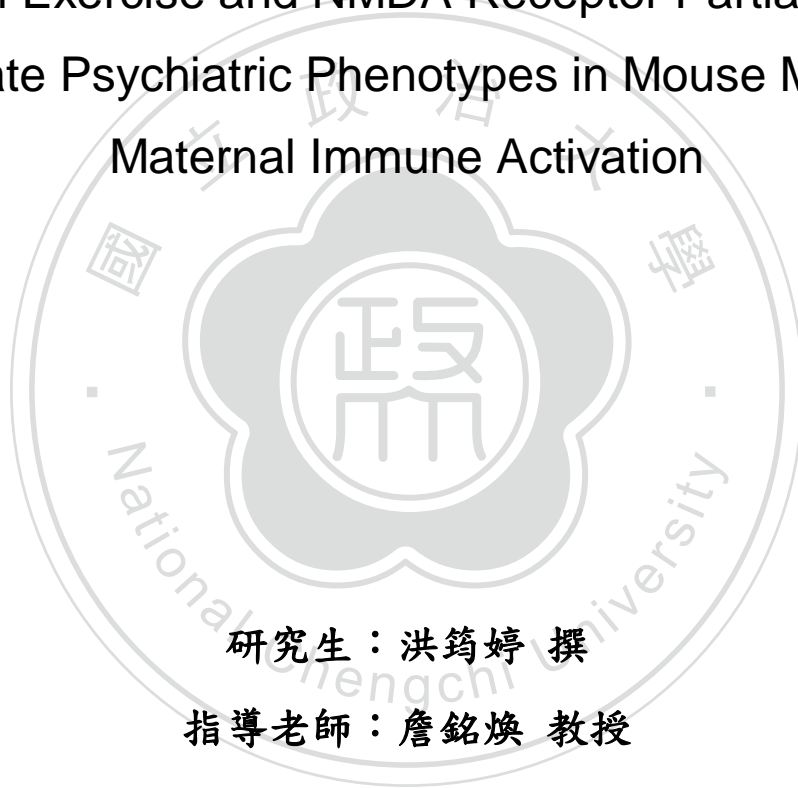


國立政治大學神經科學研究所  
碩士論文

體能運動與 NMDA 受體部分活化劑調節母體免疫激活小  
鼠引起的精神異常模型

Physical Exercise and NMDA Receptor Partial Agonist  
Modulate Psychiatric Phenotypes in Mouse Model of  
Maternal Immune Activation



研究生：洪筠婷 撰  
指導老師：詹銘煥 教授

中華民國一〇七年七月廿七日

## 中文摘要

母體免疫激活 (MIA) 對後代大腦發育有負向的傳導，導致神經化學因子異常和產生精神疾病行為。由於 MIA 子代中 N-甲基-D-天冬氨酸受體 (NMDAR) 功能低下可能是精神疾病的重要病因。精神疾病患者的症狀改善也顯示與其海馬迴的結構和功能改變有正向影響。長期以來，許多精神疾病研究指出海馬迴一直扮演關鍵角色。體能運動能刺激成年的海馬迴而引起神經新生現象，支持在海馬迴功能的神經與精神疾病發生之間建立關聯。本研究旨在評估 NMDAR 調節劑和運動是否可以減緩由 MIA 引起的子代成年期間精神疾病之行為障礙。使用產前感染模型，在胚胎第 12-17 天 (E12 至 E17) 給予懷孕的 ICR 小鼠雙鏈 RNA 聚核糖肌苷酸 - 聚核糖酸 [Poly (i : c)] 或生理食鹽水 6 天。後代 (P70-84) 每天以腹腔注射給予 NMDAR 調節劑 (100mg / kg) 或體能運動兩週。成年子代進行活動性運動，社會互動，刻板行為和急性束縛壓力誘發的行為反應測試。並且應用流式細胞儀技術測定成年子代周邊血液的細胞表面標記物的表達水平。在活動力運動測試 (LMT) 中，與控制組相比，MIA 子代在開闊場地行走的總距離相似。MIA 子代在成人階段比起控制組，表現出較少的社會互動現象但在刻板挖掘的大理石埋藏實驗無明顯變化。此外，來自 MIA 成年後代的周邊血液中 CD11b+ 細胞表達更高水平的巨噬細胞活化標記 CD86 和主要組織相容性複合體 II 類 (MHC II 類, I-A / I-E)。NMDAR 調節劑的慢性給藥和體能運動兩週減緩了由 MIA 誘導的社交缺陷，但在刻板動作挖掘中沒有明顯變化。此外，NMDAR 調節劑在急性束縛壓力中，體能運動緩解了 MIA 子代的社交活動障礙，而不是減少活動量和重複性挖掘。這項工作提出了膳食補充 NMDAR 調節劑或運動，能成功的減緩 MIA 子代精神障礙有關的社交異常行為，為此打開了新的途徑。

關鍵字：母體免疫激活、精神疾病、運動、N-甲基-D-天冬氨酸受體、海馬迴

## Abstract

Maternal immune activation (MIA) during pregnancy negatively transforms offspring brain development, resulting in neurochemical abnormalities and neuropsychiatric disorder behaviors. Since hypofunction of N-methyl-D-aspartate receptors (NMDARs) in offspring after MIA may be a convergence point for psychiatric symptoms. Improvements in the behavioral symptoms in psychosis are associated with positive changes in hippocampal structure and function as shown in patients with chronic schizophrenia, because hippocampus has been demonstrated for its critical involvement in many mental diseases. Physical exercise that stimulates adult hippocampal neurogenesis may improve the neuropsychological symptoms. This study was undertaken to evaluate whether NMDAR modulator and exercise could reduce MIA-induced behavioral impairments in the adult offspring. Using a prenatal infection model, the pregnant ICR mice were administered with double-stranded RNA polyinosinic:polycytidylic acid [Poly(i:c)] or saline on embryonic days 12-17 (E12 to E17) for six days. The offspring (P70-84) were given (i.p.) daily with NMDAR modulator (100 mg/kg) and physical exercise for two weeks. Adult offspring were tested for spontaneous locomotion, social interaction, stereotyped behavior, and restraint stress induced behavioral responses. The expressing levels of cell surface markers from adult offspring peripheral blood were also determined by flow cytometry. In spontaneous locomotion test (LMT), MIA offspring traveled a similar total distance in open field compared with their control groups. MIA offspring at adult stage exhibited a less social interaction. Their stereotypic digging and marble burying performance was not different to control offspring. Moreover, peripheral blood CD11b+ cells from MIA adult offspring expressed a higher levels of activation markers, CD86 and major histocompatibility complex class II (MHC class II, I-A/I-E). Subchronic administration of NMDAR modulator and physical exercise for two weeks attenuated the social interaction deficits, but not stereotypic digging induced by MIA. Moreover, NMDAR modulator alleviated the social interaction deficits, but did not alter locomotion and stereotypic digging in MIA offspring after acute restraint stress. This work raises the possibility that dietary supplementation with NMDAR modulator or physical exercise may open new avenues for a successful attenuation of behavioral alterations relevant to psychiatric disorder about sociality in the adult MIA offspring.

Key words: Maternal immune activation 、 Psychosis 、 Exercise 、 N-methyl-D-aspartate receptors 、 Hippocampus

## 目錄

## 頁次

圖表目錄.....	iv
縮寫表(abbreviations) .....	vi
壹、背景介紹.....	2
一、前言 .....	2
二、母體免疫激活(maternal immune activation, MIA) .....	2
三、母體免疫激活與神經發育疾病關聯 .....	4
四、思覺失調症(schizophrenia).....	6
五、思覺失調症病理學特徵 .....	7
六、思覺失調症假說 .....	9
七、NMDARs 在思覺失調症與母體免疫激活的角色.....	11
八、環境因子對思覺失調症的影響 .....	12
九、運動與思覺失調症的相關性 .....	13
十、三甲基甘胺酸(trimethylglycine).....	13
貳、實驗動機與目的.....	14
參、實驗材料與方法.....	15
肆、實驗設計.....	24
伍、實驗結果.....	29
陸、討論.....	38
柒、結論.....	42
捌、圖表.....	43
玖、參考文獻.....	73

## 圖表目錄

圖 1、思覺失調症患者與正常人之大腦影像差別 .....	8
圖 2、母體發炎造成子代 microglia 不同時期活化進而影響思覺失調症的關係 .	9
圖 3、思覺失調症患者的多巴胺投射迴路.....	10
圖 4、思覺失調症患者的 glutamate 假說 .....	11
圖 5、環境壓力與思覺失調症相關基因的互相作用關係 .....	13
圖 6、體能運動模式 .....	16
圖 7、三隔間社交偏好實驗(three chamber social preference test)流程圖 .....	20
圖 8、大理石埋藏實驗(marble burying) .....	21
圖 9、束縛壓力實驗(acute restraint stress).....	22
圖 10、Poly(i:c)引起母體免疫激活之模式檢測其子代活動力 .....	43
圖 11、Poly(i:c)引起母體免疫激活之模式檢測其子代社交能力 .....	44
圖 12、給予類心理壓力後的 Poly(i:c)子代檢測其活動力 .....	45
圖 13、給予類心理壓力後的 Poly(i:c)子代檢測其社交異常行為 .....	46
圖 14、母體受免疫刺激產生的細胞因子透過胎盤影響子代產生免疫發炎現象 .....	47
圖 15、三甲基甘胺酸與體能運動對 Poly(i:c)引起母體免疫激活之子代活動力	49
圖 16、三甲基甘胺酸與體能運動對 Poly(i:c)引起母體免疫激活之子代社交能力 .....	51
圖 17、三甲基甘胺酸與體能運動對 Poly(i:c)引起母體免疫激活之子代刻板行為 .....	52

圖 18、Poly(i:c)引起母體免疫激活之模式治療後再給予類心理壓力檢測其子代活動力 .....	54
圖 19、Poly(i:c)引起母體免疫激活之模式治療後再給予類心理壓力檢測其子代社交力 .....	55
圖 20、Poly(i:c)引起母體免疫激活之模式治療後再給予類心理壓力檢測其子代刻板行為 .....	56
圖 21、Poly(i:c)引起母體免疫激活之模式檢測其子代活動力(II) .....	57
圖 22、Poly(i:c)引起母體免疫激活之模式檢測其社交能力(II) .....	58
圖 23、三甲基甘胺酸與體能運動對 Poly(i:c)引起母體免疫激活之子代活動力(II) .....	60
圖 24、三甲基甘胺酸與體能運動對 Poly(i:c)引起母體免疫激活之子代社交能力(II) .....	62
圖 25、三甲基甘胺酸與體能運動對 Poly(i:c)引起母體免疫激活之子代刻板行為(II) .....	63
圖 26、Poly(i:c)引起母體免疫激活之模式治療後再給予類心理壓力檢測其子代活動力(II) .....	65
圖 27、Poly(i:c)引起母體免疫激活之模式治療後再給予類心理壓力檢測其子代社交力(II) .....	67
圖 28、Poly(i:c)引起母體免疫激活之模式治療後再給予類心理壓力檢測其子代刻板行為(II) .....	68
圖 29、三甲基甘胺酸與體能運動影響 Poly(i:c)引起母體免疫激活之子代對於 PPI 之反應 .....	69
圖 30、Poly(i:c)引起母體免疫激活後改變子代前額葉皮質區的 PV <sup>+</sup> 表現量 ....	71

圖 31、三甲基甘胺酸與體能運動對 Poly(i:c)引起母體免疫激活後子代海馬迴中  
NMDA 受體表現量之影響 ..... 72

表 1、其他藥品 ..... 17

表 2、免疫組織染色抗體 ..... 18

表 3、流式細胞分析之標記抗體 ..... 23

縮寫表(abbreviations)

MIA	maternal immune activation
Poly(i:c)	polyriboinosinic-polyribocytidilic acid
LPS	lipopolysaccharide
SCZ	schizophrenia
BD	bipolar disorder
FMRI	functional magnetic resonance imaging
vHipp	ventral hippocampus
NAc	nucleus accumbens
NMDA	N-methyl-D-aspartate
VTA	ventral tegmental area
GABA	γ-aminobutyric acid
DAB	3,3-diaminobenzidine
PPI	prepulse inhibition test
IHC	immunohistochemistry
ACK	ammonium-chloride-potassium

# 壹、背景介紹

## 一、前言

精神疾病罹患率的逐年增加是現代社會愈來愈棘手的問題，台灣約有千分之三的人患有不同程度的精神疾病，罹病率為百分之一，在體質、壓力和環境等多重原因下，症狀會出現被害妄想、聽幻覺、社交退縮和情感表達不佳等等(Hwu et al., 2005)。隨著社會文明與科技產業短時間內的劇烈變化下，這些類似狀況的患者更是赤裸裸地出現在社會上。2016 年在內湖區發生了一宗震驚台灣社會的隨機殺人『小燈泡事件』，而兇嫌可能罹患精神疾病。2018 年五月也發生了一則兇嫌為了向妹妹要錢去牙醫診所找人，竟將牙醫師殺害，此兇嫌也患有精神疾病。雖然這些都是非常極端的狀況，顯然精神疾病的預防及治療為急迫性待解決的問題，然其原因至今仍然未明？

越來越多流行病學的研究證據強烈表明懷孕時期婦女受到感染，容易使下一代罹患精神障礙包括躁鬱症，思覺失調症和自閉症等在內的精神疾病。而在動物研究中支持這種關聯，並證明母體免疫激活 (maternal immune activation, MIA) 改變了後代在成年期的大腦形態和發炎性細胞激素(Scola and Duong, 2017)，通常伴隨著行為異常包括，情感冷漠、情緒低落、生活失去目標、社交困難、及認知障礙…等。因此科學家們都積極地找尋瞭解精神疾病當中 MIA 與大腦發育之間的聯繫並且針對具有高風險罹患精神疾病的個體開發新的藥物治療，所以我們希望能使用天然營養食品而取代藥物，或是利用運動健身取代藥物，而得以改善少年時期潛在罹患精神疾病的病症，探討自然食品與運動對精神疾病最佳的治療時機，並深入了解其作用機制為目標。

因此，本研究是利用母體免疫激活(MIA)引發子代有類思覺失調症神經精神疾病的動物模式，探討三甲基甘胺酸(trimethylglycine)與運動對腦的功能性及認知功能和行為異常之預防及治療效用。

## 二、母體免疫激活(maternal immune activation, MIA)

母體免疫激活最早的發現可以從過去醫療還尚未進步以前，整潔環境與公共衛生在人群中沒有重要概念，因此每隔一段時間就會有大規模的流行病，影響數百萬人，而這些人中往往包含許多懷孕的婦女，進而從這些婦女所產下的孩子中發現了蛛絲馬跡。在美國，平均每年流感感染就會導致 10,000-20,000 人死亡。此外，在過去 300 年間，每 10-20 年發生一次流感大流行(Gust et al., 2001)。而孕婦的流感或病毒感染



會導致妊娠並發症如死胎和流產(Shahab and Glezen, 1994)。但最重要的是，即使不太嚴重的母體感染也可能導致嚴重性的結果。許多流行病學研究發現妊娠中期暴露於流感的女性後代患思覺失調症的風險顯著增加。風疹，麻疹，水痘 - 帶狀皰疹和白喉也有類似的聯繫(Mednick et al., 1988; Brown et al., 2000)。此外，母親病毒感染被認為是“自閉症(autism)的主要非遺傳原因”(Ciaranello and Ciaranello, 1995)。這些不同的跡象可能有共同之處是母源抗病毒反應(Patterson, 2002a)。

根據流行病學表示母親流感感染導致後代患思覺失調症的風險增加，已開發出小鼠模型，其中懷孕母親在妊娠中期接受人類流感病毒的呼吸道感染(Rapoport et al., 2005)。出生時，後代沒有出現腦病或直接病毒感染的跡象。然而，他們的確表現出新皮質和海馬迴厚度的減少，以及前額葉皮質區的 parvalbumine 陽性中間神經元數量的減少(Fatemi et al., 1999; Gonzalez-Burgos et al., 2015)。這些發現都與成人人類思覺失調症大腦的特徵一致(Patterson, 2002b)。因此現在大多數的實驗會在出生前，在懷孕母鼠體內暴露於其他病毒，細菌或寄生蟲感染，使出生後的大鼠和小鼠能觀察到大腦結構和功能的顯著變化，常見的母體免疫激活模型如下：

#### (1) 聚核糖酸酸[Polyriboinosinic-Polyribocytidilic Acid, Poly(i:c)]的類病毒樣免疫激活模型

目前最流行和廣泛使用的方法之一是聚核糖肌苷酸-聚核糖酸[Poly(i:c)]的母體給藥，此模型最初是為了測試母體和胎兒之細胞因子的改變表達是否可能調節孕期母親感染與後代腦部發育異常之間的關係中起關鍵作用(Gilmore and Fredrik Jarskog, 1997; Meyer et al., 2009)。自從它最初應用於小鼠發育生物學以來，產前 Poly(i:c) 模型對於複雜的人腦疾病如思覺失調症的神經發育和神經免疫學基礎產生了可觀的影響(Meyer and Feldon, 2012)。在小鼠產前 Poly(i:c) 模型中，在特定的妊娠階段暴露於此造成免疫作用，然後比較所得後代與控制組產生的後代相比，母體產前免疫作用造成腦和行為產生不好的結果。Poly(i:c) 是雙鏈 RNA 的合成類似物，雙鏈 RNA 在病毒感染過程中產生為單鏈 RNA 的複制中間體或 DNA 病毒中對稱轉錄的副產物。它主要通過跨膜蛋白 toll 樣受體 3(Toll 3)被哺乳動物免疫系統識別(Akira and Takeda, 2004)。跨膜蛋白 toll 樣受體是識別存在於有毒病原體上的不變結構的一類病原體識別受體。在與 Toll 樣受體 3 結合後，雙鏈 RNA 其合成的類似物 Poly(i:c)廣泛引起先天免疫基因和蛋白質的表達。這些反應的涉及許多促炎細胞因子的產生和釋放，包括白細胞介素 (IL) -1 $\beta$ ，IL-6 和腫瘤壞死因子 (TNF) - $\alpha$ 。另外 Poly(i:c) 是 I 型乾擾素

(IFN) 的有效誘導劑：IFN- $\alpha$  和 IFN- $\beta$ 。因此，Poly(i:c) 的施用可以有效地模擬對病毒感染的急性期反應，並且當母體懷孕時期給予，會間接導致胎兒腦中有顯著炎症過程(Meyer et al., 2006; Abazyan et al., 2010)。

如其他地方廣泛研究中，在成年小鼠和大鼠妊娠暴露於 Poly(i:c)後，已經檢測到許多神經化學和腦形態異常。越來越多的啮齒動物研究進一步提供了產前 Poly(i:c)誘導的免疫激活後出現多種不正常行為，認知障礙和藥理學上都有有力證據。產前 Poly(i:c)模型有趣特徵是，僅在後代達到青春期末期或成年早期後，認知不正常行為和藥理學異常才會出現。這種發病時間表明從青春期末到成年早期的病理症狀發展，與思覺失調症和相關精神疾病中完全發生於後青春期末發作一致(Zuckerman et al., 2003; Ozawa et al., 2006)。

## (2) 脂多醣(Lipopolysaccharide,LPS)類細菌樣免疫活化模型

母體給予細菌內毒素脂多醣 (LPS) 是廣泛使用的模型系統，以模擬在沒有活細菌暴露的情況下對細菌感染的先天急性期反應。LPS 是革蘭氏陰性細菌的固有細胞壁成分，主要由病原體識別受體跨膜蛋白 Toll 樣受體 4(Toll 4) 識別(Akira and Takeda, 2004)。在與 Toll 樣受體 4 結合後，LPS 刺激各種先天免疫反應的表達，所述先天免疫反應包括各種促炎細胞因子的合成和釋放。由 LPS 和 Poly(i:c) 觸發的細胞因子相關炎症反應之間存在一些顯著的相似性。因此，類似於 Poly(i:c) 的產前 LPS 治療可能引發許多與思覺失調症和相關精神疾病相關的行為和神經化學變化，此兩種模型互相有相似性(Kimura et al., 1994)。

## 三、母體免疫激活與神經發育疾病關聯

過去二十年間，大腦發育與精神疾病後期發病之間的聯繫越來越多。目前的研究強烈指出遺傳因素和環境因素在指導和塑造大腦發育中的複雜相互作用。大腦發育是一個非常複雜的過程，主要發生在產前期，其起源於神經元向大腦適當位置的增殖和遷移，隨後建立適當的神經元連接。考慮到大腦發育的高度複雜的過程，任何小的擾動（如孕婦接觸傳染病毒或發炎症狀干擾）都可以強烈地破壞胎兒大腦的發育結構和功能。來自生產前期正常大腦發育軌跡的這些擾動可能導致一系列事件隨著時間的推移逐漸放大，可能導致持續到成年期大腦和行為功能之長期變化。

流行病學研究表明，暴露於產前感染如流感，風疹，麻疹，單純皰疹病毒和細菌感染可能增加後代發展雙相障礙 (BD)，思覺失調症 (SCZ) 或自閉症。傳染性病原體

的多樣性表明，在妊娠期間的一般免疫激活，而不是病原體的類型與後代精神病後期發作相關。丹麥的一項全國性研究支持了這一觀點，該研究發現，由於嚴重感染需要住院的母親在母親所生的孩子與自閉症的診斷相關。在最近的一項探索性研究中說明，在診斷為自閉症的兒童中，在妊娠早期或中期妊娠期間長時間發熱的母親與嬰兒自閉症風險增加三倍相關。這項研究得到了一項更大的病例對照研究的證實，該研究發現妊娠期母親發熱與自閉症風險之間存在密切關聯。思覺失調症和躁鬱症在懷孕期間暴露於孕產婦流感後分別與風險增加三倍或四倍相關。這些疾病在冬季期間懷孕的嬰兒中觀察到較高的風險，可能是由於流感和傳染病的流行率較高。這些流行病學調查結果表明，激活母體免疫應答可能是一種共同的潛在途徑，賦予這些精神障礙風險。

一個盛行的假設，由於免疫激活的胎兒間隔中發炎性分子的表達水平改變可能破壞腦發育和神經連接，這可能反過來對個體晚年的精神功能具有長期影響。細胞因子是由廣泛的免疫和非免疫細胞分泌的信號發炎蛋白質。細胞因子包括各種趨化因子，白細胞介素（IL），干擾素（IFN）和腫瘤壞死因子（TNF），它們通常分成促或抗炎細胞因子。促炎性細胞因子包括 IL-1 $\beta$ ，IL-6，和 IFN- $\gamma$ ，其參與的炎症反應中的放大倍率。相反，抗炎細胞因子如 IL-4，IL-10 和 IL-13 緩解炎症反應。這些細胞因子之間的平衡調節了多種過程，如調節先天性和適應性免疫系統，細胞增殖，活化和分化。在中樞神經系統，細胞因子調節各種神經發育過程，包括神經元細胞分化，突觸連接和修剪，神經元可塑性和神經元存活。在產前大腦發育期間，細胞因子及其受體在神經元細胞上的組成型表達，表明這些分子在指導和塑造大腦發育中發揮關鍵作用。因此，細胞因子網絡的改變可能與腦發育的變化有關。

幾條證據支持這樣一種假設，即大腦早期發育過程中細胞因子表達水平的改變與廣泛的精神障礙有關。在流行病學研究報導，孕婦血清中促炎性細胞因子（TNF- $\alpha$  和 IL-8）水平升高與精神病的機率增加有關，而母體抗炎水平較高細胞因子（IL-4，IL-5 和 IL-13）與精神病的機率降低有關。這些流行病學關聯的臨床前證據已經通過將懷孕的動物（如小鼠和大鼠）暴露於特定胎齡的免疫劑獲得。這涉及母體暴露於細菌內毒素脂多醣（LPS）或合成雙鏈 RNA 的多核糖核苷酸 - 聚核糖胞苷酸[Poly (i : c)]，兩者均誘導免疫激活和細胞因子釋放。發現母體暴露於這些免疫學損傷可增加小鼠的母體血清，羊水，胎盤和胎兒腦中促炎細胞因子（IL-6，TNF- $\alpha$ ，IFN- $\beta$  和 IL-1 $\beta$ ）的水平。這些數據表明，細胞因子是母體免疫激活對後代精神表型的重要介質。

雖然有證據表明 MIA 誘導細胞因子失衡和行為改變，但對這些細胞因子如何改變大腦發育知識之甚少。一個似是而非的解釋是，MIA 導致炎症細胞因子的產生，這種炎症細胞因子在母血中經常是延長和全身性的。這些母體細胞因子可通過穿越胎盤屏障到達胎兒隔室。事實上，發現細微水平的 IL-1 $\beta$ ，IL-6 和 TNF- $\alpha$  可以穿過完整的人胎膜，即羊膜，絨毛膜和蛻膜。胎兒循環中產生的細胞因子可以激活胎兒免疫激活以產生更多細胞因子。人們普遍認為，與成人相比，胎兒的血腦屏障更加脆弱和不成熟，使得系統生成的胎兒細胞因子很可能進入胎兒大腦。因此，孕婦感染情況下的細胞因子變化可能導致對腦功能的長期影響，這會增加精神障礙的風險。

#### 四、思覺失調症(schizophrenia)

在台灣思覺失調症以往稱為精神分裂症，由於人們尚未了解精神疾病知識之前，已經搶先一步為疾病帶來了誤解與汙名，因此台灣精神醫學會在 2014 年宣布改名。思覺失調症是非常複雜的精神疾病，對感覺、知覺和認知有重要的影響力(Tandon et al., 2009)，根據世界衛生組織研究報告顯示，思覺失調症的流行率佔全世界的 3.8%~8.4% (Collin et al., 2013)，由此可見比例非常高，然而思覺失調症仍是全世界重要殘疾的其中之一，並且目前沒有充分的治療方法。思覺失調症主要在青春期後期具有高風險的發病機率。其發病年齡是在青春期後期或二十幾歲初期，女性發病較晚(Gogtay et al., 2011)。Gogtay 表示，此疾病的發病機制可能植根於早期發育，而到了青春期晚期可能反映了大腦發育的關鍵時期，使之特別容易發生精神病理變化。在 DSM-5 (Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, Fifth Edition) 中思覺失調症能準確地定義，且能使不同精神障礙之間的診斷邊界區分開來，減少了共病性，改善了整個診斷手冊的一致性，並提高了合理性而不影響依靠性(Carpenter and Tandon, 2013)。

Andreasen 將 1982 年的診斷標準重新審視，把思覺失調症細分為正性和負性症狀為主要特徵，作為症狀主要定義，因此我們現在常見的思覺失調症可分為兩種(Andreasen et al., 1990)：

正向症狀(positive symptoms)：

正常人沒有的現象的但患者卻有的症狀。妄想(delusions)：包含破壞妄想，受到騷擾等，和大膽妄想，相信自己有特殊才能或財富及名望，甚至是認為另一個人愛上他或她。幻覺(hallucinations)：知覺的失調，是思覺失調症中最常見的症狀之一，同時包

含幻聽與幻覺。思緒無組織(disorganized thought)：通常由語言中推測出來，從一主題跳到另一主題且關聯性微弱鬆散，明顯的有溝通障礙。混亂和異常行為(perception disturbances)：缺乏語言及運動反映，重複刻板動作或緘默回應，加上不可預測的刺激。

負向症狀(negative symptoms)：

反之患者比正常人缺乏的現象，而負向症狀佔此疾病發病率一大部分。較無眼神交流，情緒表達少，手腳韻律不協調，缺乏積極找人談話，同時包括焦慮症狀憂鬱。症狀包含：情感冷漠(blunted emotions)、社交障礙(social withdrawal)、對事情失去熱情(lack of feeling)、認知功能缺損。

## 五、思覺失調症病理學特徵

### (1)神經發育

許多研究者提出了導致思覺失調症的基礎性生理病理學的神經發育基礎的假說。這一假設得到了許多證據的支持，比如：妊娠和分娩發炎症，特別是影響胎兒神經系統發育的因素，導致精神障礙風險增加(McCarley et al., 1999; Tanskanen et al., 2010; Thibaut, 2017)。其他可能的病因候選物包括病毒感染、輕微的身體異常，表現為發炎或抑鬱壓力狀態，作為母體的急性變化。腦成像的進展現在已經導致思覺失調症中大量腦異常的鑑定，慢性思覺失調症患者大腦中最為一致的結果為心室擴大結構異常。這些發現還包括內側顳葉結構，包括杏仁核，海馬和新皮質顳葉區，還有一些證據表明額葉異常，特別是前額葉灰質和眶額葉區。在思覺失調症中觀察到的腦結構異常可能不僅是由於神經發育異常，而且是由於長期疾病發生的皮層可塑性和成熟過程的改變，而許多研究證實了思覺失調症的遺傳傾向，但到目前為止，分子遺傳學方法尚未為思覺失調症中明確的提供證據。

### (2)大腦結構異常

思覺失調症的結構異常在許多屍檢當中得到結果，但這些結果都是微小的，而搭配現在科技的進步，functional magnetic resonance imaging (fMRI)為重要檢測儀器，且可以更明確得去取得大腦結構的結果，在研究上可以更增加可信度與實驗 n 值。思覺失調症患者中有結構異常包含，腦室過大、第三腦室增大，其中這兩個的研究資料中佔最多部分。中顳葉結構，包含杏仁和、海馬迴、新皮質顳葉區也是常見評估腦區(Shenton et al., 2001)。

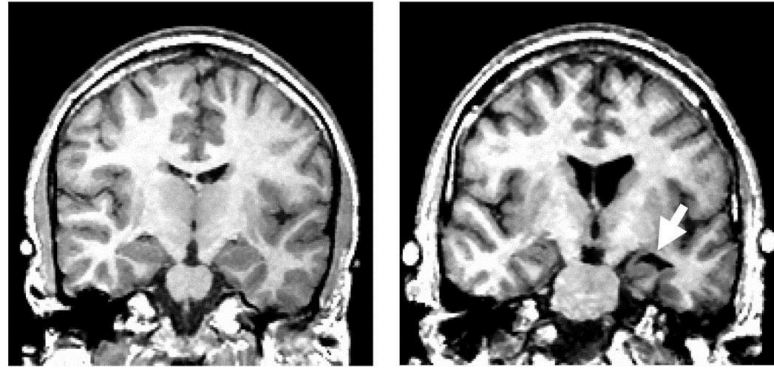


圖 1 思覺失調症患者與正常人之大腦影像差別(Shenton et al., 2001)

上圖，左邊為正常人的大腦影像圖，右邊為罹患思覺失調症之大腦影像圖，可以發現思覺失調症患者的側腦室比正常人來的大，以及箭頭部分為腦脊髓液環繞杏仁核，腦脊髓液的增加。

關於結構上異常的時機尚未確定，儘管許多患者首次出現症狀時是明顯的，然而還有其它文獻表示，腦部異常部分可能在疾病過程中發生變化。最簡單的解釋是，一些大腦異常是神經發育的起源，但在發展中後期展開，從而為思覺失調症症狀的發展奠定了基礎。或者可能還有其他因素，如壓力或神經毒性，發生在青春期或早期成年期，是思覺失調症發展所必需的，並可能與神經退行性變化相關。重要的是，由於幾個不同的腦區域參與思覺失調症的神經病理學，需要開發和測試新的模型，以解釋影響不一定在結構上彼此接近但仍然功能相關的腦區域的神經迴路異常(Shenton et al., 2001; Gross and Huber, 2008)。

### (3)腦發炎或壓力下的影響

外部壓力因素與體內生物因子之間的相互作用是思覺失調症最常見的病理學因素之一。而遺傳學或臨床前研究發現，在流行病學報告和大腦影像中有更進一步的證據顯示了可能的基礎的機制，其中 microglia 可能為關鍵的潛在因素。microglia 是中樞神經系統中主要的免疫細胞，在炎症反應時具有關鍵作用，且也會參與突觸修剪和神經元重塑(Howes and McCutcheon, 2017)。除了免疫和創傷性刺激之外，心理壓力下 microglia 也會因此活化。這些的變化將與思覺失調症的發病有關，會調節 microglia 突觸修剪，而 microglia 過度活化可能導致過度的突觸修剪和皮層灰質的損失。小膠質細胞影響的刺激敏感區域（如前額葉皮層和海馬）的損傷可能直接導致認知和負面症狀，並且導致與病症相關的許多結構性腦變化。皮質控制的喪失也可能導致皮質下多巴胺的釋放，從而導致正的精神病症狀 (Thibaut, 2017)。

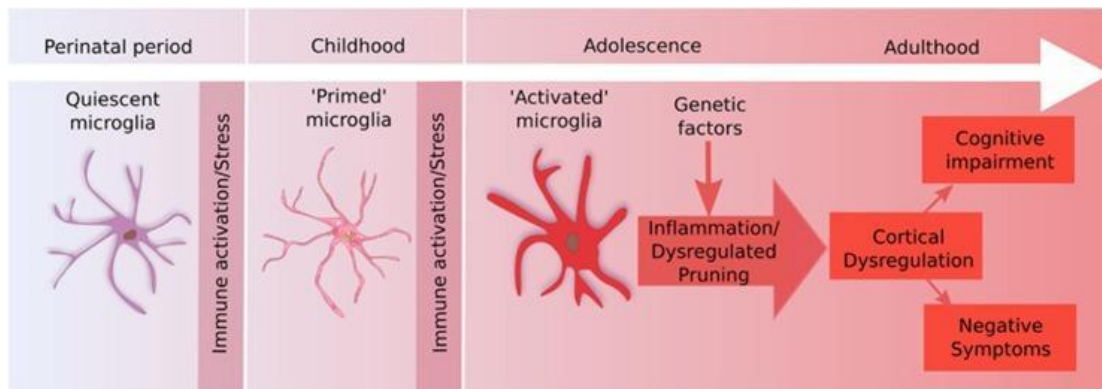


圖 2、母體發炎造成子代 microglia 不同時期活化進而影響思覺失調症的關係 (Howes and McCutcheon, 2017)

microglia 過度活化，反應導致脊柱損傷導致壓力產生，可能會使前額葉皮層和海馬迴過度突觸修剪，由此引起的突觸的變化可以解釋大腦結構性變化以及負面和認知症狀在思覺失調症相關的發展。這結果也支持灰質體積減少與認知症狀相關有明顯的相關性，並且降低突觸的密度。上圖所表示，microglia 的母體激活導致起始狀態，隨後的青春期壓力觸發病理過度活化，導致皮層損失和症狀的發展，而到了成年時期進而引發思覺失調症，稱為二次反應。因此在環境上的變化也是造成思覺失調症重要的成因之一(Thibaut, 2017)。

## 六、思覺失調症假說

上述的病理學為思覺失調症發病基礎，但在發病之後到了成年時期，所造成的大腦變化、神經迴路改變可以分為兩種重要假說，清楚瞭解兩種假說的生物機制，進而發展針對這些狀況的治療，更有效的挽救精神症狀。

### (1) Dopamine hypothesis

最常與思覺失調症相關的神經傳導系統是多巴胺因子。多巴胺假說是思覺失調症最長見的假設之一。由連接多巴胺失調與疾病的病理生理學的多個觀察，包括發現皮質下多巴胺系統活性增強與思覺失調症的正性症狀相關，以及所有抗精神病藥物是多巴胺 D2 受體拮抗劑為主要發現(Grace, 2012)。此外，在思覺失調症患者中皆觀察到多巴胺 D2 受體密度的變化。已經從人類思覺失調症患者的成像研究中獲得了進一步的支持多巴胺假說的證據，其顯示出 Amphetamine 給藥顯著增加紋狀體中多巴胺的釋放，其中多巴胺釋放增加的幅度對應於正向症狀加重。最近研究表示，思覺失調症患者多巴胺釋放量最大的紋狀體區域與關聯信息處理有關。此外，多巴胺增強藥物如

Amphetamine 會沉澱正常個體的精神病發作，與思覺失調症患者中觀察到的急性精神病發作無所區別。簡言之，這些發現為多巴胺假說提供了很多證據和支持。

腹側海馬 (vHipp) 的激活增加麻醉大鼠的伏隔核 (NAc) 中的多巴胺釋放(Lodge and Grace, 2011)。因此，vHipp 的化學或電刺激在整個 NAc (多巴胺神經元的主要區域) 中引起突觸後多巴胺的持續增加。vHipp 可以通過對突觸前多巴胺神經的直接作用或通過多種突觸路徑調節多巴胺神經元活性來增強多巴胺釋放，這種增加取決於由 vHipp 對 NAc 的活化，因為 glutamate 抑制劑微量灌注，直接進入 NAc 阻止 vHipp NMDA 興奮性誘導的群體活動增加。NMDA 的作用可以通過 NAc 激發誘導 GABA 抑制神經激活增加的作用使 ventral pallidum 對 VTA 的 GABA 受到抑制因此 VTA 可以釋放大量多巴胺出來。(如圖 3)

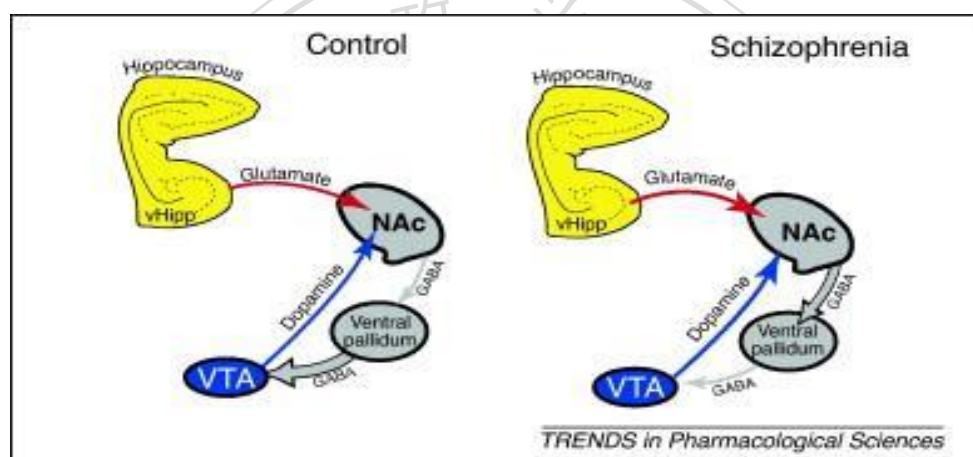


圖 3、思覺失調症患者的多巴胺投射迴路(Lodge and Grace, 2011)

然而，思覺失調症患者的中腦多巴胺系統中的病症尚未見報導。這導致了一種現象，即這種紊亂可能在調節多巴胺系統的系統中是上游的，並且異常的多巴胺傳播和相關症狀，可能進而使皮質和海馬區域的功能障礙，已知其顯示進行結構和神經化學上思覺失調症的改變。

## (2) Glutamate hypothesis

假設 glutamate 神經傳遞的缺乏是思覺失調症中功能缺損的重要原因。glutamate 是哺乳動物中樞神經系統中，最主要的興奮性神經遞質物質，而 glutamate 與三種主要類型的受體結合，其中之一為 NMDA 受體，在假說中是扮演重要角色。NMDA 受體在學習和記憶中的重要性最常被提起，但在此假說中，興奮性神經傳遞為間接作用。NMDA 受體參與思覺失調症的線索先被認為是某些濫用藥物，即 PCP 和 ketamine，導致思覺失調症中通常出現的症狀，包括精神病，社會退縮和工作記憶缺



陷，這些藥物顯示為 NMDA 受體抑制劑(Gordon, 2010)。從那時起收集的各種臨床資料的證據擴大了這些初步觀察結果，而進一步證實 glutamate 功能減退與思覺失調症有關。

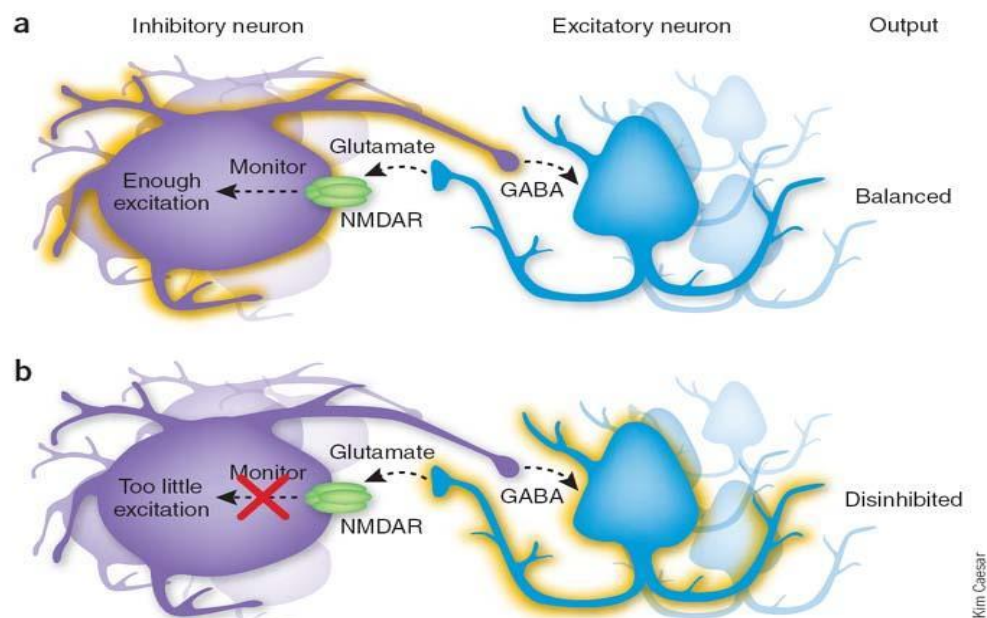


圖 4、思覺失調症患者的 glutamate 假說(Gordon, 2010)

由上圖 4 可以看到，GABA 抑制性神經元通過 NMDA 受體（NMDAR）訊號傳導來調控興奮性活性神經元。通常，抑制性神經元保持足夠的 GABA 釋放來平衡抑制或激發。在思覺失調症個體的皮層中，NMDA 受體功能下降破壞了這整個調控功能，抑制性神經元似乎沒有足夠的興奮性刺激，導致抑制性薄弱，興奮性神經過度興奮，構成思覺失調症原因。

#### 七、NMDARs 在思覺失調症與母體免疫激活的角色

思覺失調症有關的病理現象可能由產前感染和壓力的影響 N 甲基 D 天冬氨酸受體（NMDAR）。思覺失調症中 NMDAR 功能低下的假設一直在持續增加，這些原因已經在上述整理瞭解，它可能是這種疾病的最主要症狀影響，包括精神疾病和其負向症狀以及其他行為異常(Moghaddam and Javitt, 2012)。特別是在海馬體的迴路(Squire, 1992)，在思覺失調症人群中表現出 NMDAR 表現減少(Gao et al., 2000; Beneyto et al., 2007; Vrajova et al., 2010)。產前感染的動物模型與思覺失調症有關的特徵性行為表型符合，並且是檢查為與病原學的生物學機制相關假設的有價值的工具(Boksa, 2010; Meyer and Feldon, 2010; Harvey and Boksa, 2012)。最近實驗證明，產前給予

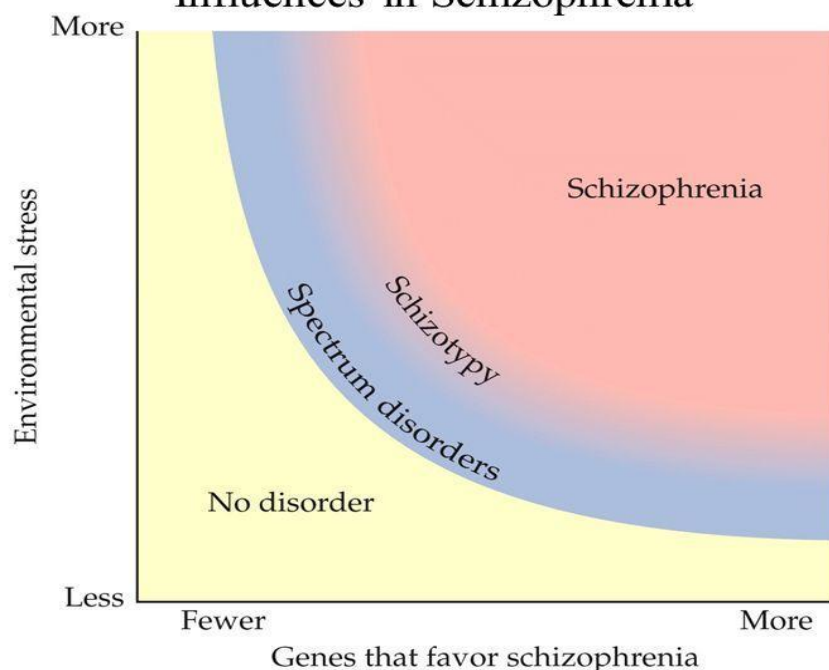
聚核糖肌苷酸 - 聚核糖酸 [Poly(i:c)] 可以在後代中產生 NMDAR 功能低下(Lante et al., 2007; Escobar et al., 2011)。

#### 八、環境因子對思覺失調症的影響

在具有同源型遺傳上的人群中發現了精神分裂症發病率，取決於某些環境特徵在時間或空間內的變化，對環境危險因素的影響在病理學研究中已經考慮將環境置於精神疾病研究的重點。各種環境因素如城市性，移民，大麻，童年創傷，感染因素，產前並發症和社會心理因素都與思覺失調症的發病風險有關(Vilain et al., 2013)。這些風險因素可以是生物的，身體的，心理的以及社會的，並且可以在個人生活的不同時間（胎兒期，兒童期，青春期和成年早期）進行影響(Szoke, 2013)。

迄今為止，人們一直認為，壓力對精神疾病病患較有敏感性，透過對行為和神經生物學層面可以看到。然而，個體對這種敏感性可能不同，一個可以解釋主體差異的機制是基因 - 環境相互作用 (G×E) (Moffitt et al., 2005)。當暴露於環境病原體對健康的影響取決於一個人的基因型，或者相反，當環境經驗減輕對健康的遺傳影響時，基因與環境的相互作用就會發生。

A Model of the Interaction between Stress and Genetic Influences in Schizophrenia



BIOLOGICAL PSYCHOLOGY 7e, Figure 16.16  
© 2013 Sinauer Associates, Inc.

圖 5、環境壓力與思覺失調症相關基因的互相作用關係(Moffitt et al., 2005)

### 九、運動與思覺失調症的相關性

長期以來，海馬迴一直參與在許多精神疾病研究中扮演重要的關鍵角色 (Bloom, 1975; Holsboer, 1988)。其在病理學中的關鍵作用為學習和記憶，認知，對壓力的反應以及對情緒和情緒的調節中的生理有緊密相關(Armstrong et al., 1993; Bruel-Jungerman et al., 2007; Reif et al., 2007)。與其他精神障礙如抑鬱症(depression)，創傷後壓力症候群(posttraumatic stress disorder)和阿茲海默病(Alzheimer's disease)相比，思覺失調對於灰質和白質的疾病相關性減少具有最強大的臨床證據，包括慢性思覺失調症患者被評估有較小的海馬體積(Wexler et al., 2009)。思覺失調症的海馬迴結構可能是由於異常神經發育和神經可塑性異常所致並且歸就於特定的潛在遺傳模式。整個生命過程中，在海馬產生新的神經元是大腦的細胞可塑性中一個特例(Altman and Das, 1965; Eriksson et al., 1998)，因為它涉及整個神經元的產生，遷移和整合，而不是只有在突觸和神經突起的變化。體育鍛煉增加成人神經發生(van Praag et al., 1999; Kronenberg et al., 2003)。思覺失調症行為症狀的改善與慢性思覺失調症患者的海馬結構和功能的正向改變相關(Pajonk et al., 2010)。有趣的是，思覺失調症患者的某些認知和行為功能在患者接受了運動項目後有所改善(Beebe et al., 2005; Duraiswamy et al., 2007)。由於自主性運動刺激成年海馬神經發生，在思覺失調症海馬迴功能和成人海馬迴神經新生中的神經心理症狀之間建立關聯。一些理論文獻已經概述了成年神經新生失敗可能導致思覺失調症(Reif et al., 2007; Kempermann et al., 2008; Mazzanti et al., 2018)。

### 十、三甲基甘胺酸(trimethylglycine)

三甲基甘胺酸(trimethylglycine)俗稱甜菜鹼(betaine)，存在動植物體內例如：在小麥、菠菜及甜菜等，其中以甜菜內富含量最高，而在動物體內三甲基甘胺酸是由膽鹼(choline)經由乙醛三甲基甘胺酸(trimethylglycine aldehyde)代謝成三甲基甘胺酸。

三甲基甘胺酸在轉換成二甲基甘胺酸的過程中，會將甲基提供給同半胱胺酸(homocysteine)合成甲硫胺酸(methionine)(Finkelstein et al., 1972 ;(Millian and Garrow, 1998; Craig, 2004)進而降低體內同半胱胺酸的濃度。體內過多的同半胱胺酸會增加心血管疾病的發生率(Finkelstein et al., 1972; Baszczuk and Kopczynski, 2014)

及提高中風的機會(Cotlarciuc et al., 2014)。血液中內過多的同半胱胺酸，會影響血液滲透壓的變化，過去的研究觀察到三甲基甘胺酸可以抑制同半胱胺酸引起 tau protein 的 hyperphosphorylation(Jung et al., 2013)以及 amyloid- $\beta$  ( $A\beta$ ) 的沉積而引起的阿茲海默症(Alzheimer disease)(Hooshmand et al., 2010; Chai et al., 2013; Liu et al., 2014)，另外動物實驗中也發現三甲基甘胺酸可以保護重金屬鎘所引發的腎毒性所產生的氧化壓力(Prozialeck and Edwards, 2012; Hagar and Al Malki, 2014)，預防過量酒精所造成的發炎反應及氧化壓力，也有助於預防神經退化性疾病的發生(Kharbanda, 2007)，三甲基甘胺酸也可以改善由葛蘭式陰性菌內毒素 lipopolysaccharide (LPS)所造成神經發炎及氧化壓力，回復記憶及認知功能的缺失(Tanaka et al., 2006; Miwa et al., 2011)。

本研究使用三甲基甘胺酸檢測是否可以改善母體免疫激活引發子代之神經精神異常，因三甲基甘胺酸具備甘胺酸 (glycine) 之分子結構而影響 NMDA 受體的活性。先前研究發現，三甲基甘胺酸與 glutamate 一起作用時，會明顯的提高 NMDA (N-methyl-D-aspartate) 受體的活性，然而甘胺酸與麩胺酸(glutamate)並用引發的 NMDA 受體的活性，卻會被三甲基甘胺酸所減弱。因此推測三甲基甘胺酸似乎具有 NMDA 受體的 partial co-agonist 的性質，而得以改善母體免疫激活所引起子代的精神分裂等疾病。

## 貳、實驗動機與目的

台灣過去 20 年來，失業、離婚、自殺率上升，精神疾病盛行率也倍增。據最新一期《全民健康保險醫療統計年報》，2017 年台灣精神科門診人數近 260 萬人 (2,570,090 人)，可見有精神困擾的民眾極多。近幾十年來，工商社會快速發展，科技蓬勃興起，追求個人表現卓越不被社會淘汰，潛移默化地影響了大眾的生活方式，同時也造成了更多無形的社會壓力與人際關係困擾。在個體體質因素上，再加上生活環境壓力上種種的觸發，造成神經化學上的功能失調產生精神疾病，伴隨行為異常具有被害妄想、幻聽幻覺、精神分裂、認知功能受損及社交行為低下等等。

現在科學家們都積極地找尋瞭解精神疾病，並且幫助罹患精神疾病減緩或調整神經化學功能失調的狀況，使患者正常的回歸社會，針對這點我們希望天然的營養食品或

是經常性運動健身能協助少年的腦部神經正常發展，因此探討天然食品與運動對精神疾病最佳的治療時機，並深入了解其作用機制為目標。本研究是利用母體免疫激活引發子代產生類思覺失調症神經精神疾病的動物模式，探討天然食品甜菜鹼(trimethylglycine)與運動對腦的功能性及認知功能和行為異常之預防及治療效用。

## 參、實驗材料與方法

### 第一節：材料

#### 1.1 實驗動物模式

本研究之實驗動物為 6 至 8 週母性 ICR 品系小白鼠，購自樂斯科生物科技股份有限公司。第一天的一次交配被定義為懷孕的第 0 天 (E0)。從 E12 至 E17 連續 6 天，將懷孕小鼠腹膜內 (IP) 注射溶於 0.9% NaCl 中的 Poly(i:c) (5.0 mg/kg, 0.1 ml/10 g 體重) 或等體積的 NaCl。子代與他們的母親在第三週之後分離，並將雄性小鼠用於實驗並分別以 5 至 6 個群體籠養。所有小鼠之飼養條件維持 12 小時光照和 12 小時黑暗的生理狀況。室溫控制在  $23\pm 1^{\circ}\text{C}$ ，濕度維持在  $60\pm 10\%$ ，飼養期間供應充足之飲水及標準飼料。

#### 體能運動模式(physical exercise)：

實驗小鼠最初被籠養在標準籠子 46cm×22cm×12.5cm (長×寬×高) 籠子裡。分組後的小鼠根據實驗時程安排，分別在第四十天和第七十天將小鼠飼養在尺寸為 67.0cm×30.5cm×19cm (長×寬×高) 的較大型籠子中，5 - 6 隻為一籠。上方放有鐵架利於擺設水瓶與飼料。除了基本墊料，小鼠一般食物和飲用水之外，還包含碟型運轉盤與活動型輪球，如圖六。每 4 - 5 天動物標準水瓶中會提供的新飲用水和飼料，並且清潔墊料與碟型運轉盤。



圖 6、體能運動模式

## 1.2 實驗藥品配置：

### 1.2.1 聚核糖肌苷酸 - 聚核糖酸 (polyriboinosinic-polyribocytidilic acid)

聚核糖肌苷酸 - 聚核糖酸【 Poly(i:c) 】購自 Sigma-Aldrich Co. 施打之劑量以 0.9% NaCl 溶液溶解配製成所需濃度：

Poly(i:c) 0.5 mg/ml，以 1 ml/100g 體重方式（5 mg/kg 投藥劑量，腹腔注射）

### 1.2.2 治療藥物方式與組別

三甲基甘胺酸 N,N,N-trimethylglycine (TMG)

購自 Sigma-Aldrich Co. 施打之劑量以 0.9% NaCl 溶液溶解配製成所需濃度：

(A). TMG 10 mg/ml，以 1 ml/100g 體重方式（100 mg/kg 投藥劑量，腹腔注射）

(B). TMG 30 mg/ml，以 1 ml/100g 體重方式（300 mg/kg 投藥劑量，腹腔注射）

## 1.3 周邊血液免疫測試溶液配置：

### 1.3.1 ACK (Ammonium-Chloride-Potassium) (1L)

(a) NaCl-8.02 g, (b) KHCO<sub>3</sub>-1 g, (c) Na<sub>2</sub>EDTA-37.2 mg, 溶於 1 L 的過濾二次水內，攪拌均勻，PH 值調整至 7.4。

### 1.3.2 Flow buffer(1L)

(a) KCl-250 mg, (b) KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-250 mg, (c) NaCl-10 g, (d) Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-1.4375 g, (e) NaCl-1 g, (f) FBS 1 ml, 溶於 1 L 的過濾二次水內。

### 1.3.3 4% Paraformaldehyde in PBS (2 L)

(a) KCl-250 mg, (b) KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-250 mg, (c) NaCl-10 g, (d) Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-1.4375 g,

(e) Paraformaldehyde-80 g，加入 NaOH 助溶，加入過濾二次水至 2L，最後 pH

調整至 7.4

1.4 灌流溶液配置：

1.4.1 0.9% saline (1L)

將 9 g 的 NaCl 溶於 1 L 的過濾二次水內，攪拌均勻，PH 值調整至 7.4。

1.4.2 4% Paraformaldehyde in PBS(2 L)

(a) KCl-250 mg, (b)  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ -250 mg, (c) NaCl-10 g, (d)  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ -1.4375 g,

(e) Paraformaldehyde-80 g，加入 NaOH 助溶，加入過濾二次水至 2L，最後 PH

調整至 7.4。

1.4.3 15% sucrose (1L)

(a) KCl-0.2 g, (b)  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ -0.2 g, (c) NaCl-8 g, (d)  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ -1.15 g,

(e) sucrose-150 g

1.4.4 30% sucrose (1L)

(a) KCl-0.2 g, (b)  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ -0.2 g, (c) NaCl-8 g, (d)  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ -1.15 g,

(e) sucrose-300 g

1.5 免疫組織化學染色法 (Immunohistochemistry, IHC)

1.5.1 0.1 X PBS (2L)

(a)  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  – 18.4 g, (b)  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  – 5.04 g, (c) NaCl – 17.5 g,

(d) KCl – 0.4 g

1.5.2 0.1 X PBS + Triton X-100 (1L)

(a)  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  – 9.2 g, (b)  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  – 2.52 g, (c) NaCl – 8.75 g,

(d) KCl – 0.2 g, (e) Triton X-100 – 2 ml

1.5.3 0.4 M Na-K PB (2L)

(a)  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  – 112 g, (b)  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  – 21.2 g,

1.5.4 0.1 M Na-K PB (1L)

(a) 0.4 M Na-K PB – 250 ml, (b) dd $\text{H}_2\text{O}$  – 750 ml

1.5.5 0.4 M Na-K PB+Sodium Azide (1L)

(a) 0.4 M Na-K PB – 250 ml, (b) dd $\text{H}_2\text{O}$  – 750 ml, (c) Sodium Azide – 1 g

表 1、其他藥品

1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine(MPTP)	Sigma
氯化鈉(NaCl)	J.T.Baker

聚甲醛(paraformaldehyde)	MERCK
蔗糖(sucrose)	MERCK
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	J.T.Baker
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Sigma
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Sigma
KCl	Sigma
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	J.T.Baker
3',3 – diaminobenzidine (DAB)	Sigma
Nickel	Sigma
Sodium Azide	MERCK
Triton X-100	J.T.Baker
Methanol	Milipore Co.
Stripping buffer	Bio-East Co.

表 2、免疫組織染色抗體

廠商	抗體	一抗	一抗稀釋比例	二抗	二抗稀釋比例
MERCK	Parvalbumin	Mouse	1:1000	Mouse	1:1000
MERCK	NMDAR1	Rabbit	1:250	Rabbit	1:1000

## 2. 實驗儀器

低溫高速離心機

去離子水製造機

微量天秤

蠕動式幫浦

迴轉式搖盪機 (orbital shaker)

恆溫加熱器 (digital water bath model)

酸鹼度計 (pH meter)

流式細胞儀 (flow cytometry)

冷凍切片機 (vibratome)

螢光顯微鏡 (light microscope)

CCD 照相機



## 第二節：動物實驗方法與流程步驟

### 1. 動物行為測試

#### 1.1 開放式空間測試(open field locomotion test)

此方法用來測量小鼠活動能力，在配有即時影像的場地（42cm 長×42cm 寬×65cm 高（SINGA Real – Time Trace System, ver. 1.17, Taipei, Taiwan）在開放室空間運動測試之前，允許小鼠在場地中進行 30 分鐘適應。適應後自由探索 15 分鐘，每一隻小鼠結束後將會使用 70% 乙醇清潔行為箱。在該測試中，將總距離經過的小鼠用於統計分析。分析項目包含總移動距離(total traveled distance)、平均移動速度、最大移動速度(maximal speed)。

#### 1.2 三隔間社交偏好實驗(three chamber social preference test)

本實驗用以測量老鼠的社交互動(sociability)與社交偏好(social preference)之能力，如圖七所示(Moy et al., 2004)。實驗器材為一個區分為三個小區塊(寬 40cm x 長 60cm x 高 30.5cm)的壓克力箱，區塊間皆有一個寬為 20 公分的通道。首先在適應階段，待測鼠可以自由探索三個區塊 5 分鐘。再來分為兩階段，第一階段，在左右區塊隨機放待測小鼠不熟悉的一般型公鼠(陌生鼠 1)於直徑 12.5 公分高為 22 公分的圓柱體內，並開始觀察 5 分鐘，待測鼠可以自由選擇進入有陌生鼠或是空無一物的空間，檢測小鼠的社會活動能力。接著，於第二階段實驗中，為測量待測鼠的社交偏好能力，在另一區塊放置一隻新的一般型公鼠(陌生鼠 2)，待測鼠可以自由選擇進入有陌生鼠 1 或是陌生鼠 2 存在的空間，測量時間也為 5 分鐘。最後分析各階段分別在不同區塊所停留的時間。

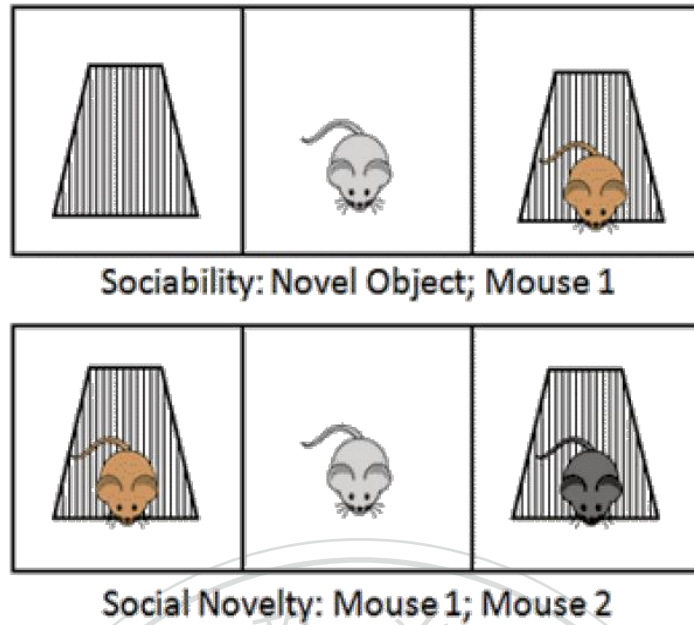


圖 7、三隔間社交偏好實驗(three chamber social preference test)流程圖

### 1.3 大理石埋藏實驗(marble burying)

此實驗為精神障礙老鼠常出現的刻板行為，例如重複的梳理和挖掘(Angoa-Pérez et al., 2013)。本實驗是以檢測重複的挖掘行為，用以(長 46cmx 寬 22cmx 高 12.5cm)籠子鋪上乾淨，無味墊料 5 公分高，將 5 x 4 個的標準玻璃彈珠（各式各樣和顏色，直徑 15 毫米，重量 5.2 克）彈珠輕輕放在鋪墊表面上如圖八所示。接著將待測鼠小心地放在鋪上角落盡可能遠離彈子，並將過濾頂蓋放在籠子上。在測試期間扣留食物和水。讓老鼠保持 15 分鐘不受干擾的籠子裡。在完成測試後，再將籠中的小鼠移出，且格外小心避免移動或移出彈珠。用 70%乙醇洗滌劑清洗彈珠，再經由去離子水中徹底沖洗，並在每次使用前晾乾。計算方式以埋入的彈珠數量而訂，如果三分之二的表面區域被墊料覆蓋，則將大理石掩埋評分為得 5 分計算；二分之一的表面區域被覆蓋則為 2.5 分計算，最後每隻實驗老鼠埋藏的彈珠平均得分為測驗值。



圖 8、大理石埋藏實驗(marble burying)

#### 1.4 束縛壓力實驗(acute restraint stress)

約束性壓力被認為是一種簡單且無痛的壓力模型，不會造成持久的損傷(Buynitsky and Mostofsky, 2009)。此被認為是一種能造成心理壓力的模型，且類似於禁閉的自然體驗(Dhabhar and McEwen, 1996)。約束力裝置由塑料圓柱約束管（直徑 5 公分，長度約 10 公分，可調整）組成，用於個別約束，固定在裝有墊料的籠子裡，尾巴和鼻子皆有通風孔，管子的設計為防止疼痛和壓縮。每一次的老鼠約束時間為 2 小時。2 小時的時間被認為足以激活 HPA 軸，增加循環皮質酮水平，造成壓力的產生 (Echeverry et al., 2004; Buynitsky and Mostofsky, 2009)。



## 圖 9、束縛壓力實驗(acute restraint stress)

### 1.5 前脈衝抑制測試 (prepulse inhibition test , PPI)

Sensorimotor gating 失能的現象廣泛的出現於神經精神疾病中，指的是對外界刺激的過濾能力，例如思覺失調症的病理假說是患者出現 gating deficient 的認知障礙 (Geyer et al., 1993; Mena et al., 2016)，已經有許多研究證實前脈衝抑制測試可以檢視精神疾病狀況(Valsamis and Schmid, 2011)。驚嚇反應測試箱之長寬高分別為 38、41、58 公分，每個箱中皆有一長 12.5 x 寬 25 公分的壓克力板，其上方放置直徑 8.2 公分透明壓克力圓筒，可將小白鼠放置其中，並由前後各一片 0.2 公分的透明壓克力面板封閉出入口，將小白鼠固定在圓筒內，但小白鼠仍可以在其中轉身。透明壓克力圓筒上方 24 公分放置高頻揚聲器(radio shack super tweeter)，可經由微電腦控制背景噪音與聽覺刺激之音量。位於壓克力板下的電壓加速度計可以接收並轉換其上方小白鼠震動的強度，並由穩定計量器在每 1 毫秒收取 100 個數據後，傳入主控電腦(SR-LAB)並透過介面配件將其校正並以數字(0-4095)的方式並在電腦螢幕呈現並存入檔案。驚嚇反應振幅之大小定義為 100 個數據之平均值。聽覺刺激之音量與接受反應之敏感度皆需要校正，使用分貝計測量音量強度，每個測試箱之間最大差異值應小於百分之一；藉由振幅校正系統測量接收震動之敏感度，每個測試箱之間最大差異值應小於百分之五。在背景噪音(background noise, 65 dB)下，動物適應 5 分鐘之後開始進行測試。給予聽覺刺激測試分為三個的階段：第一及最後階段分別僅接受單一刺激 (pulse-alone, 120 dB, 40 ms)；中間階段測試項目有三種：a. 無刺激(no stimuli)、b. 單一刺激(pulse-alone, 120 dB, 40 ms)、c. 伴隨前脈衝的刺激(prepulse-pulse, 高於背景噪音 4 dB (69 dB)、8 dB (73 dB)、12 dB (77 dB)，20 ms，測試順序 使用偽亂數(pseudorandom)方法排列，平均測試間隔約 15 秒。其驚嚇反應振幅的大小取第一階段之數據，前脈衝抑制作用的數值則是取中間階段之驚嚇刺激振幅計算。該種方式較能敏感地測得藥物對於驚嚇振幅與 PPI 的作用，而不會因對驚嚇刺激的適應性 (habituation)所干擾。以上實驗設計參考 Geyer 與 Swerdlow 編寫之實驗設計流程。

### 2. 流式細胞分析(flow cytometric analysis)

流式細胞技術是一門細胞量化技術，可測量懸浮細胞的各種物理及化學性質；分析白血球的功能及性質，對免疫功能的監控具有重要的價值。本實驗使用血球樣品：在微量離心管中先加入 10-20ul 的 0.5M EDTA，透過臉頰採血約 100-500ul，之後加入

500ul ACK 靜置約 3-5 分鐘後以 8000 rpm 室溫離心 5 分鐘，用 flow buffer 回溶染色。將收集到的樣品依據不同處理分別加入 TCR $\beta$  chain (1:500, Biolegend)、CD45R/B220 (1:250, Biolegend)、CD11c (1:200, Biolegend)、CD11b (1:500, Biolegend)、CD86 (1:100, Biolegend)、MHC class II (1:200, Biolegend)、CD206 (MMR, 1:250, Biolegend) 抗體，細胞與抗體在 4°C 避光作用 1 小時後以 500 xg 離心 5 分鐘，並以 flow buffer 清洗 1 次，藉此洗去未標定的抗體，之後加入 100 ul flow buffer 以及等體積的 4% paraformaldehyde solution (PFA) 固定，樣品存放在 4°C。

使用流式細胞儀(Beckman Coulter CytoFLEX)分析每個樣品，先調整 forward scatter 與 side scatter 電壓值，利用細胞大小及顆粒性選取出活細胞群，收集 10,000 細胞已進行分析。根據細胞類型不同，透過以下不同標記抗體是否表現來區分：

表 3、流式細胞分析之標記抗體

細胞類型	標記抗體
巨噬細胞 (macrophage) 和 單核細胞 (monocyte)	CD11b <sup>+</sup>
T-細胞(T-cell)	TCR <sup>+</sup>
B-細胞(B-cell)	CD45R <sup>+</sup>

### 3. 免疫組織化學染色法(Immunohistochemistry, IHC)

#### 3.1 腦組織的灌流製備與切片

將小鼠麻醉後，以鑷子夾住胸腔表皮，用手術剪剪開胸腔及橫隔膜，露出心臟後，將生理食鹽水(0.9% NaCl)灌入左心室數分鐘清除血液，在灌入固定液(4% paraformaldehyde, PFA)十分鐘，將腦組織取出浸泡在固定液中靜置 24 小時，在浸泡於 15% sucrose 溶液中隔夜，再將腦組織換至 30% sucrose 溶液中浸泡兩天。而後將固定好的腦組織儲存再-80°C 冰箱中。腦組織切片時，利用冷凍切片機(Leica, 3050S)以冠狀面向的方式切出厚度 10  $\mu$ m 組織切片，貼覆在 coating poly-L-Lysine 處理的載玻片(Thermo)。

#### 3.2 腦組織染色

將組織切片以 0.1 M phosphate buffer saline (PBS) 洗三次各五分鐘，而後浸泡在 0.2% Triton X-100/PBS 溶液中 10 分鐘將細胞打洞，再放入 10% MeOH/3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+0.2 Triton X-100/PBS 混合溶液中 5 分鐘去除內生性 peroxidase，反應完立即放入 0.1 M

PBS 中清洗三次各五分鐘，接著放入 3% normal goat serum + PBS 溶液中 1 小時，去掉背景值，再換至初級抗體中反應 16 小時以上。初級抗體包含 mouse anti-Parvalbumin antibody (1:1000, MERCK)、rabbit anti-NMDAR1 antibody (1:150, MERCK)。第二天先以 0.1 M PBS 洗四次，每次五分鐘，再放入二級抗體中反應 1 小時，二級抗體、Alexa Fluor 555 goat anti-mouse (1:1000, abcam)、Alexa Fluor 555 goat anti-rabbit (1:200, abcam)。反應完後以 0.1 M PBS 清洗四次，每次各五分鐘，再放入 Hoechst 33342 Solution (1:10000, Thermo) 中反應 1 小時染細胞核，反應完後以 0.1 M PBS 清洗兩次，每次五分鐘。最後在將載玻片蓋上玻片，以 Mounting medium (Fisher) 封片完後，利用顯微鏡 (Zeiss, ImagerD2) 觀察組織切片，同時利用 CCD 相機 (Hamamatsu, C10600) 拍照存檔分析。

### 三、實驗數據分析

實驗結果之數據以平均值  $\pm$  標準誤差 (means  $\pm$  S.E.M) 來表示取得資料之平均值。在小鼠模式，統計上的差異以單向變異分析 (one way analysis of variance) 來建立，並以 Student-Newman-Keuls test 進行後測，將  $p < 0.05$  視為有統計上的顯著差異。

## 肆、實驗設計

### 實驗一：評估三甲基甘胺酸及體能運動對母體免疫激活所引起的精神異常行為的治療效果

#### 1.1. 建立母體免疫激活引起的子代有精神疾病模型

先前有研究指出母體免疫激活造成子代行為異常，包括：活動能力、探索活動力下降或者焦慮 (anxiety)、社交行為缺失 (social deficits) 的現象情形，此實驗是將懷孕母鼠腹膜內注射 Poly(i:c) 引發免疫反應。Poly(i:c) 暴露後利用開放式空間測試 (open field locomotion test) 及社交互動行為 (sociability) 等，來檢測母體產生免疫反應後造成子代的神經發育異常進而影響行為。確定動物行為異常後，再給予治療藥物評估其療效。

實驗流程為大約七週的母鼠和八週的公鼠以 2:1 的比例放入同一鼠籠做配種，隔天早上八點左右確認是否有陰道栓 (vaginal plug)，有則為懷孕第一天 (E0)。懷孕母鼠以

腹腔注射生理食鹽水或是 Poly(i:c) (5 mg/kg)每天一劑，在受孕後的第 12(E12)天到第 17(E17)天共給予連續六劑，子代將大約在第十九至二十一天出生，出生第三週後離乳。於第二十八天開始進行 locomotion 與 social interaction 測試，探討母體給予 Poly(i:C)引發免疫激活後，子代是否有的精神異常行為。

#### 1.2. 探討給予類心理壓力因素對精神異常模型的行為變化

受到母體免疫激活的子代在四週大時，經過行為檢測後確定在第二階段中有社交行為偏好缺失現象，接著給予束縛壓力測試引起類心理壓力，進而觀察是否加重精神狀況影響行為異常。於第四十二天給予急性束縛壓力實驗，將待測試鼠輕輕放入管子內，不會疼痛不刻意擠壓兩小時。壓力實驗結束後緊接著進行 locomotion 與 social interaction，檢測壓力是否增加母體免疫激活的子代敏感度，而加劇行為異常的變化。

#### 1.3. 探討母體免疫激活中引起的細胞因子變化是否影響子代

先前實驗瞭解使用 Poly(i:c)(5 mg/kg)能造成母體免疫激活的子代有社交行為缺失，此實驗目的為評估從母體受免疫刺激產生的細胞因子進而透過胎盤影響腦神經發育中的子代，並探討在子代出生免疫發炎現象是否還殘存在其身體裡。測試方式為使用顏面採血 (submandibular or facial vein) 採集實驗鼠周邊血液，利用 5 mm 寬的採血針往小鼠臉部靜脈刺穿，迅速收集約 0.2  $\mu$ l(佔小鼠血液量 7.5%)的血量，經過處理染色後的血液藉由流式細胞儀分析(flow cytometric analysis)，測試免疫反應。而採血過後的實驗小鼠必須經過一個禮拜的恢復期。

#### 1.4. 在成年階段給予三甲基甘胺酸及體能運動對母體免疫激活引起的子代之行為影響

前面結果顯示，Poly(i:c)(5 mg/kg)能造成母體免疫激活的子代有社交行為缺失且經由急性束縛壓力會使精神異常行為加重，而在子代也發現有細胞因子增加微發炎的現象。因而此實驗使用三甲基甘胺酸(trimethylglycine)及體能運動(physical exercise)是否能夠達到治療且改善母體免疫激活所造成之探索活動力下降或者焦慮 (anxiety)、社交行為缺失(social deficits)及重複行為(repetitive behaviours)的情形。

在待測試小鼠成年時期，第七十天到第八十四天以腹腔注射給予小鼠生理食鹽水或是三甲基甘胺酸(100 mg/kg)和體能運動治療，連續給予兩週後的三甲基甘胺酸和持續性的運動後，於第八十四天開始進行 locomotion、social interaction 與 marble burying test，探討連續給予三甲基甘胺酸和自主性運動兩週後，是否可以改善 MIA 所引起的子代精神異常行為。

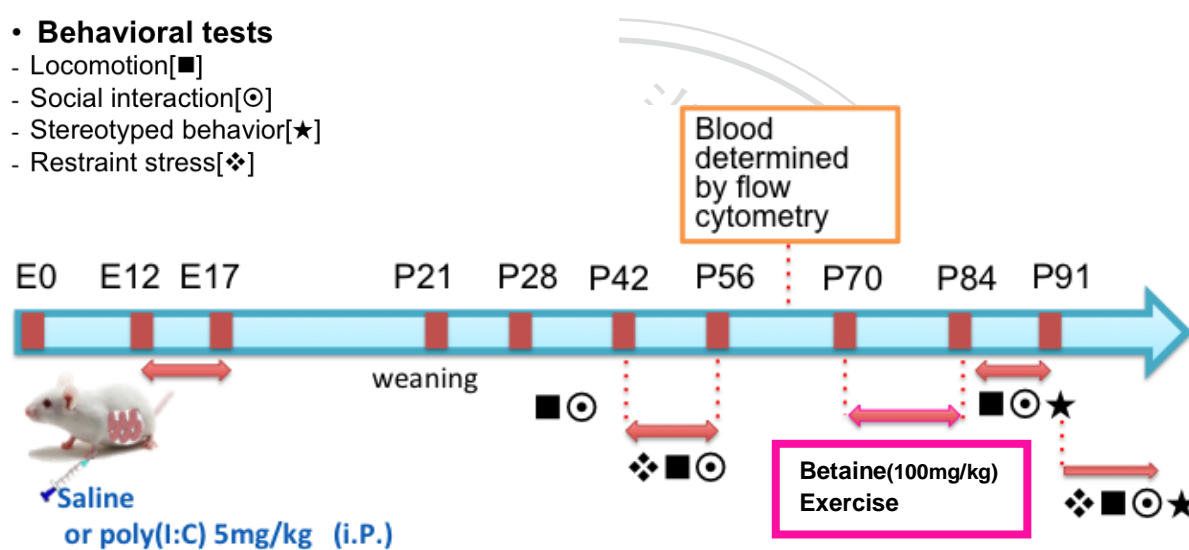
#### 1.5. 探討母體免疫激活的子代經過三甲基甘胺酸及體能運動治療後，給予類心理壓力

## 因素的行為變化

母體免疫激活的子代經過行為檢測後確定有社交行為偏好缺失現象，而接著給予三甲基甘胺酸和自主性運動兩種治療方式兩週的時間，行為測試有改善現象。為了瞭解治療作用對於急性壓力是否能減緩精神行為異常。於第九十天給予急性束縛壓力實驗，將待測試鼠輕輕放入管子內，不會疼痛不刻意擠壓兩小時。壓力實驗結束後緊接著進行 locomotion 與 social interaction，一樣檢測壓力是否增加母體免疫激活的子代敏感度，透過三甲基甘胺酸與自主性運動治療後是否有挽救行為異常變化，並於完成急性壓力測試實驗後進行小鼠犧牲，留取大腦做後續分生檢測。

### • Behavioral tests

- Locomotion[■]
- Social interaction[⊙]
- Stereotyped behavior[★]
- Restraint stress[❖]



## 實驗二：評估三甲基甘胺酸及體能運動對母體免疫激活所引起的精神異常行為的預防效果

### 2.1. 建立母體免疫激活引起的子代有類思覺失調模型

實驗目的在檢測若在少年與青少年時期給予三甲基甘胺酸及體能運動，是否能夠產生對母體免疫激活所造成的子代有行為異常具有保護效果。實驗一結果顯示在待測鼠成年時期個別使用三甲基甘胺酸(100 mg/kg)及自主性運動都能夠達到治療且改善 MIA 所造成子代有活動能力、探索活動力下降或者焦慮、社交行為缺失的情形。而首先一樣確定產生動物行為異常模型後，再給予藥物評估其療效。

如同上個實驗，大約七週的母鼠和八週的公鼠以 2:1 的比例放入同一鼠籠做配種，隔天八點左右確認是否有陰道栓，有則為懷孕第一天。懷孕母鼠以腹腔注射生理食鹽水或是 Poly(i:c) (5 mg/kg)，在受孕後的第 12 天到第 17 天共給予連續六劑，子代將大



約在第 19-21 天出生，出生第三週後離乳。於第二十八天開始進行 locomotion 與 social interaction，探討母體再給予 Poly(i:c)引發免疫激活後，是否引起子代少年時期便有精神異常行為。

## 2.2. 在少年、青少年階段給予三甲基甘胺酸及體能運動對母體免疫激活引起的子代之行為影響

此次實驗，我們進行將三甲基甘胺酸測試不同劑量的效果與持續性的運動，並且針對少年、青少年時期給予預防性治療，測試方式使用 locomotion、social interaction 和測試 marble burying 等實驗方法。

實驗流程中於第四十二到第七十天，少年及青少年時期腹腔注射給予小鼠生理食鹽水或是三甲基甘胺酸(100 mg/kg)，三甲基甘胺酸(300 mg/kg)等不同劑量，同時組別中還有持續性的自主性體能運動，連續給予一個月的給藥和運動後，於第七十天開始進行 locomotion、social interaction 等實驗，探討在少年與青少年時期連續給予三甲基甘胺酸和自主性運動預防後，是否可以改善 MIA 所引起的子代精神異常行為。

## 2.3. 探討母體免疫激活的子代經過三甲基甘胺酸及體能運動預防後，給予類心理壓力因素的行為變化

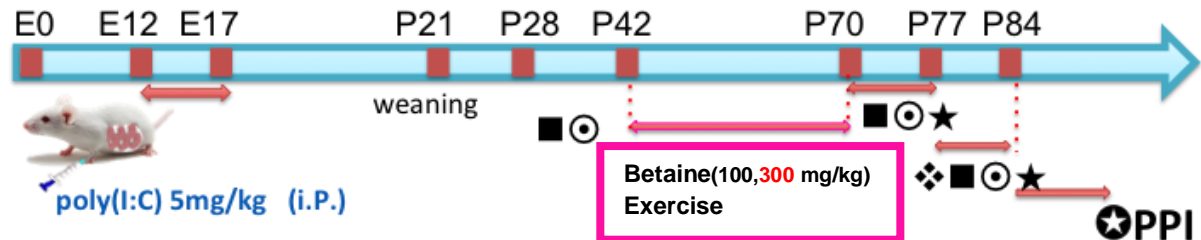
母體免疫激活的子代發病期間通常為青少年晚期及成年早期，先前實驗已經確定在少年及青少年持續的給予三甲基甘胺酸和自主性運動一個月以達到減緩精神異常行為，達到保護效果。為了瞭解早期給予三甲基甘胺酸和自主性運動是否能改善急性壓力加重的精神行為異常，於第七十七天給予急性束縛壓力實驗，將待測試鼠輕輕放入管子內，不會疼痛不刻意擠壓兩小時。壓力實驗結束後緊接著進行 locomotion 與 social interaction，一樣檢測壓力是否增加母體免疫激活的子代敏感度，透過三甲基甘胺酸與自主性運動提前預防後是否有挽救行為異常變化。

## 2.4 三甲基甘胺酸及體能運動對母體免疫激活引起子代中有類思覺失調症正向症狀的影響

先前實驗瞭解個別使用三甲基甘胺酸(100 mg/kg)、(300 mg/kg)不同劑量都能夠達到預防效果，在持續的體能運動中也有看到改善其 MIA 所造成之子代有活動能力、探索活動力下降或者焦慮、社交行為缺失的情形，而這些偏向為負向症狀。因此，此次實驗目的為評估失覺失調症中的正向症狀，測試方式使用前脈衝抑制測試 (prepulse inhibition test, PPI)之知覺敏感性實驗方法，並於完成此實驗後進行小鼠犧牲，留取大腦做後續分生檢測。

- Behavioral tests

- Locomotion[■]
- Social interaction[⊙]
- Stereotyped behavior[★]
- Restraint stress[❖]



### 實驗三：三甲基甘胺酸及體能運動及母體免疫激活對 GABAergic interneurons 所造成之影響

母體免疫激活的子代會造成有類似思覺失調症的現象，如同前額葉皮質內之 GABA (gamma-aminobutyric acid) 抑制神經元的減少，GABA 中間神經元是中樞神經系統 (CNS) 中的主要抑制性神經元，調節皮層和海馬神經迴路和活動，功能失調的 GABA 中間神經元會破壞皮層中的興奮/抑制 (E/I) 平衡，這可能是精神分裂症中認知功能障礙潛在的核心病理生理學機制。因此本研究目的將要探討給予三甲基甘胺酸及體能運動能夠回復 MIA 所造成的子代社交互動行為的缺失，是否因為 GABA 中間神經元回復，而改善前額葉皮質的受損，進而改善動物行為表現。實驗流程為相同的給藥治療方式，使用免疫染色法，取出老鼠前額葉皮質，觀察 GABA 中間神經元表現量，並與行為做對比。

### 實驗四：三甲基甘胺酸及體能運動及母體免疫激活對 NMDA receptors 所造成之影響

思覺失調症有關的病理現象可能由產前感染和壓力影響 NMDA 受體。思覺失調症中 NMDAR 功能低下的假設一直在，它可能是此疾病的最主要症狀影響。特別是在海馬體的迴路，在思覺失調症人群中表現出 NMDAR 表現減少。產前感染的動物模型與思覺失調症有關的特徵性行為表型符合，因此研究目的將要探討給予三甲基甘胺酸及體能運動能夠回復 MIA 所造成的子代社交互動行為的缺失，是否因為 NMDAR 的回

復，而改善海馬迴神經元的受損，進而改善動物行為表現。實驗流程為相同的給藥治療方式，使用免疫染色法，取出老鼠海馬迴，觀察 NMDA receptor 的 NMDA type subunit 1 (NR1) 表現量，並與行為做比對。

## 伍、實驗結果

### 實驗一：三甲基甘胺酸及體能運動對母體免疫激活所引起的子代精神異常行為之影響

#### 1.1. 母體免疫激活引起的子代是否有精神疾病現象

##### 1.1.1 以開放式空間測試(open field locomotion test) 測試模式，連續給予六天 Poly(i:c)(5mg/kg) 或 saline 觀察產生的子代對於母體激活所造成的活動力影響

圖 10 顯示，不管是 saline 或 Poly(i:c) 組，兩組動物在 15 分鐘內相同空間的活動總距離的活動力並無任何差別( $p>0.05$ )。

##### 1.1.2 以三隔間社交偏好實驗(three chamber social preference test) 測試模式，連續給予六天 Poly(i:c)(5mg/kg) 或 saline 觀察產生的子代對於母體激活所造成的社交互動影響

在母體免疫激活的子代中發現有社交障礙的現象，因此我們使用以社會互動與新奇對象之探索比較給予 Poly(i:c) 的子代與 saline 組子代的社交能力(sociability)與社交偏好(social preference)實驗。圖 11 之 A 顯示，實驗第一階段(session I)，測試小鼠的社交能力，隨機選擇一端放入一隻年齡相仿的陌生公鼠(stranger1,S1)，發現無論是 poly(i:c) 或 saline 子代小鼠皆花較多時間停留在有 S1 的區域( $p<0.001$ )，兩者皆顯示有社交能力。圖 11 之 B 顯示，在實驗第二階段(session II)，測試小鼠的社交偏好，於 S1 所在的另一側再放入一隻新的年齡相仿的陌生公鼠(stranger2,S2)，發現 saline 子代小鼠顯著的停留較多時間在有 S2 區域，顯示其具有辨識新舊同類的的能力( $p<0.001$ )，而 poly(i:c) 子代卻無明顯偏好( $p>0.05$ )。由上述實驗可知，母體給予 poly(i:c) 所產生的子代小鼠在社交偏好上較 saline 組子代不足。

#### 1.2 觀察小鼠對於母體免疫激活所造成的精神異常，再給予類心理壓力因素是否對行為產生影響

受到母體免疫激活的子代在四週大時，經過行為檢測後確定在社交行為第二階段中

有偏好缺失現象，但在第一階段則與 saline 組相同無社交障礙，因此接著給予束縛壓力測試引起類心理壓力，進而觀察是否加重精神狀況影響行為異常。於第四十二天給予急性束縛壓力實驗，將待測試鼠輕輕放入管子內，不會疼痛不刻意擠壓兩小時。壓力實驗結束後緊接著進行 locomotion 與 social interaction，檢測壓力是否增加母體免疫激活的子代敏感度，進而加劇行為異常的變化。

1.2.1 以開放式空間測試(open field locomotion test)測試模式，連續給予六天 Poly(i:c)(5mg/kg)之後再給予心理壓力觀察子代對於母體激活所造成的活動力影響

圖 12 顯示，不管是 saline 或 Poly(i:c)組，兩組動物在 15 分鐘內相同空間的活動總距離的活動力上並無任何的差別( $p>0.05$ )。

1.2.2 以三隔間社交偏好實驗(three chamber social preference test)測試模式，連續給予六天 Poly(i:c)(5mg/kg) 之後再給予心理壓力觀察子代對於母體激活所造成的社交互動影響

圖 13 之 A 中顯示，在實驗第一階段(session I)，測試小鼠的社交能力，隨機選擇一端放入一隻年齡相仿的陌生公鼠(stranger1,S1)，發現 saline 子代小鼠顯著的花較多時間停留在有 S1 的區域( $p<0.001$ )，而 Poly(i:c)子代則無明顯偏好( $p>0.05$ )，表示 Poly(i:c)子代小鼠在社交能力上有明顯缺失。圖 13 之 B 中顯示，在實驗第二階段(session II)，測試小鼠的社交偏好，於 S1 所在的另一側再放入一隻新的年齡相仿的陌生公鼠(stranger2,S2)，發現 saline 子代小鼠顯著的停留較多時間在有 S2 區域，顯示其具有辨識新舊同類的能力( $p<0.001$ )，而 Poly(i:c)子代卻仍無明顯偏好( $p>0.05$ )。由上述實驗可知，Poly(i:c)子代小鼠給予心理壓力會誘發更激烈的精神異常因此在社交能力或是社交偏好上都較 saline 組子代不足。

1.3 母體免疫激活中引起的細胞因子變化是否影響給子代

先前實驗發現 Poly(i:c)能造成母體免疫激活的子代有社交行為缺失，此實驗目的為評估從母體受免疫刺激產生的細胞因子是否進而透過胎盤影響腦神經發育中的子代，並探討在子代出生免疫發炎現象是否還殘存在其身體裡。藉由流式細胞儀分析(flow cytometric analysis)測試免疫反應，首先我們使用了 CD11b<sup>+</sup>巨噬細胞的表面抗原，來標記巨噬細胞群為 CD11b<sup>+</sup>細胞，接著 CD86 為巨噬細胞活化的標記物，和 MHCII 為 APC 抗原呈現細胞上的分子，代表 T helper cell 可能被活化。圖 14 顯示，CD11b<sup>+</sup>細

胞標記中發現，CD86 標記的表現量 Poly(i:c)子代小鼠與 saline 組子代 分別是 16.75%及 9.89%。而 MHCII 的標記表現量顯示，Poly(i:c)子代小鼠與 saline 組子代分別是 7.95%及 0.68%。由上述實驗可知，母體免疫發炎造成子代小鼠有高含量的發炎表現。

1.4 在成年階段連續給予三甲基甘胺酸及體能運動兩週後對母體免疫激活引起的子代之行為影響

1.4.1 以開放式空間測試(open field locomotion test)測試模式，連續給予三甲基甘胺酸(100mg/kg)及體能運動兩週後子代對於母體免疫激活所造成的活動力影響

圖 15 之 A 顯示，不管是 saline 或 Poly(i:c)組子代給予三甲基甘胺酸(betaine)與運動(exercise)不同治療，六組動物在相同空間的活動總距離對於小鼠活動力上並無任何差別( $p>0.05$ )。同時間還有測量中心活動距離可以顯示其焦慮狀況，圖 15 之 B 顯示，saline+saline 組與 Poly(i:c)+saline 組比較時，Poly(i:c)+saline 組在中心活動距離上有明顯減少( $p<0.001$ )，而在 Poly(i:c)+betaine(100mg/kg)與 Poly(i:c)+exercise 兩組在中心距離上與 Poly(i:c)+saline 相比，Poly(i:c)+betaine(100mg/kg)與 Poly(i:c)+exercise 有明顯增加中心活動距離( $p<0.001$ )，因此可以改善母體免疫激活造成的精神焦慮現象，從數據上顯示中心移動距離有回復情形。

1.4.2 以三隔間社交偏好實驗(three chamber social preference test)測試模式，連續給予三甲基甘胺酸(100mg/kg)及體能運動兩週後子代對於母體免疫激活所造成的社會互動影響

圖 16 之 A 顯示，在實驗第一階段(session I)，測試小鼠的社交能力，隨機選擇一端放入一隻年齡相仿的陌生公鼠(stranger1,S1)，saline+saline 組與 Poly(i:c)+saline 組相較之下，發現 saline+saline 組顯著的花較多時間停留在有 S1 的區域( $p<0.001$ )，而 Poly(i:c)+saline 組則無明顯偏好( $p>0.05$ )。而 Poly(i:c)+betaine(100mg/kg) 組也有顯著的花較多時間停留在有 S1 的區域( $p<0.001$ )而 Poly(i:c)+exercise 組在實驗中也觀察到，同樣具有社交能力回復現象( $p<0.001$ )。因此瞭解 Poly(i:c)子代小鼠給予 betaine 或運動治療能使在社交能力上有明顯改善。圖 16 之 B 中顯示在實驗第二階段(session II)，測試小鼠的社交偏好，於 S1 所在的另一側再放入一隻新的年齡相仿的陌生公鼠(stranger2,S2)，發現 saline+saline 組顯著的停留較多時間在有 S2 區域，顯示其具有

辨識新舊同類的能力( $p < 0.001$ )，而 Poly(i:c)+saline 組卻仍無明顯偏好( $p > 0.05$ )。如給予治療在 Poly(i:c)+betaine(100mg/kg)組與 Poly(i:c)+exercise 組中也觀察到停留較長時間在有 S2 區域，具有社交偏好能力回復現象( $p < 0.001$ )，由上述實驗可知，不管是給予 betaine 或是 exercise 都具有改善母體免疫發炎造成子代社交功能低下情形。

1.4.3 以大理石埋藏實驗(marble burying)測試模式，連續給予三甲基甘胺酸(100mg/kg)及體能運動兩週後子代對於母體激活所造成的精神障礙刻板行為影響

圖 17 顯示，不管是 saline+saline，saline+betaine，saline+exercise，Poly(i:c)+saline，Poly(i:c)+betaine，Poly(i:c)+exercise 等六組比較時，再檢測重複行為 marble burying 實驗中，這六組並沒有明顯差異( $p > 0.05$ )。

1.5 母體免疫激活的子代經過三甲基甘胺酸及體能運動治療後，給予類心理壓力因素是否產生行為影響

1.5.1 以開放式空間測試(open field locomotion test)測試模式，連續給予三甲基甘胺酸(100mg/kg)及體能運動兩週後再給予心理壓力使子代對於母體激活所造成的活動力影響

圖 18 之 A 中顯示，在給予精神壓力後的開放空間測試中，不管是 saline、Poly(i:c)子代給予三甲基甘胺酸(betaine)與運動(exercise)不同治療，六組動物在相同空間的活動總距離活動力上並無任何差別 ( $p > 0.05$ )，而同時還有測量中心活動距離可以顯示其焦慮狀況，圖 18 之 B 中顯示，saline+saline 組與 Poly(i:c)+saline 組比較時，Poly(i:c)+saline 組在中心活動距離上有明顯減少 ( $p < 0.001$ )，而在 Poly(i:c)+betaine(100mg/kg) 與 Poly(i:c)+exercise 兩組在中心距離上與 Poly(i:c)+saline 相比，Poly(i:c)+betaine(100mg/kg)與 Poly(i:c)+exercise 有明顯增加中心活動距離( $p < 0.001$ )，因此 betaine 與 exercise 治療對於給予心理壓力可以改善母體免疫激活造成的精神焦慮現象，從數據上顯示中心移動距離有回復情形。

1.5.2 以三隔間社交偏好實驗(three chamber social preference test)測試模式，連續給予三甲基甘胺酸(100mg/kg)及體能運動兩週後再給予心理壓力使子代對於母體激活所造成的社會互動影響

圖 19 之 A 中顯示，在實驗第一階段(session I)，測試小鼠的社交能力，隨機選擇

一端放入一隻年齡相仿的陌生公鼠(stranger1,S1)，saline+saline 組與 Poly(i:c)+saline 組相較之下，發現 saline+saline 組顯著的花較多時間停留在有 S1 的區域( $p<0.001$ )，而 Poly(i:c)+saline 組則無明顯偏好( $p>0.05$ )。而 Poly(i:c)+betaine(100mg/kg) 組也有顯著的花較多時間停留在有 S1 的區域( $p<0.001$ )而 Poly(i:c)+exercise 在實驗中也觀察到，同樣具有社交能力回復現象( $p<0.001$ )。因此瞭解 Poly(i:c)子代小鼠在社交能力上有明顯改善。圖 19 之 B 中顯示，實驗第二階段(session II)，測試小鼠的社交偏好，於 S1 所在的另一側再放入一隻新的年齡相仿的陌生公鼠(stranger2,S2)，發現 saline+saline 組顯著的停留較多時間在有 S2 區域，顯示其具有辨識新舊同類的的能力( $p<0.001$ )，而 Poly(i:c)+saline 組卻仍無明顯偏好( $p>0.05$ )。由上述實驗可知，Poly(i:c)子代小鼠給予心理壓力會誘發更激烈的精神異常但給予 betaine 與 exercise 治療後都有改善社交能力。

1.5.3 以大理石埋藏實驗(marble burying)測試模式，連續給予三甲基甘胺酸(100mg/kg)及體能運動兩週後再給予心理壓力使子代對於母體激活所造成的精神障礙刻板行為影響

圖 20 顯示，不管是 saline+saline，saline+betaine，saline+exercise，Poly(i:c)+saline，Poly(i:c)+betaine，Poly(i:c)+exercise 等六組比較時，在檢測重複行為 marble burying 實驗中，這六組並沒有明顯差異( $p>0.05$ )，顯示有無精神壓力影響在重複行為上都沒有任何差異。

## 實驗二：事前給予三甲基甘胺酸及體能運動是否預防母體免疫激活所引起的精神異常行為之影響

2.1. 母體免疫激活引起的子代是否有精神疾病現象

2.1.1 以開放式空間測試(open field locomotion test)測試模式，連續給予六天 Poly(i:c)(5mg/kg)或 saline 觀察產生的子代對於母體激活所造成的活動力影響。

圖 21 之 A 中顯示，不管是 saline、Poly(i:c)兩組動物在 15 分鐘內相同空間的活動總距離活動力上並無任何差別( $p>0.05$ )。而同時間檢測其中心活動距離可以顯示其焦慮狀況。圖 21 之 B 中顯示，Poly(i:c)子代較 saline 子代在中心活動距離上有明顯減少( $p<0.001$ )，因此母體免疫激活會造成的精神焦慮現象。

2.1.2 以三隔間社交偏好實驗(three chamber social preference test)測試模式，連續給予六天 Poly(i:c)(5mg/kg)或 saline 觀察產生的子代對於母體激活所造成的社交互動影響

在母體免疫激活的子代中會發現有社交障礙的現象，因此我們使用以社會互動與新奇事物之探索比較給予 Poly(i:c)的子代與 saline 組子代的社交能力(sociability)與社交偏好(social preference)實驗。圖 22 之 A 中顯示，在實驗第一階段(session I)，測試小鼠的社交能力，隨機選擇一端放入一隻年齡相仿的陌生公鼠(stranger1,S1)，發現 saline 子代小鼠有較明顯的停留在 S1 區域( $p<0.001$ )，而 Poly(i:c)也有停留在 S1 區域但比 saline 組子代略低一些( $p<0.05$ )，此與實驗一相符合。圖 22 之 B 中顯示在實驗第二階段(session II)，測試小鼠的社交偏好，於 S1 所在的另一側再放入一隻新的年齡相仿的陌生公鼠(stranger2,S2)，發現 saline 子代小鼠顯著的停留較多時間在有 S2 區域，顯示其具有辨識新舊同類的的能力( $p<0.001$ )，而 Poly(i:c)子代卻無明顯偏好( $p>0.05$ )。由上述實驗可知，母體給予 Poly(i:c)所產生的子代小鼠在社交偏好上較 saline 組子代不足。

2.2 在少年、青少年階段連續給予三甲基甘胺酸及體能運動四週後對母體免疫激活引起的子代之行為影響

2.2.1 以開放式空間測試(open field locomotion test)測試模式，連續給予三甲基甘胺酸(100 及 300 mg/kg)及體能運動四週後子代對於母體免疫激活所造成的活動力影響

圖 23 之 A 中顯示，不管是 saline+saline，saline+betaine，saline+exercise，Poly(i:c)+control，Poly(i:c)+saline，Poly(i:c)+betaine(100mg/kg)，Poly(i:c)+betaine(300mg/kg)，Poly(i:c)+exercise 等八組比較時，八組動物在相同空間的活動總距離活動力上並無任何差別( $p>0.05$ )。同時間還有測量中心活動距離可以顯示其焦慮狀況，圖 23 之 B 中顯示，saline+saline 組與 Poly(i:c)+control 和 Poly(i:c)+saline 組比較時，Poly(i:c)+control 和 Poly(i:c)+saline 組在中心活動距離上有明顯減少( $p<0.001$ )，而在 Poly(i:c)+betaine(100 或 300mg/kg)與 Poly(i:c)+exercise 兩組在中心距離上與 Poly(i:c)+control 和 Poly(i:c)+saline 相比，Poly(i:c)+betaine(100 或 300mg/kg)與 Poly(i:c)+exercise 有明顯增加中心活動距離( $p<0.001$ )，因此可以從數據上顯示中心移動距離增加可預防母體免疫激活造成子代的精神焦慮現象。



2.2.2 以三隔間社交偏好實驗(three chamber social preference test)測試模式，連續給予三甲基甘胺酸(100 及 300 mg/kg)及體能運動四週後子代對於母體免疫激活所造成的社交互動影響

圖 24 之 A 中顯示，在實驗第一階段(session I)，測試小鼠的社交能力，隨機選擇一端放入一隻年齡相仿的陌生公鼠(stranger1,S1)，saline+saline 組與 Poly(i:c)+control 和 Poly(i:c)+saline 組相較之下，發現 saline+saline 組顯著的花較多時間停留在有 S1 的區域( $p<0.001$ )，而 Poly(i:c)+control 和 Poly(i:c)+saline 組則無明顯偏好( $p>0.05$ )。而 Poly(i:c)+betaine(100 或 300mg/kg) 組也有顯著的花較多時間停留在有 S1 的區域( $p<0.001$ )而 Poly(i:c)+exercise 組在實驗中也觀察到，同樣具有社交能力回復現象( $p<0.001$ )。因此瞭解 Poly(i:c)子代小鼠給予 betaine 或 exercise 在社交能力上有明顯改善。圖 24 之 B 中顯示，實驗第二階段(session II)，測試小鼠的社交偏好，於 S1 所在的另一側再放入一隻新的年齡相仿的陌生公鼠(stranger2,S2)，發現 saline+saline 組顯著的停留較多時間在有 S2 區域，顯示其具有辨識新舊同類的能力( $p<0.001$ )，而 Poly(i:c)+saline 組卻仍無明顯偏好( $p>0.05$ )。如給予治療在 Poly(i:c)+betaine(100 或 300mg/kg)組與 Poly(i:c)+exercise 組中也觀察到停留較多時間在有 S2 區域，具有社交偏好能力回復現象( $p<0.001$ )，由上述實驗可知，不管是給予三甲基甘胺酸或是體能運動都具有挽救母體免疫發炎造成子代的社交功能低下情形。

2.2.3 以大理石埋藏實驗(marble burying)測試模式，連續給予三甲基甘胺酸(100 及 300 mg/kg)及體能運動四週後子代對於母體免疫激活所造成的精神障礙刻板行為影響

圖 25 顯示，不管是 saline+saline，saline+betaine，saline+exercise，Poly(i:c)+control，Poly(i:c)+saline，Poly(i:c)+betaine(100mg/kg)，Poly(i:c)+betaine(300mg/kg)，Poly(i:c)+exercise 等八組比較時，在檢測重複行為 marble burying 實驗中，這八組並沒有明顯差異( $p>0.05$ )。

2.3 母體免疫激活的子代經過三甲基甘胺酸及體能運動預防後，給予類心理壓力因素是否產生行為影響

2.3.1 以開放式空間測試(open field locomotion test)測試模式，連續給予三甲基甘胺酸(100 及 300 mg/kg)及體能運動四週後再給予心理壓力使子代對於母體免疫激活所造成的活動力影響

圖 26 之 A 中顯示，不管是 saline+saline，saline+betaine，saline+exercise，

Poly(i:c)+control ， Poly(i:c)+saline ， Poly(i:c)+betaine(100mg/kg) ， Poly(i:c)+betaine(300mg/kg) ， Poly(i:c)+exercise 等八組比較時，八組動物在相同空間的活動總距離活動力上並無任何差別( $p>0.05$ )。同時間還有測量中心活動距離可以顯示其焦慮狀況，圖 26 之 B 中顯示，saline+saline 組與 Poly(i:c)+control 和 Poly(i:c)+saline 組比較時，Poly(i:c)+control 和 Poly(i:c)+saline 組在中心活動距離上有明顯減少( $p<0.001$ )，而在 Poly(i:c)+betaine(100 或 300mg/kg)與 Poly(i:c)+exercise 兩組在中心距離上與 Poly(i:c)+control 和 Poly(i:c)+saline 相比，Poly(i:c)+betaine(100 或 300mg/kg)與 Poly(i:c)+exercise 有明顯增加中心活動距離( $p<0.001$ )，因此可以從數據上顯示中心移動距離增加顯示三甲基甘胺酸和體能運動可預防母體免疫激活後給予心理壓力造成更極端的精神焦慮現象。

2.3.2 以三隔間社交偏好實驗(three chamber social preference test)測試模式，連續給予三甲基甘胺酸(100 及 300 mg/kg)及體能運動四週再給予心理壓力使子代對於母體激活所造成的社會互動影響

圖 27 之 A 中顯示，在實驗第一階段(session I)，測試小鼠的社交能力，隨機選擇一端放入一隻年齡相仿的陌生公鼠(stranger1,S1)，saline+saline 組與 Poly(i:c)+control 和 Poly(i:c)+saline 組相較之下，發現 saline+saline 組顯著的花較多時間停留在有 S1 的區域( $p<0.001$ )，而 Poly(i:c)+control 和 Poly(i:c)+saline 組則無明顯偏好( $p>0.05$ )。而 Poly(i:c)+betaine(100 或 300mg/kg) 組也有顯著的花較多時間停留在有 S1 的區域( $p<0.001$ )而 Poly(i:c)+exercise 組在實驗中也觀察到，同樣具有社交能力回復現象( $p<0.001$ )。因此瞭解 Poly(i:c)子代小鼠給予三甲基甘胺酸或體能運動在社交能力上有明顯改善。圖 27 之 B 中顯示，實驗第二階段(session II)，測試小鼠的社交偏好，於 S1 所在的另一側再放入一隻新的年齡相仿的陌生公鼠(stranger2,S2)，發現 saline+saline 組顯著的停留較多時間在有 S2 區域，顯示其具有辨識新舊同類的能力( $p<0.001$ )，而 Poly(i:c)+saline 組卻仍無明顯偏好( $p>0.05$ )。如給予治療在 Poly(i:c)+betaine(100 或 300mg/kg)組與 Poly(i:c)+exercise 組中也觀察到停留較多時間在有 S2 區域，具有社交偏好能力回復現象( $p<0.001$ )，由上述實驗可知，不管是給予三甲基甘胺酸或是體能運動都具有挽救母體免疫激活後給予心理壓力造成社交功能低下情形。

2.3.3 以大理石埋藏實驗(marble burying)測試模式，連續給予三甲基甘胺酸(100 及 300 mg/kg)及體能運動四週後再給予心理壓力使子代對於母體激活所造成的精神障礙刻板行為影響

圖 28 顯示，不管是 saline+saline，saline+betaine，saline+exercise，Poly(i:c)+control，Poly(i:c)+saline，Poly(i:c)+betaine(100mg/kg)，Poly(i:c)+betaine(300mg/kg)，Poly(i:c)+exercise 等八組比較時，在檢測重複行為 marble burying 實驗中，這八組並沒有明顯差異( $p>0.05$ )。

2.4 三甲基甘胺酸及體能運動對母體免疫激活引起子代中有類思覺失調症正向症狀的影響

評估思覺失調症中的正向症狀，測試方式使用前脈衝抑制測試 (prepulse inhibition test, PPI)之知覺敏感性實驗方法，在思覺失調症患者中會發現有 PPI 抑制的減少。圖 29 顯示，三種不同程度分貝的前刺激，分別在 69 分貝、73 分貝及 77 分貝的情況下 saline+saline 與 Poly(i:c)+control 和 Poly(i:c)+saline 組比較，發現 Poly(i:c)+control 和 Poly(i:c)+saline 組驚嚇抑制較弱，PPI 數值都有下降的情形，達到統計上顯著性差異 ( $p<0.001$ )，而且給予 betaine(100 或 300mg/kg) 組或運動後 PPI 數值回升。結果顯示，三甲基甘胺酸和體能運動可降低 Poly(i:c)造成子代 PPI 抑制減弱的作用。

### 實驗三：三甲基甘胺酸及體能運動及母體免疫激活對 GABAergic interneurons 所造成之影響

已知 Poly(i:c)所引起的母體免疫激活機制會造成與思覺失調症相似的病理特徵，前額葉皮質中的抑制性中間神經元表現量下降，可能進而產生行為異常。其中此種中間神經元為表現 parvalbumin<sup>+</sup>的抑制中間神經元，因此我們使用免疫組織染色法標定 parvalbumin<sup>+</sup> (PV<sup>+</sup>)神經細胞，從組織切片中的前額葉皮質中觀察，為 bregma 1.54 ~ 1.98 mm 位置，將切片挑出並計算整個前額葉皮質中表現 parvalbumin 染色的神經細胞數目。圖 30 顯示，saline+saline 組與 Poly(i:c)+saline 組比較時，Poly(i:c)+saline 組在前額葉皮質區 PV<sup>+</sup> 標記的中間神經元有明顯減少 ( $p<0.001$ )，而在 Poly(i:c)+betaine(100mg/kg) 與 Poly(i:c)+exercise 兩組與 Poly(i:c)+saline 相比，

Poly(i:c)+betaine(100mg/kg)與 Poly(i:c)+exercise 有明顯 PV<sup>+</sup> 標記的中間神經元增加 (p<0.001)，因此顯示 betaine 與 exercise 治療可以恢復母體免疫激活子代的 parvalbumin<sup>+</sup>中間神經元的表現量。。

#### 實驗四：三甲基甘胺酸及體能運動及母體免疫激活對 NMDA1 receptor 所造成之影響

先前研究發現，三甲基甘胺酸在與 glutamate 一起作用時，會明顯的提高 NMDA (N-methyl-D-aspartate) 受體的活性，似乎具有 NMDA 受體的 partial co-agonist 的性質，因此推測三甲基甘胺酸可以改善母體免疫激活所引起的精神分裂等疾病，組織切片挑選出 bregma -1.82 ~ -2.30 mm 位置 6 片的切片做定量分析。圖 31 顯示，經過免疫染色法實驗，不管是 saline+saline，saline+betaine，saline+exercise，Poly(i:c)+control，Poly(i:c)+saline，Poly(i:c)+betaine(100mg/kg)，Poly(i:c)+exercise 等六組比較時，在子代的海馬迴 CA1 區的 NR1 受體的表現量無明顯變化。

### 陸、討論

目前思覺失調症是常見的精神疾病，而現今對於思覺失調症的病因學仍然不清楚，許多學者表示，思覺失調症與懷孕中的母體有密切關係，當母體懷孕時期若產生發炎現象，像是感冒、發燒和病毒感染等，其子代容易罹患思覺失調症。已有研究指出，若給予非人類之靈長動物及小鼠注射 Poly(i:c)則會模擬對病毒感染的急性期反應，並且當母體懷孕時期給予，會間接導致胎兒腦中有顯著炎症過程，造成神經發育異常，這是一種不可逆且具有選擇性的一種傷害(Patterson, 2002b; Knuesel et al., 2014)。又因現代治療思覺失調症的臨床用藥，選擇在少年、青少年時期。根據思覺失調症的發病時間，這些藥物會影響青少年還在發育的大腦，並且產生副作用(Han et al., 2016)。因此，本研究是利用天然藥物與非藥物的物理治療評估三甲基甘胺酸(betaine)和體能運動改善 Poly(i:c)所造成的類思覺失調症之效用。主要因三甲基甘胺酸具備 glycine 的分子結構，本實驗室先前研究發現，三甲基甘胺酸在與 glutamate 一起作用時，會明顯的提高 NMDA (N-methyl-D-aspartate) 受體的活性，在研究指出三甲基甘胺酸具有 NMDA 受體的 partial co-agonist 之功能，而目前已知母體給予 Poly(i:C)會造成子代 NMDA 受體功能低下(Pian et al., 2010; Fujita et al., 2016)，進而產生精神異常。另

外，自主性運動刺激成年海馬迴功能穩定，在思覺失調症海馬迴功能和成人海馬迴神經新生中的神經心理症狀之間建立關聯。一些理論文獻已經概述了成年神經新生失敗可能導致思覺失調症(Wolf et al., 2011)，因此，我們希望可以開發新的天然藥物和物理治療用於改善精神疾病，而三甲基甘胺酸和規律的體能運動是我們所期待可改善精神異常之方法。

本研究利用 Poly(i:c)造成懷孕母體發炎之實驗模式，探討三甲基甘胺酸與運動是否具有保護作用並改善其不正常行為之效用，利用 locomotion test 檢測活動力、three chamber test 評估社交能力和 marble burning test 觀察刻板行為。結果顯示，不同年紀大之子代鼠在不同 betaine 濃度及體能運動下，其 locomotion test 活動力實驗中三甲基甘胺酸與運動皆無顯著增加總移動距離之效果。這些結果顯示與其他實驗相符合，在總距離上有經過母體發炎的子代與正常子代沒有差異。而在中心活動距離方面，先前文章提到母體免疫激活的子代有精神異常出現焦慮傾向，本實驗在中心距離減少發現與其他研究相符合而本實驗給予三甲基甘胺酸與運動治療後都有明顯改善焦慮。在 three chamber test 社交能力中，發現其子代在少年期間的社交異常狀況並不是非常明顯，這可能與思覺失調症好發時間為青少年晚期與成年早期有關。先前文獻提及，此疾病的發病機制可能植根於早期發育，而到了青春期中期可能反映了大腦發育的關鍵時期，使之特別容易發生精神病理變化(Meyer et al., 2010; Piontkewitz et al., 2011)。而現已有許多文獻提及產前 Poly(i:c)模型有趣特徵是，僅在後代達到青春期中期或成年早期後，不正常行為和大腦病理異常才會出現，這種發病時間表明從青春期中期到成年期的病理症狀發展，與思覺失調症為後青春期中期發作一致(Shi et al., 2003; Harvey and Boksa, 2012; Reisinger et al., 2015)，因此在本實驗少年的社交狀況非預期中有異常行為現象。此外，我們發現 MIA 後代的前額葉皮質中 PV<sup>+</sup> 表現量減少，這與之前的研究一致(Han et al., 2016)。眾所周知在前額葉皮質減少 PV<sup>+</sup> 的表現量有可能導致思覺失調症的病理現象(Ferguson and Gao, 2018)。因此，在前額葉皮質中 PV<sup>+</sup> 的減少可能與 MIA 造成的子代成年的行為異常中起關鍵作用。重要的是，本實驗發現 MIA 後代在青少年時攝入 betaine 天然藥物或者規律性運動可以治療或預防行為異常並減緩 PV<sup>+</sup> 在 MIA 之後的表現量減少狀況。總而言之，在青少年和青少年階段對富含的 betaine 食物或規律運動進行早期干預可能對精神疾病的異常行為具有預防和治療作用。

而至今有許多文獻表明，對於環境風險因素的影響在病理學研究中已經是精神疾病研究的重點。各種環境因素如城市性，移民，童年創傷，感染並發症和社會心理因素都與思覺失調症的發病風險有關(Patterson, 2002a; Harrison and Weinberger, 2005; Knuesel et al., 2014)。這些風險因素可以是生物的，身體的，心理的以及社會的，並且可以在個人生活進行影響(Harrison and Weinberger, 2005; Rice et al., 2010)。人們一直認為，壓力對精神疾病病患較有敏感性，透過對行為和神經生物學層面可以看到。因此，本實驗使用約束性壓力被認為是一種簡單且無痛的壓力模型，不會造成持久的損傷。它被認為是一種能造成類似心理壓力的模型，因為它類似於禁閉的自然體驗。在本實驗結果顯示，給予約束性壓力使小鼠產生類心理壓力狀況，確實在 Poly(i:c)的子代鼠發現壓力對精神疾病較有敏感性，使得原本在少年時期沒有社交異常的子代經過壓力後，在 three chamber test 的第一階段與第二階段與控制組相比皆出現社交退縮，外在壓力誘導精神疾病其他研究的預期符合，而不管是在預防或者是治療，不同給予三甲基甘胺酸與運動時間，再接著給予類心理壓力都能有效改善 Poly(i:c)子代有精神異常現象。

在有些文獻表明，經 Poly(i:c)處理之母體引發發炎反應，會影響其子代有重複性的行為，相同於自閉症的三大症狀之一。在許多實驗模型中，Poly(i:c)誘導產生的精神疾病通常為兩種，一種為思覺失調症；另一種則為自閉症(Moy et al., 2004; Meyer et al., 2011; Sugranyes et al., 2011)。但本研究中卻無發現子代具有母體免疫激活後產生精神異常造成刻板動作，有可能原因如下，在前人文獻中提到，思覺失調症與自閉症有共病現象，比如情感冷漠、焦慮和社交障礙等，而母體免疫激活造成子代行為異常的模型在妊娠的關鍵階段，感染導致胎兒系統中的急性細胞因子相關炎症，其中包括重要的胎兒腦(Nurjono et al., 2012; Howes and McCutcheon, 2017)。早期胎兒大腦發育期間的急性神經炎症可能對正在進行的神經發育過程產生負面影響，如神經元、神經膠質細胞分化，增生，遷移和存活，文獻中提出急性胎兒神經炎症及其對早期神經發育過程的影響可能促進思覺失調症和自閉症所共有的精神病理學和神經病理學表型的發展。在產前急性發炎開始時，母體和胎兒系統可以被驅使進入持續性炎症或者抗發炎的控制，前者可能與發炎控制失敗有關，並可能最終導致慢性炎症持續到胎兒晚期和新生兒期。相反，在母體和胎兒系統中產生足夠的抗發炎或免疫抑制活性可以抑制急性胎兒發炎反應，但儘管如此，發育中的生物體可能會維持潛伏的免疫異常，這些潛在的免疫異常可能在出生後的生命期內暴露於特定的環境刺激之後才會變得相關

(Meyer et al., 2011)。根據文獻中的模型，持續性炎症的誘導可能促成疾病中特異性表現的表型異常而與自閉症的發病機理更相關。反之，潛伏性發炎過程可能對思覺失調症特異性腦的發病機制和行為異常至關重要。因此本實驗可能是屬於潛伏期的發炎過程，造成類思覺失調症的模型。

運動作為母體免疫發炎造成子代精神異常之治療，在 2011 年已有實驗研究，此實驗也是使用 Poly(i:c)誘導母體產生發炎，而在子代出生後少年與青少年階段給予自主性運動 10 天，而本實驗給予運動一個月，時程上稍有差異，文獻中主要的行為測試為 OFT 和 PPI。在 OFT 上研究結果顯示運動無顯著增加總距離活動力，而在驚嚇抑制實驗中，給予運動後 PPI 數值回升，顯示運動能降低 Poly(i:c)造成子代 PPI 抑制減弱作用，此結果與本實驗相符合，但在本實驗中還有針對社交行為進行觀察，發現運動也能改善 MIA 造成精神異常子代的社交狀況(Wolf et al., 2011)。最後在此篇研究中提到，自主性運動的調節確實能使神經增生，並且運動誘導對思覺失調症小鼠模型中的行為和神經增生、可塑性有益作用，但這些並非思覺失調症的重點病理特徵。在思覺失調症，多巴胺假說與麩胺酸假說才是其病理現象，因此文獻中並未建議靶向神經增生是精神分裂症或其他精神疾病最有效的治療方法，海馬迴神經增生不足以治療這些疾病。根據其它文獻表示 Poly(i:c)引起的類精神障礙有 NMDA 受體功能低下才是思覺失調症病理特徵(Vrajova et al., 2010)，在我們的行為實驗當中發現給予 Poly(i:c)的子代經過三甲基甘胺酸和連續自主性運動後，都能改善母體免疫激活造成子代社交退縮行為，在前人文獻中表示，社交大腦的神經活動受到受損的 NMDA 受體信號的影響，造成思覺失調症中觀察到的社交缺陷(Mielnik et al., 2014; Rahman et al., 2017)，文獻使用 NR 1 受體敲除老鼠造成思覺失調症，來進行社交行為測試發現有社交退縮現象，與本實驗相符合，因此接著我們進行生化分析，利用免疫組織染色法觀察其 NMDAR 在此模型中扮演的角色，但結果卻發現在 MIA 子代或者有給予運動和 betaine 治療的子代中，NR1 在海馬迴無明顯表現量變化，這可能與我們觀察的位置不同有關，前人文獻中是在扣帶皮層的神經活動與社交行為有關，但我們所觀察的位置是在海馬迴，因此結果未如預期。雖然我們沒有在母體免疫激活影響的成年的後代裡看到 NMDAR1 的變化，但是關於運動和 betaine 治療在行為實驗上有確實的發現在 MIA 子代中有幫助改善異常行為。運動和 betaine 的效益與 NMDAR1 的關係還需要再做進一步的探討，而 betaine 除了是 NMDA 受體的部分活化劑，功能上還能預防過量酒精所造成的發炎反應及氧化壓力，也有助於預防神經退化性疾病的發生(Kharbanda, 2007)，和改善由

葛蘭式陰性菌內毒素 lipopolysaccharide 所造成神經發炎及氧化壓力 (Tanaka et al., 2006; Miwa et al., 2011) ，因此對於運動和 betaine 的有效改善異常行為，未來也能朝向氧化壓力的變化來更仔細的進行觀察與探討。

因此綜合以上結果，持續性的運動和 betaine 能改善母體免疫激活造成子代的精神異常現象，所以我們認為 betaine 是一種具有神經保護及療效作用的天然食品，未來可以做為治療精神異常疾病的新興藥物，而持續性的運動也是生活中簡單的治療方式，未來在精神疾病方面可以多多提倡。

## 柒、結論

本研究發現，天然食品 betaine 和持續性的自主運動，能改善母體免疫激活對子代所引起的精神異常及社交行為缺失之現象，然而對腦神經發育的相關作用機制仍未明，有待進一步實驗釐清。因此，我們認為 betaine 在未來是一種具有可以治療精神疾病的潛力藥物，而持續性運動也是另類重要的治療方式，經自我調整的生活簡單療法更能無負擔的改善精神疾病。



## 捌、圖表

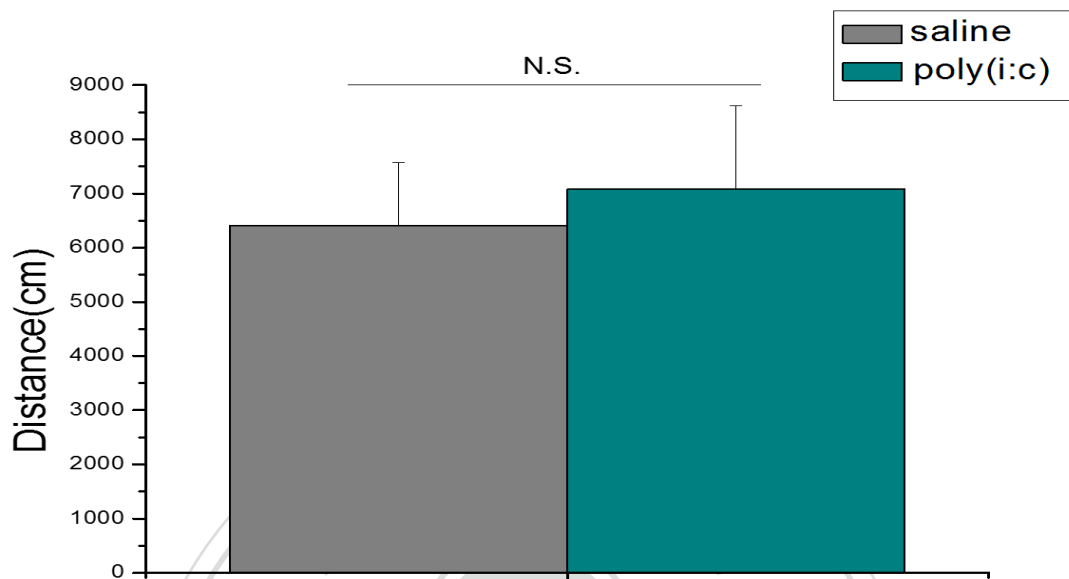


圖 10、Poly(i:c)引起母體免疫激活之模式檢測其子代活動力。

懷孕母鼠以腹腔注射 saline 控制組或是 Poly(i:c) (5 mg/kg)實驗組，在受孕後的第 12 天到第 17 天共給予連續六劑。幼鼠出生後第四週檢測其活動力。實驗結果之數據以平均值  $\pm$  標準誤差 (means  $\pm$  S.E.M) 表示。利用 Student t-test 分析檢測，結果顯示給予 Poly(i:c)處理之組別(n=27)與控制組 saline(n=27)並未有顯著差異， $p=1.25$ 。

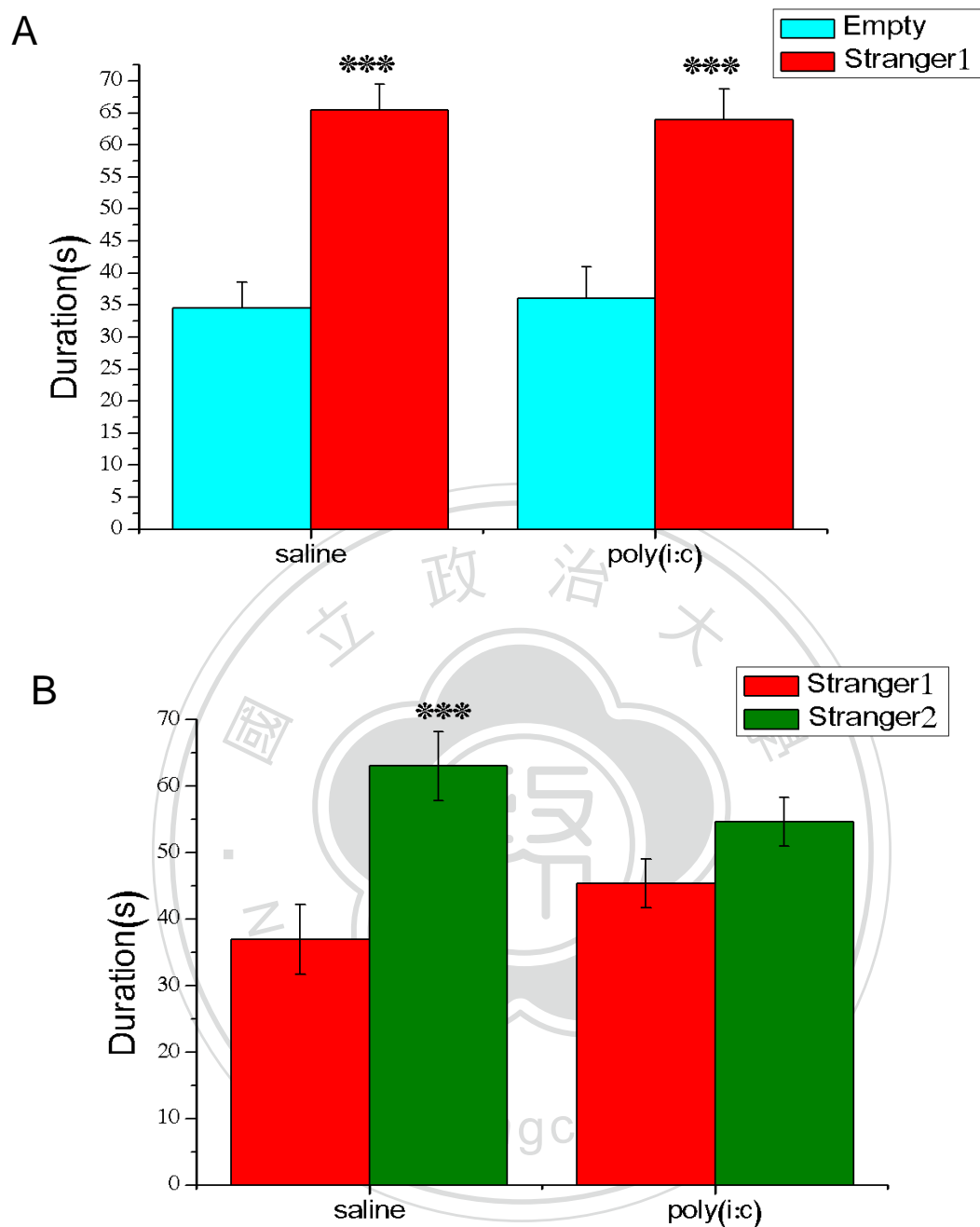


圖 11、Poly(i:c)引起母體免疫激活之模式檢測其子代社交能力。

懷孕母鼠以腹腔注射 saline 或是 Poly(i:c) (5 mg/kg)，在受孕後的第 12 天到第 17 天共給予連續六劑。幼鼠出生後第四週檢測其社交能力。(A)第一階段為社交能力，(B)第二階段社交偏好。實驗結果之數據以平均值 ± 標準誤差 (means ± S.E.M) 表示。結果顯示，給予 Poly(i:c)處理之組別(n=27)於第一階段的社交能力，而控制組(n=27)在兩階段的社交能力及偏好均達統計上顯著差異，\*\*\*，p<0.001。

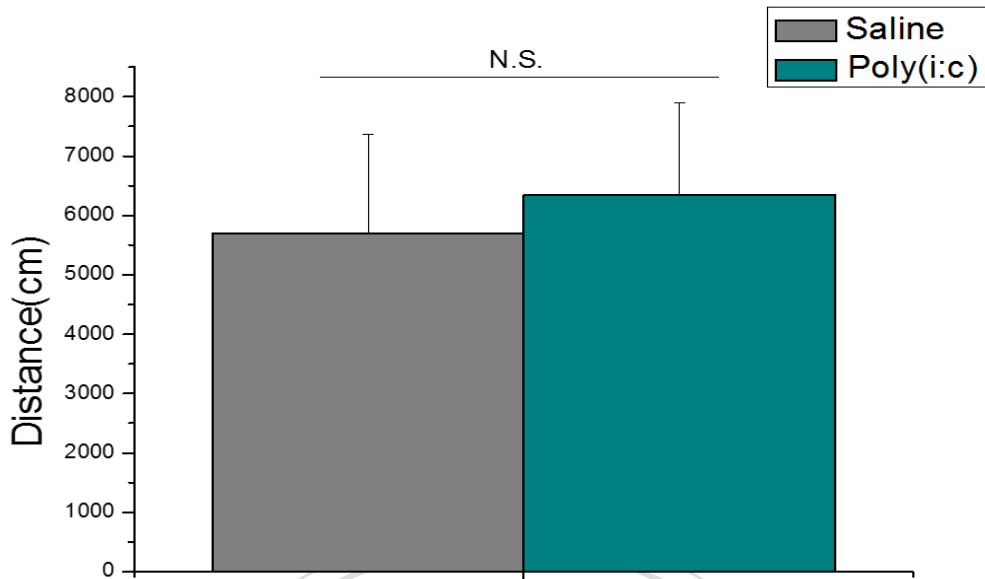


圖 12、給予類心理壓力後的 Poly(i:c)子代檢測其活動力。

母體給予 Poly(i:c)之子代於出生後第四十二天給予急性束縛壓力實驗兩小時的類心理壓力後檢測其活動力。實驗結果之數據以平均值  $\pm$  標準誤差 (means  $\pm$  S.E.M) 表示。利用 student t-test 檢測結果顯示，給予 Poly(i:c)處理之組別 (n=27) 與控制組 saline (n=27) 相比較並未達統計上差異， $p=1.05$ 。

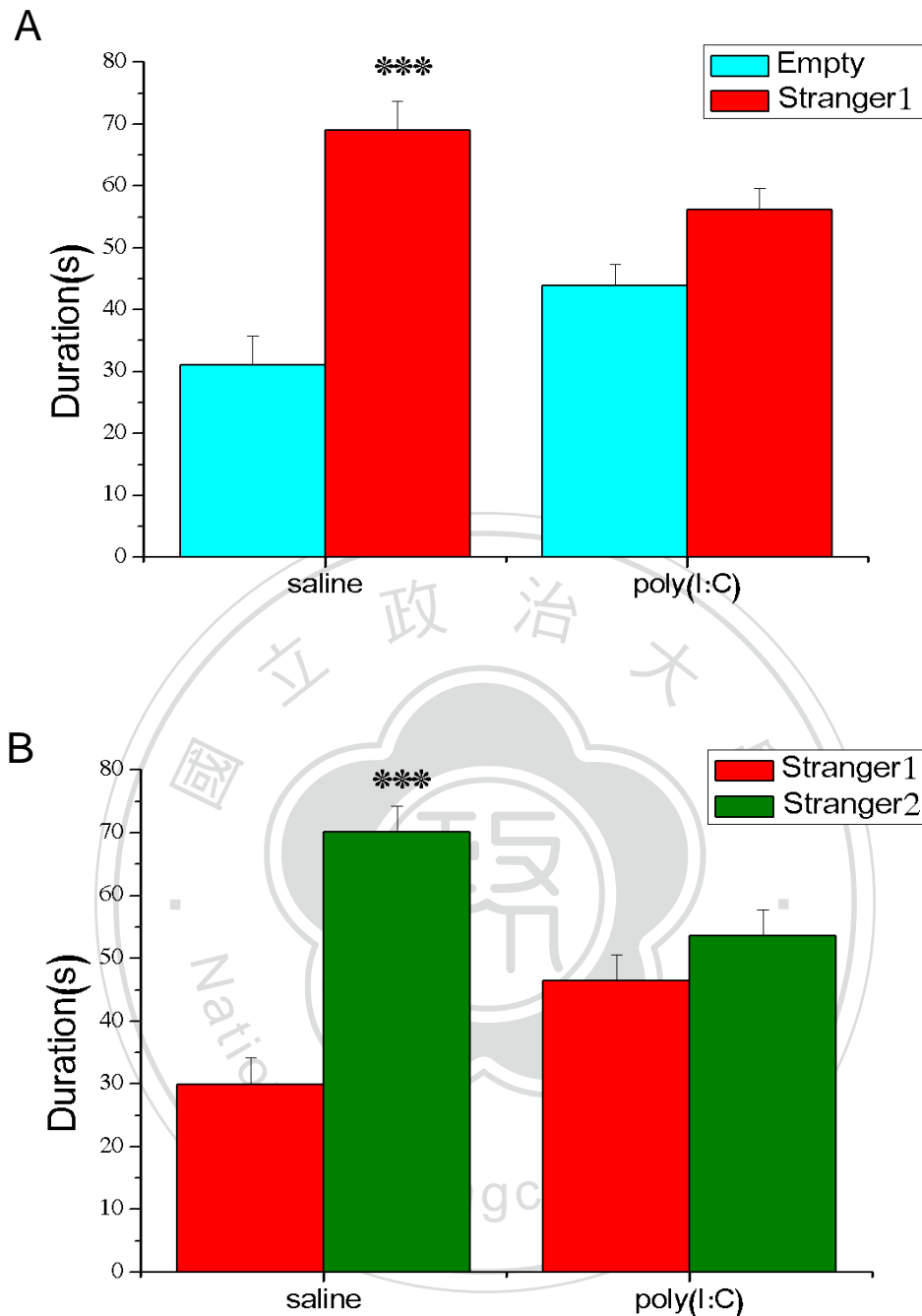


圖 13、給予類心理壓力後的 Poly(i:c)子代檢測其社交異常行為。

母體給予 Poly(i:c)之子代於出生後第四十二天給予急性束縛壓力實驗兩小時的類心理壓力後檢測其社交能力。(A)第一階段為社交能力，(B)第二階段社交偏好。實驗結果之數據以平均值 ± 標準誤差 (means ± S.E.M) 表示。其結果顯示，只有控制組(n=27)的社交反應均達統計上顯著差異，\*\*\*，p<0.001，但給予 Poly(i:c)處理之組別(n=27)並無顯著差異。

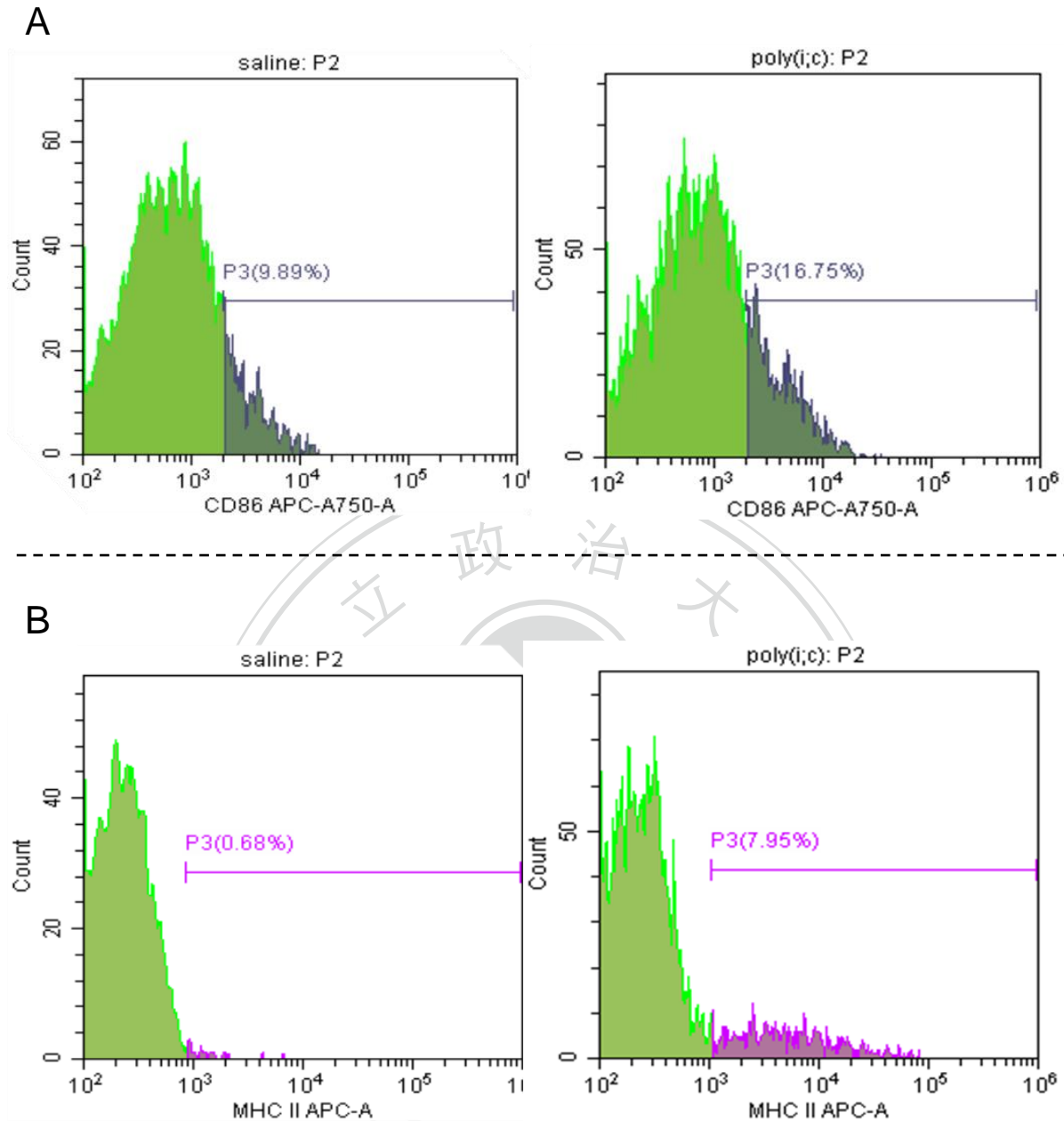
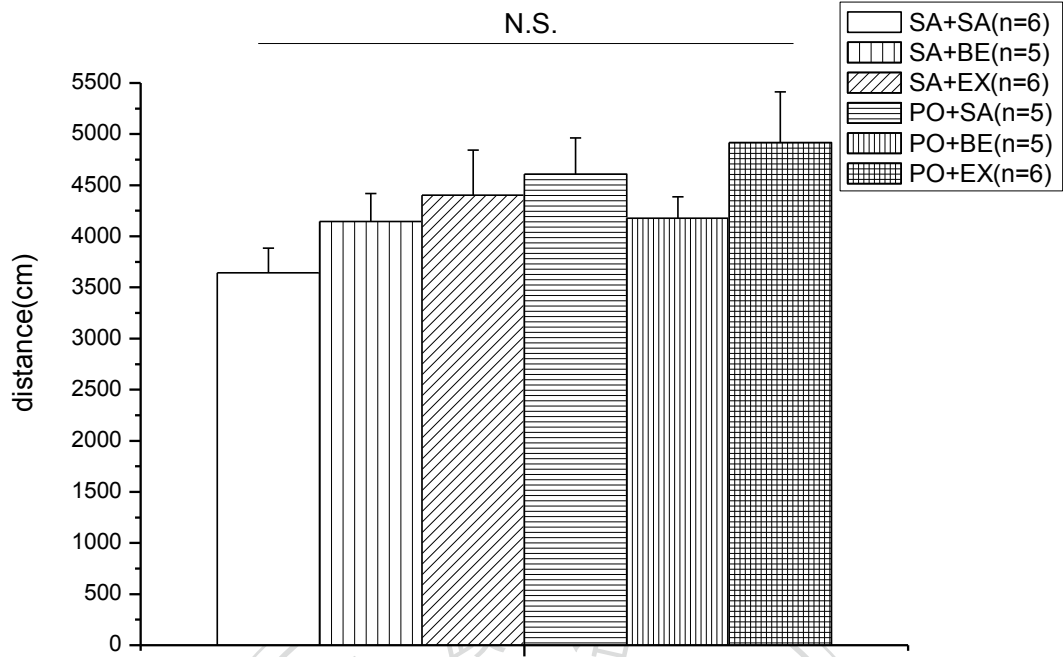


圖 14、母體受免疫刺激產生的細胞因子透過胎盤影響子代產生免疫發炎現象。

在子代第九週時進行免疫測試，使用了  $CD11b^+$  巨噬細胞的表面抗原，來標記巨噬細胞群為  $CD11b^+$  細胞，接著  $CD86$  為巨噬細胞活化的標記物，和  $MHCII$  為 APC 抗原呈現細胞上的分子，代表 T helper cell 可能被活化。(A)  $CD11b^+$  細胞標記中發現， $CD86$  標記的表現量在 saline 組子代小鼠與 Poly(i:c) 組子代 分別是 9.89% 及 16.75%，母體免疫發炎造成子代有較高含量的  $CD86$  表現，(B)  $MHCII$  的標記表現量顯示，saline 組子代小鼠與 Poly(i:c) 組子代分別是 0.68% 及 7.95%，同樣的母體發炎造成子代有較高表現的  $CD11b^+$ ，T helper cell 被活化。由上述實驗可知，母體免疫發炎造成子代有發炎表現傾向。

A



B

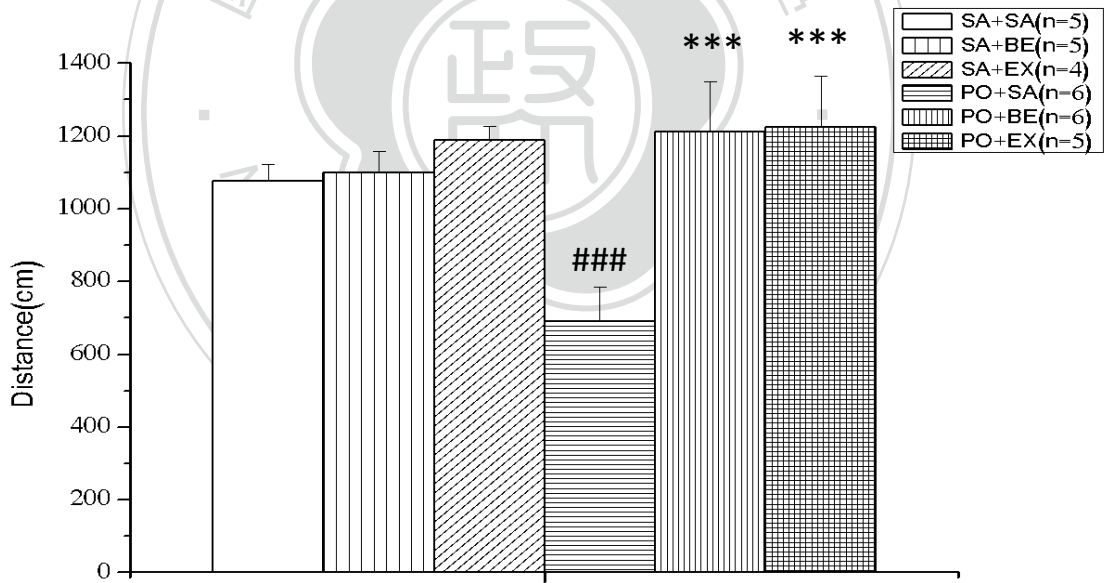
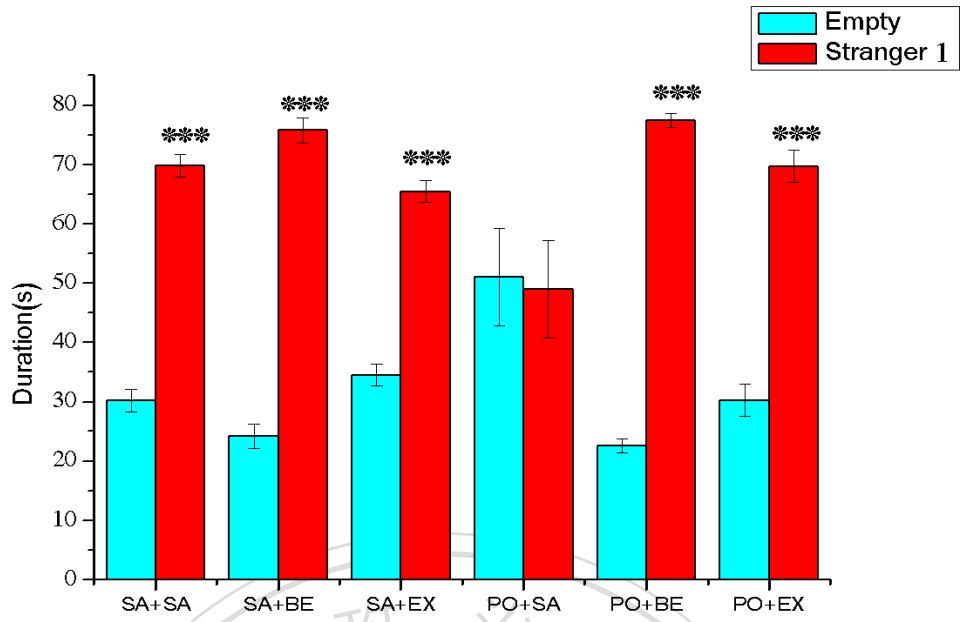


圖 15、三甲基甘胺酸與體能運動對 Poly(i:c)引起母體免疫激活之子代活動力。

母體給予 Poly(i:c)之子代於成年時期，出生後第七十天到第八十四天以腹腔注射給予小鼠食鹽水(SA)或三甲基甘胺酸(BE, 100 mg/kg)和體能運動(EX)治療後檢測其活動力。(A)總移動距離，(B)中心移動距離。實驗結果之數據以平均值  $\pm$  標準誤差 (means  $\pm$  S.E.M) 表示。利用 one way ANOVA 分析檢測結果顯示，不論是給予任何處理之組別(saline 控制組、三甲基甘胺酸和運動與 Poly(i:c)組別)，在總距離上均未達統計上顯著， $p=0.502$ 。但在中心移動距離有達統計上顯著差異，###, Poly(i:c)組相較於 saline+saline， $p<0.001$ ; \*\*\*, 三甲基甘胺酸和運動組別(PO+BE & PO+EX)相較於 Poly(i:c)+saline， $p<0.001$ ;  $n=4-6$ 。



A



B

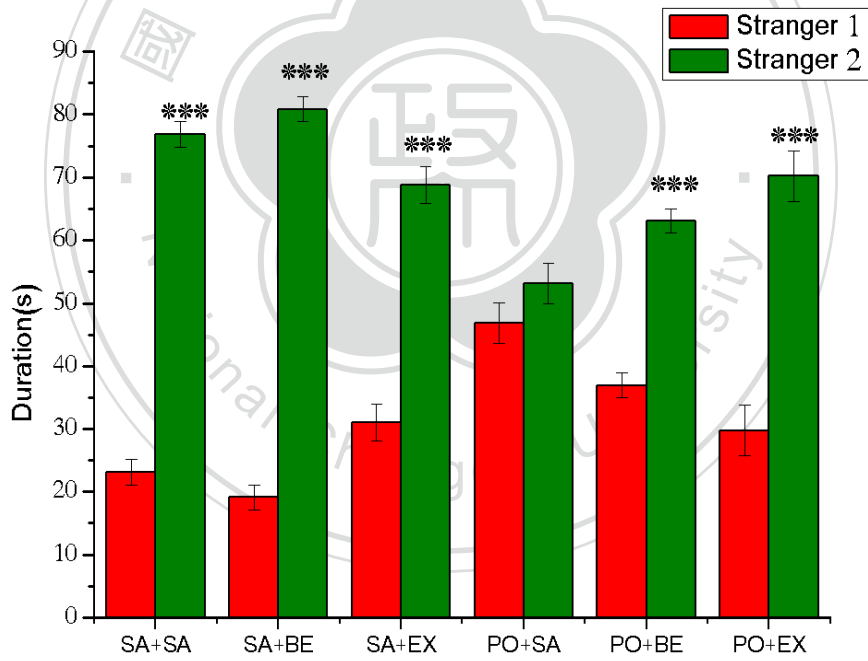




圖 16、三甲基甘胺酸與體能運動對 Poly(i:c)引起母體免疫激活之子代社交能力。

母體給予 Poly(i:c)之子代於成年時期，出生後第七十天到第八十四天以腹腔注射給予小鼠食鹽水(SA)或三甲基甘胺酸(BE, 100 mg/kg)和體能運動(EX)治療後檢測其社交能力。(A)第一階段為社交能力。(B)第二階段社交偏好。實驗結果之數據以平均值  $\pm$  標準誤差 (means  $\pm$  S.E.M) 表示。結果顯示，給予 Poly(i:c)處理之組別與控制組在個別處理之組別相比較，除了 Poly(i:c)+saline 組之外，均達統計上顯著差異，\*\*\*， $p < 0.001$ ;  $n = 6-7$ 。



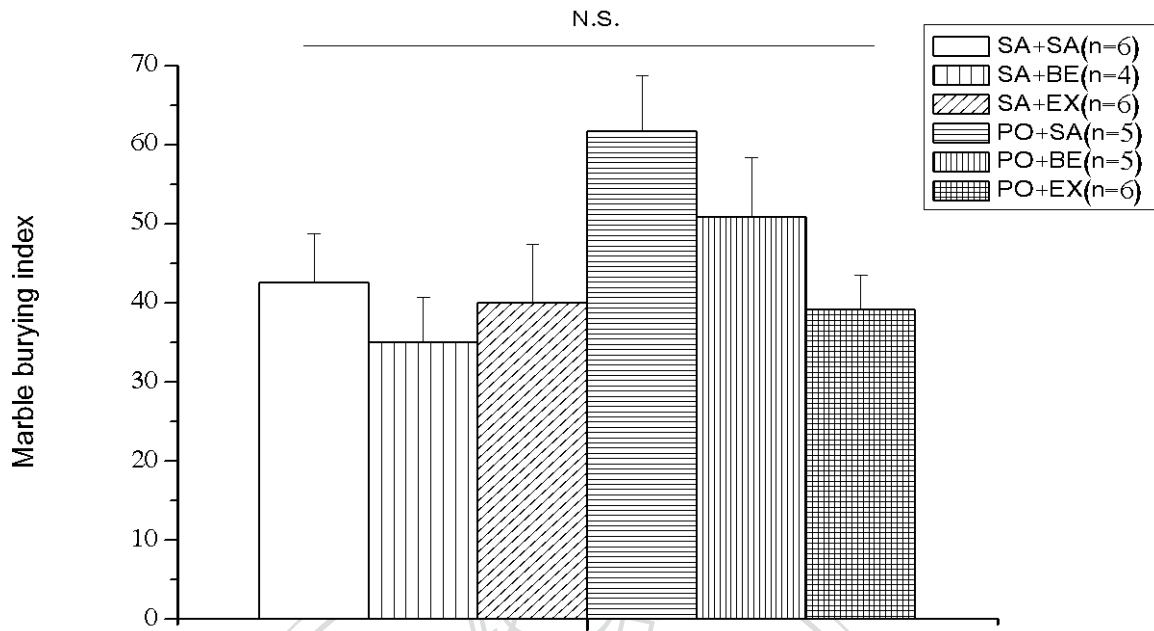
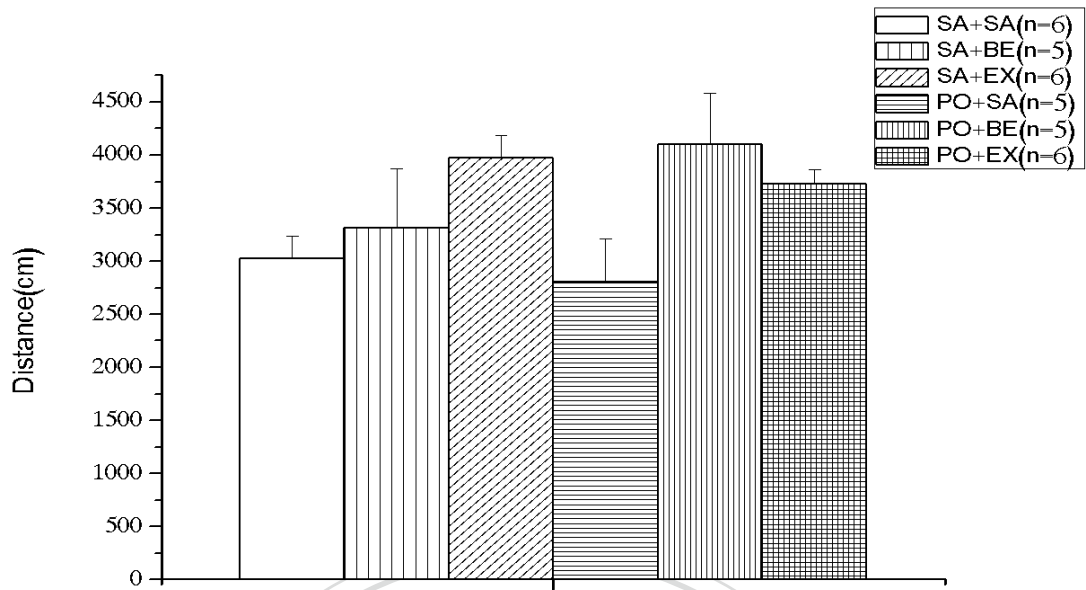


圖 17、三甲基甘胺酸與體能運動對 Poly(i:c) 引起母體免疫激活之子代刻板行為。

母體給予 Poly(i:c) 之子代於成年時期，出生後第七十天到第八十四天以腹腔注射給予小鼠食鹽水(SA)或三甲基甘胺酸(BE, 100 mg/kg)和體能運動(EX)治療後檢測其影響子代之刻板行為。實驗結果之數據以平均值  $\pm$  標準誤差 (means  $\pm$  S.E.M) 表示。利用 one way ANOVA 分析檢測結果顯示，不論是給予 Poly(i:c) 處理之組與 saline 控制組相比較或是三甲基甘胺酸和運動與 Poly(i:c) 處理之組別與單獨 Poly(i:c) 作比較，均未達統計上顯著差異， $p=0.457$ ;  $n=4-6$ 。

A



B

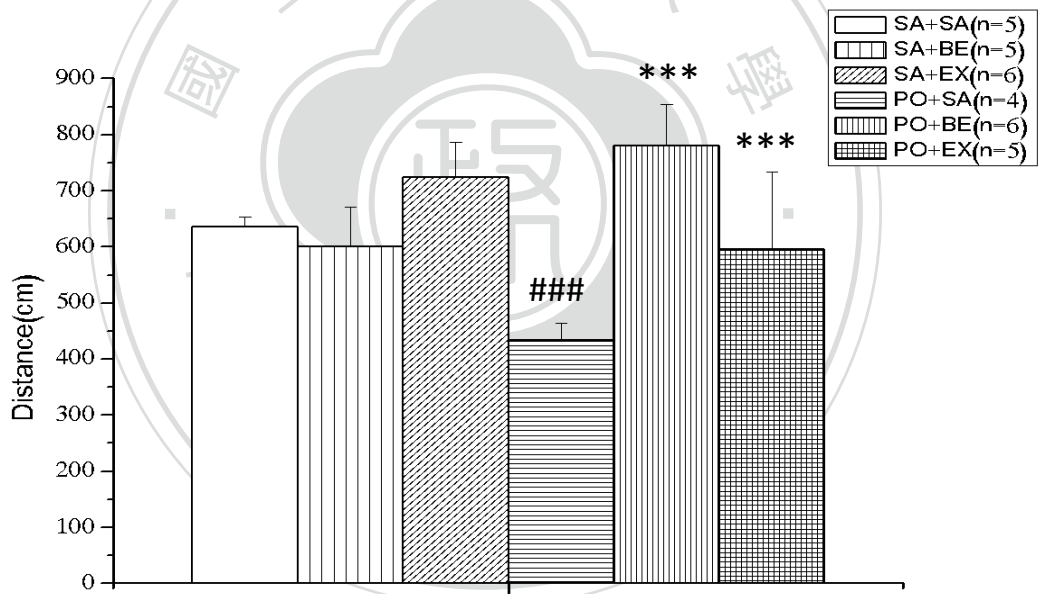


圖 18、Poly(i:c)引起母體免疫激活之模式治療後再給予類心理壓力檢測其子代活動力。

母體給予 Poly(i:c)之子代於出生後第九十天給予急性束縛壓力實驗兩小時的類心理壓力後檢測其影響子代之活動力。(A)總移動距離。(B)中心移動距離。實驗結果之數據以平均值  $\pm$  標準誤差 (means  $\pm$  S.E.M) 表示。利用 one way ANOVA 分析檢測結果顯示，在所有組別中不論是給予 Poly(i:c)處理之組、saline 控制組、三甲基甘胺酸(BE)和體能運動(EX)組別作比較，在總距離上均未達統計上顯著差異， $P=0.217$ 。但在中心移動距離有達統計上顯著差異，###, Poly(i:c)組相較於 saline+saline ,  $p<0.001$ ; \*\*\*, 三甲基甘胺酸 (PO+BE) 和體能運動 (PO+EX) 組相較於 Poly(i:c)+saline ,  $p<0.001$  ;  $n=4-6$ 。



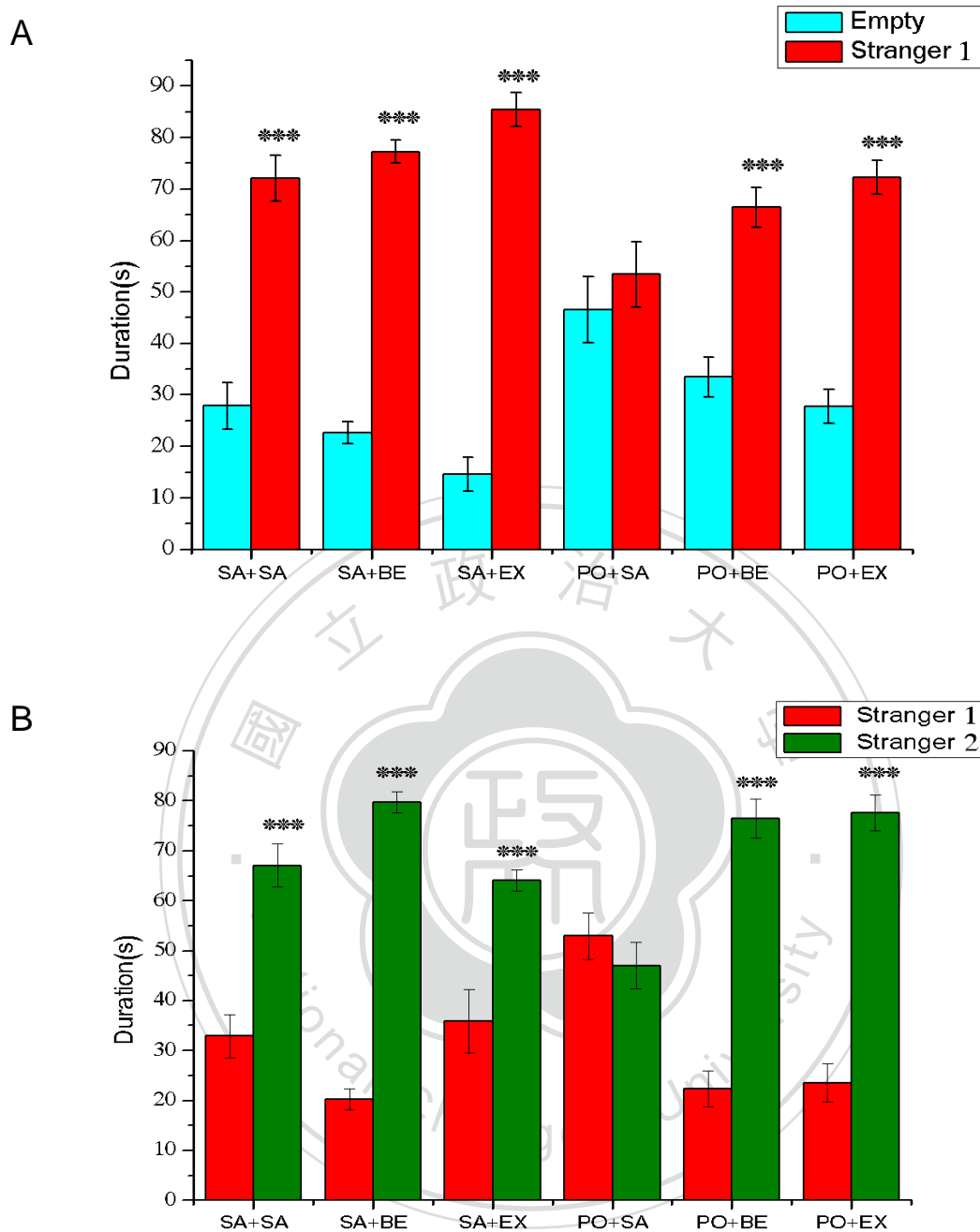


圖 19、Poly(i:c)引起母體免疫激活之模式治療後再給予類心理壓力檢測其子代社交力。

母體給予 Poly(i:c)之子代於出生後第九十天給予急性束縛壓力實驗兩小時的類心理壓力後檢測其影響子代之社交能力。(A)第一階段為社交能力。(B)第二階段社交偏好。實驗結果之數據以平均值  $\pm$  標準誤差 (means  $\pm$  S.E.M) 表示。其結果顯示，給予 Poly(i:c)處理之組別與控制組在個別處理之組別相比較，除了 Poly(i:c)+saline 組之外，均達統計上顯著差異，\*\*\*， $P < 0.001$ ;  $n = 6-7$ 。

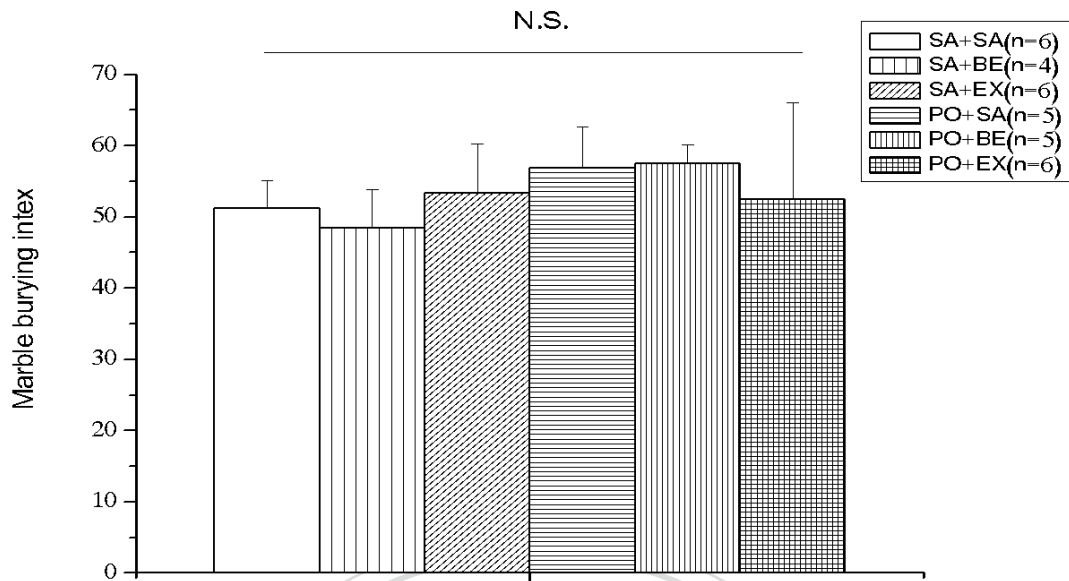


圖 20、Poly(i:c)引起母體免疫激活之模式治療後再給予類心理壓力檢測其子代刻板行為。

母體給予 Poly(i:c)之子代於出生後第九十天給予急性束縛壓力實驗兩小時的類心理壓力後檢測其影響子代之刻板行為。實驗結果之數據以平均值  $\pm$  標準誤差 (means  $\pm$  S.E.M) 表示。利用 one way ANOVA 分析檢測結果顯示，不論是給予 Poly(i:c)處理之組與 saline 控制組相比較亦或是三甲基甘氨酸(BE)和體能運動(EX)與 Poly(i:c)處理之組別與單獨 Poly(i:c)作比較，均未達統計上顯著差異， $p=0.08$ 。

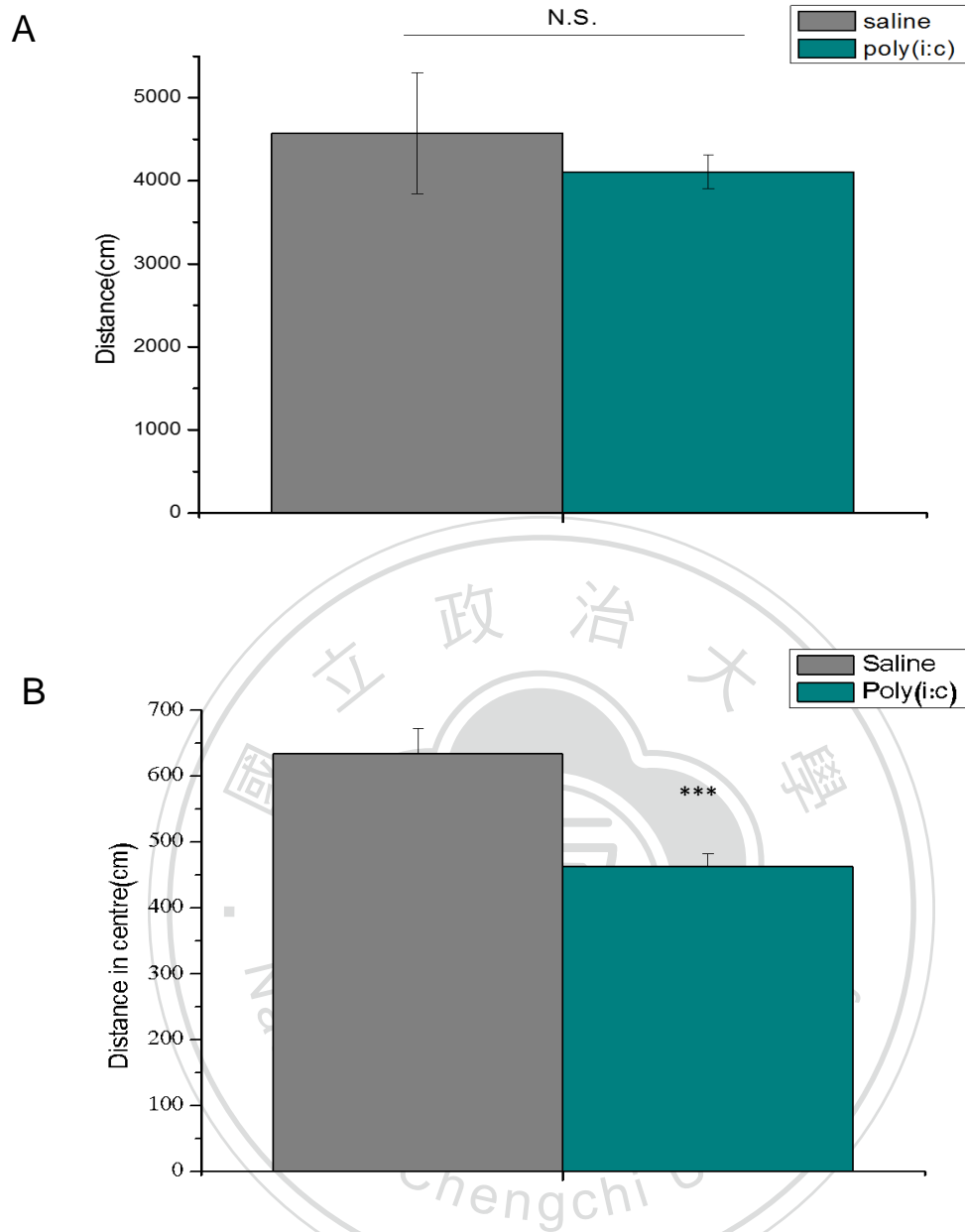


圖 21、Poly(i:c)引起母體免疫激活之模式檢測其子代活動力(II)。

懷孕母鼠以腹腔注射 saline 控制組或是 Poly(i:c) (5 mg/kg)實驗組，在受孕後的第 12 天到第 17 天共給予連續六劑。幼鼠出生後第四週檢測其影響子代之活動力。(A)總移動距離。(B)中心移動距離。實驗結果之數據以平均值  $\pm$  標準誤差 (means  $\pm$  S.E.M) 表示。利用 student t-test 分析檢測結果顯示，在總距離上給予 Poly(i:c)處理之組別(n=18)與控制組 saline(n=44)並未有顯著差異， $p=0.75$ 。但在中心移動距離有達統計上顯著差異，\*\*\*，Poly(i:c)組相較於 saline 控制組， $p<0.001$ 。

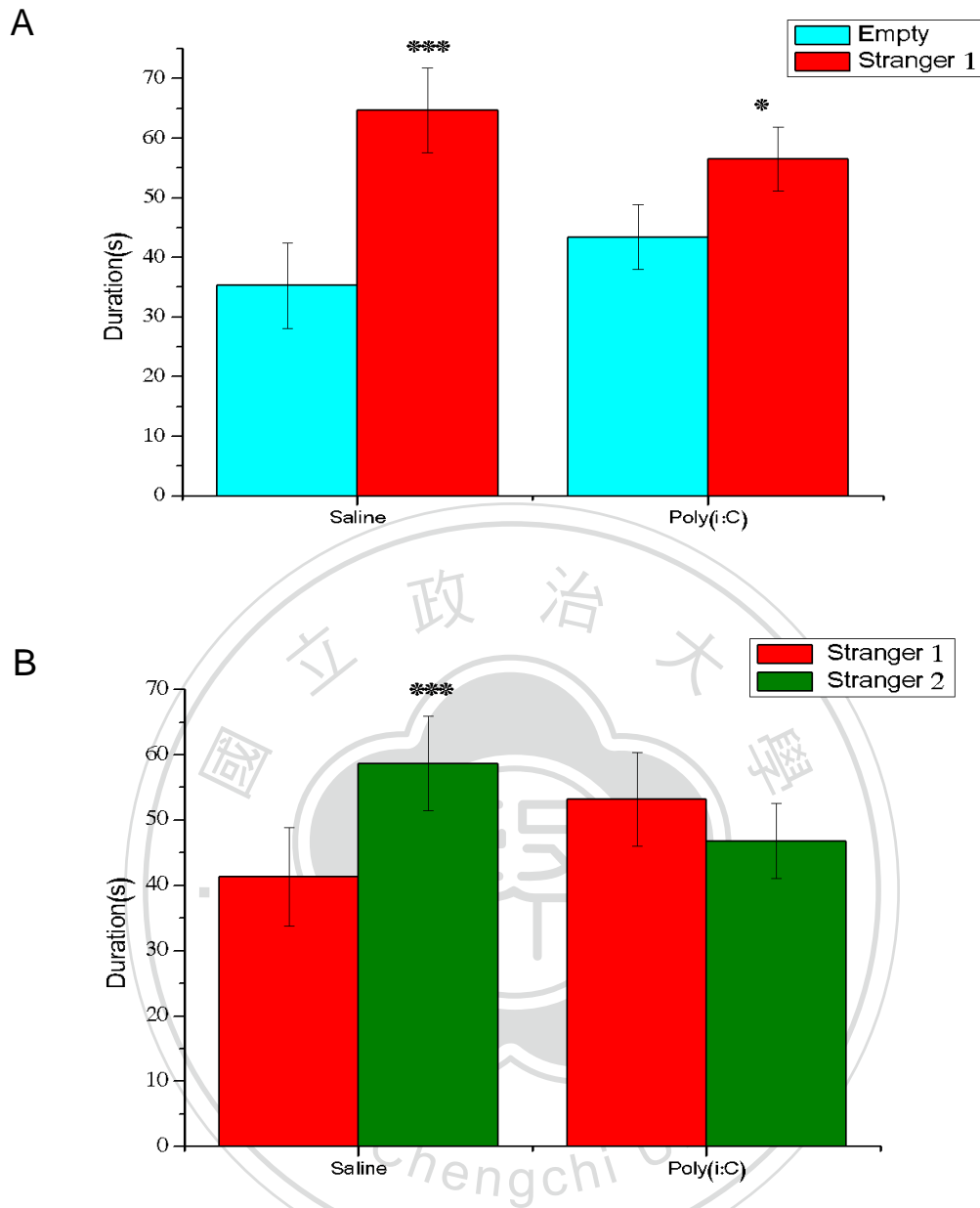
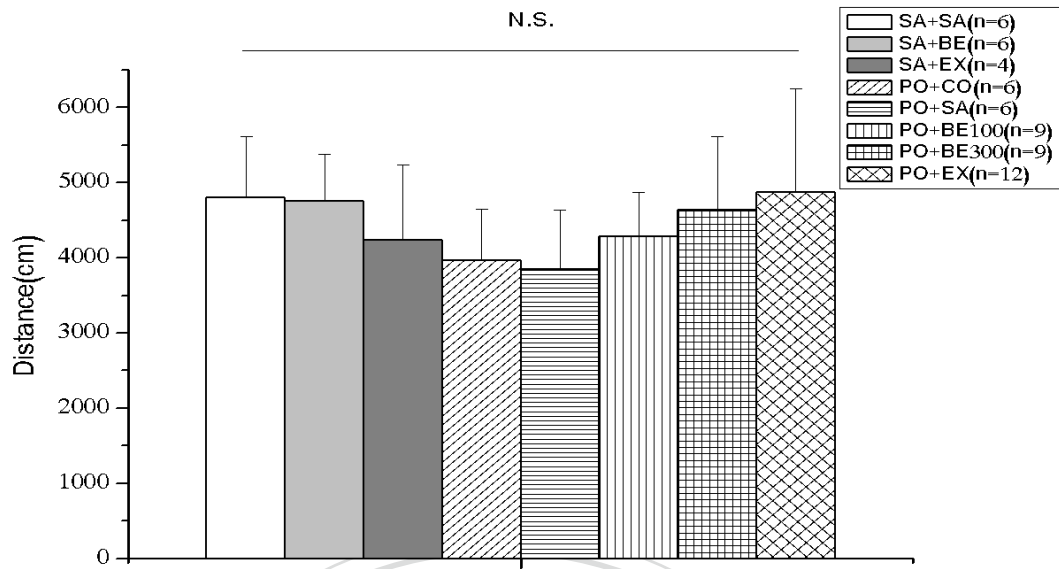


圖 22、Poly(i:c)引起母體免疫激活之模式檢測其社交能力(II)。

懷孕母鼠以腹腔注射 saline 或是 Poly(i:c) (5 mg/kg)，在受孕後的第 12 天到第 17 天共給予連續六劑。幼鼠出生後第四週檢測其社交能力。(A)第一階段為社交能力，(B)第二階段社交偏好。實驗結果之數據以平均值 ± 標準誤差 (means ± S.E.M) 表示。結果顯示，給予 Poly(i:c)處理之組別(n=18)於第一階段的社交能力，而控制組(n=44)在兩階段控制組均達統計上顯著差異，\*，p<0.05，\*\*\*，p<0.001。



A



B

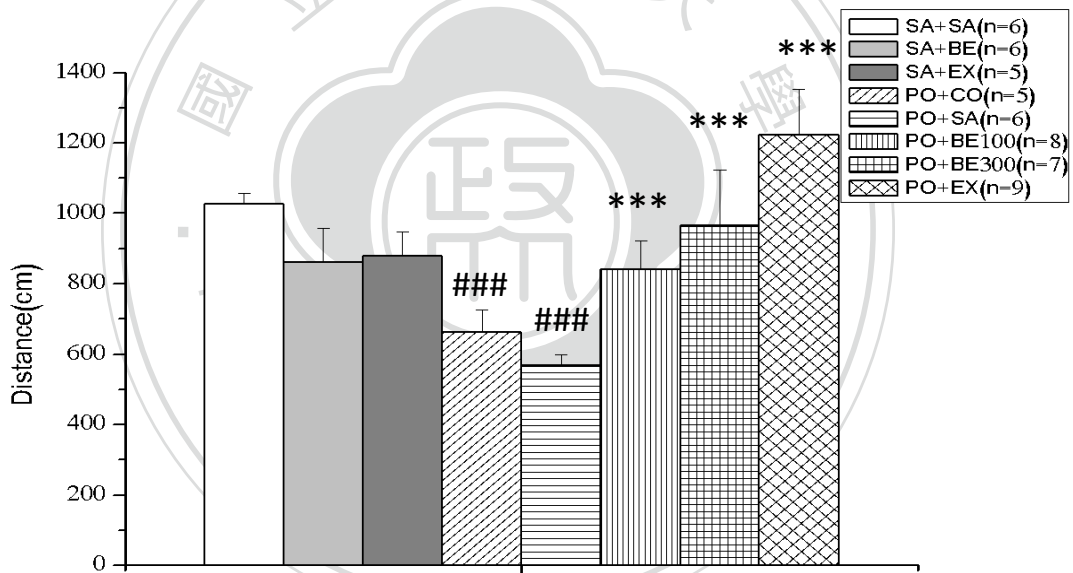
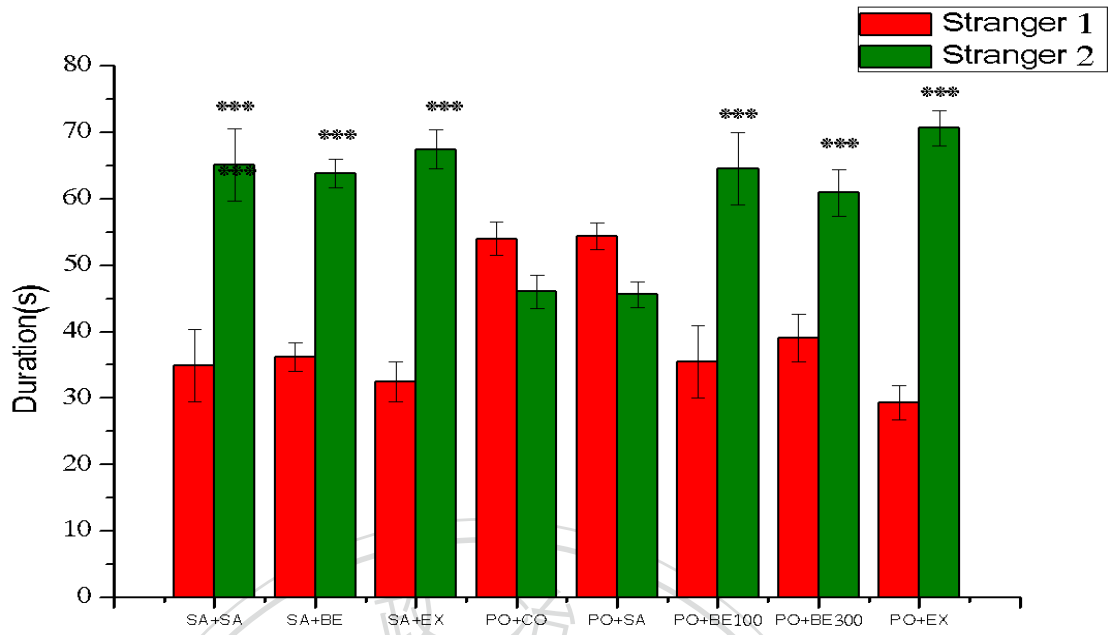


圖 23、三甲基甘胺酸與體能運動對 Poly(i:c)引起母體免疫激活之子代活動力(II)。

母體給予 Poly(i:c)之子代於少年、青少年時期，出生後第四十二到第七十天以腹腔注射給予小鼠食鹽水(SA)或三甲基甘胺酸(BE, 100, 300 mg/kg)和體能運動(EX)後檢測其影響子代之活動力。(A)總移動距離，(B)中心移動距離。實驗結果之數據以平均值 ± 標準誤差 (means ± S.E.M) 表示。利用 one way ANOVA 分析檢測結果顯示，不論是給予任何處理之組別與(saline 控制組、三甲基甘胺酸和運動與 Poly(i:c)組別)，在總距離上均未達統計上顯著差異， $p=0.953$ 。但在中心移動距離有達統計上顯著差異，###, Poly(i:c)+control 與 Poly(i:c)+saline 組相較於 saline+saline,  $p<0.001$ ; \*\*\*, 三甲基甘胺酸和運動組別(PO+BE100、PO+BE300 & PO+EX)相較於 Poly(i:c)+control 與 Poly(i:c)+saline,  $p<0.001$ ;  $n=5-9$ 。



A



B

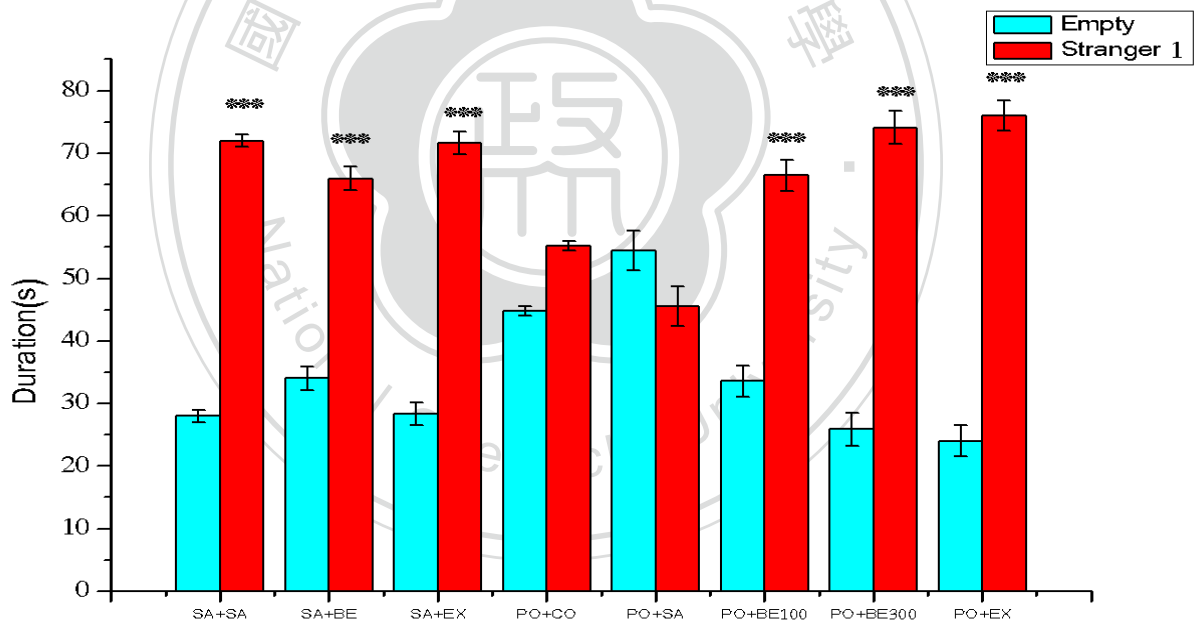


圖 24、三甲基甘胺酸與體能運動對 Poly(i:c)引起母體免疫激活之子代社交能力(II)。

母體給予 Poly(i:c)之子代於成年時期，出生後第四十二到第七十天以腹腔注射給予小鼠食鹽水(SA)或三甲基甘胺酸(BE, 100, 300 mg/kg)和體能運動(EX)治療後檢測其社交能力。(A)第一階段為社交能力，(B)第二階段社交偏好。實驗結果之數據以平均值 ± 標準誤差 (means ± S.E.M) 表示。結果顯示，給予 Poly(i:c)處理之組別與控制組在個別處理之組別相比較，除了 Poly(i:c)+control 和 Poly(i:c)+saline 組之外，均達統計上顯著差異，\*\*\*， $p < 0.001$ ;  $n = 9-12$ 。



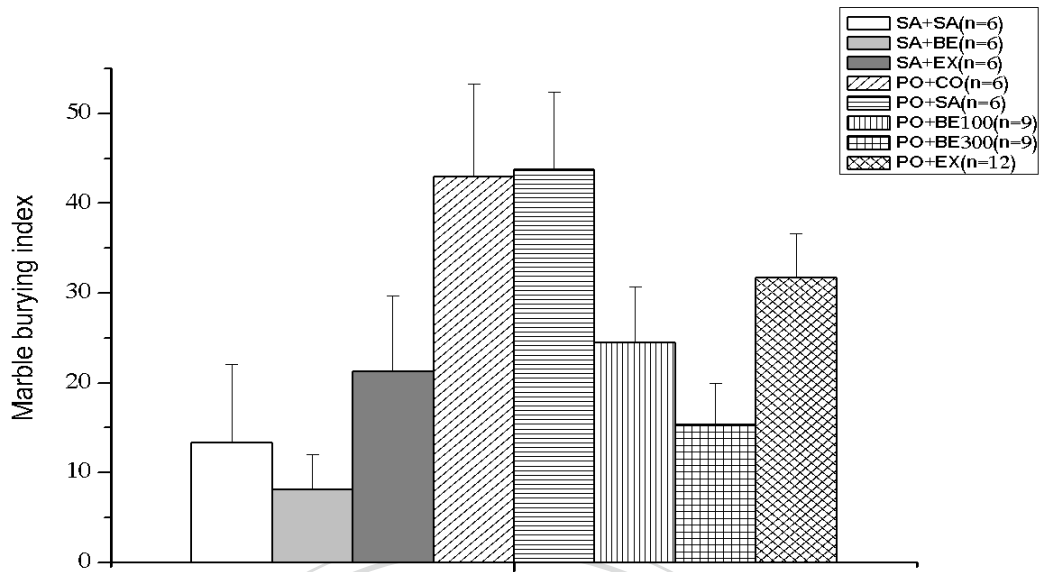
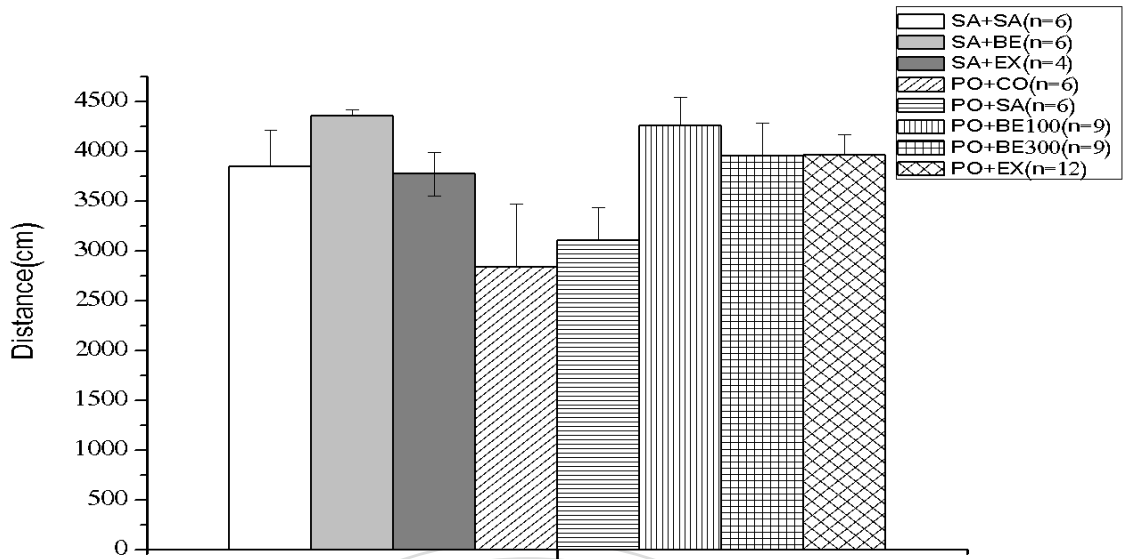


圖 25、三甲基甘胺酸與體能運動對 Poly(i:c)引起母體免疫激活之子代刻板行為(II)。

母體給予 Poly(i:c)之子代於成年時期，出生後第四十二到第七十天以腹腔注射給予小鼠食鹽水(SA)或三甲基甘胺酸(BE, 100, 300 mg/kg)和體能運動(EX)治療後檢測其影響子代之刻板行為。實驗結果之數據以平均值  $\pm$  標準誤差 (means  $\pm$  S.E.M) 表示。利用 one way ANOVA 分析檢測結果顯示，不論是給予 Poly(i:c)處理之組與 saline 控制組相比較或是三甲基甘胺酸和運動與 Poly(i:c)處理之組別與單獨 Poly(i:c)作比較，均未達統計上顯著差異， $p=0.823$ ;  $n=6-12$ 。

A



B

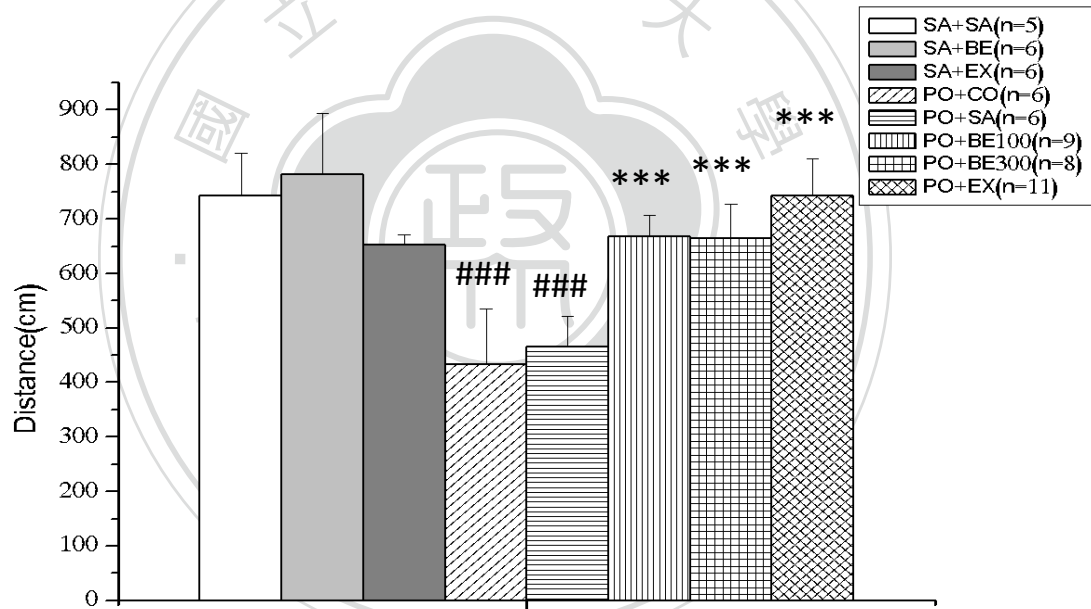
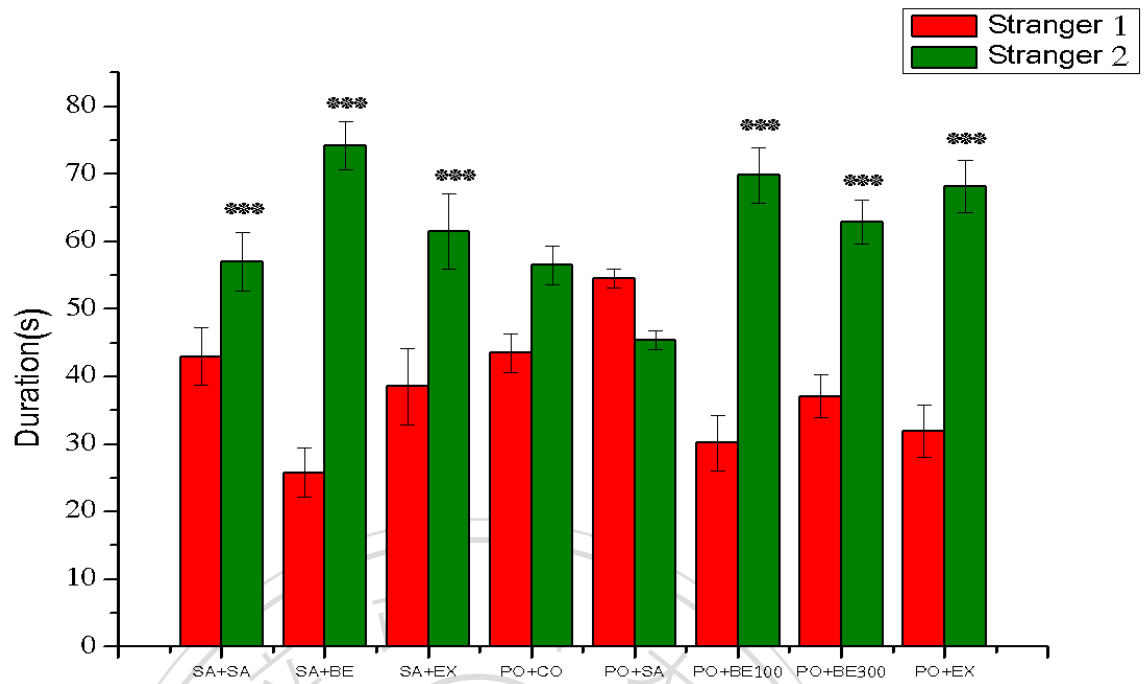


圖 26、Poly(i:c)引起母體免疫激活之模式治療後再給予類心理壓力檢測其子代活動力(II)。

母體給予 Poly(i:c)之子代於出生第七十七天給予急性束縛壓力實驗兩小時的類心理壓力後檢測其影響子代之活動力。(A)總移動距離，(B)中心移動距離。實驗結果之數據以平均值 ± 標準誤差 (means ± S.E.M) 表示。利用 one way ANOVA 分析檢測結果顯示，不論是給予任何處理之組別與(saline 控制組、三甲基甘胺酸和運動與 Poly(i:c)組別)，在總距離上均未達統計上顯著差異， $p=0.057$ 。但在中心移動距離有達統計上顯著差異，###, Poly(i:c)+control 與 Poly(i:c)+saline 組相較於 saline+saline ,  $p<0.001$ ; \*\*\*, 三甲基甘胺酸和運動組別 (PO+BE100、PO+BE300 & PO+EX) 相較於 Poly(i:c)+control 與 Poly(i:c)+saline ,  $p<0.001$ ;  $n=5-12$ 。



A



B

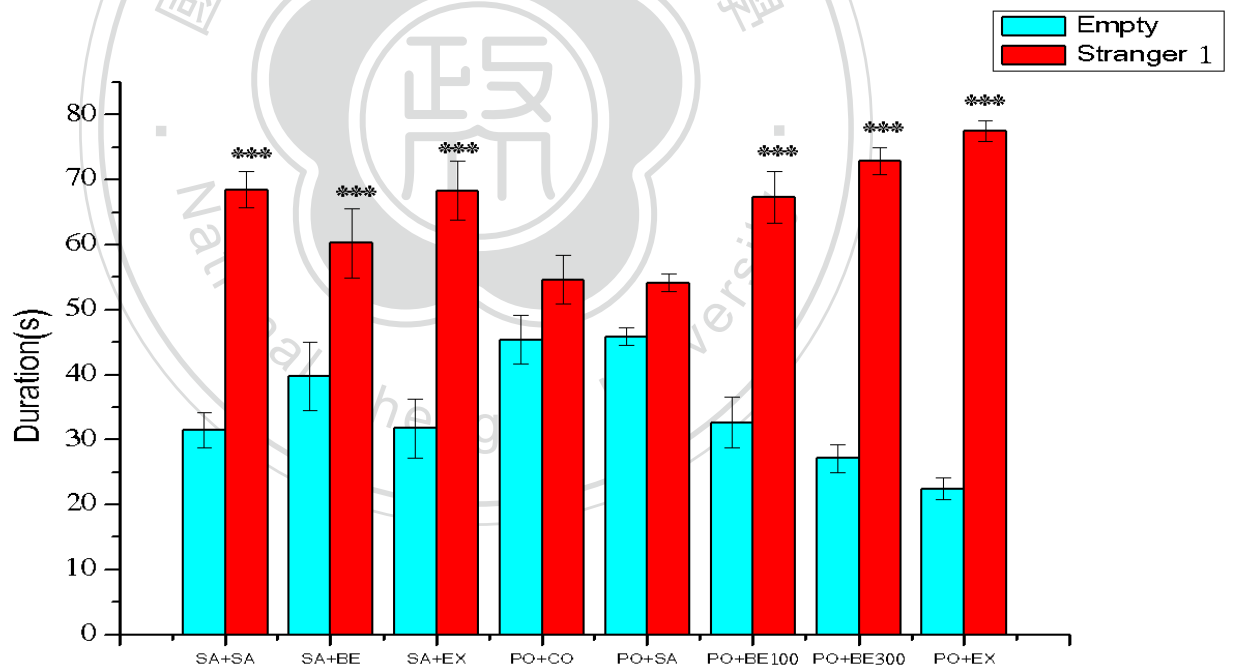




圖 27、Poly(i:c)引起母體免疫激活之模式治療後再給予類心理壓力檢測其子代社交力(II)。

母體給予 Poly(i:c)之子代於出生後第七十七天給予急性束縛壓力實驗兩小時的類心理壓力後檢測其影響子代之社交能力。(A)第一階段為社交能力，(B)第二階段社交偏好。實驗結果之數據以平均值 ± 標準誤差 (means ± S.E.M) 表示。結果顯示，給予 Poly(i:c)處理之組別與控制組在個別處理之組別相比較，除了 Poly(i:c)+control 和 Poly(i:c)+saline 組之外，均達統計上顯著差異，\*\*\*， $p < 0.001$ ;  $n = 9-12$ 。



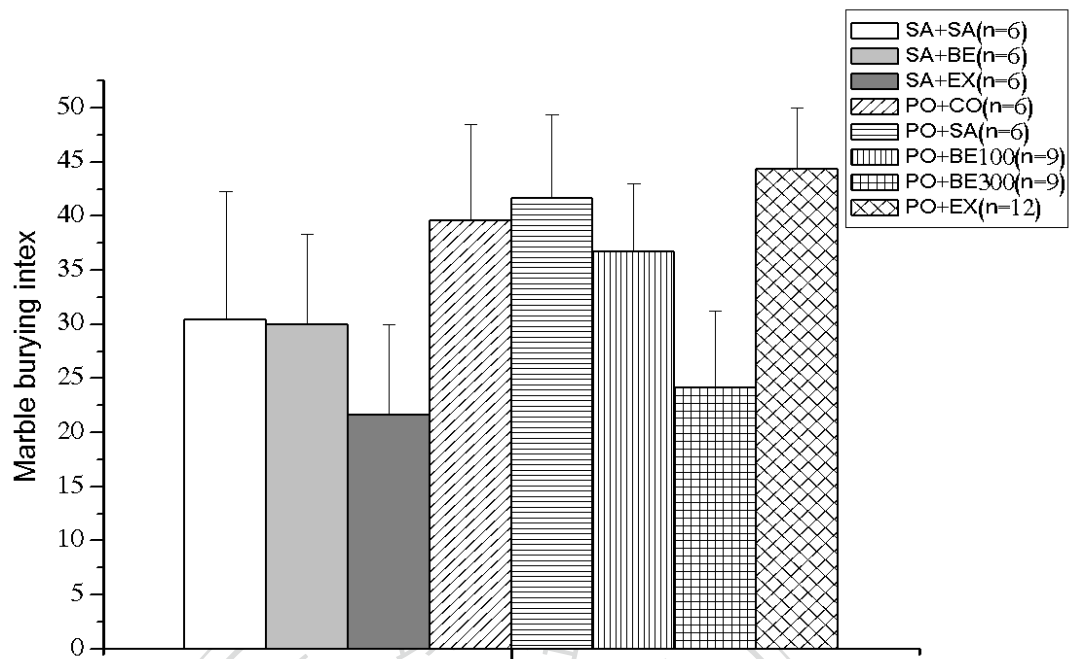


圖 28、Poly(i:c)引起母體免疫激活之模式治療後再給予類心理壓力檢測其子代刻板行為(II)。

母體給予 Poly(i:c)之子代於出生後第七十七天給予急性束縛壓力實驗兩小時的類心理壓力後檢測其影響子代之刻板行為。實驗結果之數據以平均值  $\pm$  標準誤差 (means  $\pm$  S.E.M) 表示。利用 one way ANOVA 檢測結果顯示，不論是給予 Poly(i:c)處理之組與 saline 控制組相比較或是三甲基甘胺酸和運動與 Poly(i:c)處理之組別與單獨 Poly(i:c)作比較，均未達統計上顯著， $p=0.733$ ;  $n=6-12$ 。

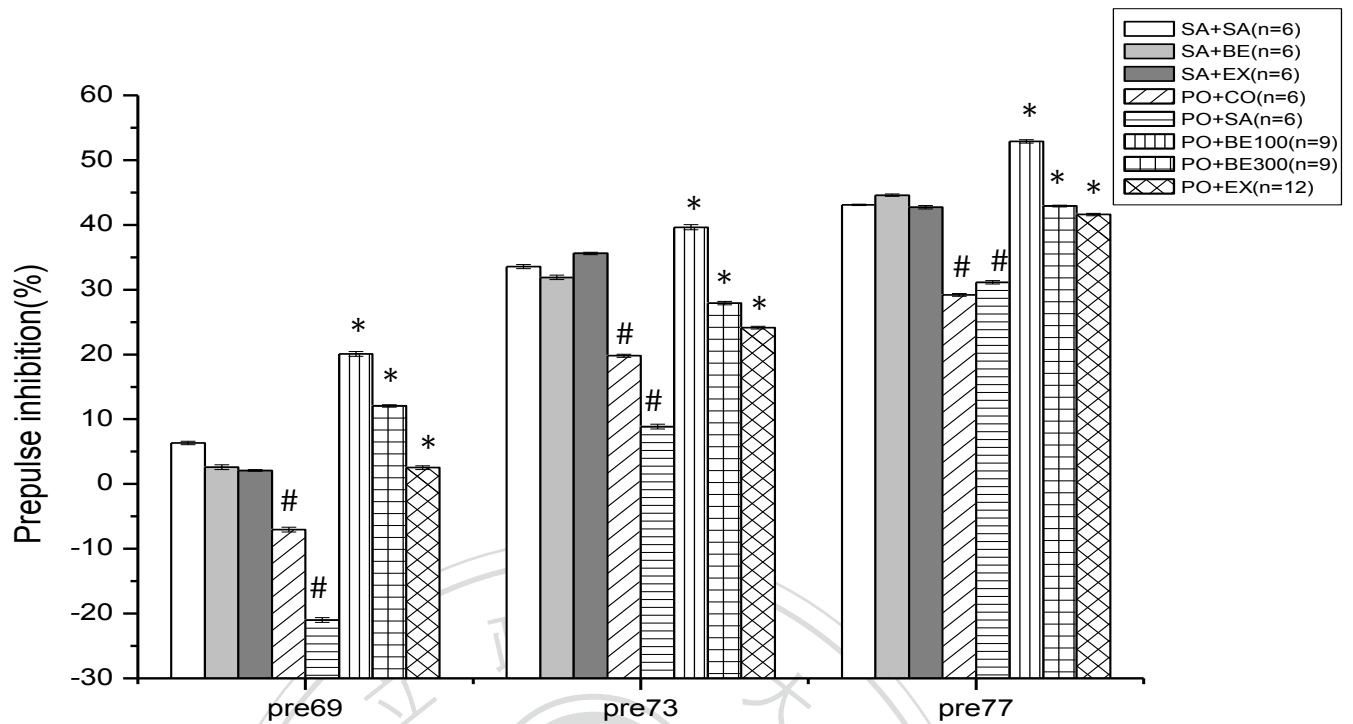
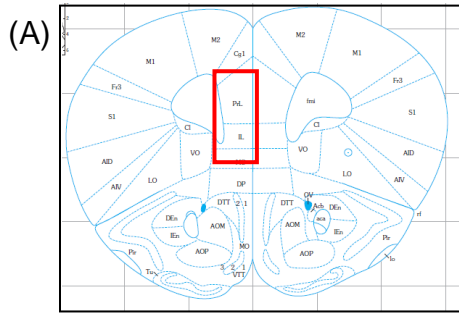
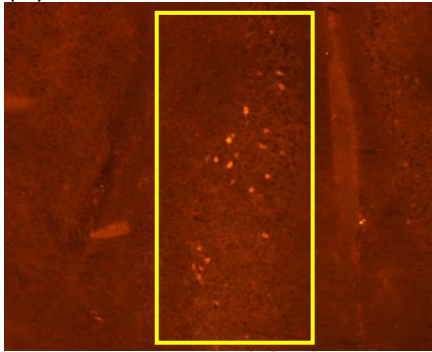


圖 29、三甲基甘胺酸與體能運動影響 Poly(i:c)引起母體免疫激活之子代對於 PPI 之反應。

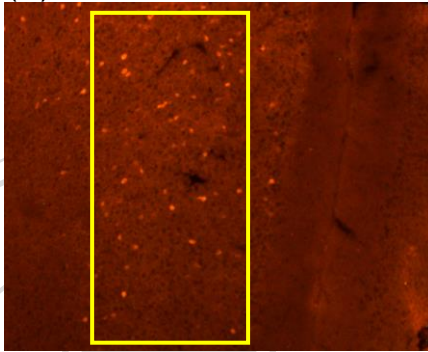
母體給予 Poly(i:c)之子代於出生後第四十二到第七十天以腹腔注射給予小鼠食鹽水 (SA)或三甲基甘胺酸(BE, 100, 300 mg/kg)和體能運動(EX)治療後檢測其影響子代之思覺失調正向症狀。實驗結果之數據以平均值  $\pm$  標準誤差 (means  $\pm$  S.E.M) 表示。結果顯示，給予 Poly(i:c)處理之組別與控制組相比較，均達統計上顯著差異，#， $p < 0.05$ 。且給予三甲基甘胺酸(100, 300 mg/kg)處理之組亦或是運動處理之組別與 Poly(i:c)單獨處理作比較，均達統計上顯著差異，\*， $p < 0.05$ 。



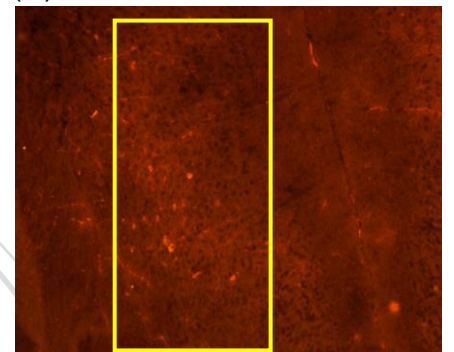
(B) SA+SA



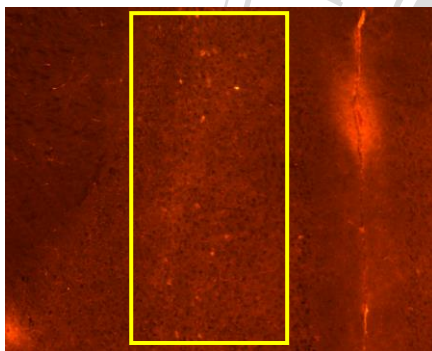
(C) SA+BE



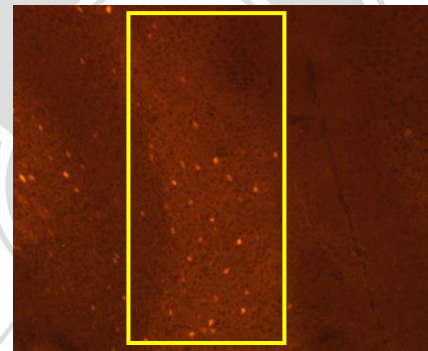
(D) SA+EX



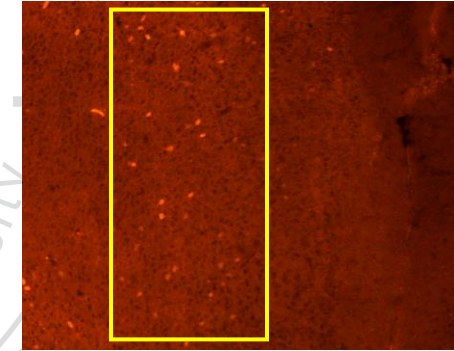
(E) PO+SA



(F) PO+BE



(G) PO+EX



(H)

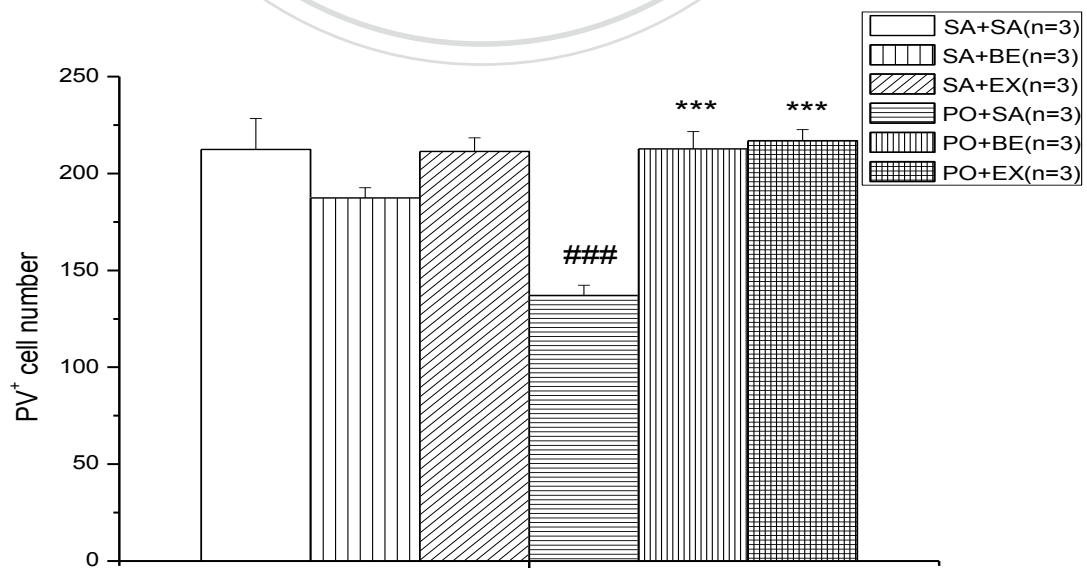


圖 30、Poly(i:c)引起母體免疫激活後改變子代前額葉皮質區的 PV<sup>+</sup>表現量。

PV<sup>+</sup>在前額葉皮質區表現以免疫組織法染色，(A)前額葉皮質區切片位置圖、(B) saline+saline、(C) saline+betaine100、(D) saline+exercise、(E) Poly(i:c)+saline、(F) Poly(i:c)+betaine100、(G) Poly(i:c)+exercise、(H) 實線區域 PV<sup>+</sup>表現量化圖。實驗結果之數據以平均值 ± 標準誤差 (means ± S.E.M) 表示。利用 one way ANOVA 分析檢測結果顯示其結果顯示，給予 Poly(i:c)處理之組別與控制組相比較，均達統計上顯著差異，###，p<0.001；且給予三甲基甘胺酸(100，300 mg/kg)處理之組亦或是運動處理之組別與 Poly(i:c)單獨處理作比較，均達統計上顯著差異，\*\*\*，p<0.001。



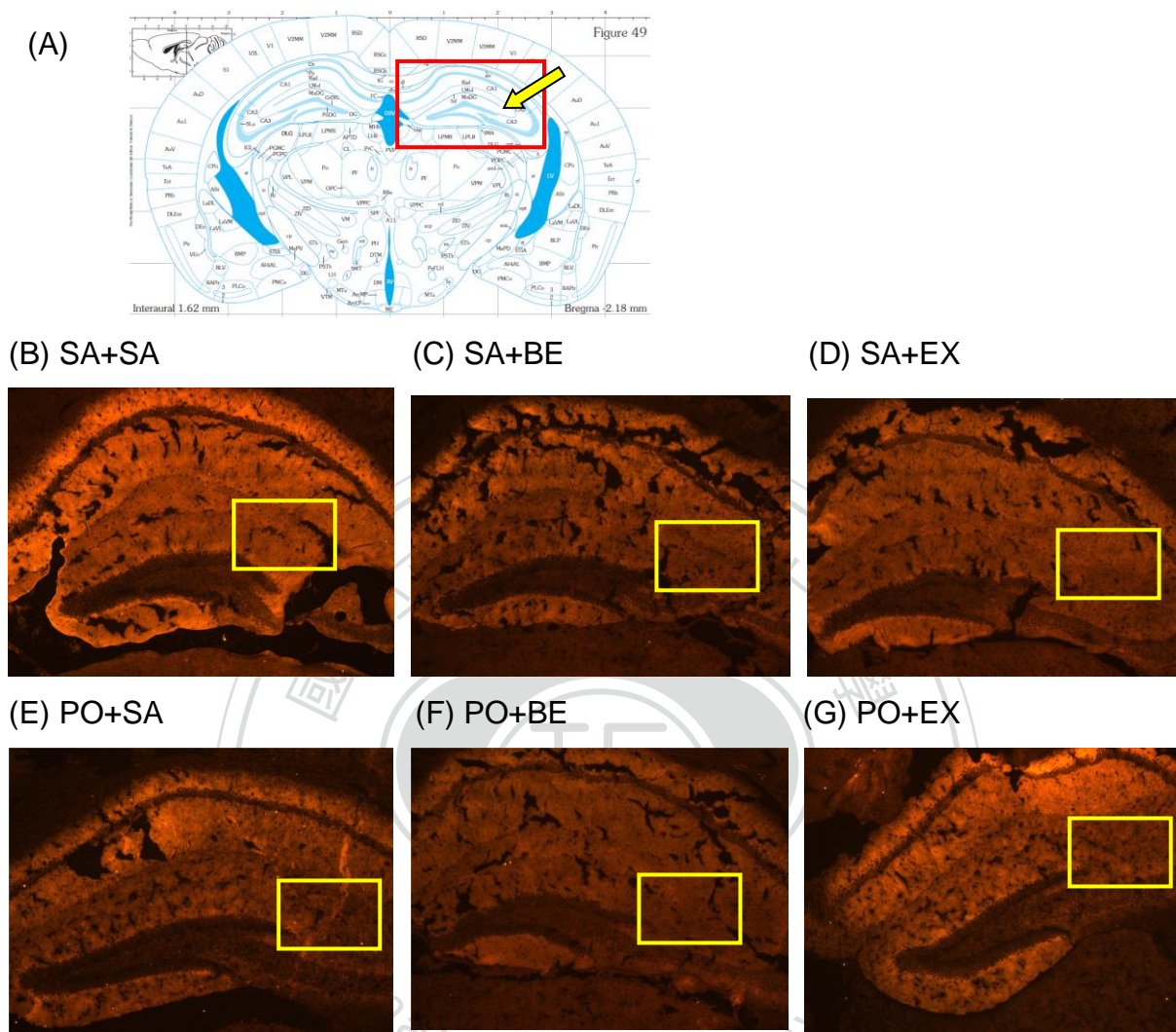


圖 31、三甲基甘胺酸與體能運動對 Poly(i:c)引起母體免疫激活後子代海馬迴中 NMDA 受體表現量之影響。

NMDAR 在海馬迴表現以免疫組織法染色，(A)海馬迴切片位置圖、(B) saline+saline、(C) saline+betaine100、(D) saline+exercise、(E) Poly(i:c)+saline、(F) Poly(i:c)+betaine100、(G) Poly(i:c)+exercise。

## 玖、參考文獻

- Abazyan B, Nomura J, Kannan G, Ishizuka K, Tamashiro KL, Nucifora F, Pogorelov V, Ladenheim B, Yang C, Krasnova IN, Cadet JL, Pardo C, Mori S, Kamiya A, Vogel MW, Sawa A, Ross CA, Pletnikov MV (2010) Prenatal interaction of mutant DISC1 and immune activation produces adult psychopathology. *Biol Psychiatry* 68:1172-1181.
- Altman J, Das GD (1965) Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. *J Comp Neurol* 124:319-335.
- Akira S, Takeda K (2004) Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol* 4:499-511.
- Andreasen NC, Flaum M, Swayze VW, li, Tyrrell G, Arndt S (1990) Positive and negative symptoms in schizophrenia: A critical reappraisal. *Arch Gen Psychiatry* 47:615-621.
- Angoa-Pérez M, Kane MJ, Briggs DI, Francescutti DM, Kuhn DM (2013) Marble Burying and Nestlet Shredding as Tests of Repetitive, Compulsive-like Behaviors in Mice. *Journal of Visualized Experiments : JoVE*.
- Armstrong JN, McIntyre DC, Neubort S, Sloviter RS (1993) Learning and memory after adrenalectomy-induced hippocampal dentate granule cell degeneration in the rat. *Hippocampus* 3:359-371.
- Baszczuk A, Kopczynski Z (2014) [Hyperhomocysteinemia in patients with cardiovascular disease]. *Postepy Hig Med Dosw (Online)* 68:579-589.
- Beebe LH, Tian L, Morris N, Goodwin A, Allen SS, Kuldau J (2005) Effects of exercise on mental and physical health parameters of persons with schizophrenia. *Issues Ment Health Nurs* 26:661-676.
- Beneyto M, Kristiansen LV, Oni-Orisan A, McCullumsmith RE, Meador-Woodruff JH (2007) Abnormal glutamate receptor expression in the medial temporal lobe in schizophrenia and mood disorders. *Neuropsychopharmacology* 32:1888-1902.
- Bloom FE (1975) Modern concepts in electrophysiology for psychiatry. *Psychopharmacol Commun* 1:579-585.
- Boksa P (2010) Effects of prenatal infection on brain development and behavior: a review of findings from animal models. *Brain Behav*

- Immun 24:881-897.
- Brown AS, Schaefer CA, Wyatt RJ, Goetz R, Begg MD, Gorman JM, Susser ES (2000) Maternal exposure to respiratory infections and adult schizophrenia spectrum disorders: a prospective birth cohort study. *Schizophr Bull* 26:287-295.
- Bruel-Jungerman E, Rampon C, Laroche S (2007) Adult hippocampal neurogenesis, synaptic plasticity and memory: facts and hypotheses. *Rev Neurosci* 18:93-114.
- Buynitsky T, Mostofsky DI (2009) Restraint stress in biobehavioral research: Recent developments. *Neurosci Biobehav Rev* 33:1089-1098.
- Carpenter WT, Tandon R (2013) Psychotic disorders in DSM-5. *Asian J Psychiatr* 6:266-268.
- Chai GS, Jiang X, Ni ZF, Ma ZW, Xie AJ, Cheng XS, Wang Q, Wang JZ, Liu GP (2013) Betaine attenuates Alzheimer-like pathological changes and memory deficits induced by homocysteine. *J Neurochem* 124:388-396.
- Ciaranello AL, Ciaranello RD (1995) The neurobiology of infantile autism. *Annu Rev Neurosci* 18:101-128.
- Collin L, Bindra J, Raju M, Gillberg C, Minnis H (2013) Facial emotion recognition in child psychiatry: a systematic review. *Res Dev Disabil* 34:1505-1520.
- Cotlarciuc I et al. (2014) Effect of genetic variants associated with plasma homocysteine levels on stroke risk. *Stroke* 45:1920-1924.
- Craig SA (2004) Betaine in human nutrition. *Am J Clin Nutr* 80:539-549.
- Dhabhar FS, McEwen BS (1996) Stress-induced enhancement of antigen-specific cell-mediated immunity. *J Immunol* 156:2608-2615.
- Duraiswamy G, Thirthalli J, Nagendra HR, Gangadhar BN (2007) Yoga therapy as an add-on treatment in the management of patients with schizophrenia--a randomized controlled trial. *Acta Psychiatr Scand* 116:226-232.
- Echeverry MB, Guimarães FS, Del Bel EA (2004) Acute and delayed restraint stress-induced changes in nitric oxide producing neurons in limbic regions. *Neuroscience* 125:981-993.
- Eriksson PS, Perfilieva E, Bjork-Eriksson T, Alborn AM, Nordborg C, Peterson DA, Gage FH (1998) Neurogenesis in the adult human



- hippocampus. *Nat Med* 4:1313-1317.
- Escobar M, Crouzin N, Cavalier M, Quentin J, Roussel J, Lante F, Batista-Novais AR, Cohen-Solal C, De Jesus Ferreira MC, Guiramand J, Barbanel G, Vignes M (2011) Early, time-dependent disturbances of hippocampal synaptic transmission and plasticity after in utero immune challenge. *Biol Psychiatry* 70:992-999.
- Fatemi SH, Emamian ES, Kist D, Sidwell RW, Nakajima K, Akhter P, Shier A, Sheikh S, Bailey K (1999) Defective corticogenesis and reduction in Reelin immunoreactivity in cortex and hippocampus of prenatally infected neonatal mice. *Mol Psychiatry* 4:145-154.
- Fujita Y, Ishima T, Hashimoto K (2016) Supplementation with D-serine prevents the onset of cognitive deficits in adult offspring after maternal immune activation. *Sci Rep* 6:37261.
- Ferguson BR, Gao WJ (2018) PV Interneurons: Critical Regulators of E/I Balance for Prefrontal Cortex-Dependent Behavior and Psychiatric Disorders. *Frontiers in Neural Circuits* 12.
- Finkelstein JD, Harris BJ, Kyle WE (1972) Methionine metabolism in mammals: kinetic study of betaine-homocysteine methyltransferase. *Arch Biochem Biophys* 153:320-324.
- Gao XM, Sakai K, Roberts RC, Conley RR, Dean B, Tamminga CA (2000) Ionotropic glutamate receptors and expression of N-methyl-D-aspartate receptor subunits in subregions of human hippocampus: effects of schizophrenia. *Am J Psychiatry* 157:1141-1149.
- Geyer MA, Wilkinson LS, Humby T, Robbins TW (1993) Isolation rearing of rats produces a deficit in prepulse inhibition of acoustic startle similar to that in schizophrenia. *Biol Psychiatry* 34:361-372.
- Gilmore JH, Fredrik Jarskog L (1997) Exposure to infection and brain development: cytokines in the pathogenesis of schizophrenia. *Schizophr Res* 24:365-367.
- Gogtay N, Vyas NS, Testa R, Wood SJ, Pantelis C (2011) Age of onset of schizophrenia: perspectives from structural neuroimaging studies. *Schizophr Bull* 37:504-513.
- Gonzalez-Burgos G, Cho RY, Lewis DA (2015) Alterations in cortical network oscillations and parvalbumin neurons in schizophrenia. *Biol Psychiatry* 77:1031-1040.
- Gordon JA (2010) Testing the glutamate hypothesis of schizophrenia.

- Nat Neurosci 13:2-4.
- Grace AA (2012) Dopamine system dysregulation by the hippocampus: implications for the pathophysiology and treatment of schizophrenia. *Neuropharmacology* 62:1342-1348.
- Gross G, Huber G (2008) [Psychopathology of schizophrenia and brain imaging]. *Fortschr Neurol Psychiatr* 76 Suppl 1:S49-56.
- Gust ID, Hampson AW, Lavanchy D (2001) Planning for the next pandemic of influenza. *Rev Med Virol* 11:59-70.
- Hagar H, Al Malki W (2014) Betaine supplementation protects against renal injury induced by cadmium intoxication in rats: role of oxidative stress and caspase-3. *Environ Toxicol Pharmacol* 37:803-811.
- Han M, Zhang JC, Yao W, Yang C, Ishima T, Ren Q, Ma M, Dong C, Huang XF, Hashimoto K (2016) Intake of 7,8-Dihydroxyflavone During Juvenile and Adolescent Stages Prevents Onset of Psychosis in Adult Offspring After Maternal Immune Activation. *Sci Rep* 6:36087.
- Harvey L, Boksa P (2012) Prenatal and postnatal animal models of immune activation: relevance to a range of neurodevelopmental disorders. *Dev Neurobiol* 72:1335-1348.
- Harrison PJ, Weinberger DR (2005) Schizophrenia genes, gene expression, and neuropathology: on the matter of their convergence. *Mol Psychiatry* 10:40-68; image 45.
- Holsboer F (1988) Implications of altered limbic-hypothalamic-pituitary-adrenocortical (LHPA)-function for neurobiology of depression. *Acta Psychiatr Scand Suppl* 341:72-111.
- Hooshmand B, Solomon A, Kareholt I, Leiviska J, Rusanen M, Ahtiluoto S, Winblad B, Laatikainen T, Soininen H, Kivipelto M (2010) Homocysteine and holotranscobalamin and the risk of Alzheimer disease: a longitudinal study. *Neurology* 75:1408-1414.
- Howes OD, McCutcheon R (2017) Inflammation and the neural diathesis-stress hypothesis of schizophrenia: a reconceptualization. *Translational psychiatry* 7:e1024.
- Hwu HG, Faraone SV, Liu CM, Chen WJ, Liu SK, Shieh MH, Hwang TJ, Tsuang MM, OuYang WC, Chen CY, Chen CC, Lin JJ, Chou FH, Chueh CM, Liu WM, Hall MH, Tsuang MT (2005) Taiwan schizophrenia linkage study: the field study. *Am J Med Genet B*

- Neuropsychiatr Genet 134B:30-36.
- Jung GY, Won SB, Kim J, Jeon S, Han A, Kwon YH (2013) Betaine Alleviates Hypertriglycemia and Tau Hyperphosphorylation in db/db Mice. *Toxicol Res* 29:7-14.
- Kempermann G, Krebs J, Fabel K (2008) The contribution of failing adult hippocampal neurogenesis to psychiatric disorders. *Current opinion in psychiatry* 21:290-295.
- Kimura M, Toth LA, Agostini H, Cady AB, Majde JA, Krueger JM (1994) Comparison of acute phase responses induced in rabbits by lipopolysaccharide and double-stranded RNA. *Am J Physiol* 267:R1596-1605.
- Kharbanda KK (2007) Role of transmethylation reactions in alcoholic liver disease. *World J Gastroenterol* 13:4947-4954.
- Knuesel I, Chicha L, Britschgi M, Schobel SA, Bodmer M, Hellings JA, Toovey S, Prinssen EP (2014) Maternal immune activation and abnormal brain development across CNS disorders. *Nat Rev Neurol* 10:643-660.
- Kronenberg G, Reuter K, Steiner B, Brandt MD, Jessberger S, Yamaguchi M, Kempermann G (2003) Subpopulations of proliferating cells of the adult hippocampus respond differently to physiologic neurogenic stimuli. *J Comp Neurol* 467:455-463.
- Lante F, Meunier J, Guiramand J, Maurice T, Cavalier M, de Jesus Ferreira MC, Aïmar R, Cohen-Solal C, Vignes M, Barbanel G (2007) Neurodevelopmental damage after prenatal infection: role of oxidative stress in the fetal brain. *Free Radic Biol Med* 42:1231-1245.
- Liu XP, Qian X, Xie Y, Qi Y, Peng MF, Zhan BC, Lou ZQ (2014) Betaine suppressed Aβ generation by altering amyloid precursor protein processing. *Neurol Sci* 35:1009-1013.
- Lodge DJ, Grace AA (2011) Hippocampal dysregulation of dopamine system function and the pathophysiology of schizophrenia. *Trends Pharmacol Sci* 32:507-513.
- Mazzanti M, Shirka E, Gjergo H, Hasimi E (2018) Imaging, Health Record, and Artificial Intelligence: Hype or Hope? *Curr Cardiol Rep* 20:48.
- Mednick SA, Machon RA, Huttunen MO, Bonett D (1988) Adult schizophrenia following prenatal exposure to an influenza

- epidemic. *Arch Gen Psychiatry* 45:189-192.
- Meyer U, Feldon J (2010) Epidemiology-driven neurodevelopmental animal models of schizophrenia. *Prog Neurobiol* 90:285-326.
- Meyer U, Knuesel I, Nyffeler M, Feldon J (2010) Chronic clozapine treatment improves prenatal infection-induced working memory deficits without influencing adult hippocampal neurogenesis. *Psychopharmacology (Berl)* 208:531-543.
- Meyer U, Feldon J, Dammann O (2011) Schizophrenia and Autism: Both Shared and Disorder-Specific Pathogenesis Via Perinatal Inflammation? *Pediatr Res* 69:26R.
- Mielnik CA, Horsfall W, Ramsey AJ (2014) Diazepam improves aspects of social behaviour and neuron activation in NMDA receptor-deficient mice. *Genes, brain, and behavior* 13:592-602.
- Millian NS, Garrow TA (1998) Human betaine-homocysteine methyltransferase is a zinc metalloenzyme. *Arch Biochem Biophys* 356:93-98.
- Miwa M, Tsuboi M, Noguchi Y, Enokishima A, Nabeshima T, Hiramatsu M (2011) Effects of betaine on lipopolysaccharide-induced memory impairment in mice and the involvement of GABA transporter 2. *J Neuroinflammation* 8:153.
- Moffitt TE, Caspi A, Rutter M (2005) Strategy for investigating interactions between measured genes and measured environments. *Arch Gen Psychiatry* 62:473-481.
- Moghaddam B, Javitt D (2012) From revolution to evolution: the glutamate hypothesis of schizophrenia and its implication for treatment. *Neuropsychopharmacology* 37:4-15.
- Moy SS, Nadler JJ, Perez A, Barbaro RP, Johns JM, Magnuson TR, Piven J, Crawley JN (2004) Sociability and preference for social novelty in five inbred strains: an approach to assess autistic-like behavior in mice. *Genes, brain, and behavior* 3:287-302.
- Nurjono M, Lee J, Chong SA (2012) A Review of Brain-derived Neurotrophic Factor as a Candidate Biomarker in Schizophrenia. *Clinical psychopharmacology and neuroscience : the official scientific journal of the Korean College of Neuropsychopharmacology* 10:61-70.
- Ozawa K, Hashimoto K, Kishimoto T, Shimizu E, Ishikura H, Iyo M (2006) Immune Activation During Pregnancy in Mice Leads to

- Dopaminergic Hyperfunction and Cognitive Impairment in the Offspring: A Neurodevelopmental Animal Model of Schizophrenia. *Biol Psychiatry* 59:546-554.
- Pajonk FG, Wobrock T, Gruber O, Scherk H, Berner D, Kaizl I, Kierer A, Muller S, Oest M, Meyer T, Backens M, Schneider-Axmann T, Thornton AE, Honer WG, Falkai P (2010) Hippocampal plasticity in response to exercise in schizophrenia. *Arch Gen Psychiatry* 67:133-143.
- Patterson PH (2002a) Maternal infection: window on neuroimmune interactions in fetal brain development and mental illness. *Curr Opin Neurobiol* 12:115-118.
- Patterson PH (2002b) Maternal infection: window on neuroimmune interactions in fetal brain development and mental illness. *Curr Opin Neurobiol* 12:115-118.
- Pian JP, Criado JR, Milner R, Ehlers CL (2010) N-methyl-D-aspartate receptor subunit expression in adult and adolescent brain following chronic ethanol exposure. *Neuroscience* 170:645-654.
- Piontkewitz Y, Arad M, Weiner I (2011) Risperidone administered during asymptomatic period of adolescence prevents the emergence of brain structural pathology and behavioral abnormalities in an animal model of schizophrenia. *Schizophr Bull* 37:1257-1269.
- Prozialeck WC, Edwards JR (2012) Mechanisms of cadmium-induced proximal tubule injury: new insights with implications for biomonitoring and therapeutic interventions. *J Pharmacol Exp Ther* 343:2-12.
- Rapoport JL, Addington AM, Frangou S, Psych MR (2005) The neurodevelopmental model of schizophrenia: update 2005. *Mol Psychiatry* 10:434-449.
- Rice F, Harold GT, Boivin J, van den Bree M, Hay DF, Thapar A (2010) The links between prenatal stress and offspring development and psychopathology: disentangling environmental and inherited influences. *Psychol Med* 40:335-345.
- Reif A, Schmitt A, Fritzen S, Lesch KP (2007) Neurogenesis and schizophrenia: dividing neurons in a divided mind? *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 257:290-299.

- Reisinger S, Khan D, Kong E, Berger A, Pollak A, Pollak DD (2015) The poly(I:C)-induced maternal immune activation model in preclinical neuropsychiatric drug discovery. *Pharmacol Ther* 149:213-226.
- Scola G, Duong A (2017) Prenatal maternal immune activation and brain development with relevance to psychiatric disorders. *Neuroscience* 346:403-408.
- Shahab SZ, Glezen WP (1994) Influenza Virus. In: *Viral Diseases in Pregnancy* (Gonik B, ed), pp 215-223. New York, NY: Springer New York.
- Shi L, Fatemi SH, Sidwell RW, Patterson PH (2003) Maternal Influenza Infection Causes Marked Behavioral and Pharmacological Changes in the Offspring. *The Journal of Neuroscience* 23:297-302.
- Squire LR (1992) Memory and the hippocampus: a synthesis from findings with rats, monkeys, and humans. *Psychol Rev* 99:195-231.
- Shenton ME, Dickey CC, Frumin M, McCarley RW (2001) A review of MRI findings in schizophrenia. *Schizophr Res* 49:1-52.
- Sugranyes G, Kyriakopoulos M, Corrigall R, Taylor E, Frangou S (2011) Autism spectrum disorders and schizophrenia: meta-analysis of the neural correlates of social cognition. *PLoS One* 6:e25322.
- Szoke A (2013) [Epidemiology of schizophrenic disorders, genetic and environmental risk factors]. *Rev Prat* 63:331-335.
- Tanskanen P, Ridler K, Murray GK, Haapea M, Veijola JM, Jaaskelainen E, Miettunen J, Jones PB, Bullmore ET, Isohanni MK (2010) Morphometric brain abnormalities in schizophrenia in a population-based sample: relationship to duration of illness. *Schizophr Bull* 36:766-777.
- Thibaut F (2017) Neuroinflammation: new vistas for neuropsychiatric research. *Dialogues Clin Neurosci* 19:3-4.
- Tanaka S, Ide M, Shibutani T, Ohtaki H, Numazawa S, Shioda S, Yoshida T (2006) Lipopolysaccharide-induced microglial activation induces learning and memory deficits without neuronal cell death in rats. *J Neurosci Res* 83:557-566.
- Tandon R, Nasrallah HA, Keshavan MS (2009) Schizophrenia, "just the facts" 4. Clinical features and conceptualization. *Schizophr Res* 110:1-23.
- Valsamis B, Schmid S (2011) Habituation and Prepulse Inhibition of Acoustic Startle in Rodents. *Journal of Visualized Experiments* :

JoVE.

- van Praag H, Kempermann G, Gage FH (1999) Running increases cell proliferation and neurogenesis in the adult mouse dentate gyrus. *Nat Neurosci* 2:266-270.
- Vilain J, Galliot AM, Durand-Roger J, Leboyer M, Llorca PM, Schurhoff F, Szoke A (2013) [Environmental risk factors for schizophrenia: a review]. *Encephale* 39:19-28.
- Vrajova M, Stastny F, Horacek J, Lochman J, Sery O, Pekova S, Klaschka J, Hoschl C (2010) Expression of the hippocampal NMDA receptor GluN1 subunit and its splicing isoforms in schizophrenia: postmortem study. *Neurochem Res* 35:994-1002.
- Wexler BE, Zhu H, Bell MD, Nicholls SS, Fulbright RK, Gore JC, Colibazzi T, Amat J, Bansal R, Peterson BS (2009) Neuropsychological near normality and brain structure abnormality in schizophrenia. *Am J Psychiatry* 166:189-195.
- Wolf SA, Melnik A, Kempermann G (2011) Physical exercise increases adult neurogenesis and telomerase activity, and improves behavioral deficits in a mouse model of schizophrenia. *Brain Behav Immun* 25:971-980.
- Xu MY, Wong AHC (2018) GABAergic inhibitory neurons as therapeutic targets for cognitive impairment in schizophrenia. *Acta Pharmacol Sin* 39:733-753.
- Zuckerman L, Rehavi M, Nachman R, Weiner I (2003) Immune activation during pregnancy in rats leads to a postpubertal emergence of disrupted latent inhibition, dopaminergic hyperfunction, and altered limbic morphology in the offspring: a novel neurodevelopmental model of schizophrenia. *Neuropsychopharmacology* 28:1778-1789.