

報告內容：

前言：

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。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)。

目前不論何種療法，成效皆不佳，其在藥物使用上之主要思維仍以類嗎啡類為主。然而類嗎啡之成癮因素很多，精神因素也是其中重要之一部份，在我們之前以小鼠跳躍模式，已發現三環抗憂鬱藥中，desipramine具有最佳之療效，其可用來作為buprenorphine之輔助治療藥物，相信還有許多的藥物也能應用於減輕各種戒斷反應，因此若能以另一種治療精神疾病用之藥物如選擇性血清素再回收抑制劑 (selective serotonin reuptakeinhibitors; SSRIs)來做為輔助療法之藥物，將可提供臨床用藥上更廣泛之選擇。

研究目的：

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)，如齧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(6,7)；acetylcholine影響尿液之排泄、體溫之下降、唾液之分泌(5,8)；正腎上腺素(norepinephrine)則和心跳、血壓、唾液之分泌有關(5,8)；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(7,9)，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。

因此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。

文獻探討：

SSRIs為一類較新的抗憂鬱劑，由於副作用較少也較低，目前已普遍使用在臨床上，主要可用來治療憂鬱症、精神疾病與物質濫用(10-11)。其現有藥物包括 citalopram、escitalopram、fluoxetine、fluvoxamine、paroxetine、sertraline及zimelidine等，及目前正在申請中之dapoxetine。SSRIs之作用機轉均為抑制突觸前(presynaptic)神經細胞血清素的回收，與傳統三環抗憂鬱劑不同的是，SSRI 抑制血清素回收選擇性高，而極少作用於正腎上腺素，對 $\alpha 1$ 、組織胺第一型或毒蕈鹼(muscarinic)接受體作用較少，可有效且精確地作用及避免不必要的副作用(12-13)，和傳統之三環類抗憂鬱劑具有同樣療效，而副作用則較少，程度較輕微，安全性較高。目前於歐美先進國家，此類藥物已被當成憂鬱症的第一線治療用藥。

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

(14-15)；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(16)，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(7,17-18)。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(19-20)。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胜肽(endogenous opioid peptides)的釋出(21-22)。Gandariae則說明其可增加細胞在 μ -類鴉片接受器上表現的密度(23)。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(18-19)。

之前之相關文獻說明了SSRIs之作用機轉可能和導致類嗎啡成癮之機制有關。因此我們推想具有此類性質者均應有降低戒斷現象之效果。然而其中還有許多種SSRIs未被提及，且對其作用機制也未進行深入之探討(18-19)，因此本研究即廣泛性地探討仍未被討論或是最新發現之SSRIs如paroxetine等為研究主題，探討其在減癮上的作用情形，並進行和神經傳導物質含量變化上之機轉研究。

研究方法：

第一部份 建立指標神經傳導物質及其代謝物之分析方法

材料與方法

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)；內標準品：L-(-)-isoproterenol (IP)；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 cm³)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 μ 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 Na₂EDTA，以磷酸調至 pH=3)與甲醇，流速為 1 ml/min，樣品注入量為 20 μ 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，CaCl₂ 1.7 mM，MgCl₂ 0.9mM)，以 NaOH 調至 pH=7.2~7.4 透析液流速為 1 μ 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 $^{\circ}$ 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。以手術刀縱切剖開腦部皮膚，以止血鉗將皮膚往左右兩邊稱開，以露出頂骨。以大白鼠腦殼前囟(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。

第二部份 確認神經傳導物質及其代謝物之變化與減輕嗎啡戒斷反應之相關性及其動物模式

材料與方法

1.試劑：

測試藥物：如 morphine、buprenorphine、naloxone；有機溶劑：如乙腈、甲醇；及其它物質如 Citric acid monohydrate、EDTA-disodium salt 等。其中主要藥物 morphine 向管制藥品管理局購買，naloxone、methadone、clonidine 購自 Sigma-Aldrich (Missouri，美國)，buprenorphine 購自 Siegfried 公司 (Zofingen，瑞士)，藥物將溶於 0.9 % saline 中，製成水溶性注射液。

2.動物、飼養環境、分析方法：

同第一部份。

3 動物實驗流程

動物狀態評估：本次實驗將分成各種不同的動物狀態，來進行其體內指標神經傳導物質及其代謝物之變化與減輕嗎啡戒斷反應之相關性的評估，以找出最佳之評估時間點

及狀態。

上述四組不同之實驗動物分別以第一部分之方法給予麻醉、股靜脈插管、腦部探針的植入，隨後於腦部開始進行透析、取採、分析。

將在各組所得之不同時間之各個神經傳導物質及其代謝物的體內濃度繪圖，比較其和基準點之差異，再和目前已知之各種藥物之作用相互比較，試著找出最明顯之差異，作為往後之指標並確認最易觀察之給藥前動物狀態。

5. 資料統計與分析：

實驗所得之數值以平均值的標準差表示。在杜納法測試之後，雙維之重覆測量變異數分析，將被使用在評估特定測試時間點之給藥組和基準點之間的差異。如果有統計意義則將再以邦弗朗尼測試來計算組間的差異。當有需要時則使用邦弗朗尼校正。當 P 值小於 0.05 視為具有顯著差異。

結果與討論：

第一部份 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(如附圖一)，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 2.8~7.5nM，線性迴歸曲線之 r^2 在 0.997~0.999 之間。

第二部份 確認神經傳導物質及其代謝物之變化與減輕嗎啡戒斷反應之相關性及其動物模式

目前實驗結果顯示在給予嗎啡後再給予其它藥物，其神經傳導物質及其代謝物之腦中濃度，可產生和基準點明顯之差異其中之結果如附圖二。

計畫成果自評：

本研究在第一年中預期完成之工作項目，包含建立指標神經傳導物質及其代謝物之分析方法，確認神經傳導物質及其代謝物之變化與減輕嗎啡戒斷反應之相關性及其動物模式。目前除了最後部份之確認神經傳導物質及其代謝物之變化與減輕嗎啡戒斷反應之相關性，數據還在進一步分析、整理、確認中外，大部份皆已順利完成，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 2.8~7.5nM，線性迴歸曲線之 r^2 在 0.997~0.999 之間。

由本年度的研究成果得知，此研究之可行性，且更值得在未來進一步篩選出能有效降低大鼠之戒斷反應之藥物。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。

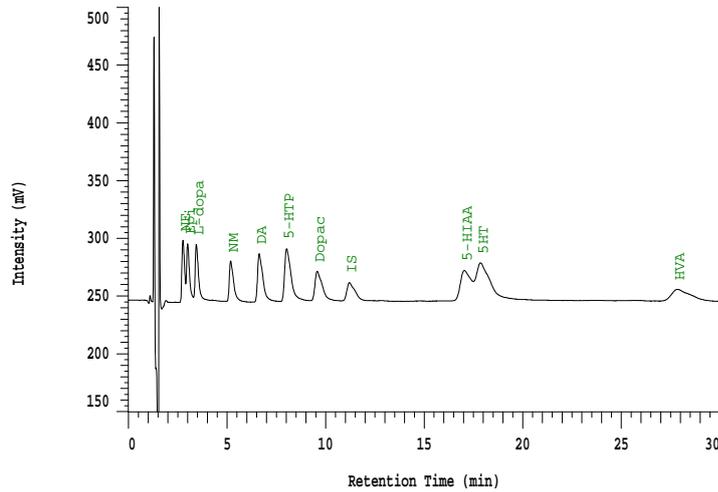
參考文獻：

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. DL Murphy.: Neuropsychiatric disorders and the multiple human brain serotonin receptor subtypes and subsystems. *Neuropsychopharmacology* 1990; 3: 457- 471.
11. VP Singh, NK Jain, SK Kulkarni, et al.: On the antinociceptive effect of fluoxetine, a selective serotonin reuptake inhibitor. *Brain Res.* 2001; 915: 218- 226.
12. BA Sproule, CA Naranjo, KE Bremner, et al.: Selective serotonin reuptake inhibitors and CNS drug interactions: a critical review of the evidence. *Clin. Pharmacokinet.* 1997; 33: 454-471.
13. JG Edwards, I Anderson.: Systematic review and guide to selection of selective serotonin reuptake inhibitors. *Drugs* 1999; 57: 507-533.
14. MC Boadle-Biber, JN Johannessen, N Narasimhachari, et al.: Activation of cortical tryptophan hydroxylase by acute morphine treatment: blockade by 6-hydroxydopamine. *Eur. J. Pharmacol.* 1987; 139: 193-204.
15. R Tao, SB Auerbach.: Increased extracellular serotonin in rat brain after systemic or intraperitoneal administration of morphine. *J. Neurochem.* 1994; 63: 517-524.
16. R Tao, Z Ma, SB Auerbach.: Alteration in regulation of serotonin release in rat dorsal raphe nucleus after prolonged exposure to morphine. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1998; 286: 481-488.
17. H Akaoka, G Aston-Jones.: Indirect serotonergic agonists attenuate neuronal opiate withdrawal. *Neuroscience* 1993; 54: 561-565.
18. L Lu, WJ Su, W Yue, et al.: Attenuation of morphine dependence and withdrawal in rats by venlafaxine, a serotonin and noradrenaline reuptake inhibitor. *Life Sci.* 2001; 69: 37-46.
19. 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.
20. 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.
21. 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.

22. 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.
23. 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.

附圖(一)：



附圖(二)：

