

乙醛與神經系統產生的縮合物的形成及降解性研究

飲酒對人體健康及人類行為所造成的影響，已有非常多的研究及報導。其影響的範圍，包括了心及血管、腸胃、內分泌、與中樞神經等幾個主要的系統(1)。在心及血管方面，飲酒過量可能造成心臟擴大、心律不整、冠狀動脈疾病、高血壓、心肌梗塞、及改變局部血的流速等等。在腸胃方面，飲酒過量可能造成脂肪肝、酒精性肝炎、胰臟炎、胃炎、及吸收不良等問題。在內分泌方面，飲酒過量可能造成男性性機能的衰退。在中樞神經方面，飲酒過量除了會造成酒醉，影響行為上的判斷外，記憶力的喪失、神經細胞的死亡、及成癮後的酒精戒斷症(alcohol withdrawal syndrome)等都可能發生(1)。另外，飲酒過量可能會增加得癌症的機率，而孕婦飲酒更可能造成胎兒酒精症候群(fetal alcohol syndrome)(2)。

有幾種機制用來解釋由乙醇及其代謝產物乙醛所造成的影響(3)：(一) 由於乙醇是極小的分子，並且同時具有疏水及親水性，因而可以與細胞膜的脂質層產生相當程度的混合。混合後的脂質層的流動性受到改變，進而改變了脂質層蛋白酵素的正常功能。(二) 酒精代謝在體內，特別是肝，產生還原力高的情形。這種現象，會將 NAD 轉換成 NADH，而改變了氧化還原的平衡。這種改變，進一步會影響到脂肪酸的氧化，同時增加形成脂肪的先驅物 glycerol-3-phosphate 及造成了脂肪肝。(三) 酒精代謝會造成體內自由基的增加，減少抗氧化分子如 glutathione 的含量。這些作用，增加了 superoxide, hydroxy radicals, 及 hydrogen peroxide 的形成，也因而增加了脂質的過度氧化，產生如 malondialdehyde 等毒性物質。(四) 酒精參與正常代謝的途徑，因而在體內產生了新的分子，影響體內內生分子正常運作。譬如說，與脂肪酸產生脂肪酸乙【丁一】(fatty acid ethyl ester)及 phosphatidylethanol。(五) 酒精直接與一些負責訊號傳遞的脂質蛋白如 protein kinase C, potassium channels, 及 IGF receptors 作用，因而可能改變了細胞間的訊息傳遞。(六) 酒精代謝中間產物乙醛的累積造成的作用。一旦乙醛代謝受阻，體內乙醛濃度就會增高。由於乙醛具高反應性可以與體內的生化分子如蛋白酵素鍵結，因而造成影響。乙醛的反應主要是先與一級及二級胺反應，形成可逆的許夫鹼(Schiff base)，進一步不可逆的產物的形成，則可藉由如 Pictet-Spengler 縮合的機制產生(4)，或由蛋白質的【丁一】胺鍵上的胺與許夫鹼的雙鍵反應，生成最終的 imidazolidinone 的環狀產物(5)。由於生物體內仍有許多生化分子具備相同的反應條件，如何鑑定並了解尚未被研究的加成產物的結構及其可能影響將是相當重要的議題。本計畫針對乙醛與體內之生化分子的反應性來加以研究。

乙醛與生化分子形成的縮合物，文獻上已報導的包括有各種大小的生化分子。在大的生化分子方面，已鑑定出與乙醛可以形成加成物的蛋白質包括了 hemoglobin、albumin、delta 4-3-ketosteroid 5 beta- reductase、collagen、tubulin、dynein、apolipoprotein B、histone H1、ethanol-inducible

P450IIE1 及 actin 等(6-16)。另外,乙醛與去氧核糖核酸(DNA)及核糖核酸(RNA)也可形成加成物,其形成鍵結的單位核苷酸與產物結構也已被鑑定出(17-19)。在小的生化分子方面,鑑定出的與乙醛形成的加成物包括了各類的生化胺(biogenic amines)(20-24):如 histamine、catecholamines (dopamine、epinephrine、norepinephrine)、indoleamines (tryptamine、serotonin);脂質:如 phosphatidylethanolamine(25);及 cofactors, 如 tetrahydrofolate(26)。另外,乙醛也能與胜太反應:(一) Braun K.P. (27)等用含 hemoglobin b-globin chain 的 N-terminal 的五及八個氨基酸組成的合成胜太來研究與乙醛反應後的結構。N-terminal 的 valine 及在八個氨基酸的胜太上的 lysine 皆可與乙醛反應形成穩定的縮合物。(二) 類似的研究, Sillanauke P. (28)等用同樣部位的前面的六個氨基酸,加上一個 cysteine, 以 1:1 與 1:10 的胜太 / 乙醛之比,在一般的或含 sodium cyanoborohydrate (NaCNBH_3)的還原狀態下反應。利用質譜結構鑑定的能力,可以得知與 N-terminal valine 形成的產物除了 imidazolidinone 外還包括 Schiff base。(三) Fowles, L.F. (29)等為了瞭解乙醛與血紅蛋白形成 imidazolidinone 的可能反應速率,以幾個含二及三個氨基酸的胜太為模型,模擬長期飲酒者肝中乙醛的反應。其結果顯示 N-terminal 氨基酸的種類對形成 imidazolidinone 之反應速率影響不大,根據其反應的速率常數(k 約 $0.734 \text{ M}^{-1}\text{min}^{-1}$)可得到在具酒癮者的肝或血中乙醛與蛋白質的縮合物應該存在的結論。而且,具有過量、能與乙醛形成 Schiff base 的物質共同存在下的狀況,會催化乙醛與胜太的反應。最後的結果,同樣在 San George(30)等人的研究中被發現。(四) 胜太荷爾蒙 methionine-enkephalin 及 leucine-enkephalin 與乙醛的反應同樣會形成 imidazolidinone,而且其反應快速。在 73 mM 乙醛與 3.6 mM methionine-enkephalin 濃度, pH 7.0, 25 °C 下 $t_{1/2}$ 為 14 分鐘。值得注意的是在形成 imidazolidinone 後,荷爾蒙會失去其活性,但產物會慢慢分解成原反應物而恢復活性(31)。類似的反應也發生在丙酮上,丙酮與 oxytocin 的 N-terminal cysteine 能形成穩定的 imidazolidinone 產物,而使 oxytocin 失去活性(32)。

本研究以血管收縮素(angiotensin I and angiotensin II)為例,測試乙醛對具生化活性之胜太可能之影響,比較乙醛及丙二醛與血管收縮素的反應性,並利用液相層析質譜與串聯質譜來分析鑑定反應之產物,最後再比較反應前後,含不同濃度血管收縮素及其與醛類反應之縮合產物對老鼠頸動脈血管收縮功能之改變情形。

實驗方法與步驟 乙醛、丙二醛與血管收縮素之反應是於 37 °C 恆溫下,以不同濃度標準品於純水及於 PBS(pH 7.4)中進行反應,反應產物直接利用發展出之液相層析/電灑游離質譜分析方法進行分析。縮合產物之結構除了利用質譜來定其分子量外,詳細之反應部位另以碰撞誘導之裂解法 (collision induced dissociation, CID) 來判定。

醛類與血管收縮素在反應前後對大鼠頸動脈血管收縮強度之比較是以體外試驗之方式，將大鼠犧牲後，取主動脈，剪成三段，置於血管張力測試儀測量其受產物造成之收縮強度變化，並以統計進行分析。

結果與討論 乙醛及丙二醛皆能與血管收縮素進行反應，而反應受到 pH 值之影響相當大，在酸性溶液中 (pH 在 3 到 4 間)，反應遠較在 PBS 中為快。以 100:1 比例之醛與勝太混合反應，在酸中數秒內即有超過一半之血管收縮素縮合產物形成，在 PBS 中則需超過半天之時間，實際之反應速率常數仍須另行量測。

乙醛及丙二醛與血管收縮素反應之產物經液相層析/電灑游離質譜分離及鑑定，為一許夫鹼 (Schiff base) 反應，是醛與胺加成脫水形成。其反應部位經質譜的 CID 實驗證實是在 N 端 (arginine)，這和乙醛與血紅蛋白反應在 N 端相同，不同的是兩種醛與血管收縮素反應並不會形成環狀縮合物。另外，血管收縮素上之 histidine 並不參與反應。

與乙醛及丙二醛反應後之血管收縮素，在大鼠頸動脈血管張力之測試中，有降低之情形，且減低可達 50%。由於反應過程是在較高濃度之血管收縮素下進行，其減低百分比可能因血管收縮素濃度過飽和而低估，未來將另進行劑量與效應關係之研究來瞭解實際形成縮合物後其功能的影響。

比較乙醛及丙二醛之反應性，發現丙二醛的反應速率遠較乙醛為快，體內內生之丙二醛與一般生化分子反應後所造成的影響，值得進一步探討。另外，反應後縮合產物之酵素分解性仍須進一步研究。

參考資料

1. MacDonald, J.; Twardon, E.M.; and Shaffer, H.J. Alcohol. In: Friedman, L.; Fleming, N.F.; Roberts, D.H.; and Hyman S.E. eds. Source Book of Substance Abuse and Addiction. Baltimore: Williams & Wilkins, 1996. Chapter 7, pp. 109-137.
2. Alcohol-Related Birth Defects. Alcohol Health and Research World 18(1), 1994.
3. Rubin, E. The chemical pathogenesis of alcohol-induced tissue injury. Alcohol Health and Research World 17(4): 272-278, 1993.
4. Abramovitch, R.A.; and Spenser, I.D. The carbolines. In: Katritzky, A.R. ed. Advances in Heterocyclic Chemistry. Vol. 3. New York: Academic Press, 1964. pp. 79-91.
5. Tuma, D.J.; Hoffman, T.; and Sorrell, M.F. The chemistry of acetaldehyde-protein adducts. Alcohol Alcohol. Supplement 1:271-276, 1991.
6. Itala, L.; Seppa, K.; Turpeinen, U.; and Sillanauke, P. Separation of hemoglobin acetaldehyde adducts by high-performance liquid chromatography-cation-exchange chromatography. Anal. Biochem. 224(1): 323-329, 1995.
7. Gross, M.D.; Hays, R.; Gapstur, S.M.; Chaussee, M.; and Potter, J.D. Evidence for the formation of multiple types of acetaldehyde-haemoglobin adducts. Alcohol Alcohol. 29(1): 31-41, 1994.

8. Fleisher, J.H.; Lung, C.C.; Meinke, G.C.; Pinnas, J.L. Acetaldehyde-albumin adduct formation: possible relevance to an immunologic mechanism in alcoholism. *Alcohol Alcohol.* 23(2): 133-141, 1988.
9. Zhu, Y.; Fillenwarth, M.J.; Crabb, D.; Lumeng, L.; and Lin, R.C. Identification of the 37-kd rat liver protein that forms an acetaldehyde adduct in vivo as delta 4-3-ketosteroid 5 beta-reductase. *Hepatology.* 23(1):115-122, 1996.
10. Svegliati-Baroni, G.; Baraona, E.; Rosman, A.S.; and Lieber, C.S. Collagen-acetaldehyde adducts in alcoholic and nonalcoholic liver diseases. *Hepatology.* 20(1 Pt 1): 111-118, 1994.
11. Smith, S.L.; Jennett, R.B.; Sorrell, M.F.; and Tuma, D.J. Substoichiometric inhibition of microtubule formation by acetaldehyde-tubulin adducts. *Biochem. Pharmacol.* 44(1): 65-72, 1992.
12. Sisson, J.H.; Tuma, D.J.; and Rennard, S.I. Acetaldehyde-mediated cilia dysfunction in bovine bronchial epithelial cells. *Am. J. Physiology.* 260(2 Pt 1): L29-36, 1991.
13. Wehr, H.; Rodo, M.; Lieber, C.S.; and Baraona, E. Acetaldehyde adducts and autoantibodies against VLDL and LDL in alcoholics. *J. Lipid Res.* 34(7):1237-1244, 1993.
14. Niemela, O.; Mannermaa, R.M.; and Oikarinen, J. Impairment of histone H1 DNA binding by adduct formation with acetaldehyde. *Life Sci.* 47(24):2241-2249, 1990.
15. Behrens, U.J.; Hoerner, M.; Lasker, J.M.; and Lieber, C.S. Formation of acetaldehyde adducts with ethanol-inducible P450IIE1 in vivo. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 154(2):584-590, 1988.
16. Xu, D.S.; Jennett, R.B.; Smith, S.L.; Sorrell, M.F.; and Tuma, D.J. Covalent interactions of acetaldehyde with the actin/microfilament system. *Alcohol Alcohol.* 24(4):281-289, 1989.
17. Steinberg, J.J.; Oliver, G.W. Jr.; and Cagigas, A. The formation and measurement of DNA neuroadduction in alcoholism. Case report. *American J. Forensic Med. Pathology.* 18(1):84-91, 1997.
18. Fang, J.L.; Vaca, C.E. Development of a 32P-postlabelling method for the analysis of adducts arising through the reaction of acetaldehyde with 2'-deoxyguanosine-3'-monophosphate and DNA. *Carcinogenesis.* 16(9):2177-2185, 1995.
19. Vaca, C.E.; Fang, J.L.; and Schweda, E.K.H. Studies of the reaction of acetaldehyde with deoxynucleosides. *Chem.-Biol. Interact.* 98: 51-67, 1995.
20. O'Donnell, J.P. The reaction of amines with carbonyls: Its significance in the nonenzymatic metabolism of xenobiotics. *Drug Metabol. Rev.* 13(1): 123-159, 1982.
21. Rommelspacher, H.; May, T.; and Susilo, R. Beta-carbolines and tetrahydroisoquinolines: detection and function in mammals. *Planta Med. Supplement*

1. 57: S85-S92, 1991.
22. Hirst, M.; Evans, D.R.; and Gowdey, C.W. Salsolinol in urine of social drinkers. In: Collins, M.A. ed. *Aldehyde Adducts in Alcoholism, Progress in Clinical and Biological Reserach*, Vol 183, Alan R. Liss, New York, 1985, pp 85-100.
23. Reddy, B.V.; and Sarkar, D.K. Effect of alcohol, acetaldehyde, and salsolinol on beta-endorphin secretion from the hypothalamic neurons in primary cultures. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 17(6): 1261-1267, 1993.
24. Walsh, M.J. Biogenesis of biologically active alkaloids from amines by alcohol and acetaldehyde. *Ann. NY Acad. Sci.* 215: 98-110, 1973.
25. Kenney, W.C. Formation of Schiff base adduct between acetaldehyde and rat liver microsomal phosphatidylethanolamine. *Alcohol Clin. Exp. Res.* 8(6):551-555, 1984.
26. LaBaume, L.B.; and Guynn, R.W. Investigation into the substrate capacity of the acetaldehyde-tetrahydrofolate condensation product. In: Collins, M.A. ed. *Aldehyde Adducts in Alcoholism, Progress in Clinical and Biological Reserach*, Vol 183, Alan R. Liss, New York, 1985, pp 189-200.
27. Braun, K.P.; Pavlovich, J.G.; Jones, D.R.; and Peterson, C.M. Stable acetaldehyde adducts: structural characterization of acetaldehyde adducts of human hemoglobin N-terminal beta-globin chain peptides. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 21(1):40-43, 1997.
28. Sillanauke, P.; Hurme, L.; Tuominen, J.; Ranta, E.; Nikkari, S.; and Seppa, K. Structural characterisation of acetaldehyde adducts formed by a synthetic peptide mimicking the N-terminus of the hemoglobin beta-chain under reducing and nonreducing conditions. *Eur. J. Biochem.* 240(1):30-36, 1996.
29. Fowles, L.F.; Beck, E.; Worrall, S.; Shanley, B.C.; and de Jersey, J. The formation and stability of imidazolidinone adducts from acetaldehyde and model peptides. A kinetic study with implications for protein modification in alcohol abuse. *Biochem. Pharmacol.* 51(10): 1259-1267, 1996.
30. San George, R.C.; and Hoberman, H.D. Reaction of acetaldehyde with hemoglobin. *J. Biol. Chem.* 261: 6811-6821, 1986.
31. Summers, M.C. Structural and biological studies of the acetaldehyde adducts of enkephalins and related peptides: a short review. In: Collins, M.A. Ed. *Aldehyde Adducts in Alcoholism, Progress in Clinical and Biological Reserach*, Vol 183, Alan R. Liss, New York, 1985, pp 30-49.
32. Hruby, V.J.; Yamashiro, D.; and du Vigeneaud, V. The structure of acetone- oxytocin with studies on the reaction of acetone with various peptides. *J. Am. Chem. Soc.* 90: 7106-7110, 1968.