

## 目錄

中文摘要	1
英文摘要	1
緣由與目的	2
材料與方法	2
結果與討論	3
計畫成果自評	4
參考文獻	4
附圖	6

# 行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告

以神經傳導物質及其代謝物含量的變化探討選擇性血清素再回收抑制劑應用於減輕嗎啡戒斷反應及其藥效機轉

## Study on the efficacy and mechanism of selective serotonin reuptake inhibitors in reducing morphine-withdrawal symptoms by the changes of neurotransmitter and metabolite levels

計畫編號：NSC 98-2314-B-041-001-MY2

執行期限：98年8月1日至100年7月31日

主持人：劉國盛 嘉南藥理科技大學藥物科技研究所

共同主持人：王志中 財團法人奇美醫院醫學研究部

宋國峻 嘉南藥理科技大學藥物科技研究所

計畫參與人員：李崇維 嘉南藥理科技大學藥物科技研究所

葉乃楨 嘉南藥理科技大學藥物科技研究所

### 一、中文摘要

類嗎啡類(opioids)成癮之療法，目前皆著重於以單一類嗎啡藥物來進行治療，然而影響其成癮之因素很多，其中精神因素即佔了重要的一部份，因此若能以治療精神疾病之藥物如選擇性血清素再回收抑制劑(selective serotonin reuptake inhibitors; SSRIs)來作為治療之藥物，將有可能加強減輕其戒斷症狀，提供另一治療之新選擇。

在本研究中我們探討以 SSRIs 應用於減輕嗎啡戒斷反應及其藥效機轉。本研究共分成二年：第一年建立以微透析高效能液相層析法，分析腦中指標神經傳導物質及其代謝物之變化，確認其與減輕嗎啡戒斷反應之相關性及其動物模式。第二年探討 SSRIs 對於具有嗎啡身體依賴性動物在戒斷上之療效(single use)。

本研究順利開發一個簡單高效能液相層析-電化學偵測器之方法可同時偵測單胺類神經傳導物質及其代謝物，其最低偵測極限範圍為 0.3-127nM，線性迴歸曲線之  $r^2$  在 0.99 以上，而利用此分析方法結合微透析技術，觀察大鼠在嗎啡注射下腦部之紋狀體核區神經傳遞物質及其代謝物濃度之變化情形。

在給予不同之 SSRIs 時，其神經傳導物質及其代謝物之變化，各有所不同，然而

目前則以 sertraline 所造成之含量變化和嗎啡較為類似，能有效增加各種神經傳導物質及其代謝物之含量，為較有潛力成為治療類嗎啡類成癮之藥物。

關鍵詞：選擇性血清素再回收抑制劑、嗎啡、戒斷現象、微透析

### Abstract

The treatments of opioid addiction focus on the single use of opioids presently. However, there are many opioid addiction-associated factors, among which a psychological factor plays an important role. If selective serotonin reuptake inhibitors (SSRIs, a psychosis drug) are applied for an treatment, the withdrawal symptoms can be reduced and is another option to treat opioid dependence.

In this study, the efficacy and mechanism of SSRIs in reducing morphine-withdrawal symptoms were investigated. The study takes 2 years. In the first year, an animal model and the target neurotransmitter and metabolite levels in brain were set up by using microdialysis coupled with HPLC-ECD to evaluate the efficacy of SSRIs. In the second year, an estimative model was set up to discover the drugs.

A Simple high-performance liquid

chromatography with electrochemical detection using microdialysis was developed for simultaneous determination of monoamine neurotransmitters and metabolite levels in the rat corpus striatum. The detection limits of these compounds were 0.3-127nM, the correlation coefficients of regression were more than 0.99.

The method has been successfully applied to measure the neurotransmitters and their metabolite levels in the rat corpus striatum by morphine injection.

Each SSRI has different effects of neurotransmitter and metabolite levels in brain. But the effects of sertraline are more like to morphine, it can efficiently enhance the levels of neurotransmitters and their metabolite. Sertraline may be a candidate drug to treat opioid dependence.

Keywords: selective serotonin reuptake inhibitors、morphine、withdrawal、microdialysis

## 二、緣由與目的

對於藥物成癮者之治療，一直是世界各國急待解決的問題(1-4)。一般治療類鴉片藥物成癮者之戒斷時，常有自律神經亢奮引發的身體不適症狀、情緒問題(如焦慮、憂鬱、躁動不安等)、渴癮(craving)及失眠等問題。

目前不論何種療法，因主要藥物使用上之思維仍以類嗎啡類為主，其成效有限。目前已有許多文獻探討不同神經傳導物質對嗎啡戒斷反應之影響(5-8)，但各神經傳導物質間可能存在交互作用，導致無法以單以神經傳導物質對單一戒斷反應來進行評估(7,9)。

然而腦中血清素及正腎上腺素含量的減少可反應出身體對嗎啡所產生之戒斷反應(10-11)。Gracely 及 Reichenberg 等人更指出重覆地在大鼠上給予 SSRIs，導致腦中內生性類嗎啡肽( endogenous opioid peptides)的釋出(12-13)。Gandariae 則說明其可增加細胞在  $\mu$ -類鴉片接受器上表現的密度(14)。目前已有文獻明白指出

venlafaxine(一種血清素及上腎上腺素再回收抑制劑)及 fluoxetine 及 citalopram(SSRIs)均可減輕嗎啡之戒斷反應(9-10)。

本研究主要利用微透析高效能液相層析法所得之指標成份-神經傳導物質及其代謝物濃度-之相對變化，藉此更方便、準確地篩選出可用於減輕各種戒斷現象之藥物，評估 SSRIs 對各種不同戒斷現象之影響，並深入探討其作用機轉。

## 三、材料與方法

建立指標神經傳導物質及其代謝物之分析方法

### 1. 試劑：

神經傳導物質及其代謝物：如 3,4-dihydroxyphenylethylamine hydrochloride (dopamine; DM) 、 5-hydroxytryptamine hydrochloride (5-HT, or serotonin) 、 norepinephrine bitartrate (NE) 、 epinephrine bitartrate (EP) 、 L-b-3,4-dihydroxyphenylalanine (L-dopa) 、 DL-normetanephrine hydrochloride (NM) 、 3,4-dihydroxyphenylacetic acid (Dopac) 、 5-hydroxytryptophan (5-HTP) 、 5-hydroxyindole-3-acetic acid (HIAA) 、 homovanillic acid (HVA) ；有機溶劑：如乙腈、甲醇；及其它物質如 Citric acid monohydrate、EDTA-disodium salt 等。

### 2. 動物：

成年雄性大鼠(SD)體重 250-300 gm，購自國科會國家動物中心。

### 3. 飼養環境：

每隻大鼠將飼養於標準之飼養籠(29×19×13 cm<sup>3</sup>)中，食物及水可以自由取食，室溫控制在 20±1 °C，溼度控制在 50±10 %，光照控制在 7 AM~7 PM，各動物將於上述環境飼養至少 7 日後方可進行實驗。

### 4. 分析方法：

#### (1) 高效率液相層析儀組件

高效率液相層析儀包含以下幾個主要組件：自動取樣器、泵浦系統、電化學偵測器、數據處理系統及分析用之管柱 (C18 ODS-3  $\mu$ m 10 mm × 4.6 mm)。

#### (2) 層析法

移動相為 90:10(v/v)之 0.05M 磷酸緩衝液(包含 0.2mM sodium octyl sulfonate 及 0.05mM Na<sub>2</sub>EDTA，以磷酸調至 pH=3)與甲醇，流速為 1 ml/min，樣品注入量為 20  $\mu$ l，電化學偵測器主要以薄層玻璃碳為工作電極 (glassy carbon working electrode)，銀/氯化銀為參考電極(Ag/AgCl reference electrode)，電壓設定在+0.6 伏特。

#### (3)微透析儀器及相關組件

微透析儀器包含以下幾個主要組件：小動物立體定位儀、微透析探針、微透析注射幫浦、微透析微量收集器、PTFE 透析液輸送管、橡膠管、聚乙烯管等。

#### (4)微透析方法

腦部透析液則採用人工腦脊髓液 (Artificial CSF)(NaCl 174mM，KCl 4mM，CaCl<sub>2</sub> 1.7 mM，MgCl<sub>2</sub> 0.9mM)，以 NaOH 調至 pH=7.2~7.4 透析液流速為 1  $\mu$ l/min。

微透析採樣方法是以微量注射幫浦 SP-300 (Next Advance)，作為透析液之推進動力，利用透析液在微透析探針 CMA/12 Elite 14/04 之透析作用來進行樣本之採樣。

#### (5)動物實驗流程

插管：手術進行前，先以腹腔注射 urethane (0.5g/kg)，麻醉大鼠，待實驗動物進入麻醉狀態後，將其仰臥以聚乙烯管 (PE-50)進行股靜脈插管，以供往後給藥之用。實驗過程皆以電熱毯進行動物體溫保溫，維持在 37 °C。

腦部探針的植入：當大鼠經過麻醉並經股靜脈插管後，剃除大鼠頭頂部鼠毛後，將大白鼠置放在立體定位儀上 (Stereotaxic apparatus) 固定。以手術刀縱切開腦部皮膚，以止血鉗將皮膚往左右兩邊稱開，以露出頂骨。以大白鼠腦殼前窗(bregma)位置為中心點，往右 3 mm、往前 0.2 mm 處以鑽孔器鑽一個洞。將腦部微透析探針固定再立體定位儀的位置，往下至腦平面，再從腦平面開始算起將腦部微透析探針往下插入 7.5 mm，將探針置於紋狀體 (striatum) 區域(ML -3 mm；AP 0.2 mm；DV -7.5 mm)中。

以人工腦脊液進行灌注，穩定 2 小時之後，開始每 30 分收集一次透析液。將所

得之樣品移至 HPLC-ECD，依其設定之參數進行神經傳導物質及其代謝物之分析。

探討 SSRIs 對於具有嗎啡身體依賴性動物在戒斷上之療效

#### 1.動物及飼養環境：

如同上述。

#### 2.藥物：

主要藥物 morphine 向管制藥品管理局購買，naloxone、SSRIs 購自 Sigma-Aldrich(Missouri，美國)或 Merck-Schuchardt 公司 (Hohenbrunn，德國)，藥物均溶於 0.9 % saline 中，製成水溶性注射液。

#### 3.方法：

動物、透析方法及 HPLC-ECD 設定如同上述。

完成探針之放置 2.5 小時後，給予 10mg/kg 之 morphine，可觀察神經傳導物質及其代謝物產生變化，藉此來衡量藥物和減輕嗎啡戒斷反應之相關性。接著在本年度中，我們在給予 10mg/kg morphine 之後 2 小時，再單獨在股靜脈插管處分別給予 sertraline 或 fluvoxamine 50 mg/kg，所得之不同時間之各個神經傳導物質及其代謝產物的體內濃度繪圖，比較其和基準點之差異，探討 SSRIs 對於具有嗎啡身體依賴性動物在戒斷上之療效。

## 四、結果與討論：

建立指標神經傳導物質及其代謝物之分析方法

已建立包含 10 種指標神經傳導物質及其代謝物之分析方法(如附圖 1)，其中在分析方法部份可同時分析 10 個神經傳導物質及其代謝物，其最低偵測極限範圍為 0.3-127nM，線性迴歸曲線之  $r^2$  在 0.99 以上。

減輕嗎啡戒斷反應之相關性及其動物模式

已建立完成探針之放置 2 小時後，研究動物之各種神經傳導物質及其代謝物含量將處於一穩定狀態，在之後 0.5 小時再給

予 10mg/kg 之 morphine，可觀察 morphine 對神經傳導物質及其代謝物之變化(如附圖 2~8)。

探討 SSRIs 對於具有嗎啡身體依賴性動物在戒斷上之療效

當在股靜脈插管處給予 10mg/kg 之 morphine 後 2 小時，再分別給予 sertraline 及 fluvoxamine 50 mg/kg，所得之不同時間之各個神經傳導物質及其代謝產物的體內濃度如附圖 2~8，其中在給予 morphine 後 NE 呈現較大幅度之含量下降(如附圖 3)，而 HVA 則呈現微幅之上升(如附圖 7)，其餘之含量變化則不大(如附圖 2,4~6,8)。而當再給予 sertraline 後，L-dopa、NM、Dopac 之含量呈現穩定，沒有改變(如附圖 2,5,6)，而 NE、EP、HVA 之含量則呈現逐漸上升之情形(如附圖 3,4,7)，另外 HIAA 則呈現逐漸下降(如附圖 8)。在給予 fluvoxamine 後，L-dopa、HVA、HIAA 則呈現含量逐漸下降(如附圖 2,7,8)，NM 之含量卻是逐漸上升(如附圖 5)，另外 NE、EP、Dopac 之含量呈現穩定，沒有改變(如附圖 3,4,6)。可見不同之 SSRI 對於各個神經傳導物質及其代謝產物的體內濃度變化皆不相同，其中 sertraline 之各個神經傳導物質及其代謝產物的體內濃度變化模式和 morphine 所造成之情形較為類似，具有 morphine-like effect(15)，普遍而言具有加強各個神經傳導物質及其代謝產物之產生(16-17)，為具有潛力之減癮藥物。

五、計畫成果自評：

本研究在第一年中預期完成之工作項目，包含建立 10 種指標神經傳導物質及其代謝物之分析方法及確認在 10mg/kg 之劑量下急性給予嗎啡，為較方便執行之動物模式，其中在分析方法部份可同時分析 10 個神經傳導物質及其代謝物，其最低偵測極限範圍為 0.3-127nM，線性迴歸曲線之  $r^2$  在 0.99 以上。

本研究在第二年中完成之工作項目，包含成功地觀察到給予 50 mg/kg 之 sertraline 或 fluvoxamine 下，各個神經傳導

物質及其代謝產物的體內濃度變化，並進而得知其 sertraline 為較有潛力成為減癮之藥物。

由以上的研究成果得知，此研究之可行性，且更值得在未來進一步探討及確定其可能有效降低大鼠之戒斷反應之作用機轉。相信此項研究不論在學術上或在臨床上將會是一件非常有意義且值得做的事。

六、參考文獻

1. SE Robinson.: Buprenorphine: An analgesic with an expanding role in the treatment of opioid addiction. *CNS Drugs* 2002; 8: 377-390.
2. BA DiPaula, PD, BCPP, et al.: Heroin detoxification with buprenorphine on an inpatient psychiatric unit. *J. Subst. Abuse Treat.* 2002; 23: 163-169.
3. S Petitjean, R Stohler, JJ Déglon, et al.: Double-blind randomized trial of buprenorphine and methadone in opiate dependence. *Drug Alcohol Depen.* 2001; 62: 97-104.
4. DA Fiellin, MV Pantalon, JP Pakes, et al.: Treatment of heroin dependence with buprenorphine in primary care. *Am. J. Drug Alcohol Abuse* 2002; 28: 231-241.
5. A Pinelli, S Trivulzio.: Quantitative evaluation of opioid withdrawal signs in rats repeatedly treated with morphine and injected with naloxone, in the absence or presence of the antiabstinence agent clonidine. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* 1997; 38: 117-131.
6. S Ghosh, K Grasing.: Presynaptic dopaminergic function in the nucleus accumbens following chronic opiate treatment and precipitated withdrawal. *Neurochem. Res.* 1999; 24: 95-107.
7. A.O el-Kadi, SI Sharif.: The role of 5-HT in the expression of morphine withdrawal in mice. *Life Sci.* 1995; 57: 511-516.
8. A Pinelli, S Trivulzio, PM Ciapponi.: Quantitative opioid withdrawal signs in rats: effects exerted by clothiapine administration. *J. Fundam Clin. Pharmacol.* 1997; 11: 346-355.
9. S Caillé, M Rodriguez-Arias, J Minarro, et al.: Changes in dopaminergic

neurotransmission do not alter somatic or motivational opiate withdrawal-induced symptoms in rats. *Behav. Neurosci.* 2003; 117: 995-1005.

10. CC Wu, Julia YR Chen, PL Tao, et al.: Serotonin reuptake inhibitors attenuate morphine withdrawal syndrome in neonatal rats passively exposed to morphine. *Eur. J. Pharmacol.* 2005; 512: 37-42.

11. M Rafieian-Kopaei, AM Gray, PS Spencer, et al.: Contrasting actions of acute or chronic paroxetine and fluvoxamine on morphine withdrawal-induced place conditioning. *Eur. J. Pharmacol.* 1995; 275: 185-189.

12. RN Gracely, R McGrath, R Dubner.: Narcotic analgesia: Fentanyl reduces the intensity but not the unpleasantness of painful tooth pulp sensations. *Science* 1979; 203: 1261-1263.

13. K Reichenberg, G Gaillard-Plaza, JL Montastruc.: Influence of naloxone on the antinociceptive effect of some antidepressant drugs. *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.* 1985; 275: 78-85.

14. JM Gandariae, E Echevasria, I Acebes, et al.: Effect of fluoxetine administration on mu-opioid receptor immunostaining in the rat forebrain. *Brain Res.* 1999; 817: 236-240.

15. KJ Schuh, SL Walsh, GE Bigelow, KL Preston, ML Stitzer. Buprenorphine, morphine and naloxone effects during ascending morphine maintenance in humans. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1996; 278: 836-846.

16. SL Sell, CP France.: Cocaine and amphetamine attenuate the discriminative stimulus effects of naltrexone in opioid-dependent rhesus monkeys. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2002; 301: 1103-1110.

17. AD Kaye, RE Banister, JM Hoover, AR Baluch, S Jacobs, RV Shah.: Chronic pain and ultrarapid opioid detoxification. *Pain Practice.* 2005; 5: 33-42.

附圖之圖說明：

圖 1 神經傳遞物質標準品混合液之層析圖譜

圖 2 大鼠腦中紋狀體區透析液中 L-dopa 之不同狀態下之濃度變化。注射 sertraline 以(●) 標示,注射 fluvoxamine 以 (○) 標示,圖形縱軸標示則為 L-dopa 含量變化百分量後之指標,0.5 小時時靜脈注射給予 10mg/kg morphine ,2 小時後再給予 50 mg/kg 之 sertraline 或 fluvoxamine 。

圖 3 大鼠腦中紋狀體區透析液中 NE 之不同狀態下之濃度變化。注射 sertraline 以(●) 標示,注射 fluvoxamine 以 (○) 標示,圖形縱軸標示則為 NE 含量變化百分量後之指標,0.5 小時時靜脈注射給予 10mg/kg morphine ,2 小時後再給予 50 mg/kg 之 sertraline 或 fluvoxamine 。

圖 4 大鼠腦中紋狀體區透析液中 EP 之不同狀態下之濃度變化。注射 sertraline 以(●) 標示,注射 fluvoxamine 以 (○) 標示,圖形縱軸標示則為 EP 含量變化百分量後之指標,0.5 小時時靜脈注射給予 10mg/kg morphine ,2 小時後再給予 50 mg/kg 之 sertraline 或 fluvoxamine 。

圖 5 大鼠腦中紋狀體區透析液中 NM 之不同狀態下之濃度變化。注射 sertraline 以(●) 標示,注射 fluvoxamine 以 (○) 標示,圖形縱軸標示則為 NM 含量變化百分量後之指標,0.5 小時時靜脈注射給予 10mg/kg morphine ,2 小時後再給予 50 mg/kg 之 sertraline 或 fluvoxamine 。

圖 6 大鼠腦中紋狀體區透析液中 Dopac 之不同狀態下之濃度變化。注射 sertraline 以(●) 標示,注射 fluvoxamine 以 (○) 標示,圖形縱軸標示則為 Dopac 含量變化百分量後之指標,0.5 小時時靜脈注射給予 10mg/kg morphine ,2 小時後再給予 50 mg/kg 之 sertraline 或 fluvoxamine 。

圖 7 大鼠腦中紋狀體區透析液中 HVA 之不同狀態下之濃度變化。注射 sertraline 以(●) 標示,注射 fluvoxamine 以 (○) 標示,圖形縱軸標示則為 HVA 含量變化百分量後之指標,0.5 小時時靜脈注射給予 10mg/kg morphine ,2 小時後再給予 50 mg/kg 之 sertraline 或 fluvoxamine 。

圖 8 大鼠腦中紋狀體區透析液中 HIAA 之不同狀態下之濃度變化。注射 sertraline 以(●) 標示,注射 fluvoxamine 以 (○) 標示,圖形縱軸標示則為 HIAA 含量變化百分量後之指標,0.5 小時時靜脈注射給予 10mg/kg morphine ,2 小時後再給予 50 mg/kg 之 sertraline 或 fluvoxamine 。

圖 1

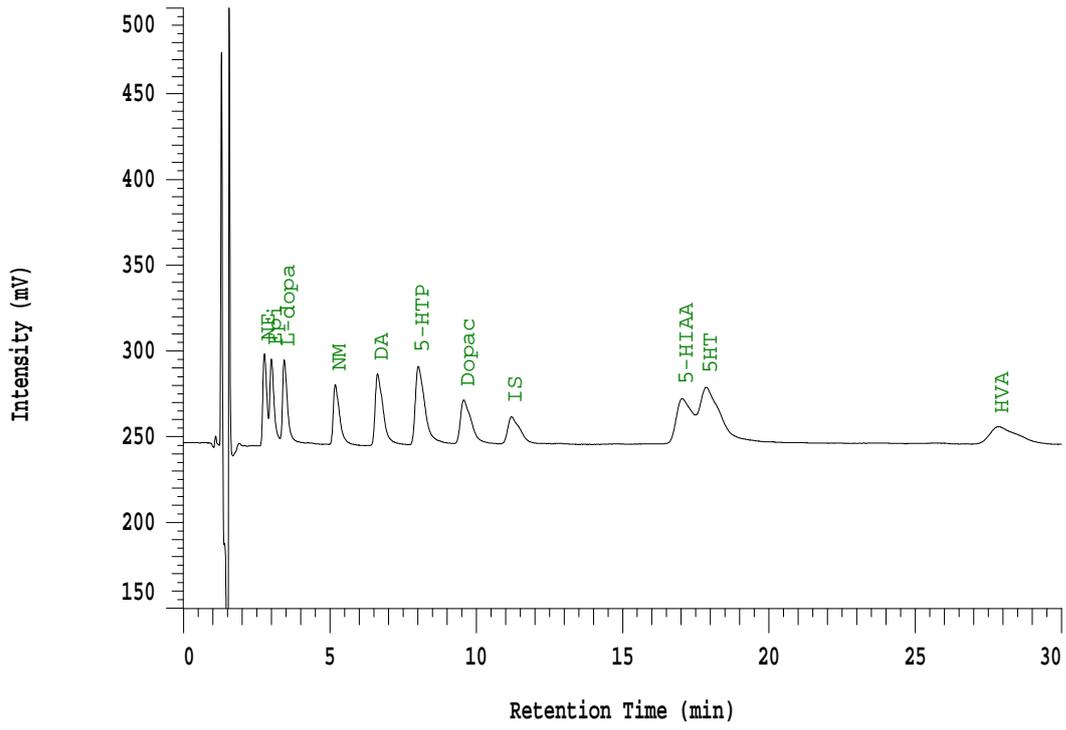


圖 2

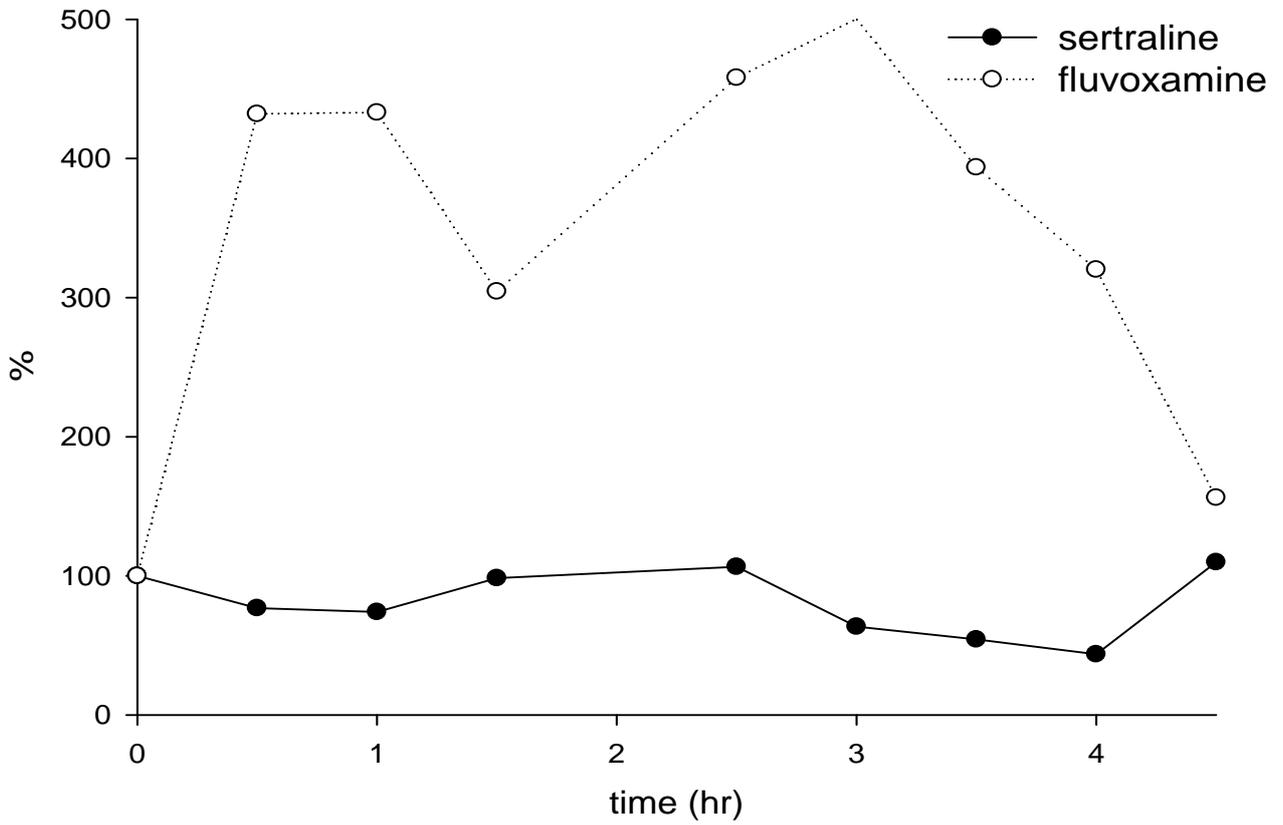


圖 3

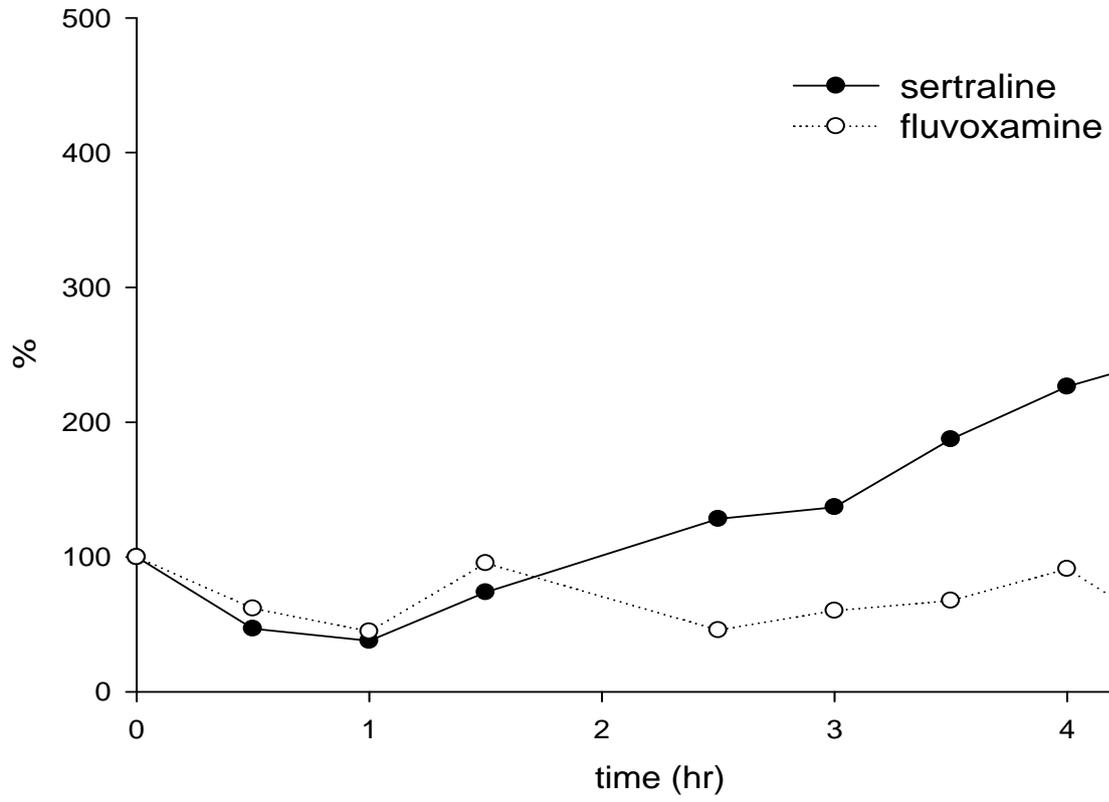


圖 4

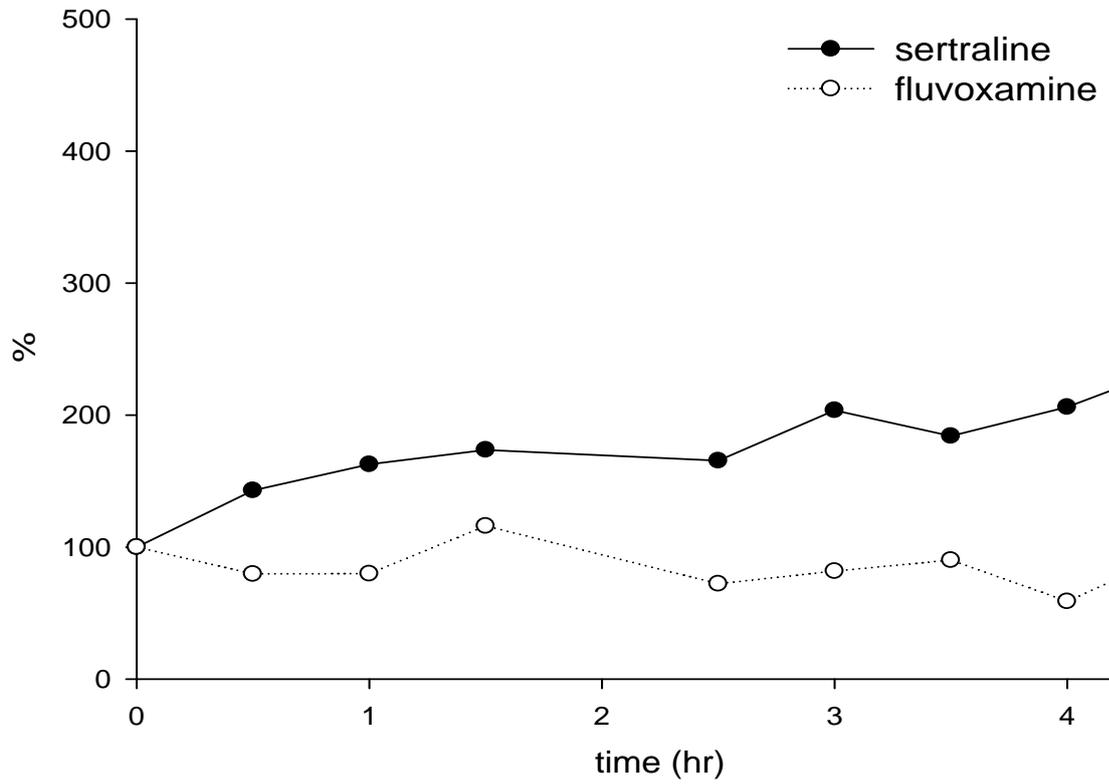


圖 5

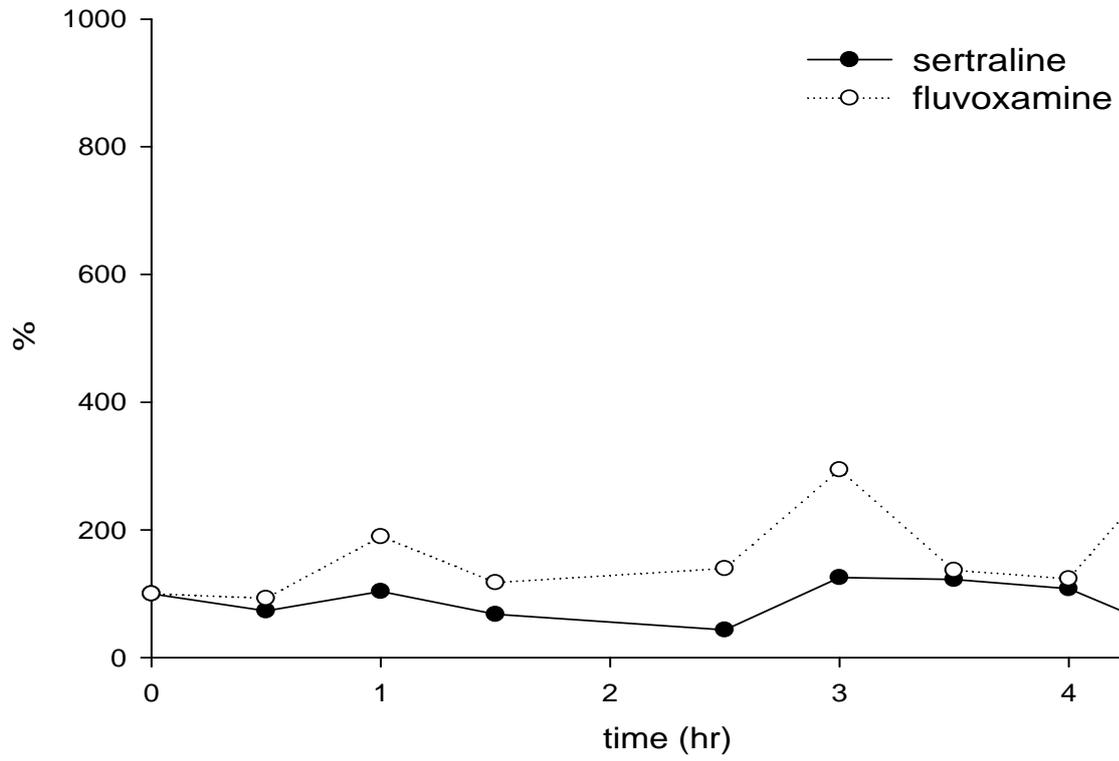


圖 6

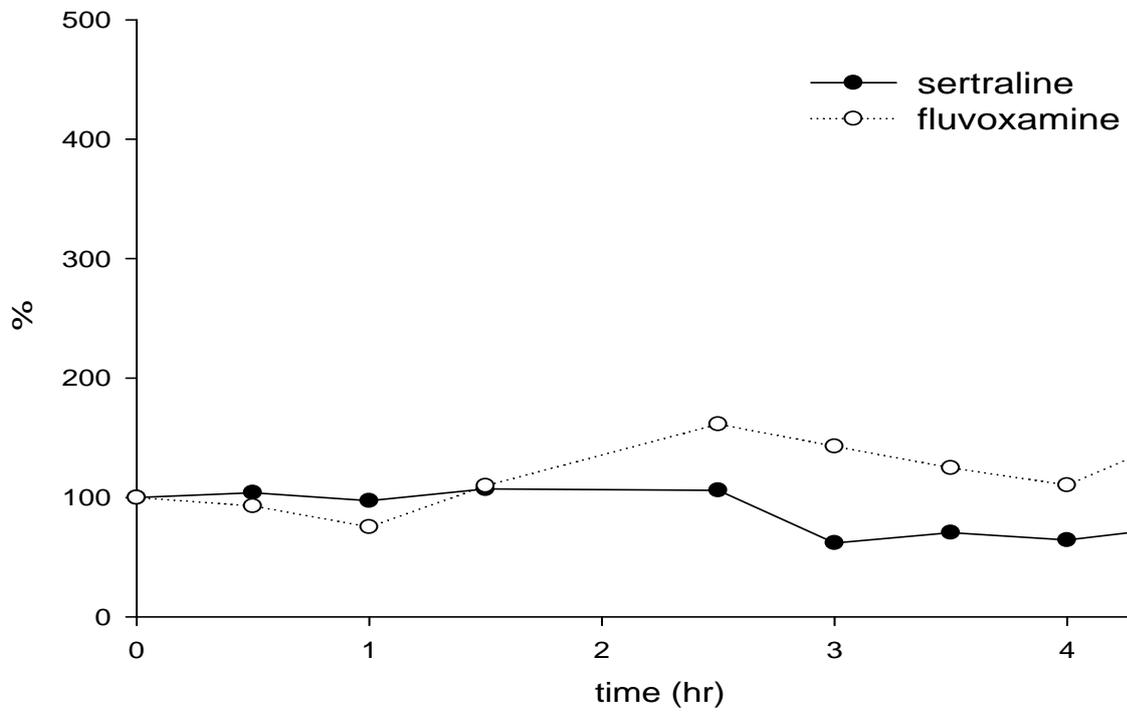


圖 7

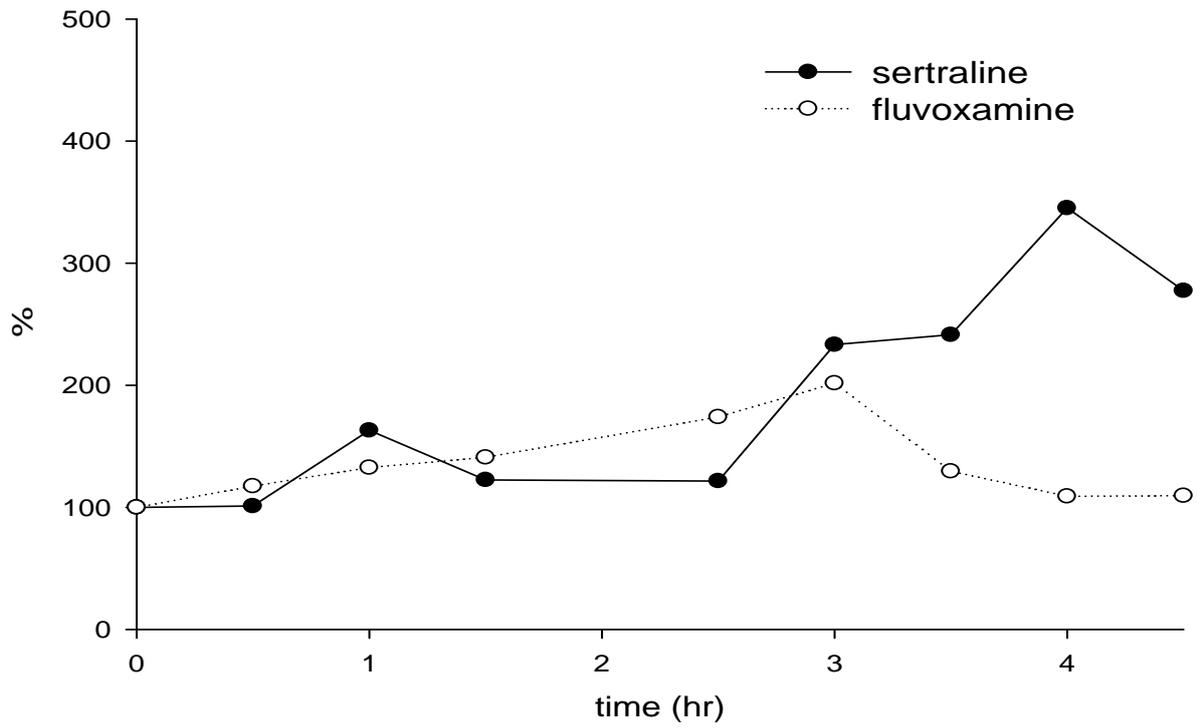


圖 8

