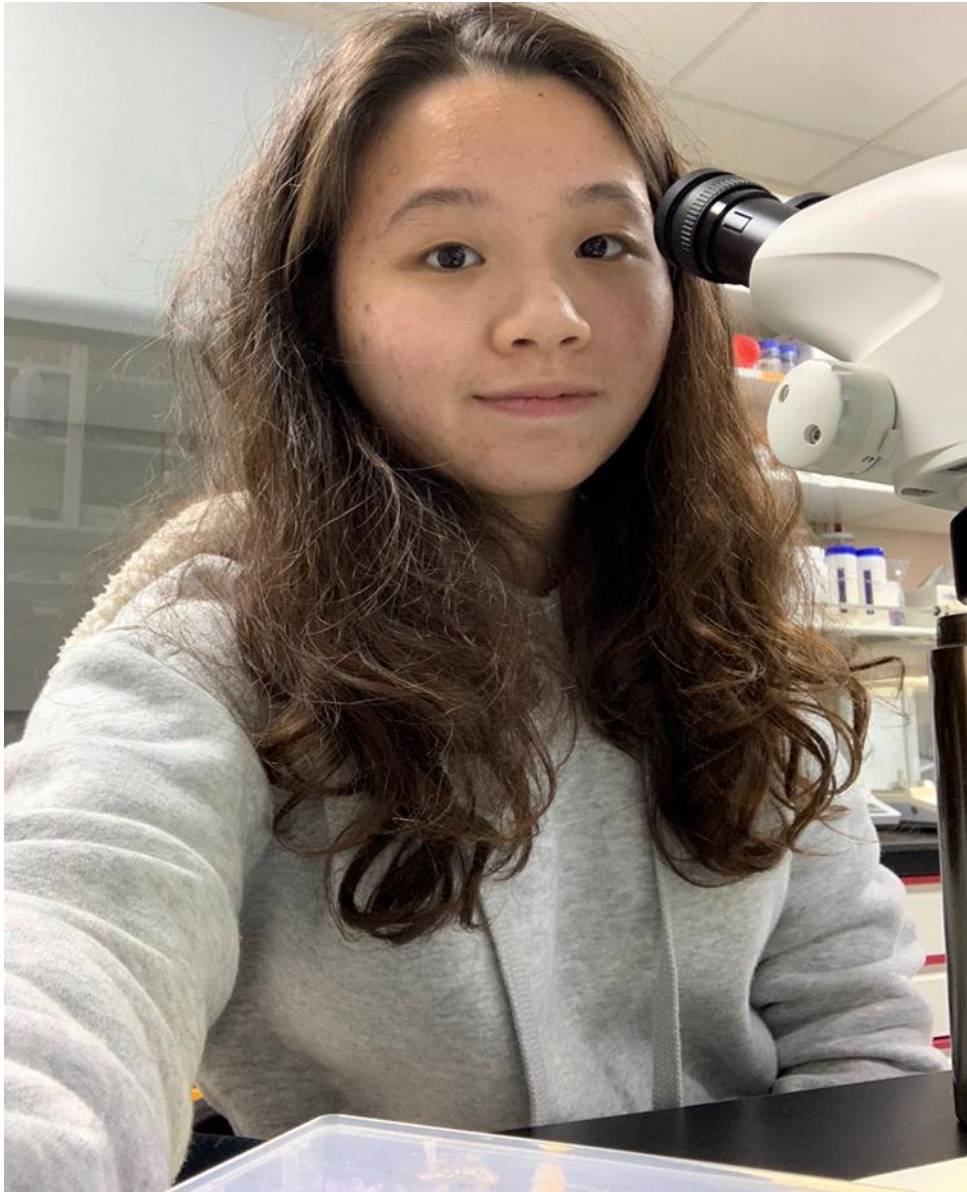


2022 年臺灣國際科學展覽會 優勝作品專輯

| | |
|------|-----------------------------|
| 作品編號 | 050010 |
| 參展科別 | 動物學 |
| 作品名稱 | 高鹽飲食對果蠅學習與記憶能力的影響及其細胞與分子機制 |
| 得獎獎項 | 一等獎 青少年科學獎 美國ISEF正選代表 |
| 就讀學校 | 臺北市立中山女子高級中學 |
| 指導教師 | 林書葦、吳庭瑜 |
| 作者姓名 | 洪苡珊 |

關鍵詞 高鹽食物、學習與記憶、果蠅

作者簡介



我是中山女中高三生洪苡珊，從小便對各種自然領域學科特別有興趣，而高二上學期本著對生物科尤其是神經科學的熱愛，帶著自己的研究計畫聯絡了中研院分生所的林書葦老師，並很幸運的加入了他的實驗室進行果蠅的學習與記憶行為能力以及相關的各種細胞層次的實驗。在高中的這段時間，真的很幸運能夠加入實驗室深入研究想探究的問題。

摘要

先前論文指出高鹽飲食會造成果蠅睡眠間斷(Jiayu Xie et al., 2019)、減短果蠅壽命(Deng-Tai Wen et al., 2020)。而另一篇論文則以小鼠作為實驗對象，發現高鹽飲食會影響小鼠記憶和學習能力(Giuseppe Faraco et al., 2018)。根據上述，高鹽飲食在不同生物中可能影響神經系統的功能，但果蠅學習與記憶能力的影響還未被探討。因此，筆者以果蠅作為模式生物，研究高鹽飲食對其學習與記憶功能是否障礙及實驗其可能的細胞與分子機制。在將野生型果蠅進行測試後，選擇了 Canton-S 做後續實驗，並發現餵食 Canton-S 四天的高鹽食物後學習及短期記憶表現下降，而進行實驗確認是由高鹽飲食導致此障礙，再研究了一系列相關研究。

本次實驗中，首次以餵食高鹽食物對果蠅學習與記憶障礙方面進行研究，並了解到高鹽飲食也會讓果蠅產生學習與短期記憶能力障礙。目前為了找出真正的細胞與分子機制提出可使用的方法，在實驗其他可能的機制。

Abstract

High-Salt Diet (HSD) has been proved that it will cause sleep fragmentation(Jiayu Xie et al., 2019), and shorten the lifespan (Deng-Tai Wen et al., 2020) on *Drosophila Melanogaster*. Another experimental also proved that HSD led to learning and memory defects on mice (Giuseppe Faraco et al., 2018). Accordingly, HSD could affect the functions of neural systems in various species, but the effects of learning and memory on *Drosophila Melanogaster* are remained unknown and the cellular and molecular mechanisms behind them need to be further discussed. In order to investigate the effects of HSD on learning and memory, we used *Drosophila Melanogaster* as experimental species. The researcher found that HSD will cause learning and memory defect on *Drosophila Melanogaster* through aversive training method. Also, by using UAS- Gal4 system and Lex-LexAop system, the researcher founded a possible cellular mechanism which could be further discussed. Last, the researcher did a hypothesis regarding ATP that could help determine other cellular and molecular mechanism.

壹、前言

一、研究動機

鹽巴中含有的鈉、氯離子在人類的神經傳導和肌肉收縮等基本功能的運作扮演重要角色；但過量的鹽份會影響生殖能力、神經傳導，也會導致多種慢性疾病並增加罹患心血管疾病的風險，長期高鹽飲食的攝入更可能導致記憶損傷，並增加罹患失智症的機率。在先前高鹽飲食導致老鼠認知障礙的研究中(Giuseppe Faraco et al., 2019； Giuseppe Faraco et al., 2018)，小鼠在餵食八週的高鹽飲食後，因為過量的鈉離子導致小腸中的 TH 免疫細胞(TH cells)增加連帶的介白素(interleukin)分泌更多，導致腦中一氧化氮供應不穩定，tau 蛋白無法持續的附著於細胞骨架上，因而累積於腦中，影響神經傳導引發認知障礙。而果蠅的研究中則發現高鹽雖然不會導致果蠅的睡眠週期改變，但會造成間歇性睡眠(Jiayu Xie, et al., 2019)，影響睡眠品質，因此高鹽食物會導致果蠅更容易疲憊，運動能力下降(Deng-Tai Wena et al., 2020)；以人類與小鼠為主要實驗對象的研究則提及高鹽飲食引發的免疫反應會影響 ATP 的製造，進一步引發認知障礙(Sabrina Geisberger et al., 2021)。

鑒於上述理由，已經了解到高鹽飲食對於神經功能及其相關行為如學習與記憶能力確實存在負面影響，而在小鼠上觀察到的結論引起我的好奇心，而高鹽在台灣的家常料理中時常發生，因此高鹽飲食的研究對人體健康將會有所貢獻。

小鼠的研究中，提及在高鹽飲食餵食八周後，認知與學習障礙是因為 tau 蛋白無法穩定附著於細胞骨架，於腦中堆積所引起。然而還有許多其他可能的機制參與其中，例如 ATP 的缺少、鈉(Wacharaporn Tiyasatkulkovit et al., 2021)或氯離子的增加都有可能導致神經傳導或是特定基因的表現量受到影響，進而造成學習與記憶障礙。另外，果蠅是適合用來研究神經科學分子機制的模式生物，因其生長週期短，累積實驗數據所需的時間較少；並且果蠅的研究已發展出許多遺傳學及分子生物學相關工具，可以快速且有效的在特定細胞內操作或偵測特定的分子機制；再者，果蠅也具備複雜的認知行為，且演化的過程會保留許多重要的分子機制，因此在果蠅的研究得出的結論經常也能運用在老鼠及人類的研究上，無論是基因或者神經科學皆成為模式生物，為很好的研究對象，對於細胞與分子機制的研究較簡單。

綜上所述，本研究想探討高鹽飲食對於果蠅的學習和記憶是否會有影響？若果蠅的記憶、學習能力受到影響，那長期的高鹽飲食是否讓影響更顯著？其中涉及的細胞與分子機制為何？

二、研究目的與問題

- (一) 高鹽飲食是否會影響果蠅的學習與記憶能力?
- (二) 高鹽飲食若影響果蠅的學習與記憶能力，則影響的持續時間多久？是否為可逆現象
- (三) 高鹽飲食若影響果蠅的學習與記憶能力，其細胞與分子機制為何?

貳、 研究方法與過程

所需設備與材料

(一) 果蠅培養基(表 1)

| | | | |
|-----|-----|-----------------|---------|
| 洋菜凍 | 葡萄糖 | 紅糖 | 丙酸(防腐劑) |
| 酵母粉 | 玉米粉 | 對氫基苯甲酸甲烷基酯(防腐劑) | |

表 1

(二) 餵食方法測試 (表 2)

| | | |
|-----------------|-----------------------|--------|
| 瓊脂(Agar) | 葡萄糖 | 吸光機 |
| 離心機(centrifuge) | 微型離心管(Eppendorf tube) | 藍色食用色素 |

表 2

(三) 學習與記憶及相關測試所需器材(表 3)

| | | | |
|--|-----------------|----------------------------------|-----|
| 氣味電擊管 | 測試管 | T 型管(T-maze) | 礦物油 |
| MCH(訓練果蠅的氣味:4-Methylcyclohexane,mixture) | OCT(:3-octanol) | 氣味傳輸裝置 (Odor delivery system) | |

表 3

(四) 飲食量測試(表 4)

| | | | |
|--------|--------|-----------|------------|
| 藍色食用色素 | 測微尺 | 酵母(yeast) | 1%瓊脂(agar) |
| 微毛細管 | 1M 蔗糖液 | | 塑膠管(vial) |

表 4

(五) 果蠅

| | | | |
|---------------|-----------------|---------------------------------|---------------|
| 神經外觀 | | 微管蛋白 | |
| 處女蠅 | | 處女蠅 | 公果蠅 |
| VT049483-Gal4 | THGal 4 Gal4 | UAS-mCD8::GFP | UAS-mCD8::GFP |
| MB320C - Gal4 | OK107 -Gal4 | | |
| ATP | | 野生種 | Canton-S, 2U |
| VT049483-Gal4 | | 前測中使用的野生種果蠅: Oregon-R, Canton-S | |
| | | AT 1.03 NL | |

(六) 解剖用溶液(表 5)

| | | | |
|------------------------|-------------------|-------|------|
| 4% Formaldehyde in PBS | 2xPBS | 1xPBS | PBST |
| 5% NGS in PBST | Mounting solution | 一級抗體 | 二級抗體 |

表 5

研究方法

(一) 果蠅飼養方式

果蠅飼養於裝有果蠅培養基的試管或玻璃瓶中並置於溫度 23°C，濕度 65%，以日光燈開

關反應日夜週期的果蠅房內：12 小時燈暗，12 小時燈亮。高鹽食物培養基內氯化鈉的重量百分濃度為 1%或 2%。

(二) 飢餓程度測試

配置含有 2M 蔗糖液和 5%藍色色素的瓊脂溶液，平均滴在長八公分寬五公分的濾紙上待其凝固後，將濾紙連同瓊脂捲入試管中，再將十隻公果蠅及十隻母果蠅至於其中讓其進食，一分鐘後將果蠅取出並置於零下二十度冰箱將其凍死。接下來將果蠅置入 1.5 毫升離心管中，加入 PBS 後磨碎離心並取其上清液，測其於 625nm 下的吸光值，吸光值越高代表在一分鐘內進食的越多，表示果蠅越飢餓。每個濃度皆有一組空白對照組，將食用藍色色素的值減去各濃度對應的對照組，獲得最終數值。組別分別為從幼蟲時期便食用高鹽飲食，自羽化後持續食用高鹽食物三天，以及羽化後才食用高鹽食物三天的果蠅。

(三) 野生品種短期記憶測試

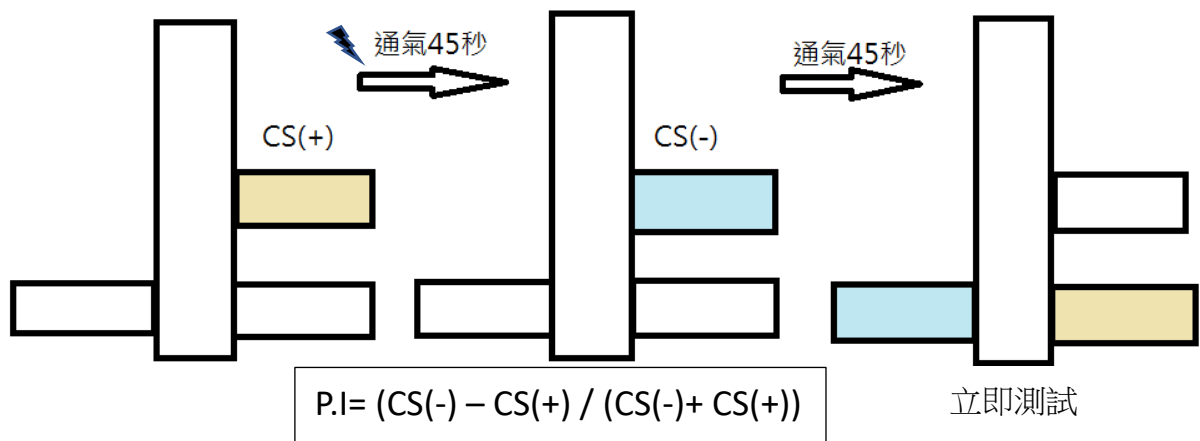
測試 Oregon-R 及 Canton-S 的短期記憶能力

(四) 飲食量測試

毛細管飲食量試驗(Capillary Feeding Assay)，將 10 隻公果蠅及 10 隻母果蠅放入同一試管，試管上方以有三個洞的頂蓋蓋住，洞內各插入 P-2 吸量管(tip)，吸量管內插入最大容量為 5 微升的微毛細管(Drummond Scientific ,1-000-0050)，微毛細管中加入含有 0%，1%或 2% 氯化鈉的蔗糖液(2M)，最上方加上礦物油避免蒸發。設置實驗組(0~2%)與控制組，控制組試管內未放入果蠅，其餘設置與實驗組相同。於四天後，量取三根微毛細管下降的長度，減去控制組下降的長度，以免計算時計入蒸發的長度。(William W. Ja., *et. al*, 2007)

(五) 學習與記憶測試：懲罰型嗅覺訓練

每次實驗從同一組別取 80~100 隻果蠅，置於氣味電擊管中，以 OCT 與 MCH 氣味分子訓練果蠅，OCT 與 MCH 配於礦物油中，濃度各為 0.0026M 與 0.0036M。訓練過程，首先通入一種氣味分子並同時給予電擊(90V, 0.2 次/s)一分鐘後，通入空氣 45 秒去除氣味，再通入另一氣味分子但並不電擊，持續一分鐘，接著通氣 45 秒去除氣味；我們稱與電擊同時給予的氣味分子為正條件氣味刺激(CS+, CS: Conditional Stimulus)，而稱單獨給予的氣味分子為負條件氣味刺激(CS-)。訓練完後立即測試果蠅對兩種氣味分子的偏好。於 T 型管兩端接上測試管，並通入不同氣味，讓果蠅選擇一分鐘。表現指數(Performance Index, P.I)的計算是以選擇 CS-的果蠅數量減去選擇 CS+的果蠅數量，除以兩者的加總(CS- + CS+)。



(六) 電擊與氣味敏感度確認

電擊敏感度確認：

- (1) 將兩根電擊管分別放置於 T 型管兩端，一邊給予電擊，另一邊則不給予電擊。表現指數(Performance Index)是以選擇無電擊的果蠅數量(N/A)減去選擇有給予電擊的果蠅數量(pulse)除以兩者的加總。

$$P.I = (N/A - pulse) / (N/A + pulse)$$

氣味敏感度確認：

- (2) 在 T 型管兩邊插入測試管，其中一邊通入氣味(OCT/MCH)，另一邊送出無味的礦物油，讓果蠅選擇兩分鐘。表現指數(Performance Index)是以選擇礦物油(mineral oil)的果蠅數量減去選擇有氣味(odor)的果蠅數量除以兩者加總。

$$P.I = (Oil - odor) / (Oil + odor)$$

(七) 攀爬能力測試

將不同濃度的果蠅，公母分開以十隻為一組，以七英吋為標準線，記錄每隻果蠅爬過標準線的時間，同時以二十秒為限。表現指數(Performance Index)以果蠅爬過標準線的時間減去二十秒，除以二十秒獲得。

$$P.I = ((Used\ time) - 20) / 20$$

(八) 高鹽食物影響學習與記憶的細胞機制

1. 解剖溶液配法:

- (1) 4% Formaldehyde in PBS: 16% Formaldehyde、2xPBS、ddH₂O(1:2:1)

- (2) 2xPBS : 10xPBS 、 ddH₂O (1:4)
- (3) 1xPBS : 10xPBS 、 ddH₂O (1:9)
- (4) PBST : 10xPBS 、 20% Triton X-100 、 ddH₂O (4:1:35)
- (5) Blocking buffer:5% NGS in PBST : 100% NGS 、 PBST (1:19)
- (6) 一級抗體: 抗體(根據插入的基因對應不同抗體) 、 5% NGS in PBST (1:100)
- (7) 二級抗體: 抗體(根據不同的一級抗體對應不同二級抗體) 、 5% NGS in PBST (1:400)

2. 解剖方法:

- (1) 取羽化後 4 天大，食用一般食物 4 天以及食用高鹽食物 4 天的果蠅放入冰內使他們昏迷
- (2) 在放入 PBS 溶液的 chamber 內解剖，以鑷子將果蠅頭身分離
- (3) 將鑷子放入果蠅頭部下方孔洞後，把一邊眼睛連頭蓋骨去掉
- (4) 將另一邊眼睛也去除後，把果蠅腦上纖維去除以免影響神經染色
- (5) 每一組約 4 至 6 顆腦放入另一個置於冰上並含有 PBS 溶液的 chamber 內，同組放在同一 well 中
- (6) 解剖後的大腦進行神經染色

3. 神經染色

- (1) 解剖後的大腦以 4% 甲醛(formaldehyde) in PBST 100 μ L 固定，並放置於 60rpm 的震盪器上 20 分鐘
- (2) 以 200 μ L PBST 沖洗三次後，再加入 200 μ L PBST 並放置於震盪器上 20 分鐘
- (3) 步驟 2 重複三次後，將溶液換成 100 μ L 5% NGS in PBST(blocking buffer)，並放置於震盪器上 30 分鐘
- (4) 每一個組別加入一級抗體溶液 50 μ L，將 chamber 放入不透光黑盒內，放置於震盪器上至隔天。
- (5) 將抗體以吸量管(pipette)吸去後，以 200 μ L PBST 沖洗三次後，再加入 200 μ L PBST，放上震盪器上 20 分鐘
- (6) 步驟 5 重複三次後，將溶液換成二級抗體溶液 50 μ L，並放置於震盪器上至隔天。
- (7) 將抗體以吸量管(pipette)吸去後，以 200 μ L PBST 沖洗三次後，再加入 200 μ L PBST，放上震盪器上 20 分鐘。此步驟重複三次。
- (8) 將大腦裝片

4. 裝片

- (1) 以無水凡士林於載玻片點上四點後，用吸量管(pipette)將大腦放上
- (2) 大腦以正面朝上，並滴上 mounting solution
- (3) 待大腦變為透明後蓋上蓋玻片，再從縫隙中加入 mounting solution
- (4) 以黑色指甲油封片

5. 神經外觀:

藉由 UAS-Gal4 system，在特定的神經細胞中表現來自酵母菌的轉錄因子(transcription factor) Gal4，而調控 Gal4 的增強子(enhancer)不同，Gal4 蛋白與 UAS 結合後，使得下游

| Select Gal4 line (male) | Express's location |
|-------------------------------|---|
| VT049483-Gal4 > UAS-mCD8::GFP | MBs: γ neurons |
| MB320C -Gal4 > UAS-mCD8::GFP | Dopaminergic neurons : PPL1- γ 1pedc |
| THGal4 -Gal4 > UAS-mCD8::GFP | Dopaminergic neurons |
| OK107 -Gal4 > UAS-mCD8::GFP | mushroom bodies(MBs) |

基因被表現如螢光蛋白。解剖

果蠅子代，將大腦染色並製成玻片。玻片完成後置於共扼焦電子顯微鏡(Confocal)觀察食用一般食物和高鹽食物的果蠅兩者神經外觀有無明顯不同的地方。

6. 神經微管(microtubule)蛋白:

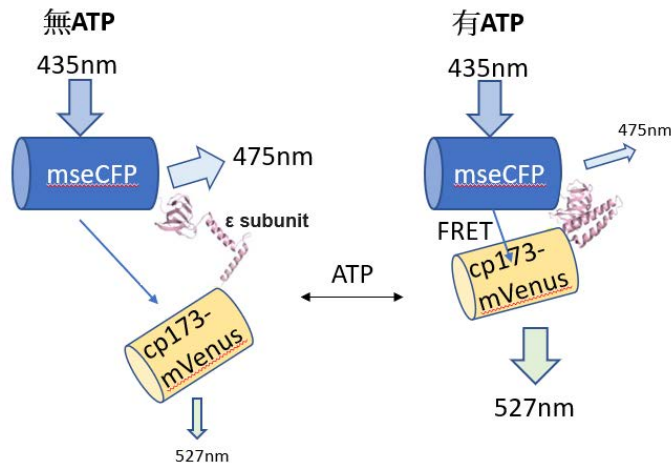
(1.) 將野生種(wild-type)果蠅微管蛋白 C 端(c terminal tail)上谷氨酰化(glutamylatation)的 α -微管蛋白(alpha tubulin)染色。

| Select wild-type line(male) | |
|-----------------------------|-----------|
| <i>Canton-S</i> | <i>2U</i> |

(2.) 藉由 UAS-Gal4 系統，使螢光蛋白會在特定區域表現，並染 glutamilated tubulin 以及 tyrosilated tubulin，並藉由 Green Fluorescent Protein 找出 ROI (Region of Intrest) 以觀察微管是否有差異。

7. ATP 含量

使用 ATP 訊號蛋白在活體果蠅偵測 ATP 的含量，ATP 訊號蛋白包括 mseCFP, cp173-mVenus 以及 ATPase 中的 ϵ subunit。當 ATP 和訊號蛋白結合時，訊號蛋白構型改變，使得 mseCFP 和 mVenus 靠近，改變訊號蛋白所放出的螢光波長。當 ATP 增加時，放出 527nm 的光增加，475nm 的



| |
|--|
| In-vivo 解剖 |
| (1.)將果蠅固定於鋁箔紙上。 |
| (2.)在果蠅頭上開洞。 |
| (3.)在果蠅裸露出腦的部分滴上 medium (Schneider's instant medium) |
| (4.)將果蠅置於共軛焦電子顯微鏡下方，拍攝 ATP 訊號。 |

參、 研究結果與討論

一、研究結果

(一)、野生品種短期記憶測試 (圖 1)：

在閱讀論文時發現絕大多數有關神經科學所使用的果蠅野生品種皆使用 *Canton-S*，但並不了解其中的原因，因此先利用了常見的兩種果蠅野生型，*Canton-S* 與 *Oregon-R* 來做學習與短期記憶測試，並選擇記憶表現較好的果蠅進行接下來的實驗。結果顯示 *Canton-S* 的學習及短期記憶能力較 *Oregon-R* 好(圖 1)，故利用 *Canton-S* 進行後續的實

| Select Gal4 line (male) | Express's location |
|------------------------------|--------------------|
| MB320C -Gal4 > UAS-mCD8::GFP | PPL1-γ1pedc |
| NP2758 -Gal4 > UAS-mCD8::GFP | PPL1-γ1pedc |
| MB112C -Gal4 > UAS-mCD8::GFP | MBON-γ1pedc > αβ |
| R83A12 -Gal4 > UAS-mCD8::GFP | MBON-γ1pedc > αβ |

驗。

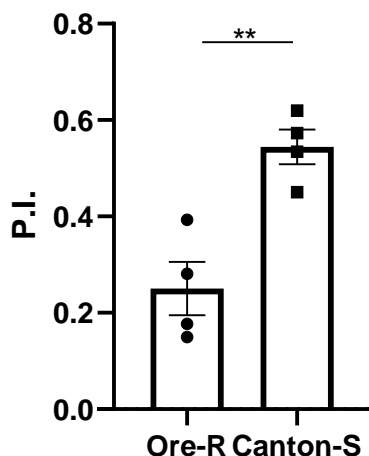


圖 1

圖中 x 軸代表果蠅品種的名稱,y 軸代表表現指數. 以 t-test 作統計分析.

Oregon-R 平均表現指數為 0.25;*Canton-S* 平均表現指數為 0.54,有顯著差異

*P value <0.05, **P value <0.005, *** P value<0.0005

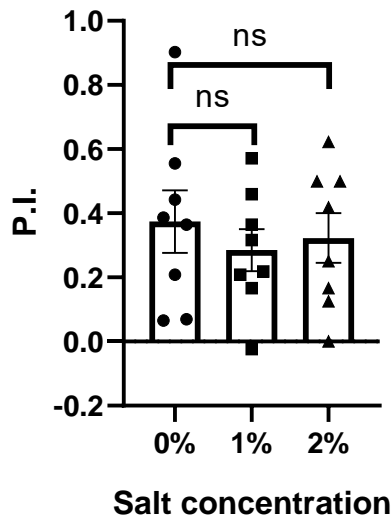
以 t-test 作統計分析. 所有組別 N 皆為 4

(二)、高鹽飲食餵食方式測試 (圖 2,3)：

起初以獎賞型的方式訓練果蠅的記憶能力，因其實驗方法須讓果蠅飢餓 24 小時以上，發現自幼蟲時期便食用高鹽食物的果蠅中，食用含鹽食物(1%、2%)的果蠅較虛弱且無法

得到顯著差異，故推測可能是高鹽環境導致果蠅產生排斥，故較飢餓，整體也較虛弱，存活率低，進而無法測試果蠅的記憶能力(圖 2)，便進行高鹽飲食餵食方式的測試：果蠅從幼蟲時期即飼養於高鹽飲食，在羽化為成蟲後繼續在相同鹽度的環境生長三天後進行飢餓程度測試，以 One-Way ANOVA 分析發現，有顯著差異，其中又以食用 2%高鹽食物的果蠅最為飢餓(圖 3)。為避免飢餓影響果蠅的學習及記憶表現，故後續實驗皆在果蠅羽化後才飼養於高鹽環境下。

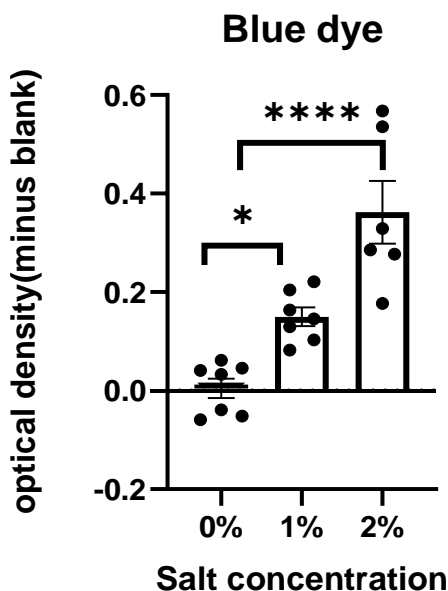
memory training with appetitive



圖中 x 軸代表, Y 軸代表表現指數. 以 One-way ANOVA 做分析. 0%平均表現指數為 0.37 ;1% 平均表現指數為 0.29; 2% 平均表現指數為 0.332, 在不論 0% 與 1% 的比較或 0% 與 2%得比較中，皆沒有顯著差異。

*P value <0.05, **P value <0.005, *** P value<0.0005
所有組別 N 皆為 8

圖 2



圖中 x 軸代表食物中的鹽濃度, Y 軸代表吸光值(以減去各組分別的控制組). 以 One-way ANOVA 做分析. 0%平均表現指數為 0.00 ;1% 平均表現指數為 0.15; 2% 平均表現指數為 0.36, 0% 與 1%互相比較 : P value=0.0271* 而 0% 與 2%互相比較 : P value <0.0001****, 有顯著差異。

*P value <0.05, **P value <0.005, *** P value<0.0005
所有組別 N 皆為 7

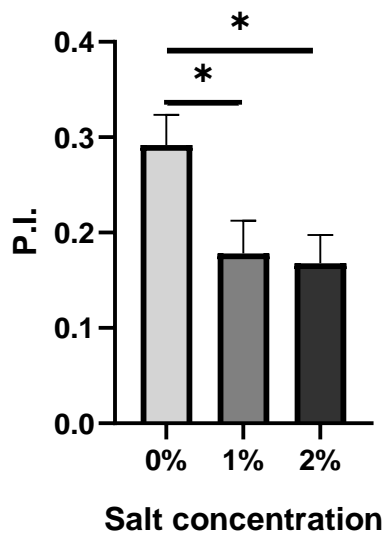
圖 3

(三)、攀爬能力測試:

再來，於文獻中(Deng-Tai Wenet, al., 2020)了解到食用一週高鹽飲食的果蠅其運動能力會受到影響。而對於果蠅的高鹽濃度尚未被定義，目前僅有文獻指出 4%的含鹽量是果蠅能接受的最高含鹽量，但絕大多數的果蠅仍會再食用 4%高鹽食物三至四天後死亡。因

此，筆者將與攀爬能力的文獻結論比對以找出最適合實驗的高鹽食物食鹽濃度。將食鹽濃度定為 1%、2%後，將果蠅以公母分開測試後，發現果蠅在成蟲後攝取四天的高鹽飲食會影響到母果蠅的攀爬能力表現，然而公果蠅並未受到影響。在母果蠅中，0%與 1%、2%皆有顯著差異(圖 4A)；公果蠅中，0%與 1%、2%皆沒有顯著差異(圖 4B)。

Climbing index-4days(♀)

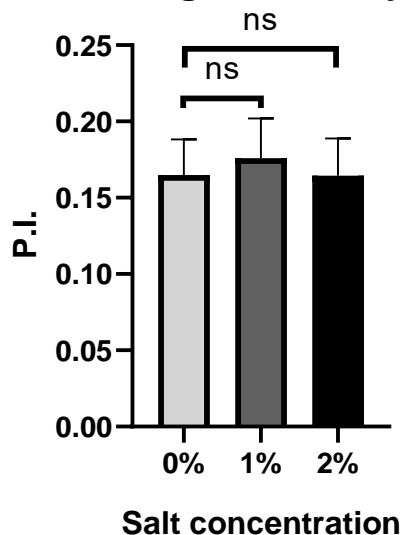


圖中 x 軸代表鹽分濃度，而 y 軸代表表現指數。0%平均表現指數為 0.29;1% 平均表現指數為 0.18; 2% 平均表現指數為 0.17. 以 One-way ANOVA 做分析, 在 0%與 1%互相比較中 P value =0.035*,而 0%與 2%互相比較中: P value =0.019*, 皆有顯著差異。

*P value <0.05, **P value <0.005, *** P value<0.0005
所有組別 N 皆為 40

圖 4A

Climbing index-4days(♂)



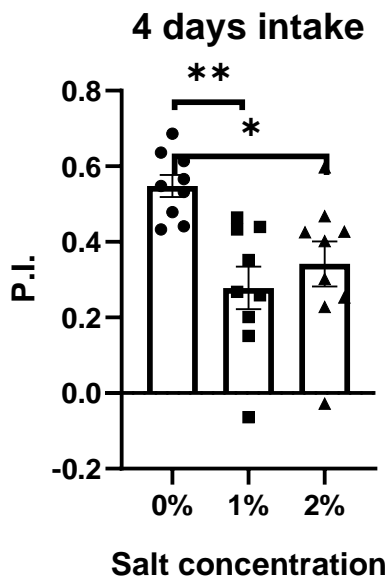
圖中 x 軸代表鹽分濃度，而 y 軸代表表現指數 0%平均表現指數為 0.16;1% 平均表現指數為 0.18; 2% 平均表現指數為 0.16. 以 One-way ANOVA 做分析, 在不不論是 0% 與 1%或是 0% 與 2%的組別比較中，都沒有顯著差異

*P value <0.05, **P value <0.005, *** P value<0.0005
所有組別 N 皆為 59

圖 4B

(四)、學習與記憶能力測試(圖 5):

為了解果蠅成蟲後食用高鹽飲食，是否會影響到果蠅的記憶。選擇在果蠅羽化後餵食四天的高鹽食物(1%、2%)進行測試。分析後發現有顯著差異，因此果蠅在出生後立即攝取高鹽飲食四天可能導致果蠅的短期記憶表現變差。



圖中 x 軸代表鹽分濃度 y 軸代表表現指數

0%平均表現指數為 0.55;1% 平均表現指數為 0.28; 2% 平均表現指數為 0.34. 以 One-way ANOVA 做分析,在 0%與 1%中(P value=0.0025) 以及 0% 和 2% 間 (P value =0.0209) 有顯著差異.

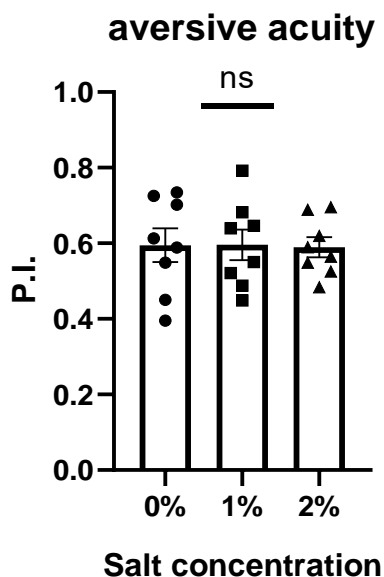
*P value <0.05, **P value <0.005, *** P value<0.0005

所有組別 N 皆為 9

圖 5

(五)、電擊與嗅覺敏感度測試:

接著，為排除短期記憶表現較差是由於嗅覺或對電敏感度較差的可能性，分別進行了電擊敏感度與嗅覺敏感度確認。而電擊敏感度(圖 5)以及嗅覺敏感度(圖 6)的結果皆顯示無論食用 1%或 2%的高鹽食物皆與食用未加入鹽分的組別沒有顯著差異，高鹽並未顯著的影響果蠅的電擊或者嗅覺感知。確認高鹽飲食造成果蠅學習及短期記憶缺陷並非對電敏感度或對味道敏感度變差而導致。

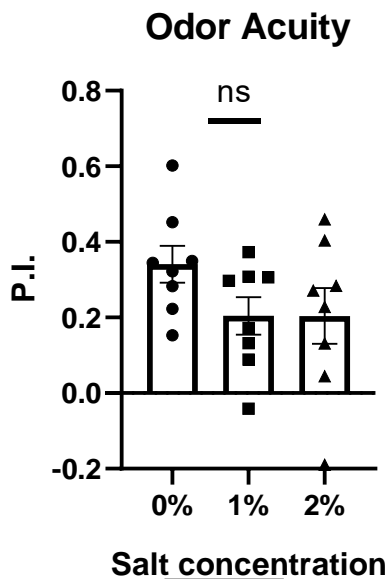


圖中 x 軸代表鹽分濃度，而 y 軸代表表現指數. 0%平均表現指數為 0.59;1% 平均表現指數為 0.60; 2% 平均表現指數為 0.59. 以 One-way ANOVA 做分析, 在不不論是 0% 與 1%或是 0% 與 2%的組別比較中，都沒有顯著差異.

*P value <0.05, **P value <0.005, *** P value<0.0005

所有組別 N 皆為 8

圖 6



圖中 x 軸代表鹽分濃度，而 y 軸代表表現指數。0% 平均表現指數為 0.34; 1% 平均表現指數為 0.20; 2% 平均表現指數為 0.20。以 One-way ANOVA 做分析，在不不論是 0% 與 1% 或是 0% 與 2% 的組別比較中，都沒有顯著差異。
*P value < 0.05, **P value < 0.005, *** P value < 0.0005
所有組別 N 皆為 8

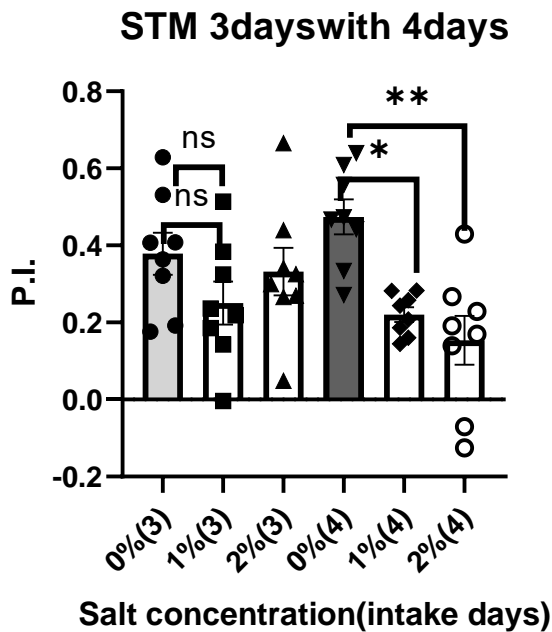
圖 7

(六)、影響記憶的最短攝食天數:

在發現餵食四天高鹽飲食的果蠅成蟲會造成記憶缺陷後(memory deficit)，因為不確定四天是否即為會造成短期記憶障礙的最短天數，接下來利用了懲罰型學習與記憶能力測試，嘗試尋找會造成記憶缺陷所需的最短攝食天數。待果蠅出生後一天，才給予果蠅食用 0~2% 的高鹽食物。果蠅依舊在四天大時接受電擊記憶能力測試(圖 7)。將食用高鹽飲食四天與三天的果蠅同時測試學習與短期記憶(STM)能力，以 One-way ANOVA 分析，食用三天高鹽飲食的果蠅在記憶表現並未有顯著差異(圖 8)，而食用四天高鹽飲食的果蠅在 1% 或者 2% 的組別仍有記憶缺陷(memory defect)。藉由以上結果，可得高鹽飲食要造成果蠅記憶與學習缺陷最短攝取天數為四天。



圖 8



圖中 x 軸代表鹽分濃度，括號內代表食用天數。Y 軸代表表現指數。首先，食用高鹽食物三天的組別，0%平均表現指數為 0.38;1% 平均表現指數為 0.25;2% 平均表現指數為 0.33。以 One-way ANOVA 做分析，不論是 0%與 1%互相比較或是 0% 與 2%的組別互相比較，皆沒有顯著差異;接著是四天的組別 0% 平均表現指數為 0.47;1% 平均表現指數為 0.22;2% 平均表現指數為 0.15。以 One-way ANOVA 做分析，不論是 0%與 1%互相比較或是 0%與 2%組別相互比較，皆有顯著差異。所有組別 N 皆為 8

圖 9

(八)、高鹽飲食對學習與短期記憶的影響是否可逆

在高鹽飲食導致小老鼠認知障礙(cognitive dysfunction)的文獻中(Giuseppe Faraco.et. al., 2018)，小鼠食用八週的高鹽飲食後，會產生認知障礙，將已產生認知障礙的小鼠餵食非高鹽食物(normal food=ND)四周後，發現認知障礙的現象可以逆轉。為了解在果蠅身上是否也有逆轉(reverse)現象，在得到至少三次食用四天高鹽飲食會導致果蠅記憶障礙，確定此現象並非單獨事件後，先在果蠅食用完四天的高鹽飲食後，使其食用兩天一般食物，一共六天，並與食用六天一般食物的果蠅互相比較，同時也進行了連續食用四天高鹽飲食的果蠅和食用一般食物四天的果蠅的實驗(圖 10A)。結果發現儘管讓果蠅回到普通環境兩天，仍與食用六天一般食物果蠅的短期記憶表現指數有顯著差異，顯示高鹽飲食導致的認知缺陷回到正常情況下兩天還不足以使果蠅回到原先的狀態，推測果蠅需要再攝取更長時間的正常食物才能改善認知缺陷。但在此次的實驗中，食用四天高鹽食物的果蠅和食用一般食物四天的果蠅雖有下降趨勢但並無顯著差異，食用 0%四天的果蠅與食用 1%四天的果蠅平均表現沒有顯著差異，食用 0%六天的果蠅和食用 1%食物四天加上兩天 0%食物的果蠅在短期記憶表現上有顯著差異。(圖 10B)

接著，將食用一般食物的天數拉長為三天，此時對照和實驗組分別為四天食用一般食物、四天食用高鹽食物、七天食用一般食物、四天食用高鹽食物三天食用一般食物(圖 10C)。結果發現，除了食用四天高鹽食物的果蠅與食用四天一般食物的果蠅在學習與記憶表現上有顯著差異外；食用四天高鹽食物並食用三天一般食物的果蠅和食用七天一般食物的果蠅學習與記憶表現並無顯著差異，顯示食用高鹽食物所造成的學習與記憶能力障礙應為可逆現象。(圖 10D)

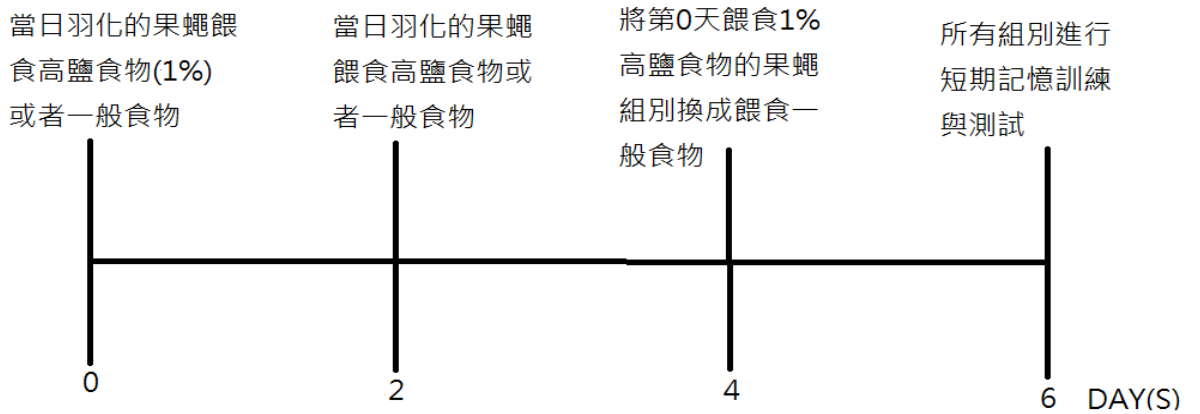
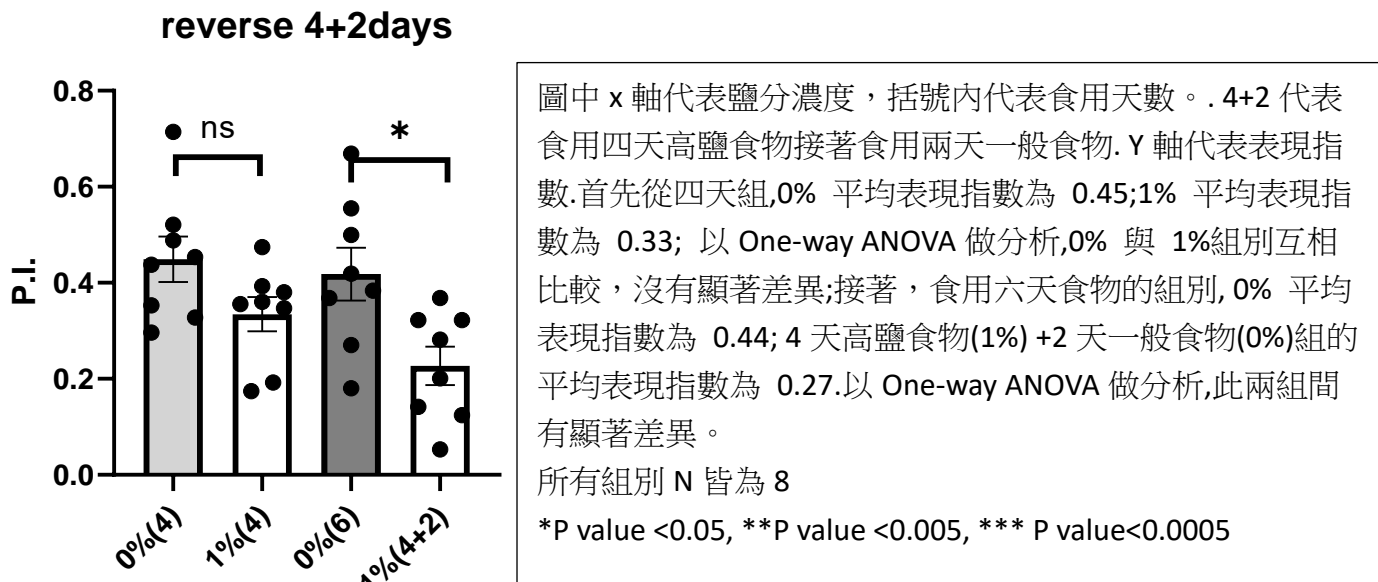


圖 10A



Salt concentration(intake days)

圖 10B

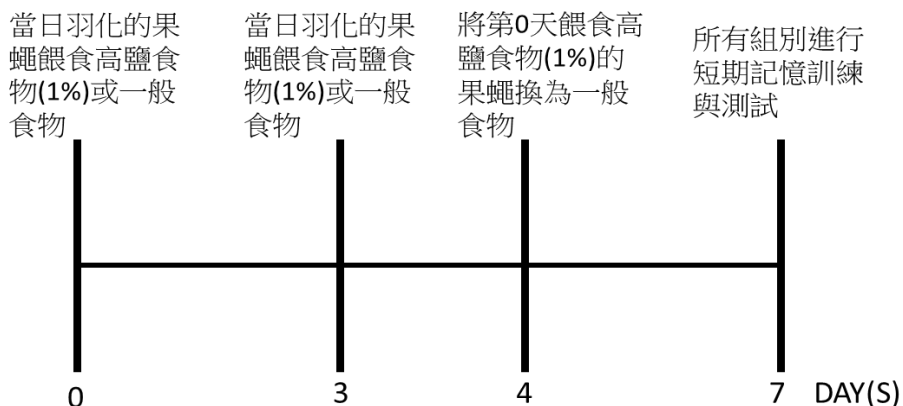
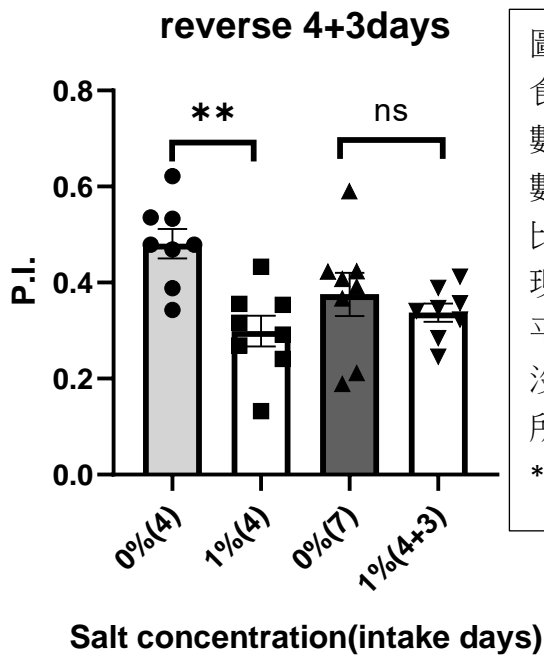


圖 10C



圖中 x 軸代表鹽分濃度，括號內代表食用天數。4+3 代表食用四天高鹽食物接著食用三天一般食物。Y 軸代表表現指數。首先從四天組，0% 平均表現指數為 0.48;1% 平均表現指數為 0.30; 以 One-way ANOVA 做分析,0% 與 1%組別互相比較，有顯著差異;接著，食用六天食物的組別，0% 平均表現指數為 0.38; 4 天高鹽食物(1%) +2 天一般食物(0%)組的平均表現指數為 0.34.以 One-way ANOVA 做分析,此兩組間沒有顯著差異。

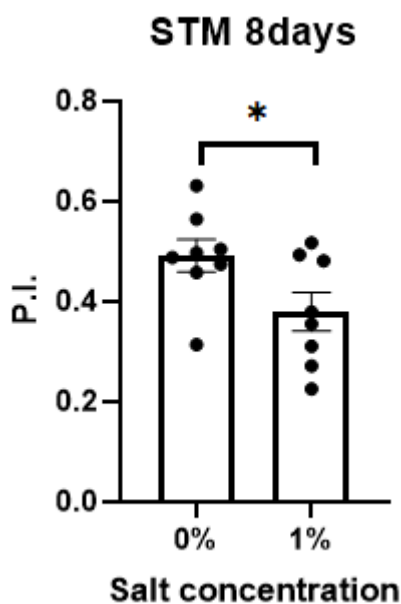
所有組別 N 皆為 8

*P value <0.05, **P value <0.005, *** P value<0.0005

圖 10D

(九)、高鹽飲食是否更加影響果蠅的學習與記憶能力

在高鹽飲食導致小老鼠認知障礙(cognitive dysfunction)的文獻中(Giuseppe Faraco.et. al., *nature* 2018)，小鼠在餵食八週的高鹽飲食後出現認知障礙(cognitive dysfunction)，接著他們持續餵食小鼠 16、24、32 週，發現認知障礙的程度並沒有持續下降。為了解此現象在果蠅中是否也相同，以懲罰型記憶測試，將餵食高鹽飲食的天數提升至八天，發現與食用八天一般食物(0%)的組別有顯著差異，但並未更顯著，推論餵食高鹽飲食在果蠅中可能不會造成更顯著的學習與記憶能力障礙。(圖 11)



圖中 x 軸代表食物中含鹽濃度.Y 軸代表表現指數.0% 平均表現指數為 0.49;1% 平均表現指數為 0.38; 以 t-test 作統計分析,0%和 1%互相比較: P value =0.04. 有顯著差異

*P value <0.05, **P value <0.005, *** P value<0.0005

所有組別 N 皆為 8

圖 11

(十)、高鹽食物影響記憶與學習能力的細胞機制

1. 神經外觀(morphology)

在文獻探討時，發現高鹽飲食會影響到果蠅的生殖量，同時，發現高鹽食物有影響到果蠅的學習與記憶能力，因此假設高鹽食物可能導致果蠅神經退化，外觀上則有可能受到影響，進而先選擇看果蠅的神經外觀。選擇目前已知與果蠅懲罰型嗅覺訓練較有關聯性的 Gal4 line，並搭配 UAS-mCD8::GFP(Um8G)。將已選的 Gal4-公果蠅和 Um8G 處女蠅交配。以及處女蠅和野生種 Canton-S 交配，以消除 balancer 上的 marker，或者避免同型合子 (homozygous)。在以共軛焦電子顯微鏡拍攝食用高鹽食物(1%、2%)以及食用一般食物的果蠅大腦並比較後，無論 Gal4 line 是使用 THGal4、VT049483、MB320C 以及 OK107 THGal4 - Gal4 > UAS-mCD8::GFP 皆沒有看到差異。(圖 12A,12B,12C,12D)。因此無論是 Dopaminergic neuron 或者 Mushroom Body(MBs)的神經在外觀上都沒有明顯差異。

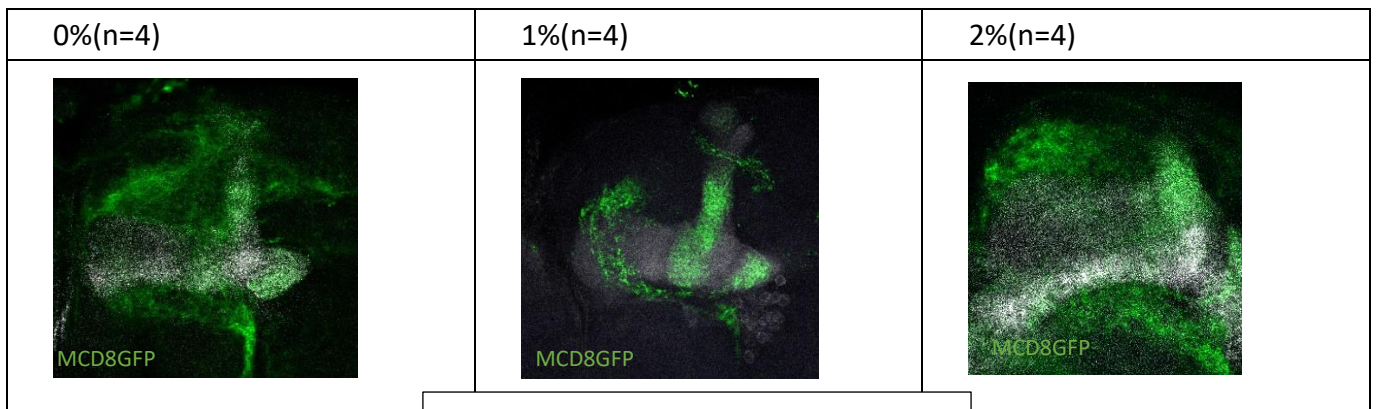


圖 12A: UAS-mCD8::GFP*THGal4

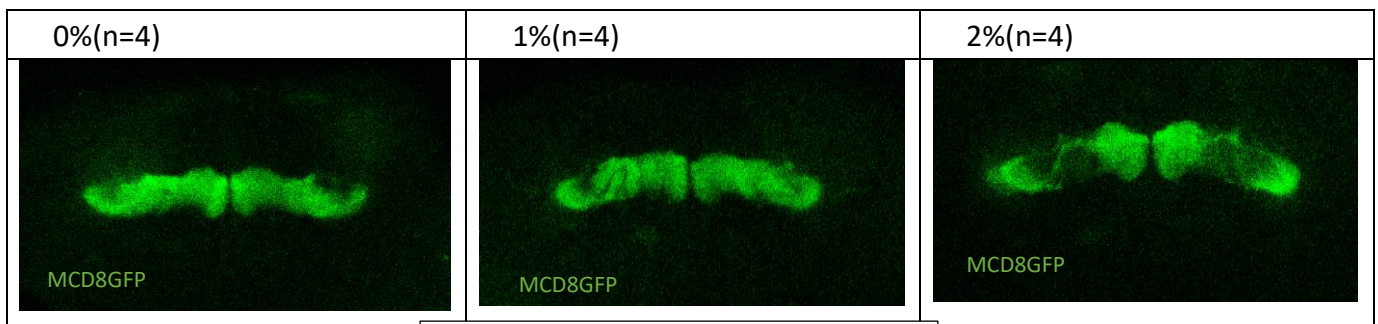


圖 12B: UAS-mCD8::GFP*VT049483

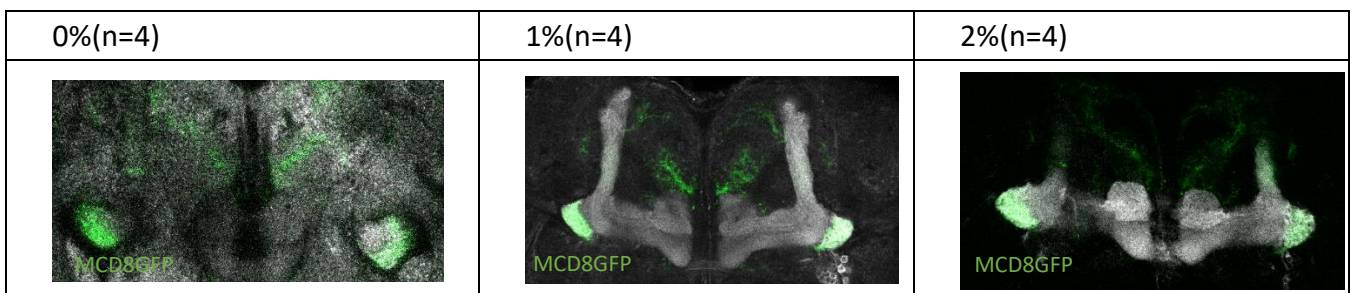


圖 12C: UAS-mCD8::GFP*MB320C

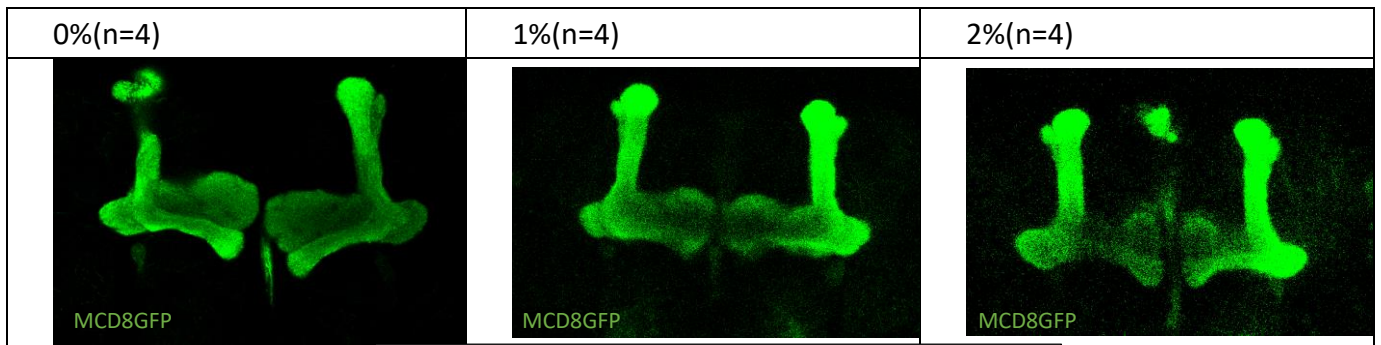


圖 12D: UAS-mCD8::

2. 神經微管蛋白

再來，因為在神經突觸的實驗上並無發現顯著差異，因此我們決定重新假設。在小鼠的實驗中，研究人員所發現的機制是因為食用高鹽食物後，因為免疫反應而導致大腦血流量的減少，致使 tau 蛋白無法穩定附著於微管上而堆積於腦中，造成學習與記憶能力上的缺陷。因此我們假設神經維管蛋白也可能導致果蠅學習與記憶能力缺陷。首先，我們看了果蠅在 Mushroom body: γ lobe 的微管，雖然沒看到甚麼明顯的差異，但同時我們將野生種果蠅麩胺酸化(glutamylated)的微管蛋白染色，發現食用高鹽食物的果蠅在 MBON: γ 1-pdec 和 PPL1- γ 1pedc 處，glutamylated tubulin 較少，因此，我們使用 UAS-Gal4 system，染了此兩處的 glutamylated tubulin，發現高鹽組別的果蠅在 MBON: γ 1-pdec 的 glutamylated tubulin 確實較少。(圖 13)

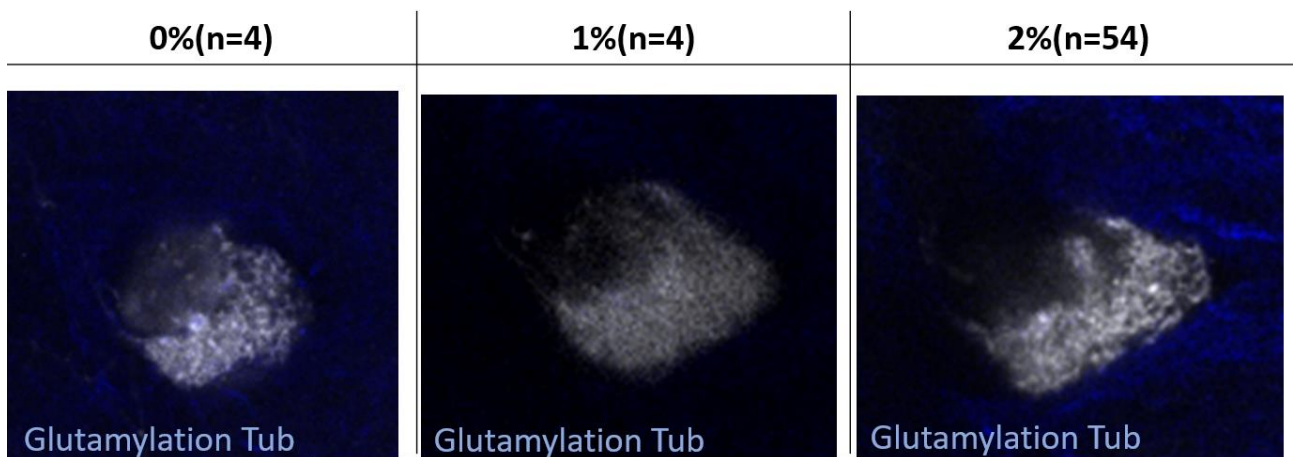


圖 13: UAS-mCD8::\gamma1pedc > $\alpha\beta$

3. ATP 含量:

在人類和小鼠的實驗中發現，高鹽食物中，過高的鹽分會抑制電子傳遞鏈(Electron transport chain,ETC)上，一個稱為 Complex II 的酶作用(Geisberger, S., et al.,2021)，而此種酶類也傳在於果蠅的 ETC 上，因此我們想藉由實驗了解是否在食用高鹽食物後 ATP 的量會減少。而目前雖然實驗正在進行且已有一些資料，但因實驗數據仍不足，因此無法下定論。(圖 14)

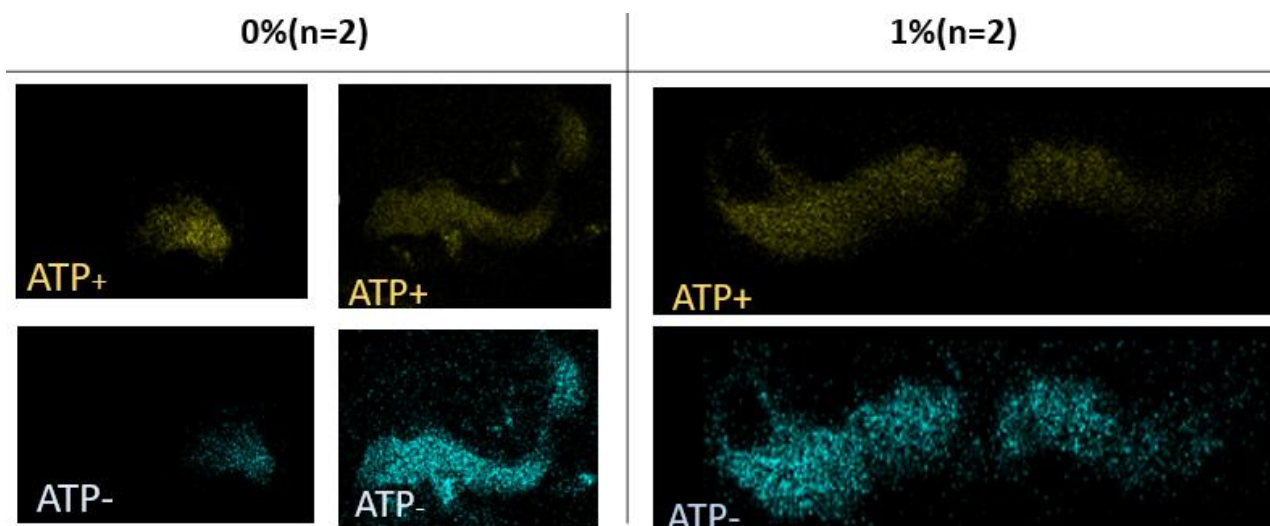


圖 14: AT1.03 NL*VT049483: MB γ neurons

二、結果討論

在目前的實驗中，首先我們發現果蠅常見野生種 Oregon-R 和 Canton-S 中，以 Canton-S 的短期記憶表現較佳，先前研究提出的現象可以解釋此現象；該研究提及 Oregon-R 果蠅的基因組中，*darcl* 基因下游有一段特殊的序列，稱為 *UGR*；該研究發現 *UGR* 序列與 *darcl* 基因某部分片段高度相似，且僅存在於 Oregon-R 果蠅的基因組中，而不存在於 Canton-S 果蠅的基因組中；該研究進一步發現此段 *UGR* 序列若存在於 *darcl* 基因下游，能夠顯著降低 *darcl* 基因的表現量。由於，*darcl* 基因所編碼的蛋白質 *darcl* 在突觸可塑性(Synaptic Plasticity)及學習記憶能力中扮演重要角色，該研究也進一步做實驗證明 *darcl* 基因下游的 *UGR* 序列會在發育過程中影響突觸的功能。雖然此研究並沒有進行學習與記憶的實驗，但可以推論 *UGR* 序列也會影響學習與記憶的功能，與筆者實驗結果一致(Ashley et al., 2018)。

使用 Canton-S 進行實驗後，獲得發現食用四天高鹽飲食的果蠅會造成記憶障礙但其對電擊敏感度和嗅覺敏感度和未食用鹽份的組別相同，並測試了食用四天高鹽食物果蠅的攀爬能力，發現食用含鹽 1%、2% 的母果蠅攀爬能力較差，但公果蠅並沒有顯著差異。關於高鹽飲食所造成的學習與短期記憶障礙是否可逆回中，起初使已食用高鹽食物四天的果蠅再食用二天一般食物，其記憶障礙並沒有獲得改善，但若食用三天一般食物，則表現可與食用一般食物的果蠅沒有顯著差異。在把餵食天數拉長至八天後，與控制組的差異並未更顯著，推論可能更長期的食用高鹽食物並不會使記憶能力更退化。而在果蠅的神經外觀上，食用高鹽飲食的果蠅和食用一般果蠅的果蠅沒有差別。

首先，雖然獲得了三次以上的實驗結果顯示食用四天的高鹽食物會導致記憶障礙，但在「高鹽食物的影響是否可逆」中，攝取四天高鹽食物的組別與控制組沒有差別，並不知道其中的原因。可能是因為當組的果蠅較其他次以及當次實驗但其他組別的果蠅都更多，密度較高；或者是當次食物放較久而導致果蠅攝食量較低，短期記憶與學習能力僅有下降趨勢但並無顯著差異；之後的實驗應再注意食物擺放時間及果蠅數量，以釐清實驗結果。可能是果蠅在這四天中因為食物存放較久或食用四天 1% 高鹽食物的果蠅在同一瓶中密度較以往更高，導致果蠅高鹽食物攝取量不足，進而沒有產生顯著的記憶差

異。同時，四天的高鹽飲食攝取影響學習與記憶則須多重複幾次以確定結果，而在此結果出現後，已實驗超過三次而且皆獲得食用四天高鹽食物會導致果蠅學習與記憶能力下降的結果，因此確定此結果是持續並可重複的。

再來，已知高鹽食物會造成果蠅的短期記憶與學習記憶障礙，且根據上方實驗結果可以發現至少需攝食四天，那在這四天中果蠅攝入了多少的食物，其中又含有多少鹽分，都是尚未了解的部分。因此將在日後的「飲食量測定」實驗中研究。接著，先前測得食用四天高鹽食物後，若再食用兩天的一般食物無法使果蠅與未食用高鹽飲食的果蠅間學習與短期記憶能力表現相當；但若食用三天一般食物，則記憶與學習的表現即跟一般食用正常食物的果蠅相比無下降趨勢或顯著差異。證明食用高鹽食物的果蠅是一旦產生記憶能力障礙後，需要較兩天更長的時間使果蠅學習與短期記憶表現才能回到原本的狀態。而攀爬能力測試中，發現食用高鹽食物母果蠅的攀爬能力較差但公果蠅並未發現此現象，而有相關的文獻在實驗時雖未將公母果蠅分開，但實驗結果也是果蠅在食用高鹽食物後，攀爬能力會下降(Deng-Tai Wen, et al., 2020)。可注意的是，在果蠅上尚未有研究著重於不同性別的運動能力對高鹽食物的耐受性，未來的實驗若發現不同性別的果蠅對高鹽食物的耐受性有差，則或許此現象在其他物種包括老鼠或人類都有相同的現象。

最後，雖然還未了解高鹽食物導致果蠅的學習與短期記憶能力較差的機制為何，但有發現可能的原因。起初，我們想到因為餵食高鹽食物可能會影響到果蠅體內滲透壓較高。由於高滲透壓可能影響到果蠅動作電位中的鈉鉀幫浦運作，進而影響學習與記憶能力。但已知口渴的果蠅其學習與記憶能力並無較差(Lin S et al., 2014)，因此可能與滲透壓並無直接的關連。而在小鼠的研究中發現學習能力障礙、學習較慢且任務執行程度較差等(Giuseppe Faraco et al., 2018; Giuseppe Faraco et al., 2019)，筆者推測可能有神經方面的退化，因此先進行了神經外觀的實驗。以 Gal4 line 標記了 Dopaminergic neuron 以及 Mushroom body 以觀察先前研究中顯示與懲罰型訓練記憶較有關連的特定神經 PPL1- $\gamma 2 \alpha '1$ 、PAM- $\beta '2a$ (Evrpidis Gkaniyas et al., bioRxiv,2021)以及 $\gamma 1pedc, \alpha '2 \alpha 2$ 、 $\gamma 2 \alpha '1, \alpha 3$ 等(Yoshinori Aso*, Gerald M Rubin*, eLife,2016; Emmanuel Perisse et al., Neuron,2016)，但並沒有在突觸外觀或者型態上看到不同。

在高鹽食物組中發現 glutamylation tubulin 較少還無法直接證實與學習與記憶能力有相關。Glutamylation protein 平時在纖毛的運動中扮演重要角色，而促使微管蛋白麩胺酸化的酶則對於纖毛和微管的架構/功能、IFT 動力學、運動性、信號傳輸至關重要。測試麩胺酸化微管蛋白是否與學習和記憶有關能力，我們可以測試製造麩胺酸化為管蛋白有障礙的突變種果蠅學習與記憶能力。或使用 RNAi 來抑制(Knockdown)特定區域(如 MBON- $\gamma 1pedc > \alpha \beta$)的麩胺酸化微管蛋白，再測試這些 RNAi knockdown 的果蠅學習與記憶能力。

而根據先前高鹽飲食導致老鼠認知障礙的研究(Giuseppe Faraco et al., Nature,2019), (Giuseppe Faraco et al., Nature Neuroscience, 2018)發現會造成此現象的原因為高鹽食物引起小腸中的免疫反應，TH 細胞的增加，產生更多的 IL-17，而 IL-17 抑制小鼠腦中血液

的一氧化氮供給量，使細胞骨架上的 tau 蛋白質無法穩定附著而堆積於腦中，造成認知障礙。免疫反應影響果蠅腦中神經傳導物質的傳輸，進而引發短期記憶與學習能力障礙。但果蠅體內的免疫反應較簡單，因此較不考慮此種可能性，而若影響 ATP 生成也可使用可以看出大腦內 ATP 含量的果蠅，研究是否高鹽食物會導致果蠅缺乏 ATP，若發現缺乏 ATP，則可再更進一步確定缺乏 ATP 會造成學習與短期記憶能力障礙。目前在 ATP 實驗中，首先可以將實驗隻數增加，以了解高鹽飲食對於果蠅 ATP 產量的影響。而若高鹽食物真的導致 ATP 產量減少，則可以了解其與學習和記憶能力之間的關聯，如可能影響到神經活性，則可以利用 CaLexA 方式了解果蠅體內鈣離子多寡以及神經活性狀況。

肆、 結論與應用

此次實驗首次發現了果蠅在食用最短四天高鹽食物後會造成學習及短期能力障礙，且會導致母果蠅的攀爬能力降低，而此現象是具有可逆性的(reversible)，雖然在果蠅的神經外觀上並未看到差異，但在 MBON- γ 1pedc > $\alpha\beta$ 看到麩胺酸化的微管蛋白產量較少值得深入了解高鹽食物的影響為何而導致此結果，釐清與學習與記憶能力下降之間的關係，同時也會嘗試其他種方法，來了解是否還有可能的細胞與分子機制。期許能藉由文中提及的方法和目前的發現找到造成果蠅食用高鹽食物而短期記憶能力降低的原因，並定量造成果蠅學習及短期記憶能力下降的食用鹽量。此研究有助於了解高鹽食物如何影響生物神經作用及記憶能力，若未來釐清了完整影響機制，也可能進一步針對人類進行高鹽食物的研究。

伍、 參考文獻

1. Giuseppe Faraco., et al. Dietary salt promotes cognitive impairment through tau phosphorylation. Nature Vol 574(2019)
2. Giuseppe Faraco., et al. Dietary salt promotes neurovascular and cognitive dysfunction through a gut-initiated TH17 response. Nature neuroscience February (2018)
3. Seth M. Tomchik and Ronald L. Davis. Drosophila Memory Research through Four Eras.Genetic, Molecular Biology, Neuroanatomy, and Systems Neuroscience Chapter 27
4. Carla Margulies, Tim Tully and Josh Dubnau. Deconstructing Memory in Drosophila (Review)Current Biology, Vol. 15, R700–R713, September 6 (2005)
5. Deng-Tai Wen, et al. Endurance exercise protects aging Drosophila from high-salt diet (HSD)-induced climbing capacity decline and lifespan decrease by enhancing antioxidant capacity. The Company of Biologists Ltd (2020)
6. Jiayu Xie, et al. High-Salt Diet Causes Sleep Fragmentation in Young Drosophila Through Circadian Rhythm and Dopaminergic Systems. Frontiers in Neuroscience Nov. (2019)
7. Wei He, et al. High-salt diet inhibits tumour growth in mice via regulating myeloid-derived suppressor cell differentiation. NATURE COMMUNICATIONS (2020)

8. Yves F. Widmer, et al. Regulators of Long-Term Memory Revealed by Mushroom Body-Specific Gene Expression Profiling in *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, Vol. 209, 1167–1181 August (2018)
9. Balint Z. Kacsoh., et al. New *Drosophila* Long-Term Memory Genes Revealed by Assessing Computational Function Prediction Methods. *Genes, Genomic, Genetics* Volume 9 January (2019)
10. Konstantinos Stergiopoulos, Pablo Cabrero, Shireen-Anne Davies, and Julian A. T. Dow Salty dog, an SLC5 symporter, modulates *Drosophila* response to salt stress. *Physiol Genomics* 37 (2009)
11. Ronald L. Davis, Traces of *Drosophila* Memory (review) *Neuron* 70, April (2011)
12. Xiaojing J Gao, et al. A transcriptional reporter of intracellular Ca²⁺ in *Drosophila*. *Nature Neuron* June (2015)
13. Xiaofan Zhang, et al. Aversive Training Induces Both Presynaptic and Postsynaptic Suppression in *Drosophila* *Neuroscience* 13, November (2019)
14. Yichun Shuai, et al. Dissecting neural pathways for forgetting in *Drosophila* in olfactory aversive memory *PNAS* 16, November (2015)
15. Yoshinori Aso and Gerald M Rubin, Dopaminergic neurons write and update memories with cell-type-specific rules. *eLife* 5:e16135 (2016)
16. James Ashley, et al. Retrovirus-like Gag Protein Arc1 Binds RNA and Traffics across Synaptic Boutons. *Cell* 172, 262–274 January 11 (2018)
17. Sabrina Geisberger, et al. Salt Transiently Inhibits Mitochondrial Energetics in Mononuclear Phagocytes. *Circulation* 120, 052788 April 28 (2021)
18. Emmanuel Perisse, et al. Aversive Learning and Appetitive Motivation Toggle Feed-Forward Inhibition in the *Drosophila* Mushroom Body. *Neuron* 90, 1086-1099 April (2016)
19. Evripidis Gkaniyas, et al. The incentive circuit: memory 2 dynamics in the mushroom body of *Drosophila melanogaster*. *bioRxiv* ,448104 June 11 (2021)
20. Taiichi Tsuyama, et al. In vivo fluorescent ATP imaging of *Drosophila melanogaster* and *Caenorhabditis elegans* by using a genetically encoded fluorescent ATP biosensor optimized for low temperatures. *Analytical Chemistry*, 4015325 July 22 (2013)
21. Xiaojing J Gao, et al. A Transcriptional Reporter of Intracellular Ca²⁺ in *Drosophila*. *Nature Neuroscience*, 917–925, June (2015)
22. Kaoru Masuyama, et al. Mapping Neural Circuits with Activity-Dependent Nuclear Import of a Transcription Factor, *Neurogenetics*, 0167-7063, November (2011)
23. Elham Nikpey, et al. High-Salt Diet Causes Osmotic Gradients and Hyperosmolality in Skin Without Affecting Interstitial Fluid and Lymph. *AHA Journal*, 116.08539, April (2017)
24. Excessive salt consumption causes systemic calcium mishandling and worsens microarchitecture and strength of long bones in rats. *Nature*, 10.1038, January (2021)
25. Lin S, Oswald D, Chandra V, Talbot C, Huetteroth W, Waddell S. Neural correlates of water reward in thirsty *Drosophila*. *Nat Neurosci* 17:1536-1542, (2014)

- 26.** Sarah G. Leinwand, Kristin Scott. Juvenile hormone drives the maturation of spontaneous mushroom body neural activity and learned behavior. *Neuron*: 1836–1847, June(2021)
- 27.** Cansu Doğan, Gözde Güney, Kardelen K. Güzel, Alp Can, Dwayne D. Hegedus, Umut Toprak, What You Eat Matters: Nutrient Inputs Alter the Metabolism and Neuropeptide Expression in Egyptian Cotton Leaf Worm, *Spodoptera littoralis* (Lepidoptera: Noctuidae), *Frontiers in Physiology*, 10.3389/fphys.2021.773688, 12,October (2020).

【評語】 050010

1. 此研究的實驗設計相當嚴謹、實驗結果呈現清楚。對於電擊與嗅覺敏感度可能造成的影響亦以實驗釐清，相當清楚的呈現果蠅的短期記憶的確是因為餵食高鹽食物所引起，並深入探究其神經機制，是原創性極佳的研究課題。
2. 作者對於實驗流程及探討問題的邏輯相當清楚，對於此研究的未來發展掌握良好。