

# 行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

長期酒精攝取對大白鼠腦部神經傳導受體 GABAAR、NMDAR 與  
含硫胺基酸代謝作用之相關性研究---牛磺酸於酒精戒斷的  
臨床意義(2/2)

計畫類別：個別型計畫

計畫編號：NSC94-2320-B-038-008-

執行期間：94 年 08 月 01 日至 95 年 07 月 31 日

執行單位：臺北醫學大學保健營養學研究所

計畫主持人：黃士懿

共同主持人：楊素卿

計畫參與人員：楊惠婷

報告類型：完整報告

報告附件：出席國際會議研究心得報告及發表論文

處理方式：本計畫可公開查詢

中 華 民 國 95 年 10 月 31 日

# 行政院國家科學委員會補助專題研究計畫成果報告

長期酒精攝取對大白鼠腦部神經傳導受體  $GABA_A R$ 、 $NMDAR$  與含硫胺基酸  
代謝作用之相關性研究 --- 牛磺酸之應用價值(2/2)

5

酒精與牛磺酸對於初代星狀細胞神經傳導及其受器作用之影響

10

計畫類別： 個別型計畫       整合型計畫

15 計畫編號：NSC 94-2320-B-038-008

執行期間：94 年 8 月 1 日至 95 年 7 月 31 日

計畫主持人：黃士懿

共同主持人：楊素卿

20 計畫參與人員：楊惠婷

成果報告類型(依經費核定清單規定繳交)： 精簡報告       完整報告

25 執行單位：台北醫學大學 保健營養學系

中華民國 95 年 10 月 30 日

30

# 長期酒精攝取對大白鼠腦部神經傳導受體 GABA<sub>A</sub>R、NMDAR 與含硫胺基酸代謝作用之相關性研究 -- 牛磺酸之應用價值(2/2)

## 酒精與牛磺酸對於初代星狀細胞神經傳導及其受器作用影響

計劃編號：NSC 94-2320-B-038-008

5

執行期限：94 年 8 月 1 日至 95 年 7 月 31 日

主持人：黃士懿 台北醫學大學 保健營養學系

### 研究目的

隨著社會進步，國人的酒精消耗率逐年增加，酒癮盛行率隨之上升。酒精依賴在台灣可謂日漸嚴重的問題。一般說來，酒精依賴性患者的神經系統長期受酒精麻醉，一旦血中酒精濃度降低會出現反彈高亢的反應，身體手腳出現顫抖、焦躁不安、噁心等，還有可能出現癲癇(seizure)，稱為酒精戒斷症狀(alcohol withdraw)<sup>(1,2)</sup>。對於酒癮愈大的患者其戒斷症狀就愈嚴重，會出現視幻覺，意識模糊、發燒、心跳加快、盜汗等，甚至死亡。根據醫學統計，此類病患的死亡率可達4%<sup>(3,4)</sup>。因此，對於減輕酒精戒斷症狀是現今治療酒癮患者一非常重要的關鍵。

目前針對酒癮治療的方式主要是以支持療法為主，除了心理輔導之外，也併有藥物治療。藥物治療上，目前多以 Acamprosate 及 Naltrexone 為主<sup>(5-7)</sup>。而 Acamprosate 與牛磺酸(taurine)為結構類似的化合物。截至目前為止，二者對於腦部呈現之戒斷症狀的調控機制仍有許多不明確的機制尚待釐清；也因為若干研究直接以牛磺酸直接投予對酒精戒斷患者進行症狀改善治療，結果發現可以顯著且有效降低病人對酒精的攝取與戒斷症狀改善<sup>(8,9)</sup>，而其中所牽涉之機轉至今仍不明確。因此本研究擬以酒精戒斷動物模式及初代星狀細胞培養(primary astrocyte culture)模式來探討牛磺酸在酒精戒斷治療上可能之機制及所扮演之角色。

目前為止，研究證實酒精影響腦部神經傳導依

傳導物質不同主要分為三類； $\gamma$ -胺基丁酸( $\gamma$ -aminobutyric acid, GABA)受器，為腦內最主要抑制性神經傳導受器，可藉由增加神經細胞膜氯離子的流入而達到去極化作用，酒精在介入後則會加強神經細胞膜氯離子的流入，增強 GABA 受器的抑制作用，對人體達到鎮靜、類似麻醉的效果。特別的是，酒精並不會對所有 GABA 受器發揮作用，一般說來，酒精對於以 GABA 為神經傳導物的受器作用並不明顯，只有對接受乙醯膽鹼的 GABA<sub>A</sub> 受器有專一性的促進作用<sup>(10)</sup>。

N-甲基-D-天門冬胺酸(N-methyl-D-aspartate, NMDA)受器為酒精進入腦中的第二主要受器，主要的傳遞物質為麩胺酸，在高酒精攝取的情況下，對於 NMDA 受器的作用格外顯著。NMDA 於大腦海馬迴(hippocampus)對於記憶形成過程中的長期增益現象(long term potentiation, LTP)具有調控作用。研究亦指出，長期且高濃度的酒精可藉著調控麩胺酸第五型受器(metotropic glutamate type 5 receptor, mGluR5，為 NMDA 受器的次單位)<sup>(11)</sup>及乙醯膽鹼的釋放而對 NMDA 有極大的抑制作用<sup>(12,13)</sup>，並呈現出劑量效應。

許多研究皆指出，若是長期攝取酒精，則會使腦部上述三類的神經傳導物質及其受器產生所謂神經依賴性(neuroadaptation)，若之後欲停止酒精攝入，則容易因神經受器過度被活化，但能與受器結合的酒精卻急遽下降，而引發腦部神經傳導異常，

此時有酒癮者會產生噁心、嘔吐、癲癇及情緒低落等所謂戒斷症狀<sup>(1,2,10,12)</sup>。因此，在酒癮患者的藥物治療上，若能有效減緩因酒精中斷而產生的戒斷症狀，降低腦部神經傳導物質對酒精的依賴，藉以提升戒酒治療的成效。

牛磺酸在早期即發現與幼兒時期神經發展有極大的相關性，許多研究亦顯示牛磺酸具有保護神經細胞的作用，一般說來，牛磺酸於腦部可能具有保護作用的機轉為維持細胞膜的穩定性、調節細胞膜的滲透壓以及控制細胞鈣離子的流動等等<sup>(14)</sup>。另一方面，牛磺酸也與神經傳導受器有相當的親和力，如 NMDA 受器，牛磺酸可以作用在 NMDA 受器上，降低氨所造成的過度的 cGMP 及氫氧自由基產生<sup>(15)</sup>，此外，牛磺酸在 GABA 受器上亦有促進的效果。近來研究顯示，短期攝入酒精，則腦部的牛磺酸濃度有明顯上升的情形，然而長期酒精攝取之大白鼠，腦內牛磺酸濃度驟降，血液中則有較低的牛磺酸濃度<sup>(16)</sup>。2002 年 Jeffery 等人的研究亦發現，腦部星狀細胞(astrocyte)具有調控腦部細胞滲透壓及胺基酸類神經傳導物質的平衡，若長期添加酒精會造成牛磺酸大量的流失<sup>(17)</sup>。上述這些結果均顯示牛磺酸在酒精於腦部正常運作似乎扮演重要的角色。綜合上述，牛磺酸於腦內的作用可能類似於酒精的角色，並且對於腦部細胞扮演著保護的角色，因此在酒精成癮戒斷患者，牛磺酸的使用是否可以一方面替代酒精，使神經傳導受器不至於因生理酒精濃度降低而產生戒斷症狀，則有待進一步研究釐清。

#### 實驗方法：

以 neurospheres 置入含有 Earle's 鹽類、10% 加熱過的馬血清、100 U/mL penicillin、100  $\mu$ g/mL streptomycin、0.25  $\mu$ g/mL Fungizone 的六孔盤進行培養 3~4 週至細胞間分支形成與增殖至足夠數目後，即進入實驗。

分為二組(50mM 酒精及控制組)，以分化培養液於 chamber slide 中進行星狀細胞(astrocyte)的分化，分化 7 天後進行觀察。細胞數目於每個 well 中固定為  $5 \times 10^3$  個。

將長成的星狀細胞置換成含酒精或是乙醛的培養基(100 mM)，以封口膜封住培養皿，置入底盤含有等濃度酒精的培養箱培養 96 小時，對照組則是以不含酒精之培養基培養之。培養 96 小時後將酒精組細胞分為兩組，一組將培養基改為不含酒精的組成，以模擬酒精戒斷時腦部的情形，另一組則維持原培養基。之後將 85 mM 的牛磺酸添加入各組，觀察一小時內細胞的變化。並進行星狀細胞 taurine transporter 及 excited amino acid transporters 的表現與星狀細胞 GABA<sub>A</sub>、NMDAR 之表現分析。

觀察項目：(以共軛焦顯微鏡進行):

1. 牛磺酸的表現 (FITC 標定);
2. GABA<sub>A</sub>  $\alpha$ 4,5 受器於神經細胞上的表現 (Rhodamine 標定, 561nm, 35%);
3. 以 GFAP 標定星狀細胞，觀察其自 neurospheres 分化的比例是否受到酒精影響。(FITC 標定)

另以以分化完成之細胞，以酒精培養二日後以雙標定方式(double labeling)觀察星狀細胞上牛磺酸及 GABA<sub>A</sub>  $\alpha$ 4,5 受器的表現。

#### 統計分析

實驗期間各組分析值以 Mean  $\pm$  SD 表示，以 three-way ANOVA 比較各組間的差異。以  $p < 0.05$  表示具有統計上的差異。

#### 結果：

由圖一可知，神經原細胞(neurospheres)於分化七日後於控制組細胞已出現較完整的分化(有觸角延伸)，而酒精組則無顯著分化作用，同時在牛磺酸的表現方面也較控制組低，顯示出酒精在影響神經分化時期，同時也增加了牛磺酸的消耗。圖二顯示了神經細胞中對酒精較為敏感的 GABA<sub>A</sub> 受器， $\alpha$ 4 及  $\alpha$ 5 型，同時也顯示出酒精的存在使得 GABA 受器的表現下降(單位螢光強度較低)。圖三則顯示出在相同培養範圍內，酒精組中星狀細胞所分化出的數目較少。

將以分化完成之神經細胞，以 50mM 酒精培養 2 日後，以星狀細胞標記(GFAP)先行標定(FITC 染色)，再行標定牛磺酸及 GABA<sub>A</sub> 受器 (Rhodamine 染色)，將圖兩兩重疊，比對出星狀細胞上的目標物表現，並以目標物與 GFAP 表現之螢光強度相對值於兩組中比較(圖四)，結果發現，酒精亦降低了星狀細胞上牛磺酸及 GABA<sub>A</sub> 受器的表現。

-----  
**Please insert Figures here**  
-----

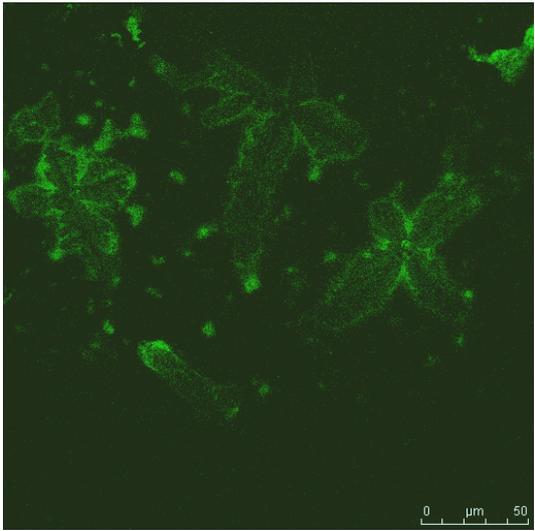
上述結果證實，酒精會影響神經細胞的分化，並且影響牛磺酸的釋放。對於已分化完全的細胞，酒精也對於 GABA<sub>A</sub> 受器的表現造成影響。

## References

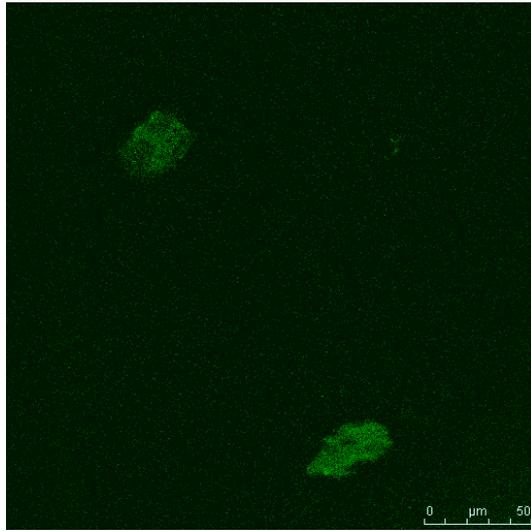
1. Mayo-Smith MF and Bernard D (1995) at-onset seizures in alcohol withdrawal. *Alcohol Clin Exp Res* 19: 656-659.
2. Ng SK, Hanser WA, Brust JC, et al. (1988) Alcohol consumption and withdrawal in new onset seizures. *N Engl J Med* 319: 666-673.
3. Rehm J, Room R, Monteiro M, Gmel G, Graham K, Rehn N, Sempos CT and Jernigan D (2003) Alcohol as a risk factor for global burden of disease. *Eur Addict Res* 9: 157-64.
4. Rehm J, Room R, Graham K, Monteiro M, Gmel G and Sempos CT (2003) The relationship of average volume of alcohol consumption and patterns of drinking to burden of disease: an overview. *Addiction* 98: 1209-1228.
5. Sab H, Soyka M, Mann K, et al. (1996) Relapse prevention by acamprosate: results from a placebo - controlled study on alcohol dependence. *Arch Gen Psychiatry* 53: 673-680.
6. Spanagel R and Zieglansberger W (1997) Anti-craving compounds for ethanol: new pharmacological tools to study addictive processes. *Trends Pharmacol Sci* 18: 54-59.
7. Ali R, Thomas P, White J, McGregor C, Danz C, Gowing L, Stegink A and Athanasos P (2003) Antagonist-precipitated heroin withdrawal under anaesthetic prior to maintenance naltrexone treatment: determinants of withdrawal severity. *Drug Alcohol Rev* 22: 425-431.
8. Ward RJ, Marshall EJ, Ball D, Martinez J and De Witte P (1999) Homeostasis of taurine and glutamate plasma levels after acute and chronic ethanol administration in man. *Neurosci Res Comm.* 24: 41-49.
9. Ikeda H (1007) Effects of taurine on alcohol withdrawal. *Lancet* 2: 509.
10. June HL, Foster KL, McKay PF, et al., (2003) The reinforcing properties of alcohol is mediated by GABAA1 receptors in the ventral pallidum. *Neuropsychopharmacology.* 28: 2124-2137.
11. Harvey SC, Foster KL, McKay PF et al. (2002) The GABAA receptor alpha1 subtype in the ventral pallidum regulates alcohol-seeking behaviors. *J Neurosci* 22: 3765-3775.
12. Siggins GR, Martin G, Roberto M, Nie Z, Madamba S and De Lecea L (2003) Glutamatergic Transmission in Opiate and Alcohol Dependence. *Ann N Y Acad Sci* 1003: 196-211.
13. Krystal JH, Petrakis IL, Mason G, Trevisan L and D'Souza DC (2003) N-methyl-D-aspartate glutamate receptors and alcoholism: reward, dependence, treatment, and vulnerability. *Pharmacol Ther* 99: 79-94.
14. Birdsall TC (1998) Therapeutic applications of taurine. *Alt Med Rev* 3: 128-136.
15. Hilgier W, Anderzhanova E, Oja SS, Saransaari P and Albert J (2003) Taurine

- reduces ammonia- and N-methyl-D-aspartate-induced accumulation of cyclic GMP and hydroxyl radicals in microdialysates of the rat striatum. *Eur J Pharmacol* 468:21-25.
16. Abdel-Nabi R, Milakofsky L, Hofford JM, Hare TA and Vogel WH (1996) Effect of ethanol on amino acids and related compounds in rat plasma, heart, aorta, bronchus, and pancreas. *Alcohol* 13: 171-174.
17. Allen JW, Mutkus LA and Aschner M (2002) Chronic ethanol produces increased taurine transport and efflux in cultured astrocytes. *Neurotoxicology* 23:693-700.

圖一(A) 控制組

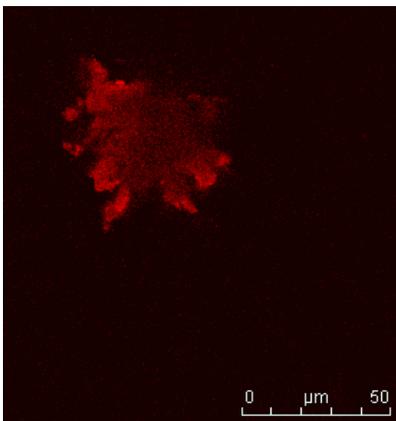


圖一(B) 酒精組(50 mM)

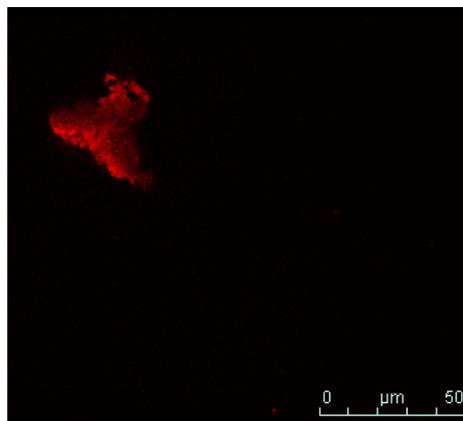


圖一、分化七日後以細胞 taurine 之表現。於相同條件下在共軛焦顯微鏡觀察所得之結果(gain:1199, pinhole:45.46  $\mu\text{m}$ , zoom:1.00)

圖二(A)控制組

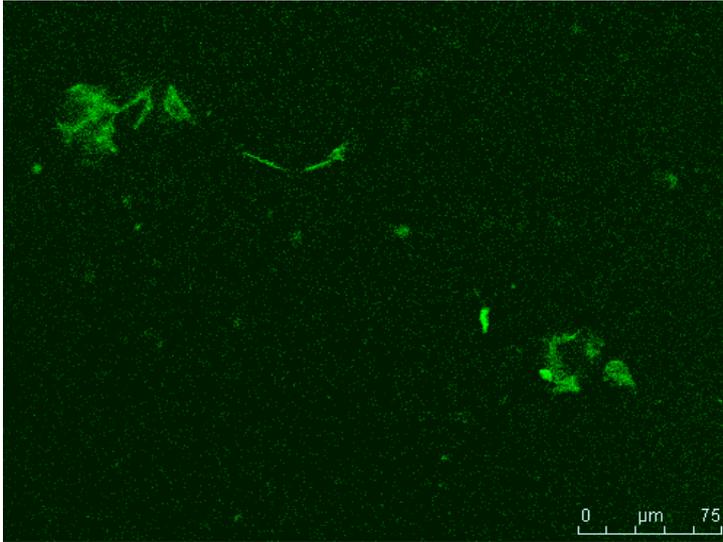


圖二(B) 酒精組(50mM)

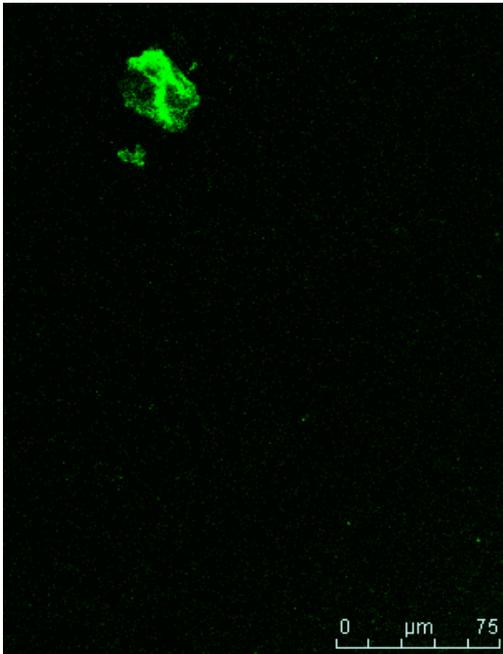


圖二、分化七日後以細胞 GABA 受器(A $\alpha$ 4,5)之表現。於相同條件下在共軛焦顯微鏡觀察所得之結果 (gain:1103, pinhole:45.46  $\mu\text{m}$ , zoom:1.00)

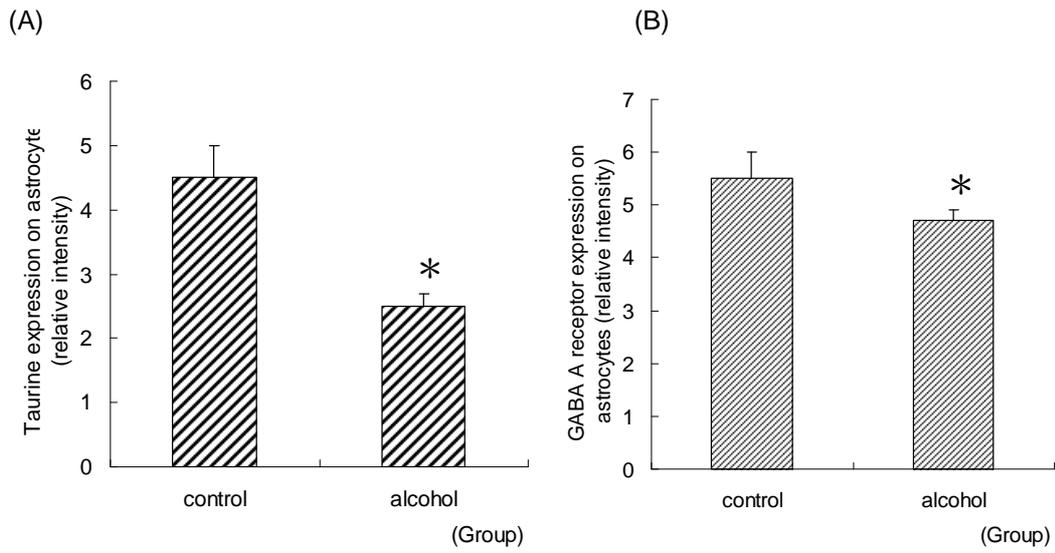
圖三(A)控制組



圖三(B) 酒精組(50 mM)



圖三、分化七日後星狀細胞之表現。於相同條件下在共軛焦顯微鏡觀察所得之結果(gain:1190, pinhole:45.46 m, zoom:1.00)



圖四、酒精對於星狀細胞中(A)牛磺酸及(B) GABA A 受器表現的影響。以雙標定染色法進行(三重複所之結果)。