢與舉起斷肢的行為反應，應該為急性疼痛的指標。

另一方面，在身體抖動與身體跳躍兩項行為指標中，腿節截肢的個體皆在熱刺激時產生增強的現象，且除了急性反應之外，也表現出持續性或晚發性的表現，後者應該為慢性疼痛的指標。

表一 探討溫熱刺激對各項行為指標的急性與慢性反應。

行為指標		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	身體跳躍
截肢	脛節	—	↑	↑	—	↑	↓	↑
	腿節	↓	↑	—	—	↑	↑	↑
急性 (立即)		○	○	○ _脛	—	○	○	○
慢性	持續	○	—	○ _脛	—	—	○	—
	晚發	—	○ _腿	—	—	—	—	○ _腿

(↑代表增加，↓代表減少，—代表不變，○代表腿節與脛節皆具有該性質，○_腿代表腿節具有該性質，○_脛代表脛節具有該性質)

除此之外，本研究在介質溫度逐漸增加的情況下觀察蟑螂截肢前後對於溫度的敏感度以及運動動機(表二)。我們發現不需消耗太多力氣的小動作如清潔行為，在截肢後有敏感化的現象。動物會因為自身的限制或周圍的環境控制而有正面或負面的運動動機，促使或抑制其運動行為(Kirkden and Pajor, 2006)，在本研究中身體抖動、跳躍等大動作在溫度升高時蟑螂做出這些行為的動機下降，這些皆符合痛覺的行為反應特徵。

利用熱刺激引發的行為反應，此為屬於促進「遠離可能造成身體損傷的刺激源」的行為量化指標。本研究分別透過以產生「抑制造成身體損傷之行為」、促進「遠離可能造成身體

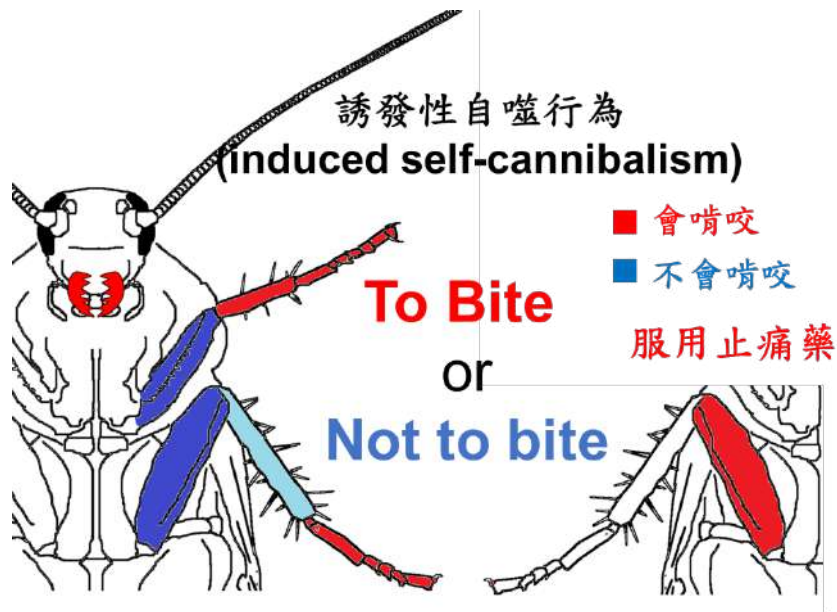
損傷的刺激源」、「敏感化」與「行為動機下降」等行為指標，證明蟑螂的步足應具急性與慢性疼痛的感覺。

表二 探討截肢後的蟑螂，對各項行為指標的是否引發敏感化的比較。

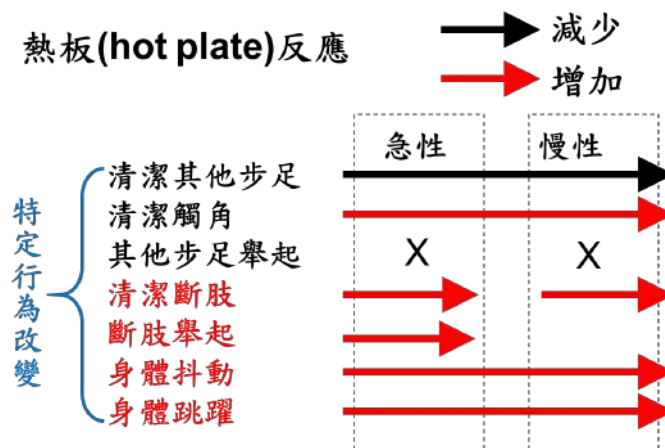
行為指標	對溫度敏感性的改變	改變的時間
清潔步足	敏感化	第 4 天
清潔觸角	敏感化	第 2 天
步足舉起	—	—
身體抖動	遲鈍化	第 2-4 天
身體跳躍	遲鈍化	第 2-7 天

柒、結論與應用

- 一、本研究建立以「誘發性自噬行為(induced self-cannibalism)」的動物模式，與記錄步足截肢蟑螂置於溫熱(42°C)介質的急性與慢性行為反應，探討昆蟲的痛覺性質(圖二十九)。
- 二、藉由誘發性自噬行為的觀察，發現蟑螂自體啃咬前腳步足中的腿節、脛節與跗節，各啃咬反應率皆超過九成，但中腳步足腿節僅有約四成，代表此操作會產生「抑制造成身體損傷之行為」。
- 三、比較誘發性自噬行為的啃咬時間，發現前腳步足腿節與中腳步足脛節具有一定程度的感覺輸入，使誘發性自噬行為的時間較短。
- 四、一般蟑螂的中腳腿節具有誘發性自噬行為的抑制現象，止痛藥劑(乙醯胺酚)可減弱此抑制現象，增加自噬行為的程度，代表昆蟲可能具有由前列腺素引發的痛覺致敏(sensitization)機制。
- 五、熱板實驗中(圖三十)，熱刺激截肢步足的蟑螂，發現：
 - (一)、清潔斷肢、舉起斷肢等行為產生增強的現象，但無持續性，應屬於急性疼痛的指標。
 - (二)、腿節截肢的個體皆產生身體抖動與身體跳躍等行為增強的現象，除了急性反應外，也表現出持續性或晚發性，後者應屬於慢性疼痛的指標。
- 六、溫度漸增引發特定行為(圖三十一)，發現：
 - (一)、引發清潔步足與清潔觸角的行為，對溫度的改變更為敏感
 - (二)、引發較大動作(身體抖動與身體跳躍)的行為動機下降
- 七、本研究透過產生「抑制造成身體損傷之行為」、促進「遠離可能造成身體損傷的刺激源」、「敏感化」與「行為動機下降」等行為指標，證明蟑螂的步足應具急性與慢性疼痛的感覺。

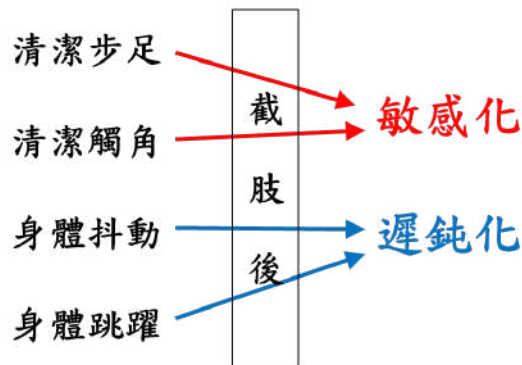


圖二十九 誘發性自噬行為的實驗發現，蟑螂的前腳與中腳的腿節，與中腳的脛節可能具有痛覺受器。



圖三十 熱板實驗發現：部分行為可反映出急性疼痛反應，部分行為反映出慢性疼痛反應。

對溫度敏感性的改變



圖三十一 探討截肢後的蟑螂對各項行為指標的敏感化效應，發現部分行為出現敏感化，部分行為出現遲鈍化的現象。

捌、參考文獻

- Abbracchio, M. P. and Angelo, M. R. 2013. 'Pain & Nociception.' *Neurosciences – From Molecule to Behaviour: A University Textbook*. Eds. C.G. Galizia and P.M. Lledo. Heidelberg: Springer-Verlag, 445-457.
- Adamo, S. 2019. Is it pain if it does not hurt? On the unlikelihood of insect pain. *The Canadian Entomologist*. 151(6): 685-695.
- Baral, P., Udit, S. and Chiu, I. M. 2019. Pain and immunity: implications for host defence. *Nat. Rev. Immunol.* 19(7): 433-447.
- Eisemann, C. H., Jorgensen, W. K., Merritt, D. J., Rice, M. J., Cribb, B. W., Webb, P. D. and Zalucki, M. P. 1984. Do insects feel pain? — A biological view. *Experientia*. 40: 164-167.
- Khuong, T. M., Wang, Q. P., Manion, J., Oyston, L. J., Lau, M. T., Towler, H., Lin, Y. Q. and Neely, G. G. 2019. Nerve injury drives a heightened state of vigilance and neuropathic sensitization in *Drosophila*. *Sci. Adv.* 5(7): eaaw4099.
- Kidd, B. L. and Urban, L. A. 2001. Mechanisms of inflammatory pain. *Br. J. Anaesth.* 87(1): 3-11.
- Kirkden, R. D. and Pajor, E. A. 2006. Using preference, motivation and aversion tests to ask scientific questions about animals' feelings. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 100(1-2): 29-47.
- Merskey, H. 1991. The definition of pain. *Eur. Psychiatry*. 6(4): 153-159.
- Morton, D. B. and Griffiths, P. H. 1985. Guidelines on the recognition of pain, distress and discomfort in experimental animals and an hypothesis for assessment. *Vet Rec.* 116(16): 431-436.
- Ohashi, N. and Kohno, T. 2020. Analgesic Effect of Acetaminophen: A Review of Known and Novel Mechanisms of Action. *Front. Pharmacol.* 11: 580289.
- Taber, S. W. 2005. **Invertebrates Of Central Texas Wetlands**. Texas Tech University Press.
- Tiffin, H. 2016. Do Insects Feel Pain? *Anim. Stud. J.* 5(1): 80-96.
- Tracey, W. D., Jr, Wilson, R. I., Laurent, G. and Benzer, S., 2003. *painless*, a *Drosophila* gene essential for nociception. *Cell*. 113(2): 261-273.
- Wigglesworth, V. B. 1980. Do insects feel pain? *Antenna*. 4: 8-9.
- Yarali, A., Niewalda, T., Chen, Y. C., Tanimoto, H., Duernagel, S. and Gerber, B. 2008. 'Pain relief' learning in fruit flies. *Animal Behaviour*. 76(4): 1173-1185.
- Zabala, N. A. and Gómez, M. A. 1991. Morphine analgesia, tolerance and addiction in the cricket *Pteronemobius* sp. (Orthoptera, Insecta). *Pharmacol. Biochem. Behav.* 40(4): 887-891.
- 蔡任圃, 2021。2021 諾貝爾生理或醫學獎—發現溫度與觸覺的受體。生物搜查線(龍騰文化)。第 27 期, 2-7。

諾貝爾生理或醫學獎官網：

<https://www.nobelprize.org/prizes/medicine/2021/advanced-information/>

<https://www.nobelprize.org/prizes/medicine/2016/advanced-information/>