

行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告

GABA 與 glycine 共同存在之生理意義：發育中及去除 GABA 或 glycine 之大白鼠三叉神經運動系統之研究

(計畫編號：NSC 89-2320-B-040-057)

執行期限：89 年 8 月 1 日至 90 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

一、 中文摘要

本研究的主要目的在探討三叉神經運動神經元上之抑制性突觸，如 GABA 性突觸、glycine 性突觸、及 GABA-glycine 性突觸的發育情形。出生後胎鼠分別於出生後第 0, 4, 9, 14 與 20 天後，給予咀嚼肌注射 HRP 以標定運動神經元。經 24 小時，後動物予以犧牲並進行 HRP 組織化學反應及電子顯微鏡處理步驟。所得之超薄連續切片在進行 GABA 與 glycine 之免疫染色。在電子顯微鏡觀察下，結果發現在出生早期，絕大部分在運動神經元上之抑制性突觸都屬於 GABA-glycine 性突觸，這種染色型式在發育後期則轉換成 glycine 性突觸及 GABA-glycine 性突觸。在發育後期才有 GABA 性突觸的出現，且大部分屬於軸突對軸突形式的突觸。這些觀察結果顯示在三叉神經運動系統，GABA 與 glycine 都參與抑制突觸後反應且 glycine 的角社較 GABA 重要。然而只有 GABA 才有參與突觸前的調節角色。

關鍵詞：電子顯微鏡、免疫-金顆粒染色
抑制性突觸、運動神經元。

Abstract

The aim of this study is to investigate the development of GABAergic, glycinergic, and GABA-glycinergic boutons on trigeminal motoneurons. Postnatal rat pups were given intra-muscular injection of HRP at postnatal day 0, 4, 9, 14 and 20, to label motoneurons. After 24 hrs of survival time, animals were

subject to HRP histochemistry and electron microscopic procedures. Serial ultrathin sections were cut. The alternate sections were then stained with antibodies to GABA and glycine followed by gold conjugated 2nd antibody, and investigated under EM. In early postnatal ages, almost all of the inhibitory boutons on motoneurons are GABA-glycine immunoreactive (IR), this pattern however shifted to GABA-glycine IR and glycine IR only in later postnatal ages. Most of GABA-IR only boutons make axo-axonic contacts, and only appeared in late postnatal ages. These results suggest a more important role for glycine than GABA in mediating specific postsynaptic inhibition, while the presynaptic modulation was only mediated by GABA in the trigeminal motor system.

Keywords: electron microscopy、immuno-gold、inhibitory synapses、motoneuron。

二、緣由與目的

我們之前已有報告過，投射到三叉神經運動元上的抑制性神經末梢對於 GABA 抗體及 glycine 抗體呈現陽性免疫反應；這個結果建議當動作電位傳遞到突觸前末梢時 GABA 與 glycine 會同時釋放出來 (Yang et al., 1997)。這樣的結果與建議在其他的中樞神經系統區域也有被報告過 (Maxwell et al., 1990; Todd et al., 1995)。然而對於 GABA 與 glycine 同時存在同一個神經末梢的生理意義尚不明

白。因此在這個研究中我們繼續探討，投射到三叉神經運動元上的抑制性神經末梢的出生後的發育情形以證實 GABA 與 glycine 對三叉神經運動元在作抑制性調節上所扮演的不同的角色。我們首先用 30% horseradish peroxidase (HRP; Sigma, type IV) 分別於大白鼠 (Wistar strain) 出生第 0(P0), 4(P4), 9(P9), 14(P14), 及 20(P20) 天, 以肌肉內注射的方式打入 jaw-closing muscles, 以標定三叉神經運動元。在給予 24hr 存活時間後, 以灌流的方式將動物組織灌流固定, 其固定液的濃度為 2.5% glutaraldehyde 及 % paraformaldehyde。隨後以 vibrotome 切出含有三叉神經運動核的 70 μ m 腦薄片, 並以 DAB 或 TMB 為 chromogen 將 HRP 呈色。之後以電子顯微鏡標本處理方法將標本包埋, 並以後包埋免疫金方式對電子顯微鏡超薄切片進行染色。連續超薄切片其含蓋相同的神經末梢; 相連的超薄片分別與 GABA 抗體及 glycine 抗體反應, 隨後在以電顯染色與以染色。最後在電子顯微鏡下觀察 GABA-ir (immunoreactive) 與 glycine-ir 的 bouton 於出生不同年齡的發育情形。

三、結果與討論

經一系列的電子顯微鏡觀察後我們有以下觀察結果, 我們首先觀察到三叉神經運動元在出生之後 (P1) 已有樹突長出, 隨著發育的年齡增加細胞本體橫切面積有增大的趨勢, 並且樹突的分枝有增多的現象。在抑制性突觸的發育方面的觀察結果顯示, 與三叉神經運動元形成抑制性突觸的 bouton, 在 P1 與 P5 時期以 glycine-GABA-ir 為主, 其所佔的比例分別為 72.7% 與 93.75% (Table 1)。並且這些抑制性突觸的 bouton 是與三叉神經運動元的細胞本體或樹突 (Table 2) 形成對稱性突觸連結 (symmetrical synapse)。而在發育的中期, 也就是在 P10 與 P15 時期, glycine-ir bouton 數目增加, 然而 glycine-GABA-ir bouton 數目減少, 其所佔的比例分別為 73.7% 與 52.94% (Table 1; F 1), 這個時期的突觸形態與 P1 與 P5 時期類似, 亦即

這些抑制性突觸的 bouton 是與三叉神經運動元的細胞本體或樹突 (Table 2) 形成對稱性突觸連結 (symmetrical synapse)。而在發育的晚期, 即 P21 時期, GABA-ir bouton 數目增加 (18.8%; Table 2), 並且大多數形成 axo-axonic contacts (軸突與軸突的連結; Fig. 2)。

由以上的觀察結果我們有幾點結論, 第一、與三叉神經運動元形成抑制性突觸的 bouton 在發育的早期是以 GABA-glycinergic 為主, 而到了發育的後期則轉變成以 GABA-glycinergic 與 glycinergic only 為主。第二、大部份的 GABAergic only boutons 形成 axo-axonic contacts, 而這樣的現象則出現在發育的晚期。第三、glycine 與 GABA 兩者可能在突觸後抑制上扮演重要角色, 而在三叉神經運動系統上突觸前抑制的調節則是以 GABA 為主。

四、計畫成果自評

本計劃的結果與當初我們的預期是相符合的, 也就是說我們能藉由探討抑制性突觸的發育而能將 GABA 與 glycine 在三叉神經運動系統的調控方面所扮演的角色予以更加區隔。簡言之, 在發育的早期以突觸後抑制而言, GABA 與 glycine 藉由共同存在同一個神經末梢, 而同時扮演重要角色。然而這個論點需要同時能知道有關 GABA 與 glycine 受器在突觸發育過程中的表現, 才能更進一步的確認 (這也就是我們目前正在進行的研究計劃的主題之一)。隨著發育的進行 GABA 的角色逐漸減少, 而 glycine 角色逐漸增加。類似的結論在聽覺的耳蝸神經核的電生理研究中也有報告 (Kotak et al., 1999)。致於在突觸前的調控方面, 則只有 GABA 有參與, 且只在發育的後期有這種調控的機制才完備。

由以上這些討論，我們很有自信這個計劃的成果是合乎預期的。目前我們正在將這些結果寫成可供發表的手稿。由於這些結果對吾人在了解抑制性調控在三叉神經運動系統，甚至整個腦幹（因為 GABA 與 glycine 共同存在同一個神經末梢的現象在腦幹中具有普遍性）的神經迴路中，有新的概念。我們相信本研究成果必能發表於知名的國際期刊。

Maxwell, D.J. et al. (1995) *Brain Res.*, **690**: 127-132.

Todd, A.J. et al. (1995) *Eur. J. Neurosci.*, **7**: 1-11.

Kotak, V.C. et al. (1998) *J. Neurosci.*, **18**: 4646-4655.

Yang H-W. et al. (1997) *Brain Res.*, **749**: 301-319.

五、參考文獻

六、表格

Table I

# of boutons	Immunoreactivity		
	Glycine- only	GABA- only	GABA- Glycine
P1 (n=11)	2 (18.2%)	1 (9.1%)	8 (72.7%)
P5 (n=16)	1 (6.3%)	0	15 (93.8%)
P10 (n=19)	4 (20.1%)	1 (5.3%)	14 (73.7%)
P15 (n=17)	6 (35.3%)	2 (11.8%)	9 (53.9%)
P21 (n=101)	33 (32.7%)	19 (18.8%)	49 (48.5%)

Table II

# of boutons	postsynaptic target								
	Glycine only			GABA only			GABA-glycine		
	Soma	Den	Axon	Soma	Den	Axon	Soma	Den	Axon
P1 (n=11)	1	1	0	1	0	0	8	0	0
P5 (n=16)	0	1	0	0	0	0	6	9	0
P10 (n=19)	2	2	0	0	0	1	5	9	0
P15 (n=17)	1	5	0	0	0	2	3	6	0
P21 (n=101)	17	16	0	2	2	15	27	14	0

七、例圖與說明

圖一 P10 之連續電子顯微鏡超薄切片，A 為 Glycine 免疫金顆粒染色，B 為 GABA 免疫金顆粒染色。可見 motoneuron 上的兩個 axo-somatic synapses，其分別為 Glycine only (S2) 與 GABA-glycine (S1)。

圖二 P21 之連續電子顯微鏡超薄切片，A 為 Glycine 免疫金顆粒染色，B 為 GABA 免疫金顆粒染色。可見與 motoneuron 形成突觸之大末梢上有兩個 axo-axonic synapses，均為 GABA only (1 與 2)。



