

探討丁基原啡因對嗎啡成癮大鼠之神經傳導物質含量的影響

劉國盛^{1*} 陳素容² 陳郁文³ 宋國峻¹ 王志中⁴

¹嘉南藥理科技大學藥物科技研究所

²嘉南藥理科技大學藥學系

³中國醫藥大學物理治療學系

⁴奇美醫學中心醫學研究部

摘要

長期使用嗎啡易產生耐受性及成癮性，當突然中斷或降低劑量時會出現戒斷症候群，目前已知戒斷症候群與神經傳導物質如多巴胺、血清素等有相關性。

本研究以大鼠為研究對象，利用微透析管在腦中取樣，再使用高效能液相層析-電化學偵測器分析神經傳導物質含量變化，以探討丁基原啡因對成癮大鼠腦中神經傳導物質之影響。

結果顯示，丁基原啡因可使 DA、Dopac 及 HVA 之含量，呈現微幅上升，NE 及 5-HTP 之含量則有明顯上升趨勢，5-HIAA 則呈現微幅之下降，而 EP 則有明顯下降趨勢，NM 則維持不變。丁基原啡因對成癮大鼠腦中神經傳導物質之影響和嗎啡類似，推測其減癮效果可能和 morphin like effect 有關。

關鍵詞：丁基原啡因、嗎啡、戒斷症候群、神經傳導物質

*通訊作者：嘉南藥理科技大學藥物科技研究所

Tel: +886-6-2664911Ext2106

Fax: +886-6-3660710

E-mail: lanceliu@mail.chna.edu.tw

前言：

對於藥物成癮者之治療，一直是世界各國急待解決的問題 (Fiellin et al., 2002; Petitjean et al., 2001; Robinson, 2002)。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。在急性戒斷期後之延長戒斷症候群也長達數月之久，這些症狀也包含了失眠、情緒不安及憂鬱等精神上的問題。成癮者常因戒斷症狀難耐、渴癮，進而鋌而走險，引發更多社會問題。

目前對於藥物成癮者之治療，已有多項藥物被使用及研究，其中被認為最好的藥物是部分類鴉片

致效劑 (partial opioid agonist)- 丁基原啡因 (buprenorphine) (Fiellin et al., 2002; Petitjean et al., 2001; Robinson, 2002)，丁基原啡因具有較長的代謝半衰期及因具有 ceiling effect 而較 methadone 安全等許多優點，非常適合用來治療類嗎啡藥物之成癮。而在快速戒癮療法中丁基原啡因也可被使用，有零星研究報告指出 (Barnett, Rodgers, & Bloch, 2001; Kutz & Reznik, 2001; Raisch, Fye, Boardman, & Sather, 2002)，給予單次大劑量的丁基原啡因也可將藥癮一次解除，不過大多數的國家仍採用長期多劑量的治療方式。

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 (el-Kadi & Sharif, 1995; Ghosh & Grasing, 1999; Pinelli & Trivulzio, 1997; Pinelli, Trivulzio, & Ciapponi, 1997), 如嚙齒類動物之跳躍反應及濕狗搖晃 (wet dog shake) 等行為和多巴胺及血清素之過度活化有關 (el-Kadi & Sharif, 1995; Ghosh & Grasing, 1999); acetylcholine 影響尿液之排泄、體溫之下降、唾液之分泌 (Pinelli & Trivulzio, 1997; Pinelli et al., 1997); 正腎上腺素 (norepinephrine) 則和心跳、血壓、唾液之分泌有關 (Pinelli & Trivulzio, 1997; Pinelli et al., 1997); 但仍有部分文獻表示其相關性較為複雜, 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 (Caille et al., 2003; el-Kadi & Sharif, 1995), 因此若能同時評估多種神經傳導物質之變化, 將可提高評估方法之準確性及擴大其結果之適用範圍。

目前已有研究報告指出, 急性給予嗎啡會促進動物腦中血清素之合成及釋出 (Boadle-Biber, Johannessen, Narasimhachari, & Phan, 1987; Tao & Auerbach, 1994); 然而若在經長時間給予嗎啡後所產生之戒斷時期, 則發現常會使腦中許多區域之血清素含量受到抑制 (Tao, Ma, & Auerbach, 1998), 在經由給予血清素再回收轉運抑制劑 (inhibitor of serotonin reuptake transporter) 後証實, 可明顯降低腦中由 naloxone 所具有之重要的類嗎啡戒斷物質如 noradrenergic locus coeruleus neurons 之過度活躍以及行為上之改變 (Akaoka & Aston-Jones, 1993; el-Kadi & Sharif, 1995; Lu et al., 2001)。因此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 (Rafieian-Kopaei, Gray, Spencer, & Sewell, 1995; Wu, Chen, Tao, Chen, & Yeh, 2005)。

目前已知丁基原啡因可有效使用於減緩類鴉片藥物成癮者之戒斷現象, 然而其對於神經傳導物質之影響仍未完全明瞭 (Konijnenberg & Melinder, 2011), 因此本研究主要以延續丁基原啡因治療類

嗎啡藥物成癮之優勢, 將以大鼠為研究對象, 採用微透析及高效能液相層析法, 藉此更方便、準確地評估丁基原啡因對各種神經傳導物質含量之影響, 探討其可能之作用機轉。

材料及方法：

1. 試劑：

標準品 3,4-dihydroxy phenyl ethyl amine hydrochloride (dopamine; DA), 3,4-dihydroxy phenyl acetic acid (Dopac), homovanillic acid (HVA), norepinephrine bitartrate (NE), epinephrine bitartrate (EP), normetanephrine (NM), (-)-5-hydroxy-L-tryptophan (5-HTP), 5-hydroxyindole-3-acetic acid (5-HIAA) 及高效能液相層析試藥 potassium dihydrogen phosphoate, sodium octyl sulfonate, ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt, phosphoric acid 等均購自 Sigma-Aldrich (Missouri, 美國)。麻醉試藥則有 Zoletil 50 (每瓶粉劑含 tiletamine base 125mg、zolazepam base 125mg, VIRBAC Laboratories)、atropine (TAH AN) 及 isoflurane (AERRANE)。丁基原啡因購自 Macfarlan Smith 公司 (Edinburgh, 英國)。

2. 動物：

實驗所使用的動物為購自樂斯科, 體重介於 280~350 公克的成熟雄性 Sprague-Dawley 大白鼠, 每隻大鼠將飼養於標準之飼養籠 (29×19×13 cm³) 中, 室溫控制在 24 ± 1°C, 光照控制在 7 AM~7 PM, 並給予充足的飼料及飲水, 各動物將於上述環境飼養至少 7 日後方可進行實驗。所有動物試驗皆遵守 International Association for the Study of Pain 之規範來進行, 所進行之試驗並經奇美醫學中心動物試驗委員會同意後實施。

3. 微透析方法：

腦部透析液則採用人工腦脊髓液 (artificial CSF; 8.18g NaCl, 0.23g CaCl₂, 0.1g MgCl₂, 0.2g Na₂HPO₄, 0.4g NaH₂PO₄, 1.29g glucose, ascorbic

acid，使用超純水配置 1 公升，以 NaOH 調至 pH=7.2~7.4)，透析液流速為 1 μ l/min。

腦部採樣探針 CMA/12 (CMA, Sweden) 是採用同心圓設計，由聚乙烯管、二氧化矽毛細管及纖維素透析膜所組成，腦部探針其長度為 4 mm，外徑為 0.24 mm，孔徑大小僅容許分子量 13000 以下之分子通過。

4.動物實驗流程與給藥模式：

在手術麻醉前 15 分鐘，先在大鼠皮下注射 atropine (0.1 mg/kg)，之後再以腹腔注射 Zoletil 50 (40 mg/kg) 進行大鼠麻醉，接著以 PE-50 管做股靜脈埋管，再將其 PE 管從大鼠背部穿出並固定之，方便手術後的藥物給予。當前處理準備妥善後，把麻醉後的大鼠放置在立體定位儀上 (stereotaxic apparatus) 固定，以手術刀將大鼠頭頂部位的皮膚劃開，露出頂骨後確認大鼠腦殼前窗 (bregma) 位置，以前窗為中心點，對準此點記錄此座標 (AP&ML)，確定 AP (前後)、ML (左右) 值後，往右 3mm、往前 0.3mm 處以鑽孔器鑽出一個洞，接著把套管 (guide cannula) 置入洞內，並以牙粉固定套管且封閉傷口，等待術後 48 小時恢復期後，再進行藥物投予。

當術後 48 小時我們進行誘發大鼠嗎啡藥物成癮，嗎啡以靜脈注射每天早晚各一次連續給予三天，採漸進式增加劑量的方式 20、40、80 mg/kg 每日接受 2 次的頻率。在第四天上午進行腦部微透析取樣，而實驗皆為在大鼠清醒狀態下進行。進行腦部微透析取樣當天，大鼠先以氣體麻醉劑 (isoflurane) 將其麻醉，再將牠頭上的套管頂蓋取下後把微透析探針放入套管中，其下針位置為 DV (上下) 往下插入為 7mm，其腦核區為紋狀體 (striatum) (ML \pm 3 mm；AP+0.3 mm；DV-7 mm)，接著以人工腦脊髓液灌注進行平衡 2 小時安定大鼠，平衡完後開始收集 1.5 小時的 baseline (以此定義為 100%)，等 baseline 收集完成後方進行第四天嗎啡之靜脈注射與丁基原啡因給予，持續觀察 3.5

小時神經傳導物質相對於 baseline 含量之百分比變化。整個實驗在進行過程當中為每 30 分鐘收集一次的透析液，再將其收集之透析液注入 HPLC 進行樣品分析。

5.層析方法：

移動相為 0.05M 磷酸緩衝液 (包含 0.2mM sodium octyl sulfonate 及 0.05mM Na₂EDTA)，以磷酸調至 pH=3 和甲醇 (91:9; v/v)。流速為 1.0 ml/min。層析管柱為逆相 C18 分析級管柱 (Inertsil ODS C18 column)，內徑 4.6 mm，長 100 mm；填充顆粒大小為 3 μ m。樣品注射體積為 20 μ l。電化學設定電位為 +0.6 V (物質之氧化電位)，以石墨為工作電極，銀/氯化銀為參考電極。

6.資料分析：

實驗所得之數值均以平均值 (\pm 標準差) 表示。各曲線 180 min 後之數值將以 180 min 之數值為控制組，分別利用 Student t test 進行統計分析。當 P 值小於 0.05 視為具有顯著差異。數據分析係使用 SPSS 12.0 套裝軟體 (SPSS 12.0, Chicago, IL, USA)。

結果與討論：

大鼠經由三天給予嗎啡後誘發其依賴性，在第四天未給予嗎啡時，可測得其穩定之各神經傳導物質濃度 (如圖 1 至圖 3 之時間點 30、60 及 90 min 之數值所示)，顯示動物安定性及分析方法準確性。然而在第四天時給予 40 mg/kg 嗎啡後，各神經傳導物質含量則呈現上升後而趨於穩定之情形 (如圖 1 至圖 3 之時間點 120、150 及 180 min 之數值所示)。

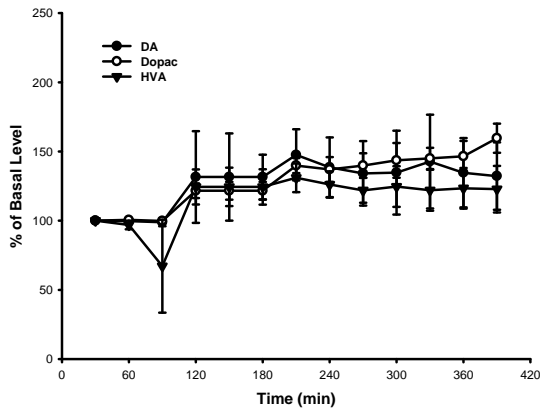


圖 1. 大鼠腦中紋狀體區透析液中 DA、Dopac 及 HVA 之濃度變化。前 60 min 為空白值，60 min 後為靜脈給予 40 mg/kg 嗎啡之觀察值，180 min 後為靜脈給予 3 mg/kg 丁基原啡因之觀察值，圖形縱軸標示則為含量變化百分比化後之值。● (DA); ○ (Dopac); ▼ (HVA), n=3。

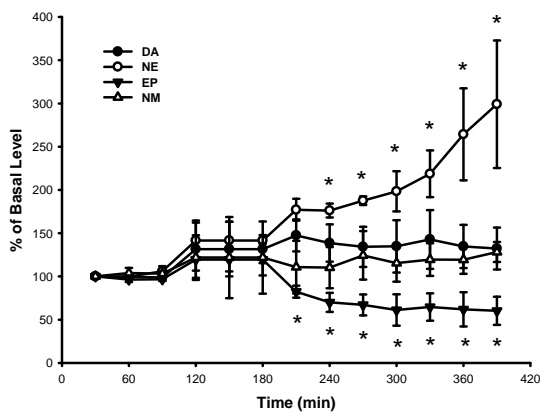


圖 2. 大鼠腦中紋狀體區透析液中 DA、NE、EP 及 NM 之濃度變化。前 60 min 為空白值，60 min 後為靜脈給予 40 mg/kg 嗎啡之觀察值，180 min 後為靜脈給予 3 mg/kg 丁基原啡因之觀察值，圖形縱軸標示則為含量變化百分比化後之值。● (DA); ○ (NE); ▼ (EP); △ (NM), n=3, * P < 0.05 (180 min 數值為控制組)。

然而當在第四天給予 40 mg/kg 嗎啡後，隨後給予 3 mg/kg 丁基原啡因，在多巴胺系統 (dopaminergic system) 之旁支代謝路徑中 (Liu,

Cheng, Chen, & Hsu, 2000), DA、Dopac 及 HVA 之濃度，呈現微幅之上升，但和 180 min 之值比較則均未有明顯之統計上之差異產生 (如圖 1); 但在另一多巴胺系統之主要代謝路徑中，NE 之濃度則呈現明顯上升趨勢，EP 則呈現下降趨勢，而 NM 則維持不變 (如圖 2)，其中 HVA 之結果，亦如同先前之文獻結果 (Dettmar, Cowan, & Walter, 1981)。

在第四天給予 3 mg/kg 丁基原啡因後，五羥基色胺系統 (serotonergic system) 之 5-HTP 濃度則呈現明顯上升趨勢而 5-HIAA 則呈現微幅之下降，但和 180 min 之值比較則均未有明顯之統計上之差異產生 (如圖 3)，5-HIAA 之結果，亦如同先前之文獻結果 (Dettmar et al., 1981)，而 5-HTP 之結果亦如同先前 Konijnenberg 和 Melinder 認為丁基原啡因對五羥基色胺系統之影響，未被深入研究，推測其結果應會如同 methadone 一樣，造成其含量之增加 (Konijnenberg & Melinder, 2011)。

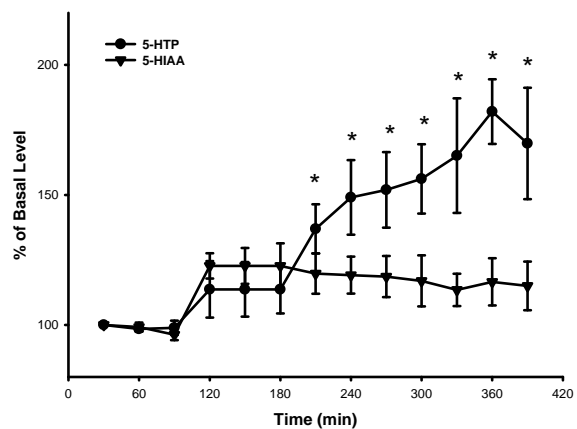


圖 3. 大鼠腦中紋狀體區透析液中 5-HTP 及 5-HIAA 之濃度變化。前 60 min 為空白值，60 min 後為靜脈給予 40 mg/kg 嗎啡之觀察值，180 min 後為靜脈給予 3 mg/kg 丁基原啡因之觀察值，圖形縱軸標示則為含量變化百分比化後之值。● (5-HTP); ▼ (5-HIAA), n=3, * P < 0.05 (180 min 數值為控制組)。

給予丁基原啡因後可發現，在多巴胺系統和五羥基色胺系統之前端物質，包括 NE、EP 及 5-HTP 可產生較大之含量變化，而較末端之物質包括 Dopac、HVA、NM 及 5-HIAA 則未有明顯之含量改變，推測原因可能愈末端之物質，可再代謝成其它物質而分散其含量，造成含量較低而不產生明顯變化，亦或其代謝至末端所需之時間較久，而未能於觀測時間內產生明顯變化等。

給予丁基原啡因後在多巴胺系統和五羥基色胺系統之前端物質，可產生較大之含量變化，而這些變化多數如同之前 90 min 後給予嗎啡所造成之上升現象，亦或維持嗎啡之影響，其中唯獨 EP 產生較明顯之下降趨勢，其原因可能來自 NE 之上升比例變化較大而減少了 EP 之比例。整體而言丁基原啡因對嗎啡成癮大鼠之影響，在神經傳導物質含量改變方面，其效果亦如同嗎啡，推測丁基原啡因能降低對嗎啡成癮者之戒斷反應，可能和其具有之 morphin like effect 有關 (Schuh, Walsh, Bigelow, Preston, & Stitzer, 1996)。

謝辭：

感謝國科會部分經費(NSC 98-2314-B-041-001-MY2) 的補助。

參考資料：

Akaoka, H., & Aston-Jones, G. (1993). Indirect serotonergic agonists attenuate neuronal opiate withdrawal. *Neuroscience*, 54(3), 561-565.

Barnett, P. G., Rodgers, J. H., & Bloch, D. A. (2001). A meta-analysis comparing buprenorphine to methadone for treatment of opiate dependence. *Addiction*, 96(5), 683-690.

Boadle-Biber, M. C., Johannessen, J. N., Narasimhachari, N., & Phan, T. H. (1987). Activation of cortical tryptophan hydroxylase by acute morphine treatment: blockade by

6-hydroxydopamine. *European Journal of Pharmacology*, 139(2), 193-204.

Caille, S., Rodriguez-Arias, M., Minarro, J., Espejo, E. F., Cador, M., & Stinus, L. (2003). Changes in dopaminergic neurotransmission do not alter somatic or motivational opiate withdrawal-induced symptoms in rats. *Behavioral Neuroscience*, 117(5), 995-1005.

Dettmar, P. W., Cowan, A., & Walter, D. S. (1981). A comparison of the neurochemical effects of buprenorphine with those of morphine and haloperidol in rats. *European Journal of Pharmacology*, 69(2), 147-153.

el-Kadi, A. O., & Sharif, S. I. (1995). The role of 5-HT in the expression of morphine withdrawal in mice. *Life Sciences*, 57(5), 511-516.

Fiellin, D. A., Pantalon, M. V., Pakes, J. P., O'Connor, P. G., Chawarski, M., & Schottenfeld, R. S. (2002). Treatment of heroin dependence with buprenorphine in primary care. *The American Journal of Drug and Alcohol Abuse*, 28(2), 231-241.

Ghosh, S., & Grasing, K. (1999). Presynaptic dopaminergic function in the nucleus accumbens following chronic opiate treatment and precipitated withdrawal. *Neurochemical Research*, 24(1), 95-107.

Konijnenberg, C., & Melinder, A. (2011). Prenatal exposure to methadone and buprenorphine: a review of the potential effects on cognitive development. *Child Neuropsychology*, 17(5), 495-519.

Kutz, I., & Reznik, V. (2001). Rapid heroin detoxification using a single high dose of buprenorphine. *Journal of Psychoactive Drugs*, 33(2), 191-193.

- Liu, Y. L., Cheng, A. T., Chen, H. R., & Hsu, Y. P. (2000). Simultaneous HPLC of twelve monoamines and metabolites shows neuroblastoma cell line releases HVA and HIAA. *Biomedical Chromatography*, 14(8), 544-548.
- Lu, L., Su, W. J., Yue, W., Ge, X., Su, F., Pei, G., et al. (2001). Attenuation of morphine dependence and withdrawal in rats by venlafaxine, a serotonin and noradrenaline reuptake inhibitor. *Life Sciences*, 69(1), 37-46.
- Petitjean, S., Stohler, R., Deglon, J. J., Livoti, S., Waldvogel, D., Uehlinger, C., et al. (2001). Double-blind randomized trial of buprenorphine and methadone in opiate dependence. *Drug and Alcohol Dependence*, 62(1), 97-104.
- Pinelli, A., & Trivulzio, S. (1997). 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. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, 38(3), 117-131.
- Pinelli, A., Trivulzio, S., & Ciapponi, P. M. (1997). Quantitative opioid withdrawal signs in rats: effects exerted by clothiapine administration. *Fundamental & Clinical Pharmacology*, 11(4), 346-355.
- Rafieian-Kopaei, M., Gray, A. M., Spencer, P. S., & Sewell, R. D. (1995). Contrasting actions of acute or chronic paroxetine and fluvoxamine on morphine withdrawal-induced place conditioning. *European Journal of Pharmacology*, 275(2), 185-189.
- Raisch, D. W., Fye, C. L., Boardman, K. D., & Sather, M. R. (2002). Opioid dependence treatment, including buprenorphine/naloxone. *The Annals of Pharmacotherapy*, 36(2), 312-321.
- Robinson, S. E. (2002). Buprenorphine: an analgesic with an expanding role in the treatment of opioid addiction. *CNS Drug Reviews*, 8(4), 377-390.
- Schuh, K. J., Walsh, S. L., Bigelow, G. E., Preston, K. L., & Stitzer, M. L. (1996). Buprenorphine, morphine and naloxone effects during ascending morphine maintenance in humans. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 278(2), 836-846.
- Tao, R., & Auerbach, S. B. (1994). Increased extracellular serotonin in rat brain after systemic or intraraphe administration of morphine. *Journal of Neurochemistry*, 63(2), 517-524.
- Tao, R., Ma, Z., & Auerbach, S. B. (1998). Alteration in regulation of serotonin release in rat dorsal raphe nucleus after prolonged exposure to morphine. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 286(1), 481-488.
- Wu, C. C., Chen, J. Y., Tao, P. L., Chen, Y. A., & Yeh, G. C. (2005). Serotonin reuptake inhibitors attenuate morphine withdrawal syndrome in neonatal rats passively exposed to morphine. *European Journal of Pharmacology*, 512(1), 37-42.

Study on the effect of buprenorphine on neurotransmitter levels in morphine dependence rat

Kuo Sheng Liu^{1*} Su Jong Chen² Yu Wen Chen³ K C Sung¹ Jhi Joung Wang⁴

¹Graduate Institute of Pharmaceutical Science,
²Department of Pharmacy,
Chia-Nan University of Pharmacy and Science, Tainan, Taiwan 71710, R.O.C.
³Department of Physical Therapy, China Medical University
⁴Department of Medical Research, Chi-Mei Medical Center

Abstract

Chronic treatment with morphine may induce tolerance and addiction. The withdrawal syndromes, which may result from the stop or dramatic reduction of morphine intake, are identified to be related to several neurotransmitters, such as dopamine and serotonin.

In this study, high performance liquid chromatography-electrochemical detection (HPLC-ECD) was used after microdialysis sampling for the determination of the neurotransmitters in the rat corpus striatum.

As a result, buprenorphine slightly increased the levels of DA, Dopac and HVA, while significantly increased the levels of NE and 5-HTP. In contrast, buprenorphine slightly decreased the levels of 5-HIAA but significantly lowered that of EP. It had no influence on NM. Buprenorphine-mediated effects were similar to that of morphine.

In summary, the impact on reducing the withdrawal symptoms to buprenorphine action may be through similar effects regulated by morphine.

Key words: Buprenorphine; Morphine; Withdrawal symptoms; Neurotransmitter.

*Correspondence: Graduate Institute of Pharmaceutical Science, Chia-Nan University of Pharmacy and Science, Tainan, Taiwan 71710, R.O.C.
Tel: +886-6-2664911Ext2106
Fax: +886-6-3660710
E-mail: lanceliu@mail.chna.edu.tw