

國立臺灣大學醫學院藥理學研究所

碩士論文

Graduate Institute of Pharmacology

College of Medicine

National Taiwan University

Master Thesis

Orexins 對小鼠海馬迴神經突觸可塑性之研究

Effect of orexins on synaptic plasticity

of mouse hippocampal slices

李家旭

Lee Chia-Hsu

指導教授：邱麗珠 博士

Advisor: Chiou Lih-Chu, Ph.D.

中華民國 97 年 7 月

July, 2008

## 目 錄

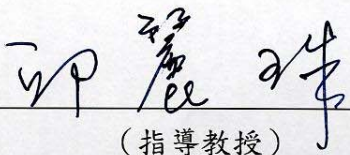
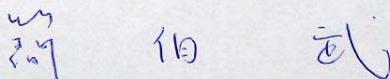
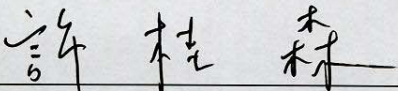
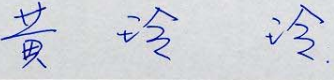
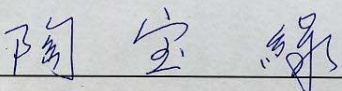
	頁次
一、 口試委員會審定書 .....	i
二、 誌謝 .....	ii
三、 縮寫表 .....	iii
四、 中文摘要 .....	iv
五、 英文摘要 .....	vii
六、 緒論 .....	1
七、 實驗材料及方法 .....	14
八、 實驗結果 .....	19
九、 討論 .....	26
十、 結論 .....	32
十一、 圖表與附圖 .....	33
十二、 參考文獻 .....	53

國立臺灣大學 (碩) 博士學位論文  
口試委員會審定書

Orexins 對小鼠海馬迴神經突觸可塑性之研究  
Effect of orexins on synaptic plasticity  
of mouse hippocampal slices


本論文係李家旭 (學號 R95443016) 在國立臺灣大學藥理學研究所完成之碩 (博) 士學位論文，於民國九十七年七月四日承下列考試委員審查通過及口試及格，特此證明

口試委員：

	博士
(指導教授)	
	博士
	博士
	博士
	博士

## 誌謝

時間飛快地流逝，在這不長不短的兩年裡，我從帶著獸醫背景進入藥理的世界，實驗室的大小事在我眼中總是新鮮又陌生，我也很高興能進入這樣的實驗環境，首先要感謝 邱麗珠老師，總是爲了學生著想，不論是學業或生活態度，總是耐心地討論，讓我知道我哪裡要改進，雖然時常有不盡理想的表現，老師還是以無比的耐心包容。這兩年的收穫是很豐富的，有歡笑有汗水，從跌倒的地方明瞭自己的缺失，從讚美之中明白有努力付出才有收穫。



實驗室成員們大家感情都很融洽，時常互助合作。短短兩年我想最辛苦的就是彥昱學長，大小事情都一把罩，平日常給學長添的麻煩，由衷感謝學長的照顧。另外一位要感謝的重要成員就是欣蓉學姐，電腦軟硬體教學多職，不但協助各項雜務，教導許多實用的軟體，精神上也常常給予我許多支持。此外還有許多要感謝的人，像是要謝謝廖蕙萍學姊帶我做實驗；謝謝范碧娟醫師在 seminar 給予指導；謝謝李建興學長和李君耀學長在 seminar 給予指正；謝謝實驗室的夥伴，俐君、昱征、心慈和宏烈平日的互助鼓勵；謝謝珮筠一直都在我身邊鼓勵我幫助我；謝謝建誠、士函、建邦和于凡等許多好友們的關心鼓勵，我們做到了；感謝我的父母與妹妹多年來無怨無悔的支持我，最後我想將此份快樂獻給在天上的爺爺，希望您會開心。

## 縮寫表( Abbreviation )

ACSF	artificial cerebral spinal fluid
AMPA	alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid receptor
CA1	cornu ammonis 1
cAMP	cyclic adenosine monophosphate
DG	dentate gyrus
fEPSP	field excitatory post-synaptic potential
GABA	gamma-aminobutyric acid
GIRK	G-protein coupled inwardly rectifying potassium channel
GPCR	G-protein coupled receptor
HFS	high frequency stimulation
LFS	low frequency stimulation
LTP	long term potentiation
LTD	long term depression
NMDA	N-methyl-D-aspartate
NMDAR	N-methyl-D-aspartate receptor
OXR	orexin receptor
OX1R	orexin 1 receptor
OX2R	orexin 2 receptor
PKA	cAMP-dependent protein kinase
PKC	protein kinase C
PLC	phospholipase C
PTX	pertussis toxin
PPF	pair pulse facilitation
PPR	pair pulse ratio
PTP	post tetanic potentiation
REM	rapid eye movement
SB 334867	N-(2-Methyl-6-benzoxazolyl)-N''-1,5-naphthyridin-4- yl urea
TBS	theta burst stimulation
VTA	ventral tegmental area



# 摘要

分佈於下視丘爲主的 orexin neurons 會經由腦部廣泛投射的軸突釋出 orexins，可分爲 orexin A (hypocretin 1)和 orexin B (hypocretin 2)，會與 orexin receptors 結合。這個受體是在 1998 年被去孤兒化的 G 蛋白偶合受體，又分做兩種亞型，orexin 1 receptor (OX1R)和 orexin 2 receptor (OX2R)。OX1R 對於 orexin A 的親和力比 orexin B 高，但是 OX2R 對於兩者的親和力則相似。這兩種 orexin receptors 的在腦中分佈極廣，並與自下視丘 orexin neurons 投射出的軸突所釋放的 orexins 接合，被証實與許多生理病理的機轉有關。hippocampus 中也有 orexin neurons 投射的軸突和 orexin receptor 的分布，且在許多以大鼠實驗對象的 *in vivo* 實驗中被證實會影響 hippocampus 的突觸可塑性以及學習和記憶的表現。而以大鼠和小鼠的 hippocampus 腦切片爲實驗材料的 *in vivo* 實驗中，亦發現 orexins 有影響神經基礎突觸傳遞和突觸可塑性的現象。但 orexin 的角色仍眾說紛紜。因此，我們利用小鼠 hippocampus 切片，觀察 Schaffer Collateral-CA1 區域中，外給 orexins 對基礎突觸傳遞和神經可塑性，包括長期增益現象和去增益現象，有何種影響。藉由在 Schaffer Collateral 至 CA1 的傳遞路徑上給予電刺激，CA1 區域中的 stratum radiatum 進行胞外紀錄，所得到的場興奮性突觸後電位(fEPSPs)進行分析。長期增益現象(long term potentiation, LTP)是由高頻所引發刺激，我們所用的高頻刺激是由三個相隔 15 秒的 theta 頻率構成之刺激組成，每個 theta 頻率的刺激是由 4 段 100 HZ 的高頻刺激構成，每段相隔 200 秒。去增益現象(depotentiation)則是在高頻刺激後四十分鐘，由連續的低頻(1 Hz)刺激 15 分鐘所引發。

灌流 orexin A (30, 100, 300 nM) 10 分鐘後，所測得 fEPSPs 的斜率，並沒有影響基礎傳遞突觸。但 orexin A 會有意義的抑制 LTP 且具濃度相依性。高頻刺激後 4 分鐘內的 fEPSPs 的斜率變化，即後強直增強效應(post-tetanic potentiation, PTP)，亦有輕微濃度相依的抑制情形，但不具統計上的差異。而各個濃度對去增益現象的影響，亦無統計上顯著差異。

灌流[Ala<sup>11</sup>, D-Leu<sup>15</sup>]-orexin B (3, 10, 30, 100, 300, 1000 nM) 10 分鐘後，並沒有發現影響基礎傳遞突觸，在低濃度即可有意義的抑制 LTP，但隨濃度的升高並無法增加抑制 LTP 的程度。觀察 PTP，各組間不具統計上的差異。而各濃度對 depotentiation，亦無統計上的顯著影響。

將 3  $\mu$ M 專一性 OX1 拮抗劑 SB 334867 與 100 nM orexin A 同時灌流，發現可部分反轉 orexin A 對 LTP 所造成的抑制。對 PTP 的輕微抑制亦有些許的反轉，但皆未達統計上顯著的差異。而各個濃度對 depotentiation 的影響，亦無統計上顯著差異。單獨投予 SB 334867 對基礎突觸傳遞、LTP、PTP 和 depotentiation 並無影響。

再將 3  $\mu$ M 專一性 OX1 拮抗劑 SB 334867 與 300 nM [Ala<sup>11</sup>, D-Leu<sup>15</sup>]-orexin B 同時灌流，發現可部分反轉[Ala<sup>11</sup>, D-Leu<sup>15</sup>]-orexin B 對 LTP 所造成的抑制。對 PTP 並無影響。各組間對 depotentiation 的影響，則無統計上顯著差異。

將 30  $\mu$ M 專一性 OX2 拮抗劑 Compound 29 與 100 nM orexin A 同時灌流，發現可部分反轉 orexin A 對 LTP 所造成的抑制，對 PTP 並無影響。各濃度對 depotentiation 的影響，則無統計上顯著差異。單獨投予 Compound 29 對基礎突觸傳遞、LTP、PTP 和 depotentiation 並無影響。

再將 30  $\mu$ M 專一性 OX2 拮抗劑 Compound 29 與 300 nM [Ala<sup>11</sup>, D-Leu<sup>15</sup>]-orexin B 同時灌流，發現可部分反轉[Ala<sup>11</sup>, D-Leu<sup>15</sup>]-orexin B 對 LTP 所造成的抑制。對 PTP 並無影響。各組間對 depotentiation 的影響，則無統計上顯著差異。

在 hippocampus CA1 突觸會因極短的成對刺激(50 ms)後，鈣離子於突觸前堆積，而出現 paired pulse facilitation 的特性。計算 paired pulse ratio (PPR)，由第二個 fEPSP 斜率除與第一個 fEPSP 斜率，來評估突觸前神經傳遞物釋放的變化。我們發現在給予高頻刺激後 40 分鐘會有 PPR 下降(1.62 $\pm$ 0.04 vs. 1.51 $\pm$ 0.03, n=4)，即突觸前神經傳遞物釋放增加。一般認為 LTP 是以突觸後 NMDAR 開啓來為主，而我們認為 LTP 應同時也有增加突觸前神經傳遞物釋放。orexin A (100 nM)並不影響基礎刺激下的 PPR，但有輕微減少 PPR 下降程度的現象。

根據我們目前的實驗結果，在小鼠 hippocampus CA1 區域，發現 orexin A 和 [Ala<sup>11</sup>, D-Leu<sup>15</sup>]-orexin B 皆會部分抑制 LTP，但並不影響 depotentiation。對 LTP 的抑制效果，可能同時經由 OX1R 和 OX2R，但 OX1R 可能佔有較大的比重。再者，突觸前的抑制效果可能很輕微，推測可能是在突觸後，藉由活化 OX1R 和 OX2R 活化 PLC/PKC 的途徑，造成抑制 NMDA 所媒介的電流為主。

關鍵字：海馬迴，Orexin，神經突觸可塑性，長期增益現象，去增益現象。





# Abstract

Orexins are a novel family of two hypothalamic peptides, consisting of orexin A and orexin B, which were also named hypocretin 1 and hypocretin 2, respectively. They were identified to be the endogenous agonists of an orphan GPCR in 1998, which was, therefore, named orexin receptor and consists of OX1 and OX2 receptors. OX1 receptors display higher affinity for orexin A than orexin B, while OX2 receptors have similar affinity for both orexin A and orexin B. Orexin-containing neurons are mostly localized in the lateral hypothalamus and send projections widely through the brain, including the hippocampus. Orexin A had been reported to affect learning and memory tasks and hippocampal synaptic plasticity *in vivo*, mostly in the rat, as well as affected synaptic plasticity of hippocampal slices of rats and mice *in vitro*. However, controversial results were reported. We, therefore, investigated the effects of orexins on the synaptic plasticity, long-term potentiation (LTP) and depotentiation, at Schaffer Collateral-CA1 synapses of mouse hippocampal slices. Field excitatory postsynaptic potentials (fEPSPs) were evoked by stimulating the Schaffer collateral pathway and recorded in the stratum radiatum of the CA1 region of hippocampal slices. LTP was induced by high frequency stimulation (HFS) which consisted of 3 trains of theta burst stimulation (TBS), separated by 15s. Each TBS consisted of 4 pulses at 100 Hz, separated by 200 ms. Depotentiation was induced by low frequency stimulation (LFS, 1Hz, 15 min) 40 min after HFS.

Orexin A (30-300 nM) had no effect on the baseline fEPSPs after 10 min treatment. Orexin A treated 10 min before and during HFS, decreased HFS-induced LTP dose-dependently. The magnitude of LTP (% of the baseline fEPSPs) 40 min after HFS was reduced by pretreatment with orexin A 100 nM and 300 nM. The magnitude of PTP (% of the baseline fEPSPs) 40 min after HFS was mild dose-dependently reduced by

pretreatment with orexin A 30 nM, 100 nM and 300 nM. Depotentiation induced by LFS (expressed by the % restoration of the magnitude of LTP) 40 min after LFS was not different with orexin A.

[Ala<sup>11</sup>, D-Leu<sup>15</sup>]-orexin B (3~1000nM) also had no effect on the baseline fEPSPs after 10 min treatment. [Ala<sup>11</sup>, D-Leu<sup>15</sup>]-orexin B treated 10 min before and during HFS, decreased HFS-induced LTP dose-dependently. The magnitude of LTP (% of the baseline fEPSPs) 40 min after HFS was reduced by pretreatment with [Ala<sup>11</sup>, D-Leu<sup>15</sup>]-orexin B 30 nM, 300 nM and 1000 nM. The magnitude of PTP (% of the baseline fEPSPs) 40 min after HFS had no different by pretreatment with [Ala<sup>11</sup>, D-Leu<sup>15</sup>]-orexin B. Depotentiation induced by LFS (expressed by the % restoration of the magnitude of LTP) 40 min after LFS was not different with [Ala<sup>11</sup>, D-Leu<sup>15</sup>]-orexin B.

SB 334867 (3 μM), a selective OX1 receptor antagonist, partially antagonized the effect of orexin A. The magnitude of LTP (% of the baseline fEPSPs) in slices treated with orexin A+ SB-334867 was higher in slices with 100 nM orexin A, which was significantly lower than the control slices. The magnitude of PTP (% of the baseline fEPSPs) in slices treated with 100 nM orexin A had no significantly difference in slices with orexin A+ SB-334867, which was not significantly different with the control slices. SB-334867 alone had no effect on basal transmission, PTP, LTP and depotentiation.

SB 334867 (3 μM) slightly antagonized the effect of [Ala<sup>11</sup>, D-Leu<sup>15</sup>]-orexin B. The magnitude of LTP (% of the baseline fEPSPs) in slices treated with 300 nM [Ala<sup>11</sup>, D-Leu<sup>15</sup>]-orexin B + SB 334867 was higher in slices with [Ala<sup>11</sup>, D-Leu<sup>15</sup>]-orexin B, which was significantly lower than the control slices. The magnitude of PTP (% of the baseline fEPSPs) in slices treated with 300 nM [Ala<sup>11</sup>, D-Leu<sup>15</sup>]-orexin B had no

statistically significant difference in slices with [Ala<sup>11</sup>, D-Leu<sup>15</sup>]-orexin B + SB 334867, which was not significantly different with the control slices. SB 334867 alone had no effect on basal transmission, PTP, LTP and depotentiation.

Compound 29 (30  $\mu$ M), a selective OX2 receptor antagonist, partially antagonized the effect of 100 nM orexin A. The magnitude of LTP (% of the baseline fEPSPs) in slices treated with 100 nM orexin A + Compound 29 was higher in slices with 100 nM orexin A, which was significantly lower than the control slices. The magnitude of PTP (% of the baseline fEPSPs) in slices treated with 100 nM orexin A was no different in slices with orexin A + Compound 29, which was no significantly difference with the control slices. Compound 29 alone had no effect on basal transmission, PTP, LTP and depotentiation.

Compound 29 (30  $\mu$ M) slightly antagonized the effect of [Ala<sup>11</sup>, D-Leu<sup>15</sup>]-orexin B. The magnitude of LTP (% of the baseline fEPSPs) in slices treated with [Ala<sup>11</sup>, D-Leu<sup>15</sup>]-orexin B + Compound 29 (133 $\pm$ 7.1%, n=5) was higher in slices with 300 nM [Ala<sup>11</sup>, D-Leu<sup>15</sup>]-orexin B (120.8 $\pm$ 7.2%, n=5), which was significantly lower than the control slices (141.9 $\pm$ 3.5%, n=16). The magnitude of PTP (% of the baseline fEPSPs) in slices treated with 300 nM [Ala<sup>11</sup>, D-Leu<sup>15</sup>]-orexin B (146.8 $\pm$ 8.7%, n=5) was not significantly different in slices with [Ala<sup>11</sup>, D-Leu<sup>15</sup>]-orexin B + Compound 29 (186.5 $\pm$ 28%, n=5), which had no significantly difference with the control slices (181.5 $\pm$ 10.4 %, n=16). Compound 29 alone had no effect on basal transmission, PTP, LTP and depotentiation.

Paired-pulse facilitation (PPF) of fEPSPs, a presynaptic phenomenon resulting from Ca<sup>2+</sup> accumulation in the presynaptic terminals in response to stimulation by a pair pulses with short interval is induced by paired-pulse (50 ms interval) stimulation. The

PPR during LTP decreased, as compared to basal PPF ratio (PPR), suggesting that increased presynaptic transmission plays a role in the LTP evoked by TBS in CA1 region of mouse hippocampal slices although this LTP is mostly mediated by NMDA receptors. Orexin A (100 nM) did not affect basal PPR but slightly reversed the PPR decreased during LTP.

It is concluded that orexin A and [Ala<sup>11</sup>, D-Leu<sup>15</sup>]-orexin B decreased LTP but not affect depotentiation in CA1 region of mouse hippocampal slices. The impairment of LTP is mediated by both OX1 and OX2 receptors. The efficacy mediated by OX1 receptors is higher than that by OX2 receptors. It is suggested that presynaptic inhibition plays a little role in orexin-induced impairment; instead, postsynaptic NMDA receptor inhibition might contribute to this impairment through PLC/PKC pathway activated by OX1 and OX2 receptor activation.

Key word: hippocampus, orexin, neural plasticity, long term potentiation, depotentiation



# 緒論

## 1. Hypocretins/ Orexins 的發現

1998 年 de Lecea 等學者發現大鼠下視丘( hypothalamus )有兩種結構近似於腸道激素, secretin, 的胜肽, 由於只分佈於下視丘, 因此被命名為hypocretin。這兩種hypocretins 是由同一種前驅蛋白, preprohypocretin, 經過水解後所得( Fig. 1 )。其中含有38 個胺基酸的胜肽稱為hypocretin 1, 而29 個胺基酸的胜肽則稱為hypocretin 2。同時, 他們也利用北方點墨法( Northern blot ) 及原位雜交法( *in situ* hybridization ) , 發現在小鼠的第11 對染色體可在出生後三週開始轉錄出preprohypocretins mRNA, 且只分布在下視丘背側與外側區( dorsal and lateral hypothalamuic area)的神經細胞體, 由於下視丘背側與外側區與進食( feeding )、血壓與中樞對免疫系統等的調控有關, 因此起初推測hypocretin 在這些生理功能中扮演重要角色(de Lecea et al., 1998)

同年, Sakurai 等學者(Sakurai et al., 1998b)使用大鼠全腦萃取物在表現各種G 蛋白偶合孤兒受體(orphan G protein-couple receptor, orphan GPCR )的細胞株上篩選這些G 蛋白偶合孤兒受體的內生性受質時, 發現大鼠全腦萃取物中有兩種新的神經胜肽, 對某orphan GPCR 有高親和力, 並且有使得細胞內的鈣離子顯著上升的特性。在動物實驗的結果顯示, 此兩種胜肽都會增加老鼠攝食行為, 故被命名為orexins, 其中orexin A 具有兩個分子內雙硫鍵且含有33 個胺基酸、分子量為3562 Da。orexin B 則含有28 個胺基酸、分子量為2973 Da。這兩種神經胜肽皆從同一種前驅蛋白, prepro-orexins, 而來。同時, 這個會與orexins 結合的orphan GPCR 被稱為orexin receptors(Sakurai et al., 1998a)。Sakurai等學者表示, 他們所分離而得的orexins 與de Lecea 等學者所發現的hypocretin 是相同的胜肽, 意指orexin A 即為hypocretin 1, 而orexin B 為hypocretin 2, 兩者的差異僅在於hypocretin 1較orexin A 在C端多出5個無功能的胺基酸, 而hypocretin 2 在N 端則多出一個Glycine (Fig. 1)(Sakurai et al., 1998b)。這兩個實驗團隊所發現的orexins與先前其他已知的胜肽完全不同, 是為一個全新種類的胜肽。因此, 後續許多作者發表相關結果時, 都會

使用orexins/ hypocretins 或hypocretins/ orexins 通稱之(Kilduff and Peyron, 2000)。

## 2. Orexins 的介紹

會有orexin( hypocretin ) neurions的神經細胞，主要聚集於下視丘，包括於下視丘外側( lateral hypothalamus, LHA ) 和下視丘背側( posterior hypothalamus, PHA ) 和穹窿狀周邊區( perifornical area, PFA )(de Lecea et al., 1998 ; Sakurai et al., 1998a)，但是其投射到非常廣泛的腦區，除了小腦以外，皆屬其投射的範圍，包括：central medial nucleus (CM) 和paraventricular nucleus of the thalamus (PVT)；下視丘的arcuate nucleus (Arc)，ventromedial nucleus (VMH)，dorsomedial nucleus (DMH) 和 tuberomammillary nucleus (TMN)；locus coeruleus (LC) 和 ventral tegmental area (VTA) 等區(Fig. 2)(Mintz et al., 2001; Nambu et al., 1999a; Peyron et al., 1998)。

由 orexin neurons 投射纖維所分泌出的 orexins 乃是屬於神經多胜類 (neuropeptide)，如前段所提，orexins 又分爲A 及B 兩種型態(即 hypocretin 1 及 hypocretin2 )，在哺乳類中，兩者皆來自於共同一段130~131氨基酸的前驅物，prepro-orexin，經由裁切後可形成orexin A 或orexin B，分別含33 和28 個氨基酸。比較其結構，orexin A有兩個雙硫鍵，而orexins B則是線狀的胜肽。Orexin A在人、豬、狗、大鼠和小鼠有相似的結構，但orexin B在種別間則差異較大(Kukkonen et al., 2002)。此外，與orexin生成有關的基因密碼已證實位於人類染色體17<sub>q21</sub> 這個位置上(de Lecea et al., 1998; Sakurai et al., 1998a)，這個位置與人類神經退化性疾病有關，例如：巴金森氏症(parkinsonism) 以及失智症(dementia)(Wijker et al., 1996; Wilhelmsen et al., 1994)。同樣的，在動物行爲實驗中，orexins 也已經證實可以影響記憶的獲取(acquisition)、固化(consolidation)和提取(retrieval)記憶的能力。(Akbari et al., 2008; Akbari et al., 2006; Akbari et al., 2007; Aou et al., 2003; Selbach et al., 2004; Wayner et al., 2004)。

### 3. Orexin receptors

當人類基因被解碼之後，近三百種的G 蛋白偶合受體(G protein-coupled receptors, GPCR)被養殖出來，這些受體有著穿膜七次的特質。其中有三分之二被認為是體內神經傳導物質的受體，另外一百多種被養殖出來的G 蛋白偶合受體尚未發現其內生性受質，因而被稱為G 蛋白偶合孤兒受體(orphan GPCR)(Chiou et al., 2007)。這些orphan GPCR被認為是許多人類束手無策疾病的可能標的，而廣為科學家或製藥界重視，被視為在藥物發展上良好的作用標的(Stadel et al., 1997)。這些orphan GPCR若找到其受質，其將被去孤兒化( de-orphanized )，OX受體即是第二個被去孤兒化的GPCR。由1998 年Sakurai 等學者如前述方式，藉由大鼠全腦萃取物在含有orphan GPCR細胞株篩選，找出兩種新的神經肽orexins，並將可以與orphan GPCR結合的受體命名為OX 受體。這類受體兩種亞型，便分別命名為OX1受體(OX1R) 與OX2 受體(OX2R)，而OX2R 有64% 的氨基酸序列與OX1R 相同，從此這兩種G 蛋白偶合受體便被去孤兒化。此外Sakurai 等學者發現orexins 對於OX1 受體(OX1R)與OX2 受體(OX2R)有不同的親和力，OX1R 對orexin A 的親和力比orexin B 高，orexin A ( $EC_{50}=30$  nM) 大於orexin B ( $EC_{50}=2500$  nM)，但OX2R 對orexin A 及orexin B 親和力則相同(Sakurai et al., 1998a)。2003 年Zhu 等學者使用BIM 細胞株( 由human neuroblastoma cells 及 thymidine auxotrophs of rat nerve-like cells 雜交而來 ) (Ishii et al., 1990) 表現OX1R 及OX2R，發現與OX1R 偶合的G-protein 是PTX( pertussis toxin )-insensitive G-protein，目前認為是 $G_{q/11}$ 和 $G_s$ 為主，其可藉由活化磷脂酶C ( phospholipase C, PLC )和磷脂酶A ( phospholipase A, PLA )進而活化其下游機制。而OX2R 則可能分別與PTX-sensitive (  $G_{i/o}$  ) 及 -insensitive G-protein (  $G_{q/11}$  ) 偶合(Fig. 3)(Matsuki and Sakurai, 2008; Spinazzi et al., 2005; Zhu et al., 2003)。為了能夠詳盡地研究OX1R 與OX2R 的特性，於是科學家研發對這兩種受體有選擇性肽類與非肽類的致效劑與拮抗劑( Tab. 1)(Cheng et al., 2005)。在本實驗中，分別使用SB-334867、[Ala<sup>11</sup>, D-Leu<sup>15</sup>] orexin-B和compound 29，三個合成的藥物來研究兩類OXR所媒介的反應。SB-334867是為對OX1R 具有

選擇性的拮抗劑(Smart et al., 2001); 而[Ala<sup>11</sup>, D-Leu<sup>15</sup>] orexin-B, 是由orexin B 將其中的胺基酸取代並修飾過後而得, 對於OX2R 是高度選擇性的致效劑(Asahi et al., 2003), 其OX1R: OX2R 的選擇性為1: 400。此外, 本實驗中亦利用OX2R 之選擇性拮抗劑N-Acyl 6,7-dimethoxy-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline, 簡稱為compound 29, 對OX2R的選擇性為OX1R的250倍(Hirose et al., 2003)。利用上述幾類種藥物則可研究orexins 的作用是經由OX1R 或OX2R 所引發。

#### 4. Orexins的細胞作用機制

由於認為兩個OXR 的G protein 有所不同, OX1R 是會經由G<sub>q/11</sub>和G<sub>s</sub>, 而OX2R 則G<sub>q/11</sub>, G<sub>i/o</sub> 和G<sub>s</sub>。藉由上述的G 蛋白, orexins 對於神經細胞內離子和通道的作用, 總括而言, 可簡單分為4 類: (1)增加細胞內鈣離子濃度(2)抑制鉀離子通道和GIRK 通道(3)開啓非選擇性的陽離子通道( non-selective cation channel, NSCC )(4)活化Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchanger(Kukkonen and Åkerman, 2005)。用Chinese hamster ovary (CHO) cell或human embryonic kidney 293( HEK 293) cell等細胞株表現 OXR 的體外實驗( *in vitro*)之中, 發現orexin A 和orexin B 均可透過OX1R 會增加細胞內鈣離子濃度, 而orexin B 在OX1R 作用能力比orexin A差, orexin A 以及orexin B 透過OX2R 增加細胞內鈣離子濃度的能力相似(Sakurai et al., 1998a)。Kukkonen以及Åkerman ( 2001)在相同實驗模式下, 發現orexin A 增加細胞內鈣離子是經由orexin- receptor- operated Ca<sup>2+</sup> influx 以及store- operated Ca<sup>2+</sup> influx 造成(Kukkonen and Akerman, 2001)。利用同時表現OX1R和OX2R以及GIRK通道的HEK-293細胞株, 發現orexin A可瞬間興奮後長期地抑制GIRK通道。由於興奮的作用可受到PTX的抑制, 但抑制的作用則否。因此推論活化GIRK是經由G<sub>i/o</sub>的G<sub>βγ</sub>, 而抑制的作用則是經由G<sub>q</sub>所媒介的PLC途徑所引發(Hoang et al., 2003)。在nucleus tractus solitarius, 除了GIRK通道外的鉀離子通道亦會受到orexin A的經由活化PLC/PKC的抑制現象(Yang et al., 2003)。有趣的是, 許多去極化的研究都顯示, Voltage-dependent calcium channel (VDCC) 都有參與其中, 因此認為這是因為



orexins 藉由減少鉀離子通道電導而開啓VDCC(Kukkonen and Åkerman, 2005)。此外，Uramura等學者在ventral tegmental area 的dopaminergic 神經元，發現orexin A 增加細胞內鈣離子的濃度是透過phosphatidyl choline- specific PLC- PKC- L/ N- type 鈣離子通道的訊息傳遞，並發現有增加NMDA所媒介電流的現象(Borgland et al., 2006; Uramura et al., 2001)。在非神經細胞實驗中，在人類與大鼠腎臟髓質上發現，給予orexin A 經由OX1R 造成cortisol 分泌的現象，會因給予adenylate cyclase 或是PKA 抑制劑而使分泌量下降，因此推測OX1R 可能偶合於Gs 蛋白 (Spinazzi et al., 2006)。

此外，orexins也會影響NMDA所媒介的電流，在ventral tegmental area可以使NMDA所媒介的電流上升(Borgland et al., 2006)。但在hippocampus CA1區域，分別利用大鼠和小鼠的腦薄片，利用胞外紀錄的方式，觀察NMDA電流的變化，卻發現無論是投與30nM orexin A 30 min 或100 nM 5 min 皆有減少NMDA電流20~30%的現象(Aou et al., 2003; Selbach et al., 2004)，似乎暗示著在hippocampus CA1區域的NMDAR會受到orexin A的影響，而有功能或是數量上削減的跡象。

## 5. Hypocretins/ Orexins 以及OXR 的分佈

科學家以原位雜交法( *in situ* hybridization )(Bingham et al., 2001; Date et al., 2000; Hervieu et al., 2001; Peyron et al., 1998; van den Pol, 1999)及免疫組織染色法( immunohistochemistry )(Cutler et al., 1999; de Lecea and Sutcliffe, 1999; Kilduff and Peyron, 2000; Sakurai et al., 1998a; van den Pol, 1999) 得知orexins 和OXR 在CNS 的分佈區域，發現orexins 的蛋白質與OXR 之mRNA 或蛋白質可在腦及脊髓中發現(Fig.2,3)。

## 6. Orexins 的生理功能與病理角色

自 orexins 被發現以來，許多研究結果發現 orexins 在清醒/睡眠、攝食行爲、報償機制、疼痛調節和記憶學習等機制，扮演著重要的調控角色，以下將逐一簡單介紹。

### 6.1 清醒/睡眠(sleep-wake)機制及猝睡症(narcolepsy)

清醒/睡眠機制及猝睡症的病理機制中，orexins 的參與其中是近來亟爲令人振奮的突破。若於老鼠的腦室內給予 orexin A，利用腦波圖(electroencephalogram, ECG)監測睡眠覺醒週期，發現使得動物增加警覺期(wakefulness)，延緩睡眠的開始(onset time)且不易入睡，入睡後明顯縮短快速動眼期( rapid eye movement, REM ) 及非快速動眼期( non-REM )(Beuckmann and Yanagisawa, 2002; Mieda and Yanagisawa, 2002)，但 orexin B 卻沒有顯著差異(Hagan et al., 1999)。因爲 orexins 可以活化許多與動物保持清醒有關的核區，包括 locus coeruleus 的 noradrenergic 神經元 (Hagan et al., 1999)，ventral tegmental area 的 dopaminergic 神經元(Nakamura et al., 2000)，dorsal raphe 的 serotonergic 神經元 (Brown et al., 2002; Liu et al., 2002)，和 TMN 的 histaminergic 神經元(Yamanaka et al., 2002)。較有進展的部分是對 histamine 的研究，對已於側腦室投與 orexin A 的大鼠給予 H<sub>1</sub> 接受器阻斷劑，pyrilamine，則會發現有大量減少其清醒時間的現象(Yamanaka et al., 2002)。若利用 H<sub>1</sub> 接受器缺失的小鼠，可以觀察到其清醒時間並不會受到 orexin A 投予而有增加的現象(Huang et al., 2001)。因此推論 orexin 使動清醒的機制可能與分佈許多 histaminergic 神經元之 TMN 核區有著極大的關係。直接觀察 preproorexin 基因剔除(knockout)的老鼠，會有猝睡症的現象，以及破壞狗的 OX2R 的基因，也會導致猝睡症(Chemelli et al., 1999; Lin et al., 1999)，因而推測 orexins 在猝睡症的病理機制中扮演重要的角色。若測量病人腦脊髓液( cerebrospinal fluid, CSF )中 orexins 濃度，發現在猝睡症病人的 CSF 與控制組比較，猝睡症病人的 CSF 測不到或測到濃度很低的 orexins，因此 orexins 的濃度可視爲嗜睡症的臨床診斷指標之一(Dalal et al., 2001; Nishino et al., 2000)。

## 6.2 攝食行爲 (feeding behavior)

Sakurai等學者(1998a)使用免疫染色法發現orexin neurons主要存在下視丘，其中LHA這個區域與進食行爲(feeding behavior) (Anand et al. 1951)而其他的下視丘區域，例如：Arc (arcuate nucleus), VMN (ventomedial nucleus), DMH (dorsomedial hypothalamic nucleus), PVN (paraventricular hypothalamic nucleus)則與能量代謝(energy hemostasis)有關(Elmqvist et al., 1999)。若將orexins 直接注入老鼠的側腦室後，會顯著促進動物的進食與飲水量，且orexin A 的效用比orexin B 顯著；若將動物禁食48 小時，或外給胰島素造成體內血糖下降(hypoglycemia)，則促使內生性orexin 的mRNA 代償性增加(up-regulation)，進而影響 hypothalamic- pituitary-adrenal axis 的調節(Kunii et al., 1999; Sakurai et al., 1998a)。在電生理*in vitro* 的實驗上發現，hypothalamic orexin neurons會受到胞外葡萄糖濃度的影響，而改變其靜止膜電位和自發性動作電位的頻率。當胞外葡萄糖濃度上升，會有過極化(hyperpolarization)和減低自發性動作電位的頻率的現象(Yamanaka et al., 2003)。相反的，胞外葡萄糖濃度下降，會有去極化(depolarization)和增加自發性動作電位的頻率的現象(Burdakov et al., 2005; Yamanaka et al., 2003)。在臨床觀察上，測量肥胖小孩血清的orexin A含量發現較正常組為低(Lou et al., 2006)。而若他們藉由減少飲食攝取和多運動，發現隨著體重的減輕，orexin A會有回升的趨勢(Bronsky et al., 2007)。在成人中，亦發現肥胖病人的血清orexin A濃度較低(Adam et al., 2002; Baranowska et al., 2005)，同樣的，在血清orexin A濃度較低的肥胖病人進行胃縮小手術，術後病人體內orexin A出現上升的情形(Heinonen et al., 2005)。CSF 中prepro-orexin 濃度，會與小鼠體內的血中葡萄糖濃度和食物攝取量呈反比(Yamanaka et al., 2003)。綜觀上述結果，orexins傾向在身體處於缺乏飢餓時釋放，而在身體能量充足時減少。

但觀察猝睡症病人在臨床上的表現後發現，典型猝睡症的病人因為orexins系統的缺失，因而有減少食物攝取量的傾向，但卻因基礎代謝率的下降，使得身體質量指數增加(body mass index, BMI)的現象(Chabas et al., 2007; Lammers et al.,

1996; Schuld et al., 2000)，同樣的，在OXR 基因剔除小鼠亦有減少食量，但卻有後期過胖(late-onset obesity) 的現象(Hara et al., 2001; Hara et al., 2005)。以上證據顯示orexin 屬於除了會促進食慾外，其對體內基底代謝率的維持也有相當的影響(Honda et al., 1986; Schuld et al., 2000)。

### 6.3 壓力(stress)

與壓力相關的研究中，已知orexin neurons會因為寒冷和束縛( immobilized )而活化(Sakamoto et al., 2004)。將orexins 注入動物的側腦室中，會促進血液中腎皮質固醇( corticosterone )的濃度(Hagan et al., 1999)，可能是經由刺激腦下垂體釋放促腎上腺素皮質醇( Adrenocorticotrophic hormone ; ACTH )(Engelmann et al., 2004)，此項結果暗示著orexin 可能參與壓力(stress)有關的生理功能(Dun et al., 2000; Ida et al., 2000)。

### 6.4 疼痛(pain)

若將 orexin A 以腦室、腹腔及靜脈投予後觀測老鼠在疼痛發炎模式 ( carrageenan-induced thermal hyperalgesia)及熱板(hot plate test) 測試下的痛覺反應，發現orexin A 以腦室和靜脈投予時，在疼痛發炎模式中具有止痛的效果，並可用OX1R 拮抗劑對抗orexin A 的止痛效果。當脊髓注射orexin A 後再給予SB 334867，則看見止痛效果被抑制，單獨腹腔給予SB 334867，則使疼痛加劇，表示此種發炎模式有內生性orexin A釋出。其對發炎反應所產生的止痛效果，可能與腦部和脊髓部位的OX1R 有關。但在熱板測試下的急性疼痛(acute pain) 模式，並不會受到SB 334867的影響，因此推論在急性疼痛模式下，沒有內生性orexin A 的釋放(Bingham et al., 2001)。術後疼痛模式上，單獨給予SB 334867 會看見老鼠有更痛的情況產生，因此推測術後疼痛模式可能有內生性的orexins 參與；以上可推知 orexin A 對疼痛反應所產生的止痛效果，可能大多與OX1R 有關。由於naloxone 不能對抗orexin A的止痛效果，所以其作用與鴉片系統無關(Cheng et al., 2005)。

## 6.5 自主神經系統(autonomic nervous system)

在自主神經系統有關的研究中，發現orexins 注射於側腦室時，可增加心跳速率(heart rate)及平均動脈壓，但如先投予 $\alpha$ 或 $\beta$ 受體拮抗劑時，這個效果就會消失(Shirasaka et al., 1999)。同時也可以觀察到在缺乏orexin的小鼠血壓會低於一般的小鼠(Kayaba et al., 2003; Zhang et al., 2006) 上述的結果似乎都支持orexin會增加交感神經(sympathetic tone)的興奮性。因此，缺乏orexin的小鼠便減低了能量的耗損。也就是說，orexins雖然增加了攝食行爲，但同時orexins 也增加了代謝的速率(Lubkin and Stricker-Krongrad, 1998)。這也解釋了動物在攝食時所需的警覺(aware)，活力(active) 以及與攝食時所需的回饋機制的參予。

## 6.6 內分泌系統(endocrine system)

在內分泌系統有關的研究中，由腦室內給予orexins 會增加黃體生成素(luteinizing hormone)的濃度(Pu et al., 1998)以及腎皮質類固醇(corticosterone)而抑制了泌乳素(prolactin)及生長激素(growth hormone)(Hagan et al., 1999)。除了在中樞影響內分泌外，進一步的研究發現，腎上腺髓質亦有其受體的存在(Lopez et al., 1999)。在病理研究上，在正常的腎上腺髓質中，OX1R 的mRNA 表現量比OX2R 的mRNA 表現量大，但形成腎上腺髓質瘤( pheochromocytomas)後，便轉變成OX2R 的mRNA 表現量比OX1R 的mRNA 表現量大(Mazzocchi et al., 2001)。

## 6.7 消化道系統(digestive system)

中樞投與orexin 後，會促進動物胃酸的分泌，一旦將動物施以迷走神經切除(vagotomy)或投與副交感神經阻斷劑阿托平(atropine)，則會使上述orexin 的作用喪失；若經由周邊給予orexin，則對動物胃酸分泌無影響，因此，暗示orexin 會經由中樞的迷走神經系統來刺激胃酸分泌(Takahashi et al., 1999)。另外研究發現，在腸胃道中有orexins 及其受體的存在，且orexins 會顯著刺激腸胃道神經元的活性，及促進腸胃道的運動(Kirchgessner and Liu, 1999)。

## 6.8 運動行爲(motor activity)

Orexin A 和 orexin B 都會促進動物自發性活動力( spontaneous physical activity) 以及增加一些行爲表現上的改變。在動物行爲上發現，由腦室給予 orexin 會增加動物的活動行爲(locomotor activity)、跳躍次數及增加警覺(Hagan et al., 1999; Kotz, 2006)，此外還發現有 freezing behavior、毛髮整理(grooming)以及咀嚼等動作的增加(Hagan et al., 1999; Ida et al., 2000; Jones et al., 2001)。若直接將 orexins 微量注入 LC，會促進同側或雙側肢體的肌肉張力(Kiyashchenko et al., 2001)。

## 6.9 報償系統(reward system)與成癮機制(addiction)

在回饋系統與成癮機制中，orexins 亦被發現有其十分重要的角色。從 hypothalamus 來的 orexin neurons 有大量的神經纖維投射在 ventral tegmental area 釋出 orexin (Fadel and Deutch, 2002; Peyron et al., 1998)，直接活化在 ventral tegmental area 上的 dopaminergic 神經元 (Korotkova et al., 2003; Nakamura et al., 2000)。如本文 6.8，由腦室給予 orexin 會有增加動物的活動行爲(locomotor activity)、跳躍次數及增加警覺(Hagan et al., 1999; Kotz, 2006)的效果。但若投予 dopamine 受體拮抗劑，haloperidol，可以有效抑制側腦室注射 orexins 所造成活動行爲的增加 (hyperlocomotion) 以及刻板行爲(stereotypy) (Nakamura et al., 2000)。如果給予 cocaine 或 morphine 引起成癮行爲後，給予 orexin 可以看到成癮行爲或攝食行爲被加強 (Boutrel et al., 2005; Harris et al., 2005)。若是給予 OX1R 拮抗劑 SB 334867，會使成癮表現降低，推測內生性 orexin A 可能藉由活化 ventral tegmental area 產生成癮行爲 (Borgland et al., 2006; Narita et al., 2006)；此外，Borgland 等學者 (Borgland et al., 2006) 進一步利用電生理記錄的方式，發現給予 orexin A 會經由 OX1R 活化 PLC/PKC，在大鼠 ventral tegmental area 的 dopamine neuron 上引發 NMDAR 所媒介的電流外，藉由此一方式，更強化了 AMPAR 所媒介的電流。推論在 ventral tegmental area 這個區域，orexins 可能強化回饋系統和成癮作用。

## 6.10 學習(learning)與記憶(memory)

在動物行為的實驗中，Telegdy 等學者，首先利用 orexin A 注入大鼠側腦室 (i.c.v.)，利用被動逃避試驗(passive avoidance test)，發現給予 orexin A 可以促進學習(learning)和記憶的固化(consolidation)，在 560 pmol orexin A 可以促進學習，而 280 pmol orexin A 即具有強化記憶固化的效果，這個增進的效果可能藉由許多受體活化而達到，利用專一性的受體拮抗劑發現，包括:dopamin 2 receptor、 $\alpha$ -adrenoreceptor、 $\beta$ -adrenoreceptor、muscarinic cholinergic receptor、GABA<sub>A</sub> receptor 等都有參與(Telegdy and Adamik, 2002b)。Jager 等學者同樣利用 orexin A 注入 CD-1 和 SMAP 小鼠側腦室後，進行主動和被動逃避試驗，發現 orexin A(3 nmol)可促進 CD-1 主動和被動逃避記憶的固化，並增強 4 個月大 SMAP 小鼠的被動逃避記憶固化，更可幫助有記憶衰退現象的 12 個月大 SMAP 小鼠的被動逃避記憶固化。然而，在水迷宮試驗(Morris water maze task) 中，於 Aou 等學者於側腦室投予 1~10 nmol orexin A，會使大鼠有記憶衰退的情形。Akbari 等學者，同時利用水迷宮以及被動逃避試驗，並於 CA1 和 DG 區域投予 OX1R 專一性的抑制劑 SB-334867(6 mg/0.5 ml)後，發現在水迷宮試驗中，若阻斷 CA1 的 OX1R 會同時減低大鼠獲取(acquisition)、固化(consolidation)和提取(retrieval)記憶的能力。但在 DG 卻只會造成獲取和固化記憶的能力下降。在被動逃避學習試驗中，於 CA1 抑制了獲取和固化記憶的能力，DG 投與的結果僅抑制了提取記憶的能力，暗示內生性的 orexin A 在不同記憶模式中，皆扮演了重要的角色。(Akbari et al., 2008; Akbari et al., 2006; Akbari et al., 2007)。Wayner 等學者於大鼠 DG 局部投與 orexin A (900 pmol)，利用 *in vivo* 的胞外電生理紀錄模式，觀察到 LTP 有被增強的現象，且此一現象可以被腹腔投予之 OX1R 專一性拮抗劑，SB-334867(10mg/kg) 所完全抑制，因此推論為 OX1R 所媒介的反應(Wayner et al., 2004)。

利用 *in vitro* 胞外紀錄的電生理實驗中，Aou 等學者觀察 orexin A(1~30 nM)對大鼠 CA1 區域長期增益現象(longterm potentiation, LTP)的影響，發現 orexin A(30nM)對 LTP 有抑制的情形，而不影響長期抑制效應和基礎突觸傳遞。此外，

利用低鎂和 AMPAR 拮抗劑觀察授予 orexin A 時 NMDA 電流的變化，發現有下降的情形，因此認為 LTP 的抑制是由於 NMDA 電流的降低而來(Aou et al., 2003)。但 Selbach 等學者給予 orexin A (100nM)於具有完整 CA3-CA1 迴路的小鼠 hippocampus 腦切片中，卻看到基礎突觸傳遞有增強的趨勢，而且此一趨勢並不會因為將 orexin A 洗去而消失。在將 CA3-CA1 迴路切斷後，這個增強的現象就會消失，而授予 orexin B (100nM)不會這個現象。他們並認為這個基礎突觸傳遞增強的趨勢可能是由於 CA3 區域的細胞群自發性去極化程度上升所造成，而此一現象可能是 orexin A 藉由活化局部區域 glutamatergic, noradrenergic, cholinergic 和 gabaergic 細胞所導致。同一篇實驗中，發現用低鎂、AMPA 拮抗劑和 GABA<sub>A</sub> 拮抗劑存在下，刺激引起的 NMDA 電流，發現 orexin A(100 nM)對 NMDA 電流有抑制的情形(Selbach et al., 2004)。這個結果與 Aou 等學者發現的相同(Aou et al., 2003)。

然而，我們知道 LHA 的神經元可以將 orexin 投射到 hippocampus 中，且 hippocampus 亦有 orexin 的受體。也有報導指出於活體實驗中，刺激 LHA 會抑制 DG 長期增益現象(LTP)(Wayner et al., 1997a; Wayner et al., 1997b)。因此推論 orexins 有機會抑制 hippocampus 長期增益現象(LTP)的形成，上述實驗的結果，有許多的不一致。由於目前的解剖證據指出，雖然大鼠和小鼠的 hippocampus 皆可發現 orexin 的受體(Cluderay et al., 2002; Marcus et al., 2001; Selbach et al., 2004; Trivedi et al., 1998)，但兩個種別間，受體的兩個亞型卻有分佈區域上的不同。在大鼠無論是分析 ORX mRNA 或是蛋白質，都發現 CA1 和 CA2 區域是以 OX1R 為主，OX2R 非常的少。此外，在 CA3 則是以 OX2R 為主，而 DG 則是兩種亞型都有，以 OXR1 較多(Cluderay et al., 2002; Marcus et al., 2001; Trivedi et al., 1998)。但在 C57/BL6 小鼠 hippocampus，無論是 CA1、CA3 或 DG 上，卻可以同時擁有 OX1R 和 OX2R 的 mRNA 和蛋白質的表現(Selbach et al., 2004)。因此，本實驗便選用 C57BL/6J 小鼠，於 hippocampus CA1 區域進行胞外電生理紀錄，研究 orxcin A 和[Ala<sup>11</sup>, D-Leu<sup>15</sup>]-orexin B 對基礎突觸傳遞和神經可塑性的影響，並利用 OX1R 之選擇性拮



抗劑 SB 334867 或 OX2R 之選擇性拮抗劑 compound 29，與 orxcin A 或[Ala<sup>11</sup>, D-Leu<sup>15</sup>]-orexin B 同時給藥，希望可以進一步釐清在小鼠和大鼠間的 orexin 受體分佈差異在基礎突觸傳遞和神經可塑性上，OX1R 和 OX2R 是否有參與且扮演何種的角色。



# 實驗材料及方法

## 1. 實驗動物

實驗使用的動物為成年雄性小鼠(C57BL/6J mice)，週齡為 8~12 週。小鼠購自國家實驗動物中心，在台大醫學院實驗動物中心飼養於室溫下，光照週期為 12h:12h 光照:黑暗，鼠籠配置食物及飲水，至少飼養一週後開始使用，。

## 2. 海馬回(hippocampus)活體腦切片製備

將小鼠斷頭犧牲後，快速取出腦，置於冰溫且充氧(5% CO<sub>2</sub> and 95% O<sub>2</sub>)的解剖用人工腦脊髓液(dissection artificial cerebral spinal fluid , ACSF),成分組成如下 (in mM): NaCl 87, KCl 2.5, MgCl<sub>2</sub> 7, CaCl<sub>2</sub> 0.5, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1.2, NaHCO<sub>3</sub> 25, sucrose 75 (pH 7.4)。取出的腦先沿著大腦縱隔的溝壑切成左右兩個腦半球，將腦半球的小腦(cerebellum)、延髓(medula)、嗅球(olfactory bulb)與前腦(prefrontal cortex)迅速切除，再將得到體積大約 0.5×0.4×0.4 cm<sup>3</sup> 包含海馬回(hippocampus)的腦區塊，再用快乾膠把腦塊的小腦切除面黏在切片機標本台上(DTK-1000, DOSAKA, Kyoto, Japan)，以 Coronal dissection 方式，切出厚度為 400 μm 的海馬回(Hippocampus)腦切片，切下的海馬回腦切片放置在人工腦脊髓液(artificial cerebral spinal fluid, ACSF) 中，室溫下平衡至少一小時。生理 ACSF 成分如下: (in mM) NaCl 117, KCl 4.5, MgCl<sub>2</sub> 1.2, CaCl<sub>2</sub> 2.5, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1.2, NaHCO<sub>3</sub> 25, Glucose 11 (pH 7.4)。

### 3.電生理學記錄

#### 3.1 電生理訊號記錄方式

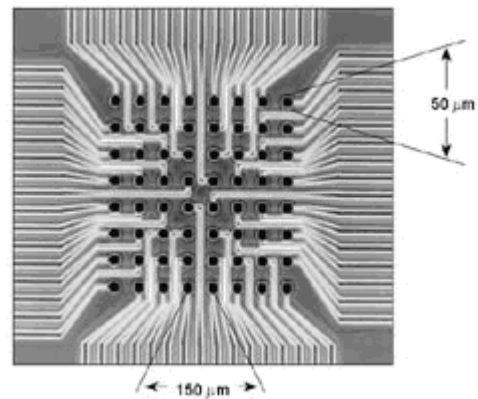
在腦切片的 hippocampus CA1 區域使用胞外紀錄(extracellular recording)的方式，記錄場興奮性突觸後電位(field excitatory post-synaptic potential, fEPSP)。本實驗利用多頻道電極記錄系統(Panasonic MED-64 system)(圖一)。記錄槽底面佈有 64 個可選作刺激或記錄的電極與四個參考電極(圖二)，這四個參考電極有助於增加訊號/雜訊比值，以這四個參考電極的平均值對應可擷取到的場興奮性突觸後電位(fEPSP)，可獲取更加清晰且雜訊較小的 fEPSP。所獲得的訊號再經由電腦軟體(Conductor 3.1)數位化後擷取與分析。64 個可刺激或記錄的電極排列成 8×8 矩陣，64 個電極覆蓋面積約為 1 mm<sup>2</sup>，每個電極面積約為 50 ×50 μm<sup>2</sup>，每個電極間距 150 μm，在 50Hz 測量下電阻值約為 ≤50kΩ。含多頻道電極記錄槽在第一次使用前，浸泡在室溫下 PEI 溶液( 1 ml 0.1% polyethylene imine 溶在 25 mM, Borate buffer ) 至少 12 小時，增加記錄槽的電極面的親水性而加強其腦切片之貼附性，之後用蒸餾水溫和地沖洗至少 3 次以上。

依前述方法分離之含腦切片，在室溫下至少平衡一小時後，待海馬體的神經細胞恢復活性，平衡後，將 hippocampus 腦切片移到紀錄槽，透過連接到電腦的顯微鏡(OLYMPUS MIC-D)將 hippocampus 區域定位到電極上，用鑲有尼龍網子的馬蹄形白金棒將 hippocampus 薄片固定住。定位後照相存檔再將含有腦切片的記錄槽安置在接有接上放大器(SU-MED640, Panasonic)的連接器(Connector)，透過電腦軟體(Conductor 3.1)操作實驗，並定位記錄槽，接上灌流裝置後，以 95% O<sub>2</sub> / 5% CO<sub>2</sub> 充氧之 ACSF 持續灌流。記錄槽內灌流液體積約為 0.5~0.6 ml，灌流速率維持約在 0.8~1 ml/min，溫度保持在室溫(約 27 °C)，酸鹼度維持在 pH 7.4。因為此套系統刺激電流傳導，腦片刺激效果與記錄訊號的大小與腦片和記錄電極的貼合度息息相關，故需待腦切片與記錄槽上電極達穩定貼合(約一小時)後，開始進行電生理紀錄。依 hippocampus 標本與對應位置選擇在 Schaffer-collateral 刺激 CA1 的 apical dendric zone, stratum radiatum 紀錄。基礎刺激條件是頻率 0.03Hz、0.1 ms，基礎刺激

強度調整在可以產生最大 fEPSP 幅度的 40%-50%。fEPSP 的丈量方式為量取 fEPSP 的起始斜率的大小為比較指標。



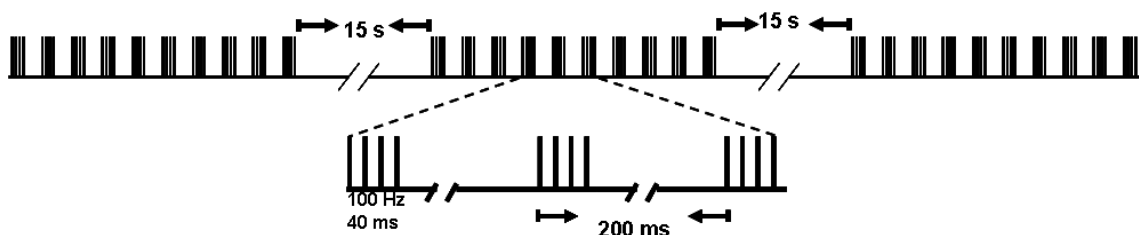
(圖一)



(圖二)

### 3.1.1 長期增益效應(Long-Term Potentiation, LTP)

長期增益效應是經由高頻刺激(High Frequency Stimulation, HFS)引起，如前述在基礎刺激條件，0.03Hz,0.1ms 刺激下得到穩定的 fEPSP 20 分鐘以上之後，紀錄十分鐘的 fEPSP 之平均值當作 baseline，再接下來加藥十分鐘後，改變刺激條件為高頻刺激，高頻刺激的條件為 Theta burst stimulation (TBS): 三次相隔 15 秒的 theta 波刺激，每次 theta 波刺激由十個相隔 200ms 的 100Hz 波串(train)組成，每個 train 由 4 個相隔 10 ms 的脈波組成(圖三)。HFS 後再轉成 0.05Hz 的基礎刺激頻率持續觀察 40 分鐘。長期增益效應(LTP)定義為高頻刺激(TBS)過後轉成基礎刺激頻率所引發的 fEPSP 比未高頻刺激前的 fEPSP 大且可以持續至少 20 分鐘以上。LTP 強度突觸塑性改變程度計算，是 HFS 後 40 分鐘每一腦切片的 fEPSP 斜率增加程度。本篇中 n 值為使用之腦片數量，每隻小鼠約使用 1~2 片。



(圖三)

### 3.1.2 去增益效應(Depotential)

在 TBS 四十分鐘後，去增益現象是由給予 1Hz 的低頻刺激(Low frequency Stimulation, LFS)15 分鐘所引發。在 LFS 之後，再轉成前述的 0.33Hz 基礎刺激頻率下觀察 40 分鐘。LFS 後原本因 TBS 產生 LTP 可以被 LFS 削弱稱為去增益效應。削弱的程度以 LFS 後 40 分鐘腦切片的 fEPSP 斜率與 LTP 時 fEPSP 斜率相減後之值，再以 LTP 的增大程度為 100%，計算而得。

### 3.1.3 強直性後增效應 Post-Tetanic Potentiation (PTP)

緊接在高頻刺激 (High-Frequency Stimulation, HFS) 後的幾分鐘內，突觸後神經元對原本的基礎刺激(0.03Hz)產生較強直刺激前大很多的 fEPSP，這樣的現象就是強直性後增效應(Post-Tetanic Potentiation, PTP)這是因為突觸前末稍聚積鈣離子(Korogod et al., 2005)。PTP 與 LTP 的差異是，PTP 評估 HFS 後短期內的神經傳遞加強現象，大量鈣離子在 HFS 後蓄積神經末梢內，造成神經傳遞增加，可以用來評估藥物對突觸前影響神經傳遞可塑性的作用。測量 PTP 的方法是觀察 HFS 後四分鐘內的 fEPSP 比未 PTP 前增加的程度。

### 3.1.4 Paired-pulse facilitation (PPF)

為了進一步評估藥物對突觸前訊息傳遞物釋放之影響，本篇利用一對兩個快速的刺激，第一個刺激和第二個刺激之間隔時間為 50 ms(Aou et al., 2003; Lauri et al., 2007)。將第二個刺激所得之 fEPSP 斜率與第一個所得之斜率相除，而得一比值，稱之為 Paired pulse ratio (PPR)。一對電刺激給予的時間點分別是在加藥前，加藥 10 分鐘後，高頻刺激後 40 分鐘以及低頻刺激後 40 分鐘後，並計算其 PPR。

## 4. 藥品來源

本實驗所用的藥品為 orexin A、[Ala<sup>11</sup>,D-Leu<sup>15</sup>] orexin-B、SB-334867 皆購自 Tocris (Bristol, UK)。Compound 29 則感謝美國國家藥物濫用研究院化學生物研究組(Cheical biology research branch, National insitute on Drug Abuse)的 Dr. Kenner C. Rice 慷慨捐贈。藥品除了 SB-334867 溶於 DMSO 之外，其餘藥品都是使用二次水溶解，泡製成實驗使用濃度 1000 倍的 stock solution，每 30 ml 成一管，儲存於

-20 °C，實驗時均取 stock solution 30  $\mu$ l 加入 30ml 的 ACSF 中稀釋為實驗所需之濃度。

## 5. 資料分析

在 ACSF 持續灌流下由前述基礎刺激條件引發的 fEPSP slope 達 steady state 後取加藥前十分鐘的 fEPSP 斜率視為 baseline fEPSP slope，其平均值則視作 100%。評估加藥物對 basal synaptic transmission 影響，是觀察加藥後達 steady state 後 10 分鐘內的 fEPSP slope 與未加藥的 baseline fEPSP slope 比較改變程度。評估 LTP 與 depotentiation 程度是分別觀察高頻刺激和低頻刺激後四十分鐘 fEPSP 斜率，與未加藥的 baseline fEPSP slope 比較。評估 PTP 則是在測量 HFS 後四分鐘內與 baseline fEPSP slope 相比的 fEPSP slope。

Time course 圖形表示每點是由每兩分鐘的 fEPSP slope 平均一次，即由四個 fEPSP 斜率平均之，標準化後用百分比加上 standard error bar 表示，並標註 N 值，指的是腦切片數目，統計方法使用 paired Student t-test 於同一片腦片間的比較，而 unpaired Student t-test 則於不同濃度的組別間比較，P 值小於 0.05 視為有統計上差異，標以\*，若 P 值小於 0.01，則標以\*\* 做區分。

## 實驗結果

本實驗之目的擬觀察 orexins 是否會對小鼠 hippocampus Schaffer collateral/commissural-CA1 間突觸之長期增益現象(LTP)以及高頻刺激後去增益現象(depotentiation)造成影響。在腦片穩定記錄到 0.03 Hz 基礎刺激誘發的 fEPSP 後，灌流 orexin A(30, 100, 300nM)或 [Ala<sup>11</sup>, D-Leu<sup>15</sup>]-orexin B (3, 10, 30, 100, 300, 1000 nM)於小鼠 hippocampus 腦薄切片 10 分鐘，再換成 ACSF，並給予高頻率刺激(TBS)後，刺激頻率轉回 0.03Hz，觀察 fEPSP 變化來評估 40 分鐘後的 LTP 程度，再給予低頻率刺激(LFS)，之後再轉回 0.03Hz，觀察 fEPSP 變化 40 分鐘，來評估 depotentiation 的程度。藉由上述方式，我們希望可以觀察 CA1 區域之神經突觸可塑性是否受到 orexins 的影響。此外，本實驗亦利用 OX1R 之選擇性拮抗劑 SB 334867 或 OX2R 之選擇性拮抗劑 Compound 29 分別與 orexin A 和 [Ala<sup>11</sup>, D-Leu<sup>15</sup>]-orexin B 一併灌流十分鐘，希望進一步釐清 orexins 在 hippocampus CA1 區域的作用所媒介的 OXR 亞型。

### Orexin A 有意義的抑制長期增益現象(LTP)的程度

在腦片穩定記錄 10 分鐘後，灌流 orexin A (30, 100,300 nM) 10 分鐘，發現基礎突觸傳導並無顯著的變化(orexin A 30, 100, 300 nM baseline 分別為: 101.9±0.9 %, n=5; 99±0.7 %, n=15; 100.3±0.3 %, n=4, drug application 後分別為: 101.3±2.7 %, n=5; 102.5±1.7 %, n=15; 101.8±1.6 %, n=4 )(Fig. 4A)。在高頻刺激後的後強直增強效應(PTP)，有觀察到隨著 orexin A 濃度上升而使得 PTP 有減弱的趨勢，雖無顯著的統計差異(control: 181.5±10.4 %, n=16; orexin A 30, 100, 300 nM 分別為: 170.3±5.9%, n=5; 161.1±7 %, n=15; 155.3±8.5 %, n=4)(Fig. 5, Fig. 6A)。繼續觀察高頻刺激(TBS)後 40 分鐘，我們發現 orexin A 濃度相依的抑制長期增益(LTP)，在 100 nM 和 300 nM 達到有意義的抑制效果(control: 141.9±3.5%, n=16; orexin A 30, 100, 300 nM 分別為: 138.8±2.5%, n=5; 124.4±4.5%, n=15, p<0.01; 114.6±9.5%, n=4, p<0.01) (Fig 5, Fig 6B)。在去增益現象(depotentiation)上，各組間並無統計上顯著差異 (control:

-64.8±7 %, n=16; orexin A 30, 100, 300 nM 分別為: -37.3±46.1%, n=5; -90±31.6%, n=15; -9±31.6 %, n=4) (Fig. 5, Fig. 6C)。

### **Orexin A 對突觸前神經傳遞物釋放有輕微抑制的傾向**

由於 PTP 可能與突觸前末梢聚積鈣離子有關(Delaney and Tank, 1994)。因此我們更進一步的利用 paired pulse facilitation 的現象來分析突觸前神經傳導物釋放的變化程度，並以 paired pulse ratio (PPR)來表示之，希望能更進一步釐清我們在 PTP 所觀察到的抑制趨勢。我們在 orexin A (100 nM 和 300 nM) 灌流前，灌流 10 分鐘後，高頻刺激後 40 分鐘以及低頻刺激後 40 分鐘分別給予 paired pulse stimulation，計算其 PPR。在基礎刺激頻率(0.03 Hz)下灌流 orexin A 100 或 300 nM 十分鐘後，並無明顯影響 basal stimulation 下的 PPR。在 orexin A 300 nM 灌流標本，在 LTP 時的 PPR 似乎有比 baseline 時的 PPR 降低的趨勢，不過統計上並無意義(1.49±0.04 vs. 1.57±0.07, n=4 )(Tab. 2)。若比較 PPR 在 LTP 與 baseline 時變化的比值，在未加藥的腦薄片，LTP 的比值為 0.938，暗示此條件刺激在小鼠 hippocampus CA1 區域所引起的 LTP 時有突觸前訊息傳遞物釋放會增加的可能。在高頻刺激(TBS)後 40 分鐘，orexin A 100 nM 和 300 nM 皆可反轉控制組之 PPR 的下降程度(control: 0.93±0.02, n=8; orexin A 100 nM: 0.98±0.03, n=5; orexin A 300 nM: 0.94±0.02, n=4)。在低頻刺激(LFS)後 40 分鐘，orexin A 100nM 和 300 nM 亦可輕微反轉控制組 PPR 減少的程度(control: 0.94±0.02, n=8; orexin A 100 nM: 1.01±0.04, n=5; orexin A 300 nM: 0.99±0.05, n=4)。但這些變化並無達到統計上顯著的意義，亦無與 orexin A 濃度上升有相關性(Tab.2)。

### **OrexinR 拮抗劑對基礎突觸傳導和突觸可塑性之影響**

根據上述之結果，我們可以肯定的是 orexin A 會抑制長期增益現象(LTP)的程度。為了瞭解 orexin A 是藉由何種受體作用而影響 LTP。因此我們分別灌流 OX1R 之選擇性拮抗劑 SB 334867 和 OX2R 之選擇性拮抗劑 Compound 29 來觀察他們對






orexin A 所造成的抑制是否有拮抗的效果。我們先分別單獨灌流此兩種拮抗劑 10 分鐘後，觀察他們對基礎突觸傳導，強直後增效應(PTP)，長期增益現象(LTP)和去增益現象(depotentiaion)是否有造成影響。

### **OX1R 拮抗劑 SB 334867 對基礎突觸傳導和突觸可塑性並無影響**

在基礎刺激頻率(0.03 Hz)下灌流 3  $\mu$ M SB 334867 十分鐘後，並沒有發現顯著影響基礎突觸傳導的現象，fEPSP slope 加藥後為加藥前的  $103.5 \pm 2.1\%$  ( $n=8$ ) (Fig. 7A $\Delta$ , Fig. 7B)。在高頻刺激後的強直後增效應(PTP)上，SB 334867 3  $\mu$ M 亦無顯著影響(control:  $181.5 \pm 10.4\%$ ,  $n=16$ ; 3  $\mu$ M SB 334867:  $162.9 \pm 9.2\%$ ,  $n=8$ ) (Fig. 7)。在高頻刺激(TBS)後 40 分鐘，3  $\mu$ M SB 334867 不影響長期增益現象(LTP) (control:  $141.9 \pm 3.5\%$ ,  $n=16$ ; 3  $\mu$ M SB 334867:  $135.3 \pm 8.2\%$ ,  $n=8$ ) (Fig. 7A,  $\Delta$  Fig. 7B )。在低頻刺激(LFS)後 40 分鐘，3  $\mu$ M SB 334867 也沒有影響去增益現象(depotentiaion) 的情形(control:  $-64.8 \pm 7\%$ ,  $n=16$ ; 3  $\mu$ M SB 334867:  $-50.2 \pm 36.9\%$ ,  $n=8$ ) (Fig. 7A,  $\Delta$  Fig. 7B )。

### **OX1R 拮抗劑 SB 334867 對 orexin A 造成之抑制長期增益現象有輕微拮抗的效果**

若同時灌流 orexin A 100 nM 和 3  $\mu$ M SB 334867 十分鐘後，基礎突觸傳導並無顯著的變化，fEPSP slope 加藥後為加藥前的  $98.7 \pm 2.9\%$  ( $n=6$ ) (Fig. 7A $\blacktriangledown$ , Fig. 7B )。Orexin A 對高頻刺激後的強直後增效應(PTP)的輕微抑制傾向，在這裡也會受到 SB 334867 些許的反轉，但未達統計上的差異(control:  $181.5 \pm 10.4\%$ ,  $n=16$ ; orexin A 100 nM:  $161.1 \pm 6.5\%$ ,  $n=15$ ; orexin A 100nM + 3  $\mu$ M SB 334867:  $170.6 \pm 11.9\%$ ,  $n=7$ ) (Fig. 7A $\blacktriangledown$ , Fig. 7B )。然而，與 orexin A 100 nM 抑制 LTP 的程度比較，同時灌流 orexin A 100 nM 和 3  $\mu$ M SB 334867 可以得到輕微的拮抗效果(control:  $141.9 \pm 3.5\%$ ,  $n=16$ ; orexin A 100 nM:  $124.4 \pm 4.5\%$ ,  $n=15$ ; orexin A 100nM + 3  $\mu$ M SB 334867:  $133.86 \pm 6.6\%$ ,  $n=7$ ) (Fig. 7A $\blacktriangledown$ , Fig. 7B )，但未達統計意義。在低頻刺激(LFS)後 40 分鐘，orexin A 100 nM 和 3  $\mu$ M SB 334867 不影響高頻刺激後



去增益現象(depotentiation) 的表現的程度(control:  $-64.8 \pm 0.07\%$ ,  $n=16$ ; orexin A 100nM:  $-90 \pm 31.6\%$ ,  $n=15$ ; orexin A 100nM +  $3\mu\text{M}$  SB 334867:  $-86.6 \pm 22.4\%$ ,  $n=6$ ) (Fig. 7A▼, Fig. 7B🔍)。

### **OX2R 拮抗劑 Compound 29 無顯著抑制基礎突觸傳導的現象**

在基礎刺激頻率(0.03 Hz)下灌流 Compound 29  $30\mu\text{M}$  十分鐘後，發現  $30\mu\text{M}$  Compound 29 有輕微抑制影響基礎突觸傳導的現象，但不具統計上的差異，fEPSP slope 加藥後為加藥前的  $96.7 \pm 3.8\%$  ( $n=4$ ) (Fig. 8A △, Fig. 8B🔍)。在高頻刺激後的強直後增效應(PTP)上， $30\mu\text{M}$  Compound 29 並無顯著影響(control:  $181.5 \pm 10.4\%$ ,  $n=16$ ;  $30\mu\text{M}$  Compound 29:  $190.7 \pm 6.1\%$ ,  $n=4$ ) (Fig. 8A △, Fig. 8B🔍)。在高頻刺激(TBS)後 40 分鐘， $30\mu\text{M}$  Compound 29 亦沒有增強長期增益現象(LTP)的效果(control:  $141.9 \pm 3.5\%$ ,  $n=16$ ; Compound 29  $30\mu\text{M}$ :  $139.1 \pm 12.9\%$ ,  $n=4$ ) (Fig. 8A △, Fig. 8B🔍)。在低頻刺激(LFS)後 40 分鐘，於高頻刺激時灌流的  $30\mu\text{M}$  Compound 29 沒有改變去增益現象(depotentiation) 的程度(control:  $-64.8 \pm 0.02\%$ ,  $n=16$ ;  $30\mu\text{M}$  Compound 29:  $-76.3 \pm 21.1\%$ ,  $n=4$ ) (Fig. 8A △, Fig. 8B🔍)。

### **OX2R 拮抗劑 Compound 29 對 orexin A 造成之抑制長期增益現象亦有輕微拮抗的效果**

同時灌流 100 nM orexin A 和  $30\mu\text{M}$  Compound 29 十分鐘後，基礎突觸傳導有些許下降的現象，且程度與單獨灌流  $30\mu\text{M}$  Compound 29 相近，fEPSP slope 加藥後為加藥前的  $96.8 \pm 3.9\%$  ( $n=7$ ) (Fig. 8A▼, Fig. 8B🔍)，但未達統計差異。高頻刺激後的強直後增效應(PTP)灌流 100 nM orexin A 和  $30\mu\text{M}$  Compound 29 並不顯著影響其程度(control:  $181.5 \pm 10.4\%$ ,  $n=16$ ; orexin A 100 nM:  $161.8 \pm 7\%$ ,  $n=15$ ; orexin A 100nM + Compound 29  $30\mu\text{M}$ :  $162.6 \pm 10.6\%$ ,  $n=7$ ) (Fig. 8A▼, Fig. 8B🔍)。當與 orexin A 100 nM 對 LTP 的抑制程度比較時，同時灌流 orexin A 100 nM 和  $30\mu\text{M}$





Compound 29 可以得到輕微的拮抗效果(control:  $141.9 \pm 3.5\%$ ,  $n=16$ ; orexin A 100 nM:  $124.4 \pm 4.5\%$ ,  $n=15$ ; orexin A 100nM + 30  $\mu$ M Compound 29:  $131.7 \pm 6.4\%$ ,  $n=7$ ) (Fig. 8A▼, Fig. 8B)，但統計上並沒有差異。在低頻刺激(LFS)後 40 分鐘，於高頻刺激時灌流的 orexin A 100 nM 和 30  $\mu$ M Compound 29 亦無影響去增益現象 (depotentiaion) 的表現的程度(control:  $-64.8 \pm 0.02\%$ ,  $n=16$ ; orexin A 100nM:  $-90 \pm 31.6\%$ ,  $n=15$ ; orexin A 100nM + 30  $\mu$ M Compound 29:  $-90.8 \pm 12.4\%$ ,  $n=8$ ) (Fig. 8A▼, Fig. 8B)。

### [Ala<sup>11</sup>, D-Leu<sup>15</sup>]-orexin B 有意義的抑制長期增益現象


在基礎刺激頻率(0.03Hz)穩定記錄十分鐘後，分別灌流 3, 10, 30, 100, 300, 1000 nM [Ala<sup>11</sup>, D-Leu<sup>15</sup>]-orexin B 十分鐘後，基礎突觸傳導並沒有顯著的變化，與 baseline 相比，[Ala<sup>11</sup>, D-Leu<sup>15</sup>]-orexin B 3, 10, 30, 100, 300, 1000 nM 分別為： $101.8 \pm 4.2\%$ ,  $n=7$ ;  $105.1 \pm 6.1\%$ ,  $n=5$ ;  $107.3 \pm 4.8\%$ ,  $n=4$ ;  $101.3 \pm 2.8\%$ ,  $n=7$ ; 300 nM:  $104.6 \pm 5.5\%$ ,  $n=5$ ;  $103.6 \pm 6.0\%$ ,  $n=4$ ) (Fig 4B, Fig. 9)。在高頻刺激後的強直後增效應(PTP)中，並無顯著統計差異(control:  $181.5 \pm 10.4\%$ ,  $n=16$ ; [Ala<sup>11</sup>, D-Leu<sup>15</sup>]-orexin B 3, 10, 30, 100, 300, 1000 nM 分別為： $148.7 \pm 5.3\%$ ,  $n=7$ ;  $146.3 \pm 9.7\%$ ,  $n=5$ ;  $159.7 \pm 13.4\%$ ,  $n=4$ ;  $167.8 \pm 8.3\%$ ,  $n=7$ ;  $146.8 \pm 8.7\%$ ,  $n=5$ ;  $161.4 \pm 14.9\%$ ,  $n=4$ ) (Fig. 9, Fig 10A)。再繼續觀察高頻刺激(TBS)後 40 分鐘，長期增益現象(LTP)的程度，發現 [Ala<sup>11</sup>, D-Leu<sup>15</sup>]-orexin B 30, 300 和 1000 nM 可以有意義的抑制長期增益(LTP)的現象，但其抑制的程度不完全與[Ala<sup>11</sup>, D-Leu<sup>15</sup>]-orexin B 濃度的上升為增加，表示在 30 nM 或 300 nM 抑制已達飽和，且很快就到達最大的抑制效果(control:  $141.9 \pm 3.5\%$ ,  $n=16$ ; [Ala<sup>11</sup>, D-Leu<sup>15</sup>]-orexin B 3, 10, 30, 100, 300, 1000 nM 分別為： $130.3 \pm 7.9\%$ ,  $n=7$ ;  $130.4 \pm 6\%$ ,  $n=5$ ;  $123.3 \pm 3.8\%$ ,  $n=4$ ,  $p < 0.05$ ;  $131.2 \pm 2.9\%$ ,  $n=7$ ;  $120.8 \pm 7.2\%$ ,  $n=5$ ,  $p < 0.05$ ;  $123.4 \pm 4.6\%$ ,  $n=4$ ,  $p < 0.05$ ) (Fig. 9, Fig 10B)。在去增益現象 (depotentiaiton)上，各組間沒有統計上顯著的差異存在。(control:  $-64.8 \pm 7\%$ ,  $n=16$ ; [Ala<sup>11</sup>, D-Leu<sup>15</sup>]-orexin B 3, 10, 30, 100, 300, 1000 nM 分別為： $-60 \pm 29.6\%$ ,  $n=7$ ;

-40.2±16.1%, n=5; -48.8±30.9%, n=4; -36.2±14.4%, n=7; -104.9±44.8%, n=5; -88.9±50.5 %, n=4) (Fig. 9, Fig 10C)。

### **OX1R 拮抗劑 SB 334867 對[Ala<sup>11</sup>, D-Leu<sup>15</sup>]-orexin B 造成之抑制長期增益現象可觀察到輕微拮抗的現象**

同時灌流[Ala<sup>11</sup>, D-Leu<sup>15</sup>]-orexin B 300 nM 和 3μM SB 334867 十分鐘後，基礎突觸傳導無顯著的變化，fEPSP slope 加藥後為加藥前的 99±4.7% (n=7) (Fig. 11A▼, Fig. 11B )。高頻刺激後的強直後增效應(PTP)亦無明顯的變化(control: 181.5±10.4%, n=16; [Ala<sup>11</sup>, D-Leu<sup>15</sup>]-orexin B 300 nM: 146.8±8.7%, n=5; [Ala<sup>11</sup>, D-Leu<sup>15</sup>]-orexin B 300 nM + 3μM SB 334867: 156.5±10.3%, n=7) (Fig. 11A▼, Fig. 11B )。然而，與[Ala<sup>11</sup>, D-Leu<sup>15</sup>]-orexin B 300 nM 抑制 LTP 的程度相較，若一起灌流[Ala<sup>11</sup>, D-Leu<sup>15</sup>]-orexin B 300 nM 和 3μM SB 334867 可以得到輕微的拮抗效果(control: 141.9±3.5%, n=16; [Ala<sup>11</sup>, D-Leu<sup>15</sup>]-orexin B 300 nM: 120.8±7.2%, n=5; [Ala<sup>11</sup>, D-Leu<sup>15</sup>]-orexin B 300 nM + 3μM SB 334867: 130.2±9.5%, n=7) (Fig. 11A▼, Fig. 11B )，但未達統計差異。在低頻刺激(LFS)後 40 分鐘，[Ala<sup>11</sup>, D-Leu<sup>15</sup>]-orexin B 300 nM 和 3μM SB 334867 亦不影響去增益現象(depotentiaion) 表現的程度(control: -64.8±2.9%, n=16; [Ala<sup>11</sup>, D-Leu<sup>15</sup>]-orexin B 300 nM: -104.9±44.8%, n=5; [Ala<sup>11</sup>, D-Leu<sup>15</sup>]-orexin B 300 nM + SB 334867 3 μM: -49.9±23.1%, n=7) (Fig. 11A▼, Fig. 11B )。

### **OX2R 拮抗劑 Compound 29 對[Ala<sup>11</sup>, D-Leu<sup>15</sup>]-orexin B 造成之抑制長期增益現象亦可發現有輕微拮抗的能力**

[Ala<sup>11</sup>, D-Leu<sup>15</sup>]-orexin B 300 nM 和 30 μM Compound 29 同時灌流十分鐘，基礎突觸傳導沒有顯著的差異，fEPSP slope 加藥後為加藥前的 99±4.7%(n=5) (Fig. 12A▼, Fig. 12B )。高頻刺激後的強直後增效應(PTP)也沒有明顯的變化(control: 181.5±10.4%, n=16; [Ala<sup>11</sup>, D-Leu<sup>15</sup>]-orexin B 300 nM: 146.8±8.7%, n=5; [Ala<sup>11</sup>,

D-Leu<sup>15</sup>]-orexin B 300 nM + 30  $\mu$ M Compound 29: 186.5 $\pm$ 28%, n=5 ) (Fig. 12A▼, Fig. 12B▣)。與[Ala<sup>11</sup>, D-Leu<sup>15</sup>]-orexin B 300 nM 抑制 LTP 的程度比較，灌流[Ala<sup>11</sup>, D-Leu<sup>15</sup>]-orexin B 300 nM 和 30  $\mu$ M Compound 29 可以得到輕微的拮抗效果(control: 141.9 $\pm$ 3.5%, n=16; [Ala<sup>11</sup>, D-Leu<sup>15</sup>]-orexin B 300 nM:120.8 $\pm$ 7.2%, n=5; [Ala<sup>11</sup>, D-Leu<sup>15</sup>]-orexin 300 nM + 30  $\mu$ M Compound 29: 132.9 $\pm$ 7.2%, n=5) (Fig. 12A▼, Fig. 12B▣)，但未達到統計上的差異。於低頻刺激(LFS)後 40 分鐘， [Ala<sup>11</sup>, D-Leu<sup>15</sup>]-orexin B 300 nM 和 30  $\mu$ M Compound 29 並不影響去增益現象 (depotentiaion) 表現的程度(control: -64.8 $\pm$ 2.9%, n=16; [Ala<sup>11</sup>, D-Leu<sup>15</sup>]-orexin B 300 nM: -104.9 $\pm$ 44.8%, n=5; [Ala<sup>11</sup>, D-Leu<sup>15</sup>]-orexin B 300 nM + 30  $\mu$ M Compound 29: -97.8 $\pm$ 33.8%, n=5) (Fig. 12A▼, Fig. 12B▣)。



## 討論

在本實驗中，利用 *in vitro* 胞外紀錄的方式，探討 orexins 對小鼠 hippocampal Schaffer collateral-CA1 的突觸傳導以及突觸塑性之影響。實驗結果顯示(1) orexin A 會抑制長期增益現象(LTP)。(2) [Ala<sup>11</sup>, D-Leu<sup>15</sup>] orexin-B 亦會抑制長期增益現象(LTP)。(3) Orexin A 和[Ala<sup>11</sup>, D-Leu<sup>15</sup>] orexin-B 所造成的抑制程度會輕微因 OX1R 拮抗劑 SB 334867 和 OX2R 拮抗劑 compound 29 的投予而減輕。(4) [Ala<sup>11</sup>, D-Leu<sup>15</sup>] orexin-B 的抑制效果有限，而 orexin A 可達較大的抑制效價(efficiency)。(5)無論是 orexin A 或[Ala<sup>11</sup>, D-Leu<sup>15</sup>] orexin-B 都不會影響 depotentiation 的程度。

許多解剖上的證據顯示，在 LHA 中生成 orexin 的神經元，會將含其有 orexin 的末梢深入 hippocampus(Chen et al., 1999; Moriguchi et al., 1999; Nambu et al., 1999b)，而目前的證據亦指出無論是大鼠或是小鼠的 hippocampus 皆可發現 orexin 的受體(Cluderay et al., 2002; Marcus et al., 2001; Selbach et al., 2004; Trivedi et al., 1998)。但兩個種別間，受體的兩個亞型卻有分佈區域上的不同。在大鼠無論是分析 ORX mRNA 或是蛋白質，都發現 CA1 和 CA2 區域是以 OX1R 為主，OX2R 非常的少。此外，在 CA3 則是以 OX2R 為主，而 DG 則是兩種亞型都有，以 OX1R 較多(Cluderay et al., 2002; Marcus et al., 2001; Trivedi et al., 1998)。但在 C57/BL6 小鼠 hippocampus，無論是 CA1、CA3 或 DG 上，卻可以同時擁有 OX1R 和 OX2R 的 mRNA 和蛋白質的表現(Selbach et al., 2004)。因此 orexins 在大鼠和小鼠 hippocampus CA1 對神經突觸可塑性的影響可能與 OX1R 亞型扮演的角色可能有所不同。以下將分成幾點討論本實驗中利用 orexins 在小鼠 hippocampus CA1 區域基礎突觸傳遞，長期增益現象(LTP)所造成的影響。

## 1. Orexins 對基礎突觸傳導的影響

在我們的實驗中，並沒有發現 orexin A(30~100 nM) 和[Ala<sup>11</sup>, D-Leu<sup>15</sup>] orexin-B(3~1000 nM) 可以有有意義的增加 CA1 區域基礎突觸傳導(Fig. 4)。而之前進行 orexins 對基礎突觸傳導影響進行研究的報導亦指出，orexin A (30nM)並不會顯著的改變大鼠 CA1 區域基礎突觸傳導(Aou et al., 2003)。但在小鼠的腦片標本上，orexin A(100 nM)被發現可藉由興奮 CA3 上游的局部區域 glutamatergic，noradrenergic，cholinergic 和 gabaergic 細胞，進而使得 CA1 基礎突觸傳導有增加的趨勢，但 orexin B 則否(Selbach et al., 2004)。推測實驗結果差異的可能是由於不同切面，迴路完整性不同所致。因為本篇所使用獲得的腦薄片的方法為利用 coronal dissection 所得，而在發現有會增加基礎突觸傳導的報導中則是使用 horizontal dissection 所取得(Selbach et al., 2004)。根據同一篇的報導(Selbach et al., 2004)指出，若將 CA3-CA1 之間的連接切斷，這種 orexin A 增進基礎突觸傳導就會消失。為此我們便回溯本實驗所使用的腦薄片後發現，我們所採用的腦薄片皆偏尾部區域 Ammon's horn 較大的腦薄片。由於海馬體結構上的限制，使得 CA3-CA1 兩個區域的連結在製備過程受到傷害而不甚完整，因此在這裡我們無法觀察到相同的反應。

## 2. Orexins 抑制長期增益現象(LTP)

在本篇利用 C57BL/6j 的小鼠 hippocampus CA1 區域發現，灌流 orexin A (100 nM)發現有抑制 LTP 的現象(Fig.6)。與此實驗結果相仿的，Aou 等學者利用大鼠於 hippocampus CA1 區域紀錄長期增益現象(LTP)，在給予 orexin A (30~100 nM) 後，亦發現有抑制的情形(Aou et al., 2003)。此外，我們更進一步的發現 orexin A (100 nM)的抑制效果可被 OX1R 專一性拮抗劑 SB 334867(3  $\mu$ M)和 OX2R 專一性拮抗劑 compound 29 (30  $\mu$ M)所減輕，因此認為此抑制的效果可能同時經由 OX1R 和 OX2R 而達成。這個結果與 C57/BL6 小鼠 hippocampus，在 CA1 上同時擁有 OX1R 和 OX2R 的 mRNA 和蛋白質的表現(Selbach et al., 2004)相呼應。

由於 orexin A 的抑制效果可能經由 OX2R。因此，本實驗中再利用[Ala<sup>11</sup>, D-Leu<sup>15</sup>] orexin-B 來觀察其對 LTP 的影響。我們發現[Ala<sup>11</sup>, D-Leu<sup>15</sup>] orexin-B 也會有抑制長期增益現象(LTP)的效果，且會受到 OX2R 專一型拮抗劑的反轉。令人意外的是，具有高度選擇性的[Ala<sup>11</sup>, D-Leu<sup>15</sup>] orexin-B(OX1R:OX2R=1:400) 所造成的抑制現象，亦會受到專一性 OX1R 拮抗劑 SB 334867 所略微減輕。推論可能的原因是由於本實驗中，為達較為顯著的抑制效果，因此在選用與 SB 334867 相互作用的[Ala<sup>11</sup>, D-Leu<sup>15</sup>] orexin-B 時，選用了較高的濃度(300nM)，也許高濃度的[Ala<sup>11</sup>, D-Leu<sup>15</sup>] orexin-B 同時也會 OX1R 接合所導致。更仔細比較 orexin A 和[Ala<sup>11</sup>, D-Leu<sup>15</sup>] orexin-B 對長期增益現象(LTP)所造成的抑制現象後，我們發現[Ala<sup>11</sup>, D-Leu<sup>15</sup>] orexin-B 的最大抑制程度有限(Fig. 7B)。因此在灌流 100 nM [Ala<sup>11</sup>, D-Leu<sup>15</sup>] orexin-B 的實驗中，雖然未達抑制上的顯著統計差異，但仍有抑制的趨勢，可能是由於 [Ala<sup>11</sup>, D-Leu<sup>15</sup>] orexin-B 可達之最大抑制效果較弱，不易滿足統計上的差異所致。反觀 orexin A 的抑制效果會隨著濃度上升進一步的增加抑制的程度，根據目前的實驗結果，我們推論 orexins 在 hippocampus CA1 區域可以抑制長期增益現象(LTP)的形成，且此一抑制效果同時會經由 OX1R 和 OX2R，但 OX2R 所媒介的抑制效果有限，而 OX1R 所媒介的抑制程度較大。

動物行為的實驗中，在大鼠側腦室投予 orexin A(140~560 pmol) 及在 CD-1 小鼠和 SMAP 小鼠側腦室投予 orexin A (1.5~3 nmol)可以幫助被動逃避試驗中記憶的形成，然而(Jaeger et al., 2002; Telegdy and Adamik, 2002b)。但利用與 hippocampus 活動為主的空間記憶的水迷宮試驗中，在大鼠側腦室投予 orexin A (1 nmol)，卻使得大鼠的學習和記憶能力下降(Aou et al., 2003)。根據上述的結果，雖然給藥的方式和區域相同，不同的是測驗的方式，因此推論 orexins 在恐懼相關的記憶學習中，可能是促進記憶形成的。然而，在以 hippocampus 為主的，空間記憶形成上，則是抑制記憶形成的，與本實驗在 hippocampus CA1 所觀察到的抑制現象是同向的。



然而，Akbari 等學者的實驗卻發現，利用專一性的 OX1R 抑制劑 SB 334867 在 hippocampus CA1 給藥後發現，無論是被動逃避試驗或水迷宮試驗，內生性 orexin A 似乎都扮演促進的角色。本實驗中，亦嘗試利用單獨投予 OX1R 拮抗劑 SB 334867 和 OX2R 拮抗劑 Compound 29，但我們並沒有發現到有任何增進或抑制的現象。這個結果並沒有辦法讓我們觀察到內生性 orexin A 的作用。根據先前的報導指出，要在 hippocampus 區域利用電刺激的方式刺激神經肽類的釋放，需要更密集的刺激頻率(Bongsebandhu-phubhakdi and Manabe, 2007)。因此，究竟內生性 orexin A 對於 LTP 和 depotentiation 的程度是如何作用的，可能需要進一步的實驗來證實。

此外，orexins 對大鼠 hippocampus 中 DG 突觸可塑性與學習記憶的研究中，許多研究都傾向 orexins 會增進突觸可塑性與學習記憶的研究。包括利用成年 SD 大鼠利用 *in vivo* 的胞外電生理紀錄方法於 DG 外給 orexin A (900 pmol) 可以增進 LTP 且受到 OX1R 專一性拮抗劑 SB 334867 (30 mg/kg, ip) 完全反轉，暗示大鼠雖然同時擁有在 DG 兩種受體，但 OX2R 並沒有參與其中(Wayner et al., 2004)。而在 DG 投予 SB 334867 (18.8 nmol) 後進行水迷宮試驗(Akbari et al., 2007)，結果認為內生性 orexin A 會增進記憶形成。首先，上述的結果中，發現 orexin A 可以增進 LTP 是在大鼠的 DG 給藥所得到的結果。再者，根據解剖上的證據顯示，雖然 DG 同時擁有 OX1R 和 OX2R (Cluderay et al., 2002; Marcus et al., 2001; Trivedi et al., 1998)。可是外投予 orexin A 的效果卻可以被 SB 334867 所完全反轉，暗示在 DG 這個區域，OX2R 是沒有參與增進 LTP 程度的。這個結果與本實驗在小鼠 CA1 所發現的結果不同，在小鼠 CA1 亦同時擁有 OX1R 和 OX2R，而且我們發現這兩個受體皆會抑制 LTP 的形成。因此本實驗中 orexins 在小鼠 CA1 所觀察到抑制效果，可能與大鼠 DG 中，orexin A 所造成的增強效果，是經由不同的機轉所達成的。

### 3. Orexins 影響神經突觸可塑性的機制

在本實驗中基礎突觸傳導的 PPR 未受到 orexin A 影響，表示 orexin A 不抑制基礎刺激頻率(0.03 Hz)下突觸前神經訊息傳遞物的釋放。在控制組的切片中，高頻刺激後 PPR 比 baseline PPR 為低，暗示在小鼠 CA1 突觸 TBS 條件所引起的 LTP，可能突觸前神經傳遞物的增加扮演某種角色(Bayazitov et al., 2007)。與控制組比較，給予 orexin A 的組別，高頻刺激後 orexin A 會輕微的反轉 PPR 比值降低程度。此外，orexin A 對 PTP 的影響隨著 orexin A 濃度的上升，PTP 會有逐漸下降的趨勢 (Fig. 6)，暗示突觸前神經訊息傳遞物的釋放受到抑制 (Delaney and Tank, 1994)，但這個現象在給予[Ala<sup>11</sup>, D-Leu<sup>15</sup>] orexin-B 時，並沒有發現。我們的結果暗示 orexin A 在高頻刺激後，可能藉由抑制突觸前神經傳訊物質的釋放來影響突觸可塑性。不過先前的報導根據在大鼠基礎突觸傳遞的數據認為，orexin A 抑制神經突觸可塑性並不是經由抑制突觸前神經傳導而來(Aou et al., 2003)。

在研究 orexin 於 hippocampus CA1 區域作用的報導中，紛紛指出投予 orexin A 會導致 NMDA 電流有下降的趨勢(Aou et al., 2003; Selbach et al., 2004)。再者，本實驗中利用 Theta burst stimulation 所引發的長期增益現象(LTP)恰為 NMDA 受體媒介所引發為主(Arai et al., 1994; Capocchi et al., 1992)。我們也發現 TBS-LTP 可以受 APV(50  $\mu$ M) 抑制(data not show)，綜觀上述，我們推測 orexins 所造成的抑制 TBS-LTP 現象，可能是藉由抑制 NMDA 受體所媒介之電流而來。

Orexins 是如何減低 NMDA 電流的原因，目前並不清楚。但我們知道 orexins 可藉由打開 OX1R 打開非選擇性陽離子通道進而增加鈣離子的流入，再活化下游的 PLC/PKC 途徑(Larsson et al., 2005)。同時，高濃度的 orexin A 也可以經由 orexin receptor 而直接活化 PLC/PKC 途徑，不一定需要陽離子通道開啓來活化(Lund et al., 2000)。另一方面，當 NMDA 通道開啓，鈣離子流入時，鈣離子可以活化 calmodulin 來抑制 NMDA 通道的開啓(Rosenmund et al., 1995; Wang et al., 2008)。而亦有報導指出，除了上述作用外，也需 Ca<sup>2+</sup>/calmodulin(Ca<sup>2+</sup>/CaM) dependent phosphatase 2B (calcineurin)活化來使 NMDA 通道不活化(Lieberman and Mody, 1994; Rycroft and

Gibb, 2004)°並且已知 PKC 會強化  $Ca^{2+}/CaM$  依賴性之 NMDA 通道不活化(Lu et al., 2000)°。但 orexins 減少 NMDA 電流，是否經由 PLC/PKC 及  $Ca^{2+}/CaM$  途徑，強化了 NMDA 通道不活化狀態，而使得 LTP 的程度弱化，尚有待進一步的實驗證據證明。

另外一個可能的推測，則是認為 orexin 可能藉由影響 NMDA 受體次單位組成結構比例，而出現抑制長期增益現象(LTP)的程度(Kopp et al., 2006)°。首先，我們知道睡眠剝奪的大鼠體內 orexin 濃度會有顯著上升的現象(Pedrazzoli et al., 2004)，而在另一個實驗中則發現，睡眠剝奪後的大鼠長期增益現象(LTP)有顯著下降的趨勢，且 LTP 下降的現象是由於 NR2A/NR2B 比例變大，即 NR2A 變多所導致(Kopp et al., 2006; Philpot et al., 2003)°。由於 orexin 也有被報導會增加 NMDA 受體的表現(Borgland et al., 2006)，但不知 orexin 在此是否藉改變 NR2A/NR2B 比例，而降低影響長期增益現象(LTP)的形成，仍有待更進一步研究。



## 結論

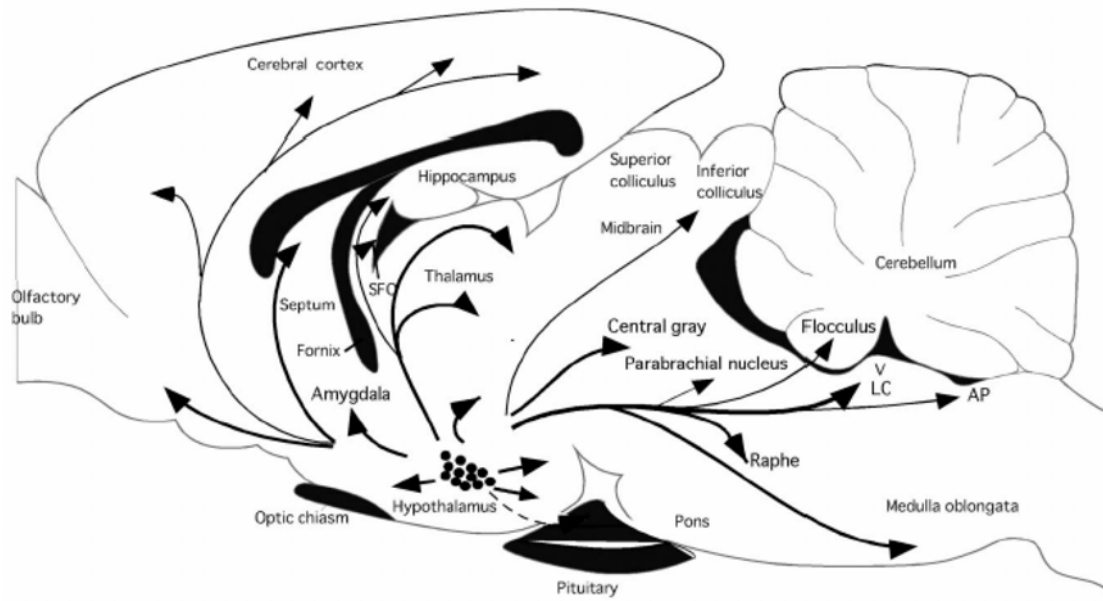
根據我們目前的實驗結果，在小鼠 hippocampus CA1 區域，發現 orexin A 和[Ala<sup>11</sup>, D-Leu<sup>15</sup>]-orexin B 皆不影響基礎突觸傳遞，但會抑制 LTP 的程度，而不影響 depotentiation。對 LTP 的抑制效果，可能同時經由 OX1R 和 OX2R，但 OX1R 可能佔有較大的比重。再者，突觸前的抑制效果可能很輕微，推論主要是在突觸後，藉由活化 OX1R 和 OX2R 及其下游反應所造成。



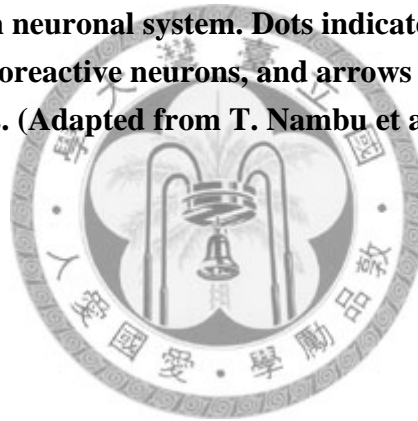
Hypocretin 1: LGVDAQPLPDCCRQKTCSCRLYELLHGAGNHAAGILTL-amide  
 Orexin A: QPLPDCCRQKTCSCRLYELLHGAGNHAAGILTL-amide  
 Hypocretin 2 : RPGPPGLQGRLQRLQANGNHAAGILTMG-amide  
 Orexin B: RPGPPGLQGRLQRLQANGNHAAGILTM-amide  
 Secretin : HSDGTFTSELSRLODSARLQRLQGLV \*HSDGTFTSE

**Fig. 1 Amino acid sequences of hypocretin- 1( rat and mice), orexin A, hypocretin- 2, orexin B and secretin.**





**Fig. 2** Schematic drawing of sagittal section through the rat brain to summarize the organization of orexin neuronal system. Dots indicate the relative location of orexin-immunoreactive neurons, and arrows show some of the more prominent terminal fields. (Adapted from T. Nambu et al., 1999, *Brain Research*)



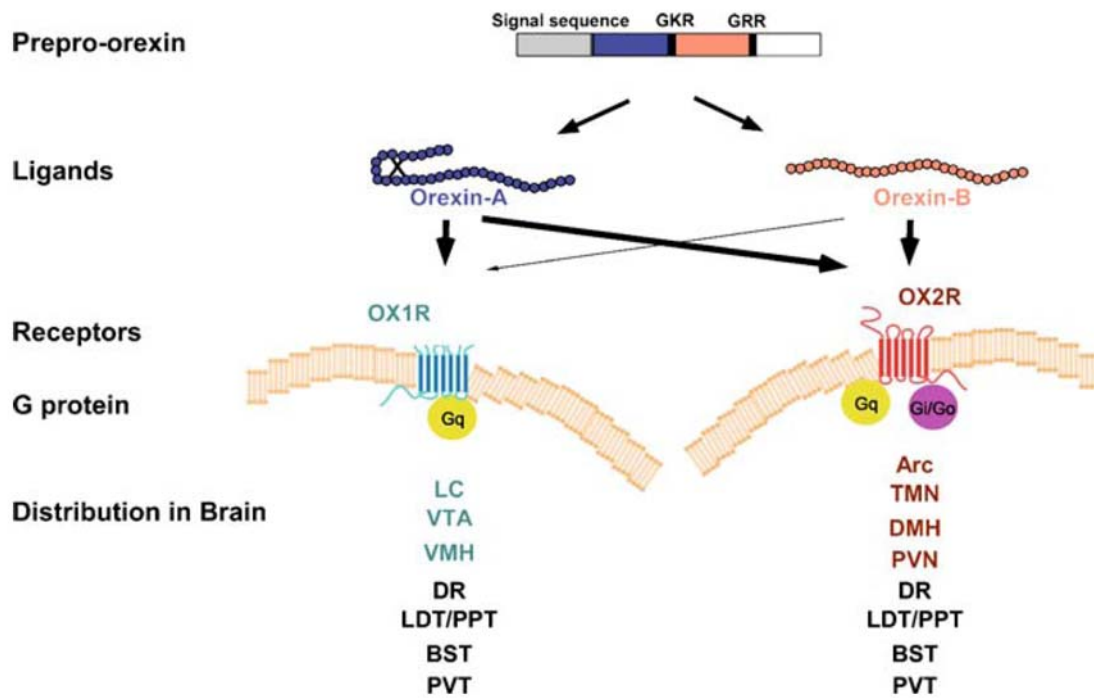
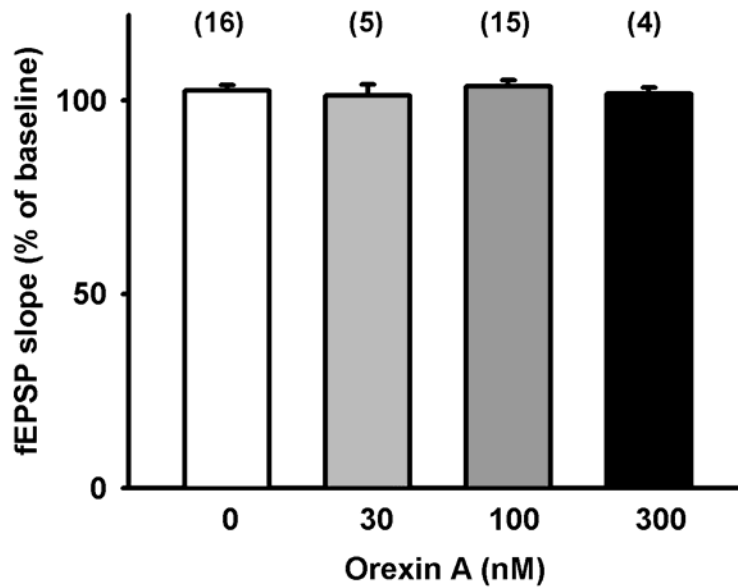


Figure 3. Orexin A and orexin B are derived from a common precursor peptide, *prepro-orexin*. The actions of orexins are mediated via two G protein-coupled receptors named orexin-1 (OX1R) and orexin-2 (OX2R) receptors. OX1R is selective for orexin A, whereas OX2R is a nonselective receptor for both orexin A and orexin B. OX1R is coupled exclusively to the Gq subclass of heterotrimeric G proteins, whereas OX2R couples to  $G_{i/o}$  and/or Gq. (Matsuki and Sakurai, 2008)

(A)



(B)

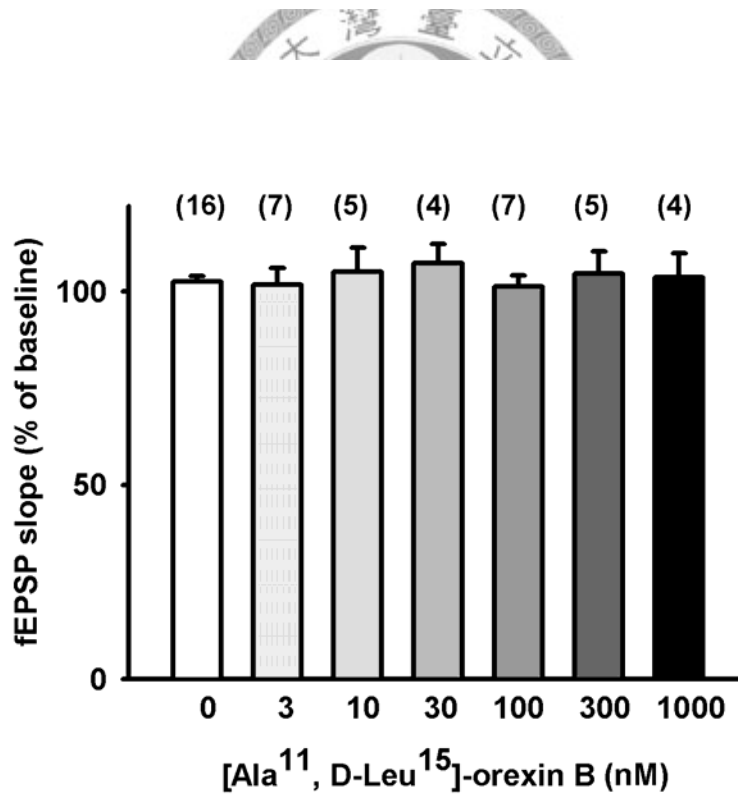
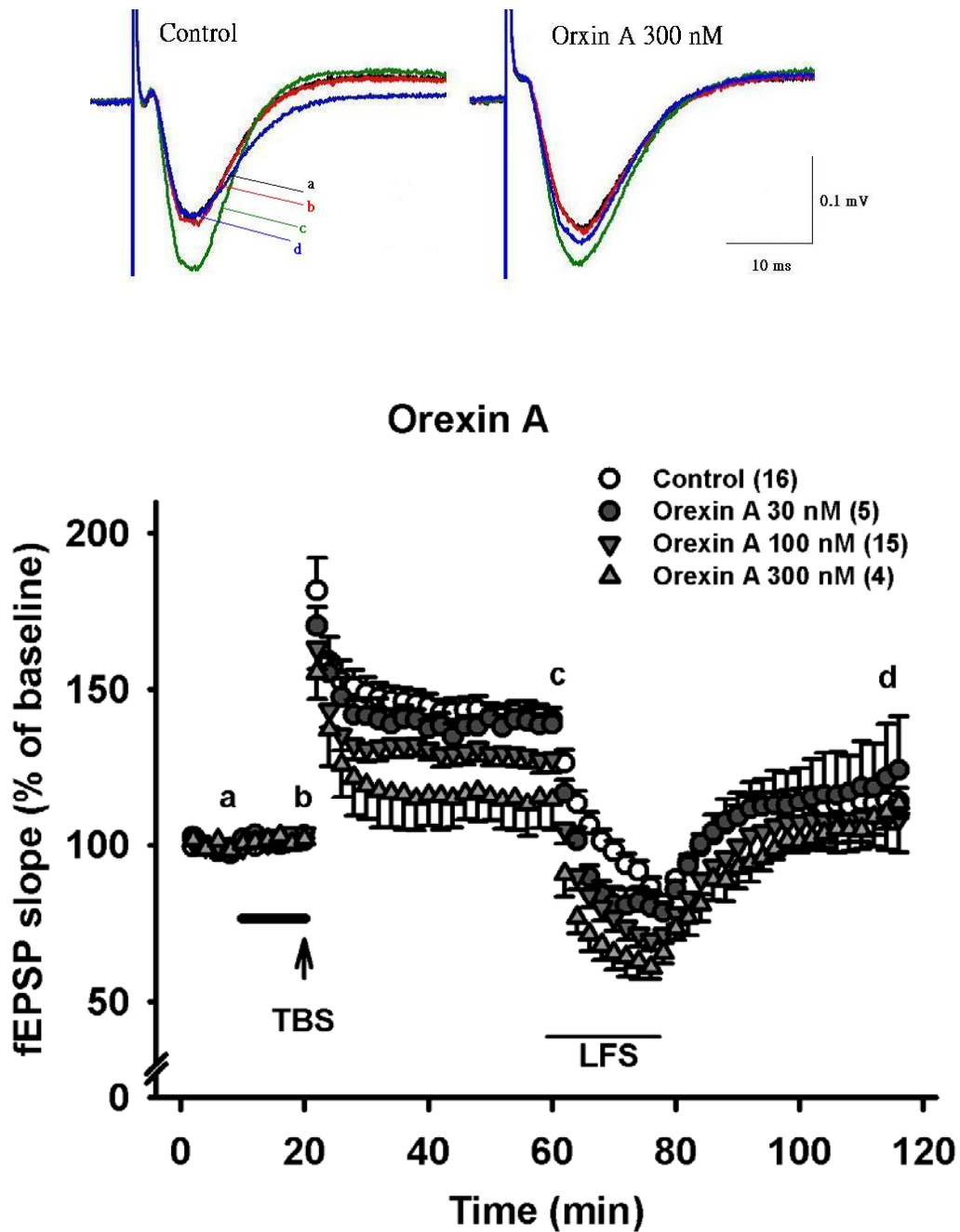
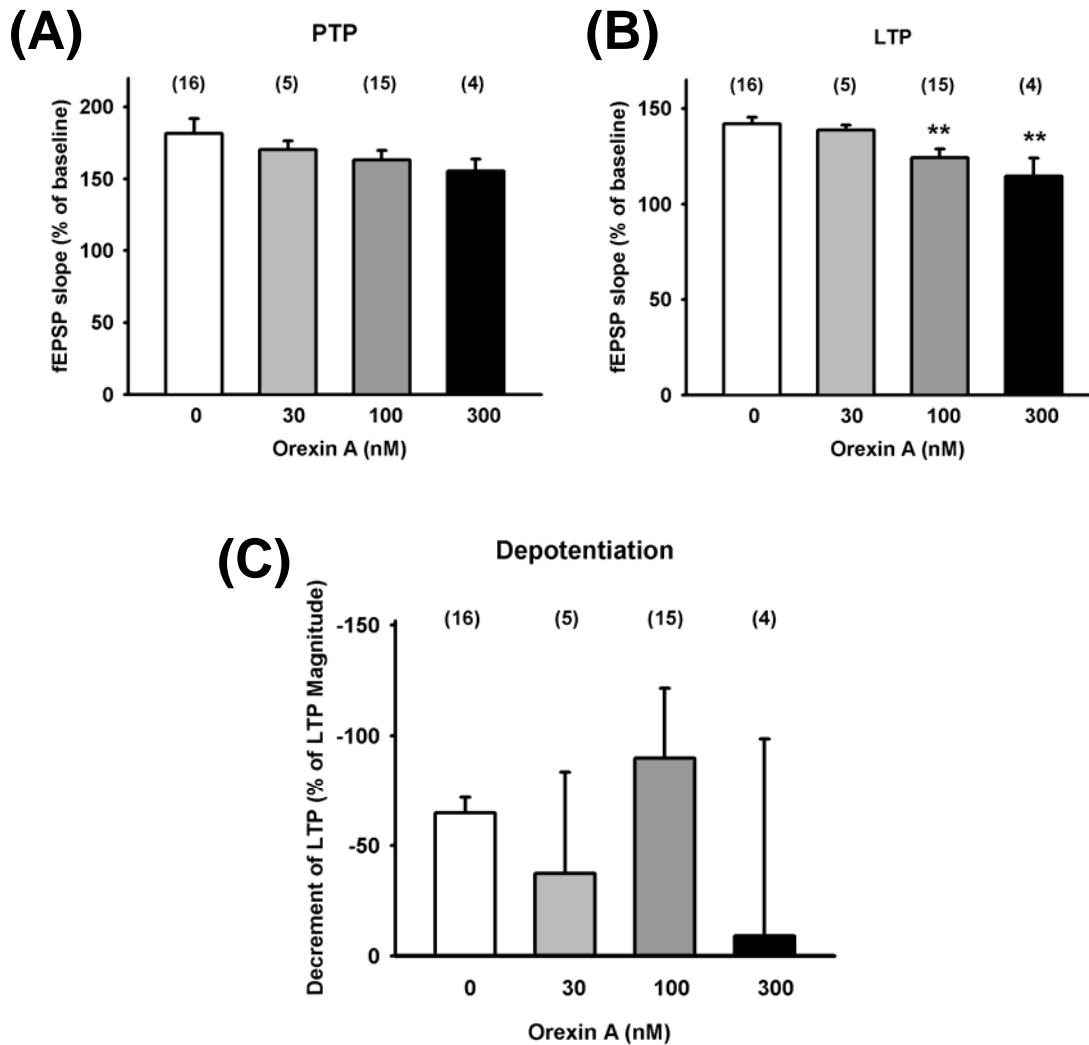


Fig. 4 Effects of orexins at various concentrations on the fEPSP slopes of Schaffer collateral-CA1 synapses in mouse hippocampal slices. Effects of orexins A (A) or [Ala<sup>11</sup>, D-Leu<sup>15</sup>]-orexin B (B) 10 min after application and was expressed as % of averaged baseline fEPSPs, which were taken 10 min before drug application. Data are the mean  $\pm$  SEM. Slice numbers are denoted in the parentheses.

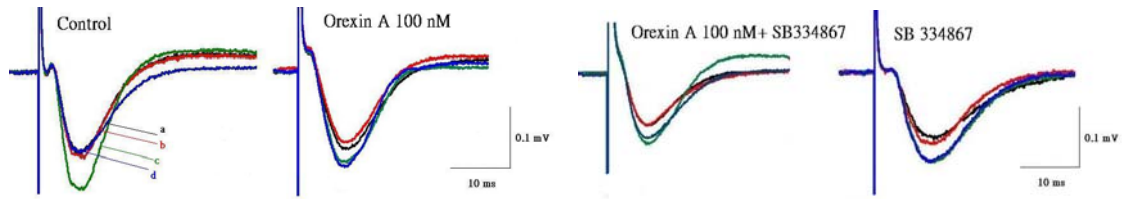




**Fig. 5** Effects of orexin A on synaptic plasticity of hippocampal CA1 synapses. After fEPSPs evoked at 0.03 Hz (basal stimulation) reached steady state, theta burst stimulation (TBS) (arrow), 3 theta burst trains as described in methods, was given to induce LTP. After TBS, the stimulation frequency was switched back to 0.03 Hz and fEPSPs were recorded for 40 min, followed by low frequency stimulation (LFS) (thin horizontal line), 1 Hz, 15 min for inducing depotentiation. Orexin A (30, 100, 300 nM) were applied (thick horizontal bar) 10 min before TBS. The traces in the upper panel are the average of 4 fEPSPs recorded at the times denoted: a, control baseline fEPSP; b, the baseline fEPSP 10 min after orexin A treatment; c: the fEPSP 40 min after TBS; d: the fEPSPs 40 min after LFS.



**Fig. 6** Effects of orexin A on (A)PTP (B)LTP and (C)depotentiation. (A)The slightly dose-related suppression of PTP (21-25 min) by orexin A. however, there are no significant differences between each group. (B)The dose-related suppression of LTP (time 78-80 min) by orexin A (100 and 300 nM). \*\*P<0.01.



### Orexin A vs. SB 334867

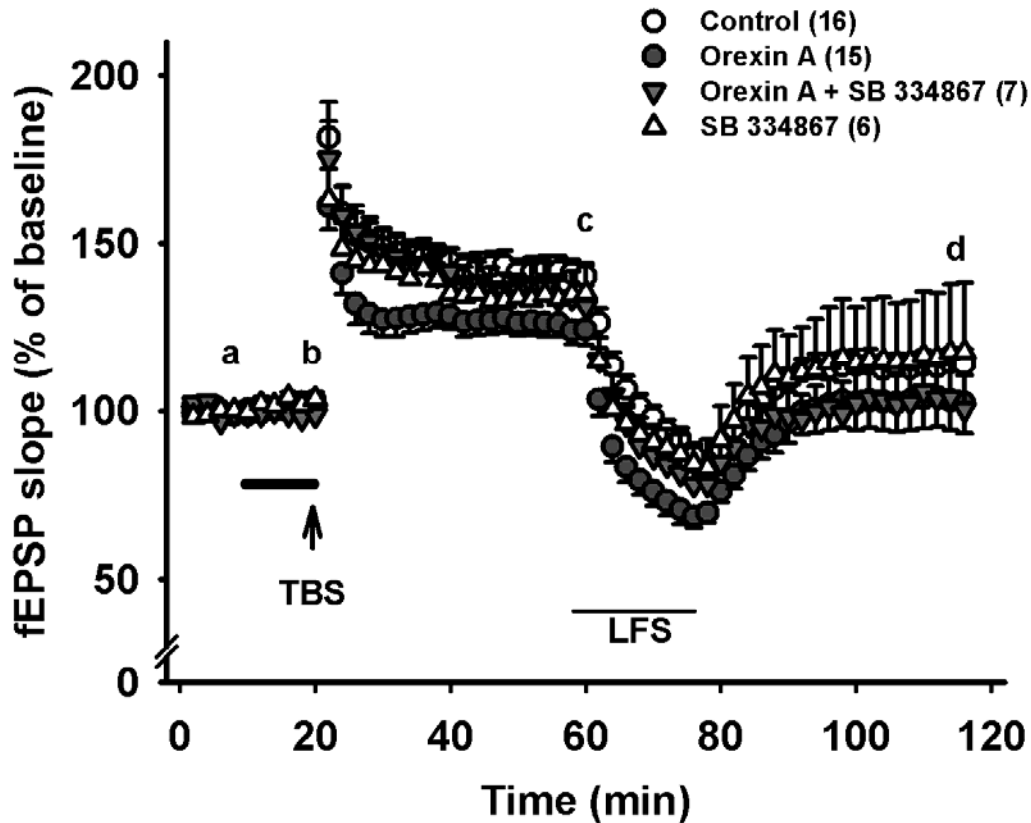


Fig. 7A Effect of SB 334867, an OX 1 receptor antagonist, on orexin A-induced alteration of synaptic plasticity. Filed EPSP slopes at the baseline, after treatment with normal ACSF (open circles), 100 nM orexin A (filled circles) or 3  $\mu$ M SB 334867 alone (filled triangles) and 100 nM orexin A plus 3  $\mu$ M SB 334867 (filled inverse triangles), after TBS and LFS were shown. Scale bar: vertical 0.1mV, horizontal 10ms

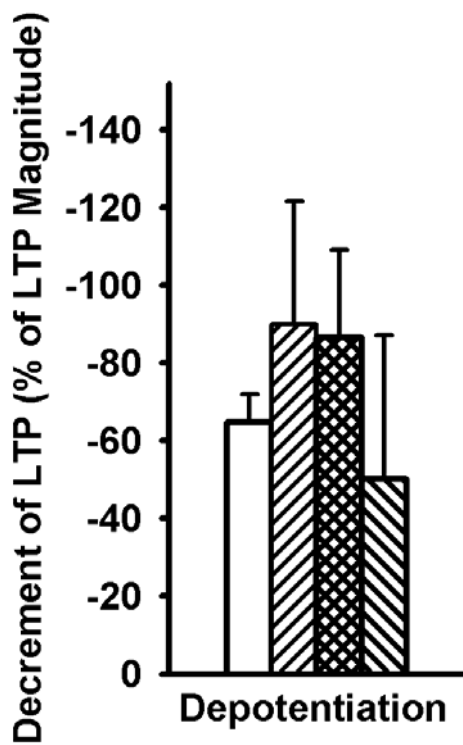
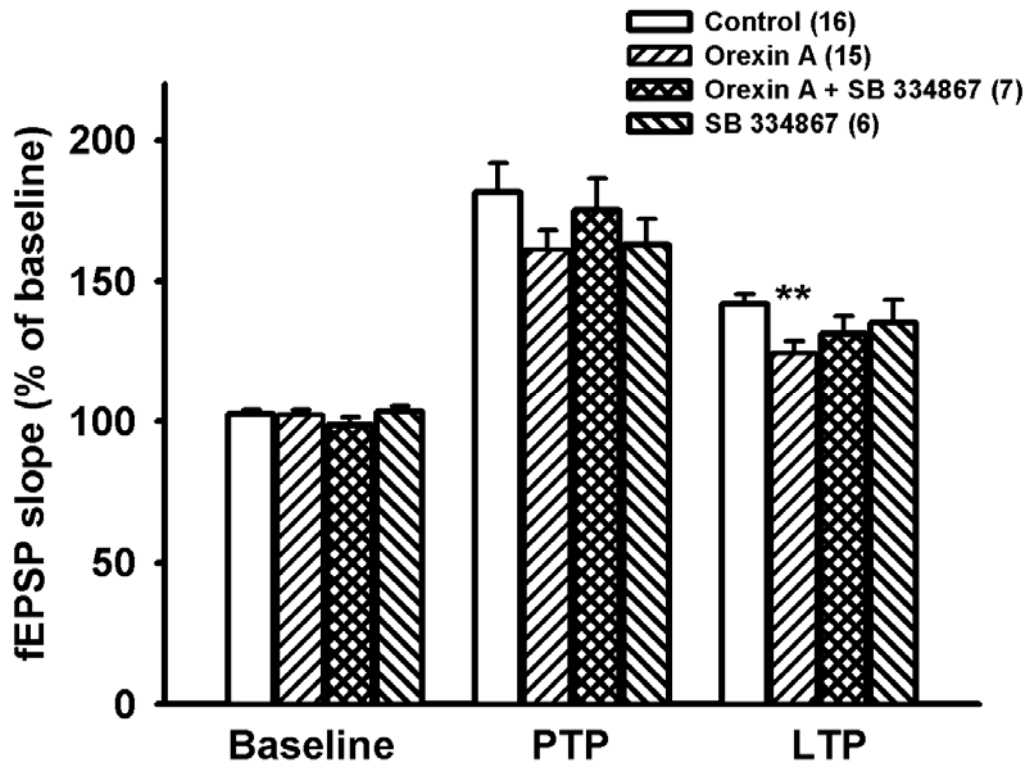
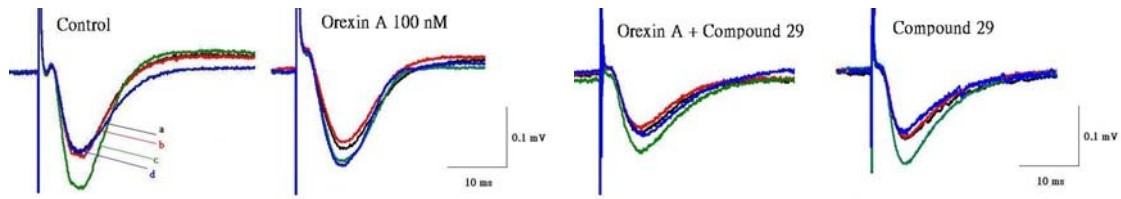
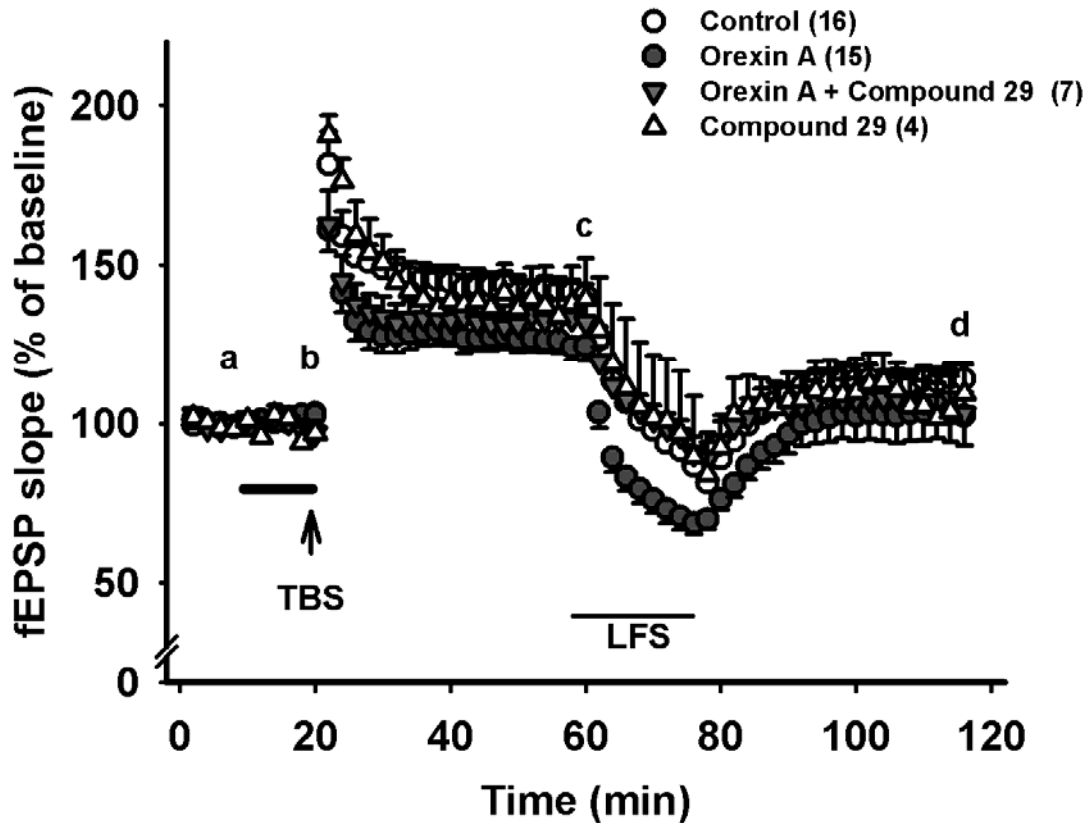


Fig. 7B Effect of SB 334867, an OX 1 receptor antagonist, on orexin A-induced alteration of synaptic plasticity. Statistic bars of the effects of ACSF, orexin A or 3  $\mu$ M SB 334867 alone, and 100 nM orexin A plus 3  $\mu$ M SB 334867 on baseline, PTP, LTP and depotentiation.



### Orexin A vs. Compound 29



**Fig. 8A** Effects of Compound 29, an OX 2 receptor antagonist, on orexin A-induced alteration of synaptic plasticity. Filled EPSP slopes at the baseline, after treatment with normal ACSF (open circles), 100 nM orexin A (filled circles) or 30  $\mu$ M Compound 29 alone (filled triangles) and 100 nM orexin A plus 30  $\mu$ M Compound 29 (filled inverse triangles), after HFS and LFS were shown. Scale bar: vertical 0.1mV, horizontal 10ms

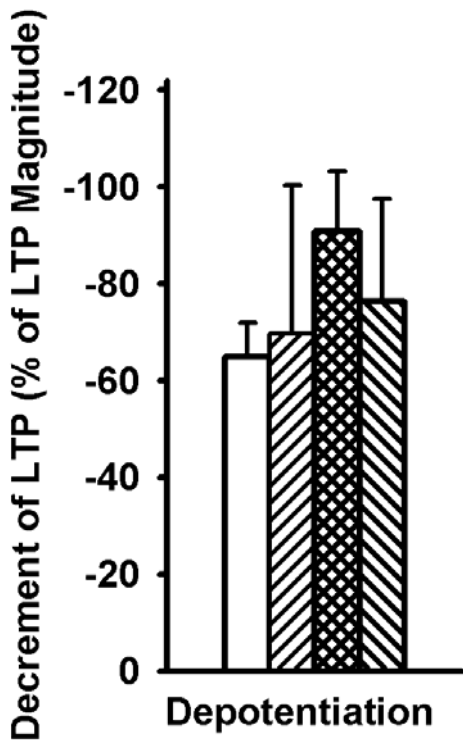
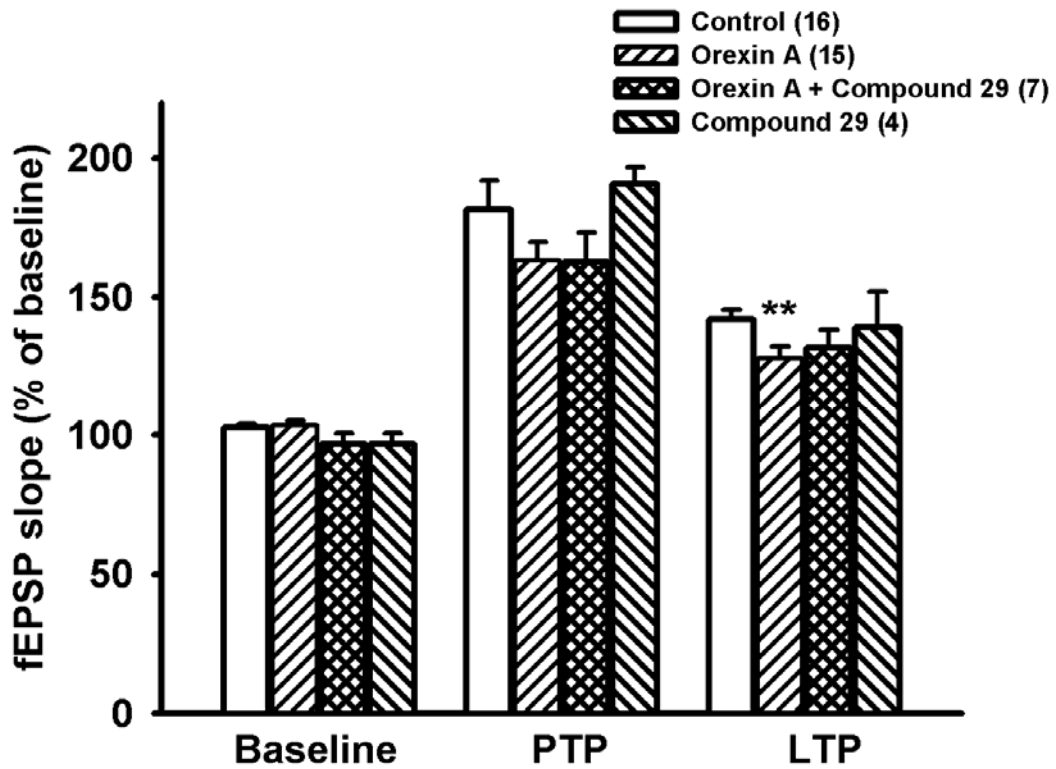
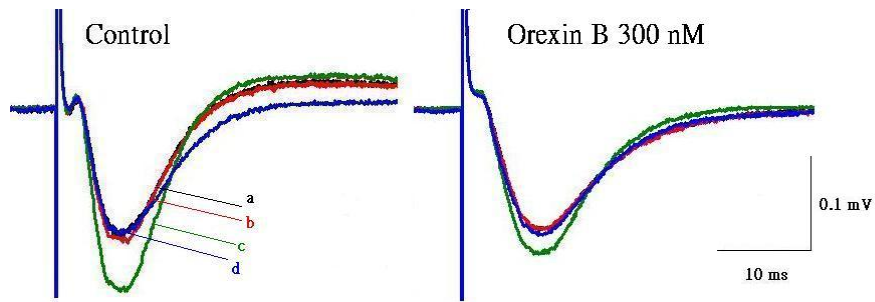


Fig. 8B Effects of Compound 29, an OX 2 receptor antagonist, on orexin A-induced alteration of synaptic plasticity. Statistical bars of the effects of ACSF, orexin A or 30  $\mu$ M Compound 29 alone, and 100 nM orexin A plus 30  $\mu$ M Compound 29 on baseline, PTP, LTP and depotentiation.



### [Ala<sup>11</sup>, D-Leu<sup>15</sup>]-orexin B

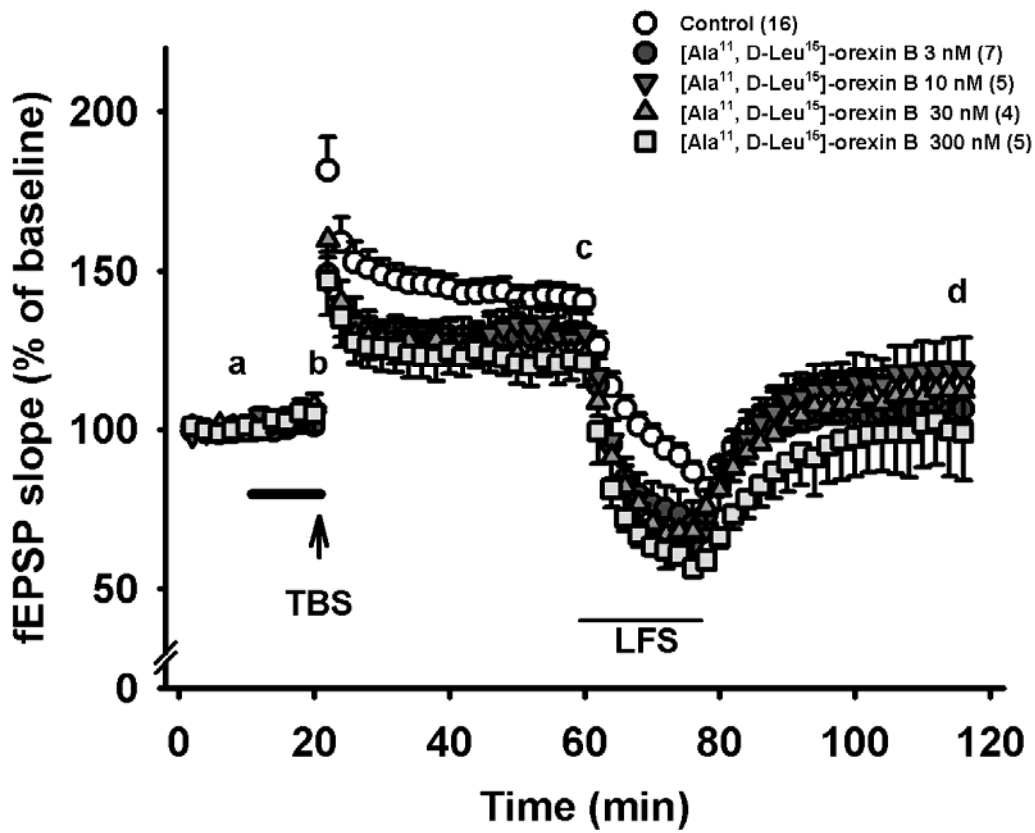
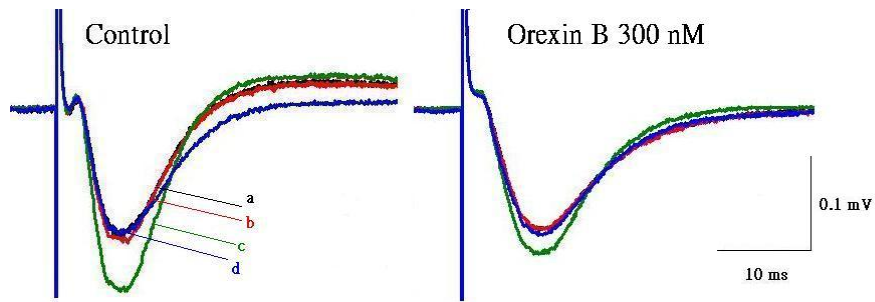


Fig. 9A Effects of [Ala<sup>11</sup>, D-Leu<sup>15</sup>]- orexin B (3 ,10, 300nM) on synaptic plasticity of hippocampal CA1 synapses. The stimulation and analysis are the same as Fig. 5. Scale bar: vertical 0.1mV, horizontal 10ms



### [Ala<sup>11</sup>, D-Leu<sup>15</sup>]-orexin B

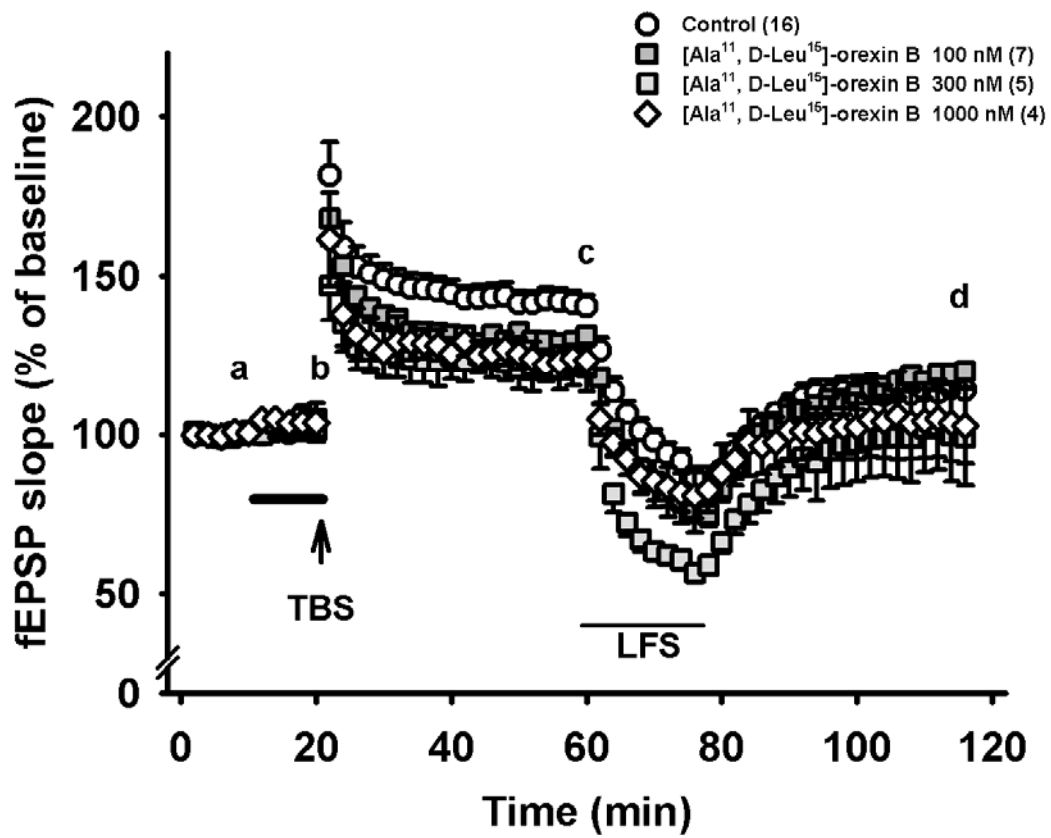
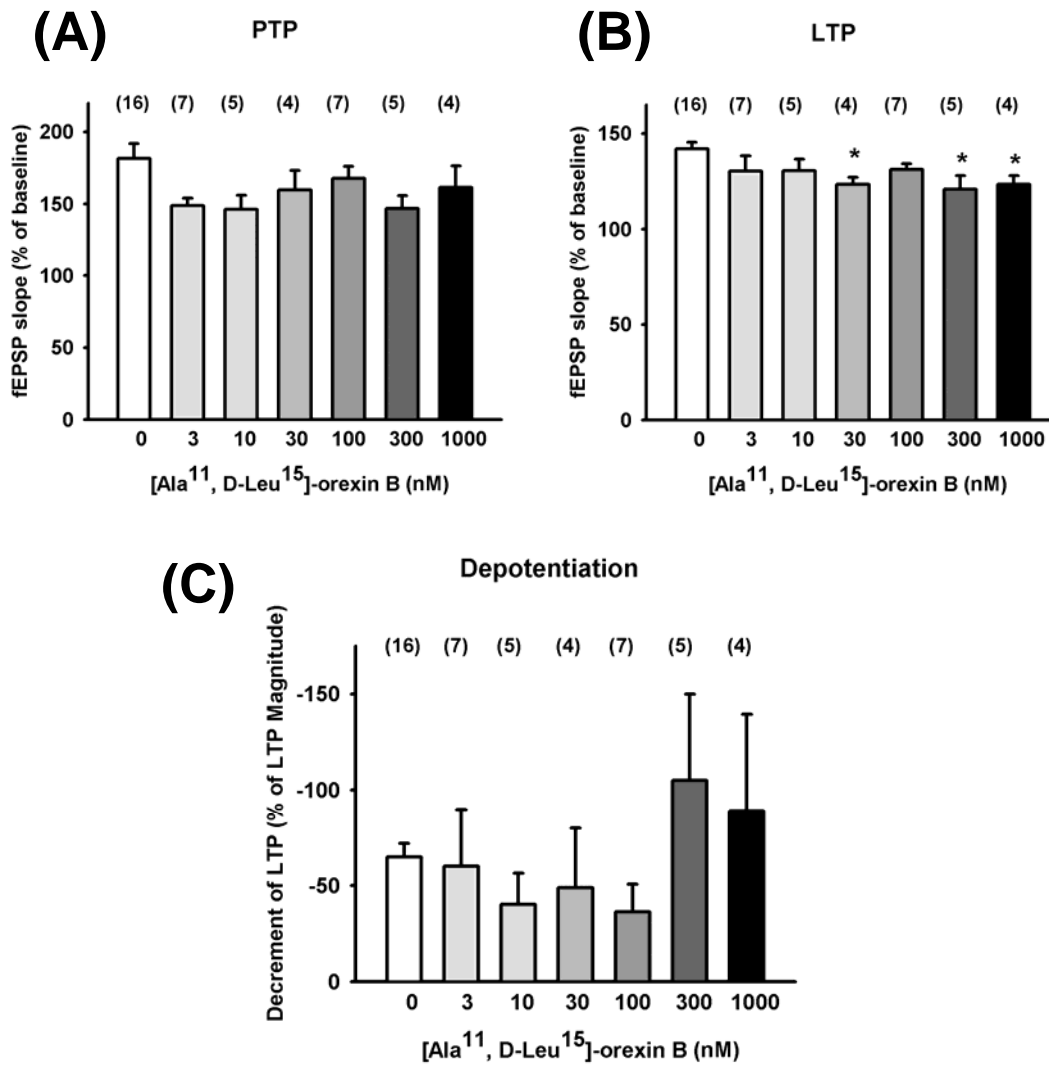
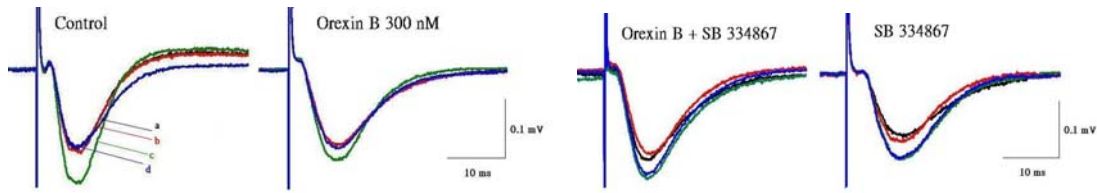


Fig. 9B Effects of [Ala<sup>11</sup>, D-Leu<sup>15</sup>]- orexin B (100, 300, 1000 nM) on synaptic plasticity of hippocampal CA1 synapses. The stimulation and analysis are the same as Fig. 5. Scale bar: vertical 0.1mV, horizontal 1ms





**Fig. 10** Effect of [Ala<sup>11</sup>, D-Leu<sup>15</sup>]-orexin B on (A)PTP(21-25 min) are no significant differences between each group. (B)The dose-related suppression of LTP (time 78-80 min) by [Ala<sup>11</sup>, D-Leu<sup>15</sup>]-orexin B. (C) depotentiation (time 113-115 min) shows no significant difference. \*P<0.05



**[Ala<sup>11</sup>, D-Leu<sup>15</sup>]-orexin B vs. SB 335867**

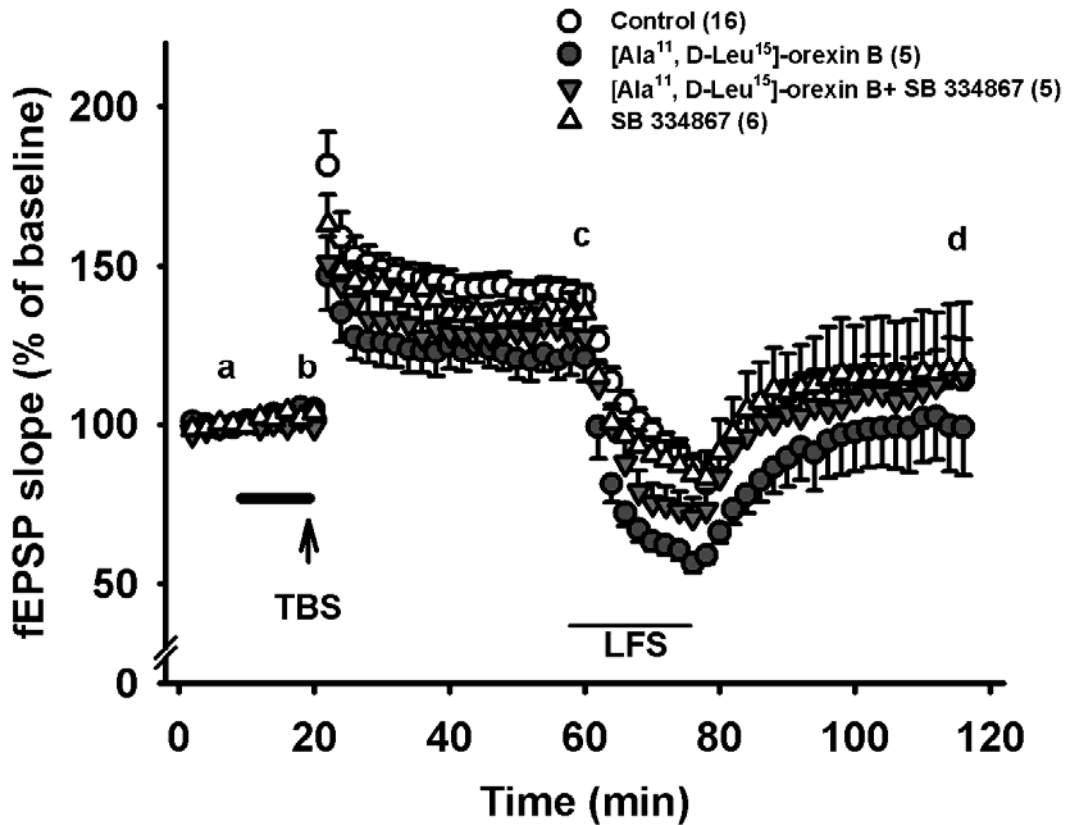


Fig. 11A Effect of SB 334867, an OX 1 receptor antagonist, on [Ala<sup>11</sup>, D-Leu<sup>15</sup>]-orexin B -induced alteration of synaptic plasticity. Filled EPSP slopes at the baseline, after treatment with normal ACSF (open circles), 300 nM [Ala<sup>11</sup>, D-Leu<sup>15</sup>]-orexin B (filled circles) or 3  $\mu$ M SB 334867 alone (filled triangles) and 300 nM [Ala<sup>11</sup>, D-Leu<sup>15</sup>]-orexin B plus 3  $\mu$ M SB 334867 (filled inverse triangles), after TBS and LFS were shown. Scale bar: vertical 0.1mV, horizontal 1ms

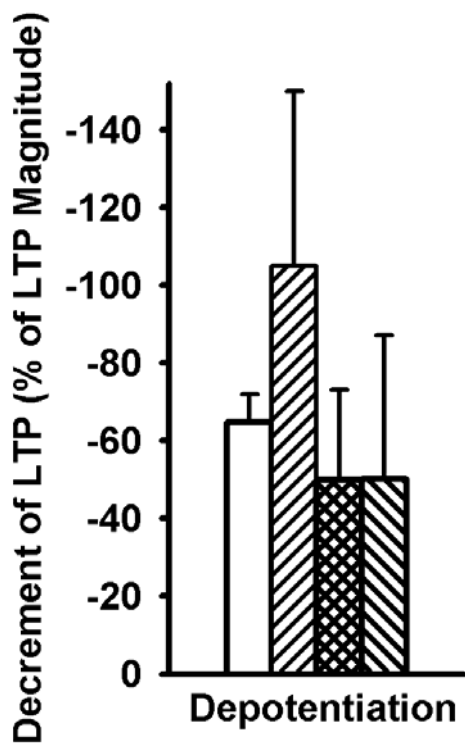
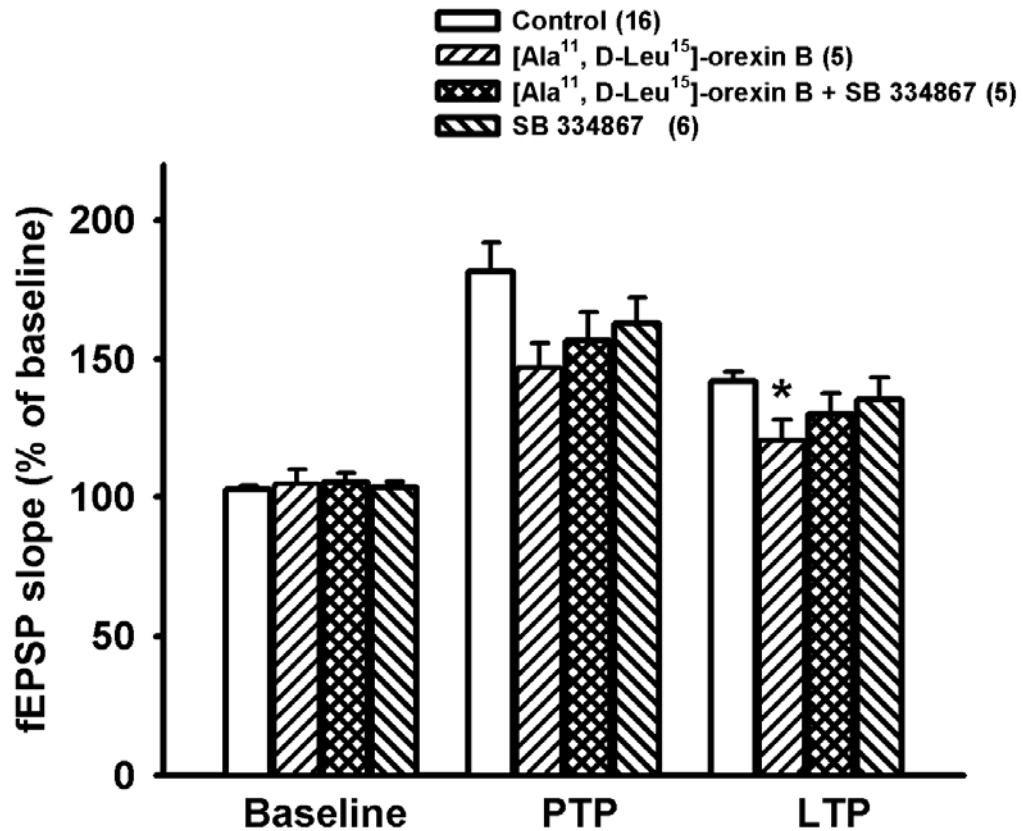
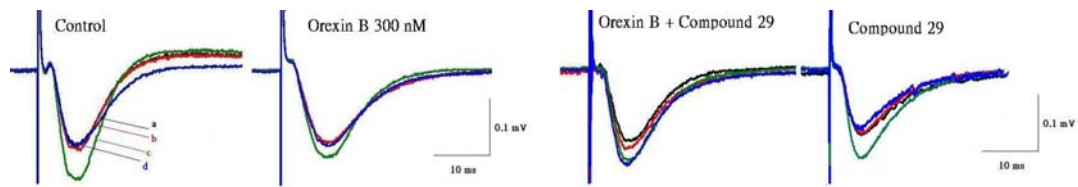


Fig. 11B Effect of SB 334867, an OX 1 receptor antagonist, on [Ala<sup>11</sup>, D-Leu<sup>15</sup>]-orexin B-induced alteration of synaptic plasticity. Statistic bars of the effects of ACSF, 300 nM [Ala<sup>11</sup>, D-Leu<sup>15</sup>]-orexin B or 3  $\mu$ M SB 334867 alone, and 300 nM [Ala<sup>11</sup>, D-Leu<sup>15</sup>]-orexin B plus 3  $\mu$ M SB 334867 on baseline, PTP, LTP and depotentiation.



### [Ala<sup>11</sup>, D-Leu<sup>15</sup>]-orexin B vs. Compound 29

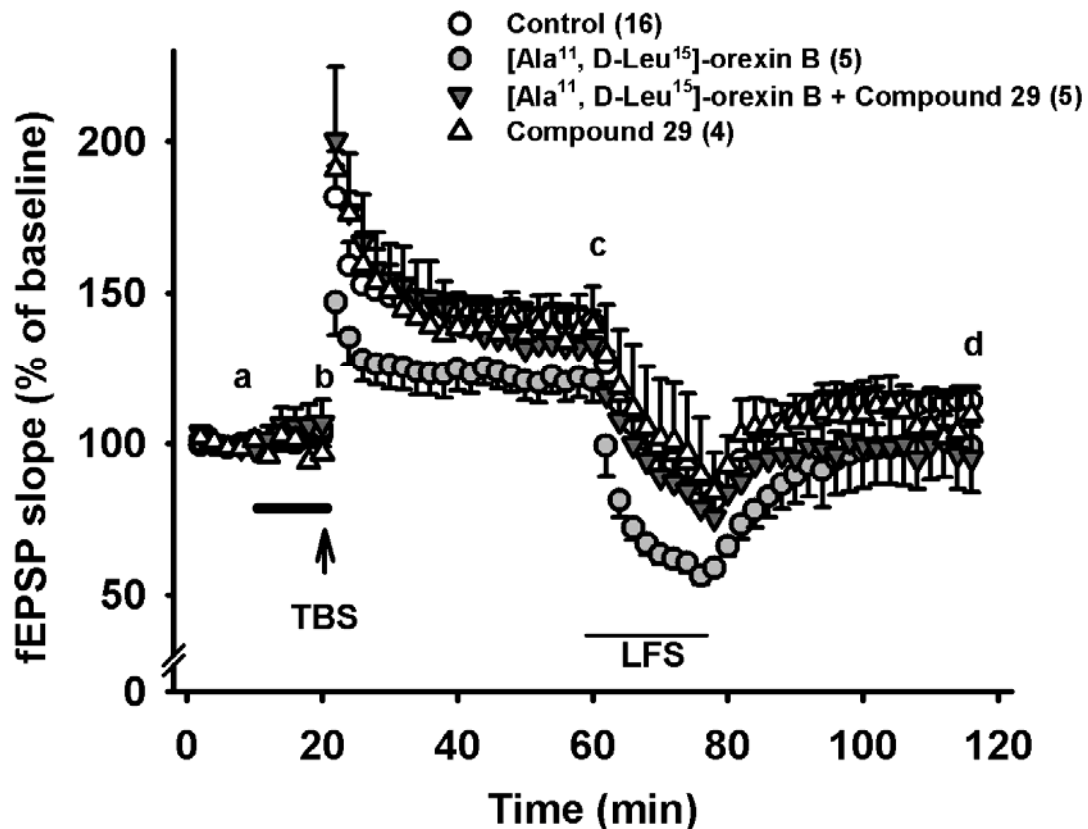


Fig. 12A Effects of Compound 29, an OX 2 receptor antagonist, on [Ala<sup>11</sup>, D-Leu<sup>15</sup>]-orexin B -induced alteration of synaptic plasticity. Filed EPSP slopes at the baseline, after treatment with normal ACSF (open circles), 300 nM [Ala<sup>11</sup>, D-Leu<sup>15</sup>]-orexin B (filled circles) or 30  $\mu$ M Compound 29 alone (filled triangles) and 300 nM [Ala<sup>11</sup>, D-Leu<sup>15</sup>]-orexin B plus 30  $\mu$ M Compound 29 (filled inverse triangles), after HFS and LFS were shown. Scale bar: vertical 0.1 mV, horizontal 1 ms

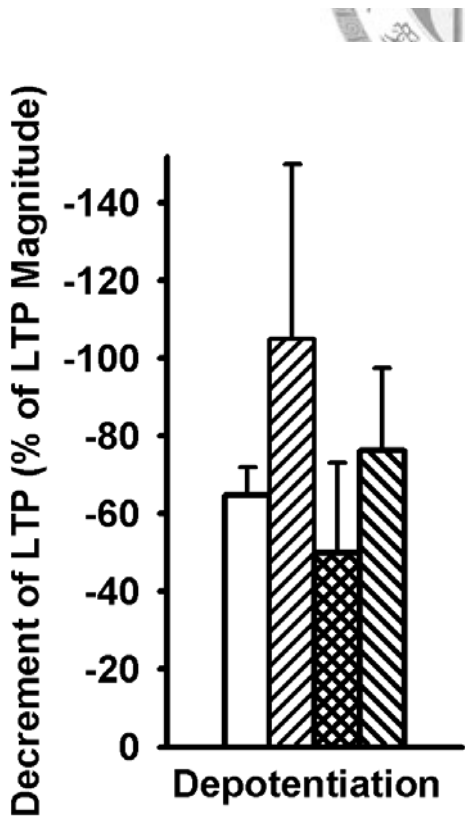
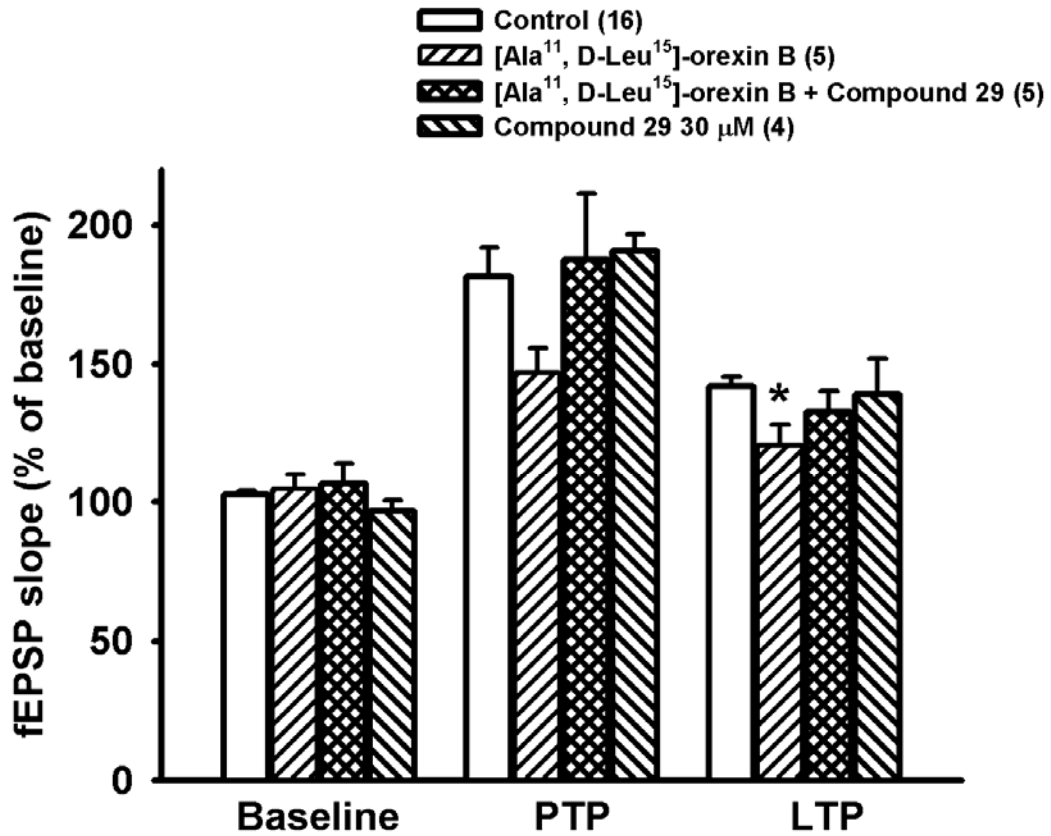


Fig. 12B Effects of Compound 29, an OX 2 receptor antagonist, on orexin A-induced alteration of synaptic plasticity. Statistical bars of the effects of ACSF, 300 nM [Ala<sup>11</sup>, D-Leu<sup>15</sup>]-orexin B or 30 μM Compound 29 alone, and 300 nM [Ala<sup>11</sup>, D-Leu<sup>15</sup>]-orexin B A plus 30 μM Compound 29 on baseline, PTP, LTP and depotentiation.

**Table 1. putative subtype-selective ligands of orexin receptors**

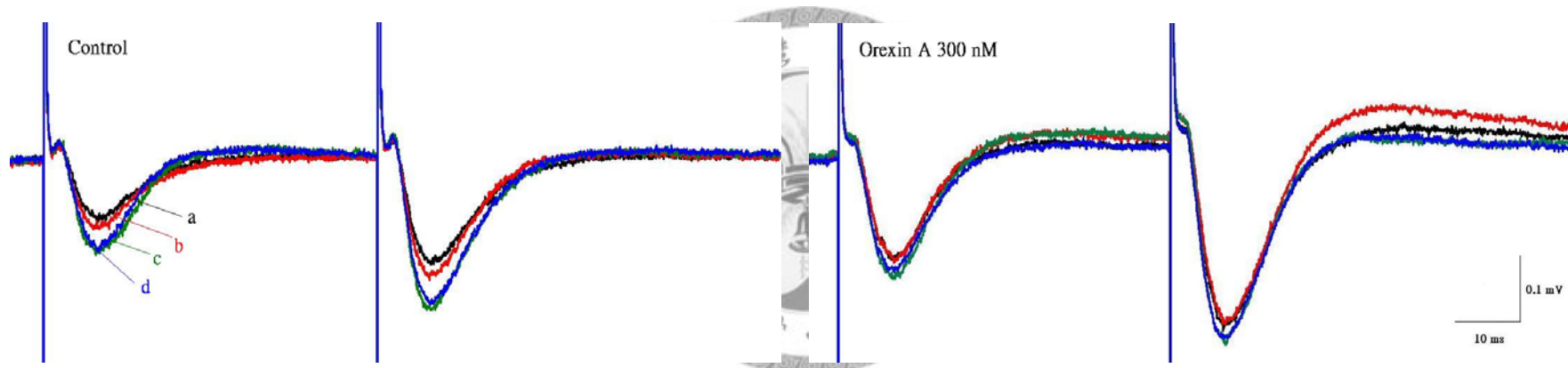
	OX1R	OX2R
Agonist	Orexin A	Orexin B [Ala <sup>27</sup> ] orexin B [Pro <sup>11</sup> ] orexin B [Ala <sup>11</sup> , D-Leu <sup>15</sup> ] orexin B
Antagonist	SB 334867	Compound 29 ( <i>N</i> -Acyl 6,7-dimethoxy-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline)

(Cheng et al., 2005)



**Table. 2 Paired pluse ratio (PPR) before and after orexin A application at basal stimulation state, LTP and depotentiation states**

Orexin A (nM)	Baseline	Drug application		LTP		Depotentialion	
	PPR	PPR	PPR change	PPR	PPR change	PPR	PPR change
<b>0</b>	1.62±0.04 (8)	1.60±0.04	0.98±0.02	1.51±0.03	0.93±0.02	1.53±0.05	0.94±0.02
<b>100</b>	1.66±0.1 (5)	1.66±0.03	1.01±0.05	1.62±0.07	0.98±0.03	1.67±0.09	1.01±0.04
<b>300</b>	1.57±0.01 (4)	1.55±0.02	0.98±0.01	1.49±0.04	0.94±0.02	1.57±0.07	0.99±0.05



**Paired pluse ratio of the fEPSPs evoked by paired pluses (50 ms interval) were calculated at the times denoted.**

**PPR change was obtained from PPR of each group divided by baseline PPR.**

**There were no statistically significant among each groups.**

Trace: a, control baseline fEPSP; b, the baseline fEPSP 10 min after orexin A treatment; c: the fEPSP 40 min after TBS; d: the fEPSPs 40 min after LFS.

**Table 3. Effect of orexins on learning and memory**

	<b>Effect</b>	<b>Animal</b>	<b>Route</b>	<b>Orexins</b>	<b>OX1R/OX2R mediated</b>	<b>Reference</b>
<b><i>In vivo</i></b>	↑ Passive avoidance test	rat	i.c.v.	Orexin A (0.14~0.56 nmol)	-	(Telegdy and Adamik, 2002a)
	↑ Active and passive avoidance test	CD-1 mice (4 mo) SMAP mice (4 & 12 mo)	i.c.v.	Orexin A (1.5~3 nmol)	-	(Jaeger et al., 2002)
	↓ Morris water maze	rat	i.c.v.	Orexin A (1~10 nmol)	-	(Aou et al., 2003)
	↑ Morris water maze	rat	Intra-CA1	Endogenous orexins*	OX1R	(Akbari et al., 2008; Akbari et al., 2007)
	↑ Passive avoidance test	rat	Intra-DG	Endogenous orexins*	OX1R	(Akbari et al., 2008; Akbari et al., 2006)
	↑ Morris water maze	rat	Intra-DG	Orexin A (0.3~0.9 nmol)	OX1R	(Wayner et al., 2004)
	↑ Passive avoidance test	rat	Intra-DG	SB 334867 (10 mg/kg)	OX1R	(Wayner et al., 2004)
<b><i>In vitro</i></b>	↓ LTP	rat	CA1	Orexin A (1~30 nM)	-	(Aou et al., 2003)
	Orexin A induces LTP, no effect of orexin B, on basal transmission	C57BL/6j mice	CA1	Orexin A (100 nM) Orexin B (100 nM)	OX1R	(Selbach et al., 2004)

\* Endogenous orexins were revealed by application of SB 334867 (4.7~18.8 nmol)



## Reference

- Adam JA, Menheere PP, van Dielen FM, Soeters PB, Buurman WA, Greve JW. 2002. Decreased plasma orexin-A levels in obese individuals. *International Journal of Obesity & Related Metabolic Disorders: Journal of the International Association for the Study of Obesity* 26(2):274-6.
- Akbari E, Motamedi F, Naghdi N, Noorbakhshnia M. 2008. The effect of antagonization of orexin 1 receptors in CA1 and dentate gyrus regions on memory processing in passive avoidance task. *Behavioural Brain Research* 187(1):172-7.
- Akbari E, Naghdi N, Motamedi F. 2006. Functional inactivation of orexin 1 receptors in CA1 region impairs acquisition, consolidation and retrieval in Morris water maze task. *Behavioural Brain Research* 173(1):47-52.
- Akbari E, Naghdi N, Motamedi F. 2007. The selective orexin 1 receptor antagonist SB-334867-A impairs acquisition and consolidation but not retrieval of spatial memory in Morris water maze. *Peptides* 28(3):650-6.
- Aou S, Li XL, Li AJ, Oomura Y, Shiraishi T, Sasaki K, Imamura T, Wayner MJ. 2003. Orexin-A (hypocretin-1) impairs Morris water maze performance and CA1-Schaffer collateral long-term potentiation in rats. *Neuroscience* 119(4):1221-8.
- Arai A, Black J, Lynch G. 1994. Origins of the variations in long-term potentiation between synapses in the basal versus apical dendrites of hippocampal neurons. *Hippocampus* 4(1):1-9.
- Asahi S, Egashira S, Matsuda M, Iwaasa H, Kanatani A, Ohkubo M, Ihara M, Morishima H. 2003. Development of an orexin-2 receptor selective agonist, [Ala<sup>11</sup>, D-Leu<sup>15</sup>]orexin-B. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 13(1):111-3.
- Baranowska B, Wolinska-Witort E, Martynska L, Chmielowska M, Baranowska-Bik A. 2005. Plasma orexin A, orexin B, leptin, neuropeptide Y (NPY) and insulin in obese women. *Neuro Endocrinol Lett* 26(4):293-6.
- Bayazitov IT, Richardson RJ, Fricke RG, Zakharenko SS, Jaeger LB, Farr SA, Banks WA, Morley JE. 2007. Slow presynaptic and fast postsynaptic components of compound long-term potentiation. *Journal of neuroscience* 24;27(43):11510-21.
- Beuckmann CT, Yanagisawa M. 2002. Orexins: from neuropeptides to energy homeostasis and sleep/wake regulation. *Journal of Molecular Medicine* 80(6):329-42.
- Bingham S, Davey PT, Babbs AJ, Irving EA, Sammons MJ, Wyles M, Jeffrey P, Cutler L, Riba I, Johns A and others. 2001. Orexin-A, an hypothalamic peptide with

- analgesic properties. *Pain* 92(1-2):81-90.
- Bongsebandhu-phubhakdi S, Manabe T. 2007. The neuropeptide nociceptin is a synaptically released endogenous inhibitor of hippocampal long-term potentiation. *Journal of Neuroscience* 27(18):4850-8.
- Borgland SL, Taha SA, Sarti F, Fields HL, Bonci A. 2006. Orexin A in the VTA is critical for the induction of synaptic plasticity and behavioral sensitization to cocaine. *Neuron* 49(4):589-601.
- Boutrel B, Kenny PJ, Specio SE, Martin-Fardon R, Markou A, Koob GF, de Lecea L. 2005. Role for hypocretin in mediating stress-induced reinstatement of cocaine-seeking behavior. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102(52):19168-73.
- Bronsky J, Nedvidkova J, Zamrazilova H, Pechova M, Chada M, Kotaska K, Nevoral J, Prusa R. 2007. Dynamic changes of orexin A and leptin in obese children during body weight reduction. *Physiology Research* 56(1):89-96.
- Brown RE, Sergeeva OA, Eriksson KS, Haas HL. 2002. Convergent excitation of dorsal raphe serotonin neurons by multiple arousal systems (orexin/hypocretin, histamine and noradrenaline). *Journal of Neuroscience* 22(20):8850-9.
- Burdakov D, Gerasimenko O, Verkhatsky A. 2005. Physiological changes in glucose differentially modulate the excitability of hypothalamic melanin-concentrating hormone and orexin neurons in situ. *Journal of Neuroscience* 25(9):2429-33.
- Capocchi G, Zampolini M, Larson J. 1992. Theta burst stimulation is optimal for induction of LTP at both apical and basal dendritic synapses on hippocampal CA1 neurons. *Brain Res* 591(2):332-6.
- Chabas D, Foulon C, Gonzalez J, Nasr M, Lyon-Caen O, Willer JC, Derenne JP, Arnulf I. 2007. Eating disorder and metabolism in narcoleptic patients. *Sleep* 30(10):1267-73.
- Chemelli RM, Willie JT, Sinton CM, Elmquist JK, Scammell T, Lee C, Richardson JA, Williams SC, Xiong Y, Kisanuki Y and others. 1999. Narcolepsy in orexin knockout mice: molecular genetics of sleep regulation. *Cell* 98(4):437-51.
- Chen CT, Dun SL, Kwok EH, Dun NJ, Chang JK. 1999. Orexin A-like immunoreactivity in the rat brain. *Neuroscience Letters* 260(3):161-4.
- Cheng JK, Hwang LL, Chou RCC, Chiou LC. 2005. Analgesic effects of orexins. *Journal of Neuropathic Pain & Symptom Palliation* 1:47-53.
- Chiou LC, Liao YY, Fan PC, Kuo PH, Wang CH, Riemer C, Prinssen EP. 2007. Nociceptin/orphanin FQ peptide receptors: pharmacology and clinical implications. *Current Drug Targets* 8(1):117-35.
- Cluderay JE, Harrison DC, Hervieu GJ. 2002. Protein distribution of the orexin-2 receptor in the rat central nervous system. *Regulatory Peptides* 104(1-3):131-44.

- Cutler DJ, Morris R, Sheridhar V, Wattam TA, Holmes S, Patel S, Arch JR, Wilson S, Buckingham RE, Evans ML and others. 1999. Differential distribution of orexin-A and orexin-B immunoreactivity in the rat brain and spinal cord. *Peptides* 20(12):1455-70.
- Dalal MA, Schuld A, Haack M, Uhr M, Geisler P, Eisensehr I, Noachtar S, Pollmacher T. 2001. Normal plasma levels of orexin A (hypocretin-1) in narcoleptic patients. *Neurology* 56(12):1749-51.
- Date Y, Mondal MS, Matsukura S, Nakazato M. 2000. Distribution of orexin-A and orexin-B (hypocretins) in the rat spinal cord. *Neuroscience Letters* 288(2):87-90.
- de Lecea L, Kilduff TS, Peyron C, Gao X, Foye PE, Danielson PE, Fukuhara C, Battenberg EL, Gautvik VT, Bartlett FS, 2nd and others. 1998. The hypocretins: hypothalamus-specific peptides with neuroexcitatory activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95(1):322-7.
- de Lecea L, Sutcliffe JG. 1999. The hypocretins/orexins: novel hypothalamic neuropeptides involved in different physiological systems. *Cellular & Molecular Life Sciences* 56(5-6):473-80.
- Delaney KR, Tank DW. 1994. A quantitative measurement of the dependence of short-term synaptic enhancement on presynaptic residual calcium. *Journal of Neuroscience* 14(10):5885-902.
- Dun NJ, Le Dun S, Chen CT, Hwang LL, Kwok EH, Chang JK. 2000. Orexins: a role in medullary sympathetic outflow. *Regulatory Peptides* 96(1-2):65-70.
- Elmquist JK, Elias CF, Saper CB. 1999. From lesions to leptin: hypothalamic control of food intake and body weight. *Neuron* 22(2):221-32.
- Engelmann M, Landgraf R, Wotjak CT. 2004. The hypothalamic-neurohypophysial system regulates the hypothalamic-pituitary-adrenal axis under stress: an old concept revisited. *Frontiers in Neuroendocrinology* 25(3-4):132-49.
- Fadel J, Deutch AY. 2002. Anatomical substrates of orexin-dopamine interactions: lateral hypothalamic projections to the ventral tegmental area. *Neuroscience* 111(2):379-87.
- Hagan JJ, Leslie RA, Patel S, Evans ML, Wattam TA, Holmes S, Benham CD, Taylor SG, Routledge C, Hemmati P and others. 1999. Orexin A activates locus coeruleus cell firing and increases arousal in the rat. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96(19):10911-6.
- Hara J, Beuckmann CT, Nambu T, Willie JT, Chemelli RM, Sinton CM, Sugiyama F, Yagami K, Goto K, Yanagisawa M and others. 2001. Genetic ablation of orexin neurons in mice results in narcolepsy, hypophagia, and obesity. *Neuron* 30(2):345-54.
- Hara J, Yanagisawa M, Sakurai T. 2005. Difference in obesity phenotype between

- orexin-knockout mice and orexin neuron-deficient mice with same genetic background and environmental conditions. *Neuroscience Letters* 380(3):239-42.
- Harris GC, Wimmer M, Aston-Jones G. 2005. A role for lateral hypothalamic orexin neurons in reward seeking. *Nature* 437(7058):556-9.
- Heinonen MV, Purhonen AK, Miettinen P, Paakkonen M, Pirinen E, Alhava E, Akerman K, Herzig KH. 2005. Apelin, orexin-A and leptin plasma levels in morbid obesity and effect of gastric banding. *Regulatory Peptide* 130(1-2):7-13.
- Hervieu GJ, Cluderay JE, Harrison DC, Roberts JC, Leslie RA. 2001. Gene expression and protein distribution of the orexin-1 receptor in the rat brain and spinal cord. *Neuroscience* 103(3):777-97.
- Hirose M, Egashira S, Goto Y, Hashihayata T, Ohtake N, Iwaasa H, Hata M, Fukami T, Kanatani A, Yamada K. 2003. N-acyl 6,7-dimethoxy-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline: the first orexin-2 receptor selective non-peptidic antagonist. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 13(24):4497-9.
- Hoang QV, Bajic D, Yanagisawa M, Nakajima S, Nakajima Y. 2003. Effects of orexin (hypocretin) on GIRK channels. *Journal of Neurophysiology* 90(2):693-702.
- Honda Y, Doi Y, Ninomiya R, Ninomiya C. 1986. Increased frequency of non-insulin-dependent diabetes mellitus among narcoleptic patients. *Sleep* 9(1 Pt 2):254-9.
- Huang ZL, Qu WM, Li WD, Mochizuki T, Eguchi N, Watanabe T, Urade Y, Hayaishi O. 2001. Arousal effect of orexin A depends on activation of the histaminergic system. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98(17):9965-70.
- Ida T, Nakahara K, Murakami T, Hanada R, Nakazato M, Murakami N. 2000. Possible involvement of orexin in the stress reaction in rats. *Biochemical & Biophysical Research Communications* 270(1):318-23.
- Ishii K, Adachi Y, Hatanaka M, Sakamoto H, Furuyama J. 1990. Spontaneous and cAMP-dependent induction of a resting phase and neurite formation in cell hybrids between human neuroblastoma cells and thymidine auxotrophs of rat nerve-like cells. *Journal of Cellular Physiology* 143(3):569-76.
- Jaeger LB, Farr SA, Banks WA, Morley JE. 2002. Effects of orexin-A on memory processing. *Peptides* 23(9):1683-8.
- Jones DN, Gartlon J, Parker F, Taylor SG, Routledge C, Hemmati P, Munton RP, Ashmeade TE, Hatcher JP, Johns A and others. 2001. Effects of centrally administered orexin-B and orexin-A: a role for orexin-1 receptors in orexin-B-induced hyperactivity. *Psychopharmacology* 153(2):210-218.
- Kayaba Y, Nakamura A, Kasuya Y, Ohuchi T, Yanagisawa M, Komuro I, Fukuda Y,

- Kuwaki T. 2003. Attenuated defense response and low basal blood pressure in orexin knockout mice. *American Journal of Physiology - Regulatory Integrative & Comparative Physiology* 285(3):R581-93.
- Kilduff TS, Peyron C. 2000. The hypocretin/orexin ligand-receptor system: implications for sleep and sleep disorders. *Trends in Neurosciences* 23(8):359-65.
- Kirchgessner AL, Liu M. 1999. Orexin synthesis and response in the gut. *Neuron* 24(4):941-51.
- Kiyashchenko LI, Milevskiy BY, Lai YY, Siegel JM. 2001. Increased and decreased muscle tone with orexin (hypocretin) microinjections in the locus coeruleus and pontine inhibitory area. *Journal of Neurophysiology* 85(5):2008-16.
- Kopp C, Longordo F, Nicholson JR, Luthi A. 2006. Insufficient sleep reversibly alters bidirectional synaptic plasticity and NMDA receptor function. *Journal of Neuroscience* 26(48):12456-65.
- Korogod N, Lou X, Schneggenburger R. 2005. Presynaptic  $Ca^{2+}$  requirements and developmental regulation of posttetanic potentiation at the calyx of Held. *Journal of Neuroscience* 25(21):5127-37.
- Korotkova TM, Sergeeva OA, Eriksson KS, Haas HL, Brown RE. 2003. Excitation of ventral tegmental area dopaminergic and nondopaminergic neurons by orexins/hypocretins. *Journal of Neuroscience* 23(1):7-11.
- Kotz CM. 2006. Integration of feeding and spontaneous physical activity: role for orexin. *Physiology & Behavior* 88(3):294-301.
- Kukkonen JP, Akerman KE. 2001. Orexin receptors couple to  $Ca^{2+}$  channels different from store-operated  $Ca^{2+}$  channels. *Neuroreport* 12(9):2017-20.
- Kukkonen JP, Åkerman KEO. 2005. Intracellular Signal Pathways Utilized by the Hypocretin/Orexin Receptors Hypocretins-Integrators of Physiological Functions 221-231.
- Kukkonen JP, Holmqvist T, Ammoun S, Akerman KE. 2002. Functions of the orexinergic/hypocretinergic system. *American Journal of Physiology - Cell Physiology* 283(6):C1567-91.
- Kunii K, Yamanaka A, Nambu T, Matsuzaki I, Goto K, Sakurai T. 1999. Orexins/hypocretins regulate drinking behaviour. *Brain Research* 842(1):256-61.
- Lammers GJ, Pijl H, Iestra J, Langius JA, Buunk G, Meinders AE. 1996. Spontaneous food choice in narcolepsy. *Sleep* 19(1):75-6.
- Larsson KP, Peltonen HM, Bart G, Louhivuori LM, Penttonen A, Antikainen M, Kukkonen JP, Akerman KE. 2005. Orexin-A-induced  $Ca^{2+}$  entry: evidence for involvement of trpc channels and protein kinase C regulation. *Journal of Biological Chemistry* 280(3):1771-81.
- Lauri SE, Palmer M, Segerstrale M, Vesikansa A, Taira T, Collingridge GL. 2007.

- Presynaptic mechanisms involved in the expression of STP and LTP at CA1 synapses in the hippocampus. *Neuropharmacology* 52(1):1-11.
- Lieberman DN, Mody I. 1994. Regulation of NMDA channel function by endogenous Ca(2+)-dependent phosphatase. *Nature* 369(6477):235-9.
- Lin L, Faraco J, Li R, Kadotani H, Rogers W, Lin X, Qiu X, de Jong PJ, Nishino S, Mignot E. 1999. The sleep disorder canine narcolepsy is caused by a mutation in the hypocretin (orexin) receptor 2 gene. *Cell* 98(3):365-76.
- Liu RJ, van den Pol AN, Aghajanian GK. 2002. Hypocretins (orexins) regulate serotonin neurons in the dorsal raphe nucleus by excitatory direct and inhibitory indirect actions. *Journal of Neuroscience* 22(21):9453-64.
- Lopez M, Senaris R, Gallego R, Garcia-Caballero T, Lago F, Seoane L, Casanueva F, Dieguez C. 1999. Orexin receptors are expressed in the adrenal medulla of the rat. *Endocrinology* 140(12):5991-4.
- Lou XM, Duan GC, Chen J, Zhou Y, Hu QY, Heng ZC. 2006. Blood leptin, orexins and NPY levels and their relations in obese children. *Sichuan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban* 37(4):621-4.
- Lu WY, Jackson MF, Bai D, Orser BA, MacDonald JF. 2000. In CA1 pyramidal neurons of the hippocampus protein kinase C regulates calcium-dependent inactivation of NMDA receptors. *Journal of Neuroscience* 20(12):4452-61.
- Lubkin M, Stricker-Krongrad A. 1998. Independent feeding and metabolic actions of orexins in mice. *Biochemical & Biophysical Research Communications* 253(2):241-5.
- Lund PE, Shariatmadari R, Uustare A, Detheux M, Parmentier M, Kukkonen JP, Akerman KE. 2000. The orexin OX1 receptor activates a novel Ca<sup>2+</sup> influx pathway necessary for coupling to phospholipase C. *Journal of biological chemistry* 275(40):30806-12.
- Marcus JN, Aschkenasi CJ, Lee CE, Chemelli RM, Saper CB, Yanagisawa M, Elmquist JK. 2001. Differential expression of orexin receptors 1 and 2 in the rat brain. *Journal of comparative neurology* 435(1):6-25.
- Matsuki T, Sakurai T. 2008. Orexins and orexin receptors: from molecules to integrative physiology. *Results and problems in cell differentiation* 46:27-55.
- Mazzocchi G, Malendowicz LK, Aragona F, Rebuffat P, Gottardo L, Nussdorfer GG. 2001. Human pheochromocytomas express orexin receptor type 2 gene and display an in vitro secretory response to orexins A and B. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 86(10):4818-21.
- Mieda M, Yanagisawa M. 2002. Sleep, feeding, and neuropeptides: roles of orexins and orexin receptors. *Current Opinion in Neurobiology* 12(3):339-45.
- Mintz EM, van den Pol AN, Casano AA, Albers HE. 2001. Distribution of

- hypocretin-(orexin) immunoreactivity in the central nervous system of Syrian hamsters (*Mesocricetus auratus*). *Journal of Chemical Neuroanatomy* 21(3):225-38.
- Moriguchi T, Sakurai T, Nambu T, Yanagisawa M, Goto K. 1999. Neurons containing orexin in the lateral hypothalamic area of the adult rat brain are activated by insulin-induced acute hypoglycemia. *Neuroscience Letters* 264(1-3):101-4.
- Nakamura T, Uramura K, Nambu T, Yada T, Goto K, Yanagisawa M, Sakurai T. 2000. Orexin-induced hyperlocomotion and stereotypy are mediated by the dopaminergic system. *Brain Research* 873(1):181-7.
- Nambu T, Sakurai T, Mizukami K, Hosoya Y, Yanagisawa M, Goto K. 1999a. Distribution of orexin neurons in the adult rat brain. *Brain Research* 827(1-2):243-60.
- Nambu T, Sakurai T, Mizukami K, Hosoya Y, Yanagisawa M, Goto K. 1999b. Distribution of orexin neurons in the adult rat brain. *Brain Research* 827(1-2):243-60.
- Narita M, Nagumo Y, Hashimoto S, Narita M, Khotib J, Miyatake M, Sakurai T, Yanagisawa M, Nakamachi T, Shioda S and others. 2006. Direct involvement of orexinergic systems in the activation of the mesolimbic dopamine pathway and related behaviors induced by morphine. *Journal of Neuroscience* 26(2):398-405.
- Nishino S, Ripley B, Overeem S, Lammers GJ, Mignot E. 2000. Hypocretin (orexin) deficiency in human narcolepsy. *Lancet* 355(9197):39-40.
- Pedrazzoli M, D'Almeida V, Martins PJ, Machado RB, Ling L, Nishino S, Tufik S, Mignot E. 2004. Increased hypocretin-1 levels in cerebrospinal fluid after REM sleep deprivation. *Brain Research* 995(1):1-6.
- Peyron C, Tighe DK, van den Pol AN, de Lecea L, Heller HC, Sutcliffe JG, Kilduff TS. 1998. Neurons containing hypocretin (orexin) project to multiple neuronal systems. *Journal of Neuroscience* 18(23):9996-10015.
- Philpot BD, Espinosa JS, Bear MF. 2003. Evidence for altered NMDA receptor function as a basis for metaplasticity in visual cortex. *Journal of Neuroscience* 23(13):5583-8.
- Pu S, Jain MR, Kalra PS, Kalra SP. 1998. Orexins, a novel family of hypothalamic neuropeptides, modulate pituitary luteinizing hormone secretion in an ovarian steroid-dependent manner. *Regulatory Peptides* 78(1-3):133-6.
- Rosenmund C, Feltz A, Westbrook GL. 1995. Calcium-dependent inactivation of synaptic NMDA receptors in hippocampal neurons. *J Neurophysiol* 73(1):427-30.
- Rycroft BK, Gibb AJ. 2004. Inhibitory interactions of calcineurin (phosphatase 2B) and calmodulin on rat hippocampal NMDA receptors. *Neuropharmacology*

47(4):505-14.

- Sakamoto F, Yamada S, Ueta Y. 2004. Centrally administered orexin-A activates corticotropin-releasing factor-containing neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus and central amygdaloid nucleus of rats: possible involvement of central orexins on stress-activated central CRF neurons. *Regulatory Peptides* 118(3):183-91.
- Sakurai T, Amemiya A, Ishii M, Matsuzaki I, Chemelli RM, Tanaka H, Williams SC, Richardson JA, Kozlowski GP, Wilson S and others. 1998a. Orexins and orexin receptors: a family of hypothalamic neuropeptides and G protein-coupled receptors that regulate feeding behavior. *Cell* 92(4):573-85.
- Sakurai T, Amemiya A, Ishii M, Matsuzaki I, Chemelli RM, Tanaka H, Williams SC, Richardson JA, Kozlowski GP, Wilson S and others. 1998b. Orexins and orexin receptors: a family of hypothalamic neuropeptides and G protein-coupled receptors that regulate feeding behavior. *Cell* 92(5):1 page following 696.
- Schuld A, Hebebrand J, Geller F, Pollmacher T. 2000. Increased body-mass index in patients with narcolepsy. *Lancet* 355(9211):1274-5.
- Selbach O, Doreulee N, Bohla C, Eriksson KS, Sergeeva OA, Poelchen W, Brown RE, Haas HL. 2004. Orexins/hypocretins cause sharp wave- and theta-related synaptic plasticity in the hippocampus via glutamatergic, gabaergic, noradrenergic, and cholinergic signaling. *Neuroscience* 127(2):519-28.
- Shirasaka T, Nakazato M, Matsukura S, Takasaki M, Kannan H. 1999. Sympathetic and cardiovascular actions of orexins in conscious rats. *American Journal of Physiology* 277(6 Pt 2):R1780-5.
- Smart D, Sabido-David C, Brough SJ, Jewitt F, Johns A, Porter RA, Jerman JC. 2001. SB-334867-A: the first selective orexin-1 receptor antagonist. *British Journal of Pharmacology* 132(6):1179-82.
- Spinazzi R, Andreis PG, Rossi GP, Nussdorfer GG. 2006. Orexins in the regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Pharmacological Reviews* 58(1):46-57.
- Spinazzi R, Ziolkowska A, Neri G, Nowak M, Rebuffat P, Nussdorfer GG, Andreis PG, Malendowicz LK. 2005. Orexins modulate the growth of cultured rat adrenocortical cells, acting through type 1 and type 2 receptors coupled to the MAPK p42/p44- and p38-dependent cascades. *International Journal of Molecular Medicine* 15(5):847-52.
- Stadel JM, Wilson S, Bergsma DJ. 1997. Orphan G protein-coupled receptors: a neglected opportunity for pioneer drug discovery. *Trends in Pharmacological Sciences* 18(11):430-7.
- Takahashi N, Okumura T, Yamada H, Kohgo Y. 1999. Stimulation of gastric acid secretion by centrally administered orexin-A in conscious rats. *Biochemical &*



- Biophysical Research Communications 254(3):623-7.
- Telegdy G, Adamik A. 2002a. The action of orexin A on passive avoidance learning. Involvement of transmitters. *Regulatory Peptides* 104(1-3):105-10.
- Trivedi P, Yu H, MacNeil DJ, Van der Ploeg LH, Guan XM. 1998. Distribution of orexin receptor mRNA in the rat brain. *FEBS Letters* 438(1-2):71-5.
- Uramura K, Funahashi H, Muroya S, Shioda S, Takigawa M, Yada T. 2001. Orexin-a activates phospholipase C- and protein kinase C-mediated Ca<sup>2+</sup> signaling in dopamine neurons of the ventral tegmental area. *Neuroreport* 12(9):1885-9.
- van den Pol AN. 1999. Hypothalamic hypocretin (orexin): robust innervation of the spinal cord. *Journal of Neuroscience* 19(8):3171-82.
- Wang C, Wang HG, Xie H, Pitt GS. 2008. Ca<sup>2+</sup>/CaM controls Ca<sup>2+</sup>-dependent inactivation of NMDA receptors by dimerizing the NR1 C termini. *Journal of Neuroscience* 28(8):1865-70.
- Wayner MJ, Armstrong DL, Phelix CF, Oomura Y. 2004. Orexin-A (Hypocretin-1) and leptin enhance LTP in the dentate gyrus of rats in vivo. *Peptides* 25(6):991-6.
- Wayner MJ, Chitwood R, Armstrong DL, Phelix C. 1997a. Ethanol affects hypothalamic neurons projecting to the hippocampus and inhibits dentate granule cell LTP. *Alcohol* 14(1):1-7.
- Wayner MJ, Phelix CF, Armstrong DL. 1997b. Lateral hypothalamic stimulation inhibits dentate granule cell LTP: direct connections. *Brain Research Bulletin* 43(1):5-15.
- Wijker M, Wszolek ZK, Wolters EC, Rooimans MA, Pals G, Pfeiffer RF, Lynch T, Rodnitzky RL, Wilhelmsen KC, Arwert F. 1996. Localization of the gene for rapidly progressive autosomal dominant parkinsonism and dementia with pallido-ponto-nigral degeneration to chromosome 17q21. *Human Molecular Genetics* 5(1):151-4.
- Wilhelmsen KC, Lynch T, Pavlou E, Higgins M, Nygaard TG. 1994. Localization of disinhibition-dementia-parkinsonism-amyotrophy complex to 17q21-22. *American Journal of Human Genetics* 55(6):1159-65.
- Yamanaka A, Beuckmann CT, Willie JT, Hara J, Tsujino N, Mieda M, Tominaga M, Yagami K, Sugiyama F, Goto K and others. 2003. Hypothalamic orexin neurons regulate arousal according to energy balance in mice. *Neuron* 38(5):701-13.
- Yamanaka A, Tsujino N, Funahashi H, Honda K, Guan JL, Wang QP, Tominaga M, Goto K, Shioda S, Sakurai T. 2002. Orexins activate histaminergic neurons via the orexin 2 receptor. *Biochemical & Biophysical Research Communications* 290(4):1237-45.
- Yang B, Samson WK, Ferguson AV. 2003. Excitatory effects of orexin-A on nucleus tractus solitarius neurons are mediated by phospholipase C and protein kinase C.

Journal of Neuroscience 23(15):6215-22.

Zhang W, Sakurai T, Fukuda Y, Kuwaki T. 2006. Orexin neuron-mediated skeletal muscle vasodilation and shift of baroreflex during defense response in mice. American Journal of Physiology - Regulatory Integrative & Comparative Physiology 290(6):R1654-63.

Zhu Y, Miwa Y, Yamanaka A, Yada T, Shibahara M, Abe Y, Sakurai T, Goto K. 2003. Orexin receptor type-1 couples exclusively to pertussis toxin-insensitive G-proteins, while orexin receptor type-2 couples to both pertussis toxin-sensitive and -insensitive G-proteins. Journal of Pharmacological Sciences 92(3):259-66.

