

腺苷类似物 WS090501 的镇静、催眠和抗惊厥作用

李 伟, 张建军*

(中国医学科学院、北京协和医学院药物研究所, 天然药物活性物质与功能国家重点实验室, 北京 100050)

关键词: 腺苷类似物; 腺苷 A₁R; 腺苷 A_{2A}R; NREM 睡眠; 自主活动

中图分类号: R965

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2011) 06-0742-05

Sedative, hypnotic and anticonvulsive effects of an adenosine analogue WS090501

LI Wei, ZHANG Jian-jun*

(State Key Laboratory for Bioactive Substances and Functions of Natural Medicines, Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Beijing 100050, China)

Abstract: This study is to examine the sedative, hypnotic and anticonvulsive effects of an adenosine analogue, WS090501. The spontaneous locomotor activity was recorded by open field equipment, and the EEG of rats was recorded by polyphysiograph. Pentylentetrazol (PTZ)-induced seizure model was used. The spontaneous locomotor activity was decreased by WS090501 at various doses (0.06, 0.13, and 0.25 mg·kg⁻¹), and the decreasing rate was 28.4%, 47.1% and 61.2% respectively. Furthermore, the effect of WS090501 on spontaneous locomotor activity of mice can be antagonized by DPCPX, a selective adenosine A₁R antagonist, but cannot be antagonized by SCH58261, a selective adenosine A_{2A}R antagonist. The NREM sleep was significantly increased by WS090501 (0.05 and 0.2 mg·kg⁻¹), and the increasing rate was 27.6% and 102.8%, respectively, at 6th hour after administration. The REM sleep decreased significantly at the higher dose. PTZ induced serious convulsion in mice. The latency of convulsion was prolonged, and the number of seizure and mortality decreased after administration of WS090501. These results show that WS090501 has potent sedative, hypnotic and anticonvulsive effects, which may be mediated through adenosine A₁R.

Key words: adenosine analogue; adenosine A₁R; adenosine A_{2A}R; NREM sleep; locomotor activity

腺苷是一种内源性的嘌呤核苷, 具有广泛的生理性调节作用。腺苷类似物具有显著的镇静^[1]、催眠和抗惊厥作用^[2], 可以抑制啮齿类动物的自主活动、诱导 NREM 睡眠 (non rapid-eye-movement sleep, 非快动眼睡眠)^[3]。腺苷及其类似物通过腺苷受体发挥作用。腺苷受体是 G 蛋白偶联受体, 主要分为 4 个亚型, 包括 A₁R、A_{2A}R、A_{2B}R 和 A₃R^[4], 其中, A₁R 和

A_{2A}R 在睡眠觉醒周期的调节中非常重要^[5]。近期研究表明, 基底前脑是介导腺苷睡眠诱导效应的主要脑区, 通过 A₁R 抑制觉醒活性神经元。基底前脑吻部蛛网膜下腔的 A_{2A}R 受体则参与介导了前列腺素 D₂ 的催眠效应^[6]。而传统的精神活性饮品咖啡因也是通过 A_{2A}R 产生促觉醒作用的^[7]。

腺苷对中枢神经系统的调节作用使腺苷受体成为了药物研发的靶点, 大量的腺苷类似物被合成出来^[8], 包括非选择性腺苷受体激动剂 NECA、选择性腺苷 A₁R 激动剂 CPA 或选择性腺苷 A_{2A}R 激动剂 CGS21680 等。WS090501 是腺苷类似物, 其对 A₁R

收稿日期: 2011-04-07.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30973512); 国家“重大新药创制”科技重大专项 (2009ZX09301-003, 2008ZX09401-004).

*通讯作者 Tel / Fax: 86-10-63182392, E-mail: jjzhang@imm.ac.cn

的选择性约是 $A_{2A}R$ 的 100 倍。本文评价了 WS090501 的镇静、催眠和抗惊厥活性, 并初步探讨其可能的作用靶点。

材料与方法

实验动物 雄性 ICR 小鼠, 体重 18~22 g; 雄性 Wistar 大鼠, 体重 200~220 g, 均购自北京维通利华实验动物技术有限公司, 许可证编号: SCXK (京) 2006-0009。实验前动物适应环境至少 3 天。室温保持在 25 °C, 自由进食和饮水。

药品与试剂 WS090501 由中国医学科学院药物研究所吴松教授提供; DPCPX (8-cyclopentyl-1, 3-dipropylxanthine, 8-环戊-1, 3-二丙基黄嘌呤) 和 SCH58261 {5-amino-7-(β -phenylethyl)-2-(8-furyl)pyrazolo [4, 3-e]-1, 2, 4-triazolo[1, 5-c]-pyrimidine, 5-氨基-7-(β -苯乙基)-2-(8-呋喃基)-吡唑-[4, 3-e]-1, 2, 4-三唑-[1, 5-c]嘧啶} 购自 Tocris 公司; 戊四唑 (PTZ) 购自 Lancaster 公司。以上各试剂用少量 Tween 80 润湿后溶于蒸馏水中配成相应浓度。蒸馏水 (Tween 80 低于 1%) 作溶剂对照。

仪器和设备 自发活动实验仪器、BehaviorSys 2.2.0 软件 (上海移数信息科技有限公司); 脑立体定位仪 (68002, 深圳市瑞沃德生命科技有限公司); 多导生理记录仪 (Model MP 100, BIOPAC System, Goleta, CA, USA); AcqKnowledge 采集分析软件。

自主活动实验 雄性 ICR 小鼠随机分为 4 组, 分别为溶剂对照组和 WS090501 组 (0.06、0.13 和 0.25 $mg \cdot kg^{-1}$)。腹腔注射 (ip) WS090501 20 min 后, 将小鼠放入单个不透明的方形自主活动箱 (50 cm \times 50 cm \times 40 cm) 内, 摄像机记录 5 min 内小鼠的活动路程, 并用 BehaviorSys 2.2.0 软件进行自动分析。

联合腺苷受体拮抗剂实验 雄性 ICR 小鼠随机分两批进行拮抗实验, 选用腺苷 A_1R 拮抗剂 DPCPX 和腺苷 $A_{2A}R$ 拮抗剂 SCH58261。第 1 批小鼠分为 Vehicle、WS090501、DPCPX 以及 DPCPX+WS090501 组; 第 2 批小鼠分为 Vehicle、WS090501、SCH58261 以及 SCH58261+WS090501 组。其中 WS090501 的剂量为 0.25 $mg \cdot kg^{-1}$, DPCPX 分为 3 个剂量 (0.04、0.2 和 1 $mg \cdot kg^{-1}$), SCH58261 分为 2 个剂量 (1 和 5 $mg \cdot kg^{-1}$)。小鼠腹腔注射溶剂或拮抗剂 10 min 后, 腹腔注射溶剂或 WS090501, 20 min 后将小鼠放入自主活动箱内, 记录分析小鼠 5 min 的自主活动。

大鼠 EEG 与 EMG 的测量和睡眠成分分析 雄性 Wistar 大鼠在睡眠记录前一周按标准程序进行手

术^[9]。采用水合氯醛 (350 $mg \cdot kg^{-1}$, ip) 麻醉大鼠, 立体定位仪固定, 剪开颅顶皮肤, 以前囟为原点, 颅钻打孔安置两个脑电电极, 坐标分别为 (AP +2.0 mm、L +2.0 mm, AP -4.0 mm、L +1.0 mm), 小脑上方安置参考电极, 颈部两侧斜方肌连接两根肌电电极。所有电极通过导线与微型插座相连接, 用牙科水泥将微型插座固定在大鼠颅骨上方。术后大鼠单笼饲养, 恢复 1 周, 放入记录笼内进行实验。大鼠适应环境 2 天后, 记录基础 EEG/EMG 作为 Baseline, 记录时间为 20:00 至次日 7:00。大鼠腹腔注射溶剂或 WS090501 (0.05 和 0.2 $mg \cdot kg^{-1}$), 记录给药后 EEG/EMG。EEG/EMG 信号经过放大、滤波 (EEG 0.5~30 Hz; EMG 16~128 Hz)、采集和记录, 最终通过 SleepSign v2.0 软件每 10 s 进行快速傅里叶转换 (FFT) 运算处理, 并依据下面的范畴进行分类: Wake (低幅 EEG 和高幅 EMG), NREM 睡眠 (高幅同步化 EEG 和低幅或无强直 EMG) 及 REM 睡眠 (rapid eye movement sleep, 快动眼睡眠, 低幅去同步化 EEG, 无强直 EMG)。

戊四唑致惊厥模型 雄性 ICR 小鼠随机分为 4 组, 分别为溶剂对照组和 WS090501 组 (0.06、0.25 和 1 $mg \cdot kg^{-1}$), 腹腔注射给药。给予 WS090501 15 min 后给予戊四唑 (100 $mg \cdot kg^{-1}$, ip) 诱导小鼠惊厥, 记录痉挛发生潜伏期、惊厥发生次数和死亡率。

统计学分析 实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 用 GraphPad Prism 5.0 软件进行统计学分析。多组间比较采用单因素方差分析, 结果显示组间差异有显著性时, 进行 Dunnett 检验, 比较各剂量组与对照组的差异。联合腺苷受体拮抗剂实验采用单因素方差分析并进行 Newman-Keuls 检验, 比较各组之间的差异。戊四唑致惊厥实验中死亡率的比较采用 Fisher 精确检验。

结果

1 WS090501 抑制小鼠的自主活动

自主活动实验用于具有镇静作用药物的筛选, 一般具有明显中枢抑制作用的药物均可显著降低小鼠的自主活动。图 1 显示 WS090501 对小鼠自主活动的影响, 与溶剂对照组相比, WS090501 能够显著抑制小鼠自主活动, 3 个剂量下的小鼠自主活动抑制率分别为 28.4%、47.1% 和 61.2%, 0.13 和 0.25 $mg \cdot kg^{-1}$ 剂量组与溶剂对照组相比有显著性差异 ($P < 0.01$)。结果显示, WS090501 具有显著的镇静作用。

2 腺苷受体拮抗剂拮抗 WS090501 对自主活动的抑制

腺苷类似物通过腺苷 A_1R 与 $A_{2A}R$ 发挥其中枢抑

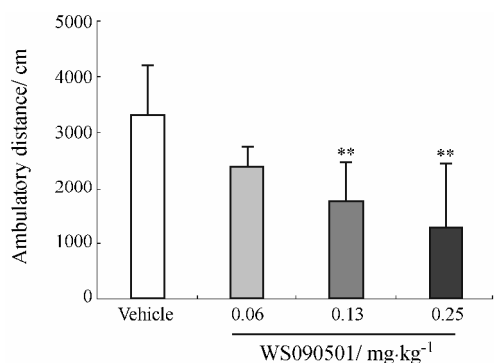


Figure 1 Effect of WS090501 on spontaneous locomotor activity in mice. Mice were injected with WS090501 (0.06, 0.13, and 0.25 mg·kg⁻¹, ip), and the ambulatory distance was calculated for 5 minutes. *n* = 8-9, $\bar{x} \pm s$. ***P* < 0.01 vs vehicle group, tested by ANOVA and Dunnett's test

制作用, 为了确定 WS090501 可能的作用靶点, 进行了联合腺苷 A₁R 拮抗剂 DPCPX 或腺苷 A_{2A}R 拮抗剂 SCH58261 的拮抗实验, 结果见图 2。给予 WS090501 (0.25 mg·kg⁻¹) 后, 小鼠的自主活动显著减少, 单独应用拮抗剂 DPCPX 不影响小鼠的正常自主活动。联合应用 DPCPX 与 WS090501 时, 随着 DPCPX 剂量的增加, WS090501 对小鼠自主活动的抑制逐渐降低, 在 DPCPX (1 mg·kg⁻¹) 作用下, WS090501 对动物自主活动的影响完全消除 (图 2A)。单独应用 SCH58261 在 1 和 5 mg·kg⁻¹ 时对小鼠自主活动无明显影响。联合应用 SCH58261 不能拮抗 WS090501 的作用 (图 2B)。结果显示, 腺苷 A₁R 而非腺苷 A_{2A}R 参与介导了 WS090501 的镇静作用。

3 WS090501 延长大鼠的 NREM 睡眠、缩短 REM 睡眠

由于一般的镇静药物都具有较强的催眠活性, 进而测定了 WS090501 对自由活动大鼠的睡眠觉醒状

态的影响。溶剂对照组大鼠每小时 NREM 睡眠约占 1/3, REM 睡眠时间很短 (图 3)。WS090501 (0.05 和 0.2 mg·kg⁻¹) 可以显著延长 NREM 睡眠 (图 3A), 给药后 6 h, NREM 总睡眠延长 27.6% 和 102.8% (图 3B)。在 0.2 mg·kg⁻¹ 剂量下, 1、2、3、4、5 和 6 h 的 NREM 睡眠分别为对照组的 1.5 倍、2.2 倍、2.7 倍、2.7 倍、2.1 倍及 2.7 倍。另外, WS090501 (0.05 和 0.2 mg·kg⁻¹) 缩短 REM 睡眠 (图 3C), 给药后 6 h 的 REM 总睡眠缩短率分别为 27.6% 和 88.1%。结果显示, WS090501 具有一定的睡眠延长作用, 同时抑制 REM 睡眠。

4 WS090501 增加 EEG delta 功率

文献报道 delta 功率 (0.5~4 Hz 的功率, 又称慢波活性) 在觉醒阶段持续增加, 在睡眠时逐渐降低, 被认为可以反映觉醒期间睡眠需求的积累, 并在睡眠时逐渐释放, 可以表征睡眠压力或倾向。WS090501 可以提高 NREM 睡眠的 EEG delta 功率。给予 WS090501 后 NREM 睡眠的 EEG delta 功率的时程变化见图 4, 在 0.05 mg·kg⁻¹ 剂量下, EEG delta 功率在 1 h 无明显改变, 从 2 h 开始增加, 到 6 h 约恢复至正常水平, 其中 3 h 和 4 h 与溶剂组相比差异显著; 增大剂量至 0.2 mg·kg⁻¹ 后, WS090501 对大鼠的 EEG 影响更明显, 给药后 2~7 h NREM 睡眠的 EEG delta 功率都显著增加。结果表明, WS090501 可能通过加强皮层放电的慢波活性, 从而增加大鼠的睡眠倾向而延长睡眠。

5 WS090501 抗戊四唑致惊厥作用

PTZ 是 GABA 受体的拮抗剂, 能够促使兴奋性突触的易化过程增强, 从而引起惊厥, 是常用的致惊剂。表 1 显示, PTZ 在 100 mg·kg⁻¹ 剂量下能使多数动物诱发惊厥并死亡, WS090501 在 3 个剂量下不同程度地延长痉挛潜伏期, 减少惊厥发作次数, 降低死亡

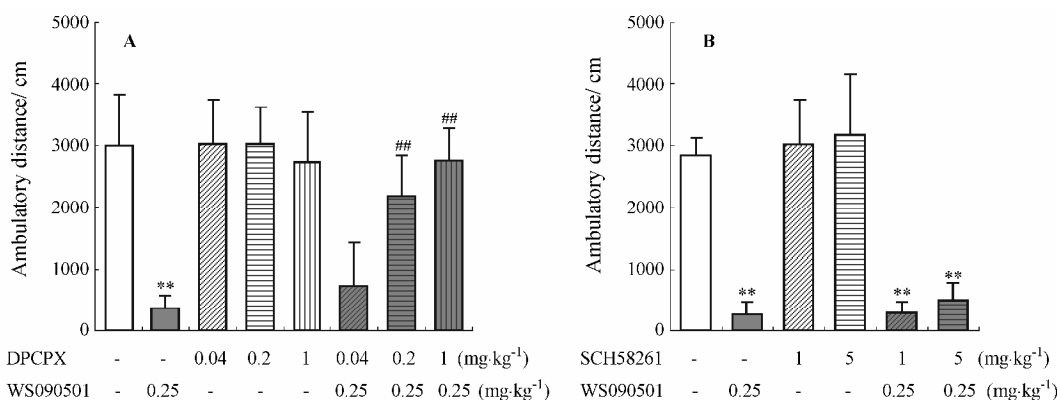


Figure 2 Spontaneous locomotor activity of mice after administration of WS090501 in absence or presence of DPCPX or SCH58261. The mice were put into the recording chamber 20 min after administration, and the ambulatory distance was calculated for 5 minutes. *n* = 9-10, $\bar{x} \pm s$. ***P* < 0.01 vs vehicle group; ###*P* < 0.01 vs WS090501, tested by ANOVA and Newman-Keuls's test

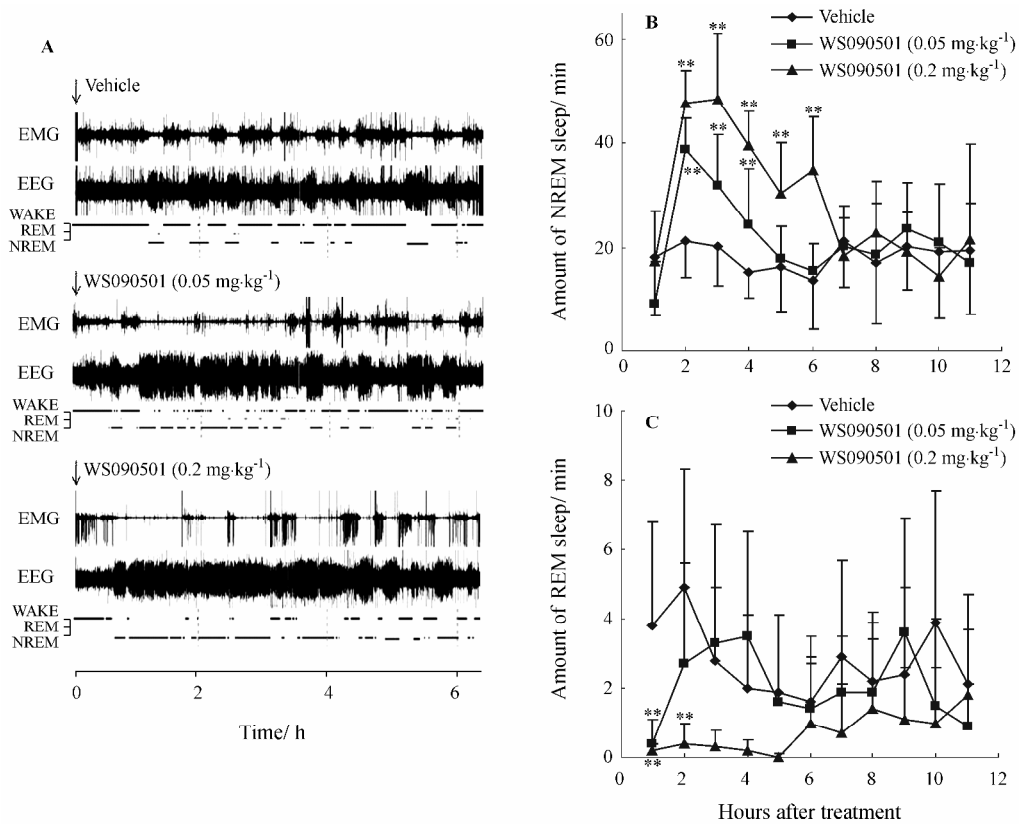


Figure 3 NREM and REM sleep after administration of WS090501 at various doses in rats. (A) Typical examples of EEG, EMG and hypnograms after administration of vehicle or WS090501 for 6 h; (B) Amount of NREM sleep per hour was calculated; (C) Amount of REM sleep per hour was calculated. $n = 6$, $\bar{x} \pm s$. ** $P < 0.01$ vs vehicle group, tested hour-by-hour using ANOVA and Dunnett's test

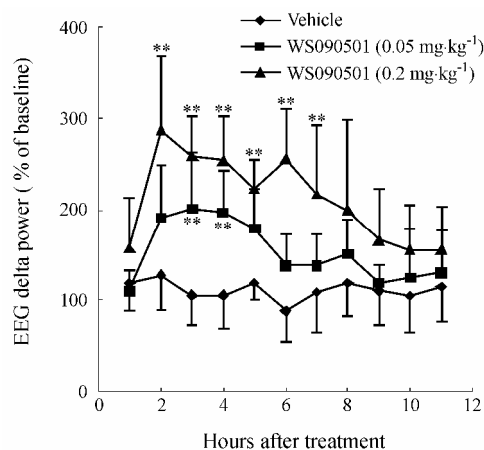


Figure 4 NREM sleep EEG delta power increased following ip administration of WS090501 at various doses versus vehicle. $n = 6$, $\bar{x} \pm s$. ** $P < 0.01$ vs vehicle group, tested hour-by-hour using ANOVA and Dunnett's test

率, 在 $1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 剂量时作用显著, 表明 WS090501 有较强的抗惊厥作用。

讨论

为了评价腺苷类似物 WS090501 的镇静活性, 作者记录分析了小鼠的自主活动。结果显示, WS090501

Table 1 Effect of WS090501 on convulsion induced by PTZ ($100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) in mice. $\bar{x} \pm s$. * $P < 0.05$ vs PTZ (only) group. Latency and number of seizure were tested by ANOVA and Dunnett's test. Mortality was tested by Fisher's exact test

Group	Dose / $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	n	Latency /min	Number of seizure	Mortality /%
PTZ (only)	—	9	1.5 ± 0.7	2.9 ± 1.7	88.9
WS090501	0.06	6	2.6 ± 2.4	2.7 ± 0.5	66.7
	0.25	6	3.0 ± 2.7	2.3 ± 1.0	33.3
	1	6	$4.5 \pm 2.6^*$	$1.0 \pm 0.6^*$	16.7*

具有明显的镇静作用。另外大鼠在白天睡眠, 而在夜间活跃, 睡眠倾向降低^[10], 一般通过在夜间记录分析大鼠的 EEG 和 EMG 来评价待测物的催眠效应。结果证实, 高、低剂量 WS090501 都能延长大鼠的 NREM 睡眠, 这与常见的腺苷类似物延长 NREM 睡眠的作用相一致; 同时, WS090501 在高剂量时明显减少大鼠 REM 睡眠。哺乳动物的 REM 睡眠又称为“异相睡眠”, 通常伴随做梦。与 NREM 睡眠相比, REM 睡眠时期脑血流及代谢增加, 心率稍快, 血压稍上升。但同时 REM 睡眠也是心肌梗死和脑缺血风险期。服用传统的苯二氮䓬类镇静催眠药, 如安定^[11], 也会抑制 REM 睡眠。另外, 也有文章报道腺苷类似

物通过腺苷 A₁R 减少 REM 睡眠^[12]。REM 睡眠的抑制可能会导致停药后代偿性反跳延长, 而使梦魇增多, 这是造成苯二氮䓬类镇静催眠药停药困难的因素之一。EEG delta 功率, 又称为慢波活性 (slow-wave activity, SWA), 是 NREM 睡眠期间与睡眠稳态相一致的一个重要生理指标。SWA 随着觉醒的持续而增加并在 NREM 睡眠进行中逐渐降低^[13], 表明睡眠倾向的增加增强了神经元 EEG 慢波的发生, 而睡眠压力的减少导致慢波活性的降低。通过研究 NREM 睡眠 SWA 是否增加, 可以确定蓄积睡眠压力下的神经放电改变。结果显示, WS090501 在增加 NREM 睡眠的同时能够产生蓄积睡眠压力相关的 SWA 的改变, 提示 WS090501 可能通过加强皮层放电的慢波活性, 从而增加大鼠的睡眠倾向而延长睡眠。WS090501 的中枢抑制作用可能是通过腺苷 A₁R 介导的, 而非腺苷 A_{2A}R。Huang 等^[7]和 Satoh 等^[14]报道在腺苷及其类似物的睡眠觉醒调节过程中, 腺苷 A_{2A}R 而非 A₁R 起主要的作用, 然而现在 A_{2A}R 的主导作用并未完全证实。一些研究^[15]显示, 将腺苷 A₁R 激动剂 N6-环戊腺苷 (CPA, N6-cyclopentyladenosine) 注入睡眠调节中枢, 如基底前脑, 也能明显诱导睡眠。WS090501 是否通过这些部位发挥效应还需要进一步的研究。

另外, WS090501 还能保护戊四唑诱导的癫痫小鼠, 这也与腺苷类似物的抗惊厥效应相一致^[2]。综上所述, 腺苷类似物 WS090501 具有强效的镇静催眠和抗惊厥效应, 并且这种效应可能是通过腺苷 A₁R 介导的。

References

- [1] Dunwiddie TV, Worth T. Sedative and anticonvulsant effects of adenosine analogs in mouse and rat [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 1982, 220: 70–76.
- [2] Malhotra J, Gupta YK. Effect of adenosine receptor modulation on pentylenetetrazole-induced seizures in rats [J]. *Br J Pharmacol*, 1997, 120: 282–288.
- [3] Schwierin B, Borbély AA, Tobler I. Effects of N6-cyclopentyladenosine and caffeine on sleep regulation in the rat [J]. *Eur J Pharmacol*, 1996, 300: 163–171.
- [4] Fredholm BB, Ijzerman AP, Jacobson KA, et al. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXXI. Nomenclature and classification of adenosine receptors—an update [J]. *Pharmacol Rev*, 2011, 63: 1–34.
- [5] Liu TY, Hong ZY, Qu WM, et al. Advances in the study of histaminergic systems and sleep-wake regulation [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2011, 46: 247–252.
- [6] Basheer R, Strecker RE, Thakkar MM, et al. Adenosine and sleep-wake regulation [J]. *Prog Neurobiol*, 2004, 73: 379–396.
- [7] Huang ZL, Qu WM, Eguchi N, et al. Adenosine A_{2A}, but not A₁, receptors mediate the arousal effect of caffeine [J]. *Nat Neurosci*, 2005, 8: 858–859.
- [8] Klotz KN. Adenosine receptors and their ligands [J]. *Naunyn-Schmiedeberg Arch Pharmacol*, 2000, 362: 382–391.
- [9] Zhao X, Cui XY, Wang LE, et al. Potentiating effect of diltiazem on pentobarbital-induced hypnosis is augmented by serotonergic system: the TMN and VLPO as key elements in the pathway [J]. *Neuropharmacology*, 2009, 56: 937–943.
- [10] Revel FG, Gottowik J, Gatti S, et al. Rodent models of insomnia: a review of experimental procedures that induce sleep disturbances [J]. *Neurosci Biobehav Rev*, 2009, 33: 874–899.
- [11] Carley DW, Trbovic SM, Radulovacki M. Diazepam suppresses sleep apneas in rats [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 1998, 157: 917–920.
- [12] Benington JH, Kodali SK, Heller HC. Stimulation of A1 adenosine receptors mimics the electroencephalographic effects of sleep deprivation [J]. *Brain Res*, 1995, 692: 79–85.
- [13] Borbély AA, Achermann P. Sleep homeostasis and models of sleep regulation [J]. *J Biol Rhythms*, 1999, 14: 557–568.
- [14] Satoh S, Matsumura H, Hayaishi O. Involvement of adenosine A_{2A} receptor in sleep promotion [J]. *Eur J Pharmacol*, 1998, 351: 155–162.
- [15] Methippara MM, Kumar S, Alam MN, et al. Effects on sleep of microdialysis of adenosine A1 and A2a receptor analogs into the lateral preoptic area of rats [J]. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2005, 289: R1715–R1723.