

# 行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告

## 探討溫度效應對壓抑海馬迴神經長期增益作用的細胞機制

Studies of temperature effects on the long-term potentiation in rat hippocampal CA1 neurons

計畫編號：NSC 88-2314-B-041-011

執行期限：87 年 8 月 1 日至 88 年 7 月 31 日

主持人：林指宏 嘉南藥理學院 休閒保健管理系

### 一、中文摘要

環境溫度變化能影響動物學習與記憶的形成。提升環境溫度以誘導動物體溫過高 (hyperthermia)，將導致實驗動物產生學習障礙。體溫過高也是引起人類健忘和學習障礙的重要誘因。阻斷 NMDA 受體及 calcium/calmodulin-dependent protein kinase II (CAMKII) 的活性是健忘症 (amnesia) 的重要細胞機制。活化 NMDA 受體及增加細胞內鈣離子含量以活化 CAMKII，也是誘導中樞神經長期增益作用的必備條件。神經長期增益作用是動物學習與記憶形成的最佳體外研究模式。改變環境溫度將直接影響中樞神經細胞膜電位及神經突觸的生理變化。記錄槽溫度由 32°C 提升到 37°C 時，降低海馬迴 CA1 地區神經的 input resistance, afterhyperpolarization potentials, 和 field potentials。高溫環境(38°C)阻斷神經長期增益作用(long-term potentiation; LTP)、抑制 NMDA 受體所媒介的興奮性突觸後電位(NMDA<sub>EPSP</sub>) 和鈣離子電位(calcium spike)的形成。高溫引起的突觸電位的抑制作用受到 L-NAME(1

mM)存在下或在 32°C 事先高頻電刺激 (100Hz/40ms, duration:10s)所阻斷。在常溫經高頻電刺激或 TEA 誘導的 LTP 也受到高溫所抑制。實驗結果將有助於說明體溫過高導致學習障礙和健忘症的可能細胞機制。

**關鍵詞：**溫度、長期增益作用、學習和記憶、海馬迴

### Abstract

It is known that ambient temperature can interfere with learning processes in various species. High ambient temperature, which induces hyperthermia in mammals, has been shown to elicit a significant learning impairment. The amnesic effects of N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor antagonists and calcium/calmodulin-dependent protein kinase II (CAMKII) inhibitors have recently been reported. Activation of NMDA receptors and voltage-dependent calcium channel increases in postsynaptic intracellular

calcium concentration to trigger the activation of CAMKII or to trigger protein phosphatase, playing an important role in synaptic plasticity. Long-term potentiation (LTP) and long-term depression (LTD) in particular are widely believed to be involved in regulation of learning and memory. Our experiments have indicated that the increase in temperature from 32°C to 37°C can significantly alter of intrinsic and synaptic physiology of hippocampal neurons. Increasing temperature led to rapid decreases the input resistance, afterhyperpolarization potentials, and field potentials. Higher temperature (38°C) was prevented the tetanic (100Hz/40ms, duration: 10s) LTP, inhibited the NMDA receptor mediated postsynaptic potentials (NMDA<sub>EPSP</sub>), and calcium spike. Higher temperature produced inhibition of synaptic transmission was prevented by L-NAME (1mM) application or tetanic stimulation at 32°C before the temperature setting. The tetanic- or TEA (20 mM)-induced LTP was reversed by high temperature. The results obtained from this proposal should disclose the cellular mechanisms underlying the hyperthermia induced amnesia and learning impairment in the hippocampus.

**Keywords :** Temperature, long-term potentiation, Learning and memory, hippocampus

## 二、緣由與目的

長久以來許多研究文獻報告指

出,體溫升高 (hyperthermia) 可經由改變神經功能而併發出人體各種不適症狀。體溫升高也被認為是導致健忘症的主要誘因(Holland et al., 1985)。人為誘導體溫過高的新生大白鼠,日後極易罹患健忘症 (amnesia)。Mickley 等人研究發現體溫過高將損及大白鼠空間記憶能力及 passive avoidance task memory (Mickley et al., 1994)。高溫環境工作者,其工作效率、數學運算能力和對環境的警覺能力都明顯下降 (Holland et al., 1985)。體溫升高導致學習與記憶能力下降可能與腦區域之 c-fos 基因表現增加有關 (Mickley et al., 1994)。

海馬迴是腦部短期記憶形成的重要區域。此區域之神經元可誘導產生長期增益現象 (Long-term potentiation; LTP) 及長期抑制現象 (Long-term depression; LTD),彼此相互作用,構成複雜的神經網路。LTP 與 LTD 分享許多共同的細胞機制,包括突觸後神經元去極化反應、開啟 NMDA 通道、增加細胞內鈣離子含量並活化鈣離子依賴型酵素的活化,進而影響突觸傳遞 (synaptic transmission)。細胞內鈣離子含量的多寡則是產生 LTP 或 LTD 的取決因素。最近學者研究指出阻斷 NMDA 受體或抑制 CAMKII 活性能引起大白鼠健忘及學習障礙反應 [Wolfman et al., 1994; Young et al., 1994]。Bittar & Muller 研究指出,急速短暫降低記錄槽溫度 (33°C → 24°C → 33°C) 能完全逆轉在 33°C 時經高頻電刺激所誘導的 LTP 現象[Bittar & Muller, 1993]。溫度的急遽改變明顯影響中樞神經活性,降低溫度能增加神經細胞膜阻力 (input resistances)、增加神經活化閾值 (high

activation thresholds)、引起較大的突觸電位 (large synaptic potentials) 及較大的匯集電位 (large field potentials) (Griffin & Boulant, 1995; Thompson et al., 1995)。無論如何，體溫升高導致學習障礙及誘導健忘症是否經由改變神經受體和細胞內訊息傳遞 (signal transduction) 機制而影響神經塑性仍有待更進一步研究探討。

### 三、結果與討論

#### 1. 溫度效應對海馬迴 CA1 神經膜電位的影響

取四週齡雄性 Sprague-Dawley 將其犧牲後進行腦切片，實施海馬迴單一神經細胞內記錄法。分析溫度效應對 input resistance、afterhyperpolarization potentials (AHP)、及動作電位振幅 (amplitude) 和持續時間 (duration) 影響。膜阻力測定是經由記錄電極注入一系列的過極化負電流，經由注入電流大小及所得膜電位變化可求出膜阻力，過極化後電位則是將靜止膜電位固定在 -65 mV 時注入 1 nA 正電流引起膜去極化後所產生，而去極化動作電位則是經由電極注入 0.8-1.4 nA 正電流引起膜去極化所產生。經由不同的記錄槽溫度設定 (24°C、32°C、37°C) 記錄神經電位的變。提高記錄槽溫度降低膜阻力、減少過極化後電位、延長動作電位發生時間和動作電位持續時間，但降低動作電位的振幅。溫度效應對突觸傳遞 (synaptic transmission) 影響，提高溫度分別縮減了 field-EPSP、population spkies 和 postsynaptic potential 的振幅起始時間 (duration of generates initial potentials)

及振幅持續時間。將溫度由 24°C 提升到 32°C 時逐漸增大振幅，但當溫度提升到 37°C 時振幅呈現明顯抑制作用，實驗結果顯示維持體外腦切片在 30-35°C 時可得到較優之突觸傳遞效果。

#### 2. 溫度效應對神經塑性的影響

比較常溫 (32°C) 和高溫 (38°C) 下記錄對經由高頻電刺激 (100Hz/40 ms, duration: 10s) 海馬迴 Schaffer-collateral fiber pathway 所誘導 CA1 神經產生長期增益現象 (long-term potentiation; LTP) 的影響。常溫高頻電刺激，誘導 CA1 神經產生之 LTP，平均最大電位增益可達高頻電刺激前電位的 180%，電位增益現象可維持三小時以上。然而，高溫高頻電刺激反而產生了長期電位抑制現象 (long-term depression; LTD)，平均最大抑制作用 (平均達 87%) 在電刺激後二分鐘內產生，電位抑制現象可維持三小時以上。結果顯示環境溫度變化將改變神經塑性 (neuronal plasticity)，高溫環境或發燒時將不利於學習模式的進行。

#### 3. 溫度效應對 NMDA<sub>EPSP</sub> 的影響

記錄槽溫度由 32°C 提升到 38°C 時，興奮性突觸後電位 (excitatory postsynaptic potential; EPSP) 平均被抑制效果達 68%，此一抑制作用受 APV (50 μM; NMDA 受體拮抗劑) 在 32°C 事前處理後，減少為 14% 的抑制作用。比較低溫 (24°C)、常溫 (32°C) 和高溫 (38°C) 對經 CNQX (10 μM) 和 Bicucullin (20 μM) 分離的 NMDA 受體媒介興奮性突觸後電位 (NMDA<sub>EPSP</sub>) 呈現 V 效果。溫度設定在 32°C 時可得最佳之 NMDA<sub>EPSP</sub>，當溫度上升至 38°C 時幾乎完全抑制 NMDA<sub>EPSP</sub>。Chung & Kuyucak 在 1995

年以 inside-out membrane patches 研究溫度效用對海馬迴神經細胞之 NMDA receptor-mediated current 發現，溫度愈高 NMDA receptor-mediated current 愈活躍 [Chung & Kuyucak, 1995]。因此，本實驗結果可能來自細胞內或外抑制因子的產生的獨特反應所致。此一經由高溫所產生的抑制 NMDA<sub>EPSP</sub> 作用是一種可逆性反應，然而若暴露在 38°C 時間超過 50 分鐘以上則呈現不可逆性反應(達 3 小時以上)，即使溫度恢復常溫再實施高頻電刺激也無法產生 LTP，但亦不會有 LTD 的產生。Bittar & Muller 指出將記錄之腦切片短暫降溫至 24°C 可抑制 LTP 的產生 [Bittar & Muller, 1993]，由本實驗結果推測可能是來自於溫度對 NMDA<sub>EPSP</sub> 的 V 效應結果。透過溫度對 NMDA 受體和 non-NMDA 受體的抑制結果也顯示溫度效應對神經傳遞訊號的傳遞影響可能是透過抑制突觸後神經受體活性遠大於直接抑制突觸前傳遞物質的釋放。

#### 4. 溫度效應對 Ca<sup>++</sup>-Spike 的影響

溫度效應對經單獨 TEA 或 TEA+TTX 共同存在下所誘導的 Ca<sup>++</sup>-Spike 的影響呈現不同的情形。在 TEA(20 mM)+TTX(1 μM)當溫度由 32°C 提升至 38°C 時，抑制了在 32°C 下以正電流直接注入突觸後神經元誘導之 Ca<sup>++</sup>-Spike (平均抑制達 73%)，但對在只有 TEA(20 mM)存在下電刺激突觸前神經元誘導的 Ca<sup>++</sup>-Spike 並不受影響。此一結果顯示溫度效應直接影響突觸後神經元電性控制鈣通道的活性，但為何在 TEA 一直存在下產生的 Ca<sup>++</sup>-Spike 並不受影響，可能是有不同的鈣通道參與不同的反應結果，或者是在 TEA 存在下(TEA

本身即可誘導 LTP 形成)增強神經傳遞物質釋出，可能透過細胞內傳遞訊息修飾突觸後鈣通道，而導致此一結果。

#### 5. 溫度效應與已形成之突觸塑性的影響

在 32°C 時以高頻電刺激或 TEA 短暫暴露下誘導之 LTP 神經傳遞訊號增益部份，受當溫度由 32°C 提升至 38°C 時所逆轉，但原應受高溫抑制的 EPSP 振幅 (amplitude) 反不受影響，顯示在常溫下誘導 LTP 的過程中，可能阻斷高溫抑制神經傳遞訊號的細胞訊息傳遞路徑，而使得原本應受高溫抑制的 EPSP 得以保存(包含 NMDA<sub>EPSP</sub>)。即使如此，一旦細胞處於 38°C 高溫環境時仍無法再次利用高頻電刺激來誘導 LTP 形成，反倒構成有短期抑制現象。顯示高溫環境的確會影響學習狀況，暴露高溫環境可能導致某些剛形成之記憶有喪失之疑慮，構成了類似健忘之現象，但高溫環境最直接影響的是改變神經機能而引起學習障礙問題。人類在環境溫度升高時導致數學運算能力下降的主因，有可能是來自高溫環境下 LTP 形成的困難性和已形成而未固著化之記憶受抑制的綜合結果所產生的一種學習障礙現象。

#### 6. 溫度效應和一氧化氮的關係

受高溫(38°C)所抑制之 NMDA<sub>EPSP</sub> 在 L-NAME (1 mM)存在下受到明顯的保護作用(由原抑制 93%減為 17%的抑制作用)。溫度上升可增加 nitric oxide synthase (NOS)的活性及 nitric oxide (NO)能抑制 NMDA 受體的活性在最近文獻中已被指出。因此，NO 可能是在高溫環境造成的學習障礙的神經細胞內訊息傳遞因素之一。

#### 四、 成果自評

本計畫以體外腦切片記錄神經電位變化方法，及改變腦切片浸潤溫度模擬體溫變化對學習與記憶形成的關係，以求能了解溫度效應影響學習與記憶形成和高溫導致健忘症之可能細胞機制。本次研究主要以海馬迴 CA1 神經為探討對象，主要是此區域與動物空間記憶形成和短期記憶形成有直接關連，研究結果可用來解釋溫度效應影響學習與記憶的詳細細胞機制，進而延伸探討高溫學習障礙和健忘症形成的病因，同時此區域為大多數學者所使用，資料完整易於結果比對。本計畫主要研究目標包含三點：

1. 確認溫度效應對海馬迴 CA1 神經元影響的詳細細胞機制。
2. 探討高溫效應影響 LTP 形成的可能細胞機制，用以解釋高溫學習障礙和臨床健忘症形成的病因。
3. 本研究探討溫度效應對神經塑性的影響，有助於釐清目前相當混淆的 LTP 和 LTD 之神經塑性細胞機制，和解釋人類學習障礙的因，結果也可提供預防醫學參考使用。

#### 參考文獻

1. Bittar P. & Muller, D. (1993). Time-dependent reversal of long-term potentiation by brief cooling shocks in rat hippocampal slices. *Brain Res.* 620: 181-8.
2. Griffin, JD. & Boulant, JA. (1995). Temperature effects on membrane potential and input resistance in rat hypothalamic neurons. *J. Physiol.* 488: 407-18.
3. Holland, RL., Sayers, JA., Keatinge, WR., Davis, HM. & Peswani, R. (1985). Effects of raised body temperature on reasoning, memory, and mood. *J. App. Physiol.* 59: 1823-7.
4. Mickley, GA., Cobb, BL., Mason, PA. & Farrell, S. (1994). Disruption of a putative working memory task and selective expression of brain c-fos following microwave-induced hyperthermia. *Physiol. Behav.* 55: 1029-38.
5. Thompson, SM., Masukawa, LM. & Prince, D.A. (1985). Temperature dependence of intrinsic membrane properties and synaptic potentials in hippocampal CA1 neurons in vitro. *J. Neurosci.* 5: 817-24.
6. Wolfman, C., Fin, C., Dias, M., Biancجي, M., Da Silva, RC., Schmitz, PK. & Medina, JH. (1994). Intrahippocampal or intraamygdala infusion of KN62, a specific inhibitor of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II, causes retrograde amnesia in the rat. *Behav. Neural Biol.* 61: 203-5.
7. Young, SL., Boheneck, DL. & Fanselow, MS. (1994). NMDA processed mediate antrograde amnesia of contextual fear conditioning induced by hippocampal damage: immunization against amnesia by context preexposure. *Behav. Neurosci.* 108: 19-29.