

## 新北市政府 107 年度自行研究報告

### 研究主題:

中文：探討血衍嗎啡素-7 在產前暴露酒精大鼠之子代中產生疼痛變化所扮演之角色

### 英文：

The possible role of LVV-hemorphin 7 in the change of pain sensation in the offspring from dam rats with prenatal alcohol exposure

研究機關：新北市立聯合醫院

研究人員：鄒樂起

研究期程：107.01.01-107.12.31

新北市政府衛生局編印

印製年月:107 年 12 月

# 新北市政府 107 年度自行研究計畫表

填表人：鄒樂起

填表日期：106/12/12

聯絡電話：0905-227013

計畫名稱	探討血行嗎啡素-7 在產前暴露酒精大鼠之子代中產生疼痛變化所扮演之角色		
研究機關及人員	計畫主持人：新北市立聯合醫院 麻醉科 鄒樂起主任	期程	自議會 107 年預算審議 通過後執行至 107 年 12 月 31 日
目的	<p>去年全國一年酒類總供給量超過 7 億公升，可以裝滿 282 座游泳池。酒不但傷肝也傷腦，全身有 60 種疾病因酒而起。酒精飲品已被世界衛生組織國際癌症研究機構列為第 1 類致癌物（即對人類致癌），與煙草、石棉及電離輻射屬同一類別。酒精可引致口腔癌、咽癌、喉癌、食道癌、肝癌、大腸癌、女性乳癌。縱使現時全球女性飲用酒精的人數仍然較男性少，而女性的酒精飲用量亦較男性為低，酒精對女士的身、心及社交影響卻不容忽視。</p> <p>孕婦飲用酒精，會影響子代對疼痛感覺的閾值，以往本實驗室發現懷孕母鼠使用臨床常用之止咳藥 dextromethorphan 會嚴重影響胎兒的死亡率、出生體重及記憶力發展等，產生嚴重的副作用。本人研究動物長期使用運動員常用之雄性類固醇 nandrolone，發現會增加大鼠對嗎啡的依賴性及增加血行嗎啡素-7(LVV-hemorphin 7, LVV-H7)的血清濃度。但進一步給予足量的抗 LVV-H7 血清卻不能阻斷 nandrolone 對嗎啡的成癮性，其複雜機轉有待查明，此結果發表於 2016 年 <b>Neuropeptides</b> 國際神經肽期刊(SCI IF=2.644)。</p> <p>LVV-H7 為人體內紅血球裂解後所產生的非典型止痛肽。文獻顯示懷孕母鼠使用酒精後，其子代體內將有更多 LVV-H7 釋出，因此 LVV-H7 應有較高的血清濃度。此研究的目的：為探討懷孕期使用酒精的母鼠，其子代的發炎性疼痛或神經性疼痛的止痛閾值是否異常，再進一步探討疼痛閾值是否與內生性止痛肽 <b>LVV-H7</b> 相關聯。目前為止，本研究為第一篇直接探討 LVV-H7 與脊髓止痛相關聯的深入研究題材。因本院為協助戒除毒癮及酒精的醫療機構，探討懷孕期使用酒精的婦女，其子代的疼痛感知是否有異常的影響實屬需要。</p>		
方法	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. 記錄酒精對懷孕母鼠的飲食影響。</li> <li>2. 觀察懷孕期間飲用酒精對子代的影響。</li> <li>3. 探討懷孕期間飲用酒精對子代的<b>疼痛閾值</b>是否有所影響: 3-10 週大之子代，測定兩組的基礎疼痛閾值。即一般的子代(控制組)及使用酒精的懷孕母鼠生產之子代(實驗組)。</li> </ol>		

	4. 使用本實驗室常用之發炎性疼痛模式，測定兩組子代在發炎性疼痛的閾值是否有所差異。(方法見本人 2013, 2015, 2016 之文獻)
經	費 799,976 元
備	註

備註：

- 一、研究機關及人員：包括研究機關、實際研究人員及參與工作人員。
- 二、方法：如研究方法之訂定、問題之發掘、研究設計、資料之蒐集與分析、解決方案之研擬、研究報告之提出。
- 三、已提報之自行研究計畫因故撤銷辦理者，應敘明原因行文通知。
- 四、自行研究報告內容應力求與所屬局處業務相關。

## 新北市政府 107 年度自行研究成果摘要表

計 畫 名 稱	探討血衍嗎啡素-7 在產前暴露酒精大鼠之子代中產生疼痛變化所扮演之角色
期 程	107 年 1 月 1 日至 107 年 12 月 31 日
經 費	799,976 元
緣 起 與 目 的	<p>去年全國一年酒類總供給量超過 7 億公升，可以裝滿 282 座游泳池。酒不但傷肝也傷腦，全身有 60 種疾病因酒而起。酒精飲品已被世界衛生組織國際癌症研究機構列為第 1 類致癌物（即對人類致癌），與煙草、石棉及電離輻射屬同一類別。酒精可引致口腔癌、咽癌、喉癌、食道癌、肝癌、大腸癌、女性乳癌。縱使現時全球女性飲用酒精的人數仍然較男性少，而女性的酒精飲用量亦較男性為低，酒精對女士的身、心及社交影響卻不容忽視。</p> <p>孕婦飲用酒精，會影響子代對疼痛感覺的閾值，以往本實驗室發現懷孕母鼠使用臨床常用之止咳藥 dextromethorphan 會嚴重影響胎兒的死亡率、出生體重及記憶力發展等，產生嚴重的副作用。本人研究動物長期使用運動員常用之雄性類固醇 nandrolone，發現會增加大鼠對嗎啡的依賴性及增加血衍嗎啡素-7(LVV-hemorphin 7, LVV-H7)的血清濃度。但進一步給予足量的抗 LVV-H7 血清卻不能阻斷 nandrolone 對嗎啡的成癮性，其複雜機轉有待查明，此結果發表於 2016 年 <b>Neuropeptides</b> 國際神經肽期刊(SCI IF=2.644)。</p> <p>LVV-H7 為人體內紅血球裂解後所產生的非典型止痛肽。文獻顯示懷孕母鼠使用酒精後，其子代體內將有更多 LVV-H7 釋出，因此 LVV-H7 應有較高的血清濃度。此研究的目的:為探討懷孕期使用酒精的母鼠，其子代的發炎性疼痛或神經性疼痛的止痛閾值是否異常，再進一步探討疼痛閾值是否與內生性止痛肽 LVV-H7 相關聯。目前為止，本研究為第一篇直接探討 LVV-H7 與脊髓止痛相關聯的深入研究題材。因本院為協助戒除毒癮及酒精的醫療機構，探討懷孕期使用酒精的婦女，其子代的疼痛感知是否有異常的影響實屬需要。</p>

<p>方 法 與 過 程</p>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. 記錄酒精對懷孕母鼠的飲食影響。</li> <li>2. 觀察懷孕期間飲用酒精對子代的影響。</li> <li>3. 探討懷孕期間飲用酒精對子代的疼痛閾值是否有所影響: 3-10 週大之子代，測定兩組的基礎疼痛閾值。即一般的子代(控制組)及使用酒精的懷孕母鼠生產之子代(實驗組)。</li> <li>4. 使用本實驗室常用之發炎性疼痛模式，測定兩組子代在發炎性疼痛的閾值是否有所差異。(詳細方法請參閱本人 2013, 2015, 2016 之文獻)</li> </ol>
<p>研 究 發 現 及 建 議</p>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1/. 懷孕母鼠飲用酒精，其體重較控制組為輕，每日飲水量也較少。</li> <li>2/. 懷孕期間飲用酒精組，其子代出生體重較輕，乃至成年前，其體重均明顯較輕，尤其小公鼠比小母鼠更顯著。</li> <li>3/. 產前暴露酒精大鼠之子代約在剛離乳的前 3 週，以閃尾測試及熱板測試測定出的疼痛閾值均明顯較高(意指較不易感覺疼痛)，但在發育越趨成熟後此差異漸消失。</li> <li>4/. 在鹿角菜膠誘發急性發炎性痛覺過敏的足底測試反應下，觀察到產前暴露酒精大鼠之子代 (12 週齡)有痛覺過敏減弱的現象，尤其子代的公鼠比母鼠更顯著。</li> <li>5/. 依此結果可繼續進行產前暴露酒精對子代發炎反應之相關實驗，探討其可能機轉。目前已收集子代各週齡的血清標本，待進一步比較 LVV-H7 在兩組血中濃度之差異，依結果了解其在臨床應用之可能性。</li> </ol>
<p>備 註</p>	

# 新北市政府 107 年度自行研究計畫執行情形季報表

填表日期：107.12.10

計畫名稱	研究機關及人員	期程		執行情形概述	備註
		起	訖		
探討血衍嗎啡素-7 在產前暴露酒精大鼠之子代中產生疼痛變化所扮演之角色	麻醉科 鄒樂起主任	107.01.01	107.3.31	實驗設計執行規劃， 實驗器材準備	
探討血衍嗎啡素-7 在產前暴露酒精大鼠之子代中產生疼痛變化所扮演之角色	麻醉科 鄒樂起主任	107.4.01	107.6.30	執行控制組實驗	
探討血衍嗎啡素-7 在產前暴露酒精大鼠之子代中產生疼痛變化所扮演之角色	麻醉科 鄒樂起主任	107.7.01	107.9.30	執行酒精組實驗	
探討血衍嗎啡素-7 在產前暴露酒精大鼠之子代中產生疼痛變化所扮演之角色	麻醉科 鄒樂起主任	107.10.01	107.12.31	實驗結果統計分析	

## 報告內容

### 1. 摘要(包含研究目的、研究方法、重要發現、主要建議及政策意涵)。

In our previous study, we demonstrated anti-hyperalgesia effects of angiotensin IV (Ang IV), LVV-hemorphin 7 (LVV-H7), and oxytocin (OT) at the spinal level in male rats with intraplantar carrageenan-induced inflammation. We also found that the anti-hyperalgesia by Ang IV and LVV-H7 was acting through their blockade on insulin-regulated aminopeptidase (IRAP) to reduce the degradation of OT. In the present study, we intend to investigate the possible role of a cryptide, LVV-H7 in the change of pain sensation caused by prenatal alcohol exposure. LVV-H7 is generated from the cleavage of the beta-chain of hemoglobin, and serves as an atypical opioid peptide. In the blood, LVV-H7 is at a high concentration, which can reach micromolar range. Although the detailed functions are still unknown, LVV-H7 was reported to be released in the presence of alcohol by the enzyme cathepsin D in vitro. Therefore, we predict that prenatal alcohol exposure can change the level of LVV-H7 in the offspring. This quantitative change may play a role in difference in analgesia, inflammatory hyperalgesia, and neuropathic allodynia, when compared with the offspring from control dam.

LVV-H7 anti-serum and pepstatin A (cathepsin D inhibitor) will be also used to examine its involvement in the prenatal alcohol-induced change of pain sensations, which will be assessed using tail-flick, plantar, and von Frey tests. Overall, the present study will be the first study to investigate the possible role of LVV-H7 in prenatal alcohol exposure-induced changes of pain sensation in the offspring. This shall help to understanding of the physiology of endogenous LVV-H7, also may have potential for the future development of new drugs in the treatment of pain in problems caused by prenatal alcohol exposure.

### 2. 主旨及背景說明(與現行業務關聯性)。

The present proposal is organized by Dr. Lok-Hi Chow, and Prof. Eagle Yi-Kung Huang from Dept. of Anesthesiology, New Taipei City Hospital and Dept. of Pharmacology, National Defense Medical Center, Taipei, Taiwan, R.O.C., respectively. The collaboration of this teamwork can integrate the clinical investigations and basic biomedical research. The project was designed to identify the possible role of LVV-hemorphin 7 (LVV-H7), a cryptide from haemoglobin, in the change of pain sensation caused by prenatal alcohol exposure. The

experiments in this project involve behavioural analysis, biochemical study of proteins, peptide synthesis, and quantitative measurement of peptides and enzyme activity. These are all important for our neuropharmacological and neurophysiological studies. Our teams have a solid experience in protein chemistry and an expertise in behavioural pharmacology (Chow et al., 2013, 2015, 2016). From the academic point of view, this project will provide important information on the underlying mechanism of prenatal alcohol exposure on analgesia and hyperalgesia in connection with LVV-H7. This can help for the understanding of the relationship between alcohol intake and LVV-H7 in basic medical research. By knowing the role of LVV-H7 in prenatal alcohol exposure on analgesia and hyperalgesia, we may design new drugs based on the structure of LVV-H7 to intervene with alcohol-induced problems of the change of pain sensation, and probably to discover novel analgesics. This is also useful in the possible, future clinical application.

### 3. 相關研究、文獻之檢討。

#### **Current state of art including relevant previous work**

Our previous studies have been working on the research of drug addiction and pain for decades. Our recent reports were mostly focus on angiotensin IV (Ang IV) and LVV-hemorphin 7. Also, we are the first group who discovered the anti-hyperalgesic effects of these two peptides at the spinal level in rats. These related publications were all listed in the attached references.

#### **Scientific excellence and originality of the proposal**

The present project is the first study to identify the possible role of LVV-H7 in the change of pain sensation caused by alcohol prenatal exposure. Being an important cryptide, LVV-H7 was found to produce analgesic and anti-hyperalgesia effects, and being able to increase dopamine turnover at the mesolimbic terminals (Cheng et al., 2012; Huang et al., 2016). These were both reported by us as shown in the publications attached. Therefore, we would like to further investigate the possible effects of LVV-H7 on the offspring when chronic/subchronic alcohol administration was given to the dam. Because alcohol can affect the activity of cathepsin D (LVV-H7 generating enzyme) in vitro, we predict that the level of LVV-H7 will change at different stages during alcohol administration.



This has been evidenced by our preliminary data, which has shown that the serum level of LVV-hemorphin 7 increased after alcohol injections. However, it will get back to the basal level following 2-week daily alcohol administration. During alcohol withdrawal, the level of LVV-hemorphin 7 will first further decrease to a level lower than the basal, but reversed to increase back to baseline level after 5-day withdrawal. We also measured the tail-flick latency to assess the pain sensation. We clearly showed an alcohol-induced anti-nociception and an alcohol withdrawal-induced hyperalgesia. The behaviour and LVV-H7 level seems to be consistent except the condition of longer withdrawal. This is interesting and consistent with the others' reports, although the correlation between the change of pain sensation and LVV-H7 level should require further investigations to confirm.

It is not known whether the change of LVV-H7 level in the dam can affect the pain sensation of the offspring in rats. However, there were many reports indicated that prenatal exposure of alcohol can affect pain sensation in the offspring by interfering the endogenous opioid system. For example, morphine analgesia and opioid stress-induced analgesia were potentiated in adult rats prenatally exposed to ethanol (Nelson et al., 1985; Nelson et al., 1986). This does not appear attributable to changes in number or affinity of mu or delta opioid receptors, or to altered occupation of receptors by morphine. Thus, we thought that this change may be in connection with the LVV-H7 level in the offspring since LVV-H7 is the most abundant opioid peptide in blood. The following report by Kehoe and Shoemaker showed the aberrant responses of vocalization and analgesia in the prenatal-ethanol-exposed offspring can be interpreted as failures to respond by opioid release/secretion to appropriate stimuli in perinatal rats (Kehoe and Shoemaker, 1991).

Taking these together, we hypothesized that alcohol administration in the dam will activate the enzyme system (cathepsin D) to produce more LVV-H7. This activation can be passed to the offspring and caused the potentiation of opioid analgesia in adult rats. However, it could be different in the offspring of perinatal rats. The level of LVV-H7 could be dropped dramatically after birth and caused a reduction of opioid response. These points will be investigated and verified in the present study. Overall, if the results will be fruitful, this project may open a new avenue in alcohol research. It can improve the understanding of the pharmacology of prenatal alcohol exposure and analgesia. Moreover, the research on the cryptide LVV-H7 will be prompted. From the view of this application, our findings should promote the future development of new drugs for the treatment of alcohol-related problems in pain. Alcohol addicts may benefit from the new drugs based on LVV-H7 and analogues.

#### 4. 研究方法(包含研究內容、範圍、對象、限制與過程)。

- (1) Alcohol will be given by voluntary drinking model. Control dam's drinking water will be 0.066% saccharin. The drinking water of dam with prenatal alcohol exposure will be 10% ethanol in 0.066% saccharin.
- (2) Using tail-flick test and hot plate test, we will determine the possible difference of pain threshold and response between the offspring adult rats from control dam and dam with prenatal alcohol exposure.
- (3) Using plantar test in rats with carrageenan-induced hyperalgesia, we will determine the possible difference of the severity of inflammatory hyperalgesia between the offspring adult rats from control dam and dam with prenatal alcohol exposure.
- (4) Data analysis: The data were all analyzed with SPSS & Prisma. Paired-t test was used when two groups were compared. Two-way ANOVA followed by Bonferroni post-test was used to analyze the data for group comparison with time domain.  $P < 0.05$  was considered to be significant.

#### 5. 研究發現

##### (1)酒精組懷孕母鼠飲水量及體重皆較低

懷孕母鼠自確認懷孕後第 1 天開始替換飲水，分為實酒精組-飲水予 10% ethanol (乙醇) in 0.066% saccharin(糖精) 及控制組-飲水加入 0.066% saccharin，持續記錄每日飲水量至子代 3 週齡離乳時。酒精組母鼠每週平均日飲水量皆較控制組低 (圖 1)，酒精組母鼠懷孕及哺乳期間，體重皆較控制組輕 (圖 2、圖 3)。

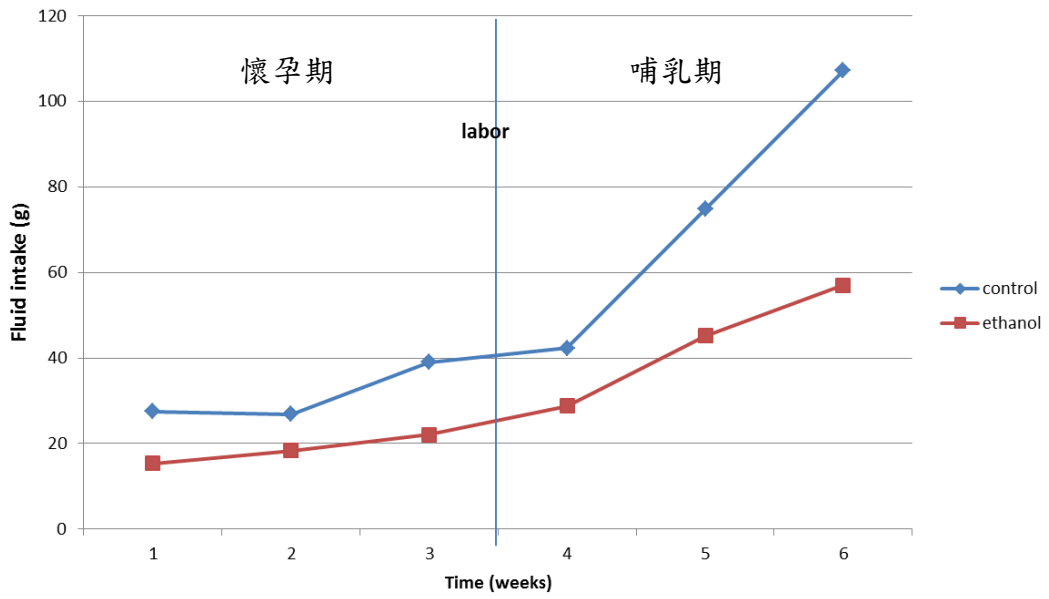


圖 1. 母鼠懷孕及哺乳期間每週平均日飲水量

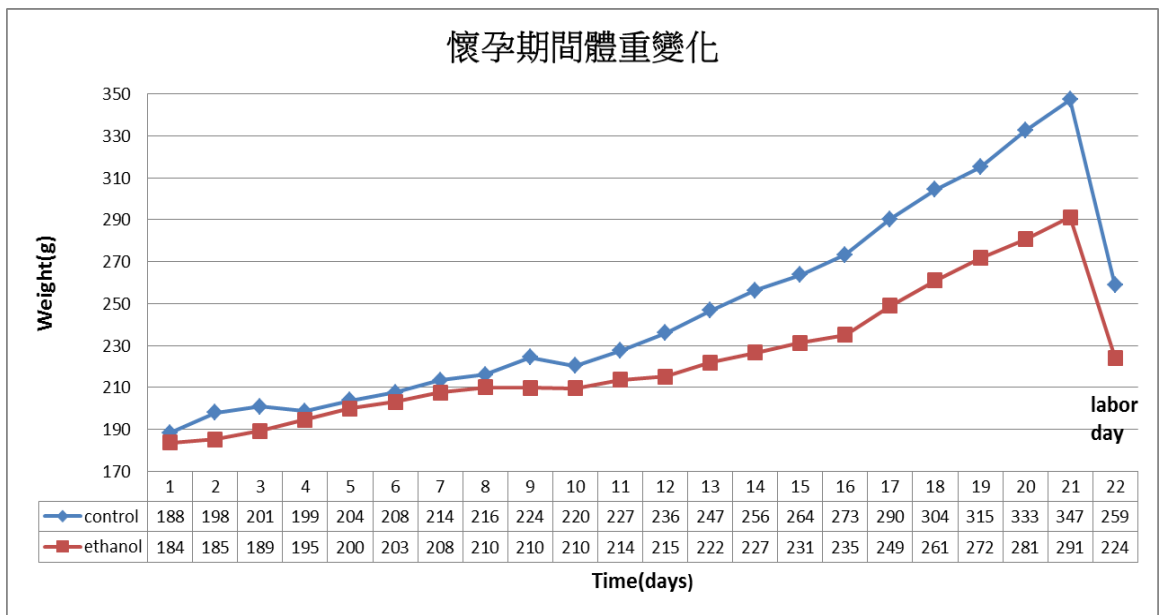


圖 2. 母鼠懷孕期間每日體重變化

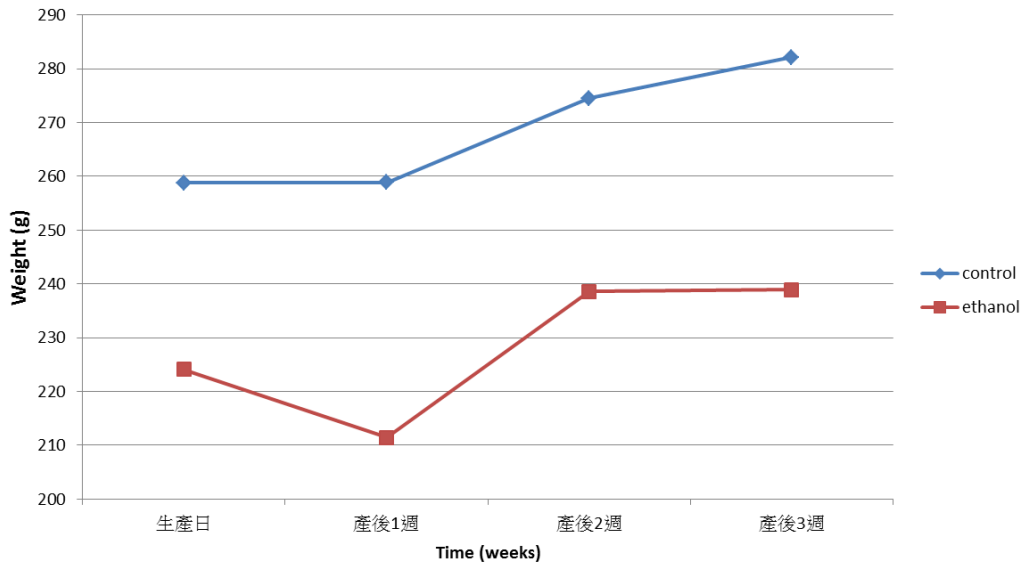


圖 3. 母鼠哺乳期間每週體重變化

## (2) 酒精組子代體重較低

記錄子代出生當日體重，之後每週紀錄體重至 12 週齡。以相同性別比較，酒精組子代出生體重與控制組均有顯著差異，至子代 12 週齡(已為成鼠)，酒精組之小公鼠於 3-12 週齡間，每週體重皆低於控制組( $P < 0.001$ ，圖 4)。

酒精組之小母鼠於 3-12 週齡間，每週體重均低於控制組，惟其不同週齡有不同程度的低體重，細分如下：於 3-7 週齡間低體重非常明顯 ( $P < 0.001$ )，於 8 及 9 週齡時低體重較明顯 ( $P < 0.01$ )，於 10-12 週齡間低體重也明顯有差異 ( $P < 0.05$ )，如圖 5 所示。

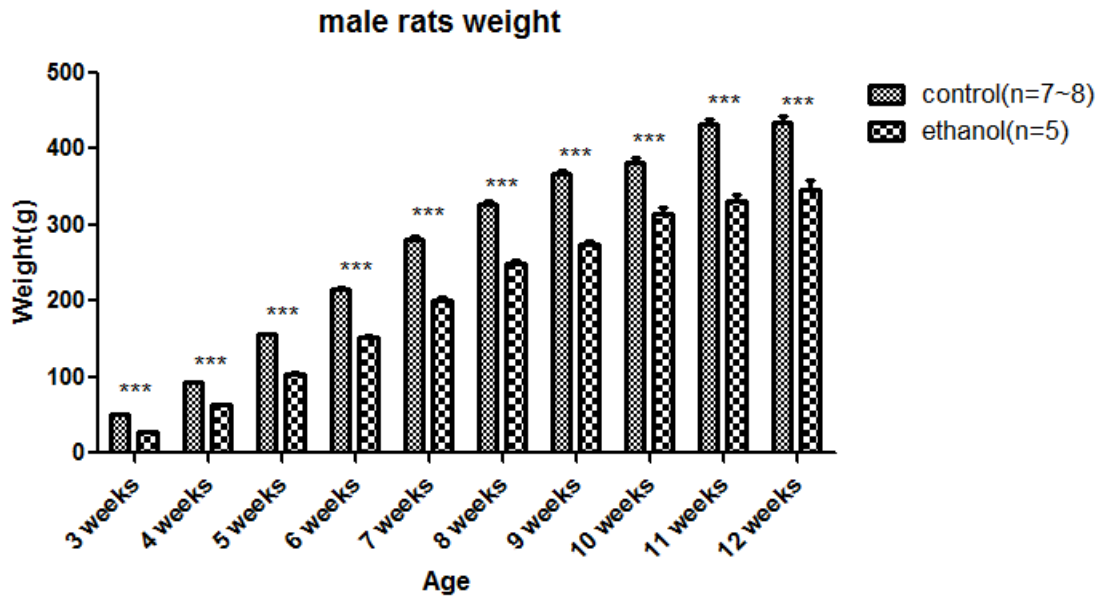


圖 4. 子代公鼠每週體重變化

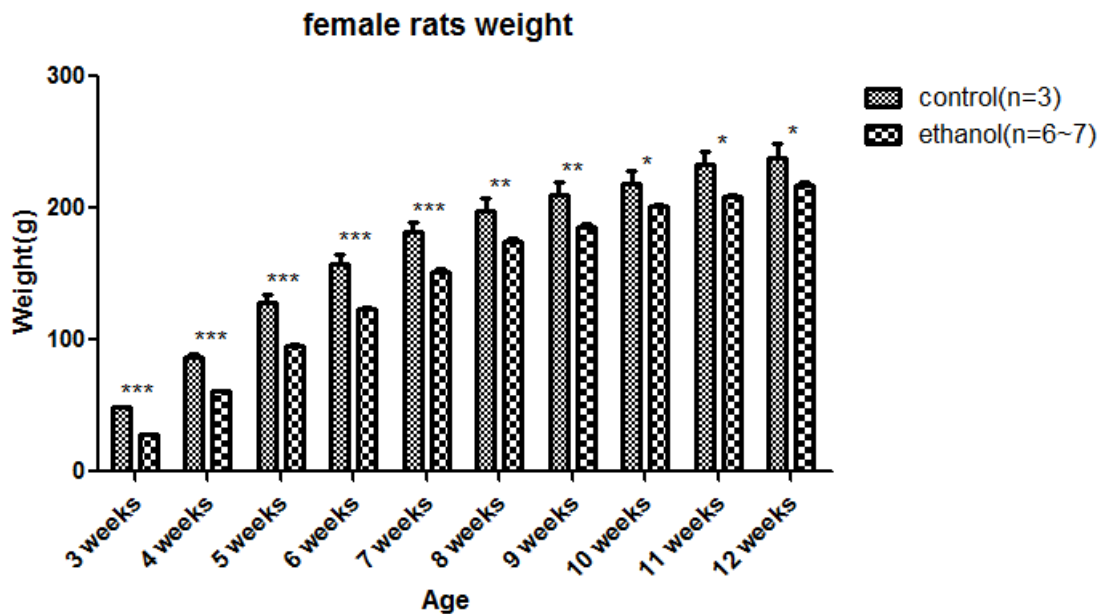


圖 5. 子代母鼠每週體重變化

### (3) Tail flick test (疼痛測試之一: 閃尾測試)

子代於 3 週齡開始每週做閃尾測試，兩組分性別互相比較(圖 6)，酒精組小公鼠於 3 週齡~6 週齡的 tail flick latency(TFL)高於控制組( $P < 0.05$ )，7 週齡~10 週齡間兩組無顯著差異；小母鼠的 TFL

酒精組僅在 3 週齡(離乳週)時明顯高於控制組( $P<0.01$ )，其餘週齡皆無統計差異。

另外將控制組及酒精組進行公、母比較，欲了解 TFL 是否有性別差異，控制組於 9 週齡時，母鼠的 TFL 高於公鼠 ( $P<0.05$ )；酒精組則僅在 3 週齡(離乳週)時母鼠的 TFL 明顯高於公鼠 ( $P<0.05$ )。

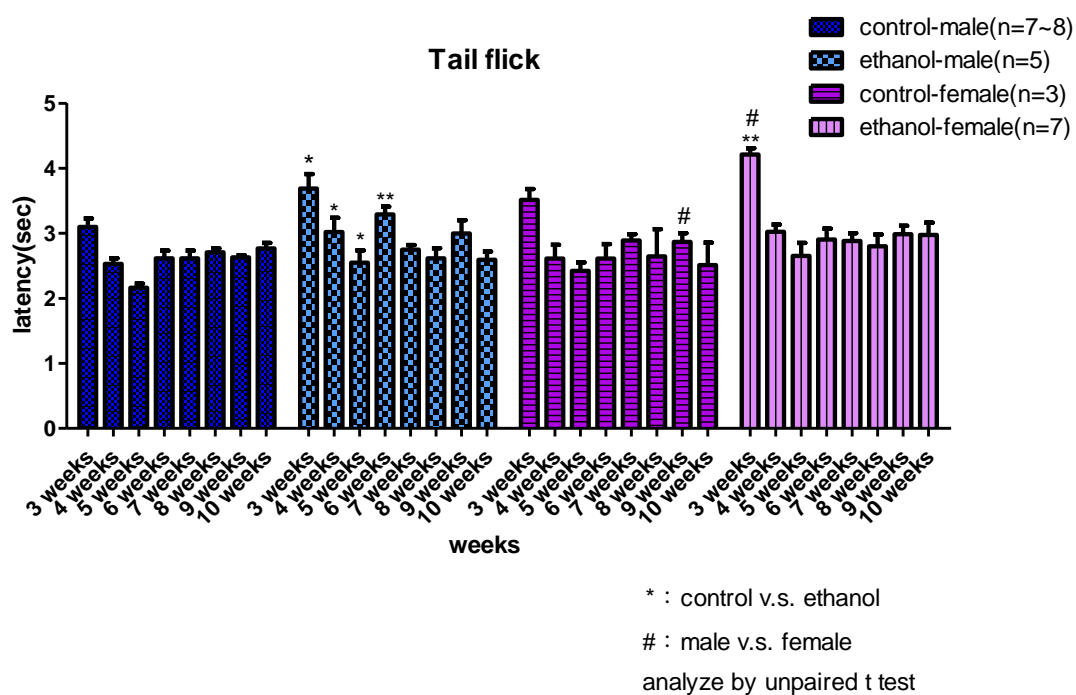


圖 6. Tail flick test

#### (4) Hot plate test (疼痛測試之二: 熱板測試)

子代於 3 週齡開始每週做熱板測試，兩組分性別互相比較(如圖 7 所示)，酒精組小公鼠於 3 週齡~6 週齡的 hot plate latency (HPL) 明顯高於控制組 ( $P<0.05$ )，7 週齡~10 週齡間兩組無顯著差異；

酒精組的小母鼠僅在 3 週齡及 4 週齡時, HPL 明顯高於控制組

( $P < 0.05$ ), 其餘週齡兩組皆無顯著差異。

另外將控制組及酒精組進行公母比較, 欲了解 HPL 是否有性別差異, 控制組的公母鼠無顯著差異; 酒精組則在 8 週齡時, 母鼠的 HPL 高於公鼠( $P < 0.05$ )。

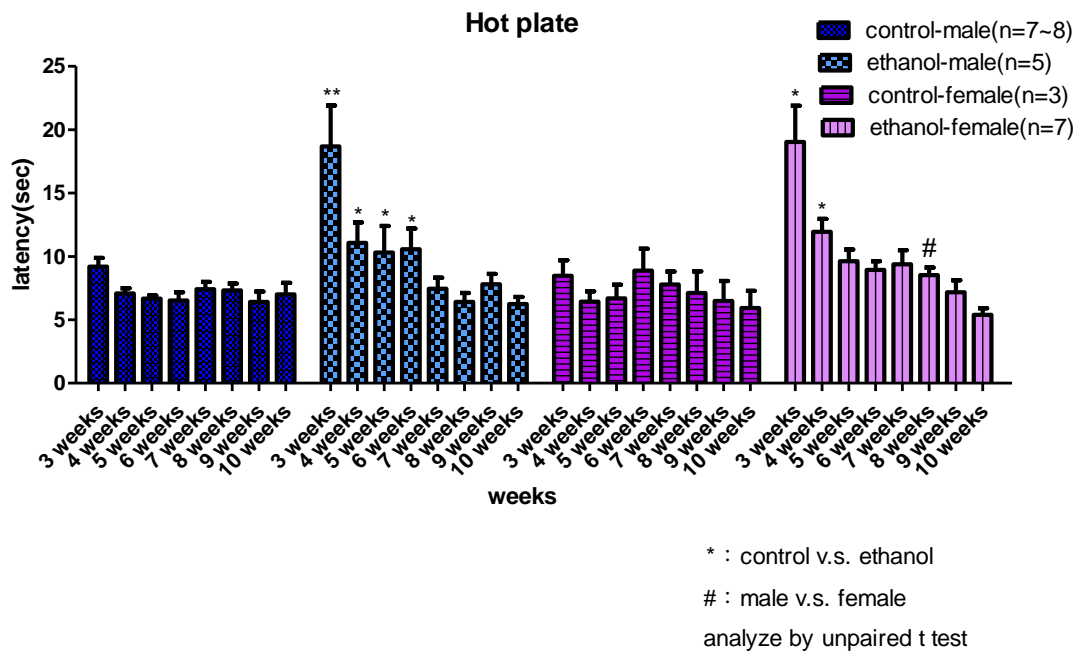


圖 7. Hot plate test

### (5) Carrageenan-induced hyperalgesia plantar test (鹿角菜膠誘發痛覺

過敏的足底測試)

子代於 12 週齡時, 已算是成熟的成鼠, 以之進行鹿角菜膠誘發痛覺過敏的足底測試, 方法為大鼠左腳底板皮下注射 0.1ml 的鹿

角菜膠(1.5 % w/v in saline) 後，於 0.25 hr (注射與給藥約花費 15 分鐘), 1 hr, 2 hr, 3hr, 4 hr, 5 hr, 6 hr, 7 hr, 24 hr 及 31 hr 等時間點紀錄 paw withdrawal latency (後腳退縮時間, PWL)。

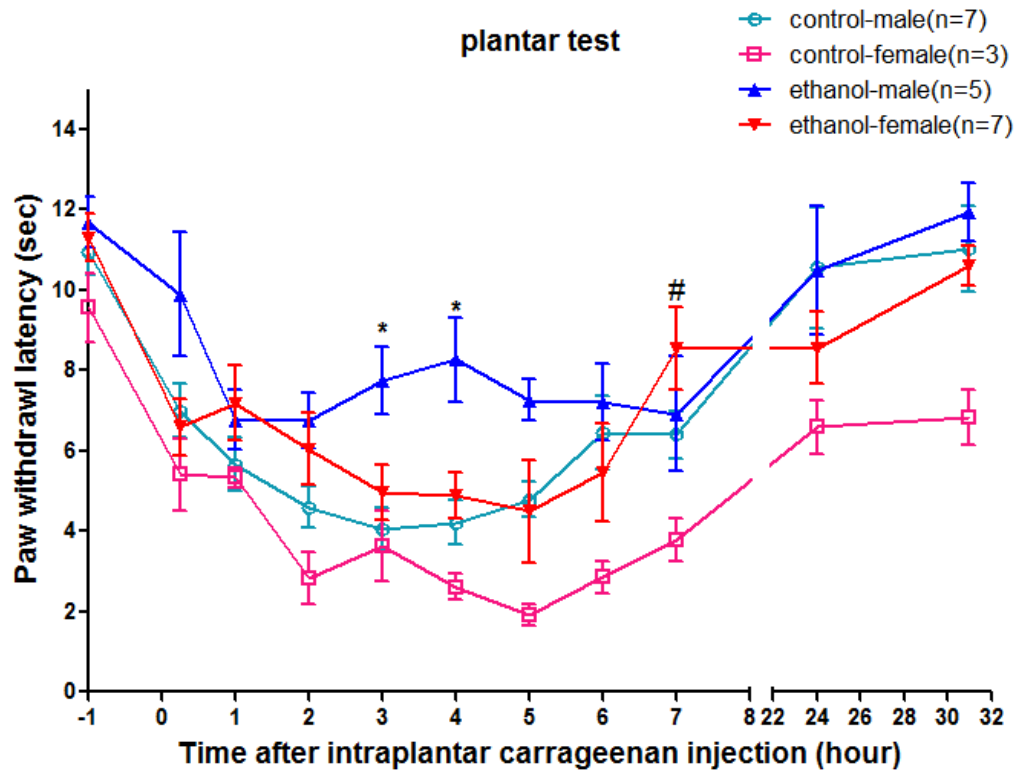
正常的鹿角菜膠注射會誘發發炎性痛覺過敏，如圖 8 所示，公鼠自基礎值，後腳可耐受 11.0 秒始覺疼痛致後腳退縮，於注射鹿角菜膠後 3~4 小時的時候，發炎性痛覺過敏會導致後腳僅耐受 4.0 秒就會後腳退縮，如圖 8 所示。後觀察至 24 小時，PWL 回到基礎值。

但公鼠酒精組在第 3 個小時及到第 4 個小時，有明顯的痛覺過敏減弱 ( $P<0.05$ )。

對控制組的母鼠而言，發炎性痛覺過敏較公鼠嚴重，但未達統計上的差異。至 32 小時後，仍未恢復到基礎值。

母鼠酒精組於注射鹿角菜膠後 3h~5h 時，為發炎性痛覺過敏最嚴重的時段，仍較控制組的痛覺過敏減弱，但未達統計上差異。只有注射 7h 時，有明顯的痛覺過敏減弱 ( $P<0.05$ )。





\* : control male v.s. ethanol male

# : control female v.s. ethanol female

圖 8. Plantar test

## 6. 結論與建議(分立即可行之建議及長期性建議)。

由閃尾測試及熱板測試結果顯示，酒精組僅在週齡較小時(公鼠 6 週齡以前、母鼠 2 週齡以前)，與控制組相較有對疼痛感受較不敏感之情形，而隨著年齡增長(公鼠 7 週齡以後、母鼠 3 週齡以後)，對疼痛的感受性開始與控制組無差異，將疼痛感受性的結果搭配兩組體重差異的現象來看，酒精組體重都較控制組輕，顯示酒精組生理發育有比控制組較差之現象，可能因此影響其對疼痛的感受，而隨著發育越趨成熟，兩組對疼痛感受之差異消失。

在成鼠階段(12 週齡)進行的鹿角菜膠誘發痛覺過敏的足底測試，顯示在急性發炎反應下，公鼠酒精組與控制組比較後呈現痛覺過敏較減弱的現象，推論產前暴露酒精會影響到子代之發炎反應，進而影響到痛覺過敏的結果，其機轉未知，需要再進行後續實驗了解。

Sanchez 等人於 2017 年的研究顯示產前暴露酒精大鼠之子代，在神經病變疼痛模式 chronic constriction injury (CCI)的狀況下，產生較嚴重的神經病變異常疼痛(allodynia)，並觀察到脊髓神經膠質細胞的活化有被增強的現象，其結果與本實驗結果相反，但因 CCI 屬於慢性發炎，而本實驗是屬於急性發炎反應，其發炎機制不盡相同，可能因此產生不同的結果。但可考慮後續實驗設

計加入慢性發炎反應之模式，比較急性與慢性發炎，對疼痛過敏化是否會有不同結果。

在鹿角菜膠誘發急性發炎性痛覺過敏的足底測試反應下，觀察到產前暴露酒精大鼠之子代 (12 週齡) 有痛覺過敏減弱的現象，尤其子代的公鼠比母鼠更顯著，顯示可能仍有其性別差異。

依本實驗室先前的實驗結果，我們預期酒精組血中 LVV- H7 之濃度會較控制組高。但本次研究結果已收集不同週齡的血清標本，作後續可測定不同週齡血中 LVV- H7 之濃度，進一步比較 LVV-H7 在兩組血中濃度之差異；也將繼續進行產前暴露酒精對子代發炎反應之相關實驗，探討可能機轉。此結果將有助於瞭解懷孕婦女於懷孕期間使用酒精，其子代的疼痛感知改變及可能的臨床治療方法。

## 7. 參考文獻。

Cheng BC, Tao PL, Cheng YY, Huang EY. LVV-hemorphin 7 and angiotensin IV in correlation with antinociception and anti-thermal hyperalgesia in rats. *Peptides*. 2012;36(1):9-16.

Chow LH, Tao PL, Chen JC, Liao RM, Chang EP, Huang EY. A possible correlation between oxytocin-induced and angiotensin IV-induced anti-hyperalgesia at the spinal level in rats. *Peptides* 2013; 39:21-8.

Chow LH, Tao PL, Chen YH, Lin YH, Huang EYK. Angiotensin IV possibly acts through PKMzeta in the hippocampus to regulate cognitive memory in rats. *Neuropeptides*. 2015; 53(10): 1-10.

Chow LH, Tao PL, Chen YH, Wu WC, Huang EYK. Sex difference of oxytocin-induced anti-hyperalgesia at the spinal level in rats with intraplantar carrageenan-induced inflammation. *PLoS One*. 2016; 11(9):e0162218.

Huang EY, Chen YH, Huang TY, Chen YJ, **Chow LH\***. Chronic administration of nandrolone increases susceptibility to morphine dependence without correlation with LVV-hemorphin 7 in rats. *Neuropeptides*. 2016 Oct; 59:63-9.

Kehoe P, Shoemaker W. Opioid-dependent behaviors in infant rats: effects of prenatal exposure to ethanol. *Pharmacol Biochem Behav*. 1991 Jun; 39(2):389-94.

Nelson LR, Taylor AN, Lewis JW, Branch BJ, Liebeskind JC. Opioid but not nonopioid stress-induced analgesia is enhanced following prenatal exposure to ethanol. *Psychopharmacology (Berl)*. 1985; 85(1):92-6.

Nelson LR, Taylor AN, Lewis JW, Branch BJ, Liebeskind JC. Morphine analgesia is potentiated in adult rats prenatally exposed to ethanol. *Brain Res*. 1986 May; 372(2):234-40.

Sanchez JJ, Noor S, Davies S, Savage D, Milligan ED. Prenatal alcohol exposure is a risk factor for adult neuropathic pain via aberrant neuroimmune function. *Journal of Neuroinflammation*. 2017; 14:254.