

中華民國第 63 屆中小學科學展覽會
作品說明書

高中組 行為與社會科學科

第一名

052711

探討一種新穎腺苷調控藥物對於思覺失調症及
焦慮症的治療潛力—以藥物及壓力引發之疾病
小鼠為模式

學校名稱：臺北市立建國高級中學

作者： 高二 曹祐彬 高二 傅紹捷	指導老師： 朱芳琳
---------------------------------	------------------

關鍵詞：新穎腺苷調控藥物、思覺失調症、焦慮症

得獎感言

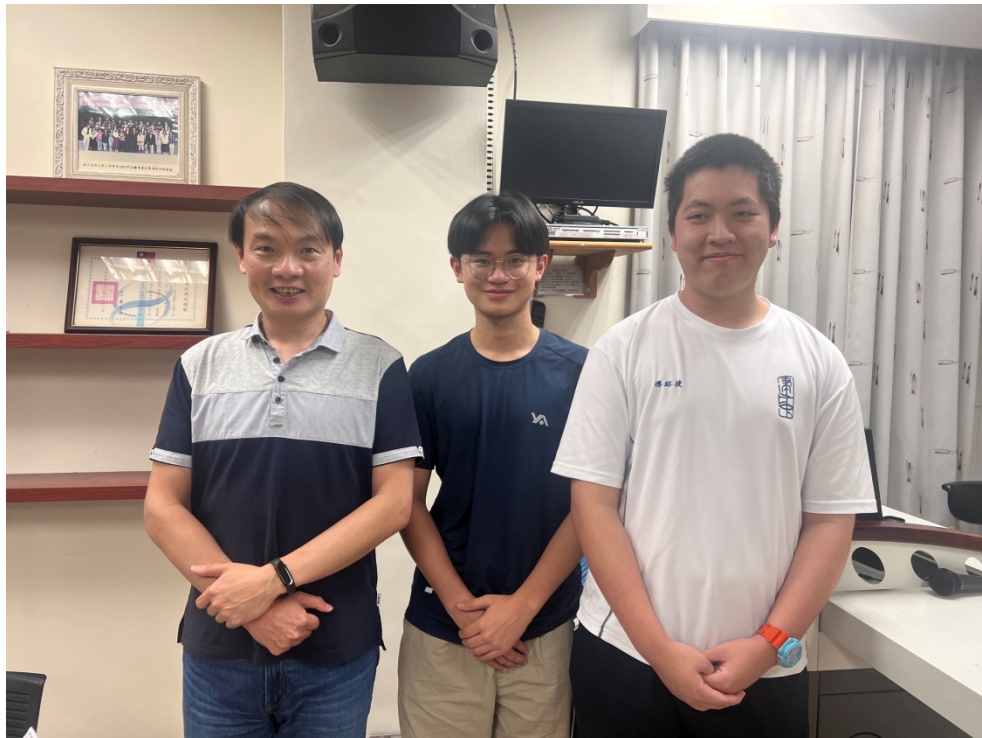
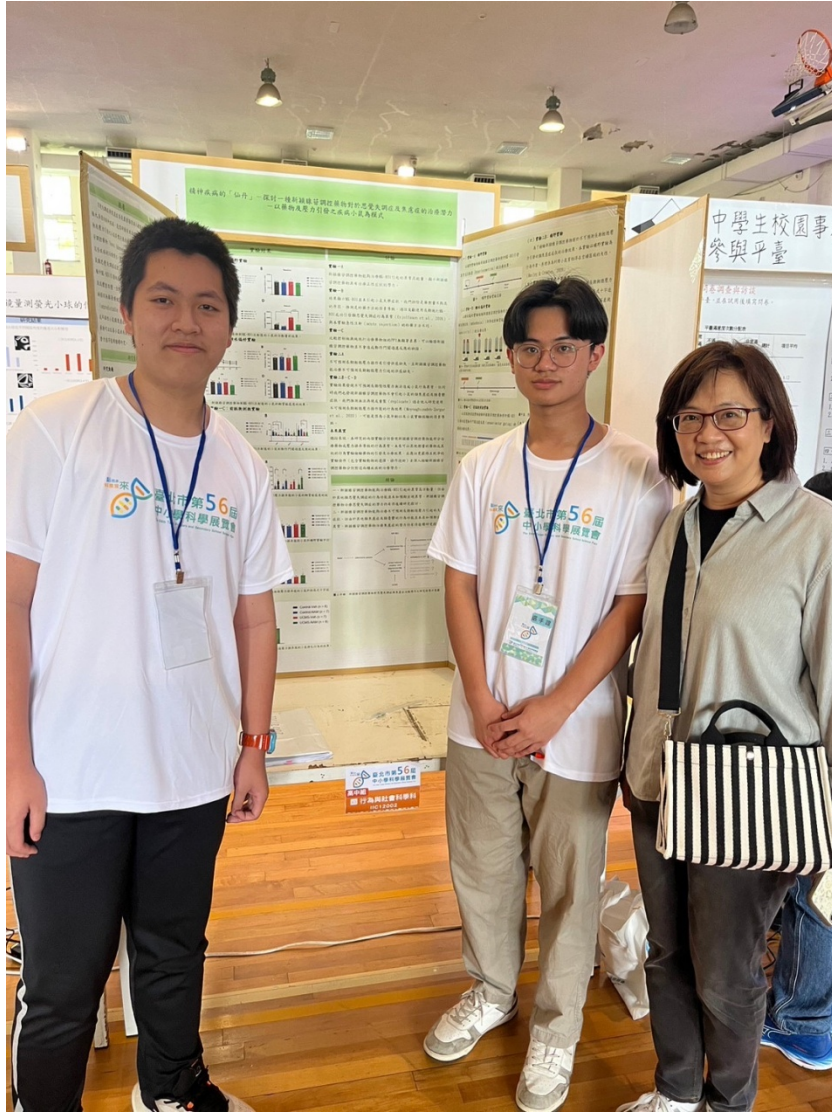
很高興我們在這次的全國科展中獲得了第一名的佳績。當初我們開始進行實驗時，從未預料到會有這樣的成果。在動物行為學的研究領域，無法獲得結果是司空見慣的情形，數據的不完美始終讓我們感到憂心，自校內科展起，至北市科展，甚至是全國科展，我們始終抱持著可能會因此而落榜的擔憂。

然而，結果相當出乎意外，評審老師肯定我們的付出，並對這份作品給予正面評價，或許這份報告不是處處完美無瑕，但因為我們在各方面的努力，最終迎來了今日的殊榮。

在這漫長的研究過程中，我們由衷感謝朱芳琳老師自始至終的默默支持，她鼓勵我們堅持下去，在專題研究這條路上勇往直前。我們要感謝台大心理系的賴文崧教授在實驗方面提供了許多協助，給予我們能在高中階段進行動物實驗的寶貴機會，並且在專業的領域引導我們探索未知。感謝張弼翔學長在我們學習實驗技術和操作方面給予了莫大的幫助，凡事皆親身示範帶領我們。感謝實驗室的學長姐，給予我們幫助與建議，提攜後輩在實驗的道路上勇於前行。

就參展這方面而言，我們深知仍有許多改進空間，我們的實驗並沒有太多獨特的創意元素，這些實驗僅是藥物開發過程中的初步階段。然而，作為這項研究的實驗者，我們依然為我們能在台灣的精神疾病研究做出一份貢獻而感到自豪。未來，我們需要設計更具實用性與挑戰性的實驗，使我們所研究的新穎腺苷調控藥物能在精神疾病治療方面做出更大的貢獻。

最後，我們想要給予學弟妹的建議是：不要輕易放棄對科學的熱愛。從實驗裡得出客觀數據，即使它們看起來並不完美，但這就是科學的本質；在黑暗中找尋可能，縱使未知的路上充斥著障礙與未知，但一步步地揭開背後的真相，才是科學所欲探求的目標。完美的實驗數據並非唯一，在失敗中探索才是科學研究的真諦。我們殷切盼望所有對科學探索抱有熱忱的人都能夠在自己所熱愛的領域實現自己所追求的理想。



摘要

思覺失調症與焦慮症皆是嚴重損害病人健康且造成社會極大負擔的精神疾病，急需研發有效治療藥物。本研究以藥物及壓力引發之小鼠異常行為為模式，探討新研發的新穎腺苷調控藥物（Novel Adenosine Modulator）對於這些疾病的治療潛力。實驗一以藥物 MK-801 引發成年雄性小鼠類思覺失調症症狀，給予新穎腺苷調控藥物可緩解曠野測驗中 MK-801 引發的過度活動量，且不會造成小鼠產生失樂症狀或體重改變。但對於 MK-801 引發的感覺動作門閾過濾反應缺損則無顯著療效。實驗二以不可預測長期輕微壓力（unpredictable chronic mild stress）引發成年雄性小鼠類焦慮症與類憂鬱之行為異常，新穎腺苷調控藥物可以改善小鼠的失樂症狀。這些結果顯示這個新藥具有潛力值得後續繼續研究。

壹、研究動機

一、實驗動機

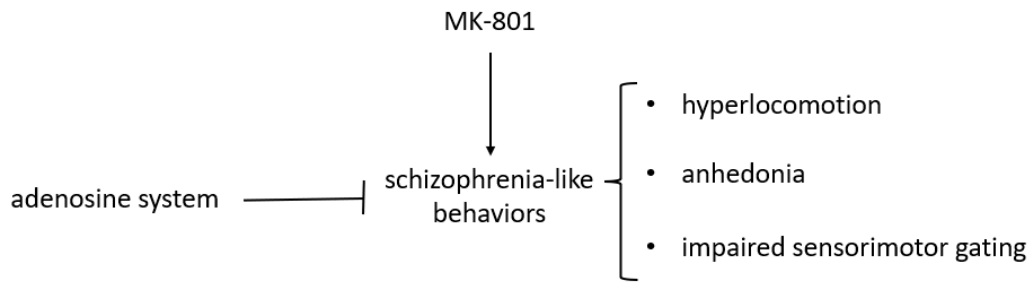
思覺失調症患者在小燈泡案、台南殺警案中皆引起社會譁然並受到高度關注，而焦慮症在台灣為最大宗的精神疾病，疫情爆發過後，出現廣泛性焦慮症症狀的人數更有明顯上升。有鑑於思覺失調症與焦慮症對個人乃至家庭、社會的健康和財政負擔，對於此二疾病的藥物研發已經刻不容緩，根據過去文獻指出腺苷系統可能是治療思覺失調症與焦慮症的治療目標，我們希望能利用動物模型去檢驗最近新研發的新穎腺苷調控藥物對於思覺失調症與焦慮症的治療潛力，希望能藉由我們的資料為新穎腺苷調控藥物的開發盡一份心力！

二、文獻回顧

（一）思覺失調症

中華民國衛生福利部統計處（2021）統計數據指出國內約有兩百八十八萬人被診斷為精神疾患，其中思覺失調症（schizophrenia）約占十五萬四千人，為台灣精神疾病中第六大疾病，臨床上將思覺失調症描述與分類為正性（例如：幻覺與妄想等等）、負性（例如：失樂症狀（anhedonia）、無動機（avolition）等等）與認知症狀（例如：執行功能缺損等等）三大症狀域，目前治療藥物雖能抑制正性症狀，卻對負性以及認知症狀的治療效果不彰且會有嚴重的副作用，因此有其需求研發新的治療藥物。

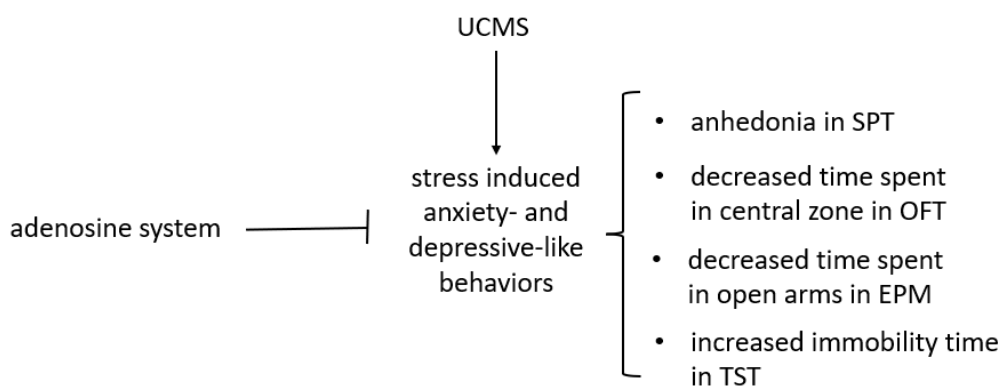
N-甲基-D-天門冬胺酸受體（N-methyl-D-aspartate receptor，簡稱 NMDAR）功能低下為思覺失調症成因假說之一（Seillier & Giuffrida, 2009），而過去文獻指出促進腺苷 2A 受體（adenosine 2A receptor，簡稱 A_{2A}R）能促進神經上 NMDA 受體引發電流（Mouro et al., 2018），另一方面，新開發的新穎腺苷調控藥物具有刺激腺苷系統的能力。



圖一 思覺失調症的機制示意圖

(二) 焦慮症

衛生福利部統計處（2021）統計國內約有兩百八十八萬人被診斷出有精神疾患，其中焦慮、解離、壓力相關、身體障礙和其他非精神病的精神疾患（anxiety, dissociative, stress-related, somatoform and other nonpsychotic mental disorders）約占一百四十六萬八千人，為台灣精神疾病中最大之疾病。焦慮症是一種以過度焦慮、擔憂、畏懼、逃避為主要症狀，造成重大痛苦、損害社會、職業功能的疾病（Craske et al., 2011），另外，憂鬱症狀也是焦慮症患者中常見的症狀，甚至時常有焦慮症與憂鬱症共病的情形，根據台灣精神醫學會在 1999 年發表的著述中指出焦慮及憂鬱終生共病的盛行率達 28%（曾美智等，1999）；臨床上已證明刺激 4-胺基丁酸受體（ γ -Aminobutyric acid receptor，簡稱 GABAR）有助於緩解焦慮症狀（Liu et al., 2007），亦有研究表示刺激 A_{2A}R 會促進 GABA 的釋放。



圖二 焦慮症的機制示意圖

(三) 腺苷 (Adenosine) 及腺苷受體 (Adenosine Receptor) 簡介

腺苷 (Adenosine) 為核苷的一種，以腺苷三磷酸 (ATP) 或腺苷雙磷酸 (ADP) 形式轉移能量，作用機制為利用磷酸根水解斷裂產生二磷酸腺苷並釋放能量，此能量釋放為人體中

重要能量來源。單磷酸腺苷（AMP）會在酵素作用下環化成為環磷酸腺苷（cAMP），環磷酸腺苷負責進行體內多種信號傳遞。腺苷對中樞神經系統有抑制作用，腺苷與受體結合時，會抑制某些神經傳遞物質的釋放，具有鎮靜的效果，如咖啡因與腺苷具有拮抗作用，咖啡因會抑制腺苷系統下游神經傳遞，造成腺苷無法正常與腺苷受體結合，使大腦神經活動保持活躍。目前已知人體中腺苷受體（adenosine receptor）具有四種亞型：A₁、A_{2A}、A_{2B}和A₃。其中腺苷酸 A_{2A} 亞型受體（A_{2A} adenosine receptor）在腦中很多區域皆有分佈，並且其能調控神經細胞的生理功能。過去已有多篇研究指出腺苷與 A_{2A} 受體結合能提高谷氨酸、γ-胺基丁酸（γ-aminobutyric acid, GABA）等分子傳遞物釋放（Cristóvão-Ferreira et al., 2009）。近期研究也指出腺苷與 A_{2A} 受體結合後能促進神經上 NMDA 受體引發電流（Mouro et al., 2018）。同時，其他研究進一步指出，腦中的腺苷 A_{2A} 受體和多巴胺 D₂ 受體會形成受體異聚複合體，腺苷受體和多巴胺受體之間具有相互拮抗的作用，可以調控這兩個受體及其下游訊息傳遞（Fuxe et al., 1998）。總體而言，腺苷調控藥物可以同時活化腺苷 A_{2A} 受體，且抑制大腦中的腺苷轉運子，進而增加蛋白質降解系統的活性，並且可有效水解突變蛋白，因此降低大腦中突變蛋白質的堆積。因此，研發腺苷調控藥物可望有機會成為一個藥物治療的新標靶。

貳、研究目的

- 一、以 MK-801 引發的類思覺失調症行為異常的動物模型探討新穎腺苷調控藥物治療思覺失調症的潛力
- 二、以不可預測長期輕微壓力引發的類焦慮症及類憂鬱行為異常的動物模型探討新穎腺苷調控藥物治療焦慮症的潛力

參、研究設備及器材

一、實驗動物

本研究使用 32 隻從國立台灣大學醫學院實驗動物中心 (NTUCM-LAC) 購買回來的野生種 (wildtype) 雄性小鼠為受試動物，實驗於小鼠成年期時進行，動物飼養在獨立通氣飼育盒 (individually ventilated cage, 簡稱 IVC) 之中，每 4 隻小鼠住一籠，食物與水皆為任意取用，飼養環境為上午 8:00 開燈而下午 8:00 關燈，室溫維持在 22°C。實驗開始前一周換籠以適應新 homecage，實驗開始後則不換籠直到最後一個實驗結束，但若實驗操作有必要仍會換籠。所有實驗程序皆符合台大實驗動物照護及使用委員會之規範。

二、藥品

(一) MK-801

藥物以生理食鹽水 (saline) 溶解 MK-801 為濃溶液形式保存於 -20°C 冰箱中，在實驗一開始前，以生理食鹽水稀釋為 0.3 mg/kg 保存在 4°C，實驗時以體積 10 ul/g 腹腔注射 (intraperitoneal injection, 簡稱 IP injection) 於小鼠體內引發類思覺失調症症狀。

(二) 新穎腺苷調控藥物 (NAM)

新穎腺苷調控藥物由中央研究院合成提供，由於專利考量，恕無法在本文公開結構式以及闡明其機制。在實驗一中，新穎腺苷調控藥物配製為 1 mg/kg 濃度於 1% 二甲基亞砜 (dimethyl sulfoxide, 簡稱 DMSO) 之中，溶劑為生理食鹽水，實驗時以體積 10 ul/g IP injection 於小鼠體內去治療類思覺失調症症狀；在實驗二中，考量到不可預測長期輕微壓力的操作時間長達四週之久，新穎腺苷調控藥物配製為 0.06 mg/ml 濃度於包含 1% 羥丙基- β -環糊精 (HP β CD) 的飲用水之中，供為小鼠的飲用水長期飲用去治療類焦慮症及類憂鬱症狀。

三、器材

(一) 小鼠飼養籠 (homecage)

我們使用的小鼠飼養籠為塑膠製，長寬高分別為 40 cm * 18 cm * 14 cm，上方加上鐵架及上蓋方便放置水瓶及飼料，籠蓋上有藍色防塵蓋搭配白色濾紙以過濾空氣雜質（圖中未裝上）。



圖三 小鼠飼養籠

(二) 曠野實驗箱

曠野實驗箱為塑膠製，長寬高為 47.5 cm * 25.5 cm * 20.5 cm，使用時上方蓋上壓克力板以避免小鼠跳出箱外。



圖四 曠野實驗箱

(三) 動物驚嚇反應測試箱 (SR-LAB startle apparatus (San Diego Instruments, San Diego, CA, USA))

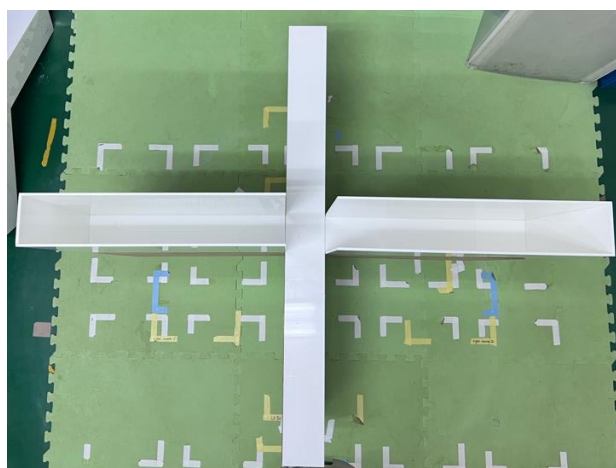
動物驚嚇反應測試管為塑膠製，長度為 8 cm，管徑為 5 cm，使用時卡上兩片壓克力片以固定小鼠。動物驚嚇反應測試箱長寬高分別為 33 cm * 33 cm * 47 cm。



圖五 動物驚嚇反應測試箱與箱內之驚嚇反應偵測裝置

(四) 抬高式十字迷宮 (EPM)

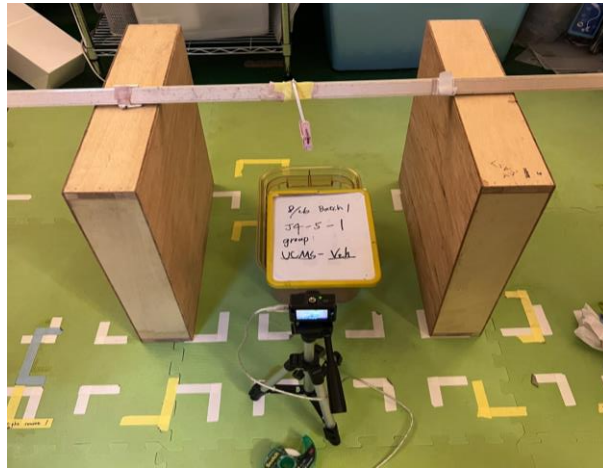
抬高式十字迷宮四個 arm 為 50 cm * 10 cm 的區域，中央為 10 cm * 10 cm 的區域，整體置於距地 50 cm。



圖六 抬高式十字迷宮

(五)、小鼠懸吊裝置

小鼠懸吊裝置以曬衣夾夾住纏於小鼠尾部的膠帶並懸吊於距地 50 cm 處。



圖七 小鼠懸吊裝置

肆、研究過程與方法

一、程序概述

本研究目的一為探討新穎腺苷調控藥物是否具有治療思覺失調症的潛力，為達到此目的，於實驗一中以注射 NMDAR 拮抗劑—MK-801 於小鼠身上為思覺失調症的藥物動物模型 (Eyjolfsson et al., 2006)，並以曠野測驗 (open-field test, 簡稱 OFT)、糖水偏好測驗 (sucrose preference test, 簡稱 SPT)、前脈衝刺激測驗 (prepulse inhibition test, 簡稱 PPI test) 來測試 MK-801 引發的類思覺失調症 (schizophrenia-like) 的行為異常來檢驗新穎腺苷調控藥物的治療效果。

本研究的目二為探討新穎腺苷調控藥物是否具有治療焦慮症的潛力，為達到此目的，於實驗二中以不可預測長期輕微壓力 (unpredictable chronic mild stress, 簡稱 UCMS) 操作於小鼠身上為焦慮症的動物模型 (Frisbee et al., 2015; Meynaghizadeh-Zargar et al., 2020)，以曠野測驗、抬高式十字迷宮 (elevated plus maze, 簡稱 EPM) 來測試不可預測長期輕微壓力引發的類焦慮症 (anxiety-like) 的行為異常，並以糖水偏好測驗、懸尾測驗 (tail suspension test, 簡稱 TST) 測試不可預測長期輕微壓力引發的類憂鬱 (depressive-like) 的行為異常，來檢驗新穎腺苷調控藥物的治療效果。

本研究分成兩個實驗，實驗一為研究目的一之實驗，檢驗新穎腺苷調控藥物治療 MK-801 引發的類思覺失調症行為異常，於小鼠年齡約三個月大左右時開始實驗，實驗一的分組為「(saline vs MK-801) * (Vehicle vs NAM)」的 2 * 2 組別的實驗設計，實驗一包含三個實驗 (實驗一 A 至 C)，詳細的實驗內容描述於下文，此三個實驗間隔為七天和十天以排除小鼠疲勞效果；實驗二為研究目的二之實驗，檢驗新穎腺苷調控藥物治療不可預測長期輕微壓力引發的類焦慮症行為異常，自不可預測長期輕微壓力的第一天開始則將小鼠的飲用水替換為包含新穎腺苷調控藥物的飲用水，實驗二的分組為「(Control vs UCMS) * (Vehicle vs NAM)」的 2 * 2 組別的實驗設計，實驗二包含四個實驗 (實驗二 A 至 D)，詳細的實驗內容描述於下文，為保留不可預測長期輕微壓力效果，在不可預測長期輕微壓力操作結束後的隔天與後天則分別進行實驗二 A 與 B，而實驗二 B 至 D 三個實驗皆間隔三天。所有實驗開

始進行前，皆會將小鼠放在執行實驗的房間中進行 20 分鐘以上的環境適應（habituation）。

二、實驗一：檢驗新穎腺苷調控藥物治療 MK-801 引發的類思覺失調症行為異常

（一）實驗一 A：曠野測驗

為了模擬正性症狀，以曠野測驗檢驗新穎腺苷調控藥物對於 MK-801 引發異常高活動量（hyperlocomotion）的治療效果。在實驗開始前，小鼠會被置於曠野實驗箱中並記錄 20 分鐘的跑量（traveled distance），是為 Baseline 階段；接著在 IP 注射 MK-801 之後隨即紀錄 20 分鐘的跑量，是為 Treatment 階段；接著注射新穎腺苷調控藥物之後隨即紀錄 60 分鐘的跑量，是為 Rescue 階段。實驗以 SMART 3.0 系統（Panlab, Spain）記錄小鼠的跑量，跑量即為小鼠活動量的指標，分析時，會將跑量分割為每 5 分鐘一個 time-bin 的形式以檢視藥物效果的趨勢，而每個階段的總跑量則會做後續的統計分析。

（二）實驗一 B：糖水偏好測驗

為了模擬負性症狀，以糖水偏好測驗檢驗新穎腺苷調控藥物對於 MK-801 引發的失樂症狀（anhedonia）（即降低對酬賞敏感度（reward sensitivity））的治療效果。本實驗採用短期版本的 1 小時糖水偏好測驗為行為作業(Mateus-Pinheiro et al., 2014)，實驗為期五天，五天皆讓小鼠處於限水狀態以確保小鼠有飲用糖水的動機，在第一天，對小鼠進行限水；在第二天，在做測驗用的 homecage 放置兩瓶以 50-ml 離心管改裝為飲水瓶的飲用水（tap water）以測量小鼠對水瓶位置的偏好；在第三天，依據第二天的數據，在較不偏好的水瓶位置放置 1%（w/v）蔗糖水（sucrose solution），另一瓶為飲用水，以確認小鼠對糖水有所偏好；在第四天，首先對小鼠 IP 注射 MK-801 並放回原本的 homecage，20 分鐘後，注射新穎腺苷調控藥物並置於測驗用的 homecage 中做測驗，糖水擺放位置與第三天擺放位置相反；在第五天，程序與第四天相同，而糖水擺放位置與第四天相反。每天測驗時間為 1 小時，1 小時到達後即將小鼠從測驗用的 homecage 抓出回原本的 homecage 結束測驗，實驗記錄兩個瓶子的飲用量（intake），並計算偏好程度（preference ratio），其公式為「 $(\text{飲用量(糖水)} / (\text{飲用量(糖水)} + \text{飲用量(水)})) * 100\%$ 」。

(三) 實驗一 C：前脈衝刺激測驗

為了模擬認知症狀，以前脈衝刺激測驗檢驗新穎腺苷調控藥物對於 MK-801 引發的感覺動作門閥過濾反應 (sensorimotor gating) 缺損的治療效果。本實驗係採用過去本實驗室的前脈衝刺激測驗程序 (Chen & Lai, 2011)，簡述如下，前脈衝刺激測驗程序包含 64 個 trials，background noise 為 72 dB 的白噪音，trial 分成三種類型：Pulse-alone (P-alone)、prepulse-Pulse (ppP)、NOSTIM，P-alone 為 40 毫秒的 120 dB 白噪音，ppP 為 20 毫秒的 78 dB (pp6) 或 82 dB (pp10) 或 90 dB (pp18) 的白噪音後有 40 毫秒的 120 dB 的白噪音，兩個聲音之間的時間為 100 毫秒，NOSTIM 為無任何聲音刺激，前脈衝刺激測驗首先會有 5 分鐘的適應期 (acclimation period)，接著進行 6 個 P-alone 的 trials，接著會有 52 個 trials 是前述各種 trial 類型的假隨機分派 (pseudo-randomization) 所組成，最後則是 6 個 P-alone 的 trials，Inter-trial interval 為 10 ~ 20 秒鐘之間的隨機的秒數 (平均為 15 秒鐘)。整個實驗程序如下，首先，先對小鼠 IP 注射 MK-801 並放回原 homecage 中，20 分鐘後，接著注射新穎腺苷調控藥物並放入動物驚嚇反應測試箱中開始前脈衝刺激測驗程序，實驗器材會記錄小鼠在每個 trial 的驚嚇反應 (startle response)，僅取在 100 毫秒中具有最大驚嚇反應的 trial 數值做計算，本實驗以在中間 52 個 trials 中的 P-alone trials 的平均 startle response 為小鼠的基準值 (即 startle response(P-alone))，並計算小鼠的 PPI 為「 $[(\text{startle response(P-alone)} - \text{startle response(ppP)}) / \text{startle response(P-alone)}] * 100\%$ 」。

三、實驗二：檢驗新穎腺苷調控藥物治療不可預測長期輕微壓力引發的類焦慮症及類憂鬱行為異常

(一) 不可預測長期輕微壓力操作

為了引發小鼠的類焦慮症 (anxiety-like) 與類憂鬱 (depressive-like) 症狀為焦慮症的動物模型，本實驗的壓力操弄主要參考與改編自 Meynaghizadeh-Zargar 等人 (2020) 的 4 週不可預測長期輕微壓力程序，程序簡述如下，UCMS 為期 4 週，程序排列如表一，在最後一天時為了配合糖水偏好測驗實驗，會多做 24 小時的限水，並在糖水偏好測驗做完後結束限水。

1. 保定 (physical restraint)：將小鼠置入管底鑽孔之 50-ml 離心管中達 2 小時。
2. 強迫游泳 (forced swimming)：以底面直徑為 16 cm 圓形、高 21 cm 的玻璃圓柱桶將小鼠放入 22°C 的水中六分鐘，結束後會以衛生紙擦乾小鼠身體並以加熱毯替小鼠保暖。
3. 傾斜籠子 (tilting cage)：原 homecage 傾斜 45 度斜置於地面持續兩小時。
4. 夾尾 (tail nipping)：在小鼠原 homecage 中以手捏小鼠尾端 1 公分處一分鐘。
5. 週期顛倒 (overnight illumination)：將小鼠整個 homecage 在暗週期時移入亮房中持續 12 小時。
6. 剝奪食物 (food deprivation)：取出小鼠原 homecage 中的食物 24 小時。
7. 移除墊料 (sawdust removal)：取出小鼠原 homecage 中的墊料 24 小時。
8. 弄濕墊料 (wet bedding)：加入適量水於小鼠原 homecage 中持續 24 小時。

	Day1	Day2	Day3	Day4	Day5	Day6	Day7
Week1	food deprivation wet bedding	overnight illumination physical restraint	physical restraint sawdust removal tail nipping	forced swimming physical restraint	physical restraint wet bedding	wet bedding physical restraint	overnight illumination tilting cage wet bedding
Week2	physical restraint sawdust removal tail nipping	forced swimming physical restraint	tilting cage overnight illumination	tail nipping physical restraint wet bedding	sawdust removal overnight illumination tail nipping	physical restraint forced swimming tail nipping	physical restraint tilting cage
Week3	sawdust removal food deprivation	forced swimming physical restraint	physical restraint sawdust removal tail nipping	sawdust removal overnight illumination physical restraint	physical restraint sawdust removal	forced swimming overnight illumination tail nipping	wet bedding physical restraint
Week4	physical restraint tail nipping	tilting cage wet bedding	physical restraint sawdust removal overnight illumination	food deprivation tail nipping	overnight illumination physical restraint	sawdust removal physical restraint	sawdust removal overnight illumination

表一 不可預測長期輕微壓力操作排程表

(二) 實驗二 A：糖水偏好測驗

為了檢驗新穎腺苷調控藥物對於不可預測長期輕微壓力引發的類憂鬱症狀的治療效果，本實驗以糖水偏好測驗為行為作業。實驗前一天（即不可預測長期輕微壓力最後一天）會進行 24 小時的限水以確保小鼠有飲用糖水的動機。在做實驗的 homecage 中放入 2 個以 50-ml 離心管製成的飲水瓶，擺放方式參考實驗一 B 第三天的擺放方式，小鼠會被放置於實驗的 homecage 中 60 分鐘，60 分鐘放回原本的 homecage。實驗記錄兩個瓶子的飲用量 (intake)，並計算偏好程度 (preference ratio)，其公式為「(飲用量(糖水) / 飲用量(糖水 + 飲用水)) * 100%」，行為作業原理為利用小鼠對糖水有偏好，故憂鬱程度高的小鼠會較憂鬱程度低的小鼠不偏好糖水。

(三) 實驗二 B：曠野測驗

為了檢驗新穎腺苷調控藥物對於不可預測長期輕微壓力引發的類焦慮症症狀的治療效果，本實驗以曠野實驗為行為作業。本實驗會將曠野實驗箱區分為中央區域（**central zone**）與邊緣區域（**peripheral zone**），小鼠被置於曠野實驗箱後，即開始以 SMART 3.0 系統記錄小鼠在 30 分鐘內的跑量、於各個 **zone** 花費時間以及進入 **central zone** 的次數，計算小鼠待在 **central zone** 的時間比例為焦慮程度的主要指標，指標計算為「 $[\text{花費時間}(\text{central zone}) / (\text{花費時間}(\text{central zone}) + \text{花費時間}(\text{peripheral zone}))] * 100\%$ 」，行為作業原理係為利用小鼠害怕待在空曠區域的天性，故焦慮程度高的小鼠會較焦慮程度低的小鼠更不偏好待在中央區域中（Bailey & Crawley, 2009）。

(四) 實驗二 C：抬高式十字迷宮

為了檢驗新穎腺苷調控藥物對於不可預測長期輕微壓力引發的類焦慮症症狀的治療效果，本實驗另以抬高式十字迷宮為行為作業。小鼠以頭面向 **open arms** 的方向被置於抬高式十字迷宮上後，即開始以 SMART 3.0 系統記錄小鼠在 10 分鐘內於各個 **arms** 的跑量、花費時間以及進出各個 **arms** 的次數，計算小鼠待在 **open arms** 的時間比例為焦慮程度的主要指標，指標計算為「 $[\text{花費時間}(\text{open arms}) / (\text{花費時間}(\text{open arms}) + \text{花費時間}(\text{close arms}))] * 100\%$ 」，行為作業原理係為利用小鼠害怕高度落差視野的區域的天性，故焦慮程度高的小鼠會較焦慮程度低的小鼠更不偏好待在 **open arm** 中（Bailey & Crawley, 2009）。

(五) 實驗二 D：懸尾測驗

為了檢驗新穎腺苷調控藥物對於不可預測長期輕微壓力引發的類憂鬱症狀的治療效果，本實驗另以懸尾測驗為行為作業。小鼠以頭朝下的方式懸吊於裝置上，開始計時 6 分鐘，期間以相機錄製小鼠活動情形，6 分鐘之後再將小鼠從裝置取下。兩位實驗者分別藉由影片記錄小鼠開始掙扎時間點及結束掙扎時間點，並取平均以減少實驗者不同造成的誤差，利用時間點計算出小鼠在 6 分鐘內的掙扎時間（**mobility time**），並且直接對於掙扎時間進行分析，行為作業原理為利用小鼠懸吊後會設法掙扎脫逃的天性，故憂鬱程度高的小鼠會較憂鬱程度

低的小鼠有較少的掙扎時間 (Can et al., 2012)。

四、統計分析

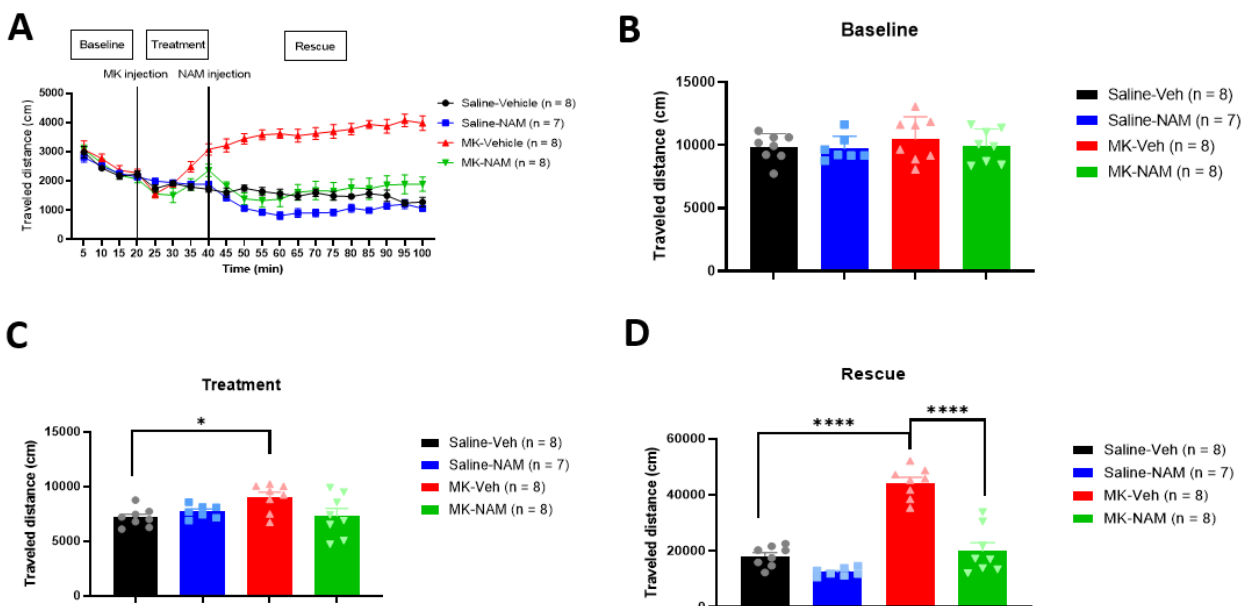
本研究的幾乎所有實驗資料皆以 one-way ANOVA 做統計檢定，以 treatment-rescue 統合為 Group 為一個因素，當 one-way ANOVA 達顯著時，才接著執行事後檢定以檢驗特定操作與治療的效果，事後檢定的方法採 Šidák method；在實驗一 A 中，於 Treatment 階段的跑量資料則以 Student *t*-test 做檢定，檢驗 MK-801 的效果；在實驗一 B 中，體重資料則以 mixed ANOVA 做統計檢定，以 Group 與 Day 分別為組間因素與組內因素，為檢驗限水操弄於何時開始有效，即使交互作用未達顯著，仍繼續使用 *Dunnett's method* 以 Day1 為比較基準做檢定；在實驗二 A 中，純水飲用量與糖水飲用量的資料則以 Student *t*-test 做統計檢定。統計顯著性的標準設為 0.05，所有資料數值皆以平均值 ± 標準誤 (mean ± SEM) 表示。

伍、實驗結果

一、實驗一之結果：新穎腺苷調控藥物治療 MK-801 引發的類思覺失調症行為異常的治療效果

(一) 實驗一 A 之結果：新穎腺苷調控藥物對於 MK-801 引發的異常高活動量的治療效果

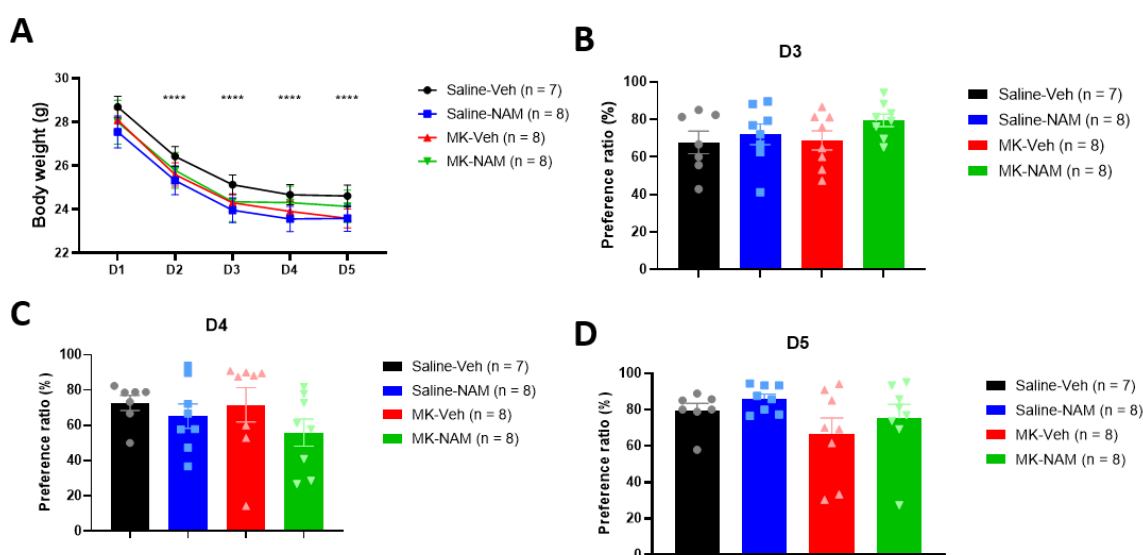
此實驗中我們發現 MK-801 能夠成功引發小鼠的異常高活動量，新穎腺苷調控藥物也能成功治療此異常。首先將曠野實驗中的跑量以每 5 分鐘為一個時間單位 (time bin) 做計算，我們檢視發現 MK-801 的藥效反應如預期，在約腹腔注射後第 20 分鐘左右會有最大的活動量 (圖八 A)，接著將各個階段的總跑量做統計檢定發現，在 Baseline 階段，四個組別之間並沒有顯著的差異 ($F(3,27) = .5100, p = .6788$) (圖八 B)；在 Treatment 階段，四個組別間有顯著的差異 ($F(3,27) = 3.490, p = .0292$)，事後檢定發現 MK-801-Vehicle 組比 Saline-Vehicle 組有顯著更高的跑量 ($t(27) = 2.904, p < .05$) (圖八 C)；在 Rescue 階段，四個組別之間具有顯著差異 ($F(3,27) = 53.24, p < .0001$)，事後檢定發現 MK-801-Vehicle 組比 Saline-Vehicle 組有顯著更高的跑量 ($t(27) = 9.702, p < .0001$) 且 MK-801-NAM 組比 MK-801-Vehicle 組有顯著更低的跑量 ($t(27) = 9.028, p < .0001$) (圖八 D)。本實驗發現 MK-801 會造成異常的高跑量，而新穎腺苷調控藥物能抑制這個異常行為，且此藥物並不會造成小鼠的異常跑量。



圖八 新穎腺苷調控藥物對 MK-801 注射後的小鼠的活動量的效果。(A) 以每五分鐘為一個時間單位的小鼠活動量。(B) Baseline 階段下的小鼠跑量。(C) Treatment 階段下的小鼠跑量。(D) Rescue 階段下的小鼠跑量。*表示 $p < .05$ 。****表示 $p < .0001$ 。

(二) 實驗一 B 之結果：新穎腺苷調控藥物對於 MK-801 引發的失樂症狀的治療效果

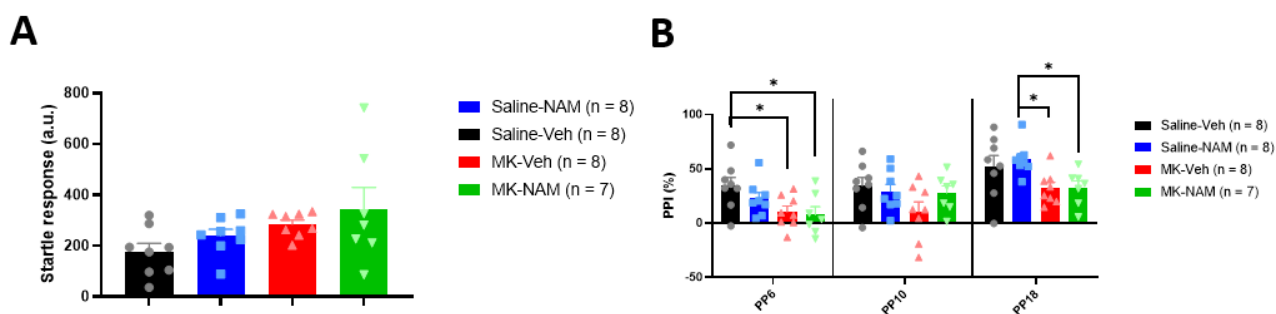
此實驗顯示 MK-801 無法引起小鼠失樂症狀，並且新穎腺苷調控藥物也不會造成小鼠的失樂症狀。首先我們對糖水偏好實驗五天期間小鼠的體重以 two-way ANOVA 做統計檢定，結果顯示體重 * 天數的交互作用並未達顯著 ($F(12, 108) = 0.6779, p = .7693$)，天數的主要效果達顯著 ($F(4, 108) = 526.5, p < .0001$)，而組別的主要效果並未達顯著 ($F(3, 27) = 0.5495, p = .6528$)，為了檢驗限水的效果，仍進一步以 *Dunnett's method* 做檢定，發現小鼠的體重如我們預期在開始限水的第二、三、四、五天皆顯著低於第一天 (all $p < .0001$) (圖九 A)，顯示限水有所效果。再來我們各別對第三、四、五天的偏好程度做統計檢定發現，在第三天各組間的偏好程度並沒有顯著差異 ($F(3, 27) = 1.129, p = .3550$) (圖九 B)，檢視可以發現每組的偏好程度皆大於 50%；第四天各組間的偏好程度也沒有顯著的差異 ($F(3, 27) = 1.031, p = .3947$) (圖九 C)，檢視後發現偏好程度皆大於 50%；第五天各組間的偏好程度沒有顯著差異 ($F(3, 27) = 1.666, p = .1977$) (圖九 D)。本實驗發現 MK-801 不能引發小鼠的失樂症狀，因小鼠沒有異常也不能確認新穎腺苷調控藥物是否能夠治療 MK-801 引發的失樂症狀，但可以確認新穎腺苷調控藥物不會引發小鼠的失樂症狀。



圖九 新穎腺苷調控藥物對 MK-801 注射後的小鼠的酬賞敏感度的效果。(A) 小鼠於五天行為作業期間的體重。(B ~ D) 小鼠於未打藥情況下 (B) 與打藥情況下 (C & D) 的糖水偏好程度。****表示 $p < .0001$ 。

(三) 實驗一 C 之結果：新穎腺苷調控藥物對於 MK-801 引發的感覺動作門閾過濾反應功能缺損的治療效果

此實驗中我們發現 MK-801 可以部分引起小鼠的感覺動作門閾過濾反應功能缺損，但新穎腺苷調控藥物無法治療此缺損，同時新穎腺苷調控藥物也不會引起感覺動作門閾過濾反應功能的異常。首先我們對 PPI 實驗中的 startle response (P-alone) 做統計檢定，發現各組間並沒有顯著差異 ($F(3, 27) = 2.476, p = .0829$) (圖十 A)，再來我們分別檢驗 PPI test 中，不同 prepulse intensity 下的組間差異，pp6 之下各組間的 PPI 有顯著的差異 ($F(3, 27) = 3.487, p = .0293$)、pp10 之下各組間的 PPI 沒有顯著的差異 ($F(3, 27) = 1.935, p = .1478$) 而 pp18 之下各組間的 PPI 有顯著的差異 ($F(3, 27) = 3.777, p = .0220$) (圖十 B)。由此得知，MK-801 只能引發小鼠部分感覺動作門閾過濾反應功能缺失，而新穎腺苷調控藥物不具治療 MK-801 引發的感覺動作門閾過濾反應功能缺失之潛力，同時新穎腺苷調控藥物不會引發小鼠感覺動作門閾過濾反應功能缺失。

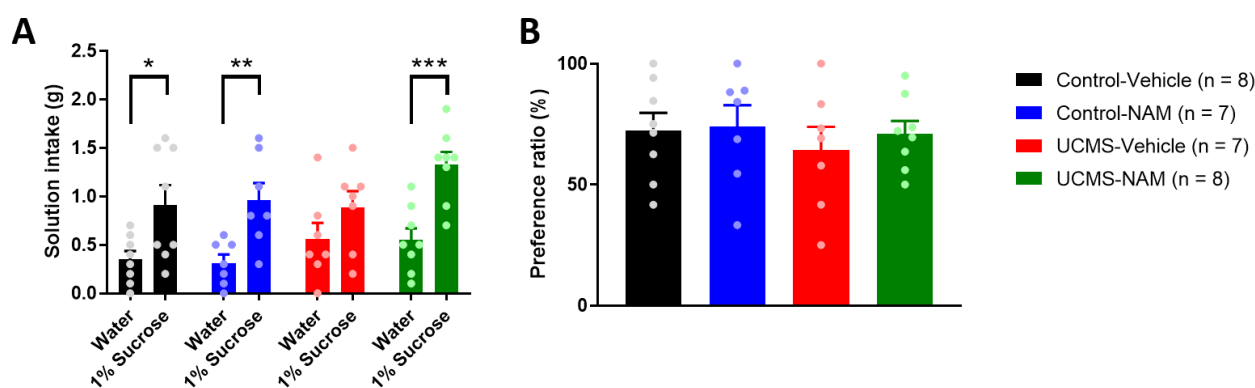


圖十 新穎腺苷調控藥物對 MK-801 注射後的小鼠的動作門閾過濾反應的效果。(A) 小鼠於 P-alone 的驚嚇反應。(B) 小鼠的 PPI。

二、實驗二之結果：新穎腺苷調控藥物治療不可預測長期輕微壓力引發的類焦慮症行為異常的治療效果

(一) 實驗二 A 之結果：新穎腺苷調控藥物對於不可預測長期輕微壓力引發的失樂症狀的治療效果

這個實驗我們發現不可預測長期輕微壓力可以引發小鼠的失樂症狀，且新穎腺苷調控藥物能夠治療失樂症狀。首先我們對各組之下的純水飲用量及糖水飲用量用 *t*-test 做統計檢定，發現在 Control -Vehicle 組 ($t(14) = 2.548, p < .05$)、Control-NAM 組 ($t(12) = 3.248, p < .01$) 及 UCMS-NAM 組 ($t(14) = 4.329, p < .01$) 的糖水飲用量皆顯著大於純水飲用量 (圖十一 A)，而 UCMS-Vehicle 組的糖水飲用量沒有顯著大於純水飲用量 ($t(12) = 1.379, p = .1932$) (圖十一 A)。再來我們對各組的偏好程度做統計檢定，發現四組間沒有顯著差異 ($F(3, 26) = 0.2843, p = .8363$) (圖十一 B)。由此實驗我們可以確定 UCMS 能夠引發小鼠的失樂症狀，且新穎腺苷調控藥物能夠治療這個症狀。



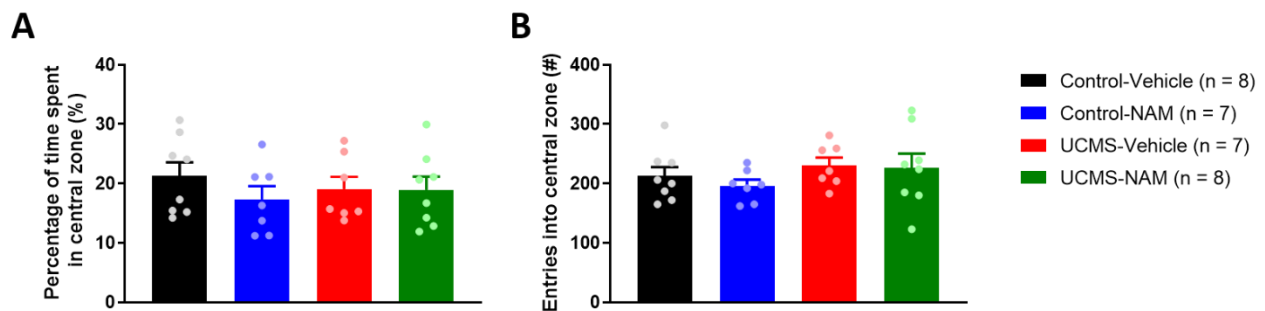
圖十一 新穎腺苷調控藥物對不可預測長期輕微壓力操弄後的小鼠的酬賞敏感度的效果。

(A) 小鼠對純水以及糖水的飲用量。(B) 小鼠的糖水偏好程度。*表示 $p < .05$ 。***表示 $p < .01$ 。***表示 $p < .001$ 。

(二) 實驗二 B 之結果：新穎腺苷調控藥物對於不可預測長期輕微壓力引發的曠野實驗中異常行為模式的治療效果

本實驗顯示不可預測長期輕微壓力不能成功引起小鼠在曠野實驗中的異常行為模式，且新穎腺苷調控藥物不會造成小鼠異常。首先我們對小鼠待在中央區域時間百分比做統計檢

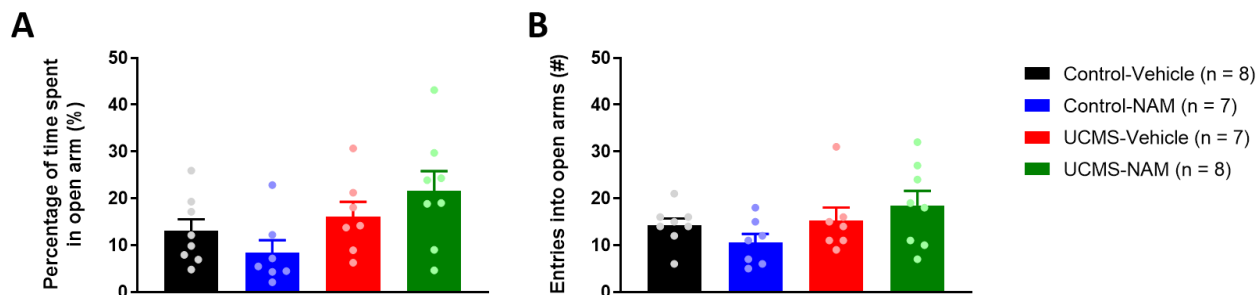
定，發現各組間並沒有顯著差異 ($F(3, 26) = 0.5428, p = .6573$) (圖十二 A)，再來我們對小鼠進入中央區域的次數做統計檢定，發現各組間沒有顯著差異 ($F(3, 26) = 0.8065, p = .5017$) (圖十二 B)。本實驗的不可預測長期輕微壓力操作無法在令小鼠展現更少待在中央區域的行為模式，因此小鼠我們也無法評估新穎腺苷調控藥物是否能治療不可預測長期輕微壓力在曠野實驗上引發的異常行為模式，但能夠確定新穎腺苷調控藥物不會引起小鼠在曠野實驗中的異常。



圖十二 新穎腺苷調控藥物對不可預測長期輕微壓力操弄後的小鼠於曠野實驗中行為模式的效果。(A) 小鼠待在中央區域的時間比例。(B) 小鼠進至中央區域的次數。

(三) 實驗二 C 之結果：新穎腺苷調控藥物對於不可預測長期輕微壓力引發的抬高式十字迷宮中異常行為模式的治療效果

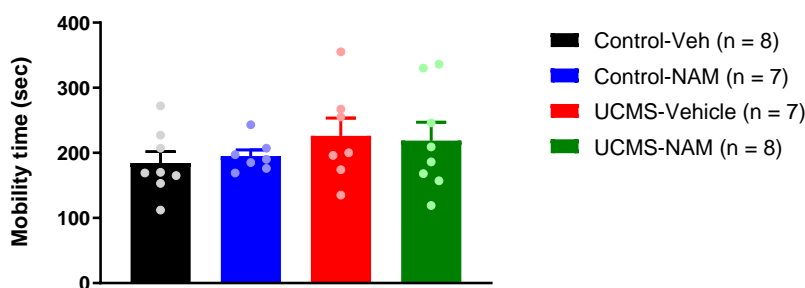
此實驗發現不可預測長期輕微壓力不能順利引起小鼠在抬高式十字迷宮中的異常，並且，新穎腺苷調控藥物也不會造成此異常。首先我們對小鼠在 open arm 的花費時間比例做統計檢定，發現各組間並沒有顯著差異 ($F(3, 26) = 2.905, p = .0537$) (圖十三 A)，再來我們對小鼠進入 open arm 的次數做統計檢定，發現各組間並沒有顯著差異 ($F(3, 26) = 1.817, p = .1688$) (圖十三 B)。本實驗的不可預測長期輕微壓力操作無法使小鼠展現出更不偏好待在 open arm 的行為模式，因此我們無法評估新穎腺苷調控藥物是否能治療不可預測長期輕微壓力在抬高式十字迷宮上引發的異常行為模式，但能確定的是新穎腺苷調控藥物並不會造成小鼠有此懼怕空曠的異常行為表現。



圖十三 新穎腺苷調控藥物對不可預測長期輕微壓力操弄後的小鼠於抬高式十字迷宮中行為模式的效果。(A) 小鼠待在 open arm 的時間比例。(B) 小鼠進至 open arm 的次數。

(四) 實驗二 D 之結果：新穎腺苷調控藥物對於不可預測長期輕微壓力引發的異常不掙扎行為的治療效果

此實驗中我們發現不可預測長期輕微壓力無法成功引起小鼠的異常不掙扎行為，且新穎腺苷調控藥物不會引起此異常。我們對小鼠的掙扎的時間做統計檢定，發現各組間並沒有顯著差異 ($F(3, 26) = 0.7766, p = .5177$) (圖十四)，本實驗的不可預測長期輕微壓力操作無法引發小鼠展現較低的掙扎行為，因此我們也無法評估新穎腺苷調控藥物是否能治療不可預測長期輕微壓力引發的異常不掙扎行為，但能確定的是新穎腺苷調控藥物不會引起小鼠的異常不掙扎行為。



圖十四 新穎腺苷調控藥物對不可預測長期輕微壓力操弄後的小鼠掙扎行為的效果。

陸、討論

首先討論實驗一「檢驗新穎腺苷調控藥物治療 MK-801 引發的類思覺失調症行為異常」的結果。我們發現 MK-801 僅能引起小鼠的異常跑量上升，且新穎腺苷調控藥物可以治療這個異常，在實驗一的 ABC 實驗中皆可以發現新穎腺苷調控藥物不會引起異常。實驗一 A 結果顯示施打 MK-801 的小鼠在跑量上與其他三組有顯著差異，由此推論 MK-801 有引發 hyperlocomotion，而新穎腺苷調控藥物能治療這個行為異常，顯示新穎腺苷調控藥物具有治療正性症狀的潛力，另外，若以 *t*-test 直接比較 Saline-NAM 組與 Saline-Vehicle 組於 Rescue 階段的跑量會發現 Saline-NAM 組的總跑量顯著低於 Saline-Vehicle 組的跑量，符合新穎腺苷調控藥物刺激 adenosine system 的機制的效果以及 pilot study 的結果，然而，在實驗的過程中我們發現 MK-801-NAM 組的小鼠具有異常的移動模式，不像是一般小鼠的走路姿勢，會如同哺哺車一般停頓、前進，推測可能是治療藥物只有動作鎮靜的效果，並沒有治療 MK-801 所引起的其他反應。實驗一 B 的結果顯示 MK-801 並未引起小鼠失樂症狀，故我們無法檢驗新穎腺苷調控藥物能否治療 anhedonia，原因可能是藥劑量不夠高或施打方法差異等原因，藥劑量因素在前次的 Pilot study 中使用的是 0.2 mg/kg 的劑量，本次實驗調高劑量至 0.3mg/kg，已經達到此藥的上限值，根據過往文獻指出，若藥劑量再提高會引發 ataxia 等症狀與本次實驗欲引發 schizophrenia-like model 的方式不相符合，另外過往文獻使用長期施打 MK-801 成功引發類思覺失調症行為異常 (Eyjolfsson et al., 2006)，與本實驗急性注射 (acute injection) 的給藥方法不同。實驗一 C 發現四組的 startle response 沒有顯著的差異，代表對驚嚇聲音的反應程度相同，而在 PPI 指標上，MK-801-Vehicle 相較 Saline-Vehicle 皆有下降的趨勢，在 PP6 指標上與 Saline-Vehicle 具有顯著差異，符合我們的預期，但 NAM 在 PP6、PP18 皆無治療的趨勢，僅在 PP10 具有恢復的趨勢，經 *t*-test 檢定後仍無顯著差異，無法驗證是否治癒。另外分別比較 PP6、PP10、PP18 的 Saline-Vehicle 及 Saline-NAM 皆無顯著差異，可以驗證新穎腺苷調控藥物並不會造成動作門閾過濾反應的缺損。

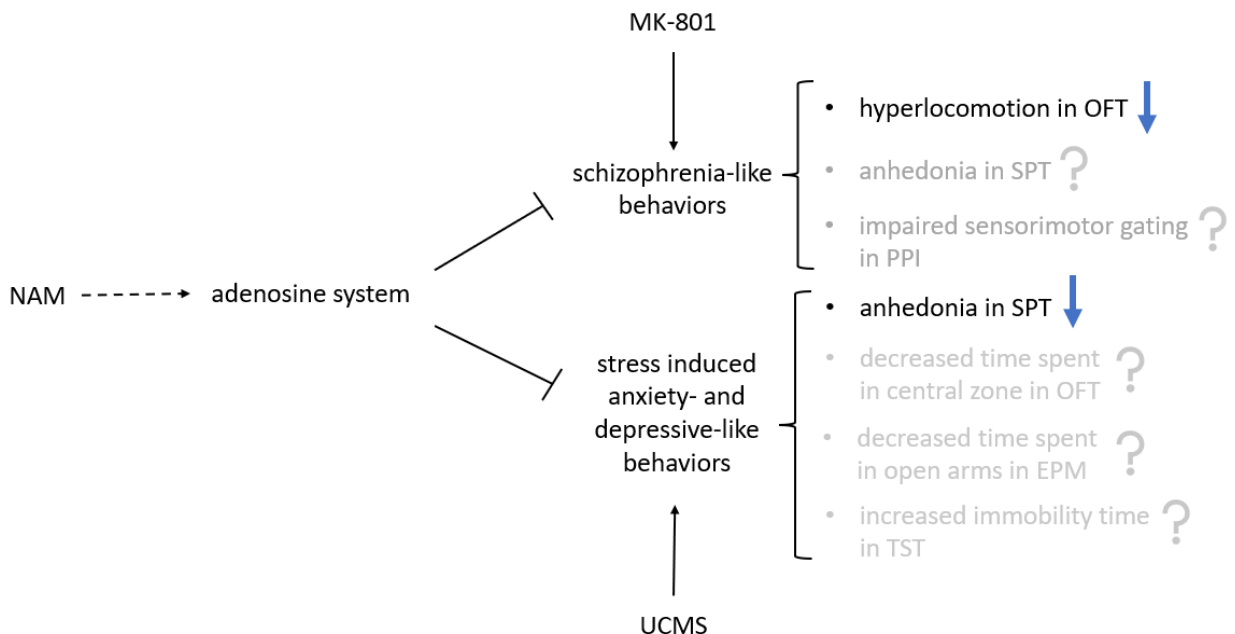
接著討論實驗二「檢驗新穎腺苷調控藥物治療不可預測長期輕微壓力引發的類焦慮症及類憂鬱行為異常」的結果。實驗二中我們可以發現不可預測長期輕微壓力僅能引發小鼠在糖水偏好實驗中的快感缺失，且新穎腺苷調控藥物可以治療此異常，而在實驗二 ABCD 實驗中皆可以發現新穎腺苷調控藥物不會引起小鼠異常。在實驗二 A 發現 UCMS-Vehicle 並未對糖水有顯著更高的飲用量，顯示不可預測長期輕微壓力操作有引發 anhedonia，且新穎腺苷調控藥物能治療 UCMS-induced anhedonia。不符合過去文獻執行不可預測長期輕微壓力作操弄的結果，而實驗二 C 亦如此，不可預測長期輕微壓力操作後的小鼠相較於 Control 組小鼠並未花更少時間待在 open arms 或更少進入 open arms，故我們無法檢驗新穎腺苷調控藥物是否能治療類焦慮症行為。實驗二 D 的結果顯示四組之間的掙扎時間無顯著差異，故在本實驗無法看出是否成功引發憂鬱表現，也無法探討新穎腺苷調控藥物是否可以治療由壓力操作引發的憂鬱現象。本實驗無法再現或重製 (replicate) 過去他人研究使用不可預測長期輕微壓力操作後的行為效果 (Meynaghizadeh-Zargar et al., 2020)，推測可能是因為小鼠年齡以及小鼠實驗經驗的因素導致，過去文獻多以年齡 2 至 3 個月大的小鼠為實驗動物，與本研究的 6 個月左右大的成鼠相差甚遠，另外，本研究在對該批小鼠進行不可預測長期輕微壓力操作前亦有作 MK-801 的實驗，其實驗經驗可能導致壓力操弄的效果有所不同。

總括來說，本研究的兩個實驗分別發現新穎腺苷調控藥物能部分治療藥物或壓力操弄導致的行為異常，針對這些行為異常我們未來希望可以採用生化分析的方式，針對特定的腦區分析腺苷的濃度，進一步了解藥物及壓力操作對小鼠的影響。行為實驗的部分未來應以更嚴格且乾淨的實驗條件（包含實驗動物的選擇、以兩批動物分別執行兩個不同種類的實驗操弄與程序等等）去深入檢驗新穎腺苷調控藥物分別對這兩種疾病的治療潛力。

柒、結論

本研究的結論如圖十五所示有兩點，分別點列如下：

- 一、新穎腺苷調控藥物能夠治療 MK-801 引起的過度活動，但由於本實驗所使用的 MK-801 劑量與作用期程，並未能如預期順利引發其他類思覺失調症相關行為症狀或缺損，因此無法有效地評估本實驗所使用的新穎腺苷調控藥物在特定劑量下是否能夠改善這些行為症狀或缺損。值得進一步去設計相關實驗及繼續更深入的探討。
- 二、新穎腺苷調控藥物能夠治療不可預測長期輕微壓力引起的失樂症狀，但由於本實驗所使用的 UCMS 操作強度與作用期程，並未能如期順利引發其他類焦慮症相關行為症狀或缺損，因此無法有效地評估本實驗所使用的新穎腺苷調控藥物在特定劑量下是否能夠改善這些行為症狀或缺損。值得進一步去設計相關實驗及繼續更深入的探討。



圖十五 新穎腺苷調控藥物對思覺失調症與焦慮症治療潛力之研究結果示意圖

捌、參考文獻

- 曾美智、李宇宙、李明濱 (1999)。憂鬱症與焦慮症之共患現象。 *台灣精神醫學*, 13(2), 125-135。
- Bailey, K. R., & Crawley, J. N. (2009). Anxiety-related behaviors in mice. In J. J. Buccafusco (Ed.), *Methods of behavioral analysis in neuroscience* (pp. 77–101). CRC Press/Routledge/Taylor & Francis Group.
- Can, A., Dao, D. T., Terrillion, C. E., Piantadosi, S. C., Bhat, S., & Gould, T. D. (2012). The tail suspension test. *J Vis Exp*(59), e3769.
- Chen, Y. W., & Lai, W. S. (2011). Behavioral phenotyping of v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1-deficient mice reveals a sex-specific prepulse inhibition deficit in females that can be partially alleviated by glycogen synthase kinase-3 inhibitors but not by antipsychotics. *Neuroscience*, 174, 178-189.
- Craske, M. G., Rauch, S. L., Ursano, R., Prenoveau, J., Pine, D. S., & Zinbarg, R. E. (2011). What is an anxiety disorder? *Focus*, 9(3), 369-388.
- Cristovao-Ferreira, S., Navarro, G., Brugarolas, M., Perez-Capote, K., Vaz, S. H., Fattorini, G., Conti, F., Lluís, C., Ribeiro, J. A., McCormick, P. J., Casado, V., Franco, R., & Sebastiao, A. M. (2011). Modulation of GABA transport by adenosine A1R-A2AR heteromers, which are coupled to both Gs- and G(i/o)-proteins. *J Neurosci*, 31(44), 15629-15639.
- Eyjolfsson, E. M., Brenner, E., Kondziella, D., & Sonnewald, U. (2006). Repeated injection of

MK801: an animal model of schizophrenia?. *Neurochemistry international*, 48(6-7), 541–546.

Frisbee, J. C., Brooks, S. D., Stanley, S. C., & d'Audiffret, A. C. (2015). An Unpredictable Chronic Mild Stress Protocol for Instigating Depressive Symptoms, Behavioral Changes and Negative Health Outcomes in Rodents. *J Vis Exp*(106).

Liu, G.-X., Cai, G.-Q., Cai, Y.-Q., Sheng, Z.-J., Jiang, J., Mei, Z., Wang, Z.-G., Guo, L., & Fei, J. (2007). Reduced anxiety and depression-like behaviors in mice lacking GABA transporter subtype 1. *Neuropsychopharmacology*, 32(7), 1531-1539.

Mateus-Pinheiro, A., Patrício, P., Alves, N. D., Machado-Santos, A. R., Morais, M., Bessa, J. M., Sousa, N., & Pinto, L. (2014). The Sweet Drive Test: refining phenotypic characterization of anhedonic behavior in rodents. *Front Behav Neurosci*, 8, 74.

Mateus-Pinheiro, A., Patrício, P., Alves, N. D., Machado-Santos, A. R., Morais, M., Bessa, J. M., Sousa, N., & Pinto, L. (2014). The Sweet Drive Test: refining phenotypic characterization of anhedonic behavior in rodents. *Frontiers in behavioral neuroscience*, 8, 74.

Meynaghizadeh-Zargar, R., Sadigh-Eteghad, S., Mohaddes, G., Salehpour, F., & Rasta, S. H. (2020). Effects of transcranial photobiomodulation and methylene blue on biochemical and behavioral profiles in mice stress model. *Lasers in Medical Science*, 35(3), 573-584.

Mouro, F. M., Rombo, D. M., Dias, R. B., Ribeiro, J. A., & Sebastião, A. M. (2018). Adenosine A2A receptors facilitate synaptic NMDA currents in CA1 pyramidal neurons. *British Journal of Pharmacology*, 175(23), 4386-4397.

- Nasir, M., Trujillo, D., Levine, J., Dwyer, J. B., Rupp, Z. W., & Bloch, M. H. (2020). Glutamate Systems in DSM-5 Anxiety Disorders: Their Role and a Review of Glutamate and GABA Psychopharmacology. *Front Psychiatry, 11*, 548505.
- Seillier, A., & Giuffrida, A. (2009). Evaluation of NMDA receptor models of schizophrenia: divergences in the behavioral effects of sub-chronic PCP and MK-801. *Behavioural brain research, 204*(2), 410-415.
- Cristóvão-Ferreira, S., Vaz, S. H., Ribeiro, J. A., & Sebastião, A. M. (2009). Adenosine A2A receptors enhance GABA transport into nerve terminals by restraining PKC inhibition of GAT-1. *J Neurochem, 109*(2), 336-347. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2009.05963.x>
- Eyjolfsson, E. M., Brenner, E., Kondziella, D., & Sonnewald, U. (2006). Repeated injection of MK801: an animal model of schizophrenia? *Neurochem Int, 48*(6-7), 541-546. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2005.11.019>
- Fuxe, K., Ferré, S., Zoli, M., & Agnati, L. F. (1998). Integrated events in central dopamine transmission as analyzed at multiple levels. Evidence for intramembrane adenosine A2A/dopamine D2 and adenosine A1/dopamine D1 receptor interactions in the basal ganglia. *Brain Res Brain Res Rev, 26*(2-3), 258-273. [https://doi.org/10.1016/s0165-0173\(97\)00049-0](https://doi.org/10.1016/s0165-0173(97)00049-0)

【評語】 052711

此研究透過藥物跟壓力，引發小鼠的思覺失調與焦慮行為。然後測試新穎腺苷調控藥物對於改善這些異常行為的影響。

實驗分為兩大組，實驗一是利用 MK-801 引發思覺失調症狀之後，測量新穎腺苷調控藥物是否可以降低曠野測驗的活動量(1A)，糖水偏好的失樂症狀(1B)，前脈衝刺激的驚嚇反應 (1C)

實驗二則是透過 UCMS 四週的時間，誘發小鼠不可預期的長期輕微壓力操作，再利用糖水偏好測驗(2A)，確認小鼠的憂鬱程度（不偏好糖水）。之後給予新穎腺苷調控藥物，進行曠野測驗(2B)，抬高式十字迷宮(2C)，以及懸尾測驗(2D)

整體的研究假設，研究設計，步驟，各種考量，都做得很仔細，統計分析也很完善，討論也很仔細。是個很完整的科學研究作品。

作品海報

探討一種新穎腺苷调控藥物對於思覺失調症及焦慮症的治療潛力
— 以藥物及壓力引發之疾病小鼠為模式

摘要

思覺失調症與焦慮症皆是嚴重損害病人健康且造成社會極大負擔的精神疾病，急需研發有效治療藥物。本研究以藥物及壓力引發之小鼠異常行為為模式，探討新研發的新穎腺苷調控藥物（Novel Adenosine Modulator，簡稱NAM）對於這些疾病的治療潛力。實驗一以藥物MK-801引發成年雄性小鼠類思覺失調症症狀，給予新穎腺苷調控藥物可緩解曠野測驗中MK-801引發的過度活動量，且不會造成小鼠產生失樂症狀或體重改變。但對於MK-801引發的感覺動作門閾過濾反應缺損則無顯著療效。實驗二以不可預測長期輕微壓力（unpredictable chronic mild stress，簡稱UCMS）引發成年雄性小鼠類焦慮症與類憂鬱之行為異常，新穎腺苷調控藥物可以改善小鼠的失樂症狀。這些結果顯示這個新藥具有潛力值得後續繼續研究。

研究背景

研究動機

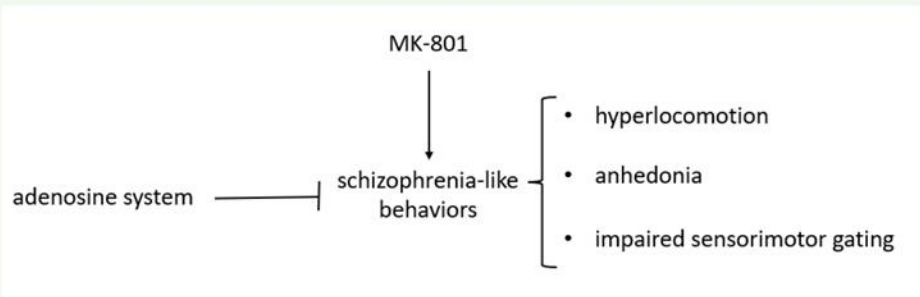
有鑑於近年來精神疾病確診人數日漸攀升，而除了西醫的藥物治療外，我們得知中醫會使用天麻作為安神的藥物，因此我們選用天麻的相關萃取物新穎腺苷調控藥物作為我們研究的目標。

腺苷

腺苷對中樞神經系統有抑制作用，腺苷與受體結合時，會抑制某些神經傳遞物質的釋放，具有鎮靜的效果，而腺苷酸 A_2A 亞型受體（ A_2A adenosine receptor）在腦中很多區域皆有分佈，並且其能調控神經細胞的生理功能。

思覺失調症

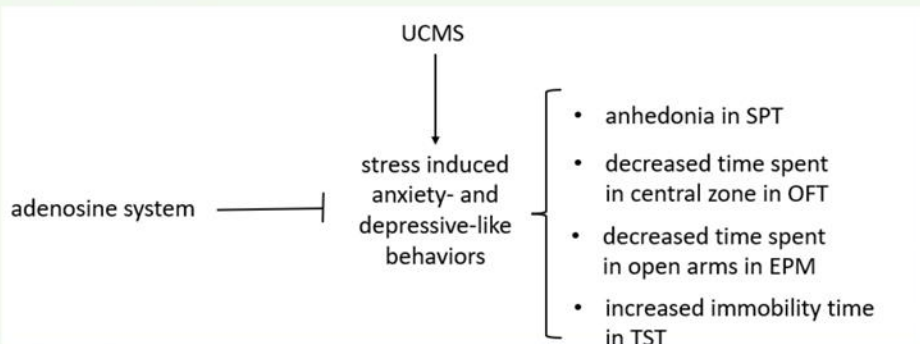
思覺失調症約十五萬四千人，為台灣精神疾病中第六大疾病，NMDA受體功能低下為思覺失調症成因假說之一（Seillier & Giuffrida, 2009），有文獻指出促進腺苷 $2A$ 受體（adenosine $2A$ receptor，簡稱 $A_{2A}R$ ）能促進神經上NMDA受體引發的電流（Mouro et al., 2018），另一方面，研究表示新穎腺苷調控藥物具有刺激腺苷系統的能力。



圖一 思覺失調症的機制示意圖

焦慮症

焦慮、解離、壓力相關、身體障礙和其他非精神病的精神疾患約一百四十六萬八千人，為台灣精神疾病中最大之疾病，且根據台灣精神醫學會在 1999 年發表的著述中指出焦慮及憂鬱終生共病的盛行率達 28%（曾美智等，1999），臨床上已證明刺激 γ -氨基丁酸受體（ γ -Aminobutyric acid receptor，簡稱GABAR）有助於緩解焦慮症狀（Liu et al., 2007），亦有研究表示刺激 $A_{2A}R$ 會促進GABA的釋放。



圖二 焦慮症的機制示意圖

研究目的

- 一、以MK-801引發的類思覺失調症行為異常的動物模型探討新穎腺苷調控藥物治療思覺失調症的潛力。
- 二、以不可預測長期輕微壓力引發的類焦慮症及類憂鬱行為異常的動物模型探討新穎腺苷調控藥物治療焦慮症的潛力。

研究設備及器材

實驗動物

32隻野生種（wildtype）雄性小鼠



藥品

- （一）MK-801（0.3 mg/kg）
- （二）新穎腺苷調控藥物（NAM）（1 mg/kg）

器材

- （一）小鼠飼養籠（homecage）
- （二）曠野實驗箱
- （三）動物驚嚇反應測試箱（SR-LAB startle apparatus（San Diego Instruments, San Diego, CA, USA））
- （四）抬高式十字迷宮（EPM）
- （五）小鼠懸吊裝置



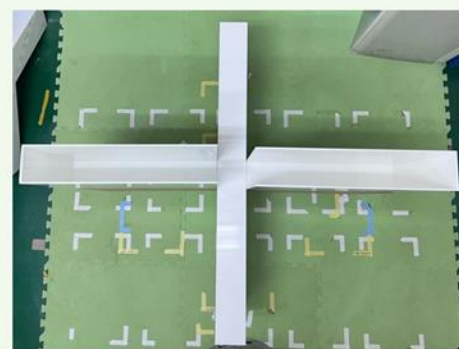
圖三 小鼠飼養籠



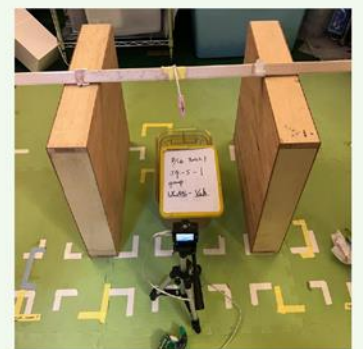
圖四 曠野實驗箱



圖五 動物驚嚇反應測試箱與箱內之驚嚇反應偵測裝置



圖六 抬高式十字迷宮

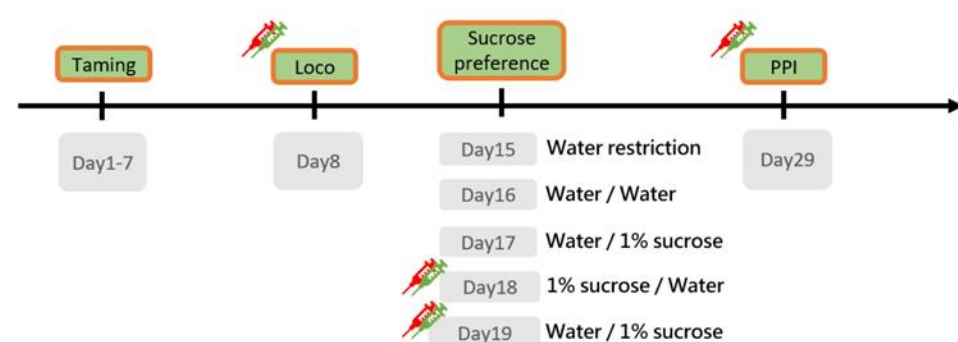


圖七 小鼠懸吊裝置

研究過程與方法

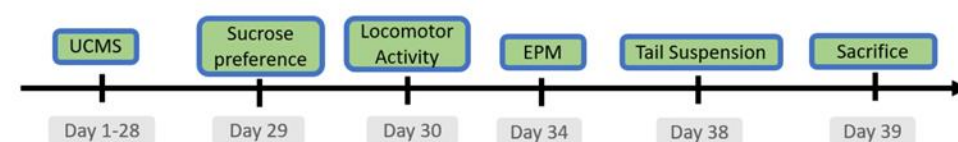
程序概述

	Saline	MK-801 0.3 mg/kg
Vehicle	n = 8	n = 8
NAM 1mg/kg	n = 7	n = 8



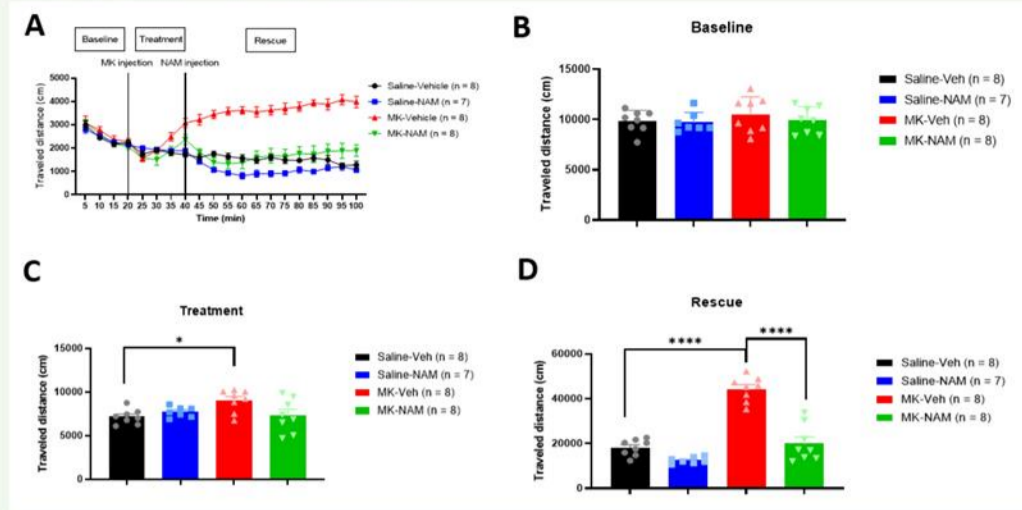
圖八 思覺失調症實驗流程圖

	Control	UCMS
Vehicle	n = 8	n = 7
NAM	n = 7	n = 8



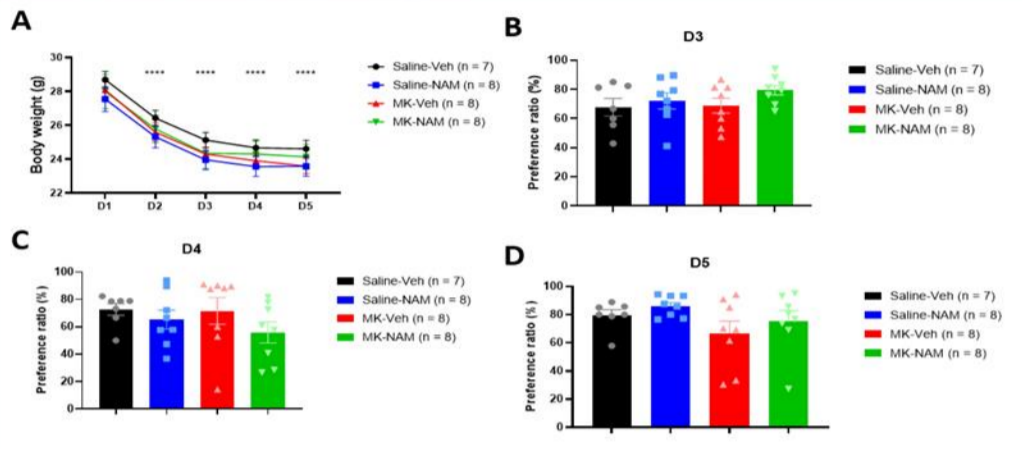
圖九 焦慮症實驗流程圖

(一) 實驗一A: 曠野實驗



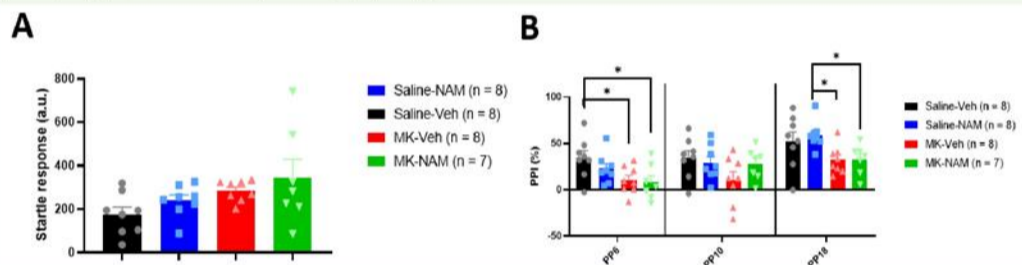
圖十七 新穎腺苷調控藥物對MK-801注射後的小鼠的活動量的效果。

(二) 實驗一B: 糖水偏好實驗



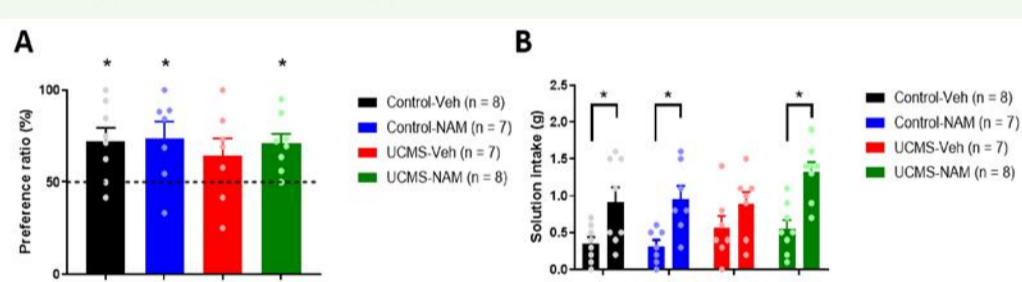
圖十八 新穎腺苷調控藥物對MK-801注射後的小鼠的酬賞敏感度的效果。

(三) 實驗一C: 前脈衝刺激實驗



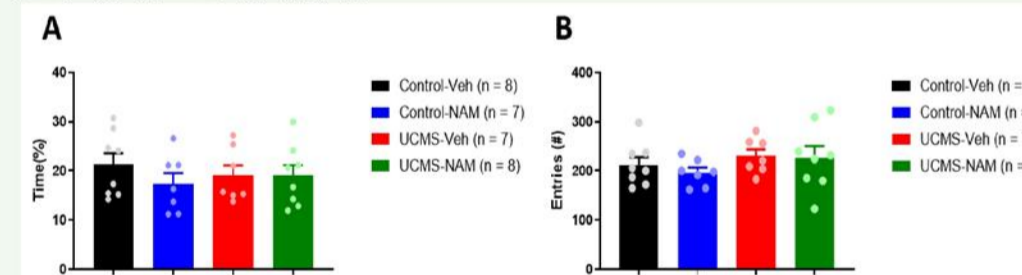
圖十九 新穎腺苷調控藥物對MK-801注射後的小鼠的動作門閥過濾反應的效果。

(四) 實驗二A: 糖水偏好實驗



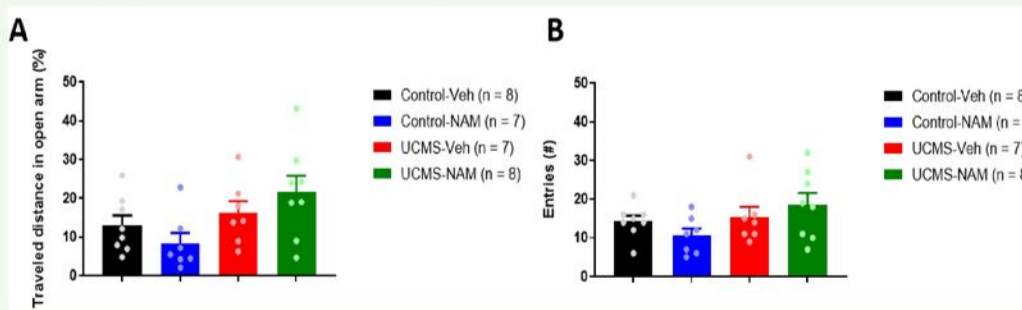
圖二十 新穎腺苷調控藥物對不可預測長期輕微壓力操弄後的小鼠的酬賞敏感度的效果。

(五) 實驗二B: 曠野實驗



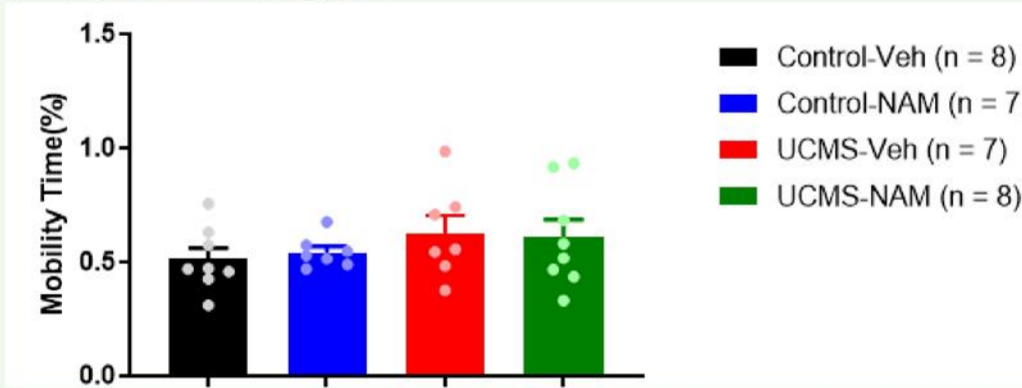
圖二十一 新穎腺苷調控藥物對不可預測長期輕微壓力操弄後的小鼠於曠野實驗中行為模式的效果。

(六) 實驗二C: 抬高式十字迷宮



圖二十二 新穎腺苷調控藥物對不可預測長期輕微壓力操弄後的小鼠於抬高式十字迷宮中行為模式的效果。

(七) 實驗二D: 懸尾實驗



圖二十三 新穎腺苷調控藥物對不可預測長期輕微壓力操弄後的小鼠掙扎行為的效果。

實驗一A

新穎腺苷調控藥物能夠治療MK-801引起的異常高跑量，顯示新穎腺苷調控藥物具有治療正性症狀的潛力。

實驗一B

結果顯示MK-801並未引起小鼠失樂症狀，我們排除是藥劑量不夠高的原因，推測是給藥方法的因素導致，過往文獻使用長期施打MK-801成功引發類思覺失調症行為異常 (Eyjolfsson et al., 2006)，與本實驗急性注射 (acute injection) 的給藥方法不同。

實驗一C

比較控制組與純施打治療藥物組的PPI無顯著差異，可以驗證新穎腺苷調控藥物並不會造成動作門閥過濾反應的缺損。

實驗二A

不可預測長期輕微壓力操作有引發快感缺失，且新穎腺苷調控藥物能治療不可預測長期輕微壓力引起的快感缺失。

實驗二B、C、D

實驗結果發現不可預測長期慢性壓力無法造成小鼠行為異常，但同時我們也發現新穎腺苷調控藥物不會引起小鼠的類焦慮症及類憂鬱症狀，我們推測無法再現或重製 (replicate) 過去他人研究使用不可預測長期輕微壓力操作後的行為效果 (Meynaghizadeh-Zargar et al., 2020)，可能是因為小鼠年齡以及小鼠實驗經驗的因素導致。

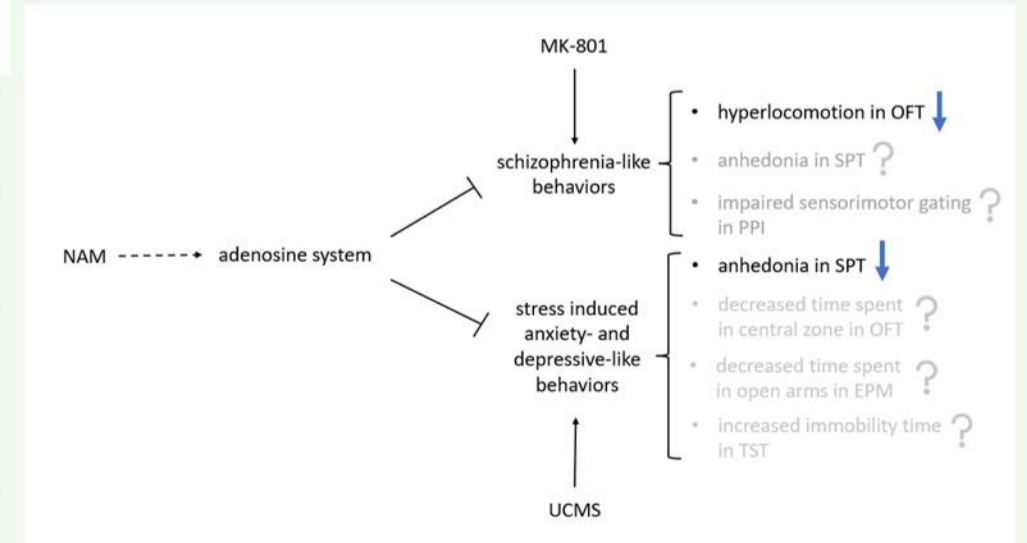
未來展望

總括來說，本研究的兩個實驗分別發現新穎腺苷調控藥物能部分治療藥物或壓力操弄導致的行為異常。未來可以其他劑量的藥物或其他的行為實驗檢驗藥物的引發及治療效果，且應以更嚴格且乾淨的實驗條件 (包含實驗動物的選擇、操作技術) 去深入檢驗新穎腺苷調控藥物分別對這兩種疾病的治療潛力。

結論

一、新穎腺苷調控藥物能夠治療MK-801引起的異常高活動量，但由於其他類思覺失調症的行為功能並未如預期出現異常，新穎腺苷調控藥物治療思覺失調症的潛力仍有待後續研究探討。

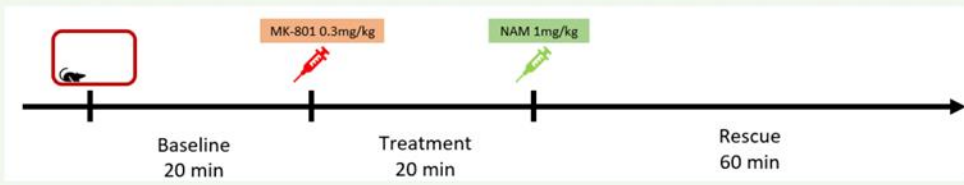
二、新穎腺苷調控藥物能夠治療不可預測長期輕微壓力引起的失樂症狀，但由於其他類焦慮症及類憂鬱的行為功能並未在如預期出現異常，新穎腺苷調控藥物治療焦慮症的潛力仍有待後續研究探討。



圖二十四 新穎腺苷調控藥物對思覺失調症與焦慮症治療潛力之研究結果示意圖

(一) 實驗一A：曠野實驗

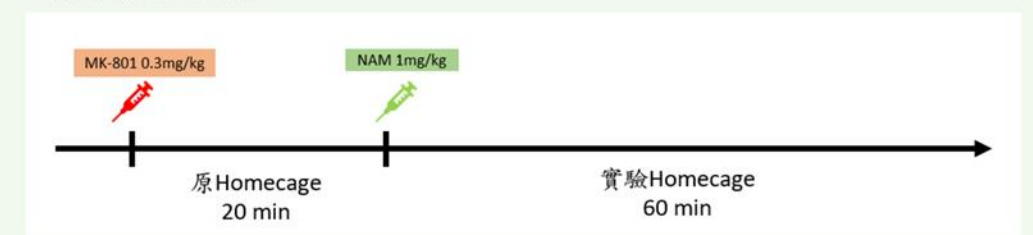
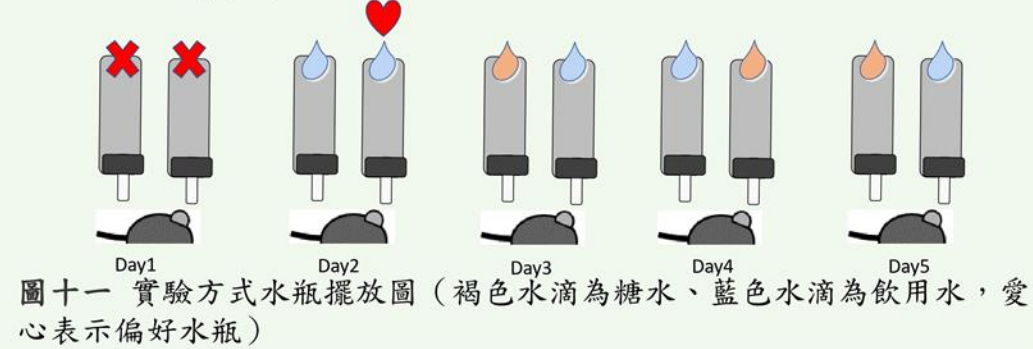
以曠野實驗檢驗新穎腺苷調控藥物對於MK-801引發異常高活動量 (hyperlocomotion) 的治療效果。



圖十 曠野實驗實驗流程

(二) 實驗一B：糖水偏好實驗

以糖水偏好實驗檢驗新穎腺苷調控藥物對於MK-801引發的失樂症狀 (anhedonia) (即降低對酬賞敏感度 (reward sensitivity)) 的治療效果。



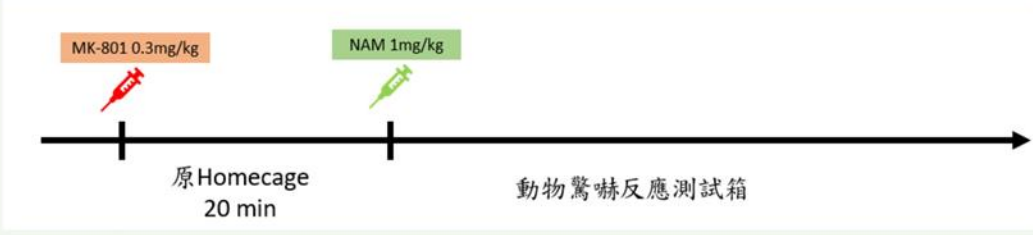
圖十二 糖水偏好實驗第四天及第五天流程。

(三) 實驗一C：前脈衝刺激實驗

以前脈衝刺激實驗檢驗新穎腺苷調控藥物對於MK-801引發的感覺動作門閾過濾反應 (sensorimotor gating) 缺損的治療效果。



圖十三 PPI Trial流程。



圖十四 PPI實驗流程。

(四) 不可預測長期輕微壓力操作概述

1. 保定 (physical restraint)
2. 強迫游泳 (forced swimming)
3. 傾斜籠子 (tilting cage)
4. 夾尾 (tail nipping)
5. 週期顛倒 (overnight illumination)
6. 剝奪食物 (food deprivation)
7. 移除墊料 (sawdust removal)
8. 弄濕墊料 (wet bedding)

	Day1	Day2	Day3	Day4	Day5	Day6	Day7
Week1	food deprivation wet bedding	overnight illumination physical restraint	physical restraint sawdust removal tail nipping	forced swimming physical restraint	physical restraint wet bedding	wet bedding physical restraint	overnight illumination tilting cage wet bedding
Week2	physical restraint sawdust removal tail nipping	forced swimming physical restraint	tilting cage overnight illumination	tail nipping physical restraint wet bedding	sawdust removal overnight illumination tail nipping	physical restraint forced swimming tail nipping	physical restraint tilting cage
Week3	sawdust removal food deprivation	forced swimming physical restraint	physical restraint sawdust removal tail nipping	sawdust removal overnight illumination physical restraint	physical restraint sawdust removal	forced swimming overnight illumination tail nipping	wet bedding physical restraint
Week4	physical restraint tail nipping	tilting cage wet bedding	physical restraint sawdust removal overnight illumination	food deprivation tail nipping	overnight illumination physical restraint	sawdust removal physical restraint	sawdust removal overnight illumination

表一 不可預測長期輕微慢性壓力操作排程表。

(五) 實驗二A：糖水偏好實驗

為檢驗新穎腺苷調控藥物對於不可預測長期輕微壓力引發的類憂鬱症狀的治療效果以糖水偏好為行為作業，實驗前一天 (即不可預測長期輕微壓力最後一天) 會進行24小時的限水以確保小鼠有飲用糖水的動機。

(六) 實驗二B：曠野實驗

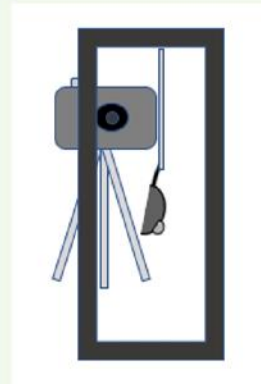
為了檢驗新穎腺苷調控藥物對於不可預測長期輕微壓力引發的類焦慮症症狀的治療效果，本實驗以曠野實驗為行為作業，原理係為利用小鼠害怕待在空曠區域的天性，(Bailey & Crawley, 2009)。

(七) 實驗二C：抬高式十字迷宮

為了檢驗新穎腺苷調控藥物對於不可預測長期輕微壓力引發的類焦慮症症狀的治療效果，本實驗另以抬高式十字迷宮為行為作業。行為作業原理係為利用小鼠害怕高度落差視野的區域的天性，(Bailey & Crawley, 2009)。

(八) 實驗二D：懸尾實驗

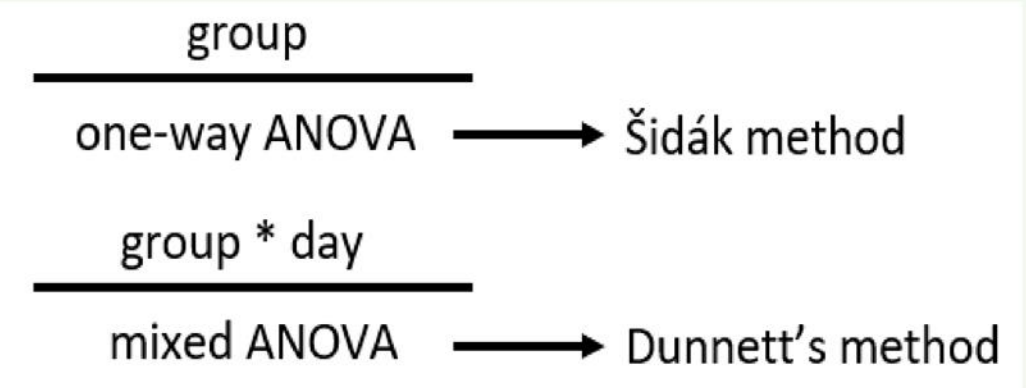
為了檢驗新穎腺苷調控藥物對於不可預測長期輕微壓力引發的類憂鬱症狀的治療效果，本實驗另以懸尾實驗為行為作業。行為作業原理為利用小鼠懸吊後會設法掙扎脫逃的天性 (Can et al., 2012)。



圖十五 懸尾實驗裝置示意圖。

(九) 統計分析

以treatment-rescue統合為組別為一個因素，以one-way ANOVA做統計檢定，接著執行事後檢定以檢驗特定操作與治療的效果。統計顯著性的標準設為0.05，所有資料數值皆以平均值 ± 標準誤 (mean ± SEM) 表示。



圖十六 統計檢定流程圖

參考文獻

Mouro, F. M., Rombo, D. M., Dias, R. B., Ribeiro, J. A., & Sebastião, A. M. (2018). Adenosine A2A receptors facilitate synaptic NMDA currents in CA1 pyramidal neurons. *British Journal of Pharmacology*, 175(23), 4386-4397.

Liu, G.-X., Cai, G.-Q., Cai, Y.-Q., Sheng, Z.-J., Jiang, J., Mei, Z., Wang, Z.-G., Guo, L., & Fei, J. (2007). Reduced anxiety and depression-like behaviors in mice lacking GABA transporter subtype 1. *Neuropsychopharmacology*, 32(7), 1531-1539.