


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

Carisbamate (RWJ-333369) 在大鼠齒回

抑制突觸前麩胺酸釋放

Carisbamate (RWJ-333369) Inhibited Presynaptic Glutamate
Release in Rat Dentate Gyrus

The logo of National Taiwan University, featuring a circular emblem with a central figure and the university's name in Chinese characters around the perimeter.

施建誠

Chien-Cheng Shih

指導教授：劉宏輝 博士

Advisor: Horng-Huei Liou, M.D., Ph.D.

中華民國 97 年 7 月

July, 2008

國立臺灣大學碩士學位論文
口試委員會審定書

Carisbamate (RWJ-333369) 在大鼠齒回抑制突觸前麩胺酸釋放

Carisbamate (RWJ-333369) Inhibited Presynaptic Glutamate
Release in Rat Dentate Gyrus

本論文係施建誠君 (R95443001) 在國立臺灣大學藥理學研究所
完成之碩士學位論文，於民國 97 年 7 月 1 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：

劉嘉輝

(簽名)

(指導教授)

閔明源

蔡明正

蘇銘嘉

系主任、所長

黃德富

(簽名)

目 錄

頁次

誌謝	i
縮寫表	iii
中文摘要	iv
英文摘要	vi
第一章 導論	1
第二章 實驗材料及方法	20
第一節 實驗材料	20
第二節 實驗方法	23
第三章 結果	28
第一節 電流引發之 AMPA/NMDA 參與興奮性突觸後電流具有專一性	28
第二節 Carisbamate 抑制 AMPA/NMDA 參與之興奮性突觸後電流	29
第三節 Carisbamate 高濃度對 PPR 產生抑制作用	29
第四節 Carisbamate 無法影響胞外給予 AMPA 引發之電流	30
第五節 Carisbamate 對於 mEPSC _{AMPA} 的電流大小和頻率皆無影響	31
第六節 Nimodipine 無法遮蔽 carisbamate 在突觸前產生的抑制作用	31
第四章 討論	33
第五章 結論	44
圖表	45
參考文獻	61

誌謝

從踏進藥理所那刻開始，七百三十天默默的流逝，直到論文口試結束後才赫然發現自己即將離開台大。對於自己能在有興趣的領域中學習、在神經領域深入瞭解、實作和辯論，感到相當慶幸。而念研究所就像登一座山，在攻頂的那一瞬間才知道值不值得，只有站在山頂才能看的更遠，也唯獨下山才能再次征服另一個山頭。

在這條攀爬的路上，感謝指導教授劉宏輝老師的鞭策，讓我在學術上的視野倍增；感謝口試委員蔡明正教授、蘇銘嘉教授、和閔明源教授，在口試時給予寶貴的意見；感謝君曜學長，一手栽培懵懂無知的我，使我最後可以在口試時侃侃而談。除了在實驗上給予指導，也在私底下給了許多建議，獲益良多，可以說沒有你就沒有這本論文，相信你一定會一一克服未來的難關，順利畢業；感謝建興學長，永遠在摸不著頭緒的時候伸出援手，並提醒著實驗室的大小事。畢業後前程似錦，以你精實的實驗精神，想必會一路順利；也感謝所有實驗室的夥伴：廷珊學姊、靚娟學姊、蕙如、校華和斐怡，一起坐過圓桌的革命情感，我永遠不會忘。

感謝永遠的好鄰居，邱老師實驗室的所有人，在這兩年來互相幫忙、打氣、在學術上交換意見、忍受我無端的闖入實驗室且神通廣大的提供涵蓋食衣住行育樂的全方面建議；我的好伙伴家旭，跟你討論電生理的知識是我這兩年學習上最愉快的事，而且還成功說服我走進班上，相信以你樂觀的個性未來無論在何處發展都會很順利；感謝彥昱學長，總在實驗鬼打牆時提醒我面對實驗的態度，替我解釋所有的可能性；

還有欣蓉大總管打點好所有的事情，連我也不例外，使我感受到實驗室的溫暖；特別感謝心慈學妹，在儀器出狀況時鼎力相助；感謝林泰元老師家的佑名，我永遠的高中同學兼樂團夥伴，很高興能重新同窗，兩年過得很快，希望你順利畢業且軍旅生活平安；感謝符老師家的學長姊們，尤其是鴻祺大學長和大宇學長教會我所有處理動物的技術，打好我這兩年實驗的基礎。祝大家未來實驗順利，在學術上或事業上更有斬獲。

感謝樂團的朋友們，讓音樂持續豐富我的精神，在繁忙的實驗生活中作為調劑，也在我忙碌時伸出援手處理行政事務。還要感謝父母多年來精神上以及經濟上的支持，並把兩小波、小皮兩隻貓照顧的肥肥胖胖，即便未來湧泉以報，也無法與你們的付出相比；還有曉寒，謝謝你接納我的忙碌以及情緒，給予我受用的建議，並在我身體不適時陪伴著我，你是我完成論文的原動力。

最後要感謝所有為實驗犧牲的動物，生命的價值在此展現。對我而言，踏入神經領域讓，比一般人更能理解這靈魂的居所，是我從小的夢想。而此時此刻，神經科學的大門因應而開，真是再幸福不過。此時即將離開這座山頂，踏上新的旅程，相信這兩年不會是我學術生涯只是個開端。希望不久將來，能繼續在學術領域付出，探究生命的奧秘。

縮寫表

AMPA	α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionic acid
CA	cornu ammonis
DG	dentate gyrus
EC	entorhinal cortex
eEPSC	evoked excitatory post-synaptic current
GABA	gamma-aminobutyric acid
mEPSC	miniature excitatory post-synaptic current
NMDA	N-methyl-D-aspartic acid
PPF	paired-pulse facilitation
PPR	paired-pulse ratio
SE	status epilepticus
TLE	temporal lobe epilepsy
TTX	tetrodotoxin

摘要

Carisbamate (RWJ-333369) 為一新的神經作用藥物，在癲癇動物模型上展現廣效的抗癲癇作用，但其抗癲癇機轉仍未明。本論文研究 carisbamate 在大鼠海馬回齒回突觸的藥理作用，利用全細胞膜片箝制技術 (whole-cell patch clamp) 記錄齒回顆粒狀細胞 (dentate granule cell) 的突觸後興奮性電位 (excitatory postsynaptic current) 變化，評估 carisbamate 在本腦區對突觸傳導的影響。

本實驗使用年齡三週的大鼠所製備之冠狀腦切片，在齒回外側的 molecular layer 給予 0.1 Hz 的電刺激，於 perforant pathway 至齒回顆粒狀細胞的突觸前引發動作電位，並於突觸後顆粒狀細胞記錄 glutamate 活化 α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionic acid (AMPA) 受體或 N-methyl-D-aspartic acid (NMDA) 受體所產生之電流。利用 whole-cell patch clamp 技術，記錄位於 Wistar 大鼠的 hippocampus 活體腦切片中 DG 的 granule cell 上由 glutamate 所引發的電流，藉由不同受體的阻斷劑，分離出 AMPA 受體和 NMDA 受體參與之電流並分析之。另外搭配不同的電生理技術，區分藥物的在突觸的作用位置。由於 glutamate 釋放受到鈣離子通道所調控，藉由同時投予鈣離子通道阻斷劑以及 carisbamate 藥物來評估鈣離子通道的作用。

結果顯示 carisbamate 對這兩類受體所引發之興奮性電位皆展現濃度依賴性的抑制效果；另外，100 μ M carisbamate 會抑制 AMPA 受體在配對刺激 (paired-pulse) 下的性質，降低配對刺激比率 (paired-pulse ratio)。30 及 100 μ M 的 carisbamate 不會對胞外給予 AMPA 所引發之電流產生影響，也不會影響在 TTX 存在下的 AMPA 最小興奮性電流 (miniature excitatory postsynaptic current)。另外，抑制 L-type 鈣離子通道無法遮蔽 carisbamate 的抑制作用，顯示該藥物的抑制作用並非透過 L-type 鈣離子通道。結果顯示 (1) carisbamate 確實會抑制 glutamate 受體所引發之興奮性電位並展現濃度依賴性的抑制作用。(2) carisbamate 以一個相近的比例抑制 AMPA 或 NMDA 引發的興奮性電流，抑制配對刺激比率，不會影響胞外給予 AMPA 引發之電流，且對最小興奮性電流的電流大小不會產生抑制。因此，評估 carisbamate 的抑制作用來自抑制突觸前減少 glutamate 釋放。(3) carisbamate 的抑制作用不是透過 L-type 鈣離子通道而來。

DG 長久以來和癲癇症，特別是顳葉癲癇症具有高度相關性。顳葉癲癇症會改變 DG 調控 hippocampus 的能力，使癲癇發作閾值降低。Glutamate 為 entorhinal cortex 傳入 DG 的主要興奮性神經傳遞物質，carisbamate 抑制突觸前 glutamate 釋放被視為抑制外來興奮性訊號的傳遞，減少外界興奮性刺激 hippocampus，降低癲癇發作的機會。此突觸前的抑制作用被認為是 carisbamate 抗癲癇作用的之一。

Abstract

Carisbamate (RWJ-333369) is a novel neuromodulator and shows a broad spectrum antiepileptic activity. We suggest that this neuroprotection effect might act through the regulation of excitatory synaptic transmission on DG. Our research evaluated its effect on excitatory signal transmission to dentate gyrus (DG) granule cell in rat hippocampus slice by whole-cell patch clamp technique.

Evoked AMPA/NMDA receptor-mediated excitatory postsynaptic currents (eEPSC_{AMPA/NMDA}) were recorded by whole-cell patch-clamp recording from the granule cells of DG in brain slice preparation of young Wistar rats (60-120 g, P21). We also used paired-pulse stimulation, exogenous AMPA application and AMPA receptor-mediated miniature EPSC (mEPSC_{AMPA}) recording to evaluate the effects of carisbamate. Our results showed that carisbamate inhibited eEPSC_{AMPA/NMDA} in a concentration-dependent manner. The decrease of paired-pulse ratio in 100 μ M at 50 and 100 ms interval suggests that carisbamate acts presynaptically to reduce AMPA-receptor mediated current from perforant pathway. The response to exogenous AMPA application and mEPSC recording in the


presence of TTX also showed that carisbamate had no effect on AMPA receptor. Furthermore, L-type Ca^{2+} channel blocker didn't mask the reduction of $\text{eEPSC}_{\text{AMPA}}$ by 100 μM carisbamate.

DG plays an important role in epilepsy, especially in temporal lobe epilepsy (TLE). The ability to regulate hippocampus is attenuated in TLE, which makes the seizure threshold lower. The inhibition of presynaptic glutamate release by carisbamate may contribute to its antiepileptic action.



第一章 導論

癲癇症 (epilepsy)



癲癇症是一種常見的神經疾病，涵蓋各年齡層，從新生兒到老年人都有機會發生。癲癇症大約影響全球人口的1-2% (McNamara, 1999)，許多國家的地區性研究顯示流行率在4/1000-10/1000間 (ILAE, 1997; Forsgren *et al.*, 2005)。後者顯示在歐洲地區孩童及青少年的癲癇大約有九十萬人 (流行率為4.5-5.0/1000)，20至64歲為一百九十萬人 (流行率為6/1000)，六十五歲以上為六十萬人 (流行率為7/1000)。台灣針對基隆市癲癇病患流行病學之研究顯示，該市30歲以上持續有發作的癲癇病患，佔其人口中的2.77/1000 (Chen *et al.*, 2006)。由於癲癇症的發作無法預期，生命受到癲癇引起的突發性意外所威脅，壽命也較正常人短。病患有明顯的神經性、精神性以及社會性的不正常，職業受到限制，結婚機率降低，生活品質下降，因此癲癇症病患的病情控制一直是很重要的議題。

根據 International League Against Epilepsy (ILAE) 在 1981 對癲癇症的分類根據臨床特徵將分成兩類：(1) partial 和 (2) generalized seizure。(1) Partial seizure 起

始於一小群神經細胞，該群細胞被認為是癲癇發作焦點（seizure focus），因此依照不同腦區的特性，表現的臨床症狀就以該處的特性為主。Partial seizure 可分為 simple partial（不伴隨意識改變）和 complex partial（伴隨意識改變）。發作時可能導致局部行動異常，如手部抽動；也可能由 partial seizure 發展至全身性的 tonic-clonic 發作，稱為 secondarily generalized tonic-clonic seizure。Partial seizure 發作前會產生一些不正常的感覺、恐懼、甚至聞到異位，這些都被稱為發作前的預兆（auras）。預兆的產生歸因於癲癇發作焦點的電生理異常，反應出 partial seizure 發作早期癱兆。（2）Generalized seizure 則不會歷經預兆，也不由局部的癲癇發作焦點引發，而是兩個大腦半球同時發作。其中可以區分為痙攣（convulsive）和非痙攣（nonconvulsive）兩種。痙攣發作為典型的 generalized seizure，有 myoclonic、clonic、tonic 和 tonic-clonic 幾種。非痙攣發作最典型的則是好發在兒童的失神性癲癇症（absence seizure）。除了癲癇引發的神經病變外，這些臨床症狀也增加了癲癇病患日常生活中的風險。



癲癇形成的原因很多，舉凡外傷、腦瘤、中風、腦炎和遺傳，任何直接或間接對腦部的傷害，都有可能引發癲癇。上述原因造成腦部不正常放電，會引起某些暫時性的異常行為或症狀。病患的腦部較易興奮，易引發的神經網路自行放電，近而癲癇發作（Lothman *et al.*, 1991; Duncanet *et al.*, 2006）。發作時，中樞神經細胞不正常的節律同步放電，引起部份或全腦性的腦部電位異常，導致行為上的各種症狀，如抽搐、失神、幻覺、錯覺或行為異常（McNamara, 1999）。一般認為，腦部的訊息傳遞功能依賴興奮性和抑制性神經物質傳遞，會在兩者間維持平衡。當癲癇發作時，興奮性的神經連結引發更多的興奮性神經傳遞物質釋放，同時抑制性的系統也失去控制神經細胞引發動作電位的能力，因而演變為癲癇發作。

由於無預警的發作是癲癇的特色，對病患生活品質造成嚴重影響，也衝擊病患的社經能力（Lothman *et al.*, 1991; Murray *et al.*, 1996），於此，醫療介入控制病情相當重要。新抗癲癇藥物的開發和外科介入治療已經有長足進展，市面上常用 20 多種抗癲癇藥物有 8 種藥是過去十年間所開發（附表一）。經過臨床調查，仍有 40% 的病人屬於難治型癲癇症。這類病患對一般的抗癲癇藥物反應不佳，對於合併兩種以上的藥物治療失敗。因而研究新的抗癲癇機轉及開發新的抗癲癇藥物勢在必行（Brodie, 2005; French, 2007）。

抗癲癇藥物及其機轉

癲癇發作難以預測，發作時重則危及生命。因此癲癇病患需要長期接受治療以控制病情。治療上主要以藥物控制為主，只有在藥物控制失敗的情形下才會考慮非藥物治療。抗癲癇藥對 60-70% 的病患有效，目標在有限的副作用下控制癲癇發作，並降低發病率和致死率。

廣泛使用的抗癲癇藥物中，依照機轉可分為四大類：第一類、藥物藉由抑制神經元上電位依賴型的鈉離子通道（voltage-dependent sodium channel）以降低神經興奮性，代表藥物為 carbamazepine、oxcarbazepine、lamotrigine、phenytoin 等。電位依賴型的鈉離子通道是神經細胞上負責動作電位的離子通道，在產生動作電位後會進入不活化態（inactivation），此類藥物可將電位依賴型鈉離子通道固定不活化態，因此可降低動作電位發生的頻率（Wickenden, 2002; Armijo *et al.*, 2005）；第二類藥物增強 GABAergic 神經傳導物質的作用，以抑制神經的興奮性，代表藥物為 benzodiazepines、barbiturates、tiagabine、vigabatrin 等。GABA 為中樞神經最重要的抑

制性神經傳導物質，bezodiazepin及phenobarbital增強GABA_A受體的功能，促進其抑制神經興奮性（Macdonald and Kelly, 1994）。

第三類抗癲癇藥物會作用在鈣離子通道上，像 ethosuximide 作用在 T-type 的鈣離子通道而對 absence seizures 產生療效（Walker *et al.*, 2004）。Gabapentin 和 pregabalin 亦被認為會作用在突觸前的電位依賴型鈣離子通道，影響鈣離子流入而調節神經傳遞物質的釋放。第四類藥物則是透過抑制 glutamate 釋放，如 lamotrigine、levetiracetam；或是抑制 glutamate 受體，像是 topiramate，而產生作用。由於 glutamate 是中樞神經中重要的興奮性神經傳遞物質，當 glutamate 參與的興奮性訊號受到抑制，會降低神經興奮性。因此，兩種作用皆會抑制神經的興奮性訊號傳遞而產生抗癲癇作用。此外，有的藥物可能透過更有效率的方式，如 levetiracetam 結合突觸前 vesicular protein 影響調節突觸前的神經傳遞物質釋放（Lynch *et al.*, 2004）。

現今對抗癲癇藥物的開發主要有兩個方向，一是研發全新結構的抗癲癇藥物，二是合成目前臨床上使用的抗癲癇藥物之衍生物，如 carisbamate（Bialer *et al.*, 2007）。除了開發新一代的抗癲癇藥物外，尋找新的抗癲癇藥物作用標的以及降低細胞興奮性的基因療法等相關研究也正在積極進行中。

Carisbamate (RWJ-333369)

Carisbamate (RWJ-333369) 為一新的神經作用藥物，由SK-Biopharmaceuticals研發後，現在由Johnson & Johnson下的Pharmaceutical Research & Development L.L.C. 繼續進行研究。該藥已經完成第二期臨床實驗進入第三期，以治療癲癇症為主要目標（Bialer *et al.*, 2007）。Carisbamate被評估為一個新的抗癲癇藥物，在癲癇症的動物

實驗展現廣效的抗癲癇的能力，ED₅₀的區間大約在 5-60 mg/kg (White *et al.*, 2006; Novak *et al.*, 2007)。對於急性齧齒類動物模型包含maximal electroshock (MES)、pentylenetetrazole (PTZ)、bicuculline和picrotoxin或是audiogenic seizures，都展現治療的活性，因此具有相當的治療潛力。

在小鼠上，Carisbamate在maximal electroshock (MES)和pentylenetetrazole (PTZ)-induced seizure的動物模型測試中都具有活性。MES屬於電刺激引發的generalized seizure的動物模式，可在短時間引發tonic-clonic seizure。PTZ是GABA的antagonist，有別於GABA受體阻斷劑，一樣會在短時間引發generalized tonic-clonic seizure。兩者常用來做抗癲癇藥物的初步評估。Carisbamate也會在bicuculline和picrotoxin引發的seizure也展現抗癲癇能力。Bicuculline及picrotoxin都是GABA_A受體的阻斷劑，注射後會產生較長時間的 tonic-clonic seizure (Rogawski, 2006; Bialer *et al.*, 2007)；該藥能減低在corneal kindling model發作後的嚴重程度，也會降低hippocampus kindling model發作後的嚴重程度和再發作的次數 (Rogawski, 2006; Bialer *et al.*, 2007)；Carisbamate在兩個absence seizure的動物模式：Genetic absence epilepsy rat from strasbourg (GAERS)和Wistar audiogenic sensitive (AS) rat皆有作用 (Nehlig *et al.*, 2008)；最後，carisbamate能抑制kainate引發癲癇後的再發作 (Grabenstatter and Dudek, 2004)，也能抑制Li-pilocarpine引發的癲癇，降低神經細胞損失或劑量依賴性的延後或預防spontaneous recurrent seizures的發展 (André *et al.*, 2005)。

由於carisbamate (S-2-O-carbamoyl-1-o-chlorophenyl-ethanol)為一個含carbamate官能基的藥物 (附圖一)，衍生自另一個臨床使用之抗癲癇藥物felbamate。雙carbamate官能基的felbamate屬於一種廣效性的抗癲癇藥物，會在培養的神經細胞上抑

制 repetitive spike firing，被認為會調節電位依賴性的鈉離子通道（White *et al.*, 1992），但 felbamate 需要在極高的濃度才會和鈉離子通道結合（Tagliatela *et al.*, 1996）。Felbamate 也會抑制高電位活化的鈣離子電流，但此作用如何產生保護能力仍未知。在治療的血中濃度下，felbamate 會異位調節 GABA_A 受體（Rho *et al.*, 1994; Kume *et al.*, 1996）。除此之外，felbamate 在濃度 100 μM 的情形下會阻斷 NMDA 受體參與的突觸反應（Pugliese *et al.*, 1996），而且會在分離的神經細胞上抑制 NMDA 受體電流（Rho *et al.*, 1994; Subramaniam *et al.*, 1995; Kuo *et al.*, 2004）。但該藥受限於血液以及肝毒性，增加體內 aldehyde（atropaldehyde or 2-phenylpropenol）（Thompson *et al.*, 2000），臨床上使用範圍減少。後續開發的衍生物 fluorofelbamate，以一個氟取代 2-position 上的氫，而 carisbamate 為單一 carbamate 的化合物，苯環上帶有一個氯，兩個藥物皆可以防止 aldehyde 的產生而沒有以上副作用。

Felbamate 具有廣效性的抗癲癇作用與 carisbamate 類似，而兩者的結構相似，因此在後者的研究上可參考之前的研究，發掘是否有雷同之處。實驗證明，carisbamate 會在 *in vitro* 的 hippocampus 神經細胞，抑制 spontaneous recurrent epileptiform discharges（SREDS）和 depolarization-induced sustained firing（SRF）。顯示 carisbamate 可能作用於抑制鈉離子通道或改變細胞內鈣離子⁺平衡。鎂離子處理過的 hippocampus 細胞模型 spontaneous recurrent epileptiform discharges（SREDS）上，會觀察到 carisbamate 具有抑制 SREDS 的能力。在該實驗中，會於實驗前 24 小時前將培養之 SD rats hippocampus 細胞預先以低鎂離子的紀錄溶液處理。低鎂離子的紀錄溶液會使 NMDA 受體過度興奮，影響細胞內鈣離子，造成細胞自發性放電。因此，carisbamate（100 μM）被認為可以透過調控細胞內鈣離子平衡，抑制這類的自發性放電。另外，carisbamate 會抑制細胞去極化引發的 sustained repetitive firing（SRF），降低引發的 spike 數量。先前的實驗證明，phenytoin、carbamazepine、valproic acid 和 lamotrigine 都

會抑制SRF，因此該實驗認為carisbamate除了影響細胞內鈣離子濃度外，也會抑制電位依賴型鈉離子通道（Deshpande *et al.*, 2008a,b）。

Carisbamate 在顳葉癲癇症（temporal lobe epilepsy）的治療作用

Carisbamate 被評估為廣效的抗癲癇藥物，雖然已經進入第三期臨床實驗，詳細的作用機轉仍屬未知。在臨床前實驗的動物實驗評估中，carisbamate 對於以下三種顳葉癲癇（Temporal lobe epilepsy, TLE）的動物模式具有療效，分別為 hippocampus kindling model、kainate 和 Li-pilocarpine model。Hippocampus kindling 被認為是 TLE 的動物模式（Goddard, 1967）多年，廣泛的用作癲癇藥物的評估，許多臨床上能有效治療 TLE 的藥物皆能抑制 limbic foci 引發的 kindling 模型，如 phenytoin、lamotrigine 及 carbamazepine 會提高發作 threshold，而 valproate、tiagabine、diazepam 增加 GABA / benzodiazepine 的作用，阻止 seizure 的惡化跟產生（Morimoto *et al.*, 1997a,b; Otsuki *et al.*, 1998）。Carisbamate 能降低 hippocampus kindling model 發作後的嚴重程度和再發作的次數，顯示該藥對 TLE 具治療潛力。

Li-pilocarpine 和 kainate 引發癲癇發作屬於另外一種 TLE 的動物模式，稱作「重積性癲癇動物模式（status epilepticus model）」。透過給予藥物，如 pilocarpine 或 kainate，可以在實驗動物上引發重積性癲癇。重積性癲癇指癲癇持續發作一段時間（5-10 分鐘），或是在 30 分鐘內反覆發作的嚴重情形。最後會用 diazepam 或 barbital 類藥物終止。研究者感興趣的部份在於重積性癲癇發作後所引發的 spontaneous seizures，因此這類動物模式又被稱作「後重積性癲癇引發之顳葉癲癇模型（post-status epilepticus models of TLE）」（Morimoto *et al.*, 2004）。給予 Li-pilocarpine 引發 SE 後伴隨著 14~25 天的不發作期，此時 hippocampus 和 dentate gyrus

間的 hilus 會造成神經損傷及神經迴路再塑造，這些神經細胞損失及新生的興奮性迴路將造成慢性期的癲癇自發性復發，並持續終生。Carisbamate 被證實對於 Li-pilocarpine 引發造成的 hippocampus 神經細胞損傷有保護作用，並可以抑制不發作期的病變，使不發作期延長或阻止癲癇症形成 (André *et al.*, 2005)。在 kainate 引發的 SE 動物模型中，carisbamate 可以依照劑量相關性有效抑制癲癇發作，並且與 topiramate 相較之下有更好的藥效。根據 Racine 在 1972 年對實驗動物所做的 seizure 分級，carisbamate 在 30 μ M 下對 class III 以上的 seizure 抑制作用接近 100% (Grabenstatter and Dudek, 2008)。顯示 carisbamate 無論在 Li-pilocarpine 或 kainate 引發的 TLE 皆能有效抑制癲癇發作。

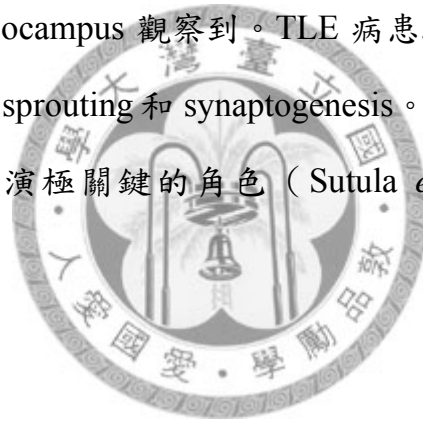


Hippocampus 在癲癇症所扮演之角色

在 TLE 的研究中，hippocampus 和 TLE 具有高度的關聯性。Carisbamate 在 TLE 動物模式展現抗癲癇作用，使我們推測 carisbamate 在 hippocampus 展現某些藥理作用，因此 hippocampus 為本實驗所重視之。

Hippocampus 與癲癇症之間的關係穩固且有相當的歷史，甚至可以追溯到 hippocampus 最早的研究。在初期的 hippocampus 研究，發現該腦區會表現 seizure-like 模式 (Green and Petsche, 1961; Purpura *et al.*, 1966; Andersen and Lømo, 1969)。後續的實驗更發現 hippocampus 表現的 epileptiform activity 會對注射抗癲癇藥物產生反應 (McIntyre and Racine, 1986)，證明 hippocampus 和 epilepsy 具有相當程度的關聯性。在手術治療上，顳葉切除也廣泛用來治療 TLE (Feindel, 1993)。

TLE 屬於 partial seizure 的一種，病患的癲癇發作位置通常在顳葉內側組織 (mesial temporal structures)，像是 hippocampus 或 amygdala (Engel, 1996)。病人無可避免會經歷熱性痙攣 (febrile seizures) 或是重積性癲癇 (status epilepticus, SE)。組織學研究也顯示，在 TLE 病患身上可看到 hippocampus 的病變，(Babb *et al.*, 1991; Sutula *et al.*, 1989)。TLE 病患的常見病理特徵是在顳葉形成「顳葉內側硬化 (mesial temporal sclerosis, MTS)」，對神經系統造成損傷。約三分之二的病患在 hippocampus 或其他顳葉組織會觀察到，特徵是神經膠質細胞纖維化 (gliosis) 和神經細胞數量減少。核磁共振造影 (MRI) 顯示 hippocampus 萎縮，正子放射型電腦斷層攝影 (PET) 顯示該區血流量或 glucose 代謝降低。除了觀察到這類退化現象，癲癇引起的神經新生可在 hippocampus 觀察到。TLE 病患經手術後切除的 hippocampus 組織可以觀察到 mossy fiber sprouting 和 synaptogenesis。因此，hippocampus 被認為在 TLE 的發生以及病因上扮演極關鍵的角色 (Sutula *et al.*, 1989; Mikkonen *et al.*, 1998)。



Dentate Gyrus 在癲癇症所扮演之角色

Dentate gyrus (DG) 為 hippocampus 相當重要之腦區，除了本身會調控傳入 hippocampus 的興奮性訊號而影響 hippocampus，也與 TLE 有高度關連性。原因由下列詳述之。

DG 屬於 hippocampus 的一部分，從解剖學的角度觀察 hippocampus 可分為 DG 及 cornu ammonis (CA) 區域兩大部分 (附圖二)。而後者又可區分為三個子區域：CA1-3。其中以 DG、CA1 和 CA3 最容易區分，CA2 則因缺乏型態上的特徵及特殊的 interneuron，常忽略而歸入 CA3 之中。DG 的 principle cell 為 granule cell，而 CA1

和 CA3 的 principle cell 是 pyramidal cell，皆受外來興奮性訊息的刺激和周圍 interneuron 的調控。在 hippocampus 中，大部分的訊息傳遞途徑為單向，entorhinal cortex (EC) 為 DG 提供主要的訊息傳入，被認為是 intrahippocampal trisynaptic loop 的第一階段。而傳入 DG 後不會回傳至 EC，該路徑稱作 perforant pathway。Perforant pathway 傳入 DG 的 molecular layer，與 principal cell 的 dendrite 相接。之後，訊息從 dentate granule cell 經 hilus 傳入 CA3，形成 trisynaptic loop 的第二階段。最後，CA3 的 pyramidal cell 再將訊息經 CA3-CA1 的路徑 (Schaffer collaterals) 傳入 CA1，完成一個 intrahippocampal trisynaptic loop。而訊息最後會經 CA1 的 pyramidal cell 傳至 EC 或 subicular complex (Amaral *et al.*, 2007) (附圖三)。

由於 DG 是外界訊息傳入 hippocampus 的第一關，解剖學及生理學上介於 EC 及 CA3 之間，而視該區為調控 hippocampus 的關鍵區域。傳統上認為，DG 會扮演門閥的角色，阻斷或篩選來自 EC 的興奮性訊號，調節 hippocampus 的興奮性。早期的實驗顯示顯示 DG 會限制特定長度和特定頻率的刺激 (Andersen *et al.*, 1966)。之後的實驗證明，在注射藥物引起的 EC discharge 會受到限制癲癇的發作，並限制其影響範圍 (Collins *et al.*, 1983)。一般認為，DG 的特性來自於本身具有較高的靜止膜電位和周圍含有大量的 GABAergic 細胞所致。在正常情形下，DG 可以阻擋經由刺激 EC 產生的興奮性訊號形成 epileptiform (Behr *et al.*, 1998)。因此，DG 被認為扮演 hippocampus 門閥的角色 (Hsu, 2007)。

另外，在許多研究中 DG 被證明與 TLE 的形成以及上述所提之 TLE 動物模式具有高度相關。Granule cell 的 axon 稱作 mossy fiber，會投射至 CA3，是 dentate gyrus 唯一的 axon 投射區域。在 TLE 的病人 (de Lanerolle *et al.*, 1989; Sutula *et al.*, 1989; Houser *et al.*, 1990; Babb *et al.*, 1991) 以及 TLE 的動物模式皆觀察到 mossy fiber 產生

sprouting 的情形，這些 mossy fiber 的形態改變會於其他的 granule cell 形成興奮性突觸 (Dudek and Sutula, 2007)。許多實驗都證明 mossy fiber sprouting 會降低癲癇發作的閾值且會增加自發性癲癇再發作 (Buckmaster and Dudek, 1997)。Mossy fiber 屬於興奮性突觸，新形成的 synapse 會釋放 glutamate，使 granule cell 接收來自鄰近 granule cell 的興奮性訊號。另外也有實驗證明 TLE 的動物模式下，電生理及免疫組織染色結果顯示 DG 的 interneuron 數量減少，(Sloviter, 1987; Buckmaster and Dudek, 1997; Gorter *et al.*, 2001)，其中包含 GABA interneuron，使癲癇發作閾值降低。由於 GABA 是抑制性的神經傳遞物質，GABA interneuron 顯示 GABA 釋放減少，因此會增加 DG 的興奮性。

這些結果顯示 TLE 形成會伴隨 DG 興奮性改變，當此區興奮性提高，便容易接受外來的興奮性訊號，並將興奮性訊號傳至 hippocampus 其他區域。因此，增加 DG granule cell 周圍的抑制性訊號或是減少興奮性外來訊號從 EC 傳入，可以作為抗癲癇藥物的標的。



Glutamate 在癲癇症以及 dentate gyrus 所扮演之角色

DG 中最重要的興奮性神經傳遞物質為 glutamate，在 CNS 分布廣泛且含量甚高。由於癲癇發作時，興奮性的神經連結導致興奮性神經訊號被放大，例如 mossy fiber sprouting 會重新在鄰近的 granule cell 上形成新的突觸；同時抑制性的系統也失去控制神經細胞引發動作電位的能力，例如 GABA interneuron 在 DG 的數量減少。因此，抗癲癇藥物抑制 glutamate 參與的興奮性訊號傳遞被認為是重要的抗癲癇標的。在本實驗中，觀察 carisbamate 在 glutamate 的作用主要有下列兩個原因：

(一) 正常生理情形下，突觸前傳入動作電位。動作電位經電位依賴型鈉離子通道延軸突傳至突觸末梢，使突觸末梢的電位依賴型鈣離子通道開啟，造成突觸前鈣離子內流。鈣離子內流會導致含有 glutamate 的 vesicle 和細胞膜融合，將 glutamate 釋放到突觸間隙 (Sudhof, 2004)。Glutamate 為 CNS 主要之興奮性神經傳遞物質，其受體主要可區分為三類： α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionic acid (AMPA)、N-methyl-D-aspartic acid (NMDA) 及 kainate 受體。AMPA 和 NMDA 皆為 ligand 依賴型 ion channel。Dentate granule cell 缺乏 kainate 受體，主要以 AMPA 受體及 NMDA 受體為主 (Epsztein *et al.*, 2005)。AMPA 受體包含四個 subunits，由分屬兩類 subunits 的兩個 dimer 組成，中央形成一個 pore。Glutamate 結合至受體時，pore 會開啟，造成鈉離子和鉀離子為主的陽離子通透，產生內流電流，提高細胞膜電位。NMDA 受體同樣包含四個 subunits，並在靜止膜電位下受到鎂離子所阻斷。在生理情形下，glutamate 與 NMDA 受體結合，需要同時 AMPA 受體開啟導致膜電位提高才會開啟。開啟後，會導致鈣離子、鈉離子和鉀離子通透，幫助膜電位提高。當膜電位提高超過 threshold，就會在 axon hillock 產生動作電位，並將訊息下傳。EC 經由 perforant pathway 經由上述機轉將 glutamate 釋放到突觸間隙，將興奮性訊號傳給 DG granule cell。DG 因為高靜止膜電位 (Fricke and Prince, 1984; Scharfman, 1992; Staley *et al.*, 1992; Williamson *et al.*, 1993) 及周遭含有大量的 GABA interneuron (Mody, 1992) 選擇性傳遞興奮性訊號而被認為扮演 hippocampus 門閥的角色，對 hippocampus 產生保護作用。但若突觸前的興奮性訊號達到特定頻率或刺激達到特定長度後，GABA 的抑制作用會喪失導致門閥開啟 (Hsu, 2007)。在 TLE 的動物模式上發現 GABA interneuron 的數量會減少，使癲癇發作閾值降低可能是失去門閥性質的原因 (Dudek and Sutula, 2007)。若藥物作用 DG 抑制 perforant pathway 傳入的興奮性訊號，可以減少 DG 門閥開啟的機會。本實驗室先前已經證明臨床上使用的抗癲癇藥物會透過突觸前或突觸後的作用抑制 glutamate 的訊號傳遞。在 DG，臨床上使

用的抗癲癇藥物 lamotrigine 會透過抑制 AMPA 受體產生抗癲癇作用 (Lee *et al.*, 2008) ; levetacetam 會抑制突觸前 P/Q- type 鈣離子通道產生抗癲癇作用。因此 carisbamate 是否作用在 DG 影響 glutamate 訊號傳遞是我們所感興趣的。

(二) Glutamate 除了在正常生理情形下即為重要外，在某些細胞病變中也扮演角色。Glutamate 會對新生鼠的 retina 神經細胞產生毒性 (Lucas and Newhouse, 1956)。並有相當多的證據指出神經細胞暴露在 glutamate 下會造成延遲的細胞死亡 (Lipton and Rosenberg, 1994)。此延遲的細胞死亡可以被 NMDA antagonist 所減緩，指出細胞死亡可能來自於 NMDA 受體引起的鈣離子內流。隨後又發現 non-NMDA 受體在 glutamate 引發之細胞死亡也有參與 (Koh *et al.*, 1990)，鈣離子的堆積可能來自電位依賴性的鈣離子通道，因此需要 non-NMDA 受體造成的電位改變來活化 (Weiss *et al.*, 1990)。癲癇引發的神經損傷可能來自於 glutamate 引起的細胞死亡逐漸受到重視。Kainate 屬於其中一種 glutamate 受體的 agonist 可以引發 SE，在 CA3 和 DG 造成神經細胞損傷。在 perforant pathway 刺激同樣會對 hippocampus 產生類似的細胞損傷，相當類似於興奮性毒性 (Nadler, 1981)。

Glutamate 的過度釋放被認為是 mesial temporal sclerosis 的形成原因之一。Glutamate 引發的神經損害類似於癲癇引發的神經損害。在 hippocampus 內注入 glutamate 會產生類似於 pilocarpine 或 kainate 所引發的神經損傷，顯示癲癇發作時所釋放的過量 glutamate 可能會對神經造成損害。另外，以 HPLC 對人以及實驗動物在癲癇發作後的研究顯示，癲癇發作會釋放大量的 glutamate 和 aspartate 等興奮性胺基酸 (excitatory amino acids, EAA)。另外，hippocampus 含有大量的 glutamate 受體，尤其是 CA3 和 hilus 存在大量的 kainate 受體，當 glutamate 過度釋放時，容易在突處後產生過量的鈣離子流入，造成細胞毒性而死亡。另外、NMDA 以及 non-NMDA 的

阻斷劑，如 MK-801 或 NBQX 則可以保護癲癇引發的神經損害。因此，抑制突觸前 glutamate 釋放或抑制突觸後 glutamate 受體便是抗癲癇藥物的重要作用標的 (Liu *et al.*, 1995)。

實驗動機及目的

Carisbamate (RWJ-333369) 為一新的神經作用藥物，除了在許多動物模式上展現廣效性的抗癲癇作用外，也已經進入第三期臨床試驗。Carisbamate 可以作用在 Lipilocarpine 及 kainate 引發的動物模式上抑制癲癇再發作；carisbamate 也可以抑制 hippocampus kindling 動物模式的再發作，皆顯示 carisbamate 對 TLE 的治療具有相當潛力。在 TLE 的病人以及動物模式中，hippocampus 病變為其特色，因此我們推測 carisbamate 的對 TLE 治療作用來自於抑制 hippocampus 的興奮性或是抑制 hippocampus 的興奮性訊號傳導。

已知 DG 為 hippocampus 的重要腦區之一，調控興奮性訊號的傳入，在控制 hippocampus 的興奮性扮演重要的角色。該區接受來自 entorhinal cortex 的興奮性訊號，由 perforant pathway 投射到 DG 的 granule cell 上，釋放 glutamate 而產生作用。Glutamate 為中樞神經重要的興奮性神經傳遞物質，除了維持正常生理情形下的訊息傳遞功能外，當癲癇發作時，突觸前過度釋放 glutamate 也會造成毒性；此外，perforant pathway 的過度活化也會造成 DG 失去調節作用。之前已有研究顯示，抗癲癇藥物會作用在 DG，抑制 glutamate 系統的興奮性作用 (Frizelle *et al.*, 1999; Lee *et al.*, 2008)。因此 carisbamate 是否能作用在 perforant pathway 到 dentate gyrus 突觸而影響 glutamate 訊號傳遞就相當重要。另外，先前的實驗指出 carisbamate 對電位依賴型鈉離子通道以及影響細胞內鈣離子的可能性 (Deshpande *et al.*, 2008a,b)。電位依

賴型鈉離子通道及細胞內鈣離子濃度都被報導過是突觸前釋放神經傳遞物質的重要途徑 (Sudhof, 2004)，在本實驗中 carisbamate 是否透過類似的機轉影響 glutamate 訊號傳遞也為我們感興趣。

本篇論文使用的紅外線顯微鏡下的 whole-cell patch clamp 技術可以依外型辨別而明確記錄到 DG 的 granule cell。實驗中使用 whole-cell patch clamp 觀察 AMPA 及 NMDA 兩種受體引發的突觸後興奮性電位，研究 carisbamate 在離體腦切片對 DG 內 glutamate 受體對於藥物的反應。並可透過研究 paired-pulse 電刺激評估 synapse 前的興奮性改變，及胞外給予 AMPA 和 miniature EPSC 記錄來評估藥物的作用位置。

首先我們觀察到 carisbamate 可以抑制 AMPA 和 NMDA 受體參與之電刺激引發突觸後興奮性電流，並且對突觸前的配對刺激比率 (paired-pulse ratio) 產生影響，顯示該藥可能在突觸前作用。在外給 AMPA 的實驗中，carisbamate 無法抑制其引發的電流，且在 mEPSC 顯示對於影響電流大小無效，結果指向該藥在突觸前的作用。最後，外給鈣離子通道拮抗劑評估抗癲癇藥物的作用機轉。此份研究可以為 carisbamate 的抗癲癇作用提出近一步的解釋。

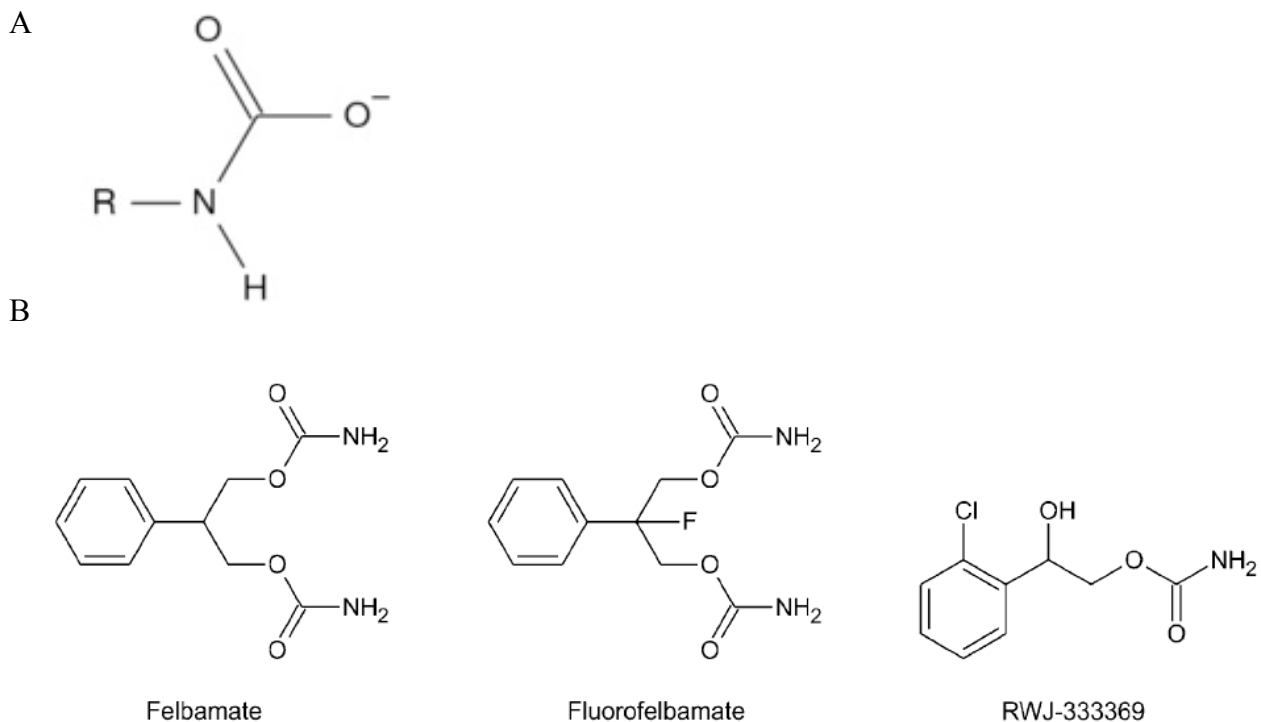
附表一：常用的抗癲癇藥物及作用機轉

	Putative modes of action	Routes of elimination and metabolites	Usual starting dose in adults	Usual daily maintenance dose in adolescent and adults	Main safety issues or concerns
Acetazolamide (1952)	Carbonic anhydrase inhibition	Renally excreted	250 mg	500-1000 mg	Idiosyncratic rash; rarely Stevens-Johnson syndrome and toxic epidermal necrolysis; aplastic anaemia
Carbamazepine (1963)	Sodium-channel inhibition	Hepatic metabolism; active metabolite	100-200 mg	400-1800 mg	Idiosyncratic reactions; rarely Stevens-Johnson syndrome; aplastic anaemia, hepatotoxicity
Clobazam (1986)	GABA augmentation	Hepatic metabolism; active metabolite	10 mg	10-30 mg	Rarely idiosyncratic rash
Clonazepam (1975)	GABA augmentation	Hepatic metabolism	0.5 mg	1-6 mg	Rarely idiosyncratic rash, thrombocytopenia
Diazepam (1965)	GABA augmentation	Hepatic metabolism; active metabolite	10-20 mg	N/A	Respiratory depression
Ethosuximide (1953)	Calcium-channel modification	Hepatic metabolism; 25% excreted unchanged	250 mg	500-1500 mg	Rarely idiosyncratic rash, Stevens-Johnson syndrome, aplastic anaemia
Felbamate (1993)	Glutamate reduction	Hepatic metabolism; active metabolites	400 mg	1800-3600 mg	Hepatic failure, aplastic anaemia
Gabapentin (1993)	Calcium-channel modulation	Not metabolised, urinary excretion unchanged	300 mg	1800-3600 mg	Paradoxical increase in seizures
Lamotrigine (1991)	Sodium-channel inhibition; glutamate reduction	Hepatic metabolism by glucuronidation	50 mg (10 mg if taking valproate)	100-400 mg	Idiosyncratic rashes, rarely Stevens-Johnson syndrome, Toxic epidermal necrolysis, liver failure, aplastic anaemia, multiorgan failure
Levetiracetam (1999)	Synaptic vesicle protein modulation	Urinary excretion	250 mg	750-3000 mg	Behavioural problems
Lorazepam (1972)	GABA augmentation	Hepatic metabolism	2-4 mg	N/A	Respiratory depression
Phenobarbital (1912)	GABA augmentation	Hepatic metabolism; 25% excreted unchanged	30 mg	30-180 mg	Idiosyncratic rash; rarely toxic epidermal necrolysis; hepatotoxicity; osteomalacia; Dupuytren's contracture
Phenytoin (1938)	Sodium-channel inhibition	Saturable hepatic metabolism	200 mg	200-400 mg	Idiosyncratic rash; rarely pseudolymphoma; peripheral neuropathy; Stevens-Johnson syndrome; Dupuytren's contracture; hepatotoxicity; osteomalacia
Pregabalin (2004)	Calcium-channel modulation	Not metabolised, excreted unchanged	50 mg	100-600 mg	Weight gain; rarely increased seizures
Primidone (1952)	GABA augmentation	Hepatic metabolism	125 mg	500-1500 mg	Idiosyncratic rash; rarely agranulocytosis; thrombocytopenia; lupus-like syndrome
Oxcarbazepine (1990)	Sodium-channel inhibition	Hepatic metabolism	150-300 mg	900-2400 mg	Idiosyncratic rash; hyponatraemia
Tiagabine (1996)	GABA augmentation	Hepatic metabolism	5 mg	30-45 mg	Increased seizures; non-convulsive status
Topiramate (1995)	Glutamate reduction; sodium-channel modulation; calcium-channel modification	Mostly hepatic metabolism, with renal excretion	25 mg	75-200 mg	Weight loss; kidney stones; impaired cognition
Valproic acid (1968)	GABA augmentation	Hepatic metabolism; active metabolites	200 mg	400-2000 mg	Teratogenicity; rarely acute pancreatitis; hepatotoxicity; thrombocytopenia; encephalopathy; polycystic ovarian syndrome
Vigabatrin (1989)	GABA augmentation	Not metabolised 85% excreted unchanged	500 mg	1000-2000 mg	Visual field defects, increased seizures
Zonisamide (1990)	Calcium channel inhibition	Urinary excretion	50-100 mg	200-600 mg	Rash; rarely blood dyscrasias

GABA=γ aminobutyric acid.

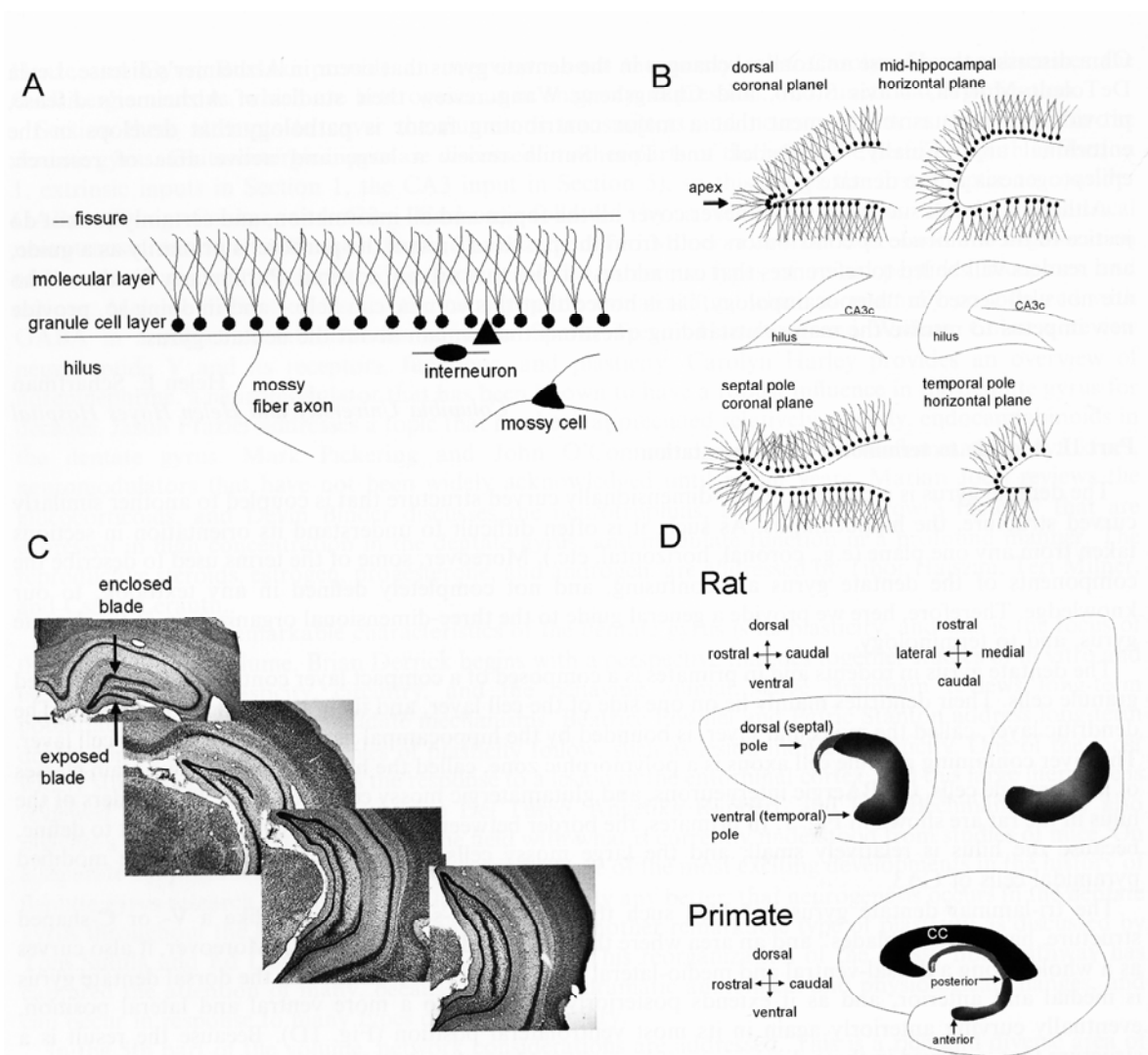
Table 1: The range of antiepileptic drugs (year of introduction) in present use

Duncan JS, Sander JW, Sisodiya SM, Walker MC. (2006) Adult epilepsy. *Lancet* 367:1087-100.



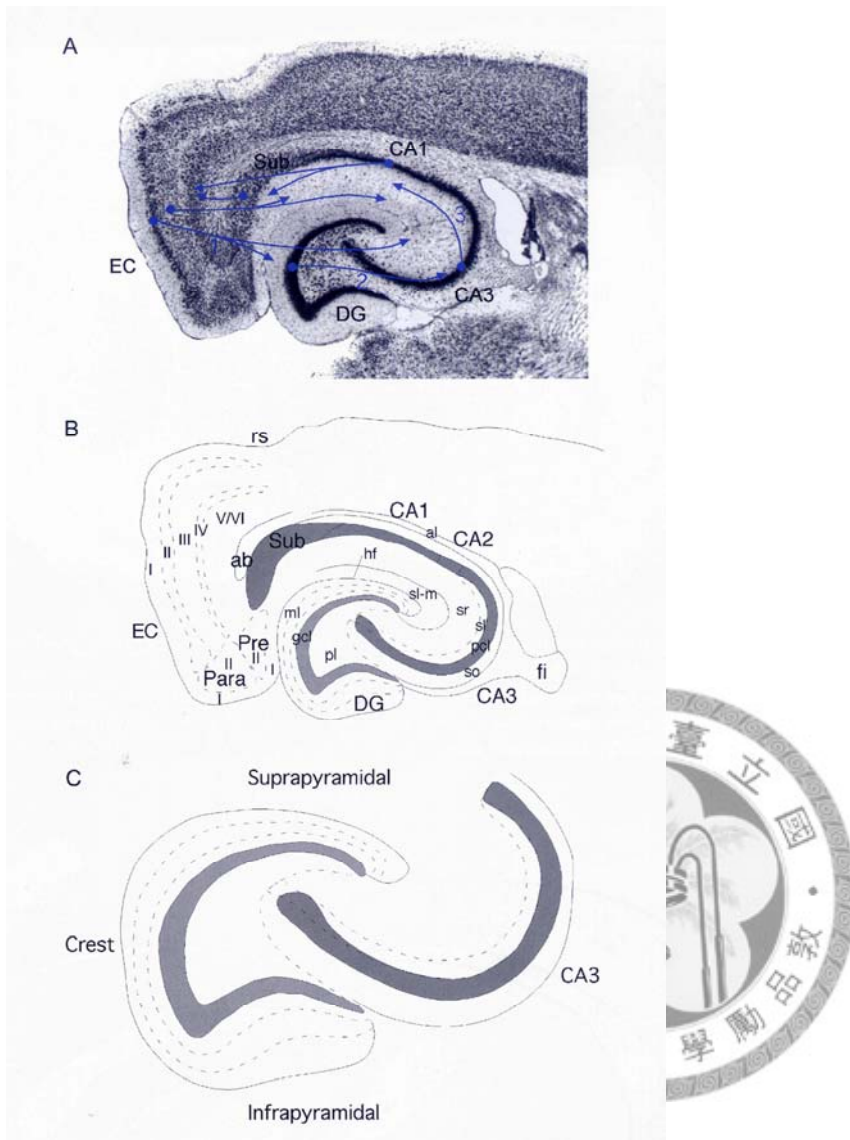
附圖一：Carisbamate (RWJ-333369) 的結構。A 圖：Carbamate 的結構式。B 圖：Felbamate、fluorofelbamate 及 carisbamate (RWJ-333369) 的結構式。雙 carbamate 的抗癲癇藥物：Felbamate 被認為會調節電位依賴型鈉離子通道以及高電位活化的鈣離子電流，並阻斷 NMDA 受體參與的突觸反應。該藥會產生血液及肝毒性，增加體內 aldehyde (atropaldehyde or 2-phenylpropenol)。以一個氟取代 2-position 上的氫所形成的 fluorofelbamate 可以防止 aldehyde 的產生。而 carisbamate 為單一 carbamate 的化合物，苯環上帶有一個氯。

Rogawski MA, Loscher W. (2004) The neurobiology of antiepileptic drugs. *Nat Rev Neurosci* 5:553–564



附圖二：dentate gyrus 的立體結構。A 圖：dentate gyrus 的基本結構示意圖，以及其分類（granule cell 和非 granule cell：GABA 類 interneuron 和 glutamate 類的 mossy cell）。B 圖：dentate gyrus 的 2D 切面，顯示背側冠狀切面（dorsal coronal panel）及 hippocampus 中段水平切面（mid-hippocampal horizontal panel）的差異。在背側冠狀切面，dentate gyrus 成 V 字形包圍 CA3，而 hippocampus 中段水平切面的 dentate gyrus 弧形較大。C 圖：由喙部（rostral）到尾部（caudal）的 hippocampus 冠狀切面，顯示所謂的背側鋒（dorsal blade）的形狀並不固定。D 圖：齧齒類動物（rodent）及靈長類動物（primate）hippocampus 位置比較圖。

Scharfman H, Witter M. (2007) The dentate gyrus: a comprehensive guide to structure, function, and clinical implications. *Prog Brain Res* 163:xii.



附圖三：老鼠 hippocampus 結構。A 圖：水平切面 Nissel 染色圖展示 hippocampus 的結構，箭頭表示神經投射途徑。1. 從 Entorhinal cortex (EC) 第二層 (layer II) 投射至 dentate gyrus (DG) 和 CA3 的 stratum lacunosum-moleculare (sl-m)，除此之外 EC 第三層 (layer III) 投射至 CA1。2. DG 的 granule cell 經 mossy fiber 投射至 CA3 的 stratum lucidum (sl)。3. CA3 經由 Schaffer collateral 投射至 CA1 的錐細胞。最後 CA1 直接或間接經由 subiculum (Sub) 投射至 EC 的深層。B 圖：線條表現分區和分層。Dentate gyrus 分為 molecular layer (ml)、granule cell layer (gcl)、polymorphic (pl)。C 圖：DG 的在水平切面下的分區示意圖。

Amaral DG, Scharfman HE, Lavenex P. (2007) The dentate gyrus: fundamental neuroanatomical organization (dentate gyrus for dummies). *Prog Brain Res* 163:3-22.

第二章 實驗材料及方法

第一節 實驗材料



實驗動物

使用年齡四週至六週大的公 Wistar 大鼠（60~120 公克）購自台大醫學院實驗動物中心，存放方式依照美國國家衛生院（U.S. National Institutes of Health）制定之實驗動物管理及使用指南（*Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*），存放在聚碳酸酯樹脂盒中，每盒最多四隻。該環境控制在日夜各十二小時光照週期（下午七時關燈）、攝氏 22 ± 2 °C，溼度介於 50%至 70%間，可自由飲食。維持良好環境以減少實驗動物痛苦及降低使用數量。本實驗經由台灣大學實驗動物使用及管理委員會（Animal Ethics Committee of the National Taiwan University）核准得實行之。

試劑與藥品配方

1. 試劑

Picrotoxin (PTX)	Tocris Co.
D-serine	Tocris Co.
Tetrodotoxin (TTX)	Tocris Co.
6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione (CNQX)	Tocris Co.
DL-aminophosphonovaleric acid (DL-APV)	Tocris Co.
α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionic acid (AMPA)	Tocris Co.
Carisbamate	Johnson & Johnson Co.
Ethylenediaminetetra-acetic acid	Sigma Co.
HEPES	Sigma Co.
QX314	Tocris Co.
Sodium Chloride (NaCl)	Sigma Co.
Cesium Chloride (CsCl)	Sigma Co.
Sodium hydroxide (NaOH)	Sigma Co.
Sodium bicarbonate (NaHCO ₃)	Sigma Co.
Dimethyl sulfoxide (DMSO)	Sigma Co.
Nimodipine	Tocris Co.

TTX、CNQX 和 DL-APV 皆溶解於 double distill water。PTX 和 Carisbamate 溶解於 100% 的 DMSO。DMSO 於 ACSF 的最終濃度小於 0.3%。



2. 溶液配方

單位：mM

(1) internal solution : 140 CsCl, 9 NaCl, 1 MgCl₂, 1 EDTA, 10 HEPES, 5 QX-314 ;

pH 7.3 °

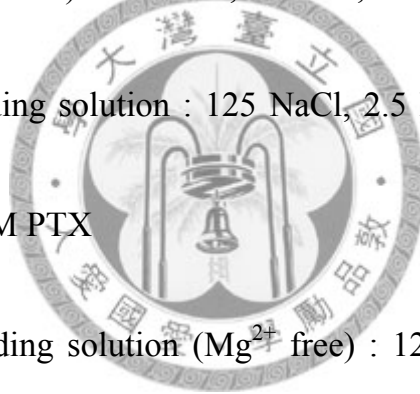
(2) external solution : 125 NaCl, 2.5 KCl, 2 CaCl₂, 1 MgCl₂, 26 NaHCO₃

(3) cutting solution (low Ca²⁺): 125 NaCl, 2.5 KCl, 0.5CaCl₂, 5 MgCl₂, 26 NaHCO₃

(4) AMPA EPSC recording solution : 125 NaCl, 2.5 KCl, 2 CaCl₂, 26 NaHCO₃, 50
μM DL-APV, 100 μM PTX

(5) NMDA EPSC recording solution (Mg²⁺ free) : 125 NaCl, 2.5 KCl, 2 CaCl₂, 26
NaHCO₃, 10 μM CNQX, 10 μM D-serine, 100 μM PTX

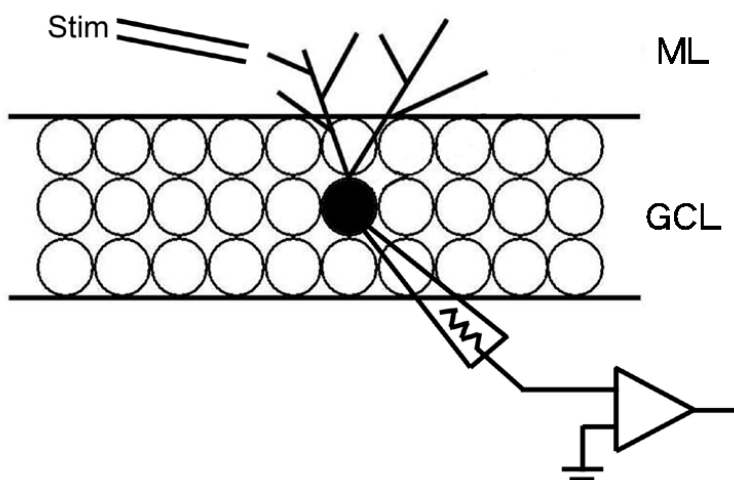
(6) mEPSC & exogenously AMPA current recording solution : 125 NaCl, 2.5 KCl, 2
CaCl₂, 26 NaHCO₃, 50 μM DL-APV, 100 μM PTX, 1 μM TTX



第二節 實驗方法

Hippocampus 活體腦切片製備

實驗動物被斷頭犧牲後，迅速將腦取出放置入低溫cutting solution中，該溶液含有以下成份，經 95 % O₂與 5 % CO₂ 混合氣通氣後，以 1N HCl及NaOH滴定至pH值 7.4。取出的腦切除小腦（cerebellum）、延髓（medulla）、嗅球（olfactory bulb）與前腦（prefrontal cortex）後，得到 0.5x0.5x1 cm³的腦切塊，用快乾膠把腦塊的小腦切面黏在microslicer的標本台上。用microslicer（DTK-1000, Dosaka, 日本京都）以冠狀切法（coronal brain slice）切出厚度 300 μm的brain slice，接著放進裝有人工腦脊液（artificial cerebrospinal fluid，ACSF）的燒杯中於室溫下置放一個小時，經 95 % O₂與 5 % CO₂ 混合氣通氣後，以 1N HCl及NaOH滴定至pH值 7.4。最後，腦切片在記錄前靜置於室溫下（23±2 °C）一個小時（Onodera *et al.*, 2000）。



圖一：刺激電極置於 molecular layer (ML)，刺激 perforant pathway 的 axon 釋放 glutamate，作用於 dentate granule cell 的 dendrite。記錄電極會在 granule cell layer (gcl) 記錄 granule cell，得到 glutamate 引發的電流。

電生理學記錄：細胞膜片箝制 (whole cell patch-clamp)

腦切片移至 recording chamber，該 recording chamber 安置在顯微鏡 (BX51, Olympus, Tokyo, Japan) 的記錄台上，腦切片浸於 ACSF 中並持續灌流，流速每分鐘 1 至 2 ml，維持於室溫下 ($23 \pm 2^\circ\text{C}$)。以紅外光顯微鏡 (Olympus, Tokyo, Japan) 搭配高倍水鏡 (400x) 觀察並記錄 hippocampus 下 dentate gyrus 的 granule cell。使用 Axopatch 200B 放大器對該細胞進行全細胞膜片箝制技術 (whole cell patch-clamp) 記錄。記錄電極以拉針器 (P97, Sutter Instrument, Novato, CA, U.S.A.) 用標準硼矽酸玻璃毛細管 (standard-walled borosilicate glass capillaries) 拉出。該電極電阻維持在 3-8 Ω ，並填充含 CsCl 的 internal solution，內含。紅外光顯微鏡將影像投影在顯示器 (JVC, Japan) 上，操作 manipulator (ONU-31P, Olympus, Japan) 將記錄電極在低倍下移到 dentate granule cell layer 上，再用高倍水鏡以及給予記錄電極正壓的情形下，將記錄電極移至 granule cell 上。當釋放正壓時同步給予負壓，便能使細胞膜與記錄電極形成緊密貼合。此時記錄電極會記錄到極大的電阻，因而稱為 giga seal。接著給予一個短暫的負壓將細胞膜記錄電極所吸付的小面積細胞膜破壞，使記錄電極內溶液和細胞質相通，稱為 whole cell 形成。Whole cell 形成後，將細胞將膜電位固定在 -70 mV 記錄，用補償消去 70~80% 來自 8 ms, -5 mV 引發後產生電流的 onset 和 offset 來測量 series resistance 和 whole-cell capacitance。突觸電流濾掉 5k Hz 以上的訊號，經 10k Hz 數位化 and 直接用記錄軟體 AxoScope9.0 (Axon Instrument) 記錄在電腦硬碟中。全部實驗固定間隔測量 access resistance，並捨棄改變超過 20% 的記錄結果。以填充 3M NaCl 溶液的玻璃電極置於 DG 的 molecular layer (圖四)，搭配刺激器 (S-48, Grass-Telefactor, W. Warwick, RI, U.S.A.) 和 isolation unit (A.M.P.I., Jerusalem, Israel) 引發 EPSC。刺激長度為 10 到 50 μs ，強度介於 5 到 20 V 間，頻率 0.1 Hz。為了避免低頻刺激下造成的 synaptic fatigue (Abrahamsson *et al.*, 2005)，會於 whole-

cell 形成後，連續刺激五分鐘之後再開始記錄。eEPSC 以平均後電流頂點量測大小，由給藥前後各取三分鐘分別作為控制組和給藥組（圖五）。

當 DG cell 的突觸前 perforant pathway 受到外來電刺激，會在突觸前的 axon 形成動作電位。動作電位經電位依賴型鈉離子通道延 axon 傳至 axon terminal，使該觸的電位依賴型鈣離子通道開啟，造成突觸前鈣離子內流，引發胞釋作用（exocytosis）將 glutamate 釋放到突觸間隙。Glutamate 為 CNS 主要之興奮性神經傳遞物質，其受體主要可區分為三類：AMPA、NMDA 及 kainate 受體，AMPA 和 NMDA 皆為 ligand 依賴型 ion channel。DG cell 缺乏 kainate 受體，因而排除該受體引發之電流影響（Epsztein *et al.*, 2005）。Glutamate 結合至受體時，AMPA 受體的 pore 會開啟，造成鈉離子和鈣離子為主的陽離子通透，產生內流電流，提高細胞膜電位。NMDA 受體在生理情形下，除了需藥 glutamate 與 NMDA 受體結合外，也需要 AMPA 受體開啟導致膜電位提高，使鎂離子離開 pore，NMDA 受體才會開啟。開啟後鈣離子為主的陽離子通透增加，幫助膜電位提高，最後產生興奮性動作電位。

AMPA 受體參與的 EPSC（AMPA receptor-mediated EPSC, eEPSC_{AMPA}）可以在含有 GABA_A 受體阻斷劑 picrotoxin（PTX, 100 μM）和 NMDA 受體阻斷劑 DL-aminophosphonovaleric acid（DL-APV, 50 μM）的 ACSF 溶液中而得；NMDA 受體參與的 EPSC（NMDA receptor-mediated EPSC, eEPSC_{NMDA}）可以在含有 picrotoxin（PTX, 100 μM）、AMPA 受體阻斷劑 6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione（CNQX, 10 μM），和 NMDA 受體異位調節劑 D-serine（10 μM）的無鎂離子 ACSF 溶液中，將膜電位固定在 -70 mV 記錄而得。另外，用 50 和 100 ms 的兩種刺激間隔來測量 paired-pulse ratio（PPR），由第二個 EPSC（pulse 2, P2）除以第一個 EPSC（pulse 1, P1）而得，以用來評估藥物作用於 synapse 的位置（Andreasen *et al.*, 1994）。為了記錄

AMPA 受體參與的最小 EPSC (AMPA receptor-mediated miniature EPSC, mEPSC_{AMPA})，在 ACSF 中加入鈉離子通道阻斷劑 tetrodotoxin (TTX, 1 μ M)、PTX (100 μ M) 和 DL-APV (50 μ M)，不施給電刺激直接記錄而得。

胞外給予 AMPA 和 NMDA 的實驗中，我們在 DG 的 molecular layer 給予 AMPA (10 mM) 和 NMDA (10 mM) 引發內流電流。AMPA 和 NMDA 每 1.5 分鐘局部給予。由 Picospritzer (General Valve, Fairfield, NJ, USA) 對 patch pipettes 施加壓力 (玻璃管尖端直徑 1-2 μ m，長度 10-50 ms 壓力 5-15 psi，Wuarin Deduk)。用含有 TTX (1 μ M)，PTX (100 μ M) 和 DL-APV (50 μ M) 的 ACSF 溶液記錄 AMPA 受體引發的內流電流，用含 TTX (1 μ M)，PTX (100 μ M) 和 CNQX (10 μ M) 的 ACSF 溶液記錄 NMDA 引發的內流電流。除胞外給予 AMPA 和 NMDA，其餘藥物和 ACSF 溶液皆經由灌流給予。



結果分析和統計

使用 Clampex 9.0 software (Axon Instrument) 收集實驗數據。用 Clampfit 9.0 (Axon Instrument) 分析 eEPSC。用 Mini Analysis Program version 6.0 (Synptosoft Inc., Fort Lee, NJ, USA) 分析 mEPSC_{AMPA}。為評估給予藥物前後是否有影響，以給予藥物之前的電流大小作為基準，將給予藥物之後的電流絕對值標準化 (normalized)。本論文實驗數據以 Student's *t*-test 分析加以運算，實驗數據皆以平均值 \pm 標準差 (mean \pm S.E) 表示，在 *p* 值小於 0.05 即是為有顯著差異。

圖二：外給刺激及藥物給予時間示意圖。

- (1) eEPSC_{AMPA/NMDA}：刺激長度 10-20 μ s，強度 5-20 V，頻率 0.1 Hz。
- (2) Paired-pulse 記錄：P1/P2 刺激間隔 50/100 ms，刺激長度 10-20 μ s，強度 5-20 V，頻率 0.1
- (3) mEPSC 記錄：不給電刺激直接記錄。
- (4) 胞外給予 AMPA：間隔 1.5-2 mins，長度 10-50 ms，壓力 5-15 psi。



取給藥前五分鐘做控制組。

給藥 3-5 分鐘

藥物產生作用至電流穩定後，取穩定後五分鐘作為實驗組。

第三章 結果

第一節 電流引發之 AMPA/NMDA 參與興奮性突觸後電流具有專一性

Glutamate受體參與之興奮性突觸後電流 (eEPSC) 可由 whole-cell patch clamp 記錄而得。當細胞與記錄電極形成 whole-cell 後，實驗所使用之 Axopatch 200B 放大器可將細胞膜電位固定在設定的電位上，為全細胞膜電位箝制 (whole-cell patch clamp)。本實驗將膜電固定在 -70 mV，並使用以 CsCl 為主的細胞內液 (internal solution) 填充記錄電極，因此在突觸後抑制大多數的電位依賴型鈉離子、鉀離子及鈣離子。在這樣的系統下，AMPA 受體參與之興奮性突觸後電流 (eEPSC_{AMPA}) 可以在灌流 ACSF 含有 GABA_A 受體阻斷劑 PTX (100 μ M) 和 NMDA 受體阻斷劑 DL-APV (50 μ M) 的情形下記錄而得。該內流電流可以受到 AMPA 受體的選擇性拮抗劑 CNQX (10 μ M) 所抑制 (圖三A)。NMDA 受體參與之興奮性突觸後電流 (eEPSC_{NMDA}) 則可以在灌流 Mg²⁺-free ACSF 含有 GABA_A 受體阻斷劑 PTX (100 μ M)、CNQX (10 μ M) 和 D-serine (10 μ M) 的情形下記錄而得，NMDA 所參與的內流電流則可以被 NMDA 的選擇性拮抗劑 DL-APV (50 μ M) 所抑制 (圖三B)。證明本實驗所記錄得之 eEPSC_{AMPA/NMDA} 各來自單一類型的 glutamate 受體，可透過此實驗系統研究藥物對於 glutamate 系統所造成的影響。

第二節 Carisbamate 抑制 AMPA/NMDA 參與之興奮性突觸後電流

在carisbamate對eEPSC_{AMPA}作用實驗中，以頻率 0.1 Hz的電刺激情形下記錄。此劑量相關的抑制作用，隨著劑量上升，抑制的程度越大（圖四）。結果顯示，在carisbamate 100 μM的作用下，會對eEPSC_{AMPA}產生顯著抑制（圖五）。Carisbamate給予後的eEPSC_{AMPA}的平均電流改變為控制組的 106.7±11.4%（10 μM, n=4）、78.0±7.1%（30 μM, n=7）、72.7±6.9%（100 μM, n=4）、74.2±5.6%（300 μM, n=4）其中 30 μM、100 μM、300 μM都具有顯著差異（ $p < 0.03$, Student's t-test）（圖八）。另外，carisbamate也會對eEPSC_{NMDA}產生顯著的劑量相關抑制作用（圖六）。在carisbamate 100 μM的作用下，會對eEPSC_{NMDA}產生顯著抑制（圖七）。在carisbamate對eEPSC_{NMDA}作用實驗中，carisbamate給予後的eEPSC_{NMDA}的平均電流改變為控制組的 87.8±3.9%（10 μM, n=4）、83.1±2.6%（30 μM, n=5）、80.6±4.2%（100 μM, n=6）、77.7±6.1%（300 μM, n=4），其中 30 μM、100 μM、300 μM都具有顯著差異（ $p < 0.01$, Student's t-test）（圖八）。由於evoked EPSC_{AMPA/NMDA}皆受到carisbamate抑制，而且在 30 μM及 100 μM的 eEPSC_{AMPA/NMDA}並沒有顯著差異（圖九），說明該抑制作用可能來自於突觸前抑制，並進一步透過其他實驗證明之。

第三節 Carisbamate 高濃度對 paired-pulse ratio (PPR) 產生抑制作用

為了要確認carisbamate在突觸的作用位置，以 50 ms或 100 ms成功引發的兩個刺激所測量計算出的PPR（paired-pulse ratio）來評估。PPR的改變屬於突觸的短期可塑性（short-term synaptic plasticity）之一，被認為反映突觸前的改變（Zucker, 1989;

Manabe *et al.* 1993)。在給予carisbamate前，paired-pulse刺激所記錄得之eEPSC_{AMPA} PPR為 1.33 ± 0.05 （刺激間隔 50 ms, n=11）和 1.26 ± 0.05 （刺激間隔 100 ms, n=9），為典型的paired-pulse facilitation（PPF），符合先前在DG的實驗所顯示（Andreasen & Hablitz, 1994; Lee *et al.*, 2008）。在給予carisbamate 30 μ M的情況下，不論是刺激間隔 50 ms (1.37 ± 0.11) 或 100 ms (1.27 ± 0.11)，都沒有看到對PPR造成顯著影響。但是在給予carisbamate 100 μ M的情形下，在刺激間隔 50 ms和 100 ms的情況下，皆產生抑制PPR的作用（圖十A和圖十一A）。在刺激間隔 50 ms的情況下，PPR抑制到 1.19 ± 0.08 ($p < 0.05$)；刺激間隔 100 ms的情況下，PPR抑制到 1.13 ± 0.08 ($p < 0.01$)，兩者皆有顯著抑制（圖十B和圖十一B）。這樣的結果顯示carisbamate可能作用在突觸前產生抑制作用，且此作用只在高劑量展現。



第四節 Carisbamate 無法影響胞外給予 AMPA 引發之電流

為了進一步確認carisbamate的AMPA抑制作用是否來自突觸後，在膜電位箝制在-70 mV的情形下，以含有TTX (1 μ M)、DL-APV (50 μ M) 和PTX (100 μ M) 的ASCF灌流下，胞外給予AMPA (10 mM)。由於TTX為一電位依賴型Na⁺ channel阻斷劑，可以阻斷突觸前因動作電位引起的glutamate釋放。此時，胞外給予AMPA作用於AMPA受體上，使該受體通道開啟並產生一內流電流，改變可反映出突觸後的作用。實驗中，改變Picospritzer的給藥時間長度可以改變內流電流大小，胞外給予AMPA引發之內流電流大小控制在 60-70 pA間。取carisbamate給予的前後來評估藥物在突觸後對AMPA受體的影響。結果顯示，carisbamate無法對胞外給予引發的AMPA內流電流產生抑制作用（圖十二A）。30 μ M carisbamate給予後平均電流為原本的 $106.2 \pm 0.03\%$ (n=4)、100 μ M carisbamate給予後為 $101.9 \pm 0.03\%$ (n=5)，都沒有造成

顯著抑制（圖十二B）。該結果間接顯示carisbamate的對AMPA電流的抑制來自突觸前作用。

第五節 Carisbamate對於mEPSC_{AMPA}的電流大小和頻率皆無影響

為了證明 carisbamate 的作用位置，另外記錄 mEPSC_{AMPA} 來分析並評估。mEPSC_{AMPA} 可在膜電位箝制在 -70 mV 的情形下，含有 TTX (1 μM)、DL-APV (50 μM) 和 PTX (100 μM) 的 ASCF 灌流下直接記錄而得。在這種條件下，記錄電極在沒有突觸前電刺激的情形下，會記錄到一些電流大小較小的 EPSC_{AMPA}，這是由突觸前的 axon terminal 自發性的 glutamate 釋放，作用在突觸後 AMPA 受體上造成通道開啟所致（圖十三）。記錄 mEPSC_{AMPA} 並分析其數據可以用來評估藥物在突觸前後的作用位置。在 30 μM 的 carisbamate 下，給藥前的 mEPSC 平均電流大小為 9.48±0.39 pA (555 次)，給藥後為 9.05±0.47 (582 次)，並沒有顯著的改變 (student test 及 KS-test: P>0.05) (圖十四)；在 100 μM 的 carisbamate 下，藥前的 mEPSC 平均電流大小為 8.05±0.85 (245 次)，給藥後為 7.95±0.77 (218 次)，如同低濃度下，電流大小並無顯著改變 (student test 及 KS-test: P>0.05) (圖十五)。此結果符合之前實驗所觀察到結果，carisbamate 無法直接影響 AMPA 受體。另外，在 30 μM 的 carisbamate 下，給藥前的平均頻率為 0.35±0.05 Hz，給藥後為 0.42±1.1 Hz；在 100 μM 的 carisbamate 下，給藥前的平均頻率為 0.26±0.07 Hz，給藥後為 0.23±0.07 Hz (圖十六)。兩個濃度對 mEPSC 的頻率皆無明顯變化。

第六節 Nimodipine 無法遮蔽 carisbamate 在突觸前產生的抑制作用

突觸前的axon terminal含有高電位依賴型鈣離子通道，可以感受動作電位產生的去極化而開啟，導致鈣離子流入，引發突觸前glutamate釋放。由於paired-pulse ratio改變被認為反應突觸前細胞內鈣離子濃度，因此本實驗選用其中一種高電位依賴型鈣離子通道：L-type鈣離子通道阻斷劑nimodipine。10 μ M的nimodipine會對eEPSC_{AMPA}產生抑制（圖十七），抑制後的平均電流大小為控制組的 $0.82 \pm 0.04\%$ （ $n=4$, $p < 0.01$ ），一段時間後給予carisbamate 100 μ M仍會展現抑制作用，carisbamate抑制後的平均電流大小為控制組的 $0.63 \pm 0.09\%$ （ $p < 0.05$ ）（圖十八）。由於nimodipine無法遮蔽carisbamate在突觸前產生的抑制作用，我們認為L-type鈣離子通道並不是carisbamate的作用位置。



第四章 討論

本實驗主要探討具有抗癲癇潛力的藥物 carisbamate (RWJ-333369) 是否可以 DG 經由抑制 glutamate 所參與的興奮性訊息傳遞而達到抗癲癇作用。由於 carisbamate 為一新的神經作用藥物，該藥詳細的作用機轉仍不明確，本實驗利用 whole-cell patch clamp 技術，記錄位於 Wistar 大鼠的 hippocampus 活體腦切片中 DG 的 granule cell 上由 glutamate 所引發的電流，藉由使用不同受體的阻斷劑，分離出 AMPA 受體和 NMDA 受體參與之電流，使用 Student's *t*-test 分析投予 carisbamate 前後的電流大小變化。並使用不同的電生理技術，區分藥物的在突觸的作用位置。由於 glutamate 釋放受到鈣離子通道所調控，藉由同時投予鈣離子通道阻斷劑以及 carisbamate 藥物來評估鈣離子通道的作用。

實驗結果顯示 carisbamate 在 perforant pathway-dentate gyrus granule cell 突觸展現抑制 eEPSC_{AMPA} 及 eEPSC_{NMDA} 的能力，且該抑制作用具有濃度依賴性。而 carisbamate (30 μ M, 100 μ M) 皆抑制 eEPSC_{AMPA} 和 eEPSC_{NMDA}，且有類似的抑制幅度，指向 carisbamate 會作用在突觸前抑制 glutamate 釋放，減少突觸間隙的興奮性神經傳遞物質濃度，因而對 glutamate 引發之電流有抑制能力。突觸前的短期可塑性 PPF 來自突觸前

短暫的鈣離子累積，使突觸反應增加。Carisbamate (100 μM) 造成的paired-pulse ratio的降低被認為是作用於突觸前使鈣離子濃度降低造成。接著，在TTX存在的情形下，胞外給予AMPA會作用在突觸後AMPA受體上引發內流電流。Carisbamate無法對AMPA引發之內流電流產生抑制作用，顯示該藥無法直接作用於AMPA受體上，間接解釋carisbamate對eEPSC_{AMPA}所產生的抑制作用來自於突觸前。另外，mEPSC_{AMPA}的電流或頻率可以反應出突觸後藥物對AMPA受體造成改變或藥物作用於突觸前影響glutamate釋放。在TTX的存在下，carisbamate不會影響mEPSC_{AMPA}的電流大小和頻率。

在本實驗系統中，以電刺激在molecular layer給予perforant pathway會於局部突觸產生同步 (synchronous) 之動作電位。當動作電位傳至axon terminal時，去極化會導致高電位依賴型鈣離子通道開啟。引發鈣離子內流使其在細胞濃度上升，促使vesicle跟細胞膜fusion，將glutamate釋放至突觸間隙。當Glutamate作用於突觸後的AMPA或NMDA受體，會產生內流電流。因為外加的電刺激會使來自不同突觸的同步釋放glutamate，使得突觸後記錄到一個電刺激引發之興奮性電流，該電流由不同的突觸所累加而來。因此，記錄此內流電流所得之結果若受到藥物作用而產生改變，顯示藥物做用於電刺激引發過程其中的環節。此為本實驗主要的應用技術，當給予carisbamate造成eEPSC_{AMPA/NMDA}皆受到抑制，表示carisbamate會作用於glutamate系統。

先前報告指出，當glutamate的突觸前釋放受到影響而改變突觸間隙的glutamate濃度時，會以類似比例影響NMDA及non-NMDA參與之EPSC (Perkel and Nicoll, 1993)。該實驗在guinea-pig的hippocampus活體腦切片中，記錄CA1的細胞所得之NMDA/non-NMDA EPSC。使用GABA_B受體致效劑baclofen和adenosine拮抗劑theophylline影響突觸前釋放。GABA_B受體致效劑baclofen會對non-NMDA受體參與之

電流及NMDA受體參與之電流產生相近幅度的抑制；theophylline 則會增加glutamate釋放，並以近似的比例增加NMDA和non-NMDA所參與之電流。顯示當glutamate在突觸間隙的濃度改變時。會同步對NMDA受體及non-NMDA受體所引發的電流產生改變。在本實驗中觀察到AMPA受體及NMDA受體所參與之電流具有近似的抑制幅度反映出carisbamate在突觸前的抑制作用導致突觸間隙的glutamate濃度改變，顯示該藥可能在突觸前產生抑制作用。

為了深入探討carisbamate的作用位置，本實驗給予paired-pulse stimulation評估藥物作用位置。結果顯示高濃度carisbamate (100 μ M) 下會影響在DG所記錄得之PPF ratio。根據之前的報告指出，PPR的改變屬於突觸的短期可塑性 (short-term synaptic plasticity)，在兩個連續刺激下，依照P2/P1 之比例可以分為paired-pulse facilitation和paired-pulse depression兩種，兩者皆被認為會反映出突觸間或神經迴路的改變。(Zucker, 1989; Manabe *et al.* 1993)。其中有許多突觸都會展現PPF的特性，長久以來被認為與突觸前的神經傳遞物質釋放有關，並且與突觸前鈣離子通道或突觸內鈣離子濃度相關 (Blitz *et al.*, 2004)。之前實驗證明，在perforant pathway-dentate gyrus的突觸展現PPF的特性。在rat上，以whole-cell patch clamp對hippocampus腦切片的DG進行研究，該研究顯示glutamate釋放所產生的PPF可以在AMPA受體所參與的電流紀錄而得；PPF並不會改變eEPSC_{AMPA}的rise time和decayed time constant；PPF在刺激間隔100 ms的情形下平均增加電流為 $35.7 \pm 2.1\%$ ，與我們的實驗相近；在連續電刺激小於350 ms的情形下都會展現PPF；另外，給予baclofen抑制突觸前glutamate釋放並不改變PPF ratio；給予GABA_A受體阻斷劑bicuculline也無法改變PPF ratio。當降低胞外鈣離子濃度時，PPF ratio也會隨之降低 (Andreasen *et al.*, 1994)。這些結果除了展示perforant pathway-dentate gyrus有PPF的特性外，也反應突觸前鈣離子濃度所參與之神

經傳遞物質釋放的改變。Carisbamate在 100 μ M情形下會抑制PPF ratio顯示該藥可能透過抑制突觸前機轉產生抑制作用。

AMPA為AMPA受體的選擇性致效劑，單獨給予AMPA會直接作用在突觸後的受體上，使AMPA受體開啟引發內流電流（Lee et al., 2008）。Glutamate受體主要有兩種：ionotropic和metabotropic。前者會形成離子通道影響膜電位傳遞訊息，後者則透過secondary messenger進行下游的訊號傳遞。AMPA受屬於ionotropic的glutamate受體，會使鈉離子和鉀離子通透，而且也會對鈣離子展現較慢的通透性。AMPA受體主要有四種subunits：GluR1-GluR4，每一個AMPA受體都是由四個subunit組成（Ashcroft, 2000）。AMPA受體主要存在於突觸後，當胞外投予AMPA作用在受體時，會導致AMPA受體開啟產生電流。當細胞箝制在-70 mV的情況下，會記錄到一個累加的AMPA電流。此電流在含有TTX的灌流液下，排除了突觸前glutamate的作用；雖然使用高選擇性的AMPA引發電流，仍然在含有DL-APV以及正常濃度鎂離子的情況下記錄，排除NMDA的作用。本實驗結果顯示，carisbamate不會影響胞外給予AMPA引發之電流，證明carisbamate對於eEPSC_{AMPA}的抑制作用來自突觸前。

在 TTX 存在的情形下，電位依賴型鈉離子通道受到抑制，此時所記錄得miniature EPSC 顯示出沒有動作電位的情形下所表現的訊號傳遞。此時所觀察到的電流為 AMPA 受體受到突觸前短暫釋放的 glutamate 作用而開啟的結果。mEPSC 以單一 vesicle 釋放所引發之電流大小為基準成倍數關係。有許多原因會影響 mEPSC 的大小，其中當藥物作用在突觸後 AMPA 受體上產生抑制作用時，會改變 AMPA 受體的對離子的通透性，減少 mEPSC 的平均電流大小（Lee et al., 2008）。本實驗結果顯示 carisbamate 不會改變其電流，同樣指出 carisbamate 在 30 μ M 或 100 μ M 下皆不會作用於 AMPA 受體，證明 carisbamate 對 AMPA 受體無法產生作用，與之前的實驗相符。

我們的實驗結果，carisbamate的抑制作用來自於突觸前的證據包含：一、carisbamate會依照濃度相關性抑制eEPSC_{AMPA/NMDA}，並有相似的抑制幅度；二、carisbamate在高濃度下會降低PPF ratio；三、carisbamate不會對胞外給予AMPA所引發之內流電流產生抑制作用；四、carisbamate不會抑制mEPSC的電流大小。因此，我們評估carisbamate產生的抑制作用來自於抑制突觸前的glutamate釋放。

正常生理情形下，突觸前傳入動作電位。動作電位經電位依賴型鈉離子通道延軸突傳至突觸末梢，使突觸末梢的電位依賴型鈣離子通道開啟，造成突觸前鈣離子內流。鈣離子內流會導致含有 glutamate 進行胞釋作用（exocytosis）（Sudhof, 2004）。影響突觸前神經傳遞物質是放的可能機轉有下列幾項：

（一）鈣離子通道以及突觸前axon terminal鈣離子濃度。突觸前釋放神經傳遞物質中，鈣離子扮演重要的角色（Katz, 1969），神經傳遞物質在突觸前的釋放需要動作電位傳入，當動作電位傳入使電位依賴型的鈣離子通道開啟時，便會引起突觸前的胞釋作用：含有神經傳遞物質的vesicle和細胞膜融合，將神經傳遞物質釋放到突觸間隙。在大部分的突觸間，動作電位引起P/Q-type（CaV2.1）和N-type（CaV2.2）的鈣離子通道開啟，另外一部分則由R-type（CaV2.3）和L-type（CaV1系列）的鈣離子通道所作用（Dietrich *et al.*, 2003）。鈣離子通道在神經傳遞物質釋放所扮演的角色主要有二：一、鈣離子通道同步開啟引發釋放神經傳遞物質，其過程小於 50 μ s；二、鈣離子通道非同步開啟，在動作電位發生後產生自發性開啟，導致神經傳遞物質釋放（Hagler & Goda, 2001），這兩種情形都需要鈣離子通道參與。鈣離子進入細胞後，會幫助SNARE（soluble NSF attachment receptor element）protein complex的形成，促進胞釋作用將神經傳遞物質釋放到突觸間隙。因此，調控鈣離子通道或影響細胞內鈣離子濃度會是carisbamate調控glutamate釋放的機轉之一（Sudhof, 2004）。由於

carisbamate經由另一個具抗癲癇作用藥物felbamate修飾而來。同樣為廣效性抗癲癇藥物的felbamate被認為會抑制高電位依賴型鈣離子通道。而先前的carisbamate實驗中指出在預先以鎂離子處理過的hippocampus細胞模型spontaneous recurrent epileptiform discharges (SREDs) 上，會觀察到carisbamate具有抑制SREDs的能力。在該實驗中，會於實驗前 24 小時前將培養之SD rats hippocampus細胞預先以低鎂離子的紀錄溶液處理。低鎂離子的紀錄溶液會使NMDA受體過度興奮，影響內鈣離子，造成細胞自發性放電。Carisbamate (100 μM) 被認為可以透過調控內鈣離子平衡，抑制這類的自發性放電。Carisbamate有可能透過改變細胞內鈣離子濃度的方式來影響突觸前的glutamate釋放 (Deshpande *et al.*, 2008a,b)。本實驗使用L-type鈣離子通道阻斷劑nimodipine (10 μM) 作為比較，投予nimodipine後會抑制eEPSC_{AMPA}，此時再給予carisbamate仍會有進一步抑制，顯示carisbamate並非透過L-type 鈣離子通道抑制突觸前釋放。不排除透過其他兩類的鈣離子通道。Carisbamate作用於突觸前是否經過N-和P/Q type鈣離子通道仍須進一步驗證。

(二) 電位依賴型鈉離子通道。除了高電位依賴型鈣離子通道外，動作電位傳遞需要電位依賴型鈉離子通道，才能在axon terminal產生去極化以驅動電位依賴型鈣離子通道 (Vautrin and Barker, 2003)。其他實驗指出carisbamate會抑制細胞去極化引發的sustained repetitive firing (SRF)，降低引發的spike數量。先前的實驗證明，phenytoin、carbamazepine、valproic acid和lamotrigine都會抑制SRF，因此該實驗認為carisbamate除了影響細胞內鈣離子濃度外，也會抑制電位依賴型鈉離子通道 (Deshpande *et al.*, 2008a,b)。在我們的實驗中，30 μM 可以抑制AMPA電流至 $78.0 \pm 7.1\%$ ，而PPR改變在carisbamate 100 μM 才有顯著差異。由於PPR主要反應突觸前axon terminal內鈣離子變化，當carisbamate阻斷鈉離子通道而影響glutamate釋放的作用可能不反應在PPR改變中，導致carisbamate在 30 μM 可以看到對eEPSC_{AMPA/NMDA}

產生抑制，卻在高濃度 carisbamate (100 μ M) 才看到降低 PPR 的作用。有些實驗指出，mEPSC 的頻率會反映出突觸前對於藥物的影響，當藥物作用於突觸前會改變 mEPSC 的頻率 (Cunningham *et al.*, 2004)；但在某些實驗中，突觸前的抑制作用不一定會改變 mEPSC 的頻率 (Lee *et al.*, 2008)。在突觸前的 axon terminal 上幾乎沒有電位依賴型的鈉離子通道，以高電位依賴型的鈣離子通道為主 (Vautrin and Barker 2003)。因此 TTX 存在的情況下鈉離子通道受到抑制，因此高電位依賴型鈣離子通道無法開啟。若藥物作用在電位依賴型鈉離子通道或鈣離子通道上，藥物作用便無法反映在 mEPSC 的頻率上。由於本實驗系統下無法單獨觀察藥物對鈉離子通道之作用，carisbamate 是否直接抑制電位依賴型的鈉離子通道，仍須未來的實驗證實。

(三) 許多蛋白質都被認為會參與突觸前 vesicle 和細胞膜融合以及神經傳遞物質的釋放 (Sudhof, 1995)，這些情形被認為是透過 protein kinase 活化所致 (Greengard *et al.*, 1993)。PKA 和 PKC 曾經被報導會影響 DG 的突觸前神經傳遞物質釋放 (Chen and Roper, 2003)，某些抗癲癇藥物被報導會透過 PKC 和 adenylyl cyclase 的活化來影響 glutamate 釋放 (DeLorenzo *et al.*, 1977; Maneuf and McKnight, 2001)。之前的實驗顯示，藥物作用在突觸前影響 protein kinase 不會對 mEPSC 的頻率造成影響 (Takasu *et al.*, 2008)。因此，carisbamate 對 mEPSC 的頻率沒有影響，不能排除突觸前抑制 glutamate 釋放透過 protein kinase 的機轉而來。

Carisbamate 為一含有 carbamate 官能基藥物，經由另一個具抗癲癇作用藥物 felbamate 所修飾。同樣為廣效性抗癲癇藥物的 felbamate 被認為會調節電位依賴型的鈉離子通道 (White *et al.*, 1992; Taglialatela *et al.*, 1996)、抑制高電位依賴型鈣離子電流、在 GABA_A 受體產生異位調節 (Rho *et al.*, 1994; Kume *et al.*, 1996) 並阻斷 NMDA 受體參與的突觸反應 (Pugliese *et al.*, 1996)。本實驗中，由於灌流液中加入 PTX，抑

制GABA_A受體在DG的作用，因此無法觀察carisbamate對GABA_A受體的影響。在其他實驗中，有許多對TLE動物模型具有活性藥物之抗癲癇作用，來自於增加突觸前GABA釋放或減少周圍GABA再回收 (Macdonald and Kelly, 1994)，本實驗中不排除carisbamate的抗癲癇作用包含增強GABA的抑制。另外，本實驗探討carisbamate對胞外給予NMDA引發內留電流的影響，無法直接排除carisbamate對NMDA受體的影響。但在本實驗中，eEPSC_{AMPA/NMDA}的抑制幅度類似且NMDA抑制幅度略小，顯示carisbamate直接作用於NMDA受體的可能性較低。

開發抗癲癇藥物於過去二十年間有長足進展，大部分的癲癇病人受惠於市售的抗癲癇藥物，使病情得到良好的控制，但仍有大約 40%的病人受苦於難治型癲癇症，無法用藥物良好的控制病情 (Duncan *et al.*, 2006; French, 2007)。TLE 在難治型癲癇症中相當常見且容易診斷，尤以 hippocampal sclerosis 最為常見 (Engel, 1996)。臨床以及實驗都有許多證據顯示 hippocampus 與癲癇症的相關性，強化該腦區在 TLE 治療上所扮演的角色 (Sutula *et al.*, 1989; Babb *et al.*, 1991; Rogawski *et al.*, 1999; Eid *et al.*, 2008)。Carisbamate 除了在不同的癲癇動物模式上展現了廣效的抗癲癇作用，其中包含 TLE 的動物模式，足見該藥物的抗癲癇作用包含 hippocampus 腦區的保護能力 (André *et al.*, 2005; Rogawski, 2006; Bialer *et al.*, 2007; Nehlig *et al.*, 2008)。

DG 在許多研究被證明與 TLE 的形成以及上述所提之 TLE 動物模式具有高度相關。Granule cell 的 axon 稱作 mossy fiber，會投射至 CA3，是 dentate gyrus 唯一的 axonw 投射區域。在 TLE 的病人 (de Lanerolle *et al.*, 1989; Sutula *et al.*, 1989; Houser *et al.*, 1990; Babb *et al.*, 1991) 以及 TLE 的動物模式皆觀察到 mossy fiber 產生 sprouting 的情形，這些 mossy fiber 的形態改變會於其他的 granule cell 形成興奮性突觸 (Dudek and Sutula, 2007)。許多實驗都證明 mossy fiber sprouting 會降低癲癇發作

的閾值且會增加自發性癲癇再發作 (Buckmaster and Dudek, 1997)。另外也有實驗證明 TLE 的動物模式下，電生理及免疫組織染色結果顯示 DG 的 interneuron 數量減少，(Sloviter, 1987; Buckmaster and Dudek, 1997; Gorter *et al.*, 2001)，其中包含 GABA interneuron，使低癲癇發作閾值降低。證明在 DG 對於 TLE 形成或發作，扮演關鍵的角色。

縱合以上結果，本實驗認為 carisbamate 在 DG 抑制突觸前的 glutamate 釋放具有下列兩種意義：

(一) 維持 DG 的門閥功能。DG 主要由 EC 投射而來，此投射路為 perforant pathway，為 entorhinal cortex 至 dentate gyrus 的主要路徑。該路徑作為 hippocampus tri-synapse 的起點接受外來訊息，並含有大量的 GABA interneuron，因此被認為扮演 hippocampus 門閥的角色，調控來自 EC 的外來訊息 (Fricke and Prince, 1984; Stringer *et al.*, 1989; Scharfman, 1992; Staley *et al.*, 1992; Williamson *et al.*, 1993)。因此 perforant pathway 也被認為會影響 DG 的興奮性。當 perforant pathway 過度活化時會對 hippocampus 造成損傷。在 *in vivo* 的動物實驗中，連續四天刺激 perforant pathway 會使 DG granule cell 更容易 discharge (Kienzler F *et al.*, 2006)。證明 perforant pathway 興奮性增加時，容易改變 DG 的興奮性而引發癲癇症。正常生理情況下，DG granule cell 很少產生動作電位，因為該細胞有很高的靜止膜電位 (Fricke and Prince, 1984; Scharfman, 1992; Staley *et al.*, 1992; Williamson *et al.*, 1993)，以及周圍有很強的 GABA 受體參與之抑制 (Mody, 1992)。早期的實驗顯示，用電極刺激成年兔的 EC 或 perforant pathway 時，可以由埋在 DG 的電極記錄得到 EPSPs，並且伴隨著一個持續 100-150 ms 的巨大 IPSP。當刺激頻率高於 10 Hz 時，會觀察到 population spike 的數量減少。在電刺激的長度小於 1 s 時，確實會觀察到此抑制作用；但當刺激長度

大於 6 s 時，granule cell 的反應反而會增強。當刺激頻率則最大到 10 Hz，當刺激頻率超過至 20 Hz 時，訊號反而會被阻斷。這兩個結果顯示 DG 會限制特定長度和特定頻率的刺激 (Andersen *et al.*, 1966)。之後的實驗證明，當局部注射藥物所引發 EC 的 spike 若小於每分鐘 10 個，不會在觀察到行為上或代謝上的異常；或引發的 spike 每分鐘介於 10-30 個，則會觀察到 DG 和 EC 的 deoxyglucose 增加，但僅限於 DG 的 molecular layer；若引發的 spike 每分鐘大於 40 個，則會引發癲癇，並且代謝上的改變除了 EC、DG 外，還擴及 CA1、CA3 或偶而擴散至部分 limbic 系統。這樣的結果顯示 DG 會限制癲癇的發作，並限制其影響範圍 (Collins *et al.*, 1983)。DG 雖然有門閥的作用，能將興奮性訊號擋在門外，但有實驗顯示 DG 門閥的特性在某些情形下會被「破壞 (breakdown)」。實驗顯示，kindling 後和正常實驗動物製備的 hippocampus 腦片相比，正常腦片刺激 DG 引發 epileptiform 的情形比 kindling 後的腦片困難，顯示在 kindling 後會降低 DG 門閥的作用 (Behr *et al.*, 1998)。當突觸前過度興奮，DG granule cell 周圍的 GABAergic 細胞無法成功抑制時，就可以突破 DG 這道關卡 (Hsu, 2007)。當藥物作用於突觸前，有效抑制 glutamate 釋放時，便能抑制突觸前興奮性訊號，降低 GABAergic 細胞抑制失敗的機會，避免 hippocampus 接受外來刺激而引發癲癇。因此，藥物抑制 glutamate 對於在癲癇發作情形下維持 DG 的功能扮演很重要的角色。

(二) 減緩在癲癇發作下 glutamate 大量釋放引起的細胞毒性。許多證據指出神經細胞暴露在 glutamate 下會造成延遲的細胞死亡 (Lipton and Rosenberg, 1994)。當 NMDA 受體活化或 non-NMDA 受體活化間接活化電位依賴型鈣離子通道時，使得細胞內部有大量鈣離子堆積而導致細胞死亡 (Weiss *et al.*, 1990)。癲癇引發的神經損傷可能來自於 glutamate 引起的細胞死亡逐漸受到重視，Glutamate 的過度釋放會形成 mesial temporal sclerosis (Liu *et al.*, 1995)，因而癲癇發作的情形下會引起神經損

傷。MK-801 或 NBQX 可以保護癲癇引發的神經損害 (Liu *et al.*, 1995)。因此，抑制突觸前 glutamate 釋放對於 TLE 具有一定程度的保護作用。

臨床上許多抗癲癇藥物抑制 glutamate 釋放或直接抑制 glutamate 受體，可以產生抗癲癇作用，可在不同的藥物和顳葉相關的腦區觀察到。在 DG，lamotrigine 可以抑制突觸後 AMPA 受體參與的興奮性電流 (Lee *et al.*, 2008)。在 amygdala，topiramate 透過作用在 GluR5 kainate 受體抑制 glutamate 引發的興奮性電流 (Gryder and Rogawski MA, 2003)。在 entorhinal cortex，gabapentin 和 pregabalin 則會作用於突觸前的 P/Q- type 鈣離子通道而抑制 glutamate 釋放 (Cunningham *et al.*, 2004)。本實驗室先前的研究也顯示在 DG，新一代的抗癲癇藥物 levetiracetam 會抑制突觸前 glutamate 釋放，而且此抑制作用同樣來自抑制突觸前的 P/Q- type 高電位依賴型鈣離子通道。

由於 TLE 會導致 DG 癲癇發作閾值下降，hippocampus 興奮性提高，因此減少 glutamate 系統的活性降低，可以有效減少發作次數。抑制 DG 突觸前的抑制，則可以減少 DG 周邊 GABAergic 抑制失敗的機會，維持 DG 的正常門閥功能，達到預防癲癇發作的目的。本實驗結果顯示 carisbamate 會抑制 DG 突觸前 glutamate 釋放，為該藥可能的抗癲癇機轉。而該藥是否透過抑制 L-type 以外的鈣離子通道，或由其他機轉而來，則需後續實驗證明之。

第五章 結論

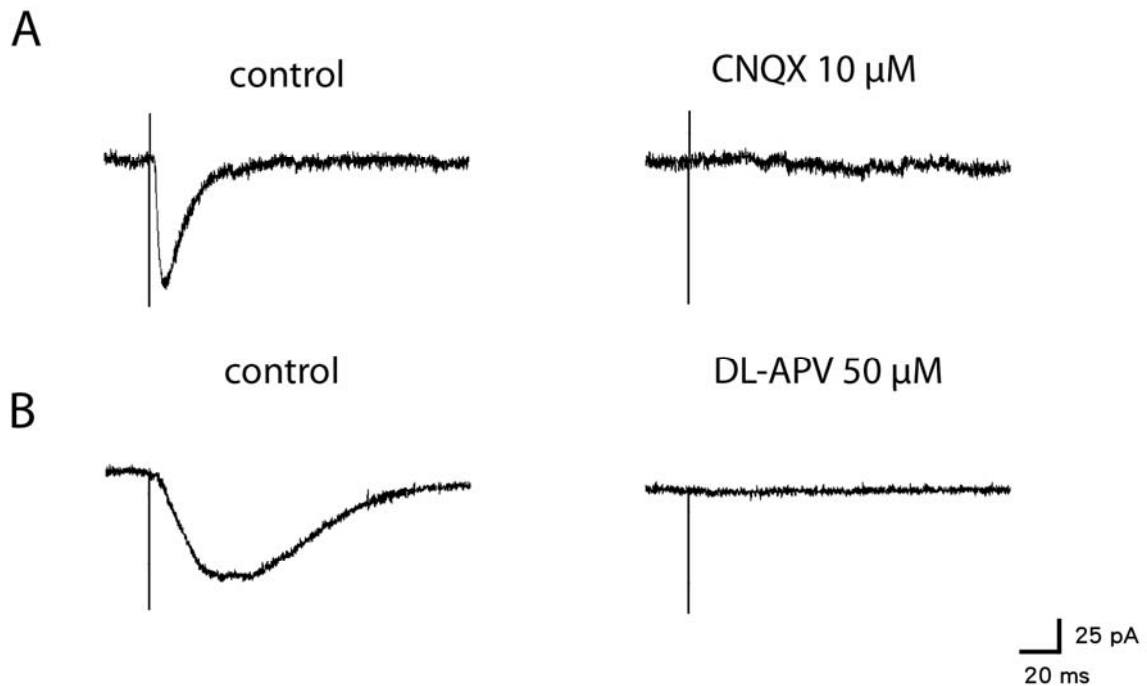
綜合實驗結果，得到以下結論：

(1) Carisbamate 在 P21 的 Wistar 大鼠所製備的腦片上，確實在 hippocampus 的 DG 抑制 glutamate 受體所引發之興奮性電位並展現濃度依賴性的抑制作用。

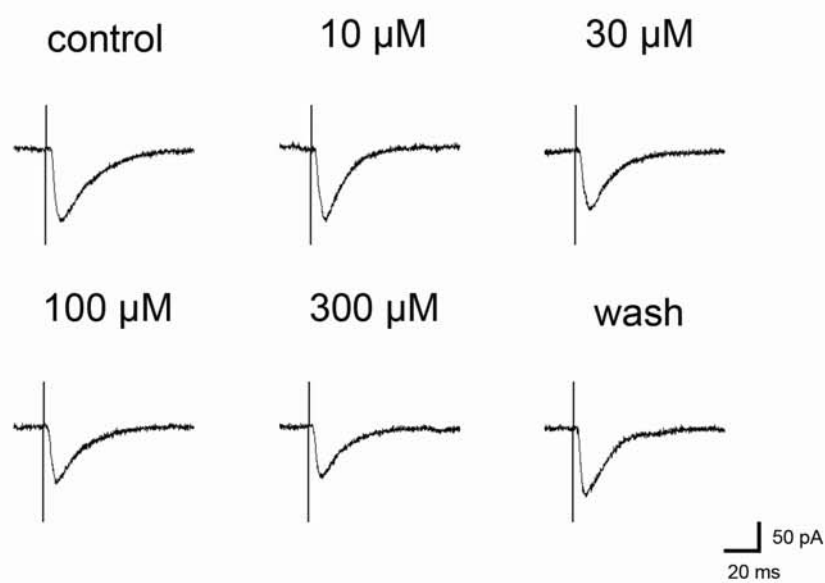
(2) Carisbamate 以一個相近的比例抑制 AMPA 或 NMDA 引發的興奮性電流，抑制配對刺激比率；carisbamate 不會影響胞外給予 AMPA 引發之電流；carisbamate 對 mEPSC 的電流大小不會產生抑制。因此，評估 carisbamate 的抑制作用來自抑制突觸前減少 glutamate 釋放。

(3) Carisbamate 的抑制作用不是透過 L-type 鈣離子通道而來。此突觸前的抑制作用被認為是 carisbamate 抗癲癇作用的之一。

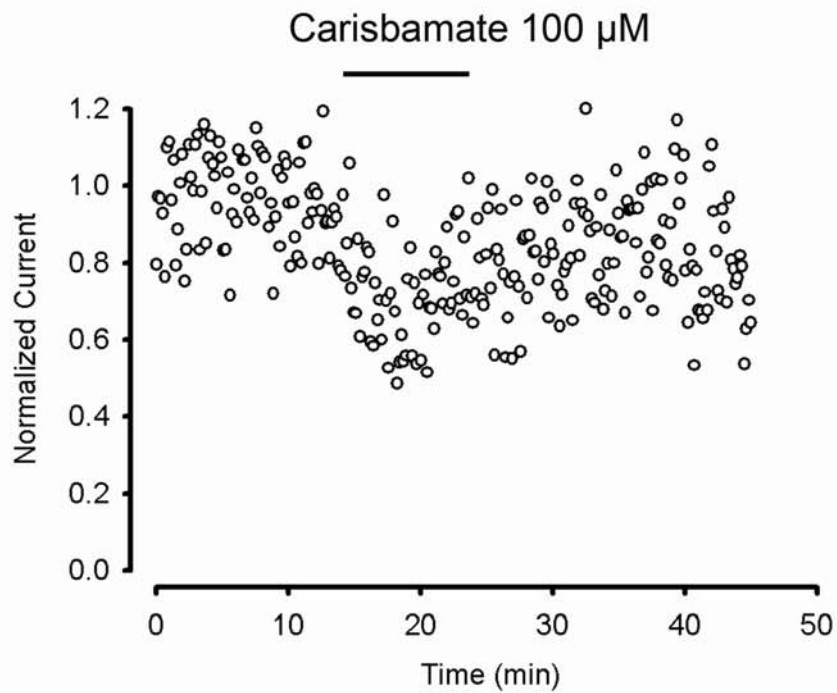
(4) Carisbamate 抑制 glutamate 的釋放以降低 DG 的興奮性並維持 DG 的門閥功能被認為是該藥的抗癲癇作用之一。



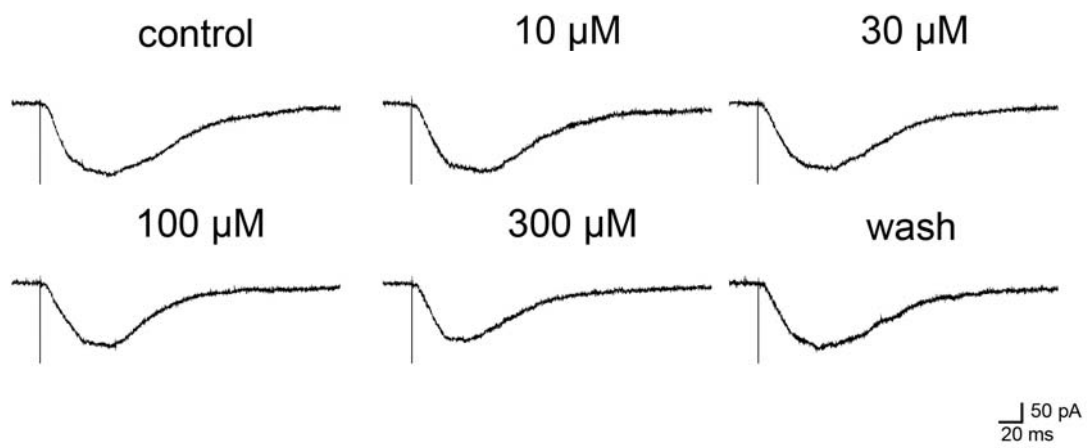
圖三：Glutamate作用在受體上所引發興奮性突觸後電流（evoked EPSC）。A圖：Glutamate作用於AMPA受體，該受體通道開啟所產生之AMPA受體參與之興奮性突觸後電流（evoked EPSC_{AMPA}）。ACSF中含有GABA_A受體阻斷劑PTX（100 μM）和NMDA受體阻斷劑DL-APV（50 μM）。加入CNQX（10 μM）後會受到抑制。B圖：Glutamate作用於NMDA受體，在低Mg²⁺的ACSF下，使NMDA受體通道開啟所產生之NMDA受體參與之興奮性突觸後電流（evoked EPSC_{NMDA}）。ACSF中含有GABA_A受體阻斷劑PTX（100 μM）、CNQX（10 μM）和D-serine（10 μM）。加入DL-APV（50 μM）後會受到抑制。A圖與B圖皆將膜電位固定在-70 mV。



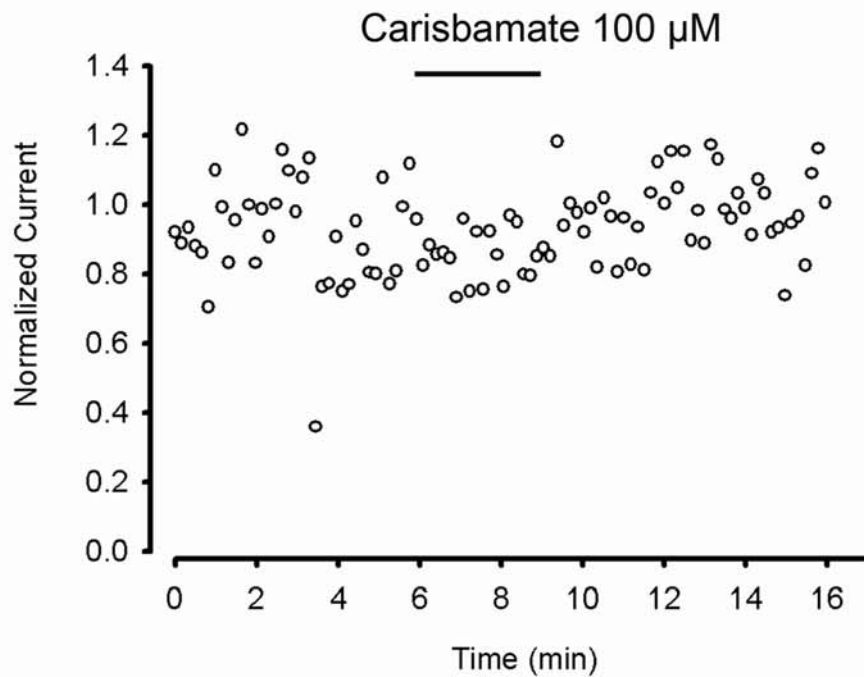
圖四：Carisbamate對AMPA受體參與之興奮性突觸後電流（ $eEPSC_{AMPA}$ ）產生劑量相關的抑制作用。



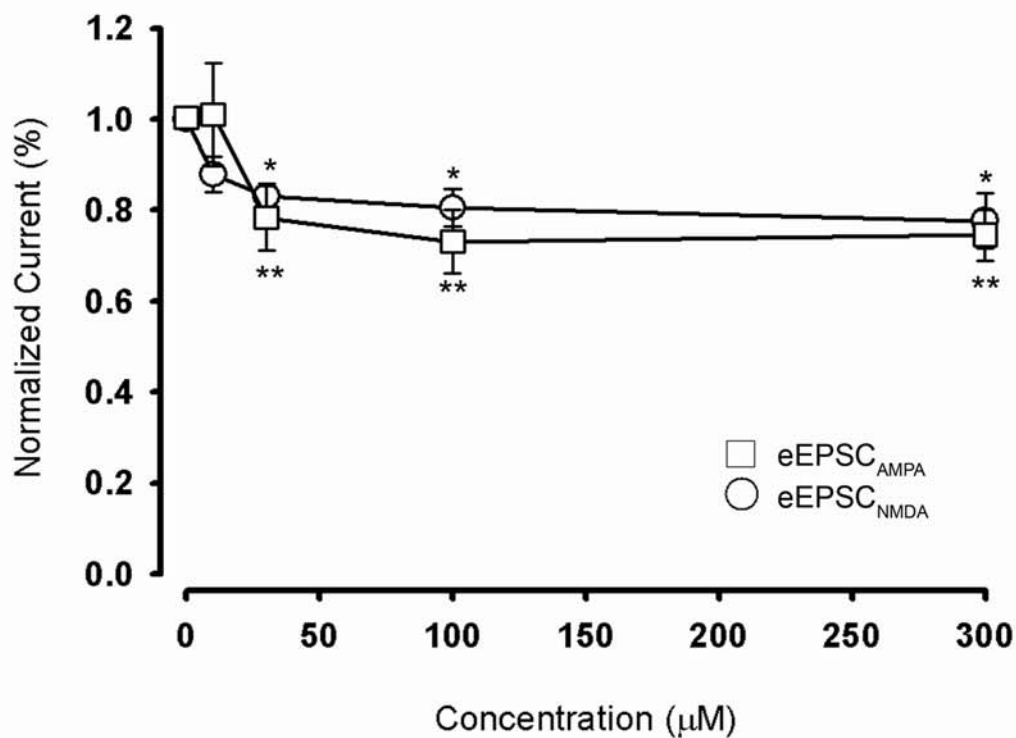
圖五：Carisbamate抑制AMPA參與之興奮性突觸後電流（ $eEPSC_{AMPA}$ ）。在頻率0.1 Hz的電刺激下，會產生AMPA受體參與之興奮性突觸後電流，當此電流維持穩定後，便在灌流液中加入carisbamate，直到藥物作用達到穩定後，置換回原本之灌流液。此為加入carisbamate 100 μ M後對AMPA受體引發之興奮性電流產生抑制作用。



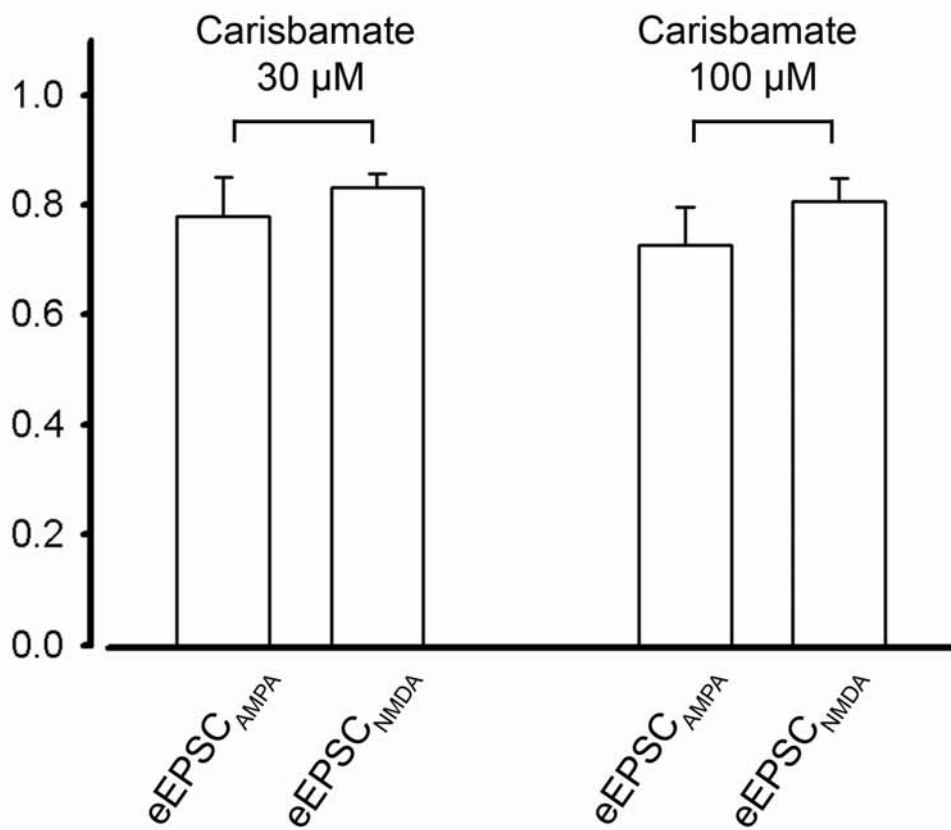
圖六：Carisbamate對NMDA受體參與之興奮性突觸後電流（ $\text{eEPSC}_{\text{NMDA}}$ ）產生劑量相關的抑制作用。



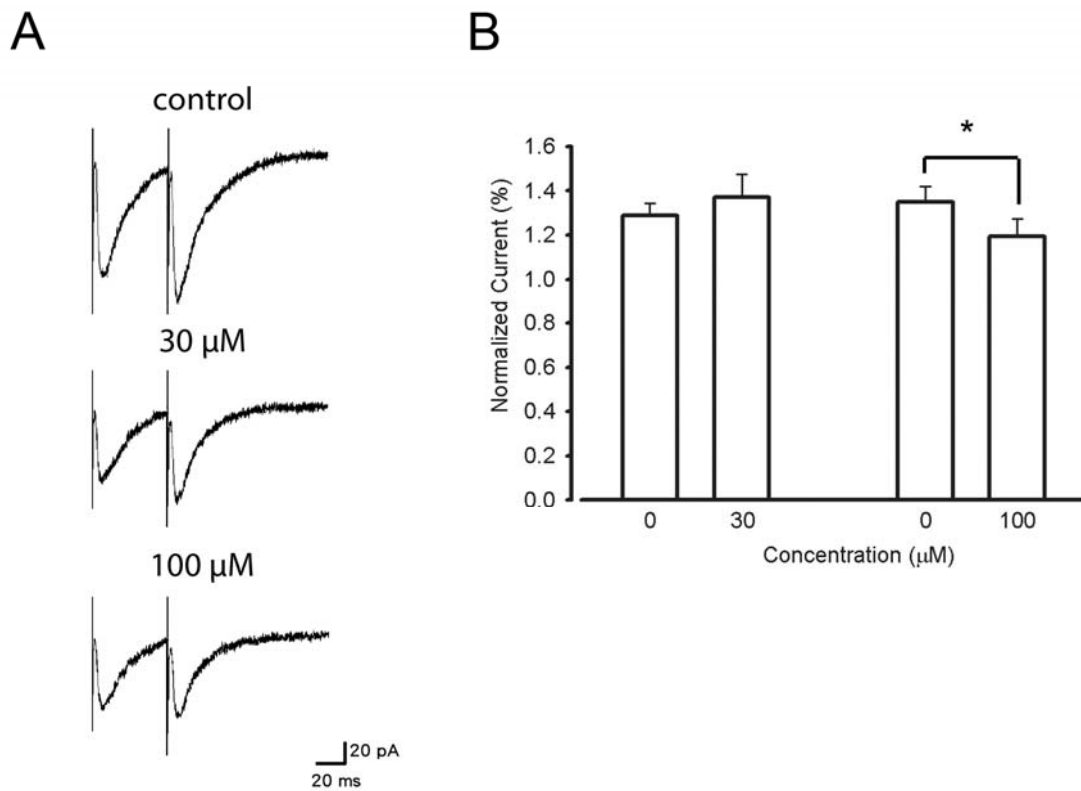
圖七：Carisbamate抑制NMDA參與之興奮性突觸後電流（ $eEPSC_{NMDA}$ ）。在頻率0.1 Hz的電刺激下，會產生NMDA受體參與之興奮性突觸後電流，當此電流維持穩定後，便在灌流液中加入carisbamate，直到藥物作用達到穩定後，再將置換回原本之灌流液。此為加入carisbamate 100 μ M後對NMDA受體引發之興奮性電流產生抑制作用。



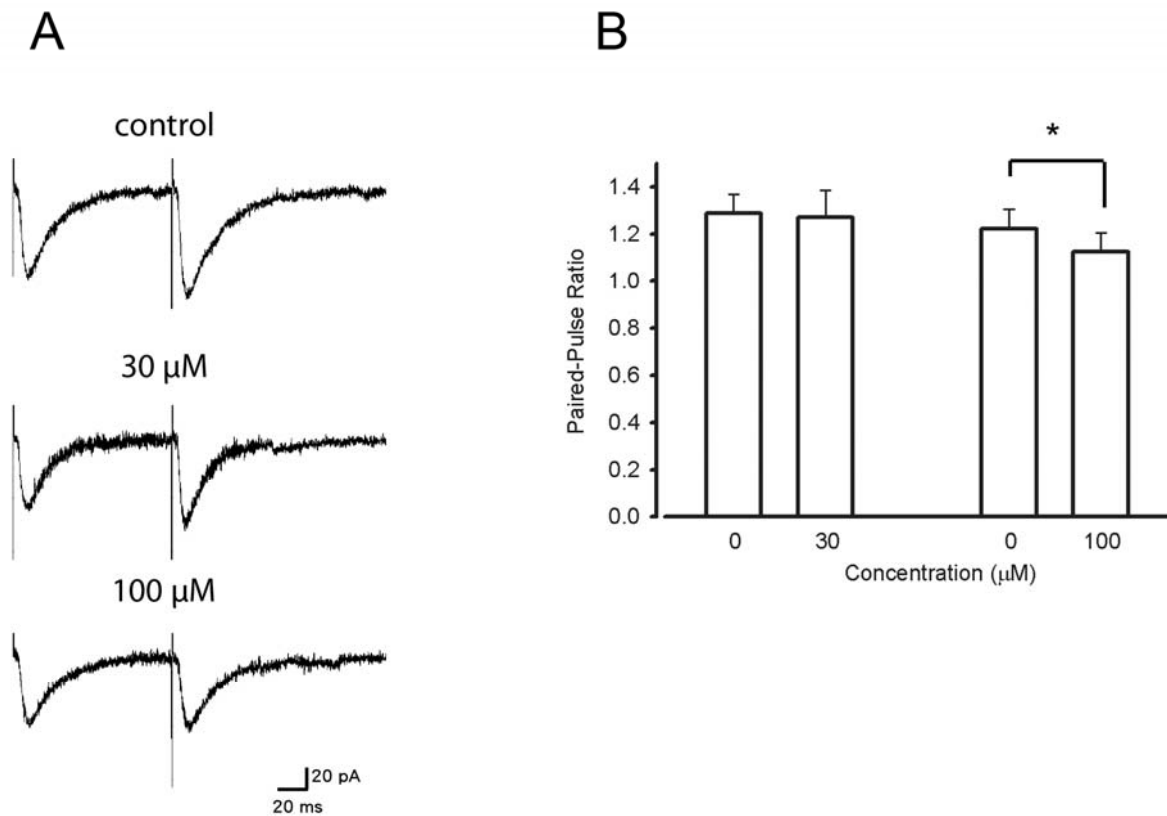
圖八：Carisbamate依照濃度依賴性抑制eEPSC_{AMPA/NMDA}。Carisbamate給予後的eEPSC_{AMPA}的平均電流改變為控制組的106.7±11.4% (10 μM, n=4)、78.0±7.1% (30 μM, n=7)、72.7±6.9% (100 μM, n=4)、74.2±5.6% (300 μM, n=4)。30 μM、100 μM、300 μM都具有顯著差異 (* : p<0.05, Student' s t-test)。carisbamate給予後的eEPSC_{NMDA}的平均電流改變為控制組的87.8±3.9% (10 μM, n=4)、83.1±2.6% (30 μM, n=5)、80.6±4.2% (100 μM, n=6)、77.7±6.1% (300 μM, n=4)，其中30 μM、100 μM、300 μM都具有顯著差異 (** : p<0.05, Student' s t-test)



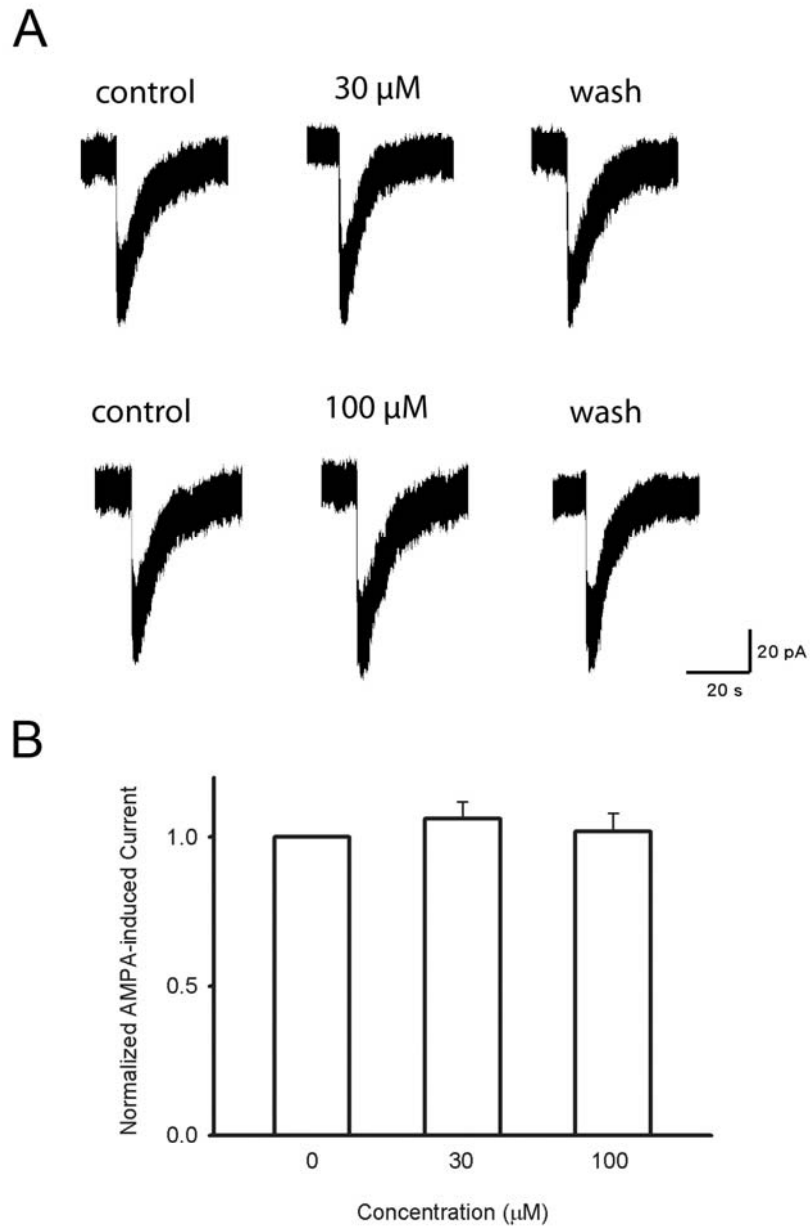
圖九：eEPSC_{AMPA/NMDA}皆受到carisbamate抑制，且在30 μM 及100 μM 的 eEPSC_{AMPA/NMDA}並沒有顯著差異。



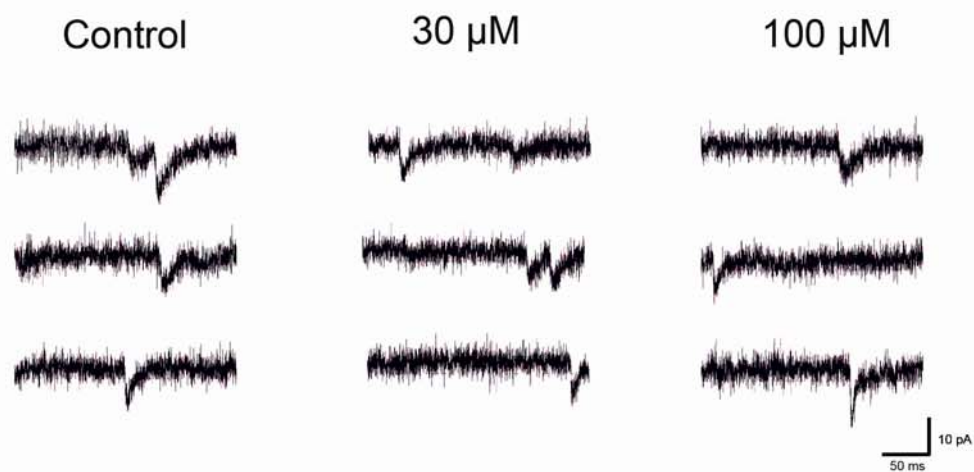
圖十：50 ms刺激間隔下，paired-pulse ratio (PPR) 對 carisbamate的作用。A圖：Carisbamate在30 μ M和100 μ M下具有不同的作用。B圖：Carisbamate在低濃度不會影響PPR，在高濃度會降低PPR。(p<0.05)



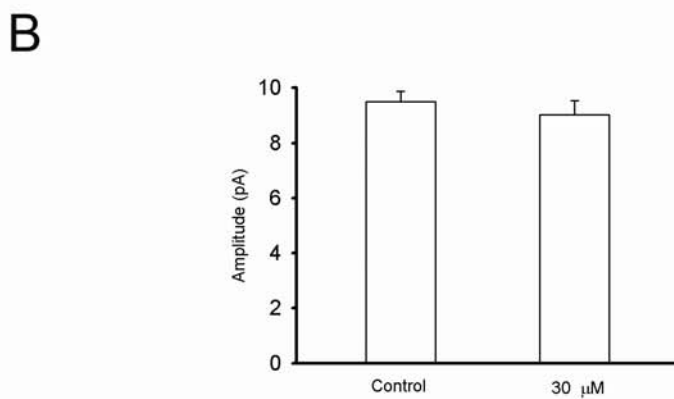
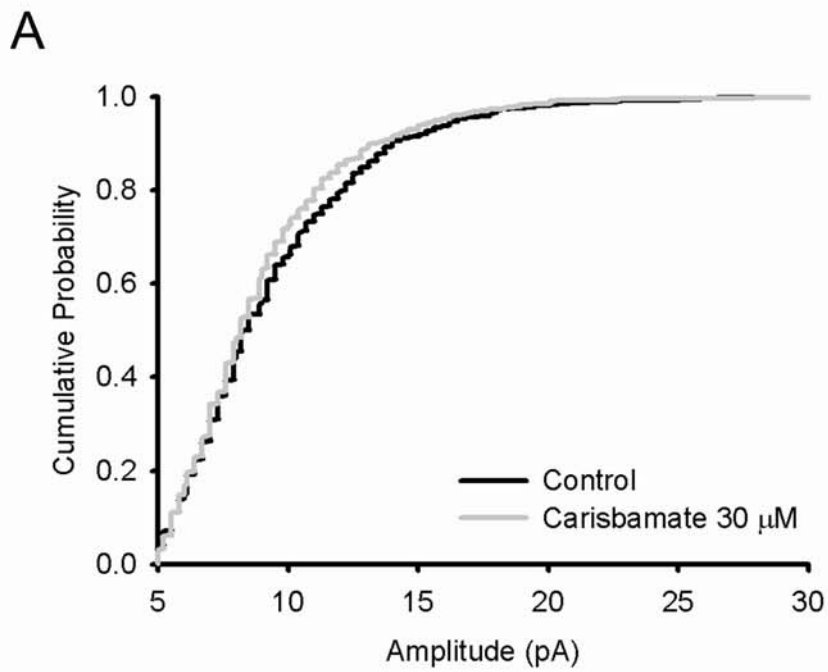
圖十一：100 ms刺激間隔下，paired-pulse ratio (PPR) 對 carisbamate的作用。A圖：Carisbamate在30 μ M和100 μ M下具有不同的作用。B圖：Carisbamate在低濃度不會影響PPR，在高濃度會降低PPR。(p<0.05)



圖十二：Carisbamate無法影響胞外給予AMPA引發之電流。A圖：胞外給予AMPA引發之內流電流。B圖：在30 μM 及100 μM 下，carisbamate皆無法改變胞外給予AMPA引發之內流電流。

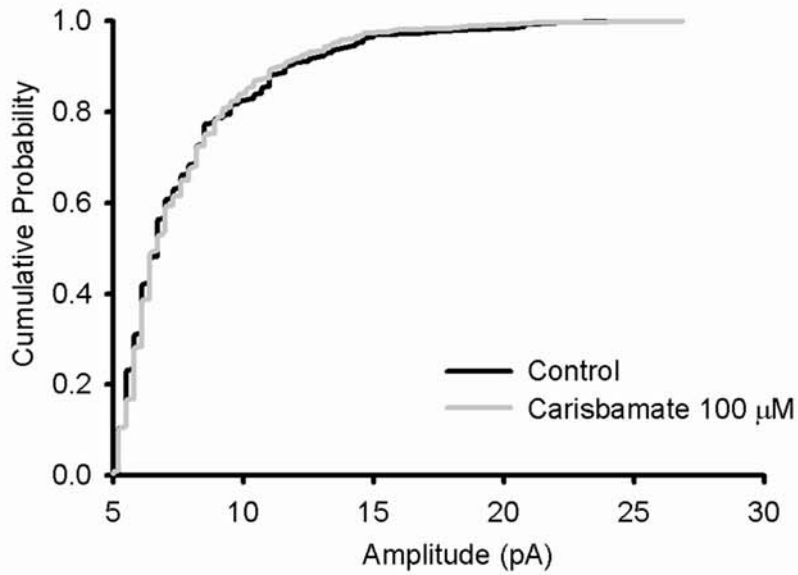


圖十三：Carisbamate對於mEPSC_{AMPA}的電流大小和頻率都沒有影響。圖為control以及在30 μM和100 μM下所紀錄得的mEPSC。

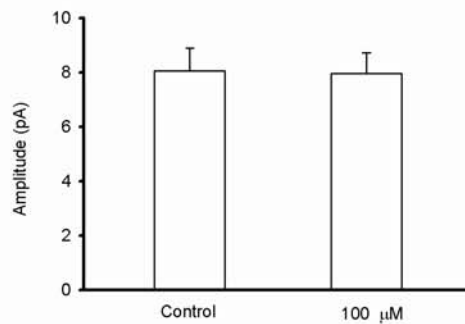


圖十四：A圖：Carisbamate對於mEPSC_{AMPA}在30 μ M下不會影響cumulative probability的分佈情形（KS test $p > 0.05$ ）。B圖：Carisbamate不會改變30 μ M下，mEPSC平均電流大小。

A

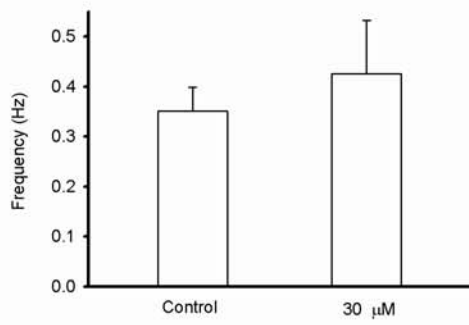


B

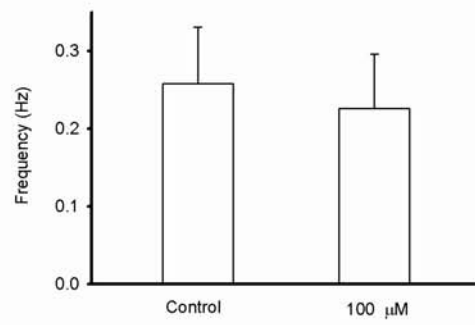


圖十五：A圖：Carisbamate對於mEPSC_{AMPA}在100 μM下不會影響cumulative probability的分佈情形（KS test $p > 0.05$ ）。
B圖：Carisbamate不會改變100 μM下，mEPSC平均電流大小。

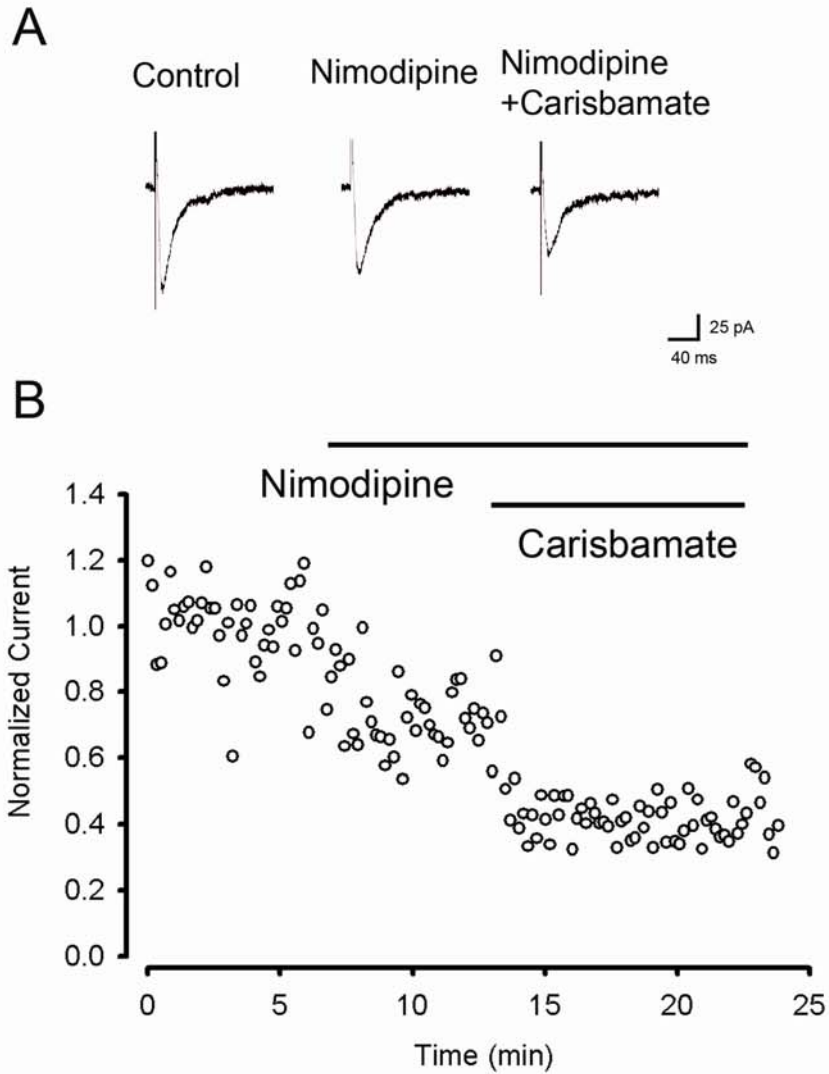
A



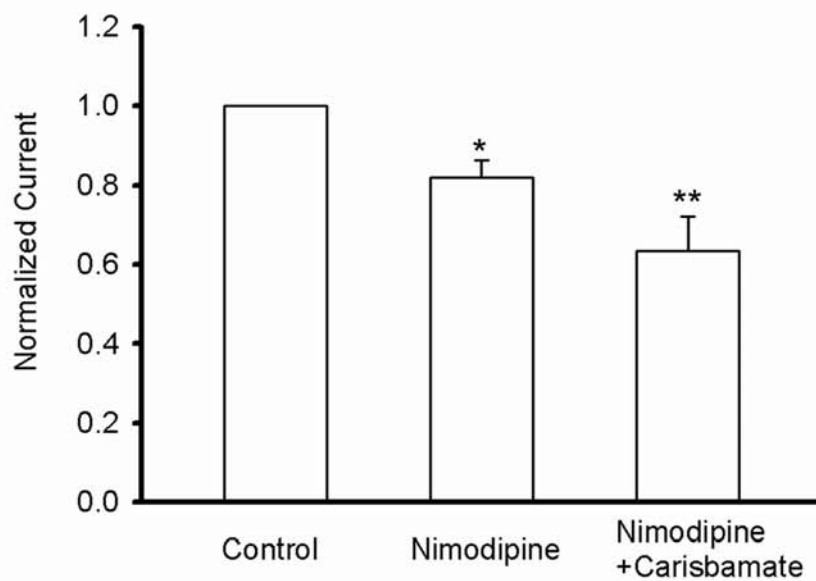
B



圖十六：Carisbamate對於mEPSC_{AMPA}的頻率都沒有影響。A圖及B圖：30 μM和100 μM下皆改變mEPSC的頻率。



圖十七：Nimodipine無法遮蔽carisbamate在突觸前的抑制作用。A圖：Nimodipine加入抑制eEPSC_{AMPA}的電流大小。B圖，給予L-type鈣離子通道阻斷劑nimodipine 10 μ M後，對eEPSC_{AMPA}產生抑制作用。隨後給予carisbamate 100 μ M，仍舊能進一步抑制。



圖十八：Nimodipine 10 μ M 抑制作用會將平均電流降低為為控制組的 $0.82 \pm 0.04\%$ (n=4, p<0.01)，給予 carisbamate 100 μ M 會將平均電流抑制到控制組的 0.63 ± 0.09 (n=4, p<0.05)。顯示 carisbamate 的突觸前抑制作用並非透過 L-type 鈣離子通道而來。

參考文獻

Amaral DG, Scharfman HE, Lavenex P. (2007) The dentate gyrus: fundamental neuroanatomical organization (dentate gyrus for dummies). *Prog Brain Res* 163:3-22.

André V, Ferrandon A, Marescaux C, Nehlig A. (2001) Vigabatrin protects against hippocampal damage but is not antiepileptogenic in the lithium-pilocarpine model of temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Res* 47:99-117.

André V, Dubé C, François J, Leroy C, Rigoulot MA, Roch C, Namer IJ, Nehlig A. (2007) Pathogenesis and pharmacology of epilepsy in the lithium-pilocarpine model. *Epilepsia* 48 Suppl 5:41-7.

Andreasen M, Hablitz JJ. (1994) Paired-pulse facilitation in the dentate gyrus: a patch-clamp study in rat hippocampus in vitro. *J Neurophysiol* 72:326–336.

Andersen P, Holmqvist B, Voorhoeve PE. (1996) Entorhinal activation of dentate granule cells. *Physiol Scand.* 66:448-60.

Andersen P, Lømo T. (1969) Organization and frequency dependence of hippocampal inhibition. In: *Basic mechanisms of the epilepsies* (Jasper HH, Ward AA, Pope A, eds), P604-609. Boston: Little, Brown and Company, Inc.

Armijo JA, Shushtarian M, Valdizan EM, Cuadrado A, de las Cuevas I, Adín J. (2005) Ion channels and epilepsy. *Curr Pharm Des* 11:1975-2003.

Ashcroft FM (2000) Glutamate receptors. In: *Ion channels and disease : channelopathies* P291-304 San Diego: Academic Press

Babb TL, Kupfer WR, Pretonus JK, Crandall PH, Levesque MF. (1991) Synaptic reorganization by mossy fibers in human epileptic fascia dentata. *Neuroscience* 42:351-363.

Bialer M, Johannessen SI, Kupferberg HJ, Levy RH, Perucca E, Tomson T. (2007) Progress report on new antiepileptic drugs: A summary of the Eighth Eilat Conference (EILAT VIII). *Epilepsy Res* 73:1-52.

Behr J, Lyson KJ, Mody I. (1998) Enhanced propagation of epileptiform activity through the kindled dentate gyrus. *J Neurophysiol* 79:1726-32.

Blitz DM, Foster KA, Regehr WG. (2004) Short-term synaptic plasticity: a comparison of two synapses. *Nat Rev Neurosci* 5:630-40.

Brodie MJ. (2005) Diagnosing and predicting refractory epilepsy. *Acta Neurol Scand Suppl* 181:36-9.

Buckmaster PS, Dudek FE. (1997) Neuron loss, granule cell axon reorganization, and

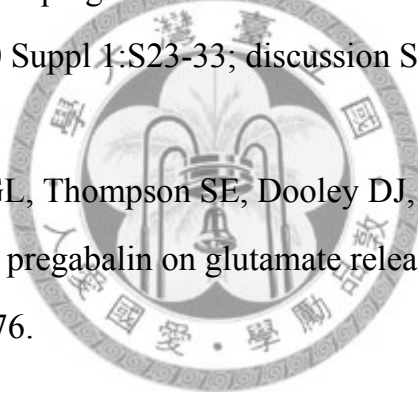
functional changes in the dentate gyrus of epileptic kainate-treated rats. *J Comp Neurol* 385:385-404.

Cohen AS, Lin DD, Quirk GL, Coulter DA. (2003) Dentate granule cell GABA(A) receptors in epileptic hippocampus: enhanced synaptic efficacy and altered pharmacology. *Eur J Neurosci* 17:1607-16.

Collins RC, Tearse RG, Lothman EW.(1983) Functional anatomy of limbic seizures: focal discharges from medial entorhinal cortex in rat. *Brain Res* 280:25-40.

Coulter DA. (1999) Chronic epileptogenic cellular alterations in the limbic system after status epilepticus. *Epilepsia* 40 Suppl 1:S23-33; discussion S40-1.

Cunningham MO, Woodhall GL, Thompson SE, Dooley DJ, Jones RS.(2004) Dual effects of gabapentin and pregabalin on glutamate release at rat entorhinal synapses in vitro. *Eur J Neurosci* 20:1566-76.



Deshpande LS, Nagarkatti N, Sombati S, Delorenzo RJ. (2008a) The novel antiepileptic drug carisbamate (RWJ 333369) is effective in inhibiting spontaneous recurrent seizure discharges and blocking sustained repetitive firing in cultured hippocampal neurons. *Epilepsy Res* 79:158-65.

Deshpande LS, Nagarkatti N, Ziobro JM, Sombati S, Delorenzo RJ. (2008b) Carisbamate prevents the development and expression of spontaneous recurrent epileptiform discharges and is neuroprotective in cultured hippocampal neurons. *Epilepsia* May

Dudek FE, Sutula TP. (2007) Epileptogenesis in the dentate gyrus: a critical perspective.

Prog Brain Res 163:755-73.

Grabenstatter HL, Dudek FE.(2008) A new potential AED, carisbamate, substantially reduces spontaneous motor seizures in rats with kainate-induced epilepsy. *Epilepsia* May

Dietrich D, Kirschstein T, Kukley M, Pereverzev A, von der Brelie C, et al. (2003) Functional specialization of presynaptic Cav2.3 Ca²⁺ channels. *Neuron* 39:483–96

Duncan JS, Sander JW, Sisodiya SM, Walker MC. (2006) Adult epilepsy. *Lancet* 367:1087-100.

Eid T, Williamson A, Lee TS, Petroff OA, de Lanerolle NC. (2008) Glutamate and astrocytes-key players in human mesial temporal lobe epilepsy? *Epilepsia* 49 Suppl 2:42-52.

Engel Jr J. (1996) Introduction to temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Res* 26:141-150.

Epsztein J, Represa A, Jorquera I, Ben-Ari Y, Crepel V. (2005) Recurrent mossy fibers establish aberrant kainate receptor-operated synapses on granule cells from epileptic rats. *J Neurosci* 25:8229–8239.

Feindel W (1993) Toward a surgical cure for epilepsy. In: *Surgical treatment of the epilepsies, second edition* (Engel J, Jr, ed), pp 1-9. New York: Raven Press.

French JA. (2007) Refractory epilepsy: clinical overview. *Epilepsia* 48 Suppl 1:3-7

Fricke RA, Prince DA. (1984) Electrophysiology of dentate gyrus granule cells. *J Neurophysiol.* 51:195-209.

Frizelle HP, Moriarty DC, O'Connor JJ. (1999) The combined effects of halothane and lamotrigine on excitatory postsynaptic potentials and use-dependent block in the rat dentate gyrus in vitro. *Anesth Analg* 89:496–501.

Goddard, GV. (1967) Development of epileptic seizures through brain stimulation at low intensity. *Nature* 214:1020–1021.

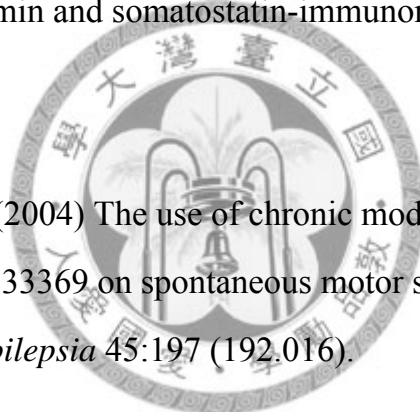
Gorter JA, van Vliet EA, Aronica E, Lopes da Silva FH. (2001) Progression of spontaneous seizures after status epilepticus is associated with mossy fibre sprouting and extensive bilateral loss of hilar parvalbumin and somatostatin-immunoreactive neurons. *Eur J Neurosci* 13:657-69.

Grabenstatter HL, Dudek FE. (2004) The use of chronic models in antiepileptic drug discovery: the effect of RWJ-333369 on spontaneous motor seizures in rats with kainate-induced epilepsy (abstract). *Epilepsia* 45:197 (192.016).

Green JD, Petsche H. (1961) Hippocampal electrical activity. IV. Abnormal electrical activity. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 13:868-879.

Gryder DS, Rogawski MA. (2003) Selective antagonism of GluR5 kainate-receptor-mediated synaptic currents by topiramate in rat basolateral amygdala neurons. *J Neurosci* 23:7069-74.

Hagler DJ, Goda Y. (2001) Properties of synchronous and asynchronous release during pulse train depression in cultured hippocampal neurons. *J Neurophysiol* 85:2324–34



Houser CR, Miyashiro JE, Swartz BE, Walsh GO, Rich JR, Delgado-Escueta AV. (1990) Altered patterns of dynorphin immunoreactivity suggest mossy fiber reorganization in human hippocampal epilepsy. *J Neurosci* 10:267-82.

Hsu D. (2007) The dentate gyrus as a filter or gate: a look back and a look ahead. *Prog Brain Res* 163:601-13.

Katz B. (1969) The Release of Neural Transmitter Substances. Liverpool: *Liverpool Univ.Press*

Kienzler F, Jedlicka P, Vuksic M, Deller T, Schwarzacher SW. (2006) Excitotoxic hippocampal neuron loss following sustained electrical stimulation of the perforant pathway in the mouse. *Brain Res* 1085:195-8.

Kume A, Greenfield Jr. LJ, Macdonald RL, Albin RL. (1996) Felbamate inhibits [³H]-butylbicycloorthobenzoate (TBOB) binding and enhances Cl⁻ current at the Gama-aminobutyric acid_A (GABA) receptor. *J Pharmacol Exp Ther* 277:1784–1792.

Koh J-Y, Goldberg MP, Hartley DM, Choi DW.(1990) Non-NMDA receptor-mediated neurotoxicity in cortical culture. *J Neurosci* 7: 693-705.

de Lanerolle NC, Kim JH, Robbins RJ, Spencer DD. (1989) Hippocampal interneuron loss and plasticity in human temporal lobe epilepsy. *Brain Res* 495(2):387-95.

Lee CY, Fu WM, Chen CC, Su MJ, Liou HH. (2008) Lamotrigine inhibits postsynaptic AMPA receptor and glutamate release in the dentate gyrus. *Epilepsia*. 49:888-97.

Lipton SA, Rosenberg PA.(1994) Excitatory amino acids as a final common pathway for neurologic disorders. *N Engl J Med* 330: 613-22.

Liu Z, Mikati M, Holmes GL.(1995) Mesial temporal sclerosis: pathogenesis and significance. *Pediatr Neurol* 12:5-16.

Lothman EW, Bertram 3rd EH, Stringer JL. (1991) Functional anatomy of hippocampal seizures. *Prog Neurobiol* 37:1-82.

Lueas DR, Newhouse JP. (1957) The toxic effects of sodium L-glutamate on the inner layers of the retina. *Arch Ophthalmol* 58:193-201.

Lynch BA, Lambeng N, Nocka K, et al. (2004) The synaptic vesicle protein SV2A is the binding site for the antiepileptic drug levetiracetam. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:9861–66.

Manabe T, Wyllie DJ, Perkel DJ, Nicoll RA. (1993) Modulation of synaptic transmission and long-term potentiation: effects on paired pulse facilitation and EPSC variance in the CA1 region of the hippocampus. *J Neurophysiol* 70:1451-1459.

Macdonald RL, Kelly KM. (1995) Antiepileptic drug mechanisms of action. *Epilepsia*. 36 Suppl 2:S2-12.

McIntyre DC, Racine RJ. (1986) Kindling mechanisms: current progress on an experimental epilepsy model. *Prog Neurobiol* 127:1-12.

McNamara JO. (1999) Emerging insights into the genesis of epilepsy. *Nature* 24;399(6738 Suppl):A15-22.

Mikkonen M, Soininen H, Kalvianen R, Tapiola T, Ylinen A, Vapalahti M, Paljarvi L, Pitkanen A. (1998) Remodeling of neuronal circuitries in human temporal lobe epilepsy: increased expression of highly polysialylated neural cell adhesion molecule in the hippocampus and the entorhinal cortex. *Ann. Neurol* 44:923-934.

Mody I. (2005) Aspects of the homeostatic plasticity of GABA_A receptor-mediated inhibition. *J Physiol* 562:37-46.

Mody I, Otis TS, Staley KJ, Köhr G. (1992) The balance between excitation and inhibition in dentate granule cells and its role in epilepsy. *Epilepsy Res Suppl* 9:331-9.

Morimoto K, Sato H, Sato K, Sato S, Yamada N, (1997a) BW1003C87, phenytoin and carbamazepine elevate seizure threshold in the rat amygdala-kindling model of epilepsy. *Eur J Pharmacol* 339:11–15.

Morimoto K, Sato H, Yamamoto Y, Watanabe T, Suwaki H. (1997b) Antiepileptic effects of tiagabine, a selective GABA uptake inhibitor, in the rat kindling model of temporal lobe epilepsy. *Epilepsia* 38:966–974.

Murray MI, Halpern MT, Leppik IE. (1996) Cost of refractory epilepsy in adults in the USA. *Epilepsy Res* 23:139-148.

Nadler JV. (1981) Kainic acid as a tool for the study of temporal lobe epilepsy. *Life Sci* 29:2031-42.

Nusser Z, Mody I. (2002) Selective modulation of tonic and phasic inhibitions in dentate

gyrus granule cells. *J Neurophysiol* 87:2624-8.

Novak GP, Kelley M, Zannikos P, Klein B. (2007) Carisbamate (RWJ-333369). *Neurotherapeutics* 4:106-9.

Onodera K, Hamba M, Takahashi T. (2000) Primary afferent synaptic responses recorded from trigeminal caudal neurons in a mandibular nerve-brainstem preparation of neonatal rats. *J Physiol* 524:503–512.

Otsuki K, Morimoto K, Sato K, Yamada N, Kuroda S. (1998) Effects of lamotrigine and conventional antiepileptic drugs on amygdala- and hippocampal-kindled seizures in rats. *Epilepsy Res* 31:101-112.

Perkel DJ and Nicoll RA. (1993) Evidence for all-or-none regulation of neurotransmitter release: implications for long-term potentiation. *J Physiol* 471:481-500.

Pugliese AM, Passani MB, Pepeu G, Corradetti R. (1996) Felbamate decreases synaptic transmission in the CA1 region of rat hippocampal slices. *J Pharmacol Exp Ther* 279: 1100–1108.

Purpura DP, McMurtry JG, Leonard CF, Malliani A. (1966) Evidence for dendritic origin of spikes without depolarizing prepotentials in hippocampal neurons during and after seizure. *J Neurophysiol* 29:954-979.

Rho JM, Donevan SD, Rogawski MA. (1994) Mechanism of action of the anticonvulsant felbamate: opposing effects on N-methyl-D-aspartate and Gama-amino butyric acid_A receptors. *Ann Neurol* 35, 229–234.

Rogawski MA, Donevan SD. (1999) AMPA receptor in epilepsy and as targets for antiepileptic drugs. *Adv Neurol* 79:947–963.

Rogawski MA, Loscher W. (2004) The neurobiology of antiepileptic drugs. *Nat Rev Neurosci* 5:553–564.

Scharfman HE. (1992) Differentiation of rat dentate neurons by morphology and electrophysiology in hippocampal slices: granule cells, spiny hilar cells and aspiny 'fast-spiking' cells. *Epilepsy Res Suppl.* 7:93-109.

Scharfman HE, Witter M. (2007) The dentate gyrus: a comprehensive guide to structure, function, and clinical implications. *Prog Brain Res* 163:xii.

Schwartzkroin PA. (1994) Role of the Hippocampus in Epilepsy. *Hippocampus* 4:239-242.

Sloviter RS. (1987) Decreased hippocampal inhibition and a selective loss of interneurons in experimental epilepsy. *Science* 235:73-6.

Staley KJ, Otis TS, Mody I. (1992) Membrane properties of dentate gyrus granule cells: comparison of sharp microelectrode and whole-cell recordings. *J Neurophysiol* 67:1346-58.

Sudhof TC. (2004) The synaptic vesicle cycle. *Annu Rev Neurosci* 27:509-47.

Sutula T, Cascino G, Cavazos J, Parada I, Ramirez L.(1989) Mossy fiber synaptic reorganization in the epileptic human temporal lobe. *Ann Neurol* 26:321-30.

Stell BM, Mody I. (2002) Receptors with different affinities mediate phasic and tonic GABA(A) conductances in hippocampal neurons. *J Neurosci.* 15;22(10):RC223.

Stringer JL, Williamson JM, Lothman EW. (1989) Induction of paroxysmal discharges in the dentate gyrus: frequency dependence and relationship to after discharge production. *J Neurophysiol* 62:126–135.

Subramaniam S, Rho JM, Penix L, Donevan SD, Fielding RP, Rogawski MA, (1995) Felbamate block of the N-methyl-d-aspartate receptor. *J Pharmacol Exp Ther* 273:878–886.

Sutula TG, Cascino J, Cavazos J, Parada I, Ramirez L. (1989) Mossy fiber synaptic reorganization in the epileptic human temporal lobe. *Ann Neurol* 26:321-330.

Tagliatalata M, Ongini E, Brown AM, Di Renzo G, Annunziato L. (1996) Felbamate inhibits cloned voltage-dependent Na⁺ channels from human and rat brain. *Eur. J. Pharmacol.* 316:373–377.

Takasu K, Ono H, Tanabe M. (2008) Gabapentin produces PKA-dependent pre-synaptic inhibition of GABAergic synaptic transmission in LC neurons following partial nerve injury in mice. *J Neurochem* 105:933-42.

Thompson CD, Miller TA, Barthen MT, Dieckhaus CM, Sofia RD, Macdonald TL. (2000) The synthesis, in vitro reactivity, and evidence for formation in humans of 5-phenyl-1,3-oxazinane-2,4-dione, a metabolite of felbamate. *Drug Metab Dispos* 28:434–439.

Vautrin J, Barker JL. (2003) Presynaptic quantal plasticity: Katz's original hypothesis revisited. *Synapse* 47:184-99.

Walker MC, Fisher A. (2004) Mechanisms of antiepileptic drugs. In: Shorvon S, Fish DR, Dodson E, Perucca E, eds. *The treatment of epilepsy*. Oxford: Blackwells 96–119.

Weiss JH, Hartley DM, Koh J, Choi DW. (1990) The calcium channel blocker nifedipine attenuates slow excitatory amino acid neurotoxicity. *Science* 247:1474-9.

Williamson A, Spencer DD, Shepherd GM. (1993) Comparison between the membrane and synaptic properties of human and rodent dentate granule cells. *Brain Res* 622:194-202.

Wickenden AD. (2002) Potassium channels as anti-epileptic drug targets. *Neuropharmacology* 43:1055-1060

White HS, Wolf HH, Swinyard EA, Skeen GA, Sofia RD. (1992) A neuropharmacological evaluation of felbamate as a novel anticonvulsant. *Epilepsia* 33: 564–572.

Zucker RS. (1989) Short-term synaptic plasticity. *Annu Rev Neurosci* 12:13-31.

