

2019 年臺灣國際科學展覽會 優勝作品專輯

作品編號 130002

參展科別 行為與社會科學

作品名稱 探討睡眠剝奪對青少年學習與記憶的影響
—以小鼠為模式探討生理、心理與大腦變化

得獎獎項 大會獎：二等獎

就讀學校 國立臺灣師範大學附屬高級中學

指導教師 蘇雨菁、賴文崧

作者姓名 林冠婷、郭妙真

關鍵詞 睡眠剝奪、青少年、學習能力

作者簡介



我是林冠婷（左），在台大心理系的 LINE 行為實驗室的這段時間，我學習到很多相關知識，並且更確立了自己對心理及行為科學的興趣。未來希望有機會能為這個領域做出更多的貢獻。

我是郭妙真（右），在師大附中科學班學習的過程中確定了自己對生命科學的熱愛。很高興能在台大心理系的 LINE 行為實驗室學習、研究，使我更了解行為科學的奧妙。

摘要

為探討青少年壓力對生活的影響，我們在網路上進行問卷調查，調查12~18歲的青少年對自身所感受到的壓力所進行的自我評估。

統整後，決定以青少年時期之小鼠作為模型，探討睡眠剝奪對青少年學習的影響，並討論男女差異。生理狀態方面得知睡眠剝奪會使體重成長較緩慢，且由曠野實驗發現睡眠剝奪不會大幅影響自主活動量。

學習與記憶方面利用新奇事物測驗測量短期記憶，在公鼠身上可以看到睡眠剝奪會影響公鼠的短期記憶；母鼠在此實驗中控制組與操作組無顯著差異。長期記憶與空間記憶部分利用巴恩斯迷宮測試，發現性別間無顯著差異，各性別控制組與睡眠剝奪組間亦無顯著差異。

Abstract

Our purposes are to find out how the lack of sleep in students' daily life affect their learning and memorizing ability through sleep deprivation experiment on mice. We did a survey on teenagers from 12~18 to find out which kind of stress affects them the most. The result of the survey demonstrated that most people think that bad sleeping quality affects them the most. However, human experiments are not allowed due to the moral limitations, we therefore chose a mouse model of sleep deprivation. Our experiment includes two parts, the first part is composed of Open Field Task, Novel Object Recognition Task and Barnes Maze Task. The second part is to analyze previously reported memory-associated proteins in sleep-deprived mice brain. The result to the first part, we see no significant difference in long term memory (Barnes Maze Task), but there is significant difference between control and treatment male mice in short term memory (Novel Object Recognition Task). In the protein analysis, we saw a significant increase in p-ERK after long term sleep deprivation

壹、研究動機

身為高中生，我們每天要面對各種壓力。長期在這些壓力下生活的我們，有些人能夠適應的好，有些人卻會完全被壓垮，那是否長期處於壓力下會對人體造成生理、心理、學習能力各方面的問題呢？而這些長期壓力中對於現在青少年，影響最大的又為何呢？於是，我們設計了一份問卷，主要調查 12~18 歲的青少年，對自身的感受到的壓力所進行的自我評估。

我們以 12 到 18 歲，271 男 388 女的青少年為樣本，給出四個選項：同儕競爭、同儕社交、睡眠品質與學習環境，讓受試者對這四種壓力進行評估。結果顯示前三名為同儕競爭、學習環境與睡眠品質。我們考慮了操作方便性與自身條件後，決定以睡眠剝奪作為本次研究的主題。

美國國家睡眠基金會指出，青少年正常的睡眠時間應為每晚 8-10 小時(National Sleep Foundation, 2006)。但近幾年的調查顯示，台灣高中生的睡眠時間大多嚴重不足，4.7%能在週間平日睡滿八小時，每三名高中生中就有一人(38.7%)平均每天睡不到六小時(兒福聯盟, 2016)。台灣學生平均一天要待在學校 8.5 個小時，最長可能會到 9.5~10 個小時，更不用說有些學生放學之後還需要去補習班；面對繁重的課業以及沉重的壓力，沒日沒夜的作息讓學生每天可以休息的時間少之又少。這有可能造成學生學習能力下降或是身體機能下降等問題。

睡眠可以幫助我們形成記憶，在一篇研究超時工作的報告中，顯示睡眠不足確實會造成工作表現以及記憶、學習能力方面的傷害 (Ellenbogen, 2005)。於是我們希望透過睡眠剝奪實驗的設計，來了解睡眠剝奪對於青少年學習能力的影響。然而因為在道德與資源上無法在人類上進行此睡眠剝奪實驗，所以我們選用小鼠作為實驗動物，觀察這樣的操作對小鼠學習能力的影響，再將結果延伸到人類。另外，我們將公鼠母鼠分開測試，想了解不同性別在睡眠不足的狀況下，對生理是否會有不同差異的影響。

貳、研究目的

- 一、以問卷調查青少年對自身壓力的評估
- 二、以動物行為實驗模擬人類青少年的睡眠不足狀況
 - (一) 睡眠剝奪對小鼠生理狀況的影響
 1. 實驗進行中每天進行體重測量以觀察小鼠的生理變化。
 2. 在開始操作睡眠剝奪前與睡眠剝奪 7 天後，各對小鼠進行一次曠野實驗，以檢視睡眠剝奪前後對小鼠是否有行為能力改變。
 - (二) 以新奇事物測試，觀察睡眠剝奪對小鼠短期記憶的影響。
 - (三) 以巴恩斯迷宮測試，觀察睡眠剝奪對小鼠長期與空間記憶的影響。
 - (四) 分析睡眠剝奪對不同性別小鼠是否有差異性。

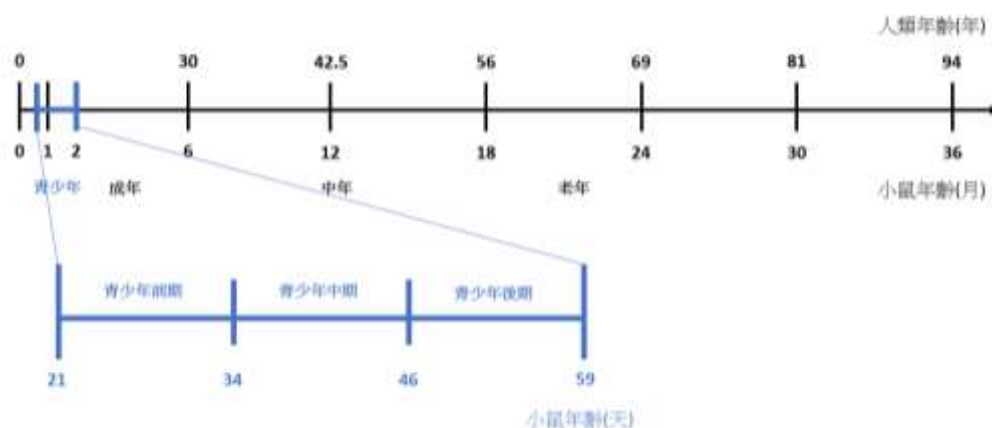
參、研究設備及器材

一、實驗材料：

- (一) 實驗動物：我們使用 C57BL/6 品系黑色小鼠，來自樂斯科生物科技股份有限公司(圖一)。一共使用雄 16 隻、雌 16 隻，並且選用出生後 45~60 天的青少年後期小鼠為我們實驗的測試對象(圖二)(Flurkey, Currer,& Harrison, 2007)。



圖一 C57BL/6 小鼠



圖二 小鼠生命分期

(一) 小鼠飼養方法

每個飼養籠內放置 2~3 隻同性別的 C57BL/6 小鼠，並放置在以早上 6 時開燈為夜週期、傍晚 18 時關燈為日週期，日夜週期為 12-12 小時的動物房中，平時約恆溫在 15 度(圖四、五、六)。小鼠在飼養籠中，可以自由取用水與飼料，並且在馴化的第一天才換籠，實驗進行的過程中不會換籠，直到實驗結束。



圖四 飼養籠架



圖五 飼養籠內部、飼料架



圖六 飼養籠內部小鼠居住情形



圖七 飼養籠外觀

一、 儀器：

(一) 飼養器材

器材	規格
飼養籠	長 29.0 公分、寬 18.5 公分、 高 13.0 公分

(二) 睡眠剝奪實驗器材

器材	規格
矩形塑膠籠	長 47.5 公分、寬 25.5 公分、 高 20.5 公分
睡眠剝奪平台	長 1.5 公分、寬 1.0 公分、 高 2.0 公分
黑色 PP 隔板	
壓克力蓋板	
計時器	

(三) 曠野實驗器材

器材	規格
矩形塑膠籠	長 47.5 公分、寬 25.5 公分、 高 20.5 公分
壓克力蓋板	
攝影機	
電腦	

(四) 新奇事物測試實驗器材

器材	規格
矩形塑膠籠	長 47.5 公分、寬 25.5 公分、 高 20.5 公分
碼表	
燒杯	50 毫升
積木	

(五) 巴恩斯迷宮實驗器材

器材	規格
小黑盒	長 20.0 公分、寬 8.0 公分、 高 3.0 公分
圓形平台	直徑 100.0 公分、高 60.0 公分 等間距洞口 20 個 洞口間距 7.0 公分、直徑 7.0 公分
製聲機	噪音：400 赫茲，75~80 分貝
檯燈	照度 100~120 勒克斯
黑色 PP 板	
大塑膠燒杯	
攝影機	

(六) 西方點墨法實驗器材

器材	規格
ELISA machine	Multiskan FC, Thermo Scientific
Western Blot machine	Tenon Western Machine Set

二、 工具與耗材：

黏土	水	墊料
小鼠飼料	酒精(清潔用)	衛生紙巾
剪刀	打耳器	油性筆
口罩	手套	海綿
紙膠帶	96 孔盤	15 ml 離心管
50 ml 離心管		

三、 藥品

(一)抗體

1. Anti-ERK1/2 (#9102S, Cell Signaling)
2. Anti-p-ERK1/2 (#9101S, Cell Signaling)
3. Anti-GAPDH (#2118S, Cell Signaling)
4. Anti-Rabbit IgG (7074S, Cell Signaling)

(二)呈色劑

1. Bio-Rad Protein Assay (#500-0006, Bio-Rad Laboratories, Inc.)
2. Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate (P90720, Millipore)

四、 軟體

Smart 3.0

IBM SPSS 20

Image J

肆、研究方法或過程

一、 青少年對自身壓力之評估

2017年9月，我們設計了一份問卷(附錄一)，透過網路傳播的方式，調查12~18歲的青少年對於自身壓力的評估。

問卷中收集了年齡、生理性別這兩項基本資料，另外給出了四個壓力來源的選項，分別是：同儕競爭、同儕社交、學習環境與睡眠品質，讓受試者針對這四個選項壓力來源，對自身的影響作出非常輕微、輕微、厲害、非常厲害四個等級的自我評估。

2017年9月21日在網路上發出問卷，2017年9月27日停止接收回應。共有659人回應，男271人，女388人，皆為12到18歲的青少年。

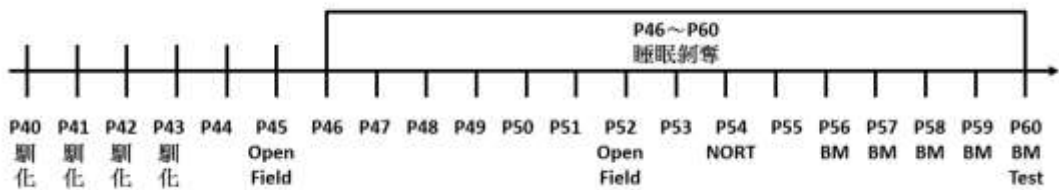
二、 以動物行為實驗模擬人類青少年的睡眠不足狀況

我們選出小鼠的後青少年期(出生後45~60天)來進行實驗，以對應到我們想研究的中學生年紀。我們將小鼠分為四組，如下(表一)，並且

標示小鼠出生後第 n 天為 Pn，針對第 40~43 天(P40~P43)做馴化後，於第 46~第 60 天(P46~P60)每天進行為期 5 小時的睡眠剝奪(圖三)。

	男性	女性
無睡眠剝奪=NSD (控制組)	N=8	N=8
有睡眠剝奪=SD (實驗組)	N=8	N=8

表一 分組與隻數



圖三 實驗流程

P54 時，會進行測試短期記憶的新奇事物測試，休息一天後，P56 會開始為期五天的巴恩斯迷宮。這樣便完成一組完整的實驗。

實驗分成四批進行，每進行一批取各組各兩隻小鼠，在上一批小鼠 P46 時開始下一批的馴化(P40)，如此交叉進行，從 2017/12/25 進行到 2018/2/3 全部結束。

睡眠剝奪的時間是早上約 6 點半開始的 5 小時，而其他行為實驗則會在傍晚 18 時之後開始。

(一) 睡眠剝奪對小鼠生理狀態的影響

1. 馴化

在小鼠出生後第 40 天(P40)開始進行馴化，實驗者會將一隻手戴上布手套，另一隻手戴乳膠手套，將小鼠放在手上 4~5 分鐘(圖八)。這個操作會持續四天，目的是為了讓小鼠適應實驗時人類的操作手法。

2. 體重測量

自開始對小鼠馴化後(P40)，我們便會每天幫小鼠用電子秤測量體重(圖九)，紀錄從實驗開始到結束，小鼠在體重上的生理變化。



圖八 馴化



圖九 量體重的情形

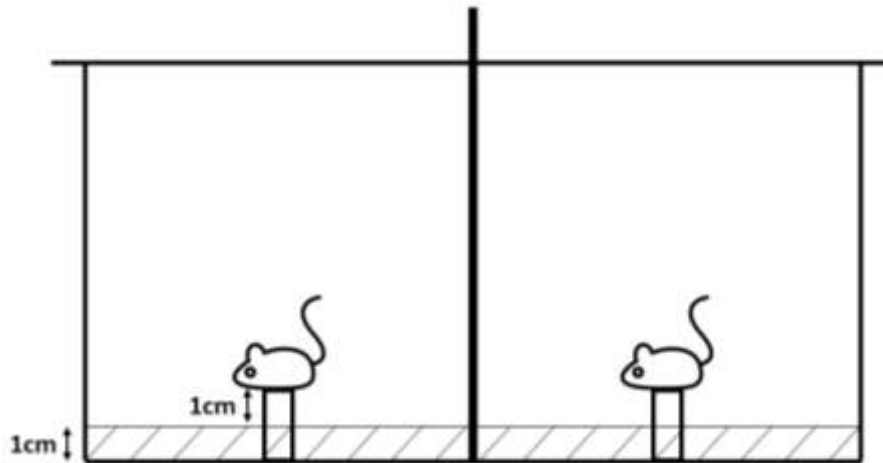
3. 睡眠剝奪

關於小鼠的睡眠剝奪，主要是針對小鼠的快速動眼期睡眠(REM)，由於此時期的睡眠會產生夢境，並對於白天的記憶以及思考會被加工處理。因此，快速動眼期被認為與學習與記憶的鞏固有關(Biological Psychology, 7th ed., Breedlove & Watson)。

從 P46 開始進行睡眠剝奪。在長 47.5 公分、寬 20.5 公分、高 25.5 公分的矩形塑膠籠中，放入約一公分的水，中間用黑色 PP 板隔開，形成兩個正方形的區域(圖十)。兩邊各在正中心黏上一個長 1.5 公分、寬 1.0 公分、高 2.0 公分的睡眠剝奪小檯子，讓小鼠可以站在上面(圖十一)，當小鼠剛要進入夜週期，約早上 6 點半時，對操作組進行 5 個小時的睡眠剝奪，而控制組的小鼠則依舊待在飼養籠，兩組在實驗過程中均放置於同一房間(Heinrichs & Koob, 2006)。

睡眠剝奪的小鼠，在這五小時之中無法進入快速動眼期睡眠(REM)。因為一旦進入快速動眼期，便會因為肌肉放鬆落入水裡

而驚醒，就算是涉水也無法進入快速動眼期而有睡眠，藉此可模擬人類犧牲睡眠的情況(圖十二)。



圖十 睡眠剝奪側面示意圖



圖十一 睡眠剝奪臺子



圖十二 睡眠剝奪進行情形

4. 曠野實驗 (Open Field Test, OFT)

在睡眠剝奪前的 P45 會先進行一次測試行為能力的曠野實驗，以確認實驗用的小鼠都有正常的行為能力。在進行 7 天的睡眠剝奪後(P52)，會再做一次曠野實驗測試有小鼠的行為能力。

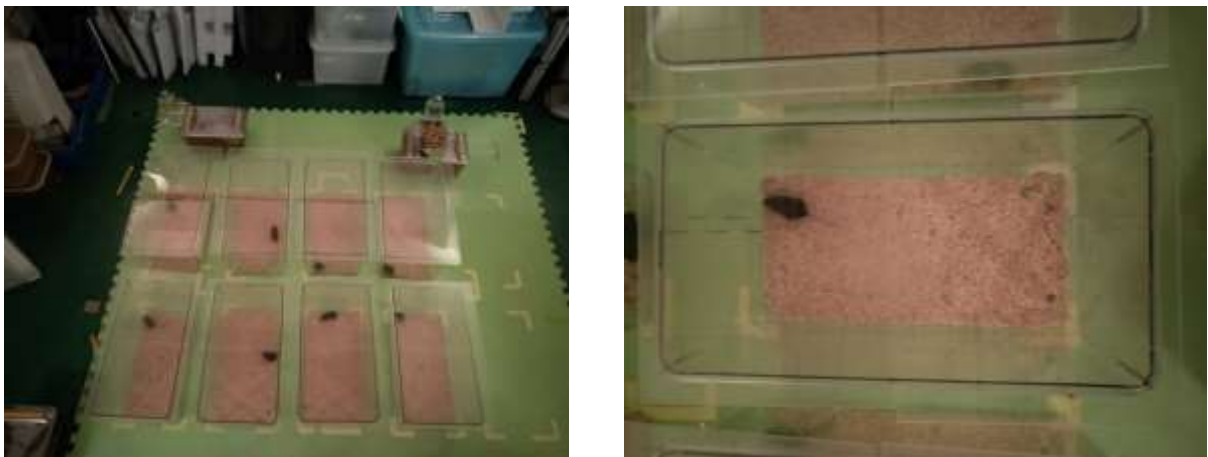
實驗中把小鼠放進矩形封閉空間 1 個小時(圖十三、十四)，錄下其活動情況，用 Smart 3.0 分析小鼠在空間中每五分鐘所行走的距離，以及一個小時中所移動的總距離，並用 IBM SPSS 20 進行統計

比較組內有無差距，此實驗可觀察小鼠的生理活動量是否正常，以及小鼠的自主活動量。

我們進行了兩次曠野實驗，除了分兩次比較組內差距，也將兩次的數據進行比對，觀察睡眠剝奪前後的小鼠是否有活動力改變的狀況 (圖十五、十六)。



圖十三、圖十四 曠野實驗基本器材配置

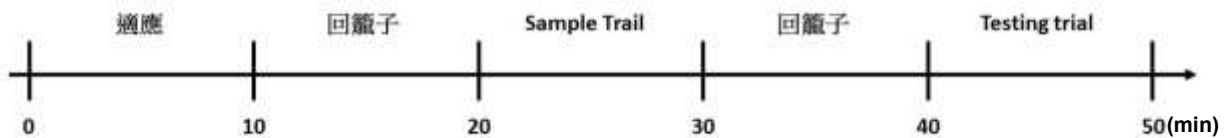


圖十五、圖十六 曠野實驗進行圖

(二)新奇事物測試(Novel Object Recognition Test, NORT)

小鼠天性偏好探索新奇事物，若小鼠有不錯的學習能力，應會花比較多的時間在新奇的事物上，因此以新奇事物測試測驗小鼠的短期工作記憶(圖十七)。

首先將小鼠放在矩形塑膠籠適應 10 分鐘後(圖十八)，先放兩個相同的燒杯，並紀錄小鼠對各燒杯接觸的時間(圖十九)，結束後，將小鼠放回飼養籠內休息 10 分鐘，再將第一次測驗中較少接觸時間的燒杯，換成一個積木，並以相同方式記錄小鼠對燒杯與積木的接觸時間(圖二十)。



圖十七 新奇事物測試實驗流程



圖十八 新奇事物測試
-測試時期



圖十九 新奇事物測試
-第一階段



圖二十 新奇事物測試
-第二階段

(三)巴恩斯迷宮(Barnes Maze, BM)

小鼠厭惡強光、噪音與高處，所以會本能的尋找可以安全休息的場所，而巴恩斯迷宮的實驗設計藉由小鼠尋找到可休息小黑盒的過程，測試實驗動物對空間及位置的記憶與學習能力。

此實驗設計中的器材有一個圓型大平台，在平台周圍有 20 個直徑 7 公分的洞，每隔九十度會黏貼標記一個視覺輔助記憶點，並且在其中一個洞口放置小黑盒，讓小鼠可以躲進去休息。再紀錄小鼠尋找放有小黑盒的洞口所需之時間，以此分析小鼠對舒適環境的記憶力(圖二十一、二十二)。



圖二十一 巴恩斯迷宮基本器材配置

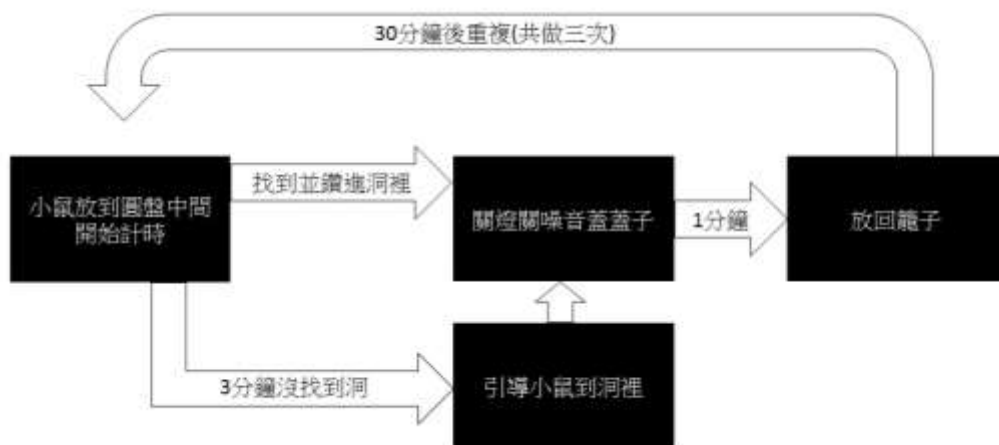


圖二十二 巴恩斯迷宮

實驗進行狀況

本實驗分為兩階段：學習階段與測驗階段。

在學習階段中，我們將小鼠放在大型圓平台的中心，開始時同時開啟強光和噪音，並記錄小鼠進入小黑盒所需要的時間。若小鼠在三分鐘內找不到小黑盒，便將其引導至小黑盒，待小鼠進入盒中之後，會以黑色 PP 板將洞口蓋起，並把燈光與噪音關掉，讓小鼠在黑盒中待一分鐘。這樣的學習流程在每次實驗過程中會重複三循環，而循環期間間隔約 30~40 分鐘，重複四天。(圖二十三)



圖二十三 巴恩斯迷宮實驗流程

學習階段結束後便馬上在第五天進入測驗階段，此階段跟學習階段流程相似，將小鼠放到圓形平台中央同時開啟強光和噪音，但不會放置小黑盒，讓小鼠在圓形平台上探索三分鐘。我們記錄小鼠第一次找到原本放小黑盒的洞口所需要的時間，並將圓形平台分為四個象限，分析小鼠在放有小黑盒的洞口之象限所花的時間。

(四)統計方法

以單因子變異數分析 (one-way ANOVA)進行統計分析，統計分析結果 $p>0.05$ 為無顯著差異， $p<0.05$ 則為有顯著差異。

三、以動物組織分析睡眠剝奪對記憶相關蛋白質含量的影響

(一)實驗流程

在第二階段，我們在小鼠出生後 42 天開始馴化四天，並在他們出生後 46 天開始進行睡眠剝奪，此階段實驗室為了要探討睡眠剝奪對小鼠腦內蛋白質的變化，所以我們將 30 隻小鼠分為六組，每組 5 隻，如下表。我們為了要觀察在各睡眠剝奪時期小鼠腦內蛋白質的變化，分別在睡眠剝奪的第一天、持續九天後、及持續兩周後進行取腦，此階段分析主要取腦前額葉的部分。實驗流程如下圖。

	P46	P54	P60
無睡眠剝奪=NSD (控制組)	N=5	N=5	N=5
有睡眠剝奪=SD (實驗組)	N=5	N=5	N=5



(二) 實驗方法

此階段的馴化、體重測量及睡眠剝奪皆依前文提及之操作進行。

1. 蛋白質濃度測定

為了將所取腦區中的蛋白質定量分析，我們用藥品(bio-rad)與蛋白質結合反應變色，再用特定波長的光檢測其變色程度，回推樣品的蛋白質濃度。在 ELISA machine 中，我們使用波長 620、595 奈米的光波照射已放上樣品的塑膠盤，盤上的樣品以三重複接續擺放。結束後分析數據，得到每份樣品的蛋白質含量。

2. 西式墨點法

在定量分析蛋白質總量後，我們想要了解特定蛋白質在此樣品中的呈現狀況。此實驗也是利用抗原與特定抗體蛋白質的特殊鍵結來標定，此次我們所使用的抗體為 ERK 與 p-ERK。

此實驗要先製作凝膠，並將樣品置入凝膠中進行電泳，此時不同大小的蛋白質便會分離。分離後再將其轉移到固態載體（膜）上，用稀釋的蛋白質容易將膜上沒有吸附蛋白質的部分阻攔。此後，再用一抗結合我們轉移上去的蛋白質，洗去後再用二抗將標定的蛋白質著色。最後，加入顯影劑後便可以電腦取得其曝光後的顯色結果。我們分析蛋白質在此的著色深度來瞭解組織中蛋白質的表現程度。

伍、研究結果

一、以問卷調查青少年對自身壓力的評估

此次的問卷總共收到了 659 則回覆，調查的對象 41.1%為男性，58.9%為女性，其中 16~18 歲的高中生占了 75%，12~15 歲的國中生占了 25%(圖二十三)。

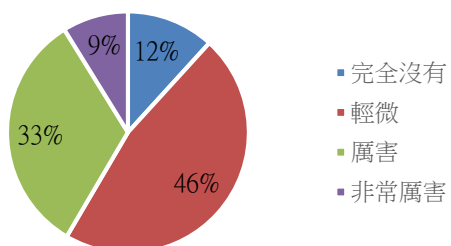
若將厲害與非常厲害總和來看，前三名為同儕競爭、學習環境與睡眠品質(圖二十四)。但是若只看非常厲害的話，睡眠品質的問題則為第一名，共占 13%(圖二十五)。因此我們在綜合評估之後，考慮實驗的可行性與方便性，還有實驗者本身對於行為實驗的熟練操作度，我們決定以睡眠剝奪作為這次研究的主題。

於是，我們選用 C57BL/6 的小鼠作為這次的實驗動物，挑選年齡為後青春期(P45~P60)的小鼠來模擬青少年對於睡眠不足所可能造成的學習能力影響。

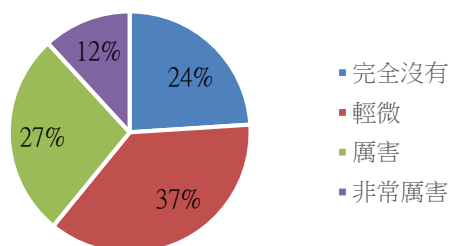


圖二十三 基本資料與基本評估結果

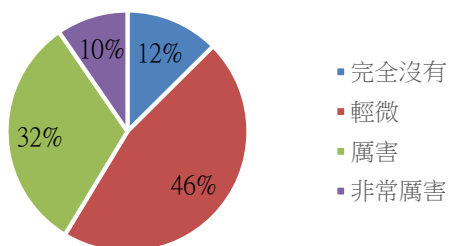
同儕競爭(男)



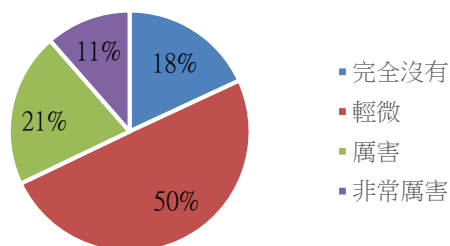
睡眠品質(男)



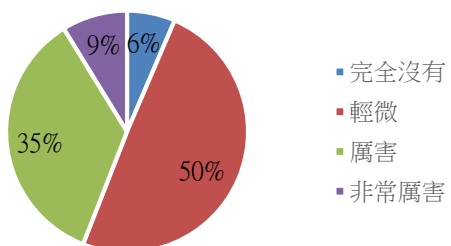
學習環境(男)



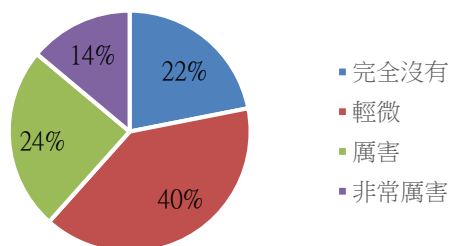
同儕社交(男)



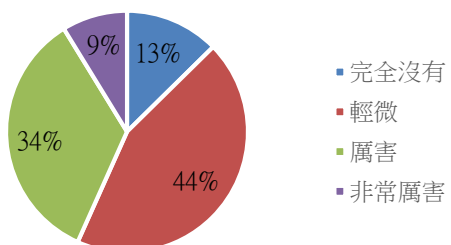
同儕競爭(女)



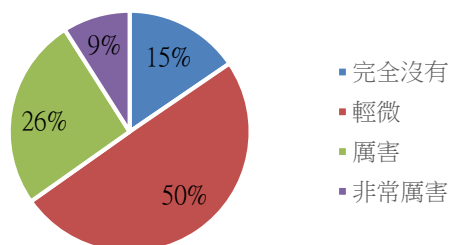
睡眠品質(女)



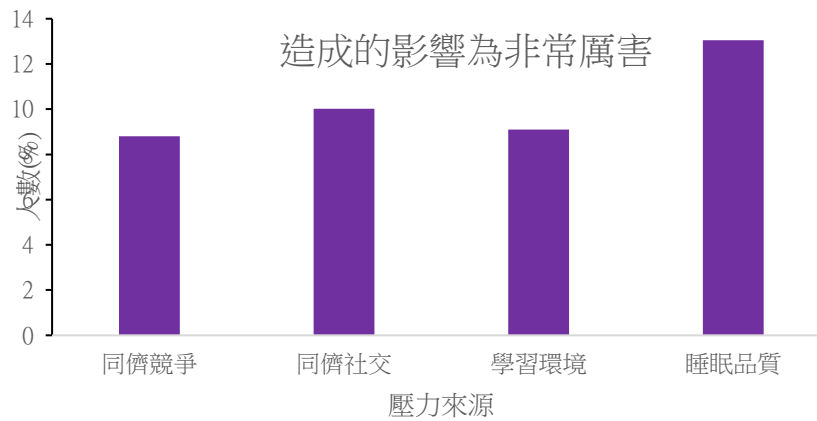
學習環境(女)



同儕社交(女)



圖二十四 分項問卷資料結果



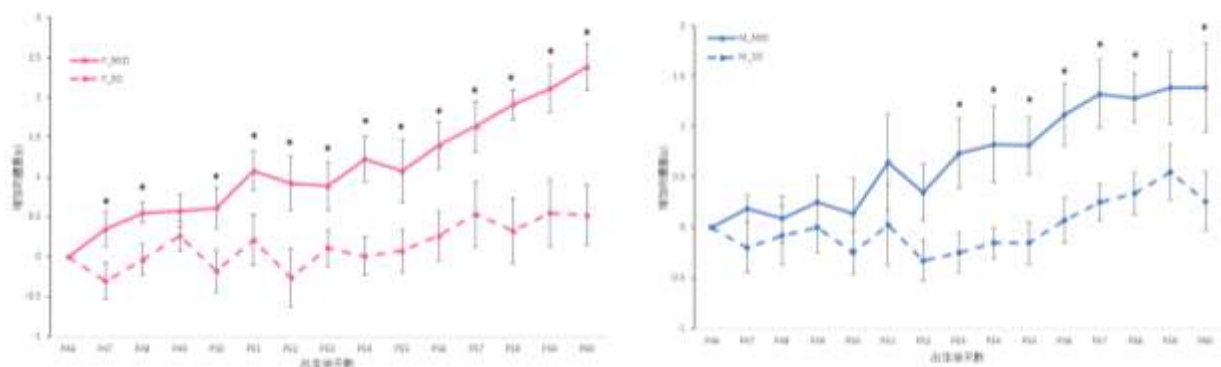
圖二十五 四種壓力中顯示為影響最大(意即「非常厲害」)的人數比例比較圖

二、 睡眠剝奪對小鼠生理狀況的影響

(一) 體重

我們從馴化的第一天(P40)開始，每天測量體重變化(圖二十六)，由圖可知沒有進行睡眠剝奪的控制組，小鼠體重呈現穩定成長，符合我們對青少年小鼠生理正常發育的期待。但是，小鼠進行睡眠剝奪的操作組，其體重則無明顯成長，表示操作組的體重增加幅度不大。可看出有進行睡眠剝奪的小鼠發育的狀況比沒有進行睡眠剝奪的小鼠發育要差。

而由 ANOVA 統計來看，兩者有顯著的差異($p < 0.05$)，F 檢定跑出的結果，公鼠為 $F(1,14)=7.015, p = 0.019 < 0.05$ ，母鼠為 $F(1,14)=11.863, p = 0.004 < 0.05$ 。



圖二十六 各組睡眠剝奪第一天起(P46)體重變化折線圖

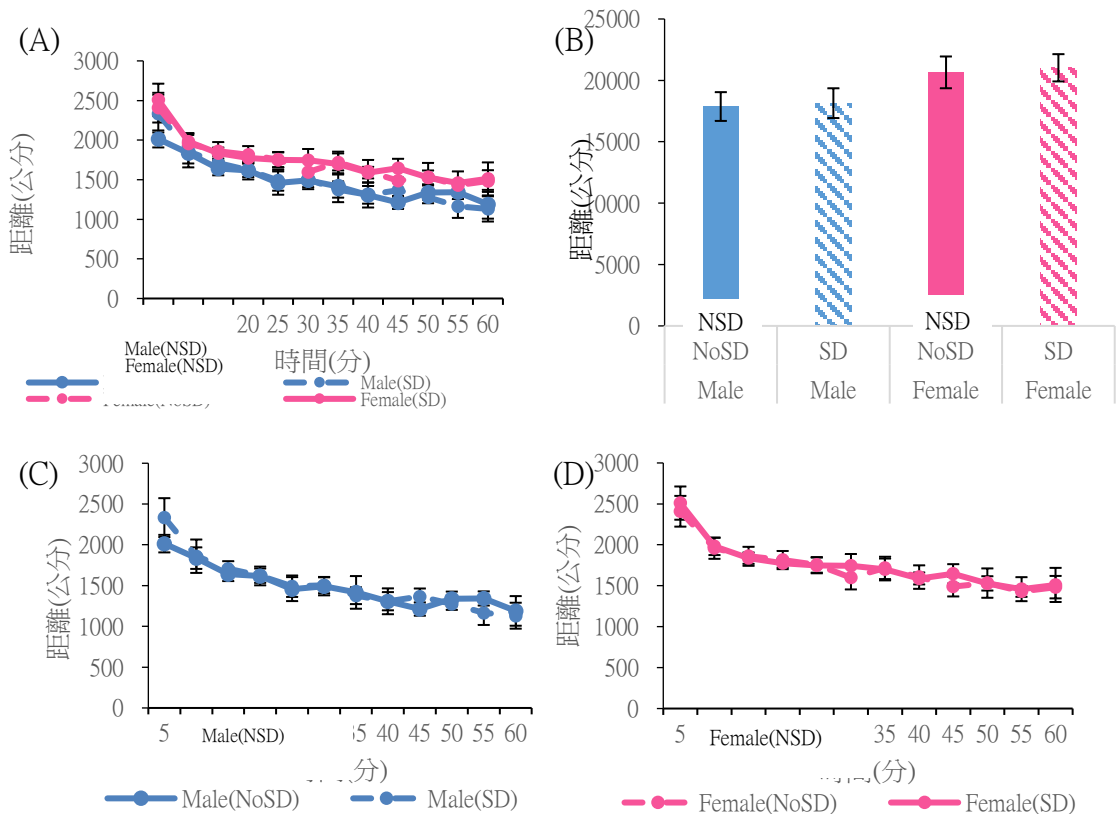
(二) 曠野實驗

1. 第一次自主活動能力測試

在進行所有行為實驗之前，我們在出生後第 45 天(P45)，先測了一次曠野實驗來確認小鼠們都有正常的活動能力。

由圖二十七(A)可以看出，小鼠們在剛進入新環境時，都會有比較高的活動力去探索新的環境，而之後則隨時間拉長而降低活動的距離。在總距離的長條圖上(圖二十七(B))，此活動在不同性別間無顯著差異，實驗組與操作組在實驗前無明顯差異。在 ANOVA 的統計上公鼠的數據為 $F(1, 14)=0.031, p = 0.864 > 0.05$ ，母鼠為 $F(1,14)=0.031, p = 0.055 > 0.05$ ，皆無顯著差異。

由此曠野實驗結果可以看出，此次所用的實驗動物基本的活動能力都正常，且不會因為性別而有生理活動能力上的差異。

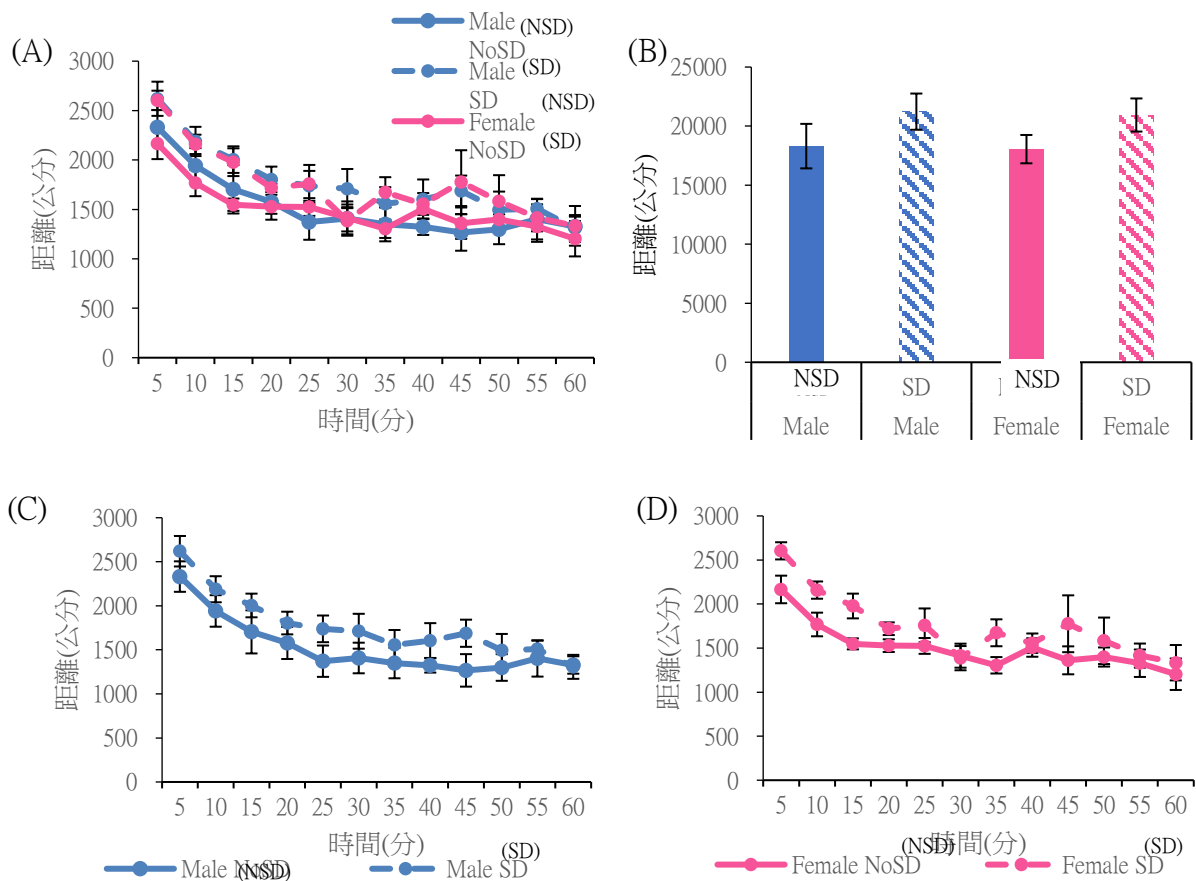


圖二十七 第一次曠野實驗結果 (A) 為各組每五分鐘走的距離折線圖。(B) 為各組在一小時內走的總距離。(C) 為公鼠控制組和睡眠剝奪組每五分鐘走的距離。(D) 為母鼠控制組和睡眠剝奪組每五分鐘走的距離。

2. 第二次自主活動能力測試(P52)

在進行一個星期的睡眠剝奪之後，又再進行了一次曠野實驗，比較小鼠在睡眠剝奪或無睡眠剝奪後有無生理上活動能力的變化。

由圖二十八(A)可看出，跟第一次一樣，剛開始會較有活動力的去探索新環境。而由圖二十八(B)可看出，有進行睡眠剝奪的小鼠比無進行睡眠剝奪的控制組多了一點移動距離，可見睡眠剝奪有造成一點生理上的影響，讓小鼠的活動力上升些。但由ANOVA 統計上來看，公鼠為($F(1, 14)=1.650, p = 0.220 > 0.05$)、母鼠為($F(1, 14)=2.808, p = 0.116 > 0.05$)，兩者皆無顯著差異。表示小鼠們都維持著基本的活動能力，可以順利的進行接下來下個階段的行為實驗。



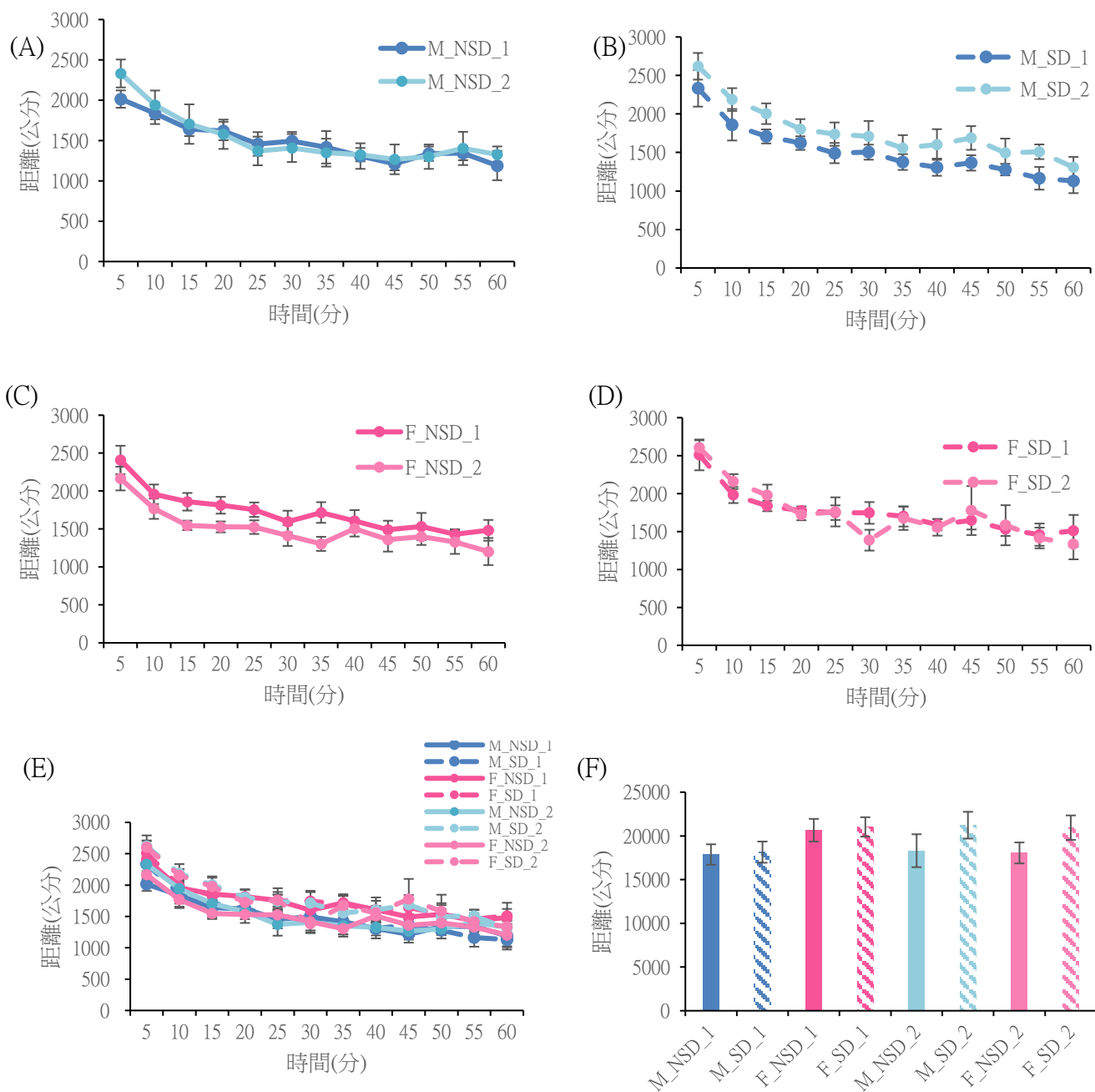
圖二十八 第二次曠野實驗結果 (A) 為各組每五分鐘走的距離折線圖。(B)

為各組在一小時內走的總距離。(C) 為公鼠控制組和睡眠剝奪組每五分鐘走的

距離。(D) 為母鼠控制組和睡眠剝奪組每五分鐘走的距離。

3. 兩次自主活動能力測試的比對

將兩次結果放在一起比對，發現兩次的曠野實驗，性別、組別間皆無顯著差異(圖二十九)。

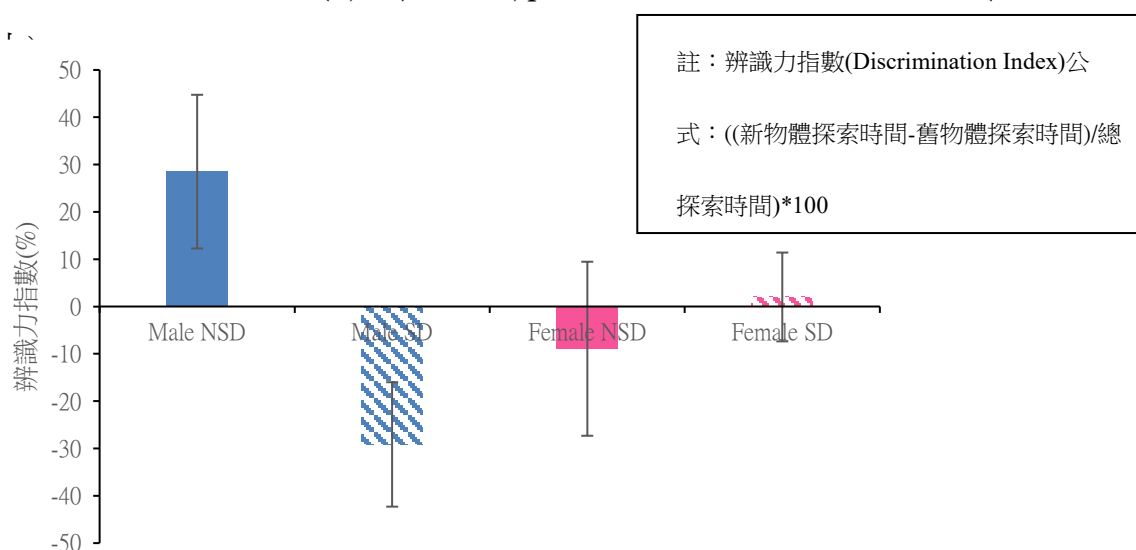


圖二十九 兩次曠野實驗結果比對 (A)為各組第一次和第二次曠野實驗每五分鐘走的距離。(B)為各組第一次和第二次曠野實驗一小時內走的總距離。(C)為公鼠控制組第一次和第二次曠野實驗每五分鐘走的距離。(D)為公鼠睡眠剝奪組第一次和第二次曠野實驗每五分鐘走的距離。(E)為母鼠控制組第一次和第二次曠野實驗每五分鐘走的距離。(F)為母鼠睡眠剝奪組第一次和第二次曠野實驗每五分鐘走的距離。

三、 測試睡眠剝奪對短期記憶的影響

(一) 新奇事物測試

從辨識力指數(Discrimination Index)來看，公鼠控制組有表現出對新物體的偏好，符合小鼠喜歡探索新事物的天性；公鼠睡眠剝奪組則沒有表現出對新物體的偏好。在 ANOVA 統計上，公鼠的數據為 $F(1, 14)=8.697, p = 0.011 < 0.05$ ，有顯著差異。在辨識力指數中母鼠控制組和睡眠剝奪組皆無表現出對新物體的偏好。在 ANOVA 統計上，母鼠的數據為 $F(1, 14)=0.321, p = 0.580 > 0.05$ ，無顯著差異(圖三



圖三十 各組新奇事物測試的辨識力指數(Discrimination Index)

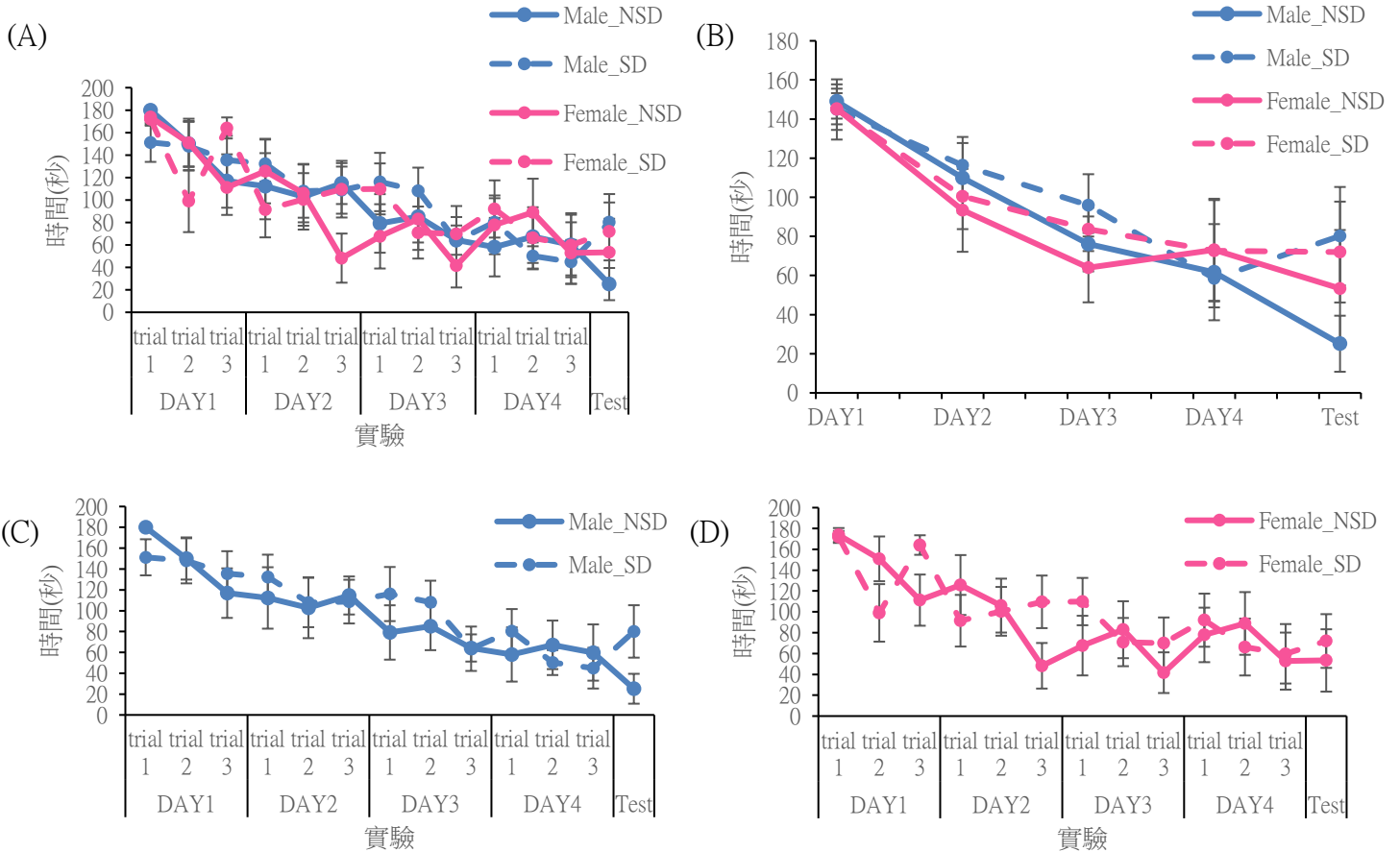
四、 測試睡眠剝奪對長期記憶及空間記憶的影響

(一) 巴恩斯迷宮

我們用巴恩斯迷宮測驗持續睡眠剝奪的小鼠和一般小鼠，在空間記憶以及長期記憶上有無差異。由每次訓練找到洞所花的時間(圖三十一(A))，及每日找到洞所花的時間平均(圖三十一(B))中，可以看到各組所花的時間都有逐漸減少，表示小鼠皆有在這些訓練中有學習如何找到洞的能力。在每日找到洞所花的時間上，性別間無顯著差異，控制組與睡眠剝奪組間亦無顯著差異(圖三十一

(C)、(D))。但在圖三十一(B)中，可看出測驗階段操縱組的小鼠有比控制組的小鼠平均花了更多時間才找到洞的位置。

而在 ANOVA 統計上公鼠的數據為 $F(1, 14)=4.125, p = 0.062 > 0.05$ ，無顯著差異；母鼠的數據為 $F(1, 14)=0.254, p = 0.622 > 0.05$ ，無顯著差異。兩者皆看不到顯著差異。



圖三十一 (A)為各組在每回訓練和最後一天測驗找到洞花的時間。(B)為各組前四天三個回合找到洞花的時間平均和最後一天測驗找到洞花的時間。(C)為公鼠控制組和睡眠剝奪組在每回訓練和最後一天測驗找到洞花的時間。(D)為母鼠控制組和睡眠剝奪組在每回訓練和最後一天測驗找到洞花的時間。

五、 檢測記憶相關蛋白質含量

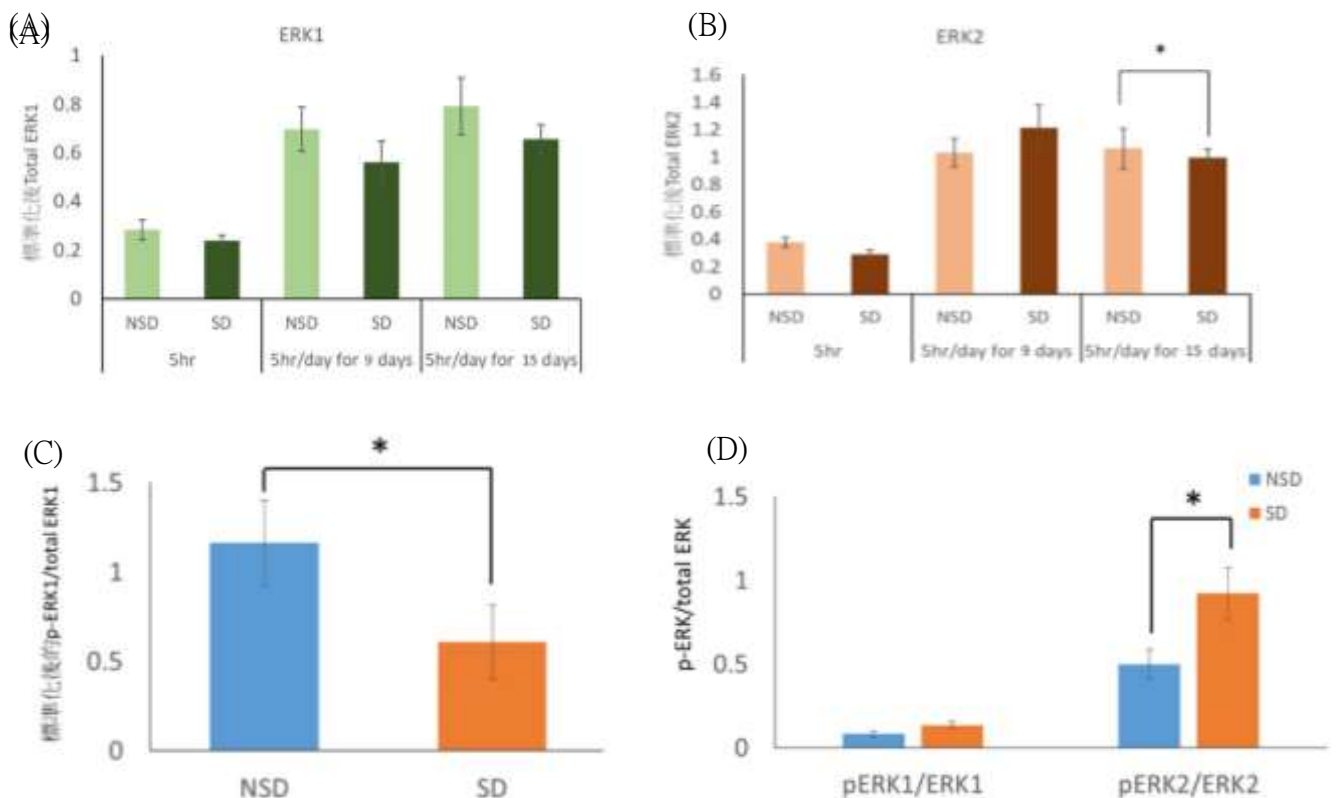
(一)西方點墨法

我們用西方點墨法分析了睡眠剝奪一天、九天、及十五天小鼠前額葉的 ERK、p-ERK 蛋白質含量是否與控制組有差異。

ERK1 蛋白質在小鼠睡眠剝奪一天(五小時)、睡眠剝奪九天及睡眠剝奪十五天後與控制組皆無顯著差異(圖三十二 A)。

ERK2 蛋白質在睡眠剝奪一天、九天後與控制組沒有顯著差異，但在睡眠剝奪十五天後，控制組小鼠的 ERK2 蛋白比操作組的小鼠還要多，兩者有顯著差異(圖三十二 B)。

在 p-ERK 的部分，睡眠剝奪一天的小鼠的 p-ERK2 顯著地比控制組低(圖三十二 C)。睡眠剝奪十五天的小鼠與控制組的 p-ERK1 沒有顯著差異，但操作組的 p-ERK2 比控制組高，有顯著差異(圖三十二 D)。



圖三十二 (A)為 ERK1 在不同組別標準化後(與 GAPDH 蛋白質的含量相除)的含量。(B) 為 ERK2 在不同組別標準化後的含量。(C)為睡眠剝奪一天後控制組與操作組 p-ERK2 除以總 ERK2 的比值。(D) 為睡眠剝奪十五天後控制組與操作組 p-ERK 除以總 ERK 的比值。



圖三十三 西方點墨法結果 (A) GAPDH (B) Total ERK1(上)、ERK2(下) (C) p-ERK1(上)、p-ERK2(下)

陸、討論

一、 測試睡眠剝奪對短期記憶的影響

在新奇事物測驗中，我們測試小鼠的短期工作記憶能力，在進行此實驗之前，我們預期有經過睡眠剝奪的小鼠會因為睡眠剝奪，而對短期的工作記憶造成損壞。在數據上，我們猜測沒有進行睡眠剝奪的小鼠應該會對新的東西有較長的接觸時間，而睡眠剝奪的小鼠則相對不會花太多時間在新事物上。

由實驗數據及統計結果可以發現，小鼠的控制組較偏好新物體，這符合前人的論文中小鼠偏好探索新事物的事實(Antunes,2012)。小鼠的睡眠剝奪組則沒有表現出偏好新物體的現象，表示睡眠剝奪會影響小鼠對新奇事物的記憶與偏好，符合我們預期的結果。

然而，新奇物體辨識對母鼠的效果不顯著。從實驗中看不出母鼠控制組對新物體偏好。有可能是生理性別差異造成母鼠對這項測驗的新物體沒有興趣，或是測驗的時間過長或過短導致我們在母鼠身上看不到顯著差異。也可能是母鼠對我們所設計的睡眠剝奪模式反應不佳，或許再增長睡眠剝奪的時間或是改變睡眠剝奪的模式，就能看到更顯著的結果。

二、 測試睡眠剝奪對長期記憶及空間記憶的影響

在巴恩斯迷宮中，所測驗的是小鼠的長期記憶能力。我們預期小鼠在持續睡眠剝奪且同時學習迷宮任務的狀態下，會因為睡眠剝奪而學習能力下降，導致不能成功完成迷宮或成功完成迷宮的時間變長。

在前四天的訓練中，所有小鼠找到洞的時間皆越來越短，由此可以確定，小鼠在這十二個回合中確實學到如何找到可以躲藏的洞和洞的位置，由此可知所有小鼠都有基本的長期記憶與空間記憶能力。

在經過睡眠剝奪的小鼠在此實驗的測驗階段都比沒有進行睡眠剝奪的小鼠花了更長的時間找到正確的位置。但經過統計分析發現公鼠和母鼠間、睡眠剝奪組和控制組沒有顯著差異。推測可能是因為實驗者的操作失誤，讓小鼠在尚未進行實驗時已經習慣了噪音，而降低了噪音造成的壓力，使實驗結果無法在時間上看出顯著差異。

整體上來說，實驗後發現睡眠剝奪對青少年小鼠的長期記憶的影響沒有短期記憶來得大。

三、 檢測記憶相關蛋白質含量

與過去的文獻相比，我們的實驗中主要是探討前額葉中 ERK 與 p-ERK 含量，因為在我們的行為實驗中，在短期記憶的部分有較顯著的結果，所以在第二階段想要深入探討。在結果中我們可以看到，ERK1 蛋白質在操作組與控制組皆無顯著差異，ERK2 蛋白質在睡眠剝奪十五天後，控制組小鼠的 ERK2 蛋白比操作組的小鼠還要多；p-ERK 的部分，睡眠剝奪一天的 p-ERK 比控制組低，符合我們對睡眠剝奪效果的預期；睡眠剝奪十五天的小鼠 p-ERK2 比控制組高，有顯著差異。

對於這樣結果我們有以下的解釋 第一， 在過去的文獻中，大多都是採用持續時間長、重複次數低的睡眠剝奪方式，並在剝奪後馬上取腦。但在我們的實驗中，是採用短時、長期的剝奪方式，這可能讓老鼠在夜週期時有睡眠補償的機會。 第二， 也有文獻指出，長期的壓力會對 ERK 的機制造成影響，其中 p-ERK 的比例會上升。在我們的研究所使用的睡眠剝奪方法，會讓小鼠處於長期壓力下(Heinrichs & Koob, 2006)，因此造成實驗的結果與過去研究相異，需進行更多實驗做進一步釐清與證實。

柒、結論

- 一、長期睡眠剝奪會抑制青少年小鼠體重的成長。
- 二、長期睡眠剝奪不會減少青少年小鼠的自主活動量。
- 三、長期睡眠剝奪會造成公鼠短期記憶變差，在新奇事物測驗時較不偏好探索新物體；但母鼠不論控制組還是睡眠剝奪組，均無在新奇事物測驗中表現出偏好新物體。
- 四、青少年小鼠對長期記憶無論公母有無睡眠剝奪均無顯著差異。
- 五、睡眠剝奪一天使前額葉 p-ERK 比值較低；睡眠剝奪十五天後 ERK 減少，但睡眠剝奪造成的壓力及睡眠補償使 p-ERK 比值升高。

捌、參考資料(文獻)及其他

一、書籍

- (一)S. Marc Breedlove and Neil V. Watson, *Biological Psychology: An Introduction to Behavioral, Cognitive, and Clinical Neuroscience*, 7, Sunderland, Massachusetts, USA., Sinauer Associates, 434- 452, (2013)

二、期刊與論文

- (二)Ellenbogen, J. M. (2005). Cognitive benefits of sleep and their loss due to sleep deprivation.*Neurology*,64(7), E25-E27.
- (三)Walsh, R. N., & Cummins, R. A. (1976). The open-field test: a critical review.*Psychological bulletin*,83(3), 482.
- (四)Antunes, M., & Biala, G. (2012). The novel object recognition memory: neurobiology, test procedure, and its modifications.*Cognitive processing*,13(2), 93-110.
- (五)Rosenfeld, C. S., & Ferguson, S. A. (2014). Barnes maze testing strategies with small and large rodent models.*Journal of visualized experiments: JoVE*, (84).

- (六)Laviola, G., Macr, S., Morley-Fletcher, S., & Adriani, W. (2003). Risk-taking behavior in adolescent mice: psychobiological determinants and early epigenetic influence. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 27(1-2), 19-31.
- (七)Graves, L. A., Heller, E. A., Pack, A. I., & Abel, T. (2003). Sleep deprivation selectively impairs memory consolidation for contextual fear conditioning. *Learning & memory*, 10(3), 168-176.
- (八)Heinrichs, S. C., & Koob, G. F. (2006). Application of experimental stressors in laboratory rodents. *Current protocols in neuroscience*, 8-4.
- (九)Flurkey, K., Curren, J. M., & Harrison, D. E. (2007). Mouse models in aging research. In *The Mouse in Biomedical Research (Second Edition)* (pp. 637-672).
- (十)Giovannini, M. G. (2006). The role of the extracellular signal-regulated kinase pathway in memory encoding. *Reviews in the neurosciences*, 17(6), 619-634.
- (十一) Trifilieff, P., Herry, C., Vanhoutte, P., Caboche, J., Desmedt, A., Riedel, G., ... & Micheau, J. (2006). Foreground contextual fear memory consolidation requires two independent phases of hippocampal ERK/CREB activation. *Learning & memory*, 13(3), 349-358.
- (十二) Guan, Z., Peng, X., & Fang, J. (2004). Sleep deprivation impairs spatial memory and decreases extracellular signal-regulated kinase phosphorylation in the hippocampus. *Brain research*, 1018(1), 38-47.

四、 網站

- (一)National Sleep Foundation。2006年，取自
<https://sleepfoundation.org/>
- (二) 兒童福利聯盟。2016年9月25日，取自
<https://sleepfoundation.org/>

玖、附錄

附錄一

青少年生活壓力程度調查

大家好！我們是師大附中1429班的學生。
我們目前正在進行青少年壓力相關的專題研究，
這份問卷的主要目的是瞭解當今12~18歲的青少年對於生活中的各種壓力源所感受到的嚴重程度。

這份問卷的調查結果將會被用於設計動物壓力模型，來了解青少年平時生活壓力對於生活作息、學習能力等的影響。

這份問卷的資料會完全保密，請安心作答！

*必填

基本資料

年齡? *

選擇 ▾

生理性別? *

女

男

你覺得平常生活壓力很大嗎? *

沒壓力

輕微壓力

壓力大

壓力很大

請問這些壓力影響你生活的程度? *

沒影響

輕微影響

有些影響

嚴重影響

繼續

青少年生活壓力程度調查

*必填

請針對以下所列的各種壓力對你造成的影響進行程度評分。

同儕競爭 *

- 完全沒有
- 輕微
- 厲害
- 非常厲害

同儕社交 *

- 完全沒有
- 輕微
- 厲害
- 非常厲害

學習環境 *

- 完全沒有
- 輕微
- 厲害
- 非常厲害

睡眠品質 *

- 完全沒有
- 輕微
- 厲害
- 非常厲害

其他壓力

您的回答

返回

提交

【評語】 130002

此研究主要是以大鼠剝奪 REM sleep 後，觀察其短期記憶、長期記憶的變化、以及測量大腦前額葉中 ERK 和 phospho-ERK 蛋白質的變化，來說明睡眠剝奪後對記憶的作用。實驗設計、方法、以及結果符合科學研究精神。

幾點建議：1、以母鼠為實驗對象時，應考慮其月經週期荷爾蒙的變化，2、部分實驗果在解釋上認為與壓力有關，建議應量測 corticosterone 濃度。