

2009 年臺灣國際科學展覽會

優勝作品專輯

編號： 120010

作品名稱

紫外線 B 對輪蟲氧化壓力的影響

得獎獎項

環境科學科大會獎第二名

香港正選代表：香港第 42 屆聯校科學展覽會

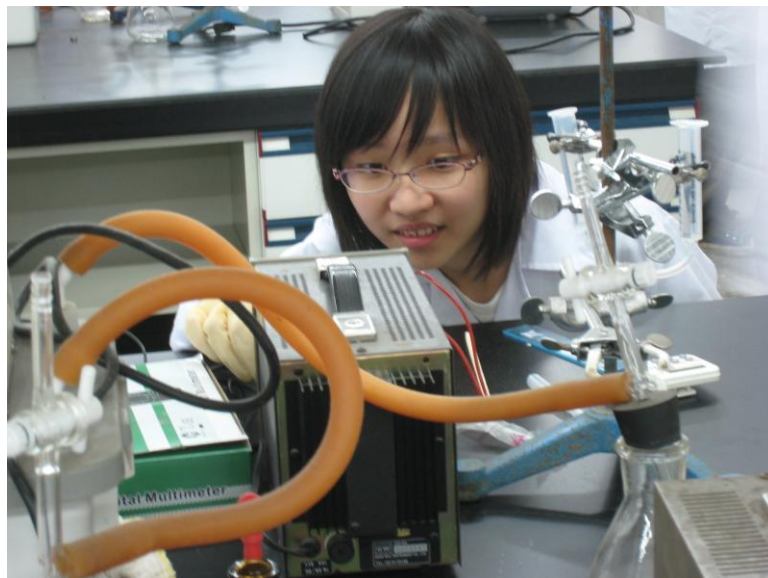
學校名稱： 臺北市立第一女子高級中學

作者姓名： 陳柏方 徐乙玉

指導老師： 薛如娟 陳俊宏

關 鍵 字： 輪蟲、紫外線、氧化壓力

作者簡介

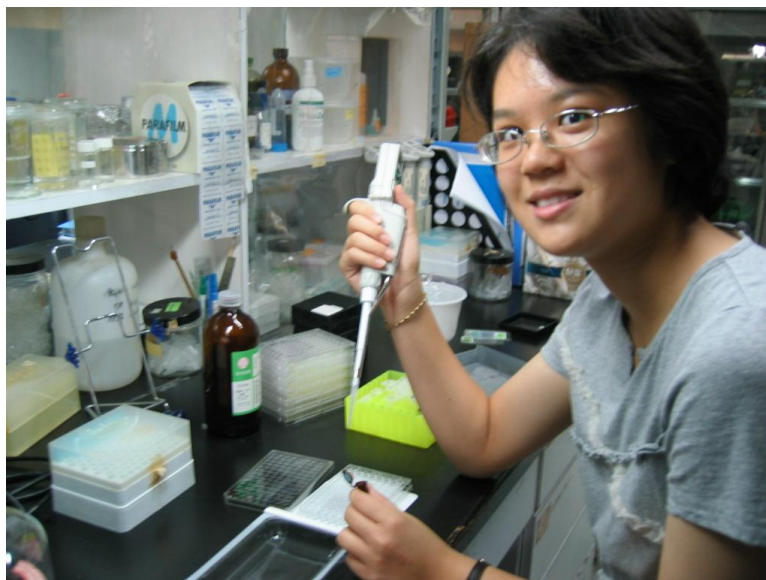


徐乙玉，1991 年生，目前就讀於北一女中數理資優班。

曾在中等學校科展生物類及校內科展生物組多次獲獎，96 年度以「泡麵王國」獲得全國性台灣資訊教育頒發地方特色的特別獎以及台北市網界博覽會佳作。

喜歡藝術，曾在全國美展版畫組、設計組及台北市美展國畫類、水彩類、書法類獲獎。熱愛運動，參加跆拳道社，目前晉級紅帶。

希望能朝向生物、環境科學繼續研究。



陳柏方，1990 年生，目前就讀北一女中數理資優班。

因為生物從微觀到巨觀都令人驚奇不已而熱愛生物學科，進而對生物專研著迷。希望大學生涯仍能沉浸於有趣的生物學中。喜歡攝影、網頁設計和 IBO。喜歡各項球類運動。高中參與跆拳道社，目前為黑帶一段。

此次能參與國際科學展覽會是一項十分難得的經驗，特別感謝陳俊宏教授及實驗室學長姊們的幫忙。

摘要

屬蛭形輪蟲(Bdelloid rotifers)的旋輪蟲(*Philodina* sp.)在紫外線 B 照射後，游動能力會立即受到抑制。以 1500 J/m^2 紫外線 B 照射的輪蟲，族群恢復游動能力的百分比在二十分鐘後會明顯回升。但以 1600 J/m^2 照射的輪蟲，具游動能力的族群百分比在三十分鐘內沒有恢復。當照射劑量增為 1700 J/m^2 ， 1800 J/m^2 或 2000 J/m^2 ，輪蟲族群游動的百分比，從照射後持續下降，甚至呈現死亡狀態。經進一步實驗結果顯示，經紫外線 B 照射二十分鐘後的輪蟲體內 H_2O_2 含量隨照射量增加有增加的趨勢；且輪蟲組織內的過氧化氫酶(catalase)活性，在 1500 J/m^2 或 1600 J/m^2 的紫外線 B 照射後會增加。若在水體加入兒茶酚(Catechin)，再以相同劑量的 UV-B 照射，則輪蟲體內的 H_2O_2 濃度明顯較對照組低。

Ultraviolet B affects the oxidative stress in Philodina rotifers

Abstract

The swimming ability of Philodina (Bdelloid rotifer) can be immediately inhibited after UV-B radiation. The percentage of rotifers recovered their swimming abilities obviously increased in 20 minutes after being radiated to 1500 J/m² levels of UV-B. However, the swimming ability of rotifers affected by 1600J/m² UV-B was hard to recover in 30 min. When the radiation levels of UV-B were higher at 1700 J/m², 1800J/m² or 2000 J/m², the percentage of swimming rotifers sharply decreases following the time course. Those levels of UV-B are high enough to kill the rotifers. Furthermore, the UV-B-radiated rotifers increased not only the amount of H₂O₂ inside their body, but also the activity of catalase. When the rotifers were incubated in catechin solution, the generated H₂O₂ inside the rotifers after UV-B radiation was lower than the non-radiation group.

紫外線 B 對旋輪蟲氧化壓力的影響

壹、前言

一、研究動機

無脊椎動物多為夜行性，除了可避免被捕食及減少水分散失外，也和紫外線照射傷害有關。能穿透大氣層到達地面的太陽輻射範圍很大，其中波長小於 400 nm 的波段稱為紫外線(ultra-violet)，紫外線可依其波長分為 UV-A(320-400 nm)，UV-B(280-320 nm)，UV-C(280 nm 以下)三種，波長越短對生物的殺傷力則越強。然而 UV-C 因對地球大氣層的穿透力極差，對地球上生物的影響一向極低；UV-A 到達地表的輻射量亦與大氣層無關，因此近年來臭氧層的變化對 UV-A 照射到地表的量無太大的影響；但 UV-B 則不然，其照射到地表的輻射量會因臭氧減少而大幅增加(Misra et al., 2002)，近年來臭氧層破洞問題嚴重，使更多的紫外線 B 照射到地球表面，對生物造成嚴重衝擊。譬如會造成 DNA 的損壞、細胞膜的異常、產生紅斑、癌症(Matsumura and Ananthaswamy, 2004)、造成皮膚老化(Isoda et al., 2003)、產生白內障、影響胚胎發育(Savage and Danilchik, 1993; Soni and Joshi, 1997)等，甚至造成死亡(Soni and Joshi, 1997; Misra et al., 1998)。

正常細胞在進行細胞呼吸、粒線體電子傳遞鏈(mitochondria electron transport)等生理反應時會自然產生 ROS(reactive oxygen species)，ROS 包括超氧自由基($O_2^{\cdot-}$)、氫氧自由基($\cdot OH$)、過氧化氫 (H_2O_2)等，一般正常細胞會利用抗氧化物將其代謝，但當 ROS 產生過量或抗氧化防禦系統如過氧化氫酶(catalase)被抑制時，便會造成氧化壓力進而對身體組織及細胞造成損害(Sander et al., 2003)。目前已知，紫外線的照射或重金屬處理等皆會造成氧化壓力(Stohs, 1995; Viarengo, 1999; Girotti, 2001; Michael, 2001)。

輪蟲屬輪形動物門，多為淡水生活，身體頭部的輪狀纖毛（trochal disc）為重要特徵，是一微小但構造完整的水生無脊椎動物。輪蟲約有 1800 種左右，一般體長在 0.5mm 以下，最大體長達 3mm 左右。蛭形輪蟲(Bdelloid rotifers)，體長從 0.1 到 1 mm 不等，身體成蠕蟲狀沒有硬殼，生活於淡水水域。一般情形行孤雌生殖，在環境惡劣時才出現雄性個體行有性生殖。由於其特殊的生殖方式及適應能力，在許多水域皆可見其蹤跡。

我們選擇輪蟲作為研究對象是由於輪蟲為一水生浮游生物，為許多魚蝦的重要食物來源，且因為水生無脊椎動物對紫外線的耐受性較差，所以 UV-B 的增加會造成其數量明顯下降，間接造成魚蝦減產。

二、研究目的

1. 本實驗以不同強度紫外線 B 照射輪蟲後，檢測輪蟲體內 H_2O_2 濃度及 catalase 活性變化，來瞭解輪蟲在紫外線 B 照射後氧化壓力的反應，看輪蟲是否可作為一適切的紫外線指標生物。
2. 在水體內加入抗氧化劑，進一步研究外加抗氧化劑是否可有效降低照射 UV-B 後的 H_2O_2 濃度，來減少對輪蟲的影響，依此實驗結果檢測市面上各種抗氧化劑的效果，作為一項指標。

貳、研究方法或過程

一、UV 照射後輪蟲游動與存活的影响

將輪蟲以定量滴管取 20.0 μ l，滴入 8 孔載玻片中，使用倒立顯微鏡觀察紀錄正常輪蟲運動狀態後，以紫外線 B 燈箱不同劑量 UV-B 照射後，計算輪蟲持續游動的比率及死亡率。

二、製配輪蟲組織均質液及蛋白質定量

將所需輪蟲裝於 1.5 ml tube，以 800 RPM，4 $^{\circ}$ C 離心 5 分鐘，去上清液，使用液態氮冷凍再解凍使細胞破裂，加入 50 μ l buffer 進行 12000 RPM 離心 10 分鐘，取上清液。再將輪蟲組織均質液置入 96 well plate 中，每 well 加入 5 μ l，再加入已配製好的 BCA reagent (BCA reagent A : BCA reagent B =50 : 1)，50 μ l/well，置入 60 $^{\circ}$ C 烘箱中反應 30 分鐘後，放入免疫酵素分析機，以波長 550 nm 讀值。此外同時將濃度為 0.5 mg/ml、0.25 mg/ml、0.125 mg/ml、0.0625 mg/ml、0.03125 mg/ml、0 mg/ml 的 BSA 同上述方法，加入 BCA reagent 後做出吸光值與濃度之標準曲線，再將輪蟲均質液對照標準曲線求出其蛋白質濃度。

三、H₂O₂ 含量檢測

取定量輪蟲以 20.0 μ l/well 的量分裝於 8 孔載玻片中，分別照射 UV-B，強度為 1500 J/m²、1600 J/m²、1700 J/m² 及對照組 (0 J/m²)，之後將照射 UV 後的輪蟲以液態氮打破細胞進行組織均質液的製配，再將輪蟲組織均質液以 25 μ l/well 加入 working solution (50 μ l 10mM amplex red reagent、100 μ l 10U/ml HRP、4.85 ml 1X reaction buffer)，放入 25 $^{\circ}$ C 恆溫箱中作用 30 分鐘，以螢光分光計測量讀值(Ex: 530 nm Em: 590 nm)。同時將 1.25 μ M、0.625 μ M、0.3125 μ M、0.15625 μ M、0.078125 μ M、0 μ M 的 H₂O₂ 置入 96 well plate 中，同上述方法做出標準曲線後，即可求出輪蟲不

同處理下的 H_2O_2 濃度。同時間再配合蛋白質濃度的測量，即可求出單位蛋白質的 H_2O_2 含量。

四、catalase 活性分析

取定量輪蟲以 $20.0\mu\text{l}/\text{well}$ 的量分裝於 8 孔載玻片中，分為照射 UV-B $1500\text{ J}/\text{m}^2$ 、 $1600\text{ J}/\text{m}^2$ 、 $1700\text{ J}/\text{m}^2$ 及對照組 ($0\text{ J}/\text{m}^2$)，再將照射 UV-B 後的輪蟲進行組織均質液的萃取。接著將四組輪蟲組織均質液及 $1\text{ U}/\text{ml}$ 、 $0.5\text{ U}/\text{ml}$ 、 $0.25\text{ U}/\text{ml}$ 、 $0.125\text{ U}/\text{ml}$ 、 $0.0625\text{ U}/\text{ml}$ 、 $0\text{ U}/\text{ml}$ 的 catalase 放入 96 well plate 中，加入 $12.5\mu\text{l}$ 的 $40\mu\text{M}$ H_2O_2 置於 25°C 作用 30 分鐘，接著再加入 working solution ($50\mu\text{l}$ 10 Mm amplex red reagent、 $20\mu\text{l}$ $100\text{ U}/\text{ml}$ HRP 以及 4.93 ml 1X reaction buffer) $25\mu\text{l}$ 混合均勻，置於 25°C 作用 30 分鐘，以螢光分光計測量讀值(Ex: 530 nm Em: 590 nm) 後，以完全不加入 catalase 的讀值為最高值作為標準，依據 working solution 與各種濃度 catalase 反應後的減少量計算出 catalase 的標準曲線，再以此曲線推算輪蟲均質液與 working solution 作用後的吸光值減少量，估算出輪蟲單位蛋白質的 catalase 活性。

五、檢測外加抗氧化劑對照射 UV-B 後輪蟲體內的 H_2O_2 濃度的影響

在飼養輪蟲的水體內加入兒茶酚 catechin。先將其溶於少量酒精後溶於水體中，濃度分別為 $0.1\text{ mg}/\text{ml}$ 、 $0.01\text{ mg}/\text{ml}$ 、 $0.005\text{ mg}/\text{ml}$ ，以及外加 RO 水和濃度 18% 酒精(和 catechin 濃度最高者酒精含量相同)的兩組對照組。放置兩小時後，取出所需輪蟲分別照射 UV-B，強度 $1700\text{ J}/\text{m}^2$ 。取輪蟲組織均質液，依上述方法檢測單位蛋白質 H_2O_2 濃度。將此數據和無外加抗氧化劑之數據作對照。

參、研究結果與討論

一、研究結果

1. UV-B 照射後輪蟲行為的影響

分別以 UV-B 500 J/m²、1000 J/m²、2000 J/m² 或 3000 J/m² 照射輪蟲後發現，輪蟲在以高劑量(2000 J/m² 或 3000 J/m²)UV-B 的照射後，頭部兩圖纖毛的擺動會停止(如圖 1.B 所示)，情況嚴重者，呈現死亡狀態(如圖 1.C 所示)。根據此結果，往後的實驗將紫外線的照射劑量選定在 1500 J/m² 到 2000 J/m² 間。在分別以 1500 J/m²、1600 J/m²、1700 J/m²、1800 J/m² 或 2000 J/m²UV-B 照射後，結果顯示：在以 1500 J/m² 的 UV-B 照射後，輪蟲族群游泳百分比在 20 分鐘後有明顯恢復現象；以 1600 J/m² 的 UV-B 照射 20 分鐘後，輪蟲族群游泳百分比無恢復現象；而以高於 1600 J/m²UV-B 照射 20 分鐘後之輪蟲族群游泳百分比則持續下降(如圖 2 所示)。依此結果，故之後的實驗設計是將輪蟲分別以 1500 J/m²、1600 J/m² 或 1700 J/m²UV-B 照射後二十分鐘在進行測試氧化壓力。

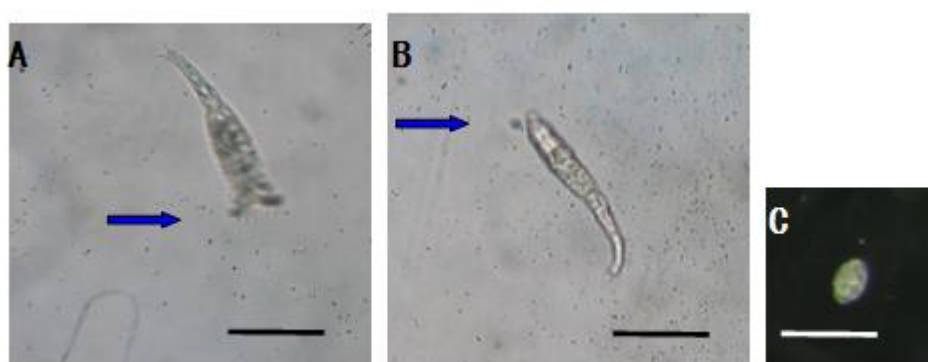


圖 1 旋輪蟲的活動。A) 未經 UV-B 照射的正常輪蟲(箭頭所指為纖毛擺動處)。B) UV-B 照射後受影響的輪蟲(箭頭所指處纖毛未擺動)。C) 過度照射 UV-B 死亡的輪蟲 (比例尺為 0.1mm)

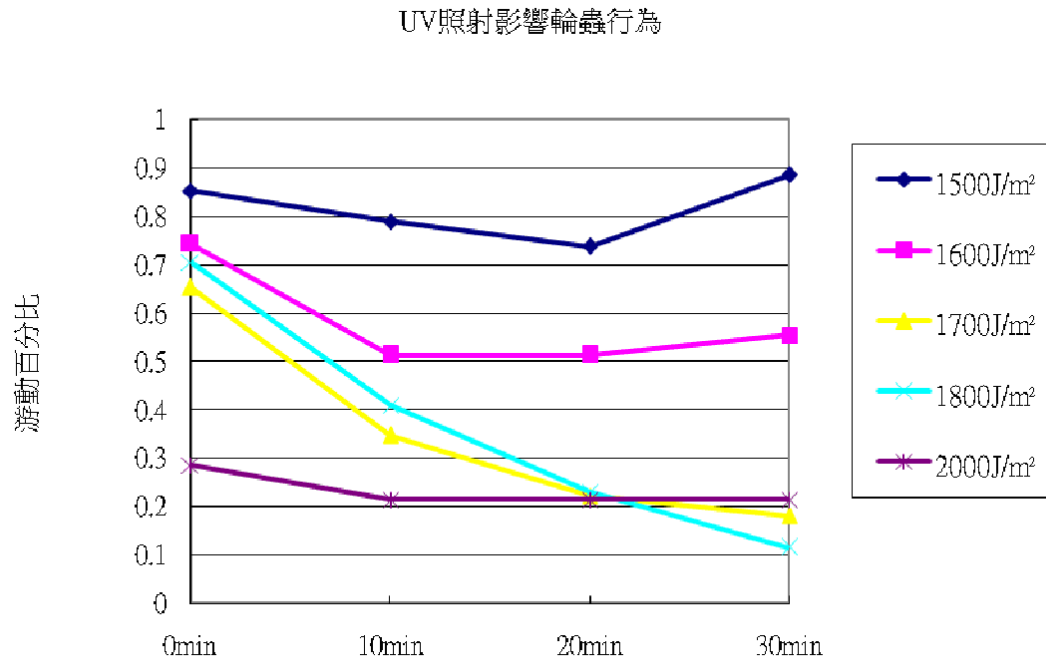


圖 2 UV-B 照射後輪蟲族群游動百分比

2. 經 UV-B 照射後輪蟲組織內 H_2O_2 濃度檢測

輪蟲以 $1500 J/m^2$ UV-B 照射下產生的 H_2O_2 濃度較於無照射 UV-B 的對照組略低，然而以 $1600 J/m^2$ 及 $1700 J/m^2$ UV-B 照射的輪蟲體內產生的 H_2O_2 濃度較對照組高出約 2 倍（如圖 3 所示）。

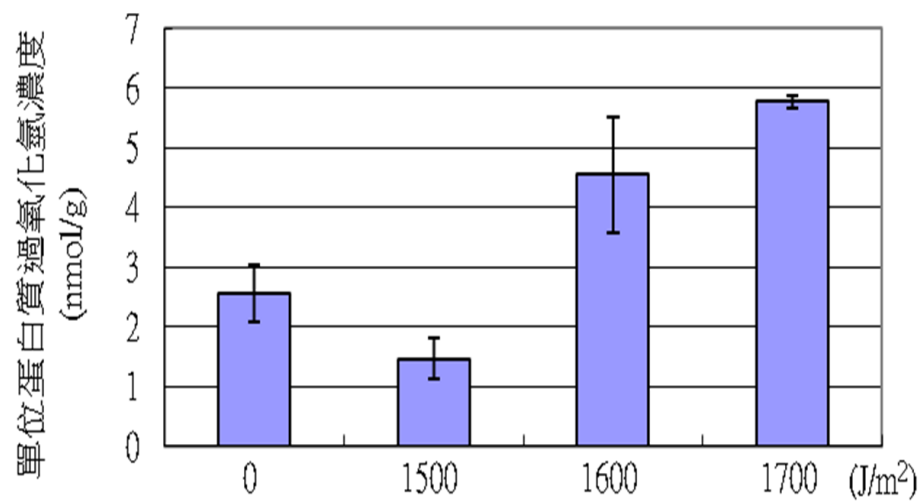


圖 3 輪蟲經 UV-B 照射後，體內過氧化氫濃度的變化

3. 經 UV-B 照射後輪蟲組織內 catalase 活性變化

以 1500 J/m^2 UV-B 照射下輪蟲體內的 catalase 活性與無照射 UV-B 的對照組比較略高。但隨著 UV-B 照射量的增加，輪蟲體內的 catalase 活性則隨之下降（如圖 4 所示）。

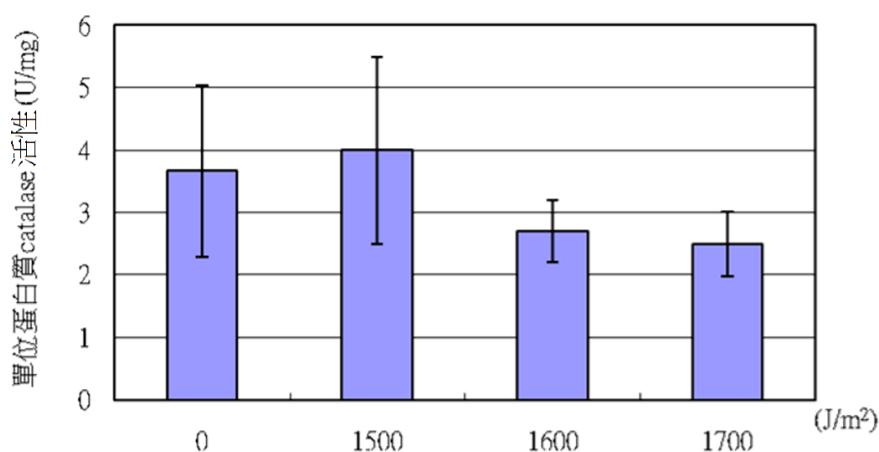


圖 4 輪蟲照射 UV-B 後，體內 catalase 活性的變化

4. 抗氧化劑對照射 UV-B 後輪蟲體內的 H_2O_2 濃度的影響

在水體內加入兒茶酚(catechin)，再以相同劑量的 UV-B 照射，其體內的 H_2O_2 濃度含量較未加抗氧化劑的濃度來得低，且 catechin 濃度越高效果越好。在對照組中外加酒精比加 RO 水的 H_2O_2 濃度略高，但兩組對照組仍比外加 catechin 的三組高出許多。

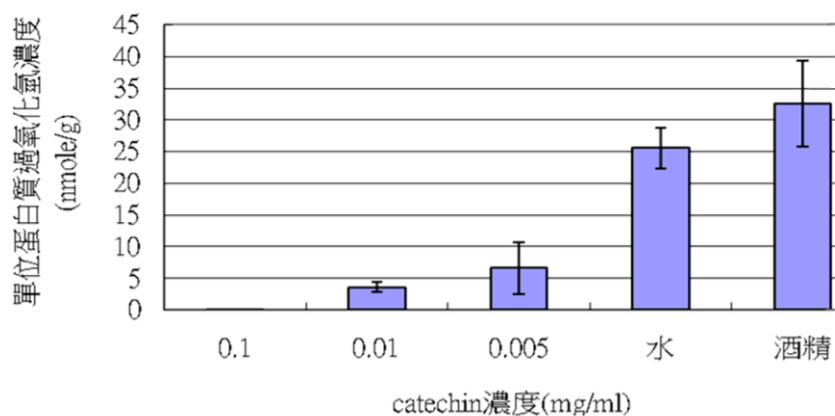


圖 5 抗氧化劑兒茶酚對照射 UV-B 後輪蟲體內的 H_2O_2 濃度的影響

二、討論

動物照射紫外線後，會依紫外線強度或動物的敏感度的不同而造成不同程度的影響（如表 1 所示），尤其是夜行性動物及水生動物的防護較差。例如蚯蚓在照射過量的 UV-B 後，會產生氧化壓力、表皮缺陷，甚至死亡(Chuang et al., 2006)；水生的斑馬魚在照射過量紫外線後也會產生氧化壓力及降低魚卵的孵化率(Charron, 2000)；而使用人類皮膚纖維母細胞或角質細胞做為實驗對象，可發現細胞凋亡、DNA 損傷等（如表 1 所示）。

表 1 不同劑量紫外線對動物的影響

動物種類	UV-B 劑量 (J/m^2)	生物的影響
輪蟲 Bdelloid rotifers	1500-1700	氧化壓力、致命
蚯蚓 Amyntas gracilis (Chuang et al., 2006)	500 -1,500	氧化壓力、表皮缺陷、致命的損害……等。
蚯蚓 Metaphrine posthuma (Chuang et al., 2006)	500 -1,500	表皮缺陷、致命……。
游絲蚓 Tubifex tubifex (Soni, 1997)	2,500 - 7,500	致命、孵化率降低、氧化壓力……等。
海膽 Strongylocentrotus droebachiensis (Lesser et al., 2003)	260 - 67,000	DNA 損傷、氧化壓力……等。.
斑馬魚 Brachydanio rerio (Charron, 2000)	3,240 - 42,120	氧化壓力、存活率下降、孵化率下降……等。
青蛙 (Blaustein et al., 1997-2004)	日光輻射 (約為 3,000 - 40,000)	DNA 損傷、光修復酶活性下降, 胚胎生長缺陷……等。
Hairless mouse (Lee et al., 2000)	5,000 - 30,000	發炎、氧化壓力……等。.
皮膚纖維母細胞或角質細胞	7,200 - 43,200	細胞死亡、細胞凋亡、DNA 損傷、氧化壓力……等。

（此表由台大動物所陳俊宏教授提供）

從表 1 所示可見人類皮膚纖維母細胞或角質細胞對 UV-B 的耐受性較高，而本實驗所做的輪蟲則與蚯蚓相似，對 UV-B 的耐受性較差。理想的指標生物即是利用其對環境的特殊感受性，在環境改變時會造成個體數、型態、行為上的改變。而輪蟲在本實驗中照射 1500 J/m^2 左右，就可以觀察到輪蟲運動模式的改變（以爬行代替游動），而隨 UV-B 的劑量越高，運動行為的改變越高，其對 UV 的敏感性明顯較其他生物高。且在多雲日子裡，一天的陽光照射量約為 1500 J/m^2 。由本實驗結果，其敏感性符合一般地表所接受到的輻射量，且似乎符合作為紫外線指標生物的條件。

過氧化氫酶(catalase)為一種含鐵酵素，主要分布於細胞中的過氧化小體(peroxisome)，可以分解 H_2O_2 ，且清除能力較其他酵素高。若要避免氧化壓力造成細胞損傷， H_2O_2 濃度越高，catalase 活性也應隨著升高，以分解過量的 H_2O_2 。本實驗中，我們將 H_2O_2 濃度以及 catalase 濃度的兩個圖表相互對照，可以發現 UV-B 劑量在 1500 J/m^2 左右時，過氧化氫濃度會下降、catalase 活性則會上升；然在照射高劑量(1600 J/m^2 以上)的 UV-B 後，catalase 的活性隨 UV-B 的照射量增加而下降，體內 H_2O_2 濃度則會上升。其可能的原因應是由於過量的紫外線直接破壞 catalase 的活性，以至於 catalase 無法發揮降低 H_2O_2 的功能。這應該也是輪蟲對紫外線照射所能忍受的劑量，若過高的劑量可能造成輪蟲無法修復的損傷。

抗氧化劑可以防止細胞老化，也就是避免細胞氧化產生氧化壓力造成細胞損傷。因此在水體內加入抗氧化劑兒茶酚，以相同劑量的 UV-B 照射後，其體內的 H_2O_2 濃度含量較對照組來得低，表示此抗氧化劑對輪蟲抗氧化有顯著效果，也可進一步研究其他抗氧化劑是否能達到相同效果。若此實驗成果為正向的，或許可依此檢測市面上各種抗氧化劑的效果，作為一項指標。另外，我們也發現當輪蟲飼養於有外加 catechin 的水體內，若時間過長(一天以上)，會造成輪蟲大量死亡，以此推測若輪蟲吸收過量的抗氧化劑，不僅失去防護的功能，可能也會對輪蟲造成傷害。

動物體內抗氧化酵素如 catalase 活性在蚯蚓照射 UV-B 兩小時後，catalase 會逐漸下降，之後就沒有明顯差異；斑馬魚體表組織的 catalase 在照射 UV-B 數小時後也會有先上升隨後下降的趨勢(Charron et al.,2000)。在輪蟲的實驗結果亦同，由於原因及造成的機制未明，因此值得進一步研究。

肆、結論與應用

由實驗結果發現，輪蟲經過量 UV-B 照射後，體內 H_2O_2 濃度會明顯上升，catalase 活性受抑制；但微量 UV-B 照射後，catalase 活性反而升高， H_2O_2 濃度下降。因此我們推論，catalase 活性會因照射微量 UV-B 而升高，降低體內氧化壓力；過量 UV-B 照射可能會破壞 catalase 的功能，使氧化壓力提升，進而影響輪蟲運動模式改變甚至死亡，且輪蟲對 UV-B 的敏感性符合一般地表所接受到的輻射量，進一步研究將可作為一理想的紫外線指標生物。另外，若在水體內提供輪蟲適量的抗氧化劑，可以有效降低輪蟲經 UV-B 照射後體內 H_2O_2 含量，可依此檢測市面上各種抗氧化劑的效果，作為一項指標。

伍、參考文獻

1. 莊淑君, 蚯蚓照射紫外線 A 或紫外線 B (UV-A or UV-B)後對爬行行為、呼吸及體表氧化壓力之研究
2. Charron RA, Fenwick JC, Lean DRS and Moon TW. 2000.Ultraviolet-B radiation effects on antioxidant status and survival in the zebrafish, *Brachydanio rerio*. *Photochem Photobiol* 72(3): 327-333.
3. CHIA-NAN ANNUAL BULLETIN VOL. 32, PP. 433—442, 2006
4. Isoda M, Ueda S, Imayama S and Tsukahara K. 2001. New formulation of chemical peeling agent: histological evaluation in sun-damaged skin model in

- hairless mice. *Journal of Dermatological Science* 27: S60-S67
5. Kring JB. 1977. Structure of the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum*. *Ann Ent Soc Am* 70:855-860
 6. Kring JB and Kring TJ. 1990. Aphid fight behavior. In *aphid-plant interaction; populations to Molecules* 'Peter, D. C., Webster, J.A. and Chlouber, C.S. eds' p. 203-214. MP-132 USDA/ARS
 7. Lee SC, Jung JW Lee HW, Chun SD, Kang IK, Won YH and Kim YP. 2000. Protective role of nitric oxide-mediated inflammatory response against lipid peroxidation in ultraviolet B-irradiated skin. *British J Dermatol* 142:653-359
 8. Matsumura Y and Ananthaswamy HN. 2004. Toxic effects of ultraviolet radiation on the skin. *Toxicol Appl Pharmacol* 195(3): 298-308
 9. Misra RB, Babu GS, Ray RS and Hans RK. 2002. Tubifex: a sensitive model for UV-B-induced phototoxicity. *Ecotoxicol Environ Safety* 52:288-295
 10. Soni AK and Joshi PC. 1997. High sensitivity of tubifex for ultraviolet-B. *Biochem Biophys Res Commun* 231: 818-819
 11. Savage RM and Danilchik MV. 1993. Dynamics of germ plasm localization and its inhibition by ultraviolet irradiation in early cleavage *Xenopus* eggs. *Dev Biol* 157:371-382.
 12. Soni and Joshi, 1997. High sensitivity of tubifex for ultraviolet-B. *Biochem Biophys Res Commun* 231:818-819
 13. Sander CF, Hamm S, Elsner P and Thiele JJ. 2003. Oxidative stress in malignant melanoma and non-melanoma skin cancer. *British J Dermatol* 148:913-922

評語

本作品探討蛭形輪蟲在紫外線照射後，游動能力受抑制與影響之狀況，發現照射劑量高達 1700J/m^2 時，輪蟲族群游動能力明顯下降，甚至呈現死亡狀態。經紫外線 B 照射 20 分鐘後，輪蟲體內的 H_2O_2 含量隨照射劑量增加而增加，catalase 活性則受到抑制，但在微量 UV-B 照射下，反而有相反之效應。另外，若在水體內提供輪蟲適量的抗氧化劑，則可有效降低輪蟲經 UV-B 照射後體內 H_2O_2 之含量。本作品實驗項目雖不多，但提出一些重要的輻射影響現象，值得參考。