

國立政治大學神經科學研究所

碩士論文

抑制外側韁核對大鼠場地制約的影響效果

Effects of inactivation of the lateral habenula  
on place conditioning in rats

研究生：楊季樺

指導教授：廖瑞銘 博士

趙知章 博士

中華民國一〇七年七月

## 摘要

個體面對不同的外部刺激選擇合宜的行為反應，同時對環境的變化具備行為調整與學習之能力有助於生物體的存活。中腦邊緣多巴胺系統在上述行為中扮演重要的角色，其涉及個體的酬賞動機與聯結學習等認知行為。根據神經解剖學與行為神經科學的研究，外側韃核可以調控中腦邊緣多巴胺系統進而影響酬賞相關的動機行為；迄今絕大多數研究是使用操作式制約行為作業檢測外側韃核的神經活動與酬賞相關行為的關係，較少研究探討抑制外側韃核對於多巴胺相關之古典式制約行為的影響。因此本研究透過藥理抑制的方式，探討外側韃核的 GABA 受體對於場地制約行為的影響。實驗一的結果顯示 GABA<sub>A</sub> 受體致效劑 muscimol 注入外側韃核無法引發場地制約偏好 (CPP)。實驗二的結果同時將 muscimol 及 GABA<sub>B</sub> 受體致效劑 baclofen 混合液(B/M) 注入外側韃核無法形成 CPP，惟有增加藥物制約配對箱的自發性活動量。實驗三進行周邊注射安非它命(d-AMP)0.5, 1, 2 mg/kg 的劑量反應，發現其無法令受試習得 CPP，但有增加藥物配對箱的行為活動量。實驗四進行 B/M 注入外側韃核結合腹腔注射 d-AMP，其可有效地使受試習得 CPP。綜合上述的實驗結果顯示，單獨以 GABA 類受體致效劑抑制外側韃核或以較低劑量的 d-AMP 周邊注射，皆無法讓個體形成顯著的 CPP，而須在這兩項藥物處置同時進行方得顯著的 CPP，這意含抑制外側韃核可以增強個體對於藥物酬賞相關的古典式制約學習行為。

關鍵字：場地制約偏好、韃核、GABA 受體致效劑、心理興奮劑

## Abstract

The ability of appropriate reaction to different kinds of external stimuli as well as behavioral flexibility in cases of response reinforcement contingencies being changed are essential for survival. Such behaviors involved in reward motivation and associative learning are known to be mediated by the mesolimbic dopamine (DA) systems. In terms of anatomy and behavioral neuroscience, the lateral habenula (LHb) has been suggested to modulate reward-related behaviors that are mediated by the mesolimbic DA systems. While there have been a number of studies using operant conditioning task to investigate the role of the LHb in reward-related behavior, less work has attended on the role of the LHb in reward-related behavior as measured by the tasks based on classical conditioning theory. Therefore, in the present study, we investigated the effects of inactivation of the LHb by using GABA agonists on place conditioning task. The results of Experiment 1 show that intra-LHb infusion of muscimol, a GABA<sub>A</sub> agonist, did not produce any significant place conditioning. The results of Experiment 2 show that a mixture of the GABA<sub>B</sub> and GABA<sub>A</sub> agonists, baclofen and muscimol (B/M), infused into the LHb did not establish any significant place conditioning; even with the enhanced locomotor activity observed in drug-paired chamber during the conditioning sessions. In Experiment 3, we examined the dose effects of d-amphetamine (d-AMP; 0, 0.5, 1, or 2 mg/kg; IP) on place conditioning, and there was no drug-induced conditioned place preference (CPP). Locomotor activity was enhanced by d-AMP in drug-paired chamber during the conditioning session. The results of Experiment 4 show that intra-LHb infusion of B/M combined with IP injection of d-AMP significantly induced CPP. These data demonstrated that neither intra-LHb infusion of GABA agonists alone nor systemic injection of d-AMP alone produced significant place conditioning, but a CPP

was developed by two aforementioned drug treatments administered in combination. Thus, the inactivation of the LHb is indicated to facilitate the individual in acquiring task involved classical conditioning of drug reward to contextual cue.

Keywords: conditioned place preference, habenula, GABA receptor agonist, psychostimulant



# 目錄

中文摘要 .....	I
英文摘要 .....	II
目錄 .....	IV
圖次 .....	VI
<b>第一章、緒論 .....</b>	<b>1</b>
一. 前言 .....	1
二. 多巴胺系統 .....	1
三. 韞核 .....	2
四. 外側韞核神經元 .....	3
五. 外側韞核與酬賞相關行為 .....	5
六. 場地制約作業 .....	8
七. 研究目的與實驗設計 .....	9
<b>第二章、實驗材料與方法 .....</b>	<b>11</b>
一、 受試者 .....	11
二、 場地制約作業的測試儀器 .....	11
三、 腦部埋管手術 .....	11
四、 藥物 .....	12
五、 顱內注射藥物 .....	12
六、 場地制約作業的訓練程序 .....	13
七、 實驗步驟 .....	14
八、 組織學檢驗 .....	15
九、 統計分析 .....	16

<b>第三章、結果</b> .....	<b>18</b>
一、 組織學檢驗 .....	18
二、 實驗一：MUS 微量注射至外側韮核在場地制約作業的結果 .....	18
三、 實驗二：B/M 微量注射至外側韮核在場地制約作業的結果.....	19
四、 實驗三：周邊注射 D-AMP 在場地制約作業的結果 .....	19
五、 實驗四：抑制外側韮核對周邊注射 D-AMP 在場地制約作業的影響 .....	20
<b>第四章、討論</b> .....	<b>23</b>
一、 GABA 類受體致效劑注入外側韮核在場地制約作業的探討.....	23
二、 周邊注射 D-AMP 在場地制約作業的探討 .....	27
三、 B/M 注入外側韮核結合腹腔注射 D-AMP 在場地制約作業的探討.....	28
四、 外側韮核與多巴胺神經元.....	29
五、 未來研究方向.....	30
六、 結論 .....	31
<b>參考文獻</b> .....	<b>32</b>
<b>附圖</b> .....	<b>41</b>
<b>附錄目次</b> .....	<b>55</b>
<b>附錄表一</b> .....	<b>56</b>
<b>附錄圖一至七</b> .....	<b>57</b>

## 圖次

圖一：藥物注入外側韮核的組織學檢驗結果(實驗四「Veh-Sal」組及「B/M-Sal」組之受試).....	41
圖二：藥物注入外側韮核的組織學檢驗結果(實驗四「Veh-0.5 AMP」組及「B/M-0.5 AMP」組之受試).....	42
圖三：藥物注入外側韮核的組織學檢驗結果(實驗四「Veh-1 AMP」組及「B/M-1 AMP」組之受試).....	43
圖四：實驗一 muscimol (Mus)微量注射至外側韮核在場地制約作業的結果。Sal 控制組(n=20)；Mus 劑量 50 ng 組(n=4)、100 ng 組(n=17)、200 ng 組(n=15)與 400 ng 組(n=4).....	44
圖五：實驗一 muscimol (Mus)微量注射至外側韮核對於制約期間自發性活動量的影響.....	45
圖六：實驗二 baclofen 及 muscimol 混和液(B/M)微量注射至外側韮核在場地制約作業的結果.....	46
圖七：實驗二 baclofen 及 muscimol 混和液(B/M)微量注射至外側韮核對於制約期間自發性活動量的影響.....	47
圖八：實驗三周邊注射安非它命(d-AMP)在場地制約作業的結果.....	48
圖九：實驗三周邊注射安非它命(d-AMP)對於制約期間自發性活動量的影響.....	49
圖十：實驗四 baclofen 與 muscimol 混和液(B/M)注入外側韮核及周邊注射安非它命(d-AMP)對於場地制約作業的影響.....	51
圖十一：實驗四 baclofen 與 muscimol 混和液(B/M)注入外側韮核及周邊注射安非它命(d-AMP)對於制約期間自發性活動量的影響.....	53
圖十二：外側韮核的神經活動對於中腦多巴系統的影響示意圖.....	54

# 第一章、緒論

## 一. 前言

個體的存活需要在面對不同的外部刺激時，能選擇合宜的行為反應，例如：趨樂避苦，同時需具備行為調整與學習的能力，以因應外部環境的變化。多巴胺(dopamine; DA) 系統，又稱為大腦中的酬賞迴路(brain reward circuitry)，涉及酬賞動機與聯結學習(associative learning)等認知行為。在神經解剖學上，外側韃核(lateral habenula)連接於前腦，並藉由直接或間接路徑調控中腦多巴胺的釋放量；因此就行為神經科學而言，外側韃核理應參與酬賞相關的學習歷程。本研究欲以場地制約作業(place conditioning task)，探討外側韃核對酬賞相關的行為功能所扮演之角色。

## 二. 多巴胺系統

多巴胺是一種兒茶酚胺類(catecholamine) 的神經傳導物質，其生成路徑經由酪胺酸羥酶(tyrosine hydroxylase)將酪胺酸轉換成多巴(dopa)，再藉由多巴去羧酶(dopa decarboxylase)將多巴轉換成多巴胺(Fakhoury and López, 2014)。多巴胺神經元主要從中腦的黑質體(substantia nigra)和腹側蓋區(ventral tegmental area; VTA)，投射至前腦；有三條主要的解剖路徑：(1)從黑質體投射到紋狀體(striatum)的路徑稱為黑質紋狀體多巴胺系統(nigrostriatal DA system)，主要涉及運動功能。(2) VTA 投射至邊緣系統(limbic system)與依核(nucleus accumbens)，其路徑稱為邊緣多巴胺系統(mesolimbic DA system)，主要功能涉及動機與酬賞。(3) VTA 投往前額葉皮質(prefrontal cortex)的路徑稱為皮質多巴胺系統(mesocortical DA system)，其主要涉及高階認知功能(Money and Stanwood, 2013)。

Olds 和 Milner (1954)在大白鼠腦中埋入刺激性電極，並進行顱內自我電刺激的實驗(intracranial self-stimulation)。實驗結果呈現大白鼠的壓桿頻率大幅增加，顯示受試對於獲得顱內自我刺激有強烈的偏好。電刺激的區域在當時被稱為愉快中樞(pleasure center)，於後續的文獻報導證實這些區域和現今的多巴胺系統之腦區多有重疊。Wise



(1982)提出 anhedonia hypothesis，認為多巴胺的神經活動可反映外部刺激的酬賞價值(rewarding value)。當個體在獲得酬賞的時候，其腦內的多巴胺釋放量增加，從而得到「愉悅感」。若以多巴胺受體拮抗劑(receptor antagonist)抑制腦內多巴胺的釋放，則會頓化(blunt)個體對酬賞的「愉悅感」，而出現抑制個體之酬賞相關的行為反應。由於這個假說過於簡單，近期研究提出不支持的證據(Salamone and Correa, 2012; Bromberg-Martin et al., 2010)。Schultz 等人(1997)以電生理儀器記錄猴子的中腦多巴胺神經元活動量。實驗結果顯示猴子在無預警下獲得酬賞(果汁)時，其多巴胺神經元的活動呈現興奮反應。當猴子經過燈光刺激與酬賞配對的制約學習後，其多巴胺神經興奮活動現象的時間點提前至燈光制約刺激(conditioned stimulus)出現時，而神經元活動在獲得酬賞的當下卻沒有變化。另外，若在燈光刺激出現後，酬賞未在應該出現的時間點出現(reward omission)，則此時多巴胺神經元的活動呈現被抑制的反應。該實驗發現多巴胺神經興奮活動不是只反映酬賞效用本身，它也可在學習歷程中反映酬賞預測誤差(reward prediction error)，這意含中腦多巴胺系統在動機與酬賞學習(reward learning)中扮演重要的角色。

### 三. 韃核

在系統發育學上，韃核是一個存留已久的古老腦區，在大部分的脊椎動物腦中都可以發現該腦區；就演化而言，韃核對於個體的存活扮演重要的角色(Proulx et al., 2014)。韃核位於視丘(thalamus)尾端背側的位置，鄰近第三腦室，並與松果體(pineal body)合稱為上丘腦(epithalamus)。韃核由前腦傳入的(afferent)神經為髓紋(stria medullaris)，並以後屈束 (fasciculus retroflexus)為輸出的(efferent)神經，將訊號傳遞至中腦的腦區。上述三個神經結構—韃核、髓紋、後屈束，合稱為背側間腦傳導系統(dorsal diencephalic conduction system) (Hikosaka, 2010; Fakhoury and López, 2014)。

韃核本身可區分為兩個不同的結構：內側韃核(medial habenula)和外側韃核，兩

者在形態、免疫化學和功能性上皆不相同。因本研究側重在外側韃核的探討，以下文獻整理以此腦區為主。前腦邊緣系統與基底核(basal ganglia)的訊號經由髓紋傳遞至外側韃核，外側韃核的上游腦區包含：外側下視丘(lateral hypothalamus)、內側蒼白球(globus pallidus interna; 在嚙齒動物則稱 entopeduncular nucleus)、內側前額葉皮質(medial prefrontal cortex)、Broca 氏對角帶(diagonal band of Broca)、腹側蒼白球(ventral pallidum)、VTA、依核、側視前區(lateral preoptic area)、外側中隔核(lateral septal nuclei)、終紋床核(bed nucleus of stria terminalis) (Hikosaka et al.,2008; Lecca et al ., 2014; Proulx et al., 2014)。外側韃核經由後屈束的外圍區域，將訊號傳送至中腦與單胺類神經化學物質有關的神經核(monoaminergic nuclei)包含：以 5-羥色胺(serotonergic)神經元為主的背側縫核(dorsal raphe nucleus)及內側縫核(median raphe nucleus)；以乙醯膽鹼(cholinergic)神經元為主的背側頂蓋區(laterodorsal tegmental nucleus)；以正腎上腺素(noradrenergic)神經元為主的藍斑核(locus coeruleus)；以多巴胺神經元為主的 VTA、黑質緻密部(substantia nigra compacta)；以  $\gamma$ -氨基丁酸(GABA)神經元為主的內側被蓋核(rostromedial tegmental nucleus; 又稱為 tail of the VTA) (Lecca et al ., 2014; Velasquez et al., 2014)。其中外側韃核可藉由直接或間接的路徑調控 VTA 多巴胺神經元的活動量。直接路徑是外側韃核投射興奮性神經傳導物質(excitatory neurotransmitter)麩胺酸(glutamate)到 VTA 的多巴胺神經元或 GABA 神經元；間接路徑則是外側韃核投射麩胺酸至內側被蓋核，再藉由內側被蓋核投射抑制性神經傳導物質(inhibitory neurotransmitter) GABA 至 VTA，抑制多巴胺神經元活動。外側韃核雖然本身是以興奮性的麩胺酸神經元為主，但藉由連接內側被蓋核，可以使中腦邊緣多巴胺系統的神經元受到抑制。除此之外，VTA 亦會投射麩胺酸和 GABA 至外側韃核，調控該腦區的神經活動(Omelchenko et al., 2009; Matsumoto and Hikosaka, 2007; Baker et al., 2016)。

#### 四. 外側韃核神經元

根據形態學與免疫化學的研究，外側韞核的神經元屬於異質多元族群 (heterogeneous populations)，其中主要為麩胺酸神經元。外側韞核的神經活動受到上游腦區的興奮性傳導(excitatory transmission)與抑制性傳導(inhibitory transmission)影響。興奮性傳導主要藉由麩胺酸；抑制性傳導則主要藉由 GABA。由於外側韞核只有極為稀少的 GABA 中間神經元(interneuron)，因此主要接受來自其他腦區的抑制性調控(Smith et al., 1987; Weiss and Veh, 2011; Lecca et al., 2014)。

投射麩胺酸至外側韞核的上游腦區包含：側下視丘、內側蒼白球、VTA (Baker et al., 2016)。外側韞核神經元上所表現的麩胺酸受體有：AMPA 受體( $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid receptor, AMPA R)、NMDA 受體(N-methyl-D-aspartate receptor, NMDA R)、代謝型麩胺酸受體(metabotropic glutamate receptor)。AMPA R 為外側韞核最主要的興奮性受體，屬於離子通道型受體(ionotropic glutamate receptor)，可快速使神經元去極化(depolarization)。AMPA R 可根據是否含有 GluA2 subunit，分為鈣離子可滲透性(calcium-permeable, CP-AMPA R)和鈣離子不可滲透性(calcium-impermeable)，其中以 CP-AMPA R 在外側韞核最為普遍(Fakhoury and López, 2014)。NMDA R 屬於離子通道型受體，但在外側韞核的表現量少於 AMPA R。代謝型麩胺酸受體屬於 G 蛋白耦合接受體，在外側韞核的表現量亦少於 AMPA R。

投射 GABA 至外側韞核的上游腦區包含：內側蒼白球、腹側蒼白球、Broca 氏對角帶、側視前區、依核、VTA、下視丘。外側韞核神經元上所表現的 GABA 受體有：GABA<sub>A</sub> 受體和 GABA<sub>B</sub> 受體。GABA<sub>A</sub> 受體屬於離子通道型受體，表現在外側韞核的突觸後神經元上。當活化 GABA<sub>A</sub> 受體時，氯離子流入細胞內造成過極化(hyperpolarization)抑制神經元的活動。在大鼠腦組織中，外側韞核所表現的 GABA<sub>A</sub> 受體主要由  $\alpha$ 1,  $\beta$ 1-2 和  $\gamma$ 3 三種 subunit 組成。GABA<sub>B</sub> 受體屬於 G 蛋白耦合接受體，表現在外側韞核的突觸前與突觸後神經細胞膜上。GABA<sub>B</sub> 受體由 GABA<sub>B</sub>1 和 GABA<sub>B</sub>2 兩種 subunits 組成，調控神經活動中較慢出現的抑制型電流(Meye et al., 2013)。

近期有一些研究針對外側韃核 GABA 受體探討相關的行為功能。Winter 等人 (2011) 首次以 GABA 專屬性藥物抑制外側韃核，探討對先天性憂鬱症動物模型之憂鬱症狀的影響；結果發現使用注射 GABA 致效劑(agonist)至外側韃核，可以改善憂鬱行為。其他關於外側韃核 GABA 突觸傳導所涉及的行為功能包含：空間記憶(Mathis et al., 2015)、嫌惡型記憶(Tomaiuolo et al., 2014)、工作記憶(working memory) (Mathis et al., 2016)、衝動行為(Zapata et al., 2017)、行為彈性(Baker et al., 2017)。上述文獻皆以微量注射 GABA 致效劑的方式，檢測藥物抑制外側韃核對於個體行為功能的影響，但是少有實驗屬直接探討酬賞相關行為。

## 五. 外側韃核與酬賞相關行為

在 1950 年代就有關於韃核的文獻，但是因為其解剖區域較小，在早期研究缺乏相對適合的技術下，針對外側韃核探討其涉及的行為功能較為困難。直到近期，Matsumoto 和 Hikosaka (2007) 發表關於外側韃核與酬賞預測誤差之間關係的研究，重新引起學者們對於此腦區的關注(Velasquez et al., 2014; Hikosaka, 2010)。外側韃核涉及的行為功能，包含：猴子視覺酬賞與嫌惡刺激的訊息處理(Bromberg-Martin and Hikosaka, 2011)、攝食行為(Stamatakis et al., 2016)、大腦的酬賞機制之決策(Stopper and Floresco, 2014)、迴避的制約學習與消除(Song et al., 2017)。另外，外側韃核的功能失調涉及一些精神疾病：憂鬱症(Winter et al., 2011; Shabel et al., 2014)、精神分裂症(Lecourtier et al., 2004)、藥物成癮(Meye et al., 2016)、注意力不足過動症(Lee and Goto, 2011)。

外側韃核可經由直接或間接路徑調控中腦多巴胺的釋放量。若以電刺激興奮外側韃核，則抑制 VTA 和黑質體的多巴胺神經元活動(Christoph et al., 1986; Matsumoto and Hikosaka, 2007)。若破壞或抑制外側韃核神經元的活動，則令多巴胺釋放量增加(Lecourtier et al., 2008; Tian and Uchida, 2015)。Lecourtier 等人(2008)利用微透析技術(microdialysis)分別檢測電刺激或藥物抑制外側韃核，前額葉皮質、依核和紋狀體的

細胞外多巴胺濃度變化。實驗結果顯示以 AMPA 受體拮抗劑 LY293558 抑制外側韃核，會同時增加這三個腦區的多巴胺濃度；相反，以電刺激興奮外側韃核，則使依核的多巴胺濃度降低。這些證據表示外側韃核的神經活動可以調控多巴胺的釋放量。

Matsumoto 和 Hikosaka (2007) 以電生理儀器記錄猴子外側韃核與黑質體的神經活動，並訓練其進行視覺掃視作業(visual saccade task)。實驗結果顯示：當受試接收到有酬賞的線索(cue)時，記錄到外側韃核的神經元活動呈現被抑制的反應；當受試接收到沒酬賞的線索時，則記錄到外側韃核的神經元活動呈現興奮反應。另外，在非預期的情境下未獲得酬賞，亦會發現外側韃核的神經元活動量增加；非預期的酬賞則抑制外側韃核的神經活動。這表示面對不同的酬賞相關刺激，外側韃核的神經活動與多巴胺神經元的活動呈相反方向反應之。若使用電刺激興奮外側韃核，亦記錄到黑質體的多巴胺神經元活動呈現被抑制的反應。這說明外側韃核可藉由抑制多巴胺神經元，涉及酬賞預測誤差相關行為的調控。Tian 和 Uchida (2015) 以電燒法破壞(electrolytic lesion)小鼠的外側韃核，結合電生理儀器記錄 VTA 多巴胺神經元的活動，發現破壞外側韃核不僅使多巴胺神經元的基礎活動(baseline)高於對照組，也令酬賞預測誤差的相關訊號受損。這代表外側韃核參與多巴胺神經元所調控的酬賞預測誤差訊號。Wang 等人(2017)以光纖記錄(fiber photometry)不同情境刺激下，外側韃核的神經活動變化。研究結果顯示在酬賞事件的巴普洛夫條件性學習(reward-Pavlovian conditioning)行為中，外側韃核的神經活動會隨著學習的過程而改變，即說明外側韃核參與酬賞相關的學習歷程。根據上述的文獻證實：外側韃核的神經興奮會抑制中腦多巴胺神經元的活動；破壞外側韃核，則令多巴胺神經元的活動呈現活耀的狀態(disinhibition)。外側韃核可藉由調控多巴胺神經元的活動提供個體完整的酬賞預測誤差訊號，該訊號可因為制約學習的過程動態性地改變外側韃核的神經活動，也代表外側韃核對於酬賞物與其對應的線索相當敏感。酬賞預測誤差訊號被認為是一種學習相關的訊號(teaching signal)，使個體調整行為反應趨向獲得酬賞(Schultz, 2013)。操弄外側韃核的神經活動可改變酬賞預測誤差訊號，並影響個體對於酬賞相關的學習行為(Lecca et al., 2014)。

Friedman 等人(2010)分別以電刺激或神經毒素喹啉酸(quinolinic acid)破壞單側的

外側韃核，檢測是否影響已習得的古柯鹼(cocaine)自我注射(self-administration)行為。研究結果顯示：以低頻(10赫茲)電流刺激外側韃核，受試的壓桿反應增加；以高頻(100赫茲)電流刺激外側韃核，則不影響受試的壓桿反應；以高低頻交互(100赫茲與10赫茲)電流刺激外側韃核，受試的壓桿反應降低，並且促進後續的戒斷(extinction)行為，降低古柯鹼自我注射的再犯(reinstatement)行為。這表示不同的電流刺激外側韃核，會有不同影響受試對於古柯鹼的酬賞價值之效果。反之，破壞外側韃核則延緩受試在此作業的戒斷行為。這說明外側韃核的神經活動會改變個體對於覓藥行為(drug-seeking behavior)的動機。Friedman等人(2011)的另一項研究使用同樣的方法操弄外側韃核，進行相似的動物行為作業，但是酬賞物由古柯鹼替換成蔗糖液(sucrose)；這項研究結果與前述使用古柯鹼作為酬賞物的實驗結果相似。上述兩篇文獻證實在自我注射的行為作業中，不論以自然性酬賞(natural reward)或是藥物酬賞(drug reward)作為增強物(reinforcer)，外側韃核的神經活動皆影響個體尋覓酬賞物的動機行為。

Gill 等人(2013)探討在焦慮情境下，以 GABA 致效劑抑制外側韃核是否影響古柯鹼自我注射行為的戒斷與再犯。研究結果顯示抑制外側韃核不影響受試對於古柯鹼的戒斷行為；但在藥物引發的焦慮情境下，抑制外側韃核有助於降低大白鼠對於古柯鹼自我注射行為的再犯。這說明外側韃核參與焦慮情境下的藥癮的再犯行為。

Stopper 等人(2014)以電刺激興奮外側韃核，檢測是否影響大鼠在機率折扣作業(probability discounting task)的選擇表現。實驗結果呈現：在受試作壓桿的選擇之前以電刺激興奮外側韃核，降低受試對於大而有風險桿子的壓桿反應，使其無法表現原先的選擇曲線。Stopper和Floresco (2014)以GABA致效劑抑制外側韃核，進行相似的動物行為作業，研究結果顯示抑制外側韃核亦降低受試的風險反應。這說明當個體涉入成本與利益(cost and benefit)考量之決策歷程時，外側韃核會調控個體選擇的行為。

Gifuni 等人(2012)使用神經毒素鵝膏蕈氨酸(ibotenic acid)破壞外側韃核，並將刺激性電極埋入後側中腦(posterior mesencephalon)或前腦內側神經束(medial forebrain bundle)，再以顱內自我刺激作業檢測外側韃核的神經活動，對於安非它命(amphetamine; AMP)酬賞作用的影響。研究結果顯示破壞外側韃核不改變 AMP 對於

受試在該作業行為之影響，即破壞外側韃核不影響 AMP 的酬賞效果。Duchesne 和 Boye (2013)以大白鼠的後側中腦進行顱內自我電刺激作業，檢測微量注射 AMP 至外側韃核，探討外側韃核的多巴胺受體與自我電刺激的酬賞之關係。研究結果顯示將 AMP 注入外側韃核不改變受試的行為表現，即外側韃核的多巴胺受體不影響個體對於顱內電刺激的酬賞價值。

就上述的文獻回顧而言，外側韃核可以藉由調控中腦多巴胺神經元，影響個體的酬賞預測誤差訊號和對於外部酬賞的動機價值(motivational value)，改變個體的酬賞相關行為(Baker et al., 2016)。但是以往利用電刺激、破壞或是顱內的藥物注射，探討外側韃核與酬賞相關行為的關係多是使用操作式制約行為作業，而少有研究檢測外側韃核對於古典式制約行為的影響。故本研究欲以古典式制約作業，探討外側韃核的神經活動對於酬賞相關學習行為的影響。

## 六. 場地制約作業

在行為神經科學研究領域中，場地制約作業被廣泛地使用於探討藥物的酬賞性質或嫌惡性質(Sanchis-Segura and Spanagel, 2006)。此作業最主要特色在於藥物效果與特定環境的聯結學習，是以 Pavlov (1927)提出的古典制約學習理論為根據所設計的行為作業。作業中，藥物效果作為非制約刺激(unconditioned stimulus)；若藥物效果為酬賞性質，則引發的非制約反應(unconditioned response)是個體趨近(approach)特定刺激目標的行為。當藥物效果與檢測箱的環境刺激經過多次配對，原本環境的中性刺激(neutral stimulus)轉變為制約刺激。表示環境刺激成為個體「預期」藥效發生的一種訊號，或是環境刺激「取代」(substitute)藥物刺激的意義，進而引發個體趨近該環境，此稱為場地制約偏好(conditioned place preference; CPP)。；相反，若非制約刺激為嫌惡性質，經與環境刺激配對後，會引發個體迴避(avoidance)該環境場地，此稱為場地制約嫌惡。

可引發 CPP 的藥物多作用於中腦邊緣多巴胺系統，尤其是依核相關的機制。

Spyraki 等人(1982)在場地制約作業的研究中，將心理興奮劑(psychostimulants) AMP 周邊注射至大白鼠，藉此增加腦內包括多巴胺的單胺類神經傳導物之釋放量。實驗結果呈現此藥物操弄可以有效地建立受試的 CPP。再則，依核被多巴胺神經毒素 6-OHDA 破壞造成受試無法習得 AMP 引發地 CPP(AMP-CPP)，並依核被破壞的程度與受試待在藥物配對箱的時間呈負相關。另外，關於 AMP-CPP 神經機制的探討，多巴胺受體拮抗劑 SCH23390 或 spiperone 的周邊注射會抑制 AMP-CPP (Liao et al., 1998)。Liao 等人(2000)進一步將 AMP 或古柯鹼注射至在大白鼠的依核，亦引發受試的 CPP。Liao (2008)以多巴胺受體拮抗劑 SCH23390 或 raclopride 微注射至依核，造成受試無法建立 AMP 注入依核所引發的 CPP。然而外側韃核是否參與多巴胺調控此種制約行為的歷程，這個議題僅有少數的近期研究涉略。Friedman 等人(2011)以電流刺激外側韃核作為非制約刺激，與環境的制約刺激進行配對後，結果引發場地制約嫌惡。另一研究使用光遺傳學(optogenetics)技術活化外側韃核對多巴胺系統的直接路徑(LHb-VTA)與間接路徑(LHb-RMTg)，亦引發個體的場地制約嫌惡(Stamatakis and Stuber, 2012; Lammel et al., 2012)。目前尚未有研究探討抑制外側韃核的神經活動對個體學習場地制約作業之影響，也尚無研究檢測外側韃核的神經活動是否影響個體建立 AMP-CPP。

## 七. 研究目的與實驗設計

外側韃核似乎可藉由調控中腦多巴胺系統，進而影響酬賞相關的動機行為，但多數文獻是以操作式制約行為作業進行檢測，少有文獻以酬賞的角度探討外側韃核對於多巴胺相關之古典式制約行為的影響。在場地制約作業的研究中，外側韃核的神經興奮可促使個體建立場地制約嫌惡，然而較少研究檢測外側韃核的神經抑制在古典式制約聯結學習的角色。故本研究欲以藥理方式活化外側韃核的 GABA 受體，探討這項抑制外側韃核的實驗操弄，對於學習場地制約作業的影響。

本研究假設：抑制外側韃核可促使中腦多巴胺的釋放量增加，提升個體正向的動



機，藉此這項酬賞動機理當可促進個體習得 CPP。本研究含四個實驗，其各別的藥理實驗操弄如下述。實驗一：以 GABA<sub>A</sub> 受體致效劑注入外側韁核，檢測受試對於 CPP 的學習。實驗二：以 GABA<sub>A</sub> 與 GABA<sub>B</sub> 受體的致效劑混合注入外側韁核，檢測受試對於 CPP 的學習。實驗三以周邊注射 AMP，檢測 AMP-CPP 的劑量反應。實驗四：周邊注射 AMP 結合 GABA 類受體致效劑混合注入外側韁核，檢測抑制外側韁核是否促進個體習得 AMP-CPP。



## 第二章、實驗材料與方法

### 一、 受試者

本研究使用 Wistar 品系的雄性大白鼠為實驗受試，從樂斯科生物科技股份有限公司購入，並個別飼養於國立政治大學心理學系生理心理學實驗室動物房的不銹鋼吊籠內。動物房內設定 12/12 小時晝夜週期(早上 8:00 到晚上 8:00 為光照期)，室溫維持在攝氏  $22\pm 2$  度。每隻受試在飼養與實驗全期，皆供應充足的食物與飲水。所有實驗均在白天進行，約從早上 10:00 至下午 6:00。本研究從大白鼠購入到實驗開始前，進行約 2 週的適應期，期間實驗者每天抓取每隻受試至懷中安撫約 3 至 5 分鐘，令大白鼠習慣實驗者的觸碰與抓握，以降低受試在行為實驗中可能產生的緊張。適應期過後即進行手術及後續的行為實驗。本研究的相關動物實驗步驟與流程，經過國立政治大學動物實驗管理小組審核通過後執行之，受試的使用與照料均遵循行政院農委會頒布有關動物實驗規定的相關條例，並參考美國 National Institute of Health (NIH) 的動物使用及照顧之相關規定。

### 二、 場地制約作業的測試儀器

本研究所採用的檢測箱包含兩個壓克力製箱子。兩側制約箱的長寬高皆為 37 cm x 36 cm x 60.5 cm，其中一制約箱的牆壁花色為 4 cm 寬黑白相間直條紋，並地板環境為 0.5 cm 平行排列的條狀鐵條，稱之黑箱；另一側制約箱的牆面皆為白色，並地板環境為網狀鐵架，其正方形網格邊長為 0.5 cm，稱之白箱。在兩制約箱相鄰界的牆面右下方底部有一 15 cm x 15 cm 的方形孔洞，以供受試在前測與後測時可自由地來回穿梭兩側制約箱。在制約期間實驗者會以隔板阻擋此孔洞，以將受試活動限制於其中一側的制約箱。在檢測箱上方 52 cm 處架設有感知光耦合元件(Charge-coupled Device; CCD)的攝影鏡頭，用以記錄受試在實驗期間的活動。

### 三、 腦部埋管手術

在大白鼠體重達 300 克以上時即接受顱內鋼管埋管手術(intra-cranial cannula implantation)。首先，大白鼠接受腹腔注射 1mg/kg 的複合型麻醉藥 Zoletil 50 (Virbac Laboratories, France)。待大白鼠完全麻醉後，剃除其顱毛，再固定於腦部立體定位儀 (stereotaxic apparatus; DKI-900)上。以優碘消毒頭部，用手術刀劃開頭皮並清除結締組織使顱骨外露。將囟門 (bregma)作為腦部座標定位的原點，依據 Paxinos 與 Watson (2007)圖譜，定出外側韃核座標為 AP:-3.6 mm, ML:  $\pm$ 0.7 mm, DV:-5.0 mm，並計算出目標神經核上方 1 mm 處的立體座標，以牙科電鑽鑽開兩側目標神經核上方顱骨，再用細針挑破腦膜，之後將長度 15 mm 的雙側鋼管(規格為 23 G：外徑 0.63 mm，內徑 0.33 mm)緩緩植入到腦部雙側正確位置，最後將埋入的雙側鋼管以牙科膏(dental cement)包埋固定於栓在顱骨上的三根小螺絲釘上。待牙科膏乾燥固定後，將長 15 mm 不銹鋼絲插入鋼管內，以避免鋼管內部堵塞或感染。手術完成後於大白鼠的皮下注射 0.2 ml 抗生素(Penicillin-streptomycin, 20,000 IU)，以預防傷口引發的發炎感染。手術後，動物至少經過 7 天的復原期才進行後續行為實驗。

#### 四、藥物

本研究於行為實驗所須用藥物有 GABA 類受體致效劑：GABA<sub>A</sub> 受體致效劑 Muscimol (Mus)與 GABA<sub>B</sub> 受體致效劑 Baclofen (Bac)。上述二種藥物皆購於 Tocris Bioscience (Ellisville, MO, USA)。Mus 和 Bac 注射液的配置，皆以 0.9%生理食鹽水 (saline; Sal)依照實驗所需劑量進行泡製，此藥物注射時間在行為實驗開始前 20 至 30 分鐘(Mathis et al., 2015; Tomaiuolo et al., 2014)。腹腔注射(intraperitoneal injection)所使用的藥物為 d-amphetamine sulfate (d-AMP)，購自於 Sigma Chemical Co. (St. Louis, Mo., USA)，依照實驗所需劑量以 0.9% Sal 製備，此藥的周邊注射量以 1 ml/kg 的標準，並且在行為實驗開始前注射該藥物。

#### 五、顱內注射藥物

受試進行顱內注射藥物前，將注射針頭(規格 31 號)一端與聚乙烯管(PE20)連結於微量注射筒(Hamilton microsyringe, 2.0  $\mu$ l)。注射前，以蒸餾水充滿注射針頭和聚乙烯管內，再將注射針筒向後拉、吸入一小段空氣柱於聚乙烯管內，以隔開蒸餾水與藥物，避免發生藥物濃度被稀釋。接著將藥物吸入注射針頭與聚乙烯管內。

微量注射時，先將鋼管中防止堵塞的不銹鋼絲取出，再將注射針管置入兩側鋼管內，並使針頭突出鋼管底部 1.0 mm。再藉由微量幫浦(microinjection pump; Legacy Series)，以每分鐘 0.066  $\mu$ l 的注射速率，推動微量注射針筒，使藥物緩慢注入兩側目標腦區。單側所注入的溶液體積為 0.2  $\mu$ l，並於 3 分鐘完成顱內注射。完成藥物注射後，注射針滯留於鋼管原處 30 秒，於後再緩緩取出注射針管，此舉動使藥物於目標腦區得以充分的擴散。於後再將不銹鋼絲再度放回頭顱埋置的鋼管內，以防止鋼管堵塞。

## 六、場地制約作業的訓練程序

在行為實驗進行前，將受試以推車由動物房運送至行為測試室所在的房間外，靜置五分鐘後才開始後續實驗。該行為作業程序共為期八天，分為三個階段進行：制約前測(探索期)、制約訓練期、制約後測(測試期)。

**制約前測：**此階段實驗為期一天，進行十分鐘。目的在於使受試熟悉場地制約的測試箱，並檢測其是否有先天性場地偏好行為(initial bias)。實驗開始時，將受試隨機放入一檢測箱中，並可自由地來回穿梭於黑白兩箱，期間以電腦記錄受試滯留於各箱的累計時間與行進距離。受試於此階段，並沒有接受任何藥物的注射操弄。

**制約訓練期：**此階段實驗為期六天，每天進行單次場地制約學習，時間為三十分鐘。目的在於使非條件刺激(藥物)與條件刺激(檢測箱環境)進行三次配對，以產生制約學習的效果。實驗採用非偏誤設計(unbiased design)，以排除各組對於檢測箱兩側可能存在的先天偏好性，降低可能的干擾因子所產生之誤差。依據前測的行為結果(附錄表一)，進

行對抗平衡(counter-balanced; Carr et al.,1989)設計，即一半的受試在制約期第 1、3、5 天接受 Sal 注射後配對其前測偏好的箱子，在第 2、4、6 天接受藥物注射後配對前測非偏好的箱子；另一半的受試則相反，以 Sal 配對前測非偏好的箱子，以藥物配對前測偏好的箱子。此階段依實驗設計，將 GABA 致效劑以微量注射或 d-AMP 腹腔注射後，受試在制約配對箱中 30 分鐘，期間以電腦記錄受試在檢測箱中的行進距離。另外，本研究的藥物注射劑量之操弄，皆採用受試者間設計(between-subjects design)。

**制約後測：**此階段實驗為期一天，於上述制約期結束的後一天(第 8 天)進行十分鐘的測試。此階段實驗程序如同制約前測，以電腦記錄受試滯留在各箱的累計時間與行進距離，受試在此階段沒有接受任何的藥物注射。

## 七、實驗步驟

### 實驗一：將 Mus 微量注射至外側韃核

制約期間將 Mus (0, 50,100, 200, 400 ng/side) 注射至外側韃核。本項藥物劑量範圍，係參考與外側韃核腦區範圍接近的腦區:杏仁核(amygdala) (Hasanein et al., 2008; Akirav et al., 2006)、VTA (Sun et al., 2011)和內側前額葉皮質(Samson and Chappell, 2001)。Mus 劑量操弄的各組所使用受試隻數：Sal 控制組(n=43)；50 ng 組(n=8)、100 ng 組(n=22)、200 ng 組(n=20)，及 400 ng 組(n=10)。

### 實驗二：將 Bac 與 Mus 混合，微量注射至外側韃核

實驗二步驟與實驗一相似，只有測試藥物替換為 Bac 與 Mus 混合( B/M, 50 ng + 50 ng /side)，藥物劑量與製備方式參考前人研究(Stopper and Floresco, 2014)。各組所使用受試的隻數：控制組(n=14)；實驗組(n=18)。

### 實驗三：周邊注射 d-AMP

制約期間腹腔注射 d-AMP (0,0.5, 1, 2 mg/kg)。d-AMP 劑量操弄的各組所使用受試隻數：Sal 控制組(n=12)；0.5 mg/kg 組(n=8)、1 mg/kg 組(n=8)，及 2 mg/kg 組(n=8)。

#### 實驗四：微量注射 B/M 至外側韃核及周邊注射 d-AMP

制約期間檢測藥物與注射方式為：Vehicle (Veh)或 B/M (50 ng + 50 ng /side)微量注射至外側韃核結合腹腔注射 d-AMP (0, 0.5, 1 mg/kg)。各組所使用受試的隻數：Veh + Sal (Veh-Sal)組(n=35)；B/M + Sal (B/M-Sal)組(n=22)、Veh + 0.5 mg/kg d-AMP (Veh-0.5 AMP)組(n=19)、B/M+ 0.5 mg/kg d-AMP (B/M-0.5 AMP)組(n=18)、Veh + 1 mg/kg d-AMP (Veh-1 AMP)組(n=20)，及 B/M + 1 mg/kg d-AMP (B/M-1 AMP)組(n=22)。

#### 八、組織學檢驗

待完成所有行為檢測後，受試接受灌流(perfusion)程序，以備組織學檢視顱內注射位置。首先以腹腔注射過量的 chloral hydrate (30 mg/kg)，使受試進入深層麻醉，打開肋骨並剪開右心室讓血液釋出，再以 0.9%的 Sal 由左心室注入血管中，直至血液幾乎被 Sal 置換。後續以 4%的 paraformaldehyde (PFA)注入左心室，待大白鼠不再顫抖並呈現肌肉僵直的狀態後，將鼠腦取出並浸泡於 4%的 PFA 以固定(fixation)之。室溫下，將其放置於震動器上緩慢搖晃一晚，使腦組織溶浸於 4% PFA。隔天將腦從 PFA 中取出，並浸泡於 30%蔗糖保存液脫水，放入 4°C 冰箱冷藏 3 天，期間須每天稍微搖晃溶液。待鼠腦下沉至液體底部，以備進行組織切片。切片時，以冷凍膠包埋膠 (Tissue-Tek; Sakura Finetek U.S.A)包埋鼠腦後，置於冷凍切片機(Leica, Jung CM1800)上，以 50 μm 的厚度進行冠狀切片(coronal section)，再將取下的組織切片依序展平在塗有蛋白膠(gelatin)的載玻片上，並靜置一段時間。待組織切片完全乾燥後，以 Cresyl violet 作為染料進行染色，並使用封片膠(Histokitt) 進行封片程序。染色

完成後，對照腦圖譜(Paxinos and Watson, 2007)確認埋入鼠腦的雙側銅管位置，只有顱內微量注射位置正確之受試的行為數據，才列入統計考驗分析。

## 九、統計分析

### CPP 的指標

針對各組受試之間於前後測在藥物配對箱的滯留時間，進行二因子混合設計變異數分析考驗(two-way analyses of variance; two-way ANOVA) (藥物 x 前後測)。唯有實驗四採用三因子混合設計 ANOVA (d-AMP x B/M x 前後測)進行考驗。並且皆以 Bonferroni 進行所需要的事後比較。若受試於後測待在藥物配對箱的累計時間，相比前測待在藥物配對箱的時間長，代表受試對此配對箱形成 CPP。

除此之外，以成對 t 檢定考驗各組受試分別在前測與後測停留於檢測箱兩側的累計時間，若受試在後測滯留於藥物配對箱的時間相較於待在控制液配對箱的時間長，則代表受試習得 CPP。

### 自發性活動量的指標

本部份分別以 ANOVA 或獨立樣本 t 檢定，考驗各組受試之間在制約訓練期於藥物配對箱的平均行進距離。實驗二 B/M 注入外側韁核對行為活動量的影響以獨立樣本 t 檢定考驗；實驗三周邊注射 d-AMP 的劑量反應對行為活動量的影響，以獨立樣本單因子 ANOVA 進行統計分析；實驗四 B/M 注入外側韁核及周邊注射 d-AMP 對行為活動量的影響，以完全獨立樣本二因子 ANOVA 進行統計分析(B/M x d-AMP)。

除此之外，各實驗之單一劑量組的受試在制約訓練期分別待在藥物配對箱或控制液配對箱的自發性活動距離，以完全相依樣本二因子 ANOVA 進行考驗(檢測箱兩側 x 制約訓練期)，並且以 Bonferroni 進行事後比較。

本研究所有實驗數據均以平均數±標準誤(mean±sem)表示，當統計考驗所得的  $p$

值小於 0.05 時，視為該統計考驗達顯著標準。相關的統計資料分析以 GraphPad Prism 6.01 版或 SPSS 19.0 版(SPSS Inc, Chicago, U.S.A.)進行。





## 第三章、結果

### 一、組織學檢驗

本研究受試經藥物注入外側韞核，均於行為測試後進行的組織學檢驗。因核查資料太多，此論文僅以實驗四的部分代表呈現，其結果標示於圖一至圖三，分別呈現其冠狀切片(coronal section)與腦圖譜的對照。圖一為「Veh-Sal」組及「B/M-Sal」組之受試，藥物注入外側韞核的組織學檢驗結果。圖二為「Veh-0.5 AMP」組及「B/M-0.5 AMP」組之受試，藥物注入外側韞核的組織學檢驗結果。圖三為「Veh-1 AMP」組及「B/M-1 AMP」組之受試，藥物注入外側韞核的組織學檢驗結果。只有完成行為測試和組織學檢驗正確的受試，才納入後續的統計考驗。各實驗最後的有效樣本數如下；實驗一：Sal 控制組(n=20)；Mus 劑量 50 ng 組(n=4)、100 ng 組(n=17)、200 ng 組(n=15)，及 400 ng 組(n=4)。實驗二：控制組(n=5)；實驗組(n=9)。實驗三：Sal 控制組(n=12)；0.5 mg/kg 組(n=8)、1 mg/kg 組(n=8)，及 2 mg/kg 組(n=8)。實驗四：控制組「Veh-Sal」組(n=12)；實驗組「B/M-Sal」組(n=9)、「Veh-0.5 AMP」組(n=8)、「B/M-0.5 AMP」組(n=8)、「Veh-1 AMP」組(n=9)、「B/M-1 AMP」組(n=10)。

### 二、實驗一：Mus 微量注射至外側韞核在場地制約作業的結果

圖四為 Mus 注入外側韞核對場地制約作業的劑量反應結果。針對不同劑量的 Mus 在前後測於藥物配對箱的滯留時間進行二因子 ANOVA 分析，結果顯示「藥物劑量」與「前後測」的主要效果和「藥物劑量 x 前後測」之交互作用的考驗，皆未達顯著水準( $p>0.05$ )。另外，針對每一劑量組分別在前測及後測於檢測箱兩側的滯留時間進行成對 t 檢定考驗，所有 t 檢定結果皆未達顯著水平( $p>0.05$ ) (附錄圖二 A 至 E)。

圖五呈現 Mus 對實驗動物在制約期間自發性活動量變化的影響。圖五 A 至 E 分別為 Mus 不同劑量組在檢測箱內的移動距離；就圖五 A 至 D 的二因子 ANOVA 結果而言，顯示「0 ng」、「50 ng」、「100 ng」和「200 ng」等四組，其「檢測箱兩側」及「制約訓練期」的主要效果和「檢測箱兩側 x 制約訓練期」之交互作用考驗，皆未達

顯著水準( $p>0.05$ )。圖五 E 所針對的「400 ng」組之結果，發現「制約訓練期」的主要效果及「檢測箱兩側 x 制約訓練期」之交互作用考驗皆達顯著水平， $F(2, 6) = 7.54$ ,  $p<0.05$ ;  $F(2, 6) = 65.36$ ,  $p<0.0001$ 。而「檢測箱兩側」的主要效果則未達到顯著性( $p>0.05$ )。經單純主要效果檢定，發現制約期第一次制約配對(第一天與第二天)及第三次制約配對(第五天與第六天)的平均行進距離變化量皆達顯著差異( $p<0.001$ )。

### 三、實驗二：B/M 微量注射至外側韞核在場地制約作業的結果

圖六為 B/M 注入外側韞核對場地制約作業的學習結果。使用二因子 ANOVA 考驗結果，顯示「B/M」與「前後測」的主要效果和「B/M x 前後測」之交互作用的考驗，皆未達顯著水準( $p>0.05$ )。另外，以 t 檢定考驗各組分別在前測與後測於檢測箱兩側的滯留時間，皆未達顯著差異( $p>0.05$ ) (附錄圖三 A 至 B)。

圖七呈現 B/M 對實驗動物在制約期間自發性活動量變化的影響。圖七 A 至 B 分別為控制組和實驗組在檢測箱的移動距離；二因子 ANOVA 結果顯示，「Veh」組在「檢測箱兩側」及「制約訓練期」的主要效果和「檢測箱兩側 x 制約訓練期」之交互作用考驗，皆未達顯著水準( $p>0.05$ ) (圖七 A)。「B/M」組在「檢測箱兩側」的主要效果達顯著水平， $F(1, 8) = 9.67$ ,  $p<0.05$ ，但「制約訓練期」的主要效果與「檢測箱兩側 x 制約訓練期」之交互作用考驗並沒有達顯著差異( $p>0.05$ ) (圖七 B)。圖七 C 為兩組受試在藥物配對箱的平均行進距離，以獨立樣本 t 考驗顯示兩者的自發性活動量變化沒有顯著差異( $p>0.05$ )。

### 四、實驗三：周邊注射 d-AMP 在場地制約作業的結果

圖八為周邊注射 d-AMP 對場地制約作業的劑量反應結果。針對不同劑量的 d-AMP 在前後測於藥物配對箱的滯留時間進行二因子 ANOVA 分析，結果顯示「藥物劑量」與「前後測」的主要效果和「藥物劑量 x 前後測」之交互作用的考驗，皆未達顯著水準( $p>0.05$ )。附錄圖四 A 至 D 呈現每一劑量組分別在前測及後測於檢測箱兩側的

滯留時間。使用成對 t 檢定考驗結果發現，「1 mg/kg」組在後測時停留於藥物配對箱的累計時間有多於另一側非配對箱的趨勢， $t(7) = 2.22, p=0.062$  (附錄圖四 C)。其餘各組 t 檢定考驗結果皆未達顯著水平 ( $p>0.05$ )。

圖九為 d-AMP 對實驗動物在制約期間自發性活動量變化的影響。圖九 A 至 D 分別為 d-AMP 不同劑量組在檢測箱內的移動距離；使用二因子 ANOVA 考驗，結果顯示「Sal」組在「檢測箱兩側」及「制約訓練期」的主要效果皆未達顯著的水平 ( $p>0.05$ )，「檢測箱兩側 x 制約訓練期」之交互作用考驗達顯著水準， $F(2, 22) = 6.05, p<0.01$ 。經單純主要效果檢定，發現制約期第三次制約配對(第五天與第六天)的平均行進距離變化量達顯著差異 ( $p<0.05$ ) (圖九 A)。「0.5 mg/kg」組在「檢測箱兩側」及「制約訓練期」的主要效果和「檢測箱兩側 x 制約訓練期」之交互作用考驗，皆未達顯著水準 ( $p>0.05$ )。但是「檢測箱兩側」的主要效果趨近顯著意義， $F(1, 7) = 4.90, p=0.062$  (圖九 B)。「1 mg/kg」組在「檢測箱兩側」的主要效果及「檢測箱兩側 x 制約訓練期」之交互作用考驗皆達顯著水平， $F(1, 7) = 15.09, p<0.01$ ;  $F(2, 14) = 8.31, p<0.01$ 。「制約訓練期」的主要效果則未達顯著差異 ( $p>0.05$ )。經單純主要效果檢定，發現制約期三次制約配對(第一天與第二天; 第三天與第四天; 第五天與第六天)的行進距離變化量皆達顯著差異 ( $p<0.05$ ;  $p<0.001$ ) (圖九 C)。「2 mg/kg」組在「檢測箱兩側」的主要效果達顯著水平， $F(1, 7) = 11.99, p<0.05$ 。「制約訓練期」的主要效果與「檢測箱兩側 x 制約訓練期」之交互作用考驗皆沒有達顯著差異 ( $p>0.05$ ) (圖九 D)。圖九 E 為受試在藥物配對箱的平均行進距離。以單因子 ANOVA 考驗四組受試的行進距離變化量，結果顯示「劑量」的主要效果達顯著差異， $F(3, 104) = 35.26, p<0.001$ 。經事後比較，發現「Sal」組分別與 d-AMP 不同劑量組之間的差異皆達顯著水準 ( $p<0.001$ )。

## 五、實驗四：抑制外側韁核對周邊注射 d-AMP 在場地制約作業的影響

圖十表示 B/M 注入外側韁核結合腹腔注射 d-AMP 對場地制約作業的學習影響。

圖十 A 針對不同藥物處理組在前後測停留於藥物配對箱的累計時間進行三因子 ANOVA 分析，發現只有「B/M x 前後測」之交互作用的考驗達顯著水準， $F(1, 50) = 4.32, p < 0.05$ ，「d-AMP」、「B/M」與「前後測」等主要效果或是其他交互作用的差異並沒有達顯著水平( $p > 0.05$ )。圖十 B 呈現實驗動物滯留於藥物配對箱的時間差，即受試在後測停留於藥物配對箱的累計時間減去在前測滯留於藥物配對箱的時間。二因子 ANOVA 考驗結果發現，僅有「B/M」的主要效果達顯著水平， $F(1, 50) = 4.32, p < 0.05$ ，「d-AMP」的主要效果和「d-AMP x B/M」之交互作用考驗未達顯著差異( $p > 0.05$ )。針對各組在藥物配對箱的滯留時間差，另外用單一樣本 t 檢定考驗，顯示「B/M-0.5 AMP」組與「B/M-1 AMP」組經制約學習後滯留在藥物配對箱的累計時間明顯增加， $t(7) = 2.46, p < 0.05$ ;  $t(9) = 3.91, p < 0.01$ ，表示這兩組受試對藥物配對箱建立 CPP。其餘四組別 t 檢定結果皆未達顯著水平( $p > 0.05$ )。附錄圖五 A 至 F 呈現實驗四各組受試分別在前測及後測於檢測箱兩側的滯留時間。使用成對 t 檢定考驗結果發現，「B/M-0.5 AMP」組於前測時待在非藥物配對箱的累計時間多於在藥物配對箱的時間， $t(7) = 2.52, p < 0.05$  (附錄圖五 D)。「B/M-1 AMP」組於後測時在藥物配對箱的停留時間多於在另一側的非配對箱， $t(9) = 3.93, p < 0.01$  (附錄圖五 F)。其餘各組的 t 檢定結果皆無顯著差異( $p > 0.05$ )。改將 B/M 注入外側韁核的相鄰區域(附錄圖一 A 至 B)，則「B/M-0.5 AMP」和「B/M-1 AMP」兩組在前後測於檢測箱兩側的滯留時間經 t 檢定考驗結果皆無顯著差異( $p > 0.05$ ) (附錄圖六 A 至 B)。

圖十一呈現 B/M 注入外側韁核對於制約期間 d-AMP 引發行為活動量變化的影響。圖十一 A 至 F 分別為不同藥物處理組在檢測箱內的行進距離；使用二因子 ANOVA 考驗，結果顯示圖十一 A 「Veh-Sal」組在「檢測箱兩側」及「制約訓練期」的主要效果和「檢測箱兩側 x 制約訓練期」之交互作用考驗，皆未達顯著水準( $p > 0.05$ )。就圖十一 B 至 D 及圖十一 F 的二因子 ANOVA 結果而言，發現「B/M-Sal」、「Veh-0.5 AMP」、「B/M-0.5 AMP」和「B/M-1 AMP」等四組，其「檢測箱兩側」的主要效果達顯著水平， $F(1, 8) = 7.11, p < 0.05$ ;  $F(1, 7) = 34.55, p < 0.001$ ;  $F(1, 7) = 36.83, p < 0.001$ ;  $F(1, 9) = 25.46, p < 0.001$ 。「制約訓練期」的主要效果與「檢測

箱兩側 x 制約訓練期」之交互作用考驗則皆沒有達顯著差異( $p>0.05$ )。「B/M-Sal」組在「制約訓練期」的主要效果趨近顯著意義， $F(2, 16) = 3.44, p=0.057$ 。圖十一 E 「Veh-1 AMP」組，顯示「檢測箱兩側」的主要效果及「檢測箱兩側 x 制約訓練期」之交互作用考驗皆達顯著水平， $F(1, 8) = 109.7, p<0.001$ ;  $F(2, 16) = 7.28, p<0.01$ 。「制約訓練期」的主要效果並未達顯著差異( $p>0.05$ )。經單純主要效果檢定，發現在制約期的 3 次制約配對(第一天與第二天; 第三天與第四天; 第五天與第六天)於檢測箱的行進距離變化量皆達顯著差異( $p<0.001$ )。圖十一 G 為受試在藥物配對箱的平均行進距離。以二因子 ANOVA 考驗六組受試的行進距離變化量，結果顯示「d-AMP」的主要效果及「d-AMP x B/M」之交互作用考驗皆達顯著水平， $F(2, 162) = 62.06, p<0.001$ ;  $F(2, 162) = 7.64, p<0.001$ 。「B/M」的主要效果則未達顯著差異( $p>0.05$ )。經單純主要效果檢定，發現「Veh-Sal」組分別與「Veh-0.5 AMP」組或「Veh-1 AMP」組之間的差異達顯著水準( $p<0.001$ )。「B/M-Sal」組分別與「B/M-0.5 AMP」組或「B/M-1 AMP」組之間的差異達顯著水平( $p<0.01$ ;  $p<0.001$ )。另外，「Veh-1 AMP」組的平均行進距離顯著多於「B/M-1 AMP」組( $p<0.01$ )。

## 第四章、討論

本研究以場地制約作業，透過藥理抑制外側韃核的方式，探討外側韃核對酬賞相關的古典式制約學習之影響效果。實驗一檢測不同劑量的 GABA<sub>A</sub> 受體致效劑 Mus 注入外側韃核在場地制約作業的影響效果，結果顯示使用 Mus 抑制外側韃核無法建立個體的 CPP。實驗二混合 GABA<sub>A</sub> 與 GABA<sub>B</sub> 受體致效劑注入外側韃核，結果呈現 B/M 微量注射至外側韃核無法引發受試的 CPP，卻令受試在制約期間的自發性活動量增加。實驗三檢測周邊注射 d-AMP 在場地制約作業的劑量反應，結果顯示周邊注射不同劑量的 d-AMP 皆無法引發實驗動物的 CPP，但是使受試在制約期間的行為活動量增加。實驗四檢測 GABA 類受體致效劑混合注入外側韃核對個體學習 AMP-CPP 的影響，結果顯示以 B/M 抑制外側韃核可促使受試習得 AMP-CPP，而單獨使用 B/M 注入外側韃核或腹腔注射 d-AMP 皆無法建立受試的 CPP。除此之外，B/M 注入外側韃核使用周邊注射 1 mg/kg d-AMP 之受試在藥物配對箱的平均行進距離明顯減少。

### 一、GABA 類受體致效劑注入外側韃核在場地制約作業的探討

#### 場地制約行為

由實驗一及實驗二的結果發現僅以 GABA 類受體致效劑抑制外側韃核不足以誘發受試的 CPP，以下將針對該實驗結果討論外側韃核與場地偏好行為的關係。

透過抑制外側韃核探討酬賞相關的聯結學習之文獻多涉及其他「非制約刺激」(如：古柯鹼、食物、社交等) (Gill et al., 2013; Zapata et al., 2017; Stopper and Floresco, 2014; Golden et al., 2016)。未有文獻在古典式制約行為作業中單獨以抑制外側韃核的神經活動作為「非制約刺激」，因此關於『該操弄是否足以對個體產生「非制約刺激」的效果』之問題值得探討。在過去探究外側韃核傳入神經之行為功能的文獻中，多結合光遺傳學技術與即時性場地偏好作業(real-time place preference)。即時性場地偏好作業雖與一般場地制約作業相似，但是前者主要探討實驗操弄當下對於受試動機狀態的影響。作業中將實驗動物放入可自由穿梭的檢測箱中，當受試進入特定

的環境場域就立即性地給予實驗操弄(如：光刺激)直到離開該場域。實驗期間記錄受試停留於檢測箱兩側的累計時間。若實驗的操弄屬於酬賞性質則會引發受試趨近該場域，此舉動稱為即時性場地偏好行為；反之，若實驗的操弄屬於嫌惡性質則引發受試迴避該場域，此舉動稱為即時性場地嫌惡行為。Golden 等人(2016)以光刺激興奮前腦基底(basal forebrain; BF)投往外側韃核的神經路徑(BF-LHb)，探討此神經路徑在侵略引發地場地制約作業(aggression-based place conditioning task)的影響。研究結果顯示 BF 投射 GABA 至外側韃核，若透過光源刺激 BF-LHb 路徑會改變受試原先對入侵者配對箱的偏好表現。在制約後測，刺激興奮 BF-LHb 路徑會使原先迴避入侵者配對箱的受試改變成對配對箱表現偏好；抑制 BF-LHb 路徑則使原本偏好入侵者配對箱的受試改變成迴避該配對箱。這說明 BF 投射 GABA 至外側韃核會影響受試原先對於特定場域的動機價值。除此之外，多個腦區(如：側下視丘和 VTA)會同時釋放(co-release)麩胺酸和 GABA 至外側韃核，若是整合兩種神經傳導物質的淨效果(net effect)，是抑制外側韃核的神經活動，則個體表現即時性場地偏好行為(Stamatakis et al., 2013; Stamatakis et al., 2016)。因此根據上述研究說明，僅僅活化外側韃核的 GABA 受體可以帶給個體正向動機價值，並且引發趨近特定場地配對箱的行為，屬於「酬賞性質的非制約刺激」。然而，就本實驗結果所顯示 Mus 或 B/M 注入外側韃核無法令受試習得 CPP，可能因為該「非制約刺激」的強度不足以令受試將此酬賞性的經驗與環境刺激產生制約性聯結學習(Lecca et al., 2014)。另外，「非制約刺激」與「制約刺激」的配對次數也可能影響實驗動物對於場地制約作業的學習。一般而言，若制約配對的次數越多，受試越容易習得 CPP (Carr et al., 1989)。因此本實驗也可能是所採用的制約配對次數有所不足，導致無法有效地產生場地制約效果。上述推論皆有待進一步地實驗加以驗證。

在場地制約作業中，通常也需考慮藥物是否影響受試對於環境刺激的「區辨能力」。若藥物操弄使實驗動物無法區辨不同的環境刺激，則無法建立受試的 CPP。Meye 等人(2016)以基因轉殖技術增加內側蒼白球投往外側韃核神經路徑(EPN-LHb)的囊泡 GABA 轉運蛋白(vesicular GABA transporter)，發現不影響實驗動物表現對於古

柯鹼配對箱的 CPP。Golden 等人(2016)以光遺傳學技術刺激 BF-LHb 路徑改變受試對於入侵者配對箱的偏好表現。上述兩篇文獻證實活化外側韃核的 GABA 類受體不影響個體對「環境刺激」的區辨能力，因此實驗動物仍可以表現 CPP。另外，實驗四的「B/M-0.5 AMP」和「B/M-1 AMP」兩組受試經過制約訓練後皆對藥物配對箱形成 CPP。因此可證實 Mus 或 B/M 注入外側韃核不影響實驗動物對於環境刺激的「區辨能力」，也說明本研究所使用行為檢測箱的兩側「環境刺激」相異，其程度是足夠凸顯 (salient) 可令受試辨認。

使用光遺傳學技術探討外側韃核迴路在場地偏好作業的影響。Stamatakis 等人(2013)以光源刺激興奮含有 TH 訊息核糖核酸(mRNA)之 VTA 投往外側韃核的神經路經 (VTA-LHb)，引發小鼠表現即時性場地偏好行為。Root 等人(2014b)活化含有囊泡麩胺酸轉運蛋白(vesicular glutamate transporter; Vglut2) 之 VTA-LHb 路經，卻發現小鼠表現即時性場地嫌惡行為。在 Root 等人(2014a)另一項研究，透過逆向的神經追蹤劑 (retrograde tracer) 探究 VTA-LHb 路經的神經化學性質，發現該神經路徑有部分(24.9%)的 VTA 神經元同時表現 Vglut2 和 TH 的 mRNA。根據過去文獻指出破壞外側韃核會增加 VTA 多巴胺神經元的基礎活動量(Tian and Uchida, 2015)，本研究以 Mus 或 B/M 抑制外側韃核的操弄，很可能造成 VTA 多巴胺的神經活動呈現活耀的狀態，進而可能同時活化上述兩種 VTA-LHb 的神經路徑，導致本研究之實驗操弄的效果受到限制無法建立受試的 CPP。另外，Lammel 等人(2012)以光源刺激興奮外側韃核投往 VTA 的神經路徑(LHb-VTA)，建立實驗動物的場地制約嫌惡，並進一步研究發現 LHb-VTA 路徑投射多巴胺至內側前額葉皮質，並且內側前額葉皮質在上述的制約性迴避行為中扮演重要的角色。若使用多巴胺受體拮抗劑 SCH23390 注入內側前額葉皮質，會使受試無法習得場地制約嫌惡。這表示在內側前額葉皮質的多巴胺釋放量，涉及個體在場地制約作業的學習行為。根據過去文獻顯示以 AMPA 受體拮抗劑 LY293558 抑制外側韃核會使前額葉皮質、依核和紋狀體等三個腦區的多巴胺濃度增加(Lecourtier et al., 2008)。雖然依核的多巴胺濃度增加有助於個體習得 CPP (Liao et al., 2000)，但是抑制外側韃核也導致前額葉皮質的多巴胺濃度提高，進而可能干擾受試在場地制約作業



的學習行為，這推測也是造成實驗一及實驗二結果不顯著的原因之一。

### 制約訓練期間的自發性活動量變化

實驗一的結果顯示高劑量的 400 ng Mus 注入外側韃核改變受試制約期間的行為活動量，而其餘劑量的 Mus 皆不影響受試的自發性活動量。雖然「400 ng」組的統計考驗結果顯示在制約期第一次制約配對及第三次制約配對的平均行進距離變化量皆有顯著差異，但是由於其樣本數過少，此行為結果的推論有待進一步增加樣本數來驗證。

Wang 等人(2017)透過破壞黑質體結合 Mus 注入外側韃核，探討外側韃核與帕金森氏症的關係。實驗使用 Mus (0, 150, 300, 600 ng) 微量注射至左側外側韃核，並進行五分鐘的開放空間試驗(open field test)。結果顯示 Mus 注入外側韃核不影響受試的自發性活動量，與過去文獻的結果一致(Tomaiuolo et al., 2014)。但是 Mathis 等人(2015)卻發在 Mus (24 ng) 注入外側韃核會令實驗動物在籠屋(home cage)的行為活動量提高。從上述文獻發現將 24 ng Mus 注入外側韃核會造成實驗動物的自發性活動量增加，但是若使用較高劑量的 Mus 則不改變受試的行為活動量，與實驗一的結果一致。

實驗二的結果呈現「B/M」組的受試在制約期間於藥物配對箱的自發性活動量增加，但是「B/M」組與「Veh」組在藥物配對箱的平均行進距離變化量之統計考驗結果卻沒有明顯差異，可能是由於控制組的樣本數過少所導致，需要進一步增加樣本數來驗證之。

Gill 等人(2013)將 64.1 ng Bac 混合 3.4 ng Mus 注入外側韃核並進行一小時的開放空間試驗。結果顯示該劑量的 B/M 注入外側韃核不影響受試的自發性活動量。van Kerkhof 等人(2013)使用較高劑量 213.7 ng Bac 混合 11.4 ng Mus 注入外側韃核也呈現相同的行為結果。實驗二的結果與上述文獻不一致，可能和本研究所採用的藥物劑量、行為檢測箱及受試品系等皆不同有關。另外，Bressel 等人(2014)將 AMPA 受體拮抗劑 NBQX 注入外側韃核，發現受試的自發性活動量增加。Stamatakis 等人(2016)利用基因轉殖的方式操弄外側韃核的上游腦區，剔除含有 Vglut2 的側下視丘神經元並進行 35 分鐘的開放空間試驗，實驗結果卻顯示不影響小鼠的自發性活動量。而破壞外側

韃核對於實驗動物的行為活動量之影響也有不一致的實驗結果：Lee 和 Huang (1988) 與 Wang 等人(2013)皆發現破壞外側韃核促使受試的自發性活動量提高；而 Thornton 等人(1990)與 Song 等人(2017)的實驗結果則顯示破壞外側韃核不改變實驗動物的行為活動量。因此根據上述的文獻資料顯示外側韃核的神經活動對於個體行為活動量之影響有不一致的結果，若是抑制或破壞外側韃核可能令實驗動物的自發性活動量增加。

## 二、周邊注射 d-AMP 在場地制約作業的探討

實驗三的結果顯示腹腔注射不同劑量的 d-AMP 皆無法引發受試的 CPP。雖然過往許多文獻報導周邊注射 d-AMP 可以形成 CPP (Spyraki et al., 1982; Rademache et al., 2006; Shen et al., 2014)，但是仍有部分研究呈現不一樣的行為結果。Lett (1988) 指出 d-AMP 的藥物效果同時具有酬賞性質與嫌惡性質，兩者共同影響實驗動物對於場地制約行為的學習，若是減少 d-AMP 的嫌惡性質可增強受試在 AMP-CPP 的表現。除此之外，個體對於 d-AMP 之酬賞性質及嫌惡性質的敏感度也會影響受試在場地制約作業的學習表現(Cabib et al., 1996)。Budygin 等人(2004)分別使用 2.5 或 5 mg/kg 的 d-AMP 與環境刺激進行兩次配對，發現兩組受試皆沒有形成 AMP-CPP。Runkorg 等人(2006)分別使以 1, 2 及 3 mg/kg 的 d-AMP 與環境刺激進行四次配對，發現 1 mg/kg 的受試表現出對藥物配對箱偏好的傾向，但是統計考驗結果未達顯著差異；其餘劑量的受試皆習得 AMP-CPP。而實驗三的結果與上述兩篇研究的實驗結果較為相似。除此之外，本研究在制約期間發現「2 mg/kg」組的受試，在周邊注射 d-AMP 後出現刻板行為(stereotyped behavior) (例如：重複性甩頭)。過去文獻報導注射 2 mg/kg 的 d-AMP 容易令大白鼠產生刻板行為(Kuczenski and Segal, 1990; Kuczenski et al., 1991)，而該行為可能導致 d-AMP 的嫌惡性質增強，進而削弱個體在 AMP-CPP 的學習表現(Laviola et al., 1994)。因此這可能是「2 mg/kg」組之受試沒有形成 CPP 的原因之一。

實驗三的結果顯示腹腔注射不同劑量的 d-AMP 皆令大白鼠在制約期間於藥物配對

箱的自發性活動量增加，與過往周邊注射 d-AMP 之文獻的研究結果一致(Kuczenski and Segal, 1990; Bardo et al., 1999)。

### 三、B/M 注入外側韞核結合腹腔注射 d-AMP 在場地制約作業的探討

#### 場地制約行為

實驗四的結果發現 B/M 注入外側韞核可促進個體習得 AMP-CPP，若是單獨使用 B/M 注入外側韞核或是腹腔注射 d-AMP 皆無法有效地引發 CPP，與實驗二及實驗三的研究結果一致。若是將 B/M 注射至外側韞核的相鄰區域(例如：視丘與海馬迴)則無法令受試習得 AMP-CPP，這表示實驗四的結果確實來自於對外側韞核的操弄，並非藥物擴散至其他腦區所導致。另外 CPP 需考慮藥物操弄對於個體的影響是否涉及狀態依賴學習(state dependent learning; SDL)。在制約期間若藥物的注射操弄造成實驗動物短暫的失憶或是干擾其感官訊息處理的能力，會令受試對於藥物配對的環境產生陌生感，導致在後測時滯留於藥物配對箱的累計時間增加，此現象稱為 SDL；此時 CPP 的形成原因並非受藥物之酬賞性質的影響，而是因為對於藥物配對箱的陌生感造成較長時間的探索 (Carr et al., 1989)。Reicher 和 Holman (1977)針對已習得 AMP-CPP 的受試於後測時再度腹腔注射 AMP，結果發現不改變受試原先對藥物配對箱的偏好。這表示 AMP 沒有產生 SDL 的疑慮；若是 AMP 導致實驗動物產生 SDL，則在後測時注射藥物將使受試無法表現 CPP。除此之外，根據實驗二的結果也可以排除 B/M 注入外側韞核產生 SDL 的疑慮，如果該操弄導致個體產生 SDL 則會令受試形成 CPP。綜合上述的討論，說明實驗四的結果是由於藥物注射的操弄改變受試對於酬賞相關的動機所導致，而非其他的生理因素。因此推論 B/M 注入外側韞核結合腹腔注射 d-AMP 可促進個體正向的動機，進一步增強實驗動物對於酬賞相關的古典式制約學習行為。

在行為神經科學的研究領域中，自我注射作業與場地制約作業均被廣泛地使用於探討藥物的酬賞性質。相較於前者，場地制約作業的優勢在於制約後測時可以在無藥物作用下檢測聯結學習的效果，以排除藥物對於學習表現的干擾(Carr et al., 1989;

Cunningham et al., 2006)。藉由上述兩種行為作業的研究，可進一步探究外側韃核的神經活動對於藥物酬賞相關之動機行為的影響。Zapata 等人(2017)將 64.1 ng Bac 混合 3.4 ng Mus 注入外側韃核，檢測是否改變受試在古柯鹼自我注射作業的動機行為，研究結果發現不影響實驗動物的壓桿反應。Gill 等人(2013)也以相同劑量的 B/M 注入外側韃核，發現亦不影響受試在古柯鹼自我注射作業的戒斷行為。上述研究結果說明 B/M 注入外側韃核不影響實驗動物對於古柯鹼的酬賞價值及覓藥行為的動機。雖然上述兩篇文獻報導所使用的行為作業與心理興奮劑皆與本研究不同，但是推測實驗四的結果並非因為 B/M 抑制外側韃核影響實驗動物對於 d-AMP 的酬賞價值，例如：增加對 d-AMP 之酬賞性質的敏感度。而是由於 B/M 注入外側韃核結合周邊注射 d-AMP，兩種藥物注射的操弄同時使中腦的多巴胺釋放量增加，進而令個體產生足夠的酬賞動機而引發 CPP。

#### 制約訓練期間的自發性活動量變化

實驗四的結果顯示單獨以 B/M 注入外側韃核或是單獨腹腔注射 d-AMP 皆令受試的自發性活動量增加，這與實驗二及實驗三的研究結果一致。另外，實驗結果也發現 B/M 注入外側韃核造成 1 mg/kg d-AMP 引發地行為活動變化量減少。然而 Gifuni 等人(2012)卻指出周邊注射 1 mg/kg d-AMP 的受試中，外側韃核損傷之受試的行為活動量高於外側韃核假損傷(sham-lesion)之受試的行為活動量。實驗四結果與上述文獻的研究結果不一致，可能由於兩者所採用的實驗方法及行為檢測箱皆不相同有關。本研究透過藥理的方式暫時性抑制外側韃核的神經活動，並使用場地制約作業之檢測箱進行測量；而 Gifuni 等人則以藥物永久性破壞外側韃核，並使用動物活動力測試箱進行測量。由於腦部組織遭到永久性地破壞可能導致大腦的代償作用(compensatory mechanisms)，因此這可能是兩者研究結果不相同的原因之一。

#### 四、外側韃核與多巴胺神經元

根據神經化學的研究顯示外側韃核的神經活動可調控中腦多巴胺系統。若是以電刺激興奮外側韃核，可抑制中腦多巴胺的神經活動(Christoph et al., 1986)；若是破壞或抑制外側韃核，則令中腦多巴胺神經元活動量增加(Tian and Uchida, 2015)。

Bromberg-Martin 等人(2010)指出多巴胺神經元可根據對外部刺激的反應分成不同的類型，以完整地反映個體不同層面的動機。一類的多巴胺神經元反映外部刺激的「動機價值」。若個體接收到酬賞或酬賞相關之線索時，此類多巴胺神經元的活動呈現興奮反應；反之，在個體接收到嫌惡性刺激時，此類多巴胺神經元的活動呈現被抑制的反應。因此其主要涉及酬賞相關的動機行為(例如：酬賞學習及覓藥行為)；另一群的多巴胺神經元則反映外部刺激的「動機顯著性」(motivational salience)，當個體接收到顯著且強烈的外部刺激(例如：無預期的嫌惡性刺激)時，此類多巴胺神經元呈現興奮活動的現象，因此主要涉及非酬賞相關的動機行為。本研究以 GABA 類受體致效劑抑制外側韃核，推測可使中腦多巴胺神經元的活動量增加，卻無法進一步得知被影響的的多巴胺神經元之類型與比例。如果實驗操弄僅僅影響少部分「動機價值」相關的多巴胺神經元，推測受試會產生較低的酬賞動機，導致無法建立 CPP。這可能是 Mus 或 B/M 單獨注入外側韃核皆無法形成 CPP 的原因之一。B/M 注入外側韃核結合周邊注射 d-AMP，推測刺激興奮更多「動機價值」相關的多巴胺神經元，促使個體的酬賞動機增強，進而習得 CPP。上述的研究結果之推論需要進一步實驗加以驗證。

## 五、未來研究方向

綜合本研究結果顯示，單獨使用 GABA 類致效劑類注入外側韃核或是腹腔注射 d-AMP，皆無法令受試建立 CPP。但是透過 B/M 抑制外側韃核結合周邊注射 d-AMP，可促進受試在場地制約作業的學習效果。推測該實驗結果是由於兩種藥物注射的操弄皆引發中腦多巴胺釋放量的增加，令個體產生足夠的酬賞動機而引發 CPP(圖十二 A 至 B)。但是就本研究的實驗結果並無法證實該假設，因為 d-AMP 不僅作用在多巴胺系統，也影響其他單胺類神經傳導物的釋放量(例如：血清素)(Sitte and Freissmuth,

2015)。而外側韃核亦調控多個包括 VTA 的單胺類神經化學物質有關之神經核(例如：藍斑核和背側縫核)。因此未來可進一步針對本研究的實驗結果與中腦多巴胺系統之關係作探討。除此之外，就實驗四的結果而言，也無法得知受試的行為表現是受到 GABA<sub>A</sub> 受體、GABA<sub>B</sub> 受體或是兩種受體同時作用的影響。未來研究可針對 GABA<sub>B</sub> 受體在場地制約作業的影響效果進行探討，檢測 baclofen 注入外側韃核在該作業的劑量反應。

## 六、結論

生物體的存活需具備行為調整與學習之能力以因應環境的改變。本研究透過將 GABA 類受體致效劑注入外側韃核，探討抑制外側韃核對於場地制約作業的影響。研究結果發現僅使用 Mus 或 B/M 抑制外側韃核皆無法引發實驗動物在場地制約作業的聯結學習，但是 B/M 注入外側韃核卻使受試的行為活動量增加。另外，本研究以周邊注射 d-AMP 檢測在場地制約作業的劑量反應，研究結果顯示注射 d-AMP 並未形成任何場地制約行為，但是增加實驗動物的行為活動量。當 B/M 注入外側韃核結合周邊注射 d-AMP，可以有效地令大白鼠習得 CPP，但是令 d-AMP 引發地行為活動變化量減少。綜合上述的實驗結果，單獨使用 GABA 類藥物抑制外側韃核或是周邊注射 d-AMP，皆無法令個體形成場地制約行為。當結合兩種藥物注射的操弄，發現抑制外側韃核會增強個體對藥物酬賞與環境場地的聯結學習。由於本研究是透過微量注射藥物的方式探討外側韃核對酬賞相關之古典式制約學習的影響，未來可進一步針對抑制外側韃核可能影響的多巴胺神經路徑及其神經元類型進行研究，以更多的了解外側韃核在多巴胺相關之古典式制約行為的角色。

## 參考文獻

- Akirav I, Raizel H, Maroun M (2006) Enhancement of conditioned fear extinction by infusion of the GABA(A) agonist muscimol into the rat prefrontal cortex and amygdala. *Eur J Neurosci* 23:758-764.
- Baker PM, Jhou T, Li B, Matsumoto M, Mizumori SJY, Stephenson-Jones M, Vicentic A (2016) The lateral habenula circuitry: reward processing and cognitive control. *J Neurosci* 36:11482-11488.
- Baker PM, Raynor SA, Francis NT, Mizumori SJY (2017) Lateral habenula integration of proactive and retroactive information mediates behavioral flexibility. *Neuroscience* 345:89-98.
- Bardo MT, Valone JM, Bevins RA (1999) Locomotion and conditioned place preference produced by acute intravenous amphetamine: role of dopamine receptors and individual differences in amphetamine self-administration. *Psychopharmacology* 143:39-46.
- Bressel PJD, McNally GP (2014) The role of the lateral habenula in punishment. *PLoS One* 9:e111699.
- Bromberg-Martin ES, Hikosaka O (2011) Lateral habenula neurons signal errors in the prediction of reward information. *Nat Neurosci* 14:1209-1216.
- Bromberg-Martin ES, Matsumoto M, Hikosaka O (2010) Dopamine in motivational control: rewarding, aversive, and alerting. *Neuron* 68:815-834.
- Budygin EA, Brodie MS, Sotnikova TD, Mateo Y, John CE, Cyr M, Gainetdinov RR, Jones SR (2004) Dissociation of rewarding and dopamine transporter-mediated properties of amphetamine. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:7781-7786.
- Cabib S, Puglisi-Allegra S, Genua C, Simon H, Le Moal M, Piazza PV (1996) Dose-dependent aversive and rewarding effects of amphetamine as revealed by a

- new place conditioning apparatus. *Psychopharmacology* 125:92-96.
- Carr GD, Fibiger HC, Phillips AG (1989) Conditioned place preference as a measure of drug reward. In: *The neuropharmacological basis of reward* (Liebman JM, Cooper SJ, eds), pp 264-319. New York: Oxford UP.
- Christoph GR, Leonzio RJ, Wilcox KS (1986) Stimulation of the lateral habenula inhibits dopamine-containing neurons in the substantia nigra and ventral tegmental area of the rat. *J Neurosci* 6:613-619.
- Cunningham CL, Gremel CM, Groblewski PA (2006) Drug-induced conditioned place preference and aversion in mice. *Nat Protoc* 4:1662-1670.
- Duchesne V, Boye SM (2013) Differential contribution of mesoaccumbens and mesohabenular dopamine to intracranial self-stimulation. *Neuropharmacology* 70:43-50.
- Fakhoury M, Domínguez López S (2014) The Role of Habenula in Motivation and Reward. *Adv in Neurosci* 2014.
- Friedman A, Lax E, Dikshtein Y, Abraham L, Flaumenhaft Y, Sudai E, Ben-Tzion M, Ami-Ad L, Yaka R, Yadid G (2010) Electrical stimulation of the lateral habenula produces enduring inhibitory effect on cocaine seeking behavior. *Neuropharmacology* 59:452-459.
- Friedman A, Lax E, Dikshtein Y, Abraham L, Flaumenhaft Y, Sudai E, Ben-Tzion M, Yadid, G (2011) Electrical stimulation of the lateral habenula produces an inhibitory effect on sucrose self-administration. *Neuropharmacology* 60:381-387.
- Gifuni AJ, Jozaghi S, Gauthier-Lamer AC, Boye SM (2012) Lesions of the lateral habenula dissociate the reward-enhancing and locomotor-stimulant effects of amphetamine. *Neuropharmacology* 63:945-957.
- Gill MJ, Ghee SM, Harper SM, See RE (2013) Inactivation of the lateral habenula



reduces anxiogenic behavior and cocaine seeking under conditions of heightened stress. *Pharmacol Biochem Behav* 111:24-29.

Golden SA, Heshmati M, Flanigan M, Christoffel DJ, Guise K, Pfau ML, Aleyasin H, Menard C, Zhang H, Hodes GE, Bregman D, Khibnik L, Tai J, Rebusi N, Krawitz B, Chaudhury D, Walsh JJ, Han MH, Shapiro ML, Russo SJ (2016) Basal forebrain projections to the lateral habenula modulate aggression reward. *Nature* 534:688-692.

Hasanein P, Mirazi N, Javanmardi K (2008) GABAA receptors in the central nucleus of amygdala (CeA) affect on pain modulation. *Brain Res* 1241:36-41.

Hikosaka O (2010) The habenula: from stress evasion to value-based decision-making. *Nat Rev Neurosci* 11:503-513.

Kuczenski R, Segal DS (1990) In vivo measures of monoamines during amphetamine-induced behaviors in rats. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 14:S37-S50.

Kuczenski R, Segal DS, Aizenstein ML (1991) Amphetamine, cocaine, and fencamfamine: relationship between locomotor and stereotypy response profiles and caudate and accumbens dopamine dynamics. *J Neurosci* 11:2703-2712.

Lammel S, Lim BK, Ran C, Huang KW, Betley MJ, Tye KM, Deisseroth K, Malenka RC (2012) Input-specific control of reward and aversion in the ventral tegmental area. *Nature* 491:212-217.

Laviola G, Dell'Omo G, Chiarotti G, Bignami G (1994) d-Amphetamine conditioned place preference in developing mice: relations with changes in activity and stereotypies. *Behav Neurosci* 108:514-524.

Lecca S, Meye FJ, Mameli M (2014) The lateral habenula in addiction and depression: an anatomical, synaptic and behavioral overview. *Eur J Neurosci* 39:1170-1178.

- Lecourtier L, Defrancesco A, Moghaddam B (2008) Differential tonic influence of lateral habenula on prefrontal cortex and nucleus accumbens dopamine release. *Eur J Neurosci* 27:1755-1762.
- Lecourtier L, Neijt HC, Kelly PH (2004) Habenula lesions cause impaired cognitive performance in rats: implications for schizophrenia. *Eur J Neurosci* 19:2551-2560.
- Lee EH, Huang SL (1988) Role of lateral habenula in the regulation of exploratory behavior and its relationship to stress in rats. *Behav Brain Res* 30:265-271.
- Lee YA, Goto Y (2011) Neurodevelopmental disruption of cortico-striatal function caused by degeneration of habenula neurons. *PLoS One* 6:e19450.
- Lett BT (1988) Enhancement of conditioned preference for a place paired with amphetamine produced by blocking the association between place and amphetamine-induced sickness. *Psychopharmacology* 95:390-394.
- Liao RM (2008) Development of conditioned place preference induced by intra-accumbens infusion of amphetamine is attenuated by co-infusion of dopamine D1 and D2 receptor antagonists. *Pharmacol Biochem Behav* 89:367-373.
- Liao RM, Chang YH, Wang SH (1998) Influence of SCH23390 and Spiperone on the expression of conditioned place preference induced by d-amphetamine or cocaine. *Chin J Physiol* 41:85-92.
- Liao RM, Chang YH, Wang SH, Lan CH (2000) Distinct accumbal subareas are involved in place conditioning of amphetamine and cocaine. *Life Sci* 67:2033-2043.
- Li K, Zhou T, Liao L, Yang Z, Wong C, Henn F, Malinow R, Yates JR 3rd., Hu H (2013)  $\beta$ CaMKII in lateral habenula mediates core symptoms of depression. *Science* 341:1016-1020.
- Mathis V, Barbelivien A, Majchrzak M, Mathis C, Cassel JC, Lecourtier L (2016) The

Lateral Habenula as a Relay of Cortical Information to Process Working Memory. *Cereb Cortex* 13:1-11.

Mathis V, Cosquer B, Avallone M, Cassel JC, Lecourtier L (2015) Excitatory transmission to the lateral habenula is critical for encoding and retrieval of spatial memory. *Neuropsychopharmacology* 40:2843-2851.

Matsumoto M, Hikosaka O (2007) Lateral habenula as a source of negative reward signals in dopamine neurons. *Nature* 447:1111-1115.

Meye FJ, Lecca S, Valentinova K, Mameli M (2013) Synaptic and cellular profile of neurons in the lateral habenula. *Front Hum Neurosci* 7:860.

Meye FJ, Soiza-Reilly M, Smit T, Diana MA, Schwarz MK, Mameli M (2016) Shifted pallidal co-release of GABA and glutamate in habenula drives cocaine withdrawal and relapse. *Nat Neurosci* 19:1019-1024.

Money KM, Stanwood GD (2013) Developmental origins of brain disorders: roles for dopamine. *Front Cell Neurosci* 7:260.

Olds J, Milner P (1954) Positive reinforcement produced by electrical stimulation of septal area and other regions of rat brain. *J Comp Physiol Psychol* 47:419-427.

Omelchenko N, Bell R, Sesack SR (2009) Lateral habenula projections to dopamine GABA neurons in the rat ventral and tegmental area. *Eur J Neurosci* 30:1239-1250.

Pavlov IP (1927) *Conditioned reflexes: An investigation of the physiological activity of the cerebral cortex*. Trans and ed GV Anrep London: Oxford University Press.

Paxinos G, Watson C (2007) *The rat brain in stereotaxic coordinates*. San Diego: Academic Press.

Proulx CD, Hikosaka O, Malinow R (2014) Reward processing by the lateral habenula in normal and depressive behaviors. *Nat Neurosci* 17:1146-1152.

Prus A, James JR, Rosecrans JA (2009) Conditioned Place Preference. *Methods of*

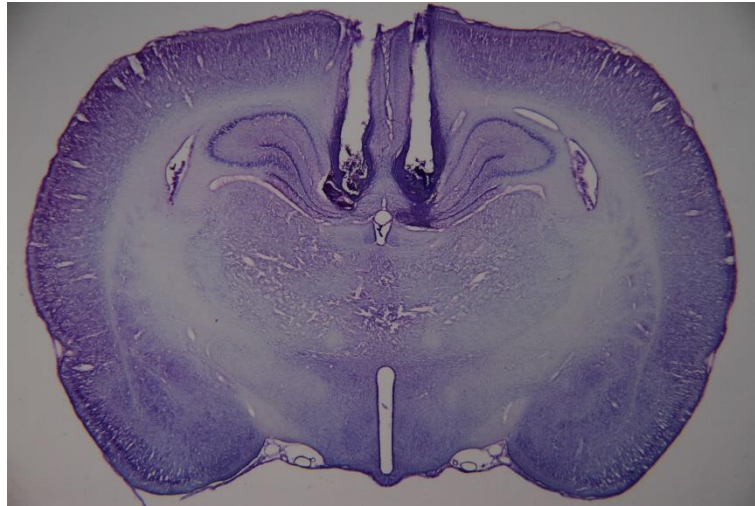
- Behavioral Analysis in Neuroscience. J Buccafusco Boca Raton (FL), CRC Press.
- Rademacher DJ, Kovacs B, Shen F, Napier TC, Meredith GE (2006) The neural substrates of amphetamine conditioned place preference: implications for the formation of conditioned stimulus-reward associations. *Eur J Neurosci* 24:2089-2097.
- Reicher MA, Holman EW (1977) Location preference and flavor aversion reinforced by amphetamine in rats. *Animal Learning & Behavior* 5:343-346.
- Root DH, Mejias-Aponte CA, Zhang S, Wang HL, Hoffman AF, Lupica CR, Morales M (2014a) Single rodent mesohabenular axons release glutamate and GABA. *Nat Neurosci* 17:1543-1551.
- Root DH, Mejias-Aponte CA, Qi J, Morales M (2014b) Role of glutamatergic projections from ventral tegmental area to lateral habenula in aversive conditioning. *J Neurosci* 34:13906-13910.
- Rünkorg K, Värvi S, Matsui T, Köks S, Vasar E (2006) Differences in behavioural effects of amphetamine and dopamine-related gene expression in wild-type and homozygous CCK 2 receptor deficient mice. *Neuroscience letters* 406:17-22.
- Salamone JD, Correa M (2012) The mysterious motivational functions of mesolimbic dopamine. *Neuron* 76:470-485.
- Samson HH, Chappell A (2001) Muscimol injected into the medial prefrontal cortex of the rat alters ethanol self-administration. *Physiol Behav* 74:581-587.
- Sanchis-Segura C, Spanagel R (2006) Behavioural assessment of drug reinforcement and addictive features in rodents: an overview. *Addict Biol* 11:2-38.
- Schultz W, Dayan P, Montague PR (1997) A neural substrate of prediction and reward. *Science* 275:1593-1599.

- Schultz W (2013) Updating dopamine reward signals. *Curr Opin Neurobiol* 23:229-238.
- Shabel SJ, Proulx CD, Trias A, Murphy RT, Malinow R (2012) Input to the lateral habenula from the basal ganglia is excitatory, aversive, and suppressed by serotonin. *Neuron* 74:475-481.
- Shabel SJ, Proulx CD, Piriz J, Malinow R (2014) GABA/glutamate co-release controls habenula output and is modified by antidepressant treatment. *Science* 345:1494-1498.
- Shen YL, Chang TY, Chang YC, Tien HH, Yang FC, Wang PY, Liao RM (2014) Elevated BDNF mRNA expression in the medial prefrontal cortex after d-amphetamine reinstated conditioned place preference in rats. *Neuroscience* 263:88-95.
- Sitte HH, Freissmuth M (2015) Amphetamines, new psychoactive drugs and the monoamine transporter cycle. *Trends Pharmacol Sci* 36:41-50.
- Smith Y, Séguéla P, Parent A (1987) Distribution of GABA-immunoreactive neurons in the thalamus of the squirrel monkey (*Saimiri sciureus*). *Neuroscience* 22:579-591.
- Song M, Jo YS, Lee YK, Cho JS (2017) Lesions of the lateral habenula facilitate active avoidance learning and threat extinction. *Behav Brain Res* 318:12-17.
- Sun JY, Yang JY, Wang F, Hou Y, Dong YX, Wu CF (2011) GABAA receptors in VTA mediate the morphine-induced release of ascorbic acid in rat nucleus accumbens. *Brain Res* 1368:52-58.
- Spyraki C, Fibiger HC, Phillips AG (1982) Dopaminergic substrates of amphetamine-induced place preference conditioning. *Brain Res* 253:185-193.
- Stamatakis AM, Stuber GD (2012) Activation of lateral habenula inputs to the ventral midbrain promotes behavioral avoidance. *Nat Neurosci* 15:1105-1107.

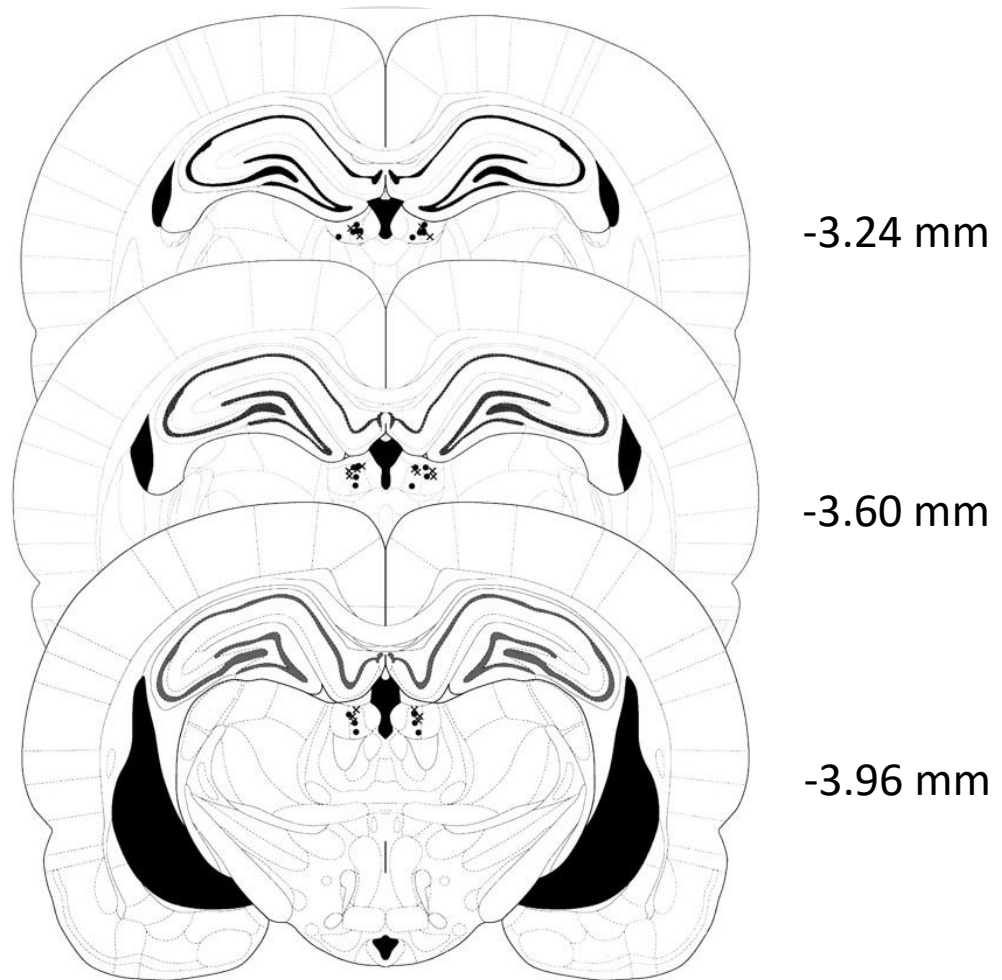
- Stamatakis AM, Jennings JH, Ung RL, Blair GA, Weinberg RJ, Neve RL, Boyce F, Mattis J, Ramakrishnan C, Deisseroth K, Stuber GD (2013) A unique population of ventral tegmental area neurons inhibits the lateral habenula to promote reward. *Neuron* 80:1039-1053.
- Stamatakis AM, Van Swieten M, Basiri ML, Blair GA, Katak P, Stuber GD (2016) Lateral hypothalamic area glutamatergic neurons and their projections to the lateral habenula regulate feeding and reward. *J Neurosci* 36:302-311.
- Stopper CM, Floresco SB (2014) What's better for me? Fundamental role for lateral habenula in promoting subjective decision biases. *Nat Neurosci* 17:33-35.
- Stopper CM, Maric TL, Montes DR, Wiedman CR, Floresco SB (2014) Overriding phasic dopamine signals redirects action selection during risk/reward decision making. *Neuron* 84:177-189.
- Thornton EW, Bradbury GE, Davies C (1990) Increased immobility in an automated forced swimming test following lesion of the habenula in rats: Absence of evidence for a contribution from motor impairment. *Behav Neurosci* 104:37-43.
- Tian J, Uchida N (2015) Habenula lesions reveal that multiple mechanisms underlie dopamine prediction errors. *Neuron* 87:1304-1316.
- Tomaiuolo M, Gonzalez C, Medina JH, Piriz J (2014) Lateral Habenula determines long-term storage of aversive memories. *Front Behav Neurosci* 8:170.
- van Kerkhof LWM, Damsteegt R, Trezza V, Voorn P, Vanderschuren LJMJ (2013b) Functional integrity of the habenula is necessary for social play behavior in adolescent rats. *Eur J Neurosci* 38:3465-3475.
- Velasquez M, Molfese DL, Salas R (2014) The role of the habenula in drug addiction. *Front Hum Neurosci* 8:174.
- Wang D, Li Y, Feng Q, Guo Q, Zhou J, Luo M (2017) Learning shapes the aversion and reward responses of lateral habenula neurons. *eLife* 6:e23045.

- Wang T, Zhang L, Zhang QJ, Wang Y, Du CX, Sun YN, Zhang J, Lv SX, Chen L, Liu J (2017) Involvement of lateral habenula  $\alpha 1$  subunit-containing GABAA receptor-mediated inhibitory transmission in the regulation of depression-related behaviors in experimental Parkinson's disease. *Neuropharmacology* 116:399-411.
- Wang Z, Wang L, Yamamoto R, Sugai T, Kato N (2013) Role of the lateral habenula in shaping context-dependent locomotor activity during cognitive tasks. *Neuroreport* 24:276-280.
- Weiss T, Veh RW (2011) Morphological and electrophysiological characteristics of neurons within identified subnuclei of the lateral habenula in rat brain slices. *Neuroscience* 172:74-93.
- Winter C, Vollmayr B, Djodari-Irani A, Klein J, Sartorius A (2011) Pharmacological inhibition of the lateral habenula improves depressive-like behavior in an animal model of treatment resistant depression. *Behav Brain Res* 216:463-465.
- Wise RA (1982) Neuroleptics and operant behavior: the anhedonia hypothesis. *Behav Brain Sci* 5:39.
- Zapata A, Hwang EK, Lupica CR (2017) Lateral Habenula Involvement in Impulsive Cocaine Seeking. *Neuropsychopharmacology* 42:1103-1112.

A



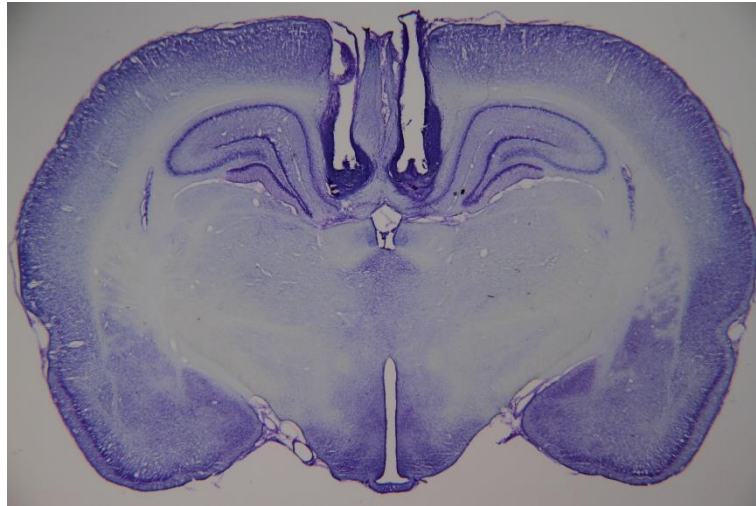
B



圖一：藥物注入外側韁核的組織學檢驗結果(實驗四「Veh-Sal」組及「B/M-Sal」組之受試)。A圖為鋼管埋入位置的實際腦組織切片照。B圖以腦圖譜標示注射針頭落於外側韁核的分布位置。•表示「Veh-Sal」組的注射位置，x表示「B/M-Sal」組的注射位置。



A

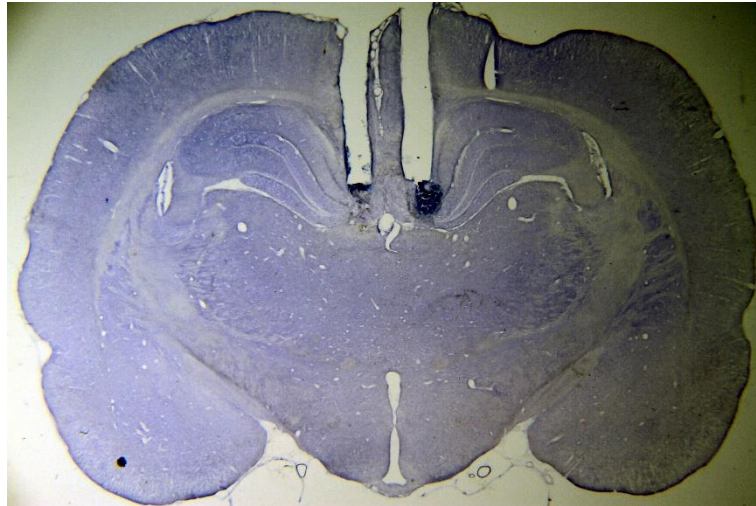


B

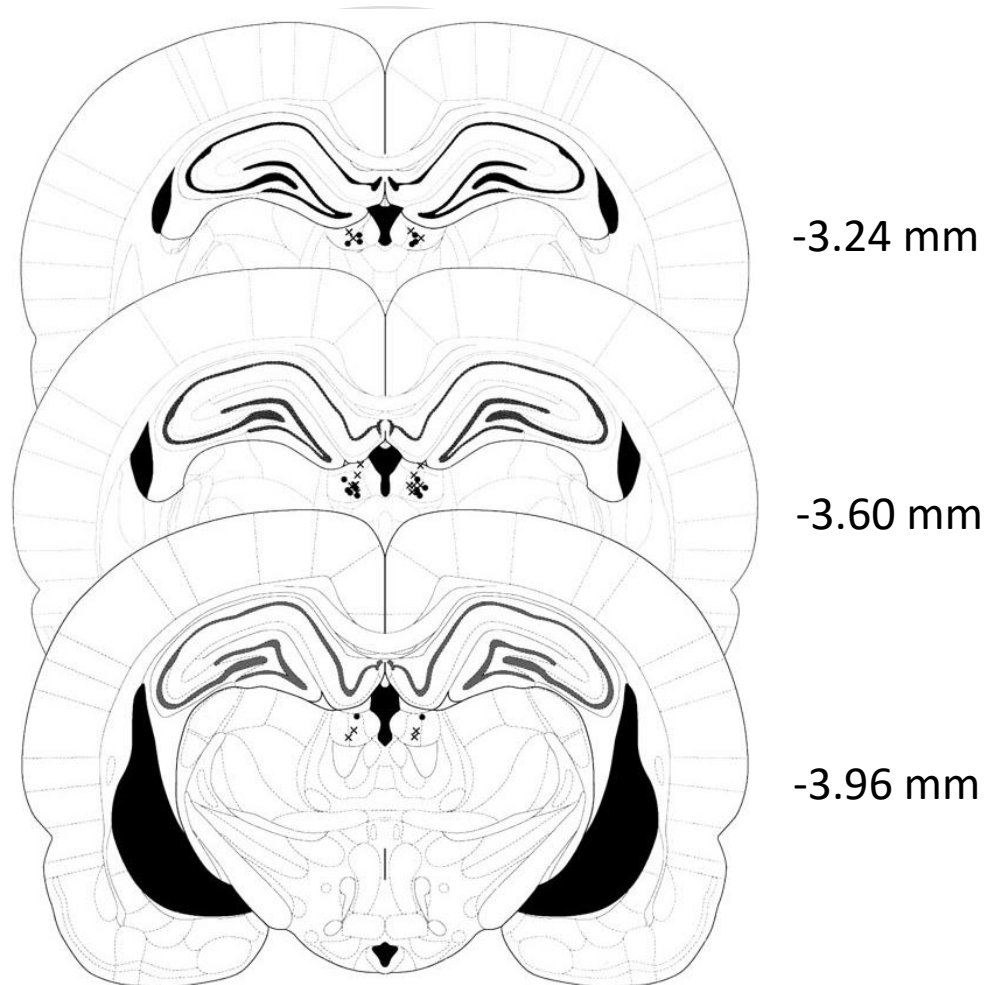


圖二：藥物注入外側韁核的組織學檢驗結果(實驗四「Veh-0.5 AMP」組及「B/M-0.5 AMP」組之受試)。A 圖為鋼管埋入位置的實際腦組織切片照。B 圖以腦圖譜標示注射針頭落於外側韁核的分布位置。• 表示「Veh-0.5 AMP」組的注射位置，x 表示「B/M-0.5 AMP」組的注射位置。

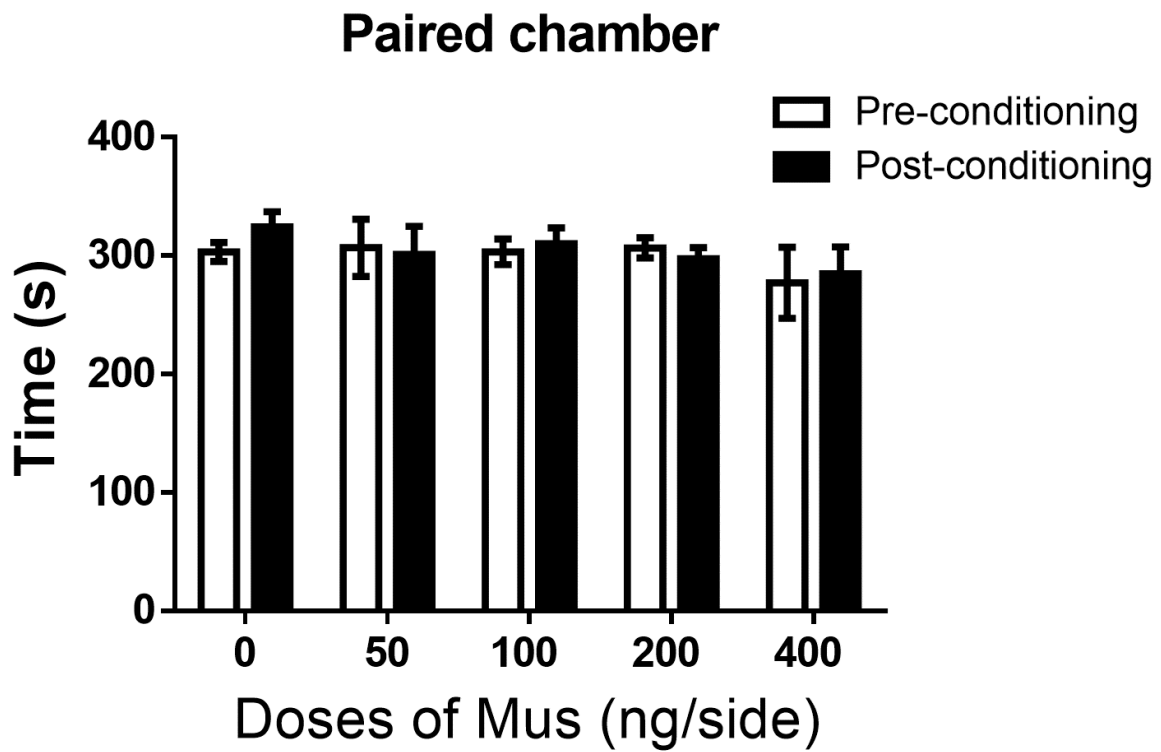
A



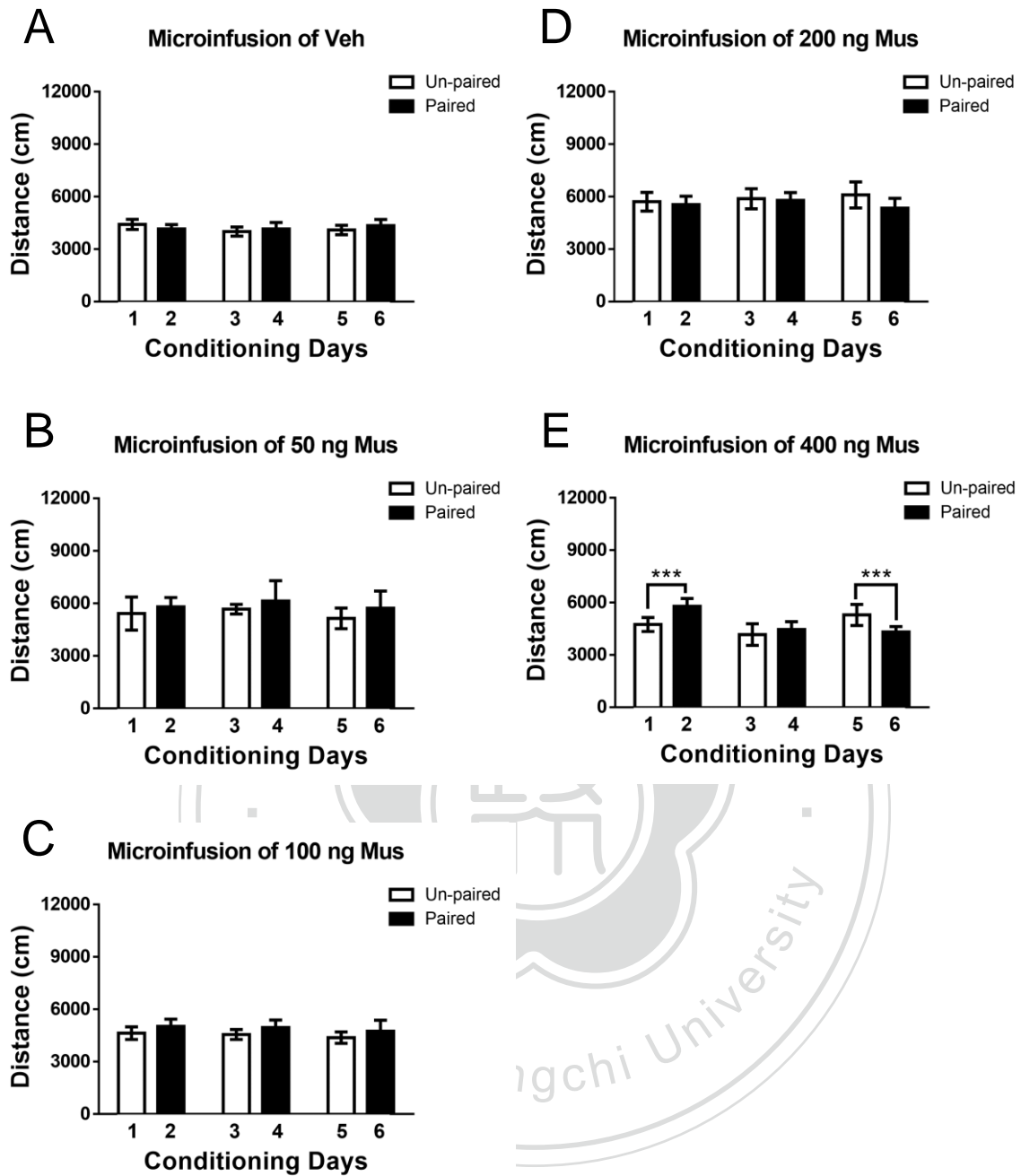
B



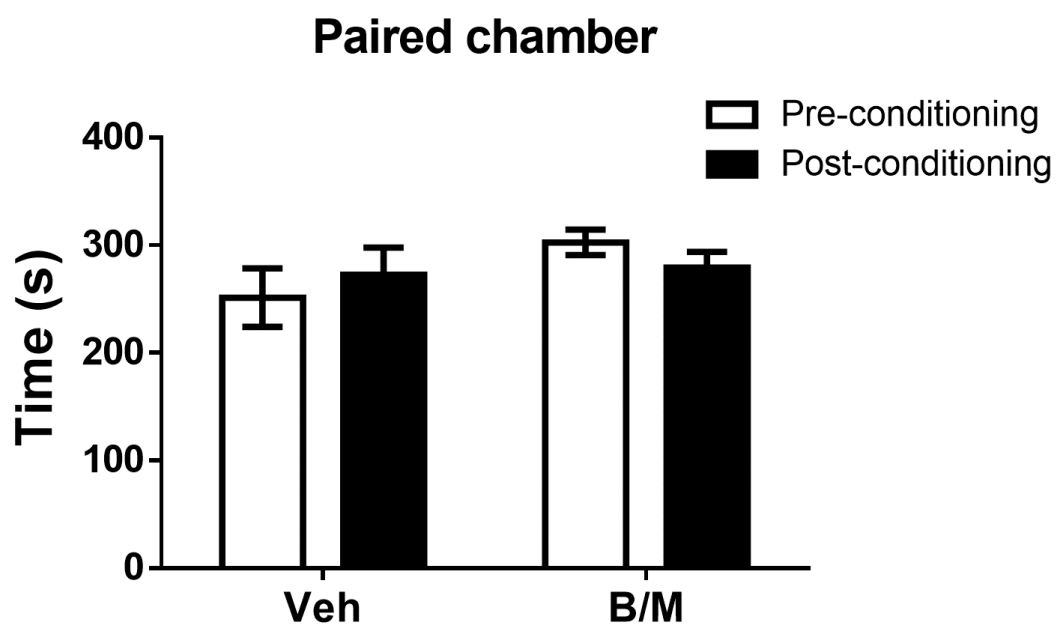
圖三：藥物注入外側韁核的組織學檢驗結果(實驗四「Veh-1 AMP」組及「B/M-1 AMP」組之受試)。A 圖為鋼管埋入位置的實際腦組織切片照。B 圖以腦圖譜標示注射針頭落於外側韁核的分布位置。• 表示「Veh-1 AMP」組的注射位置，x 表示「B/M-1 AMP」組的注射位置。



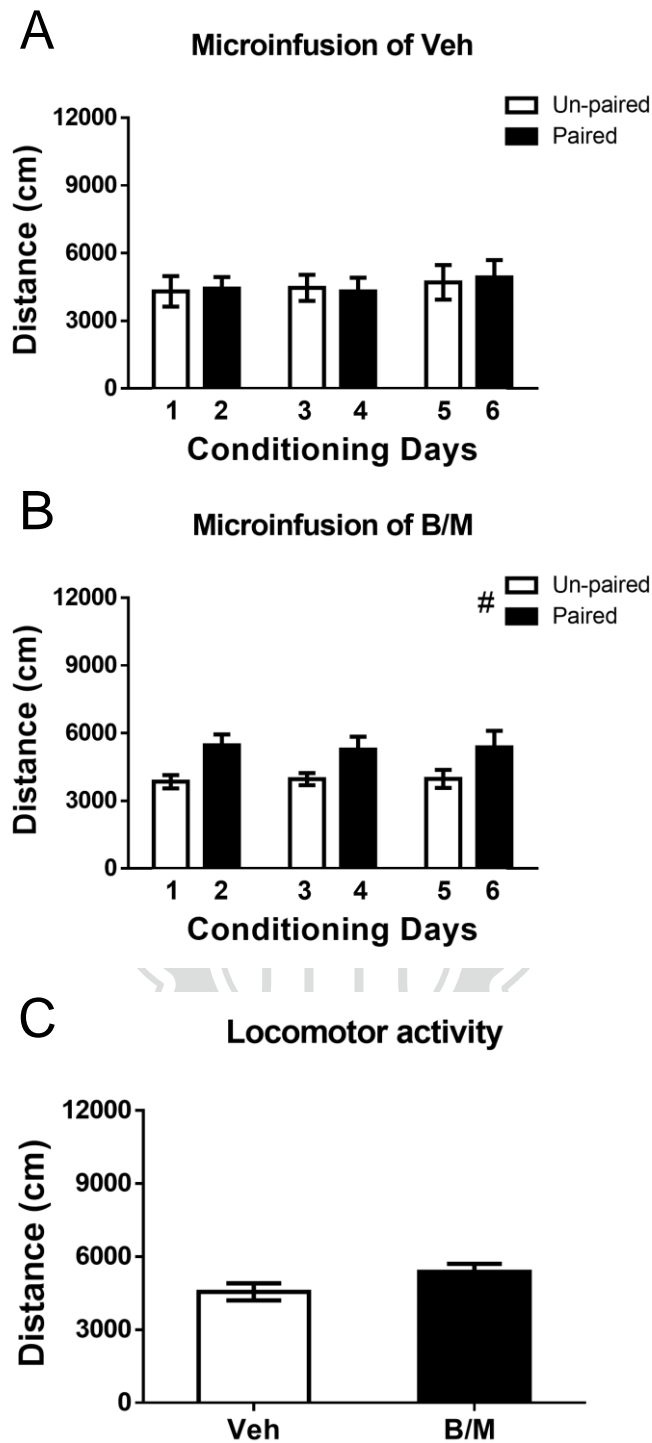
圖四：實驗一 muscimol (Mus)微量注射至外側韁核在場地制約作業的結果。Sal 控制組(n=20)；Mus 劑量 50 ng 組(n=4)、100 ng 組(n=17)、200 ng 組(n=15)與 400 ng 組(n=4)。圖中數據為各組在前後測滯留於藥物配對箱的時間，均使用平均值加減一個標準誤(S.E.M)作表示。



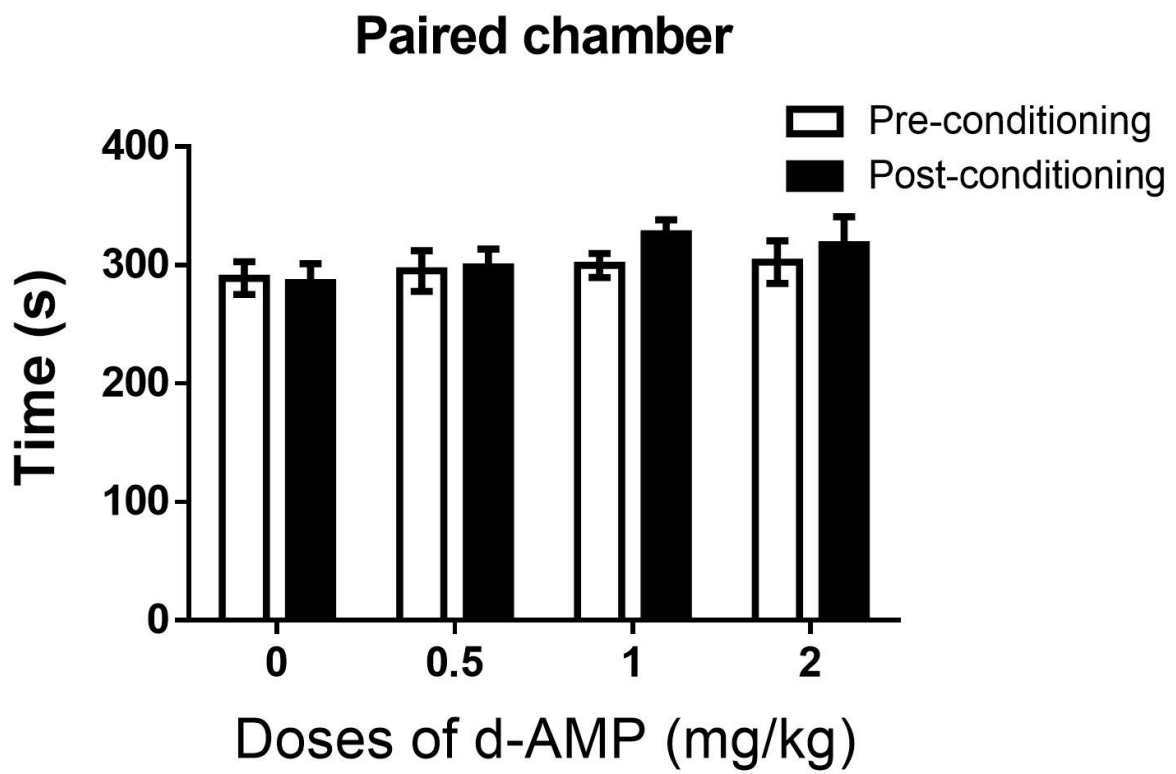
圖五：實驗一 muscimol (Mus)微量注射至外側韁核對於制約期間自發性活動量的影響。A-E 圖分別為每一劑量組在檢測箱內的行進距離變化量，均使用平均值加減一個標準誤作表示。\*表示各組組內在藥物配對箱和控制液配對箱的差異，經 Bonferroni 事後比較考驗(\*\* $p < 0.001$ )的結果。



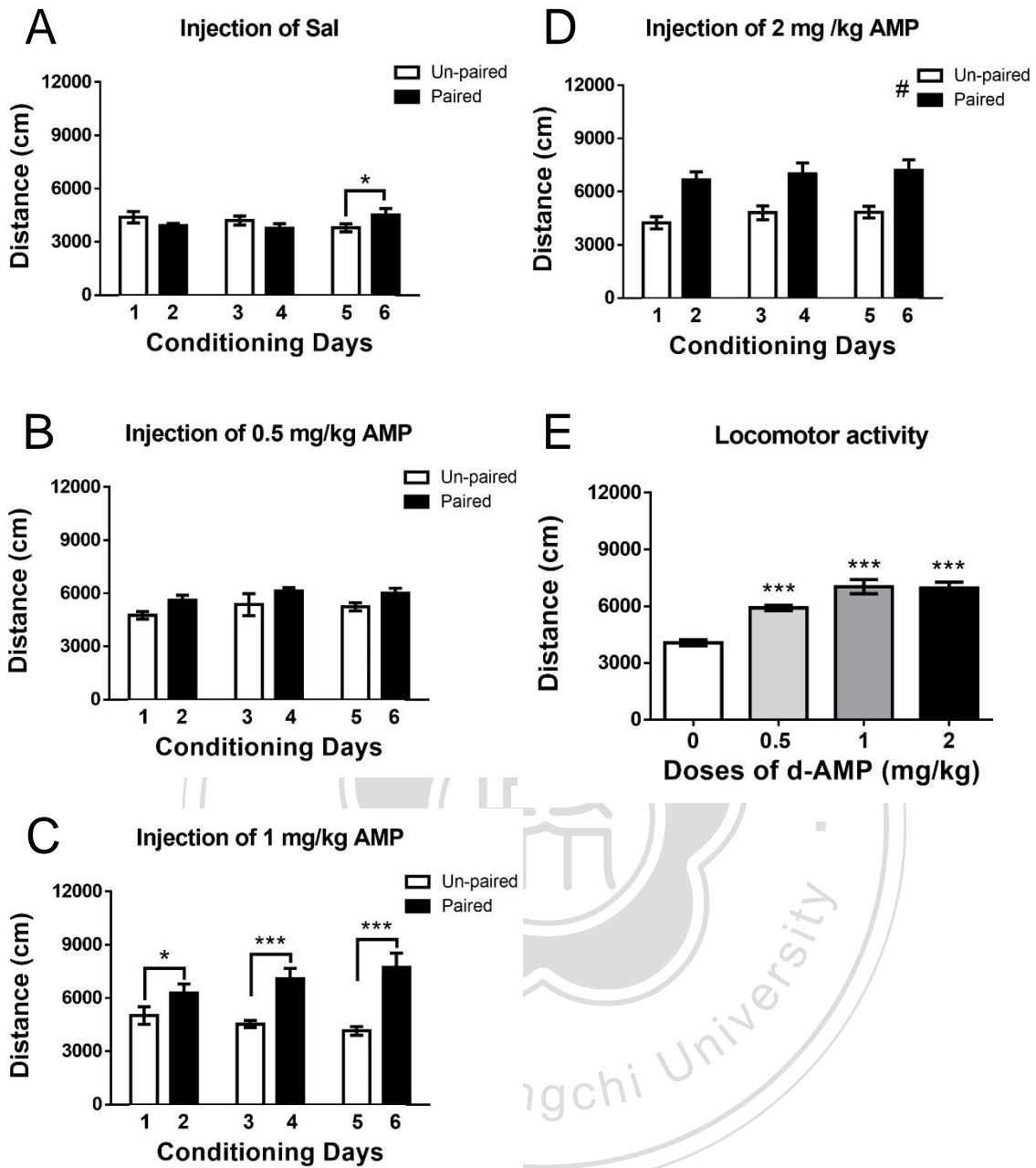
圖六：實驗二 baclofen 及 muscimol 混和液(B/M)微量注射至外側韞核在場地制約作業的結果。控制組(n=5)；實驗組(n=9)。圖中數據為各組在前後測滯留於藥物配對箱的時間，均使用平均值加減一個標準誤作表示。



圖七：實驗二 baclofen 及 muscimol 混和液(B/M)微量注射至外側韞核對於制約期間自發性活動量的影響。A-B 圖分別為控制組與實驗組在檢測箱內的行進距離變化量。C 圖為各組在藥物配對箱內的平均行進距離。數據均使用平均值加減一個標準誤作表示。#表示「配對邊」的主要效果達顯著水準(#  $p < 0.05$ )。

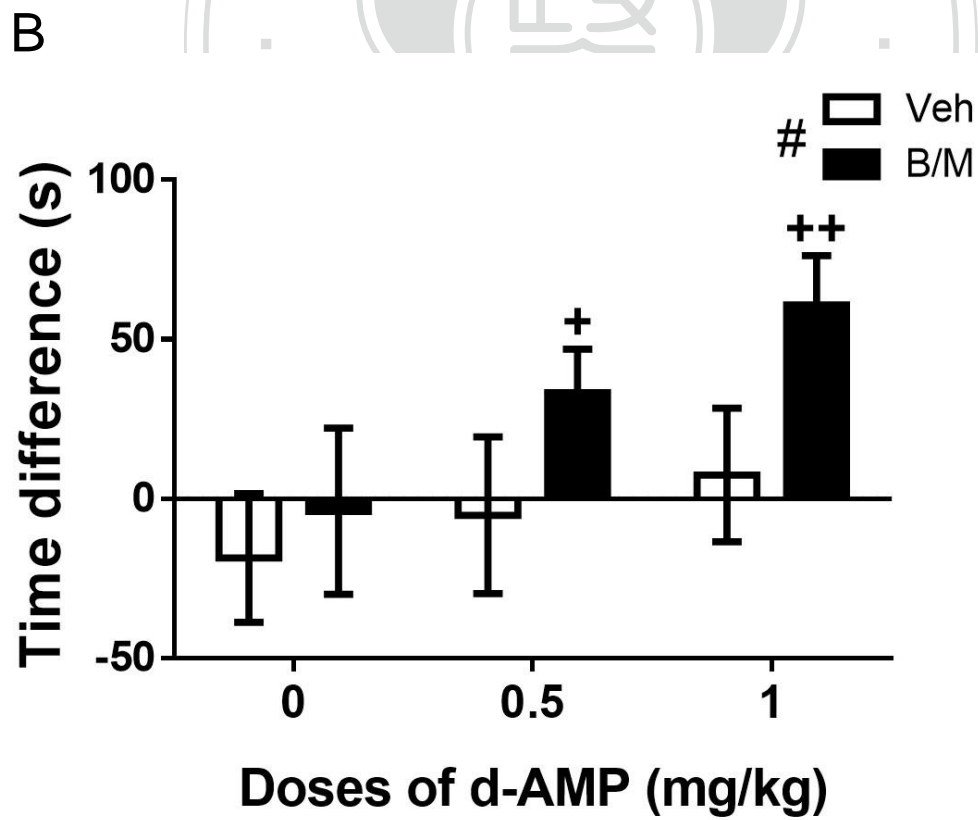
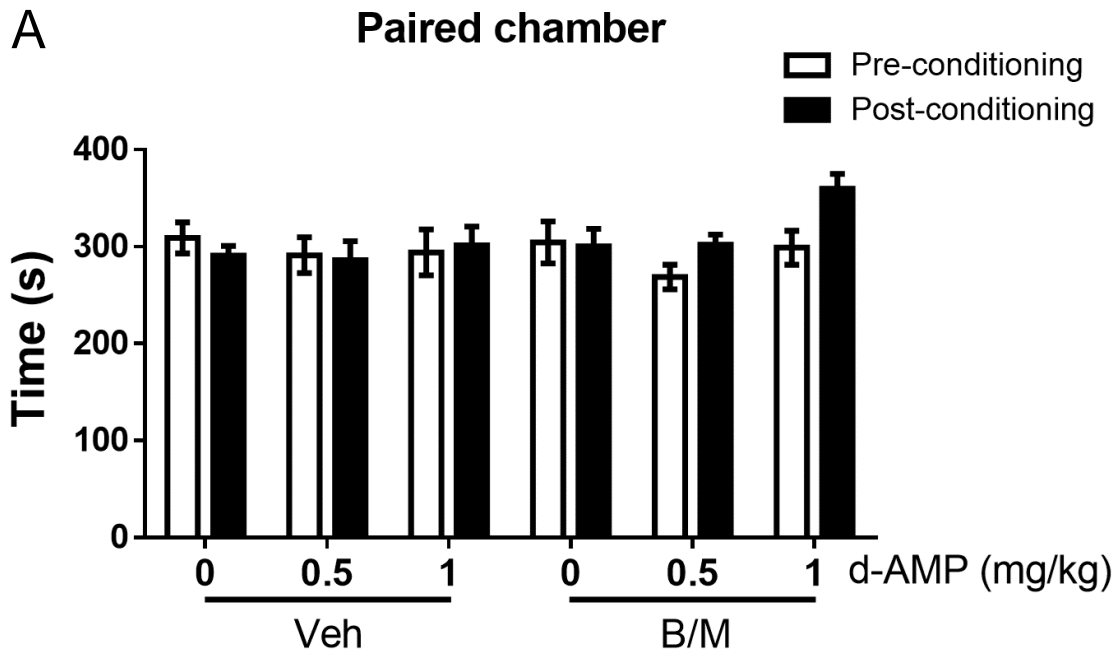


圖八：實驗三周邊注射安非它命(d-AMP)在場地制約作業的結果。圖中數據為 d-AMP 劑量操弄的各組在前後測滯留於藥物配對箱的時間，均使用平均值加減一個標準誤作表示。



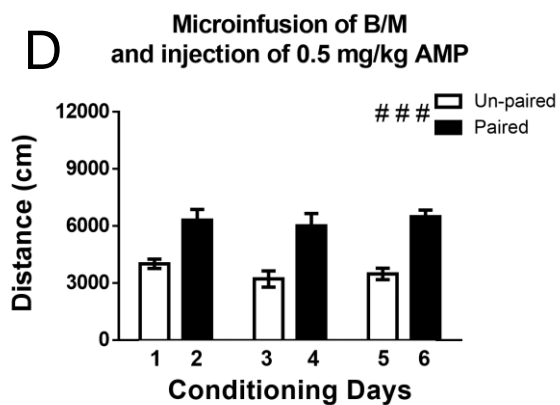
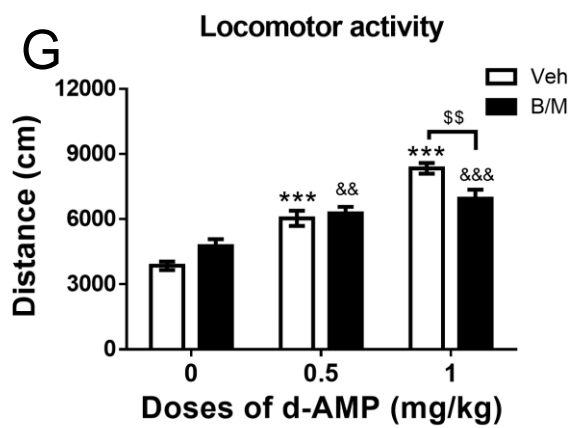
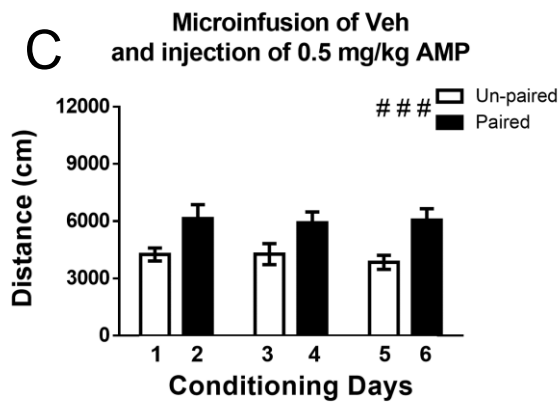
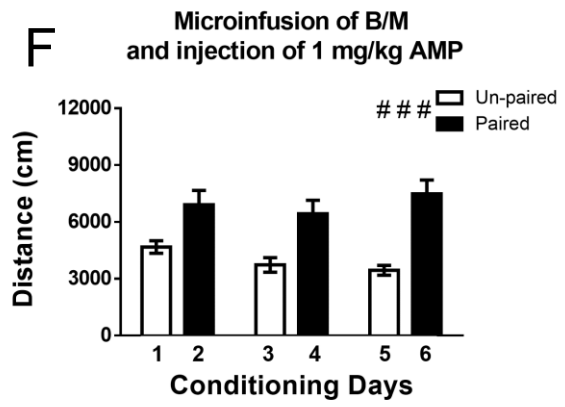
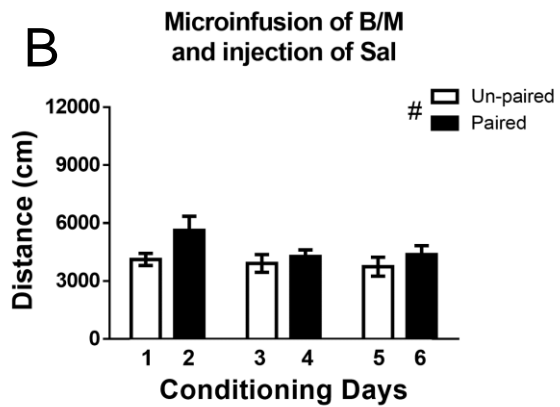
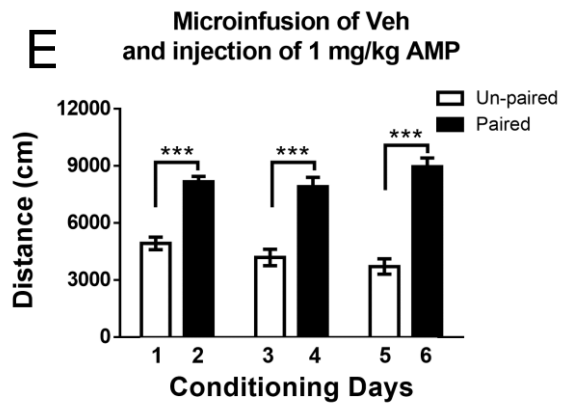
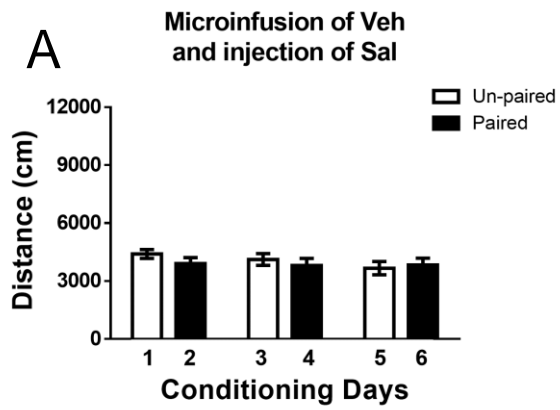
圖九：實驗三週邊注射安非它命(d-AMP)對於制約期間自發性活動量的影響。A-D圖分別為每一劑量組在檢測箱內的行進距離變化量。#表示「配對邊」的主要效果達顯著水準( $p < 0.05$ )。\*表示各組組內在藥物配對箱和控制液配對箱的差異，經 Bonferroni 事後比較考驗( $p < 0.05$ ,  $***p < 0.001$ )的結果。E圖數據為各組在藥物配對箱內的平均行進距離。\*表示控制組與各實驗組之間的差異，經 Bonferroni 事後比較考驗( $***p < 0.001$ )的結果。數據皆以平均值加減一個標準誤作表示。





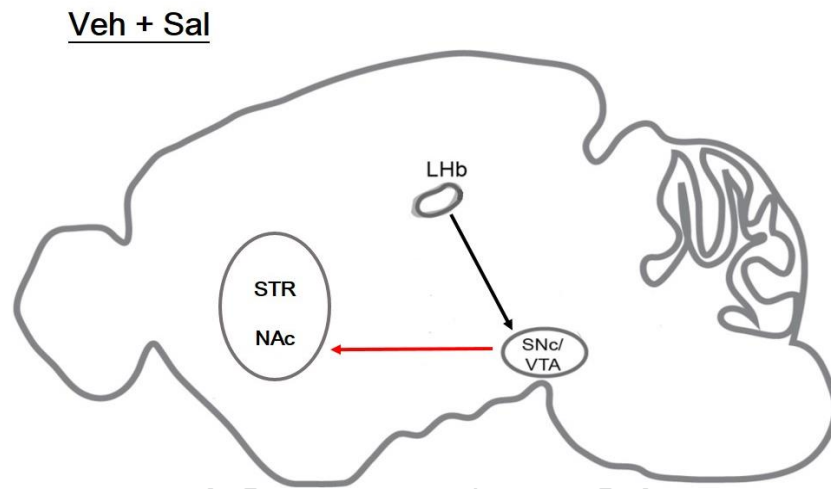
圖十：實驗四 baclofen 與 muscimol 混和液(B/M)注入外側韞核及周邊注射安非它命(d-AMP)對於場地制約作業的影響。控制組「Veh-Sal」組(n=12)；實驗組「B/M-Sal」組(n=9)、「Veh-0.5 AMP」組(n=8)、「B/M-0.5 AMP」組(n=8)、「Veh-1 AMP」組(n=9)、「B/M-1 AMP」組(n=10)。A 圖數據為各組在前後測滯留於藥物配對箱的時間。B 圖數據為各組在前後測滯留於藥物配對箱的時間差。#表示「B/M」的主要效果達顯著水準(#  $p<0.05$ )。+表示各組在藥物配對箱的時間差，經單一樣本 t 檢定考驗 (+  $p<0.05$ , ++  $p<0.01$ )的結果。數據均使用平均值加減一個標準誤作表示。



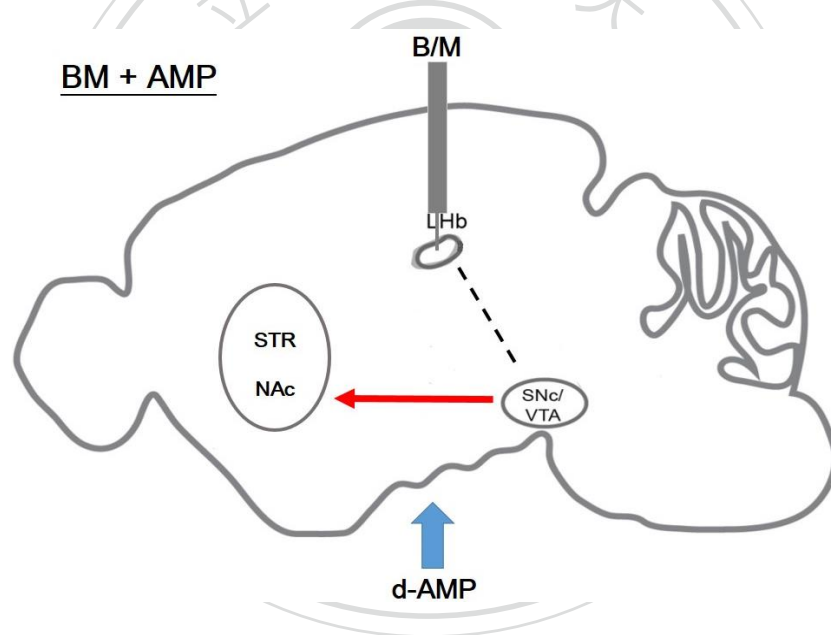


圖十一：實驗四 baclofen 與 muscimol 混和液(B/M)注入外側韞核及周邊注射安非它命(d-AMP)對於制約期間自發性活動量的影響。A-F 圖分別為不同的藥物處理組(A: Veh-Sal, B: B/M-Sal, C: Veh-0.5 AMP, D: B/M-0.5 AMP, E: Veh-1 AMP, F: B/M-1 AMP)，在檢測箱內的行進距離變化量。#表示「配對邊」的主要效果達顯著水準(#  $p < 0.05$ , ###  $p < 0.001$ )。\*表示各組組內在藥物配對箱和控制液配對箱的差異，經 Bonferroni 事後比較考驗(\*\* $p < 0.001$ )的結果。G 圖數據為各組在藥物配對箱的平均行進距離。\*表示「Veh-Sal」組分別與「Veh-0.5 AMP」組或「Veh-1 AMP」組之間的差異，經 Bonferroni 事後比較考驗(\*\* $p < 0.001$ )的結果。&表示「B/M-Sal」組分別與「B/M-0.5 AMP」組或「B/M-1 AMP」組之間的差異，經事後比較考驗(&&  $p < 0.01$ , &&&  $p < 0.001$ )的結果。\$表示「Veh-1 AMP」組與「B/M-1 AMP」組在平均行進距離的差異，經事後比較考驗(\$\$  $p < 0.01$ )的結果。數據皆以平均值加減一個標準誤作表示。

A



B



圖十二：外側韃核的神經活動對於中腦多巴系統的影響示意圖。A 圖表示實驗四

「Veh-Sal」組的受試，其外側韃核對中腦多巴胺釋放量的影響。黑色箭頭表示外側韃核對於中腦多巴神經元的調控；紅色箭頭表示投射多巴胺至依核(NAc)與紋狀體(STR)的釋放量。B 圖表示實驗四「B/M-AMP」組的受試，抑制外側韃核的神經活動結合周邊注射安非它命(d-AMP)對中腦多巴胺釋放量的影響。以 baclofen 及 muscimol 混和液(B/M)抑制外側韃核，降低對中腦多巴胺神經元的抑制性調控(黑色虛線)，結合周邊注射 d-AMP 使中腦多巴胺釋放量增加(較粗的紅色箭頭)。

## 附錄目次：

附錄表一：實驗受試於前測在檢測箱兩側的滯留時間與統計結果 .....	56
附錄圖一：藥物注入外側韁核相鄰區域的實際腦組織切片照.....	57
附錄圖二：實驗一 muscimol (Mus)微量注射至外側韁核在場地制約作業的結果.....	58
附錄圖三：實驗二 baclofen 及 muscimol 混和液(B/M)微量注射至外側韁核在場地制約作業的結果.....	59
附錄圖四：實驗三周邊注射安非它命(d-AMP)在場地制約作業的結果 .....	60
附錄圖五：實驗四 baclofen 與 muscimol 混和液(B/M)注入外側韁核及周邊注射安非它命(d-AMP)在場地制約作業的效果.....	61
附錄圖六：baclofen 及 muscimol 混和液(B/M) 微量注射至外側韁核的相鄰區域，結合周邊注射安非它命(d-AMP)在場地制約作業的結果.....	62

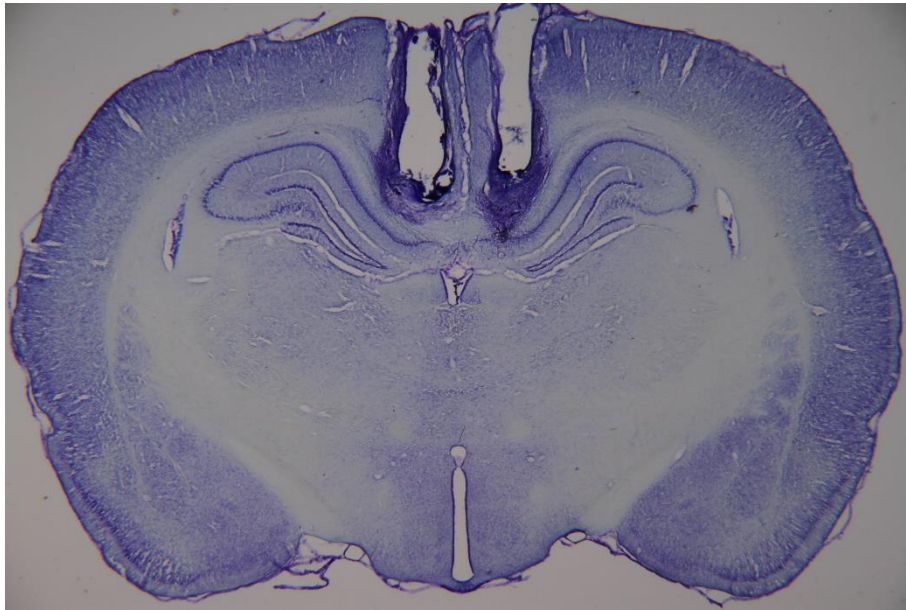


附錄表一：實驗受試於前測在檢測箱兩側的滯留時間與統計結果。

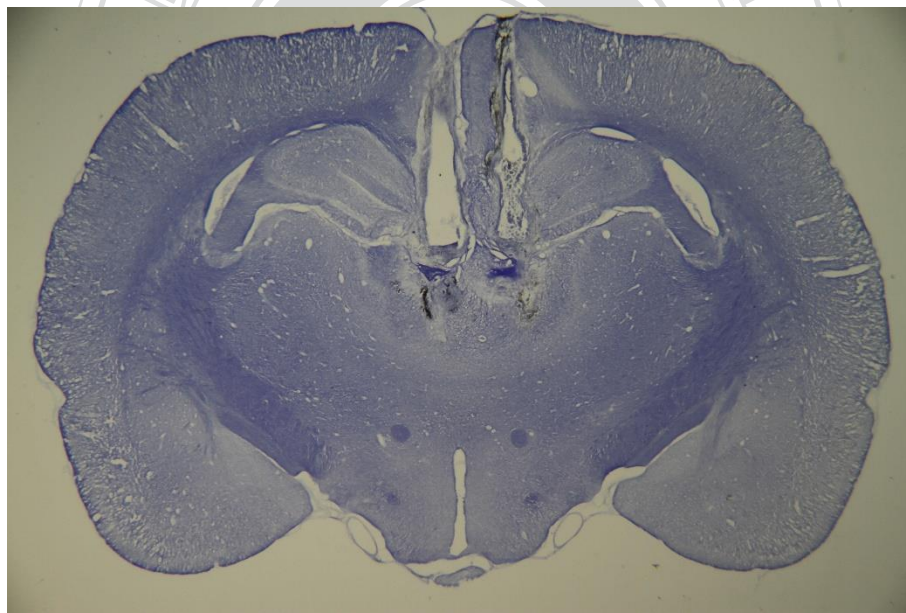
(單位：秒；平均值 ± 標準誤)

實驗批數	樣本數	黑箱時間	白箱時間	<i>t</i>	<i>p</i>
1	32	315.18 ± 6.32	285.54 ± 6.41	2.34	0.03*
2	18	306.51 ± 8.37	295.38 ± 8.37	0.66	0.52
3	17	302.29 ± 7.75	299.25 ± 7.86	0.19	0.85
4	20	340.83 ± 17.41	260.14 ± 17.41	2.32	0.03*
5	16	323.04 ± 9.56	277.88 ± 9.56	2.36	0.03*
6	20	311.55 ± 15.78	289.40 ± 15.78	0.70	0.49
7	36	315.87 ± 6.84	285.06 ± 6.84	2.25	0.03*
8	19	299.55 ± 7.75	301.37 ± 7.75	0.12	0.91
9	20	327.56 ± 7.55	273.36 ± 7.55	3.59	0.002**
10	24	337.18 ± 10.71	263.80 ± 10.71	3.42	0.002**
11	16	314.85 ± 11.62	286.08 ± 11.62	1.24	0.23
12	25	328.70 ± 6.74	272.22 ± 6.74	4.19	0.0003***
13	24	322.36 ± 11.18	278.58 ± 11.18	1.96	0.06
14	20	309.10 ± 11.13	291.83 ± 11.13	0.78	0.45
平均值		<b>318.69 ± 2.71</b>	<b>282.31 ± 2.71</b>		

A

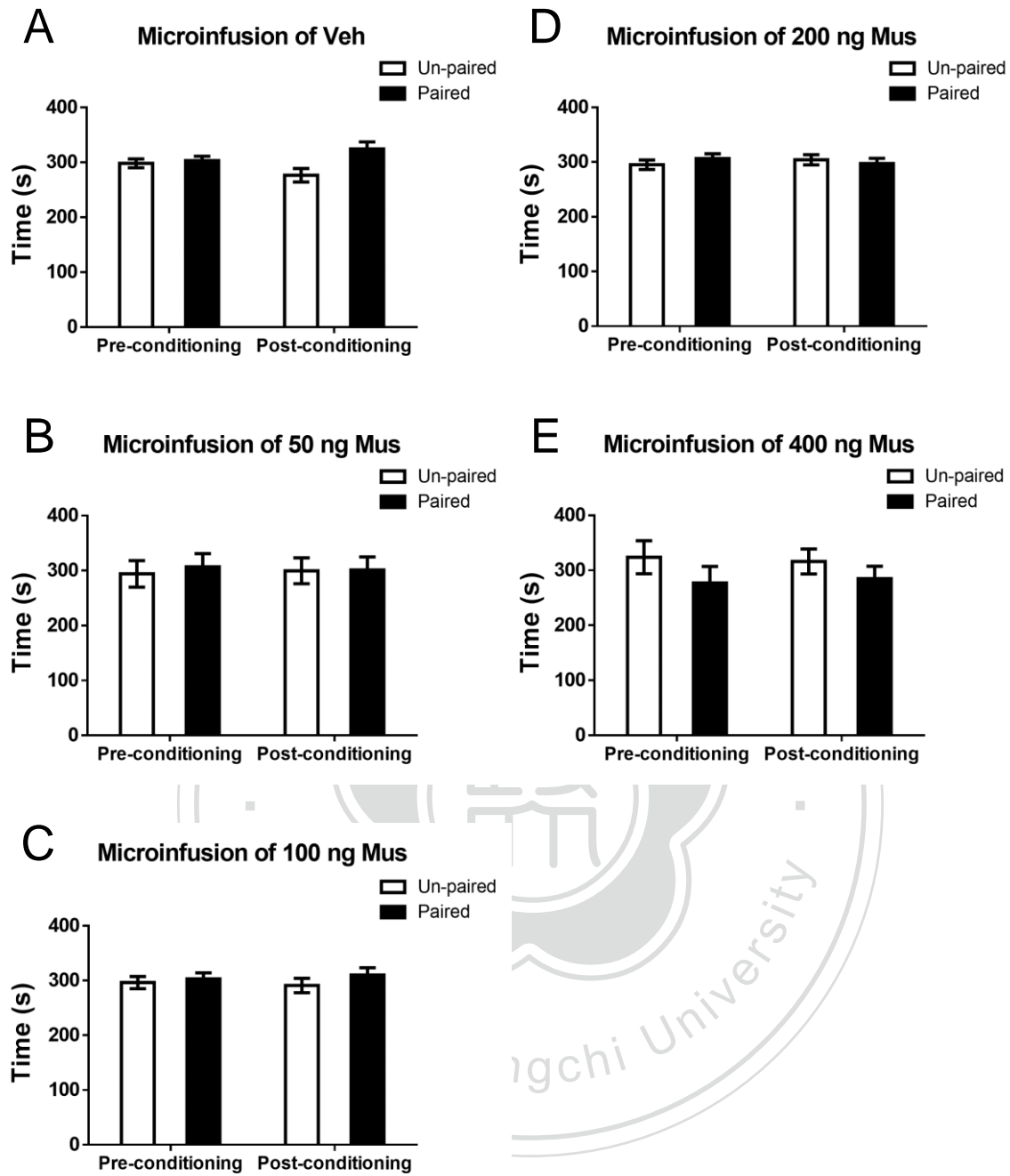


B

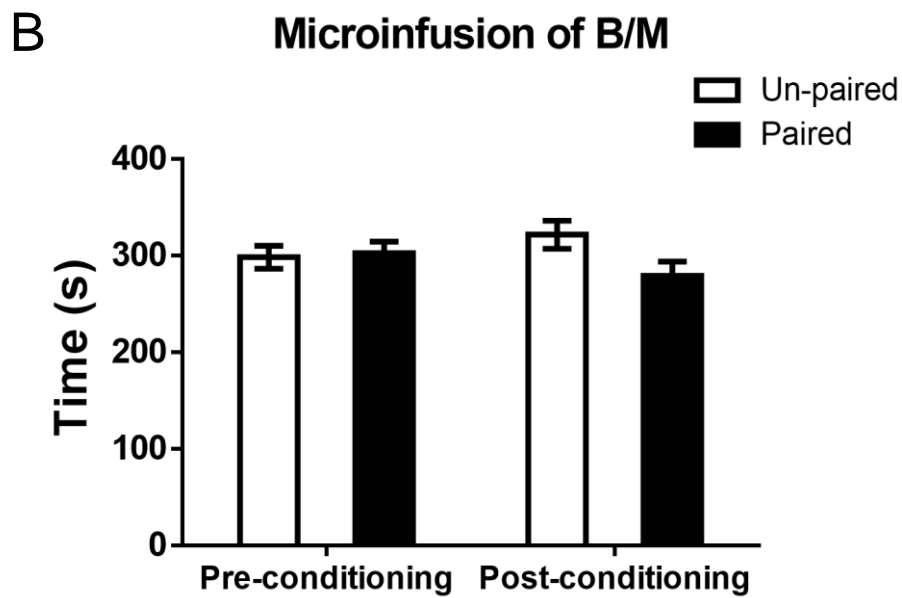
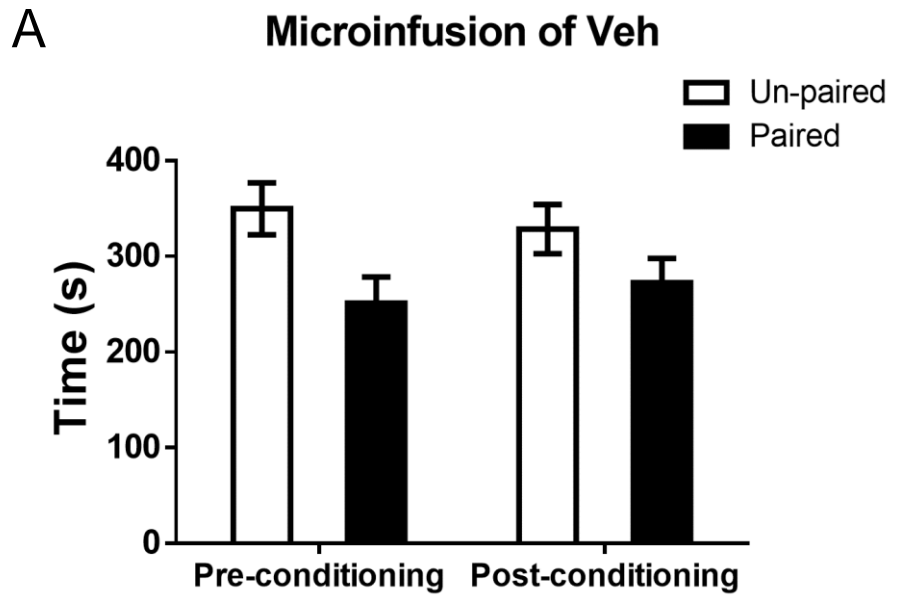


附錄圖一：藥物注入外側韁核相鄰區域的實際腦組織切片照。A 圖顯示注射針頭落於外側韁核背側區域的海馬迴。B 圖顯示注射針頭落於外側韁核腹側區域的視丘。

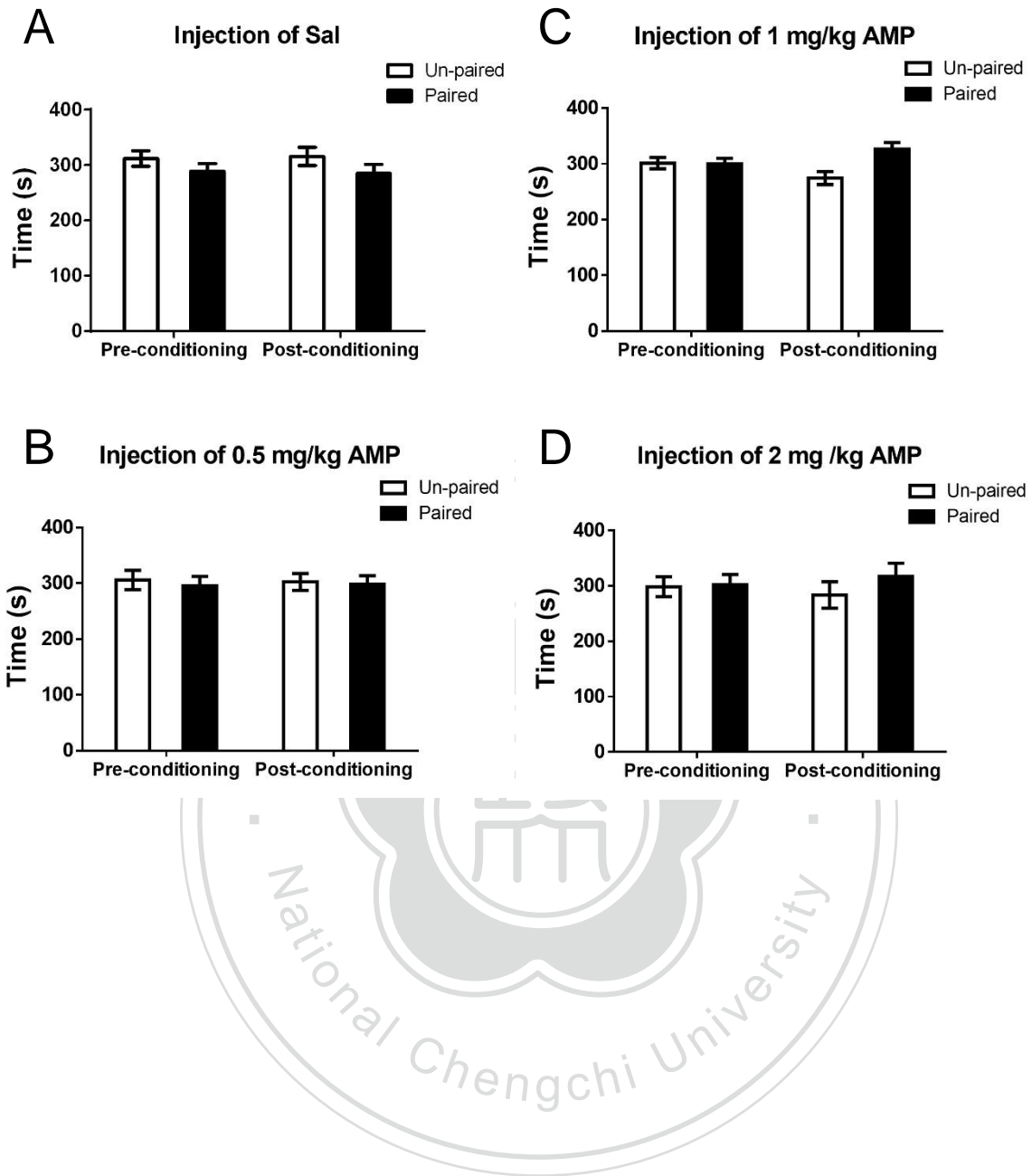




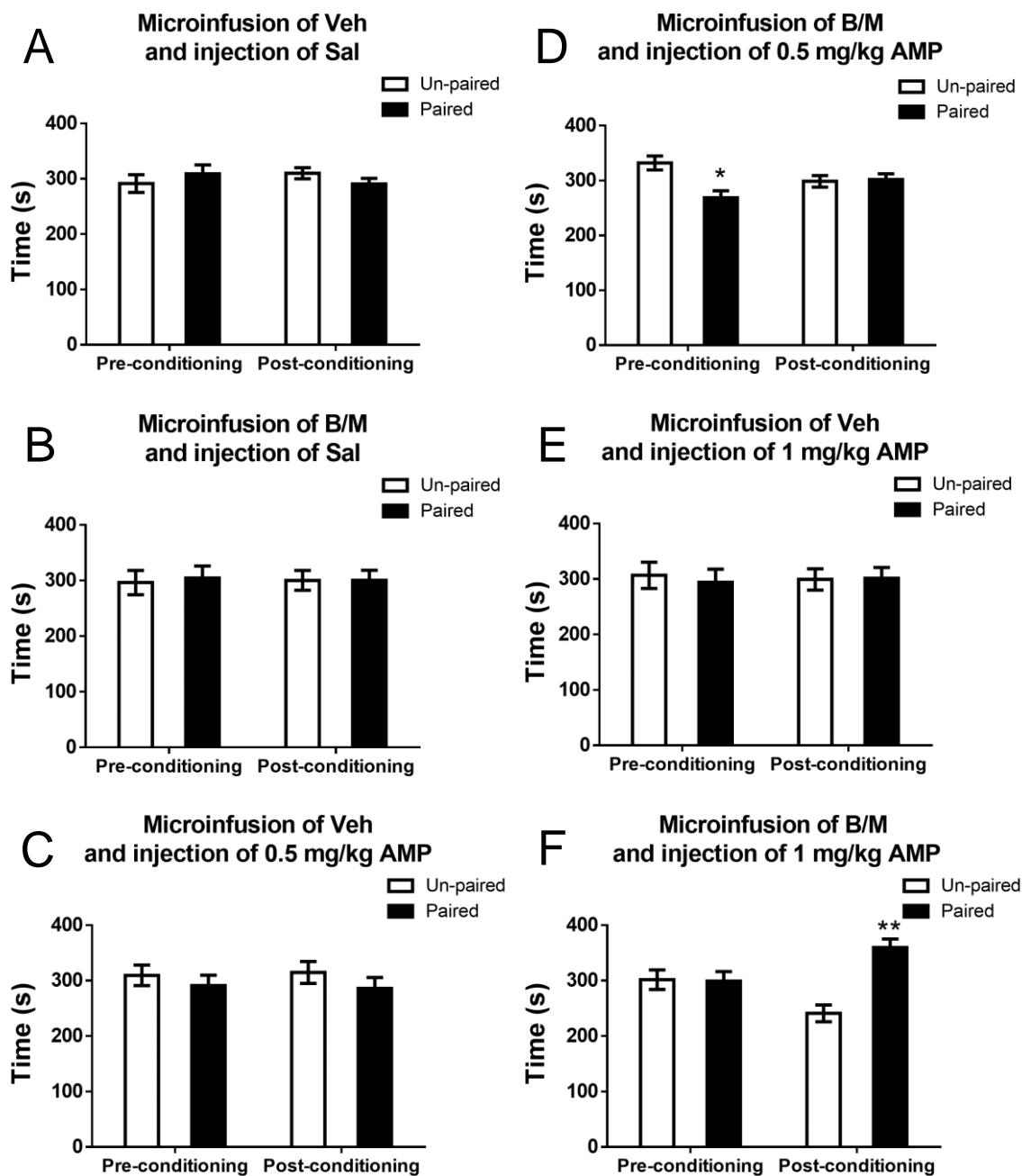
附錄圖二：實驗一 muscimol (Mus)微量注射至外側韮核在場地制約作業的結果。A-E圖分別為 Mus 注入外側韮核的不同劑量組，在前測及後測滯留於檢測箱兩側的時間，均使用平均值加減一個標準誤作表示。



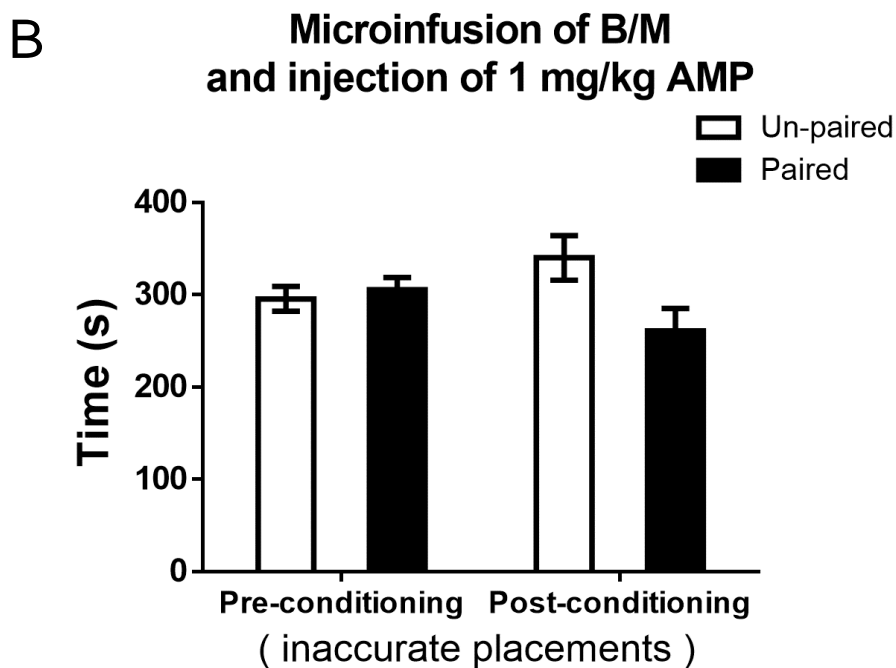
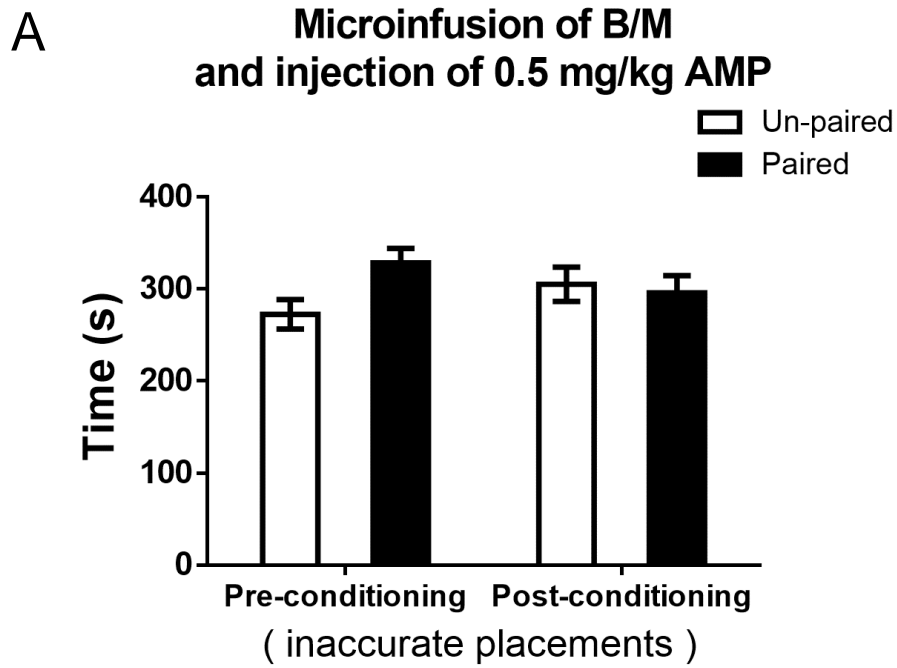
附錄圖三：實驗二 baclofen 及 muscimol 混和液(B/M)微量注射至外側韞核在場地制約作業的結果。A-B 圖數據分別為控制組與實驗組在前側及後測時滯留於檢測箱兩側的時間，均使用平均值加減一個標準誤作表示。



附錄圖四：實驗三周邊注射安非它命(d-AMP)在場地制約作業的結果。A-D 圖分別為 d-AMP 不同劑量組在前測及後測滯留於檢測箱兩側的時間，均使用平均值加減一個標準誤作表示。



附錄圖五：實驗四 baclofen 與 muscimol 混和液(B/M)注入外側韞核及周邊注射安非他命(d-AMP)在場地制約作業的效果。A-F 圖分別為不同的藥物處理組(A: Veh-Sal, B: B/M-Sal, C: Veh-0.5 AMP, D: B/M-0.5 AMP, E: Veh-1 AMP, F: B/M-1 AMP)，在前測及後測滯留於檢測箱兩側的時間。\*表示各組組內在前測或後測於藥物配對箱和控制液配對箱的差異，經成對 t 檢定考驗(\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ )的結果。均使用平均值加減一個標準誤作表示。



附錄圖六：baclofen 及 muscimol 混和液(B/M) 微量注射至外側韞核的相鄰區域，結合周邊注射安非它命(d-AMP)在場地制約作業的結果。A-B 圖分別為不同的藥物處理組 (A: B/M-0.5 AMP, B: B/M-1 AMP)，在前測及後測滯留於檢測箱兩側的時間，均使用平均值加減一個標準誤作表示。