國立台灣師範大學生命科學系碩士論文

探討斑馬魚恐懼記憶之神經機制

To elucidate the neural mechanism of fear memory in zebrafish

研究生：許竣博

Chun-Po Hsu

指導教授：呂國棟博士

Kwok-Tung Lu, Ph.D.

中華民國 九十八 年 六 月

目錄

壹、中文摘要（Abstract in Chinese）.....2-3

貳、英文摘要（Abstract in English）.....4-5

參、緒論（Introduction）

一、研究背景（Research Background）.....6-16

二、研究目的（Research Aim）.....16

肆、研究材料與方法（Materials & Methods）

A. 實驗動物（Animals）.....17

B. 實驗藥物（Drug）.....17

C. 抑制性趨避行為（Inhibitory Avoidance Apparatus）.....18-20

D. 運動行為監測（Locomotor Activity Monitoring）.....20

E. 西方轉漬法（Western Blotting Assay）.....20-27

F. 統計分析（Statistics）.....27

伍、實驗結果（Results）.....28-38

陸、實驗討論（Discussion）.....39-44

柒、參考文獻（References）.....45-52

捌、附圖/表（Figures & Tables）.....53-62

壹、中文摘要

斑馬魚在脊椎動物學習和記憶能力之基因體研究方面是一種功能強大的模式動物。科學家利用斑馬魚的基因轉殖技術，發展出多樣不同基因變異的品系。而在各種突變斑馬魚被大量建立的同時，更迫切需要進行專門針對斑馬魚學習與記憶功能的行為研究。在許多研究抑制性逃避行為實驗，常以其他物種—例如大白鼠當動物模式。然而，目前對硬骨魚類情緒性記憶相關的研究依然相當缺乏，有礙於斑馬魚於神經科學相關研究的推廣。本研究採用改良型之抑制性逃避行為箱來研究斑馬魚之抑制性逃避行為。

本研究之實驗結果顯示：（1）於訓練後 24 小時，所有斑馬魚將會被再放回淺水區進行測試。此時，斑馬魚會對深水區產生抑制性逃避行為，且停留在淺水區的時間較訓練前有明顯的延長。（2）在消滅階段，所有重新暴露於深水區的斑馬魚，會改變其對深水區已建立之抑制性逃避行為，而停留在淺水區的時間較訓練前有明顯的縮短。（3）在訓練後 7 天，所有斑馬魚放回淺水區進行測試，斑馬魚仍對深水區產生抑制性逃避行為，顯示此恐懼記憶被保存下來的時間至少可達到 7 天。（4）經過(+)MK-801（一種非競爭性麩胺酸 NMDA 受體拮抗劑）處理的斑馬魚，其抑制性逃避行為將會被阻斷。 (+) MK-801 處理組和對照組之間，斑馬魚對深水區產生抑制性逃避行為

而停留在淺水區的時間有顯著差異。（5）在經過訓練後的斑馬魚，端腦內的 MAPK 的磷酸化程度，會隨著時間而增加，在訓練後 1.5 小時到達高峰，同時與 naïve 組比較也有明顯增加。而端腦內的 MAPK 的表現量並沒有明顯變化。

綜合上述各點，本實驗不只建立一套操作簡單的行為儀器來研究斑馬魚的恐懼記憶，且實驗結果推論斑馬魚恐懼記憶相關的神經機轉與陸生的脊椎動物相似。因此，也許可以增進我們使用斑馬魚來研究神經科學的可行性，並且拓展對精神疾病藥物的開發領域，而在未來配合多樣不同突變的斑馬魚，將有助釐清脊椎動物基因與學習以及記憶功能之間的關係。

貳、英文摘要

The zebrafish (*Danio rerio*) represents a powerful model for genetic studies involved in learning and memory function in vertebrates. Scientist developed a variety of genetic mutants by using genetic techniques in zebrafish. While zebrafish mutants are being developed, behavioral researches on learning and memory function in zebrafish are in urgent need. Numerous studies investigated inhibitory avoidance conditioning in other animal model such as rat. However, the study of emotional behavior in teleost fish was still lacking. We used a modified behavioral chamber in our study to study the inhibitory avoidance learning in zebrafish.

Results showed: (1) Twenty-four hour after the training day, all fishes were returned to the shallow compartment again. The escape latency to enter the deeply compartment was significantly longer than pre-training. (2) After exposing to the deeply compartment (extinction training), all fishes were decline in escape latency when compared with the previously test. (3) Seven day after the training day, all fishes were returned to the shallow compartment again. The escape latency to enter the deeply compartment was significantly longer than pre-training. It suggested that this memory can be stored at least seven days. (4) The administration of (+)MK-801(a noncompetitive NMDA receptor antagonist) blocked the expression of inhibitory avoidance behavior in zebrafish. There was a significant difference in escape latency between (+)MK-801-treated group and control group. (5) The phospho-MAPK expression of trained zebrafish's telencephalon was gradually increasing after training. One and half hour after training, the phospho-MAPK

expression of trained zebrafish's telencephalon reached peak, and there was a significant increase compared with naïve group. The MAPK expression of trained zebrafish's telencephalon was no significant change.

The present study not only establishes a simple behavior model to study the fear memory in zebrafish, but also suggest the similar involvements of neurochemicals in learning and memory among vertebrates. Thus, it may improve our usage of zebrafish model in neuroscience researches, which may extend to the pace of psychiatric drug discovery, and future studies with zebrafish mutants may be helpful for identify genes involved in learning and memory in vertebrates.

參、緒論

一、研究背景

A.學習與記憶（Learning and memory）

學習與記憶有許多不同方面的定義，一般最簡單的說法即為喚回與重現過去的經驗(Tully et al., 2003)；而行為方面上，學習為透過指示或經驗的過程中獲得新的反應或技能，記憶即指將習得之反應及技能保存下來。從細胞分子方面來看，外界刺激訊號的重複輸入，會造成神經細胞的功能和結構上產生變化，並且在神經細胞間突觸數量的增加，因此記憶可視為神經可塑性（neuronal plasticity）的結果(Squire, 1987；Richardson, 1996)。

B. 記憶之分類與形成（Classification and formation of memory）

許多文獻指出記憶並不是一種單純的認知功能，且進而依照它不同特質加以分類。在 1927 年由心理學家 McDougal 提出以記憶後提取方式來分類，將記憶分為陳述性記憶（declarative）和非陳述性記憶（non-declarative），又稱為外顯（explicit）或內隱（implicit）的記憶。前者為有意識的去回憶過去發生的事，此記憶屬於事實、念頭、事件的回憶，有可依個人意志將記憶帶回意識裡回憶出來的特性，如今天早上電視所報導的新聞；後者則是較屬於自動化和反射反應，此

記憶無法清楚地以言語陳述，而只能用行為上表達來顯示其記憶，很多運動和視覺上的技能、習慣和情緒的學習和基本反射反應形式的學習均屬於此類記憶。研究顯示，在大腦的不同區域分別參與不同形式的非陳述性記憶，如杏仁核（amygdala）、海馬迴（hippocampus）、小腦（cerebellum）、紋狀體（striatum）等，和反射反應所需要的特定知覺和運動系統，如感覺皮質（somatosensory cortex）、基底核（basal ganglia）等構造亦參與其中(Richardson, 1996; Squire and Zola, 1996)。

藉由臨床和實驗的觀察，發現記憶亦可依儲存在大腦的時間長短來分類。在 1880 年德國心理學家 Ebbinghaus 提出兩個重要發現：第一，記憶有不同的生命期限，有些記憶很久長，可以記得幾天甚至幾年；而有些記憶卻很短，只能記得幾秒鐘或幾分鐘。第二，重複的學習可使記憶維持較久。後來美國心理學家 James 將這些發現清楚地在量化上的劃分，分別把它們稱之為短期記憶（short term memory）和長期記憶（long term memory）。短期記憶可持續幾秒鐘或幾分鐘，而長期記憶則是可持續幾小時、幾天、幾年，甚至終生(Goelet et al., 1986)。

在外界刺激訊息輸入後至記憶形成的過程中，通常都需透過記憶獲得（acquisition）、記憶固化（consolidation）、記憶提取（retrieval）及再學習獲得（reacquisition）等四個階段，當動物感受到外來的刺

激時，感覺受器先感應到訊息，若動物獲得此訊號後，則進入到短期記憶階段，此訊息一旦經記憶的固化之後，便進入中期記憶型態，若再經由不斷的再學習獲得或記憶之再現，將使記憶型態再次固化便進入長期記憶。

C. 情緒性記憶（Emotional memory）

情緒為一種非意識形態的心路歷程，不僅影響生物體的生活作息，且賦予動物多樣的感受。在自然環境下，生物隨時得面臨捕食與被捕食之生死關頭，故情緒反應對於生物的存活具有重要性，當生物面對危險時，可立即做出本能性的防衛反應，以利其生存。而生物體產生本能防衛反應包括恐懼的行為與情緒的表現(Marks, 1987)。在1950 年科學家便提出大腦的邊緣系統（limbic system）調控著情緒的學習和反應。此外，許多研究指出主要是由大腦顳葉內的杏仁核（amygdala） 調控這些因恐懼與驚嚇所引發之防衛反應，而杏仁核除了在情緒記憶的習得（包括恐懼）具有重要的影響力外，亦會影響非習得情緒的表達(Walker and Davis, 1997)。因此杏仁核遭受損傷的生物，在面對環境威脅時，不僅不再感覺到恐懼且也不會做出防衛動作，甚至連恐懼情緒的表達都受到干擾(Davis, 1992)。

D. 條件化恐懼模式（Fear conditioning model）

條件化恐懼（fear conditioning）是最常被用於研究情緒學習和恐懼記憶形成機制的研究方式，此行為模式是經由先給予動物一個無傷害性的條件刺激（conditional stimulus, CS），例如燈光或聲音等，隨後再配合一個嫌惡性的非條件刺激（unconditional stimulus, US），例如給予電擊。在幾次配對，使動物習得條件刺激（CS）與非條件刺激（US）間的配對連結後，當單獨給予條件刺激（CS）時，亦會誘發動物表現出面對非條件刺激（US）時之行為與生理的反應：例如驚嚇反射增加、血壓上升、心跳加速、呼吸困難或是僵直、制約的情緒反應等等，這些反應與動物在面臨大自然環境威脅時的行為表現極為相似。並且，一旦動物學習到條件刺激與非條件刺激間的關連性後，雖然只給動物單獨的條件刺激而未給非條件刺激，就算經過一段時間後，還是會引發動物對非條件刺激的行為反應，這種現象與記憶模式和長期的神經可塑性非常符合(Davis, 1992; Myers and Davis, 2002)。

E. 硬骨魚的學習與記憶（Learning and memory in teleost fish）

近十年來，越來越多文獻指出硬骨魚的學習與記憶之能力，如同哺乳類與鳥類，也存在著相類似的神經機轉。前人曾將魚類視為最古

老的脊椎動物，並認為其僅具有未分化完全的端腦（telencephalon）及有限的學習能力。然而，近年來在發育學和神經解剖學的研究發現，在魚類到陸生脊椎動物的演化過程中，許多功能、行為與腦區具有到高度的保留性。越來越多的研究支持，魚類與陸生脊椎動物在學習與記憶的過程和神經機轉十分相似。利用物理性破壞方式研究腦區功能實驗中，發現硬骨魚的端腦外側區（telecephalic lateral pallium, LP），同源於哺乳類動物的海馬迴，具有控制空間學習與記憶能力，而在端腦中側區（telecephalic medial pallium, MP），則同源於哺乳類動物的杏仁核，負責調控情緒性記憶(Rodriguez et al., 2002; Rodriguez et al., 2005)，綜合以上的發現，硬骨魚與陸生脊椎動物在記憶處理與儲存方面相似，分別由不同部位的腦區所調控。證實了脊椎動物為了適應環境所帶來的衝擊，發展出高度保守性的記憶系統(Salas et al., 2003)。

F. 斑馬魚（Zebrafish）

斑馬魚（*Danio rerio*）屬淡水硬骨魚類，輻鰭亞綱鯉科，原產於東印度河川流域，為一種廣溫性魚類，在攝氏二十四度以上的環境下極易誘發生殖行為，且產卵不受季節所侷限，在實驗室中可藉由光週期來誘發產卵，行體外受精，每隻母魚單次排卵可達數百顆，在胚胎

發育時呈透明狀，透過光學顯微鏡即可觀察神經、內臟及血管等器官發育過程。而受精卵孵化只需2~3天，三個月左右即達性成熟期，有利於研究世代間基因的調節表現。此外，斑馬魚和人類的基因序列相似度高達**87%**，且在胚胎發育過程機制和許多重要的調控蛋白的表現，不論在位置及時間上都跟哺乳動物非常相似，因此近年來已成為研究脊椎動物胚胎發育當紅的模式物種。

在齧齒類演化開始之前，硬骨魚類早已存在於地球上，然而魚類生長環境又是一個極為複雜的地方，為了適應環境所帶來的衝擊，魚類必須具備生存所需的學習本領，如空間學習（spatial learning）以及逃避學習（avoidance learning）等，魚類透過這些學習本能，藉以搜尋食物、迴避掠食者及尋覓繁殖場所。

近幾年來，藉由研究金魚（goldfish）的認知學習行為，累積了許多有關魚類學習和記憶的基礎資料，過去的研究成果發現，在金魚的中樞系統中，由前腦發育而成的端腦（telencephalic region），為負責調控認知學習之重要腦區，當破壞金魚端腦外側時，會造成空間記憶的缺失(Rodriguez et al., 2002)；而端腦內側遭受破壞的金魚，則會在情緒記憶的實驗中產生學習障礙(Portavella and Vargas, 2005)，而根據端腦的功能性以及神經解剖的相關資訊，端腦是同源於哺乳類的邊緣系統。其中，端腦中側（medial telencephalic pallia, MP）是等同於

邊緣系統中杏仁核的功能，而端腦旁側（lateral telencephalic pallia, LP）則是和海馬迴（hippocampus）相似，具備調控空間認知的功能(Portavella et al., 2004)和認知以及情緒表達功能相關的腦區，除了端腦以外還包括小腦具備部分的功能(Rodriguez et al., 2005)。近年來，由於相關知識作為研究後盾，斑馬魚也逐漸發展成為用來探討認知恐懼學習的工具。過去文獻指出，斑馬魚也和哺乳類一樣具有習得恐懼記憶的能力，實驗者利用紅色燈光當作條件刺激（CS），而嫌惡性電擊當作非條件刺激（US）。結果發現，經過數次紅色燈光和電擊配對後，斑馬魚就能夠產生主動趨避的行為，證實在斑馬魚身上也能夠成功建立出將燈光和電擊連結的條件化恐懼記憶(Xu et al., 2007)，此外，也發現了褪黑激素能夠影響斑馬魚記憶的形成(Rawashdeh et al., 2007)。此外，投予尼古丁或尼古丁受器致效劑，均能改善斑馬魚認知學習能力(Levin and Chen, 2004; Levin et al., 2006)，而這對於開發認知功能障礙疾病（如阿茲海默症）的治療藥物，提供了一個全新的治療途徑(Newhouse et al., 1997)。

G. 端腦，Glutamate NMDA receptor 及 Long-term potentiation

在哺乳類大腦邊緣系統裡，海馬迴主要是調控動物對空間記憶的學習，而杏仁核則是負責掌控情緒性記憶的學習能力，兩者是情緒學

習研究的主要探討對象，而長久以來，杏仁核被認為是產生和儲存恐懼情緒所不可或缺的構造，研究者將經過條件恐懼學習的老鼠，在訓練結束後以電燒的方式破壞杏仁核腦區，結果顯示這些老鼠在恐懼行為的表現上出現異常(Phillips and LeDoux, 1992; Kim and Davis, 1993)。而生物體接受到情緒刺激時，此刺激將會在腦中分別進行兩種不同的傳遞途徑，一是經由視丘直接投射到杏仁核區，同時另一個路徑則是上傳至感覺皮質區之後，再傳至杏仁核區(Doron and Ledoux, 2000)。然而無論是在哺乳類(Eichenbaum et al., 1999; Hartley et al., 2003)、爬蟲類(Lopez et al., 2000)和鳥類(Sherry et al., 1996; Bingman, 1998)都具有相同的功能。魚類和其他陸生之脊椎動物一樣，會利用相同的空間學習策略以及對特定的刺激產生恐懼反應來適應生存的環境。先前學者發現，硬骨魚類的端腦扮演著類似於海馬迴及杏仁核等同源構造(Northcutt, 1981; Vargas et al., 2000; Rodriguez et al., 2002)。若將金魚之端腦內側部位施予物理性的破壞，實驗動物則將會喪失過去所學會之恐懼記憶(Portavella and Vargas, 2005)。

長期增益效應（long-term potentiation, LTP）一般認為與神經突觸可塑性有重要的關連性，它會誘發神經突觸傳導的增加，因而推論在學習記憶中扮演著重要的角色。長期增益效應被認為是大腦神經細胞儲存訊息的方式，也是學習與記憶的細胞生理模式(Bliss and

Collingridge, 1993)。利用活體電生理的實驗方法，學者發現在恐懼記憶的形成過程中，杏仁核區域的神經細胞會呈現 LTP 的現象(Rogan et al., 1997; Maren, 1999)，此一證據更進一步確立了在建立恐懼記憶的學習過程中，杏仁核為必要之構造。其不僅在恐懼記憶的習得扮演重要的角色，亦會影響非習得情緒的表達(Walker and Davis, 1997)。因此當杏仁核受到損傷後，生物體在面對生存威脅時，不僅不再感到恐懼也不再有防衛的動作，甚至連恐懼情緒的表達都受到干擾(Davis, 1992)。LTP 建立之神經機轉，目前相信是和興奮性神經傳遞物質（excitatory neurotransmitter），特別是與麩胺酸（glutamate）的釋放與作用有關，受麩胺酸活化的受器種類繁多，其中的 N-methyl-D-aspartate（NMDA）receptor subtype 扮演重要的角色。許多哺乳類的研究結果指出，位在海馬迴部位的 glutamate NMDA receptor 參與了記憶的獲取及固化過程。若使用 glutamate NMDA receptor 之拮抗劑（antagonist），則會造成學習的障礙(Morris, 1989)，因此推論透過活化 glutamate NMDA receptor 可以驅動海馬迴中的 LTP。此外，在 1992 年 Miserendino 等人使用 fear-potentiated startle 實驗模式，於 light（CS）-shock（US）配對學習前在中樞 basolateral amygdale（BLA）部位給予 glutamate NMDA receptors antagonist，如 L-AP5 或 AP7，可阻斷後續動物在驚跳反應的表現，證明杏仁核中

glutamate NMDA receptors 的活化在恐懼學習是扮演相當重要的角色(Campeau et al., 1992)。

在魚類的相關實驗中，2004 年首次有研究者利用離體電生理技術，在離體之斑馬魚端腦中建立 LTP，這初步證明魚腦中亦可產生 LTP，而利用 glutamate NMDA receptor 之拮抗劑也可阻斷 LTP 的形成(Nam et al., 2004)，進一步確立了斑馬魚端腦具有神經突觸可塑性（neuronal synaptic plasticity）的能力。然而哺乳類海馬迴及杏仁核中的神經突觸可塑性以及長期記憶（long-term memory）的建立，除了受到 glutamate NMDA receptor 調節外，尚需要仰賴其他訊息分子的傳遞以及調控，例如 mitogen-activated protein kinase / extracellular signal regulated kinase（MAPK / ERK）(Impey et al., 1999)以及 cAMP response element-binding protein（CREB）(Guzowski and McGaugh, 1997)。過去的研究發現，斑馬魚和哺乳類的基因結構有非常多的保守部位，也就是能夠表現出相似結構和相似功能性的蛋白質。活化哺乳類細胞中之 MAPK 訊息路徑，可以刺激細胞的分裂、增生、分化以及存活(Marshall, 1995; Ballif and Blenis, 2001)。而利用 insulin-like growth factor 來活化斑馬魚細胞內 MAPK 以及 PI-3 kinase 的訊息路徑，也能夠達到刺激斑馬魚細胞的增生現象(Pozios et al., 2001)，這和哺乳類實驗動物之研究結果是相吻合的。此外，根據胺基酸序列的比

對結果，斑馬魚體內的 CREB 蛋白質與老鼠體內之相同蛋白質有高達 95%的相似性(Whitmore et al., 1998)。這似乎暗示了，在斑馬魚的腦部，也存在著等同於哺乳類動物活化 LTP 相近的分子機轉。

二、研究目的

A. 建立新型斑馬魚抑制性逃避行為箱。

B. 利用新型斑馬魚抑制性逃避行為箱，來探討斑馬魚是否能建立條件化恐懼而產生抑制性逃避行為。

C. 探討斑馬魚的條件化恐懼記憶是否透過活化 glutamate NMDA receptor 訊息傳導途徑。

D. 探討斑馬魚的條件化恐懼記憶是否透過活化其端腦內 MAPK 之訊息傳導途徑。

肆、研究材料與方法

一、研究材料

A. 實驗動物（Animals）

三至五個月的成熟斑馬魚個體，體長約為三至四公分左右。實驗期間動物將飼養於師大生命科學系動物房內，飼養環境維持在28.5℃，光週期採 14/10 小時，所有行為實驗均於動物之光週期中進行，實驗用之斑馬魚均來由中研院細胞與生物個體研究所（Institiute of Cell and Organismic Biology, Academia Sinica）所提供，並由本實驗室自行繁殖，繁殖方法是參考自 Westerfield（1995）所建立之飼育方法，並受師大實驗動物管理小組監督，而研究所採取的實驗方法，由國立台灣師範大學實驗動物管理委員會審核通過後進行，並符合農委會所訂定之實驗動物使用規章。

B. 實驗藥物（Drug）

Glutamate NMDA receptor antagonist：（+）-Hydrogen maleate（MK-801）（20 μM），購自 Sigma 公司。投藥方式則採用過去文獻所使用的浸泡方式和藥物劑量(Swain et al., 2004)，在動物進行馴化階段的前四天，連續四天每天浸泡在 20 μM 的 MK-801 溶液裡，每次浸泡時間為一小時。當浸泡結束後，動物放回魚缸內休息。

二、研究方法

C. 抑制性逃避行為箱（Inhibitory avoidance apparatus）

抑制性行為箱是研究情感性學習與空間認知的標準行為儀器，外型為長方體結構，而主要分為兩個相同大小的隔室，其中一隔室放有平台，其水位控制在2公分的淺水位，此區為淺水區，而未放平台的另一隔室為深水區，則水位為11公分的深水位。實驗開始前，斑馬魚會在淺水區靜等待閘門的開啟。閘門開啟後，斑馬魚就能自由游動適應行為箱之環境，而利用魚類偏好棲息的深水區當作條件化刺激（CS），而嫌惡性電擊當做非條件化刺激（US），將兩者配對，讓斑馬魚將深水區與電擊聯結在一起，而抑制原本行為，產生對深水區的恐懼記憶。（行為儀器結構請參考**附圖一**）

此恐懼記憶學習行為訓練主要可以分為三個階段馴化階段（acclimation）、訓練階段（training Trial）以及條件化恐懼（conditioned fear），各階段簡介如下：

a. 馴化階段（Acclimation）

在動物放置各自飼養箱中適應五天後，將動物放置於淺水區中自由游動適應環境五分鐘後，開啟閘門，而開啟閘門後五分鐘結束此階段實驗，此為了讓斑馬魚熟悉陌生的環境，避免在之後的正式訓練中受到了自然行為活動量的干擾。而在開啟閘門後五分鐘內，未進入到

深水區的斑馬魚，將會被剔除於實驗外，因為這些動物可能在側線或運動功能上的障礙，對實驗可能造成不良的影響。此階段結束後，動物會放回魚缸內休息。

b. 訓練階段（Training trial）

馴化階段的隔一天，將動物放置在淺水區中，待斑馬魚開始自由游動後一分鐘，開啟閘門。當斑馬魚進入深水區後，關起閘門後兩秒鐘，給予電擊（1.5 伏特/公分；10毫秒開啟，10毫秒關閉）五秒鐘，斑馬魚將能學習到深水區和電擊的聯結，進而抑制原本行為。實驗結果將紀錄動物在閘門開啟後第一次進入深水區前，在淺水區所逗留的時間。

c. 條件化恐懼（Conditioned fear）

於前述測試結束一天或七天後，動物被放置於淺水區中，待斑馬魚開始自由游動後一分鐘，開啟閘門。當斑馬魚進入深水區則結束此階段實驗，實驗結果將紀錄動物在閘門開啟後第一次進入深水區前，在淺水區所逗留的時間。

d. 消滅作用訓練（Extinction training）

在消滅作用訓練，其定義為動物接受重複之條件化刺激（CS）之呈現（深水區），但不再配對非條件化刺激（US）（嫌惡性電擊），故於條件化恐懼測試時，當斑馬魚進入深水區後，不給予嫌惡性電擊

而讓斑馬魚待留深水區裡5分鐘，再將斑馬魚放回原本的魚缸內休息。

e. 消滅作用訓練後測試 （post-extinction training test）

於消滅作用訓練後 24 小時，動物被放置於淺水區中，待斑馬魚開始自由游動後一分鐘，開啟閘門。當斑馬魚進入深水區則結束此階段實驗，實驗結果將紀錄動物在閘門開啟後第一次進入深水區前，在淺水區所逗留的時間。

D. 自發性探索行為儀器（Locomotor activity）

實驗設計為偵測斑馬魚處在一個陌生環境下的自發性探索行為能力以及基本的運動能力。行為儀器為一圓形水池，直徑 22 公分 ，高 20 公分，材質使用透明壓克力板，使用時內置水深 10 公分，環境燈光抱保持正常充足照明，而水池底部鋪設白色防反光板，配合動物行為影像偵測系統（Etho vision）對於的行為表現情況作紀錄，主要針對斑馬魚在特定時間內所游動總距離及游動速率作為觀察指標。

E. 西方點墨反應（Western blotting）

利用硫酸十二酯鈉聚丙烯醯胺凝膠電泳法（sodium dedecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE）依各種蛋白質具有不同分子量之特性來進行分離。本次實驗所針對探討的蛋白質為 MAPK 蛋白質及 phospho-MAPK 蛋白質，其份子量大小均為 44 kDa。

SDS-PAGE 準備：

製備 gel 的各種溶液：

【溶液配製一】

30g acrylamide，0.8g bis acrylamide 加水至 100 ml（a 溶液）

Tris buffer a：12.1g Tris 加水至 100 ml，pH 6.8

Tris buffer b：12.1g Tris 加水至 100 ml，pH 8.8

10% SDS：10g SDS 加水至 100 ml

10% ammonium persulfate：0.1g ammonium persulfate 加水至 1 ml

TEMED

10％ Resoling gel：

a 溶液	3.3 ml
Tris buffer b	2.5 ml
10% SDS	0.1 ml
ddH_2O	4.0 ml
10% ammonium persulfate	0.1 ml
TEMED	0.004 ml
Total 10 ml	

5％ Stacking gel：

a 溶液	0.67 ml
Tris buffer a	0.5 ml

10%SDS	0.04 ml
ddH_2O	2.7 ml
10% ammonium persulfate	0.04 ml
TEMED	0.004 ml
Total 4 ml	

製備 gel

配製好的 **r**esoling gel 溶液，倒入已準備好之玻璃片槽內，再加入水或酒精於 gel 上使其平整。待 gel 凝結後，除去水或酒精層，加入混合好之 stacking gel 溶液並同時將一個梳狀模板（comb）插入，待其凝結後即完成 SDS-PAGE gel 的製備。

萃取蛋白質

動物犧牲後，將端腦取出並且加入蛋白質萃取液（Tissue Protein Extraction Reagent, PIERCE）混合後，利用研磨棒將組織均質化（homogenize）。在 4℃下以 10,000 g 之速度離心 30 分鐘。取上清液作為全量細胞溶解液，貯存於-20℃備用。

電泳（Electrophoresis）

依照 Laemmali 法進行 SDS-PAGE，將蛋白質分離。將凝好的膠體置於電泳槽中（Bio-Rad），並於槽中注入 running buffer（參考，溶

液配製二)。將定量之蛋白質樣本注入凝膠內所預留之空格（well）中，以 70 伏特作為電泳之起始電壓，當色帶進入分離區（resoling gel）時，再以 150 伏特之電壓進行跑至藍色染劑到達凝膠底部(約 1.2 小時)。待電泳結束後，取出膠體，進行轉印(transfer)的步驟。

【溶液配製二】

Running buffer, pH8.3：

Tris	15.1 g
Glycine	94 g
（先加 900 ml的ddH_2O溶解之）	
10% SDS	50 ml
加ddH_2O至最後體積為 1000 ml	

Sample buffer（5X）：

1 M Tris（pH6.8）	1.25 ml
Glycerol	2.0 ml
20 %SDS	2.0 ml
β-mercaptoethanol	0.2 ml
Bromophenol blue	2 mg
加ddH_2O使體積至 10 ml	

蛋白質電泳轉印法（Blotting）

將 PVDF membrane 用浸泡 5 分鐘後，作為前處理。在半乾轉漬槽（semi-dry transfer unit）內預鋪一張經 transfer buffer（參考，溶液配製三）浸潤的 3M 濾紙，把跑完電泳的 SDS-PAGE 凝膠取出，平鋪在濾紙上，再將已預處理完全的 PVDF membrane 鋪上，並趕走氣泡。最後在上方加鋪一張經 Transfer buffer 浸潤的 3M 濾紙。完成裝置後，在 4℃下以 70 伏特電壓，200 毫安培電流進行轉漬 1 小時，完成後取出 PVDF membrane。

【溶液配製三】

Transfer buffer：

Tris	3.03 g
Glycine	14.41 g
Methanol	200 ml

加ddH_2O使體積至 1L

封阻步驟 （blocking）

轉印完成的 PVDF membrane 置於 5%脫脂牛奶／PBST 中，在室溫下以 30 rpm 搖晃 1~2 小時，以阻斷非特異性結合。

免疫染色法

將 PVDF membrane 以 washing buffer（參考，溶液配製四）清洗 5 分鐘四次，再加入以 1x PBST 稀釋的 first antibodies(Anti- MAPK & Anti-Phospho- MAPK，如附表一)，4℃下反應過夜。反應完後以 washing buffer 清洗 5 分鐘四次，加入以 1x PBST 稀釋的 HRP conjugated secondary antibodies (如附表一)，室溫下反應一個小時。反應完後以 washing buffer 清洗 5 分鐘四次。

最後，將PVDF membrane上殘留的buffer稍微以擦手紙吸乾後，以ECL™套組呈色（PerkinElmer Life Sciences, USA, NEL104/NEL 105)，將Luminol和反應促進劑混合液，倒入PVDF membrane上使之均勻分布。Luminol 和second antibody上的HRP於溫室下反應 1 分鐘，產生的螢光物質，再以冷光影像分析儀（FUJIFILM, LAS-3000）進行螢光偵測，即可得清晰結果。最後利用冷光影像分析儀所搭配的分析軟體MultiGauge進行分析蛋白質條紋的optical density值，以量化蛋白質的表現量。

【溶液配製四】

Washing buffer（PBST）：

10X Phosphate Buffered Saline（10X PBS）(1000 ml)

NaH_2PO_4 2.03 g

Na_2HPO_4	11.49 g
NaCl	85 g

10X PBS-Tween 20（10X PBST）（1000 ml）

10X PBS	995 ml
Tween 20	5 ml

Blocking buffer：

Non-fat milk powder	5 g

加 washing buffer 至 100 ml

<附表一>

a. First antibody diluents

抗體名稱：Anti- p44/42 MAP Kinase	稀釋濃度：1/5000
購買公司、貨品編號：Cell signaling Technology, Inc. #9101	

抗體名稱：Anti-phospho-p44/42MAPKinase (Thr202/Tyr204)	稀釋濃度：1/5000
購買公司、貨品編號：Cell signaling Technology, Inc. #9102	

抗體名稱：GAPDH	稀釋濃度：1/2500
購買公司、貨品編號：Gene Tex, Inc. GTX82899	

抗體名稱：Beta-actin	稀釋濃度：1/5000
購買公司、貨品編號：Abcom. ab8227	

b. HRP conjugated secondary antibody diluent

抗體名稱： Goat anti-Rabbit IgG：HRP	稀釋濃度：1/20000
購買公司、貨品編號：Jackson ImmunoResearch. 71148	

F. 統計方法

利用 SPSS 統計軟體分析，所有抑制性逃避性行為實驗數據，組內採用 Wilcoxon signed-rank test，$p < 0.05$ 被認定具有統計上之顯著差異。在自發性探索行為實驗數據，則是採用 Student's t test。$p < 0.05$ 被認定具有統計上之顯著差異。在西方點墨反應的量化結果，主要使用 one-way ANOVA 變異分析，將有經過訓練或是不同處理方式當作因子，再運用 Student's t test 進行事後各組之間的比較，$p < 0.05$ 被認定具有統計上之顯著差異。

伍、實驗結果

實驗一

A. 實驗設計說明

斑馬魚是否可以透過抑制性行為箱建立起條件化恐懼記憶，我們利用了抑制性逃避行為箱（inhibitory avoidance apparatus）來進行斑馬魚的條件化恐懼學習實驗，本實驗總共使用 61 隻三至五個月大的成熟斑馬魚進行實驗，按照實驗的分組方法分為五組，各組分別接受如下之不同電擊刺激強度：

Group one：

接受 0.8 V/cm 之電擊刺激強度。

Group two：

接受 1.0 V/cm 之電擊刺激強度。

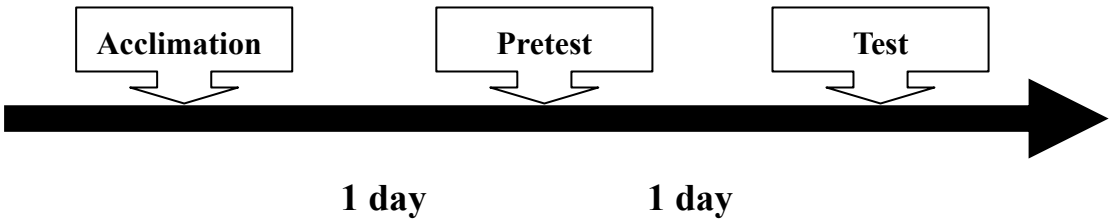
Group three：

接受 1.3 V/cm 之電擊刺激強度。

Group four：

接受 1.5 V/cm 之電擊刺激強度。

實驗流程簡圖如下



（實驗一的流程圖）

B. 實驗結果說明

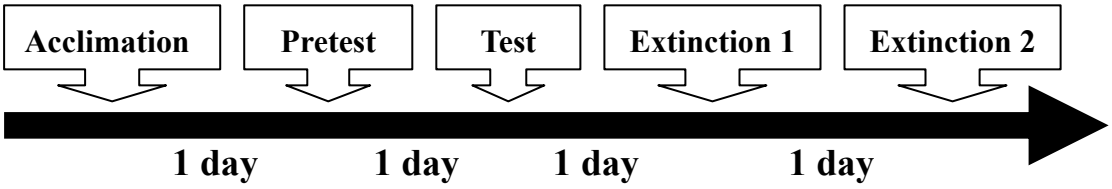
1. 實驗結果如圖二，經過 Wilcoxon signed-rank test 分析顯示在 1.3 V/cm 以上的電擊刺激強度之所有個體在淺水區停留的時間呈現顯著的上升，在兩組之 pretest 和 test 之間差異達到統計上的顯著水準（$p < 0.001$），而 1.3 V/cm 以下的電擊刺激強度之所有個體在淺水區停留的時間並無顯著的改變。表示在 1.3 V/cm 以上的電擊刺激強度下，斑馬魚經過了一次的訓練以後，就能成功建立出條件化恐懼記憶。

實驗二

A. 實驗設計說明

為了驗證斑馬魚抑制性逃避行為是透過學習而產生的，恐懼記憶是否可以利用情境的連續暴露而消減掉，我們利用了抑制性逃避行為箱來進行斑馬魚的恐懼學習實驗，使用13隻三至五個月大的成熟斑馬魚進行實驗，而電擊刺激強度之強度依照實驗一所顯示學習效果最好之1.5 V/cm之電擊刺激強度。

實驗流程簡圖如下



（實驗二的流程圖）

B. 實驗結果說明

1. 實驗結果如圖三，經過 Wilcoxon signed-rank test 分析顯示在 1.5 V/cm 之電擊刺激強度下，斑馬魚確實在經過一次的訓練後，就能成功建立出條件化恐懼記憶，在 pretest 和 test 之間差異達到統計

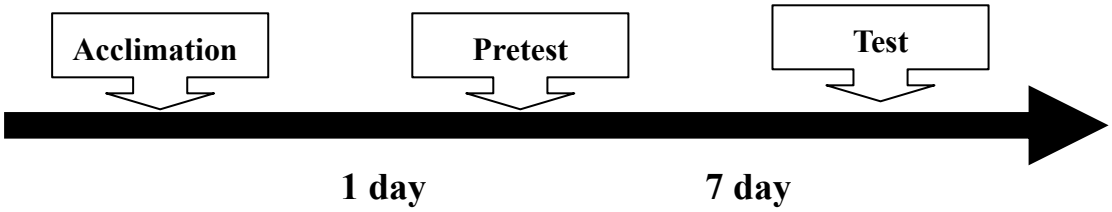
上的顯著水準（$p < 0.01$）；而此條件化恐懼記憶在情境的連續兩次暴露而消滅掉，在 test 和之 extinction 2 間差異達到統計上的顯著水準（$p < 0.05$）。

實驗三

A. 實驗設計說明

為了釐清斑馬魚條件化恐懼記憶是否可以長期儲存下來，我們利用了抑制性逃避行為箱來進行斑馬魚的恐懼學習實驗，使用9隻三至五個月大的成熟斑馬魚進行實驗，而電擊刺激強度之強度依照實驗一所顯示效果最好之1.5 V/cm之電擊刺激強度。

實驗流程簡圖如下



（實驗三的流程圖）

B. 實驗結果說明

1. 實驗結果如圖四，經過 Wilcoxon signed-rank test 分析顯示，即使訓練後歷經七天的時間，pretest 和 test 之間仍呈現顯著差異（ $p<0.05$），代表著此記憶保存下來的時間至少達七天。

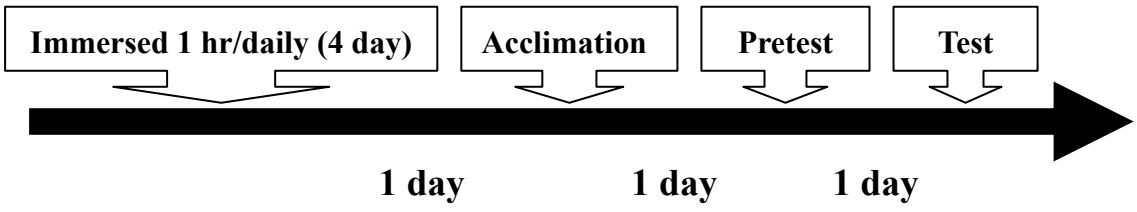
實驗四

A. 實驗設計說明

（1）實驗目的：

為了瞭解斑馬魚條件化恐懼學習是否需活化glutamate NMDA receptor，本實驗分為兩組，第一組為control組，在與另一組相同的時間點放置在裝有溶劑（二次水）的盒子，其反應之結果單純作為對照藥物處理組，是實驗數值的基準指標；另一組為浸泡20 μM glutamate NMDA receptor antagonist, MK-801組，而浸泡時間點如之前所述。觀察MK-801對各組動物於條件化恐懼學習之影響。兩組分別於test後，馬上進行自發性探索行為檢測，藉以排除藥物累加作用而影響斑馬魚的自發性探索行為的可能性；浸泡過MK-801之組別，隔一週後，再進行一次條件化恐懼學習流程。

實驗流程簡圖如下



（實驗四的流程圖）

B. 實驗結果說明

1. 自發性探索行為實驗結果如圖五，經過 one-way ANOVA 分析顯示組間並沒有達到統計上的顯著水準，表示雖然在經過了多天的藥物浸泡，但是卻不會造成動物在運動能力上受到藥物累積之傷害。
2. 條件化恐懼學習實驗結果如圖六，經過 Wilcoxon signed-rank test 分析顯示浸泡過 MK-801 的實驗組，在 pretest 和 test 之間並沒有顯著差異，這結果顯示 MK-801 能夠對條件化恐懼學習產生顯著的阻斷效果。
3. 條件化恐懼學習實驗結果如圖七，Wilcoxon signed-rank test 分析顯示於一週後將浸泡過 MK-801 之組別再次進行條件化恐懼學習，斑馬魚恢復條件化恐懼學習之能力。在 pretest 和 test 之間差異達到統計上的顯著水準（$p < 0.01$），由實驗結果發現 MK-801 可以阻斷斑馬魚條件化恐懼學習，且為暫時性阻斷條件化恐懼學習，並非造成毒殺性損傷，故推測斑馬魚的條件化恐懼學習可能是透過活化 glutamate NMDA receptor。

實驗五

A. 實驗設計說明

探討斑馬魚條件化恐懼學習是否需透過增加端腦中 MAPK 蛋白質的磷酸化。本實驗中使用 18 隻斑馬魚，按照的分組方法分為六組，各組分別接受如下之處理：

Group one：

為控制組，未經任何處理(naïve)。

Group two：

為完成條件化恐懼學習訓練之斑馬魚，而在訓練後 0.25 小時犧牲。

Group three：

為完成條件化恐懼學習訓練之斑馬魚，而在訓練後 0.5 小時犧牲。

Group four：

為完成條件化恐懼學習訓練之斑馬魚，而在訓練後 1 小時犧牲。

Group five：

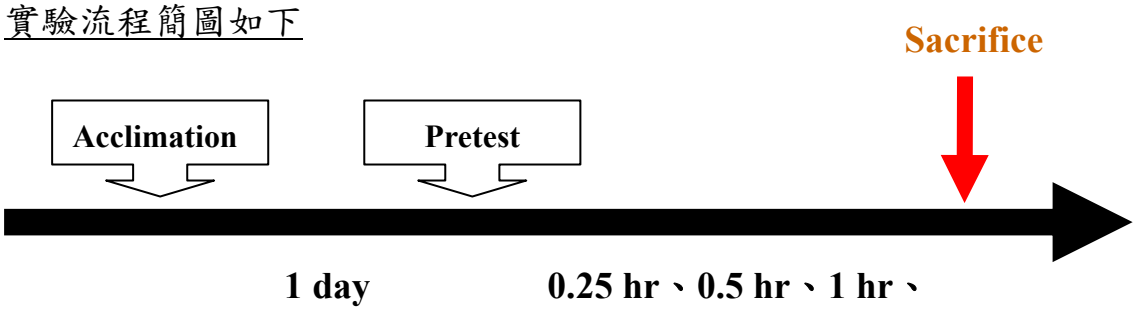
為完成條件化恐懼學習訓練之斑馬魚，而在訓練後 1.5 小時犧牲。

Group six：

為完成條件化恐懼學習訓練之斑馬魚，而在訓練後 2 小時犧牲。

本實驗將會利用西方點墨反應(western blot)偵測磷酸化 MAPK 蛋白質的含量以及 MAPK 蛋白質的總含量。

實驗流程簡圖如下



（實驗五的流程圖）

B. 實驗結果說明

1. 實驗結果如圖八，經過 one-way ANOVA 分析顯示組間 main effect 達到統計上的顯著水準（$p = 0.000534$），磷酸化 MAPK 蛋白質在端腦中的表現量隨著時間呈現增加的現象，而在條件化恐懼訓練後 1.5 小時，磷酸化 Erk1 蛋白質在端腦中的表現量相較於 naïve 組有明顯的增加，且達到統計上的顯著水準（$p < 0.001$）。
2. 實驗結果如圖九，經過 one-way ANOVA 分析顯示組間 main effect 並沒有達到統計上的顯著水準，表示 MAPK 在端腦中的表現量隨著時間並沒有明顯的改變。

實驗六

B. 實驗設計說明

進一步確認斑馬魚條件化恐懼學習是否需透過增加端腦中 MAPK 蛋白質的磷酸化。本實驗中使用 25 隻斑馬魚，按照的分組方法分為五組，各組分別接受如下之處理：

Group one：naïve

為控制組，未經任何處理。

Group two：contextual treatment

為進入抑制性趨避行為箱而未經過條件化恐懼學習之斑馬魚，在離開抑制性趨避行為箱後 1.5 小時犧牲。

Group three：shock alone

為單純接受嫌惡性電擊刺激之斑馬魚，在電擊後 1.5 小時犧牲。

Group four：paired

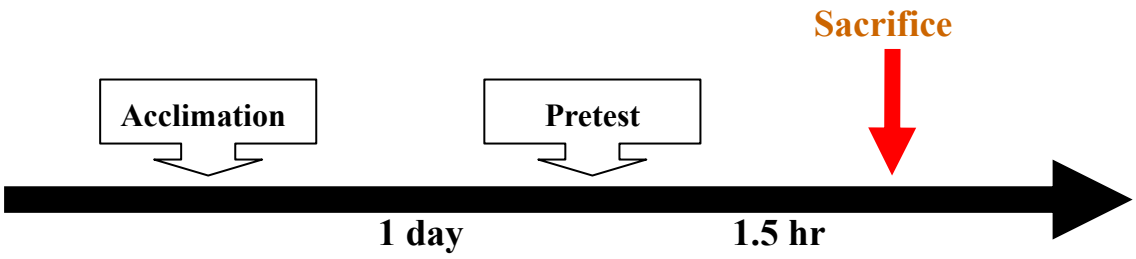
為完成條件化恐懼學習訓練之斑馬魚，而在訓練後 1.5 小時犧牲。

Group five：paired + MK-801

為訓練前經過 MK-801 處理過且完成條件化恐懼學習訓練之斑馬魚，而在訓練後 1.5 小時犧牲。

本實驗將會利用西方點墨反應(western blot)偵測磷酸化 MAPK 蛋白質的含量。

實驗流程簡圖如下



（實驗六的流程圖）

B. 實驗結果說明

1. 實驗結果如圖十，經過 one-way ANOVA 分析顯示組間 main effect 達到統計上的顯著水準（$p = 0.000204$），僅在 Group four 與另外四組在統計上有顯著差異，其他組別之間在統計上並無顯著差異，進一步證實斑馬魚在條件化恐懼記憶學習中，記憶的獲取不僅需要透過 glutamate NMDA receptor 的活化且藉由 MAPK 蛋白質的磷酸化來調控。

陸、實驗討論

本研究採用了行為科學、神經藥理學以及分子生物學等方法，主要針對斑馬魚的條件化恐懼學習記憶之獲取(acquisition)作用進行研究。本研究發現，斑馬魚能夠藉由抑制性逃避行為箱的行為訓練方式，獲取條件化恐懼學習之記憶。在本次研究中，我們發現僅需要一次訓練，斑馬魚即可建立的條件化恐懼記憶而產生抑制性逃避行為。除此之外，對於條件化恐懼記憶的獲取，斑馬魚端腦內 glutamate NMDA receptor 也調控著記憶獲取所需的分子機轉。而先前學者發現，硬骨魚類的端腦扮演著類似於海馬迴及杏仁核等同同源構造(Northcutt, 1981; Vargas et al., 2000; Rodriguez et al., 2002)，因此我們分析訓練過後斑馬魚端腦內 Erk1 的磷酸化表現量，也發現 Erk1 的磷酸化表現量在學習過後隨時間逐漸增加，證實了斑馬魚條件化恐懼學習需透過 MAPK 的磷酸化表現量增加，代表與囓齒類相同的神經機轉也存在於斑馬魚腦內。這些研究結果，支持在物種的演化過程中，脊椎動物為了適應環境所帶來的生存衝擊，在大腦的結構以及功能上，都發展出保守性的記憶系統。

1. 斑馬魚能在抑制性逃避行為箱中展現條件化恐懼學習記憶能力。

過去有許多研究者透過了各種不同類型的行為訓練方式來觀察及瞭解斑馬魚學習的表現能力。過去許多的行為訓練模式都是採用

食物當成促進訓練的學習誘因(Williams et al., 2002)，或者是利用嫌惡性電擊來當作促進訓練的懲罰(Xu et al., 2007)。而本實驗利用魚類偏好棲息的深水區當作條件化刺激（CS），而嫌惡性電擊當作非條件化刺激（US），將兩者配對，讓斑馬魚將深水區與電擊聯結在一起，而抑制原本行為，產生對深水區的恐懼記憶。根據實驗（一）所呈現出的實驗結果發現，斑馬魚經過了一次條件化恐懼學習訓練後，隔天的測試（test）中都能夠達到顯著的學習效果（圖一）。此外，此恐懼記憶可以透過情境（深水區）的連續呈現而消滅掉，證實此抑制性逃避行為的確是透過學習而來，這符合 Pavlov 所提出的正統條件化之學習曲線。

而目前理論對於記憶消除的機轉，主要有兩大方向，一是經由遺忘(forgetting)，隨著時間逐漸忘記 CS-US 之聯結關係；另一是經由主動重新學習產生新的記憶，進而可將之前學得獲取之 CS-US 和後來新的消滅訓練所習得的做進一步的區分。目前較多的研究證明，消滅作用像是一個重新學習的過程，即原來的記憶還存在於大腦中，但生物體經由另外的經驗而有了不同的記憶存在於大腦中，即所謂新的記憶(Wagner et al., 1981; Bouton et al., 1993; Lovibond et al., 2000; Bouton, 2004; Vervliet et al., 2004)。

本實驗（一）~（三）的結果，不但驗證了斑馬魚擁有條件化

恐懼學習能力和此記憶可保存至少達七天外，也確立了後續實驗中所採用的動物行為訓練模式。

2. 斑馬魚條件化恐懼學習與 glutamate NMDA receptor 的關係。

行為實驗結果顯示，在條件化恐懼記憶訓練前，採用 MK-801（glutamate NMDA receptor antagonist）(20 μM)浸泡方式處理的實驗組能夠有效的阻斷條件化恐懼學習（圖六）。除此之外，根據圖七所顯示的結果發現，雖然先前的條件化恐懼記憶訓練受到 MK-801 藥物的阻斷，但是一個星期後，當牠們再次重新接受條件化恐懼記憶訓練時，牠們還是能夠恢復其學習能力。因此，MK-801 藥物並不會對斑馬魚腦部產生永久性的傷害，而只是暫時性的抑制 glutamate NMDA receptor 的活化。

過去，有許多相關研究的文獻報導，將 glutamate NMDA receptor antagonist 注射入大白鼠體內後，能夠阻斷大白鼠的學習能力(Tan et al., 1989; Packard and Teather, 1997)。除此之外，在 2006 年的時候，Gomez 等人利用金魚進行類似實驗，也發現相似的實驗結果，動物的學習能力被阻斷。

透過對實驗（四）和（五）的瞭解，能夠進一步推論在脊椎動物的條件化恐懼記憶學習過程當中，活化glutamate NMDA receptor是不可或缺的重要分子調控機制之一。

3. 比較斑馬魚與其他脊椎動物在條件化恐懼學習中的分子機轉。

脊椎動物的條件化恐懼記憶學習，除了受到 glutamate NMDA receptor 的調節外，還需要依賴其他訊息分子的傳遞以及調控，例如 mitogen-activated protein kinase/extracellular signal regulated kinase（MAPK/ERK）(Impey et al., 1999)以及下游 cAMP response element-binding protein（CREB）的參與(Guzowski and McGaugh, 1997)。

本研究利用西方點墨法（western blot），分析斑馬魚端腦中 MAPK 蛋白質的磷酸化程度是否會和條件化恐懼記憶學習的過程有關。結果發現，在學習訓練後，斑馬魚端腦中的磷酸化 Erk1 蛋白質隨著時間有逐漸上升的現象，而在訓練後 1.5 小時，磷酸化 Erk1 蛋白質表現量達到高峰，而此磷酸化 Erk1 蛋白質表現量增加，並非透過 Erk1 蛋白質的總量增加。此結果支持在斑馬魚的腦內，可能存在著等同於哺乳類動物活化 LTP 相近的分子機轉，即條件化恐懼記憶訓練後，先透過 glutamate NMDA receptor 的活化，之後鈣離子進入細胞內藉由 Ras、Raf、MEK 等訊息傳遞路徑而活化 MAPK(Falls et al., 1992; Maren et al., 1996; Impey et al., 1999；Schafe et al., 2000；German et al., 2003)，MAPK 活化時會進入細胞核影響基因的表現，進而造成神經的可塑性之改變(Ghosh et al., 1994; Davis et al., 2000;

Kida et al., 2002; Lonze and Ginty, 2002; Lin et al., 2003)。

4. 斑馬魚在行為科學中未來的發展。

行為科學是神經科學當中相當重要的一個環節，我們能夠藉由研究動物的學習行為，來了解及探討學習與記憶過程中的神經機轉。過去的研究發現，斑馬魚大腦的發育過程以及各主要腦部的構造，都和人類有著相當大的保守性，有利於研究者進行比較。而且成熟之斑馬魚大腦和其他脊椎動物一樣，具有典型的感覺器官(視覺、嗅覺、味覺、觸覺、平衡覺以及聽覺)以及和人類同源性的感覺傳遞路徑(Byrd et al., 1996; Orger et al., 2000; Mombaerts, 2001)。

本研究結果中所以發現的四項結果：(一)斑馬魚具備條件化恐懼記憶學習能力；(二)此條件化恐懼記憶至少可被保存七天；(三)斑馬魚的條件化恐懼記憶學習需要透過活化glutamate NMDA receptor來調控；(四)斑馬魚的條件化恐懼記憶學習訓練需要MAPK的磷酸化來傳遞訊息，在訓練後1.5小時，磷酸化Erk1蛋白質表現量達到高峰，且此磷酸化Erk1蛋白質增加是藉由被磷酸化的Erk1蛋白質數目增加，而非透過Erk1蛋白質總量的增加。

本研究之實驗結果將能夠提供未來更多的研究及實驗方向，例如透過轉殖斑馬魚之建立，來瞭解基因與學習之間的微妙關係；開發更多元化行為儀器，來研究斑馬魚的學習行為模式；透過斑馬魚的學習

行為來篩選具治療價值之藥物等。相較於金魚，斑馬魚更具備前述之實驗優勢，因此，相信斑馬魚在未來的行為科學中，將會是研究脊椎動物行為科學所不可忽視的新希望。

柒、參考文獻

Ballif BA, Blenis J. 2001. Molecular mechanisms mediating mammalian mitogen-activated protein kinase (MAPK) kinase (MEK)-MAPK cell survival signals. *Cell Growth Differ* 12:397-408.

Bingman VV. 1998. The importance of atmospheric odours for the homing performance of pigeons in the sonoran desert of the southwestern united states. *J Exp Biol* 201 (Pt 12):755-760.

Bliss TV, Collingridge GL. 1993. A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature* 361:31-39.

Bouton ME. 2004. Context and behavioral processes in extinction. *Learn Mem* 11:485-494.

Bouton ME, Rosengard C, Achenbach GG, Peck CA, Brooks DC. 1993. Effects of contextual conditioning and unconditional stimulus presentation on performance in appetitive conditioning. *Q J Exp Psychol* B 46:63-95.

Byrd CA, Jones JT, Quattro JM, Rogers ME, Brunjes PC, Vogt RG. 1996. Ontogeny of odorant receptor gene expression in zebrafish, Danio rerio. *J Neurobiol* 29:445-458.

Campeau S, Miserendino MJ, Davis M. 1992. Intra-amygdala infusion of the N-methyl-D-aspartate receptor antagonist AP5 blocks acquisition but not expression of fear-potentiated startle to an auditory conditioned stimulus. *Behav Neurosci* 106:569-574.

Davis M. 1992. The role of the amygdala in fear-potentiated startle: implications for animal models of anxiety. *Trends Pharmacol Sci* 13:35-41.

Davis S, Vanhoutte P, Pages C, Caboche J, Laroche S. 2000. The MAPK/ERK cascade targets both Elk-1 and cAMP response element-binding protein to control long-term potentiation-dependent gene expression in the dentate gyrus in vivo. *J Neurosci* 20:4563-4572.

Doron NN, Ledoux JE. 2000. Cells in the posterior thalamus project to both amygdala and temporal cortex: a quantitative retrograde double-labeling study in the rat. *J Comp Neurol* 425:257-274.

Eichenbaum H, Dudchenko P, Wood E, Shapiro M, Tanila H. 1999. The hippocampus, memory, and place cells: is it spatial memory or a memory space? *Neuron* 23:209-226.

Falls WA, Miserendino MJ, Davis M. 1992. Extinction of fear-potentiated startle: blockade by infusion of an NMDA antagonist into the amygdala. *J Neurosci* 12:854-863.

German S, Monica RMV, James LM, Jorge HM, Ivan I. 2003. The role of NMDA glutamate receptors, PKA, MAPK, and CAMKII in the hippocampus in extinction of conditioned fear. *Hippocampus* 13:53-58.

Ghosh A, Ginty DD, Bading H, Greenberg ME. 1994. Calcium regulation of gene expression in neuronal cells. *J Neurobiol* 25:294-303.

Goelet P, Castellucci VF, Schacher S, Kandel ER. 1986. The long and the short of long-term memory--a molecular framework. *Nature* 322:419-422.

Gomez Y, Vargas JP, Portavella M, Lopez JC. 2006. Spatial learning and goldfish telencephalon NMDA receptors. *Neurobiol Learn Mem* 85:252-262.

Guzowski JF, McGaugh JL. 1997. Antisense oligodeoxynucleotide-mediated disruption of hippocampal cAMP response element binding protein levels impairs consolidation of memory for water maze training. *Proc Natl Aca Sci* USA:5647-5651.

Hartley T, Maguire EA, Spiers HJ, Burgess N. 2003. The well-worn route and the path less traveled: distinct neural bases of route following and wayfinding in humans. *Neuron* 37:877-888.

Impey S, Obrietan K, Storm DR. 1999. Making new connections: role of ERK/MAP kinase signaling in neuronal plasticity. *Neuron* 23:11-14.

Kida S, Josselyn SA, de Ortiz SP, Kogan JH, Chevere I, Masushige S, Silva AJ. 2002. CREB required for the stability of new and reactivated fear memories. *Nat Neurosci* 5:348-355.

Kim M, Davis M. 1993. Lack of a temporal gradient of retrograde amnesia in rats with amygdala lesions assessed with the fear-potentiated startle paradigm. *Behav Neurosci* 107:1088-1092.

Levin ED, Chen E. 2004. Nicotinic involvement in memory function in zebrafish. *Neurotoxicol Teratol* 26:731-735.

Levin ED, Limpuangthip J, Rachakonda T, Peterson M. 2006. Timing of nicotine effects on learning in zebrafish. *Psychopharmacology* (Berl) 184:547-552.

Lin CH, Yeh SH, Lu HY, Gean PW. 2003. The similarities and diversities of signal pathways leading to consolidation of conditioning and consolidation of extinction of fear memory. *J Neurosci* 23:8310-8317.

Lonze BE, Ginty DD. 2002. Function and regulation of CREB family transcription factors in the nervous system. *Neuron* 35:605-623.

Lopez JC, Bingman VP, Rodriguez F, Gomez Y, Salas C. 2000. Dissociation of place and cue learning by telencephalic ablation in goldfish. *Behav Neurosci* 114:687-699.

Lovibond PF, Davis NR, O'Flaherty AS. 2000. Protection from extinction in human fear conditioning. *Behav Res Ther* 38:967-983.

Maren S. 1999. Long-term potentiation in the amygdala: a mechanism for emotional learning and memory. *Trends Neurosci* 22:561-567.

Maren S, Aharonov G, Stote DL, Fanselow MS. 1996. N-methyl-D-aspartate receptors in the basolateral amygdala are required for both acquisition and expression of conditional fear in rats. *Behav Neurosci* 110:1365-1374.

Marks I. 1987. The development of normal fear: a review. J Child *Psychol Psychiatry* 28:667-697.

Marshall CJ. 1995. Specificity of receptor tyrosine kinase signaling: transient versus sustained extracellular signal-regulated kinase activation. *Cell* 80:179-185.

Mombaerts P. 2001. How smell develops. *Nat Neurosci* 4 Suppl:1192-1198.

Morris RG. 1989. Synaptic plasticity and learning: selective impairment of learning rats and blockade of long-term potentiation in vivo by the N-methyl-D-aspartate receptor antagonist AP5. *J Neurosci* 9:3040-3057.

Myers KM, Davis M. 2002. Behavioral and neural analysis of extinction. *Neuron* 36:567-584.

Nam RH, Kim W, Lee CJ. 2004. NMDA receptor-dependent long-term potentiation in the telencephalon of the zebrafish. *Neurosci Lett* 370:248-251.

Newhouse PA, Potter A, Levin ED. 1997. Nicotinic system involvement in Alzheimer's and Parkinson's diseases. Implications for therapeutics. *Drugs Aging* 11:206-228.

Northcutt RG. 1981. Evolution of the telencephalon in nonmammals. *Annu Rev Neurosci* 4:301-350.

Orger MB, Smear MC, Anstis SM, Baier H. 2000. Perception of Fourier and non-Fourier motion by larval zebrafish. *Nat Neurosci* 3:1128-1133.

Packard MG, Teather LA. 1997. Double dissociation of hippocampal and dorsal-striatal memory systems by posttraining intracerebral injections of 2-amino-5-phosphonopentanoic acid. *Behav Neurosci* 111:543-551.

Phillips RG, LeDoux JE. 1992. Differential contribution of amygdala and hippocampus to cued and contextual fear conditioning. *Behav Neurosci* 106:274-285.

Portavella, M., Torres, B. and Salas, C., 2004. Avoidance response in goldfish：emotional and temporal involvement of medial and lateral telencephalic pallium. J Neurosci. 24, 2335-2342.

Portavella M, Vargas JP. 2005. Emotional and spatial learning in goldfish is dependent on different telencephalic pallial systems. *Eur J Neurosci* 21:2800-2806.

Pozios KC, Ding J, Degger B, Upton Z, Duan C. 2001. IGFs stimulate

zebrafish cell proliferation by activating MAP kinase and PI3-kinase-signaling pathways. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 280:R1230-1239.

Rawashdeh O, de Borsetti NH, Roman G, Cahill GM. 2007. Melatonin suppresses nighttime memory formation in zebrafish. *Science* 318:1144-1146.

Richardson JT. 1996. Memory impairment in multiple sclerosis: reports of patients and relatives. *Br J Clin Psychol* 35 (Pt 2):205-219.

Rodriguez F, Duran E, Gomez A, Ocana FM, Alvarez E, Jimenez-Moya F, Broglio C, Salas C. 2005. Cognitive and emotional functions of the teleost fish cerebellum. *Brain Res Bull* 66:365-370.

Rodriguez F, Lopez JC, Vargas JP, Gomez Y, Broglio C, Salas C. 2002. Conservation of spatial memory function in the pallial forebrain of reptiles and ray-finned fishes. *J Neurosci* 22:2894-2903.

Rogan MT, Staubli UV, LeDoux JE. 1997. Fear conditioning induces associative long-term potentiation in the amygdala. *Nature* 390:604-607.

Salas C, Broglio C, Rodriguez F. 2003. Evolution of forebrain and spatial cognition in vertebrates: conservation across diversity. *Brain Behav Evol* 62:72-82.

Schafe GE, Atkins CM, Swank MW, Bauer EP, Sweatt JD, LeDoux JE. 2000. Activation of ERK/MAP kinase in the amygdala is required for memory consolidation of pavlovian fear conditioning. *J Neurosci* 20: 8177-8187.

Sherry DF, Galef BG, Jr., Clark MM. 1996. Sex and intrauterine position influence the size of the gerbil hippocampus. *Physiol Behav*

60:1491-1494.

Squire LR. 1987. The organization and neural substrates of human memory. *Int J Neurol* 21-22:218-222.

Squire LR, Zola SM. 1996. Structure and function of declarative and nondeclarative memory systems. *Proc Natl Acad Sci* U S A 93:13515-13522.

Swain HA, Sigstad C, Scalzo FM. 2004. Effects of dizocilpine (MK-801) on circling behavior, swimming activity, and place preference in zebrafish (Danio rerio). *Neurotoxicol Teratol* 26:725-729.

Tan S, Kirk RC, Abraham WC, McNaughton N. 1989. Effects of the NMDA antagonists CPP and MK-801 on delayed conditional discrimination. *Psychopharmacology* (Berl) 98:556-560.

Tully T, Bourtchouladze R, Scott R, Tallman J. 2003. Targeting the CREB pathway for memory enhancers. *Nat Rev Drug Discov* 2:267-277.

Vargas JP, Rodr inverted question markiguez F, JC Liqm, Arias JL, Salas C. 2000. Spatial learning-induced increase in the argyrophilic nucleolar organizer region of dorsolateral telencephalic neurons in goldfish. *Brain Res* 865:77-84.

Vervliet B, Vansteenwegen D, Eelen P. 2004. Generalization of extinguished skin conductance responding in human fear conditioning. *Learn Mem* 11:555-558.

Wagner T, Swierczynska Z, Stankiewicz C, Bujalska H, Kosowska E. 1981. A new model of experimental amyloidosis? *Z Rheumatol* 40:234-235.

Walker DL, Davis M. 1997. Double dissociation between the involvement of the bed nucleus of the stria terminalis and the

central nucleus of the amygdala in startle increases produced by conditioned versus unconditioned fear. *J Neurosci* 17:9375-9383.

Westerfield, M. 1995. *The Zebrafish Book: A Guide for Laboratory Use of the Zebrafish* (*Brachydanio Rerio*). University of Oregon Press.

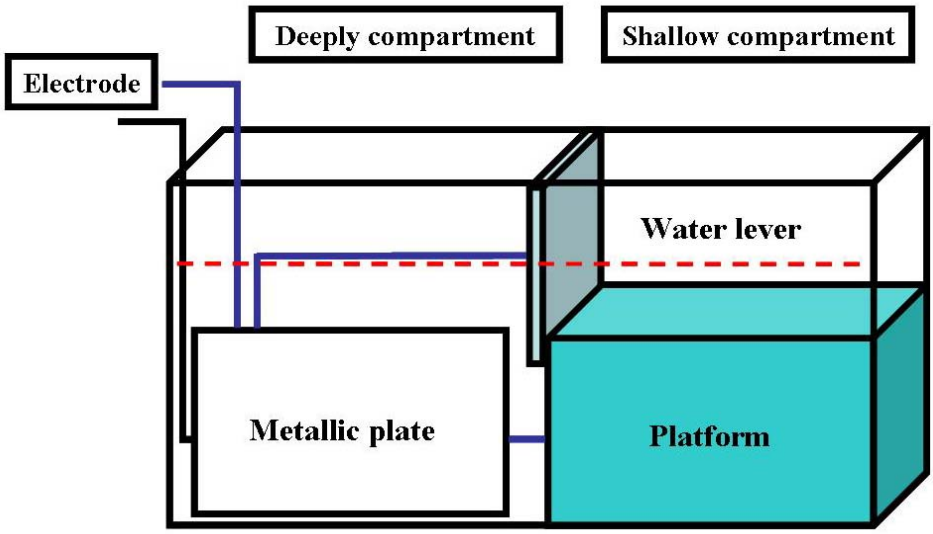
Whitmore D, Foulkes NS, Strahle U, Sassone-Corsi P. 1998. Zebrafish Clock rhythmic expression reveals independent peripheral circadian oscillators. *Nat Neurosci* 1:701-707.

Williams FE, White D, Messer WS. 2002. A simple spatial alternation task for assessing memory function in zebrafish. *Behav Processes* 58:125-132.

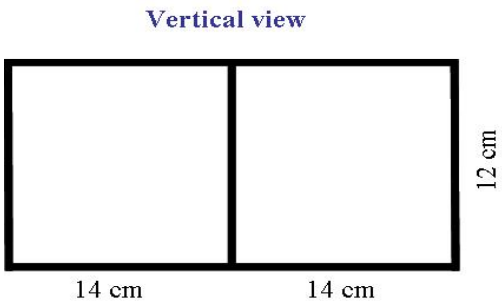
Xu X, Scott-Scheiern T, Kempker L, Simons K. 2007. Active avoidance conditioning in zebrafish (Danio rerio). *Neurobiol Learn Mem* 87:72-77.

捌、附圖/表

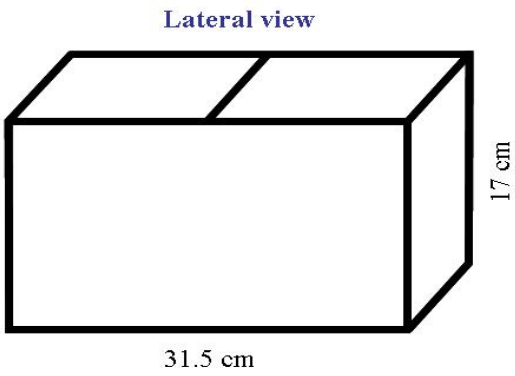
（A）



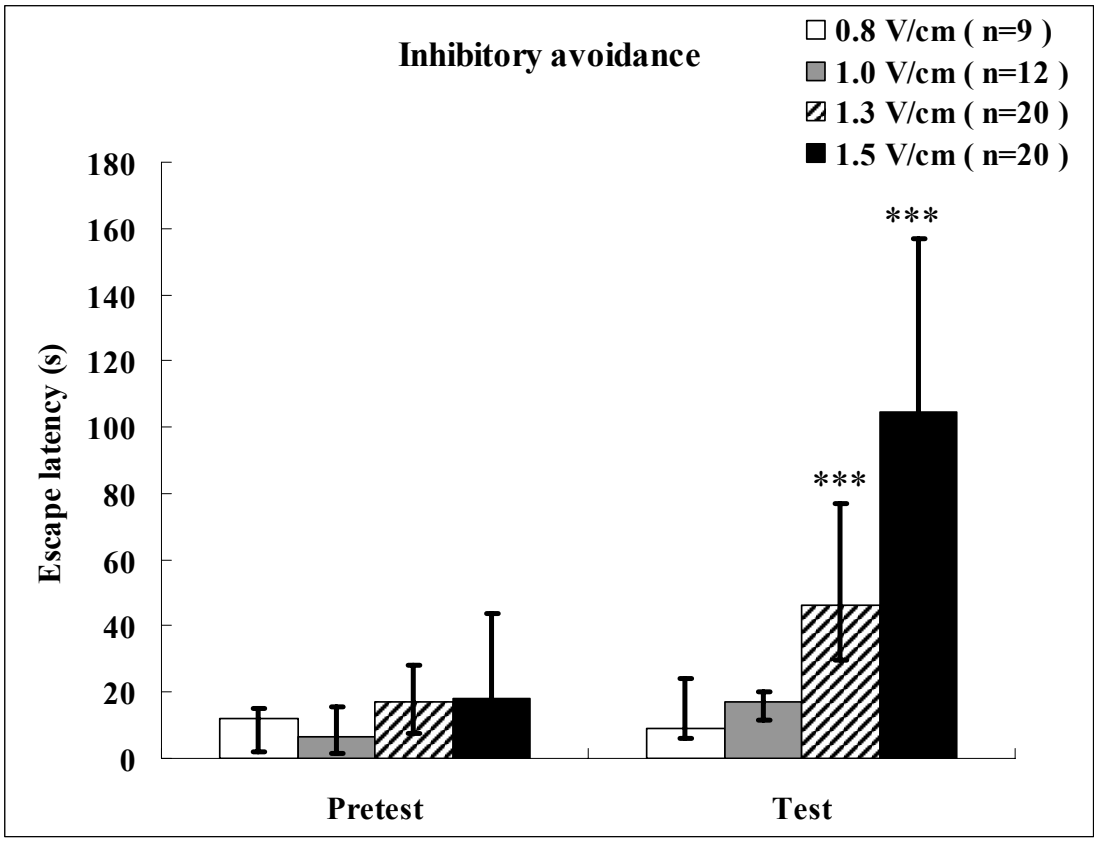
（B）



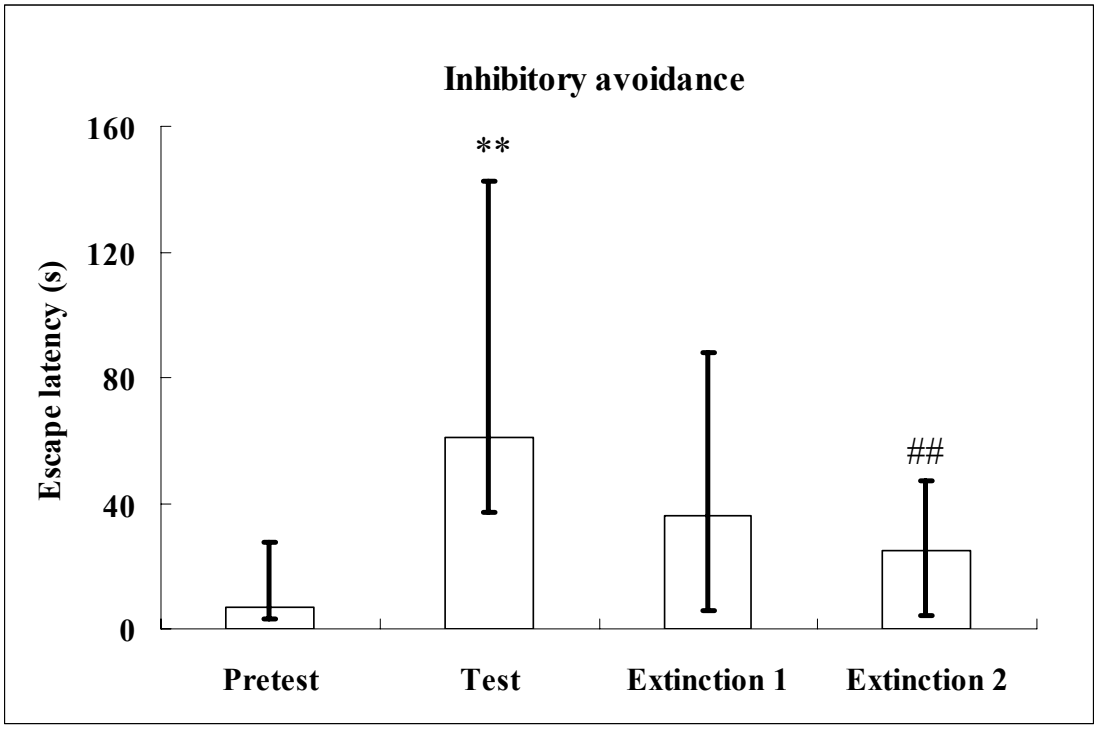
（C）



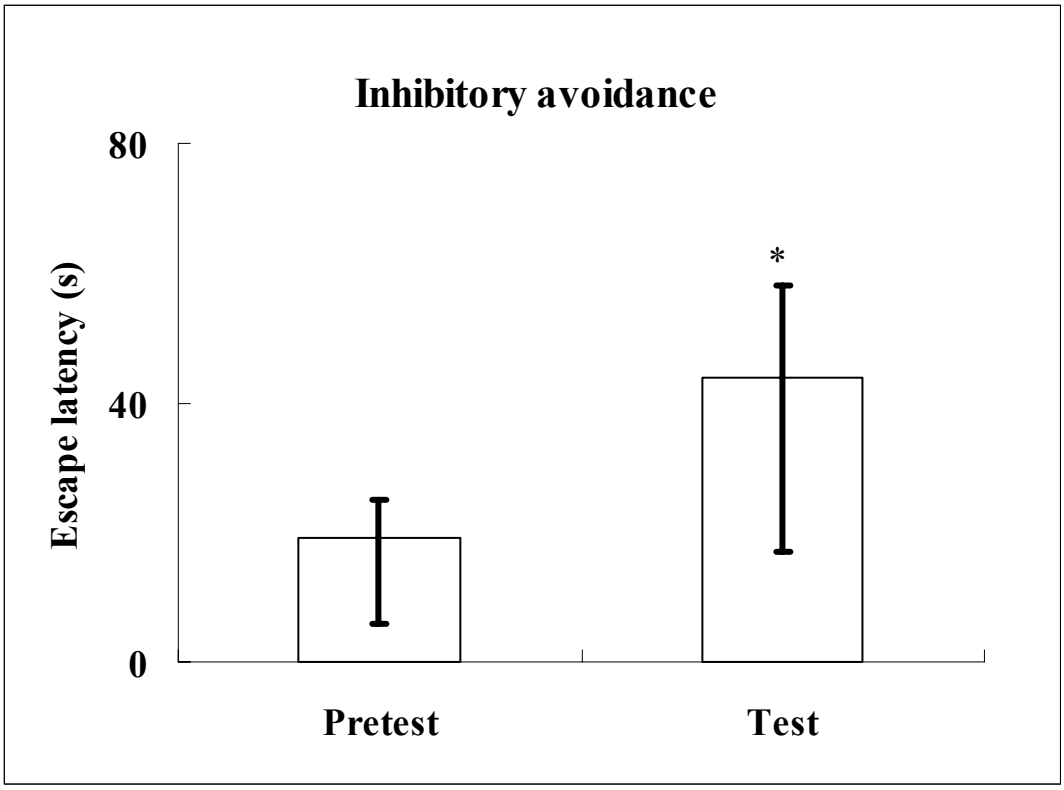
圖一、圖（**A**）為抑制性逃避行為箱（inhibitory avoidance apparatus）之結構組成分析圖；圖（**B**）為抑制性逃避行為箱俯瞰之實際比例圖；圖（**C**）為抑制性逃避行為箱側觀之實際比例圖。



圖二、圖為斑馬魚對不同刺激電擊強度的抑制性逃避行為反應，圖中所示之pretest 為斑馬魚訓練前所有個體在淺水區停留的時間之中位數，代表著斑馬魚對於深水區有偏愛性，所以在閘門打開後，很快地就會游進深水區，不會在淺水區停留太久。test 為訓練後 24 小時後的測試，在 1.3 V/cm以上的刺激強度之所有個體在淺水區停留的時間呈現顯著的上升，而 1.3 V/cm以下的刺激強度之所有個體在淺水區停留的時間並無顯著的改變。(圖中數值以median ± quartiles方式表示，***, $p < 0.001$)(Wilcoxon signed-rank test)

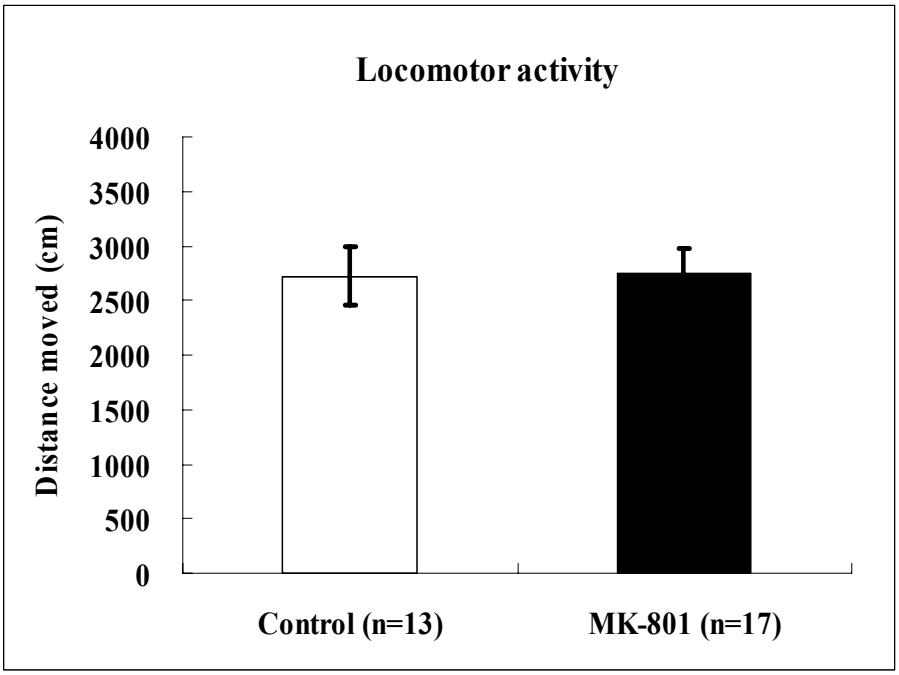


圖三、圖為斑馬魚在不同學習階段之抑制性逃避行為反應，圖中所示之extinction 1 為test後 24 小時後的測試，而在test階段當斑馬魚進入到深水區，讓其停留在深水區 5 分鐘之後再放回原飼養魚缸，extinction 2 為extinction 1 後 24 小時後的測試，而在extinction 1 階段以跟上述test之處理相同之後再放回原飼養魚缸，而在經過兩次連續情境的暴露後，所有個體在淺水區停留的時間呈現顯著的下降。（圖中數值以median ± quartiles方式表示，；**, $p < 0.01$，與pretest比較； ##, $p < 0.01$，與test比較，n=13）（Wilcoxon signed-rank test）

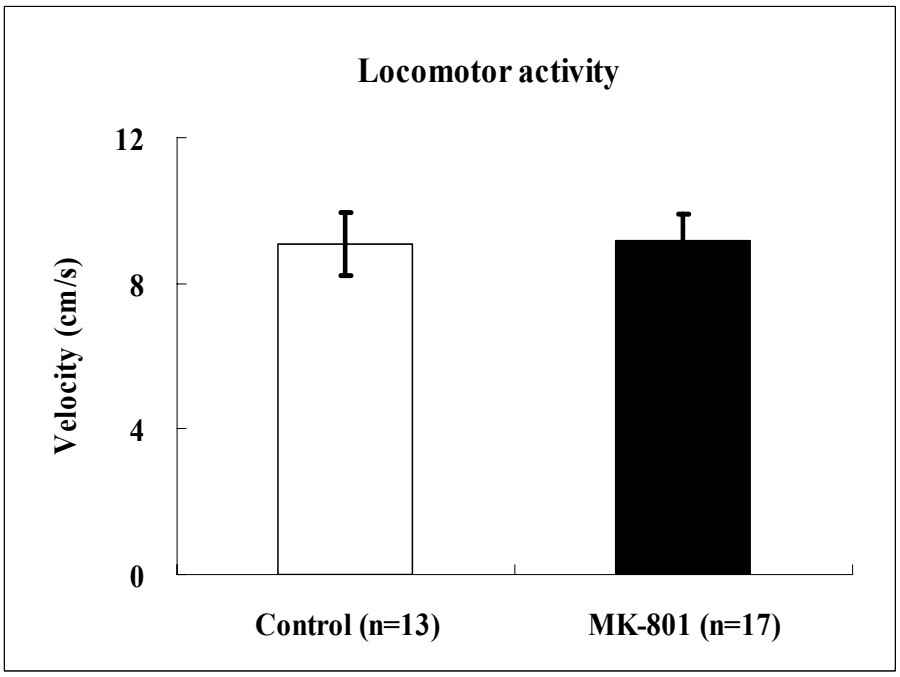


圖四、圖為斑馬魚在訓練後七天之抑制性逃避行為反應，由結果顯示，即使在訓練後七天，所有個體在淺水區停留的時間呈現顯著的上升。（圖中數值以median ± quartiles方式表示，*, $p < 0.05$）（Wilcoxon signed-rank test）

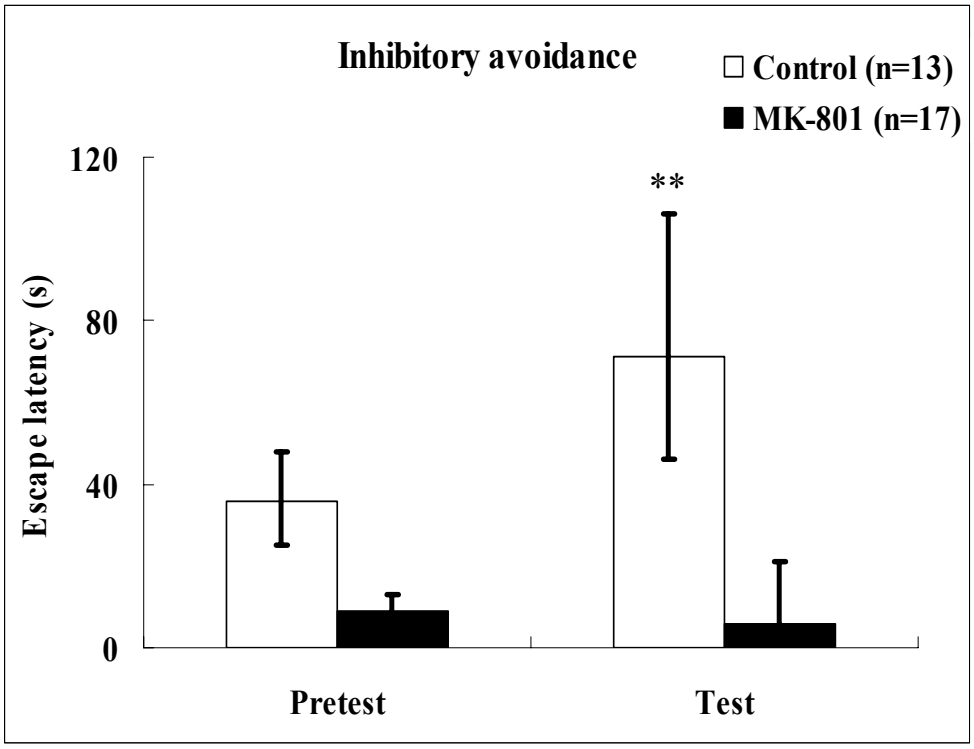
（A）



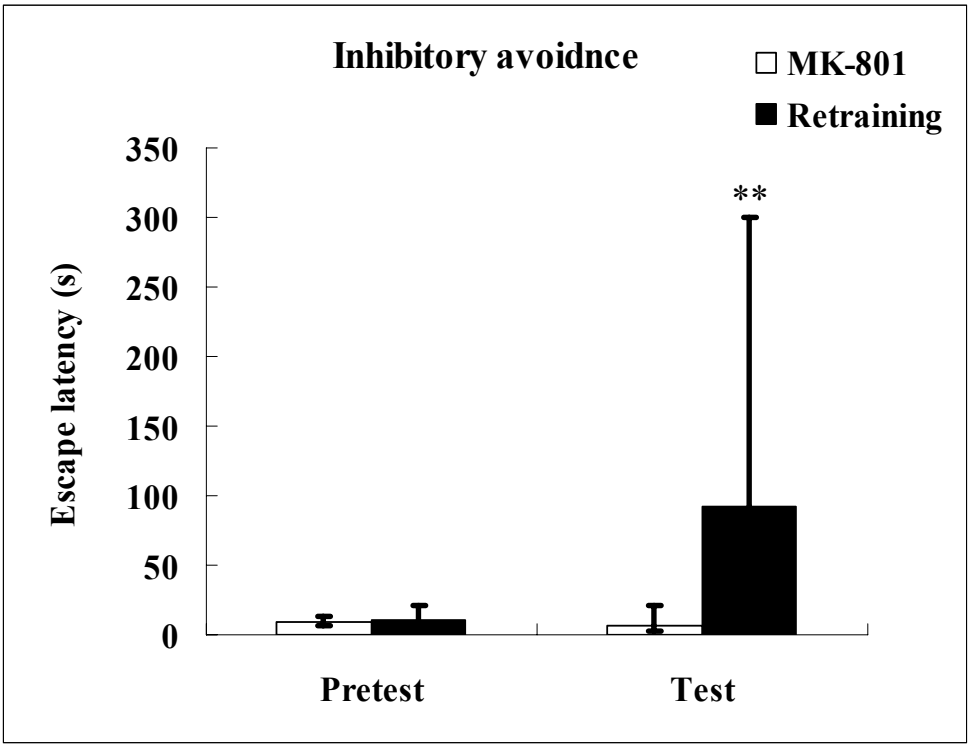
（B）



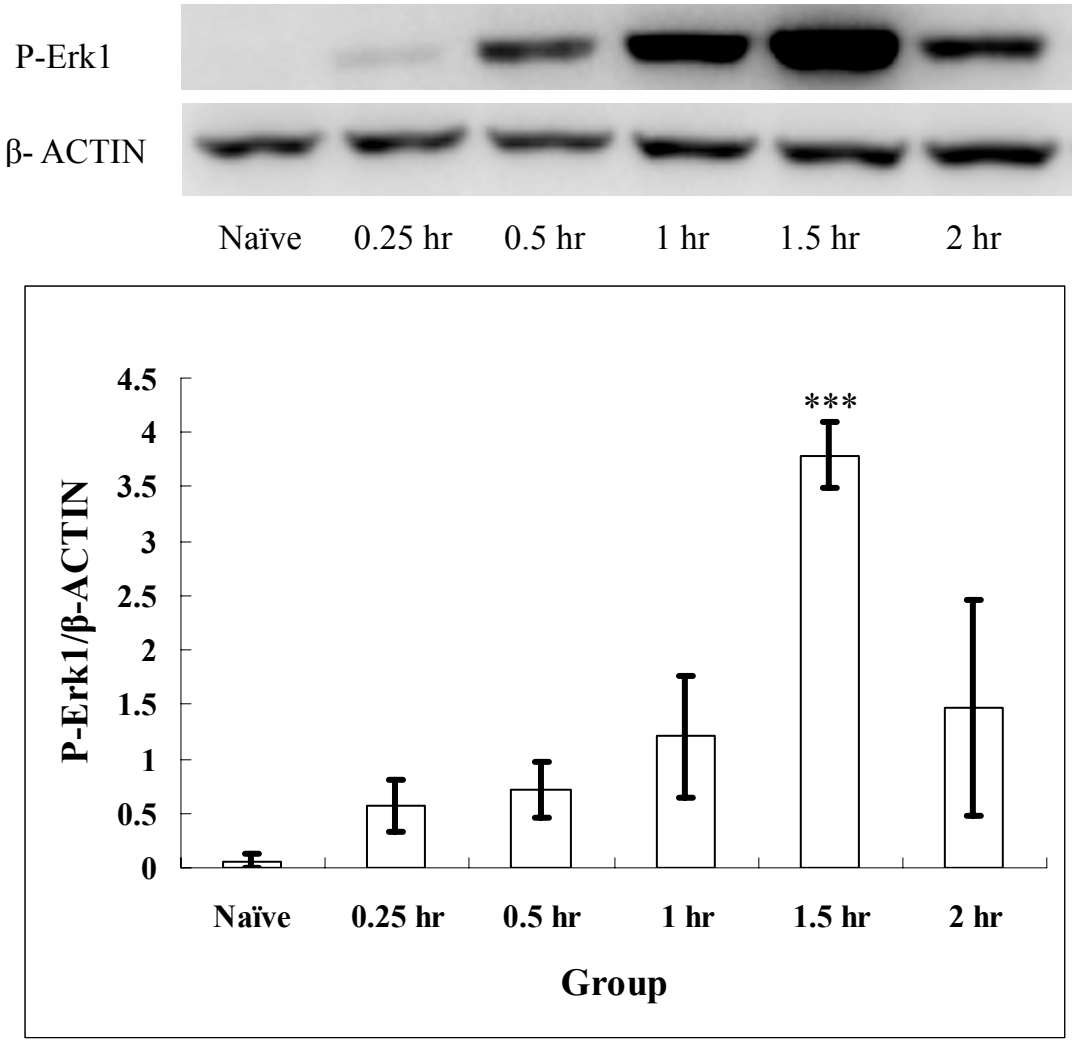
圖五、圖為實驗（四）中兩組別的所有個體的自發性探索行為表現情況，藉以瞭解其基本運動能力。（a）為distance moved（b）為velocity；各組之間在distance moved和velocity上並沒有任何顯著差異。（圖中數值以mean ± SEM方式表示）（ANOVA）



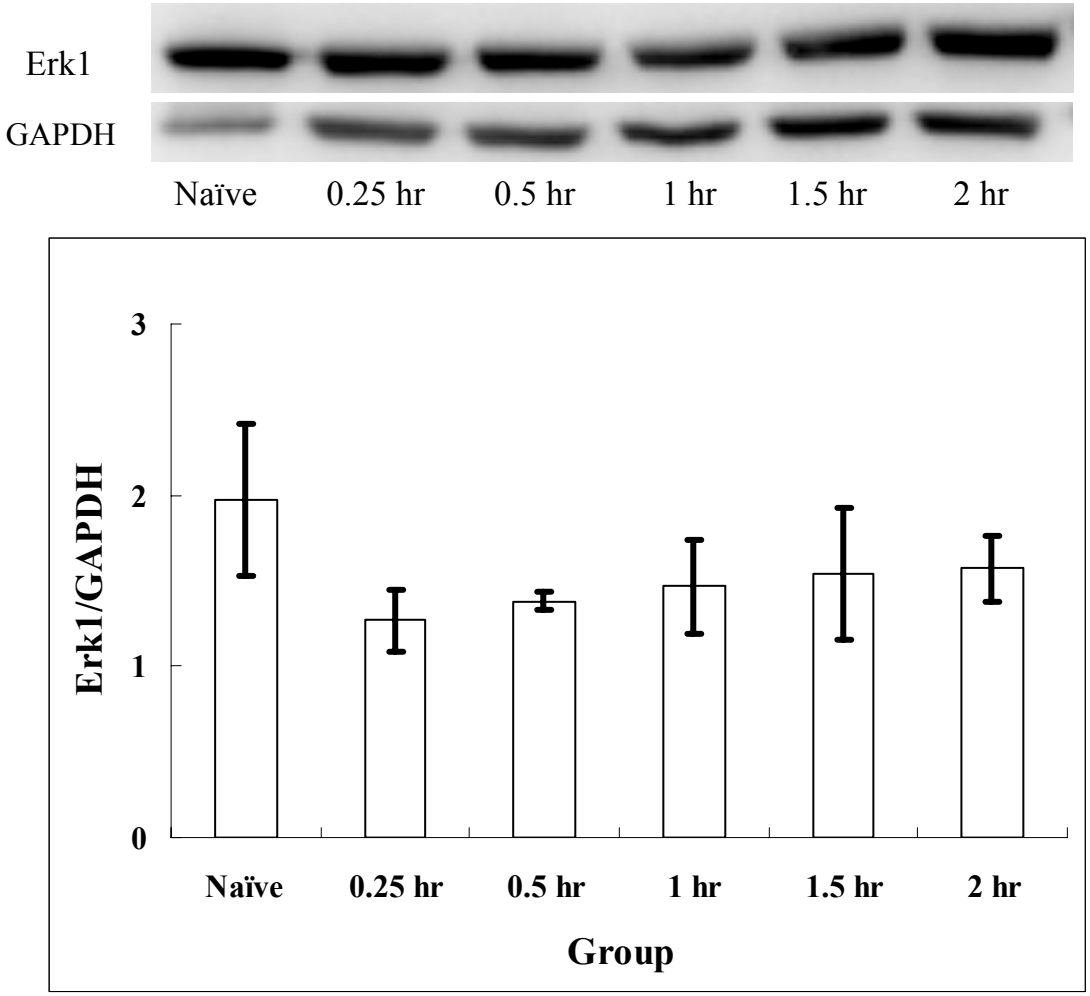
圖六、圖為實驗（四）兩組在條件化恐懼學習的表現結果。此實驗分別為對照組和浸泡過NMDA receptor antagonist MK-801（20 μM）組。浸泡NMDA receptor antagonist MK-801（20 μM），將可以阻斷斑馬魚的條件化恐懼學習。（圖中數值以median ± quartiles方式表示；**, $p < 0.01$，與control組中pretest比較）（Mann-Whitney U test & Wilcoxon signed-rank test）



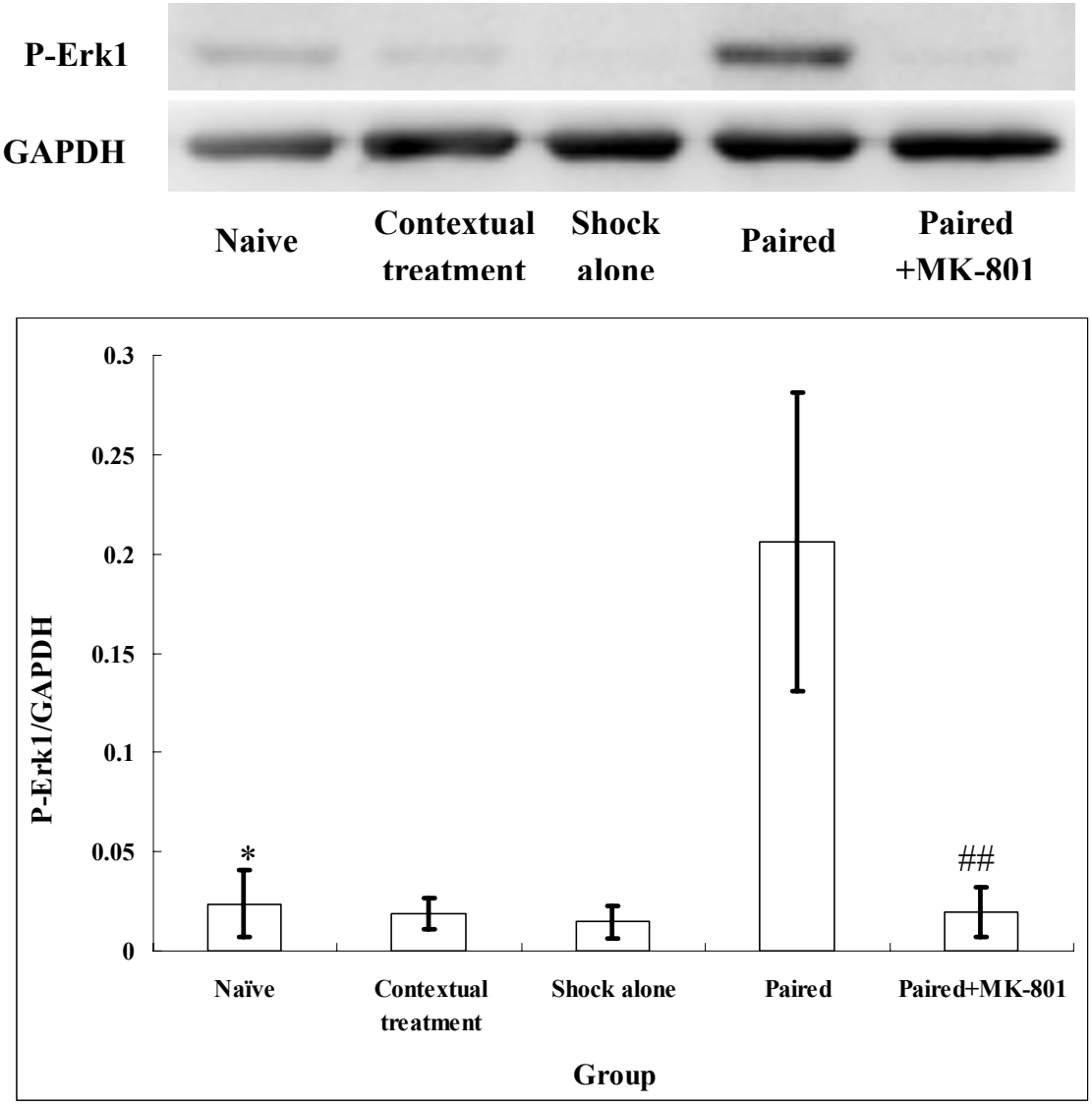
圖七、圖為浸泡過NMDA receptor antagonist MK-801（20 μM）組在條件化恐懼學習後，相隔一週後再次條件化恐懼訓練之結果。斑馬魚條件化恐懼學習之阻斷效果消失，恢復條件化恐懼學習之能力。（圖中數值以median ± quartiles方式表示，**, $p < 0.01$）（Wilcoxon signed-rank test）



圖八、圖為在進行完條件化恐懼訓練後分別在 15 分鐘、0.5 小時、1 小時、1.5 小時以及 2 小時犧牲取端腦，斑馬魚端腦內磷酸化MAPK蛋白質在不同犧牲時間點之表現量。磷酸化Erk1 蛋白質在端腦中的表現量隨著時間呈現增加的現象，而在條件化恐懼訓練後 1.5 小時，磷酸化MAPK蛋白質在端腦中的表現量相較於Naïve組有明顯的增加。（圖中數值以mean ± SEM方式表示；***, $p < 0.001$，與Naïve比較，各組別n = 3）（Student's t test）



圖九、圖為在進行完條件化恐懼訓練後分別在 0.25 小時、0.5 小時、1 小時、1.5 小時以及 2 小時犧牲取端腦，斑馬魚端腦內MAPK蛋白質在不同犧牲時間點之表現量。Erk1 蛋白質在端腦中的總量隨著不同犧牲時間並沒有明顯的改變。（圖中數值以mean ± SEM方式表示，各組別n = 3）（ANOVA）



圖十、圖為在進行不同處理後 1.5 小時犧牲取端腦，斑馬魚端腦內磷酸化MAPK蛋白質在不同處理之表現量。相較其他處理組別，經過條件化恐懼學習的斑馬魚端腦中磷酸化Erk1 蛋白質的表現量有明顯的增加。（圖中數值以mean ± SEM方式表示；*, $p < 0.05$，與paired比較；##, $p < 0.01$，與paired比較，各組別n = 5）（Student's t test）