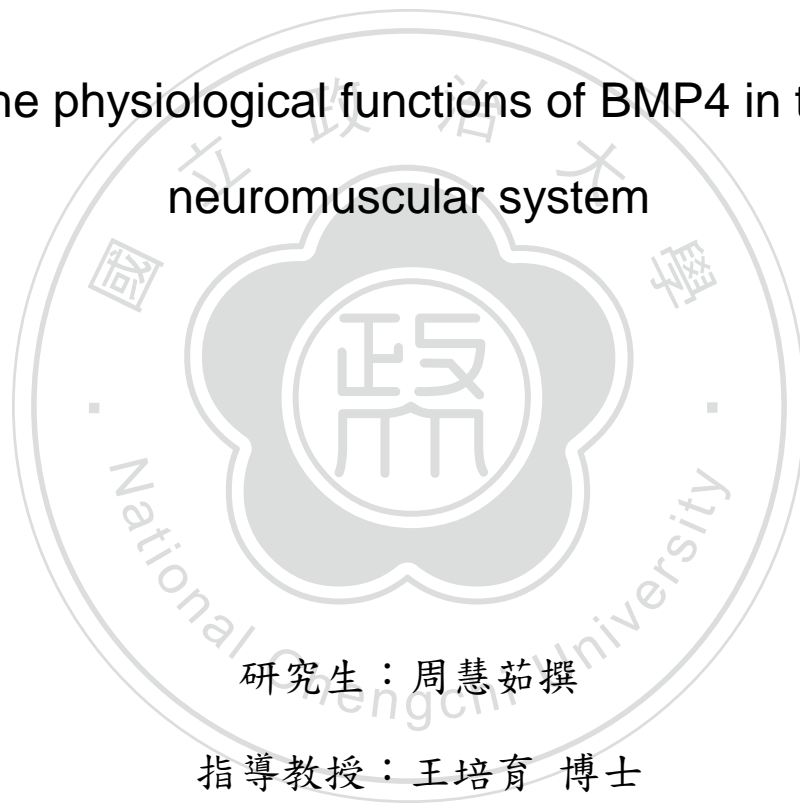


國立政治大學神經科學研究所

碩士論文

BMP4 於神經肌肉系統生理功能之探討

The physiological functions of BMP4 in the  
neuromuscular system



研究生：周慧茹撰

指導教授：王培育 博士

中華民國 101 年 1 月 12 日

## 謝誌

終於到了寫謝誌的時刻，內心感到無比的歡喜，在這將近三年的時間裡學到了很多東西，也認識了一群好人。我覺得自己很幸運，可以待在氣氛如此融洽的實驗室裡學習，和實驗室的夥伴們一起做實驗、一起打籃球、一起成長，回想碩一時實驗室剛成立的那段時光，心裡更是充滿了感謝。我要非常感謝我的指導教授王培育老師，不論是在學業或是生活上，他的建議總是給了我很大的幫助，能夠順利地拿到我的碩士學位，真的很感謝王老師的幫忙。也謝謝我的口試委員周韻家教授以及廖瑞銘所長，感謝他們願意抽空參與我的論文口試並且給我建議，讓我順利地畢業。感謝所上趙知章老師以及賴桂珍老師的實驗室，在實驗技術及儀器上的幫忙。還有人美心更美的于立恩小公主，真的很感謝于大正妹這段時間的照顧，給予我許多的鼓勵跟關懷。謝謝蘇阿三一直以來的支持與陪伴，大學四年加上研究所兩年的情誼真的非常珍貴。謝謝祐陞兄、小喬、曉怡以及蘇品諺，同為神科所第三屆我真的很開心能夠認識你們，想起一起上課考試的日子還有點懷念。我還要感謝政文大學長，不管在實驗上及生活上都給予我極大的幫助，也讓我認識了廣論以及師父。謝謝在我寫論文時一直鼓勵我的林歐弟、阿函以及帥氣的志鵬老師。也謝謝高醫的曾昭能老師，在大學時期引領我認識神經科學的奧妙，鼓勵我進修研究所。還要感謝實驗室的學弟妹們以及怡菁小秘書，希望大家能夠一切順利。感謝在實驗上犧牲的小鼠們，讓我能夠完成我的實驗。最最重要的，我要感謝我的家人，沒有他們的支持與鼓勵，就沒有今天的我。

## 中文摘要

骨形成蛋白 (bone morphogenetic proteins, BMPs) 屬於 TGF $\beta$  家族的成員，過去的研究指出 BMPs 對神經系統的發育及維持非常的重要，並且會參與調控突觸的形成。然而，在哺乳類動物的研究中，BMPs 在神經肌肉系統中所調控的生理功能仍未完全了解。本實驗室初步的研究資料顯示 BMPs 的 type II 受體 (bone morphogenetic protein type II receptor, BMPRII) 會表現在神經與肌肉接合處 (neuromuscular junction, NMJ)，而從本論文中的免疫染色實驗結果觀察到骨形成蛋白-4 (BMP4) 會表現在肌肉及許旺細胞上，且 BMP4 與乙醯膽鹼受體 (acetylcholine receptors, AChRs) 有 colocalization 的現象。由 double nerve ligations 的實驗觀察到 BMP4 會堆積在打結處的兩端，顯示 BMP4 可能是由肌肉或許旺細胞分泌後送進運動神經元之軸突內運輸，其方向為雙向性運輸，而利用 Q-PCR mRNA 定量實驗發現 BMP4 mRNA 在 double-ligated 之坐骨神經中表現量下降，但在肌肉中表現量則顯著增加。

由上述實驗顯示肌肉細胞為 BMP4 主要來源之一，利用 NG108-15 神經細胞及 C2C12 肌肉細胞培養，我們發現 BMP4 mRNA 在 C2C12 肌小管上有高度表現，相反地在分化後的 NG108-15 神經細胞上表現量極少，而 BMP4 的 mRNA 及 protein 在 C2C12 肌肉上的表現量則受到神經衍生蛋白 Agrin 的調控。此外我們亦發現來自於肌肉的 BMP4 則會保護分化後的 NG108-15 神經細胞對抗 Glutamate 所誘導的細胞死亡反應。綜合這些結果，我們認為 BMP4 主要來自於運動神經元之周邊的肌肉及許旺細胞，其可能會參與調控運動神經元的存活機制。

關鍵字：骨形成蛋白-4、神經肌肉系統、興奮性毒殺作用

## Abstract

Bone morphogenetic proteins (BMPs), members of the TGF $\beta$  superfamily, have been shown to play important roles in the development of nervous system including neuronal survival and synaptogenesis. However, the physiological functions of BMP signaling at the mammalian neuromuscular system are not well understood. Our preliminary data showed that proteins of the type II bone morphogenetic receptors (BMPRII) were specifically expressed in nerve terminals at neuromuscular junctions. In this study, we found that proteins of bone morphogenetic protein-4 (BMP4) were detected at Schwann cells and colocalized with postsynaptic acetylcholine receptors (AChRs) in skeletal muscle fibers. In double-ligated nerves, BMP4 proteins were accumulated at the proximal and distal portions of the axons, suggesting that Schwann cell- and muscle fiber-derived BMP4 proteins were anterogradely and retrogradely transported by motor neurons. Additionally, BMP4 mRNA was significantly up-regulated in the muscle but down-regulated in ligated sciatic nerves.

The physiological functions of BMP4 in the neuromuscular system were further examined *in vitro*. We found that mRNA of BMP4 was highly expressed in differentiated C2C12 muscle cells, but it was barely detectable in NG108-5 neurons. The expression of BMP4 mRNA and protein in C2C12 muscle cells were upregulated when the motor neuron-derived factor, agrin, was presented in the culture. Moreover, muscle-derived BMP4 could protect NG108-5 neurons from glutamate-induced excitotoxicity. These results together suggest that BMP4 is a peripheral-derived factor that may regulate the survival of motor neurons.

Key words: BMP4, neuromuscular junction, excitotoxicity

## 目錄

謝誌.....	I
中文摘要 .....	II
英文摘要 .....	III
目錄.....	IV
圖次.....	VII
縮寫表 .....	VIII
第一章 緒論.....	1
第一節、脊髓運動神經元的發育過程 .....	1
一、 脊髓運動神經元早期的發育 .....	1
二、 脊髓運動神經元的構造.....	2
第二節、神經肌肉接合處 (neuromuscular junction, NMJ) .....	3
一、 NMJ 的形成 .....	3
二、 Agrin/Lrp4/MuSK/rapsyn 訊息傳遞路徑 .....	4
三、 TGF $\beta$ /BMP 訊息傳遞路徑與 NMJ 之間的關係.....	6
第三節、運動神經元的發育與周邊系統之間的關係.....	7
第四節、周邊衍生性神經滋養因子.....	7
一、 肌肉衍生性神經滋養因子.....	8
二、 許旺細胞衍生性神經滋養因子.....	8
第五節、骨形成蛋白家族 (BMP superfamily) .....	8
一、 骨形成蛋白-4 .....	9
二、 骨形成蛋白-4 之受體.....	10
三、 骨形成蛋白-4 之生理功能.....	11
第六節、興奮性毒殺作用與運動神經元疾病.....	11
第七節、本論文之研究目的.....	13

第二章 實驗材料與研究方法.....	14
第一節、細胞株之培養.....	14
一、細胞株之種類及來源.....	14
二、細胞培養.....	14
三、藥物處理.....	16
第二節、實驗動物.....	17
第三節、Nerve ligation.....	17
第四節、Muscle denervation.....	18
第五節、免疫染色法 (immunostaining).....	18
一、免疫組織染色法 (immunohistochemistry).....	18
二、Whole mount soleus muscle 及免疫螢光染色法.....	20
三、C2C12 肌小管之免疫螢光染色及定量分析.....	20
第六節、即時定量聚合酶連鎖反應.....	21
一、RNA 之萃取.....	21
二、互補鏈 DNA 反轉錄反應.....	22
三、即時定量聚合酶連鎖反應.....	23
第七節、細胞存活率分析.....	24
第八節、統計分析.....	24
第三章 實驗結果.....	25
第一節、BMPRII 的表現位置.....	26
第二節、BMP4 參與調控運動神經元與肌肉之間的機制.....	27
第三節、BMP4 亦是由許旺細胞所產生並且於運動神經元中運輸.....	35
第四節、軸突損傷會影響周邊組織中 BMP4 的表現.....	38
第五節、BMP4 可能參與調控運動神經元的存活.....	40
第四章 討論.....	46

第五章 結論 .....	50
參考文獻 .....	51
附錄一 .....	IX
附錄二 .....	X



## 圖次

圖一、BMPRII 在運動神經元及坐骨神經上的表現.....	26
圖二、分化後的 NG108-15 細胞及 C2C12 肌小管中 BMP4 mRNA 表現量...	29
圖三、BMP4 表現在 muscle fiber 及 NMJ 處.....	30
圖四、Muscle denervation 後 BMP4 在 NMJ 處的表現.....	31
圖五、神經性衍生蛋白 Agrin 調控 C2C12 肌小管中 BMP4 的 mRNA 表現量， 但不影響 BMPRII mRNA 表現量.....	32
圖六、神經性衍生蛋白 Agrin 調控 C2C12 肌小管中 BMP4 的 protein 表現量， 但不影響 BMP4 的表現位置.....	33
圖七、BMP4 在坐骨神經上的表現.....	36
圖八、Nerve ligation 後 BMP4 在坐骨神經的表現.....	37
圖九、Nerve ligation 後 BMP4 在肌肉組織、坐骨神經以及 lumbar spinal cord 中的 mRNA 表現量.....	39
圖十、已分化 NG108-15 細胞經 Glutamate/glycine 及不同濃度之 BMP4 同時 處理 16 小時的細胞存活表現.....	42
圖十一、已分化 NG108-15 細胞經 Glutamate/glycine 及 BMP4 (10ng/ml )同 時處理 16 小時的細胞.....	44
圖十二、BMP4 保護已分化 NG108-15 細胞對抗 Glutamate 誘導之興奮性毒殺 作用.....	45



## 縮寫對照表

ACh	Acetylcholine
AChR	Acetylcholine receptor
AEC	3-Amino-9-ethyl-carbazole
AMPA	$\alpha$ -amino-3-hydroxyl-5-methyl-4-isoxazole-propionate
ALS	Amyotrophic lateral sclerosis
BMP4	Bone morphogenetic protein-4
BMPRII	BMP type II receptor
BSA	Bovine serum albumin
ChAT	Coline acetyltransferase
CNS	Central nervous system
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DPBS	Dulbecco's Phosphate Buffered Saline
DRG	Dorsal root ganglion
FBS	Fetal bovine serum
Gbb	Glass bottom boat
LCM	Lateral motor colum
MMC	Medial motor column
MS	Multiple Sclerosis
MuSK	Mucle specific kinase receptor
NGF	Nerve growth factor
NMDA	N-methyl-D-aspartate
NMJ	Nenuromuscular junction
NTF	Neurotrophic factor
PBS	Phosphate Buffered Saline
PFA	Paraformaldehyde
Sax	Saxophone
Shh	Sonic hedgehog
SMA	Spinal Muscular Atrophy
Tkv	Thickveins
Wit	Wishful thinking

## 第一章 緒論

### 第一節、脊髓運動神經元 (spinal motor neuron) 的發育過程

運動神經元主要可分為兩個族群：上位運動神經元 (upper motor neuron) 以及下位運動神經元 (lower motor neuron)。上位運動神經元位於大腦運動皮質 (motor cortex)，此神經元的突觸會直接或間接地與下位運動神經元做連結，上位神經元又被稱為 premotor neuron，負責往下傳遞大腦給予的動作指令。下位運動神經元又可分為自主運動神經元 (autonomic motor neuron) 以及體運動神經元 (somatic motor neuron)，在脊髓中的自主運動神經元又稱為神經節前神經元 (autonomic preganglionic neuron)，其可透過調控節後神經元 (post ganglionic neuron) 的活性，進而影響腺體、血管或平滑肌等器官組織。而體運動神經元則是分布在脊髓的 anterior horn 以及 cranial nerve nuclei 中，並且會支配骨骼肌。體運動神經元又可分為 alpha motor neuron ( $\alpha$ -MN) 以及 gamma motor neuron ( $\gamma$ -MN)， $\alpha$ -MN 會神經支配梭外肌纖維 (extrafusal muscle fiber)，控制個體運動能力 (locomotor activity)， $\gamma$ -MN 則會控制 muscle spindles 的收縮，muscle spindles 的功能為提供中樞神經系統 (central nervous system, CNS) 本體感覺相關資訊。體運動神經元的細胞本體 (cell body) 和軸突 (axon)、與神經-肌肉的接合處 (neuromuscular junction, NMJ) 以及梭外肌纖維 (extrafusal muscle fiber) 合稱為運動單位 (motor unit) (Kilpatrick and Soilu-Hanninen, 1999)。

#### 一、脊髓運動神經元早期的發育

脊髓 (spinal cord) 是由神經管 (neural tube) 經 dorsal 及 ventral 衍生性因子調控發育而成的。在啮齒類動物實驗中發現，胚胎時期第 12 天 (E12) 時 neural tube 中 ventral 區域的 multipotential progenitors 會開始分化形成脊髓處之運動神經元 (Jessell, 2000)。在組織移植以及抗體抑制的實驗中發現，

notochord 及 floor plate 會分泌 Sonic hedgehog (Shh)，其能誘導 ventral 區域運動神經元以及 floor plate 區細胞的分化(Marti et al., 1995; Ericson et al., 1996)，另外，floor plate 亦會分泌 bone morphogenetic proteins (BMPs) 來調控 dorsal 區域細胞的形成(Liem et al., 1995; Liem et al., 1997)，過去的研究中發現，在 Shh 以及 BMP receptor 缺失的老鼠中，會缺乏運動神經元和 dorsal 區域的 commissural neuron (Chiang et al., 1996; Wine-Lee et al., 2004)。在脊髓的發育過程中，Shh 及 BMPs 對於細胞分化的調控似乎是有拮抗作用，由 Shh 所調控而分化的 ventral 區細胞，其分化能力可以被高濃度的 BMPs 所抑制(Arkeel and Beddington, 1997; Liem et al., 2000)，相反地，Shh 可以抑制經 BMPs 所調控的 dorsal 區細胞形成作用(Liem et al., 1995)，Shh 的功能隨著濃度梯度分布而有所不同，例如，低濃度的 Shh 能夠誘導運動神經元的形成，而在高濃度 Shh 環境中則可以誘導 floor plate 細胞分化(Roelink et al., 1995)。因此，由 notochord 及 floor plate 所分泌的 Shh 因其濃度分布不同可以決定細胞分化的種類並且影響脊髓 ventral 區域的發育。

## 二、 脊髓運動神經元的構造

當運動神經元進行有絲分裂後便會遷移到脊髓 ventral 部分的其他區域，並且形成截然不同的 motor column，包含 medial motor column (MMC) 以及 lateral motor column (LMC)。MMC 在整個脊髓中延伸且可分為 medial 及 lateral 兩個部分，其區域之功能為神經支配 dorsal 及 ventral 處的中軸肌群 (axial musculature)。而 LMC 只會表現在支配臂神經叢 (brachial plexus) 及腰神經叢 (lumbar plexus) 的脊髓區域，其又可分為 medial 及 lateral 兩個部分，神經支配 ventral 及 dorsal 區域的肢軀肌肉。

## 第二節、 Neuromuscular junction (NMJ) 的形成

### 一、 NMJ 之形成

Neuromuscular junction (NMJ) 是運動神經元與肌肉纖維之間特化的突觸，運動神經末梢會分化形成前突觸高度活化區域 (presynaptic active zone)，具有許多突觸小泡 (synaptic vesicle) 並且能夠釋放神經傳導物質 (neurotransmitter) 至突觸間隙中，神經傳導物質會與後突觸膜上高度聚集的神經傳導物質之受體結合，引起下游機制的活化控制肌肉的收縮。NMJ 的發育過程可以分為五個階段：(1) 神經末梢未到達肌肉纖維之前，乙醯膽鹼受體 (acetylcholine receptors, AChRs) 會廣泛地分布在肌肉纖維的中央區域，其稱為 pre patterning。(2) 神經末梢到達肌肉纖維後，調控後突觸膜上 AChRs 更加聚集在神經與肌肉連結的區域，限制 AChRs 分布在中央運動終板帶 (central motor endplate band)。(3) 運動神經之軸突 (axon) 會分枝連結到肌肉纖維的特化區域。(4) 運動神經末梢之前突觸區域開始特化。(5) 維持後突觸膜上與神經連結之 AChRs 的穩定 (An et al., 2010)。

NMJ 的形成需要運動神經元、肌肉纖維以及神經膠細胞三者之間的相互合作才得以完成，運動神經元所釋放的訊息傳遞因子會直接經由活化肌肉上的受體或是間接地刺激神經膠細胞上的受體，以達到調控後突觸端的分化及穩定。例如：在老鼠的研究上發現，肌肉去極化 (depolarization) 會抑制 AChR 次單位基因的轉錄並且增加 AChR 的分解 (Salpeter et al., 1986)，此外，在缺乏製造乙醯膽鹼 (acetylcholine, ACh) 的膽鹼乙醯轉移酶 (choline acetyltransferase, ChAT) 的老鼠中觀察到 AChR 聚集的更多更快 (Misgeld et al., 2002; Brandon et al., 2003)。所以，由運動神經元所釋放的 ACh 對後突觸膜上之 AChRs 會有負調控的影響 (An et al., 2010)。這個由 ACh 引起的負調控反應影響了整個肌肉纖維，但是 AChRs 卻能高度地聚集在 NMJ 的位置，顯示運動神經元亦會釋放出正向的訊息傳遞因子用以調控後突觸膜上 AChRs 聚

集，抵抗 ACh 的負調控反應，其中最為人所知的正向因子為 Agrin。

## 二、 Agrin/Lrp4/MuSK/rapsyn 訊息傳遞路徑

運動神經元會釋放出正向因子用以抵抗 ACh 對 AChR 聚集的負調控反應，一般認為是透過 Agrin/Lrp4/MuSK 訊息傳遞路徑。1987 年，McMahan 與其學生在 Torpedo electric organ 中發現了與 AChR 聚集活性相關的糖蛋白 (glycoprotein)，且命名為 Agrin (Nitkin et al., 1987)。Agrin 是由運動神經元所製造，沿著軸突運送至神經末梢前突觸之區域且釋放至突觸間隙，誘導後突觸端的分化以及 AChR 在後突觸膜上聚集(Ruegg et al., 1992)。而在 Agrin<sup>-/-</sup> 老鼠中發現個體在胚胎時期就已經死亡，且沒有 NMJ 形成，AChR 會廣泛地分布在肌肉纖維上，沒有高度聚集表現(Gautam et al., 1996)。

肌肉纖維與許旺細胞亦會分泌 Agrin isoform，但其缺少 exon 32 及 exon 33 轉錄之 C 端區域 (carboxy-terminal site)(Ruggiu et al., 2009)，由 exon 32 或 exon 33 轉錄的 C 端位置在雞的研究上稱為 B 位置 (B site)，而在哺乳類動物的研究中稱為 Z 位置 (Z site) (Ruegg and Bixby, 1998)，只有運動神經元分泌的 Agrin 具有 B/Z 區域，而且誘導 Muscle specific kinase receptor 在後突觸膜上聚集的程度，與其他細胞所分泌之 Agrin 相較為千倍以上(Gesemann et al., 1995)。Nova 是調控 Z<sup>+</sup> form Agrin splicing 的重要因子，nova1<sup>-/-</sup>/nova2<sup>-/-</sup> double knockout (Nova DKO) 的老鼠出生後會癱瘓且在 NMJ 中缺乏 AChR 聚集，而近期研究指出，在 Nova DKO 的老鼠中將 Z<sup>+</sup> form Agrin 送進運動神經元中將會使 AChR 在後突觸膜上聚集(Ruggiu et al., 2009)，可見由運動神經元所分泌之 Z<sup>+</sup> form Agrin 對 NMJ 的形成相當的重要。

Muscle specific kinase receptor (MuSK) 最早被發現在含有許多突觸的 Torpedo electric organ 中有大量表現(Jennings et al., 1993)，並且與 NMJ 中的 AChR 有 co-localization 的情形(Valenzuela et al., 1995)。在 MuSK<sup>-/-</sup> 老鼠中發



現運動神經元所釋放之 Agrin 無法誘導後突觸膜上 AChR 的聚集，可以了解 Agrin 的功能需透過 MuSK 得以完成(Glass et al., 1996b)，另外，近期的研究發現，當 Agrin 基因發生突變時，過度表現 (overexpression) MuSK 亦會促進 NMJ 形成並且使 Agrin 突變之個體存活，也發現了 MuSK 會影響前突觸神經末梢的分支 (branching) 及神經支配 (innervation) 的分布範圍(Kim and Burden, 2008)。

在 NMJ 形成過程中，Agrin 與 MuSK 皆是不可或缺的，雖然由上述內容知道 Agrin 的功能需要 MuSK 的存在，但是這兩個 protein 並不會直接結合作用 (Glass et al., 1996a)。根據研究發現，在早期發育時期 Irp4 ( low density lipoprotein receptor-related protein 4 ) 的缺失會造成 NMJ 發育不完全，甚至會有死胎的情況，而且突觸的分化情況與 MuSK 突變時類似(Weatherbee et al., 2006)，而 Irp4 屬於低密度脂蛋白受體 ( low density lipoprotein receptor, LDLR ) 家族中的一員。經由研究發現，在給予 Agrin 的情況下，Irp4 的存在對於 MuSK 的磷酸化相當重要並且會跟 MuSK 聚集在一起形成 complex，在 LDLR 家族中只有 Irp4 具有此功能，所以 Irp4 對 MuSK 的磷酸化具有專一性，且 Irp4 與來自運動神經元所釋放的 Agrin 之間具有高度的結合能力(Kim et al., 2008)。另外亦發現 Irp4 會專一地表現在 myotube 中且聚集在 NMJ 處(Zhang et al., 2008)，顯示了 Irp4 為 Agrin 的 coreceptor，參與 Agrin 活化 MuSK 的過程。換言之，Irp4 會與神經元所釋放的 Agrin 結合，並且跟 MuSK 聚集在一起，使得 MuSK 被活化後可以磷酸化下游的機制，最後讓突觸蛋白 rapsyn 幫助乙醯膽鹼受體的聚集。

突觸蛋白 rapsyn 的分子量大約 43 kDa，分布在後突觸膜上常常與 AChR 聚集在一起，而在 rapsyn 缺失的情況下 AChR 沒有聚集的情況。根據研究發現，AChR 的次單位 (subunit) 具有可以被磷酸化的位置，而且當 AChR 的磷酸化受阻時，AChR 沒有聚集的現象。經由研究發現，AChR 平常就會跟少量的

rapsyn 聚在一起，但在 AChR 的  $\beta$ -subunit Y390 位置被磷酸化之後，與 AChR 聚在一起的突觸蛋白 rapsyn 數量會增加，而 rapsyn 之間會互相吸引，幫助許多乙醯膽鹼受體在後突觸膜上排列聚集形成巨大的 complex(Borges et al., 2008)，讓 NMJ 的發育得以完全。

### 三、 TGF $\beta$ /BMP 訊息傳遞路徑與 NMJ 的之間的關係

TGF $\beta$ 家族是蛋白質中最多的一群，其中包含 TGF $\beta$ 、bone morphogenetic proteins (BMPs)以及 activins，這些蛋白質皆會透過刺激其 type I 及 type II 受體來調控下游機制(Wu et al., 2010)。近期在以 *Xenopus* 為模型的研究發現，由許旺細胞所分泌的 TGF $\beta$ 1 能夠誘導運動神經元內 Agrin 表現量增加，間接地促進 NMJ 的形成(Feng and Ko, 2008)，在過去許多以果蠅為模型的研究上發現，BMP 訊息傳遞路徑會參與調控 NMJ 的形成，當果蠅體內的 BMP homolog Glass bottom boat (Gbb)、type I receptors Thickveins(Tkv) 與 Saxophone(Sax)、type II receptor Wishful thinking(Wit)以及其下游 Smad homolog Mad 的基因發生突變時，皆會導致 NMJ 發生缺失。例如，當果蠅體內 type II BMP receptor (BMPRII) homolog Wit 發生突變時，NMJ 的大小及功能會顯著地降低，然而利用基因工程操作專一性地將 Wit 送進 Wit 突變的果蠅體內運動神經元中則可部分恢復 NMJ 的形態及功能(Aberle et al., 2002; Marques et al., 2002)，而當 Gbb 發生突變時，利用基因工程方法將 Gbb 專一地表現在肌肉上可以恢復 NMJ 的缺失，此外，當運動神經元軸突中的逆向運輸蛋白 Glued (dynactin homolog) 被抑制時會破壞運動神經元內 BMP 訊息傳遞路徑(McCabe et al., 2003)。另外，過去的研究已證實運動神經元的 trio 會促進 NMJ 處前突觸的生長，而當果蠅體內 Gbb 及 Mad 發生突變時會降低運動神經元中 Rac/GEF/Trio 的表現，相反地在運動神經元中過度表現 (overexpression) 活化態的 Tkv 及 Sax 時則會增加 trio 的轉錄作用(Ball et al.,

2010)，這些觀察提供了一些證據支持肌肉所分泌的 Gbb 是一種 retrograde signal 能夠調控運動神經元軸突末梢突觸的生長且影響 NMJ 的形成。

### 第三節、運動神經元的發育與周邊系統之間的關係

在神經新生 (neurogenesis) 時期，神經元會先過度增生而之後有一部分的神經元會被消除。以老鼠腰椎處脊髓 (lumbar spinal cord) 中的 lateral motor column 為例，在老鼠胚胎時期第 13 天 (E13) 約有 4000 到 5000 個運動神經元，但當老鼠出生之後只有不到 50% 的運動神經元存活下來 (Oppenheim et al., 2001)。這樣大量細胞死亡的現象在神經系統發育的過程中相當常見，有研究指出，運動神經元這樣自然發生細胞死亡是由於周邊系統的影響 (Hamburger, 1958)。例如，在雞胚胎中摘除掉 limb buds 之後會導致運動神經元及感覺神經元大量死亡，相反地，將額外的 limb buds 移植進雞胚胎中則可發現這些神經元將會大量增生。

### 第四節、Peripheral-derived neurotrophic factor

1960 年，Montalcini 及 Cohen 等人發現了 nerve growth factor (NGF)，證實了 Hamburger 於 1958 年由實驗結果所提出的看法，在神經元發育的過程中會發生計畫性的細胞死亡 (programmed cell death, PCD) 又稱細胞凋亡 (apoptosis)，這些神經元需要來自目標組織細胞 (例如肌肉) 所分泌的訊號因子才得以生存。而 Puvion 於 1988 年提出了 neurotrophic hypothesis，透過計算健康的神經元與死亡的神經元可了解到，細胞凋亡的時期在特定的神經細胞族群中增加 neurotrophic factors (NTFs) 或是移除 NTFs，對於神經元的存活影響很大，NTFs 可以促進神經細胞的存活 (Gould and Enomoto, 2009)。NTFs 的來源及種類非常多，例如：



## 一、 muscle-derived signal

由缺乏 limb buds 的動物實驗中可以發現在神經元細胞發生計畫性細胞死亡的過程中，肌肉可以調控運動神經元的存活。曾有研究分析 wingless 基因發生突變的雞胚胎，發現脊髓中 lateral motor column 區域的運動神經元存活數目與 wing bud muscle 的數量成比例(Lanser and Fallon, 1987)，亦有研究發現當老鼠的肌肉發育缺失時，會導致90%的運動神經元死亡(Oppenheim et al., 1993)。然而，當 limb muscle 數量趨近為零時仍有存活的運動神經元，顯示除了肌肉之外還有其他組織細胞會影響運動神經元的生存。

## 二、 Schwann cell-derived signal

由上述的內容可知肌肉對運動神經元的生存非常的重要，但也有研究發現許旺細胞 (Schwann cell) 在運動神經元的存活上亦扮演了重要的角色。ErbB3 為 neuregulin receptor，ErbB3 null mutant 的老鼠無法生成許旺細胞，實驗發現與正常老鼠相較，運動神經元的數目在 E18 時減少了約 79% (Riethmacher et al., 1997)，顯示許旺細胞跟肌肉一樣都對運動神經元的生存相當重要。在過去研究中發現，發育中的許旺細胞會製造多種的 neurotrophic factor，例如 glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) 以及 TGF $\beta$  等。所以，ErbB3 null mutant 的老鼠因為不能生成許旺細胞而無法提供給運動神經元需要的 NTFs。

## 第五節、 BMP superfamily

骨形成蛋白 (bone morphogenetic proteins, BMPs) 最早被發現其可以誘導細胞分化形成骨頭，故命名為骨形成蛋白(Wozney et al., 1988)。BMPs 是 TGF $\beta$  superfamily 中最為龐大的一群蛋白質，至今已發現超過 20 種 BMPs。就如同 TGF $\beta$  family 中其他成員，BMPs 的受體為 type I 以及 type II 受體共同組成的複合體。Type II 受體具有與 ligand 結合的專一特性，而 type I 受體決定下游訊息傳遞路徑的活化。目前已知 type II 受體有五種而 type I 受體有七種 (Shi and

Massague, 2003) , 五種 type II 受體包含 TGF $\beta$  type II receptor (T $\beta$ RII) 、 BMP type II receptor (BMPRII) 、 Mullerian inhibiting substance type II receptor (MISRII) 以及 activin type II receptor (ActRIIA 及 ActRIIB) , 而 type I 受體則包括 activin receptor-like kinase (ALK)-1 到 ALK-7 共七種。其中, BMPs 會與 BMPRII 、 ActRIIA 及 ActRIIB 三種 type II 受體結合, 並且與 ALK-2 、 ALK-3 及 ALK-6 三種 type I 受體結合(Labeur et al., 2010) 。

如附錄一顯示, BMPs 以 homodimer 或是 heterodimer 的形式與 type II 受體結合後會跟 type I 受體形成複合體, type II 受體會磷酸化 type I 受體的 GS domain (Wrana et al., 1994) , 接著活化的 type I 受體會磷酸化下游 receptor-regulated Smad (R-Smad) 的 C 端 Ser-Ser-X-Ser (SSXS) motif 中的 serines , R-Smad 包括 Smad 1 、 Smad 2 、 Smad 3 、 Smad 5 以及 Smad 8 (Kretschmar and Massague, 1998) 。活化的 R-Smad 會與 Smad 4 (亦稱為 Co-Smad) 結合形成 R-Smad/Co-Smad 複合體, 並且進入細胞核內調控目標基因的轉錄作用(Chen et al., 1997) 。除了經由 Smad 傳遞訊息之外, BMPs 亦會經由其他途徑傳遞訊息, 曾有研究指出 BMPs 能夠調控 p38 、 MAPK 、 ERK 、 NF $\kappa$ B 及 PI3K 等 intracellular mediators 引起下游機制反應(Sieber et al., 2009; Bragdon et al., 2011) , 另外, BMPRII 的 cytoplasmic tail 透過 LIM kinase 1 (LIMK1) 及 c-Jun N-terminal kinase (JNK) , 其會影響調控細胞骨架動態的因子(Foletta et al., 2003; Podkowa et al., 2010) 。

#### 一、 BMP4

BMP4 最早被發現在皮膚或肌肉中表現可以誘導異位性 (ectopic) 骨頭及軟骨的形成(Wozney et al., 1988) , 由 408 個胺基酸 (amino acid, aa) 所組成之 prepropeptide , 其中包含 N 端 19 個胺基酸的訊息序列 (signal sequence) 、 273 個胺基酸的 prodomain 以及 C 端 116 個胺基酸的 mature peptide ,

prodomain 及 mature peptide 皆具有兩個 N-linked glycosylation site，而 mature peptide 內含有七個 cysteine(Wozney et al., 1988; Sieber et al., 2009)。所以，就如同其他 TGF $\beta$  superfamily 成員，BMP4 一開始被產生出來時作為較大的 precursor，經由 protease 作用後形成 mature dimer form，接著釋放到細胞間質 (extracellular matrix) 中(Suzuki et al., 1993)，其七個 cysteine 可以讓 BMPs 之間產生共價雙硫鍵 (covalent disulfide bond)，使 BMPs 聚合成 homodimer 或 heterodimer 以形成具有活性的訊號傳遞因子(Nohe et al., 2004)。

## 二、 BMP4 之受體

曾有研究指出，BMPRII 具有不同的 variant。Long form BMPRII 由 1038 個胺基酸所組成，其 kinase domain 後面接著富含 serine/threonine residues 的較長 C 端，而 short form BMPRII 則是缺少 C 端並且在多數細胞中較為稀少 (Beppu et al., 1997)。BMPRII 表現在許多不同的組織上，例如骨骼肌、心臟以及大腦等，也會表現在 cultured cell lines 中，像是 ROB-C26 osteoprogenitor cells、lung epithelial cells 以及 COS cell。BMPRII 與 BMP4 的結合能力只有在缺乏 type I receptor 會變得微弱，type I receptor 的存在可以促進 BMPRII 與 BMP4 之間的結合能力 (Kawabata et al., 1998)。在哺乳類動物中，BMPs 會結合的 type I receptor 有兩種，分別為 BMP type IA (亦稱為 ALK-3) 及 BMP type IB (又稱為 ALK-6)，此兩種 type I receptor 的結構非常相似並且其 kinase domain 有 85% 胺基酸序列是一樣的。BMP type IA 及 type IB 分別與 BMPs 之間的結合能力不盡相同，但此兩種 receptor 與 BMP4 的結合能力是相似的 (Kawabata et al., 1998)。BMP4 亦會與 ALK-2 及 ActRIIA 結合(Bragdon et al., 2011)。

### 三、 BMP4 之生理功能

BMP4 與 BMP2 的胺基酸序列有 83% 是一樣的，他們是 BMPs 中最常被研究的成員(Labeur et al., 2010)，BMP4 及 BMP2 皆具有誘導骨頭與軟骨形成的能力，且在早期胚胎發育時期扮演重要的角色。當老鼠體內 BMP4 基因缺失時，使得 extraembryonic mesoderm 及 posterior/ventral mesoderm 無法形成，胚胎會在 E6.5 至 E9 之間死亡(Winnier et al., 1995)。BMP4 的生理功能相當地多元複雜且重要，由過去的研究發現其亦會參與去髓鞘化 (demyelination) 與軸突再生 (axon regeneration) 的過程，當 spinal cord lesion 時，BMP4 表現量會增加且促進星狀膠細胞 (astrocyte) 的活化，進而形成 glial scar 阻礙軸突再生的功能(Fuller et al., 2007)，而近期亦有研究觀察到在 spinal cord injury 的動物模型中在背根神經節 (dorsal root ganglion, DRG) 加強 BMP4 訊息傳遞機制可以促進軸突再生 (axon regeneration) 的能力(Parikh et al., 2011)。BMP4 亦會調控細胞的死亡與存活，曾有文獻指出在基因轉殖鼠的皮膚中過度表現 (overexpression) BMP4 時，會降低神經支配的程度而誘導細胞凋亡反應，造成背根感覺神經元的數目顯著性減少(Guha et al., 2004)，另外亦有研究發現 BMP4 能夠促進耳蝸內的螺旋神經節 (spiral ganglion) 之單極神經元 (monopolar neuron) 以及沒有 neurite 的神經元之存活(Whitlon et al., 2007)。BMP4 亦具有神經保護的功能，曾有文獻指出 BMP4 與 ciliary neurotrophic factor (CNTF) 皆可保護視網膜中的無長突神經細胞 (amacrine neuron) 以及雙極神經細胞 (bipolar neuron) 抵抗 NMDA 所誘導的興奮性毒殺作用(Fischer et al., 2004)。

### 第六節、興奮性毒殺作用與運動神經元疾病

麩氨酸 (glutamate) 是中樞神經系統中主要的興奮性神經傳導物質，在神經傳遞訊息時期，前突觸末梢因去極化反應而將 glutamate 釋放至突觸間隙中，

活化後突觸膜上的 glutamate 受體引起下游反應。在後突觸端的 glutamate 受體是離子通道型受體 (ionotropic receptor)，依據其對不同試藥之作用可分為 N-methyl-D-aspartate(NMDA)受體、 $\alpha$ -amino-3-hydroxyl-5-methyl-4-isoxazole-propionate (AMPA)受體以及 kainate 受體(Heath and Shaw, 2002)。興奮性反應的終止主要是透過星狀膠細胞 (astrocyte) 膜上的麩氨酸轉運蛋白 (glutamate transporter) 將突觸間隙中 94%的 glutamate 送進星狀膠細胞內，經由星狀膠細胞內 glutamine synthetase 作用將其轉變成 glutamine 後送到星狀膠細胞外，神經細胞會回收 glutamine 再合成 glutamate 利用(Laake et al., 1995; Tanaka et al., 1997)。過多的 glutamate 將會造成其 NMDA 受體過度活化，引起大量  $Ca^{2+}$  流進細胞內，細胞質內過多的  $Ca^{2+}$  會進入粒線體中(Peng and Greenamyre, 1998)，影響粒線體膜上抗細胞凋亡蛋白 (antiapoptotic protein) Bcl-2 與促細胞凋亡蛋白 (proapoptotic protein) Bax 之比例進而引起細胞死亡 (Schelman et al., 2004a)，此外， $Ca^{2+}$  亦會活化 MEK / ERK 訊息路徑促使細胞膜上 AMPA receptor 大量增加，促使細胞內環境更為興奮性，造成細胞死亡 (Zhu et al., 2002)，此興奮性毒殺作用與中樞系統的疾病有關，包括缺血性損傷 (ischemia)、血流再灌注損傷 (reperfusion injury) 以及神經退化性疾病如肌萎縮性側索硬化症 (amyotrophic lateral sclerosis, ALS)(Weiss, 2011)。

ALS 的病理特徵為運動皮質、腦幹以及脊髓中的運動神經元死亡，ALS 病人的隨意肌會逐漸衰弱，而當呼吸肌衰弱時會使個體無法呼吸(Caroscio et al., 1987)。ALS 的致病機制相當地複雜，其中曾有文獻指出興奮性毒殺作用與 ALS 疾病有關，在 ALS 病人的腦脊髓液中發現 glutamate 的含量是正常人的 3 倍以上(Rothstein et al., 1990)，從 ALS 病人身上取得的腦脊髓液在細胞實驗中會造成運動神經元死亡及退化(Rothstein et al., 1992; Rothstein et al., 1995)，Riluzole 目前是治療 ALS 疾病較有效的藥劑，其可以抵抗 glutamate 所誘導的興奮性毒殺作用，延緩 ALS 病人運動神經元的退化(Bensimon et al., 1994)。



## 第七節、本論文之研究目的

許多研究指出 BMP 的訊息傳遞對果蠅體內 NMJ 發育相當重要，retrograde BMP 會調控前突觸運動神經元的突觸生長、聚集及穩定，當果蠅體內的 Gbb 及其受體發生突變時，會導致 NMJ 受到破壞，降低神經傳導物質的釋放及突觸的大小。然而，在哺乳類 NMJ 的研究上，一般多為探討 Agrin/MuSK 之訊息傳遞路徑，但在過去的研究中指出 BMP 在脊髓損傷時會有所反應並且參與軸突再生的過程，顯示了 BMP 在神經元及周邊系統之間扮演重要的角色。但是，目前關於 BMP 在哺乳類 NMJ 的研究還未完全了解，而從本實驗室初步的實驗結果發現，BMP 之受體 BMPRII 會表現在 NMJ 處，顯示 BMP 的訊息傳遞可能也參與運動神經元與肌肉之間的調控機制，故我們將進一步探討 BMP 在 neuromuscular system 中的表現情形，本論文內容主要針對 BMP4 作探討。



## 第二章 實驗材料與研究方法

### 第一節、細胞株之培養

#### 一、細胞株之種類及來源

本論文使用兩種細胞株來進行實驗，包括：(1) C2C12 細胞 (肌肉母細胞株) 培養於含有 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, sigma)、20% fetal bovine serum (FBS, Biological industries)、1x penicillin/streptomycin (sigma, 內含 100 U/ml penicillin 以及 100 µg/ml streptomycin) 的生長培養液。(2) NG108-15 細胞 (小鼠神經細胞瘤與大鼠神經膠細胞瘤之融合細胞) 培養於含有 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, sigma)、10% fetal bovine serum (FBS, Biological industries)、1x HAT solution (invitrogen, 內含 100 µM hypoxanthine、1µM aminopterin 及 0.4 µM thymidine)、1x penicillin/streptomycin (sigma, 內含 100 U/ml penicillin 以及 100 µg/ml streptomycin) 的生長培養液。此兩種細胞皆來自國家衛生研究院細胞庫/食品工業發展研究所生資中心。細胞均以 37°C、5% CO<sub>2</sub> 之生長環境於培養箱 (SANYO MCO-20AIC) 中進行培養，每 2 天更換一次培養液維持細胞健康，若細胞數目生長過多，則進行分盤，以保持足夠細胞進行實驗。

#### 二、細胞培養

本論文使用兩種細胞：C2C12 及 NG108-15，細胞皆以直徑 10 公分的圓形培養皿進行母盤繼代培養，然而依照實驗所需分別有不同的培養方式。而在細胞培養過程中，為了增加細胞貼附在培養皿底部的能力，會將配置好的聚離胺酸 (Poly-L-lysine) 加至實驗所需的培養皿中，置於培養箱 1 小時進行被覆 (coating)。其配置方法為將 5mg Poly-L-lysine (Sigma) 加入 50 ml 滅過菌的 ddH<sub>2</sub>O 完全溶解均勻，並以 0.22 µm 的 filter 過濾後置於 4°C 冰箱保存。

##### (一) C2C12 細胞

種細胞前，先將無菌無塵操作台 (Laminar flow working station) 打開抽風約 15 分鐘，並將 0.05% Trypsin-EDTA (GIBCO)、1X 杜氏磷酸緩衝液 (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline, DPBS) 以及配製好的 C2C12 細胞生長培養液自冰箱 4°C 中取出，進行 37°C 水浴回溫後，以 75% 酒精噴灑瓶身、瓶口相接處以及雙手再拿進操作台，並在操作台中以酒精燈燃燒瓶口相接處再次進行滅菌處理。細胞母盤自培養箱中取出，移除舊培養液後先以 10 ml 不含  $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$  等離子的 DPBS 沖洗細胞一次，將洗過細胞的 DPBS 吸掉，在培養皿中加入 2 ml Trypsin-EDTA 後置於培養箱 37°C 溫度下作用。由於 Trypsin 為胰蛋白酶，其作用可分解細胞與培養皿間的附著蛋白，而 EDTA 為螯合劑，其作用為去除  $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$  等離子，故 Trypsin 與 EDTA 共同作用，可使附著在培養皿底部的細胞懸浮在液體中。置於培養箱約 2 ~ 3 分鐘後取出，由於 Trypsin-EDTA 作用時間過長會破壞細胞，故取出細胞後加入 3 ml 的細胞生長培養液至培養皿中混勻以抑制 Trypsin-EDTA 的活性。接著將混勻的細胞液吸至 15 ml 離心管中，用 500 g 轉速離心 5 分鐘後清除上清液，再加入 1 ml 細胞生長培養液均勻打散細胞，取 5  $\mu\text{l}$  細胞液進行稀釋，並加入與稀釋後細胞液同等體積的染色劑 Trypan-Blue 混勻，進行細胞計數，取 10  $\mu\text{l}$  稀釋液至細胞計數盤上，蓋上蓋玻片使細胞液均勻分佈，接著在顯微鏡下隨機取樣細胞計數盤九宮格中的 5 格，因細胞計數盤上有兩個九宮格，故總共取樣 10 格求出平均值。再以平均值  $\times 10^4$  (九宮格每一格的體積)  $\times$  培養液稀釋倍數  $\times 2$  (Trypan-Blue 同體積稀釋)，回推離心管中細胞液所含的所有細胞數，依照實驗需求分別種植細胞數  $2 \times 10^4/\text{well}$  到 6 孔盤的培養盤中或  $8 \times 10^4/\text{well}$  到含有聚離胺酸 (Poly-L-lysine) coating 過之蓋玻片 (直徑 15mm) 的 6 孔盤中培養，細胞生長至約 80% 空間時換至含有 2% horse serum 的 fusion medium 中培養五至六天，誘導 C2C12 肌肉母細胞株融合成成熟的肌小管 (myotube) 後以進行藥物處理，並於 37°C，5%  $\text{CO}_2$  之培養箱中培養。



## (二) NG108-15 細胞

細胞培養過程基本操作如同上述。NG108-15 細胞培養在被覆好的直徑 10 公分圓形培養盤中，當細胞生長約至 80%空間時，在培養液中加入 1 mM dibutyryl cAMP (sigma) 培養四天，誘導 NG108-15 細胞株分化成神經，此期間由於細胞代謝速率變快，故需每天更換生長培養液以維持足夠的養分。將分化成神經的 NG108-15 細胞依實驗需求種植  $4 \times 10^5$  至直徑 3.5 公分圓形培養盤中以進行藥物處理，並於 37°C，5% CO<sub>2</sub> 之生長環境下培養。

## 三、藥物處理

本論文使用兩種細胞：C2C12 及 NG108-15，故依照實驗需求分別使用不同的藥物處理。

### (一) C2C12 細胞

多篇文獻皆利用在 C2C12 肌小管 (C2C12 myotube) 中加入運動神經衍生性蛋白 Agrin，誘導乙醯膽鹼受體 (acetylcholine receptor, AChR) 聚集現象，模擬 NMJ 以達到研究目標 (Ferayorni et al., 2004; Lin et al., 2005)。我們將訂購的 Recombinant Rat Agrin (R&D) 溶解至無菌的 DPBS 中，以 100 µg/ml 濃度分裝成小體積保存至 -80°C，再依實驗所需以未含血清的 DMEM 將高濃度藥劑稀釋成 2 ng/ml、10 ng/ml 以及 50 ng/ml，加入已培養五天成熟之 C2C12 肌小管培養盤中處理 16 小時後，進行 RNA 萃取或是細胞染色實驗。

### (二) NG108-15 細胞

為了探討 BMP4 對神經細胞的保護作用，我們利用 Glutamate/glycine 溶液對神經細胞產生興奮性毒殺作用 (excitotoxicity)，Glutamate 與 glycine 共同作用活化 NMDA 受體，讓 Ca<sup>2+</sup>、Na<sup>+</sup> 及 K<sup>+</sup> 等離子流進細胞內 (Oza et al., 2008)。我們以未含血清的 DMEM 配製濃度為 50 µM glutamate 及 50 µM glycine 的 Glutamate/glycine 混合液，此溶液需實驗當天新鮮配製。接著我們從細胞培養

箱中取出前一天種好細胞數的培養盤，用微量吸管 (pipette) 將舊培養液 (conditioned medium, CM) 吸至 15ml 離心管後以 500 g 轉速離心 5 分鐘後吸取上清液至 50ml 離心管中，並保存於 4°C。細胞則以 DPBS 沖洗一次後，更換 medium 為 Glutamate/glycine 混合液或 DMEM 培養，分別加入 2 ng/ml、10 ng/ml 以及 50 ng/ml 不同濃度的 BMP4 (R&D)，處理 16 小時或是 24 小時後計數細胞存活數目。

## 第二節、實驗動物

本論文所使用之實驗動物為 C57BL6 小鼠，購自於國家實驗動物中心。年齡約八週至十週大成鼠，動物房之室內溫度維持在 22±1°C，晝夜循環燈控設定為 12/12 小時，早上八點至下午八點為白晝，實驗期間給予充足的飼料與飲水。

## 第三節、Nerve ligation

本實驗以 isoflurane 氣體麻醉小鼠，將氣體麻醉機 (Matrx™ VIP 3000 Calibrated Vaporizer, Midmark Corp.) 的氧氣進氣量流速調整為 0.4 L/min，isoflurane 氣體濃度調整至 3% 之後，先將成鼠放入氣麻機管線連接的盒子中予以麻醉，迷昏後的成鼠戴上氣麻機管線連接的面罩以便手術過程中持續麻醉。剔除成鼠後肢右大腿處的皮毛，劃開股二頭肌 (biceps femoris) 的前緣讓坐骨神經 (sciatic nerve) 顯露出來，並小心地將坐骨神經與其他組織分開，之後利用黑絲線(2-0)在坐骨神經上打兩個結，兩結之間距離約 1-2 mm，須注意不可拉斷坐骨神經，最後將切口用手術線縫合。手術完 18-20 小時之後，利用二氧化碳犧牲手術後的老鼠取出坐骨神經 (sciatic nerve)、肌肉組織 (soleus muscle) 以及腰椎部分的脊髓組織 (lumbar spinal cord) 以進行 RNA 萃取或是組織染色實驗。沒有做手術的左後肢則作為 control 組。

#### 第四節、Muscle denervation

本實驗過程亦用 Isoflurane 氣體麻醉機 (Matrx™ VIP 3000 Calibrated Vaporizer, Midmark Corp.) 持續麻醉成鼠。剔除成鼠後肢右大腿處的皮毛，劃開股二頭肌 (biceps femoris) 的前緣讓坐骨神經 (sciatic nerve) 顯露出來，並小心地將坐骨神經與其他組織分開，將坐骨神經剪斷 1~2 公分長度後縫合傷口 (Okada et al., 2006; Macpherson et al., 2011)，於手術七天後以二氧化碳犧牲手術後的老鼠取出肌肉組織 (soleus muscle) 以進行組織染色實驗。沒有剪斷坐骨神經的左後肢即為 control 組別。

#### 第五節、免疫染色法 (immunostaining)

##### 一、免疫組織染色法 (immunohistochemistry)

##### (一) 組織包埋與切片

小鼠依實驗所需取下各個部位組織之後，將組織置於盛裝一些冷凍包埋劑 (OCT Compound) 的自製鋁箔紙盒內擺正，再加入冷凍包埋劑覆蓋住組織，而後用鑷子夾住鋁箔紙盒與在液態氮環境下成固體狀的 2-Methylbutane 接觸，在低溫環境中冷凍包埋劑會逐漸硬化形成固態將組織良好包覆，包埋好的組織塊保存於 -80°C 冰櫃中。組織切片時，利用冷凍切片機 (Leica, 3050S) 以縱切或是橫切的方式切出 10 μm 組織切片，將其貼附在 Poly-L-lysine 被覆好的玻璃載玻片 (Thermo, SCIENTIFIC, 25x75x1 mm) 上，靜置一段時間讓組織切片水氣晾乾後，即可進行組織染色。

##### (二) 組織染色

利用強力膠可貼附在玻璃及易撕除的特性，在組織玻片上畫出強力膠圈圍住組織，在強力膠圍住的組織區域內加入 4% 或 1% 固定液 (paraformaldehyde, PFA)，將其置於 4°C 冰箱中反應 30 分鐘後取出，移除掉固定液，用 0.1M Glycine/0.01M Phosphate Buffered Saline (PBS) 洗兩次各 5 分鐘，接著使用

0.01M PBS 洗兩次，每次 5 分鐘，之後移除廢液，加入 Donkey serum (1: 30, abcam) 在室溫下進行 blocking 作用，減少抗體非專一性的結合，反應 20 分鐘後移除，而後加入初級抗體置於 4°C 冰箱中反應 overnight。初級抗體包含 Rabbit polyclonal to BMP4 ( 1 µg/ml, abcam) 、 anti-human BMPRII antibody (15 µg/ml, R&D) 、 anti-neurofilament200 IgG (1 µg/ml, sigma) 、以及 rabbit polyclonal to S100 beta (1:100, abcam) 等。 Donkey serum 以 0.01M PBS 稀釋，初級抗體則以 0.01% Bovine serum albumin (BSA) / 0.2% Tween20 / 0.01M PBS 溶液稀釋成所需濃度，兩者溶液在使用前須經過 10000 rpm 轉速，離心 2 分鐘。第二天移除初級抗體之後，先以 0.1% Tween20 / 0.01M PBS 洗六次各 2 分鐘，洗去殘留的初級抗體，移除清洗液之後加入二級抗體反應 1 小時，二級抗體包含 biotinylated donkey anti-rabbit IgG (1:200, amersham) 及 biotinylated donkey anti-goat IgG (1:100, abcam)。接著用 0.5% Tween20 / 0.01M PBS 洗三次各 5 分鐘，洗去多餘的二級抗體後以 0.01M PBS 清洗 1 分鐘，而後利用 0.3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/methanol 混合液反應 10 分鐘去除內生性 peroxidase，過程中需注意避免 0.3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/methanol 混合液揮發掉，反應完後立即以 0.01M PBS 清洗三次各 1 分鐘，移除掉清洗液後加入 streptavidin-biotinylated-HRP 溶液反應 1 小時將訊息放大，反應完後以 0.01M PBS 清洗三次各 2 分鐘，再以 0.1M acetate buffer (pH= 5.2) 清洗 3 分鐘，而後使用 3-Amino-9-ethyl-carbazole (AEC) 呈色劑反應約 12 分鐘，當有適量紅色呈色時立即移除呈色劑並以 ddH<sub>2</sub>O 清洗終止呈色反應，接著拭去玻片上多餘水分，滴一些 90% glycerol / 10% PBS 配製而成的封片液 (mounting medium) 並蓋上蓋玻片，最後塗上指甲油完成封片。玻片完成後利用顯微鏡 (Zeiss, Imager D2) 觀察，同時利用 CCD 相機 (AxioCam ICc3) 拍照存檔。

## 二、 Whole mount soleus muscle 及免疫螢光染色法

將做過 muscle denervation 實驗之成鼠用二氧化碳犧牲後取下 soleus muscle 置於解剖盤上拉直用針固定，之後利用 2%固定液在 4°C 冰箱中反應 1 小時，反應完後立即以 0.1M Glycine/0.01M PBS 清洗兩次各 5 分鐘，再以 0.01M PBS rinse 一次，而後於解剖顯微鏡下解剖組織，去除掉除了肌肉以外的組織並用鑷子將肌肉撕成條狀，放入 chicken serum 中在室溫下進行 blocking 作用，反應 20 分鐘後移除，而後加入初級抗體置於 4°C 冰箱中反應 overnight。初級抗體包含 Rabbit polyclonal to BMP4 ( 4 µg/ml, abcam) 及 Rabbit monoclonal to synaptophysin (1:100, abcam)。第二天移除初級抗體後以 0.01M PBS 清洗三次，每次 20 分鐘，而後加入二級抗體 Alexa Fluor 488 chicken anti-rabbit IgG (1:250, invitrogen) 以及 Tetramethylrhodamine- $\alpha$ -bungarotoxin (100nM, Molecular probes) 於室溫下反應 2 小時，再以 0.1M PBS 清洗三次各 20 分鐘，最後將條狀的肌肉組織置於載玻片上以封片液及指甲油完成封片。螢光染色完成之玻片需避光，並且立即使用螢光顯微鏡 (Delta Vision imaging system, Applied precision) 觀察並且拍照存檔。

## 三、 C2C12 肌小管之免疫螢光染色及定量分析

### (一) 細胞螢光染色法

培養在 6 孔盤中之蓋玻片 (直徑 15mm) 上已五天的成熟 C2C12 肌小管，經 Agrin (10 ng/ml) 或 DMEM 處理 16 小時之後從培養箱取出，移除培養皿中的 medium 後以 DPBS rinse 兩次，接著加入 1% 固定液在 4°C 冰箱中反應 30 分鐘，反應完後立即以 0.1M Glycine / 0.01M PBS 清洗兩次各 5 分鐘，再以 0.01M PBS 洗兩次，每次 5 分鐘，而後加入 chicken serum 在 4°C 冰箱中進行 blocking 反應 20 分鐘，反應完後移除 chicken serum，接著加入初級抗體 Rabbit



polyclonal to BMP4 ( 0.5 µg/ml, abcam)置於 4°C 冰箱中處理 overnight，第二天先以 0.1% Tween20 / 0.01M PBS 洗六次各 2 分鐘後，加入二級抗體 Alexa Fluor 488 chicken anti-rabbit IgG (1:1000, invitrogen) 以及 Tetramethylrhodamine- $\alpha$ -bungarotoxin (100nM, Molecular probes) 置於 4°C 冰箱中反應 overnight，第三天實驗先以 0.5% Tween20 / 0.01M PBS 洗三次各 5 分鐘，洗去多餘的二級抗體後以 0.01M PBS 清洗兩次各 5 分鐘，最後用鑷子將 6 孔盤中之蓋玻片取出，細胞面朝下放在載玻片上以封片液及指甲油完成封片後立即用螢光顯微鏡 (Delta Vision imaging system, Applied precision) 觀察並拍照存檔。

## (二) 螢光定量

在螢光顯微鏡 (Delta Vision imaging system, Applied precision) 下以 60X 物鏡觀察，在每一片染色後的玻片上隨機取樣 20 條以上之成熟 C2C12 肌小管，並且立即拍照存檔。照片則以 image j 1.44c (<http://imagej.nih.gov/ij/>) 軟體分析，由於  $Intensity = area \times mean$  (平均像素)，故以 image j 1.44c 軟體分析照片可得知每條肌小管單位面積下綠色螢光像素值，而在每張照片中隨機取樣 3 處背景最黑的地方做平均為背景值。肌小管單位面積下綠色螢光像素值減去背景值即為單位面積下綠光螢光強度。綠色螢光為 BMP4 染色，故可定量 BMP4。

## 第六節、即時定量聚合酶連鎖反應 (quantitative real-time polymerase chain reaction, Q-PCR)

### 一、RNA 之萃取

#### (一) 細胞之 RNA 萃取

從培養箱中取出預萃取 RNA 之細胞盤，移除培養液後先以 0.01M PBS 清洗兩次，接著使用 RNeasy Mini Kit (Qiagen, cat No.74104) 套組萃取 RNA，萃取出來的 RNA 最後以 RNase-free water 回溶，並取出 1 ul 以 Nanodrop

(NanoDrop 2000, UV-Vis Spectrophotometer) (Thermo, SCIENTIFIC) 測量樣本 RNA 的濃度，其 OD 260/280 的比值須在 1.8 以上，保存於-80°C 冰箱。

## (二) 動物組織之 RNA 萃取

從做過 nerve ligation 實驗的老鼠身上取得之坐骨神經 (sciatic nerve)、肌肉組織 (soleus muscle) 以及腰椎部分的脊髓組織 (lumbar spinal cord) 樣本自-80°C 冰箱中取出放置於盛裝碎冰的保麗龍盒中，待稍融解之後即進行 RNA 之萃取。本實驗中使用 RNeasy® Fibrous Tissue Mini Kit (Qiagen, cat No. 74704) 套組，萃取出來的 RNA 最後以 RNase-free water 回溶，並取出 1 µl 以 Nanodrop 2000 (Thermo, SCIENTIFIC) 測量樣本 RNA 的濃度，其 OD 260/280 的比值須在 1.8 以上，保存於-80°C 冰箱。

## 二、互補鏈 DNA 反轉錄反應

### (一) DNase treatment

本實驗使用 DNase treatment kit (Ambion, AM1906)，在萃取出來之 RNA 樣本要轉成 cDNA 之前，先進行 DNase treatment 去除樣本裡可能存在之 genomic DNA，以確保 RNA 之純度。從-80°C 冰箱中取出 RNA 樣本放置於碎冰上，待融解後取出 0.5~5 µg RNA 至 0.2 ml PCR 反應管中，加入 1 µl DNase I buffer 及 1µl rDNase I 後，再加 RNase free H<sub>2</sub>O 將體積補至 10 µl，混合均勻後放入 PCR machine (Bio rad, MJ Mini Thermal cycler) 中，在 37°C 環境下反應 20 分鐘，反應完後取出樣本加入 2 µl DNase inactivation reagent，在室溫下靜置 2 分鐘，終止 DNase 酵素作用，接著以 10000 g 轉速離心 2 分鐘後抽取 8 µl 反應完成的 RNA 至新的 PCR 反應管中，進行反轉錄反應。

### (二) First strand cDNA synthesis

將經 DNase 處理過後的 RNA 取 8 µl 至新的 PCR 反應管中，加入 1 µl Oligo(dT)<sub>15</sub> Primer 及 1 µl 10 mM dNTP Mix，並加入 RNase free H<sub>2</sub>O 將體積

補至 13  $\mu$ l，混合均勻後放入 PCR machine (Bio rad, MJ Mini Thermal cycler) 中，在 65°C 環境下反應 5 分鐘。在進行反應的同時，將事先從 -20°C 冰箱中取出退冰之反轉錄作用所需之緩衝液及相關試劑，依實驗所需配製成 Master mix。當 RNA 變性反應結束後，稍微 spin 一下樣本後立即放置碎冰上 1 分鐘以上，接著加入 7  $\mu$ l Master mix，混合均勻後再放入 PCR machine (Bio rad, MJ Mini Thermal cycler) 中，在 50°C 環境下進行反轉錄作用 1 小時，最後再以 70°C 加熱 15 分鐘終止反應，反轉錄反應完成後之 cDNA 保存於 -20°C 冰箱。本實驗使用 SuperScript™ III Reverse Transcriptase ( invitrogen )，Master mix : 4  $\mu$ l 5X First Strand Buffer, 1  $\mu$ l 100 mM DTT, 1  $\mu$ l RNase Out (40U/ $\mu$ l), 1  $\mu$ l SuperScript™ III RT (200 units/ $\mu$ l)。

### 三、即時定量聚合酶連鎖反應

將反轉錄反應完的 cDNA 樣本，利用 SYBR Green 螢光染劑 (Fermentas, #K0222) 進行測定，此螢光物質可以嵌入雙股 DNA (dsDNA) 的小凹槽 (minor-groove) 中，當 PCR 的產物越多時，嵌入 dsDNA 的螢光物質就越多，經由儀器偵測到的螢光值再回推即可算出原始基因的表現量。實驗中使用的引子 (primer) 如下：GAPDH-F: 5'- TAC ATG GCC TCC AAG GAG TAA GAA-3'，GAPDH-R: 5'- GGA TGG AAA TTG TGA GGG AGA TG -3'，BMP4-F: 5'- GTG AGG AGT TTC CAT CAC GAA GA -3'，BMP4-R: 5'- GTG AGG AGT TTC CAT CAC GAA GA -3'，BMPRII-F: 5'- ATT CTC TGG ATC TTT CAG CCA CAA -3' 以及 BMPRII-R: 5'- ATG GAG TTT TCA CAC GTC TCT TGA T -3'。首先把轉好之 cDNA 樣本、2X SYBR Green Master mix、forward 及 reverse 引子自 -20°C 冰箱中取出放置碎冰中解凍。將解凍後的 cDNA 樣本稀釋後濃度為 2.5 ng/ $\mu$ l，在 PCR 反應管中依序加入 10  $\mu$ l 2X SYBR Green Master mix、0.6  $\mu$ l forward primer、0.6  $\mu$ l reverse primer、3.8  $\mu$ l RNase free H<sub>2</sub>O 以及 5  $\mu$ l 稀釋後的



cDNA 樣本，最後體積為 20  $\mu$ l，混合均勻後 spin 一下，之後放入 7300 Real-Time PCR System (Applied Biosystems) 中進行分析。PCR 反應條件為：50°C 2 mins，95°C 10 mins，95°C 15 sec，60°C 1 min 共 40 cycles。反應完成之後，由儀器所附之軟體可得到測定的 Ct 值，將其帶入公式算出目標基因與 GAPDH 的相對值，而後進行統計分析。其公式為： $Ct_{GENE} - Ct_{GAPDH} = \Delta Ct$ 。

#### 第七節、細胞存活率分析：Trypan blue 染劑排除法

本實驗利用 Trypan blue 染劑排除法 (Trypan blue exclusion)，其原理為 Trypan blue 染劑會直接進入死細胞中而呈藍色，活細胞的細胞膜完整且具有選擇性通透性，染劑無法滲入細胞所以不會呈色。從細胞培養箱中取出經藥物處理的細胞，先用 DPBS 清洗兩次，洗去殘留培養液後每盤加入 750  $\mu$ l 0.5% Trypan blue，接著用裁剪成適當大小的石蠟膜 (paraffin) 將培養盤的蓋子封好，避免移動過程中打翻濺出液體，於培養盤底部會畫十字將培養盤分為四個區域，而後在倒立顯微鏡 (Zeiss observer A1) 下以 10 x 物鏡觀察，並於每個區域中隨機取樣 5 個地方拍照，故每盤細胞總共拍攝 20 張照片，存檔之照片則利用 image j 1.44c 軟體計數活細胞數目。

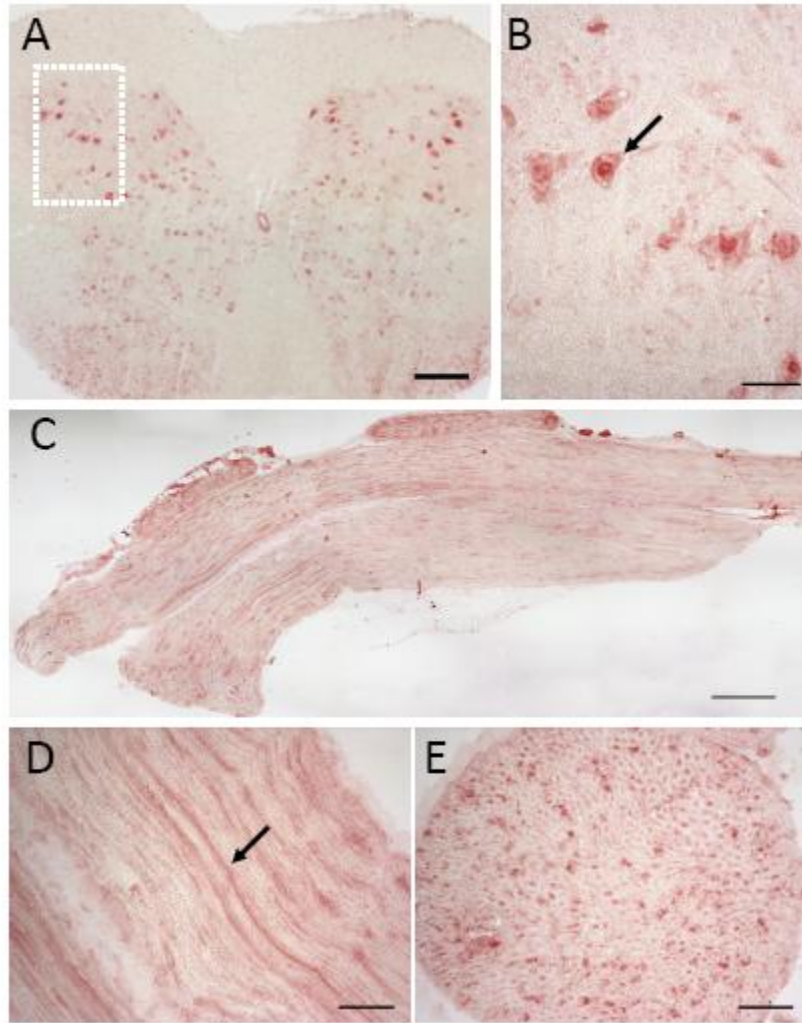
#### 第八節、統計分析

分析實驗結果數據利用 Excel 軟體進行分析。本論文中的實驗主要是在比較單一實驗組與單一對照組之間的差異，故利用 Student's t-test 統計方式來進行分析。統計分析結果顯著差異表示方式：\*，# 表示  $p < 0.05$ ，\*\*，## 表示  $p < 0.01$ ，\*\*\*，### 表示  $p < 0.001$ 。

### 第三章 實驗結果

#### 第一節、 type II BMP receptor 的表現位置

首先，我們取下成鼠的 lumbar spinal cord，其 ventral 處為運動神經元分布的區域，利用 BMPRII 之專一性抗體觀察 BMPRII 之表現情形，發現 BMPRII protein 會表現在運動神經元上 (圖一 A,B)，結果與文獻一致 (Wang et al., 2007a)。為了瞭解 BMPRII 在運動神經元上所參與的機制，我們亦取下成鼠之坐骨神經 (sciatic nerve) 觀察 BMPRII 之表現，實驗發現 BMPRII 也會分布在坐骨神經上，由坐骨神經之縱切圖可觀察到 BMPRII 染色呈現長條狀 (圖一 C,D)，且從坐骨神經之橫切圖發現 BMPRII 染色呈現點狀 (圖一 E)，此型態與利用 neurofilament 的專一性抗體在橫切坐骨神經上標定軸突 (axon) 之染色型態一致，故可得知 BMPRII 分布在坐骨神經之軸突內。本實驗室先前研究亦顯示，BMPRII 表現在 NMJ 上(附錄二)(Wang, 2006)。



圖一、BMPRII 在運動神經元 (motor neuron) 及坐骨神經 (sciatic nerve) 上的表現。利用 BMPRII 抗體之專一性，最後以 AEC 呈色，觀察 BMPRII 在運動神經元與坐骨神經上的表現情形。(A) 為 lumbar spinal cord 切片，可觀察到運動神經元聚集的 ventral 區域有專一性紅色呈色，即為 BMPRII。(B) 為圖(A)白色虛線框框內之區域放大圖，箭頭所指為運動神經元具有專一性紅色呈色，由此可知 BMPRII 在運動神經元上表現。(C) 為坐骨神經之縱切圖，可觀察到 BMPRII 之專一性染色。(D) 為圖(C)之區域放大圖，箭頭所指為 BMPRII 專一性紅色染色，呈長條狀。(E) 為坐骨神經之橫切圖，可觀察到 BMPRII 之分布呈點狀。圖(A)及圖(C)之比例尺為 200  $\mu\text{m}$ ，其餘之比例尺為 50  $\mu\text{m}$ 。

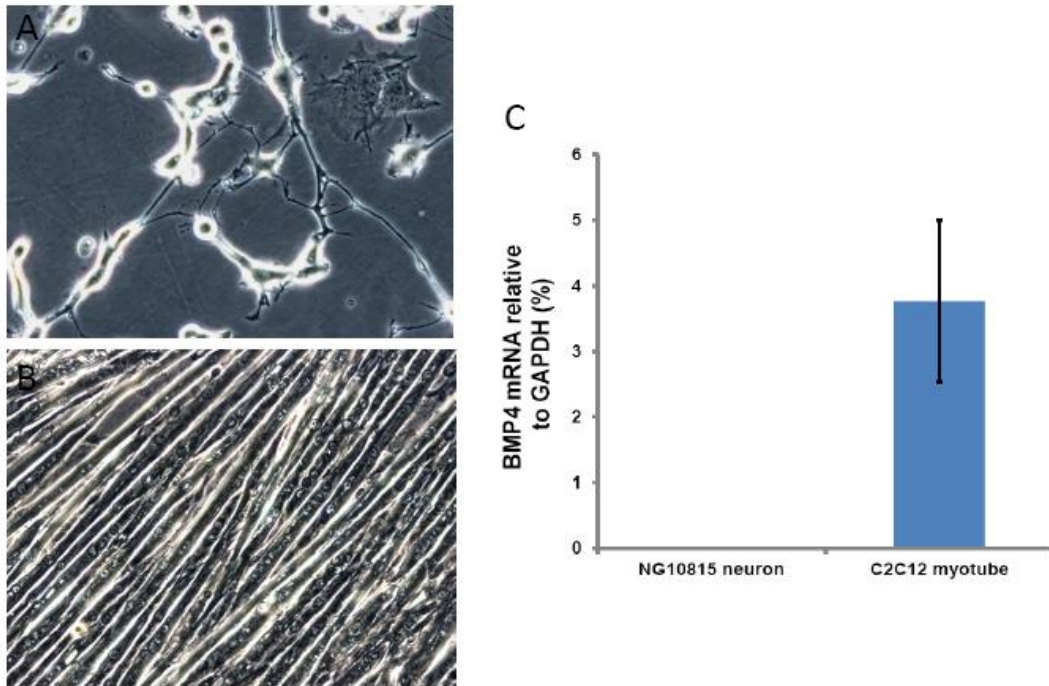
## 第二節、BMP4 參與調控運動神經元與肌肉之間的機制

BMPRII 表現在肌纖維的 NMJ 處，表示運動神經元可能是需要接受來自肌肉所分泌的 BMP protein 以維持正常功能。由於 C2C12 肌肉母細胞株與 NG108-15 神經細胞是經常使用於研究運動神經元及肌肉之間作用機轉的 *in vitro* model (Ling et al., 2005)，故為了瞭解哪些 BMPRII ligand 參與運動神經元及肌肉之間的機制，我們利用 NG108-15 神經細胞(圖二 A) 以及 C2C12 肌肉母細胞株養成成熟的肌小管(圖二 B) 觀察 BMPRII ligand 之表現。其中 BMP4 mRNA 在肌小管上有高度表現，相反地在神經細胞上的表現量極少(圖二 C)。另外，根據本實驗室之前的資料顯示，利用雷射顯微擷取儀(laser capture microdissection, LCM) 取得運動神經元組織後觀察 BMP4 mRNA 表現量，發現與在 NG108-15 神經細胞上表現情形一致，BMP4 mRNA 在神經細胞中表現量極少(Wang, 2006)。所以，BMP4 mRNA 在肌小管及神經細胞表現量上的差異，提高了肌肉所分泌的 BMP4 參與運動神經元及肌肉之間作用機轉的可能性。

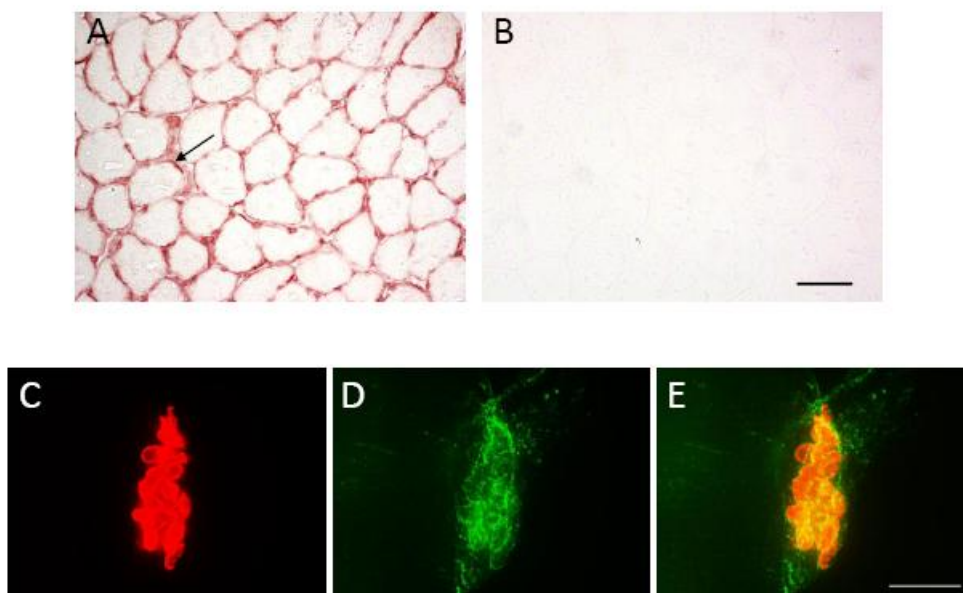
為了瞭解肌肉所分泌的 BMP4 是否參與調控運動神經元及肌肉之間的作用機制，我們首先利用免疫組織染色法發現肌肉會表現 BMP4 (圖三)，接著利用與 rhodamine- $\alpha$ -bungarotoxin 的 double staining 實驗顯示 BMP4 聚集在肌肉的 NMJ 處(圖三 C-E)。我們想要了解 BMP4 聚集在 NMJ 處的現象與運動神經元及肌肉之間的關係，故進一步利用 muscle denervation 實驗觀察 NMJ 處 BMP4 的表現情形，過去曾有文獻指出，當老鼠的坐骨神經被切除七天後軸突末梢之 presynaptic synaptophysin protein 會消失(Okada et al., 2006)，首先我們確認了 muscle denervation 實驗的可行性 (圖四 A-F)，而後從 muscle denervation 實驗中我們觀察到 BMP4 聚集在 NMJ 處的現象消失了(圖四 G-I)，此結果顯示肌肉的 BMP4 在 NMJ 中穩定表現需要來自運動神經元所分泌的訊號因子。

根據文獻研究顯示，Agrin 在 NMJ 發育過程時會被運動神經元所分泌，並且誘導後突觸端乙醯膽鹼受體(acetylcholine receptor, AChR)聚集以形成穩定的 NMJ (Reist et al., 1992)，故 Agrin 是廣泛研究於運動神經元與肌肉間作用的調控因子。所以，我們更進一步探討 Agrin 是否會調控 BMP4 在 NMJ 處的表現量及分布位置。首先，利用不同濃度的 Agrin 處理成熟的 C2C12 肌小管後觀察 BMP4 mRNA 表現情形，結果顯示隨著 Agrin 濃度的增加，C2C12 肌小管中 BMP4 mRNA 的表現量亦跟著增加 (圖五 A)，另外，我們也同時分析了 Agrin 對於 BMPRII 的調控情形，結果顯示 Agrin 不影響肌小管中 BMPRII 之 mRNA 表現量 (圖五 B)。而在 BMP4 protein 表現方面，實驗顯示相較於缺少 Agrin 處理的組別，加了 Agrin 處理的 C2C12 肌小管其 BMP4 抗體染色的螢光強度有顯著上升，顯示 Agrin 可以促進 BMP4 蛋白質的表現(圖六)。然而，從實驗中可知 Agrin 調控肌肉中 BMP4 mRNA 及 protein 的表現量，但卻不能誘導 BMP4 聚集在 NMJ 處(圖六 A-F)，由上述實驗顯示，我們先前所觀察到 BMP4 聚集在 NMJ 處的現象可能需要來自運動神經元其他的訊號因子所調控。

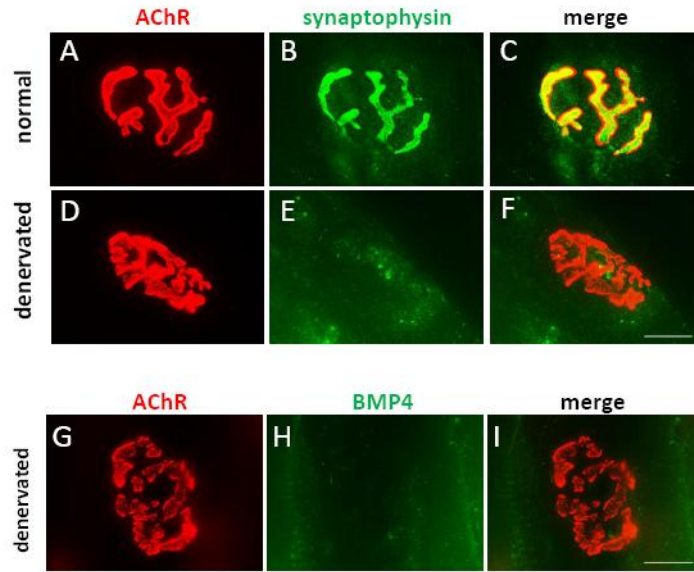




圖二、分化後的 NG108-15 細胞及 C2C12 肌小管中 BMP4 的 mRNA 表現量。  
 (A) 為培養四天之誘導分化的 NG108-15 細胞，神經細胞具有延長的 neurite。(B)  
 為培養五天之成熟 C2C12 肌小管，細胞融合形成長條狀。(C) 為分化後的  
 NG108-15 細胞及 C2C12 肌小管中 BMP4 的 mRNA 表現量比較，發現 BMP4  
 的 mRNA 在 C2C12 肌小管上表現量較多； $n=3$ 。實驗數值以  $\text{mean} \pm \text{SEM}$  表示。



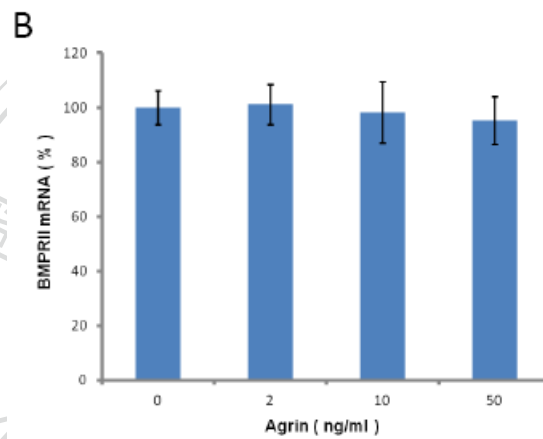
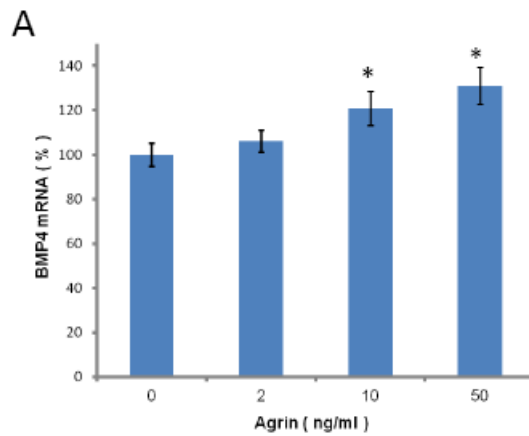
圖三、BMP4 表現在 muscle fiber 及 neuromuscular junction 處。利用 BMP4 之專一性抗體，觀察 BMP4 在肌肉組織中的表現情形。(A)為 soleus muscle 之橫切圖，利用為 AEC 呈色，可見 BMP4 之專一性染色分布在肌肉束外圍組織，並且部分區域具有較深色染色，如箭頭所示。(B)為 non-immune rabbit IgG 處理之 control 組。(C-E)從正常成鼠身上取得 soleus muscle 做 whole mount 免疫螢光染色實驗，觀察 BMP4 與 neuromuscular junction 之間的分佈位置。(C)利用 rhodamine- $\alpha$ -bungarotoxin 標定乙醯膽鹼受體 (AChR)，代表 neuromuscular junction 區域，為紅色螢光。(D)利用 BMP4 抗體與 Alexa Fluor 488 chicken anti-rabbit IgG 標定 BMP4，為綠色螢光。(E) 為圖 C 及圖 D 之疊合圖，大部分呈現黃色，顯示 BMP4 表現在 neuromuscular junction 處。圖 A 及圖 B 之比例尺為 50  $\mu$ m，圖 C 至圖 E 之比例尺則為 15  $\mu$ m。



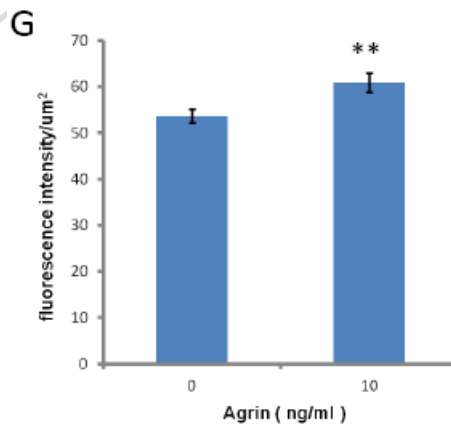
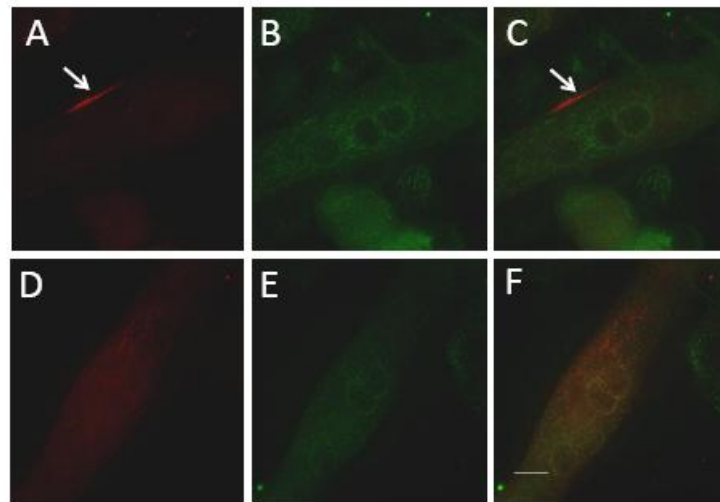
圖四、Muscle denervation 後 BMP4 在 neuromuscular junction 處的表現。

將成鼠的坐骨神經摘除七天之後，取下成鼠之 soleus muscle 且利用 whole mount 免疫螢光染色法，觀察 BMP4 在 neuromuscular junction 處的分布情況。(A-C) 為正常組別之老鼠 soleus muscle，(A)利用 rhodamine- $\alpha$ -bungarotoxin 標定乙醯膽鹼受體(AChRs)，代表 neuromuscular junction 區域，為紅色螢光。(B)利用 synaptophysin 抗體與 Alexa Fluor 488 chicken anti-rabbit IgG 標定 synaptophysin，synaptophysin 為突觸小泡 (synaptic vesicle) 上之蛋白質，分布在穩定的軸突末梢處，為綠色螢光。(C)為圖 A 及圖 B 之疊合圖呈現黃色，顯示正常成鼠之 neuromuscular junction 表現穩定。(D-F)為 muscle denervation 組別之老鼠 soleus muscle，可觀察到將成鼠之坐骨神經摘除後，(D)後突觸端乙醯膽鹼受體之紅色螢光不受影響，但圖(E)中 synaptophysin 之綠色螢光消失，neuromuscular junction 處軸突末梢已受到破壞。(F) 為圖 D 及圖 E 之疊合圖，沒有黃色呈色，顯示摘除坐骨神經七天後，neuromuscular junction 遭受破壞而不穩定。(G-I)為 muscle denervation 組別之老鼠 soleus muscle，(D)後突觸端乙醯膽鹼受體之紅色螢光不受影響，(E)利用 BMP4 之抗體與 Alexa Fluor 488 chicken anti-rabbit IgG 標定 BMP4 的表現。(F)為圖 D 及圖 E 之疊合圖，沒有黃色呈色，顯示軸突末梢遭受破壞後，BMP4 的表現消失了。比例尺皆為 15  $\mu$ m。





圖五、神經性衍生蛋白 Agrin 調控 C2C12 肌小管中 BMP4 的 mRNA 表現量，但不影響 BMPRII mRNA 表現量。(A) 培養五天之成熟 C2C12 肌小管，以 2 ng/ml、10 ng/ml 及 50 ng/ml 三種濃度之 Agrin 處理 16 小時後萃取 total RNA，再以 real-time PCR 分析三種不同濃度刺激下 BMP4 的 mRNA 表現量，可觀察到給予的 Agrin 濃度越高，BMP4 之 mRNA 表現量會跟著增加，在 10 ng/ml 及 50 ng/ml 的濃度下達到顯著；n=6。(B) 培養五天之成熟 C2C12 肌小管，同樣以 2 ng/ml、10 ng/ml 及 50 ng/ml 三種濃度之 Agrin 處理 16 小時後萃取 total RNA，最後以 real-time PCR 分析 BMPRII 的 mRNA 表現量，發現給予不同濃度的 Agrin 刺激，BMPRII 之 mRNA 表現量沒有顯著差異；n=6。實驗數值以 mean±SEM 表示，統計結果以 Student's t-test 統計方法計算；\* 代表 p < 0.05。



圖六、神經性衍生蛋白 Agrin 調控 C2C12 肌小管中 BMP4 的 protein 表現量，但不影響 BMP4 的表現位置。(A-C)在蓋玻片上培養五天之 C2C12 成熟肌小管，經 10 ng/ml Agrin 處理 16 小時後以 1% paraformaldehyde 固定細胞，接著以 rhodamine- $\alpha$ -bungarotoxin、BMP4 抗體及 Alexa Fluor 488 chicken anti-rabbit IgG 做免疫螢光染色實驗。(A)利用 rhodamine- $\alpha$ -bungarotoxin 標定乙醯膽鹼受體 (AChR)，箭頭所指為乙醯膽鹼受體聚集處，即紅色螢光。(B) 綠色螢光即為 BMP4 染色處，可觀察到 BMP4 分布在 C2C12 肌小管中。(C) 為圖 A 及圖 B 之疊合圖，沒有黃色呈色，顯示 Agrin 會調控乙醯膽鹼受體之聚集，但不影響 BMP4 的分布位置。(D-F) 則為未經 Agrin 處理之對照組。(D) 沒有乙醯膽鹼受體聚集之現象，無紅色螢光。(E) 綠色螢光為 BMP4，分布在 C2C12 肌小管中，其綠

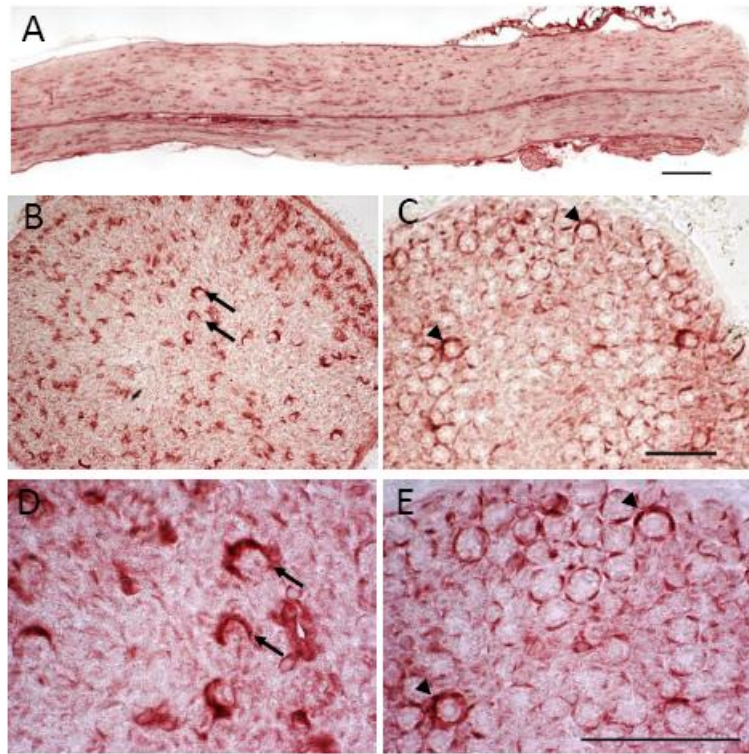
色螢光強度較圖 B 弱。(F) 為圖 D 及圖 E 之疊合圖。(D)利用 image J 軟體分析 Agrin 處理組與對照組之綠色螢光強度，各組分析至少 60 條以上肌小管，取得數值後比較兩組 BMP4 抗體染色的螢光強度。結果顯示經 Agrin 處理之組別，綠色螢光強度較高，代表相較於對照組，BMP4 的 protein 表現量有顯著增加；n=3。實驗數值以 mean±SEM 表示，統計結果以 Student's t-test 統計方法計算；\*\*代表  $p < 0.01$ 。



### 第三節、BMP4 亦是由 Schwann cell 所產生並且會於運動神經元中運輸

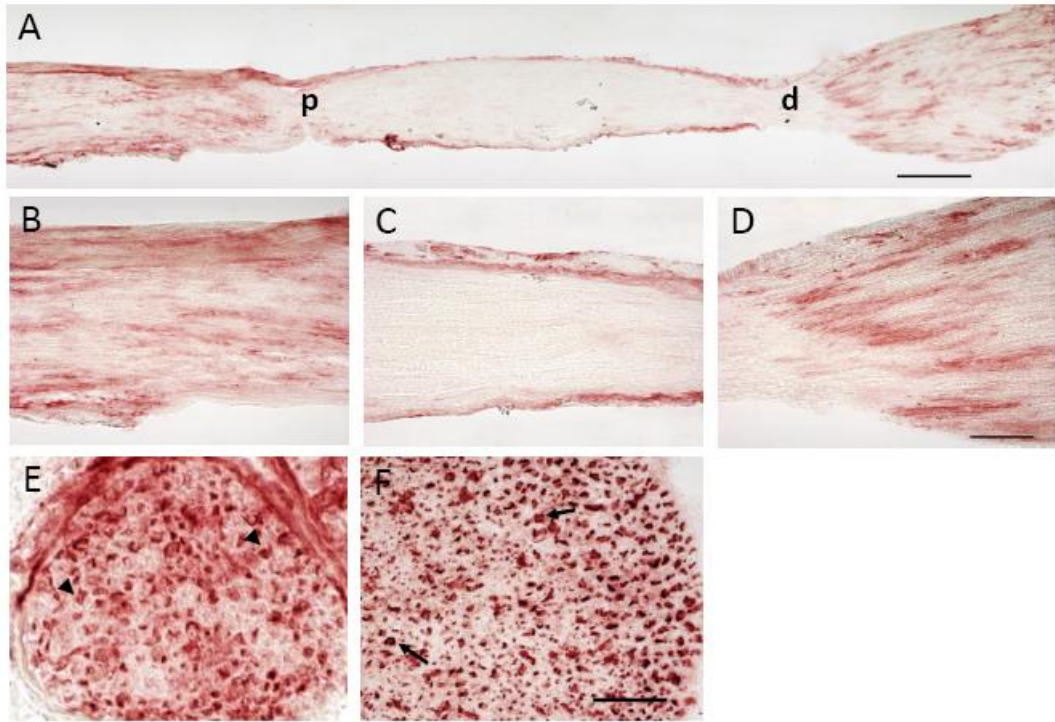
為了更加了解 BMP4 在運動神經元與肌肉之間作用機制中所扮演的角色，我們亦利用免疫組織染色法觀察 BMP4 在坐骨神經( sciatic nerve)上表現的情況，由坐骨神經縱切的染色圖可知 BMP4 會有高度表現(圖七 A)，而在坐骨神經橫切的染色圖中發現 BMP4 的分布型態呈現半同心圓狀(圖七 B,D)，此型態與坐骨神經橫切的 Schwann cell 染色圖(圖七 C,E)表現一致，故 Schwann cell 亦會產生 BMP4。

假設肌肉纖維與 Schwann cell 皆是經由產生 BMP4 以達到調控運動神經的功能，BMP4 應該會在軸突(axon)中被運送，就如同其他神經滋養因子 (Jiang et al., 2000a; Russell et al., 2000; Wang et al., 2007a)。所以我們進一步地做 nerve ligation 實驗，在老鼠的坐骨神經上打兩個結，經過 18-20 小時後取下坐骨神經組織觀察 BMP4 的表現型態及運輸方向。坐骨神經縱切染色圖發現 BMP4 會堆積在打結處兩端(圖八 A-D)，顯示 BMP4 的運送方式為雙向運輸，而在靠近神經末端的遠端處(distal)堆積的 BMP4 可能是來自於肌肉或 Schwann cell 所分泌(圖八 D)。另外，由坐骨神經橫切的染色圖發現 BMP4 在 Schwann cell 中的表現程度下降並且型態出現點狀(圖八 E)，而此型態與軸突染色型態一致(圖八 F)，故當坐骨神經受傷時，由肌肉或 Schwann cell 所分泌的 BMP4 會被運送進運動神經之軸突內。



圖七、BMP4 在坐骨神經 (sciatic nerve) 上的表現。(A) 坐骨神經之縱切圖，利用 BMP4 之專一性抗體以 AEC 呈色，可觀察 BMP4 在坐骨神經上有表現。(B) 坐骨神經之橫切圖，箭頭所指為 BMP4 聚集處，顯示 BMP4 的分布呈半同心圓形。(C) 坐骨神經之橫切圖，利用 S-100 beta 之抗體標定 Schwann cell，箭頭所指為 Schwann cell，呈圓形或半圓形。(D) 為圖 B 之區域放大圖。(E) 為圖 C 之區域放大圖。圖 A 之比例尺為 200  $\mu\text{m}$ ，圖 B 至圖 E 之比例尺為 50  $\mu\text{m}$ 。





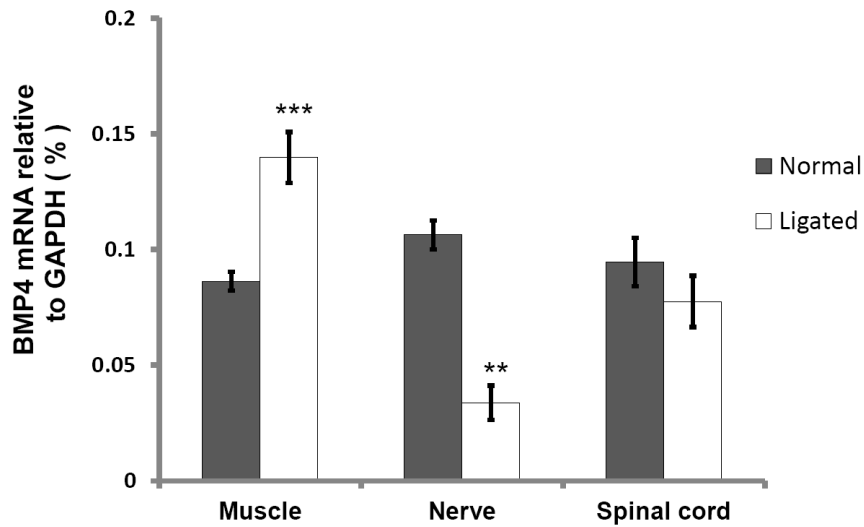
圖八、Nerve ligation 後 BMP4 在坐骨神經 (sciatic nerve) 上的表現。將 nerve ligation 後 18-20 小時之成鼠犧牲，取出坐骨神經後包埋以組織切片及利用 BMP4 之專一性抗體，以 AEC 呈色觀察 BMP4 的表現情形。(A) nerve ligation 後坐骨神經之縱切圖，圖中 “p”代表近端處 (proximal)，靠近運動神經元，而 “d”則代表遠端處 (distal)，靠近軸突末梢，由圖中可觀察到 BMP4 在打結處兩端皆有堆積的現象，而在兩個結的中間沒有 BMP4 之染色。(B) 為圖(A)近端處之區域放大圖。(C) 為圖(A)打結之中間區域放大圖。(D) 為圖(A)遠端處之區域放大圖。(E) nerve ligation 後坐骨神經之橫切圖，箭頭所指為 BMP4 之染色，大部分呈點狀。(F) 為正常成鼠之坐骨神經橫切圖，利用 neurofilament 之專一性抗體標定軸突 (axon)，其分布情形如箭頭所指呈點狀。圖 A 之比例尺為 200  $\mu\text{m}$ ，圖 B 至圖 F 之比例尺皆為 50  $\mu\text{m}$ 。



#### 第四節、軸突損傷會影響周邊組織中 BMP4 的表現

在許多文獻研究中發現，當神經受到損傷時周邊系統的衍生因子表現型態會跟著改變(Ishii, 1989; Friedman et al., 1992; Sendtner et al., 1992; Jiang et al., 2000a)，然而，為了提升在 nerve ligation 實驗中靠近神經末端的遠端處(distal)堆積的 BMP4 是來自於肌肉或 Schwann cell 所分泌的可能性，我們利用 nerve ligation 實驗進一步分析在坐骨神經受損情況下，肌肉組織、坐骨神經組織以及腰椎處脊髓組織中 BMP4 mRNA 表現量。結果顯示當軸突受損時肌肉組織中 BMP4 mRNA 表現量會顯著增加，在坐骨神經組織中 BMP4 mRNA 表現量則會下降，而在腰椎處脊髓組織中則是沒有差異(圖九)，故可知軸突損傷時會影響周邊系統 BMP4 的表現，使肌肉組織產生更多的 BMP4。





圖九、Nerve ligation 後 BMP4 在肌肉組織、坐骨神經以及 lumbar spinal cord 中的 mRNA 表現量。將 nerve ligation 後 18-20 小時之成鼠犧牲，取出 soleus muscle (n=5)、坐骨神經(n=5)以及 lumbar spinal cord (n=4) 後萃取 total RNA，再以 real-time PCR 分析 BMP4 之 mRNA 表現量。同一隻老鼠中未做 nerve ligation 之另一側後肢取得的組織即為對照組。結果顯示，相較於對照組，nerve ligation 後肌肉組織內的 BMP4 mRNA 表現量顯著增加，在坐骨神經中 BMP4 mRNA 表現量則顯著下降，而在 lumbar spinal cord 中 BMP4 mRNA 表現量則無顯著差異。實驗數值以 mean±SEM 表示，統計結果以 Student's t-test 統計方法計算；\*\* 代表  $p < 0.01$ ，\*\*\* 代表  $p < 0.001$ 。

## 第五節、BMP4 可能參與調控運動神經的存活

BMP4 由周邊系統之許旺細胞以及肌肉組織所分泌並且在運動神經之軸突內有運輸的表現。上述實驗讓我們提出一個假設，周邊系統所分泌的 BMP4 對於運動神經之功能可能是作為存活因子。根據文獻顯示分化後的 NG108-15 細胞上會表現具有功能的 NMDA receptor (Schelman et al., 2004b)，故 Glutamate/glycine 誘導之興奮性毒殺作用能使分化成神經之 NG108-15 細胞死亡 (Oza et al., 2008)，因此，我們以此為模型探討 BMP4 對神經細胞死亡之保護作用。我們將 50  $\mu$ M Glutamate/glycine 加入細胞處理 16 小時，此期間稱為興奮性毒殺時期 (excitotoxicity)，而後以 trypan blue 染色法計數細胞 (圖十 A)。首先，我們探討不同濃度之 BMP4 與神經細胞死亡之間的關係，BMP4 分別以 2 ng/ml、10 ng/ml 及 50 ng/ml 三種濃度與 Glutamate/glycine 同時處理，結果顯示，相較於 DMEM 之對照組，單獨以 Glutamate/glycine 處理之組別細胞存活率顯著下降，証實 Glutamate/glycine 的確能夠毒殺分化後之 NG108-15 細胞。然而，同時以 Glutamate/glycine 及 BMP4 處理之組別，BMP4 皆能保護 NG108-15 細胞免於毒殺死亡 (圖十 C)。另外，我們亦探討單獨處理不同濃度之 BMP4 對 NG108-15 細胞之存活率的影響，結果顯示在 2 ng/ml、10 ng/ml 及 50 ng/ml 之濃度下，BMP4 本身不會影響細胞的存活率 (圖十 B)。之後的實驗皆以 10 ng/ml BMP4 作探討，從圖十一中可觀察單獨以 Glutamate/glycine 處理之組別細胞密度較低，同時以 10 ng/ml BMP4 處理之組別則增高細胞密度。

先前文獻證實 Glutamate/glycine 的興奮性會造成延遲性的細胞死亡(Choi, 1987)，因此我們以 Glutamate/glycine 處理細胞 16 小時 (此期間稱為興奮性毒殺時期，excitotoxicity)，之後再將培養液更換為 condition medium 處理 8 小時 (此 8 小時期間為恢復時期，recovery)，我們分別在不同時期加入 BMP4，最後以 Trypan blue 染色法計數細胞數目(圖十二 A)。結果顯示，單獨在興奮

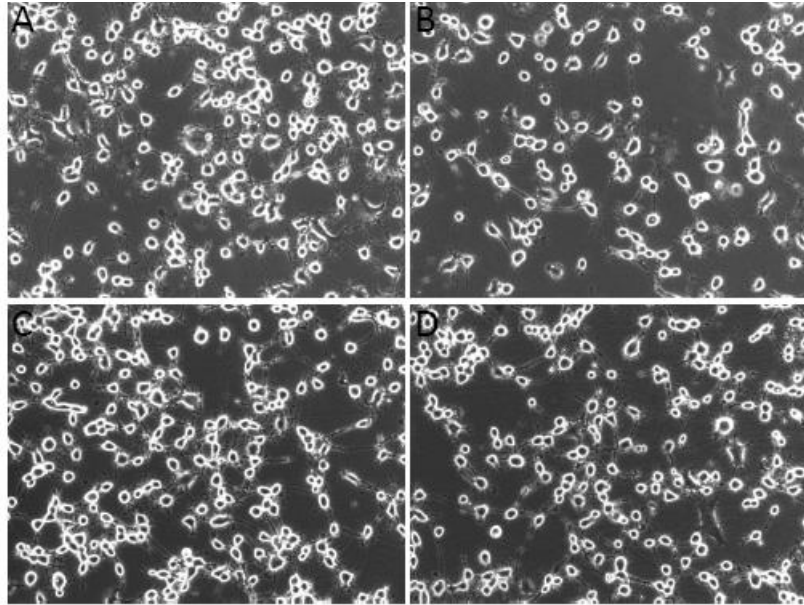
性毒殺時期加入 BMP4 處理，與在興奮性毒殺時期以及恢復時期皆以 BMP4 處理皆能保護 NG108-15 神經細胞。



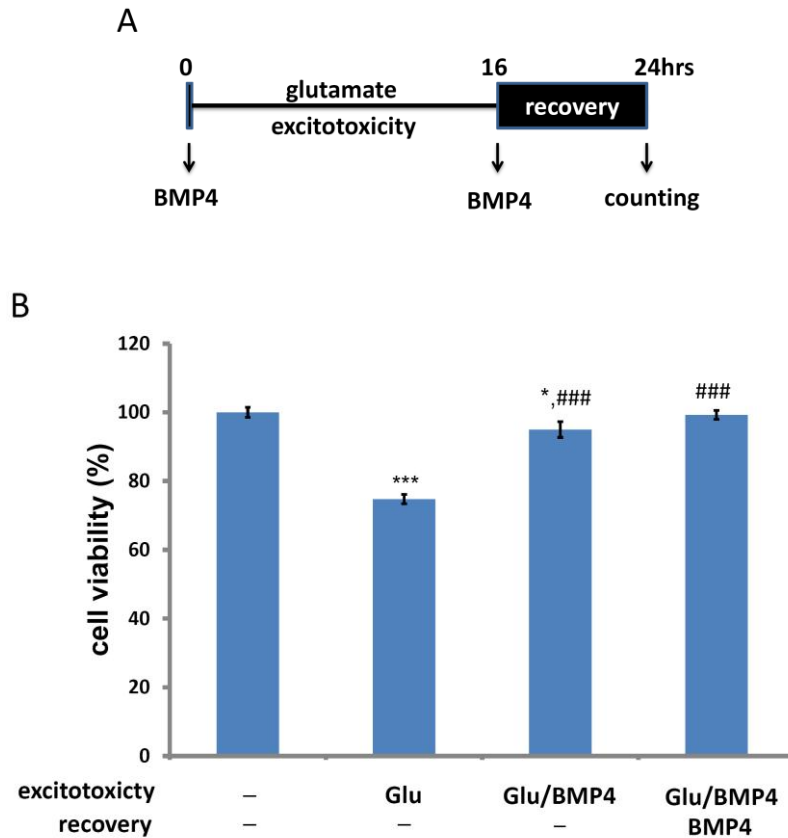


圖十、已分化 NG108-15 細胞經 Glutamate/glycine 及不同濃度之 BMP4 同時處理 16 小時的細胞存活表現。(A)圖示已分化四天之 NG108-15 細胞經 Glutamate/glycine (Glu/gly) 處理 16 小時後，以 Trypane blue 染色法計數細胞數目之步驟。(B) 分化後的 NG108-15 細胞，以 2 ng/ml、10 ng/ml 及 50 ng/ml 三種濃度之 BMP4 處理 16 小時後分析細胞存活率，與對照組無顯著差異。(C) 分化後的 NG108-15 細胞，經 Glutamate/glycine (Glu/gly) 與以 2 ng/ml、10 ng/ml 及 50 ng/ml 三種濃度之 BMP4 同時處理 16 小時後分析細胞存活率，相較於 DMEM 對照組，Glu/gly 處理之組別細胞存活率顯著下降。而相較於 Glu/gly 組，以不同濃度的 BMP4 與 Glu/gly 同時處理之組別細胞存活率皆顯著增加。而相較於 DMEM 對照組，在處理 Glu/gly 亦同時加入 2 ng/ml、10 ng/ml 及 50 ng/ml BMP4 的組別中，細胞存活率沒有顯著差異；n=3-4。實驗數值以 mean±SEM 表示，統計結果以 Student's t-test 統計方法計算；相較於 DMEM 對照組，\*\*\* 代表  $p < 0.001$ ；相較於 Glu/gly 組，# 代表  $p < 0.05$ ，### 代表  $p < 0.001$ 。





圖十一、已分化 NG108-15 細胞經 Glutamate/glycine 及 BMP4 (10ng/ml ) 同時處理 16 小時的細胞。(A) 已分化 NG108-15 細胞經 DMEM 處理 16 小時後之細胞圖。(B) 已分化 NG108-15 細胞經 Glutamate/glycine (Glu/gly) 處理 16 小時後之細胞圖，其細胞密度較圖 A 為低。(C) 已分化 NG108-15 細胞經 10 ng/ml BMP4 處理 16 小時後之細胞圖。(D) 已分化 NG108-15 細胞經 Glu/gly 及 10 ng/ml BMP4 同時處理 16 小時後之細胞圖，其細胞密度較圖 B 為高。



圖十二、BMP4 保護已分化 NG108-15 細胞對抗 Glutamate 誘導之興奮性毒殺作用。(A)圖示已分化四天之 NG108-15 細胞經 Glutamate/glycine (Glu/gly) 處理 16 小時，此 16 小時期間稱為興奮性毒殺時期 (excitotoxicity)，之後將培養液更換為 condition medium 處理 8 小時，此 8 小時期間為恢復 (recovery) 時期，加入 BMP4 處理的時間點分別為只在興奮性毒殺時期加入 BMP4 處理(n=5)，或是在興奮性毒殺時期以及恢復時期皆以 BMP4 處理(n=6)，最後以 Trypane blue 染色法計數細胞數目之步驟。(B)單獨在興奮性毒殺時期加入 BMP4 處理，與在興奮性毒殺時期以及恢復時期皆以 BMP4 處理皆能保護 NG108-15 神經細胞。實驗數值以 mean±SEM 表示，統計結果以 Student's t-test 統計方法計算；相較於對照組(n=11)，\* 代表  $p < 0.05$ ，\*\*\* 代表  $p < 0.001$ ；相較於 Glu/gly 組(n=11)，### 代表  $p < 0.001$ 。

## 第四章 討論

本論文研究的主旨在於探討神經肌肉系統中 BMP4 的生理功能，而神經肌肉系統中的細胞種類主要包括運動神經元、肌肉及許旺細胞等，運動神經元之軸突末端會與肌肉纖維形成 NMJ，許旺細胞則是包覆在神經元之軸突外圍形成髓鞘，其三者之間的關係相當密切。

由本實驗室初步的資料顯示 BMPRII 受體表現在 NMJ 處(附錄二)，而從本論文的免疫染色實驗觀察到 BMPRII 亦會表現在運動神經元及坐骨神經之軸突內(圖一)，BMP4 則是在許旺細胞(圖七)及肌肉上有表現，並且會表現在 NMJ 處(圖三)，顯示 BMP4 可能參與在運動神經元與周邊組織細胞之間的作用機制。過去已有文獻探討 BMP 與神經肌肉系統之間的關係，在以果蠅為模型的研究上已證實 BMPRII homolog 發生突變時會使果蠅致命，而將 BMPRII homolog 送進內生性 BMPRII homolog 突變果蠅之運動神經元中則可使果蠅生存，並且部分恢復 NMJ 中突觸 (synapse) 的型態及功能(Marques et al., 2002)，另外，在哺乳類動物的研究中發現當神經受到損傷時，運動神經元中的 BMP2 mRNA 表現量會增加(Wang et al., 2007b)。

過去曾有多篇研究利用 nerve ligation 實驗方法，觀察內生性蛋白質在軸突內的運輸情形，用以證明其蛋白質對神經元而言是否具有生理功能。在過去研究中來自許旺細胞及肌肉的 Glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) 已被證實為運動神經元的 neurotrophic factor 之一，而在 nerve ligation 實驗發現其會堆積在打結點近端處位置，顯示其在神經軸突內有順向運輸的現象(Russell et al., 2000)，亦有研究利用 nerve ligation 實驗方法觀察到 BMP6 會堆積在打結點遠端處的位置，顯示其在軸突內有逆向運輸的情形，且由許旺細胞產生的 BMP6 亦被證實能夠促進運動神經元的存活(Wang et al., 2007a)。另外，在 TGF-beta 2 的研究上發現，許旺細胞以及肌肉皆會表現 TGF-beta 2，而在 nerve ligation 實驗中觀察到 TGF-beta 2 在打結處的兩端皆有堆積的現象，顯示其在運動神經元

之軸突內具有雙向運輸的特性(Jiang et al., 2000b)，亦有研究指出在神經撕裂傷的老鼠身上每天給予 TGF-beta 2 處理，4 週後觀察發現 TGF-beta 2 能夠降低運動神經元死亡的數目(Jiang et al., 2000a)。而本論文中觀察到 BMP4 會堆積在打結處的兩端，其運輸方向有順向運輸及逆向運輸(圖八)，其運輸方向與先前研究發現的 TGF-beta 2 一致(Jiang et al., 2000b)，由這些結果顯示，BMP4 或許與 TGF-beta 2 具有相似生理功能。綜合上述，我們認為周邊肌肉組織及許旺細胞可能藉由多種因子影響運動神經元各種不同的生理功能。

Muscle-derived factor 對於運動神經元的發育及至成熟穩定非常的重要，曾有研究發現肌肉發育缺失的老鼠，其 90%的運動神經元會死亡(Oppenheim et al., 1993)，亦有文獻指出在大鼠的肌肉中移植進過度表現 neurotrophin-4 (NT-4) 的細胞後，會大量增加運動神經末梢的分支 (branching)數目，顯示由肌肉所分泌的 NT-4 可以調控運動神經元對肌肉的神經支配 (innervation) 程度，然而肌肉所產生的 NT-4 亦受到運動神經元之調控，當神經訊號傳導路徑受到抑制而導致肌肉無法去極化時，肌肉所產生的 NT-4 mRNA 表現量會下降 (Funakoshi et al., 1995)。從本論文之實驗中可觀察到，在正常情況下 BMP4 會表現在 NMJ，有趣的是，當神經摘除七天後，BMP4 的染色消失了(圖四)，也就是說由肌肉所分泌的 BMP4 受到運動神經元的調控。我們發現了 Agrin 會調控肌肉的 BMP4 mRNA 及 protein 的表現量，但是不會調控 BMP4 聚集在 NMJ 上，所以，我們推測除了 Agrin 之外，運動神經元可能會分泌其他的訊號因子，調控肌肉內部機制或是透過其他細胞(如許旺細胞)直接或間接地影響肌肉上 BMP4 的表現及位置，因此，未來可進一步確認調控 BMP4 聚集在 NMJ 處的訊號因子為何。另外，由 nerve ligation 實驗，我們發現逆向運輸之 BMP4 堆積在遠端處，且神經損傷後肌肉中的 BMP4 mRNA 表現量會增加(圖九)，提高了逆向運輸的 BMP4 是由肌肉產生的可能性，而近期研究觀察到 spinal cord injury 的動物模型中於背根神經節 (dorsal root ganglion, DRG) 加強 BMP4 訊息傳遞機制可以促進軸突再

生 (axon regeneration) (Parikh et al., 2011)，且在中樞神經系統損傷後發生去髓鞘化 (demyelination) 過程中，短時間內給予外源性 (exogenous) BMP4 處理可以在促進寡突膠前驅細胞 (oligodendrocyte progenitor cells, OPCs)、星狀膠神經細胞 (astrocyte) 以及為神經膠細胞 (microglial) 增生 (Sabo et al., 2011)，故本論文實驗中所觀察到由肌肉產生之 BMP4，可能會參與軸突修復 (repair) 過程。

過去的研究發現在 homozygous *erbB3* mutant 的胚胎中則因缺乏許旺細胞而導致 79% 運動神經元死亡 (Riethmacher et al., 1997)，顯示許旺細胞產生的神經滋養因子對於運動神經元的存活也很重要。由免疫染色實驗觀察到正常狀態下，BMPRII protein 會表現在神經軸突內(圖一)，BMP4 的 protein 則集中表現在坐骨神經之許旺細胞上(圖七)，且坐骨神經上能夠偵測到 BMP4 mRNA 表現(圖九)，顯示在正常狀態下，許旺細胞可能會產生 BMP4 並且參與許旺細胞與運動神經元之間的機制作用。在正常的情況下，許旺細胞會分泌多種 neurotrophic factor 以維持與運動神經元之間環境的穩定，曾有文獻指出，出生後的個體之許旺細胞才會表現 CNTF (Sendtner et al., 1992)，且外源性 (exogenous) CNTF 可以促進神經損傷後運動神經元的存活 (Sendtner et al., 1990)，然而在神經損傷後的坐骨神經上觀察到內生性 CNTF mRNA 表現量下降，而由本論文的 nerve ligation 實驗，我們觀察到坐骨神經之 BMP4 mRNA 表現量有下降的情形(圖九)，另外，由免疫染色實驗我們觀察到 nerve ligation 後的坐骨神經上 BMP4 則集中在神經軸突內(圖八)。根據上述內容，我們可以知道許旺細胞在正常的狀態下會產生 BMP4，故 BMP4 是一種 Schwann cell-derived factor，用以維持神經肌肉系統之環境的穩定，而當神經軸突受到損傷時，許旺細胞所產生的 BMP4 將會被運送進軸突內，參與許旺細胞及運動神經元之間的機制作用。

過去有研究指出，BMP4 與 CNTF 皆可保護視網膜神經細胞抵抗 NMDA 所



誘導的興奮性毒殺作用(Fischer et al., 2004)，而在許多研究上已證實興奮性毒殺作用與運動神經元疾病 ALS 有關，曾有文獻指出 glutamate 所誘導的興奮性毒殺作用會立刻改變細胞型態，緊接者在後期會造成細胞大量死亡(Choi, 1987)，由本論文之實驗發現，BMP4 可以保護 NG108-15 神經細胞對抗由 glutamate 引起的毒殺反應。過去曾有研究發現，在卵巢組織培養系統中，加入 BMP4 中和性抗體抑制掉卵巢內部 BMP4 訊息傳遞路徑，將會促進細胞凋亡反應，然而以 BMP4 處理卵巢組織後則可觀察到其 transforming growth factor-alpha ( $TGF\alpha$ ) mRNA 表現量下降，顯示 BMP4 為卵巢細胞的 survival factor，其可以透過調控 growth factor 而維持組織細胞的穩定(Nilsson and Skinner, 2003)，故 BMP4 也許可以藉由調控 NG108-15 神經細胞內部 growth factor 的表現而達到神經保護之效果。另外，曾有文獻指出 glutamate 誘導的興奮性毒殺作用會透過活化 MEK / ERK 訊息路徑促使細胞膜上 AMPA receptor 大量增加，細胞內環境更為興奮性後引起細胞死亡 (Zhu et al., 2002)，而過去的研究發現 BMP4 在胚胎幹細胞 (embryonic stem cells, ES cells) 內會藉由抑制 ERK/p38 MAPK 訊息路徑達到細胞自我更新 (self-renewal)，且 p38 MAPK 的抑制劑之功能與處理 BMP4 的效果相同(Qi et al., 2004)，另外，在大腦缺血性損傷 (cerebral ischemia) 的動物模型中則發現 p38 MAPK 的抑制劑會降低 glutamate 誘導之細胞死亡反應 (Barone et al., 2001)，所以，BMP4 也許會透過抑制 glutamate 所活化的訊息路徑以達到保護神經細胞的功能。因此，我們未來可進一步確認 BMP4 保護 NG108-15 神經細胞對抗興奮性毒殺反應的作用機制為何。

而在本論文中觀察到單獨在興奮性毒殺時期給予 BMP4 處理，或是在興奮性毒殺時期與恢復時期皆給予 BMP4 處理皆有神經保護的效果(圖十二)，所以，BMP4 也許可以應用在運動神經元疾病的治療上。然而本篇論文並未探討 BMP4 是否可以預防神經細胞不受興奮性毒殺的傷害，故未來可做進一步探討 BMP4 是否能夠預防運動神經元病變的發生。



## 第五章 結論

在本篇論文中以各種不同技術初步證實 BMP4 於神經肌肉系統中具有生理功能，在正常狀態下，許旺細胞與肌肉皆會產生 BMP4，而由肌肉產生的 BMP4 亦會表現在 NMJ 處，且其 mRNA 及 protein 之表現量皆會受到神經衍生性蛋白 Agrin 的調控。另外，由 nerve ligation 實驗中發現 BMP4 在神經軸突內有雙向運輸的現象，當神經受損時，周邊的肌肉組織及神經軸突上的許旺細胞之 BMP4 mRNA 表現量皆受到影響。

此外，我們亦觀察到 BMP4 能夠保護 NG108-15 神經細胞對抗 Glutamate 誘導的興奮性毒殺作用，且在興奮性毒殺時期以及恢復時期皆以 BMP4 處理對神經細胞的保護效果最好。由本論文之實驗結果推論：BMP4 是運動神經元的 peripheral-derived factor 之一，在神經肌肉系統中具有生理功能，而當神經受損時，其可能會參與調控運動神經元的存活，故 BMP4 未來也許可以應用在臨床醫療上，發展成治療運動神經元疾病的方法。

## 參考文獻

- Aberle H, Haghghi AP, Fetter RD, McCabe BD, Magalhaes TR, Goodman CS (2002) wishful thinking encodes a BMP type II receptor that regulates synaptic growth in *Drosophila*. *Neuron* 33:545-558.
- An MC, Lin W, Yang J, Dominguez B, Padgett D, Sugiura Y, Aryal P, Gould TW, Oppenheim RW, Hester ME, Kaspar BK, Ko CP, Lee KF (2010) Acetylcholine negatively regulates development of the neuromuscular junction through distinct cellular mechanisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107:10702-10707.
- Arkell R, Beddington RS (1997) BMP-7 influences pattern and growth of the developing hindbrain of mouse embryos. *Development* 124:1-12.
- Ball RW, Warren-Paquin M, Tsurudome K, Liao EH, Elazzouzi F, Cavanagh C, An BS, Wang TT, White JH, Haghghi AP (2010) Retrograde BMP signaling controls synaptic growth at the NMJ by regulating trio expression in motor neurons. *Neuron* 66:536-549.
- Barone FC, Irving EA, Ray AM, Lee JC, Kassis S, Kumar S, Badger AM, White RF, McVey MJ, Legos JJ, Erhardt JA, Nelson AH, Ohlstein EH, Hunter AJ, Ward K, Smith BR, Adams JL, Parsons AA (2001) SB 239063, a second-generation p38 mitogen-activated protein kinase inhibitor, reduces brain injury and neurological deficits in cerebral focal ischemia. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 296:312-321.
- Bensimon G, Lacomblez L, Meininger V (1994) A controlled trial of riluzole in amyotrophic lateral sclerosis. ALS/Riluzole Study Group. *The New England journal of medicine* 330:585-591.
- Beppu H, Minowa O, Miyazono K, Kawabata M (1997) cDNA cloning and genomic organization of the mouse BMP type II receptor. *Biochemical and biophysical research communications* 235:499-504.
- Borges LS, Yechikhov S, Lee YI, Rudell JB, Friese MB, Burden SJ, Ferns MJ (2008) Identification of a motif in the acetylcholine receptor beta subunit whose phosphorylation regulates rapsyn association and postsynaptic receptor localization. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 28:11468-11476.
- Bragdon B, Moseychuk O, Saldanha S, King D, Julian J, Nohe A (2011) Bone morphogenetic proteins: a critical review. *Cellular signalling* 23:609-620.
- Brandon EP, Lin W, D'Amour KA, Pizzo DP, Dominguez B, Sugiura Y, Thode S,

- Ko CP, Thal LJ, Gage FH, Lee KF (2003) Aberrant patterning of neuromuscular synapses in choline acetyltransferase-deficient mice. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 23:539-549.
- Caroscio JT, Mulvihill MN, Sterling R, Abrams B (1987) Amyotrophic lateral sclerosis. Its natural history. *Neurologic clinics* 5:1-8.
- Chen X, Weisberg E, Fridmacher V, Watanabe M, Naco G, Whitman M (1997) Smad4 and FAST-1 in the assembly of activin-responsive factor. *Nature* 389:85-89.
- Chiang C, Litingtung Y, Lee E, Young KE, Corden JL, Westphal H, Beachy PA (1996) Cyclopia and defective axial patterning in mice lacking Sonic hedgehog gene function. *Nature* 383:407-413.
- Choi DW (1987) Ionic dependence of glutamate neurotoxicity. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 7:369-379.
- Ericson J, Morton S, Kawakami A, Roelink H, Jessell TM (1996) Two critical periods of Sonic Hedgehog signaling required for the specification of motor neuron identity. *Cell* 87:661-673.
- Feng Z, Ko CP (2008) Schwann cells promote synaptogenesis at the neuromuscular junction via transforming growth factor-beta1. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 28:9599-9609.
- Ferayorni AJ, Gunville CF, Grow WA (2004) Nicotine decreases agrin signaling and acetylcholine receptor clustering in C2C12 myotube culture. *Journal of neurobiology* 60:51-60.
- Fischer AJ, Schmidt M, Omar G, Reh TA (2004) BMP4 and CNTF are neuroprotective and suppress damage-induced proliferation of Muller glia in the retina. *Molecular and cellular neurosciences* 27:531-542.
- Foletta VC, Lim MA, Soosairajah J, Kelly AP, Stanley EG, Shannon M, He W, Das S, Massague J, Bernard O (2003) Direct signaling by the BMP type II receptor via the cytoskeletal regulator LIMK1. *The Journal of cell biology* 162:1089-1098.
- Friedman B, Scherer SS, Rudge JS, Helgren M, Morrisey D, McClain J, Wang DY, Wiegand SJ, Furth ME, Lindsay RM, et al. (1992) Regulation of ciliary neurotrophic factor expression in myelin-related Schwann cells in vivo. *Neuron* 9:295-305.
- Fuller ML, DeChant AK, Rothstein B, Caprariello A, Wang R, Hall AK, Miller RH (2007) Bone morphogenetic proteins promote gliosis in demyelinating

- spinal cord lesions. *Annals of neurology* 62:288-300.
- Funakoshi H, Belluardo N, Arenas E, Yamamoto Y, Casabona A, Persson H, Ibanez CF (1995) Muscle-derived neurotrophin-4 as an activity-dependent trophic signal for adult motor neurons. *Science* 268:1495-1499.
- Gautam M, Noakes PG, Moscoso L, Rupp F, Scheller RH, Merlie JP, Sanes JR (1996) Defective neuromuscular synaptogenesis in agrin-deficient mutant mice. *Cell* 85:525-535.
- Gesemann M, Denzer AJ, Ruegg MA (1995) Acetylcholine receptor-aggregating activity of agrin isoforms and mapping of the active site. *The Journal of cell biology* 128:625-636.
- Glass DJ, DeChiara TM, Stitt TN, DiStefano PS, Valenzuela DM, Yancopoulos GD (1996a) The receptor tyrosine kinase MuSK is required for neuromuscular junction formation and is a functional receptor for agrin. *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology* 61:435-444.
- Glass DJ, Bowen DC, Stitt TN, Radziejewski C, Bruno J, Ryan TE, Gies DR, Shah S, Mattsson K, Burden SJ, DiStefano PS, Valenzuela DM, DeChiara TM, Yancopoulos GD (1996b) Agrin acts via a MuSK receptor complex. *Cell* 85:513-523.
- Gould TW, Enomoto H (2009) Neurotrophic modulation of motor neuron development. *The Neuroscientist : a review journal bringing neurobiology, neurology and psychiatry* 15:105-116.
- Guha U, Gomes WA, Samanta J, Gupta M, Rice FL, Kessler JA (2004) Target-derived BMP signaling limits sensory neuron number and the extent of peripheral innervation in vivo. *Development* 131:1175-1186.
- Hamburger V (1958) Regression versus peripheral control of differentiation in motor hypoplasia. *The American journal of anatomy* 102:365-409.
- Heath PR, Shaw PJ (2002) Update on the glutamatergic neurotransmitter system and the role of excitotoxicity in amyotrophic lateral sclerosis. *Muscle & nerve* 26:438-458.
- Ishii DN (1989) Relationship of insulin-like growth factor II gene expression in muscle to synaptogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 86:2898-2902.
- Jennings CG, Dyer SM, Burden SJ (1993) Muscle-specific trk-related receptor with a kringle domain defines a distinct class of receptor tyrosine kinases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90:2895-2899.
- Jessell TM (2000) Neuronal specification in the spinal cord: inductive signals

- and transcriptional codes. *Nature reviews Genetics* 1:20-29.
- Jiang Y, Zhang M, Koishi K, McLennan IS (2000a) TGF-beta 2 attenuates the injury-induced death of mature motoneurons. *Journal of neuroscience research* 62:809-813.
- Jiang Y, McLennan IS, Koishi K, Hendry IA (2000b) Transforming growth factor-beta 2 is anterogradely and retrogradely transported in motoneurons and up-regulated after nerve injury. *Neuroscience* 97:735-742.
- Kawabata M, Imamura T, Miyazono K (1998) Signal transduction by bone morphogenetic proteins. *Cytokine & growth factor reviews* 9:49-61.
- Kilpatrick TJ, Soilu-Hanninen M (1999) Molecular mechanisms regulating motor neuron development and degeneration. *Molecular neurobiology* 19:205-228.
- Kim N, Burden SJ (2008) MuSK controls where motor axons grow and form synapses. *Nature neuroscience* 11:19-27.
- Kim N, Stiegler AL, Cameron TO, Hallock PT, Gomez AM, Huang JH, Hubbard SR, Dustin ML, Burden SJ (2008) Lrp4 is a receptor for Agrin and forms a complex with MuSK. *Cell* 135:334-342.
- Kretschmar M, Massague J (1998) SMADs: mediators and regulators of TGF-beta signaling. *Current opinion in genetics & development* 8:103-111.
- Laake JH, Slyngstad TA, Haug FM, Ottersen OP (1995) Glutamine from glial cells is essential for the maintenance of the nerve terminal pool of glutamate: immunogold evidence from hippocampal slice cultures. *Journal of neurochemistry* 65:871-881.
- Labeur M, Paez-Pereda M, Haedo M, Arzt E, Stalla GK (2010) Pituitary tumors: cell type-specific roles for BMP-4. *Molecular and cellular endocrinology* 326:85-88.
- Lanser ME, Fallon JF (1987) Development of the brachial lateral motor column in the wingless mutant chick embryo: motoneuron survival under varying degrees of peripheral load. *The Journal of comparative neurology* 261:423-434.
- Liem KF, Jr., Tremml G, Jessell TM (1997) A role for the roof plate and its resident TGFbeta-related proteins in neuronal patterning in the dorsal spinal cord. *Cell* 91:127-138.
- Liem KF, Jr., Jessell TM, Briscoe J (2000) Regulation of the neural patterning activity of sonic hedgehog by secreted BMP inhibitors expressed by notochord and somites. *Development* 127:4855-4866.



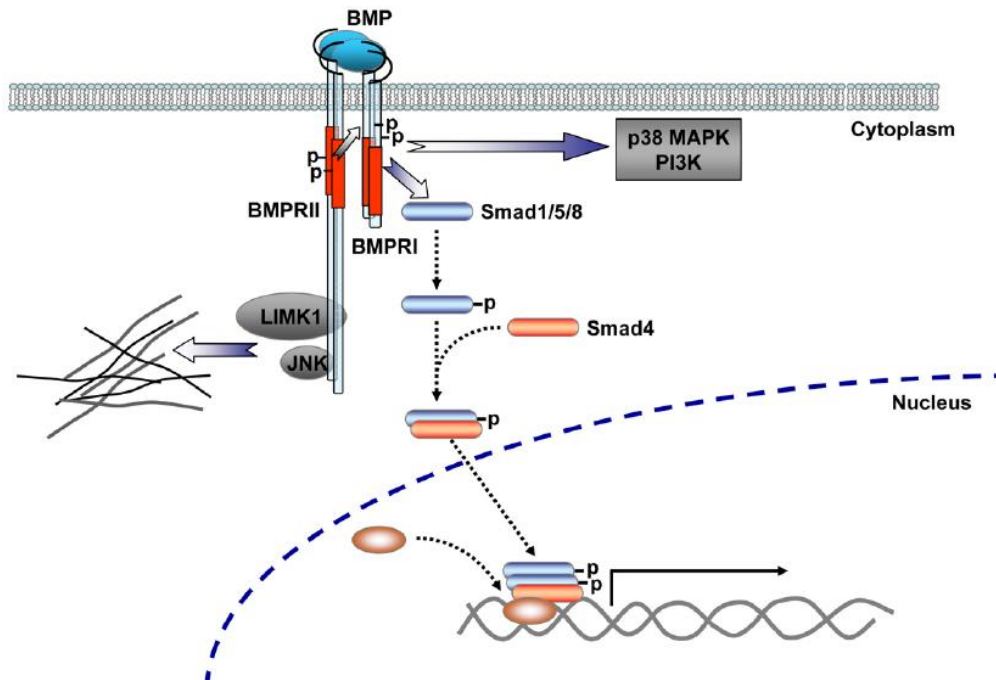
- Liem KF, Jr., Tremml G, Roelink H, Jessell TM (1995) Dorsal differentiation of neural plate cells induced by BMP-mediated signals from epidermal ectoderm. *Cell* 82:969-979.
- Lin W, Dominguez B, Yang J, Aryal P, Brandon EP, Gage FH, Lee KF (2005) Neurotransmitter acetylcholine negatively regulates neuromuscular synapse formation by a Cdk5-dependent mechanism. *Neuron* 46:569-579.
- Ling KK, Siow NL, Choi RC, Tsim KW (2005) ATP potentiates the formation of AChR aggregate in the co-culture of NG108-15 cells with C2C12 myotubes. *FEBS letters* 579:2469-2474.
- Macpherson PC, Wang X, Goldman D (2011) Myogenin regulates denervation-dependent muscle atrophy in mouse soleus muscle. *Journal of cellular biochemistry* 112:2149-2159.
- Marques G, Bao H, Haerry TE, Shimell MJ, Duchek P, Zhang B, O'Connor MB (2002) The *Drosophila* BMP type II receptor Wishful Thinking regulates neuromuscular synapse morphology and function. *Neuron* 33:529-543.
- Marti E, Bumcrot DA, Takada R, McMahon AP (1995) Requirement of 19K form of Sonic hedgehog for induction of distinct ventral cell types in CNS explants. *Nature* 375:322-325.
- McCabe BD, Marques G, Haghighi AP, Fetter RD, Crotty ML, Haerry TE, Goodman CS, O'Connor MB (2003) The BMP homolog Gbb provides a retrograde signal that regulates synaptic growth at the *Drosophila* neuromuscular junction. *Neuron* 39:241-254.
- Misgeld T, Burgess RW, Lewis RM, Cunningham JM, Lichtman JW, Sanes JR (2002) Roles of neurotransmitter in synapse formation: development of neuromuscular junctions lacking choline acetyltransferase. *Neuron* 36:635-648.
- Nilsson EE, Skinner MK (2003) Bone morphogenetic protein-4 acts as an ovarian follicle survival factor and promotes primordial follicle development. *Biology of reproduction* 69:1265-1272.
- Nitkin RM, Smith MA, Magill C, Fallon JR, Yao YM, Wallace BG, McMahan UJ (1987) Identification of agrin, a synaptic organizing protein from Torpedo electric organ. *The Journal of cell biology* 105:2471-2478.
- Nohe A, Keating E, Knaus P, Petersen NO (2004) Signal transduction of bone morphogenetic protein receptors. *Cellular signalling* 16:291-299.
- Okada K, Inoue A, Okada M, Murata Y, Kakuta S, Jigami T, Kubo S, Shiraishi H, Eguchi K, Motomura M, Akiyama T, Iwakura Y, Higuchi O, Yamanashi Y (2006) The muscle protein Dok-7 is essential for neuromuscular

- synaptogenesis. *Science* 312:1802-1805.
- Oppenheim RW, Prevette D, Haverkamp LJ, Houenou L, Yin QW, McManaman J (1993) Biological studies of a putative avian muscle-derived neurotrophic factor that prevents naturally occurring motoneuron death in vivo. *Journal of neurobiology* 24:1065-1079.
- Oppenheim RW, Wiese S, Prevette D, Armanini M, Wang S, Houenou LJ, Holtmann B, Gotz R, Pennica D, Sendtner M (2001) Cardiotrophin-1, a muscle-derived cytokine, is required for the survival of subpopulations of developing motoneurons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 21:1283-1291.
- Oza J, Yang J, Chen KY, Liu AY (2008) Changes in the regulation of heat shock gene expression in neuronal cell differentiation. *Cell stress & chaperones* 13:73-84.
- Parikh P, Hao Y, Hosseinkhani M, Patil SB, Huntley GW, Tessier-Lavigne M, Zou H (2011) Regeneration of axons in injured spinal cord by activation of bone morphogenetic protein/Smad1 signaling pathway in adult neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108:E99-107.
- Peng TI, Greenamyre JT (1998) Privileged access to mitochondria of calcium influx through N-methyl-D-aspartate receptors. *Molecular pharmacology* 53:974-980.
- Podkowa M, Zhao X, Chow CW, Coffey ET, Davis RJ, Attisano L (2010) Microtubule stabilization by bone morphogenetic protein receptor-mediated scaffolding of c-Jun N-terminal kinase promotes dendrite formation. *Molecular and cellular biology* 30:2241-2250.
- Qi X, Li TG, Hao J, Hu J, Wang J, Simmons H, Miura S, Mishina Y, Zhao GQ (2004) BMP4 supports self-renewal of embryonic stem cells by inhibiting mitogen-activated protein kinase pathways. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101:6027-6032.
- Reist NE, Werle MJ, McMahan UJ (1992) Agrin released by motor neurons induces the aggregation of acetylcholine receptors at neuromuscular junctions. *Neuron* 8:865-868.
- Riethmacher D, Sonnenberg-Riethmacher E, Brinkmann V, Yamaai T, Lewin GR, Birchmeier C (1997) Severe neuropathies in mice with targeted mutations in the ErbB3 receptor. *Nature* 389:725-730.
- Roelink H, Porter JA, Chiang C, Tanabe Y, Chang DT, Beachy PA, Jessell TM (1995) Floor plate and motor neuron induction by different

- concentrations of the amino-terminal cleavage product of sonic hedgehog autoproteolysis. *Cell* 81:445-455.
- Rothstein JD, Martin LJ, Kuncl RW (1992) Decreased glutamate transport by the brain and spinal cord in amyotrophic lateral sclerosis. *The New England journal of medicine* 326:1464-1468.
- Rothstein JD, Van Kammen M, Levey AI, Martin LJ, Kuncl RW (1995) Selective loss of glial glutamate transporter GLT-1 in amyotrophic lateral sclerosis. *Annals of neurology* 38:73-84.
- Rothstein JD, Tsai G, Kuncl RW, Clawson L, Cornblath DR, Drachman DB, Pestronk A, Stauch BL, Coyle JT (1990) Abnormal excitatory amino acid metabolism in amyotrophic lateral sclerosis. *Annals of neurology* 28:18-25.
- Ruegg MA, Bixby JL (1998) Agrin orchestrates synaptic differentiation at the vertebrate neuromuscular junction. *Trends in neurosciences* 21:22-27.
- Ruegg MA, Tsim KW, Horton SE, Kroger S, Escher G, Gensch EM, McMahan UJ (1992) The agrin gene codes for a family of basal lamina proteins that differ in function and distribution. *Neuron* 8:691-699.
- Ruggiu M, Herbst R, Kim N, Jevsek M, Fak JJ, Mann MA, Fischbach G, Burden SJ, Darnell RB (2009) Rescuing Z+ agrin splicing in Nova null mice restores synapse formation and unmasks a physiologic defect in motor neuron firing. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106:3513-3518.
- Russell FD, Koishi K, Jiang Y, McLennan IS (2000) Anterograde axonal transport of glial cell line-derived neurotrophic factor and its receptors in rat hypoglossal nerve. *Neuroscience* 97:575-580.
- Sabo JK, Aumann TD, Merlo D, Kilpatrick TJ, Cate HS (2011) Remyelination is altered by bone morphogenic protein signaling in demyelinated lesions. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 31:4504-4510.
- Salpeter MM, Cooper DL, Levitt-Gilmour T (1986) Degradation rates of acetylcholine receptors can be modified in the postjunctional plasma membrane of the vertebrate neuromuscular junction. *The Journal of cell biology* 103:1399-1403.
- Schelman WR, Andres RD, Sipe KJ, Kang E, Weyhenmeyer JA (2004a) Glutamate mediates cell death and increases the Bax to Bcl-2 ratio in a differentiated neuronal cell line. *Brain research Molecular brain research* 128:160-169.
- Schelman WR, Andres R, Ferguson P, Orr B, Kang E, Weyhenmeyer JA

- (2004b) Angiotensin II attenuates NMDA receptor-mediated neuronal cell death and prevents the associated reduction in Bcl-2 expression. *Brain research Molecular brain research* 128:20-29.
- Sendtner M, Kreutzberg GW, Thoenen H (1990) Ciliary neurotrophic factor prevents the degeneration of motor neurons after axotomy. *Nature* 345:440-441.
- Sendtner M, Stockli KA, Thoenen H (1992) Synthesis and localization of ciliary neurotrophic factor in the sciatic nerve of the adult rat after lesion and during regeneration. *The Journal of cell biology* 118:139-148.
- Shi Y, Massague J (2003) Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell* 113:685-700.
- Sieber C, Kopf J, Hiepen C, Knaus P (2009) Recent advances in BMP receptor signaling. *Cytokine & growth factor reviews* 20:343-355.
- Suzuki A, Nishimatsu S, Shoda A, Takebayashi K, Murakami K, Ueno N (1993) Biochemical properties of amphibian bone morphogenetic protein-4 expressed in CHO cells. *The Biochemical journal* 291 ( Pt 2):413-417.
- Tanaka K, Watase K, Manabe T, Yamada K, Watanabe M, Takahashi K, Iwama H, Nishikawa T, Ichihara N, Kikuchi T, Okuyama S, Kawashima N, Hori S, Takimoto M, Wada K (1997) Epilepsy and exacerbation of brain injury in mice lacking the glutamate transporter GLT-1. *Science* 276:1699-1702.
- Valenzuela DM, Stitt TN, DiStefano PS, Rojas E, Mattsson K, Compton DL, Nunez L, Park JS, Stark JL, Gies DR, et al. (1995) Receptor tyrosine kinase specific for the skeletal muscle lineage: expression in embryonic muscle, at the neuromuscular junction, and after injury. *Neuron* 15:573-584.
- Wang PY (2006) Novel survival factors with a gender specific twist for motor neurons: a thesis submitted for the degree of Doctor of Philosophy at the University of Otago, Dunedin, New Zealand: University of Otago.
- Wang PY, Koishi K, McLennan IS (2007a) BMP6 is axonally transported by motoneurons and supports their survival in vitro. *Molecular and cellular neurosciences* 34:653-661.
- Wang YL, Wang DZ, Nie X, Lei DL, Liu YP, Zhang YJ, Suwa F, Tamada Y, Fang YR, Jin Y (2007b) The role of bone morphogenetic protein-2 in vivo in regeneration of peripheral nerves. *The British journal of oral & maxillofacial surgery* 45:197-202.
- Weatherbee SD, Anderson KV, Niswander LA (2006) LDL-receptor-related protein 4 is crucial for formation of the neuromuscular junction.

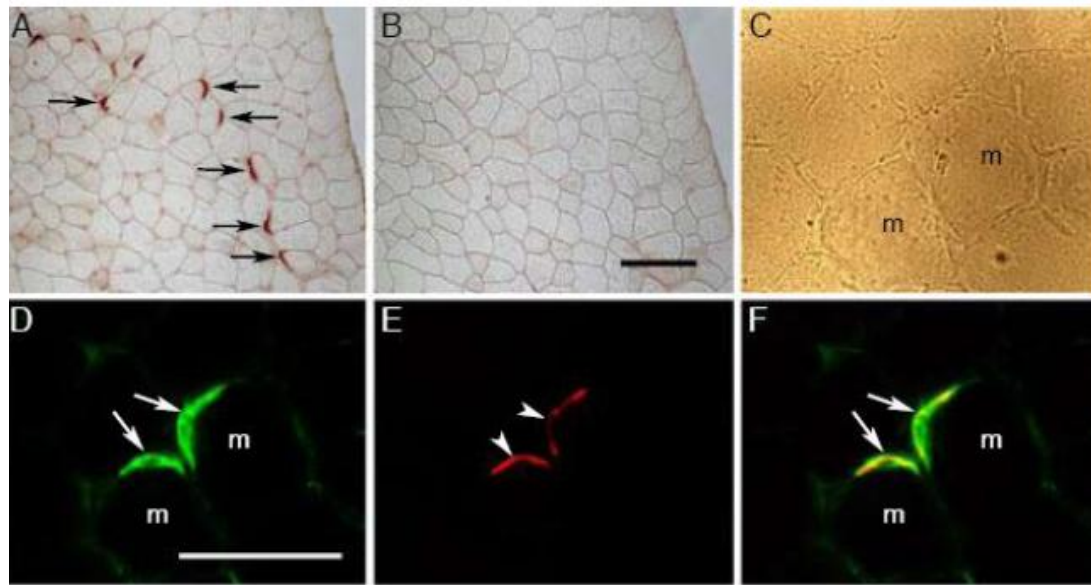
- Development 133:4993-5000.
- Weiss JH (2011) Ca permeable AMPA channels in diseases of the nervous system. *Frontiers in molecular neuroscience* 4:42.
- Whitlon DS, Grover M, Tristano J, Williams T, Coulson MT (2007) Culture conditions determine the prevalence of bipolar and monopolar neurons in cultures of dissociated spiral ganglion. *Neuroscience* 146:833-840.
- Wine-Lee L, Ahn KJ, Richardson RD, Mishina Y, Lyons KM, Crenshaw EB, 3rd (2004) Signaling through BMP type 1 receptors is required for development of interneuron cell types in the dorsal spinal cord. *Development* 131:5393-5403.
- Winnier G, Blessing M, Labosky PA, Hogan BL (1995) Bone morphogenetic protein-4 is required for mesoderm formation and patterning in the mouse. *Genes & development* 9:2105-2116.
- Wozney JM, Rosen V, Celeste AJ, Mitsock LM, Whitters MJ, Kriz RW, Hewick RM, Wang EA (1988) Novel regulators of bone formation: molecular clones and activities. *Science* 242:1528-1534.
- Wrana JL, Attisano L, Wieser R, Ventura F, Massague J (1994) Mechanism of activation of the TGF-beta receptor. *Nature* 370:341-347.
- Wu H, Xiong WC, Mei L (2010) To build a synapse: signaling pathways in neuromuscular junction assembly. *Development* 137:1017-1033.
- Zhang B, Luo S, Wang Q, Suzuki T, Xiong WC, Mei L (2008) LRP4 serves as a coreceptor of agrin. *Neuron* 60:285-297.
- Zhu JJ, Qin Y, Zhao M, Van Aelst L, Malinow R (2002) Ras and Rap control AMPA receptor trafficking during synaptic plasticity. *Cell* 110:443-455.



附錄一、BMPs 訊息傳遞路徑，詳細路徑請見內文，圖片截自(Henriquez et al., 2011)。







附錄二、BMPRII 表現在 NMJ 處。(A)為 EDL muscle 橫切圖，利用 BMPRII 抗體之專一性，最後以 AEC 呈色，觀察 BMPRII 在 EDL muscle 上的表現。箭頭所指為 BMPRII 聚集處，可觀察到 BMPRII 分布在肌肉束表面特定區域，呈半月形。(B)為 IgG 抗體之對照組。(C-F)為同一片肌肉組織切片，(C)以相位差顯微鏡觀察之肌肉組織，可見肌肉束之輪廓。(D)利用 BMPRII 抗體之專一性及接有綠色螢光之二抗標定 BMPRII 分布位置，箭頭所指綠光聚集處即為 BMPRII。(E)利用 rhodamine- $\alpha$ -bungarotoxin 標定乙醯膽鹼受體 (AChR)，代表 neuromuscular junction 區域，為紅色螢光如箭頭所示。(F)為圖 D 及圖 E 之疊合圖，如箭頭所指黃色區域，表示 BMPRII 表現在 NMJ 處。圖中 "m" 代表肌肉纖維。圖 A 及圖 B 之比例尺為 100  $\mu$ m，圖 D 至圖 F 之比例尺為 50  $\mu$ m。(Wang, 2006)