

行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

大白鼠三叉神經運動系統之局部神經迴路結構研究(3/3)

計畫類別：個別型計畫

計畫編號：NSC92-2320-B-040-019-

執行期間：92年08月01日至93年07月31日

執行單位：中山醫學大學生命科學系

計畫主持人：楊琇雯

計畫參與人員：許珮蒨

報告類型：完整報告

處理方式：本計畫可公開查詢

中 華 民 國 93 年 11 月 4 日

一、中文摘要

三叉神經運動神經原有接受來自 A5、A7 區域 noradrenergic neurons 的神經投射。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功能。為了瞭解正腎上腺素神經纖維所形成的超微結構，因此我們藉由電子顯微鏡技術，觀察並比較出生後第 5 天(postnatal; P5)、P15 以及成熟大白鼠(P60)，其三叉神經運動核內呈現 anti-TH 免疫反應陽性之 noradrenergic fibers 的超微結構，及其在不同出生後發育期間的變化。由研究結果顯示成熟大鼠三叉神經運動核內之 noradrenergic varicosities，有 60% 會與三叉神經運動核內神經元之細胞本體或樹突，形成對稱性或不對稱性的突觸連結。而在 P15 時會形成突觸連結的比率與成鼠相當；然而在發育的早期 P5 時，則僅有 13.3% 的 noradrenergic varicosities 會形成突觸連結。此結果顯示正腎上腺素系統對三叉神經運動核內的神經元調控，在發育較早期時可能多是透過 non-synaptic vesicosities 以擴散方式對多量標的細胞做大範圍的調節；然而，在 P15 與成熟大白鼠中，除了藉由擴散型式的調節外，有部份 synaptic varicosities 會與其他 neurotransmitters 一樣，藉由特化的突觸連結機制，對特定目標給予專一性的調控。

關鍵詞： 三叉神經運動核、noradrenaline、A7、rat

二、前言與實驗目的

三叉神經運動神經有接受來自 A5、A7 區域 noradrenergic neurons 的神經投射。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功能。然而對於正腎上腺素神經纖維所形成的超微結構報告直至目前為止仍是非常的紛齊。Descarries 與其研究團隊，在大白鼠額頂葉大腦皮質(frontoparietal cortex)局部給予 [³H]NA，再利用 autoradiography 技術觀察正腎上腺素神經末梢之形態。其研究結果指出正腎上腺素神經末梢很少形成細胞膜特化之突觸連結(Beaudet & Descarries, 1978; Descarries *et al.*, 1977; Descarries & Lapierre, 1973)。其並提出：正腎上腺素軸突末梢或 varicosities，不會與其投射標的形成明顯的細胞膜特化之突觸連結。且正腎上腺素是由 non-synaptic 的軸突末梢或 varicosities 釋放出來，不但會影響鄰近神經元，並且透過擴散(diffusion)方式亦可影響較多且距離較遠的其他神經細胞。

然而，有部分的研究學者對此假說提出異議。例如，在新生大白鼠投予 false neurotransmitter —5-hydroxydopamine(Molliver & Kristt, 1975; Swanson *et al.*, 1978; Tennyson *et al.*, 1974; Zecevic & Molliver, 1981)，或是利用 DBH 之免疫組織化學染色法(Hagihira *et al.*, 1990; Olschowka *et al.*, 1981)，以及於腦室內投予 [³H]NA 後再以 auto-radiography (Parnacelas *et al.*, 1985) 技術所觀察到的正腎上腺素神經末梢或 varicosities，則常會與其投射神經標的形成細胞膜特化之突觸連結。而

Papadopoulos *et al.*(1987; 1989)利用 NA 之免疫組織化學染色技術，直接標定出視覺皮質(visual cortex)中的正腎上腺素神經纖維，並觀察了 800 個 NA varicosities 之連續超微切片後，其中則有將近 90% 皆會與其投射標的形成對稱性或不對稱性的突觸連結。

關於正腎上腺素系統是以突觸連結方式，或是以擴散方式調節其影響標的神經元的爭議至今仍未能有明確定論。而在出生後之發育過程中三叉神經運動核內之正腎上腺素軸突末梢或 varicosities 的超微結構形態，迄今仍未有文獻報導。因此，我們希望透過包埋前 anti-TH 免疫組織化學染色 (TH: tyrosine hydroxylase)，以標定正腎上腺素神經，觀察大白鼠出生後第 5 天、第 15 天及成鼠之正腎上腺素軸突末梢或 varicosities 的超微結構形態，能對正腎上腺素系統是以突觸連結方式，或是以擴散方式調節其影響在三叉神經運動核內之神經元有所了解。

三、實驗方法

(一) 組織之固定與染色：

將出生後第 5 天(postnatal; P5)、P15 與成鼠麻醉後，以 2.5% glutaraldehyde 和 1% paraformaldehyde 固定灌流後，將腦幹組織塊以震盪切片機切成 70 μ m 厚度的矢狀切片。在解剖顯微鏡觀察下，將含有三叉神經運動核(trigeminal motor nucleus, Mo5) 及其周圍區域的腦幹切片挑選出。將腦幹切片經過 freeze and thaw 的方法處理後再以 0.5% sodium borohydride 反應 15 分鐘，以去除組織中內生性過氧化酶的活性。之後加入 2% BSA + 10% NHS 反應 1 小時，以減少抗體與組織抗原非專一性的結合。再將腦幹切片置於一級抗體：Mouse anti TH (Chemicon, MAB5280, 抗體稀釋濃度：1/1300)，於 4 $^{\circ}$ C 下反應 48 小時。之後再將腦幹切片置於二級抗體：Biotinylated anti mouse IgG(抗體稀釋濃度：1/200)，於 4 $^{\circ}$ C 下反應 16~18 小時。再將腦幹切片置於 ABC(avidine-biotin- peroxides complex)試劑中(稀釋濃度：1/200)，於室溫下反應 1 小時。接著將腦幹切片以 0.05% DAB(3,3-diaminobenzidine)反應 10 分鐘。之後加入 200 μ l 的 3% H₂O₂ 至 DAB 溶液中，讓腦幹切片再反應 10 分鐘。經過 immunoperoxidase 的反應後，會在抗體所標定的地方形成黑褐色的最終產物。

(二) 電子顯微鏡標本處理：

將經過 DAB 呈色之腦幹切片，以 1% 鉻酸(osmium tetroxide, OsO₄)，於 4 $^{\circ}$ C 下反應 30 分鐘進行後固定。之後即以連續濃度：30%、50%、70%、90% 和 100% 酒精進行脫水。最後將腦幹切片平版包埋於 Durcupan 樹脂中，並放入 60 $^{\circ}$ C 烘箱中 24 小時，待其樹脂聚合硬化。將樹脂包埋後的腦幹切片之三叉神經運動核區域切割出來進行超微切片。以超微切片機將樣本切成 70 nm 厚度的連續超微切片，將連續切片收集於有 Formvar-coated 的銅網中。經過 lead citrate 和 uranyl acetate 染色後，即可於穿透式電子顯微鏡下觀察 TH-ir 之 varicosities 的超微結構。

(三)電子顯微鏡觀察與分析：

varicosities 所形成的突觸(synapse)定義為含有突觸前(per-)和突觸後(post-synaptic)的細胞膜特化，清晰明顯的突觸間隙(synaptic cleft)，以及突觸前有突觸小泡堆積聚集的特徵。並進一步將突觸聯合(synaptic junctions)分類為對稱性(symmetrical)與不對稱性(asymmetrical)。依此定義，TH-ir varicosities 於穿透式電子顯微鏡下觀察的重點著重於：

- (1) 三叉神經運動核內，TH-ir varicosities 以擴散方式或是以形成特化之突觸聯結方式釋出神經傳導物質的比率為多少？
- (2) 若是形成特化之突觸聯結，TH-ir varicosities 是與神經元之細胞本體、樹突、或軸突形成突觸連結？
- (3) 若是形成特化之突觸聯結，TH-ir varicosities 和其形成之突觸的型態為何？是對稱性(symmetrical) 或不對稱性(asymmetrical)？
- (4) 並測量 TH-ir varicosities 之面積大小，postsynaptic density 長度，等參數值。

四、結果與討論

(一)成鼠中三叉神經運動核內 TH-ir 之 NA 神經纖維的超微結構：

(i) non-synaptic varicosities：

在電子顯微鏡下觀察可見到 TH-ir 的產物表現在包含有突觸小泡的 varicosities 內，或是在 intervaricose segments 內。在本實驗中每個 TH-ir varicosities 皆觀察 8~30 個連續超薄切片以確定其是否有形成突觸連結的細胞膜特化。於連續超薄切片的觀察中可見部份的 TH-ir 正腎上腺素神經纖維會形成膨大且其內包含有突觸小泡的 varicosities。然而這些 varicosities 雖與其周圍之其他神經結構靠近，但皆未有形成細胞膜特化之突觸連結(圖一)。因此，得以判斷其確實為 non-synaptic varicosities。並且透過完整的連續超薄切片的影像，更可進一步了解此 varicosities 從出現至消失的整個立體型態上的變化。

(ii) TH-ir synaptic varicosities：

TH-ir 的 varicosities 會與 Mo5 中的神經元細胞本體或樹突(圖二、圖三)形成特化的突觸連結。就兩種突觸連結形式：symmetrical 和 asymmetrical 而論，TH-ir varicosities 所形成之突觸連結上皆可觀察到此兩種形式的突觸連結，其中又以 symmetrical 的形式(圖二)最為常見，；而 asymmetrical 的突觸連結形式(圖三)則較少見。除此之外，在與 TH-ir varicosities 形成突觸連結的突觸後神經結構上，還常可見有其他未被免疫染色標定的軸突末梢(unlabeled axon terminal; uT)亦會與其形成突觸連結(圖二、圖三)。

在 TH-ir varicosities 中包含有為數眾多小而中空的突觸小泡而其型態以多形態(pleomorphism)為主，即其中包含有圓形、卵圓形或長柱型等多種型態。除了突觸小泡外，還常可觀察到另一類較大但中心深染的 dense core vesicles(圖二、圖三)，絕大部分的 TH-ir varicosities 中，不論有形成突觸與否，皆含有此種類的 vesicles。

(二)不同出生後發育時期大鼠三叉神經運動核內 TH-ir 之 NA 神經纖維的超微結構:

於 P5 大鼠中約僅有 13.3% 的 TH-ir varicosities 會形成突觸的結構，而於 P15 時則可達到約有 60% TH-ir varicosities 會形成突觸連結，並且此比率與成鼠相當(表一)。於 P5、P15，皆可見到 TH-ir 的 varicosities 與三叉神經運動核內神經元之細胞本體(圖六 C)或樹突(圖四、五、六 A-B)形成突觸連結。P5、p15 與成鼠之 TH-ir varicosities 所形成的突觸類型，皆是以對稱性(symmetric)突觸較為常見(突四、六 B-C)，而不對稱性(asymmetric)突觸的表現比率較少(圖五、六 A、表一)。而突觸小泡形態上 P15 與成鼠相似，皆是屬多形態性(pleomorphic)，並且大部分皆含有 dense core vesicles(dcv)；而於發育早期的 P5 則突觸小泡的形態較差、較難判斷。

五、計畫成果自評

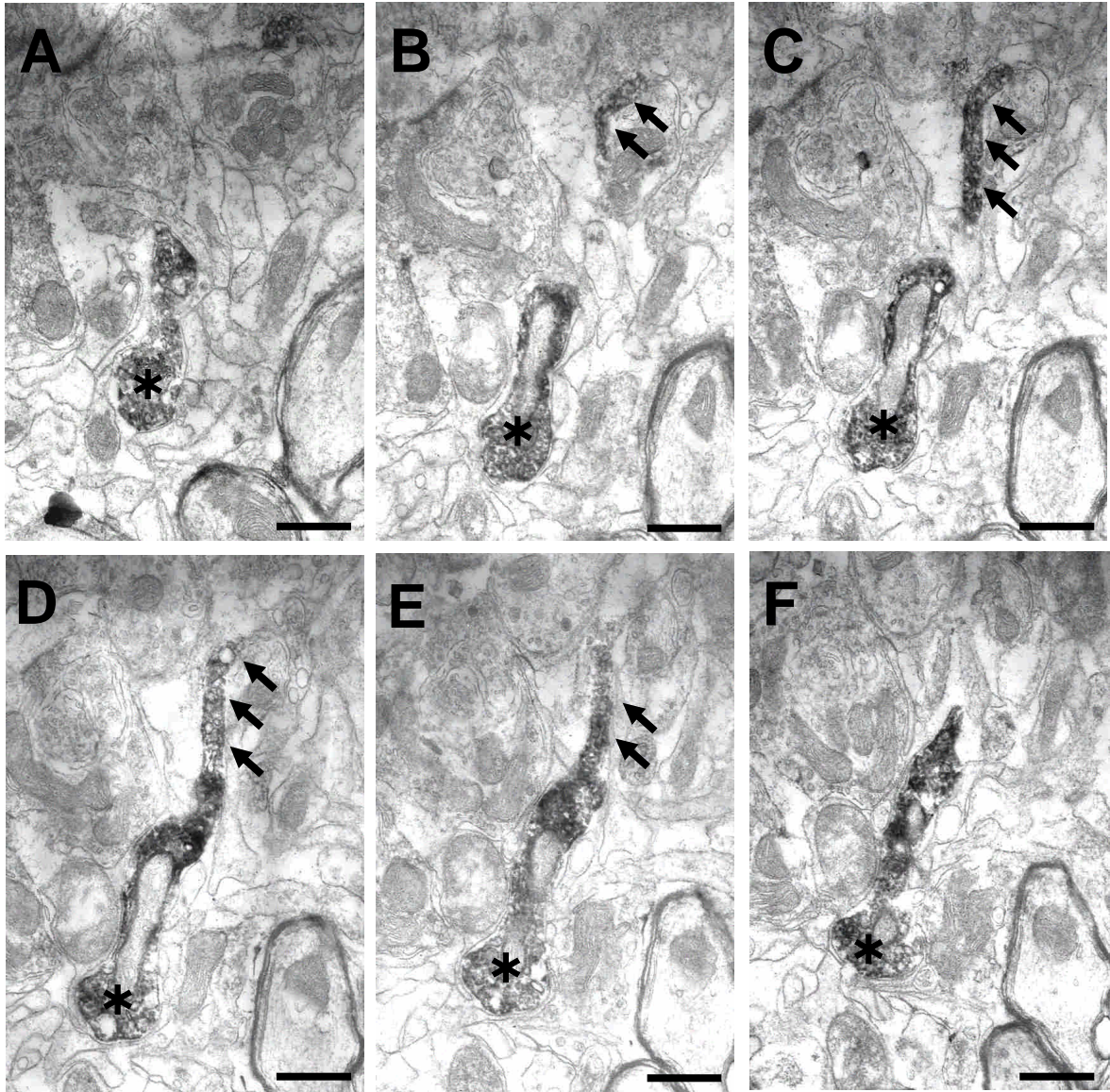
結至目前為止，本實驗已完成成鼠三叉神經運動核中 TH-ir varicosities 的超微結構觀察與分析，而針對不同出生後發育時期中 TH-ir varicosities 超微結構的發育變化也在陸續完成中，相信不久的將來，我們即可著手進行論文的撰寫。

六、參考文獻

- (1) Beaudet, A and Descarries, L. (1978) The monoamine innervation of rat cerebral cortex: Synaptic and nonsynaptic axon terminals. *Neuroscience* **3**, 851-60.
- (2) Descarries, L. and Lapierre, Y. (1973) Noradrenergic axon terminals in the cerebral cortex of the rat. I. Radioautographic visualization after topical application of DL-[3H]norepinephrine. *Brain Res.* **51**: 141-60.
- (3) Descarries, L., Watkins, L. C. and Lapierre, Y. (1977) Noradrenergic axon terminals in the cerebral cortex of rat. III. Topometric ultrastructural analysis. *Brain Res.* **133**: 197-222.
- (4) Molliver, M. E. and Kristt, D. A. (1975) The fine structural demonstration of monoaminergic synapses in immature rat neocortex. *Neuroscience Letters* **1**:305-10.
- (5) Olschowka, J. A., Molliver, M. E., Grzanna, R., Rice, F. L. and Coyle, J. T. (1981) Ultrastructural demonstration of noradrenergic synapses in the rat central nervous system by dopamine- β -hydroxylase immunocytochemistry. *J. Histochem. Cytochem.* **29**: 271-280.
- (6) Papadopoulos, G. C., Parnavelas, J. G. and Buijs, R. M. (1987) Monoaminergic fibers form conventional synapses in the cerebral cortex. *Neuroscience Letters* **76**: 275-279.
- (7) Papadopoulos, G. C., Parnavelas, J. G. and Buijs, R. M. (1989) Light and electron microscopic immunocytochemical analysis of the noradrenaline innervation of the rat visual cortex. *Journal of Neurocytology* **18** 1-10.
- (8) Parnavelas, J. G., Moises, H. C. and Speciale, S. G. (1985) The monoaminergic

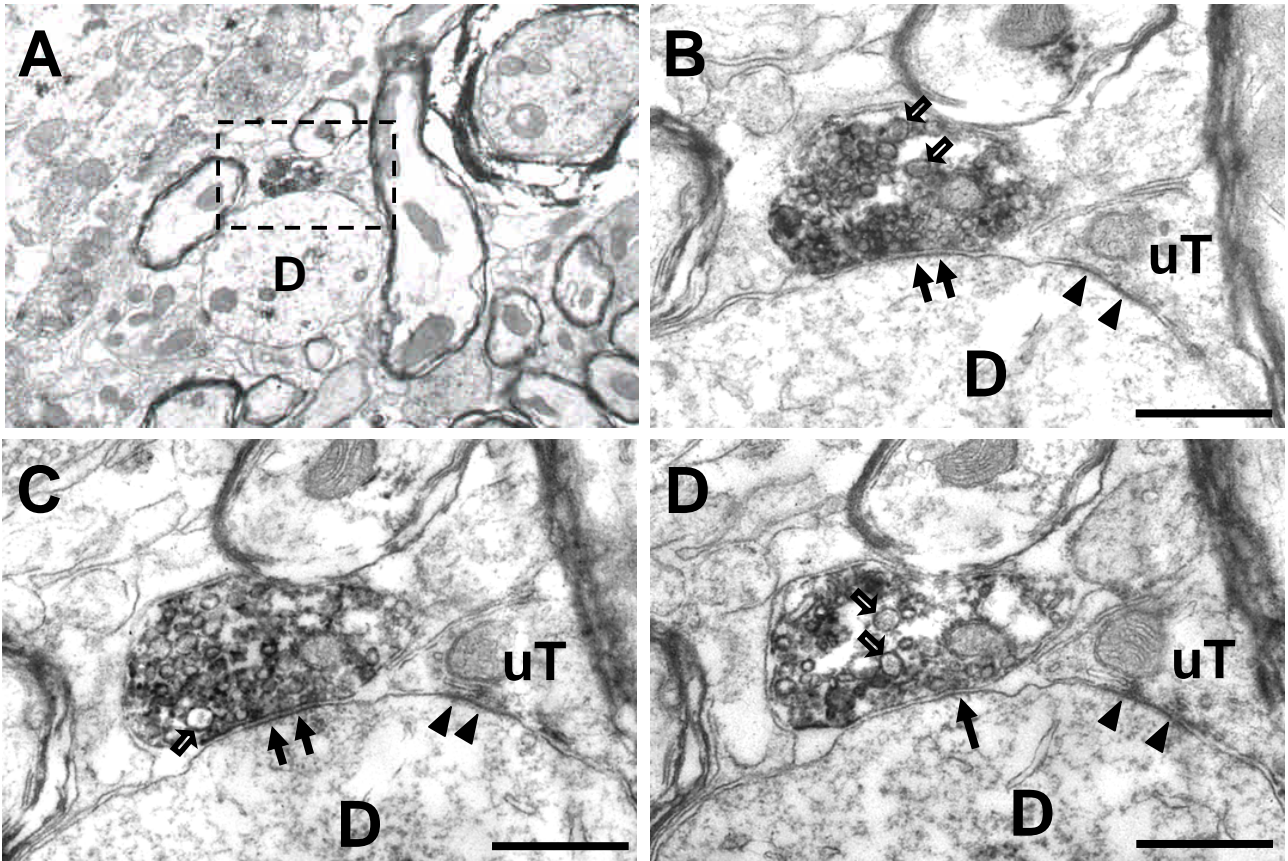
innervation of the rat visual cortex . *Proceedings of the Royal Society of London, Series B* **23**: 319-29.

- (9)Swanson, L.W., Connelly, M. A. and Hartman, B. K. (1978) Further studies on the hypothalamus. *Brain Res.* **151**: 165-74.
- (10)Tennyson, V.M., Heikkila, R., Mytilineou, C., Cote, L. and Cohen, G.(1974). 5-Hydroxydopamine “tagged” neuronal boutons in rabbit neostriatum: inter-relationship between vesicles and axonal membrane, *Brain Res.* **82**: 341-348.
- (11)Zecevic, N. R. and Molliver, M. E. (1978) The origin of monoaminergic innervation of immature rat neocortex:An ultrastructural analysis following lesions. *Brain Res.* **150**: 387-97.



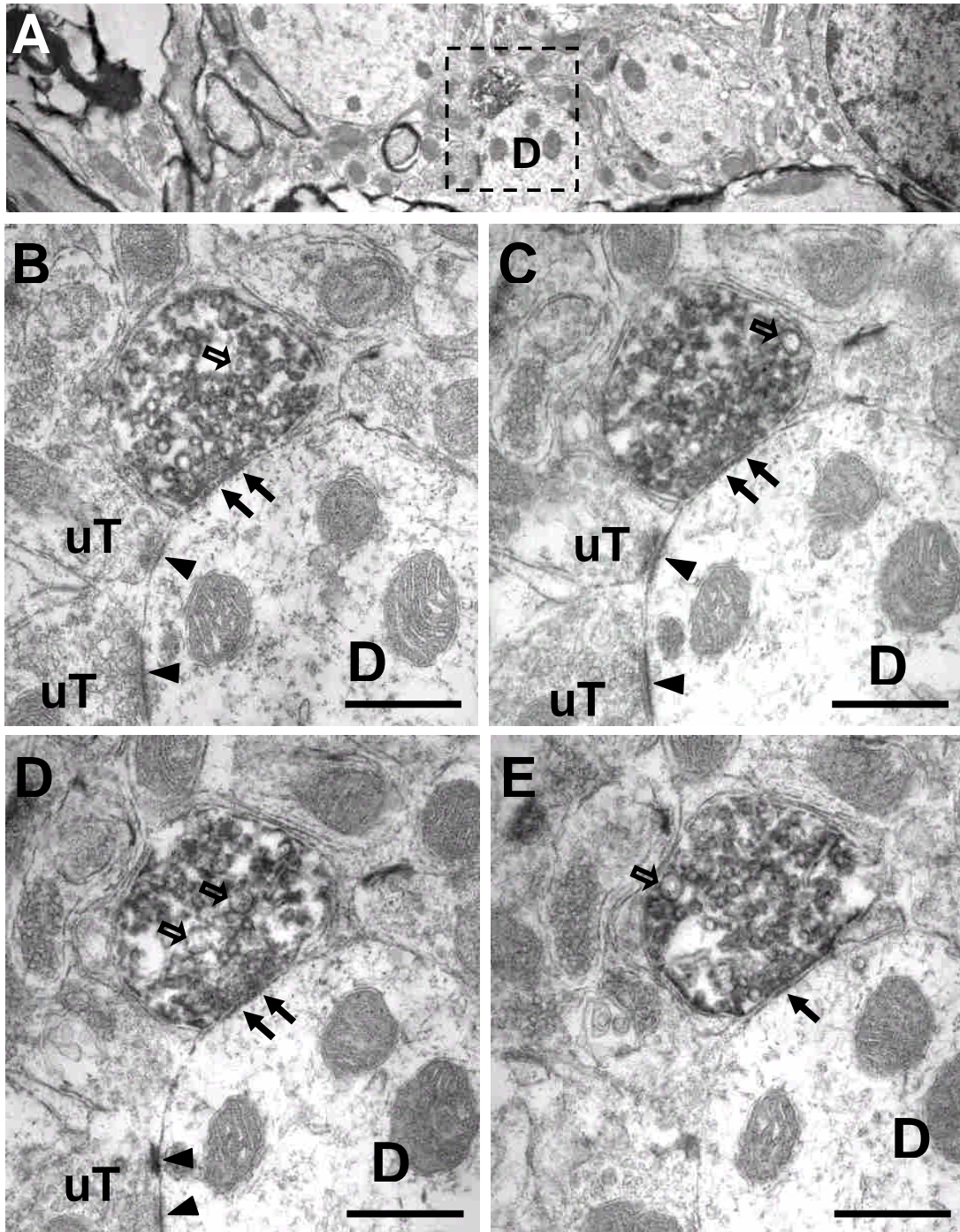
圖一：成鼠腦幹之三叉神經運動核內，TH-ir non-synaptic varicosities 的超微結構。

A~F 為同一個 TH-ir 之 non-synaptic varicosity (星號：指示處)的連續超微切片，此 varicosity 並連結一段 intervaricose segment(箭號：指示處)。可觀察到此 varicosity 內包含有許多的突觸小泡及粒線體，但卻未與任何其他神經結構形成突觸連結。A~F：scale bar = 0.5 μ m。



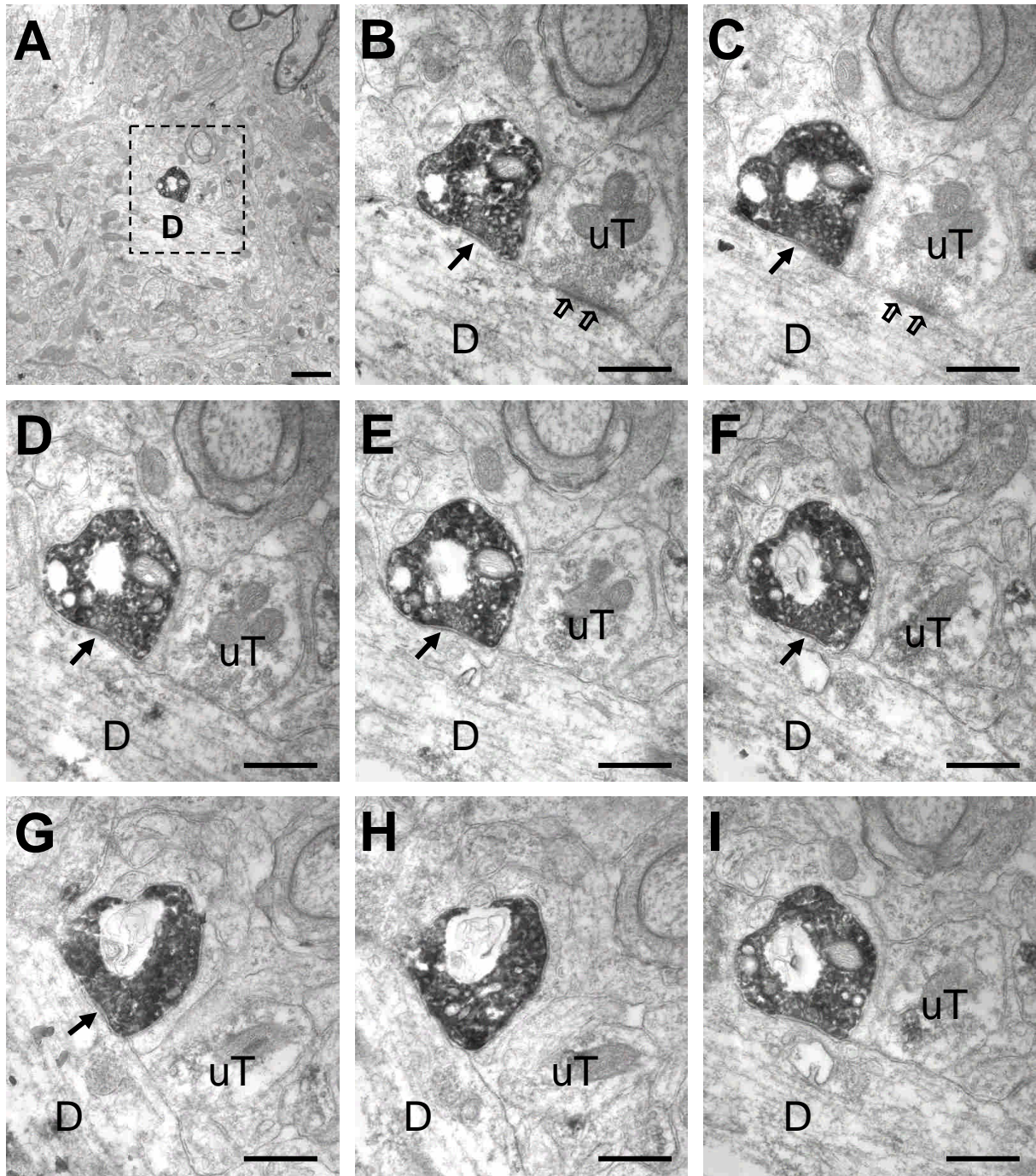
圖二：於成鼠腦幹中，TH-ir 之 varicosities 與三叉神經運動核內的神經元樹突 (dendrite) 形成對稱性突處連結 (symmetrical synapse) 之超微結構。

TH-ir 之 varicosities 與神經元之樹突形成對稱性突處連結(A)。將 A 圖之框線圈選處放大後(B)，可見到與 varicosity 連結之樹突的細胞膜特化形成對稱性突觸(箭號：標示處)。在 varicosity 中除了突觸小泡外，還包含有 dense core vesicle (空心箭號：指示處)。此樹突還與其他未被免疫染色標定的軸突末梢形成對稱性突觸(箭頭：指示處)。B~D 圖為同一 varicosity 之連續超微切片。B~D：scale bar = 0.5 μm 。D：dendrite；uT：unlabeled axon terminal。



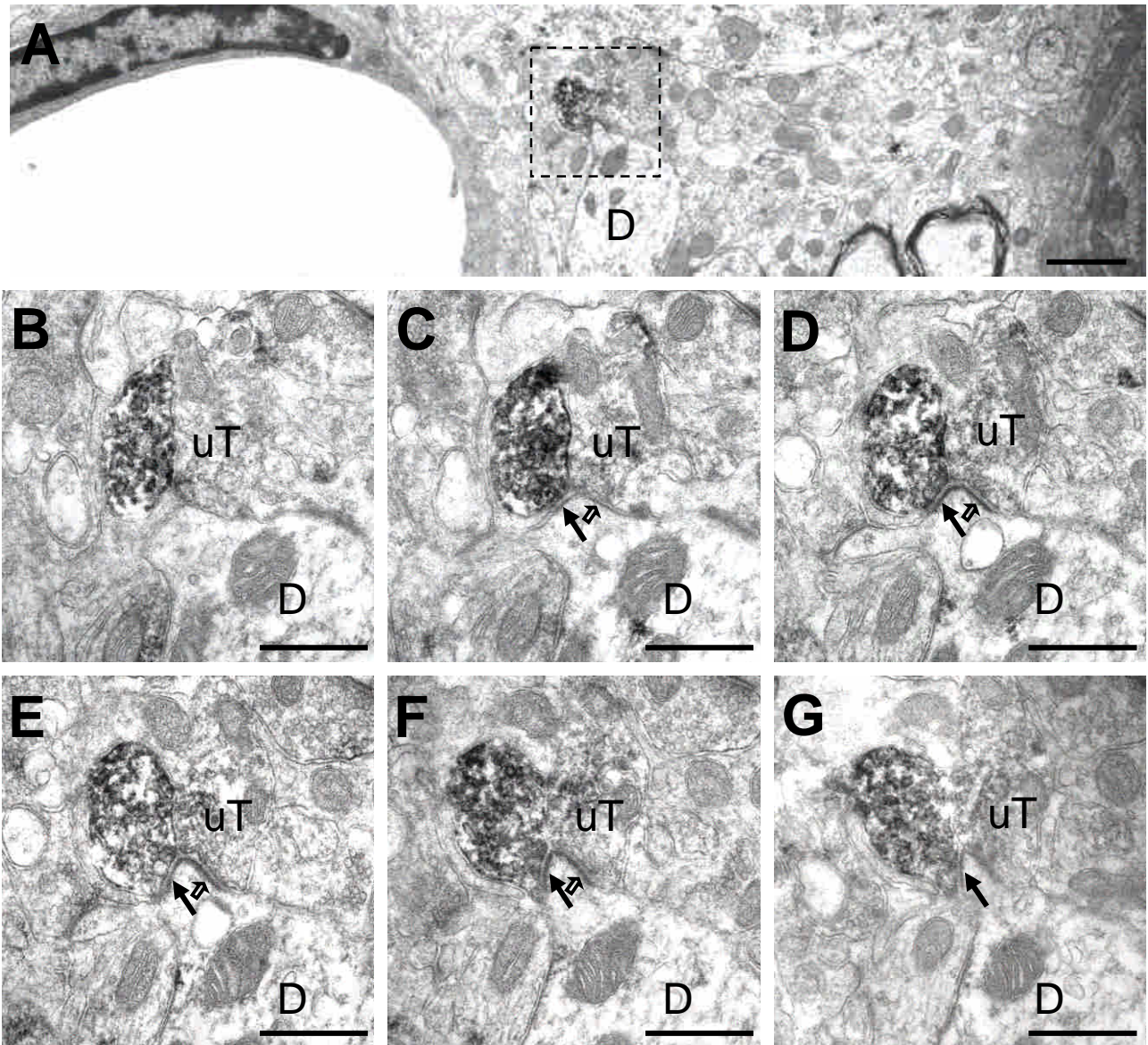
圖三：於成鼠腦幹中，TH-ir varicosities 與三叉神經運動核內的神經元樹突 (dendrite) 形成不對稱性突處連結 (asymmetrical synapse) 之超微結構。

TH-ir varicosities 與神經元之樹突形成不對稱性突處連結(A)。將 A 圖之框線圈選處放大後(B)，可見到與 varicosity 連結之樹突的細胞膜特化形成不對稱性突觸(箭號：標示處)。此 varicosity 亦包含有 dense core vesicle (空心箭號：指示處)。此樹突還與其他未被免疫染色標定的軸突末梢形成不對稱性突觸(箭頭：指示處)。B~D 圖為同一 varicosity 之連續超微切片。B~D：scale bar = 0.5 μ m。D：dendrite；uT：unlabeled axon terminal。



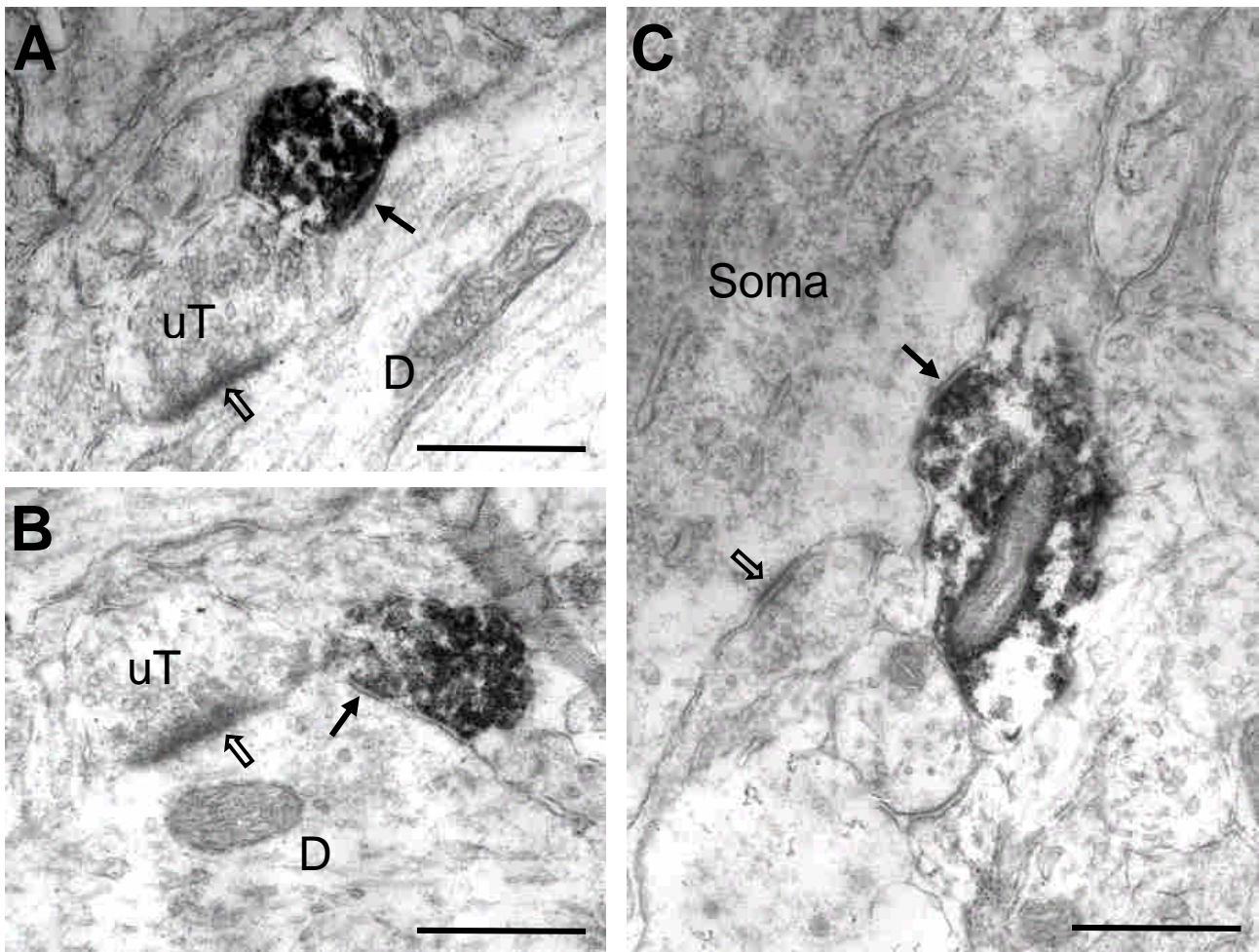
圖四：於出生後 15 天(P15)之大鼠腦幹中，TH-ir varicosities 與三叉神經運動核內的神經元樹突(dendrite)形成對稱性突處(symmetrical synapse)之超微結構。

TH-ir 之 varicosities 與神經元之樹突形成對稱性突處連結(A)。將 A 圖之框線圈選處放大後(B)，可見到與 varicosity 連結之樹突的細胞膜特化形成對稱性突觸(箭號：標示處)。此樹突還與其他未被免疫染色標定的軸突末梢形成不對稱性突觸(空心箭號：指示處)。B~I 圖為同一 varicosity 之連續超微切片。B~I: scale bar = 0.5 μ m。D: dendrite; uT: unlabeled axon terminal。



圖五：於出生後 15 天(P15)之大鼠腦幹中，TH-ir varicosities 與三叉神經運動核內的神經元樹突(dendrite)形成不對稱性突處(asymmetrical synapse)連結。

TH-ir varicosities 與神經元之樹突形成不對稱性突處連結(A)。將 A 圖之框線圈選處放大後(B)，可見到與 varicosity 連結之樹突的細胞膜特化，以形成不對稱性突觸(箭號：標示處)。此樹突還與其他未被免疫染色標定的軸突末梢形成不對稱性突觸(空心箭號：標示處)。B~G 圖為同一 varicosity 之連續超微切片。B~G：scale bar = 0.5 μm 。D：dendrite；uT：unlabeled axon terminal。



圖六：於出生後 5 天(P5)之大鼠腦幹中，TH-ir varicosities 與三叉神經運動核內的神經元細胞本體(soma)或樹突(dendrite)形成多種突觸連結型態之超微結構。

TH-ir 之 varicosities 會與神經元之樹突形成不對稱性突觸連結(圖 A, 箭號: 標示處)或對稱性突觸連結(圖 B, 箭號: 標示處), 這些樹突還與其他未被免疫染色標定的軸突末梢形成不對稱性突觸(圖 A、B, 空心箭號: 指示處)。TH-ir varicosity 亦會與神經元細胞本體形成對稱性突觸連結(圖 C, 箭號: 指示處)A~C: scale bar = 0.5 μm 。D: dendrite; uT: unlabeled axon terminal。

Age	Bouton type	Number sampled	Active zone		vesicles		Post-synaptic target			Size		
			Sym	Asym	Type	No. with dcV	Soma	Proximal dendrite	Distal dendrite	Area (μm^2)	Apposition (μm)	Active zone (μm)
Adult	Synapse	45 (60%)	40 (89%)	5 (11%)	Pleo	40	5 (11%)	11 (24.4%)	29 (64.4%)	0.56±0.05	0.73±0.05	0.31±0.03
	Non-synapse	30 (40%)	-	-	Pleo	29	-	-	-	0.56±0.04	-	-
Total		75				69				0.56±0.03		
P15	Synapse	6 (60%)	5 (83.3%)	1 (16.7%)	Pleo	9	0 (0%)	2 (30%)	4 (70%)	0.37±0.05	0.44±0.08	0.23±0.03
	Non-synapse	4 (40%)	-	-	Pleo	1	-	-	-	0.58±0.11		
Total		10				10				0.44±0.06		
P5	Synapse	4 (13.3%)	3 (75%)	1 (25%)	Pleo		1 (25%)	2 (50%)	1 (25%)	0.37±0.11	0.76±0.14	0.23±0.05
	Non-synapse	26 (86.7%)	-	-	Pleo		-	-	-	0.59±0.06		
Total		30								0.56±0.06		

表一：不同出生後發育時期中，大鼠之三叉神經運動核內 TH-ir varicosities 形態的參數分析。

分別將成熟、出生後 15 天(P15)與出生後 5 天(P5)的大白鼠之三叉神經運動核內的 TH-ir varicosities，依其形成突觸連結與否，區分為 synapse 與 non-synapse 兩類。再依突觸後細胞模特化的型式不同，將突觸連結型式分為對稱性(symmetrical, sym)與不對稱性(asymmetrical, asym)。再根據 varicosities 內突觸小泡的形態，區分出突觸小泡的種類與是否含有 dense core vesicles(dcv)。將與 TH-ir varicosities 形成突處之突處後標的，區分為細胞本體(soma)、近端樹突(proximal dendrite)和遠端樹突(distal dendrite)。分別分析 TH-ir varicosities 的面積大小、TH-ir varicosities 與突觸後結構貼近(apposition)的細胞膜長度、形成突觸連結時突觸後細胞膜特化(active zone)的長度。Pleo, pleomorphic。