# 臺灣二 OO 四年國際科學展覽會

科　　別：醫學與健康科學科

作品名稱：長期服用安非他命對小鼠腦部紋狀體內蛋白質表現的影響

得獎獎項：醫學與健康科學科第二名
香港第卅七屆聯校科學展覽會正選代表

學　　校：國立臺灣師範大學附屬高級中學

作　　者：李佩芝

# 作 者 簡 介



我的父母都是從事有關生物方面研究工作，因此我就在充滿科學氣息的環境中長大，造就了我對科學，尤其是生物的濃厚興趣，以及凡事堅持到底的性格，無徵不信的態度，與挑戰挫折的精神。從小就參加了多次科展，有校內的也有校外的，讓我得到了不少獎狀，更培養了研究精神與興趣。進了附中科教

班後，我有更多機會做實驗、參加獎助計畫和科展等，第一次的校內科展就讓我得到了好成績，讓我更加有信心，也更加努力做好每一個實驗。

# 目錄

中文摘要..... P.2

英文摘要..... P.3

一、 前言..... P.4

二、 研究方法或過程..... P.9

三、 研究結果與討論..... P.18

四、 結論與應用..... P.29

五、 參考文獻..... P.30

六、 附錄..... P.34

# 中文摘要

安非他命的濫用在台灣是非常嚴重的公眾健康及社會問題。安非他命會導致一連串的行爲異常，包括在中腦紋狀體內釋放多巴胺及阻止多巴胺回收來增加使用者的活動力。由於安非他命會對腦細胞造成傷害，本研究的目的爲探討低劑量、無立即毒性之安非他命(類似於人類使用習慣)長期施打下，是否會對 C57BL6 小鼠大腦紋狀體內的蛋白質表現有影響。因此利用西方點墨法分析施打低劑量安非他命(2 到 6 mg/kg)約一星期之後，C57BL6 小鼠的大腦紋狀體中一些重要蛋白質(包括腺苷酸受體 $A_{2A}$-R、第五亞型腺苷酸環化酶 AC5、caspase-8 及 PARP)的表現是否有改變。實驗結果顯示，低劑量安非他命處理對這些蛋白質的表現並沒有明顯的差異。但利用二維電泳法可看到有少許蛋白質，在經過安非他命處理下有顯著的差別，如 KIAA0193 homolog、GOS-28、gammacrystallin A、malate dehydrogenase 和 phosphoglycerate mutase isozyme B (PGAM-B)。這些蛋白質中，malate dehydrogenase 和 PGAM-B 都與代謝和產生 ATP 有關，但前者是增加的，而後者減少，推測安非他命會影響神經細胞的能量代謝，因此長期施打安非他命對紋狀體造成的影響值得進一步探討。

# 英文摘要

The wide spreading use of amphetamine (AMPH) in Taiwan has become a serious public health and social problem. AMPH evokes a series of behavior abnormality including enhanced locomotor behavior by releasing dopamine and inhibiting dopamine-uptake in the striatum. Since AMPH is known to cause brain damage, the purpose of this study is to investigate the expression of several important proteins in the striatum of C57BL6 mice after chronic treatment with low and non-toxic dosages of AMPH (mimicking the common usage pattern of AMPH addict). C57BL6 mice were daily IP-injected with various dosages of AMPH (0 to 6 mg/kg) for one week. Expression levels of $A_{2A}$ adenosine receptor ($A_{2A}$-R), adenylyl cyclase type V (AC5), caspase-8 and PARP in the striatum were analyzed by Western blotting analysis. Most proteins examined were not affected by this 1-week AMPH treatment. By the aid of two-dimensional gel electrophoresis, expressions of a few striatal proteins (such as KIAA0193 homolog, GOS-28, gammacrystallin A, malate dehydrogenase and phosphoglycerate mutase isozyme B (PGAM-B) in AMPH-treated mice were altered. Note that malate dehydrogenase and PGAM-B are two enzymes involved in energy metabolism and ATP generation. Interestingly, the former was increased and while the latter was decreased in AMPH-treated mice. Collectively AMPH may affect the energy metabolism in neuronal cells. These results suggest that the injury induced by long-term AMPH exposure warrants our further concerns and investigation.

# 一、 前言

## (一) 安非他命之探討

### 1. 簡介

藥物濫用以及成癮問題是很久以前就存在的問題，中國在清朝末年就已經有鴉片氾濫。而近年來藥物濫用在台灣有快速蔓延之趨勢，尤其以安非他命類藥物最爲嚴重，已成爲國內治安惡化及社會問題之根源。而青少年使用毒品的比例也越來越高，學生所使用的毒品以安非他命(amphetamine)爲主，其次爲強力膠。

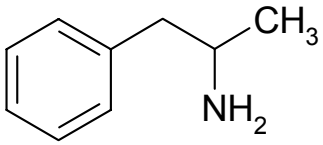
安非他命於 1887 年首先由 Edeleano 合成。1927 年安非他命被發現具有解除鼻黏膜充血之藥理作用，因此在 1932 年一種含有消旋安非他命(dl-amphetamine)用來解除鼻黏膜充血治療鼻塞的藥品 Benzedrine 問市。同時期安非他命具有神經刺激性之作用被發現，屬中樞神經興奮劑，接著安非他命濫用的報告亦首次被發表 (Piness *et al*, 1930)。1937 年安非他命定在美國以新藥核准上市，過去數十年來安非他命被用爲支氣管擴張劑、食慾抑制劑及治療抑鬱症之興奮劑 (Ersner *et al*, 1940)。自從 1930 年代安非他命作爲醫療藥物使用後，首例因安非他命引致精神症於 1938 年被報導，此後陸續有幾篇報導提出。

安非他命濫用造成社會問題始於 1950 年代的日本。於當時二次大戰剛結束，日本經濟蕭條、生活艱苦，因此安非他命以 Philopon 之名上市並廣爲流行。1954 年據說全日本有 150 萬人在使用，於是日本政府下令禁止使用。日籍非法安非他命製造者乃退至南韓、台灣發展。1971 年美國將安非他命列爲二級管制藥物，台灣亦於民國 60 年將之列爲禁藥，民國 79 年 10 月 9 日列爲麻醉藥品管理。

由於安非他命製造容易，獲利高，且安非他命使用後，心情會高昂，會有無窮體力的假象，例如學生考試熬夜或軍人熬夜準備高裝檢，常會想要提升體力，最易被同學或同袍騙去使用，使得安非他命的濫用在台灣十分盛行，造成相當大的社會問題。由於其使用後可能會不知不覺產生習慣性、進而上癮。目前治療抑鬱症之用途已由三環抗憂鬱劑(Tricyclic antidepressants)及單胺氧化酵素抑制劑所取代 (Rehavi *et al*, 1981)。安非他命治療抑鬱症的效果不能與這些藥品相比，因此安非他命在醫療上已是

不太有價值之藥品。雖然有人用來治療肥胖症，但效果則令人懷疑；目前僅能用來治療少數嗜眠症(Narcolepsy)或癲癇症(Epilepsy)患者在使用抗痙攣藥物(Anticonculsants)控制發作時引起之催眠作用(Zarcon V. 1973; Nahmias *et al*, 1989)。

## 2. 安非他命的結構與化學特性




Amphetamine

安非他命的主結構相當簡單，化學構造爲 β-苯乙胺化合物，僅有九個碳和一個氨基，其中包含一個六碳的苯環，分子式爲 $C_9H_{13}N$。純的安非他命(Free base)爲無色或淡黃色之油狀物，具輕微腥味、胺臭，然而實際上常見的安非他命大多以鹽酸鹽或硫酸鹽形成白色、微帶苦味之結晶性粉末。安非他命結晶極易容於水或酒精中，亦可溶於氯仿及二氯二氟化甲烷，但不溶於乙醚。

安非他命之俗名包括: Bennies，Black beauties，Bombitas，crystal，copilot，speed，Ice。國外專利名稱有：Amphedroxyn、Dioxins、Dexoval、Methedrine、Isophen….等。

至於安非他命對於中樞神經興奮作用之強度方面，安非他命之右旋體，較左旋爲強，其強度有 3-4 倍，10-20 倍等不同的報導。其強度依序爲：右旋安非他命＞消旋安非他命＞左旋安非他命。右旋體對中樞神經興奮作用較強，左旋體對心臟血管作用較強。

## 3. 安非他命的藥理作用

安非他命本身以及其衍生物對人類所產生的效應有鎮靜、興奮以至於幻覺等，主要會分爲三種效應：一是警覺作用(Alerting action)，這是一種大腦皮質效應，爲學生、司機、運動員等用來提神，創造良好成績。二是欣快作用(Euphoric action)，這是下視丘愉快中樞效應，爲求快感濫用之原因。最後是食慾抑制作用(Appetite suppression)，此爲下視丘飲食中樞效應，臨床上做爲減肥之用。安非他命能刺激中樞及周邊交感神

經之 α 及 β 感受器，而呈現出神經及心臟血管系統之亢奮作用，其化學結構與多巴胺(Dopamine)、腎上腺素(Epinephrine)極爲相似，同屬於具神經傳導作用之中樞神經興奮劑，但是其真正藥理作用及作用機轉尚未十分清楚(Kuhn *et al*, 1974；Nichols, 1994)。然而其作用在長期停藥後還存在，所以不可能是安非他命或其他代謝物累積所致。目前認爲可能的作用機轉是：1、使神經傳導物質釋放之增加(Glowinaki *et al*, 1965)。2、具有抑制單胺氧化酵素 (monoamine oxidase) 的作用，使神經傳導物質被氧化的機會降低，同時回收亦受到抑制而持續呈現興奮狀態 (Ross *et al*, 1964；Mantle *et al*, 1976)。3、其本身或在體內的代謝物可能具有假性神經傳導物質 (False neurotransmitter)，如 Hydroxynorephedrine 的性質。

## 4. 安非他命之神經化學

研究顯示，安非他命引發的行爲反應有些與中樞神經的兒茶酚胺神經元有關。其中的動向性(locomotion)及刻板性(stereotypy)行爲，甚至報償性(reward)行爲被認爲與多巴胺的神經訊息傳遞活性有密切的關連(Creese & Iversen, 1974；Kelly, 1975；Sessions *et al.*, 1980)。安非他命之所以導致多巴胺(或其他兒茶酚胺)訊息傳遞量增加主要是因它與多巴胺轉運子、小泡、粒線體上的單胺類氧化酵素間交互作用所引起。

安非他命最初被認爲抑制了兒茶酚胺的回收，然而之後的學者認爲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；Raiteri *et al.*, 1975)。在之後的實驗也顯示，安非他命促使多巴胺釋放的方式與胞吐作用不同，它的釋放可被多巴胺轉運子抑制劑阻斷(Raiteri *et al.*, 1979)、而且不受鈣離子的影響(Meyerhoff & Kant, 1978)、同時也不受多巴胺自調性接受器活性的影響(Kamal *et al.*, 1981)。所以有人提出"交換擴散"(exchange diffusion)模式來說明安非他命促使多巴胺釋放的機轉(Raiteri *et al.*, 1979)。

## 5. 安非他命之神經毒性

在實驗動的研究中，發現安非他命的神經毒性對於紋狀體而言可以降低多巴胺的

含量(Wagner *et al.*, 1979)，抑制酪胺酸氫氧化酵素的活性(Koda and Gibb, 1973)；減少多巴胺轉運子的數目(Wagner *et al.*, 1980)。這一些現象被認爲與多巴胺神經末稍的退化有關(Ellison *et al.*, 1978)。目前安非他命及其類似物所引發的神經毒性機轉假說很多，大約可將之分爲興奮毒性(excitotoxicity)、氧化壓力(oxidative stress)、內生性多巴胺以及能量損傷(energy impairment)等機轉。另一方面，神經退化一般指據功能性的神經徑路受到損傷，而導致相關神經傳遞物質系統與型態組織改變。期間較常被發現參與的因子有能量代謝的傷害、自由基引發的氧化壓力及麩胺酸與其致效劑所引發之興奮性(Lees, 1993)。

## (二) $A_{2A}$-R 與 AC5

腺苷酸在許多組織中，調控多種生理功能。目前共有四種腺苷酸受體 ($A_1$，$A_{2A}$，$A_{2B}$ 及 $A_3$) 被發現。在中樞神經系統中，$A_{2A}$ 腺苷酸受體亞型 ($A_{2A}$ -R)大量表現於紋狀體(striatum)。$A_{2A}$ 腺苷酸受體($A_{2A}$-R)屬於 G 蛋白質受體家族，在紋狀體主要透過"腺苷酸環化脢第五亞型"(adenylyl cyclase type V, AC5)傳遞 cAMP 訊號。以神經細胞及疾病小鼠模型進行研究，我們實驗室過去曾發現 $A_{2A}$-R 對神經細胞凋亡及神經退化疾病具有療效 (Huang *et al.*, 2001; Cheng *et al.*, 2002)。由於 $A_{2A}$ –R 與多巴胺受體 D2 亞型(D2-R)共存於腦內嗎啡紋狀體,而 D2-R 是安非他命在紋狀體主要影響的蛋白質之一，$A_{2A}$-R 及 AC5 亦極可能在安非他命的作用中受到調控，或扮演重要角色。

## (三) 細胞凋亡

細胞凋亡(apoptosis)是生物用來去除多餘或缺陷的細胞，以使個體能發揮最佳功能的機制。Apoptosis 在希臘文是描述樹葉從枝頭掉落的狀態。細胞凋亡首先被 Kerr, Wyllie 和 Currie 在 1972 年用來描述一種過程被嚴密控制的細胞死亡機制。細胞凋亡對於維持組織和器官內細胞數目的恆定很重要，當細胞接受來自藥物或細胞激素的刺激，將引發細胞內死亡訊息的傳遞，最後會啓動 caspase 系列的蛋白酵素(有 caspase-3、-8…等等)，caspase 活化後主要會切斷細胞內的結構蛋白質，也會破壞參與代謝的酵素

和傳遞訊息的蛋白質，透過分解細胞生存所需要的蛋白質或細胞結構讓細胞死亡(見附錄一)。

## (四)　實驗動機與目的

由於一般人吸食安非他命並不會一次使用很高的劑量，因此我們建立動物模型，在老鼠中施打低劑量、無立即毒性之安非他命(類似於人類使用習慣)進行研究。由於大腦紋狀體是安非他命作用的最主要組織之一，所以我們利用西方點墨法觀察施打低劑量安非他命之老鼠(C57BL6)腦部紋狀體中與訊號傳導有關的 A2A-R、AC5 及與細胞凋亡之相關蛋白質(如：caspase、PARP 等)的表現；進而利用可同時分析大量蛋白質之二維電泳法，觀察施打低劑量安非他命之老鼠(C57BL6)腦部紋狀體中蛋白質的表現是否受到影響

實驗室中已經建構一套關於安非他命劑量與老鼠反應的模型。安非他命在劑量 0, 2, 5, 6 mg/kg 會增加老鼠活動力，但不會立即造成老鼠死亡(見附錄二)，因此選取這些濃度施打約一個星期的安非他命，再取出腦紋狀體組織偵測蛋白質的表現。

# 二、 研究方法或過程

## (一) 儀器與器材

1. 電泳槽
2. 分光光度計(spectrophotometer, Hitachi U320, 日本東京)
3. 高解析度數位式掃描器(UMAX PowerLook 3000)
4. 離心機
5. 洗片機
6. pipetteman
7. pipetteaid
8. IPGphor$^{TM}$ Isoelectric Focusing Unit（Amersham Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Sweden）
9. 蛋白質抽乾機(Speed-Vac)

## (二) 材料與藥品

1. 安非他命(Amphetamine, 來自陳老師實驗室)
2. 胰蛋白酶(Trypsin)
3. DryStripe（13cm, pH 3-10, Non Linear）（Amersham Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Sweden）
4. Parafilm
5. 一級抗體
   I. rabbit anti-$A_{2A}$-R (取自陳老師實驗室)
   II. rabbit anti-AC5 (取自陳老師實驗室)
   III. mouse anti-caspase-8 (SANTA CRUZ)
   IV. rabbit anti-PARP (SANTA CRUZ)
   V. goat anti-Actin (SANTA CRUZ)

6. 二級抗體
   I. goat anti-rabbit antibody (Amersham, Buckinghamshire, UK)
   II. goat anti-mouse antibody (Amersham, Buckinghamshire, UK)
   III. goat anti-goat antibody (Amersham, Buckinghamshire, UK)
7. ECL (SuperSignalTM Chemiluminescent)
8. 硝化纖維膜 (PVDF membranes, ImmunobilonTM-P, Millipore Corporation, Bedford, MA, USA)
9. 底片 (Fuji Co., Japan)

## (三) 溶液配方

### 1. IEF lysis buffer（LB）

| | |
|---|---|
| 5M Urea | 15 g |
| 2M Thiourea | 7.6 g |
| 40mM Tris | 0.24 g |
| 65mM DTE | 0.5 g |
| 2％ CHAPS | 1 g |
| 2％ SB 3-10 | 1 g |
| Total volume | 50 ml |

### 2. IEF rehydration buffer（RB）

| | |
|---|---|
| 5M Urea | 21.02 g |
| 2M Thiourea | 7.6 g |
| 4％ CHAPS | 2 g |
| 65 mM DTE | 0.5 g |
| Total volume | 50 ml |

### 3. equilibration buffer

| | |
|---|---|
| 50mM Tris-HCL pH8.8 | 6.7 ml |
| 6M Urea (Mw60.06) | 72.07 g |

| | |
|---|---|
| 30％ Glycerol (100％) | 60 ml |
| 2％ SDS | 4 g |
| Bromophenol blue | A few grains |
| $H_2O$ | to 200 ml |
| Total volume | 200 ml |

### 4. 10% gel（for 2D）

| | |
|---|---|
| $H_2O$ | 40 ml |
| 30 % acrylamide,<br>0.8 % bis-arcrylamide | 33.2 ml |
| 1.5 M Tris(pH 8.8) | 25 ml |
| 10 % SDS | 1 ml |
| 10 % APS | 0.8 ml |
| TEMED | 80 µl |
| Total volume | 100 ml |

### 5. Running buffer

| | |
|---|---|
| Tris-base | 15.15 g |
| Glycine | 68.65 g |
| SDS | 5 g |

加 $H_2O$ 至 5 L，保存在 4℃

### 6. stacking gel

| | |
|---|---|
| $H_2O$ | 10 ml |
| 30 % acrylamide,<br>0.8 % bis-arcrylamide | 2.6 ml |
| 1 M Tris(pH 6.8) | 1.9 ml |
| 10 % SDS | 150 µl |

| | |
|---|---|
| 10 % APS | 150 µl |
| TEMED | 15 µl |
| Total volume | 15 ml |

### 7. 10 % gel（for western blot）

| | |
|---|---|
| $H_2O$ | 15.8 ml |
| 30 % acrylamide, 0.8 % bis-arcrylamide | 13.3 ml |
| 1.5 M Tris(pH 8.8) | 10.0 ml |
| 10 % SDS | 0.4 ml |
| 10 % APS | 0.3 ml |
| TEMED | 30 µl |
| Total volume | 40 ml |

### 8. 10X PBS (phosphate buffered saline)

| | |
|---|---|
| NaCl | 80 g |
| KCl | 2 g |
| $Na_2HPO_4$ | 14.4 g |
| $KH_2PO_4$ | 2.4 g |

### 9. 0.2% PBST: 0.2% Tween 20 in 1X PBS

### 10. 2X Sample buffer

| | |
|---|---|
| $H_2O$ | 6.35 ml |
| 1 M Tris (pH 6.8) | 1.25 ml |
| Glycerol (甘油) | 2 ml |
| SDS | 0.4 g |

β-mercapto-ethanol 0.2 ml

bromophenol-blue 0.1 mg

Total volume 10 ml

保存於 -20℃

**11. Transfer buffer**

10X Stock 10ml

(Tris 5.8 g, Glycine 2.9 g, 加 $H_2O$ 至 100 ml)

20% SDS 185 µl

MeOH 20 ml

加 $H_2O$ 至 100 ml

## (四) 研究方法

### 1. 樣品取得

本實驗樣品取自於八週大的 C57BL6 老鼠，分別施打 0、2、5、6 (ml/kg)的安非他命與生理食鹽水混合液。第一到五天施打安非他命，然後停止施打三天第九天再施打一劑，於第十一天蒐集腦組織。

把收集到的紋狀體組織放入均質機打碎，置於離心機中高速離心(50,000 *g*)三十分鐘，然後收集位於均質溶液中的細胞質以及位於 Pellet 中的細胞膜蛋白質，以進行二維電泳法，另外取部分細胞膜蛋白質進行 $A_{2A}$-R、AC5 之西方點墨法實驗；以及部分細胞質蛋白質，以進行其餘蛋白質之西方點墨法實驗。

### 2. 蛋白質定量

取適量的細胞萃取液，加入去離子水至 800 µl，再加入 200 µl 蛋白質染劑(Bio-Rad protein assay dye reagent)，以分光光度計(spectrophotometer)測量在波長 595 nm 的吸收值，再依據由已知濃度的胎牛血清白蛋白(bovine serum albumin)所訂出之標準曲線，

換算出蛋白質含量。

## 3. 二維電泳法

### I. 蛋白質沉澱（丙酮沉澱）

取適當量的蛋白質樣品，加入冰的丙酮（－20℃）（蛋白質：冰丙酮 = 1：10），放置於－20℃冰箱隔夜。於 4℃離心 10 分鐘（2500 xg），倒去上清液，然後抽乾 pellet，便可進行二維電泳。

### II. 蛋白質裝填（Protein loading）

把乾的蛋白質加入適當的 lysis buffer，在室溫下放 1 小時之後重新定量蛋白質。將定量好的 protein 取適量的濃度，再加入 rehydration buffer 至 250μl，均勻混合後以 14,000 rpm 離心 5 分鐘，取 250μl 之上清液填裝入 IPGphore Strip Holder 中，在放 IPG DryStripe（13 cm, pH 3-10, Non Linear）（Amersham Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Sweden），用礦物油覆蓋之，蓋上蓋子即可進行第一維等焦電泳。

### III. 第一維等焦電泳程式設定

IPGphor$^{TM}$ Isoelectric Focusing Unit（Amersham Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Sweden）設定於 20℃的環境下，給予 30 伏特的低電壓進行再水和（rehydration）14 小時，使 IPG DryStrip 能主動的吸收樣品。在水合完畢，接著設定 500、1000 伏特，分別跑 0.5 和 1 小時，再 gradient 到 8000 伏特之後累積 80,000 伏特小時，讓蛋白質跑到等電點（isoelectric point）位置，結束第一維電泳。將已跑完第一維電泳的 IPG DryStrip 用二次水輕輕沖洗，接著以 parafilm 封好，儲存於－70℃冰箱，或者直接進行第二維電泳。

### IV. 平衡

將跑完第一維電泳的 IPG DryStrip 泡在平衡溶液 I（equilibration buffer I, 含 64.8μl 1M DTT/1ml equilibration buffer ）中進行雙硫鍵還原作用 20 分鐘，之後再將 IPG DryStrip

泡在平衡溶液 II（equilibration buffer II, 含 25mg IAA/1ml equilibration buffer）中作用 20 分鐘，即完成平衡。平衡後利用 SDS-polyacrylamide 膠體電泳法來進行二維電泳。

V. 第二維 SDS-PAGE 電泳(SDS-polyacrylamide 膠體電泳法)

將平衡好之 IPG DryStrip 平行放入 10% SDS-polyacrylamide 膠體的孔洞（well）中，並在上面裝填一層 0.5% agarose（配製於含有極微量的 bromophenol blue 的 running buffer 中），使 IPG DryStrip 和 SDS-PAGE 之間緊密接合，接著用 200 伏特的電壓將蛋白質依分子量的不同來進行分哩，電泳時間約 4.5 小時，然後將膠片用 Fast Stain 染色法分析。

## 4. 質譜儀分析

I. 挖取膠點（spot picking）及退染(spot destaining)

用 70%酒精清洗過的剪刀將 100µl 或 200µl 之 tip 尖端剪成直徑約 1mm~2mm 大小，直接挖取膠片上的膠點，將膠點泡於 200µl 50% Acetoitrile（ACN, 配製於 25mM 之 $NH_4HCO_3$, pH8.0），輕拍並放置十分鐘，然後吸掉 ACN，重複 2~3 次；接著用 100% ACN 將膠點脫水，置於室溫五分鐘後移除 100% ACN，用蛋白質抽乾機(Speed-Vac)將膠體抽乾，約 30 分鐘。

II. 膠體內分解 peptide 片段(In-gel digestion)

爲了得到膠體中的peptide片段，利用Trypsin蛋白酶水解膠體。用5~10µl的Trypsin（10µg/ml，配製於 25mM $NH_4HCO_3$, pH8.0）處理退染後且抽乾的膠體，置於室溫約十分鐘，然後放置在 37℃的培養箱中約 16~24 小時，以充分進行膠內分解 peptide 片段的作用。接著先將與膠體作用的 trypsin 溶液收集到一新的 eppendorf。再用含有 50% CAN 和 5% formic acid 的溶液 5µl 再次萃取，靜置於室溫三十分鐘至一小時後，收集萃取後的溶液，此步驟進行兩次。之後將所有收集到的萃取物（約 25µl）用 Speed-Vac 抽乾，約三至四個小時。此樣品委託中研院生醫所公用儀器室進行質譜儀分

析(Peptide Mass Fingerprinting Analysis)。

## 5. 蛋白質資料庫比對

### I. 影像處理

將銀染出來的膠片利用 GS 710 掃描器(BioRad) 掃描圖檔後，以 Quality 1 軟體進行影像強化。強化後之圖檔利用 Melanie 3 軟體偵測圖檔中蛋白質的影像，影像中一個點即代表一種蛋白質。首先先以肉眼觀察這些圖檔影像在不同處理之下都有表現的蛋白質的點，然後以這些點當作座標（landmarks）以進行比對工作。

### II. 資料處理

這些出現的資料會包括蛋白質的身分號碼 (ID number)、等電點 (isoelectric point, PI)、分子量 (molecular weight, MW) 以及體積百分比值 ( % Vol ; % Vol = % 吸光值 × % 面積)，我們利用此% Vol 值觀察蛋白質表現的變化。

首先將不同處理之下所產生的不同蛋白質和肌蛋白 (actin)表現量相除，以得知這些蛋白質和肌蛋白之間表現的差異倍數，接著再將不同處理之間，相同蛋白質的差異倍數再對除，求得在不同的處理之下，兩種相同蛋白質表現的倍數。

### III. 資料庫比對

在不同處理之下相同蛋白質的倍數差異越大，就表示此蛋白質的表現改變越大。將不同處理之下之相同蛋白質 (即 pairs) 的等電點值以及分子量利用瑞士 SWISS-PROT 網站中的 TagIdent 工具，分別輸入等電點值 ( ± 0.1)、分子量 ( ± 10% )，隨後在種族種類中輸入 RODENT，進行資料庫比對而找出可能的蛋白質種類。

## 6. 西方點墨法

取定量的蛋白質樣品，取 50 μg，加入 1 X sample buffer 20 μl，均勻混合後，置於 100℃水浴煮沸五分鐘使蛋白質變性(denature)。

將處理好的樣品以電泳(SDS-PAGE, Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis)的方式依照不同的分子量大小分離。之後用 3-4 mA/cm$^2$ 的電流持續通電 90 分鐘，將蛋白質樣品由 acrylamide gel 轉漬到硝化纖維膜(PVDF membrane, ImmunobilonTM-P, Millipore Corporation, Bedford, MA, USA)上。PVDF membrane 須先浸漬於含有 5%脫脂奶粉(skim milk)的 0.2% PBST 中，在室溫下進行一小時的 blocking 反應，以減少非專一性的鍵結。接著將 PVDF membranes 放入一級抗體溶液(primary antibody solution 包含：稀釋至適當倍率的一級抗體，0.2%sodium azide 及 5%脫脂奶粉的 0.2% PBST)中置於 4℃搖晃 12-16 小時。從一級抗體溶液中取出 PVDF membranes，以 0.2% PBST 充分清洗未鍵結之一級抗體。然後放入的二級抗體溶液中(secondary antibody, horseradish peroxidase-conjugatd goat anti-goat antibody 稀釋兩千倍，溶於 0.2% PBST 中；或 horseradish peroxidase-conjugatd goat anti-mouse antibody、horseradish peroxidase-conjugatd goat anti-rabbit antibody 稀釋三千倍，溶於 0.2% PBST 中)，於室溫下反應一個半小時以標記一級抗體。再用 0.2% PBST 充分清洗。便利用化學冷光系統(enhanced chemoluminscence, ECL system, SuperSignal$^{TM}$ Chemiluminescent)於室溫下反應 3 分鐘，再用 X 光感光底片(Fuji Co., Japan))進行壓片及沖片，偵測蛋白質所在位置。

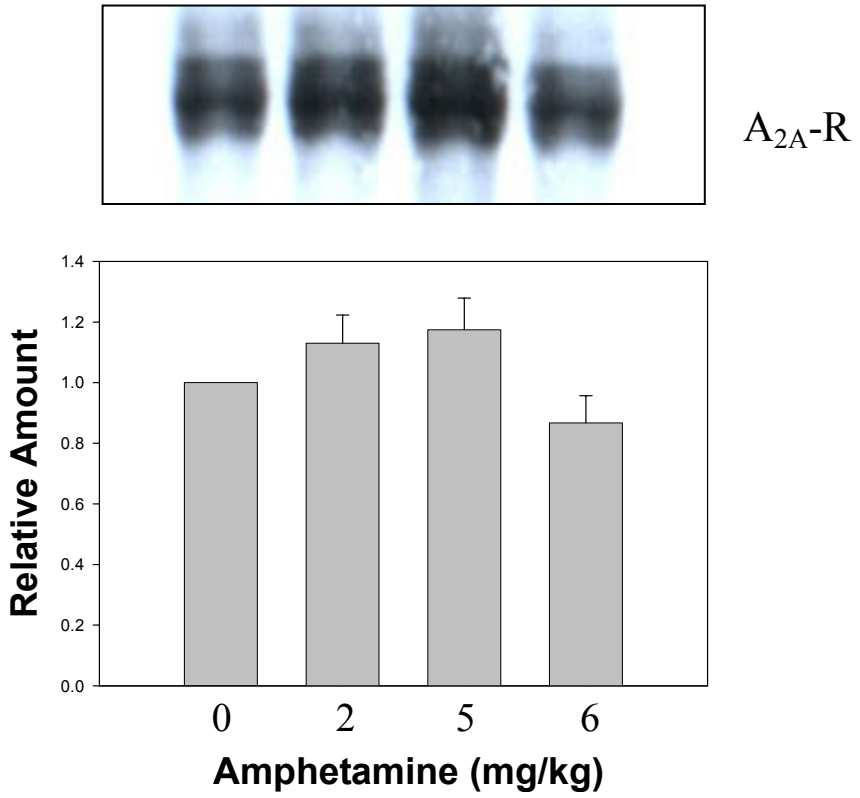
# 三、 研究結果與討論

## (一) Western blot 實驗一：訊號傳導相關蛋白質

此實驗總共分爲四組取濃度分別爲 0, 2, 5, 6 mg/kg 的老鼠之腦部紋狀體組織的細胞膜利用西方點墨法進行實驗。

### 1. $A_{2A}$-R

本次實驗主要觀察施打不同濃度的安非他命的老鼠，腦部紋狀體中 $A_{2A}$-R 的表現。

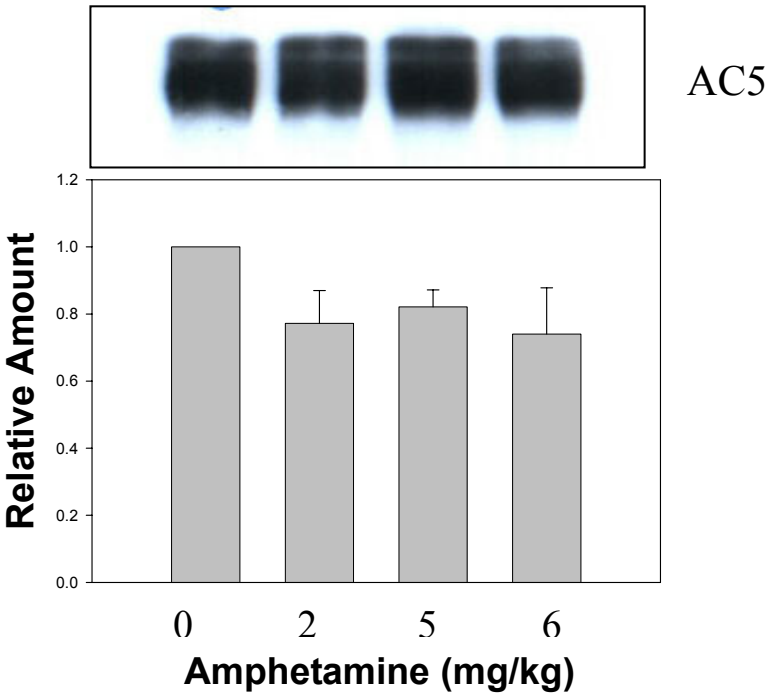



圖一：**經西方點墨法定量之紋狀體 $A_{2A}$-R 蛋白質在安非他命處理老鼠中無明顯改變。**上圖為西方點墨法所偵測之 $A_{2A}$-R 蛋白質；下圖為三次實驗平均數值之相對柱狀圖，以 control 組 (無打藥) 為一。

由圖一可以看出 $A_{2A}$-R 蛋白質的量在濃度 6 mg/kg 時多少有一點影響，但是差異皆不大。所以可以知道在 0-6 mg/kg 的濃度下 $A_{2A}$-R 蛋白質的表現並無明顯差異。

**2. AC5**

主要觀察施打不同濃度的安非他命的老鼠，腦部紋狀體中 AC5 的表現。




**圖二：經西方點墨法定量之紋狀體 AC5 蛋白質在安非他命處理老鼠中無明顯改變。**上圖為西方點墨法所偵測之 AC5 蛋白質；下圖為三次實驗平均數值之相對柱狀圖，以 control 組 (無打藥) 為一。

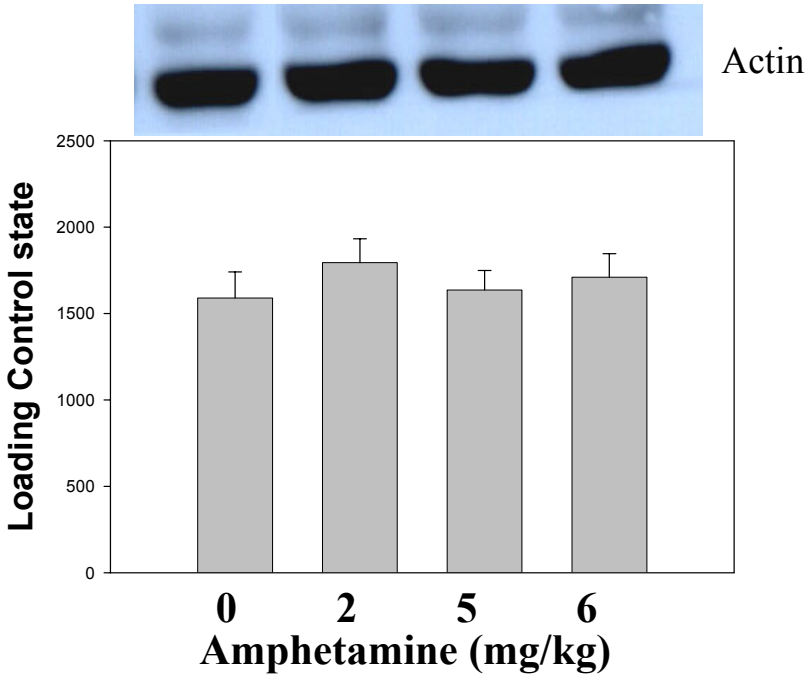
由圖二可以看出，AC5 的量在有施打安非他命時比對照組略爲降低。不過差異不甚明顯，因此在這個濃度範圍內，AC5 的量也不會有太大差異。

## (二) Western blot 實驗二：細胞凋亡相關蛋白質

本次實驗亦是分爲四組，分別取濃度爲 0, 2, 5, 6 mg/kg 的老鼠之腦部紋狀體組織內的細胞質利用西方點墨法進行實驗。

### 1. Actin

Actin 是量極爲固定的蛋白質，用來作爲對照組，以確定跑電泳時蛋白質的量是否固定或有無其他影響實驗的因素。



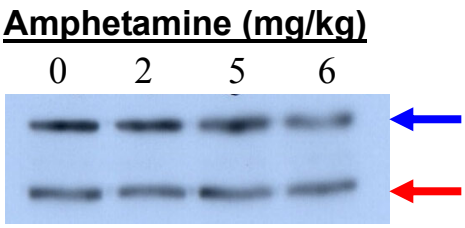

**圖三：經西方點墨法定量之紋狀體內 Actin 蛋白質在安非他命處理老鼠中無改變。上圖為西方點墨法所偵測之 Actin 蛋白質；下圖為兩次實驗平均數值之柱狀圖。**

由圖三可以看出於不同濃度之安非他命下，Actin 的量並無明顯差異。表示此實驗所跑的蛋白質的量皆固定，亦無其他因素影響蛋白質量。因此以下的蛋白質變化應爲安非他命造成的影響。

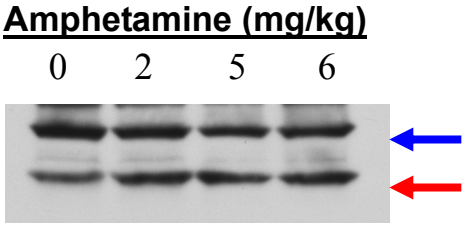
## 2. caspase-8

此實驗主要觀察施打不同濃度的安非他命的老鼠，腦部紋狀體中 caspase-8 的表現。

a.




b.




圖四 a：**經西方點墨法定量之紋狀體內 caspase-8 蛋白質，在較高濃度安非他命處理下有減少。**圖四 a 為西方點墨法所偵測之 caspase-8 蛋白質，藍色箭頭所標示的為 caspase-8 的位置，紅色箭頭則為 caspase-8 之水解蛋白質產物。

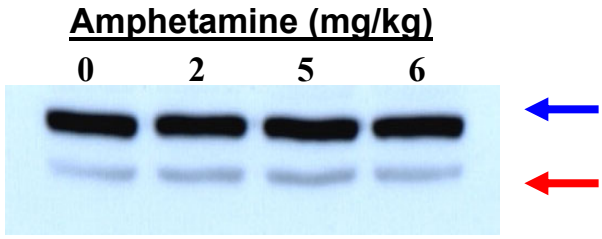
圖四 b：**第二次重複之紋狀體內 caspase-8 蛋白質的表現並無差異。**圖四 b 為西方點墨法所偵測之 caspase-8 蛋白質，為兩次實驗的代表照片，藍色箭頭所標示的為 caspase-8 的位置，紅色箭頭則為 caspase-8 之水解蛋白質產物。

由圖四 a 可以看到，當安非他命濃度到 6 mg/kg 時，caspase-8 的蛋白質及其水解產物略有下降。但是在寒假重複實驗中發現 caspase-8 在 0-6mg/kg 的濃度中皆無明顯變化。經討論後認爲兩次實驗以第二次的較爲可信(因爲有兩次實驗重複)，而第一次實驗應該是一開始跑電泳時量沒有取好。所以安非他命在此濃度範圍下，不會影響 caspase-8 的蛋白質的表現。

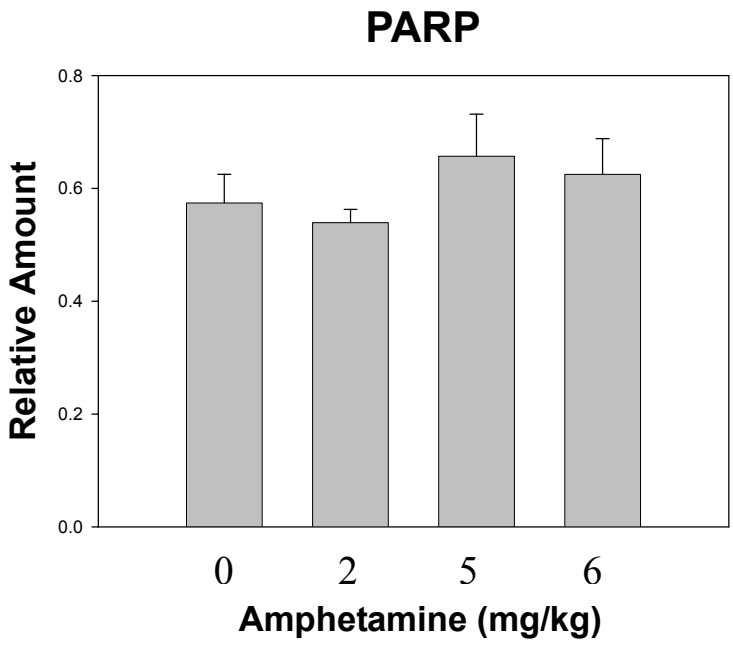
### 3. PARP

此實驗主要觀察施打不同濃度的安非他命的老鼠，腦部紋狀體中 PARP 的表現。PARP 與實驗一之 $A_{2A}$-R、AC5 蛋白質一樣是屬於訊號傳導的蛋白質，它會影響到細胞內的訊號傳導，而間接影響細胞凋亡機制的運作，亦是 caspase 家族中的一員。

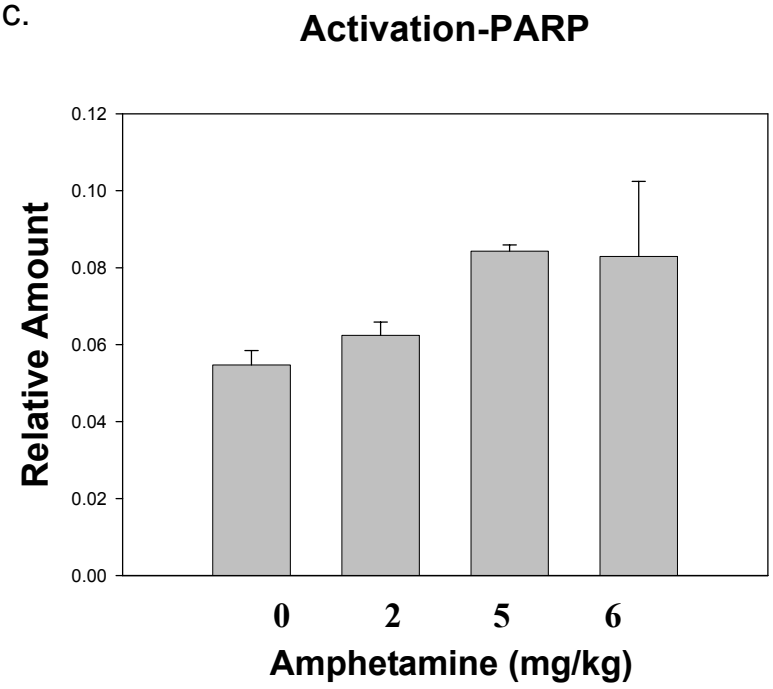
a.




b.



c.




圖五：**經西方點墨法定量之紋狀體內 PARP 蛋白質，在較高濃度安非他命處理下 PARP 蛋白質與其水解蛋白質產物並無太大改變。**圖 **a.**為西方點墨法所偵測之 PARP 蛋白質，藍色箭頭所標示的為 PARP 的位置，紅色箭頭則為 PARP 之水解蛋白質產物。圖 b.為以 PARP 平均量值除以 Actin 平均量值所得之數據。圖 c.為以 PARP 之水解蛋白質產物平均量值除以 Actin 平均量值所得之數據。

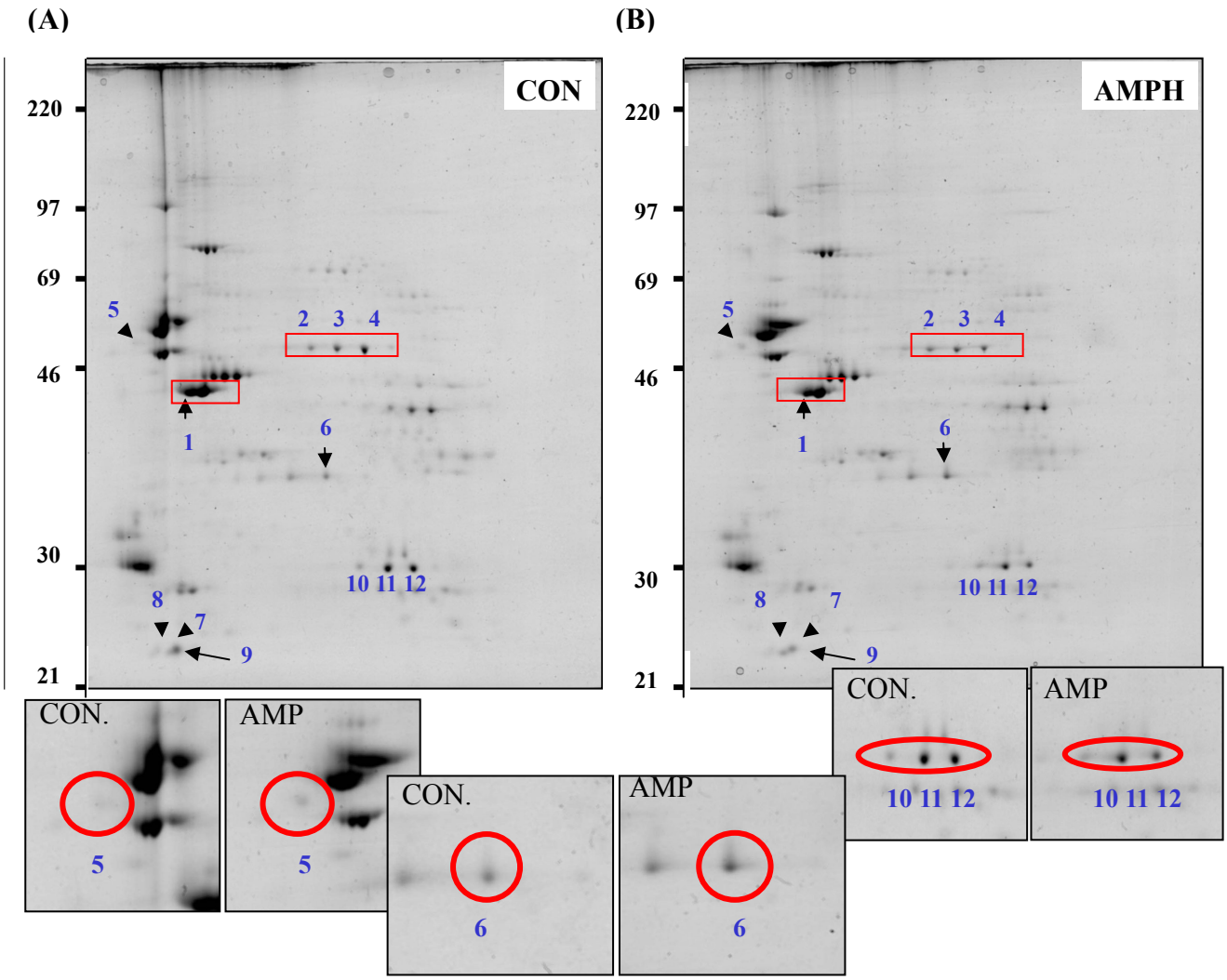
由圖五可以看出當安非他命濃度較高(5 mg/kg)時，PARP 的水解蛋白質產物表現量有上升的趨勢，但誤差值大，趨勢也不是很明顯。因此推測在此濃度範圍的安非他命處理下，不會造成 PARP 明顯的改變。

根據以上兩個 Western blot 實驗結果可發現，大部分紋狀體內的負責訊號傳導($A_{2A}$-R、AC5)及細胞凋亡(caspase-8、PARP)重要蛋白質都無明顯改變，也就是在我所使用的濃度以及處理的時間下，安非他命不會影響這些蛋白質。由於 Western blot 一次只能看一兩種蛋白質，而大部分的蛋白質又沒太大改變。因此，我們決定利用二維電泳法繼續深入探討，因爲此實驗方法可以一次搜尋多種蛋白質，比較容易看出哪些蛋白質發生改變。

## (三) 二維電泳實驗結果

### 1. 細胞質(cytosol)

此實驗是取兩組不同濃度的小鼠之腦部紋狀體組織的細胞質，利用二維電泳法進行實驗，觀察蛋白質的表現。一組爲 control，施打生理食鹽水；另一組爲施打 AMPH 濃度 6 mg/kg 的小鼠。




圖六：**利用二維電泳法觀察安非他命的處理對紋狀體內細胞質蛋白質表現的影響。**本實驗總共進行了三次，所分析的蛋白質量分別為 170μg、200μg、300μg。本圖以蛋白質量為 170μg 的實驗作為代表。上圖左為 control 組經二維電泳法的蛋白質表現；右為施打 AMPH (6mg/kg)組經二為電泳法的蛋白質表現。下三圖為上圖的局部放大。

表一：**圖一部分蛋白質經 mass 處理以及資料庫比對，找出的可能蛋白質；並經影像處理定量比較。**

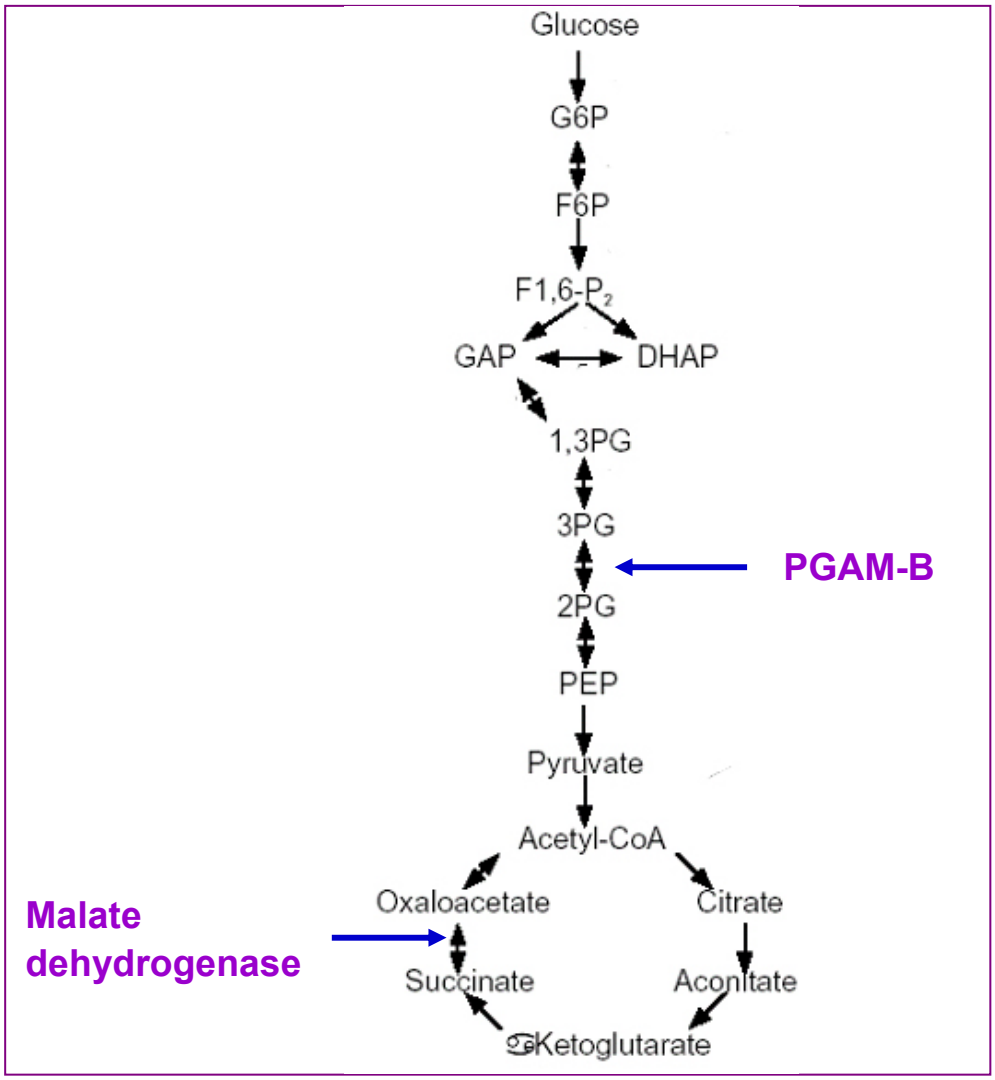
| NO. | Mw (kDa) | Protein | (AMPH-CON)/CON*100 (%) | |
|---|---|---|---|---|
| 1 | 41 | gamma-actin | 0 | - |
| 2 | 47 | Non-neural enolase (NNE) (Enolase 1) | 20 | ↑ |
| 3 | 47 | Non-neural enolase (NNE) (Enolase 1) | -25 | ↓ |
| 4 | 47 | Non-neural enolase (NNE) (Enolase 1) | -19 | ↓ |
| 5 | 46 | Protein KIAA0193 homolog | 356 | ↑ |
| 6 | 36 | Malate dehydrogenase, cytoplasmic | 60 | ↑ |
| 7 | 28 | 28 kDa cis-Golgi SNARE p28 (GOS-28) | — | 在 CON 出現 |
| 8 | 22 | Thiol-specific antioxidant protein (TSA) | 102 | ↑ |
| 9 | 21 | Gamma crystallin A | — | 在 AMPH 出現 |
| 10 | 29 | Phosphoglycerate mutase isozyme B (PGAM-B) | -7 | ↓ |
| 11 | 29 | Phosphoglycerate mutase isozyme B (PGAM-B) | -29 | ↓ |
| 12 | 29 | Phosphoglycerate mutase isozyme B (PGAM-B) | -24 | ↓ |

本實驗總共進行了三次，每次 loading 的量分別爲 170μg、200μg、300μg。分別挖取有趣的點拿去做 mass 處理，而 300μg 有點過量，所以只用來做質譜分析(見附錄三)，Image 定量的數據則由 170μg 和 200μg 兩次實驗做出。由圖一可看出，大部分的蛋白質在 AMPH 處理下，經二維電泳法看不出明顯差異。但還是有少許蛋白質，在經過 AMPH 處理下看到些微但顯著的差別。表一爲經質譜分析和資料庫比對後確認且經影像處理定量後具變化的幾個蛋白質之總整理。其中 KIAA0193 homolog 變化最爲顯著，但其蛋白質的功能並不清楚；GOS-28 和 gammacrystallin A 一個在 CON 出現，一個則在施打 AMPH 時出現，前者爲高基氏體和內質網間的一蛋白質，後者則是眼睛水晶體內的一重要蛋白質，然而此二者在腦內紋狀體的功能皆不清楚，在此不多做討論。

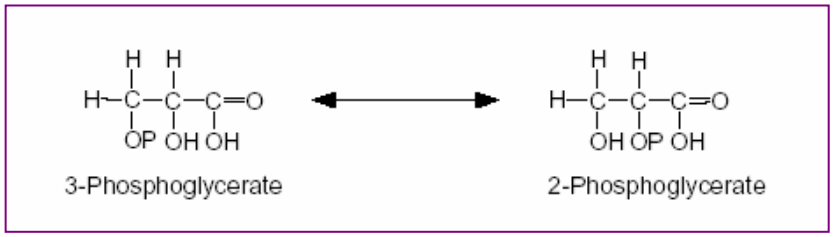
此外，最感興趣的是 malate dehydrogenase 和 PGAM-B 兩個蛋白質，前者在安非他命處理下會增加，而後者則會減少，這兩個蛋白質都與代謝和產生 ATP 有關(見圖七)。其中 PGAM-B 是糖解作用中，3PG 到 2PG 中的一個重要蛋白質(見圖八)，這個蛋白質分布很廣，只要需要很多能量的細胞中都能發現大量 PGAM-B(Ikemoto & Ueda,

2003)。而去年亦有學者利用其他實驗發法證實在短期處理高劑量甲基安非他命的情況下，PGAM-B 會減少而其他與 ATP 有關的蛋白質也會發生改變(Xie *et. al*, 2002)。也有研究證實施打安非他命會造成 ATP 量的改變(Huang *et. al*, 1997)。因此，處理安非他命，會影響到能量的代謝，且長時間低劑量的安非他命也能產生與施打短時間高劑量的安非他命相同的影響。

Malate dehydrogenase 則是在檸檬酸循環(citric acid cycle, TCA cycle)中一個重要的蛋白質，它在細胞質中主要是將 L-malate 轉變成 oxaloacetate 和高能物質(NADH)(見圖九)，讓 oxaloacetate 離開粒線體(mitochondria)。它在施打安非他命之後有增加的現象，推測神經細胞被安非他命影響能量的代謝後所做的調節，讓神經細胞能維持一定的能量。




圖七：**糖解作用能量代謝圖**




圖八：**PGAM-B 的作用**

**Malate dehydrogenase**

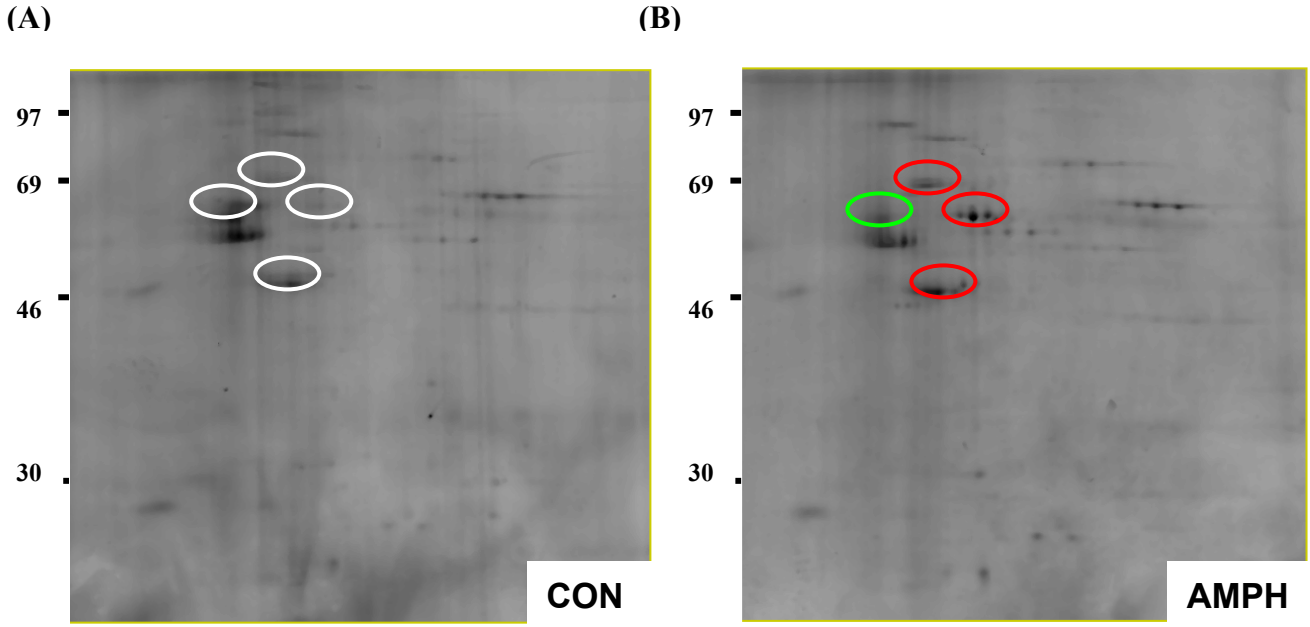
-oxaloacetate + NADH ---> malate + $NAD^+$ (**mitochondrial**)

-malate + $NAD^+$ ---> oxaloacetate + NADH **(cytosolic)**

圖九：**Malate Dehydrogenase 的作用**

## 2. 粒線體(mitochondria)

此實驗是取兩組不同濃度的小鼠之腦部紋狀體組織的粒線體，利用二維電泳法進行實驗，觀察蛋白質的表現。一組爲 control，施打生理食鹽水；另一組爲施打 AMPH 濃度 6 mg/kg 的小鼠。




圖十：**利用二維電泳法觀察安非他命的處理對紋狀體內粒線體蛋白質表現的影響。**本實驗總共進行了兩次，本圖以蛋白質量為 500μg 的實驗作為代表。在 AMPH 組中，紅色圈代表在安非他命作用下會增加；綠色圈代表下降。

由於之前實驗找出在細胞質裡被安非他命影響的蛋白質中，主要是和能量代謝有關，因此進一步探討和能量代謝有極大關聯的粒線體，看看是否有會受到影響的蛋白質。由圖十可看出其中有不少蛋白質，在長期使用安非他命的情況下有改變。過去曾有研究指出在安非他命短期高劑量處理下，粒線體的活性會受到抑制。此實驗目前僅進行到二維電泳法階段，將會進一步用質譜分析其有改變的蛋白質。

# 四、 結論與應用

綜合以上實驗結果，發現在低劑量下(無立即毒性，較類似於人類吸食習慣)，連續打一個星期安非他命老鼠的紋狀體中，無論是細胞膜上的訊號傳導蛋白質($A_{2A}$-R、AC5)，或者關於細胞凋亡的 caspase，大部分都沒有很明顯的增加或減少。但進一步利用二維電泳法則可以看出有一些蛋白質的表現受到影響。

本實驗主要發現了和能量代謝有關的蛋白質發生改變，可推測長期安非他命造成了神經細胞在能量的產生及使用上的改變。在此實驗中，亦發現雖然是低劑量的安非他命，但在長期處理下，會造成和高劑量安非他命相同的傷害。

一般人在吸食安非他命時，並非一下子使用非常高的劑量，同時在吸食安非它命後，大部分的人也不會立即死亡，但是長期吸食安非他命對身體的影響絕對不可以忽略。此外，吸食安非他命也會造成成癮現象，對吸食者的情緒、生理等多種反應也均有重大影響。因此，未來可利用此模型研究安非他命長期吸食所造成的傷害。

再者，經由幾次二爲電泳法實驗，亦發現和能量代謝有很大關係的粒線體內，有蛋白質受到安非他命影響，將繼續分析其蛋白質爲何。另外，安非他命對神經訊號傳導上也有極大的關係，所以取細胞膜部分來進行二維電泳法的實驗，也是未來的目標。實驗室更已開始製作 Malate dehydrogenase 和 PGAM-B 的抗體。未來可用抗體觀察這兩個蛋白質在腦中分布的位置。

# 五、 參考文獻


1. Burrows KB, Gudelsky G, Yamamoto BK (2000) Rapid and transient inhibition of mitochondrial function following methamphetamine or 3,4-methylenedioxy-methamphetamine administration. *Eur. J. Pharmacol.* 398:11-18
2. Cheng H-C, Shih H-M and Chern Y (2002) Essential role of CREB activation by $A_{2A}$ adenosine receptors in rescuing the NGF-induced neurite outgrowth impaired by blockage of the MAPK cascade. *J. Biol. Chem.* 277: 33930- 33942
3. Creese I and Iversen SD (1974) The role of forebrain dopamine systems in amphetamine induced stereotyped behavior in the rat. *Psychopharmacologia(Berl.)* 39: 345-357
4. Ellison G (1978) Long-term changes in dopaminergic innervation of caudate nucleus after continuous amphetamine administration. *Science* 201: 276-278
5. ErSner JS (1940) The treatment of obesity due to dietary indiscretion (overeating) with Benzedrine sulphate. *Endocrinology* 27: 776-780
6. Glowinaki J and Axelrod J (1965) Effects of drugs on the uptake release and metabolism of $^{3}$H-norepinephrine in the rat brain. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 149: 43-49
7. Heikkila RE, Orlansky H, Mytilineous C and Cohen G (1975) Amphetamine:Evaluation of d- and l-isomers as releasing agents and uptake inhibitors for 3H-dopamine and 3H-norepinephrine in slices of rat neostriatum and cerebral cortex. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 193: 47-56
8. Huang N-K, Wan F-J, Tseng C-J and Tung C-S (1997) Nicotinamide attenuates methamphetamine-induced striatal dopamine depletion in rats. *NeuroReport* 8:1883-1885
9. Huang N-K, Lin Y-W, Huang C-L, Messing RO and Chern Y (2001) Activation of protein kinase A and atypical protein kinase C by $A_{2A}$ adenosine receptors antagonizes apoptosis due to serum deprivation in PC12 cells. *J. Biol. Chem.* 276: 13838-13846

10. Ikemoto A and Ueda T (2003) Identification of a nerve ending-enriched 29-kDa protein, labeled with [3-$^{32}$P]1,3-bisphosphoglycerate, as monophosphoglycerate mutase: inhibition by fructose-2, 6-bisphosphate via enhancement of dephosphorylation. *J. Neurochem.* 85: 1382-1393
11. Lees GJ (1993) Inhibition of sodium-potassium ATPase: a potentially ubiquitious mechanism contributing to central nervous system neuropathology. *Brain Res. Rev.* 16: 283-300
12. Kamal L, Aribba S and Langer S (1981) Presynaptic modulation of the release of dopamine from the rabbit caudate nucleus: Differences between electrical stimulation, amphetamine and tyramine. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 216: 592-598
13. Kelly PH, Saviour PW and Iversen SD (1975) Amphetamine and apomorphine responses in the rat following 6-OHDA lesions of the nucleus accumbens septi and coupus striatum. *Brain Res.* 94: 507-522
14. Koda LY and Gibb JW (1973) Adrenal and striatal tyrosine hydroxylase acitivity after methamphetamine. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 185: 42-48
15. Kuhn DM, Appel JB and Greenberg I (1974) An analysis of some discriminative properties of d-amphetamine. *Psychopharmacologia* 39: 57-66
16. Maines MD (1997) The heme oxygenasesystem: a regulator of second messenger gases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 37: 517-554
17. Mantle TJ, Tipton KF and Garrent NJ (1974) Inhibition of monoamine oxidase by amphetamine and related compounds. *Biochem. Pharmacol.* 25: 2073-2077
18. McCoubrey Jr WK, Huang TJ and Maines MD (1997) Isolation and characterization of a cDNA from the rat brain that encodes hemoprotein heme oxygenase-3. *Eur J biochem* 247: 725-732
19. Meyerhoff JL and Kant GJ (1978) Release of endogenous dopamine from crpus striatum. *Life Sci.* 23: 1481-1486
20. Nahmias J and Karetzky MS (1989) Current concepts in narcolepsy. *NJ. Medicine* 86:

617-622

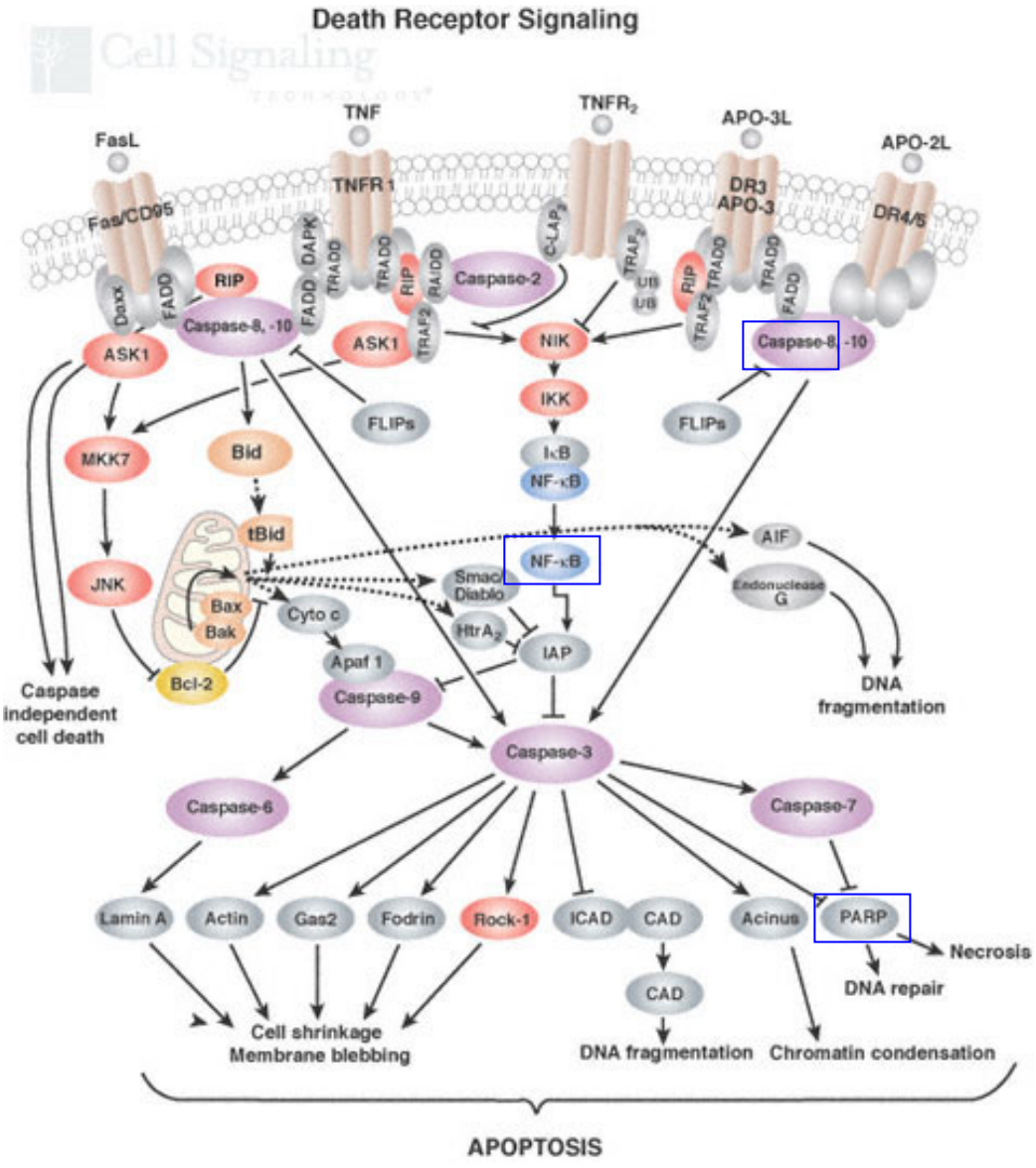
21. Neuzil J and Stocker R (1994) Free and albumin-bound bilirubin are efficient co-antioxidants for alpha-tocopherol, inhibiting plasma andlow desitylipoprotein lipid peroxidation. *J Biol Chem* 269: 16712-16719
22. Nichols DE, Medical chemistry and structure-activity relationships. in:Amphetamine and its analogs: Psychopharmacology, toxicology, and abuse. Edited by Cho AK and Segal DS, New York, Academic press, pp.3-41, 1994
23. Priness G, Miller H and Alles GA (1930) Clinical observations on phenylaminoethanol sulphate. *J. Am. Med. Assoc.* 94: 790-791
24. Raiteri M, Bertollini A, Angelini F and Levi G (1975) d-Amphetamine as a releaser or reuptake inhibitor of biogenic amines in synaptosomes. *Eur. J. Pharmacol.* 34: 189-195
25. Raiteri M, Cerrito F, Cervoni A and Levi G (1979) Dopamine can be released by two mechanisms differentially affected by the dopamine tranaproter inhibitor nomifensine. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 208: 195-202
26. Rehavi M, Skolnick P, Hulihan B and Paul SM (1981) "High affinity" binding of [$^3$H]-desipramine to rat cerebral cortex: relationship to tricyclic antidepressant-induced inhibition of norepinephrine uptake. *Eur. J. Phormacol.* 70: 597-599
27. Ross SB and Renyi AL (1964) Blocking action of sympathomimetic amines on the uptake of tritiated noradrenaline by mouse cerebral cortex tissues in vitro. *Acta. Pharmacol. Toxicol.* 21: 226-239
28. Sessions G, Meyerhoff J, Kant G and Koob GF (1980) Effects of lesions of the ventral medial tegmentum on locomotor activity, biogenic amines and response to amphetamine in rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 12: 603-608
29. Stocker R, Yamamoto Y, Mcdonagh AF, Glazer AN and Ames BN (1987) Bilirubin is an antioxidant of possible physiological importance. *Science* 235:1043-1046
30. Wagner GC, Ricaurte GA, Seiden LS, Schuster CR, Miller JM and Westly J (1980) Long-lasting depletion of striatal dopamine and less of dopamine uptake sites following

the repeated administration of methamphetamine. *Brain Res.* 177: 151-160

31. Wagner GC, Seiden LS and Schuster CR (1979) Methamphetamine induced changes in brain catecholamines in rats and guinea pigs. *Drug Alcohol Dep.* 4: 135-138
32. Xie T, Tong L, Barrett T, Yuan J, Hatzidimitriou G, McCann UD, Becker KG, Donovan DM and Ricaurte GA (2002) Changes in gene expression linked to methamphetaine-induced dopaminergic neurotoxicity. *J. Neurosci.* 22:274-283
33. Zarcon V (1973) Narcolepsy. N. Engl. J. Med. 288:1156-1166

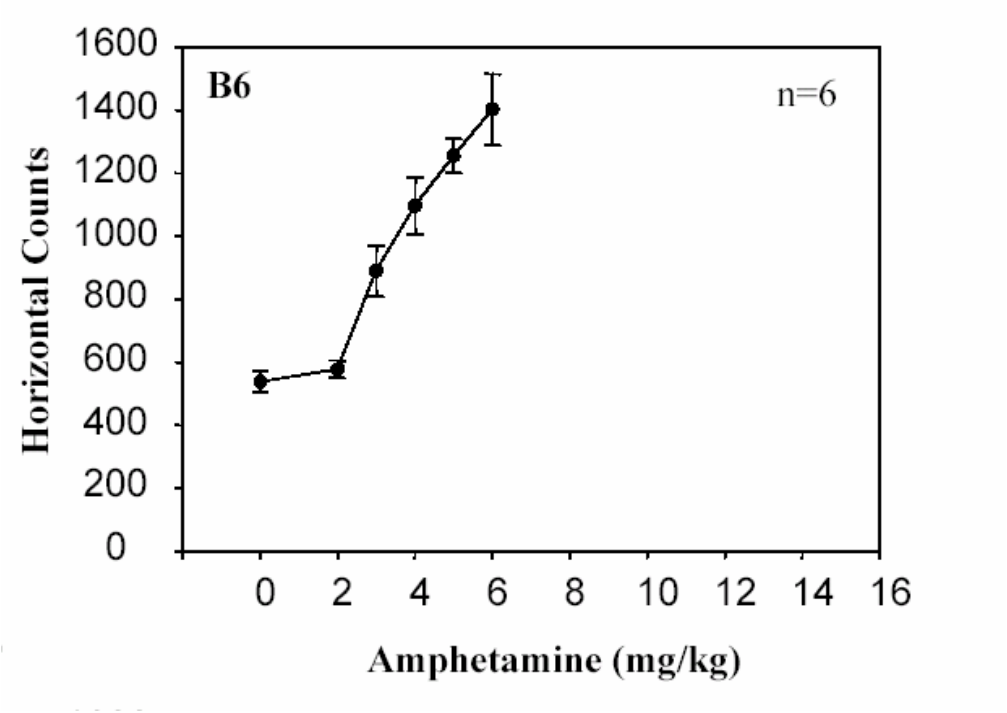
# 六、 附錄

## (一) 附錄一




附錄圖一：**caspase 在細胞中作用的路徑圖。**藍色框框內為我所偵測的 proteins。

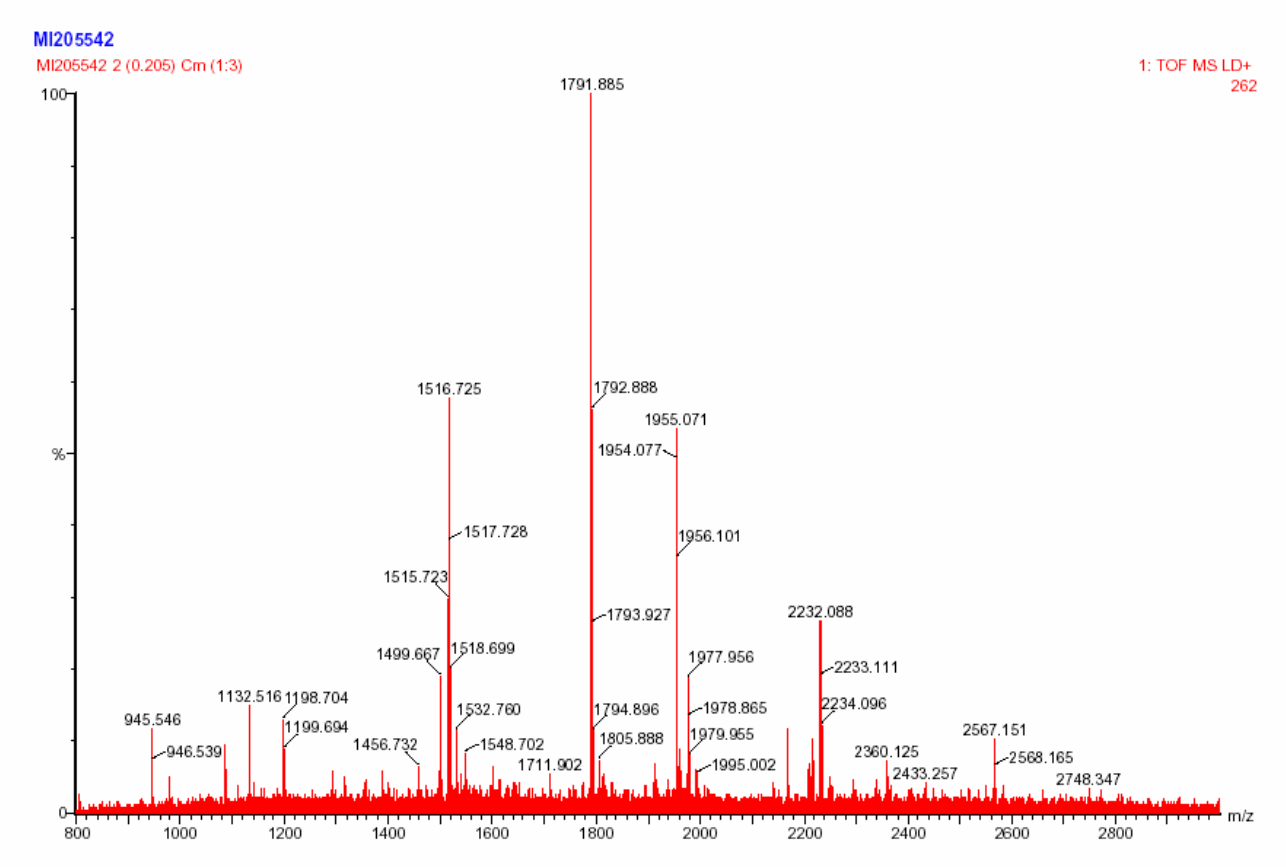
## (二) 附錄二




附錄圖二：**老鼠的水平活動力隨著安非他命的劑量增加而提高。**C57BL6 老鼠在施打不同濃度之安非他命 20 分鐘後，測其水平活動度 10 分鐘之折線圖

由此圖可知老鼠的水平活動力隨著安非他命的劑量增加而提高。而相關實驗也顯出，當濃度高於 6 mg/kg 時水平活動力會突然下降，老鼠會顯得十分虛弱或出現不尋常的動作甚至死亡。

# (三) 附錄三




附錄圖三：**質譜分析圖，橫軸為分子量大小；縱軸為所佔比例。**以 actin 之分析圖為代表。拿所佔比例最多的幾個去資料庫比對，可搜尋到可能之蛋白質資料。

# 評語及建議事項

1. 本代表作爲探討安非他命對小鼠腦部紋狀體內蛋白質的影響，結果顯示對與能量代謝有關的粒線體內蛋白質亦有影響。
2. 本計畫二維電泳法建議使用螢光染色法染蛋白質，較有專一性。
3. 本著作具創見性。