

2023 年臺灣國際科學展覽會 優勝作品專輯

作品編號 130007

參展科別 行為與社會科學

作品名稱 探討棕色脂肪組織對成年小鼠生理與行為的影響

得獎獎項

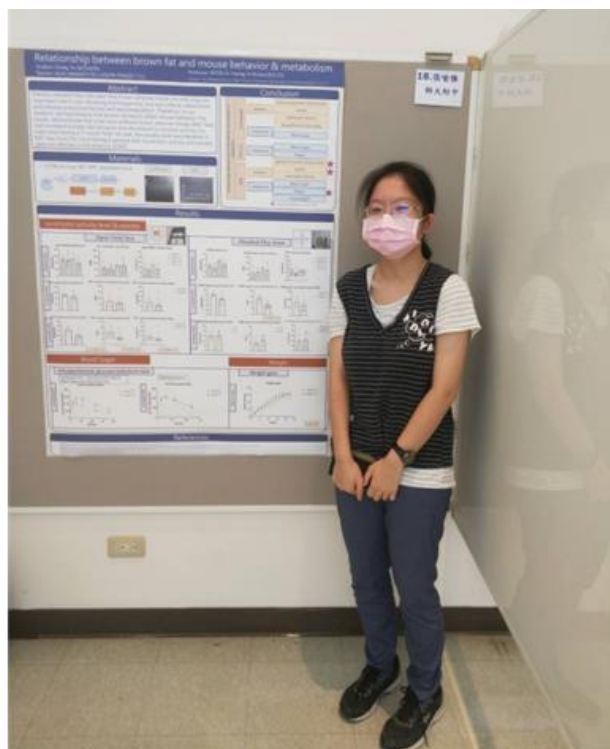
就讀學校 國立臺灣師範大學附屬高級中學

指導教師 黃怡萱、蘇雨菁

作者姓名 張喻雅

關鍵詞 棕色脂肪、焦慮行為、血糖

作者簡介



自我介紹：

喜歡日漫、華語樂、新台語歌。喜歡喜劇，很崇拜可以一本正經搞笑的人。喜歡奇奇怪怪的東西，但宗教或暴力恐怖類除外。喜歡隨心所欲，嚮往自由自在的生活。

每天最喜歡的事情是睡覺，最討厭的事情是起床，心願是可以一直做最喜歡的事，永遠不要做最討厭的事。覺得人生最棒的部分就是，有一天心願一定會實現。

Abstract

Previous research has indicated that brown adipose tissue not only plays important role in non-shivering thermogenesis, but also affects metabolism and releases endocrine factors and neuroregulators. Therefore, in our research, we hypothesize that brown fat would affect mice' s behavior, including anxiety behavior, locomotor activity, social behavior, working memory, and spatial learning and memory. There are three parts to our research. We examine mice behavior and metabolism, for mice having a general diet, induced by a high-fat diet as well as CL316,243, or induced by months of a high-fat diet. The results imply that for mice having a 6-month high-fat diet, lacking brown fat does not affect working memory, learning & memory, or swimming velocity, but could increase male mice' s anxiety levels and decrease the levels of locomotor activity. For mice having a 3-month high-fat diet, lacking brown fat does not affect their locomotor activity, working memory, learning & memory, or swimming velocity significantly, but could increase male mice' s anxiety levels. For mice having a general diet, lacking brown fat does not affect mice's locomotor activity, anxiety, working memory, social ability, social novelty, learning & memory, and swimming velocity. Also, brown fat affects male mice' s weight gain and blood sugar maintenance. In our research, for male mice having a 3-month high-fat diet, lacking brown fat could increase male mice' s weight gain and worsen blood sugar maintenance. While for mice having a 6-month high fat diet, male mice without brown fat show no significant difference in weight gain and blood sugar maintenance. Thus, it can

be inferred that it might be factors other than blood sugar or weight gain that help lower the mice' s anxiety levels. That is, brown fat might change the mice' s intestinal microbiota, which is reported to relate to the brain-derived neurotrophic factor and anxiety. Also, brown fat might secrete neurotrophic factor, which may pass the blood-brain barrier, and thus affect mice' s anxiety behavior. Further research should be done to uncover the mechanism and understand what role brown fat plays to help lower mice' s anxiety levels.

摘要

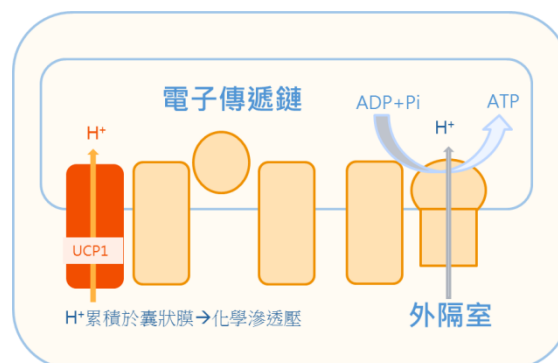
除了與產熱代謝有關外，近年許多研究指出，棕色脂肪組織亦會分泌神經影響因子，並且可能會進入小鼠腦部進而影響其行為與表現。本實驗透過利用基因工程讓小鼠帶有 UCP1-Cre 與 LSL-DTA 序列，產出缺乏棕色脂肪組織的小鼠，了解不同飼料飼養條件下，棕色脂肪組織對於成鼠行為與生理的影響。結果發現，對於高脂飼料飼養 3 個月的公鼠，缺乏棕色脂肪組織可能使成年公鼠焦慮程度較高。高脂飼料飼養 6 個月的公鼠，缺乏棕色脂肪組織可能使成年公鼠運動能力較差，焦慮程度也較高。生理方面則發現，經歷 3 個月高脂飲食的成年公鼠，缺乏棕色脂肪組織會造成體重增加量較大，葡萄糖吸收能力較差，但在經歷共 6 個月高脂飲食後，缺乏棕色脂肪組織的公鼠，與野生種公鼠在體重增加與葡萄糖吸收能力方面，皆無顯著差異。關於棕色脂肪組織調節焦慮行為的機制，值得未來更多實驗繼續探討。

壹、前言

一、文獻探討

(一)棕色脂肪的產熱機制

脂肪組織分為白色脂肪組織(white adipose tissue, WAT)、棕色脂肪組織(brown adipose tissue, BAT,又稱 Brown Fat)、和米



色脂肪組織(beige adipocyte tissue)。棕色脂肪組織是人類、齧齒類和許多其他哺乳類共有的非顫抖性產熱組織，而米色

圖 1 UCP1 運作 圖為棕色脂肪細胞內的粒線體示意圖，外框表示粒線體外膜，內框代表粒線體內膜，內膜上的長方體代表蛋白質，蘑菇型圖案代表 ATP 合成酶。UCP1 蛋白在內膜上讓質子由外隔室(膜間腔)洩漏至內膜中，以此將氫離子濃度梯度型的能量轉換為熱能，產生的熱能會由周邊血管送至全身。(圖片來源：本組自繪)

脂肪組織則是介於棕色脂肪組織與白色脂肪組織間。米色脂肪能由白色脂肪「褐變」(browning)而來，在冷溫度刺激 (cold exposure)時進行產熱。

棕色脂肪細胞內的粒線體上具有棕色脂肪組織專一表達的解偶聯蛋白 1 (uncoupling protein 1,UCP1)，造成質子洩漏後將能量轉換為熱能，由棕色脂肪周圍的血管將熱能輸出至全身，可幫助維持哺乳類動物的體溫(圖 1)(Lu Yuan, 2019)。

(二)棕色脂肪的代謝功能

棕色脂肪除了產熱功能，還有抗肥胖的功能。棕色脂肪會被交感神經信號激活，去甲腎上腺素激活棕色脂肪細胞上的 β 3-腎上腺素能受體，啟動細胞內三酸甘油脂分解。游離脂肪酸釋放，促進粒線體呼吸，產生氫離子梯度，透過

UCP1 產生熱能，透過此機制，棕色脂肪細胞能消耗能量，而達到減少體脂的功效。另外，2013 年，Xiaomeng Liu 等人的研究中，對以高脂飼料(high fat diet, HFD) 餵養的小鼠(mouse)，移植棕色脂肪，發現進行移植手術的小鼠相較進行假手術 (sham operated) 而餵養高脂飼料的小鼠，體重增加量較少，因此對小鼠而言，棕色脂肪組織能有減少體重的功能 (Xiaomeng Liu et al, 2013)。

(三)小鼠棕色脂肪分布

棕色脂肪組織 位於小鼠的肩胛間、肩胛下、腋窩、腎周和主動脈周圍區域 (圖 2、圖 3、圖 4)，最大塊的棕色脂肪組織為肩胛骨間棕色脂肪組織(iBAT)。WAT 主要分布於左右大腿皮下的腹股溝白色脂肪組織(iWAT)及黏接副睪的 eWAT。

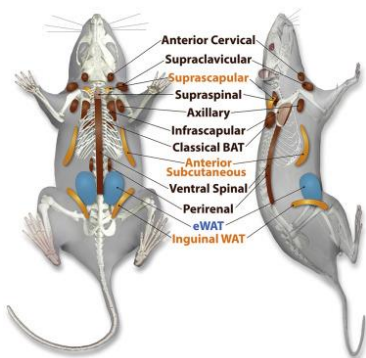


圖 2 小鼠棕色脂肪分布圖 棕色脂肪組織位於小鼠的肩胛間、肩胛下、腋窩、腎周和主動脈周圍區域。WAT 主要分布於左右大腿皮下及黏接副睪的 eWAT。(圖片來源：Fang Zhang et al, 2018)



圖 3 iBAT 將小鼠後背剪開，能看見肩胛下成蝴蝶形的 iBAT，此為小鼠最大塊的棕色脂肪組織。(圖片來源：自行拍攝)



圖 4 小鼠脂肪組織 通常取下小鼠脂肪組織觀察時，會取下背面的 iBAT，腹面則取位於兩邊唾腺下的 scBAT，食道下、血管上的 AO，左右大腿皮下的 iWAT，以及黏接著副睪的 eWAT。(圖片來源：自行拍攝)

(四)棕色脂肪作為分泌性組織

棕色脂肪組織除了產熱功能，以及對於體重、體脂、血糖調節有貢獻之外，棕色脂肪可透過自分泌與旁分泌的方式，分泌一些化學分子，統稱為脂肪細胞素(brown adipokines, 又稱 batokines)，能促進棕色脂肪組織的增生和肥大，以及血管形成、神經支配等。另外，脂肪細胞素中，也包含一些神經調節因子，如纖維母細胞生長因子 21(fibroblast growth factor 21)，以及神經調節蛋白 Neuregulin4 (Nrg4) (Villarroya, Cereiyo, Villarroya, & Giralt, 2016)。神經調節蛋白 Neuregulin4 (Nrg4)是發育中的大腦皮層中樹突分支的主要新型調節劑，在發育中的新皮質錐體樹突的生長和分化中有重要作用(Blanca Paramo, Sean Wyatt, & Alun M. Davies, 2018)。神經營養因子(neurotrophic factor)，如腦多巴胺神經營養因子(Cerebral dopamine neurotrophic factor, Cdnf)，是帕金森氏症研究的新希望(XinmiaoRen, 2013)，以及中腦星形膠質細胞源性神經營養因子(mesencephalic astrocyte-derived neurotrophic factor, Manf)，研究發現對於中風腦損傷修復有益(KERT MÄTLIK et al, 2018)。這些在中樞神經系統(CNS)中具有神經保護特性的神經營養因子，也被發現表達在棕色脂肪。

(五)基因工程方法製作去掉棕色脂肪組織的小鼠模型(BAT-depleted mouse model)

Cre-loxp 為神經科學常用的基因工具，包含 Cre 重組酶和 *loxp* 序列。1984 年，漢米爾頓 (Daniel. L Hamilton) 與亞伯斯基 (Ken Abremski) 在 P1 噬菌體中，發現 Cre 重組酶會辨識 *Loxp* 序列來重組基因片段。*Loxp* 序列全長 34 個核苷酸，由兩組各 13 個核苷酸的迴文序列 (palindromic sequence)，中間夾著一段 8 個核苷酸的核心序列(圖 5) (鄭淵仁，2016)。

由於小鼠本身無白喉毒素受體(diphtheria toxin receptor, DTR)，並不會感染白喉毒素，所以，在小鼠細胞中，插入白喉毒素片段 A(Diphtheria toxin A chain, DTA)，能使表達的細胞死亡。因此，在過去有兩種方法製作去掉棕色脂肪組織的小鼠，第一種方法為 *UCP1-DTA* 轉基因小鼠，即 DTA 的表達會由 UCP1 啟動子驅動 (Lowell et al., 1993)。第二種方法為 UCP1-Cre 轉基因小鼠與 LSL-DTA 小鼠(The Jackson Laboratory)交配而得去掉棕色脂肪組織的小鼠(Claflin et al., 2022; Craft et al., 2019)。這隻廣為應用的 UCP1-Cre 小鼠，因轉殖基因設計的問題，會在腦部非專一的表達 Cre，而造成部分腦神經被去除而有問題。

本實驗使用以實驗室自行製作繁殖的 *UCP1-Cre* 小鼠(基因敲入(Knock-in)與 *LSL-DTA* 小鼠(The Jackson Laboratory)交配，得即全身沒有棕色脂肪的小鼠(圖 6)。在實驗組小鼠中，*Cre* 基因序列接於 UCP1 啟動子之後，又 UCP1 為在棕色脂肪專一表達的蛋白，因此擁有 *UCP1-Cre* 序列的小鼠，在所有棕色脂肪細胞皆會表達 *Cre* 序列，產生 Cre 重組酶。而 *LSL-DTA* 小鼠則擁有 *loxP-stop-loxP(LSL)* 序列，後面接入 *DTA* 序列。*DTA* 小鼠雖有 *DTA* 序列，但因前面有 *stop* 序列，因此並不會表達 *DTA*，僅在細胞擁有 Cre 重組酶時，會將 *LSL* 序列切掉，而讓細胞表達白喉毒素，讓細胞死亡。

總結來說，本實驗中，同時擁有 *UCP1-Cre* 序列與 *DTA* 序列的小鼠，因在所有棕色脂肪細胞皆會表達 Cre 重組酶，將 *LSL* 序列切掉，而讓細胞表達白喉毒素，造成該棕色脂肪細胞死亡，因此同時擁有 *UCP1-Cre* 序列與 *DTA* 序列的小鼠，全身皆無棕色脂肪細胞（之後簡稱 KO）。而僅有 *UCP1-Cre* 序列或僅有 *DTA* 序

列的小鼠，以及兩種序列皆無的小鼠，全身皆有棕色脂肪細胞，則為實驗中的對照組，即野生種小鼠（之後簡稱 WT）。



圖 5 **loxp 序列** Loxp 序列包含 Loxp 序列全長 34 個核苷酸，由兩組各 13 個核苷酸的迴文序列，中間夾著一段 8 個核苷酸的核心序列(圖片來源：鄭淵仁，2016)。

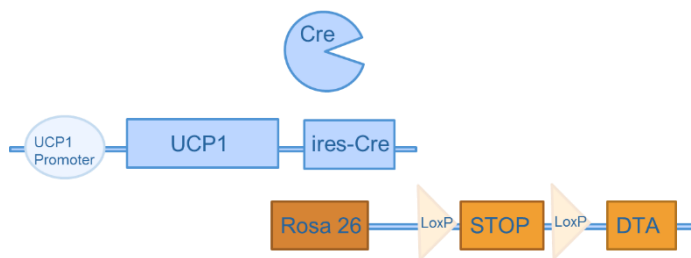


圖 6 **缺乏棕色脂肪組織小鼠模型基因序列設計** 缺乏棕色脂肪組織小鼠模型由 *UCP1-Cre* x *LSL-DTA* 而得，棕色脂肪細胞中，Cre 重組酶會辨識同向的 *loxP* 序列而將之去掉，因此在棕色脂肪中會表達 DTA，讓棕色脂肪細胞死亡，而得到自出生全身缺乏棕色脂肪細胞的小鼠模型。(圖片來源：本組自繪)

二、實驗動機

以前聽過棕色脂肪有非顫抖性產熱的功能，後來知道原來除了產熱以外，棕色脂肪還有分泌的功能，覺得很有趣、很新奇，因此想了解棕色脂肪除了對體重、血糖調控有影響外，究竟會不會對學習記憶以及其他行為表現也有影響呢？但因為過去沒有任何研究探討有關棕色脂肪組織與行為表現的影響，因此，本實驗以基因工程，將全身棕色脂肪組織去除的成鼠，與野生種成鼠進行生理與行為的比較，以探討成鼠在缺乏棕色脂肪組織時，對其生理與行為會有何影響。

三、研究目的

探討野生種成鼠與缺乏棕色脂肪組織成鼠在生理與行為方面的差異。生理方面，探討有無棕色脂肪對體重、葡萄糖耐量的影響。行為方面，包括運動能力、類焦慮行為、工作記憶、社交行為、學習與長期記憶。

貳、研究方法與過程

一、實驗材料

(一)實驗動物：

使用 C57BL/6 品系黑色小鼠(圖 7)，UCP1-Cre 小鼠自行繁殖，DTA 小鼠

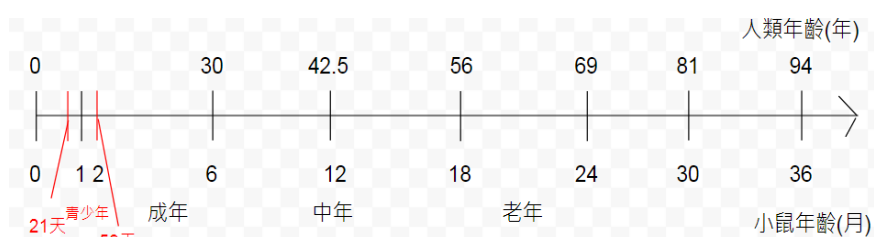


圖 8 小鼠年齡分期 (Flurkey, K., Currer, J. M., & Harrison, D. E., 2007)(圖片來源：本組自繪)

來自 The Jackson Laboratory。一共使用野生種公鼠 10 隻，母鼠 9 隻，缺乏棕色脂肪組織公鼠 12 隻，母鼠 9 隻，並且選用成鼠為實驗的測試對象(圖 8)。

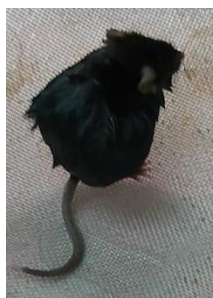


圖 7 C57BL/6 品系黑色小鼠 (圖片來源：自行拍攝)

(二)飼養方法

每個飼養籠內放置 4~5 隻同性別的 C57BL/6 小鼠，並放置在以早上 8 時開燈為日週期、傍晚 20 時關燈為夜週期，日夜週期為 12-12 小時的動物房中，平時約恆溫在 22-24 度。小鼠在飼養籠中，可以自由取用水與飼料(圖 9)(圖 10)。

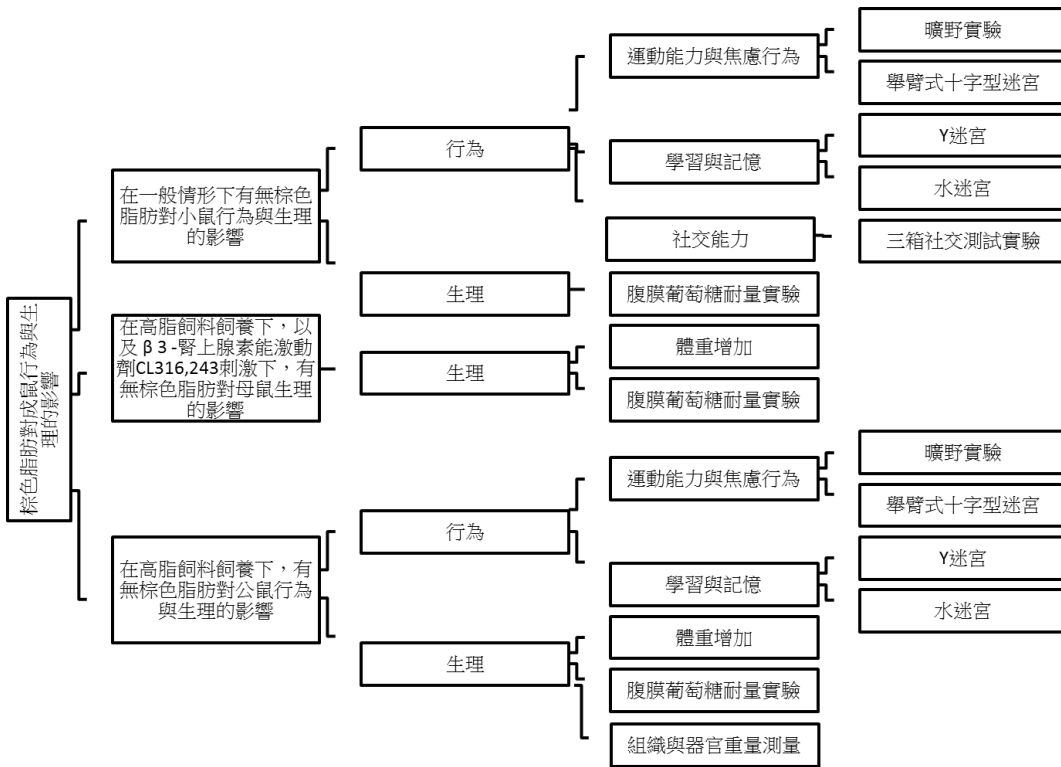


圖 9 飼養籠架 (圖片來源：自行拍攝)



圖 10 飼養籠 (圖片來源：自行拍攝)

二、實驗架構圖



三、實驗設計

在每項實驗前由不參與實驗之他人以聚合酶連鎖反應實驗與凝膠電泳進行基因型分析，詳如實驗步驟(八)。所有實驗皆以盲測進行。

(一) 在一般情形下有無棕色脂肪組織對小鼠行為與生理的影響

實驗期間自 2021 年 7 月 5 日至 2021 年 7 月 30 日，使用出生於 2021 年 5 月 20-24 日的小鼠，共使用野生種公鼠 4 隻，母鼠 3 隻，缺乏棕色脂肪組織公鼠 4 隻，母鼠 3 隻，自出生後餵養 PicoLab Diet 5058 (23%kcal from Fat)飼料。依序進行腹膜內葡萄糖耐量實驗，曠野實驗，Y 迷宮，舉臂式十字型迷宮，三箱社交行為實驗，水迷宮。

(二)在高脂飼料飼養下，以及 $\beta 3$ -腎上腺素能激動劑 CL316,243 刺激下，有無棕色脂肪組織對母鼠生理的影響

實驗期間自 2021 年 8 月 1 日至 2021 年 8 月 31 日，使用出生於 2021 年 6 月 28 日的小鼠，共使用野生種母鼠 6 隻，缺乏棕色脂肪組織母鼠 6 隻。實驗期間為盲測，自 8/1 餵養 Research Diet D12492(60% kcal from Fat)，並在每周 5 天腹膜注射藥劑，編號 1-6 小鼠施打 $\beta 3$ -腎上腺素能激動劑 CL316,243(0.1 毫克/公斤小鼠)，7-12 小鼠施打生理食鹽水。實驗期間，每周量測體重，於 8/31 進行 IGTT。

(三)在高脂飼料飼養下，有無棕色脂肪組織對公鼠行為與生理的影響

實驗期間自 2022 年 1 月 11 日至 2022 年 8 月 31 日，使用出生於 2021 年 10 月 1 日的小鼠，野生種公鼠 3 隻，缺乏棕色脂肪組織公鼠 5 隻自 11/22 餵養 Research Diet D12492(60% kcal from Fat)。出生於 2021 年 12 月 1 日的小鼠，野生種公鼠 3 隻，缺乏棕色脂肪組織公鼠 3 隻，自 1/11 餵養 Research Diet D12492(60% kcal from Fat)。實驗期間，每 2 周量測體重，依序進行腹膜內葡萄糖耐量實驗，曠野實驗，舉臂式十字型迷宮，Y 迷宮，水迷宮，最後進行組織與器官重量量測。

四、實驗步驟

(一)曠野實驗(Open Field Test, OFT)

曠野實驗(圖 11、圖 12、圖 13)是利用小鼠趨觸性(thigmotaxis)，即齧齒類動物天生有靠近周邊的傾向。對小鼠而言，中央區塊意味著威脅情境，周邊區塊則相對安全。一般小鼠在中央區塊滯留時間或進出次數，與小鼠焦慮程度呈負相關，即進入中央區塊時間越長、次數越多，小鼠焦慮程度下降。另外，透過小鼠在曠野實驗中的移動速度與距離分析，能了解小鼠的運動能力差異。

實驗步驟如下：

- 1 打開電腦錄影設定，調整攝影機。
- 2 以 75%酒精擦拭箱體內部，以消毒及消除之前測試小鼠之氣味，注意邊角。
- 3 待約 15-20 秒，酒精揮發後，將老鼠放入箱體，放置時，老鼠皆面向壁面。
- 4 錄影半小時，錄影期間應保持極度安靜，以免影響小鼠實驗。
- 5 以 ANY-Maze 進行行為分析，以 GraphPad Prism 9 進行統計分析。

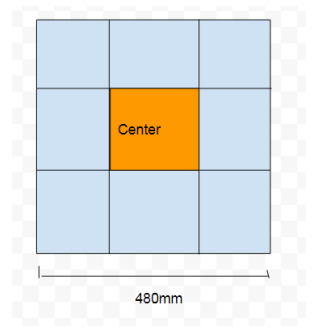


圖 11 箱體區域劃分 以 ANY-maze 分析時，會將箱體區域劃分為九等分，圖中橘色區塊為中央區塊。(圖片來源：自行繪製)



圖 12 影機架設 (圖片來源：自行拍攝)



圖 13 曠野實驗箱體 (圖片來源：自行拍攝)

(二)Y 迷宮實驗(Y-mazes)

在 Y 迷宮中，小鼠能自由移動，且小鼠傾向使用空間記憶探索未知的區域，因此會輪流進入每個跑道(圖 14、圖 15)，此種行為稱為「自發性交替行為」。透過自發性交替行為計算，能了解小鼠的工作記憶。自發性交替行為計算為： $[(\text{總交替次數}) \div (\text{全部進入次數}-2)] * 100$ 。其中小鼠進入跑道以四肢全進入為一次標準。

實驗步驟如下：

- 1 架設實驗器材，在每一跑道的末端以磁鐵貼上圖樣標示。
- 2 調整攝影機，並設定電腦錄影選項。
- 3 以 75%酒精擦拭箱體內部，以消毒及消除之前測試小鼠之氣味，注意邊角。
- 4 待約 15-20 秒，酒精揮發後，將老鼠放入 Y 迷宮中如圖，放置時，老鼠皆面向末端壁面。
- 5 錄影半小時，錄影期間應保持極度安靜，以免影響小鼠實驗。
- 6 以 ANY-Maze 進行行為分析，以 GraphPad Prism 9 進行統計分析。

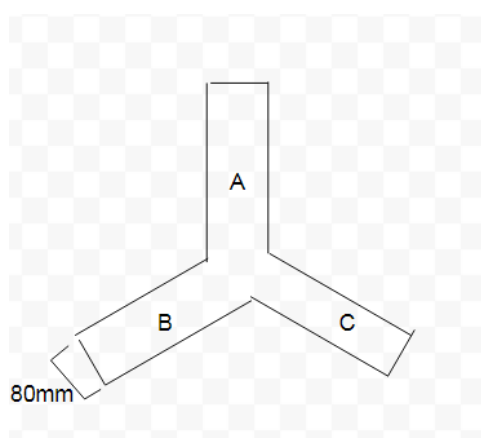


圖 14 Y 迷宮區域劃分 Y 迷宮三臂分別為三個區域。
(圖片來源：自行繪製)



圖 15 Y 迷宮與小鼠活動情形
(圖片來源：自行拍攝)

(三)舉臂式十字迷宮實驗(Elevated Plus Maze, EPM)

小鼠對未知新環境喜好探索，但又恐懼空曠而高懸的環境，舉臂式十字迷宮實驗(圖 16、圖 17)於是利用此種矛盾的特性，模擬小鼠焦慮程度。一般小鼠進入空曠的開放臂(Open Arm)時間越長、次數越多，其焦慮程度越低。

實驗步驟如下：

- 1 架設實驗器材。
- 2 調整攝影機，並設定電腦錄影選項。
- 3 以 75%酒精擦拭箱體內部，以消毒及消除之前測試小鼠之氣味，注意邊角。
- 4 待約 15-20 秒，酒精揮發後，將老鼠放入中央。
- 5 錄影 5 分鐘，錄影期間應保持極度安靜，以免影響小鼠實驗。
- 6 以 ANY-Maze 進行行為分析，以 GraphPad Prism 9 進行統計分析。

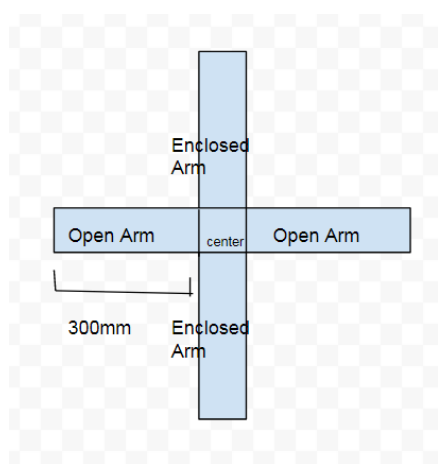


圖 16 舉臂式十字型迷宮區域劃分 (圖片來源：自行繪製)



圖 17 舉臂式十字型迷宮裝置架設

(圖片來源：自行拍攝)

(四)三箱社交測試實驗(Three Chamber Social T)

三箱社交測試實驗(圖 18、圖 19、圖 20)分為陌生小鼠(stranger mouse)訓練階段，與實驗小鼠測試階段，測試指標包

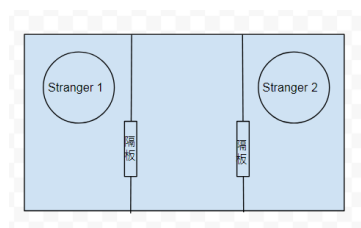


圖 18 三箱社交實驗區域劃分

(圖片來源：自行繪製)

括小鼠社交能力(sociability)與社交趨新性(social novelty)兩項。社交能力指的是正常小鼠與 Stranger 1 交流的時間和次數明顯多於空籠，社交趨新性指的是小鼠會更喜歡與陌生鼠 2 交流，而非已交流過的陌生鼠 1。陌生小鼠與實驗鼠應在測試前隔離 10 天，不能養置在同一個房間。陌生小鼠需在測試前 3-4 日，每日進行訓練，訓練時，以兩側各 10 分鐘進行。若陌生小鼠訓練時，攻擊性過強，則實驗者應將它剔除。

陌生小鼠訓練步驟如下：

- 1 架設實驗器材。
- 2 以 75%酒精擦拭鐵籠與裝置。
- 3 待約 15-20 秒，酒精揮發後，將小鼠放入鐵籠中，以重物固定鐵籠。
- 4 計時 10 分鐘，在期間，實驗者應觀察並紀錄小鼠繞圈、啃咬、攀網等攻擊性行為。
- 5 若陌生小鼠攻擊行為持續時間過久，可輕點上方蓋子提醒、制止小鼠。

實驗鼠應在測試前隔離 10 天，每隻老鼠若合籠養，則應改成單隻單籠飼養。

測試階段分為 3 階段(圖 19)，進行 10 分鐘適應，10 分鐘放置 Stranger 1，進行社交能力測試，10 分鐘再放置 Stranger 2，進行社交趨新性測試。每階段之間裝置不以酒精消毒，亦不清理糞便、尿液。而陌生小鼠性別應與實驗鼠同性別，且每隻陌生小鼠一天至多只能為兩隻實驗鼠作陌生小鼠。

測試階段步驟如下：

架設實驗器材。

- 1 調整攝影機，並設定電腦錄影選項。
- 2 以 75%酒精擦拭鐵籠與裝置，將小鼠放置於中間隔間。
- 3 錄影 10 分鐘。錄影開始時，抽掉兩邊的隔板，讓小鼠能自由穿梭於三個隔間。
- 4 10 分鐘後，將小鼠趕到中間隔間，並插回隔板。
- 5 在左邊隔間的鐵籠中，放入 Stranger 1。
- 6 錄影 10 分鐘。錄影開始時，抽掉兩邊的隔板，讓小鼠能自由穿梭於三個隔間。
- 7 10 分鐘後，將小鼠趕到中間隔間，並插回隔板。
- 8 在右邊隔間的鐵籠中，放入 Stranger 2。
- 9 錄影 10 分鐘。錄影開始時，抽掉兩邊的隔板，讓小鼠能自由穿梭於三個隔間。
- 10 10 分鐘後，將小鼠趕到中間隔間，並插回隔板。
- 11 將實驗鼠與陌生鼠放回飼養箱後，以 75%酒精擦拭鐵籠與裝置。
- 12 以 ANY-Maze 進行行為分析，以 GraphPad Prism 9 進行統計分析。

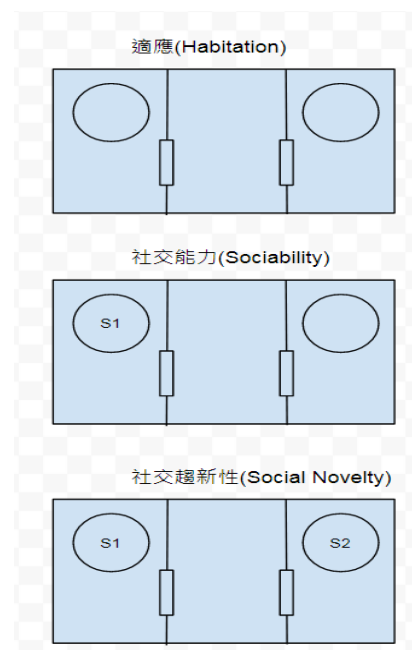


圖 19 三項社交實驗流程 (圖片來源：自行繪製)



圖 20 三箱社交實驗裝置與陌生鼠 (圖片來源：自行拍攝)

(五)水迷宮實驗(Water Maze)

水迷宮實驗共持續五天。前四天進行隱藏平台學習實驗(hidden-platform acquisition training)，測量小鼠學習與記憶。第五天進行空間探索實驗(probe trial testing)，以及視力測驗(visual test)，其中空間探索實驗測試小鼠記憶保持力，而視力測試則為確認小鼠在水迷宮測試中能看見貼在水缸四周的標示。

在實驗前，需將水缸注水至較透明平台約高 0.5 至 1 公分處，並加入 100 公克高脂奶粉，以沉水馬達將奶粉與水均勻混合，以讓水體混濁。以強力磁鐵在水缸四周貼上圖卡標示，將水缸分為四大區域(quadrant, Q)(圖 21)。實驗時，會將布簾拉上(圖 24)，結束時，將小鼠以網子撈起(圖 26)，並以紅外線照暖燈維持動物體溫(圖 25)。實驗期間，每隔 2 至 3 天需要洗缸一次，洗缸時，需加入漂白水清潔，並以掃把刷洗水缸。

隱藏平台獲得實驗為期四天(圖 23)，每天進行四次訓練。訓練時，依順序放置於不同區間(表 1)，最後將每隻老鼠每日四回測試結果取平均值。

訓練步驟如下：

- 1 打開攝影機與電腦，進行電腦設定。設定電腦追蹤老鼠，由放置小鼠後 1 秒開始，60 秒結束，或小鼠站於平台 3 秒結束錄影。
- 2 黑色阻光布簾拉上。
- 3 錄影開始，將小鼠由圖卡下方面壁放入水上。
- 4 紀錄小鼠抵達平台的時間。若小鼠 60 秒仍未到平台，則以網子引導小鼠至平台。

5 至平台後，應再將布簾拉上，讓小鼠在平台上 30 秒適應。此種停留時適應，能避免水中高度緊張的小鼠，再度跳回水中，以確保實驗的成功。

將小鼠由平台以網子撈起，放回飼養箱中，並以紅外線燈照小鼠，以防動物低體溫。

空間探索實驗在實驗第五天進行。實驗時，將透明平台移除。以電腦追蹤小鼠在 Q2 停留的時間與進出次數。在 Q2 停留時間越長，進出次數越多，表示小鼠記憶保持越好。

實驗步驟如下：

- 1 打開攝影機與電腦，進行電腦設定。設定電腦錄影 60 秒，由偵測到小鼠 1 秒後計起。
- 2 黑色阻光布簾拉上。
- 3 錄影開始，將小鼠由 Q4 圖卡下方面壁放入水上。
- 4 60 秒到時，將小鼠以網子撈起。放回飼養箱中，並以紅外線燈照小鼠，以防動物低體溫。
- 5 紀錄小鼠在 Q2 停留的時間與進出次數
- 6 以 TopScan 進行行為分析，以 GraphPad Prism 9 進行統計分析。

視力測驗(圖 22)亦在實驗第五天，空間探索實驗結束後進行。實驗時，要在水缸正中央擺放紅色平台。以電腦追蹤紀錄小鼠在水中的平均泳速，以及抵達平台的時間。若小鼠 60 秒內無回到平台，則引導小鼠至平台，停留 30 秒，再

撈起讓小鼠休息 20 分鐘後，讓小鼠再測試一次。若小鼠共測試三次，仍未能上平台，則紀錄逃脫時間為 60 秒。

表 1 隱藏平台獲得實驗訓練區間 共訓練四天，每天訓練四次，每次訓練會從不同水缸不同等分區間放入小鼠

天次	第一次訓練	第二次訓練	第三次訓練	第四次訓練
第一天	Q1	Q4	Q3	Q1
第二天	Q4	Q3	Q1	Q4
第三天	Q3	Q1	Q4	Q3
第四天	Q1	Q4	Q3	Q4

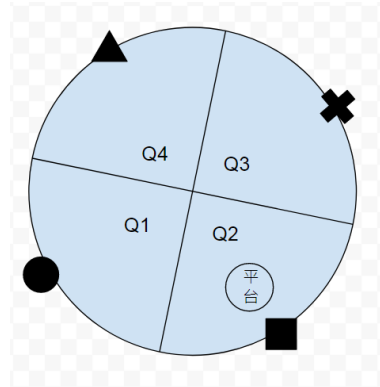


圖 21 水迷宮區域劃分 (圖片來源：自行繪製)

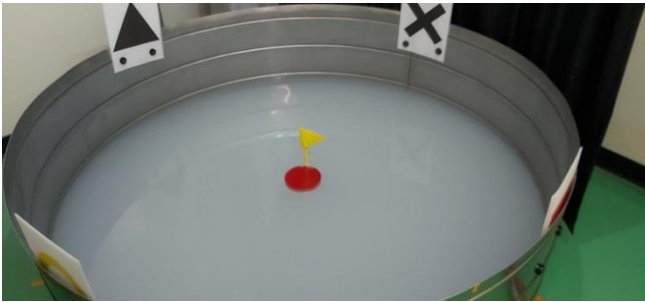


圖 22 水迷宮視力測試裝置 (圖片來源：自行拍攝)

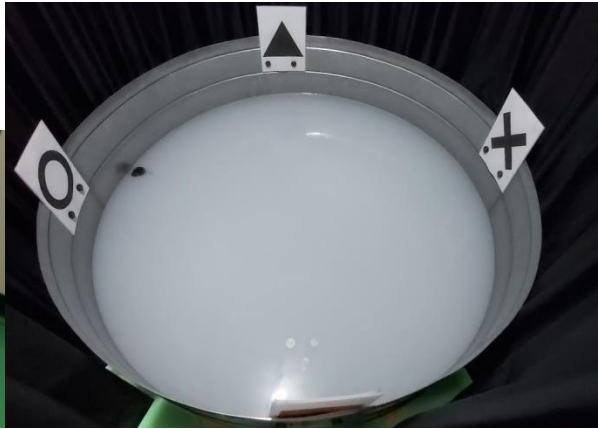


圖 23 水迷宮隱藏平台獲得實驗 (圖片來源：自行拍攝)



圖 24 阻光布簾 (圖片來源：自行拍攝)

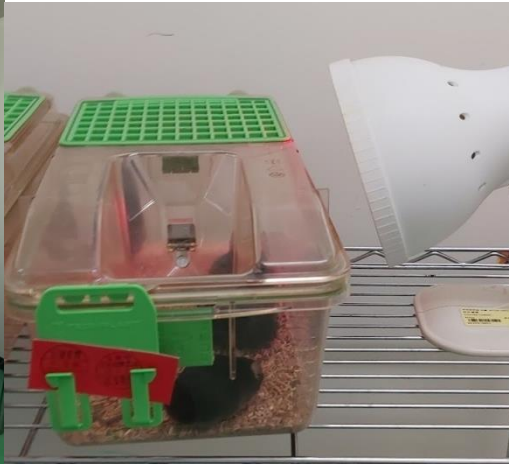


圖 25 紅外線照暖燈 (圖片來源：自行拍攝)



圖 26 以網子將小鼠由水中撈起 (圖片來源：自行拍攝)

(六) 體重測量

將老鼠放入容器，當小鼠四腳著地靜止時，記錄體重。

步驟如下：

- 1 體重機打開，放上容器，歸零。

將老鼠放入容器，當小鼠四腳著地靜止時，記錄體重。

(七) 腹膜內葡萄糖耐量實驗 (intraperitoneal glucose tolerance test, IGTT or ipGTT)

小鼠是夜間活動的動物，並且每日總食物攝入量的三分之二是在一夜之間消耗的，因此隔夜禁食會引發分解代謝狀態(Dinger, K. et al, 2018)。腹膜內葡萄糖耐量實驗是將小鼠隔夜禁食 14-18 小時後，在小鼠腹腔注射葡萄糖液(1.5 公克葡萄糖/公斤小鼠)，以血糖機(圖 27)測量小鼠 0、15、30、60、120 分鐘之血糖。此試驗用於測量小鼠細胞在攝入一定量的葡萄糖後，吸收葡萄糖的能力，也能間接說明胰島素的分泌和胰島素的作用。因此，GTT 已成為用於糖尿病和肥胖小鼠模型的最廣泛使用的生理測試之一(Ayala JE, et al, 2010)。



圖 27 血糖機 (圖片來源：自行拍攝)

實驗步驟如下：

- 1 量小鼠體重並記錄。
- 2 葡萄糖水配製：秤重 1.5 公克葡萄糖，至離心管，以吸量管加入 10 毫升生理實驗水，再以振盪器(vortex)震動均勻。
- 3 在小鼠尾巴以刀片畫一刀(勿太深)，以血糖機測小鼠血糖並記錄於 0 分鐘。每隻小鼠間，刀片要消毒。
- 4 在小鼠腹腔以胰島素筆針(insulin pen)注射葡萄糖液(1.5 公克葡萄糖/公斤小鼠)，並測量小鼠 15、30、45、60、120 分鐘之血糖。

(八)基因型分型-聚合酶連鎖反應實驗(Polymerase chain reaction, PCR)與瓊膠電泳分析

小鼠的基因型分析是利用以 PCR 放大小鼠尾巴之基因片段，再以瓊膠電泳分析小鼠基因型，而確

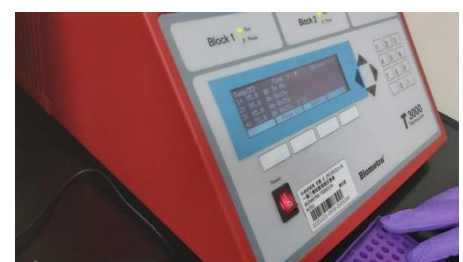


圖 28 PCR 機器 (圖片來源：自行拍攝)

定小鼠為野生型(Wild Type, WT)，還是同時具有 DTA 與 UCP1-Cre 基因的無棕色脂肪小鼠。

步驟如下：

- 1 以刀片切小鼠尾巴毫米。
- 2 準備基因體 DNA(genomic DNA, gDNA)萃取物(extraction)：在離心管內加入 1 段小鼠尾巴，2 微升 10X Express Extract Buffer，0.4 微升 KAPA Express Extract Enzyme 以破壞組織，以及 17.6 微升去離子水，共 20 微升後，以離心機離心，使混合液蓋住組織。
- 3 將盛裝基因體 DNA 萃取物的離心管於 75°C 乾浴槽(Dry Bath)保溫 30 分鐘，每 10 分鐘搖勻。
- 4 以手輕打離心管已離心，此時不用振盪器因為液體含 DNA，然後在 95°C 水浴槽(Water Bath)保溫 5 分鐘以破壞 KAPA Express Extract Enzyme。
- 5 加入 60 微升的去離子水達 1:4 比例稀釋 gDNA 濃縮物(concentration)。
- 6 製備 PCR 試劑：5 微升 2X Taq 聚合酶(從嗜熱細菌海棲熱袍菌 *Thermus aquaticus* 分離的聚合酶)、0.12 微升引子(表 2)、4.2 微升去離子水，共 9.32 微升，再離心。
- 7 將 PCR 試劑加入 gDNA 萃取物離心管，並輕打離心。
- 8 PCR 機器(圖 28)設定：95°C 3 分鐘 (1 次)，95°C 30 秒，56°C 30 秒，70°C 30 秒(重複 34 次)，72°C 3 分鐘 (1 次)。

凝膠電泳分析步驟如下：

- 1 製備 1.5%TAE，在 100 毫升 1X TAE 緩衝液，加入 1.5 公克之 agarose，以及 1 微升 EtBr，以微波爐加熱溶解，待冷卻後，將其倒入膠體製備槽中，厚度約 7.5 毫米，並立刻插入梳板。(應避免氣泡產生，且注意液面是否平整)
- 2 待膠體凝膠後，在電泳槽(圖 29)加入 TAE 緩衝液，蓋過膠體。
- 3 在最左邊的格子加入 1kb DNA ladder，在右側格中依序加入樣本 5 微升。
- 4 插入 120 福特電，負極接樣本側，正極接對側。
- 5 當染劑移動到距底部 1.5 公分處，則停止跑膠。
- 6 將凝膠放置 UV 箱照相。
- 7 若信號不清楚，則將膠體浸入稀釋的 EtBr 染劑中浸泡，進行外染後，再照一次相。

表 2 引子設計

目標序列	引子設計	引子序列	鹼基對 (base pair, bp)
DTA	DToxin_mutF (JAX#12211)	CGACCTGCAGGTCCTCG	約 650bp
	DToxin_mutR (JAX#8824)	CTCGAGTTTGTCCAATTATGTCAC	約 650bp
UCP1-Cre	UCP1Cre_F	GTT CTT GCA CTC ACG CCT CT	約 383bp
	UCP1Cre_R	GTGAAACAGCATTGCTGTCACCTT	約 383bp



圖 29 電泳槽 (圖片來源：自行拍攝)

(九)組織及器官重量測量

實驗必須於生物抽氣櫃操作，先進行斷頸確保動物進行解剖時不具知覺，後以心臟灌流將血液洗淨，最後以剪刀及鑷子取下目標組織與器官。詳細步驟如下：

1. 紀錄小鼠體重、編號、基因型。
2. 將小鼠丟入塑膠盒中，丟入沾異氟醚(Isofluran)的棉球。
3. 待數分鐘，小鼠昏迷後，取出小鼠並斷頸。
4. 將小鼠以解剖針固定於解剖板上。
5. 於腹面噴灑酒精，以剪刀沿中線剪開至心臟露出。
6. 進行心臟灌流：剪開右心耳，由左心室插針注入磷酸鹽緩衝生理鹽水(Phosphate buffered saline, PBS)，直到肝臟顏色不再變淺。
7. 以剪刀及鑷子取下腹面的 eWAT、WAT、腎、肝，背面的 iBAT、及 iBAT 旁的 WAT，放在培養皿並置於冰上。
8. 將各個組織以微量天平秤重，測量各組織占總體重百分比。

參、研究結果與討論

一、基因型分析-聚合酶連鎖反應實驗與凝膠電泳分析

在所有研究前，會先進行基因型分析，透過聚合酶連鎖反應實驗與凝膠電泳分析，得知小鼠為野生種或是同時擁有 *Cre* 序列(約 383 鹼基對)與 DTA 序列(約 650 鹼基對)的缺乏棕色脂肪組織小鼠。由電泳結果圖顯示(圖 30、圖 31)，編號 3、5、6、7、8、10、12、14 有 *UCP1-Cre* 序列，編號 4、5、6、7、8、9、10、12、

13、14 有 *DTA* 序列，因此同時有 *UCP1-Cre* 序列與 *DTA* 序列的 5-8、10、12、14 即為缺乏棕色脂肪組織小鼠，其餘之 1-4、9、11、13 則為實驗的對照組野生種。

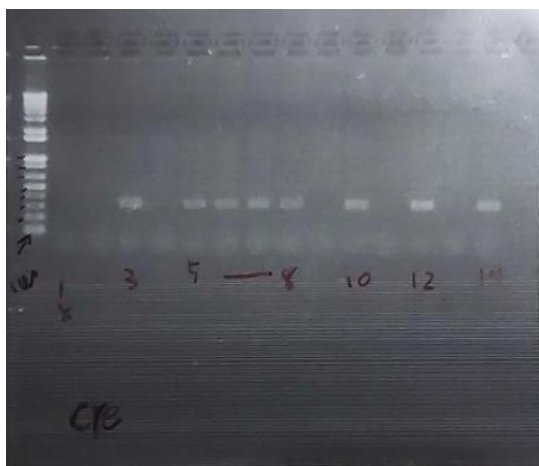


圖 30 Cre 電泳結果圖 約 383bp 處有表達 Cre 序列的小鼠為編號 3、5、6、7、8、10、12、14。(圖片來源：自行拍攝)

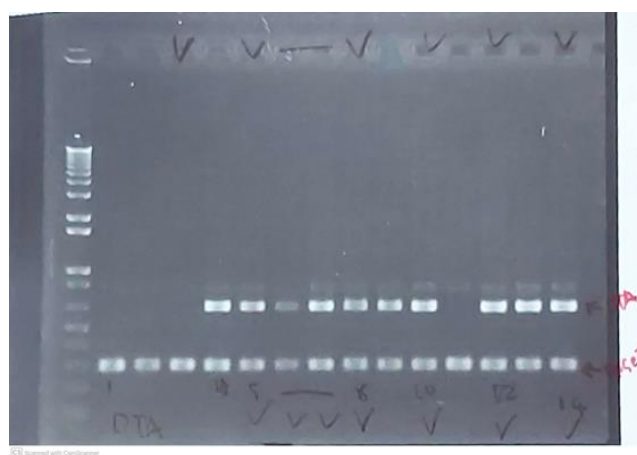


圖 31 DTA 電泳結果圖 約 650bp 處有表達 DTA 序列的小鼠為編號 4、5、6、7、8、9、10、12、13、14。

(圖片來源：自行拍攝)

二、在一般飼料飼養下有無棕色脂肪組織對小鼠行為與生理的影響

(一)行為

1.運動能力與焦慮行為

(1)曠野實驗

曠野實驗主要測試成鼠的運動能力與焦慮行為。以 ANY-Maze 追蹤分析成鼠移動的路徑、總距離，以及在中間區域進入次數以及停留時間(圖 32)。以 Mann-Whitney test 分析成鼠移動總距離差異，公鼠 $p=0.6857>0.05$ ，母鼠 $p=0.7>0.05$ ，皆無顯著差異，顯示有無棕色脂肪組織對成鼠運動能力影響不顯著。

以 Mann-Whitney test 分析成鼠進出中間區域次數，公鼠 $p>0.9999$ ，母鼠 $p>0.9999$ ，皆無顯著差異。小鼠在中間區域停留時間，公鼠 $p=0.8857>0.05$ ，母鼠

$p=0.7000>0.05$ ，皆無顯著差異，顯示有無棕色脂肪組織對成鼠焦慮行為影響不顯著。

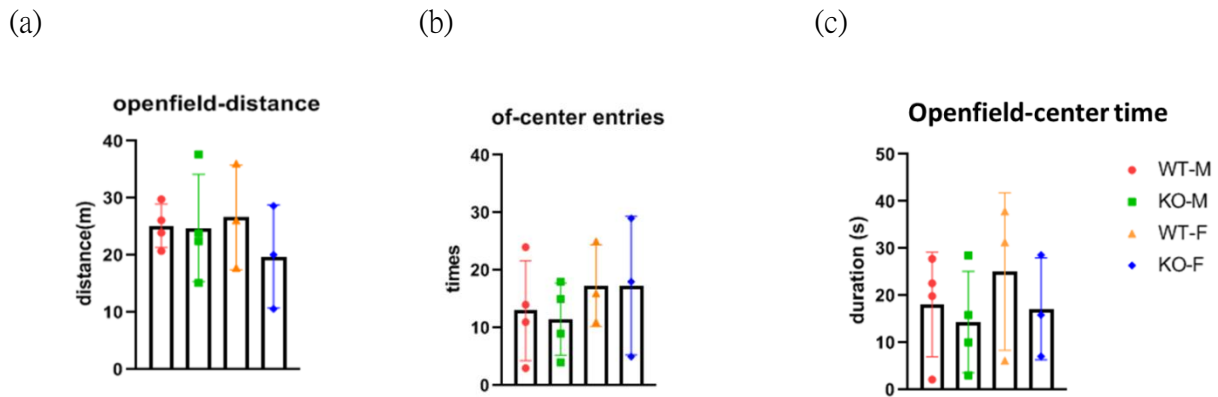


圖 32 一般飼料飼養之成年公鼠曠野實驗 圖 a、b、c 分別為一般飼料飼養公鼠移動總距離、中央區域進入次數、中央區域停留時間。圖中 WT：野生種，KO：缺乏棕色脂肪組織。M：公鼠，F：母鼠。

(2) 舉臂式十字型迷宮

以 ANY-Maze 追蹤分析成鼠移動的路徑、總距離，以及在中間區域進入次數以及停留時間(圖 33)。以 Mann-Whitney test 分析成鼠移動總距離差異，公鼠 $p=0.8857>0.05$ ，母鼠 $p=0.4000>0.05$ ，皆無顯著差異，顯示有無棕色脂肪組織對成鼠運動能力影響不顯著。

以 Mann-Whitney test 分析成鼠進出開放臂區域次數，公鼠 $p>0.9999$ ，母鼠 $p=0.8000>0.05$ ，皆無顯著差異。成鼠在開放臂區域停留時間，公鼠 $p=0.3429>0.05$ ，母鼠 $p=0.7000>0.05$ ，皆無顯著差異，顯示有無棕色脂肪組織對成鼠焦慮行為影響不顯著。

(a) (b) (c)

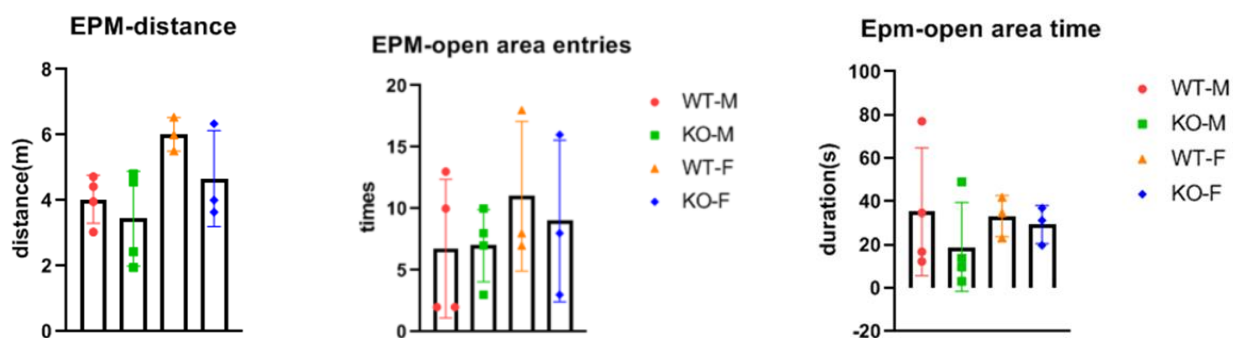


圖 33 一般飼料飼養之成年公鼠舉臂式十字型迷宮 圖 a、b、c 分別為一般飼料飼養公鼠移動總距離、開放臂進入次數、開放臂停留時間。圖中 WT：野生種，KO：缺乏棕色脂肪組織。M：公鼠，F：母鼠。

2.學習與記憶

(1)Y 迷宮

計算成鼠自發性交替行為百分比： $[(\text{總交替次數}) \div (\text{全部進入次數}-2)] * 100$ ，

一般正常成鼠自發性交替行為百分比大於 50。除編號 6 成鼠略小於 50，其餘成

鼠皆 ≥ 50 (表 3、圖 34)，因此實驗成鼠工作記憶能力

皆大致正常。以 Mann-Whitney test 分析成鼠自發性

交替行為百分比，公鼠 $p=0.8857 > 0.05$ ，母鼠 $p > 0.9999$ ，

皆無顯著差異，顯示有無棕色脂肪組織對成鼠工作

記憶能力影響不顯著。

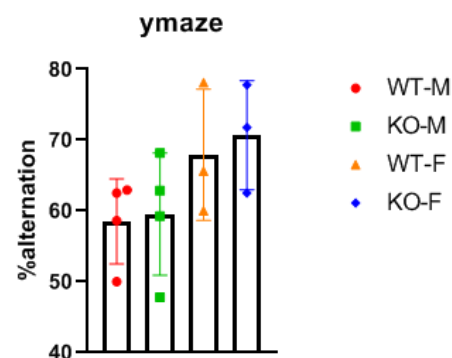


圖 34 一般情形下成鼠 Y 迷宮移動自發性交替行為百分比 圖中 WT：野生種，KO：缺乏棕色脂肪組織，M：公鼠，F：母鼠

表 3 一般情形下成鼠 Y 迷宮移動自發性交替行為百分比

鼠編號.基因型-性別	1.WT-M	2.WT-M	3.WT-M	4.WT-M	5.KO-M	6.KO-M	7.KO-M
%alternation	62.96	58.62	50	62.5	59.26	47.83	68.18
鼠編號.基因型-性別	8.KO-M	9.WT-F	10.KO-F	11.WT-F	12.KO-F	13.WT-F	14.KO-F

%alternation	62.86	60	71.79	78.13	77.78	65.63	62.5
--------------	-------	----	-------	-------	-------	-------	------

(2)水迷宮

前四天的隱藏平台學習實驗，成鼠隨訓練天數增加，逃脫時間則越短(圖 35(a))。以 2way ANOVA 分析成鼠逃脫時間，公鼠而言， $F(3,18)=0.01139$ ， $p=0.9983>0.05$ ，母鼠而言， $F(3,12)=2.811$ ， $p=0.0846>0.05$ ，皆無顯著差異，顯示有無棕色脂肪組織對成鼠學習與記憶能力影響不顯著。

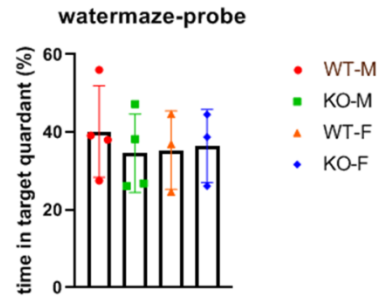
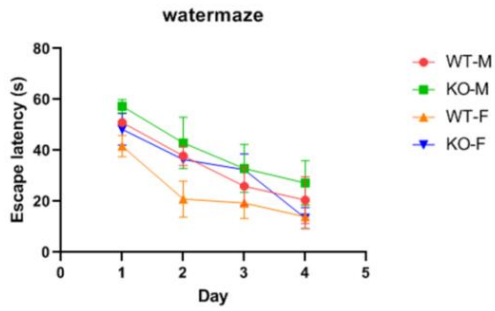
第五天的空間記憶實驗，以 Mann-Whitney test 分析成鼠在目標區域(第二區)待的時間百分比差異(圖 35(b)))，公鼠 $p=0.4857>0.05$ ，母鼠 $p>0.9999$ ，皆無顯著差異，顯示有無棕色脂肪組織對成鼠記憶保持能力影響不顯著。

第五天的視力測試，編號 2、4、6、7、8 成鼠，試驗 3 次後，皆未達平台，不符合實驗期待，計為 60 秒。以 Mann-Whitney test 分析成鼠逃脫時間差異(圖 35(c))，公鼠 $p>0.9999$ ，母鼠 $p=0.7000$ ，皆無顯著差異。

第五天視力測試，以 Mann-Whitney test 分析成鼠泳速平均值差異(圖 35(d))，公鼠 $p>0.9999$ ，母鼠 $p=0.4000>0.05$ ，顯示有無棕色脂肪組織對成鼠游泳能力影響不顯著。

(a)

(b)



(c)

(d)

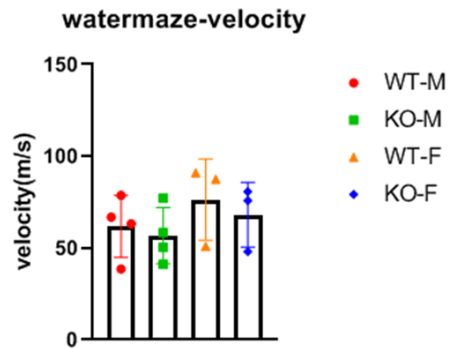
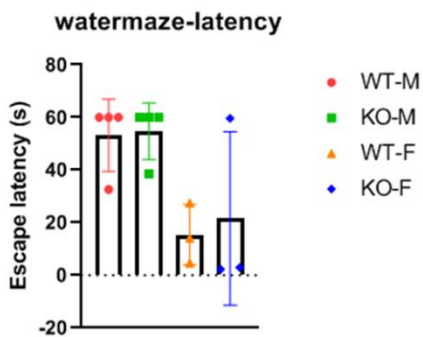


圖 35 一般飼料飼養情形下成年公鼠水迷宮 a、b、c、d 分別為一般飼料飼養之公鼠隱藏平台學習實驗逃脫時間、空間記憶實驗目標區塊停留時間占比、視力測試逃脫時間、視力測試泳速 圖中 WT：野生種，KO：缺乏棕色脂肪組織，M：公鼠，F：母鼠。

3. 社交行為

(1) 三箱社交測試實驗

以 ANY-Maze 追蹤分析成鼠於適應期間，加入陌生鼠 1，加入陌生鼠 2 時，實驗鼠待在左右兩區域的時間。

在實驗鼠適應期間，以 2way ANOVA 分析成鼠待在左右兩側的時間(圖 36)，公鼠而言， $F(1,6)=0.6486$ ， $p=0.4513>0.05$ ，母鼠而言， $F(1,4)=2.917$ ， $p=0.1629>0.05$ ，皆無顯著差異。

在陌生鼠 1 期間，小鼠在左側，即有新小鼠的區域，待的時間較右側(空籠)久。以 2way ANOVA 分析小鼠待在左右兩側的時間(圖 37)，公鼠而言， $F(1,6)=1.175$ ， $p=0.3199>0.05$ ，母鼠而言， $F(1,4)=3.755$ ， $p=0.1247>0.05$ ，皆無顯著差異，顯示有無棕色脂肪組織對小鼠社交能力影響不顯著。

在陌生鼠 2 期間，成鼠在右側，即有新鼠的區域，待的時間較左側(有熟悉鼠)久，不完全符合對成鼠天性的實驗期待。以 2way ANOVA 分析成鼠待在左右兩側的時間(圖 38)，公鼠而言，

$F(1,6)=0.105$ ， $p=0.7569>0.05$ ，母鼠而言， $F(1,4)=2.694$ ， $p=0.1761>0.05$ ，皆無顯著差異，顯示有無棕色脂肪組織對成鼠社交趨新性影響不顯著。但值得注意的是因

控制組野生鼠的社交趨新性不明顯，所以此實驗的結論還需進一步確認。

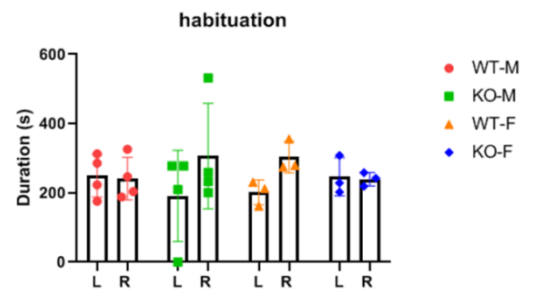


圖 36 一般情形下成鼠三箱社交行為實驗適應階段於左右區塊停留時間 圖中 WT：野生種，KO：缺乏棕色脂肪組織，M：公鼠，F：母鼠，L：左區塊，R：右區塊

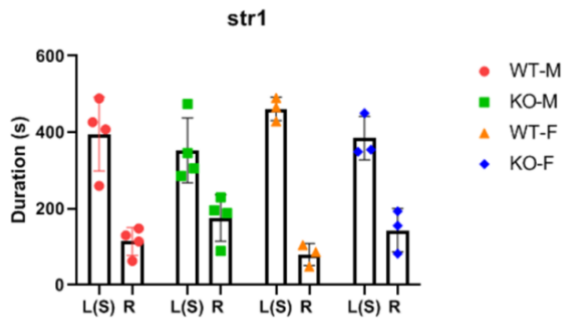


圖 37 一般情形下成鼠社交能力測試階段於左右區塊停留時間 圖中 WT: 野生種, KO: 缺乏棕色脂肪組織, M: 公鼠, F: 母鼠, L(S): 左區塊(含陌生鼠 1), R: 右區塊

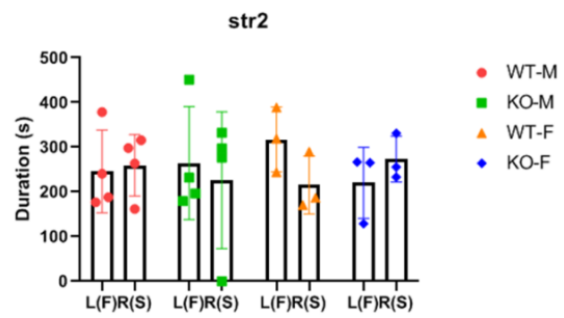


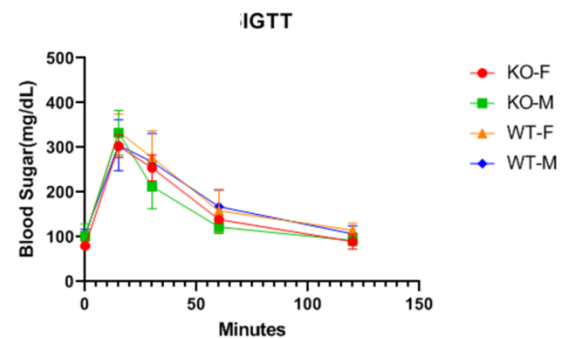
圖 38 一般情形下成鼠社交趨新性測試階段於左右區塊停留時間 圖中 WT: 野生種, KO: 缺乏棕色脂肪組織, M: 公鼠, F: 母鼠, L(F): 左區塊(含陌生鼠 1), R(S): 右區塊(含陌生鼠 2)

(二)生理

1. 腹膜內葡萄糖耐量實驗

腹膜內葡萄糖耐量實驗，測量隔夜斷食約 14

小時的成鼠，在腹腔注射葡萄糖液後，血糖的變化，以測試小鼠葡萄糖吸收能力。圖 39 顯示，成鼠血糖在未施打葡萄糖液前，血糖約為 100mg/dL，



15 分鐘時，達到約 300mg/dL 的，後逐漸下降，至 120 分鐘時，回到 100mg/dL。以 2way ANOVA 分析

圖 39 一般情形下成鼠腹膜內葡萄糖耐量實驗 圖中 WT: 野生種, KO: 缺乏棕色脂肪組織, M: 公鼠, F: 母鼠

成鼠血糖升降趨勢變化，公鼠 $F(4,24)=1.872, p=0.1481 > 0.05$ ，母鼠 $F(4,16)=0.06453, p=0.9916 > 0.05$ ，皆無顯著差異，顯示在攝入一定量的葡萄糖後，有無棕色脂肪組織對成鼠血糖升降趨勢變化影響不顯著。因此，缺乏棕色脂肪組織，並不會對一般飼料飼養的成鼠之葡萄糖吸收能力有顯著影響。

三、在 1 個月高脂飼料飼養下，以及 $\beta 3$ -腎上腺素能激動劑 CL316,243 刺激下，有無棕色脂肪組織對母鼠生理的影響。

(一)生理

1.體重增加

追蹤四周成年母鼠體重增加量(圖 40)，以 2way ANOVA 分析成年母鼠體重變化量，施打 $\beta 3$ -腎上腺素能激動劑 CL316,243 的野生種與缺乏棕色脂肪組織鼠， $F(3,12)=0.2806$ ， $p=0.8384>0.05$ ，無顯著差異，顯示在 $\beta 3$ -腎上腺素能激動劑刺激下，有無棕色脂肪對成鼠體重增加量影響不顯著。因此，對於施打 $\beta 3$ -腎上腺素能激動劑 CL316,243 的成鼠，缺乏棕色脂肪組織並不會對體重增加量有顯著影響。

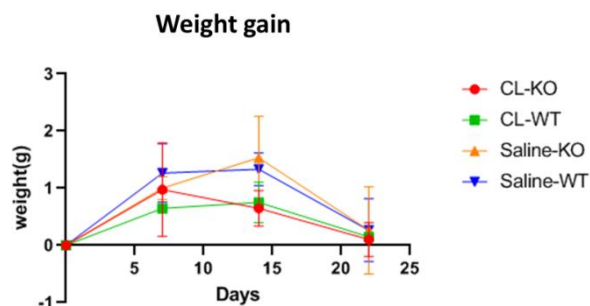


圖 40 高脂飼養情形下成年母鼠體重變化量趨勢 圖中 WT：野生種，KO：缺乏棕色脂肪組織，CL：施打 $\beta 3$ -腎上腺素能激動劑 CL316,243，Saline：施打生理食鹽水

施打生理食鹽水的野生種與缺乏棕色脂肪

組織鼠， $F(3,12)=0.3163$ ， $p=0.8134>0.05$ ，無顯著差

異，顯示有無棕色脂肪對成鼠體重增加量影響不顯著。因此，缺乏棕色脂肪組織不會對成鼠體重增加量有顯著影響。

施打 $\beta 3$ -腎上腺素能激動劑 CL316,243 與施打生理食鹽水的缺乏棕色脂肪組織鼠， $F(3,15)=1.332$ ， $p=0.3011>0.05$ ，顯示對於缺乏棕色脂肪組織成鼠，是否施打 $\beta 3$ -腎上腺素能激動劑 CL316,243 對體重增加量影響不顯著。因此，對於缺乏棕色脂肪組織的成鼠， $\beta 3$ -腎上腺素能激動劑 CL316,243 的刺激並不會對體重增加量有顯著影響。

施打 β 3-腎上腺素能激動劑 CL316,243 與施打生理食鹽水的野生種鼠， $F(3,9)=1.286$ ， $p=0.3373>0.05$ ，顯示對於野生種成鼠，是否施打 β 3-腎上腺素能激動劑 CL316,243 對體重增加量影響不顯著。因此，對於野生種成鼠， β 3-腎上腺素能激動劑 CL316,243 的刺激並不會對體重增加量有顯著影響。

2.腹膜內葡萄糖耐量實驗

腹膜內葡萄糖耐量實驗，測量隔夜斷食約 14 小時的成鼠，在腹腔注射葡萄糖液後，血糖的變化，以測試小鼠葡萄糖吸收能力。圖 41 顯示，成鼠血糖在未施打葡萄糖液前，血糖約為 100mg/dL。以 2way ANOVA 分析成鼠血糖升降趨勢變化，施打 β 3-腎上腺素能激動劑 CL316,243 的野生種與缺乏棕色脂肪組織鼠， $F(4,16)=6.044$ ， $p=0.0037<0.05$ ，有顯著差異，顯示對於施打 β 3-腎上腺素能激動劑 CL316,243 的成鼠，有無棕色脂肪對成鼠血糖升降變化趨勢影響不顯著。因此，在 β 3-腎上腺素能激動劑刺激下，推測缺乏棕色脂肪組織不會對葡萄糖吸收能力有顯著影響。

施打生理食鹽水的野生種與缺乏棕色脂肪組織鼠， $F(4,16)=4.698$ ， $p=0.0106<0.05$ ，有顯著差異，顯示有無棕色脂肪對成鼠血糖升降變化趨勢影響顯著。因此，推測缺乏棕色脂肪組織可能升高成年母鼠葡萄糖吸收能力。

施打 β 3-腎上腺素能激動劑 CL316,243 與施打生理食鹽水的缺乏棕色脂肪組織鼠， $F(4,20)=17.90$ ， $p<0.0001$ ，顯示對於缺乏棕色脂肪組織成鼠，是否施打 β 3-腎上腺素能激動劑 CL316,243 對血糖升降變化趨勢影響顯著。因此，對於缺乏

棕色脂肪組織的成年母鼠，推測 $\beta 3$ -腎上腺素能激動劑 CL316,243 的刺激可能降低葡萄糖吸收能力。

施打 $\beta 3$ -腎上腺素能激動劑 CL316,243 與施打生理食鹽水的野生種鼠， $F(4,12)=2.671$ ， $p=0.0839>0.05$ ，顯示對於野生種成鼠，是否施打 $\beta 3$ -腎上腺素能激動劑 CL316,243 對血糖升降變化趨勢影響不顯著。因此，對於野生種成鼠， $\beta 3$ -腎上腺素能激動劑 CL316,243 的刺激並不會對葡萄糖吸收能力有顯著影響。

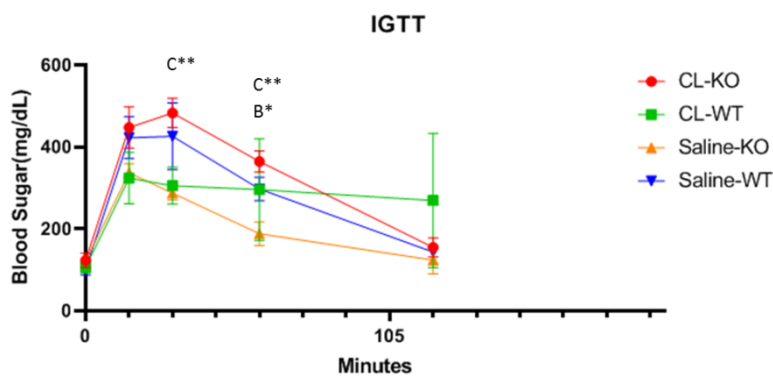


圖 41 高脂飼養情形下成年母鼠腹膜內葡萄糖耐量實驗 圖中 WT：野生種，KO：缺乏棕色脂肪組織，CL：施打 $\beta 3$ -腎上腺素能激動劑 CL316,243，Saline：施打生理食鹽水，B：Saline-KO 和 Saline-WT 比較有顯著差異，C：CL-KO 和 Saline-KO 比較有顯著差異

四、在 3 個月高脂飼料飼養下(出生後約 1 個月開始飼養 HFD)，有無棕色脂肪組織對公鼠行為與生理的影響

(一)行為

1.運動能力與焦慮行為

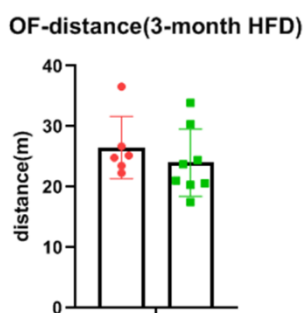
(1)曠野實驗

以 ANY-Maze 追蹤分析成鼠移動的路徑、總距離，以及在中間區域進入次數以及停留時間。

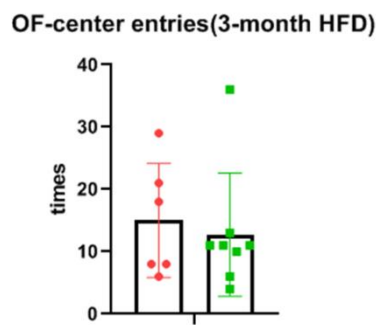
對於飼養 3 個月高脂飼料(HFD)之成鼠：以 Mann-Whitney test 分析成鼠移動總距離差異(圖 42(a))，公鼠 $p=0.2284>0.05$ ，無顯著差異，顯示在高脂飼料飼養下，有無棕色脂肪組織對公鼠運動能力影響不顯著。分析成鼠進出中間區域次數(圖 42(b))，公鼠 $p=0.7786>0.05$ ，無顯著差異。成鼠在中間區域停留時間(圖 42(c))，公鼠 $p=0.4908>0.05$ ，無顯著差異，顯示在 3 個月高脂飼料飼養下，有無棕色脂肪組織對公鼠焦慮行為影響不顯著。

對於飼養 6 個月高脂飼料(HFD)之成鼠：以 Mann-Whitney test 分析成鼠移動總距離差異(圖 42(d)、圖 43)，公鼠 $p=0.0426<0.05$ ，有顯著差異，顯示在高脂飼料飼養下，有無棕色脂肪組織對公鼠運動能力有顯著影響：缺乏棕色脂肪組織之公鼠於 10 分鐘實驗期間內，移動總距離較低，代表其運動能力可能較差。分析成鼠進出中間區域次數(圖 42(e))，公鼠 $p=0.0123<0.05$ ，有顯著差異。在中間區域停留時間(圖 42(f))，公鼠 $p=0.0286<0.05$ ，有顯著差異，顯示在高脂飼料飼養下，有無棕色脂肪組織對公鼠焦慮行為有顯著影響：缺乏棕色脂肪組織之公鼠，進入中間區域次數較少，停留時間較短，代表其焦慮程度可能較高。

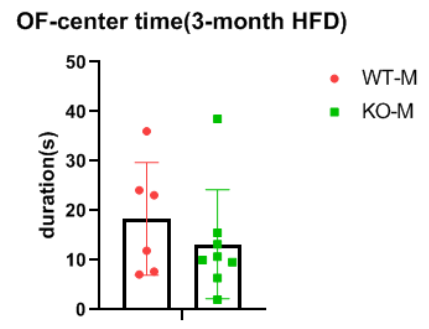
(a)



(b)



(c)



(d)

(e)

(f)

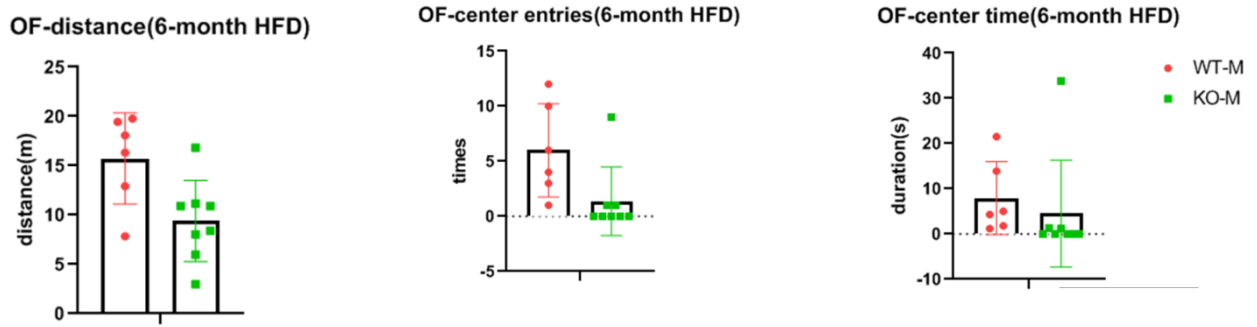
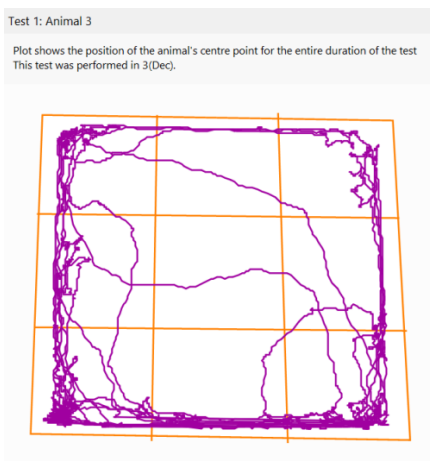


圖 42 高脂飼養情形下成年公鼠曠野實驗 圖 a、b、c 分別為 3 個月高脂飼料飼養公鼠移動總距離、中央區域進入次數、中央區域停留時間。圖 d、e、f 分別為 6 個月高脂飼料飼養公鼠移動總距離、中央區域進入次數、中央區域停留時間。圖中 WT：野生種，KO：缺乏棕色脂肪組織。

(a)



(b)

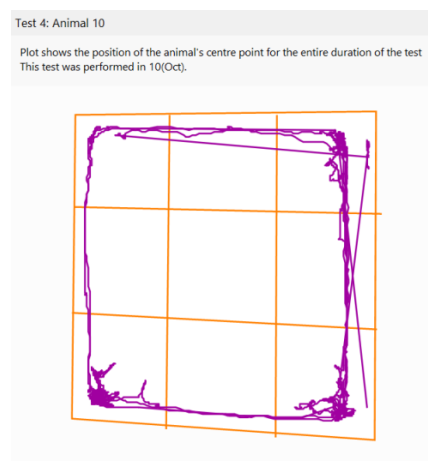


圖 43 高脂飼養情形下成年公鼠曠野實驗軌跡圖 圖 a 為 6 個月高脂飼料飼養之野生種公鼠，於曠野實驗正方箱體內的移動軌跡，圖 b 則為缺乏棕色脂肪組織之公鼠於曠野實驗正方箱體內的移動軌跡。

(2) 舉臂式十字型迷宮

對於飼養 3 個月高脂飼料(HFD)之成鼠：以 Mann-Whitney test 分析成鼠移動總距離差異(圖 44(a))，公鼠 $p=0.0813>0.05$ ，無顯著差異，顯示在高脂飼料飼養下，有無棕色脂肪組織對公鼠運動能力影響不顯著。成鼠進出開放臂區域次數(圖 44(b))，公鼠 $p=0.1059>0.05$ ，無顯著差異，成鼠在開放臂區域停留時間(圖 44(c))，

公鼠 $p=0.2284>0.05$ ，無顯著差異，缺乏棕色脂肪之公鼠進入開放臂次數較野生種低，顯示缺乏棕色脂肪組織對公鼠的焦慮程度無顯著影響。

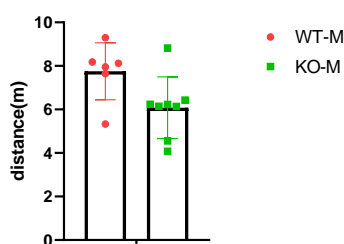
對於飼養 6 個月高脂飼料(HFD)之成鼠：以 Mann-Whitney test 分析成鼠移動總距離差異(圖 44(d))，公鼠 $p=0.3929>0.05$ ，無顯著差異，顯示在高脂飼料飼養下，有無棕色脂肪組織對公鼠運動能力影響不顯著。成鼠在開放臂區域停留時間(圖 44(e))，公鼠 $p=0.9497>0.05$ ，無顯著差異，成鼠進出開放臂區域次數(圖 44(f))，公鼠 $p=0.9704>0.05$ ，無顯著差異，缺乏棕色脂肪之公鼠進入開放臂次數與野生種近似，顯示缺乏棕色脂肪組織對公鼠的焦慮程度無顯著影響。值得注意的是，長期吃高脂飼料影響野生公鼠的表現較大，造成在吃了 6 個月後與缺乏棕色脂肪組織公鼠的表現無異。若老鼠隻數足夠，下次應同時加入吃一般飼料的對照組。

(a)

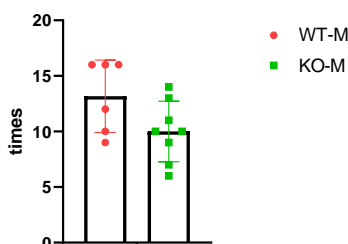
(b)

(c)

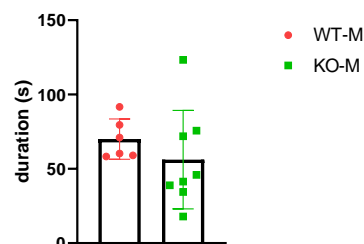
EPM-distance(3-month HFD)



EPM-open arm entries(3-month HFD)



EPM-open arm time(3-month HFD)



(d)

(e)

(f)

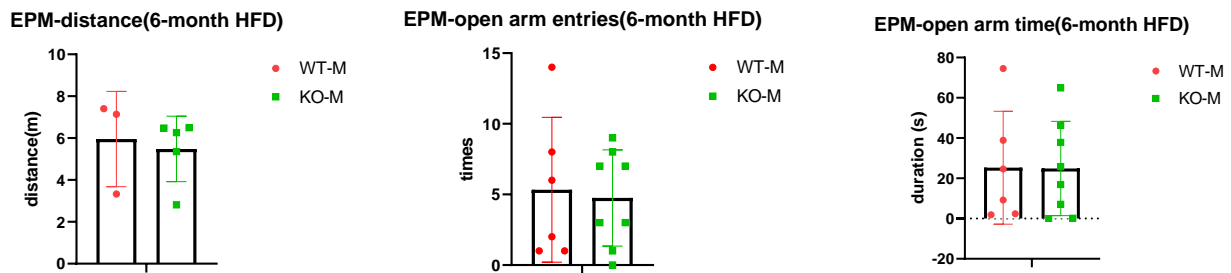


圖 44 高脂飼養情形下成年公鼠舉臂式十字型迷宮圖 a、b、c 分別為 3 個月高脂飼料飼養公鼠移動總距離、開放臂區域停留時間、開放臂區域進入次數。圖 d、e、f 分別為 6 個月高脂飼料飼養公鼠移動總距離、開放臂區域停留時間、開放臂區域進入次數。圖中 WT：野生種，KO：缺乏棕色脂肪組織。

(1)Y 迷宮

計算成鼠自發性交替行為百分比： $[(\text{總交替次數}) \div (\text{全部進入次數}-2)] * 100$ 。

對於以飼養 3 個月高脂飼料(HFD)之成鼠：以 Mann-Whitney test 分析成鼠自發性交替行為百分比(圖 45(a))，公鼠 $p=0.2284 > 0.05$ ，無顯著差異，顯示有無棕色脂肪組織對成年公鼠工作記憶能力影響不顯著。

對於以飼養 6 個月高脂飼料(HFD)之成鼠：以 Mann-Whitney test 分析成鼠自發性交替行為百分比(圖 45(b))，公鼠 $p=0.85185$ ，無顯著差異，顯示有無棕色脂肪組織對成年公鼠的工作記憶能力影響不顯著。

(a)

(b)

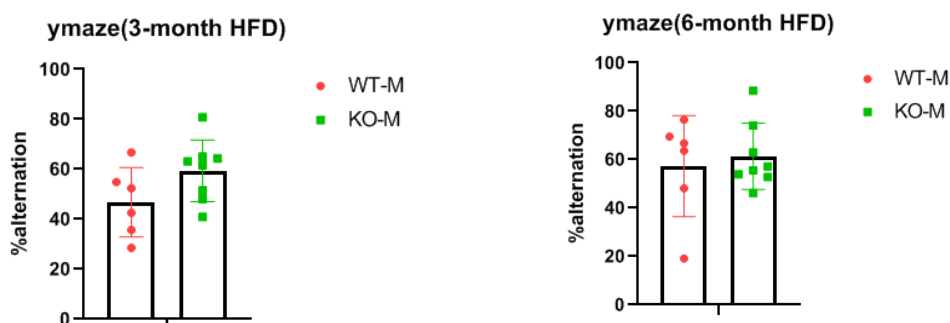


圖 45 高脂飼養情形下成年公鼠自發性交替行為百分比 圖 a、b、c 分別為 3 個月與 6 個月高脂飼料飼養公鼠之自發性交替行為百分比。圖中 WT：野生種，KO：缺乏棕色脂肪組織。

(2)水迷宮

對於 3 個月高脂飼料飼養之公鼠：

前四天的隱藏平台學習實驗，成鼠隨天數增加，逃脫時間長越短。以 2way ANOVA 分析成鼠逃脫時間(圖 46(a))，公鼠而言， $F(3,18)=0.4642$ ， $p=0.7108>0.05$ ，無顯著差異，顯示有無棕色脂肪組織對成鼠學習與記憶能力影響不顯著。

第五天的空間記憶實驗(圖 46(b))，以 Mann-Whitney test 分析成鼠在目標區域(第二區)待的時間百分比差異，公鼠 $p=0.25>0.05$ ，無顯著差異，顯示有無棕色脂肪組織對成年公鼠記憶保持能力影響不顯著。

視力測試中，所有成鼠皆達到平台。以 Mann-Whitney test 分析成鼠逃脫時間差異(圖 46(c))，公鼠 $p=0.7857>0.05$ ，無顯著差異。

第五天視力測試，以 Mann-Whitney test 分析成鼠泳速平均值差異(圖 46(d))，公鼠 $p=0.3929>0.05$ ，有顯著差異，顯示有無棕色脂肪組織對成鼠游泳能力影響不顯著。

對於 6 個月高脂飼料飼養之公鼠：

前四天的隱藏平台學習實驗，成鼠隨天數增加，逃脫時間長越短。以 2way ANOVA 分析成鼠逃脫時間(圖 47(a))，公鼠而言， $F(3,12)=0.4642$ ， $p=0.1029>0.05$ ，無顯著差異，顯示有無棕色脂肪組織對成鼠學習與記憶能力影響不顯著。

第五天的空間記憶實驗(圖 47(b))，以 Mann-Whitney test 分析成鼠在目標區域(第二區)待的時間百分比差異，公鼠 $p>0.9999$ ，無顯著差異，顯示有無棕色脂肪組織對成年公鼠記憶保持能力影響不顯著。

視力測試中，所有成鼠皆達到平台。以 Mann-Whitney test 分析成鼠逃脫時間差異(圖 47(c))，公鼠 $p=0.1000>0.05$ ，無顯著差異。

第五天視力測試，以 Mann-Whitney test 分析成鼠泳速平均值差異(圖 47(d))，公鼠 $p=0.7000>0.05$ ，有顯著差異，顯示有無棕色脂肪組織對成鼠游泳能力影響不顯著。

對於 8 個月高脂飼料飼養之公鼠：

前四天的隱藏平台學習實驗，成鼠隨天數增加，逃脫時間長越短。以 2way ANOVA 分析成鼠逃脫時間(圖 48(a))，公鼠而言， $F(3,15)=0.3267$ ， $p=0.8061>0.05$ ，無顯著差異，顯示有無棕色脂肪組織對成鼠學習與記憶能力影響不顯著。

第五天的空間記憶實驗(圖 48(b))，以 Mann-Whitney test 分析成鼠在目標區域(第二區)待的時間百分比差異，公鼠 $p=0.0571>0.05$ ，無顯著差異，顯示有無棕色脂肪組織對成年公鼠記憶保持能力影響不顯著。

視力測試中，所有成鼠皆達到平台。以 Mann-Whitney test 分析成鼠逃脫時間差異(圖 48(c))，公鼠 $p=0.2286>0.05$ ，無顯著差異。

第五天視力測試，以 Mann-Whitney test 分析成鼠泳速平均值差異(圖 48(d))，公鼠 $p>0.9999$ ，有顯著差異，顯示有無棕色脂肪組織對成鼠游泳能力影響不顯著。

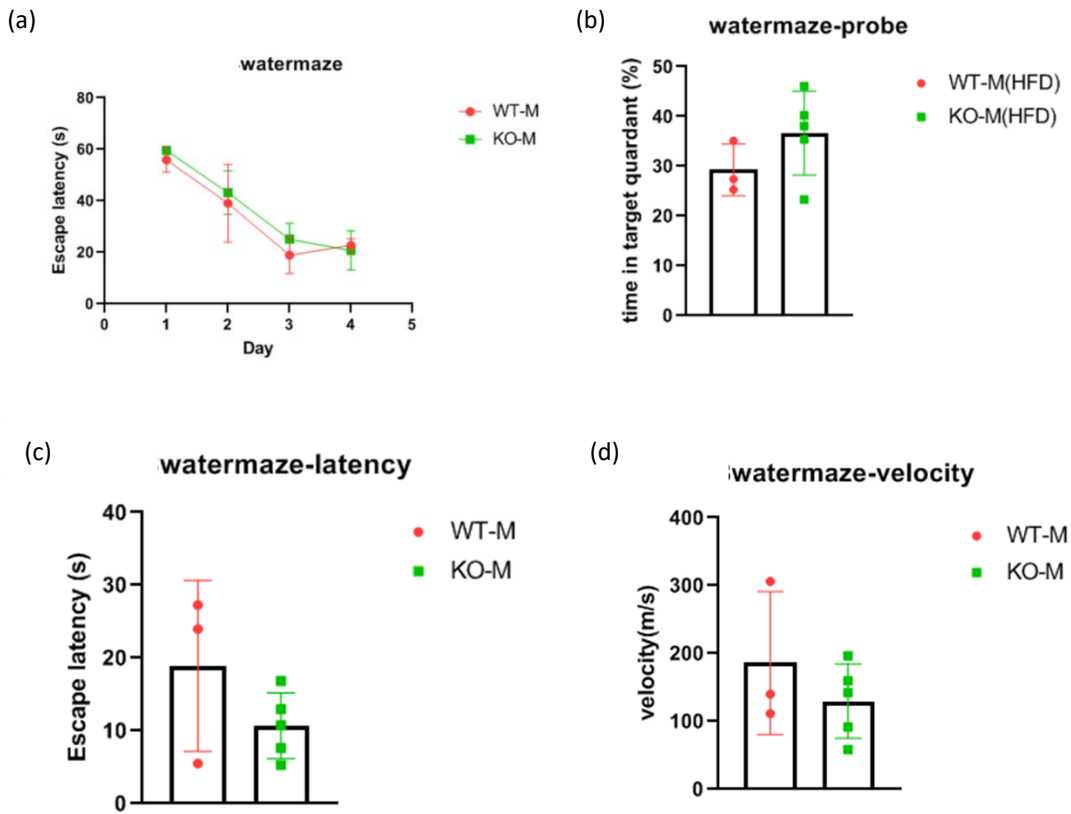
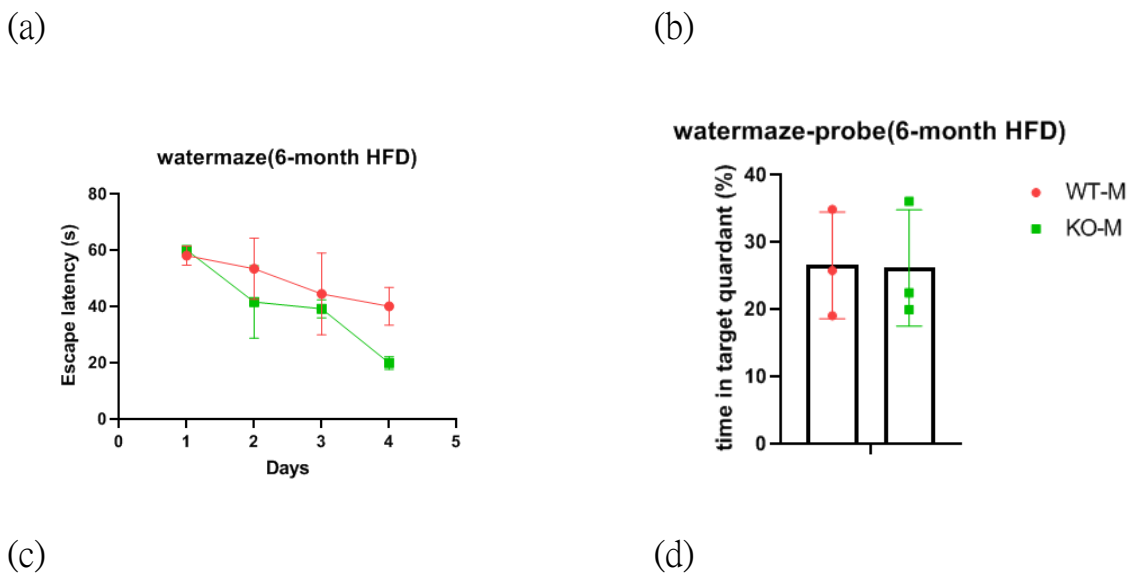
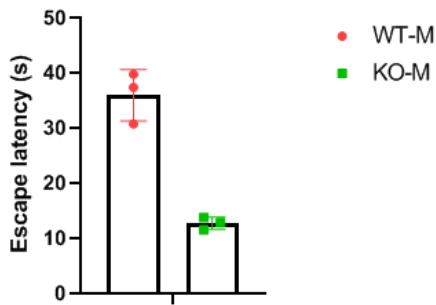


圖 46 三個月高脂飼養情形下成年公鼠水迷宮 a、b、c、d 分別為三個月高脂飼料飼養之公鼠隱藏平台學習實驗逃脫時間、空間記憶實驗目標區塊停留時間占比、視力測試逃脫時間、視力測試泳速 圖中 WT：野生種，KO：缺乏棕色脂肪組織，M：公鼠。



watermaze-visual test(6-month HFD)



watermaze-velocity(6-month HFD)

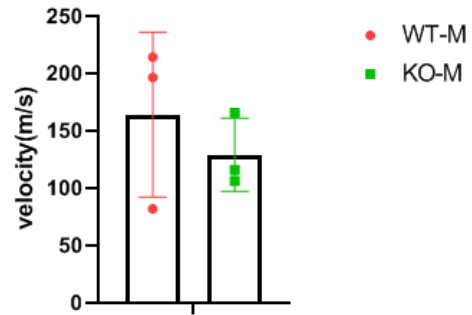
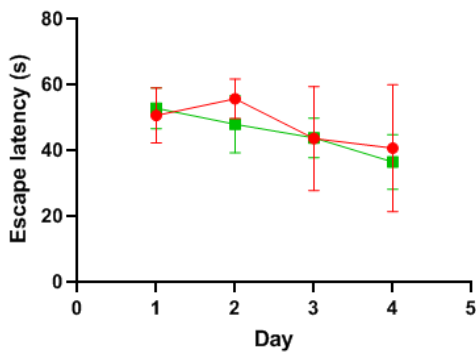


圖 47 六個月高脂飼養情形下成年公鼠水迷宮 a、b、c、d 分別為六個月高脂飼料飼養之公鼠隱藏平台學習實驗逃脫時間、空間記憶實驗目標區塊停留時間占比、視力測試逃脫時間、視力測試泳速 圖中 WT：野生種，KO：缺乏棕色脂肪組織，M：公鼠。

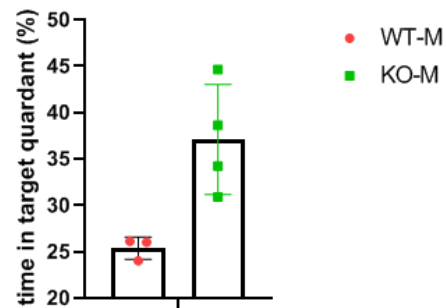
(a)

(b)

watermaze(8-month HFD)



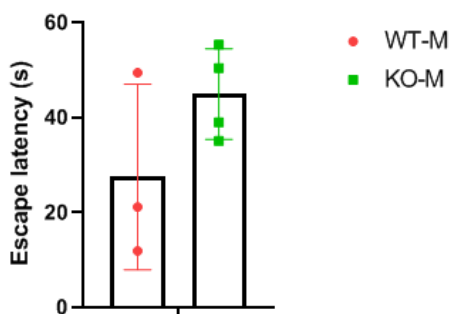
watermaze-probe(8-month HFD)



(c)

(d)

watermaze-visual test(8-month HFD)



watermaze-velocity(8-month HFD)

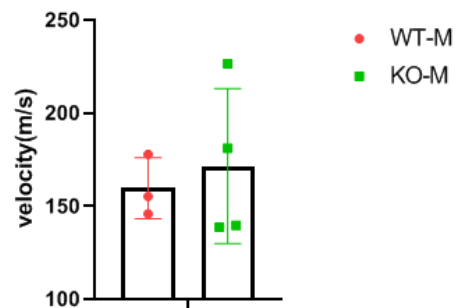
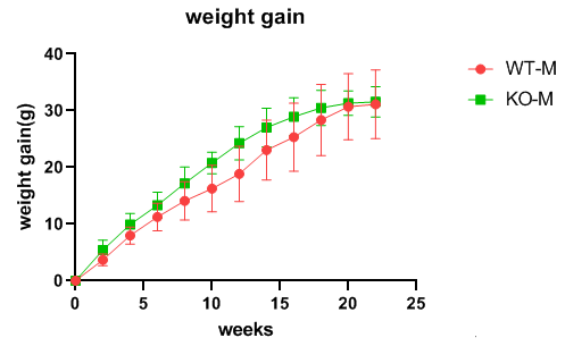


圖 48 八個月高脂飼養情形下成年公鼠水迷宮 a、b、c、d 分別為八個月高脂飼料飼養之公鼠隱藏平台學習實驗逃脫時間、空間記憶實驗目標區塊停留時間占比、視力測試逃脫時間、視力測試泳速 圖中 WT：野生種，KO：缺乏棕色脂肪組織，M：公鼠。

(二)生理

1.體重增加

追蹤以高脂飼料飼養開始，共 22 周成年公鼠體重增加量，期間每兩周測量



1 次。以 2way ANOVA 分析成年公鼠體重變化量(圖 49), $F(11,132)=2.031$,

圖 49 高脂飼養情形下成年公鼠體重增加量 追蹤以高脂飼料飼養開始，共 22 周成年公鼠體重增加量，期間每兩周測量 1 次。WT:野生種，KO：缺乏棕色脂肪組織，M：公鼠。

$p=0.0301<0.05$ ，有顯著差異，顯示在高脂飼料飼養下，缺乏棕色脂肪對成鼠體重增加趨勢影響顯著。

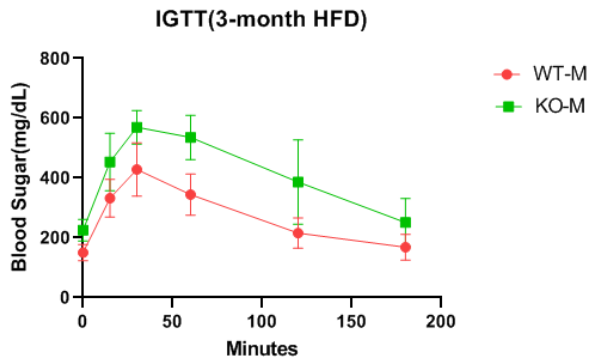
2.腹膜內葡萄糖耐量實驗

腹膜內葡萄糖耐量實驗，測量隔夜斷食約 14 小時的成鼠，在腹腔注射葡萄糖液後，血糖的變化，以測試小鼠葡萄糖吸收能力。

對於 3 個月高脂飼料飼養之公鼠，注射 1g/kg 老鼠之葡萄糖液，以 2way ANOVA 分析血糖上升曲線 $F(5,60)=2.131$ ， $P=0.0739>0.05$ ，無顯著差異。但圖 50(a) 顯示，缺乏棕色脂肪組織成年公鼠，血糖上升幅度較野生種公鼠大，代表其葡萄糖吸收能力可能較差。

對於 6 個月高脂飼料飼養之公鼠，注射 0.8g/kg 老鼠之葡萄糖液，以 2way ANOVA 分析血糖上升曲線(圖 50(b))， $F(4,44)=0.4575$ ， $P=0.7664>0.05$ ，無顯著差異，顯示以高脂飼料飼養 6 月後，有無棕色脂肪組織對於公鼠葡萄糖吸收能力無顯著影響。

(a)



(b)

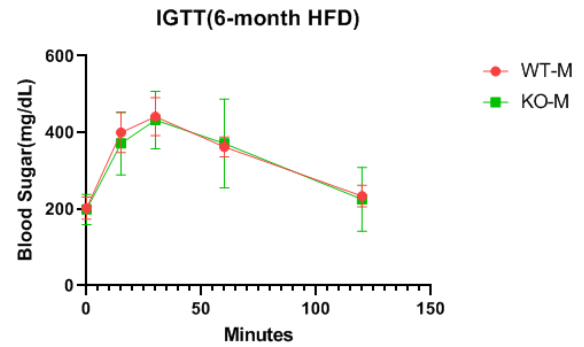


圖 50 高脂飼養情形下成年公鼠腹膜內葡萄糖耐量實驗 (a)為 3 個月飼料飼養之公鼠，施打 1g/kg 老鼠葡萄糖液後，血糖之變化，超過機器限制 600mg/dL 以 600 計。(b)為 6 個月飼料飼養之公鼠，施打 0.8g/kg 老鼠葡萄糖液後，血糖之變化。圖中 WT：野生種，KO：缺乏棕色脂肪組織，M：公鼠。

3. 組織及器官重量測量

測量高脂飼料飼養之成年公鼠的體重後，取出其白色脂肪、腎臟、肝臟，以微量天平秤重，計算各組織或器官佔體重之百分比。

對於 7 個月高脂飼料飼養之成年公鼠，以 Mann-Whitney test 分析算各組織或器官對體重佔比(圖 51(a))：eWAT 佔比， $P=0.2000>0.05$ ，無顯著差異；iWAT 佔比， $P=0.7000>0.05$ ，無顯著差異；肝臟重量佔比， $P>0.9999$ ，無顯著差異；腎臟重量佔比， $P>0.9999$ ，無顯著差異。UCP1-Cre x DTA 老鼠缺乏 iBAT，野生種則具有。

對於 9 個月高脂飼料飼養之成年公鼠，以 Mann-Whitney test 分析算各組織或器官對體重佔比(圖 51(b))：eWAT 佔比， $P=0.6286>0.05$ ，無顯著差異；iWAT 佔比， $P=0.0571>0.05$ ，無顯著差異；腎臟重量佔比， $P=0.4000>0.05$ ，無顯著差異；

肝臟重量佔比， $P=0.8571>0.05$ ，無顯著差異。UCP1-Cre x DTA 老鼠缺乏 iBAT，野生種則具有。

(a)

(b)

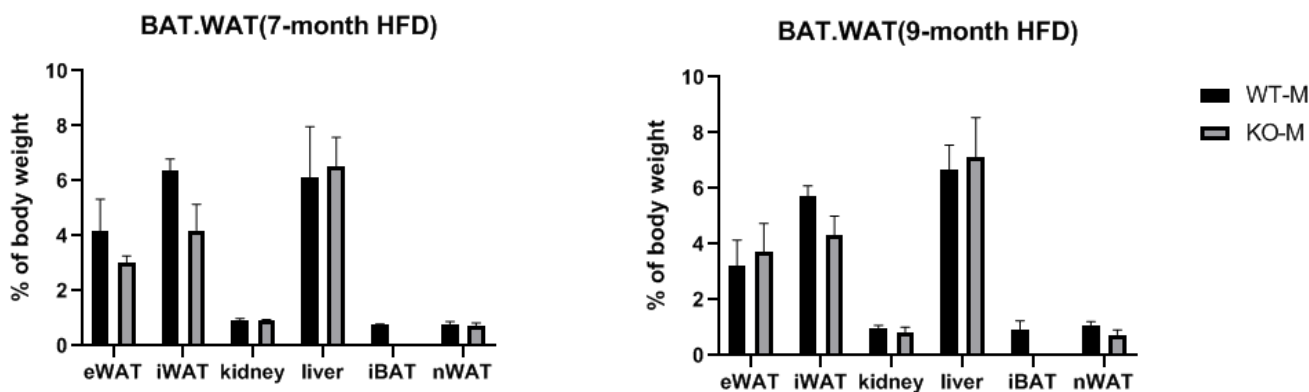


圖 51 高脂飼養情形下成年公鼠各組織或器官佔體重之百分比 eWAT 為連接副睪的白色脂肪，iWAT 左右大腿皮下的腹股溝白色脂肪組織，iBAT 為肩胛骨間棕色脂肪組織，kidney 為腎臟，liver 為肝臟，nWAT 代指 iBAT 下方的 WAT。圖中 WT：野生種，KO：缺乏棕色脂肪組織，M：公鼠。

五、實驗討論

對於自出生一個月後以高脂飼料飼養 6 個月的公鼠，從曠野實驗，缺乏棕色脂肪組織成鼠移動總距離較短、中間區域進入次數與時間較短可以推論，缺乏棕色脂肪組織之成年運動能力可能較差，焦慮程度可能較高。由 Y 迷宮與水迷宮實驗結果中可以推論，缺乏棕色脂肪組織不會對成年公鼠工作記憶、學習能力與記憶保持力有顯著影響。

對於自出生一個月後以高脂飼料飼養 3 個月的公鼠，在舉臂式十字形迷宮實驗結果推論缺乏棕色脂肪組織可能升高公鼠的焦慮程度。由 Y 迷宮與水迷宮實驗結果中可以推論，缺乏棕色脂肪組織不會對 3 個月高脂飼料飼養之成年公鼠的工作記憶、學習能力與記憶保持力有顯著影響。

在一般飼料飼養下，由曠野實驗與舉臂式十字型迷宮實驗結果推論，缺乏棕色脂肪組織不會對 2 個月大成鼠運動能力與焦慮行為有顯著影響；由三箱社交行為實驗結果推論，缺乏棕色脂肪組織不會對成鼠社交能力、社交趨新性有顯著影響；由 Y 迷宮與水迷宮實驗結果中可以推論，缺乏棕色脂肪組織不會對一般飼料飼養之成年公鼠的工作記憶、學習能力與記憶保持力有顯著影響。

追蹤以高脂飼料飼養開始，共 22 周成年公鼠體重增加量，推測缺乏棕色脂肪組織可能造成成鼠體重增加量大。而對於在高脂飼料飼養下的成年母鼠，追蹤四周成年母鼠體重增加量，對於施打 $\beta 3$ -腎上腺素能激動劑 CL316,243 或施打生理食鹽水的成年母鼠，缺乏棕色脂肪組織並不會對體重增加量有顯著影響；對於野生種或缺乏棕色脂肪的成年母鼠， $\beta 3$ -腎上腺素能激動劑 CL316,243 的刺激皆不會對體重增加量有顯著影響。

由腹膜內葡萄糖耐量實驗發現，在一般飼料飼養下，缺乏棕色脂肪組織，並不會對成鼠的葡萄糖吸收能力有顯著影響。對於 3 個月高脂飼料飼養之公鼠，缺乏棕色脂肪組織成年公鼠葡萄糖吸收能力可能較差。然而，對於 6 個月高脂飼料飼養之公鼠，有無棕色脂肪組織對於公鼠葡萄糖吸收能力可能無顯著影響。

另外，對 1 個月高脂飼料與 $\beta 3$ -腎上腺素能激動劑刺激的成年母鼠， $\beta 3$ -腎上腺素能激動劑 CL316,243 的刺激會讓缺乏棕色脂肪組織的成年母鼠，葡萄糖吸收能力降低，擁有棕色脂肪組織可能降低葡萄糖吸收能力。但 $\beta 3$ -腎上腺素能激動劑 CL316,243 的刺激對野生種成年母鼠的葡萄糖吸收能力無顯著影響。

由曠野實驗結果可以推論，對於 6 個月高脂飼料飼養之公鼠，缺乏棕色脂肪組織可能降低成年公鼠運動能力，升高焦慮程度，但對於體重增加量、葡萄糖吸收能力沒有顯著影響。因此，在 6 個月高脂飼料刺激下，棕色脂肪組織對於成年公鼠運動能力、焦慮行為的影響，可能為體重及血糖以外的影響因素造成，即可能是棕色脂肪組織分泌的神經調節因子，通過血腦屏障(blood - brain barrier, BBB)進入腦袋影響小鼠運動能力、焦慮行為，亦有可能是棕色脂肪組織分泌的化學因子，影響未知的其他代謝活動造成。

最近研究指出，高脂飲食可能影響腸道菌相(intestinal microbiota)，進而影響壓力調適。高脂飼料會引起代謝混亂，透過抑制單磷酸腺苷活化蛋白質激酶(AMP activated protein kinase, AMPK)磷酸化和促進雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin, mTOR)磷酸化，活化膠質細胞和星形膠質細胞，神經炎症增加，降低自噬和腦源性神經營養因子(Brain-derived neurotrophic factor, BDNF)水平，進而使從而導緻小鼠出現抑鬱和焦慮行為(Luo et al., 2018, Li et al., 2022)。然而，高脂飼料同時也會增加棕色脂肪組織上的解偶聯蛋白 1(UCP-1)產熱，可能同時刺激棕色脂肪組織分泌內分泌調節因子，使腸道菌相改變，因而降低小鼠焦慮程度。

由腹膜內葡萄糖耐量實驗結果發現，發現缺乏棕色脂肪組織可能升高成年母鼠葡萄糖吸收能力，但過去的研究指出，棕色脂肪組織能幫助小鼠葡萄糖穩定(Li et al., 2021)，而且在本實驗中，亦發現對 3 個月高脂飼料飼養下的公鼠，棕色脂肪組織也具有穩定葡萄糖的效果，因此推測，可能是母鼠的生理狀況，包含月經週期或其他代謝，影響實驗結果。另外，對於缺乏棕色脂肪組織的成年

母鼠，發現 β 3-腎上腺素能激動劑 CL316,243 的刺激可能降低葡萄糖吸收能力，但對野生種母鼠的葡萄糖吸收能力則無顯著影響。然而，過去的研究指出，CL316,243 能協助降低小鼠血糖(MacPherson, Castellani, Beaudoin, & Wright, 2014)，推測可能是使用的小鼠性別不同，而造成生理條件不同導致。

比較 3 個月與 6 個月高脂飲食的成年公鼠的生理資料，發現在經歷 3 個月高脂飲食的成年公鼠，缺乏棕色脂肪組織會造成體重增加量較大，葡萄糖吸收能力較差，但在經歷共 6 個月高脂飲食後，缺乏棕色脂肪組織的公鼠與野生種公鼠在體重增加與葡萄糖吸收能力方面，皆無顯著差異，推測可能棕色脂肪組織對於體重、血糖的調節，有一定限度，當體重及吃的高脂量超過特定值之後，棕色脂肪組織便無法對成年公鼠的生理環境有顯著的影響。

未來可以增設一般飼料對照組，了解不同年齡段，缺乏棕色脂肪組織對成年公鼠行為、生理的影響。另外，可以一般飼料飼養公鼠，並以 CL316243 或冷刺激，了解一般體重情形下，缺乏棕色脂肪組織對成年公鼠行為、生理的影響

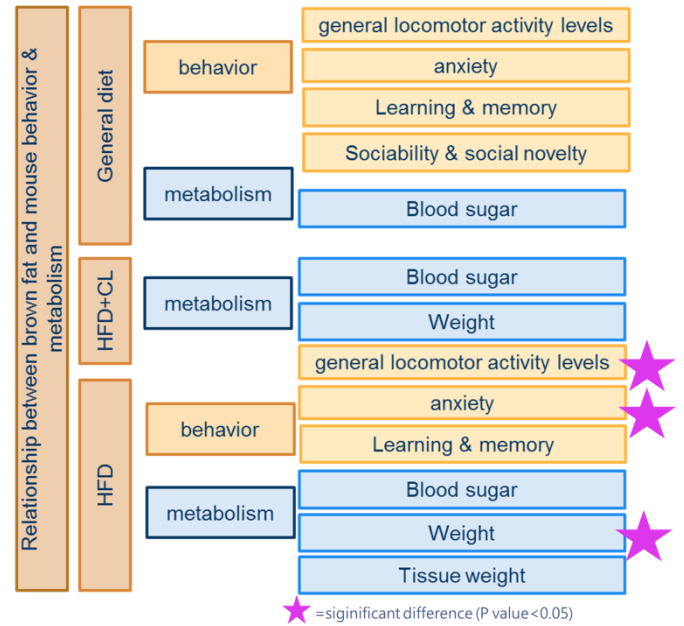
肆、結論與應用

- 1 本實驗利用同時具有 UCP1-Cre 與 LSL-DTA 序列，缺乏棕色脂肪組織的成鼠，了解一般飼料、高脂飼料加上 β 3-腎上腺素能激動劑刺激、與高脂飼料等不同飼養條件下，棕色脂肪組織對於成鼠行為與生理的影響。
- 2 對於自出生一個月後以高脂飼料飼養 6 個月的公鼠，缺乏棕色脂肪組織可能使成年公鼠運動能力可能較差，焦慮程度可能較高，對工作記憶、學習能力與記憶保持力則無顯著影響。

3 對於自出生一個月後以高脂飼料飼養 3 個月的公鼠，缺乏棕色脂肪組織可能升高公鼠的焦慮程度，對運動能力、工作記憶、學習能力與記憶保持力則無顯著影響。

4 在一般飼料飼養下，缺乏棕色脂肪組織不會對 2 個月大成鼠運動能力、焦慮行為、社交能力、社交趨新性工作記憶、學習能力與記憶保持力有顯著影響。

5 經歷 3 個月高脂飲食的成年公鼠，缺乏棕色脂肪組織會造成體重增加量較大，葡萄糖吸收能力較差，但在經歷共 6 個月高脂飲食後，缺乏棕色脂肪組織的公鼠與野生種公鼠在體重增加與葡萄糖吸收能力方面，皆無顯著差異。



6 未來可繼續深入研究棕色脂肪組織調節小鼠焦慮行為的機轉，進而拓展相關保健藥品的研發。

圖 52 研究結論 圖中顯示各分項實驗所作結果，末端標示星號顯示該結果有顯著差異，及 P 值小於 0.05。(圖片來源：自行繪製)

伍、參考文獻

1. 李愛萍，趙慧，李韶，樸花，孫長凱(2005)。不同鼠種在 Morris 水迷宮學習記憶行為中的種屬差異。中國行為醫學科學 第 14 卷第 1 期。
2. 鄭淵仁(2016)。幫基因裝上一個開關—後基因標的時代關鍵工具：Cre 重組酶與 loxP 序列。科學月刊，561，<http://scimonth.blogspot.com/2016/08/creloxp.html>

3. Lowell, B. B., S-Susulic, V., Hamann, A., Lawitts, J. A., Himms-Hagen, J., Boyer, B. B., Kozak, L. P., & Flier, J. S. (1993). Development of obesity in transgenic mice after genetic ablation of brown adipose tissue. *Nature*, *366*(6457), 740 – 742. <https://doi.org/10.1038/366740a0>.
4. 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). <https://doi.org/10.1016/B978-012369454-6/50074-1>
5. Ayala, J. E., Samuel, V. T., Morton, G. J., Obici, S., Croniger, C. M., Shulman, G. I., Wasserman, D. H., McGuinness, O. P., & NIH Mouse Metabolic Phenotyping Center Consortium (2010). Standard operating procedures for describing and performing metabolic tests of glucose homeostasis in mice. *Disease models & mechanisms*, *3*(9-10), 525 – 534. <https://doi.org/10.1242/dmm.006239>.
6. Liu, X., Zheng, Z., Zhu, X., Meng, M., Li, L., Shen, Y., Chi, Q., Wang, D., Zhang, Z., Li, C., Li, Y., Xue, Y., Speakman, J. R., & Jin, W. (2013). Brown adipose tissue transplantation improves whole-body energy metabolism. *Cell research*, *23*(6), 851 – 854. <https://doi.org/10.1038/cr.2013.64>.
7. XinmiaoRen1TingZhanga1XiaoliGongbGuanzhengHuaWeiDingcXiaominWangab(2013). AAV2-mediated striatum delivery of human CDNF prevents the deterioration of midbrain dopamine neurons in a 6-hydroxydopamine induced parkinsonian rat model. *Experimental Neurology* Volume 248, October 2013, Pages 148-156

8. MacPherson, R. E., Castellani, L., Beaudoin, M., & Wright, D. C. (2014). Evidence for fatty acids mediating CL 316,243-induced reductions in blood glucose in mice. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 307(7). doi:10.1152/ajpendo.00287.2014
9. Villarroya, F., Cereijo, R., Villarroya, J., & Giralt, M. (2016). Brown adipose tissue as a secretory organ. *Nature Reviews Endocrinology*, 13(1), 26-35. doi:10.1038/nrendo.2016.136
10. Blanca Paramo, Sean Wyatt, and Alun M. Davies(2018). An essential role for neuregulin-4 in the growth and elaboration of developing neocortical pyramidal dendrites. *Exp Neurol*, 302 : 85-92
11. Dinger, K., Mohr, J., Vohlen, C., Hirani, D., Hucklenbruch-Rother, E., Ensenaer, R., Dötsch, J., & Alejandro Alcazar, M. A. (2018). Intraperitoneal Glucose Tolerance Test, Measurement of Lung Function, and Fixation of the Lung to Study the Impact of Obesity and Impaired Metabolism on Pulmonary Outcomes. *Journal of visualized experiments : JoVE*, (133), 56685. <https://doi.org/10.3791/56685>
12. KERT MÄTLIK etal(2018). Poststroke delivery of MANF promotes functional recovery in rats. *SCIENCE ADVANCES* • 23 May 2018 • Vol 4, Issue 5 • DOI: 10.1126/sciadv.aap8957

13. Luo, Y., Zeng, B., Zeng, L., Du, X., Li, B., Huo, R., . . . Xie, P. (2018). Gut microbiota regulates mouse behaviors through glucocorticoid receptor pathway genes in the hippocampus. *Translational Psychiatry*, 8(1). doi:10.1038/s41398-018-0240-5
14. Zhang, F., Hao, G., Shao, M., Nham, K., An, Y., Wang, Q., Zhu, Y., Kusminski, C. M., Hassan, G., Gupta, R. K., Zhai, Q., Sun, X., Scherer, P. E., & Oz, O. K. (2018). An Adipose Tissue Atlas: An Image-Guided Identification of Human-like BAT and Beige Depots in Rodents. *Cell metabolism*, 27(1), 252 – 262.e3. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2017.12.004>
15. Lu, Yuan (2019). Brown Adipose Tissue Energy Metabolism. *Cellular Metabolism and Related Disorders. IntechOpen.* ,
16. Craft, C. S., Robles, H., Lorenz, M. R., Hilker, E. D., Magee, K. L., Andersen, T. L., Cawthorn, W. P., MacDougald, O. A., Harris, C. A., & Scheller, E. L. (2019). Bone marrow adipose tissue does not express UCP1 during development or adrenergic-induced remodeling. *Scientific reports*, 9(1), 17427. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-54036-x>.
17. Li, M., Li, L., Li, B., Hambly, C., Wang, G., Wu, Y., Speakman, J. R. (2021). Brown adipose tissue is the key depot for glucose clearance in microbiota depleted mice. *Nature Communications*, 12(1). doi:10.1038/s41467-021-24659-8
18. Claflin, K. E., Flippo, K. H., Sullivan, A. I., Naber, M. C., Zhou, B., Neff, T. J., Jensen-Cody, S. O., & Potthoff, M. J. (2022). Conditional gene targeting using

UCP1-Cre mice directly targets the central nervous system beyond thermogenic adipose tissues. *Molecular metabolism*, 55, 101405.

<https://doi.org/10.1016/j.molmet.2021.10140512>.

19. Li, Y., Cheng, Y., Zhou, Y., Du, H., Zhang, C., Zhao, Z., . . . Chen, M. (2022). High fat diet-induced obesity leads to depressive and anxiety-like behaviors in mice via AMPK/mTOR-mediated autophagy. *Experimental Neurology*, 348, 113949. doi:10.1016/j.expneurol.2021.113949

【評語】 130007

1. 建議研究主題能夠更聚焦在一種行為或是神經機制上。此研究雖然分析相當多的行為測試，但是大部分在實驗組以及控制組上的比較均無明顯的統計學上差異，容易失焦。
2. 此研究以科學方法分析動物焦慮行為以及學習記憶行為。
3. 表達能力尚可，稍嫌緊張。
4. 在棕色脂肪藉由何種機制（影響何種神經系統）導致行為的變化上，並沒有提出一套可能的機制假說，尚為可惜。
5. 有很多不顯著的研究結果，建議可以探討是否與樣本數有關，或者嘗試說明不顯著的原因，未來研究有無可以改善之處。
6. 同一個行為，不同年齡或飼養狀態的比較，建議可以設計比較清楚的表格跟圖表，有助於理解。
7. 因部分生理與行為表現在一般飼料、3個月高脂飼料、6個月高脂飼料飼養下，棕色脂肪組織對生理與行為之表現各有不同實驗結果，或可嘗試更深入歸納並解釋比較其間差異
8. 較難看出研究假設的創新性