

計畫編號：DOH88-TD-1116

行政院衛生署八十八年度科技研究發展計畫

安非他命成癮及毒性作用之探討

年度計畫執行報告

執行機構：國防醫學院

計畫主持人：萬芳榮

執行期間：87年7月1日至88年6月30日

(壹) 中文摘要：

關鍵字：神經毒性、紋狀體、氧化壓力

安非他命是一種中樞神經興奮劑，長期或大劑量給予安非他命會誘發紋狀體多巴胺的神經末梢的退化，這種現象包括多巴胺長期的排空，多巴胺轉運子的減少以及酪胺酸氫氧化酶活性的降低。過多的內生性多巴胺可能透過自動氧化或在代謝過程中產生自由基而造成毒性，若前處理多巴胺合成酶抑制劑可以減緩安非他命對多巴胺的神經毒性。安非他命及其類似物可以引發紋狀體 6-hydroxyldopamine (6-OHDA)及氫氧游離基的生成，若前處理自由基清除劑及多巴胺轉運子抑制劑也可以減緩多巴胺的神經毒性。另外，安非他命及其類似物亦會造成紋狀體麩胺酸的釋放，而這種毒性可因拮抗麩胺酸接受器而減弱。而麩胺酸接受器活化時亦可產生大量的一氧化氮，若前處理一氧化氮合成酶的抑制劑也可以減緩多巴胺的神經毒性。上述的實驗皆顯示安非他命與其類似物引發紋狀體多巴胺神經毒性的機轉可能包括氧化壓力、內生性多巴胺以及興奮性毒性。

本計劃以活體微透析技術和腦組織均質化的方法，配合高效率液相層析儀電化學法，直接測量多巴胺以及氫氧游離基含量，探討氧化壓力、內生性多巴胺及興奮性毒性與安非他命的神經毒性之間的關係。利用水楊酸與氫氧游離基形成 2,3-DHBA 來反應氫氧游離基的生成，另外以 desipramine (DMI) 前處理來抑制安非他命的代謝速率，進而延長安非他命存在大白鼠體內時間的方式，作為引發紋狀體多巴胺神經毒性之實驗動物模式。在此一模式下 DMI 合併安非他命的處理可以明顯增加安非他命原本對於多巴胺釋放及紋狀體神經毒性的作用。實驗結果顯示：使用 B 型單胺氧化酶抑制劑(-)-deprenyl 及多巴胺轉運子抑制劑 nomifensine 可以阻斷氫氧游離基含量生成的增加，以上的藥物皆可以減緩安非他命引發紋狀體多巴胺的長期排空。

綜合以上結果顯示，氧化壓力可能參與安非他命紋狀體多巴胺的神經毒性，其機制可經由多巴胺釋放的增加造成氫氧游離基的生成所引發。

(貳) 英文摘要：

Keyword: Neurotoxicity ; Striatum; Oxidative stress

Amphetamine (AMPH) is a potent central stimulant and long-term or large doses of AMPH can cause striatal dopamine (DA) terminal degeneration in the rat. This phenomena includes long-term depletion of DA, decrease in the number of DA transporters and decrease in the activity of tyrosine hydroxylase (TH) in the striatum. AMPH-induced neurotoxic effects

upon striatal dopaminergic terminals has been suggested to correlate with the extent of DA production and activation of glutamate receptors. Excessive DA by AMPH can lead to oxidative stress via enzymatic or nonenzymatic reactions, which can be attenuated by TH inhibitors and free radical scavengers. Thus, the present study determined whether oxidative stress is involved in the AMPH-induced free radical formation and long-term DA depletion. Our data showed that systemic administration of AMPH (10 mg/kg) with desipramine (DMI, 10 mg/kg), a drug that retards the metabolism of AMPH, significantly increased striatal DA, and caused long-term striatal DA depletion in the rat. (-)-Deprenyl was noted to attenuate long-term striatal DA depletion and hydroxyl radical formation induced by AMPH. Nomifensine also reduced long-term DA depletion in the striatum of AMPH-treated rats.

In conclusion, this study indicates that DA is involved in the AMPH-induced hydroxyl radical formations and dopamine neurotoxicity in the rat striatum.

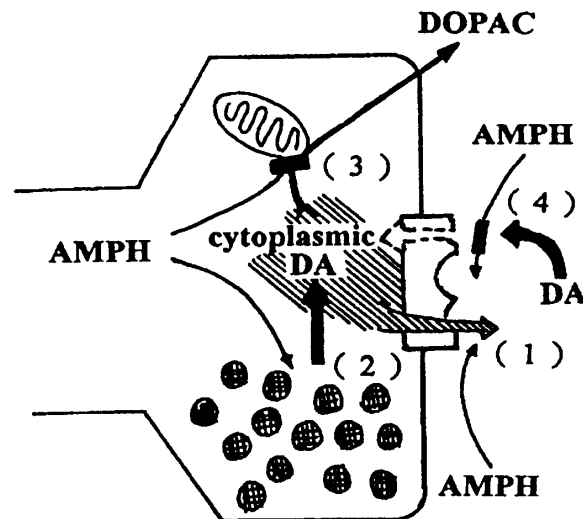
(參) 問題之背景與現況、研究目的：

安非他命 (amphetamine, AMPH) 是一種中樞神經興奮性製劑，也是目前社會上常見的濫用性藥物。因此以下將就安非他命對於中樞神經的影響、安非他命的神經毒性以及與引發神經毒性可能的相關的機轉作一一介紹。研究顯示，安非他命之所以導致多巴胺 (或是其他兒茶酚胺) 含量的增加主要是因為它與多巴胺轉運子，小泡及粒線體上之單胺類氧化酵素間之交互作用所使然。於 1960 年代安非他命即被證實可以干擾神經元對兒茶酚胺 (正腎上腺素) 的滯留，因此最初該效應被認為是安非他命抑制了兒茶酚胺的回收，然而之後的學者則認為安非他命促使多巴胺的釋放較抑制多巴胺的回收來得重要 (Heikkila et al., 1975)。在之後的實驗亦顯示，安非他命促使多巴胺釋放的方式與胞吐作用有所不同，它的釋放可被多巴胺轉運子抑制劑所阻斷、而且不受鈣離子的影響、同時也不受多巴胺自調性接受器活性的影響。是以，學者提出所謂的“交換擴散” (exchange diffusion) 模式用以說明安非他命促使多巴胺釋放的機轉 (Raiteri et al., 1979)。安非他命作用在多巴胺轉運子之後，一方面抑制多巴胺的重回收，另一方面則與胞內之多巴胺進行交換，使得多巴胺被排至細胞間隙，而安非他命被送至胞內。又由於安非他命的脂溶性較高，因此在高劑量時 (大於 5 mg/kg)，安非他命除了上述的進入模式之外，尚可以擴散的方式進入胞內，此時安非他命便可進一步作用在小泡及單胺類氧化酵素。

小泡的功能主要在儲存神經傳遞物。安非他命可以如上述之交換擴散模式經由小泡上之轉運子進入小泡內並促使多巴胺排至胞質中。又由於安非他命為鹼性物質，倘若它大量進入小泡內，將干擾其間之酸性環境，進而影響氫離子之離子梯度，使得多巴胺難以進入小泡內，反而使得小泡內之多巴胺往外漏至胞質中。多巴胺神經元內之單胺類氧化酵素主要在氧化多巴胺使形成 DOPAC，而安非他命可抑制該酵素之活性，其 K_i 值約於 μM 的範圍。所以安非他命可以

藉由促使多巴胺釋放，以及抑制單胺類氧化酵素的方式，進而降低胞內及胞外之 DOPAC 含量。

以下簡圖主要在綜合上述對於安非他命如何作用於多巴胺神經末梢做一簡單的歸納 (Kuczenski & Segal, 1994)。(1) 安非他命作用於末梢上之多巴胺轉運子，並藉由“交換擴散”的模式促使胞質內之多巴胺釋放至胞外。(2) 當安非他命的濃度增高時，它可干擾小泡使多巴胺釋出於胞質並且 (3) 抑制單胺類氧化酵素的活性，使 DOPAC 的含量下降。(4) 安非他命直接抑制多巴



胺轉運子對多巴胺的回收。

許多證據顯示，接受器可以透過細胞內之訊息傳遞物質（如：cAMP、cGMP、NO或PKC）來調控轉運子活性。而安非他命處理也被發現，可以改變腦部calmodulin的含量以及紋狀體多巴胺激活之adenylate cyclase的活性。所以，對於安非他命透過轉運子而促使多巴胺之大量釋放，是否會經由作用於多巴胺接受器來調控轉運子活性，仍有待進一步探討。

雖然安非他命透過不同的方式作用於多巴胺神經末梢，然而它最終的結果都將使得胞外多巴胺的含量大幅增加。其中變化至為明顯之多巴胺系統又以黑質紋狀體系統之紋狀體以及中邊緣系統之阿控伯核為最。在安非他命毒性的實驗動物模式上，學者利用微量幫浦包埋於動物皮下，使安非他命能持續釋放約5~7天，結果發現，若以兒茶酚胺螢光染色法來觀察紋狀體則可發現其背景顏色較淡（因為多巴胺排空），而且許多軸突變為較粗大且短；若以酪胺酸氫氧化酵素免疫染色法，則可發現酪胺酸氫氧化FA60的反應量減少；或者以銀染色法，可以發現許多不連續性軸突且含有銀的沈著顆粒。這些現象說明連續給予安非他命所造成的神經毒性會使得紋狀體的多巴胺神經軸突退化。

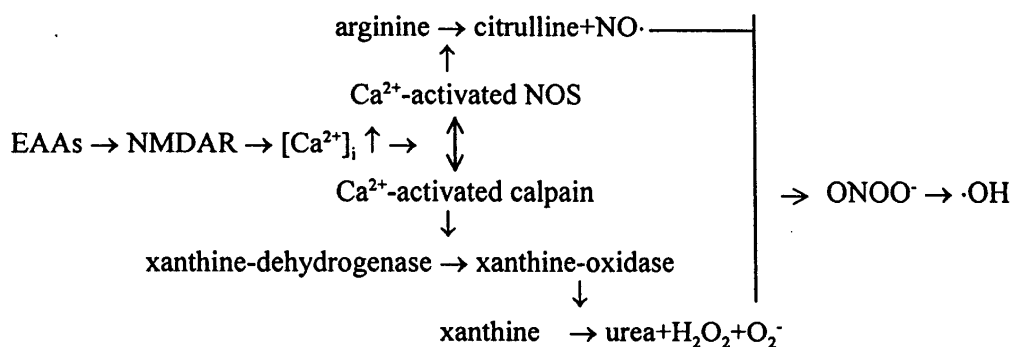
長期或過量使用安非他命及其類似物之神經毒性首先由Pletscher等人 (1963) 所報導。在實驗動物的研究顯示，該神經毒性對於紋狀體而言可以降低其多巴胺的含量，抑制酪胺酸氫氧化酶的活性；減少多巴胺轉運子的數目。這一些現象被認為與多巴胺神經末梢的退化有關 (Fuller & Hemrick-Luecke, 1980)。雖然目前對於安非他命及其類似物所引發該神經毒性機轉之假說相當的多，然而卻眾說紛紜。倘若將這些假說歸納，大約可將之分為興奮毒性 (excitotoxicity)、氧化壓力 (oxidative stress) 以及內生性多巴胺等機轉。另一方面，神經退化一般意指具功能性的神經徑路遭受損傷，並導致相關神經傳遞物質系統與型態組織的改變。其間較常被發現參與的因子有游離基所引

發的氧化壓力及麩胺酸與其致效劑所引發之興奮毒性 (Lees, 1993)。所以，以下將就安非他命引發之神經毒性機轉之假說，以及合併說明目前引發神經退化相關之證據與假說。

興奮性胺基酸可能參與安非他命及其類似物的神經毒性最早由Sonsalla等人所發現 (1989)。他們使用NMDA接受器之拮抗劑，如MK-801、ketamine及PCP (phencyclidine) 等，皆可以阻斷安非他命及其類似物對紋狀體所產生的神經毒性。之後的一些研究也都支持安非他命及其類似物所引發的紋狀體神經毒性與興奮性胺基酸有關 (Hemrick-Luecke et al., 1991)。而且更有報告指出，安非他命及其類似物可以引發紋狀體麩胺酸的釋放量增加 (Nash & Yamamoto, 1992)。從這些實驗結果似乎顯示，安非他命及其類似物會促使紋狀體麩胺酸含量增加，而該麩胺酸可能可以激活麩胺酸接受器，進而引發神經毒性。因為使用麩胺酸接受器拮抗劑可以抑制此神經毒性。

Olney等人 (1969a) 認為麩胺酸所引發之毒性與興奮性胺基酸接受器之活化有關，而將此種毒性稱之為興奮毒性。之後Rothman (1983) 發現麩胺酸在缺氧狀態下的釋放可導致海馬迴神經元的死亡。另外無論在實驗動物或人體皆可發現腦部缺血及創傷時麩胺酸濃度皆大幅增加。而且使用NMDA或AMPA接受器之拮抗劑可用以減緩腦部缺血及創傷之後所造成的組織損傷。無論在活體內或外皆有實驗證明麩胺酸接受器活化後可以引發游離基的生成。此機轉主要是因為鈣離子大量流入胞內後激活了nitric oxide synthase (NOS)、xanthine oxidase或phospholipase A₂等酶，而這些酶皆可進一步的促使游離基生成。再則，除了上述機制外，鈣離子可直接作用於粒線體使之產生游離基 (Dugan et al., 1995)。

以下所示為興奮性胺基酸 (EAA) 刺激NMDA接受器 (R) 後生成游離基的途徑。當興奮性胺基酸，如麩胺酸，在激活NMDA接受器後可使鈣離子大量流入胞內，鈣離子與calmodulin結合後會活化NOS，活化後之NOS會使arginine轉化成citrulline及一氧化氮 (NO)。另外，鈣離子會活化calpain，使得xanthine dehydrogenase轉成xanthine oxidase，然後以xanthine為受質再生成尿素 (urea)、過氧化氫 (H₂O₂) 與超氧游離基 (O₂⁻)。一氧化氮與超氧游離基結合可生成peroxynitrite (ONOO⁻)，它可與氫離子結合之後再裂解成氫氧游離基 (hydroxyl radical; ·OH)。



有些學者使用抗氧化劑，如抗壞血酸與維他命E，或者游離基清除劑，如：mannitol，可以減緩安非他命及其類似物所引發的多巴胺長期排空 (Wagner et al., 1985)。有的學者則發現銅/鋅-超氧游離基歧異化酶 (Cu/Zn superoxide dismutase) 之基因轉植鼠 (transgenic mice) 具有抵抗該毒性之效果。另外，倘若使用NOS抑制劑，如L-NAME (N^ω-nitro-L-arginine methyl ester) 或7-

nitroindazole 皆有抑制該毒性之效果 (Abekawa et al., 1996; Itzhak & Ali, 1996)。也有學者發現甲基安非他命可促使紋狀體氫氧游離基的生成 (Kondo et al., 1994; Giovanni et al., 1995)。因此，以上的實驗證據皆顯示安非他命及其類似物所引發的紋狀體神經毒性與氧化壓力的形成具有密切的關連性。

在 1980 年，Furchgott 和 Zawadzki 發現到刺激內皮細胞可以釋放出一種因子，造成血管舒張，稱為內皮衍生舒鬆因子 (EDRF)，後來由 Moncada 等人證實 EDRF 就是 NO。在中樞神經系統方面 Garthwaite 等人發現 NO 在中樞神經可當作神經傳遞物質或調節神經傳訊。NO 在體內具有許多重要的生理與病理的作用，它可以擴張血管、抑制血小板凝集、抑制細胞增生以及在免疫反應中扮演重要角色。NO 之病理角色除了參與神經元的退化性疾病外，它也參與了麩胺酸興奮性毒性之下游媒介者，當 NMDA 接受器被活化後，進入細胞內的鈣離子除了一連串毒性外，亦可活化 NOS 產生 NO 造成毒性，NO 的合成的原料來自胺基酸 L-arginine 經由 NO 合成酶作用行成 L-citrulline 及 NO。NO 可以活化 guanylate cyclase 使細胞內 cGMP 增加，cGMP-dependent protein kinase，之後再活化 cGMP-dependent protein kinase 產生生理上的作用。

NO 造成細胞傷害的機制包括抑制呼吸鏈中的 complexes I 及 II (Stadler et al., 1991)，抑制核糖核酸還原酶改變 DNA 的合成 (Wink et al., 1991) 以及一氧化氮與超氧游離基形成更具反應性的 peroxynitrite 或其他的自由基 (Radi et al., 1991)。上述造成細胞傷害的機轉，與安非他命誘發神經毒性的機轉相類似，因此安非他命與一氧化氮造成神經毒性的機制上可能有某種的關聯性。所以有學者認為非他命誘發神經毒性的機轉，一氧化氮可能直接參與其中，因為安非他命會造成突觸間麩胺酸含量的增加，而活化 NMDA 受器進而增加一氧化氮的生成。此外有學者更進一步發現，前處理一氧化氮合成酶抑制劑可以降低安非他命誘發 CF-1 小鼠多巴胺及五 色胺酸神經損傷 (Taraska & Finnegan 1996)。

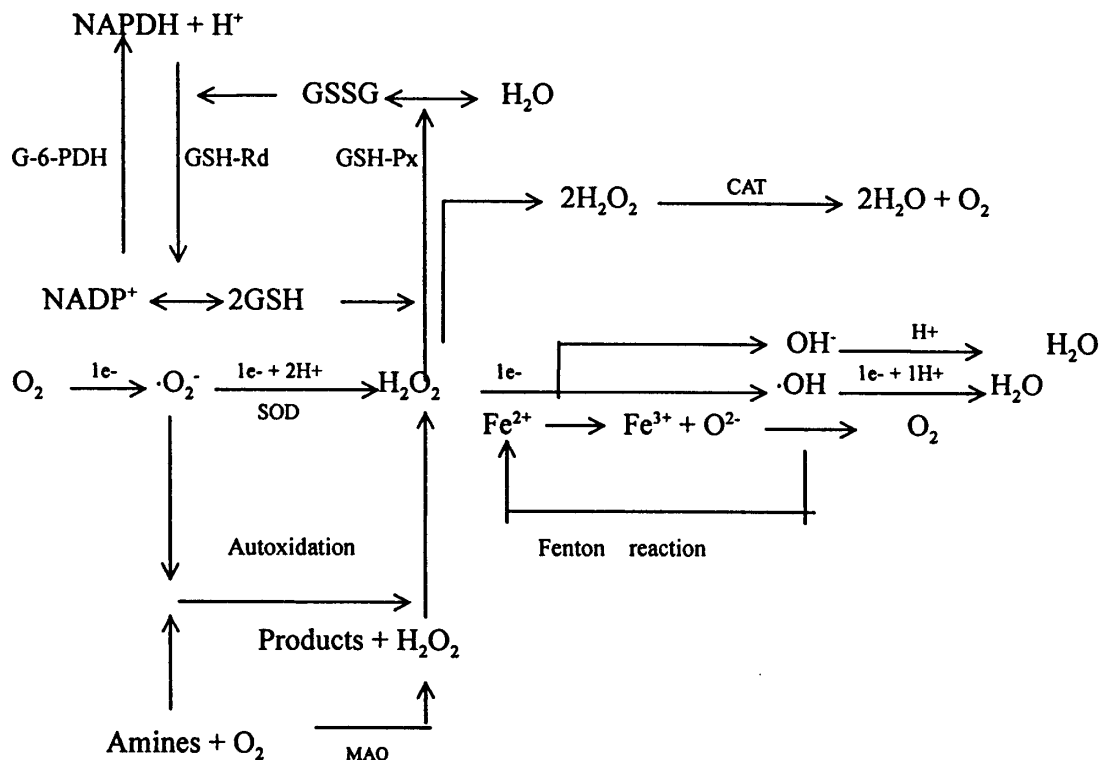
最初學者發現安非他命及其類似物可造成紋狀體內 6-hydroxydopamine (6-OHDA) 的生成 (Seiden & Vesmer, 1984)。若使用 α -methyl-*p*-tyrosine 以抑制 tyrosine hydroxylase 之活性，進而減少紋狀體多巴胺含量，可減緩安非他命及其類似物所引發的紋狀體神經毒性 (Wagner et al., 1983)。所以有學者推測其實該毒性的產生就是因為大量的多巴胺被釋放的結果 (O'Dell et al., 1991)。另一方面，若使用多巴胺 D₁ 或 D₂ 接受器拮抗劑則具有減緩該毒性的效果 (O'Dell et al., 1993)。而被安非他命及其類似物所釋放的多巴胺，可以經由自動氧化的作用產生極具活性的含氧游離基，此游離基即與毒性有關 (Cubells et al., 1994)。

多巴胺的另一代謝途徑是和氧分子直接作用，形成過氧化氫以及高活性的自由基。在此一反應過程中，已被證實會產生超氧游離基、氫氧游離基及 semiquinone (Graham et al., 1978)。此外，由於鐵離子也可以催化多巴胺的自動氧化 (autoxidation)，同時經由 Fenton reaction 與過氧化氫作用後，同樣會產生氫氧游離基。在含鐵量甚豐以及以多巴胺為主要的神經傳遞物質之紋狀體內，倘若多巴胺的代謝、釋放與回收等不能有效的運作，則多巴胺經由自動氧化因而產生毒性並非不可能的事。

氧化壓力指的是由於細胞內游離基的生成與其防衛機轉之間無法取得平衡所導致的細胞病理現象 (Simonian & Coyle, 1996)。游離基一般泛指具有未共價電子對之物質，它主要來自粒線體的氧化代謝、酵素的反應及小物質如：

多巴胺的自動氧化。其中超氧游離基可來自高能電子從粒線體電子傳遞鏈中的逸失或是位於胞質與胞膜上的酵素反應。這些酵素包括NOS、xanthine oxidase、cytochrome P450 complex及phospholipase A₂等。過氧化氫則同樣可來自電子傳遞鏈、小物質的自動氧化及超氧游離基之歧異化 (dismutation)。過氧化氫在經由鐵離子的催化後 (Fenton reaction) 可產生極具反應性的氫氧游離基。這些游離基可與 (1) 胞膜之脂質反應，產生脂質過氧化反應 (lipid peroxidation)，進而影響膜電位與胞膜的流動性，導致離子通透性增加，如：鈣離子。(2) 細胞內之蛋白質反應，造成蛋白質的變性或裂解 (Stadtman, 1986) (3) 胞核或粒線體內之去氧核糖核酸反應，導致核酸的斷裂或突變 (Brawn and Fridovich, 1981)。如此可造成細胞的損傷或死亡。

至於細胞內的防衛機轉包括，超氧游離基歧異化酶 (superoxide dismutase, SOD)，它分佈於細胞內外及粒線體中，可將超氧游離基轉成過氧化氫；在腦中大部份的過氧化氫皆以麩胺基硫過氧化酶 (glutathion peroxidase, GSH-Px) 經由氧化麩胺基硫而得無毒害的水，麩胺基硫與NADPH (nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, reduced form) 結合可還原大部份的游離基；另外腦中含量較少的過氧化氫酶 (catalase) 同樣可將過氧化氫轉換成水；運鐵蛋白 (transferrin) 則與鐵離子結合，以減少自動氧化發生以及氫氧游離基生成；脂溶性維他命E則可中斷脂質過氧化反應；至於如抗壞血酸則為還原劑，但它本身亦有可能成為游離基的來源 (Herbert et al., 1996)。除上一節所述氫氧游離基之生成途徑外，下圖另外簡示以上所述有關細胞體之氧化壓力的主要來源與生成途徑以及其相關之保護機制 (Reiter, 1995)。



由於，紋狀體為一多巴胺含量相當高的腦區，同時也因為安非他命的作用與多巴胺神經系統及麩胺酸系統有密切的關係。綜合上述，內生性多巴胺、氧化壓力和興奮毒性之於安非他命所引發紋狀體神經毒性，扮演著一定的角色，基本上我們可以了解，雖然它們之間有的事件可以獨立發生，然而有的機轉在反應的時序上則是可以伴隨著發生的。如：過多的多巴胺可經由代謝時或自體氧化

作用形成過氧化氫及高活性的自由基導致氧化壓力的生成;此外,大量麩胺酸在過度激活興奮性胺基酸接受器之後所產生的興奮毒性,可以經由鈣離子的大量流入進而引發氧化壓力生成。因此,這顯示過多的多巴胺、興奮毒性以及氧化壓力的生成以至於之後對於生物體所造成的傷害,可能並非僅由單一機轉所導致,而可能是彼此之間具有某種程度的關連性所共同產生的。這也顯示了,引發神經毒性以至於神經退化生成,之可能參與機轉的多重性與複雜性。

因此綜合以上的實驗背景,本實驗研究主要著重在安非他命引發紋狀體(striatum)神經毒性與自由基生成機轉的探討。

(肆) 研究方法：

I. 微透析技術：

實驗動物 Sprague-Dawley 大白鼠重在 250-350 公克,以水化氯醛(chloral hydrate, 400mg/kg i.p.) 麻醉後架於立體定位儀(David Kopf)上,切開頭皮,用電鑽在顱骨上鑿孔,以便植入探針及栓入骨釘。以顱骨上的十字縫(bregma)作為參考原點,兩之探針植入紋狀體,其座標分別為:(A+1.0, L+2.8, V-7.0)。微透析探針植入後,用牙粉將探針黏牢在顱骨及骨釘上。以人工腦脊髓液。(140mM NaCl, 1.2mM CaCl₂, 3.0mM KCl, 1.0mM MgCl₂, ascorbic acid 7mg/l), 開始灌流,流速為每分鐘 1 μ L。

待手術完畢約 16 至 20 小時後開始收集透析液,每 30 分鐘收集一次。以前三次所收集之透析液作為基礎,再將原灌流液換為含水楊酸(salicylate, 5 mM)之人工腦脊髓液持續灌流,前 1 小時 30 分之灌流液棄置不用,俟其達平衡狀態後再行收集。實驗一:在收集至第四次完後將安非他命(10 mg/kg)或溶劑(vehicle)行腹腔注射或在人工腦脊髓液加入安非他命(15 μ mole),而且在注射安非他命之前 15 分鐘同時腹腔給予 desipramine (10 mg/kg)或溶劑(vehicle)。若將給予安非他命的時間設為零時,則在之後 4 小時內仍每 30 分鐘收集一次,但 4 至 12 小時內則每小時收集一次。實驗二:給予安非他命 3.5 或 1 小時前,腹腔給予 α -methyl-p-tyrosine(α -MT; 250 mg/kg)或 MK-801 (1mg/kg),測量多巴胺、氫氧游離基及一氧化氮的含量。

待動物進行腦部微透析實驗結束後,以水化氯醛(600mg/kg i.p.)使之深度麻醉後開胸進行心臟灌流,先以生理食鹽水經左心室灌流 10 分鐘,再以福馬林(formaldehyde 4%)灌流 10 分鐘。然後打開顱骨,取出腦組織,浸泡於 30% 蔗糖溶液 4-7 天。然後進行冷凍切片(厚度 40 μ m),再以(cresyl violet)染色置於顯微鏡下觀察以確定微透析植入的位置。

II. 慢性實驗方面

安非他命(10 mg/kg)合併給予 DMI (10 mg/kg)兩次劑量,間隔一天。在給予安非他命前 1 小時或 0.5 小時前,腹腔給予 MK-801 (1mg/kg)或 L-NAME (150mg/kg),在給予第一劑的安非他命的第七天,斷頭犧牲取其紋狀體腦區,測量多巴胺、氫氧游離基及一氧化氮的含量。

III. 組織萃取液之分析

大白鼠於斷頭取腦後，切下紋狀體腦區，置於已稱重的離心管中，稱得組織淨重並加以紀錄，儲存於 -70°C 之冰庫中，待要分析時取出，加入含有 $1\ \mu\text{M}$ 3,4-dihydroxybenzylamine (DHBA, RBI) 作為內部標準品之 0.1N 過氯酸 (perchloric acid, Merck)，所加入過氯酸之體積與組織重量之比為 $10\ \mu\text{l}/\text{mg}$ wet tissue weight。然後於冰浴中，使用超音波組織均質器 (Ultrasonic cell disruptor, Sonicator, W-225, U.S.A.)，以間斷方式將鼠腦組織打成均質液，再用離心機於 4°C 下以每分鐘 14,000 轉之轉數離心 30 分鐘，所得之上清液，再經 $0.2\ \mu\text{m}$ 濾膜過濾即為組織萃取液。如同透析液之分析模式，所獲取之組織萃取液亦分為兩個部分，於獲取後二十分鐘內進行分析。其中一部份是以高效率逆向層析儀 (reversed-phase ion-pair microbore-column system) 針對多巴胺系統各物質含量進行分析；而另一部份則是以一氧化氮分析儀 (nitric oxide analyzer 280A) 針對一氧化氮含量進行分析。

(伍) 研究結果：

壹、安非他命神經毒性與單胺酶抑制劑(-)-deprenyl

(一) (-)-deprenyl 與紋狀體多巴胺含量

紋狀體多巴胺含量的基礎值在食鹽水控制組為 $45.68 \pm 3.96\ \text{n mole/g}$ weight。藥物處理之後第 7 天對於大白鼠所造成紋狀體多巴胺含量的變化相對於食鹽水控制組具有顯著的統計意義，約減少 53%。(-)-deprenyl 前處理對於紋狀體多巴胺含量 $72.97 \pm 5.78\ \text{n mole/g}$ weight 亦有顯著的統計意義，但(-)-deprenyl 前處理則可反轉安非他命對於 DMI 處理鼠所造成紋狀體多巴胺含量的下降，約增加 210%。(參看圖 1)。

(二) (-)-deprenyl 與紋狀體氮氧游離基含量

紋狀體氮氧游離基含量的基礎值在食鹽水控制組為 $0.14 \pm 0.02\ \text{n mole/g}$ weight。藥物處理之後第 7 天對於大白鼠所造成紋狀體氮氧游離基含量的變化相對於食鹽水控制組具有顯著的統計意義，約增加 271%。而且(-)-deprenyl 前處理對於紋狀體氮氧游離基含量 $0.17 \pm 0.02\ \text{n mole/g}$ weight 並無長期顯著的影響，但(-)-deprenyl 前處理則可抑制安非他命對於 DMI 處理鼠所造成紋狀體氮氧游離基含量的增加，約降低 31%。(參看圖 2)

貳、安非他命神經毒性與多巴胺轉運子抑制劑 nomifensine

(一) nomifensine 與紋狀體多巴胺含量

紋狀體多巴胺含量的基礎值在食鹽水控制組為 $55.998 \pm 1.082\ \text{n mole/g}$ weight。統計結果顯示，藥物處理之後第 14 天對於大白鼠所造成紋狀體多巴胺含量的變化相對於食鹽水控制組具有顯著的統計意義，約

減少 45%。nomifensine 前處理對於紋狀體多巴胺含量 52.473 ± 1.891 n mole/g weight 沒有顯著的統計意義，但 nomifensine 前處理則可反轉安非他命對於 DMI 處理鼠所造成紋狀體多巴胺含量的下降，約增加 174%。（參看圖 3）

(二) nomifensine 與紋狀體氫氧游離基含量

紋狀體氫氧游離基含量的基礎值在食鹽水控制組為 0.278 ± 0.038 n mole/g weight。統計結果顯示，藥物處理之後第 7 天對於大白鼠所造成紋狀體氫氧游離含量的變化相對於食鹽水控制組具有顯著的統計意義，約增加 167%。而且 nomifensine 前處理對於紋狀體氫氧游離基含量 0.413 ± 0.041 n mole/g weight 並無長期顯著的影響，nomifensine 前處理則可抑制安非他命對於 DMI 處理鼠所造成紋狀體氫氧游離基含量的增加，約降低 88%。（參看圖 4）

(陸) 討論及結論：

一、安非他命誘發之紋狀體多巴胺長期排空

實驗結果顯示，DMI 合併安非他命處理可以造成紋狀體多巴胺的長期排空，此與 Fuller 與 Hemrick-Luecke 等人 (1980) 的發現相類似。再者，個別單一劑的 DMI 或者安非他命處理，對於紋狀體的多巴胺含量並不具有長期的影響。這表示，單一劑安非他命在短期內雖然可明顯影響實驗動物之行為以及神經訊息傳遞，但並不足以造成多巴胺長期排空，此與安非他命在大白鼠體內的半生期過短有關。這一點曾在緒言中說明，即誘發安非他命神經毒性所需的劑量為 3~4 天內給予 25~50 mg/kg，所以單一劑安非他命 (10 mg/kg) 並不能明顯造成神經毒性。此一結果也突顯出一個現象，若能延長單一劑安非他命存於動物內的時間便有可能可以誘發安非他命神經毒性。因此，本實驗利用抑制安非他命代謝的方式，對於研究安非他命神經毒性方面，確實提供一簡便的實驗動物體模式。另一方面，雖然已有學者證實 DMI 可增強安非他命的毒性作用，但是 DMI 合併安非他命處理可造成紋狀體多巴胺長期排空卻是本實驗室的首次發現。

二、安非他命神經毒性與氧化壓力

實驗結果顯示，DMI 合併安非他命處理可以誘發大白鼠紋狀體 2,3-DHBA 生成量的延遲性增加，但是單一劑的 DMI 或者安非他命個別處理則對於 2,3-DHBA 的生成沒有影響。另外，倘若以 α -MT 作為前處理，則原本 DMI 合併安非他命處理所導致 2,3-DHBA 生成量增加的現象即被阻斷。這表示 DMI 合併安非他命處理，在某一程度上可以誘發紋狀體腦區氫氧游離基的生成，而 α -MT 前處理可以阻斷此一現象，則表示該游離基的生成與多巴胺的釋放有關。另有文獻報告指出，安非他命類似物可誘發紋狀體尾核 6-OHDA 的生成，且該反應被認為與安非他命類似物的毒性有關。故使用 α -MT 作為前處理，或可減少 6-OHDA 的生成，減緩安非他命或類似物的毒性作用，而其他學者亦有相同的看法 (O'Dell et al., 1991)。由於 6-OHDA 的毒性被認為與過氧化氫、超氧游離基及氫氧游離

基的生成有關，所以實驗所測得的氫氧游離基亦有可能來自6-OHDA的氧化反應。此外也有學者認為多巴胺在代謝過程中亦可以生成自由基，再經由Fenton reaction也可以產生氫氧游離基。總而言之，在本實驗動物模式下，安非他命確實可以誘發紋狀體氧化壓力，而且此一壓力的形成可能來自多巴胺的釋放。

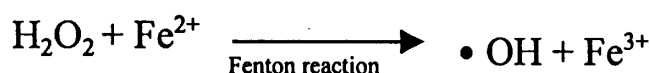
由於在本實驗設計上運用的微透析技術僅能探測細胞外的物質，所以由微透析實驗所顯示的，2,3-DHBA生成量在DMI合併安非他命處理後約3小時才呈現顯著性的增加，代表此時之紋狀體細胞外液正有氫氧游離基生成。然而，在DMI合併安非他命給予之後的3小時內，是否在細胞內同樣有氫氧游離基生成則仍不清楚，可能先在紋狀體多巴胺神經末梢內產生氫氧游離基，然後該游離基的生成會逐漸延伸至神經元外。

DMI在另外一方面而言為正腎上腺素轉運子的阻斷劑，會提高正腎上腺素神經系統分佈區域之細胞外正腎上腺素的含量。由於正腎上腺素與多巴胺同樣為兒茶酚胺，所以同樣具有被氧化而生成氫氧游離基的可能性，這使人推測DMI合併安非他命處理所誘發紋狀體氫氧游離基的生成，其中是否包含了DMI促使紋狀體正腎上腺素的細胞外含量增加，進而也參與了氫氧游離基的生成？近來的學者利用微透析技術發現安非他命可促使前額皮質或海馬回之正腎上腺素在細胞外的含量增加，至於紋狀體則鮮少有文章報導。再者，倘若將正腎上腺素或多巴胺直接微量注入紋狀體腦區，則發現多巴胺具有較高的毒性 (Ben-Shachar et al., 1995)。另外的實驗則發現DMI對於紋狀體正腎上腺素或多巴胺的含量並無直接的影響 (Mandel, 1994)。綜合上述原因，若DMI作為一正腎上腺素轉運子來促使紋狀體正腎上腺素細胞外含量增加，進而導致氫氧游離基生成之可能性並不大。

雖然以水楊酸來捕捉氫氧游離基並以其中之產物 (如2,3-DHBA及2,5-DHBA) 來作為氫氧游離基生成之指標歷來已久 (Halliwell, 1978)，但近來有學者認為 (Halliwell et al., 1991)，2,5-DHBA除了可來自水楊酸與氫氧游離基反應外，尚可經由cytochrome P450系統與水楊酸的反應生成，而2,3-DHBA為水楊酸與氫氧游離基反應的主要來源且較為單純，因此他們認為以2,3-DHBA作為指標較為合適。

三、單胺類氧化酶與氧化壓力

由於單胺類氧化酶能氧化多巴胺並生成過氧化氫此一產物，因此，倘若多巴胺進行此一代謝途徑，則多巴胺經氧化後所產生的過氧化氫，同樣很有可能受鐵離子催化而後產生氫氧游離基。在啮齒動物中，多巴胺的代謝大部份是經由A型單胺酶所代謝。但本實驗所選用(-)-deprenyl的劑量足以抑制100%的B型單胺酶及50%的A型單胺酶 (Lamensdorf, 1996)，因而降低了多巴胺在代謝時所產生的自由基。



四、安非他命神經毒性與氧化壓力

實驗結果顯示，前處理(-)-deprenyl 對於 DMI 合併安非他命處理所造成紋狀體多巴胺含量的長期排空具有保護的作用。已有實驗證實在活體內時(in vivo) (-)-deprenyl 卻能保護黑核細胞對抗 MPP+的氧化傷害，當 MPP+誘發黑核組織傷害程度小於 50%時，(-)-deprenyl 幾乎能完全阻止其毒性。同時也與許多體內體外研究報告結果相類似(Vizuete et al., 1993)，(-)-deprenyl 對於中腦黑質部做初級細胞培養(primary cell culture)或塊培養(organotypic culture)的多巴胺神經細胞亦有保護神經元對抗 MPP+的毒害作用。最近有報告指出將 C57BL 小黑鼠以 MPTP 處理造成黑質組織的傷害，再給予長期的(-)-deprenyl 治療也能夠增加神經細胞的存活率，而這種的保護作用與抑制單胺酶的作用無關(Tatton, 1993)。而本實驗證實(-)-deprenyl 在活體內確實有保護作用，能夠減輕安非他命誘發大白鼠多巴胺排空及氧化傷害。然而(-)-deprenyl 的神經保護作用不只有對 MPP+及安非他命的多巴胺神經毒性有保護作用，也能保護周邊交感神經元對抗 6-OHDA 的氧化傷害(Ahola et al., 1994)。此外對於 DSP-4 (N-(2-chloroethyl)-N-ethyl-2-bromobenzyl-amine, 正腎上腺神經毒素)所造成的神經傷害，(-)-deprenyl 亦有保護的作用(Finneagan et al., 1990)。除此之外，一些活體外實驗也證明(-)-deprenyl 能夠增加受機械性傷害的顏面運動神經元的存活率(Ansari et al., 1993)。凡此種種都暗示著(-)-deprenyl 可能擁有複雜而多方面的作用機制。而本實驗前處理(-)-deprenyl 對安非他命誘發紋狀體多巴胺的神經毒性的保護作用，也可能是經由複雜而多方面的機轉所造成。(-)-deprenyl 也可抑制多巴胺轉運子，使多巴胺經自我氧化所產生的 6-OHDA 無法進入細胞內而產生毒性。另外(-)-deprenyl 本身也可以增加 SOD 及 catalase 的活性，使體內的自由基氧化成水，降低了氧化壓力的生成，而降低了安非他命所引起氫氧游離基的生成(圖 2)。

五、多巴胺轉運子抑制劑 nomifensine 與安非他命的神經毒性

先前研究報告顯示給予安非他命後會誘發紋狀體長期多巴胺神經毒性期現象包括了降低多巴胺及其代謝物 DOPAC 及 HVA 的含量，此外，也降低酪胺酸氫氧化酶的活性及多巴胺轉運子的數目。雖非它命誘發紋狀體多巴胺神經毒性的機制，目前仍然眾說紛紜，但是有些學者認為是藉由多巴胺本身的作用。因此，安非他命可能是藉由與多巴胺轉運子的交互作用，改變了多巴胺神經的恆定，而直接產生了神經毒性。事實上多巴胺本身的代謝作用就有可能產生活性氧類自由基，促使神經元本身承受一種慢性的氧化壓力。多巴胺除了前面提到經由 MAO 代謝產生自由基外，多巴胺亦可以和氧分子直接作用，形成過氧化氫以及高活性的自由基，例如 6-hydroxydopamin、 O_2^- 、氫氧自由基和 semiquinone 等氧類自由基。有學者給予多巴胺轉運子的抑制劑 amfonelic acid 後，可以降低安非他命引起長期多巴胺神經毒性，顯示多巴胺轉運子的抑制劑的作用可能是抑制了多巴胺自體氧化和其氧類自由基代謝物的生成以及抑制其回收。另外也有學者以多巴胺轉運子之基因移除鼠的研究顯示，給予多劑量的甲基安非他命，七天後，可以抑制安非他命所造成多巴胺、DOPAC 及 HVA 含量的降低。在急性微透析實驗中，同樣多巴胺轉運子之基因移除鼠可以抑制安非他命對正常鼠造成多巴胺、DOPAC 以及氫氧游離基的

生成。本論文給予多巴胺轉運子抑制劑雖對自由基有所影響，在統計上沒有意義。這可能是因為本論文是以腦組織均質化的方法測量紋狀體氫氧游離基的含量，所以氫氧游離基的來源可來自細胞內及細胞外。另外也有學者進一步探討以突觸小泡多巴胺轉運子之基因移除鼠，結果顯示突觸小泡多巴胺轉運子之基因移除鼠對於安非他命誘發長期多巴胺神經毒性更為敏感，且發現安非他命引起的神經毒性與細胞內的多巴胺的濃度增加有關。

前處理 nomifensine 對於 DMI 合併安非他命處理所造成紋狀體多巴胺含量的長期排空具有保護的作用。已有實驗活體證實多巴胺轉運子抑制劑 amfonelic acid、mazindol、bupropion 及 benztropine 可以降低安非他命或是 MPTP 引起紋狀體多巴胺的神經毒性，其機制可能與抑制了安非他命經由多巴胺轉運子進入細胞內。在多巴胺轉運子之基因移除鼠的實驗中顯示，基因移除鼠可以降低安非他命引起多巴胺釋放的增加，多巴胺轉運子可能參與抑制安非他命所引起多巴胺的釋放。而本論文所使用的多巴胺轉運子抑制劑 nomifensine 同樣也可以抑制安非他命所引起的神經毒性。所以多巴胺轉運子的抑制劑阻斷安非他命誘發多巴胺神經毒性的機制可能是經由阻斷安非他命進入多巴胺神經系統裡、阻斷安非他命經由多巴胺轉運子所引起多巴胺的釋放或是阻斷了在突觸中 6-hydroxydopamine 或是多巴胺的其他毒性代謝物進入多巴胺神經系統裡。(圖 4)。

(柒) 未來計劃

- 一、近年來對於神經退化疾病的探討已有愈來愈受重視的趨勢，其中對於引發疾病機轉之探討大約可歸納為能量損傷、興奮毒性以及氧化壓力等機轉。本實驗則發現以上兩種機轉(興奮毒性以及氧化壓力)皆參與安非他命神經毒性的作用。這除了暗示安非他命神經毒性的引發可能導致神經退化之外，同時也說明，不同致病機轉之間具有交互作用與相互加成性的可能。另一方面，由於在安非他命長期濫用者有時可以產生運動困難、妄想症或類似精神分裂等症狀，但其真正的機轉並不清楚，甚至是精神分裂本身的機轉。又由於在實驗動物模型上發現，連續安非他命給予所造成的神經毒性，如：紋狀體、lateral habenular 與 fasciculus retroflexus 等腦區之神經退化，因此，對於本實驗在安非他命之動物模式下所造成的神經毒性，假若也同樣可以導致類似的神經退化現象，則對於上述藥物濫用者所產生異常的行為現象，是否與腦部的病變有關，本實驗可以提供一些線索；而且對於使用一些神經保護製劑來對抗上述藥物所引發之神經毒性產生，本實驗也顯示出其可行性。
- 二、雖然本實驗已有具體的成果與結論，但是仍有許多問題尚待解決與進一步探討，茲簡述如下：
 1. 測量安非他命於腦部的分佈與存在的時間，如此將得以直接證明安非他命可以被代謝抑制劑作用，使其存在於動物體的時間延長，兩者亦可釐清一些神經保護劑，並非透過干擾安非他命在腦區的分佈與存在時間才具有其功效的。

2. 近年來證據顯示，能量損傷也參與安非他命誘發紋狀體多巴胺的神經毒性，探討安非他命是否可以直接抑制與能量代謝途徑有關之酵素，如：hexokinase、aconitase、Complex I 或 Complex II 等相關的酵素。
3. 探討安非他命神經毒性下所引發的興奮毒性，將活化何種鈣離子依賴性的酵素使產生游離基。
4. 近年來神經生長因子在神經退化疾病中所佔的角色日顯重要，因此，是否神經生長因子的表現與安非他命神經毒性有關仍是值得探討的。

(捌) 參考文獻

Abekawa T, Ohmori T and Koyama T: Effects of nitric oxide synthesis inhibition on methamphetamine-induced dopaminergic and serotonergic neurotoxicity in the rat brain. *J. Neural Transm.* 103: 671-680, 1996.

Bowyer JF, Clausing P, Gough B, Slikker Jr. W. and Holson RR: Nitric oxide regulation of methamphetamine-induced dopamine release in caudate/putamen. *Brain Res.* 699: 62-70, 1995.

Cho AK, Schaeffer JC and Fisher JF: The accumulation of 4-hydroxyamphetamine by rat striatal homogenates. *Biochem. Pharmacol.* 24: 1540-1542, 1975.

Cubells JF, Rayport S, Rajendran G and Sulzer D: Methamphetamine neurotoxicity involves vacuolation of endocytic organelles and dopamine-dependent intracellular oxidative stress. *J. Neurosci.* 14: 2260-2271, 1994.

Fuller RW and Hemrick-Luecke SK: Long-lasting depletion of striatal dopamine by a single injection of amphetamine in iprindole-treated rats. *Science* 209:305, 1980.

Garthwaite J, Charles SL and Chess-Williams R: Endothelium-derived relaxing factor release on activation of NMDA receptors suggests role as intracellular messenger in the brain. *Nature* 336: 385-388, 1988.

Globus MY-T, Busto R, Dietrich WD, Martinez E, Valdes I and Ginsberg MD: Effect of ischemia on the in-vivo release of striatal dopamine, glutamate, and *r*-aminobutyric acid studied by intracerebral microdialysis. *J. Neurochem.* 51: 1455-1464, 1988.

Gunaseker PG, Kanthasamy AG, Browitz JL and Isom GE: NMDA receptor activation produces current generation of nitric oxide and reactive oxygen species: implication for cell death. *J. Neurochem.* 65: 2016-2021, 1995.

Halliwell B: Superoxide-dependent formation of hydroxyl radicals in the presence of iron chelates. *FEBS Lett.* 92: 321-326, 1978.

Hemrick-Luecke SK, Henderson MG and Fuller RW: MK-801 antagonism of the prolonged depletion of striatal dopamine by amphetamine in iprindole-treated rats. *Life Sci.* 50: PL31-PL33, 1991.

- Henderson MG, Hemrick-Luecke SK and Fuller RW: MK-801 protects against amphetamine-induced striatal dopamine depletion in iprindole-treated rats, but not against brain serotonin depletion after p-chloroamphetamine administration. *Ann. New York Acad. Sci.* 648: 286-288, 1992.
- Koda LY, Gibb JW: Adrenal and striatal tyrosine hydroxylase activity after methamphetamine. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 185:42-48, 1973.
- Kuczenski R and Segal DS: Concomitant characterization of behavioral and striatal neurotransmitter response to amphetamine using in vivo microdialysis. *J. Neurosci.* 9: 2051-2065, 1989.
- Lafon-Cazal M, Pletri S, Culcasi M and Bockaert J: NMDA-dependent superoxide production and neurotoxicity. *Nature* 364: 535-537, 1993.
- L'Heureux R, Dennis T, Curet O and Scatton B: Measurement of endogenous noradrenaline release in the rat cerebral cortex in vivo by transcortical dialysis: Effects of drugs affecting noradrenergic transmission. *J. Neurochem.* 46: 1794-1801, 1986.
- Miller KJ and Hoffman BJ: Adenosine A3 receptors regulate serotonin transport via nitric oxide and cGMP: *J. Biol. Chem.* 269: 27351-27356, 1994.
- Nash JF and Yamamoto BK: Methamphetamine neurotoxicity and striatal glutamate release: comparison to 3,4-methylenedioxy-methamphetamine. *Brain Res.* 581: 237: 237-243, 1992.
- O'Dell SJ, Weihmuller FB and Marshall JF: Multiple methamphetamine injections induce marked increases in extracellular striatal dopamine which correlate with subsequent neurotoxicity. *Brain Res.* 564:256-260, 1991.
- Olney JW, Sharpe LG: Brain lesions in infant rhesus monkey treated with monosodium glutamate. *Science*: 166: 386-388, 1969b.
- Patel M., Day BJ, Crapo JD, Fridovich I and McNamara JO: Requirement for superoxide in excitotoxic cell death. *Neuron* 16: 345-355, 1996.
- Schulz JB and Beal MF: Neuroprotective effects of free radical scavengers and energy repletion in animal models of neurodegenerative disease. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 765: 100-110, 1995.
- Sonsalla PK, Nicklas WJ and Heikkila RK: Role of excitatory amino acids in methamphetamine-induced nigrostriatal dopaminergic toxicity. *Science* 243: 398-400, 1989.
- Stadtman E: Oxidation of proteins by mixed-function oxidation systems. *Trans Biol. Sci.* 11: 11-12, 1986.
- Volterra A, Trotti C, Tromba C, Floridi S and Racagni G: Glutamate uptake inhibition by oxygen free radicals in rat brain cortical astrocyte. *J. Neurochem.* 14: 2924-2932, 1994.
- Wagner GC, Seiden LS and Schuster CR: Methamphetamine induced changes in brain catecholamines in rats and guinea pigs. *Drug Alcohol Dep.* 4: 135-138, 1979.

Figure 1

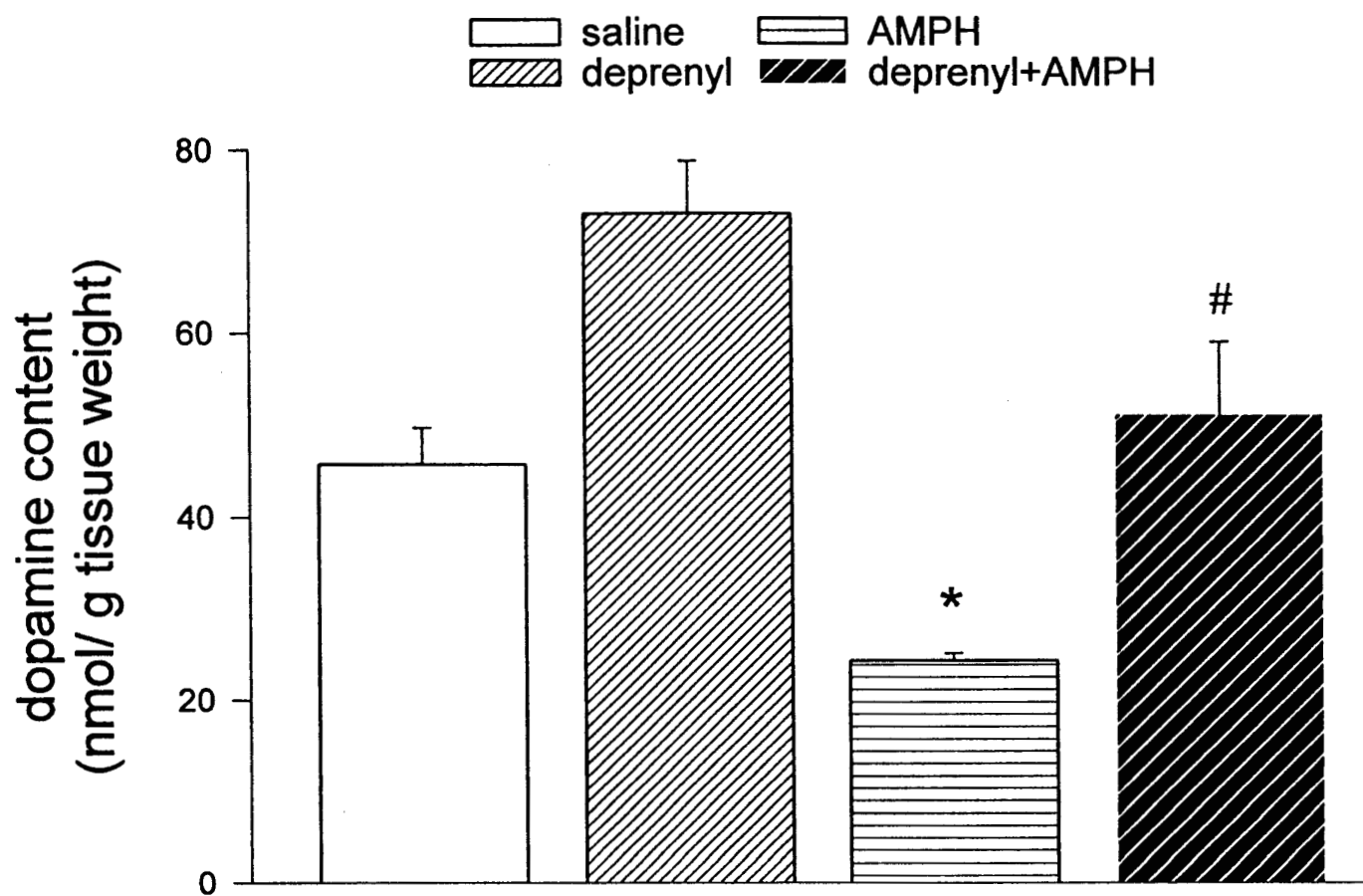


Figure 2

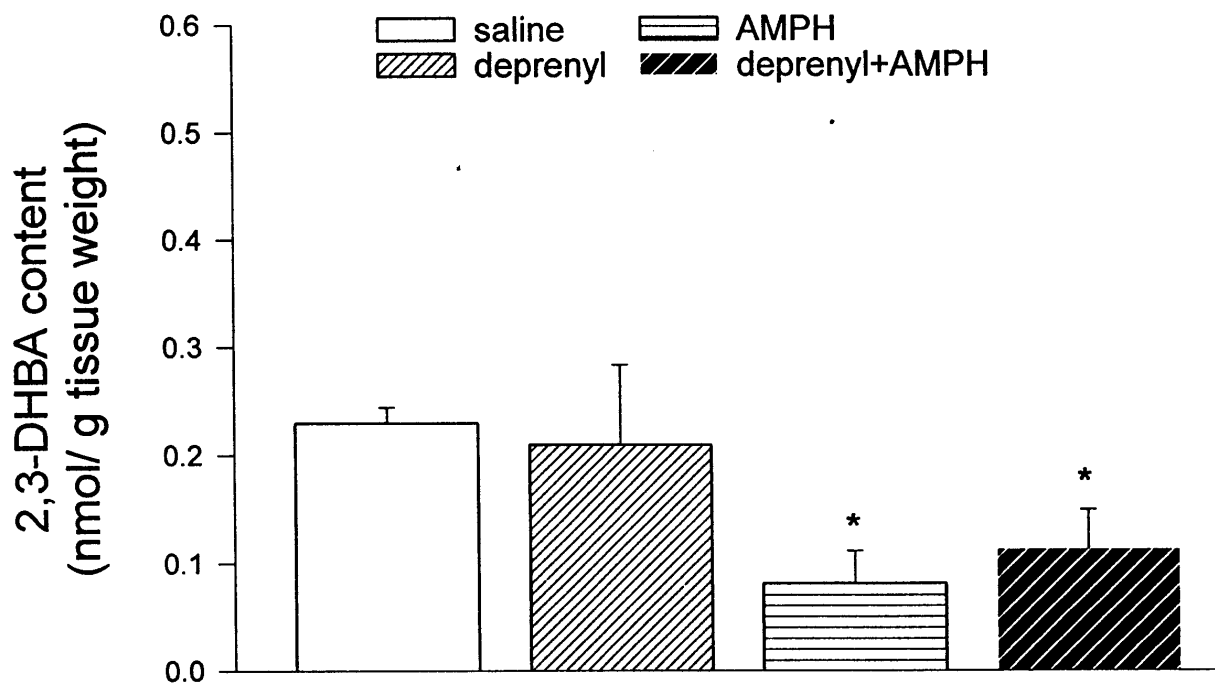


Figure 3

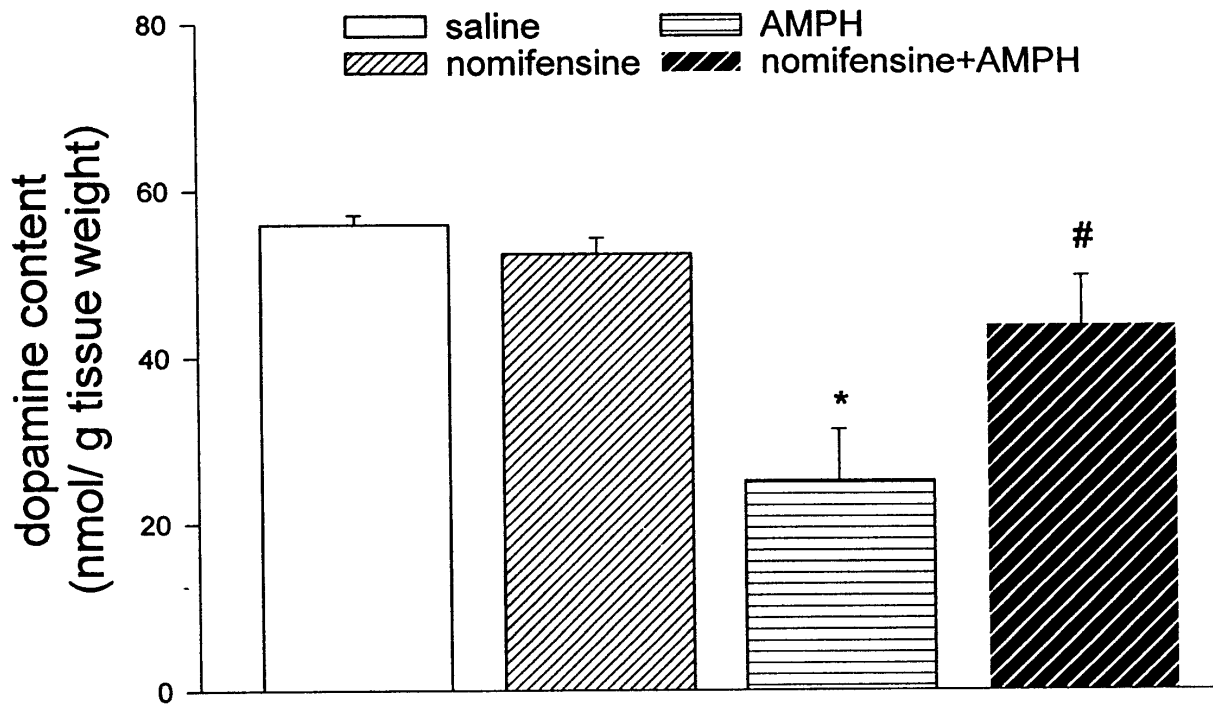


Figure 4

