行政院國家科學委員會補助
大專學生參與專題研究計畫研究成果報告

＊ ********* ** ＊
＊ 計 畫 ： 探討動物焦慮程度之個體差異是否會影響其腦內 ERK ＊
＊ 名 稱 對 D-cycloserine 之反應性 ＊
＊ ********* ** ＊

執行計畫學生： 吳玉含
學生計畫編號： NSC 97-2815-C-040-035-H
研 究 期 間 ： 97 年 07 月 01 日至 98 年 02 月 28 日止，計 8 個月
指 導 教 授 ： 何應瑞

處理方式： 本計畫可公開查詢

執 行 單 位： 中山醫學大學醫學檢驗暨生物技術學系(所)

中華民國 98 年 03 月 24 日

行政院國家科學委員會補助

大專學生參與專題研究計畫研究成果報告

＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊

＊ 計畫名稱： 探討動物焦慮程度之個體差異是否影響其腦內 ERK D-cycloserine 之反應性 ＊

＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊

執行計畫學生：吳玉荅

學生計畫編號：NSC97－2815－C－040 －035-H

研 究 期 間 ：97 年 7 月 1 日至 98 年 2 月底止，計 8 個月

指 導 教 授 ：何應瑞

執 行 單 位：

中華民國 2009 年 03 月 10 日

目錄

(一) 摘要 3

(二) 文獻回顧探討與研究目的 4

研究目的 4

(三) 研究之材料方法及步驟 5

實驗動物 5

一般步驟 5

生化試驗 5

統計方法 7

(四) 研究結果 7

(五) 研究討論 10

(六) 文獻 10

(一) 摘要

根據文獻指出，ERK 在中樞神經系統中廣泛分布，由於 ERK 活化後的 p-ERK 調節神經功能因此 ERK 的訊息傳遞參與了動物之學習、記憶及神經的可塑性。IL-1、TNF-a 以及 IL-2 等細胞激素的釋放和參與調節神經行爲功能有關。高腳十字迷宮是常用來測定情緒行爲的工具，其中 closed arm rearing 的行爲參數，是代表大鼠的探索行爲。在生物學上，心理、神經及免疫三者會互相影響。細胞激素的釋放，可以影響神經基礎活性，再藉由神經的活性影響了情緒行爲的表現。本實驗主要目的在於探討細胞激素影響行爲表現是否和細胞訊息傳遞路徑有關。

關鍵字：中樞神經系統、ERK 、細胞激素、高腳十字迷宮

(二) 文獻回顧探討與研究目的

文獻中指出 extracellular signal-regulated kinase (ERK)在中樞神經系統中廣泛分布，由於 ERK 活化後的 p-ERK 調節神經功能(Sweatt, 2001)因此 ERK 的訊息傳遞參與動物之學習(Grinkevich et al., 2006)、記憶(Villarreal and Barea-Rodriguez, 2006)、神經的可塑性(Impey et al., 1999)及情緒行爲表現(Wu et al., 2008)。研究顯示大腦前額葉皮質(prefrontal cotex；PFC)內 ERK 訊息傳遞參與調節情緒行爲(Botreau and Gisquet-Verrier, 2006)。

細胞激素中 IL-1β、TNF-a 以及 IL-2 的釋放和參與調節神經行爲功能有相關。像高焦慮的大鼠腦部紋狀體內的 interleukin-2 (IL-2) mRNA 的表現量比低焦慮的大鼠爲高(Pawlak et al., 2003)，但這種關係在前額葉皮質正好呈現相反之趨勢(Pawlak et al., 2005)。IL-1β、TNF-a 是屬於發炎性的細胞激素，會使 ERK 產生活化(Fusello et al., 2006)。IL-1β、TNF-a 以及 IL-2 的釋放會影響到大鼠的情緒行爲表現，像焦慮行爲會受到影響(Pawlak et al., 2003)、會產生壓力(Glaser et al., 1999)等的情緒行爲在大鼠身上發現。

高腳十字迷宮試驗(elevated plus-maze test)被廣泛運用在行爲實驗中以測量大鼠之情緒行爲(Andrews and File, 1993)。研究者可以用大鼠在高腳十字迷宮測試時停留在開放臂的時間來區分其爲高焦慮或低焦慮動物，大鼠停留在開放臂時間較短者，定義爲焦慮程度較高；反之則反。當大鼠只以兩隻腳在高腳十字迷宮中站立、攀爬則紀錄爲 rearing。Rearing 在大鼠的身上代表著探索行爲的表現，也可視之爲一種情緒行爲的表現(Thiel et al., 1998)。

生物學上，心理、神經及免疫三者會互相影響。經由細胞激素的釋放，可以影響神經基礎活性，再藉由神經基礎活性的改變影響了情緒行爲的表現。根據這個原則，當細胞激素影響了大鼠的情緒行爲表現，經由 ERK 這條訊息傳遞路徑有相當大的關係存在。

研究目的

本實驗的目的主要是以探討細胞激素影響行爲表現是否和細胞訊息傳遞路徑有關。

(三) 研究之材料方法及步驟

實驗動物

本研究使用八週大之 Wistar 大鼠爲實驗動物，共十隻。大鼠送達動物中心時，大鼠放於大型壓克力的飼育籠(35×56×19)內，每一個飼育籠中飼養 5 隻大鼠，並飼養於溫度控制良好(21℃-25℃)的環境中，充分給予食物與飲水，光照週期爲 12 小時的光照及 12 小時黑暗(早上 7:00 亮燈)。在進行研究前三天每天都對大鼠施予 5 min 的 handling，以減低大鼠對實驗操作者的壓力反應。本研究的各項動物實驗依照美國國家衛生研究院實驗動物使用與照顧須知的規定執行。

一般步驟

對大鼠施予高腳十字迷宮試驗，以測量其情緒行爲，而後間隔一天，將大鼠犧牲以摘取腦組織以西方墨點法試驗測量腦組織內 ERK 的表現量以及酵素連結免疫吸附分析來測量腦組織內細胞激素的濃度。

高腳十字迷宮試驗

高腳十字迷宮試驗將在早上 9 點開始進行，在進行測試前，都先以 20% 酒精清潔行爲試驗的工具，以避免氣味所造成的影響。高腳十字迷宮是以不透明的壓克力板製作而成的，有一對開放臂(50×10 cm)、一對無頂蓋的封閉臂(50×10×40 cm)加上一個中央區域(10×10 cm)，這一整個裝置離地 50 cm。每一隻大鼠都在高腳十字迷宮中觀察 5 min，所記錄的參數如下：(1)停留在開放臂的時間。(2)進入各個臂的時間及次數。(3)進入開放臂的潛伏期。(4)大鼠跨越各個臂的中線之次數。依照大鼠停留在開放臂的時間長短來評估其焦慮程度。停留在開放臂時間較長的前 50% 之大鼠，定義爲焦慮程度較低之大鼠，反之則定義焦慮程度較高。

生化試驗

動物犧牲時用 phosphat buffered saline (PBS)進行心臟灌流而後取出其腦組織，放置在冰盤上把腦組織(前額葉皮質、海馬迴、紋狀體、杏仁核、大腦皮質、腦下垂體)區分開來，放置於 1.5 ml 的 vial 中，放入-80℃冷凍儲存備用。

蛋白均質化

將腦組織加入蛋白溶解液(lysis bufer內含 Proteinase inhibitor、Tris (pH=8.0) 20 mM 、NaCl 137 mM 、glycerol 10% 、Triton X-100 1% 、EDTA 2 mM)在冰浴下進行研磨均質化，而後進行離心 (115000 × rpm，8 min)，而後吸取上清液以相同條件再離心一次，接著取上清液以 Bio-rad kit 測量蛋白的濃度以便後續進行西方墨點法試驗。

西方墨點法試驗

以均質化的蛋白原液進行西方墨點法試驗。在開始前要先將蛋白原液加上二次水及 loading-dye 在 100 ℃下加熱 10 min 以進行變性反應。接著把 35-50 μg 之樣品蛋白置入 10% 的 SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gels)中進行電泳分離，而後以半乾式轉置器將膠上分離的蛋白轉置到 PVDF 膜 (polyvinylidene difluoride membrane) 。轉置後以 7% 脫脂奶粉(溶於 Tris buffer saline +0.1 % Tween 20)把 PVDF 膜進行 blocking，接著以一級抗體(ERK1/2、p-ERK1/2、tubulin)進行標定(4℃ , overnight)，隔天以二級抗體(anti-mouse 或 anti-rabbit)進行標定。而後將 PVDF 膜均勻覆蓋顯影劑與定影劑，用 Fuji Film Las-1000 機器進行冷光螢光攝影。

酵素連結免疫吸附分析

先將 IL-2、IL-1β、TNF-α 抗體（anti rat IL-2、IL-1β、TNF-α coatting antibody） coating 於 96 孔盤上（100μl/孔），並放在 4℃ 冰箱中靜置 12 小時後甩淨並以 PBS-T（200μl/孔，0.05% Tween20 in PBS）清洗三次。加入抗體稀釋劑（200μl/孔，1% BSA in PBS）於 37℃ 中 blocking 1 小時後甩淨並以 PBS-T（200μl/孔）清洗三次。測試前必須先將蛋白質檢體稀釋到 4 μg/μl 的濃度，再取出 10μl 進行實驗，並以抗體稀釋劑將待測檢體之體積補足至 100 μl/孔。將 96 孔盤包覆保鮮膜，放置於 37℃ 震盪反應 90 分鐘，反應結束後甩淨並清洗。96 孔盤內每孔再注入 100μl 的 IL-2、IL-1β、TNF-α 偵測抗體，於 37℃ 下作用 60 分鐘後甩淨並清洗。再加入 streptaviding-HRP（100μl/well）並於室溫中避光作用 20 分鐘後甩淨並清洗，接著以 TMB（100μl/well）於室溫中避光作用 20 分鐘進行呈色反應。最後以加入 2N H_2SO_4（50 μl/well）終止呈色，並利用 ELISA reader 以 450 nm 波長讀取吸光值。依標準品之標準曲線將各檢體之

吸光值換算成實際濃度值以進行分析。

蛋白定量

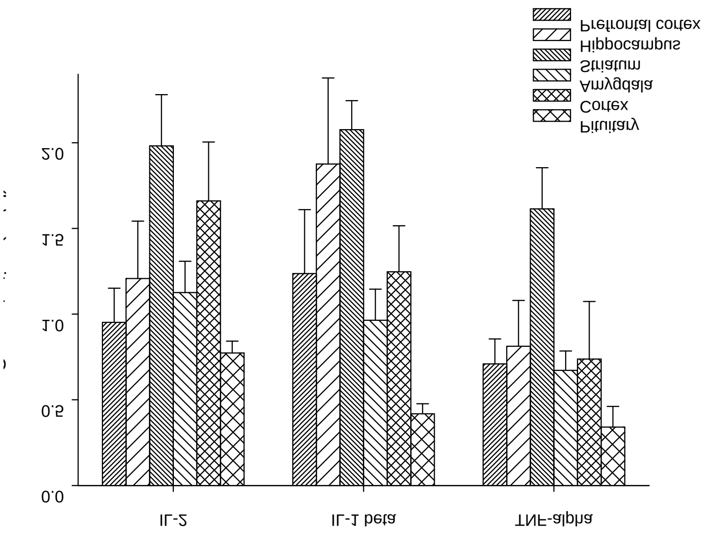
使用 Fujix-science lab software (Image Gauge 3.46)，測出 PVDF 膜上 ERK1/2、p-ERK1/2、tubulin band 的亮度，以 tubulin 做為總量蛋白以計算 ERK1/2 及 p-ERK1/2 的含量。

統計方法

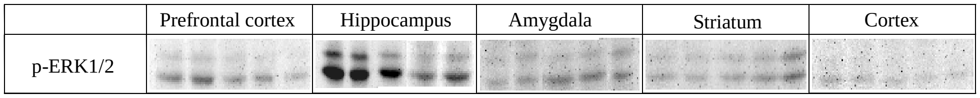
把細胞激素、p-ERK 、plus-maze 互做相關

(四) 研究結果

在酵素連結免疫吸附分析實驗中發現三種細胞激素都是在紋狀體(striatum)中濃度最高，在腦下垂體(pituitary)中濃度是最低(圖一)；p-ERK 在經過半定量分析後在海馬迴(hippocampus)中表現量顯示最高，大腦皮質(cortex)中是最低(圖二)。再把六個腦區中的細胞激素及 ERK 活化程度分別跟高腳十字迷宮中所測得的各個參數做相關，發現在 PFC 中的 IL-1β 、TNF-α 以及 IL-2 都跟 closed arm rearing 呈現負相關，而 cortex 內 IL-1β 及 TNF-α 與 closed arm rearing 則有正相關存在(表一)；cortex 內的 p-ERK 跟 closed arm rearing 有正相關，另外和 open arm activity 有負相關(表二)。再加上 cortex 內之 IL-2 及 IL-1β 跟 p-ERK 的表現量有正相關出現(表三)。



圖一：三種細胞激素在各個腦區的濃度



圖二：p-ERK 在各腦區的西方墨點法

		IL-2	IL-1β	TNF-α
PFC	Pearson Correlation	-0.75	-0.68	-0.71
	p-value	0.01*	0.03*	0.02*
Hip	Pearson Correlation	0.61	0.44	0.68
	p-value	0.06	0.21	0.03*
Stri	Pearson Correlation	0.04	0.46	0.68
	p-value	0.92	0.18	0.03*
Amg	Pearson Correlation	0.61	0.68	0.59
	p-value	0.06	0.03*	0.07
Cort	Pearson Correlation	0.51	0.80	0.77
	p-value	0.13	0.01*	0.01*
Pit	Pearson Correlation	0.55	0.66	-0.29
	p-value	0.10	0.04*	0.42

* $p<0.05$

表一：細胞激素與 closed arm rearing 的相關

		closed arm time	center time	open arm time	open arm entry	open arm activity	closed arm entry	closed arm activity	closed arm rearing
PFC p-ERK	Pearson Correlation	0.23	0.45	-0.51	-0.42	-0.30	0.48	-0.43	-0.34
	p-value	0.53	0.19	0.14	0.22	0.40	0.16	0.21	0.33
Hip p-ERK	Pearson Correlation	-0.15	0.67	-0.22	0.02	-0.20	0.44	-0.39	0.00
	p-value	0.69	0.05	0.57	0.95	0.61	0.24	0.30	1.00
Stri p-ERK	Pearson Correlation	0.37	0.08	-0.47	-0.51	-0.44	0.20	-0.50	-0.30
	p-value	0.30	0.82	0.17	0.13	0.21	0.58	0.14	0.40
Amg p-ERK	Pearson Correlation	-0.11	0.77	-0.27	0.02	-0.01	0.42	-0.35	-0.29
	p-value	0.78	0.01*	0.49	0.95	0.98	0.26	0.36	0.44
Cort p-ERK	Pearson Correlation	0.57	-0.36	-0.49	-0.48	-0.73	-0.36	-0.41	0.77
	p-value	0.09	0.31	0.15	0.16	0.02*	0.31	0.23	0.01*

* $p<0.05$

表二： p-ERK 與 plus-maze 參數相關

IL-2	Amygdala	Pearson Correlation	0.67
		p-value	0.03*
	Cortex	Pearson Correlation	0.68
		p-value	0.03*
IL-1β	Cortex	Pearson Correlation	0.89
		p-value	0.00*
TNF-α	Striatum	Pearson Correlation	0.82
		p-value	0.00*

* $p<0.05$

表三：細胞激素與 p-ERK 的相關

(五) 研究討論

本實驗的結果認為 PFC 中的細胞激素和調節動物情緒有關與先前實驗結果可以互相應稱(Pawlak et al., 2005)，並新發現到 PFC 中的細胞激素和 closed arm rearing 呈現負相關。Rearing 能代表動物的情緒行為，也能代表大鼠的探索行為。Cortex 內的 IL-1ß 與 p-ERK 呈現了正相關和 closed arm rearing 也有正相關，且在 Cortex 內的 p-ERK 又跟 closed arm rearing 有了正相關。然而 IL-2 及 TNF-alpha 並沒有發現到上述的關係。由於生物學上，心理、神經及免疫三者會互相影響，因此認為 IL-1ß 可能藉由 ERK 這條訊息傳遞路徑來影響動物的行為表現。

(六) 文獻

Andrews, N., File, S.E., 1993. Handling history of rats modifies behavioural effects of drugs in the elevated plus-maze test of anxiety. Eur J Pharmacol. 235, 109-12.

Botreau, F., Gisquet-Verrier, P., 2006. Memory reactivation, dissociated from behavioural expression, decreases ERK phosphorylation in the rat prefrontal cortex and amygdala. Behav Brain Res. 169, 176-80.

Fusello, A.M., Mandik-Nayak, L., Shih, F., Lewis, R.E., Allen, P.M., Shaw, A.S., 2006. The MAPK scaffold kinase suppressor of Ras is involved in ERK activation by stress and proinflammatory cytokines and induction of arthritis. J Immunol. 177, 6152-8.

Glaser, R., Kiecolt-Glaser, J.K., Marucha, P.T., MacCallum, R.C., Laskowski, B.F., Malarkey, W.B., 1999. Stress-related changes in proinflammatory cytokine production in wounds. Arch Gen Psychiatry. 56, 450-6.

Grinkevich, L.N., Lisachev, P.D., Baranova, K.A., Kharchenko, O.A., 2006. [Comparative analysis of MAP/ERK-kinase activation in the CNS of animals with different capability for learning]. Ross Fiziol Zh Im I M Sechenova. 92, 536-45.

Impey, S., Obrietan, K., Storm, D.R., 1999. Making new connections: role of ERK/MAP kinase signaling in neuronal plasticity. Neuron. 23, 11-4.

Pawlak, C.R., Ho, Y.J., Schwarting, R.K., Bauhofer, A., 2003. Relationship between striatal levels of interleukin-2 mRNA and plus-maze behaviour in the rat. Neurosci Lett. 341, 205-8.

Pawlak, C.R., Schwarting, R.K., Bauhofer, A., 2005. Cytokine mRNA levels in brain and peripheral tissues of the rat: relationships with plus-maze behavior. Brain Res Mol Brain Res. 137, 159-65.

Sweatt, J.D., 2001. The neuronal MAP kinase cascade: a biochemical signal integration system subserving synaptic plasticity and memory. J Neurochem. 76, 1-10.

Thiel, C.M., Huston, J.P., Schwarting, R.K., 1998. Cholinergic activation in frontal cortex and nucleus accumbens related to basic behavioral manipulations: handling, and the role of post-handling experience. Brain Res. 812**,** 121-32.

Villarreal, J.S., Barea-Rodriguez, E.J., 2006. ERK phosphorylation is required for retention of trace fear memory. Neurobiol Learn Mem. 85**,** 44-57.

Wu, S.L., Hsu, L.S., Tu, W.T., Wang, W.F., Huang, Y.T., Pawlak, C.R., Ho, Y.J., 2008. Effects of d-cycloserine on the behavior and ERK activity in the amygdala: Role of individual anxiety levels. Behav Brain Res. 187**,** 246-53.