

東海大學食品科學研究所
Graduate Institute of Food Science
TUNGHAI UNIVERSITY

食品科技組
Food Technology Section

碩士論文
Master thesis

指導教授：盧錫祺 博士
Advisor : Hsi-Chi Lu, Ph.D.

探討 omega-3 多元不飽和脂肪酸缺乏飼料對大鼠神經行為的影響
**Effect of omega-3 polyunsaturated fatty acids deficient diet on
neurobehavior in rat**

研究生：林附偉 撰
Graduate Student : Fu-Wei Lin

中華民國九十九年一月
January, 2010

謝誌

本論文可以順利完成，首先要感謝我的家人給予我精神及金錢上的支持，讓我可以專心於論文研究。以及指導教授盧錫祺老師，不僅細心解答我所面臨的難題，也讓我有機會到台中榮總教研部進行研究，學習更多實驗方法及不同領域的想法。感謝教研部的陳春榮博士對我論文方向的指導，以及中山醫學大學關宇翔博士給予的寶貴意見，使我的論文更加完善。

感謝系上林怡君助教、陳叔瑜助教、吳貞誼助教、王茹婕學姐及王琴助理，雖然見面時間不多，但總是給予最溫暖的關心。感謝教研部 R401 中廖素蘭學姐、阮淑玲學姐、陳文英學姐讓我對實驗想法及待人處事上皆有極大的收穫。實驗室的重強學長、慶憶學長、玉涵學姐、玉汝學姐、思吟學姐、全緯學長、佩娟學姐、文曉、雅妮、明論及玉婷隊長，以及 R214 中潘宏川醫師、淑貞學姐、穆蓉學姐、怡津學姐、明昌學長、宛頻學姐及宛婷，不只提供實驗上的協助，也讓我研究生生活總是充滿了大爆笑。此外，也謝謝已畢業學長姐偉龍學長、鈺玲學姐、志丞學長及茹婕學姐的鼓勵和在校學弟妹子堯、庭儒、青蓉、佳華及邁文的幫忙。

還有陪我走到最後一刻的大白鼠們，若沒有你們無私的犧牲奉獻，我的實驗就沒有辦法完成。最後還要感謝一起畢業的夥伴們汝翔、惠蘭及心語，要不是彼此推著對方前進，現在論文可能還沒完成呢！除了感謝還是感謝！

祝福各位 福運滿滿！

林附偉 謹至於

東海大學食品科學研究所

中華民國九十九年一月十四日

目錄

	頁數
中文摘要	1
Abstract.....	3
文獻回顧	5
壹、憂鬱症	5
一、憂鬱症分類及成因	5
二、憂鬱症治療	7
貳、脂肪酸.....	10
一、Omega-3 多元不飽和脂肪酸.....	11
二、Omega-3 多元不飽和脂肪酸與憂鬱症	12
參、神經營養因子	13
一、腦衍生神經營養因子	14
二、腦衍生神經營養因子與憂鬱症	15
三、腦衍生神經營養因子與神經新生	16
肆、實驗目的	17
材料與方法	19
壹、材料：	19
一、飼料	19

二、實驗動物	19
三、抗體	20
四、引子序列	20
貳、實驗方法	21
一、實驗組別	21
二、行為評估	21
(一) Open field行為測試.....	21
(二) 懸吊尾測試(Tail Suspension Test, TST).....	22
(三) 強迫水測試(Forced swimming test, FST)	22
三、組織染色	23
(一) 檢體處理.....	23
(二) 免疫螢光染色.....	23
(三) BrdU標定染色.....	24
四、蛋白質分析	24
(一) 蛋白質備製.....	24
(二) 西方轉漬.....	24
五、反轉錄聚合酶連鎖反應	25
(一) RNA萃取	25

(二) mRNA 反轉錄	26
(三) 聚合酶連鎖反應.....	26
六、酵素連結免疫分析法	27
七、統計分析	28
結果	29
討論	37
結論	45
圖表	46
參考文獻	65

圖表目次

	頁數
圖一、飼料配方。.....	48
圖二、母鼠攝食及體重變化量.....	49
圖三、每胎平均仔鼠數.....	50
圖四、母鼠活動量及似憂鬱症行為測試.....	51
圖五、3週齡仔鼠似憂鬱症行為測試.....	52
圖六、3週齡仔鼠體重及腦組織重變化.....	53
圖八、3週齡仔鼠腦部神經元細胞數及新生神經元細胞.....	57
圖九、3週齡仔鼠腦部細胞型態分析.....	59
圖十、3週齡仔鼠腦衍生神經營養因子變化.....	61
圖十一、3週齡仔鼠腦部CREB磷酸化程度.....	62
圖十二、3週齡仔鼠腦部內源性神經幹細胞特異性標誌蛋白質表現量	64

中文摘要

現今憂鬱症已是不可輕忽的精神疾病，世界衛生組織也把憂鬱症列為二十一世紀三大疾病之一。流行病學研究發現，補充 omega-3 多元不飽和脂肪酸可改善憂鬱症患者的臨床症狀，反之，若飲食缺乏 omega-3 多元不飽和脂肪酸則會更加惡化憂鬱症患者的臨床症狀。這些發現暗示著 omega-3 多元不飽和脂肪酸含量變化與憂鬱症的產生及惡化可能有極大的關係。雖然補充 omega-3 多元不飽和脂肪酸在生理上的活性機制已被廣泛研究，但是缺乏 omega-3 多元不飽和脂肪酸後對於神經活性影響的分子機制還不明確。本研究的目的主要探討餵食 omega-3 多元不飽和脂肪酸缺乏飼料是否會影響動物神經行為及探討影響神經行為的分子作用機制，特別著重於似憂鬱症行為方面的變化。結果發現，大鼠餵食 omega-3 多元不飽和脂肪酸缺乏飼料後會增加懸吊尾測試及強迫水測試的靜止時間，表示似憂鬱症行為的產生。相對於正常飼料組動物，餵食 omega-3 多元不飽和脂肪酸缺乏飼料動物腦組織重量明顯下降、神經元細胞數量降低、神經元細胞相關的 NeuN 蛋白質表現量降低、寡樹突細胞相關的 CNPase 蛋白質表現量降低，但是卻增加星狀神經膠細胞相關的 GFAP 蛋白質表現。藉由 BrdU 標定探討大腦神經新生變化發現，餵食 omega-3 多元不飽和脂肪酸缺

乏飼料動物，腦組織中 BrdU 陽性細胞數量顯著低於對照組。西方轉漬分析結果顯示餵食 omega-3 多元不飽和脂肪酸缺乏飼料動物，腦組織內與內源性神經幹細胞相關的特異性標誌蛋白質如 Nestin、Klf4 及 Sox2 等表現量都比對照飼料組低。進一步更發現餵食 omega-3 多元不飽和脂肪酸缺乏飼料動物，腦組織及血漿中腦衍生神經營養因子含量都低於對照組。本論文的研究結果說明，餵食 omega-3 多元不飽和脂肪酸缺乏飼料會造成動物似憂鬱症行為的表現，而似憂鬱症神經行為的表現則伴隨有內源性神經幹細胞數量下降、神經新生活性下降及腦衍生神經營養因子表現下降等。

Abstract

Depression is a prevalent psychiatric disorder. World Health Organization (WHO) suggests that the depression is one of major diseases in the twenty-first century. Epidemiological studies show that supplementation with omega-3 polyunsaturated fatty acids can improve clinical outcome of depression patients. In contrast, diet deficient of omega-3 polyunsaturated fatty acids exacerbates clinical outcome. These observations suggest that the alteration of omega-3 polyunsaturated fatty acid content may have a role in the induction and augmentation of depression. While the action mechanisms of omega-3 polyunsaturated fatty acid supplementation in the physiological processes have been widely studied, the effect and potential action mechanisms of omega-3 polyunsaturated fatty acid deficiency on neurobehavior remain largely unclear. This study was designed to investigate whether supplementation with omega-3 polyunsaturated fatty acid deficient diet alters animal neurobehavior and what is the potential action mechanism, focusing on depression-related changes. Rats fed with omega-3 polyunsaturated fatty acid deficient diet showed prolonged immobility time in tail suspension test and forced swimming test, indicating a depression-like behavior. In comparing with control normal diet, rats fed with omega-3 polyunsaturated fatty acid deficient diet showed decreases in brain weight, neuronal number, and NeuN and CNPase protein expression but increase in GFAP protein expression. The BrdU incorporation assay showed a decreased number of proliferating cells in omega-3 polyunsaturated fatty acid deficient diet-fed animals. Western blot analysis revealed that rats fed with omega-3 polyunsaturated fatty acid deficient diet expressed lower levels of Nestin, Klf4, and Sox 2 protein in cerebral cortices. Besides, a decreased level of

BDNF was detected in cerebral cortices and plasma when rats were fed with omega-3 polyunsaturated fatty acid deficient diet. In conclusion, our results show that supplementation with omega-3 polyunsaturated fatty acid deficient diet may cause rats expressing depression-like behavior. This diet-induced behavioral alteration was accompanied by decreased number of endogenous neural stem cells, decreased neurogenesis, and decreased BDNF expression.

文獻回顧

壹、憂鬱症

憂鬱症(depression)是一種精神疾病。現今憂鬱症已是不可輕忽的疾病，大多數病患可能會有自殺的行為，自殺在臺灣也被列為前十大死因之一。嚴重的患者常因失去日常生活機能，造成自己及家人的負擔。且隨著時代的進步，罹患憂鬱症的人數逐年增加。因此世界衛生組織(World Health Organization, WHO)將憂鬱症、心血管疾病以及惡性腫瘤並列二十一世紀的三大疾病及預防重點。

一、憂鬱症分類及成因

憂鬱患者(depressive disorders)包含了重度憂鬱患者(major depressive disorder)、輕度憂鬱患者(dysthymic disorder)。憂鬱症致病的原因較其他疾病複雜許多，由多種的致病因子交互影響所引發(Nestler et al., 2002)。首先，生物因素方面，如：正腎上腺素(norepinephrine)、血清素(serotonin)以及多巴胺(dopamine)等，這些生物胺(biogenic amines)參與神經訊息傳遞，所以也稱神經傳導物質(neurotransmitters)。憂鬱症患者生物胺濃度都有較低的情形，其中以正腎上腺素及血清素失衡的相關性較大。

遺傳因素是重要致病因子之一。文獻指出同卵雙胞胎的共病率為 70-90 %；異卵雙胞胎共病率約 10-25 %。其他研究亦指出，重度憂鬱症患者其一等親的患病率約 14 % (Faraone et al., 1990；李, 1999)。目前已有許多基因被發現與憂鬱症病發有關，如血清素第 2A 型接受體 (serotonin 2A receptor, 5HTR2A)、血清素轉運體 (serotonin transporter, SLC6A4)、兒茶酚胺氧位甲基轉移酶 (catechol-o-methyltransferase, COMT)、色氨酸氫化酶 1 (tryptophan hydroxylase 1, TPH1) 及酪胺酸羥化酶 (tyrosine hydroxylase, TH)，這些皆與神經傳導物質之合成或受體相關 (Levinson et al., 2006)。近期被廣為探討的腦衍生神經營養因子 (brain-derived neurotrophic factor, BDNF)，由於憂鬱症患者血清中的腦衍生神經營養因子濃度較低，給予抗憂鬱症藥物治療時發現腦衍生神經營養因子有改善 (Karege et al., 2002；Gonul et al., 2005)。因此，認為這類神經營養因子與憂鬱症有關。

除了上述兩種因素，外在環境因素也被認為與憂鬱症病發相關，其中以壓力 (stress) 因子為主。壓力因子常在日常生活中發生，例如：失去雙親、失業、重大疾病、缺乏良好的人際關係以及年幼時遭受虐待等等，皆有可能導致憂鬱症。當個體受到壓力時，體內壓力反應系統會啟動，此系統主要由下視丘-腦下垂體-腎上腺皮質

(hypothalamus-pituitary gland-adrenal cortex axis, HPA axis)組成。會產生大量有抗壓功能荷爾蒙可體松(cortisol)以調整各器官之代謝、降低非必要的生理機能及抑制發炎反應。過去文獻指出，憂鬱症患者體內可體松會過量表現(Gillespie and Nemeroff, 2005)，並抑制大腦神經新生的現象(Czéh et al., 2002)。另外，有文獻指出飲食失調及營養素攝取不當與憂鬱症病發有關，早期研究發現憂鬱症盛行率與飲食中魚類消耗量呈負相關性(Hibbeln, 1998)。深海魚類含有豐富的魚油，包含了DHA、EPA等omega-3多元不飽和脂肪酸。且憂鬱症患者血中omega-3多元不飽和脂肪酸濃度比正常人低(Peet et al., 1998)。近期研究更發現體內omega-3多元不飽和脂肪酸含量與憂鬱症罹患率成負相關性(Freeman et al., 2006)。所以omega-3多元不飽和脂肪酸與憂鬱症有一定的相關性。

二、憂鬱症治療

目前治療憂鬱症的方法有，藥物治療、心理治療以及電痙治療。由於憂鬱症病發原因複雜，所以在治療上也從多方面著手。除了利用藥物治療腦中病變外，也會搭配一些輔助治療。藥物治療應以低劑量開始給予再逐漸增加的原則，初期應該選用副作用較少的藥物進行治療再做調整。

藥物治療方面，主要是改變大腦生化反應過程，讓體內的神經傳導物質正常運作，常使用藥物種類有單胺氧化酶抑制劑(monoamine oxidase inhibitors, MOAI)、三環抗憂鬱藥物(tricycle antidepressants, TCA)、選擇性血清素再吸收抑制劑(selective serotonin reuptake inhibitors, SSRI)、選擇性正腎上腺素再吸收抑制劑(serotonin norepinephrine reuptake inhibitor, SNRI)。只要依據憂鬱症患者的病情，給予正確的藥物及劑量，皆可以有效的改善。但藥物多少都會有副作用，抗憂鬱症藥物也不例外，所以須注意患者服藥後的身心狀況。

心理治療(psycho-therapy)主要以一對一面談的方式進行，讓憂鬱症患者有宣洩情緒的管道，導正其負面思考，釐清自身的困惑點，給予情感上的支持並建立患者自信心。目前的治療方法有，人際關係心理治療(interpersonal psycho-therapy)、行為治療(behavior therapy)、支持性心理治療(supportive psycho-therapy)以及認知心理治療(cognitive therapy)。一般認為使用抗憂鬱症藥物加上心理治療的輔助，可以更佳改善患者的病情(Thase et al., 1997)。

電痙治療(electroconvulsive therapy, ECS)或稱電擊法，此方法對重度憂鬱症患者、藥物治療反應不佳的患者有改善效果，對自殺意念強烈之患者也能有效減緩病情。電痙治療作用與藥物治療類似，能快速

恢復腦中神經傳導物質之平衡，由於頭部遭受電擊後可能會產生副作用如促使腦壓上升、記憶力受損等。

近年來，以天然飲食的方式作為替代治療或輔助治療(alternative therapy)越來越普遍。研究發現食用中草藥材貫葉連翹(*St. John's Wort*)對輕度、中度憂鬱症患者有明顯的療效，而且副作用極少。藥材中的金絲桃素(hypericin)可以增加體內的神經傳導物質，但它會與其他藥物在肝臟交互作用並產生不良影響(Di Matteo et al., 2000；Hypericum Depression Trial Study Group, 2002)。補充 omega-3 多元不飽和脂肪酸，可改善輕憂鬱症患者，在憂鬱症患者康復後可預防再度病發(Nemets et al., 2002；Peet and Stokes, 2005)。這類脂肪酸能增加神經元細胞的突觸蛋白，加強神經元之間的連結，可改善年齡所造成的長期記憶損害及神經傳導物質釋出退化的情況，如果與藥物治療搭配使用，能降低抗憂鬱症藥物的使用量，使藥效提前發揮效果(McGahon et al., 1997；Venna et al., 2009)。除此之外，omega-3 多元不飽和脂肪酸與細胞膜的組成有關，膜上有很多神經傳導物質之受體，可能會間接或直接影響訊息傳遞，進而調節基因的表現。所以補充 omega-3 多元不飽和脂肪酸不只可減輕憂鬱症患者病情，對健康者而言也有預防憂鬱症之效果。

貳、脂肪酸

脂肪酸(fatty acid)依據碳雙鍵飽和程度分為，飽和脂肪酸(saturated fatty acid)和不飽和脂肪酸(unsaturated fatty acid)。不飽和脂肪酸依碳雙鍵數又分為單元不飽和脂肪酸(monounsaturated fatty acid, MUFA)以及多元不飽和脂肪酸(polyunsaturated fatty acid, PUFA)。不飽和脂肪酸若依碳雙鍵位置分 omega-9 單元不飽和脂肪酸、omega-6 多元不飽和脂肪酸以及 omega-3 多元不飽和脂肪酸。Omega-9 單元不飽和脂肪酸屬於非必需脂肪酸(non-essential fatty acids, NEFA)，在體內會自行合成。這類脂肪酸可以降低血中的低密度脂蛋白(Low-density lipoprotein, LDL)膽固醇，預防心血管疾病亦可促進小腸蠕動易於排便。Omega-6 和 omega-3 多元不飽和脂肪酸屬必需脂肪酸(essential Fatty Acid, EFA)，人體不易自行合成，需藉由飲食的方式獲取。攝取過多 omega-6 多元不飽和脂肪酸易產生促發炎因子產生。如攝取過多的花生四烯酸(arachidonic acid, AA)會增加 prostaglandin E2 (PGE2)等促發炎因子，使腦部神經元細胞受損；然而攝取 omega-3 多元不飽和脂肪酸(如：DHA、EPA)可抑制腫瘤壞死因子(tumor necrosis factor- α , TNF- α)、介白素-6 (interleukin-6, IL-6)、介白素-12 (interleukin-12, IL-12)等發炎因子產生(Calder, 2006)。文獻更發現攝取 omega-3 多元不飽和脂肪酸能

減少血小板凝集、增加血管的彈性、降低心血管以及中風的死亡率 (Hibbeln et al., 2006)，尚可活化腦細胞、增加腦中神經傳導物質含量 (Delion et al., 1996)。

一、Omega-3 多元不飽和脂肪酸

由於 omega-3 多元不飽和脂肪酸幾乎只能經由飲食獲得。可從植物攝取豐富 α -次亞麻油酸(alpha-linolenic acid, ALA)，至於二十二碳六烯酸(docosahexaenoic acid, DHA)及二十二碳五烯酸(eicosapentaenoic acid, EPA)，主要從深海魚類中獲得(Sioen, 2008)。這幾種為常見的 omega-3 多元不飽和脂肪酸。體外實驗發現神經膠細胞和內皮細胞可將 ALA 及其他前驅物轉換成 DHA，但神經元細胞無此活性(Moore, 2001)，所以缺乏 omega-3 多元不飽和脂肪酸可能會影響神經元細胞生存。

Omega-3 多元不飽和脂肪酸在腦中扮演重要的角色，對細胞膜功能、細胞活性以及基因表現，都有一定的影響。多元不飽和脂肪酸不只是構成細胞膜的主要成分還可增加細胞膜流動，讓訊息傳遞更順暢；反之，飽和脂肪酸會讓細胞膜變的較硬使膜上通道開關不易。且 omega-3 多元不飽和脂肪酸可調節神經傳導物質釋出(Zimmer et al., 2000)，影響葡萄糖攝入(uptake)及調節神經營養因子(neurotrophin)合成

(Ikemoto et al., 2000 ; Ximenes et al., 2002)。甚至研究發現 omega-3 多元不飽和脂肪酸含量與腦部神經元細胞數量、細胞大小及腦組織重量有相關性(Ahmad et al., 2002)。文獻亦指出大鼠長期食用富含 ALA 或 DHA + EPA 飼料會影響腦部超過 100 種基因之表現，其中也包含腦衍生神經營養因子表現量(Kitajka et al., 2004 ; Sinclair et al., 2007)。

二、Omega-3 多元不飽和脂肪酸與憂鬱症

流行病學研究發現在憂鬱症患者的血液中 omega-3 多元不飽和脂肪酸濃度較健康者低，許多臨床研究上認為補充 omega-3 多元不飽和脂肪酸可改善憂鬱症(Su et al., 2003 ; Nemets et al., 2006)。若飲食中缺乏也會造成神經元細胞葡萄糖攝入能力降低和細胞色素氧化酶 (cytochrome oxidase) 活性下降，進而影響神經元細胞正常功能 (Vaidyanathan et al., 1994 ; Ximenes et al., 2002)。此外也發現在憂鬱症患者腦中血流量及糖類代謝皆有明顯下降。另有研究顯示憂鬱症患者體內都有高表現之促發炎因子(TNF- α 、IL-6、IL-12 等)，而補充 omega-3 多元不飽和脂肪酸可抑制這類促發炎因子的表現，降低腦中神經元細胞死亡。且發現憂鬱症患者腦部神經元細胞密度低且細胞較小的現象 (Rajkowska et al., 1999)。由動物實驗中也觀察到缺乏 omega-3 多元不飽和脂肪酸也會降低神經元細胞密度和細胞大小(Ahmad et al.,

2002)。有研究指出食用高飽和脂肪酸及高蔗糖飼料，會降低腦衍生神經營養因子表現量，然而腦衍生神經營養因子與細胞的生存有關 (Molteni et al., 2002)。若給予 omega-3 多元不飽和脂肪酸可增加老年小鼠腦部腦衍生神經營養因子與神經傳導物質含量(Jiang et al., 2009)。研究亦指出大鼠餵食缺乏 omega-3 多元不飽和脂肪酸飼料，大腦中腦衍生神經營養因子表現量會降低(Rapoport et al., 2007)。

參、神經營養因子

神經營養因子是一種蛋白質，屬於生長因子(growth factor)一族，神經營養因子家族很多如神經生長因子(nerve growth factor, NGF)、腦衍生神經營養因子、神經營養因子-3 (neurotrophin- 3, NT- 3)、神經營養因子-4/5 (neurotrophin- 4/5, NT-4/5)。主要功能是參予神經新生(neurogenesis)、神經元細胞活性、生長以及功能之調控(Hempstead, 2006；Reichardt, 2006)。除了可以促進神經元細胞生存外，文獻研究指出神經營養因子也能調節突觸(synapses)的結構和可塑性，進而影響突觸的連結及神經傳導物質的釋出(McAllister et al., 1999；Thoenen, 2000)，甚至可以誘導幹細胞分化成神經相關之細胞如神經元細胞(neurons)、星狀神經膠細胞(astrocytes)以及寡樹突細胞

(oligodendrocytes) (Okano, 2002a ; Sun, et al., 2002)。

一、腦衍生神經營養因子

腦衍生神經營養因子是神經營養因子家族之一，在中樞神經系統中分布範圍最廣也最豐富(Connor and Dragunow, 1998)。腦衍生神經營養因子除了調節細胞之生長、遷移、功能活性外，也會影響大腦的學習力以及記憶力。甚至對突觸可塑性及維持功能有關，這與神經元細胞之間訊息傳遞有密切關係(Alder and DiStefano, 1998)。腦衍生神經營養因子基因表現受到神經元細胞活性影響，神經元細胞活性上升，鈣離子通道會打開，當鈣離子進入細胞內後，會與攜鈣素(calmodulin, CaM)結合並活化鈣-鈣調蛋白依賴性蛋白激酶II/IV (Ca²⁺/calmodulin dependent protein kinase II/IV, CaMK II/IV)及蛋白質激化酶A (protein kinase A, PKA)，讓環腺嘌呤核單磷酸反應物質結合蛋白(cyclic adenosine monophosphate response-element binding protein, CREB)磷酸化，可以增加腦衍生神經營養因子表現量(Finkbeiner, 2000 ; West et al., 2001)。從動物實驗發現，給予抗憂鬱症藥物可以增加腦中腦衍生神經營養因子表現量，若把小鼠CREB基因剔除後，給予抗憂鬱症藥物卻無法增加腦中腦衍生神經營養因子表現量(Conti et al ., 2002)。由此可知，CREB可調節腦衍生神經營養因子表現量。另有研究指出長期補

充omega-3 多元不飽和脂肪酸也可增加CREB表現，進而提高腦衍生神經營養因子表現量(Logan, 2003)。現在大家已知的神經系統疾病如帕金森氏症(Parkinson's disease, PD)、阿茲海默症(Alzheimer's disease, AD)、雷氏症(Rett's syndrome, RTT)、亨丁頓舞蹈症(Huntington's disease, HD)、癲癇症(epilepsy)以及憂鬱症都與腦衍生神經營養因子有關(Hu and Russek, 2008)。

二、腦衍生神經營養因子與憂鬱症

過去屍檢研究指出未使用抗憂鬱症藥物的患者大腦海馬迴(hippocampus)腦衍生神經營養因子表現量比接受抗憂鬱症藥物治療的患者低(Chen et al., 2001)。臨床上無法直接偵測大腦中腦衍生神經營養因子，則會以血清中濃度為代表，發現使用抗憂鬱症藥物患者血清中腦衍生神經營養因子含量較未使用藥物治療者高(Karege et al., 2002；Gonul et al., 2005)。動物研究方面，給予抗憂鬱症藥物會增加大鼠海馬迴及大腦皮質區的腦衍生神經營養因子表現量(Nibuya et al., 1995；Zetterstrom et al., 1999)。反之，腦衍生神經營養因子基因剔除小鼠會增加似憂鬱行為(depression-like behavior)，給予抗憂鬱藥物治療後，則可改善似憂鬱行為(Saarelainen et al., 2003；Monteggia et al., 2004；Yuluğ B et al., 2009)。然而環境壓力因素會降低大鼠腦中腦衍生神經營養因子表

現量，增加似憂鬱行為(Anglucchi et al., 2005)。慢性壓力會造成海馬迴的神經營養因子合成下降，讓CA 3椎體細胞及DG顆粒細胞(dentate gyrus granule cell)腦衍生神經營養因子表現量降低，嚴重者會造成CA 3椎體細胞死亡(Sapolsky, 1990；Takahashi et al., 2000；Marmigère et al., 2003)。所以腦衍生神經營養因子在憂鬱症上扮演重要角色。

三、腦衍生神經營養因子與神經新生

神經新生以往認為出生不久後就不會再發生，這個觀念在幹細胞的出現而被改變，藉由神經幹細胞，可以補充新的神經元細胞至神經系統中，也可應用在神經疾病修補與治療。而幹細胞是指尚未分化的細胞，存在於早期胚胎、骨髓、臍帶和部分成年人細胞中，擁有自我更新能力、多向分化潛能及可塑性。有許多種類的幹細胞，例如胚胎幹細胞(embryonic stem cell, ESC)，它能發育和分化成身體的每種細胞；成體幹細胞(adult stem cell)，它們也有潛力成為幾乎所有的細胞類型；較特化性的細胞類型，此細胞類型會朝向目標細胞邁進，在那個領域中，有潛力成為多種不同的細胞，神經幹細胞就是其中一員。目前的活體研究發現，側腦室附近的室管膜下區、海馬迴和齒狀回是目前公認的成年哺乳動物神經系統中神經幹細胞最為集中的部位，這些內源性神經幹細胞會經由神經營養因子和內環境的調控，啟動分化成某些類型的神經細胞

(Okano, 2002b)，在早期神經發育與組織修補過程扮演重要角色。

腦衍生神經營養因子會影響神經新生，在動物實驗研究發現，把腦衍生神經營養因子注入到右側腦室，則右側嗅球的神經元細胞數目有明顯增加(Zigova et al., 1998)，反映出腦衍生神經營養因子確實會使腦室下區有神經新生的情形。腦衍生神經營養因子影響細胞存活及活性途徑，首先會結合到膜上受體tropomyosin-related kinase B (Trk B)時，會活化下游MEK/ERK 1/2 訊息傳遞路徑增加轉錄因子CREB磷酸化使協助細胞存活之基因(Bcl-2、Bcl-X_L)表現量提高。也會增加PI3K/Akt訊息路徑影響細胞活性、生長和分化，並降低細胞凋亡(apoptosis) (Ying et al., 2002)。

肆、實驗目的

現今憂鬱症已是不可輕忽的精神疾病。環境壓力隨著經濟起飛而越來越大，再加上現今人們飲食趨向西方三高飲食(高鹽、高糖分及高油脂)，使罹患憂鬱症人數逐年增加。世界衛生組織也將憂鬱症列為二十一世紀三大疾病之一及預防重點。憂鬱症患者會有行動遲緩、求生意志降低、自閉等，嚴重者會有自殺傾向，造成家人及社會的負擔。流行病學研究發現，補充omega-3多元不飽和脂肪酸可改善憂鬱症患者的臨床症狀，反之，若飲食缺乏omega-3多元不飽和脂肪酸則會更加惡化憂鬱

症患者的臨床症狀。這些發現暗示著omega-3多元不飽和脂肪酸含量變化與憂鬱症的產生及惡化可能有極大的關係。雖然補充omega-3多元不飽和脂肪酸在生理上的活性機制已被廣泛研究，但是缺乏omega-3多元不飽和脂肪酸後對於神經活性影響的分子機制還不明確。本研究的目的主要探討餵食omega-3多元不飽和脂肪酸缺乏飼料是否會影響動物神經行為及探討影響神經行為的分子作用機制，特別著重於似憂鬱症行為方面的變化。

材料與方法

壹、材料：

一、飼料

本實驗所使用的動物飼料有正常對照飼料(Control diet)及 omega-3 多元不飽和脂肪酸缺乏飼料(Deficient diet)。正常對照組飼料源自 AIN-93G 配方，含有 7%的 Soybean oil，omega-3 多元不飽和脂肪酸約 0.55%。omega-3 多元不飽和脂肪酸缺乏飼料，以 AIN-93G 為基本配方，但以 0.35% Soybean oil 及 6.65% Safflower oil 為脂肪酸來源，omega-3 多元不飽和脂肪酸約 0.03% (Reeves et al., 1993 ; Ahmad et al., 2008 ; Church et al., 2008)。由雍立飼料代理商代購(圖一)。

二、實驗動物

本實驗所使用的實驗動物為購自台灣樂斯科生技公司 Sprague–Dawley rat 並自行繁殖之大鼠。飼養於動物籠中並維持 $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ，60-80%之相對濕度的環境中。光照週期為 12 小時，通風良好，並給予足量的飼料及飲水。

三、抗體

抗體名稱	廠商
NeuN	Millpore
GFAP	BD transduction
CNPase	Sigma
BrdU	Sigma
Phospho-CREB 1 (ser 133)	Sigma
Nestin	BD transduction
Sox2	Sigma
Klf4	Sigma

四、引子序列

引子名稱	序列	產物大小	黏合溫度
GAPDH	sense 5'-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3' antisense 5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3'	450 bp	58 °C
β -III-tubulin	sense 5'-TGCGTGTGTACAGGTGAATGC-3' antisense 5'-AGGCTGCATAGTCATTTCCAAG-3'	139 bp	61 °C
BDNF	sense 5'-GATGACCATCCTTTTCCTTACTATGG-3' antisense 5'-ACTATCTTCCCCTTTTAATGGTCAG-3'	751 bp	58 °C

(二) 懸吊尾測試(Tail Suspension Test, TST)

以懸吊尾測試評估大鼠是否有憂鬱的情形(Chermet et al., 1986 ; Cryan et al., 2005)。將餵食 16 週母鼠及 3 週齡仔鼠進行懸吊尾測試，將大鼠尾巴夾住離地約 1 公尺，正常大鼠被懸吊時會緊張不安而掙扎；有憂鬱傾向時，則有放棄反抗的現象。測定時間為 6 分鐘，並觀察記錄大鼠靜止的秒數(immobility time)。

(三) 強迫水測試(Forced swimming test, FST)

強迫水測試常與懸吊尾測試搭配評估憂鬱症(Porsolt et al., 1977 ; Huang et al., 2008)。將餵食 16 週母鼠及 3 週齡仔鼠進行強迫水測試，利用大鼠怕水性，所以正常大鼠置於水中會想逃脫掙扎，然而有憂鬱傾向的大鼠，則掙扎情形有下降的趨勢。將大鼠置於透明壓克力圓柱桶(底直徑 20 公分，高 45 公分)，水高 30 公分(水溫 24-26°C)。在測試前一天須先投入相同環境水桶 20 分鐘讓大鼠適應水中環境。24 小時後，再將大鼠置入水桶中，評估時間為 5 分鐘，並觀察記錄大鼠靜止秒數(immobility time)、游泳秒數(swimming time)以及掙扎秒數(climbing time)。

三、組織染色

(一) 檢體處理

於動物犧牲分析前三天開始給予 BrdU (50 mg/kg, i.p.)，每天一劑，共三劑，注射過量麻藥(520-600 mg/kg chloral hydrate)使大鼠安樂死，以 4°C 生理食鹽水灌流完畢後，將灌流管換 4°C 之 4% paraformaldehyde/0.1 M phosphate buffer 灌流量約等於大鼠之體重，直至四肢僵硬為止。將灌流完成的大鼠腦組織取出，並將腦組織橫切 5 mm，冏門(bregma) -2~3 mm。其後浸泡在 4% paraformaldehyde/0.1 M phosphate buffer 4 小時，置換於 15% sucrose/0.1 phosphate buffer 16 小時，在放置 OCT 約 8 小時。以液態氮快速冷凍。以 CM 3050S 冷凍切片機制成厚度約 10 μ m 之冷凍切片。於 -80°C 保存。

(二) 免疫螢光染色

將冷凍切片於室溫下風乾 2 小時，PBS 清洗 5 分鐘 3 次，以 PAP pen 將組織圈起。並以 0.5% Triton X-100 於室溫下作用 10 分鐘。再以 PBS 清洗 5 分鐘 2 次，加入 5% 脫脂奶於室溫下作用 30 分鐘，以 PBS 清洗 2 分鐘。加入一級抗體於 4°C 下作用約 16 小時。再以 PBS 清洗 5 分鐘 5 次，加入二及抗體於室溫下作用 1 小時。PBS 清洗 5 分鐘 5 次，最後以封片膠封片。

(三) BrdU 標定染色

將冷凍切片於室溫下風乾 2 小時，PBS 清洗 5 分鐘 3 次，以 PAP pen 將組織圈起。以 2 N HCl 於 37°C 下作用 30 分鐘，再以 pH 8.2 之 0.1 M 硼酸中和酸性 5 分鐘 2 次。以 PBS 清洗後，加入 5% 脫脂奶於室溫下作用 30 分鐘，以 PBS 清洗 2 分鐘。加入一級抗體於 4°C 下作用約 16 小時。再以 PBS 清洗 5 分鐘 5 次，加入二及抗體於室溫下作用 1 小時。PBS 清洗 5 分鐘 5 次，最後以封片膠封片。

四、蛋白質分析

(一) 蛋白質備製

注射過量麻藥(520-600 mg/kg chloral hydrate)使大鼠安樂死，取下大鼠腦組織，於冰上分離左右側之大腦皮質區。將分離的腦組織加入 T-PER (Tissue Protein Extraction Reagent) 內含 proteinase inhibitor 並剪碎。超音波震碎組織 1 至 2 次，以 12000 rpm，4°C 離心 10 分鐘，取上清液。將上清液以 12000 rpm，4°C 離心 10 分鐘，並將上清液定量保存於 -70°C。

(二) 西方轉漬

將定量完之檢體加入 4 x Sample buffer (250 mM Tris-HCl, pH

6.8、10% SDS、50 Glycerol、2.5% β -mercaptoethanol、0.5% Bromophenol blue)，於 96°C 加熱 10 分鐘，之後放置冰上 2 分鐘。將檢體加入 10% SDS-PAGE 電泳膠片，置於電泳槽中並加入 Running Buffer (250 mM Tris-HCl、1.25 M Glycine、1% SDS)，以 120 V 進行電泳分離。約 3.5 小時後，將膠片取下，利用 Transfer buffer (25 mM Tris-HCl，pH 7.5、190 mM Glycine、0.05% SDS、20% Methanol)，以濕式轉漬槽將蛋白質轉漬到 PVDF 膜上。將含有蛋白質之 PVDF 膜浸泡在 5% 脫脂奶。1 小時後，加入適當稀釋倍數的一級抗體作用 2 小時，以 Washing Buffer (0.1% Tween 20/PBS) 清洗 4 次，每次 10 分鐘。再加入含有 Horseradish Peroxidase (HRP) 標定之二級抗體，於室溫下反應 1 小時，以 Washing Buffer 清洗 4 次，每次 10 分鐘。清洗後加入 ECL 於 X 光底片呈像。

五、反轉錄聚合酶連鎖反應

(一) RNA 萃取

取 0.1 g 腦組織，加入 RareRNA reagent，用小剪將腦組織剪碎後放置冰上 5 分鐘，加入氯仿混勻後放置冰上 10 分鐘，以 12000 rpm，4°C 下離心 10 分鐘，取上清液加入等體積之異丙醇，放置 -20°C 沉澱 2 小時，以 12000 rpm，4°C 下離心 20 分鐘，去除上清液，再以

75%酒精清洗沉澱物，以 12000 rpm，4°C 下離心 5 分鐘，移除上清液在室溫風乾。風乾後加入二次水回溶。為了提高 RNA 濃度，加入 DNase 於 37°C 作用 30 分鐘，再加入酚/氯仿進行萃取，以 12000 rpm，4°C 下離心 10 分鐘，取上清液加入等體積之異丙醇，於-20°C 沉澱 2 小時後，以 12000 rpm，4°C 下離心 20 分鐘，去除上清液後加入 75%酒精清洗沉澱物，再以 12000 rpm，4°C 下離心 5 分鐘，移除上清液在室溫下風乾加入 RNA buffer 回溶，以分光光度計定量，波長為 260 nm 和 280 nm。

(二) mRNA 反轉錄

取 5 μ g mRNA 進行反轉錄(reverse transcription)反應，將 RNA 加入 1 μ g dT 於 70°C 下加熱 10 分鐘後，放置冰上 5 分鐘，再加入 5x reverse transcription buffer (250 mM Tris-HCl, pH 8.3、250 mM KCl、20 mM MgCl₂、50 mM DTT)、10 mM dNTP 及 200 U M-MLV reverse transcriptase (with 1 U RNA inhibitor)，於 42°C 反應 60 分鐘，可得終產物互補 DNA (cDNA)。cDNA 保存於-20°C。

(三) 聚合酶連鎖反應

取 cDNA 進行聚合酶連鎖反應(polymerase chain reaction, PCR)，加

入 10x reaction buffer (400 mM Tris-HCl, pH 8.0、60 mM MgCl₂、100 mM DTT、20 mM spermidine、100 mM NaCl)、2.5 mM dNTP、20 pmole 正反股引子、0.5 U Taq DNA polymerase和二次水。混和均勻後，以PCR 機器(Perkin-Elmer-Cetus 9700)進行擴增。條件為one cycle of 94°C, 2 分鐘; 28 cycle of 94°C, 40 秒、56-61°C 40 秒、72°C, 40 秒; 然後 72°C, 10 分鐘。擴增後的產物以 1.5% 瓊脂凝膠電泳(agarose gel electrophoresis)進行分析。

六、酵素連結免疫分析法

取 100 µl capture 抗體，加入 96 孔盤中，以塑膠膜密封，於室溫下靜置隔夜。以清洗液(0.05% Tween 20 溶於PBS, pH 7.2-7.4)清洗 3 次，並加入 300 µl Reagent diluents(1% BSA溶於PBS, pH 7.2-7.4, 並以 0.2 µm過濾)於室溫下靜置 1 小時，以清洗液清洗 3 次，再加入 100 µl 檢體於室溫下靜置 2 小時，以清洗液清洗 3 次，加入 100 µl Streptavidin-HRP (1:200)，避光靜置 20 分鐘，並以清洗液清洗 3 次，加入 100 µl Substrate solution (H₂O₂與Tetramethylbenzidine 1:1 混和) 避光靜置 20 分鐘後，直接加入 50 µl Stop solution (2 N H₂SO₄)終止反應，以ELISA reader (450 nm)偵測其吸光值。

七、統計分析

所有實驗數據皆以平均值±標準誤差(mean ± SEM)表示，實驗數據皆以 SigmaPlot 9.0 之 unpaired t-test 進行統計分析，比較各組處理平均差異，當機率小於 0.05 ($p < 0.05$)時顯示各組於統計上有顯著差異。

結果

母鼠攝食及體重變化量

對照飼料(Control diet)及 omega-3 多元不飽和脂肪酸缺乏飼料(Deficient diet)除了脂肪酸比例不同，其外觀和非脂肪酸配方皆相同(圖一)。為了解兩組不同飼料是否會影響母鼠攝食量及體重變化，於 3 週齡母鼠開始餵食至配種前連續紀錄 10 週母鼠攝食量及體重變化，10 週後會有公鼠進入會干擾攝食量，所以不記錄。結果顯示(圖二)，兩組母鼠每天平均飼料攝食量隨年紀增長而增加，但兩組間無明顯差異(a)；在體重變化方面，餵食 10 週後對照飼料組平均體重為 299 ± 11.84 克；omega-3 多元不飽和脂肪酸缺乏飼料組平均體重為 300.5 ± 11.93 克，兩組母鼠體重變化無差異(b)。由此結果可知，餵食不同飼料之母鼠，不會影響其攝食量和體重變化。

仔鼠特性分析

為了解兩組飼料對母鼠配種後，對下一代仔鼠數目及性別之差異。實驗針對仔鼠特性分析。由結果顯示(圖三)，餵食對照飼料組為 13 ± 0.85 隻；omega-3 多元不飽和脂肪酸缺乏飼料組為 13 ± 0.28 隻，每胎仔鼠數目無差異(a)。餵食對照飼料組公仔鼠/母仔鼠為 $6 \pm 0.7/7 \pm$

0.62 隻；omega-3 脂肪酸缺乏飼料組公仔鼠/母仔鼠為 $6 \pm 0.57/7 \pm 0.64$ ，隻每胎仔鼠性別隻數也沒有明顯差異(b)。由此結果得知餵食 omega-3 脂肪酸缺乏飼料不會影響每胎仔鼠數目以及性別。

母鼠之行為變化分析

有研究發現體內 omega-3 多元不飽和脂肪酸攝取量與憂鬱症罹患率呈負相關性。為了解餵食不同飼料是否會影響母鼠整體活動量及似憂鬱症行為，將母鼠餵食不同飼料 16 週後(已哺乳完仔鼠)，藉由行為測試觀察整體活動量及似憂鬱症行為。結果發現(圖四)，餵食對照飼料組母鼠活動量為 6236.4 ± 311.87 公分，而 omega-3 多元不飽和脂肪酸缺乏飼料組之母鼠的活動量為 5099 ± 291.42 公分，與對照飼料組有顯著的差異(a)。在懸吊尾測試中。發現餵食 omega-3 多元不飽和脂肪酸缺乏飼料組母鼠掙扎時間(climbing time)比對照飼料組短，且 omega-3 多元不飽和脂肪酸缺乏飼料組母鼠靜止時間(immobility time)較對照飼料組母鼠長，兩項結果皆有顯著的差異(b)。Open field 結果得知，餵食 omega-3 多元不飽和脂肪酸缺乏飼料組之母鼠，整體活動量會降低；並且由懸吊尾測試得知，餵食 omega-3 多元不飽和脂肪酸缺乏飼料組之母鼠會有似憂鬱症行為發生。

仔鼠似憂鬱症行為變化

為了解餵食 omega-3 多元不飽和脂肪酸缺乏飼料母鼠是否會影響仔鼠似憂鬱症行為的表現，實驗將分析 3 週齡仔鼠似憂鬱症行為變化。由結果顯示(圖五)，在懸吊尾測試中，餵食 omega-3 多元不飽和脂肪酸缺乏飼料組之仔鼠掙扎時間為 124.8 ± 9.68 秒較對照飼料組之仔鼠 165.6 ± 8.69 秒短；靜止時間 omega-3 多元不飽和脂肪酸缺乏飼料組之仔鼠為 230 ± 10.54 秒較對照飼料組之仔鼠 173.2 ± 9.72 秒長(a)。於另一似憂鬱症行為強迫水測試中。發現 omega-3 脂肪酸缺乏飼料組之仔鼠靜止時間為 107.7 ± 10.72 秒，也較對照飼料組之仔鼠 27.8 ± 5.57 秒長；而 omega-3 多元不飽和脂肪酸缺乏飼料組之仔鼠掙扎時間及游泳時間(swimming time)為 70.9 ± 6.36 秒及 121.3 ± 10.21 秒，皆比對照飼料組之仔鼠 115 ± 5.4 秒及 184.3 ± 8.7 秒短(b)。此結果得知，餵食 omega-3 多元不飽和脂肪酸缺乏飼料組之仔鼠也會有似憂鬱症行為發生。

仔鼠體重及腦組織重之變化

過去研究發現，憂鬱症患者大腦皮質及海馬迴體積皆比較正常人小。為了解餵食不同飼料母鼠所生仔鼠對體重及腦組織重變化影響，將 3 週齡仔鼠離乳後犧牲並紀錄體重及腦組織重。結果顯示(圖六)，

餵食對照飼料組之仔鼠體重為 49.3 ± 1.49 克；omega-3 多元不飽和脂肪酸缺乏飼料組之仔鼠體重為 45.1 ± 3.12 克，彼此無顯著差異(a)。腦重變化方面，餵食對照飼料組之仔鼠腦組織重佔體重 $3 \pm 0.08\%$ ；omega-3 多元不飽和脂肪酸缺乏飼料組之仔鼠腦組織重佔體重 $2.7 \pm 0.13\%$ ，兩組間有顯著差異(b)。由結果得之，兩組不同飼料組之仔鼠，體重變化無顯著差異；但 omega-3 多元不飽和脂肪酸缺乏飼料組之仔鼠在腦組織重佔體重百分比有明顯較小的現象。

仔鼠大腦細胞增生變化

研究發現缺乏omega-3 多元不飽和脂肪酸腦部細胞增生數會下降。欲了解餵食不同飼料母鼠所生之仔鼠腦組織細胞增生情況，於仔鼠 3 週齡後犧牲以BrdU組織切片染色追蹤細胞增生變化。結果顯示(圖七)，從組織切片染色中觀察發現對照飼料組(a)之仔鼠在大腦皮質區BrdU陽性細胞數較omega-3 多元不飽和脂肪酸缺乏飼料組(b)之仔鼠多。量化結果顯示，對照飼料組之仔鼠在大腦皮質區每 $100 \mu\text{m}^2$ 面積有 10.3 ± 1.01 個BrdU陽性細胞數，遠高於omega-3 多元不飽和脂肪酸缺乏飼料組之仔鼠 4.3 ± 0.77 個BrdU陽性細胞數，且有顯著差異(c)。此結果得知，餵食omega-3 多元不飽和脂肪酸缺乏飼料母鼠所生之仔鼠，腦組織中BrdU陽性細胞會下降。

仔鼠大腦神經元細胞數變化

文獻指出缺乏omega-3 多元不飽和脂肪酸會降低腦中神經元細胞數量。為了解餵食不同飼料母鼠所生之仔鼠大腦神經元細胞數，於仔鼠 3 週齡後犧牲以NeuN組織切片染色追蹤神經元細胞。結果顯示(圖八)，從組織切片染色中發現對照飼料組(a)之仔鼠在大腦皮質區神經元細胞數較omega-3 多元不飽和脂肪酸缺乏飼料組(b)之仔鼠多。量化結果顯示，對照飼料組之仔鼠在大腦皮質區每 100 μm^2 面積中有 10.1 ± 0.89 個NeuN陽性細胞數，且omega-3 脂肪酸缺乏飼料組之仔鼠 8 ± 0.49 個NeuN陽性細胞數，兩組間有顯著差異(c)。由結果得知，餵食omega-3 多元不飽和脂肪酸缺乏飼料母鼠所生之仔鼠，腦組織中神經元細胞數較對照飼料組之仔鼠少。

仔鼠大腦細胞型態分析

過去認為內源性神經幹細胞會分化成神經元細胞、寡樹突細胞及星狀神經膠細胞。為了解餵食不同飼料母鼠所生之仔鼠大腦主要神經相關細胞蛋白質表現量，於仔鼠 3 週齡後犧牲取大腦皮質區進行西方轉漬法分析。結果顯示(圖九)，以 NeuN 代表神經元細胞。發現缺乏omega-3 多元不飽和脂肪酸飼料組之仔鼠大腦皮質區 NeuN 蛋白質表

現量比對照飼料組之仔鼠蛋白質表現量低 33% (a)。以 CNPase 代表寡樹突細胞。餵食 omega-3 多元不飽和脂肪酸缺乏飼料組之仔鼠大腦皮質區 CNPase 蛋白質表現量也比對照飼料蛋白質表現量低 18.5% (b)。以 GFAP 代表星狀神經膠細胞。餵食 omega-3 多元不飽和脂肪酸缺乏飼料組之仔鼠大腦皮質區 GFAP 蛋白質表現量比對照飼料蛋白質表現量增加 96.2% (c)，以上三組皆有顯著差異。由結果得知，餵食 omega-3 多元不飽和脂肪酸缺乏飼料組之仔鼠，腦中 NeuN 及 CNPase 蛋白質表現量較對照飼料組之仔鼠低；但 GFAP 蛋白質表現量比對照飼料組之仔鼠高。

仔鼠體內腦衍生神經營養因子變化

研究發現當腦中神經元細胞活性下降時，體內腦衍生神經營養因子表現量會下降；另有研究指出缺乏 omega-3 多元不飽和脂肪酸血清中腦衍生神經營養因子也會降低。為了解餵食不同飼料母鼠所生之仔鼠體內衍生神經營養因子變化，將 3 週齡仔鼠犧牲取大腦皮質區進行反轉錄聚合酶連鎖反應及西方轉漬分析，偵測腦衍生神經營養因子基因及蛋白質表現量；血清以酵素連結免疫分析腦衍生神經營養因子濃度。結果顯示(圖十)，餵食 omega-3 多元不飽和脂肪酸缺乏飼料組之仔鼠大腦皮質區的腦衍生神經營養因子基因表現量比對照飼料組之仔

鼠基因表現量低 39.4% (a)。其腦衍生神經營養因子蛋白質表現量也比對照飼料組之仔鼠低 22.5% (b)。血清方面，餵食 omega-3 多元不飽和脂肪酸缺乏飼料組之仔鼠腦衍生神經營養因子濃度為 1200.5 ± 160.97 ng/ml 比對照飼料組之仔鼠濃度 1999.4 ± 128.6 ng/ml 低(c)。以上三項測試兩組間皆有顯著差異。由結果得知，餵食 omega-3 多元不飽和脂肪酸缺乏飼料組之仔鼠在大腦皮質區及血清，其腦衍生神經營養因子基因表現量、蛋白質表現量及濃度皆比對照飼料組之仔鼠低。

仔鼠大腦 CREB 磷酸化程度

過去研究認為腦衍生神經營養因子表現量，受到轉錄因子 CREB 調控。當 CREB 被磷酸化時，腦衍生神經營養因子表現量會增加。為了解餵食不同飼料母鼠所生之仔鼠大腦皮質區 CREB 磷酸化程度，於仔鼠 3 週齡後犧牲取大腦皮質區進行西方轉漬法分析。結果顯示(圖十一)，餵食 omega-3 多元不飽和脂肪酸缺乏飼料組之仔鼠大腦皮質區 CREB 磷酸化程度比對照飼料組 CREB 磷酸化程度低 34.6%，且有顯著差異。結果得知，餵食 omega-3 多元不飽和脂肪酸缺乏飼料組之仔鼠在大腦皮質區 CREB 磷酸化程度較對照飼料組之仔鼠低。

仔鼠大腦內源性神經幹細胞變化

近期研究發現，omega-3 多元不飽和脂肪酸會影響神經新生(Innis, 2007)。為了解餵食不同飼料母鼠所生之仔鼠大腦內源性神經幹細胞變化，於仔鼠 3 週齡後犧牲取大腦皮質區進行西方轉漬法分析內源性神經幹細胞特異性標誌 Nestin、Klf4、Sox2 蛋白質表現量。結果顯示(圖十二)，餵食 omega-3 多元不飽和脂肪酸缺乏飼料組之仔鼠大腦皮質區 Nestin 蛋白質表現量比對照飼料組之仔鼠蛋白質表現量低 47% (a)。餵食 omega-3 多元不飽和脂肪酸缺乏飼料組之仔鼠大腦皮質區 Klf4 蛋白質表現量較對照飼料組之仔鼠蛋白質表現量低 18.9% (b)。餵食 omega-3 多元不飽和脂肪酸缺乏飼料組之仔鼠大腦皮質區 Sox2 蛋白質表現量較對照飼料組之仔鼠蛋白質表現量低 36% (c)。由結果可知，餵食 omega-3 多元不飽和脂肪酸缺乏飼料組之仔鼠，腦中內源性神經幹細胞數可能較餵食對照飼料組之仔鼠少。

討論

憂鬱症是一種精神疾病，其成因有很多。若從飲食方面探討，認為 omega-3 多元不飽和脂肪酸攝取量與憂鬱症有密切相關。且發現憂鬱症患者體內 omega-3 多元不飽和脂肪酸含量比健康者低(Peet et al., 1998)。有文獻指出 omega-3 多元不飽和脂肪酸(ALA、DHA 及 EPA) 攝取量與罹患憂鬱症成負相關性(Freeman et al., 2006)。另有許多研究認為 omega-3 多元不飽和脂肪酸可以改善憂鬱症並降低健康者罹患憂鬱症的機率(Nemets et al., 2002；Peet and Stokes, 2005)。也可與藥物搭配使用，除了減少藥物使用量並使藥效提前發會效用(Venna et al., 2009)。不只如此，攝取 omega-3 多元不飽和脂肪酸可調節基因表現量，如降低發炎因子表現量及增加神經營養因子表現量(Logan, 2003；Calder, 2006)。由此可知，攝取 omega-3 多元不飽和脂肪酸，不僅可以減緩憂鬱症並情，可活化大腦中細胞生長之因子。

流行病學研究指出，攝取不足 omega-3 多元不飽和脂肪酸者，其憂鬱症罹患率為正常人的 65 倍(Hibbeln, 1998)。此外，也會提高憂鬱症患者自殺率(Hibbeln, 2009)。另有動物研究發現環境壓力會降低腦中腦衍生神經營養因子表現量，增加似憂鬱症行為(Anglucchi et al., 2005)。亦有研究發現，給予高飽和脂肪酸及高蔗糖飼料，會影響腦中

腦衍生神經營養因子表現量(Molteni et al., 2002)。近期研究發現大鼠餵食缺乏 omega-3 多元不飽和脂肪酸飼料，大腦內腦衍生神經營養因子表現量會降低(Rapoport et al., 2007)。進而影響大腦中神經元細胞活性與生存。

過去研究已發現 omega-3 多元不飽和脂肪酸攝取不足與憂鬱症有密切相關，由我們結果顯示，母鼠分別餵食兩組不同飼料 16 週，在似憂鬱症行為中發現，omega-3 多元不飽和脂肪酸缺乏飼料組(Deficient diet)之母鼠比對照飼料組(Control diet)之母鼠靜止時間較長，掙扎時間和游泳時間較短(圖四 b)。推測餵食 omega-3 多元不飽和脂肪酸缺乏組之母鼠可能有放棄生存想法。過去文獻也發現缺乏 omega-3 多元不飽和脂肪酸的大鼠在強迫水測試中靜止時間也較長(Frances et al., 1996；DeMar et al., 2006)。且在 open field 行為測試中發現，餵食 omega-3 多元不飽和脂肪酸缺乏飼料組之母鼠其活動量有減少的情況(圖四 a)。雖然文獻指出，飲食中缺乏 omega-3 多元不飽和脂肪酸不會影響大鼠在 open field 行為測試中活動量的差異(Carrié et al., 2000；DeMar et al., 2006)。我們主要針對大鼠對新環境探索能力進行測試，在文獻所使用的時間下無法看到差異，所以增長測試時間來觀察。從我們結果推測餵食 omega-3 多元不飽和脂肪酸缺乏飼料組之母鼠降低

對新環境探索的基本能力，這些都與臨床上憂鬱症患者自殺傾向及降低好奇心類似。文獻指出，餵食相同飼料配方(圖一)之母鼠會影響其奶水 omega-3 多元不飽和脂肪酸含量(Church et al., 2008)。所以兩組飼料之仔鼠從懷孕期到哺乳期攝取多元不飽和脂肪酸的量皆不同。在我們結果得知，在 3 週齡仔鼠似憂鬱症行為測試發現，不論是懸吊尾測試或強迫水測試，餵食 omega-3 多元不飽和脂肪酸缺乏飼料組之仔鼠靜止時間皆較長，掙扎時間皆較短(圖五)。過去認為 omega-3 多元不飽和脂肪酸在神經發育過程中為一個重要分子。文獻也指出在懷孕期間及哺乳期缺乏 omega-3 多元不飽和脂肪酸會降低後代神經傳導物質表現量(Church et al., 2008)，且會增加仔鼠似憂鬱症行為。

研究指出 omega-3 多元不飽和脂肪酸與腦部神經元細胞數量、細胞大小及腦組織重量有相關性(Ahmad et al., 2002)。缺乏 omega-3 多元不飽和脂肪酸會造成神經元細胞葡萄糖攝入能力降低和細胞色素氧化酶活性下降，使神經元細胞活性下降(Vaidyanathan et al., 1994；Ximenes et al., 2002)。若神經元細胞活性下降則會使腦衍生神經營養因子表現量降低，過去動物研究發現腦衍生神經營養因子基因剔除小鼠會增加似憂鬱症行為，給予抗憂鬱藥物治療後，則可改善似憂鬱症行為(Saarelainen et al., 2003；Monteggia et al., 2004；Yuluğ B et al.,

2009)。這表示腦衍生神經營養因子表現量會影響憂鬱症病發。接下來探討餵食兩組飼料之仔鼠腦組織重變化、大腦神經元細胞變化及體內腦衍生神經營養因子表現量。由結果得知，餵食不同飼料組之仔鼠體重變化無差異(圖六 a)，但餵食 omega-3 多元不飽和脂肪酸缺乏飼料組之仔鼠腦組織重佔體重百分比有明顯較小(圖六 b)。推測這可能與腦中細胞數及細胞大小有關，以神經元細胞的相關性較大。當大腦發育不良時，腦中神經元細胞數會有降低的情形。因此我們以 NeuN 追蹤神經元細胞數，結果發現餵食 omega-3 多元不飽和脂肪酸缺乏飼料組之仔鼠大腦 NeuN 陽性細胞數(圖八 b)明顯比對照飼料組之仔鼠(圖八 a)少；西方轉漬結果也顯示，餵食 omega-3 多元不飽和脂肪酸缺乏飼料組之仔鼠大腦皮質區 NeuN 蛋白質表現量也較對照飼料組低(圖九 a)。其結果在其他文獻研究中也觀察到缺乏 omega-3 多元不飽和脂肪酸也會降低神經元細胞密度(Ahmad et al., 2002)。由另一分析結果得知，餵食 omega-3 多元不飽和脂肪酸缺乏飼料組之仔鼠大腦皮質區腦衍生神經營養因子基因表現量(圖十 a)及蛋白質表現量(圖十 b)皆比對照飼料組之仔鼠低；且血清中腦衍生神經營養因子濃度也比對照飼料組之仔鼠低(圖十 c)。推測大腦及血清中腦衍生神經營養因子表現量低與神經元細胞活性有關。文獻指出，缺乏 omega-3 多元不飽和脂

肪酸會影響神經元細胞膜的流動性，使離子通道開關及訊息傳遞上出問題，使轉錄因子調控上有問題，所以降低腦衍生神經營養因子表現量(Finkbeiner, 2000；West et al., 2001；Rapoport et al., 2007；Sinclair et al., 2007)。此外，神經突觸所釋出的神經傳導物質主要受到腦衍生神經營養因子調節(Numakawa et al., 2010)。發現腦衍生神經營養因子表現量降低會減少神經傳導物質釋出與合成。從我們結果發現缺乏 omega-3 多元不飽和脂肪酸會降低腦衍生神經營養因子表現量，可能會影響神經傳導物質釋出與合成，使神經連結發生異常，導致大鼠有似憂鬱症行為發生。

文獻中發現腦衍生神經營養因子表現量是受到上游轉錄因子 CREB 調節(Finkbeiner, 2000；West et al., 2001)。有研究指出長期補充 omega-3 多元不飽和脂肪酸也可增加 CREB 表現量，進而提高腦衍生神經營養因子表現量(Logan, 2003)。由結果得知，餵食 omega-3 多元不飽和脂肪酸缺乏飼料組之仔鼠大腦中 p-CREB 蛋白質表現量也較對照飼料組低(圖十一)。在近期文獻發現餵食缺乏 omega-3 多元不飽和脂肪酸也會降低腦中 CREB 磷酸化及腦衍生神經營養因子表現量(Rapoport et al., 2007)。推測缺乏 omega-3 多元不飽和脂肪酸不只會影響大腦神經元細胞數及活性，也能影響腦衍生神經營養因子表現量及

其上游轉錄因子 CREB 磷酸化程度。

上述結果顯示，餵食 omega-3 多元不飽和脂肪酸缺乏飼料組之仔鼠其大腦組織重降低、神經元細胞數下降及腦衍生神經營養因子表現量減少。種種結果推測可能與內源性神經幹細胞有關。在幹細胞一詞出現以前，認為神經新生在出生之後就不會再有。研究已發現側腦室附近的室管膜下區、海馬迴和齒狀回是目前公認的成年哺乳動物神經系統中神經幹細胞最為集中的部位，這些內源性神經幹細胞會經由神經營養因子和內環境的調控，啟動分化成某些類型的神經細胞，如神經元細胞、寡樹突細胞及星狀神經膠細胞(Okano, 2002b)。且神經營養因子會影響神經新生。因此我們認為餵食 omega-3 多元不飽和脂肪酸缺乏飼料組之仔鼠大腦神經新生有下降的趨勢。文獻研究發現有些特異性標誌可代表神經幹細胞如 Nestin、Sox2、c-Myc 及 Klf4 (Lendahl et al., 1990 ; Kim et al ., 2008)。所以我們用特異性標誌蛋白質觀察內源性神經幹細胞表現量。由我們結果顯示，餵食 omega-3 多元不飽和脂肪酸缺乏飼料組之仔鼠大腦皮質區 Nestin、Klf4 及 Sox2 蛋白質表現量比對照飼料組之仔鼠蛋白質表現量低(圖十二)。且以 BrdU 追蹤新生細胞，結果發現，餵食 omega-3 多元不飽和脂肪酸缺乏飼料組之仔鼠大腦皮質區 BrdU 陽性細胞數比對照飼料組之仔鼠少(圖七)。也有動物實

驗發現母鼠餵食 omega-3 多元不飽和脂肪酸缺乏飼料會影響胎兒大腦的神經新生(Coti Bertrand et al., 2006)。由另一結果顯示，餵食 omega-3 多元不飽和脂肪酸缺乏飼料組之仔鼠大腦皮質區除了 NeuN 蛋白質表現量降低外，CNPase 蛋白質表現量也會降低，但 GFAP 蛋白質表現量卻上升(圖九)。從這結果推測餵食 omega-3 多元不飽和脂肪酸缺乏飼料組之仔鼠內源性神經幹細胞有減少的趨勢，並會降低大腦神經新生。所以下游分化神經相關細胞應同時減少，但 GFAP 蛋白質表現量卻有顯著增加，間接表示星狀神經膠細胞量有活化增加的現象。與我們的推測有出入。因此缺乏 omega-3 多元不飽和脂肪酸不只會降低內源性神經幹細胞，也可能會影響其分化成星狀神經膠細胞。過去體外實驗發現，介白素-6 家族除了自己本身還有血癌抑制因子 (leukemia inhibitory factor, LIF)、睫狀神經營養因子 (ciliary neurotrophic factor, CNTF)、心肌營養因子-1 (cardiotrophin-1, CT-1)皆可活化下游 JAK/STAT 訊息傳遞路徑誘發神經幹細胞分化星狀神經膠細胞(Bonni et al., 1997 ; Rajan and McKay, 1998)。

此外文獻中亦發現憂鬱症患者體內促發炎因子 IL-6、IL-1 β 、IL-12 及腫瘤壞死因子(tumour necrosis factor-alpha, TNF- α)會上升(Wichers and Maes., 2002 ; Lee and Kim., 2006)，其中 IL-1 β 及 TNF- α 上升較明

顯(Suarez et al., 2003)。在西方飲食中油脂成份，主要以 omega-6 多元不飽和脂肪酸及飽和脂肪酸為主(Logan, 2004 ; Cordain et al., 2005)。且本實驗 omega-3 多元不飽和脂肪酸缺乏飼料中，omega-6 多元不飽和脂肪酸與 omega-3 多元不飽和脂肪酸比例偏向西方油脂攝取情形。當體內 omega-6 多元不飽和脂肪酸過多時會增加發炎反應(Dinan et al., 2009)。若補充 omega-3 多元不飽和脂肪酸可以降低體內促發炎因子表現(Calder PC, 2006)。文獻顯示促發炎因子可能誘導星狀神經膠細胞活化釋出活性氧(reactive oxygen species, ROS)及活性氮(reactive nitrogen species, RNS)並結合成喹啉酸(Quinolinic acid, QA)，使氧化壓力增加。使神經元細胞及寡樹突細胞更容易受到氧化傷害，功能下降甚至死亡(Buntinx et al., 2004 ; Thornton et al., 2006 ; Gavillet et al., 2008 ; Li et al., 2008 ; McTigue and Tripathi, 2008 ; Miller et al., 2009)。於是未來將繼續探討缺乏 omega-3 多元不飽和脂肪酸如何影響內源性神經幹細胞分化及神經行為變化過程是否牽涉腦中發炎相關因子的變化仍需進一步探討。

結論

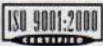

本論文的研究結果說明，餵食 omega-3 多元不飽和脂肪酸缺乏飼料會造成動物似憂鬱症行為的表現，而似憂鬱症神經行為的表現可能因內源性神經幹細胞數量下降，使大腦內神經新生活性下降，進而降低神經元細胞的數量及活性，影響神經傳導物質的合成與釋出，導致神經行為的異常。過程中伴隨著轉錄因子 CREB 磷酸化幅度低下及下游的腦衍生神經營養因子表現下降。從本實驗的結果及相關文獻推論，我們認為內源性神經幹細胞活性的降低及似憂鬱症神經行為的表現可能與腦衍生神經營養因子表現量的低下有關。對於 omega-3 多元不飽和脂肪酸如何影響內源性神經幹細胞分化及神經行為變化過程是否牽涉腦中發炎相關因子的變化仍需進一步探討。

圖表

(a)

AIN-93G Growth Purified Diet (also known as #5801-G)		57W5												
DESCRIPTION		NUTRITIONAL PROFILE ¹												
<p>TestDiet® AIN-93G Growth Purified Diet is the growth diet for rodents recommended by the American Institute of Nutrition. It is formulated to substitute for the previous version (AIN-76A) to improve animal performance.</p> <p>Storage conditions are particularly critical to TestDiet® products, due to the absence of antioxidants or preservative agents. To provide maximum protection against possible changes during storage, store in a dry, cool location. Storage under refrigeration (2° C) is recommended. If long term studies are involved, store the diet at -20° C or colder. Be certain to keep in air tight containers.</p>		<p>Protein, % 17.9</p> <p>Arginine, % 0.70 Histidine, % 0.52 Isoleucine, % 0.96 Leucine, % 1.73 Lysine, % 1.45 Methionine, % 0.52 Cystine, % 0.37 Phenylalanine, % 0.96 Tyrosine, % 1.01 Threonine, % 0.77 Tryptophan, % 0.22 Valine, % 1.14 Alanine, % 0.55 Aspartic Acid, % 1.29 Glutamic Acid, % 4.08 Glycine, % 0.39 Proline, % 2.36 Serine, % 1.10 Taurine, % 0.00</p> <p>Minerals</p> <p>Calcium, % 0.50 Phosphorus, % 0.32 Phosphorus (available), % 0.16 Potassium, % 0.36 Magnesium, % 0.05 Sodium, % 0.13 Chlorine, % 0.22 Fluorine, ppm 1.0 Iron, ppm 35 Zinc, ppm 35 Manganese, ppm 11 Copper, ppm 6.0 Cobalt, ppm 0.0 Iodine, ppm 0.21 Chromium, ppm 1.0 Molybdenum, ppm 0.14 Selenium, ppm 0.17</p> <p>Vitamins</p> <p>Vitamin A, IU/g 4.0 Vitamin D-3 (added), IU/g 1.0 Vitamin E, IU/kg 81.6 Vitamin K (as menadione), ppm 0.29 Thiamin Hydrochloride, ppm 6.2 Riboflavin, ppm 7.0 Niacin, ppm 30 Pantothenic Acid, ppm 15 Folic Acid, ppm 2.3 Pyridoxine, ppm 5.9 Biotin, ppm 0.2 Vitamin B-12, mcg/kg 35 Choline Chloride, ppm 1,250 Ascorbic Acid, ppm 0.0</p>												
<p>Product Forms Available* Catalog #</p> <p>1/2" Pellet 7597 1/2" Pellet, Irradiated 1810393 Meal 1810538 Meal, Irradiated 1810539</p> <p><i>*Other Forms Available By Request</i></p>		<p>Fat, % 7.1</p> <p>Cholesterol, ppm 0 Linoleic Acid, % 3.58 Linolenic Acid, % 0.55 Arachidonic Acid, % 0.00 Omega-3 Fatty Acids, % 0.55 Total Saturated Fatty Acids, % 1.09 Total Monounsaturated Fatty Acids, % 1.65 Polyunsaturated Fatty Acids, % 4.27</p> <p>Fiber (max), % 5.0</p> <p>Carbohydrates, % 63.2</p> <p>Energy (kcal/g) ² 3.89</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>From:</th> <th>kcal</th> <th>%</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Protein</td> <td>0.715</td> <td>18.4</td> </tr> <tr> <td>Fat (ether extract)</td> <td>0.637</td> <td>16.4</td> </tr> <tr> <td>Carbohydrates</td> <td>2.528</td> <td>65.1</td> </tr> </tbody> </table>	From:	kcal	%	Protein	0.715	18.4	Fat (ether extract)	0.637	16.4	Carbohydrates	2.528	65.1
From:	kcal	%												
Protein	0.715	18.4												
Fat (ether extract)	0.637	16.4												
Carbohydrates	2.528	65.1												
<p>TYPICAL ANALYSIS</p> <p>Protein..... 18.7% Fat..... 7.0% Fiber..... 5.0% Carbohydrate..... 64.7% Metabolizable Energy..... 3.97 kcal/gm</p> <p>INGREDIENTS (%)</p> <p>Corn Starch 39.7486 Casein - Vitamin Free 20.0000 Maltodextrin 13.2000 Sucrose 10.0000 Soybean Oil 7.0000 Powdered Cellulose 5.0000 AIN 93G Mineral Mix 3.5000 AIN 93 Vitamin Mix 1.0000 L-Cystine 0.3000 Choline Bitartrate 0.2500 t-Butylhydroquinone 0.0014</p>		<p>1. Based on the latest ingredient analysis information. Since nutrient composition of natural ingredients varies, analysis will differ accordingly. Nutrients expressed as percent of ration on an As Fed basis except where otherwise indicated.</p> <p>2. Energy (kcal/gm) - Sum of decimal fractions of protein, fat and carbohydrate x 4,9,4 kcal/gm respectively.</p>												
<p>FEEDING DIRECTIONS</p> <p>Feed ad libitum to mice and rats. Plenty of fresh, clean water should be available at all times.</p> <p>CAUTION: Perishable, upon receipt store in a cool dry place, refrigeration recommended.</p> <p>For laboratory animal experimental use only, NOT for human consumption.</p>		<p>ISO 9001:2000 CERTIFIED</p> <p>TestDiet www.testdiet.com</p>												
8/23/2007														

(b)

AIN-93G w/ Safflower and Soy Oil		5SAW
DESCRIPTION		NUTRITIONAL PROFILE ¹
Modification of TestDiet® AIN-93G Semi-Purified Diet 57W5 with 6.65% Safflower Oil and 0.35% Soy Oil.		Protein, % 18.3
Storage conditions are particularly critical to TestDiet® products, due to the absence of antioxidants or preservative agents. To provide maximum protection against possible changes during storage, store in a dry, cool location. Storage under refrigeration (2° C) is recommended. Maximum shelf life is six months. (If long term studies are involved, storing the diet at -20° C or colder may prolong shelf life.) Be certain to keep in air tight containers.		Minerals
Product Forms Available* Catalog #		Arginine, % 0.70 Calcium, % 0.51
1/2" Pellet	1813132	Histidine, % 0.52 Phosphorus, % 0.32
		Isoleucine, % 0.96 Phosphorus (available), % 0.16
		Leucine, % 1.73 Potassium, % 0.36
		Lysine, % 1.45 Magnesium, % 0.05
		Methionine, % 0.52 Sodium, % 0.13
		Cystine, % 0.37 Chloride, % 0.22
		Phenylalanine, % 0.96 Fluorine, ppm 1.0
		Tyrosine, % 1.01 Iron, ppm 36
		Threonine, % 0.77 Zinc, ppm 35
		Tryptophan, % 0.22 Manganese, ppm 11
		Valine, % 1.14 Copper, ppm 6.0
		Alanine, % 0.55 Cobalt, ppm 0.0
		Aspartic Acid, % 1.29 Iodine, ppm 0.21
		Glutamic Acid, % 4.08 Chromium, ppm 1.0
		Glycine, % 0.39 Molybdenum, ppm 0.14
		Proline, % 2.36 Selenium, ppm 0.17
		Serine, % 1.10
		Taurine, % 0.00
		Vitamins
		Vitamin A, IU/g 4.0
		Vitamin D-3 (added), IU/g 1.0
		Vitamin E, IU/kg 75.3
		Vitamin K (as menadione), ppm 0.29
		Thiamin Hydrochloride, ppm 6.1
		Riboflavin, ppm 6.7
		Niacin, ppm 30
		Pantothenic Acid, ppm 16
		Folic Acid, ppm 2.1
		Pyridoxine, ppm 5.8
		Biotin, ppm 0.2
		Vitamin B-12, mcg/kg 29
		Choline Chloride, ppm 1,250
		Ascorbic Acid, ppm 0.0
		Other Forms Available On Re
		INGREDIENTS (%)
		Corn Starch 39.7486
		Casein - Vitamin Free 20.0000
		Maltodextrin 13.2000
		Sucrose 10.0000
		Safflower Oil (Linoleic) 6.6500
		Powdered Cellulose 5.0000
		AIN 93G Mineral Mix 3.5000
		AIN 93 Vitamin Mix 1.0000
		Soybean Oil 0.3500
		L-Cystine 0.3000
		Choline Bitartrate 0.2500
		t-Butylhydroquinone 0.0014
		Fat, % 7.1
		Cholesterol, ppm 0
		Linoleic Acid, % 5.35
		Linolenic Acid, % 0.09
		Arachidonic Acid, % 0.00
		Omega-3 Fatty Acids, % 0.03
		Total Saturated Fatty A 0.66
		Total Monounsaturated Fatty Acids, % 0.88
		Polyunsaturated Fatty Acids, % 5.42
		Fiber (max), % 5.0
		Carbohydrates, % 63.2
		Energy (kcal/g) ² 3.89
		From: kcal %
		Protein 0.731 18.8
		Fat (ether extract) 0.637 16.4
		Carbohydrates 2.528 64.9
		1. Based on the latest ingredient analysis information. Since nutrient composition of natural ingredients varies, analysis will differ accordingly. Nutrients expressed as percent of ration on an As-Fed basis except where otherwise indicated.
		2. Energy (kcal/gm) - Sum of decimal fractions of protein, fat and carbohydrate x 4,9,4 kcal/gm respectively.
FEEDING DIRECTIONS		
Feed ad libitum. Plenty of fresh, clean water should be available at all times.		
CAUTION: Perishable - store properly upon receipt. For laboratory animal use only; NOT for human consumption.		
6/11/2008		
		 www.testdiet.com

(c)

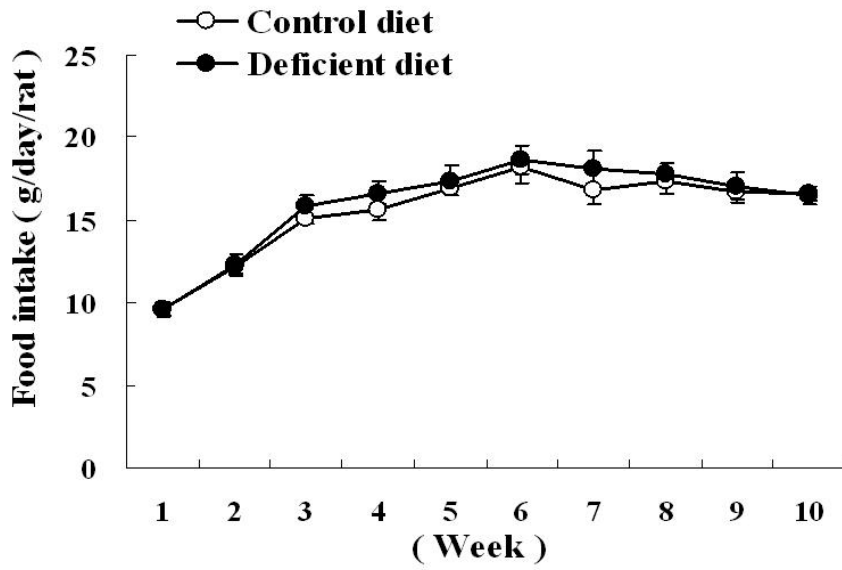
Control diet

Deficient diet

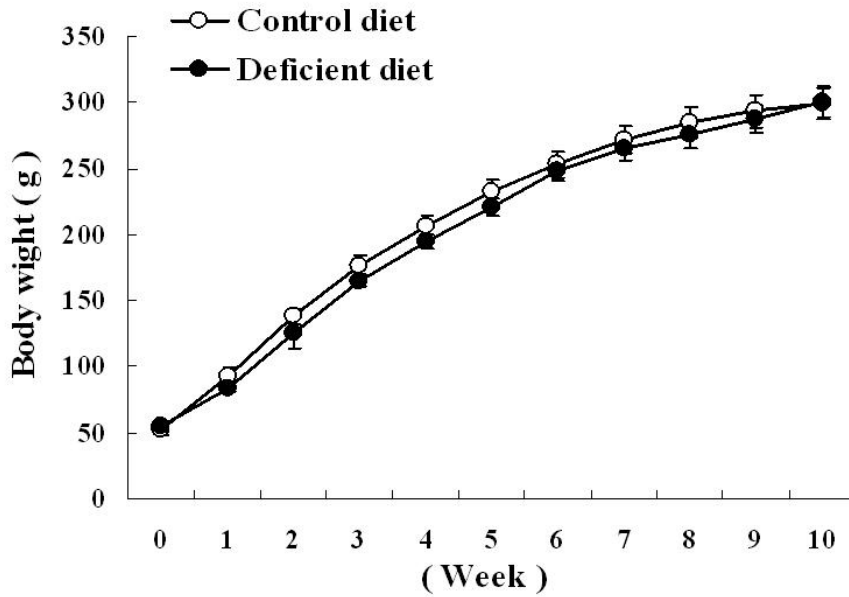


圖一、飼料配方。不同飼料成分比例。(a)對照飼料(Control diet)。(b) omega-3 多元不飽和脂肪酸缺乏飼料(Deficient diet)。(c)兩組飼料外觀。

(a)

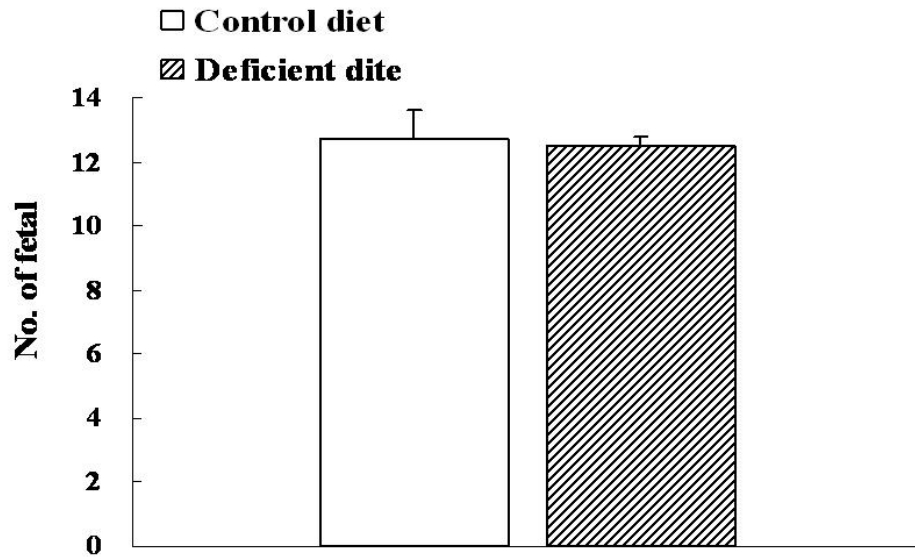


(b)

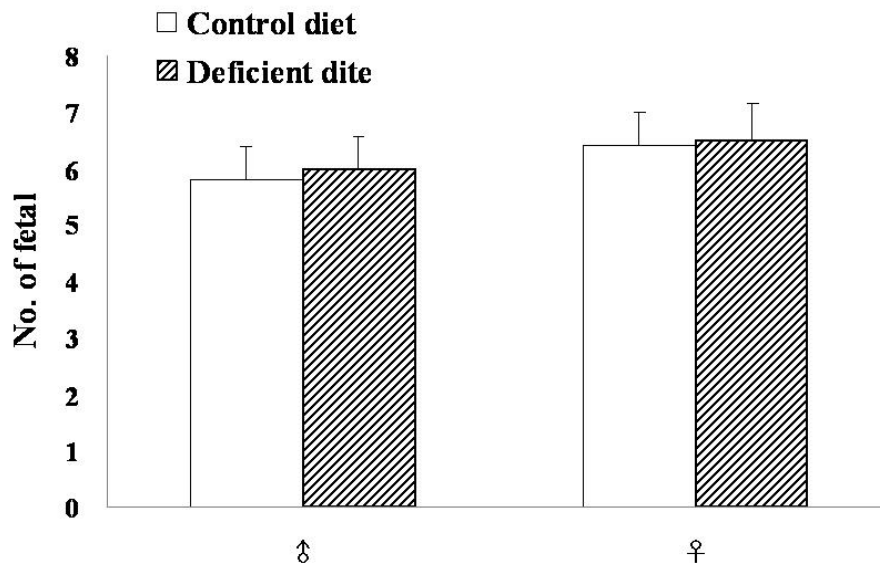


圖二、母鼠攝食及體重變化量。母鼠餵食不同飼料 10 週，過程中紀錄攝食量及體重變化量。(a)攝食量變化。(b)體重變化。(control diet, n = 10 ; Deficient diet, n = 10)。

(a)

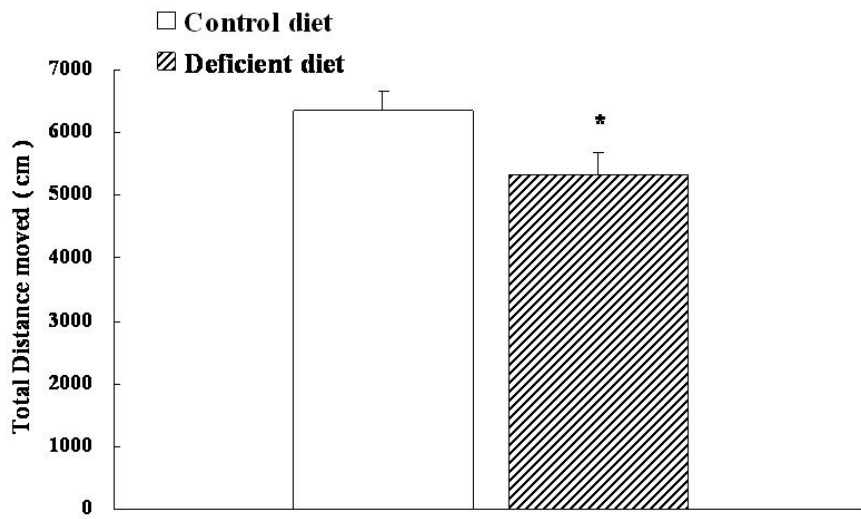


(b)

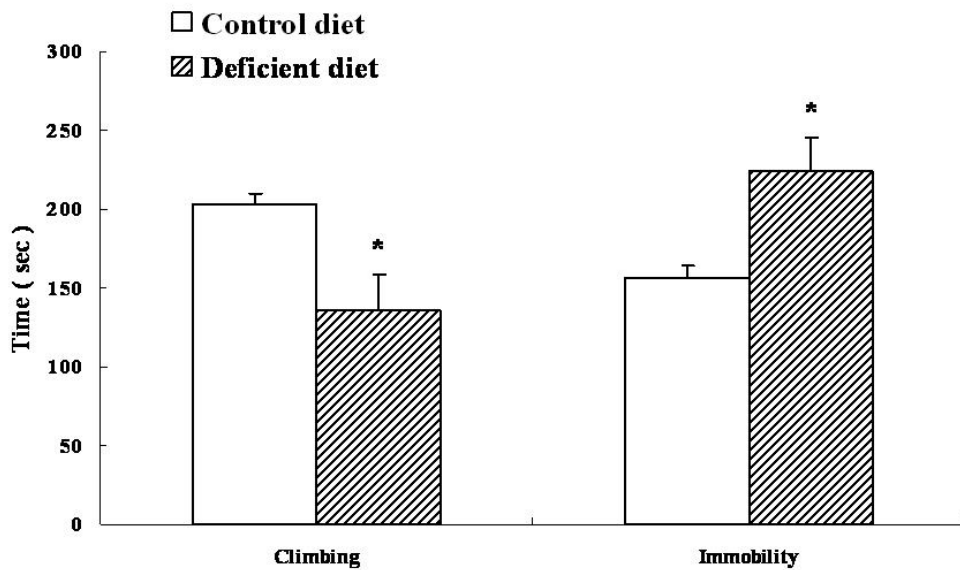


圖三、每胎平均仔鼠數。母鼠餵食不同飼料 10 週後配種，記錄所生仔鼠數。(a)總仔鼠數。(b)不同性別仔鼠數。(Control diet, n = 5 ; Deficient diet, n = 4)。

(a)

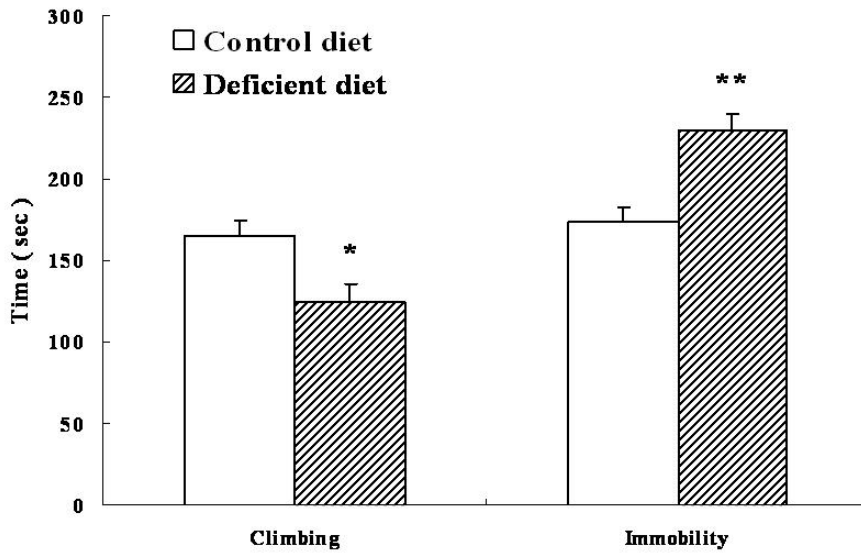


(b)

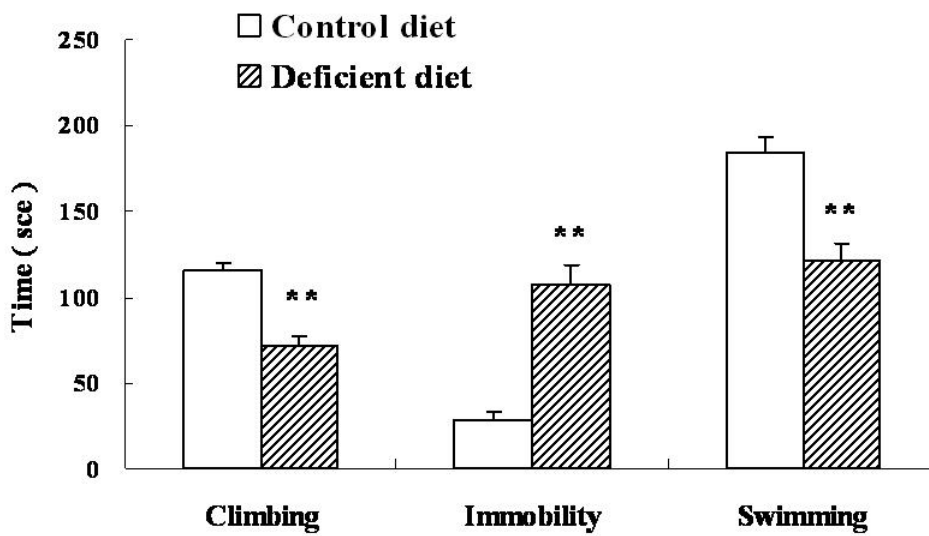


圖四、母鼠活動量及似憂鬱症行為測試。母鼠餵食不同飼料 16 週觀察行為變化量。(a)以 open field 觀察動物活動量。(b)以懸吊尾測試觀察似憂鬱症行為。(Control diet, n = 4 ; Deficient diet, n = 4)。圖中*表具有顯著差異(p < 0.05)。

(a)

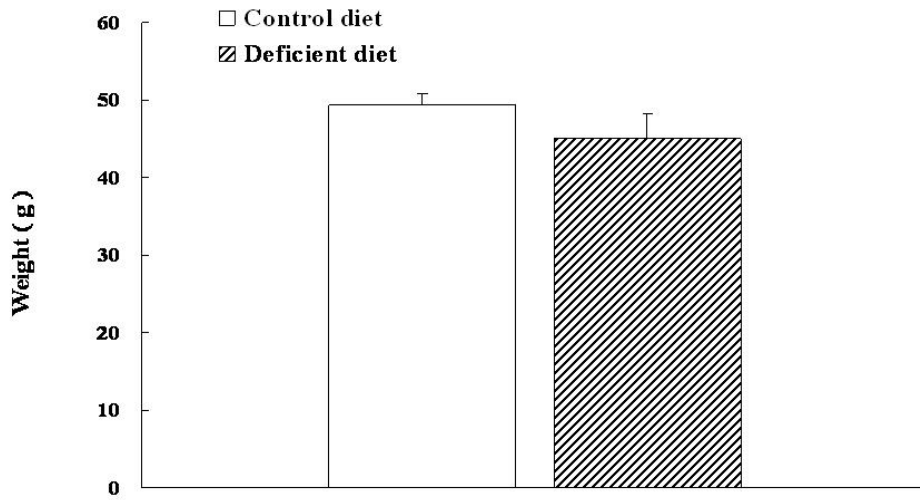


(b)

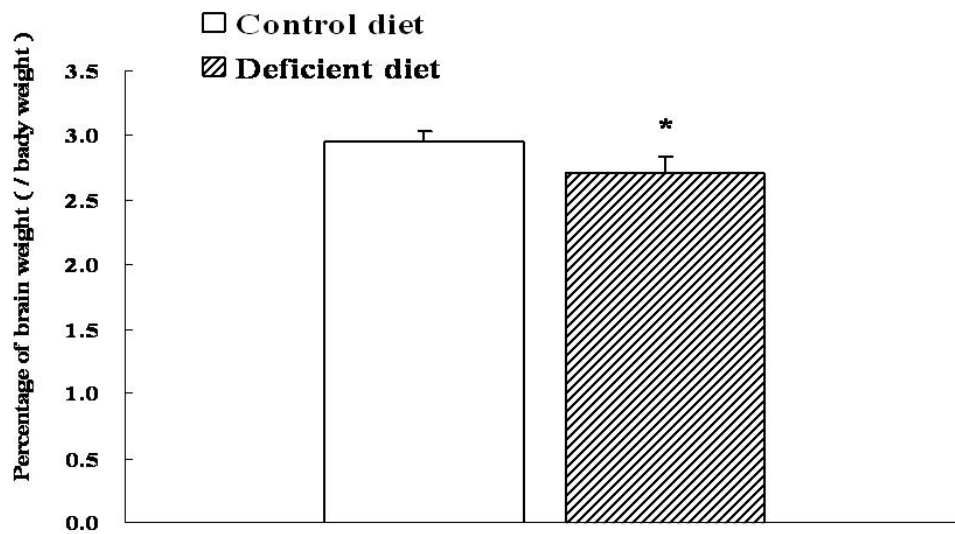


圖五、3週齡仔鼠似憂鬱症行為測試。兩組飼料餵食母鼠所生之仔鼠，於3週齡犧牲前分析似憂鬱症行為變化。(a)懸吊尾測試。(b)強迫水測試。(Control diet, n = 18 ; Deficient diet, n = 18)。圖中*表具有顯著差異($p < 0.05$)；**表具有顯著差異($p < 0.01$)。

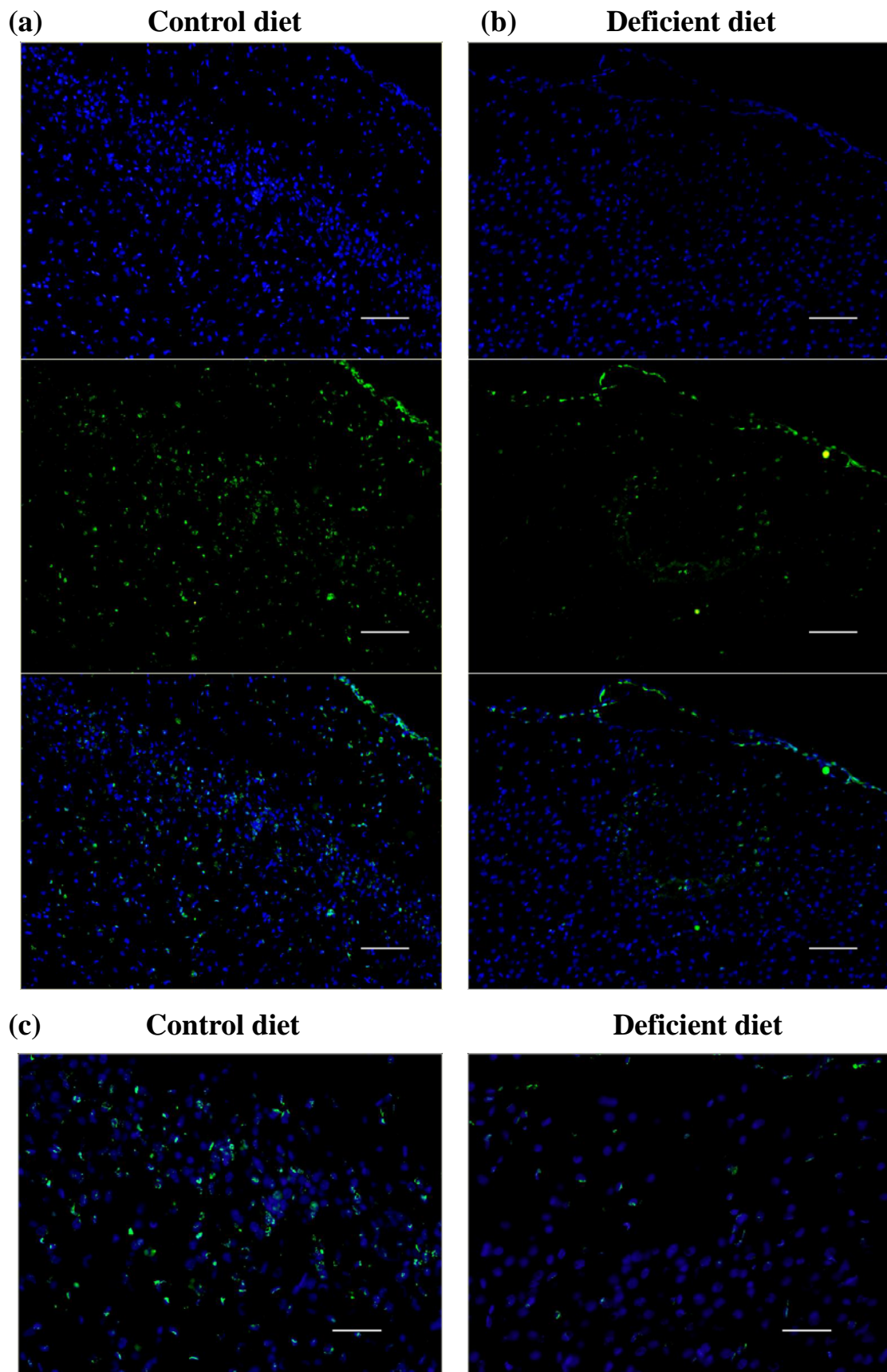
(a)



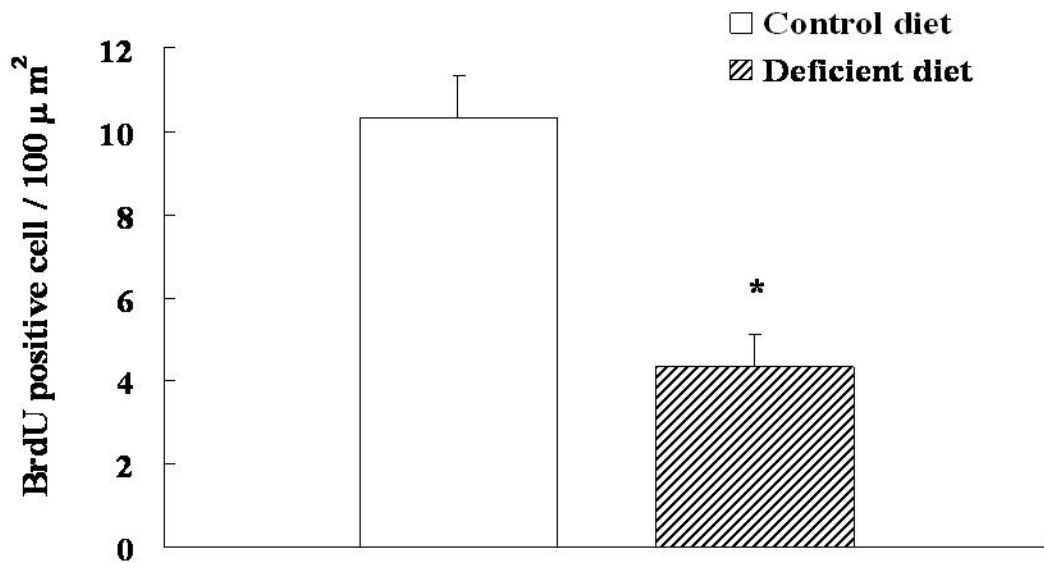
(b)



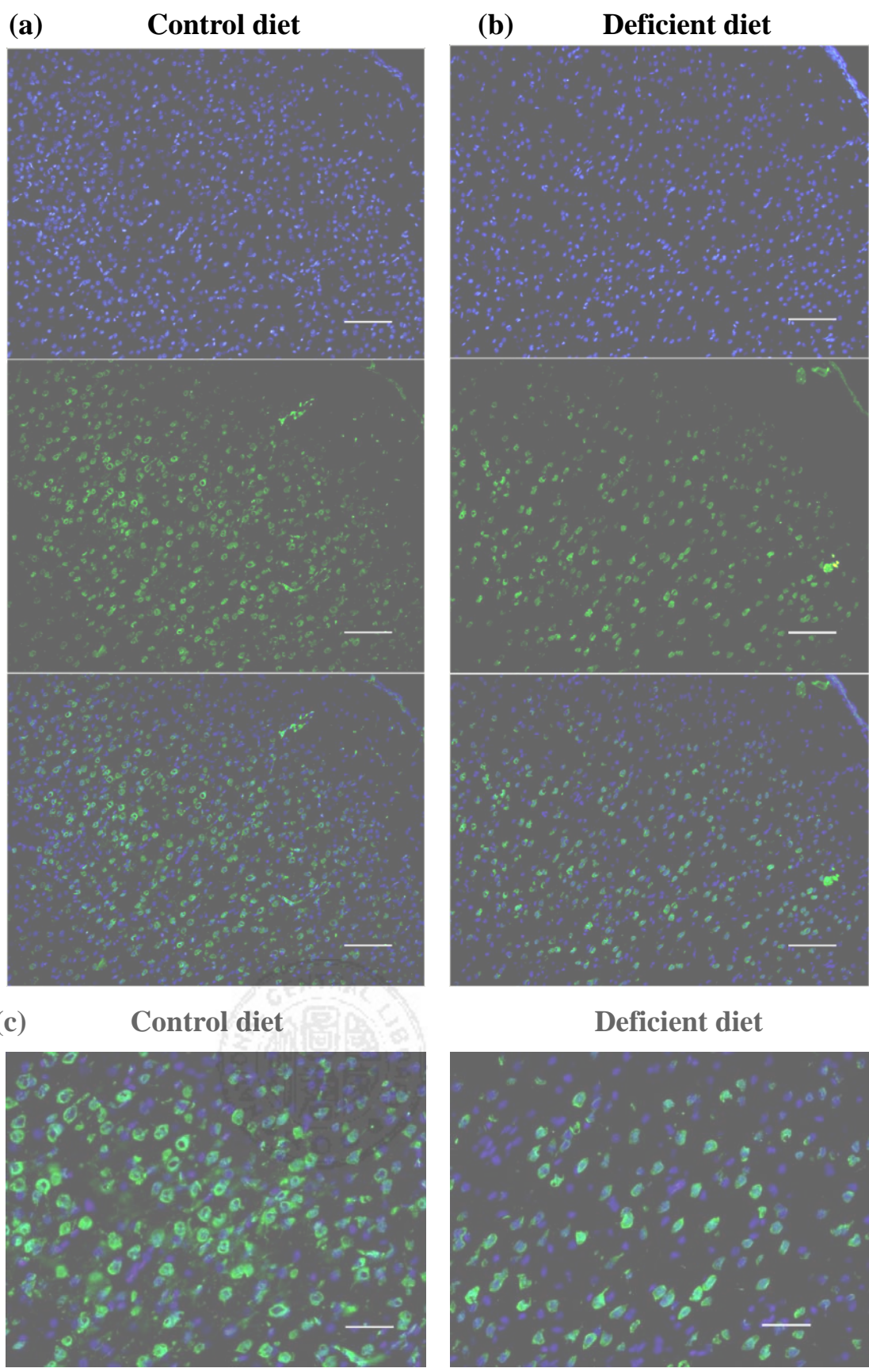
圖六、3 週齡仔鼠體重及腦組織重變化。兩組飼料餵食母鼠所生之仔鼠，於 3 週齡犧牲並紀錄體重和腦重。(a) 3 週齡仔鼠體重。(b) 3 週齡仔鼠腦組織重量。(Control diet, n = 12 ; Deficient diet, n = 12)。圖中* 表具有顯著差異($p < 0.05$)。



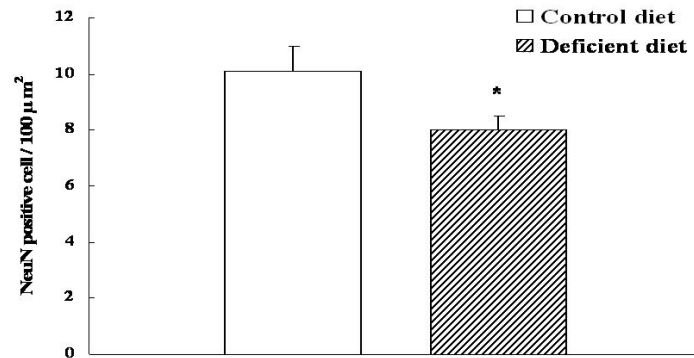
(d)



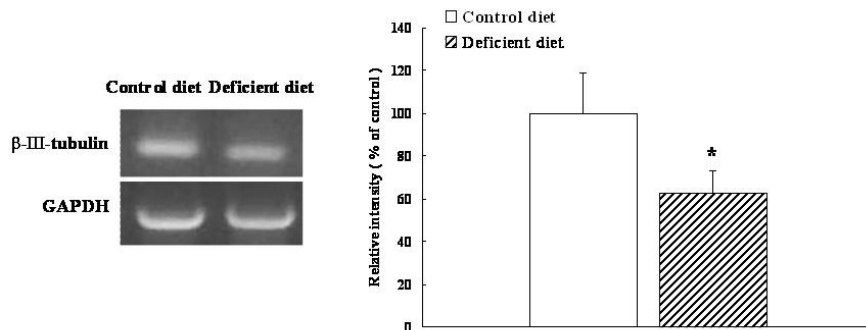
圖七、3 週齡仔鼠腦部細胞增生。兩組飼料餵食母鼠所生 3 週齡小鼠，犧牲後以 BrdU 標定染色觀察大腦皮質區細胞增生情形。綠色代表 BrdU 表現；藍色為 hoechst 3342 標定細胞核。(a) Control diet。(b) Deficient diet。(c)兩組飼料螢光染色放大倍率。(d) BrdU positive cell 量化數據。(Control diet, n = 2；Deficient diet, n = 2)。圖中*表具有顯著差異(p < 0.05)。(a、b) Scale bar = 100 μm。(c) Scale bar = 50 μm。



(d)

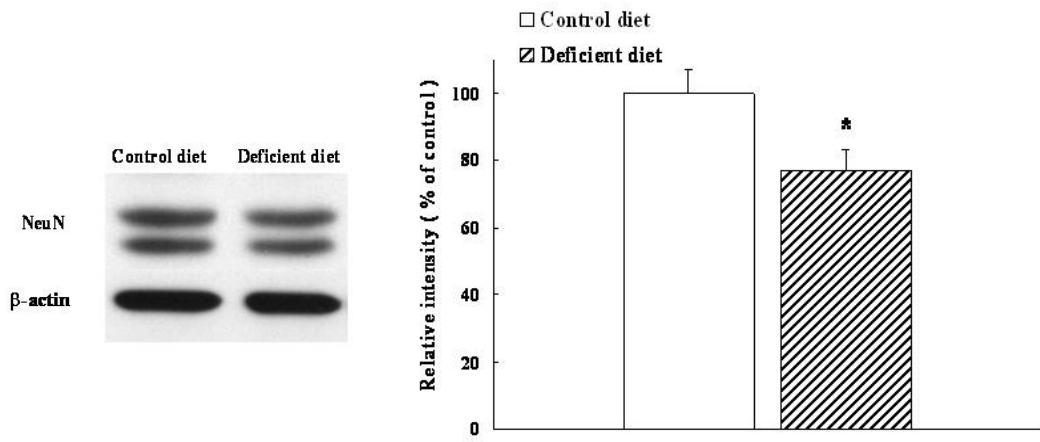


(e)

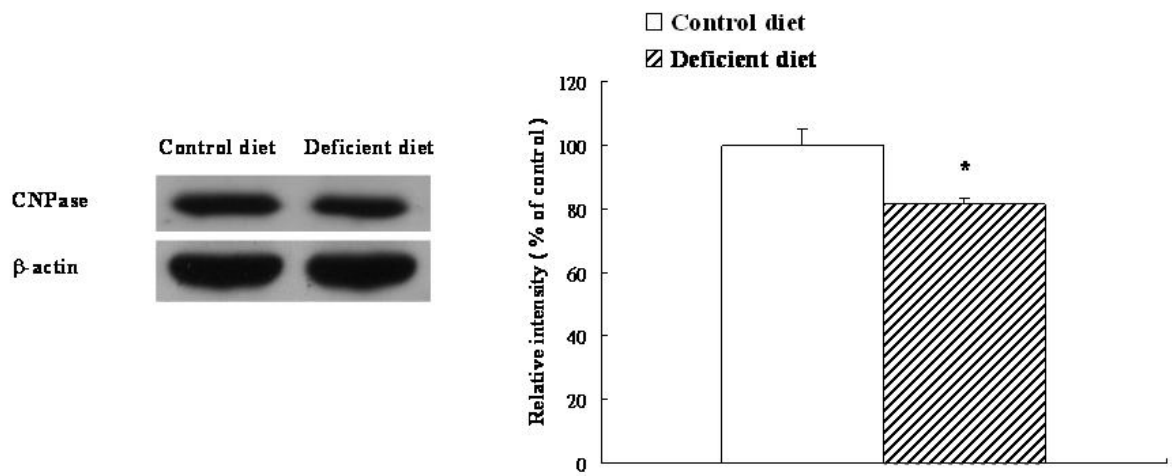


圖八、3 週齡仔鼠腦部神經元細胞數及新生神經元細胞。兩組飼料餵食母鼠所生 3 週齡小鼠，犧牲後以 NeuN 染色標定神經元細胞。另取大腦皮質區進行反轉錄聚合酶連鎖反應觀察新生神經元細胞 (β -III-tubulin) 基因表現量。綠色代表 NeuN 表現；藍色為 hoechst 3342 標定細胞核。(a) Control diet。(b) Deficient diet。(c) 兩組飼料螢光染色放大倍率。(d) NeuN positive cell 量化數據。(Control diet, n = 2 ; Deficient diet, n = 2)。(e) β -III tubulin 基因表現量及量化數據(Control diet, n = 3 ; Deficient diet, n = 3)。圖中*表具有顯著差異($p < 0.05$)。(a、b) Scale bar = 100 μ m。(c) Scale bar = 50 μ m。

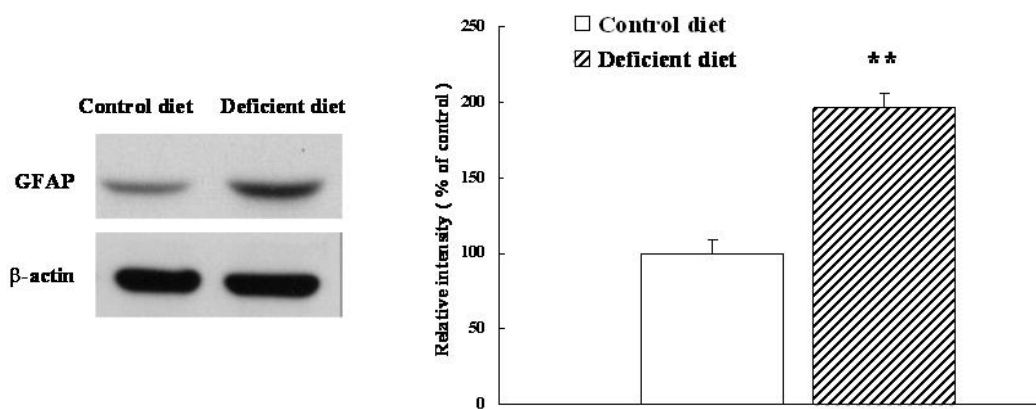
(a)



(b)

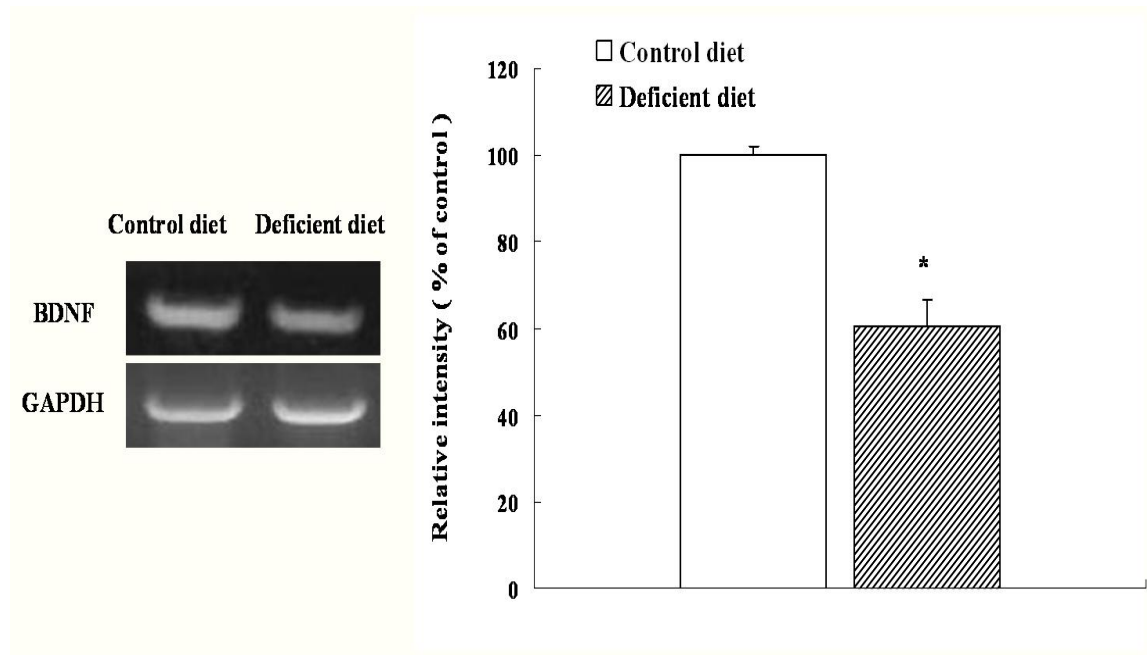


(c)

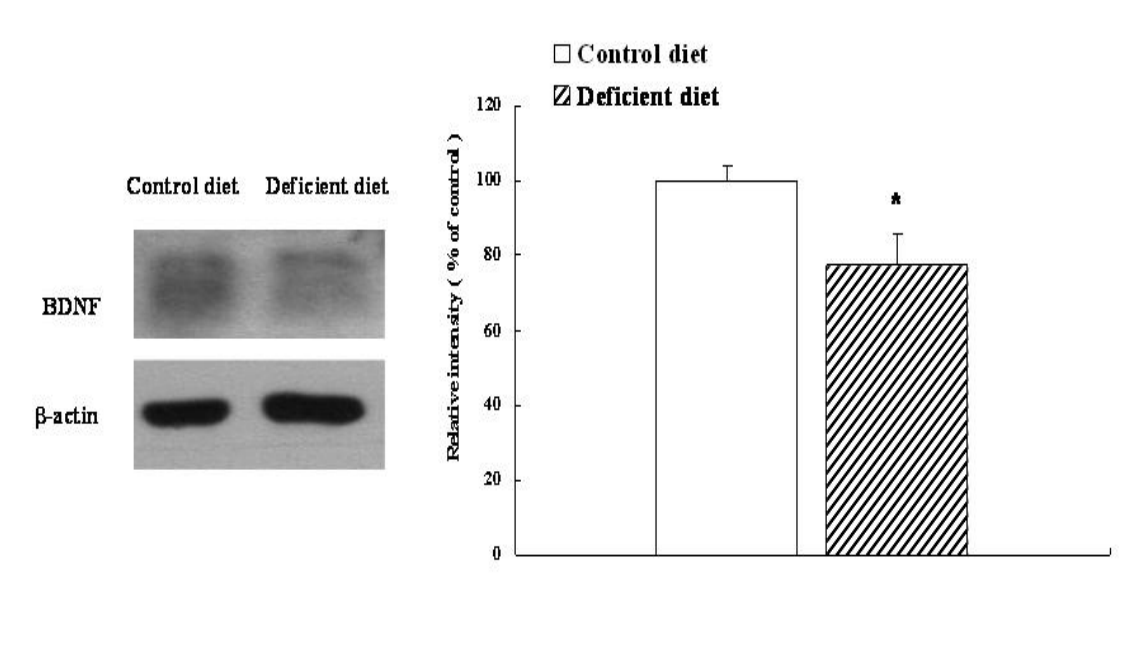


圖九、3 週齡仔鼠腦部細胞型態分析。兩組飼料餵食母鼠所生 3 週齡小鼠，犧牲後取大腦皮質區進行西方轉漬法偵測神經元細胞(NeuN)、寡樹突細胞(CNPase)以及星狀神經膠細胞(GFAP)蛋白質表現。(a) NeuN 西方轉漬法結果及量化數據。(b) CNPase 西方轉漬法結果及量化數據。(c) GFAP 西方轉漬法結果及量化數據。(Control diet, n = 5 ; Deficient diet, n = 5)。圖中*表具有顯著差異($p < 0.05$)。

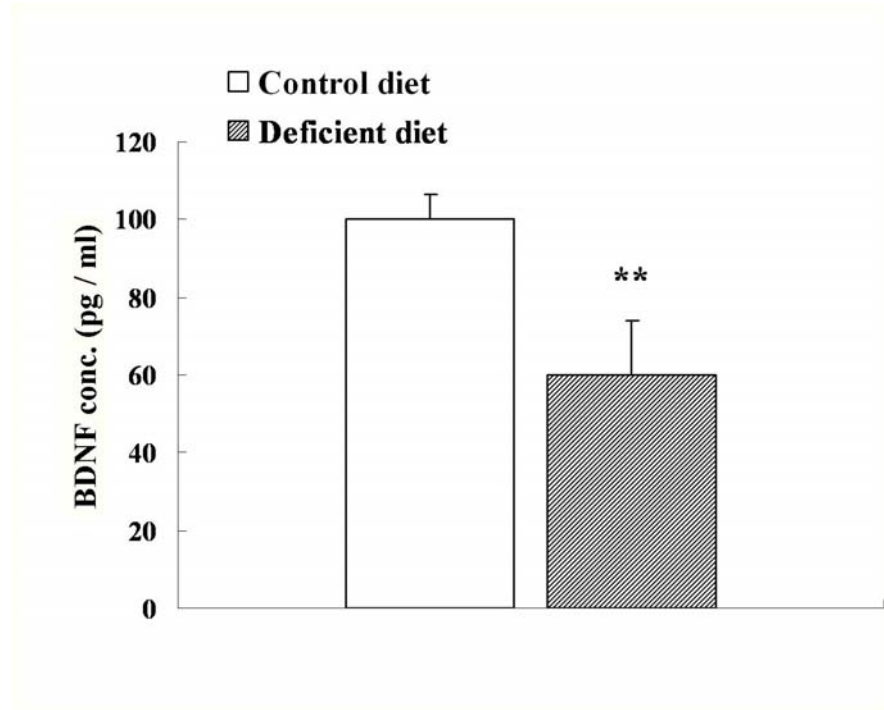
(a)



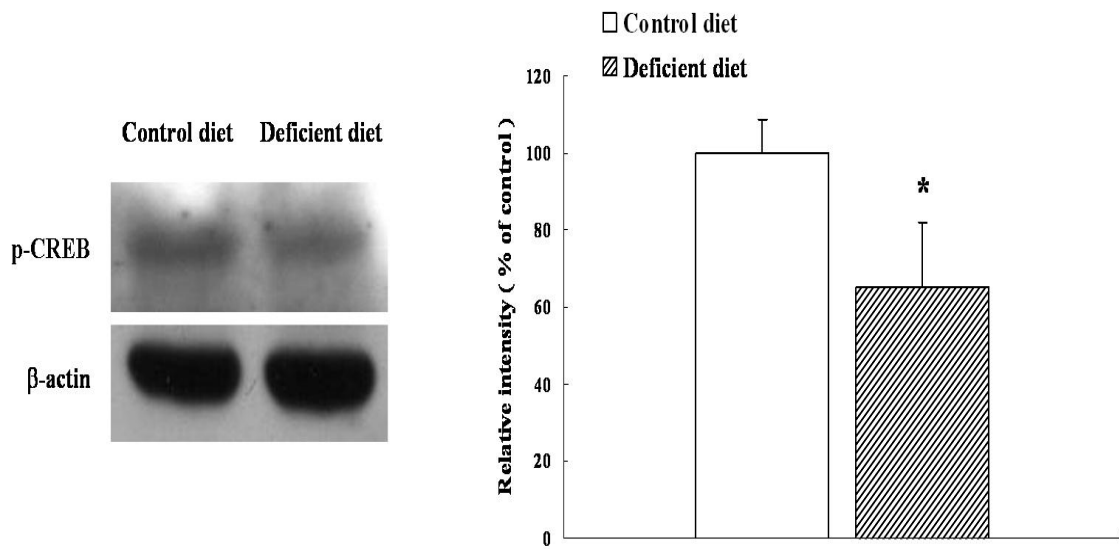
(b)



(c)

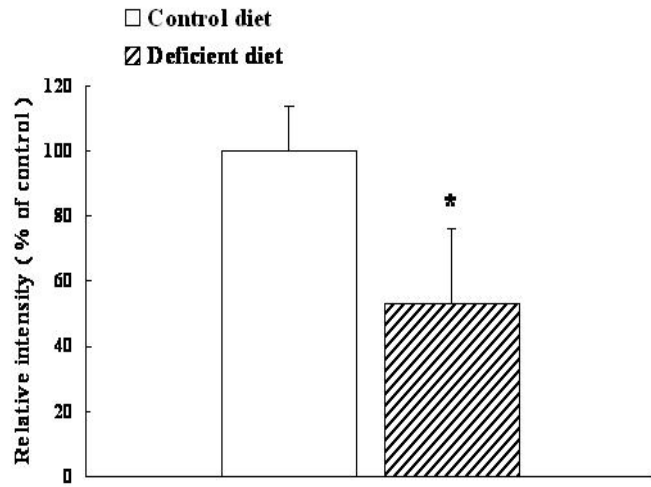
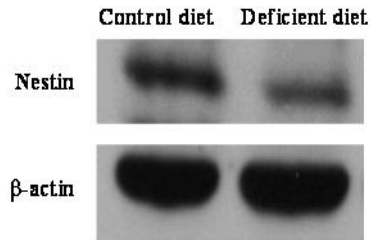


圖十、3 週齡仔鼠腦衍生神經營養因子變化。兩組飼料餵食母鼠所生 3 週齡小鼠，犧牲後取大腦皮質區進行西方轉漬及反轉錄聚合酶連鎖反應偵測腦衍生神經營養因子蛋白質及基因表現量；取血清進行酵素連結免疫分析腦衍生神經營養因子濃度。(a)基因表現量及量化數據圖(Control diet, n = 3 ; Deficient diet, n = 3)。(b)西方轉漬結果及量化數據圖(Control diet, n = 3 ; Deficient diet, n = 3)。(c)酵素連結免疫分析量測血清腦衍生神經營養因子濃度(Control diet, n = 13 ; Deficient diet, n = 13)。圖中*表具有顯著差異($p < 0.05$)；**表具有顯著差異($p < 0.01$)。

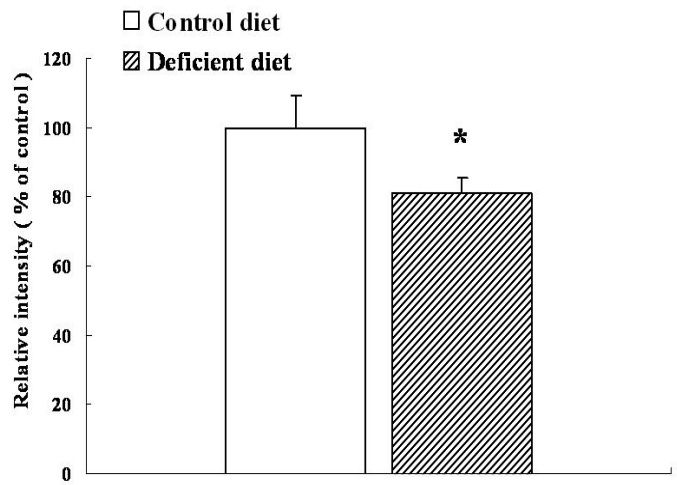
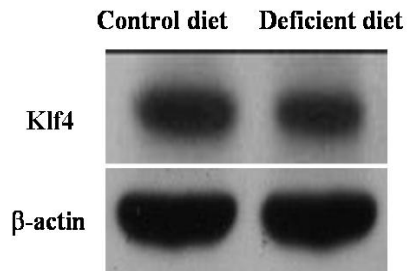


圖十一、3 週齡仔鼠腦部 CREB 磷酸化程度。兩組飼料餵食母鼠所生 3 週齡小鼠，犧牲後取大腦皮質區進行西方轉漬偵測 p-CREB 蛋白質變化。圖表示 p-CREB 蛋白質表現量及量化數據圖(Control diet, n = 3 ; Deficient diet, n = 3)。圖中*表具有顯著差異($p < 0.05$)。

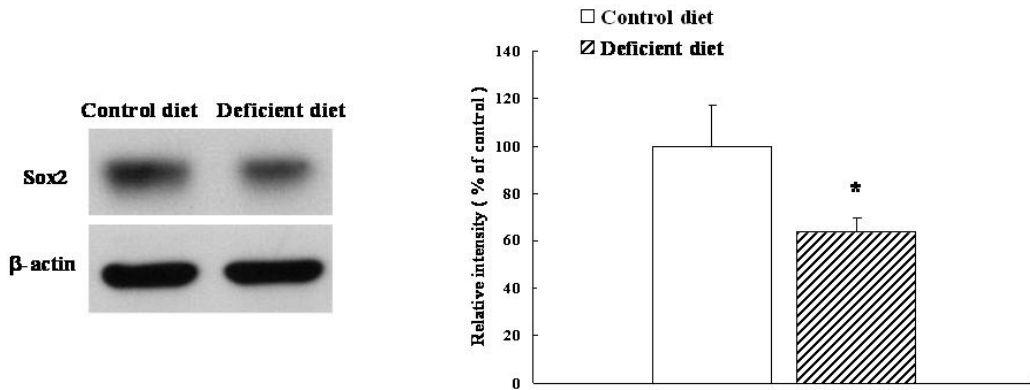
(a)



(b)



(c)



圖十二、3 週齡仔鼠腦部內源性神經幹細胞特異性標誌蛋白質表現量。兩組飼料餵食母鼠所生 3 週齡小鼠，犧牲後取大腦皮質區進行西方轉漬偵測神經幹細胞特異性標誌 Nestin、Klf4、Sox2 蛋白質表現量。(a) Nestin 西方轉漬結果及量化數據圖。(b) Klf4 西方轉漬結果及量化數據圖(Control diet, n = 3 ; Deficient diet, n = 3)。(c) Sox2 西方轉漬結果及量化數據圖(Control diet, n = 6 ; Deficient diet, n = 6)。圖中*表具有顯著差異($p < 0.05$)。

參考文獻

- Ahmad A, Moriguchi T, Salem N (2002) Decrease in neuron size in docosahexaenoic acid-deficient brain. *Pediatr Neurol* **26**(3): 210-8
- Ahmad SO, Park JH, Radel JD, Levant B (2008) Reduced numbers of dopamine neurons in the substantia nigra pars compacta and ventral tegmental area of rats fed an n-3 polyunsaturated fatty acid-deficient diet: a stereological study. *Neurosci Lett* **438**(3): 303-7
- Altar CA, DiStefano PS (1998) Neurotrophin trafficking by anterograde transport. *Trends Neurosci* **21**(10): 433-7
- Angelucci F, Brenè S, Mathé AA (2005) BDNF in schizophrenia, depression and corresponding animal models. *Mol Psychiatry* **10**(4): 345-52
- Bonni A, Sun Y, Nadal-Vicens M, Bhatt A, Frank DA, Rozovsky I, Stahl N, Yancopoulos GD, Greenberg ME (1997) Regulation of gliogenesis in the central nervous system by the JAK-STAT signaling pathway. *Science* **278**(5337): 477-83
- Buntinx M, Moreels M, Vandenabeele F, Lambrichts I, Raus J, Steels P, Stinissen P, Ameloot M (2004) Cytokine-induced cell death in human oligodendroglial cell lines: I. Synergistic effects of IFN-gamma and TNF-alpha on apoptosis. *J Neurosci Res* **76**(6): 834-45
- Calder PC (2006) n-3 polyunsaturated fatty acids, inflammation, and inflammatory diseases. *Am J Clin Nutr* **83**(6 Suppl): 1505S-1519S

- Carrié I, Clément M, de Javel D, Francès H, Bourre JM (2000) Phospholipid supplementation reverses behavioral and biochemical alterations induced by n-3 polyunsaturated fatty acid deficiency in mice. *J Lipid Res* **41**(3): 473-80
- Chermat R, Thierry B, Mico JA, Steru L, Simon P (1986) Adaptation of the tail suspension test to the rat. *J Pharmacol* **17**(3): 348-50
- Church MW, Jen KL, Dowhan LM, Adams BR, Hotra JW (2008) Excess and deficient omega-3 fatty acid during pregnancy and lactation cause impaired neural transmission in rat pups. *Neurotoxicol Teratol* **30**(2): 107-17
- Connor B, Dragunow M (1998) The role of neuronal growth factors in neurodegenerative disorders of the human brain. *Brain Res Rev* **27**(1): 1-39
- Conti AC, Cryan JF, Dalvi A, Lucki I, Blendy JA (2002) cAMP response element-binding protein is essential for the upregulation of brain-derived neurotrophic factor transcription, but not the behavioral or endocrine responses to antidepressant drugs. *J Neurosci* **22**(8): 3262-8
- Cordain L, Eaton SB, Sebastian A, Mann N, Lindeberg S, Watkins BA, O'Keefe JH, Brand-Miller J (2005) Origins and evolution of the Western diet: health implications for the 21st century. *Am J Clin Nutr* **81**(2): 341-54
- Coti Bertrand P, O'Kusky JR, Innis SM (2006) Maternal dietary (n-3) fatty acid deficiency alters neurogenesis in the embryonic rat brain. *J Nutr*

136(6): 1570-5

Cryan JF, Mombereau C, Vassout A (2005) The tail suspension test as a model for assessing antidepressant activity: review of pharmacological and genetic studies in mice. *Neurosci Biobehav Rev* **29**(4-5): 571-625

Czéh B, Welt T, Fischer AK, Erhardt A, Schmitt W, Müller MB, Toschi N, Fuchs E, Keck ME (2002) Chronic psychosocial stress and concomitant repetitive transcranial magnetic stimulation: effects on stress hormone levels and adult hippocampal neurogenesis. *Biol Psychiatry* **52**(11): 1057-65

Delion S, Chalon S, Guilloteau D, Besnard JC, Durand G (1996) alpha-Linolenic acid dietary deficiency alters age-related changes of dopaminergic and serotonergic neurotransmission in the rat frontal cortex. *J Neurochem* **66**(4): 1582-91

DeMar JC, Ma K, Bell JM, Igarashi M, Greenstein D, Rapoport SI (2006) One generation of n-3 polyunsaturated fatty acid deprivation increases depression and aggression test scores in rats. *J Lipid Res* **47**(1): 172-80

Di Matteo V, Di Giovanni G, Di Mascio M, Esposito E (2000) Effect of acute administration of hypericum perforatum-CO₂ extract on dopamine and serotonin release in the rat central nervous system. *Pharmacopsychiatry* **33**(1): 14-8

Dinan T, Siggins L, Scully P, O'Brien S, Ross P, Stanton C (2009) Investigating the inflammatory phenotype of major depression: focus on cytokines and polyunsaturated fatty acids. *J Psychiatr Res* **43**(4): 471-6

- Faraone SV, Kremen WS, Tsuang MT (1990) Genetic transmission of major affective disorders: quantitative models and linkage analyses. *Psychol Bull* **108**(1): 109-27
- Finkbeiner S (2000) CREB couples neurotrophin signals to survival messages. *Neuron* **25**(1): 11-4
- Frances H, Monier C, Clement M, Lecorsier A, Debray M, Bourre JM (1996) Effect of dietary alpha-linolenic acid deficiency on habituation. *Life Sci* **58**(21): 1805-16
- Freeman MP, Hibbeln JR, Wisner KL, Davis JM, Mischoulon D, Peet M, Keck PE Jr, Marangell LB, Richardson AJ, Lake J, Stoll AL (2006) Omega-3 fatty acids: evidence basis for treatment and future research in psychiatry. *J Clin Psychiatry* **67**(12): 1954-67
- Gavillet M, Allaman I, Magistretti PJ (2008) Modulation of astrocytic metabolic phenotype by proinflammatory cytokines. *Glia* **56**(9): 975-89
- Gonul AS, Akdeniz F, Taneli F, Donat O, Eker C, Vahip S (2005) Effect of treatment on serum brain-derived neurotrophic factor levels in depressed patients. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* **255**(6): 381-6
- Hempstead BL (2006) Dissecting the diverse actions of pro- and mature neurotrophins. *Curr Alzheimer Res* **3**(1): 19-24
- Hibbeln JR. (1998) Fish consumption and major depression. *Lancet* **351**(9110): 1213

- Hibbeln JR, Nieminen LR, Blasbalg TL, Riggs JA, Lands WE (2006) Healthy intakes of n-3 and n-6 fatty acids: estimations considering worldwide diversity. *Am J Clin Nutr* **83**(6 Suppl): 1483S-1493S
- Hu Y, Russek SJ (2008) BDNF and the diseased nervous system: a delicate balance between adaptive and pathological processes of gene regulation. *J Neurochem* **105**(1): 1-17
- Huang SY, Yang HT, Chiu CC, Pariante CM, Su KP (2008) Omega-3 fatty acids on the forced-swimming test. *J Psychiatr Res* **42**(1): 58-63
- Hypericum Depression Trial Study Group (2002) Effect of Hypericum perforatum (St John's wort) in major depressive disorder: a randomized controlled trial. *JAMA* **287**(14): 1807-14
- Ikemoto A, Nitta A, Furukawa S, Ohishi M, Nakamura A, Fujii Y, Okuyama H (2000) Dietary n-3 fatty acid deficiency decreases nerve growth factor content in rat hippocampus. *Neurosci Lett* **285**(2): 99-102
- Innis SM (2007) Dietary (n-3) fatty acids and brain development. *J Nutr* **137**(4): 855-9
- Jiang LH, Shi Y, Wang LS, Yang ZR (2009) The influence of orally administered docosahexaenoic acid on cognitive ability in aged mice. *J Nutr Biochem* **20**(9): 735-41
- Karege F, Perret G, Bondolfi G, Schwald M, Bertschy G, Aubry (2002) JM Decreased serum brain-derived neurotrophic factor levels in major

depressed patients. *Psychiatry Res* **109**(2): 143-8

Kitajka K, Sinclair AJ, Weisinger RS, Weisinger HS, Mathai M, Jayasooriya AP, Halver JE, Puskás LG (2004) Effects of dietary omega-3 polyunsaturated fatty acids on brain gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(30): 10931-6

Lee KM, Kim YK (2006) The role of IL-12 and TGF-beta1 in the pathophysiology of major depressive disorder. *Int Immunopharmacol* **6**(8): 1298-304

Lendahl U, Zimmerman LB, McKay RD. (1990) CNS stem cells express a new class of intermediate filament protein. *Cell* **60**(4): 585-95

Levinson DF (2006) The genetics of depression: a review. *Biol Psychiatry* **60**(2): 84-92

Li J, Ramenaden ER, Peng J, Koito H, Volpe JJ, Rosenberg PA (2008) Tumor necrosis factor alpha mediates lipopolysaccharide-induced microglial toxicity to developing oligodendrocytes when astrocytes are present. *J Neurosci* **28**(20): 5321-30

Logan AC (2003) Neurobehavioral aspects of omega-3 fatty acids: possible mechanisms and therapeutic value in major depression. *Altern Med Rev* **8**(4): 410-25

Marmigère F, Givalois L, Rage F, Arancibia S, Tapia-Arancibia L (2003) Rapid induction of BDNF expression in the hippocampus during immobilization stress challenge in adult rats. *Hippocampus* **13**(5): 646-55

- McAllister AK, Katz LC, Lo DC (1999) Neurotrophins and synaptic plasticity. *Annu Rev Neurosci* **22**: 295-318
- McTigue DM, Tripathi RB (2008) The life, death, and replacement of oligodendrocytes in the adult CNS. *J Neurochem* **107**(1): 1-19
- Miller AH, Maletic V, Raison CL (2009) Inflammation and its discontents: the role of cytokines in the pathophysiology of major depression. *Biol Psychiatry* **65**(9): 732-41
- Monteggia LM, Barrot M, Powell CM, Berton O, Galanis V, Gemelli T, Meuth S, Nagy A, Greene RW, Nestler EJ (2004) Essential role of brain-derived neurotrophic factor in adult hippocampal function. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(29): 10827-32
- Molteni R, Barnard RJ, Ying Z, Roberts CK, Gómez-Pinilla F (2002) A high-fat, refined sugar diet reduces hippocampal brain-derived neurotrophic factor, neuronal plasticity, and learning. *Neuroscience* **112**(4): 803-14
- Moore SA (2001) Polyunsaturated fatty acid synthesis and release by brain-derived cells in vitro. *J Mol Neurosci* **16**(2-3): 195-200
- Nemets B, Stahl Z, Belmaker RH (2002) Addition of omega-3 fatty acid to maintenance medication treatment for recurrent unipolar depressive disorder. *Am J Psychiatry* **159**(3): 477-9
- Nemets H, Nemets B, Apter A, Bracha Z, Belmaker RH (2006) Omega-3 treatment of childhood depression: a controlled, double-blind pilot

- study. *Am J Psychiatry* **163**(6): 1098-100
- Nestler EJ, Barrot M, DiLeone RJ, Eisch AJ, Gold SJ, Monteggia LM (2002) Neurobiology of depression. *Neuron* **34**(1): 13-25
- Nibuya M, Morinobu S, Duman RS (1995) Regulation of BDNF and trkB mRNA in rat brain by chronic electroconvulsive seizure and antidepressant drug treatments. *J Neurosci* **15**(11): 7539-47
- Numakawa T, Suzuki S, Kumamaru E, Adachi N, Richards M, Kunugi H (2010) BDNF function and intracellular signaling in neurons. *Histol Histopathol* **25**(2): 237-58
- Okano H (2002a) Neural stem cells: progression of basic research and perspective for clinical application. *Keio J Med* **51**(3): 115-28
- Okano H (2002b) Stem cell biology of the central nervous system. *J Neurosci Res* **69**(6): 698-707
- Peet M, Stokes C (2005) Omega-3 fatty acids in the treatment of psychiatric disorders. *Drugs* **65**(8): 1051-9
- Peet M, Murphy B, Shay J, Horrobin D (1998) Depletion of omega-3 fatty acid levels in red blood cell membranes of depressive patients. *Biol Psychiatry* **43**(5): 315-9
- Porsolt RD, Le Pichon M, Jalfre M (1977) Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. *Nature* **266**(5604): 730-2
- Rajan P, McKay RD (1998) Multiple routes to astrocytic differentiation in

the CNS. *J Neurosci* **18**(10): 3620-9

Rajkowska G, Miguel-Hidalgo JJ, Wei J, Dilley G, Pittman SD, Meltzer HY, Overholser JC, Roth BL, Stockmeier CA (1999) Morphometric evidence for neuronal and glial prefrontal cell pathology in major depression. *Biol Psychiatry* **45**(9): 1085-98

Rapoport SI, Rao JS, Igarashi M (2007) Brain metabolism of nutritionally essential polyunsaturated fatty acids depends on both the diet and the liver. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* **77**(5-6): 251-61

Reeves PG, Nielsen FH, Fahey GC Jr (1993) AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J Nutr* **123**(11): 1939-51

Reichardt LF (2006) Neurotrophin-regulated signalling pathways. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **361**(1473): 1545-64

Saarelainen T, Hendolin P, Lucas G, Koponen E, Sairanen M, MacDonald E, Agerman K, Haapasalo A, Nawa H, Aloyz R, Ernfors P, Castrén E (2003) Activation of the TrkB neurotrophin receptor is induced by antidepressant drugs and is required for antidepressant-induced behavioral effects. *J Neurosci* **23**(1): 349-57

Sapolsky RM (1990) Glucocorticoids, hippocampal damage and the glutamatergic synapse. *Prog Brain Res* **86**: 13-23

Sinclair AJ, Begg D, Mathai M, Weisinger RS (2007) Omega 3 fatty acids and the brain: review of studies in depression. *Asia Pac J Clin Nutr*

16(Suppl 1): 391-7

Sioen I, De Henauw S, Verbeke W, Verdonck F, Willems JL, Van Camp J (2008) Fish consumption is a safe solution to increase the intake of long-chain n-3 fatty acids. *Public Health Nutr* **11**(11): 1107-16

Su KP, Huang SY, Chiu CC, Shen WW (2003) Omega-3 fatty acids in major depressive disorder. A preliminary double-blind, placebo-controlled trial. *Eur Neuropsychopharmacol* **13**(4): 267-71

Suarez EC, Krishnan RR, Lewis JG (2003) The relation of severity of depressive symptoms to monocyte-associated proinflammatory cytokines and chemokines in apparently healthy men. *Psychosom Med* **65**(3): 362-8

Sun Y, Shi J, Lu PH (2002) Neurotrophic factors and neural stem cells. *Sheng Li Ke Xue Jin Zhan* **33**(4): 313-6

Takahashi M, Shirakawa O, Toyooka K, Kitamura N, Hashimoto T, Maeda K, Koizumi S, Wakabayashi K, Takahashi H, Someya T, Nawa H (2000) Abnormal expression of brain-derived neurotrophic factor and its receptor in the corticolimbic system of schizophrenic patients. *Mol Psychiatry* **5**(3): 293-300

Thase ME, Greenhouse JB, Frank E, Reynolds CF 3rd, Pilkonis PA, Hurley K, Grochocinski V, Kupfer DJ (1997) Treatment of major depression with psychotherapy or psychotherapy-pharmacotherapy combinations. *Arch Gen Psychiatry* **54**(11): 1009-15

Thoenen H (2000) Neurotrophins and activity-dependent plasticity. *Prog Brain Res* **128**: 183-91

- Thornton P, Pinteaux E, Gibson RM, Allan SM, Rothwell NJ (2006) Interleukin-1-induced neurotoxicity is mediated by glia and requires caspase activation and free radical release. *J Neurochem* **98**(1): 258-66
- Vaidyanathan VV, Rao KV, Sastry PS (1994) Regulation of diacylglycerol kinase in rat brain membranes by docosahexaenoic acid. *Neurosci Lett* **179**(1-2): 171-4
- Venna VR, Deplanque D, Allet C, Belarbi K, Hamdane M, Bordet R (2009) PUFA induce antidepressant-like effects in parallel to structural and molecular changes in the hippocampus. *Psychoneuroendocrinology* **34**(2): 199-211
- West AE, Chen WG, Dalva MB, Dolmetsch RE, Kornhauser JM, Shaywitz AJ, Takasu MA, Tao X, Greenberg ME (2001) Calcium regulation of neuronal gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(20): 11024-31
- Wichers M, Maes M (2002) The psychoneuroimmuno-pathophysiology of cytokine-induced depression in humans. *Int J Neuropsychopharmacol* **5**(4): 375-88
- Ximenes da Silva A, Lavialle F, Gendrot G, Guesnet P, Alessandri JM, Lavialle M (2002) Glucose transport and utilization are altered in the brain of rats deficient in n-3 polyunsaturated fatty acids. *J Neurochem* **81**(6): 1328-37
- Ying SW, Futter M, Rosenblum K, Webber MJ, Hunt SP, Bliss TV, Bramham CR (2002) Brain-derived neurotrophic factor induces long-term potentiation in intact adult hippocampus: requirement for

ERK activation coupled to CREB and upregulation of Arc synthesis. *J Neurosci* **22**(5): 1532-40

Yuluğ B, Ozan E, Gönül AS, Kilic E (2009) Brain-derived neurotrophic factor, stress and depression: a minireview. *Brain Res Bull* **78**(6): 267-9

Zetterström TS, Pei Q, Madhav TR, Coppel AL, Lewis L, Grahame-Smith DG (1999) Manipulations of brain 5-HT levels affect gene expression for BDNF in rat brain. *Neuropharmacology* **38**(7): 1063-73

Zigova T, Pencea V, Wiegand SJ, Luskin MB (1998) Intraventricular administration of BDNF increases the number of newly generated neurons in the adult olfactory bulb. *Mol Cell Neurosci* **11**(4): 234-45

Zimmer L, Vancassel SD, Durand G, Guilloteau D, Bodard S, Besnard JC, Chalon S (2000) Modification of dopamine neurotransmission in the nucleus accumbens of rats deficient in n-3 polyunsaturated fatty acids. *J Lipid Res* **41**(1): 32-40

Zimmer L, Vancassel S, Cantagrel S, Breton P, Delamanche S, Guilloteau D, Durand G, Chalon S (2002) The dopamine mesocorticolimbic pathway is affected by deficiency in n-3 polyunsaturated fatty acids. *Am J Clin Nutr* **75**(4): 662-7

李明濱主編 (1999) 實用精神科學. 台灣: 台大醫學院/金名圖書