

中華民國第 62 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

052013

陽光照射造成皮膚溫熱感覺的神經活化機轉

學校名稱：高雄市立高雄女子高級中學

作者： 高一 李幸真	指導老師： 林孝正
---------------	--------------

關鍵詞：TRP、背根神經元、皮膚角質細胞

摘要

陽光晒到皮膚，人體感覺到刺痛來避免過強紫外線。但為何感覺到刺痛呢?過去對光的生體受器著重於眼睛錐及桿狀細胞(Opsin 1/2)，但它們在背根神經元 (DRG，神經末端主體細胞) 的表現並不多。TRP channels 表現在皮膚及神經。TRPV1 是痛覺受器，引起鈣離子通透，Dr. Julius 因它得到 2021 諾貝爾獎。TRPV1/A1 受溫度、酸度等活化，但 DRG 的 TRPV1/A1，是否會因紫外線(UVB)照射而影響，並導致鈣通透並不了解。我以不同強度 UVB 照射人類角質細胞或大鼠 DRG，以螢光顯微鏡及流式細胞儀測量 TRP 蛋白質表現，以實時影像來作動態鈣離子分析。結果顯示 UVB 增加 DRG 的 TRPA1/V1 表現。且 UVB 顯著增加角質細胞的 TRPA1/V1 表現，有劑量相關效後，惟 UVB 照射對鈣通透影響不大。結論是，UVB 照射增加角質細胞及 DRG 的 TRPA1/V1 表現，可能與光照引起之麻痛有關。

壹、前言

一、研究動機

在物理課程中，老師教到熱在兩個物體的傳播有三種方式，包括傳導、對流、及輻射。其中輻射經由光子，不需介質。輻射熱傳播在生活的重要例子是太陽光照到地球表面，帶來溫熱。這種自發的電磁輻射，主要在紅外線波段，有強烈的熱作用。但是，這種熱傳播是在物理物體與物理物體中間的熱交換。但生物體如作為接收物體，本身有恒定(homeostasis)機轉，保持恆溫；而且，生物體本身有感覺，這種感覺是生物體的神經受器將光子能量吸收，引起生物體的生物電脈衝，沿著感覺神經，將它傳到中樞神經及大腦，最後引起大腦的感覺。所以，我們人體，作為生物體接收這電磁輻射後，不僅大腦中有溫暖的感覺，有時更有刺痛的感覺，特別在正中午太陽較大的時候。這種感覺，讓我們的大腦可以知道，現在的陽光較強，要避免過度的陽光暴晒。但是，陽光是如何造成人體的急性的皮膚刺痛感呢?陽光依據其波長的不同，可分成紅外光、可見光、及紫外光。其中紅外光帶有熱量，可能會讓皮膚溫度升高，而間接導致溫熱感，但是，人有溫度恒定系統，經由排汗發及血管擴張來降溫，紅外線的能量(波長較長、頻率較低)較弱，對人體的直接的分子影響可能較其他可見光及紫外光低。而紫外線(UV)的波長較小，頻率較高，能量較強，對皮膚中的分子直接影響有可能較高。因此，我決定要看陽光中的紫外線，在造成紅疹及發炎之前，是如何造成急性的皮膚刺痛感?是經由什麼機轉，導致皮膚的末梢神經的活化呢?

二、目的

我想知道，陽光中的紫外線，在造成紅疹及發炎之前，是如何造成急性的皮膚刺痛感?是經由什麼機轉，導致皮膚的末梢神經的活化呢?

三、文獻回顧

(一) 光線在生物體內可能的受器

太陽光經由直接或間接作用通過大氣後，到達地球表面。到達地球表面的光線的強度，與緯度、高度、季節、大氣條件都有關係。而陽光的光子到人體的受器可能有那些呢? 皮膚及眼睛是人體兩大光學受器器官，因為皮膚與環境的介面的表面積是最大的，有半透光的特質，而眼睛是特化的透光的器官。過去的文獻報導，Cytochrome c oxidase，G-protein-coupled receptor opsins (OPNs)，circadian transcriptional factors (CRYs)，都可能是潛在的光的生物受器，接收光子的能量¹。

眼睛是特化的器官，人體可以感知光的存在，特別是可見光波長(經由網膜的桿狀及錐狀細胞的受器)。其他非人類的動物也有特化的非眼的光受器，特別是區隔外界與人體的最大介面，皮膚，已經被發現有眼外最多的受器稱為 chromatophores。這些在許多魚、蛙、螃蟹等有發現，特別是在頭足類 cephalopods(如花枝、章魚等)高度發展。這些動物利用變色來模擬環境、嚇唬敵人、吸引異性等²。但是，也有第二種，非用來當視覺的受器，稱為 cryptochromes，其功能尚不清楚，但在昆蟲的觸角及大腦或是鳥類的網膜中有被發現，可能與感知周圍環境有關³。

(二) Opsin 3 光受器

科學研究已知道哺乳類動物表現許多 Opsins，包括在眼睛中的 Opsin 1 (blue, green, and red cone opsin 錐狀細胞)，Opsin 2 (rhodopsin 桿狀細胞)，Opsin 4 (melanopsin，與瞳孔放大縮小以及 circadian rhythm 生物晝夜節律有關)。人體與小鼠的皮膚都有許多 Opsins，但表現最多的是 Opsin 3¹。它在許多皮膚的細胞表現，包括表皮的最多的角質細胞、黑色素細胞、真皮纖維母細胞⁴等。

目前對皮膚的 Opsin 3 如何受到光的影響的研究很少。Castellano 等人發現藍色可見光照射角質細胞會透過 Opsin 3 影響其分化⁵。Opsin 3 對黑色素細胞傳送其製造的黑色素到角質細胞是否有影響，目前尚有爭論⁶。不過，人體對光的感覺是經由周邊的神經末梢(也就是背神經元 Dorsal root ganglion(DRG)的突觸)在表皮中受到刺激引起，但背神經元細胞表面的 Opsin 3 並無表現。

(三) Transient receptor potential cation channels (TRP channels)

另外一個光線的可能受器是 TRP channels，在許多細胞的表面都有表現。在果果蠅的研究中，發現果蠅如果沒有 TRP 的話，對光的感知性會降低。目前 TRP 可以被分成幾個大組，包括 TRP C (canonical)，TRP V (vanilloid)，TRP M (melastatin)，TRP N (no mechanoreceptor potential C)，及 TRP A (Family A)。

TRPV1 又稱 capsaicin receptor，是第一個被發現的 TRPV，也就是我們貼辣椒膏貼布(含 capsaicin)時，會有熱痛感的原因，David Julius 博士在 1996 年發現 TRPV1 是一個會受熱活化的離子通道而媒介痛感的路徑⁷，因 TRPV1 的發現，他在 2021 年獲得諾貝爾生理獎。TRPV1 的功能是體溫的調控，也與熱感及痛有關⁷。在感覺神經節神經元，它會與 TRPA1 合作⁸，來偵測環境中的刺激⁹。TRPV1 是非特異性的帶正電的離子通道，可以被許多環境因子刺激。例如：溫度大於 43 °C，酸，辣椒，Allyl isothiocyanate (Wasabi 芥末會辣的原因)，內生性的刺激物含酸性情況、endocannabinoid anandamide, N-oleyl-dopamine, 及 N-arachidonoyl-dopamine 等等。海德大學 Weinkauf 等人發現 UV 照射在人體後，有許多介質的表現會增加，其中包括 TRPV1¹⁰。但是光線如何或可能透過 TRPV1 來影響皮膚感覺較不知道。有證據顯示 UVB 造成的發炎因子 NGF 的釋出，會讓 TRPV1 的反應加強而導致疼痛¹¹。英國 Chizh 等人發現以 SB-705498 抑制 TRPV1 會使得 UVB 引起的發炎性的痛覺過敏降低¹²。德國 Schaffler 等人發現口服 TRPV1 抑制劑在人體中得到同樣的結果¹³。但是在無發炎的狀況下，UVB 如何造成皮膚熱痛感較不清楚。

TRPA1 也是一個鈣離子通道，存在感覺神經元中，有許多化學物質會導致他的活化(如 Allyl isothiocyanate or acrolein)造成鈣離子進入細胞。德國 Hill 等人發現 UVA 的照射人類胚胎腎細胞會經由 TRPA1 導致氧化壓力增加¹⁴。UV 調節 TRPA1 的表現文獻並不多。在果蠅中，美國杜克大學 Guntur 等人發現 UV 照射引起的 H₂O₂ 增加是經由 TRPA1¹⁵。在人體中，UV 照射會引起

黑色素細胞的 TRPA1 增加¹⁶。但是，UV 照射如何背根神經元的影響的研究文獻直到目前都相當少。

(四) TRP channel 在皮膚細胞中以 UVB 照射的反應

對於光線對其他皮膚細胞的 TRPV 影響的研究並不多。國內國防醫學院關小輝教授發現紫外線 B 會透過真皮纖維細胞中的 TRPV1 來引起 Nrf2 的降解¹⁷。同樣的，關教授的團隊發現紫外線 B 會引發經由 TRPV1 來調控角質細胞 keratin1/10 的表現¹⁸。韓國 Chung 等人發現紫外線 B 會經由 TRPV1 引發 gasdermin C 在角質細胞的活化¹⁹。最近 2021 年，Camponogara 等人發現 TRPV1 的新型抑制劑，可以減輕 UVB 在小鼠引起的皮膚發炎²⁰。2021 年 10 月，美國 Cao 等人，使用小鼠模式，發現使用 broad-band UVB 照射小鼠後，其抓癢的次數在無 TRPV1 的小鼠中較低；而且，以背根神經元細胞照射 UVB 後，TRPV1 及 TRPA1 的 mRNA 增加，且對 capsaicin 100nM 及 KCl 100 mM 造成的胞內鈣離子反應加強²¹。不過，在他們的研究中，並未有紫外線是否造成蛋白質層次的 TRPV1 及 TRPA1 的表現，而且，是否紫外光線照射後，是否會直接(非經由發炎)造成鈣離子的胞內通透增加並不清楚。

綜合以上，我想要知道，陽光中的紫外線，在造成紅疹及發炎之前，是如何造成急性的皮膚刺痛感?是經由什麼機轉，導致皮膚的末梢神經的活化呢?

貳、研究設備及器材

一、紫外線照射儀

本研究採用 UVB 照射器，以 SVL (311 nm, 1 × 15 W, intensity 1.28 mW/cm², France) ，並以 UVX digital radiometer 來作校正 (UVR-305/365-D detector, Tokyo Optical Co., LTD.) ，使得在 15 公分的高度時可以有 1 mW/cm² 的能量密度。

二、細胞培養箱

一般二氧化碳細胞培養箱。恒定 CO₂ 濃度及氧氣濃度。

三、光學顯微鏡

一般 Olympus 光學顯微鏡(BX43)。

四、細胞螢光染色劑

DRG 細胞：TRPA1 以 Novus NB110-40763 (1:200, 5 ug/ml) 染紅色；TRPV1 以 Novus NBP1-71774 (1:200, 5 ug/ml) 染綠色；DAPI 藍色染細胞核。

角質細胞：TRPA1, Novus NB110-40763(1:200, 5 ug/ml) 染紅色；TRPV1 Invitrogen PA1-748(1:200, 5 ug/ml) 染綠色；DAPI 藍色染細胞核。

五、鈣離子螢光染色劑

Fluo-4, AM (ThermoFisher, F14201)。

六、單細胞離子影像分析儀

這個離子影像分析儀配有超快速切換的全波段單波長光源系統，可靈活有效率的調整激發波長以便進行實驗。優點有：(1)高亮度和光效率；(2)可調式波長選擇；(3)高穩定性光源；(4)快速影像擷取。使用 HC Image 來圈選影像中目標細胞的邊緣，並測量圈選範圍內的螢光值。

340 nm 激發所得到的螢光值表示 F340 nm，380 nm 激發所得到的螢光值表示 F380 nm，最後以 F340 nm/ F380 nm 來表示細胞內 Ca²⁺濃度的變化。

七、流式細胞儀

使用 BD 公司的四色流式細胞儀，以 TRPV1 及 TRPA1 的抗體染色，PBS 三次沖洗後，進行 unstained，isotype，以及 specific 抗體染色的分析。

八、研究設計：

以不同強度的 UVB 照射人類培養表皮角質細胞或是小鼠的背神經元細胞，然後以螢光顯微鏡測量它們的 TRPV1/TRPA1 的蛋白質表現在細胞上，也以鈣離子影像分析儀來作動態鈣離子分析。

參、研究過程及方法

一、小鼠的背根神經節培養

這個研究，如果要自行培養，應主要依照哈佛大學 Perner 及 Sokol 的步驟來完成²²。必需要把脊椎解剖分離，再用 digesting medium 及 culture medium 將 DRG 細胞 explant。

例如，使用 DRG digest (Sigma-Aldrich)來 digest 組織。

Dispase II (2.5 mg/ml), collagenase A (1.25 mg/ml), 37 degree, 150 rpm, 15 min.

1 ml syringe + 18G needle, 23G and 28G needle.

並用 DRG culture medium (Sigma-Aldrich and Thermo Fisher)來培養細胞

Neurobasal-A medium 含 Penicillin/streptomycin，B-27 supplement，GlutaMax，NGF 2.5 S (50 ng/ml)，GDNF (2 ng/ml)，Ara-C (10 uM)

但為了方便操作起見，與指導老師討論後，決定直接購買 Rat dorsal root ganglion neurons (RDRGN)(Sigma-Aldrich R8820N-05)來作實驗(台灣 distributor，Merck 台灣)。並以以上述的 DRG culture medium 來作培養。

二、鈣離子染色及影像分析

細胞先以 PBS 室溫下洗滌三次，確保緩衝液中無鈣離子，使用 Flou-4 染色，5ug/ml 37degree。之後置於螢光顯微鏡下

三、TRPA1/TRPA1 染色

細胞以 UVB 照射後，以 TRPA1/TRPV1 作螢光染色。TRPA1 以 Novus NB110-40763 (1:200, 5 ug/ml)染紅色；TRPV1 以 Novus NBP1-71774 (1:200, 5 ug/ml)染綠色；DAPI 藍色染細胞核。

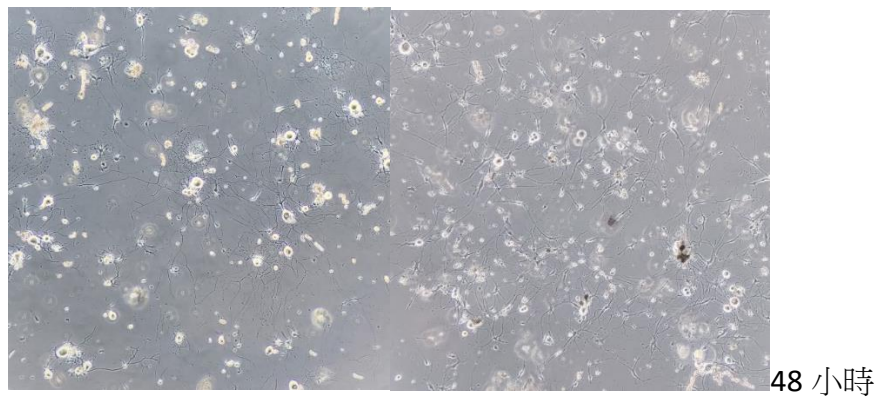
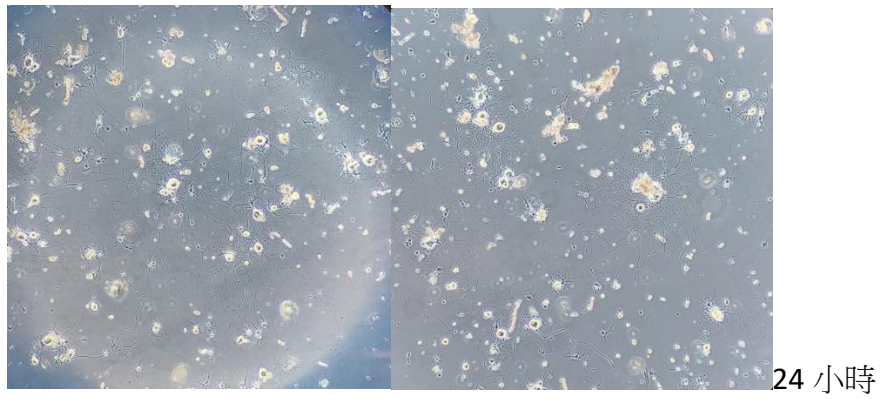
四、人類角質細胞培養

人類角質細胞，為 primary culture 之人類角質細胞，非 HaCaT(Immortalized keratinocytes)細胞。此成人皮膚角質細胞自 ATCC 購買(PCS-200-011)。(台灣世盟生物科技)。

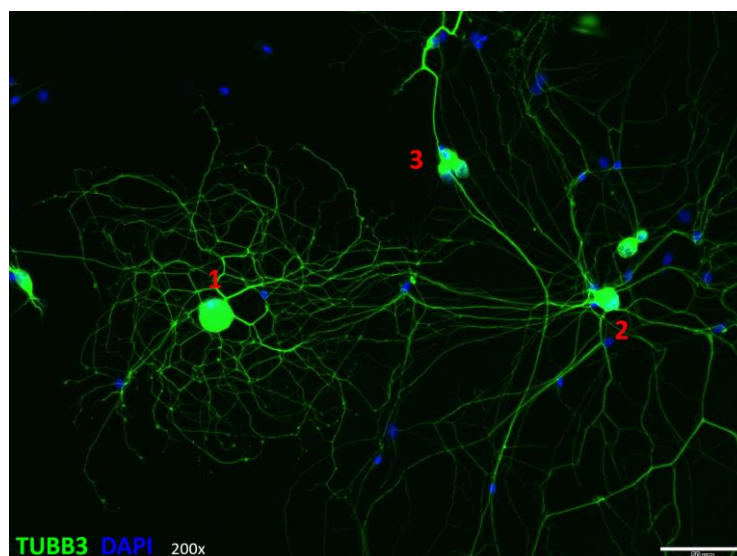
肆、研究結果

一、背根神經節細胞(DRG, dorsal root ganglion)的培養

培養 24 及 48 小時後，以光學顯微鏡觀察，可以看到有些樹突狀細胞開始產生出來。依形態上，應屬神經來源的細胞。

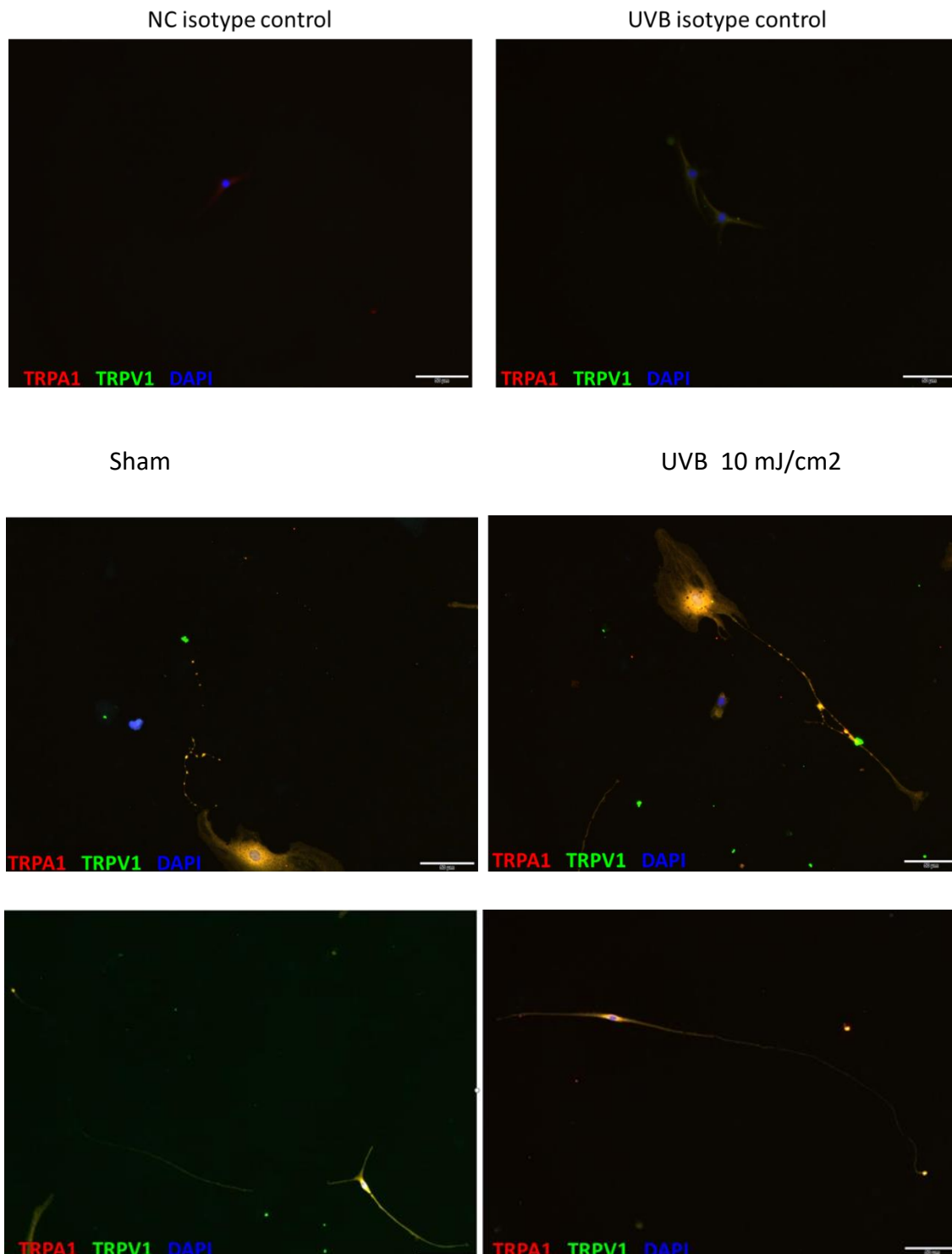


在第 48 小時，以 Tubulin 3 來染神經細胞骨架，可以看到很明顯的分支構造。



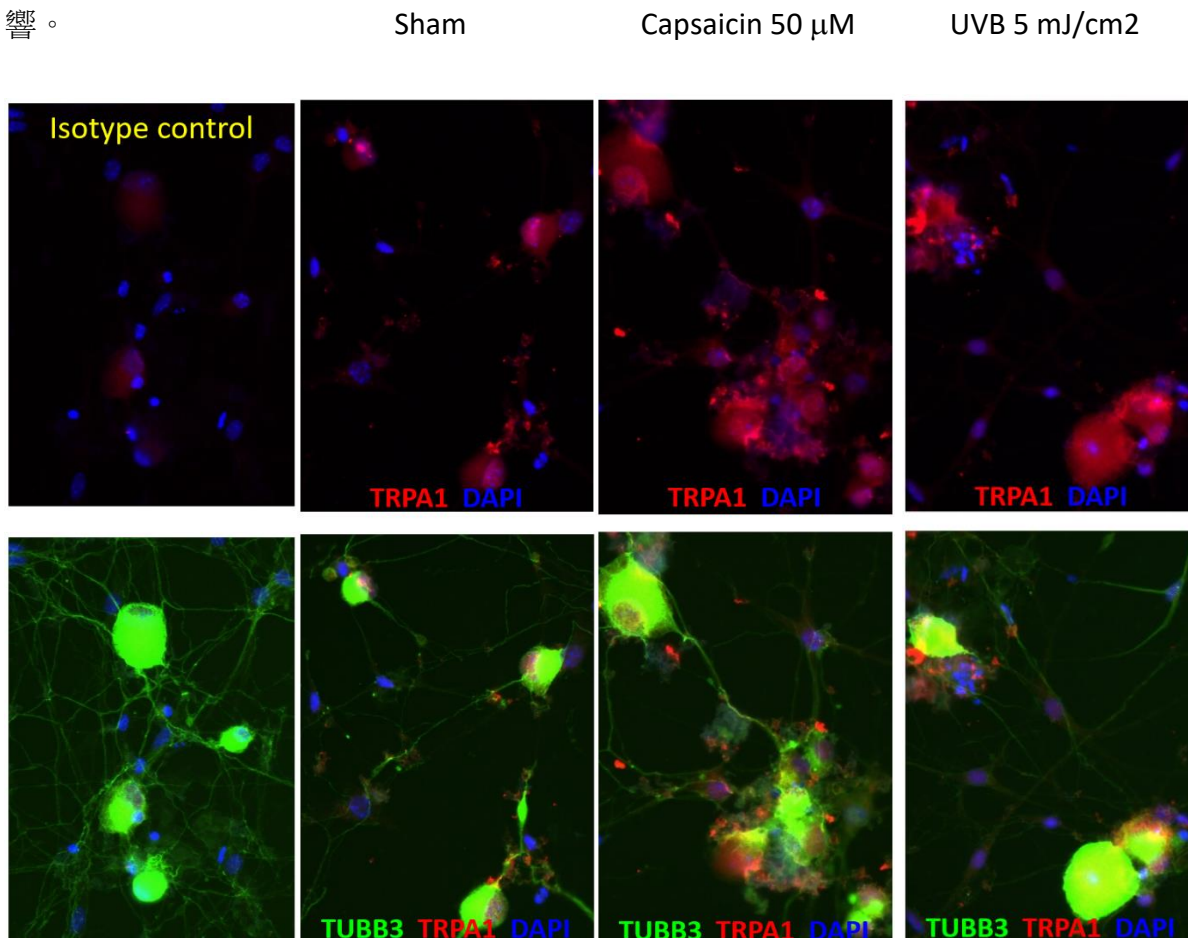
二、DRG 細胞照射 UVB 後引起 TRPA1 表現增加

DRG 細胞以 10 mJ/cm² UVB 照射後，對 TRPA1/TRPV1 作螢光染色。TRPA1 以 Novus NB110-40763 (1:200, 5 ug/ml) 染紅色；TRPV1 以 Novus NBP1-71774 (1:200, 5 ug/ml) 染綠色；DAPI 藍色染細胞核。

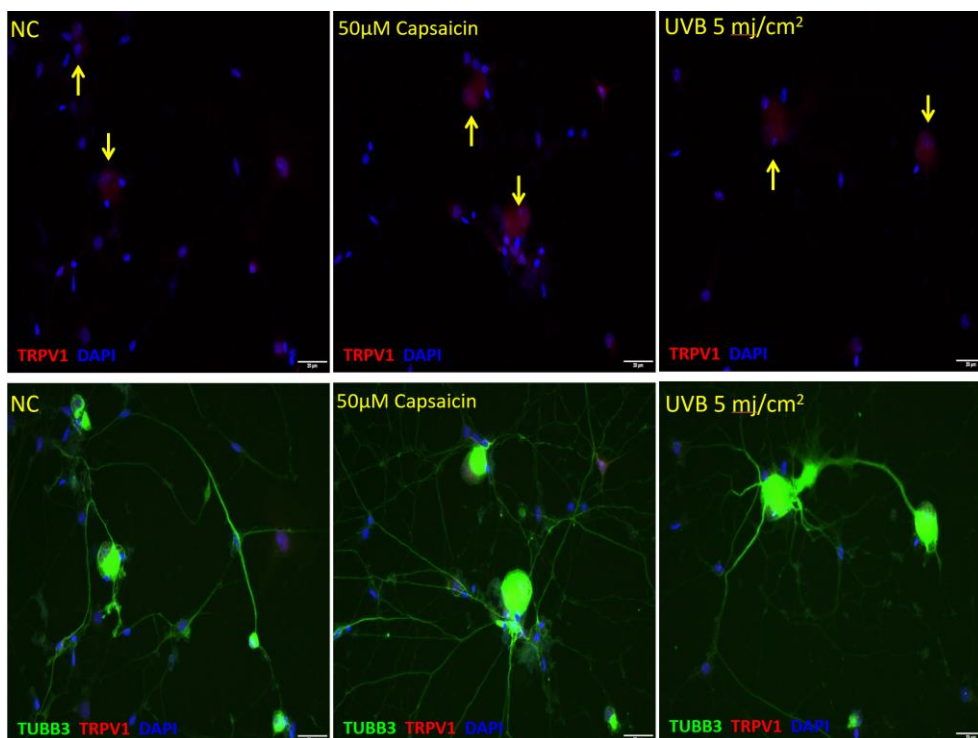


結果發現：未照射 UVB 時，DRG 細胞有些許表現 TRPA1 及 TRPV1，照射 UVB 後，發現 TRPV1 及 TRPA1 的表現都有些微增加。接下來，我用較低能量的 UVB 5 mJ/cm²，並同時加入

Capsaicin 陽性控制組，來研究是否較低的 UVB 能量對 DRG 的 TRPV1/TRPA1 會有不一樣的影響。

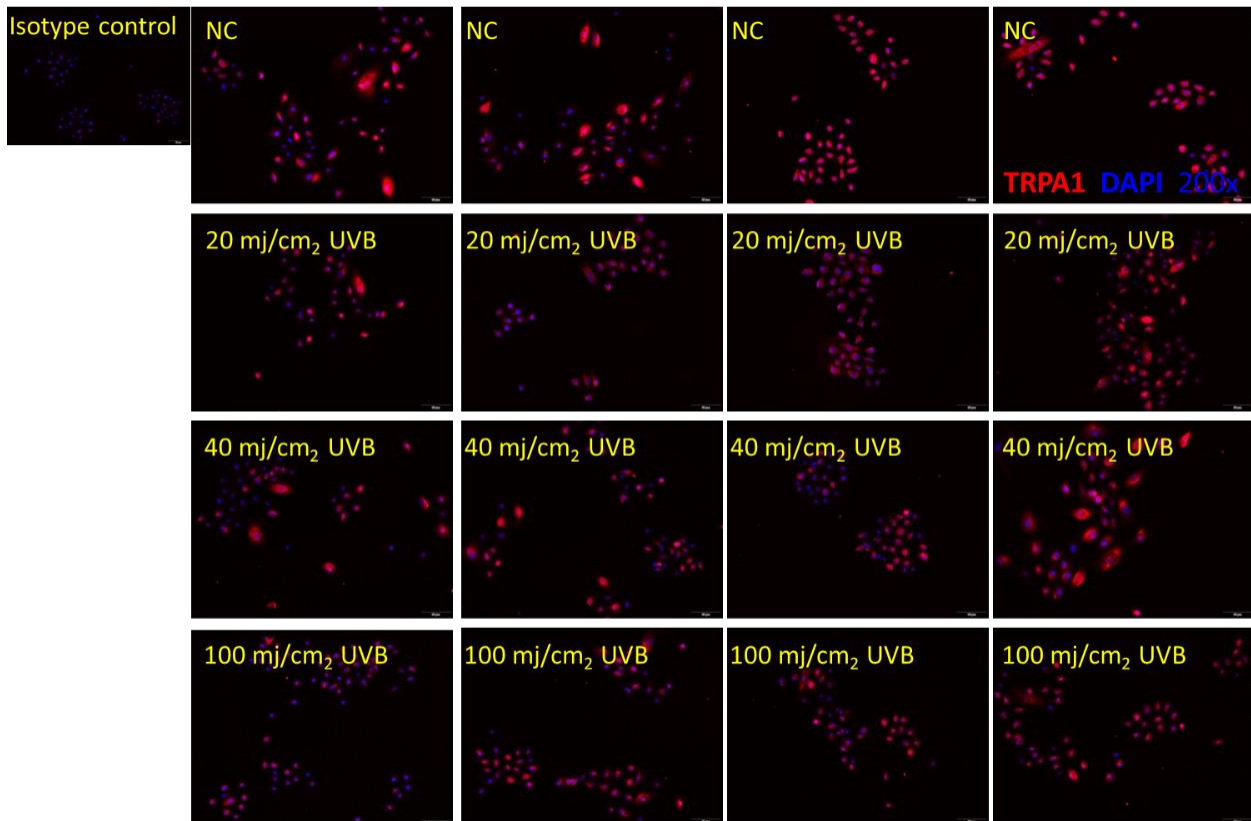


上圖可看到，UVB 在 5 mJ/cm² 的照射或 Capsaicin 處理，會引起相當程度 TRPA1 的表現增加。下圖，TRPV1 的表現則未受 capsaicin 或是 UVB 5 mJ/cm² 的影響。



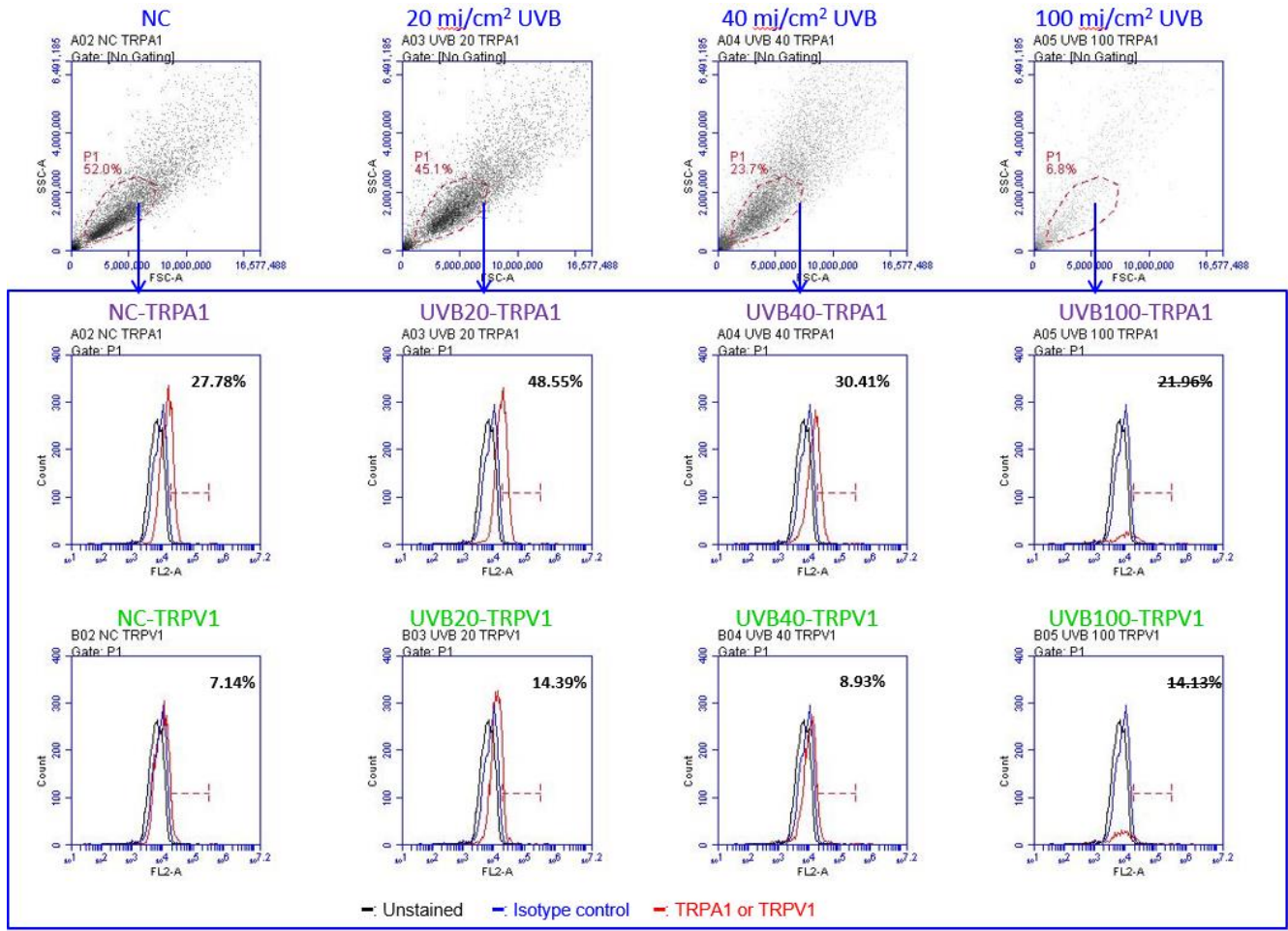
三、UV 照射角質細胞後的 TRPA1 表現：以螢光顯微鏡觀察

測試 TRPA1 在角質細胞中，以 UVB 不同劑量照射後的表現。以 UVB 20, 40, 100 mj/cm² 照射後，我發現在高劑量下，細胞的數目減少，因此，之後的實驗改成用 15 mj/cm² 照射。且 TRPA1 的表現在照射之後，在角質細胞的表現並無明顯增加。(TRPA1, Novus NB110-40763；TPRV1 Invitrogen PA1-748)

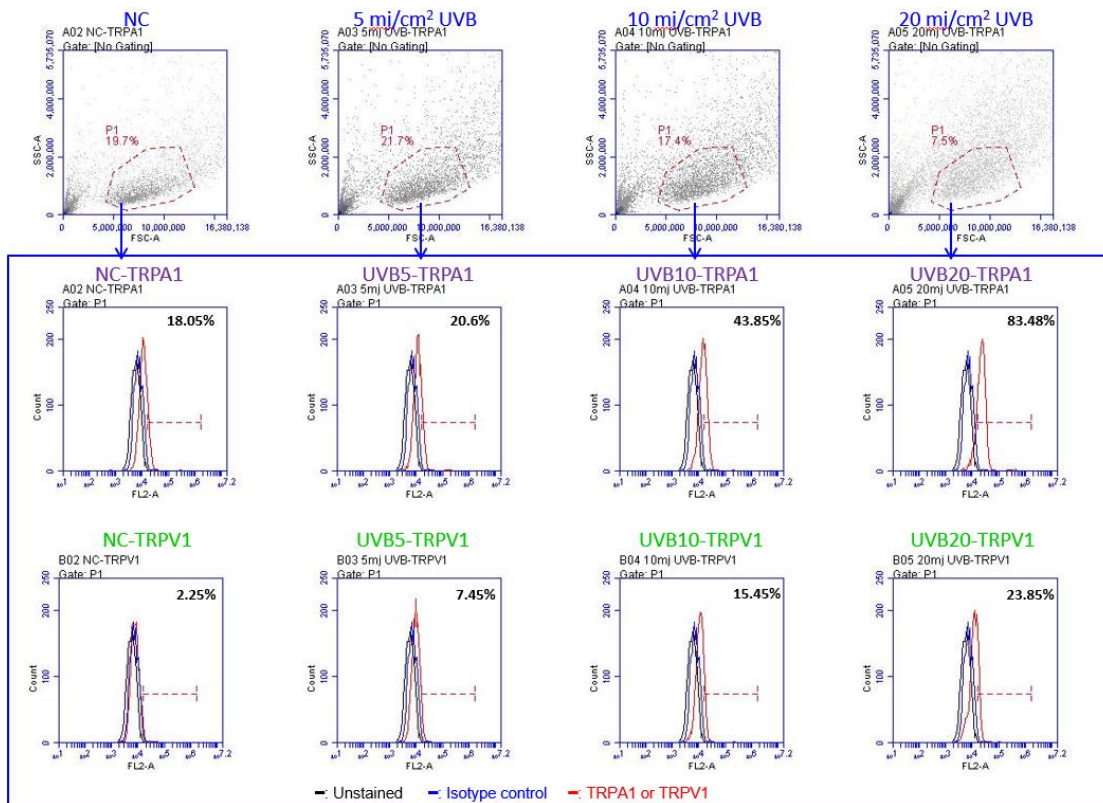


四、UVB 照射促使角質細胞 TRPV1 及 TRPA1 表現顯著增加：以流式細胞儀測量

接下來，我運用另一種方法，流式細胞儀(flow cytometry)，來測量角質細胞照射完 UVB 後，表面表現 TRPV1 及 TRPA1 的表現。使用不同能量的 UVB(20, 40, 100 mJ/cm²)照射完角質細胞後 24 小時後，再來量測細胞表面的 TRPV1 及 TRPA1 的表現。結果顯示，UVB 100 mJ/cm² 的細胞數明顯降低，可能已有細胞毒性，UVB 20 mJ/cm² 照射後，TRPA1 的表現從 27% 增加到 48%；TRPV1 的表現則從 7% 增加到 14%。顯示 UVB 20 mJ/cm² 的照射後，促使角質細胞的 TRPV1 及 TRPA1 的表現顯著增加。

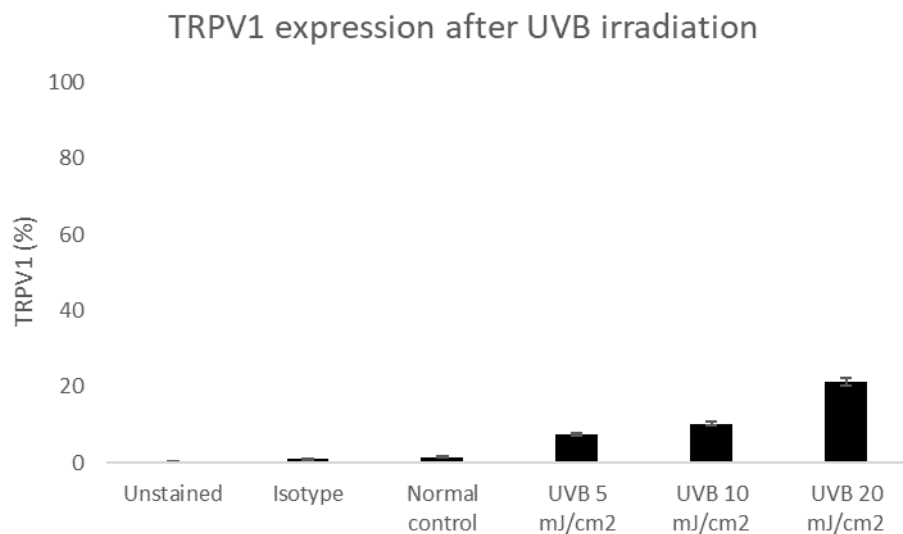
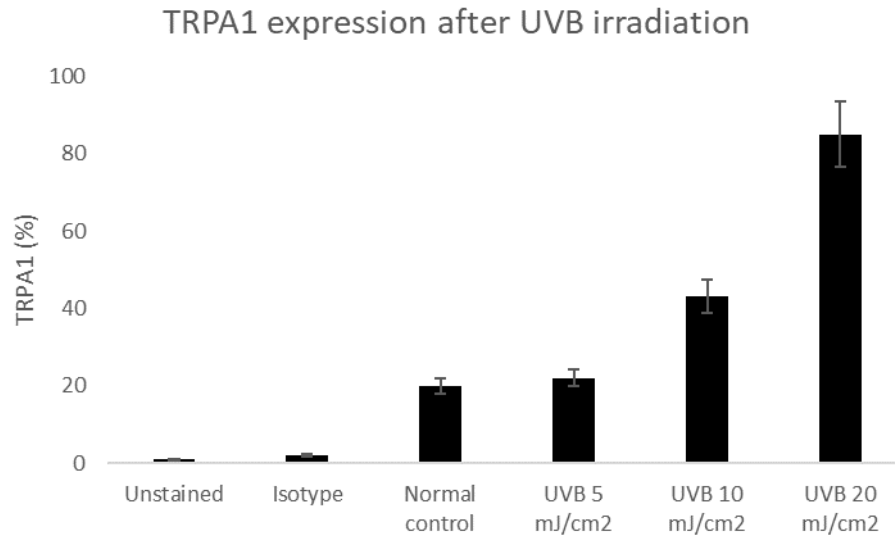


由於 UVB 40mJ/cm² 照射後，TRPA1 及 TRPA1 的表現比 UVB 20mJ/cm² 降低，猜測 40 mJ/cm² 可能也有細胞毒殺性。所以下次的實驗，我就想把 UVB 的能量再降低，以 5, 10, 20 mJ/cm² 照射 24 小時後，測量角質細胞的 TRPV1 及 TRPA1 的表現。



結果發現，其中 UVB 20mJ/cm² 所造成的 TRPA1(18%→83%)與 TRPV1(2%→24%)上升雖然顯著，但細胞群相對於其它組別少，表示 20mJ/cm² 在本次的實驗還是有細胞毒性。而 UVB 10mJ/cm² 造成 TRPA1(18%→43%)與 TRPV1(2%→15%)顯著上昇，比起 UVB 5mJ/cm² 更高。綜合以上，我發現 UVB 10 mJ/cm² 的照射，確實顯著增加角質細胞的 TRPA1 及 TRPV1 的表現。

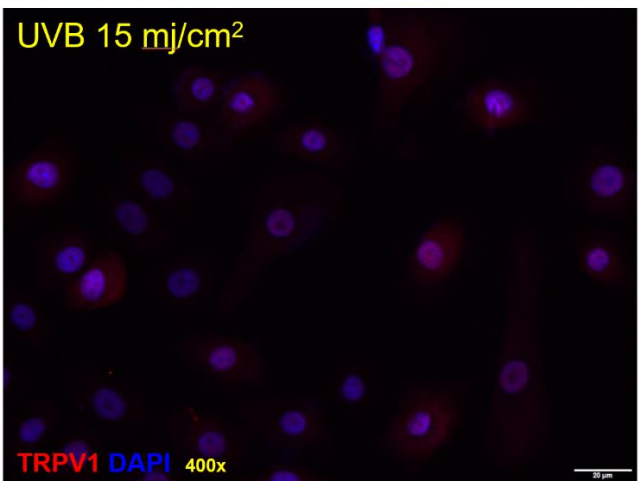
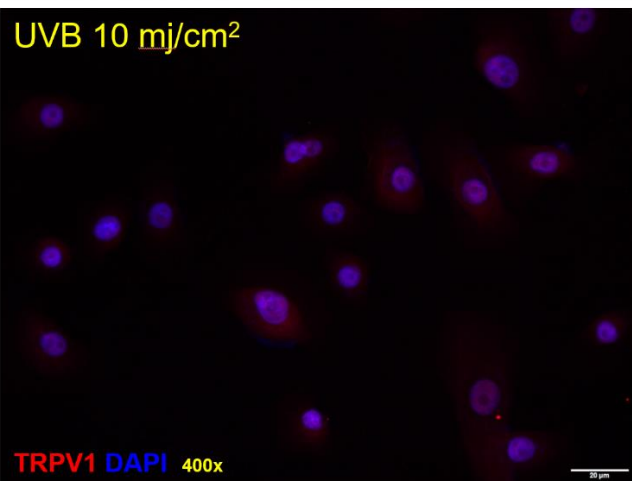
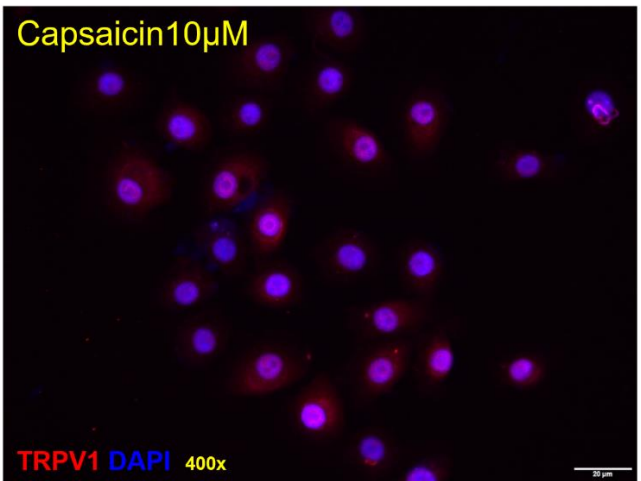
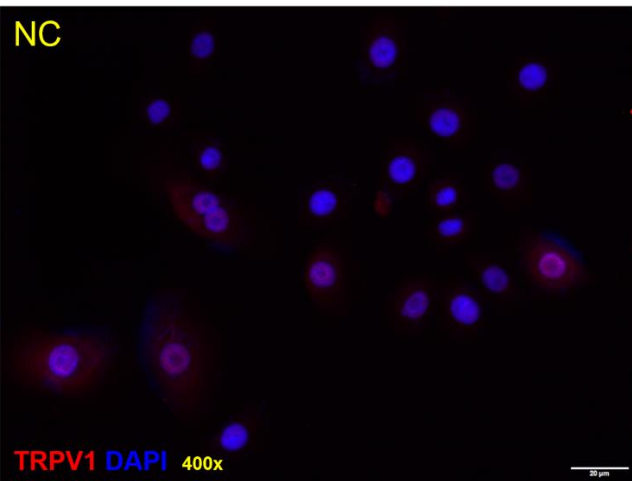
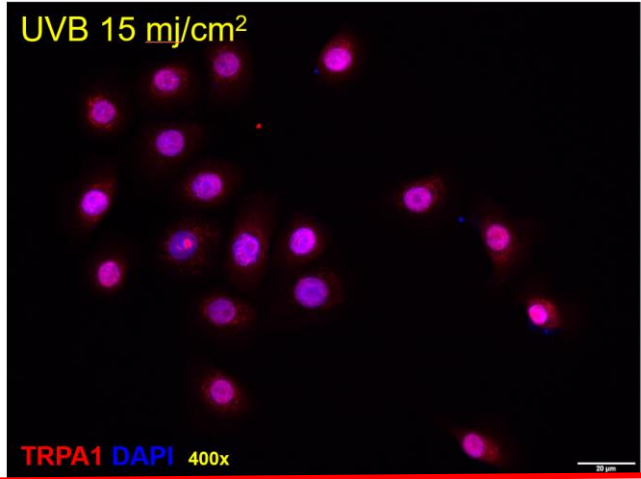
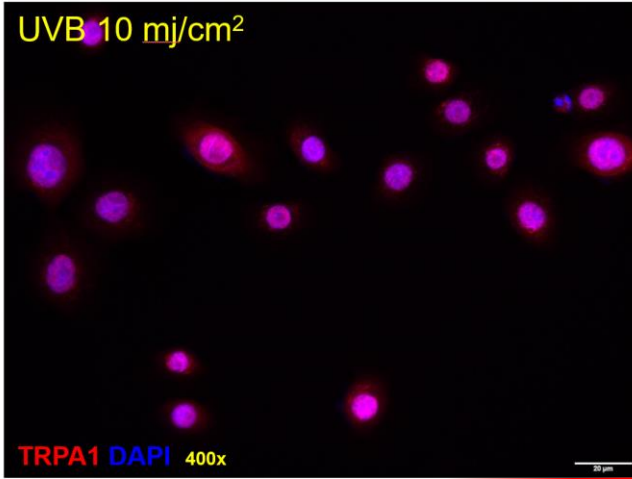
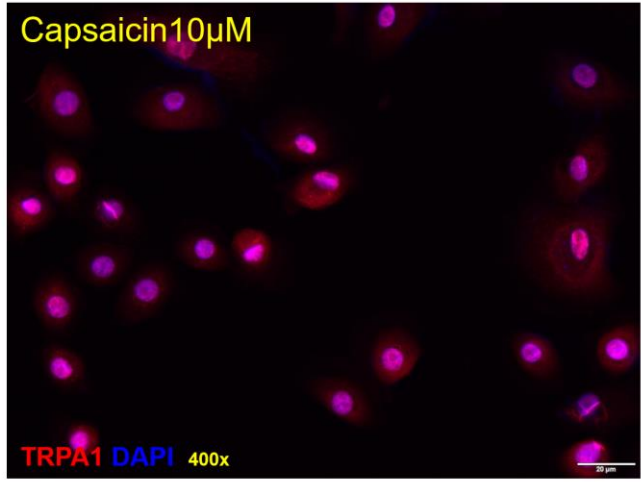
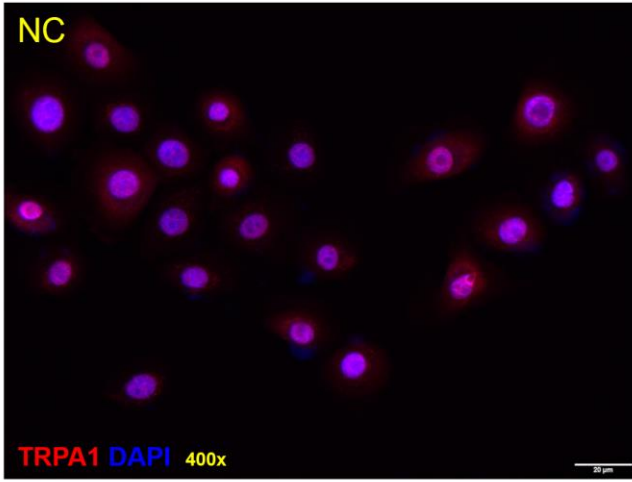
以上兩個流氏細胞儀的實驗，我將圖表作量化如下。



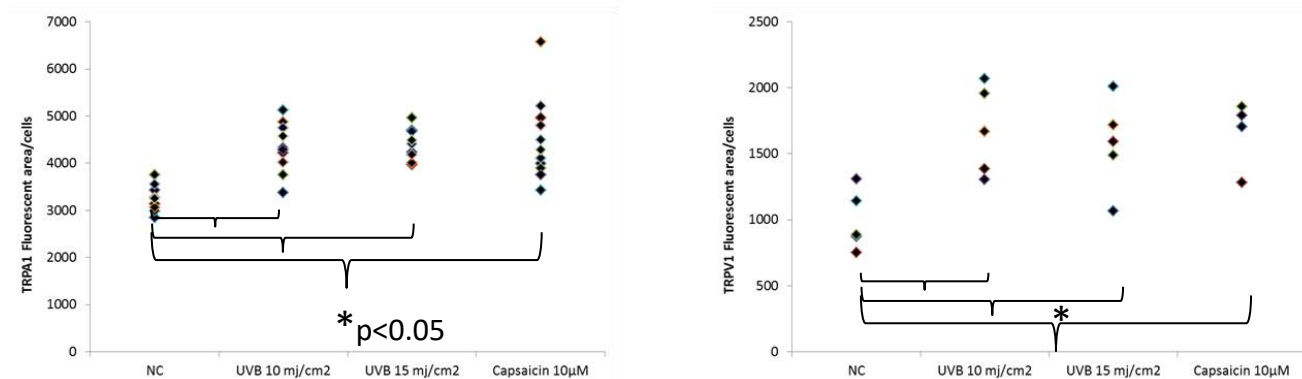
結果顯示，不管 TRPV1 或是 TRPA1 在照射 UVB 10 mJ/cm² 及 20 mJ/cm² 24 小時後，都有顯著的表現增加。

四、UVB 照射促使角質細胞 TRPV1 及 TRPA1 表現顯著增加：以螢光顯微鏡測量

由於在以上的實驗中，我發現 UVB 10 mJ/cm² 的照射，會造成角質細胞的 TRPV1/TRPA1 表現增加(流式細胞儀)，而 UVB 20 mJ/cm² 的照射，會造成角質細胞的毒性。我就想回過頭來，用 10-15 mJ/cm² 的 UVB 照射後，用螢光顯微鏡測量角質細胞的 TRPV1 and TRPA1 的表現。下圖可以看到以 capsaicin 當作陽性對照組，以 capsaicin 處理後，不管 TRPA1/TRPV1 的表現都有增加。

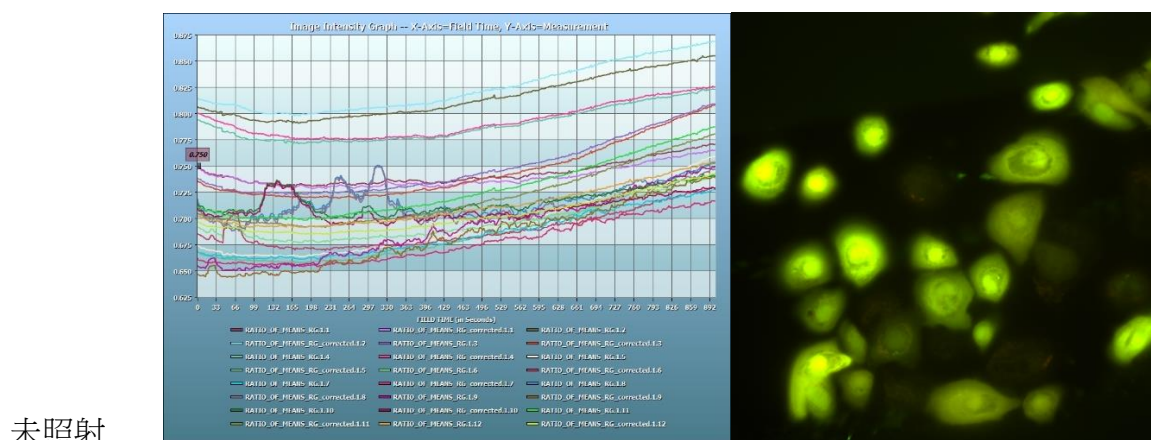


以螢光強度量化後，可以看到 UVB 10 與 15 mJ/cm^2 的強度，均可以使得 TRPA1/TPRV1 的表現增加。其中，TRPA1 的表現比 TPRV1 的表現強度高，這結果與流式細胞儀的結果相符合。

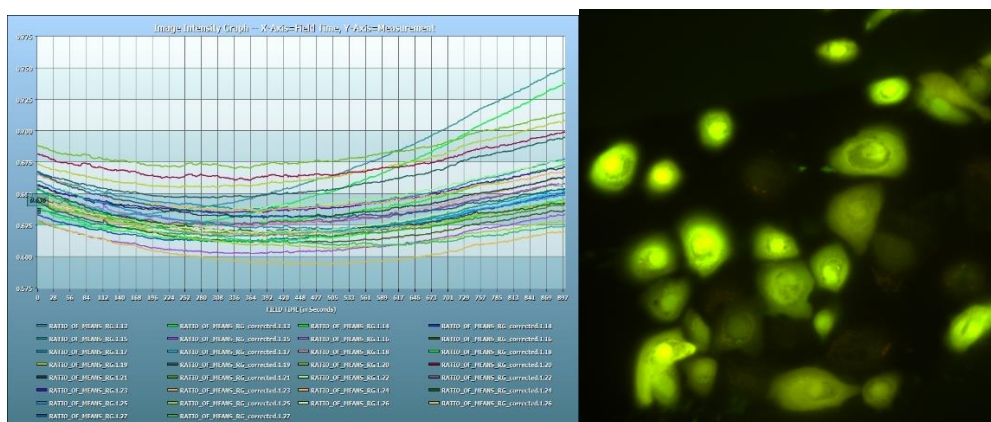


五、UV 照射角質細胞後的鈣離子通透改變

人類角質細胞的培養及以 UVB 15 mJ/cm^2 照射後，以螢光顯微鏡實時觀察鈣離子影像。每一條曲線代表一顆細胞的鈣離子影像強度。



照射 UVB 15 mJ/cm^2



這個實驗看起來不管有無照紫外線，胞內的鈣離子影像的強度(Y 軸)並無明顯不同。由於照完光線後，無法立刻放到螢光顯微鏡下看，因此隔了約 5 分鐘，無法發現照完紫外線後，實時的鈣離子影像。之後考慮將使用該螢光顯微鏡含 UV emission 的光線來取代目前的紫外線，方能測到光照後直接的細胞鈣離子反應。但由於目前的鈣離子分析儀並無另外的多光子雷射管，所以尚未能直接量測 UV 對鈣離子的實時分析。另一方式是可使用 Thapsigargin 或是 ATP 引起鈣離子活化，再比較有無照 UVB，細胞的鈣離子反應。

伍、討論

本研究發現 UVB 可以增加 TRPA1 及 TRPV1 在背根神經節細胞的表現。UVB 照射後，顯著增加角質細胞的 TRPA1 及 TRPV1 的表現，但 UVB 照射後的角質細胞的鈣離子通透影響不大。

一、不同光線強度及時間軸可更增加或使用 TRPV1-GFP 小鼠

本實驗結果發現 UVB 可增加 TRPA1 及 TRPV1 在 DRG 細胞的表現，但是幅度並不大，可以使用不同 UVB 強度照射，並在不同的時間點，以螢光顯微鏡再度觀察，或者是直接利用 TRPV1-GFP transgenic mouse，來直接量測 TRPV1 的強度，不用染色 GENSAT program (MMRRC services; UC Davis, CA)。

二、直接照射紫外線後，實時觀察細胞鈣離子影像

本實驗乃以紫外線照射器照射細胞一定劑量後，才放到鈣離子影像儀去看鈣離子的分析。因此，結果似乎有照 UV 和沒有照 UV 的鈣離子影像差別不大。而照完紫外線後實時觀察，未來將要使用 Two-beam confocal microscope 來觀察，一方面可以使用紫外線直接擊發某一顆或某群細胞一定劑量後，實時觀察，這樣可以直接回答是否紫外線直接造成鈣離子的活化。

三、紫外線會導致 DRG 細胞的 TRPV1/TRPA1 表現增加

過去有關紫外線引起 DRG 細胞的 TRPV1/TRPA1 的表現調節只有三篇論文。第一篇，Cao 等人發現發現使用 broad-band UVB 照射小鼠後，其抓癢的次數在無 TRPV1 的小鼠中較低；而且，以背根神經元細胞照射 UVB 後，TRPV1 及 TRPA1 的 mRNA 增加，且對 capsaicin 100nM 及 KCl 100 mM 造成的胞內鈣離子反應加強²¹。不過，在他們的研究中，並未有紫外線是否造成

蛋白質層次的 TRPV1 及 TRPA1 的表現。其他二篇論文，則主要是研究紫外線照射皮膚後引起的發炎如何間接導致 TRPV1 及 TRPA1 的增加^{20,23}。因此我的研究結果是相當有意義的，我看的是蛋白質的表現，而非只有 mRNA 的表現，而且是獨立於發炎的結果。接下來我將更進一步測量照紫外光後實時鈣離子的影像分析，將更有功能性結果。

四、角質細胞的下游調控分析

由於角質細胞在照射 UVB 後，顯示有 TRPA1/TRPV1 增加的現象。之後可以研究其功能性的變化，例如鈣離子影像或是細胞中的訊息傳遞，這需要更多的再現性實驗結果及更多的時間，在短暫的高中一年級的半年時間較不易完成。不過，在這實驗過程中，我更了解了細胞鈣離子的動態影像的測量，看到活細胞的鈣離子影像亮了起來，就像一群螢光蟲間歇性發光一樣。

陸、結論

本研究發現 UVB 可以增加 TRPA1 及 TRPV1 在背根神經節細胞的表現。UVB 照射後，顯著增加角質細胞的 TRPA1 及 TRPV1 的表現，但 UVB 照射後的角質細胞的鈣離子通透影響不大。這初步的研究結果，顯示 (1) UVB 會顯著增加角質細胞的 TRPA1 及 TRPV1 的表現；(2) UVB 照射 DRG 細胞後產生的 TRPA1 的增加，與光照引起之麻痛可能有關。

柒、參考文獻資料

1. Olinski LE, Lin EM , Oancea E. Illuminating insights into opsin 3 function in the skin. *Adv Biol Regul* 2020;75:100668.
2. Bonade M, Ogura A, Corre E, Bassaglia Y , Bonnaud-Ponticelli L. Diversity of Light Sensing Molecules and Their Expression During the Embryogenesis of the Cuttlefish (*Sepia officinalis*). *Front Physiol* 2020;11:521989.
3. Patke A, Murphy PJ, Onat OE, Krieger AC, Ozcelik T, Campbell SS et al. Mutation of the Human Circadian Clock Gene *CRY1* in Familial Delayed Sleep Phase Disorder. *Cell* 2017;169:203-15 e13.
4. Lan Y, Wang Y , Lu H. Opsin 3 is a key regulator of ultraviolet A-induced photoageing in human dermal fibroblast cells. *Br J Dermatol* 2020;182:1228-44.
5. Castellano-Pellicena I, Uzunbajakava NE, Mignon C, Raafs B, Botchkarev VA , Thornton MJ. Does blue light restore human epidermal barrier function via activation of Opsin during cutaneous wound healing? *Lasers Surg Med* 2019;51:370-82.
6. Hu QM, Yi WJ, Su MY, Jiang S, Xu SZ , Lei TC. Induction of retinal-dependent calcium influx in human melanocytes by UVA or UVB radiation contributes to the stimulation of melanosome transfer. *Cell Prolif* 2017;50.
7. Caterina MJ, Schumacher MA, Tominaga M, Rosen TA, Levine JD , Julius D. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature* 1997;389:816-24.
8. Paulsen CE, Armache JP, Gao Y, Cheng Y , Julius D. Structure of the TRPA1 ion channel suggests regulatory mechanisms. *Nature* 2015;520:511-7.
9. Basbaum AI, Bautista DM, Scherrer G , Julius D. Cellular and molecular mechanisms of pain. *Cell* 2009;139:267-84.
10. Weinkauf B, Rukwied R, Quiding H, Dahllund L, Johansson P , Schmelz M. Local gene expression changes after UV-irradiation of human skin. *PLoS One* 2012;7:e39411.
11. Pezet S , McMahon SB. Neurotrophins: mediators and modulators of pain. *Annu Rev Neurosci* 2006;29:507-38.
12. Chizh BA, O'Donnell MB, Napolitano A, Wang J, Brooke AC, Aylott MC et al. The effects of the TRPV1 antagonist SB-705498 on TRPV1 receptor-mediated activity and inflammatory hyperalgesia in humans. *Pain* 2007;132:132-41.
13. Schaffler K, Reeh P, Duan WR, Best AE, Othman AA, Faltynek CR et al. An oral TRPV1 antagonist attenuates laser radiant-heat-evoked potentials and pain ratings from UV(B)-inflamed and normal skin. *Br J Clin Pharmacol* 2013;75:404-14.
14. Hill K , Schaefer M. Ultraviolet light and photosensitising agents activate TRPA1 via generation of

oxidative stress. *Cell Calcium* 2009;45:155-64.

15. Guntur AR, Gu P, Takle K, Chen J, Xiang Y, Yang CH. *Drosophila* TRPA1 isoforms detect UV light via photochemical production of H₂O₂. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2015;112:E5753-61.

16. Bellono NW, Kammel LG, Zimmerman AL, Oancea E. UV light phototransduction activates transient receptor potential A1 ion channels in human melanocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013;110:2383-8.

17. Huang KF, Ma KH, Jhap TY, Liu PS, Chueh SH. Ultraviolet B irradiation induced Nrf2 degradation occurs via activation of TRPV1 channels in human dermal fibroblasts. *Free Radic Biol Med* 2019;141:220-32.

18. Huang KF, Ma KH, Liu PS, Chen BW, Chueh SH. Ultraviolet B irradiation increases keratin 1 and keratin 10 expressions in HaCaT keratinocytes via TRPV1 activation and ERK phosphorylation. *Exp Dermatol* 2017;26:832-5.

19. Kusumaningrum N, Lee DH, Yoon HS, Park CH, Chung JH. Ultraviolet light-induced gasdermin C expression is mediated via TRPV1/calcium/calcineurin/NFATc1 signaling. *Int J Mol Med* 2018;42:2859-66.

20. Camponogara C, Brum ES, Pegoraro NS, Brusco I, Brucker N, Oliveira SM. Diosmetin, a novel transient receptor potential vanilloid 1 antagonist, alleviates the UVB radiation-induced skin inflammation in mice. *Inflammopharmacology* 2021;29:879-95.

21. Cao L, Yue X, Zhao Y, Du L, Xie Z, Yuan Y et al. Mechanisms of Broad-Band UVB Irradiation-Induced Itch in Mice. *J Invest Dermatol* 2021;141:2499-508 e3.

22. Perner C, Sokol CL. Protocol for dissection and culture of murine dorsal root ganglia neurons to study neuropeptide release. *STAR Protoc* 2021;2:100333.

23. Camponogara C, Brum ES, Pegoraro NS, Brusco I, Rocha FG, Brandenburg MM et al. Neuronal and non-neuronal transient receptor potential ankyrin 1 mediates UVB radiation-induced skin inflammation in mice. *Life Sci* 2020;262:118557.

【評語】 052013

1. 研究作品旨在探討陽光中的紫外線導致皮膚的末梢神經的活化而造成急性的皮膚刺痛感之機轉。實驗結果發現 UVB 可以增加 TRPA1 及 TRPV1 在背根神經節細胞的表現，而TRPA1 的增加，與光照引起之麻痛可能有關，另外實驗結果照紫外線對胞內的鈣離子影像的強度並無明顯不同，此點在實驗設計上應再釐清是否為時間因素。
2. 本作品研究主題清楚且聚焦，適時參考前人的文獻資料，並有系統地收集數據及分析。
3. 作品說明書第 2 頁的摘要書寫宜避免使用英文縮寫，如首度使用英文縮寫也需書寫全名，避免混淆。摘要及其它多處出現 TPR，應為 TRP 之誤。

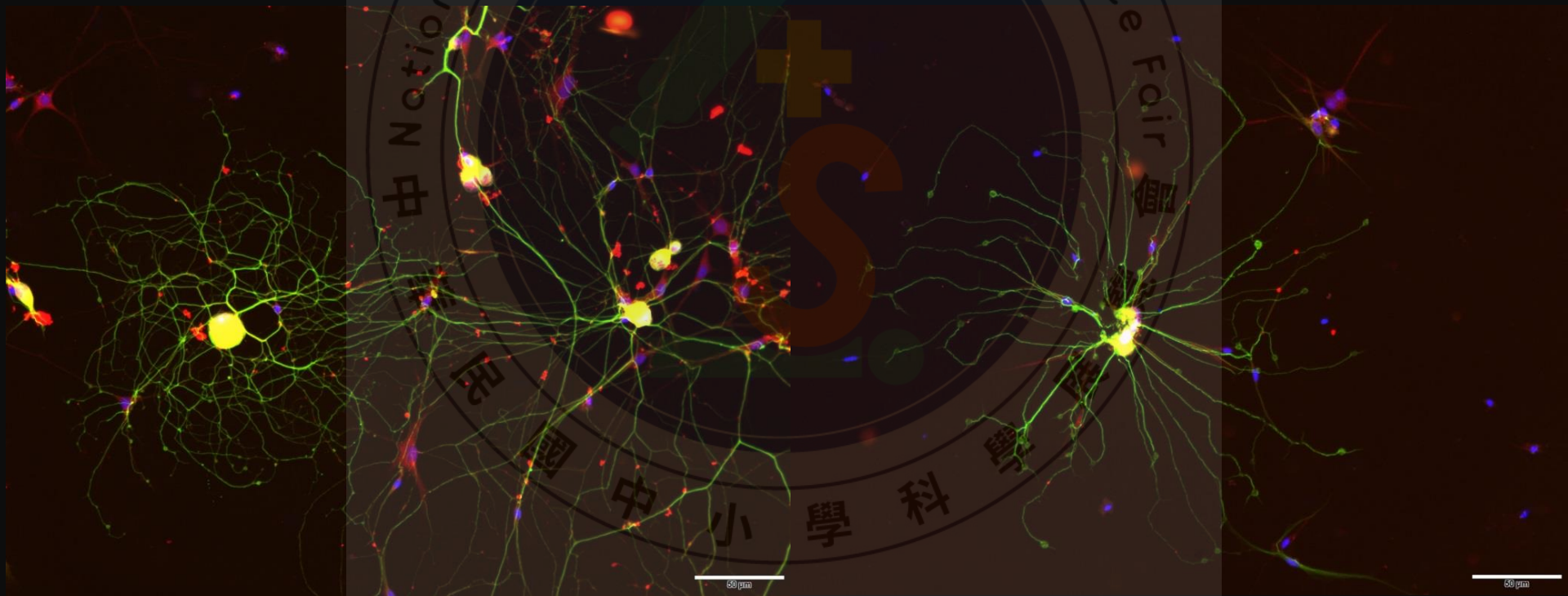
作品簡報

動物與醫學學科

組別：高級中等學校組

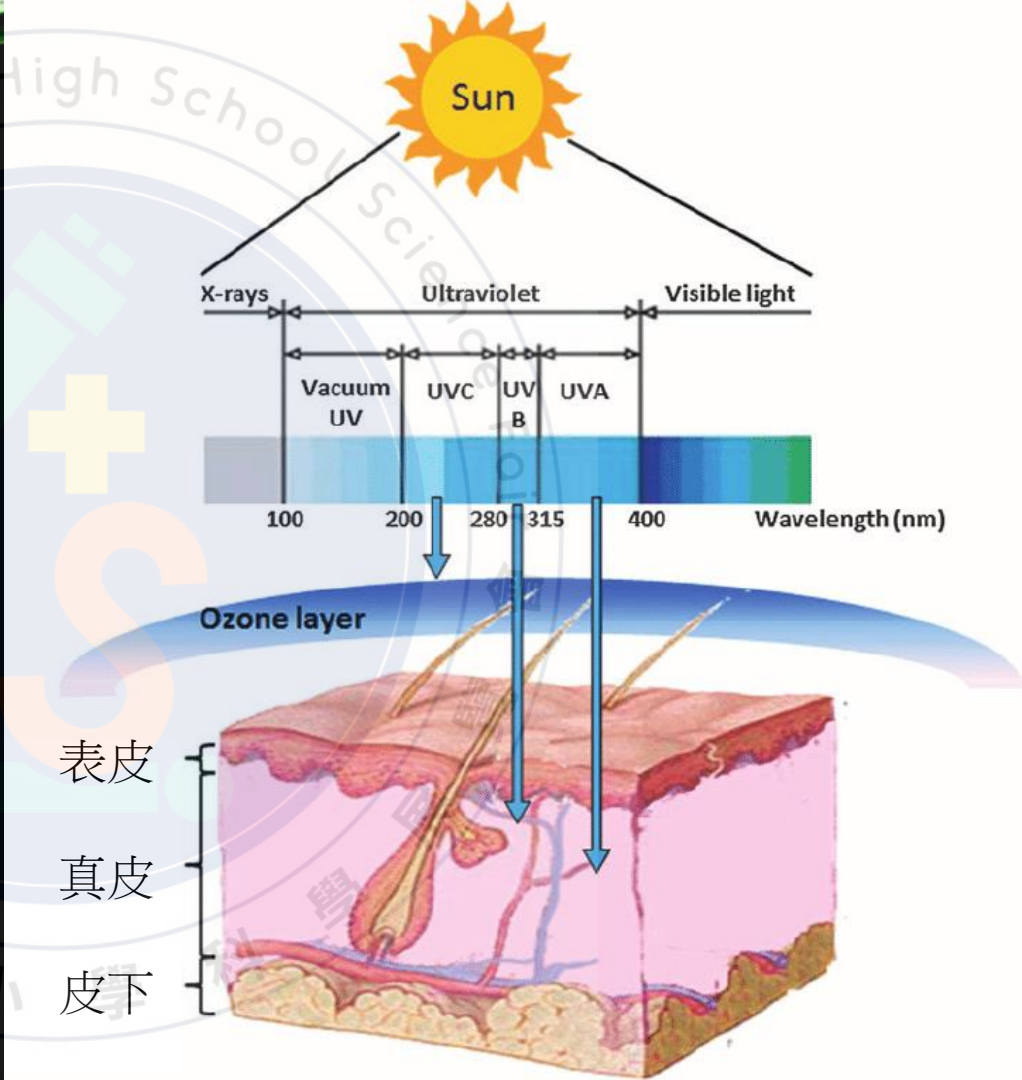
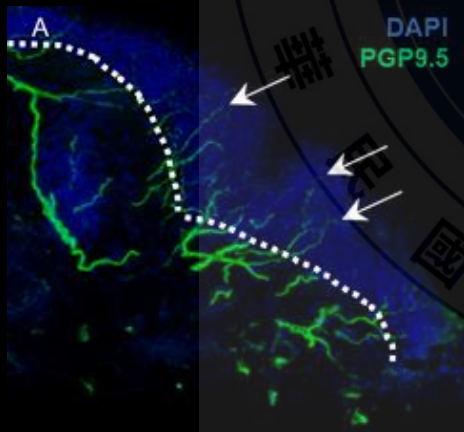
作品名稱：

陽光照射造成皮膚溫熱感覺的神經活化機轉

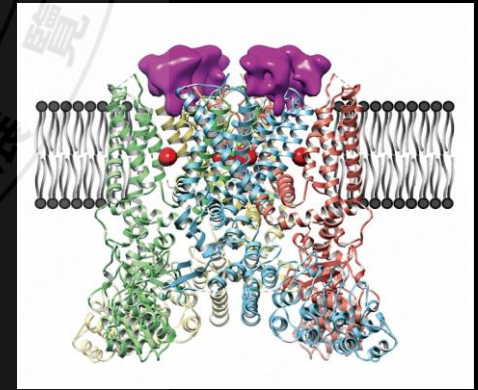
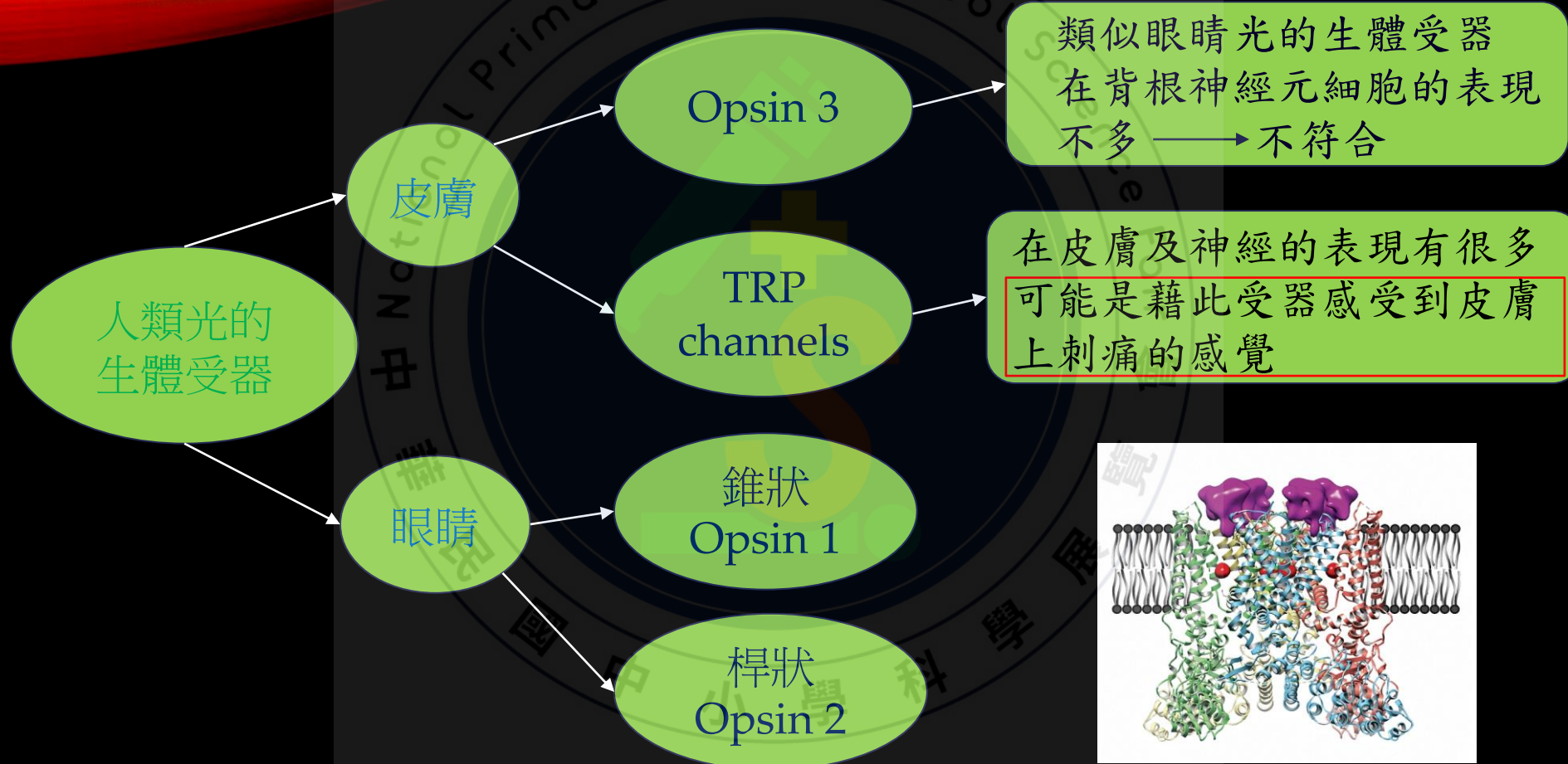


研究動機

- 人體接收陽光時，不僅大腦中有溫暖的感覺，有時更有刺痛的感覺，特別在正中午太陽很大的時候。
- UVB 能量較UVA、可見光及IR高
- 皮膚的感覺神經穿透到表皮



已知可能的人類光生體受器



TRP channels

- TRPV1由Dr. David Julius在1996年發現，許多環境物理/化學因子可刺激。他2020得到諾貝爾獎
- TRP channels是一種鈣離子通道。
- 沒有TRP的果蠅，對光的感知會降低。
- 過去研究顯示，UV會增加TRPV1的表現。但光線如何透過TRPV1來影響皮膚感覺並不知道。
- TRPA1也會受許多物理化學因子刺激。德國Hill發現UVA照射人類胚胎腎細胞會經由TRPA1導致氧化壓力增加。UV調節TRPA1的文獻不多。UV照射使人類皮膚黑色素細胞TRPA1增加。
- 光線對其他皮膚細胞TRPV影響的研究並不多。
- 國防醫學院關小輝發現UVB透過纖維細胞的TRPV1引起Nrf2的降解及角質細胞keratin1/10表現。
- 韓國首爾大學Chung發現UVB會經由TRPV1引發gasdermin C在角質細胞的活化。

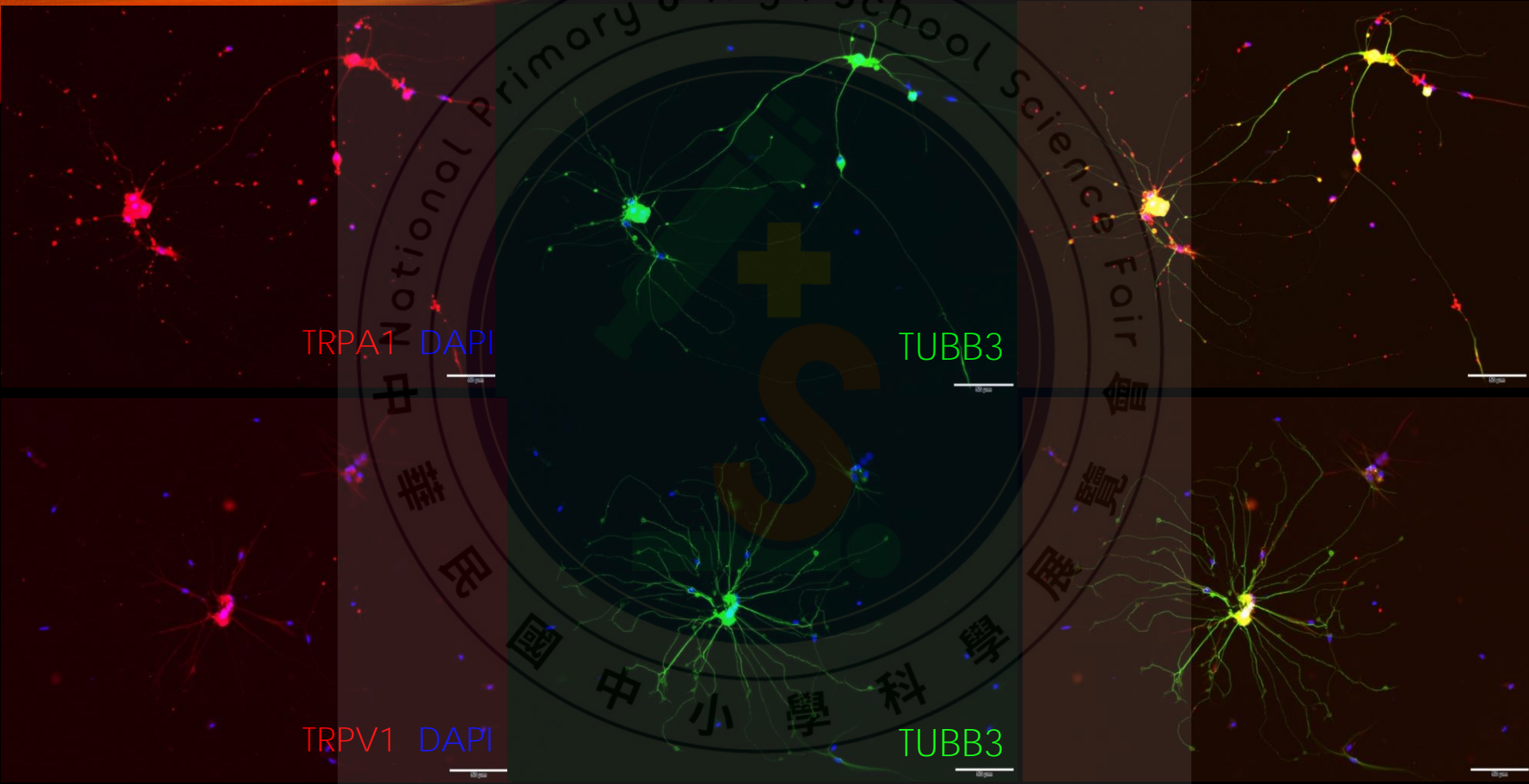
UV對背根神經元的TRPA1/TRPV1影響研究的文獻直到目前都相當少。

2021年10月，美國華盛頓大學Cao發現UVB照射小鼠引起抓癢的次數，在無TRPV1的小鼠中較低；以UVB照射背根神經元細胞後，TRPV1及TRPA1的mRNA增加。在他們的研究中，並未有是否UVB造成蛋白質層次的TRPV1及TRPA1的表現，而且，是否紫外光線照射後，是否會直接造成鈣離子的胞內通透增加並不清楚。

研究假設及研究設計

- 研究假設：
 - UVB照射會造成人類角質細胞或是小鼠背神經元細胞的TRPV1/TRPA1活化。
- 研究設計：
 - 以不同強度的UVB照射人類培養表皮角質細胞或是小鼠的背神經元細胞，然後以螢光顯微鏡及流氏細胞儀，測量它們在細胞上的TRPV1/TRPA1的蛋白質表現，再以鈣離子影像分析儀來作動態鈣離子分析。
 - 實驗組：不同UVB強度
 - 對照組：一般光線
 - 陽性對照組：Capsaicin (TRP 活化)

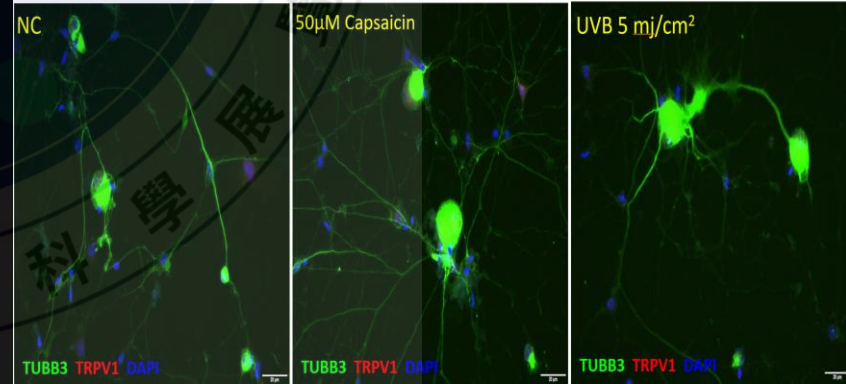
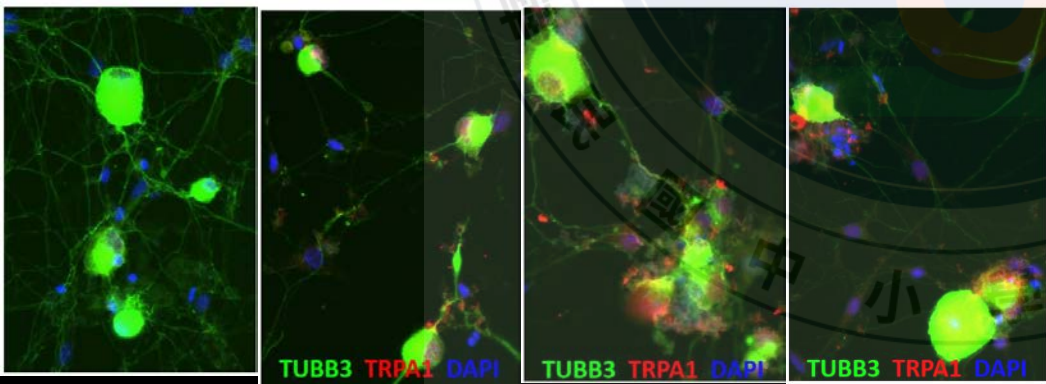
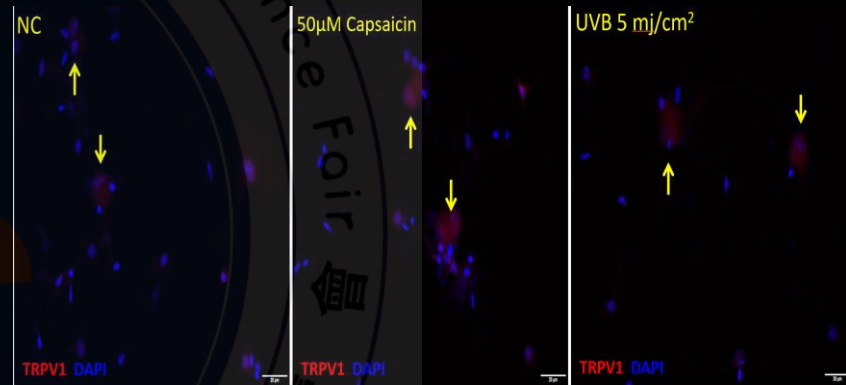
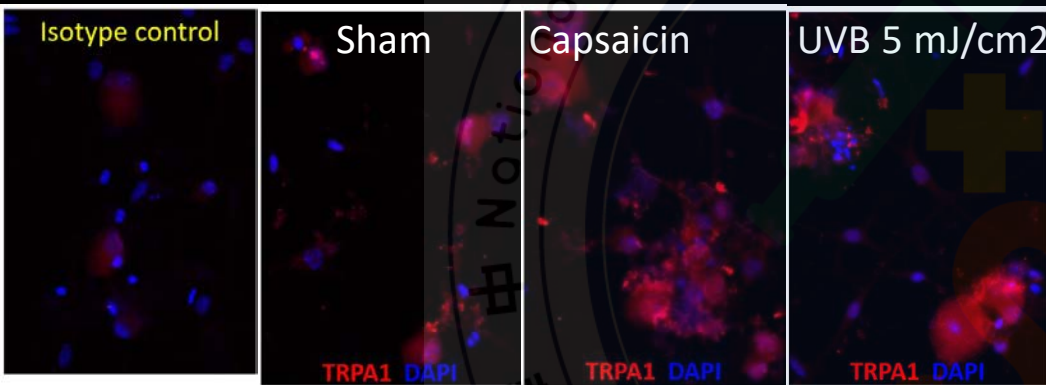
DRG細胞表現TRPA1及TRPV1

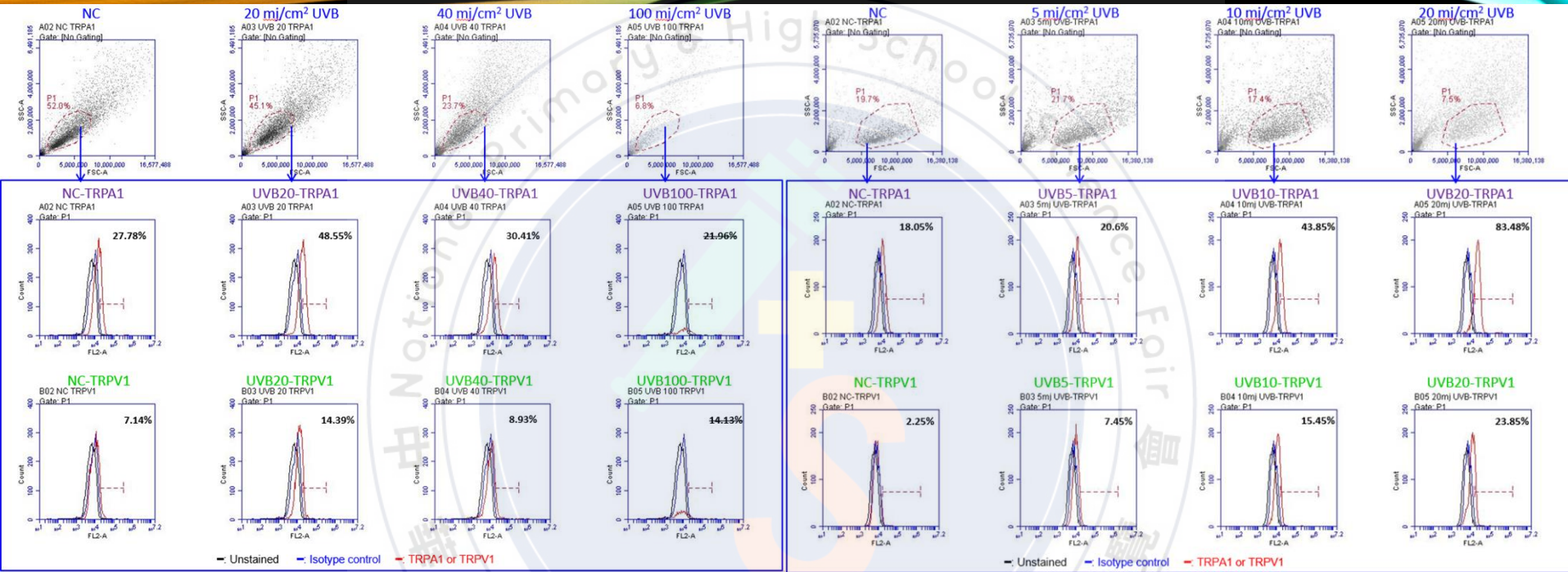


UVB照射增強DRG細胞TRPA1的表現

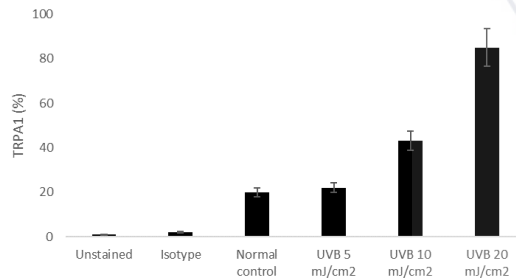
TRPA1

TRPV1



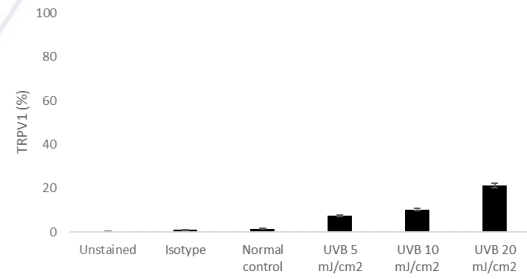


TRPA1 expression after UVB irradiation

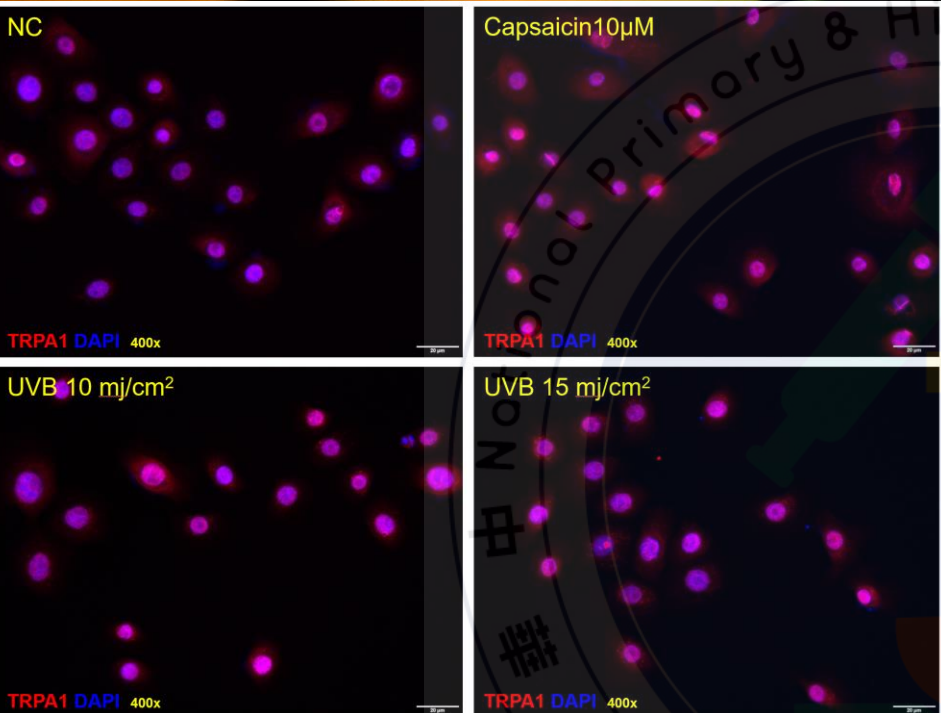


UVB促使角質細胞
TRPV1及TRPA1表現顯著增加
(流氏細胞儀)

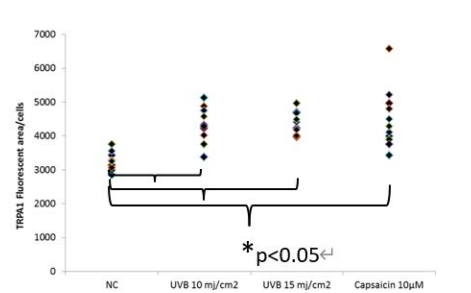
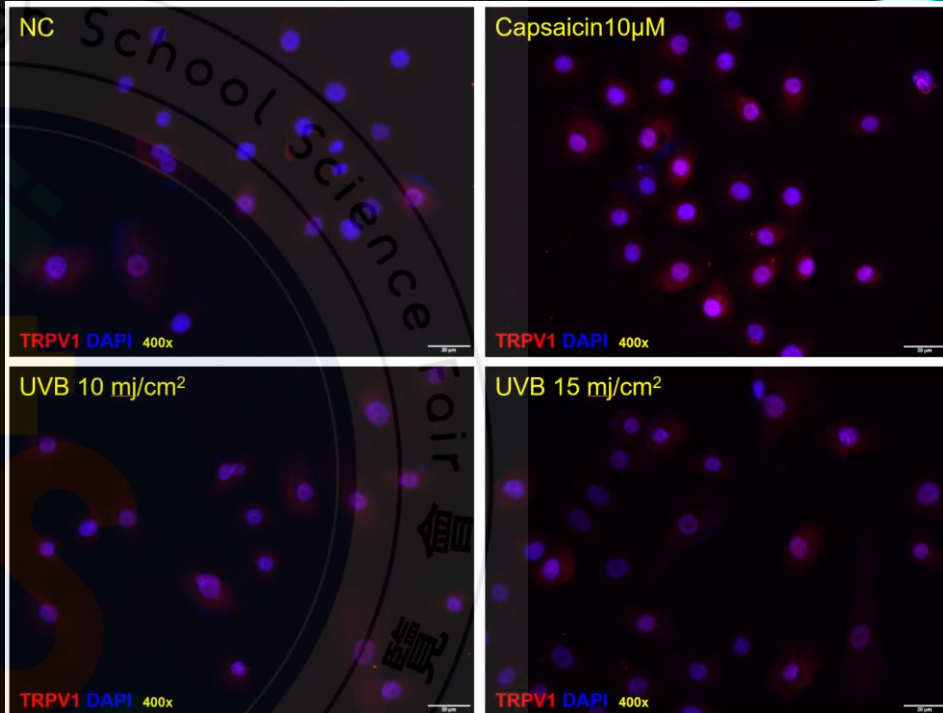
TRPV1 expression after UVB irradiation



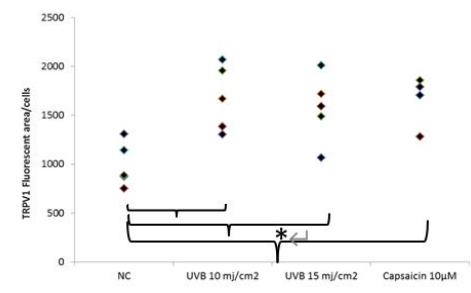
TRPA1

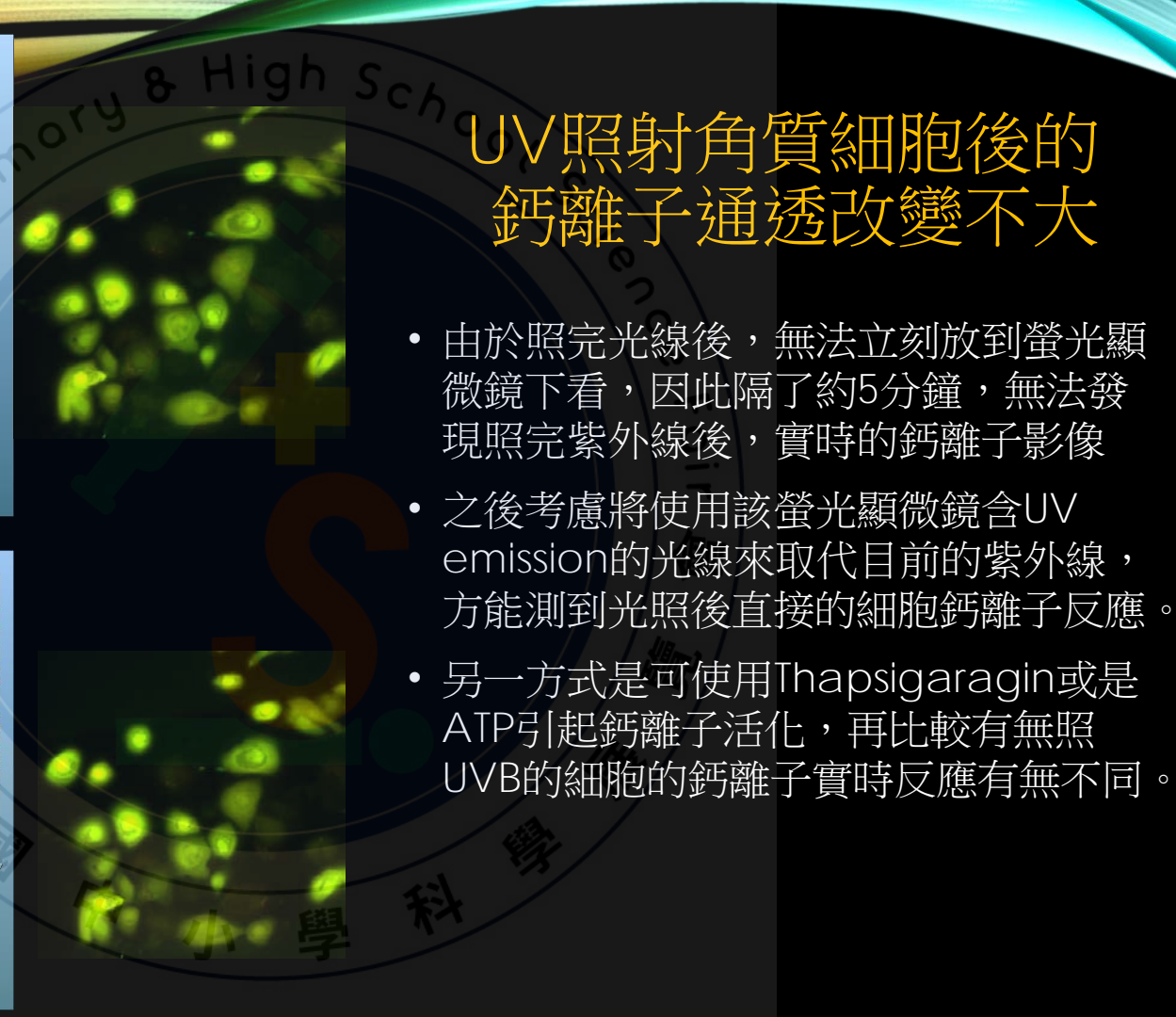


TRPV1



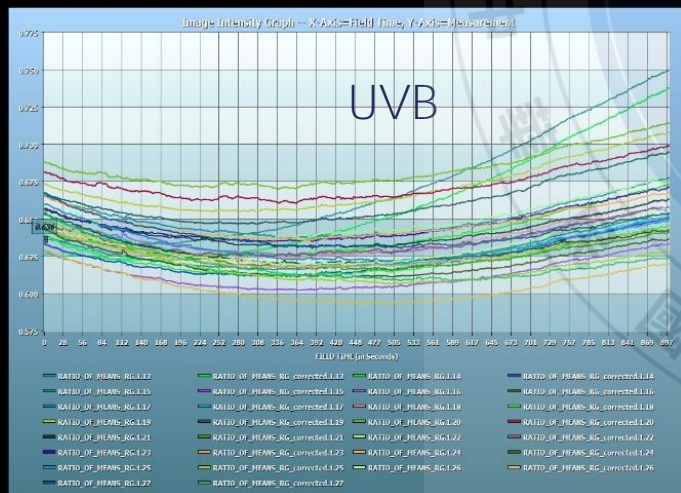
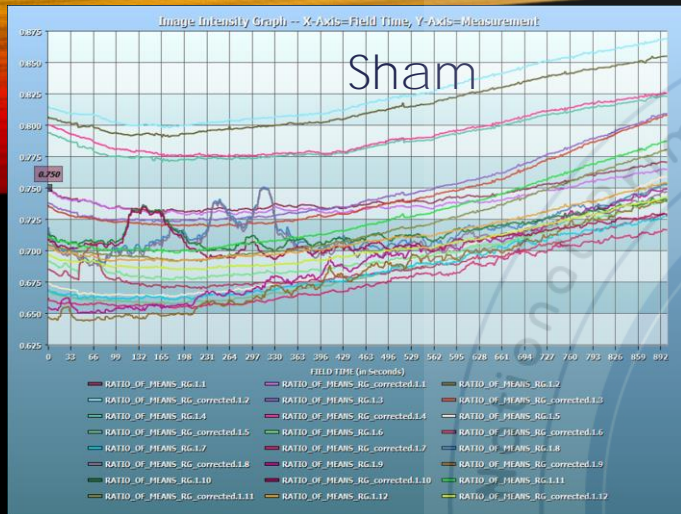
UVB照射促使角質細胞TRPV1及TRPA1表現顯著增加：以螢光顯微鏡測量





UV照射角質細胞後的鈣離子通透改變不大

- 由於照完光線後，無法立刻放到螢光顯微鏡下看，因此隔了約5分鐘，無法發現照完紫外線後，實時的鈣離子影像
- 之後考慮將使用該螢光顯微鏡含UV emission的光線來取代目前的紫外線，方能測到光照後直接的細胞鈣離子反應。
- 另一方式是可使用Thapsigargin或是ATP引起鈣離子活化，再比較有無照UVB的細胞的鈣離子實時反應有無不同。



- 結論**
- 本研究發現UVB顯著增加角質細胞的TRPA1及TRPV1的表現
 - UVB照射DRG細胞後TRPA1的蛋白質表現增加
 - 以上與陽光照到皮膚引起之麻痛有可能有關

討論

一、再使用不同光線強度及時間軸，或可使用TRPV1-GFP小鼠

二、直接照射紫外線後，實時觀察細胞鈣離子影像

三、紫外線會導致DRG細胞的TRPV1/TRPA1表現增加的討論

過去有關紫外線引起DRG細胞的TRPV1/TRPA1的表現調節只有三篇論文。第一篇，UVB造成TRPV1及TRPA1的mRNA增加，但並未有UVB造成蛋白質層次的TRPV1及TRPA1表現的報告。其他二篇論文，則是研究UVB照射皮膚後引起的發炎間接導致TRPV1及TRPA1的增加。本研究看的是蛋白質的表現，而非只有mRNA的表現，而且是獨立於發炎的結果。

四、角質細胞的下游功能性調控分析：之後可深入研究鈣離子影像或是細胞中的訊息傳遞。

五、實驗過程中，我了解了細胞鈣離子的動態影像的測量，看到活細胞的鈣離子影像亮了起來，就像一群螢光蟲間歇性發光一樣。

參考資料

- Basbaum AI, Bautista DM, Scherrer G, Julius D. Cellular and molecular mechanisms of pain. *Cell* 2009;139:267-84.
- Caterina MJ, Schumacher MA, Tominaga M, Rosen TA, Levine JD, Julius D. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature* 1997;389:816-24.
- Paulsen CE, Armache JP, Gao Y, Cheng Y, Julius D. Structure of the TRPA1 ion channel suggests regulatory mechanisms. *Nature* 2015;520:511-7.
- Cao L, Yue X, Zhao Y, Du L, Xie Z, Yuan Y et al. Mechanisms of Broad-Band UVB Irradiation-Induced Itch in Mice. *J Invest Dermatol* 2021;141:2499-508 e3.
- Guntur AR, Gu P, Takle K, Chen J, Xiang Y, Yang CH. Drosophila TRPA1 isoforms detect UV light via photochemical production of H₂O₂. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2015;112:E5753-61.
- Camponogara C, Brum ES, Pegoraro NS, Brusco I, Brucker N, Oliveira SM. Diosmetin, a novel transient receptor potential vanilloid 1 antagonist, alleviates the UVB radiation-induced skin inflammation in mice. *Inflammopharmacology* 2021;29:879-95.