

苯并噻唑啉-2-酮-甲酰胺类化合物 Y-QA31 对甲基苯丙胺诱导的大鼠条件位置偏爱效应的影响

王琦, 吴纯启, 吴宁, 王晓菲*, 王全军*, 张有志*

军事科学院军事医学研究院毒物药物研究所, 抗毒药物与毒理学国家重点实验室, 国家北京药物安全评价研究中心, 北京 100850

摘要: **目的** 探讨多巴胺 D3 受体拮抗剂苯并噻唑啉-2-酮-甲酰胺类化合物 Y-QA31 对甲基苯丙胺 (METH) 诱导的大鼠条件位置偏爱 (CPP) 效应的影响。**方法** 通过 CPP 实验, 以 METH 为阳性药, 观察 Y-QA31 (12.5、25、50 mg/kg, ip) 自身致 CPP 潜力; 通过 CPP 实验建立大鼠 METH 精神依赖模型, 观察 Y-QA31 (6.25、12.5、25、50 mg/kg, ip) 预处理是否干预模型的形成、表达、复吸。**结果** 0.5 mg/kg METH 可诱导大鼠产生明显的 CPP; Y-QA31 自身不能诱导大鼠形成 CPP; 伴随给予 Y-QA31 不能阻止 METH 诱导大鼠 CPP 的形成; 表达期单次给予 Y-QA31 能剂量依赖性降低 METH 诱导的大鼠 CPP 的表达; Y-QA31 可抑制 METH 诱导大鼠 CPP 的复吸。**结论** Y-QA31 能抑制 METH 的奖赏效应, 在成瘾治疗中发挥一定作用。

关键词: 药物成瘾; 甲基苯丙胺; 多巴胺 D3 受体拮抗剂; 条件位置偏爱; Y-QA31; 苯并噻唑啉-2-酮-甲酰胺类化合物
中图分类号: R962.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-6376 (2018) 05- 0799 - 06

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2018.05.014

Benzothiazoline -2- ketone - formamide Y-QA31 attenuates methamphetamine-induced conditioned place preference in rats

WANG Qi, WU Chunqi, WU Ning, WANG Xiaofei, WANG Quanjun, ZHANG Youzhi

National Beijing Center for Drug Safety Evaluation and Research, State Key Laboratory of Toxicology and Medical Countermeasures, Institute of Pharmacology and Toxicology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China

Abstract: Objective To study the effect of compound of Benzothiazoline - 2- ketone - formamide: Y-QA31 on conditioned place preference (CPP) induced by methamphetamine (METH). **Methods** The CPP potential of Y-QA31 (12.5, 25 and 50 mg/kg, IP) was observed by the CPP experiment and METH as the positive drug. METH-induced CPP was established in rats. The acquisition, expression and reinstatement of CPP was influenced by Y-QA31 (6.25, 12.5, 25 and 50 mg/kg, ip). The results of each group were compared and analyzed. **Results** 0.5 mg/kg METH induced cpp; (1) Y-QA31 failed in inducing CPP in rats; (2) repetitive injection of YQA31(daily during the METH conditioning) did not alter the acquisition of METH-induced CPP; (3) a single injection of YQA31 (prior to CPP test) dose-dependently attenuated the expression of METH-induced CPP; (4) a single injection of YQA31 decreased the reinstatement of METH-induced CPP. **Conclusion** Y-QA31 can inhibit the rewarding effect induced by METH and may play a role in the treatment of METH addiction.

Key words: drug addiction; methamphetamine; dopamine D3 receptor; conditioned place preference; Y-QA31; Benzothiazoline - 2- ketone - formamide

甲基苯丙胺 (Methamphetamine, METH), 俗称冰毒, 是 21 世纪以来全球滥用最广泛的新型合成毒品之一, 属于苯丙胺类兴奋剂 (amphetamine-type stimulants, ATS)^[1]。METH 脂溶性高, 易透过血

收稿日期: 2018-01-16

基金项目: 国家“重大新药创制”科技重大专项 (2017ZX09101-005-007、2016ZX08011007、2017ZX09201008-001-002、ZDYZ2015-2)

第一作者: 王琦 (1991-), 女, 硕士在读, 研究方向为精神神经药理毒理学。E-mail: wqwq199135@163.com

*通信作者: 张有志, 研究员, 研究方向为神经精神药理学。Tel: (010)66874606 E-mail: bcczyz@163.com

王全军, 研究员, 研究方向为毒理学与药物临床前安全性评价。Tel: (010)66931631 E-mail: wangquanjunbeijing@163.com

王晓菲, 博士, 研究方向为毒理学与药物临床前安全性评价、精神神经药理学。Tel: (010)66930754 E-mail: wangxf_glp@163.com

脑屏障, 单次使用即可成瘾, 具有强精神依赖性、中枢神经兴奋、致幻、抑制食欲和拟交感效应等药理学特性, 长期大量使用可导致脑的病理改变, 包括单胺能末端变性、脑灰质萎缩和白质增生以及胶质细胞活化, 进而导致脑功能障碍, 使成瘾者控制和辨认能力受损, 产生精神病性症状和认知损害^[2]。此外, 由于 METH 躯体依赖相对于精神依赖不是十分显著, 更具欺骗性和迷惑性, 导致滥用人群众体低龄化和女性化, 对社会进步和人类文明构成了重大威胁。

前期研究表明, 药物成瘾与中脑边缘多巴胺系统 (mesolimbic dopamine system, MLDS) 密不可分, 其几乎参加了所有成瘾药物的奖赏效应。多巴胺 (Dopamine, DA) 是奖赏环路的主要神经递质, 动物实验表明, 在使用 METH 后, 成瘾相关脑区 (如纹状体、海马、额叶皮质等) 中 DA 及其代谢产物含量降低, 表明 METH 的毒性作用与体内 MLDS 密切相关^[3]。因此, DA 受体成为研究和治疗 METH 成瘾的重要靶标分子。DA 受体属于 G 蛋白耦连受体家族, 包括 D1 样和 D2 样两类受体, D1 样受体包括 D1、D5 受体 (D1R、D5R), D2 样受体包括 D2、D3、D4 受体 (D2R、D3R、D4R)。D1R 和 D5R 同源性超过 80%, 都与兴奋性 G 蛋白耦连, 激活腺苷酸环化酶, 使细胞内环化腺苷酸增加; D2R、D3R、D4R 同源性约为 45%, 与抑制性 G 蛋白耦连, 抑制腺苷酸环化酶, 并通过与细胞内其他第二信使系统相耦连, 调节下游信号转导^[4]。在 5 种 DA 受体亚型中, D3R 与内源性 DA 的结合力最强^[5]。D3R 分布具有特异性, 特别在中脑腹侧被盖区及伏隔核高度表达^[6], 具有调节 DA 能神经元放电频率、调节 DA 能神经元轴突末梢 DA 合成与释放的作用^[7]。因此, 高选择性的 D3R 配体对于毒品成瘾的治疗具有重大意义。

目前报道的 D3R 靶向化合物 (SB-277001A、NGB2904) 在成瘾治疗方面已取得了积极进展, 但同时存在靶向性不高、特异性不强、半衰期较短等问题^[8]。本实验室经过前期研究, 筛选出了具有较高选择性的 D3R 拮抗剂 Y-QA31, 为苯并噻唑啉-2-酮-甲酰胺类化合物, 化学名为 (N-N-(4-(4-(2-甲氧基苯基) 哌嗪-1-基) 丁基)-2-苯并噻唑啉酮-6-甲酰胺) 盐酸盐, 结构式见图 1。对 D3R 的亲合力为 $K_i = (0.28 \pm 0.08)$ nmol/L, 是 D2R 选择性的 186 倍, 具有良好的开发前景。目前尚无关于 Y-QA31

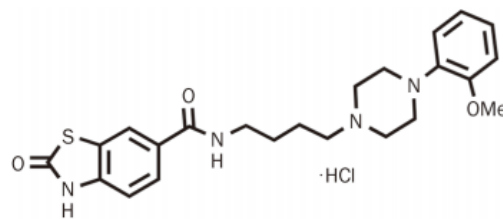


图 1 Y-QA31 化学结构

Fig. 1 Chemical structure of Y-QA31

对 METH 精神依赖的报道, 因此本研究通过条件位置偏爱实验 (conditioned place preference, CPP) 评价了 Y-QA31 自身的致成瘾潜能及其对 METH 诱导大鼠 CPP 效应的形成及复吸的影响。

1 材料

1.1 实验动物

Sprague-Dawley (SD) 大鼠, SPF 级, 雄性, 体质量 180~200 g, 北京维通利华实验动物技术有限公司提供, 动物合格证号 SCXK (京) 2012-0001。饲养于军事医学科学院国家北京药物安全评价研究中心屏障环境内, 动物房内通风良好, 室温 20~25 °C, 湿度 40%~70%, 采用 12 h 昼夜节律控制 (8:00~20:00)。饲养方式为群养, 每笼 5 只, 在整个实验过程中自由饮水及摄食。实验开始前, 动物至少适应环境 3 d, 每天抓持大鼠 1 次, 使大鼠适应以后的实验操作带来的刺激, 实验均在白天进行 (8:00~16:00)。

1.2 实验药物

Y-QA31, 军事医学科学院毒物药物研究所一室提供, 实验前用 40%羟丙基-β-环糊精溶液配制成所需浓度; 羟丙基-β-环糊精, 国药集团化学试剂有限公司, 用生理盐水配制成 40%羟丙基-β-环糊精溶液作为溶剂; METH, 公安部物证鉴定中心提供, 实验前用生理盐水配置成所需浓度。

1.3 主要仪器

本实验采用的条件位置偏爱装置由安来科技软件有限公司生产, 由穿梭箱、摄像头、红外接收系统、视频分析及计算机数据采集系统组成。每个穿梭箱由可以升降的隔板分成两个大小相同的条件训练箱 (黑箱、白箱) 和一个中间箱 (灰箱), 隔板下降时可将动物限制在某一个箱内, 抽出后动物可自由穿梭。各箱颜色和底纹不同, 白色箱底部为方格状底板, 黑色箱底部为条栅状底板, 中间箱底部为黑色木板。各箱顶部有照明、视频及红外监控装置。动物进入装置后, 可记录其在各箱内的停留时间及

穿梭次数。

2 方法与结果

2.1 CPP 训练程序

本实验采用的 CPP 训练程序按文献所述^[9], 为非倾向性程序。实验中 CPP 的表达以 CPP 分值表示, CPP 分值以动物在伴药箱停留的时间减去非伴药箱停留时间的差值表示。

预适应 (第 1~3 天, 即 D1~D3): 动物适应性饲养 3 d 后, 进行环境预适应训练。箱内隔板抽出后将动物由中间箱放入, 让其在 3 个箱内自由活动 15 min 并记录其在各箱内的停留时间, 共 3 d。统计后两天数据, 剔除在黑白两箱停留时间差较大的动物后平均分组, 每组黑箱及白箱伴药动物数量各半。

形成期 (D4~D13): 将箱内的隔板放下, 动物单日给予 METH (0.5 mg/kg, ip) 或生理盐水 (对照组) 后放入伴药箱训练, 双日给予生理盐水后放入非伴药箱训练。每只动物每天训练 45 min, 共 10 d。

表达期 (D14): 取出隔板, 将动物从中间箱放入自由活动 15 min, 记录其在各箱内停留时间。

戒断期: 采用条件性戒断方式, 将动物放入伴药箱或非伴药箱交替训练, 每只动物每天训练 45 min, 周期长短根据具体实验而定。

复吸期: 取出隔板, 所有动物给予小剂量 METH (0.25 mg/kg, ip) 后, 将动物从中间箱放入自由活动 15 min, 记录其在各箱内停留时间。

2.2 统计学方法

数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 Graph Pad Prism 5 软件进行作图和统计分析。组间比较采用单因素方差分析或 *t* 检验, 组内比较采用配对 *t* 检验。

2.3 Y-QA31 自身致 CPP 潜力观察

治疗成瘾药物首先要确认自身是否会诱发成瘾, 为了考察 Y-QA31 自身致 CPP 潜力, SD 大鼠随机分为对照、METH (阳性对照) 及 Y-QA31 (12.5、25、50 mg/kg) 组。训练期单日, 对照组动物给予生理盐水, METH 组动物给予 METH (0.5 mg/kg), Y-QA31 组动物提前 20 min 给予相应剂量的 Y-QA31 (12.5、25、50 mg/kg), ip 给药, 放入伴药箱训练。训练 5 轮 (共 10 d) 后进行测试, 方法同表达期。实验流程图见图 2A。

如图 2B 所示, 动物经过 10 d 的训练后, METH 可以显著增加大鼠在伴药箱的停留时间, 其 CPP 分值明显高于预适应期前测值 ($P < 0.05$), 提示其

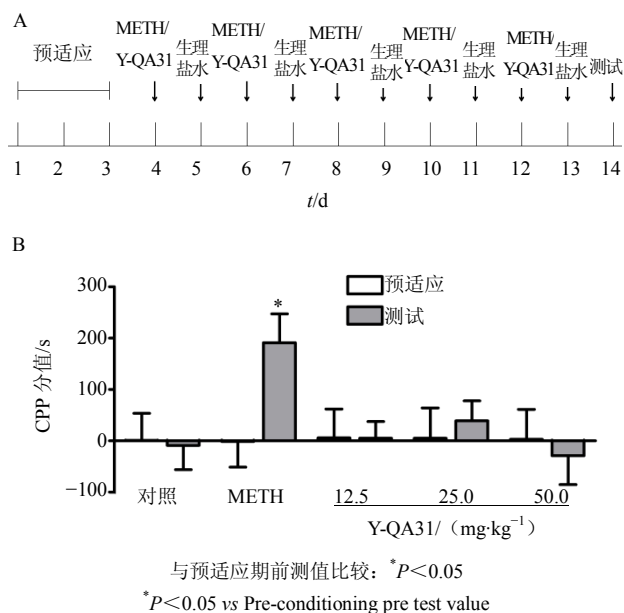


图 2 Y-QA31 自身致 CPP 实验 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Fig. 2 Y-QA31 induced CPP experiment ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

CPP 形成。而 Y-QA31 各剂量组停留时间与给药前及对照组比较均无显著性差异, 表明 Y-QA31 单独给药不能形成 CPP, 本身无致成瘾潜能。

2.4 对 METH 诱导大鼠 CPP 形成的影响

为了观察伴随给予 Y-QA31 对 METH 诱导大鼠 CPP 形成的影响, SD 大鼠随机分为对照组、模型组 (METH) 及 Y-QA31 (6.25、12.5、25、50 mg/kg) 组。Y-QA31 组动物形成期单日训练前 20 min 给予 Y-QA31 (6.25、12.5、25、50 mg/kg, ip), 而后给予 METH (0.5 mg/kg, ip), 双日训练前 20 min 给予生理盐水, D14 表达期不给予任何药物, 放入中间箱内让其自由活动 15 min, 记录其在各箱停留时间 (图 3A)。

由“2.3”项结果可知, METH 可以显著诱导 CPP 的形成。如图 3B 所示, 伴随给予 Y-QA31 (12.5、25 mg/kg, ip) 组大鼠也形成了 CPP, 6.25、50 mg/kg 组大鼠虽未形成 CPP, 但其 CPP 分值与模型组比较无显著性差异, 表明形成期伴随给予 Y-QA31 不影响 METH 诱导大鼠 CPP 的形成。

2.5 对 METH 诱导大鼠 CPP 表达的影响

为了观察 Y-QA31 对 METH 诱导大鼠 CPP 表达的影响, SD 大鼠随机分为模型组、Y-QA31 组 (6.25、12.5、25、50 mg/kg), 形成期照常训练, D14 表达期测试前 20 min 分别给予 Y-QA31 组动物相应剂量的 Y-QA31 (6.25、12.5、25、50 mg/kg, ip), 而后放入中间箱内让其自由活动 15 min, 记

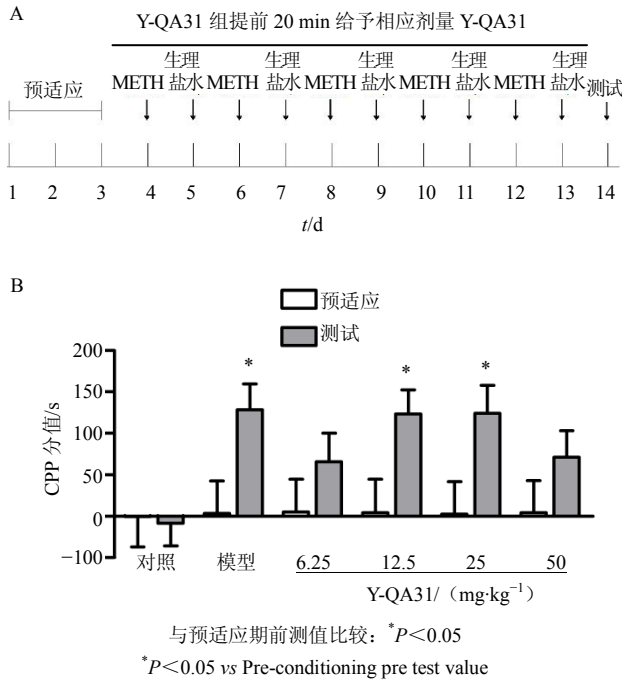


图3 Y-QA31对METH诱导CPP形成的影响($\bar{x} \pm s, n = 12$)
Fig. 3 Effects of Y-QA31 on acquisition of METH-induced CPP ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

录其在各箱停留时间(图4A)。

如图4B所示, METH能够显著诱导模型组形成CPP, 而表达期单次给予Y-QA31(6.25、12.5、25、50 mg/kg, ip)预处理可剂量依赖性地降低METH诱导的CPP表达, 50 mg/kg剂量组具有统计

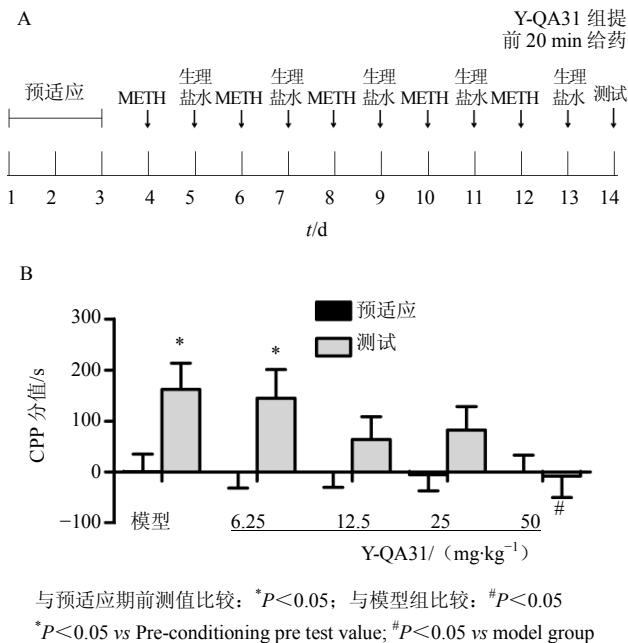


图4 Y-QA31对METH诱导CPP表达的影响($\bar{x} \pm s, n = 12$)
Fig. 4 Effects of Y-QA31 on expression of METH-induced CPP ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

学差异($P < 0.05$)。

2.6 对METH诱导大鼠CPP复吸的影响

为了观察伴随给予Y-QA31对METH诱导大鼠CPP复吸的影响, SD大鼠随机分为模型组、Y-QA31(6.25、12.5、25.0、50.0 mg/kg)组, 形成期和表达期照常训练。之后将METH成瘾大鼠进行条件性戒断训练, 单双日训练前分别给予生理盐水后放入伴药箱或非伴药箱, 训练至测试动物毒瘾熄灭后, 次日给予小剂量METH(0.25 mg/kg, ip)点燃, 点燃前20 min分别给予Y-QA31组动物相应剂量的Y-QA31(6.25、12.5、25、50 mg/kg), 而后放入中间箱内让其自由活动15 min, 记录其在各箱停留时间(图5A)。

METH能够显著诱导大鼠CPP的表达, 在经过2轮(共16 d)的条件性戒断后, 各组大鼠CPP分值均下降, 与前测值相比无显著性差异。次日提前20 min给予Y-QA31组相应剂量Y-QA31后, 给予小剂量METH(0.25 mg/kg)点燃, 如图5B所示, 模型组大鼠CPP分值显著高于前测值($P < 0.05$), 甚至高于表达期; 而Y-QA31(25、50 mg/kg)组大鼠CPP分值与模型组比较显著降低($P < 0.05$)。

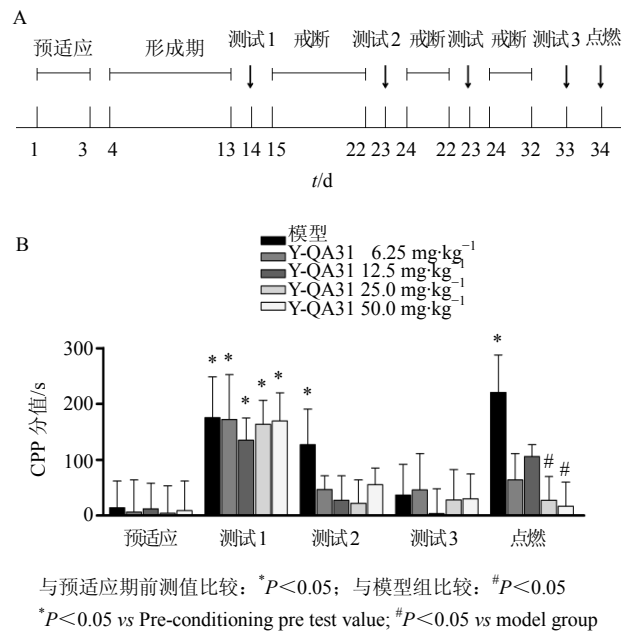


图5 Y-QA31对METH诱导CPP复吸的影响($\bar{x} \pm s, n = 8$)
Fig. 5 Effects of Y-QA31 on reinstatement of METH-induced CPP ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

3 讨论

METH成瘾的中枢神经作用机制复杂, 目前尚未完全研究清楚。METH具有较高脂溶性, 可通过

血脑屏障直接作用于脑细胞,影响囊泡单胺转运体的活性,从而促进神经元中 DA 的释放^[10]。长期 METH 给药可以损伤纹状体、海马和前额叶皮质中的 DA 能神经元^[11],与此同时伴有明显的 DA 含量下降及 DA 运体结合位点功能丧失^[12],从而引发神经毒性,因此 METH 的中枢作用机制与体内 DA 系统有着密切关系。而 D3R 在奖赏环路中特异性分布、在成瘾特定脑区内含量发生显著性变化,提示了其在药物成瘾中的重要作用^[13],新型 D3R 拮抗剂 Y-QA31 具有高亲和力和高选择性,提示其可能在发挥抗成瘾作用的同时可避免严重的椎体外系反应副作用的发生。

CPP 实验是用来评价药物精神依赖性的经典模型,可用来反映成瘾患者的觅药行为和心理渴求程度,最早由 Katz 和 Gormezano 建于 1979 年^[14]。CPP 实验基于巴甫洛夫的条件反射学说,把奖赏性刺激(如成瘾药物)与特定的非奖赏性刺激(如环境)反复练习建立联系后,使特定环境具有奖赏效应,再通过观察动物在不给药的情况下对相应环境的偏爱程度,来测定药物是否具有奖赏效应^[15]。该模型具有操作简单、实验周期短、动物无需手术、对条件位置偏爱/厌恶均敏感、无药状态下测试可以排除药物自身药理作用的影响等优点^[16]。因此本研究利用 CPP 模型,对 D3R 拮抗剂 Y-QA31 抗 METH 成瘾作用进行了初步研究。

在本研究中,0.5 mg/kg 的 METH 可显著诱导大鼠产生 CPP 效应,而 Y-QA31 各剂量组大鼠均未出现明显的 CPP 行为,说明该药本身不具有奖赏效应。而在 METH 诱导的大鼠 CPP 模型中,明确了 Y-QA31 抗成瘾的潜在治疗作用。Y-QA31 虽然不影响 METH 诱导大鼠 CPP 的形成,但可以剂量依赖性地降低其 CPP 表达,表明 Y-QA31 可能对预防 METH 成瘾无相关作用,但可以应用于成瘾后的治疗,这也与 D3R 拮抗剂的相关文献报道一致^[17],提示阻断 D3R 后有抑制 METH 成瘾的潜在药理学作用。之后又采用给予生理盐水条件性戒断的方法,通过建立新的记忆,使环境线索与无药奖赏状态相关联,以达到戒断的目的^[18],毒瘾熄灭后给予小剂量 METH (0.5 mg/kg) 点燃,可以看出 Y-QA31 (25、50 mg/kg) 预处理可以使复吸期大鼠 CPP 分值显著降低,说明 Y-QA31 可以使大鼠不易被 METH 诱发产生复吸。

基于上述结论, Y-QA31 能够有效抑制 METH

的奖赏效应及诱发的复吸行为,推测其可能是通过拮抗 D3R 从而降低 DA 受体活性,阻断 DA 升高引起的后继效应,最终降低 METH 成瘾带来的欣快感,其作用机制还有待进行深入研究,以便为之后的药物研发与临床应用提供参考。

参考文献

- [1] Miliano C, Serpelloni G, Rimondo C, et al. Neuropharmacology of new psychoactive substances (NPS): focus on the rewarding and reinforcing properties of cannabimimetics and amphetamine-like stimulants [J]. *Front Neurosci*, 2016, 10(4): 153.
- [2] 郝柳, 罗涛, 唐爱国, 等. 甲基苯丙胺滥用的研究进展 [J]. *中国药物滥用防治杂志*, 2015(5): 302-306.
- [3] 李学锋, 邱平明, 金贺, 等. 甲基苯丙胺对相关脑区的神经毒性作用 [J]. *解剖学杂志*, 2007, 30(1): 63-65.
- [4] Vallone D, Picetti R, Borrelli E. Structure and function of dopamine receptors [J]. *Neurosci Biobehav Rev*, 2000, 24(1): 125.
- [5] Sokoloff P, Le F B, Perachon S, et al. The dopamine D3 receptor and drug addiction [J]. *Neurotox Res*, 2001, 3(5): 433.
- [6] Sokoloff P, Giros B, Martres M P, et al. Molecular cloning and characterization of a novel dopamine receptor (D3) as a target for neuroleptics [J]. *Nature*, 1990, 347(6289): 146-151.
- [7] Tang L, Todd R D, O'Malley K L. Dopamine D2 and D3 receptors inhibit dopamine release [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 1994, 270(2): 475.
- [8] Heidbreder C A, Newman A H. Current perspectives on selective dopamine D (3) receptor antagonists as pharmacotherapeutics for addictions and related disorders [J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2010, 1187(1): 34-44.
- [9] Hu R, Song R, Yang R, et al. The dopamine D(3) receptor antagonist YQA14 that inhibits the expression and drug-prime reactivation of morphine-induced conditioned place preference in rats [J]. *Eur J Pharmacol*, 2013, 720(1-3): 212.
- [10] Fleckenstein A E, Volz T J, Riddle E L, et al. New Insights into the Mechanism of Action of Amphetamines [J]. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2007, 47(1): 681.
- [11] Afanador L, Mexhitaj I, Diaz C, et al. The Role of the Neuropeptide somatostatin on methamphetamine and glutamate-induced neurotoxicity in the striatum of mice [J]. *Brain Res*, 2013, 1510: 38.
- [12] Kita T, Wagner G C, Nakashima T. Current research on

- methamphetamine-induced neurotoxicity: animal models of monoamine disruption [J]. *J Pharmacol Sci*, 2003, 92(3): 178-195.
- [13] Heidbreder C A, Gardner E L, Xi Z X, et al. The role of central dopamine D3 receptors in drug addiction: a review of pharmacological evidence [J]. *Brain Res Brain Res Rev*, 2005, 49(1): 77.
- [14] Katz R J, Gormezano G. A rapid and inexpensive technique for assessing the reinforcing effects of opiate drugs [J]. *Pharmacol Biochem Behav*, 1979, 11(2): 231-233.
- [15] Tzschentke T M. Measuring reward with the conditioned place preference (CPP) paradigm: update of the last decade [J]. *Addict Biol*, 2007, 12(3-4): 227-462.
- [16] Bardo M T, Bevins R A. Conditioned place preference: what does it add to our preclinical understanding of drug reward ? [J]. *Psychopharmacology (Berl)*, 2000, 153(1): 31-43.
- [17] Spiller K, Xi Z X, Peng X Q, et al. The selective dopamine D 3, receptor antagonists SB-277011A and NGB 2904 and the putative partial D 3, receptor agonist BP-897 attenuate methamphetamine-enhanced brain stimulation reward in rats [J]. *Psychopharmacology (Berl)*, 2008, 196(4): 533-542.
- [18] Myers K M, Davis A M. Behavioral and Neural Analysis of Extinction [J]. *Neuron*, 2002, 36(4): 567.