



研究計畫編號：DOH95-NNB-1018  
科資中心編號：PG9501-0536

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

腦內 Cocaine and Amphetamine-Related  
Transcript (CART) 神經傳導系統在 Amphetamine  
誘發之毒性及厭食效應之角色探討

研 究 報 告

執行機構：中山醫學大學生化學科

計畫主持人：謝易修

研究人員：謝易修教授，郭東益教授，楊順發助理教授

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
中文摘要.....	III
Abstract.....	V
壹、前言.....	1
貳、材料與方法.....	7
參、結果.....	11
肆、討論.....	19
伍、結論與建議.....	21
陸、參考文獻.....	22

## 圖 次

	頁 碼
圖一、Amphetamine 誘發之厭食的影響。	(13)
圖二、不同時間 Amphetamine 對下視丘 CART 基因變化。	(14)
圖三、不同時間注射下 Amphetamine 對下視丘 SOD-1 及 SOD-2 基因變化。	(15)
圖四、CART missense 及 antisense 對下視丘 CART 基因的影響。	(16)
圖五、Amphetamine 及 CART antisense 所誘發之厭食的影響。	(17)
圖六、不同時間注射下 Amphetamine 對下視丘 c-fos 及 c-jun 基因變化。	(18)

## 中文摘要

安非他命對於中樞神經系統的作用，大都來自對於諸多神經傳導物質受體系統的影響，經由在貯存處游離釋放、阻斷回收、抑制代謝的方式，增加神經傳導物質的作用強度和時間，造成中樞神經的興奮、神經毒性和行為的變化。而目前已有許多研究證實安非他命對於norepinephrine 受體系統的作用，會導致中樞神經興奮；而對於dopamine 受體系統的作用則是產生快感和幻覺，並強化回饋成癮系統 (reward system)；至於對於serotonin的回收抑制則先是造成分泌增加，進而因回饋機制導致接受器的敏感度降低，造成serotonin急速消耗，這時候使用者會出現憂鬱、焦慮、注意力不集中、記憶力障礙和失眠問題，而長期使用則會導致腦功能受損和神經毒性。

CART的全名為Cocaine and Amphetamine-Regulated Transcript (古柯鹼和安非他命調控之轉錄因子)。目前研究顯示CART peptide與Amphetamine或古柯鹼等興奮性濫用藥物之作用有關，也有許多的文獻指出CART 55-102是調控著厭食反應最重要的區域。這結果顯示CART可能是一種內生性的神經傳遞物質，可能會影響許多與厭食反應有關的訊息傳遞，但其詳細機制及其相關的訊息傳遞路徑卻仍不清楚。

雖然安非他命對中樞神經的影響已有許多相關的研究，但對於下視丘及其他腦區的影響及對於CART的影響則仍不清楚，因此本計畫擬利用大白

鼠以「重複注射Amphetamine」的處理方式，每天一次，連續數天。在重複注射期間，每天記錄大白鼠的食物攝取量，完成由Amphetamine誘發之毒性及厭食的影響。並利用同樣的模式在重複注射的不同時間犧牲大白鼠，取腦內的下視丘及其他腦區，萃取其蛋白及mRNA，以western blotting及RT-PCR的分析方式，完成不同時間Amphetamine對下視丘及其他腦區中CART、SOD、c-Jun及c-fos的基因變化及影響。我們利用不同濃度(2mg/kg及4 mg/kg)的Amphetamine每天注射一次，注射四天。於Amphetamine注射開始的第一天大白鼠便出現厭食的情況，且於第二到四天有慢慢恢復的情況。而此厭食情形亦具有濃度的相關效應。而以RT-PCR的分析方式，可發現在初期CART、SOD、c-Jun及c-fos有明顯的上升，於第2-4天緩慢的下降。而我們設計CART的antisense oligodeoxynucleotide，以活體(*In Vivo*)的動物為材料，在Amphetamine注射前，將CART的antisense直接注入下視丘PVN部位，由攝食行為的改變及CART基因的表現，觀察改變CART的antisense對Amphetamine之影響。我們發現CART antisense的處理有回覆此厭食情形。因此我們發現，CART基因在由Amphetamine誘發之厭食反應中扮演一個很重要的角色。

關鍵字：古柯鹼和安非他命調控之轉錄因子、安非他命、下視丘

## **Abstract**

Amphetamine (AMPH) and associated derivatives are the most commonly abused psychostimulant in the young people. AMPH is known for its suppressive effect on appetite. A daily treatment of AMPH for several days could induce a marked decrease of food intake on the first day of dosing and then the food intake returned gradually to the normal level (tolerant effect) on the followings. The mechanism for the anorectic action of AMPH was through the inhibitory action on hypothalamic neuropeptide Y, an orexigenic neurotransmitter in the brain.

Amphetamine is an artificially synthesized psychostimulant. It could activate both central and autonomic nervous system. As we know, amphetamine acts on mesolimbic circuit or associated brain regions and influences on associated emotional circuit. Therefore, to investigate the modulation of amphetamine on emotional circuit is very important for current study.

Cocaine and Amphetamine Regulated Transcript (CART), brilliantly identified by Douglass and co-workers is an anorectic peptide regulated by leptin. Fasting animals show a pronounced decrease in CART mRNA expression in the arcuate nucleus, an area of the brain known to be associated with feeding behavior. In animal models with disrupted leptin signalling, CART mRNA is almost absent in the arcuate nucleus. ICV administration of CART inhibits both normal and starvation-induced feeding and completely blocks the feeding response induced by NPY. Antisera directed against CART increases feeding in normal rats. Indications are that CART may be an endogenous inhibitor of food intake

Therefore, to determine if CART was involved in the anorectic response, the intracerebroventricular infusions of antisense oligonucleotide (or missense control)

were performed at 60 min before daily Amphetamine treatment in conscious rats, and results showed that CART knock down could block AMPH-induced anorexia. Furthermore, we found that c-fos or c-jun was also involved in the anorectic response of Amphetamine. It was suggested that c-fos/c-jun SOD-1/SOD-2 signaling might involve in the central regulation of AMPH-mediated feeding suppression via the modulation of CART gene expression.

keyword : Amphetamine, Cocaine and Amphetamine Regulated Transcript, anorexia

## 壹、前言

Amphetamine 是一種很著名的厭食劑 (1-2)，亦屬於中樞神經的興奮劑，但由於在其原料的取得容易、製作方法不難的情況下，致使 Amphetamine 十分廣泛的被濫用。在初期使用 Amphetamine 的情形下，會有心情愉悅、精力旺盛、降低食慾的情形，因此有人會藉用此藥達到提振工作精神或減肥的目。

Amphetamine 被合成於 1887 年，早期在臨床醫學上被使用於鼻充血、鼻塞等呼吸道疾病，之後應用在昏睡症 (sleeping sickness)、過動兒 (attention deficit and hyperactivity disorder, ADHD) 及減肥相關的治療上(3)；在二次世界大戰期間，日軍更藉由 Amphetamine 來消除疲勞，使士兵提高戰鬥力及攻擊力；但在 1950 年代以後就逐漸被濫用。而我國行政院衛生署為了國民健康，早於 70 年 6 月公告禁用屬 Amphetamine 類之減肥藥品，而更於七十九年十月，衛生署會同法務部及內政部研商將安非他命列入「麻醉藥品管理條例」管理，近年來更發現 Amphetamine 濫用的問題越來越嚴重，因此對其濫用之後所造成的毒性機轉探討則日益重要。

在藥理上，Amphetamine 被視為 indirect dopamine agonist，它的作用機制，與腦內 catecholamine (包括 epinephrine、norepinephrine 及 dopamine) 之



釋放有關(4)。Amphetamine 曾被用為「減肥劑」(3)，但因具有「成癮性及耐受性」的副作用(5)，及青少年為追求刺激，經常濫用而造成社會問題，因此被停用。然而，Amphetamine 無論是短期或長期的使用都會對身體造成很大的傷害，而在社會新聞中，因過量的吸食 Amphetamine，進而導致自主神經系統過度興奮，心跳加快、血壓過高、體溫調節失控而致死的案例並不少見。而在長期的過度依賴進而過度使用下，有些人會出現各種類似精神疾病的症狀，如：視、聽幻覺，被害妄想，情緒起伏大且控制能力差，現實感及判斷力減退等；接連而來的種種意外事件，更是時有所聞。值得注意的是吸食 Amphetamine 會產生嚴重的『生理依賴』。也就是說，安非他命經吸食並在人體作用一段時間後，人體將會『適應』藥物的影響，久而久之，如果吸食者不再繼續用藥，身體將會產生戒斷症狀( withdrawal symptoms )，如：嗜睡、憂鬱、坐立不安等等症狀。

Amphetamine 的毒性反應及其厭食作用的主要因素，主要是透過腦內 dopamine 的釋放，進而去影響腦內一些神經傳導物質所導致的(6)。而這些神經傳導物質也已經被證實會透過一些基因所調控，而比較著名的調控因子如 Neuropeptide Y (NPY) 及 CART 等調控因子。NPY 及 CART 是腦內含量豐富，並可興奮食慾的神經傳遞物質(neurotransmitter)(7)。NPY 具有「刺激攝食行為」的功用，可由 NPY 直接注入第三腦室的實驗獲得證明(8)。除

外，NPY 也能超越「腦內 satiety signal」的調控，導致貪食行為；而 CART 也被發現與精神興奮藥物的作用有關。CART 的全名為 Cocaine and Amphetamine-Regulated Transcript (古柯鹼和安非他命調控之轉錄因子)。目前研究顯示 CART peptide 與 Amphetamine 或古柯鹼等興奮性濫用藥物之作用有關，但其詳細機制及其相關的訊息傳遞路徑卻仍不清楚。CART 在 1995 年被 Douglass 實驗室所發現 (9)，他們發現 CART 是一個可以被 leptin 所調節的基因，主要是與厭食反應的調節有關的一個因子。而 CART 主要是存在在大白鼠腦內的下視丘中，而 CART 的構造在 N 端有一個 signal sequence，而整個片段從 1-102 個包含著不同的調節區，其中以 CART 55-102 最為重要 (10)。也有許多的文獻指出 CART 55-102 是調控著厭食反應最重要的區域(11-12)。另外，有學者發現利用了免疫組織化學方法發現，除了下視丘之外，中樞神經系統的許多區域，如神經細胞本身及許多神經末梢都含有 CART 及其蛋白產物(13-14)。這幾年有許多文獻指出，將 Amphetamine 和古柯鹼注射至大白鼠腦內，在利用 DDRT-PCR (differential display RT-PCR) 的方式發現與控制組比較之後，在注射 Amphetamine 和古柯鹼的大白鼠腦內，其 CART 的 mRNA 表現有明顯的增加 (9, 15)。由此可知，CART 的基因表現和 Amphetamine 的使用是息息相關的。另外，更有學者在解開 CART 基因的全部序列之後，進一步進行 CART 的結構分析與生理功能的研究，

發現 CART 55-102 是主要具有活性的區域，並且是調控著厭食反應的最主要的位置。而隨後更有研究者將這一段有活性的胜肽片斷注射到大白鼠的腦內，發現大白鼠所會出現厭食的狀態，且表現出的行為變化與注射 Amphetamine 的情況是非常類似的 (10, 16)。由此，更可以證明 CART 的表現的確和 Amphetamine 的存在與否有非常大的相關性。

而 Amphetamine 的學名又稱為苯丙胺，其結構十分類似於中樞神經傳遞物質多巴胺( dopamine )。因此，在 Amphetamine 的作用上，與調控 dopamine 的釋放息息相關。而目前對於 Amphetamine 及其類似物所引發該神經毒性機轉之原因有相當多的文獻探討，其主要是跟神經毒性伴隨著氧游離基的傷害為主(17)，而 Amphetamine 誘導氧游離基的形成大約可將之分為 [1]興奮性毒性 (excitotoxicity) [2]內生性多巴胺及其氧化作用[3]粒腺體瓦解 (mitochondrial disruption)。在興奮性毒性中，Sonsalla 等人在 1989 發現 Amphetamine 所誘發的神經毒性過程中可能有興奮性胺基酸的參與(18)。之後的一些研究也都支持 Amphetamine 及其類似物所引發的紋狀體神經毒性與興奮性胺基酸有關 (19)。而且更有報告指出，Amphetamine 及其類似物可以引發紋狀體麩胺酸的釋放量增加(20)。從這些實驗結果似乎顯示，安非他命及其類似物會促使紋狀體麩胺酸含量增加，而該麩胺酸可能可以激活麩胺酸接受器，進而引發神經毒性。另外 Amphetamine 的毒性作用，也有可能

是透過腦內 dopamine 的釋放。安非他命及其類似物誘導所釋放的多巴胺，可以經由自體氧化的作用產生極具活性的含氧游離基如：過氧化氫等(21-22)，此游離基與毒性有關(23)。過多的多巴胺也會被單胺氧化酵素(MAO)代謝成 3,4-dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC)及過氧化氫(24)。而 Amphetamine 長時間的傷害除了導致多巴胺的氧化作用外，也會有其他如麩胺酸及過氧亞硝基物（peroxynitrite）釋放所調節的神經毒性，並且由於 Amphetamine 具親脂性正電荷的特性，而可輕易的擴散到細胞內如粒腺體等胞器中，可能進而破壞細胞內的電化學梯度，當粒腺體功能失常會釋放 Cytochrome C(細胞色素 C)，鈣離子也經由 PTP(permeability transition pore)被釋放出來，而活化 caspase 使細胞走向細胞凋亡(25)。

而安非他命厭食機制是否可能和腦內正腎上腺和色胺素之間作用也有密切關係？而 CART 基因對於在連續注射 Amphetamine 之後，其基因與 Amphetamine 所引起的毒性反應及其相關訊息傳遞的機轉研究卻是比較少人探討。而此厭食反應是否同樣也可能造成下視丘旁室核當中所檢視的一些相同分子蛋白和 mRNA 的表現(SOD-1、SOD-2、c-jun、c-fos)的變化？因此，本計畫擬利用重複注射「Amphetamine」的處理方式，每天一次，連續數天。建立了 Amphetamine 誘發之毒性及厭食的模式，並進一步利用 CART 的 antisense 的注射方式探討其詳細機轉，將來可應用為發展 Amphetamine 誘發

之毒性的預防及治療上，對現今藥物濫用的社會中亦有貢獻。

## 貳、材料與方法

### 1. 動物飼養環境 (26)

Wistar 種系大白鼠，體重約 200~300g，擬購自「國科會動物繁殖中心」，培養在室溫 ( $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ )、12-h 明暗交替（每天傍晚 6:00 PM 關）的環境，給予一般飼料及飲水。AMPH 注射時間在每天傍晚 6:00 PM，因有文獻指出，下視丘內 CART 的濃度變化，呈日週期性變化，在每天黑夜來臨時達最高峰(26)。因此，Amphetamine 於此時注射可達較顯著之抑制效果。動物將區分成「Amphetamine 單一注射」及「Amphetamine 持續注射」二組，分別進行實驗。

### 2. Amphetamine 單一注射之動物處理 (27-28)

大白鼠自腹腔注射 AMPH (0,2 或 4 mg/kg 共三群；每群動物 24 隻)，每群動物每四隻一組，共六組，分別在注射 saline 或 Amphetamine 後 1h、2h、4h、8h 及 24h，將動物麻醉(pentobarbital, 60mg/kg; i.p.)，並斷頭取腦，於 ice plate 上摘取下視丘組織。時間點選在 1h、2h、4h 及 8h 是因為有文獻指出，Amphetamine 引發的厭食作用，在注射後 2-5 h 達最高峰 (28)。此外，也有文獻指出，PKC activator (TPA)直接注入下視丘 PVN 部位時，在注射後 2h，可顯著影響某些基因表現(例如可增加 POMC mRNA 的含量)(29)。

### 3. Amphetamine 持續注射之動物處理

大白鼠自腹腔連續注射 Amphetamine (0 或 4 mg/kg 劑量；每天注射一次，連續 4 天；每組 20 隻)，動物細分成五組，每組 4 隻，分別在注射 saline 或 AMPH 後經過 1 天、2 天、3 天或 4 天後（另一組為控制組（0 天））。將動物麻醉(pentobarbital, 60mg/kg; i.p.)，並斷頭取腦，於 ice plate 上摘取下視丘組織。動物在斷頭之前 30 分鐘，須注射一次同劑量的 Amphetamine。

### 4. Amphetamine 持續注射之動物厭食反應及行為觀察

大白鼠在重複注射期間，我們給予多量的飼料及飲水，與大白鼠注射 Amphetamine 前先記錄當天的食物及飲水總量，在注射 Amphetamine 期間每天記錄大白鼠的食物及飲水攝取量，完成由 Amphetamine 誘發之厭食反應的影響。

### 5. 腦內埋管 (cannulation)

4-1.埋管於左右兩側下視丘 (29, 30)大白鼠(n=32，分四組，每組 8 隻)在麻醉(pentobarbital, 60mg/kg; i.p.)情況下，固定於立體定位儀(stereotaxic apparatus)，依腦圖 (30) 所示位置埋管於下視丘 PVN 位置。埋管的位置參考學者的文獻(29)，為：左右 0.8 mm，後 1.6 mm，下 8.0 mm。外管為 23 號不銹鋼管，以牙科接合劑固定於頭骨，內管為 31 號不銹鋼管，外接 PE-20 管做為注射用。大白鼠在手術後一週才進行實驗。

4-2. CART 的 antisense oligodeoxynucleotide (29)以 microsyringe 將 CART 的 antisense oligodeoxynucleotide 注入 PVN 部位，讓藥物以擴散方式進入神經元，注射體積為 100 nl/side，注射時間為 10 秒，注射劑量為 0.1-10  $\mu$ M (29)。CART 的 antisense oligodeoxynucleotide 處理方式為「單獨注射」或「在 Amphetamine 之前 30 min 注射」二種，觀察它(a)單獨注射時，對正常攝食行為及下視丘 CART mRNA 含量之影響。(b)前處理方式對 Amphetamine 引發之毒性及厭食行為及下視丘 CART mRNA 含量之影響。

#### 6. total RNA 及 mRNA 分離 (31)

檢體 total cellular RNA 是以傳統在 4M guanidine thiocyanate-acid phenol method 或以 RNA 萃取套組 RNazol 進行分離; poly(A)RNA 則是用 oligo(dT)-latex 進一步純化。

#### 7. RT-PCR 分析 (32-33)

取 15 $\mu$ g mRNA 利用 oligo-d(T)為 primer (或「random primer」以 MMLV-RTase (200units)在 20 $\mu$ l 反應溶液中(50mM Tris-HCl, pH 8.3), 75mM KCl, 3mM MgCl<sub>2</sub>, 10mM DTT, 20units RNasin)進行 cDNA 合成; 取 5 $\mu$ l cDNA 至 PCR 反應溶液中(最終為 50 $\mu$ l)以下表之 primers 資料的預估溫度, 利用 Taq polymerase 進行 30 cycles PCR 反應, 其產物再以 1.8 % agarose 膠電泳分離, 以 ethidium bromide 染色並觀察。



## 8. 統計分析

所有數據將以電腦統計軟體 SigmaStat (Jandel Scientific Software, USA) 進行 one-way analysis of variance(one-way ANOVA)分析。

Table 1. The sequences of primers used in the experiment of RT-PCR.

	<b>Primer</b>	<b>Sequence 5'→3'</b>	<b>Size of product (base pairs)</b>
<b>CART</b>	Sense	GGGCTGTGTGGACTGACC	512
	Antisense	GGAAGGGTCTTCAAGCCT	
<b>NOS</b>	Sense	AGAGTGAATCGGACTCGGACG	396
	Antisense	GCCACGGTTTGCATACTGACC	
<b>SOD-1</b>	Sense	GAG CAT GGGTTCCATGTCCAT	279
	Antisense	ACTTTCTTCATT TCCACCTTTGCC	
<b>SOD-2</b>	Sense	CTTCAGCCTGCACTGAAGTTCAAT	327
	Antisense	CTGAAGATAGTAAGCGTGCTCCC	
<b>GAPDH</b>	Sense	TCCCTCAAGATTGTCAGCAA	309
	Antisense	AGATCCACAACGGATACATT	

## 結果

我們初步利用大白鼠以「重複注射 Amphetamine」的處理方式，每天一次，連續數天。在重複注射期間，每天記錄大白鼠的食物攝取量，完成由 Amphetamine 誘發之毒性及厭食的影響。由 Fig-1 可以發現到 Amphetamine 注射後第一天大白鼠便出現厭食的情況，且於第 2-4 天有慢慢恢復的情況。而此厭食情形亦具有濃度的相關效應。而在飲水的攝取量方面，我們發現在 Amphetamine 重複注射期間，其飲水的攝取量方面沒有很大的差異性。

接著我們利用同樣的模式在重複注射的不同時間犧牲大白鼠，取腦內的下視丘，萃取其 mRNA，以 RT-PCR 的分析方式，完成不同時間 Amphetamine 對下視丘中 CART 的基因變化及影響。由 Fig-2 可以發現在第一天 CART 基因有明顯的上升，於第 2-4 天緩慢的下降至未處理 Amphetamine 的表現量。另一方面，我們也發現大白鼠下視丘中 SOD-1 及 SOD-2 的差異性表現。我們由 Fig-3 可發現在第一天 SOD-1 有明顯的上升，並於第 2 天 SOD-1 基因表現達到最高，而 SOD-2 則在第一天就達到基因表現量，並於第 2-4 天緩慢的下降至未處理 Amphetamine 的表現量。

另外，我們也設計 CART 的 antisense oligodeoxynucleotide 及 missense oligodeoxynucleotide (control) 以活體(*In Vivo*)的動物為材料，在 Amphetamine

注射前，將 CART 的 antisense oligodeoxynucleotide 及 missense oligodeoxynucleotide (control) 直接注入下視丘 PVN 部位，由攝食行為的改變及 CART 基因的表現，觀察改變 CART 的 antisense 對 Amphetamine 之影響。由 Fig-4 可發現在 CART antisense 的注射下，與當作 control 的 CART missense 的比較下，其 CART 基因有明顯的下降量。而當作 CART 基因則沒有任何變化。接著我們在 CART antisense 及 Amphetamine 不同處理下，可發現在 Amphetamine 注射開始的第一天大白鼠便出現厭食的情況，且於第二到四天有慢慢恢復的情況。而此厭食情形亦具有濃度的相關效應。而在 CART antisense 的處理有些微回覆此厭食情形(Fig-5)，而當作 control 的 CART missense 的注射下，厭食情形則沒有任何變化。

最後，我們也發現經由 Amphetamine 處理大白鼠其下視丘一些常見的 transcription factor 如 c-Jun 及 c-fos 的 mRNA 變化。可發現在第一天 c-fos 有明顯的上升，並於第 2 天 c-fos 基因表現達到最高，而 c-jun 則在第二天才達到最高的基因表現量，並於第 3-4 天緩慢的下降(Fig-6)。

Fig-1

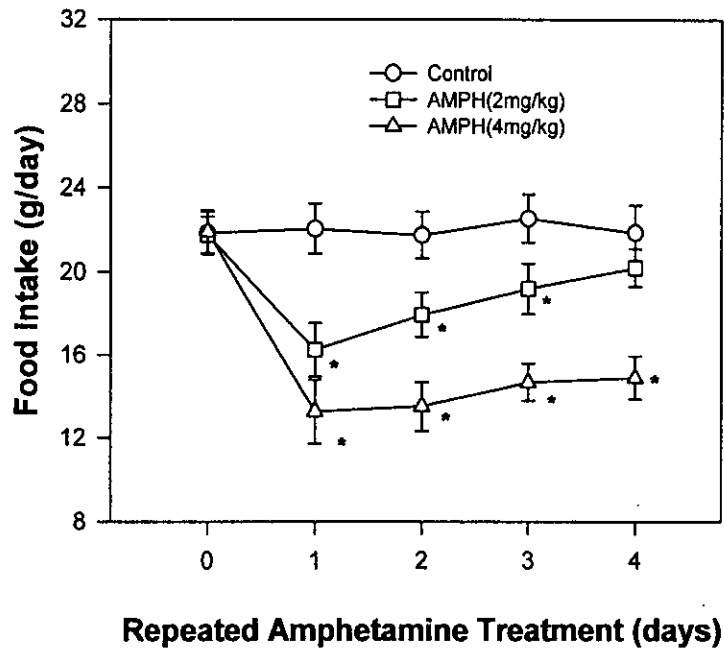


Fig-1: Amphetamine 誘發之厭食的影響。利用不同濃度(2 mg/kg 及 4 mg/kg) 的 Amphetamine 每天注射一次，注射四天。於 Amphetamine 注射開始的第一天大白鼠便出現厭食的情況，且於第二到四天有慢慢恢復的情況。而此厭食情形亦具有濃度的相關效應。\*表示  $P < 0.05$

**Fig-2**

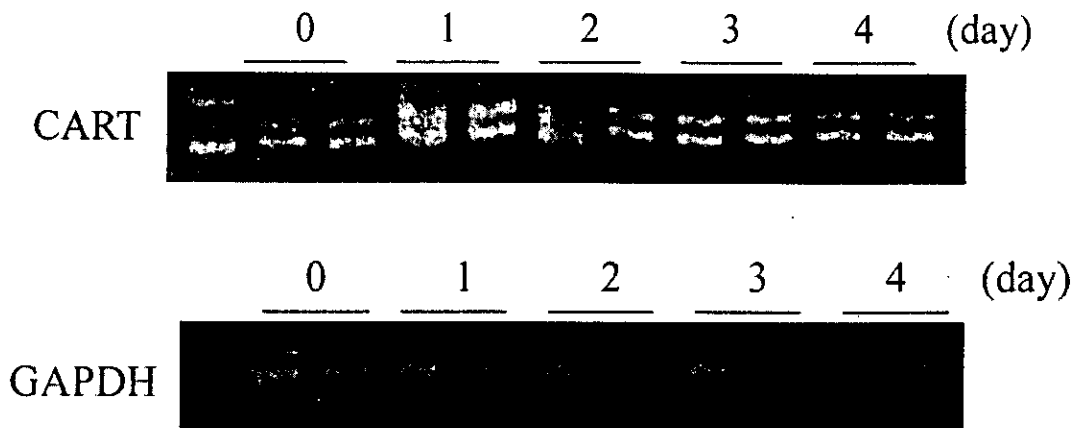


Fig-2: 不同時間 Amphetamine 對下視丘 CART 基因變化。利用 2mg/kg 的 Amphetamine 每天注射一次，注射四天。於 Amphetamine 注射開始的不同天數犧牲大白鼠，萃取其 mRNA，以 RT-PCR 的分析方式，完成不同時間 Amphetamine 對下視丘 CART 基因變化。可發現在第一天 CART 有明顯的上升，於第 2-4 天緩慢的下降至未處理 Amphetamine 的表現量。

**Fig-3**

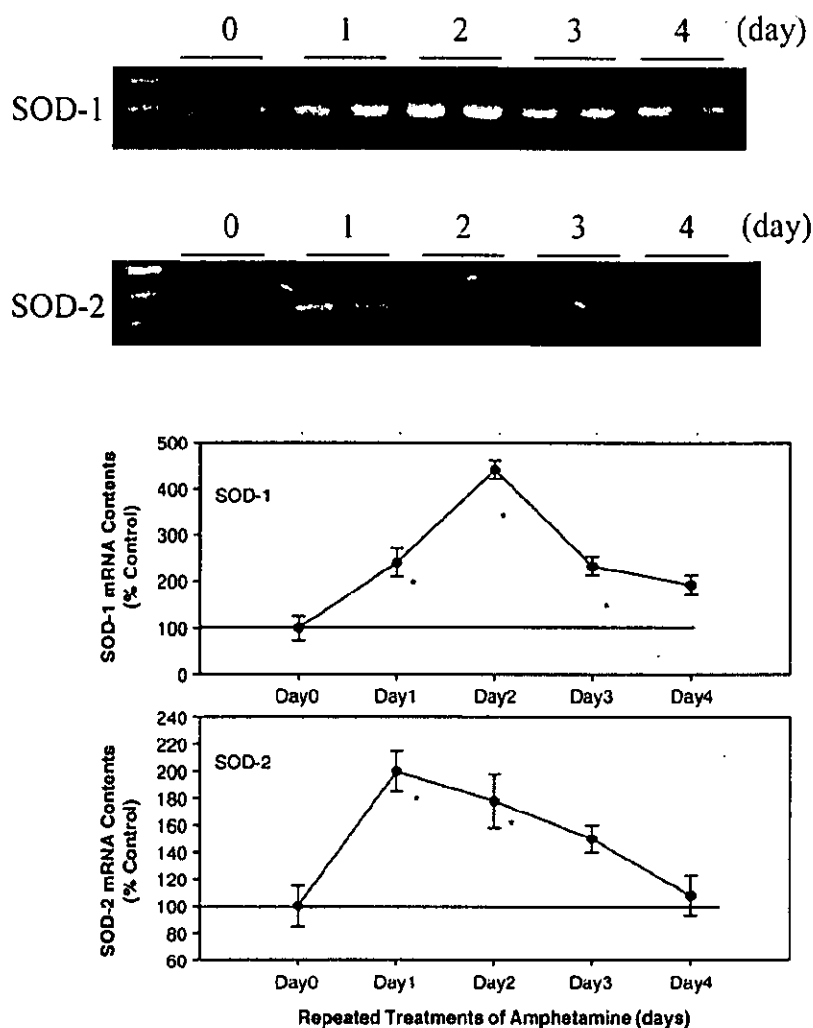


Fig-3: 不同時間注射下 Amphetamine 對下視丘 SOD-1 及 SOD-2 基因變化。利用 2mg/kg 的 Amphetamine 每天注射一次，注射四天。於 Amphetamine 注射開始的不同天數犧牲大白鼠，萃取其 mRNA，以 RT-PCR 的分析方式，完成不同時間 Amphetamine 對下視丘 SOD-1 及 SOD-2 基因變化。可發現在第一天 SOD-1 有明顯的上升，並於第 2 天 SOD-1 基因表現達到最高，而 SOD-2 則在第一天就達到基因表現量，並於第 2-4 天緩慢的下降至未處理 Amphetamine 的表現量。

**Fig-4**

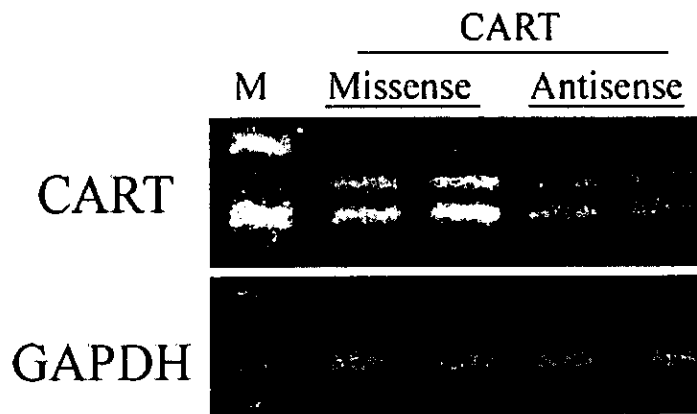


Fig-4: CART missense 及 antisense 對下視丘 CART 基因的影響。於 CART missense 及 antisense 注射開始的第二天犧牲大白鼠，萃取其 mRNA，以 RT-PCR 的分析方式，完成 CART missense 及 antisense 對下視丘 CART 基因變化。可發現在 CART antisense 的注射下，與當作 control 的 CART missense 的比較下，其 CART 基因有明顯的下降量。

Fig-5

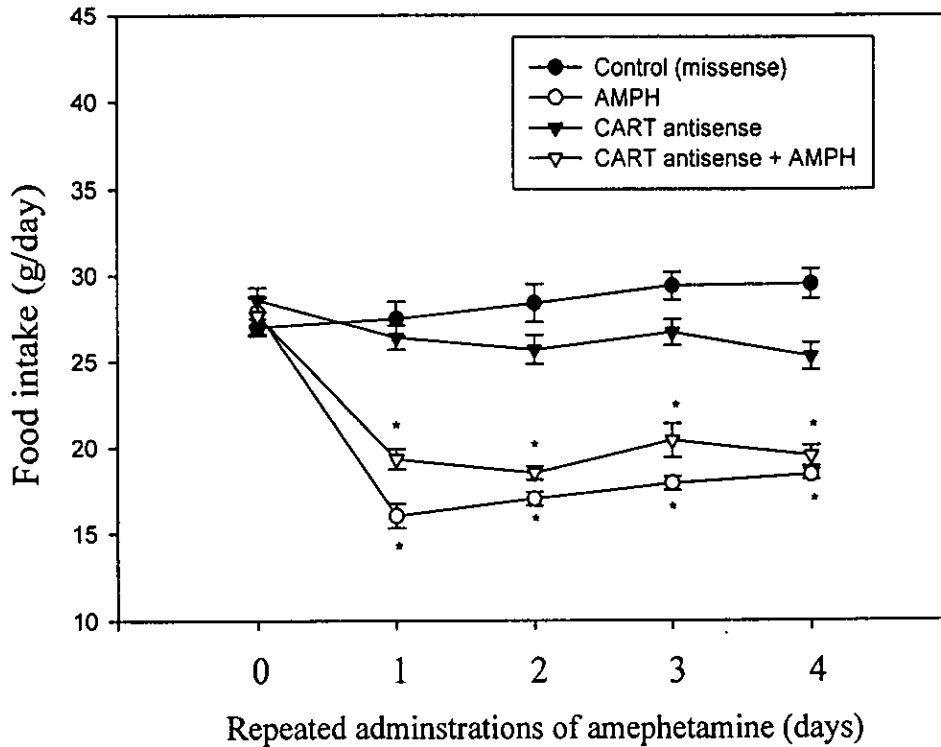


Fig-5 : Amphetamine 及 CART antisense 所誘發之厭食的影響。利用 4 mg/kg 的 Amphetamine 每天注射一次，注射四天。於 Amphetamine 注射開始的第一天大白鼠便出現厭食的情況，且於第二到四天有慢慢恢復的情況。而此厭食情形亦具有濃度的相關效應。而在 CART antisense 的處理有些微回覆此厭食情形，而當作 control 的 CART missense 的注射下，厭食情形則沒有任何變化。\*表示  $P < 0.05$



**Fig-6**

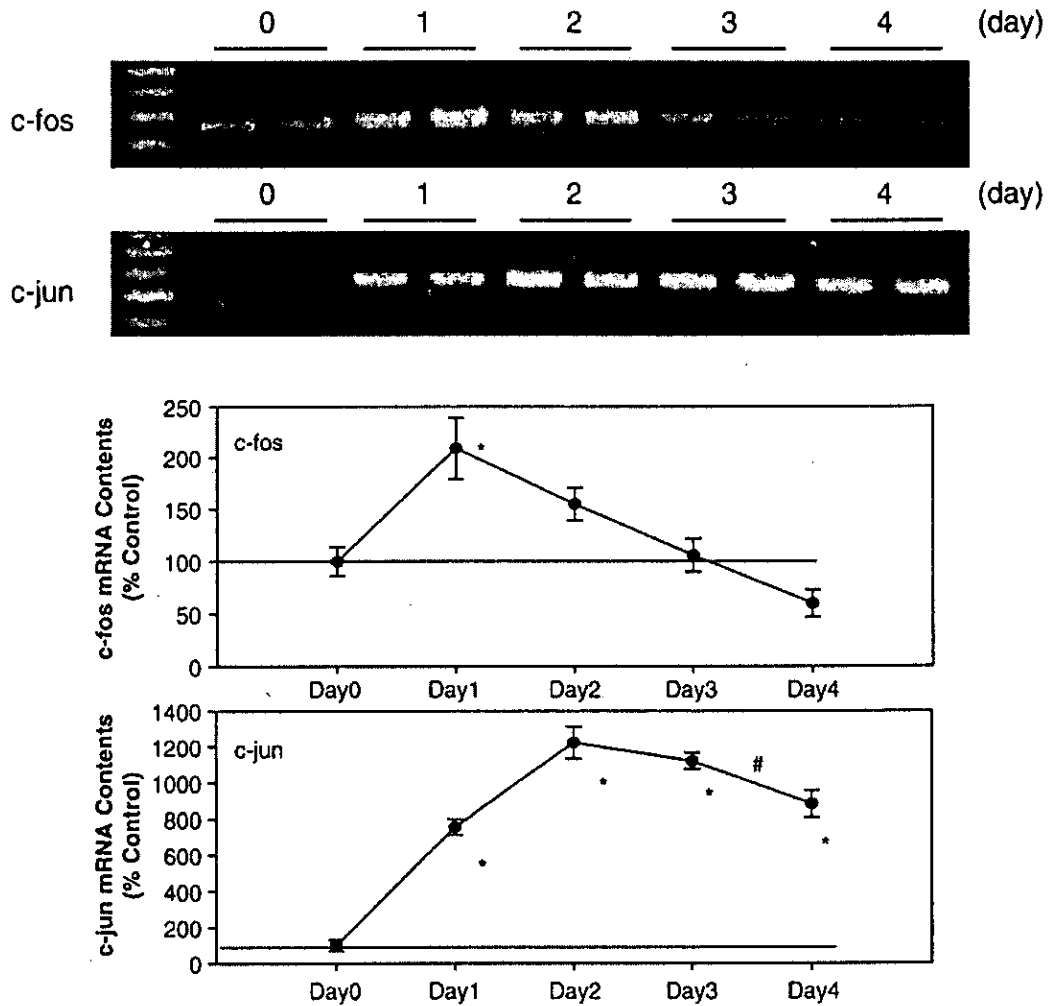


Fig- 6: 不同時間注射下 Amphetamine 對下視丘 c-fos 及 c-jun 基因變化。利用 2mg/kg 的 Amphetamine 每天注射一次，注射四天。於 Amphetamine 注射開始的不同天數犧牲大白鼠，萃取其 mRNA，以 RT-PCR 的分析方式，完成不同時間 Amphetamine 對下視丘 c-fos 及 c-jun 基因變化。可發現在第一天 c-fos 有明顯的上升，並於第 2 天 c-fos 基因表現達到最高，而 c-jun 則在第二天才達到最高的基因表現量，並於第 3-4 天緩慢的下降。

## 肆、討論

Amphetamine 的毒性反應及其厭食作用的主要因素，主要是透過腦內 dopamine 的釋放，進而去影響腦內一些神經傳導物質所導致的(21)。而這些神經傳導物質也已經被證實會透過一些基因所調控，而比較著名的調控因子如 Neuropeptide Y (NPY) 及 CART 等調控因子。NPY 及 CART 是腦內含量豐富，並可興奮食慾的神經傳遞物質(neurotransmitter) (22)。NPY 具有「刺激攝食行為」的功用，可由 NPY 直接注入第三腦室的實驗獲得證明(23)。除外，NPY 也能超越「腦內 satiety signal」的調控，導致貪食行為；而 CART 也被發現與精神興奮藥物的作用有關。本計劃發現 CART 在 Amphetamine 所誘導的厭食反應中扮演一個很重要的角色。而 CART 參與在 Amphetamine 所誘導的厭食反應中也和 SOD-1, SOD-2, c-jun 及 c-fos 有很大的相關性。

除了 CART 基因表現之外，c-jun 及 c-fos 在 Amphetamine 所誘導的厭食反應中也很重要。而 c-jun 及 c-fos 在正常情況是扮演轉錄因子的調控者(34)。而我們之前的研究及別人的文獻也發現 c-jun 及 c-fos 的訊息傳遞和許多 Amphetamine 所引起的基因表現有關。例如 NPY 的抑制作用就必須過這個路徑(35-36)。因此，在 CART 所參與 Amphetamine 誘導的厭食反應中，似乎和 NPY 的路徑類似。他們都需要 c-jun 及 c-fos 的活化。

另一方面，我們設計了 CART antisense oligodeoxynucleotide (29)以

microsyrange 將 CART 的 antisense oligodeoxynucleotide 注入 PVN 部位，讓藥物以擴散方式進入神經元。再配合 4 mg/kg 的 Amphetamine 每天注射一次，注射四天。我們發現 Amphetamine 注射開始的第一天大白鼠便出現厭食的情況，且於第二到四天有慢慢恢復的情況。而在 CART antisense 的處理有些微回覆此厭食情形。由 CART antisense 的實驗中，更可發現 CART 的確參與在 Amphetamine 所誘導的厭食反應中。

## 伍、結論與建議

綜合上述結果，我們發現重複注射 Amphetamine 之下，第一天大白鼠便出現厭食的情況，且於第二到四天有慢慢恢復的情況。而此厭食情形亦具有濃度的相關效應。而我們也發現這些厭食反應和大白鼠下視丘中 CART, SOD-1 及 SOD-2 的 mRNA 表現有關。而且可能透過活化 c-jun 和 c-fos 這些轉錄因子。而我們更利用 CART 的 antisense oligodeoxynucleotide 直接注入下視丘 PVN 部位，發現在 CART antisense 的處理有些微回覆此厭食情形。因此，我們發現 CART 在 Amphetamine 的厭食反應中的確扮演很重要的角色。

## 陸、參考文獻

1. Leibold SF: Amphetamine. possible site and mode of action for producing anorexia in the rat. *Brain Res* 1975; 84:160-7.
2. Foltin RW: Effects of amphetamine on food and fruit drink self-administration. *Exp Clinic Psychopharmacol* 2000; 8: 37-46.
3. Ersner JS: The treatment of obesity due to dietary indiscretion (over-eating) with benzedrine sulfate. *Endocrinology* 1940; 27: 776-80.
4. Seiden LS, Sabol KE, Ricaurte GA: Amphetamine: effects on catecholamine systems and behavior. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1993; 23: 639-77.
5. Nichols DE: Medicinal chemistry and structure-activity relationships. In *Amphetamine and its analogs: psychopharmacology, toxicology, and abuse*. Cho, A.K., and Segal, D.S. eds. San Diego: Academic Press, 1994; pp.3-41.
6. Gillard ER, Dang DQ, Stanley BG: Evidence that neuropeptide Y and dopamine in the perifornical hypothalamus interact antagonistically in the control of food intake. *Brain Res* 1993; 628:128-36.
7. Billington CJ, Briggs JE, Harker S, Grace M, Levine AS: Neuropeptide Y in hypothalamic paraventricular nucleus: a center coordinating energy metabolism. *Am J Physiol* 1994; 266: R1765-70.
8. Seiden LS, Sabol KE, Ricaurte GA: Amphetamine: effects on catecholamine systems and behavior. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1993; 23: 639-77.
9. Douglass J, Daoud S: Characterization of the human cDNA and genomic DNA encoding CART: a cocaine- and amphetamine-regulated transcript. *Gene* 1996; 169: 241-5.
10. Dominguez G, Vicentic A, Del Giudice EM, Jaworski J, Hunter RG, Kuhar

- MJ: CART peptides: modulators of mesolimbic dopamine, feeding, and stress. *Ann N Y Acad Sci* 2004; 1025: 363-9.
11. Jaworski JN, Vicentic A, Hunter RG, Kimmel HL, Kuhar MJ: CART peptides are modulators of mesolimbic dopamine and psychostimulants. *Life Sci* 2003; 73: 741-7.
  12. Hillebrand JJ, de Wied D, Adan RA: Neuropeptides, food intake and body weight regulation: a hypothalamic focus. *Peptides* 2002; 23: 2283-306.
  13. Kuhar MJ, Adams S, Dominguez G, Jaworski J, Balkan B. CART peptides. *Neuropeptides* 2002; 36: 1-8.
  14. Scruggs P, Lai CC, Scruggs JE, Dun NJ: Cocaine- and amphetamine-regulated transcript peptide potentiates spinal glutamatergic sympathoexcitation in anesthetized rats. *Regul Pept* 2005; 127: 79-85.
  15. Albertson DN, Pruetz B, Schmidt CJ, Kuhn DM, Kapatos G, Bannon MJ: Gene expression profile of the nucleus accumbens of human cocaine abusers: evidence for dysregulation of myelin. *J Neurochem* 2004; 88: 1211-9.
  16. Yang SC, Shieh KR, Li HY: Cocaine- and amphetamine-regulated transcript in the nucleus accumbens participates in the regulation of feeding behavior in rats. *Neuroscience* 2005; 133: 841-51.
  17. Gotz ME, Kunig G, Riederer P, Youdim MB: Oxidative stress: free radical production in neural degeneration. *Pharmacol Ther*. 1994; 63: 37-122.
  18. Sonsalla PK, Nicklas WJ, Heikkila RE: Role for excitatory amino acids in methamphetamine-induced nigrostriatal dopaminergic toxicity. *Science* 1989; 243: 398-400.
  19. Marshall JF, Ruskin DN, LaHoste GJ: Dopaminergic regulation of immediate early gene expression in the basal ganglia. *Adv Pharmacol* 1998; 42: 678-81.

20. Nash JF, Yamamoto BK: Effects of D-amphetamine on the extracellular concentrations of glutamate and dopamine in iprindole-treated rats. *Brain Res* 1993; 627: 1-8.
21. Chiueh CC, Wu RM, Mohanakumar KP, Sternberger LM, Krishna G, Obata T, Murphy DL: In vivo generation of hydroxyl radicals and MPTP-induced dopaminergic toxicity in the basal ganglia. *Ann. N.Y. Acad. Sci* 1994; 738: 25-36.
22. Olanow CW: A radical hypothesis for neurodegeneration. *TINS* 1993; 16: 439-44.
23. Cubells JF, Rayport S, Rajendran G, Sulzer D: Methamphetamine neurotoxicity involves vacuolation of endocytic organelles and dopamine-dependent intracellular oxidative stress. *J Neurosci* 1994; 14: 2260-71.
24. Chiueh CC, Huang SJ, Murphy DL: Enhanced hydroxyl radical generation by 2'-methyl analog of MPTP: suppression by clorgyline and deprenyl. *Synapse* 1992; 11: 346-8
25. Marshall JF, Ruskin DN, LaHoste GJ: Dopaminergic regulation of immediate early gene expression in the basal ganglia. *Adv Pharmacol* 1998; 42: 678-81
26. Leibowitz SF. Neurochemical-neuroendocrine systems in the brain controlling macronutrient intake and metabolism. *Trends Neurosci* 1992; 15:491-497.
27. Fraioli S, Cioli I, Nencini P. Amphetamine reinstates polydipsia induced by chronic exposure to quinpirole, a dopaminergic D2 agonist, in rats. *Behav Brain Res* 1997; 89: 199-215.
28. Itoi K, Horiba N, Tozawa F, Sakai Y, Sakai K, Abe K, Demura H, Suda T. Major role of 3',5'-cyclic adenosine monophosphate-dependent protein kinase

- A pathway in corticotropin-releasing factor gene expression in the rat hypothalamus in vivo. *Endocrinology* 1996; 137:2389-2396.
29. Kuo DY. Co-administration of dopamine D1 and D2 agonists additively decreases daily food intake, body weight and hypothalamic neuropeptide Y level. *J Biomed Sci* 2002; 9: 126-132.
30. Paxinos G., Watson C. *The rat brain in stereotaxic coordinates*. Sydney Australia: Academic Press, pp. 1986; C10-33.
31. Chiang WL, Chu SC, Yang SS, Li MC, Lai JC, Yang SF, Chiou HL, Hsieh YS. The aberrant expression of cytosolic carbonic anhydrase and its clinical significance in human non-small cell lung cancer. *Cancer Lett.* 2002; 188: 199-205
32. Kuo WH, Yang SF, Chu SC, Lu SC, Chou FP, Hsieh YS. Differential inductions of MMP-2 and MMP-9 in host tissues during the growth of ascitic sarcoma 180 cells in mice. *Cancer Lett.* 2003; 189: 103-112.
33. Mullah B, Livak K, Andrus A, Kenney P. Efficient synthesis of double dye-labeled oligodeoxyribonucleotide probes and their application in a real time PCR assay. *Nucleic Acids Res.* 1998; 26: 1026-31.
34. Ostrander MM, Richtand NM, Herman JP: Stress and amphetamine induce Fos expression in medial prefrontal cortex neurons containing glucocorticoid receptors. *Brain Res.* 2003; 990: 209-214
35. Wang L, Saint-Pierre DH, Tache Y: Peripheral ghrelin selectively increases Fos expression in neuropeptide Y-synthesizing neurons in mouse hypothalamic arcuate nucleus. *Neurosci. Lett.* 2002; 325: 47-51.
36. Wu Y, Zhang G, Lou D, Fan Y, Aronow B, Xu M, Zhang J: C-fos regulates neuropeptide Y expression in mouse dentate gyrus. *Neurosci. Lett.* 2004;



363:6-10.