

運動訓練對憂鬱症老鼠影響之生理機轉評估

李瑞娟／國立政治大學副教授

劉鎮國／樹人醫專教授

黃順顯／遠東技院副教授

摘要

憂鬱已是現代社會的重要議題，目前約有 2% 的人有重度憂鬱的困擾，其中 20% 左右的人有中度憂鬱症的困擾。實驗動物中發現，早期與母親隔離的初生動物，長大後在行為上會發生深遠的影響。我們的實驗室也發現早期與母親隔離的初生動物會有憂鬱症的傾向。在過去運動曾經被拿來當作改善憂鬱傾向的方法，然而關於運動訓練如何影響大腦的訊息傳遞，目前並不清楚。本研究的目的就是要運用我們所發展出的憂鬱症老鼠之實驗模式，來探討憂鬱症的病理轉機。我們將以強迫游泳試驗來檢驗早期隔離老鼠其憂鬱症發展的情形。並檢驗運動訓練對憂鬱症老鼠在強迫游泳試驗之行為表現改善狀況。除了行為觀察外，我們同時研究腦細胞的分子機轉。我們將觀察憂鬱症老鼠其大腦訊息調控的改變。同時再比較運動訓練的老鼠，相同腦區憂鬱行為上有無差異。並探討可否直接以影像處理的方式，研究杏仁核受刺激後鈣離子訊息傳遞機轉有何差異，以做為未來憂鬱症研究的基礎。本研究發現憂鬱症的老鼠其 MAPK 在杏仁核的活性有變高的現象。初步的研究結果發現，在老鼠身上發現運動可以改善憂鬱的情形。同時我們也可以直接測定鈣離子在杏仁核的濃度變化，故此運動模式值得繼續應用在憂鬱症的研究上，深入研究運動訓練的機轉。

關鍵詞：憂鬱、運動訓練、MAPK 激酶

壹、簡介

一、憂鬱症簡介

憂鬱症在精神疾病之中，情緒錯亂是最普遍的症狀。憂鬱症在情緒錯亂中佔有很高的比例。在美國約有 2 至 5% 的人受到嚴重憂鬱的影響，另外約有 20% 的人受到中度的憂鬱困擾(Nestler et al., 2002)。然而，至目前為止，憂鬱症的起因與病理生理機轉仍不清楚。也因此使得在抗憂鬱的藥物發展遲緩。為了有效研究憂鬱症形成機轉，本研究使用 early-life stress animal model(即早期生活隔離之動物模式)來探討憂鬱症中大腦的特異性的生理機轉，並從運動訓練中，觀察運動訓練對憂鬱症的改變情況。

回顧過去關於憂鬱症研究文獻顯示，憂鬱主要是由於神經與內分泌失衡而對神經細胞造成的長期性傷害所致。一般而言，壓力會對下視丘－腦下腺－腎上腺軸，簡稱 HPA(hypothalamic-pituitary-adrenal)產生影響。而長期壓力可能是造成憂鬱的主要原因。當動物受到壓力刺激時，下視丘的神經核(PVN)會分泌 CRF(corticotropin-releasing factor)而造成腦下腺 ACTH 的分泌。ACTH 又促進腎上腺之 Glucocorticoids 如 cortisol 的分泌。Glucocorticoids 會對動物的行為產生深遠的影響，Glucocorticoids 主要的作用在幫助身體應付外在的壓力。在短暫壓力下 Glucocorticoids 會回饋抑制下視丘神經核。當外在情況回復正常後，下視丘神經核分泌的 CRF 又回到基礎狀態。外在壓力刺激會先對 hippocampus 及杏仁核 (amygdale)產生影響。而此區的訊息會在下視丘經過整合。統合以後的訊息會調節 CRF 的分泌量。報告顯示，高劑量的 Glucocorticoids 分泌會使得 hippocampus 受傷害。而造成 hippocampus 無法調節 CRF 進而導致血中高 Glucocorticoids，這可能是憂鬱症的造成原因之一。另一個造成憂鬱症的可能模式是神經營養傷害理論 (Impairment of neurotrophic mechanisms)。主要的關鍵因子是 brain-derived neurotrophic factor (BDNF) 腦衍生神經營養因子。在成熟動物中，BDNF 是一個重要的分泌因子，他

可以幫助神經元及神經膠細胞的生長。長期壓力可能會造成 BDNF 的表現下降而造成 hippocampus 神經元受損。而此路徑主要也是受到 Glucocorticoids 分泌的影響。憂鬱與 hippocampus 顯然有明顯而重要的關係，然而除了 hippocampus 以外，杏仁核對憂鬱症可能也有重要影響。杏仁核是一個外來緊迫刺激的整合中心，因此，它被發現不僅是一個恐懼記憶產生的區域，同時是一個對於外來刺激而使身體引發自主神經性反應及神經內分泌產生的樞紐，最近更發現它參與在憂鬱症的產生機制之中。因為杏仁核可以正向調控 HPA 的活性，以致於可以平衡海馬迴對於 HPA 活性的負向調控，然而，一旦杏仁核神經細胞產生問題，導致對於 HPA 活性的調控失衡，則最終會引發憂鬱症狀的產生。另外，在憂鬱症人的腦部解剖實驗中亦發現，這類病人的杏仁核都產生病灶現象；因此，對於憂鬱症機轉的探討，杏仁核是一個重要的腦區。

二、憂鬱的研究模型

早期生活隔離之動物模式是將出生後的幼鼠，即與其母代做適當隔離，根據過去的研究報告顯示，其於憂鬱症研究中之重要性可從兩方面得知，一方面在於基礎研究，另一方面在於臨床證據。從基礎研究來談，此種將生物體從出生之後，就與母體隔離的個體，不論在非人類的靈長類或於啮齒動物中，都顯示此個體的行為及生理功能都會產生異樣的變化，將到地之類個體的 HPA axis 會產生異常，而這種 HPA axis 異常的現象，根據文獻報導會增加成體產生憂鬱症狀的危機。另一方面，在臨床上證據顯示，對於早年被遺棄的小孩，無論是父母過世，或被刻意遺棄，甚至小時候生活被忽略(即不被重視)，則往往這些族群成年之後產生憂鬱症的流行率相當高。所以，由以上兩方面的證據顯示，就憂鬱症形成機轉的研究，早期生活隔離動物模式是一個相當好的工具。Forced swimming test(即所謂強迫性游泳試驗)是一個相當廣泛被使用的憂鬱老鼠動物模式(15, 23, 24, 25, 26, 27)，並且這個模式也常被用來研究憂鬱劑之間的交互作用情形(9, 10, 18, 21, 22, 31)，甚至用來研究緊張性引發

(stress-induced)的荷爾蒙與神經傳導物質之間的作用；另外，內分泌系統及免疫系統研究亦用到 forced swimming test 的動物模式(16)。而此動物模式的原創者是由 Porsolt 等人於 1977 年發表於”Nature”雜誌的方法(26)，更重要的是，此種測式中最重要的一項指標就是”immobility”，即老鼠於強迫性游泳的過程中，其水中不動的行為(23，24，25，26)。即在這種強迫性游泳過程老鼠所產生的不動情形則反應出老鼠的行為沮喪，即憂鬱傾向(25)。也就是說，老鼠在此模式中所反應出不動時間的多寡，即可判定此老鼠的憂鬱程度，也就是說不動狀態的產生即為老鼠產生憂鬱的指標。

三、以憂鬱症模型研究憂鬱基轉的可行性分析

過去本實驗室也藉此動物模式，進行與早年被遺棄導致的憂鬱症其形成機制之探討，而我們探討的首要在於早期生活隔離是否會引起老鼠的杏仁核細胞之分子層面的變化，若有所變化，則我們會進一步地去探討此種變化與行為之間關係。本研究運用強迫性游泳試驗進行實驗，而此強迫性游泳試驗中之不動時間為一重要行為指標，因此，在本計畫中，我們採用強迫性游泳試驗來測定早期生活隔離老鼠的不動時間是否有所變化，以探討早期生活隔離老鼠的行為改變情形。在神經系統中，MAPK 的路徑是參在許多緊張性引發的神經突觸可塑變化過程中(synaptic plasticity)。另外，在離體實驗中亦顯示，MAPK 路徑參與在 long-term depression(腦被長期抑制現象)之中。近年來在動物樣式的研究中發現，MAPK 路徑參與在恐懼記憶的形成與消除的過程；最近更有些微證據顯示 MAPK 路徑參與在憂鬱症的形成過程，然而，證據仍嫌不足。因此，本研究是要利用早期生活隔離動物模式，去探討大白鼠杏仁核細胞中之 MAPK 路徑在早期生活隔離老鼠中所扮演的角色，一方面純粹探討腦部神經細胞內分子層面的變化，另一方面進一步探討此種分子變化與實際上動物行為之間的調控關係如何，由此範圍找出與早期生活隔離相同的憂鬱症形成途徑。

四、運動對憂鬱的影響研究

運動訓練對心血管的影響已經廣泛的被人們所接受。過去我們發現，受過運動訓練的動物，其心跳速率會下降，同時心血管對乙醯膽鹼的靈敏度會上升，同時對於細胞內鈣離子傳導系統也會變化。受過運動訓練的老鼠，其主動脈內皮細胞對於鈣離子通透性會增加，而造成乙醯膽鹼對內皮細胞鈣離子誘導上升效果增強。運動訓練除了對心血管功能有提升的效果之外，有許多報告顯示，運動對於憂鬱症的病人有減低病情的效果。然而目前對於運動如何影響腦細胞的訊息調控仍不清楚。

本研究結合三種動物模式，一為早期隔離的憂鬱老鼠動物模式，第二為運動訓練老鼠模式，第三為強迫游泳試驗模式。我們以早期隔離的方法來誘導大白鼠產生憂鬱的作用，同時比較有運動訓練及沒有運動訓練的老鼠，在杏仁核其訊息傳遞因子濃度有無改變。之後我們將老鼠運動訓練 2 週，藉由強迫游泳訓練的方式，去看老鼠憂鬱症改善的情形。

貳、實驗方法及步驟

一、動物來源：

本實驗所用的動物為雄性成熟 Sprague-Dawley rats，約四週至五週大，平均重量為 150~170g。而動物來源主要由國科會動物中心及中華醫事學院生科所 SPF 級動物飼養房供應，而運送過來的老鼠在實驗期間則受到妥善的照顧，其生存的環境溫度為 $21 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 且溼度為 $50 \pm 10\% \text{RH}$ ，另外，由動物房的固定晝夜控制，白晝開燈由 0700 到 1900，且燈光強度為 40~130 lux。

二、動物模型的建立：

本實驗老鼠主要在中華醫事學院建立，實驗時將懷孕母鼠單獨觀察，等到分娩的當天，算為產後第 0 天(postnatal day 0)，並於產後第二天

開始進行對雄性幼鼠隔離。再將公的一群以隨機方式分成 control 及隔離實驗組，而實驗組的隔離時間為每天固定時段 1hr(60min/day)，如此隔離方式持續到 postnatal day 14。在隔離期間，隔離者須放於保溫箱中，以防失溫導致身體代謝速率產生變化。等到所有動物都斷奶後，則開始老鼠分籠(control 與實驗組分開)，並於 22±1°C 的室溫及 12hr 晝夜循環的環境下，無限自由地供給食物及自來水來飼養，預備進行實驗。

三、forced swimming test 的測試：

強迫性游泳的老鼠主要測試老鼠被置於水中後，其掙扎的時間。老鼠怕水的特性，所以正常老鼠放入水中都會強力掙扎，然而如果一些老鼠比較有憂鬱傾向的，則這些老鼠投入水中其掙扎情況會顯著下降，即所謂不動時間會增加。實驗步驟如 Porsolt 的流程所述(24, 26)。我們利用一個直徑 18cm 高 38cm 的透明圓柱壓克力桶，盛滿 20cm 的自來水(2)，水溫維持在 25°C 左右。測試的前一天，必須先讓老鼠熟悉水性。將老鼠置於相同環境的水桶中 15 分鐘，再將他取出。並於 24 小時之後，讓老鼠浸入水槽 5 分鐘，並此時觀察老鼠的不動時間。所謂不動時間是採用觀察老鼠的掙扎時間，再由總秒數 300sec 扣掉老鼠掙扎時間。游泳完後必須將老鼠置於同樣大小的透明塑膠圓柱筒中(乾燥的)休息，並照 60W 燈泡 30 分鐘以烘乾。

四、運動訓練：

進行運動訓練的老鼠給予如下的訓練強度。每週訓練 5 天，在訓練前先讓老鼠預跑 1 週，跑步機轉速為 9m/min，每天 10 分鐘。訓練的第一週轉速增至 12m/min，時間由第一天的 20 分鐘開始，每天增加 10 分鐘，直到第五天的 60 分鐘。此後，每天的訓練時間都維持一小時。第二週的運動速度為 12m/min。之後每兩週速度增加 3m/min。對照組不運動，但必須置於跑步機上相同的時間。

五、老鼠腦部定位手術：

將 control 老鼠進行杏仁核體的腦部定位手術，首先將老鼠用 sodium pentobarbital(50mg/kg, i.p.)進行麻醉，等到完全麻醉後(可用針刺腳測試)將老鼠固定在立體定位儀上。之後再將兩根 23-gauge 不銹鋼管各插入兩側的杏仁核體中，而定位位置的方位是根據 1986 年 Paxinos 及 Watson 發表的數據，AP-2.3mm，ML+-4.5mm，DV-7.0mm。接著，將三根 jewelry screws 固定於頭蓋骨上當作 anchors，之後用 dental cement 覆蓋頭部即完成手術。然後再將二根 28-gauge dummy cannula 插入各 23-gauge 的鋼管中以防止管內外被腦液或灰塵阻塞，最後讓老鼠術後休息 5~7 天，然後才可進行實驗。之後進行腦切片，老鼠以斷頭犧牲之後，立即取出老鼠大腦，並將老鼠大腦固定在石蠟上。再以切片機進行切片。將老鼠的海馬回及杏仁核切出。切片的厚度約 500 μ m 左右。所得的切片保純於 4°C 的 CSF 中。

六、西方點墨法：

本法是將 forced swimming rats 的腦部細胞(即杏仁核細胞)取下，並用乾冰瞬間 freeze 細胞內部的蛋白質成分，之後，再加入含蛋白酶抑制劑，或磷酸酶抑制劑等藥物的 HBII 溶液於所取的 amygdala sample 中，然後進行 sonication 先讓組織均質化後，再利用 7500rpm、15min 加上 50000rpm 時(溫度均為 4°C)的離心過程萃取出所要的 cytosol protein，然後再利用 Bradford assay 定出等量 40 μ g 的各 sample 的容積，以便進行跑電泳實驗。電泳所用的材質為 8.5%濃度的 SDS-polyacrylamide gels，而跑完電泳之後，則進行 transfer(即 blotting)約用電流量 130mA，時間 12 時的流程，之後將 blotting membrane 取出，利用 TBS 加安佳脫脂奶粉(以 20ml : 1g 的比例泡製)溶液進行 blocking 且經過一夜。隔天，利用 TBST wash 三次後，進行室溫下 1 μ Ab 的 incubation，時間約一天，之後，隔天再進行三次 TBST wash 後，進行 2 μ Ab 的 incubation，於室溫下 1 小時，

之後，再 wash 三次，然後加上 chemiluminescence kit 即 ECL 螢光顯示 Kit，incubate 1 min，然後迅速進入暗房以顯影劑及定影劑呈現出 X-film 上的蛋白質螢光影像，之後再利用 image analysis system 去分析定量蛋白質。

七、鈣離子指示劑染色：

爲了要研究鈣離子訊息對腦細胞的影響，我們以鈣離子指示劑去染腦細胞以觀測其在進行穿透作用所扮演的角色。雖然過去我們有許多以 fura2-AM 去量測細胞內鈣離子的經驗(Huang et al., 2000；Huang et al 2001；Huang et al 2002)。我們以 fura2-AM 做爲腦細胞之鈣離子之螢光指示劑。其實驗步驟如下：腦切片取下之後，將他轉移並固定至流體系統裝中的底層，並通以氧氣。再以含 fura2 AM(2mM)的 CSF 處理 30 分鐘。之後以 CSF 液體取代。靜置 30 分鐘使 fluo-3 AM 完全被切除之後再進行腦細胞實驗。在將來的實驗我們預計以刺激劑探討不同的化學物質對正常的、運動的、憂鬱的及憂鬱又運動的老鼠腦細胞，其鈣離子訊息機轉表現有何不同。

八、統計方法：

本實驗主要是利用 SAS version 6.08 版軟體來進行分析，實驗組與對照組之間的比較差異，主要用 ANOVA 的分析方法，而若多組數據之間的差異則使用 Newman-keuls analysis 來進行。P 值爲小於 0.05($P < 0.05$)統計結果爲有差異的。

參、結果與討論

我們建立早期隔離老鼠的動物模式。新生的老鼠分娩的當天算爲產後第 0 天(postnatal day 0)，並於產後第二天開始隔離，隔離開始當天就先分公母並標識。然後再將公的一群以隨機方式成 control 及實驗組(即預備

隔離者)，而實驗組的隔離時間為每天固定時段 1hr(60min/day)，如此隔離方式持續到 postnatal day 14。(即隔離約二個星期)。隔離期間，隔離者須放於保溫箱中，以防失溫導致身體代謝速率產生變化。等到所有動物都斷奶後，則開始將老鼠分籠(control 與實驗組分開)，並於 22±1°C 的室溫及 12hr 晝夜循環的環境下，無限自由地供給食物及自來水來飼養。經過 13 天一小時的隔離後，在第四到五週齡時進行強迫性游泳試驗。

從我們進行的強迫游泳試驗發現，經過隔離的老鼠，其在水中不動的時間明顯上升。此種測試中最重要的一項指標就是”immobility”，即老鼠於強迫性游泳的過程中，其水中不動的時間。此時間反應出老鼠的沮喪放棄掙扎的時間，此時間可以用來當做憂鬱傾向的定量標準。在我們所得的結果顯示，正常老鼠 immobility time 約 40%左右。而早期隔離，每天隔離 60 分鐘的老鼠之 immobility time 高達 70%左右。目前我們已經可以得到穩定的憂鬱老鼠。

老鼠經過隔離後，在第四到五週進行游泳試驗，結果顯示隔離老鼠在水中不動的時間增長。亦即表示隔離老鼠容易放棄希望的特性。

在取得憂鬱症的老鼠後，我們更進一步將老鼠杏仁核取下，藉由西方點漬法對杏仁核細胞的 MEPK kinase 活性作測試。結果我們發現經由母鼠隔離的憂鬱老鼠其杏仁核之 MEPK kinase 活性有增加的現象。我們進一步發現老鼠杏仁核 MEPK kinase 活性與老鼠絕望的行為有相關。

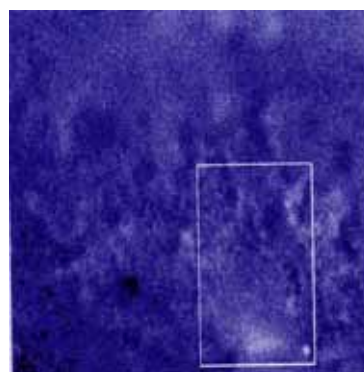
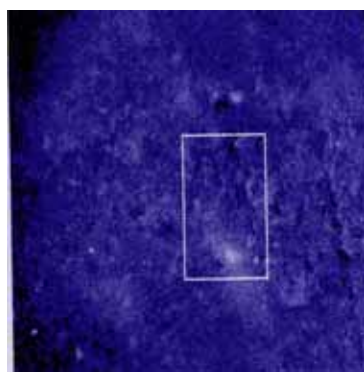
在我們得到憂鬱的實驗動物之後，我們立即進行早年被遺棄導致的憂鬱症其形成機制之探討。由於老鼠的杏仁核細胞長久以來就知道與負面的學習與記憶所造成的生物焦慮情形關係。因此，我們就去看憂鬱老鼠其杏仁核的分子表現與正常鼠有無不同(Schafe et al, 2000；Waltereit et al, 2003)。由於過去林老師等曾經發現杏仁核的 MAPK kinas 與焦慮的產生很有關係(Lin et al, 2001；Lu et al, 2001)。因此我們便進一步探討憂鬱老鼠其杏仁核的 MAPK kinas 與正常老鼠有無差異。結果我們發現，憂鬱老鼠其杏仁核之 MAPK kinas 會持續活化的現象，其活化程度大約高於正常鼠兩倍左右。

憂鬱老鼠與正學老鼠 MAPK 的表現量並無異差，然而在憂鬱老鼠中，其 MAPK kinas 磷酸化程度增加。

我們接著探討運動效果對憂鬱老鼠的影響，結果我們發現，受過運動訓練後的老鼠，其憂鬱的情形有受到改善。

憂鬱的老鼠經過運動訓練之後，類似憂鬱的行為受到改善。

本研究利用外加的腎上腺皮質素於杏仁核神經細胞來觀察鈣離子之變化。為了進行此項研究，我們先開發 calcium image 技術將之應用於腦組織上。我們將老鼠斷頭，取下含杏仁核之腦片，經過染色後，mount 在組織流體室中，再以藥物處理並取得處理過程的鈣離子影像。結果我們發現以 NE 刺激杏仁核神經細胞，會看到杏仁核細胞之內鈣離子濃度增加的情形。由 NE、ACTH 等都是壓力 hormone，而壓力 hormone 對於憂鬱症之產生扮演相當角色(Duman et al, 1997)，未來我們可以研究其他的壓力激素，在杏仁核產生的鈣離子訊息為何。並比較正常老鼠與憂鬱老鼠之間的差異。



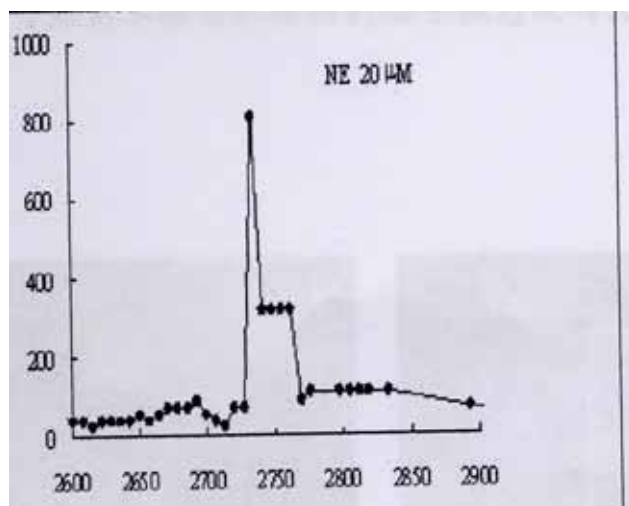


圖 1：壓力激素導致老鼠杏仁核的腦細胞胞內鈣離子濃度上升

圖 1 為杏仁核的 340 螢光影像圖，實驗中將腦切片之杏仁核腦區置於顯微鏡下方，先給予灌流。之後在給予 NE 刺激。幾分鐘後以人工腦脊髓液洗掉。實驗結束後，對腦切片做鈣離子濃度校正。方法於實驗步驟中詳述。

由於本實驗是在腦片上進行，因此所得到杏仁核細胞鈣離子的表現，即具有代表價值。為了更進一步純化所得的鈣離子訊息，我們希望能夠對單顆的杏仁核細胞做影像處理，得到單顆細胞的鈣離子活性訊息，我們再實驗末了時，將細胞以福馬林固定。之後嘗試以硝酸銀染色，並在光學系統下，得到先前所進行鈣離子影像處理的細胞位置。因此，在我們的實驗中，我們除了可以對整區的杏仁核細胞做影像處理以外，還可以對單顆杏仁核的鈣離子訊息做研究。

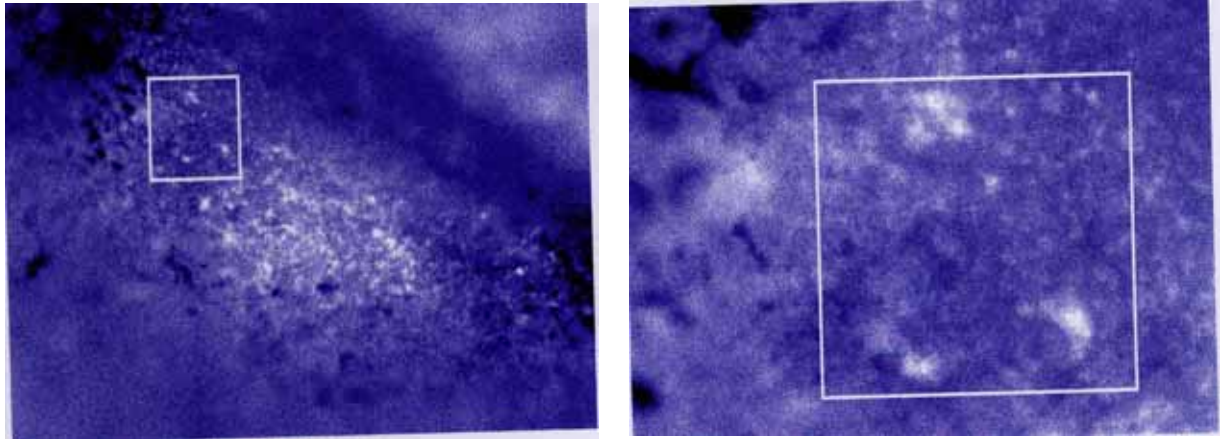


圖 2：老鼠杏仁核以硝酸銀染色結果

圖 2 左圖是一個倍率比較低的鏡頭所得的影像，左圖右邊較黑的區域為紋狀體延伸的部位。焦距較清楚的區位為杏仁核區。右區是 40X 的鏡頭所得的影像。

肆、結論

本研究主要結論如下

1. 早期隔離老鼠會造成憂鬱的傾向。
2. 憂鬱的老鼠其杏仁核中 MAPK 磷酸化活性會增高。
3. 運動訓練會改善憂鬱的情況。
4. 鈣離子影像可以用來量化杏仁核的神經細胞活性，做為未來研究憂鬱症基轉的工具。

伍、參考文獻：

(略)

Abstract

Mood disorders are among the most prevalent forms of mental illness. Severe forms of depression affect 2-5% of the U.S. population and up to 20% of the population suffer from milder forms of the illness. Numerous studies have shown that early life stress in nonhuman primates produces profound and long-lasting changes in behavior and biological function. Our previous data indicated that the maternal deprivation animal showed a depression-like behavior in response to force swimming tests. Studies on human depression revealed beneficial effects of exercise in the treatment of psychiatric disorders. However, the underlying mechanisms are largely unknown. In this study, the underlying mechanisms of depression will be tested in normal, as well as maternal deprivation rats with or without exercise training. The force-swimming test will be carried out to test the animal behavior before and after exercise treatments. The brain slice calcium image of amygdala will also be investigated for the possible application of future investigation of depression. Our study revealed that amygdala phospho-MAPK level was elevated in maternal deprivation rats. Exercise training can inhibit the immobility time during forced swim test, suggesting an inhibition on depression-like behavior through exercise training. Calcium image of amygdala were also accessible by brain slice preparation. Our data provided a basic foundation for the application of exercise program on depression treatments.

Keywords: Zno; depression; exercise training; MAPK;