(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 103269699 A
(43)申请公布日 2013.08.28

(21)申请号 201180048110.X
(22)申请日 2011.08.23
(30)优先权数据
61/376,528 2010.08.24 US
(85)PCT申请进入国家阶段日
2013.04.03
(86)PCT申请的申请数据
PCT/US2011/048749 2011.08.23
(87)PCT申请的公布数据
WO2012/027326 EN 2012.03.01
(71)申请人 加利福尼亚大学董事会
地址 美国加利福尼亚州
(72)发明人 静·梁 理查德·W·奥尔森
伊戈尔·斯皮格尔曼
(74)专利代理机构 北京安信方达知识产权代理有限公司 11262
代理人 武晶晶 杨淑媛
(51)Int.Cl.
A61K 31/353(2006.01)
A61K 31/352(2006.01)
A61K 31/7048(2006.01)
A61P 25/32(2006.01)
A61P 25/00(2006.01)

权利要求书1页 说明书21页 附图13页

(54)发明名称

包括给予二氢杨梅素的治疗酒精中毒、酒精使用障碍以及酒精滥用的方法

(57)摘要

在此披露了用于治疗酒精中毒、酒精使用障碍以及酒精滥用的方法，这些方法包括给予二氢杨梅素。如在此所披露的，二氢杨梅素增强具有α4βδ亚基的$GABA_ARs$的活性，其中α4βδ亚基与乙醇的作用相关，拮抗乙醇对$GABA_ARs$的作用，作用于$GABA_ARs$的苯二氮卓位点，并且抑制、降低和/或逆转由暴露于乙醇引起的部分或全部$GABA_AR$可塑性。

CN 103269699 A

1. 一种用于治疗、抑制、减轻和 / 或逆转与由暴露于乙醇引起的 $GABA_AR$ 可塑性相关的酒精中毒和酒精使用障碍的方法，该方法包括向将要、正在和 / 或已经暴露于乙醇的 $GABA_A$ 受体给予二氢杨梅素。

2. 一种用于增强 $GABA_A$ 受体的活性的方法，包括向 $GABA_A$ 受体给予二氢杨梅素。

3. 一种拮抗乙醇对 $GABA_A$ 受体的活性的方法，包括在 $GABA_A$ 受体暴露于乙醇之前、期间和 / 或之后向其给予二氢杨梅素。

4. 一种用于治疗、抑制和 / 或减轻受试者中的乙醇中毒、戒酒综合征的症状、酒精使用障碍和 / 或酒精滥用的方法，包括根据权利要求 1 所述的治疗、降低或逆转受试者中的 $GABA_A$ 受体的 $GABA_AR$ 可塑性；根据权利要求 2 所述的增强受试者中的 $GABA_A$ 受体的活性；和 / 或根据权利要求 3 所述的拮抗受试者中的乙醇对 $GABA_A$ 受体的活性。

5. 根据权利要求 4 所述的方法，其中戒酒综合征的症状选自下组，该组由以下各项组成：对乙醇的耐受性、基础焦虑增加、以及过度兴奋。

6. 根据权利要求 4 所述的方法，其中该治疗减轻或抑制了受试者中的由暴露于乙醇引起的警觉性的下降。

7. 根据以上权利要求中的任何一项所述的方法，其中二氢杨梅素是以有效量给予的。

8. 根据以上权利要求中的任何一项所述的方法，其中二氢杨梅素是在暴露于乙醇之前、期间和 / 或之后给予的。

9. 根据以上权利要求中的任何一项所述的方法，其中二氢杨梅素是以可能含有或可能不含有乙醇的食品的形式如饮料给予的。

10. 根据以上权利要求中的任何一项所述的方法，其中二氢杨梅素是和乙醇共同给予的。

11. 如在此所披露的本发明。

包括给予二氢杨梅素的治疗酒精中毒、酒精使用障碍以及酒精滥用的方法

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本发明要求2010年8月24日提交的美国专利临时申请序列号61/376,528的权益，该专利申请通过引用以其全文结合在此。

[0003] 美国政府支持声明

[0004] 本发明是在由美国国立卫生研究院授予的批准号AA007680、AA016100和AA0017991的政府支持下做出的。政府在本发明中有某些权利。

[0005] 发明背景

[0006] 1. 发明领域

[0007] 本发明总体上涉及使用二氢杨梅素来调节乙醇诱导的γ-氨基丁酸(A)受体的可塑性的方法。本发明还涉及使用二氢杨梅素来治疗乙醇中毒、酒精使用障碍以及酒精滥用的方法。

[0008] 2. 相关技术说明

[0009] 在美国，酒精依赖在可预防的发病率和死亡率的原因列表中排名第三。在美国，每年有超过20,000例酒精诱导的死亡，不包括事故和杀人。2008年，11,773人死于酒后驾驶撞车，几乎占美国所有交通相关死亡的三分之一。根据美国国家疾病控制与预防中心，与酒精有关的撞车的年度费用总数超过510亿美元。

[0010] 酒精(乙醇，EtOH)与γ-氨基丁酸(A)受体($GABA_AR_S$)的相互作用在戒酒综合征(AWS)中起重要作用。参见贝克尔HC(Becker HC)(1998)，《酒精健康与研究世界》(Alcohol Health Res World)22(1):25-33);布恩SL(Boehm SL)等人(2004)，《生化药理学》(Biochem Pharmacol)68(8):1581-1602);库布GF(Koob GF)(2004)，《生化药理学》(Biochem Pharmacol)68:1515-1525);Anacker AM和Ryabinin AE(2010)，《环境研究与公共卫生国际期刊》(Int J Environ Res Public Health)7(2):473-493);以及Dopico AM和Lovinger DM(2009)，《药理学评论》(Pharmacol Rev)61(1):98-114)。

[0011] 突触上的$GABA_AR_S$是由对乙醇具有低敏感性的αβγ亚基形成的;而含有α4βδ亚基的$GABA_AR_S$对低乙醇浓度是高度敏感的。参见Liang J等人(2008)，《酒精临床实验研究》(Alcohol Clin Exp Res)32(1):19-26);Santhakumar V等人(2007)，《酒精》(Alcohol)41(3):211-221);以及Jia F等人(2005)，《神经生理学杂志》(J Neurophysiol)94(6):4491-4501)。已知$GABA_AR_S$经受乙醇、全身麻醉药、苯二氮卓类以及神经类固醇的变构调节。参见奥尔森RW(Olsen RW)和Homanics GE(2000)《神经系统中的GABA：五十年的观点》(GABA IN THE NERVOUS SYSTEM:THE VIEW AT FIFTY YEARS)(马丁DL(Martin DL)和奥尔森RW编辑)第81-96页，利平科特(Lippincott)威廉姆斯&威尔金斯(Williams&Wilkins)，费城(Philadelphia));以及沃尔尼M(Wallner M)(2003)，《美国国家科学院院刊》100(25):15218-15223)。这些研究表明AWS的内在机制是由过度滥用乙醇诱导的$GABA_AR_S$可塑性，该可塑性与普遍降低的$GABA_AR$激活以及差异改变的亚基表达相关。参见奥尔森(2005)，《神经化学研究》(Neurochem Res)30:1579-1588);Liang J等人

(2006),《神经科学杂志》(J Neurosci)26:1749-1758);以及 Liang J 等人(2007),《神经科学杂志》(J Neurosci)27:12367-12377)。含有 $GABA_AR_S$ 的突触外 α4βδ 亚基在体内或体外乙醇中毒之后不久内化。参见 Shen Y 等人(2010),《分子药理学》(Mol Pharmacol)79(3):432-442);以及 Liang J 等人(2007)。含有 $GABA_AR_S$ 的突触外 α4βδ 亚基与由乙醇中毒和其他镇静催眠麻醉药诱导的行为性翻正反射丧失(LORR)展现出显著的线性关系。参见 Liang J 等人(2009),《神经生理学杂志》(J Neurophysiol)102:224-233)。换言之,含有 $GABA_AR$ 性质改变的突触外 α4βδ 是酒精诱导的行为改变的基础。因此,$GABA_AR_S$ 已经被指示为一种可能用于治疗酒精依赖的神经药理学靶标。参见奥尔森和席哈特 W(Sieghart W)(2009),《神经药理学》(Neuropharmacology)56:141-148)。遗憾的是,还没有已知的抑制和/或逆转由慢性暴露于乙醇导致的 $GABA_AR$ 可塑性的方法或组合物。

[0012] 苯二氮卓类(例如,地西泮)是用于减少 AWS 症状的经典药剂。然而,苯二氮卓类在含有酒精敏感性和不敏感性 α4βδ 亚基的 $GABA_AR_S$ 下是无活性的。另外,苯二氮卓类对乙醇产生交叉耐受性。而且,作为一个主要副作用,频繁使用苯二氮卓类可能导致依赖性。事实上,苯二氮卓类和酒精的结合导致更大的物质成瘾问题,这些问题与酒精依赖本身相比更难克服。

[0013] 除了苯二氮卓类,目前只有三种用于治疗酒精依赖的药剂通过了美国 FDA 的批准,即纳曲酮、阿坎酸、以及双硫仑。纳曲酮阻断阿片样受体且它可能还减少思考和反应时间,并且产生焦虑和其他不愉快的感觉。阿坎酸引起包括头痛、腹泻、肠胃气胀以及恶心的副作用,且两个大型美国临床试验未能证实其疗效。双硫仑是针对阻断酒精代谢的,由此引起对于酒精摄入的负反应,于是它的副作用包括潮红、心率加快、呼吸急促、恶心、呕吐、头痛、视觉障碍、精神错乱、以及循环衰竭。双硫仑还可能引起周围神经病变。

[0014] 因此,对于治疗、抑制、降低和/或逆转部分或全部由暴露于乙醇引起的 $GABA_AR$ 可塑性的制剂和方法存在着一种需要。

[0015] 发明概述

[0016] 在一些实施例中,本发明提供了治疗、抑制、降低和/或逆转部分或全部由暴露于乙醇引起的 $GABA_AR$ 可塑性的方法,这些方法包括向一种将要、正在、和/或已经暴露于乙醇的 $GABA_A$ 受体给予二氢杨梅素。在一些实施例中,本发明提供了增强 $GABA_A$ 受体的活性的方法,包括向 $GABA_A$ 受体给予二氢杨梅素。在一些实施例中,本发明提供了拮抗乙醇对 $GABA_A$ 受体的活性的方法,包括在暴露于乙醇之前、期间和/或之后向脑组织给予作用于中枢神经系统 $GABA_A$ 受体的二氢杨梅素。

[0017] 在一些实施例中,本发明提供了用于治疗、抑制和/或减轻受试者中的乙醇中毒、戒酒综合征的至少一种症状、酒精使用障碍和/或酒精滥用的方法,包括如在此所披露的治疗、降低和/或逆转 $GABA_A$ 受体的 $GABA_AR$ 可塑性、增强 $GABA_A$ 受体的活性、和/或拮抗酒精对 $GABA_A$ 受体的活性。在一些实施例中,该受试者是哺乳动物,优选人类。在一些实施例中,戒酒综合征的症状选自下组,该组由以下各项组成:对乙醇的耐受性、基础焦虑增加、以及过度兴奋。在一些实施例中,该治疗减轻或抑制了受试者中的由暴露于乙醇引起的警觉性下降。在一些实施例中,酒精滥用是一种由酒精暴露诱导的大量饮酒。

[0018] 如在此所披露的实施例,二氢杨梅素可以在暴露于乙醇之前、期间和/或之后给予。在一些实施例中,在范围从暴露于乙醇之前大约 30 分钟到立刻暴露于乙醇的时期期间

给予二氢杨梅素。在一些实施例中，在范围从立刻暴露于乙醇之后到暴露于乙醇大约 30 分钟之后的时期期间给予二氢杨梅素。在一些实施例中，可以以一种可能含有或可能不含有乙醇的食品的形式（如饮料）给予二氢杨梅素。在一些实施例中，可以以一种药物制剂的形式给予二氢杨梅素。在一些实施例中，二氢杨梅素是与乙醇共同给予的。在在此所披露的实施例中，可以给予有效量的二氢杨梅素。在一些实施例中，给予治疗有效量的二氢杨梅素。在一些实施例中，给予单位剂量形式的二氢杨梅素。在一些环境下，对于一个人，单位剂量形式的二氢杨梅素的量是大约 50-70mg。

[0019] 上述总体说明和以下详细说明两者都仅仅是示例性的和说明性的，并且旨在为所要求的本发明提供进一步解释。附图被包括以便为本发明提供进一步的理解，并且被结合在本说明书中并构成它的一部分，图解本发明的若干实施例，以及与该说明一起用来解释本发明的原理。

[0020] 附图说明

[0021] 通过参考附图进一步理解本发明，其中：

[0022] 图 1A-1F 为显示 DHM 阻断急性 EtOH 中毒并且防止 EtOH 戒断症状的图。通过用 DHM（1mg/kg，腹膜内注射，n=5-7 只大鼠 / 组）预治疗（图 1A）、后治疗（图 1B）以及联合治疗（图 1C），缩短了 EtOH（3g/kg，腹膜内注射）诱导的 LORR 持续时间。载体组大鼠接受盐水（20mL/kg，腹膜内注射）。这些结果显示单独的 DHM 不诱导 LORR（图 1C），然而即使在注射 EtOH 后 30 分钟时（虚线），DHM 显著缩短了 LORR 持续时间。图 1D 是显示一个单独实验的结果的图。如在图 1D 中所示，乙醇（3g/kg）和 DHM（1mg/kg，腹膜内注射）的同时腹膜内注射消除了戒断（48 小时）诱导的耐受性以及 EtOH（3g/kg，腹膜内注射）诱导的 LORR（n=7/组）。DHM 和 EtOH 的共同给予阻止了戒断（24 小时）诱导的在 PTZ 诱导的发作持续时间（图 1E）以及单剂量 EtOH 中毒（与图 1B 中相同的动物）发生率（图 1F）方面的增加。*，$p<0.01$，相对于载体治疗，单因素方差分析。

[0023] 图 2A-2B 是显示 DHM 阻止单剂量 EtOH 暴露 / 戒断诱导的 $GABA_AR$ 可塑性的图。将大鼠分为 4 个组并且用载体、EtOH（5g/kg，E）、EtOH 联合 DHM（1mg/Kg，E+D）或 DHM（D）管饲。在戒断 48 小时之后，在海马切片中的 DGCs 上进行膜片钳记录。$I_{强直}$的变化显示于图 2A 中，mIPSC 的变化显示于图 2B 中（对照 %）。N=4-7 只鼠 / 组。*，$p<0.05$ 对 0；†，$p<0.05$，相对于载体治疗，双向 RM 方差分析。

[0024] 图 3 是显示 DHM 增强 $GABA_AR$ 介导的电流，并且通过来自初次接受试验的大鼠的 DGCs 中的急性 EtOH 拮抗他们的增强的图。图 a 为一个连续电流跟踪，显示了 DHM 对 $I_{强直}$幅值和 mIPSC 电荷转移（mIPSC 面积）的影响。DHM（1.0μM）轻微增加了总的电荷转移。$I_{强直}$（图 a-1）以及 mIPSC（图 a-2）的 DHM 浓度依赖性增强。N=6 个神经元 / 组。*，$p<0.05$，相对于给药前，单因素方差分析。图 B 是一个样品跟踪记录，该踪迹记录来自施用 EtOH（60mM）继之共同施用 EtOH 和 DHM（0.3μM 和 1μM）的过程中的 DGC。图 b-1 显示 EtOH 显著增强了 $I_{强直}$幅值；这种增强通过 DHM 共同施用而被浓度依赖性地减弱。n=6 个神经元 / 组。图 b-2 显示 EtOH-DHM 类似地影响了 mIPSC 总电荷转移，但是由于 mIPSC 对 EtOH 和 DHM 两者的低敏感性，这种影响并不显著。n=5-7 神经元 / 组。图 c 为一个样品跟踪记录，该踪迹记录来自施用 EtOH（0.3μM）继之共同施用 EtOH 和 DHM（10mM 和 60mM）的过程中的 DGC。图 c-1 显示 EtOH 并没有通过 DHM 影响 $I_{强直}$的增强。图 c-2 显示 DHM-EtOH 类似地影响了

mIPSC 总电荷转移，但这种影响并不显著。n=5-7 个神经元 / 组。*，p<0.01，DHM 治疗后相对于给药前，单因素方差分析。

[0025] 图 4A-4B 显示 DHM+EtOH 的共同给予防止了在 DIV14 原代培养的海马神经元中 EtOH 中毒诱导的功能性 $GABA_AR$ 可塑性。图 4A 是 $I_{强直}$幅值的总和，图 4B 显示了响应于来自载体治疗的、EtOH 治疗的、EtOH+DHM 治疗的以及 DHM 治疗的神经元的急性 EtOH（60mM）的 mIPSC 电荷转移的变化（给药前 %）。n=8-9 个神经元 / 组。*，p<0.05，相对于 EtOH 治疗前；†，p<0.05，药物治疗相对于载体治疗，双向 RM 方差分析。

[0026] 图 5A-5D 显示 DHM 在对照神经元和 EtOH 暴露 / 戒断神经元两者中都增强了 $GABA_AR$ 功能。DHM 浓度依赖性地增强了 DIV14 神经元中 $GABA_AR$ 介导的 $I_{强直}$（图 5A）和 mIPSC（图 5B）。与对照（空心圆）相比较，这种反应在 EtOH 暴露之后（实心圆）适度地降低了。在 EtOH 暴露 / 戒断之后，$I_{强直}$幅值存在轻微的右移，但 mIPSC 总电荷迁移则不然（n=5-9 个神经元 / 组）。图 5C 显示了激发的 $GABA_AR$ 介导的电流的样品跟踪。图 5D 显示了 DHM 对 GABA 浓度反应曲线的影响。将幅值标准化到峰值电流，该峰值电流在不存在 DHM 的情况下由 300μM GABA 激活。每个数值点为来自 5-9 个神经元的平均幅值。DHM 是与 GABA 共同施用的。

[0027] 图 6A-6C 是显示 DHM 消除了 EtOH 中毒以及 DHM 的作用被氟马西尼拮抗的图。图 6A 显示 EtOH（E，3g/kg，腹膜内注射）诱导了翻正反射的丧失（LORR），而 DHM（1mg/kg，腹膜内注射）和 EtOH（E+D1）的同时注射大大缩短了 LORR 的持续时间。作为盐水注射，DHM（D1）没有诱导 LORR（n=8-20 只大鼠 / 组）。图 6B 显示在 EtOH 注射 30 分钟前施用 DHM 消除了 EtOH 诱导的 LORR；而在 EtOH 诱导的 LORR（用黑线指示）30 分钟后，注射 DHM 降低了 LORR 的残余（n=5-10 只大鼠 / 组）。图 6C 显示 EtOH 和 DHM（3mg/kg，E+D3）的共同注射大大降低了 EtOH 诱导的 LORR。氟马西尼（10mg/kg，F10）、EtOH 以及 DHM 的同时注射（E+D3+F10）逆转了 DHM 的作用。当 DHM 的剂量增加到 10mg/kg（E+D10+F10）时，氟马西尼部分地逆转了 DHM 的作用。当氟马西尼的剂量增加到 30mg/kg（E+D10+F30），观察到 DHM 的更强的拮抗作用。氟马西尼和 EtOH（E+F10）的共同注射没有改变 LORR 持续时间（n=5-6 只大鼠 / 组，†，p<0.05，相对于盐水组，*，p<0.05，相对于 EtOH 组）。

[0028] 图 7 显示了在大鼠中的高剂量 DHM 和氟马西尼对 LORR 的影响。100mg/kg 或 300mg/kg 的 DHM（腹膜内注射）诱导了很短的 LORR 持续时间，以 30 和 200mg/kg 氟马西尼腹膜内注射没有诱导 LORR。

[0029] 图 8 显示了在 EtOH 诱导的 LORR 过程中的血浆 [EtOH] 测定的结果。X 轴显示了在腹膜内注射 EtOH（3g/kg）或共同施用 DHM（1mg/kg 和 10mg/kg）与 EtOH（E+D）之后的血液取样时间点（n=3-4 只大鼠 / 组，*，p<0.05，相对于 EtOH 组，双向 RM 方差分析）。

[0030] 图 9 显示 DHM 拮抗了 EtOH 诱导的 $GABA_AR$ 增强，并且该作用被氟马西尼阻断。图 A 显示了来自大鼠海马 DGC 的全细胞电压钳（-70mV）记录（左）以及叠加的平均 mIPSC（右）。灰色虚线代表在所有 $GABA_AR$ 电流被印防己毒素（PTX，一种 $GABA_AR$ 拮抗剂，100μM）完全阻断后的平均电流，该电流作为用于计算 $GABA_AR$ 介导的 $I_{强直}$的幅值的基线。EtOH（60Mm，E）的浴应用（bath application）增加了 $I_{强直}$和 mIPSC。DHM（0.3 和 1.0μM）拮抗了这些 EtOH 效应。图 B 总结了响应于 EtOH 和 DHM 的 $I_{强直}$面积。图 C 显示了响应于 EtOH 和 DHM 的 mIPSC 面积。图 D 是记录自 DGC 的样品跟踪（左）和叠加的平均 mIPSC（右）。DHM（3μM）对急性 EtOH 诱导的 $GABA_AR$ 增强的拮抗作用被 10μM 氟马西尼逆转。图 E 是响应于 EtOH、

DHM 以及氟马西尼的 $I_{强直}$面积的总结。图 F 是响应于 EtOH、DHM 以及氟马西尼的 mIPSC 面积的总结。n=4-6/ 组。*，p<0.05，相对于药物 0；†，p<0.05，相对于 EtOH，双向 RM 方差分析。

[0031] 图 10 显示了 DHM 是一种 $GABA_AR_S$ 在苯二氮卓位点的正向调节剂。图 A 显示了来自大鼠的海马 DGC 的全细胞电压钳(-70mV)记录(左)以及叠加的平均 mIPSC(右)。图 B 是被 DHM (从 0.1μM 到 30μM)增强的 $I_{强直}$的总结(n=4-5.*，p<0.05，相对于药物 0，单因素 RM 方差分析)。图 C 是被 DHM (从 0.1μM 到 30μM)增强的 mIPSC 面积的总结(n=4-5.*，p<0.05，相对于药物 0，单因素 RM 方差分析)。图 D 显示了来自在 DIV14 的(DIV：在体外的天数)培养的海马神经元的全细胞电压钳(-70mV)记录。DHM (1μM，D1)增强的 $GABA_AR$ 介导的 $I_{强直}$和 mIPSC 被氟马西尼(F，10μM 和 100μM)逆转。所有 $GABA_AR$ 电流被荷包牡丹碱($GABA_AR$ 拮抗剂，Bic，10μM，灰色虚线)阻断。$I_{强直}$(图 E)以及 mIPSC (图 F)的 DHM (1μM，D1)增强的总和(给药前(0)的 %)，而氟马西尼浓度依赖性地抑制了它们(n=7，*p<0.05，相对于药物 0，单因素 RM 方差分析)。图 G 显示 DHM 抑制了结合在大鼠皮层膜匀浆中的 [^{3}H] 氟硝西泮(flu)。增加 DHM (0.03-100μM)的终浓度导致在皮层结合位点的 [^{3}H] 氟硝西泮(终浓度为 1nM)的移位。结果用 GraphPad Prism4.0 绘制并且呈现为两次实验的平均值(每个点做三次重复，n=2)。

[0032] 图 11A 至 11D 显示 DHM 以一种浓度依赖性的方式增强了在来自大鼠的在 DIV14 的原代培养的海马神经元中的 $GABA_AR$ 介导的抑制。DHM 以一种浓度依赖的方式增强了 $GABA_AR$ 介导的抑制。在 DIV14 的培养的神经元是在 -70mV 下电压钳制的全细胞。DHM 对 $I_{强直}$(图 11A)和 mIPSC (图 11B)的剂量反应曲线(n=9-10 个神经元 / 组)。图 11C 显示了来自培养的海马神经元的样品跟踪，显示 DHM (1μM)增强了由 10μM 和 300μM GABA 的局灶胀泡(focal puff)激发的 $GABA_AR$ 电流。图 11D 显示了由 GABA 的局灶胀泡诱导的 $GABA_AR$ 电流的浓度反应曲线被 DHM 左移(0.3 和 1μM，n=5-9 个神经元 / 组，*，p<0.05，相对于 DHM0，单因素方差分析)。

[0033] 图 12A-12E 显示 DHM 防止了 EtOH 戒断症状并且在大鼠海马中拮抗了 EtOH 暴露 / 戒断诱导的 $GABA_AR\alpha4$ 亚基表达的改变。向 4 组大鼠注射(腹膜内)单剂量载体、EtOH (3g/kg，E)、EtOH 加上 DHM (1mg/kg，E+D)、或单独的 DHM (图 12D)。在戒断 48 小时之后：图 12A 通过高架十字迷宫(EPM)测量焦虑。E 组在开放臂中花费较短的时间而在封闭臂中花费较长的时间。E+D 组在两种臂中花费的时间和载体组相似；图 12B 显示了通过 LORR 测量的耐受性。E 组显示出显著较短的急性 EtOH 诱导的 LORR 的持续时间。E+D 组显示在 LORR 方面与载体组相比没有差异；图 12C 显示 E 组增加了 PTZ 诱导的发作持续时间。E+D 组显示与载体组相似的 PTZ 诱导的发作。在所有三组测定中，D 组与载体组相比未显示出差异(n=5-13 只大鼠 / 组)。图 12D 显示了来自用载体、EtOH、E+D 或者 DHM 管饲的大鼠的海马组织 $GABA_AR\alpha4$ 亚基在戒断 48 小时之后的蛋白质印迹。β 肌动蛋白被显示为内参照(loading control)。图 12E 显示了来自图 12D 的实验的总 α4 亚基蛋白质的定量。EtOH 戒断诱导了 $\alpha4GABA_AR$ 亚基的增加，而 E+D 治疗防止了这种增长。DHM 在 $\alpha4GABA_AR$ 亚基蛋白方面未产生变化(n=3 只大鼠 / 组，*，p<0.05，相对于载体治疗，单因素方差分析)。□ = 载体，■ =EtOH，▨ =EtOH+DHM，▩ = DHM。

[0034] 图 13 显示 DHM 抑制了在大鼠海马 DGC 中的 EtOH 暴露 / 戒断诱导的 $GABA_AR$ 功能

性可塑性。将大鼠分为 4 组，并且用载体、EtOH（5g/kg，E）、EtOH 联合 DHM（1mg/Kg，E+D）或 DHM（图 D）的任何之一管饲。在戒断 48 小时之后，在海马切片中的 DGC 上进行膜片钳记录。图 A 显示了急性 EtOH（60mM）增强了载体治疗大鼠中的 $I_{强直}$和 mIPSC。图 B 显示在 EtOH/ 戒断组中，EtOH 没有增加 $I_{强直}$但它大大地增强了 mIPSC 面积。图 C 显示在 E+D 组中，EtOH 增加了 $I_{强直}$和 mIPSC，与载体组中的那些相似。图 D 显示来自 DHM 组的 $I_{强直}$和 mIPSC 对 EtOH 的反应与载体组中的那些类似。图 E 和 F 显示，与在载体组中一样，唑吡坦（ZP，一种苯二氮卓激动剂，0.3μM）增强了 DHM 组中的 $I_{强直}$和 mIPSC；但它对 EtOH 组中的 $GABA_AR$ 电流没有影响。图 G 显示了 EtOH 对 4 组中的 $I_{强直}$影响的总和。图 H 显示了 EtOH 对 4 组中的 mIPSC 影响的总和。图 I 显示了唑吡坦在 4 组中对 $I_{强直}$影响的总和，并且图 J 显示了在 4 组中的 mIPSC 面积的总和（n=4-7 只大鼠 / 组，*，$p<0.05$，相对于药物 0；†，$p<0.05$，相对于载体组，双向 RM 方差分析）。

[0035] 图 14A-14D 显示了 DHM 增强了预暴露于乙醇的培养的海马神经元中的 $GABA_AR$ 介导的抑制；DHM 和 EtOH 的共同给予防止了体外 EtOH 诱导的 $GABA_AR$ 的可塑性。与图 11A 和 11B 相比较，在培养的海马神经元（DIV13-14）暴露于 EtOH（60mM，30 分钟）之后，DHM 仍然能够浓度依赖性地没有耐受地增强 $GABA_AR$ 介导的 $I_{强直}$（图 14A）和 mIPSC 面积（图 14B）两者（n=8-9 个神经元 / 组，*，$p<0.05$，相对于药物 0，单因素方差分析）。图 14C 显示 EtOH 和 DHM 的共同给予防止了 EtOH 诱导的 $GABA_AR$ 可塑性。在用载体、EtOH、E+D 以及 DHM 治疗之后的 24 小时后检测的代表性蛋白质印迹显示了在培养的海马神经元中（DIV13-14）的 $GABA_AR\alpha4$ 亚基的相对于总表达（tol）的细胞表面表达（sur）。β - 肌动蛋白被显示为内参照，并且在细胞表面上未检测到。图 14D 显示了表面 $GABA_AR\alpha4$ 蛋白（载体的 %）的定量。将表面信号标准化为对应的 β 肌动蛋白信号（载体 =100%）。EtOH 在 $GABA_AR\alpha4$ 蛋白的表面表达中诱导了 1.5 倍的增加，而 E+D 防止了这种增加（n=5/ 组，*，$p<0.05$，相对于载体，单因素方差分析）。

[0036] 图 15A 和 15B 显示通过加入 DHM 完全防止了在双瓶选择范例中增加的 EtOH 消耗。图 15A 显示在暴露于间歇性接触 20%EtOH 的 EtOH/ 水的组中，EtOH 消耗快速增加。DHM（0.05mg/ml）和 EtOH（E+D/ 水）的共同给予消除了这种增加。这些标志是平均 EtOH 摄入量（g/kg/24 小时）±SEM。在 4 周之后，E/ 水组被分成两个亚组；一组继续间歇性接触 EtOH；而另一组间歇性接触 E+D。而 E/ 水组保持着高水平的 EtOH 消耗，E+D/ 水组在三个剂量的 DHM 中显示出在 EtOH 消耗方面的大大降低，并且到第四个剂量的 DHM 时在 EtOH 消耗方面变得相似。注意的是，在水 / 水组和 D/ 水组之间的溶液消耗没有显著差异（n=6-8 只大鼠 / 组 .*，$p<0.05$，E+D/ 水组相对于 E/ 水组；†，$p<0.05$，从第 5 周的 E+D/ 水组相对于第 5、6 和 7 周的 E/ 水组；双向 RM 方差分析，继之为纽曼 - 科伊尔斯事后检验）。图 15B 显示了在第 5 周测量的血浆 [EtOH]（n=2-5 只大鼠 / 组，*，$p<0.05$，相对于 EtOH 组，学生 t- 检验）。

[0037] 发明详细说明

[0038] 本发明是针对用于治疗、抑制和 / 或减轻酒精（乙醇，EtOH）中毒、从酒精暴露和酒精滥用戒断的方法和组合物，包括给予二氢杨梅素（DHM）。

[0039] DHM 可以从枳椇子（Hovenia dulcis））中获得。含有北枳椇提取物以及纯化的 DHM 的草药疗法被用来改善由酒精以及其他化学品诱导的肝损伤，改善酒后宿醉的症状，以及减轻酒精中毒。参见卡瓦依 K（Kawai K）等人（1977），Experientia33(11):1454）；哈泽 K

(Hase K)等人(1997),Biol Pharm Bull20:381-385);Yoshikawa 等人(1997),Yakugaku Sasshi117(2):108-118);Ji Y 等人(2001),《中药材》(Zhong Yao Cai)24:126-128);Ji Y 等人(2002),《中药材》(Zhong Yao Cai)25:190-191);Chen SH 等人(2006),《中药材杂志》(Zhongguo Zhong Yao Za Zhi)31:1094-1096);Liu XL 等人(2006),《中药材杂志》(Zhongguo Zhong Yao Za Zhi)31:1097-1100);Fang HL 等人(2007),《美国中医药杂志》(Am J Chin Med)35:693-703);Hussain RA 等人(1990),《民族药物学杂志》(J Ethnopharmacol)28(1):103-115);Yoshikawa K 等人(1993),《植物化学》(Phytochemistry)34:1431-1433);Yoshikawa M 等人(1996),Chem Pharm Bull(东京)44:1454-1464);Wang Y 等人(1994),《中草药》(China Trad Herbal Drugs)25:306-307);以及 Kim K 等人(2000)《韩国医学作物科学杂志》(Korean J Med Crop Sci)8:225-233。

[0040] 然而,在本发明之前,DHM 和/或任何枳椇子提取物是否能够调节由酒精暴露引起的 $GABA_AR$ 可塑性是未知的。事实上,在本发明之前,还没有研究证实 DHM 和/或任何枳椇子提取物对 $GABA_AR_S$ 的影响。另外,现有技术研究不一定涉及慢性酒精暴露的情况,这样可以说现有技术研究固有地传授或暗示了给予 DHM 和/或枳椇子提取物来治疗、抑制和/或逆转由于酒精暴露引起的部分或全部 $GABA_AR$ 可塑性。

[0041] 除了二氢杨梅素之外,许多种黄酮类,如杨梅树皮素、槲皮素(quercitin)、hovenitin、西伯利亚落叶松黄酮(laricitrin)、芹菜苷元等等,发现于枳椇子和其他植物中(例如,野葛),并且它们的提取物被用于多种病症的草药疗法中。黄酮类相对于酒精暴露的许多有益效果是它们的抗氧化性能的结果。因此,DHM 或任何枳椇子的化合物或提取物对由慢性酒精暴露引起的 $GABA_AR$ 可塑性是否有影响或者 DHM 和枳椇子提取物的有益效果是否仅仅是抗氧化活性的结果是未知的。另外,虽然我们诸位发明人相信一定量的 DHM 可能会穿过血脑屏障,但这些量是否对 $GABA_AR_S$ 有影响是未知的,因为许多黄酮类和抗氧化剂对 $GABA_AR_S$ 没有影响。因此,我们进行了如在此所描述的各种实验。如在此所提供的,该实验显示:

[0042] 1)DHM (1mg/kg)有效消除了 EtOH 中毒。因此,本发明提供了用于治疗、抑制、减轻受试者中的 EtOH 中毒的方法,包括向对有需要的受试者给予 DHM。在一些实施例中,DHM 是在暴露于 EtOH 之前、期间和/或之后给予的。在一些实施例中,DHM 是与 EtOH 一起给予的。例如,DMH 被加到一种包含 EtOH 的组合物(例如一种食品,如饮料)中,然后向受试者给予该组合物。在一些实施例中,EtOH 中毒是急性 EtOH 中毒。

[0043] 2)DHM 改善了 EtOH 暴露/戒断诱导的行为改变,包括 a)对 EtOH 的耐受性;b)基础焦虑增加;以及 c)对 PTZ 诱导的发作(过度兴奋)的超敏感性。因此,本发明提供了用于治疗由于从 EtOH 暴露戒断引起的症状的方法,包括向对其有需要的受试者给予 DHM。在一些实施例中,DHM 是在暴露于 EtOH 之前、期间和/或之后给予的。在一些实施例中,该症状选自下组,该组以下各项组成:对 EtOH 的耐受性、基础焦虑增加、以及过度兴奋。

[0044] 3)DHM 防止了受试者中 EtOH 消费的增加。因此,本发明提供了用于抑制、降低或防止受试者自愿消费更多的 EtOH,包括向受试者给予 DHM。在一些实施例中,DHM 是在 EtOH 消费之前、期间和/或之后给予的。在一些实施例中,DHM 是与将被消费的 EtOH 一起给予的。例如,DMH 被加到一种包含 EtOH 的组合物(例如一种食品,如饮料)中,然后向受试者给予该组合物。

[0045] 4）DHM 不引起中毒、镇静或麻醉现象。因此，本发明提供了用于治疗、减轻或抑制受试者中的由于暴露于 EtOH 而引起的警觉性的下降，包括向受试者给予 DHM。在一些实施例中，DHM 是在暴露于 EtOH 之前、期间和 / 或之后给予的。在一些实施例中，DHM 是与 EtOH 一起给予的。例如，DMH 被加到一种包含 EtOH 的组合物（例如一种食品，如饮料）中，然后向受试者给予该组合物。

[0046] 在此披露的实验还显示：a）DHM 的消除作用在体内和在体外被氟马西尼拮抗，并且 DHM 竞争性地抑制 [^{3}H] 氟硝西泮结合到 $GABA_AR_S$ 的苯二氮卓位点；b）DHM 拮抗了急性 EtOH 诱导的 $GABA_AR_S$ 的增强；c）DHM 拮抗了 EtOH 诱导的在 $GABA_AR_S$ 对急性 EtOH 的反应性方面的改变（包括 $I_{强直}$ 调节的丧失以及增加的 mIPSC 敏感性）；d）DHM 增强了在海马切片和培养的神经元中的 $GABA_AR_S$，并且即使在 EtOH 暴露 / 戒断之后仍保持增强 $GABA_AR_S$ 的功效（诱导对 EtOH 的耐受性）；以及 e）DHM 阻断了 EtOH 暴露 / 戒断诱导的在大鼠海马中 $GABA_AR\alpha4$ 亚基的量的增加。换言之，DHM 增强了与 EtOH 暴露相关的 $GABA_AR_S$ 的活性，拮抗了 EtOH 对相应的 $GABA_AR_S$ 的作用，并且结合到 $GABA_AR_S$ 的苯二氮卓位点上。如在此所使用的，“增强”表示引起 $GABA_AR_S$ 活性和 / 或效力的增加。

[0047] 出人意料地，在此的实验还显示 DHM 抑制、降低、以及甚至逆转了由暴露于 EtOH 引起的 $GABA_AR_S$ 的可塑性。如在此所使用的，受体的“可塑性”表示该受体的在亚基组成方面的变化。如在此所使用的，关于本发明，“$GABA_AR$ 可塑性”是指 $GABA_AR_S$ 的在亚基组成方面的变化。暴露于 EtOH 引起含有 α4βδ 亚基的 $GABA_AR_S$ 将被内化。当 α4 亚基返回到突触后膜时，δ 亚基的位置被改变了，这样 δ 亚基就不再与 α4 亚基结合，因此导致了 $GABA_AR$ 的可塑性，与 EtOH 暴露之前相比 α4 亚基在突触后膜的增加。如在此所示的，DHM 抑制、降低、逆转和 / 或防止了由暴露于 EtOH 引起的 $GABA_AR$ 的可塑性。这些结果是出人意料的，因为直到本发明为止，还不存在已知的抑制、降低、逆转和 / 或防止由 EtOH 暴露引起的 $GABA_AR$ 可塑性的化合物或组合物。在此的实验结果是尤其是出人意料的，这是鉴于这样的事实，即，其他的与 DHM 相似的黄酮类（例如大豆甙和槲皮素）未呈现出与 DHM 相同或相似的活性，即增强 $GABA_AR_S$、拮抗 EtOH 作用、以及结合 $GABA_AR_s$ 的苯二氮卓位点。

[0048] 因此，本发明提供了用于治疗、抑制、降低、逆转和 / 或防止由暴露于乙醇引起的 $GABA_AR$ 的可塑性的方法，包括向脑组织给予作用于 $GABA_AR_S$ 的 DHM。如在此所使用的，“由 EtOH 暴露引起的 $GABA_AR$ 可塑性”是指如由以下文献所描述的 $GABA_AR$ 的可塑性：Liang 等人（2007），《神经科学杂志》（J Neurosci.）27(45):12367-77）；Zucca S 和 Valenzuela CF（2010），《神经科学杂志》30(19):6776-81）；以及 Shen 等人（2011），《分子药理学》（Mol Pharmacol.）79(3):432-42。在本发明的一些实施例中，给予的 DHM 的量是有效量。如在此所使用的，DHM 的“有效量”是与对照相比导致所希望的效果的量，即治疗、抑制、降低和 / 或逆转由暴露于乙醇引起的 $GABA_AR$ 可塑性，或增强 $GABA_A$ 受体的活性，或拮抗乙醇对 $GABA_A$ 受体的活性的量。例如，一个逆转由暴露于 EtOH（包括慢性间歇性暴露和单剂量暴露）导致的部分或全部 $GABA_AR$ 的可塑性的 DHM 的有效量是增加具有一种基本上与相应的天然 $GABA_AR_s$ 相似或相同的组成和 / 或活性的 $GABA_AR_S$ 的量。

[0049] DHM 的“治疗有效量”是这样一个量，当给予受试者时，该量足以治疗、抑制、降低和 / 或逆转由暴露于 EtOH 引起的 $GABA_AR$ 的可塑性，或增强 $GABA_AR$ 的活性，或者拮抗在受试者中的乙醇对 $GABA_AR$ 的活性，使得该受试者的病症与该受试者在治疗之前或与对照受试者

相比较可观察到改进。同样，如在此所使用的，DHM 的“治疗有效量”是这样一个量，当给予受试者时，与对照相比，该量治疗受试者中的给定的临床病症，例如乙醇中毒、戒酒综合征的至少一个症状、酒精使用障碍、或酒精滥用。典型地，DHM 的治疗有效量可以每天以大约 0.002 到大约 200mg/kg 的剂量口服或静脉给药，优选大约 0.1 到大约 100mg/kg，例如大约是体重的 1mg/kg。

[0050] 通常，0.01 到 10mg/kg 的剂量被分为每天一到四次剂量，或者以持续释放的制剂给予对获得所希望的药理效应是有效的。然而，将被理解的是，对于任何特定的受试者，具体的剂量水平将取决于各种各样的因素，包括所采用的具体化合物的活性、年龄、体重、健康状况、性别、饮食、给药时间、给药途径以及排泄率、联合用药以及特定疾病和 / 或病症的严重性。给药的频率也可以取决于特定的待治疗的疾病和 / 或病症而变化。还应当理解的是，治疗的有效剂量在特定的治疗过程中可以增加或减少。通过本领域已知的临床技术中的标准诊断测定，剂量的变化可以产生并且变得清楚。在一些情况下可能需要长期给药。DHM 的有效量和治疗有效量可以通过本领域已知的常规方法由一位普通技术人员容易地确定。

[0051] 在一些实施例中，DHM 的有效量可以呈一种食品的形式给予，如饮料。在一些实施例中，该饮料含有可以由发酵的谷物（例如，威士忌酒、波本酒、黑麦酒、伏特加酒、杜松子酒和 / 或啤酒）、发酵的水果（如葡萄酒、白兰地、雪利酒和科涅克白兰地）、甘蔗和 / 或甜菜（例如朗姆酒）、和 / 或发酵的龙舌兰头（龙舌兰酒）制成的酒精。在一些实施例中，DHM 的有效量可以以一种口香糖组合物的形式给予。

[0052] 本发明的药物制剂包括分次剂量或单剂量的 DHM 并且可以制备成单位剂量的形式和 / 或适于所希望的给药方式的包装。本发明的药物制剂可以针对治疗通过任何适合的途径来给药，包括口服、直肠、经鼻、局部（包括含服和舌下）、皮肤、粘膜、阴道以及肠胃外（包括皮下、肌内、静脉内和皮内）。将被理解的是，优选的途径将随着接受者的病症和年龄、将被治疗的病症的性质而变化。例如，在一些实施例中，可以以透皮贴剂或泡腾片（例如，一种包含有效量的 DHM、一种碳酸盐如碳酸氢钠、一种酸性物质如柠檬酸的片剂，当被溶解于一种液体如水中时导致泡腾）的形式向受试者给予治疗有效量的 DHM。

[0053] 在一些实施例中，对于人类受试者的 DHM 的单位剂量是大约 50-70mg。因此，在一些实施例中，根据本发明的食品、透皮贴剂、口香糖和 / 或泡腾片包含大约 50-70mg 的单位剂量。

[0054] 实验

[0055] 动物和材料

[0056] 实验动物管理与使用委员会批准了所有的动物实验。雄性和雌性 Sprague-Dawley(SD) 大鼠（250-300g）在动物饲养所中在 12 小时的光照 / 黑暗周期下养殖，并且可以随意接近食物和水。

[0057] 二氢杨梅素（DHM，(2R,3R)-3,5,7- 三羟基 -2-(3,4,5- 三羟基苯基)-2,3- 二氢苯并吡喃 -4- 酮)）购自中国上海的 ZR 化学公司（ZR Chemical）（CAS 号 27200-12-0，通过 HPLC 纯化为 98%）。氟马西尼、印防己毒素以及荷包牡丹碱购自西格玛公司（Sigma）。

[0058] 统计分析

[0059] 如所指示的，数据来自神经元培养物和 / 或大鼠的至少三种独立的制剂。使

用 Sigmaplot（Windows 版本 10.1）和 SigmaStat（Windows 版本 3.5）来进行数据显示和统计分析。数据表示为平均值 ±SEM。通过基于邓尼特(Dunnett）或纽曼 - 科伊尔斯(Newman-Keuls）事后对比分析的单因素或双因素重复测量(RM）方差分析、以及学生 t- 检验来确定在治疗组与载体组之间的显著性差异。

[0060] DHM 阻断急性 EtOH 中毒并且防止 EtOH 戒断症状

[0061] 在大鼠中进行的代谢研究表明，没有由 DHM（口服给药，1mg/kg）给药诱导的代谢变化(对于食物和水的摄取、尿量和粪便量）(数据未显示)。

[0062] 使用本领域已知的标准 LORR 测定来检验 DHM 对大鼠中 EtOH 诱导的 LORR 的影响。参见 Kakihana R 等人(1966)，《科学》(Science)154(756):1574-1575)。简言之，在药物注射之后，将大鼠以仰卧位置于一个 V 形支架中。从药物注射(腹膜内注射)的终点获得 LORR 起始时间。当动物可以在 30 秒内翻转三次时，LORR 持续时间结束。盲法进行 LORR 测定。LORR 持续时间以平均(min）±SEM 的形式报告。

[0063] 在对照组中，EtOH（3g/kg，腹膜内注射）诱导了 72±2 分钟的 LORR（用盐水预治疗，20mL/kg，在 EtOH 注射之前 30 分钟腹膜内注射)。用 DHM（1mg/kg，在 EtOH 注射 30 分钟之前腹膜内注射）预治疗，EtOH 诱导的 LORR 被降到了 8±4LORR（对照的 10.6±5.9%，图 1A，$p<0.05$)。在 EtOH（3mg/kg，腹膜内注射）给予 30 分钟之后用 DHM（1mg/kg，腹膜内注射）治疗引起 LORR 从 79±2 下降到 49±2（图 1B)。具体地说，从 DHM 注射开始(在图 1B 中的红色虚线)，LORR 持续时间从 51±2 分钟被减少到 21±2 分钟(对照组的 41.2±3.8%，$p<0.05$)。EtOH（3mg/kg，腹膜内注射)和 DHM（1mg/kg，腹膜内注射)的共同给予将 EtOH 诱导的 LORR 持续时间显著地减少到 0.7±0.4 分钟(对照的 1.2±0.6%，图 1C，$p<0.05$)。单独的 DHM 不诱导 LORR（图 1C)。这些结果表明当在给予 EtOH 之前、期间和 / 或之后给予 DHM 时，DHM 拮抗了急性 EtOH 中毒。

[0064] 检验了 DHM 对单剂量 EtOH 中毒和戒断的影响。用盐水(20ml/kg，载体)、EtOH(3g/kg)、EtOH+DHM (注射 EtOH 之后 30 分钟，1mg/kg)、或单独的 DHM (1mg/kg)腹膜内注射大鼠。在 48 小时的戒断时期之后，进行 EtOH 诱导的 LORR 测定(EtOH，3g/kg，腹膜内注射)。通过单剂量 EtOH 中毒 / 戒断显著减少了 LORR 持续时间，即 9±3 分钟(相对于 58±5 分钟(载体))。这表明 EtOH 戒断诱导了 EtOH 耐受性。用 EtOH 进行的 DHM 后治疗显著地抑制、减轻和 / 或防止了由于 EtOH 戒断产生的 LORR 持续时间的降低(图 1D，$p<0.05$)。LORR 持续时间(min)：分别为 EtOH+DHM61±4 和 DHM61±4。这表明 DHM 抑制、降低和 / 或防止了 EtOH 戒断诱导的 EtOH 耐受性。

[0065] 还测量了大鼠中戊四氮(PTZ)诱导的发作。在距离载体(盐水，20ml/kg，腹膜内注射)、EtOH（3g/kg，腹膜内注射)、DHM+EtOH（1mg/kg+3g/kg，腹膜内注射）或者 DHM（1mg/kg，腹膜内注射)治疗的戒断 24 小时之后，检测到大鼠 PTZ 诱导的发作。在本研究中使用的 PTZ 剂量(在盐水中，42mg/kg)被确定为诱导 75% 初次接受试验的大鼠的发作的剂量。简言之，在 PTZ 的腹膜内注射之后，如先前描述测定了开始的时间和强直阵挛发作的持续时间。进行动物行为实验的研究者对治疗组是不知情的。对于任何测定，这些动物只使用一次。

[0066] EtOH 戒断将 PTZ 发作持续时间从 1.7±0.8 分钟(载体)显著地增加到 8.1±1.2 分钟(图 1E，$p<0.05$)。这表明 EtOH 戒断增加了发作的易感性。DHM 和 EtOH 的共同给予显著地消除、减少、和 / 或抑制了 PTZ 发作持续时间的增加(减少到 0.9±0.2 分钟)。单独用 DHM

预治疗没有诱导发作持续时间的任何显著的或可观察的变化。DHM 也显著地消除、减少、和/或抑制了发作持续时间的增加(图 1F)。与载体组(85%)相比,EtOH 戒断将发作发生率增加至 100%,而 DHM 抑制、降低和/或防止了这种增长(85%)。这些结果表明 DHM 改善了 EtOH 戒断诱导的发作易感性和过度兴奋的增加。

[0067] 这些发现表明 DHM 有效地抑制、减轻、和/或防止了急性 EtOH 中毒、EtOH 暴露/戒断诱导的 EtOH 耐受性、以及 EtOH 戒断诱导的过度兴奋。

[0068] DHM 防止了单剂量 EtOH 中毒诱导的 $GABA_AR$ 可塑性

[0069] 为了确定 DHM 是否防止了 EtOH 中毒诱导的对急性 EtOH 的 $GABA_AR$ 敏感性的改变,用来自在戒断 48 小时的大鼠海马切片中的齿状回颗粒细胞(DGC)的全细胞膜片钳记录检验了 DHM 对 EtOH 戒断诱导的 $GABA_AR$ 功能性改变的影响。

[0070] 用振动切片机(VT100,国际技术产品公司,圣路易斯,密苏里州(VT100,Technical Products International,St.Louis,MO))以及本领域已知的标准技术获得背侧海马的横切片(400μm)。用人工脑脊液(ACSF)连续灌注这些切片。参见 Liang J 等人(2007),《神经科学杂志》(J Neurophysiol)27:12367-12377)。

[0071] 在用人工脑脊液(ACSF,125mM NaCl、2.5mM KCl、2mM $CaCl_2$、2mM $MgCl_2$、26mM $NaHCO_3$、以及 10mM D-葡萄糖)灌注的过程中,在 34° C±0.5° C 下从位于在 -70mV 的保持电位的 DG 层的细胞获得全细胞膜片钳记录。用 95% 的 O_2-5%CO_2 使 ACSF 连续鼓泡以确保薄片的充分氧合和 7.4 的 pH。从具有 7.5MΩ-9MΩ 的电阻的薄壁硼硅酸盐玻璃移液管中拉出贴片电极,并用移液管溶液充满(即,137mM CsCl、2mMMgCl_2、1mM $CaCl_2$、11mM EGTA、10mM HEPES 和 3mM ATP,用 CsOH 调节 pH 至 7.30)。用 Axopatch700B 放大器(分子仪器,森尼韦尔,(Sunnyvale),CA)以电压钳模式记录信号。在电气补偿大约 70% 之前全细胞接入电阻在 <25MΩ 的范围内。在电压钳记录过程中,通过测量响应于 5mV 单步命令的的电容瞬态大小来监测接入电阻,并且如果遇到 >20% 的变化就弃去数据。在开始 mIPSC 记录之前,允许用胞内环境平衡移液器溶液至少 10 分钟。将胞内信号在 3kHz 下低通滤波,并且用 Digidata1440A 和软件 CLAMPEX10 (分子仪器)在 20kHz 的采样频率下采集数据。

[0072] 如前所述,记录药理学分离的 $GABA_AR$ 介导的 mIPSC ((Liang(2007)) 和 (Shen(2011)))。对于 GABA 浓度反应曲线,使用 Valvelink8.02 快速交换灌注系统(AutoMate Scientific 公司,美国)通过可移除的移液管尖在将 GABA、DHM、或地西泮急性施用到神经元上的过程中记录激发的 $GABA_AR$ 电流。使用 Clampfit (版本 9.0,分子仪器,(Version9.0,Molecular Devices))和 MiniAnalysis Program (版本 6.0.7,Synaptosoft,德卡特(Decatur),GA)分析数据。

[0073] 使用 MiniAnalysis program (Synaptosoft,德卡特,GA)来分析 mIPSC。$I_{强直}$为一个给定的记录时间段的平均基线电流。将 $I_{强直}$幅值计算为在给予印防己毒素(100μM)或荷包牡丹碱(10μM)之前和之后测量的保持电流之间的差异。参见 Wei 等人(2004),《神经科学杂志》(J Neurosci)24,8379-8382);Liang (2007)和 Shen (2011)。简言之,将这些记录在 2kHz 离线低通滤波(Clampfit 软件)。用 8pA 幅值和 20pA*ms 电荷转移的阈值标准检测 mIPSC(Mini Analysis Program,版本 6.0.7)。在给定的 100 秒记录时期中从所有自动检测事件中确定 mIPSC 的频率。对于动力学分析,在这些记录跟踪的目测过程中只选择具有稳定基线、急剧上升期(10% 到 90% 的上升时间)、以及指数式衰减的单事件 mIPSC。

排除掉双峰和多峰的 mIPSC。在每个实验条件下，记录至少 100 个单独的 mIPSC 事件。在每个单元中，根据与半上升时间对齐的平均选择单事件的分析获得 mIPSC 动力学。通过将双指数与该平均的 mIPSC 的下降期的拟合而获得衰减时间常数。从一个给定的记录时间段的平均基线电流获得 $I_{强直}$ 大小。将 $I_{强直}$ 幅值计算为在施用印防己毒素（50 μ M）或荷包牡丹碱（10 μ M）之前和之后测量的保持电流之间的差异。参见 Liang 等人（2007）；Shen（2011）；Hamann（2002）；以及 Mangan PS 等人（2005），《分子药理学》（Mol Pharmacol）67(3):775-788）。进行这些记录和 mIPSC 分析的研究者对于大鼠接受的治疗（载体、EtOH、E+D、或 D）是不知情的。

[0074] 来自 EtOH 治疗的大鼠的神经元的记录揭示，通过急性 EtOH 施用（60mM），$I_{强直}$ 增强丧失（图 13A、图 3B、图 13G）（$I_{强直}$ 从 14.0±2.1 到 14.3±2.8pA，相对于载体：28.2±4.5 到 62.1±3.0pA；图 2A $p<0.05$），并且 mIPSC 的 EtOH 易感性增加（增加 58.5%±20.0%，相对于载体对照：16.9%±4.1%（图 13H，图 2B，$p<0.05$）。相比之下，来自 EtOH+DHM 治疗的大鼠的神经元的记录展现出对急性 EtOH 的反应性，该反应性与载体组的不能区别（图 13C）（$I_{强直}$ 从 27.9±3.0 增加到 61.3±2.3pA，mIPSC 增加了 18.0%±5.9%，图 13G、图 13H、图 2A、图 2B）。

[0075] 检验了来自大鼠海马的平行蛋白质印迹来确定 EtOH 是否诱导 $GABA_AR\alpha 4$ 亚基的总蛋白的变化。将来自大鼠的海马组织溶解在 RIPA 缓冲液中，该 RIPA 缓冲液含有 1%Triton X-100、0.1% 十二烷基硫酸钠（SDS）、50mM Na_3PO_4、150mM 的 NaCl、2mM 的 EDTA、50mM 的 NaF、10mM 焦磷酸钠、1mM 原钒酸钠、1mM 苯甲磺酰氟（PMSF）以及完全蛋白酶抑制剂混合物（罗氏）。将溶解产物离心 15 分钟（14,000xg，4° C），并收集上清液用于蛋白质印迹分析。使用兔抗 $GABA_AR\alpha 4$（aa379-421）和鼠抗 -P 肌动蛋白（西格玛公司）以及随后的 HRP 结合的第二抗体来进行蛋白质印迹。使用 ECL 检测试剂盒（Amersham）来检测条带，并且使用 ImageQuant5.2（分子动力学）通过光密度测量进行分析。用含有 62.5mM Tris-HCl、100mM β - 巯基乙醇以及 2%SDS 的缓冲液（pH6.7）来剥离这些条带，并重测（reprobe）数次。根据制造说明书用 BCA 蛋白分析试剂盒（Pierce）来测定蛋白浓度。

[0076] 图 12D 中显示了来自用载体、EtOH、E+D 或者 DHM 管饲的大鼠的海马组织 $GABA_AR\alpha 4$ 亚基在戒断 48 小时之后的蛋白质印迹。EtOH 暴露 / 戒断诱导了 $\alpha 4GABA_AR$ 亚基的增加，而 E+D 治疗防止了这种增长。单独的 DHM 对 $\alpha 4GABA_AR$ 亚基不产生变化（图 12D）。图 12E 显示了来自图 12D 的实验的总 α 4 亚基蛋白质的定量。这些结果显示，DHM 与 EtOH 的治疗可以抑制、降低和 / 或防止全部或部分 EtOH 戒断诱导的 $GABA_AR$ 可塑性。因此，本发明提供了治疗、抑制、降低和 / 或防止受试者中的 EtOH 暴露 / 戒断诱导的 $GABA_AR$ 的可塑性的方法，包括向受试者给予 DHM。

[0077] DHM 增强了 $GABA_AR$ 介导的电流，并且在初次接受试验的大鼠 DGC 中通过急性 EtOH 拮抗它们的增强

[0078] 如上所述，为了确定 DHM 的抗酒精作用是否是由于它与 $GABA_AR_S$ 的相互作用（$GABA_AR_S$ 代表了酒精作用的主要靶标），检验了急性 DHM 对来自初次接受试验的大鼠的海马切片中的 DGC 的 $GABA_AR$ 功能的影响。急性 DHM（0.3 μ M）以一种浓度依赖性方式将 $GABA_AR$ 介导的 $I_{强直}$ 从 17.5±4.9 增加到 29.0±6.7pA，延长了 mIPSC 衰减时间，并且增强了 mIPSC 在 DGC 中的总电荷转移（面积）（面积从 571±61 增加到 615±22fC）（图 3，图 a、a-1 和 a-2）。

[0079] 当分开施用时，EtOH 和 DHM 两者都增强了 $GABA_AR$ 介导的电流。然而，在 EtOH 存在

的情况下，DHM浓度依赖性地降低了EtOH诱导的$I_{强直}$增强（通过1μM的DHM，从43.8±1.8降低到32.0±2.0pA，图3，图b和b-1，$p<0.05$）。然而，当在DHM存在的情况下施用EtOH时，$I_{强直}$没有进一步的增强（通过60mM EtOH，从41.1±2.2到44.4±3.6pA，图3，图c和c-1）。

[0080] 这些数据表明DHM通过干扰EtOH诱导的$GABA_AR_S$的增强而拮抗EtOH中毒诱导的$GABA_AR$可塑性。因此，本发明提供了通过共同给予DHM和EtOH来拮抗EtOH诱导的$GABA_AR$可塑性的方法。因此，本发明还提供了通过在暴露于EtOH之前给予DHM来拮抗EtOH诱导的$GABA_AR$可塑性的方法。在一些实施例中，本发明提供了用于增强$GABA_AR$介导的电流的方法，包括给予DHM。

[0081] DHM和ETOH的共同给予防止在原代培养的海马神经元中的EtOH中毒诱导的$GABA_AR$可塑性

[0082] 为了确定DHM是否抑制、和/或防止在体外培养的神经元中的由EtOH诱导的$GABA_AR$可塑性，进行了以下实验。

[0083] 通过木瓜蛋白酶分解（沃辛顿生化（Worthington Biochemical），莱克伍德（Lakewood），新泽西（NJ））从18天胎龄大鼠制备海马神经元，并且在神经干细胞培养基和B27添加物（英杰公司（Invitrogen））中培养。如前所述，将培养物在37° C下在一个5%CO_2加湿培养箱中保持。参见Shen等人（2011），《分子药理学》（Mol Pharmacol）79:432-442）。

[0084] 如前所述，通过木瓜蛋白酶分解（沃辛顿生化（Worthington Biochemical），莱克伍德（Lakewood），新泽西（NJ））从18天胎龄SD大鼠制备海马神经元，并且在神经干细胞培养基和B27添加物（英杰公司（Invitrogen））中培养。参见Stowell JN和Craig AM（1999），《神经元》（Neuron）22(3):525-536）。简言之，从用异氟烷麻醉并用断头术实施安乐死的孕鼠中取出胚胎。切开海马并放到不含Ca^{2+}和Mg^{2+}的HEPES缓冲的Hank氏缓冲盐溶液（pH7.45）中。通过木瓜蛋白酶消化来解离组织，随后通过一个巴斯德吸管和木瓜蛋白酶抑制剂处理将其研磨。使细胞沉淀并且再悬浮于含有2%B27添加物（不含血清）、100U/mL青霉素、100μg/mL链霉素、0.5mM谷氨酰胺（均来自英杰公司）、以及10μM谷氨酸盐（西格玛公司）的神经干细胞培养基中。

[0085] 然后将解离后的神经元以0.3×10^5细胞/cm^2的密度铺板于24孔板的12mm的圆形盖玻片上（用于膜片钳记录）和/或以0.5×10^5细胞/cm^2的密度铺板于用多聚-D-赖氨酸（西格玛公司，50μg/ml）包被的6孔板上（用于蛋白质印迹和生物素酰化分析）。将培养物在37° C下在一个5%CO_2加湿培养箱中保持。此后，用含有2%B27添加物以及0.5mM谷氨酰胺的神经干细胞培养基每周更换两次三分之一到一半的培养基。

[0086] 在DIV13-14神经元之后（体外培养13-14天），培养的神经元的一半培养基用含有120mM EtOH（EtOH终浓度为60mM）、0.2μM DHM加上120mM EtOH、或只有0.2μM DHM（DHM对照，即没有EtOH）的神经干细胞培养基更换，持续30分钟，然后分别用一半新鲜的神经干细胞培养基加上一半初始培养基更换所有的培养基。对照神经元用用相应的载体治疗，如EtOH治疗的神经元一样的程序。鉴于之前的实验，选择60mM EtOH的浓度。参见Liang J等人（2007）。具体地说，60mMEtOH的浓度被选择用来处理培养的神经元，以便匹配在用5g/kg的管饲中毒之后的成年大鼠中测量的血液水平，产生了持续大约2-3小时的60mM血浆峰值[EtOH]，并且诱导了显著的$GABA_AR_S$可塑性和耐受性。

[0087] 将DIV14神经元（体外培养14天）用载体、EtOH、EtOH+DHM或单独的DHM处理，随

后戒断 24 小时。然后，在电生理记录之前立刻将生长在盖玻片上的细胞转移到一个灌注室中(华纳仪器(Warner Instruments))，然后用一个倒置显微镜(TE200，尼康(Nikon))观察。在 -70mV 的保持电位、在室温(22° C-25° C)下在电压钳模式下从培养的神经元获得全细胞膜片钳记录。用一种细胞外溶液(137mM NaCl、5mM KCl、2mM $CaCl_2$、1mM $MgCl_2$、20mM 葡萄糖以及 10mM HEPES (310-320 渗透压克分子(Osm)，用 NaOH 调节 pH 至 7.40))灌注细胞。用与切片记录中一样的内标溶液充满玻璃移液管，输入电阻为 4-7 MΩ。使用如上提及的同样的药理学方法记录 $GABA_AR$ 介导的 mIPSC。对于 GABA 浓度反应曲线，通过一个位于在神经元的胞体附近的可移除尖端用一种 Valvelink8.02 快速交换灌注系统(AutoMate Scientific，美国)，通过将 GABA 和 / 或 DHM 急性施用到培养的神经元上来记录激发的 $GABA_AR$ 介导的电流。使用 Multiclamp200B 放大器(分子仪器，美国)来放大电信号。在建立全细胞配置之后，在施用药物之前至少允许经过 10 分钟，以允许膜片稳定并且允许在记录电极与细胞质之间发生离子交换。用 pClamp 软件(版本 10.0，分子仪器，美国)获取数据，在 20kHz 下数字化(Digidata1440A，分子仪器)，并且使用 Clampfit 软件(版本 10.0，分子仪器)以及 Mini Analysis 程序(版本 6.0.7，Synaptosoft，德卡特，GA)使用本领域已知的方法进行分析。参见 Hamann M 等人(2002)，《神经元》(Neuron)33(4):625-633)；Stell BM 和 Mody I (2002)《神经科学杂志》(J Neurosci)22(10):RC223)；以及 Liang (2007)。

[0088] 如先前报道的，EtOH 暴露 / 戒断神经元在 $I_{强直}$ 幅值上显示出急剧降低(从在载体神经元中的 13.8±1.4pA 到 EtOH 神经元中的 5.6±1.0pA)，并且在对急性 EtOH 的反应性上急剧降低(EtOH 增强从载体神经元中的 109.6±15.7% 降到 EtOH 神经元中的 14.3±18.9%，图 4A，$p<0.05$)；而 EtOH 暴露 / 戒断神经元产生增加的针对 EtOH 神经元中的急性 EtOH 的 mIPSC 反应性(EtOH 增强从载体神经元中的 3.0±10.0% 增加到 33.7±14.9%)，图 4B，$p<0.05$)。参见 Shen(2010)。DHM 和 EtOH 的共同给予拮抗了在 $GABA_AR_S$ 中的这些作用(平均 $I_{强直}$ 幅值为 11.2±0.6pA，通过 EtOH 增加到 25.2±1.2pA，并且通过 EtOH 的 mIPSC 增强为 8.3±9.4%)；单独的 DHM 暴露 / 戒断不改变 $GABA_AR$ 功能(图 4A 和 4B)。

[0089] 如在此描述的，对培养的神经元进行蛋白质印迹和检验。如前所述进行了培养的神经元的 $GABA_AR_S$ 的生物素酰化分析。参见 Chung WO 等人(2000)，《感染免疫学》(Infect Immun)68(12):6758-6762)。Briefly, the neurons in culture dishes were placed on ice and washed twice with ice cold PBS.〈〉0〈〉 简言之，将培养皿中的这些神经元置于冰上并且用冰冷 PBS 洗涤二次。然后将这些神经元在冰上用含有 1mg/ml 磺基 -NHS-LC- 生物素(ProteoChem)的 PBS 孵育 30min。在用三羟甲基氨基甲烷缓冲盐水(TBS)猝灭生物素反应之后，在 150μl 改良的 RIPA 缓冲液(20mMTris-HCl (pH7.5)、150mM NaCl、1mM Na_2EDTA、1mM EGTA、1%NP-40、1% 脱氧胆酸钠、2.5mM 焦磷酸钠、1mM b- 甘油酸磷酯、1mMNa_3VO_4 中以及 1μg/ml 亮抑蛋白酶肽)中溶解这些神经元。将匀浆离心 15 分钟(14,000x g，4° C)。移出上清液的等分部分(10%)来测量 β - 肌动蛋白。剩余的上清液在 60μl 的 50% 中性亲和素琼脂糖(Pierce 化学公司)中在 4° C 下孵育 4 小时，然后用溶解缓冲液洗涤四次。将结合琼脂糖的蛋白溶于 20μl SDS 样品缓冲液中并煮沸。如以上提及的，进行蛋白质印迹。

[0090] 来自蛋白质印迹和生物素酰化的数据显示，DHM 消除或逆转了 EtOH 暴露 / 戒断诱导的在培养的神经元的细胞表面 $GABA_AR\alpha 4$ 亚基方面的改变(图 14C)。这些发现证明，DHM 和 EtOH 的共同给予可以抑制、降低和 / 或阻止体外 EtOH 诱导的 $GABA_AR$ 可塑性，由此证实

了如在此所披露的在大鼠体内的发现。

[0091] DHM 增强对照神经元和 EtOH 暴露 / 戒断神经元两者中的 $GABA_AR$ 功能

[0092] 还检验了 DHM 对培养的海马神经元的作用。在培养的神经元中建立了 DHM 对 $GABA_AR$ 介导的 $I_{强直}$(图 5A,空心圆,EC_{50}= 大约 0.2μM)和 mIPSC (图 5B,空心圆,EC_{50}= 大约 0.3μM)的浓度反应曲线。为了确定 EtOH 暴露是否改变了 $GABA_AR$ 对 DHM 的反应性,也建立了在具有 EtOH 暴露 / 戒断的神经元中的 DHM 浓度反应曲线。EtOH 暴露对 DHM 与 $I_{强直}$(图 5A,空心圆,EC_{50}= 大约 0.3μM)或 mIPSC (图 5B,空心圆,EC_{50}= 大约 0.5μM)的浓度反应关系没有影响。这些结果表明,即使在 EtOH 暴露 / 戒断的条件下,DHM 增强了突触和突触外的 $GABA_AR_S$,表明 DHM 不产生对 EtOH 的交叉耐受性。

[0093] 为了阐明 DHM 对 $GABA_AR_S$ 的直接作用,将 GABA (1-300μM)吹到培养的海马神经元上并建立浓度反应曲线。在相同的 GABA 浓度下,DHM (0.3 和 1μM)与 GABA 的共同施用增加了 GABA 激活的电流的幅值,产生了 GABA 浓度反应曲线的左移(图 5C 和 5D)。这些结果表明 DHM 直接增强了 $GABA_AR_S$。

[0094] DHM 拮抗 EtOH 中毒而这些 DHM 作用被氟马西尼拮抗

[0095] 如下所述进行了进一步的 LORR 测定。将大鼠分为 4 个组,并且用盐水、EtOH(3g/kg,E)、EtOH 联合 DHM (1mg/kg,E+D1)、或 DHM (D1)腹腔内注射。EtOH 诱导了 69±18LORR。E+D1 将 LORR 减少到 2.7±1.4 (图 6A)。和盐水一样,DHM 没有诱导 LORR。这些结果表明 DHM 消除了急性 EtOH 中毒。

[0096] 还进行了另外的预治疗和后治疗实验。在注射 EtOH (D1+E)之前 30 分钟,DHM 将 LORR 减少到 8.2±4.1(图 6B)。在诱导了 LORR 的 EtOH 注射之后 30 分钟,LORR 在注射盐水的大鼠中持续另外的 42±9.1 ;而 DHM 注射将剩余的 LORR 减少到 19±1.0(E+ 盐水的 42%,图 6B)。这些结果表明 DHM 消除了急性 EtOH 中毒。因此,即使在 EtOH 暴露之前 30 分钟或暴露之后 30 分钟给予,DHM 有效地改善了中等到高剂量 EtOH 中毒。

[0097] 为了检验 DHM 的抗 EtOH 作用的靶标,测试了氟马西尼,一种调节 $GABA_ARs$ 的选择性苯二氮卓类拮抗剂。参见 Hunkeler,W. 等人(1981),《自然》(Nature)290:514-516。EtOH 诱导了 69±11.3LORR ;DHM(3mg/kg)和 EtOH 的共同注射将 LORR 减少到 2.7±1.7(图 6C)。氟马西尼(10mg/kg)逆转了 DHM 在 LORR 方面的减少(56.1±4.6)。将 DHM 剂量增加到 10mg/kg 降低了氟马西尼的作用(29.3±4.8),而将氟马西尼的剂量增加到 30mg/kg 增加了它的 DHM 作用的拮抗作用(58.2±3.9)。与 EtOH 组(71.1±4.8,图 6C)相比,氟马西尼和 EtOH 共同注射没有改变 LORR。这些结果表明,$GABA_ARs$ 在体外 EtOH 诱导的 LORR 的行为效应中起主要作用。氟马西尼竞争性地拮抗 DHM 对 EtOH 诱导的 LORR 的作用。另外,这些结果表明,DHM 和 EtOH 的相互作用涉及 DHM 在 $GABA_AR$ 苯二氮卓位点的作用,这可能成为 DHM 对 EtOH 中毒的疗效的基础。

[0098] 检验了高剂量的 DHM (高于其对 EtOH 中毒具有拮抗作用的剂量的数百倍)。DHM (100mg/kg 和 300mg/kg)分别仅仅诱导 0.9±0.8 和 4.0±2.8 的 LORR (图 7)。这表明 DHM 不仅仅是典型的苯二氮卓类。高剂量的氟马西尼(200mg/kg)不诱导 LORR (图 7)。

[0099] 在 LORR 测定的过程中,在从 5 分钟 -180 分钟的不同的点处取静脉血样品来测量来自 EtOH 组和 EtOH+DHM 组的血浆 EtOH 浓度(血浆 [EtOH])。收集在 EtOH 或 E+D 腹膜内注射后的不同时间点(0、5、30、60、90、180 分钟)来自大鼠尾静脉的血液样品,或来自在自愿酒

精双瓶选择范例(EtOH 和 EtOH+DHM 组)之后的大鼠的血液样品用于血浆 [EtOH] 测定。参见 Liang(2007)。将大鼠放到一个约束管中,并且在大约 40° C 下它的尾巴是温暖的。用锋利的刀片穿刺在尾尖处的尾静脉。将大约 0.2mL 静脉血滴入一个含有肝素锂(拉姆科学公司(Ram Scientific Inc),杨克斯(Yonkers),纽约(NY))的毛细血液收集管。血液样品在 2500rpm 下离心 15 分钟。收集上清液并且在 -80° C 下储存直至测定。用 EtOH 标准品,使用醇氧化酶反应程序,一式两份地测量每个血液样品的 EtOH 含量(GM7Micro-Stat ;安纳劳科斯仪器公司(Analox Instruments),卢嫩堡(Lunenberg),加拿大)。

[0100] EtOH 在 5 分钟之内诱导了 LORR 的开始。血浆 [EtOH] 快速增加持续 5 分钟,随后缓慢增加到大约 60 分钟,然后 [EtOH] 逐渐下降。在 E+D1 和 E+D10 (DHM1,10mg/kg)组,血浆 [EtOH] 的上升时间在早期减慢(图 8)。然而,从 30 分钟到 60 分钟,血浆 [EtOH] 在 EtOH 组与 E+D1 组之间没有显示出统计显著性差异(30 分钟 :EtOH 相对于 E+D1=334.9±37.8 相对于 287.7±21.5mg/dl ;以及 60 分钟 :EtOH 相对于 E+D1=353.7±35.4 相对于 326.27±17.8mg/dl),而 E+D10 组在该期间显著降低了 [EtOH] (30 分钟为 250.6±12.2 并且 60 分钟为 306.0±7.6mg/dl,图 8)。在 30 分钟到 60 分钟的过程中,EtOH 组在睡眠而 E+D1 组和 E+D10 组处于清醒状态。这些结果表明,DHM 影响 EtOH 药物代谢动力学,但是这种作用不足以解释 DHM 对 EtOH 诱导的 LORR 的阻断。

[0101] DHM 拮抗 EtOH 诱导的 $GABA_AR$ 增强,并且这种作用被氟马西尼阻断

[0102] 如上述进行的,进行了在来自体外海马切片的齿状回颗粒细胞(DGCs)中的全细胞膜片钳记录。EtOH (60mM) 的浴应用将 $I_{强直}$从 22.0±0.7 增加到 46.9±1.4pA,并且将 mIPSC 从 0.53±0.02 提高到 0.64±0.02nC(图 9,图 A-C)。DHM(0.3 和 1.0μM) 浓度依赖性地拮抗了这些 EtOH 效应。

[0103] 然后如在此所提供的,测试了氟马西尼对 DHM 的抗 EtOH 作用的影响。DHM(3μM) 将 EtOH 增强的 $I_{强直}$从 44.8±2.3 降低到 21.0±0.9pA 并且将 mIPSCs 从 0.78±0.01 降低到 0.70±0.02nC,而氟马西尼(10μM)逆转了这种 DHM 作用(将 $I_{强直}$逆转到 37.3±1.6pA,并且将 mIPSCs 逆转到 0.78±0.01nC,图 9,图 D-F)。这些数据表明,DHM 拮抗了 EtOH 诱导的突触外和突触 $GABA_ARs$ 两者的增强,并且该作用被氟马西尼阻断。这些数据与行为实验观察的结果是一致的(图 6C),表明 DHM 和 EtOH 对 $GABA_AR$ 苯二氮卓位点的相互作用是成为 DHM 对 EtOH 中毒的疗效的基础的细胞机制。

[0104] DHM 是 $GABA_ARS$ 在苯二氮卓位点处的正向调节剂

[0105] DHM (0.1 到 30μM) 对 $GABA_AR$ 介导的海马切片中的 DGC 的 mIPSC 的影响。DHM (1μM) 浓度依赖性地(从 0.1 到 30μM) 增强了 $I_{强直}$(从 22.5±2.5 到 44.0±4.1pA) 并且增大了 mIPSC 面积(从 0.59±0.01 到 0.72±0.03nC,图 10,图 A-C)。这些结果表明,DHM 增强了 CNS 神经元中的 $GABA_AR$ 功能。

[0106] 为了进一步检验 DHM 的位点对 $GABA_AR_S$ 的作用,测定了氟马西尼对在 DIV13-14 (DIV :体外培养天数)的培养的海马神经元中的 DHM 增强的 $GABA_AR$ 功能的影响。DHM(1μM) 增强了 $I_{强直}$(对照组的 194.9%±13.6%) 和 mIPSC 面积(对照组的 181.8%±9.2%,图 10,图 D-F)。氟马西尼以一种浓度依赖的方式抑制了 DHM 增强的 $GABA_AR$ 电流(10μM 的氟马西尼将 $I_{强直}$降低到 143.0%±3.2% 并且将 mIPSC 降低到 125.7%±3.9%,图 10,图 D-F)。这些观察结果表明,DHM 作用于 $GABA_ARS$ 上与苯二氮卓一样的位点上来增强 $GABA_AR$ 功能。

[0107] 使用结合在来自初次接受试验的成年大鼠的皮质膜匀浆中的 [^{3}H] 氟硝西泮，检验了 DHM（0.03-100μM）对苯二氮卓位点的作用。如前所述的，用离心和清洗的速度和次数以及缓冲液组成的改良来进行制备用于放射性配体结合试验的大鼠皮质膜的标准程序。参见 Li GD 等人（2010），《生物化学杂志》（J Biol Chem）285:8615-8620。从脑分离初次接受试验的大鼠皮质并在 0.32M 蔗糖、10mM HEPES 缓冲液（pH7.4）中均质化，并且在 650x g4° C 下离心。将随后的上清液在 150,000xg 下离心来收集含有所希望的膜的沉淀。该沉淀被洗涤和离心两次以上，第一次使用冰冷的水，第二次施用含有 50mM KH_2PO_4、1mM EDTA、2mM 苯甲脒 HCl、0.5mM DTT、0.1mM 苯乙铵 HCl、0.01% 杆菌肽、0.2PMSF（pH7.4）的膜缓冲液，然后将产生的沉淀冻干。在结合测定的当天，在含有 50mM KH_2PO_4、1mM EDTA、200mM KCl（pH7.4）的测定缓冲液中将沉淀均质化并且离心，然后在新鲜的测定缓冲液中再悬浮，直至蛋白终浓度为 1mg/ml。将 [^{3}H] 氟硝西泮（85.2Ci/mmol，珀金埃尔默（PerkinElmer），波士顿（Boston），MA）、脑匀浆、以及 DHM 合并至 0.5ml 的测定终体积，在冰上孵育，并且用 Brandel 细胞收集器 M-24R（Brandel 公司，马里兰州盖瑟斯堡（Gaithersburg MD））过滤。在贝克曼（Beckman）LS-3801 液体闪烁计数器中进行样品计数。特异性结合被定义为总的结合量（没有未标记的配体）减去在 10μM 终浓度的氟西泮（西格玛公司）存在下的结合。用 GraphPad Prism4.0 软件（圣地亚哥，加利福尼亚）分析数据，以便确定 IC_{50}（一个位点竞争方程）和希尔斜率（Hill slope）（S 型剂量反应方程）。实验一式三份地进行。

[0108] 观察到 DHM 对 [^{3}H] 氟硝西泮结合的显著抑制，以一种浓度依赖性的方式从 0.3μM 开始，其中 IC_{50} 为 4.36μM，并且希尔斜率为 -0.73（图 10，图 G）。这些数据表明，DHM 直接抑制了 [^{3}H] 氟硝西泮结合到 $GABA_AR_S$（显然是竞争性的），表明 DHM 很可能作用在 $GABA_AR$ 苯二氮卓位点。

[0109] 还检验了 DHM 对在培养的海马神经元中的 $GABA_AR$ 介导的电流的影响。DHM 浓度依赖性地增强了 $I_{强直}$（0.3μM 的 DHM 将 $I_{强直}$ 从 9.5±1.5 增加到 21.0±2.3pA，EC_{50} 大约为 0.20μM）并且增加了 mIPSC（1μM 的 DHM 将 mIPSC 增加到对照组的 128.2%±8.3%，EC_{50} 大约为 0.20μM；对高于 1μM 的 DHM 的反应轻微下降，图 11A 和 11B）。

[0110] 检验了 DHM 在 DIV14 的培养的神经元中对由 10μM 和 300μM 的 GABA 的局灶胀泡诱导的 $GABA_AR$ 电流的影响。DHM（0.3 和 1μM）与 GABA 的共同施用增加了 GABA 电流的幅值，并且产生了 GABA 浓度反应曲线的左移（图 11C 和 11D）。这些结果表明，DHM 直接作用在 $GABA_AR_S$ 并且强有力地增强了突触和突触外 $GABA_AR_S$。

[0111] DHM 防止 EtOH 戒断症状并且防止 EtOH 暴露 / 戒断诱导的在大鼠海马中的 $GABA_AR$ 可塑性

[0112] 检验了 DHM 对大鼠中的 EtOH 戒断症状的影响。将大鼠分为 4 个组，并且分别用载体、EtOH（5g/kg，E）、EtOH 联合 DHM（1mg/kg，E+D）或者 DHM 管饲。在注射 48 小时之后，将大鼠再细分为 3 个组来测量 EtOH 戒断的征象。

[0113] 在高架十字迷宫上测量与 EtOH 戒断相关的在 EtOH 戒断大鼠中的焦虑和运动 / 共济失调（EPM，图 12A）。以分钟度量花费的时间。如先前所述构建了十字迷宫并且将测量结果平分。参见 Liang 等人（2004），《药理学与实验治疗学杂志》（J Pharmacol Exp Ther）310:1234-1245）。简言之，使迷宫高于地面 1m，并且包含四个成直角地安排的长 51cm、宽 11.5cm 的臂。封闭臂具有延伸该臂的长度的 30cm 高的不透明的壁。在实验的时候，将每个

动物放到该迷宫的中心，面对一个开放臂并且允许探索 5 分钟的时间。在这期间，将该动物的行为（例如，进入臂的次数以及每次进入臂花费的时间）记录在摄像机上。

[0114] 属于载体组的受试者在开放臂中花费 2.71±0.71 并且在封闭臂中花费 1.80±0.67。属于 EtOH 组的受试者在开放臂中花费的时间（0.88±0.32）明显短于载体组，并且在封闭臂中花费的时间（3.64±0.27）长于载体组；而属于 EtOH+DHM（E+D）组的受试者花费相似的时间（开放臂：2.68±0.77 以及封闭臂：1.88±0.79）。DHM 对大鼠在任意的臂中花费的时间没有影响（开放臂：2.92±0.70 以及封闭臂：1.52±0.56）。这些数据表明：（1）EtOH 暴露 / 戒断产生了焦虑；（2）DHM 联合 EtOH 抑制、减轻和 / 或阻止了 EtOH 诱导的焦虑；以及（3）DHM 不影响焦虑水平。

[0115] 对 EtOH 的耐受性用急性 EtOH 诱导的 LORR 来度量（以分钟计，图 12B）。与在 EtOH 组受试者中诱导的 10.8±3.8LORR 相比，EtOH 在载体组受试者中诱导了 63.6±7.0LORR。EtOH 在 EtOH+DHM 组受试者中诱导了 61.0±3.8LORR，并且在 DHM 组受试者中诱导了 65.6±8.4LORR。这些结果表明，单次暴露于 EtOH 产生了对 EtOH 的耐受性，并且 DHM 抑制、减轻和 / 或防止了这种 EtOH 暴露 / 戒断诱导的对 EtOH 的耐受性。

[0116] 如在此所述的，用 PTZ 诱导的发作持续时间来量度过度兴奋（图 12C）。PTZ 在载体组的受试者中诱导了 0.9±0.2 分钟的发作，并且在 EtOH 的受试者中诱导了 6.5±1.1 分钟的发作。在 EtOH+DHM 组中发作持续时间减少到最低（1.7±0.8 分钟）。在 DHM 组中 PTZ 诱导的发作与载体组相似（0.6±0.4 分钟）。这些结果表明，EtOH 暴露 / 戒断增加了发作的易感性（兴奋过度）并且 DHM 改善了 EtOH 的这些影响。

[0117] 测定了在上述 4 组治疗 48 小时之后的海马中的 $GABA_AR$ α 4 亚基的总蛋白含量。蛋白质印迹表明，与载体组相比，EtOH 暴露将总 α 4 蛋白水平增加到 84.0±26.0%。在 EtOH+DHM 组中，总 α 4 蛋白水平没有增加（对照组的 93.0±21.0%）。DHM 暴露对 α 4 亚基水平没有影响（对照组的 88.3±10.3%，图 12D 和 12E）。这些数据表明，DHM 抑制、降低和 / 或防止了体内 EtOH 暴露 / 戒断诱导的 $GABA_AR$ 可塑性。

[0118] 测定了 DHM 是否防止了在 CNS 神经元中 EtOH 诱导的 $GABA_AR$ 可塑性。用载体（载体组）、EtOH（EtOH 组）、EtOH 联合 DHM（1mg/kg，E+D，EtOH+DHM 组）或者 DHM（DHM 组）管饲四个组的大鼠。在戒断 48 小时之后，记录在海马切片中的 DGC 上的全细胞 $GABA_AR$ 介导的电流。在载体组中，EtOH（60mM）的浴应用将 $I_{强直}$ 从 28.8±3.1 增加到 62.1±3.3pA（图 13，图 A、G）。EtOH 将 mIPSC 面积从 0.67±0.08 增加到 0.78±0.10nC（图 13，图 A、H）。在 EtOH 组中，EtOH 没有增加 $I_{强直}$（从 13.0±0.95 到 13.8±1.28pA），但将 mIPSC 面积从 0.95±0.01 大大增加到 1.4±0.02nC（图 13，图 B、G、H）。在 EtOH+DHM 组中，EtOH 将 $I_{强直}$ 从 30.0±2.8 增加到 60.0±2.2pA，而 mIPSC 调节没有改变（从 0.70±0.03 到 0.78±0.02nC，图 13，图 C、G、H）。在 DHM 组中，$I_{强直}$ 和 mIPSCs 对 EtOH 的反应与载体组对 EtOH 的反应相似（图 13，图 D、G、H）。这些结果表明，EtOH 联合 DHM 灌胃给药抑制、降低和 / 或防止了随后的对 EtOH 的耐受性以及 EtOH 诱导的 $GABA_AR$ 可塑性。

[0119] 在上述 4 组治疗后唑吡坦（一种苯二氮卓类激动剂）对大鼠中 DGC 的影响。唑吡坦在 DHM 组中如在载体组一样诱导了 $GABA_AR$ 电流的增强，但是没有影响 EtOH 组中的 $GABA_AR$ 电流，因此表明 EtOH 对唑吡坦产生了交叉耐受性（图 13，图 F、I、J）。这些结果表明，EtOH 和 DHM 的共同给予抑制、降低和 / 或防止了 EtOH 诱导的 $GABA_AR$ 可塑性，并且 DHM 不产生对

EtOH 或唑吡坦的交叉耐受性。

[0120] 检验了 DHM 对预先暴露于 EtOH 的培养的神经元的作用。DHM 的浴应用浓度依赖性地增强了 $I_{强直}$ 和 mIPSC（0.03-30μM，图 14A 和 14B）。用于增强 $I_{强直}$（大约 0.20μM）和 mEPSC（大约 0.15μM）的 EC_{50} 与在载体组中的相似（图 11A 和图 11B）。这些数据表明，即使在 EtOH 暴露 / 戒断后（导致了对 EtOH 的耐受性），DHM 在增强突触和突触外 $GABA_AR_S$ 中保持有效。

[0121] 使用细胞表面生物素化作用继之以蛋白质印迹分析来测量在培养的神经元中的 α4 亚基的表面表达。EtOH 治疗的神经元显示出增加的 α4 亚基表面表达（对照组的 249.7%±28.1%）；而这种增加在用 EtOH+DHM 治疗的神经元中被阻断（对照组的 123.0±8.4%，图 14C 和 14D）。DHM 没有改变 α4 亚基表面表达（对照组的 125.0%±27.3%，图 14C 和 14D）。这些体外数据表明，EtOH 和 DHM 的共同给予抑制、降低和 / 或防止了通常可能由暴露于 EtOH（包括单次暴露和慢性间歇性 EtOH 暴露）而产生的 $GABA_AR$ 的可塑性。

[0122] DHM 诱导在慢性自愿酒精摄取大鼠模型中的 EtOH 消耗

[0123] 检验了 DHM 对酒精消耗的影响。所有的流体提供在 100mL 的具有不锈钢饮用管（drinking spout）的有刻度的玻璃量筒中，该量筒在逆向光 / 暗周期室（reversed light/dark cycle room）中的光线消失 15 分钟后插入。在提供流体 30 分钟和 24 小时之后称量瓶子。每天对每只大鼠称重，以便监测健康，并且计算每公斤体重的乙醇摄入克数。将大鼠分为 4 个组，并分别间歇接近水 / 水、20%EtOH/ 水、E+D/ 水、或 DHM/ 水的双瓶选择范例。

[0124] 训练大鼠使其自由接近水 / 水、20%（w/v）EtOH/ 水、EtOH+DHM（0.05mg/ml，E+D）/ 水或 DHM/ 水的双瓶选择，持续两周。第一周向每个瓶中加入甜味剂（2pk/L）。第二周向每个瓶中加入甜味剂（1pk/L）。在训练之后，在每周 3 个 24 小时（周一、周三和周五）的期间给予这些大鼠接近水 / 水、EtOH/ 水、E+D/ 水、或 DHM/ 水（全都不含甜味剂）的双瓶选择。大鼠在 EtOH 接近时期不受限制地接近双瓶。在每个 EtOH 饮用期间轮换 EtOH 瓶的布局来控制侧偏好。将大鼠保持在 20%EtOH 间歇性接近双瓶选择范例上持续 7 周（21 个 EtOH 接近期间）。从第 5 周（第 13 期间）开始向 EtOH 组的一半大鼠在 EtOH 瓶中加入 DHM。剩余的 EtOH 组大鼠继续 EtOH 接近期。EtOH 消耗被表示为每公斤体重消耗的 EtOH 的克数。接近双瓶水的大鼠被视为对照组。在实验结束时，在对照组大鼠与饮用 EtOH 的大鼠的体重之间没有显著差异。

[0125] 从第二周开始，在 EtOH/ 水组中的 EtOH 消耗从 3.1±1.3 增加到 7.5±0.5g/kg/ 天。EtOH 和 DHM 的共同给予（E+D/ 水组）消除了这种 EtOH 摄入的增加（2.6±0.4g/kg/ 天，图 15A）。在四周之后，将 EtOH/ 水组再细分为 2 个组：一组继续提供 EtOH/ 水，而给另一组提供 E+D/ 水。E/ 水亚组维持高水平的 EtOH 摄入，而在 E+D/ 水亚组中，EtOH 消耗在第 5 周末时降低到 1.8±1.0g/kg/ 天，并且在第六周末时降低到 1.2±0.2g/kg/ 天，与用 E+D/ 水开始的组相似（图 15A）。在 4 个组之间的总流体消耗没有显著差异。这些结果表明，DHM 抑制、降低、和 / 或防止了过度的酒精消耗（酒精滥用）（如果采用酒精的话）。当高的自愿 EtOH 消耗已经通过 EtOH 暴露建立时，DHM 降低了酒精消耗（治疗酒精滥用）。

[0126] 在第四周末，来自暴露于 E+D/ 水组的大鼠的血浆 [EtOH] 显著低于来自暴露于 E/ 水的组。血浆 [EtOH] 与测量的 EtOH 消耗量很好地关联。在第 4 周末的酒精日开始的 30、45、60 以及 100 分钟的自愿 20%EtOH 后，测量每个动物的血浆 [EtOH]（mg/dl）。两组中的

血浆 [EtOH] 具有显著性差异（$p<0.05$，图 15B）。这些数据表明 DHM 抑制、降低、和 / 或防止了高的自愿 EtOH 消耗（EtOH 滥用）。

[0127] 另外进行的实验表明，通过用 DHM （1mg/kg，腹膜内注射，n=6 只大鼠 / 组）联合治疗减少了雌性大鼠中（与雄性大鼠中相似）EtOH （3g/kg，腹膜内注射）诱导的 LORR 持续时间。同样，在雌性大鼠中，DHM+EtOH 的共同给予同样抑制、降低和 / 或防止了 EtOH 中毒 / 戒断诱导的在 PTZ 诱导的发作持续时间和发作频率方面的增加。

[0128] 在此的实验显示，培养的或在切片中的海马神经元中，DHM 浓度依赖性地增强了 $GABA_AR$ 介导的 mIPSC 和强直电流。利用培养的神经元，DHM 引起 GABA 浓度反应关系的左移。这些结果表明，DHM 增强了突触和突触外 $GABA_ARs$ 两者。然而，DHM 暴露 / 戒断不诱导细胞水平的长期 $GABA_AR$ 的可塑性。在足以改善 EtOH 中毒的剂量范围，DHM 不诱导中毒症状（如 LORR）或引起 AWS （如发作易感性的增加），也不诱导对 EtOH 的交叉耐受性。因此，DHM 可以用于治疗急性或慢性酒精消耗。

[0129] 在从 EtOH 暴露中戒断的大鼠中，体内行为实验显示出发作阈值、焦虑、以及对镇静 / 麻醉药物的耐受性的下降（以一种与在人 AWS 中观察到的症状相似的方式）。如在此所披露的，用海马切片进行的研究显示，在从 DHM 和 EtOH 共同给予戒断 48 小时后，对急性 EtOH 具有显著的 $I_{强直}$ 敏感性。同样，DHM 和 EtOH 的共同给予通过 EtOH 治疗而阻断了基线 $I_{强直}$ 幅值的降低。在培养的海马神经元中发现了相似的 DHM 的作用。这些来自大鼠海马的结果表明，EtOH 诱导的在含有 α 4 的 $GABA_AR_S$ 方面的改变被 DHM 阻断。这些结果表明，DHM 不仅拮抗了 EtOH 对 $GABA_AR$ 功能的作用响，而且阻断了含有 α 4 的 $GABA_AR_S$ 从突触外到突触的再定位。因此，DHM 可以被用来治疗与由于暴露于 EtOH 导致的 $GABA_AR$ 可塑性相关的酒精使用障碍。

[0130] 在此的实验表明，对于初次接受试验的 $GABA_AR_S$ 和已经暴露到 EtOH 的 $GABA_AR_S$，DHM 继续有效地增强了突触和突触外 $GABA_AR_S$。而且，在脑切片中，DHM 阻断了初次接受试验的海马神经元中的突触 $GABA_AR_S$ 的急性 EtOH 增强。这些结果表明，DHM 是一种 $GABA_AR_S$ 调节剂，因此表明在受试者中对其他药剂（如苯二氮卓类）有耐受性的酒精中毒和 AWS，DHM 可能是一种有效的治疗。

[0131] 用大豆甙、槲皮素、染料木黄酮、杨梅树皮素、以及葛根素的比较实验显示，DHM 对与由于 EtOH 暴露导致的 $GABA_AR_S$ 相关的酒精中毒、酒精使用障碍以及酒精滥用的影响可能是独特的。具体地说，来自大鼠海马切片的神经元的膜片钳记录显示 :A)DHM 增强了突触外 $GABA_AR$ 介导的强直电流（$I_{强直}$）和突触后电流（mIPSC），而大豆甙对 $I_{强直}$ 没有影响但显著增强了 mIPSC。槲皮素对 I_{tonic} 或 mIPSC 均没有影响。因此，DHM 可以被用来选择性地调节突触外 $GABA_AR_S$。在大鼠海马切片中的神经元的膜片钳记录显示，在 60mM EtOH 存在的情况下，DHM 浓度依赖性地阻断了 $GABA_AR$ 介导的 $I_{强直}$ 和 mIPSC 的 EtOH 增强，而大豆甙和槲皮素则不然。[3H] 氟硝西泮结合测定表明，DHM、大豆甙元以及大豆甙 (dainzin) 结合 $GABA_AR_S$，但是显著地被 [3H] 氟硝西泮取代 ；而染料木黄酮、杨梅树皮素、葛根素和槲皮素不与 $GABA_AR_S$ 结合。这些结果表明，DHM 独特地拮抗了 CNS 神经元中的 $GABA_AR_S$ 的酒精增强。

[0132] 到理解或完成本发明的披露必要的程度，在此所提及的所有出版物、专利、专利申请通过引用在其中而清楚地结合，其程度如同各自单独地这样结合。

[0133] 在此所披露的实例和实验旨在展示而非限制本发明。因此已经描述了本发明的示

例性实施例，本领域的技术人员应当注意的是，其中的披露仅仅是示例性的，并且可以在本发明的范围之内做出不同的其他替代方案、适应性改变、以及修改。因此，本发明不限于如在此展示的具体实施例，但是仅由以下权利要求书限定。

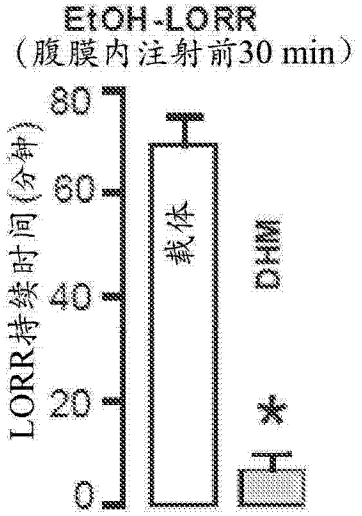


图 1A

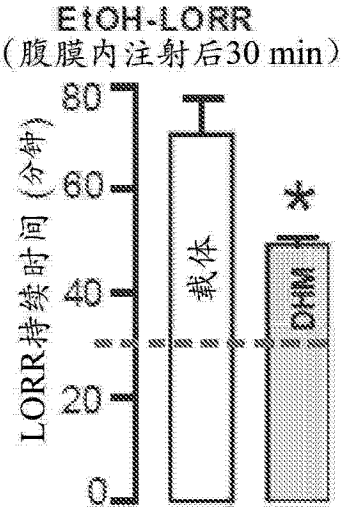


图 1B

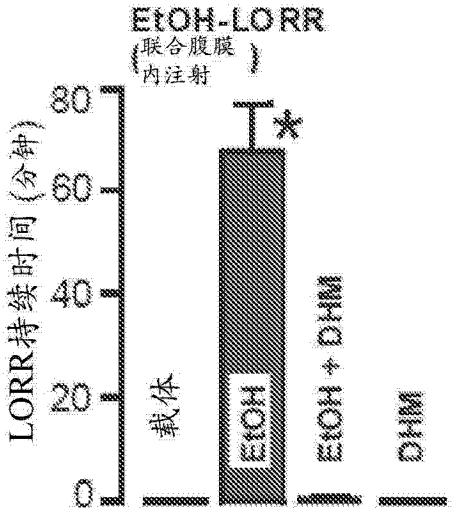


图 1C

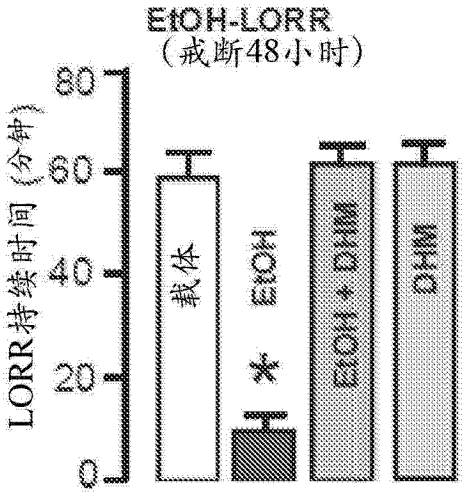


图 1D

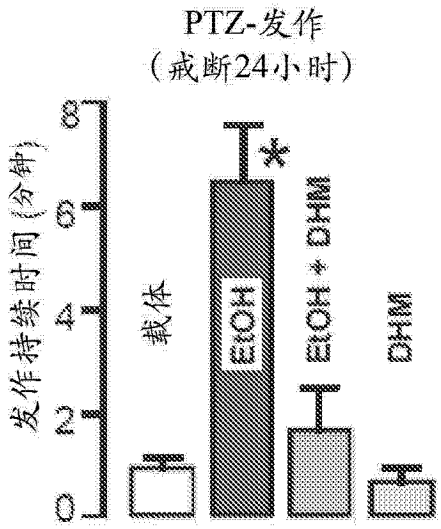


图 1E

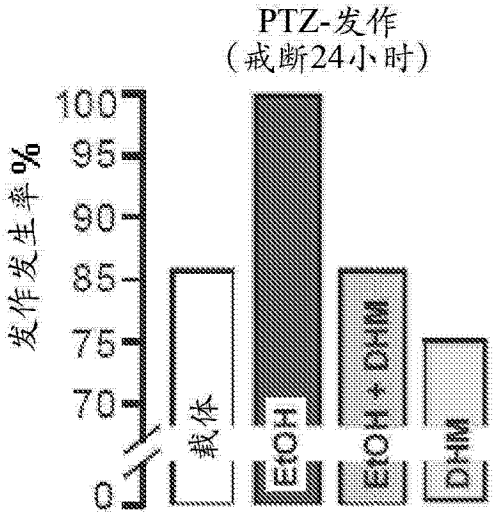


图 1F

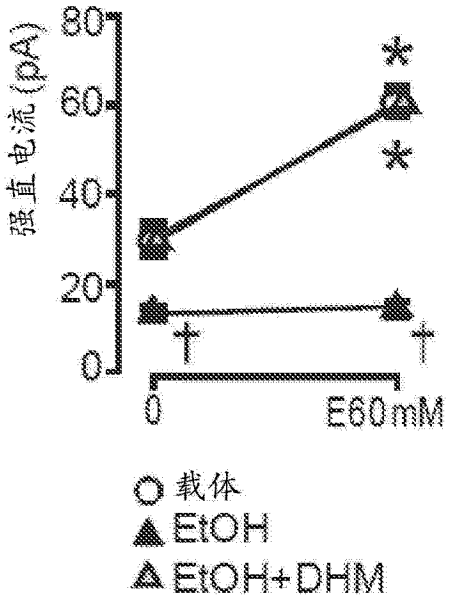


图 2A

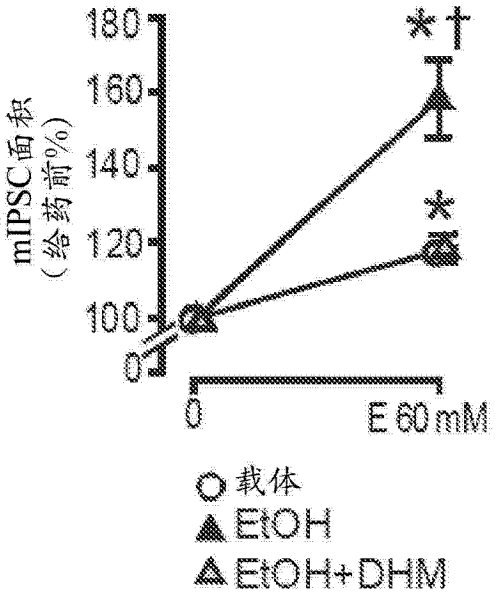


图 2B

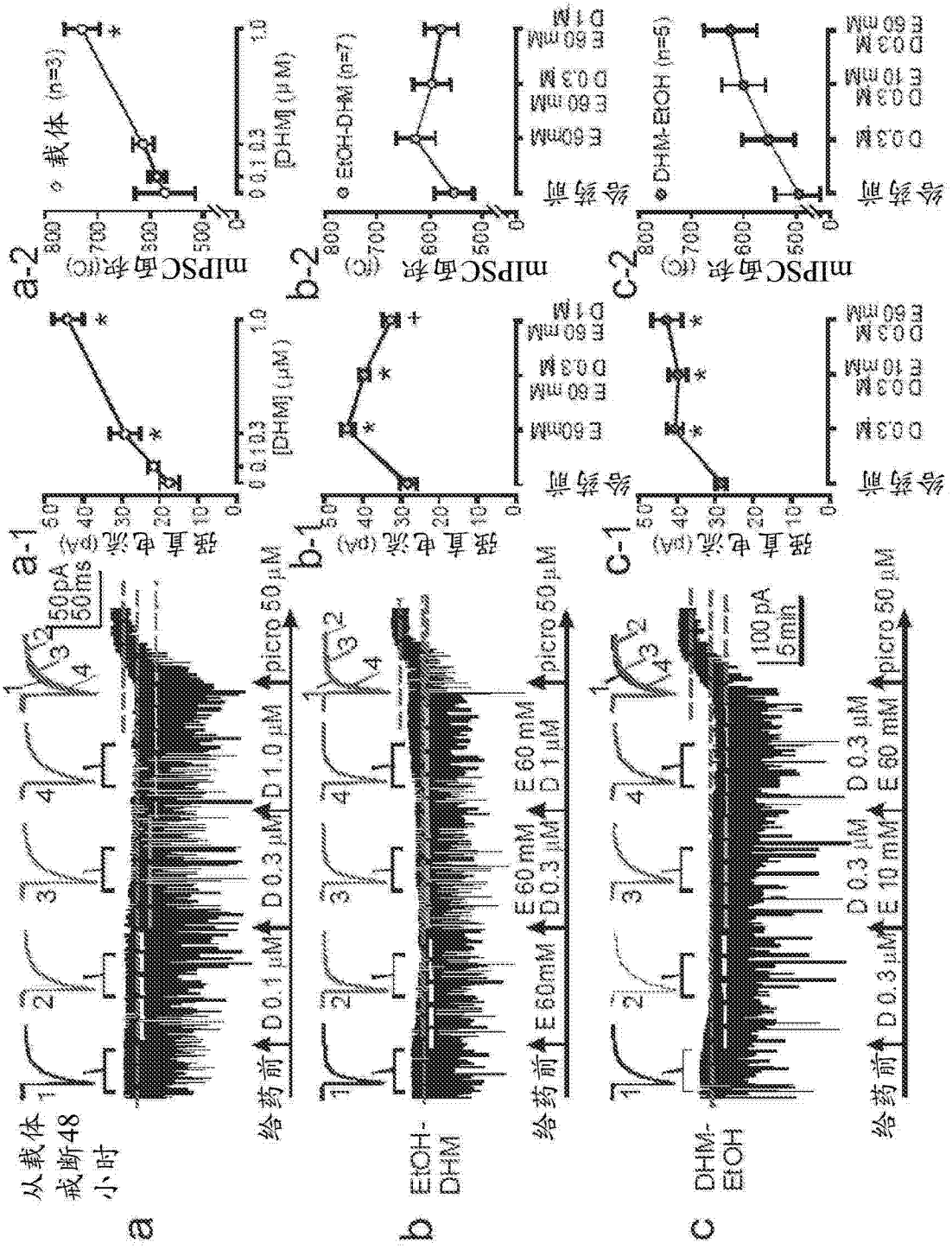

a
从载体
或断48
小时
给药前
D 0.1 μM
D 0.3 μM
D 1.0 μM
picro 50 μM
50 pA
50 ms
a-1
强直电流 (pA)
[DHM] (μM)
a-2
mIPSC 面积 (C)
载体 (n=3)
b
EtOH-
DHM
E 60mM
D 0.3 μM
D 1 μM
b-1
EtOH-DHM (n=7)
c
DHM-
EtOH
100 pA
6 min
E 10 mM
E 60 mM
c-1
DHM-EtOH (n=5)

图 3

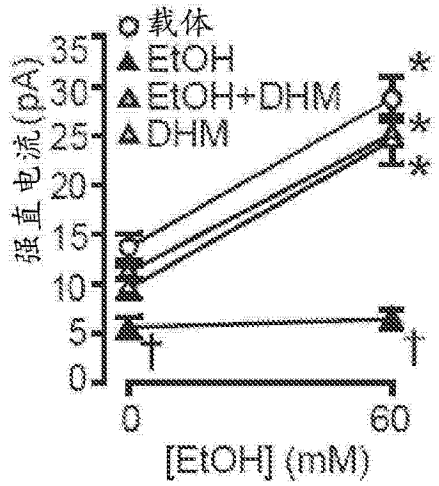


图 4A

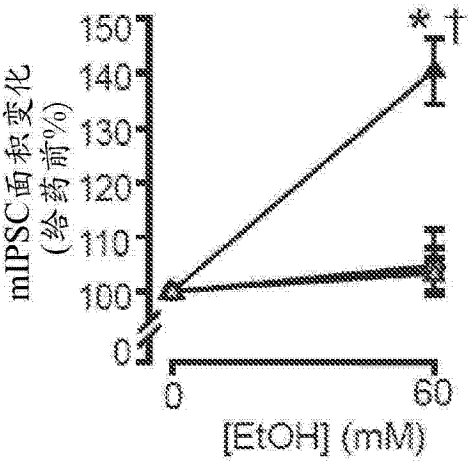


图 4B

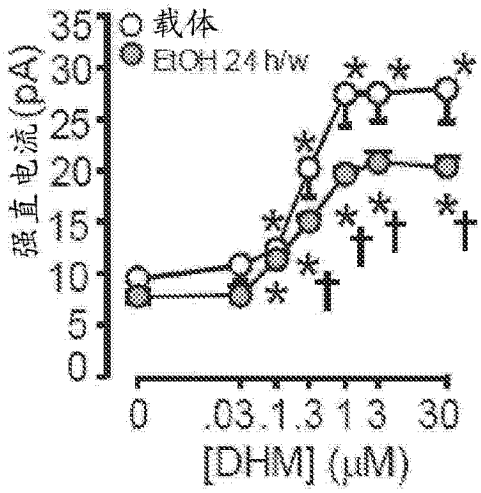


图 5A

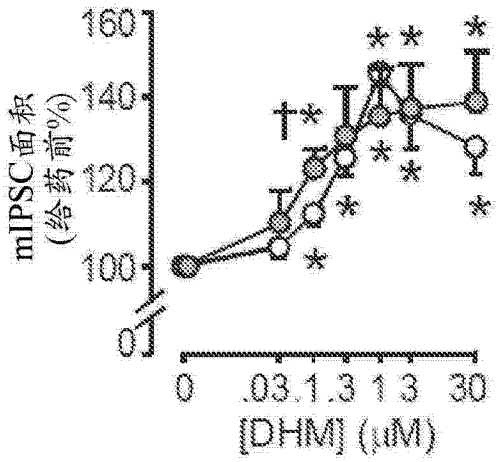


图 5B

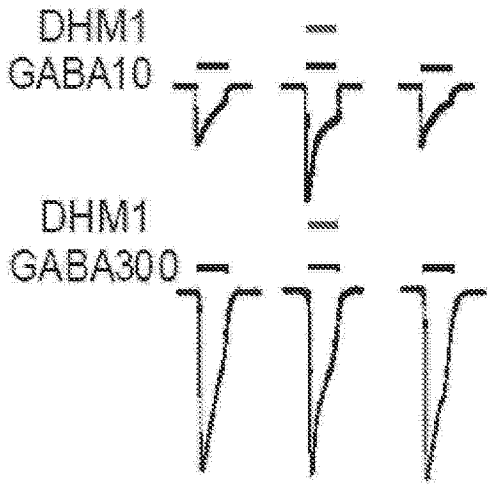


图 5C

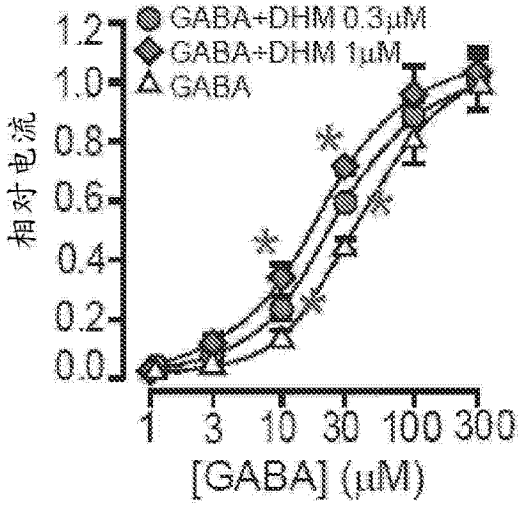


图 5D

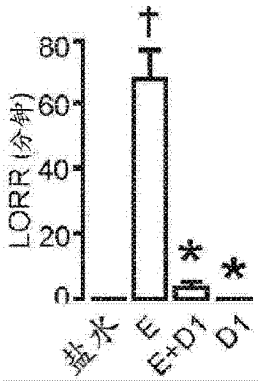


图 6A

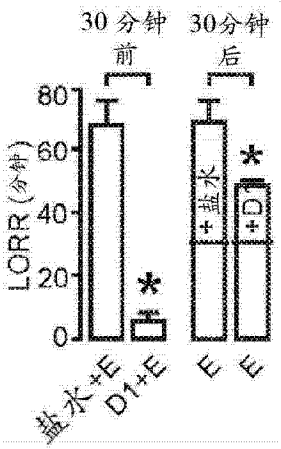


图 6B

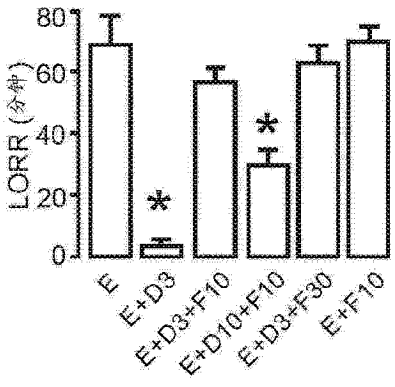


图 6C

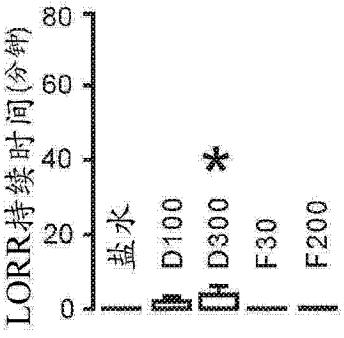


图 7

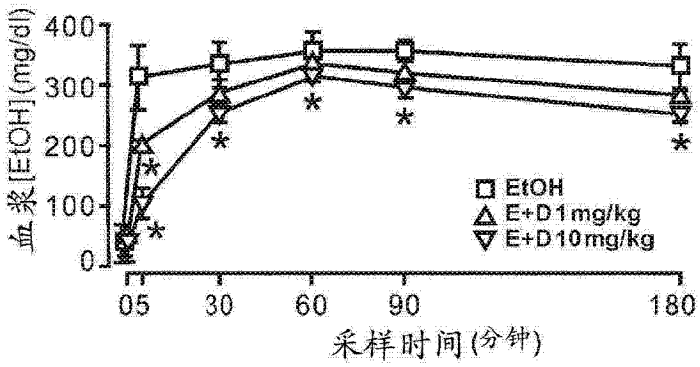


图 8

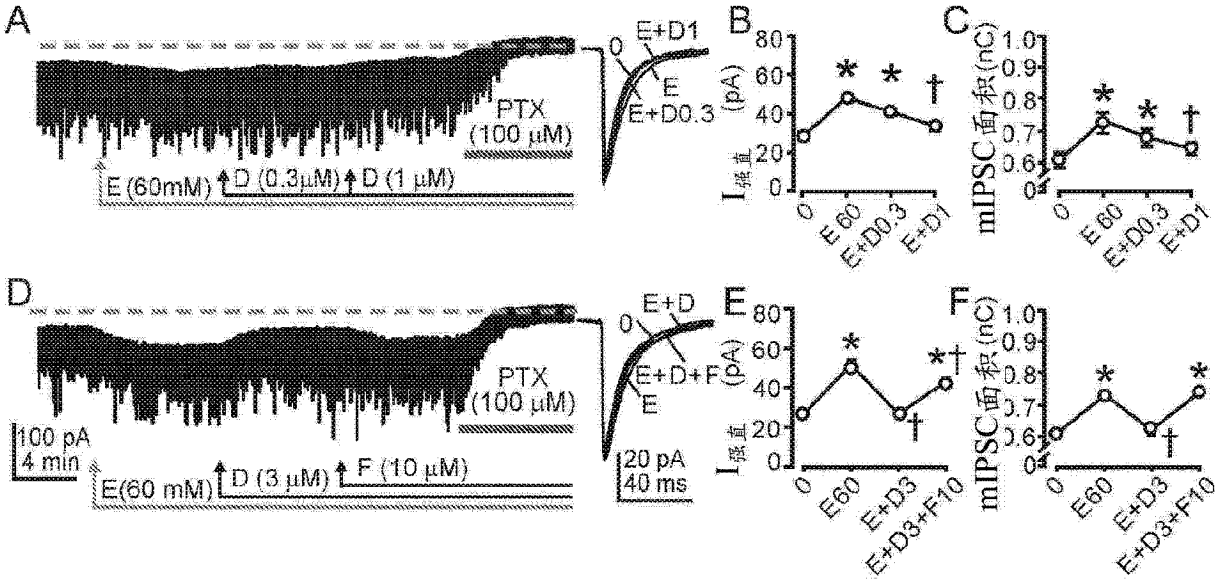

A
PTX
(100 μM)
E (60mM)
D (0.3μM)
D (1 μM)
E+D1
E
E+D0.3
B
C
mIPSC面积(nC)
D
PTX
(100 μM)
100 pA
4 min
E(60 mM)
D (3 μM)
F (10 μM)
E+D
E+D+F
E
20 pA
40 ms
E
E60
E+D0.3
E+D1
E+D3
E+D3+F10

图 9

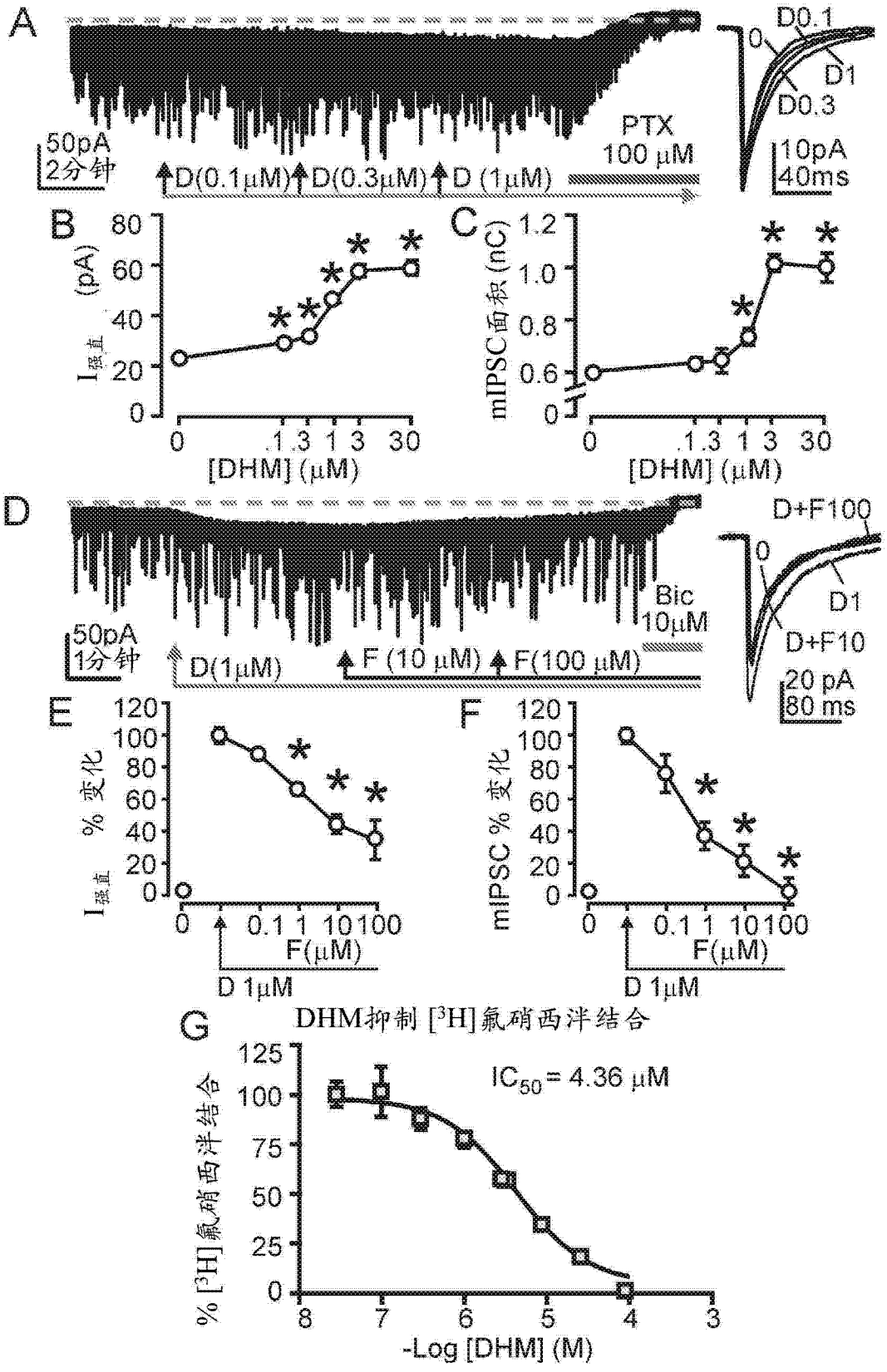

A
50pA
2分钟
D(0.1μM)
D(0.3μM)
D (1μM)
PTX
100 μM
D0.1
D1
D0.3
10pA
40ms
B
I强直 (pA)
[DHM] (μM)
C
mIPSC面积 (nC)
[DHM] (μM)
D
50pA
1分钟
D(1μM)
F (10 μM)
F(100 μM)
Bic
10μM
D+F100
D1
D+F10
20 pA
80 ms
E
I强直 % 变化
F(μM)
D 1μM
F
mIPSC % 变化
F(μM)
D 1μM
G
DHM抑制 [3H]氟硝西泮结合
IC50 = 4.36 μM
% [3H]氟硝西泮结合
-Log [DHM] (M)

图 10

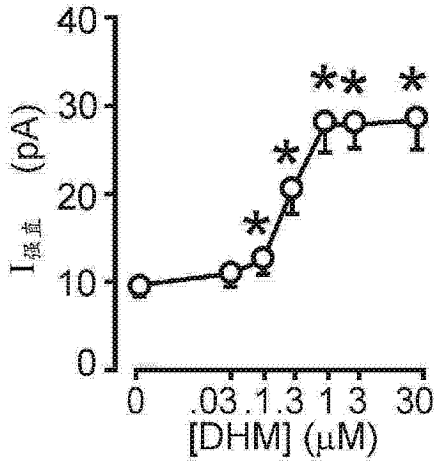


图 11A

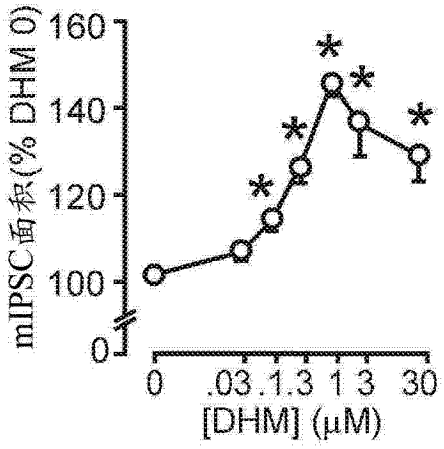


图 11B

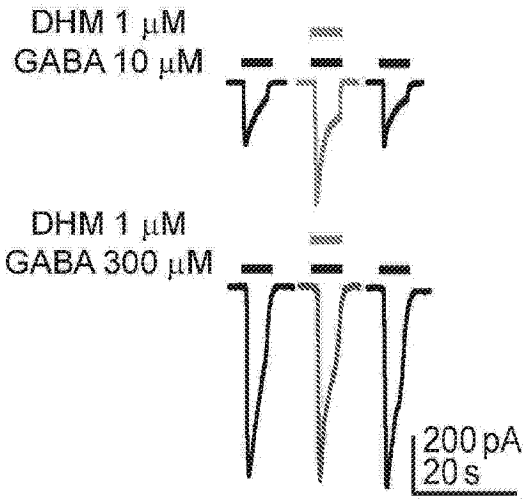


图 11C

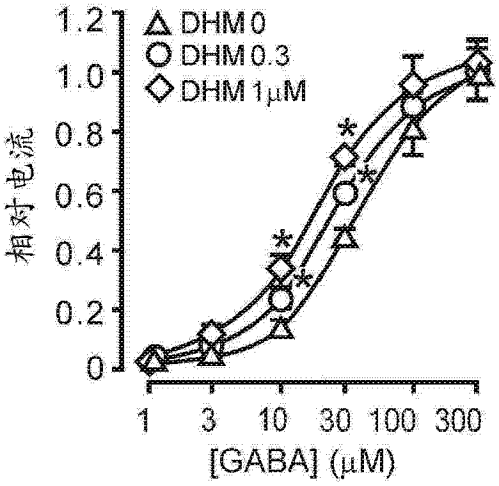


图 11D

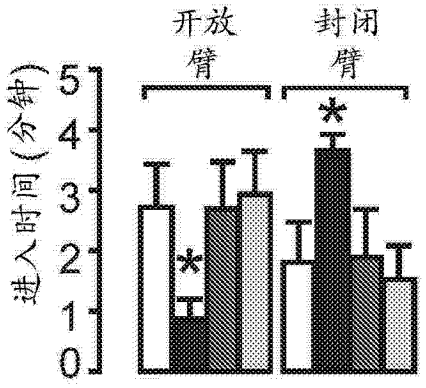


图 12A

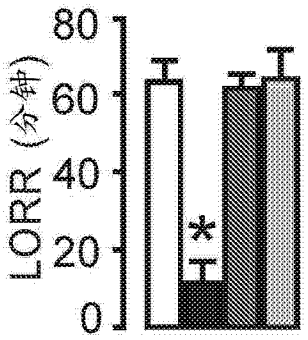


图 12B

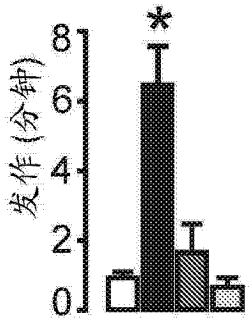


图 12C

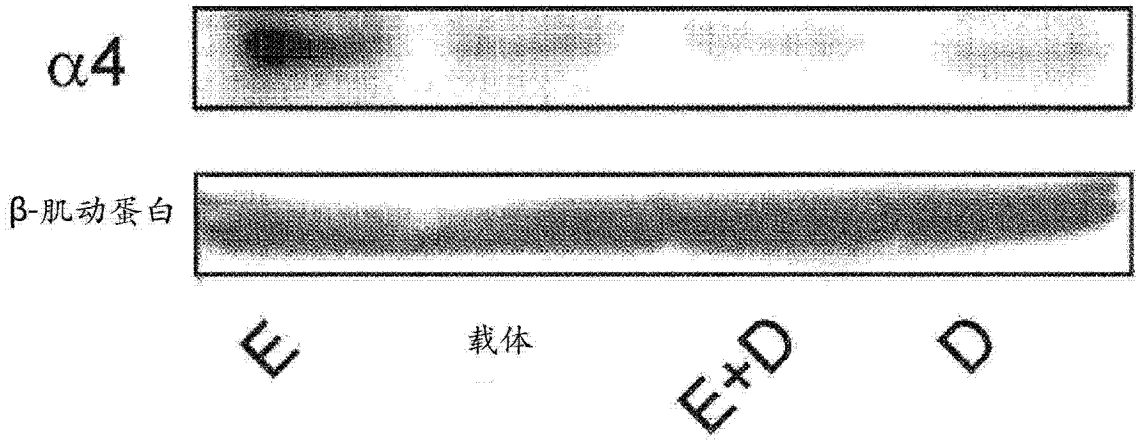


图 12D

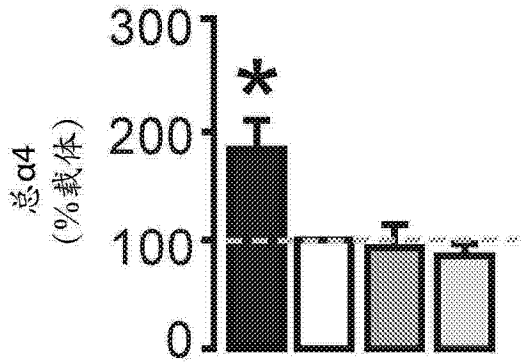


图 12E

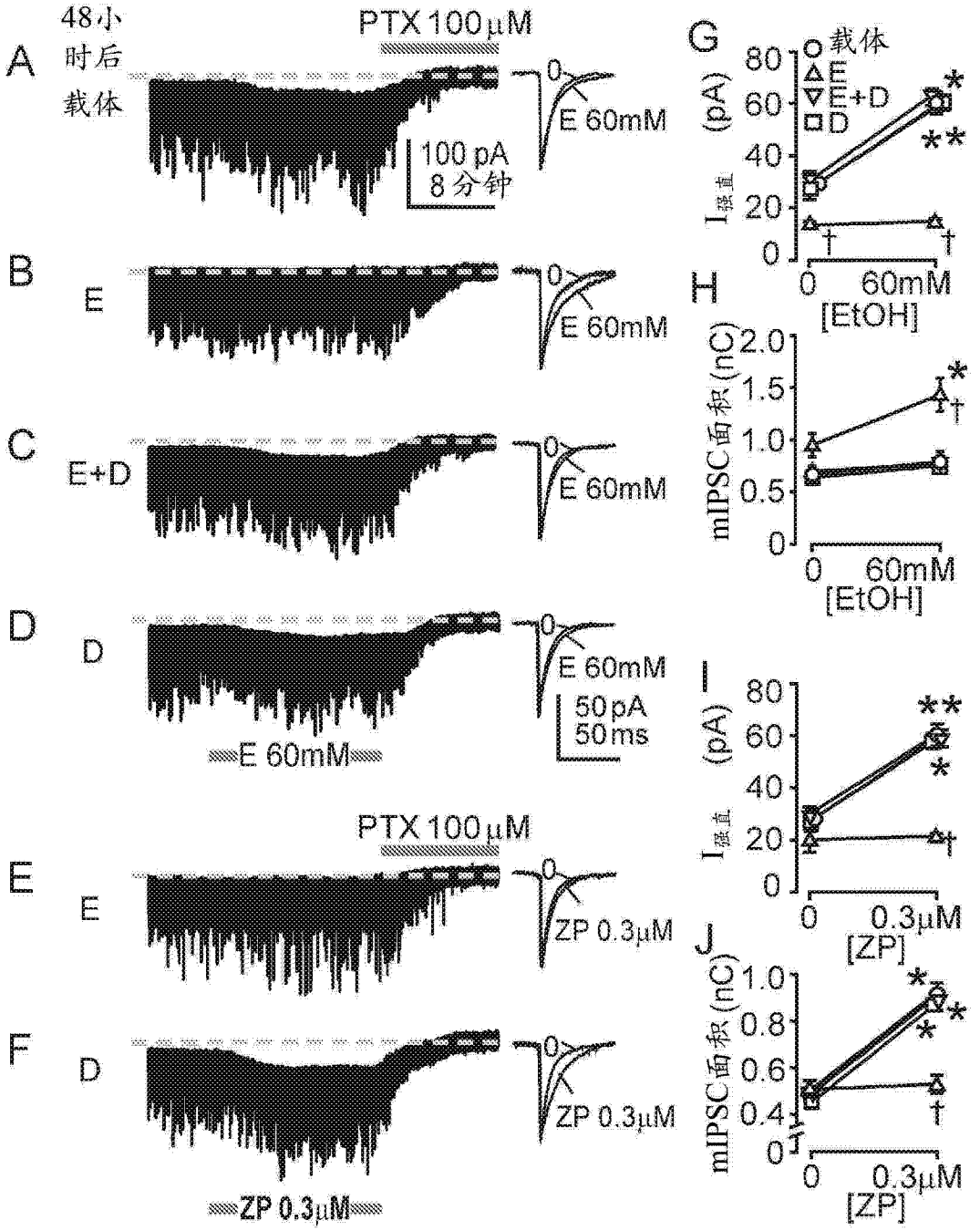

A
48小时后载体
PTX 100μM
E 60mM
100 pA
8 分钟
B
E
E 60mM
C
E+D
E 60mM
D
D
E 60mM
50 pA
50 ms
E 60mM
E
E
PTX 100μM
ZP 0.3μM
F
D
ZP 0.3μM
ZP 0.3μM
G
载体
E
E+D
D
I强直 (pA)
60mM
[EtOH]
H
mIPSC面积 (nC)
60mM
[EtOH]
I
I强直 (pA)
0.3μM
[ZP]
J
mIPSC面积 (nC)
0.3μM
[ZP]

图 13

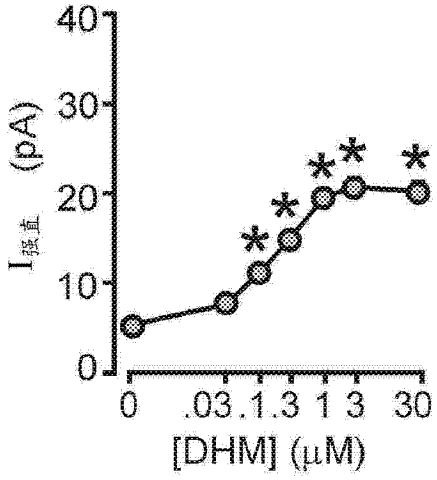


图 14A

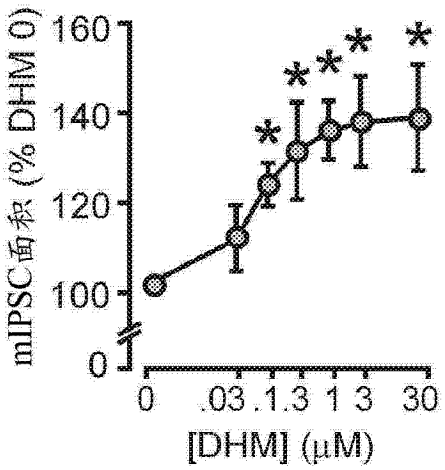


图 14B

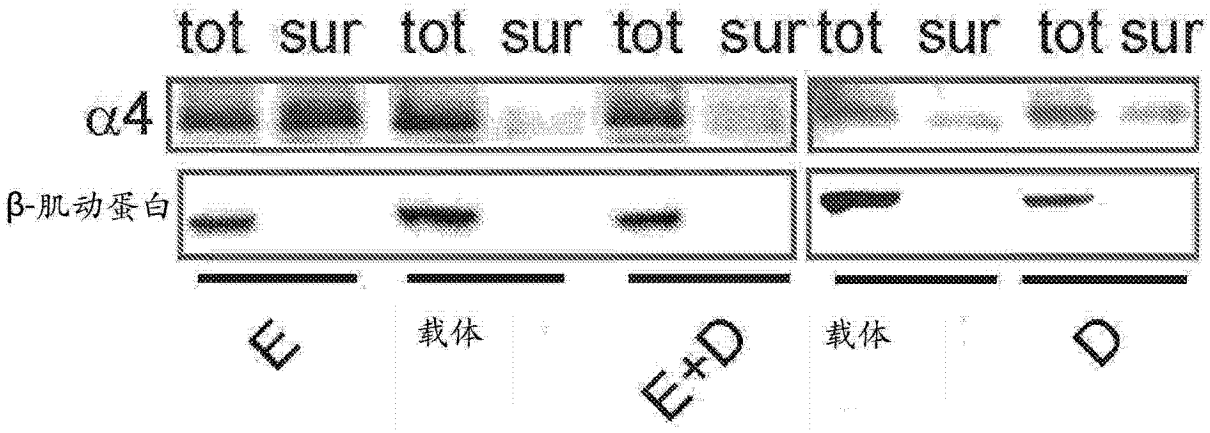


图 14C

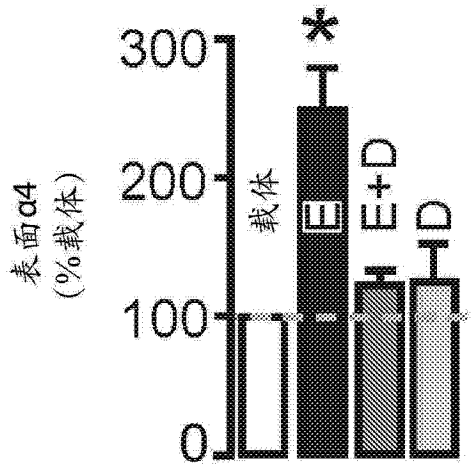


图 14D

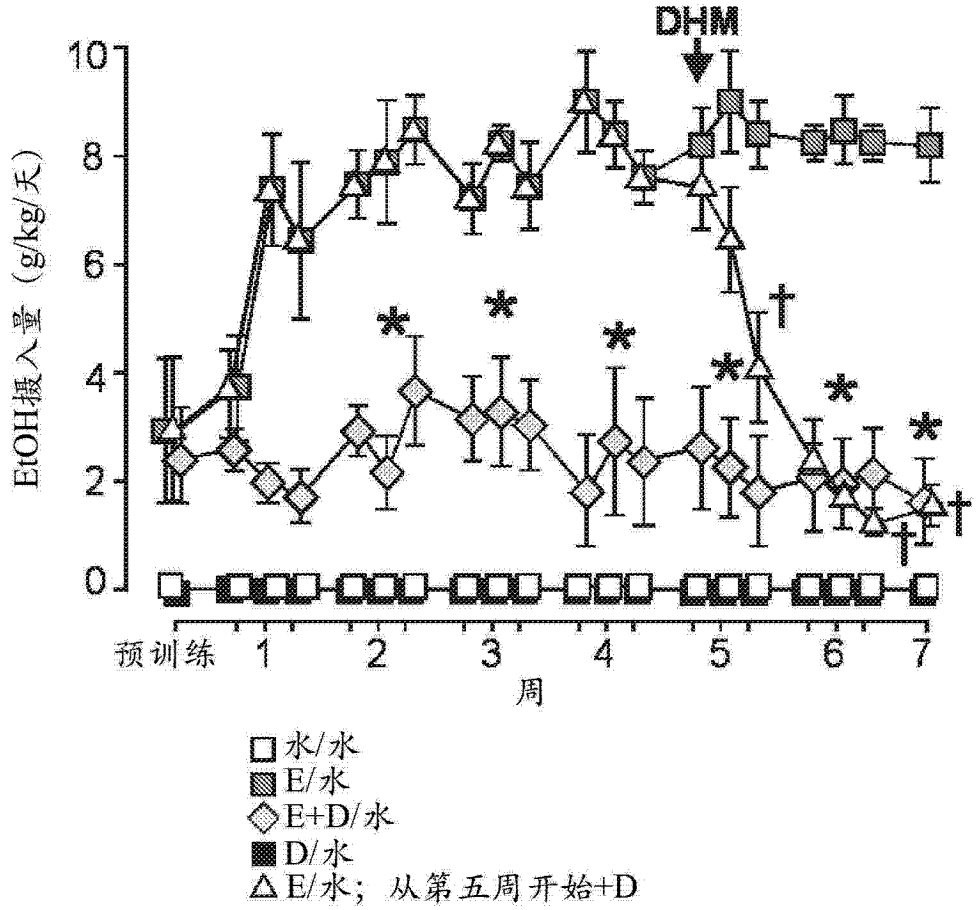

DHM
10
8
6
4
2
0
EtOH摄入量（g/kg/天）
预训练
1
2
3
4
5
6
7
周
水/水
E/水
E+D/水
D/水
E/水；从第五周开始+D

图 15A

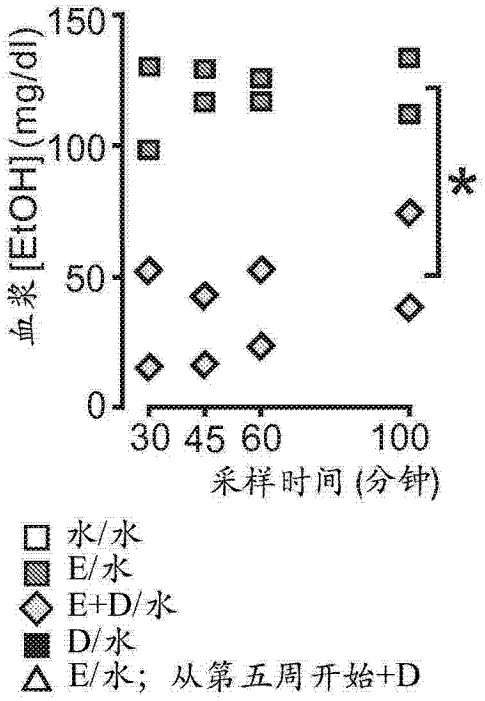

150
100
50
0
血浆 [EtOH](mg/dl)
30 45 60 100
采样时间 (分钟)
*
水/水
E/水
E+D/水
D/水
E/水；从第五周开始+D

图 15B