

國立政治大學神經科學研究所

碩士論文

干擾素引起小鼠憂鬱行為之細胞分子機制研究

Investigating the cellular and molecular mechanisms
underlying interferon-alpha (IFN- α) induced depressive-like
behavior in the mouse

研究生：張凱傑 撰
指導教授：陳紹寬 博士
共同指導：廖瑞銘 博士

中華民國 110 年 5 月

謝致

在研究所學習的這段時間內，碩士論文能夠完成，需要感謝許多人，在此獻上最大的敬意。

首先感謝我的兩位指導教授陳紹寬博士以及廖瑞銘博士的諄諄教誨，在整個研究過程中，均不厭其煩地給予指導與協助，提供了良好的學習以及實驗環境，兩位在神經科學和心理領域上的教導讓我受益良多，謝謝陳老師以及廖老師。

其次要感謝的是所有在實驗室的同仁朱珮文、湯之皓、林牧昀、陳芊慧、陳蕙芃、陳誼穎、廖翊妤、林有上、吳芳諭、林姿佑、陳盛翔，有你們的協助才能讓我的實驗以及論文可以順利的進行。在此特別感謝我的同學廖翊妤，有你在我的碩士的學習過程中的陪伴與指教，你的熱情相助讓我不論在課業上的學習以及生活上的支持都有極大的幫助。另外也感謝政治大學神經科學所行政專員于立恩，感謝您在我就讀政治大學的這段時間提供我許多協助不論在課業上或是許多行政的流程上都有極大的幫助，也感謝您為政治大學神經科學所的付出。

最後更要感謝父母的養育之恩，有了家人的支持，讓我能安心地完成最終的學業，達成人生階段性的理想。有了他們的協助，使我的論文能順利完成，如果這份薄薄的論文能為科學及社會上帶來一些貢獻，請將榮耀歸於他們。

摘要

臨床研究中發現，長期的發炎與憂鬱症有緊密的關聯。然而，發炎與重度憂鬱症(Major Depression Disorder, MDD)之間的因果關係與病理機制尚未釐清。干擾素- α (IFN- α)屬於第一類型的干擾素。常被用於治療自體免疫性疾病，病毒性疾病和癌症。然而長期使用 IFN- α 也會導致憂鬱。長期接受 IFN- α 治療的患者中大約有 15%至 40%被診斷患有憂鬱症，由於使用 IFN- α 也會誘導發炎，因此長期使用 IFN- α 導致憂鬱的分子機制可能與發炎引起憂鬱的機制相似。長期注射 IFN- α 的小鼠也會引起類似憂鬱的行為表現，因此可用做 IFN- α 導致憂鬱的動物模式。前人研究發現，大腦中發炎及微膠質細胞的活化，及神經細胞的 IFN- α 受體的訊息傳導被活化，均與此異常行為的發生有密切的關聯。本研究旨在了解第一類型干擾素誘導憂鬱症的細胞分子機制，透過為期四周的腹腔注射 IFN- α 來誘導小鼠出現憂鬱行為，包括懸尾實驗以及強迫游泳中的僵直時間會更長，糖水偏好測試中糖水的飲用量減少，相比之下透過施打 IFN- α 處理的小鼠在高腳十字迷宮和開放場域的行為測試中並未出現焦慮行為。我們透過文獻回顧挑選在憂鬱症的致病中幾個關鍵的大腦核區，包括下視丘、海馬迴、前額葉皮質、依核以及杏仁核。並檢驗在各腦區干擾素是否可直接作用，及是否造成發炎。我們檢驗在這些腦區中干擾素訊息傳遞的下游基因 IFNRA、IRF1 和 STAT1，以及發炎因子 TNF- α 和 iNOS 等的基因表現。我們發現干擾素可直接作用在下視丘中，並引起發炎。另在海馬迴中干擾素訊息傳遞的下游基因表現也顯著上升，但並未有發炎的現象。因此干擾素引起憂鬱可能是先作用在下視丘或海馬迴，再進一步影響血清素及多巴胺等系統。我們進一步對施打了 IFN- α 的下視丘中數種神經勝肽的表現進行分析，發現許多神經勝肽的 mRNA 表現量有所抑制。另外在海馬迴以及杏仁核中我們發現 PKA 活性受到抑制。總而言之我們的實驗結果顯示，IFN- α 在腹腔施打在大腦中的初級作用點應為下視丘或海馬迴，

可能經由造成神經胜肽的功能低下後進一步造成憂鬱的症狀，我們的發現將會提供有關 IFN- α 與憂鬱症之間的致病機制的重要資訊及新的研究方向。

關鍵字:憂鬱症、干擾素- α 、發炎、下視丘、海馬迴、前額葉皮質、依核、杏仁核。



Abstract

Clinical studies revealed that inflammation is highly associated with the pathogenesis of major depression disorder (MDD). However, the causative relationship and the cellular and molecular mechanisms of inflammation induced MDD have not been established. Type I interferons, such as Interferon-alpha (IFN- α), function as an inflammatory regulator that displays a unique pharmacological profile, including induce pro-inflammatory cytokines and prevent the virus producing and replicating the RNA and DNA. Based on these pharmacological characteristics, IFN- α is often used for treating the autoimmune disease, viral disease, and various cancers. Chronic treatment of IFN- α leads to one notable adverse side effect: depression. About 15% to 40% of patients were diagnosed with depression after receiving IFN- α treatment for several months. The mechanisms of IFN- α induced depression might be similar to the mechanisms underlying inflammation induced depression. Therefore, the IFN- α can be used as an animal model of depression. Previous studies suggested that the activation of myeloid cells, including microglia and perivascular macrophages, contributes to IFN- α induced depression. Additionally, the phenotypes of conditional mutants indicated that IFN- α Signaling in neurons is essential for the onset of the pathological behavior. This study aimed to understand the cellular and molecular mechanism of type-I interferon induced depression. Daily injected with IFN- α through intraperitoneal route for four weeks induced depressive like behavior, including longer immobility time in tail suspension and forced swim test, as well as reduced sugar intake in sucrose preference test. In comparison, these IFN- α treated mice did not exhibit anxiety-like behavior in elevated plus maze and open field test. We first identify the primary target brain regions of IFN- α . Five brain regions that are involved in depression, including hypothalamus, hippocampus, prefrontal cortex, nucleus accumbens and amygdala,

were examined. The expression of inflammatory genes, TNF- α and iNOS, as well as the downstream genes of interferon signaling, IFNRA, IRF1 and STAT1, were determined. As we expected, our preliminary data suggested that inflammatory genes and interferon signaling were only upregulated in hypothalamus, possibly due to the higher permeability to blood brain barrier as a circumventricular organ. Based on the above observations, we hypothesized that chronic treatment of IFN- α induces hypothalamic inflammation, disrupts the normal functions of neuropeptide system and trigger depressive like behavior or indirectly affect mesolimbic pathways to generate anhedonia. The expressions of various neuropeptide genes in the IFN- α treated hypothalamus were further evaluated. Numbers of neuropeptide mRNA level are decrease. In addition, IFN- α treatment downregulated the activation of protein kinase A, which is a major downstream target of monoaminergic receptors, in the hippocampus and amygdala. In conclusion, our results suggested IFN- α can directly suppress the functions of neuroendocrine system, and possibly in turn affect serotonergic or dopaminergic system. Our finding will provide important information about the pathological mechanisms of IFN- α induced depression.

Key word: Depression; Interferon-alpha; inflammation; hypothalamus; hippocampus; prefrontal cortex; nucleus accumbens; amygdala

目錄

謝致.....	I
摘要.....	II
Abstract	IV
目錄.....	VI
縮寫對照表.....	IX
緒論.....	1
文獻回顧.....	1
1. 憂鬱症.....	1
2. 干擾素 α (Interferon alpha, IFN- α).....	7
3. 憂鬱症相關大腦核區.....	10
研究目的及策略.....	14
1. 研究目的及動機.....	14
2. 實驗設計.....	15
材料與方法.....	17
1. 實驗設計及受試動物.....	17
2. 行為測試.....	17
3. 免疫組織染色(Immunohistochemistry, IHC).....	18
4. 西方墨點(Western blot).....	19
5. quantitative Polymerase Chain Reaction (qPCR).....	20
6. Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA).....	20
7. 統計分析.....	21
實驗結果.....	22
1. 長期施打 IFN- α 影響小鼠出現憂鬱行為.....	22
2. 腹腔施打 IFN- α 會在下視丘以及海馬迴活化 IFN- α 的訊息傳遞因子.....	23
3. IFN- α 調節周邊免疫以及中樞神經系統的發炎反應.....	24
4. 施打 IFN- α 會導致下視丘的功能失調.....	27

5. 海馬迴以及杏仁核的蛋白酶 A 會因為 IFN- α 而發生改變.....	29
討論	31
實驗結果	36
圖一 小鼠的在接受 IFN- α 後的基本生理體徵。.....	36
圖二 在接受 IFN- α 後並不會誘發焦慮行為但會發生憂鬱行為。.....	38
圖三 IFN- α 調節下視丘中的 IFN- α 訊息傳遞路徑上的因子。.....	40
圖四 IFN- α 部分涉及調節前額葉皮質中的 IFN- α 訊息傳遞路徑上的因子。.....	41
圖五 IFN- α 不涉及調節依核中的 IFN- α 訊息傳遞路徑上的因子。.....	42
圖六 IFN- α 活化部分海馬迴中的 IFN- α 訊息傳遞路徑上的因子。.....	43
圖七 IFN- α 不涉及調節杏仁核中的 IFN- α 訊息傳遞路徑上的因子。.....	44
圖八 長期施打干擾素會調節周邊免疫的發炎。.....	45
圖九 小鼠下視丘的免疫細胞及免疫反應受到 IFN- α 而活化。.....	47
圖十 IFN- α 不參與調節前額葉皮質部分發炎因子的 RNA 表現量。.....	48
圖十一 IFN- α 不參與調節依核部分發炎因子的 RNA 表現量。.....	49
圖十二 IFN- α 不參與調節海馬迴中發炎因子的 RNA 表現量。.....	50
圖十三 IFN- α 不參與調節杏仁核中部分發炎因子的 RNA 表現量。.....	51
圖十四 長期施打 IFN- α 的小鼠其行為及其大腦中的分子表現的相關值。.....	52
圖十五 HPA 系統與 IFN- α 之間的相互作用。.....	53
圖十六 下視丘分泌神經胜肽的功能異常。.....	54
圖十七 大腦中蛋白酶 A 迴路的異常在接受 IFN- α 後的變化。.....	57
圖十八: IFN- α 引發憂鬱行為的假設。.....	58
參考文獻	59
附錄:	74
附錄一:裂解緩衝液(Lysis Buffer)配方	74
附錄二:loading dye 配方.....	74
附錄三:Running Gel 配方.....	74
附錄四:Stacking Gel 配方	75
附錄五:Tank Buffer 配方	75

附錄六:Transfer Buffer 配方	75
附錄七:RT 混合液體.....	76
附錄八:cDNA 混合液體.....	76
附錄九:實驗中使用的 primer 以及其溫度.....	76



縮寫對照表

5-HIAA	5-Hydroxyindoleacetic Acid
5-HT	Sweotonin
ACTH	Adrenocorticotropic Hormone
ASD	Autism Spectrum Disorder
AVP	Arginine Vasopressin
BBB	Blood Brain Barrier
cGAS	Cyclic GMP-AMP Synthase
CMS	Chronic Mild Stress
CNS	Central Nervous System
CRH	Corticotropin Releasing Hormone
CSF	Cerebrospinal Fluid
CVOs	Circumventricular Organs
DA	Dopamine
DAT	Dopamine Transporter
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
EPM	Elevated plus maze
EPSP	Excitatory Postsynaptic Potential
FST	Forced swim test
GFAP	Glial fibrillary acidic protein
HPA	Hypothalamic-Pituitary-Adrenal
IFITM	Interferon Inducible Transmembrane Protein
IFN- α	Interferon Alpha
IFNAR	Interferon Alpha Receptor
IHC	Immunohistochemistry
IL-1 β	Interleukin 1 β
IL-6	Interleukin 6
IRF	Interferon Regulatory Factor
ISGF	Interferon-Stimulated Gene Factor
ISRE	Interferon-Sensitive Response Element
JAK	Janus Kinases

L-DOPA	Levodopa
LTD	Long-Term Depression
LTP	Long-Term Potentiation
MAOI	Monoamine Oxidase Inhibitor
MC4R	Melanocortin 4 Receptor
MC4R	Melanocortin 4 Receptor
MDD	Major Depression Disorder
MIA	Maternal Immune Activation
MRI	Magnetic Resonance Imaging
MS	Multiple Sclerosis
NAc	Nucleus Accumbens
NE	Norepinephrine
NET	Norepinephrine Transporter
NO	Nitric Oxide
NOS	Nitric Oxide Synthases
NPY	neuropeptide Y
PD	Parkinson's Disease
PET	Positron Emission Tomography
PFC	Prefrontal Cortex
PKA	Protein kinase A
PKA	Protein kinase A
POMC	Pro-Opiomelanocortin
PP-1	phosphatase-1
p-PKA	Phospho- Protein kinase A
PTSD	Post-Traumatic Stress Disorder
qPCR	quantitative Polymerase Chain Reaction
SNRI	Serotonin Norepinephrine Reuptake Inhibitor
SOCS	Suppressor of cytokine signaling
SPT	Sucrose preference test
SSRI	Selective Serotonin Reuptake Inhibitor
STAT	Signal Transducers And Activators
STAT	Signal transducer and activator of transcription
TBI	Traumatic Brain Injury

TCAS
TLR
TNF- α
TST
VTA
 α -MSH

Tricyclic Antidepressants
Toll-Like Receptor
Tumor necrosis factor- α
Tail suspension test
Ventral Tegmental Area
 α -Melanocyte-Stimulating Hormone



緒論

文獻回顧

1. 憂鬱症

憂鬱症(Major Depression Disorder, MDD)普遍的發生在許多開發中或已開發國家內，其症狀會導致患者出現長時間的鬱悶情緒並且患者以前感到有趣的活動會失去興趣甚至會喪失個體的身體的活動能力此症狀稱之為喜樂不能(Anhedonia)，另外患者會出現大量的負面思考，認為生活毫無意義、出現極大的罪惡感以及對事情的無助感，表現出對社交行為的抗拒有反覆自殺以及死亡的念頭，飲食習慣的巨大變化出現沒有食慾或是大量暴飲暴食的情形，也可能會併發其他精神問題出現妄想、幻覺或是幻聽。然而這些症狀會影響其生活機能以及降低整體社會的生產力，因此憂鬱症在目前的社會上被認為是急需被解決的疾病。

1.1. 憂鬱症的可能原因(神經傳遞物質)

目前對於憂鬱症發生的推測原因有三種，其一是大腦中的神經傳遞物質(Neurotransmitters)調節異常，猜測神經傳遞物質為其主要原因是由於抑鬱症藥物，最早被用於憂鬱症的治療是單胺類氧化酶抑制劑(Monoamine Oxidase Inhibitor, MAOI)，它被發現可以提高大腦中血清素(Serotonin, 5-HT)、正腎上腺素(Norepinephrine, NE)和多巴胺(Dopamine, DA)的濃度水平(Loomer *et al.*, 1957)。三環抗憂鬱藥劑(Tricyclic Antidepressants, TCAS)則是憂鬱症的第一代治療藥物，在當時是最為常見也是最被廣泛使用的藥物，三環抗憂鬱藥劑主要是增加單胺類的濃度並且會阻斷血清素和正腎上腺素的再吸收(Ross and Renyi, 1969; Tatsumi *et al.*, 1997)，不過由於三環抗憂鬱藥劑的副作用過於嚴重便針對其藥理上的機制開發出了第二代的抗憂鬱藥劑選擇性血清素再吸收抑制劑(Selective Serotonin Reuptake Inhibitor, SSRI)

以及血清素和正腎上腺素再吸收抑制劑 (Serotonin Norepinephrine Reuptake Inhibitor, SNRI)，第二代抗憂鬱藥劑的副作用有明顯的改善因此這類藥物到現在仍然還是世界上處方最多的治療藥物。在第一代以及第二代抗憂鬱藥劑的功效，便奠定憂鬱症的單胺類假說。

1.1.1. 血清素

除了治療藥物的證據外，還有許多證據可以指出神經傳遞物質是參與在憂鬱症症狀之中，對於分析憂鬱症患者的大腦脊髓液中發現5-HT的初級產物5-HIAA(5-Hydroxyindoleacetic Acid)濃度低下，特別是出現自殺行為的那些患者有更明顯的差異(Träskman *et al.*, 1981)。動物實驗上面也得到相似證據，在5-HT的基因剔除鼠在實驗結果中發現其自身會誘發憂鬱行為(Ramboz *et al.*, 1998; Cryan and Mombereau, 2004; Hedlund *et al.*, 2005)。對於5-HT與憂鬱症之間的關聯性逐漸清晰後，大量實驗發現5-HT一共有十四種亞型受體，其中會有五種與受體參與在憂鬱症當中: 5-HT 1A, 5-HT 1B, 5-HT 4, 5-HT 6和5-HT 7，而這五種受體在憂鬱症患者上的變異差異也會出現病理上的不同(Yohn *et al.*, 2017)，這或許也可以解釋並非所有患者皆可以透過SSRI類藥物來進行治療。

1.1.2. 正腎上腺素

然而SSRI類藥物無法治療所有患者症狀的這一特性也凸顯出正腎上腺素上的重要性，部分患者可以透過SNRI類代替SSRI類藥物來治療。在歐洲部分國家甚至批准使用選擇性正腎上腺素再吸收抑制劑來治療憂鬱症，且在文獻中也發現選擇性正腎上腺素再吸收抑制劑的治療效果甚至可以與三環抗憂鬱藥劑的效果相似(Montgomery, 1997; Eyding *et al.*, 2010)。對小鼠的正腎上腺素轉運蛋白(Norepinephrine Transporter,

NET)的功能性喪失後會對壓力誘導憂鬱症具有抵抗力(Haenisch *et al.*, 2009)，這些研究便可指出NE與憂鬱症的關聯性。

1.1.3. 多巴胺

憂鬱症狀中的Anhedonia經常性的伴隨著許多疾病同時出現，例如帕金森氏症(Parkinson's Disease, PD)(Isella *et al.*, 2003)以及思覺失調症(Schizophrenia)(Strauss and Gold, 2012)，吸毒的成癮患者的戒斷症狀也會發生(Gawin and Kleber, 1986)，然而Anhedonia的定義並非僅僅是無法獲得喜悅，還包括其酬賞(Reward)以及嫌惡(Aversion)的複雜機制，然而動機決策以及酬賞反應主要是透過多巴胺系統(Schultz, 1998)，在大量針對成癮藥物的研究中發現多巴胺在大腦中主要影響愉悅感(Reward)和嫌惡感(Aversion)(Nestler and Carlezon Jr, 2006; Lammel *et al.*, 2014)。在過去的研究中成癮藥物的結果發現酬賞迴路主要都是透過Ventral Tegmental Area(VTA)至Nucleus Accumbens (NAc)，幾乎所有的成癮藥物都會增加NAc中的多巴胺釋放，這條迴路與酬賞效果的反應還透過光學遺傳學的技術證實(Tsai *et al.*, 2009)。另一方面當大鼠透過慢性輕度的壓力(Chronic Mild Stress ,CMS)來誘發憂鬱症後發現糖水偏好測試的異常以及強迫游泳的行為的僵直時間增加並且伴隨著多巴胺系統的下調(Willner *et al.*, 1987; Tye *et al.*, 2013)，當使用D2受體的興奮劑，也可以讓接受過CMS的小鼠增加糖水的飲水量(Willner *et al.*, 1994)，在患有憂鬱症的患者身上發現多巴胺的轉運蛋白(Dopamine Transporter, DAT)以及多巴胺D2的受體都有著顯著下降(D'haenen and Bossuyt, 1994; Meyer *et al.*, 2001)。

1.2. 憂鬱症的可能原因(內分泌系統)

內分泌系統的功能失調，HPA(Hypothalamic-Pituitary-Adrenal)軸是在憂鬱症裡時常被討論的一種假設，在過去的研究中發現當個體感受到壓力反應，會使的大腦中的下視丘(Hypothalamus)釋放促皮質素釋放激素(Corticotropin Releasing Hormone, CRH)到腦下垂(Anterior Pituitary)促使他釋放促腎上腺皮質素(Adrenocorticotrophic Hormone, ACTH)到腎上腺皮質(Adrenal Gland)使其釋放可體松(Cortisol)到血液並循環到全身，而當下視丘和腦下垂體偵測到可體松後便會啟動負調節系統降低可體松在身體裡的濃度(Pariante and Lightman, 2008)。壓力導致憂鬱症發生的可能原因是壓力無法排除，導致體內的CRH、ACTH、可體松不斷保持高濃度使HPA軸失調引發憂鬱症的發生(Burke *et al.*, 2005)。另一個假設是當壓力導致可體松的關係增加後，下視丘和腦下垂體的負回饋的系統異常，因此可體松的濃度無法回復到正常值。在眾多文獻中也許多的證據可以支持這些假設，如憂鬱症患者體內CRH有不正常的反應(Gold and Chrousos, 2002)，在糖皮質激素受體缺失的小鼠憂鬱行為亦會有所增加(Boyle *et al.*, 2005)。

除了主要在憂鬱症大量被探討的HPA軸之外，其實還有許多神經胜肽也被發現在憂鬱症是有異常的表現，在憂鬱症的大腦中另外還發現催產素(Oxytocin)主要影響情感的社位行為、伴侶行為等(Smith *et al.*, 2010)，催產素顧名思義還有參與在分娩和哺乳期的子宮收縮以及乳汁的分泌(Carson *et al.*, 2013)。過去的文獻也發現催產素會抑制ACTH的釋放(Legros, 2001)，不過在憂鬱症患者死後的催產素反應並不太一致，部分文獻指出催產素的濃度會升高(Heinrichs and Domes, 2008; Turan *et al.*, 2013)，另一部分的文獻又指出其濃度會下降(Ozsoy *et al.*, 2009)。在後續的研究也發現催產素在性別上有著差異，這也被推測可能與臨床上的研究有所關連(Dai *et al.*, 2017)。
血管收縮素又稱抗利尿激素(Arginine Vasopressin, AVP)參與在血壓、壓力、

以及可體松的濃度的調節，過去的研究發現血管收縮素會增強ACTH的釋放(Engelmann *et al.*, 2004)，在精神疾病的研究中發現AVP的數量增加(Meynen *et al.*, 2006)，另外當控制血液中的AVP濃度還可以同時抑制HPA軸的系統並且恢復重度憂鬱症患者的症狀。正腎上腺素以及血清素兩者都是參與在憂鬱症發病的訊息傳遞路徑，而甘丙胺素(Galanin)則是調節兩者合成的重要因子，實驗中也發現刺激特定Galanin的受體也會導致憂鬱症的症狀，同時HPA軸也會受到刺激增加壓力賀爾蒙的濃度增加(Kuteeva *et al.*, 2008)。食慾素(Hypocretin/Orexin)調節進食行為、體溫控制、以及睡眠，過去的研究發現，在食慾素基因剔除的小鼠行為表現上出現嚴重得睡眠以及進食問題(Chemelli *et al.*, 1999; Hara *et al.*, 2001)，並且影響其酬賞效果與壓力反應(Boutrel *et al.*, 2005; Harris *et al.*, 2005; Inutsuka and Yamanaka, 2013)。這些觀點都被認為參與在憂鬱症發病的過程當中，然而這些神經肽的製造場所就是在下視丘中。由於以上諸多證據，我們推測憂鬱症患者的主要發病原因可能是來自於下視丘的功能異常，導致大量的神經肽物質嚴重失調最後讓憂鬱症的症狀逐漸出現。雖然這樣的假設還需要大量的文獻支持，不過下視丘在精神疾病中扮演的角色絕對是不容小覷的。

1.3. 憂鬱症的可能原因(免疫系統)

發炎反應是針對細菌或是病毒的感染、有害的化學物質以及組織損害後會啟動的生理保護機制，不過除了維持身體的健康外，過度的發炎反應會引發負面的效應，甚至導致精神疾病的發生，針對免疫系統與大腦之間有許多的假設以及研究，而且大量的文獻也明確指出其相關性。以思覺失調症為例，產婦免疫系統活化(Maternal Immune Activation ,MIA)意味著病毒或細菌感染了懷孕的婦女，使其在妊娠期間引發免疫系統的活化，其子女在未來罹患思覺失調症的機率會提高三成以上(Brown and Derkits, 2010)，這些免疫系

統的活化主要會引發IL-1，IL-6，TNF α 和IFN γ (Shi *et al.*, 2003)，而這些發炎因子中干擾素誘導的跨膜蛋白(Interferon Inducible Transmembrane Protein ,IFITM) 則被認為與思覺失調症的發生有著最直接的關係，在思覺失調症的患者體內也被檢驗到不正常的IFITM的表現(Arion *et al.*, 2007)。除了思覺失調症外還有許多的精神疾病是與發炎的關係十分強烈，如:自閉症(Autism Spectrum Disorder, ASD)、創傷後壓力症候群(Post-Traumatic Stress Disorder, PTSD)、憂鬱症等。另一方面免疫系統的活化反應也會導致精神疾病的發生，創傷性腦損傷(Traumatic Brain Injury ,TBI)、自發性免疫疾病(Autoimmune Diseases)、多發性硬化(Multiple Sclerosis, MS)都是免疫系統異常導致身體的慢性發炎進而併發精神疾病的證據(Heaton *et al.*, 1985; Shi *et al.*, 2003; Eaton *et al.*, 2006)，這些發現都說明了精神疾病在某些方面可能是因為發炎反應過度或是失調所導致。

發炎反應與憂鬱症之間的關聯是近期在科學界熱烈被討論的其中一種議題，文獻指出當壓力出現後會誘發大腦中Microglia活化(Frank *et al.*, 2007) Microglia分布於中樞神經系統(Central Nervous System, CNS)當中，主要功能為清除CNS中的斑塊以及保護神經系統受到感染或是傷害，當他偵測到CNS中的異常後會開始分泌促發炎因子(Pro-Inflammatory)活化免疫系統，透過免疫系統的效果改善異常情形並減緩疾病症狀。然而當身體裡長期處於發炎的環境，會引起很多身體產生負擔並且導致不良的影響，在許多疾病中也可以發現體內中有相對較高的發炎反應(Burguillos *et al.*, 2011; Perry and Holmes, 2014)。發炎反應其實也會影響著憂鬱症，在MMD的患者中可以檢驗到免疫系統過度的活化(Miller and Raison, 2016)，透過抗憂鬱藥物來治療憂鬱症患者後其免疫反應同時也會降低(Nazimek *et al.*, 2017)，有趣的是若僅降低發炎反應也可有效的改善憂鬱症狀(M Schmidt *et al.*, 2016)。另一方

面，長期被發炎反應影響的人有較高的機率會被憂鬱症纏身(Dantzer *et al.*, 2008)，以多發性硬化症(Multiple Sclerosis, MS)的患者為例，患者免疫系統內的T細胞異常，會攻擊自身神經元的髓鞘，導致血腦障壁(Blood Brain Barrier, BBB)損傷，發炎因子在大腦中的活化反應會隨之增加，發炎的狀況也會日益嚴重。然而憂鬱的症狀則是經常伴隨著多發性硬化症的發生而跟著併發。在動物實驗中若已經因基因編輯技術修改小鼠的免疫系統表現，也發現到會使小鼠自發性地出現憂鬱症狀。Toll-Like Receptor(TLR)在先天性免疫系統中扮演相當重要的角色，主要用來辨識病原體的分子並且進一步誘發免疫系統得活化。Toll-Like Receptor(TLR)基因剔除小鼠比起正常的野生小鼠有更高的可能性在受到壓力後會出現憂鬱行為(Nie *et al.*, 2018)。另一個透過發炎因子影響精神疾病的案例是干擾素 α (Interferon Alpha ,IFN- α)，在長期服用IFN- α 的病人會漸漸出現抑鬱的副作用症狀(Hauser *et al.*, 2002; Raison *et al.*, 2005; Lotrich, 2009)。

2. 干擾素 α (Interferon alpha, IFN- α)

干擾素主要是當細胞受到病毒感染後，細胞會釋放干擾素，藉由干擾素本身的特性活化免疫系統並且同時抑制病毒的複製。干擾素可以依照其功能性分成三種：第一類型干擾素、第二類型干擾素、第三類型干擾素。IFN- α 則是屬於第一類型的干擾素，第一類型的干擾素僅鍵結到干擾素第一類型的受體，受體由IFNAR1和IFNAR2以及第一型的干擾素配體組成。干擾素是一種免疫調節因子，當身體裡受到病毒或是細菌的侵襲時，便會透過免疫調節因子來進行細胞之間的溝通與活化免疫系統來保護個體。也因為IFN- α 的這種能影響免疫系統的能力，在臨床上主要被用來治療惡性腫瘤(Kirkwood and Ernstoff, 1990)、以及病毒感染的B型肝炎或是C型肝炎(Saracco *et al.*, 2003)，然而在治療的期間發現患者會開始出現憂鬱症狀，同時在許多動物模型上長期施打IFN- α 也使其出現抑鬱的

行為表徵(Felger *et al.*, 2007; Zheng *et al.*, 2014)。但針對IFN- α 為甚麼會出現憂鬱症狀目前還未明，如果可以從IFN- α 誘發憂鬱症的原因查明，那對於憂鬱症的了解一定會有更佳清晰的輪廓。

2.1. IFN- α 的訊息傳遞路徑

IFN- α 在臨床上已經被大量的運用於許多疾病中，為了確保IFN- α 在臨床上使用不會產生嚴重的副作用，因此在藥物動力學上有許多研究針對IFN- α 在進入身體裡後所引發的變化，研究中發現JAK(Janus Kinases)分布在IFN- α 受體的細胞膜內側(Gauzzi *et al.*, 1997; Ragimbeau *et al.*, 2003; Felger *et al.*, 2007)，當IFN- α 鍵結在IFN- α 受體上後，JAK會被磷酸化導致STAT(Signal Transducers And Activators)蛋白結構發生改變且也被磷酸化，這其中又以Signal transducer and activator of transcription 1(STAT1)和Signal transducer and activator of transcription 2(STAT-2)為最主要的兩個因子(Melén *et al.*, 2001)，而後與IRF-9(IFN Regulatory Factor-9)相互作用形成名為ISGF-3(Interferon-Stimulated Gene Factor-3)的複合物(Levy *et al.*, 1989; Fu *et al.*, 1990; Schindler *et al.*, 1992)，接著ISGF3會進到細胞核與DNA序列中的ISRE(Interferon-Sensitive Response Element)的DNA片段鍵結(Reich *et al.*, 1987; Schindler *et al.*, 1992)，最後改變大量的轉錄因子在後續的轉錄反應，如:cGAS (Cyclic GMP-AMP Synthase),IRF-1(IFN Regulatory Factor-1)、IRF-3(IFN Regulatory Factor-3)、SOCS-1(Suppressor of cytokine signaling 1)...(Schneider *et al.*, 2014)，同時也會使促炎性因子活性增加，引發免疫系統的活化製造發炎的環境，讓身體裡的免疫系統可以達到抗病毒或是抑制癌細胞的效果。

2.2. IFN- α 與血腦障壁

精神疾病或是免疫疾病從周邊免疫上可以發現發炎因子的大量反應，不過這些

發炎因子是如何通過腦血管障壁的阻擋影響大腦是近年來許多文獻在探討的重要議題，而在我們的案例中對於IFN- α 與BBB之間的交互作用也是我們相當好奇的問題，過去就有許多文獻指出IFN- α 在透過腹腔或是靜脈注射的方式增加血液中IFN- α 濃度後，在大腦中也可以發現IFN- α 的濃度量增加，這些證據也指出IFN- α 是有能力可以穿越BBB的(Smith *et al.*, 1985; Greig *et al.*, 1988; Fioravanti *et al.*, 2012)。有部分的文獻發現，長期的慢性發炎可能會導致BBB的結構發生異常的變化，使腦血管障壁的細胞間隙變大，讓部分的促發炎因子通過使大腦中的免疫系統因而失調導致精神疾病的發生(Menard *et al.*, 2017)。雖然目前IFN- α 為何可以通過BBB影響大腦的機制還不明朗，但我們透過文獻搜索提出了一些假設。大腦中有部分的腦核區由於其坐落的位置特別，因此與腦血管障壁的作用也有一些差異，其中最特別的非室周器(Circumventricular Organs, CVOs)，CVOs剛好位於第三腦室以及第四腦室的旁邊，然而這個位置的腦血管障壁缺乏完整的緊密結構，是允許部分的單胺類或是其他分子藉由這裡通過腦血管障壁，CVOs主要影響的大腦核區主要是同樣位於腦室旁的下視丘(Fry and Ferguson, 2007)，因此我們認為或許IFN- α 可能是藉由下視丘能通過部分物質的機制來影響大腦的活性反應，而這樣的過程最主要受到影響的便是下視丘，因此下視丘可能在IFN- α 誘導憂鬱症的過程中相當重要。

2.3. IFN- α 與神經傳遞物質

雖然IFN- α 誘發憂鬱症的確切原因依舊不明，但在近期的研究中有部分文獻針對IFN- α 與神經傳遞物質進行研究，在靈長類動物的身上長期的施打IFN- α 後使其出現憂鬱症的行為，並對其以斷層掃描的方式檢驗腦中的多巴胺變化，研究結果發現長期的干擾素 α 會抑制靈長類動物的多巴胺受體數量下降，且其多巴胺的釋放量也減少(Felger *et al.*, 2013)。另一些證據也指出憂鬱症患者在長期服用IFN- α 後開始出現帕金森氏症的症狀，並且這症狀可以透過服用Levodopa(L-

DOPA)恢復顫抖等症狀，並且當治療結束後停止服用IFN- α ，帕金森氏症的症狀也隨之復發(Kajihara *et al.*, 2010)。雖然IFN- α 與神經傳遞物質之間的證據還不多，但是無法排除IFN- α 會直接影響神經傳遞物質的可能性。

3. 憂鬱症相關大腦核區

目前常用的抗憂鬱藥劑中，不過有效的抗憂鬱藥劑都伴隨著較強的耐藥性，耐藥性的效果大幅度的降低了憂鬱症狀的緩解，也因為這樣的緣故衍伸出憂鬱症的標靶治療，希望透過僅改變特定憂鬱症的大腦核區來達到最好的治療效果，為了達到這個目的大量的研究團隊去探討與涉及憂鬱症的大腦核區。

3.1. 前額葉皮質

前額葉皮質(Prefrontal Cortex, PFC)，在過去的文獻中發現 PFC 主要調節個體的認知學習、情緒控制以及選擇決策…等功能，PFC 以及憂鬱症之間的關聯性在許多實驗中都可以得到證明，例如在 PFC 的體積在重度憂鬱症患者上明顯的下降(Fry and Ferguson, 2007)，正子斷層照影 (Positron Emission Tomography, PET)的顯像結果也顯示 MMD 的患者的突觸數量減少，在動物實驗中透過慢性壓力的方式誘導小鼠出現憂鬱行為後，同樣可以觀察到小鼠的前額葉皮質的突觸量也同樣出現減少的狀況(Li *et al.*, 2011; Kang *et al.*, 2012)。在 HPA 軸的系統中，PFC 實際上也參與著對可體松的調節並且是啟動負回饋機制中重要的一環，也就是說 PFC 的功能異常將會導致 HPA 軸的功能失衡(Diorio *et al.*, 1993)，總和來說前額葉皮質的重要性在憂鬱症的控制是也是相當重要的一環。

3.2. 依核

依核(Nucleus Accumbens, NAc)，在藥物成癮的領域中已經確定NAc以及腹側被蓋區(Ventral Tegmental Area, VTA)中的多巴胺訊息傳遞會影響酬賞效果的調

節，並且所有的成癮藥物都會導致多在NAc-VTA迴路中的巴胺含量增加(Koob and Le Moal, 2001)。在壓力與NAc的研究上發現，短期的壓力會引發類似於藥物誘導多巴胺系統的現象，這樣的效果依然有著的爭議畢竟與嫌惡效果的反應完全相反，不過值得注意的一點是，長期暴露在壓力的環境下，確實會導致NAc-VTA的神經路徑發生變異(Saal *et al.*, 2003)。而NAc與下視丘之間的關係更是在早就已經被發現了，當時發現兩個腦核區之間的訊息傳遞會影響進食行為與酬賞機制之間的關係 (Wise, 1996)，在後續的實驗中更發現其主要調節的方式可能是透過MC4R(Melanocortin 4 Receptor)，MC4R主要受到下視丘內的POMC(Pro-Opiomelanocortin)神經元所調節，當POMC收到到瘦素(Leptin)的訊號，便會釋放 α -MSH(α -Melanocyte-Stimulating Hormone)到下游神經元上MC4R(Melanocortin 4 Receptor)進食行為便會隨之增加，飲食行為的大量變化也屬於憂鬱症的症狀之一，以及有近期的實驗發現，MC4R在NAc中的表現量直接參與到Reward的效果(Kirkwood and Ernstoff, 1990; Lim *et al.*, 2012)。

3.3. 海馬迴

海馬迴(Hippocampus)是對憂鬱症的研究中常見的大腦核區，其功能普遍認為與記憶的儲存有關，海馬迴的神經細胞使用著一種特殊的方式來增強學習記憶稱為長期增強作用(Long-Term Potentiation, LTP)，當海馬迴內神經細胞的突觸在一定時間內受到快速且大量的刺激後，這個神經細胞在往後會對刺激的反應變得敏感化並延長且強化興奮性突觸後電位 (Excitatory Postsynaptic Potential, EPSP) 的效果，然而當LTP發生的時間過長後，便會出現長期減損效果(Long-Term Depression, LTD)，LTD會阻止刺激再次建立新的LTP，因為這特殊的機制建立了海馬迴中的突觸可塑性。而在動物模型中透過壓力誘發憂鬱症後發現海馬迴的LTP效果大量下降，取而代之的是LTD的發生(Kim and Diamond, 2002)。與前額葉皮質相同的情形，海馬迴的體積在MMD的患者有明

顯得降低同時增加可體松的濃度(Sheline, 2011; Chan *et al.*, 2016)，並且在透過選擇性血清素再吸收抑制劑(SSRI)類型藥物是可以成功的逆轉海馬迴的體積減少。

3.4. 杏仁核

杏仁核(Amygdala)的功能與海馬迴的功能相當接近，兩者的功能皆參與學習記憶以及情緒的功能(Jarrard, 1993)，不過杏仁核又特別掌管恐懼記憶和負向的情緒(Kim *et al.*, 1993; Ehrlich *et al.*, 2009)，因此被認為是影響憂鬱症的可能原因，以磁力共振成像(Magnetic Resonance Imaging, MRI)和解剖學上的研究皆發現憂鬱症患者在杏仁核的反應以及體積都有顯著的減少(Mervaala *et al.*, 2000; Hastings *et al.*, 2004)。杏仁核對於酬賞獎勵的機制中也有反應，在成癮藥物的研究中發現除了常見的NAc外，杏仁核同樣也會因為成癮藥物的作用被一起活化(Everitt *et al.*, 1999)。雖然過去的文獻指出杏仁核的關注大多在焦慮症狀上面，不過壓力所誘發的訊息傳遞會通過下視丘接著到杏仁核，通過CRH再投射到大腦中的其他核區接著影響HPA軸迴路。

3.5. 下視丘

下視丘(Hypothalamus)具有內分泌的功能，主要是調節內分泌的主要核區，在過去對於下視丘的功能發現他主要調節溫度、進食行為、睡眠、以及戰或逃的行為反應。另一種下視丘特性是其位於大腦核區的位置，在前幾節中也提到下視丘與腦血管障壁之間的功能並不如其他大腦核區完善，也因為這樣他可以進行訊息的交流並且調節生理上的口渴、血管收縮以及血壓的變化。證據也指出促發炎因子是能夠通過 CVOs 來影響下視丘的功能，引發情緒上的變化更可能導致精神疾病的發生(Fry and Ferguson, 2007)，除此之外，內分泌系統中也

有許多類型的物質被發現與憂鬱症的功能有高度的關聯性，從這些證據都指出，干擾素誘發憂鬱症有極大的可能性是透過下視丘來誘導憂鬱症的發生。



研究目的及策略

1. 研究目的及動機

先前的研究中發現，臨床上的患者在透過IFN- α 進行腫瘤或是肝炎等疾病的治療時，在治療期間常伴隨著憂鬱症狀的出現，不過對於IFN- α 誘發憂鬱症狀的致病原因目前並未完全清楚，由於IFN- α 長期治療使用範圍廣，且其致病機制可能與發炎引起的憂鬱相似，因此此致病機制研究具有臨床上的重要性。而且對於這方面的研究數量也相當少，不過值得慶幸的是由於IFN- α 在抑制病毒的功效上十分顯著，被大量的運用於臨床的病歷上，IFN- α 在細胞中的信息傳遞路徑已經被研究的相當透徹。

另一方面先前對於憂鬱症的動物模型大多是透過長期的低強度壓力來誘導憂鬱症狀，但是大量的文獻指出以壓力誘發的動物模型會使其出現焦慮的症狀，並且在進行的文獻中指出個體會因為基因上的差異而出現壓力的調節能力的不同(Nie *et al.*, 2018)，另外壓力的設置的控制也並非容易，使研究結果上時常出現結果的不同，但使用IFN- α 來誘導動物引發憂鬱症狀的話，便可以通過精準的濃度測量來達到控制IFN- α 在動物體內的含量，也可以藉由明確了解的IFN- α 神經傳遞路徑來確保其在大腦中的活性反應。

過去的研究發現。由於IFN- α 誘導發炎因子的特性，研究發現IFN- α 誘導憂鬱症出現的同時，在其周邊免疫會出現發炎因子的活化(Zheng *et al.*, 2015)，在大腦中也可以觀測到大量小膠質細胞的活化(Zheng *et al.*, 2015; Wachholz *et al.*, 2016)。抑制微膠質細胞的活化可減少類憂鬱行為。IFN- α 在中樞神經系統內的神經細胞的信息傳遞對憂鬱行為的非常重要，在神經細胞中條件敲除IFN- α 受體可抑制類憂鬱行為的發生(Zheng *et al.*, 2014)，而在IFN- α 的訊息傳遞中STAT-1在過去的研究中又相當關鍵，若將STAT-1的活性降低，將會出現憂鬱行為同時也會抑制IFN- α 的訊息傳遞訊號。(Wang *et al.*, 2008)。另外在IFN- α 除了誘導憂鬱行為德發生，也會抑制5-

HT的受體生成，並且減少5-HT的濃度(Guo *et al.*, 2016; Murakami *et al.*, 2016)，我們希望在這個基礎上，進一步研究此現象的細胞與分子機制。

2. 實驗設計

本研究希望透過長期施打IFN- α 在小鼠的腹腔中，檢測五種與憂鬱症密切相關的大腦核區並就三個方向進行探討。第一是基於過去對於IFN- α 的神經傳遞路徑的研究來探討IFN- α 是否有增加大腦中的RNA表現量，來確保IFN- α 是通過該核區來影響動物行為上的變化。第二是建立在IFN- α 屬於發炎調節因子的一種，會增加免疫系統的活性，因此可能會在周邊免疫亦或者在中樞神經系統中導致發炎因子的增加。第三種假設則是下視丘的異常假說，由於其核區座落位置地點特殊，位於腦室的旁邊，最容易受到周邊免疫的影響，並且此大腦核區有著調節內分泌系統的功能，即有可能是此核區發生異常後導致憂鬱症狀的出現。

我們對小鼠施打IFN- α 四周後，檢驗其行為以及其基本生理特徵是否因IFN- α 而產生改變。發現小鼠確實會因為長期施打IFN- α 後誘發憂鬱行為後，我們認為IFN- α 可能是透過改變中樞神經系統來改變其行為的反應，因此我們在實驗的第二的部分以中樞神經系統為主要的研究方向，在這個部分下視丘為研究的主要目標，主要挑選下視丘的原因為他所屬的區域以及其調節神經肽的特性等等，同時檢測另外四個與憂鬱症相關的大腦核區，分別是前額葉皮質、依核、海馬迴、杏仁核，我們檢測了IFN- α 的訊息傳遞路徑中的訊息因子表現量，藉此來檢測IFN- α 所參與的大腦核區，由於IFN- α 下游的訊息因子有許多，我們挑選了四種作為IFN- α 被活化的標記因子，分別為 STAT-1、IRF-1、SOCS-1以及IFN- α 的受體，並透過即時定量聚合酶連鎖反應來探討訊息傳遞路徑的分子活性表現量。 第三個部份是IFN- α 屬

於發炎調節因子，可能會誘發或是抑制發炎因子的表現量，因此在周邊免疫中透過ELISA檢測周邊免疫的發炎因子濃度，並在中樞神經系統中再次透過即時定量聚合酶連鎖反應來檢測發炎因子在下視丘以及其他四個大腦核區中的活化情形，在發現了下視丘的發炎因子表現量較高後，在透過免疫組織染色的方式來觀察發炎細胞的表現量是否會因為IFN- α 的長期注射而誘發改變。

第四個部分則是在確認到下視丘有IFN- α 的活性以及發炎反應後，我們認為下視丘的功能可能會因為IFN- α 的關係而出現改變，因此我們挑選了數種神經胜肽來檢測，並透過即時定量聚合酶連鎖反應來觀察下視丘對神經胜肽的RNA活性。

最後一部分，我們認為神經傳遞物質也可能是IFN- α 誘發憂鬱行為出現的可能原因之一，因此我們挑選了多巴胺的下游PKA作為其一的標的物，並以西方墨點法來檢測p-PKA以及PKA的表現量在下視丘以及其他四個大腦核區內的變化。

材料與方法

1. 實驗設計及受試動物

本研究旨在探討長期施用IFN- α 對憂鬱症相關腦區造成的細胞及分子層次的變化，實驗設計見圖一。實驗小鼠採購自國家實驗研究院國家實驗動物中心，使用的動物品系採用C57BL/6J八周大的雄性小鼠，小鼠飼育在自動調節12小時照明以及12小時昏暗的環境中，食物以及水則是讓受試隨意獲取。受試分成兩組，分別使用PBS 或是IFN- α (4×10^5 IU/kg)每日透過腹腔注射的方式施打進小鼠體內，連續施打28天，第29天以及第30天行為測試後再次透過腹腔施打的方式施打PBS 或是IFN- α 。在動物行為測試完後會接著採取受試動物的血液以及大腦組織進行後續的基因表現及蛋白質分析。同一動物的行為及生化分析的數據會再進行關聯性測試(correlation analysis)。

2. 行為測試

2.1. 開放場域 (Open field):

小鼠被放置在黑色的壓克力板製的空曠空間(60公分*60公分*60公分)，讓小鼠在此空間自由移動10分鐘，並透過攝影機以及路徑自動追蹤分析軟體追蹤以及分析，並將正中間的區域(20公分*20公分)設定為中心區域。

2.2. 高架十字迷宮 (Elevated plus maze, EPM):

迷宮由黑色壓克力板的兩兩相對(25公分*5公分*16公分)的開放式平台(25公分*5公分*0.5公分)以及封閉式平台所構成，中間十字交接處有一個小平面(5公分*5公分)，在實驗開始時，將小鼠放置於迷宮交接處，小鼠的面朝封閉端的平台放置，讓小鼠在此空間自由移動10分鐘，並透過攝影機以及路徑自動追蹤分析軟體追蹤以及分析。

2.3. 懸尾實驗(Tail suspension test, TST):

將小鼠尾巴吊起而呈現倒掛於半空中的狀態，讓小鼠以這樣的狀態維持6分鐘，並透過攝影機以及路徑自動追蹤分析軟體追蹤以及分析。

2.4. 強迫游泳(Forced swim test, FST):

將小鼠放置於室溫的透明圓柱水桶中，水的深度保持在即使小鼠游泳也不會踩到地板為基準，讓小鼠以這樣的狀態維持6分鐘，並透過攝影機以及路徑自動追蹤分析軟體追蹤以及分析。

2.5. 糖水偏好測試(Sucrose preference test, SPT):

在實驗開始的當天，將原本放置於鼠籠的水瓶內的水替換成0.1%的糖水，讓小鼠在48小時內自由飲用糖水，並記錄在兩天內小鼠對於糖水的攝取量。

3. 免疫組織染色(Immunohistochemistry, IHC)

以 Isoflurane 將小鼠麻醉並且對痛覺沒有反應後，透過心臟將食鹽水注入小鼠體內把血液沖出，接著將 2%的 Paraformaldehyde(PFA)以相同得方式注入心臟，使其流至全身。完成後取出小鼠的腦袋，將其完全浸泡於 2%PFA 中進行後固化一天，第二天取出腦袋將其置換於 30%糖水中直到鼠腦在糖水中完全沉澱，此時即可將腦取出，以急速冷凍的方式透過 2%的 gelatin 包埋，便可使用冷凍切片機以 20 μ m 的厚度切片。接著執行染色，第一天先以 PBS 清洗腦切片三次每次十分鐘，接著使用 0.2%的 Triton X 進行清洗兩個小時，最後加上適當的一級抗體使其作用 12 小時。本實驗所使用的一級抗體為：

(1) Rabbit anti-Iba1 antibody (1:1000, FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation)

(2) Mouse anti-GFAP antibody -Astrocyte Marker ab7260(1:500, abcam)

隔天再以 PBS 清洗三次每次 10 分鐘，此時加入適當的二級抗體，最後使用 Fluoroshield™ 封片。本實驗所使用二級抗體為：

(1) Goat Anti-Mouse IgG Antibody, Alexa Fluor Plus 555 (1:500, Thermo)

(2) Goat Anti-rabbit IgG Antibody, Alexa Fluor Plus 488 (1:500, Thermo)

4. 西方墨點(Western blot)

將細胞以蛋白酶抑制劑(Protease inhibitor)以及磷酸酶抑制劑(Phosphatase inhibitor)的裂解緩衝液(lysis buffer)，以物理方式研磨細胞並以 14,000XG 離心取其上清液，利用 Bradford 測定蛋白質的濃度，並以 (Bovine serum albumin, BSA)做出標準曲線透過分光光度計檢測樣品的 595nm 吸光值來計算蛋白質的實際濃度。並將蛋白與 loading dye 混合形成蛋白樣品，並加熱 95°C 十分鐘後，以 10%Gel 配置於電泳槽中，隨後注入蛋白在樣品格中，以每片膠電流 30Ma 電壓 400V 持續一小時。隨後透過 PVDF 膜(Polyvinylidene fluoride)浸泡於甲醇(Methanol)中，接著接膠片、PVDF 膜與濾紙組裝後放入轉置槽中，電壓為 100V，電流 700Ma 轉置一小時。轉置完後以 5%BSA 於 0.005%TBST 緩衝液，在室溫中以 40rpm 一小時，再透過一級抗體在 4°C 中維持 16-18 小時。本實驗所使用的一級抗體為：

(1) Mouse anti-actin antibody (1:100000, Chemicon)

(2) Rabbit anti-PKA C- α antibody (1:1000, Cell Signaling)

(3) Rabbit Phospho-PKA C- α Antibody(1:1000, Cell Signaling)

待一級抗體反應結束後，以 0.1%TBST 清洗三次，加入 0.05%TBST 緩衝液稀釋二級抗體一個小時。並清洗三次。本實驗所使用的二級抗體為：

(1) Goat Anti-Mouse IgG Antibody, horseradish peroxidase conjugate antibody (1:5000, Millipore)

(2) Goat Anti-Rabbit IgG Antibody, horseradish peroxidase conjugate antibody (1:5000, Millipore)

西方墨點所需的所有材料配方皆在附錄一至六。

5. quantitative Polymerase Chain Reaction (qPCR)

以Isoflurane將小鼠麻醉並且對痛覺沒有反應後，直接斷頭取出小鼠的腦袋並精確的提取所需要的腦核區，接著加入RNAzol®RT以及水並在室溫以物理的方式研磨組織，以離心機12XG持續15分鐘後提取上清液，接著加入isopropanol再次離心，將沉澱物以75%enthal清洗最後以ddH₂O回融。接著透過NanoDrop測量後，計算以及分配試管中的RNA濃度，加入所需的Primer(oligo)將RNA合成為cDNA並加熱65°C兩分鐘，接著以特定比例加入水、RT-script buffer、dNTPs、RT-script enzyme、RNase inhibitor混合詳細配方如附錄七，以37°C放置90分鐘後立刻以85°C放置5分鐘。最後以特定比例混合SYBR Green Master Mix、ddH₂O、適當的Primer序列進行混合詳細配方如附錄八，最後透過即時定量聚合酶連鎖反應儀器 (Applied Biosystem 7300 Real-Time PCR System)。本實驗使用得primer序列如附錄九

6. Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA)

以Isoflurane將小鼠麻醉並且對痛覺沒有反應後，透過臉頰採血的方式提取血液，將血液保存於4°C冰箱12小時，以離心的方式取出血清，接著將血液加入已經透過coating buffer固定好的各孔格中2小時，接著以0.05%的Tween20清洗，三次然後以blocking buffer加入孔格中1小時。再加入適當

的capture antibody一個小時，再加入detection antibody一個小時，最後加入Avidin-HRP 並透過ELISA Reader進行光譜450nm、570nm讀值並分析來計算結果。

7. 統計分析

實驗結果的數據以GraphPad Prism軟體進行分析，結果表示為平均值±標準物(mean ± SEM)，當僅有實驗組及對照組，使用Student's Test統計分析。統計顯著得結果表示為:*表示 $P < 0.05$, **表示 $P < 0.01$ 。關聯性測試則是進行多變數(multiple variable)的皮爾森線性相關分析(Pearson linear correlation)對各變數進行兩兩比較。分析結果以相關係數(correlation coefficient, r)表示，r質介於0到1之間為正相關，0到-1為負相關。統計以雙尾95%信賴區間(two-tailed test using 95% confidence level)進行檢定。

實驗結果

1. 長期施打 IFN- α 影響小鼠出現憂鬱行為

在長期服用干擾素進行癌症或是肝炎治療的患者會伴隨著憂鬱症狀的副作用 (Hauser *et al.*, 2002; Raison *et al.*, 2005; Lotrich, 2009)。然而這樣的反應在啮齒類動物以及靈長類動物中也會出現類似的效果 (Felger *et al.*, 2007; Zheng *et al.*, 2014)。在我們的實驗設計中，我們使用 C57BL/6 的小鼠並進行為期 28 天腹腔注射 PBS/IFN- α (Zheng *et al.*, 2014)，在 28 天後我們透過一系列的動物行為測試來檢驗 IFN- α 所影響的變化。我們測量小鼠的基本生理體徵，我們記錄小鼠在注射 IFN- α 的四週內的體重變化(圖一 A)，以及記錄第 22 天到第 28 天內小鼠進食食物的消耗量(圖一 B)，結果顯示 IFN- α 組的小鼠不會影響小鼠的進行為，也不會出現體重的大幅度變化，這也與過去的論文結果一致 (Zheng *et al.*, 2014)。

為了評估小鼠的焦慮行為，我們以兩種常見的行為測量方式來驗證，首先是高架十字迷宮 (Elevated Plus Maze, EPM) 以及開放場域 (Open field)。在 EPM 中我們記錄了小鼠在開放端以及封閉端所花費的時間以及在時間內的移動距離，開放端以及封閉端的时间表現在兩個組別中並無任何差異，另外移動的距離上同樣也是沒有出現變化 (圖一 A)。開放場域中則分別記錄小鼠在中間方框的時間與方框外圍的時間，透過統計結果後發現，在開放場域的行為測試中長期注射 IFN- α 並不會對小鼠出現影響 (圖一 B)。在這兩種焦慮行為測試結果顯示 IFN- α 並不會誘導小鼠在長期的服用後誘導其焦慮的行為的發生。這與以前的研究結果一致，IFN- α 所誘導出來的結果並不會出現焦慮行為 (Zheng *et al.*, 2014)。

在小鼠的憂鬱行為可以透過懸尾實驗 (Tail Suspension Test, TST) 以及強迫游泳 (Forced swim test, FST) 的方法測得，兩者是透過習得無助 (learning helpless)

的理論來檢驗小鼠的憂鬱行為，小鼠放棄掙扎的整體時間被認為是憂鬱的行為指標。在通過 4 週的 IFN- α 後不論是 TST 以及 FST 中小鼠的放棄掙扎的表現都顯著增加(圖一 C、D)。糖水偏好測試(Sucrose preference test)，的行為測試則是建立在憂鬱症的 anhedonia 症狀上，過去研究發現小鼠對於糖水的攝取是有所偏好的，基於這樣的理論，發現長期注射 IFN- α 的組別降低了小鼠對於糖水的攝取量(圖一 E)。綜合以上結果後表明長期注射 IFN- α 可以誘導小鼠出現憂鬱的行為表現，這也與過去的論文結果一致(Fahey *et al.*, 2007; Felger *et al.*, 2007)。結果顯示 IFN- α 組的小鼠不會影響小鼠的進行行為，也不會出現體重的大幅度變化。

2. 腹腔施打 IFN- α 會在下視丘以及海馬迴活化 IFN- α 的訊息傳遞因子

有鑑於 IFN- α 在臨床上頻繁的被使用，IFN- α 在細胞內的訊息傳遞路徑也已經被清晰的描述。在過去的文獻中發現 IFN- α 的濃度升高後，會出現正向的回饋反應使 IFN- α 的受體增生，因此我們檢驗 IFN- α 受體在下視丘中 RNA 變化，在長期施打 IFN- α 後可以觀測到下視丘中的 IFN- α 受體的 RNA 大量增加(圖三 A)。在過去的論文中發現當受到病毒感染後，先天免疫系統會開始運作，透過 cGAS 影響細胞內內質網上的 STING，接著會磷酸化數種 IRF 因子，被磷酸化的 IRF 因子會進入細胞核內並增加干擾素的生成，當干擾素合成並且釋放後會鍵結的細胞膜上的干擾素受體，再次使 STAT-1/STAT-2 以及 IRF-9 合成為 ISGF3 最後再次進入細胞核內調節數十種基因表現，並透過正向調節的方式使干擾素的生成增加。由於 IFN- α 下游所參與調節的訊息傳遞因子數量相當龐大，因此我們挑選了四種因子作為 IFN- α 影響並參與調節的生物指標分別為分別是 STAT-1、IRF-1、SOCS-1 以及 IFN- α 受體。透過檢驗發現長期施打 IFN- α 的小鼠在下視丘中會發生活化 STAT-1、IRF-1、SOCS-1 的 RNA 表現(圖三 A-D)。雖然已經檢驗到數種 IFN- α 的下游訊息傳遞因子得表現已經在下視丘增加，但

無法得知其他大腦核區的反應狀況，所以我們也同時檢驗其他四個大腦核區，不過在前額葉皮質內僅有發現 SOCS-1 以及 IRF-1 的 RNA 表現有出現顯著差異(圖四 A-D)，但並未發現 STAT-1、IRF-1、SOCS-1 的 RNA 表現在依核(圖五 A-D)以及杏仁核(圖七 A-D)有任何統計差異，但是在海馬迴(圖六 A-D)我們也在此發現了 IFN- α 訊息傳遞訊號的活化。在過去的文獻中指出，IFN- α 導致憂鬱症發生的原因是透過神經細胞上的訊息傳遞所導致(Zheng *et al.*, 2014)，也就是說在我們的結果中可以說明下視丘以及海馬迴可能是 IFN- α 誘發憂鬱行為發生的兩個關鍵核區。

3. IFN- α 調節周邊免疫以及中樞神經系統的發炎反應

透過腹腔施打 IFN- α 後會從周邊免疫進入到中樞神經系統，在過去的文獻中發現 IFN- α 屬於發炎調節因子，會誘發大量發炎因子的活化，為了探索 IFN- α 的發炎機制，在血清中檢測腫瘤壞死因子(Tumor necrosis factor- α , TNF- α)，TNF- α 最初被發現會抑制癌細胞的生長以及引起癌細胞凋亡(Carswell *et al.*, 1975)，不過在許多疾病包括阿茲海默症、癌症甚至是糖尿病等也都發現 TNF- α 的活性增加(Decourt *et al.*, 2017)，然而在長期施打 IFN- α 的小鼠血液中的 TNF- α 比控制組高了一倍左右(圖八 A)。這可以說明我們的結果跟過去的論文表現一致，IFN- α 確實擁有可以調節發炎因子的表達。另外我們也檢測了另一個發炎因子 Interleukin 1 β (IL-1 β)，在長期施打 IFN- α 小鼠的周邊免疫中 IL-1 β 的表現量有著相當顯著的下降(圖八 B)，在以往對於 IFN- α 的相關實驗中發現，IFN- α 與 IL-1 β 之間有著拮抗的平衡(Mayer-Barber *et al.*, 2010; Novikov *et al.*, 2011)，可惜的是到目前為止還無法得知兩者之間的作用機制。從這些實驗數據可以得知 IFN- α 再透過腹腔施打的話會影響周邊免疫內的發炎因子的表現量，除了在血液中增加 TNF- α 的濃度同時也會降低 IL-1 β 的濃度，由此可知，IFN- α 在周邊免疫中會調節發炎因子的活化程度。

在了解完周邊免疫的促發炎因子會因為 IFN- α 而活化後，我們認為下視丘可能會因為其特性而更容易受到 IFN- α 的影響，因此我們透過免疫組織染色 (Immunohistochemistry, IHC) 的方式來檢驗下視丘內神經元的反應，膠質纖維狀酸性蛋白 Glial fibrillary acidic protein (GFAP) 位於下視丘中神經元的數量在 IFN- α 組中比起 PBS 組的還要高，也代表星狀細胞的活性表達被增強(圖九 A)，Iba1 的抗體上也能觀測到相似的效果，Iba1 在大腦中主要與小膠質細胞 (microglia) 的活性有著很高的相似性。GFAP 主要分布於星狀細胞 (Astrocytes) 並維持其結構的完整性，因此也被認為是星狀細胞的生物指標。星狀細胞主要提供神經細胞養分、維持離子濃度的平衡以及填充修復損壞的細胞 (Freeman and Rowitch, 2013)。但越來越多的論文指出在許多疾病中皆會發現星狀細胞的異常活化 (Verkhatsky *et al.*, 2012; Sofroniew, 2015b)，另外在大腦的損傷或是許多神經退化性疾病中也會發現星狀細胞會誘導發炎因子的活化 (Sofroniew, 2015a)，與 GFAP 的表現相似 Iba1 也會因為 IFN- α 的反應而在下視丘中增加神經細胞的數量(圖九 B)。從以上的結果可以得到下視丘中會因為 IFN- α 的長期注射下影響發炎因子的 RNA 表現量，並且會導致 Astrocytes 以及 microglia 在下視丘的數量。先前的報導發現，下視丘附近的腦血管障壁具有讓部分物質進出大腦的能力 (Fry and Ferguson, 2007)，因此我們檢驗了下視丘內諸多免疫系統相關引子的 RNA，來測量下視丘中的發炎反應。我們挑選的四種 Primer 分別是 TNF- α 、NOS-2、GFAP、IL-6，透過這些數據來分析 IFN- α 在大腦中的發炎狀況。長期注射 IFN- α 會在大腦中的下視丘中活化 TNF- α 的 RNA 表現(圖九 C)。接著我們測試的是 NOS-2，一氧化氮合酶 (Nitric Oxide Synthases, NOS) 是巨噬細胞中、神經細胞以及內皮細胞中通過它來產生一氧化氮 (Nitric Oxide, NO)，一氧化氮合酶一共有三種類型分別為 NOS-1，NOS-2 和 NOS-3。NOS-1、NOS-3 的差異主要在細胞類型上的不同並且這兩種亞型主要需要高的鈣離子濃度才可以被活性，與之相反的是 NOS-2 則是僅需要低濃度的鈣離子即可反應，

並且主要透過小膠質細胞和星狀細胞來誘導，其產生 NO 的含量也比另外兩種的還要高數百倍。(Iqbal *et al.*, 2016)。NO 在發炎疾病中扮演重要的作用，NO 被發現其含有多種抗原體，對於宿主的防禦至關重要(Fang, 2004)，但是高濃度的一氧化氮也會對個體產生傷害並誘發過度的發炎反應。在長期注射 IFN- α 後在大腦中的下視丘中 NOS-2 的 RNA 表現量增加(圖九 D)。GFAP 在下視丘中的表現會因為 IFN- α 得反應而被活化(圖九 E)。Interleukin 6 (IL-6)是發炎調節因子的一種，在正常的情況下 IL-6 的表現量相當的低，但是在類風溼性關節炎或是自發性免疫疾病等的發炎情況下 IL-6 則會有數千倍的表現量(Rose-John, 2018)，不過過去的研究也發現 IL-6 的基因剔除鼠會更容易受到細菌的感染，並且在研究中也發現 IL-6 會參與在細胞的保護以及再生也可以達到抑制發炎的反應。相較於前面三種 IL-6 並不會因為 IFN- α 的關係而導致下視丘中的表現量增加(圖九 F)。

在針對下視丘的研究後我們對於其他的大腦核區是否也同等因為 IFN- α 的誘導使其發炎因子得 RNA 表現量增加感到好奇，我們使用先前的發炎因子來檢測前額葉皮質(圖十 A-D)、依核(十一 A-D)、海馬迴 (圖十二 A-D)、以及杏仁核(圖十三 A-D)也進行 RNA 的檢驗分析，與 IFN- α 的訊息傳遞路徑不同，在發炎因子的檢測當中，只有下視丘發現有發炎反應的發生，並未發現海馬迴的發炎，我們認為這可能與下視丘的特性有關，下視丘的發炎可能並非透過 IFN- α 在大腦中的影響，而是周邊免疫的發炎因子透過血腦障壁的特性進行物質的交換進一步引發發炎。

在透過對小鼠的行為以及大腦的訊息傳遞路徑和發炎的數個因子進行 RNA 分析後，我們進一步分析其行為的改變與其細胞分子變化是否有著直接的相關性，因此我們將此數據以皮爾森相關檢驗的方式來檢驗，在三種憂鬱行為的表

現與訊息傳遞路徑的表現上，FST 與 SPT 均與多個下視丘中的干擾素訊息途徑的基因 (STAT-1, SOCS1)，及發炎相關基因(TNF- α , GFAP)的基因表現改變成現正相關(FST/STAT-1, P=0.018; SPT/STAT-1, P=0.002; FST/SOCS-1, P=0.044; FST/TNF- α , P=0.019; SPT/TNF- α , P=0.031; FST/GFAP, P=0.033)，代表這些類憂鬱行為與下視丘中的干擾素途徑及發炎高度相關。另外，這些行為也與海馬迴中的干擾素訊息傳遞路徑上有較高的相關性(FST/IFN- α R, P=0.012; SPT/IFN- α R, P=0.038; FST/STAT-1, P=0.037; FST/IRF-1, P=0.024; SPT/IRF-1, P=0.011; SPT/SOCS-1, P/0.05)，表示在此二腦區中干擾素所造成的改變可能是造成類憂鬱行為的重要因子。

4. 施打 IFN- α 會導致下視丘的功能失調

在了解 IFN- α 對於下視丘的直接影響以及發炎的活化後，我們希望了解 IFN- α 或是發炎環境是否會對下視丘引起功能異常。首先 HPA 軸的反應效果便是我們最直接的聯想，因此我們首先針對小鼠血液內的可體松濃度變化(圖十五 A)，血液內的可體松濃度在施打了 IFN- α 三十一天後濃度顯著了提升。為了更詳細的了解 HPA 軸的系統反應，我們檢測大腦中下視丘內 CRH 的 RNA 表現量，CRH 並不會因為 IFN- α 而改變其 RNA 的表現(圖十五 B)，我們認為由於 HPA 系統中有負回饋的機制，血液中的可體松濃度過高抑制了大腦中 CRH 的生成。並且在我們的實驗中無法得知在腦下垂體內 ACTH 的狀況，因此也無法過於詳細得描繪 HPA 系統中的變化，並且在本實驗中也只測量 CRH 的 RNA 表現量，並未檢測 CRH 的蛋白質的濃度高低，不過我們可以得知 IFN- α 確實會影響 HPA 軸的平衡。

除了 HPA 軸外，下視丘還掌控了許多生理反應的控制，比如說進食行為的調節，在過去的研究中對於進食行為的調節路徑已相當詳細，在下視丘中掌控進

食行為的系統一般將他們稱為 melanocortin 系統 (Horvath *et al.*, 1992)，主要影響進食行為的神經元是 pro-opiomelanocortin (POMC)神經元以及 neuropeptide Y/agouti-related peptide (NPY/AgRP)神經元，許多文獻也透過專一的興奮 POMC 來減少食物的攝取，透過專一的調節 NPY 活性來增加進食行為的發生。這些神經元的訊息會統一彙整到下游的 MC4R 受體，透過兩種神經元的相互拮抗作用來達到訊息的整合最後反應出飲食的控制(Lin *et al.*, 2000)，在臨床的重度憂鬱症患者身上可以觀測到體重以及進食行為的巨幅變化，因此 POMC 以及 NPY 確實很有可能參與在憂鬱症狀的調節當中。近年來發現 melanocortin 系統並非只有調節飲食行為，部分文獻發現 MC4R 的受體會改變個體對於嫌惡效果的控制，在 MC4R 基因剔除鼠上會發現嫌惡的效果受到抑制，因此近期 MC4R 的變化也被認為與 anhedonia 的症狀有所關連(Lim *et al.*, 2012; Klawonn *et al.*, 2018)。雖然在實驗一中小鼠的進食狀況以及體重的變化上面並無出現顯著差異(圖一 A、B)，不過我們在下視丘的 POMC 以及 NPY 則會因為 IFN- α 的誘導而出現 RNA 的抑制，我們推測在體重以及進食行為的紀錄上沒有出現變化，可能來自於 POMC 以及 NPY 的 RNA 表現量皆一起受到 IFN- α 的抑制，最後經過訊息的整合導致進食行為的沒有變化(圖 C、D)。

下視丘具有神經勝肽的功能，可以調節許多分泌腺體和器官，然而數種神經勝肽被發現與憂鬱的症狀有極高的關聯性。催產素(Oxytocin)與伴侶之間的親密行為有關，甚至在憂鬱症患者的體內會測量到催產素的濃度異常，不過長期注射 IFN- α 後催產素的表現量沒有出現顯著差異，不過有被抑制的趨勢(圖 E)。血管收縮素(Vasopressin)會影響 ATCH 的生成，並且影響著 HPA 軸的平衡，不過在 IFN- α 誘導憂鬱症的案例中，血管收縮素的 RNA 表現量並不會受到影響(圖 F)。甘丙胺素(Galanin)是合成神經傳遞物質正腎上腺素以及血清素的關鍵，而這兩種神經傳遞物質與憂鬱症有諸多的證據指出雙方的關聯性，不過 Galanin 不會

受到 IFN- α 的影響而發生改變(圖 G)。。最後一個測量的內分泌是食慾素(Hypocretin/Orexin)，在長期注射了 IFN- α 後食慾素的 RNA 表現量受到了抑制(圖 H)。，不過目前對於食慾素的發現主要會影響睡眠的反應，在我們的實驗中並沒有測量小鼠的睡眠狀況，但或許 IFN- α 可能會誘發小鼠出現睡眠障礙，在臨床的患者服用 IFN- α 後也會出現睡眠障礙的問題可能就與食慾素有關(Raison *et al.*, 2010)。

5. 海馬迴以及杏仁核的蛋白酶 A 會因為 IFN- α 而發生改變

神經傳遞物質的影響在憂鬱症的治療中扮演相當重要的工作，其中多巴胺與憂鬱之間的研究又有著極高的相關度，因此我們透過檢驗蛋白酶 A(Protein kinase A,PKA)以及 p-PKA(Phospho- Protein kinase A)的表現量來檢測長期施打 IFN- α 的變化。在過去的許多研究中發現，當多巴胺的受體 D1 以及 D2 受體受到活化後主要會引起 cAMP 以及 PKA 的訊息傳遞鏈，PKA 在 Thr34 位點磷酸化透過 DARPP-32 抑制 phosphatase-1(PP-1) 的活性，而 PP-1 的抑制則控制了下游的許多磷酸化的狀態以及神經傳遞物質的受體活性，如轉錄因子:CREB、c-fos 等，神經傳遞物質的受體:AMPA 受體、NAMD 受體等(Nishi *et al.*, 2011)。對於 DARPP-32 缺失的小鼠對於多巴胺、成癮藥物以及抗精神疾病藥物的反應以及行為表現有著明顯的變化，如此諸多的證據都指出，PKA、DARPP-32 在多巴胺的訊息傳遞中有著重要的功能。在實驗中檢測了五個我們認為在憂鬱症中極為重要的大腦核區，並透過 p-PKA/PKA 來評估 IFN- α 對於多巴胺系統的作用(Fienberg and Greengard, 2000)。在長期施打 IFN- α 後的大腦前額葉、依核以及下視丘中並未發現顯著差異，不過在杏仁核在受到 IFN- α 的影響讓 p-PKA/PKA 的表現下降(圖 E)，雖然海馬迴在 p-PKA/PKA 中沒有統計上的不同但在 p-PKA/Actin 中有顯著的差異，而且 PKA/Actin 上也有著下降的趨勢。目前以我們的實驗結果只測量 PKA 在五個大腦核區中的表現，可惜

的是對於多巴胺系統的整體變化我們尚未測量，因此目前我們依舊無法完全排除前額葉皮質以及依核兩個核區參與 IFN- α 誘導憂鬱症的致病可能，在往後的研究需要在測量更多的多巴胺系統如:多巴胺受體 D1 和多巴胺受體 D1 等等...來更加確定多巴胺系統在此動物模型中的重要性。



討論

本論文實驗結果執行長期施打28天IFN- α 後觀察到小鼠的行為中出現憂鬱行為的發生，透過懸尾實驗、強迫游泳和糖水偏好測試中都可以測得，但焦慮的行為不會受到IFN- α 的誘導進而出現，實驗結果與臨床上患者的藥物使用狀況一致(Bhatti and Berenson, 2007)。IFN- α 僅誘發出憂鬱行為，憂鬱症的研究在過去的研究中大多都使用實際的壓力來源(Stressor)誘導小鼠出現憂鬱行為，但壓力的調節對於個體有著極大的差異，抗壓的能力可能與其本身的基因有所相關(Nie *et al.*, 2018)，而且壓力所誘發的行為又可能使小鼠出現焦慮症狀，焦慮行為的出現可能會導致研究的結果出現許多結果完全不同的實驗結果。而且長期慢性壓力誘導的憂鬱症模型不可量化其壓力源的強度，因此IFN- α 進行憂鬱症的研究可能比壓力誘導的模式更佳。

對小鼠的大腦變化進行分析後所得的結果中，海馬迴以及下視丘中都可以測量到IFN- α 的訊息傳遞因子被活化，在近期的一篇文獻中指出，透過IFN- α 受體剔除鼠進行長期施打IFN- α 的研究，小鼠並不會出現憂鬱行為，若以Cre-loxP的基因重組方式重新表達IFN- α 受體在神經細胞上的表現後便會使憂鬱行為再次出現，由此我們可以推測IFN- α 在神經細胞上的訊息傳遞對於憂鬱症的出現有關極為關鍵的(Zheng *et al.*, 2014)。綜上所述，IFN- α 只會影響下視丘以及海馬迴的神經細胞內的IFN- α 訊息傳遞信號，因此我們認為下視丘以及海馬迴可能是IFN- α 影響憂鬱行為出現的兩個重要核區。然而我們只在下視丘中發現發炎反應的發生，在海馬迴中並會檢測到任何發炎反應的出現，我們認為這可能與下視丘的特性有關，下視丘旁即是第三以及第四腦室，我們認為下視丘所檢測到的發炎反應可能是透過周邊免疫所引發的發炎環境進一步誘發的，正因為如此海馬迴才沒有檢測到發炎因子的活化。下視丘內的發炎環境會干擾下視丘內的神經肽的生成，以及影響HPA系統的平衡。接著大量的IFN- α 在經由下視丘影響海馬

迴的神經元，加劇憂鬱行為的表現，在過去的文獻中報導IFN- α 確實會影響HPA軸系統以及內分泌系統(Reyes-Vázquez *et al.*, 2012)。雖然本文的實驗設計尚未無法釐清下視丘的功能異常是因為IFN- α 的直接影響或者是因為發炎環境的改變所導致，不過從目前的研究結果能確定下視丘的異常會抑制許多神經勝肽的RNA表現。

在下視丘內發現IFN- α 會抑制NPY以及POMC這兩種RNA的表現量有顯著的下降，NPY以及POMC兩者主要都是調節進食行為的勝肽，雖然在體重控制上面我們並未觀測到小鼠體重或是進食量的明顯變化，但由於NPY以及POMC是屬於相互拮抗，因此兩者的表現量同時下降便可能無法出現行為上的變化。但有趣得是近期的文獻指出POMC的下游MC4R可能參與在anhedonia的症狀調節(Klawonn *et al.*, 2018)，因此POMC在此出現顯著性的下降也可能與憂鬱症行為的出現有著直接性的相關，不過NPY的下降是否也與憂鬱症有直接的相關目前則是沒有過多的研究支持。食慾素則是另一個在下視丘受到抑制的另一個神經勝肽，在許多研究中早已指出食慾素可能與憂鬱症有直接的關係，食慾素與睡眠行為有關(Inutsuka and Yamanaka, 2013; Krystal *et al.*, 2013)，而憂鬱症患者也常出現睡眠障礙的問題(Deuschle *et al.*, 1997)，另外在用IFN- α 來治療的臨床患者在服用前以及服用後也出現食慾素下降的結果(Ogawa *et al.*, 2003)，以上研究證據顯示食慾素可能會為憂鬱症提出一種新穎的見解，並為憂鬱症的治療提供一種新的標靶治療方向。

HPA系統異常引起憂鬱症的假說目前主要有兩種，其一是當壓力來臨時，中樞神經系統內的下視丘會釋放CRH到腦下垂體促進其釋放ACTH進到周邊免疫後在使腎上腺釋放可體松，讓個體足以適應壓力並對抗壓力所帶來的影響，而目前認為此迴路的過度活化可能會導致下視丘或是腦下垂體不斷誘發可體松的

增加，進而導致HPA軸平衡異常進而誘發憂鬱症的發生。第二種則是，當周邊免疫內的可體松濃度升高後，身體會自主出現負回饋反應，透過此反應來回頭抑制下視丘內的CRH以及腦下垂體的ACTH的增生釋放，最後讓HPA軸的平衡回歸正常，而負回饋系統的功能失調則是另一種導致HPA軸異常的可能原因，周邊免疫內的可體松濃度不斷上升，但卻無法啟動負回饋系統，便無法減緩下視丘以及腦下垂體的反應。以上兩種假設是目前對於HPA軸系統誘發憂鬱症的主要假設，然而在我們的實驗結果中，目前還無法得知是否是這兩種假設引起憂鬱行為的出現，而且我們的實驗結果還可能提出一種新的可能性，IFN- α 可能會直接作用於周邊免疫中的IFN- α 受體，並使其調節腎上腺釋放可體松，不透過下視丘或是腦下垂體，不過目前的實驗同樣無法檢驗此種可能性，未來也需透過更多的實驗來檢驗IFN- α 導致HPA軸發生改變的直接原因。

此外在海馬迴中也同樣發現了IFN- α 的訊息傳遞訊號被活化了，雖然在我們的假設中並未將海馬迴劃入我們的藍圖中，但在實驗結果卻有意外的發現，在過去的文獻中指出IFN- α 確實會影響海馬迴，在長期施打IFN- α 後發現海馬迴的神經細胞數量下降以及神經元萎縮的情形(Zheng *et al.*, 2014)，而且海馬迴在憂鬱症中也確實扮演著相當重要的角色(Hastings *et al.*, 2004)，不過海馬迴的主要功能是掌控長期記憶的功能，然而在我們的行為實驗中並未檢測IFN- α 是否會改變小鼠的長期記憶能力。對於IFN- α 是如何通過BBB進入並影響海馬迴我們也無法確認，不過可以肯定的是，對於IFN- α 誘導憂鬱行為海馬迴的重要性且不可或缺的存在，並值得在未來針對此點做更多的探討及研究。

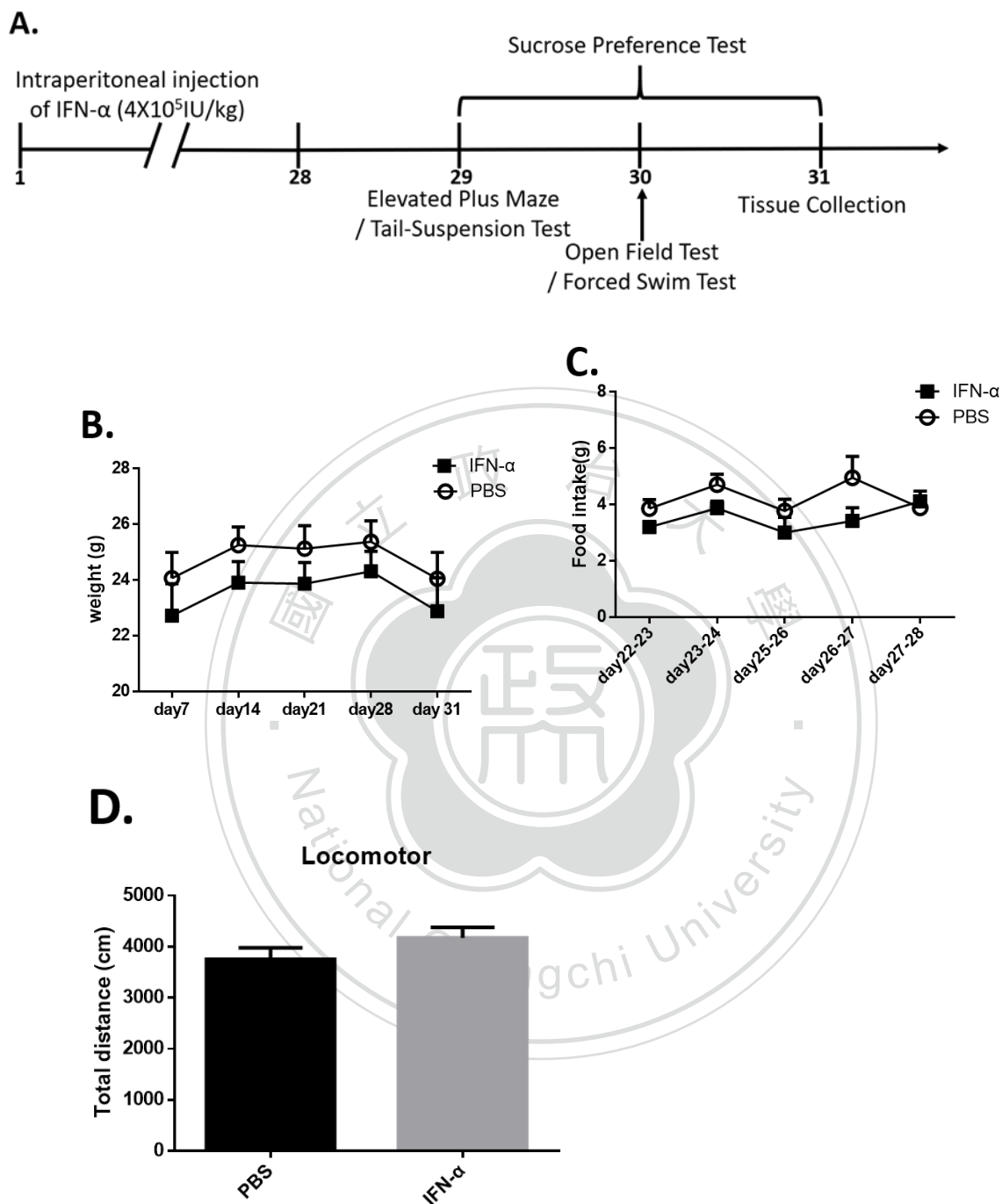
神經傳遞物質也被歸類為誘發憂鬱症症狀出現的可能原因之一，對於IFN- α 與血清素之間的研究是較多的，以骨髓細胞和T細胞內加以IFN- α 後發現HTR1A會減少。在動物實驗中使用IFN- α 誘發憂鬱行為後透過SSRI類藥物或是5-HT的結

抗劑進行憂鬱症的治療可以有效的減少小鼠的憂鬱行為(Zhang *et al.*, 2010)，臨床的患者使用IFN- α 其副作用導致罹患憂鬱症後透過百憂解也可以達到症狀的治療效果(Levenson and Fallon, 1993)，這些證據可以指出血清素可能會受到IFN- α 的抑制，並且透過抑制血清素的再回收機制也可以減緩憂鬱症狀。從我們的實驗結果中可以觀測到在海馬迴內的p-PKA/Actin出現顯著上的變化，而且在PKA/Actin的結果也有相似的趨勢，因此海馬迴內的多巴胺系統活性可能受到抑制。在杏仁核中的多巴胺系統不論在何種計算方式上面都出現顯著差異，在過去的文獻中指出，抑制了杏仁核中的多巴胺受體抑制劑後，並不會增加其焦慮行為但會增加其aversion的反應(Stevenson and Gratton, 2004)。另外也有數篇文獻提到多巴胺與HPA系統之間也有著交互作用(Sullivan and Dufresne, 2006; Thurzó *et al.*, 2016)，因此海馬迴與杏仁核之間的PKA變化也可能是來自於HPA異常後所導致得影響。

在本實驗中有一個目前無法說明但也極為重要的一個環節，這個問題是IFN- α 是如何通過BBB的保護影響大腦的功能，在目前的研究中並文獻提出一個完善的解釋機制。不過我們認為IFN- α 影響BBB有幾種可能性，其一是IFN- α 在周邊免疫引起發炎因子的增生，並導致BBB的緊密程度變得脆弱，使部分的物質可以輕易地進行物質的交換。第二種可能性則為，BBB上可能含有IFN- α 的受體或者是發炎因子的受體，當這些受體被激活之後，則會直接增生另一端在大腦中IFN- α ，又或者是增生發炎因子在進一步增加大腦中的IFN- α ，第三種則是我們的假設IFN- α 是直接通過下視丘的BBB進入且影響此核區。雖然本實驗無法驗證此狀況，但IFN- α 如何穿越BBB並不會影響本篇的研究目的，不過IFN- α 與BBB之間的交互作用也極為重要，在未來的實驗方向也可以針對這個方面進行更多的探討即研究，來更好的釐清以及幫助IFN- α 與憂鬱症之間的關係。

總而言之，IFN- α 肯定會影響下視丘以及海馬迴的訊息傳遞路徑，因此我們提出一種假設，當 IFN- α 透過腹腔注射進入小鼠的中樞神經系統後，會影響血液中的 Cytokine 反應再增加更多的 IFN- α 在身體中的濃度。在大腦中各腦區的表現狀況如圖，依據過去的文獻，下視丘有著可以與周邊免疫進行訊息交換的能力，因此下視丘為主要受到 IFN- α 影響的大腦核區，在下視丘中可以看見 IFN- α 的訊息傳遞路徑被誘發同時發炎因子也因為 IFN- α 的關係隨之上升，眾多神經胜肽也會因為長期的 IFN- α 誘導出現異常的反應如:HPA 軸系統、POMC、NPY 等。基於過往的文獻資料，在海馬迴中也可以檢測到 IFN- α 的訊息傳遞路徑表現，IFN- α 的訊息傳遞路徑會直接影響憂鬱行為的發生，因此我們認為 IFN- α 是通過下視丘進入中樞神經系統在藉由下視丘活化海馬迴中的 IFN- α 訊息傳遞路徑導致憂鬱行為的出現，並誘發杏仁核抑制 PKA 的活性。然而前額葉皮質以及依核並不會受到 IFN- α 影響。不過目前對於此假設還有諸多可能性需要更多的實驗來佐證。首先針對 IFN- α 造成下視丘的異常是否是造成類憂鬱行為的主因，我們後續可透過對干擾素受體 IFNAR1 基因的條件敲除(conditional mutagenesis)研究參與症狀形成的細胞種類，例如 POMC 神經元、AGRP 神經元、orexin 神經及微膠質細胞等等，測試小鼠在上述細胞中阻斷干擾素信息傳導是否影響症狀的形成。另外針對下視丘發現顯著減少的神經胜肽，是否這與蛋白的減少造成憂鬱症狀的產生，我們也會進一步以遺傳學方法(條件敲除等)，或藥物工具(agonist 或 antagonist 等)進行測試。另外針對海馬的變化，油油前人研究報告在部份憂鬱症患者中有海馬神經細胞減少或整體體積萎縮的現象，我們會測試在小鼠中是否有類似的現象，若有此現象則會進一步分析其是否與憂鬱形成有關，及分子機制為何等。但目前的這些發現可以增進我們對於 IFN- α 誘導憂鬱行為的病理了解，並指出海馬迴以及下視丘在此模型中的重要性，期望在未來可用於預防或治療 IFN- α 誘導憂鬱症的發生或進一步幫助重度憂鬱症的治療。

實驗結果

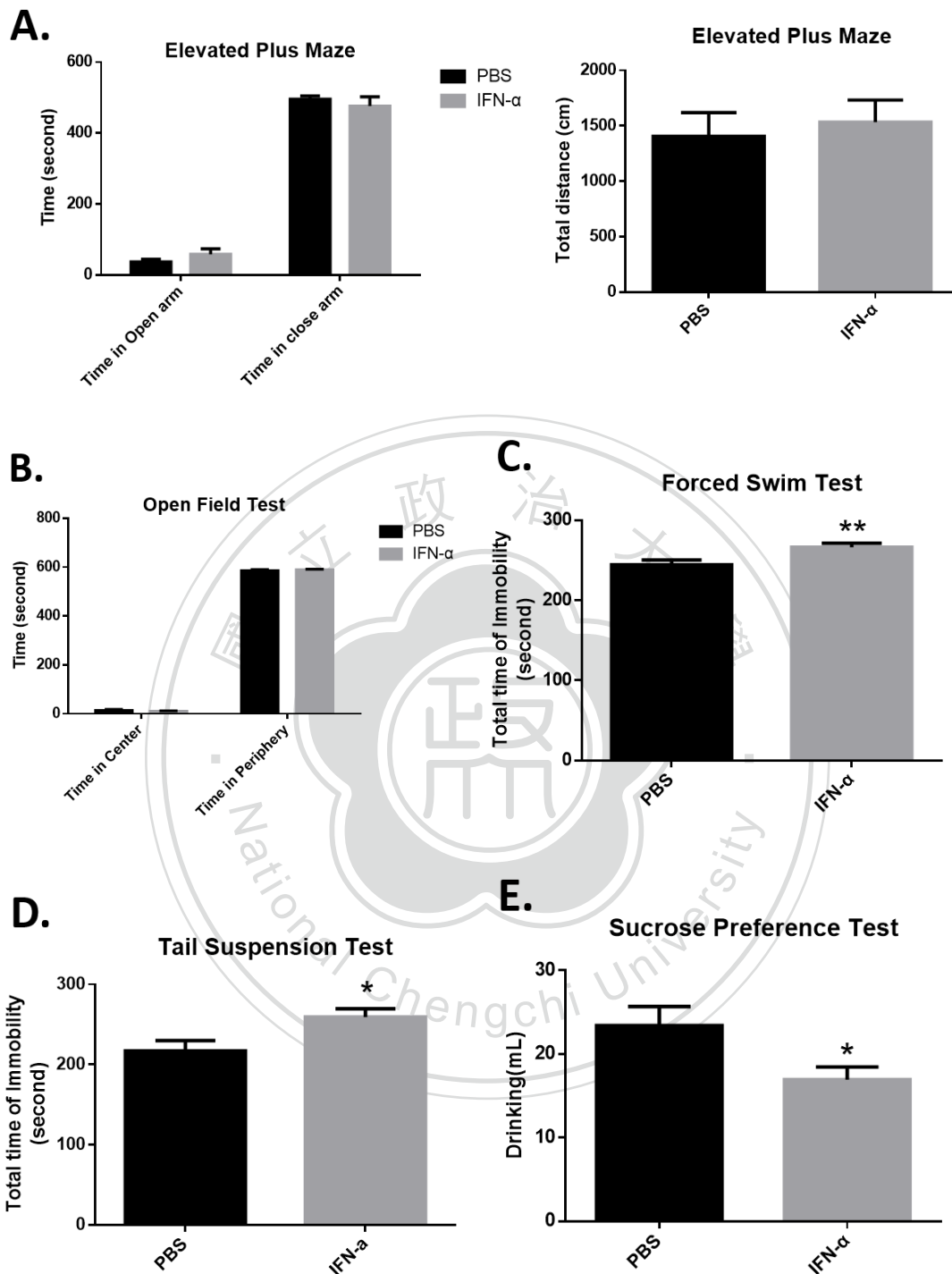


圖一 小鼠的在接受 IFN- α 後的基本生理體徵。

(A) 實驗設計的方式是透過施打 IFN- α 二十八天後，在第 29 天進行高架十字迷宮以及懸尾實驗，第 30 天進行開放場預測試以及強迫游泳實驗，以及在 29 到 31 進行兩天的糖水偏好測試。小鼠在接受了為期四星期的 IFN- α ，檢測小鼠

的基本生理體徵(B)體重，分別在第 7、14、21、28、31 天記錄;實驗組小鼠(N=9)控制組小鼠(N=10)。(C)進食行為，記錄在第二十二天到二十八天之間小鼠每天的進食狀況;實驗組小鼠(N=3)控制組小鼠(N=4)。(D)運動能力，以行為測試來檢測小鼠在空曠的空間中自由移動的總距離;實驗組小鼠(N=12)控制組小鼠(N=12)。試驗數據以 mean \pm SEM 表示，以 T-test 進行統計分析，*表示 P<0.05,**表示 P<0.01。



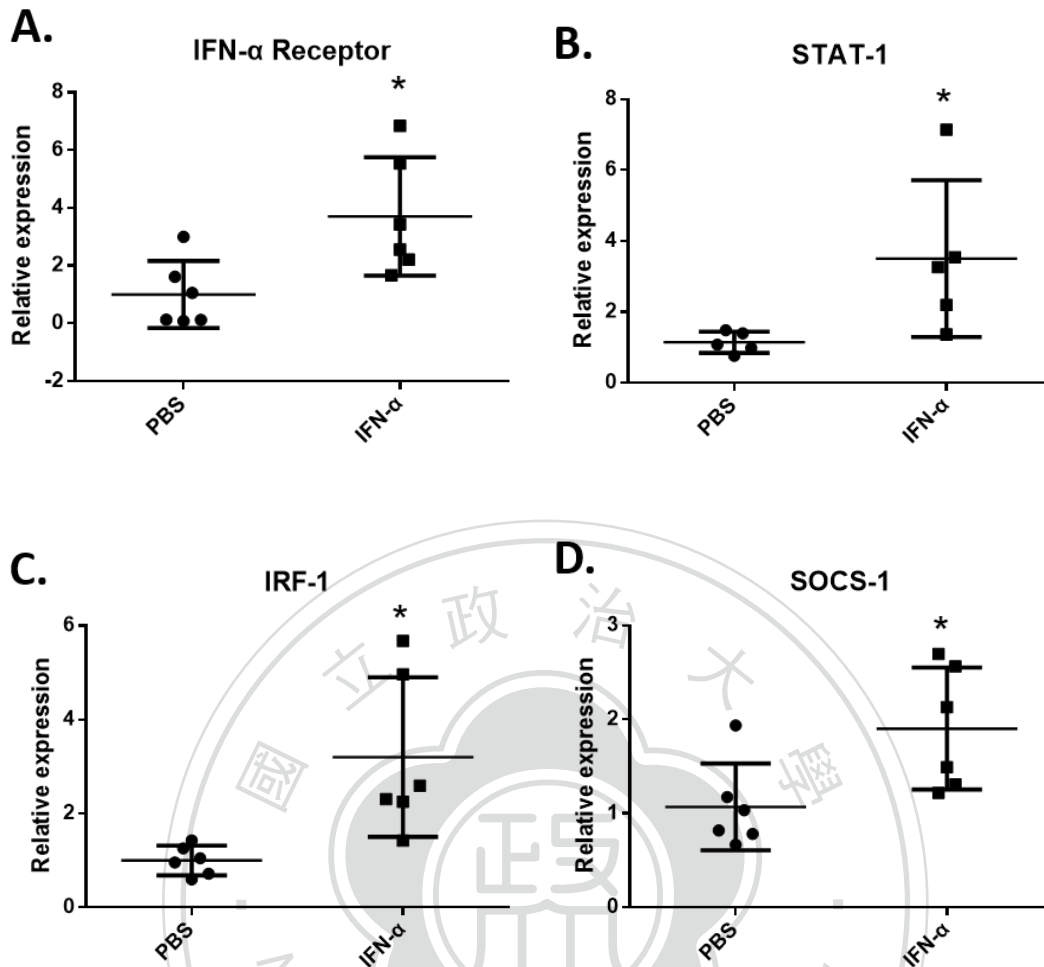


圖二 在接受 IFN- α 後並不會誘發焦慮行為但會發生憂鬱行為。

小鼠在接受了為期四星期的 IFN- α ，檢測小鼠是否會因為藥物而引起行為發生改變(A)高架十字迷宮(Elevated Plus Maze, EPM)，計算小鼠在開放端以及

封閉端的空間內小鼠所待的時間長度(左圖)，小鼠在高架十字迷宮中的總移動距離(右圖)，實驗組小鼠(N=12)控制組小鼠(N=12)。(B)小鼠在接受完藥物注射流程後將其放置於開放場域中(Open Field)，並記錄小鼠在中心方框中或外圍方框中所待的時間長度，實驗組小鼠(N=12)控制組小鼠(N=12)。(C)施打了四周的小鼠在游泳的過程中僵直不動的時間(p=0.009)，實驗組小鼠(N=12)控制組小鼠(N=12)。(D)小鼠在懸尾倒吊的行為中，小鼠僵直不動的時間(p=0.0252)，實驗組小鼠(N=7)控制組小鼠(N=8)。(E)小鼠在飲用糖水的量(p=0.0284)。實驗組小鼠(N=12)控制組小鼠(N=12)。試驗數據以 mean ± SEM 表示，以 T-test 進行統計分析，*表示 P<0.05,**表示 P<0.01。





圖三 IFN- α 調節下視丘中的 IFN- α 訊息傳遞路徑上的因子。

對小鼠長期施打 IFN- α 後提取其下視丘的 RNA 並透過 RT-qPCR 進行 mRNA。

(A) IFN- α Receptor mRNA 表現量($p=0.0184$); (實驗組 $N=5$; 控制組 $N=6$)。

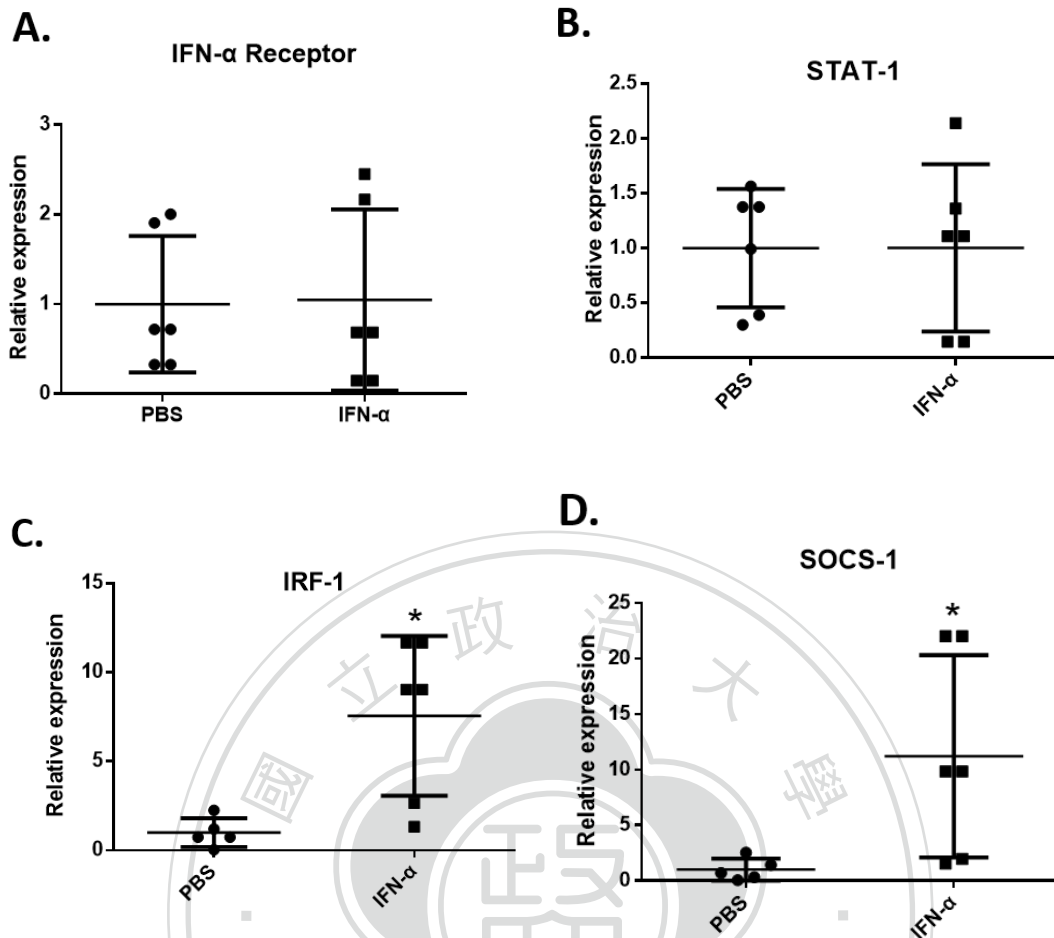
(B) STAT-1 的 mRNA 表現量($p=0.0458$); (實驗組 $N=6$; 控制組 $N=5$)。

(C) IRF-1 的 mRNA 表現量($p=0.0109$); (實驗組 $N=6$, 控制組 $N=6$)。

(D) SOCS-1 的 mRNA 表現量($p=0.0283$); (實驗組 $N=5$, 控制組 $N=4$)。實驗數據以 mean \pm SEM 表示，

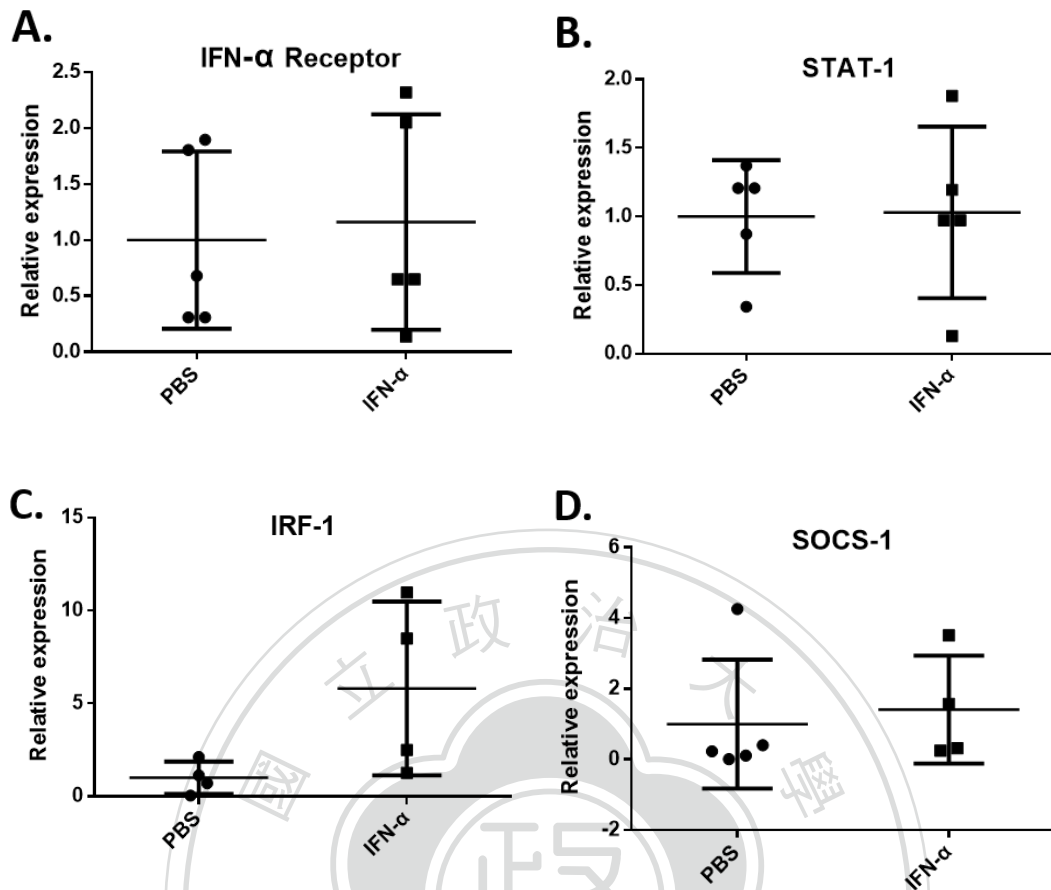
以 T-test 進行統計分析，並以 Delta-delta CT 的方式進行分析，*表示 $P<0.05$,**

表示 $P<0.01$ 。



圖四 IFN- α 部分涉及調節前額葉皮質中的 IFN- α 訊息傳遞路徑上的因子。

對小鼠長期施打 IFN- α 後提取其前額葉皮質的 RNA 並透過 RT-qPCR 進行 mRNA。(A) IFN- α Receptor mRNA 表現量(實驗組 N=6;控制組 N=6)。(B) STAT-1 的 mRNA 表現量(實驗組 N=6;控制組 N=6)。(C) IRF-1 的 mRNA 表現量;(實驗組 N=6, 控制組 N=6);(p=0.0109)。(D) SOCS-1 的 mRNA 表現量;(實驗組 N=6, 控制組 N=6) (p=0.0357)。實驗數據以 mean \pm SEM 表示, 以 T-test 進行統計分析, 並以 Delta-delta CT 的方式進行分析。*表示 P<0.05,**表示 P<0.01。

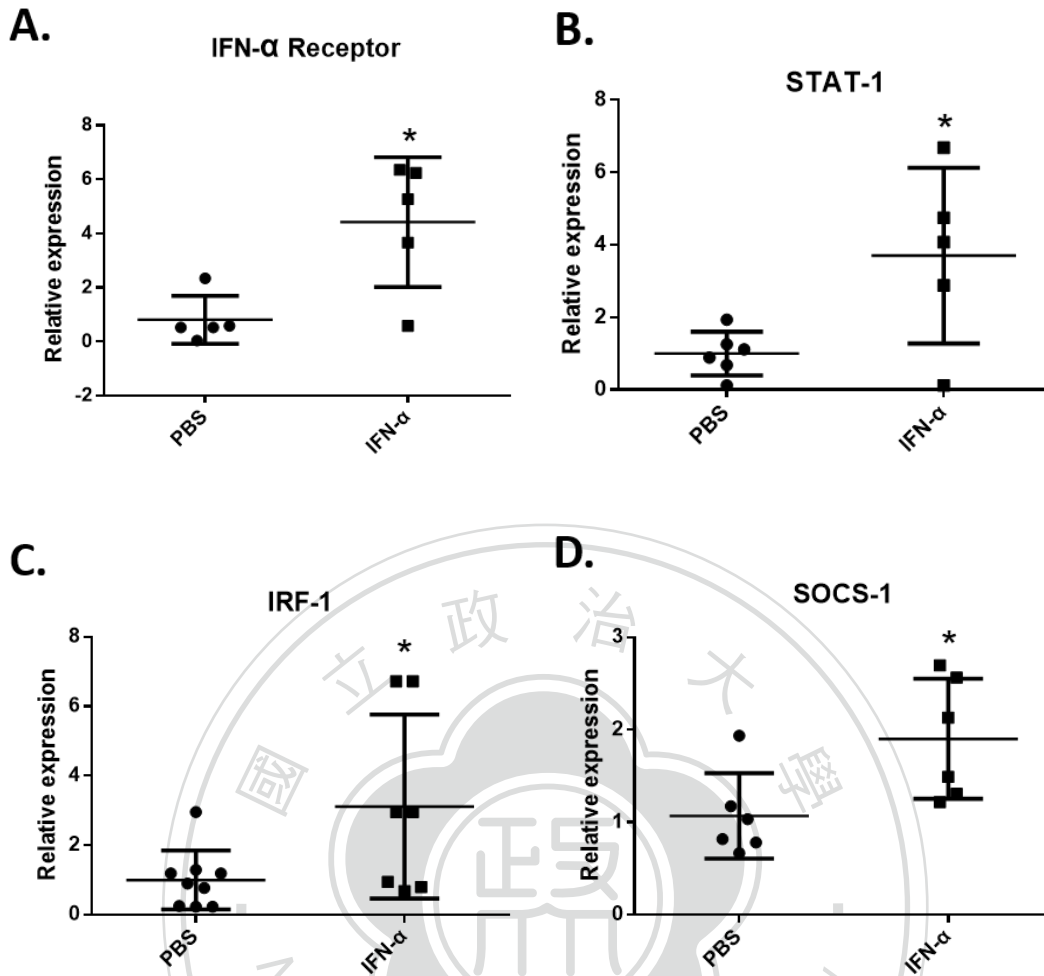


圖五 IFN- α 不涉及調節依核中的 IFN- α 訊息傳遞路徑上的因子。

對小鼠長期施打 IFN- α 後提取其依核的 RNA 並透過 RT-qPCR 進行 mRNA。

(A) IFN- α Receptor mRNA 表現量(實驗組 N=6;控制組 N=5)。(B) STAT-1 的 mRNA 表現量(實驗組 N=6;控制組 N=4)。(C) IRF-1 的 mRNA 表現量;(實驗組 N=8, 控制組 N=8)。(D) SOCS-1 的 mRNA 表現量;(實驗組 N=8, 控制組 N=6)。

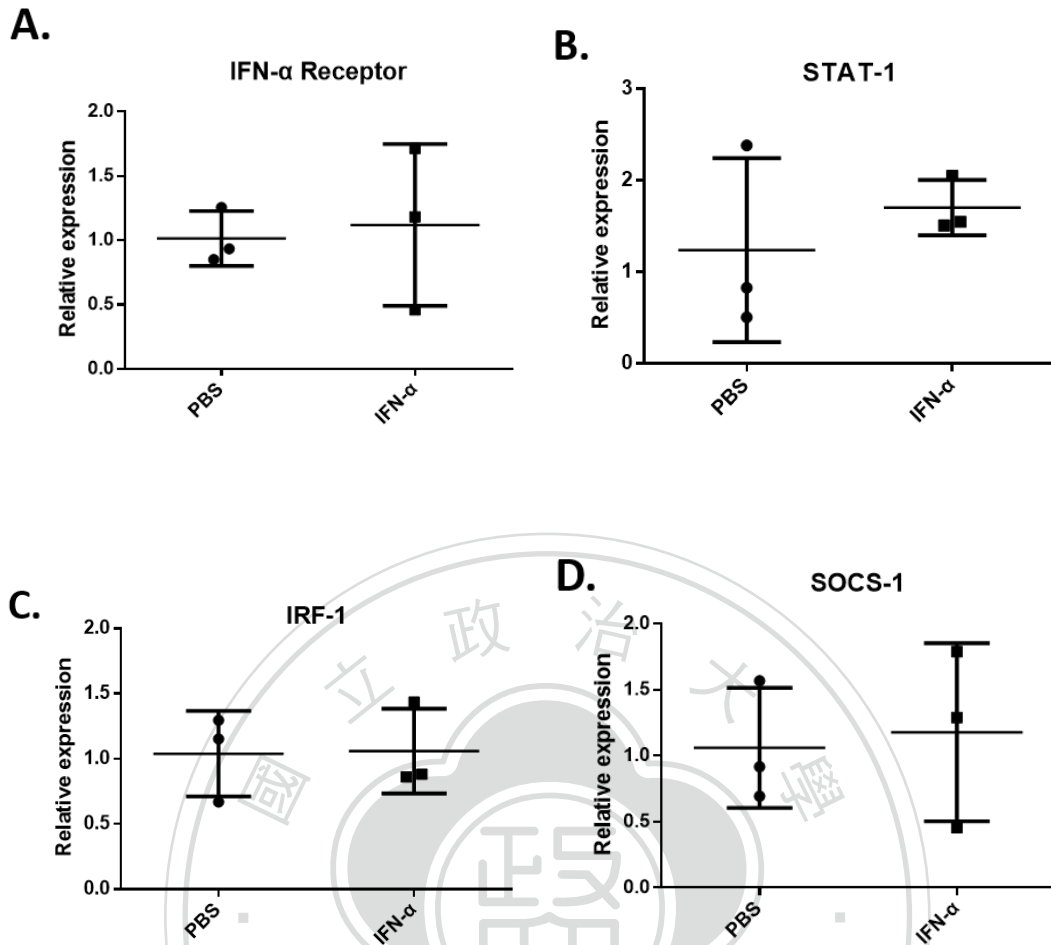
實驗數據以 mean \pm SEM 表示, 以 T-test 進行統計分析, 並以 Delta-delta CT 的方式進行分析。



7

圖六 IFN- α 活化部分海馬迴中的 IFN- α 訊息傳遞路徑上的因子。

對小鼠長期施打 IFN- α 後提取其海馬迴的 RNA 並透過 RT-qPCR 進行 mRNA。
 (A) IFN- α Receptor mRNA 表現量($p=0.0134$);(實驗組 N=8;控制組 N=8)。(B) STAT-1 的 mRNA 表現量($p=0.0263$);(實驗組 N=7;控制組 N=8)。(C) IRF-1 的 mRNA 表現量($p=0.0399$);(實驗組 N=8, 控制組 N=8)。(D) SOCS-1 的 mRNA 表現量($p=0.0283$);(實驗組 N=8, 控制組 N=6)。實驗數據以 mean \pm SEM 表示, 以 T-test 進行統計分析, 並以 Delta-delta CT 的方式進行分析, *表示 $P<0.05$, **表示 $P<0.01$ 。

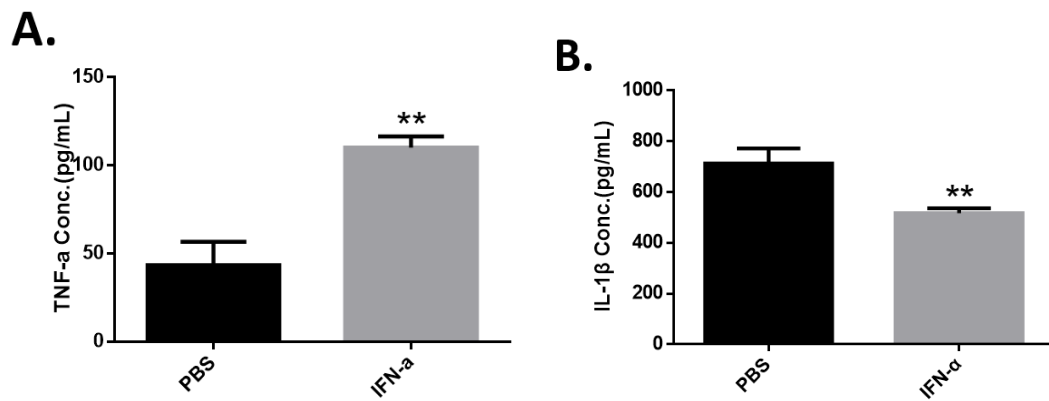


圖七 IFN- α 不涉及調節杏仁核中的 IFN- α 訊息傳遞路徑上的因子。

對小鼠長期施打 IFN- α 後提取其杏仁核的 RNA 並透過 RT-qPCR 進行 mRNA。

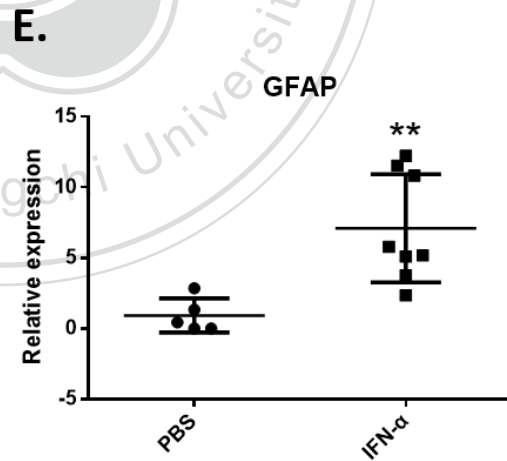
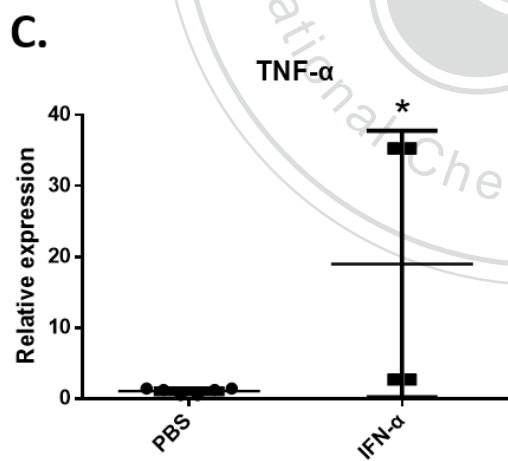
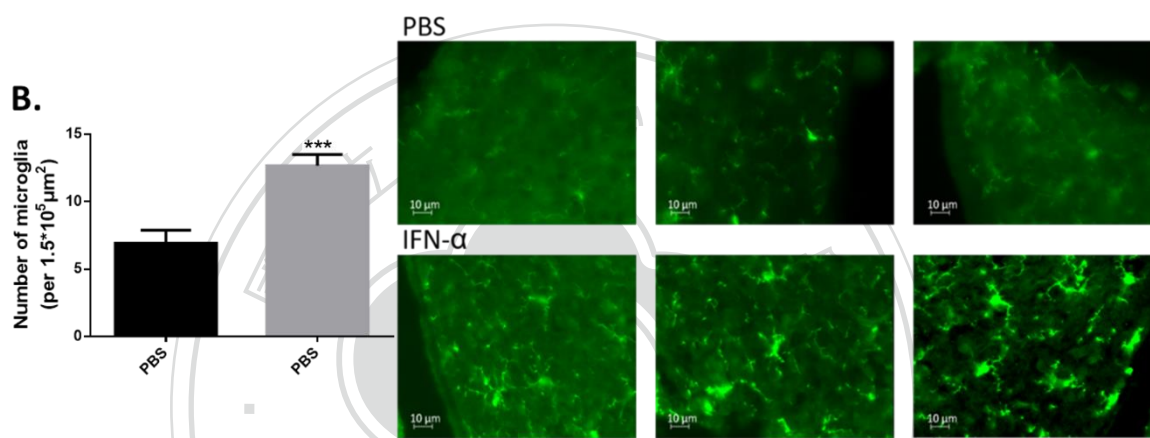
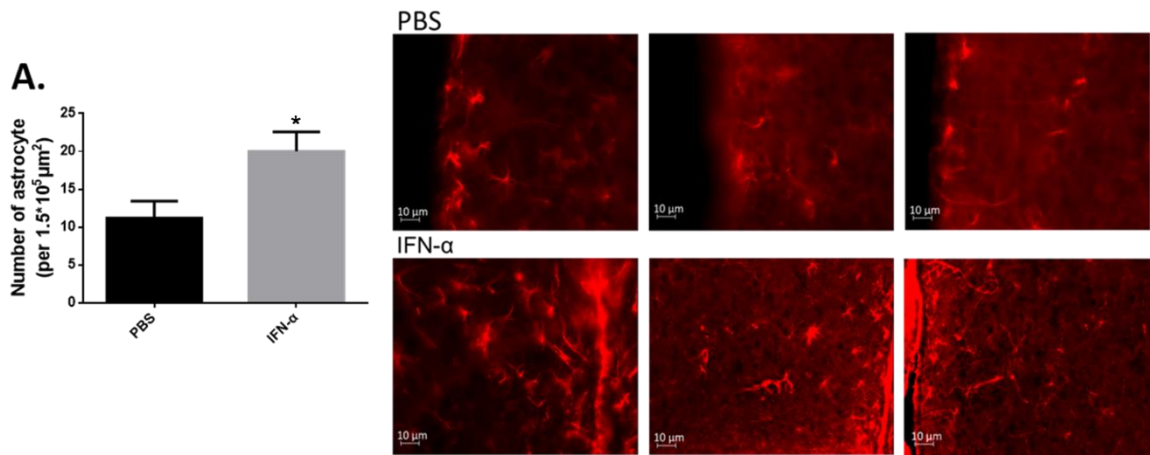
(A) IFN- α Receptor mRNA 表現量(實驗組 N=6;控制組 N=5)。(B) STAT-1 的 mRNA 表現量(實驗組 N=6;控制組 N=5)。(C) IRF-1 的 mRNA 表現量;(實驗組 N=4, 控制組 N=6)。(D) SOCS-1 的 mRNA 表現量;(實驗組 N=4, 控制組 N=6)。

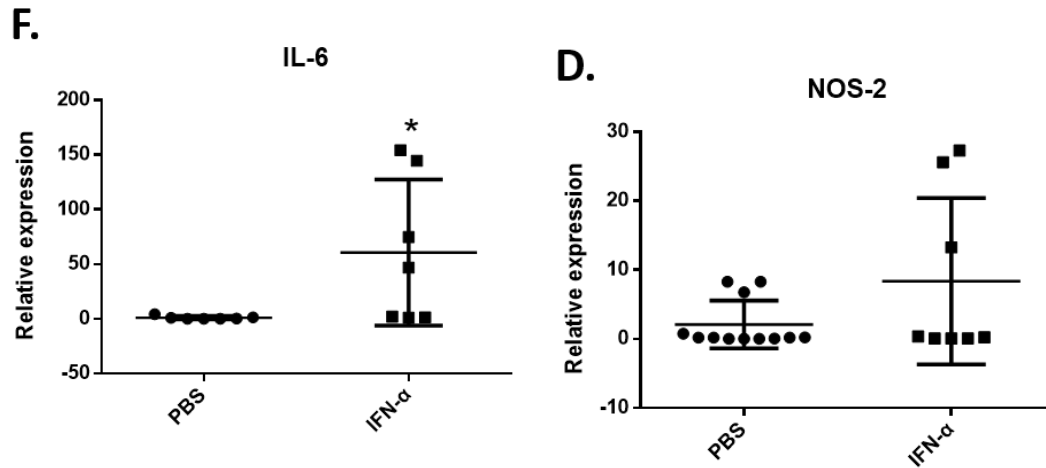
實驗數據以 mean \pm SEM 表示, 以 T-test 進行統計分析, 並以 Delta-delta CT 的方式進行分析。



圖八 長期施打干擾素會調節周邊免疫的發炎。

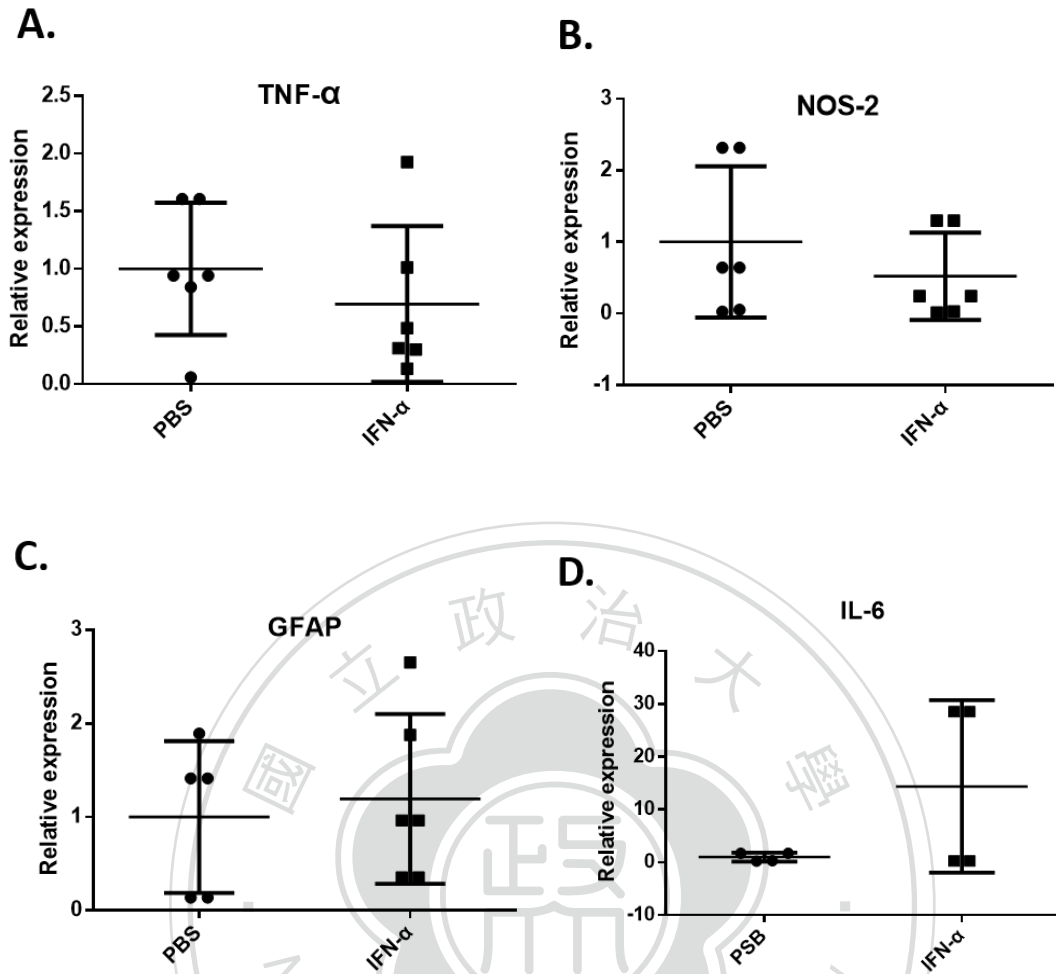
對小鼠長期施打 IFN- α 三十一天後後測量其血液中的發炎因子的活化反應。(A) 血液中 TNF- α 表現量(p=0.0041); (實驗組 N=4;控制組 N=4)。(B)血液中 IL-1 β 表現量(p=0.0072);(實驗組 N=8;控制組 N=8)。實驗數據以 mean \pm SEM 表示，以 T-test 進行統計分析，*表示 P<0.05,**表示 P<0.01。





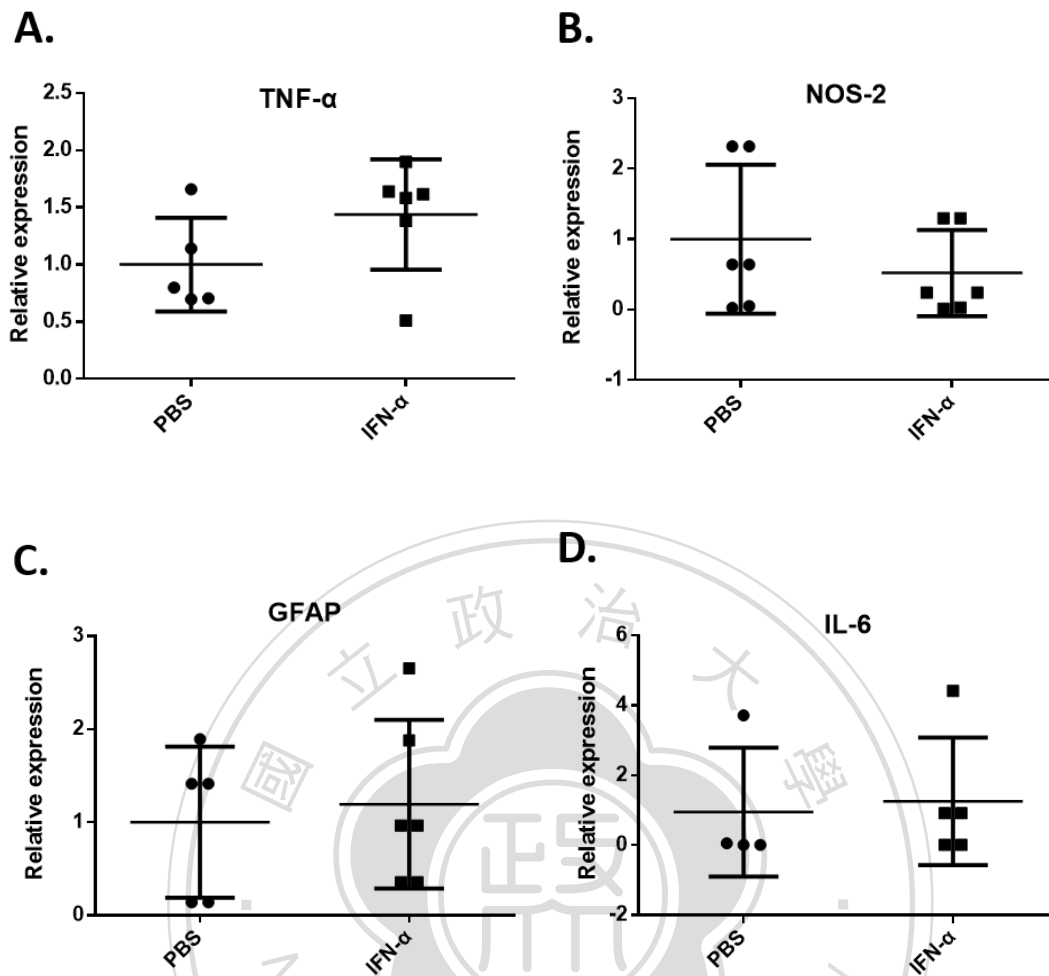
圖九 小鼠下視丘的免疫細胞及免疫反應受到 IFN- α 而活化。

長期施打 IFN- α 三十一天後，檢驗其下視丘的發炎反應。(A)以免疫組織染色的方式檢驗 GFAP 並計算其神經細胞的表現量($p=0.0327$);(實驗組 N=6;控制組 N=6)。(B) 以免疫組織染色的方式檢驗 Iba1 並計算其神經細胞的表現量($p=0.0002$);(實驗組 N=6;控制組 N=6)。(C)下視丘中 TNF- α 的 mRNA 表現量($p=0.0425$); (實驗組 N=6;控制組 N=4)。(D) 下視丘中 NOS-2 的 mRNA 表現量(實驗組 N=6;控制組 N=4)。(E)下視丘中 GFAP 的 mRNA 表現量($p=0.0055$);(實驗組 N=8, 控制組 N=6)。(F) 下視丘中 IL-6 的 mRNA 表現量($p=0.0357$);(實驗組 N=6, 控制組 N=5)。實驗數據以 mean \pm SEM 表示，以 T-test 進行統計分析，另外 RT-qPCR 實驗數據加以 Delta-delta CT 的方式進行分析，*表示 $P<0.05$,**表示 $P<0.01$ 。



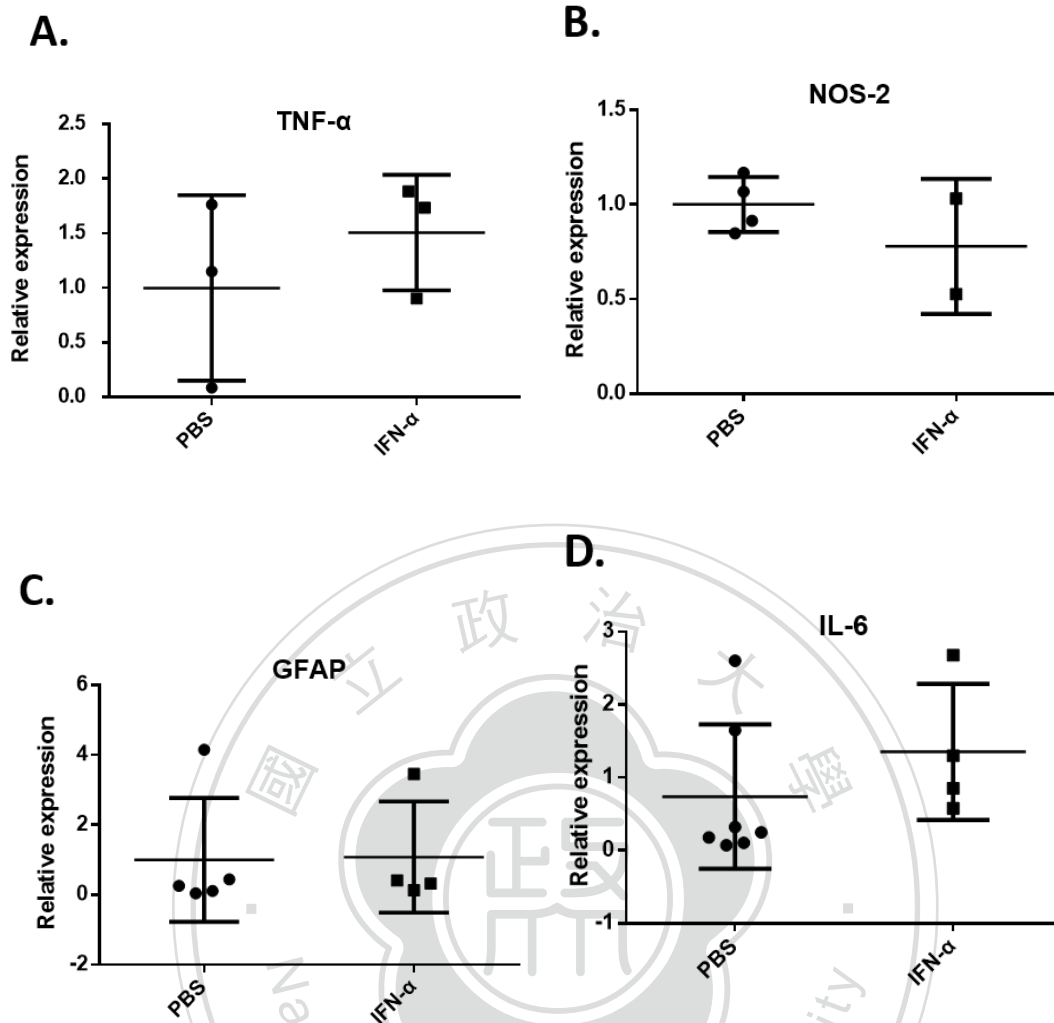
圖十 IFN- α 不參與調節前額葉皮質部分發炎因子的 RNA 表現量。

對小鼠長期施打 IFN- α 後提取其前額葉皮質的 RNA 並透過 RT-qPCR 進行 mRNA。(A)TNF- α mRNA 表現量(實驗組 N=6;控制組 N=6)。(B) NOS-2 的的 mRNA 表現量(實驗組 N=6;控制組 N=6)。(C) GFAP 的 mRNA 表現量;(實驗組 N=6, 控制組 N=5)。(D) IL-6 的 mRNA 表現量;(實驗組 N=6, 控制組 N=5)。實驗數據以 mean \pm SEM 表示, 以 T-test 進行統計分析, 並以 Delta-delta CT 的方式進行分析。



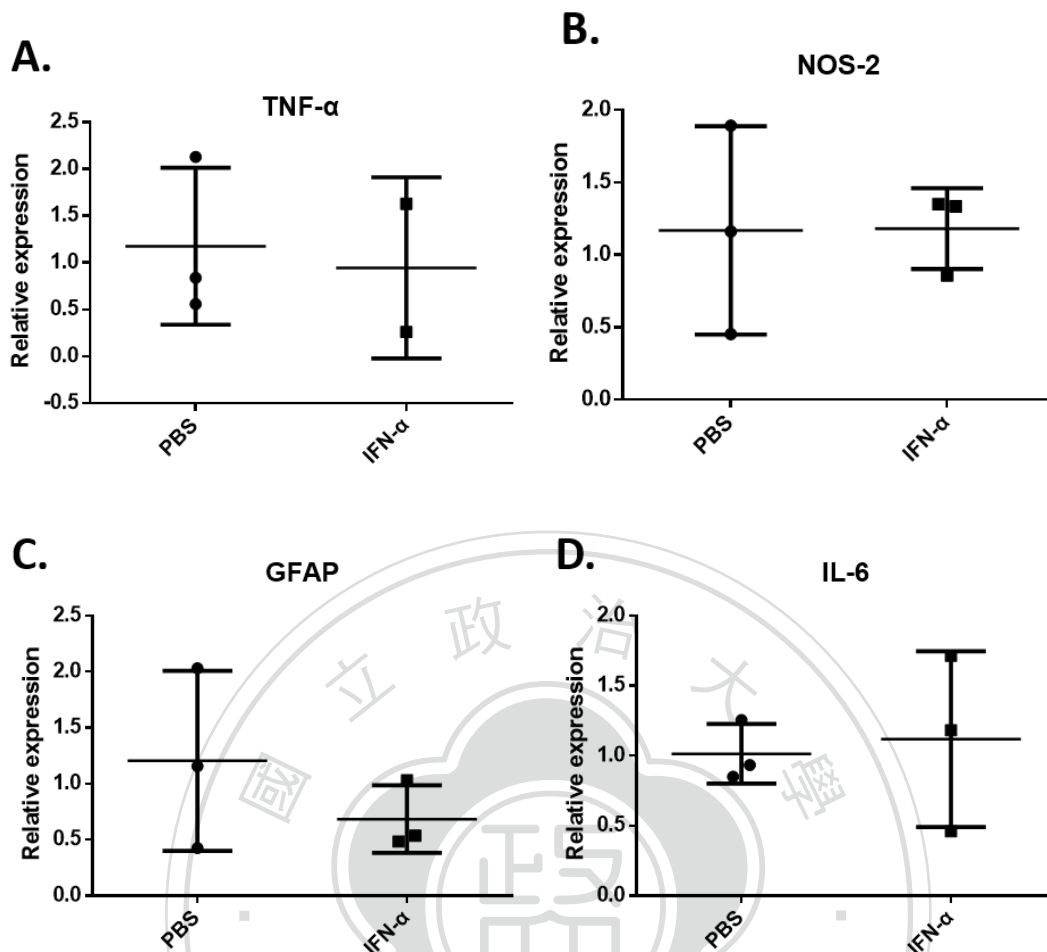
圖十一 IFN- α 不參與調節依核部分發炎因子的 RNA 表現量。

對小鼠長期施打 IFN- α 後提取其依核的 RNA 並透過 RT-qPCR 進行 mRNA。
 (A) TNF- α mRNA 表現量(實驗組 N=6;控制組 N=5)。(B) NOS-2 的 mRNA 表現量(實驗組 N=5;控制組 N=4)。(C) GFAP 的 mRNA 表現量;(實驗組 N=5, 控制組 N=5)。(D) IL-6 的 mRNA 表現量;(實驗組 N=5, 控制組 N=6)。實驗數據以 mean \pm SEM 表示, 以 T-test 進行統計分析, 並以 Delta-delta CT 的方式進行分析。



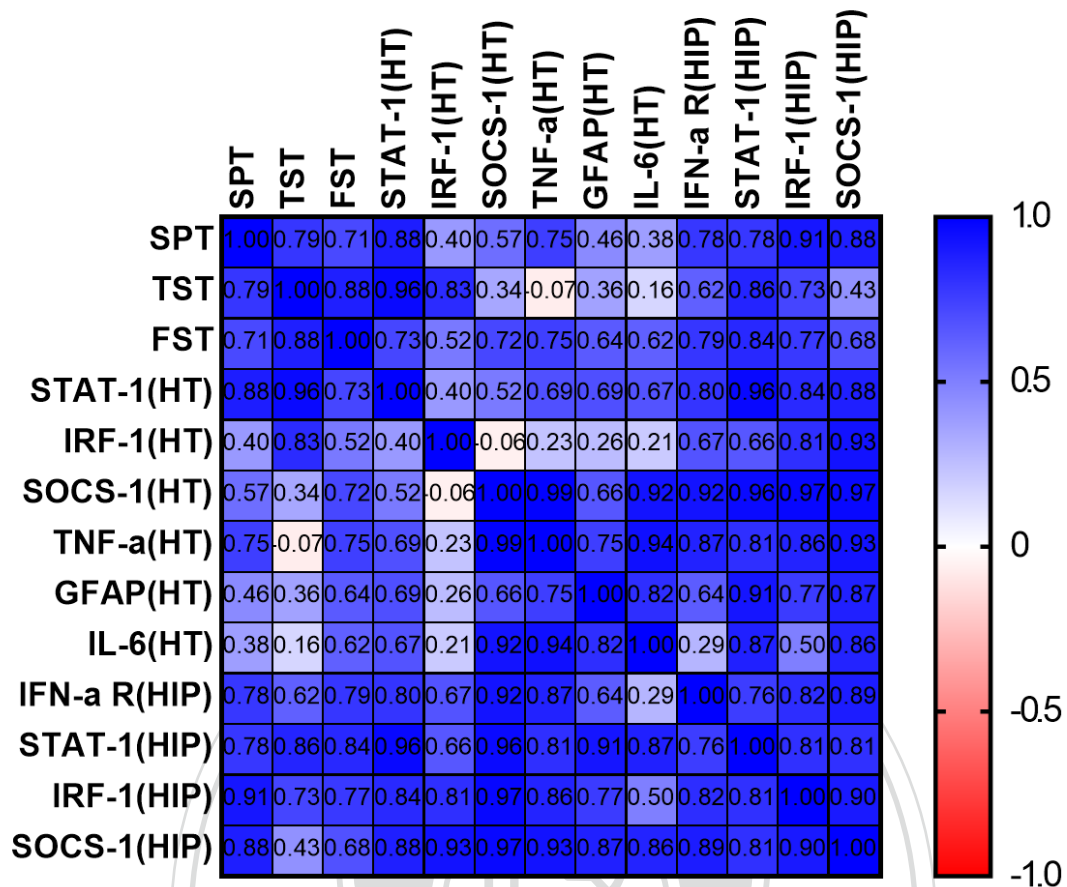
圖十二 IFN- α 不參與調節海馬迴中發炎因子的 RNA 表現量。

對小鼠長期施打 IFN- α 後提取其海馬迴的 RNA 並透過 RT-qPCR 進行 mRNA。
 (A) TNF- α mRNA 表現量(實驗組 N=5;控制組 N=5)。(B) NOS-2 的 mRNA 表現量(實驗組 N=9;控制組 N=8)。(C) GFAP 的 mRNA 表現量;(實驗組 N=7, 控制組 N=6)。(D) IL-6 的 mRNA 表現量;(實驗組 N=8, 控制組 N=7)。實驗數據以 mean \pm SEM 表示, 以 T-test 進行統計分析, 並以 Delta-delta CT 的方式進行分析。



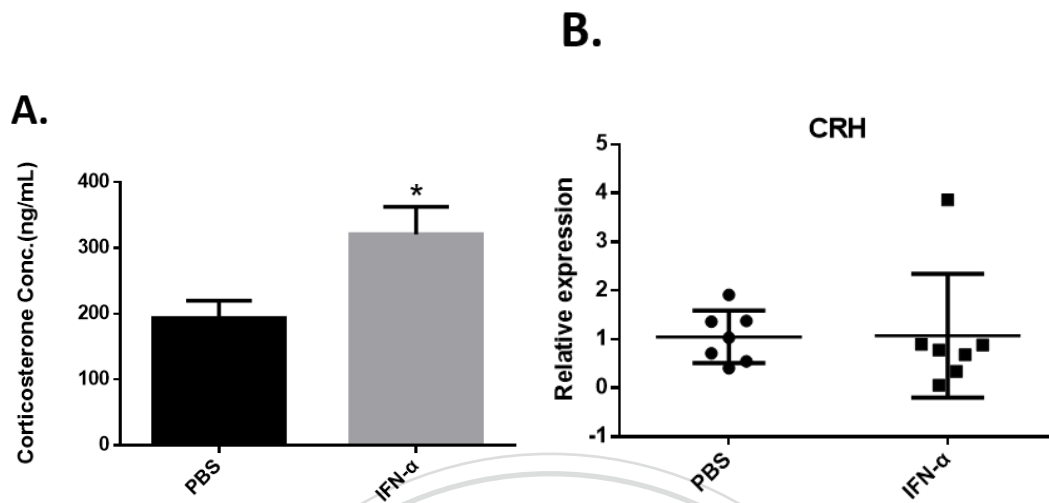
圖十三 IFN- α 不參與調節杏仁核中部分發炎因子的 RNA 表現量。

對小鼠長期施打 IFN- α 後提取其杏仁核的 RNA 並透過 RT-qPCR 進行 mRNA。
 (A) TNF- α mRNA 表現量(實驗組 N=4;控制組 N=5)。(B) NOS-2 的 mRNA 表現量(實驗組 N=6;控制組 N=5)。(C) GFAP 的 mRNA 表現量;(實驗組 N=5, 控制組 N=5)。(D) IL-6 的 mRNA 表現量;(實驗組 N=5, 控制組 N=6)。實驗數據以 mean \pm SEM 表示, 以 T-test 進行統計分析, 並以 Delta-delta CT 的方式進行分析。



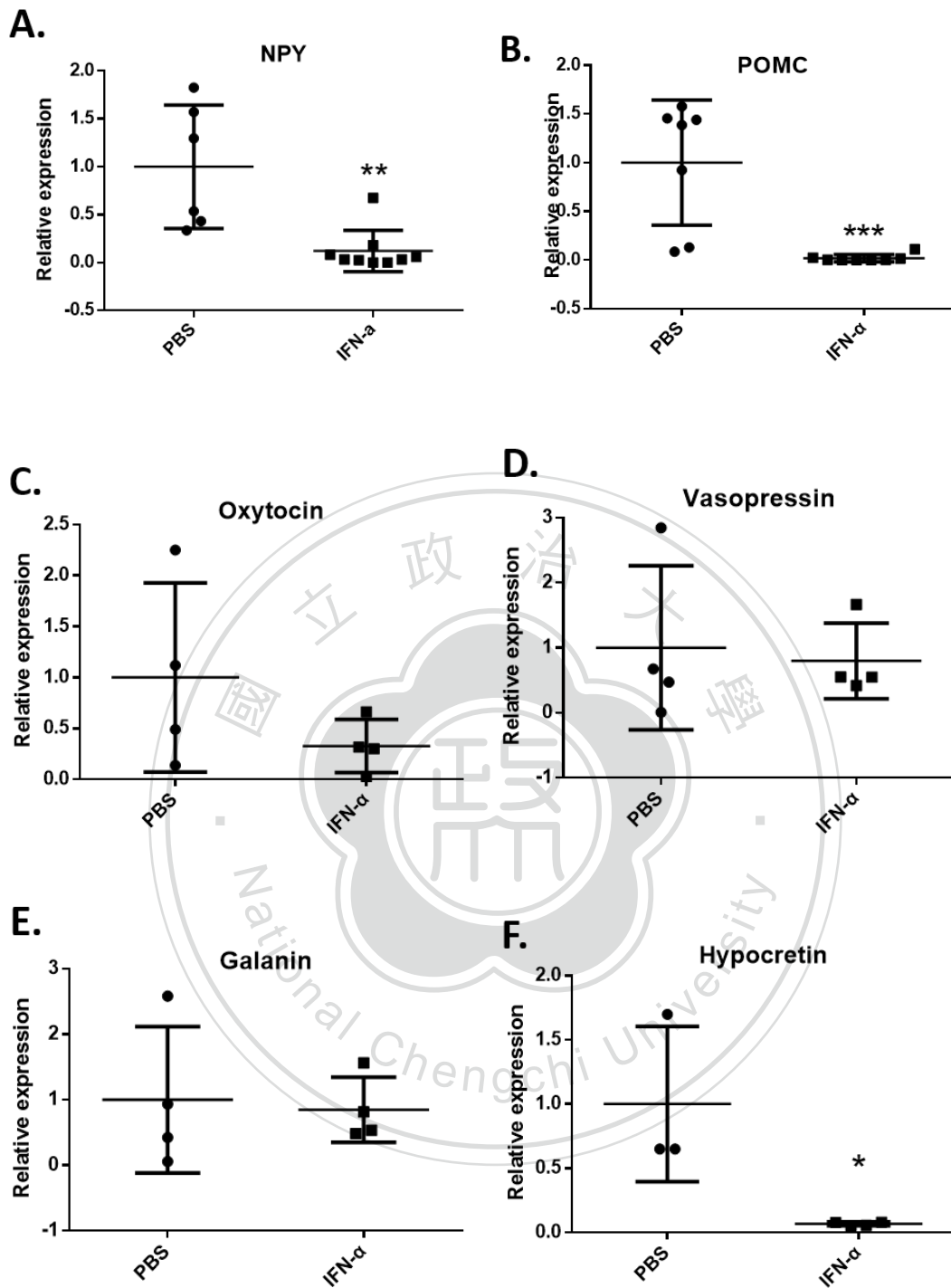
圖十四 長期施打 IFN- α 的小鼠其行為及其大腦中的分子表現的相關值。

在老鼠的組內數據，以皮爾森相關統計分析後所得其相關 r 值，並將 r 值越接近 1 的以深藍表示，越接近-1 的則以紅色表示。



圖十五 HPA 系統與 IFN- α 之間的相互作用。

對小鼠長期施打 IFN- α 後，檢驗其 HPA 系統內的反應。(A)血液中 Corticosterone 表現量($p=0.0282$); (實驗組 $N=4$; 控制組 $N=4$)。(B)下視丘內 CRH 表現量(實驗組 $N=8$; 控制組 $N=8$)。



圖十六 下視丘分泌神經胜肽的功能異常。

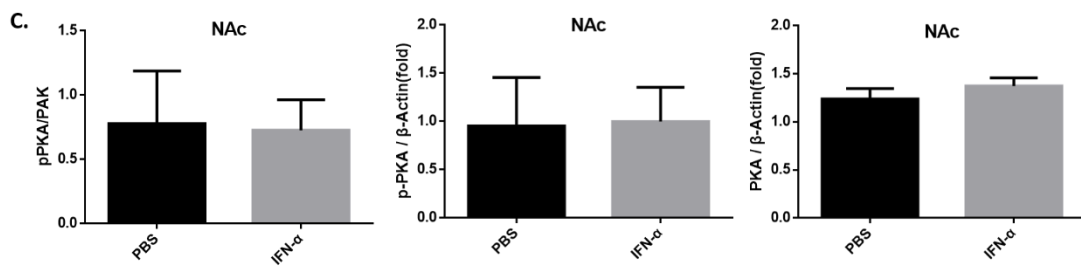
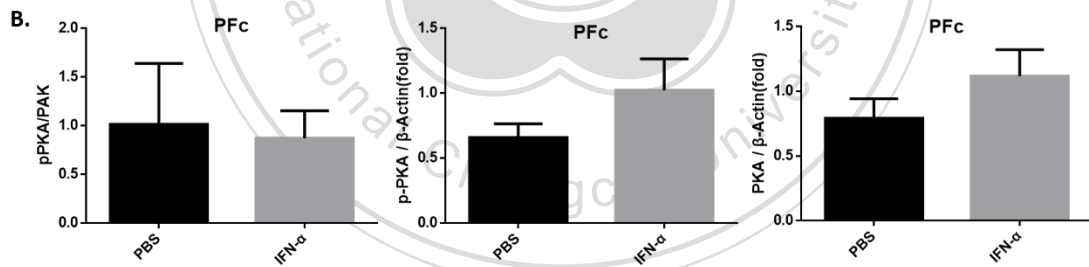
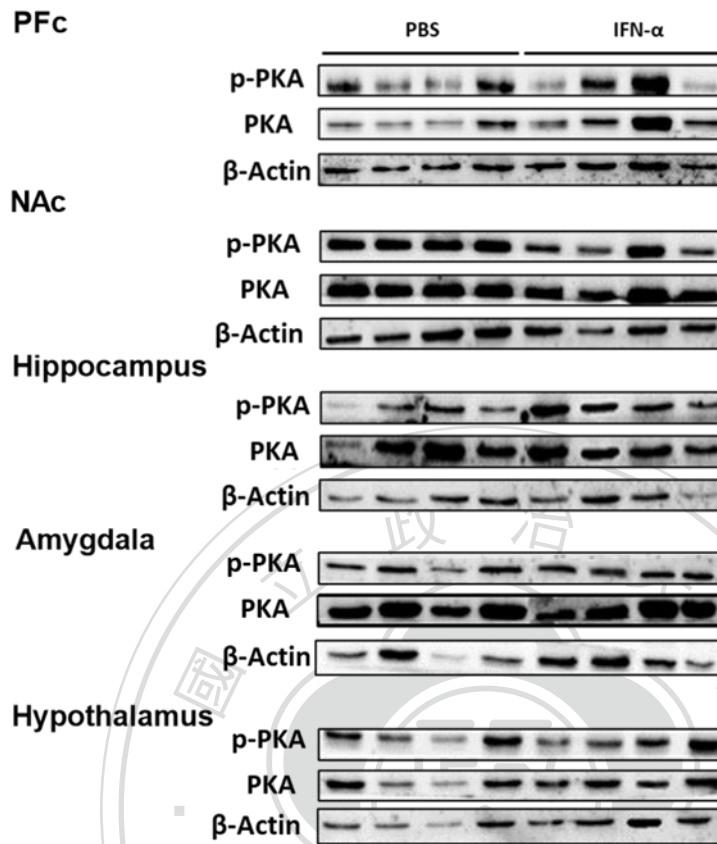
對小鼠長期施打 IFN- α 後提取其下視丘的 RNA 並透過 RT-qPCR 進行 mRNA。

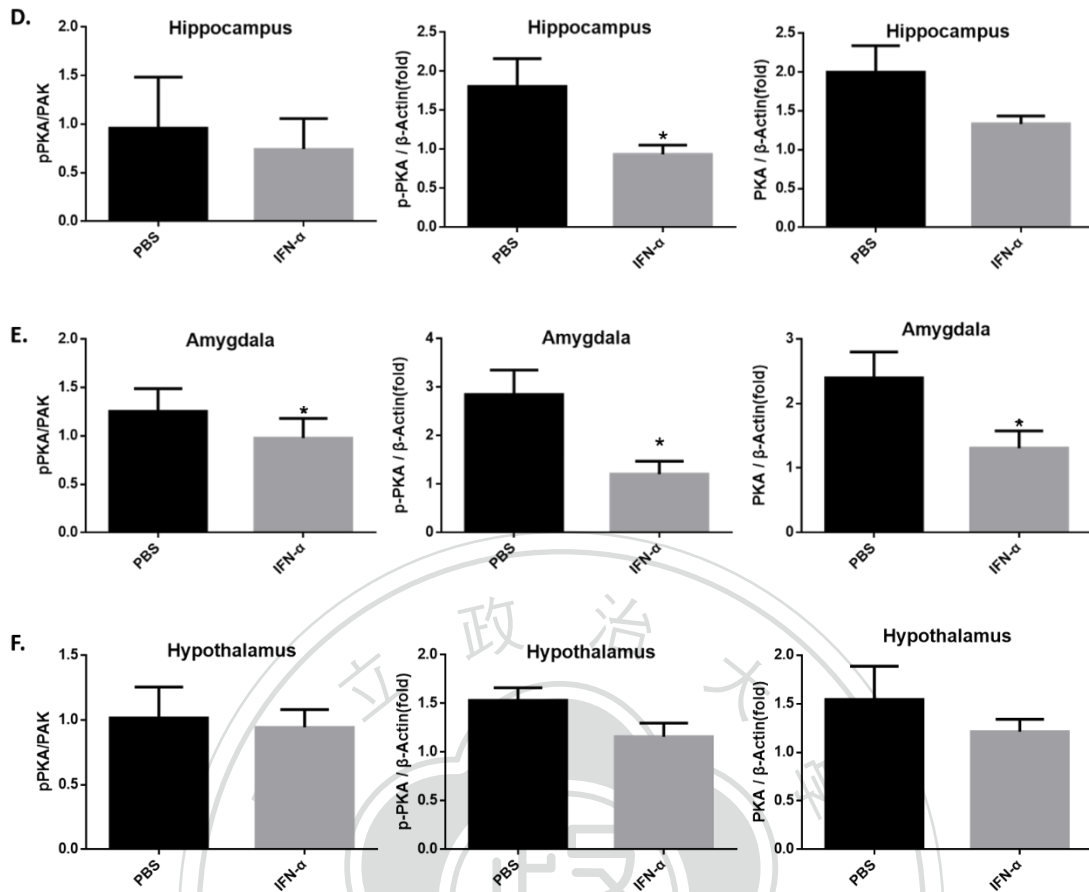
(A) NPY 的 mRNA 表現量($p=0.0020$); (實驗組 $N=6$; 控制組 $N=7$)。 (B) POMC 的

mRNA 表現量($p=0.0008$); (實驗組 $N=7$, 控制組 $N=7$)。 (C)Oxytocin 的 mRNA 表現量;(實驗組 $N=4$, 控制組 $N=4$)。 (D)Vasopressin 表現量(實驗組 $N=4$;控制組 $N=4$)。 (E) Galanin 的 mRNA 表現量(實驗組 $N=4$;控制組 $N=4$)。 (F)Hypocretin 的 mRNA 表現量($p=0.0243$);(實驗組 $N=4$, 控制組 $N=4$)。 實驗數據以 $\text{mean} \pm \text{SEM}$ 表示, 以 T-test 進行統計分析, 另外 RT-qPCR 實驗數據加以 Delta-delta CT 的方式進行分析, *表示 $P<0.05$, **表示 $P<0.01$ 。



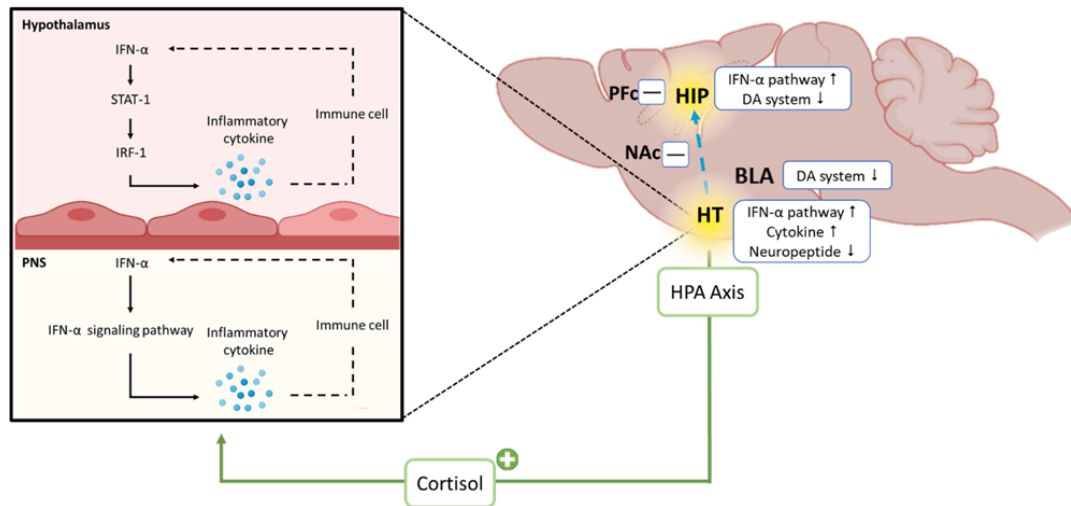
A.





圖十七 大腦中蛋白酶A迴路的異常在接受 IFN- α 後的變化。

對小鼠長期施打 IFN- α 後萃取其蛋白進行西方墨點法分析，(A)蛋白質電泳圖譜(實驗組 N=8;控制組 N=8)。(B)前額葉皮質。(C)依核。(D)海馬迴。(E)杏仁核。(F)下視丘。實驗數據以 mean \pm SEM 表示，以 T-test 進行統計分析。*表示 P<0.05,**表示 P<0.01。



圖十八: IFN- α 引發憂鬱行為的假設。

當 IFN- α 透過腹腔注射進入小鼠的中樞神經系統後，會影響血液中的 Cytokine 反應再活化更多的 IFN- α 在身體中的表現量，。在大腦中各腦區的表現狀況如圖，在下視丘中可以看見 IFN- α 的訊息傳遞路徑被誘發同時發炎因子也因為 IFN- α 的關係隨之上升，眾多神經多肽類也會因為長期的 IFN- α 誘導出現異常的反應如:HPA 軸系統、POMC、NPY 等。在海馬迴中也可以檢測到 IFN- α 的訊息傳遞路徑表現，另外與杏仁核有相似的反應在 PKA 的活性上也皆有發現有受到 IFN- α 的抑制效果。不過在前額葉皮質以及依核並未看到任何的差異表現。

參考文獻

- Arion D, Unger T, Lewis DA, Levitt P, Mirnics K (2007) Molecular evidence for increased expression of genes related to immune and chaperone function in the prefrontal cortex in schizophrenia. *Biol Psychiatry* 62:711-721.
- Bhatti Z, Berenson CS (2007) Adult systemic cat scratch disease associated with therapy for hepatitis C. *BMC Infect Dis* 7:1-4.
- Boutrel B, Kenny PJ, Specio SE, Martin-Fardon R, Markou A, Koob GF, de Lecea L (2005) Role for hypocretin in mediating stress-induced reinstatement of cocaine-seeking behavior. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 102:19168-19173.
- Boyle MP, Brewer JA, Funatsu M, Wozniak DF, Tsien JZ, Izumi Y, Muglia LJ (2005) Acquired deficit of forebrain glucocorticoid receptor produces depression-like changes in adrenal axis regulation and behavior. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 102:473-478.
- Brown AS, Derkits EJ (2010) Prenatal infection and schizophrenia: a review of epidemiologic and translational studies. *Am J Psychiatry* 167:261-280.
- Burguillos MA, Deierborg T, Kavanagh E, Persson A, Hajji N, Garcia-Quintanilla A, Cano J, Brundin P, Englund E, Venero JL (2011) Caspase signalling controls microglia activation and neurotoxicity. *Nature* 472:319-324.
- Burke HM, Davis MC, Otte C, Mohr DC (2005) Depression and cortisol responses to psychological stress: a meta-analysis. *Psychoneuroendocrinology* 30:846-856.
- Carson DS, Guastella AJ, Taylor ER, McGregor IS (2013) A brief history of oxytocin and its role in modulating psychostimulant effects. *Journal of psychopharmacology* 27:231-247.

- Carswell E, Old LJ, Kassel R, Green S, Fiore N, Williamson B (1975) An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 72:3666-3670.
- Chan SW, Harmer CJ, Norbury R, O'Sullivan U, Goodwin GM, Portella MJ (2016) Hippocampal volume in vulnerability and resilience to depression. *J Affect Disord* 189:199-202.
- Chemelli RM, Willie JT, Sinton CM, Elmquist JK, Scammell T, Lee C, Richardson JA, Williams SC, Xiong Y, Kisanuki Y (1999) Narcolepsy in orexin knockout mice: molecular genetics of sleep regulation. *Cell* 98:437-451.
- Cryan JF, Mombereau C (2004) In search of a depressed mouse: utility of models for studying depression-related behavior in genetically modified mice. *Mol Psychiatry* 9:326-357.
- D'haenen HA, Bossuyt A (1994) Dopamine D2 receptors in depression measured with single photon emission computed tomography. *Biol Psychiatry* 35:128-132.
- Dai D, Li Q-C, Zhu Q-B, Hu S-H, Balesar R, Swaab D, Bao A-M (2017) Direct involvement of androgen receptor in oxytocin gene expression: possible relevance for mood disorders. *Neuropsychopharmacology* 42:2064-2071.
- Dantzer R, O'Connor JC, Freund GG, Johnson RW, Kelley KW (2008) From inflammation to sickness and depression: when the immune system subjugates the brain. *Nature reviews neuroscience* 9:46-56.
- Decourt B, K Lahiri D, N Sabbagh M (2017) Targeting tumor necrosis factor alpha for Alzheimer's disease. *Current Alzheimer Research* 14:412-425.
- Deuschle M, Schweiger U, Weber B, Gotthardt U, Körner A, Schmider J, Standhardt H, Lammers C-H, Heuser I (1997) Diurnal activity and pulsatility of the hypothalamus-pituitary-adrenal system in male depressed patients and

- healthy controls. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 82:234-238.
- Diorio D, Viau V, Meaney MJ (1993) The role of the medial prefrontal cortex (cingulate gyrus) in the regulation of hypothalamic-pituitary-adrenal responses to stress. *Journal of Neuroscience* 13:3839-3847.
- Eaton WW, Byrne M, Ewald H, Mors O, Chen C-Y, Agerbo E, Mortensen PB (2006) Association of schizophrenia and autoimmune diseases: linkage of Danish national registers. *Am J Psychiatry* 163:521-528.
- Ehrlich I, Humeau Y, Grenier F, Ciochi S, Herry C, Lüthi A (2009) Amygdala inhibitory circuits and the control of fear memory. *Neuron* 62:757-771.
- Engelmann M, Landgraf R, Wotjak CT (2004) The hypothalamic–neurohypophysial system regulates the hypothalamic–pituitary–adrenal axis under stress: an old concept revisited. *Front Neuroendocrinol* 25:132-149.
- Everitt BJ, Parkinson JA, Olmstead MC, Arroyo M, Robledo P, Robbins TW (1999) Associative processes in addiction and reward the role of amygdala-ventral striatal subsystems. *Ann N Y Acad Sci* 877:412-438.
- Eyding D, Lelgemann M, Grouven U, Härter M, Kromp M, Kaiser T, Kerekes MF, Gerken M, Wieseler B (2010) Reboxetine for acute treatment of major depression: systematic review and meta-analysis of published and unpublished placebo and selective serotonin reuptake inhibitor controlled trials. *BMJ* 341:c4737.
- Fahey B, Hickey B, Kelleher D, O'Dwyer A-M, O'Mara SM (2007) The widely-used antiviral drug interferon-alpha induces depressive-and anxiogenic-like effects in healthy rats. *Behav Brain Res* 182:80-87.
- Fang FC (2004) Antimicrobial reactive oxygen and nitrogen species: concepts and controversies. *Nature Reviews Microbiology* 2:820-832.

- Felger JC, Alagbe O, Hu F, Mook D, Freeman AA, Sanchez MM, Kalin NH, Ratti E, Nemeroff CB, Miller AH (2007) Effects of interferon-alpha on rhesus monkeys: a nonhuman primate model of cytokine-induced depression. *Biol Psychiatry* 62:1324-1333.
- Felger JC, Mun J, Kimmel HL, Nye JA, Drake DF, Hernandez CR, Freeman AA, Rye DB, Goodman MM, Howell LL (2013) Chronic interferon- α decreases dopamine 2 receptor binding and striatal dopamine release in association with anhedonia-like behavior in nonhuman primates. *Neuropsychopharmacology* 38:2179-2187.
- Fienberg AA, Greengard P (2000) The DARPP-32 knockout mouse. *Brain Res Brain Res Rev* 31:313-319.
- Fioravanti J, Medina-Echeverez J, Ardaiz N, Gomar C, Parra-Guillén ZP, Prieto J, Berraondo P (2012) The fusion protein of IFN- α and apolipoprotein AI crosses the blood-brain barrier by a saturable transport mechanism. *The Journal of Immunology* 188:3988-3992.
- Frank MG, Baratta MV, Sprunger DB, Watkins LR, Maier SF (2007) Microglia serve as a neuroimmune substrate for stress-induced potentiation of CNS pro-inflammatory cytokine responses. *Brain Behav Immun* 21:47-59.
- Freeman MR, Rowitch DH (2013) Evolving concepts of gliogenesis: a look way back and ahead to the next 25 years. *Neuron* 80:613-623.
- Fry M, Ferguson AV (2007) The sensory circumventricular organs: brain targets for circulating signals controlling ingestive behavior. *Physiol Behav* 91:413-423.
- Fu X-Y, Kessler DS, Veals SA, Levy DE, Darnell J (1990) ISGF3, the transcriptional activator induced by interferon alpha, consists of multiple interacting

polypeptide chains. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 87:8555-8559.

Gauzzi MC, Barbieri G, Richter MF, Uzé G, Ling L, Fellous M, Pellegrini S (1997) The amino-terminal region of Tyk2 sustains the level of interferon α receptor 1, a component of the interferon α/β receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 94:11839-11844.

Gawin FH, Kleber HD (1986) Abstinence symptomatology and psychiatric diagnosis in cocaine abusers: clinical observations. *Arch Gen Psychiatry* 43:107-113.

Gold P, Chrousos G (2002) Organization of the stress system and its dysregulation in melancholic and atypical depression: high vs low CRH/NE states. *Mol Psychiatry* 7:254-275.

Greig NH, Fredericks WR, Holloway HW, Soncrant TT, Rapoport SI (1988) Delivery of human interferon-alpha to brain by transient osmotic blood-brain barrier modification in the rat. *J Pharmacol Exp Ther* 245:581-586.

Guo J, Zhang W, Zhang L, Ding H, Zhang J, Song C, Zhang Y, Xia N, Li M, Liang Y (2016) Probable involvement of p11 with interferon alpha induced depression. *Sci Rep* 6:1-15.

Haenisch B, Bilkei-Gorzo A, Caron MG, Bönisch H (2009) Knockout of the norepinephrine transporter and pharmacologically diverse antidepressants prevent behavioral and brain neurotrophin alterations in two chronic stress models of depression. *J Neurochem* 111:403-416.

Hara J, Beuckmann CT, Nambu T, Willie JT, Chemelli RM, Sinton CM, Sugiyama F, Yagami K-i, Goto K, Yanagisawa M (2001) Genetic ablation of orexin neurons in mice results in narcolepsy, hypophagia, and obesity. *Neuron* 30:345-354.

- Harris GC, Wimmer M, Aston-Jones G (2005) A role for lateral hypothalamic orexin neurons in reward seeking. *Nature* 437:556-559.
- Hastings RS, Parsey RV, Oquendo MA, Arango V, Mann JJ (2004) Volumetric analysis of the prefrontal cortex, amygdala, and hippocampus in major depression. *Neuropsychopharmacology* 29:952-959.
- Hauser P, Khosla J, Aurora H, Laurin J, Kling M, Hill J, Gulati M, Thornton A, Schultz R, Valentine AD (2002) A prospective study of the incidence and open-label treatment of interferon-induced major depressive disorder in patients with hepatitis C. *Mol Psychiatry* 7:942-947.
- Heaton RK, Nelson LM, Thompson DS, Burks JS, Franklin GM (1985) Neuropsychological findings in relapsing-remitting and chronic-progressive multiple sclerosis. *J Consult Clin Psychol* 53:103.
- Hedlund PB, Huitron-Resendiz S, Henriksen SJ, Sutcliffe JG (2005) 5-HT₇ receptor inhibition and inactivation induce antidepressantlike behavior and sleep pattern. *Biol Psychiatry* 58:831-837.
- Heinrichs M, Domes G (2008) Neuropeptides and social behaviour: effects of oxytocin and vasopressin in humans. *Prog Brain Res* 170:337-350.
- Horvath TL, Naftolin F, Kalra SP, Leranth C (1992) Neuropeptide-Y innervation of beta-endorphin-containing cells in the rat mediobasal hypothalamus: a light and electron microscopic double immunostaining analysis. *Endocrinology* 131:2461-2467.
- Inutsuka A, Yamanaka A (2013) The physiological role of orexin/hypocretin neurons in the regulation of sleep/wakefulness and neuroendocrine functions. *Front Endocrinol (Lausanne)* 4:18.

- Iqbal S, Hayman EG, Hong C, Stokum JA, Kurland DB, Gerzanich V, Simard JM (2016) Inducible nitric oxide synthase (NOS-2) in subarachnoid hemorrhage: Regulatory mechanisms and therapeutic implications. *Brain circulation* 2:8.
- Isella V, Iurlaro S, Piolti R, Ferrarese C, Frattola L, Appollonio I, Melzi P, Grimaldi M (2003) Physical anhedonia in Parkinson's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 74:1308-1311.
- Jarrard LE (1993) On the role of the hippocampus in learning and memory in the rat. *Behav Neural Biol* 60:9-26.
- Kajihara M, Montagnese S, Khanna P, Amodio P, Schapira AH, Dusheiko GM, Morgan MY (2010) Parkinsonism in patients with chronic hepatitis C treated with interferon- α 2b: a report of two cases. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 22:628-631.
- Kang HJ, Voleti B, Hajszan T, Rajkowska G, Stockmeier CA, Licznarski P, Lepack A, Majik MS, Jeong LS, Banasr M (2012) Decreased expression of synapse-related genes and loss of synapses in major depressive disorder. *Nat Med* 18:1413-1417.
- Kim JJ, Diamond DM (2002) The stressed hippocampus, synaptic plasticity and lost memories. *Nature Reviews Neuroscience* 3:453.
- Kim JJ, Rison RA, Fanselow MS (1993) Effects of amygdala, hippocampus, and periaqueductal gray lesions on short-and long-term contextual fear. *Behav Neurosci* 107:1093.
- Kirkwood JM, Ernstoff MS (1990) Role of Interferons in the Therapy of Melanoma. *J Invest Dermatol* 95.
- Klawonn AM, Fritz M, Nilsson A, Bonaventura J, Shionoya K, Mirrasekhian E, Karlsson U, Jaarola M, Granseth B, Blomqvist A (2018) Motivational valence is determined by striatal melanocortin 4 receptors. *The Journal of Clinical Investigation* 128:3160-3170.

- Koob GF, Le Moal M (2001) Drug addiction, dysregulation of reward, and allostasis. *Neuropsychopharmacology* 24:97-129.
- Krystal AD, Benca RM, Kilduff TS (2013) Understanding the sleep-wake cycle: sleep, insomnia, and the orexin system. *The Journal of clinical psychiatry* 74:3-20.
- Kuteeva E, Hökfelt T, Wardi T, Ogren S (2008) Galanin, galanin receptor subtypes and depression-like behaviour. *Cellular and molecular life sciences: CMLS* 65:1854-1863.
- Lammel S, Lim BK, Malenka RC (2014) Reward and aversion in a heterogeneous midbrain dopamine system. *Neuropharmacology* 76:351-359.
- Legros J-J (2001) Inhibitory effect of oxytocin on corticotrope function in humans: are vasopressin and oxytocin ying-yang neurohormones? *Psychoneuroendocrinology* 26:649-655.
- Levenson JL, Fallon HJ (1993) Fluoxetine Treatment of Depression Caused by Interferon- α . *American Journal of Gastroenterology (Springer Nature)* 88.
- Levy DE, Kessler D, Pine R, Darnell J (1989) Cytoplasmic activation of ISGF3, the positive regulator of interferon-alpha-stimulated transcription, reconstituted in vitro. *Genes Dev* 3:1362-1371.
- Li N, Liu R-J, Dwyer JM, Banasr M, Lee B, Son H, Li X-Y, Aghajanian G, Duman RS (2011) Glutamate N-methyl-D-aspartate receptor antagonists rapidly reverse behavioral and synaptic deficits caused by chronic stress exposure. *Biol Psychiatry* 69:754-761.
- Lim BK, Huang KW, Grueter BA, Rothwell PE, Malenka RC (2012) Anhedonia requires MC4R-mediated synaptic adaptations in nucleus accumbens. *Nature* 487:183-189.

- Lin S, Storlien LH, Huang X-F (2000) Leptin receptor, NPY, POMC mRNA expression in the diet-induced obese mouse brain. *Brain Res* 875:89-95.
- Loomer HP, Saunders JC, Kline NS (1957) A clinical and pharmacodynamic evaluation of iproniazid as a psychic energizer. *Psychiatr Res Rep Am Psychiatr Assoc.*
- Lotrich FE (2009) Major depression during interferon- α treatment: vulnerability and prevention. *Dialogues Clin Neurosci* 11:417.
- M Schmidt F, C Kirkby K, Lichtblau N (2016) Inflammation and immune regulation as potential drug targets in antidepressant treatment. *Curr Neuropharmacol* 14:674-687.
- Mayer-Barber KD, Barber DL, Shenderov K, White SD, Wilson MS, Cheever A, Kugler D, Hieny S, Caspar P, Núñez G (2010) Cutting edge: caspase-1 independent IL-1 β production is critical for host resistance to Mycobacterium tuberculosis and does not require TLR signaling in vivo. *The Journal of Immunology* 184:3326-3330.
- Melén K, Kinnunen L, Julkunen I (2001) Arginine/lysine-rich structural element is involved in interferon-induced nuclear import of STATs. *J Biol Chem* 276:16447-16455.
- Menard C, Pfau ML, Hodes GE, Kana V, Wang VX, Bouchard S, Takahashi A, Flanigan ME, Aleyasin H, LeClair KB (2017) Social stress induces neurovascular pathology promoting depression. *Nat Neurosci* 20:1752-1760.
- Mervaala E, Föhr J, Könönen M, Valkonen-Korhonen M, Vainio P, Partanen K, Partanen J, Tiihonen J, Viinamäki H, Karjalainen A-K (2000) Quantitative MRI of the hippocampus and amygdala in severe depression. *Psychol Med* 30:117-125.

- Meyer JH, Krüger S, Wilson AA, Christensen BK, Goulding VS, Schaffer A, Minifie C, Houle S, Hussey D, Kennedy SH (2001) Lower dopamine transporter binding potential in striatum during depression. *Neuroreport* 12:4121-4125.
- Meynen G, Unmehopa UA, van Heerikhuize JJ, Hofman MA, Swaab DF, Hoogendijk WJ (2006) Increased arginine vasopressin mRNA expression in the human hypothalamus in depression: a preliminary report. *Biol Psychiatry* 60:892-895.
- Miller AH, Raison CL (2016) The role of inflammation in depression: from evolutionary imperative to modern treatment target. *Nature reviews immunology* 16:22.
- Montgomery SA (1997) Reboxetine: additional benefits to the depressed patient. *Journal of psychopharmacology (Oxford, England)* 11:S9.
- Murakami Y, Ishibashi T, Tomita E, Imamura Y, Tashiro T, Watcharanurak K, Nishikawa M, Takahashi Y, Takakura Y, Mitani S (2016) Depressive symptoms as a side effect of Interferon- α therapy induced by induction of indoleamine 2, 3-dioxygenase 1. *Sci Rep* 6:1-12.
- Nazimek K, Strobel S, Bryniarski P, Kozlowski M, Filipczak-Bryniarska I, Bryniarski K (2017) The role of macrophages in anti-inflammatory activity of antidepressant drugs. *Immunobiology* 222:823-830.
- Nestler EJ, Carlezon Jr WA (2006) The mesolimbic dopamine reward circuit in depression. *Biol Psychiatry* 59:1151-1159.
- Nie X, Kitaoka S, Tanaka K, Segi-Nishida E, Imoto Y, Ogawa A, Nakano F, Tomohiro A, Nakayama K, Taniguchi M (2018) The innate immune receptors TLR2/4 mediate repeated social defeat stress-induced social avoidance through prefrontal microglial activation. *Neuron* 99:464-479. e467.
- Nishi A, Kuroiwa M, Shuto T (2011) Mechanisms for the modulation of dopamine D1 receptor signaling in striatal neurons. *Front Neuroanat* 5:43.

- Novikov A, Cardone M, Thompson R, Shenderov K, Kirschman KD, Mayer-Barber KD, Myers TG, Rabin RL, Trinchieri G, Sher A (2011) Mycobacterium tuberculosis triggers host type I IFN signaling to regulate IL-1 β production in human macrophages. *The journal of immunology* 187:2540-2547.
- Ogawa Y, Kanbayashi T, Yano T, Sawaishi Y, Saito Y, Shimizu T (2003) Cerebrospinal fluid-orexin decreases during intraventricular α -interferon therapy of the patients with subacute sclerosing panencephalitis. *Sleep Biol Rhythms* 1:143-145.
- Ozsoy S, Esel E, Kula M (2009) Serum oxytocin levels in patients with depression and the effects of gender and antidepressant treatment. *Psychiatry Res* 169:249-252.
- Pariante CM, Lightman SL (2008) The HPA axis in major depression: classical theories and new developments. *Trends Neurosci* 31:464-468.
- Perry VH, Holmes C (2014) Microglial priming in neurodegenerative disease. *Nature Reviews Neurology* 10:217-224.
- Ragimbeau J, Dondi E, Alcover A, Eid P, Uzé G, Pellegrini S (2003) The tyrosine kinase Tyk2 controls IFNAR1 cell surface expression. *The EMBO journal* 22:537-547.
- Raison CL, Rye DB, Woolwine BJ, Vogt GJ, Bautista BM, Spivey JR, Miller AH (2010) Chronic interferon-alpha administration disrupts sleep continuity and depth in patients with hepatitis C: association with fatigue, motor slowing, and increased evening cortisol. *Biol Psychiatry* 68:942-949.
- Raison CL, Borisov AS, Broadwell SD, Capuron L, Woolwine BJ, Jacobson IM, Nemeroff CB, Miller AH (2005) Depression during pegylated interferon-alpha plus ribavirin therapy: prevalence and prediction. *The Journal of clinical psychiatry* 66:41.

- Ramboz S, Oosting R, Amara DA, Kung HF, Blier P, Mendelsohn M, Mann JJ, Brunner D, Hen R (1998) Serotonin receptor 1A knockout: an animal model of anxiety-related disorder. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95:14476-14481.
- Reich N, Evans B, Levy D, Fahey D, Knight E, Darnell J (1987) Interferon-induced transcription of a gene encoding a 15-kDa protein depends on an upstream enhancer element. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 84:6394-6398.
- Reyes-Vázquez C, Prieto-Gómez B, Dafny N (2012) Interferon modulates central nervous system function. *Brain Res* 1442:76-89.
- Rose-John S (2018) Interleukin-6 family cytokines. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 10:a028415.
- Ross S, Renyi A (1969) Inhibition of the uptake of tritiated 5-hydroxytryptamine in brain tissue. *Eur J Pharmacol* 7:270-277.
- Saal D, Dong Y, Bonci A, Malenka RC (2003) Drugs of abuse and stress trigger a common synaptic adaptation in dopamine neurons. *Neuron* 37:577-582.
- Saracco G, Olivero A, Ciancio A, Carenzi S, Rizzetto M (2003) Therapy of chronic hepatitis C: a critical review. *Current Drug Targets-Infectious Disorders* 3:25-32.
- Schindler C, Fu X-Y, Improta T, Aebersold R, Darnell JE (1992) Proteins of transcription factor ISGF-3: one gene encodes the 91-and 84-kDa ISGF-3 proteins that are activated by interferon alpha. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 89:7836-7839.
- Schneider WM, Chevillotte MD, Rice CM (2014) Interferon-stimulated genes: a complex web of host defenses. *Annu Rev Immunol* 32:513-545.

- Schultz W (1998) Predictive reward signal of dopamine neurons. *J Neurophysiol* 80:1-27.
- Sheline YI (2011) Depression and the hippocampus: cause or effect? *Biol Psychiatry* 70:308.
- Shi L, Fatemi SH, Sidwell RW, Patterson PH (2003) Maternal influenza infection causes marked behavioral and pharmacological changes in the offspring. *Journal of Neuroscience* 23:297-302.
- Smith AS, Ågmo A, Birnie AK, French JA (2010) Manipulation of the oxytocin system alters social behavior and attraction in pair-bonding primates, *Callithrix penicillata*. *Horm Behav* 57:255-262.
- Smith RA, Norris F, Palmer D, Bernhardt L, Wills RJ (1985) Distribution of alpha interferon in serum and cerebrospinal fluid after systemic administration. *Clin Pharmacol Ther* 37:85-88.
- Sofroniew MV (2015a) Astrocyte barriers to neurotoxic inflammation. *Nature Reviews Neuroscience* 16:249-263.
- Sofroniew MV (2015b) Astrogliosis. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 7:a020420.
- Stevenson CW, Gratton A (2004) Basolateral amygdala dopamine receptor antagonism modulates initial reactivity to but not habituation of the acoustic startle response. *Behav Brain Res* 153:383-387.
- Strauss GP, Gold JM (2012) A new perspective on anhedonia in schizophrenia. *Am J Psychiatry* 169:364-373.
- Sullivan RM, Dufresne MM (2006) Mesocortical dopamine and HPA axis regulation: role of laterality and early environment. *Brain Res* 1076:49-59.

- Tatsumi M, Groshan K, Blakely RD, Richelson E (1997) Pharmacological profile of antidepressants and related compounds at human monoamine transporters. *Eur J Pharmacol* 340:249-258.
- Thurzó B, Jászberényi M, Bagosi Z, Pataki I, Kádár E, Szabó G, Telegdy G (2016) Evidence of the dopamine-2 receptor mediated inhibition of the hypothalamic-pituitary-adrenal system; a rodent model of hypercortisolism in chronic neuropsychiatric disorders.
- Träskman L, Åsberg M, Bertilsson L, Sjöstrand L (1981) Monoamine metabolites in CSF and suicidal behavior. *Arch Gen Psychiatry* 38:631-636.
- Tsai H-C, Zhang F, Adamantidis A, Stuber GD, Bonci A, De Lecea L, Deisseroth K (2009) Phasic firing in dopaminergic neurons is sufficient for behavioral conditioning. *Science* 324:1080-1084.
- Turan T, Uysal C, Asdemir A, Kılıç E (2013) May oxytocin be a trait marker for bipolar disorder? *Psychoneuroendocrinology* 38:2890-2896.
- Tye KM, Mirzabekov JJ, Warden MR, Ferenczi EA, Tsai H-C, Finkelstein J, Kim S-Y, Adhikari A, Thompson KR, Andalman AS (2013) Dopamine neurons modulate neural encoding and expression of depression-related behaviour. *Nature* 493:537-541.
- Verkhatsky A, Sofroniew MV, Messing A, deLanerolle NC, Rempe D, Rodríguez JJ, Nedergaard M (2012) Neurological diseases as primary gliopathies: a reassessment of neurocentrism. *ASN Neuro* 4:AN20120010.
- Wachholz S, Eßlinger M, Plümper J, Manitz M-P, Juckel G, Friebe A (2016) Microglia activation is associated with IFN- α induced depressive-like behavior. *Brain Behav Immun* 55:105-113.

- Wang J, Campbell I, Zhang H (2008) Systemic interferon- α regulates interferon-stimulated genes in the central nervous system. *Mol Psychiatry* 13:293-301.
- Willner P, Lappas S, Cheeta S, Muscat R (1994) Reversal of stress-induced anhedonia by the dopamine receptor agonist, pramipexole. *Psychopharmacology (Berl)* 115:454-462.
- Willner P, Towell A, Sampson D, Sophokleous S, Muscat R (1987) Reduction of sucrose preference by chronic unpredictable mild stress, and its restoration by a tricyclic antidepressant. *Psychopharmacology (Berl)* 93:358-364.
- Wise RA (1996) Addictive drugs and brain stimulation reward. *Annu Rev Neurosci* 19:319-340.
- Yohn CN, Gergues MM, Samuels BA (2017) The role of 5-HT receptors in depression. *Mol Brain* 10:1-12.
- Zhang H, Wang W, Jiang Z, Shang J, Zhang L (2010) Differential involvement of 5-HT_{1A} and 5-HT_{1B/1D} receptors in human interferon-alpha-induced immobility in the mouse forced swimming test. *Arzneimittelforschung* 60:109-115.
- Zheng L-S, Kaneko N, Sawamoto K (2015) Minocycline treatment ameliorates interferon-alpha-induced neurogenic defects and depression-like behaviors in mice. *Front Cell Neurosci* 9:5.
- Zheng L-S, Hitoshi S, Kaneko N, Takao K, Miyakawa T, Tanaka Y, Xia H, Kalinke U, Kudo K, Kanba S (2014) Mechanisms for interferon- α -induced depression and neural stem cell dysfunction. *Stem cell reports* 3:73-84.

附錄:

附錄一:裂解緩衝液(Lysis Buffer)配方

Lysis Buffer Component	volume
0.5M Tris-HCL PH=8	1.214g
1.5M NaCl	1.7532g
EDTA	0.1488g
NP40	2ml
Distilled water	Final to 200ml

附錄二:loading dye 配方

5X Loading Dye Component	volume
0.25M Tris-HCL PH=6.8	1.25ml
0.5M DTT	0.38g
10% Sodium Dodecyl Sulfate(SDS)	0.5g
0.5% Bromophenol Blue	0.025g
50% Glycerol	2.5ml
Distilled water	1.25ml
Total	5ml

附錄三:Running Gel 配方

4% Running Gel	volume
Distilled water	3.97ml
30% Acrylamide	3.33ml
0.5M Tris-HCl, PH 8.8	2.5ml
10% Sodium Dodecyl Sulfate(SDS)	100 μ l
10% Ammonium Persulfate	100 μ l
TEMED	8 μ l
Total	10 ml

附錄四:Stacking Gel 配方

4% Stacking Gel	volume
Distilled water	2.1ml
30% Acrylamide	0.48ml
1.5M Tris-HCl, PH 8.8	0.9ml
10% Sodium Dodecyl Sulfate(SDS)	36 μ l
10% Ammonium Persulfate	36 μ l
TEMED	4.8 μ l
Total	3.6 ml

附錄五:Tank Buffer 配方

10X Tank Buffer	volume
Tris	30.28g
Glycine	144.13g
SDS	10g
Total	Find to 1L

附錄六:Transfer Buffer 配方

10X Transfer Buffer	volume
Tris	30.3g
Glycine	144g
Distilled water	Find to 1L

1X Transfer Buffer	volume
10x Transfer Buffer	100ml
Methanol	150ml
Distilled water	750ml

附錄七:RT 混合液體

Component	volume
10X RT-script buffer	2 μ l
RNase inhibitor	0.5 μ l
dNTP solution	1 μ l
RT-script enzyme	0.5 μ l
Nuclease-free water	6 μ l
Total	20 μ l

附錄八:cDNA 混合液體

Component	volume
cDNA	1 μ l
Primer F(10nM)	1 μ l
Primer R(10nM)	1 μ l
Nuclease-free water	7 μ l
SYBER Green Master Mix	10 μ l
Total	20 μ l

附錄九:實驗中使用的 primer 及其溫度

GAPDH	Forward: 5'-GCACAGTCAAGGCCGAGAAT-3'	56
	Reverse: 5'-GCCTTCTCCATGGTGGTGAA-3'	
IFN-α R	Forward: 5'-AGCCACGGAGAGTCAATGG-3'	56
	Reverse: 5'-GCTCTGACACGAACTGTGTTTT-3'	
STAT-1	Forward: 5'-GCCTCTCATTGTCACCGAAGAAC-3'	56
	Reverse: 5'-TGGCTGACGTTGGAGATCACCA-3'	
IRF-1	Forward: 5'-TCCAAGTCCAGCCGAGACACTA-3'	56
	Reverse: 5'-ACTGCTGTGGTCATCAGGTAGG-3'	
SOCS-1	Forward: 5'-CTGCGGCTTCTATTGGGGAC-3'	56
	Reverse: 5'-AAAAGGCAGTCGAAGGTCTCG-3'	
TNF-α	Forward: 5'-CCCTCACACTCAGATCATCTTCT-3'	56
	Reverse: 5'-GCTACGACGTGGGCTACAG-3'	
NOS-2	Forward: 5'-CTTTGCCACGGACGAGAC-3'	56
	Reverse: 5'-TCATTGTACTCTGAGGGCTGAC-3'	
POMC	Forward: 5'-CCATAGATGTGTGGAGCTGGTG-3'	56

	Reverse: 5'-CATCTCCGTTGCCAGGAAACAC-3'	
CRH	Forward: 5'-CCTCAGCCGGTTCTGATCC-3'	56
	Reverse: 5'-AGCAACACGCGGAAAAAGTTA-3'	
NPY	Forward: 5'-TACTCCGCTCTGCGACACTA-3'	56
	Reverse: 5'-GATGAGGGTGGAAACTTGGA-3'	
GFAP	Forward: 5'-CGGAGACGCATCACCTCTG-3'	56
	Reverse: 5'-AGGGAGTGGAGGAGTCATTTCG-3'	
Oxytocin	Forward: 5'-CTGTGCTGGACCTGGATATGCG-3'	56
	Reverse: 5'-AGCTCGTCCGCGCAGCAGATG-3'	
vasopressin	Forward: 5'-GCCAGGATGCTCAACACTACG-3'	56
	Reverse: 5'-TCTCAGCTCCATGTCAGAGATG-3'	
Hypocretin	Forward: 5'-GTCGCCAGAAGACGTGTTC-3'	56
	Reverse: 5'-GGTGGTAGTTACGGTCGGAC-3'	
Galanin	Forward: 5'-GGCAGCGTTATCCTGCTAGG-3'	56
	Reverse: 5'-CTGTTTCAGGGTCCAACCTCT-3'	
IL-6	Forward: 5'-TAGTCCTTCCTACCCCAATTTCC-3'	56
	Reverse: 5'-TTGGTCCTTAGCCACTCCTTC-3'	

