

鼠大腦神經元發育 早期樹突小刺形態 與生化之研究

作者：吳漢傑

壹、緒論

神經細胞為一群特化的細胞，其主要功能之一為負責身體電訊號的產生與傳遞，這些電訊號進而控制所有的身體感覺與動作。神經細胞的形態上有其特殊之分化，一般而言，一個神經元至少包含了兩個部分：細胞本體 (cell body) 與分支 (processes)，而分支部分又可分為細分為樹突 (dendrite) 與軸突 (axon)。樹突主要負責將其他細胞產生之電訊號傳入細胞本體，經過細胞本體的整合後再經由軸突將電訊號傳遞出去。在某些神經元的樹突上可以看到一些像是小刺狀的突出物，這就是所謂的樹突小刺 (dendritic spine)。樹突小刺的分布情形依神經元分布的區域與形態不同而不同，如大白鼠第五

層視覺皮質區 (layer V of primary visual cortex) 的角錐形細胞 (pyramidal cell)，其樹突小刺的密度為每個微米 (micrometer) 有 2 個小刺 (Larkman, 1991)，而在海馬迴 CA1 區的角錐形細胞，依染色的方式不同其密度有每微米 1 至 5 個小刺的變化 (Harris and Stevens, 1989; Amaral et al., 1990)。此外，在新大腦皮質 (neocortex)、海馬迴 (hippocampus)、及嗅覺皮質區 (olfactory cortex) 等區域，依照樹突小刺數目的多寡可將神經細胞分為 spiny neurons 與 smooth neurons 兩大類。前者通常為負責興奮性傳導的神經元 (excitatory neurons)，如角錐形細胞 (pyramidal cell)，如名所示這些神經元的樹突上含有許多樹突小刺；而後者主要是負責抑制性的神經傳導的 interneurons，如 basket cell，其樹突小刺的數目極少，有些甚至沒有小刺的出現 (for review, Christof and

Anthony, 1993)。除了數目不同外，不同性質的神經元其樹突小刺的形態也不同，如負責抑制性傳導的 GABAergic 神經元，其樹突小刺中通常沒有小刺內器 (spine apparatus，後詳)，而且在一個樹突小刺上通常會形成 4-8 個突觸。興奮性角錐形細胞的樹突小刺通常含有小刺內器，而且一個小刺上通常只形成一個突觸(McBain et al., 1999)。

樹突小刺這一個名詞是 Cajal 於 1888 年最先提出來的，在他 1911 年的敘述中提到：Spine 是一種位於 Purkinje 細胞樹突中像是小絨毛的一些突起物 (Cajal, 1911)。就以形態上來分 Spine 有許多不同的形態呈現，以 spine 末端的體積比上其頸部的體積可將 spine 粗分為兩大類：有頭(Head)與沒頭(Headless)兩種 (Michele et al., 1995)。一般在成熟神經細胞中最典型的 spine 形態為一頸細頭粗，單一短棒狀突出，其他類型包括了從

細長無頭的到粗短的，甚至有從同一基部長出兩個分支兩個頭的類型(Gordon, 1996)。由樹突小刺的大小來看，在齧齒類動物成熟的角錐形細胞中所發現的 Spine 其平均頸部的長度約為 0.1-2 μm ，寬度為 0.04-0.2 μm ，而 spine 的總體積約為 0.004-2 μm^3 ，總表面積約為 0.1-0.7 μm^2 (Harris and Kater, 1994)；另外也有報導指出在 olfactory granule 細胞其 spine 的長度約為 0.28-3.8 μm ，寬度為 0.12-0.4 μm ，而平均 spine 頭部的體積約為 0.58 μm^3 (Woolf et al., 1991)。再以電子顯微技術來看 spine 內胞器的種類，典型的 spine 內沒有粒線體 (mitochondria)、核糖體 (ribosome)、及 microtubules，但是可以發現許多平滑內質網 (smooth endoplasmic reticulum)，這些平滑內質網被稱做小刺內器 (spine apparatus)。這些小刺內器的功

能推測可以調控突觸間信號傳遞時鈣離子濃度的變化(Yuste and Denk, 1995), 並且在小刺內器的外膜(outer lamella)上發現了AMPA受器的免疫反應, 顯示此處為AMPA受器在轉運過程中的暫駐點(Nusser et al., 1998)。然而, 此小刺內器並不是出現在所有的小刺中, 因此不能當作定義樹突小刺的標準。

樹突小刺內的細胞骨架(cytoskeleton)組成成分及分布也有其特色, 由電顯免疫標定以及免疫螢光的結果顯示, 在樹突小刺頸部及大部分頭部的細胞質中的細胞骨架成分並沒有tubulin, 但含有相當豐富的actin以及MAP2(Alfredo, 1983)。在樹突小刺頸部的actin沿著小刺內器縱向排列著(Fifkova, 1985), 而且至少有兩種不同類型的actin同時存在; 而由電顯免疫染色結果發現在小刺頭部中後質密區(Postsynaptic density)可同時發現有tubulin及actin的

存在(Alfredo, 1983)。另外一些蛋白質像是neuronal myosin(Drenckhahn and kaiser, 1983)、fodrin(Carlin et al., 1983)、以及calmodulin(Caceres et al., 1983)等等, 其作用都是以actin為媒介的(actin mediated activities), 也可在樹突小刺中找到。神經細胞的actin調控著許多生理生化功能, 如利用藥物將細胞中的microfilaments分解後, 利用免疫染色定位觀察位於後突觸上的NMDA及AMPA受器, 發現有40%的NMDA及AMPA受器在microfilaments被分解後消失, 這代表了大部分位於後突觸上的NMDA及AMPA受器是以microfilaments為鷹架, 並利用一些接合蛋白(linker proteins)鑲嵌於後突觸膜上(Allison et al., 1998)。

除了由形態、長短大小、組成成分來定義樹突小刺外, 由於曠時攝影(time-lapse

microscopy) 以及共軛焦顯微技術 (confocal microscopy) 的發展，使得樹突小刺的活動力 (mobility) 也成為鑑定樹突小刺的標準之一。如 Ziv 和他的同事在 1996 年所發表的文獻就以活動力小於等於每分鐘 $0.33 \mu\text{m}$ 的小突起稱作樹突小刺，大於此的則被稱做是 filopodia-like protrusion (Ziv and Smith, 1996)。這些 protrusions 被認為是日後形成樹突小刺的先驅物 (Engert and Bonhoeffer, 1999; Maletic-Savatic, 1999)。

有關 Spine 生理上的功能的研究一直進展有限，主要的原因是 spine 相當細小，而且多半的 spine 分布在離細胞本體較遠端處，增加了研究上面的困難，因此目前我們所預測的 spine 的功能很多是藉由電腦模擬而來 (Harris and Kater, 1994)。隨著實驗技術的改進，使得 spine 的生理功能逐漸明朗。目前基於一些形態學、生理學、電腦模擬、

電生理、生化、影像處理，以及顯微技術的數據推測 spine 的生理生化功能包括了：形成突觸 (synapse)、形成局部樹突上輸出輸入的單位、造成可塑性的區域、區隔生化分子、調控突觸電位、增強突觸的訊號、處理信號及時序、局部改變細胞膜的電性 (for review, Gordon, 1996) 等等。

在大白鼠大腦皮質區中，成熟的興奮性神經元約有 85% 樹突小刺上可發現突觸 (Micheva and Beaulieu, 1996)。由一些電顯的結果證明，在興奮性突觸 (asymmetric, type I) 之後緊接著的通常就是樹突小刺 (Gray, 1959)。但是這樹突小刺與突觸相連的關係只限於興奮性突觸。在新皮質區 (neocortex)，抑制性 (symmetric, type II) 突觸約只有 5% 到 20% 是座落在樹突小刺上 (Dehay et al., 1991)。在許多關於突觸形成 (synaptogenesis) 的實驗中指出，在離體 (*in vitro*) 細

胞培養實驗情形下，突觸形成的時間會在細胞培養後 2-3 周才發生。如 Muraoka 及 Takahashi(1989)由一些電顯超微結構的實驗結果中指出，第一個可被辨識的突觸是在培養後的第 10 天形成。

在培養的下視丘細胞 (hypothalamic cultures) 中，Legendre (1988)等人利用電生理紀錄指出：在培養後 6 天內測不到後突觸電生理反應，9 天可測得一些，10 天後突觸電訊號大量出現，顯示突觸開始大量形成。Tixier-Vidal(1992)等人利用免疫螢光染色的方式，標定前突觸蛋白 synaptophysin 作為突觸所在的指標，檢查培養的下視丘細胞。結果顯示，細胞培養後 6 天內無法染到 synaptophysin，也就是說在細胞培養六天後才有突觸的生成。另外在培養的海馬迴細胞 (hippocampal cultures) 中，Basarsky(1994)等人指出，在第 4 天時約有 29%的神經元

有自發性的電訊號產生，而且在高滲透壓溶液 (high-osmolarity) 刺激下有電訊號反應的比例增高，細胞培養至第 12 天有自發性電訊號反應的細胞比例增加至 75%。Ziv 及 Smith(1996)以 vesicle-labeling 的方法標示已有功能的突觸，結果顯示細胞培養頭 7 天內無法明顯偵測到有功能的突觸形成。另外，Van Den Pol 等人利用免疫螢光染色以及電生理的技術探討在高低兩種密度的細胞培養下，下視丘及海馬迴之突觸形成的時間。在高密度培養的狀況下，不論是海馬迴或是下視丘的細胞培養在培養後第三天即可測得 synaptophysin 的螢光反應，並可測得自發性的後突觸電訊號。其他區域如，低密度細胞培養下的 striatal 神經元要到 9 天後才有突觸的形成 (Rouget et al., 1993)；在大白鼠脊髓(spinal cord)細胞培養的實驗中，培養三天後可測得自發性後突觸電訊號，而連續性的後

突觸電訊號由培養後第 7 天的 29%急速升到第 11 天的 95%，顯示突觸在這短短數天內大量形成(O'Brien et al., 1997)。

大腦皮質區由於細胞種類太過複雜，因此對於大腦皮質神經元突觸形成的研究並不多，並且多半的研究者只注意到突觸形成的時間。Blue 及 Parnavelas 指出在大白鼠視覺皮質區的突觸形成多半是發生在出生後 1 周內才開始，到第二週後在整個皮質區都可發現突觸的形成，其分佈模式與成鼠相當。第一類型的突觸隨著發育的時間增加其密度持續增加，到出生後第 20 天其密度相當於成鼠；而第二類型的突觸在出生後六天內無明顯增加的趨勢，但在出生後 2 到 3 周時其密度急速增加，20 天到 90 天之間其密度又會明顯的下降，顯示明顯的突觸削減的現象(synapse elimination)(Blue and Parnavelas, 1983)。而在大白鼠的體感覺大腦皮質區

(somatosensory cortex)的腦切片電顯研究中發現，小鼠出生後第五天只有少數的突觸形成，在出生後第 10 至 15 天其突觸形成的速度最快，到第 20 天達最大值。另外，興奮性突觸在發育 60 天後形成於樹突小刺的情形為發育 5 天的 12 倍，但是形成於樹突分支(Dendritic shaft)上就只增加了 2 倍；抑制性突觸在發育 60 天後形成於樹突小刺的比例則為發育 5 天的 3 倍，而形成於樹突上則增加了 4 倍(Micheva and Beaulieu, 1996)。這與海馬迴區的突觸研究情形相似 興奮性突觸多半形成在樹突小刺上。在大腦皮質的細胞培養實驗方面，Kuroda 等人以 fura-2 來監測細胞內 Ca^{2+} 濃度的變化。細胞培養的第 7 天，多數的細胞都有鈣離子濃度同步震盪 (Ca^{2+} synchronous oscillation)的現象，此反應可以被河豚毒(tetrodotoxin, 鈉離子通道的阻斷劑)、D(-)-2-amino-5-phosphonovaleric(APV,

NMDA 受器之拮抗劑)、adenosine、及細胞外低濃度的 Ca^{2+} 環境所抑制，該批細胞在電顯下也觀察到有突觸形成，代表此鈣離子同步震盪可能是突觸在傳遞神經訊號所產生的現象，也就是說在培養 7 天後多數的細胞都已形成有功能型的突觸 (Kuroda et al., 1992)。

綜觀上述各種突觸形成的實驗，由於使用的細胞種類、培養方式及密度、實驗方法等因素造成不同研究者對於突觸形成的時間觀察不同，並且多半的研究者只注意到突觸形成的時間。我們結合了電生理以及免疫螢光的技術來探討大腦皮質神經元樹突小刺在發育的過程中其形態上的變化，以及內部蛋白的組成改變對於突觸形成與電訊號的影響。我們以螢光標示在不同發育時期的細胞並紀錄電訊號特性，之後同一細胞的突觸位置亦以免疫螢光法顯示。因此我們可以探討發育過程中樹突小刺的密度以及突觸生長的位置與電生理之間的關係。另外我們分別以免疫螢光法標示細胞骨架

蛋白及突觸，並持續觀察樹突小刺內細胞骨架消長的情形，以及最後突觸形成處的樹突小刺特徵。

貳、材料與方法

材料

Sprague Dawley rats 是由國科會實驗動物中心提供。HEPES, glucose, poly-D-lysine(P2658), Cysteine, Triton X-100, BSA, papain(P-4762), DNaseI 是來自 Sigma ; 18 mm 圓形蓋玻片 (No.1001) 來自 Assistant ; 12-well plate(No. 9212) 購自 TPP ; Ca^{2+} -free, Mg^{2+} -free Hanks' balanced salt saline(HBSS, 14170-112, MEM powder (11700-010) 購自於 GIBCO ; Donor horse serum (04-004-1A) , Fetal bovine serum (04-001-1A) , 購自於 Biological Industries ; $NaHCO_3$,

EDTA, CaCl₂, NaCl, KCl, 購自於 Merck ; Glutaraldehyde solution 來自和光一級 ; Sucrose 購自於 Tedia ; 所有二級抗體及 Oregon Green conjugated-Phalloidin 來自 Molecular probe ; Mouse anti-tubulin antibody 購自於 Chemicon ; Mouse anti-synaptophysin antibody 購自於 Boehringer Mannheim Biochemica。

方法

1 大腦皮質神經細胞之組織培養(Cell Culture)

1.1 Medium 配法

Poly-D-lysine

將 5mg poly-D-lysine 溶於 5ml borate buffer (0.15M , pH 8.4 boric acid , 以 NaOH 調 pH) , 然後加 3ml poly-D-lysine 到 100ml borate buffer (最終濃

度為 30μg/ml) , 以 0.2μm 過濾膜過濾。

MEM/High glucose

將 HEPES 2.38 克、MEM 粉末一包、Glucose 2.5 克 , 以及 NaHCO₃ 3.7 克溶於適量(約 950 毫升)的無菌水中 , 以 HCl 或 NaOH 調 pH 至 7.4 後 , 將體積調為 990 毫升並以 0.2μm 過濾膜過濾 , 最後加入 10 毫升的 penicillin/streptomycin(100,000 unit)混合。

MEM/HS/FCS

取配好的 MEM/High glucose 溶液 900 毫升 , 加入馬血清(Horse Serum)及小牛血清(Fetal Calf Serum)各 50 毫升混合。

Papain Solution

取 Ca²⁺, Mg²⁺ free 的 HBSS 5.6 毫升、Papain stock 200μl(3 克 papain 溶於 100 毫升的無菌水中 , 濃度為 30 mg/ml)、EDTA 100μl (9.3 克 EDTA 溶於 500 毫升無菌水中 , 以 NaOH 調 pH 至 8.0 , 濃度為 50 mM)、Cysteine

1ml (1 克 cysteine 溶於 500 毫升無菌水中，濃度為 2 mg/ml)、CaCl₂ 100μl (150 mM)，以及 DNaseI 3ml (0.21 克 DNaseI 溶於 100 毫升 MEM/High glucose，濃度為 0.21 %)等溶液混合。

1.2 老鼠的育種(Rat Breeding)

懷孕母鼠需自行交配，其步驟如下：將一母鼠(8 週大)和一公鼠(19 週大)在下午或傍晚放入同一籠中(通常其在半夜交配)，隔天檢查是否有 vaginal plug 來判斷母鼠是否可能受孕，若有 vaginal plug 這天為受孕的第零天，將受孕的母鼠分開置於盒中飼養。

1.3 培養盤之準備(Culture Plate Preparation)

為了使細胞能附著在玻片上，必須先準備 coat 有 poly-D-lysine 的玻片。將 18mm 圓形蓋玻片經濃硝酸浸泡 8 小時後，於自來水下沖洗隔夜

(overnight)，各以 RO 水及 Mili Q 水沖洗三次後，放入燒杯中滅菌。將玻片放入 12 well plate 中，加入 1ml 之前配好的 poly-D-lysine 至每一個 well 中 coating，避開紫外線，隔夜之後，以無菌水清洗三次，將多餘的水分吸乾後備用。

1.4 解剖老鼠胚胎的大腦(Dissection of Prenatal Rat Cortex)

細胞培養的方法是參考 Buchhalter and Dichter(1991)，Basarsky et al.，(1994)，Maki et al.(1994)，Aranico et al.(1996)的方法。將懷孕 17 至 18 天的 Sprague-Dawley 大白鼠以乙醚進行麻醉，動物麻醉後以 70% 酒精消毒其腹部。以解剖剪剪開其腹部並穿刺橫隔膜，從腹腔中取出子宮置於乾淨的培養皿中。剪開子宮將胚胎由 amnio-chorionic membrane 中取出，剪開胚胎頸部的皮膚後，沿著腦殼縱剪至鼻子部位，以鑷子將頭

皮及腦殼向兩側剝開。用鑷子取出全腦並將之置於含有約 5 毫升 MEM/High Glucose 的培養皿中。將裝有腦組織的培養皿置於解剖顯微鏡下，將全腦背面(dorsal)朝上以五號鑷子夾住並分開左右半腦(hemisphere)。將半腦翻面使其內側面(inner lateral)朝上，以五號鑷子夾住間腦(diencephalon)另一鑷子將之去除。將除去間腦後的半腦轉至外側面(outter lateral)，由嗅球部位將腦膜去除之後將腦翻轉回內側，除去海馬迴部分，最後裝在含有 10 毫升 HBSS 溶液中的離心管中。

1.5 培養老鼠皮質細胞(Culture of Rat Cortical Neurons)

將處理完的腦以 HBSS(Ca²⁺ Mg²⁺ Free) 洗兩次後，將腦組織換到另一無菌的離心管中再以 HBSS 洗一次後將 HBSS 吸掉，以可拋棄式塑膠滴管(pipette)將腦組織磨碎。以一顆全腦 1ml 的木瓜酵素(papain solution)加入

組織塊中，並置於 37°C 的水浴中反應 15 分鐘。加入木瓜酵素體積十分之一的馬血清終止酵素反應，於室溫下以 1500 RPM 離心 15 分鐘。拋棄上清液，加入 10ml 之 MEM/HS/FCS 以塑膠吸管吸放五十次。將均質液以 Cell Strainer (70 μ m) 過濾去除過未被打散的組織塊。取出 15 μ l 過濾後的細胞液加入等體積的 Trypan blue 於室溫靜置 4 分鐘後，在血球計數器下計算活細胞濃度。稀釋成 1 \times 10⁵ cells/ml 後分種於 12 Well 中(內含有 Coating 好的 poly-D-lysine 蓋玻片) 培養於 37°C，5% CO₂ 之培養箱中。培養至第六天加入 cytosine -D-arabinofuranoside (ArC, 1mM) 5 μ l，使最終 ArC 濃度為 5 μ M。隔天將 Medium 全部置換成 condition Medium(養過大腦皮質細胞之培養液，細胞濃度 5 \times 10⁵/ml)培養，之後每隔 4 天換一次 condition Medium。

2 免疫螢光染色 (Immunostaining)

2.1 緩衝液配法

Phosphate Buffered Saline (PBS)

分別將 2.84 克 Na_2HPO_4 及 1.2 克 NaH_2PO_4 溶於 100 及 50 毫升的二次水中，並分別標示為溶液 A 及溶液 B。取 80ml 溶液 A 加上 20ml 溶液 B 混合而成為 0.2M 的 Phosphate Buffer (PB)(於 4°C 下保存使用期限為 1 星期)，以溶液 A 或溶液 B 互調 pH 使 PB 最終 pH 為 7.4。另外將 8.76 克 NaCl 及 0.2 克 KCl 溶於 930ml 二次水中，並加入 50ml 的 0.2M PB pH7.4 溶液，混合後將最終體積調為 1000ml，並以 0.22 μm 過濾膜過濾於 4°C 下保存。

固定液

將 2 克 sucrose 溶於約 45ml 的 PBS 中之後，再加入 2 克 paraformaldehyde 加熱至 50°C

溶解之，若無法完全溶解則加入 1M NaOH 數滴，直到溶液變透明澄清。待溶液冷卻到室溫後加入 500 μl 25% 的 glutaraldehyde，最後將溶液總體積以 PBS 調至 50ml。於 4°C 下保存，使用期限為 1 星期。4% 的 sucrose 是為了讓細胞的保存更好而加入(Luduena, 1973)

固定液 I

配法如固定液，但是不加 500 μl 25% 的 glutaraldehyde，最終體積為 50ml。於 4°C 下保存，使用期限為 1 星期。

0.05% Triton X-100

取 25 μl Triton X-100 溶於 50ml PBS 中，於 4°C 下保存。

1% FCS (Blocking solution)

取 500 μl FCS 溶於 50ml PBS 中，於 4°C 下保存。

稀釋溶液(Diluted solution)

取 0.1 克 BSA 溶於 50ml PBS 中，於 4°C 下保存。用以抗體的稀釋。

2.2 Lucifer yellow-

Synaptophysin 雙重標定

實驗時間分為三組，分別為細胞培養後 7 至 8 天、14 至 15 天，及 20 至 22 天。在各組時間點中將注射 lucifer yellow 後的細胞，加入固定液 I 於室溫下進行固定 30 分鐘。細胞固定後以 PBS 沖洗三次，以 methanol/acetone 1:1(v/v) 溶液於 -20°C 下靜置 5 分鐘以蝕穿細胞膜。以拭鏡紙擦掉玻片四周多餘的部分，留下注射 lucifer yellow 細胞為中心約 0.5cm² 的面積保持濕潤，在其四周塗上指甲油標示並可限制抗體的流動。加入 1% FCS 於 4°C 下靜置 1 小時以減少抗體非專一性的結合。玻片以 PBS 沖洗一次後，以下步驟皆在避免強光照射下環境進行。加入一級抗體(Mouse Anti-Synaptophysin, 1μg/ml) 約 15μl 後，將玻片置於 10mm 培養皿中並以濕潤的擦手紙包住培養皿，外加蓋一層鋁箔紙以保持溼度並隔絕光線(稱作為 wet

chamber)靜置 2 小時。以 PBS 沖洗三次去除過量的一級抗體，加入二級抗體(Texas Red Conjugated Goat Anti-Mouse, 5μg/ml) 約 15μl，靜置於 wet chamber 中 2 小時。以 PBS 沖洗三次去除過量的二級抗體，加入 15μl Prolong Antifade 溶液封片，等溶液乾後置於螢光顯微鏡(Nikon, Optiphot-2)下觀察照相(Nikon FX-35DX with CF PL5X projection lens)。螢光部分分別以 B-2A(EX:450-490nm, BA: 520nm, DM: 510nm)與 G-2A(EX: 510-560nm, BA: 590nm, DM:580nm) 濾鏡激發 lucifer yellow(Ex:428 Em:533, maximum)及 texas red(EX:587 Em:602, maximum)；phase contrast 則使用一般可見光源。於 100 倍(CFWN 10X, Plan 10X) 下以注射 lucifer yellow 的細胞為中心，各在 phase contrast 及螢光下照一張相片，以作為日後計算細胞密度的依據。另外選擇所標示細胞之距細胞本體

150 μ m 內主要分支(通常有 3 條主分支)，在同一顯微視野下分別針對 lucifer yellow 及 synaptophysin 染色照相(1000 放大倍率，CFWN 10X, Plan Fluro 100X)。

2.3 Actin-Tubulin/Actin-Synaptophysin 雙重標定

所有染色方法是參考 Wang et al(1998)，Banker and Goslin (1991)，及 Bolam (1992)的方法。實驗時間分為四組分別為細胞培養後 3 至 5 天、8 至 10 天、13 至 15 天，以及 18 至 20 天。在各實驗的時間點中將含有細胞的蓋玻片以 PBS (因此時細胞尚未固定必須用 37°C PBS)洗去培養液，並加入固定液於 4°C 下進行固定 30 分鐘。細胞固定後以 PBS 沖洗三次，以 0.05% Triton X-100 於室溫下(約 23°C)靜置 15 分鐘以蝕穿細胞膜。以 PBS 沖洗三次後，加入 1% FCS 於 4°C 下靜置 1 小時以減少抗

體非專一性的結合。玻片以 PBS 沖洗一次後，以拭鏡紙擦掉玻片四周多餘的部分，留下約 0.5cm² 的濕潤面積，在其四周塗上指甲油標示並可限制抗體的流動。以下步驟皆在避免強光照射下環境進行。加入 Oregon Green conjugated- Phalloidin (50units/ml)約 15 μ l 至指甲油畫出的小框區，靜置於 wet chamber 中 30 分鐘後，以 PBS 沖洗三次去除過量的 Phalloidin，加入一級抗體 (Mouse Anti-Tubulin，1:500(v/v)； Mouse Anti-Synaptophysin，1 μ g/ml) 約 15 μ l，靜置於 wet chamber 中 2 小時。以 PBS 沖洗三次去除過量的一級抗體，加入二級抗體 (Texas Red Conjugated Goat Anti-Mouse，5 μ g/ml)約 15 μ l，靜置於 wet chamber 中 2 小時。以 PBS 沖洗三次去除過量的二級抗體，加入 15 μ l Prolong Antifade 溶液封片，等溶液乾後

置於螢光顯微鏡 (Nikon, Optiphot-2) 下觀察照相 (Nikon FX-35DX with CF PL5X projection lens)。螢光部分分別以 B-2A 與 G-2A 濾鏡激發 oregon green (Ex:493 Em:520, maximum) 及 texas red (EX:587 Em:602, maximum) ; phase contrast 則使用一般可見光源。於一百倍 (CFWN 10X, Plan 10X) 下隨機取三點照相, 以作為日後計算細胞密度的依據。另外於一千倍 (CFWN 10X, Plan Fluro 100X) 下隨機選擇小刺中有 actin 的樹突區 (不限制在距離細胞本體 150 μ m 內的樹突分支), 在同一顯微視野下針對 actin-tubulin 及 actin-synaptophysin 配對染色的細胞先後照相, 每一個神經元只照一組照片。

3. 數據分析(Data analysis)

照片經由 Nikon CoolscanII scanner 以寬 2.44cm、高 3.66cm、解析度 1350 pixel/cm

條件下輸入電腦, 並利用 Photoshop 5.0(adobe)調整照片之對比 (contrast)、亮度 (brightness) 及各種必要的影像處理 (所有圖片皆經過對比、亮度, 以及飽和度的修飾並非原來的色彩, pseudo-color), 以利於計算各測量值。另外使用 Excel 7.0(microsoft)、SAS 6.12(SAS) 及 Origin 4.1(microcal) 作數據的資料分析, 以 Origin 4.1 做圖。圖中所有的數值都是以 Mean \pm SEM 表示。統計方法包括了 Student's T-test、Linear regression、Mann-Whitney U test 以及 One-way ANOVA。當 One-way ANOVA 測得各組間至少一組間有差異時, 以 Duncan's multiple range test 分析各組之間的差異。

3.1 Lucifer yellow-Synaptophysin 雙重標定

3.1a 樹突小刺密度 (spine density)

在 lucifer yellow 螢光的照片中，於各樹突分支(processes)的中心處連出曲折的直線段，此直線段的總長代表樹突分支的長度。樹突小刺的定義是參考 Michele 於 1995 發表的文獻中樹突小刺的定義：凡小於 $7\mu\text{m}$ 且不分岔的小突起都定義為樹突小刺。算出整張照片中樹突小刺的數目除上中線的總長度即為樹突小刺的密度(圖 1)。

3.1b 樹突小刺有突觸分布的百分比 (Percentage of colocalization)

將相同顯微視野區域 lucifer yellow 及 synaptophysin 的螢光照片重疊，計算照片上所有同時有 lucifer yellow 及 synaptophysin 螢光反應的樹突小刺數目除上照片中所有的樹突小刺的數目，即為突觸形成於樹突小刺上的比例(圖 2)。

3.1c 突觸在樹突分支上分布的情形(S/D Ratio)

將相同顯微視野區域 lucifer yellow 及 synaptophysin 的螢光照片重疊，將 lucifer yellow 圖層勾邊(find edges)，使其只剩下樹突分支的輪廓。在各樹突分支的中線處畫線，計算 synaptophysin 螢光穿過中線以及樹突分支兩側輪廓的長度(S)除上各分支中線的長度總和(D)，此比值代表突觸在樹突分支上的分布程度(圖 3)。

3.2 Actin-Tubulin/ Actin-synaptophysin 雙重標定

3.2a Actin-Tubulin 消長情形

分別計算相同顯微區域照片中所有 actin 及 tubulin 免疫染色可辨識的樹突小刺，以數目多者當作樹突小刺的總數。將小刺尾端直徑(D_h)除上頸部直徑(D_n)值大於 1 者定義為有頭(head)類型；等於或小於 1 者為沒頭(headless)類型。分別將 actin 免疫染色照片中可辨識之有頭與沒頭的樹突小刺計算出

來，相加除上樹突小刺的總數為 actin 出現在所有樹突小刺上的比例；將有頭的樹突小刺數目除上樹突小刺總數，為所有樹突小刺中有頭小刺所佔的比例。tubulin 算法比照 actin。

3.2b synaptophysin 分布情形

計算 actin 染色照片中所有可辨識的樹突小刺，當作樹突小刺的總數。將相同顯微視野區域 synaptophysin 染色的照片重疊，分別計算 synaptophysin 螢光反應出現在有頭及沒頭類型樹突小刺的數目，將這兩數值分別除上小刺總數可得 synaptophysin 分布於兩種樹突小刺類型的比值。

參、結果

3.1 同一神經細胞之電生理及形態特性分析

Synaptophysin 為位於前突觸中 clear small synaptic vesicle 膜上一個 38kDa 的蛋白 (Navone et al. 1986, Jahn et al.

1985, Fletcher et al. 1991)。我們利用 synaptophysin 的免疫染色標定處代表突觸形成的所在。圖 4 為細胞培養 14 天後的細胞作 synaptophysin 的免疫染色並於 400 倍放大照相結果，由圖中可以清楚看到 synaptophysin 的螢光沿著細胞分支及細胞本體邊緣分布，每一個點都代表了前突觸的位置。另外利用全細胞電位箝制法 (whole cell voltage clamp) 的技術可記錄細胞的電生理反應，並可利用同一根記錄電極將螢光物質 lucifer yellow 注入此細胞內。我們可以利用藍光激發 lucifer yellow 而在顯微鏡下找到這顆發黃綠色記錄過電生理訊號的細胞。如圖 5 所示，左圖為 100 倍下 phase contrast 的照片顯示了視野中有許多角錐細胞，而右圖則是在同一顯微視野中被 lucifer yellow 標示的細胞在藍光的激發下所呈現的細胞形態，可見到角錐形的細胞本體及許多細長延伸的分支。由於只

標示一顆細胞因此我們可以輕易的追蹤並分析此顆細胞分支的細微結構而不至於與其他細胞的分支混淆。結合了這些技術，我們便可同時找出發育過程中細胞的形態變化與突觸的形成及電生理之間的關係。

3.2 細胞培養之細胞密度穩定

以被 lucifer yellow 標示的細胞為中心，對此區的細胞族群以 100 倍 phase contrast 的顯微區域照一張照片(如圖 5 之左圖)，以顯示該區域細胞生長的情形，並計算此顯微視野中神經細胞(有分支的細胞)的密度。依發育時間分組並計算各組細胞密度的平均值(取整數)。結果顯示，細胞密度在第 7 天加過 Arc 後明顯下降(t-test, $P < 0.05$)，而在之後第 2 及第 3 週的細胞培養中，細胞密度並無明顯改變(圖 6A, t-test, $P > 0.05$)。相同的情形亦出現在對細胞作 actin 染色

的實驗上。在染色處理完的細胞片子上以 100 倍 phase contrast 的顯微區域隨機照三張照片，平均此三張照片中神經細胞的密度代表整個細胞族群中神經細胞的密度。在加入 Arc 後(第 6 天)細胞密度明顯下降 (t-test, $P < 0.05$)，而之後密度就無明顯變動(圖 6B, one-way ANOVA, $P > 0.05$)。因此，在培養中加入 Arc 可造成細胞密度降低，將 Arc 洗去後以 condition medium 繼續培養細胞，細胞的密度並沒有隨著培養時間而明顯減少。另外電生理紀錄顯示細胞膜的隔絕效果(leakage current level)，以及在形態上細胞的外觀皆無明顯異常現象，顯示在此細胞培養的狀況下細胞的生長良好。

3.3 小刺密度隨發育時間減少；突觸的出現隨時間增加

由於細胞培養至後期，神經網路的連結太過複雜以至於距離細胞本體太遠的分支在

synaptophysin 染色結果上無法判定是來自於哪一顆細胞，因此在 lucifer yellow 及 synaptophysin 雙重標定中我們只計算細胞培養後第 1、2、3 週時距離細胞本體 150 μ m 內樹突小刺的密度、突觸在樹突分支以及樹突小刺上分布的情形。

圖 7 為細胞培養第 7(圖 A)、14(圖 B)、22(圖 C)天後以 lucifer yellow 標示細胞並疊上對 synaptophysin 作免疫標定的雙染圖。由這三張照片可以反映出突觸的出現隨時間增加。細胞培養 7 天只有少數的突觸形成，且多形成在樹突(dendritic shaft)上，有少數的樹突小刺上可發現有突觸形成(白色箭號)；到 14 天後突觸大量形成，並且突觸出現在樹突小刺的數量增多，到了第 22 天出現在小刺上的突觸增加的趨勢更為明顯。另外小刺的形態亦隨著發育的時間不同有所不同(後詳)。

將照片的結果做圖統計，小刺密度隨著發育時間增加由第一週的每微米約有 0.23 個小刺下降第二週的每微米 0.12 個，及第三週每微米 0.10 個小刺(圖 8)。因此，在 150 μ m 內樹突小刺的密度隨發育時間有明顯減少的趨勢 (One-way ANOVA, $P < 0.05$)。而突觸形成在樹突小刺及樹突分支(dendritic shaft)上的比例則隨著發育的時間而增加。突觸形成在樹突小刺上的情形以百分比表示，隨著發育時間的增加，突觸形成在小刺上的比例也隨著明顯增高，由第 1 週的 2.5%增加到第 2 週 18.3%及第 3 週的 52.9%(圖 9, Mann-Whitney U test, 第 1 週與第 2 週比較；第 2 週與第 3 週比較， P 皆小於 0.05)。另外突觸形成於樹突分支上的情形則以 S/D Ratio 表示。突觸出現在樹突分支上的比值，第 1 週至 2、3 週的 S/D Ratio 分別為 0.04、0.23 及 0.46，呈現一個明顯上升的

趨勢(圖 10, One-way ANOVA, $P < 0.001$)。因此，突觸在樹突小刺及樹突分支的分布情形皆隨著發育時間增加而有明顯增加的趨勢。

3.4 小刺中 Tubulin 成分隨時間遞減；小刺形態隨時間改變

對各發育時期的神經細胞作細胞骨架蛋白的染色標定，並觀察樹突小刺中 F-actin 及 tubulin 分布的情形，結果如圖 11。在發育的早期絕大多數的樹突小刺中皆可偵測到此兩種細胞骨架蛋白的存在(如圖 A)，且 tubulin 分布的範圍較 F-actin 廣，但是少數的小刺中染得到 tubulin 但卻無法偵測到 F-actin(圖 B 之白色箭頭處)，也有些可染到 F-actin 而無法染到 tubulin(圖中無此例)。隨著發育的時間增加小刺內的 tubulin 成分逐漸減少，由 tubulin 染色中可看出小刺中的 tubulin 由小刺頂端開始向基部

削減(螢光開始減弱)，但在基部之 tubulin 染色並未完全消失(圖 B)。當發育時間到第二週時，tubulin 在小刺頭部的染色較明顯，但在頸部的 tubulin 變少(圖 C)，而到第 18 天後小刺頸部的 tubulin 更少了，幾乎很難偵測到(圖 D)。將各發育天數的結果做圖統計，結果發現在前兩個時期 (3-5, 8-10 days) 可染到 tubulin 的樹突小刺總數較可染到 actin 的來得多，也就是小刺內含有 tubulin 的比例較含有 actin 的高(Mann-Whitney U test, $P < 0.05$)；在 13 至 15 天的時期由於小刺中 tubulin 的成分減少使得可染到含有 tubulin 的小刺之比值開始降低，與可染到含有 actin 的小刺比值無異(Mann-Whitney U test, $P > 0.05$)；在培養 18 天後，可染到含有 actin 小刺的比值 (98.75%) 遠高於 tubulin (70.69%) (Mann-Whitney U test, $P < 0.05$) (圖 12)。由以上數據說明了，小刺中 tubulin 成分隨時間以兩種形式遞減，無頭

類型的樹突小刺 tubulin 由小刺末端向基部削減；有頭類型的小刺，頸部的 tubulin 成分減少。

比較以 lucifer yellow 標定及利用免疫螢光標定的樹突小刺在形態上並無明顯的差別，顯示經過 patch，紀錄電訊號並注入 lucifer yellow 的細胞其樹突小刺的形態並不受到影響。由 actin 的染色及 lucifer yellow 的標定皆可以觀察出，樹突小刺的形態隨著發育時間的增加而有所變化。不論是以 lucifer yellow microinjection (圖 7)或是以免疫染色標定小刺內的 actin(圖 11 及圖 14)都可看出小刺在發育早期多為沒頭類型，隨著發育時間的增加，有頭類型的小刺比例逐漸增加取代了沒頭類型的小刺。將 actin 對 tubulin 雙重標定染色中含有 actin 有頭類型的小刺佔所有小刺的比例對時間做圖統計，發現有頭類型的小刺由細胞培養後一週的 24.55%增加到第三週的 83.78%(圖 13)，顯示小

刺形態隨時間由沒頭類型轉變為有頭類型(Mann-Whitney U test, $P < 0.05$)。另外，由各圖中也可明顯看出除了形態上發生改變外，樹突小刺的長度也隨發育時間增加而變短。

3.5 大多有頭類型的小刺上會形成突觸

利用 synaptophysin 與 actin 雙重標定，我們發現突觸大多出現在有頭類型的小刺上。圖 14 為各時期對 synaptophysin 與 actin 作雙重標定的疊層圖，在細胞培養 3 至 4 天後可測得 synaptophysin 的螢光反應(白色星形，圖 14a)，表示在 1×10^5 的細胞密度培養下，突觸可能在細胞培養三天後即可形成，但是數目極少，並且沒有電生理的紀錄因此無法確定是否為有功能的突觸，並且此時突觸大多形成於樹突分支(dendritic shaft)上。隨著發育時間增加，突觸形成的程度亦隨時間增加，分析突觸形成

在樹突小刺的情形發現，突觸出現在有頭類型的小刺的比例增加(圖 14b, c, d)。將照片的結果做圖統計發現，隨著時間增加有頭類型的小刺上可發現突觸的比例由第 1 週的 10.02% 升到第 2 週的 41.78%，而在沒頭類型的小刺上出現突觸的比例一直低於 5%(圖 15)。因此我們可以說大多有頭類型的小刺上會形成突觸。

肆、討論

我們以 1×10^5 cells/ml 的密度培養神經細胞，利用免疫染色及全細胞電位箝制的方式記錄了細胞發育形態變化與電生理的關係，以及利用雙重免疫標定的技術研究小刺內細胞骨架的消長情形與突觸形成在小刺的類型研究上得到下面幾點結論：1. 小刺密度隨發育時間遞減；2. 突觸形成在樹突分支及樹突小刺的比值隨發育時間增加；3. 小刺內 tubulin 成分會隨發育時間而遞減；4. 細胞發育至第 3 週，有

頭類型的樹突小刺佔所有小刺的 80% 以上；5. 突觸多半形成在有頭類型的小刺上。

有文獻指出，培養的大白鼠海馬迴神經細胞其樹突小刺的密度隨著發育時間而遞增，第三週小刺密度達最大值(每微米約有 0.35 個小刺)，但是發育到第四週，小刺密度有些許的下降趨勢(每微米約有 0.3 個小刺)(Papa et al., 1995)。我們計算大白鼠大腦皮質細胞距離細胞本體 $150\mu\text{m}$ 內小刺密度結果密度隨發育時間而遞減，除了由於實驗細胞之區域不同及細胞培養的密度不同可能導致的結果外，另外有報導指出樹突小刺多半分布於樹突的遠端處(distal)(Shepherd, 1996)。比較我們實驗的結果，在細胞培養二週後小刺密度確實以遠端處較多，但由於細胞培養至二週後，神經網路的連結太過複雜以至於距離細胞本體太遠的分支在

synaptophysin 染色結果上無法判定是來自於哪一顆細胞，因此我們只計算距離細胞本體 150 μ m 內樹突小刺的密度、突觸在樹突分支以及樹突小刺上分布的情形。我們雖然以此區域內小刺及突觸在發育中的變化反映細胞表面大多數的情況，然而我們不排除在不同發育時期，樹突遠端的形態變化可能與近端的相異。

在距細胞本體 150 μ m 內突觸形成在小刺的比例隨時間增加，由第 1 週的 2.5%增加到第 2 週 18.3%及第 3 週的 52.9%。Boyer 等人比較三週內之細胞培養與出生後 5 至 21 天之大白鼠腦組織切片海馬迴區的樹突小刺發現，在細胞發育的過程中不論在細胞培養或是腦組織切片都可發現突觸的密度會隨時間而增加，但是在細胞培養下當細胞發育至 21 天左右，突觸形成在樹突小刺與樹突分支上的比例是差

不多的約各佔 50%，而在腦組織切片中有 80%的突觸是長在突觸小刺上的 (Boyer et al., 1998)。這與我們的結果相類似：在細胞培養至第三週小刺上可發現突觸的機率約有 53%；而突觸形成在樹突分支上的比值(S/D ratio)也是隨發育時間增高，到第 3 週比值約為 0.46。另外 Micheva 與 Beaulieu 於 1996 年提出大白鼠的體感覺大腦皮質區(somatosensory cortex)的腦切片電顯中發現，小鼠出生後第五天已有少數的非抑制性突觸形成在小刺上(42%)，在出生後第 10 至 15 天其突觸形成於小刺上的速度最快，到第 20 天達最大值(85%)。比較我們與 Micheva 的實驗結果，兩個實驗之突觸形成在小刺的比例皆隨著時間而增加，且在 10 至 15 天突觸形成於小刺上的速度最快，但是由於 Micheva 等人取樣的細胞來自於腦切片，除了有高密度的神經網路的連結外，神經膠細胞(glia

cells)的支持更提供了神經細胞完整的發育空間，因此在細胞出生後第 5 天突觸形成在小刺的位置即可達到 42%，而在第三週其數值即與成熟細胞類似。

樹突小刺中是否含有 tubulin 一直是大家爭論的話題。因為利用不同的抗體或是不同的染色步驟乃至於細胞培養或是組織切片的研究比較都有不同的結果報導。一般認為，在樹突小刺細胞質中 tubulin 的含量極少，但在 PSD 的位置含有大量的 tubulin。我們的結果指出在發育過程中小刺頸部的 tubulin 會隨時間而遞減，但在頭部區域 tubulin 減少的趨勢並不明顯，到細胞培養第三週小刺頸部 tubulin 成分幾乎偵測不到，但頭部依然可以偵測到有 tubulin 存在，因此我們實驗在細胞培養第三週所測得小刺頭部 tubulin 的螢光也許是來自 PSD。Van Rossum 等人於 1999 年指出 NMDA 受器的次級單位

(subunits)NR1 及 NR2B 會與 tubulin 做結合，並且這些次級單位對於 tubulin dimer 或是其他一些 soluble form 的 tubulin 作用有較高的親和性，而對 microtubules 的親和性則較弱 (Van Rossum et al., 1999a)。因此可能在發育過程中小刺內 microtubules 隨時間退縮至基部最後消失，但在頭部 PSD 區的 tubulin 因為 NMDA 受器的次級單位的箝制而保留，並以 tubulin dimer 或是以 soluble form 存在。

到底小刺內的 tubulin 及 actin 扮演著麼樣的角色？一些非直接性的證據指出 NMDA 受器傳導之突觸訊號與 tubulin 的動態(dynamic)有關，如 Halpain 與 Colleagues 觀察藉由 NMDA 離子通道的開啟增加細胞內鈣離子的濃度會造成 microtubule associated protein 2(MAP2)的磷酸化被抑制而可穩定 microtubule 的結構(Quinlan and

Halpain, 1996)。而小刺中的 microfilaments 比細胞其他區域來的穩定(Allison et al., 1998)，但是有許多文獻指出聚合形的 actin 受到突觸活性的影響而有分解的現象，如將 NMDA 加至培養的小腦顆粒細胞(cerebellar granule cells)，會造成全面性的 microfilament 分解的現象(Shorte, 1997)。根據這些研究 Van Rossum 等人於 1999 年提出了一個假說：在一般情形 PSD 上有許多 dimmer 或 soluble 形式的 tubulin，而 actin 則聚合成 microfilament 的形式存在，作為各種受器的立足點。當後突觸區鈣離子濃度經由 NMDA 受器開啟而聚增時，GTPase 活化而造成 tubulin 聚合成 microtubule，並且 MAP2 因去磷酸化作用而與 tubulin 的親和性大增而穩定 microtubule 的結構。而 Microfilament 也因為鈣離子濃度增加而分解。此時 microtubule 可當作運送系統的

軌道，將新合成之蛋白送至突觸的活性區，因而提供了突觸間可塑性的機制(Van Rossum et al., 1999b)。

另外在無頭類型的小刺上 tubulin 隨發育時間在小刺的基部逐漸消失，並且由 actin-synaptophysin 雙重標的顯示，無頭小刺形成突觸的機率極低，由於沒有 NMDA 受器的次級單位的箝制，因此無頭形小刺內的 tubulin 由頂端向基部逐漸消失。有文獻指出以高頻率的電刺激刺激大白鼠海馬迴 CA1 區的細胞，結果發現受刺激的樹突區比起未受刺激的樹突區其類似小刺的突起物數目明顯增加，他們稱作此類型的突起物為 filopodia-like protrusions，這些 protrusions 被認為是日後形成樹突小刺的先驅物(Maletic-Savatic, 1999)。在發育的早期無頭類型的小刺為主要的小刺形態，此類型的小刺其分類上較屬於 filopodia-like protrusions，隨

著發育時間逐漸由有頭類型的小刺所取代並開始於其上形成突觸。這些在發育過程中沒有轉形成成功的無頭類型的小刺最終可能消失，但是新的小刺可視突觸活性的需求而再生，最後達到動態平衡。

我們為了比較細胞發育中形態與功能之間的關聯，在檢查發育中形態變化的同時也記錄了一些功能上的變化(目前侷限於電生理功能)。同實驗室葉家成同學以全細胞電位箝制法(whole cell voltage clamp)，紀錄在高濃度鉀離子的 external solution (K^+ 濃度為 25mM)中細胞的後突觸興奮性電訊號 eEPSCs (evoked EPSCs) 的頻率及大小。在灌流 high K^+ external solution 之後，細胞培養 1 週之細胞開始有少量的 eEPSCs 可以被記錄到，然而出現的頻率並不高，約為 2.2 Hz。在 2 週大的神經細胞上開始可以見到少量自發性後突觸電訊號 sEPSCs

的出現。在灌流 high K^+ external solution 後，發現 eEPSCs 的頻率與第 1 週大的細胞所測得的並無明顯改變，值約為 2.19 Hz。在神經細胞發育的第 3 週記錄其電流訊號時，會發現其 sEPSCs 的頻率與前面二週所記錄到的訊號相較之下，有略微增加的趨勢。灌流 high K^+ external solution 之後，eEPSCs 的頻率與 sEPSCs 的頻率相較，有大幅上升的情形出現，達到 10.24 Hz。將這個值與前兩週所觀測到的 eEPSCs 頻率相比，亦可發現第三週 eEPSCs 的頻率大幅增加了約有 5 倍之多，另外電流大小也有隨發育天數增加的趨勢(葉家成,1999)。

為了了解電訊號的增加與形態變化上的關聯，我們將測得之 eEPSCs 與 lucifer yellow 與 synaptophysin 雙重標定的結果作圖，並作直線回歸計算其相關係數 R 值以比較突觸形成在樹突分支上(S/D ratio)與形成在小

刺上 (percentage of colocalization) 的比例與 eEPSCs 出現頻率的關係。突觸形成在樹突分支上、突觸形成在小刺上的比例與 eEPSCs 出現頻率的 R 值分別為 0.52、及 0.67(附錄圖一)。由相關係數來看突觸形成在小刺上的比例與 eEPSCs 出現頻率最為相關，其次為突觸形成在樹突分支上的比例。由之前研究來看，在中樞神經系統中，成熟的興奮性神經元有超過 90% 樹突小刺上發現突觸(Harris and Kater, 1994)，而突觸為神經系統中傳遞電訊號的所在，因此理論上突觸越多可測得之後突觸電訊號也相對性的增多。然而，突觸形成在小刺上的比例與 eEPSCs 出現頻率的相關係數只有 0.67，而突觸形成在樹突分支上的比例與 eEPSCs 出現頻率的相關係數只有 0.52，顯示這兩個因素的相關程度並不好。有可能是因為我們以 synaptophysin 染色作為突觸的

指標(包括興奮性及抑制性突觸)，但是這並不能反映出此時的突觸是否為有功能的突觸，也無法確定抑制性突觸的影響。最後由於樹突小刺上可發現有突觸的機率只有 53%，其他有相當多的突觸形成在樹突分支上，而 eEPSC 是所有突觸傳導的結果。因此，這可能也是造成 eEPSC 對於突觸形成在小刺上與突觸形成在樹突分支上的比例相關程度不佳的原因之一。

先形成樹突小刺再生成突觸，或是先有電訊號的刺激而引發樹突小刺的生長，這是一個我們想要知道的問題。然而以目前的實驗方法所得到的資訊並不足以解決這個問題。另外樹突小刺中細胞骨架的消長在生理上有何意義，以及在不同細胞培養密度下細胞形態與功能之間的關聯是否不同。這些都是未來有待研究解決的方向。

伍、參考文獻：

Alfredo C, Michael RP, Lester IB, and Oswald S, 1983, Immunocytochemical localization of actin and microtubule-associated protein MAP2 in dendritic spines, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80, 1738-1742.

Allison DW, Gelfand VI, Spector I, and Craig AM, 1998, Role of actin in anchoring postsynaptic receptors in cultured hippocampal neurons: differential attachment of NMDA versus AMPA receptors, J. Neurosci., 18(7), 2423-2436.

Amaral DG, Ishizuka N, Claiborne BJ, 1990, Neurons, numbers and the hippocampal network, Prog. Brain Res., 83, 1-11.

Banker G and Goslin K, 1991, Characterizing and studying neuronal cultures, Chapter 4 in Culturing Nerve Cells, MIT Press, Cambridge Massachusetts, pp. 75-112.

Basarsky TA, Parpura V, and Haydon PG, 1994, Hippocampal synaptogenesis in cell culture: Developmental time course of synapse formation, calcium influx, and synaptic protein distribution, J. Neurosci., 14, 6402-6411.

Blue ME, and Parnavelas JG, 1983, The formation and maturation of synapses in the visual cortex of the rat. II. Quantitative analysis, J. Neurocytol., 12, 697-712.

Bolam JP, 1992, Preparation of central nervous system tissue for light and electron microscopy, Chapter 1 in Experimental Neuroanatomy: a practical approach, Bolam JP ed, Oxford University Press, New York, pp. 1-29.

Boyer C, Schikorski T, and Stevens CF, 1998, Comparison of hippocampal dendritic spines in culture and in brain, J. Neurosci., 18, 5294-5300.

Buchhaker JR, and Dichter MA, 1991,

- Electrophysiological comparison of pyramidal and stellate nonpyramidal neurons in dissociated cell culture of rat hippocampus, *Brain Res. Bull.*, 26, 333-338.
- Caceres A, Bender P, Snavely L, Rebhun LL, Steward O, 1983, Distribution and subcellular localization of calmodulin in adult and developing brain tissue, *Neuroscience*, 10, 394-410.
- Cajal SR, 1911, *Histologie du systeme nerveux de l'homme et des vertebres*, Paris: Maloine.
- Carlin RK, Bartlet DC, Siekevitz P, 1983, Identification of fodrin as a major calmodulin-binding protein in postsynaptic density preparation, *J. Cell Biol.*, 96, 443-448.
- Christof K, and Anthony Z, 1993, The function of dendritic spine: devices subserving biochemical rather than electrical compartmentalization, *J. Neurosci.*, 13, 413-422.
- Dehay C, Douglas RJ, Martin KAC, Nelson C, 1991, Excitation by geniculo-cortical synapses is not vetoed at the level of dendritic spines in cat visual cortex, *J. Physio (Lond)*, 440, 723-734.
- Drenckhahn D, Kaiser HW, 1983, Evidence for the concentration of F-actin and myosin in synapses and in the plasmalemmal zone of axon, *Eur. J. Cell Biol.*, 31, 235-240.
- Engert F, and Bonhoeffer T, 1999, Dendritic spine changes associated with hippocampal long-term synaptic plasticity, *Nature*, 399, 66-70.
- Fifkova E, 1985, A possible mechanism of morphometric changes in dendritic spines induced by stimulation, *Cell Mol. Neurobiol.*, 5, 47-63.
- Fletcher TL, Cameron P, Camilli PD, and Banker G, 1991,

- The distribution of synapsin I and synaptophysin in hippocampal neurons developing in culture, *J. Neurosci.*, 11, 1617-1626.
- Gordon MS, 1996, The dendritic spine: a multifunctional integrative unit, *J. Neurophysiol.*, 75, 2197-2210.
- Gray EG, 1959, Axo-somatic and axo-dendritic synapses of the cerebral cortex: an electron-microscopic study, *J. Anat.*, 93, 420-433.
- Harris KM, and Kater SB, 1994, Dendritic spines: cellular imparting both stability and flexibility to synaptic function, *Neuroscience*, 17, 341-371.
- Harris KM, and Stevens JK, 1989, Dendritic spines of CA1 pyramidal cells in the rat hippocampus: serial electron microscopy with reference to their biophysical characteristics, *J. Neurosci.*, 9, 2982-2997.
- Jahn R, Schiebler W, Ouimet C, and Greengard P, 1985, A 38,000-dalton membrane protein (p38) present in synaptic vesicles, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82, 4137-4141.
- Kuroda Y, Ichikawa M, Muramoto K, Kobayashi K, Matsuda Y, Ogura A, and Kudo Y, 1992, Block of synapse formation between cerebral cortical neurons by a protein kinase inhibitor, *Neurosci. Lett.*, 135, 255-258.
- Larman AU, 1991, Dendritic morphology of pyramidal neurons of the visual cortex of the rat: III. spine distribution, *J. Comp. Neurol.*, 306, 332-343.
- Legendre PA, Tixier-Vidal JL, Brigant, and Vincent JD, 1988, Electrophysiology and ultrastructure of mouse hypothalamic neurons in culture: A correlative analysis during development, *Dev. Brain Res.*, 43, 273-285.
- Luduena MA, 1973, The growth of spinal ganglion

neurons in serum-free medium, *Develop Biol.*, 33, 470-476.

Maki R, Robison MB, and Pichter MA, 1994, The glutamate uptake inhibitor L-trans-pynolidine-2,4-dicarboxylate depresses excitatory synaptic transmission via a presynaptic mechanism in cultured hippocampal neurons, *J. Neurosci.*, 14, 6754-6762.

Maletic-Savatic M, Malinow R, and Svoboda K, 1999, Rapid dendritic morphogenesis in CA1 hippocampal dendrites induced by synaptic activity, *Science*, 283, 1923-1927.

McBain CJ, Freund TF, and Mody I, 1999, Glutamatergic synapses onto hippocampal interneurons: precision timing without lasting plasticity, *TINS*, 22, 228-235.

Michele P, Marsha CB, Varda G., and Menahem S., 1995, Morphological analysis of dendritic spine development in primary cultures of

hippocampal neurons, *J. Neurosci.*, 15(1), 1-11.

Micheva KD, and Beaulieu C, 1996, Quantitative aspects of synaptogenesis in the rat barrel field cortex with special reference to GABA circuitry, *J. Comp. Neurol.*, 373, 340-354.

Muraoka S, and Takahashi T, 1989, Primary cell culture of fetal rat central nervous tissue. I. Immunocytochemical and ultrastructural studies of cell development and synaptogenesis, *Dev. Brain Res.*, 49, 51-62.

Navone F, Jahn R, Gioia GD, Stukenbrok H, Greengard P, and Camilli PD, 1986, Protein p38: An integral membrane protein specific for small vesicles of neurons and neuroendocrine cells, *J. Cell Biol.*, 103, 2511-2527.

Nusser Z, Lujan R, Laube G, Roberts JD, Molnar E, and Somogyi P, 1998, Cell type and pathway dependence of synaptic AMPA receptor

number and variability in the hippocampus, *Neuron*, 21, 545-559.

O'Brien RJ, Mammen AL, Blackshaw S, Ehlers MD, Rothstein JD, and Huganir RL, 1997, The development of excitatory synapses in cultured spinal neurons, *J. Neurosci.*, 17(19), 7339-7350.

Quinlan EM, and Halpain S, 1996, Postsynaptic mechanisms for bidirectional control of MAP2 phosphorylation by glutamate receptors, *Neuron*, 16, 357-368.

Rouget M, Araud D, Seite R, Prochiantz A, and Autillo-Touati A, 1993, Astrocyte-regulated synaptogenesis: An in vitro ultrastructural study, *Neurosci. Lett.*, 150, 85-88.

Shorte SL, 1997, N-methyl-D-aspartate evokes rapid net depolymerization of filamentous actin in cultured rat cerebellar granule cells, *J. Neurophysiol.*, 78, 1135-1143

Tixier-Vidal A, Barret A, Faivre-Bauman A, Huttner W, and Wiedenmann B, 1992, Differential expression and subcellular localization of secretogranin II and synaptophysin during early development of mouse hypothalamic neurons in culture, *Neuroscience*, 47, 967-978.

Van Den Pol AN, Obrietan K, Belousov AB, Yang Y, and Heller HC, 1998, Early synaptogenesis in vitro: role of axon target distance, *J. Comp. Neurol.*, 399, 541-560.

Van Rossum D, Kuhse J, and Betz H, 1999a, Dynamic interaction between soluble tubulin and C-terminal domains of N-methyl-D-aspartate receptor subunits, *J. Neurochem.*, 72, 962-973.

Van Rossum D, and Hanisch UK, 1999b, Cytoskeletal dynamics in dendritic spines: direct modulation by glutamate receptors, *Trends Neurosci.*, 22,

290-295.

Wang TT, Chiang AS, Chu JJ, Cheng TJ, Chen TM, Lai YK, 1998, Concomitant alterations in distribution of 70 kDa heat shock proteins, cytoskeleton and organelles in heat shocked 9L cells, *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 30, 745-759.

Woolf TB, Shepherd GM, and Greer CA, 1991, Serial reconstructions of granule cell spines in mammalian olfactory bulb, *Synapse*, 7, 181-192.

Yuste R, and Denk W, 1995, Dendritic spines as basic functional units of neuronal integration, *Nature*, 375, 682-684.

Ziv NE, and Smith SJ, 1996, Evidence for a role of dendritic filopodia in synaptogenesis and spine formation, *Neuron*, 17, 91-102.

葉家成(1999)鼠大腦神經元發育早期興奮性突觸生成與樹突小刺消長之關聯性研究. 國立清華大學生命科學研究所碩士論文

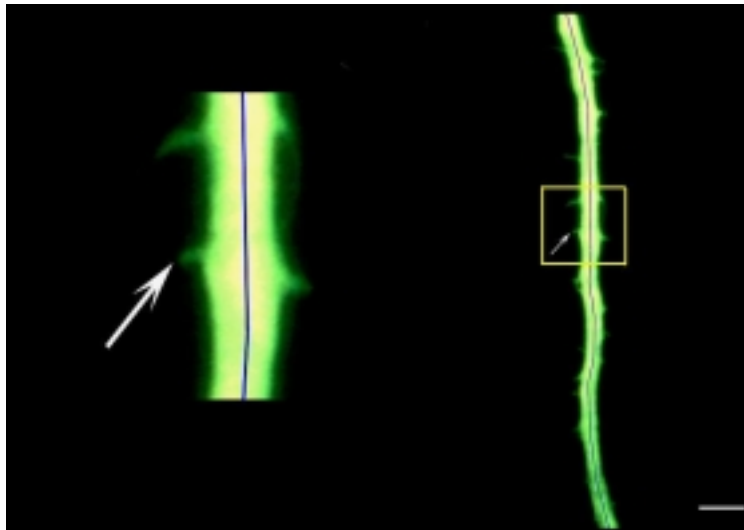


圖 1 此為 lucifer yellow(黃綠色)螢光標定的一根樹突(processes)，右半部為全景；左半部為黃色框內的放大。於樹突的中心處連出曲折的直線段(藍色線條)，此直線段的總長代表樹突分支的長度。圖中像是小刺狀的突出物(白色箭號)，即為樹突小刺。算出整張照片中樹突小刺的數目除上藍線的總長度即為樹突小刺的密度。(Scale bar=10 μm)

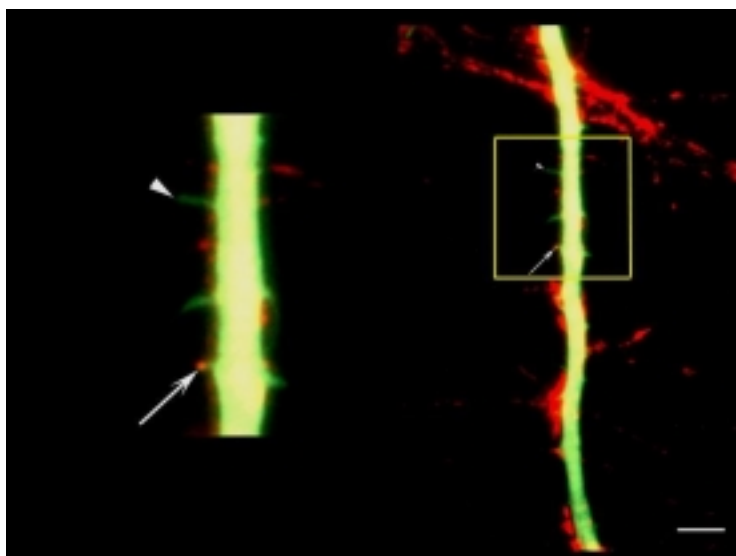


圖 2 圖為相同顯微視野區域 lucifer yellow(黃綠色)及 synaptophysin (texas red, 紅色)的螢光照片之疊層圖，右半部為全景；左半部為黃色框內的放大。圖中突觸形成在樹突小刺的地方，由於同時出現 lucifer yellow 的黃綠色及 synaptophysin 紅色，因此呈現橘紅色的顏色(白色箭號)。白色箭頭所指處為沒有突觸的小刺。計算照片上突觸形成在樹突小刺的數目除上照片中所有的樹突小刺的數目，即為突觸形成於樹突小刺上的比例。(Scale bar=10 μm)

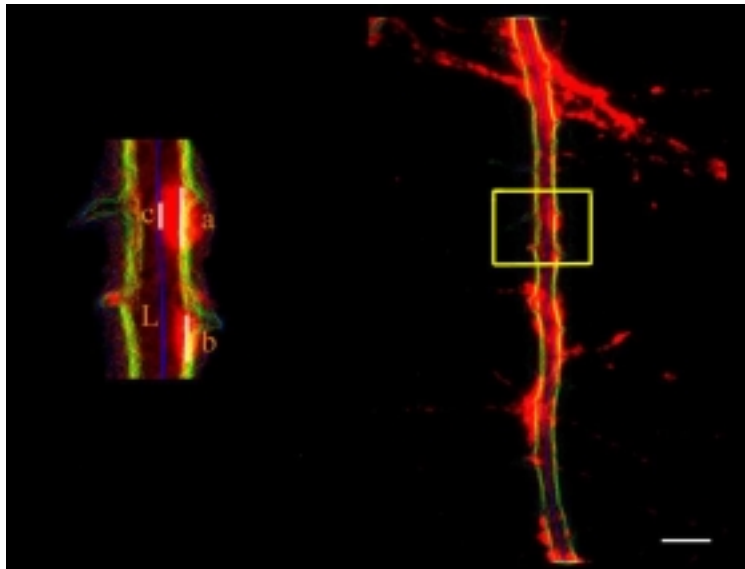


圖 3 圖為相同顯微視野區域 lucifer yellow 及 synaptophysin(texas red, 紅色)的螢光照片之疊層圖，右半部為全景；左半部為黃色框內的放大。將 lucifer yellow 圖層勾邊(find edges)，使其只剩下樹突分支及小刺的輪廓(黃綠色)。在樹突的中心處連出曲折的直線段(藍色線條)，此直線段的總長代表樹突分支的長度。計算中線(c 線段)以及樹突分支兩側輪廓(a b 線段)穿過 synaptophysin 螢光之長度，除上中線的長度總和(L)， $S/D \text{ Ratio} = (a+b+c)/L$ ，此比值代表突觸在樹突分支上的分布程度。(Scale bar=10 μm)

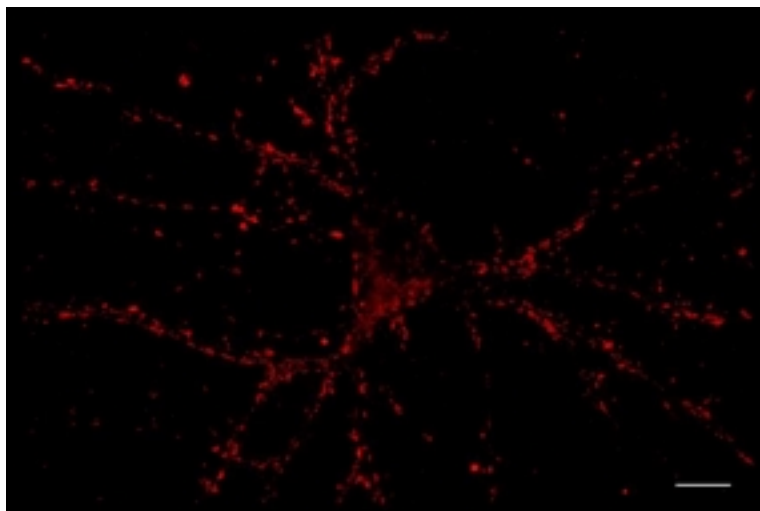


圖 4 此為細胞培養 14 天後的細胞作 synaptophysin 的免疫染色結果，由圖中可以清楚看到 synaptophysin 的紅色螢光沿著細胞分支(輻射狀分布)及細胞本體邊緣(中央呈現三角形分布)分布，每一個點都代表了突觸的位置。(Scale bar=10 μm)

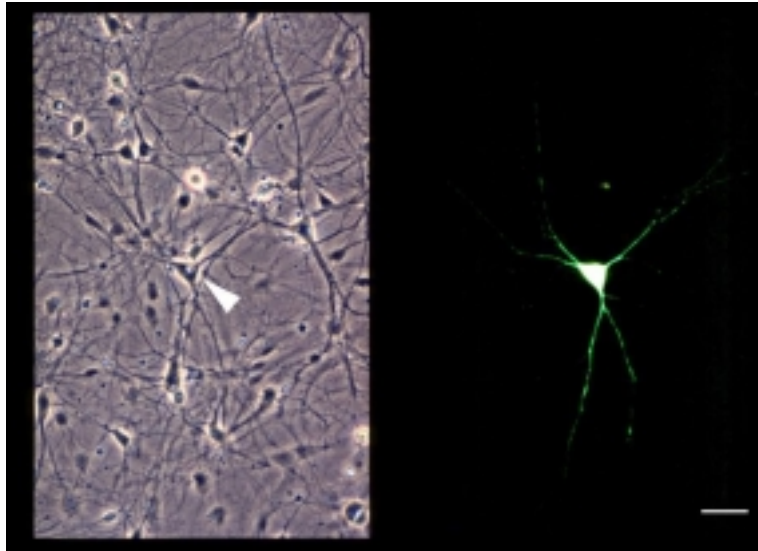


圖 5 利用 patch electrode 將 lucifer yellow 注入細胞並固定後，我們可以利用藍光激發 lucifer yellow 而在顯微鏡下找到這顆發黃綠色螢光記錄過電生理訊號的細胞(右圖)，圖中可見一顆角錐形的細胞本體及許多細長延伸的細胞分支。而在同一顯微視野下 phase contrast 的照片中(左圖)可以看到有許多細胞本體以及錯縱複雜的分支，圖中央角錐形的細胞(白色箭頭)即為右圖發螢光的細胞。(Scale bar=50 μ m)

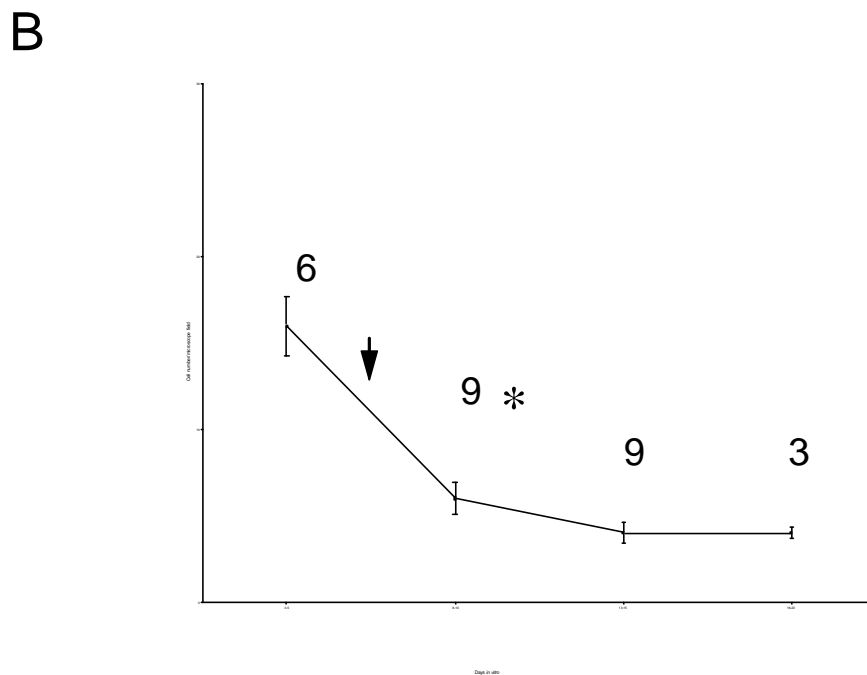
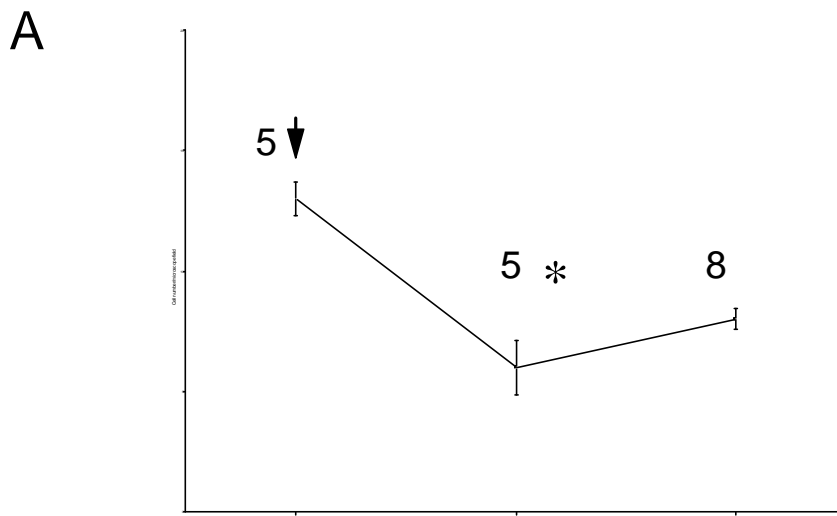
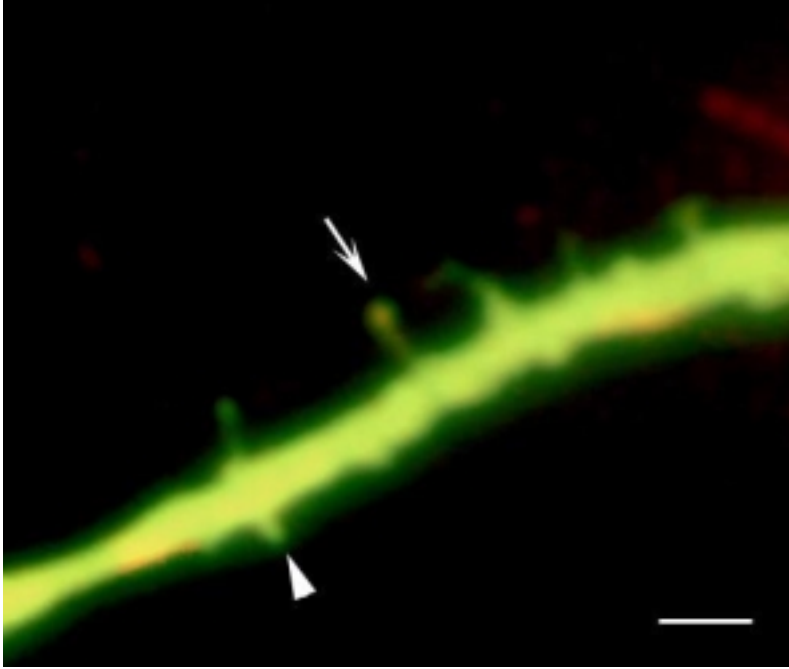


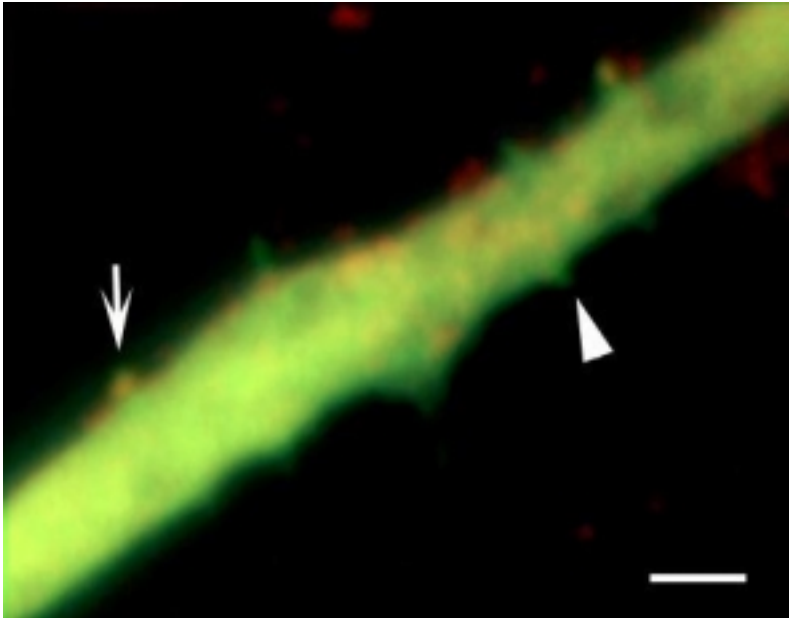
圖6 Arc處理造成細胞密度減低

A圖是以 lucifer yellow 標定的實驗組；B圖則為 actin 免疫標定的實驗組。X軸為實驗取樣的時間點；Y軸為100倍的顯微視野下細胞的數目(取整數)，箭頭處代表 Arc 加入的時間(A第七天，B第六天)。圖中各時間點上的數字為 n 值。經過 Arc 處理細胞密度明顯下降(T test, *: $P < 0.05$, Arc 處理前後兩組比較)；將 Arc 洗去後以 condition medium 繼續培養細胞，細胞的密度並沒有隨著培養時間而減少(T test for Fig.A; One-way ANOVA for Fig.B $P > 0.05$)

A



B



C

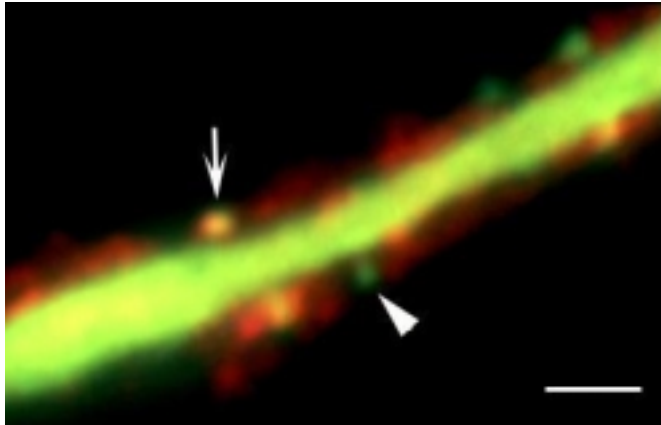


圖 7 各圖中白色箭號所指的位置即為突觸形成在樹突小刺的例子(橘紅色)，白色箭頭所指處為沒有突觸的小刺。細胞培養 7 天(圖 A)只有少數的突觸形成，且多半形成在樹突(dendritic shaft)上，樹突小刺上可發現有 synaptophysin 螢光反應的機率極低；到 14 天(圖 B)後突觸大量形成，並且出現在樹突小刺上的比例增高；到了第 22 天(圖 C)出現在小刺上的突觸數量增加更為明顯(橘紅色小刺數量增多)。另外小刺的型態亦隨著時間而轉變，由長而無頭轉變為短而有頭的型態。(Scale bar=2.5 μ m)

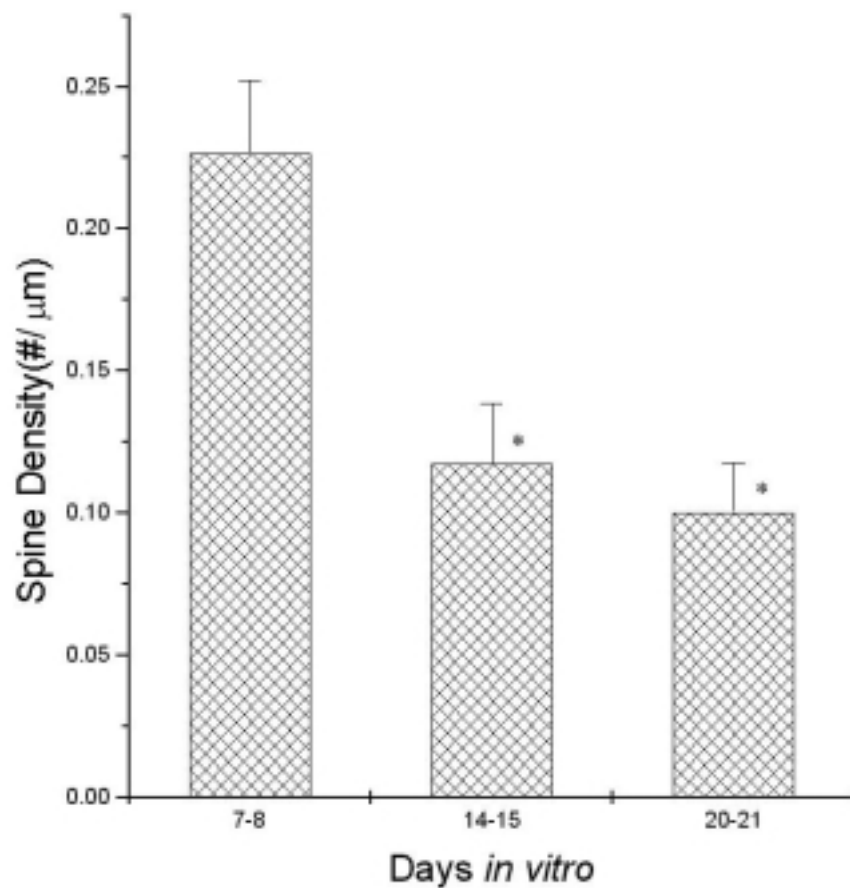


圖 小刺密度隨發育時間遞減

計算各發育天數 150 微米樹突小刺的密度。小刺密度隨著發育時間增加由第一周的每微米約有 0.23 個小刺下降第二周的每微米 0.12 個，及第三周每微米 0.10 個小刺，呈現一個隨時間遞減現象。(n=8, One-way ANOVA, *P<0.05, 與 7-8 天比較)

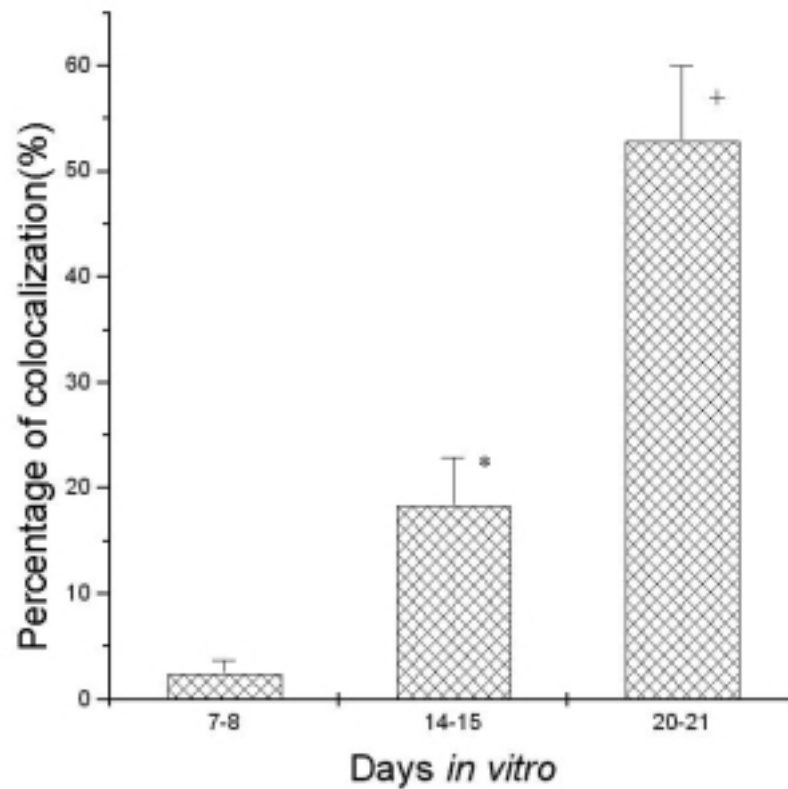


圖 突觸在樹突小刺上分布的情形

突觸出現在小刺上的比例由第1周的2.5%增加至第2周 18.3%及第3周的52.9%，呈現一個隨發育時間明顯增加的趨勢。
(n=8, Mann-Whitney U test, *P<0.05, 7-8天與14-15天比較
+P<0.05, 14-15天與20-22天比較)

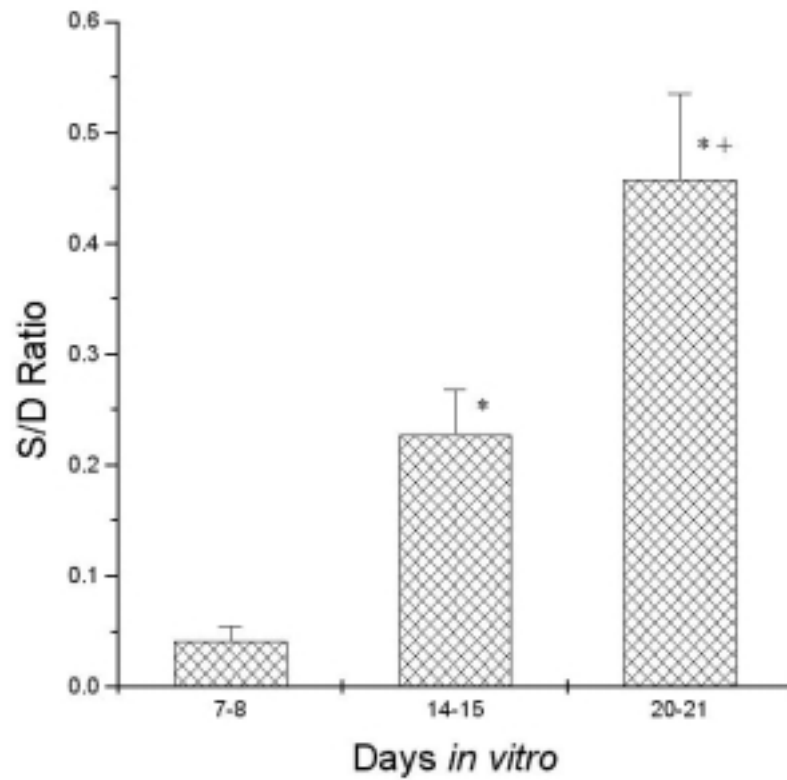
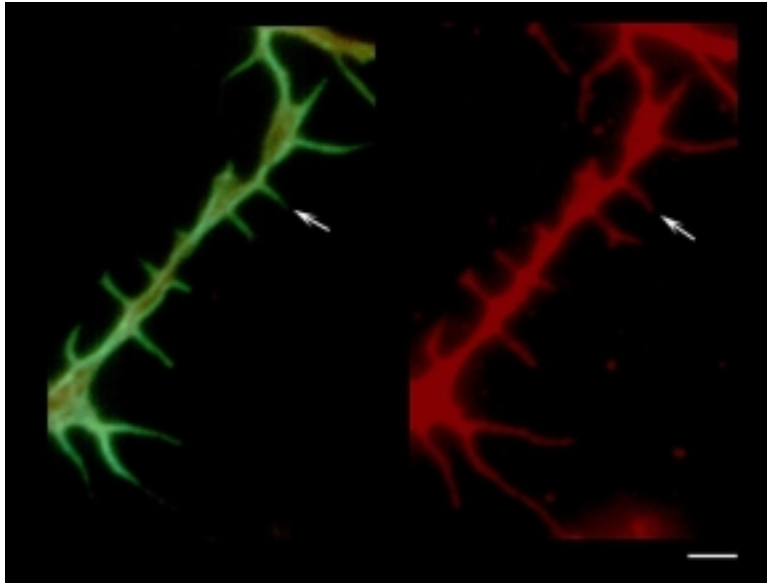
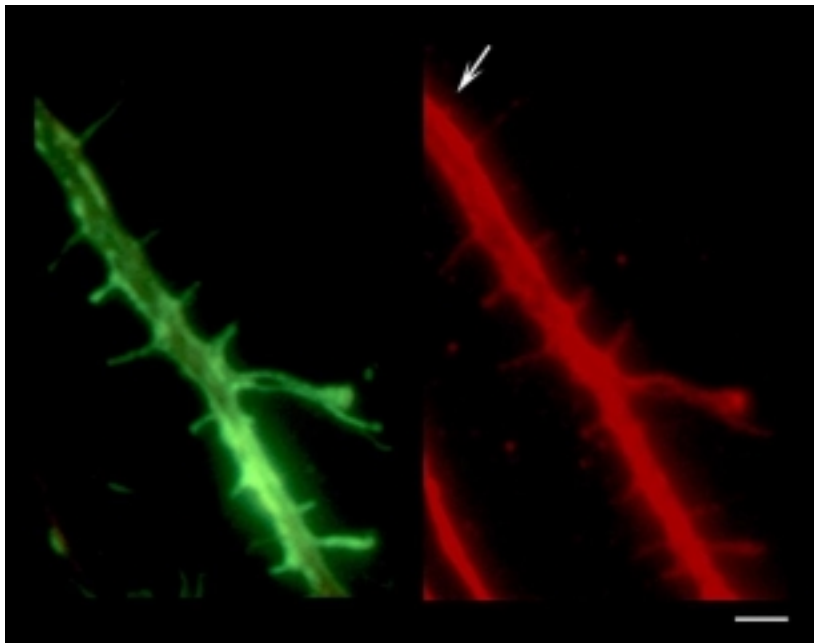


圖0 突觸形成於樹突分支(dendritic shaft)上的百分比
 隨著發育時間突觸出現於樹突分支上的比值由第1周 0.04
 至第2、3周的0.23及0.46，呈現一個明顯上升的趨勢
 (n=8, One-way ANOVA, *:P<0.05, 與7-8天比較
 +:P<0.05, 與14-15天比較)

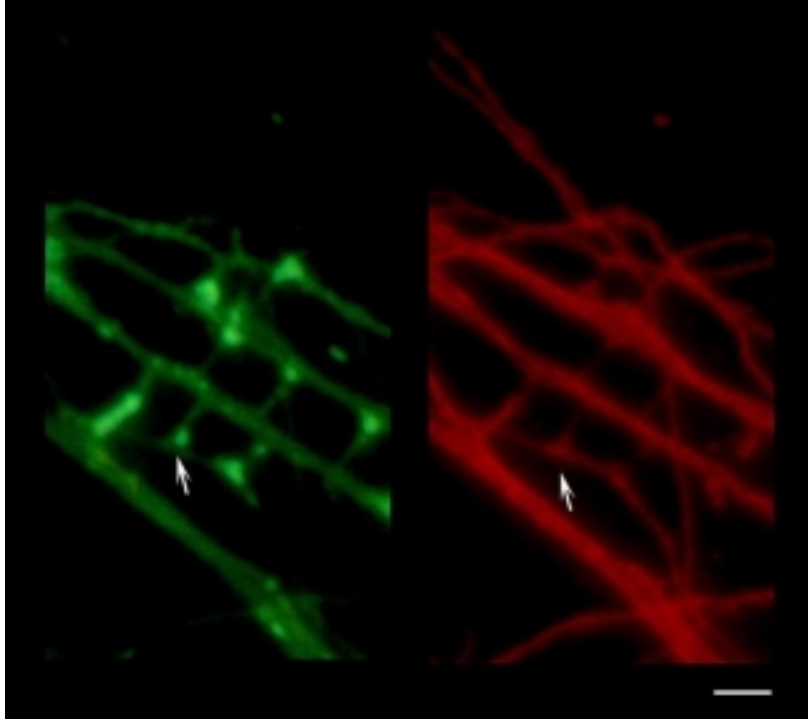
A



B



C



D

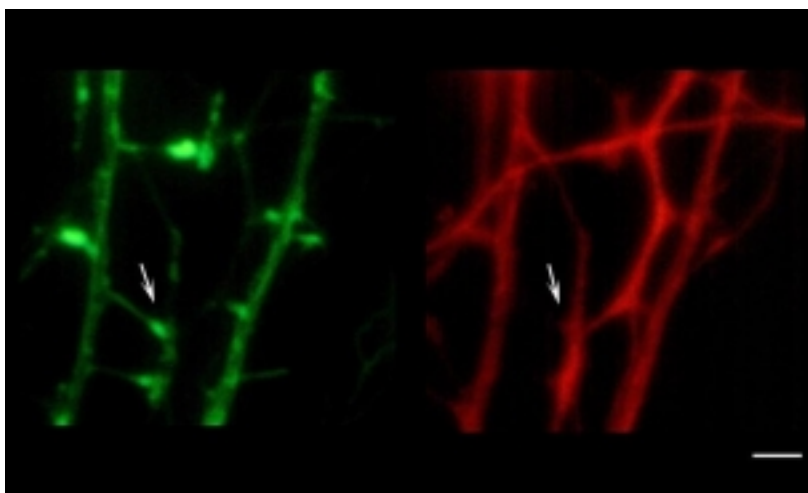


圖 11 各圖為神經細胞樹突分支處，左圖為利用 Oregon Green conjugated- Phalloidin(綠色)標示 F-actin 的情形；右圖為 tubulin 免疫標定的結果(texas red, 紅色)。在發育早期絕大多數的樹突小刺內可同時染到有 actin 及 tubulin 存在，且 tubulin 分布的範圍較 actin 廣，如圖 A(細胞培養後 3 天)白色箭號所指處，小刺長度似乎以 tubulin 染色者較長。發育到第 10 天(圖 B)左右，小刺內的 tubulin 成分開始減弱(小刺內 tubulin 螢光變弱)，此圖白色箭號所標示處為只含有 tubulin 而無 actin 的小刺。當發育到了約 13 天大時(圖 C)，小刺頸部的 tubulin 成分會逐漸減少(白色箭號)，但在小刺的頂端 tubulin 成分看來並無減少的現象；而小刺中 actin 的成分並無明顯變動的現象。當細胞培養 18 天時(圖 D)，小刺頸部 tubulin 成分減少的現象看來更為明顯，此時小刺頸部處幾乎已經測不到 tubulin 的螢光反應，但在小刺的頂端 tubulin 成分並無明顯變動的現象(白色箭號)；而小刺中 actin 的成分無明顯變動的現象。(Scale bar=2.5 μ m)

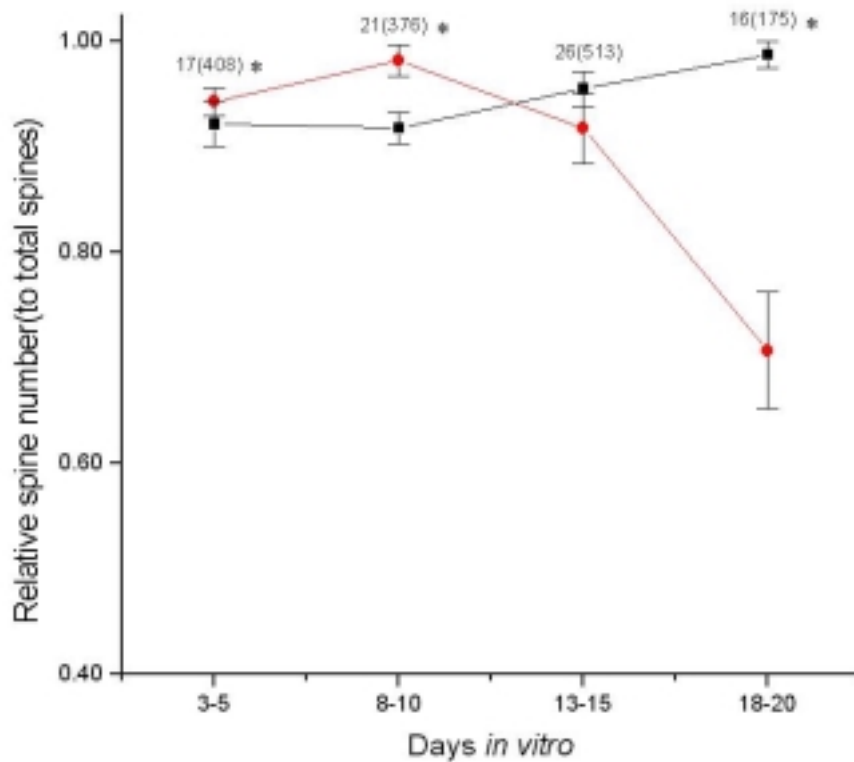


圖2 小刺內細胞骨架之消長情形

分別計算actin-tubulin雙重標定的照片中含actin、tubulin的小刺佔所有樹突小刺的比例。圖中實心方塊為actin佔所有小刺的比例；實心圓則為tubulin的比值。前兩個時期(3-5, 8-10 days)可染到tubulin的樹突小刺比例較可染到actin的樹突小刺來得多。在3至15天的時期由於小刺中tubulin的成分減少使得可染到含有tubulin的小刺之比值開始降低，在培養18天後，可染到含有actin小刺的比值(98.75%)遠高於tubulin(70.69%)。圖中各時間點上的數字分別代表細胞及小刺括弧內的值。Actin與tubulin之間的差別在3-5, 8-10, 18-20這三組為統計上顯著的Mann-Whitney U test, *: $P < 0.05$

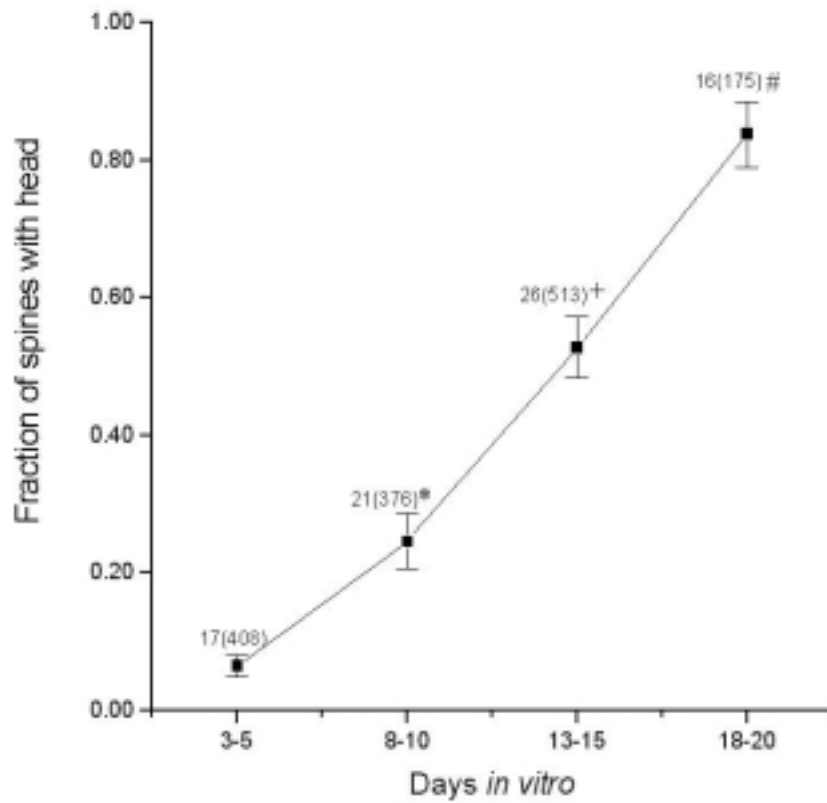
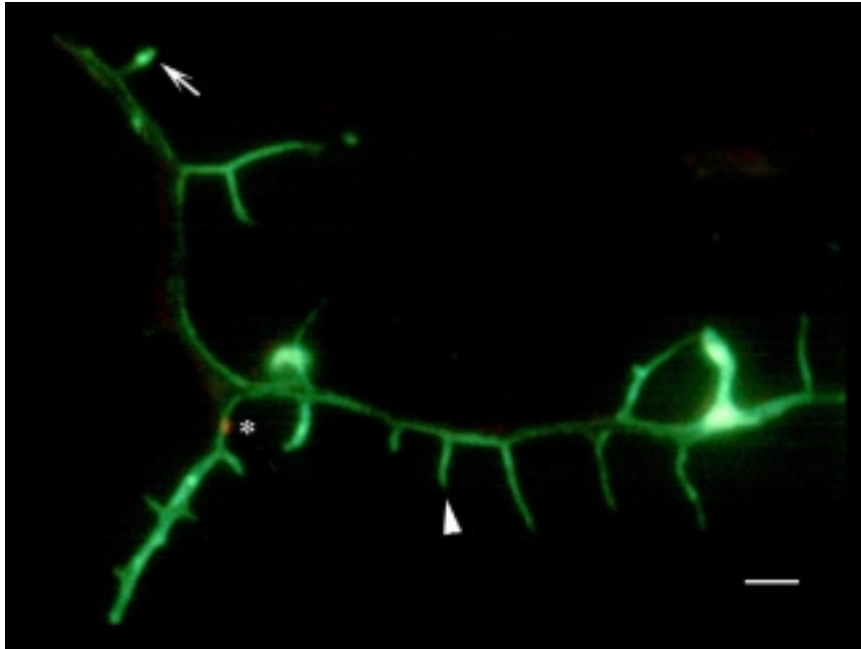
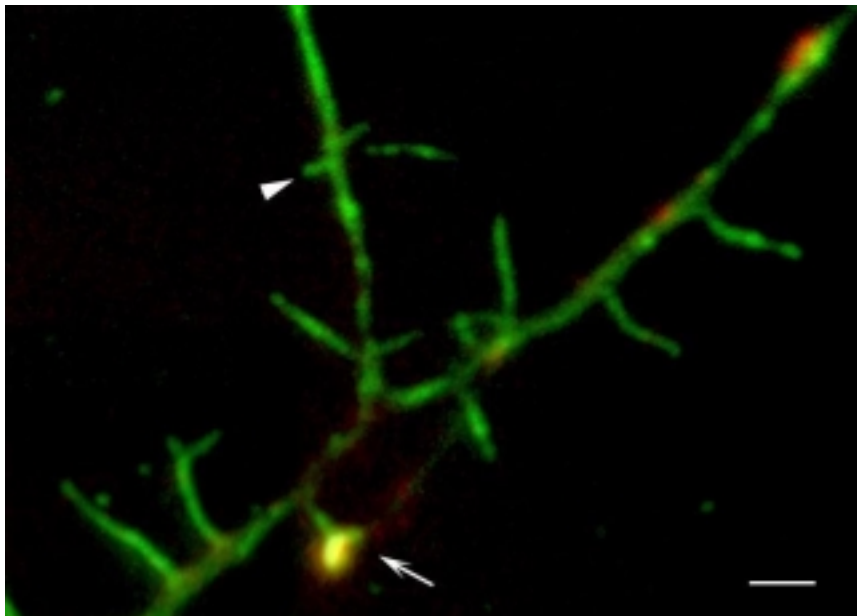


圖3 有頭類型小刺的比例隨發育時間增加
 計算actin染色中有頭類型的小刺佔所有小刺的比例。圖中各時間點上的數字分別代表細胞及小刺括弧內的值。隨著發育時間其比例有明顯上升的趨勢。顯示小刺型態隨時間由沒頭類型轉變為有頭類型(Mann-Whitney U test, *: $P < 0.05$, 3-5天與 8-10比較 +: $P < 0.05$, 8-10天與 13-15天比較 #: $P < 0.05$, 13-15天與 18-20天比較)

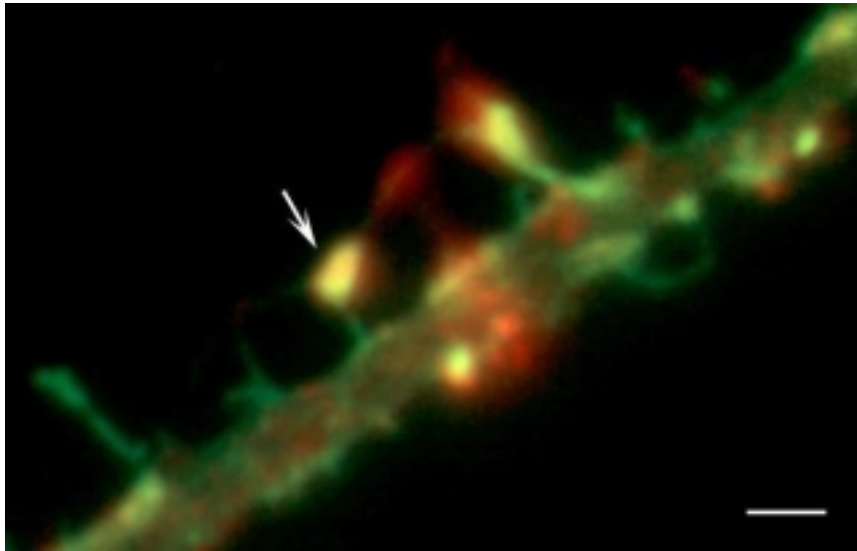
A



B



C



D

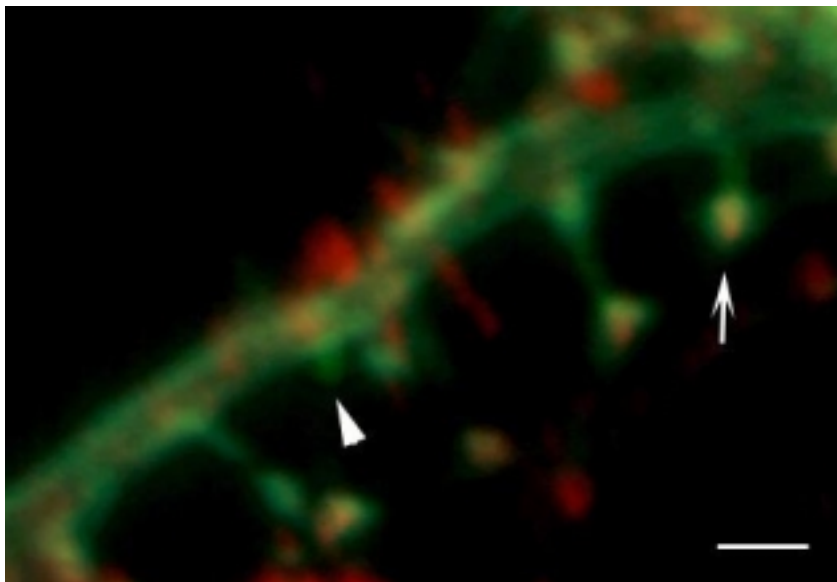


圖 14 各圖為神經細胞樹突分支處，利用 Oregon Green conjugated-Phalloidin(綠色)標示 F-actin，並以 synaptophysin 免疫標定的結果 (texas red, 紅色)。圖中白色箭號處為有頭類型的樹突小刺；白色箭頭為無頭類型。在細胞培養 4 天(圖 A)已經可以測得 synaptophysin 的螢光，但是數量極少，此時也沒有發現有突觸形在在樹突小刺上。白色星形處為突觸形成的所在。當細胞培養至 10 天時(圖 B)，細胞的樹突小刺上可發現有 synaptophysin 的螢光(呈現橘黃色)，且通常出現在有頭類型的小刺上。到第 14 天(圖 C)，小刺上可發現突觸的依然為有頭類型者；細胞培養第 18 天(圖 D)，更多有頭類型的小刺上可發現突觸，但是在無頭類型的小刺上，無突觸可見。(Scale bar 圖 A=2.5 μ m, 圖 B,C,D=2 μ m)

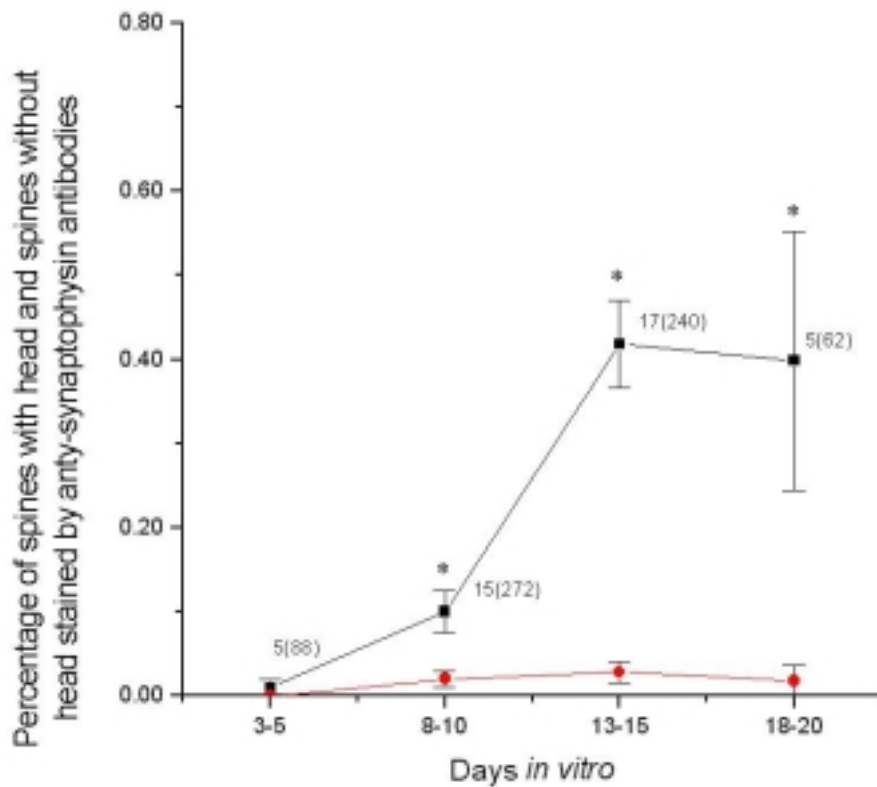


圖5 突觸多牛形在有頭類型的小刺上
 計算突觸形成在有頭及無頭小刺上的比例，實心方塊為突觸形成在有頭類型小刺的比例，實心圓則為突觸形成在無頭類型小刺的比例。隨著時間增加有頭類型的小刺上可發現突觸的比例由第1周的10.02%升到第2周的41.78%，而在無頭類型的小刺上出現突觸的比例一直低於5%。圖中各時間點上的數字分別代表細胞及小刺括弧內的值。突觸形成在有頭與無頭小刺之間的差異在8-10, 13-15, 18-20這三組為統計上顯著的Mann-Whitney U test, * P<0.05)