

臺灣二〇〇三年國際科學展覽會

科 別：醫學與健康科學科

作品名稱：安非他命對小鼠中腦紋狀體之細胞凋亡相關蛋白質表現的影響

得獎獎項：儲備代表

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。

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)於短期內是否會對老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、PARP、NF- κ B 及血紅素加氧酶-1(HO-1)]的表現是否有改變。實驗結果顯示，低劑量安非他命處理對大部分蛋白質的表現並沒有明顯的差異，但在施打安非他命老鼠之大腦紋狀體中，HO-1 有些微但明顯的增加，顯示安非他命可能對腦組織產生氧化性傷害。因此長期使用安非他命對中腦紋狀體是否造成傷害是值得關心及繼續探討的課題。

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 mouse striatum after treatment with low and non-toxic dosages of AMPH for a short period (mimicking the common usage pattern of humans). C57BL6 mice were daily IP-injected with various doses of AMPH (0 to 6 mg/kg) for one week. Expression levels of adenosine receptor A_{2A} -R, adenylyl cyclase type 5, caspase-8, PARP, NF- κ B and heme oxygenase-1 (HO-1) in the striatum were analyzed by Western blotting technique. Most proteins examined were not affected by the 1-week AMPH treatment, except HO-1. A slight but significant increase of HO-1 by AMPH treatment indicated that AMPH may cause oxidative damage in brain. These results suggest that the injury induced by long-term AMPH exposure warrants our further concerns and investigation.

壹、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為嚴重，已成為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)為主，其次為強力膠。

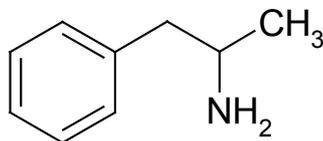
安非他命於 1887 年首先由 **Edeleano** 合成。1927 年安非他命被發現具有解除鼻黏膜充血之藥理作用，因此在 1932 年一種含有消旋安非他命(**dl-amphetamine**)用來解除鼻黏膜充血治療鼻塞的藥品 **Benzedrine** 問市。同時期安非他命具有神經刺激性之作用被發現，屬中樞神經興奮劑，接著安非他命濫用的報告亦首次被發表 (**Piness et al, 1930**)。1937 年安非他命定在美國以新藥核准上市，過去數十年來安非他命被用為支氣管擴張劑、食慾抑制劑及治療抑鬱症之興奮劑 (**Ersner et al, 1940**)。自從 1930 年代安非他命作為醫療藥物使用後，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** 之名上市並廣為流行。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為二級管制藥物，台灣亦於民國 60 年將之列為禁藥，民國 79 年 10 月 9 日列為麻醉藥品管理。

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**)

患者在使用抗癲癇藥物(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，化學構造為 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，分子式為 $C_9H_{13}N$ 。純的安非他命(Free base)為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: Amphetroxyn、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，較左旋為強，其強度有 3-4 倍，10-20 倍等不同的報導。其強度依序為：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，主要會分為三種效應：一是警覺作用(Alerting action)，這是一種大腦皮質效應，為學生、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，為求快感濫用之原因。最後是食慾抑制作用(Appetite suppression)，此為下視丘飲食中樞效應，臨床上做為減肥之用。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)極為相似，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。目前認為可能的作用機轉是：1、使神經傳導物質釋放之增加 (Glowinski *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，安非他命引發的行為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)行為，甚至報償性(reward)行為被認為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。

安非他命最初被認為抑制了兒茶酚胺的回收，然而之後的學者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; 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)。這一些現象被認為與多巴胺神經末梢的退化有關(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，大約可將之分為興奮毒性 (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 (A₁, A_{2A}, A_{2B} 及 A₃) 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”腺苷酸環化酶第五亞型”(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，最後會啟動 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、 血色素加氧酶 (heme oxygenase, HO)

HO 以三種異構酶的形式存在於細胞內(McCoubrey *et al.*, 1997):HO-1 是誘導型(inducible)的血色素加氧酶、HO-2 是持續表現型(constitutive)的血色素加氧酶、HO-3 是一種新發現的異構酶，其胺基酸序列與 HO-2 類似。

本實驗主要是觀察 HO-1 的蛋白質表現量，HO-1 分子量約為 32KD，不僅會被血紅素(heme)誘導而產生，也會被一些其他的物質給誘導出來，包括佛波醇酯(phorbol ester)、紫外線照射、

氧化性壓力、熱刺激、重金屬...等等(Maines, 1997)。

HO-1 在生理上的功能主要是將血紅素轉化為膽綠素(biliverdin)、一氧化碳(CO)以及二價的鐵離子(Fe^{2+})，其中膽綠素會繼續被膽綠素還原酶(biliverdin reductase)還原為膽紅素(bilirubin)(Stocker *et al.*, 1987)。膽紅素可以減少為飽和脂肪酸發生過氧化效應，以避免自由基生成，故具有抗氧化的性質(Neuzil & Stocker, 1994)。因此，HO-1 的生成常被認為是一種細胞受到氧化性傷害的保護機制；換句話說，HO-1 被誘發表示細胞可能受到氧化性的傷害。

五、 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 $\text{A}_{2\text{A}}\text{-R}$ 、AC5、NF- κB 及與細胞凋亡之相關蛋白質(如：caspase、PARP 等)，還有與氧化傷害相關的 HO-1 蛋白質的表現。

由於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 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與訊號傳導及細胞凋亡相關的蛋白質的表現。

貳、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. pipette man
7. pipette aid

二、材料與藥品

1. 安非他命(Amphetamine, 來自陳老師實驗室)
2. 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. mouse anti-NF- κ B (SANTA CRUZ)
 - VI. goat anti-Actin (SANTA CRUZ)
 - VII. rabbit anti-HO-1 (SANTA CRUZ)
3. 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)
4. ECL (SuperSignalTM Chemiluminescent)
5. 硝化纖維膜 (PVDF membranes, ImmobilonTM-P, Millipore Corporation, Bedford,

MA, USA)

6. 底片 (Fuji Co., Japan)

三、 溶液配方

1. stacking gel

H ₂ O	10 ml
30 % acrylamide, 0.8 % bis-acrylamide	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

2. 10 % gel

H ₂ O	15.8 ml
30 % acrylamide, 0.8 % bis-acrylamide	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

3. 10X PBS (phosphate buffered saline)

NaCl	80 g
KCl	2 g
Na ₂ HPO ₄	14.4 g
KH ₂ PO ₄	2.4 g

4. 0.2% PBST: 0.2% Tween 20 in 1X PBS

5. 2X Sample buffer

H ₂ O	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°C

6. Running buffer

Tris	3.03 g
Glycine	13.73 g
20% SDS	5 ml

加 H₂O 至 1 L，保存在 4°C

7. Transfer buffer

10X Stock	10ml
(Tris 5.8 g, Glycine 2.9 g, 加 H ₂ O 至 100 ml)	
20% SDS	185 μ l
MeOH	20 ml

加 H₂O 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 (mg/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 \times g)三十分鐘，然後收集位於 Pellet 中的細胞膜蛋白質，以進行 A_{2A}-R、AC5 之西方點墨法實驗；同時收集位於均質溶液中的細胞質蛋白質，以進行其餘蛋白質之西方點墨法實驗。

2. 西方點墨法

I. 蛋白質定量

取適量的細胞萃取液，加入去離子水至 800 μ l，再加入 200 μ l 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。

II. 西方點墨法

取定量的蛋白質樣品，取 50 μ g，加入 1 X sample buffer 20 μ l，均勻混合後，置於 100°C 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/cm²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)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°C 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)於室溫下反應 3 分鐘，再用 X 光感光底片進行壓片及沖片，偵測蛋白質所在位置。

所有西方點墨法所使用到的一級抗體及其稀釋倍率如下：rabbit anti-A_{2A}-R Ab 1:1000、rabbit anti-AC5 Ab 1:1000、mouse anti-caspase-3 Ab 1:2000、mouse anti-caspase-8 Ab 1:2000、rabbit anti-PARP Ab 1:1000、rabbit anti-BCL-XL Ab 1:1000、mouse anti NF- κ B Ab 1:1000、rabbit anti HO-1 Ab 1:1000、goat anti-Actin Ab 1:2000。

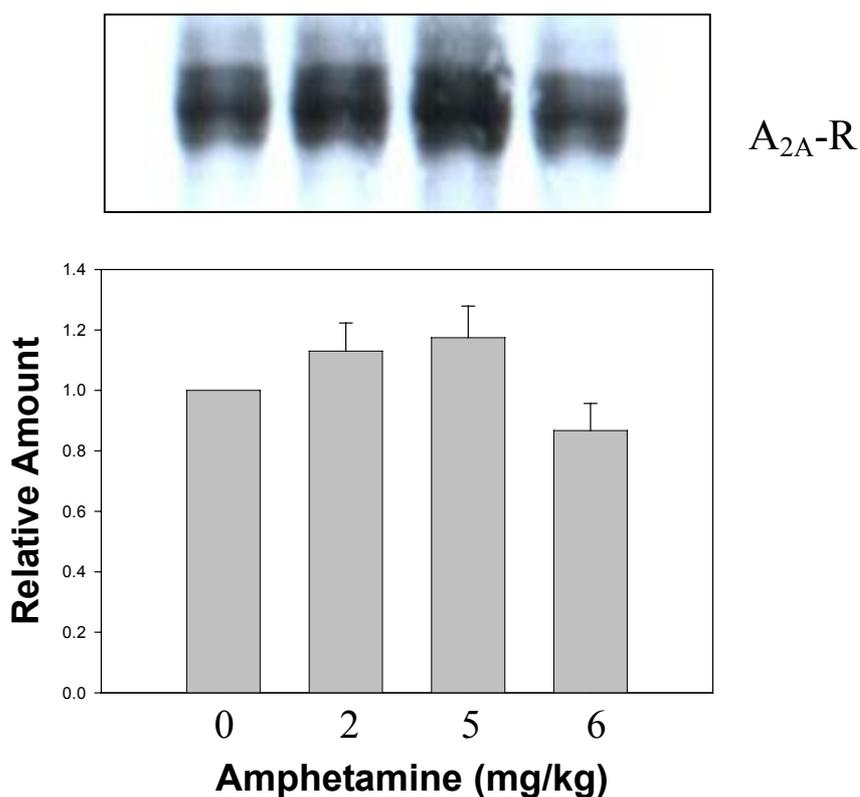
參、研究結果與討論

一、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。

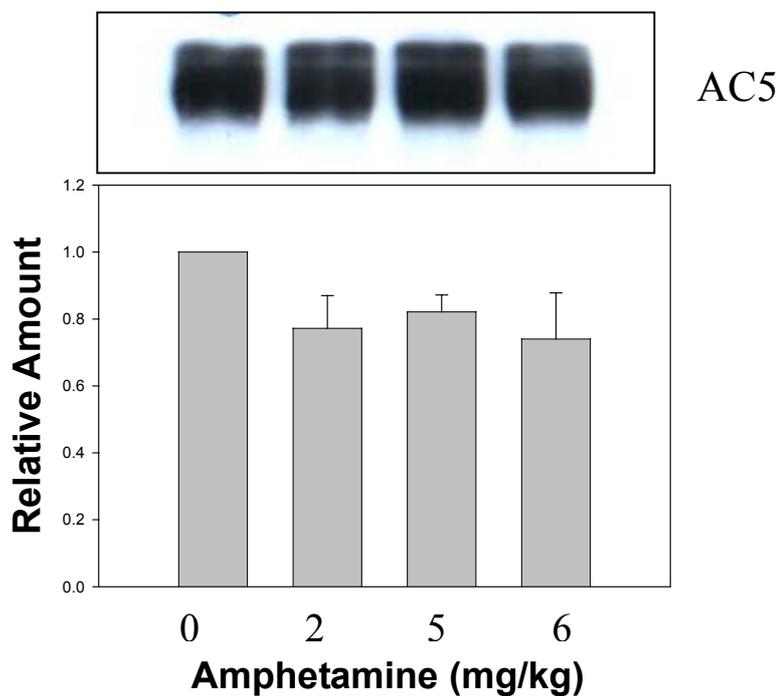


圖一：經西方點墨法定量之紋狀體 A_{2A}-R 蛋白質在安非他命處理老鼠中無明顯改變。上圖為西方點墨法所偵測之 A_{2A}-R 蛋白質；下圖為三次實驗平均數值之相對柱狀圖，以 control 組（無打藥）為 1。

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。

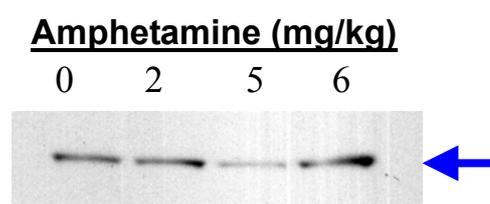


圖二：經西方點墨法定量之紋狀體 AC5 蛋白質在安非他命處理老鼠中無明顯改變。上圖為西方點墨法所偵測之 AC5 蛋白質；下圖為三次實驗平均數值之相對柱狀圖，以 control 組（無打藥）為一。

由圖二可以看出，AC5 的量在有施打安非他命時比對照組略為降低。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。

3. NF- κ B

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 NF- κ B 的表現。NF- κ B 是一種重要的基因轉錄因子(transcription factor)，可傳遞細胞外刺激訊號至核內，它的改變有可能導致細胞凋亡機制的活化。



圖三：經西方點墨法定量之紋狀體內 NF- κ B 蛋白質，在不同濃度安非他命處理下並無顯著差異。左圖藍色箭頭所指為西方點墨法所偵測之 NF- κ B 蛋白質，為兩次實驗之代表照片。

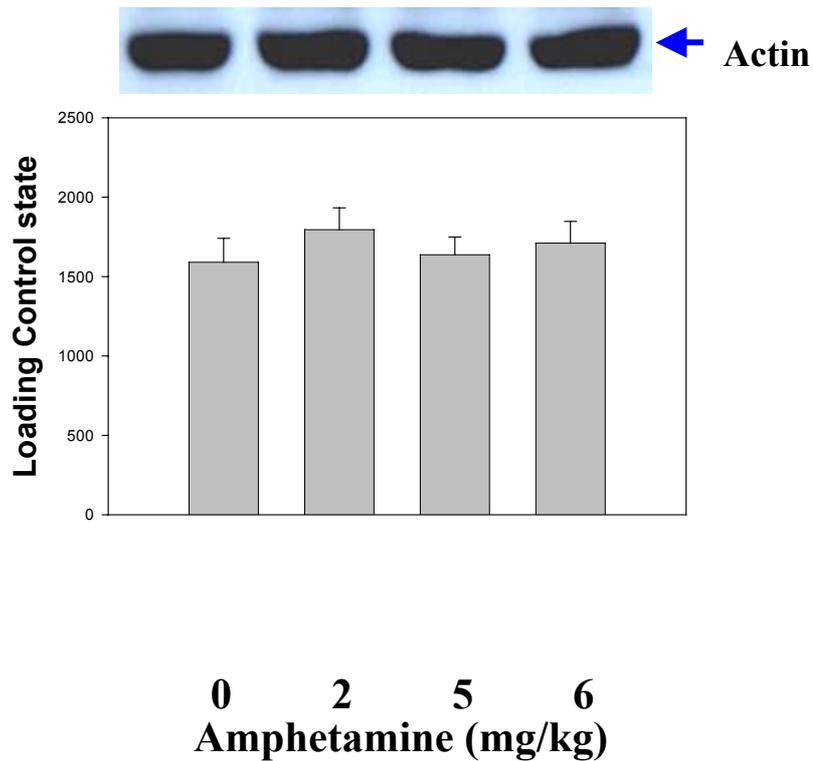
由圖三可以看到，在我所使用的安非他命濃度範圍中，NF- κ B 的表現量除了在 5mg/kg 的濃度下外，並無明顯改變。而在 5mg/kg 下 NF- κ B 的量明顯比較少，推測是在收 sample 的時候造成的誤差，需要在另一批收 sample 以檢驗此次實驗結果。

二、實驗二：細胞凋亡相關蛋白質

本次實驗亦是分為四組，分別取濃度為 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 是量極為固定的蛋白質，用來作為對照組，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。



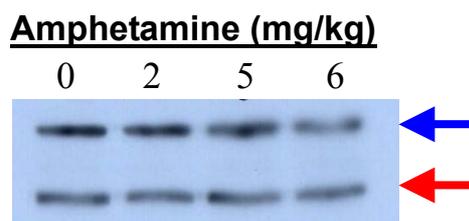
圖四：經西方點墨法定量之紋狀體內 Actin 蛋白質在安非他命處理老鼠中無改變。上圖為西方點墨法所偵測之 Actin 蛋白質；下圖為兩次實驗平均數值之柱狀圖。

由圖四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為安非他命造成的影響。

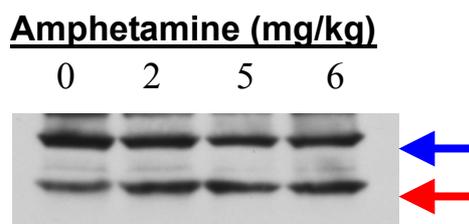
2. caspase-8

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.



圖五 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。

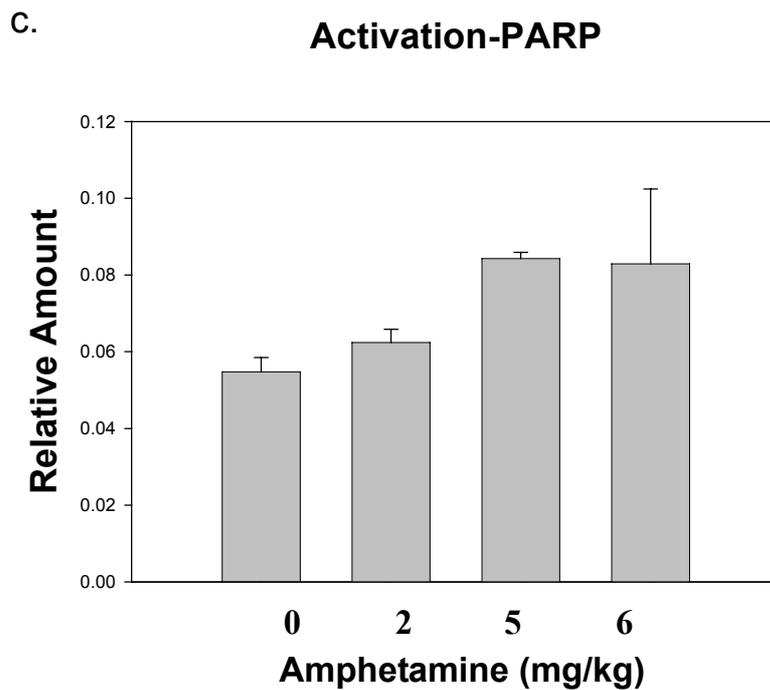
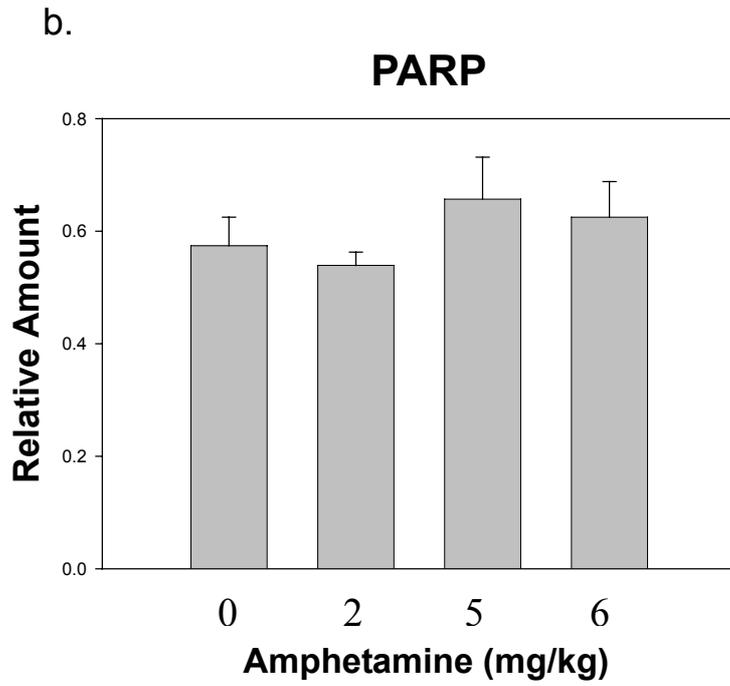
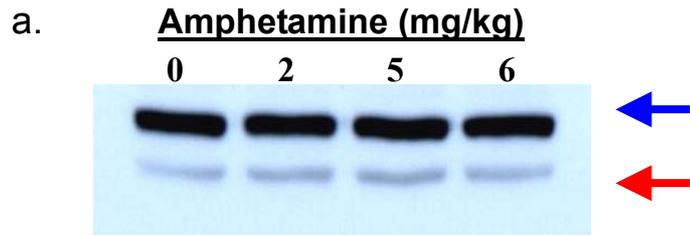
圖五 a 為西方點墨法所偵測之 caspase-8 蛋白質，藍色箭頭所標示的為 caspase-8 的位置，紅色箭頭則為 caspase-8 之水解蛋白質產物。

圖五 b: 第二次重複之紋狀體內 caspase-8 蛋白質的表現並無差異。圖五 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。

由圖五 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。經討論後認為兩次實驗以第二次的較為可信(因為有兩次實驗重複)，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。

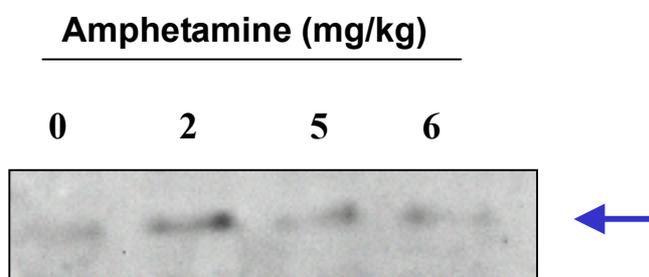


圖六：經西方點墨法定量之紋狀體內 PARP 蛋白質，在較高濃度安非他命處理下 PARP 蛋白質與其水解蛋白質產物並無太大改變。圖 a. 為西方點墨法所偵測之 PARP 蛋白質，藍色箭頭所標示的為 PARP 的位置，紅色箭頭則為 PARP 之水解蛋白質產物。圖 b. 為以 PARP 平均量值除以 Actin 平均量值所得之數據。圖 c. 為以 PARP 之水解蛋白質產物平均量值除以 Actin 平均量值所得之數據。

由圖六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。

三、 實驗三：HO-1

本次實驗亦是分為四組，分別取濃度為 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。HO-1 的誘發可視為細胞受到氧化性的傷害，所以我偵測 HO-1 蛋白質，看看安非他命是否會造成氧化性傷害。



圖七：經西方點墨法偵測之紋狀體內 HO-1 蛋白質，在有處理安非他命下 HO-1 蛋白質被誘發。圖九為西方點墨法所偵測之 HO-1 蛋白質，藍色箭頭所標示的為 HO-1 的位置。

由圖七可以看出當處理安非他命(0-6 mg/kg)時，HO-1 蛋白質有被誘發，表示安非他命可能造成了氧化性傷害。由於此批 sample 處理安非他命的模式是打完最後一劑過兩天才收的，而 HO-1 消失的速度又很快，所以結果不是很明顯。因此改變施打安非他命的模式是往後研究的目標。

根據以上實驗結果，大部分紋狀體內的負責訊號傳導(A2A-R、AC5、NF- κ B)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。而 HO-1 在有施打安非他命的情況下有被活化，表示細胞有受到氧化性傷害，值得進一步研究、探討。

肆、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、NF-κB)，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。然而這些蛋白質的活性是否受到影響則須進一步的驗證。至於與氧化性傷害有關的 HO-1 蛋白質，可看到有少量但明顯的增加，因此吸食安非他命是否會誘引腦組織的氧化性傷害，亦值得進一步探討。

一般人在吸食安非他命時，並非一下子使用非常高的劑量，同時在吸食安非他命後，大部分的人也不會立即死亡，但是長期吸食安非他命會造成成癮現象，對吸食者的情緒、生理等多種反應均有重大影響。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。

伍、參考文獻

1. 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
2. Creese I. & Iversen SD. (1974) The role of forebrain dopamine systems in amphetamine induced stereotyped behavior in the rat. *Psychopharmacologia(Berl.)* 39: 345-357
3. Ellison G. (1978) Long-term changes in dopaminergic innervation of caudate nucleus after continuous amphetamine administration. *Science* 201: 276-278
4. ErSner, J. S. (1940) The treatment of obesity due to dietary indiscretion (overeating) with Benzedrine sulphate. *Endocrinology* 27: 776-780
5. Glowinski J. and Axelrod J. (1965) Effects of drugs on the uptake release and metabolism of ³H-norepinephrine in the rat brain. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 149: 43-49
6. 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
7. 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
8. Lees GJ. (1993) Inhibition of sodium-potassium ATPase: a potentially ubiquitous mechanism contributing to central nervous system neuropathology. *Brain Res. Rev.* 16: 283-300
9. 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
10. Kelly PH., Saviour PW. and Iversen SD. (1975) Amphetamine and apomorphine

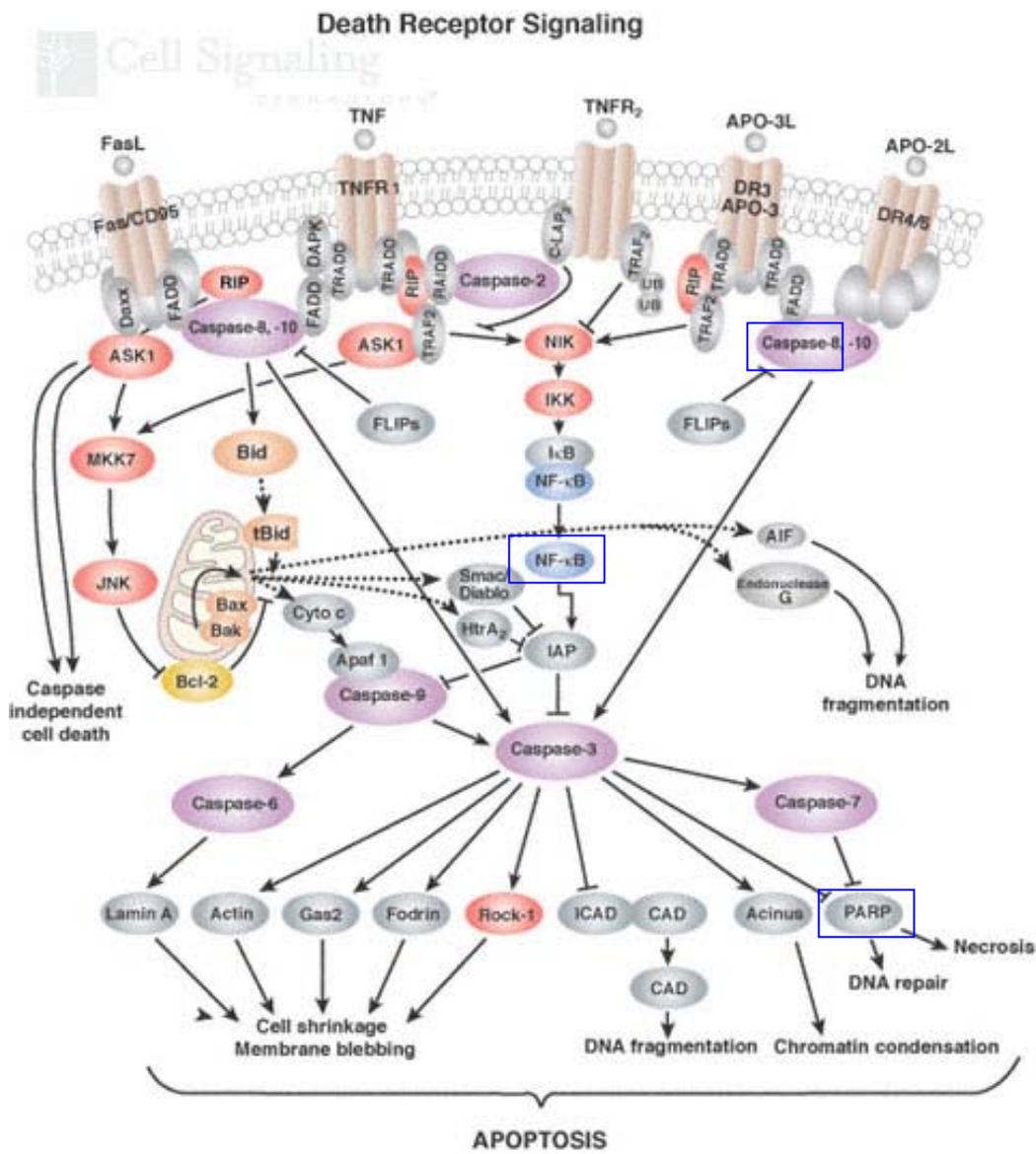
responses in the rat following 6-OHDA lesions of the nucleus accumbens septi and corpus striatum. *Brain Res.* 94: 507-522

11. Koda LY. and Gibb JW. (1973) Adrenal and striatal tyrosine hydroxylase activity after methamphetamine. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 185: 42-48
12. Kuhn D. M., Appel J. B. and Greenberg I. (1974) An analysis of some discriminative properties of d-amphetamine. *Psychopharmacologia* 39: 57-66
13. Maines, M. D. (1997) The heme oxygenase system: a regulator of second messenger gases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 37: 517-554
14. Mantle T. J., Tipton K. F. and Garrent N. J. (1974) Inhibition of monoamine oxidase by amphetamine and related compounds. *Biochem. Pharmacol.* 25: 2073-2077
15. McCoubrey, W. K., Jr., T. J. Huang and M. D. Maines (1997) Isolation and characterization of a cDNA from the rat brain that encodes hemoprotein heme oxygenase-3. *Eur J biochem* 247: 725-732
16. Meyerhoff JL and Kant GJ (1978) Release of endogenous dopamine from corpus striatum. *Life Sci.* 23: 1481-1486
17. Nahmias J. and Karetzky M. S. (1989) Current concepts in narcolepsy. *NJ. Medicine* 86: 617-622
18. Neuzil, J. and R. Stocker (1994) Free and albumin-bound bilirubin are efficient co-antioxidants for alpha-tocopherol, inhibiting plasma and low density lipoprotein lipid peroxidation. *J Biol Chem* 269: 16712-16719
19. 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
20. Priness G., Miller H. and Alles G. A. (1930) Clinical observations on phenylaminoethanol sulphate. *J. Am. Med. Assoc.* 94: 790-791
21. 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

22. Raiteri M., Cerrito F., Cervoni A. and Levi G. (1979) Dopamine can be released by two mechanisms differentially affected by the dopamine transporter inhibitor nomifensine. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 208: 195-202
23. Rehavi M., Skolnick P., Hulihan B. and Paul S. M. (1981) "High affinity" binding of [³H]-desipramine to rat cerebral cortex: relationship to tricyclic antidepressant-induced inhibition of norepinephrine uptake. *Eur. J. Pharmacol.* 70: 597-599
24. Ross S. B. and Renyi A. L. (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
25. 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
26. Stocker, R., Yamamoto, A. F. McDonagh, A. N. Glazer and B. N. Ames (1987) Bilirubin is an antioxidant of possible physiological importance. *Science* 235:1043-1046
27. Wagner GC., Ricaurte GA., Seiden LS., Schuster CR., Miller JM. and Westly J. (1980) Long-lasting depletion of striatal dopamine and loss of dopamine uptake sites following the repeated administration of methamphetamine. *Brain Res.* 177: 151-160
28. 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
29. Zarcon V. (1973) Narcolepsy. *N. Engl. J. Med.* 288:1156-1166

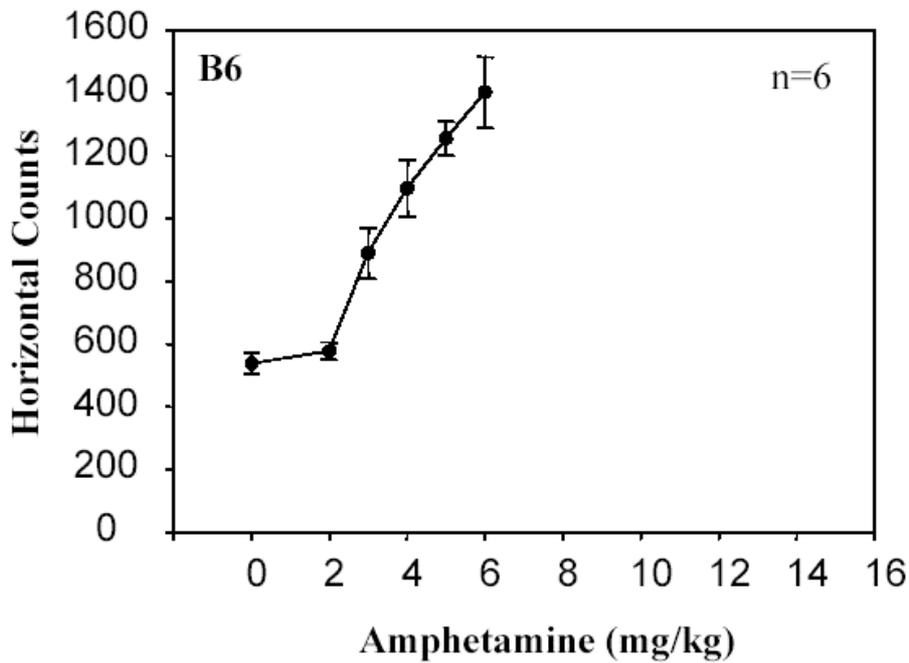
陸、附錄

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。

評語

本論文研究安非他命對小鼠的大腦紋狀體中之蛋白質(A2A-R, AC5, CASPASE 8, 及 NGKB)之影響。結果顯示給 6Mg/Rg 安非他命於小鼠，則其 Caspase 8 有減少 PARP 有增加。本論文具實用價值。