

適應症

皮膚的創傷，外傷，皮膚感染症及膿皮症，皮膚潰爛症。

成分

每塊(3"×9")紗布墊含有Nitrofurazone



台灣 嘉原企業股份有限公司 台中

科學專欄

李水源

β -Endorphin

is A Potent

Analgesic Agent

編輯者

李水源

中國醫藥學院藥學系

台灣大學生化研究所碩士

中國醫藥學院生化學科講師

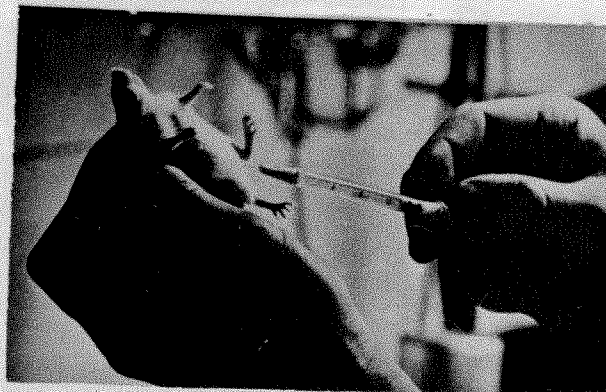
原著者

Horace H. Loh

L. F. Tseng

Eddie Wei

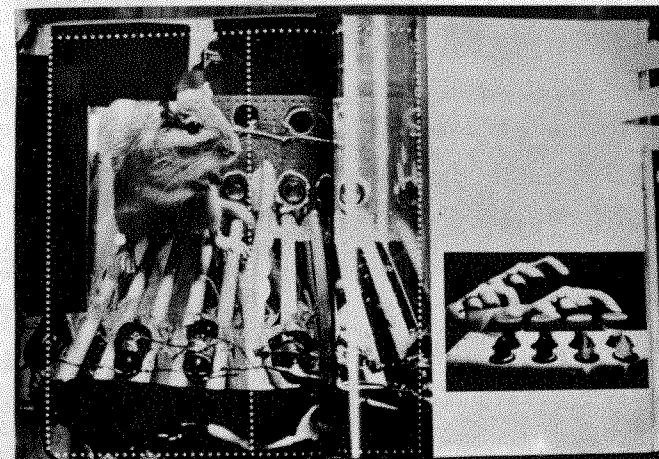
Choh Hao Li



腦啡

爲強力止痛劑

痛覺及止痛作用之機構在醫學上始終是一個謎題。自從我旅美生物化學家李卓浩博士最近發現：在人體及動物體內，含有具有止痛作用的 peptide，即 β -Endorphin 以及相關的 peptide 以後，此種謎題始獲一線曙光。相信在不久的將來，痛覺及止痛作用的機轉必可迎刃而解。筆者擬藉一席之地，陸續介紹李卓浩博士及其他有關 opiate peptide 研究之發現；未能盡善之處，如蒙諸先進長者指正，則感激不盡矣！



摘要

β -Endorphin 為一種類似鴉片之胜肽 (peptide)，當其注射入腦中後，可以小白鼠之尾部輕擊試驗、熱板試驗、及翻騰試驗和大白鼠之溼震盪試驗出其具有強力的抗傷害感受的特性 (antinociceptive properties)。基於克分子莫耳濃度立場而言， β -endorphin 之效用比 morphine 強 18 到 33 倍；並且其效用易被特定的鴉片拮抗藥— naloxone hydrochloride 所抑制。並且 β -endorphin 在體內的活性可以和已在體外證實具有類似鴉片活性的其他 peptide 相比較。

緒論

Collier 和 Goldstein 提出腦中含有與鴉片結合之內在結合物。為了尋找這些內在結合物，Terenius、Wahlstroum 和 Hughes 利用小白鼠輸精管及天竺鼠迴腸做受體結合試驗 (receptor binding assay) 及生物鑑定 (bioassay)，而均發現腦中含有類似鴉片的物質存在。之後，Hughes 等人純化並鑑定出兩種類似鴉片之 peptide，稱之 enkephalins；具有下列的胺基酸順序：H-Tyr-Gly-Gly-Phe-Met-OH 和 H-Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-OH。並且也已獲得其他工作者之證實。在此同時，Goldstein 和他的同僚們亦發現在 corticotropin (ACTH) 之粗提取物中亦含有類似鴉片之物質。而合成的 corticotropin 和 α -melanotropin 則缺乏這些相似的活性。並且在 corticotropin 夾雜物 (contaminant) 的純化及鑑定之後，發現有一分子量約為 1750 之 peptide 存在。最近，李卓浩博士由駱駝之腦下垂體分離出 untriakontapeptide，並測定其胺基酸之排列次序。該 peptide 稱之 β -endorphin。現已可用合成法製得，並且該合成品已被證實其在天竺鼠迴腸之生物鑑定及受體結合鑑定中具有類似鴉片的活性。

在分離和鑑定腦及腦下垂體組織的類似鴉片 peptide 時，其活性之標準乃依據其在體外之生物鑑定試驗。由於缺乏純化或合成品，故缺乏這些 peptide 在體內藥理特性的報告。

本篇文章乃是敘述 β -endorphin 及其他有關之 peptide 間之相對止痛性。而此些止痛作用乃是在小白鼠及大白鼠之體內實驗鑑定而得。

試劑及方法

- △體重 25~30 g 之雄性 小白鼠。
(Simonsen Laboratories, Gilroy, Calif.)
- △體重 250~350 g 之雌性 Sprague-Dawley 大白鼠。
- △Methionine-enkephalin.
購自 Bachem Laboratories (Marina del Reyes, Calif.)
- △ β -Endorphin：以合成法製得。
- △ β -Lipotropin (LPH)：由羊之腦下垂體分離出 (以李某所述之法)。
- △Naloxone-HCl：
為 Endo Laboratories (Garden City, N.Y.) 所賜。
- △Morphine sulfate：
購自 Mallinckrodt Chemical Works (St. Louis, MO.)
- △Sodium pentobarbital (Diabatal)：以蒸餾水稀釋成 25 mg/ml 作注射用。
- △Morphine pellets：含 75 mg 的 morphine
(乃根據 Gibson 和 Tingstad 之處方)。

抗傷害感受性活性的鑑定

- △ β - Endorphin 及 Morphine 的抗傷害感受性及止痛特性可以小白鼠的尾部輕擊試驗法、熱板試驗法、醋酸誘導翻騰試驗法及大白鼠的冰水誘導—濕震盪反應法鑑定之。
- △ 所有試驗的 peptide 及 morphine sulfate 均以腦內注射法給藥。
- △ 注射之劑量為每隻小白鼠 $5 \mu l$; 每隻大白鼠 $1 \mu l$ 。

(一)小白鼠熱板及尾部輕擊試驗

- △ 控制潛伏期(control latencies)(T_0): 為三次注射藥以後測得之潛伏期的平均值。
- △ 試驗潛伏期(test latencies)(T_1): 由各試驗動物注射後各時間內測得。
- △ 平均止痛(percent analgesia): 以 $(T_1 - T_0) / (T_2 - T_0) \times 100$ 計算而此處的 T_2 (cut-off time) 對 hot-plate 及 tail-flick test 而言, 各為 60 秒及 15 秒。
- △ 反應時間之潛伏期增加 2 倍, 可作為抑制作用量的指標。
- △ 中間抗傷害感受性劑量 (AD_{50})(Median antinociceptive dose) 及 95% 可信限度, 乃是依照 Litchfield 及 Wilcoxon 之法計算。
- △ 每一劑量至少試驗八個動物, 而用 3 個至 5 個劑量的平均測定 AD_{50} 。

(二)小白鼠翻騰試驗

- △ 以翻騰法試驗止痛作用時, 在皮下注射 (I.C.) β - endorphin 5 分鐘後, 以腹腔注射 (I.P.) 給予 acetic acid ($0.1 ml / 10 g$ 體重。計算每 15 分鐘內翻騰之次數。
- △ 為了測定翻騰之 AD_{50} , 乃將抑制反應之量指標定義為在服用藥物後, 所有小白鼠之翻騰次數少於 2 次。

(三)大白鼠濕震盪反應

- △ β - endorphin 對麻醉後的大白鼠在冰水中誘導出的重覆震盪移動的抑制效應, 也是被研究的對象。此實驗的模式是以靈敏的生物鑑定法去測定中樞的鴉片活性的一種體內試驗。
- △ 動物以 50 mg/kg 的 Sodium pentobarbital 行 I.P. 注射。30 分鐘後, 將 β - endorphin 溶於蒸餾水內, 注入大白鼠兩大腦半球之 periaqueductal gray region; 每大腦半球注射 $0.5 \mu l$ 。5 分鐘後將實驗動物浸入冰水中, 然後計算 5 分鐘內震盪移動的次數。
- △ 選用 periaqueductal gray 作研究的原因, 乃是因最近作該腦部位置的微量注射實驗時, 發現其對嗎啡之藥理作用極為敏感。

心理依賴之評定

為了研究 β - endorphin 對誘導心理依賴性的能力, 乃使用一種稱為 Osmotic minipump 的裝置 (即 Alza Corp, Palo Alto, Cali 的 AlzetTM 全身輸送系統)。此裝置可以恆定之速率灌流少量體積的系統 ($1.40 \pm 0.4 \mu l/hr$ 約 5 天) 將藥物直接輸入腦中。

試驗動物先以 Sodium pentobarbital 50 mg/kg I.P. 麻醉, 再以 L 型不銹鋼管植入 frontal cortex 或 periaqueductal gray。管中先填充蒸餾水, 而後將植入的管以牙用黏著劑固定於腦殼上。然後再將 minipump 內填充適量的藥物溶液後, 鑲入肩胛骨間之皮下; 而 minipump 突出之不銹鋼管部份再以塑膠管連接至鑲在腦中之管。為了避免 minipump 被動物脫落, 將腦殼之傷縫合, 以便使整個灌流單位包在皮下。

在藥物灌流至腦中 70 小時後, 稱量動物的重量。然後放於一加侖之玻璃瓶中, 在 10 至 15 分鐘的調節期間之後, 給予鴉片拮抗藥 naloxone hydrochloride 10 mg/kg I.P.

禁斷行為 (resultant withdrawal behavior) 乃是以標準法觀察法得之。在服用鴉片拮抗藥後產生心理依賴性的實驗動物上, 可發現具有企圖往上跳而逃離玻璃的行為及濕狗震盪 (wet dog shake) 及牙齒卡搭地撞抖行為發生。假若大白鼠在注射 naloxone 後 15 分鐘內有兩次以上企圖逃離玻璃瓶, 或有三次以上的“濕狗震盪”或發出磨牙的聲音, 則可視為已經產生禁斷症狀, 亦可利用這些表現出來的特殊禁斷徵兆而分類。

結果與討論

(-)、 β -Endorphin與相關peptide
及morphine之相對強度

(-)、 β -Endorphin之藥理特性

為決定此種新的“peptide 止痛劑”成癮易致性，使用上述Osmotic minipump將 β -Endorphin以每小時1.4 ml速率直接灌入大白鼠腦中的periaqueductal gray fourth Ventricular space 並且以 β -Endorphin, 0.67ug/ml之溶液灌洗70小時。當給予naloxone時，則幾乎所有之動物均呈現典型之類似morphine之禁斷現象。

每一小白鼠給予0.5 mg及1.0 μ g之 β -Endorphin後，則小白鼠對傷害感受性刺激之尾部輕擊及熱板試驗的反應呈劑量一關連性之抑制作用(圖1 a及b)。此種效應持續60~90分鐘；持續之時間決定於所使用的劑量，並且此種效應與morphine對相同試驗之持續時間極相類似。該二試驗 β -Endorphine之抗傷害感受性作用可被純鴉片拮抗物naloxone完全恢復。(圖1) β -Endorphin對於小白鼠注射醋酸後所引起之翻騰反應乃呈劑量相關性控制作用。此種效應可持續約60至90分鐘之久(圖1c)。小白鼠在注射 β -Endorphin以前5分鐘若預先以naloxone HCl (1mg/kg 皮下注射)處理，則完全消除 β -Endorphin對翻騰反應之抑制作用。而後在大白鼠之濕震盪反應中，亦會產生劑量相關性的抑制作用，此種抑制作用可在於給予 β -Endorphin 15分鐘之前服用naloxone, 5mg/kg, IP而拮抗之。因此，在上列中樞抗傷害感受性的體內試驗中， β -Endorphin有如鴉片擬似物之作用。而該 β -Endorphin之擬似作用可被naloxone所恢復(圖2)。

三種小白鼠之生物鑑定法中， β -Endorphine與morphine間止痛效力之量的比較，表示於表1。效力以克分子比較時， β -Endorphine比morphine sulfate強18至33倍。

為了進一步明白peptide構造及止痛活性間之關係，與 β -Endorphin有關之peptide亦試驗之。 β -Lipotropin為91個氨基酸之peptide，在其構造內含有 β -Endorphin [β -LPH(61-91)]，其活性至少小於 β -Endorphin 80倍。nonapeptide, β -LPH(61-69)在上述試驗中，以高至200ⁿmole/kg之劑量亦不顯示統計上有意義之抗傷害感受性活性。Methionine-enkephalin為含有 β -LPH上61~65胺基酸次序的pentapeptide。當每隻小白鼠給予50 μ g (3.3 μ mole/kg, I.C.)作上述三項試驗時，只產生短期間(小於5至10分鐘)之弱止痛作用。給予較高之劑量時，並不延長methionine-enkephalin之止痛活性。這些以enkephalin所做的實驗結果與最近Belluzzi等人以enkephalin對大白鼠之活性之觀察結果相似。 β -Endorphine以trypsin水解，則被壞大部分之止痛效力。證明整個分子為完整活性所需。

概言之，我們已證明 β -Endorphin為強力止痛劑；以克分子計算，其效力較morphine sulfate強18至33倍。更進一步我們亦發現長期局部灌流 β -Endorphin進入大白鼠之腦中，可誘導嗎啡樣之心理依賴性。目前之結果產生關於 β -lipotropin可能作為擬鴉片peptide (β -Endorphin)及鴉片拮抗peptide (β -melanotropin, Arg-enkephal等)之前身激素(prohormone)。

當這些peptides在體外之生物鑑定，如立體專一性結合或天竺鼠小腸試驗所得的相對活性比較時， β -endorphin及相關peptides在體內之藥理效力為頗有趣之事。Cox等人以鴉片受體結合鑑定法證明 β -Endorphin效力比non morphine強了3倍左右，而Enkephalin效力却為normorphine之 $\frac{1}{5}$ 倍。在天竺鼠迴腸作試驗中，這些著者發現 β -Endorphin及enkephalin之效力幾乎相同，但兩者均較normorphine為弱。對此兩種體外之生物鑑定法所得活性之差異之解釋，Cox等人建議可能實驗中所使用之迴腸片段對peptide具有通透性障礙。而在該研究中， β -Endorphin在體內之活性較morphine sulfate強18至33倍，然而enkephalin却在同一試驗系統中呈相對的不活性。但是中樞活性之不同，不可能以peptide達到止痛受體之不同或以該peptides之分解速率之不同而解釋之。因此，體外鑑別試驗雖然在預測鴉片生物鹼之止痛效力上有極高之精確度，但是却不能用於定量擬鴉片peptides之體內試驗的活性。

(表 1)

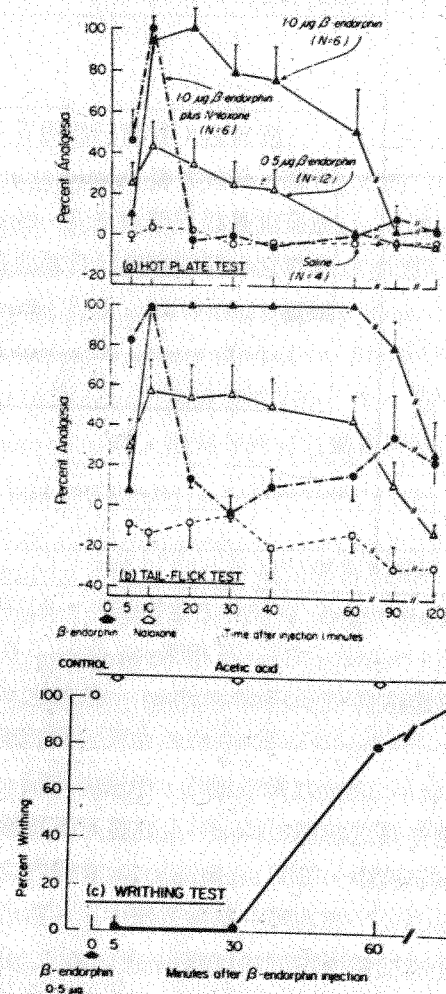
在大白鼠中morphine 和 β -endorphin 的 AD_{50} 。
其中使用的 β -endorphin 及 morphine sulfate 之分子量分別為 3438 和 334。
 AD_{50} 和 95% 可信度以 h mole/kg I.C. 為準則。

Tests	β -Endorphin	Morphine sulfate	Potency ratio.
Writhing	0.92 (0.48-1.56)	17.92 (10.76-27.52)	19.5
Hot-plate	2.32 (1.4-3.96)	40.68 (32.28-51.44)	17.5
Tail-flick	1.52 (0.88-2.64)	50.24 (43.04-58.60)	33.0

The molecular weights of 3438 and 334 were used for β -endorphin and morphine sulfate, respectively. AD_{50} in nmol/kg i.c. (95% confidence limits).

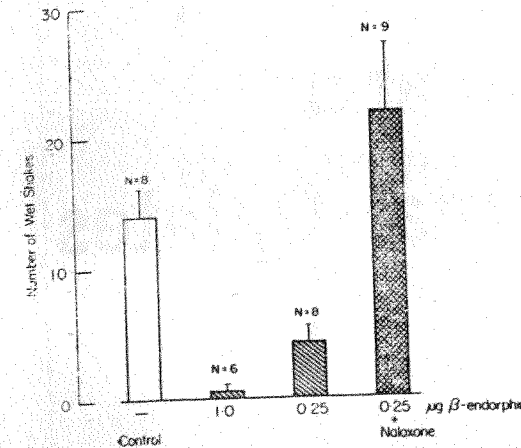
(圖 1) β -Endorphin 在(a)熱板試驗(b)尾
部輕擊試驗及(c)翻騰試驗之抗傷害感受性作用
，及其被 naloxone 所恢復之作用。

在(a)及(b)在零時 (zero time) (\uparrow)
I.C. 注射 β -Endorphin。注射後 10 分
鐘注射 naloxone (1mg/kg 皮下注射)。N
= 實驗小白鼠之數目。在控制試驗之小白鼠下
，以腦內注射 (intracerebrally) $5 \mu l$
之生理食鹽水。垂直之桿表示 SEM。在(c)的
4 組小白鼠，每組 5~8 隻皮下注射 β -Endo-
rphin $0.5 \mu g$ 。在給予醋酸 (0.6%, 0.1
ml/10g 體重) 腹膜內注射後，計算翻騰反應
10 分鐘。抑制之量指標定義為小於兩次之翻騰
移動。



(圖 2) β -Endorphin 對濕震盪行為之抑
制作用及其被 naloxone 所恢復之作用。

大白鼠在兩側注射 β -Endorphin 進入
periaqueductal gray (每半球 $0.5 \mu l$
) 以前 30 min 先以 sodium pentobarbital
麻醉。注射 5 分鐘後將大白鼠浸於冰水中，計
算 5 分鐘之濕震盪次數。在注射 β -Endorphin
15 分鐘前以皮下注射 Naloxone 5mg/kg
。控制組注射食鹽水。



1. Collier, H. O. J. (1973) Proc. 5th Int. Congr. Pharmacol., San Francisco, 1972, ed. Cochin, J. (Karger, Basel), Vol. 1, PP. 65 - 76.
2. Goldstein, A. (1974) "Proc, Intl, Symp. Alcohol and Drug Res.," in Biological and Behavioral Approaches to Drug Dependence, eds. Cappel, H. & LeBlanc, A. E. (Addiction Research Foundation, Toronto, Canada), PP. 217 - 241.
3. Terenius, L. & Wahlstrom, A. (1974) Acta Pharmacol. Toxicol. Suppl, 1, 35, 55.
4. Hughes, J. (1975) Brain Res. 88, 295 - 308.
5. Hughes, J., Smith, T. W., Kosterlitz, H. W., Fothergill, L. A., Morgan, B. A. & Morris, H. R. (1975) Nature 258, 577 - 579.
6. Pasternak, G. W., Goodman, R. & Snyder, S. H. (1975) Life Sci. 16, 1765 - 1769.
7. Simantov, R. & Snyder, S. H. (1976) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 73, 2515 - 2519.
8. Teschemacher, H., Opheim, K. E., Cox, B. M. & Goldstein, A. (1975) Life Sci. 16, 1771 - 1776.
9. Cox, B. M., Opheim, K. E., Teschemacher, H. & Goldstein, A. (1975) Life Sci. 16, 1777 - 1782.
10. Li, C. H. & Chung, D. (1976) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73, 1145 - 1148.
11. Li, C. H., Lemaire, S., Yamashiro, D. & Doneen, B. A. (1976) Biochem. Biophys. Res. Commun., in press.
12. Cox, B. M., Goldstein, A. & Li, C. H. (1976) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73, 1821 - 1823.
13. Li, C. H., Barnafi, L., Chretien, M. & Chung, D. (1966) Excerpta