

行政院所屬各機關因公出國人員出國報告提要

出國報告名稱：神經組織訊息者核醣核酸雙重原位雜交技術和運用研究

頁數 含附件： 是 否

出國計畫主辦機關：國防大學國防醫學院

聯絡人：楊素足 電話：02-87923100 轉 18111

出國人員姓名：王順德 服務機關：國防醫學院

單位：生物及解剖學科 職稱：上校副教授 電話：02-87924955

出國類別： 1 考察 2 進修 3 研究 4 實習 5 其他

出國期間：89.08.01-90.01.31 出國地區：美國

報告日期：90.03.08

分類號/目：

關鍵詞：雙重原位雜交、神經組織損傷和修復、神經組織

內容摘要：

近年來神經生物學研究，雖然受惠於免疫組織化學技術的協助，學者專家能夠借助抗體來研究神經組織的發育、損傷和修復，藥物的影響，但是還有許多無法產生抗體的神經化學物質，必須透過其訊息者核醣核酸(mRNA)在各種處理狀況下的變化，經由原位雜交(*in situ* hybridization)技術探討其基因訊息是否在轉錄(transcription)或轉譯(translation)過程的變化。以往學者大多進行單一原位雜交，來研究神經組織的變化情形，最近美國衛生及社會福利部國家衛生院藥物濫用研究所，在 Barry J. Hoffer 教授帶領下發展出神經組織訊息者核醣核酸雙重原位雜交技術，可以研究同一神經組織或細胞兩種神經化學物質包括受體，在損傷修復期間和受藥物影響的消長變化。本次研究發現，在週邊神經組織的三叉神、nodose 和頸上神經節中血清胺受體第三 A 型(5HT_{3A})和第三 B 型(5HT_{3B})同時存在於神經節中，而中樞神經組織僅有血清胺受體第三 A 型存在於腦和脊髓中。並發現脊髓腹角中的運動神經細胞存有血清胺受體第三 A 型，相對著其含有 dynorphin 細胞並無血清胺受體第三 A 型存在。從本研究得知，血清胺調節週邊神經組織須經由血清胺受體第三 A 型和第三 B 型進行，但是中樞神經系統則僅需血清胺受體第三 A 型即可，這可能是血清胺扮演中樞和週邊神經組織損傷和修復的差異所在。

本文電子檔以上傳至出國報告資訊網 (<http://report.gsn.gov.tw>)

壹：目的

近百年來由於科技發展，帶動了生物醫學研究日新月異，尤其神經科學研究再美國政府於一九九〇年代發表(Decade of Brain)之後，在經費充分支持下近十年來的發展，累積的研究成果比過往百來更豐碩。從分子生物學、解剖學、行為科學，以至臨床研究都有傑出表現。然而受限於研究技術，神經科學仍有許多不為人知的領域有待研究。雖然受惠於免疫組織化學(immuohistochemistry)技術的協助，學者專家能夠借助抗體來研究神經組織的發育、損傷和修復，藥物的影響，但是還有許多無法產生抗體的神經化學物質，必須透過其訊息者核糖核酸(mRNA)在各種處理狀況下的變化，經由原位雜交(*in situ* hybridization)技術探討其基因訊息是否在轉錄(transcription)或轉譯(translation)過程的變化。以往學者大多進行單一原位雜交，來研究神經組織的變化情形，最近美國衛生及社會福利部國家衛生院藥物濫用研究所，在 Barry J. Hoffer 教授帶領下發展出神經組織訊息者核糖核酸雙重原位雜交技術，可以研究同一神經組織或細胞兩種神經化學物質包括受體，在損傷修復期間和受藥物影響的消長變化。此次短期進修目的在於研究「神經組織訊息者核糖核酸雙重原位雜交技術」，祈能運用於進行的慢性安非他命濫用研究及脊髓損傷和神經組織移植研究，有關神經傳遞物質其基因訊息是否在轉錄(transcription)或轉譯(translation)過程的變化。

貳：過程

^職奉國防部(八九)易旭字第一六九六八號令准赴美國馬里蘭州巴爾第摩市，美國衛生及社會福利部國家衛生院藥物濫用研究所(National Institute on Drug Abuse, National Institute of Health, Department of Health and Human Services, USA)短期進修「神經組

織訊息者核醣核酸雙重原位雜交技術和運用研究」(The study and application of double *in situ* hybridization technique of mRNA on neuronal tissue)半年，進修期限自民國八十九年八月一日至九十年一月三十一日止。並奉中華民國駐美軍事代表團（八九）奮央字第一二五 號令核准赴華盛頓特區喬治城大學神經科學中心 (Neuroscience Center, Georgetown University, Washington, DC.)畢業學術參訪七天自民國九十年一月三十一日至二月六日止。於民國九十年二月七日從美國巴爾第摩華盛頓國際機場(BWI)，搭乘聯合航空公司 223 次班機經舊金山轉乘聯合航空公司 845 次班機，在民國九十年二月八日晚間返抵台北，並於隔天（二月九日）回原服務單位國防大學國防醫學院生物及解剖學科完成返國報到手續。謹將出國進修之學習過程簡述如后。

本人於民國八十九年八月一日抵達美國馬里蘭州巴爾第摩市，美國衛生及社會福利部國家衛生院藥物濫用研就所(National Institute on Drug Abuse, National Institute of Health, Department of Health and Human Services, USA)，於隔日完成報到及各項手續後，在所長 Barry J. Hoffer 教授安排在其研究群中，由專門研究雙重原位雜交技術的 Marisela Morales 博士研究室進行為期六個月的神經組織訊息者核醣核酸雙重原位雜交技術和運用研究。

一、研究方法及步驟

（一）實驗動物

雄性八週大年輕 Sprague-Dawley 大白鼠（購自 Charles River Lab. USA），體重為 200 至 250 公克，給與適當光照與溫度，充份給與鼠料及飲水(國家衛生院藥物濫用研就所動物中心代養)。

（二）神經組織標本製作

動物經深度麻醉後，由心臟灌流 50 至 100 毫升 DEPC 含 0.9% NaCl/ 0.2% sodium nitrate 後，接入含 4% paraformaldehyde in DEPC 0.1 M Phosphate buffer (pH 7.4) 500 ml 固定液後，將腦、腦幹和脊髓取出後置於原固定液後固定二小時後，轉入含 18% 蔗糖 DEPC 固定液中過夜後，再行更換

於 18% 蔗糖固定液中，進行冷凍切片，每片 20 微米並置於 4% paraformaldehyde in DEPC 0.1 M Phosphate buffer 中。除了取出中樞神經組織外，並將兩側背根神經節、三叉神經節、頸上神經節、nodose 神經節、腹腔神經節、上腸繫膜神經節，和下腸繫膜神經節取出置於攝氏負八十度冷凍冰箱內備用。將以上收集的腦和脊髓組織至置於防凍溶液瓶中，保存於攝氏負八十度冷凍冰箱內備用。

(三) 雙重原位雜交(double *in situ* hybridizations)

1、Oligonucleotide 探子及 DIG-11-ddUTP 製備

酪胺酸羥化酵素為合成多巴胺的限制酵素，因此以偵測酪胺酸羥化酵素作為多巴胺的指標。偵測酪胺酸羥化酵素、SP 和 enkephalin mRNA 的探子是分別由不同的同序列 48 個核苷酸所組成(Young *et al.*, 1986)。得到由廠商合成的探子後，以 1 毫升 DEPC-treated 水稀釋，以 100 微升分裝後，儲存於 - 20 冰箱中備用。

將 oligonucleotide 溶解液和 3'-end labeling kit (Boehringer, UK) 於冰上解凍後，將 buffer、25Mm CoCl₂，unlabeled oligonucleotide，1 Mm-11-ddUTP 混合於消毒過的為亮離心管中，再以 DEPC-treated 水將體積加到 20 微升，接著於 37 水浴中反應 15 分鐘後，加入 2 微升含 0.2M EDTA 和 glycogen 的溶液以終止反應。再加入 2.5 微升 4M LiCl 和 75 微升預冷的 100% 酒精，混合均勻後置入 - 80 冰箱內 30 分鐘。接著以 13000rpm 的轉速於 4 的冷房內離心 15 分鐘。離心後用微量吸管吸去上層懸浮液後，再加入 50 微升 70% 酒精，於 4 的冷房內以 13000rpm 的轉速離心 5 分鐘，以微量吸管吸去懸浮液後，再以快速，真空抽乾殘留的酒精，最後加入 20 微升 DEPC-treated H₂O 稀釋，儲存於 - 20 冰櫃內備用。

2、第三型血清胺受體 ribonucleotide 探子製備

血清胺受體第三 A 型(5HT_{3A}) sense 和 antisense ribonucleotide 探子源自大白鼠血清胺受體第三 A 型(5HT_{3A}) 次級單位 nucleotides 1500-2230，血清胺受體第三 B 型(5HT_{3B})

為源自大白鼠血清胺受體第三 B 型(5HT_{3B}) 次級單位 nucleotides 335-1346.其製備方法依標準步驟和西元 1997 年 Morales 和 Bloom 發表文章進行(Morales, Bloom, 1997)。

3、雙重標識原位雜交步驟

(1)取出保存於攝氏負八十度冷凍冰箱中事先切好的神經組織標本，待回溫後將標本放入裝有濾網經 DEPC 處理後的小皿內，以磷酸緩衝液清洗兩次，每次五鐘。經含有 0.5% Triton X-100 磷酸緩衝液處理 10 分鐘，以磷酸緩衝液清洗兩次，每次五鐘。神經組織在室溫下以 0.2 N HCl 處理 15 分鐘，以磷酸緩衝液清洗兩次，每次五鐘。經 0.25% acetic anhydride (in 0.1 M TEA pH 8.0)乙醯化 15 分鐘，以磷酸緩衝液清洗兩次，每次五鐘。經 4% paraformaldehyde 後固定 10 鐘，以磷酸緩衝液清洗兩次，每次五鐘。將神經組織標本置入 2 毫升 50 預熱的 Oligonucleotide (hybridization buffer, 50% formamide; 10% dextran sulfate; 5X Denhardt's solution; 0.62 M NaCl; 50 mM DTT; 10 mM EDTA; 20 mM PIPES, pH 6.8; 0.2% SDS; 250 µg/ml ssDNA; 250 µg/ml tRNA)在 55 下培養三小時。將含有 10⁷ cpm/ml [³⁵S] 和 [³³P]單股 5HT_{3A} 或 5HT_{3B} riboprobe 及所欲標識的 10 至 20 微升 Oligonucleotide-DIG 加入 hybridization buffer 中 55 下培養 16 小時。在室溫下，以 2XSSC 泡製 10 Mm β-mercaptoethanol 作用三十分鐘；在 37 下以 Rnase 處理 60 分鐘。以 0.5XSSC 泡製 10 Mm β-mercaptoethanol 和 0.5% Sakosyl 在 55 下作用二小時後，以 0.1XSSC 泡製 10 Mm β-mercaptoethanol 和 0.5% Sakosyl 在 60 下作用一小時。以 Tris 鹽緩衝液(TBS, pH 9.5)清洗 6 次，每次 10 鐘。

(2) Oligonucleotides-DIG 探子組織化學反應：為掩蓋非專一性組織化學反應，首先將清洗過後的標本宜入新的濾網小皿內，以 2% BSA 含 0.3% TritonX-100 及 2 Mm NaN₃ 作用一小時。加入 1:3000 的 alkaline phosphatase sheep anti-Dig antibody (Boehringer, UK)在 4 冷藏櫃中培養 16 小時以上。以 Tris 鹽緩衝液(TBS, pH 9.5)清洗 3 次，每次 10 鐘。呈色反應時，將每 10

毫升 Tris 鹽緩衝液(TBS, pH 9.5)溶入 2.4 毫克 levamisole 完全混合後，加入 44 微升 NBT 和 33 微升 BCIP (Boehringer, UK)，將標本盒以錫箔紙包裹避光反應 3 至 6 小時，視反應情況而以磷酸緩衝液清洗兩次以終止反應，每次五鐘。將標本平鋪於載玻片上，待玻片乾燥後 X 光片後安放於 X 光盒內固定後在暗房內裝入柯達高感度 X 光片(BMX, Kodak, USA)，套入暗袋內置於陰暗處 3 至 5 天後，以柯達 D-19 沖片 5 分鐘，經終止並在固定液內 5 分鐘後，取出 X 光片於清水中沖洗 20 至 30 分鐘後晾乾，以看片盒檢查放射專一標識效果。或將乾燥後玻片置於 phosphor 影像趕光片上隔夜後，以富士 BA5000(Fuji, Japan)讀取影像。尤以上兩項初步判斷為專一探子標識後，經系列酒精脫水乾燥後，在暗房內進行顯影劑沾塗步驟，待乾燥後裝入致有乾燥劑片盒內，以黑色塑膠電布封緊後，裝入暗袋並置於冷藏冰櫃內 4 至 6 週後進行沖片固定，經沖水一小時後，玻片經系列酒精脫水透明後，以 Permout 封片置於煙廚內，待乾燥後以顯微鏡觀察並以 Neurolucida and Stereo Investigator Systems for 3D Microscopy 分別觀察分析。

二、研究結果和討論

(一) 血清胺受體第三 A 型(5HT_{3A})和第三 B 型(5HT_{3B})在神經節的分佈

以 Nikon E-800 型顯微鏡接上 Stereo Investigator Systems 後，在四倍物鏡下描繪神經節外觀後，將電腦記憶軟體和顯微物鏡同時調整為四十倍後，以不同符號分別標明血清胺受體第三 A 型有神經核、血清胺受體第三 A 型無神經核、非血清胺受體第三 A 型有神經核，和血清胺受體第三 A 型無神經核；血清胺受體第三 B 型有神經核、血清胺受體第三 B 型無神經核、非血清胺受體第三 B 型有神經核，和血清胺受體第三 B 型無神經核。將以上量測所得數據轉入微軟 Excel 套裝軟體經整理後，輸入 stat-3 統計套裝軟體統計分析數據。分別統計分析比較三叉神經節、nodose 神經節和頸上神經節中含血清胺受體第三 A 型有神經核，和含血清胺受體第三 B 型有神經核細

胞的大小比較（平均值 \pm 標準差）；以及比較同一神經節含血清胺受體第三 A 型，和血清胺受體第三 B 型神經細胞的百分比。

（1）三叉神經節：在四片不同神經節所得 916 個含血清胺受體第三 B 型有神經核其平均直徑為 25.41 ± 5.90 微米；而所得 477 個含血清胺受體第三 B 型有神經核其平均直徑為 26.77 ± 6.75 微米，兩者大小在統計學上無明顯差異[見附表一]。再者，有關三叉神經節其含血清胺受體第三 A 型，和血清胺受體第三 B 型神經細胞的百分比分別為 $45.73 \pm 6.56\%$ (712/1557)和 $29.95 \pm 3.69\%$ (446/1489)，在統計學上發現含血清胺受體第三 A 型比含血清胺受體第三 B 型神經細胞多($p < 0.05$) [見附表二]。

（2）Nodose 神經節：在五片不同神經節所得 460 個含血清胺受體第三 B 型有神經核其平均直徑為 26.28 ± 5.61 微米；而所得 477 個含血清胺受體第三 B 型有神經核其平均直徑為 27.71 ± 5.10 微米，兩者大小在統計學上無明顯差異[見附表一]。再者，有關三叉神經節其含血清胺受體第三 A 型，和血清胺受體第三 B 型神經細胞的百分比分別為 $88.64 \pm 1.99\%$ (1272/1435)和 $51.11 \pm 2.41\%$ (922/1804)，在統計學上發現含血清胺受體第三 A 型比含血清胺受體第三 B 型神經細胞多($p < 0.05$) [見附表二]。

（3）頸上神經節：在五片不同神經節所得 1193 個含血清胺受體第三 B 型有神經核其平均直徑為 25.86 ± 5.03 微米；而所得 720 個含血清胺受體第三 B 型有神經核其平均直徑為 28.34 ± 5.43 微米，兩者大小在統計學上無明顯差異[見附表一]。再者，有關頸上神經節其含血清胺受體第三 A 型，和血清胺受體第三 B 型神經細胞的百分比分別為 $45.71 \pm 3.72\%$ (895/1957)和 $35.97 \pm 3.89\%$ (9182/2551)，在統計學上發現含血清胺受體第三 A 型比含血清胺受體第三 B 型神經細胞並無明險差藝多($p > 0.05$) [見附表二]。

（二）血清胺受體第三 A 型(5HT_{3A})和第三 B 型(5HT_{3B})在中樞神經組織的分佈

以 Nikon E-800 型顯微鏡接上 Stereo Investigator Systems

後，在一倍物鏡下描繪腦和脊髓外觀後，將電腦記憶軟體和顯微物鏡同時調整為四十倍後，分別在螢光明視野及暗視野下觀察、記錄血清胺受體第三 A 型(5HT_{3A})和第三 B 型(5HT_{3B})在中樞神經組織的分佈狀況。中樞神經組織無論腦或脊髓，經放大倍數檢查僅含有血清胺受體第三 A 型(5HT_{3A})，並無含有第三 B 型(5HT_{3B})。

(三) 血清胺受體第三 A 型(5HT_{3A})和乙醯膽鹼在脊髓神經組織雙重原位雜交的分佈

以 Nikon E-800 型顯微鏡接上 Stereo Investigator Systems 後，在一倍物鏡下描繪脊髓外觀後，將電腦記憶軟體和顯微物鏡同時調整為四十倍後，分別在螢光明視野及暗視野下觀察、記錄血清胺受體第三 A 型(5HT_{3A})和乙醯膽鹼在脊髓神經組織雙重原位雜交的分佈狀況。研究結果發現，在動物脊髓腹角大型含有乙醯膽鹼的運動神經細胞上，併存有血清胺受體第三 A 型(5HT_{3A})，這顯示出脊髓腹角運動神經細胞存有血清胺受體能接受血清胺的工能調節，這證實近年來研究發現血清胺能促進受傷脊髓的恢復部份運動功能的結果。

(四) 血清胺受體第三 A 型(5HT_{3A})和 P 物質在脊髓神經組織雙重原位雜交的分佈

以 Nikon E-800 型顯微鏡接上 Stereo Investigator Systems 後，在一倍物鏡下描繪脊髓外觀後，將電腦記憶軟體和顯微物鏡同時調整為四十倍後，分別在螢光明視野及暗視野下觀察、記錄血清胺受體第三 A 型(5HT_{3A})和 P 物質在脊髓神經組織雙重原位雜交的分佈狀況。研究結果發現，在脊髓背角的第一和第二板層上含有 P 物質的神經細胞上，含有血清胺受體第三 A 型(5HT_{3A})，這顯示出血清胺在脊髓也扮演著調節傳導疼痛的功能。

(五) 血清胺受體第三 A 型(5HT_{3A})和 dynorphin 在脊髓神經組織雙重原位雜交的分佈

以 Nikon E-800 型顯微鏡接上 Stereo Investigator Systems 後，在一倍物鏡下描繪脊髓外觀後，將電腦記憶軟體和顯微物鏡同時調整為四十倍後，分別在螢光明視野及暗視野下觀察、記錄血清胺受體第三 A 型(5HT_{3A}) 和 dynorphin 在脊髓神經組織雙重原位雜交的分佈狀況。研究結果發現，存在於第三板層的含 dynorphin 神經細胞上並未發現有血清胺受體第三 A 型(5HT_{3A})，這表示 dynorphin 神經細胞上無血清胺受體，此處 dynorphin 神經細胞不受血清胺功能調節。

三、參考文獻

1. Barbara AB, Josepn MP and Julie RP: Stimulant-induced alterations in dopaminergic and serotonergic function in fetal raphe neurons. *Brain Res. Bull.* 31: 471-476, 1993.
2. Braestrup C: Biochemical differentiation of amphetamine vs methylphenidate and nomifensine in rats. *J. Pharm. Pharmac.* 29: 463-470, 1977.
3. Bunney BS, Walters JR and Aghajanian GK: D-and L-amphetamine stereoisomers : Comparative potencies in affecting firing of central dopaminergic and noradrenergic neurons. *Psychopharmacol. Commun.* 1975, 1:177.
4. Cadet JL, Ordonez SV and Ordonez JV: Metamphetamine induce apoptosis in immortalized neural cells: protection by the proto-oncogene, bcl-2. *Synapse.* 25: 176-184, 1997.
5. Cho AK, Wight J and Minireview: Pathways of metabolism of amphetamine and related compounds. *Life Sci.* 22: 363-372, 1978.
6. Cho AK, Wight J and Minireview: Pathways of metabolism of amphetamine and related compounds. *Life Sci.* pp349-350, 763-764, 1978.
7. Edeleano L: Uber einige derivate der phenylmethacrylsaure und der phenylisobutter saure. *Berl. Dtsch. Chem. Ges.* 20: 616-622, 1887.

8. Espelin DE and Done AK: Amphetamine poisoning. *The New England J. Medicine.* 278 (25): 1361-1365, 1968.
9. Fukunaga T, Mizol Y and Adachi J: Methamphetamine-induced changes of peripheral catecholamines: an animal experiment to elucidate the cause of sudden death after methamphetamine abuse. *Jpn. J. Legal Med.* 41 (4a): 328-334, 1987.
10. Hu BR, Liu CL, Quyang YB, Blomgren K and Siesjo BK: Involvement of caspase-3 in cell death after hypoxia-ischemia declines during brain maturation. *J Cereb Blood Flow Metab.* 20:1294-1300, 2000.
11. Huang NK, Wan FJ, Tseng CJ and Tung CS: Amphetamine induces hydroxyl radical formation in the striatum of rats. *Life Sci.* 61: 2219-2229, 1997.
12. Itzhak Y and Ali SF: The neuronal nitric oxide synthase inhibitor, 7-nitroindazole, protects against methamphetamine-induced neurotoxicity in vivo. *J. Neurochem.* 67: 1770-1773, 1996.
13. Karch SB: *The pathology of drug abuse*, CRC press in the United States. 1993, pp166-218.
14. King GR and Ellinwood EH: Amphetamine and other stimulants. *A comprehensive Textbook*, 1992.
15. LaVoie MJ and Hastings TG: Peroxynitrite- and nitrite-induced oxidation of dopamine: implications for nitric oxide in dopaminergic cell loss. *J. Neuro.* 73(6): 2546-2554, 1999.
16. Mattson MP and Duan W: "Apoptotic" biochemical cascades in synaptic compartment: Role in adaptive plasticity and neurodegenerative disorders. *J Neurosci Res.* 58: 152-166, 1999.
17. Ono H and Fukuda H: Effect of methamphetamine on rat spinal cord.
18. Ricaurte GA, Guillery RW, Seiden LS, Schuster CR and Moore RY: Dopamine nerve terminal degeneration produced by high doses of methylamphetamine in the rat brain. *Brain Res.* 235: 93-103, 1982.

19. Seiden LS, Sabol KE and Ricuarte GA: Amphetamine: effects on catecholamine systems and behavior. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 32: 639-677, 1993.
20. Steven J, o'Dell, Fredric B, Weihmuller and Marshall JF: Multiple methamphetamine injections induce marked increases in extracellular strial dopamine which correlate with subsequent neurotoxicity. *Brain Res.* 564: 256-260, 1991.
21. Stumm G, Schlegel J, Schafer T, Wurz C, Mennel HD, Krieg JC and Vedder H: Amphetamine induce apoptosis and regulation of bcl-x splice variants in neocortical neurons. *FASEB J.* 13: 1065-1072, 1999.
22. Tateyama M, Ohta S, Nagao, Hirobe M and Ono H: Effect of 4-phenyl-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline on ambulation induced by injection of methamphetamine into the nucleus accumbens in rats. *Neuropharm.* 32: 243-248, 1993.
23. Westerink BHC: The effects of frugs on dopamine biosynthesis and methabolism in the brain. In: Horn A.S., Korf J., Westerink BHC. (eds). *The Neurobiology of Dopamime.* Academic London; pp224-291, 1979.
24. 法務部統計處：法務統計摘要，1999。
25. 徐人英：藥效藥劑學與臨床藥品動態學，合記圖書出版社，1982。
26. 蕭開平：1996年台灣高等法院檢察署法醫中心甲基安非他命與鴉片類藥物相關致死案例分析，麻醉藥品簡訊，1996。

參：心得

本次短期進修研究，由於事先提早安排聯絡，加上美國家衛生院藥物濫用研究所所長 Barry J. Hoffer 教授熱心安排在其所領導實驗室進行研究，不管在儀器設備均能充份配合使用，並支援大部份研究經費，得使研究順利達到預期目標。再者發現目前生

物醫學的研究，均為跨領域、跨學門的共同合作研究，從基礎醫學的生物、物理、化學、解剖、免疫病理、生理藥理、生化、統計，電腦科技應用；並結合臨床研究。例如此次進修單位美國國家衛生院藥物濫用研究所，其本身為美國國家衛生院院外的獨立研究所，包括基礎研究和臨床研究兩大部門，其中基礎研究主要分為：行為神經科學、細胞神經生物學、分子神經生物學、毒物學等系所，再細分組和獨立研究室。各系所有其獨立研究經費，但共同使用重要儀器設備，而且各系組間密切合作進行共同研究計劃。這在研究經費充裕的美國家衛生院尚進行這種跨學門領域的研究，而且與附近著名的約翰霍普金斯及馬里蘭大學學術交流人員交換進行合作研究，值得國內各研究單位參考。

本人於進修期限後，受經費補助前往美國華盛頓特區喬治城大學(Georgetown University)神經科學中心參訪有關脊髓損傷和修復的相關研究。喬治城大學神經科學中心脊髓損傷和修復的研究是由 Bregman 教授所領導主持，目前 Bregman 教授研究發現脊髓白質中的抑制性蛋白可能是造成長的神經纖維無法再生的主因。從本人的參訪中發現美國的私立大學中雖然獲政府的補助不多，但經尤募款、其他跨（國）院校合作結合產業界，可以發揮相當的功能。

肆：建議

一、 檢討現行短期進修生活補助和醫療保險經費

目前國防部軍醫局民診基金補助赴美短期進修每人每月生活費為美金九百元，六個月的醫療保險費為美金二百五十元，這樣的生活補助費對於短期進修人員顯然嚴重不足，因為在為期半年的期間必須以短期租屋方式付出高於平常房租，建議恢復行政院主計處原頒訂短期進修受訓的給付標準；再者固定醫療保險費為美金二百五十元必須重新檢討，因為受訓各單位有其規定的最低保險標準，建議醫療保險費以實報實銷，核發給進修人員。

二、加強國際學術研究合作計劃

現今的生物醫學研究，不論是基礎醫學或臨床研究，雖然國內近年來培養為數不少的研究人員，但所須的消耗品和貴重儀器經費相當驚人。尤其是先進的研究設備在國內相關法令規定下，要花相當多的時間才能採購使用，因此建議在國科會主導，及並鼓勵相關研究單位及學校爭取與國外個著名公、私立大學或研究單位簽訂合作研究計劃，國內派遣必要研究人員到合作單位進行短期特定計畫研究，故同執行法表研究結果，以達國際學術研究水準。

三、嚴格執行追蹤考核和預算分配

由於長年來國內研究經費的分配過度實施平頭式，教科研預算因而分散，加上對於經費執行結果追蹤考核鬆散，導致成效不彰層出不窮。建議往後訂定追蹤考核標準，定期（二至四年間）由公正人員執行公平、公開考核評鑑，並以評鑑結果作為經費預算核發的依據，以此激勵國人研究發展的潛力和決心，共同爭取中華民國生物醫學研究達到國際水準。

表一、三叉、nodose 和頸上神經節中表現有血清胺受體第三 A 型(5HT_{3A})和第三 B 型(5HT_{3B})訊息者核糖核酸次單位的神經細胞直徑 (平均值±標準差 ; n 為神經細胞數 , 從五至六神經節中四至六切片統計)。

神經節	血清胺受體第三 A 型(5HT _{3A})	血清胺受體第三 B 型 (5HT _{3B})
三 叉	25.41 ± 5.90 微米 (n= 916)	26.77 ± 6.75 微米 (n=477)
Nodose	26.28 ± 5.61 微米 (n=460)	27.71 ± 5.10 微米 (n=477)
頸 上	25.86 ± 5.03 微米 (n=1193)	28.34 ± 5.43 微米 (n=720)

表二、三叉、nodose 和頸上神經節中表現有血清胺受體第三 A 型(5HT_{3A})和第三 B 型(5HT_{3B})訊息者核糖核酸次單位的神經細胞百分比 (平均值±標準誤 ; n 為神經細胞數 , 從五至六神經節中四至六切片統計)。

神經節	血清胺受體第三 A 型(5HT _{3A})	血清胺受體第三 B 型 (5HT _{3B})
三 叉	45.73 ± 6.56% (n=712/1557)	29.95 ± 3.69% (n=146/1489)
Nodose	88.64± 1.99% (n=1722/1435)	51.11 ± 2.41% (n=922/1804)
頸 上	45.71 ± 3.72% (n=895/1957)	35.97 ± 3.89% (n=918/2551)