

## 中文摘要

此研究的目的是在於探討大白鼠海馬迴 CA1 突觸之中，細胞本體 theta-頻率波的刺激對 1 train 的 100 Hz 高頻率刺激所引發之早期長期效能增益的影響以及其作用機制。

應用標準的電氣生理學之細胞外記錄技術，放置一支用以記錄的微細玻璃電極（填充 3M 的 NaCl，電阻大約是 3-5 MO）在 CA1 的 stratum radiatum 區域上。另外兩支雙極不銹鋼刺激電極分別為擺置在 stratum radiatum 上，用以刺激 Schaffer collateral branch 的 S1 電極；以及擺放在 alveus 處的 S2 電極，S2 電極是用來引發 CA1 錐形細胞之回溯性動作電位。

首先我們要確認，經由 S1 給予單一 train 的 100 Hz 強直刺激（TS；100 個刺激方形波/秒）能夠引發早期長期效能增益，此增益現象會在高頻率刺激後 60 分鐘消退至 baseline，（E-LTP =  $125.2 \pm 5.40$  %， $n=10$ ， $p < 0.05$ ，paired t-test）。5 trains 和 9 trains 的 100 Hz 強直刺激，則可以引發出維持長達 270 分鐘的晚期長期效能增益（L-LTP，分別為  $126.3 \pm 9.44$  %， $n=8$ ， $p < 0.05$ ； $151.9 \pm 17.45$  %， $n=8$ ， $p < 0.05$ ，paired t-test）。如果回溯性 somatic spiking 在強直刺激後 20 分鐘經由 S2 給予 theta-頻率波刺激（TBS）引發，則經由 S1 給予單一 train 的強直刺激所引發的早期長期效能增益會被鞏固成晚期的長期效能增

益。此種晚期長期效能增益的現象，也可以在 S1 強直刺激後 60 分鐘時，配合 S2 給予 theta-頻率波刺激的組別中觀察到；但是，如果 TBS-TS 的間距增加到 120 分鐘，則僅能引發早期的長期增益，相同的結果也在 TBS 和 TS 先後順序調換的實驗中觀察到。

給予 NMDA 接受器的拮抗劑  $D,L$ -APV ( 50  $\mu$ M )，並不會影響早期長期增益被鞏固為晚期長期增益，因此推測此為 NMDA-independent 的鞏固機制。給予 L-型的受電壓調控之鈣離子通道 ( VGCCs ) 的拮抗劑---nimodipine ( 10  $\mu$ M ) 和 PKC 蛋白質激素的阻斷劑---chelerythrine ( 3  $\mu$ M )，用以阻斷細胞本體 TBS 使 E-LTP 被鞏固為 L-LTP 的作用，推測 TBS 刺激細胞本體會使鈣離子經由 VGCCs 進入細胞質，並且進一步活化 PKC 而使單一 train 強直刺激所引發的早期長期增益被鞏固成晚期長期增益。

綜合此實驗結果可以推論，somatic spiking 會使細胞本體合成新的訊息分子，而使受刺激突觸之 E-LTP 被強化成 L-LTP。然而，此作用需要鈣離子經 CA1 細胞本體上 L-型 VGCC 進入細胞內和 PKC 的活化。

## Abstract

The purpose of this study to investigate the effect of somatic  $\theta$ -burst stimulation on expression of early phase long-term potentiation ( LTP ) induced by 1 train of tetanus stimulation comprising 100 pulses at 100 Hz, at CA1 synapses in rat hippocampus, and the underlying cellular mechanisms.

Standard electrophysiological technique for field-potential recording in hippocampal slices was employed. A glass recording electrode ( filled with 3M NaCl, 3-5 M $\Omega$  ) was positioned in stratum radiatum, and two bipolar stainless stimulating electrodes were positioned in stratum radiatum for stimulation of Schaffer collateral branch fibers ( S1 ) and in alveus for eliciting of antidromic spike of pyramidal cells ( S2 ).

We first confirmed that, while single train of tetanus stimulation ( TS ) at 100 Hz ( 100 pulses ) delivering via S1 only induced early phase LTP that started decaying to baseline level 60 minutes after high frequency stimulation ( E-LTP =  $125.2 \pm 5.40$  % ,n=10,  $p < 0.05$ , paired t-test ), 5 and 9 trains of TS at 100 Hz induced late phase LTP that could last for at least 270 minutes ( respectively,  $126.3 \pm 9.44$  % , n=8,  $p < 0.05$  ;  $151.9 \pm 17.45$  % , n=8,  $p < 0.05$ , paired ttest ). Early phase-LTP induced by single train of TS via S1 was consolidated to late phase-LTP if somatic spiking was antidromically elicited 20 mins after TS using theta-burst stimulation ( TBS ) paradigm delivered through S2. L-LTP was also induced by single train of TS via S1 when somatic spiking

elicited using TBS via S2 was given 60 mins after TS. Only E-LTP was induced if interval between TBS-TS was increased to 120 mins. Similar results were obtained when the temporal order of TS and TBS was reversed.

Application  $D,L$ -APV ( 50  $\mu$ M ), an NMDA receptor antagonist, has no effect on the consolidation of early phase-LTP to late phase-LTP by somatic -burst stimulation, suggesting a NMDA receptors independent mechanism is involved. The effect of somatic TBS was blocked upon bath application of Nimodipine, the antagonist of L-type voltage-gated calcium channels ( VGCC ), and blocker of protein kinase C ( PKC ) pathway, suggesting influx of calcium into cytoplasm via VGCC during somatic TBS which in turn activate PKC are crucial factors for consolidation of early phase LTP induced by single strain of TS into late phase LTP.

Taken together, the results of this study provide information on temporal profile of signal molecules generated in soma by somatic spiking which trigger further synthesis of new signal molecules and consolidate E-LTP at tagged synapses to L-LTP. The above process require influx of calcium into soma of pyramidal cells via L-type VGCC, and activation of PKC.

## 第一章：序論

神經系統由神經細胞 (neuron) 以及神經膠細胞 (neuroglial) 共同組成，神經細胞負責訊息的接收、統整以及反應；神經膠細胞負責養分的供給、支持以及保護神經系統的結構。神經系統接收體外環境的訊息，將訊息傳入中樞神經系統整合之後，經傳出神經調節肌肉收縮及腺體分泌來反應外在環境的變化以及維持體內的恆定。

### 第一節：神經細胞之間訊息的傳遞

#### (1.) 神經細胞的結構：

單獨一個神經細胞又稱為神經元，神經元的構造包括細胞本體 (cell body; soma)、樹突 (dendrite) 和軸突 (axon) 等三大部分。細胞本體具有細胞核，神經細胞大部分的蛋白質都在細胞本體合成 (Davis et al., 1987; Kleiman et al., 1990)。樹突狀似樹枝，分支數目多，負責接收訊息，訊息接收後傳給細胞本體；軸突數目較少，可以將訊息由細胞本體傳給另一神經元、肌肉或是腺體，大部分的軸突會有神經膠細胞 (例如：許旺氏細胞、oligodendroglia) 圍繞形成髓鞘 (myelin sheath)，使得與外界絕緣而加快訊息的傳遞。

## ( 2.) 神經細胞之間的連結：

神經元與神經元連結之處最早由 Sherrington 在 1906 年定義為突觸 ( synapse )。突觸有兩端：突觸前端 ( presynaptic ) 和突觸後端 ( postsynaptic )，突觸前端通常是軸突末梢，突觸後端可能是另一個神經細胞的樹突、軸突或是細胞本體，在突觸前與突觸後細胞膜之間所形成的空間稱為突觸裂隙 ( synaptic cleft )，突觸包含了突觸前神經軸突的末梢、突觸裂隙和突觸後神經樹突、軸突或是細胞本體等三部分。

依據神經細胞的連結方式，突觸可以分為電性突觸 ( electrical synapses ) 和化學性突觸 ( chemical synapses ) 兩大類。哺乳類動物大部分的突觸都是屬於化學性突觸，但仍有少數是以電性突觸的方式來傳遞訊息。若神經細胞以 gap junction 的方式相連結，則突觸前和突觸後神經細胞的細胞膜距離就僅以 3 nm 相隔，此種通道的孔徑大、不具開關性、對離子也不具選擇性，所以使得細胞內離子可以直接相互流通快速傳達訊息，此種連接方式之突觸稱為電性突觸。這類突觸常見於無脊椎動物的感覺神經與運動神經之連結處，但在哺乳類動物神經系統中則相當罕見，只出現在一些 non-neural cells，包括神經膠細胞、上皮細胞、平滑肌細胞、心肌細胞、肝細胞和一些線體細胞 ( Nicholls et al., 1992 )。

所謂化學性突觸，是指突觸前神經細胞利用釋放化學物質來當媒介，將訊息傳遞給突觸後神經細胞。化學性突觸為哺乳類動物中樞神經系統中最常見的突觸類型，此類突觸藉由細胞外纖維蛋白的作用，使突觸前神經細胞的末端與突觸後神經細胞之細胞膜間得以維持一定距離，約 20-50 nm，形成突觸裂隙（Shepherd and Koch, 1998）。突觸前神經細胞的軸突末梢中含有許多突觸小泡（synaptic vesicle），這些突觸小泡內含有神經傳導物質（neurotransmitter），此神經傳導物質可能為興奮性神經傳導物質，如 glutamate；或是抑制性神經傳導物質，像 Glycine 及 GABA（ $\gamma$ -amino butyric acid），而且軸突末梢中也具有許多粒腺體，可以供給突觸小泡釋放時所需的能量。

### （3.）神經訊息的傳導：

當突觸前神經細胞受到刺激而引發動作電位，並傳達至神經末梢時，會使神經末梢的細胞膜去極化，細胞膜去極化會使受電位調控的鈣離子通道（voltage-gated calcium channels）打開，由於細胞外的鈣離子濃度大於細胞內鈣離子濃度，所以會使鈣離子以被動運輸方式經由通道進入細胞內，提高細胞內鈣離子的濃度，因此造成軸突末梢中的突觸小泡和微小纖維之間的連結斷裂，促使突觸小泡和突觸前細胞膜融合而以胞泄作用（exocytosis）的方式將神經傳導物質釋放至突

觸裂隙中 ( Hanson et al., 1997 ; Neher, 1998 ), 突觸前神經軸突末梢可以釋放突觸小泡的區域被稱為作用區 ( active zone ), 神經傳導物質被釋放後會與突觸後細胞膜上的接受器結合, 使接受器被活化或是打開, 使得細胞內外離子得以藉由被動運輸的方式進出突觸後神經細胞。

glutamate 是哺乳類動物中樞神經系統中最常見也是被廣泛研究的興奮性神經傳導物質, 突觸小泡釋放 glutamate 後, glutamate 會與突觸後神經細胞膜上各種相關的接受器結合, 如 AMPA (  $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionate ) 接受器, 接受器與 glutamate 結合後會被開啟, 因為細胞內外鈉、鉀離子的濃度差異所以會使得鈉離子往細胞內流而鉀離子往細胞外流出, 而產生興奮性突觸後電位 ( EPSP : excitatory postsynaptic potential )。

相對於興奮性的神經傳導物質, 抑制性的神經傳導物質包括 Glycine 及 GABA (  $\gamma$ -amino butyric acid ) 兩種 ( Jonas et al., 1998 ), 這兩種神經傳導物質所調控的離子通道最主要是使氯離子 ( Cl<sup>-</sup> ) 進行通透, 所以當 Glycine 及 GABA<sub>A</sub> 接受器被活化時, 會使得氯離子進入突觸後神經細胞質內, 由於氯離子的平衡電位約為 -65 mV, 和細胞休息時的靜止膜電位相近, 所以會使得細胞膜處於穩定的狀態而不易受外界刺激而興奮, 因此達到抑制的效果 ( Nicoll et al., 1990 )。



膜電位經由時間整合( temporal summation )或是空間整合( spatial summation ) 修飾後能使細胞膜去極化的程度變大，而形成較大之興奮性突觸後電位，當細胞膜電位到達一定閾值時就能形成動作電位而使訊息繼續往下一個細胞傳達 ( Bear et al., 2001 )。

#### ( 4. ) Glutamate 接受器的簡介：

Glutamate 是哺乳類動物中樞神經系統中最常見也是被廣泛研究的興奮性神經傳導物質，glutamate 調控的接受器類型很多，若以神經藥理學的分析，可以依據接受器對不同致效劑( agonist )的敏感度，將 glutamate 接受器區分為: AMPA 接受器 ( AMPA-gated receptors ) NMDA 接受器 ( NMDA-gated receptors ) 以及 kainate 接受器三種類型。AMPA 接受器和 NMDA 接受器存在突觸後細胞膜上，調節著中樞神經系統中大部分的快速興奮性突觸的傳導 ( Nicoll et al., 1990 )，kainate 接受器也存在於中樞神經系統中，但它有何功能則還不清楚。

AMPA 接受器可以被 AMPA (  $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionate ) 所活化，AMPA 共含有 GluR1~GluR4 四種次型接受器 ( subtype ) ( Hollmann and Heinemann, 1994 )，AMPA 接受器本身就是一種離子通道，它允許鈉離子和鉀離子的通透，但大部分的 AMPA 通道對鈣離子的通透度相當低，這與 AMPA 接受器組成的次

單元體有關，一般 AMPA 接受器是由 4 至 5 個次單元體所組成，不同次單元體的組成方式會使接受器具有不同的性質，如 AMPA 接受器的次單元體中若含有 GluR2 次單元體的話，則該接受器對於鈣離子的通透度較低（Geiger et al., 1995；Hollmann and Heinemann, 1994）。在中樞神經系統中的神經細胞，其 AMPA 接受器大多數皆含有 GluR2，如海馬體中之 pyramidal cell（Angulo et al., 1997），但仍有些中間神經元（interneuron）的 AMPA 接受器不具有 GluR2 次單元體（Jonas et al., 1994）。當 AMPA 接受器被活化之後，會使得鈉離子流進細胞內，而造成細胞膜快速去極化而形成興奮性突觸後電位，若經時間整合或空間整合則可能形成動作電位，使訊息往下一個神經細胞傳達。

NMDA 接受器可以被 NMDA（N-methyl-D-aspartate）所活化，NMDA 可細分為 NR1~NR4 四種次單元體（Hollmann and Heinemann, 1994），該接受器的作用與 AMPA 相似，也是准許鈉離子和鉀離子的通透，唯一差異的是 NMDA 接受器會使鈣離子進行通透，當 NMDA 接受器被活化時，鈣離子會流進細胞內，鈣離子的進入會活化次級傳導物質進而傳達神經訊息。由於 NMDA 調控的通道內側含有鎂離子的結合區，鎂離子的結合會使得 NMDA 調控的通道無法進行離子通透，所以在一般的細胞膜電位下，NMDA 接受器是不會被活化的，

當神經細胞受到某種程度的刺激後，細胞膜電位達到一定的去極化程度之後，會使得鎂離子被排斥而離開 NMDA 接受器，接著 NMDA 接受器便可以進行離子通透，所以 NMDA 接受器也是一種 voltage-dependent 的接受器 ( Nicoll et al., 1990 )。

## 第二節：大腦學習與記憶的調控區---海馬體

### ( 1. ) 海馬體的簡介：

海馬體是大腦顳葉的皮質之一，在 1960 年代，海馬體首度從大腦中被游離出來並製作成腦組織薄片，而且可以用 *in vitro* 的培養方式讓腦組織薄片在體外保持數小時的活性，這樣的腦組織薄片之神經纖維可以用電極刺激並記錄突觸的反應，因此海馬體成為研究神經傳導的好區域。

海馬體由兩簇 C 型的神經元聚集所組成，即 Ammon's horn 以及 dentate gyrus ( DG ) ( 如圖一 )。Ammon's horn 可以細分為 CA1~CA4 但最主要被廣泛研究的區域為 CA1 及 CA3。CA 意指 cornu Ammonis 即拉丁文的 Ammon's horn，以神經細胞的大小來說為 CA3 > CA1 ( Bartesaghi et al., 1999 )。本實驗要探討的 CA1 區域可分為下列幾層 ( 如圖二 )：1. stratum pyramidale ( SP )；2. stratum radiatum ( SR )；3. stratum oriens ( SO )；4. alveus。

CA1 的細胞型態為錐狀細胞 ( pyramidal cell ), stratum pyramidale 是由 3 至 6 個 CA1 錐狀細胞的細胞本體聚集而成。CA1 錐狀細胞具有兩種類型樹突，一為 basal dendrite，此種樹突離開錐狀細胞後會向 stratum oriens 延伸；另一種是 apical dendrite，此種樹突由錐狀細胞的尖端往海馬體的中心延伸進入 stratum radiatum，此種樹突的長度較 basal dendrite 長，主要接受來自 CA3 的神經訊息，而 alveus 則是 CA1 錐狀細胞軸突聚集的區域。

DG 的神經細胞呈圓形，因此稱為顆粒細胞 ( granule cell )，DG 主要可以分成三層細胞層：1. 顆粒細胞層 ( granule cell layer )，由 4 至 6 個神經細胞聚集而成；2. 次細胞分子層 ( acellular molecular layer )；3. 多層細胞層 ( polymorphic cell layer )。DG 之軸突為單一方  
向延伸至 CA3，且因為軸突細胞特殊的形狀而稱為 mossy fiber ( Johnston and Amaral, 1998 )。

## ( 2.) 海馬體之神經迴路：

海馬體最主要的三條神經傳導路徑 1. Perforant pathway ( PP )；  
2. Mossy fiber ( MF )；3. Schaffer collateral ( SC ) pathway ( 如圖一 )。  
傳入海馬體的神經訊息主要來自 entorhinal cortex，entorhinal cortex  
傳入海馬體的神經軸突稱為 perforant pathway。Perforant pathway 與

dentate gyrus 的顆粒細胞形成突觸，且將訊息傳給顆粒細胞，dentate gyrus 的顆粒細胞將訊息整合之後由軸突（mossy fiber）將訊息傳入 CA3，CA3 錐狀細胞的軸突有兩分支，其中一分支將訊息傳送至邊緣系統（limbic system）的 fornix，另外一分支則是與 CA1 錐狀細胞的 apical dendrite 形成突觸，將訊息傳送至 CA1，此分支稱為 Schaffer collateral pathway（Johnston and Amaral, 1998）。由於海馬體神經組織結構上較為清晰簡易，因此長久以來一直為哺乳動物中最常被拿來做為研究神經傳導的大腦皮質。

### （3.）海馬體的功能：

所有的生物都無時無刻地在接受訊息，然而要如何將接受到的不同訊息儲存以及提取，是現在神經科學家極力想要釐清的一門學問。在臨床的病例中發現，若病人大腦的海馬體皮質區域受損的話，則病人可以回顧很久以前發生的事件，包括家人的名字，家附近的環境...等先前已經儲存的記憶，但是對於受損之後，近期記憶的事件卻無法儲存，當向病人敘述一件事情之後，當時病人可以理解，但事後該病人卻忘記了有發生過此事件，可見海馬體區域受損的病人，其無法將學習到的事件儲存至腦海中，由此結果可以推論，海馬體是學習及記憶的重要大腦皮質區（Milner et al., 1998）。

### 第三節：神經突觸的可塑性

在中樞神經系統中，突觸的傳導效能可以依據突觸所使用的情況，透過各種機制的協調而進行訊息的整合和突觸的修飾，即所謂突觸可塑性 (synaptic plasticity)，最典型的例子之一為突觸的長期增益 (LTP; long term potentiation)。所謂 LTP 是指突觸的傳導效率可能會因為使用的狀況而造成長期突觸傳導效能提升的現象 (Bliss and Lømo, 1973; Bliss and Collingridge, 1993)。突觸傳導效能之可塑性已被認定是學習及記憶的主要細胞級機制 (Hebb, 1949)。

#### (1.) 長期增益的定義：

長期增益是突觸可塑性的一種，最早在 1973 年由 Bliss 和 Lømo 所定義。他們在兔子海馬體的研究中發現，若在兔子海馬體興奮性神經迴路上給予一段固定頻率的基礎刺激時，所得到的興奮性突觸後電位的大小會非常相似，此時若突然給予一個既短暫又高頻率的強直刺激再馬上恢復到原本基礎刺激的刺激條件，結果發現所引發出來的興奮性突觸後電位的大小已經變大了，這表示神經之間的訊息傳導效率變好了，突觸之間對於訊息的傳遞效能被提升了，而且此現象可以持續一段相當長的時間，此種神經之間傳導效能增加的現象定義為長期增益 (long term potentiation; LTP) (Bliss and Lømo, 1973)。

## (2.) 長期增益的機制：

當興奮性神經細胞受到刺激電極刺激時，突觸前神經末梢會釋放出興奮性神經傳導物質 glutamate，然而在高頻率刺激過程中，興奮性突觸後電位會進行時間加成作用 (Larson et al., 1986)，使突觸後細胞膜達到較高的去極化程度，進而活化 NMDA 接受器 (Bear and Malenka, 1994) 即 NMDA 接受器的通道被打開，此時鈣離子會進入突觸後神經細胞內。先前的研究報告指出，當鈣離子進入突觸後神經細胞後，可能會活化一些訊息傳導分子，這些傳導分子可以將訊息傳回突觸前末梢，使突觸前釋放神經傳導物質的量增加或減少以達成長期增益或是長期抑制的表現，這些回溯性分子可能為一氧化氮 (NO) (Bon and Garthwaite, 2003)、一氧化碳 (CO) (Alkadhi et al., 2001) 以及血小板活化因子 (Grassi and Pettorossi, 2001)

鈣離子進入突觸後神經細胞內，除了會有以上描述的作用外，還會使突觸後神經細胞的細胞質中鈣離子濃度升高，高濃度的鈣離子會與 calmodulin K II (CaMK II) 結合形成複合體，促使 Adenylyl Cyclase 的活性上升，進而催化 ATP 轉變成 cAMP，使神經細胞內 cAMP 的濃度升高 (Chetaovich and Sweatt, 1993)，而使 CaM Kinase 被活化，如 Protein Kinase C (PKC)，或是 Protein Kinase A (PKA) (Pockett et al., 1993; Huang et al., 2000; Makhinson et al., 1999)。PKA、PKC、

CaMK II 這些酵素的作用可進一步活化 Mitogen-Activated protein kinase ( MAPK)( Giovannini et al., 2001 ; Roberson et al., 1999 ), 以及促使 cAMP response element binding protein ( CREB ) 的磷酸化 ( Roberson et al., 1999 ), CREB 與 CRE 基因結合之後會使 CRE 基因表現, 進而產生新的作用因子或是調節因子, 這些酵素和因子的作用不但可以將 AMPA 接受器磷酸化, 提升 AMPA 接受器的功能, 另一方面也可以增加 AMPA 接受器之數目, 因而使突觸傳導效能增加, 形成所謂的長期增益 ( Liu et al., 1999 )。

### ( 3. ) LTP 的分期 :

由高頻率刺激所引發的突觸傳導效能增益可以依據其維持的時間和其所需要的生化分子分為以下四個時期 :

#### ( I )、強直後增益 ( post-tetanic potentiation ; PTP ) :

此增益僅能維持短暫的幾分鐘, 然後就迅速的消退。短暫而且強大的增益是因為強直刺激時, 突觸前神經末梢對鈣離子的堆積, 使突觸小泡釋放較多的神經傳導物質所造成的現象, 然而快速消退則是因為突觸前神經末梢對鈣離子的清除 ( Stevent et al., 1994 ; Zuker, 1999 )。



( II )、 早期長期增益 ( early phase LTP ) :

刺激所引發的突觸傳導效能增益會在刺激後的 30 分鐘至 1 小時時消退 , 此時期的長期增益表現僅需要一些 Protein Kinases , 如 calcium/calmodulin-dependent protein kinase II( CaMK II )、 tyrosine kinase Fyn ( Mayford et al., 1995 ) 以及 c-AMP ( Otmakhova et al., 2000 )、 c-AMP-dependent protein kinase C ( PKC )( Malinnow, 1998 ) 等作用 , 這些蛋白質酵素活化後會將突觸的一些接受器或離子通道磷酸化或是增加 AMPA 接受器數目 , 而使突觸的傳導效能提升 , 當這些分子被代謝後則傳導效能增益的表現就會慢慢消退。

( III )、 中期長期增益 ( intermedial phase LTP ) :

此長期增益能維持至條件刺激後的 1 至 3 小時 , 此時期的長期增益表現也需要 Protein Kinase 以及 cAMP 的作用 ( Winder et al., 1999 )。

( IV )、 晚期長期增益 ( late phase LTP ) :

在海馬體薄片的 *in vitro* 實驗中 , 條件刺激所引發的的突觸傳導效能增益可以持續長達數小時 ( Frey et al., 1993 ) , 而在 *in vivo* 的實驗中不但可以觀察到 LTP 甚至還可以維持數天到數個

月 ( Abraham et al., 1993 ; Squire and Alvarez, 1995 ), 一般將維持超過 3 小時的 LTP 稱為晚期長期增益。此時期的長期增益之表現是藉由 calcium 大量活化上述的蛋白質酵素如 cAMP、PKC , 當這些蛋白質酵素增加到某一程度後 , PKA、CAMK II、CaM Kinase IV 等會造成細胞核內 CREB 的活化 , 進而啟動 CRE 基因的表現以及合成新的蛋白質因子如作用因子、調節因子 ( Huang and Kandel, 1994 ; Nguyen et al., 1994 ; Deisseroth et al., 1996 )。

#### ( 4. ) E-LTP 與 L-LTP 的引發方式以及分子機制 :

單一刺激電極以重複數次的高頻率刺激 ( = 100 Hz ) ( Bliss and Lomo, 1973 ) 或是短暫高頻的 theta 頻率波刺激 ( Larson et al., 1986 ) 都能引發長期突觸傳導效能增益 然而,條件刺激引發 E-LTP與L-LTP最大的不同處在於給予的刺激強度 , 典型 early-phase LTP 的引發方式是以單一次的高頻率刺激 ( 100 Hz , 1 S ) , 而 late-phase LTP 則是以相同的高頻率刺激給予數個 trains 來引發 ( Huang et al., 1996 ; Abel et al., 1997 ) 單一次高頻率刺激所誘發的突觸效能增益只能維持短暫的數十分鐘 , 而引發 LTP 的表現可能是藉由 AMPA-receptors 被磷酸化 , 或者是有新的 receptors 被加入突觸區 , 然而此過程並不需要活化 ERK 或是啟動 gene 合成新的蛋白質因子 ( Huang et al., 1996; Winder et al.,

1999)。數個 trains 的高頻率刺激，除了會活化 NMDA receptors 促使細胞內鈣離子的濃度增加，產生 AMPA-receptors 磷酸化而形成 early-phase LTP 外，進一步的作用可能活化下游的 PKA、PKC、MAPK 等蛋白質酵素，一連串的反应會將突觸的訊息回溯到細胞本體而使細胞核合成新的 mRNA 以及蛋白質因子，更進一步形成 late-phase LTP (Frey et al., 1988; Montarolo et al., 1986; Nguyen et al., 1994; Huang et al., 1996; Roberson et al., 1999)。early-phase LTP 可以藉由加入抑制基因轉錄以及轉譯的抑制劑來與 late-phase LTP 作區分 (Krug et al., 1984; Nguyen et al., 1994)。

由於 late-phase LTP 具有 pathway specific 的特性，因此衍生而來的問題是：被 activated 的突觸處被活化的 PKA 和 PKC 回溯到細胞本體後，經由活化 CREB 所產生的新蛋白質如何只精確強化先前被 activated 的 pathway，而不影響其它 pathway 的突觸。

Frey 和 Morris 在 1997 年提出“tag 蛋白”假說來解釋這個問題，並且利用實驗加以證實，他們認為當 LTP 被引發時，受刺激的突觸會產生 tag 蛋白，而當神經細胞本體受刺激引發 LTP 的過程中，溯回被活化的 PKA 和 PKC，進而活化 CREB，啟動基因合成新分子再回傳突觸區時，此 tag 蛋白會與神經細胞本體新合成的分子作用而使突觸的傳導效能增益維持至晚期 (Frey and Morris, 1997)。

過去一直認為新蛋白質因子的合成，需要被活化突觸將接受到的訊息往細胞本體傳送，再經由細胞核基因的轉錄、轉譯合成新的 mRNA 和蛋白質因子；然而，Dudek 和 Fields 在 2002 年提出，要合成新的蛋白質不一定要由被活化突觸將接受到的訊息往細胞本體傳送，也可以藉由直接刺激 CA1 細胞本體來達成。此為一有趣的新觀點，值得我們進一步去探討其中的機制以及意義。

#### 第四節：研究目的

本實驗首先是使用單一刺激電極給予不同強度的條件刺激模式做為引發 LTP 的條件，論證不同強度的條件刺激所引發出的 LTP 所持續的時間，試問 LTP 的持續時間是否與刺激強度有關？接著再以 Dudek 的刺激模式，在海馬體的 stratum radiatum 及 alveus 處各擺放一支雙極的刺激電極，在不同的時間間距內配合給予不同的條件刺激，探討早期的長期突觸傳導效能增益 (early-phase LTP; E-LTP) 被鞏固成晚期的長期突觸傳導效能增益 (late-phase LTP; L-LTP) 的時間差 (time course)。

最後以 1 train 的高頻率刺激配合 theta 頻率波刺激，兩者間距為 60min 的刺激模式當基礎，探討此種將 early-phase LTP 鞏固成 late-phase LTP 的分子機制，因此我們想了解，使用此模式造成

early-phase LTP 被鞏固的過程中是否需要 NMDA 接受器的活化？於是給予 NMDA 接受器的拮抗劑  $D,L$ -AP5 ( 50  $\mu$ M ), 接著將使用 L 型鈣離子通道 ( L-type Calcium channels ) 的抑制劑--- Nimodipine ( 10  $\mu$ M ) 以及 PKC 的阻斷劑--- Chelerythrine chloride ( 3  $\mu$ M ), 來觀察大白鼠海馬體之 CA1 神經迴路中 early-phase LTP 被鞏固成 late-phase LTP 的表現是否會受到上述物質的影響。

## 第二章：實驗材料與研究方法

### 第一節：實驗動物

本實驗所使用的是 Sprague Dawley (SD) 品系大白鼠，體重介於 100 至 180 公克重，年齡約 4 至 6 週大，雌雄不拘，動物來源為中國醫藥大學和國科會之動物中心。動物飼養於恆溫 ( 22 )，每日週期為 12 / 12 小時光暗循環的動物房中，並且提供充足的食物和飲水。本實驗所有實驗動物的處理皆符合中國醫藥大學所規定的實驗動物法。

### 第二節：藥物介紹

( 1. ) 以下藥品購自 MERCK 公司：

1. NaCl
2. KCl
3. MgSO<sub>4</sub>
4. NaHCO<sub>3</sub>
5. NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>
6. Glucose
7. CaCl<sub>2</sub>

以上藥品使用於配製人工腦脊髓液。

( 2. ) 以下藥品購自美國 SIGMA 藥廠 ( st. Louis, MO ) :

1. Picrotoxin : GABA<sub>A</sub> 接受器的拮抗劑。
2. Chelerythrine chloride : 直接抑制 PKC 的活化。
3. D,L-APV : NMDA 接受器的拮抗劑。

( 3. ) 以下藥品購自英國 TOCRIS 公司 ( Bristol, UK ) :

1. Nimodipine : L 型鈣離子通道的拮抗劑。

### 第三節：海馬體組織切片之製備

首先，先用 halothane 將實驗動物麻醉，再以斷頭台將其頭顱迅速砍下，所有的實驗步驟皆符合中國醫藥大學所訂立的動物實驗人道法規。先將覆蓋於頭顱之頭皮用手術刀劃開，然後用骨剪將頭蓋骨剝除，使大腦暴露出來，接著用手術刀分開左右大腦並將大腦及部分小腦游離出，迅速置放於 4 °C 之冰冷人工腦脊髓液中 ( cold artificial cerebrospinal fluid ; cold ACSF )，組成成分包括：NaCl 119 mM、KCl 2.5 mM、MgSO<sub>4</sub> 1.3 mM、NaHCO<sub>3</sub> 26.2 mM、NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1 mM、glucose 11 mM、CaCl<sub>2</sub> 2.5 mM，並且持續給予 95 % O<sub>2</sub> 及 5 % CO<sub>2</sub> 的混合氣，使 ACSF 溶液含氧量達飽和並且使其維持適當 pH 值 ( 大約 7.4 )，降低溫度可以降低腦組織的代謝速率，使大腦神經細胞之活性受損的可

能性降到最低，之後將游離的腦組織置放在含有 cold-ACSF 的濾紙上，並將海馬體解剖出來。

接著在洋菜膠 (Agar) 上切出兩個適當大小的凹槽，然後將海馬體貼附於洋菜膠之凹槽中，以三秒膠將它固定於震盪切片機 (Vibrating tissue slicer; Campden Instruments, Loughbrough, UK) 之切片槽的載臺上，切片槽中注入冰冷人工腦脊髓液，接著利用震盪切片機上的刀片將海馬體以垂直其長軸方向切成厚度 450 $\mu$ m 的薄片，切下來的海馬體薄片 (hippocampal slices) 移置於室溫 (27 ) 之 interface holding chamber 中，此 chamber 為自行設計的裝置，主要是一個盛滿人工腦脊髓液之培養皿，再覆蓋上濾紙後移至充滿飽和水蒸氣的培養盒中，培養盒中之環境富含有飽和 O<sub>2</sub> 及 CO<sub>2</sub> 水蒸氣，海馬體薄片即靜置於濾紙上，並培養於介於濕潤空氣與 ACSF 介面之環境中至少 90 分鐘，使海馬體的神經細胞恢復穩定，即可進行細胞外電氣生理學實驗。

#### **第四節：實驗設計以及細胞外記錄**

等海馬體組織切片恢復神經活性後，將海馬體組織切片由 interface holding chamber 上轉移至浸潤型記錄槽 (immersion-type



recording chamber) 中，用鑲有尼龍網的馬蹄形白金條將它固定，穩定的灌注含有 0.1 mM picrotoxin 之人工腦脊髓液（持續給予 95 % O<sub>2</sub> 及 5 % CO<sub>2</sub> 混合氣，使液體的含氧量充足，並且使 ACSF 酸鹼度維持在 pH 7.4），流速約為 2 ml/min，以上實驗在室溫下進行。在 ACSF 中加入 0.1 mM picrotoxin 是因為本實驗主要是要觀察興奮性神經的傳導訊息，因此用此拮抗劑以阻斷 GABA<sub>A</sub> 接受器所媒介之抑制性訊息。然而，因為本實驗所要研究的是 CA1 區域，為了防止加入 picrotoxin 阻斷 GABA<sub>A</sub> 接受器所媒介之抑制性訊息後，促使 CA3 產生突發的 epilepticform activity，影響到 CA1 神經細胞所傳遞的訊息，因此會在紀錄前先在海馬體切片 CA3 與 CA1 連接處以刀片切斷其連接途徑。

使用 Flaming/Brown micropipette puller (Sutter instrument Co.) 將玻璃毛細管拉成微細玻璃電極，填充 3M 的 NaCl (電阻約為 3-5 MO)，放置在 CA1 之 stratum radiatum 區域上，用以記錄細胞外興奮性突觸後電位 (field excitatory postsynaptic potential; fEPSP) 之訊號。在距離紀錄電極不遠處放置一支雙極 (bipolar) 不銹鋼刺激電極 (Frederick Haer Company, Bowdoinham, ME)，以間隔為 60 秒的刺激頻率 (0.0167 Hz) 刺激 Schaffer collateral branch，另一支雙極不銹鋼刺激電極則是放置在 alveus 處，刺激 CA1 之軸突使產生回溯性動作

電位 ( antidromic spike ) 的訊號。我們將放置在 stratum radiatum 上的刺激電極定義為 S1 刺激電極，S1 的刺激強度為能引發最大之興奮性突觸後電位之 20-30 % 的強度，另外放置在 alveus 的刺激電極定義為 S2 刺激電極，S2 的刺激強度為能引發約 1~1.5 mV 的 spike 電位，如圖二所示。

本實驗中會給予以下幾種不同的刺激模式來誘發突觸傳導效能的長期增益 ( LTP )：

### **實驗一：( 實驗流程如圖三 A.)**

在此系列實驗中，只使用單一支刺激電極 ( S1 電極 )，以每分鐘刺激一次的刺激頻率 ( 0.0167 Hz ) 給予相同刺激強度的基礎刺激引發 field EPSP ( fEPSP )，等到引發的 fEPSP 呈現穩定狀態 ( 最少要 30 分鐘 ) 之後再給予 100 Hz ( 含有 100 個刺激方形波 / 秒，間距為 10 毫秒 ) 高頻率刺激 ( HFS ) 1 秒鐘，稱為 1 train；或者是給予 3 trains、5 trains、9 trains 的高頻率刺激，train 與 train 之間間距為 90 秒。高頻率刺激之後，再將 S1 電極的刺激頻率調回原本每分鐘刺激一次的基礎刺激頻率繼續給予刺激，最少要以此刺激頻率再給予 270 分鐘的刺激，記錄取得資料，然後量取最後 30 分鐘 ( 241~270 min ) 所誘發出的 fEPSP 之斜率值 ( slope ) 以及基礎刺激時穩定 30 分鐘的 fEPSP

之斜率值,以 paired t test 來判斷突觸的傳導效能是否有形成 late-phase LTP。

## 實驗二 : ( 實驗流程如圖三 B. )

S1 電極以 0.0167 Hz 的刺激頻率給予刺激，等到引發的 fEPSP 穩定最少 30 分鐘之後，再給予 1 train 的高頻率刺激，高頻率刺激完後將 S1 電極的刺激頻率調回原本 0.0167 Hz 的刺激頻率繼續給予刺激，接著在高頻率刺激完後的第 21、61 或是 121 分鐘時，給予 S2 刺激電極 3 次的 theta 頻率波刺激 ( ?-burst stimulation ; TBS )，theta 頻率波刺激之間的時間距為 5 分鐘。每次的 theta 頻率波刺激包含三個 trains 的刺激，train 之間的時間距為 20 sec，每個 train 各含有 10 個 bursts，bursts 之間的時間距為 200 ms ( 5 Hz )，每個 burst 是由 4 個 100 Hz 的刺激方形波所組成，刺激方形波之間的時間距為 10 毫秒。S2 刺激電極之 ?-burst 刺激與 S1 之刺激彼此互相獨立無干擾，S2 電極之 ?-burst 刺激後，持續以 0.0167 Hz 的刺激頻率由 S1 引發 fEPSP 基礎刺激，直到高頻率刺激後的 270 分鐘。因為 theta 頻率波刺激分別是在高頻率刺激後的 20 或 60、120 分鐘給予，於是分別以 20 或 60、120 分鐘表示。是否形成晚期的 LTP 則是以 paired t test 分析最後 30 分鐘 ( 241~270 min ) 所誘發出的 fEPSP 之斜率值是否與 baseline 的

fEPSP 之斜率值有統計差異來做為依據。

### 實驗三：(本系列實驗流程圖如圖三 C.所示)

此系列實驗是將 theta 頻率波刺激與高頻率刺激給予的順序顛倒,在電極擺放完成後,待 slice 穩定後,首先在 S2 電極給予 3 次 theta 頻率波刺激 (theta 頻率波刺激的刺激條件與實驗二.相同) 3 次 theta 頻率波刺激之後,的 60 或是 120 分鐘後,收集記錄由以 0.0167 Hz 所引發之 baseline fEPSP 20 分鐘,然後給予 S1 電極 1 train 的高頻率刺激。高頻率刺激之後再將 S1 的刺激頻率調回 0.0167 Hz 的刺激頻率繼續給予刺激,最少還要以此刺激頻率再給予 270 分鐘的刺激。量取最後 20 分鐘 (251~270 min) 所誘發出的 fEPSP 之斜率值以及 baseline 20 分鐘 fEPSP 之斜率值,以 paired t-test 來判斷突觸的傳導效能是否有形成晚期的 LTP。因為 theta 頻率波刺激在高頻率刺激之前給予,而兩者之間的時間分別為 60 和 120 分鐘,所以以-60 和-120 分鐘分別表示。

### 實驗四：(此系列的實驗流程圖如圖三 D.所示)

最後以藥理實驗來證實細胞本體 theta-頻率波刺激鞏固長期增益之機制。此系列實驗設計基本上與實驗二無異, S1 之 100 Hz 刺激與 S2 之 ?-burst 刺激的間隔固定為 60 分鐘。在 S2 之 ?-burst 刺激

前 15 分鐘開始給予含有以下藥劑: NMDA 接受器的拮抗劑---DL-AP5 ( 50  $\mu$ M); L 型鈣離子通道的拮抗劑--- Nimodipine ( 10  $\mu$ M ) 或者是 PKC 的抑制劑--- Chelerythrine chloride( 3  $\mu$ M )的人工腦脊髓液, 給予的時間為四十五分鐘, 除了給予藥物之外, 所有實驗條件與實驗二相同。

## 第五節：實驗數據的取得

記錄電極所記錄到的 fEPSP 訊息會被傳送至交流擴大器 ( AC amplifier ; Warner Instrument ), 經過擴大器內建之濾波器, 將訊號( 波段: 0.1~1k Hz ) 過濾後, 再將訊號放大 1000 倍, 並輸入 CED 1401 ( Cambridge Electronic Design, Cambridge, UK ) interface 將訊號數位化後輸出於個人電腦, 然後以 CED 公司的 signal 軟體在個人電腦上將訊號呈現並儲存。實驗所使用的刺激條件之頻率、週期、時間間隔的設定則是由 Master-8 ( AMPI, Israel ) 控制。為了避免測量到受動作電位干擾的 fEPSP, 我們不量取 fEPSP 振幅的大小, 而是改以測量 fEPSP 之起始端斜率大小為指標。實驗記錄所得的結果, 是以量取 20 或是 30 分鐘穩定 baseline 的 fEPSP slope 之平均值為基準值, 再將每個時間點所量得的 fEPSP slope 之值跟基準值做比較, 結果以百分比

顯示並繪圖。在高頻率刺激完後繼續記錄 270 分鐘，並且截取每次實驗記錄的最後 20 或 30 分鐘的斜率平均值以及基礎刺激時之斜率平均值，以 paired t-test 分析，來判斷突觸的傳導效能是否有改變，若突觸的傳導效能增加，分析又具有統計意義 ( $p < 0.05$ )，則判定為 L-LTP；而早期和中期的 LTP 之判定則是分別截取高頻率刺激後 31-60 以及 121-150 分鐘的斜率平均值，與基礎刺激時之斜率平均值做 paired t-test 分析，若  $p < 0.05$  則分別判定為早期或是中期的 LTP。

## 第六節：統計分析

所有的實驗結果皆以平均值±標準誤差 (mean ± S.E.) 表示，n 是表示實驗的次數，同一組實驗，條件刺激引發前與引發後的差異以 paired t-test 分析；不同實驗組別之間的差異則以 one-way ANOVA (Analysis of Variance) test 作統計學上的比較，當 probability value,  $p < 0.05$  時，則表示有統計學上的顯著差異。

### 第三章：實驗結果

#### 第一節：高頻率刺激之 trains 數目與早晚期 LTP 的表現關係

先前有許多研究已指出高頻率刺激 (HFS) 可以誘發突觸傳導效能的長期增益 (LTP), 因此本實驗首先要研究的主題是-----誘發突觸傳導效能增益的刺激強度是否與 LTP 維持的時間長短有關? 於是實驗設計在大白鼠海馬體 CA1 區域上, 給予不同 trains 數目的 100 Hz 高頻率刺激 (high frequency stimulation; HFS) 來觀察各自引發出的 LTP 所維持之時間。圖五結果顯示, 在海馬體 CA1 區域給予 1 train 的 100 Hz 高頻率刺激 (single train of HFS) 可以使 CA1 突觸的傳導效能提升, 並且形成 early-phase LTP (LTP =  $125.2 \pm 5.40\%$ ,  $n = 10$ ,  $p < 0.05$ , paired t-test, LTP 之測量為 HFS 之後 31~60 分鐘); 但無法形成晚期的長期增益 (LTP =  $102.5 \pm 6.59\%$ ,  $n = 10$ ,  $p = 0.71$ , paired t-test, LTP 之測量為 HFS 之後 241~270 分鐘)。如果將刺激的強度增強為 3 trains 的高頻率刺激, 則引發出的 LTP 可以維持得比較久 (見圖七), 但是突觸傳導效能的增益一樣無法維持至晚期 (LTP =  $106.6 \pm 7.15\%$ ,  $n = 8$ ,  $p = 0.38$ , paired t-test, LTP 之測量為 HFS 之後 241~270 分鐘)。然而, 要是將條件刺激刺激強度增強到 5 trains 或者是

9 trains 的高頻率刺激，則可以引發出維持長達 270 分鐘的 late-phase LTP ( LTP 分別是  $126.3 \pm 9.44 \%$ ,  $n = 8$ ,  $p < 0.05$ ;  $151.9 \pm 17.45 \%$ ,  $n = 8$ ,  $p < 0.05$ , paired t-test, LTP 之測量為 HFS 之後 241~270 分鐘) (見圖九、圖十一)。圖十二為以上結果的整合圖，由圖中可觀察得知，1 train 或 3 trains 的高頻率刺激能夠引發出 early-phase LTP，而 5 trains 或是 9 trains 的高頻率刺激則可以引發出維持長達 270 分鐘的 late-phase LTP。由此實驗結果可推知，LTP 之表現時間長短與刺激時所給予之 trains 數目成正比例關係。

## **第二節：細胞本體 theta-頻率波刺激使早期的 LTP 鞏固為晚期的 LTP 之時間差約為 -60 至 60 分鐘。**

過去的研究報告指出，在海馬體 CA1 誘發 early-phase LTP 之刺激條件如果配合細胞本體給予刺激 (somatic stimulation)，則會使突觸之 early-phase LTP 鞏固成 late-phase LTP ( Dudek and Fields, 2002 )，因此，我們進一步的實驗想要論證的是，配合海馬體 CA1 細胞本體 theta-頻率波刺激 (somatic theta-burst stimulation) 的給予是否會將由 1 train 的高頻率刺激所引發的 early-phase LTP 鞏固成為 late-phase LTP? 若可以的話，則再進一步探討給予細胞本體 theta 頻率波刺激與高頻率刺激之間的時間差關係為何？



首先，我們經由 S1 電極給予基礎刺激，測得 20 分鐘穩定 baseline 之後，再經由 S2 電極給予三次 TBS 刺激活化細胞本體，則結果發現 TBS 的刺激對 S1 刺激所引發出的 fEPSP 不會造成 potentiation 的影響 ( $93.8 \pm 2.97\%$ ,  $n = 16$ ,  $p = 0.055$ , paired t-test, fEPSP 之測量為 TBS 之後 51~70 分鐘)，因此證實 S1 電極與 S2 電極所刺激的 pathway 是互為獨立的 (圖十三)。

進一步的實驗，我們在 S1 電極經由給予高頻率刺激來引發 fEPSP 的 LTP，在經過 20 分鐘 (20 min) 後，再經由擺放在 alveus 的 S2 刺激電極給予 theta 頻率波刺激活化 CA1 細胞本體，可以由圖十五的結果分析得知，這樣的刺激條件，可以使原先的 early-phase LTP 被鞏固成為 late-phase LTP ( $117.8 \pm 6.13\%$ ,  $n = 8$ ,  $p < 0.05$ , paired t-test, LTP 之測量為 HFS 之後 241~270 分鐘)。然而，如果是在高頻率刺激給予後的 60 分鐘再配合 theta-頻率波刺激活化 CA1 細胞本體的話，則結果由圖十七可以發現，在此時間差配合 theta-頻率波刺激依然能夠使 1 train 高頻率刺激所引發之 early-phase LTP 被鞏固成為 late-phase LTP ( $121.6 \pm 9.12\%$ ,  $n = 9$ ,  $p < 0.05$ , paired t-test, LTP 之測量為 HFS 之後 241~270 分鐘); 但是，若將 theta-頻率波刺激給予的時間延長至高頻率刺激後的 120 分鐘再給予，則突觸傳導效能增益的現象僅能形成 early-phase LTP ( $123.3 \pm 5.67\%$ ,  $n = 7$ ,  $p < 0.05$ , paired t-test, LTP 之

測量為 HFS 之後 31~60 分鐘), 而無法將 early-phase LTP 被鞏固成為 late-phase LTP ( $90.4 \pm 13.36\%$ ,  $n = 7$ ,  $p = 0.5$ , paired t-test, LTP 之測量為 HFS 之後 241~270 分鐘)(見圖十九)。

我們接下來的實驗想要測試配合 somatic  $\gamma$ -burst 刺激對 early-phase LTP 鞏固為 late-phase LTP 的效應是否和 somatic 刺激與高頻率刺激的時間次序有關? 因此以下實驗將細胞本體 theta-頻率波刺激與 1 train 高頻率刺激的刺激順序顛倒並進行與上述實驗類似的實驗(實驗流程:圖三.C) 當細胞本體 theta-頻率波刺激與 1 train 高頻率刺激的時間間距為 120 分鐘(-120 min)時, 由圖二十一的结果分析得知, 在此間距的刺激條件下, 由 1 train 高頻率刺激所誘發出的 early-phase LTP 無法被鞏固為 late-phase LTP ( $101.5 \pm 13.57\%$ ,  $n = 8$ ,  $p = 0.92$ , paired t-test, LTP 之測量為 HFS 之後 251~270 分鐘)。我們將細胞本體 theta-頻率波刺激與 1 train 高頻率刺激的時間間距拉近至 60 分鐘(-60 min), 由圖二十三的结果得知, 在此間距的刺激條件下由 1 train 所誘發的 early-phase LTP 能夠被鞏固為 late-phase LTP ( $121.6 \pm 7.91\%$ ,  $n = 8$ ,  $p < 0.05$ , paired t-test, LTP 之測量為 HFS 之後 251~270 分鐘)。由以上的結果可以得知, 1 train 的高頻率刺激所引發的 early-phase LTP 要能夠被鞏固為 late-phase LTP, 需要 theta-頻率波刺激在高頻率刺激之前的特定時間間距內活化細胞本體才得以形成, 間

距在-60 分鐘時，可使 early-phase LTP 被鞏固成為 late-phase LTP；然而，間距若延長至-120 分鐘時，則無法使 early-phase LTP 被鞏固為 late-phase LTP。

由此系列實驗結果整合圖（見圖二十四）可以得知，theta-頻率波刺激活化細胞本體與 1 train 高頻率刺激的時間間距決定了 early-phase LTP 是否可以被鞏固成為 late-phase LTP。然而，1 train 高頻率刺激所引發的 early-phase LTP 要能夠被鞏固成為 late-phase LTP 需要在 1 train 高頻率刺激之前或刺激之後 60分鐘以內配合 theta-頻率波刺激活化 CA1 細胞本體；當時間間距延長為 120 或-120 分鐘時，則細胞本體 theta 頻率波刺激對 1 train 高頻率刺激所引發的 early-phase LTP 則沒有鞏固的作用。

### **第三節：theta-頻率波刺激鞏固長期增益的作用是不需 NMDA 接受器之調控。**

先前的生化、型態實驗結果推測，somatic theta-burst 的刺激在-30 分鐘的時間差內給予，能使 1 train 高頻率刺激所引發的 early-phase LTP 受到鞏固而成為 late-phase LTP 的效應是 NMDA-receptors independent，但卻是 voltage-gated calcium channels dependent（Dudek and Fields, 2002），因此我們進一步的研究是要以 1 train 高頻率刺激

後 60 分鐘再給予 CA1 細胞本體 theta-頻率波刺激所造成的 late-phase LTP 為基準，提供上述論述的電生理證據以及進一步研究其可能的細胞機制。

$D,L$ -AP5 是一種有效而且具專一性的 NMDA 接受器之拮抗劑 (antagonist)，能夠有效抑制 NMDA 接受器被活化，於是實驗設計於高頻率刺激後的 45 分鐘起，開始灌流含有  $50 \mu M$   $D,L$ -AP5 的人工腦脊髓液，直至給予 theta-頻率波刺激活化 CA1 細胞本體後的 20 分鐘，再換回原先的人工腦脊髓液，總共給藥的時間為 45 分鐘（實驗流程如圖三 D.所示）。結果由圖二十六可觀察出，給予  $D,L$ -AP5 的組別，配合 theta-頻率波刺激一樣會使 1 train 高頻率刺激所引發出的 early-phase LTP 被鞏固成為 late-phase LTP ( $115.4 \pm 5.58 \%$ ,  $n = 6$ ,  $p < 0.05$ , paired  $t$ -test, LTP 之測量為 HFS 之後 241~270 分鐘)。將給予  $D,L$ -AP5 組與沒有給藥的 control 組之 late-phase LTP (LTP 之測量為 HFS 之後 241~270 分鐘) 使用分析軟體 one way ANOVA 比較，則結果顯示兩者並沒有差異  $p = 0.62$  (見圖二十七)。換言之，以此種刺激模式使 early-phase LTP 鞏固成為 late-phase LTP 是不需要經由活化 NMDA 接受器就可以達成。

#### 第四節：受電壓調控之鈣離子通道（L-type VGCCs）參與 theta 頻率波刺激鞏固長期增益作用的調控

除了前面探討的 NMDA 接受器外，我們接下來探討經由活化受電壓調控的鈣離子通道（voltage-gated calcium channels；VGCCs）可能扮演的角色。因此我們給予 L 型鈣離子通道（L-type calcium channels）的拮抗劑----- Nimodipine（10  $\mu$ M），探討 L 型鈣離子通道是否會對以此種刺激模式所引發之 early-phase LTP 被鞏固成為 late-phase LTP 的機制有所影響？Nimodipine 給予的時間點與給予 D,L-AP5 相同，實驗結果由圖二十九顯示，在給予 Nimodipine 的條件下，1 train 高頻率刺激所引發出來的 early-phase LTP 無法被鞏固成 late-phase LTP（ $91.1 \pm 10.24\%$ ,  $n = 8$ ,  $p = 0.41$ , paired t-test，LTP 之測量為 HFS 之後 241~270 分鐘）將有給予 Nimodipine 藥物組與沒有給予藥物的 control 組之 late-phase LTP 作 one way ANOVA 分析比較，結果指出兩者之間具有統計上的明顯差異（ $p < 0.05$ ，見圖三十），此結果表示細胞本體受 theta-頻率波刺激活化，促使 early-phase LTP 被鞏固成為 late-phase LTP 是需要 L 型鈣離子通道的參與，若抑制 L 型鈣離子通道的活化則會阻斷 early-phase LTP 的鞏固作用。

## 第五節：細胞本體 theta 頻率波刺激促使早期的長期增益被鞏固成晚期的長期增益需要 PKC 的參與

活化受電壓調控之鈣離子通道，使鈣離子流入細胞內，提升細胞內鈣離子濃度，可能會活化下游的 CAMK II, protein kinase C ( PKC ) 或 protein kinase A ( PKA )。從文獻得知要形成 late-phase LTP 必須使基因表現或合成新的蛋白質 ( Huang and Kandel, 1994 ; Nguyen et al., 1994 )，因此我們利用 protein kinase C ( PKC ) 的抑制劑 chelerythrine 來測試在細胞本體給予 theta 頻率波刺激促使 early-phase LTP 鞏固成為 late-phase LTP 的機制是否與活化 PKC 有關？

Chelerythrine ( 3  $\mu$ M ) 給予的時間一樣是在 theta 頻率波刺激前 15 分鐘給予，直至 theta 頻率波刺激後的 20 分鐘再換回原先的人工腦脊髓液，結果在給予 Chelerythrine 的條件下，由 1 train 高頻率刺激所引發出來的 early-phase LTP 無法被鞏固成 late-phase LTP (  $84.3 \pm 10\%$ ,  $n = 7$ ,  $p = 0.17$ , paired t-test, LTP 之測量為 HFS 之後 241~270 分鐘 ) ( 見圖三十二 )。給予 Chelerythrine 組與沒有給予藥物的 control 組之 late-phase LTP 作 one way ANOVA 分析比較，結果指出兩者之間具有統計上的明顯差異 (  $p < 0.05$ , 見圖三十二 )，此結果表示抑制 PKC 的活化會阻斷 LTP 的鞏固作用；換句話說，細胞本體受 theta 頻率波

刺激活化，促使 early-phase LTP 被鞏固成 late-phase LTP 是需要經由活化 PKC 的途徑。

## 第四章：結論

由我們的實驗結果可以證實 1 train 的 100 Hz 高頻率刺激能夠在大白鼠海馬體 CA1 區域誘發出維持 60 分鐘的 early-phase LTP; 然而, 5 trains 和 9 trains 的高頻率刺激則可以誘發出維持長達 270 分鐘的 late-phase LTP, 由此實驗結果可推論, LTP 之表現時間長短與刺激時所給予之 trains 數目成正比例關係。

在特定時間差內, 配合 theta-頻率波刺激活化 CA1 細胞本體, 能夠促使 1 train 高頻率刺激引發的 early-phase LTP 被鞏固成為 late-phase LTP, 然而此鞏固作用與 theta 頻率波刺激和高頻率刺激兩者的刺激次序無關而與兩者之間的時間差有關, 為一對稱的 time window, 約為 60 分鐘至 -60 分鐘左右。

進一步實驗結果證實配合 theta 頻率波刺激促使鞏固 LTP 的機制是不需要 NMDA 接受器之調控, 但是需要受電壓調控之 L-型鈣離子通道 ( L-type calcium channels ) 以及 protein kinase C ( PKC ) 的參與。



## 第五章：討論

我們的實驗結果證實以 1 train 的 100 Hz 高頻率刺激可在大白鼠海馬體 CA1 區域誘發出 early-phase LTP; 而 5 trains 和 9 trains 的高頻率刺激則可以誘發出維持長達 270 分鐘的 late-phase LTP。先前的研究指出微弱的條件刺激，如 1 或 3 trains 的刺激只能使受刺激的突觸區域局部被活化，而誘發的突觸傳導效能增益只能維持短暫的數十分鐘，形成 early-phase LTP，所引發 LTP 的表現可能是有 AMPA 接受器被磷酸化，或者有新的 AMPA 接受器被加入受刺激的突觸區，其過程並不需要活化 ERK，或是啟動 gene 合成新的蛋白質( Huang et al., 1996; Winder et al., 1999 )。然而重複數次的高頻率刺激，如數個 trains 的 100 Hz 刺激，本研究的條件為 5 trains 以上的 100 Hz 刺激，則會活化 NMDA 接受器，促使細胞內鈣離子的濃度增加，除了會造成 AMPA 接受器被磷酸化而形成 early-phase LTP 外，進一步可能活化下游的 PKA、PKC、MAPK 和 CREB，一連串的反應促使神經細胞核合成新的 mRNA 和蛋白質因子，進而形成 late-phase LTP( Frey et al., 1988; Montarolo et al., 1986; Nguyen et al., 1994; Huang et al., 1996; Roberson et al., 1999 )。

在其它大腦皮質區，如杏仁核 ( lateral amygdala ; LA )，若給予 1 train ( 100 Hz , 1 秒 ) 的高頻率刺激則可以引發出維持約 40 分鐘的

LTP，而 5 trains ( 100Hz，1 秒，間距 3 分鐘 ) 的高頻率刺激則可以引發出維持最少 3 小時的 late-phase LTP，這些結果頗與本實驗的結論相符合，此外進一步也證實誘發此 late-phase LTP 需要基因的表現和新蛋白質的合成 ( Huang et al., 2000 )。

由於 late-phase LTP 具有 pathway specific 的特性，因此有關它們的引發機制所衍生的問題是：由被 activated 的突觸處被活化的 PKA/PKC 回溯到細胞本體後，經由活化 CREB 而使 CRE 基因產生新的蛋白質，是如何精確強化先前被 activated 的 pathway，而不影響其它的 pathway 之突觸？

Frey 和 Morris 在 1997 年提出“tag 蛋白”假說來解釋這個問題，並利用實驗加以證實，他們認為當 LTP 被引發時，受刺激的突觸會產生 tag 蛋白，而當神經細胞之細胞本體受 LTP 引發過程中回溯的 PKA / PKC 活化，進而活化 CREB，啟動基因合成新分子再回傳突觸區時，此 tag 蛋白會與神經細胞本體新合成的分子作用，而使突觸的傳導效能增益維持至晚期 ( Frey and Morrise, 1997 )。

Dudek 和 Fields 等實驗主要結果是，在 CA1 之 stratum radiatum 的異突觸型長期增益實驗中，如果在一 pathway 單獨給予一刺激強度較弱的條件刺激則如本實驗的結果，一般只能引發 early-phase LTP；然而如果在此 pathway 被刺激引發 LTP 之前或刺激之後的 60 分鐘，

給予另外一 pathway 一較強的強直刺激，並可在此 pathway 引發 late-phase LTP，則原本微弱刺激所引發的 early-phase LTP 會被鞏固為 late-phase LTP (Frey et al.,1997; 1988)。Frey et al.的實驗動物為 7 週大，公的 Wistar 品系大白鼠。而闡述這個實驗結果的最佳推論即為：微弱刺激的刺激強度能夠使受刺激的突觸合成 tag 蛋白，而另一 pathway 的強直刺激可以促使細胞核產生新的蛋白質因子，藉由原 pathway 突觸 tag 蛋白與另一 pathway 強直刺激促使細胞本體產生的新蛋白質因子作用，可使原被活化 pathway 之 CA1 突觸的傳導效能增益延長為 late-phase LTP。

基於上述之討論，我們推論 1 train 的高頻率刺激雖然可以引發突觸合成 tag 蛋白，但此刺激強度尚無法促使細胞本體合成新的蛋白質所以僅藉由突觸的局部磷酸化作用而形成 early-phase LTP。然而，5 trains 和 9 trains 的高頻率刺激不但可以促使受刺激的突觸局部磷酸化和合成 tag 蛋白，而且還可以促使細胞本體合成新的蛋白質，因此能夠使突觸的傳導效能增益持續而形成 late-phase LTP (見圖三十四)。

經由此實驗結果可以再次確定 CA1 區域在給予不同強度的條件刺激下所誘發得到的 LTP 所維持之時間，並且可以由進一步推論得知，重複的學習或訓練確實有幫助記憶的形成和鞏固。

過去一直認為新蛋白質因子的合成，需要被活化的突觸將接受到的訊息往細胞本體傳送，再經由細胞核基因的轉錄、轉譯合成新的 mRNA 和蛋白質因子。然而，Dudek 和 Fields 在 2002 年提出，要合成新的蛋白質不一定要由被活化的突觸將接受到的訊息往細胞本體傳送，也可以藉由直接刺激 CA1 細胞本體來達成。

在 1 train 高頻率刺激之前或刺激之後大約 60 分鐘以內，給予三次 theta-頻率波刺激以活化海馬體 CA1 之細胞本體，能夠促使 1 train 高頻率刺激所引發的 early-phase LTP 被鞏固為 late-phase LTP。而這個鞏固機制主要是因為 theta-頻率波的刺激活化了 CA1 細胞本體之 VGCCs 而非 NMDA receptors，進而促使鈣離子經由此通道流入細胞內，提高了細胞內鈣離子的濃度，再進一步活化了下游的二級傳訊物質 ---PKC，而使突觸的傳導效能增益得以延續並且形成 late-phase LTP。

Dudek 和 Fields 在 5-12 週大的 SD 大白鼠海馬體薄片上進行的免疫組織化學染色之實驗證實，細胞本體 theta-頻率波刺激在保護 CA1 突觸傳導效能增益免於衰退的機制主要也是藉由活化細胞本體的 VGCCs，進而活化 ERK 與磷酸化下游的 CREB 所導致 (Dudek and Field, 2002)，這個結果也與本實驗相符合；更進一步看本實驗所提供的是一更直接有力的電生理證據而非染色結果，並且證實 S1 電極與

S2 電極所刺激的 pathway 互為獨立。

由上述討論可知，誘發 late-phase LTP 的表現與細胞內鈣離子濃度的增加有很大的關係 (Cummming et al., 1996)，然而鈣離子進入細胞內的管道包括 1. 在突觸 (synapse) 是經由 NMDA receptor; 2. 在細胞本體 (somatic) 則是經由受電位調控的鈣離子通道 (voltage-gated calcium channels; VGCCs)。細胞內鈣離子的濃度增加會促使活化鈣離子所調節的一連串次級傳導物質來傳導突觸的訊息 (calcium-dependent signaling cascades) 並且使基因活化和表現 (Bading et al., 1993; Diesseroth et al., 1996; Ginty, 1997)。

本研究的藥理實驗則證實給予 NMDA 接受器的專一性拮抗劑 D,L-AP5 (50  $\mu$ M)，並不能使 theta-頻率波刺激所導致的鞏固機制受到抑制，因此得知以配合 somatic 刺激而將 early-phase LTP 鞏固為 late-phase LTP 的機制是不需經由 NMDA 接受器。

Nimodipine 是一種有效的 L-型鈣離子通道的阻斷劑 (Avery and Johnston, 1996)，經由之前的實驗結果證實給予 20-50  $\mu$ M 的 Nimodipine，10 分鐘以上，則對 mEPSCs (最小興奮性突觸後電流) 的發生頻率和振幅的大小皆沒有影響 (Hirasawa and pittman, 2003)，因此可知實驗中加入 10  $\mu$ M Nimodipine 並不會影響 EPSP 的表現，所以本實驗中添加 Nimodipine 的組別，造成抑制鞏固的作用確實是經

由抑制 VGCCs 的活化所達成的，此結果也表示 early-phase LTP 被鞏固為 late-phase LTP 的機制是需要 L-型鈣離子通道的參與。

Early-phase LTP 需要 protein kinase 的活化與作用，而 late-phase LTP 則需要依賴基因的表現 (Roberson et al., 1996)，然而 Roberson 在 1999 的報導中也指出，在海馬體 CA1 區域引發 late-phase LTP 可以經由 PKA 和 PKC 的活化，而進一步活化 MAPK，使其將 CREB 磷酸化，由此可知 PKC 的活化與突觸形成 late-phase LTP 有關。因此我們的研究進一步想了解促使 early-phase LTP 被鞏固為 late-phase LTP 的機制是否有需要 PKC 的參與？結果由本實驗中可以得知 PKC 抑制劑的給予可以抑制 theta-頻率波刺激所造成的鞏固作用，因此證明這種機制所引發的 late-phase LTP 是需要 PKC 的參與。

藉由圖三十五表示，我們認為 CA1 細胞本體受到 theta 頻率波的刺激時，能夠經由活化 VGCCs，使細胞外鈣離子進入細胞內而提升細胞內鈣離子的濃度，再經由活化下游的酵素---protein kinase C (PKC)，進而使細胞核的基因被活化而進行轉錄、轉譯產生新的蛋白質，如調控因子、作用因子；而 1 train 高頻率刺激不但可以使突觸局部磷酸化還可以使受刺激的突觸合成 tag 蛋白，藉由突觸 tag 蛋白與細胞本體所合成的新蛋白質，如調控因子、作用因子的作用，可使 1 train 引發的 early-phase LTP 被鞏固而形成 late-phase LTP。

## 參考文獻：

Abel T, Nguyen PV, Barad M, Deuel TAS, Kandel ER, Bourtchouladze R (1997). Genetic demonstration of a role for PKA in the late phase of LTP and in hippocampus-based long-term memory. *Cell* 88,615-626.

Abraham WC, Mason SE, Demmer J, Williams JM, Richardson CL, Tate WP, Lawlor PA, Dragunow M (1993). Correlations between immediate early gene induction and the persistence of long-term potentiation. *Neuroscience* 56, 717-727.

Alkadhi KA, AlHijailan RS, Malik K, Hogan YH (2001). Retrograde carbon monoxide is required for induction of long-term potentiation in rat superior cervical ganglion. *J Neurosci* 21 (10), 3515-3520.

Avery RB, Johnston (1996). Multiple channel types contribute to the low-voltage-activated calcium current in hippocampal CA3 pyramidal neurons. *J Neurosci* 16, 5567-5582.

Angulo MC, Lambolez B, Audinat E, Hestrin S, Rossier J (1997). Subunit composition, kinetic, and permeation properties of AMPA receptors in single neocortical nonpyramidal cells. *J Neurosci.* 17, 6685-6696.

Bading H, Ginty DD, Greenberg ME (1993). Regulation of gene expression in hippocampal neurons by distinct calcium signaling pathways. *Science* 206, 181-186.

Bartesaghi R and Ravasi L (1999). Pyramidal neuron types in field CA2 of the guinea pig. *Brain Res. Bull.* 50, 263-273.

Bear MF, Connors BW, Paradiso MA (2001). Synaptic transmission. In *Neuroscience*, edited by Bear MF, Baltimore MD:Williams and Wilkins, Chapter 5.

Bear MF, Malenka RC (1994). Synaptic plasticity : LTP and LTD. *Current Opinion in Neurobiology* 4, 389-399.

- Bliss TV, Collingridge GL (1993). Synaptic model of memory : long term potentiation in the hippocampus. *Nature* 361, 31-39.
- Bliss TV, Lomo T (1973). Long lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of perforant path. *J Physiol (Lond)* 232, 331-356.
- Bon CL, Garthwaite J (2003). On the Role of Nitric Oxide in Hippocampal Long-Term Potentiation. *J Neurosci.* 23, 1941-1948.
- Chetaovich DM, Sweatt JD (1993). NMDA receptor activation increases cyclic AMP in area CA1 of the hippocampus via calcium/calmodulin stimulation of adenylyl cyclase. *J Neurochem* 61, 1933-1942.
- Cumming JA, Mulkey RM, Nicoll RA, Malenka PC (1996). Ca<sup>2+</sup> signaling requirements for long term depression in the hippocampus. *Neuron* 16, 825-833.
- Davis L, Banker GA, Steward O (1987). Selective dendritic transport of RNA in hippocampal neurons in culture. *Nature* 330, 477-479.
- Deisseroth K, Bito H, Tsien RW (1996). Signaling from synapse to nucleus: postsynaptic CREB phosphorylation during multiple forms of hippocampal synaptic plasticity. *Neuron* 16, 89-101.
- Dudek SM, Fields RD (2002). Somatic action potentials are sufficient for late-phase LTP-related cell signaling. *PNAS* 99, 3962-3967.
- Frey U, Huang YY, Kandel ER (1993). Effects of cAMP simulate a late stage of LTP in hippocampal CA1 neurons. *Science* 260, 1661-1664.
- Frey U, Krug M, Reymann KG, Matthies H (1998). Anisomycin, an inhibitor of protein synthesis, blocks late phase of LTP phenomena in hippocampal CA1 region in vitro. *Brain Res* 452, 57-65.
- Frey U and Morris RGM (1997). Synaptic tagging and long-term potentiation. *Nature* 385, 533-536.



Frey U and Morris RGM (1998). Synaptic tagging : implications for late maintenance of hippocampal long-term potentiation. *Trends Neuroscience* 21, 181-188.

Geiger JR, Melcher T, Koh DS, Sakmann B, Seeburg PH, Jonas P, Monyer H (1995). Relative abundance of subunit mRNAs determines gating and Ca<sup>2+</sup> permeability of AMPA receptors in principal neurons and interneurons in rat CNS neuron. *Neuron* 15, 193-204.

Ginty DD (1997). Calcium regulation of gene expression: isn't that spatial ? *Neuron* 18, 183-186.

Giovannini MG, Blitzer RD, Wong T, Asoma K, Tsokas P, Morrison JH, Iyengar R, Landau EM (2001). Mitogen-activated protein kinase regulates early phosphorylation and delayed expression of Ca<sup>2+</sup> /calmodulin dependent protein kinase II in long-term potentiation. *J Neurosci.* 21, 7053-7062.

Grassi S and Pettorossi VE (2001). Synaptic plasticity in the medial vestibular nuclei: role of glutamate receptors and retrograde messengers in rat brainstem slices. *Prog Neurobiol* 64 (6): 527-53.

Hanson PI, Heuser JE, Jahn R (1997). Neurotransmitter release-four years of SNARE complexes. *Current Opinion in Neurobiology* 7, 310-315.

Hebb DO (1949). *Organization of Behavior* (Wiley, New York)

Hirasawa M, Pittman QJ (2003). Nifedipine facilitates neurotransmitter release independently of calcium channels. *PNAS* 100, 6139-6144.

Hollmann M and Heinemann S (1994). Cloned glutamate receptors. *Annl Rev Neurosci.* 17, 31-108.

Huang YY, Kandel ER (1994) Recruitment of long-lasting and protein kinase A-dependent long-term potentiation in the CA1 region of hippocampus requires repeated tetanization. *Learn Mem.* 1, 74-82.

Huang YY, Kandel ER (1996). Modulation of both the early and the late phase of mossy fiber LTP by activation of  $\beta$ -adrenergic receptors. *Neuron* 16, 611–617.

Huang YY, Nguyen PV, Abel T, Kandel ER (1996). Long-lasting forms of synaptic potentiation in the mammalian hippocampus. *Learn Mem* 3, 74-85.

Huang Y-Y, Martin KC, Kandel ER (2000). Both protein kinase A and mitogen-activated protein kinase are required in the amygdala for the macromolecular synthesis-dependent late phase of long-term potentiation. *J Neurosci* 20, 6317-6325.

Jonas P, Bischofberger J, Sandkuhler J (1998). Corelease of two fast neurotransmitters at a central synapses. *Science* 281, 419-424.

Jonas P, Racca C, Sakmann B, Seeburg PH, Monyer H (1994). Differences in  $\text{Ca}^{2+}$  permeability of AMPA-type glutamate receptor channels in neocortical neurons caused by differential GluR-B subunit expression. *Neuron* 12, 1281-1289.

Johnston D and Amaral DG (1998). Hippocampus in “The synaptic organization of the brain”(GM Shepherd, Ed) chapter 11.

Kleiman R, Banker G, Steward O (1990). Differential subcellular localization of particular mRNAs in hippocampal neurons in culture. *Neuron* 5, 821-830.

Krug M, Lossner B, Ott T (1984). Anisomycin blocks the late phase of long-term potentiation in the dentate gyrus of freely moving rats. *Brain Res. Bull.* 13, 39-42.

Larson J, Wong D, Lynch G (1986). Pattern stimulation at the theta frequency is optimal for the induction of hippocampal long-term potentiation. *Brain Res* 368, 347-350.

Lin CH, Yeh SH, Lu HY and Gean PW (2003) The Similarities and Diversities of Signal Pathways Leading to Consolidation of Conditioning

and Consolidation of Extinction of Fear Memory. *J Neurosci* 23, 8292–8299.

Liu J, Fukunaga K, Yamamoto H, Nishi K, Miyamoto E (1999). Differential roles of  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulin-dependent protein kinase II and mitogenactivated protein kinase activation in hippocampal long-term potentiation. *J Neurosci* 19, 8292-8299.

Makhinson M, Chotiner JK, Watson JB, O’Dell TJ (1999). Adenylyl cyclase activation modulates activity-dependent changes in synaptic strength and  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulin-dependent kinase II autophosphorylation. *J Neurosci* 19, 2500-2510.

Mayford M, Abel T, Kandel ER (1995). Transgenic approaches to cogniyion. *Cuur. Opin. Neurobiol.* 5, 141-148.

Malinnow R, et al (1998). Persistent protein kinase activity underlying long-term potentiation. *Nature.* 325, 820-824.

Milner B, Squire LR, Kandel ER (1998). Congnitive neuroscience and the study of memory. *Neuron* 20, 445-468.

Montarolo PG, Goelet P, Castellucci VF, Morang J, Kandel ER, Schanher S (1986). A critical period for macromolecular synthesis in long-term heterosynaptic facilitation in *Aplysia*. *Science* 234, 1249-1254.

Morris RGM, Anderson E, Lynch GS, Baudry M (1986). Selective impairment of learning and blockade of long-term potentiation by an N-methyl-D-aspartate receptor antagonist AP5. *Nature* 319, 774-776.

Neher E (1998). Vesicle pools and  $\text{Ca}^{2+}$  microdomains: new tools for understanding their roles in neurotransmitter release. *Neuron* 20, 389-399.

Nguyen PV, Abel T, Kandel ER (1994). Requirement for a critical period of transcription for induction of a late phase of LTP. *Science* 256, 1104-1107.

Nicholls JG, Martin AR, Wallace BG (1992) Principles of synaptic Transmission. in "FROM NEURON TO BRAIN" (J.G.Nicholls, Ed). Chapter 7.

Nicoll RA, Malenka RC, Kauer JA (1990). Functional comparison of neurotransmitter receptor subtypes in mammalian central nervous system. *Physiol Rev* 70, 513-565.

Otmakhova NA, Otmakhov N, Mortenson LH, Lisman JE (2000) Inhibition of cAMP pathway decreases early long-term potentiation at CA1 hippocampal synapses. *J Neurosci* 20, 4446-4451.

Pockett S, Slack JR, Peacock S (1993). Cyclic AMP and long-term potentiation in the CA1 region of rat hippocampus. *Neuroscience* 52, 229-236.

Roberson ED, English JD, Adams JP, Selcher JC, Kondratieck C and Sweatt JD (1999). The Mitogen-Activated Protein Kinase Cascade Couples PKA and PKC to cAMP Response Element Binding Protein phosphorylation in Area CA1 of Hippocampus. *J Neurosci* 19, 4337-4348.

Roberson ED, English JD, Sweatt JD (1996). Second messengers in LTP and LTD. In: Cortical plasticity: LTP and LTD (Fazeli MS, Collingridge GL, eds), pp 35-60. Oxford: BIOS Scientific.

Shepherd GM and Koch C (1998). Introduction to synaptic circuits. In "The synaptic organization of the brain" (G.M. Shepherd, Ed.), chapter 1.

Sherrington C (1906). Integrative action of the nervous system. New Haven: Yale University Press.

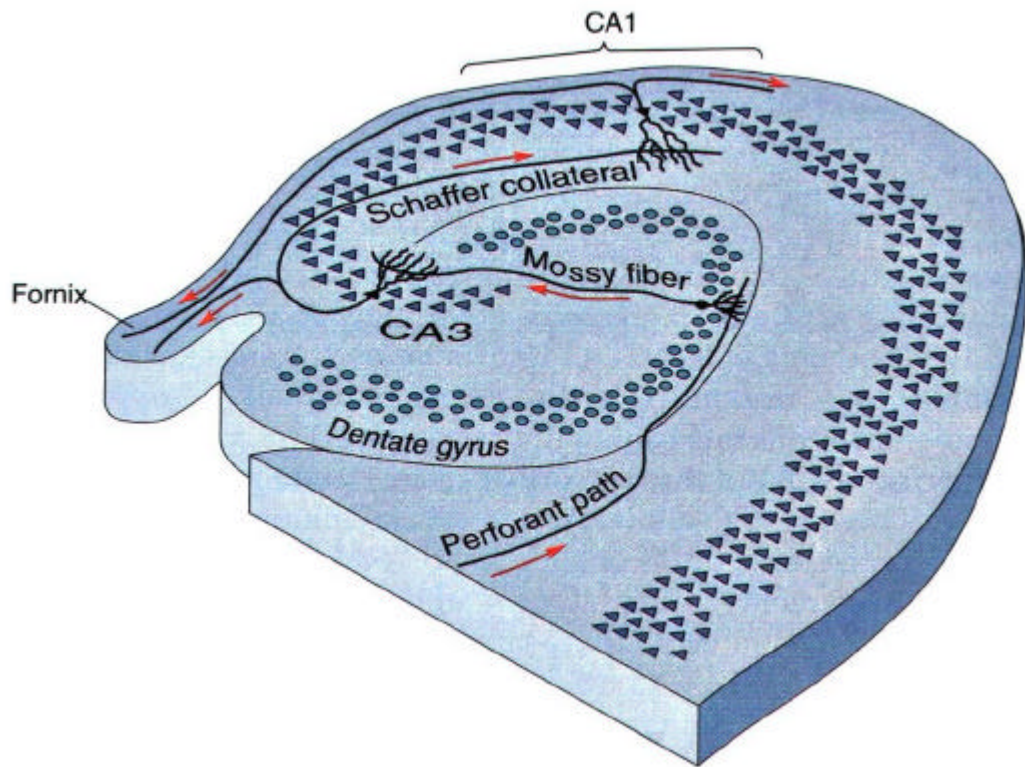
Squire LR, Alvarez P (1995). Retrograde amnesia and memory consolidation: a neurobiological perspective. *Curr. Opin. Neurosci.* 5, 167-177.

Stevens CF, Tonegawa S, Wang Y (1994). The role of calcium-calmodulin kinase II in three forms of synaptic plasticity. *Curr Biol* 4, 687-693.

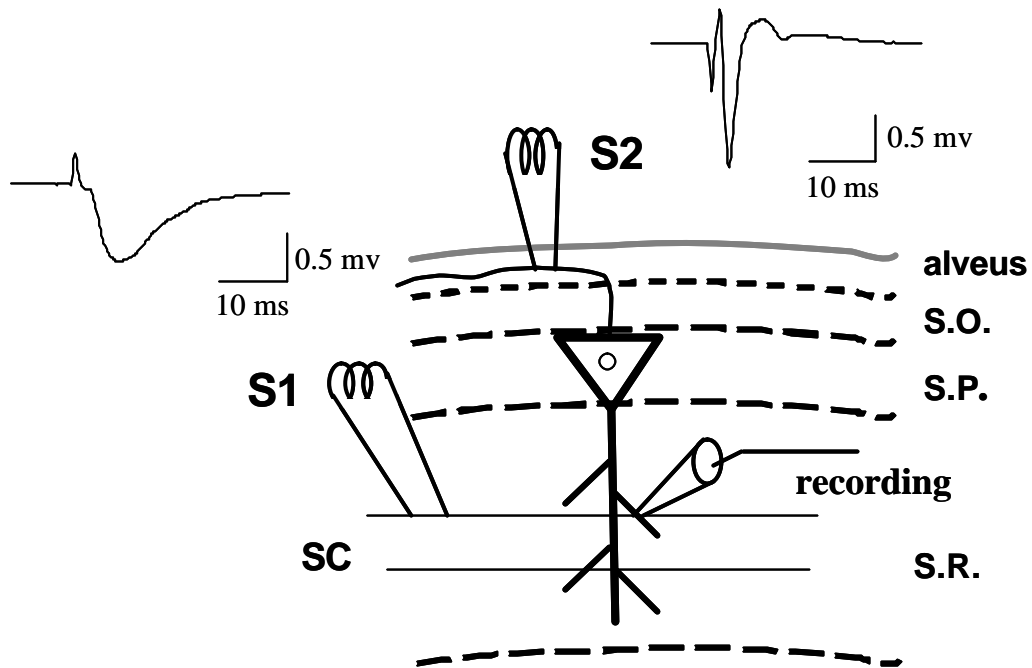
Trimarchi JR and Murphey RK (1997). The shaking-B<sup>2</sup> mutation disrupts electrical synapses in a flight circuit in adult drosophila. *J Neurosci* 17, 4700-4710.

Winder DG, Martin KC, Muzzio IA, Rohrer D, Chruscinski A, Kobilka B, Kandel ER (1999). ERK plays a regulatory role in induction of LTP by theta frequency stimulation and its modulation by beta-adrenergic receptors. *Neuron* 24, 715-726.

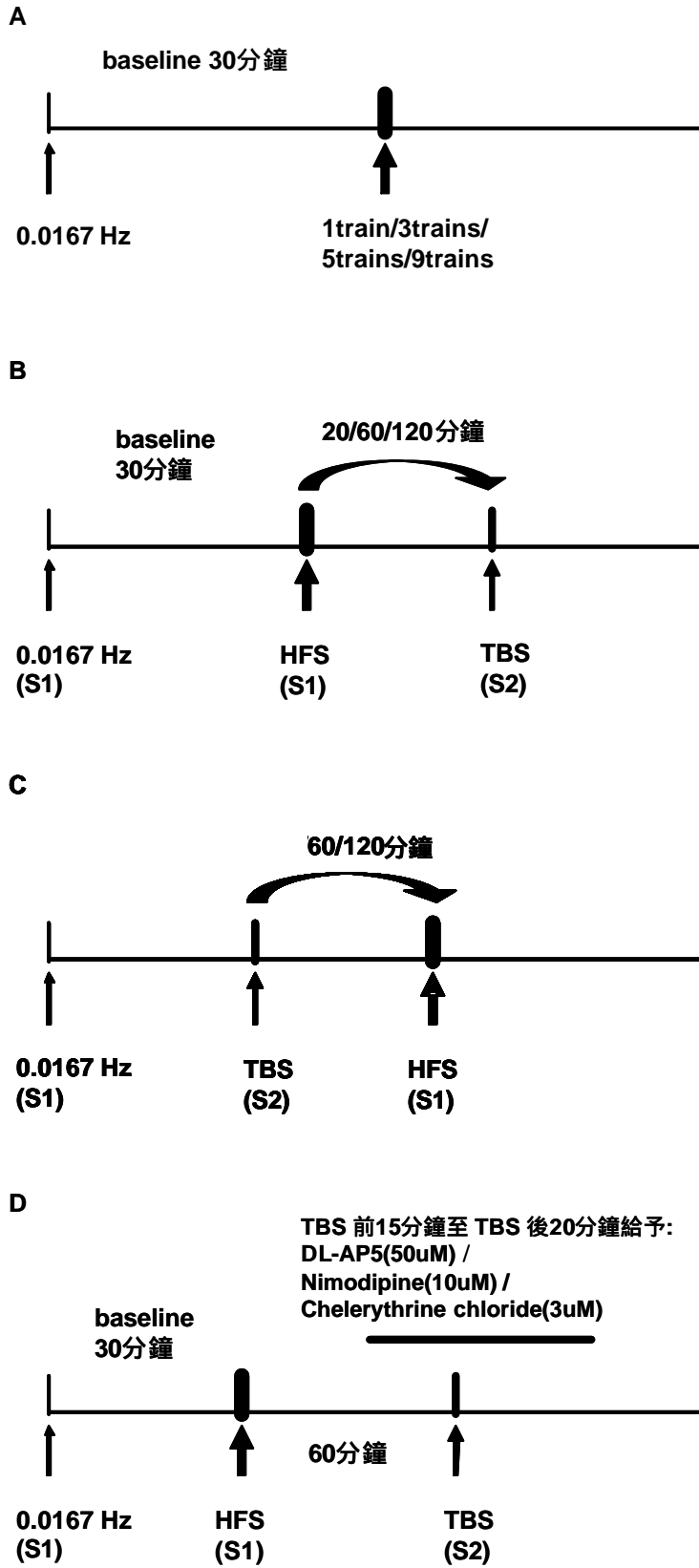
Zucker RS (1999). Calcium-and activity-dependent synaptic plasticity. *Curr opin Neurobiol* 9, 305-313.



圖一：海馬體的結構與神經迴路。海馬體由兩簇 C 型的神經元聚集所組成，即 cornu Ammonis (CA) 以及 dentate gyrus (DG)，CA 可以細分為 CA1、CA2、CA3 和 CA4，細胞形狀似三角形，因此稱為錐狀細胞 (pyramidal cell)；DG 的細胞形狀似圓形，稱為顆粒細胞 (granule cell)。海馬體之神經迴路有：1. Perforant pathway (PP)；2. Mossy fiber (MF)；3. Schaffer collateral (SC) pathway。其詳細介紹如序論第二節(1.)和(2.) (圖形引用 Neuroscience 2002；chapter 24, Fig 24.23)。

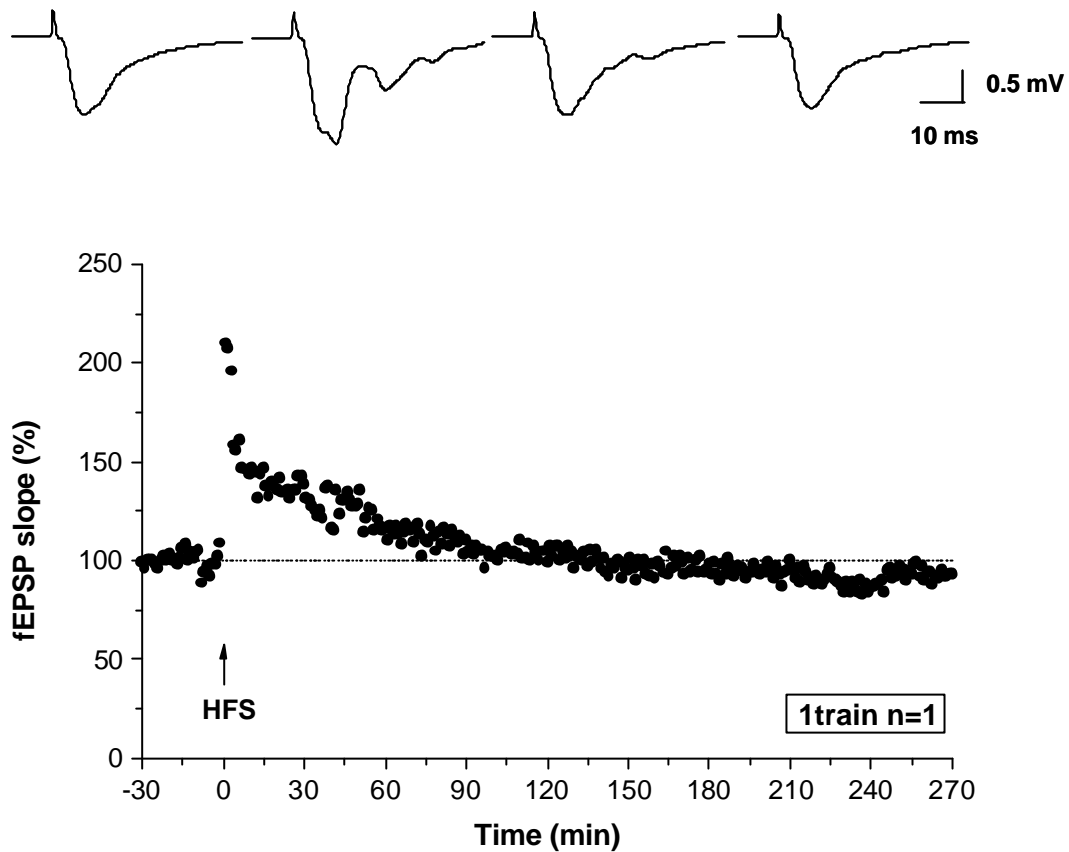


圖二：海馬體 CA1 之電極所擺放的位置圖。記錄電極擺放在 stratum radiatum (SR) 區域，用以記錄細胞外 fEPSP；S1 刺激電極擺放在記錄電極不遠處用來刺激 Schaffer collateral (SC) branch 引發 fEPSP，以及給予 HFS；S2 刺激電極則擺放在 CA1 的 alveus 區域，用來引發 antidromic spike 以及給予 TBS。SO：stratum oriens；SP：stratum pyramidale (somata)。

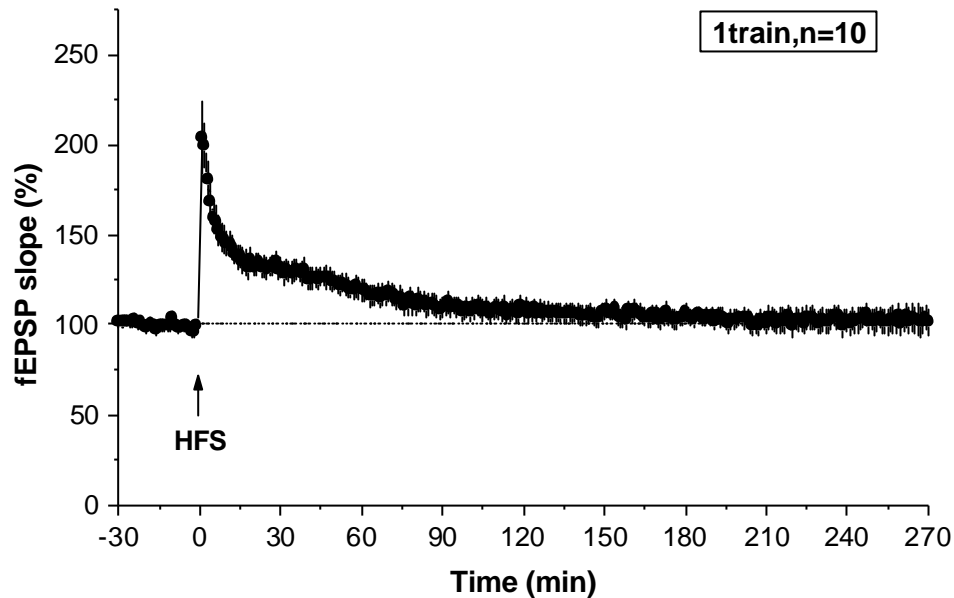


圖三：實驗流程圖。細節如實驗方法第四節所敘述。

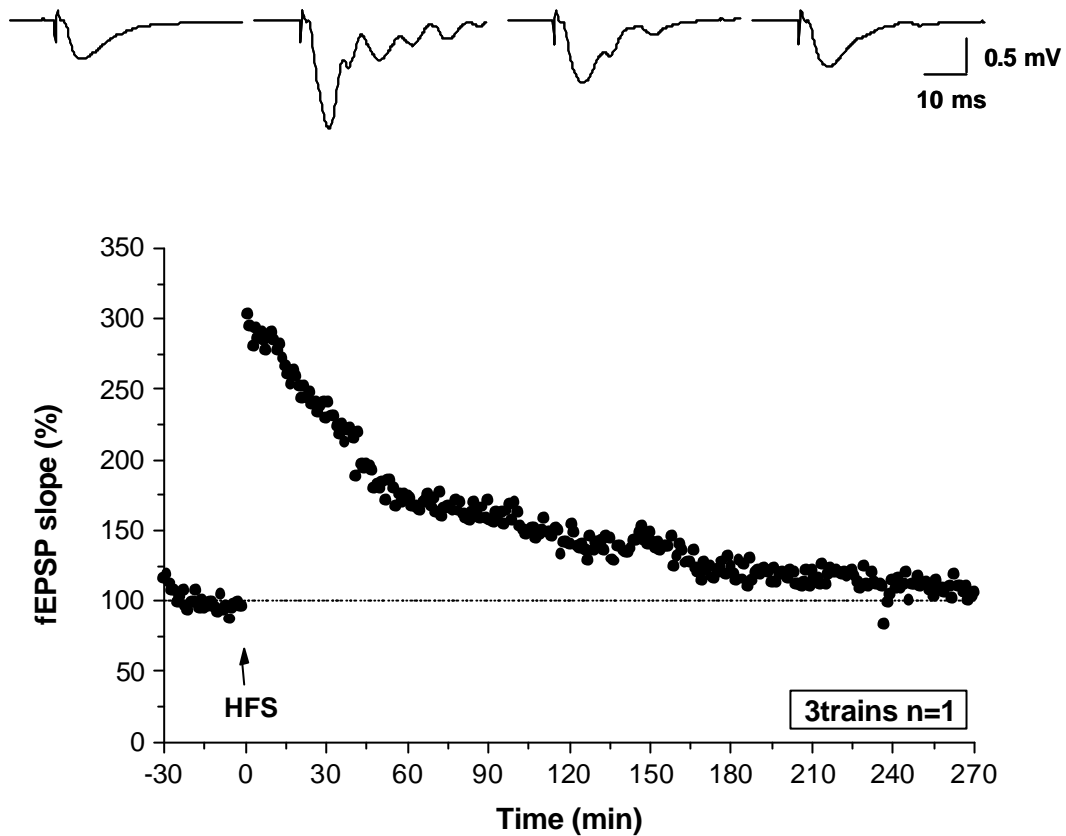




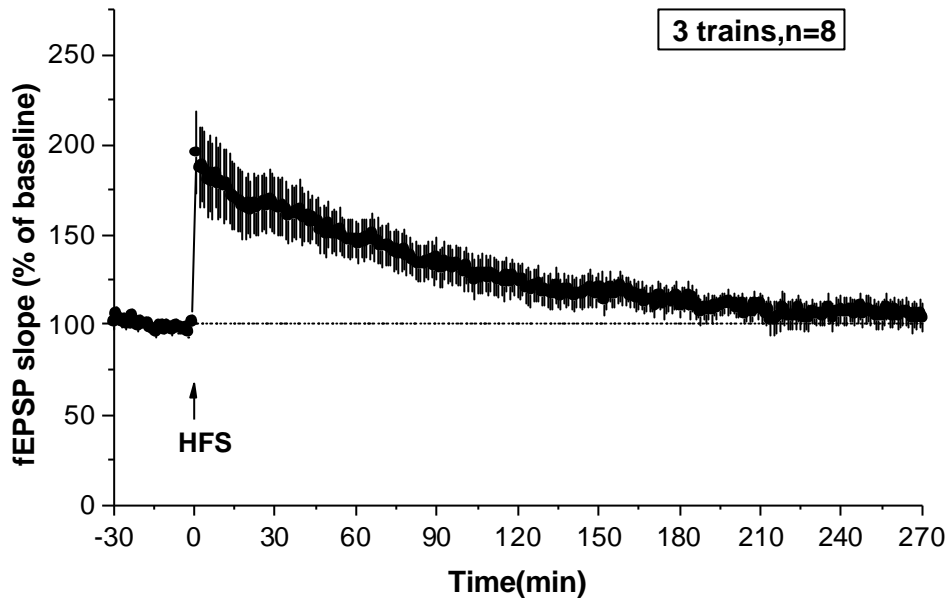
圖四：1 train 的 100 Hz 高頻率刺激能夠誘發 early-phase LTP，此圖為單一次實驗的結果。測得 30 分鐘穩定 baseline 之後，給予 1 train 的高頻率刺激（箭頭所指之時間點），可以誘發 early-phase LTP（LTP=125.4 %，LTP 之測量為 HFS 之後 31~60 分鐘）。每個 Raw data trace 由 30 個 responses 平均而成，由左至右分別為 baseline、HFS 後 31-60 分鐘、HFS 後 121-150 分鐘和 HFS 後 241-270 分鐘。



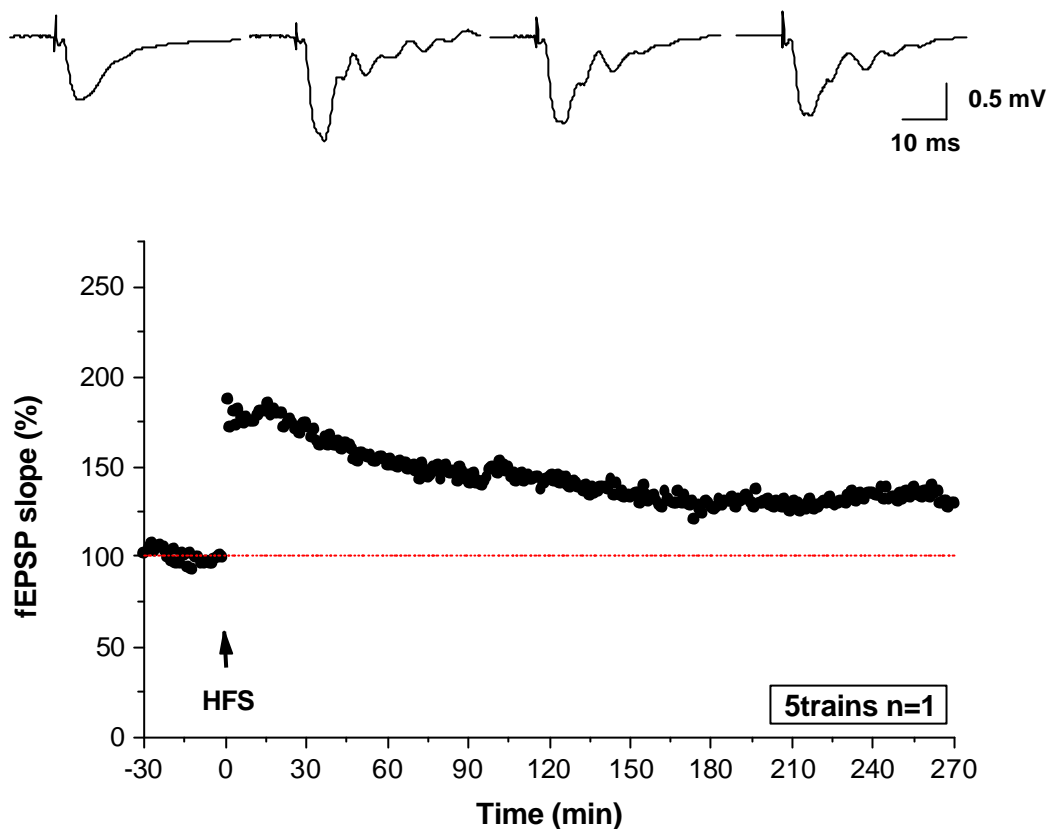
圖五：1 train 的高頻率刺激能夠在海馬體 CA1 區域誘發 early-phase LTP, 此為總合十次如圖四之實驗結果的圖(  $n = 10$  ) 由圖可知 1 train 的高頻率刺激所誘發出的 LTP , 可以維持至高頻率刺激後的 60 分鐘 (  $125.2 \pm 5.40\%$ ,  $n = 10$ ,  $p < 0.05$ , paired t-test , LTP 之測量為 HFS 之後 31~60 分鐘) , 此 LTP 屬於 early-phase LTP。



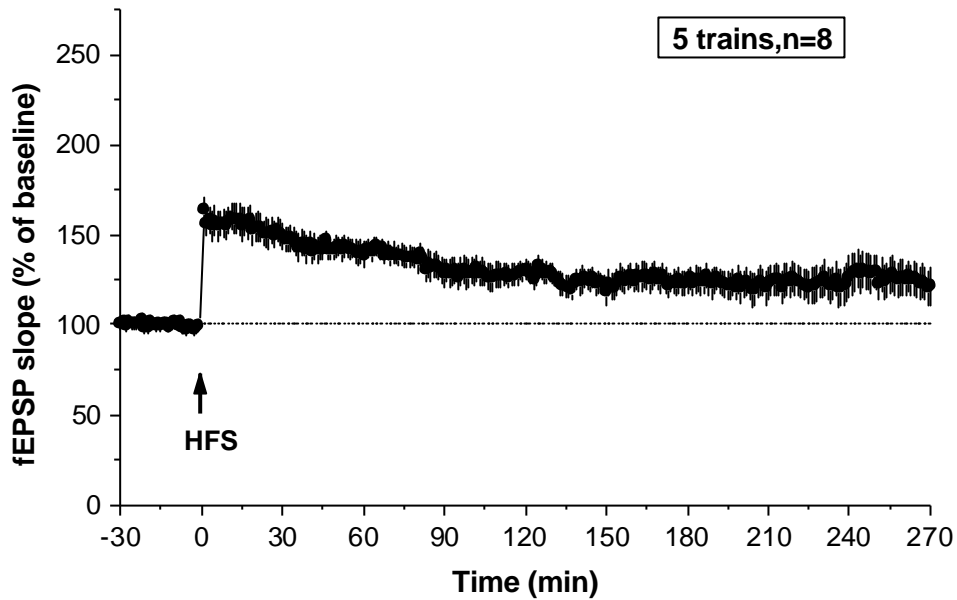
圖六：3 trains 的高頻率刺激能夠誘發 early-phase LTP，此圖為單一次實驗的結果。測得 30 分鐘穩定 baseline 之後，給予 3 trains 的高頻率刺激，間距為 90 秒（箭頭所指之時間點），可以誘發 early-phase LTP（197.7%，LTP 之測量為 HFS 之後 31~60 分鐘）。每個 Raw data trace 由 30 個 responses 平均而成，由左至右分別為 baseline、HFS 後 31-60 分鐘、HFS 後 121-150 分鐘和 HFS 後 241-270 分鐘。



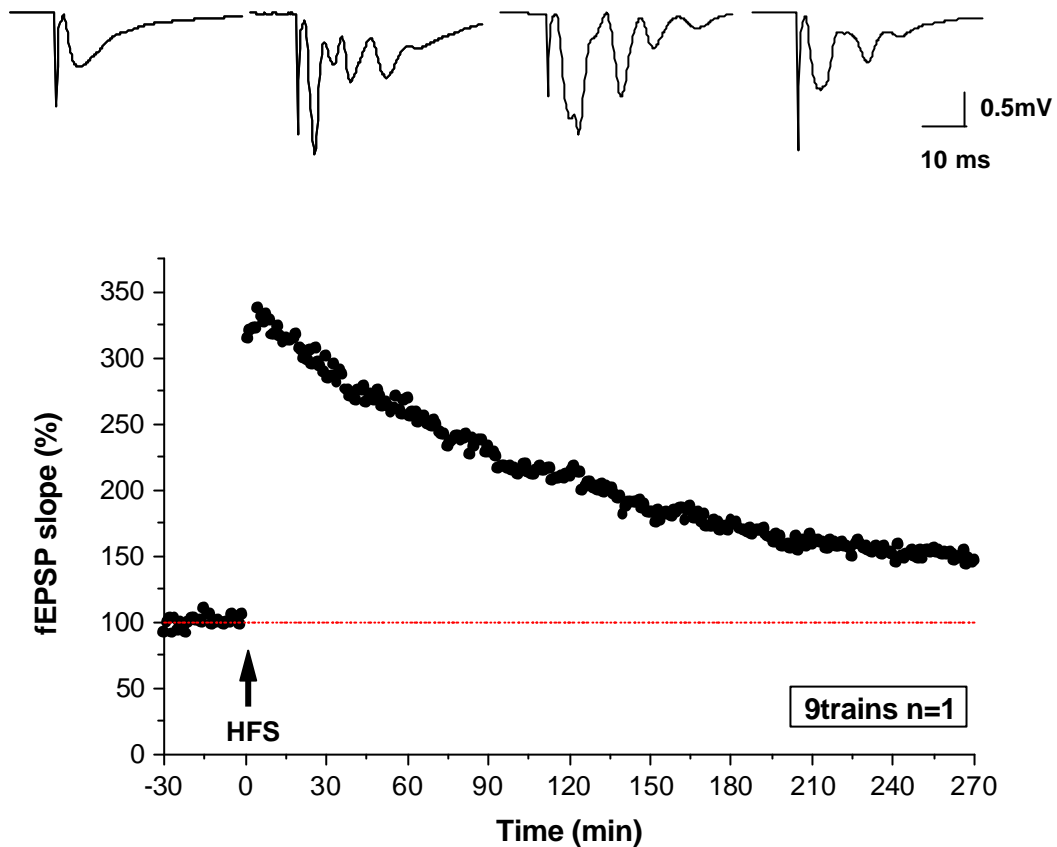
圖七：3 trains 的高頻率刺激能夠在海馬體 CA1 區域誘發 early-phase LTP, 此為總合八次如圖六之實驗結果的圖(  $n = 8$  )。由圖可知 3 trains 的高頻率刺激所誘發的 LTP 能夠形成 early-phase LTP (  $156.3 \pm 12.98\%$ ,  $n = 8$ ,  $p < 0.05$ , paired t-test, LTP 之測量為 HFS 之後 31~60 分鐘), 但無法維持至 late-phase LTP (  $106.6 \pm 7.15\%$ ,  $n = 8$ ,  $p = 0.38$ , paired t-test, LTP 之測量為 HFS 之後 241~270 分鐘)。



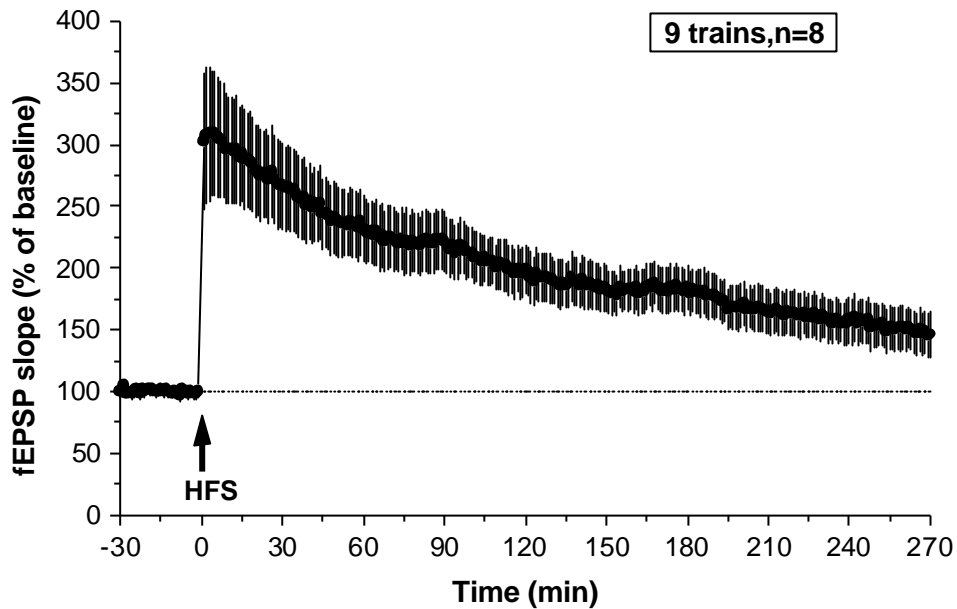
圖八：5 trains 的高頻率刺激能夠誘發 late-phase LTP，此圖為單一次實驗的結果。測得 30 分鐘穩定 baseline 後，給予 5 trains 的高頻率刺激，間距為 90 秒（箭頭所指之時間點），可以誘發維持長達 270 分鐘的 LTP，形成 late-phase LTP（133.6%，LTP 之測量為 HFS 之後 241~270 分鐘）。每個 Raw data trace 由 30 個 responses 平均而成，由左至右分別為 baseline、HFS 後 31-60 分鐘、HFS 後 121-150 分鐘和 HFS 後 241-270 分鐘。



圖九：5 trains 的高頻率刺激能夠在海馬體 CA1 區域誘發 late-phase LTP, 此為總合八次如圖八之實驗結果的圖( n = 8 )。由圖可知 5 trains 的高頻率刺激所誘發的 LTP, 可以維持至高頻率刺激後的 270 分鐘, 形成 late-phase LTP (  $126.3 \pm 9.44\%$ ,  $n = 8$ ,  $p < 0.05$ , paired t-test, LTP 之測量為 HFS 之後 241~270 分鐘 )。

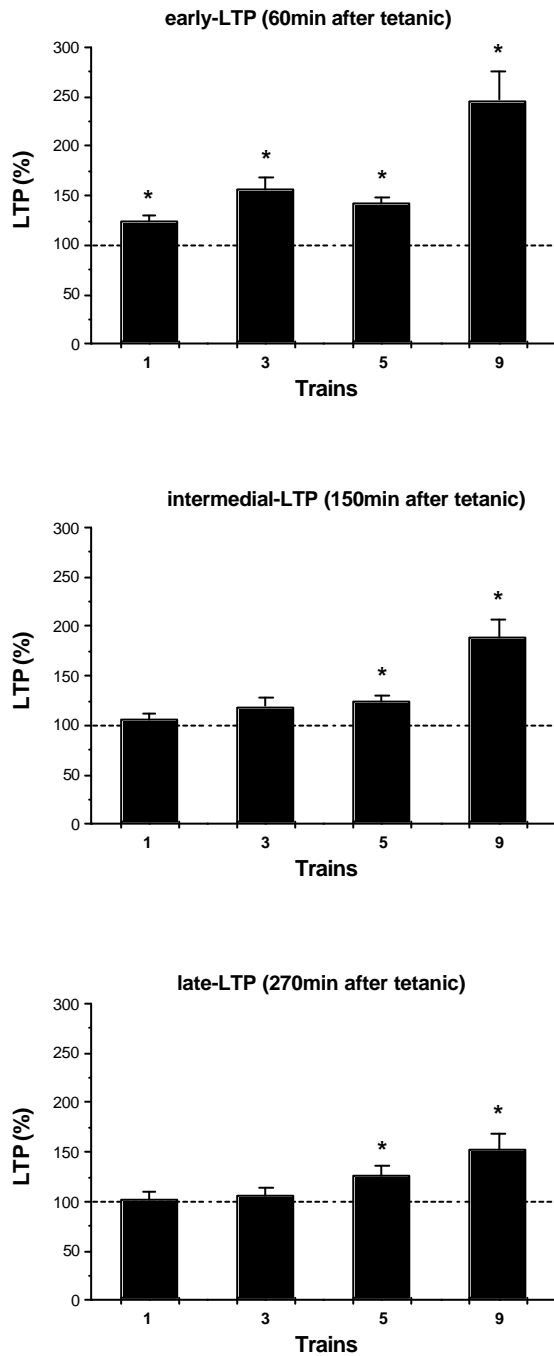


圖十：9 trains 的高頻率刺激能夠誘發 late-phase LTP，此圖為單一次實驗的結果。測得 30 分鐘穩定 baseline 之後，給予 9 trains 的高頻率刺激，間距為 90 秒（箭頭所指之時間點），可以誘發 late-phase LTP（150.4%，LTP 之測量為 HFS 之後 241~270 分鐘）。每個 Raw data trace 由 30 個 responses 平均而成，由左至右分別為 baseline、HFS 後 31-60 分鐘、HFS 後 121-150 分鐘和 HFS 後 241-270 分鐘。

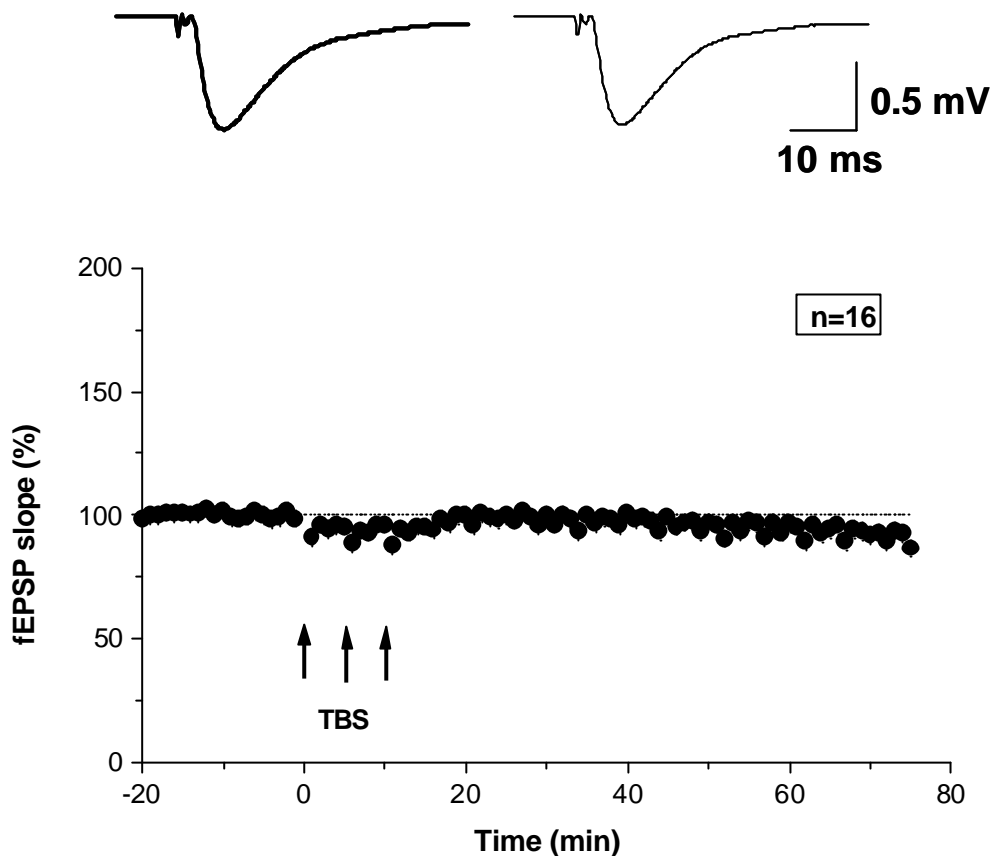


圖十一：9 trains 的高頻率刺激能夠在海馬體 CA1 區域誘發 late-phase LTP, 此為總合八次如圖十之實驗結果的圖( n = 8 )。由圖可知 9 trains 的高頻率刺激所誘發出來的 LTP , 可以形成 late-phase LTP , (  $151.9 \pm 17.45 \%$  , n = 8 ,  $p < 0.05$  , paired t-test , LTP 之測量為 HFS 之後 241~270 分鐘 )。

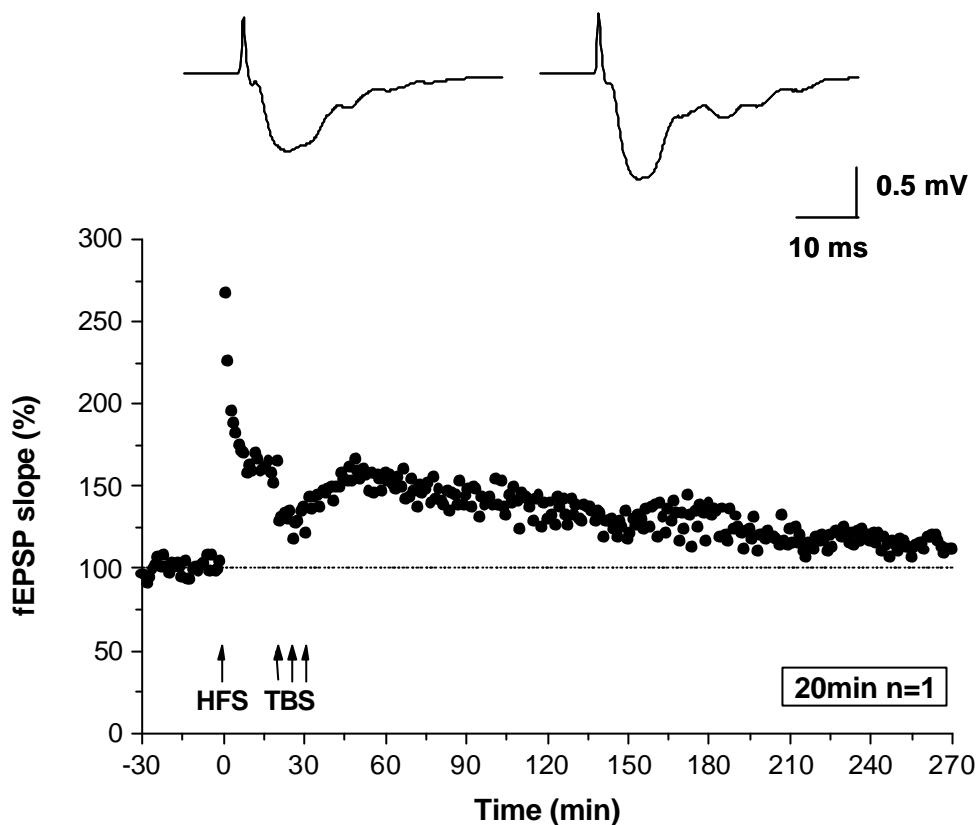




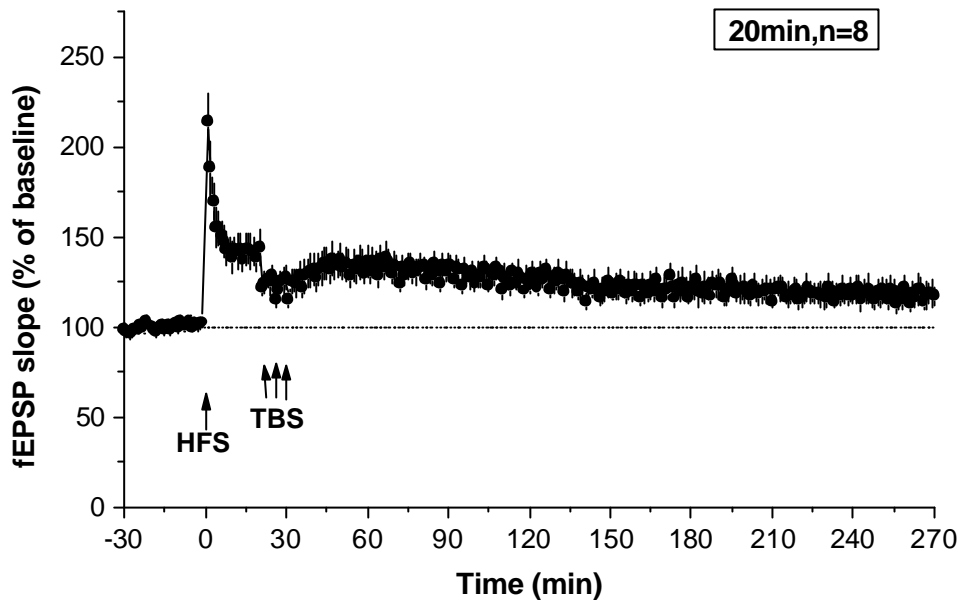
圖十二：在海馬體 CA1 區域，LTP 之表現時間長短與刺激時所給予的 trains 數目成正比例關係。1 train (n = 10)、3 trains (n = 8) 的高頻率刺激能夠引發 early-phase LTP；而 5 trains (n = 8) 和 9 trains (n = 8) 的高頻率刺激則能夠引發出 late-phase LTP。



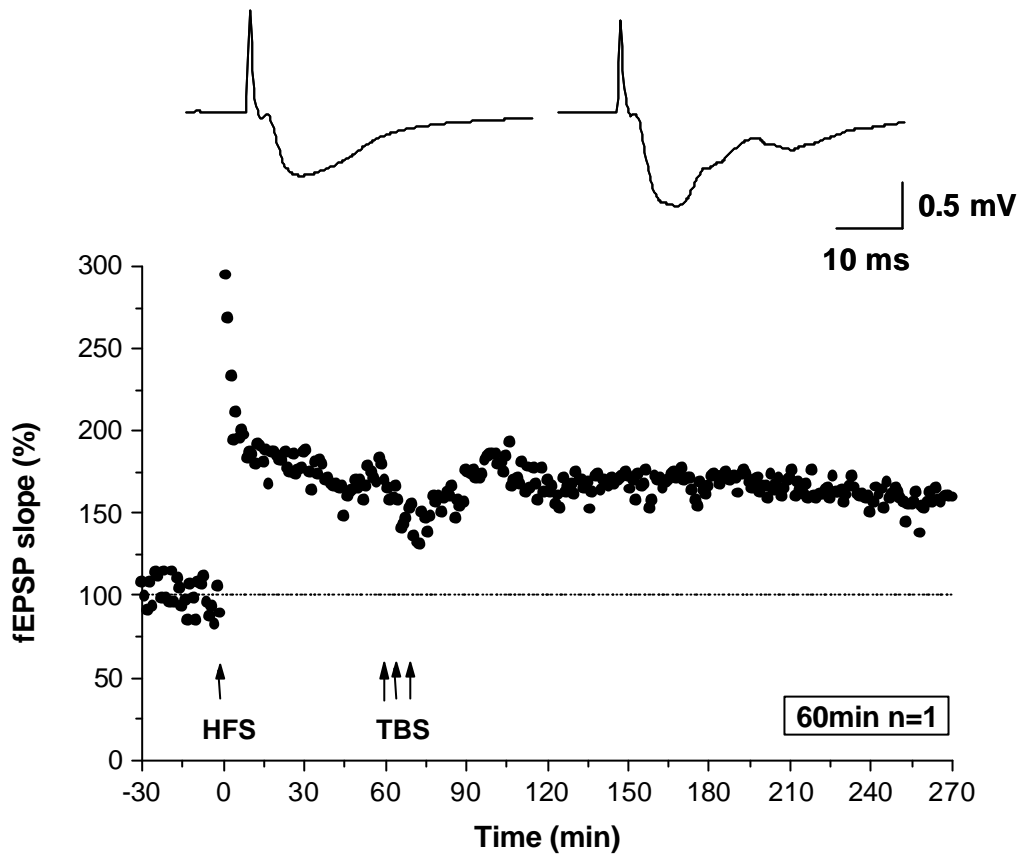
圖十三：S1 電極與 S2 電極所刺激的 pathway 互為獨立，此為總合十六次實驗的結果圖（ $n = 16$ ）。測得 20 分鐘穩定 baseline 之後，經由 S2 電極給予三次 TBS 刺激（箭頭所指之時間點）活化細胞本體，則 TBS 刺激對 S1 刺激所引發出的 fEPSP 不會造成 potentiation 的影響（ $93.8 \pm 2.97\%$ ,  $n = 16$ ,  $p = 0.055$ , paired t-test, fEPSP 之測量為 TBS 之後 51~70 分鐘）。每個 Raw data trace 由 20 個 responses 平均而成，左圖為 baseline；右圖為 TBS 後 51-70 分鐘。



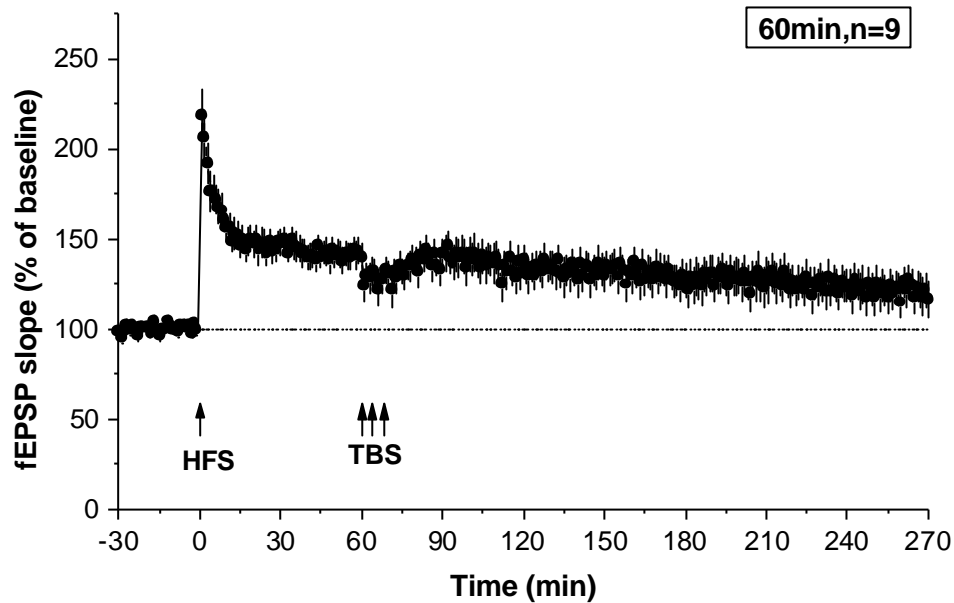
圖十四：在 1 train 的高頻率刺激後 20 分鐘，配合 theta-頻率波刺激活化 CA1 細胞本體，能使 1 train 誘發的 early-phase LTP 被鞏固成為 late-phase LTP，此圖為單一次實驗的結果。在 1 train 的高頻率刺激後 20 分鐘，再給予 3 次 theta-頻率波刺激活化 CA1 細胞本體（箭頭所指之時間點），能夠使 1 train 誘發的 early-phase LTP 被鞏固成為 late-phase LTP（114.3%，LTP 之測量為 HFS 之後 241~270 分鐘）。每個 Raw data trace 由 30 個 responses 平均而成，左圖為 baseline；右圖為 HFS 後 241-270 分鐘。



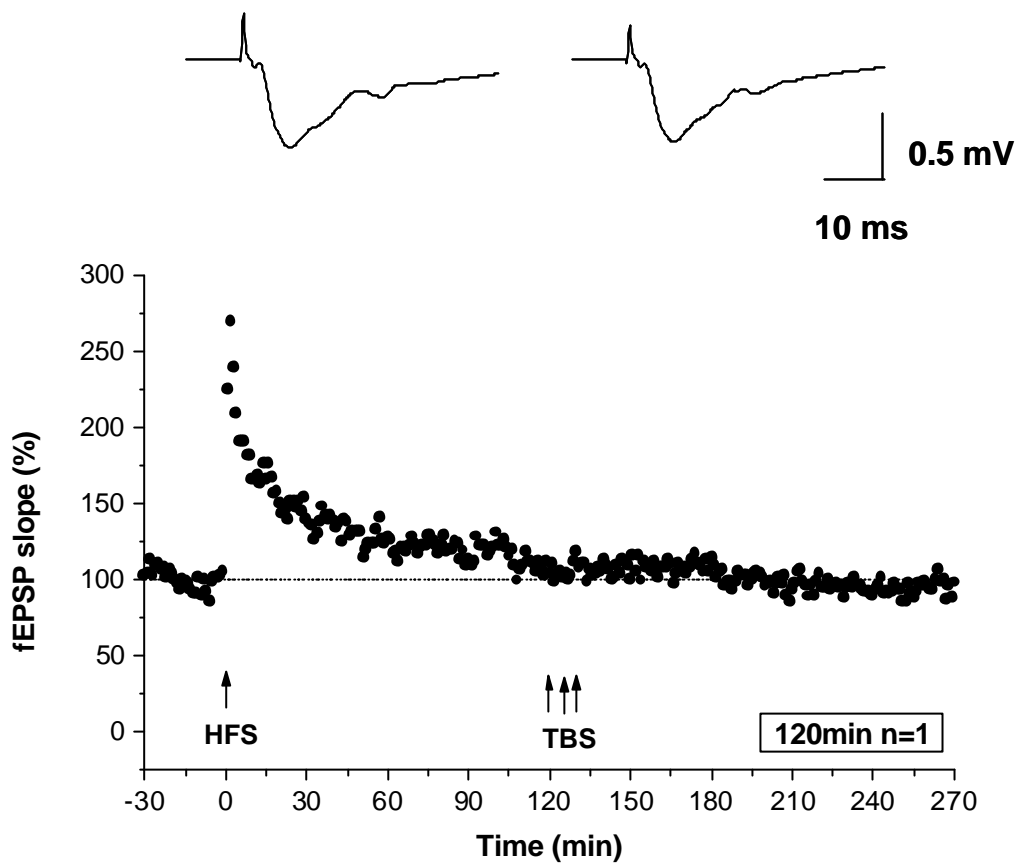
圖十五：在 1 train 的高頻率刺激後 20 分鐘，配合 theta-頻率波刺激活化 CA1 細胞本體，能使 1 train 誘發的 early-phase LTP 被鞏固成為 late-phase LTP，此為總合八次如圖十三之實驗結果的圖（ $n = 8$ ）。在 1 train 高頻率刺激後 20 分鐘，再給予 theta-頻率波刺激，能夠使 1 train 高頻率刺激誘發之 LTP，維持至高頻率刺激後的 270 分鐘，形成 late-phase LTP（ $117.8 \pm 6.13\%$ ,  $n = 8$ ,  $p < 0.05$ , paired t-test, LTP 之測量為 HFS 之後 241~270 分鐘）。



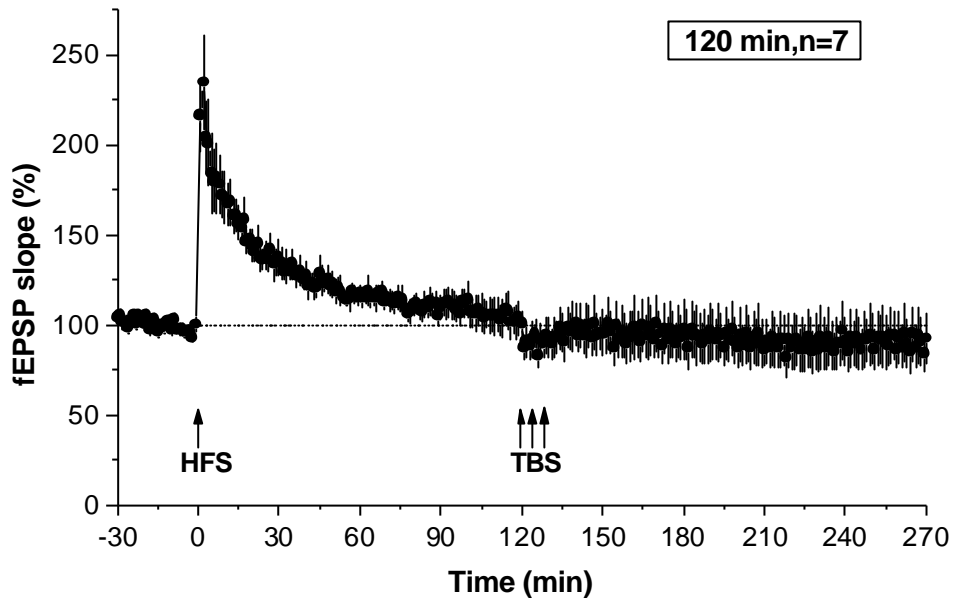
圖十六：在 1 train 的高頻率刺激後 60 分鐘，配合 theta-頻率波刺激活化 CA1 細胞本體，能使 1 train 引發的 early-phase LTP 被鞏固成為 late-phase LTP，此圖為單一次實驗的結果。在 1 train 高頻率刺激後 60 分鐘，再給予 3 次 theta-頻率波刺激（箭頭所指之時間點），能使 1 train 誘發的 early-phase LTP 被鞏固成為 late-phase LTP（158.1%，LTP 之測量為 HFS 之後 241~270 分鐘）。每個 Raw data trace 由 30 個 responses 平均而成，左圖為 baseline；右圖為 HFS 後 241-270 分鐘。



圖十七：在 1 train 的高頻率刺激後 60 分鐘，配合 theta-頻率波刺激活化 CA1 細胞本體，能使 1 train 引發的 early-phase LTP 被鞏固成為 late-phase LTP，此為總合九次如圖十五之實驗結果的圖（ $n = 9$ ）。由圖可知在 1 train 的高頻率刺激後 60 分鐘，再給予 theta-頻率波刺激能使 1 train 誘發之 early-phase LTP 被鞏固成為 late-phase LTP（ $121.6 \pm 9.12\%$ ， $n = 9$ ， $p < 0.05$ ，paired t-test，LTP 之測量為 HFS 之後 241~270 分鐘）。

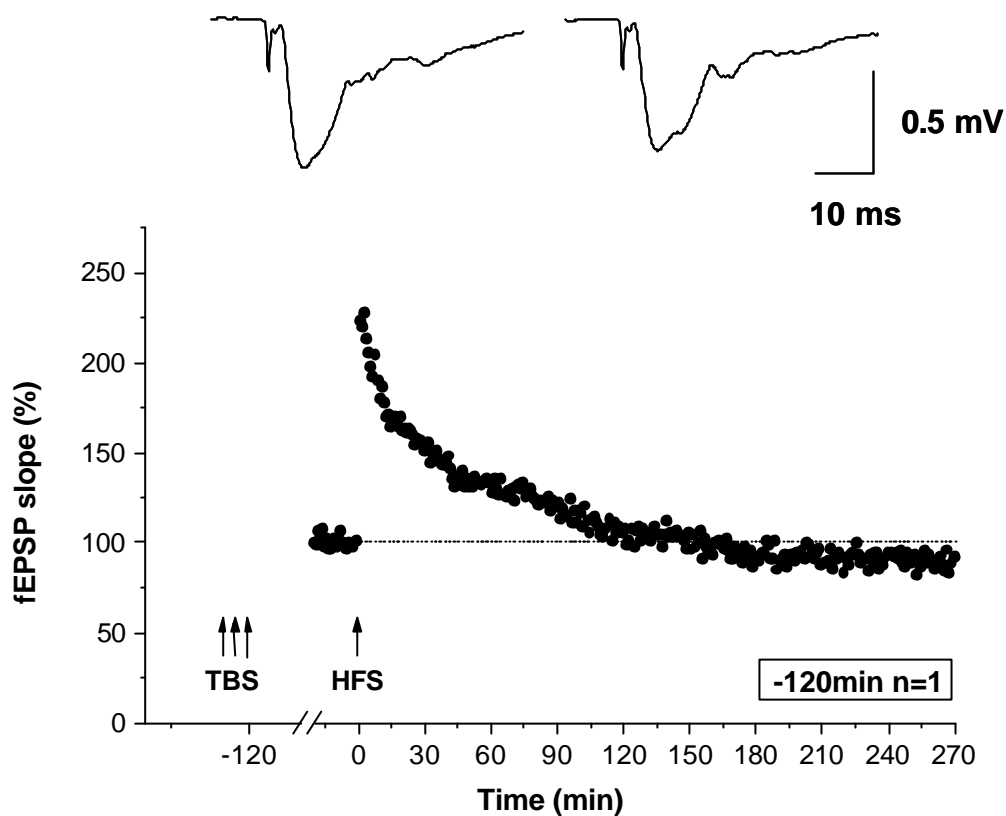


圖十八：在 1 train 的高頻率刺激後 120 分鐘，再配合 theta-頻率波刺激，則 1 train 誘發的 early-phase LTP 無法被鞏固為 late-phase LTP，此圖為單一次實驗的結果。在 1 train 高頻率刺激後 120 分鐘，再給予 3 次 theta 頻率波刺激（箭頭所指之時間點），則無法使 1 train 誘發的 early-phase LTP 被鞏固成為 late-phase LTP（94.0%，LTP 之測量為 HFS 之後 241~270 分鐘），每個 Raw data trace 由 30 個 responses 平均而成，左圖為 baseline，右圖為 HFS 後 241-270 分鐘。

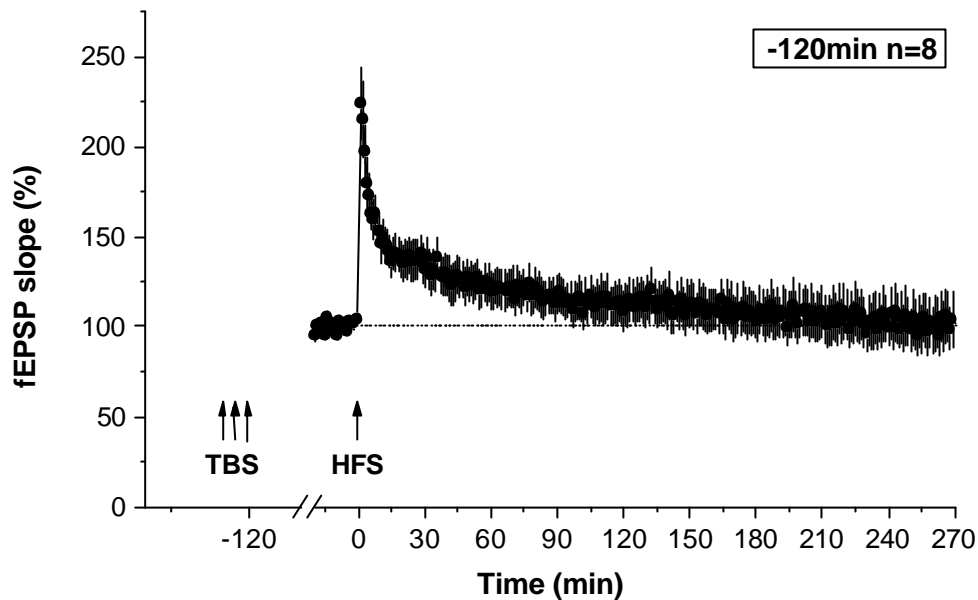


圖十九：在 1 train 的高頻率刺激後 120 分鐘，再配合 theta-頻率波刺激活化細胞本體，則 1 train 誘發的 early-phase LTP 無法被鞏固為 late-phase LTP，此為總合七次如圖十七之實驗結果的圖（ $n = 7$ ）。由圖可知在 1 train 高頻率刺激後 120 分鐘，再給予 theta-頻率波刺激，則無法使 1 train 誘發的 early-phase LTP 無法被鞏固為 late-phase LTP（ $90.4 \pm 13.36\%$ ， $n = 7$ ， $p = 0.5$ ，paired t-test，LTP 之測量為 HFS 之後 241~270 分鐘）。

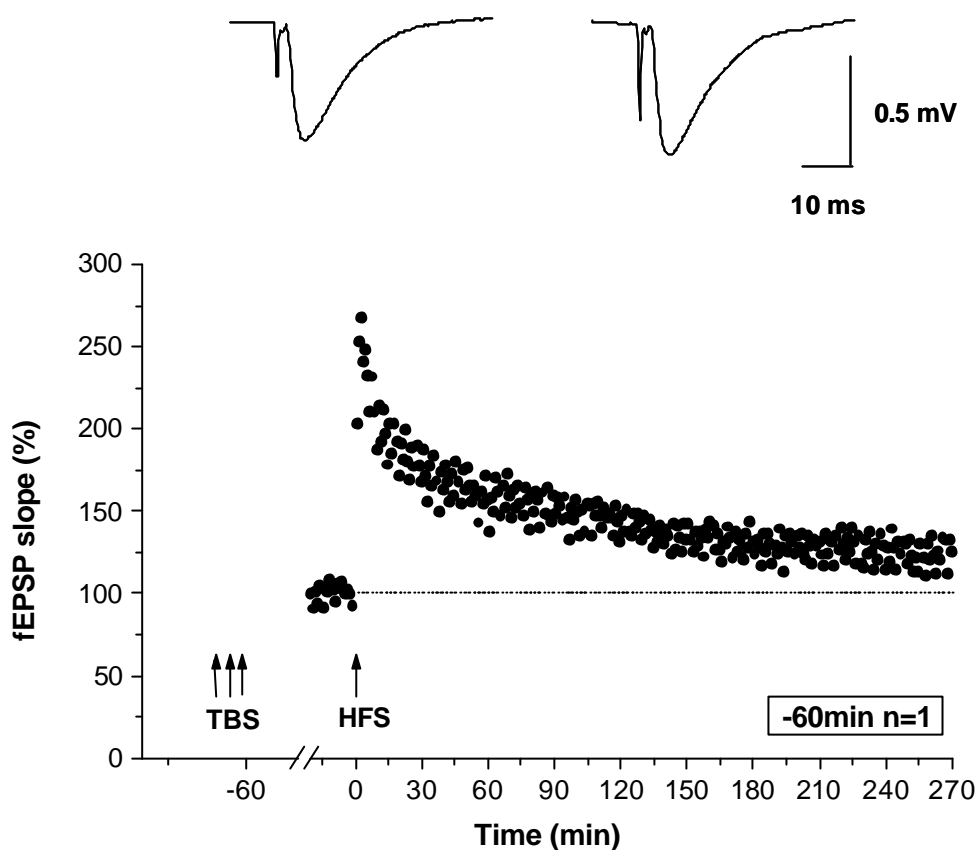




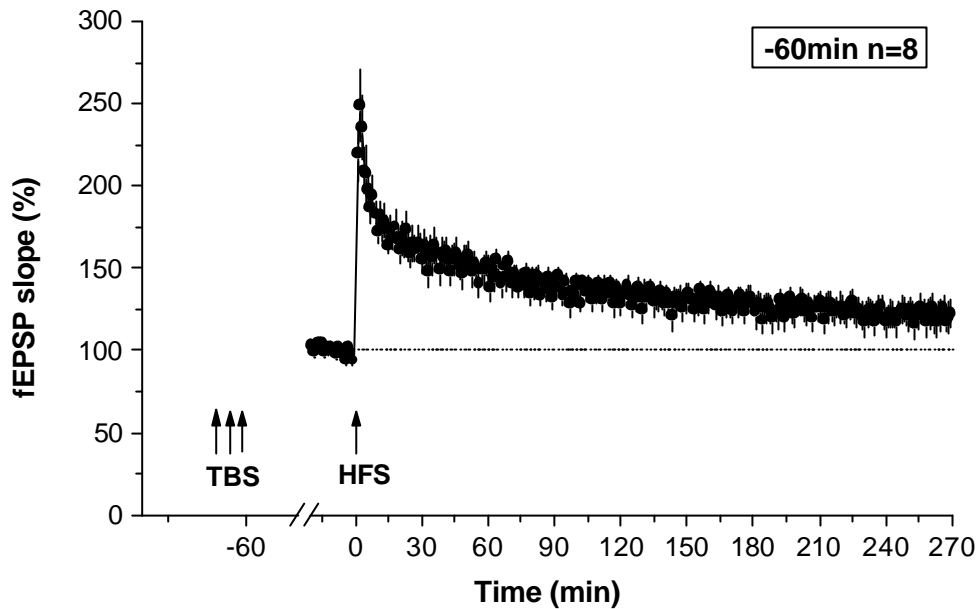
圖二十：在 1 train 的高頻率刺激前 120 分鐘，先配合 theta-頻率波刺激，則 1 train 引發的 early-phase LTP 無法被鞏固為 late-phase LTP，此圖為單一次實驗的結果。在 1 train 的高頻率刺激前 120 分鐘，先給予 3 次 theta-頻率波刺激(箭頭所指之時間點)，則無法使 1 train 誘發的 early-phase LTP 被鞏固為 late-phase LTP (89.2%，LTP 之測量為 HFS 之後 251~270 分鐘)，每個 Raw data trace 由 20 個 responses 平均而成，左圖為 baseline，右圖為 HFS 後 251-270 分鐘。



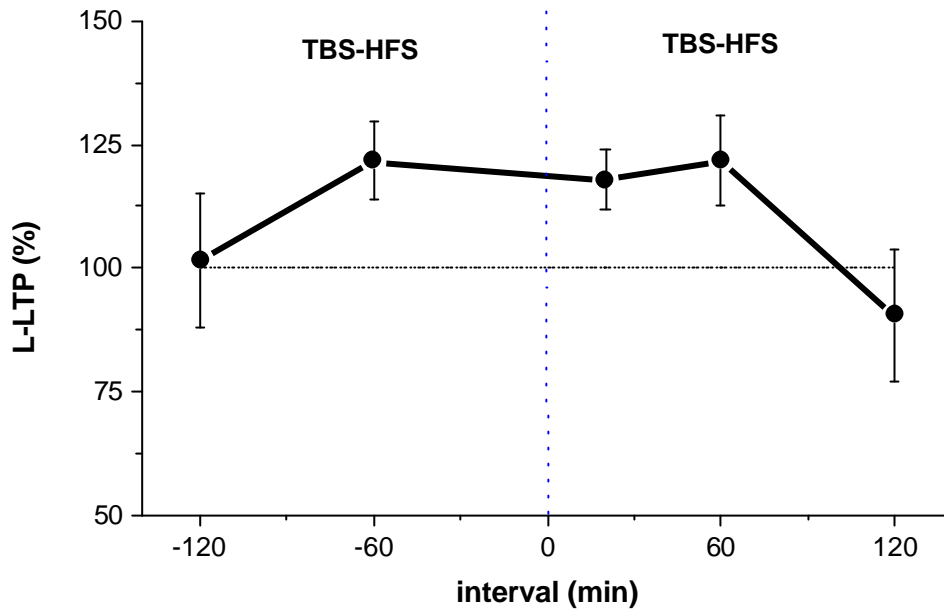
圖二十一：在 1 train 的高頻率刺激前 120 分鐘，先配合 theta-頻率波刺激活化 CA1 細胞本體，則 1 train 引發的 early-phase LTP 無法被鞏固為 late-phase LTP，此為總合八次如圖十九之實驗結果圖（ $n = 8$ ）。由圖可知在 1 train 高頻率刺激前 120 分鐘，先給予 theta 頻率波刺激，則無法使 1 train 引發的 early-phase LTP 無法被鞏固為 late-phase LTP（ $101.5 \pm 13.57\%$ ， $n = 8$ ， $p = 0.92$ ，paired t-test，LTP 之測量為 HFS 之後 251~270 分鐘）。



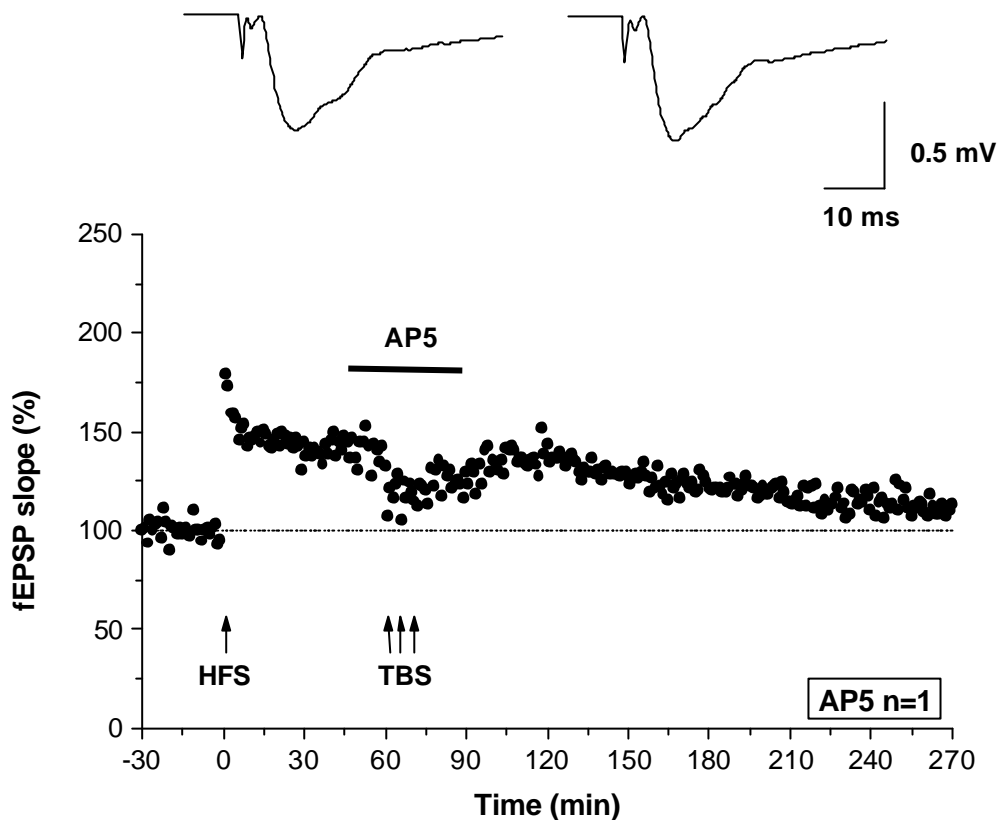
圖二十二：在 1 train 的高頻率刺激前 60 分鐘，先配合 theta-頻率波刺激，能使 1 train 引發的 early-phase LTP 被鞏固成為 late-phase LTP，此圖為單一次實驗的結果。在 1 train 高頻率刺激前 60 分鐘，先給予 3 次 theta-頻率波刺激，間隔為五分鐘（箭頭所指之時間點），能使 1 train 高頻率刺激誘發出的 early-phase LTP 被鞏固成為 late-phase LTP（123.0%，LTP 之測量為 HFS 之後 251~270 分鐘）。每個 Raw data trace 由 20 個 responses 平均而成，左圖為 baseline，右圖為 HFS 後 251-270 分鐘。



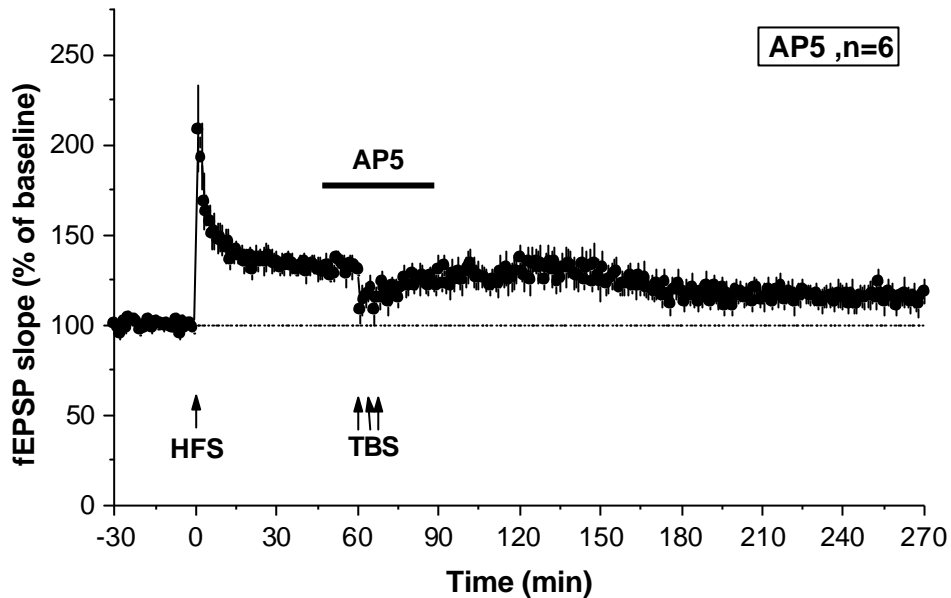
圖二十三：在 1 train 的高頻率刺激前 60 分鐘，先配合 theta-頻率波刺激活化 CA1 細胞本體，能夠使 1 train 引發的 early-phase LTP 被鞏固成為 late-phase LTP，此為總合八次如圖二十一之實驗結果的圖（ $n = 8$ ）。由圖可知在 1 train 高頻率刺激前 60 分鐘，先給予 theta-頻率波刺激，能夠使 1 train 引發的 early-phase LTP 被鞏固成為 late-phase LTP ( $121.6 \pm 7.91\%$ ,  $n = 8$ ,  $p < 0.05$ , paired t-test, LTP 之測量為 HFS 之後 251~270 分鐘)。



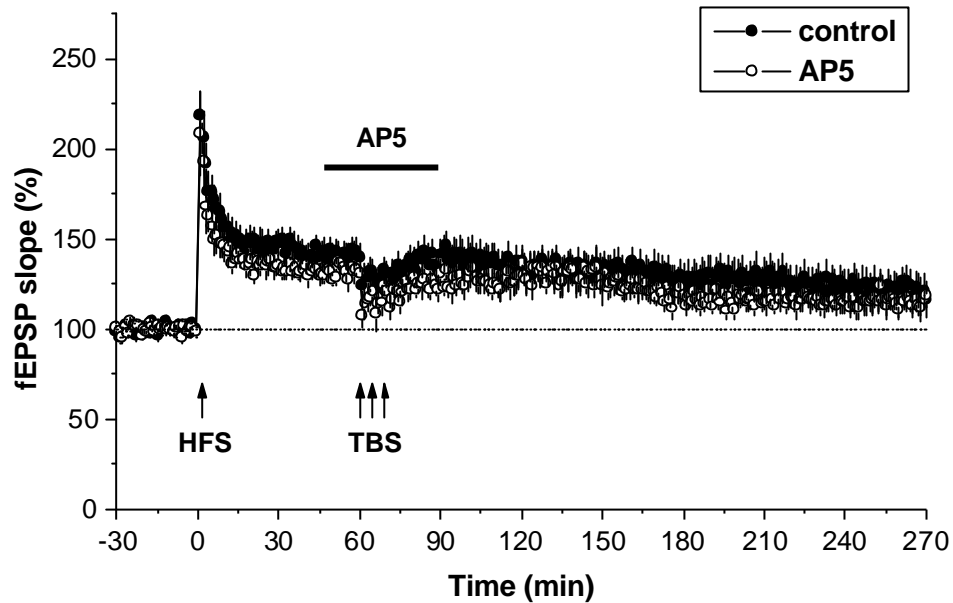
圖二十四：1 train 的高頻率刺激配合 theta-頻率波刺激活化 CA1 細胞本體，使 1 train 高頻率刺激引發的 early-phase LTP 被鞏固成為 late-phase LTP 之時間差與給予的時間次序無關，形成一對稱 time window，約為兩者相距 60 分鐘至 -60 分鐘左右。



圖二十五：配合 theta-頻率波刺激活化 CA1 細胞本體，使 early-phase LTP 被鞏固成為 late-phase LTP 的機制是不需要 NMDA 接受器的參與，此為單一次實驗之結果。給予 NMDA 接受器的抑制劑  $D,L$ -AP5 (50  $\mu$ M)，則 1 train 的高頻率刺激仍然可以誘發出 late-phase LTP (112.8%，LTP 之測量為 HFS 之後 241~270 分鐘)，此結果表示抑制 NMDA 接受器，無法使 early-phase LTP 被鞏固成為 late-phase LTP 之機制受到抑制。給予  $D,L$ -AP5 的時間用黑線表示；每個 Raw data trace 由 30 個 responses 平均而成，左圖為 baseline，右圖為 HFS 後 241-270 分鐘。

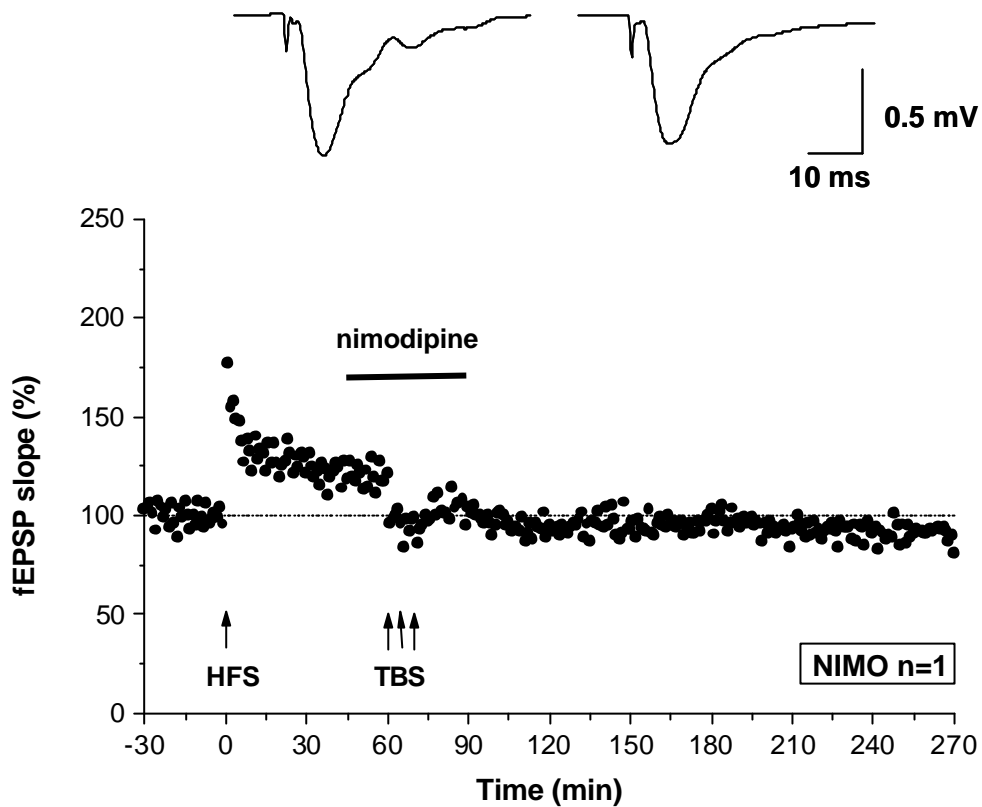


圖二十六：配合 theta-頻率波刺激活化 CA1 細胞本體，使 1 train 高頻率刺激引發的 early-phase LTP 被鞏固成為 late-phase LTP 之機制是不需要 NMDA 接受器的參與，此為總合六次如圖二十五之實驗結果的圖 (n = 6)。由圖可見，雖然給予 NMDA 接受器的抑制劑  $D,L$ -AP5 (50  $\mu$ M), 1 train 高頻率刺激配合 theta-頻率波刺激仍然能夠使 1 train 誘發的 early-phase LTP 被鞏固成為 late-phase LTP (115.4  $\pm$  5.58 %, n = 6,  $p < 0.05$ , paired t-test, LTP 之測量為 HFS 之後 241~270 分鐘), 可見  $D,L$ -AP5 無法使 LTP 的鞏固作用受到抑制，即鞏固機制不需 NMDA 接受器的參與。給予  $D,L$ -AP5 的時間用黑線表示。

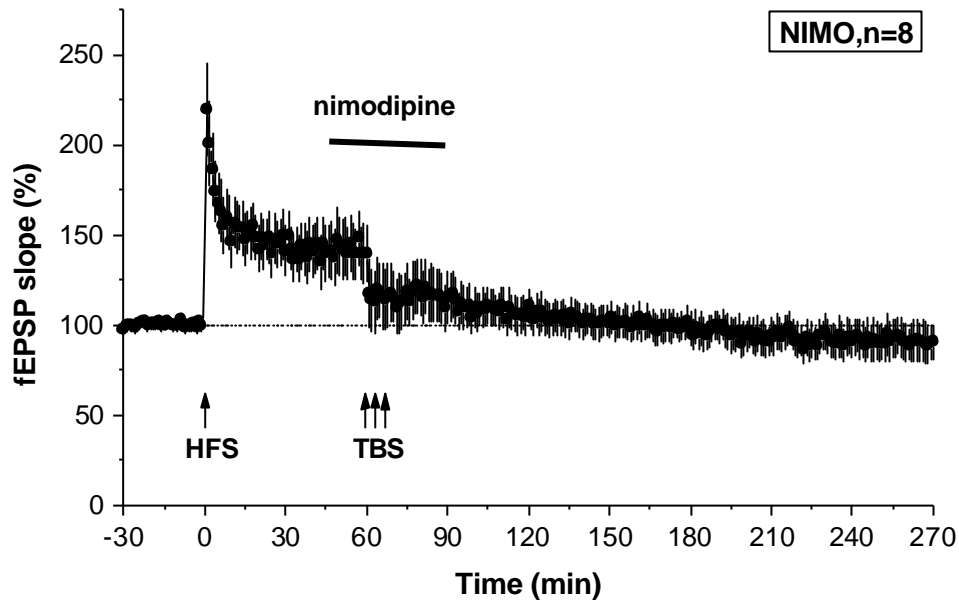


圖二十七：給予  $D,L$ -AP5 ( 50  $\mu$ M ) 組與沒有給藥的 control 組之 late-phase LTP ( LTP 之測量為 HFS 之後 241~270 分鐘 ) 以 one way ANOVA 分析比較的話，並沒有顯著差異  $p = 0.6$ 。可見  $D,L$ -AP5 無法使 1 train 高頻率刺激配合 theta 頻率波刺激所誘發之 early-phase LTP 被鞏固成為 late-phase LTP 的作用受到抑制，即表示此鞏固機制不需 NMDA 接受器的參與。Control 組以黑色實心圓表示， $D,L$ -AP5 ( 50  $\mu$ M ) 組以空心圓表示，給予  $D,L$ -AP5 的時間用黑線表示。

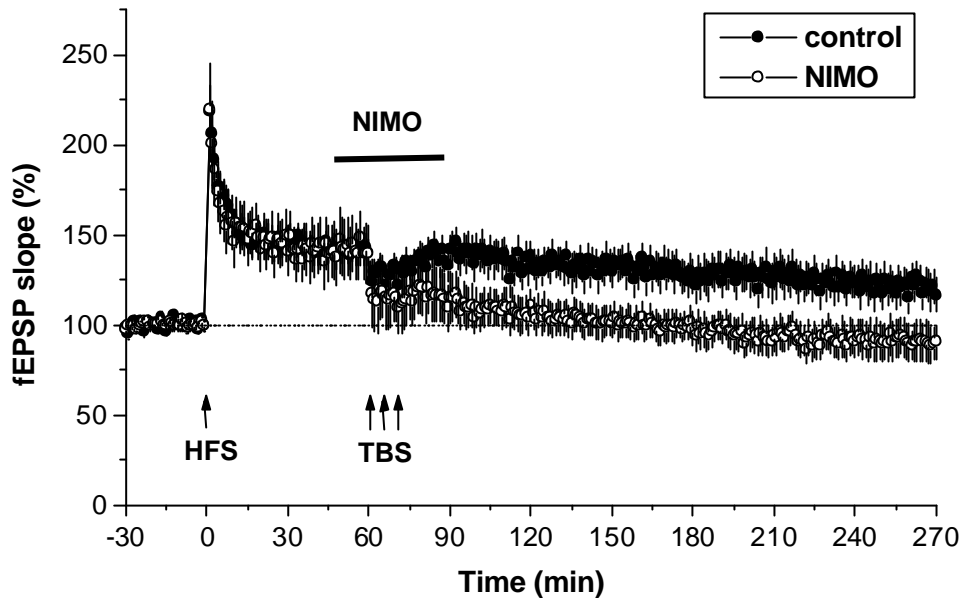




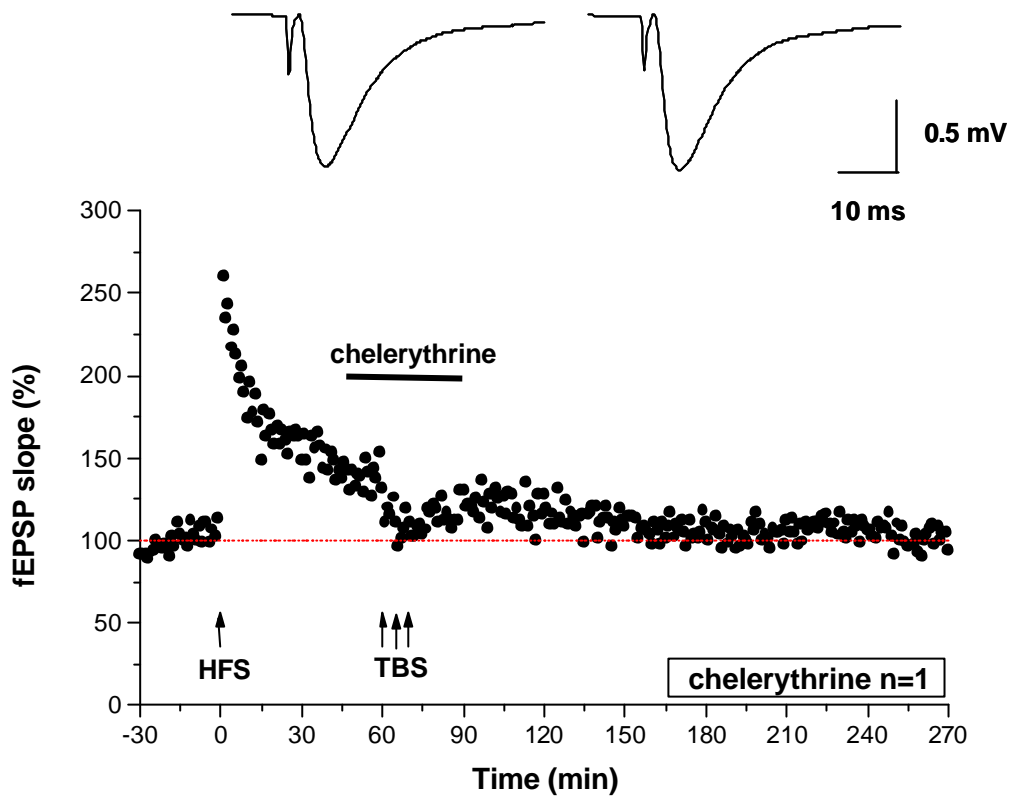
圖二十八：1 train 高頻率刺激配合 theta-頻率波刺激，使 early-phase LTP 被鞏固成為 late-phase LTP 的機制是需要 L 型鈣離子接受器的參與，此為單一次實驗之結果。給予 L 型鈣離子接受器的抑制劑 nimodipine ( 10  $\mu$ M )，則 1 train 高頻率刺激誘發之 early-phase LTP 無法被鞏固成為 late-phase LTP ( 90.1 % )。給予 nimodipine 的時間用黑線表示；每個 Raw data trace 由 30 個 responses 平均而成，左圖為 baseline，右圖為 HFS 後 241-270 分鐘。



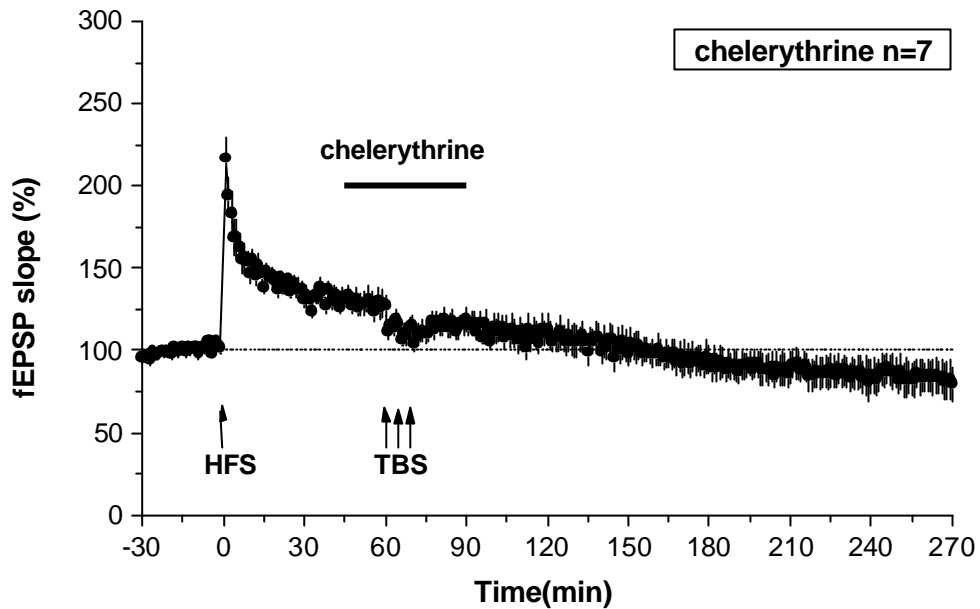
圖二十九：1 train 高頻率刺激配合 theta-頻率波刺激活化 CA1 細胞本體，使 early-phase LTP 被鞏固成為 late-phase LTP 的機制是需要 L 型鈣離子接受器的參與，此為總合八次如圖二十七之實驗結果的圖 (n = 8)。由圖可知，給予 L 型鈣離子接受器的抑制劑 nimodipine (10  $\mu$ M)，則 1 train 高頻率刺激誘發的 early-phase LTP 無法被鞏固為 late-phase LTP (91.1  $\pm$  10.24 %, n = 8,  $p = 0.41$ , paired t-test , LTP 之測量為 HFS 之後 241~270 分鐘)，即表示此鞏固機制需要 L 型鈣離子接受器的參與。給予 nimodipine 的時間用黑線表示。



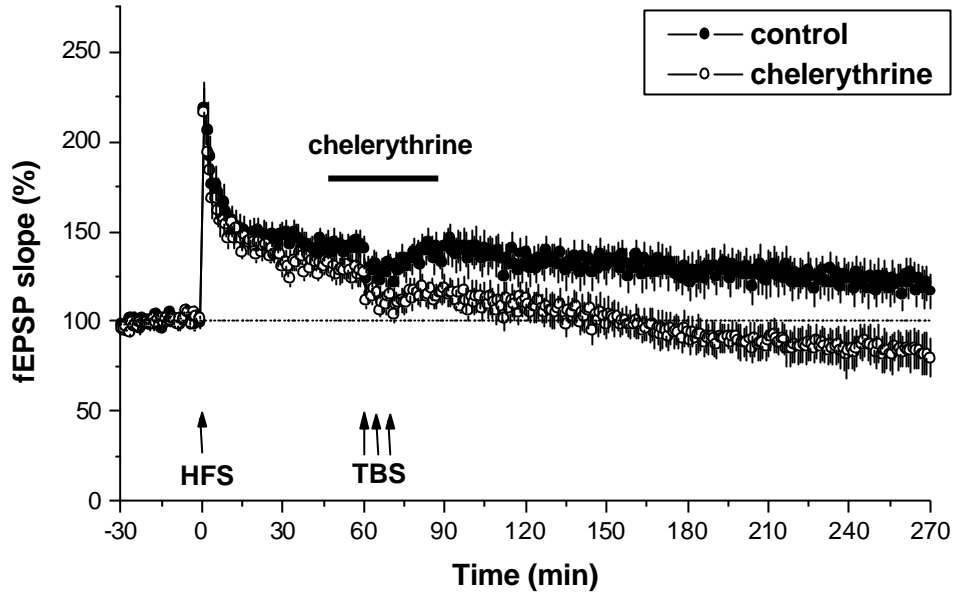
圖三十：給予 nimodipine ( 10  $\mu$ M ) 組與沒有給藥的 control 組之 late-phase LTP ( LTP 之測量為 HFS 之後 241~270 分鐘 ) 以 one way ANOVA 分析比較是具有統計上顯著差異 (  $p < 0.05$  )。此結果表示 1 train 高頻率刺激配合 theta 頻率波刺激所誘發之 early-phase LTP 被鞏固成為 late-phase LTP 的作用需要 L 型鈣離子接受器的參與 Control 組以黑色實心圓表示， NIMO 組以空心圓表示，給予 nimodipine 的時間用黑線表示。



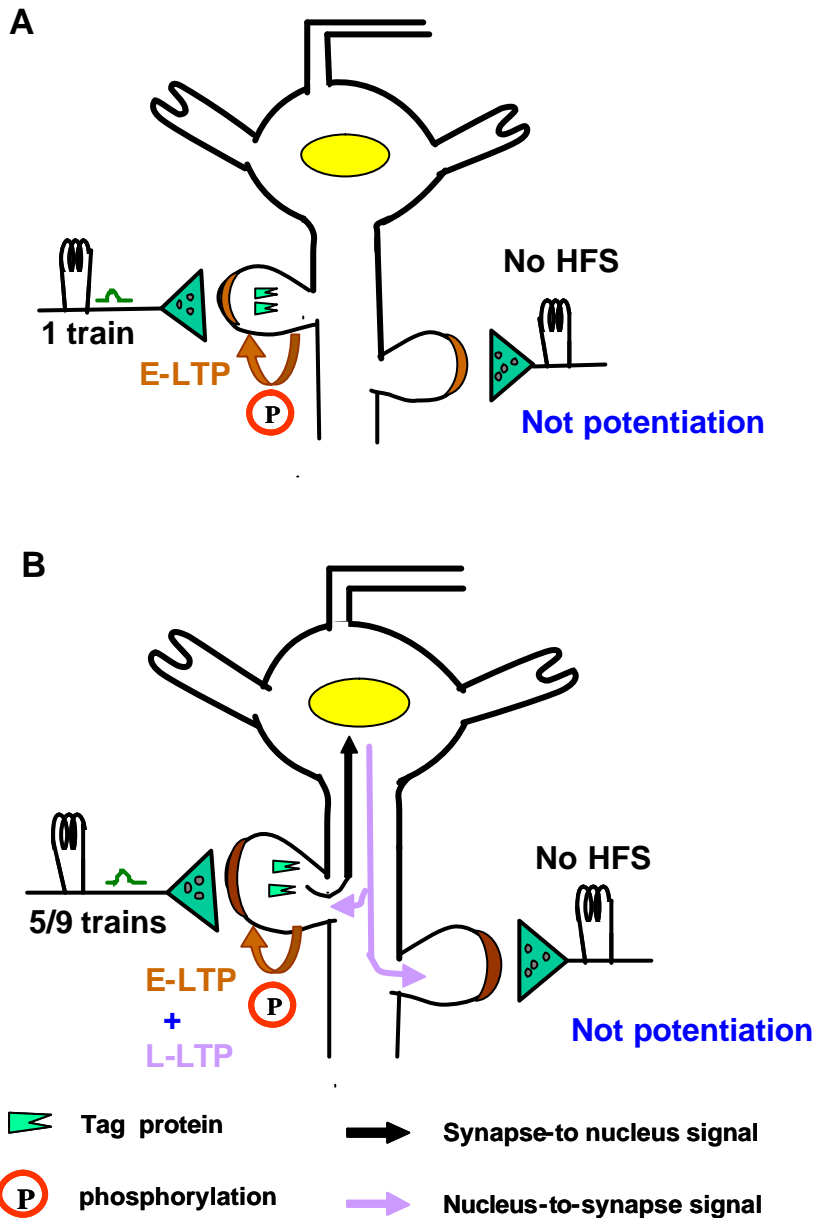
圖三十一：1 train 高頻率刺激配合 theta-頻率波刺激，使 early-phase LTP 被鞏固成為 late-phase LTP 的機制是需要 protein kinase C 的參與，此為單一次實驗之結果。給予 protein kinase C 的抑制劑 chelerythrine (3  $\mu$ M)，則 1 train 高頻率刺激誘發之 early-phase LTP 無法被鞏固為 late-phase LTP (102.6%)。給予 chelerythrine 的時間用黑線表示；每個 Raw data trace 由 30 個 responses 平均而成，左圖為 baseline，右圖為 HFS 後 241-270 分鐘。



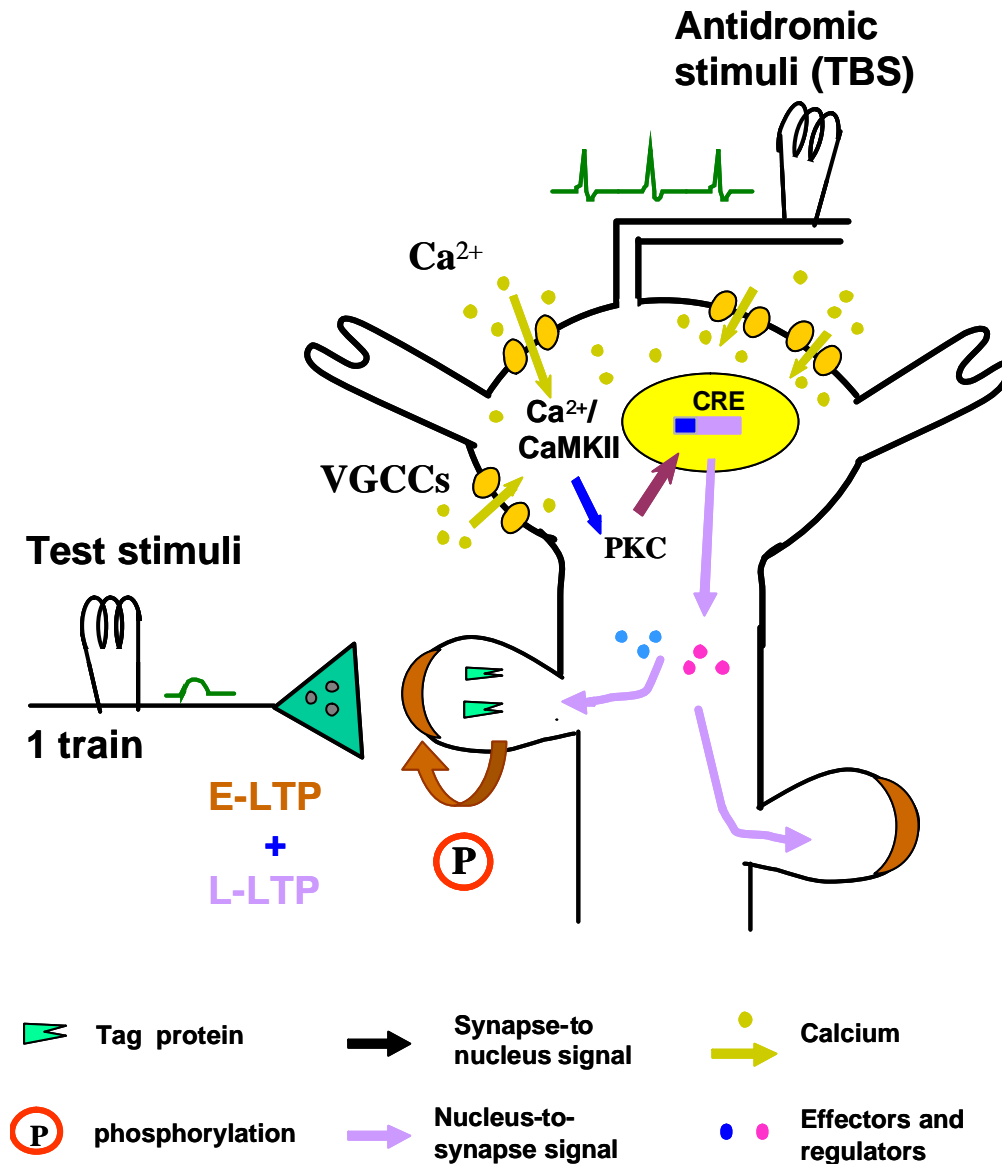
圖三十二：1 train 高頻率刺激配合 theta-頻率波刺激活化 CA1 細胞本體，使 early-phase LTP 被鞏固成為 late-phase LTP 的機制是需要 protein kinase C 的參與，此為七次如圖三十之實驗結果的圖 (n = 7)。由圖可知，給予 protein kinase C 的抑制劑 chelerythrine (3  $\mu$ M)，則 1 train 高頻率刺激誘發之 early-phase LTP 無法被鞏固成為 late-phase LTP (84.3  $\pm$  10.00%，n = 7,  $p = 0.16$ , paired t-test, LTP 之測量為 HFS 之後 241~270 分鐘)，此結果表示配合 theta-頻率波刺激使 1 train 高頻率刺激誘發的 early-phase LTP 被鞏固成為 late-phase LTP 的機制需要 protein kinase C 的參與，給予 chelerythrine 的時間用黑線表示。



圖三十三：給予 chelerythrine ( 3  $\mu$ M ) 組與沒有給藥的 control 組之 late-phase LTP ( LTP 之測量為 HFS 之後 241~270 分鐘 ) 以 one way ANOVA 分析比較是具有統計上顯著差異 (  $p < 0.05$  )。此結果表示 1 train 高頻率刺激配合 theta 頻率波刺激所誘發之 early-phase LTP 被鞏固成為 late-phase LTP 的作用需要 protein kinase C 的參與。Control 組以黑色實心圓表示，chelerythrine ( 3  $\mu$ M ) 組以空心圓表示，給予 chelerythrine 的時間用黑線表示。



圖三十四：1 train 高頻率刺激能引發海馬體 CA1 區域的突觸局部磷酸化，形成 early-phase LTP (圖 A)。然而，5 或 9 trains 高頻率刺激不但可以促使受刺激的突觸局部磷酸化和合成 tag 蛋白，而且還可以將突觸訊息傳回細胞本體，使基因表現產生新的蛋白質，藉由突觸的 tag 蛋白與細胞本體合成的蛋白質作用而形成 late-phase LTP(圖 B)。圖形修飾於 Frey and Morris, 1997。



圖三十五：配合 theta 頻率波刺激活化 CA1 細胞本體，使 1 train 高頻率刺激引發的 early-phase LTP 被鞏固為 late-phase LTP 之機制是經由活化 VGCCs，使鈣離子進入細胞內而提升細胞內鈣離子的濃度，再活化下游的 protein kinase C (PKC)，更進一步使細胞核的基因表現而產生新的蛋白質，如調控因子、作用因子，這些因子再與突觸的 tag 蛋白作用而形成 late-phase LTP。圖形修飾於 Frey and Morris, 1997。