

M₅ 毒蕈碱乙酰胆碱受体参与药物成瘾的研究进展

刘惠芬 周文华 杨国栋

M₅ 受体是毒蕈碱乙酰胆碱受体家族的一个新成员,是毒蕈碱乙酰胆碱受体家族(M1-M₅亚型)最后一个被克隆出来的,属于G蛋白偶联受体。免疫沉淀和mRNA原位杂交实验表明M₅受体在中枢神经系统中特定区域表达,包括海马、丘脑、黑质和中脑腹侧背盖区(VTA)部位^[1,2,3]。可是和其他M受体比较,M₅受体表达水平较低,在脑内占M1-M₅受体总表达不到2%。近来,M₅受体在一些外周组织和细胞中也检测到。但至今为止,仍缺乏高选择性M₅受体阻断或激动剂,因此,M₅受体亚型的许多生理学功能还不甚清楚。目前,随着基因敲除、转基因技术、细胞克隆等分子生物学技术的迅速发展,关于M₅受体的药理学作用,尤其在药物成瘾领域内的研究越来越受人们关注。许多研究阐明M₅受体参与了调制一些重要的药理学和行为学的功能过程,这些发现为药物成瘾和某些大脑血管疾病提供了治疗学新靶点^[4,5]。

一、M₅受体促进纹状体多巴胺释放

M₅受体mRNA是黑质多巴胺神经元上唯一的一种毒蕈碱受体mRNA^[1,2]。纹状体中多数的多巴胺递质是由这些神经元提供。Lehmann等科学家发现纹状体毒蕈碱受体的激活促进多巴胺的释放^[6,7]。Yamada等用一系列M₅野生型和缺失型小鼠的纹状体脑片体外H₃-多巴胺释放实验研究,发现M₅野生型小鼠纹状体脑片中,非选择性毒蕈碱激动剂-氧化震颤素以浓度依赖的方式提高K⁺刺激引起的多巴胺释放。在氧化震颤素高剂量使用时(100 μm)这一反应的强度并不因为M₅受体的缺失而改变。但是,在氧化震颤素10 μm使用浓度时,在M₅受体缺失小鼠和M₅野生型小鼠相比,前者纹状体中多巴胺释放强度被显著地减少50%以上,这进一步确证:位于纹状体多巴胺神经元上的M₅受体介导了多巴胺释放反应^[8]。

二、M₅受体介导吗啡奖赏和戒断反应

M₅受体是VTA区内多巴胺神经元上唯一的毒蕈碱M受体,而这些多巴胺神经元发出多巴胺能神经支配伏隔核(NAC)和其他边缘系统。众所周知,这些多巴胺系统在介导阿片和其他滥用药物的奖赏作用中起关键的作用^[9,10,11]。二十世纪九十年代Lacey等几位科学家的研究工作相继证实中脑边缘系统中的毒蕈碱乙酰胆碱受体参与激活VTA区内多巴胺神经元^[12,13,14]。接下来的研究更表明,电刺激被盖背外侧核(LDT),则持续提高NAC中多巴胺水平,而在M₅受体缺失小鼠则看不到上述现象^[15]。因为LDT区内神经元主要是胆碱能来源,它发出神经支配VTA区多巴胺神经元,所以,推测VTA中多巴胺神经元上M₅受体的激活导致LDT受刺激后NAC区内持续的多巴胺水平提高。

1. 条件性位置偏爱(CPP)实验:基于上述的研究发现,有人对M₅受体可能参与调制觅药行为的假说加以验证。发现M₅受体缺失和吗啡奖赏、镇痛作用的变化关系。研究利用条

件性位置偏爱实验(CCP实验):一种评价滥用药物是否具有奖赏作用常用的实验方法。在CPP试验中,经过8天条件位置偏爱训练的野生型小鼠,腹腔注射不同剂量的吗啡(2.5~25mg/kg, i. p.),显著提高吗啡引起的位置偏爱反应。而M₅敲除小鼠,在2.5和10mg/kg剂量范围内,不存在吗啡引起的位置偏爱反应。在25mg/kg剂量,小鼠的位置偏爱反应明显减弱。在杂合型或纯合型敲除小鼠中均发现这种结果,这更表明M₅敲除小鼠中吗啡引起的位置偏爱反应的减弱,不是由于人为因素引起的^[16]。为了研究上述结果的可能机理,研究者进一步运用μ阿片受体、D₁和D₂多巴胺受体放射结合实验,发现这些受体亚型在M₅野生型和缺失型小鼠的所有检测的脑区中均没有显著的不同。这些实验结果充分表明了M₅缺失型小鼠位置偏爱反应的丧失或减弱不是由于小鼠中μ阿片受体或多巴胺受体密度的变化引起,而恰恰是由于M₅受体缺失的结果。

2. 神经递质和基因表达研究:体外微透析研究表明,野生型小鼠,腹腔注射25mg/kg吗啡显著地提高NAC中多巴胺的浓度(比对照组提高70%)。可是,在M₅缺失小鼠中,NAC中多巴胺浓度提高幅度明显偏弱^[16]。同时,通过观察慢性吗啡处理后M₅野生型和缺失型小鼠NAC中FosB蛋白的表达,发现慢性吗啡处理后,长时程的突触变化的发展和Fos有关即刻早期基因产物(包括FosB蛋白)的表达升高有关^[17]。Basile等人应用Western blotting分子生物学实验发现,小鼠皮下埋植吗啡药丸(每丸75mg剂量)共7d后,野生型小鼠NAC中的FosB表达比空白对照组提高2倍左右,而M₅缺失小鼠中没有变化,这一实验结果表明小鼠由于M₅受体的缺失,与神经元可塑性有关的Fos基因表达发生了相应的改变,从而导致对吗啡处理后反应的不同^[19]。1996年,Wang等科学家还发现M受体包括M₅受体对一氧化氮(NO)合成的调控作用^[18]。国内最近的一些研究结果也表明,在吗啡依赖和戒断中,脊髓水平主要以M₂和M₃受体为主,而脊髓上水平以M₁和M₅受体为主介导吗啡依赖和戒断过程,初步阐明了M受体在吗啡依赖过程中适应性变化是吗啡戒断反应重要的生物学基础^[19];并确定了在吗啡戒断过程中M受体、N-甲基-D-天门冬氨酸受体(NMDA受体)以及NO途径之间存在着内在的调节通路^[20,21],其中发现M₅受体参与了激活吗啡奖赏大鼠腹侧背盖区一氧化氮合酶(nNOS)的表达^[22]。

3. 纳洛酮激发的戒断症状的分析:众所周知,中脑边缘多巴胺系统参与了阿片戒断症状的表达。所以,有关研究者还观察了M₅野生型和缺失型小鼠中的吗啡戒断反应。实验中,小鼠皮下埋植75mg药丸,共7d,吗啡戒断症状用单剂量的阿片拮抗剂(i. p, 1mg/kg纳洛酮)激发。在吗啡慢性处理后的野生型小鼠中,观察到明显的纳洛酮激发的躯体戒断症状,包括跳跃、湿狗、颤抖、咬牙等。有趣的是,这些戒断症状在M₅缺失小鼠中明显地减弱。上述结果表明这种戒断症状表达的明显不同和M₅受体基因的缺乏有关^[16]。

4. 镇痛研究:为了观察M₅受体的缺失是否影响吗啡镇痛特性,实验人员运用了小鼠甩尾试验和热板镇痛实验,发现在野生型小鼠中,腹腔注射2.5, 5和10mg/kg吗啡剂量依赖地引

基金项目:国家自然科学基金项目(30470554);宁波市科技计划项目(2005C100007)

作者单位:315010 宁波,宁波市微循环与萜萜类药研究所,宁波戒毒研究中心

起吗啡镇痛作用。上述作用同样在 M₅ 缺失小鼠中看到。这表明吗啡急性镇痛作用不受 M₅ 基因的敲除而受到影响。同样, M₅ 野生型和 M₅ 缺失型小鼠皮下埋植吗啡药丸(75 mg) ,并测试这些小鼠 2 周内的慢性镇痛作用。甩尾试验和热板镇痛测试实验均表明,慢性吗啡处理引起的镇痛耐受在 M₅ 受体缺失小鼠中同样没有受到影响。如果急性单剂量腹腔 100 mg/kg 吗啡注射,观察其 24 h 后的急性吗啡耐受的变化,发现的结果和上述也一致^[16]。

三、M₅ 受体参与可卡因成瘾

2003 年 Jensen 等人利用小鼠可卡因自身给药模型,研究发现在可卡因 0.03 mg/kg 和 0.3 mg/kg 剂量, M₅ 缺失型小鼠可卡因自身给药反应显著低于 M₅ 野生型小鼠,同时, M₅ 缺失型小鼠可卡因条件性位置偏爱(CPP)反应也明显减弱,运用高台十字迷宫测定可卡因戒断有关的焦虑程度,实验显示可卡因依赖戒断后 48 h, M₅ 缺失型小鼠处在开放臂的时间显著多于 M₅ 野生对照组,表明 M₅ 缺失型小鼠可卡因戒断后焦虑程度显著轻于 M₅ 野生型小鼠,但两者焦虑有关行为基础值没有差别,并且用被动逃避实验评价小鼠记忆成绩,两者也没有区别,这些结果提示 M₅ 受体也参与可卡因有关的奖赏和戒断调制^[23]。为了更详细地阐明可卡因奖赏效应的胆碱能机理,2005 年 Thomsen 等^[24]组成的研究小组设计了更细致复杂的实验方案,观察和比较了不同 M₅ 缺失型、不同性别种类小鼠或不同训练程序下,不同组小鼠可卡因的奖赏效应变化。主要的实验研究结果有:首先,在可卡因低剂量(0.03 mg/kg), M₅ 野生型小鼠能建立起自身给药模型,而 M₅ 缺失型小鼠(包括纯合子 M₅-/-型和杂合子 M₅+/-型)则不能获得自身给药反应;第二,利用累进比率训练获得的小鼠可卡因自身给药模型中,在低剂量到中等剂量范围内(0.03~0.3 mg/kg), M₅ 缺失型小鼠(纯合子 M₅-/-型)可卡因奖赏效应明显弱于 M₅ 野生型小鼠。但在固定比率或高剂量可卡因情况下, M₅ 野生型和缺失型小鼠的可卡因奖赏效应没有明显不同。而且,实验研究表明 M₅ 野生型和缺失型小鼠的可卡因奖赏效应的明显不同与小鼠的性别和种族无关。上述最新的研究报告提示毒蕈碱 M₅ 受体在可卡因有关的奖赏和戒断中均发挥重要作用。

四、结语

综上所述, M₅ 受体参与了啡和可卡因戒断与奖赏的行为表达,可能通过激活 NAC 中多巴胺神经多巴胺的释放而起调制作用。因为中脑边缘多巴胺途径均参与了其他滥用药物,包括尼古丁、酒精的奖赏效应。因此, M₅ 受体可能参与了诸多觅药行为的调制。因为 M₅ 受体的缺乏并不影响啡介导的镇痛, M₅ 受体拮抗剂有望在临床上能有效减少阿片的滥用,但并不改变阿片的镇痛。而且 M₅ 受体的缺乏似乎没有明显的毒蕈碱副作用,所以今后继续寻找 M₅ 受体的高亲和性高选择性配体,进一步从细胞和分子水平阐明 M₅ 受体参与滥用药物的奖赏过程,将为寻找和设计药物成瘾的治疗药物提供新的研究策略和药物靶点。

参 考 文 献

- 1 Vilaro MT, Palacios JM, Mengod G. Localization of m5 muscarinic receptor mRNA in rat brain examined by in situ hybridization histochemistry. *Neurosci* ,1990 ,114 :154-159.
- 2 Weiner DM, Levey AI, Brann MR. Expression of muscarinic acetylcho-

- line and dopamine receptor mRNAs in rat basal ganglia. *Proc Natl Acad Sci* ,1990 ,87 :7050-7054.
- 3 Yasuda RP, Ciesla W, Flores LR, Wall et al. Development of antisera selective for m4 and m5 muscarinic cholinergic receptors : distribution of m4 and m5 receptors in rat brain. *Mol Pharmacol* ,1993 ,43 :149-157.
- 4 王昊, 陆阳, 陈红专, 等. 毒蕈碱乙酰胆碱受体新成员: 孤儿受体 m₅. *生理科学进展* ,2003 ,34 :156-158.
- 5 王丽韞, 郑建全, 阮金秀, 等. 毒蕈碱型 M5 受体亚型及生物学特性. *中国药理学通报* ,2005 ,21 :10-13.
- 6 Lehmann J, Langer SZ. Muscarinic receptors on dopamine terminals in the cat caudate nucleus : neuromodulation of [^{3H}]dopamine release in vitro by endogenous acetylcholine. *Brain* ,1982 ,248 :61-69.
- 7 Raiteri M, Leardi R, Marchi M. Heterogeneity of presynaptic muscarinic receptors regulating neurotransmitter release in the rat brain. *J Pharmacol Exp Ther* ,1984 ,228 :209-214.
- 8 Yamada M, Lamping KG, Duttaroy A, et al. Cholinergic dilation of cerebral blood vessels is abolished in M5 muscarinic acetylcholine receptor knockout mice. *Proc Natl Acad Sci USA* ,2001 ,98 :14096-14101.
- 9 Koob GF. Drugs of abuse : anatomy , pharmacology and function of reward pathways. *Trends Pharmacol Sci* ,1992 ,13 :177-184.
- 10 Wise RA. Neurology of addiction. *Current Opinions in Neurobiology* ,1996 ,6 :243-251.
- 11 Koob GF, Sanna PP, Bloom FE. Neuroscience of addiction. *Neuron* ,1998 ,21 :467-476.
- 12 Lacey MG, Calabresi P, North RA. Muscarine depolarizes rat substantia nigra zona compacta and ventral tegmental neurons in vitro through M1-like receptors. *J Neurosci* ,1990 ,253 :395-400.
- 13 Yeomans J, Baptista M. Both nicotinic and muscarinic receptors in ventral tegmental area contribute to brainstimulation reward. *Pharmacol Biochem Behav* ,1997 ,57 :915-921.
- 14 Gronier B, Perry KW, Rasmussen K. Activation of the mesocorticolimbic dopaminergic system by stimulation of muscarinic cholinergic receptors in the ventral tegmental area. *Psychopharmacology* ,2000 ,147 :347-355.
- 15 Forster GL, Yeomans JS, Takeuchi J et al. M5 muscarinic receptors are required for prolonged accumbal dopamine release after electrical stimulation of the pons in mice. *J Neurosci* ,2001 ,21 :1-6.
- 16 Basile AS, Fedorova I, Zapata A et al. Deletion of the M5 muscarinic acetylcholine receptor attenuates morphine reinforcement and withdrawal but not morphine analgesia. *Proc Natl Acad Sci USA* ,2002 ,99 :11452-11457.
- 17 Nye HE, Nestler EJ. Induction of chronic Fos-related antigens in rat brain by chronic morphine administration. *Mol Pharmacol* ,1996 ,49 :636-645.
- 18 Wang SZ, Lee SY. Differential coupling of m1 , m3 , and m5 muscarinic receptors to activation of neuronal nitric oxide synthase. *Pharmacol* ,1996 ,53 :271-280.
- 19 周文华, 刘惠芬, 顾钧, 等. 啡依赖大鼠脊髓和脑干毒蕈碱受体亚型基因的表达. *药学报* ,2002 ,37 :611-615.
- 20 刘惠芬, 周文华, 顾钧, 等. NOS 合酶抑制剂和 MK-801 对啡依赖大鼠脊髓和脑干毒蕈碱型乙酰胆碱受体亚型基因表达的影响. *中国行为医学科学* ,2003 ,12 :21-23.
- 21 刘惠芬, 周文华, 谢小虎, 等. M 受体对啡戒断大鼠脊髓和脑干 NMDA 受体基因表达及中脑导水管周围灰质中谷氨酸释放的调节. *生理学报* ,2004 ,56 :95-100.
- 22 康定鑫, 顾钧, 曹君利, 等. M5 受体参与激活啡奖赏大鼠腹侧背盖区 nNOS 表达. *中国药理学通报* ,2004 ,20 :1412-1416.
- 23 Fink-Jensen A, Fedorova I, Wortwein G et al. Role for M5 muscarinic acetylcholine receptors in cocaine addiction. *J Neurosci Res* ,2003 ,74 :91-96.
- 24 Thomsen M, Woldbye DP, Wortwein G, et al. Reduced cocaine self-administration in muscarinic M5 acetylcholine receptor-deficient mice. *J Neurosci* ,2005 ,25 :8141-8149.

(收稿日期 2006 - 07 - 04)

(本文编辑 : 冯学泉)