

編號：CCMP94-RD-041

憂鬱症患者之中醫證型與週邊淋巴球 mRNA 之表現總報告

謝慶良

中國醫藥大學附設醫院

摘要

本研究目的為探討憂鬱症由中醫（辯證分型）、西醫（DSM-IV 診斷準則）臨床觀點、及週邊淋巴球 mRNA 表現之間的相關性。

研究方法：由精神科門診收集符合 DSM-IV 憂鬱症診斷之患者，進行漢氏憂鬱量表評分及中醫辯證分型，並抽血進行 mRNA 分析。同時收集配對良好的健康受試者接受相同分析。

結果與討論：

第一年度：收集 35 名符合 DSM-IV 憂鬱症診斷標準之個案與 35 名對照組，由精神科醫師診斷（DSM-IV 診斷準則與漢氏憂鬱量表）及中醫師進行中醫辯證分型，再抽取週邊血 RNA 進行 Real time PCR 偵測。

為更快速的找到影響疾病的基因我們建立一個 Real time PCR 偵測平台完成選殖 RGS4、PSAT1、GRM3、SLCIA3、LSM4、GAD1、SHMT2、PPP3CC、GCAT、NRG1、SRR、CHRNA7 等基因與其 Relative standard curve，使用 Real-time PCR 同步分析，使用此方法我們可同時觀看一個檢體在一次上機中多基因的表現量差異。

第二年度：共已收集 99 名符合 DSM-IV 憂鬱症診斷標準之個案與 96 名的對照組，同樣地，由精神科醫師診斷及中醫師進行中醫辯證分型，再抽取週邊血 RNA 進行 Real time PCR 偵測。

第二年度共已完成選殖 PSAT1、RGS4、SHMT2、CSRP1、GCAT、ASCT1、CHRNA7、RGS2、GAD1、GRM3、SLC1A3、COMT、NRG1、DTNBP1、

SELENBP1、GRIK5 與 PPP3CC 等基因與其 relative standard curve。

其中各 88 名年齡與性別配對的個案組與對照組相較，SHMT2 之 mRNA 表現於個案組低於對照組：SHMT2/GAPDH 於病患組與對照組分別為 2.3 ± 8.6 與 29.9 ± 27.1 ($p=0.005$)。GRM3/GAPDH 於病患組之表現也明顯低於對照組，分別為 4.1 ± 9.1 與 35.1 ± 29.7 ($p=0.03$)。PSAT1 基因表現於個案組男性顯著地高於女性，顯示性別可能會造成基因表現差異。此外，目前已完其他 14 個檢體測定(如上述)。我們發現有幾個基因的 mRNA 表現與漢氏憂鬱量表的分數有顯著相關性，包括 DTNBP1、SELENBP1、以及 NRG1。

關鍵詞：重鬱症、中醫辨證分型、基因表現

Number: CCMP94-RD-041

Depression Patients: Chinese Medicine Viewpoints and mRNA Expressions in Peripheral Lymphocytes

Ching-Liang Hsieh

China Medical University Hospital

ABSTRACT

This study was aimed to explore the relationships among the phenotypes of Chinese medicine, Western medicine, and mRNA expression.

We need to enroll patients with major depressive disorder (by DSM-IV criteria) from psychiatric OPD and matched healthy controls. The patients were all rated by Hamilton's Depression Rating Scale and subgrouped by Chinese medicine definition. Blood samples were drawn for mRNA expression from all subjects.

During the first year, we enrolled 35 drug-free patients with a DSM-IV diagnosis of MDD and 35 healthy controls. All patients were classified by Chinese medicine definitions, and rated with Hamilton Depression Rating Scale (HDRS). Messenger RNA was extracted from venous blood of all subjects for gene-expression analysis by real-time PCR.

To make gene detection faster and to normalize data among batches, we have set up a real time PCR polygene platform. Novel candidate genes, such as RGS4, PSAT1, GRM3, SLC1A3, LSM4, GAD1, SHMT2, PPP3CC, GCAT, NRG1, SRR, and CHRNA7, were cloned into plasmid DNA to create relative standard curves. Using this method, we can examine many genes' expressions in one sample with merely one-time real time PCR. Now we have already done about 10 samples in this platform.

After two years, we have already enrolled 99 drug-free patients with a DSM-IV diagnosis of MDD and 96 healthy controls. All patients were also classified by Chinese medicine definitions, and rated with Hamilton Depression Rating Scale (HDRS). Messenger RNA was also extracted from venous blood of all subjects for gene-expression analysis by real-time PCR. Novel candidate genes, such as PSAT1, RGS4, SHMT2, CSR1, GCAT, ASCT1, CHRNA7, RGS2, GAD1, GRM3, SLC1A3, COMT, NRG1, DTNBP1, SELENBP1, GRIK5, and PPP3CC, were cloned into plasmid DNA to create relative standard curves.

Among 88 patients and 88 age- and gender-matched healthy controls, SHMT2 expression levels (SHMT2/GAPDH) were significantly lower in patients (2.3 ± 8.6) than in controls 29.9 ± 27.1 ($p = 0.005$). The mRNA expression ratio of GRM3/GAPDH was also lower in depression patients: 4.1 ± 9.1 vs. 35.1 ± 29.7 ($p = 0.03$). In addition, PSAT1 expression in male patients was significantly higher than that in female, suggesting gender effects on gene expression. We have also measured mRNA levels of another 14 genes (CSR1, GCAT, ASCT1, CHRNA7, RGS4, RGS2, GAD1, GRM3, SLC1A3, COMT, NRG1, DTNBP1, SELENBP1, GRIK5, and PPP3CC). We found several genes' mRNA levels were correlated with HDRS scores; these genes included DTNBP1, SELENBP1, and NRG1.

Keywords: Major Depression, Chinese Medicine, gene expression

壹、前言

世界衛生組織 (WHO) 預測，至西元 2020 年時，重鬱症將僅次於心血管疾病，成為影響全人類生活功能的第二大疾病。目前全世界約有 3% 的人口 (二億人) 罹患重鬱症，而各種疾病引起的負荷或失能中，精神疾病是最重要的因素，在 1999 年已高達各種疾病或傷害所造成失能生命年 (DALYs) 的 11.5%，且估計至 2020 年還會上升至 15%，其中以重鬱症最多，占 36.5%，但全球重鬱症患者接受有效治療者不到 25%。國內調查則發現，18 歲以上嚴重精神病的盛行率已接近 1%，重鬱症占 3%，即台灣地區各式嚴重精神病患約十至十二萬人，重鬱症患者則有三十至三十六萬人。

傳統中醫對於重鬱症亦有其臨床診斷的方式及治療經驗，為求診斷上的一致性，中國中西醫結合研究會精神病專業委員會制定一證型規範，將所謂「憂鬱」的患者分為四型：

- 一、肝鬱脾虛型：精神症狀包括多愁善慮、悲觀厭世、情緒不穩、唉聲嘆氣、失眠多夢；軀體症狀包括：兩脅脹滿、腹脹痛瀉、身倦納呆、舌淡紅苔薄白、脈弦細。
- 二、肝血瘀滯型：精神症狀包括情緒抑鬱、自殺觀念或行為、心情煩躁、思維聯想緩慢、運動遲緩；軀體症狀包括：面色晦暗、脅肋疼痛、婦女閉經、舌質紫暗瘀點苔白、脈沉弦。
- 三、心脾兩虛型：精神症狀包括：失眠健忘、興趣缺乏、心悸易驚、善悲易哭、倦怠乏力；軀體症狀包括：面色淡白或萎黃、食少腹脹便溏、舌質淡苔白、脈細弱。
- 四、脾腎陽虛型：軀體症狀包括：精神萎靡、情緒低落、嗜臥少動、心煩驚恐、心悸失眠；軀體症狀包括：面色晄白、陽萎遺精 (婦女帶下清稀)、舌質胖淡或有齒痕苔白、脈沉細。

目前從中醫觀點所診斷的「憂鬱症」，尚未有流行病學資料；中西醫學中所謂「憂鬱症」之關聯性，目前也尚未有系統性的研究，分子層次 mRNA 表現量變化的研究在精神疾患的研究中漸受重視，因為其更能反應基因與環境因子的交互關係。近年有研究發現憂鬱症患者週邊淋巴球 DRD4 受體之 mRNA 較之正常人為低 (Rocc et al, 2002)，而 CREB mRNA 表現與正常人無異，但會隨著藥物治療而變化 (Lai et al, 2003)。然而，大部分的候選基因仍尚未有系統性之研究。

除了單胺類神經傳遞缺損理論 (Hindmarch et al, 2001), NMDA 功能變異為近來深受重視的憂鬱症病因之理論基礎 (Berman et al, 2000), 本實驗室透過 NCBI 之 UniGene 資料庫 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=unigene>), 已經找出一些同時在大腦及週邊白血球有 mRNA 表現的與 NMDA 神經傳遞相關之基因, 包括: serine hydroxymethyltransferase 2 (SHMT2, 與 glycine 製造有關)、phosphoserine aminotransferase 1 (PSAT1, 與 L-serine 磷酸化過程有關)、serine transporter (ASCT1, 與中性胺基酸之回收器有關) (Kanai and Hediger 2003)、serine racemase (將 L-serine 轉成 D-serine) 等。

本研究計畫一方面探討憂鬱症之中醫臨床分型、西醫觀點之臨床嚴重度 (以漢氏憂鬱量表評量)、及 mRNA 表現之間的關係。另一方面, 亦將辨識憂鬱症在週邊淋巴球特有的基因表現, 並搜尋可能有助於診斷的週邊標記。

貳、材料與方法

- 一、本研究係橫斷面 (cross-sectional) 之個案一對照研究。
- 二、經由精神科門診收集重鬱症患者 (排除系統性身體疾患、雙極性情感疾患、器質性心智疾患、衝動控制疾患、物質濫用疾患) 與健康對照組 (一等親以內無重度憂鬱或其他精神病), 年齡 18 至 65 歲。西醫診斷 (依據 DSM-IV 診斷準則) (American Psychiatric Association, 1994a; 1994b) 均符合重鬱症之定義。
- 三、重鬱症患者須至少三個月未使用精神藥物, 以減少對於基因表現之可能影響。
- 四、由中醫師診察後判斷證型 (依據中國中西醫結合研究會精神病專業委員會之證型規範): 肝鬱脾虛、肝血瘀滯、心脾兩虛、脾腎陽虛。
- 五、主持人與共同主持人於第二年度互調, 但依然由精神科專科醫師、也就是目前的共同主持人藍先元醫師利用漢氏憂鬱量表 (Hamilton Depression Rating Scale) (Hamilton, 1960) 評估症狀嚴重度, 重鬱症患者其總分須高於或等於 18 分, 健康對照組須低於或等於 3 分。漢氏憂鬱量表內容如下:

漢氏憂鬱量表 (HDRS)

提示：在每一項中，選擇最符合病患狀況之分類

1. 憂鬱情緒 (悲傷、無望、沒有價值)

0：無

1：只有在詢問時才會說出這些感覺。

2：自發地以言語表達這些感覺。

3：以非言語方式表達這些感覺，如：面容表情、聲音、飲泣之傾向等。

4：病患自發性的言語或非言語的表達。

2. 愧疚感 (或罪惡感)

0：無

1：自責，覺得拖累人們。

2：自我愧疚或罪惡的想法，反覆念及過去的錯誤或罪惡的行為。

3：認為現在罹病是一種懲罰，罪惡妄想。

4：有指責、斥罵的聽幻覺，或有威脅性的視幻覺。

3. 自殺

0：無

1：覺得生活沒有意思。

2：希望自己死了，或有任何自己可能死的想法。

4. 失眠，早期型

0：入睡無困難。

1：抱怨有時難以入睡，如：多於半小時。

2：抱怨每晚皆難入睡。

5. 失眠，中期型

0：無困難。

1：抱怨夜裡睡不安穩 (包括多夢)，有些困擾。

2：夜間清醒過來 (除如廁外，離床即評2)，甚感困擾。

6. 失眠，晚期型

0：無困難。

1：很早醒來，但能再度入睡，有些困擾。

2：醒來後即無法入睡，甚感困擾。

7. 工作及活動狀況

- 0：無困難。
- 1：自覺或認為從事種種的活動、工作或平常的嗜好時，無力、疲倦或軟弱。
- 2：自述對工作或平常的嗜好失去興趣，或間接地由生活無精打采、躊躇、缺乏決斷等表現出來（覺得必須勉強自己去工作）
- 3：工作量或確實花在活動的時間減少；若住院中，除病房日常生活基本活動外，從事活動（病房的安排或自己的興趣）的時間不超過3小時即評3。
- 4：因現病況而停止工作；若住院中，除日常生活基本活動，不參加任何活動或需人協助才能完成病房日常生活基本活動即評4。

8. 遲滯現象（思考和說話的緩慢，注意力減低，活動量減少）

- 0：正常的說話和思考。
- 1：會談時顯得稍微遲滯。
- 2：會談時有明顯的遲滯。
- 3：會談難以進行。
- 4：完全靜呆，無法會談。

9. 焦躁

- 0：無
- 1：玩弄手、毛髮等，顯得有些坐不安穩。
- 2：扭絞自己的手，咬指甲，拉扯頭髮，咬嘴唇等，相當坐不安穩（任何站起來的舉動評2）

10. 焦慮，精神層面

- 0：無困難。
- 1：自覺緊張，容易生氣。
- 2：擔心各種小事情。
- 3：自表情言談中很明顯表露不安的狀態。
- 4：不必詢問就可看出害怕。

11. 焦慮，身體層面

0：無

1：輕微，詢問時才會提出。

2：中度，會主動抱怨症狀。

3：嚴重，要求檢查、治療，反覆提出。

4：無法承受，以致一般日常生活功能難以進行。

(附註：焦慮伴有的生理症狀，如：胃腸系統—口乾、脹氣、消化不良、腹瀉、絞痛。心臟循環系統—心悸。呼吸系統—過度換氣、嘆氣。其他—多汗、頻尿、頭痛。)

12. 身體症狀，胃腸系統。

0：無

1：食慾不振，不覺得餓，但進食不需他人鼓勵。

2：若無他人督促則不願進食；要求通便劑或其他解決胃腸症狀的藥物。

13. 身體症狀，全身性。

0：無

1：感覺頭、背、肢體沉重；背痛、頭痛、肌肉酸痛；缺乏精力，易疲倦。

2：任何明確的症狀即評2。

14. 生殖系統症狀，如性慾減低，月經失調。

0：無

1：輕微，有些困擾。

2：嚴重，甚感困擾。

3：不明確或病患不願回答。

15. 慮病現象

0：無

1：過分關心身體的狀況。

2：一直顧慮身體的健康情形。

3：常抱怨不適，主動要求協助。

4：慮病妄想。

16. 體重減輕

(甲)依病史評分

- 0：無減輕。
- 1：體重似有減輕且與現在病情有關。
- 2：確實體重有減輕（依病患的描述）。

(乙)病房每週依實際體重變化評分

- 0：每週減輕 0.5 公斤以下。
- 1：每週減輕 0.5~1 公斤。
- 2：每週減輕 1 公斤以上。

17. 病識感

- 0：認為自己情緒憂鬱，而且是處於病態。
- 1：認為自己生病了，但歸於食物不佳天氣、工作過度、感冒，需要休息等。
- 2：否認自己有任何的不舒服或生病。

18. 一日的情緒變化：午前較差。

- 0：無
- 1：輕微，差異度輕微，僅情緒上的感覺。
- 2：嚴重，差異度大，會影響日常活動的表現。

19. 自我感消失和現實感消失（如感覺周圍人、事、物不真實；虛無意念）

- 0：無
- 1：輕微：詢問時才說出。
- 2：嚴重：會主動提出。
- 3：極嚴重：會重覆提出，以致一般日常生活功能難以進行。

20. 妄想症狀

- 0：無
- 1：輕微多疑，自以為不可能但仍會想。
- 2：中度多疑，自以為可能但不確定。
- 3：關係意念。
- 4：關係妄想和被害妄想。

21. 強迫意念和強迫行為

0：無

1：輕微：日常生活不受干擾。

2：嚴重：日常生活受干擾。

22. 無助感

0：無

1：只有在詢問時，才會表達有此感覺。

2：病患主動表達他的無助感。

3：需要督促、指引、鼓勵，才能完成個人衛生或病房日常生活基本活動。

4：需要他人協助穿著、梳理進食、個人衛生或床邊事務。

23. 無望感

0：無

1：繼續地懷疑“情況會改善”，但經鼓勵、支持可化解。

2：持續地感覺無望，經鼓勵、支持，可化解。

3：表達他的沮喪、失望，對未來的悲觀，經鼓勵、支持，無法化解。

4：自發地且不適切反覆敘述“我永遠不會好起來”。

24. 無用感（從輕度的喪失自尊、自卑感、自我貶低至妄想程度的無用感）

0：無

1：只有在詢問時才敘述自覺沒有用（或失去自尊）。

2：自發地敘述自覺沒有用（或失去自尊）。

3：病患主動地說自己一文不值，一無是處。

4：自覺沒有價值到妄想程度（的無用感），如“我是一堆廢物”或同等之言語。

- 六、基因選殖：設計目標基因引子進行聚合酵素連鎖反應 (Polymerase Chain Reaction, 簡稱 PCR)，將 PCR 產物以 TOPO TA Cloning Kit. (Invitrogen) 進行 PCR 產物選殖，將 plasmid DNA 經萃取定序確認後，即為含有目標基因之 plasmid DNA。
- 七、每位個案抽取周邊靜脈血 8ml 以進行基因表現分析，收集白血球後以 TRIZOL 試劑套組 (Invitrogen) 萃取 RNA，RNA 以分光光度計進行 OD 260/280 偵測定量與純度後保存於 -80°C 冰箱。
- 八、cDNA 合成：取 2.5 μ g RNA，加入 0.25 μ g/ μ l random primer 與 0.25 μ g/ μ l oligo dT15 primer 後補水至 12 μ l，混合均勻後以 70°C 反應 5 分鐘後，置於冰上 2 分鐘，再依序加入 4 μ l 5x M-MLV reaction buffer，3 μ l 10 mM dNTP，Recombinant RNasin[®] Ribonuclease Inhibitor 25units，M-MLV Reverse Transcriptase (Promega Madison, WI) 200units，混合均勻後以 25°C 反應 10 分鐘、37°C 反應 90 分鐘、70°C 反應 10 分鐘後中止反應。
- 九、real time PCR 反應：參考 Ball et al (2003) 與 Kreuzer et al (1999) 的實驗方法，分別加入下列物品：1 μ l cDNA、4 μ l ddH₂O、4 μ l 600 nM forward primer、4 μ l 600nM reverse primer、12 μ l 2x iQ[™]SYBR[®]Green Supermix kit (Bio-Rad)，混合均勻後以 iCycler real time PCR (BIO-RAD) 機器進行基因表現及時定量偵測 Ct 值 (threshold cycle)，反應條件為 Step 1：95°C 4 min、Step 2：95°C 30 sec、Step 3：58°C 30 sec、Step 4：重覆進行 Step 2 與 Step 3 共 45 次循環、Step 5：55°C 每隔 10 秒上升 0.5°C 上升至 95°C 停止。
- 十、目標基因之 mRNA 表現量再以 GAPDH 之表現量進行標準化、並以 2- $\Delta\Delta$ CT 法 (Livak et al 2001) 呈現其表現量。
- 十一、統計分析：資料分析使用 SPSS 8.0 軟體 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) 而 Student's test, ANOVA 與 Non-parametric test 計算平均值 (Means)；chi-square test 用以計算比例，所有統計皆為 two-tailed，P values < 0.05 被接受為具有顯著差異。

參、結果

- 一、由精神科門診陸續收集由精神科醫師診治後符合 DSM-IV 憂鬱症診斷標準之患者，經患者同意進入研究並簽署同意書後，收集基本資料。並由精神科醫師診斷（DSM-IV 診斷準則與漢氏憂鬱量表）及中醫師進行中醫辨證分型。
- 二、第一年度收集研究個案數為 35 名，年齡平均為 32.77 ± 11.17 歲、教育程度平均 13.03 ± 2.36 年、漢氏憂鬱量表平均分數 30.88 ± 9.38 分。中醫辨證分型個數分別為，肝鬱脾虛型 14 人、肝血鬱滯型 7 人，心脾兩虛型 9 人、脾腎陽虛型 5 人。我們同步收集對照組（符合一等親當中無重度憂鬱或其他精神病），第一年度對照組有 35 名，年齡平均為 27.17 ± 5.6 歲、教育程度平均 16.19 ± 2.1 年、及漢氏憂鬱量表平均分數 1.31 ± 2.13 分。
- 三、第一年度實驗室 cDNA microarray 之平台因靈敏度考量，取而代之以為 Real time PCR。為更快速的找到影響疾病的基因，我們建立一個 Real time PCR 偵測平台。
- 四、至第二年度，共收集研究個案數為 99 名，對照組 96 名。其中，有各 88 名年齡與性別配對的個案組與對照組（Table 1）。88 名個案中，中醫辨證分型個數分別為，肝鬱脾虛型 37 人、肝血鬱滯型 10 人，心脾兩虛型 33 人、脾腎陽虛型 8 人。
- 五、第二年，已完成選殖 PSAT1、RGS4、SHMT2、CSRP1、GCAT、ASCT1、CHRNA7、RGS2、GAD1、GRM3、SLC1A3、COMT、NRG1、DTNBP1、SELENBP1、GRIK5 與 PPP3CC 等基因與其 Relative standard curve，每個基因所使用之引子皆符合下列標準， $R^2 > 0.9$ 、PCR 效能在各基因間效能皆 $> 95\%$ ，使用 Real-time PCR 同步分析，使用此方法我們可同時觀看一個檢體在一次上機中多基因的表現量，本實驗室已建立整個流程。
- 六、兩年結束後，共 88 名年齡與性別配對的個案組與對照組相較，SHMT2 之 mRNA 表現於個案組低於對照組：於病患組與對照組分別為 2.3 ± 8.6 與 29.9 ± 27.1 ($p = 0.005$)。GRM3/GAPDH 於病患組之表現也明顯低於對照組，分別為 4.1 ± 9.1 與 35.1 ± 29.7 ($p = 0.03$) (Table 2)。

- 七、PSAT1 基因表現 (PSAT1/GAPDH) 於個案組男性顯著地高於與女性 (2.6 ± 1.2 vs. 0.1 ± 0.8 , $p=0.004$) (Table 3), 顯示性別可能會造成基因表現差異。
- 八、此外, 目前已完其他 14 個檢體測定 (如上述)。我們發現有幾個基因的 mRNA 表現與漢氏憂鬱量表的分數有顯著相關性, 包括 DTNBP1 ($r = -0.40$; $p = 0.025$)、SELENBP1 ($r = -0.45$; $p = 0.020$)、與 NRG1 ($r = -0.39$; $p = 0.045$) (Table 4)。但是, 目前尚未見基因表現與中醫辨證分型之間的相關性, 可能是因為有些分型的個案數還不是很足夠所致, 我們還會繼續收案, 以擴大樣本數。

肆、討論與建議

一、目前診斷精神疾病，包括憂鬱症，仍端賴症狀學表現，缺乏可靠的實驗室診斷工具。然而有關精神疾病的週邊生物標記(如基因表現)的研究目前相當有限(Lai et al, 2003)，很重要的原因是不易收集未用藥的患者(因藥物有可能影響基因表現)。

本研究的優勢之一在於所收集的憂鬱症患者須至少三個月未使用精神藥物，以減少對基因表現之可能影響。

再者，個案組與對照組也進行性別與年齡良好的配對，以減少因基本資料之不同所造成的基因表現之差異。

二、RNA 的儲存一直是個難題，早期本實驗室是先將 RNA 儲存起來，待收集至一定數量之後再上機，目前實驗室發現二個月前的 RNA 檢體降解速度非常快，而臨床檢體無法一次收集，為解決此問題採用先到先做的策略，檢體一收到立即上 Real time PCR 偵測平台，一次看完所相關的基因表現，再藉由平台中所設計的 internal control 來校正不同批次上機之結果。

三、實驗室 cDNA microarray 之平台因靈敏度考量，取而代之為 Real time PCR 偵測平台建立，目的在於能夠更靈敏的看到基因表現。我們將 17 個可能與疾病相關基因在同一次上機，一次可以同時看見 17 個基因表現，因此，可更快速的找到影響疾病的基因。分析方法採用相對標準曲線的方法(relative standard curve method)。利用 plasmid DNA 完成之 standard curve，每個基因所使用之 primer 皆符合下列標準： $R^2 > 0.9$ 、且 PCR 效能在各基因間效能皆 $> 95\%$ 。

四、本計劃雖已屆滿兩年、並順利完成。不過，基本上，這只是初步平台之建立，主持人、共同主持人、與研究團隊將持續進行本研究。首先，我們也正新增其他基因表現之檢測：針對最新發現的與憂鬱症相關之基因，如 DISC1、SHMT1、CD38 等進行檢測，這些都是與精神疾病，包括憂鬱症，有非常重要關聯性之基因，以 DISC1 基因為例，英國愛丁堡大學人類分子遺傳學暨精神醫學研究團隊最近於一個有多人罹患精神疾病的蘇格蘭大家庭中分辨出 DISC1 基因，他們並利用化合物在兩批老鼠身上引發 DISC1 基因兩種不同的突變，其中一批後來出現類似精神分裂的症狀，另一批出現憂鬱的症狀，而在分別施予治療精神分裂症狀和抗憂鬱的藥物之後，它們

的症狀都有改善 (Hodgkinson et al, 2004 ; Ma et al, 2002)。

我們已設計出他們的 primers (見下)、並正進行這些基因的 mRNA 表現量檢測。

DISC1 的 Primers:

Sense: TTTGAAGTATTTGGGCAGGTGAGT

Anti-sense: ACTCTAAGACCAAGCAAAGACAACAGA

Product size: 78 bp.

CD38 的 Primers:

Sense: CGATGCGTCAAGTACTGAAATT

Anti-sense: TTGAAATAAATGCACCCTTGAAAG

Product size: 91 bp.

SHMT1 的 Primers:

Sense: AGGAAATGCCCATGTCCACAG

Anti-sense: TACAGCAGAAGCCTCAGAAGC

Product size: 152 bp.

此外，除了本報告已完成的 17 個基因，本實驗室也透過 NCBI 之 UniGene 資料庫 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=unigene>) 找出 165 個同時在大腦及週邊白血球有 mRNA 表現的與神經/精神疾病相關的基因，亦已完成 primers 之設計，將陸續進行基因表現量之測定。

- 五、我們也將繼續個案組患者與正常對照組之收案，以擴大研究樣本。由於目前樣本數尚不足以有效探討中醫證型分型與各個基因表現之關聯性，擴大研究樣本後亦有利於中醫證型分型與各個基因表現之關聯性分析。

六、過去本研究室對於蛋白質表現之測定，經驗較少，目前正著手進行，特別是本研究有顯著差異的基因將優先進行。

此外，這些基因對於功能的影響也相當重要。以 SHMT2 為例，SHMT2 與 NMDA 相關胺基酸（如 glycine）有關，我們也正在測定憂鬱症患者與健康對照組血清 glycine 等 NMDA 相關胺基酸濃度，以進一步分析 SHMT2 mRNA 表現與這些胺基酸濃度之關聯性。

七、本研究結果，特別是有關於 SHMT2 mRNA 表現的部分，也支持憂鬱症的 NMDA 假說。

八、未來的研究也可進一步探討憂鬱症患者於發病期與緩解期、或是發病早期與慢性期、以及藥物反應良好者與反應不佳者是否也有不同的基因 mRNA 表現。甚至對於高危險族群之早期偵測與預防可能也有應用價值。

九、除了憂鬱症，其他神經／精神疾患或其他中樞神經疾患有許多也是所謂的複雜疾病（complex disease），由於活體腦組織取得不易，本研究計畫所建立之平台也可應用於其他神經／精神疾患病因之探討。

總結，本研究已建立基因之 mRNA 表現之測定平台，也為憂鬱症的後續研究奠定基礎。全球每十五個人當中，大約有一個人會出現憂鬱症，許多病例發生在具有某種精神病史的家庭，而這暗示這些疾病跟基因有很大的關聯。

然而，基因與環境皆對憂鬱症的發生皆具有重要影響性，例如，晚近研究發現晝夜節律（circadian rhythm）的人為改變與情緒穩定度及憂鬱症的發生有關，故而，輪班制職業族群其生理時鐘的調節變異對自殺行為的影響值得注意。其次，前驅型研究指出：憂鬱患者其血漿基因表現之測定亦同時受基因與環境因素之影響，故更適合作為憂鬱症病因之探討。

進而言之，與憂鬱症相關也有許多重要的議題。例如，憂鬱症被認為是自殺行為重要的原因，其中青壯年就業人口的折損，造成巨大的社會損失。精神科醫師以及公衛學者也一致認為自殺行為極難預測。血清素回收器（serotonin transporter, 5-HTTLPR）的基因型與抗壓性與自殺的風險均有初步的相關報導，但未明確。傳統上認為憂鬱症患者因為疏於治療而導致自殺，但近年來數個大規模的回溯性研究發現，抗鬱劑治療似乎不盡然能降低憂鬱症患者的自殺意圖，甚至選擇性血清素回收抑

制劑 (selective serotonin reuptake inhibitor, SSRI) 可能還有增加的風險，美國 FDA 已在 2004 年針對抗鬱劑提出警語：自殺意念可能在任一種抗鬱劑治療的早期出現或增劇。而究竟是哪些因素影響著憂鬱症患者的自殺意圖，目前仍缺乏前瞻性之研究。本研究平台之建立也有助於憂鬱相關議題（如自殺防治）之探討。

誌謝

本研究計畫承蒙行政院衛生署中醫藥委員會，計畫編號 CCMP94-RD-041 提供經費贊助，使本計畫得以順利完成，特此誌謝。

伍、參考文獻

1. 陳九如：黃帝內經今義。正中書局，1996。
2. 王彥恆：實用中醫精神病學。人民衛生出版社，2000。
3. American Psychiatric Association. Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders (Fourth Edition). Washington, DC. 1994a.
4. American Psychiatric Association. Structured Clinical Interview for DSM-IV. American Psychiatric Press: Washington, DC. 1994b.
5. Ball TB, Plummer FA, HayGlass KT.: Improved mRNA quantitation in LightCycler RT-PCR. *Int Arch Allergy Immunol* 2003; 130: 82-86.
6. Berman RM, Cappiello A, Anand A, Oren DA, Heninger GR, Charney DS, Krystal JH.: Antidepressant effects of ketamine in depressed patients. *Biol Psychiatry*. 2000; 47: 351-354.
7. Hamilton M.: A rating scale of depression. *J Neurol Neurosurg Psychiat* 1960; 23: 56-62.
8. Hodgkinson CA, Goldman D, Jaeger J, Persaud S, Kane JM, Kipsky RH, Malhotra AK.: Disrupted in schizophrenia1(DISC1): association with schizophrenia, schizoaffective disorder, and bipolar disorder. *Am J Hum Genet*. 2004; 75: 862-872.
9. Kanai and Hediger.: The glutamate and neutral amino acid transporter family: physiological and pharmacological implications. *Eur J Pharmacol*. 2003; 479: 237-247
10. Kreuzer KA, Lass U, Bohn A, Landt O, Schmidt CA.: LightCycler technology for the quantitation of bcr/abl fusion transcripts. *Cancer Res* 1999; 59: 3171-3174
11. Lai IC, Hong CJ, Tsai SJ.: Expression of cAMP response element-binding protein in major depression before and after antidepressant treatment. *Neuropsychobiology*. 2003; 48: 182-185.
12. Livak KJ, Schmittgen TD.: Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻($\Delta\Delta C(T)$) Method. 2001; 25: 402-408

13. Ma L, Liu Y, Ky B, Shughrue PJ, Austin CP, Morris JA.: Cloning and characterization of DISC1, the mouse ortholog of DISC1 (disrupted-in-schizophrenia 1). *Genomics*. 2002; 80:662-672.
14. Rocc P, De Leo C, Eva C, et al.: Decrease of the D4 dopamine receptor messenger RNA expression in lymphocytes from patients with major depression. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2002; 26: 1155-1160.

陸、表

Table 1 Characteristics of Depression Patients and Matched Healthy Controls

	Depression Patients n = 88	Healthy Controls n = 88	p value ^a
Gender (No., female/male)	57/31	57/31	NS
Age (years)	30.4 (7.3)	29.1 (5.8)	NS
Education (years)	14.0 (3.7)	15.3 (6.0)	NS
Age of illness onset (years)	26.3 (4.9)	-	-
Hamilton Depression Rating Score	32.8 (9.0)	1.4 (2.4)	<0.0001

Standard deviations in parentheses.

^a As assessed by two-sample t-test, or χ^2 test where appropriate.

Table 2 mRNA Expression in Depression Patients and Matched Healthy Controls

mRNA Expression	Depression Patients n = 88	Healthy Controls n = 88	p value ^a
SHMT/GAPDH	2.3 (8.6)	29.9 (27.1)	0.005
GRM3/GAPDH	4.1 (9.1)	35.1 (29.7)	0.03

Standard deviations in parentheses.

^a As assessed by two-sample t-test.

Table 3 mRNA Expression of PSAT1 in Male and Female Depression Patients

mRNA Expression	Male Patients n = 31	Female Patients n = 57	p value ^a
PSAT1/GAPDH	2.6 (1.2)	0.1 (0.8)	0.004

Standard deviations in parentheses.

^a As assessed by two-sample t-test.

Table 4 Correlation Between mRNA Expression Levels and Hamilton Depression Rating Scale (HDRS) Scores

mRNA Expression	r value	p value
DTNBP1/GAPDH	-0.40	0.025
SELENBP1/GAPDH	-0.45	0.020
NRG1/GAPDH	-0.39	0.045

