

行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告

探討溫度效應對神經突解塑性影響的細胞機制

Exploration of temperature effects on the synaptic plasticity in rat

計畫編號：NSC 89-2314-B-041-011

執行期限：88 年 8 月 1 日至 89 年 7 月 31 日

主持人：林指宏 嘉南藥理科技大學 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 38°C 及 40°C 時，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_{EPSP})、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)及 TEA 事先加入後所阻斷。在常溫經高頻電刺激或

TEA 誘導的 LTP 部份明顯受到高溫所抑制，但原先之 EPSP 則受到保護。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 38°C or 32°C to 40°C can significantly alter of synaptic plasticity. Higher temperature (38°C or 40°C) was prevented the tetanic (100Hz/40ms, duration: 10s) LTP, inhibited the NMDA receptor mediated postsynaptic potentials (NMDA_{EPSP}), 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。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]。活體實驗訓練後大白鼠，經主動或被動的游泳訓練誘導體溫升高，明顯降低 Morris water maze 測試能力。Bittar & Muller 研究指出，急速短暫降低能抑制 LTP 現象的產生 [Bittar & Muller, 1993]。Shen 等人利用成兔的海馬迴 CA1 神經進行細胞內記錄，發現溫度由 35°C 提升至 40°C 時，細胞膜呈現 hyperpolarization，而當溫度上升超過 40°C 時，則出現 depolarization。溫度的急遽改變明顯影響中樞神經活性，降低溫度能增加 input resistances、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是否 LTP 的形成有關，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. 溫度效應對神經塑性的影響

比較 32°C、38°C 及 40°C 記錄槽溫度下對神經塑性 (neuronal plasticity) 的影響。LTP 及 LTD 的產生是經由高頻電刺激 (100Hz/40 ms, duration:10s) 或低頻電刺激 (1Hz/40 ms, duration:10s) 海馬迴 Schaffer-collateral fiber pathway 所誘導。32°C 下高頻電刺激，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。反之，38°C 及 40°C 下給予高頻電刺激突觸後電位呈現 LTD 現象，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。

2. 溫度效應對 NMDA_{EPSP} 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%，提升至 40°C 平均被抑制效果達 93%，此一抑制作用受 APV (50 μM; NMDA 受體拮抗劑) 在 32°C 事前處理後，分別減少為 14% 及 51% 的抑制作用。若事先經 CNQX (10 μM) 和 Bicucullin (20 μM) 分離的 NMDA 受體媒介興奮性突觸後電位 (NMDA_{EPSP})，當溫上升至 38°C 時幾乎可逆性完全抑制 NMDA_{EPSP} 作用，可逆比率達 32°C 時振幅的 85%，但上升至 40°C 時其可逆性為則減為 23%。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_{EPSP} 作用是一種可逆性反應，然而若暴露在 38°C 以上溫度時間超過 50 分鐘以上則呈現完全不可逆性反應(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，顯示神經長期曝曬在高溫環境下，將會導致神經細胞嚴重受損。

3. 溫度效應對 Ca⁺⁺-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⁺⁺-Spike 的影響呈現不同的情形。在 TEA (20 mM)+TTX (1 μM) 同時存在下，溫度由 32°C 提升至 38°C 時，抑制了突觸後神經元誘導之 Ca⁺⁺-Spike (平均抑制達 73%)。反之，在 TEA (20 mM) 單獨存在下的 Ca⁺⁺-Spike 並不受影響溫度變化而有明顯改變。此結果可能是 Ca⁺⁺-Spike 的產生至少可透過突觸後神經電位變化而產生，但對溫度改變極為敏感，而透過受體誘導產生的 Ca⁺⁺-Spike 可能來自不同 Ca⁺⁺ 管道，或經 TEA 活化後的神經 Ca⁺⁺ 管道對溫度變化有明顯抗性。

4. 溫度效應與已形成之突觸塑性的影響

前面結果顯示，高溫會抑制 LTP 及 LTD 產生，可能與 NMDA 受體及 Ca⁺⁺ 管道的活性有直捷關係。而被活化的受體和 Ca⁺⁺ 管道是否受溫度影響。我們實驗發現，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，受當溫度升高時所逆轉，但不影響 32°C 時的 EPSP 振幅，顯示在 32°C 下除了可誘導產生 LTP 外，尚可產生保護機制，防止高溫產生的 EPSP 抑制作用(包含 NMDA_{EPSP})。即使如此，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。顯示高溫環境不但會影響學習狀況，也可能導致某些已形成之記憶有喪失的疑慮，構成了類似健忘之現象。

5. 溫度效應和一氧化氮的關係

在 32°C 時加入 L-NAME (1 mM) 可有效防止高溫所產生的 NMDA_{EPSP} 抑制現象(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

本研究計畫將針對溫度效應引起之學習障礙為主題。採活體動物環境溫度重新適應模式及環境溫度急遽變化對學習影響模式，經由體外海馬迴切片進行電生理記錄深入探討，結果有助於了解溫度效應對學習影響的詳細細胞機制。本計畫主要研究目標包含二點：

1. 確認高溫環境對海馬迴神經元影響的細胞機制。用於解釋發燒及在高溫環境下引起學習困難的生理機制。
2. 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., Bianchi, 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., Bohenek, 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.

