

# 國立政治大學神經科學研究所

## 碩士論文

國立政治大學  
神經科學研究所

碩士論文

親子分離對新生老鼠之腎上腺發育的影響

親子分離對新生老鼠之腎上腺發育的影響

The effects of maternal separation on the  
development of adrenal glands



研究生:周李澧 撰

指導教授:賴桂珍 博士

研究生  
周李澧  
撰

中華民國 101 年 7 月 17 日

101  
年

## 中文摘要

腎上腺素為哺乳類為了因應各種不同的壓力所釋放出的物質，影響生物體日常的生理功能且對生物體的存活有著莫大的貢獻，在成體中的調節已經在很多文獻中被探討，但對於處在發育階段的新生兒其腎上腺的發育與早期壓力對此系統的影響仍不盡清楚。為探討壓力與腎上腺發育及壓力調控之間的關係，本論文將觀察之重點放在腎上腺髓質中能夠製造腎上腺素的嗜鉻細胞(chromaffin cells)上。要了解新生兒腎上腺發育與壓力之間的關係，主要是利用親子分離的實驗，對新生老鼠造成壓力，實驗將新生老鼠分成三組，分別為控制組(control)、隔離組(isolate;P2~P14 一小時/天)與撫摸組(handle;P2~P14 十分鐘/天)，試驗完畢後分別在老鼠出生後十四天(P14)與出生後二十一天(P21)進行腎上腺切片，利用腎上腺素合成酵素(PNMT，phenylethanolamine-N-methyl transferase)及腎上腺素與正腎上腺素共同合成酵素(TH，tyrosine hydroxylase)之螢光免疫染色，來區分可製造腎上腺素的 chromaffin cells，發現不管在 P14 或是 P21，三組之間的腎上腺髓質結構並無太大差異。結果顯示，經過親子分離實驗的操弄，發現在撫摸組 chromaffin cells 中其 PNMT 的含量相對於 TH 的比例含量高於控制組與隔離組，顯示在撫摸組中每一

chromaffin cell 含有較多的 PNMT，可能可以製造較多的腎上腺素。

最後，為探討親子分離實驗對新生老鼠之腎上腺素與正腎上腺素含量的影響，以 HPLC 檢測經過親子分離實驗的新生老鼠之腎上腺，發現在 P14 時撫摸組與隔離組之腎上腺素含量比控制組高( $p < 0.05$ )，而正腎上腺素的含量則沒有差異；在 P21 時三組間的腎上腺素與正腎上腺素含量則沒有差異。而同樣的親子分離實驗在一胎一組新生老鼠的腎上腺發育上未看到任何顯著影響。



## 英文摘要

Epinephrine for the mammalian order in response to a variety of different pressure release substances. Affect organisms daily physiological functions and has made a great contribution to the survival of the organism. The adjustment in the adult have already been discussed in many literature, but for newborns in the developmental stages of adrenal development and early pressure this system is not fully clear. To investigate the relationship between the pressure and adrenal development and stress management. This thesis will be observed that the focus on the adrenal medulla to produce epinephrine from chromaffin cells. To understand the relationship between neonatal adrenal development and pressure. Mainly using maternal separation experiments pressure of newborn rats. Experimental newborn rats were divided into three groups, respectively for the control group, isolation group (P2 ~ P14 one hour / day) and handle group ( P2 ~ P14 ten minutes / day). After the test, respectively 14 days after the

rats born and 21 days after the rats born to adrenal slices. Immunofluorescence staining of the use of the epinephrine synthetic enzymes (PNMT, phenylethanolamine-N-methyl transferase) and epinephrine and norepinephrine common synthase (TH, tyrosine hydroxylase). To distinguish between manufacturing epinephrine chromaffin cells. Found that regardless of the P14 or P21, adrenal medulla structure between the three groups is not much different. The results show that the manipulation of the maternal separation experiments, found that the proportion of PNMT content relative to TH content in the handle group chromaffin cells higher than the control group and isolation group. Handle group, each the chromaffin cell containing more PNMT, may be able to create more epinephrine. Finally, to explore the impact of maternal separation experiments of newborn rats of epinephrine and norepinephrine content. HPLC detection of newborn rat' adrenal gland after maternal separation experiments. The handle group and the isolated group of epinephrine

content found in P14 higher than the control group ( $p < 0.05$ ), and norepinephrine content was no difference. Epinephrine and norepinephrine content among the three groups there was no difference in P21. The same maternal separation experiments do not see any significant impact on the development of one-mother pregnancy as a group of newborn rats adrenal.



## 目錄

中文摘要.....	I
英文摘要.....	III
目錄.....	VI
圖次.....	X
縮寫對照表.....	XII
第一章、緒論.....	1
第一節 壓力的產生.....	1
一、壓力的定義.....	1
二、壓力的種類.....	1
三、壓力賀爾蒙的生理功能.....	2
第二節 壓力反應機制.....	3
一、戰或逃反應(fight-or flight response) .....	3
二、hypothalamic-pituitary-adrenal axis(HPA axis) .....	4
(1)HPA axis 的組成 .....	4
(2)HPA axis 的反應機制 .....	5
(3)HPA axis 反應機制的調控 .....	5
(4)HPA axis 對新生老鼠發育的影響 .....	6
第三節 腎上腺發育過程.....	7

第四節 嗜鉻細胞(chromaffin cells)的生理功能.....	8
一、嗜鉻細胞的介紹.....	8
二、腎上腺素與正腎上腺素的合成 .....	9
三、腎上腺素與正腎上腺素的儲存.....	11
四、腎上腺素與正腎上腺素的釋放.....	11
五、壓力與腎上腺素、正腎上腺素的關係.....	12
第五節 與壓力賀爾蒙相關的疾病 .....	13
第六節 與壓力相關的動物行為實驗 .....	15
一、親子分離(maternal separation) .....	15
二、高腳十字迷宮 (Elevated Plus Maze、EPM) .....	15
三、其他與壓力相關的動物行為實驗.....	16
第七節 本論文之研究目的與策略 .....	16
第二章、實驗材料與研究方法 .....	18
第一節 實驗動物.....	18
第二節 親子分離行為實驗(maternal separation) .....	18
一、交配判定 .....	19
二、新生老鼠的標記 .....	19
三、親子分離(一胎三組) .....	19
四、time course 與親子分離(一胎一組) .....	20



第三節 初代細胞培養(primary cell culture) .....	20
一、 細胞培養皿之塗抹(coating plate) .....	20
二、 培養基配製 .....	20
三、 初代細胞培養(primary cell culture) .....	21
第四節 免疫螢光染色(Immunofluorescence) .....	22
第五節 Chromaffin cell 的 PNMT/TH 強度(intensity)分析 ...	23
第六節 免疫組織化學染色(immunohistochemistry) .....	23
一、 組織切片的製備 .....	23
二、 封片膠與明膠的製備 .....	24
三、 免疫螢光染色(Immunofluorescence) .....	25
第七節 高壓液相層析儀檢測(HPLC; high performance liquid chromatography) .....	26
一、 移動相的配製 .....	26
二、 standard 的配製與 catechoamine 的萃取 .....	26
三、 高壓液相層析儀(HPLC) .....	27
第三章 結果 .....	28
第一節 親子分離實驗對新生老鼠的腎上腺結構並無影響 .....	28
第二節 親子分離實驗對新生老鼠其腎上腺可製造腎上腺素之 chromaffin cells 的影響 .....	32
第三節 親子分離實驗影響新生老鼠之腎上腺素與正腎上腺素的含	

量 .....	41
第四節 親子分離實驗(操弄至 P21)對新生老鼠其腎上腺之腎上腺素與正腎上腺素含量的影響.....	49
第五節 親子分離實驗對一胎一組新生老鼠其腎上腺之腎上腺素與正腎上腺素含量的影響 .....	52
第四章 討論 .....	59
第五章 結論 .....	70
參考資料 .....	71



## 圖次

圖 1、將經過親子分離實驗的新生老鼠(P14)之腎上腺切片染色(染 TH 與 PNMT)。	29
圖 2、將經過親子分離實驗的新生老鼠(P21 之腎上腺切片染色(染 TH 與 PNMT)。	30
圖 3、親子分離實驗後測量新生老鼠的體重。	35
圖 4、chromaffin cells 在可見光及螢光下的細胞型態。	37
圖 5、經過親子分離實驗後分析新生老鼠 chromaffin cells 中 PNMT 與 TH 在各組中的相對含量。	38
圖 6、經過親子分離實驗後計算新生老鼠有染到 PNMT 的 chromaffin cells 細胞數量。	40
圖 7、經過親子分離實驗後檢測新生老鼠腎上腺中腎上腺素與正腎上腺素的含量。	44
圖 8、經過親子分離實驗後檢測新生老鼠腎上腺中腎上腺素與正腎上腺素的含量。	45
圖 9、經過親子分離實驗後以 HPLC 檢測新生老鼠腎上腺中腎上腺素與正腎上腺素的含量。	46
圖 10、經過親子分離實驗後以 HPLC 檢測新生老鼠腎上腺中腎上腺素與正腎上腺素的含量。	47

圖 11、延長親子分離實驗後分析新生老鼠體重、chromaffin cells 中 PNMT 與 TH 在各組中的相對含量以及 HPLC 檢測新生老鼠腎上腺中腎上腺素與正腎上腺素的含量。 .....	50
圖 12、親子分離實驗後測量新生老鼠的體重。.....	54
圖 13、經過親子分離實驗後分析新生老鼠 chromaffin cells 中 PNMT 與 TH 在各組中的相對含量。 .....	55
圖 14、經過親子分離實驗(一胎一組)後計算新生老鼠有染到 PNMT 的 chromaffin cells 細胞數量。 .....	56
圖 15、經過親子分離實驗(一胎一組)後檢測新生老鼠腎上腺中腎上腺素與正腎上腺素的含量。 .....	57
圖 16、經過親子分離實驗(一胎一組)後檢測新生老鼠腎上腺中腎上腺素與正腎上腺素的含量。 .....	58
圖 17、親子分離不影響新生老鼠腎上腺髓質中 chromaffin cells 的細胞大小。 .....	65
圖 18、腎上腺素含量佔腎上腺素與正腎上腺素含量總和的百分比。 .....	66
圖 19、有染到 PNMT 的 chromaffin cells 在所有 chromaffin cells 中所佔的百分比。 .....	67
圖 20、在有無表現 PNMT 的 chromaffin cells 中 TH 的強度。 ....	68

## 縮寫對照表

Adrenal gland excision:ADX  
adrenocorticotrophic hormone: ACTH  
animal facility rearing:AFR  
corticotroppin-releasing hormome: CRH  
catechol-O-methyltransferase:COMT  
dopamine $\beta$ -hydroxylase: DBH  
fetal bovine serum: FBS  
glucocoticoicd receptor: GR  
Hanks' Balanced Salt Solution:HBSS  
horse serum: HS  
monoamine oxidase: MAO  
hypothalamic-pituitary-adrenal axis: HPA axis  
immobilization:IMO  
mineralocoticoicd receptor: MR  
paraformaldehyde:PFA  
phenylethanolamine-N-methyl transferase: PNMT  
phosphate-buffered saline:PBS  
S-adenosylmethionine:SAM  
stress hyporesponsive period:SHRP  
tyrosine hydroxylase:TH  
Vesicular monoamine transporters(VMAT)  
Voltage-dependent calcium channels:VDCC

# 第一章 緒論

## 第一節 壓力的產生

### 一、壓力的定義

壓力一詞最早源自拉丁文 *stringere*，意思為緊繃 (to draw tight; Keil, 2004)，指個體處在壓迫不安的環境中。而在1926年，Walter Cannon 將對於某些可破壞維持體內恆定(homeostasis)的因素，導致身體產生的反應稱為壓力(strain)(Cannon, 1926)。而後，Hans Selye 首先將壓力(stress)這個工程名詞用來形容個體面對心理上或生理上非特定性反應所造成的傷害，以至於無法正常回應的感受狀態(Selye, 1956)。此外，Selye認為造壓力的因素為有害因子(noxious agents)，即所謂的壓力源(stressor)。

### 二、壓力的種類

壓力的種類依照壓力源的性質來區分，可分為生理上與心理上。生理上的壓力來源可能來自身體上的疾病、疼痛等等；而心理上的壓力則是由已經發生或即將發生的生活事件引起的，如即將到來的考試、人與人間的衝突等。

以壓力源持續時間的長短來分，短暫的壓力(如噪音等)，因為持續的時間很短，對個體的影響也較少，一旦壓力源消失，則壓力所造

成的反應也會跟著消失;反之，長期壓力則因為壓力源持續的存在，造成個體身心無法放鬆，並衍生出一系列在長期壓力下所引發的反應，如會造成免疫系統的功能下降(Kemeny，2007)、影響幼兒的生長發育等(Powell，1967)。

而內分泌學家 Hans Selye 將壓力分為惡性壓力 (Distress) 與良性壓力 (Eustress) 兩種(Selye，1975)，顧名思義惡性壓力對人造成負面的反應，通常會對個體造成傷害與破壞;而良性壓力則對人造成正面的效果，讓人有機會去挑戰與超越，並在關鍵的時刻對個體的存活具有一定的幫助。

Szabo 則將壓力依據其抗原(agent)來源分為特定性作用 (specific effect)與非特定性作用(nonspecific effect)。特定性作用包含冷、熱、病毒等具有特定來源及作用的因子，而非特定性作用包含壓力源、神經內分泌等沒有固定模式所產生的因子，但無論是非特定性作用還是特定性作用皆會對個體造成相同的壓力反應 (Szabo，1980)。

### 三、壓力賀爾蒙的生理功能

當一壓力源對個體產生刺激時，體內便會分泌壓力賀爾蒙來應付此壓力源所造成的影響。壓力賀爾蒙由腎上腺所分泌，當壓力的產生時，便會刺激腎上腺皮質(adrenal cortex)釋放固醇類荷爾蒙腎上腺糖皮質素(glucocorticoid)，糖皮質素包含皮質醇(cortisol)與皮質酮

(cortisone)，而腎上腺髓質(adrenal medulla)則會釋放腎上腺素(epinephrine)與正腎上腺素(norepinephrine)，腎上腺皮質素能提高血液中葡萄糖的利用率，而經交感神經(sympathetic nervons)分泌的腎上腺素與正腎上腺素則有增加心跳與呼吸加快，降低肌肉疲勞等作用，腎上腺皮質素會導致其他生理過程，包含消化系統、生殖系統、成長免疫等暫時停止運作或減慢，腎上腺素則是造成戰或逃反應機制的賀爾蒙。

## 第二節 壓力反應機制

### 一、戰或逃反應(fight-or flight response)

壓力反應為當有壓力源存在時個體所產生的反應。當壓力源存在時，會刺激中樞神經系統下的下視丘(hypothalamus)，活化內分泌與交感神經系統，進而引發一連串的壓力生理反應。壓力生理反應機制主要有戰或逃反應(fight-or flight response)與下視丘-腦下垂體-腎上腺皮質系統(HPA axis)。戰或逃反應 (Cannon, 1929)由交感神經腎上腺髓質系統 (sympathetic adrenal medullary system) 調節，即動物在面對肉體或精神的受創或壓力時，會有心跳及呼吸增快(心跳速率增加與肺臟通氣率上升)、血流重新分布(將血液從內臟轉移至骨骼肌)、血糖升高、降低肌肉疲勞、血液凝固時間縮短等種種有利於個體生存的反應。



## 二、hypothalamic-pituitary-adrenal axis(HPA axis)

### (1)HPA axis 的組成

除了戰或逃反應，個體對於壓力的反應機制還經由 hypothalamic-pituitary-adrenal axis(HPA axis) 這條路徑所調控，包含下視丘、腦下垂體與腎上腺這三個部分。首先介紹下視丘 (hypothalamus)，下視丘位於視丘(thalamus)下方，腦幹(brain stem)上方，為哺乳類維持體內恆定(homeostasis)的重要部位，包含維持血壓、飢餓、口渴、疲勞與睡眠等。而下視丘另一個重要的功能，就是透過腦下垂體(pituitary gland)連結神經系統與內分泌系統。而腎上腺位於腎臟上方，身體兩側各一，為一呈現三角形狀的分泌腺體。腎上腺分為覆蓋在外圍的皮質與在腺體中心的髓質，皮質又從外到內分為小球層(zona glomerulosa)、束狀層(zona fasciculate)與網狀層(zona reticularis)三小層，小球層可分泌醛固酮(aldosterone)，而與壓力相關的糖皮質素則為束狀層所分泌；腎上腺髓質為特化的交感神經節，但並無明顯的神經突觸(synapse)，而是將分泌物直接分泌至血液中，固屬於分泌腺體的定義，其中的 chromaffin cells 分泌腎上腺素與正腎上腺素，因應壓力產生時所造成的影響。

## (2)HPA axis 的反應機制

當一外來刺激被下視丘中的神經內分泌細胞(parvocellular neurosecretory cells)判定為壓力源，此神經分泌細胞便會分泌腎皮釋素(corticotropin-releasing hormone;CRH)，腎皮釋素經由血液運送後，作用於腦下垂體前葉(anterior pituitary)造成腦下垂體前葉釋放腎皮促素(adrenocorticotrophic hormone;ACTH)，腎皮促素作用於腎上腺皮質(adrenal cortex)導致糖皮質素(glucocorticoid)的釋放，進而引發一系列身體對壓力的反應。

## (3)HPA axis 反應機制的調控

HPA axis 的調控為負向回饋調控(negative feedback)，即過多的糖皮質素可負向調控腎皮釋素與腎皮促素的釋放，而糖皮質素則透過 mineralocorticoid receptor(MR)與 glucocorticoid receptor(GR)來調控生理功能，這兩種接受器多分布於神經細胞連結密集的地方，糖皮質素與 MR 具有較高的親和性，而與 GR 的親和性較低，在正常狀況下糖皮質素與 MR 的含量處在飽和狀態，但當有壓力產生時，體內糖皮質素的含量上升，導致糖皮質素與親和性較低的 GR 結合，引發負向回饋作用，抑制 parvocellular neurosecretory cells 分泌腎皮釋素，進而減少糖皮質素的含量，屬於長徑回饋(long-loop feedback)。而過多的糖皮質素利用短徑回饋(short-loop feedback)的方式抑制腦下垂

體前葉釋放腎皮促素，以確保體內糖皮質素的含量不會過高，而對其他細胞造成傷害。

#### **(4)HPA axis 對新生老鼠發育的影響**

早在胎兒發育時期，不管在正常狀況或受到壓力的情形下，腦下垂體與腎上腺皆有能力分泌壓力賀爾蒙，然而出生後新生老鼠的皮質類固醇(corticosterone)快速下降，且在出生後兩週內皮質類固醇的含量始終不高，皮質類固醇的含量在新生老鼠出生後十五天(P15)開始增加，到出生後二十四天(P24)達到高峰。此外在同樣的壓力源下，成鼠能夠產生壓力反應，但對 P1~P14 的新生老鼠則無壓力反應的產生，顯示在 P1~P14 新生老鼠對 HPA 的反應減少，這段期間(P1~P14)稱為 stress hyporesponsive period (SHRP)(Sapolsky，1986；Giuseppe，1998)。在 SHRP 期間，下視丘中的 CRH 與腦下垂體前葉的 ACTH 含量均低於成鼠，而在 HPA-axis 壓力反應中 CRH 誘導 ACTH 的釋放量也比成鼠來的低，一部分的原因來自於新生老鼠中的 GR 對腦下垂體的負向回饋抑制作用增強，最後導致新生老鼠腎上腺皮質中的糖皮質素含量低於成鼠。此外，在成鼠階段海馬迴中的 GR 含量受到糖皮質素的負向調控，即過多的糖皮質素會減少 GR 的表現量，但在出生後前兩週時，海馬迴中的 GR 數量上升且不受糖皮質素的調控，導致 GR 含量在老鼠發育時增加，因而更加抑制 CRH 與

ACTH 的含量，導致糖皮質素的含量降低

，待 GR 的含量在青春期穩定後，方能正常調控 HPA axis，故在發育時期 GR 含量的改變為 HPA axis 成熟的關鍵(Meaney，1985; Benedict J. Kolber，2008)。

### 第三節 腎上腺發育過程

腎上腺實際上是由兩個不同功能的部位所組成，即腎上腺皮質與腎上腺髓質。而兩者在胚胎發育時期的來源也不一樣，腎上腺皮質由中胚層(mesoderm)發育而成，而腎上腺髓質源自神經外胚層(neural ectoderm)。老鼠的腎上腺皮質發育始於交配後 11.5 天(Sass，1996)，即腎上腺皮質原質由體腔上皮(coelomic epithelium)中增生並經由萌芽(budding)的方式移動至胃背繫膜(mesogastrium)與泌尿生殖襞(urogenital fold)間(人類為四周)，並在交配後 12.5 天移動至動脈與中腎(mesonephros)間與腎上腺髓質交感母細胞(sympathoblasts)靠近(人類為七周)，交配後 14 天時腎上腺髓質細胞移動至將即將形成腎上腺的中間，並在交配後 15 天形成腎上腺的雛形(Nyska，1999)。在人類胎兒時期，腎上腺皮質的組成包含三層，最外層有一小層 definitive zone，definitive zone 剛形成時不具備產生固醇的能力，直到懷孕後期才有製造固醇的能力，而最中心的一層為 fetal zone，為面積較大的一層，此層在懷孕期間都具備產生固醇的能力，而位於兩

層中間為 transitional zone，在胎兒發育晚期時產生 cortisol (Mesiano, 1997; Coulter, 2004)。當胎兒出生後六個月，面積較大的 fetal zone 便會開始消失，與此同時，definitive zone 與 transitional zone 便會慢慢分化成完整的小球層與束狀層，至三歲後才完全分化完成，故人類胎兒剛出生時，腎上腺分為腎上腺髓質與兩層腎上腺皮質(小球層與束狀層)，而到四歲時才開始形成網狀層，且在十五歲後才能分化完成，即腎上腺皮質分為三層(由外到內為小球層、束狀層與網狀層) (Petra, 2008)。此外，在靈長類胎兒中，腎上腺為體內血管最為密集的部位之一，幾乎每個腎上腺皮質細胞都與血管內皮細胞接鄰(Mesiano, 1997)。

#### 第四節 嗜鉻細胞(chromaffin cells)的生理功能

##### 一、嗜鉻細胞的介紹

嗜鉻細胞在胚胎發育時期源自於神經脊(neural crest)，屬於神經內分泌細胞，主要分布於腎上腺髓質與副神經節(paraganglia)如腹主動脈(Zuckerkindl organ)、頸動脈體(carotid body) (Klaus, 2005)，之所以稱為 chromaffin 乃是因為 Kohn 在 1902 年發現此種細胞與鉻鹽(chromium salts)具有親和性(以鉻鹽溶液染色後呈棕色) (Kohn, 1902)。嗜鉻細胞在很久之前已經被證實在細胞體中具有高濃度的兒茶酚胺(catecholamine) (Eranko, 1963; Mary K.

Dahme, 1996), 以及儲存兒茶酚胺的顆粒(granules) (Matthews, 1969; H. Winkler, 1993), 最後發現 chromaffin cells 本身即可製造腎上腺素、正腎上腺素等兒茶酚胺(Ehrhart, 1998)。而副神經節這些除了腎上腺髓質外具有嗜鉻細胞(extra-adrenal chromaffin cells)的部位也通常位於血管的附近(Vincent, 1910; Beatriz Galán-Rodríguez, 2004), 顯示嗜鉻細胞釋放的腎上腺素等賀爾蒙靠著血液運送的方式來影響身體其他部位。

## 二、腎上腺素與正腎上腺素的合成

兒茶酚胺在 chromaffin cells 中被合成出來, 且皆是由酪胺酸 (tyrosine) 這個胺基酸合成而來, 而 TH (tyrosine hydroxylase) 為酪胺酸合成兒茶酚胺的第一個酵素, 同時也是合成正腎上腺素的速率限制酵素(rate-limiting enzyme)(Levin, 1960; Fangwen Rao, 2007), TH 的功能為將酪胺酸轉變成多巴(dopa) (Ikeda, 1966; Alison, 1991), 其活性受到兩種機制調控, 分別為基因表現的調控(如轉錄、轉譯的調控)與酵素活性的調控(如回饋抑制、磷酸化與否)(Kumer, 1996)。當細胞中的兒茶酚胺釋放出去後, TH 會在其絲胺酸(serine)殘基 8, 19, 31 和 40 的位置會被磷酸化而變成有活性(Peter, 2004), TH 在絲胺酸 40 被磷酸化比絲胺酸 31 被磷酸化能催化更多的酪胺酸, 而磷酸化 TH 上的絲胺酸 8 或 19 並不會直接增加 TH 的活性, 而是透

過間接的方式，如磷酸化絲胺酸 19 會增加絲胺酸 40 被磷酸化的速率，因而達到增加 TH 活性的效果。此外，當兒茶酚胺被釋出時，組織中兒茶酚胺的含量卻沒有降低，顯示合成兒茶酚胺的酵素活化有助於組織中兒茶酚胺含量的恆定(Zigmond, 1989)。而多巴經由多巴脫羧酶(dopa decarboxylase)轉換成多巴胺(dopamine)( Blaschko, 1942; Peter, 2001)，多巴胺再經由 dopamine $\beta$ -hydroxylase(DBH)(Kirshner, 1956; John, 2001)轉換成正腎上腺素，而 Keller 與 Boissonas 證實正腎上腺素合成腎上腺素的過程中需要 S-adenosylmethionine(SAM)轉移一個甲基至正腎上腺素胺基的氮原子上，催化這個甲基化反應的酵素為 phenylethanolamine-N-methyl transferase(PNMT) (Edith, 1949; Yuan Ji, 2008)。在腎上腺髓質中正腎上腺素的合成主要受到 TH 的調控，而 TH 的活性又會受到正腎上腺素的抑制(Kvetnansky, 2009); 相對於正腎上腺素，腎上腺素的合成速率受到 PNMT 的調控，而 PNMT 的活性又可被腎上腺素所抑制(Connett, 1970)。兒茶酚胺的合成除了多巴胺合成正腎上腺素的過程是在嗜鉻顆粒中進行(因所需酵素 dopamine $\beta$ -hydroxylase 位在嗜鉻顆粒中)，其餘步驟均是在嗜鉻細胞的細胞質中進行，而當正腎上腺素要合成腎上腺素時，正腎上

腺素會從嗜鉻顆粒中移動到細胞質，經 PNMT 催化合成腎上腺素後，腎上腺素便回到嗜鉻顆粒中儲存，以等待時機釋放。

### 三、腎上腺素與正腎上腺素的儲存

利用電子顯微鏡觀察腎上腺髓質細胞，會發現許多嗜鉻顆粒 (chromaffin granules) 與細胞胞器 (Coupland, 1965)，而腎上腺髓質當中的兒茶酚胺則儲存在這些 granules 中 (Banks, 1965)，而在嗜鉻顆粒中也發現 dopamine $\beta$ -hydroxylase 這個能將多巴胺轉換為正腎上腺素的酵素。嗜鉻顆粒為圓形或橢圓形，直徑為 150 至 300 nm，而 granules 外層的膜約為 75 nm (Coupland, 1965)，且嗜鉻細胞內大部分的體積皆由嗜鉻顆粒所填滿，利用戊二醛 (glutaraldehyde) 固定嗜鉻細胞後，可以利用嗜鉻顆粒外觀分辨腎上腺素細胞與正腎上腺素細胞，儲存正腎上腺素的顆粒非常密集，但正腎上腺素皆不是分布在顆粒中心，而儲存腎上腺素的顆粒中心並非特別密集，但腎上腺素皆分布在中心位置，此外，儲存腎上腺素的細胞比起儲存正腎上腺素的細胞擁有較大量的嗜鉻顆粒 (Pohorecky, 1968)。

### 四、腎上腺素與正腎上腺素的釋放

腎上腺髓質與交感神經末梢釋放兒茶酚胺的過程類似，即交感神經節前神經末梢 (sympathetic preganglionic nerve terminals) 釋放乙醯



膽鹼(Acetylcholine)，而乙醯膽鹼會與尼古丁受體(nicotinic cholinergic receptors)結合並造成突觸後細胞的細胞膜去極化(depolarization)，導致細胞膜對鈉離子的通透性增加，而細胞膜的去極化，造成電壓依賴性鈣離子通道(Voltage-dependent calcium channels，VDCC)打開，鈣離子進入細胞的數量上升，而鈣離子參與刺激分泌耦合(stimulus-secretion coupling) (Douglas，1961; P. E. MacDonald，2003)，便會促進嗜鉻顆粒與嗜鉻細胞或交感神經細胞的細胞膜結合(Baker，1978)，進行胞吐作用(exocytosis)，將嗜鉻顆粒中的腎上腺素或正腎上腺素以及其他物質(如 ATP、neuropeptides 與 DBH 等)釋放出來(Kvetnansky，2009)，在嗜鉻細胞中這些釋放出來的物質會透過血液運送至其他部位作用，而在交感神經中，釋放出的正腎上腺素還能當作神經傳導物質影響後續作用的部位。

## 五、壓力與腎上腺素、正腎上腺素的關係

當處在壓力下時，兒茶酚胺的生合成會增加(Kvetnansky，1971)，而處在長期壓力的狀況下，合成兒茶酚胺的酵素活性(除了多巴脫羧酶)皆會上升(Kvetnansky，1971)。主要是透過HPA axis路徑中，腎上腺皮質產生的糖皮質素來調控腎上腺髓質中兒茶酚胺的合成，即糖皮質素能調控多巴胺、腎上腺素與正腎上腺素的合成。透過腎上腺皮質與腎上腺髓質間血管的連結，糖皮質素能進入腎上腺髓質中調控腎

上腺素的合成，透過誘導PNMT的產生(Wurtman, 1965)。而在 immobilization(IMO) stress 的實驗中發現，持續兩個小時的IMO stress 能夠減少15~20%腎上腺髓質中腎上腺素的存量，但卻不影響正腎上腺素的存量(Kvetnansky, 1970)，而重複的IMO stress能夠透過增加TH、DBH與PNMT的活性，增加腎上腺髓質合成兒茶酚胺的能力(Sabban, 2001)。在IMO stress中對TH活性的探討在一開始TH的Km與Vmax皆沒有改變，但在重複的IMO stress中發現Km同樣沒有改變，但Vmax增加，顯示因為TH蛋白質合成量增加而增加TH的活性(Blazicek, 1989)。在cold(4°C)stress實驗中也顯示TH的活性上升乃因TH數量與合成TH的效率上升所造成(Chuang, 1974)。而IMO stress也被證實能夠增加腎上腺髓質中TH、DBH與PNMT的mRNA表現量(Kubovcakova, 2004)。但長時間重複的壓力，TH、DBH與PNMT的活性則不再因為壓力的關係而增加(Baruchin, 1993)，顯示個體對壓力的反應能夠適應。

## 第五節 與壓力賀爾蒙相關的疾病

當一壓力源產生時，哺乳類動物會釋放一連串的神經化學分子與賀爾蒙到血液及腦中(如戰或逃反應與HPA axis反應)，以因應壓力源所造成的反應，而當壓力源消失時，這些神經分子與賀爾蒙變會慢慢回到體內恆定(homeostasis)的狀態，此一身體對壓力源反應最後回

到恆定的過程稱為 allostasis (Mcewen, 1993)。但當長時間處在壓力的狀態時，壓力賀爾蒙的過度分泌會導致個體出現 allostatic overload 的現象，即體內過多的壓力賀爾蒙無法被移除，且壓力賀爾蒙仍然持續被分泌，將會對神經系統及體內其他系統造成傷害。如遇到危難時，壓力賀爾蒙在腦中的釋放，原本有助於增強與改善記憶力，以期能在危難中生存，但當此壓力源在數周內不斷重複時，便會造成海馬迴(hippocampus)中神經細胞的萎縮與記憶的受損(Mcewen, 1998);而在免疫系統中，急遽的壓力增加免疫細胞移動至體內所需位置的速度，有助於個體對抗病原，但慢性長期的壓力反而會抑制免疫系統的功能。而壓力引起長期及反覆的交感神經活化，也可能會促使某些疾病的發展，特別是高血壓(hypertension)及動脈粥狀硬化(atherosclerosis)。此外，長期持續性的壓力(過高的皮質醇)會減少血清素(serotonin)的活動，並導致神經傳導物質分泌的不正常，因而造成憂鬱症的發生，如針對庫興氏症候群(Cushing's syndrome)患者所做的研究可得到證實，庫興氏症候群患者因垂體或腎上腺長瘤，導致體內合成太多皮質醇，而患者得憂鬱症的機率非常高。但當患者服用一種可降低類固醇(或皮質醇)分泌量的藥物時，憂鬱的症狀隨即獲得改善。

## 第六節 與壓力相關的動物行為實驗

### 一、親子分離(maternal separation)

親子分離實驗已被廣泛的運用在行為以及內分泌方面的探討，主要操弄的時間為單日 24 小時的親子分離，或者是重複性的親子分離(3 小時至 12 小時/天)，而操弄的天數為老鼠出生後 1~2 至老鼠出生後 14~21，此外，依照新生老鼠與母鼠分離的方式，又可分為新生老鼠個別分離或者是集體分離。Plotsky 與 Meaney 在 open colony 中觀察到母鼠會為了水與食物離開新生老鼠 5~15 分鐘，有些母鼠則會離開 60~180 分鐘，依照他們在上述所觀察到的結果在 Long Evans 中建立親子分離模式，一隻母鼠一次照顧八隻新生老鼠(公母鼠各 4 隻或 8 隻公鼠)，親子分離的天數為 P2~P14，操弄的方式主要分成四組:(1)每天分離 180 分鐘 (2)每天分離 15 分鐘 (3)不操弄 (4)動物設施養殖( animal facility rearing, AFR)，在新生老鼠出生後第四天(P4)開始，一週只操弄兩次。結果顯示每天分離 180 分鐘的新生老鼠，其 ACTH 與糖皮質素對壓力的反應均上升，而每天分離 15 分鐘的新生老鼠其 ACTH 與糖皮質素對壓力的反應均下降，顯示長時間的親子分離能對新生老鼠產生壓力。

### 二、高腳十字迷宮 (Elevated Plus Maze、EPM)

高腳十字迷宮為一種檢視啮齒動物的焦慮模型，作為抗焦慮等藥物

的篩選試驗。由兩個相同的 open arms(40cm X 10cm)與兩個相同的 close arms(40cm X 10cm)以及中心區域(10 cm X 10cm)所組成，open arms 與 close arms 呈直角交錯排列，距離地面 40cm。當進行 EPM 時於昏暗的燈光下進行實驗，將老鼠放置至中心區域面向 close arms 以防止老鼠過於緊張而掉落，實驗的時間為 5 分鐘，以攝影的方式觀察老鼠於 5 分鐘內的行為反應。

### 三、其他與壓力相關的動物行為實驗

經由腎上腺切除(ADX, Adrenal gland excision)的實驗可發現，經過手術後的人或老鼠，在下視丘與腦下垂體於正常情況下，依舊無法對壓力產生反應，可發現腎上腺與壓力的關係密不可分。此外在動物實驗中，腦下垂體經由手術破壞後，也可大大減少對壓力的反應。而經由破壞下視丘的埋管實驗，也可發現對壓力的反應減弱，可以推論 HPA axis 中任何一個部分受損皆會影響到生物體對壓力的反應。

### 第七節 本論文之研究目的與策略

當個體感受到壓力的存在時，HPA axis 會刺激腎上腺皮質釋放糖皮質素，且交感神經也會刺激腎上腺髓質釋放腎上腺素來對壓力產生反應，因此腎上腺為個體調控壓力的重要部位。而壓力反應的強度與持續時間隨著哺乳類動物的年齡而有所差異，如在新生老鼠

(neonatal)中，壓力反應較難被引發，且在面對相同壓力源時，歲數較高(成鼠)的哺乳類動物又比歲數較輕(青春期)的哺乳類動物具有較強的壓力反應與持續時間，顯示個體對壓力的反應可在發育的階段(development)進行調控。因此本論文將探討的重點放在新生老鼠腎上腺發育與壓力之間的關係，利用連續十四天短暫的親子分離(maternal separation)來對新生老鼠造成壓力，探討親子分離對發育中新生老鼠(P14 與 P21)腎上腺的影響。在親子分離實驗中將新生老鼠分成三組，分別為控制組、隔離組(與母鼠分離時間為一小時/一天)與撫摸組(十分鐘/一天)，比較三組間的差異以探討親子分離對新生老鼠腎上腺造成的影響。此外，腎上腺皮質所分泌的糖皮質素可促進腎上腺髓質分泌腎上腺素，且交感神經也會直接刺激腎上腺髓質中腎上腺素的釋放，而腎上腺素在個體面對極大壓力時，對個體存活又有著莫大的貢獻，因此探討親子分離與新生老鼠腎上腺髓質發育的關係，勢必為一有趣議題。而 chromaffin cells 為腎上腺髓質中分泌腎上腺素與正腎上腺素的細胞，因此透過觀察與研究 chromaffin cells 可進一步了解親子分離對新生老鼠腎上腺髓質發育所造成的影響，並探討對個體壓力反應所可造成的影響。

## 第二章 實驗材料與研究方法

### 第一節 實驗動物

本實驗選用雄性與雌性 Long-Evans(LE)品系大鼠 (購自財團法人國家實驗研究國家實驗動物中心)，年齡約 8 周，每一受試飼養於國立政治大學心理系生理心理實驗室動物房的不銹鋼各別鼠籠內，雌鼠懷孕至產後 21 天移至壓克力鼠籠中飼養，給予 12/12 小時的晝夜週期，早上七點開燈，晚上七點關燈。所有的動物實驗均於早上八點至下午一點之時段內進行，室溫維持在  $24\pm 2^{\circ}\text{C}$ ，按時供給足夠食物及飲水。實驗人員對動物福祉的規範均遵照行政院農委會(1998)動物保護法相關規定。

### 第二節 親子分離行為實驗(maternal separation)

#### 一、交配判定

選取 8 周以後的雄鼠與雌鼠，放入空間較大的不銹鋼鼠籠內進行交配，在不銹鋼鼠籠下以白報紙取代原本的墊料，每 12 小時檢查白報紙上是否有乳白色的結晶塊(mating plug)，如有發現表示有交配行為的產生。

## 二、 新生老鼠的標記

小老鼠出生的第一天為(P0) ，在隔天(P1)時對小老鼠做標記，一胎分三組，一組剪左後腳的小趾(isolate)，一組剪右後腳的小趾(handle) ，一組則不做任何操弄(control) ，對老鼠的傷口則不用塗抹藥物，以防止雌鼠誤食。

## 三、 親子分離(一胎三組)

分離自小老鼠出生後第二天(P2)，持續至小老鼠出生後第十四天(P14)。按照標記所分之三組做分別之操弄。Isolate 定義為小老鼠與雌鼠在不同房間分離一小時。handle 定義為在與雌鼠同一房間裡將小老鼠放置實驗操弄者手上 10 分鐘。Control 定義為在 isolate 與 handle 進行中，一直待在雌鼠旁。實驗前先在另一個房間準備好放置小老鼠的電熱毯，以及經過裁切後的粗水管，對小老鼠做 isolate 的操弄時，將小老鼠置於鋪有擦手紙的電熱毯( $30\pm 2^{\circ}\text{C}$ )上，以粗水管將小老鼠個別隔離，每隻小老鼠距離約 8~10 公分，爾後計時一小時，一小時後將小老鼠放回雌鼠籠中。放置完 isolate 後，進行 handle 的操弄，將小老鼠放置手中撫摸，歷時十分鐘，後放回雌鼠籠中。爾後犧牲於想觀察之時間點，做 primary cell culture，主要時間點為 14 天、21 天及 3 個月。



#### 四、 time course 與親子分離(一胎一組)

為了瞭解實際小老鼠的狀況，time course 為不做任何操弄將小老鼠與同年齡有做過操弄的老鼠做比較，同樣取時間點為 14 天、21 天及 3 個月。另一種親子分離(一胎一組)為將一胎全部進行同一種操弄，而此種一胎一組所需之三隻雌鼠生產日期皆不超過 2 天，其餘方法與一胎三組相同。

### 第三節 初代細胞培養(primary cell culture)

#### 一、 細胞培養皿之塗抹(coating plate)

準備 35mm 的培養皿，以熱熔槍在其上劃出直徑約  $0.8\text{cm}\pm 0.2\text{cm}$  的圓圈，融膠凝固後，於無菌操作台(laminar flow)中，將 PureCol(Advanced Bio Matrix, San Diego, California)與滅菌過二次水以 1:5 的比例混合後，於培養皿中圓圈部分加入 250 $\mu\text{l}$  的混合液，均勻搖晃培養皿使混合液能完全覆蓋在圓圈部分，靜置於無菌操作台 4~5 個小時，待液體能完全乾後，以 2 ml 的二次水沖洗培養皿兩次，防止 PureCol 遺留的酸性物質對實驗造成影響，爾後風乾培養皿，置於 4 $^{\circ}\text{C}$  冰箱中存放，即可用於培養 chromaffin cell。

#### 二、 培養基配製

將 RPMI1640(GIBCO, Invitrogen, USA)、胎牛血清(fetal bovine

serum,FBS, Biological industries, Israel) 、馬血清(horse serum,HS, GIBCO, Invitrogen, USA)與 Penicillin-Streptomycin ( GIBCO, Invitrogen, USA);置於 37°C 水浴槽中預熱 10 分鐘。培養基比例為 10 % horse serum,5% fetal bovine serum 與 Penicillin-Streptomycin 100 units/ml , 剩餘部分以 RPMI1640 補足至所需之體積。

### 三、初代細胞培養(primary cell culture)

行為實驗結束後，即犧牲想探討時間點的小老鼠，分別為 P14、P21 與 P90。將小老鼠以 CO<sub>2</sub> 弄暈後，進行犧牲並採血，取出腎上腺(adrenal gland)放置在裝有 HBSS (Hanks' Balanced Salt Solution 1X,GIBCO,Invitrogen,Grand island, N.Y,USA)的培養皿中，而血液則放置於 4°C 的冰上。以顯微剪刀在三眼實體顯微鏡(廠牌: 群育 CHEMIST,型號:MS-641)下剪取出腎上腺髓質(adrenal medulla) 時，先將腎上腺外膜黏附的脂肪去除，輕壓腎上腺讓其中的血液排出，後將外膜與腎上腺皮質去除，取出腎上腺髓質放置在裝有膠原蛋白酶(collagenase B ,Roche,Indianapolis, IN,USA)(1.5mg/1 ml HBSS)的 5 ml 塑膠管中，於 37±1°C 的水浴槽(water bath,廠牌:鑫冠,型號:B206T2)中以自製的儀器將此 5 ml 塑膠管緩慢的前後搖動 20 分鐘，20 分鐘後以 pasteur pipettes 吸除膠原蛋白酶，加入 1 ml 胰蛋白酶(trypsin,0.25%, GIBCO,Invitrogen,Grand island, N.Y,USA)前後

搖動 7 分鐘，後去除胰蛋白酶，加入 500  $\mu$ l 培養基(RPMI 1640, 10 % horse serum, 5% fetal bovine serum 與 Penicillin-Streptomycin 100 units/ml)。將組織與培養基的混和液以加工過不同孔徑大小的 pasteur pipettes 進行 trituration，後放置在以 PureCol coating 的 35mm 培養皿中，置入細胞培養箱(incubator)中培養，24 小時後進行免疫染色。

#### 第四節 免疫螢光染色(Immunofluorescence)

將已培養 24 小時的細胞從細胞培養箱中取出，以塑膠滴管將培養基吸取去除，用 1X PBS (phosphate-buffered saline, UniRegion Bio-Tech) 緩慢加入培養皿中，此時 PBS 的體積要能完全覆蓋培養皿中圓圈的部分，清洗的時間為 10 分鐘，需清洗三次，清洗完後將 PBS 吸除，加入 PFA(paraformaldehyde, SIGMA-ALDRICH, USA)/in PBS 的混合液，靜置 40 分鐘後，將混和液吸除，再以 1X PBS 清洗三次，每次 10 分鐘，接著再以 1X PBS/0.1% Triton X-100 清洗 5 分鐘，最後加入初級抗體於室溫下靜置 24 小時。初級抗體包含 mouse anti-Tyrosine Hydroxylase antibody (0.2:1000, SIGMA-ALDRICH, USA)、goat anti-PNMT antibody(1:500, Santa Cruz Biotechnology, USA)。初級抗體作用完後以 1X PBS 清洗三次，每次 20 分鐘，加入二級抗體(ALEXA 488

rabbit anti-mouse 與 ALEXA 555 donkey anti-goat, Invitrogen,USA)

室溫下反應 2 小時，再以 1X PBS 清洗三次，每次 20 分鐘，後將培養皿置於 4°C 的冰箱中避光保存，以便後來影像的擷取。

## 第五節 Chromaffin cell 的 PNMT/TH 強度(intensity)分析

將已經過免疫螢光染色的培養皿，置於螢光顯微鏡(廠牌:Carl Zeiss, 型號: MicAxio observer.A1)上做影像的擷取，使用軟體為 Axio Vision Rel 4.8，拍攝倍率為 20X20，同一個選取區域拍攝三張，以可見光、FITC 及 Rhod 分別觀察。一個培養皿總共拍攝 20 X 3 張，拍攝出來的照片為黑白，以利 Image J 進行強度的分析，可見光(bright view)用於判定為細胞，後標記所選定的細胞，將同一個細胞的 PNMT 與 TH 的強度作比較，以 Anova 進行統計分析，強度的定義為細胞面積(area)乘以細胞平均強度(mean)，而後將強度乘以 1000 以方便後來觀察。

## 第六節 免疫組織化學染色(immunohistochemistry)

### 一、組織切片的製備

將 P21 的小老鼠以腹腔注射 0.3ml dead drug 後，在抽氣櫃流理台解剖小老鼠，露出心臟組織與主動脈，將灌流針頭自左心室插入老鼠心臟，以止血鉗將針頭與插入心臟的縫隙夾緊，在右心室剪一小洞讓

血液流出，利用灌流幫浦(perfusion pump)進行灌流，以每分鐘 10 ml 流速灌入 1X PBS(phosphate-buffered saline) ，約使用與小老鼠體重數值相當體積之 1X PBS，約灌流 10 分鐘，流出的血液變淡，待透明後，以 PFA/in PBS 的混合液灌入，同樣灌流 10 分鐘，可發現小老鼠全身變硬，且其他器官的顏色變淡。利用解剖器械取出腎上腺，於 4°C 下浸泡在 PFA/in PBS 的混合液 24 小時，後將組織移至 30% 的 sucrose 浸泡，放入 4°C 中約一至二天，確認組織已沉入 50 ml 的離心管底部後，取出腎上腺吸乾表面的 sucrose，以膠將腎上腺直立黏在手動切片機的台子上，在台子周圍放入乾冰後以洗瓶將酒精噴灑在乾冰上，加速組織的冷凍，待腎上腺外圍附上一層白色的冰霜後，即可進行組織切片，切出厚度為 40 $\mu$ m 的圓形切片。將切好的切片輪流放置於五個 1.5ml 離心管，離心管中則事先加入 1X PBS (phosphate-buffered saline) ，以方便後來實驗使用。

## 二、封片膠與明膠的製備

封片膠的製備:取 12g 的 glycerol(liquid;SIGMA-ALDRICH,USA)放置於 50ml 的離心管，加入 4.8g 的 PVA(polyvinyl alcohol; SIGMA-ALDRICH,USA) ，輕微搖晃使 glycerol 均勻覆蓋 PVA，加入 12ml 的一次水，在室溫下置於 rotator 上搖晃整夜，加入 24ml 的 0.2M Tris-HCl 後，在烘箱中(約 50°C)加熱 30 分鐘(每 10 分鐘拿出均勻搖

晃)，加入 0.313g 的 DABCO (SIGMA-ALDRICH,USA) 均勻混合後，離心 5000g 15 分鐘，離心後小心抽取出上清液，分裝置 1.5ml 離心管後置於 -20°C 中保存。

明膠(gelatin)的製備: 玻片置於玻片架上，放入玻片缸後，加入 cleaning solution (95% ethanol 495ml 與 acetic acid 5ml) 搖晃 5 分鐘，取出玻片架於抽氣櫃中瀝乾。將玻片架與 gelatin solution (5g gelatin 溶於 500ml 二次水) 放入玻片缸中搖晃 5 分鐘後，再次將玻片瀝乾即可使用。

### 三、免疫螢光染色(Immunofluorescence)

將腎上腺切片浸潤於裝有 1X PBS 的 12 孔盤上，以 1X PBS 清洗兩次，每次 10 分鐘，接著將組織切片浸潤於 0.3% Triton X-100 之 1X PBS 30 分鐘。初級抗體(mouse anti-Tyrosine Hydroxylase antibody 與 goat anti-PNMT antibody) 溶於 0.3% Triton X-100 之 1X PBS 後，將組織切片放入，置於室溫反應。隔天以 1X PBS 清洗三次，每次 10 分鐘，將組織切片加入 PBS 稀釋過的二級抗體(ALEXA 488 rabbit anti-mouse 與 ALEXA 555 donkey anti-goat) 於室溫下作用，隔天再以 1X PBS 清洗三次，每次 10 分鐘，最後將組織切片攤平放在經明膠(gelatin)處理過的玻片上，以封片膠封片，置於螢光顯微鏡下觀察並照相紀錄，以螢光顯微鏡軟體 Neurolucida 中做出完整

腎上腺拼圖。

## 第七節 高壓液相層析儀檢測(HPLC;high performance liquid chromatography )

### 一、移動相的配製

將  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  13.8g(Merck,Germany) 、  $\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  10mg (Merck,Germany) 、 methanol 100ml (J.T.Baker) 、 KCl 149.2mg (sigma)與 Heptane-1-sulfonic acid sodium salt 160mg (Merck,Germany) 加入 1L 的二次水中，以  $\text{H}_3\text{PO}_4$ (sigma)將 pH 值調整至 3，接著用溶媒過濾組在抽氣櫃中過濾，最後除氣，即完成移動相的配製。

### 二、standard 的配製與 catechoamine 的萃取

Standard 為 epinephrine hydrochloride(sigma)與 norepinephrine hydrochloride (sigma)，將 standard 溶於 perchloric acid 配製成 stock( 10 $\mu\text{g}/20\mu\text{l}$ )，將 stock 分裝後放置於-80 $^\circ\text{C}$  保存方便使用。需檢測時將 stock 分別配製成不同濃度的 epinephrine hydrochloride(0.5ng/20 $\mu\text{l}$ 、2ng/20 $\mu\text{l}$ 、4 ng/20 $\mu\text{l}$ )與 norepinephrine hydrochloride(0.2ng/20 $\mu\text{l}$ 、1 ng/20 $\mu\text{l}$ 、2ng/20 $\mu\text{l}$ )，以準備 HPLC 的檢測。將已做過親子分離實驗的新生老鼠，按照欲探討之時間點做犧牲，取出腎上腺，使用微量天平秤重後，置於 1.5ml 離心管中放入-80

°C 保存。待要使用 HPLC 做檢測時，於放置有腎上腺的 1.5ml 離心管中加入 200 $\mu$ l 的 perchloric acid (sigma; 可將 catechoamine 從細胞中釋放出來)，使用研磨棒研磨組織後，以 12000g 離心 15 分鐘，取出上清液後再以 0.2 $\mu$ m 的 filter 過濾，過濾後以 perchloric acid 稀釋 100 倍，即可進行 HPLC 的檢測。

### 三、高壓液相層析儀(HPLC)

放置好移動相後，需先平衡 HPLC 系統，以移動相平衡兩小時後，確認系統穩定後方能開始檢測，所使用的 column 為 Alltima C18 5 $\mu$ m。分別檢測 perchloric acid、standard (epinephrine hydrochlorid 與 norepinephrine hydrochloride) 以及腎上腺經過萃取所得到的待測物。每個相同的待測物皆連續檢測兩次，一次檢測 12 分鐘，流速為一分鐘一毫升，壓力約為 10.4 MPa，每個不同待測物中會以 perchloric acid 做分隔，以防止濃度互相干擾。將檢測出來的曲線進行分析，並利用 excel 做出標準曲線，以探討經過親子分離實驗的老鼠其腎上腺素與正腎上腺素的濃度。



### 第三章 結果

#### 第一節 親子分離實驗對新生老鼠的腎上腺結構並無影響

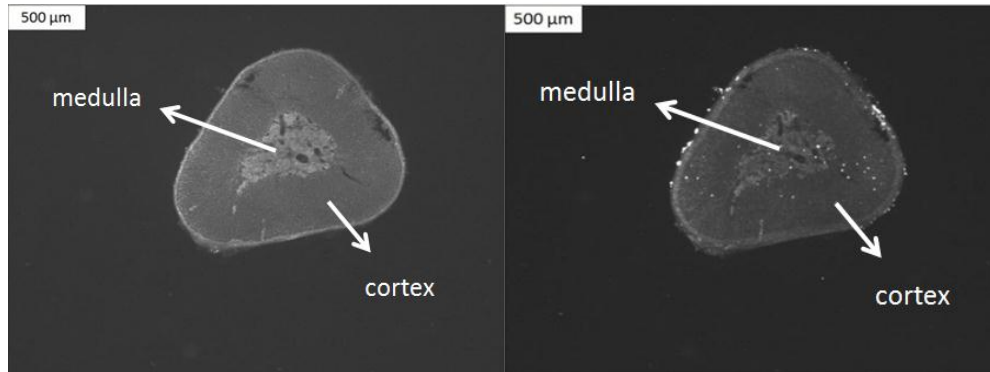
欲觀察親子分離實驗是否會對新生老鼠的腎上腺結構造成改變，首先將經過親子分離實驗的新生老鼠，分別在出生後第十四天與出生後第二十天做犧牲，然而因為新生老鼠在出生後十四天時過於幼小無法進行灌流，所以犧牲後直接取出腎上腺，而出生後第二十一天的新生老鼠則需進行灌流。取出腎上腺進行切片染色後發現，在老鼠出生後十四天時，撫摸組的腎上腺髓質結構與隔離組和控制組相比(圖 1)並無任何太大差異，而相同的狀況也出現在老鼠出生後第二十天時(圖 2)，顯示出親子分離實驗並不會對老鼠的腎上腺髓質的結構造成改變。

圖 1

P14

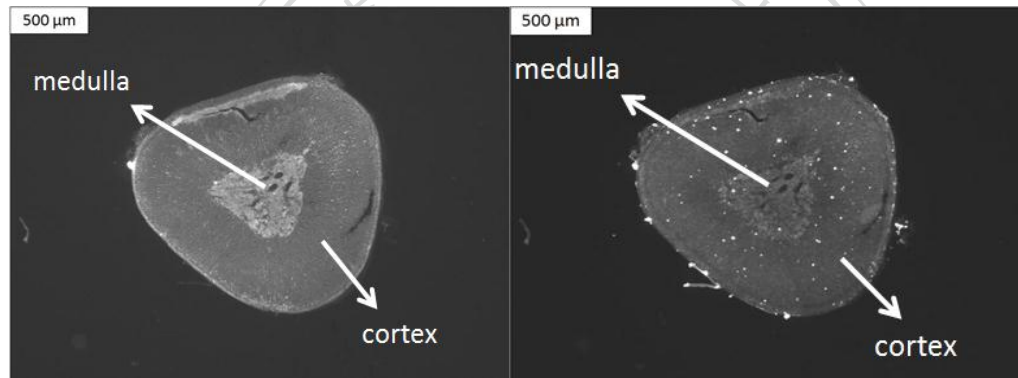
(A) 控制組 TH

(B) PNMT



(C) 撫摸組 TH

(D) PNMT



(E) 隔離組 TH

(F) PNMT

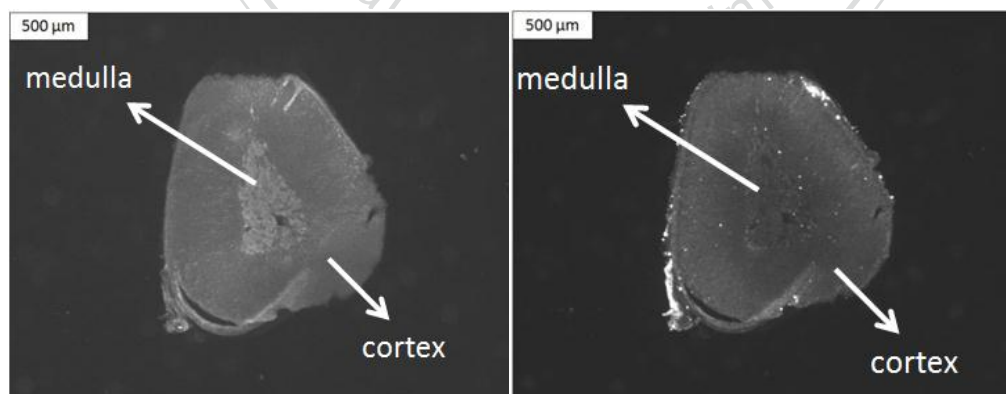
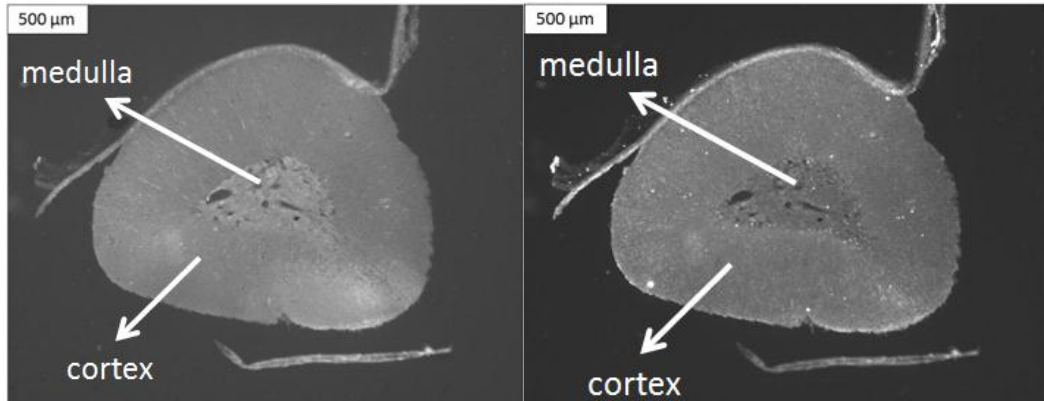


圖 2

P21

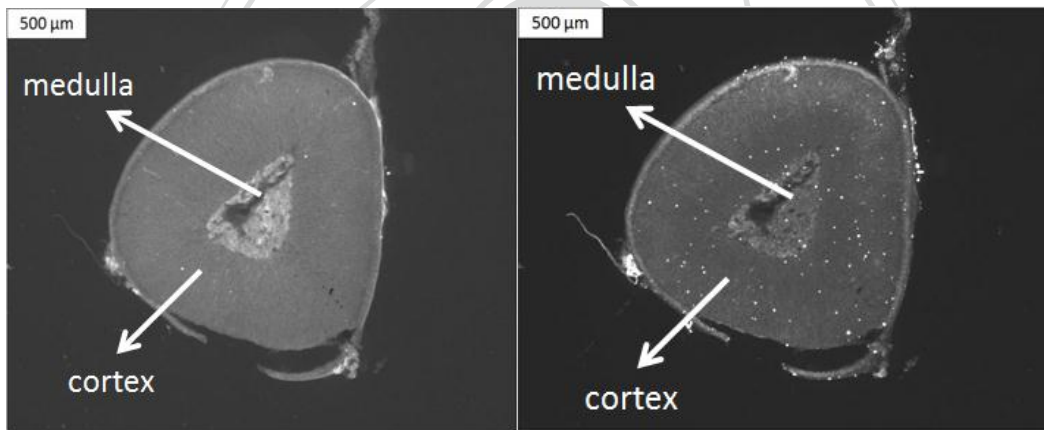
(A) 控制組 TH

(B) PNMT



(C) 撫摸組 TH

(D) PNMT



(E) 隔離組 TH

(F) PNMT

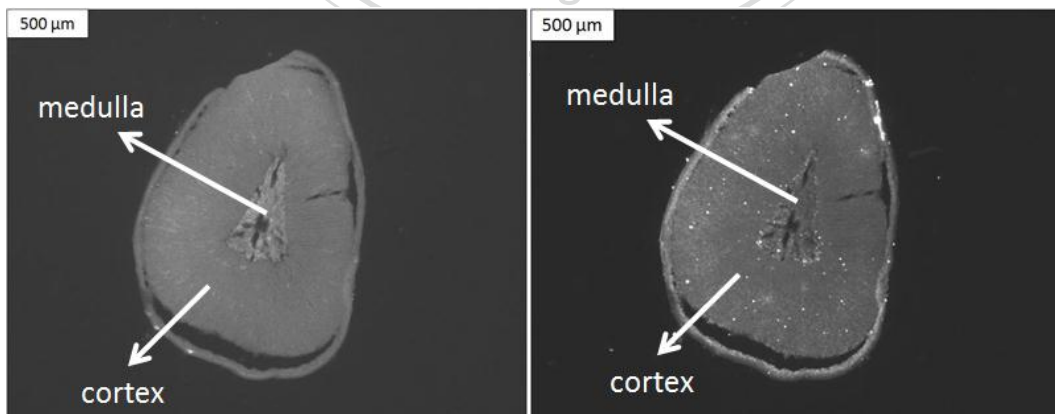


圖 1、2 將經過親子分離實驗的新生老鼠之腎上腺切片染色(染 TH 與 PNMT)。在老鼠出生後十四天(圖 1) , 發現撫摸組(圖 1C、1D)其腎上腺的結構與控制組(圖 1A、1B)和隔離組(圖 1E、1F)相比, 並無明顯差異, 且腎上腺髓質結構也無明顯改變;而在老鼠出生後二十一天(圖 2)的觀察結果也與十四天相同, 撫摸組(圖 2C、2D)與控制組(圖 2A、2B)和隔離組(圖 2E、2F)的腎上腺結構沒有太大的差別, 腎上腺髓質結構也無明顯改變, 實驗結果得知親子分離實驗並不會對新生老鼠之腎上腺髓質的結構造成影響。



## 第二節 親子分離實驗對新生老鼠其腎上腺可製造腎上腺素之 chromaffin cells 的影響

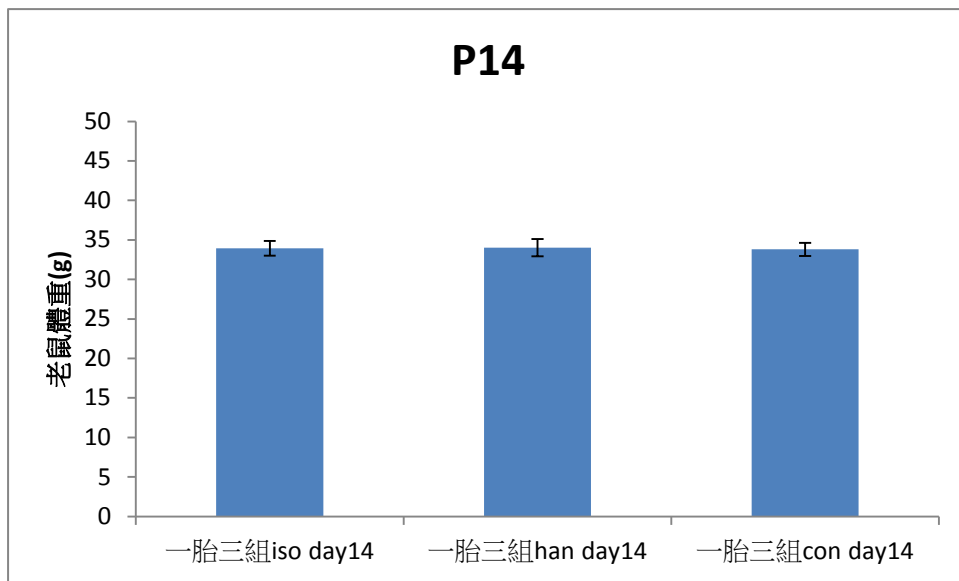
壓力會刺激動物釋放腎上腺素與正腎上腺素，而釋放這兩種物質的細胞主要為腎上腺髓質之 chromaffin cells，為觀察壓力對新生老鼠腎上腺髓質發育的影響，因此本論文利用親子分離實驗來對新生兒老鼠造成壓力，進而探討是否會對製造腎上腺素的 chromaffin cells 造成影響。首先於新生老鼠犧牲時測量其體重，發現到在老鼠出生後第十四天(P14)(圖 3A)、出生後第二十天(P21)(圖 3B)以及出生後第六十天(P60)時三組間並無明顯差異(圖 3C)，顯示親子分離實驗並不會對新生老鼠的體重造成影響。而後將取出之新生老鼠的腎上腺於解剖顯微鏡下剪取出腎上腺髓質後，經過酵素作用分離出 chromaffin cells，進行初代細胞培養，24 小時後隨即進行免疫螢光染色(染 Tyrosine Hydroxylase 與 PNMT, phenylethanolamine N-methyl transferase)，免疫螢光染色染出 chromaffin cells，後於顯微鏡下觀察 TH (Tyrosine Hydroxylase)與 PNMT 的螢光呈色(圖 4); PNMT 為將正腎上腺素轉為腎上腺素的酵素; 而 TH (Tyrosine Hydroxylase) 則是將酪胺酸(tyrosine)轉換成正腎上腺素時所需的前驅酵素;故可用 PNMT 來當作有能力製造腎上腺素的細胞數量指標，而腎上腺素和正腎上腺素的合成均需有 TH 的存在，故可以用來當作所有能製造腎上

腺素與正腎上腺素細胞的指標。將觀察到的 chromaffin cells 拍照後 (每個培養皿皆拍攝 200 顆)，利用分析軟體 Image J 檢測出每顆嗜鉻細胞的面積與平均強度後，算出每顆 chromaffin cell 中 TH 與 PNMT 的強度(intensity) ，再利用 SPSS 統計軟體進行 Anova 分析後，發現到在老鼠出生後第十四天時，將新生老鼠放置在手上操弄的撫摸組，其每一 chromaffin cell 之 PNMT 與 TH 的比例明顯比分離一小時/天 (隔離組)與控制組來的高 (圖 5A)，藉此可推論在老鼠出生後第十四天時撫摸組的腎上腺素比例可能高於隔離組與控制組，因其合成腎上腺素的酵素(PNMT)增加，也可揭示當放置在手中時，對新生兒老鼠造成較大的壓力;但在老鼠出生後二十一天(圖 5B)時撫摸組則與控制組和隔離組沒有任何差異。造成新生兒老鼠在出生後十四天有差異而出生後二十一天沒有差異的原因，推論可能原因為親子分離實驗只進行到新生老鼠出生後第十四天，而在老鼠出生後十四天到二十一天間則無任何操弄，導致新生老鼠在 P14~P21 期間可能受到母鼠的照顧因而有了補償的結果，最後造成新生兒老鼠在出生後二十一天(P21)時，實驗組(隔離組和撫摸組)與控制組間沒有顯著差異。而經過免疫螢光染色後，觀察有染到 PNMT 的 chromaffin cells 細胞數量，發現親子分離的操弄，並不會改變新生老鼠其腎上腺中可製造腎上腺素的細胞數量(圖 6)，即實驗組(隔離組和撫摸組)與控制組間沒有顯著差

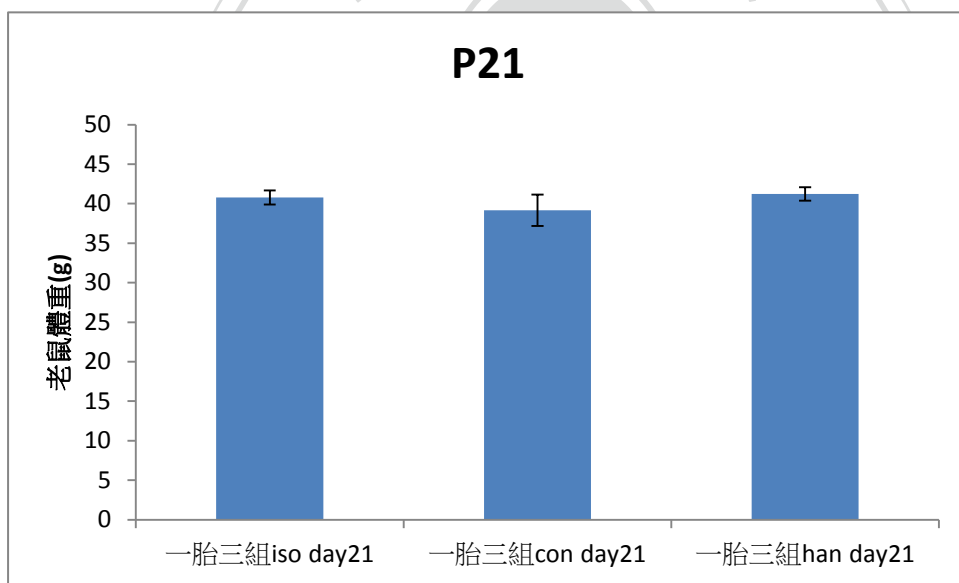
異。

本論文將研究重點放在出生後十四天與出生後二十一天的新生老鼠，觀察其腎上腺中腎上腺素與正腎上腺素的含量，在 SHRP 期間 (P14) 與過了 SHRP (P21) 中發現了新生老鼠對壓力的反應產生差異 (圖 5、8、9)，讓人不免好奇在 P21 中所觀察到的結果是否會與成鼠的結果相符合，因為過了 SHRP 期間後，老鼠對壓力的反應將會大幅增加，欲探討這個問題，本論文進行三個月成鼠的實驗，即用相同親子分離的方式，將新生老鼠分成控制組、隔離組(一小時/天)與撫摸組(十分鐘/天)，在 P2~P14 進行親子分離並於三個月時犧牲進行分析，發現在 P90 時三組間 PNMT 與 TH 的比例並無顯著差異(圖 5D)。

(A)



(B)





(C)

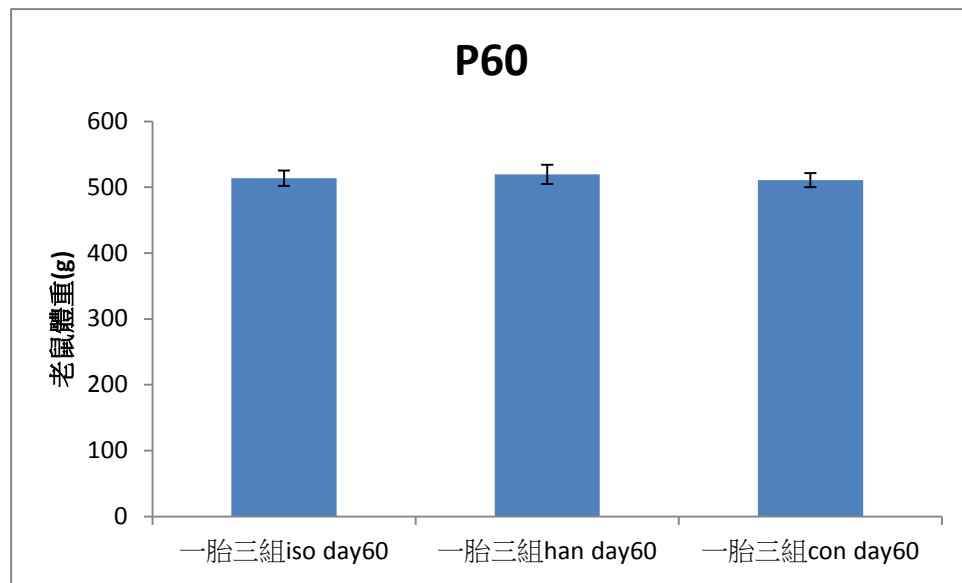


圖 3、親子分離實驗後測量新生老鼠的體重。新生兒老鼠經過親子分離實驗後犧牲時體重，實驗將新生兒老鼠分為三小組(控制組、撫摸組與隔離組)，(A)老鼠出生後十四天(P14)，(B)老鼠出生後二十一天(P21)，(C)老鼠出生後六十天，P14、P21 與 P60 在三組間皆無明顯差異。

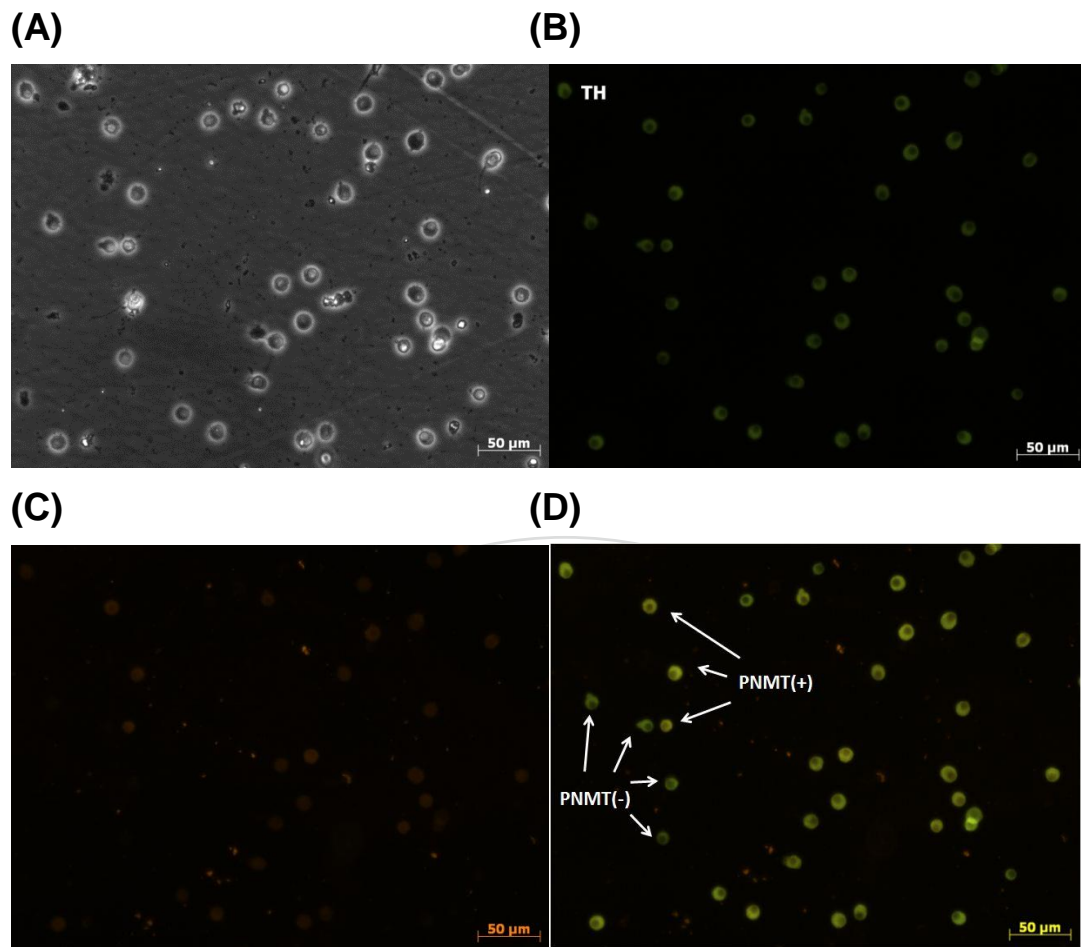
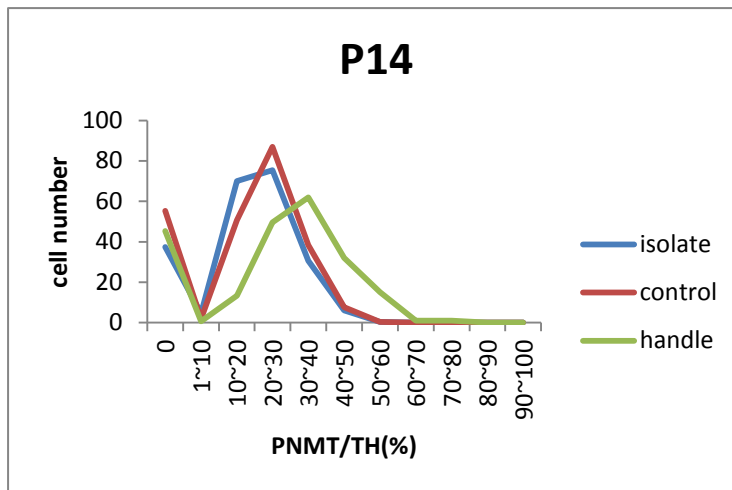
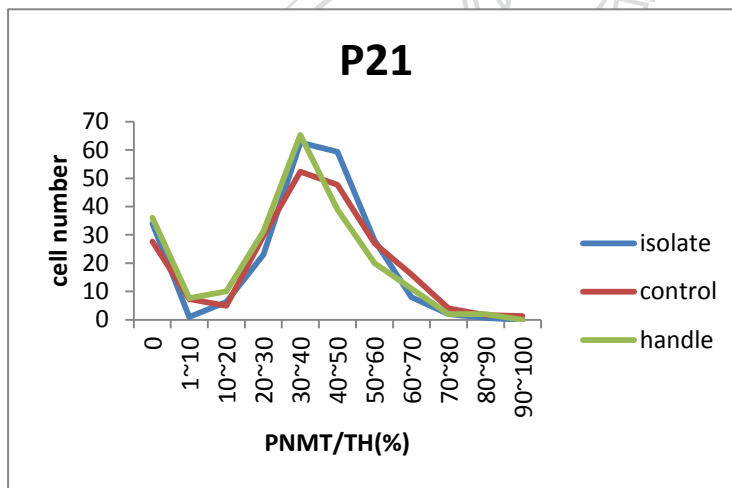


圖 4、chromaffin cells 在可見光及螢光下的細胞型態。在可見光下的細胞型態(圖 A)，以及經過螢光免疫染色後，觀察染到 TH(圖 B)或 PNMT(圖 C)的 chromaffin cells，圖 D 可以看到有表現 PNMT 與沒表現 PNMT 的 chromaffin cells。

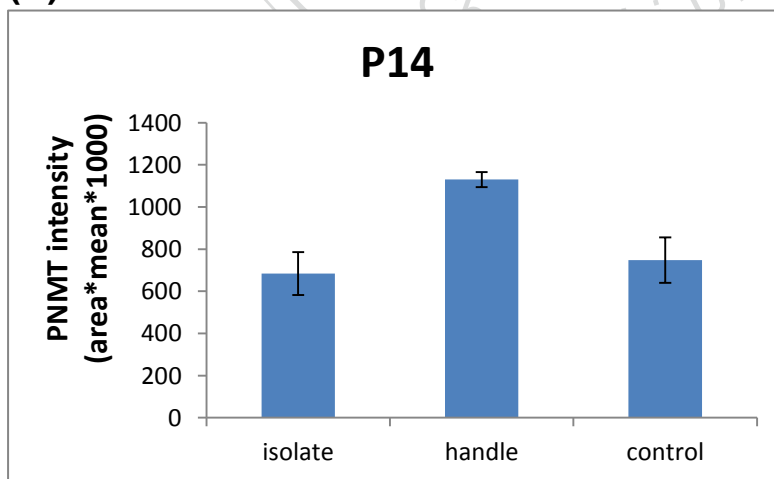
(A)



(B)



(C)



(D)

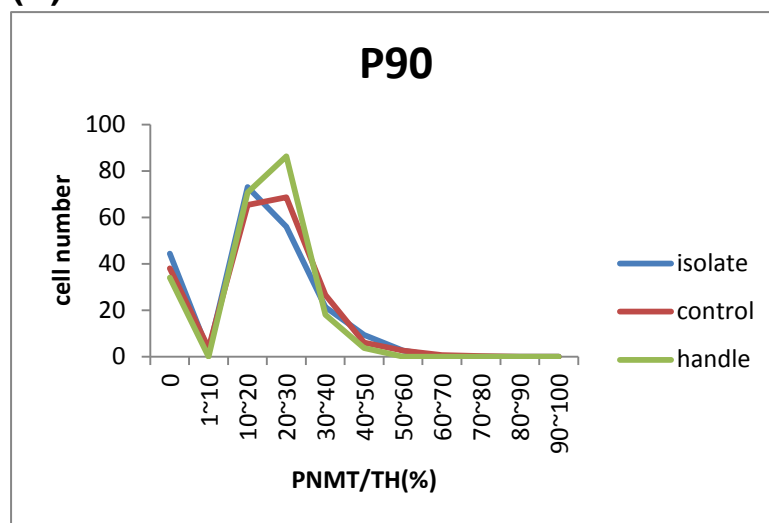
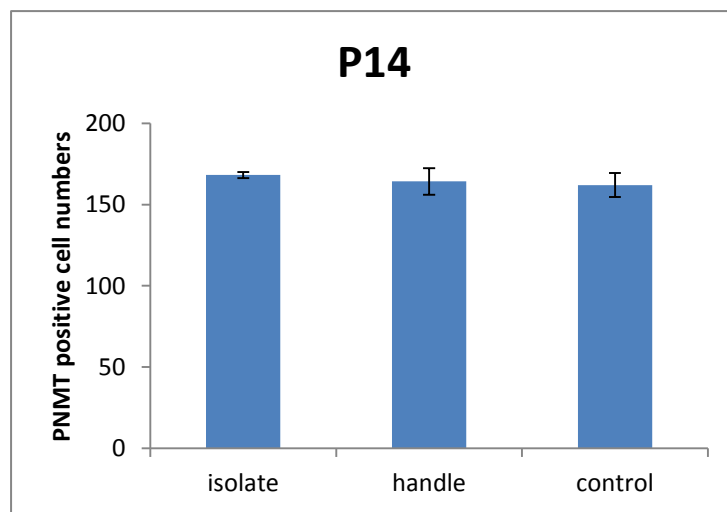


圖 5、經過親子分離實驗後分析新生老鼠 chromaffin cells 中 PNMT 與 TH 在各組中的相對含量。分析結果發現老鼠在出生後十四天時，撫摸組 (放置在手中十分鐘/天) 的 PNMT 與 TH 的比例高於隔離組 (分離一小時/天) 與控制組 (圖 A)，分析 chromaffin cells 當中 PNMT 螢光強度發現，撫摸組的 PNMT 強度確實比控制組與隔離組高 ( $p < 0.05$ ) (圖 C); 而在老鼠出生後二十一天與九十天時，三組間則無明顯差異 (圖 B, D)。

(A)



(B)

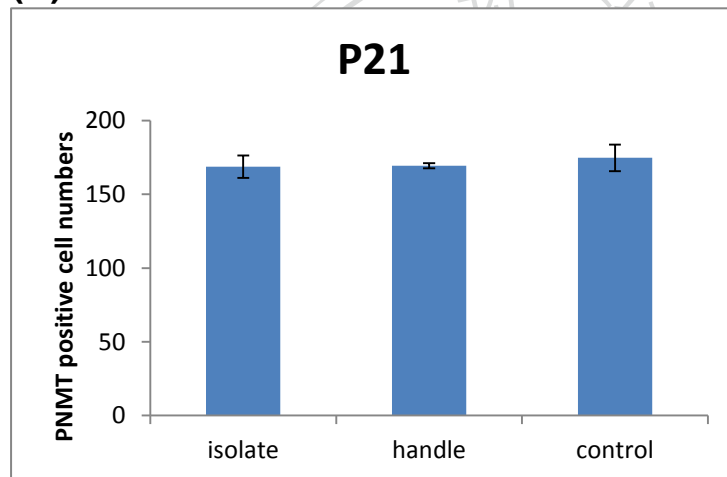


圖 6、經過親子分離實驗後計算新生老鼠有染到 PNMT 的 chromaffin cells 細胞數量。利用初代細胞培養與螢光免疫染色，計算有染到 PNMT 的 chromaffin cells 細胞數量，即代表製造腎上腺素的 chromaffin cells 細胞數量，在 P14(圖 A)與 P21(圖 B)時，三組間皆無明顯差異，顯示親子分離操弄不會影響 chromaffin cells 中有表現 PNMT 與不表現 PNMT 間的細胞數量比例。

### 第三節 親子分離實驗影響新生老鼠之腎上腺素與正腎上腺素的含量

雖然透過免疫螢光染色得知撫摸組的新生老鼠其 PNMT 在 chromaffin cells 中的表現量是較控制組高的，但不清楚是否真能讓 chromaffin cells 製造較多的腎上腺素，欲探討早期的親子分離是否會造成腎上腺素與正腎上腺素含量的改變，首先同樣將老鼠分成三小組，隔離組(isolate;與母鼠分離一小時/一天，P2~P14)、撫摸組(handle;放置手上撫摸十分鐘/一天，P2~P14)與控制組(control)，在老鼠出生後十四天與二十一天進行犧牲，取出腎上腺後，將裝有腎上腺的離心管加入 200ml 的 0.1N 過氯酸研磨後，抽取出上清液以 HPLC 檢測，可計算出所製造的腎上腺素與正腎上腺素的含量(圖 7)。而經過親子分離實驗的新生老鼠在 P14 的情況下發現，隔離組與撫摸組中的新生老鼠，比起控制組，其腎上腺含有較多的腎上腺素(圖 8A)( $p < 0.05$ )，但三組間在正腎上腺素的釋放上沒有甚麼差異(圖 8B)，而在撫摸組中的實驗結果符合之前本論文的實驗:即在新生老鼠出生後十四天，該組 PNMT 含量相對於 TH 含量的比例高於隔離組與控制組，但為何隔離組在 PNMT 含量相對於 TH 含量的比例與控制組相同的情況下會含有比控制組更多的腎上腺素，推測可能原因為經過親子分離實驗的老鼠(隔離組與撫摸組)比起沒有經過親子分離實驗的老鼠(控制組)較容易感到緊張，故導致隔離組的腎上腺素製造量大於控制組。此外，

雖然隔離組與撫摸組製造腎上腺素的含量沒有差異，但在本論文之前的實驗發現到：經過親子分離實驗後，撫摸組的新生老鼠，其 PNMT 在 chromaffin cells 染到的強度高於同一胎中的其他兩組(分別為隔離組與控制組)(圖 5A)，而造成撫摸組腎上腺組織中的腎上腺素含量高於其他兩組，可能的原因有兩個，一為腎上腺髓質中可製造腎上腺素的 chromaffin cells 數量增加，一為 PNMT(合成腎上腺素的酵素)的效率提高。而第一個可能的原因，本論文在第二節已透過實驗證明(圖 6)，製造腎上腺素的 chromaffin cells 數量不會因為親子分離操弄而有所改變，而分析能製造腎上腺素的 chromaffin cells 在所有 chromaffin cells(200 顆)中所佔的比率(圖 17)，發現隔離組與其他兩組相比，似乎擁有較高的能製造腎上腺素 chromaffin cells 的比率，但經 Anova 統計分析後，發現隔離組與控制組( $p=0.178$ )及撫摸組( $p=0.23$ )間沒有顯著差異。顯示隔離組能夠製造與撫摸組無差異的腎上腺素含量，可能為 PNMT 的效率提高所造成的結果。而在老鼠出生後二十一天的情況下發現，不管在隔離組、撫摸組還是控制組的新生老鼠，其腎上腺素(圖 9A)的含量沒有差異，與本論文之前對於一胎三組 P21 的實驗相符合，即 PNMT 與 TH 的比例在三組間沒有差異；而在正腎上腺素(圖 9B)的釋放量上三組間仍沒有差異。造成 P14 與 P21 的結果不同的原因可能為，因新生老鼠的 SHRP 時期為 P4~P14，

故新生老鼠超過 P14 以後，體內對壓力的反應可以正常的回應，因而在 P14 與 P21 出現不同結果，而 P21 三組間無差異，顯示三組間可能對壓力有著相同的反應。為探討幼年的親子分離實驗是否會影響老鼠成鼠後的行為，本論文將經過親子分離的老鼠於 P60 進行 EPM 行為測試，但並沒有發現顯著的差異(圖 10A)，且三組間腎上腺素與正腎上腺素也無顯著差異(圖 10B、C)，顯示親子分離實驗並不會對老鼠其腎上腺發育有所影響。

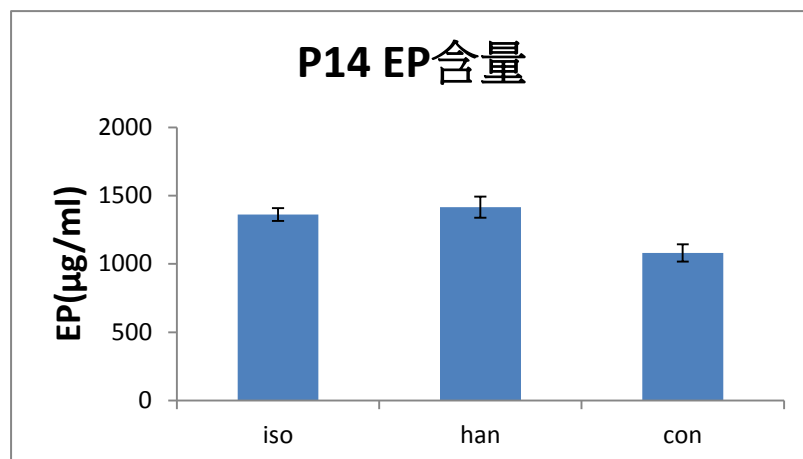






圖 7、經過親子分離實驗後檢測新生老鼠腎上腺中腎上腺素與正腎上腺素的含量。以 HPLC 檢測的結果可發現正腎上腺素約在六分多鐘時出現，而腎上腺素則在十分鐘時顯現。

(A)



(B)

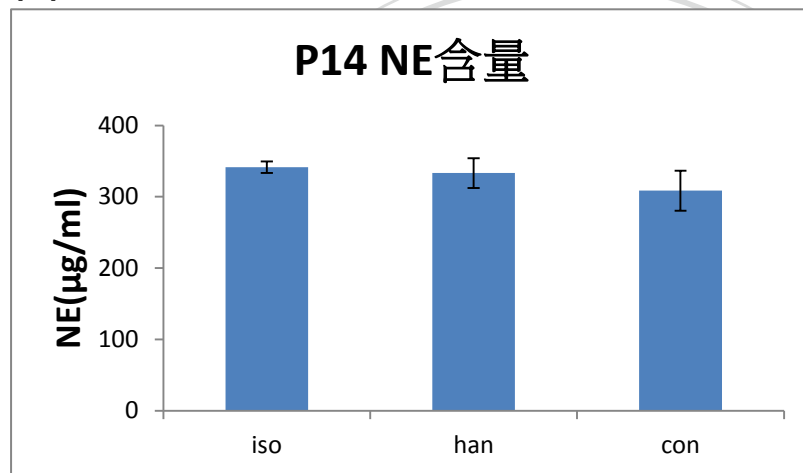
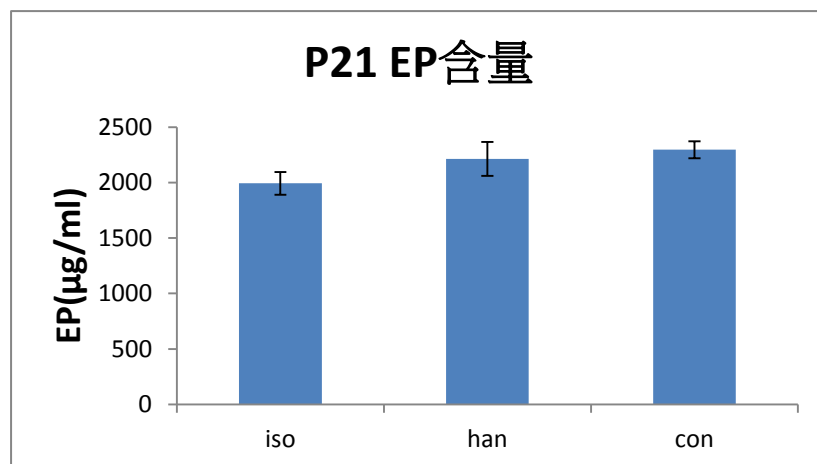


圖 8、經過親子分離實驗後檢測新生老鼠腎上腺中腎上腺素與正腎上腺素的含量。在老鼠出生後十四天的情況下，發現隔離組(isolate)與撫摸組(handle)中其腎上腺比起控制組(control)含有較多的腎上腺素(圖 A)( $p < 0.05$ )，但在正腎上腺素的含量上沒有甚麼差異(圖 B)。

(A)



(B)

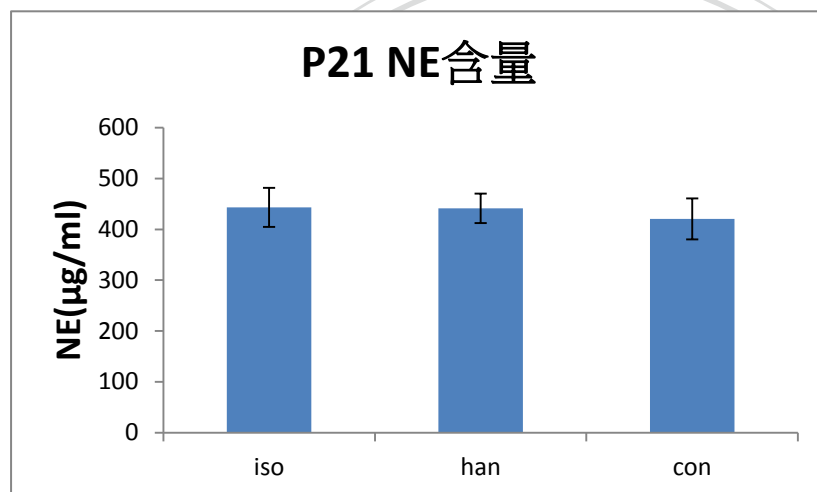
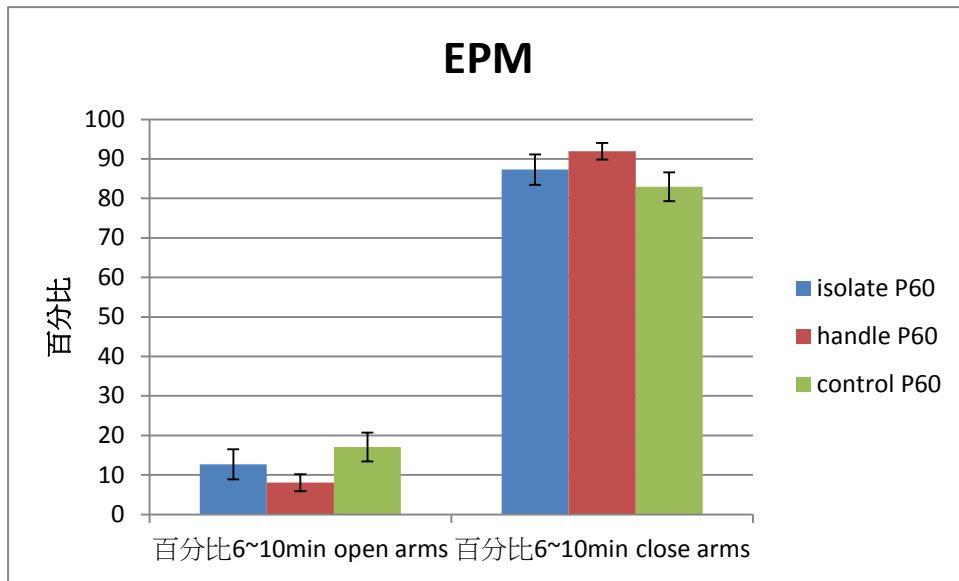
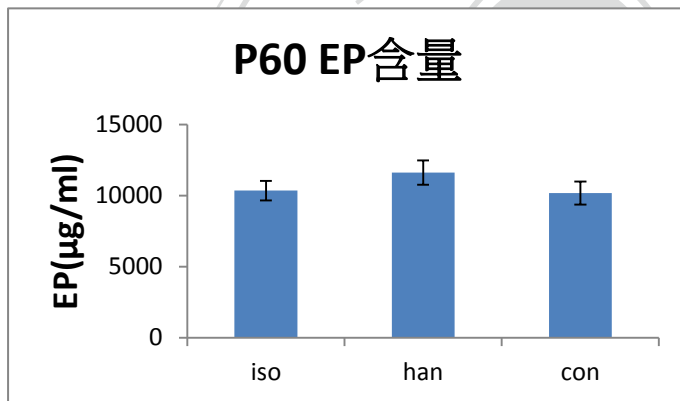


圖 9、經過親子分離實驗後以 HPLC 檢測新生老鼠腎上腺中腎上腺素與正腎上腺素的含量。在一胎三組老鼠出生後二十一天的情況下，發現三組間其腎上腺之腎上腺素(圖 A)與正腎上腺素含量(圖 B) 沒有太大的差異，符合本論文之前對於 PNMT/TH 染色分析的實驗結果。

(A)



(B)



(C)

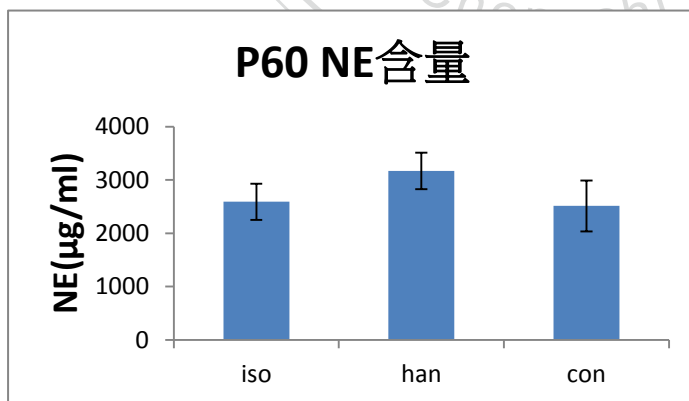


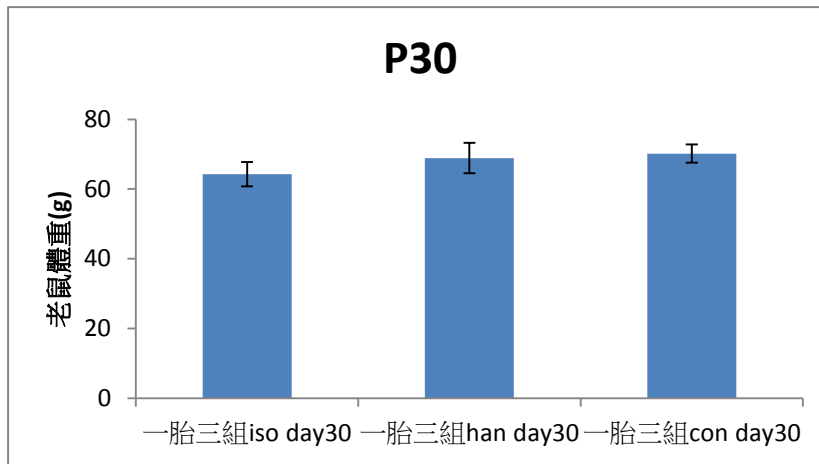
圖 10、經過親子分離實驗後，待老鼠成長至 P60 後進行 EPM，發現三組間並無明顯差異(圖 A)，於 open arms 中撫摸組與控制組 (P=0.052)，而後以 HPLC 檢測新生老鼠腎上腺中腎上腺素與正腎上腺素的含量。發現三組間其腎上腺之腎上腺素(圖 B)與正腎上腺素含量(圖 C) 沒有太大的差異，符合本論文之前對於 PNMT/TH 染色分析的實驗結果。



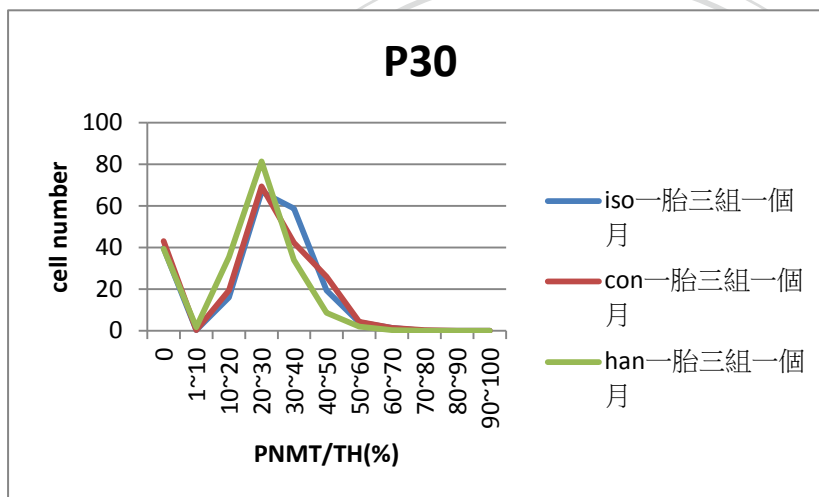
#### 第四節 親子分離實驗(操弄至 P21)對新生老鼠其腎上腺之腎上腺素與正腎上腺素含量的影響

根據本論文的結果發現，親子分離實驗會影響新生老鼠其腎上腺髓質中 chromaffin cells 的發育，即在老鼠出生十四天後撫摸組新生老鼠的 PNMT 含量相對於 TH 含量的比例高於控制組與隔離組(圖 5A)，推論在撫摸組中新生老鼠的 chromaffin cells 能製造較多的腎上腺素，因為可合成出腎上腺素的酵素(PNMT)數量較多；而在老鼠出生後二十一天時，實驗組(隔離組與撫摸組)與控制組間沒有明顯差異，推論可能原因為母鼠補償的關係，因親子分離實驗只進行到老鼠出生後十四天，而在老鼠出生後十四天至二十一天完全沒有進行任何操弄，導致在這七天內，新生老鼠可能受到母鼠的照顧因而有了補償的效果，為了探討是否為母鼠補償效果，本論文進行後續的實驗:將親子分離操弄的時間延長至老鼠出生後二十一天，觀察母鼠補償的效果是否存在。將親子分離操弄的時間延長至二十一天後，於 P30 犧牲老鼠。發現在 P30 時三組間體重並無差異(圖 11A)，且 PNMT 比 TH 的比例也無差異(圖 11B)，以 HPLC 分析腎上腺中腎上腺素與正腎上腺素的含量三組間也無明顯差異(圖 11C、D)。

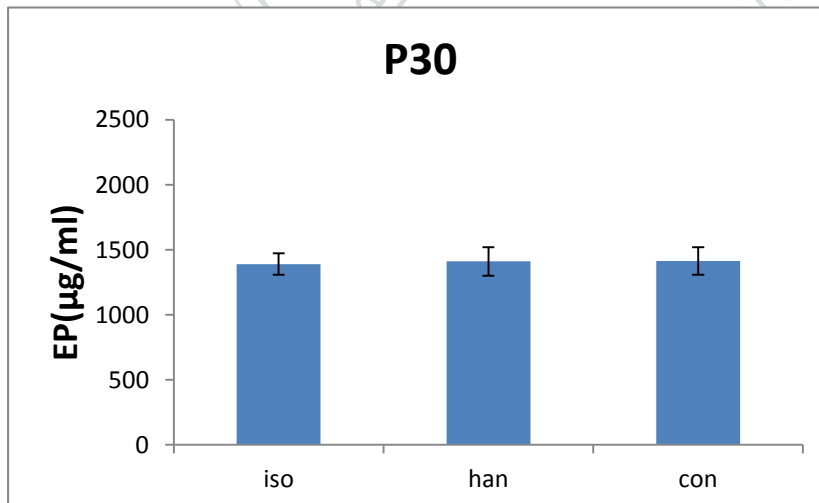
(A)



(B)



(C)



(D)

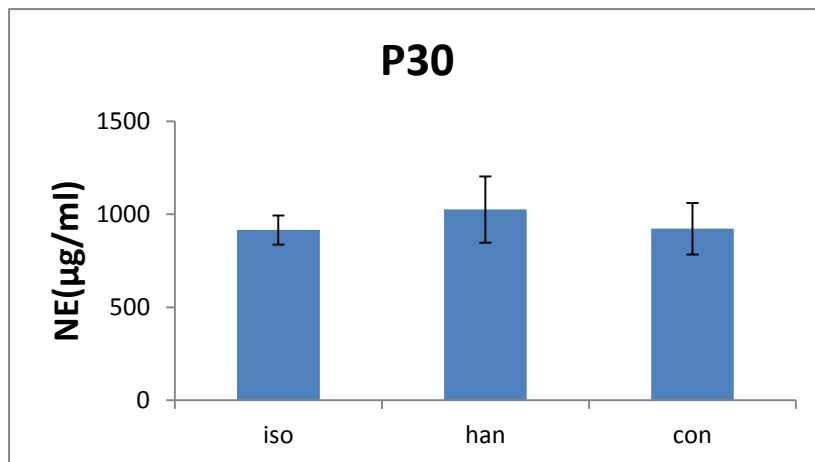
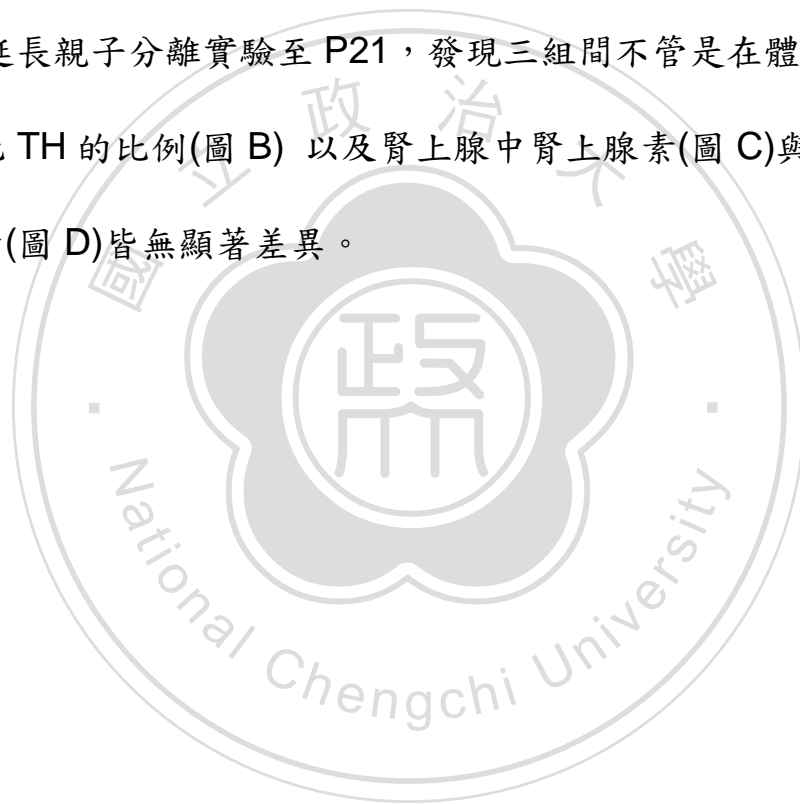


圖 11、延長親子分離實驗至 P21，發現三組間不管是在體重(圖 A)、PNMT 比 TH 的比例(圖 B) 以及腎上腺中腎上腺素(圖 C)與正腎上腺素的含量(圖 D)皆無顯著差異。





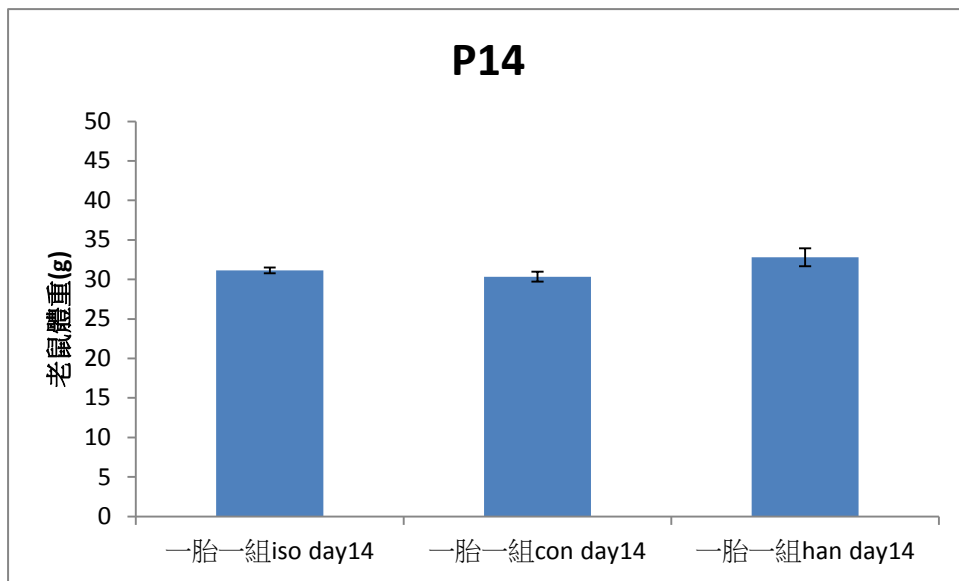
## 第五節 親子分離實驗對一胎一組新生老鼠其腎上腺之腎上腺素與正腎上腺素含量的影響

經過一胎三組新生老鼠的探討後，發現到親子分離實驗會在老鼠出生後十四天造成影響(圖 5A、8A)。而欲探討此結果是否有除了親子分離以外的原因影響，即進行一胎一組的親子分離實驗。一胎一組是將三隻母鼠(分娩的天數最多差三天)各別分成三大組，即一隻母鼠為一組，分成控制組、隔離組與撫摸組，而實驗組持續操弄的時間同樣為 P2~P14，同樣將新生老鼠於 P14 與 P21 進行犧牲。發現到在 P14 與 P21 時，實驗組與控制組的新生老鼠體重沒有差異(圖 12)，而經過初代細胞培養與螢光免疫染色後發現，PNMT 含量相對於 TH 含量的比例在 P14 與 P21 時三組間沒有差異(圖 13)，同樣的，顯示 PNMT positive 的 chromaffin cells 細胞數量也沒有差異(圖 14)。以 HPLC 檢測經過親子分離操弄的新生老鼠其腎上腺中腎上腺素與正腎上腺素的含量，結果顯示在老鼠出生後十四天時，實驗組與控制組的腎上腺素與正腎上腺素含量沒有差異(圖 15)，而同樣無差異的結果也出現在老鼠出生後二十一天時(圖 16)。同樣的親子分離實驗，卻在一胎一組與一胎三組的 P14 撫摸組中出現差異，推論可能原因為:進行親子分離實驗的過程中，一胎三組的撫摸組新生老鼠隻數較一胎一組少，而在親子分離結束將新生老鼠放回鼠籠時，因為一胎三組的新

生老鼠隻數較少，導致母鼠會將注意力放在剛放回籠中的撫摸組新生老鼠，而一胎一組為整胎都是撫摸組，這個狀況對一胎一組母鼠而言可能沒有太大的影響，因為隻數太多造成母鼠分散注意力，進而導致只有一胎三組撫摸組的新生老鼠受到影響，而一胎一組撫摸組的新生老鼠受到的影響較少。



(A)



(B)

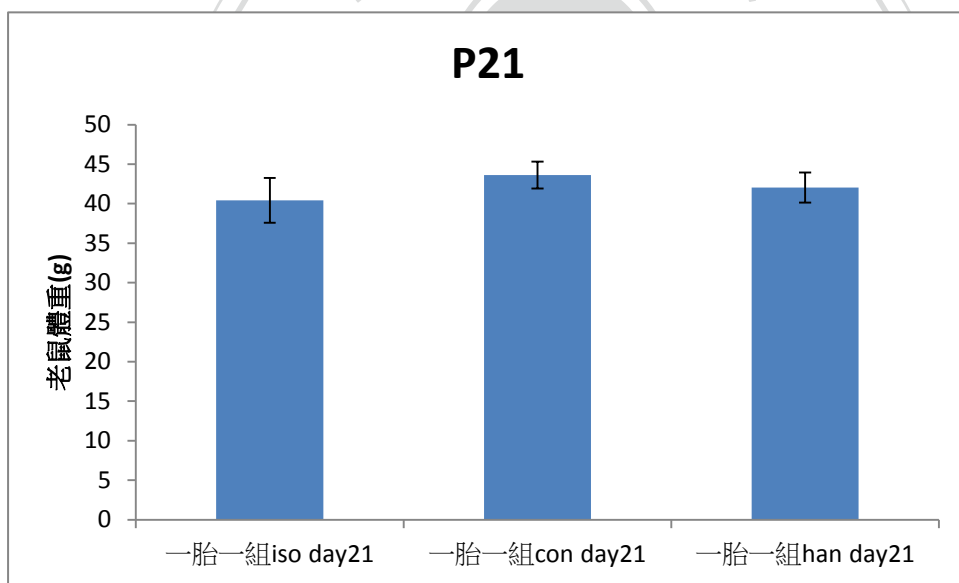
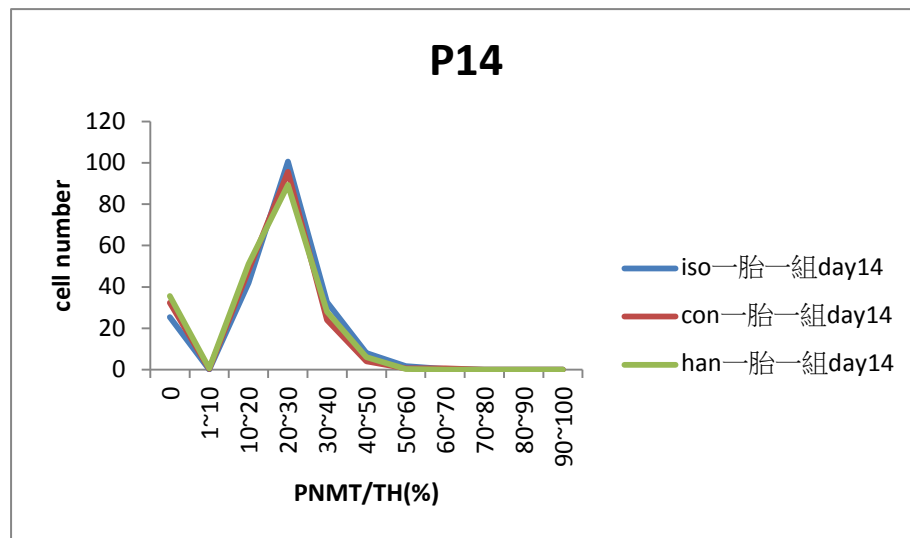


圖 12、親子分離實驗後測量新生老鼠的體重。實驗將新生兒老鼠分為三小組(控制組、撫摸組與隔離組)，(A)老鼠出生後十四天(P14)，(B)老鼠出生後二十一天(P21)。

(A)



(B)

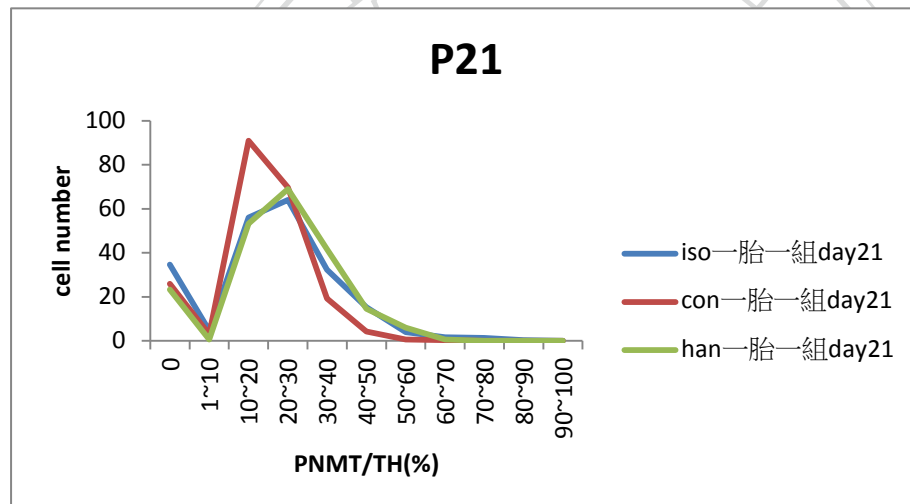
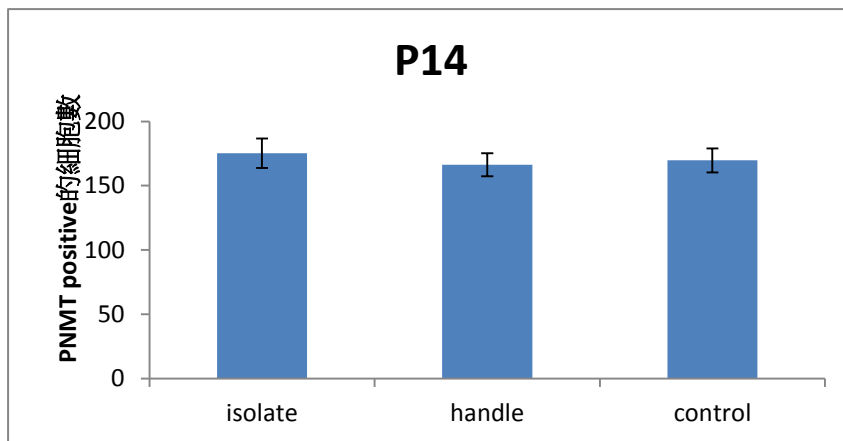


圖 13、經過親子分離實驗後分析新生老鼠 chromaffin cells 中 PNMT 與 TH 在各組中的相對含量。在一胎一組的狀況下，老鼠在出生後十四天(A)與出生後二十一天(B)時，實驗組(隔離組和撫摸組)與控制組間 PNMT 含量相對於 TH 含量的比例趨勢並無顯著差異。

(A)



(B)

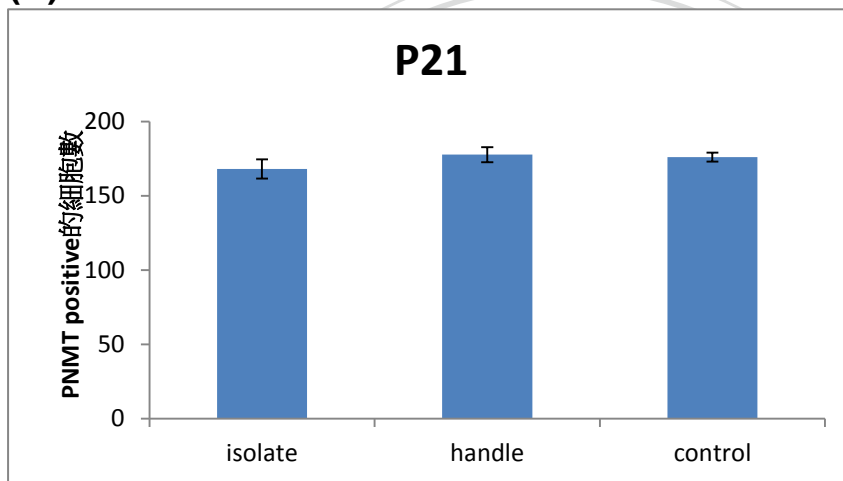
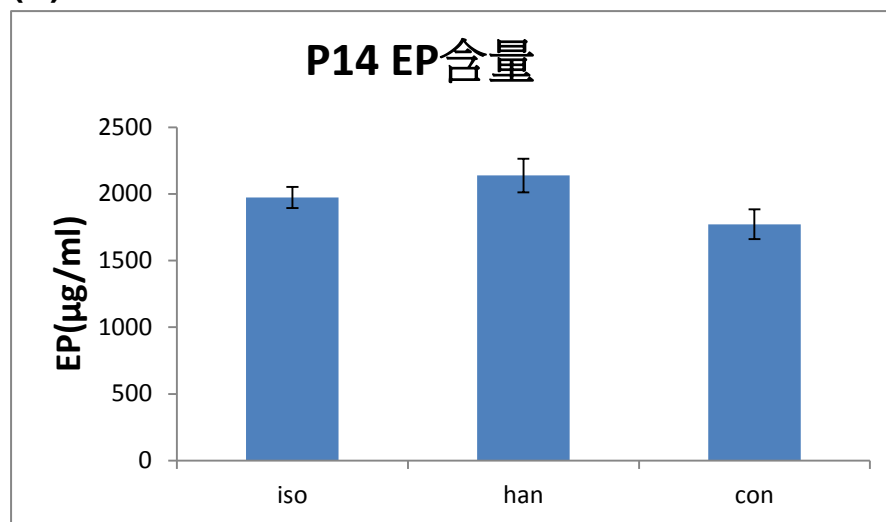


圖 14、經過親子分離實驗(一胎一組)後計算新生老鼠有染到 PNMT 的 chromaffin cells 細胞數量。即可製造腎上腺素的 chromaffin cells 細胞數量，在 P14(圖 A)與 P21(圖 B)時，三組間皆無明顯差異。

(A)



(B)

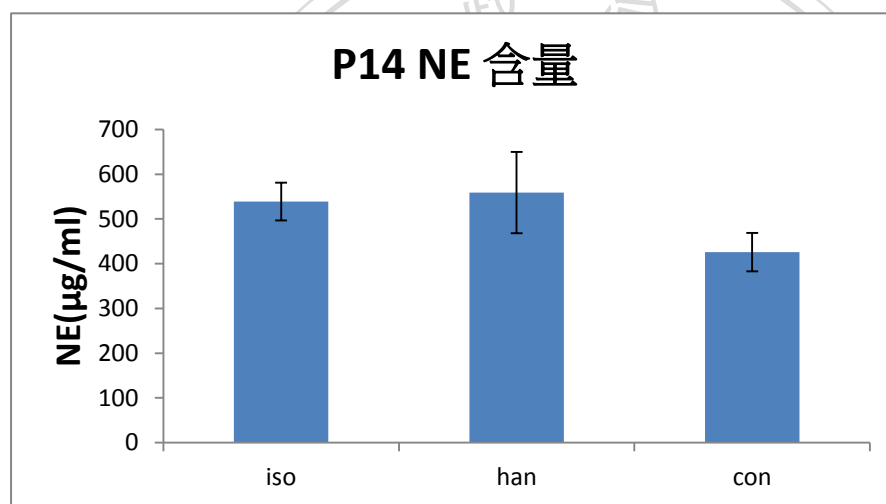
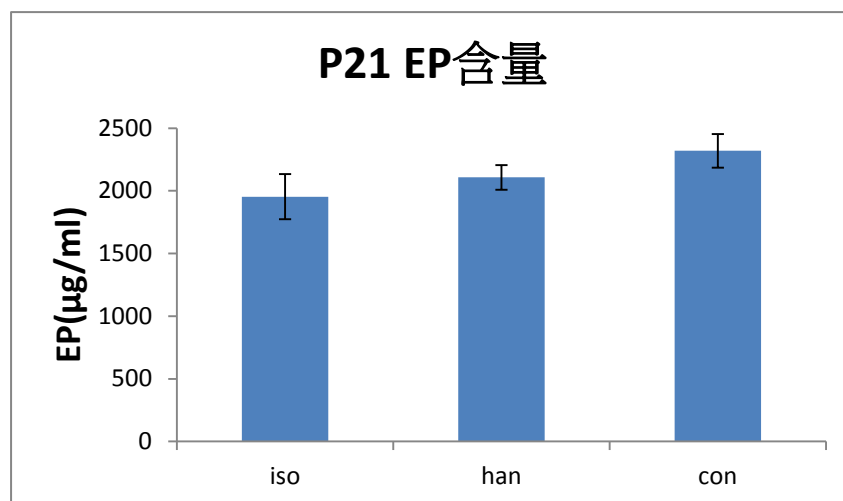


圖 15、經過親子分離實驗(一胎一組)後檢測新生老鼠腎上腺中腎上腺素與正腎上腺素的含量。在一胎一組老鼠出生後十四天的情況下，發現到實驗組與控制組間腎上腺素的含量沒有差異(圖 A)，而正腎上腺素的含量，同樣沒有差異(圖 B)。

(A)



(B)

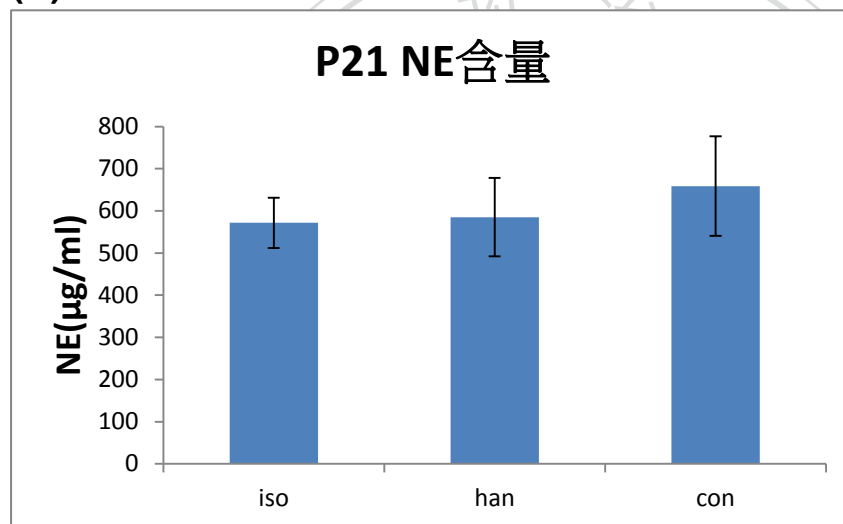


圖 16、經過親子分離實驗(一胎一組)後檢測新生老鼠腎上腺中腎上腺素與正腎上腺素的含量。發現隔離組撫摸組與控制組三組間的腎上腺素(圖 A)與正腎上腺素(圖 B)含量並沒有因為經過親子分離實驗的影響而有有改變。

## 第四章 討論

因新生老鼠隨著天數的增加，活動力也會隨著上升，且新生老鼠對壓力的反應也較敏感，而欲進行的操弄時間為老鼠出生後十四天至二十一天，此時正好過了 stress hyporesponsive period (SHRP) (P4~P14)，因此新生老鼠對壓力的反應勢必增強，將會對親子分離實驗產生不確定的影響。以 HPLC 檢測新生兒老鼠其腎上腺組織中腎上腺素含量的結果也顯示，在老鼠出生後十四天時，撫摸組中的新生老鼠其腎上腺比控制組製造更多的腎上腺素(圖 8A)，但隔離組與撫摸組間製造腎上腺素的含量並無顯著差異，而在 PNMT 含量相對於 TH 含量的比例上，隔離組低於撫摸組，推論可能原因為經過親子分離後，撫摸組中新生老鼠受到持續觸碰的時間比起隔離組要多出很多，而持續性的人為觸碰可能對新生老鼠產生較高的壓力刺激，而使新生老鼠產生較多醣皮質素，因而導致 chromaffin cells 的 PNMT 表現量增加，雖然撫摸組中雖有較多的 PNMT 表現，但所偵測到的腎上腺素含量卻是與隔離組相當，推論可能原因為撫摸組中腎上腺素的代謝量增加亦或是撫摸組中 PNMT 的活性不如隔離組，首先，為了探討是否為腎上腺素代謝量增加，可利用 HPLC 將腎上腺素經 MAO (monoamine oxidase)與 COMT (catechol-O-methyltransferase)代謝後的產物(分別為 dihydroxymandelic acid 與 metanephrine)含量



一併計算，而檢測 PNMT 的活性的方法為將新生老鼠腎上腺研磨後，加入已知濃度的正腎上腺素後，利用 HPLC 檢測腎上腺素與正腎上腺素的含量，便可得知隔離組與撫摸組中 PNMT 的活性是否有改變。而隔離組在 PNMT 含量相對於 TH 含量的比例上與控制組沒有差異，但卻製造比控制組更多的腎上腺素( $p < 0.05$ )，可能原因為隔離組新生老鼠經過親子分離後對壓力的反應高於控制組，因而使隔離組中 PNMT 的效率增加，而製造比控制組更多的腎上腺素；此外，隔離組與撫摸組所檢測到的腎上腺素含量沒有差異，但撫摸組卻在 PNMT 含量相對於 TH 含量的比例上高於隔離組(圖 5A)( $p < 0.05$ )，而觀察有染到 PNMT 的 chromaffin cells 在所有 chromaffin cells 中所佔的百分比(圖 19)，發現雖然隔離組與控制組( $p = 0.178$ )及撫摸組( $p = 0.23$ )間沒有顯著差異，但因 error bar 過於大，所以不排除隔離組擁有較高能製造腎上腺素的 chromaffin cells 比例之可能性，因而導致隔離組在 PNMT 相對活性低於撫摸組的情況下，能夠製造與撫摸組相當的腎上腺素。

在第二節結果中也探討到，腎上腺組織中腎上腺素的含量取決於 chromaffin cells 的數量增加或是 PNMT 的效率提高，而本論文已證實親子分離操弄並不會改變可製造腎上腺素的 chromaffin cells 細胞數量(圖 6)，且 chromaffin cells 的細胞大小在經過親子分離操弄後三

組間(隔離組、撫摸組與控制組)並無差異(圖 17)，所以 PNMT 的效率增加很有可能是造成腎上腺素分泌量上升的原因。另外，以 HPLC 檢測經過親子分離的新生老鼠腎上腺組織，發現只有在老鼠出生後十四天時出現差異，即撫摸組與隔離組比起控制組製造較多的腎上腺素，但在正腎上腺素的含量上三組間沒有差異(圖 8B);而在老鼠出生後二十一天時，腎上腺素與正腎上腺素的含量皆沒有差異(圖 9)，有趣的是在老鼠出生後十四天時，隔離組與撫摸組的腎上腺素含量明明高於控制組，且正腎上腺素含量無差異，但在  $EP/(EP+NE)$  的比例上(圖 18)卻始終維持 80%，與控制組相同，而 80% 的腎上腺素含量與 20% 的正腎上腺素含量正好符合正常老鼠體內腎上腺素與正腎上腺素的比例，這個結果也與初代細胞培養的結果相符合，即細胞免疫染色後有染到 PNMT 的 chromaffin cells 細胞數量約佔所有 chromaffin cells 的八成(圖 19)，顯示親子分離實驗對新生老鼠腎上腺之腎上腺素與正腎上腺素含量的比例並無影響。而這個結果也間接證實需製造較多的腎上腺素就必須有相對應含量的正腎上腺素，以維持體內腎上腺素與正腎上腺素比例的恆定(Zigmond, 1989)。此外，透過分析細胞免疫染色中 chromaffin cells 的 TH 強度，發現可製造腎上腺素的 chromaffin cells (PNMT positive) 中其細胞內 TH 的強度大於只能製造正腎上腺素的 chromaffin cells (PNMT negative)，顯示在腎上腺

髓質中可製造腎上腺素的 chromaffin cells 擁有較多的 TH 酵素(圖 20)。

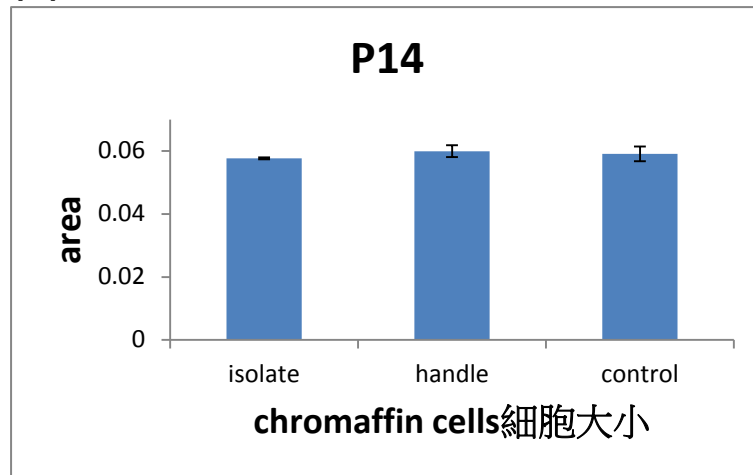
此外，本論文所做的隔離組與文獻所得到的結果不太一樣，即文獻中指出隔離組對壓力的反應應當高於控制組(CRH、ACTH 與皮質酮含量上升)，而皮質酮會促進 PNMT 的表現量上升，理論上在隔離組中 PNMT 的含量會高於控制組，但在本論文得到的結果卻是隔離組在 PNMT 的含量上與控制組相同，推論很大的原因為分離的時間不夠長，文獻中隔離組一天與母鼠分離的時間高達 4~8 小時，而本論文只分離 1 小時，因而使得隔離組的效果不明顯。

相對於本論文將重點放在新生老鼠腎上腺的發育，觀察其製造腎上腺素與正腎上腺素的含量，而這些賀爾蒙被釋放後是經由血液運送到下游的組織中，因而觀察新生老鼠血液中腎上腺素與正腎上腺素的含量，可進一步有效分析壓力對新生老鼠所造成的影響，此外也可分析血液中糖皮質素的含量，藉此觀察親子分離所造成的壓力在三組間(隔離組、控制組與撫摸組)的差異。此外，因在 SHRP 期間新生老鼠的糖皮質素含量低於非 SHRP 期間的新生老鼠，所以檢測 P14 與 P21 新生老鼠血液中糖皮質素的含量為一值得探討的方向。

每個腎上腺髓質中的 chromaffin cell 約包含 10000 個 chromaffin granules，且依照表現 PNMT 與否又分成可釋放腎上腺素的 chromaffin cells(細胞內 chromaffin granules 包含腎上腺素或正腎上腺素，但兩者不同時存在同一 chromaffin granules 中)與只能釋放正腎上腺素的 chromaffin cells(細胞內 chromaffin granules 不含腎上腺素) (Cynthia G Zoski, 2007)。當有壓力存在時，交感神經系統便會透過 splanchnic nerves 刺激腎上腺髓質釋放腎上腺素與正腎上腺素，此時這些 chromaffin granules 便會透過胞吐作用分別釋放腎上腺素與正腎上腺素，但真實釋放的含量是多少則須個別討論，但唯一確定的是壓力存在時，血清中腎上腺素與正腎上腺素的含量確實會增加。此外，chromaffin cells 釋放出腎上腺素與正腎上腺素後，勢必透過一些路徑來生成一些新的腎上腺素與正腎上腺素，如 ACTH 與交感神經系統可以藉由增強 TH 與 DBH 的活性來生成新的腎上腺素前驅物，且 ACTH 能夠透過刺激醣皮質素來增強 PNMT 的表現量，藉此提高腎上腺素的含量。在文獻中也發現 IMO stresss 兩小時能夠增加 Vesicular monoamine transporters 2(VMAT2) mRNA 的表現量，但對 VMAT1 則沒有影響(VMAT1 表現在兩種 chromaffin cells 中，而 VMAT2 只表現在只能釋放正腎上腺素的 chromaffin cells 中)，且 VMAT2 的 turnover number 為 VMAT1 的三倍，顯示出在只能釋放正

腎上腺素的 chromaffin cells 中其正腎上腺素可以更有效率地回到 chromaffin granules 中以利下次的釋放(Andrej, 2010)。而正腎上腺素經胞吐作用釋放至突觸間隙後，居然有約 90%的正腎上腺素可以被回收回神經末端，加上一些被代謝掉的正腎上腺素，實際上隨著血液運送至作用目標可能不到 5%。在壓力存在的情況下，可推測腎上腺素在體內需求量較正腎上腺素多，且腎上腺素在 chromaffin granules 中的補充是透過生成新的腎上腺素，而正腎上腺素則是回收大於生成。而此一現象在本論文中可以用來解釋為何新生老鼠在受到壓力的狀況下，正腎上腺素的含量始終維持固定，而腎上腺素的含量卻能提高。

(A)



(B)

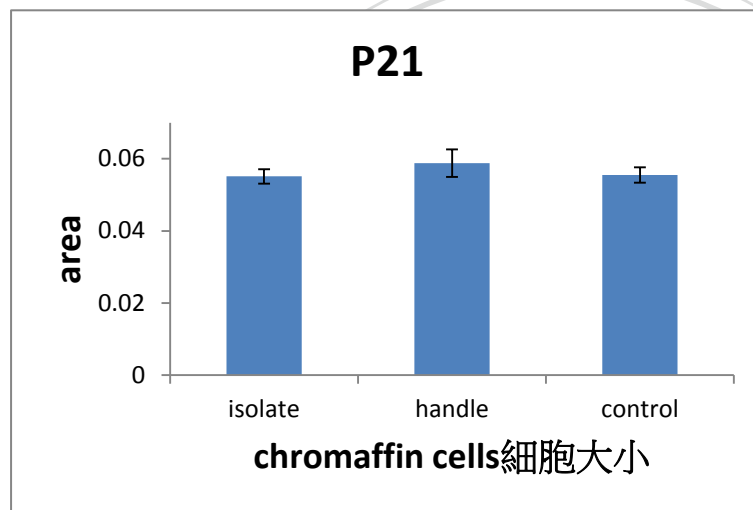
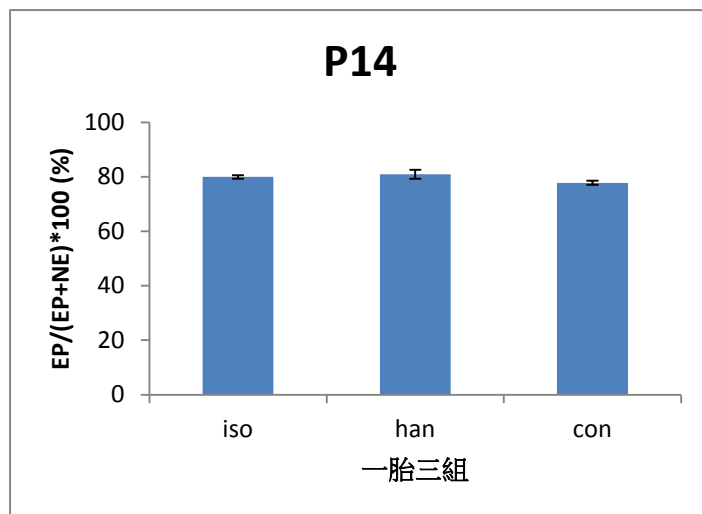


圖 17、親子分離不影響新生老鼠腎上腺髓質中 chromaffin cells 的細胞大小。以分析軟體 Image J 分析 chromaffin cells，發現經過親子分離的新生老鼠 P14(圖 A)與 P21(圖 B)，在隔離組、控制組與撫摸組三組間 chromaffin cells 的細胞大小皆無明顯差異。

(A)



(B)

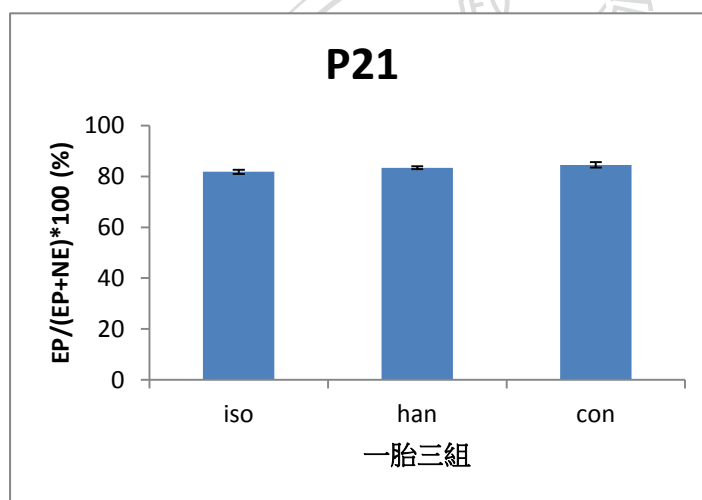
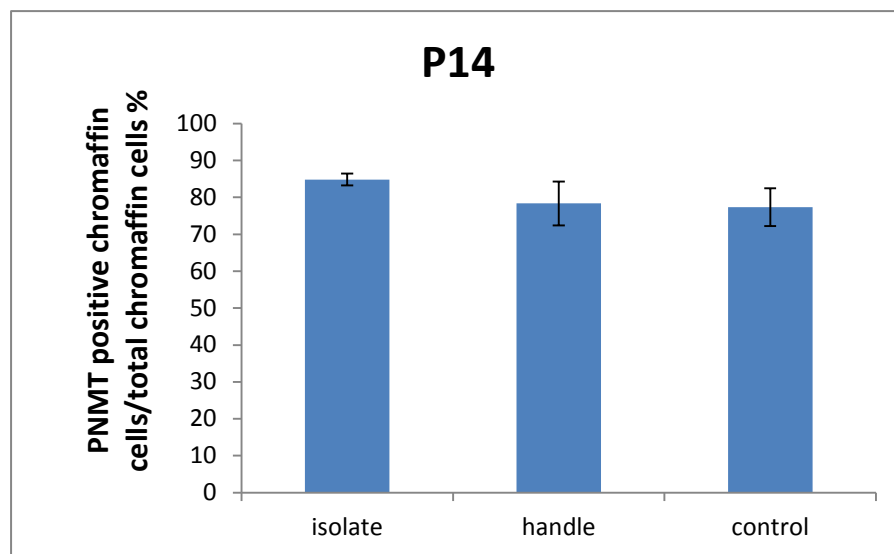


圖 18、腎上腺素含量佔腎上腺素與正腎上腺素含量總和的百分比。  
以 HPLC 檢測新生老鼠腎上腺中腎上腺素含量與正腎上腺素含量後  
(圖 8、9)，將圖 8、9 所得的含量分析後，發現在 P14(圖 A)與 P21(圖  
B)中，腎上腺素含量約佔腎上腺素與正腎上腺素含量總和中的 80%。

(A)



(B)

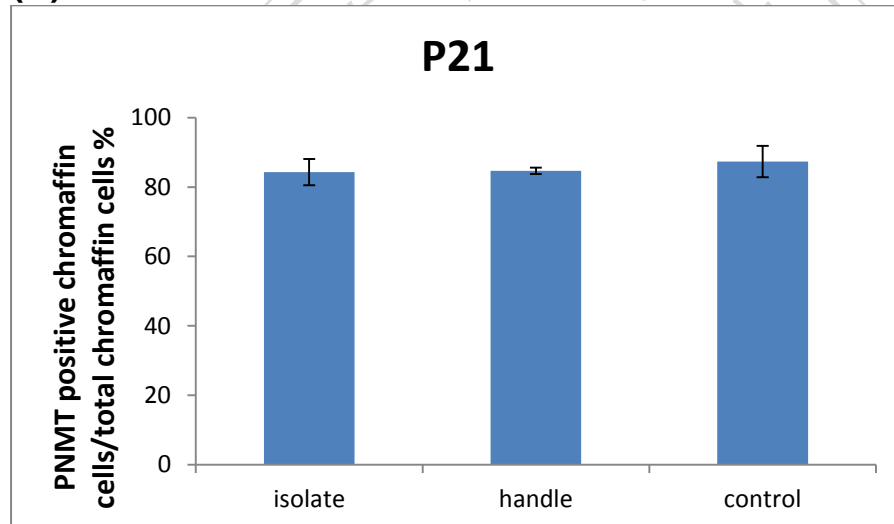
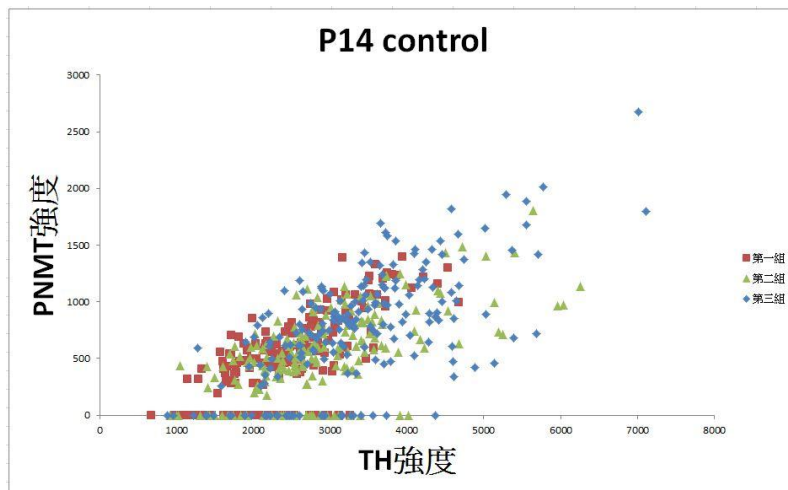


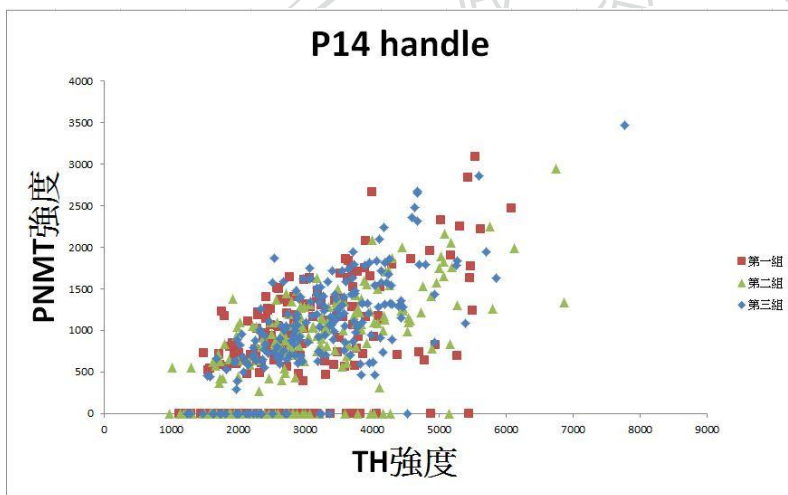
圖 19、有染到 PNMT 的 chromaffin cells 在所有 chromaffin cells 中所佔的百分比。從圖 6 得知有染到 PNMT 的 chromaffin cells 的細胞數量，計算在所有 chromaffin cells 中所佔的百分比，發現能製造腎上腺素的 chromaffin cells 約佔所有 chromaffin cells 的八成。



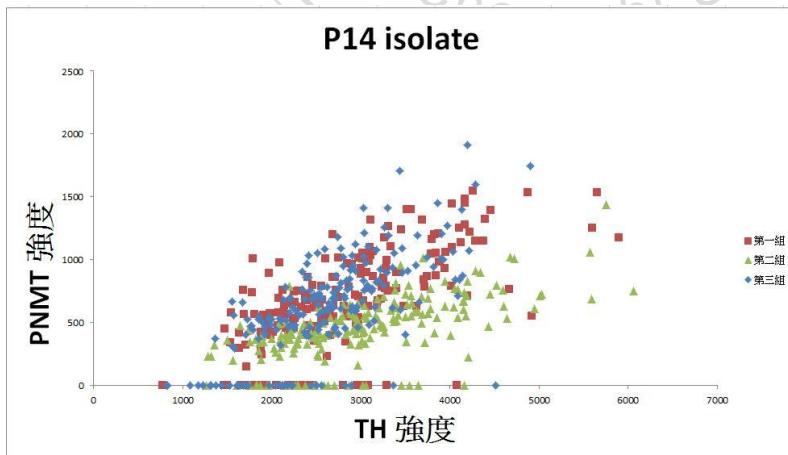
(A)



(B)



(C)



(D)

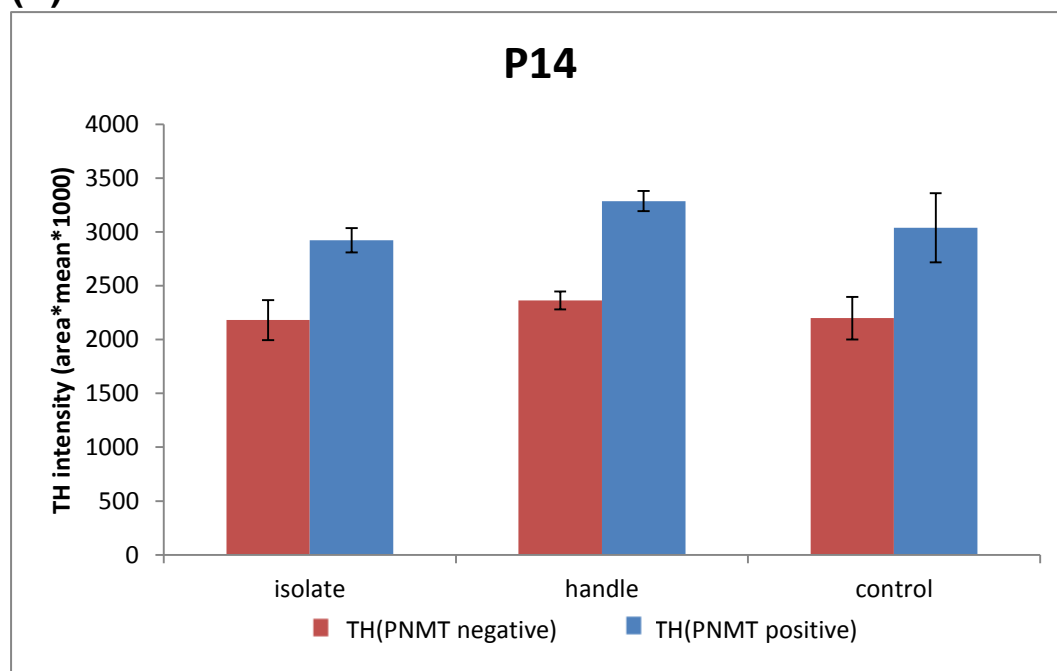


圖 20、在有無表現 PNMT 的 chromaffin cells 中 TH 的強度。於三組中個別分析 chromaffin cells 的 TH 與 PNMT 強度，一點為一個細胞，顯示即使較高的 TH 強度在 PNMT negative 的細胞中 PNMT 依舊為零，證明免疫染色結果值得信賴(圖 A、B、C)。將圖 A、B、C 量化後發現於有染到 PNMT 的 chromaffin cells 中，其 TH 的強度在三組間無差異;而沒有染到 PNMT 的 chromaffin cells 其 TH 強度亦無差異，但 TH 強度在有或無 PNMT 表現的 chromaffin cells 之間卻是有顯著差異(圖 D) ( $p < 0.05$ )。

## 第五章 結論

(一) 親子分離實驗影響出生後十四天(P14)的新生老鼠其腎上腺髓質中 chromaffin cells 的發育，在撫摸組中的 chromaffin cells 其 PNMT 與 TH 的相對含量高於隔離組與控制組;而在出生後二十一天(P21)的新生老鼠中則沒有發現任何差異。

(二) 親子分離實驗不會改變新生老鼠(P14 與 P21)腎上腺髓質的結構，也不會影響新生老鼠(P14 與 P21)製造腎上腺素的 chromaffin cells 數量。

(三) 親子分離實驗增加實驗組(隔離組與撫摸組)新生老鼠(P14)其腎上腺髓質中腎上腺素的含量，但不影響正腎上腺素的含量;而親子分離實驗對 P21 新生老鼠的腎上腺素與正腎上腺素含量沒有影響。

(四) 親子分離實驗對一胎一組的新生老鼠(P14 與 P21)不造成任何影響，不管在 HPLC 檢測腎上腺髓質中腎上腺素的含量或者是螢光免疫分析 PNMT 與 TH 的強度等，皆無任何證據顯示親子分離實驗會對一胎一組新生老鼠其腎上腺髓質中 chromaffin cells 的發育造成影響。

## 參考文獻

- Alison J. WINDER (1991) New assays for the tyrosine hydroxylase and dopa oxidase activities of tyrosinase. *Eur J. Biochem.* 198, 317-326
- Andrej Tillinger (2010) Vesicular Monoamine Transporters (VMATs) in Adrenal Chromaffin Cells: Stress-Triggered Induction of VMAT2 and Expression in Epinephrine Synthesizing Cells. *Cell Mol Neurobiol* 30:1459–1465
- Baker PF, Knight DE. (1978) Calcium-dependent exocytosis in bovine adrenal medullary cells with leaky plasma membranes. *Nature* 276: 620–622.
- Banks, P. (1965) Effects of stimulation by carbachol on the metabolism of the bovine adrenal medulla. *Biochem. J.* 97: 555.
- Baruchin A, Vollmer RR, Miner LL, Sell SL, Stricker EM, Kaplan BB. (1993) Cold-induced increases in phenylethanolamine N-methyltransferase (PNMT) mRNA are mediated by non-cholinergic mechanisms in the rat adrenal gland. *Neurochem Res* 18: 759–766.
- Beatriz Galán-Rodríguez (2004) Extra-adrenal chromaffin cells of the Zuckerkandl's paraganglion: morphological and electrophysiological study. *Cell Biology of the Chromaffin Cell*
- Benedict J. Kolber (2008) HPA axis dysregulation and behavioral analysis of mouse mutants with altered GR or MR function. *NIH Public Access* 11(5): 321–338
- Blaschko (1942) The activity of L-dopa decarboxylase. *J. Physiol.* 101, 337-
- Blazicek P, Kvetnansky R (1989) Kinetic parameters of rat adrenal TH and PNMT under acute and repeated stress. In: *Stress: Neurochemical and Humoral Mechanisms*, edited by Van Loon GR, Kvetnansky R, McCarty R, Axelrod J. New York: Gordon and Breach, p. 787–797
- Benedict J. Kolber (2008) HPA axis dysregulation and behavioral analysis of mouse mutants with altered GR or MR function. *NIH Public Access* 11(5): 321–338
- Cannon. (1926) *Physiological regulation of normal states: some tentative postulates concerning biological homeostatics.* p. 91. Paris: Éditions Médicales.
- Chuang DM, Costa E. (1974) Biosynthesis of tyrosine hydroxylase in rat adrenal medulla after exposure to cold. *Proc Natl Acad Sci USA* 71: 4570–4574.
- Connett, R. J., Kirshner, N. (1970) Purification and properties of bovine

- phenylethanolamine N-methyltransferase.  
 J. Biol. Chem. 245: 329, 1970.
- Coulter CL.(2004) Functional biology of the primate fetal adrenal gland: advances in technology provide new insight. *Clinical and Experimental Pharmacology & Physiology*.31: 475–484.
- Coupland, R. E.(1965) Electron microscopic observations on the structure of the rat adrenal medulla. II. Normal innervation. *J. Anat.* 99: 255.
- Cynthia G Zoski (2007) *Handbook of electrochemistry P722*
- Douglas WW , Rubin RP(1961) The role of calcium in the secretory response of the adrenal medulla to acetylcholine. *J Physiol* 159: 40–57.
- Edith (1949) Formation of adrenaline from noradrenaline in the perfused suprarenal gland. *Brit. J. Pharmacol.*,4, 245.
- Ehrhart-Bornstein (1998) Intraadrenal Interactions in the Regulation of Adrenocortical Steroidogenesis. *Endocrine Reviews* 19(2): 101–143
- Erankii O, Harkonen M (1963) Histochemical demonstration of fluorogenic amines in the cytoplasm of sympathetic ganglion cells of the rat. *Acta Physiol Stand* 58:285-286.
- Fangwen Rao (2007) Tyrosine Hydroxylase, the Rate-Limiting Enzyme in Catecholamine Biosynthesis *Circulation*.116: 993-1006
- Giuseppe Biagini (1998) Postnatal maternal separation during the stress hypo-responsive period enhances the adrenocortical response to novelty in adult rats by affecting feedback regulation in the CA1 hippocampal field. *Neuroscience Volume 16, Issues 3–4 Pages 187–197*
- H. Winkler (1993) The adrenal chromaffin granule: a model for large dense core vesicles of endocrine and nervous tissue. *J. Anat.* 183, pp. 237-252
- Ikeda, M., Fahien, L. A(1966) A kinetic study of bovine adrenal tyrosine hydroxylase. *J. Biol.Chem.* 241: 4452.
- John F. Cryan(2001) Use of Dopamine-b-hydroxylase-Deficient Mice to Determine the Role of Norepinephrine in the Mechanism of Action of Antidepressant Drugs. *vol. 298 no. 2 651-657*
- Kirshner, N.(1957) Pathway of noradrenaline formation from dopa. *J. Biol. Chem.* 226: 821.
- Klaus Unsicker(2005) Chromaffin Cell and its Development. *Neurochemical Research, Vol. 30, 921–925*
- Kohn, A.(1902)Des chromaffine Gewebe. *Ergeb. Anat. Entw. Gesch.* 12: 253.
- Kubovcakova L, Tybitanclova K, Sabban EL, Majzoub J, Zorad S, Vietor I, Wagner EF, Krizanova O, Kvetnansky R (2004)

- Catecholamine synthesizing enzymes and their modulation by immobilization stress in knockout mice. *Ann NY Acad Sci* 1018: 458–465.
- Kumer S. C. ,Vrana K. E. (1996) The intricate regulation of tyrosine hydroxylase activity and gene expression. *J. Neurochem.* 67, 443–462.
- Kvetnansky R, Mikulaj L.(1970) Adrenal and urinary catecholamines in rats during adaptation to repeated immobilization stress. *Endocrinology* 87: 738–743.
- Kvetnansky R, Weise VK, Gewirtz GP, Kopin IJ.(1971) Synthesis of adrenal catecholamines in rats during and after immobilization stress. *Endocrinology* 89: 46–49.
- Kvetnansky (2009) Catecholaminergic Systems in Stress: Structural and Molecular Physiol. Genetic Approaches.Rev 89: 535–606
- Levin, E. Y., LEVENBERG, B. AND KAUFMAN, S.(1960): The enzymatic conversion of 3, 4-dihydroxyphenylethylamine to norepinephrine. *J. Biol. Chem.* 235: 2080.
- Mary K. Dahmer (1996) Dopaminergic Inhibition of Catecholamine Secretion from Chromaffin Cells: Evidence that Inhibition Is Mediated by D4 and D5 Dopamine Receptors *Journal of Neurochemistry* Volume 66, Issue 1, pages 222–232
- Matthews (1969) The ultrastructure and somatic efferent synapses of small granule-containing cells in the superior cervical ganglion. *J. Anat*, 105, 2, pp. 255-282
- Mcewen,B.s.,stellar,e.(1993).Stress and the individual: mechanisms leading to disease.*arch int Med*,153:2093-2011
- Mcewwn,b.s.(1998). Protective and damaging effects of stress mediators. *New eng J med*,338:171-179
- Meaney,M.J.,Sapolsky,R.M.,Mcewen,b.s.(1985).The development of the glucocorticoid receptor system in the rat limbic brain.i.ontogeny and autoregulation.*dev brain res*,18:159-164
- Mesiano S , Jaffe RB.(1997) Developmental and functional biology of the primate fetal adrenal cortex.*Endocrine Reviews* 18: 378–403.
- P. E. MacDonald (2003)Voltage-dependent K<sup>+</sup>channels in pancreatic beta cells: Role, regulation and potential as therapeutic targets.*Diabetologia*46:1046–1062
- Peter Burkhard (2001) Structural insight into Parkinson's disease treatment from drug-inhibited DOPA decarboxylase *Nature Structural Biology* 8,

- Petra Kempna (2008) Adrenal gland development and defects. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism* Vol. 22, No. 1, pp. 77–93.
- Peter R. Dunkley, Larisa Bobrovskaya, Mark E. Graham (2004) Tyrosine hydroxylase phosphorylation: regulation and consequences. *Journal of Neurochemistry*, 91, 1025–1043
- Pohorecky, L. A., Rust, J. H. (1968) Studies on the cortical control of the adrenal medulla in the rat. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 162: 227.
- Richard Kvetnansky, Esther L. Sabban, Miklos Palkovits (2009) Catecholaminergic Systems in Stress: Structural and Molecular Genetic Approaches. *Physiol Rev* 89: 535–606.
- Ruth M.K. Keil (2004) Coping and stress: a conceptual analysis. *Journal of Advanced Nursing* 45(6), 659–665
- Sabban EL, Kvetnansky R. (2001) Stress-triggered activation of gene expression in catecholaminergic systems: dynamics of transcriptional events. *Trends Neurosci* 24: 91–98.
- Sapolsky, R.M., Meaney, M.J. (1986). maturation of the adrenocortical stress response: neuroendocrine control mechanisms and the stress hyporesponsive period. *Brain res rev*, 396:64-76
- Selye (1955) Stress and disease. *science* 122:625-631
- Selye (1975). Confusion and controversy in the stress field. *Journal of Human Stress* 1: 37–44.
- Szabo, S. (1980) Stress and gastroduodenal ulcers. *Stress* 1: 25-36
- Vincent, S. (1910) The chromophil tissues and the adrenal medulla. *Proc. Roy. Soc. Ser. B Biol. Sci.* 82: 502, 1910.
- Walter Bradford Cannon (1929). *Bodily changes in pain, hunger, fear, and rage.* New York: Appleton-Century-Crofts.
- Wurtman, R. J., Axelrod, J. (1965) Adrenaline synthesis: Control by the pituitary gland and adrenal glucocorticoids. *Science* 150:237–252.
- Yuan Ji (2008) Human phenylethanolamine N-methyltransferase genetic polymorphisms and exercise-induced epinephrine release. *Physiol Genomics* 33: 323–332
- Zigmond R. E., Schwarzschild M. A., Rittenhouse A. R. (1989) Acute regulation of tyrosine hydroxylase by nerve activity and by neurotransmitters via phosphorylation. *Ann. Rev. Neurosci.* 12, 415–461.