

行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告

Preparation of NSC Project Reports

計畫編號：NSC 91-2320-B-040-021

執行期限：91 年 8 月 1 日至 92 年 7 月 31 日

主持人：楊琇雯 中山醫學大學生命科學系

共同主持人：閔明源 中國醫藥學院生理學科

計畫參與人員：許珮蓓 中國醫藥學院生理學科

一、中文摘要

三叉神經運動神經元有接受來自 A5、A7 區域 noradrenergic neurons 的投射。並且 noradrenergic neurons 會藉由不同之 noradrenergic receptor subtype 對節率性咀嚼運動產生不同的調節作用。因此，我們以西方墨點法、免疫組織化學染色，觀察並比較出生後第 0 天(postnatal 0; P0)、P5、P10、P15、P20、P30 和成熟的大白鼠(P60) 其組織內 noradrenaline 的表現量和 A7、A5 noradrenergic neurons 的細胞型態變化，以及 noradrenergic fibers 在三叉神經運動神經核的分佈情形及超微結構之特性。以西方墨點法分析發現，由 P0 至 P10 noradrenaline 含量漸增，而 P10 至 P20 則無統計上明顯差異，由 P20 至成鼠則是呈現 noradrenaline 含量漸增的趨勢。光學免疫組織化學染色觀察發現，A7 和 A5 group 之細胞面積大小在 P0 至 P5 時有些微增加的趨勢，而 P5 至 P10 時則有很明顯的增加細胞的大小，但於 P10 之後到成鼠之間，細胞則維持相似的大小無太大差異。

此外，進一步觀察在三叉神經運動核內呈現 anti-DBH 免疫陽性反應之 noradrenergic fibers 的密度分析顯示，在 P0 至 P20 之間會隨著出生後日齡增加 noradrenergic fibers 的密度亦會隨之增加。而在 P20 之後至成鼠的時期中，則 fibers 密度有些微下降的趨勢。由以上結果得知，A7 和 A5 之 noradrenergic 細胞於出生後第 2 週，無論是細胞本體或神經纖維之密度，都以達到與成熟大白鼠之量。

關鍵詞： 三叉神經運動神經核、noradrenalin、A7、A5、rat

二、前言與實驗目的

三叉神經運動神經核(trigeminal motor nucleus)位於中樞神經系統(central nervous system; CNS)中，橋腦下蓋(tegmentum of pons)靠近於主司感覺的三叉神經核(trigeminal nucleus)的內側(Travers, 1995)。它主要含有可支配控制下頷關節(jaw)肌肉的運動神經元(motoneuron)之細胞本體，如下頷關節閉合肌肉(jaw closing muscle)，包括有 masseters, medial pterygoid, 與 temporalis 等肌肉，以及下頷關節開啟肌肉(jaw opening muscle)，包括有 anterior digastric 與 mylohyoid 等肌肉

(Limwongse and DeSantis, 1977)。如同其他的運動系統，特別是支配下頷關節閉合肌肉的運動神經元，主要接受神經細胞本體位於三叉神經中腦核(trigeminal mesencephalic nucleus)的 Ia 輸入神經纖維(Appenteng et al., 1978; Appenteng et al., 1985)，亦即來自於支配肌梭(muscle spindle)的神經纖維的興奮性輸入(excitatory input)，而口腔的反射動作正是透過此一傳導路徑完成。同時為了達到協調的運動機能，運動神經元也必須接受來自於其背-後側(dorsal-caudal)的中間神經元的控制。許多中間神經元均具有放射節率性動作電位的特性，因此許多學者建議它們也能傳遞一些由中樞皮質發出的節率性咀嚼運動(rhythmical jaw movements; RJMs)的指令到運動神經元(Langrend et al., 1986; Nozaki et al., 1986; Donga, 1999)。

三叉神經運動神經元另外有接受來自 A5、A7 區域 noradrenergic neurons 的投射(Grzanna et al., 1987; Vornov and Sutin, 1983)。並且 noradrenergic neurons 會藉由不同之 noradrenergic receptor subtype 對節率性咀嚼運動產生不同的調節作用(Kogo et al., 2000)。

因此我們有興趣去觀察比較在發育的各時期當中，noradrenaline 的表現量和 A7、A5 noradrenergic neurons 的細胞型態變化，以及 noradrenergic fibers 在三叉神經運動神經核的分佈情形及超微結構之特性，藉此以使我們對於三叉神經運動神經核的神經調控有更進一步的認識。

三、實驗方法

(一)西方墨點法：

分別將出生後第 0 天(postnatal 0; P0)、P10、P20、和成熟的大白鼠(P60)的腦幹(brain stem)取出、均質、離心後取得上清液。以 BCA (bi-cinchoninic acid) protein assay 分析出上清液中蛋白質含量。將固定量之蛋白質以 SDS- PAGE 進行電泳分離後轉漬於 NC membrane 上。以 mouse anti DBH(dopamine-beta-hydroxylase, Chemicon)之抗體進行免疫化學染色，最後以 ECL reagent 使反應結果以冷光方式呈現，再以自動射線照相術(autoradiography)測量冷光之強度。

(二) 免疫組織化學染色-光學：

分別將出生後第 0 天(postnatal 0; P0)、P5、P10、P15、P20、P30 和成熟的大白鼠(P60)之大白鼠分別經 4% paraformaldehyde 固定灌流後，以冷凍切片機將腦幹組織以縱向切的方式，切成 50 μm 的組織切片，並且在解剖顯微鏡下將含有三叉神經運動神經核及周圍區域的切片選取出來。以 mouse anti DBH 之抗體進行免疫組織化學染色，再以 DAB(3,3-diaminobenzidine)進行成色。並且於光學顯微鏡觀察對 DBH 呈現陽性反應之 noradrenergic neurons 及三叉神經運動神經核中 noradrenergic fibers 的分布。

(三) 免疫組織化學染色-電顯：

分別將出生後 P5、P15、P30 和成熟的大白鼠(P60)之大白鼠經 3% glutaraldehyde + 0.2% sodium matabisulfide 固定灌流後，以震盪切片機將腦幹組織以縱向切的方式，切成 80 μm 的組織切片，並且在解剖顯微鏡下將含有三叉神經運動神經核及周圍區域的切片選取出來。腦組織切片以 mouse anti DBH 之抗體進行免疫組織化學染色，最後以 DAB(3,3 -diaminobenzidine)進行成色。再以 1% 鐵酸(osmium,OsO₄)進行後固定，經連續酒精脫水後，平板包埋於 Durcupan 樹脂中。

(四) Noradrenergic fibers 密度分析：

不同出生後日齡的大白鼠，分別於其每個經免疫化學組織染色後的腦組織切片中選取出三個切片，選取出的每個切片再將其三叉神經運動神經核的區域劃分為 9 個區塊，以隨機選取的方式於 9 個區塊中選出 3 個區塊，每個選取出的三叉神經運動神經核區塊上分別畫上垂直線與水平線各 10 條，之後去計數三叉神經運動神經中 noradrenergic fibers，藉此來分析 fibers 的分佈密度及 fibers 的神經走向。

四、結果與討論

(一) 西方墨點分析：

經由 DBH 的蛋白質分析結果顯示(圖一 A)，在發育過程中，noradrenaline 之含量會隨出生後日數增加而有增加的趨勢。由 P0 至 P10，noradrenaline 含量漸增，而 P10 至 P20 則無統計上明顯差異，由 P20 至成鼠則是呈現 noradrenaline 含量漸增的趨勢(圖一 B)。

(二) 免疫組織化學染色：

於光學顯微鏡下觀察顯示，三叉神經運動神經核其前側的 A7 noradrenergic cells 及前-腹側的 A5 noradrenergic cells 均有對 anti-DBH 呈現免疫陽性反應(圖二)。另外，觀察出生後不同時期的 A7 和 A5 group 之細胞型態顯示，細胞面積大小在 P0 至 P5 時有些微增加的趨勢，而 P5 至 P10 時則有很明顯的增加細胞的大小，但於 P10 之後到成鼠之間，細胞則維持相似的大小無太大差異(圖三)。

此外，進一步觀察在三叉神經運動核內呈現 anti-DBH 免疫陽性反應之 noradrenergic fibers 的密度分析顯示，在 P0 至 P20 之間會隨著出生後日齡增加 noradrenergic fibers 的密度亦會隨之增加。而在 P20 之後至成鼠的時期中，則 fibers 密度有些微下降的趨勢(圖四、五)。於發育過程的各個時期中，水平線(horizontal)

所計數之 fibers 密度皆較垂直線(vertical)的密度高,藉此可以推知 noradrenergic fibers 於三叉神經運動核中的神經走向應該是以水平(horizontal)走向多於垂直(vertical)走向(圖五)。

於西方墨點分析顯示對 DBH 呈陽性反應之蛋白質密度以成鼠為最高,然而對照至免疫化學染色對 DBH 呈陽性反應之 noradrenergic fibers 的密度則是以 P15~P20 為最高,此非一致性的結果是因為西方墨點分析所取的實驗樣本為整各腦幹部分,其中亦包含了 A7 或 A5 以外的 noradrenergic neurons (例如腦中最大的 noradrenalin 來源 — Locus coeruleus)

,因此可能因為其他來源之 noradrenergic cell groups 於發育過程中的變化而導致蛋白質密度分析與免疫染色之 fibers 密度分析的結果有出入。

在觀察到 P0-P20 之大白鼠其三叉神經運動核中 noradrenergic fiber density 有逐漸增加的趨勢,而 P20 之後至成鼠的時期中,則 fibers 密度有些微下降的趨勢。此項結果與 Rinama (2001)觀察下視丘 paraventricular nucleus 中 noradrenergic fiber density 之發育情形相符合。

四、計畫成果自評

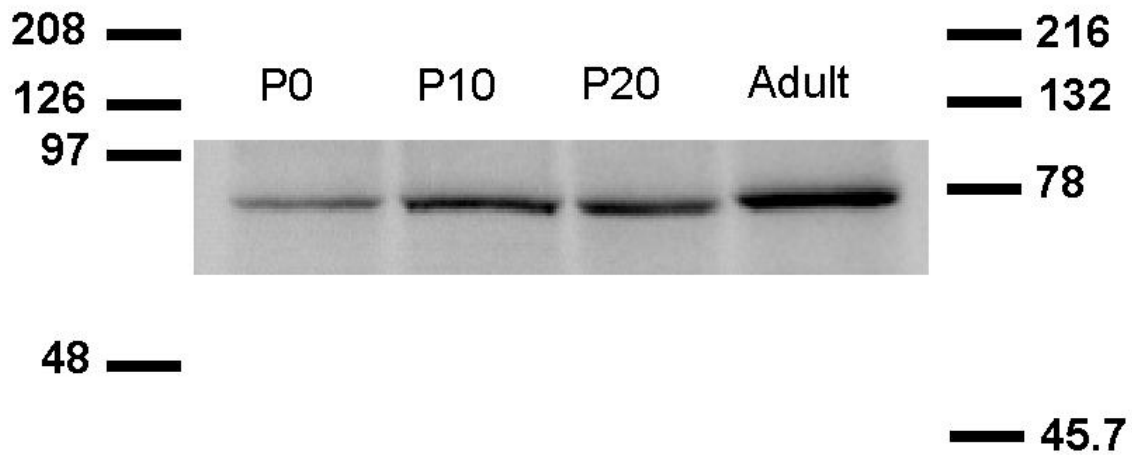
結至目前為止,我們已完成西方墨點分析、免疫組織化學染色-光學分析。另外,我們將進一步利用電子顯微鏡技術來觀察這些三叉神經運動核中之 noradrenergic fibers 的超微結構(圖六),以進一步探討以下問題:這些 fibers 是否會與三叉神經運動核內之運動神經元形成突觸?若有形成突觸則其型態為何?在出生後不同日齡間其超微結構有何改變?相信在不久的將來,我們即可著手進行論文的撰寫。

五、參考文獻

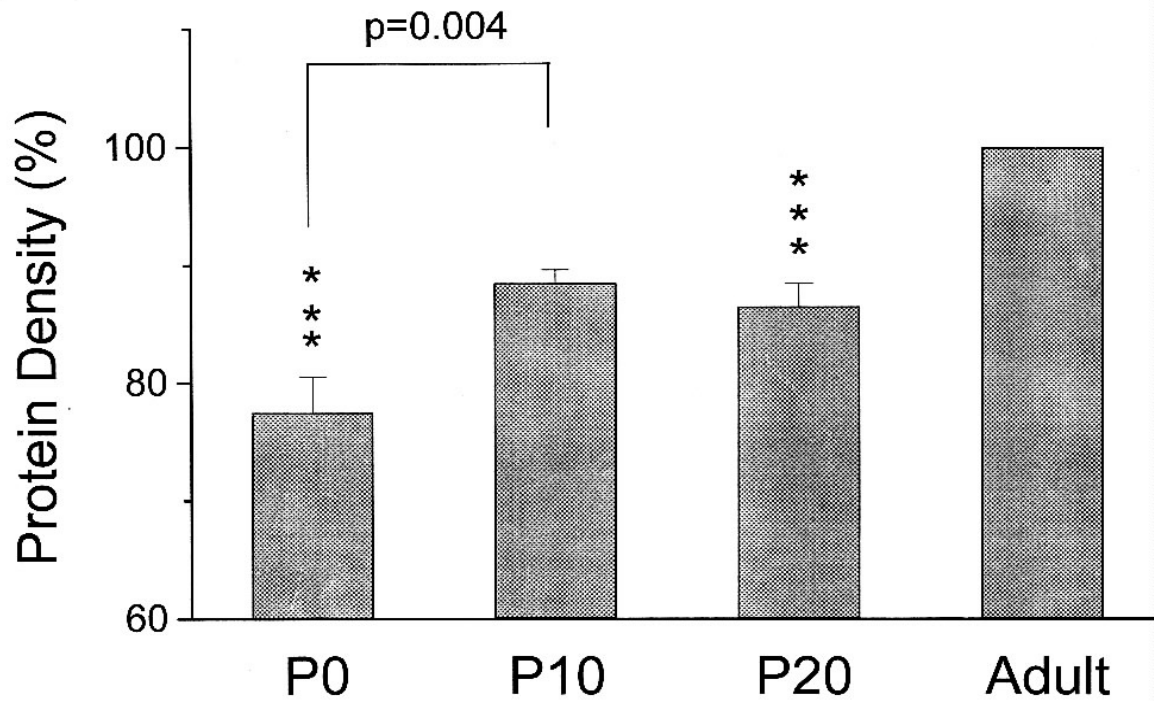
- (1) Appenteng, K., and Girdlestone, D. (1987). *J. Comp. Neurol.* **258**, 387-396.
- (2) Appenteng, K., Curtis, J.C., Grimwood, P.D., Min, M.-Y., and Yang, H.-W. (1995). In "Alpha and Gamma Motor System" (A. Taylor, M.H. Gladden, and Durbaba, Eds.), pp.29-36. Plenum Press, New York.
- (3) Appenteng, K., Donga, R., and Williams, R.G. (1985). *J. Physiol.* **369**, 93-113.
- (4) Appenteng, K., O'donovan, M.J., Somjen, G., Stephens, J.A., and Taylor, A. (1978). *J. Physiol.* **279**, 409-423.
- (5) Curtis, J.C., and Appenteng, K. (1993). *J. Physiol.* **465**, 85-119.
- (6) Grimwood, P.D., Appenteng, K., and Curtis, J.C. (1992). *J. Physiol.* **455**, 641-662.
- (7) Grzanna, R., Chee, W.K., Akeyson, E.W. (1987). *J. Comp. Neurol.* **263**, 79-91
- (8) Kogo, M., Mori, A., Koizumi, H., Ishihama, K., Iida, S., Tanka, S., Matsuya, T. (2000). *Brain Res.* **53(2)**, 171-174

- (9) Landgren, S., Olsson, K.A., and Westberg, K.G. (1986). *Exp. Brain Res.* **65**, 98-111.
- (10) Limwonges, V., and Detantis, M. (1997). *Am. J. Anat.* **149**, 477-488.
- (11) Min, M.-Y., Appenteng, K.A., and Yang, H.-W. (2002). *J. Biomed. Sci.* 9(4), 348-358.
- (12) Mizuno, N., Yukihiro, Y., Nomura, S., Itoh, K., Tkada, M., and Kudo, M. (1983). *J. Comp. Neurol.* **215**, 290-298.
- (13) Redman, S. (1990). *Physiol. Rev.* **70**, 165-198.
- (14) Rinaman, L. (2001). *J. Comp. Neurol.* **438**, 411-422
- (15) Vornov, J.J., Sutin, J. (1983). *J. Comp. Neurol.* **214**, 198-208
- (16) Yang, H.-W., Appenteng, K., and Batten, T.F.C. (1997a). *Exp. Brain Res.* **114**, 99-116.
- (17) Yang, H.-W., Min, M.-Y., Appenteng, K., and Batten, T.F.C. (1997b). *Brain Res.* **749**, 301-31

A



B

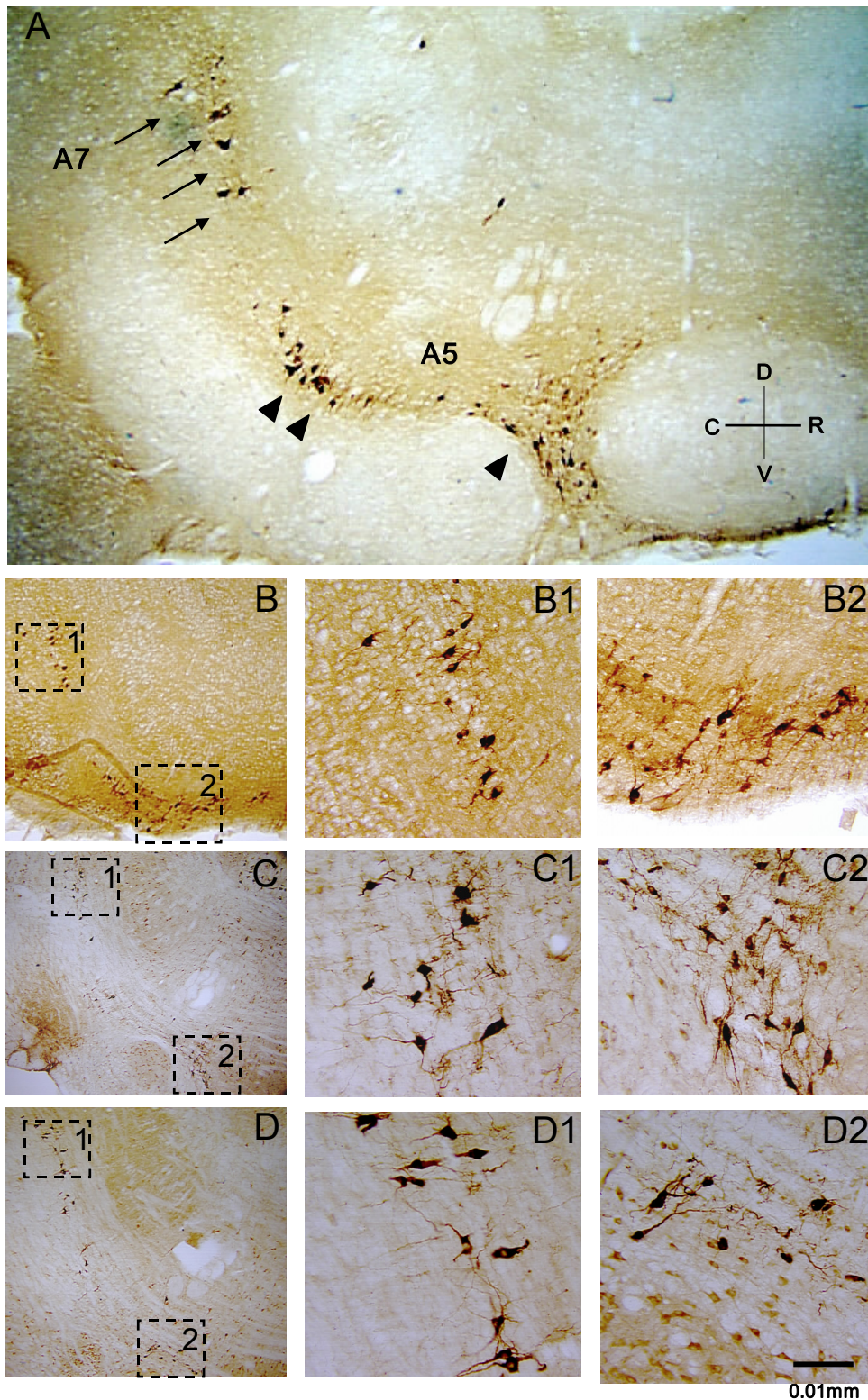


圖一：

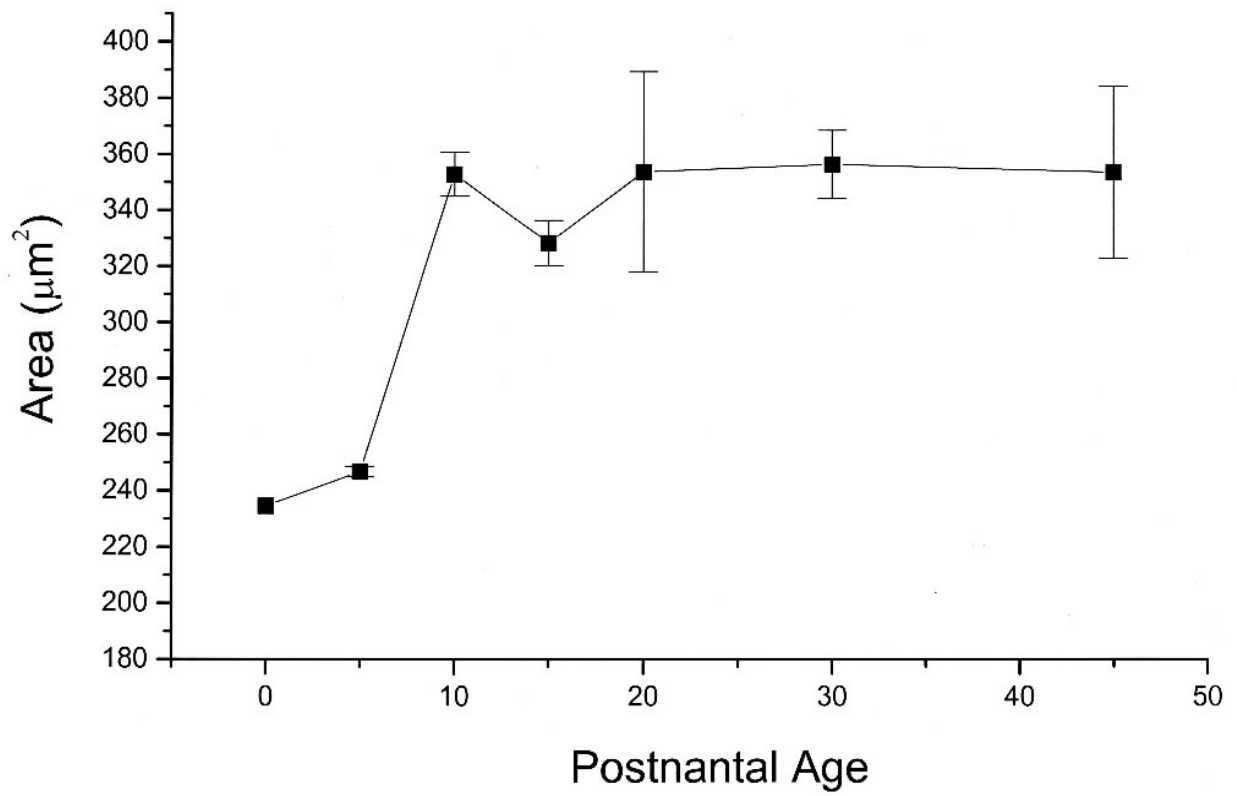
(A) 西方墨點分析腦幹組織中對 anti-DBH 具專一性之蛋白質密度分析。DBH 分子量為 70~75 KDa。

(B) 西方墨點分析腦幹組織中對 anti-DBH 具專一性之蛋白質密度量畫圖。

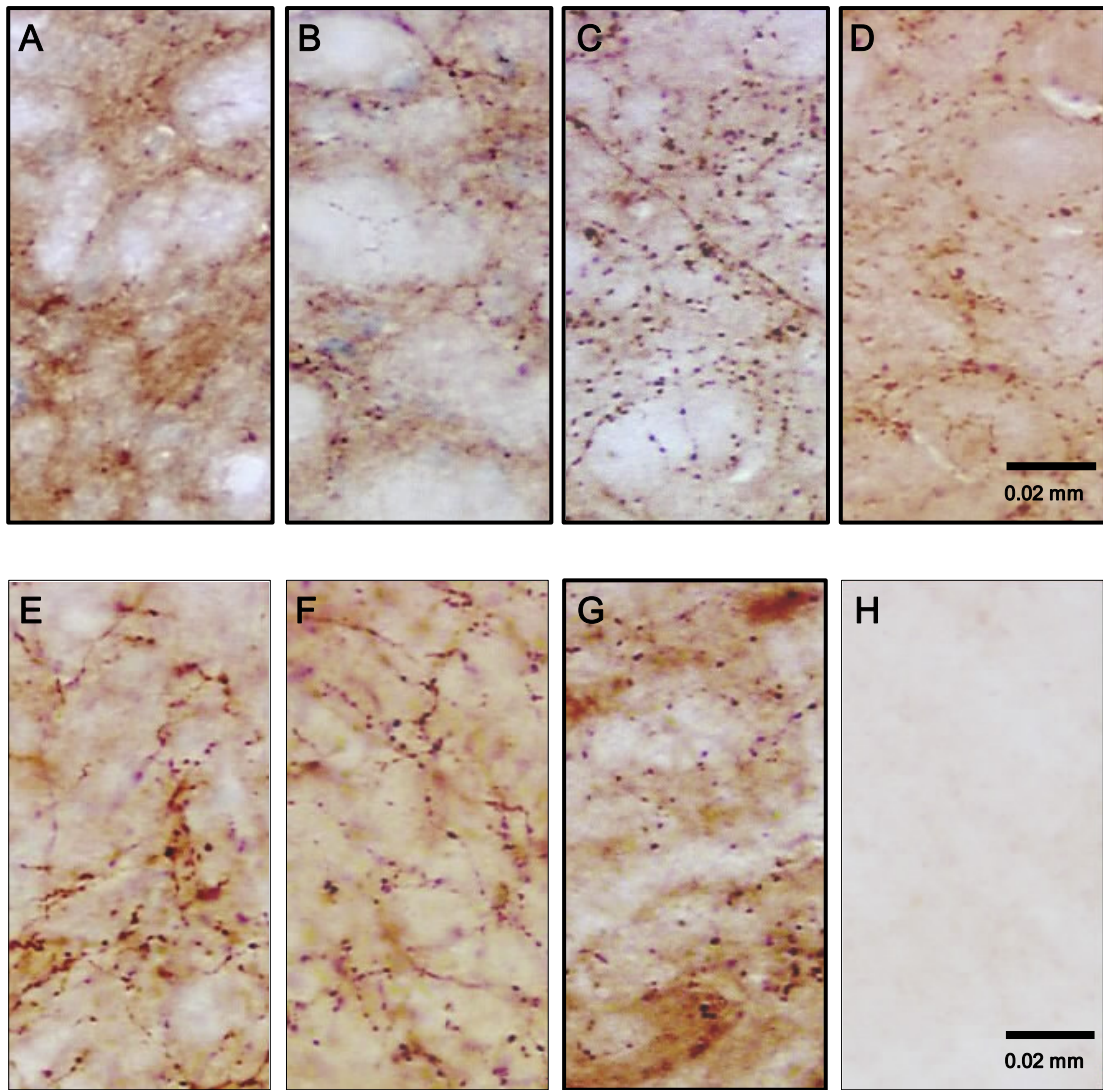
*** $p < 0.001$ (compared to adult); $P = 0.004$ (compared to P0)。



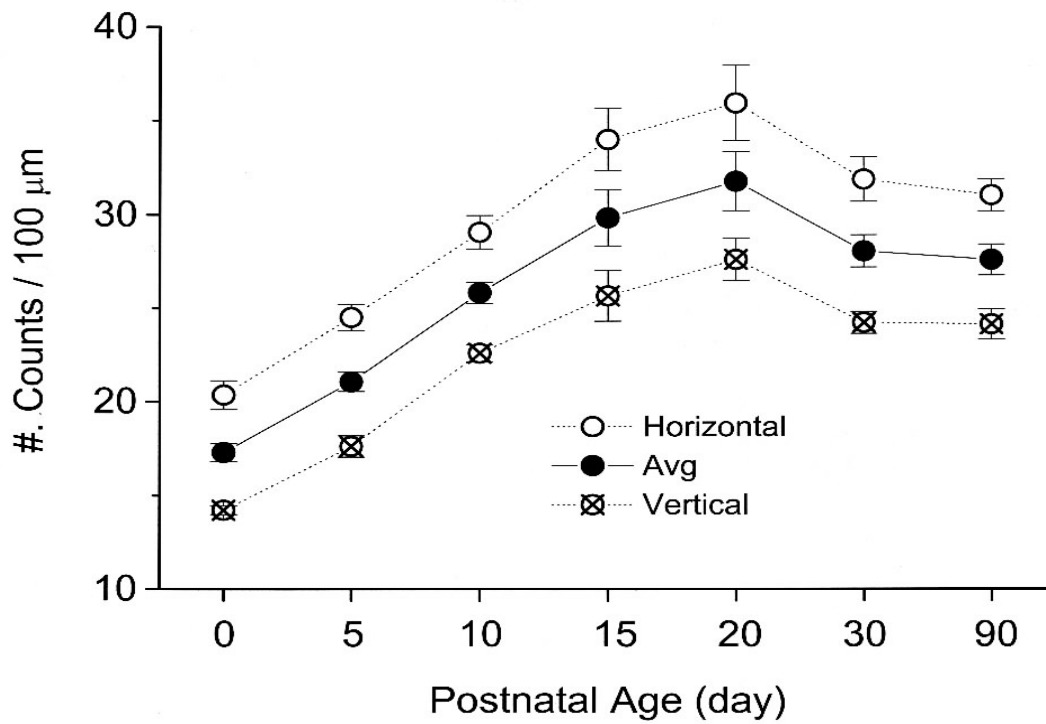
圖二：三叉神經運動神經核其前側的 A7 noradrenergic cells 及腹側的 A5 noradrenergic cells 對 anti-DBH 呈現免疫陽性反應之 noradrenergic neurons 的分佈情形。A:P10; 箭號為 A7 noradrenergic cells ; 箭頭為 A5 noradrenergic cells 。 B:P0; C:P20; D:Adult 。 C:caudal; R:rostral; D:dorsal; V:ventral. scale bar = 0.01mm (B, C, D)。



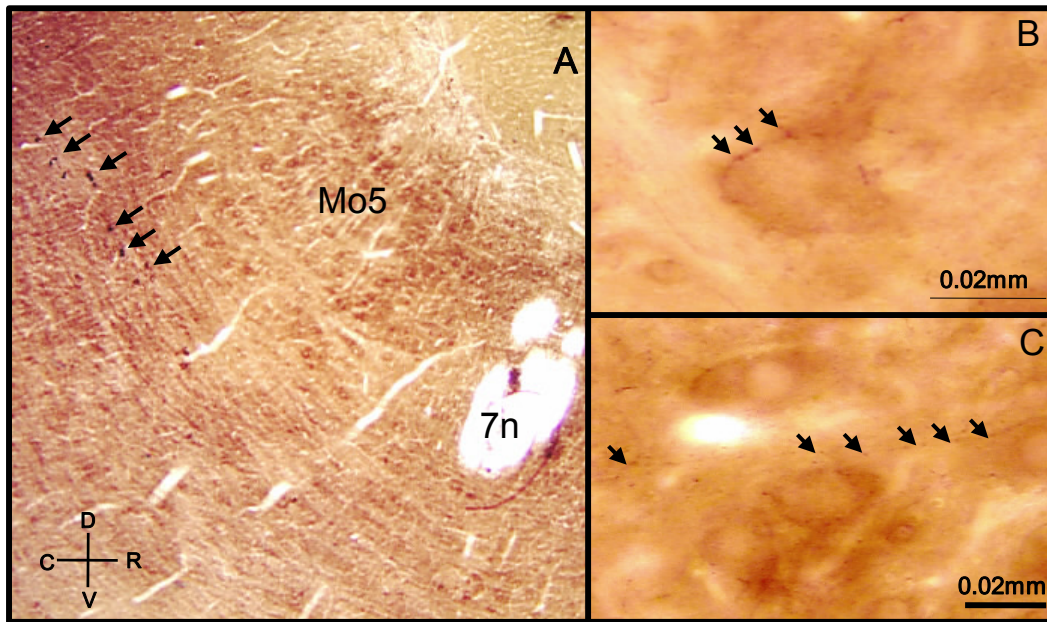
圖三：三叉神經運動神經核其前側的 A7 noradrenergic cells 及腹側的 A5 noradrenergic cells 於出生後不同日齡，其細胞大小之變化。



圖四：三叉神經運動核內呈現 anti-DBH 免疫陽性反應之 noradrenergic fibers 的型態變化。A:P0; B:P5; C:P10; D:P15; E:P20; F:P30; G:Adult; H:control ;scale bar = 0.02mm。



圖五：三叉神經運動核內呈現 anti-DBH 免疫陽性反應之 noradrenergic fibers 的密度分析。在 P0 至 P20 之間會隨著出生後日齡增加 noradrenergic fibers 的密度亦會隨之增加。而在 P20 之後至成鼠的時期中，則 fibers 密度有些微下降的趨勢。於發育過程的各個時期中，水平線(horizontal)所計數之 fibers 密度皆較垂直線(vertical)的密度高。



圖六：以電子顯微鏡技術來觀察這些三叉神經運動核中之 noradrenergic fibers 的超微結構。圖 A 為經 Durcupan 樹脂平板包埋後之腦幹之切片，箭頭所指即為 A7 group noradrenergic cells。圖 B、C 為三叉神經運動核內 noradrenergic fiber 之神經投射，箭頭所指即為 noradrenergic varicosities。MO5; trigeminal motor nucleus, 7n; 7th nerve. scale bar = 0.02mm