

BDNF與c-Fos在習得無助小鼠腦部的表現

**Expression of BDNF and c-Fos in the
Brain of Mice with Learned Helplessness**

研 究 生：鄭之雅 (Chih-Ya Cheng)

指導教授：黃銀河 (Yn-Ho Huang , Ph. D.)

國立陽明大學

解剖暨細胞生物學研究所

碩士論文

National Yang-Ming University

Institute of Anatomy and Cell Biology

Master Thesis

中華民國九十二年六月

June 2003

誌謝

學術是一條不歸路，碩士論文的完成才正開啟另一扇做學問的窗，兩年的求學生涯在師長、親友的多方大力支持下，走得辛苦卻也收穫滿囊。

首先，最感謝的是我的指導教授 黃銀河老師和洪成志醫師，他們的學術風範、治學態度、全力以赴的研究精神、以及對研究生的提攜及照顧，真是令我受益良多且深受感動。

這個研究的憂鬱症動物模式是在台北榮總精神部的行為與基因實驗室建立的，感謝洪成志醫師與蔡世仁醫師提供了環境空間、金錢支助及無數次的討論，讓我能夠在嚐盡各種錯誤後累積經驗，逐步建立憂鬱症習得無助的動物模式；免疫染色的實驗與資料分析在陽明黃銀河老師的實驗室完成。過程中還有台北榮總實驗外科蔣湘蓉小姐在免疫染色技術上的協助，尹相姝老師與游祥明老師的指導和關心，才使得這個研究與論文得以順利完成。

另外，感謝台北榮總精神部行為與基因實驗室夥伴們與解剖所郁娟學姊，他們的經驗與雜事上的分憂解勞，使我能在愉快的氣氛中完成這個研究。

最後將這份成果獻給我的家人、親友，他們的鼓勵與心理上的支持，使我能在挫折時鼓起勇氣，繼續前行，終於完成了這個二年前我所認為的「不可能的任務」。

鄭之雅 謹誌

2003.8

目錄

英文摘要.....	1
中文摘要.....	3
壹.緒言	
一.憂鬱症簡介.....	5
二.憂鬱症與基因、環境的關係.....	5
三.憂鬱症的病理.....	6
(1)單胺假說.....	6
(2)下視丘-腦下腺-腎上腺素失調假說.....	6
四.與憂鬱及壓力有關的分子.....	7
(1)腦內神經滋養因子 BDNF.....	8
(2)早期警示基因 c-Fos	9
五.與憂鬱症有關的神經路徑.....	10
(1)海馬結構.....	10
(2)內側前額皮質區.....	11
(3)外側中隔核.....	11
(4)下視丘室旁核.....	11
(5)杏仁體.....	12
(6)伏核.....	12
六.習得無助-憂鬱症動物模式.....	13
貳.研究目的.....	14
參.研究材料及方法	
一.實驗動物.....	15
二.習得無助動物模式.....	15
三.實驗配備.....	16
四.實驗分組.....	16
五.固定及冷凍保存.....	17
六.冷凍切片.....	17
七.免疫染色.....	17
八.資料分析.....	18
(1)神經核定位.....	18
(2)免疫染色資料分析.....	18
九.統計分析.....	19

肆. 結果	
一. 行為測試的結果.....	20
二. 免疫染色結果.....	20
(1)BDNF.....	20
(2)c-Fos.....	21
伍. 討論	
一. c-Fos 免疫染色結果.....	23
二. BDNF 免疫染色結果.....	24
三. 習得無助-憂鬱症動物模式.....	26
陸. 結論.....	28
名詞縮寫.....	29
圖表與說明	
圖一：細胞的訊息傳導路徑.....	32
圖二：長期服用抗憂鬱劑的分子機轉.....	33
圖三：下視丘-腦下腺-腎上腺軸的調節.....	34
圖四：ABC 方法.....	35
圖五：PsyLab Escape AutoBox	36
圖六：PsyLab Inescapable Box.....	36
圖七：習得無助的標準.....	37
圖八：可逃脫的電擊程式圖.....	38
圖九：實驗分組.....	38
圖十~十八：BDNF 的免疫染色組織圖.....	39
圖十九~二十七：c-Fos 的免疫染色組織圖.....	48
表一：憂鬱症的診斷標準.....	53
表二：動物實驗申請同意書.....	54
表三~表六：BDNF 的免疫染色數據結果與柱狀圖	55
表七~表十：c-Fos 的免疫染色數據結果與柱狀圖	59
參考文獻.....	63

Abstract

Backgrounds : Depression is a mental disorder characterized by persistent feelings of depression, impaired attention, loss of interest or pleasure, fatigue, helplessness, and even suicide attempt. Learned helplessness (LH) not only mimicks the various symptoms of human depression but is curable by antidepressant treatment. In animal model, LH can be induced by inescapable stress. Stress induces the expression of immediate-early oncogenes including *c-fos* in many areas of the brain. The expression of c-Fos also indicates the activity of neurons. The brain derived neurotrophic factors (BDNF) are essential for the development and survival of the neurons. The mRNA of the BDNF was found to decrease with stress and increase with antidepressant treatment in the hippocampus of rats. In this study, we applied the "learned helplessness" animal model to study the nature of stress-induced depression. The technique of immunohistochemistry was used to identify the expression of c-Fos and BDNF in the mice brain. **Methods** : Male BALB/cByJ mice (12-week age) were purchased from the National Laboratory Animal Center and divided into the control (N= 6), the non-LH (N= 7) and the LH groups (N= 5) according to the results of electrical foot-shock escape test. At the first day, each mouse was trained using the foot-shock escape instrument. After this training, 300 inescapable foot-shocks (0.8mA and 10 second per shock) were given to each mouse with its tail fixed by a tape for 3 consecutive days. At the fifth day, each mouse was given 30 foot-shock escape tests. The mouse performed a more than 70% failure (> 20/30) was recruited into the LH group. The mice after behavioral studies were deeply anesthetized and perfused with paraformaldehyde. Frozen sections of the mice brain were incubated with BDNF or c-Fos rabbit polyclonal antibody, followed by signal amplification using an ABC kit and visualized with DAB. The numbers of BDNF and c-Fos positive nuclei per area on four sections from each animal were counted using the MCID software. The hippocampus (CA and DG), medial prefrontal cortex (MPC), lateral septal nucleus (LSN), paraventricular hypothalamic nucleus (PVN), amygdala (coA and blA) and nucleus accumbens (NACc

and NACs) were measured. One-way ANOVA with Scheffe's post-hoc tests were performed to compare the means of the three study groups using SPSS software. In order to reduce the probability of type I error caused by multiple tests, p value of 0.01 was regarded as significant.

Results : Among the twelve mice receiving inescapable foot-shock test, five (41.6%) of them were recruited into the LH group, and the others (n=7) into the non-LH group. The numbers of BDNF positive neurons in the MPC, LSN, PVN, NAC, amygdala and hippocampus did not show any significant difference among all the three groups studied. While a significant trend of "LH > non-LH > control" for the intensity of BDNF stain was noted in the pyramidal layers of CA1, CA2 and CA3 of the hippocampus. Judging from the morphology, the increased BDNF stain must come from the inhibitory basket cells surrounding the pyramidal cells. The expression of c-Fos in the LH group was significantly lower than the non-LH group in the areas of the LSN ($p = 0.007$) and dentate gyrus (DG) of hippocampus ($P = 0.002$), with a trend of "non-LH > control > LH". In addition, the non-LH group had a higher c-Fos expression than the control group in the MPC ($p = 0.008$), with a trend of "non-LH > LH > control" ; as to the PVN, the c-Fos expression in the LH group was higher than the control group ($p = 0.001$), with a trend of "LH > non-LH > control". **Conclusions** : Increased c-Fos-stained cells in the MPC and PVN of mice under stress indicates the neuronal activity in these nucleus is related to stress. When the mice became helpless, the c-Fos-stained cell number in the LSN decreased, and a significant trend of "LH > non-LH > control" for the intensity of BDNF stain in the pyramidal layers of CA1, CA2 and CA3 of the hippocampus was noted. Because the pyramidal layer contains inhibitory basket cells in addition to the pyramidal cells which did not differ in cell counts, our results indicate the pathophysiology of learned helplessness or depression is related to an inhibition on the pyramidal cell of the hippocampus and suppressed activity on the LSN.

Keywords- Depression ; Stress ; Learned Helplessness ; Brain-derived Neurotrophic Factor ; c-Fos

中文摘要

背景：憂鬱症是長期的情緒低落、注意力不集中、缺乏興致、倦怠合併無助感，甚至有自殺意念的一種疾病。很多研究顯示憂鬱常發生在一些精神壓力之後。小鼠在無法逃脫的電擊壓力下所產生的習得無助(learned helplessness)不僅與人類的憂鬱症有許多相似之處，而且能夠藉由抗憂鬱劑的治療獲得改善，因此小鼠的習得無助提供了研究憂鬱症一個很好的動物模式。壓力可誘發細胞內的早期警示基因 *c-fos* 的表現，也有研究顯示 c-Fos 與對抗壓力時活化的神經路徑很有關係。腦內神經滋養因子 BDNF 可影響神經分化、生長及維持大腦神經細胞的存活，一些研究顯示壓力與抗憂鬱劑可分別降低與增加海馬結構 BDNF 信使核糖核酸(mRNA) 的表現。因此本研究利用習得無助的動物模式和免疫染色的方法來探討 BDNF 與 c-Fos 在小鼠不同腦區的表現，以釐清此二分子在憂鬱症病理所扮演的角色。

方法：將十二週大，雄性的 BALB/cByJ 小鼠(由國家實驗動物中心所繁殖)根據逃脫測驗的結果分成對照組(N=6)、非無助組(N=7)和無助組(N=5)。實驗步驟為：第一天先給予足底電擊逃脫訓練，以膠帶固定小鼠的尾部，接著給予連續三天無法逃脫的電擊壓力(300 次,0.8 毫安培,每次電擊 10 秒)。第五天再給予足底電擊逃脫測驗，將逃脫失敗率大於 70% (>20/30)者歸入習得無助組。所有的老鼠在行為測試後麻醉並以 paraformaldehyde 灌流，取腦組織做冷凍切片。BDNF 和 c-Fos 的免疫染色依照標準流程，用 ABC 進行信號放大反應，最後再用 DAB 呈色。BDNF 和 c-Fos 標記的神經細胞數量使用 MCID 軟體來分析，每隻小鼠每個核區讀取四片。讀取的核區包括海馬結構(CA 和 DG)、內側前額皮質區、外側中隔核、下視丘室旁核、杏仁體(coA 和 blA)、伏核(NACc 和 NACs)。然後以 SPSS 統計軟體做單因子變異數分析(one-way ANOVA)與 Scheffe 事後檢定(post-hoc test)。為了修正多重比較所增加的第一型統計錯誤，此研究將 $p < 0.01$ 時定為統計上有意義的差異。

結果：接受無法逃脫電擊壓力的 12 隻小鼠中 5 隻有產生習得無助的表現(41.6%)、7 隻沒有產生無助。這三組的 BDNF 免疫染色細胞數在內側前額皮質區、外側中隔核、下視丘室旁核、杏仁體、伏核都沒有顯著的差異；而海馬結構 CA1、CA2 與 CA3 的錐體細胞層 BDNF 蛋白的染色有"習得無助>非無助>對照組"的趨勢，但是染色的錐狀細胞數目沒有差別，顯示習得無助組所增加的 BDNF 來自錐狀細

胞週邊的抑制性細胞。與非無助組比較，習得無助組小鼠在外側中隔核($p = 0.007$)和海馬結構齒狀回($p = 0.002$) c-Fos 的表現細胞數顯著降低並且有"非無助>對照組>習得無助組"的趨勢；與對照組比較，非習得無助組在內側前額皮質區的 c-Fos 表現細胞數顯著增加($p = 0.008$)，並且有"非無助>習得無助>對照組"的趨勢；另外，與對照組比較，習得無助組在下視丘室旁核的 c-Fos 表現細胞數顯著增加($p = 0.001$)，其趨勢為"習得無助>非無助>對照組"。**結論**：小鼠受到壓力時，其內側前額皮質區和下視丘室旁核 c-Fos 的表現會增加，顯示此兩核區的細胞活性與壓力反應有關。當小鼠變得習得無助時，其外側中隔核的 c-Fos 顯著減少；另外海馬結構 CA1、CA2 與 CA3 的錐體細胞層 BDNF 蛋白的染色有"習得無助組> 非無助組> 對照組"的趨勢，但是染色的錐狀細胞數目沒有差別，顯示習得無助組所增加的 BDNF 來自錐體細胞層的抑制性細胞，因此此結論為習得無助或憂鬱症的病理與外側中隔核神經細胞的活性降低及錐狀細胞受到抑制有關。

關鍵字- 憂鬱症；壓力；習得無助；腦內神經滋養因子；c-Fos

緒言

一.憂鬱症簡介

世界衛生組織等的研究發現，平均每一百人中就有三人患有憂鬱症。憂鬱症在高壓力社會幾乎已成為最流行的精神文明病。世界衛生組織（WHO）也將其與癌症、AIDS 並列為廿一世紀的三大疾病及衛教預防重點工作。

憂鬱症是一種情緒持續低落超過兩個星期的疾病，其常見的合併症狀包括全身無力、注意力不能集中、失眠、食慾不振、甚至自殺（DSM-IV, 2000）【表一】。相較於糖尿病、癌症等疾病有比較明確的生物學病因與診斷方法，如血液生化、器官攝影、組織切片來診斷疾病，憂鬱症是以很多症狀組合來達到判定診斷標準。因此憂鬱症不應被視為是單一疾病，而是多種疾病及病理構成的異源症狀（Nestler et al., 2002）。

二.憂鬱症與基因、環境的關係

流行病學的研究發現會誘發憂鬱症，有四~五成是因為本身體質因素，一些研究也顯示憂鬱症具有遺傳性（Sanders et al., 1999；Fava et al., 2000），但是到目前為止仍無法確切的定位出影響憂鬱症的主要基因，其困難之處主要在於憂鬱症本身的複雜性，可能並非單一基因所致，而是多基因各具影響力，而導致異源症狀-憂鬱症（Burmeister, 1999）。

除了本身體質因素之外，非遺傳因素，如：環境壓力也是很重要的。憂鬱症常被描述為壓力相關的疾病（stress-related disorder），而且有很多證據顯示憂鬱症通常發生在一些壓力之後（Nestler et al., 2002）。美國精神醫學甚至在 1987 年發表論文指出：只要是憂鬱症，都跟壓力有關。但壓力本身並不足以產生憂鬱症，例如大部分的人在歷經極度壓力之後並未產生憂鬱症狀。因此憂鬱症是本身體質和一些環境壓力交互作用而導致的疾病（Nestler et al., 2002）。

三.憂鬱症的病理

(1)單胺假說

早期的研究發現一些會耗盡單胺的藥物，例如：降血壓藥 reserpine，會使部分個案情緒低落。這些發現認為單胺此種神經傳導物質濃度降低，尤其是血清素和正腎上腺素，可能是導致憂鬱症的重要原因（Schildkaut, 1965；Bunney et al., 1965；Coppen, 1967）。典型抗憂鬱劑的發現也支持著單胺假說，例如三環抗抑鬱劑（tricyclic antidepressants, TCA）和單胺氧化酶抑制劑（monoamine-oxidase inhibitors, MAOIs）的作用機轉都可在短時間使得突觸間的單胺濃度上升。

憂鬱症治療至今有五十年的歷史，當時兩大類抗憂鬱劑：（1）三環抗抑鬱劑（TCA）和（2）單胺氧化酶抑制劑（MAOIs）的急性作用為：三環抗抑鬱劑是抑制血清素（serotonin）和正腎上腺素（norepinephrine）的回收；而單胺氧化酶是分解單胺最主要的酵素，因此抑制此酵素的作用為單胺氧化酶抑制劑的急性藥物作用（Frazer, 1997）。

研究者設計了更進一步的實驗來探討單胺在憂鬱症所扮演的角色，他們利用藥物使正常個案的血清素和正腎上腺素耗盡，結果發現正常個案並不會因此而產生憂鬱情緒（Shopsin et al., 1975；Delgado et al., 1994；Miller et al., 1996）。另外，抗憂鬱劑在短時間內就可造成突觸間的單胺濃度上升了，但臨床上卻需要持續服用抗憂鬱劑數週後才能產生療效。這似乎意味著單胺雖與抗憂鬱劑的療效有關，但在解釋憂鬱症的病理上卻存有一些矛盾之處。

(2)下視丘-腦下腺-腎上腺軸失調假說

急性或慢性壓力會導致下視丘-腦下腺-腎上腺軸（hypothalamic-pituitary-adrenal axis, HPA axis）功能異常。當下視丘室旁核（paraventricular hypothalamic nucleus, PVN）分泌促腎上腺皮質激素釋放因子（corticotropin-releasing factor, CRF）時，腦下腺前葉（anterior pituitary）將合成及釋放促腎上腺皮質激素

(adrenocorticotropin, ACTH)。促腎上腺皮質激素可刺激腎上腺皮質(adrenal cortex)合成及釋放糖皮質激素(glucocorticoids)【圖三】。

海馬結構和杏仁體可以影響下視丘-腦下腺-腎上腺軸(HPA axis)的功能。海馬結構的功能是維持壓力荷爾蒙的製造；而杏仁體則是相反，對此路徑具興奮作用。糖皮質激素對海馬結構和下視丘室旁核有回饋抑制的功能【圖三】。

憂鬱會增加腦部壓力荷爾蒙(cortisol)的製造，雖然海馬結構的功能維持需要此壓力荷爾蒙，但過多反而可能對海馬結構有毒性而損害海馬結構，使海馬結構體積變小。1999年Sheline等人對24名23-86歲、過去平均有五次復發性憂鬱症病史的女性、和24名基礎條件相似的無憂鬱症病史對照組研究。用核磁共振影像(MRI)掃描腦部三度立體影像，發現有憂鬱症病史者的左右兩側海馬體積都比對照組小約9-13%；而且憂鬱症病史愈多，海馬的體積就愈小(Sheline et al., 1999; Bremner et al., 2000)。

在憂鬱症的病人身上可以看到不正常，過度活化的下視丘-腦下腺-腎上腺軸(HPA axis)，而服用抗憂鬱劑之後可以使HPA axis回復正常(Sachar et al., 1979; De Kloet et al., 1988)。一些研究報告也顯示cortisol和CRF接受體的拮抗劑(如：RU486)，具抗憂鬱的療效功能(Belanoff et al., 2001; Arborelius et al., 1999; Holsboer, 2001)。

四.與憂鬱及壓力有關的分子

抗憂鬱劑真正的作用其實是非常複雜的。抑制血清素和正腎上腺素的回收與代謝，最主要就是增加單胺類神經傳導物質在神經突觸的濃度與作用。藥理學的研究已顯示抗憂鬱劑能很快地增加此類神經傳導物質在突觸的濃度(Duman, 1997)，但臨床上所有的抗憂鬱劑要達到「情緒提升」的療效卻必須在持續服用藥物數週到一個月後才能顯現，這意味著增加血清素和正腎上腺素並非抗憂鬱劑達到臨床療效的最主要作用。

分子與細胞生物技術的進步已為抗憂鬱劑如何在腦中作用的研究鋪路，不少的研究文獻對細胞內訊息傳導路徑做了一系列的整理

(Duman et al., 1997)，大致可以區分成兩大類。(1) 與二級訊號傳遞因子偶合的接受體 (receptor-coupled second messengers)：此為最主要的一類。當它接受神經傳導物質 (例如：單胺) 的刺激後會產生二級訊號傳遞因子 (second messenger)：cAMP、Ca²⁺、IP₃，進一步活化蛋白激酶 (protein kinase)，使蛋白受質磷酸化而產生一連串接續的訊息傳導。(2) 酪氨酸蛋白激酶接受體 (receptor tyrosine kinase)：主要受到神經滋養物質 (neurotrophins，例如：BDNF) 或細胞激素 (cytokine) 的調節。許多研究報告發現長期給予抗憂鬱劑會增加海馬結構 (hippocampus) 腦內神經滋養因子 (BDNF) 信使核糖核酸 (mRNA) 的表現量 (Nibuya et al., 1996; Nibuya et al., 1999)。當酪氨酸蛋白激酶 (protein tyrosine kinase) 被磷酸化後可以活化 MAPK (mitogen-activated protein kinase) 訊息傳導路徑，進而影響到轉錄因子 (transcriptional factor) 啟動轉錄後續基因【圖一、二】。

以下針對本研究有興趣的分子做了整理與介紹：

(1) 腦內神經滋養因子 (Brain-derived neurotrophic factors, BDNF)

BDNF 是一種神經滋養物質 (neurotrophins) 可影響神經的分化、生長及維持大腦成熟神經細胞的存活 (Lindsay et al., 1994; Lindvall et al., 1994; Thoenen, 1995)。許多研究證實長期給予抗憂鬱劑會活化環狀磷酸腺苷 (cyclic AMP) 訊息傳導路徑，進而增加了大腦邊緣系統 (limbic system) 尤其是海馬結構的 BDNF 信使核糖核酸 (mRNA) 表現量 (Nibuya et al., 1996; Nibuya et al., 1999)。臨床大腦影像研究也發現憂鬱症病人的海馬結構萎縮且 BDNF 信使核糖核酸 (mRNA) 表現量下降 (Duman et al., 1997)。

抗憂鬱劑增加了 BDNF 的表現量進而保護和修復海馬結構因為壓力所產生的損害。這似乎可以說明為什麼抗憂鬱劑的治療效果時間延遲，因為抗憂鬱劑需要足夠的時間活化細胞內訊息傳導路徑來增加 BDNF 產生保護和修復功能。

但直接證明海馬結構 BDNF 與憂鬱症的關係仍有一些爭議。雖然直接微量注射 BDNF 到海馬結構 CA3 可對強迫游泳與習得無助兩種憂鬱症動物模式具治療效果 (Shirayama et al., 2002)，但也有研究顯示抗憂鬱劑改善海馬結構 CA3 錐狀神經細胞 (pyramidal neurons) 的

樹突結構並非透過BDNF(Kuroda et al, 1998);另外缺乏CREB(BDNF傳導路徑的上游物)的小鼠,給予抗憂鬱劑仍可在強迫游泳此動物模式上表現出療效,但卻未發現BDNF在海馬結構上表現增加(Conti et al., 2002)。剔除BDNF的基因轉殖鼠出生後不易存活,2001年Rios成功繁殖出在胚胎期(embryonic development)才剔除BDNF的小鼠,小鼠除了顯現出焦慮的個性以及體重肥胖外,並未發現憂鬱症狀(Rios et al., 2001)。過去針對BDNF的研究比較著重在信使核糖核酸(mRNA)表現量的探討,因此仍需更多的實驗來證實海馬結構BDNF蛋白質與憂鬱症的關係。

(2)早期警示基因 c-Fos

c-fos 為細胞中的早期警示訊號,轉譯出的蛋白 c-Fos 是轉錄因子(transcriptional factor),因此在胞內訊號傳導(signal transduction)中扮演著極為重要的角色。Fos 蛋白會和另一種早已存在的 Jun 蛋白結合形成 AP-1, AP-1 可作用在 DNA 的特定區域(AP-1 site), AP-1 site 是一些常用基因的啟動區,平常處於靜止狀態,一旦和 AP-1 site 結合後,可以啟動轉錄後續基因,造成神經細胞改變來適應環境壓力(Morgan et al., 1991)。c-Fos 的轉譯與調節機制在分子生物學的研究中有很多強烈的佐證與細胞內訊息傳導息息相關。藉由 Fos 的激活,神經細胞核將啟發一連串的蛋白質合成及細胞膜電位改變的反應。

當遭遇無法掌控或預知狀況等立即壓力,為了存活,壓力訊息會傳遞至掌管神經內分泌系統(neuroendocrine)的下視丘和其它腦區來誘發一連串的調節反應以維持體內環境平衡(Dallman et al., 1987; Johnson et al., 1992; Koolhaas et al., 1997)。暴露於生理壓力或精神壓力時,參與調節 HPA axis 對糖皮質激素(glucocorticoid)敏感化的神經路徑被認為可以用 c-Fos 蛋白免疫染色來定義(Leah et al., 1992; Thrivikraman et al., 1997)。標定 c-Fos 蛋白的表現可以了解特定腦區對抗壓力的反應。過去的研究顯示多種急性壓力都可使細胞內的 c-Fos 在短時間內快速上升(Aloisi et al., 1997; Bonaz et al., 1994; Cullinan et al., 1995)。而一些研究也顯示不論長期或短期的給予抗憂鬱劑都可增加 c-Fos 的表現量(Hope., 1994)。

五.與憂鬱症有關的神經路徑

很多大腦區域都和情緒有關，神經解剖學家對正常的情緒調控神經路徑雖有基本的認識，但因為無法獲取憂鬱症病人活組織切片，因此這樣的了解缺乏了一些事實的左證。近幾年的腦功能研究以正子加速器（positron emission tomography, PET），藉由腦血流或葡萄糖代謝功能偵測出前額皮質（prefrontal cortex）、海馬結構（hippocampus）、紋狀體（striatum）、杏仁體（amygdala）和視丘（thalamus）都可能是與憂鬱症相關的腦區（Drevets, 2001；Liotti et al., 2001）。認識這些腦功能區在正常功能時所扮演的角色可以提供我們對憂鬱症有更多的認識。新皮質區和海馬結構調節憂鬱症的認知功能層面，例如：憂鬱症的病人會有無助、無望、罪惡感、自殺意念。紋狀體（尤其是伏核, NAC）和杏仁體是產生憂鬱情緒的主要區域，例如：失去樂趣（anhedonia-喪失對任何事物的興致）。而憂鬱症也會有睡眠失調、飲食失調、缺乏性慾的問題，這或許是下視丘在此疾病所扮演的角色。

根據上述的參考文獻，針對本研究有興趣的核區做了以下的整理介紹：

(1)海馬結構（hippocampus）

海馬結構是與記憶和學習最相關的結構區，它可將學習來的記憶整理，提供往後遇到相同狀況的情境做出行為反應。

海馬結構有著最多的糖皮質激素（glucocorticoids）接受體，所以是大腦很容易受到壓力傷害的區域（Sapolsky, 1996）。完整的邊緣系統表現了很多糖皮質激素接受體，包含 type I 和 type II 兩種類型，這些接受體最主要是對 HPA axis 產生抑制性的影響（Jacobson et al., 1991）。長期暴露在高濃度的糖皮質激素會對啮齒類和靈長類的海馬結構神經元造成不可逆的傷害（Magarinos et al., 1996；McEwen, 1992；Sapolsky, 1994；Sapolsky et al., 1990；Uno et al., 1989）。用核磁共振影像（MRI）觀察大腦結構，發現有憂鬱症病史者的左右兩側海馬體積都比對照組小約 9-13%；而且憂鬱症病史愈多，海馬的體積就愈小（Sheline et al., 1999；Bremner et al., 2000）。

(2)內側前額皮質區 (medial prefrontal cortex, MPC)

內側前額皮質區是一個被廣泛討論對壓力反應敏感和習得無助行為相關的核區 (Duncan et al., 1996; Petty et al., 1997)。血清素 (serotonin) 系統與壓力刺激產生的行為反應有關在過去頗受認同與重視。在受到束縛 (restraint)、寒冷 (cold)、社會環境等壓力實驗可發現血清素系統被活化 (Blanchard et al., 1991; Clement et al., 1993; Goldstein et al., 1994; Inoue et al., 1994; Joseph et al., 1983; Kirby et al., 1995; Yoshioka et al., 1995)。利用選擇性神經毒性 (neurotoxin) 5,7-dihydroxytryptamine (5,7-DHT) 使得前額皮質區的血清素大量耗盡，可降低因 plus maze 迷宮測試產生的焦慮行為 (Briley et al., 1990)。直接注射 5-HT_{1A} 促進劑 (agonist) 到中腦的縫合核 (raphe nucleus) 可以產生焦慮行為 (File et al., 1996); Deakin 等人 (1991) 提出背側縫合核與適應壓力有關 (Deakin et al., 1991)，他們認為 5-HT 路徑-由背側縫合核投射到前額皮質區和杏仁體，然後由其 5HT_{1A/2A/2C} 接受體來調節躲避性的逃跑行為。

(3)外側中隔核 (lateral septal nucleus, LSN)

一些研究顯示抗憂鬱劑可以增加外側中隔核神經產生神經衝動的頻率 (firing rate) (Contreras et al., 1990; Contreras et al., 1991; Contreras et al., 1993)。Sherman 等人 (1980) 發現無助行為與中隔核的 5HT 釋放減少有關；當血清素 (serotonin) 微量注射到外側中隔核，可以改善無助行為。另外中隔核也參與著其它憂鬱症動物實驗，例如：強迫游泳導致的行為絕望 (behavioral despair)。

(4)下視丘室旁核 (paraventricular hypothalamic nucleus, PVN)

下視丘掌管著神經內分泌系統，其所參與調節的飲食、睡眠、心跳節律、性慾等，在很多的憂鬱症患者都發現有不正常的現象。過去對下視丘和憂鬱症之間的研究多著重在 HPA axis (已在前文有過介紹)，而腎上腺皮質激素釋放因子 (CRF-由 PVN 釋放) 調節著睡眠、警覺和飲食功能 (Willie et al., 2001); 另外 MCH (Melanin concentrating hormone-在下視丘表現的一種荷爾蒙) 可增加性慾並減少焦慮反應 (Gonzalez et al., 1996; Monzon et al., 2001)。下視丘因為參與著多樣荷爾蒙的表現，因此與憂鬱症之間有著密切的關係。

(5)杏仁體 (amygdala)

杏仁體是記憶穩固的重要結構 (McGaugh, 2002)，在恐懼條件學習 (fear conditioning) 中扮演了舉足輕重的角色 (Davis, 1998; Cahill et al., 1999; LeDoux, 2000)。當面臨情緒危機，負責思考的新皮質尚未做成決定時，丘腦就直接將「害怕」訊息傳到杏仁體的基底核 (basal nucleus) 和外側核 (lateral nucleus)，接著訊息傳給杏仁體的中央核 (central nucleus)，再透過投射神經纖維與很多腦區連結，產生多樣的生理與行為反應來對抗害怕。

1969 年 Fonberg 利用電解作用 (electrolytically) 將狗的杏仁體背內側核 (dorsomedial nucleus) 損傷，結果意外的發現狗呈現嚴重的憂鬱症狀 (Fonberg et al., 1969; Fonberg et al., 1969; Fonberg et al., 1972)。這些狗嗜睡 (lethargy)、消極 (negativism)、不願意吃東西、表情也顯得悲傷。

杏仁體參與掌控情緒的分子機轉並不像海馬結構被了解的多，但如同海馬結構一般，研究也發現壓力會降低 BDNF 信使核糖核酸 (mRNA) 在杏仁體的表現 (Smith et al., 1995)。儘管杏仁體與焦慮、害怕有著密切關係，但其與憂鬱症的關係還是較少被關注，其調節機轉和功能上的邏輯也仍然不很清楚。

(6)伏核 (Nucleus Accumbens, NAC)

邊緣葉中與多巴胺系統最相關的核區就是伏核。伏核接受了來自中腦 (midbrain) 腹側被蓋核 (VTA) 的多巴胺神經元。此多巴胺神經元的投射區在「獎賞」行為中扮演著關鍵的角色。大部分的藥物濫用都會增加伏核的多巴胺神經傳導；而這些藥物產生的「獎賞」反應也是透過伏核的多巴胺機轉 (Koob et al., 1998; Wise, 1998)。

從腹側被蓋核 (VTA) 到伏核 (NAC) 的多巴胺投射，是目前公認的介導自然和藥物獎賞的重要神經通路。此 VTA-NAC 路徑與情緒調節、憂鬱症的關係到目前為止了解得並不多，只有少數的論文曾做了探討 (Willner, 1995; Di Chiara et al., 1999; Brown et al., 1993; Pallis et al., 2001; Yadid et al., 2001)。有一個初步的實驗結果發現 VTA-NAC 路徑上的 BDNF 改變可以在強迫游泳行為測驗上測出憂鬱症狀 (E.J.N., and A.J.E., 未發表的論文)。

然而研究者還是習慣將情緒方面的研究著重在海馬結構上的血清素和正腎上腺素機轉。這樣的分野是人為的，因此仍需要更有系統的研究來探討 VTA-NAC 獎賞路徑在情緒功能上所扮演的角色。

六.習得無助-憂鬱症動物模式

憂鬱症動物模式-習得無助 (learned helplessness) 是 1967 年由 Seligman 和 Maier 提出。實驗中給予實驗老鼠電擊的環境壓力，讓老鼠習得無助，一旦實驗老鼠習得無助，即使有機會逃避，牠仍然接受固定時間的電擊而放棄逃避。這樣的無助被發現可以藉由抗憂鬱劑的治療獲得改善 (Sherman., 1982)。因此習得無助提供了研究憂鬱症一個很好的動物模式。

此動物模式是將動物 (大白鼠、狗等) 固定 (約束) 在一個無法逃脫 (inescapable)、無法自我掌控 (uncontrollable) 的電擊箱中接受足底電擊 (foot shock) 後，放回籠子飼養一天，再將它們無束縛 (controllable) 的放到另一電擊測試箱中，動物竟會喪失逃脫的能力 (Seligman et al., 1971)。Weiss (1968) 發現大白鼠經過無法掌控的電擊之後會減少對水和食物的攝取，並且體重下降。1974 年 Seligman 提出無法掌控的環境壓力會造成動物產生類似憂鬱症的症狀。1982 年 Weiss 將動物經無法掌控的電擊 (uncontrollable shock) 之後所產生的症狀加以探討，發現竟與 DSM-III 精神科用來診斷人類憂鬱症患者的診斷條件非常吻合。這些症狀包括：(1)減少水和食物的攝取；(2)體重下降；(3)減少活動、競爭、玩耍、理毛的時間；(4)影響睡眠週期；(5)降低對獎賞的反應；(6)辨識錯誤率增加。1982 年 Sherman 與 1990 年 Martin 等人發現不論傳統或非傳統抗憂鬱劑皆可改善此逃脫缺陷。

研究目的

本研究利用習得無助的動物模式和免疫染色的方法來探討 BDNF 與 c-Fos 在小鼠不同腦區的表現，以釐清此二分子在憂鬱症病理所扮演的角色。

研究材料及方法

一.實驗動物

實驗所採用的動物為國家實驗動物中心所繁殖的雄性 BALB/cByJ 種小鼠。小鼠的年齡約 12 週大，體重為 29.2 ± 1.3 公克。飼養環境：每日十二小時（06：00~18：00）人工照明週期，一個鼠籠飼養五隻小鼠，室溫控制在 $24 \pm 1^\circ\text{C}$ ，溼度 55-65%。食物及水充分供應。所有的行為測試實驗皆在白天（早上十點~下午三點）進行。

二.習得無助動物模式

第一天-逃脫訓練（pre-shock escape training）：

訓練小鼠逃脫。將小鼠無束縛的放在 PsyLab Escape AutoBox（一個底層有電網，中間有跨板的長方盒）【圖五】。小鼠遭到電擊可以逃脫，只要小鼠越過跨板，電擊立即終止。訓練 30 次，每次 30 秒，評估小鼠是否學會逃脫。小鼠如果在 30 秒內沒有逃脫越過跨板，則算逃脫失敗。成功率達七成（21 次）以上的小鼠視為學會逃脫，然後才會繼續進行後面的實驗。

可逃脫的電擊程式為【圖八】-電擊強度：0.6 毫安培；持續期間：5 秒；中間休息時間：1 秒。

第二~四天-無法逃脫的電擊壓力（inescapable shock）：

讓小鼠待在一个無法逃脫（inescapable）的電網上（PsyLab Inescapable Box）【圖六】，並將小鼠的尾巴用膠帶固定。小鼠接受連續三天，每天 300 次無法逃脫的電擊（inescapable electric foot shock）。電擊強度：0.8 毫安培；持續期間：10 秒；中間休息時間：隨機，20 ~ 70 秒（平均約 45 秒）。電完 300 次後立即放回一般鼠籠。

第五天-習得無助的判定與分組（post-shock escape testing）：

待第四天電完小鼠，讓小鼠休息 24 小時後，第五天測驗小鼠是否產生無助。測驗方式是將小鼠無束縛的放在 PsyLab Escape AutoBox

【圖五】，小鼠遭到電擊可以逃脫，如第一天的訓練一樣，只要小鼠越過跨板，電擊立即終止。小鼠如果在 30 秒內沒有逃脫，則算逃脫失敗。我們將給予 30 次的測驗，失敗 20 次以上就達到習得無助（learned helplessness）的標準。失敗 20 次以下（包含 20 次）視為未產生習得無助（non-learned helplessness）【圖七】。

習得無助動物模式經過實驗動物管理委員會審核通過【表二】。

三.實驗配備

無法逃脫的電擊是使用 PsyLab Inescapable Box【圖六】，大小 10"x5"x4"，下方為可通電的鋼條，鋼條上的電線與 PsyLab Programmable Electricity Generator 相接，可輸入通電時間、通電強度、休息時間、通電次數。

逃脫行為測試儀為 PsyLab Escape AutoBox【圖五】，大小 50"x12"x15"；下方為可通電的鋼條；牆上有 7 道紅外線光柱可偵測實驗動物所在的位置；鋼條與光柱的電線透過光電開關與電腦連線，再由 Escape Controller（Delphi + VCLMMI）軟體自動執行 N 次（可自行設定）逃脫行為測試。測試中，電腦將紀錄每一次實驗動物的逃脫時間並依設定判斷是否逃脫成功。

四.實驗分組

小鼠依行為處理方式分為三組【圖九】，每組 5~7 隻，分別是：

(1) learned helplessness (LH) 組 - 習得無助組：5 隻

經過無法逃脫電擊壓力後產生習得無助。

(2) non-helplessness (non-LH) 組 - 非無助組：7 隻

經過無法逃脫電擊壓力後未產生習得無助。

(3) control 組- 對照組：6 隻

當實驗組老鼠接受無法逃脫電擊壓力的這一段時間，都持續養在一般鼠籠裡，沒有給予任何壓力，但其它的變數，例如：年

齡等，均控制一樣。

五.固定及冷凍保存

行為測試後立即注射 130mg/Kg 的巴比妥納(sodium pentobarbital, 65mg/ml) 將小鼠麻醉，剪開胸骨，插入一 26G 之針頭於左心室中，利用蠕動幫浦以 50ml 0.9% Normal Saline 進行灌流，而後再以 50ml 4% paraformaldehyde/0.1M phosphate buffer 灌流使組織固定。取出小鼠的腦，浸泡在 4% paraformaldehyde/0.1M phosphate buffer 4 小時做後固定。再以 30% sucrose/phosphate buffer 隔夜冷藏做冰凍保護。將腦組織冰到超低溫冷凍櫃-80°C，隔天進行冷凍切片。

六.冷凍切片

將腦自超低溫冷凍櫃取出後，迅速放入-20°C 的冷凍切片機，以包埋膠 (Shandon, Cryomatrix) 將腦黏在樣本載物台上，經 20 分鐘後包埋膠變色已達堅硬程度，腦組織便不會在切片過程中脫落，即可開始進行冷凍切片。切片的厚度設定在 30 μ m，每切三片取一片，以 phosphate buffer 收集，每一平口試管約放十片腦組織，一隻小鼠大腦約可切出 160 片。

七.免疫染色

組織免疫染色 (immunohistochemistry) 是運用抗原和抗體結合的原理，來檢測細胞內蛋白質的分布。這種方法的特異性強、敏感度高，已廣泛地被應用在生物學和醫學等研究。

在攝氏 4 度下給予稀釋成 1000 倍之兔多株抗 c-Fos 血清 (Oncogene 序號 PC38) 24 小時或稀釋成 70 倍之兔多株抗 BDNF 血清 (Chemicon 序號 AB1779SP) 48 小時，讓初級抗體在組織內辨認出抗原後，再以結合生物素 (biotin) 的羊抗兔抗體 (biotinylated goat anti-rabbit antibody) (稀釋 200 倍, Calbiochem 序號 401313) 作為次級

抗體 (secondary antibody)。次級抗體辨認兔多株抗體上的特殊抗原後，露出尾部的生物素 (biotin)。由於卵白素 (avidin) 與生物素 (biotin) 的鍵結力很強，外加卵白素 (avidin) 又可以同時接受多個生物素 (biotin)，因此進行標準的 avidin-biotin complex (ABC kit, 稀釋 100 倍, Vector PK4001) 之信號放大反應步驟【圖四】，會將原本微弱的訊號放大數千倍，形成含有大量過氧化酶 (peroxidase) 的聚合物。最後當聚合在組織中的過氧化酶被過氧化氫 (0.09% H_2O_2) 氧化還原時，會把呈色劑 DAB (0.05%) 還原成棕色的顆粒而沉澱在過氧化酶上 (呈色時間分別為 c-Fos 呈色 5 分鐘；BDNF 呈色 30 分鐘)，把原本無色的抗原-抗體複合物染成可以目測的顆粒。免疫染色後的切片置放在玻片上風乾後，蓋上蓋玻片供顯微鏡放大觀察。

八. 資料分析：

(1) 神經核定位

根據小鼠腦部定位圖 (Paxinos and Franklin, 1997) 與顯微鏡和電腦影像分析系統做比對，即可清楚了解並定位出玻片上各神經核所在位置。

(2) 免疫染色資料分析

BDNF 和 c-Fos 標記的神經細胞數量都是使用光學顯微鏡 (Ernst Leitz, 020-437, Germany) 65 倍放大倍率來判讀。利用 MCID (Micro Computer Imaging Device. Imaging Research Inc., Brock University, St. Catharine, Ontario Canada L2S 3A1) 影像分析系統來計算顏色較深、可清楚與背景區分之 BDNF 和 c-Fos 標記的神經細胞數量。計算範圍大小為 0.4mm×0.4mm。每一隻小鼠的每一個腦區數四個切片。欲讀取的腦區有：內側前額皮質 (MPC)、外側中隔核 (LSN)、伏核 (NAC-NACc、NACs)、海馬結構 (Hippocampus-CA、DG)、杏仁體 (Amygdala-coA、blA)、下視丘室旁核 (PVN)。

九.統計分析：

所有平均數都以平均值±標準誤 (mean ± standard error) 表示，對於三組以上平均數的比較，以第十版的 SPSS 統計軟體做單因子變異數分析 (one-way ANOVA)，以 Scheffe's test 做事後檢定 (post-hoc test)。因為此研究分別對十一個核區做了統計上的檢測，而使假陽性的機會上升，為了修正這種多重比較所增加的第一型統計錯誤，我們捨棄傳統的 $\alpha = 0.05$ ，而採用比較嚴謹的 $\alpha = 0.01$ ，也就是當 $p < 0.01$ 時才視為有意義的差異。

結果

一.行為測試的結果：

(1)逃脫訓練 (pre-shock escape training)

各組的實驗小鼠在接受電擊壓力之前都經過訓練，逃脫成功率達七成（逃脫成績為 6.1 ± 0.5 秒）的老鼠才進行後面的實驗。

(2)無法逃脫的電擊壓力 (inescapable shock)

實驗組經過無法逃脫的電擊壓力之後，逃脫的成績 (mean±S.E.M.) 為 non-helplessness 組 (非無助)：逃脫失敗小於 20 次 (逃脫成功的時間為 14.5 ± 1.9 秒)；learned helplessness 組 (習得無助)：逃脫失敗大於 20 次 (逃脫成功的時間則延長為 27.1 ± 1.2 秒)。

(3)習得無助的判定與分組

12 隻 BALB 小鼠在經過無法逃脫的電擊壓力之後，有 5 隻 (41.6%) 產生習得無助，另外 7 隻 (58.4%) 則沒有產生習得無助。

二.免疫染色結果：

將經過行為測試後的實驗小鼠立即犧牲灌流進行免疫染色，結果如下：

(1)腦內滋養因子 BDNF 之免疫染色結果

Hippocampus：

在 CA1[F(2,65) = 2.067, $p = 0.135$] 【圖十】、CA2[F(2,65) = 0.619, $p = 0.541$] 【圖十一】、CA3[F(2,65) = 2.057, $p = 0.136$] 【圖十二】、DG[F(2,57) = 1.871, $p = 0.163$] 【圖十三】四區，三組實驗動物

(control, non-helplessness, learned helplessness) BDNF 免疫染色的細胞數目都沒有顯著的差異【表三】。但以型態學來觀察時，我們的結果顯示 CA1、CA2、CA3 錐體細胞層 (stratum pyramida) 與 CA3 放射層 (stratum radiatum) BDNF 的染色有"習得無助>非無助>對照組"的明顯趨勢。

MPC :

BDNF 免疫染色的細胞數目在三組實驗動物間都沒有顯著的差異 [F(2,57) = 0.136, $p = 0.874$] 【圖十四】 【表四】。

LSN :

BDNF 免疫染色的細胞數目在三組實驗動物間都沒有顯著的差異 [F(2,69) = 0.903, $p = 0.410$] 【圖十五】 【表四】。

PVN :

BDNF 免疫染色的細胞數目在三組實驗動物間都沒有顯著的差異 [F(2,60) = 0.226, $p = 0.799$] 【圖十六】 【表四】。

Amygdala :

在 coA 區 [F(2,61) = 1.223, $p = 0.301$]、blA 區 [F(2,61) = 4.115, $p = 0.021$]，三組實驗動物 BDNF 免疫染色的細胞數目都沒有顯著的差異 【圖十七】 【表五】。

NAC :

在 NACc 區 [F(2,69) = 1.306, $p = 0.277$]、NACs 區 [F(2,69) = 3.105, $p = 0.051$] 兩區，三組實驗動物 BDNF 免疫染色的細胞數目都沒有顯著的差異 【圖十八】 【表六】。

(2) 早期警示基因 c-Fos 之免疫染色結果

Hippocampus :

在 CA1 [F(2,72) = 0.508, $p = 0.604$] 【圖十九】、CA2 [F(2,64) = 1.450, $p = 0.242$] 【圖二十】、CA3 [F(2,80) = 2.252, $p = 0.112$] 【圖二十一】三區，三組實驗動物免疫染色的細胞數目沒有顯著的差異；在 DG 區 [F(2,71) = 6.611, $p = 0.002$] 【圖二十二】的 c-Fos 免疫染色的細胞數目 learned helplessness 組 (18.17 ± 1.77) 顯著低於 non-helplessness 組 (29.47 ± 2.50) (Scheffe's test, $p = 0.002$)，c-Fos 表現趨勢為"非無助 > 對照組 > 習得無助組" 【表七】。

MPC :

c-Fos 的免疫染色的細胞數目 non-helplessness 組 (23.19 ± 2.36) 顯著高於 control 組 (11.25 ± 2.02) [F(2,33) = 6.141, $p = 0.005$] (Scheffe's

test, $p = 0.008$)，c-Fos 表現趨勢為"非無助>習得無助>對照組"【圖二十三】【表八】。

LSN：

c-Fos 的免疫染色的細胞數目 learned helplessness 組 (21.62 ± 1.64) 顯著低於 non-helplessness 組 (31.48 ± 2.14) [$F(2,71) = 5.393, p = 0.007$]，c-Fos 表現趨勢為"非無助>對照組>習得無助組"【圖二十四】【表八】。

PVN：

c-Fos 的免疫染色的細胞數目 control 組 (32.61 ± 2.16) 顯著低於 learned helplessness 組 (46.68 ± 2.28) (Scheffe's test, $p = 0.001$)。 [$F(2,58) = 7.719, p = 0.001$]，c-Fos 表現趨勢為"習得無助>非無助>對照組"。【圖二十五】【表八】。

Amygdala：

在 coA 區 [$F(2,81) = 2.865, p = 0.063$] 和 blA 區 [$F(2,81) = 3.129, p = 0.049$]，三組實驗動物 c-Fos 免疫染色的細胞數目都沒有顯著的差異【圖二十六】【表九】。

NAC：

NACc 區 [$F(2,71) = 2.049, p = 0.136$] 和 NACs 區 [$F(2,71) = 0.978, p = 0.381$]，三組實驗動物 c-Fos 免疫染色的細胞數目都沒有顯著的差異【圖二十七】【表十】。

討論

一.本實驗選取與憂鬱症有關的腦區之 c-Fos 免疫染色結果

本研究發現 BALB 小鼠在習得無助時，其外側中隔核和海馬結構齒狀回的 c-Fos 免疫染色細胞數會減少，因為非習得無助組接受了與習得無助組完全一樣的無法逃脫電擊壓力，而非習得無助組與對照組在這二個核區 c-Fos 的表現又沒有差異，所以 c-Fos 在外側中隔核和海馬結構齒狀回的表現量降低不是單純的電擊壓力所造成，而是習得無助才會有的現象。這個結果不僅與 Steciuk 等人（1999）發現習得無助大鼠的外側中隔核 c-Fos 表現會下降一致；而且與 Duncan（1996）等人的發現相呼應，他們發現抗憂鬱劑 desipramine 不僅使大鼠在強迫游泳時不容易變成失望與無助，而且其中隔核 c-Fos 的表現量會增加 60%。

無助小鼠海馬結構齒狀回的 c-Fos 蛋白表現顯著降低，意味著這個區域的神經活性降低，這可能與海馬結構因為壓力而受傷害有關，因為動物在壓力狀態下會促使糖皮質激素分泌，而長期暴露在高濃度的糖皮質激素會對嚙齒類和靈長類的海馬結構神經元造成不可逆的傷害（Magarinos et al., 1996；McEwen, 1992；Sapolsky, 1994；Sapolsky et al., 1990；Uno et al., 1989）；另外，核磁共振影像（MRI）也發現有憂鬱症病史者的左右兩側海馬體積比對照組小約 9-13%（Sheline et al., 1999；Bremner et al., 2000）。過去有關海馬結構的 c-Fos 表現和壓力的研究，都沒有討論到神經元傷害的問題，或許因為那些研究大多施以較短時間的壓力（30 分鐘-120 分鐘），而本研究施以的壓力時間則長了許多（每天四小時，連續三天）。至於為何只在海馬結構的齒狀回出現這種現象，而 CA 的 c-Fos 表現卻無顯著的變化，我們還無法解釋。

不少研究（Duncan et al., 1996；Petty et al., 1997）都認為內側前額皮質區是一個對壓力反應敏感並且與習得無助有關的核區。我們的結果也顯示了這個區域與壓力有關，因為 non-helplessness 組 c-Fos 表現量顯著高於 control 組；但是沒有足夠的結果顯示與習得無助有關，因為無助小鼠在內側前額皮質區 c-Fos 的表現量與非無助組沒有顯著差異，這部分與 Steciuk 等人（1999）的研究結果一致。

因為 c-Fos 可以反應神經細胞的活性，因此我們的無助小鼠其下視丘室旁核 c-Fos 表現量增加，表示小鼠在無助或憂鬱的狀態下其下視丘室旁核的活性會增加。Shumake 等人 (2001) 以細胞色素氧化酵素 (cytochrome oxidase) 作為細胞氧化代謝與神經活性的指標，也發現先天憂鬱的大白鼠下視丘室旁核的代謝率比一般的老鼠增加了 80%，但 Steciuk 等人 (1999) 對無助大鼠的研究卻沒有這樣的發現。

儘管有上述的發現，但是這些結果還不能直接說明是習得無助造成 c-Fos 表現降低，還是 c-Fos 表現降低才使小鼠變成習得無助。另外，c-Fos 只是細胞內訊息傳導流程的一個傳遞者，也就是說我們對 c-Fos 的觀察只能意味著轉譯前現象 (pre-translation event)，是一個指標，但不能用來推論其訊息傳遞的最終表現。因為真正重要的課題是 c-Fos 蛋白到底調節了那些後續基因？這些基因的活化為細胞帶來何種改變？神經細胞的功能和型態是否因此而受到影響？這些屬於探討轉譯後現象 (post-translation event) 的等等疑問是未來值得深入的研究方向。

二.本實驗選取與憂鬱症有關的腦區之 BDNF 免疫染色結果

過去有許多研究顯示環境壓力會導致憂鬱和降低 BDNF 信使核糖核酸 (mRNA) 的表現；長期給予抗憂鬱劑可增加海馬結構 BDNF mRNA 的表現量並可抑制 BDNF mRNA 受環境壓力影響而降低 (Nibuya et al., 1996 ; Nibuya et al., 1999)。臨床大腦影像研究也發現憂鬱症病人的海馬結構萎縮且 BDNF mRNA 表現量下降 (Duman et al., 1997)。甚至有研究者直接微量注射 BDNF 到海馬結構 CA3，發現可對憂鬱症動物模式：強迫游泳與習得無助具治療效果 (Shirayama et al., 2002)。雖然給予外生性 BDNF 可以產生類抗憂鬱劑的效果，但內生性 BDNF 和憂鬱症之間的關係仍不清楚。而且針對憂鬱和 BDNF 的研究多以信使核糖核酸 (mRNA) 為主，十分缺乏 BDNF 蛋白質的研究報告，因此本實驗針對真正扮演功能性角色的 BDNF 蛋白質進行研究。

Yan 等人在 1997 年廣泛地比較了 BDNF 信使核糖核酸 (mRNA) 和蛋白質在老鼠大腦表現的異同，發現有諸多區域表現是不一致的，

一些腦區表現了 BDNF mRNA 但卻探測不到蛋白質 (Yan et al., 1997)。以海馬結構為例，正常大白鼠的齒狀回 (dentate gyrus) 表現了非常大量的 BDNF mRNA，但卻表現極少量的 BDNF 蛋白質 (Ernfors et al., 1990; Hofer et al., 1990; Phillips et al., 1990)。其可能的原因為：(一) 蛋白質的表現量真的太少；(二) BDNF 蛋白在神經細胞以前體 (prepro-) 或反摺疊 (unfold) 的形式存在，而不被抗體所辨識；(三) BDNF 蛋白質在合成 (processing) 後就馬上被運送或釋放到軸突 (axon)，沒有囤積在神經細胞的本體，因此以型態學來分析時，我們的結果顯示 CA1、CA2、CA3 的錐體細胞層 (stratum pyramida) 與 CA3 的放射層 (stratum radiatum) BDNF 蛋白質的染色有"習得無助>非無助>對照組"的明顯趨勢。

從形態學來研判，習得無助小鼠的 CA 區所增加的 BDNF 可能來自籃狀細胞 (basket cell)，而籃狀細胞會對錐狀細胞 (pyramidal neuron) 發出抑制性的訊息，因此我們的結果顯示 CA 區的錐狀細胞受到抑制可能與習得無助或憂鬱症的機轉有關。另外齒狀回 (dentate gyrus) 的顆粒細胞 (granule Cell)，其苔狀纖維 (mossy fiber) 延伸到 CA3 的放射層，如果習得無助或憂鬱時，顆粒細胞所合成的 BDNF 蛋白會立刻傳送出去，在苔狀纖維的末端形成 post releasing pool，而不囤積在細胞本體，此可以解釋我們所觀察到 CA3 的放射層 BDNF 染色變深，而齒狀回錐狀細胞 BDNF 染色卻沒有變化的現象。

2002 年 Conti 發現缺乏 CREB (BDNF 傳導路徑的上游物) 的小鼠，給予抗憂鬱劑仍可在強迫游泳測試上表現出療效，但卻未發現 BDNF 在海馬結構上表現增加。2001 年 Rios 成功繁殖出 BDNF 基因剔除小鼠，小鼠除了顯現出焦慮的個性以及體重肥胖外，並未發現憂鬱症狀。另外 BDNF 蛋白的合成也似乎還受著某種調節，並不直接完全仰賴 mRNA 的轉錄 (Yan et al., 1997)。因此雖然已有很多的研究發現憂鬱症與 BDNF mRNA 之間的重要關係，但在憂鬱症的 BDNF 蛋白質層面、BDNF mRNA 與 BDNF 蛋白質之間的關係在憂鬱症所扮演的角色都值得再進行更深入的研究。

三. 習得無助-憂鬱症動物模式

人類是很難被控制在特定生理與條件環境下被實驗的，因此利用動物模式研究憂鬱症的病因及藥物療效有其重要性。但缺乏有效的動物模式是阻礙憂鬱症研究最主要的原因，因為憂鬱症的重要症狀（例如：憂鬱情緒、無用感、自殺意念）沒有辦法很簡單的在動物身上加以評估。因此建立憂鬱症的動物模式必須符合(1)壓力造成；或者(2)對抗憂鬱劑有治療反應，才具有可信度（Willner, 1995；Hitzemann, 2000；Porsolt, 2000；Lucki, 2001）。另外對憂鬱症是否有基因上的病因？有多少個基因與憂鬱症有關？都還不能確定，因此目前還無法利用基因轉殖鼠來做深入的研究。

雖然習得無助的特徵與憂鬱症的表面症狀有許多相似之處，但是二者仍有以下幾點實質上的差異，因此利用習得無助的動物模式來研究憂鬱症的病理時，解釋上就必須有適當的保留：（1）利用無法逃脫的電擊產生的憂鬱症狀通常不會持續超過 48-72 小時，而且經常恢復得很突然、很快速（Desan et al., 1988；Overmier et al., 1967；Weiss et al., 1981；Zacharko et al., 1983），這與憂鬱症是一種持久而且恢復緩慢的特性有很大的差異；（2）臨床經驗顯示憂鬱症不一定起因於外在的壓力，許多研究顯示憂鬱症與遺傳或個性有密切的關聯，是內因性的（Plomin., 1995；Kendler et al., 1997；Rutter et al., 1997），因此以外力引發的習得無助就不能用來解釋這種類型的憂鬱症；（3）Seligman 等人(1967)認為動物在無法逃脫的情境下持續接受電擊，次數多了就會產生一種「不論我怎麼做都沒有用（nothing I do matters）」的「認知」，因為這種「認知」而放棄掙扎，放棄逃脫，而變得無助，好像因學習而得到無助。Weiss 等人認為對於非人類的動物下這樣的推論是非常困難的（Weiss, 1970；Weiss, 1980；Anisman et al., 1978；Anisman et al., 1991）。因為成鼠（小鼠）的大腦重量是人類的二千分之一，而且在行為本質上也與人類迥異，老鼠是否真有能力因「不論我怎麼做都沒有用」的「認知」而變得無助應當持保留的態度。人類大腦皮質和其它進化上的改變產生了複雜的認知、情緒、社交活動和社會結構；而老鼠因為大腦皮質和訊息溝通的技巧使得它們的藝術創造力、悲傷情緒（grief）等都受到限制。面對這些明顯的物種上的差異，我們該如何去了解老鼠的大腦功能真能恰當的代表人類的行為與情緒？

實驗過程中利用電擊壓力誘發小鼠產生無助，再利用逃脫測驗評估是否產生無助。我們發現，直接將沒有經過電擊壓力的小鼠拿來做逃脫測驗會有 70% 的小鼠皆逃脫失敗，這些小鼠如果不經過訓練而拿來進行後面的實驗，將會產生很多的實驗假象。大多數國際發表的論文在建立習得無助動物模式時都沒有提到訓練這一步驟，這有可能是本研究免疫染色結果與前面引述的少數論文不一致的部分原因。另外在逃脫訓練過程中，我們發現，如果先給予小鼠十五分鐘的時間在 PsyLab Escape AutoBox 適應，讓它們探索知道跨板兩側的環境，通電時它們會比較敢逃脫至不熟悉的對側而訓練成功，此也使得評估經無法逃脫電擊壓力後產生的習得無助更為客觀。

結論

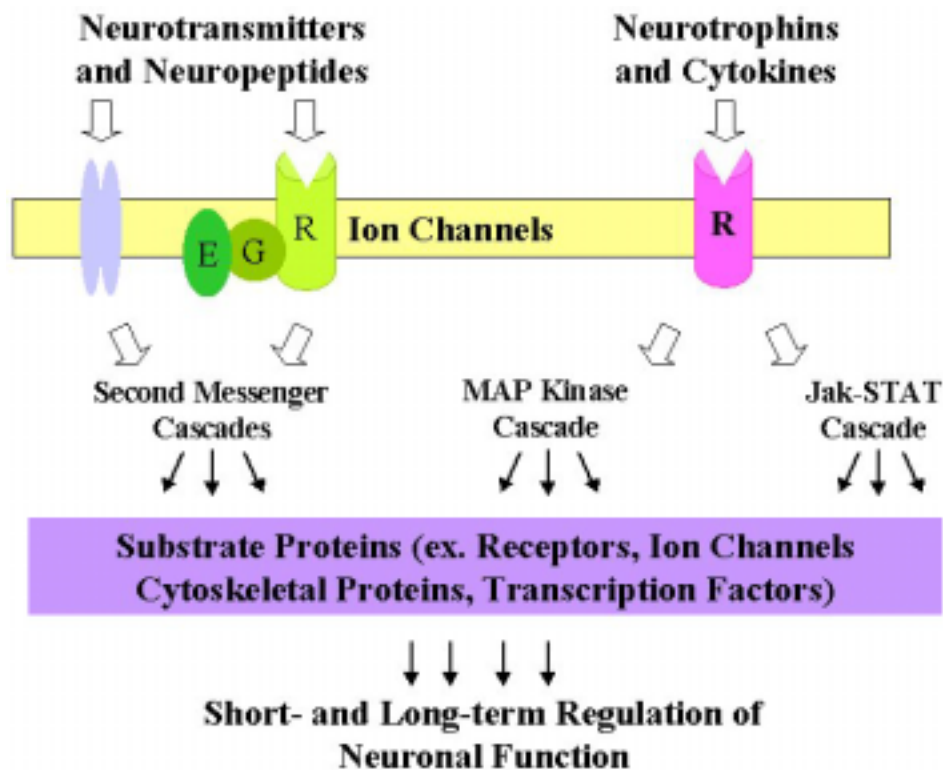
小鼠受到壓力時，其內側前額皮質區和下視丘室旁核 c-Fos 的表現會增加，顯示此兩核區的細胞活性與壓力反應有關。當小鼠變得習得無助時，其外側中隔核的 c-Fos 顯著減少；另外海馬結構 CA1、CA2 與 CA3 的錐體細胞層 BDNF 蛋白的染色有"習得無助組> 非無助組 > 對照組"的趨勢，但是染色的錐狀細胞數目沒有差別，顯示習得無助組所增加的 BDNF 來自錐體細胞層的抑制性細胞，因此此結論為習得無助或憂鬱症的病理與外側中隔核神經細胞的活性降低及錐狀細胞受到抑制有關。

名詞縮寫

ACTH	adrenocorticotropin	促腎上腺皮質激素
BDNF	brain-derived neurotrophic factor	腦內神經滋養因子
blA	basolateral amygdale nucleus	杏仁體外側基底核
CA1	hippocampus formation CA1	海馬結構 CA1
CA2	hippocampus formation CA2	海馬結構 CA2
CA3	hippocampus formation CA3	海馬結構 CA3
coA	central amygdala nucleus	杏仁體中央核
CRF	corticotropin-releasing factor	促腎上腺皮質激素釋放因子
DG	hippocampus formation, dentate gyrus	海馬結構齒狀回
HPA axis	hypothalamic-pituitary-adrenal axis	下視丘-腦下腺-腎上腺軸
LH	learned Helplessness	習得無助
LSN	lateral septal nucleus	外側中隔核
MAOIs	monoamine-oxidase inhibitors	單胺氧化酶抑制劑
MPC	medial prefrontal cortex	內側前額皮質區
NAC	nucleus Accumbens	伏核
NACc	Core of nucleus accumbens	伏核核區
NACs	Shell of nucleus accumbens	伏核殼區
non-LH	non-learned helplessness	非無助
PET	positron emission tomography	正子加速器

PVN	paraventricular hypothalamic nucleus	下視丘室旁核
TCA	tricyclic antidepressants	三環抗抑鬱劑

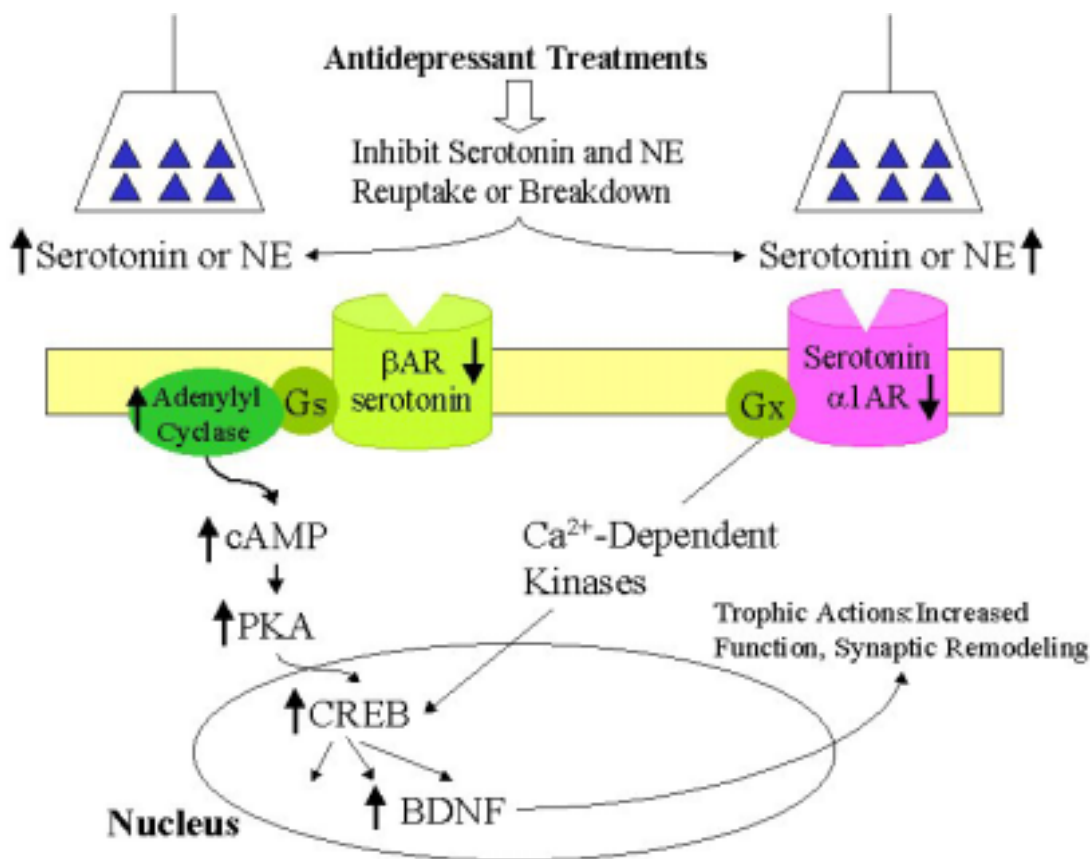
圖表與說明



【圖一】細胞的訊息傳導路徑

參考 Duman et al., 1997 (鄭之雅畫, 2003)

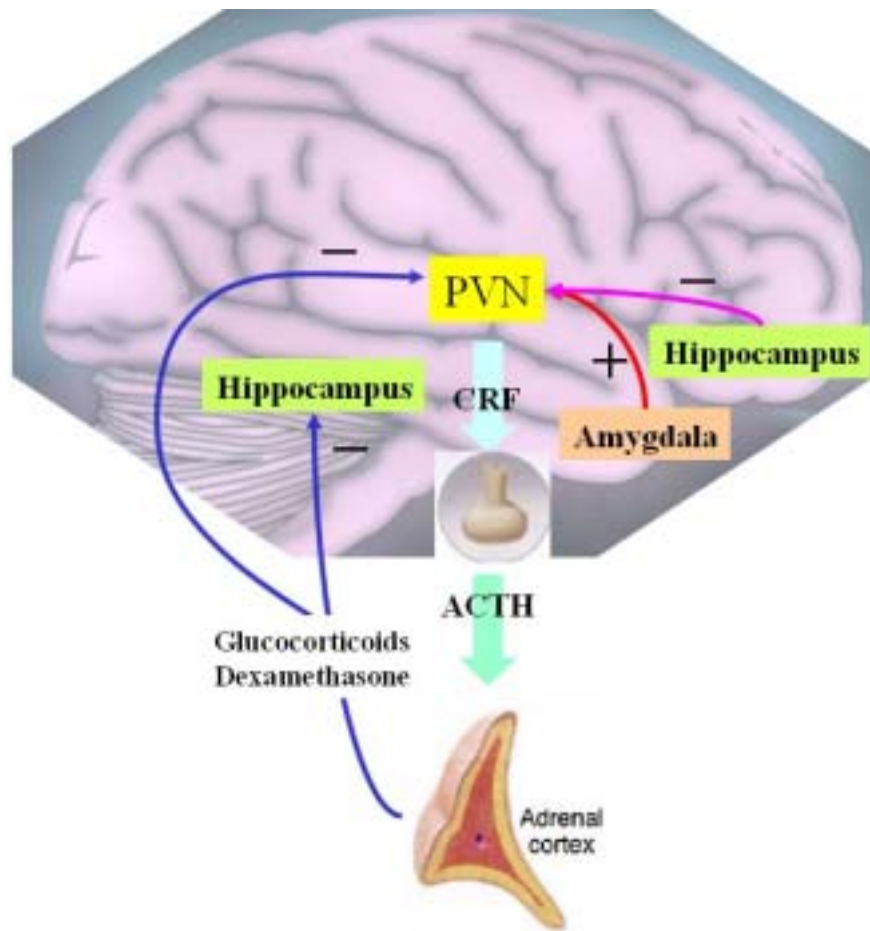
細胞內訊息傳導路徑大致可區分成兩類，(1) 與二級訊號傳遞因子偶合的接受體 (receptor-coupled second messengers)：這條路徑可受神經傳導物質 (例如：單胺) 的刺激後活化。二級訊號傳遞因子 (second messenger) 包括：cAMP、Ca²⁺、IP3，可進一步活化蛋白激酶 (protein kinase)，使蛋白受質磷酸化而產生一連串接續的訊息傳導。(2) 酪氨酸蛋白激酶接受體 (receptor tyrosine kinase)：此路徑受到神經滋養物質 (neurotrophins) 和細胞激素 (cytokine) 的調節。當接受體活化後，細胞內的酪氨酸蛋白激酶 (protein tyrosine kinase) 會被磷酸化進而可再活化 MAPK (mitogen-activated protein kinase) 和 Jak-STAT 訊息傳導路徑。調節這些細胞內的訊息傳導可產生特定蛋白，最後造成短期甚至長期影響到神經細胞的功能。



【圖二】長期服用抗憂鬱劑的分子機轉

參考 Duman et al., 1997 (鄭之雅畫, 2003)

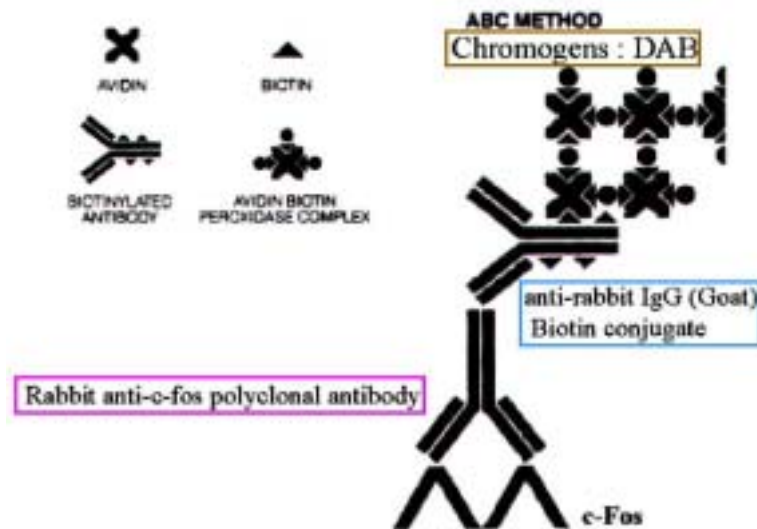
抗憂鬱劑可在短期便透過抑制血清素 (Serotonin)、正腎上腺素 (norepinephrine) 的回收與抑制單胺 (monoamines) 的分解而造成血清素和正腎上腺濃度增加。長期服用抗憂鬱劑會降低血清素和正腎上腺素接受體的功能與表現，但會活化環狀磷酸腺苷 (cyclic AMP) 訊息傳導路徑，包括：增加 PKA 和轉錄因子 CREB (cAMP response element-binding protein) 的濃度。單胺接受體活化後導致 Ca²⁺ 激酶濃度增加也可調節 CREB 的表現。活化 cAMP 訊息傳導路徑意味著血清素和正腎上腺素正向調節 (up-regulated) 了一些大腦功能。因為最近的研究發現腦內神經滋養因子 BDNF (CREB 轉錄因子的目標物) 也會在長期服用抗憂鬱劑後表現量增加。BDNF 與神經的分化、生長及維持大腦成熟神經細胞的存活有關。



【圖三】下視丘-腦下腺-腎上腺軸的調節 (HPA axis)

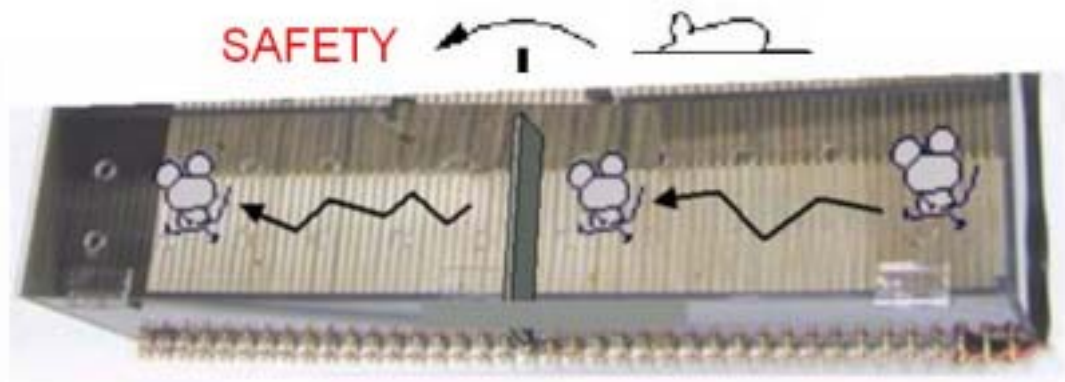
參考 Nestler et al., 2002 (鄭之雅畫, 2003)

下視丘室旁核 (PVN) 的 CRF-containing parvocellular neurons 會在接收到壓力訊息時開始作用，此外還受到杏仁體興奮性神經纖維 (excitatory afferents) 和海馬結構抑制性神經纖維 (inhibitory afferents) 的調控。當分泌出促腎上腺皮質激素釋放因子 (CRF) 時，腦下腺前葉 (anterior pituitary) 將合成及釋放促腎上腺皮質激素 (ACTH)。ACTH 會透過血流到達腎上腺皮質 (adrenal cortex) 來刺激合成及釋放糖皮質激素 (glucocorticoids)。糖皮質激素 (glucocorticoids) 可合成 dexamethasone 來抑制 CRF 和 ACTH 的合成及釋放，最終則抑制了自己的合成。糖皮質激素 (glucocorticoids) 在濃度高的時候對海馬結構是具有損害性的，因此過量的糖皮質激素 (glucocorticoids) 與憂鬱症可能有關。



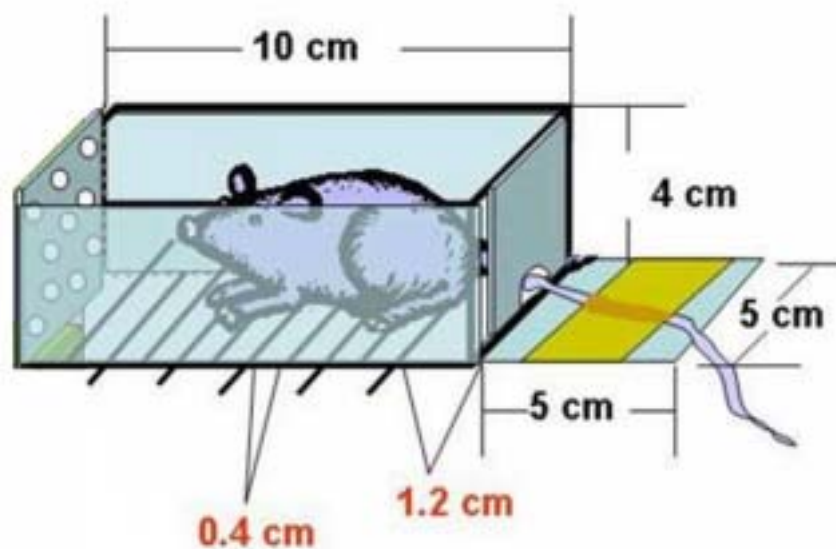
【圖四】ABC 方法

這個方法是利用著卵白素（avidin）與生物素（biotin）特殊超強結合力之特性（分離率： $10^{-19}M$ ）。一個 avidin 有四個可與 biotin 結合的位置，然而由於 biotin 分子結合的方向性，通常少於四個 biotin 會與 avidin 結合。這個方法需要先以「被生物素標籤化」的二次抗體（biotinylated antibody）與一次抗體連結後，再加入 avidin-biotin 複合物，利用此複合物卵白素（avidin）的 open site 來與二次抗體的生物素（biotin）結合。最後複合物上的過氧化物酶利用 DAB 來呈色（棕色產物）。



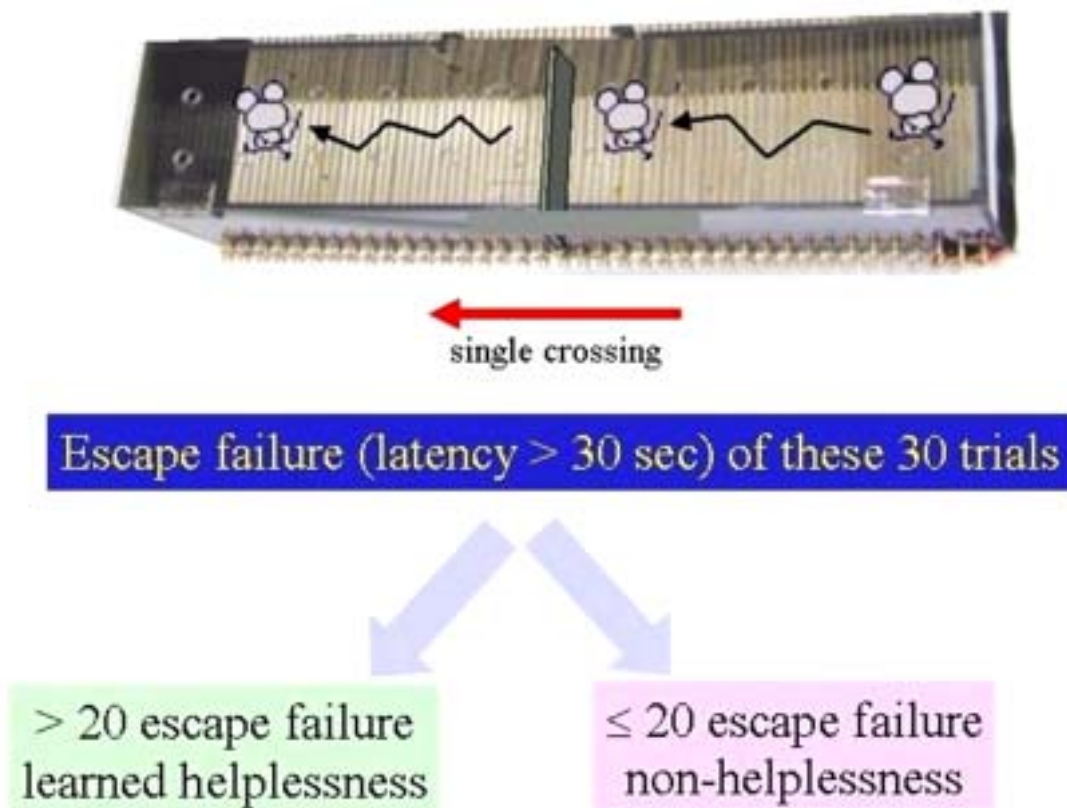
【圖五】PsyLab Escape AutoBox（鄭之雅畫, 2003）

此為一底層有電網，中間有跨板的長方盒。小鼠遭到電擊可以逃脫，只要小鼠越過跨板，電擊立即終止。



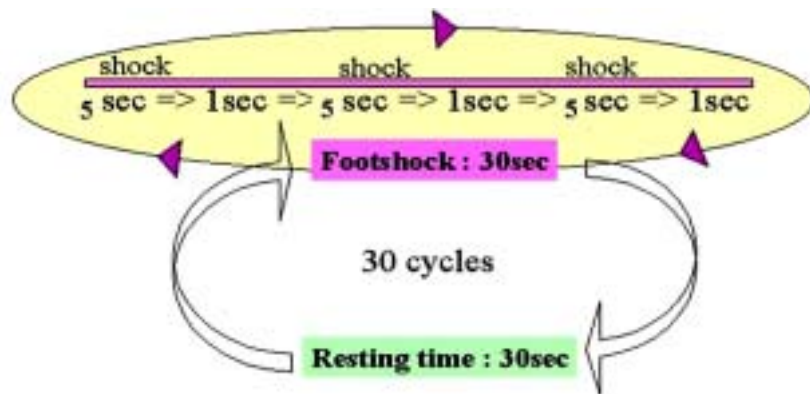
【圖六】PsyLab Inescapable Box（Hong, 2002）

讓小鼠待在一个無法逃脫（inescapable）的電網上，並將小鼠的尾巴用膠帶固定。小鼠接受 300 次無法逃脫的電擊（inescapable electric foot shock）。



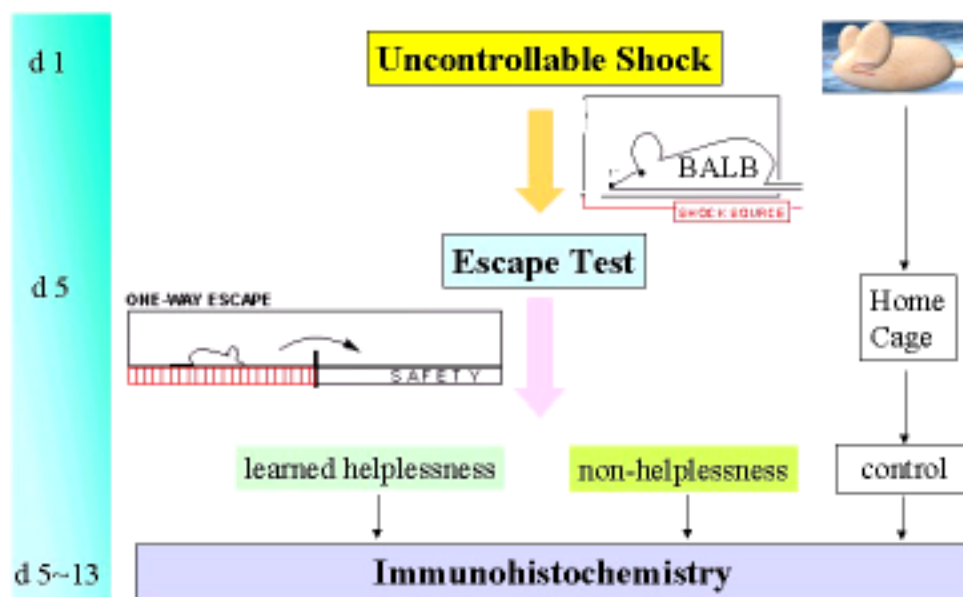
【圖七】習得無助的標準（鄭之雅畫, 2003）

小鼠遭到電擊可以逃脫，只要小鼠越過跨板，電擊立即終止。一般小鼠未經過無法逃脫的電擊（inescapable electric foot shock）壓力，在這樣的測驗不需 10 秒的時間就會馬上逃脫到對側而終止不舒服的電擊，因此當小鼠超過 30 秒未成功穿越中線，就算逃脫失敗。我們將給予 30 次的測驗，失敗 20 次以上就達到習得無助的標準。失敗 20 以下（包含 20 次）視為未產生習得無助。



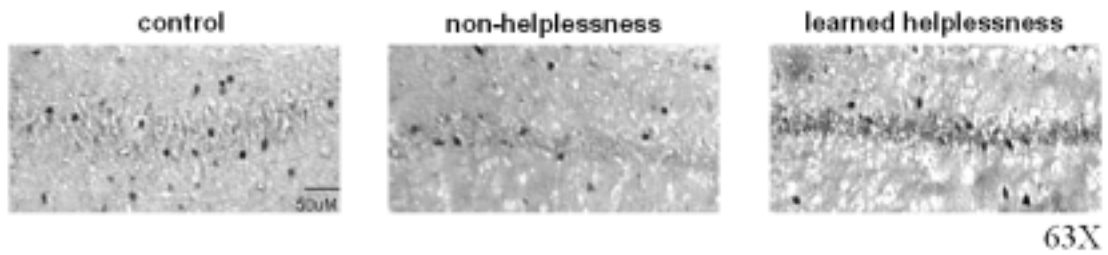
【圖八】可逃脫的電擊程式圖（鄭之雅畫, 2003）

電擊強度：0.6 毫安培；電流持續期間：5 秒；每電 5 秒休息 1 秒。當小鼠在通電狀態成功越過跨板或延遲 30 秒仍未越過跨版，電擊程式都將立即終止，開始休息程式。給予 30 秒的休息時間之後再開始第二次的逃脫測驗。一共評估 30 次。

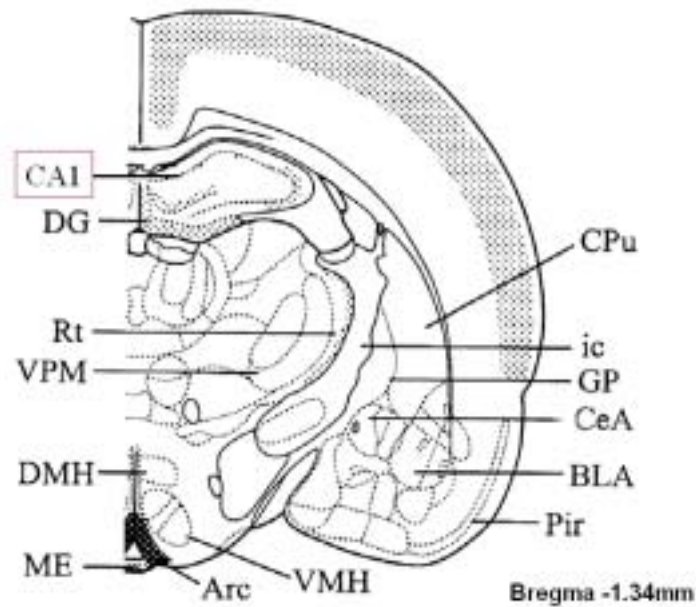


【圖九】實驗分組（鄭之雅畫, 2003）

小鼠依行為處理方式分成三組。對照組（control）所有時間都待在一
般鼠籠。實驗組分兩組，經無法逃脫電擊壓力後評估有產生無助的
learned helplessness 組及沒有產生無助的 non-helplessness 組。

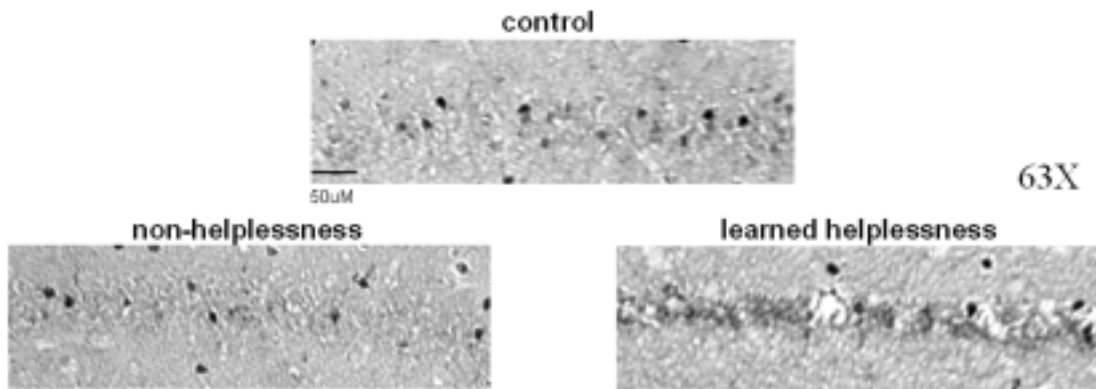


A. BDNF immunoreactivity neurons in the CA1 area of hippocampus. The results of different groups are shown. scale bar = 50µm.

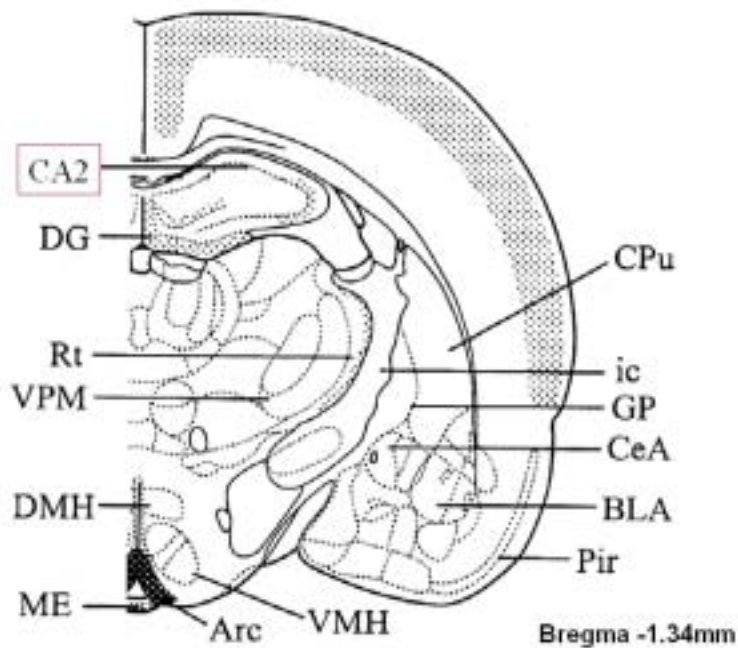


B. 相對應的小鼠腦部定位圖 (Migita et al., 2001)

【圖十】A圖是BDNF在海馬結構CA1區的免疫染色組織圖。63倍放大來判讀。計算範圍大小為 0.16mm^2 。比例尺=50µm。B圖是相對應的小鼠腦部定位圖。以型態學來觀察時，我們的結果顯示CA1錐體細胞層（stratum pyramida）BDNF的染色有"習得無助>非無助>對照組"的明顯趨勢。



A. BDNF immunoreactivity neurons in the CA2 area of hippocampus. The results of different groups are shown. scale bar = 50um.

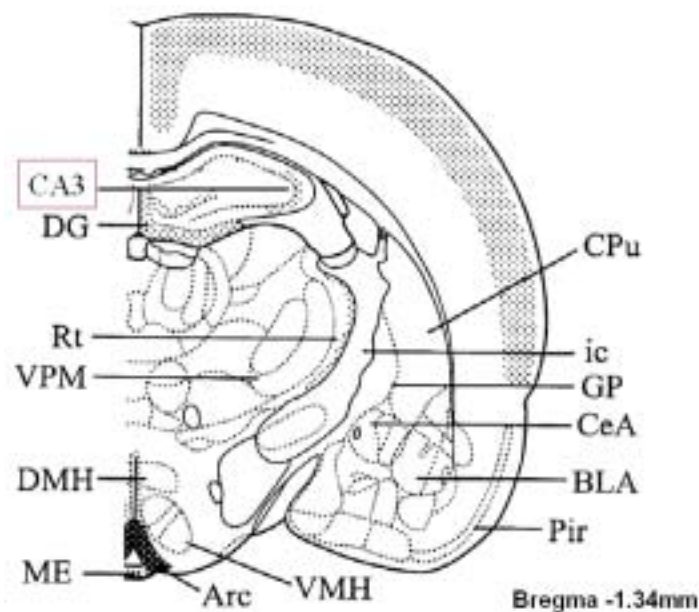


B. 相對應的小鼠腦部定位圖 (Migita et al., 2001)

【圖十一】A 圖是 BDNF 在海馬結構 CA2 區的免疫染色組織圖。63 倍放大來判讀。計算範圍大小為 0.16mm^2 。比例尺 = 50um。B 圖是相對應的小鼠腦部定位圖。以型態學來觀察時，我們的結果顯示 CA2 錐體細胞層 (stratum pyramida) BDNF 的染色有"習得無助>非無助>對照組"的明顯趨勢。

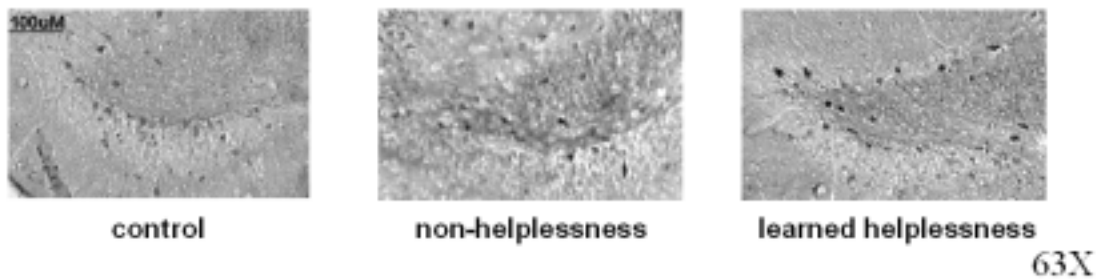


A. BDNF immunoreactivity neurons in the CA3 area of hippocampus. The results of different groups are shown. scale bar = 100um.

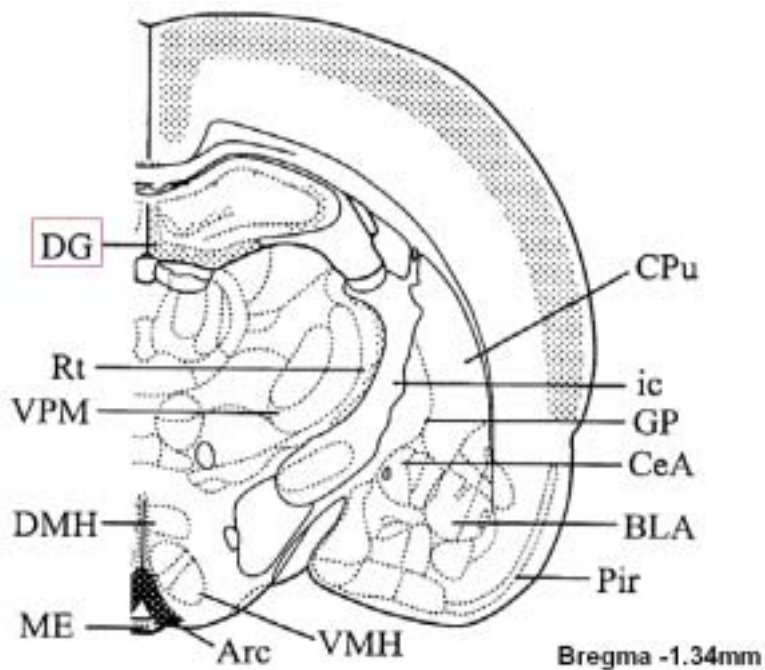


B. 相對應的小鼠腦部定位圖 (Migita et al., 2001)

【圖十二】A 圖是 BDNF 在海馬結構 CA3 區的免疫染色組織圖。63 倍放大來判讀。計算範圍大小為 0.16mm^2 。比例尺 = 100um。B 圖是相對應的小鼠腦部定位圖。以型態學來觀察時，我們的結果顯示 CA3 錐體細胞層 (stratum pyramida) 和放射層 (stratum radiatum) BDNF 的染色有"習得無助>非無助>對照組"的明顯趨勢。



A. BDNF immunoreactivity neurons in the DG area of hippocampus. The results of different groups are shown. scale bar = 100µm.

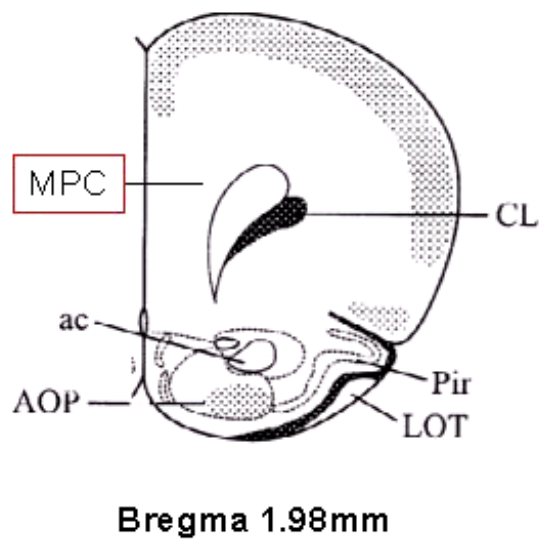


B. 相對應的小鼠腦部定位圖 (Migita et al., 2001)

【圖十三】A 圖是 BDNF 在海馬結構 DG 區的免疫染色組織圖。63 倍放大來判讀。計算範圍大小為 0.16mm^2 。比例尺 = 100µm。B 圖是相對應的小鼠腦部定位圖。

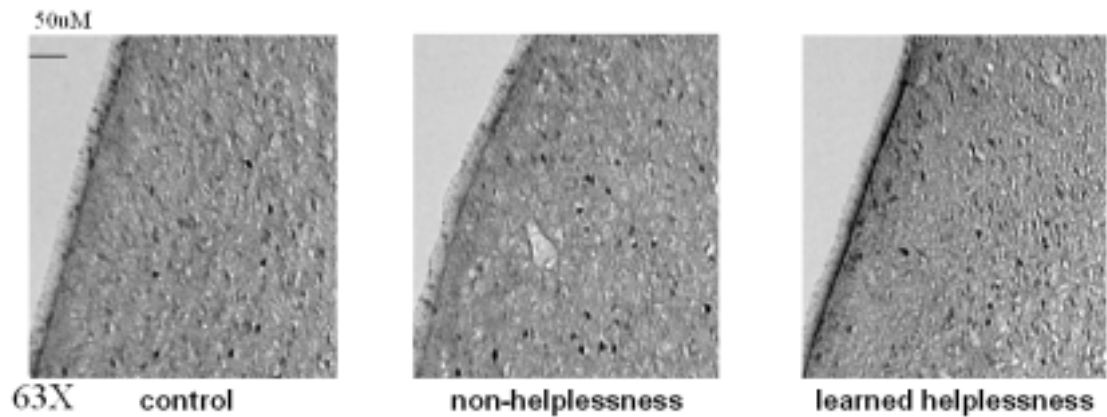


A. BDNF immunoreactivity neurons in the MPC. The results of different groups are shown. scale bar = 200µm.

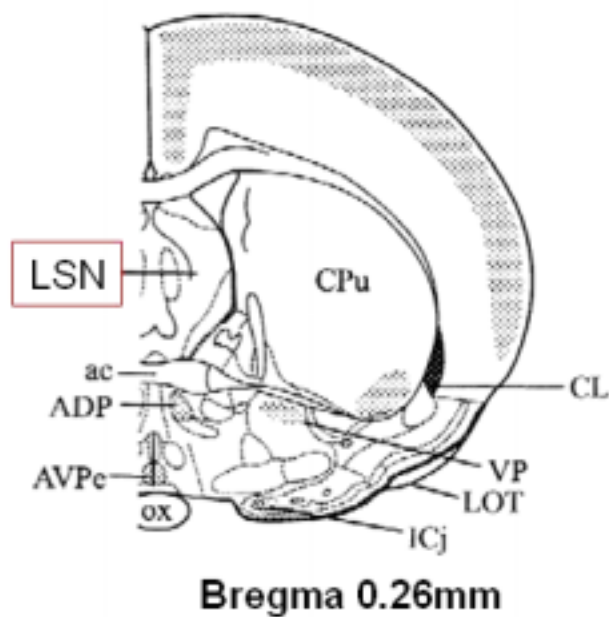


B. 相對應的小鼠腦部定位圖 (Migita et al., 2001)

【圖十四】A圖是BDNF在內側前額皮質區的免疫染色組織圖。25倍放大來判讀。計算範圍大小為 0.16mm^2 。比例尺=200µm。B圖是相對應的小鼠腦部定位圖。



A. BDNF immunoreactivity neurons in the LSN. The results of different groups are shown. scale bar = 50µm.

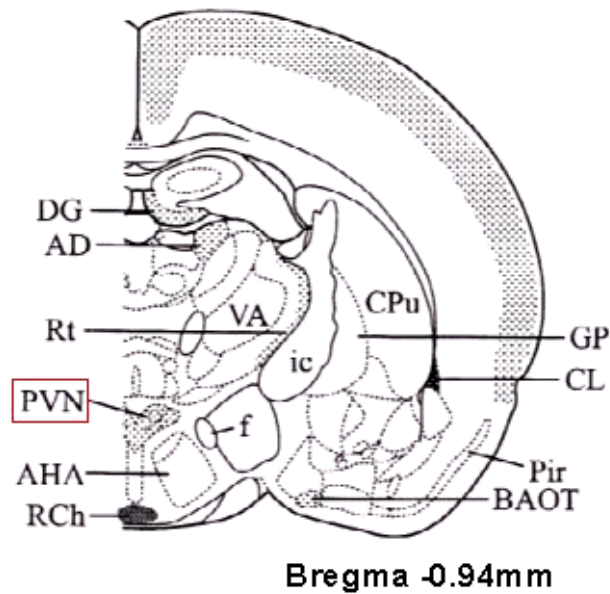


B. 相對應的小鼠腦部定位圖 (Migita et al., 2001)

【圖十五】A圖是BDNF在外側中隔核區的免疫染色組織圖。63倍放大來判讀。計算範圍大小為 0.16mm^2 。比例尺=50µm。B圖是相對應的小鼠腦部定位圖。



A. BDNF immunoreactivity neurons in the PVN. The results of different groups are shown. scale bar = 100um.

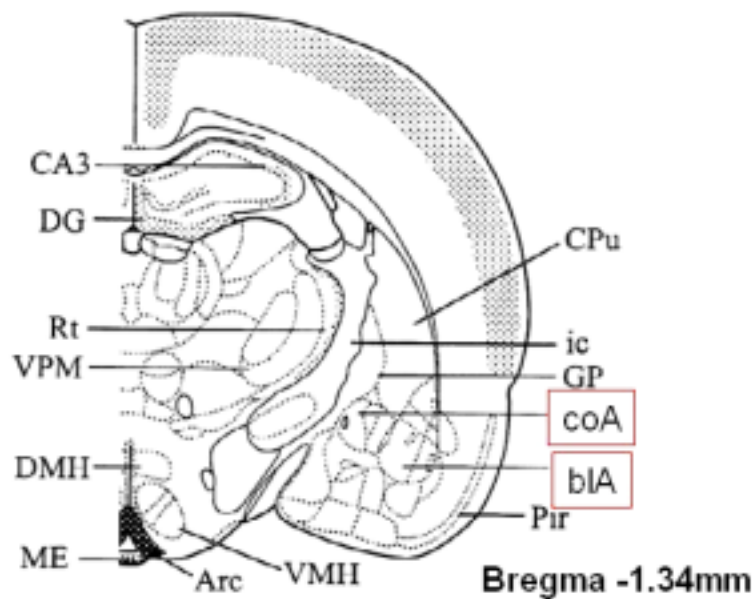


B. 相對應的小鼠腦部定位圖 (Migita et al., 2001)

【圖十六】A圖是BDNF在下視丘室旁核區的免疫染色組織圖。63倍放大來判讀。計算範圍大小為 0.16mm^2 。比例尺=100um。B圖是相對應的小鼠腦部定位圖。



A. BDNF immunoreactivity neurons in the amygdala. The results of different groups are shown. scale bar = 100um.

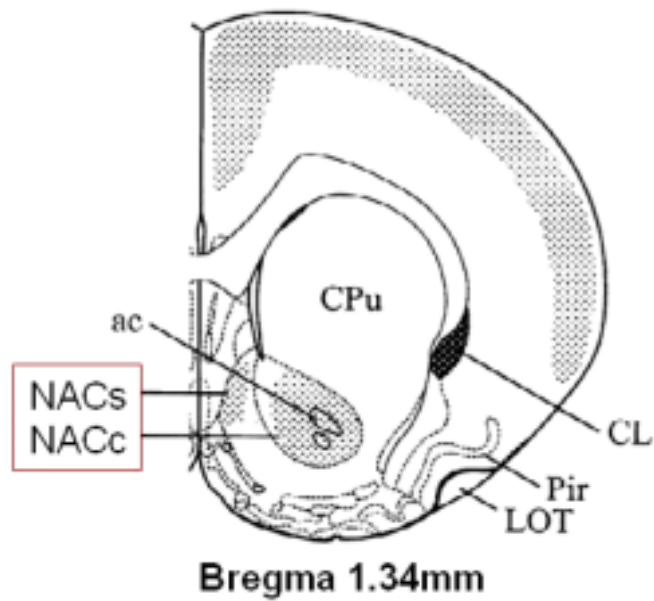


B. 相對應的小鼠腦部定位圖 (Migita et al., 2001)

【圖十七】A圖是BDNF在杏仁體核區的免疫染色組織圖。63倍放大來判讀。計算範圍大小為 0.16mm^2 。比例尺=100um。B圖是相對應的小鼠腦部定位圖。

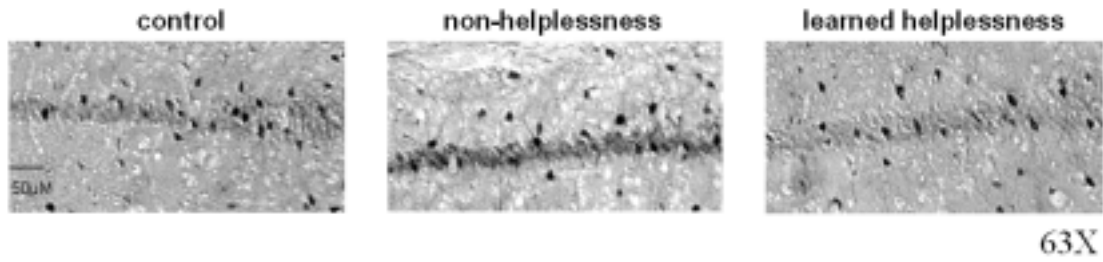


A. BDNF immunoreactivity neurons in the nucleus accumbens. The results of different groups are shown. scale bar = 100µm.



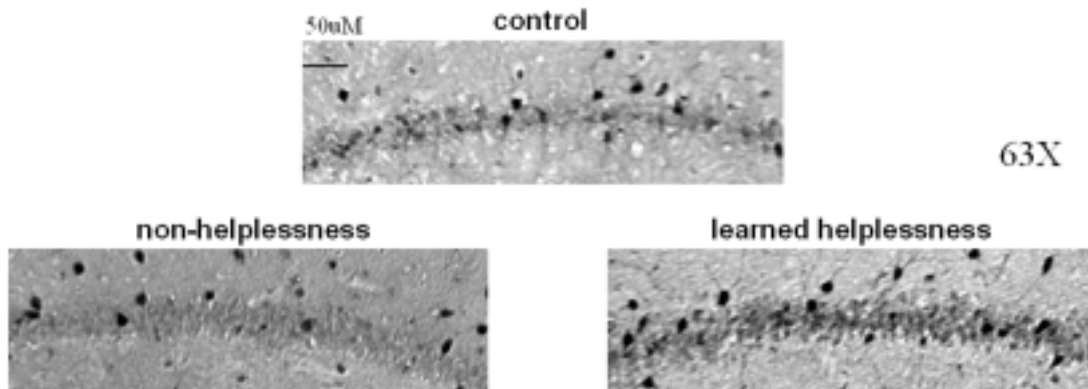
B. 相對應的小鼠腦部定位圖 (Migita et al., 2001)

【圖十八】A圖是BDNF在伏核核區的免疫染色組織圖。63倍放大來判讀。計算範圍大小為 0.16mm^2 。比例尺=100µm。B圖是相對應的小鼠腦部定位圖。



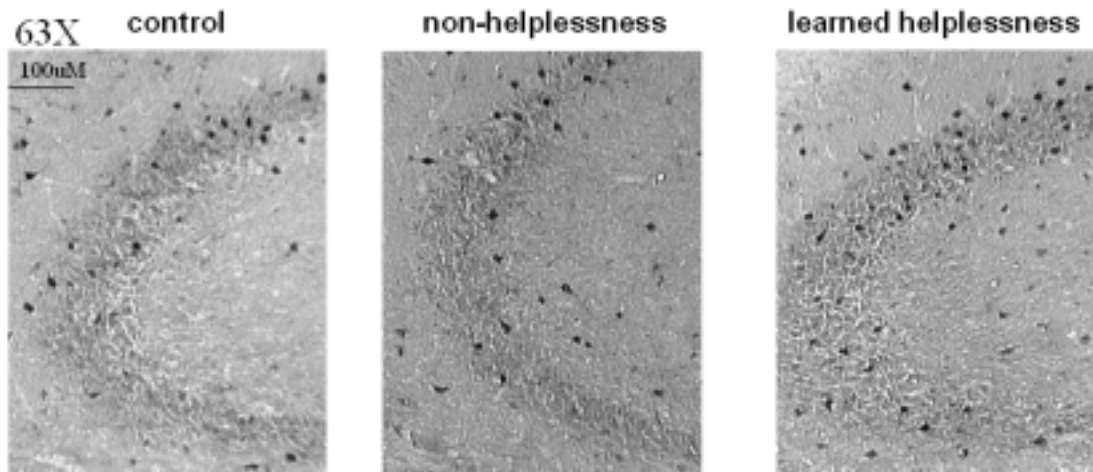
c-Fos-like immunoreactivity neurons in the CA1 area of hippocampus.
The results of different groups are shown. scale bar = 50um.

【圖十九】c-Fos 在海馬結構 CA1 區的免疫染色組織圖。63 倍放大來判讀。計算範圍大小為 0.16mm^2 。比例尺 = 50um。



c-Fos-like immunoreactivity neurons in the CA2 area of hippocampus.
The results of different groups are shown. scale bar = 50um.

【圖二十】c-Fos 在海馬結構 CA2 區的免疫染色組織圖。63 倍放大來判讀。計算範圍大小為 0.16mm^2 。比例尺 = 50um。



c-Fos-like immunoreactivity neurons in the CA3 area of hippocampus. The results of different groups are shown. scale bar = 100um.

【圖二十一】BDNF 在海馬結構 CA3 區的免疫染色組織圖。63 倍放大來判讀。計算範圍大小為 0.16mm^2 。比例尺 = 100um。



c-Fos-like immunoreactivity neurons in the DG area of hippocampus. The results of different groups are shown. scale bar = 100um.

【圖二十二】c-Fos 在海馬結構 DG 區的免疫染色組織圖。63 倍放大來判讀。計算範圍大小為 0.16mm^2 。比例尺 = 100um。



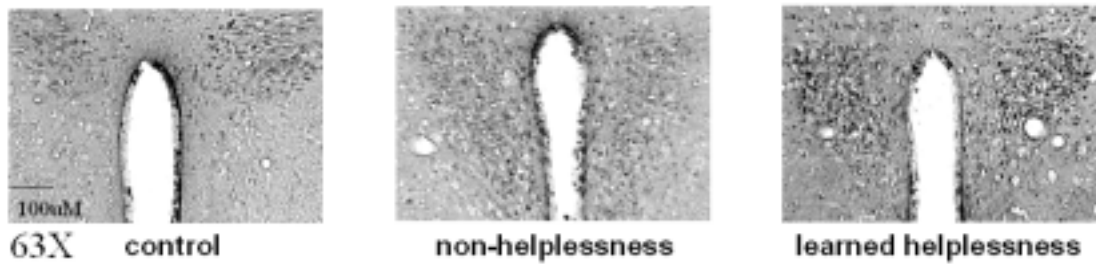
c-Fos-like immunoreactivity neurons in the MPC. The results of different groups are shown. scale bar = 200um.

【圖二十三】c-Fos 在內側前額皮質區的免疫染色組織圖。25 倍放大來判讀。計算範圍大小為 0.16mm^2 。比例尺 = 200um。



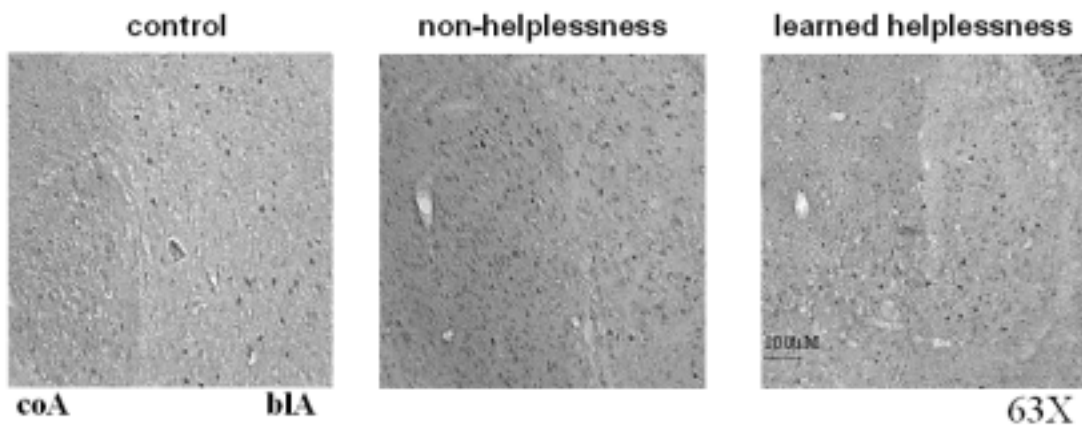
c-Fos-like immunoreactivity neurons in the LSN. The results of different groups are shown. scale bar = 50um.

【圖二十四】c-Fos 在外側中隔核區的免疫染色組織圖。63 倍放大來判讀。計算範圍大小為 0.16mm^2 。比例尺 = 50um。



c-Fos-like immunoreactivity neurons in the PVN. The results of different groups are shown. scale bar = 100um.

【圖二十五】c-Fos 在下視丘室旁核區的免疫染色組織圖。63 倍放大來判讀。計算範圍大小為 0.16mm^2 。比例尺 = 100um。



c-Fos-like immunoreactivity neurons in the amygdala. The results of different groups are shown. scale bar = 100um.

【圖二十六】c-Fos 在杏仁體核區的免疫染色組織圖。63 倍放大來判讀。計算範圍大小為 0.16mm^2 。比例尺 = 100um。



c-Fos-like immunoreactivity neurons in the nucleus accumbens. The results of different groups are shown. scale bar = 100µm.

【圖二十七】c-Fos 在伏核核區的免疫染色組織圖。63 倍放大來判讀。計算範圍大小為 0.16mm^2 。比例尺 = 100µm。

Table 1. Diagnostic Criteria for Major Depression

Depressed mood
Irritability
Low self esteem
Feelings of hopelessness, worthlessness, and guilt
Decrease ability to concentrate and think
Decreased or increased appetite
Weight loss or weight gain
Insomnia or hypersomnia
Low energy, fatigue, or increased agitation
Decreased interest in pleasurable stimuli (e.g.,
sex, food, social interactions)
Recurrent thoughts of death and suicide

A diagnosis of major depression is made when a certain number of the above symptoms are reported for longer than a 2 week period of time, and when the symptoms disrupt normal social and occupational functioning (see DSM-IV, 2000)

【表一】：憂鬱症的診斷標準

參考 Nestler et al., 2002 (鄭之雅重畫, 2003)

精神科醫師用來診斷憂鬱症的標準，是根據精神疾病診斷與統計手冊 (DSM-IV) 來定義，有上述五種症狀以上，持續兩星期就可能患有憂鬱症。

**台北榮民總醫院
動物實驗申請同意書**

凡進行動物實驗者，須由計劃主持人填寫本表（白色，一式兩份），送動物實驗管理小組審查同意並簽名後，發還申請人。申請研究計劃時，可將本表隨附於計劃書備查。研究計劃核准後，所進行之動物實驗須與填寫內容相符，如實驗內容變更，須另填寫「變更動物實驗申請同意書」（黃色，一式兩份），報請動物實驗管理小組同意。

研究計劃名稱：小鼠腦部 BDNF 表現與情緒行為的相關性
 計劃主持人：洪成志 電話：7027-266,269 傳真：28725643
 單位：精神部 e-mail：cjhong@ujh.tpe.gov.tw

一、動物實驗內容：

- 動物種類：小鼠 大鼠 天竺鼠 倉鼠 兔子 狗 豬 其他：_____
- 動物需接受的實驗步驟：
 - 是否給予外物（抗原或化合物等）或藥物？-----是 否
 物品名稱：1. fluoxetine 2. _____ 3. _____
 給予方式：口服 肌肉 靜脈 腹腔 吸入 皮下
 - 是否需要抽血？----- 是 否 頻率：_____ 體積：_____
 - 是否接受手術？----- 是 否 名稱：_____
 - 是否需要麻醉？----- 是 否 藥品：Pentobarbital 130mg/kg
 - 其他實驗步驟：Inescapable foot-shock 0.8mA, 10sec / 1-10min x 20次 x 3(天)
 -20°/天
- 是否進行感染性微生物之實驗 ----- 是 否
 是否進行毒性化學物質之實驗 ----- 是 否
 是否進行放射性物質之實驗 ----- 是 否

（若上述回答為是，請先向本院生物實驗安全委員會或輻射防護委員會商議安全防護措施，包括動物的隔離、墊料、排泄物的處理、籠架的清洗、屍體的處理及避免污染的相關方法，獲得安全委員會認可後，再送此申請書。）

二、實驗方法是否會造成動物持久之疼痛？----- 是 否

請說明疼痛處理及照顧辦法：輸液療法 保溫 流質食物 處方飼料 傷口之處理
鎮痛劑 抗生素 其他：_____

三、實驗動物是否需要進行安樂死？-----是 否

請說明安樂死的方法：Cervical Dislocation Decapitation CO₂ Pentobarbital overdose
其他：_____

計劃主持人簽名：洪成志 日期：92/2/17

動物實驗管理小組查閱欄

本項動物實驗審查結果：同意進行 不同意進行

附註意見（無則免填）：此實驗以 inescapable foot shock 引發小鼠的學習幫助而達成憂鬱。此種 learned helplessness 為神經科學界使用的一種 behavioral model of depression, 已為國際科學雜誌認可。如 J. Neuroscience, Eur. J. Pharmacol. 及 Biol. Psychol.

評審人簽名：洪成志 日期：_____ 召集人簽名：洪成志

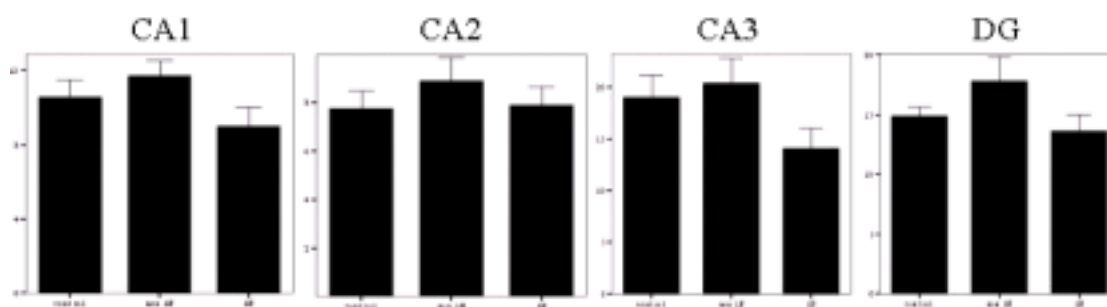


【表二】動物實驗申請同意書

Hippocampus

Area	Group		
	control (n=6)	non-helplessness (n=6)	learned helplessness (n=5)
CA1	10.58±0.93	11.71±0.85	9.00±1.01
CA2	7.75±0.72	8.92±0.95	7.90±0.75
CA3	18.96±2.19	20.33±2.41	14.10±1.91
DG	14.90±0.77	17.83±2.00	13.63±1.41

Values represent means number of cells (\pm S.E.M.) per tissue area (0.4mm×0.4mm) expressing BDNF immunoreactivity in hippocampus.



縱座標：BDNF 免疫染色細胞數目 (mean±S.E.M.)；橫座標：組別

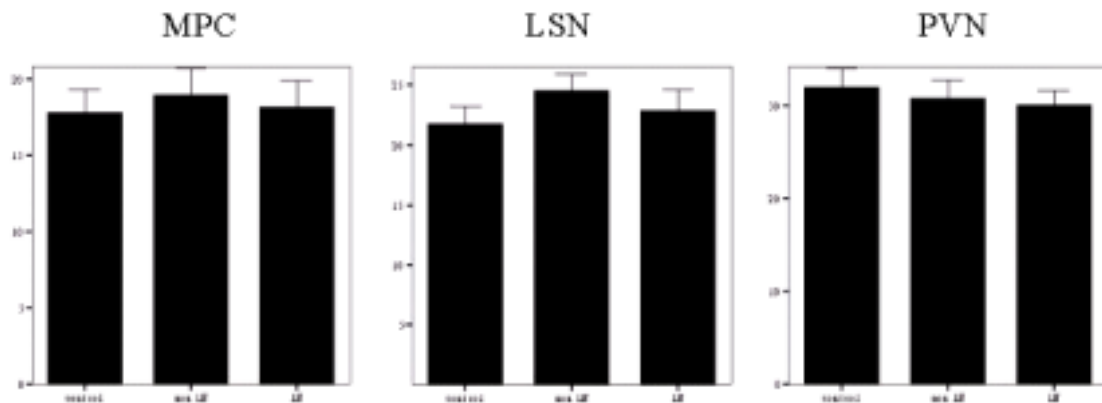
表三：海馬結構中各神經核區的 BDNF 免疫染色細胞數目。三組實驗動物 (control, non-helplessness, learned helplessness) BDNF 免疫染色的細胞數目在海馬結構都沒有顯著的差異。

MPC . LSN . PVN

Area	Group		
	control (n=6)	non-helplessness (n=7)	learned helplessness (n=5)
MPC	17.80±1.50	18.95±1.70	18.17±1.70
LSN	21.79±1.48	24.54±1.35	22.85±1.79
PVN	32.00±2.04	30.80±2.00	30.06±1.57

Values represent means number of cells (\pm S.E.M.) per tissue area (0.4mm \times 0.4mm) expressing BDNF immunoreactivity in MPC、LSN、PVN.

MPC = medial prefrontal cortex. LSN = lateral septal nucleus. PVN = paraventricular hypothalamic nucleus.



縱座標：BDNF 免疫染色細胞數目 (mean \pm S.E.M.)；橫座標：組別

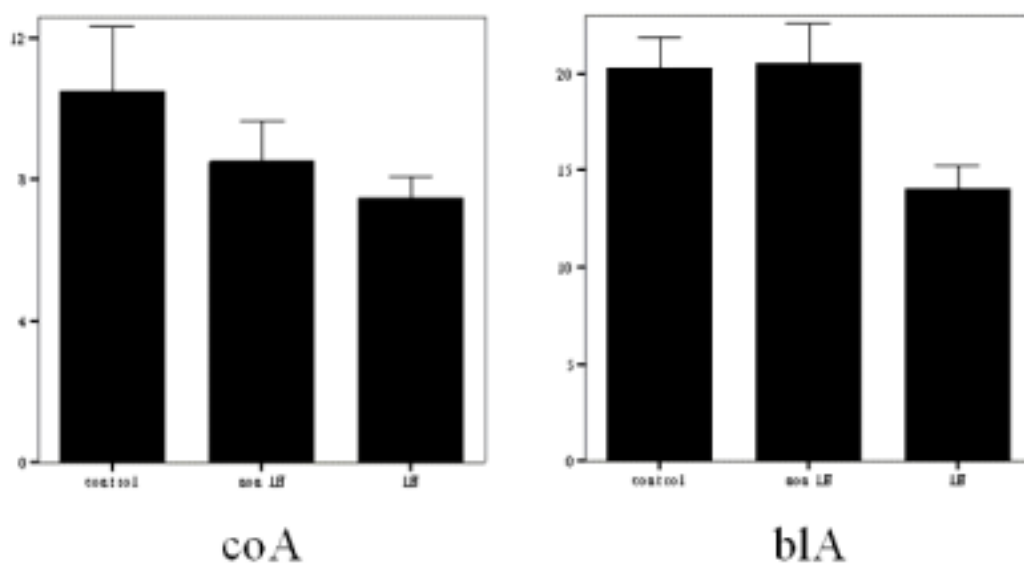
表四：內側前額皮質、外側中隔核、下視丘室旁核的 BDNF 免疫染色細胞數目。三組實驗動物 (control, non-helplessness, learned helplessness) BDNF 免疫染色的細胞數目在這三個腦區都沒有顯著的差異。

Amygdala

Area	Group		
	control (n=6)	non-helplessness (n=6)	learned helplessness (n=5)
coA	10.48±1.86	8.50±1.18	7.47±0.63
blA	20.29±1.61	20.50±2.09	14.05±1.20

Values represent means number of cells (\pm S.E.M.) per tissue area (0.4mm \times 0.4mm) expressing BDNF immunoreactivity in amygdala.

coA = central amygdala nucleus. blA = basolateral amygdala nucleus.



縱座標：BDNF 免疫染色細胞數目 (mean \pm S.E.M.)；橫座標：組別

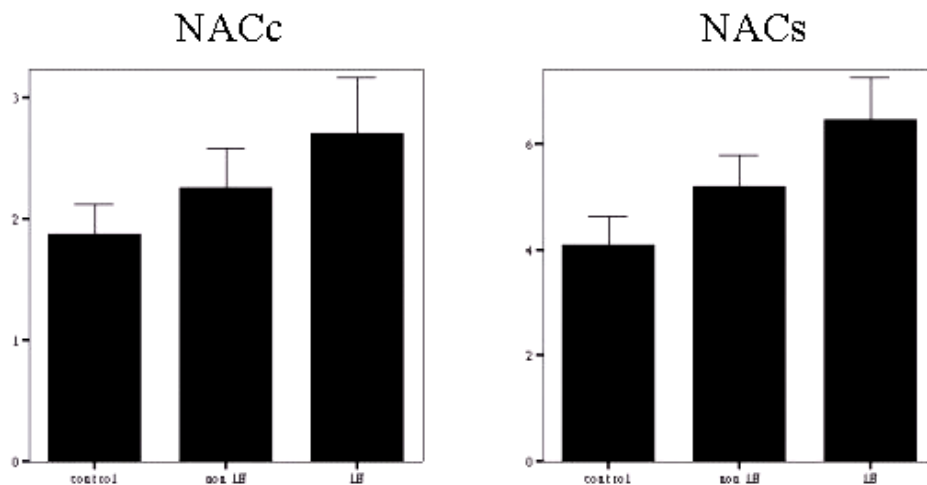
表五：杏仁體的 BDNF 免疫染色細胞數目。三組實驗動物 (control, non-helplessness, learned helplessness) BDNF 免疫染色的細胞數目在 coA 區和 blA 區都沒有顯著的差異。

NAC

Area	Group		
	control (n=6)	non-helplessness (n=7)	learned helplessness (n=5)
NACc	1.88±0.24	2.25±0.33	2.70±0.47
NACs	4.08±0.54	5.18±0.60	6.45±0.80

Values represent means number of cells (\pm S.E.M.) per tissue area (0.4mm×0.4mm) expressing BDNF immunoreactivity in nucleus accumbens.

NACc = Core of nucleus accumbens. NACs = Shell of nucleus accumbens.



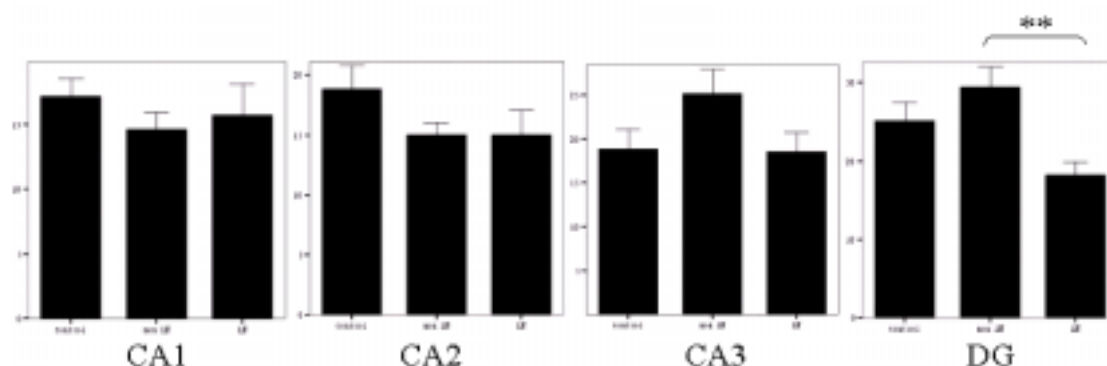
縱座標：BDNF 免疫染色細胞數目 (mean±S.E.M.)；橫座標：組別

表六：伏核的 BDNF 免疫染色細胞數目。三組實驗動物 (control, non-helplessness, learned helplessness) BDNF 免疫染色的細胞數目在 NACc 區與 NACs 區都沒有顯著的差異。

Hippocampus

Area	Group		
	control (n=6)	non-helplessness (n=7)	learned helplessness (n=5)
CA1	17.15±1.43	14.61±1.28	15.71±2.43
CA2	18.81±1.95	15.00±1.04	15.04±1.99
CA3	18.83±2.25	25.11±2.83	18.54±2.13
DG	25.15±2.30	29.47±2.50	18.17±1.77**

Values represent means number of cells (\pm S.E.M.) per tissue area (0.4mm×0.4mm) expressing c-Fos-like immunoreactivity in hippocampus. ** indicates that significant difference exists ($p < 0.01$) as compared to non-helplessness group.



縱座標：c-Fos 免疫染色細胞數目 (mean±S.E.M.)；橫座標：組別

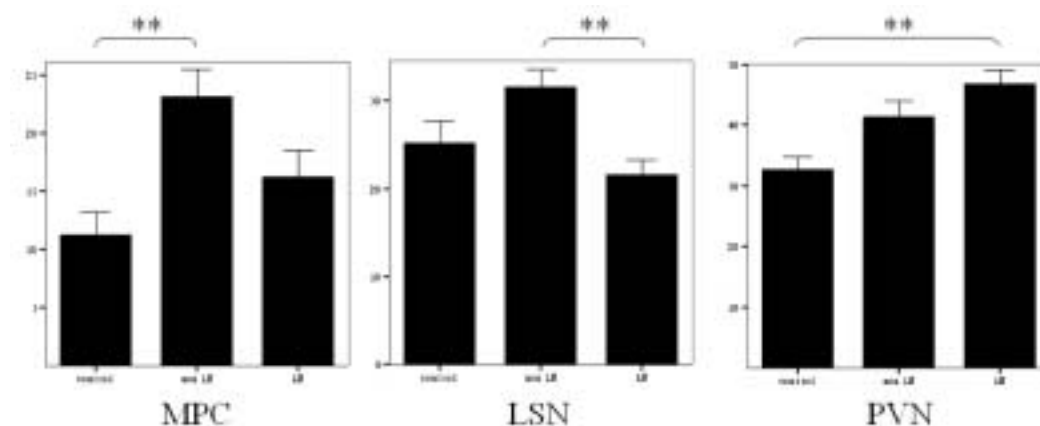
表七：海馬結構中各神經核區的 c-Fos 免疫染色細胞數目。三組實驗動物 (control, non-helplessness, learned helplessness) c-Fos 免疫染色的細胞數目在 CA1、CA2、CA3 區都沒有顯著的差異；在 DG 區，learned helplessness 組顯著低於 non-helplessness 組。

MPC . LSN . PVN

Area	Group		
	control (n=6)	non-helplessness (n=7)	learned helplessness (n=5)
MPC	11.25±2.02	23.19±2.36 ^{a**}	16.25±2.25
LSN	25.21±2.49	31.48±2.14	21.62±1.64 ^{b**}
PVN	32.61±2.16	41.25±2.62	46.68±2.28 ^{c**}

Values represent means number of cells (\pm S.E.M.) per tissue area (0.4mm×0.4mm) expressing c-Fos-like immunoreactivity in MPC、LSN、PVN. a** indicates that significant difference exists ($p < 0.01$) as compared to control group; b** indicates that significant difference exists ($p < 0.01$), as compared to the non-helplessness group; c** indicate that significant difference exists ($p < 0.01$) as compared to the control group.

MPC = medial prefrontal cortex. LSN = lateral septal nucleus. PVN = paraventricular hypothalamic ucleus.



縱座標：c-Fos 免疫染色細胞數目 (mean±S.E.M.)；橫座標：組別

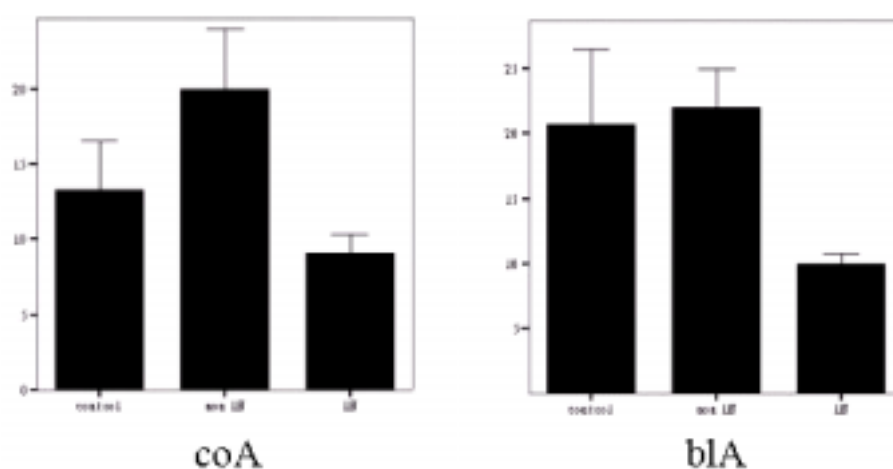
表八：內側前額皮質、外側中隔核、下視丘室旁核的 c-Fos 免疫染色細胞數目。三組實驗動物 (control, non-helplessness, learned helplessness) c-Fos 免疫染色的細胞數目在 MPC 區，non-helplessness 組顯著高於 control 組；在 LSN 區，learned helplessness 組顯著低於 non-helplessness 組；在 PVN 區，control 組顯著低於 learned helplessness 組。

Amygdala

Area	Group		
	control (n=6)	non-helplessness (n=6)	learned helplessness (n=5)
coA	13.24±3.29	19.94±3.97	9.08±1.26
blA	20.72±5.78	21.97±2.96	9.96±0.81

Values represent means number of cells (\pm S.E.M.) per tissue area (0.4mm×0.4mm) expressing c-Fos-like immunoreactivity in amygdala.

coA = central amygdala nucleus. blA = basolateral amygdala nucleus.



縱座標：c-Fos 免疫染色細胞數目 (mean±S.E.M.)；橫座標：組別

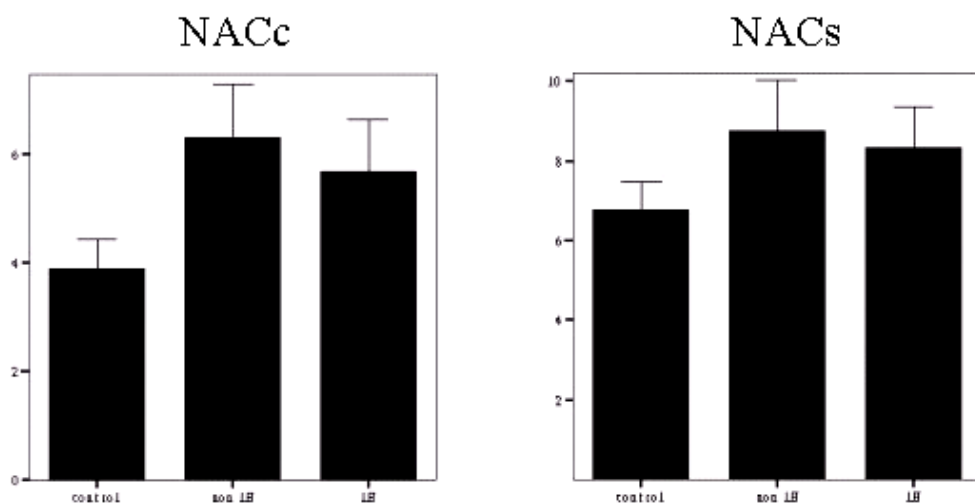
表九：杏仁體的 c-Fos 免疫染色細胞數目。三組實驗動物 (control, non-helplessness, learned helplessness) c-Fos 免疫染色的細胞數目在 coA 區和 blA 區都沒有顯著的差異。

NAC

Area	Group		
	control (n=6)	non-helplessness (n=7)	learned helplessness (n=5)
NACc	3.88±0.54	6.28±1.01	5.67±0.96
NACs	6.75±0.74	8.76±1.27	8.33±1.01

Values represent means number of cells (\pm S.E.M.) per tissue area (0.4mm×0.4mm) expressing c-Fos-like immunoreactivity in nucleus accumbens.

NACc = Core of nucleus accumbens. NACs = Shell of nucleus accumbens.



縱座標：c-Fos 免疫染色細胞數目 (mean±S.E.M.)；橫座標：組別

表十：伏核的 c-Fos 免疫染色細胞數目。三組實驗動物 (control, non-helplessness, learned helplessness) c-Fos 免疫染色的細胞數目在 NACc 區和 NACs 區都沒有顯著的差異。

參考文獻

- Aloisi A.M., Zimmermann M, Herdegen T.** Sex-dependent effects of formalin and restraint on c-fos expression in the septum and hippocampus of the rat. *Neuroscience* 81 : 951-958. 1997
- Anisman H., Bignami G.** A comparative neurochemical, pharmacological, and functional analysis of aversively motivated behaviors: caveats and general consideration. in *Psychopharmacology of Aversively Motivated Behavior*. Edited by Anisman H, Bignami G. New York, Plenum, 1978, pp 487-512.
- Anisman H., Shanks N., Zakman S.** Multisystem regulation of performance deficits induced by stressors: an animal model of depression. In *Animal Models in Psychiatry*. Vol 2. Edited by Iverson MTM. Clifton, NJ, Humana Press, 1991, pp1-55.
- Arborelius L., Owens M.J., Plotsky P.M., Nemeroff C.B.** The role of corticotropin-releasing factor in depression and anxiety disorders. *Journal of Endocrinology*. 160 : 1–12. 1999
- Belanoff J.K., Flores B.H., Kalezhan M., Sund B., Schatzberg A.F.** Rapid reversal of psychotic depression using mifepristone. *Journal of Clinical Psychopharmacology*. 21 : 516–521. 2001
- Blanchard D.C., Cholvanich P., Blanchard R.J., Clow D.W., Hammer R.P., Rowlett J. K. Bardo M.T.** Serotonin, but not dopamine, metabolites are increased in selected brain regions of subordinate male rats in a colony environment. *Brain Research*. 568 : 61–66. 1991
- Bonaz B., Tache Y.** Water-avoidance stress-induced c-fos expression in the rat brain and stimulation of fecal output: role of corticotrophin-releasing factor. *Brain Research*. 641 : 21-28. 1994
- Bremner J.D., Narayan M., Anderson E.R., Staib L.H., Miller H.L., Charney D.S.** Hippocampal volume reduction in major depression. *American Journal of Psychiatry*. 157 : 115–118. 2000
- Briley M., Chopin P., Moret C.** Effect of serotonergic lesion on "anxious" behaviour

- measured in the elevated plus-maze test in the rat. *Psychopharmacology*. 101 : 187–189. 1990
- Brown A.S., Gershon S.** Dopamine and depression. *Journal of Neural Transmission*. 91 : 75–109. 1993
- Bunney W.E., Davis J.** Norepinephrine in depressive reactions: a review. *Archives of General Psychiatry*. 13 : 483-494. 1965
- Burmeister M.** Basic concepts in the study of diseases with complex genetics. *Biological Psychiatry*. 45 : 522–532. 1999
- Cahill L., Weinberger N.M., Roozendaal B., McGaugh J.L.** Is the amygdala a locus of "conditioned fear"? Some questions and caveats. *Neuron*. 23 : 227–228. 1999
- Clement H.W., Schäfer F., Ruwe C., Gemsa D., Wesemann W.** Stress-induced changes of extracellular 5-hydroxyindoleacetic acid concentrations followed in the nucleus raphe dorsalis and the frontal cortex of the rat. *Brain Research*. 614 : 117–124. 1993
- Conti A.C., Cryan J.F., Dalvi A., Lucki L., Blendy J.A.** CREB is essential for the upregulation of BDNF transcription, but not the behavioral or endocrine responses to antidepressant drugs. *Journal of Neuroscience*. 22 : 3262-3268. 2002
- Contreras C.M., Marvan M.L., Alcalá-Herrera V., Guzmán-Saenz M.A.** Effect of chronic clomipramine administration on septal nuclei of the rat. *Physiology & Behavior*. 48 : 551-554. 1990
- Contreras C.M., Marvan M.L., Lara-Morales H., Barradas A., Chacón L., Guzmán-Saenz M.A., Márquez-Flores C.** Clomipramine actions on firing rate in septal nuclei of the rat are not related to anaesthesia(urethane). *Boletín de Estudios Médicos y Biológicos*. 39 : 3-8. 1991
- Contreras C.M., Marvan M.L., Alcalá-Herrera V.** Sleep deprivation is a less potent agent than clomipramine in increasing firing rate in lateral septal neurons in the rat. *Neuropsychobiology*. 27 : 83-85 1993

- Coppen A.** The biochemistry of affective disorders. *British Journal of Psychiatry*. 113 : 1237-1264. 1967
- Cullinan W.E., Herman J.P., Battaglia D.F., Akil H., Watson S.J.** Pattern and time course of immediate early gene expression in rat brain following acute stress. *Neuroscience*. 64 : 477-505. 1995
- Dallman M.F., Akana S.F., Cascio C.S., Darlington D.N., Jacobson L., Levin N.** Regulation of ACTH secretion: variations on a theme of B. *Recent Progress in Hormone Research*. 43 : 113–173. 1987
- Davis M.** Are different parts of the extended amygdala involved in fear versus anxiety? *Biological Psychiatry*. 44 : 1239–1247. 1998
- Deakin J.W., Graeff F.G.** 5-HT and mechanisms of defence. *Journal of Psychopharmacology*. 5 : 305–315. 1991
- De Kloet E.R., Rosenfeld P., Van Eekelen J.A., Sutanto W., Levine S.** Stress glucocorticoids and development. *Progress in Brain Research*. 73 : 101–120. 1988
- Delgado P.L., Price L.H., Miller H.L., Salomon R.M., Aghajanian G., Heninger G.R., Charney D.** Serotonin and the neurobiology of depression. *Archives of General Psychiatry*. 51:865-874. 1994
- Desan P.H., Silbert L.H., Maier S.F.** Long-term effects of inescapable stress on daily running activity and antagonism by desipramine. *Pharmacology Biochemistry & Behavior*. 30 : 21-29. 1988
- Drevets W.C.** Neuroimaging and neuropathological studies of depression: Implications for the cognitive-emotional features of mood disorders. *Current Opinion in Neurobiology*. 11 : 240–249. 2001
- Duman R.S., Heninger G.R., Nestler E.J.** A molecular and cellular theory of depression. *Archive of General Psychiatry*. 54 : 597-606. 1997
- Duncan G.E., Knapp D.J., Johnson K.B., Breese G.R.** Functional classification of antidepressants based on antagonism of swim stress-induced fos-like

- immunoreactivity. *Journal of Pharmacology & Experimental Therapeutics*. 277 : 1076–1089. 1996
- Ernfors P., Wetmore C., Olson L., Persson H.** Identification of cells in rat brain and peripheral tissues expressing mRNA for members of the nerve growth factor family. *Neuron*. 5 : 511-526. 1990
- Fonberg E.** Effects of small dorsomedial amygdala lesions on food intake and acquisition of instrumental alimentary reactions in dogs. *Physiology & Behavior*. 4 : 739-743. 1969
- Fonberg E.** The role of the hypothalamus and amygdala in food intake, alimentary motivation and emotional reaction. *Acta Biologicae Experimentalis*. 29 : 335-358. 1969
- Fonberg E.** Control of emotional behaviour through the hypothalamus and amygdaloid complex. *Ciba Foundation Symposium*. 8 : 131-161. 1972
- Frazer A.** Pharmacology of antidepressants. *Journal of Clinical Psychopharmacology*. 17 : 2S–18S. 1997
- Goldstein L.E., Rasmusson A.M., Bunney B.S., Roth R.H.** The NMDA glycine site antagonist (1)-HA-966 selectively regulates conditioned stress-induced metabolic activation of the mesoprefrontal cortical dopamine but not serotonin systems: a behavioural, neuroendocrine, and neurochemical study in the rat. *Journal of Neuroscience*. 14 : 4937–4950. 1994
- Gonzalez L.E., Andrews N., File S.E.** 5-HT_{1A} and benzodiazepine receptors in the basolateral amygdala modulate anxiety in the social interaction test, but not in the elevated plus-maze. *Brain Research*. 732 : 145–153. 1996
- Hitzemann R.** Animal models of psychiatric disorders and their relevance to alcoholism. *Alcohol Research & Health*. 24 : 149–158. 2000
- Hofer M., Pagliusi S.R., Hohn A., Leibrock J., Brarde Y. A.** Regional distribution of brain-derived neurotrophic factor Mrna in the adult mouse brain. *Eur. Molec. Biol. Org. J.* 9 : 2459-2464. 1990

- Holsboer F.** Stress, hypercortisolism and corticosteroid receptors in depression: implications for therapy. *Journal of Affective Disorders*. 62 : 77–91. 2001
- Inoue T., Tsuchiya K., Koyama T.** Regional changes in dopamine and serotonin activation with various intensity of physical and psychological stress in the rat brain. *Pharmacology Biochemistry & Behavior*. 49 : 911–920. 1994
- Jacobson L., Sapolsky R.** The role of the hippocampus in feedback regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis. *Endocrine Reviews*. 12 : 118-134. 1991
- Johnson E.O., Kamilaris T.C., Chrousos G.P., Gold P.W.** Mechanisms of stress: a dynamic overview of hormonal and behavioral homeostasis. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*. 16 : 115–130. 1992
- Joseph M., Kennett G.A.** Stress-induced release of 5-HT in the hippocampus and its dependence on increased tryptophan availability: an in vivo electrochemical study. *Brain Research*. 270 : 251–257. 1983
- Kendler K.S., Karkowski-Shuman L.** Stressful life events and genetic liability to major depression: genetic control of exposure to the environment? *Psychological Medicine*. 27 : 549-564. 1997
- Kirby L.G., Allen A.R., Lucki I.** Regional differences in the effects of forced swimming on extracellular levels of 5-hydroxytryptamine and 5-hydroxyindoleacetic acid. *Brain Research*. 682 : 189–196. 1995
- Koob G.F., Sanna P.P., Bloom F.E.** Neuroscience of addiction. *Neuron*. 21 : 467–476. 1998
- Koolhaas J.M., Meerlo P., De Boer S.F., Strubbe J.H., Bohus B.** The temporal dynamics of the stress response. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*. 21 : 775–782. 1997
- Kuroda Y., McEwen B.S.** Effect of chronic restraint stress and tianeptine on growth factors, growth-associated protein-43, and microtubule-associated protein 2 mRNA expression in rat hippocampus. *Molecular Brain Research*. 59 : 35–39. 1998

- Leah J.D., Sandkuhler J., Herdegen T., Murashov A., Zimmermann M.**
Potentiated expression of FOS protein in the rat spinal cord following bilateral noxious cutaneous stimulation. *Neuroscience*. 48 : 525–532. 1992
- LeDoux J.E.** Emotion circuits in the brain. *Annual Reviews in Neuroscience*. 23 : 155–184. 2000
- Lindsay R.M., Wiegand S.J., Altar C.A., Di Stefano P.S.** Neurotrophic factor: from molecular to man. *Trends Neuroscience* 17 : 182-190. 1994
- Lindvall O., Kokaia Z., Bengzon J., Elmer E., Kokaia M.** Neurotrophins and brain insults. *Trends Neuroscience*. 17 : 490-496. 1994
- Liotti M., Mayberg H.S.** The role of functional neuro-imaging in the neuropsychology of depression. *Journal of Clinical Experimental Neuropsychology*. 23 : 121–136. 2001
- Lucki I.** A prescription to resist proscriptio for murine models of depression. *Psychopharmacology*. 153 : 395–398. 2001
- Magarinos A., McEwen B.S., Flugge G.** Chronic psychosocial stress causes apical dendritic atrophy of hippocampal CA3 pyramidal neurons in subordinate tree shrews. *Journal of Neuroscience*. 16 : 3534-3540. 1996
- Martin J.V., Edwards E., Johnson J.O.** Monoamine receptors in an animal model of affective disorder. *Journal of Neurochemistry*. 55 : 1142-1148. 1990
- McEwen B.S.** Re-examination of the glucocorticoid hypothesis of stress and aging. *Progress in Brain Research*. 93 : 365-383. 1992
- McGaugh J.L.** Memory consolidation and the amygdala: a systems perspective. *Trends in Neuroscience*. 25 : 456-461. 2002
- Migita K., Loewy A.D., Ramabhadran T.V., Krause J.E., Waters S.M.**
Immunohistochemical localization of neuropeptide Y Y1 receptor in rat central nervous system. *Brain Research*. 889 : 23-37. 2001
- Miller H.L., Delgado P.L., Salomon R.M., Berman R., Krystal J.H., Heninger G.R., Charney D.S.** Clinical and biochemical effects of catecholamine depletion

- on antidepressant-induced remission of depression. *Archives of General Psychiatry*. 53:117-128. 1996
- Monzon M.E., Varas M.M., Izquierdo L.A., Izquierdo I., Barros D.M., de Barioglio S.R.** Anxiogenesis induced by nitric oxide synthase inhibition and anxiolytic effect of melanin-concentrating hormone (MCH) in rat brain. *Peptides*. 22 : 1043–1047. 2001
- Morgan J.I., Curran T.** Stimulus-transcription coupling in the nervous system: involvement of the inducible proto-oncogenes Fos and Jun. *Annual Review of Neuroscience*. 14 : 421-451. 1991
- Nestler E.J., Barrot M., DiLeone R.J., Eisch A.J., Gold S.J., Monteggia L.M.** Neurobiology of Depression. *Neuron*. 34 : 13–25. 2002
- Nibuya M., Morinobu S., Duman R.S.** Regulation of BDNF and trkB mRNA in rat brain by chronic electroconvulsive seizure and antidepressant drug treatments. *Journal of Neuroscience*. 15 : 7539-7547. 1996
- Nibuya M., Takahashi M., Russell D.S., Duman R.S.** Chronic stress increase catalytic TrkB mRNA in rat hippocampus. *Neuroscience Letter*. 267 : 81-84. 1999
- Overmier J.B., Seligman M.E.P.** Effect of inescapable shock upon subsequent escape and avoidance learning. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*. 63 : 28-33. 1967
- Pallis E., Thermos K., Spyraiki C.** Chronic desipramine treatment selectively potentiates somatostatin-induced dopamine release in the nucleus accumbens. *European Journal of Neuroscience*. 14 : 763–767. 2001
- Petty F., Kramer G.L., Wu J.** Serotonergic modulation of learned helplessness. *Psychobiology of Posttraumatic Stress Disorder*. 538–541. 1997
- Petty F., Kramer G., Wilson L.** Prevention of learned helplessness: in vivo correlation with cortical serotonin. *Pharmacology Biochemistry & Behavior*. 43 : 361–367. 1992

- Phillips H.S., Hains J.M., Laramée G.R., Rosenthal A., Winslow J.W.** Widespread expression of BDNF but not NT3 by target areas of basal forebrain cholinergic neuron. *Science*. 250 : 290-294. 1990
- Plomin R.** Genetics and children's experiences in the family. *Journal of Child Psychology and Psychiatry*. 36 : 33-68. 1995
- Porsolt R.D.** Animal models of depression: utility for transgenic research. *Review of Neuroscience*. 11 : 53-58. 2000
- Rios M., Fan G., Fekete C., Kelly J., Bates B., Kuehn R., Lechan R.M., Jaenisch R.** Conditional deletion of brain-derived neurotrophic factor in the postnatal brain leads to obesity and hyperactivity. *Molecular Endocrinology*. 15 : 1748-1757. 2001
- Rutter M., Dunn J., Plomin R.** Integrating nature and nurture: implications of person - environment correlations and interactions for developmental psychopathology. *Development and Psychopathology*. 9 : 335-364. 1997
- Sachar E.J., Baron M.** The biology of affective disorders. *Annual Reviews in Neuroscience*. 2 : 505-517. 1979
- Sapolsky R.M., Krey L.C., McEwen B.S.** The neuroendocrinology of stress and aging: the glucocorticoid cascade hypothesis. *Endocrine Reviews*. 7 : 284-301. 1986
- Sapolsky R.M., Uno H., Rebert C.S.** Hippocampus damage associated with prolonged stress exposure in primates. *Journal of Neuroscience*. 9 : 2897-2902. 1990
- Sapolsky R.M.** Glucocorticoids, stress and exacerbation of excitotoxic neuron death. *Seminars in Neurosciences*. 6 : 323-331. 1994
- Sapolsky R.M.** Why stress is bad for your brain. *Science*. 273 : 749-750, 1996
- Schildkaut J.J.** The catecholamine hypothesis of affective disorders: a review of supporting evidence. *American Journal of Psychiatry*. 122 : 509-522. 1965
- Seligman M.E.P., Maier S.F.** Failure to escape traumatic shock. *Journal of*

Experimental Psychology. 74 : 1-9. 1967

Seligman M.E.P., Maier S.F., Solomon R.L. Unpredictable and uncontrollable aversive events, in *Aversive Conditioning and Learning*. Edited by Brush F.R. New York, Academic Press, 1971, pp347-400

Sheline Y.I., Sanghavi M., Mintun M.A., Gado M.H. Depression duration but not age predicts hippocampal volume loss in medically healthy women with recurrent major depression. *Journal of Neuroscience*. 19 : 5034–5043. 1999

Sherman A.D., Petty F. Neurochemical basis of the action of antidepressants on learned helplessness. *Behavioral and Neuralgia Biology*. 30 : 119–134. 1980

Sherman A.D., Sacquitne J.L., Petty F. Specificity of the learned helplessness model of depression. *Pharmacology Biochemical behavior*. 16 : 449-454. 1982

Shirayama Y., Chen A., Nakagawa S., Russell D.S., Duman R.S. Brain derived neurotrophic factor produces antidepressant effects in behavioral models of depression. *Journal of Neuroscience*. 22 : 3251-3261. 2002

Shopsin B., Gershon S., Goldstein M., Friedman E., Wilk S. Use of synthesis inhibitors in defining a role for biogenic amines during imipramine treatment in depressed patients. *Psychopharmacology Communications*. 1:239-249. 1975

Shumake J., Edwards E., Gonzalez-Lima F. Hypermetabolism of paraventricular hypothalamus in the congenitally helpless rat. *Neuroscience Letter*. 311 : 45-48. 2001

Smith M.A., Makino S., Kim S.Y., Kvetnansky R. Stress increases brain-derived neurotrophic factor messenger ribonucleic acid in the hypothalamus and pituitary. *Endocrinology*. 136 : 3743–3750. 1995

Steciuk M., Kram M., Kramer G.L., Petty F. Decrease in stress-induced c-Fos-like immunoreactivity in the lateral septal nucleus of learned helpless rats. *Brain Research*. 822 : 256-259. 1999

Thoenen H. Neurotrophins and neuronal plasticity. *Science*. 270 : 593-598. 1995

Thrivikraman K.V., Su Y., Plotsky P.M. Patterns of Fos-immuno reactivity in the

- CNS induced by repeated hemorrhage in conscious rats: correlations with pituitary–adrenal axis activity. *Stress*. 2 : 145–158. 1997
- Uno H., Tarara R., Else J.G.** Hippocampal damage associated with prolonged and fatal stress in primates. *Journal of Neuroscience*. 9 : 1705-1711. 1989
- Weiss J.M., Stone E.A., Harrell N.** Coping behavior and brain norepinephrine level in rats. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*. 72 : 153-160. 1970
- Weiss J.M., Bailey W.H., Pohorecky L.A.** Stress-induced depression of motor activity correlates with regional changes in brain norepinephrine but not in dopamine. *Neurochemical Research*. 5 : 9-22. 1980
- Weiss J.M., Goodman P.A., Losito B.G.** Behavioral depression produced by an uncontrollable stressor: relationship to norepinephrine, dopamine, and serotonin levels in various regions of the rat brain. *Brain Research Review*. 3 : 167-205. 1981
- Willie J.T., Chemelli R.M., Sinton C.M., Yanagisawa M.** To eat or to sleep? Orexin in the regulation of feeding and wake-fulness. *Annual Review of Neuroscience*. 24 : 429–458. 2001
- Willner P.** Animal models of depression: validity and applications. *Advances in Biochemical Psychopharmacology*. 49 : 19–41. 1995
- Wise, R.A.** Drug-activation of brain reward pathways. *Drug & Alcohol Dependence*. 51 : 13–22. 1998
- Yadid G., Overstreet D.H., Zangen A.** Limbic dopaminergic adaptation to a stressful stimulus in a rat model of depression. *Brain Research*. 896 : 43–47. 2001
- Yan Q., Rosenfeld R.D., Matheson C.R., Hawkins N., Lopez O. T., Bennett L., Welcher A. A.** Expression of brain-derived neurotrophic factor protein in the adult rat central nervous system. *Neuroscience*. 78 : 431-448. 1997
- Yoshioka M., Matsumoto M., Togashi H., Saito H.** Effects of conditioned fear stress on 5-HT release in the rat prefrontal cortex. *Pharmacology Biochemistry &*

Behavior. 51 : 515–519. 1995

Zacharko R.M., Bowers W.J., Kokkinidis L. Region-specific reductions of intracranial self-stimulation after uncontrollable stress: possible effects of reward precesses. *Behavioural Brain Research*. 9 : 129-141. 1983