PG9501-0595 (37頁)

研究計畫編號：DOH95-NNB-1019
科資中心編號：PG9501-0595

行政院衛生署管制藥品管理局
九十五年度科技研究發展計畫

以動物模式探討產前長期暴露於甲基安非他命對中樞神經發育所產生的毒性－針對血清及興奮性氨基酸傳導系統的研究

研　究　報　告

執行機構：台北醫學大學醫學研究所
計畫主持人：葉健全 教授
研究人員：郭秋吟

執行期間：95年 1 月 1 日至95年12月31日

＊＊本研究報告僅供參考，不代表本局意見＊＊

目　錄

頁　碼

目　錄 I

圖　次 II

表　次 III

中文摘要 IV

Abstract V

壹、前言 1

貳、材料與方法 11

　、結果 14

肆、討論 24

伍、結論與建議 26

陸、參考文獻 27

圖 次

頁 碼

圖一、一個月內出生幼鼠體重增加趨勢 (17)

圖二、一個月內出生幼鼠體溫計錄 (18)

圖三: 不同年齡天數之正常出生幼鼠之海馬迴 NR1、NR2A 及 NR2B 之表現量 (19)

圖四: 在七天(PND7)、十四(PND14)天及三十天(PND30)控制組(Con)及甲基安非它命組(MAMP)幼鼠海馬迴中 NR1、NR2A 及 NR2B 之表現量的比較。 (20)

圖五: 在七天(PND7)、十四(PND14)天及三十天(PND30)控制組(Con)及甲基安非它命組(MAMP)幼鼠海馬迴中磷酸化 pGSK-3β/GSK-3β 之比例的比較。 (21)

圖六. 在七天(PND7)、十四(PND14)天及三十天(PND30)控制組(Con)及甲基安非它命組(MAMP)幼鼠海馬迴中 5-HT1A、 5-HT1B、5-HT2A 及 5-HT2B 之表現量的比較。 (22)

圖七: 在七天(PND7)、十四(PND14)天及三十天(PND30)控制組(Con)及甲基安非它命組(MAMP)幼鼠海馬迴中磷酸化 NR2B 表現量的比較。 (23)

表 次

頁 碼

表一、 (15)

中文摘要

以動物模式探討產前長期暴露於甲基安非他命對中樞神經發育所產生的毒性－針對血清素及興奮性氨基酸傳導系統的研究

關鍵字：甲基安非他命 幼年大白鼠 NMDA 接受器 GSK

由於甲基安非他命對於中樞神經系統的神經毒性，會透過降低血清素傳導系統的活性及提高興奮性氨基酸接受器之亞型 NMDA (N-methyl-D-asparate) 接受器的活性來產生。有證據顯示安非他命也會對肝醣合成酶激酶(GSK-3beta)的活化產生影響 GSK-3beta 是早期胚胎發育和神經細胞發展很重要的酶，其活性的改變會導致腦神經功能的變化。而 GSK-3beta 的活化也受到腦中血清素及 NMDA 接受器的調控。本研究計畫主要的目的，在於建立一個胎兒時期長期暴露於甲基安非他命的幼年動物模式並偵測幼鼠腦中血清素及 NMD 接受器的表現量及 GSK-3beta 的活化是否會受到甲基安非他命的影響。我們以翻身反射及學習測試來偵測幼鼠行為發展的影響以西方點默法來定量幼鼠七天、十四天及三十天時其大腦皮質、海馬迴及紋狀體中血清素接受器 5-HT1A、1B、2A、2B 的表現量以及 NMDA 接受器亞型蛋白 NR1、NR2A、NR2B 的表現量。並且定量 GSK-3beta 的表現量以及其絲氨酸 9 磷酸化的情形。結果發現甲基安非他命組其出生後一週內體溫較控制組低且一個月內其體重增加也較低。而在甲基安非他命組於七天大時海馬迴之 NR1 及 NR2A 均較同年齡之控制組低但是 NR2B 並無顯著差異。而甲基安非他命組於十四天及三十天大與控制組間無明顯差異。相反的甲基安非他命組於七天、十四天及三十天大時海馬迴之磷酸化 pGSK-3β/GSK-3β 比例均較同年齡之控制組高。本計劃結果將有助於進一步瞭解甲基安非他命影響胎兒腦部發育的機制，並且提供未來在藥物治療上以 NMDA 接受器的拮抗劑、血清素再吸收抑制劑或選擇性 GSK-3beta 抑制劑在治療產前甲基安非他命對幼鼠發育發展所造成影響上的可能性的重要評估

Abstract

keyword : methamphetamine, NMDA receptor, GSK, developing rats

Methamphetamine (MAMP) is one of the leading abused drug in Taiwan society. There is increased incidence of children born to mother addicted to MAMP, suggesting that the potential risk of abnormal neuropsychological development in these children. To identify the impact to neural development especially in the neuroplasticity of hippocampus, we determined the physical growth and body temperature in the rats born to dams rats received daily subcutaneous injection of MAMP (5 mg/kg) (MAMP group rats) or normal saline (control group rats) . We also used immunoblotting assay to determine the expression of NMDA receptor subunits, NR1,NR2A and NR2B in the hippocampus of these rats on day 7 , 14 and 30. The results showed that the rats born to MAPH-addicted rats had lower body temperature during the fist week after birth, and had lower body weight gain during the first postnatal month as compared to that of control rats. In addition, the expression of NR1A and NR2A of MAMPH group on day 7 is significantly lower that of control rats. However the expression of NR2B was not difference between these two groups of rats. On the contrary, the ratio of pGSK-3β/GSK-3β is significantly increased in MAPH group on day 7, 14 and 30. These results suggest that prenatal exposure to MAMPH could induce an subunit-selective down regulation of NMDA receptor with an increased in the GSK-3β activation in the hippocampus, an important region for the developmental of learning and memory in the developing rats.

壹、前言

甲基安非他命是常見的濫用藥物之一，是安非他命的衍生物，但其對於中樞神經的影響性和成癮性皆比安非他命更強，它們在構造上與天然兒茶酚（如腎上腺素、多巴胺等）類似，屬於中樞神經興奮劑，吸食者初用時會有自信、精力旺盛、振奮、欣快和滿足的感覺，但成癮後一旦停止吸食，便會產生戒斷症狀，包括疲倦、沮喪、焦慮、易怒、全身無力等症狀。長期吸食甲基安非他命對生理的影響包括食慾減弱、體溫昇高、出汗增加、心跳加速、血壓升高、肢體活動增加、記憶力降低、失眠、焦慮、妄想、暴力行為等，甚至會發生類似妄想型精神分裂症之精神病變，以及腦血管損傷和心臟疾病等。由於甲基安非他命對於中樞神經系統中的多巴鞍和血清素細胞具有神經毒性，長期吸食甲基安非他命還會引起腦中神經傳導素多巴胺和血清素的含量降低，而導致肢體運動失調，產生類似帕金森氏症的狀況。

由於濫用甲基安非他命的族群以青少年和年輕成人為主，而這些人們正值生育年齡，有些婦女可能於懷孕期間持續吸食甲基安非他命，造成腹中胎兒在發育期中長期受到甲基安非他命的影響。關於產前長期暴露於甲基安非他命對於胎兒發育影響的相關研究仍然有限，研究報告指

出孕婦吸食甲基安非他命可能造成懷孕早期的流產、早產、胎盤早期剝離等情形，且她們所生下的嬰兒和未吸食甲安孕婦所生的嬰兒比較起來，明顯有身長較短、體重較輕、頭圍較小的情形(Little et al.,1988; Smith et al.,2003)，許多還有睡眠異常、進食較少、顫抖、肌肉張力過強等明顯脫癮症狀的產生(Oro & Dixon,1987; Smith et al.,2003)，並有些兔唇、心臟缺陷、膽道閉鎖(Plessinger,1998)等個案出現，長大後也較容易有神經行為功能上的改變，較容易具有侵略性人格(Billing et al.,1988)。一項研究對於 65 名吸食安非他命婦女所生孩童從出生起作長達十四年的追蹤，發現這些孩童雖然大多數在寄養家庭中長大，但到了十四五歲的年齡時，數學、語文和體育方面的表現皆仍然明顯落後同齡兒童，顯示胎兒時期暴露於安非他命對兒童身心發展的影響至少持續到青少年時期(Cernerud et al.,1996)。

產前施打甲基安非他命的動物模式實驗中也發現，對懷孕母鼠連續施打甲安明顯提高母鼠死亡、生產失敗、或幼鼠早夭等情形(Martin et al.,1976; Acuff-Smith et al.,1992)。施打甲安的懷孕母鼠容易早產、胎數較少、懷孕期間體重增加也較少(Martin,1975; Martin et al.,1976)，所生下的幼鼠則有死亡率較高、生長及動作發展較遲緩、眼部缺陷及顎裂等情形(Cho et al.,1991; Yamamoto et al.,1992; Acuff-Smith et al.,1996)。更重要的

是在出生後一或二個月時學習行為測試發現這些幼鼠其表現均較正常幼鼠差。因此這些研究結果都顯示安非他命和甲基安非他命對發育中胎兒的腦部具有神經毒性，因此孕婦吸食甲基安非他命對於下一代所產生的毒害不容忽視。

然而甲基安非他命對於胎兒腦部發育影響的機制尚不清楚，也沒有治療的方法。若能對此問題能有進一步瞭解，將有助於尋找治療的方向。已有明顯證據顯示長期給於成年成年大白鼠甲基安非他命可以對大腦之多巴胺(dopamine)及血清素(serotonin)神經傳導系統產生神經毒性降低二者的活性(Bakhit *et al.*, 1981, Seiden & Sabol, 1996)。 然而，對幼年動物的研究並不多。有實驗發現產前給於懷孕小黑鼠甲基安非他命可以加速所生幼鼠間腦神經培養細胞中血清素傳導系統的發展(Won *et al.*, 2002)。相反的，有研究顯示在懷孕時給予大白鼠甲基安非他命會降低其所生幼鼠在六十天大其腦部精血清素刺激所產生的賀爾蒙釋放反應(Cabrera *et al.*, 1993)。血清素傳導系統是胎兒腦部最早發育形成的神經傳導系統，其功能會影響到整體腦神經功能的發育。血清素神經元(serotonergic neurons)在大腦神經細胞胚胎發育早期就出現，研究顯示血清素對於神經細胞發展過程扮演非常重要的角色，包括神經細胞形態形成、神經膠細胞增生、神經細胞分化、突觸生成及血清素神經元與其作用器官之間聯結等

(Lauder and Krebs, 1978; Lauder, 1990; Bennett-Clarke et al., 1994)。血清素對大腦神經細胞亦具有調控細胞增生及分化的能力 (Ahmad and Zamenhof, 1978; Mattson, 1988; LoTurco et al., 1995)。在大腦，和血清素相互作用的受體(receptors)至少有 14 種，依其所表現的形態、對血清素的親和力、訊息傳遞路徑以及功能上的不同區分為 7 群，5-HT_1、5-HT_2、5-HT_3、5-HT_4、5-HT5、5-HT_6 以及 5-HT_7 (Rottenstone and Sato, 1979; Martin and Humphrey, 1994; Saudi and Hen, 1994) 。例如：5-HT_{1A} receptor 在中樞神經系統早期就已出現，其與星形細胞 (astrocyte) S-100β 的分泌有關，並減低神經元 c-AMP 濃度。這些行為可提供細胞內骨架的穩定度，並導致細胞分化同時停止神經細胞增生。而 5-HT_{2A} receptor 對血清素的親和力比 5-HT_{1A} receptor 低一千倍，發展出來也比較慢。5-HT_{2A} receptor 與星形細胞的 glycogenolysis 有關，並可增加神經元的可利用鈣離子 (Azmitia, 2001)。這些行為會使細胞內骨架的穩定度變差，並可導致神經細胞增生、突觸生成及細胞凋亡。5-HT_{1A} 的促進劑(agonist) (如 Bay × 3702) 對於缺氧或缺血導致麩氨酸(glutamate)過量的大腦細胞具有保護作用 (Alessandri et al., 1999; Mauler et al., 2001) ，亦有學者發現失去血清營養的神經細胞及給予細胞毒性物質的腦神經細胞，5-HT_{1A} 的促進劑也具有保護作用(Semkova et al., 1998; Suchanek et al., 1998; Ahlemeyer et al.,

1999)。相反的，以 3,4-methylenedioxy - methamphetaine (MDMA)結合並活化 5-HT_{1A} receptor 可使培養中的血清素神經元細胞引起鈣離子相關細胞毒性(Azmitia et al., 1990) 。長期給於懷孕母鼠安非他命的衍生物 D-fenfluramine(其可促進血清素釋放)，可使得所生幼鼠其學習能力下降 (Morford et al 2002)。由此可見產前長期暴露於甲基安非他命會對幼鼠其血清素系統產生影響。而此可能為是導致學習行為及其他生理性變化之一個重要的神經病理機轉。血清素系統的變化有可能是因血清素合成、釋放及代謝。但此可能性不被前各述研究結果所支持。另一可能便是血清素接受器的量發生變化。這包含主要的接受器如 5-$HT1_A$、5-$HT1_B$ 、5-$HT2_A$ 及 $5HT2_B$ 。有鑑於此我們將在本研究計畫針對此部分進行分析。

興奮性氨基酸之一亞型接受器 NMDA(N-methyl-D-aspartate)接受器所產生的神經傳導活性是神經發育不可或缺的。阻斷或影響 NMDA 接受器活性會影響腦神經分化及可塑性的產生進而抑致學習等重要功能的發育。對於脊椎動物的中樞神經系統，NMDA 接受器在神經發育、神經可塑性和調節大腦神經突觸的訊號傳遞都扮演重要的角色，從而影響人類及動物的學習、記憶和其它認知的功能。NMDA 接受器在各種神經系統疾病的病理機轉上亦有一定程度的了解及應用，如研究發現利用 NMDA 受體的拮抗劑可有效減低因缺血而引起的細胞傷害(Sheardown et al.,

1990)；而以 NMDA 接受器的拮抗劑(MK801, Dextromethorphen, ketamine)阻塞 NMDA 接受器體的離子通道可以明顯舒緩癲癇發作的症狀(Schmitt et al., 1994)，顯示 NMDA 接受器對於神經系統疾病的治病機轉上亦有相當重要的地位。在神經發育的過程中，神經細胞會進行移動（migration）到特定的區域進行組織化（organization），也就是神經細胞在進行分化的狀態。過去研究指出，在神經細胞的 migration 和神經細胞的突觸可塑性都和 NMDA 接受器息息相關（Komuro & Rakic, 1993）。NMDA 接受器的活化可以調節神經細胞的 migration (Komuro & Rakic, 1993; Rossi and Slater, 1993)及刺激神經軸突和神經樹突的生長(Pearce et al., 1987)。若加入 NMDA 接受器的拮抗劑如：MK801, D-AP5 將發現神經細胞所必需進行的 migration 會受到抑制(Schmitt et al., 1994)；此外，NMDA 接受器的拮抗劑會使動物在發育及成熟時期對於學習和記憶的能力減低或喪失(Morris, 1989)，表示 NMDA 接受器的活化對於神經系統在發育與分化時期扮演了一個相當重要的角色。如果 NMDA 接受器的表現受到影響，有可能導致神經發育的異常。NMDA 接受器蛋白是由多個次單元(subunit)蛋白結合而形成，目前已知的次單元有 NR1 、NR2 以及 NR3，而 NR2 可再細分成 NR2A、NR2B、NR2C 及 NR2D 等(Kutsuwada et al., 1992)。NR1、NR2A、NR2B、NR2C 以及 NR2D 分別是由 920、1445、1456、

1220 以及 1296 個胺基酸所組成，若以抗體來確認 NMDA 接受器各次單元，則其表現的分子量大小分別為 120、180、180、140、150KD。在結構上，NR1、NR2A 其胺基酸序列有 80-90%的相似性，而其兩側末端有 carboxyl 基及氨基，在 amino 基端有 45-60%的相似性，而在 carboxyl 基端只有 20-30%的相似性。NR1 及 NR2A 還具有可供 protein kinase A, protein kinase C 以及 calcium-calmodulin kinase II 作用的磷酸化位置。在這些 NMDA 受體次單元中以 NR1 為活化 NMDA 受體所必須的基本次單元，並且 NR1 本身就具備了 NMDA 接受器的電生理及藥理學上的特性。而 NR2 則會影響 NMDA 接受器本身對於 glycine 和鎂離子的親和力，若 NR1 與 NR2 共同組合成 NMDA 接受器，則會提升 NMDA 接受器的反應。並且不同的 NR2 次單元與 NR1 所構成的 NMDA 接受器，其電生理特性也會有明顯的不同。

過去在成鼠上有研究發現 NMDA 接受器拮抗劑如 MK-801 和 dextromethorphan 能保護神經細胞對抗甲基安非他命的神經毒性(Miller & O'Callaghan,1994; O'Callaghan & Miller,1994; Sonsalla et al.,1998)，表示 NMDA 接受器的過度活化是甲基安非他命的神經毒性形成的一個重要機制。由此推測有可能使腦部細胞中 NMDA 接受器的質或量上發生了變化。然而，是否甲基安非他命對成長中幼鼠也會有相同的毒性作用值得

探討，特別是過去研究均顯示產前暴露於甲基安非他命之幼鼠會有學習能力的問題。因此，本研究將偵測產前暴露於甲基安非他命是否會影響到 NMDA 接受器的發展表現，特別是針對與學習及行為控制有關之腦區如海馬迴、大腦皮質及紋狀體。我們將以西方點默法針對幾個 NMDA 接受器亞型蛋白進行量的分析，這包括 NR1、NR2A 及 NR2B。

肝醣合成酶激酶 glycogen synthase kinase-3 beta (GSK-3beta) 最早在 20 多年前被發現時，原本只知道它是肝醣合成路徑中調節肝醣合成酶活性的一個磷酸激酶，受到胰島素接受器傳導路徑的調控(Roach,1981)。許多年之後，在果蠅和牛蛙的研究中發現，GSK-3 在早期胚胎的發育中主導細胞命運 (cell fate)的調控。在果蠅胚胎中，GSK-3 的同源分子 sheggy 及其上下游的 Wnt 傳導路徑決定了果蠅胚胎體節的極性 (segment polarity) (Bejsovec,1999)。之後又發現，以鋰鹽刺激牛蛙胚胎所形成的形態，與在胚胎腹面表現 dominant negative 形突變的 GSK-3 beta 蛋白所形成的形態相同(Hedgepeth *et al.*,1997)，才發現鋰鹽能抑制 GSK-3 的活性，因而意外發現鋰鹽在治療躁鬱症上的機轉。GSK-3 beta 的絲氨酸 9 磷酸化後，成不活化狀態，而絲氨酸 9 去磷酸化後則成活化狀態。近十年來研究陸續發現 GSK-3 beta 與許多細胞訊息傳遞路徑有關，除了胰島素和 Wnt 路徑，還受 EGF、FGF、phorbolester 等因子的調控(Grimes &

Jope,2001)；現在已知 GSK-3beta 的表現和磷酸化程度的變化與阿茲海默症及海綿樣腦病變 TSE 等神經退化性疾病、精神分裂症、躁鬱症的病因，以及生理時鐘的調控有著很密切的關係；選擇性 GSK-3beta 抑制劑用於治療這些疾病的可能性也已有廣泛的研究和探討(Eldar-Finkelman,2002; Meijer *et al.*,2004)。另外有研究指出，對大白鼠單次施打 d-安非他命即可顯著提高 GSK-3beta 的磷酸化程度(Svenningsson *et al.*,2003)，在小鼠以 d-fenfluramine 提高腦中血清素的濃度後，GSK-3beta 的磷酸化即提高數倍(Li *et al.*,2004)，顯示 GSK-3beta 的磷酸化和活性受到血清素傳導系統的調控。研究顯示，對於 GSK-3beta 活性有抑制效果的鋰鹽在大白鼠大腦皮質細胞培養中，對於興奮性氨基酸的毒性有保護效果，並能降低 NMDA 接受器上 NR2B 次單元酪氨酸 1472 磷酸化的程度，因而降低 NMDA 接受器的活性(Hashimoto *et al.*,2002)；選擇性 GSK-3beta 抑制劑在細胞培養中也能有效地對抗興奮性毒性(Facci *et al.*,2003)，因此 GSK-3beta 和 NMDA 接受器的活性之間可能有某種關聯。由於 GSK-3beta 在早期胚胎發育和神經細胞發展中扮演著很重要的角色(Arevalo & Chao,2005)，也和細胞的存活有關，提高 GSK-3beta 的磷酸化程度抑制 GSK-3beta 的活性，對神經細胞有保護的作用。根據上述研究結果推測，GSK-3beta 有可能在甲基安非他命的神經毒性及其對胎兒腦部發育的影

響中扮演著某種角色。因此本計劃中將探討產前甲基安非他命對發育中幼鼠腦部奮性氨基酸 NMDA 接受器及血清素接受器所造成的影響，以及肝醣合成酶激酶 GSK-3beta 在其中的關聯性，並進而評估 dextromethorphan 等 NMDA 接受器的拮抗劑、fluoxetine 等選擇性血清素再吸收抑制劑、以及選擇性 GSK-3beta 抑制劑在治療產前甲基安非他命所造成神經毒性上的可行性。

貳、材料與方法

1. 實驗動物及化學藥品：

母大白鼠(Sprauge-Dawley 重 200~250 克，由國家實驗動物中心購得)，個別飼養於壓克力籠內，安置於在台北醫學大學動物中心內，給予充足的食物和水，並維持在攝氏 24 左右。所有動物實驗依遵照北醫動物中心的指導方針。甲基安非他命將由中華民國管制藥品管理局購得。

2. 產前施打甲基安非他命的動物模式：

甲安組母鼠從配種前 7 天開始，每天兩次以皮下注射施打甲基安非他命（5 mg/kg/day）；受孕後持續施打至生產。控制組母鼠則每天兩次以皮下注射施打等體積的生理食鹽水。每隻母鼠所產下幼鼠的數目和出生後一週內的死亡數目皆分別記錄。

3. 初生小鼠體溫和體重的測量：

初生小鼠腹部中央的體溫以測量體表溫度的微探針感應器（BAT-12，Physitemp Intrument, NJ., USA）測量，其靈敏度為攝氏 0.1 度。此一部位的體溫在初生幼鼠上起伏很小，較肛溫低約攝氏 1.5~2 度（但肛溫測量操作上較困難，且在容易對初生幼鼠造成傷害）。第一次

測量於出生後 12 小時內進行，出生兩天內每 12 小時測量一次，之後每天上午 10 點至 11 點間測量一次。體重則以靈敏度 0.002 克的電子天平測量，與體溫的測量同時進行。

4. 腦部組織的置備：

小鼠於不同天數時斷頭取腦，並將每隻小鼠的大腦、小腦、海馬迴、斜紋體等不同部位分離，以液態氮急凍後保存於攝氏零下 80 度的冷凍櫃中。置備組織均質液時，冷凍的組織以含有 10 μM PMSF、15 μM pepstatin A 及 2 μM leupeptin 等蛋白酶抑制劑之緩衝液（50 mM tris-acetate/5mM EDTA/0.1mM, pH 7.4）利用超音波震盪均質化。蛋白質濃度則以 Bio-Rad 蛋白分析試劑進行定量。

5. 西方點墨法：

20 μg 的組織均質液以 10 % SDS-polyacrylamide gel 進行電泳分離，並轉印到 PVDF 膜上。血清素接受器 5-HT1A、1B、2A、2B 次單元、NMDA 接受器 NR1、NR2A、NR2B 次單元和 GSK-3beta 的表現量皆各別以其專一性抗體和適當的二次抗體來偵測，NR2B 上酪氨酸 1472 磷酸化以及 GSK-3beta 絲氨酸 9 磷酸化的情形則各別以其磷酸化專一性抗體和適當的二次抗體來偵測；再以化學冷光（ECL）偵測試劑以及 X-光底片進行感光。其訊號再以影像處理系統進行分析。

9. 統計方法：

採用 student t test 或 one way ANOVA with post hoc Newmans-Keuls pair test。

、結果

(一)動物模式建立

我們初期分別以三種不同甲基安非他命劑量(5mg/kg、7.5mg/kg 及 10mg/kg)施打於已懷孕的母鼠，由懷孕第二天起每天皮下施打一次，至幼鼠出生止。結果發現接受 7.5mg/kg 及 10mg/kg 劑量之母鼠，於施打期間產生明顯的體重下降、口鼻出血且無法生出幼鼠，而施打 5mg/kg 之母鼠則無上述副作用且約有 75%之母鼠可產下存活鼠。因此，我們接續實驗將以此劑量進行。

(二) 出生幼鼠之存活率、體重及體溫之比較

1. 安非他命組有出生幼鼠之母鼠比例與控制組低(表一)
2. 安非他命組幼鼠之存活率與控制組無顯著差異(表一)
3. 安非他命組幼鼠出生體重與體溫與控制組無顯著差異(表一)
4. 安非他命組幼鼠其在一個月內之體重較控制組低(圖一)
5. 安非他命組在一週內之體溫較控制組高(圖二)

(三)以西方點墨法偵測幼鼠海馬迴 NMDA 接受器亞型蛋白質表現

1. NR1、 NR2A 及 NR2B 在不同天數的表現量(圖三)
2. 七天大甲基安非它命組之 NR1 及 NR2A 表現量比控制組低， 但是 NR2B 表現量兩組間無差異 (圖四)。而十四天及三十天大之甲基安非它

命組之 NR1，NR2A 及 NR2B 均與控制組無顯著差異。

(四) 以西方點墨法偵測幼鼠海馬迴 pGSK-3β 及 GSK-3β 的表現

1. 七天，十四天及三十天大之甲基安非它命組之磷酸化 pGSK-3β/GSK-3β 比例均較控制組高(圖五)

(五) 以西方點墨法偵測幼鼠海馬迴 5-HT1A，5-HT1B， 5-HT2A 及 5-HT2B 的表現量

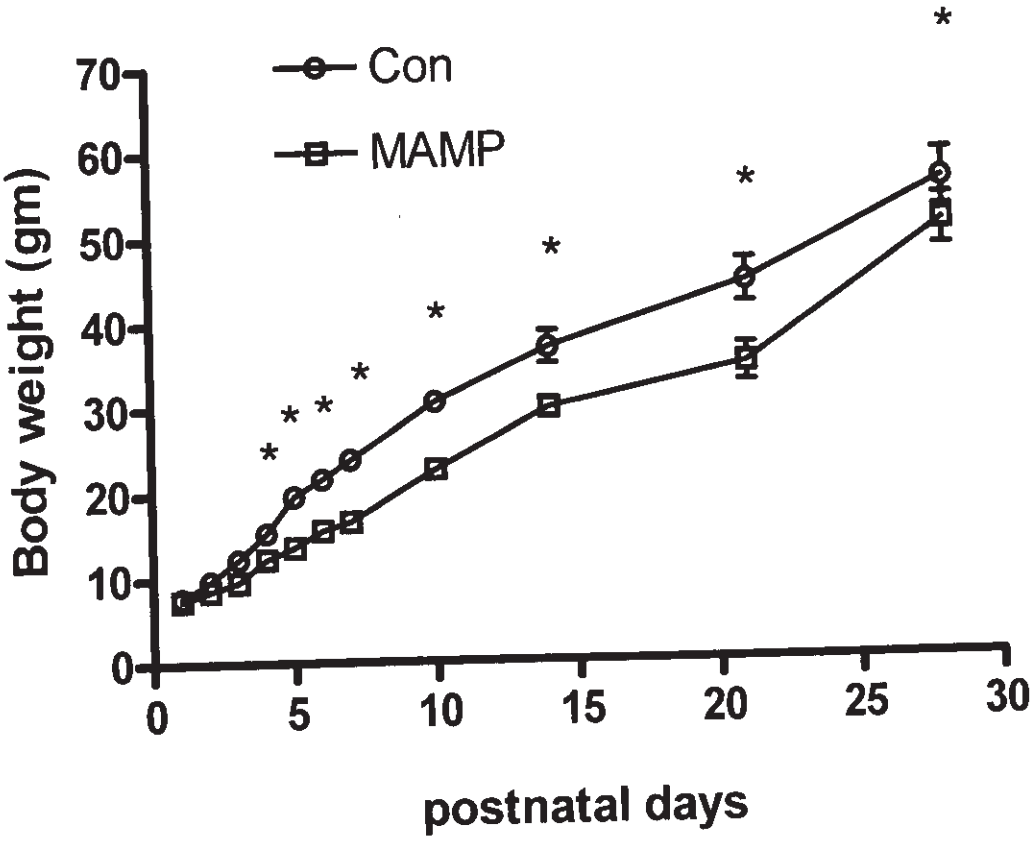
在 5-HT1A、5-HT1B 及 5-HT2A 的表現量的比較發現甲基安非他命組於七天，十四天均較控制組低但三十天大時則與控制組無差異(圖 六)。但是在 5-HT2B 的表現量的比較則發現甲基安非他命組於七天，十四天及三十天大時則與控制組無差異。

(六) 以西方點墨法偵測幼鼠海馬迴 NR2B 之 1472 位置酪胺酸磷酸化的表現量表現量的比較

甲基安非他命組於七天，十四天及三十天大時則與控制組無差異(圖七)。

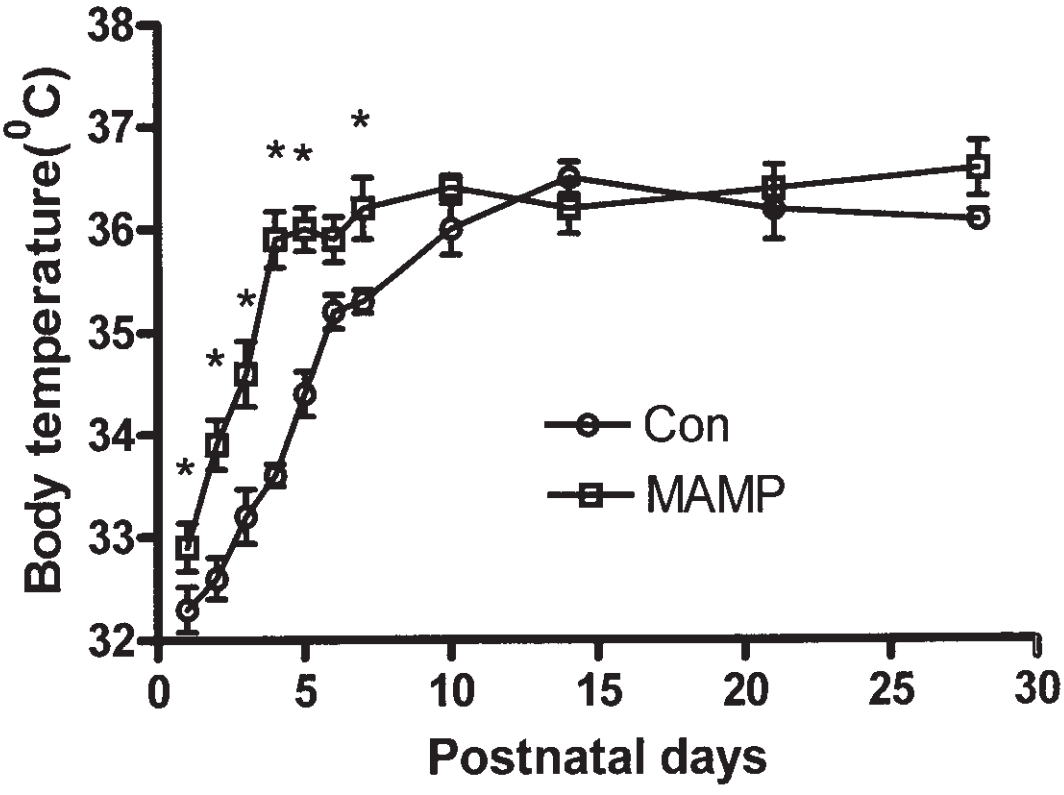
表一

	控制組	安非他命組
有出生幼鼠之母鼠隻數/母鼠隻數	10/10 (100%)	7/10(70%)*
存活隻數/出生幼鼠數	97/112	64/81
出生後一天體重	7.8 ± 0.2 gm	7.4 ± 0.2 gm*
出生後一天體溫	32.3 ± 0.1 ^{0}C	32.6 ± 0.1 ^{0}C



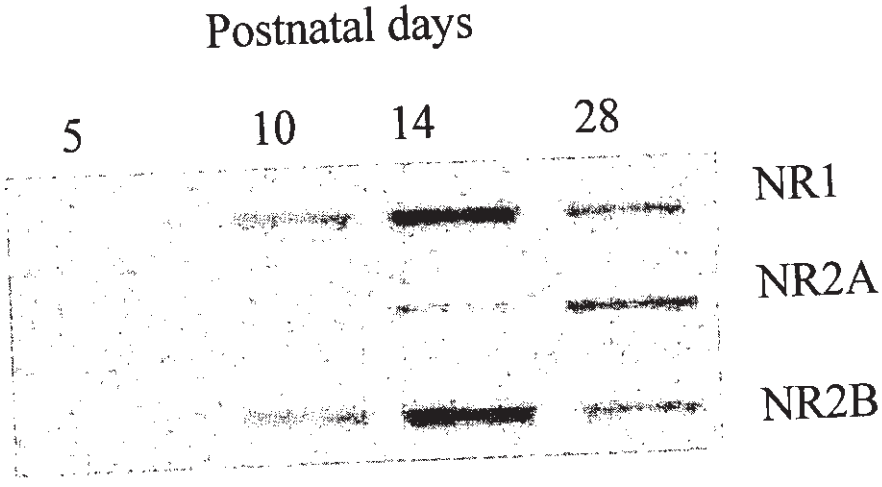
圖一: 一個月內出生幼鼠體重增加趨勢

* 表示有統計學上的差異(Student paired t test $p<0.05$)

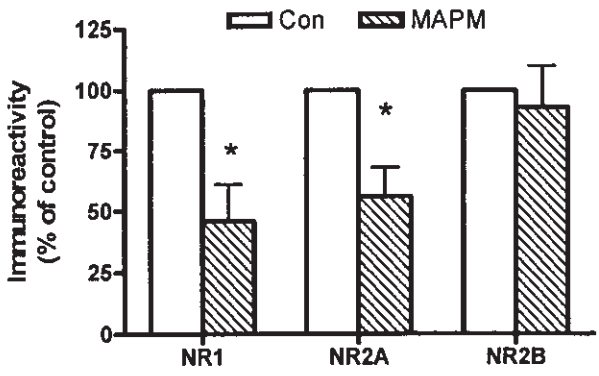


圖二:一個月內出生幼鼠體溫計錄

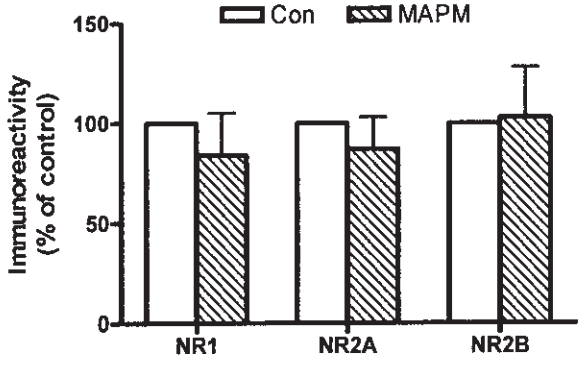
＊ 表示有統計學上的差異(Student paired t test　$p<0.05$)



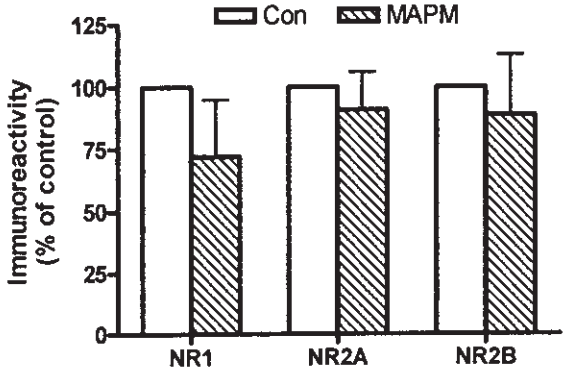
圖三：不同年齡天數之正常出生幼鼠之海馬迴 NR1、NR2A 及 NR2B 之表現量



PND7



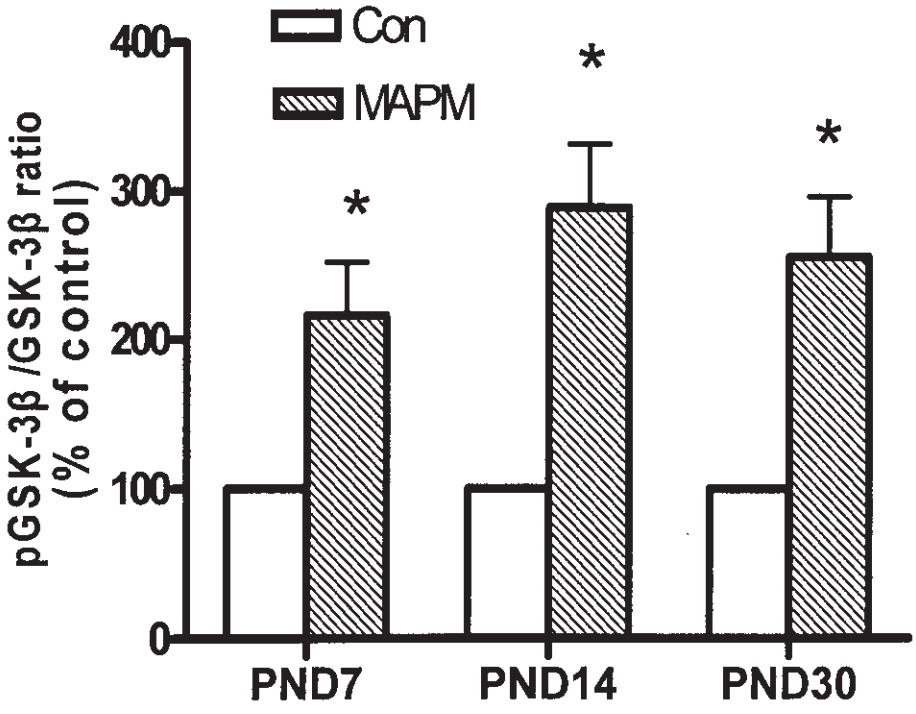
PND14



PND30

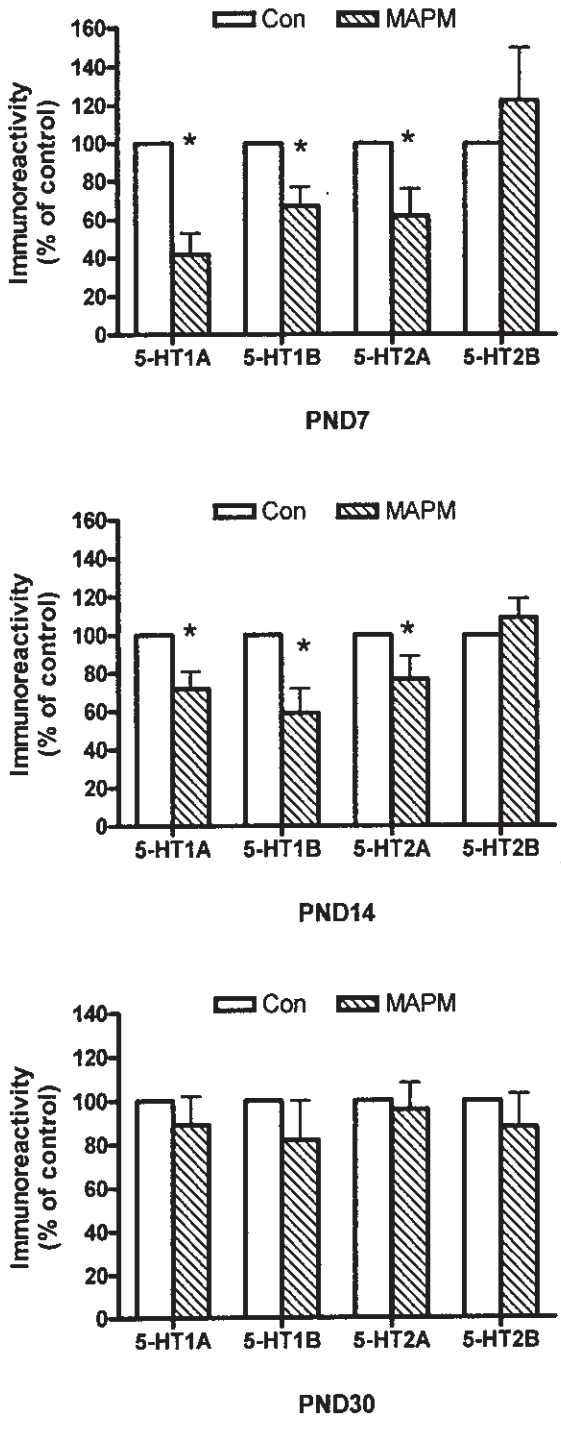
圖四: 在七天(PND7)、十四(PND14)天及三十天(PND30)控制組(Con)及甲基安非它命組(MAMP)幼鼠海馬迴中 NR1、NR2A 及 NR2B 之表現量的比較。

* 表示有統計學上的差異(Student paired t test $p<0.05$)

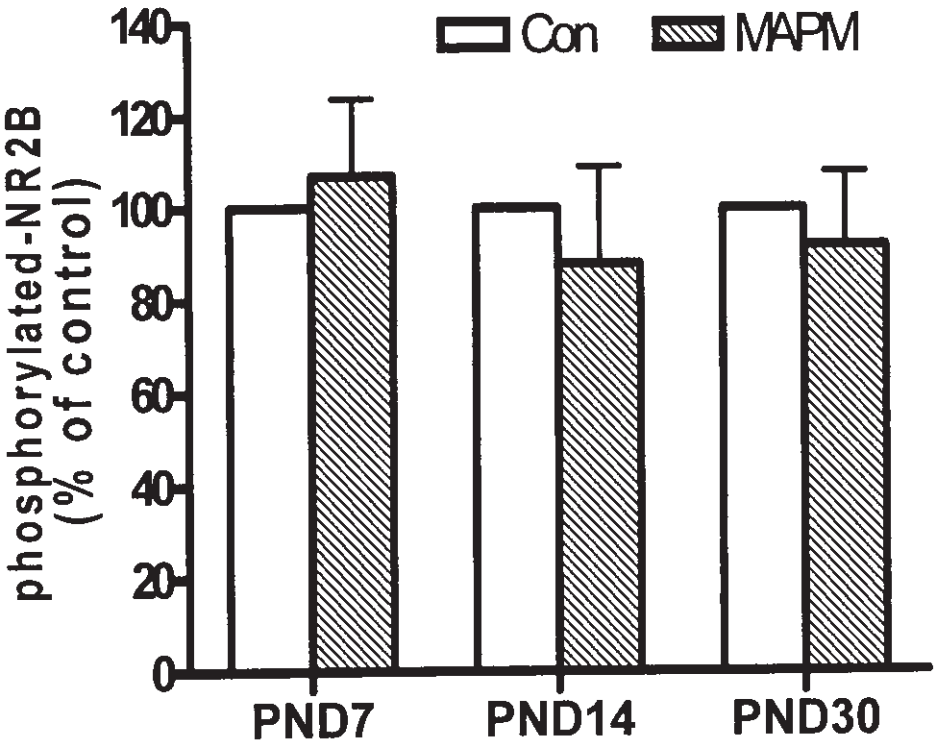


圖五: 在七天(PND7)、十四(PND14)天及三十天(PND30)控制組(Con)及甲基安非它命組(MAMP)幼鼠海馬迴中磷酸化 pGSK-3β/GSK-3β 之比例的比較。

* 表示有統計學上的差異(Student paired t test $p<0.05$)



圖六. 在七天(PND7)、十四(PND14)天及三十天(PND30)控制組(Con)及甲基安非它命組(MAMP)幼鼠海馬迴中 5-HT1A、 5-HT1B、5-HT2A 及 5-HT2B 之表現量的比較。* 表示有統計學上的差異(Student paired t test $p<0.05$)



圖七: 在七天(PND7)、十四(PND14)天及三十天(PND30)控制組(Con)及甲基安非它命組(MAMP)幼鼠海馬迴中磷酸化 NR2B 表現量的比較。

肆、討論

一、產前長期給於懷孕母鼠 MAMP 會影響所生幼鼠身體發展表現於體重增加的趨勢減緩以及母鼠生產率低。而且與幼鼠出生後一週內其體溫均較高，此現象有可能是 MAMP 戒斷症狀的其中之一表現。**因為體溫及體重的變異是在出生以後，而母鼠在生產後不再接受甲基安非它命施打。 因此， 所哺乳之幼鼠不會再繼續從母鼠接收到甲基安非它命，如此，幼鼠在出生後理論上是進入戒斷時期，所以出生後一週體溫及體重之變異有可能是戒斷之生理表現。**然而本計劃所使用 MAMP 之注射劑量及方式並不造成任何出生鼠有外觀或腦部畸型因此本動物模式適合進行行為觀察及神經生化學相關研究。

二、甲基安非他命組其海馬回中 NMDA 接受表現有短暫性的降低即在出生後七天較控制組有明顯差異而其他天數則無差異。此現象有可能是產前暴露於甲基安非他命對腦部之長期影響，但也可能是出生後戒斷所產生一過性變化。有趣的是這種現象僅在 NR1 及 NR2A 而 NR2B 的表現量不受影響，如此則甲基安非他命組之海馬回 NMDA 接受器不僅有總量的降低而且其接受器之亞型組合也產生變化。依據此結果可推測此組合變化會導致 NMDA 接受器族群裡 NR1/NR2B 所佔比例上升而 NR1/NR2A 比例下降。若是如此則 NMDA 接受器之神經傳導活性勢必下降但是通過 NR1/NR2B 之活性所佔比

例會上升。這對發展中的海馬迴所必要的神經可塑性必然帶來明顯的影響。

三、本結果顯示甲基安非他命組幼鼠其海馬迴中 pGSK-3β/GSK-3β 之比例比控制組顯著增加且此現象持續至三十天大。pGSK-3β/GSK-3β 之比例代表 GSK-3β 的磷酸化提昇這意味 GSK-3β 的活性增強。此種活性長期增強勢必代表海馬迴神經具有長期處於過度興奮狀態，這會導致神經毒性產生。

伍、結論與建議

本計劃結果顯示產前慢性甲基安非他命給於懷孕動物會導致其幼鼠有身體發展遲緩及腦部海馬迴 NMDA 接受器及血清素接受器表現量短暫下降及 GSK-3β 活性長期性上升，這些均代表甲基安非他命對胎兒及發展中腦部所產生的毒性。此成果可提供實驗證據強調懷孕母親吸食甲基安非他命對胎兒之神經毒性。

陸、參考文獻

Acuff-Smith, K.D., George, M., Lorens, S.A. & Vorhees, C.V. (1992) Preliminary evidence for methamphetamine-induced behavioral and ocular effects in rat offspring following exposure during early organogenesis. *Psychopharmacology (Berl)*, 109, 255-263.

Acuff-Smith, K.D., Schilling, M.A., Fisher, J.E. & Vorhees, C.V. (1996) Stage-specific effects of prenatal d-methamphetamine exposure on behavioral and eye development in rats. *Neurotoxicol Teratol*, 18, 199-215.

Ahlemeyer B, Glaser A, Schaper C, Semkova I, Krieglstein J (1999) The 5-HT1A receptor agonist Bay x 3702 inhibits apoptosis induced by serum deprivation in cultured neurons. Eur J Pharmacol 370:211-216.

Ahmad G, Zamenhof S (1978) Serotonin as a growth factor for chick embryo brain. Life Sci 22:963-970.

Alessandri B, Tsuchida E, Bullock RM (1999) The neuroprotective effect of a new serotonin receptor agonist, BAY X3702, upon focal ischemic brain damage caused by acute subdural hematoma in the rat. Brain Research 845:232-235.

Arevalo, J.C. & Chao, M.V. (2005) Axonal growth: where neurotrophins meet Wnts. *Curr Opin Cell Biol*, 17, 112-115.

Azmitia, E.C. (2001) Modern views on an ancient chemical: serotonin effects on cell proliferation, maturation, and apoptosis. Brain Res Bull, 56, 413-424.

Azmitia EC, Murphy RB, Whitaker-Azmitia PM (1990) MDMA (ecstasy) effects on cultured serotonergic neurons: evidence for Ca2(+)-dependent toxicity linked to release. Brain Res 510:97-103.

Bakhit, C., Morgan, M.E., Peat, M.A. & Gibb, J.W. (1981) Long-term effects of methamphetamine on the synthesis and metabolism of 5-hydroxytryptamine in various regions of the rat brain. Neuropharmacology, 20, 1135-1140.

Bennett-Clarke CA, Leslie MJ, Lane RD, Rhoades RW (1994) Effect of serotonin depletion on vibrissa-related patterns of thalamic afferents in the rat's somatosensory cortex. J Neurosci 14:7594-7607.

Billing, L., Eriksson, M., Steneroth, G. & Zetterstrom, R. (1988) Predictive indicators for adjustment in 4-year-old children whose mothers used

amphetamine during pregnancy. *Child Abuse Negl*, 12, 503-507.
Cabrera, T.M., Levy, A.D., Li, Q., van de Kar, L.D. & Battaglia, G. (1993) Prenatal methamphetamine attenuates serotonin mediated renin secretion in male and female rat progeny: evidence for selective long-term dysfunction of serotonin pathways in brain. Synapse, 15, 198-208.
Cernerud, L., Eriksson, M., Jonsson, B., Steneroth, G. & Zetterstrom, R. (1996) Amphetamine addiction during pregnancy: 14-year follow-up of growth and school performance. *Acta Paediatr*, 85, 204-208.
Cho, D.H., Lyu, H.M., Lee, H.B., Kim, P.Y. & Chin, K. (1991) Behavioral teratogenicity of methamphetamine. *J Toxicol Sci*, 16 Suppl 1, 37-49.
Cory-Slechta, D.A. (1994) The impact of NMDA receptor antagonists on learning and memory functions. *Psychopharmacol Bull*, 30, 601-612.
Eldar-Finkelman, H. (2002) Glycogen synthase kinase 3: an emerging therapeutic target. *Trends Mol Med*, 8, 126-132.
Facci, L., Stevens, D.A. & Skaper, S.D. (2003) Glycogen synthase kinase-3 inhibitors protect central neurons against excitotoxicity. *Neuroreport*, 14, 1467-1470.
Hashimoto, R., Hough, C., Nakazawa, T., Yamamoto, T. & Chuang, D.M. (2002) Lithium protection against glutamate excitotoxicity in rat cerebral cortical neurons: involvement of NMDA receptor inhibition possibly by decreasing NR2B tyrosine phosphorylation. *J Neurochem*, 80, 589-597.
Komuro, H. & Rakic, P. (1993) Modulation of neuronal migration by NMDA receptors. Science, 260, 95-97.
Kutsuwada T, Kashiwabuchi N, Mori H, Sakimura K, Kushiya E, Araki K, Meguro H, Masaki H, kumanishi T, Arakawa M, et al. (1992) Molecular diversity of the NMDA receptor channel 〔see comments〕. Nature 358:36-41
Lauder JM (1990) Ontogeny of the serotonergic system in the rat: serotonin as a developmental signal. Ann N Y Acad Sci 600:297-313; discussion 314.
Lauder JM, Krebs H (1978) Serotonin as a differentiation signal in early neurogenesis. Dev Neurosci 1:15-30.
Li, X., Zhu, W., Roh, M.S., Friedman, A.B., Rosborough, K. & Jope, R.S. (2004) In vivo regulation of glycogen synthase kinase-3beta (GSK3beta) by serotonergic activity in mouse brain. *Neuropsychopharmacology*, 29, 1426-1431.
Little, B.B., Snell, L.M. & Gilstrap, L.C., 3rd (1988) Methamphetamine abuse

during pregnancy: outcome and fetal effects. *Obstet Gynecol*, 72, 541-544.
LoTurco JJ, Owens DF, Heath MJ, Davis MB, Kriegstein AR (1995) GABA and glutamate depolarize cortical progenitor cells and inhibit DNA synthesis. Neuron 15:1287-1298.
Martin GR, Humphrey PP (1994) Receptors for 5-hydroxytryptamine: current perspectives on classification and nomenclature. Neuropharmacology 33:261-273.
Martin, J.C. (1975) Effects on offspring of chronic maternal methamphetamine exposure. *Dev Psychobiol*, 8, 397-404.
Martin, J.C., Martin, D.C., Radow, B. & Sigman, G. (1976) Growth, development and activity in rat offspring following maternal drug exposure. *Exp Aging Res*, 2, 235-251.
Mattson MP (1988) Neurotransmitters in the regulation of neuronal cytoarchitecture. Brain Res 472:179-212.
Mauler F, Fahrig T, Horvath E, Jork R (2001) Inhibition of evoked glutamate release by the neuroprotective 5-HT(1A) receptor agonist BAY x 3702 in vitro and in vivo. Brain Research 888:150-157.
Meijer, L., Flajolet, M. & Greengard, P. (2004) Pharmacological inhibitors of glycogen synthase kinase 3. *Trends Pharmacol Sci*, 25, 471-480.
Miller, D.B. & O'Callaghan, J.P. (1994) Environment-, drug- and stress-induced alterations in body temperature affect the neurotoxicity of substituted amphetamines in the C57BL/6J mouse. *J Pharmacol Exp Ther*, 270, 752-760.
Morford, L.L., Inman-Wood, S.L., Gudelsky, G.A., Williams, M.T. & Vorhees, C.V. (2002) Impaired spatial and sequential learning in rats treated neonatally with D-fenfluramine. Eur J Neurosci, 16, 491-500.
Morris, R.G. (1989) Synaptic plasticity and learning: selective impairment of learning rats and blockade of long-term potentiation in vivo by the N-methyl-D-aspartate receptor antagonist AP5. J Neurosci, 9, 3040-3057.
O'Callaghan, J.P. & Miller, D.B. (1994) Neurotoxicity profiles of substituted amphetamines in the C57BL/6J mouse. *J Pharmacol Exp Ther*, 270, 741-751.
Oro, A.S. & Dixon, S.D. (1987) Perinatal cocaine and methamphetamine exposure: maternal and neonatal correlates. *J Pediatr*, 111, 571-578.
Pearce, I.A., Cambray-Deakin, M.A. & Burgoyne, R.D. (1987) Glutamate acting on NMDA receptors stimulates neurite outgrowth from cerebellar granule cells. FEBS Lett, 223, 143-147.

Plessinger, M.A. (1998) Prenatal exposure to amphetamines. Risks and adverse outcomes in pregnancy. *Obstet Gynecol Clin North Am*, 25, 119-138.

Rossi, D.J. & Slater, N.T. (1993) The developmental onset of NMDA receptor-channel activity during neuronal migration. Neuropharmacology, 32, 1239-1248.

Saudou F, Hen R (1994) 5-Hydroxytryptamine receptor subtypes in vertebrates and invertebrates. Neurochem Int 25:503-532.

Schmitt, B., Netzer, R., Fanconi, S., Baumann, P. & Boltshauser, E. (1994) Drug refractory epilepsy in brain damage: effect of dextromethorphan on EEG in four patients. J Neurol Neurosurg Psychiatry, 57, 333-339.

Seiden, L.S. & Sabol, K.E. (1996) Methamphetamine and methylenedioxymethamphetamine neurotoxicity: possible mechanisms of cell destruction. NIDA Res Monogr, 163, 251-276.

Semkova I, Wolz P, Krieglstein J (1998) Neuroprotective effect of 5-HT1A receptor agonist, Bay X 3702, demonstrated in vitro and in vivo. Eur J Pharmacol 359:251-260.

Sheardown MJ, Nielsen EO, Hansen AJ, Jacobsen P, Honore T (1990) 2,3-Dihydroxy-6-nitro-7-sulfamoyl-benzo(F)quinoxaline: a neuroprotectant forcerebral ischemia. Science 247:571-574

Smith, L., Yonekura, M.L., Wallace, T., Berman, N., Kuo, J. & Berkowitz, C. (2003) Effects of prenatal methamphetamine exposure on fetal growth and drug withdrawal symptoms in infants born at term. *J Dev Behav Pediatr*, 24, 17-23.

Sonsalla, P.K., Albers, D.S. & Zeevalk, G.D. (1998) Role of glutamate in neurodegeneration of dopamine neurons in several animal models of parkinsonism. *Amino Acids*, 14, 69-74.

Svenningsson, P., Tzavara, E.T., Carruthers, R., Rachleff, I., Wattler, S., Nehls, M., McKinzie, D.L., Fienberg, A.A., Nomikos, G.G. & Greengard, P. (2003) Diverse psychotomimetics act through a common signaling pathway. *Science*, 302, 1412-1415.

Suchanek B, Struppeck H, Fahrig T (1998) The 5-HT1A receptor agonist BAY x 3702 prevents staurosporine-induced apoptosis. Eur J Pharmacol 355:95-101.

Won, L., Bubula, N. & Heller, A. (2002) Fetal exposure to (+/-)-methylenedioxymethamphetamine in utero enhances the development and metabolism of serotonergic neurons in three-dimensional reaggregate

tissue culture. Brain Res Dev Brain Res, 137, 67-73.
Yamamoto, Y., Yamamoto, K., Fukui, Y. & Kurishita, A. (1992) Teratogenic effects of methamphetamine in mice. *Nippon Hoigaku Zasshi*, 46, 126-131.