

國立臺灣大學醫學院毒理學研究所



碩士論文

Graduate Institute of Toxicology

College of Medicine

National Taiwan University

Master Thesis

NMDA 受體調節劑對大鼠 K 他命自我給藥之影響

Effects of NMDA receptor modulators on ketamine

self-administration in rats

蕭宇晴

Yu-Ching Hsiao

指導教授：陳慧誠 劉秉慧 博士

Advisor : Hwei-Hsien Chen, Ph.D

Biing-Hui Liu, Ph.D

中華民國 109 年 7 月

July 2020

國立臺灣大學碩士學位論文  
口試委員會審定書

NMDA 受體調節劑對大鼠 K 他命自我給藥之影響  
Effects of NMDA receptor modulators on ketamine  
self-administration in rats

本論文係蕭宇晴君(R07447006)在國立臺灣大學毒理學研究所完成之碩士學位論文，於民國 109 年 07 月 07 日承下列考試委員審查通過及口試及格，特此證明

口試委員：

劉東慧

(簽名)

(指導教授)

陳慧誠

詹紹煥

姚皓傑

系主任、所長

劉東慧

(簽名)



## 誌謝

我要感謝陳慧誠老師，五年前初來乍到時陳老師問我有沒有取得碩士學位的規劃，從助理到完成碩士學位的過程陳老師不但給我各種機會外，在我迷惘時指引我、沮喪時鼓勵我及困難時幫助我，陳老師不僅是我學業上的老師，亦是我的榜樣，期許自己能像陳老師一樣自信發光，對各種事物抱有熱忱且積極，與人相處友善熱情，樂觀開朗充滿活力。感謝我的另一位指導教授，劉秉慧老師對我的指導及關懷，與您相處如沐春風，期盼未來我也能像您一樣讓人感到溫暖且有力量。謝謝詹銘煥老師及姚皓傑老師撥冗擔任口試委員並給予我許多建議。謝謝王明升老師及徐雪瑩老師在我大學畢業前夕迷茫時鼓勵我往心之所向努力。

謝謝美儀學姊在實驗上的幫助及生活中的所有關心，每當我辛苦時，你往往第一時間向我伸出援手幫助我；謝謝崇斌學長幫助我克服學業上的困難，你總是不厭其煩地跟我解說，謝謝你跟美儀學姊總在我受挫折時鼓勵我、給我信心、並且有好吃好玩的經常想到我，遇到你們是我最大的幸運；謝謝偉唐學長、欣穎學姊、冠伶學姊、了塵學姊、筠婷、婕敏、陳浩、亦賢、哲維的關懷照顧，因為有你們，這五年一點都不漫長。謝謝映慈學姊、張永學長及睿豐的照顧，雖然相處時間短暫，但很高興認識你們。謝謝縈倩、佳鴻當我的垃圾桶，你們是最佳盟友以及額外的大收穫。謝謝思妤總是在我需要時出現。謝謝 K 大幫我修改備審資料和一針見血的建議，你就像個領航員一樣。謝謝琬琳姊協助處理各項事務。謝謝瑞雲及家寬用心地照顧老鼠，讓我的實驗能順利進行。謝謝老鼠溫馴地配合我進行各項實驗。謝謝所有鼓勵、幫助及祝福我的人。

感謝我的父母蕭振宇先生及吳秀荷女士，因為你們的支持、不放棄、培養及鼓勵才有現在的我；謝謝我的姊姊蕭鈺婕、妹妹蕭庭譽，因為有你們的支持、陪伴及包容，我才能走完這條路，我親愛的家人，你們是我最珍貴的寶藏及最強力的後盾。最後，我要謝謝自己，你很棒，恭喜你進入下一個人生階段。



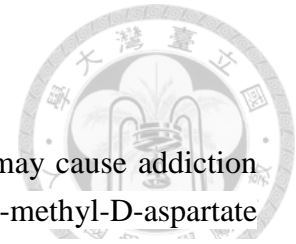
## 摘要

K 他命濫用為全球面臨之公衛議題，K 他命可能經由阻斷 N-甲基-D-天門冬胺酸受體(N-methyl-D-aspartate receptor, NMDA receptor)導致成癮。本研究欲釐清調節 NMDA 受體功能的藥物是否能降低獲取 K 他命的動機及尋求 K 他命的再犯反應，測試藥物包括肌胺酸，D-絲胺酸，和 L-4-fluorophenylglycine (L-4FPG)；其中肌胺酸是甘胺酸轉運蛋白 1 抑制劑並且作用於 NMDA 受體甘胺酸結合位點，D-絲胺酸為 NMDA 受體甘胺酸結合位點之內生性共同致效劑，L-4FPG 是中性胺基酸轉運蛋白 alanine-serine-cysteine transporter(ASCT)抑制劑，藉由抑制 D-絲胺酸再回收以提高突觸間隙 D-絲胺酸的濃度，因此三種測試藥物均可以調節 NMDA 受體的功能。本研究首先利用大鼠自我給藥系統訓練 Sprague-Dawley 公鼠按壓壓桿以獲得靜脈 K 他命輸注(0.5 mg/kg/infusion)，當訓練穩定後進行以下實驗：(1)在累進比率時程下，測試分別給予肌胺酸(30 及 100 mg/kg)、D-絲胺酸(30 及 100 mg/kg)或 L-4FPG (0.3 及 1 mg/kg)對於 K 他命靜脈內自我給藥大鼠之劑量依賴反應。(2)測試在線索(cue)或 K 他命誘發的再犯試驗前，急性給予肌胺酸(30 及 100 mg/kg)、D-絲胺酸(30 及 100 mg/kg)或 L-4FPG (1 及 3 mg/kg)之劑量依賴反應。(3)測試在消除階段給予肌胺酸(100 mg/kg)、D-絲胺酸(100 mg/kg)或 L-4FPG (3 mg/kg)是否可以促進消去形成，並利用線索或 K 他命誘發的再犯試驗來測試藥物效果。結果顯示，於累進比率時程下急性前給予肌胺酸(100 mg/kg)、D-絲胺酸(100 mg/kg)或 L-4FPG(1 mg/kg)皆會降低大鼠按壓壓桿的次數(lever presses)、斷點數值(breakpoint)以及所獲得的藥物輸注次數(number of infusions)，與此相同的抑制效果也存在於線索及 K 他命誘導再犯試驗中，不過，於誘導再犯試驗中，L-4FPG 的用量須提高至 3 mg/kg 才有顯著差異；此外，於消除階段給予此三種藥物，只能防止線索誘發再犯反應但是不能促進消除。此三種藥物均不影響壓桿取得食物粒的實驗以及運動活性。本研究結果顯示，肌胺酸、D-絲胺酸及 L-4FPG 可能具有防止 K 他命成癮的渴藥及復發的潛力，並為未來臨床研究奠立基礎。

關鍵字: K 他命、自我給藥、消除、再犯反應、復發



## Abstract



Ketamine abuse is a worldwide public health problem. Ketamine may cause addiction through blocking the phencyclidine (PCP) binding site of N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors. The present study examined whether the drugs with NMDA receptors-modulation ability could attenuate the motivation and reinstatement of ketamine-seeking behavior. Sarcosine is a glycine transporter 1 inhibitor and works on the glycine binding site of NMDA receptor. D-serine is an endogenous NMDA receptor co-agonist at the glycine binding site. L-4-fluorophenylglycine (L-4FPG) is a neutral amino acid transporter ASCT (Alanine/Serine/Cysteine-preferring Transporter) inhibitor by blocking the reuptake of D-serine in the synaptic cleft. In the present study, male Sprague-Dawley rats were trained to press an active lever for self-administration (SA) of intravenous ketamine (0.5 mg/kg/infusion), and then subjected to the following three experiments. Experiment 1 is to assess the dose-dependent effects of acute treatment of sarcosine (30 and 100 mg/kg), D-serine (30 and 100 mg/kg), and L-4FPG (0.3 and 1 mg/kg) on the self-administration motivation which is determined by the breakpoint according to during the progressive ratio (PR) schedule. Experiment 2 is to evaluate the acute effects of sarcosine (30 and 100 mg/kg), D-serine (30 and 100 mg/kg), and L-4FPG (1 and 3 mg/kg) on the cue-induced and ketamine priming-induced reinstatement of ketamine seeking behaviors. Experiment 3 is to examine the repeated administration of sarcosine (100 mg/kg), D-serine (100 mg/kg), and L-4FPG (3 mg/kg) during extinction on the cue-induced and ketamine priming-induced reinstatement of ketamine seeking behaviors. Our data demonstrated that sarcosine (100 mg/kg), D-serine (100 mg/kg) and L-4FPG (1 mg/kg) significantly decreased the lever presses, breakpoint and number of infusions for ketamine and attenuated the cue-induced and ketamine priming-induced ketamine seeking behavior; however, the dose of L-4FPG must be increased to 3 mg/kg to show significant difference on reinstatement. Additionally, administration of these three compounds during extinction only prevented cue-induced reinstatement of ketamine-seeking behavior but did not facilitate the extinction. These three drugs had no effect on food self-administration and locomotor activity in the present study. Our findings suggest that sarcosine, D-serine, and L-4FPG have the anti-craving and anti-relapse potential for treatment of ketamine addiction, laying the groundwork for future clinical research.

**Keywords:** ketamine, self-administration, extinction, reinstatement, relapse

# 目錄



壹、介紹 .....	1
一、 K 他命 (ketamine) .....	1
二、 K 他命與成癮 .....	5
三、肌胺酸 (Sarcosine) .....	10
四、 D-絲胺酸 (D-serine) .....	11
五、 L-4-氟苯基甘胺酸 (L-4-fluorophenylglycine, L-4FPG) .....	12
貳、實驗假說 .....	14
參、研究動機與目的 .....	16
肆、實驗材料、方法及結果 .....	17
一、實驗動物 .....	17
二、實驗藥品配置 .....	17
三、實驗方法及流程 .....	19
四、實驗數據分析 .....	26
五、實驗結果 .....	27
伍、討論 .....	35
陸、結論 .....	39
柒、參考資料 .....	40
捌、圖表 .....	52

## 圖表目錄

Figure 1. Ketamine self-administration at 0.5 mg/kg/infusion. ....	52
Figure 2. Effects of acute sarcosine on the motivation to self-administer ketamine under a PR schedule of reinforcement. ....	53
Figure 3. Effects of acute D-serine on the motivation to self-administer ketamine under a PR schedule of reinforcement. ....	54
Figure 4. Effects of acute L-4FPG on the motivation to self-administer ketamine under a PR schedule of reinforcement. ....	55
Figure 5. Effects of acute sarcosine on cue- and ketamine prime-induced reinstatement of ketamine seeking. ....	56
Figure 6. Effects of acute D-serine on cue- and ketamine prime-induced reinstatement of ketamine seeking. ....	57
Figure 7. Effects of acute L-4FPG on cue- and ketamine prime-induced reinstatement of ketamine seeking. ....	58
Figure 8. Effects of sarcosine, D-serine and L-4FPG during extinction session of ketamine self-administration. ....	59
Figure 9. Food self-administration. ....	60
Figure 10. Effects of sarcosine on food reinforcement under a PR schedule and cue- and food priming-induced reinstatement of food seeking. ....	61
Figure 11. Effects of D-serine on food reinforcement under a PR schedule and cue- and food priming-induced reinstatement of food seeking. ....	62
Figure 12. Effects of L-4FPG on food reinforcement under a PR schedule and cue- and food priming-induced reinstatement of food seeking. ....	63
Figure 13. Effects of sarcosine on locomotor activity in the open field. ....	64
Figure 14. Effects of D-serine on locomotor activity in the open field. ....	65
Figure 15. Effects of L-4FPG on locomotor activity in the open field. ....	66





## 壹、介紹

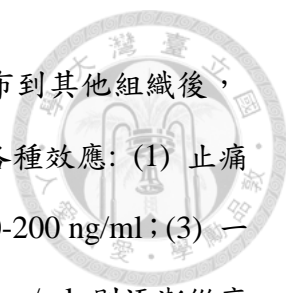
### 一、 K 他命 (ketamine)

K 他命於 1962 年由 Clavin Steven 首次合成，是天使塵 (phencyclidine, PCP) 的衍生物(Peltoniemi et al., 2016)，具有麻醉、鎮靜及止痛效果，1970 年經美國食品藥物管理局批准作為麻醉劑上市(Dundee et al., 1970)，常見的不良反應為幻覺、精神混亂或失憶等(Morgan et al., 2012)，不過近年來，K 他命也被用於改善物質使用疾患(substance use disorder)，例如酒精、古柯鹼、鴉片類以及治療憂鬱症、躁鬱症、止痛、哮喘等(Jones et al., 2018; Xu and Lei, 2014)。然而，從 1980 年代 K 他命開始遭到濫用，其濫用問題遍佈全球(Yew, 2015)，因此各國政府相繼訂定相關法規來管制。在台灣，K 他命是青少年常用的濫用藥物之一，俗稱 K 仔、卡門或 Special K，主要暴露途徑為口服、鼻吸、煙吸或注射方式，使用後出現幻覺及欣快感等現象並且具有助興效果，因此，經常出現在各種娛樂活動中。長期使用 K 他命除了造成成癮外，也對大腦及膀胱等多處器官產生永久性傷害，現今台灣列為第三級毒品。

#### (1) K 他命吸收與代謝

暴露 K 他命常見的途徑為，口服、吸入及注射方式等(Dinis-Oliveira, 2017)。經首渡效應(first-pass effect)代謝為 norketamine 及 dehydronorketamine(Qi et al., 2010)，依照暴露途徑生物有效性(bioavailability)有所不同(口服 20%、鼻吸 50%、肌肉注射 90%)(Fanta et al., 2015; Malinovsky et al., 1996)。

K 他命為高脂溶性物質與白蛋白親和性低(10-30%)(Dayton et al., 1983)，可快速通過血腦屏障(blood-brain barrier)造成麻醉效果，在人體中不同的投予方式，需等待不同的時間發揮效用(1. 肌肉注射及皮下注射後：10-15 分鐘發揮麻醉作用，並持續 30-120 分鐘；2. 靜脈注射：1-2 分鐘發揮效果，持續 20-60 分鐘；3. 口服：



20-30 分鐘發揮效果，持續 60-90 分鐘(Barash et al., 2013))，分布到其他組織後，麻醉效果即停止。K 他命根據在人體中的血漿濃度的不同產生各種效應：(1) 止痛作用濃度約：100-160 ng/ml；(2) 嗜睡及視覺扭曲反應濃度約：50-200 ng/ml；(3) 一般麻醉濃度約：2000-3000 ng/ml；(4) 當血漿濃度低於 500-1000 ng/ml 則逐漸從麻醉甦醒(Sinner and Graf, 2008)。

K 他命在成人的半衰期(half-life)是 2-3 小時，清除率(elimination clearance)為 12-20 ml/kg/min，且女性高於男性 20%，在兒童的半衰期為 100 分鐘，清除率約 16.8 ml/kg/min (Mion and Villevieille, 2013)。

K 他命是由細胞色素 P450(CYP450)在肝臟進行代謝，除此之外，也可在腎臟、小腸及肺進行代謝(Edwards and Mather, 2001)。K 他命透過 CYP3A4 代謝為 norketamine (80%)、6-hydroxy-norketamine (15%)及 hydroxy-ketamine (5%)(Mion and Villevieille, 2013)。在動物實驗發現，norketamine 可通過血腦屏障，具有些微麻醉效果(20-30%)(Malinovsky et al., 1996)，這也是 K 他命在血中濃度降低時，仍然保有麻醉功效的原因。K 他命及其代謝物可經由尿液排除(2% ketamine、2% norketamine、16% dehydronorketamine、80% hydroxylated ketamine 代謝物與 glucuronic acid 形成的共軛物質)(Adamowicz and Kala, 2005; Karch and Drummer, 2008)。

## (2) K 他命的藥理學作用

K 他命為 NMDA 受體的非競爭型拮抗劑。其兩種消旋混合物：S(+)-K 他命及 R(-)-K 他命，S(+)-K 他命對 NMDA 受體親和性較高(S(+): Ki:0.2~1.6  $\mu$ M、R(-): Ki:0.6~6.4  $\mu$ M)(Hirota and Lambert, 1996; Zeilhofer et al., 1992)且麻醉效果比 R(+)-K 他命高 3-4 倍(靜脈注射：S(+): 140 $\pm$ 21 mg；R(-): 429 $\pm$ 37 mg)(White et al., 1985)。

NMDA 受體是離子通道受體，具有兩個結合位點：麩胺酸(glutamate)－促效劑(agonist)及甘胺酸(glycine)－共同致效劑(co-agonist)，必須兩個胺基酸同時結合上 NMDA 之後才能被活化，並開啟通道(Thomson et al., 1989)。NMDA 受體由多種次

單元(subunit)組成：NR1、NR2及NR3，不同的次單元具有不同的結合位點，例如：NR1—甘胺酸結合位點(glycine binding site)，glycine、D-serine及D-cycloserine皆可作用在此結合位點。NR2—麩胺酸結合位點(glutamate binding site)。另外也有其他調節位置，像是Mg<sup>2+</sup> site—阻斷離子通道，使鈣離子無法流入。Phencyclidine(PCP) site—阻斷NMDA受體活化，拮抗劑包含K他命、phencyclidine及dizocilpine(MK-801) (Fig. A)。目前證據顯示NMDA受體是由2個NR1和2個NR2、2個NR3或1個NR2+1個NR3構成的異四聚體(heterotetramers) (Fig. B)，根據不同的組成，具有不同的生物化學及物理特性(Yamakura and Shimoji, 1999)。

除了NMDA受體，K他命也作用於其他受體。像是對毒蕈鹼型受體(muscarinic receptor)的抑制效果：M1亞型 (Ki:45 μM)、M2亞型 (Ki:294 μM)、M3亞型(Ki:246 μM)(Hirota et al., 2002)。抑制類鴉片受體(opioid receptor)：μ-opioid receptor (Ki:26.8 μM)、κ-opioid receptor (Ki:85.2 μM)、δ-opioid receptor (Ki:66 μM)(Hustveit et al., 1995)。此外，對單胺類轉運蛋白(monoamine transporter)：正腎上腺素轉運蛋白(norepinephrine transporter)(Ki:66.8 μM)、血清素轉運蛋白(serotonin transporter) (Ki:161.7 μM)、多巴胺轉運蛋白(dopamine transporter) (Ki:62.9 μM)(Nishimura et al., 1998)也有抑制作用。

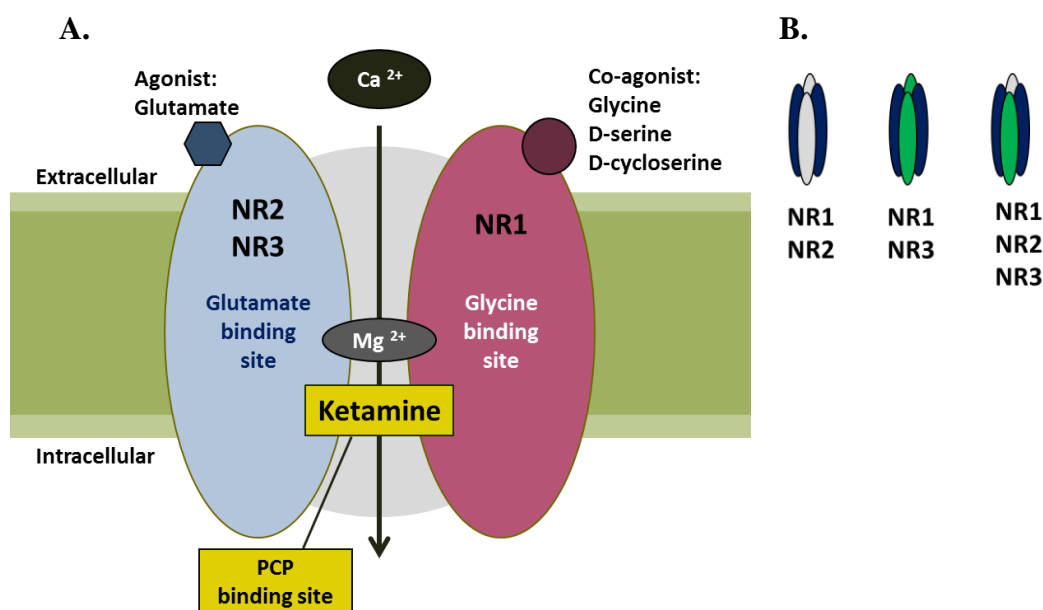




圖1. (A) K他命結合於PCP結合位點進而阻斷NMDA受體功能。(B) NMDA受體由不同的次單元組成。

### (3) K他命於神經系統的作用

K他命作為NMDA受體非競爭型拮抗劑，結合在PCP binding site，阻斷陽離子經離子通道流入，使NMDA受體功能低下，影響神經傳導功能(Mion and Villevieille, 2013; Smith et al., 2002)。NMDA受體負責學習、記憶及認知等功能，NMDA受體功能低下產生記憶及學習缺失、思覺失調症(schizophrenia)、憂鬱症等精神疾病，過度活化則可能發生癲癇(Newcomer et al., 2000; Tsai, 2016)。

利用核磁共振成像檢測K他命濫用者(0.5-12年)的大腦，發現不管是位於前額葉、頂葉、枕葉、邊緣系統、腦幹或紋狀體內的灰質或白質皆受到損傷(Wang et al., 2013)。K他命會增加多巴胺在前額葉皮質(medial prefrontal cortex)及紋狀體(striatum)中的釋放(Breier et al., 1998)急性及慢性暴露K他命，也會對啮齒類動物及人類的記憶造成傷害(Morgan and Curran, 2006)。

K他命可作為抗憂鬱劑，特別用於難治型憂鬱症及重鬱症，給予低劑量K他命大約2小時內可產生抗憂鬱作用(Phelps et al., 2009; Zarate et al., 2006)，並且經過單次治療，療效就能維持數天至數周(Irwin and Iglewicz, 2010; Liebrezn et al., 2007)，除此之外，其他NMDA受體PCP site拮抗劑—PCP、MK-801都同樣具有抗憂鬱的潛力(Lodge and Mercier, 2015; Sernagor et al., 1989; Trullas and Skolnick, 1990)。

使用K他命會造成類精神疾病症狀，如認知缺陷、記憶障礙(Adler et al., 1998)、幻覺、漂浮感及與周圍環境知覺分離(Collier, 1972)。因此在啮齒類動物(Keilhoff et al., 2004)及人類(Driesen et al., 2013)K他命經常被用於建立類思覺失調症模型(Ezquerro-Romano et al., 2018)。

K他命為解離性麻醉劑，隨著劑量增加能造成近乎完全的麻醉和鎮靜效果，相較其他麻醉藥不同的地方在於對麻醉者的呼吸功能影響輕微甚至可緩解疼痛。K他

命的麻醉效果是通過電壓依賴性 (voltage-dependent) 及濃度依賴性 (concentration-dependent) 阻斷NMDA調控的電流，減少NMDA受體通道平均開啟時間及頻率(MacDonald et al., 1991; MacDonald et al., 1987; Orser et al., 1997)。

K他命也是止痛藥的一種，作用於脊髓背角(dorsal horn of the spinal cord)，可治療慢性疼痛如纖維肌痛症、燒傷、神經痛或偏頭痛等，於術前給予低劑量K他命能舒緩術後疼痛，此外K他命對鴉片類止痛藥具有加乘效果(Ezquerro-Romano et al., 2018)。

## 二、 K 他命與成癮

### (1) 成癮之神經科學概論

藥物成癮的定義為使用者明知使用藥物後會產生不良反應，仍舊無法控制地強迫性使用藥物(Goodman, 1990; Koob and Le Moal, 1997)。可分為三個階段，參與的神經迴路也不同：(1)沉醉、陶醉、中毒(intoxication)/大量使用(binge)－藥物會刺激中腦皮質獎勵/動機系統(mesolimbic reward/motivation system)使多巴胺大量釋放，強化了獎勵(如:欣快感)、藥物及線索(如:針頭)之間的條件式連結，造成使用者增加用藥的頻率及次數(Di Chiara, 2002; Volkow and Baler, 2015)。此處的intoxication指的為使用藥物後，引起類似酒醉，微醺、飄飄然的狀態而非單純指中毒現象(2)戒斷(withdrawal)－停藥後中腦皮質獎勵/動機系統功能低下，並且 basal forebrain-extended amygdala-habenula迴路活化(Batalla et al., 2017; Koob and Le Moal, 2005)，引發負面情緒、不適感、憂鬱、焦慮等戒斷症狀，導致使用者渴望藥物(craving)，並希望藉由藥物來滿足 (preoccupation)此不適感(Volkow and Morales, 2015)。(3)復發(relapse)－在渴望階段，條件刺激(藥物、線索)引起多巴胺從紋狀體中釋放，從而引發尋求及使用藥物的動機及行為(Volkow et al., 2006)。此時期也會活化釋放麩胺酸的神經元，從前額葉迴路[眶額皮質(orbitofrontal)及前扣帶迴皮層]、海馬迴(hippocampus)及杏仁核(amygdala)投射至腹側被蓋區(ventral

tegmental area)及紋狀體(striatum)，引發再次使用藥物的行為(Robbins et al., 2008; Volkow et al., 2016; Volkow et al., 2005)。



## (2) 成癮之行為制約理論

以心理學的角度來看，成癮是制約學習的結果，酬賞則是主要的核心概念，以下理論可用於解釋藥物成癮。

### A. 古典制約 (classical conditioning)

以帕夫洛夫(Ivan Pavlov)發表的「狗的唾液制約反射實驗」為例，其實驗原理及方法為(Pavlov and Anrep, 1928)：

(1) 非制約刺激 (unconditioned stimulus, US) 能引起非制約反應 (unconditioned response, UR)，並且不需經過學習：狗聞到食物(US)→流口水(UR)；狗聽到鈴聲(CS)→不流口水(UR)。

(2) 制約刺激 (conditioned stimulus, CS) 能引起制約反應 (conditioned response, CR)：狗聞到食物(US)時伴有鈴聲(CS)→流口水(UR)。當制約反應形成後，狗聽到鈴聲(CS)也會出現流口水(UR=CR)的制約反射。

### B. 操作制約 (operant conditioning)

操作制約是一種學習行為，由個體主動做出行為以獲得結果的方式，輔以增強物強化行為。以史金納 (B. F. Skinner) 發表的「大白鼠壓桿實驗」為例，其實驗原理及方法為，將老鼠放置於一個箱子內，此箱內部設置一個壓桿，當老鼠肚子餓四處探索時誤觸了壓桿，食物便掉出來，重複多次後，因食物的增強作用 (reinforcement)，老鼠學會只要按壓壓桿就能取得食物。由於壓桿是取得食物的手段或工具，因此又稱為工具性制約 (instrumental conditioning)。當個體做出行為時，給予某種誘因、強化物 (reinforcer) 加強它持續進行該行為的方式，即為增強作用 (Skinner, 1963)。

### C. 藥物成癮與制約

藥物成癮也是種制約。使用者因強化物(欣快感)，而重複使用藥物(US)並同時與環境線索(CS)做連結，制約成功之後(成癮)，使用者只要接觸藥物或線索便會出現尋求藥物(CR)的行為，此現象可用來解釋渴望(craving)及復發(relapse)(Chandler and Gass, 2013; Childress et al., 1988; Childress et al., 1999; Kalivas and Volkow, 2005)。

#### **D. 自我給藥模型**

自我給藥模型是常見研究成癮的動物模型之一，此設計含有操作制約的要素，用來模擬人類濫用藥物的情境。自我給藥操作箱內設有壓桿、線索(燈光)，當老鼠按壓壓桿時，燈光亮起同時獲得藥物，藉由藥物的強化作用(欣快感)，讓老鼠將按壓壓桿—線索(燈光)—欣快感做連結，已被廣泛用於評估藥物的強化作用及動機(Bossert et al., 2013; Spealman and Goldberg, 1978)。

#### **習得(acquisition)**

利用增強作用讓老鼠形成制約過程稱之為習得。增強作用可分為正向(positive)和負向(negative)，老鼠獲得的回饋又可分成獎勵或懲罰：(1)當老鼠做出預期的行為後，給予他喜歡的獎賞稱為正向獎勵(positive reinforcement)；(2)移除不喜歡的東西稱為負向獎勵(negative reinforcement)；(3)給予懲罰稱為正向懲罰(positive punishment)；(4)移除喜歡的東西稱為負向懲罰(negative punishment)(Maag, 2001; McConnell, 1990; Premack, 1959)。根據實驗設計需求，可以利用不同的增強作用來建立制約。固定比率(fixed-ratio, FR)程序為老鼠按壓壓桿「固定次數」後得到1次回饋的方式，來增強個體行為的常見方式之一，如老鼠每按壓1次壓桿獲得1次回饋或是每按壓2次壓桿獲得1次回饋等等。累進比率(progressive ratio, PR)程序則是藉由「逐漸增加」按壓壓桿次數來增強個體行為，並且其breakpoint數值經常用來評估動物對回饋的「動機(motivation)」(Griffiths et al., 1979; Hodos, 1961)，其按壓壓桿次數是根據公式： $\text{ratio} = [5 e^{(\text{reinforce} \times 0.2)}] - 5$  (ie, 1, 2, 4, 6, 9, 12, 15, 20, 25, 32, etc)所決定，老鼠為獲得第1次回饋需按壓1下，獲得第2次回饋需按壓2下，獲得第3次回饋需按壓4下等等以此類推，而老鼠願意按壓多少下來獲得回饋，這個數字則稱之為「breakpoint=



動機」。本研究是利用固定比率程序及正向獎勵作用讓老鼠對壓桿—線索(燈光)—欣快感形成制約，並以累進比率評估動物對藥物的動機。

### **消除(extinction)**

此階段的老鼠按壓壓桿，無法獲得線索跟藥物，因此逐漸減少按壓壓桿的行為。之前原本認為消除是將原本成癮的記憶/制約(藥物—線索—欣快感)刪除(Rescorla and Wagner, 1972)，實際上，消除是形成一個新的學習記憶，其相關的證據為(1)消除後，只需要一次的刺激，就能誘導出尋求藥物(drug-seeking)的行為。(2)經過長時間的消除後，還是會出現尋求藥物的行為，表示先前的成癮記憶並未被刪除。(3)經過消除後，重新再進行習得訓練，形成新制約所需要花費的時間較原本的短(Chandler and Gass, 2013)。與消除相關的腦區包括前額葉皮質、紋狀體、杏仁核、海馬迴及下視丘(Chandler and Gass, 2013)，透過藥理方法強化及促進消除記憶的形成，能降低尋求藥物行為及復發的機會(Chandler and Gass, 2013; Gass et al., 2014)。了解消除記憶的形成、參與的腦區及相關分子機轉，對於開發成癮藥物具有重大意義。

### **再犯(reinstatement)**

當老鼠經過消除訓練，再次接觸藥物、線索或壓力會產生渴藥現象造成再犯反應，此階段可用於模擬人類戒斷後的復發。再犯的發生牽扯複雜的因素，不同的藥物及情境在大腦中形成不同的連結，目前的證據顯示與再犯相關的腦區包含前額葉皮質、杏仁核、海馬迴及伏隔核(nucleus accumbens)(McGlinchey et al., 2016)，了解參與此階段的神經迴路及神經傳導物質，有助於發展相關的治療策略。

### **(3) K 他命成癮**

藥物的正向及負向增強作用皆會促進使用藥物的行為(Deneau et al., 1969; Weeks, 1962)，K他命的正向增強作用包含欣快感及解離麻醉效果，戒斷症狀則是負向增強作用，包含疲勞、焦慮、睡眠問題及煩躁不安(Chen et al., 2014)等。強迫游泳試




驗結果顯示，慢性暴露K他命增加老鼠在水中不動的時間，表示長期暴露K他命也會產生憂鬱症狀(Chatterjee et al., 2011)。

中腦皮質系統—腹側被蓋區、伏隔核及前額葉皮質是形成獎勵/動機的重要神經迴路之一(Carlezon Jr and Thomas, 2009)，先前研究指出，於伏隔核外殼區及前額葉皮質直接微量注射PCP、MK-801或3-((+/-)2-carboxypiperazin-4yl)propyl-1-phosphate對老鼠按壓壓桿的行為有增強作用，此外，將多巴胺受體拮抗劑sulpiride同時注射並不會降低老鼠對此三種藥物按壓壓桿的次數，但sulpiride與nomifensine—dopamine uptake inhibitor同時注射則有降低nomifensine壓桿次數的現象，表示PCP及其相關衍生物造成的獎勵及增強作用可能主要與NMDA受體相關而不是多巴胺系統(Carlezon and Wise, 1996)。K他命也是PCP衍生物的一種，因此推測K他命的正向增強作用可能也是與此兩個腦區中的NMDA受體阻斷相關。

已知伏隔核中的中型多棘神經元(medium spiny neurons, MSNs)在獎勵/動機系統中扮演關鍵角色(Carlezon Jr and Thomas, 2009)，MSNs為GABAergic neuron [以GABA (gama-aminobutyric acid)作為神經傳導物質的抑制型神經元]，MSNs受到多種神經傳導物質調控，除了VTA 投射過來的多巴胺神經元。也包含前額葉皮質中的麩胺酸神經元(Carlezon Jr and Thomas, 2009)。前額葉皮質藉由麩胺酸活化GABAergic MSNs上的NMDA受體再投射至腹側蒼白球(ventral pallidum)以調控獎勵/動機系統，而K他命可能會間接阻斷GABAergic MSNs上的NMDA受體或是直接阻斷前額葉皮質中的NMDA受體，減少GABAergic MSNs被活化，進而降低GABAergic MSNs投射至腹側蒼白球的作用(Smith et al., 2009)，而產生獎勵。因此，推測K他命造成的增強作用可能與抑制於伏隔核的GABAergic MSNs或前額葉皮質上的NMDA受體有關。

#### **(4) NMDA 受體調節劑與 K 他命**

NMDA受體開啟需要同時存在麩胺酸及甘胺酸，許多研究指出，調節NMDA受體



甘胺酸結合位點可以改善NMDA受體功能低下，並且調節甘胺酸結合位點相對於麩胺酸結合位點，神經毒性及癲癇的風險較低(Gray and Roth, 2007)。例如在大鼠模型中藉由甘胺酸轉運蛋白(glycine transport 1, GlyT1)抑制劑提升突觸間隙中甘胺酸濃度，增強NMDA受體活性，進而改善PCP誘導的思覺失調症(Gozzi et al., 2008)。肌胺酸(sarcosine)是GlyT1抑制劑，在恆河猴及臨床實驗皆已證實可以增強NMDA受體功能，並恢復K他命造成的記憶缺失(Castner et al., 2014; Roberts et al., 2010)，D-絲胺酸(D-serine)為NMDA受體甘胺酸結合位點的共同致效劑，在小鼠研究中發現，給予D-serine之氧化酶抑制劑(D-amino acid oxidase, DAAO)—sodium benzoate可以改善PCP造成的前脈衝抑制作用缺失及運動活性障礙(Matsuura et al., 2015)。

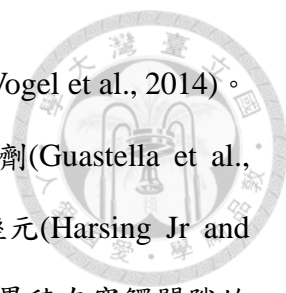
#### (5) NMDA 受體調節劑與成癮

在臨床治療成癮的研究中發現，NMDA受體甘胺酸結合位點的部分致效劑—D-cycloserine可促進消除記憶形成，並抑制酒精成癮復發(MacKillop et al., 2015)。除此之外，於大鼠模型中給予GlyT1抑制劑可以改善酒精(Vengeliene et al., 2018)、尼古丁(Cervo et al., 2013)成癮復發，D-serine則是可以降低古柯鹼再犯反應(Healey, 2017)。

由上述內容得知，調節NMDA受體甘胺酸結合位點能改善K他命或PCP造成的行為缺失以及K他命以外的成癮物質的再犯反應，而sarcosine與D-serine皆為NMDA受體甘胺酸結合位點的共同致效劑，sarcosine同時也是GlyT1抑制劑，兩者皆具有調節NMDA受體的效能，因此本研究假設給予sarcosine以及提升D-serine在突觸間隙的濃度調節NMDA受體甘胺酸結合位點能影響K他命成癮大鼠之行為。

### 三、肌胺酸 (Sarcosine)

Sarcosine 為白色無味結晶粉末，可溶於水，存在於豆類、肉類等食品當中，也可透過保健食品補充之，在人體當中，sarcosine 是膽鹼代謝(choline metabolism)為




glycine 的中間產物，為 N 端攜帶一個甲基的 N-methylglycine(De Vogel et al., 2014)。

Sarcosine 是甘胺酸轉運蛋白 1(glycine transporter 1, GlyT1)抑制劑(Guastella et al., 1992)，GlyT1 大多數位於星狀膠質細胞(astrocytes)及突觸後神經元(Harsing Jr and Matyus, 2013; Snyder and Ferris, 2000; Zafra et al., 1995)，負責將累積在突觸間隙的甘胺酸回收入細胞或突觸中，以維持甘胺酸濃度恆定，在調節 NMDA 受體中扮演重要的角色。Sarcosine 藉由抑制 GlyT1，進而增強 NMDA 受體功能。Sarcosine 同時也是 NMDA 受體甘胺酸結合位點的共同致效劑，可以調節 NMDA 受體，不過相較於甘胺酸，sarcosine 引起 NMDA 受體脫敏現象(desensitization)程度較小(Zhang et al., 2009)。

動物研究發現，給予 GlyT1 拮抗劑可以抑制 PCP-induced hyperactivity(Javitt et al., 1999)。Sarcosine(1000 mg/kg)提升大腦中甘胺酸濃度、減輕 NMDA 受體拮抗劑 MK-801 以及 serine racemase-null mutant 老鼠 (SR<sup>-/-</sup>)產生的思覺失調症狀，而未出現不良反應(Pei et al., 2019)。在臨床方面，連續 6 周給予 sarcosine (2 g/d)，得以改善思覺失調症的症狀，雖有出現心搏過速的不良反應，但幾天內就能恢復。Sarcosine 目前尚未有完整的毒理學資料，但已知 sarcosine 與其他治療精神疾病藥物合併使用，並不會加乘不良反應(Tsai et al., 2004)。此外，負責將 sarcosine 轉化成甘胺酸的 sarcosine dehydrogenase 是一種粒線體基質黃素酵素(mitochondrial matrix flavoenzyme)，肌胺酸血症患者(sarcosinemia)缺乏此種代謝酵素，因此會有高濃度的 sarcosine 存在血液及尿液中，不過此類型的病患，無不良反應出現(Sernagor et al., 1989)。

#### 四、D-絲胺酸 (D-serine)

絲胺酸是非必需胺基酸，富含於大豆、魚及雞蛋等食品中，也能由人體自行合成，分為 L 型(L-serine)及 D 型(D-serine)，D-serine 大多數存在於星狀膠質細胞(astrocyte)及神經元當中，維持大腦多種功能。內源性 D-serine 主要在神經膠質細胞當中合成；




L-serine由絲胺酸消旋酶(serine racemase, SR)轉化成D-serine，之後進入到突觸間隙，進而調節NMDA受體功能。累積在突觸間隙的D-serine可經由丙胺酸-絲胺酸-半胱胺酸-蘇胺酸運輸子 (alanine-serine-cysteine-threonine transporter, ASCT)與L-serine交換回收入神經膠質細胞，再被DAAO分解代謝(Wolosker et al., 2016)。

D-serine藉由作用在NMDA受體來調控神經可塑性及行為。當伏隔核內的D-serine含量降低，造成古柯鹼成癮動物的突觸可塑性受損及運動活性敏感化(D'Ascenzo et al., 2017)。體內D-serine減少與思覺失調症及老化也有相關，臨床數據顯示，口服D-serine可有效降低思覺失調症的負性症狀及認知缺陷(Kantrowitz et al., 2015; Panizzutti et al., 2014; Yamamori et al., 2014)。在酒精成癮的動物模式中，D-serine透過抑制伏隔核內的NMDA受體過極化，進而減少強迫性使用酒精行為(compulsive alcohol intake)(Seif et al., 2015)。並且D-serine (600 mg/kg)和sarcosine (600 mg/kg)皆可消除小鼠古柯鹼場地制約偏好(Yang et al., 2013)。給予DAAO抑制劑—sodium benzoate可以促進小鼠古柯鹼場地制約偏好的消除記憶形成(Tsai et al., 2016)。

#### 五、 L-4-氟苯基甘胺酸 (L-4-fluorophenylglycine, L-4FPG)

L-4FPG為合成胺基酸，外觀呈現白色無味粉末，不溶於水，近幾年發現L-4FPG可作為鈉離子依賴性中性胺基酸轉運子ASCT transporter的抑制劑。ASCT transporter位於astrocyte及神經元上，具有ASCT1(SLC1a4)及ASCT2(SLC1a5)兩種(Scopelliti et al., 2013)，可以運輸alanine、serine、cysteine及threonine(Rosenberg et al., 2013)，在serine shuttle中扮演重要的調控角色(Foster et al., 2016; Ribeiro et al., 2002)。Alan C. Foster團隊篩選多種胺基酸衍生物，發現苯基甘胺酸(phenylglycine)及其衍生物可以抑制ASCT1及ASCT2，並且有D-serine依賴性的促進NMDA受體調節長期增益效應現象(long-term potentiation of synaptic transmission)(Foster et al., 2017)，L-4FPG對ASCT1及ASCT2的IC<sub>50</sub>分別是244 μM 和318 μM(Foster et al., 2017)，在大鼠中相較



於其他衍生物有較短的半衰期(靜脈注射:0.82 h、皮下注射0.68 h、腹腔注射:1.04 h)、快速的清除率(靜脈注射:16.2 ml/min/kg、皮下注射7070 ng/ml/kg、腹腔注射:3940 ng/ml/kg)及良好的大腦通透性 (brain/plasma ratio：大鼠0.7-1.4、小鼠0.7-0.9)(Li et al., 2018)。在動物模型中，L-4FPG可以改善因NMDA受體功能低下造成的視覺異常及類思覺失調症(Li et al., 2018)。



## 貳、實驗假說

NMDA受體與K他命成癮相關，sarcosine為甘胺酸位點致效劑及GlyT1抑制劑，可直接或間接調節NMDA受體活性。另外，D-serine是NMDA受體甘胺酸內生性作用劑，提升D-serine濃度可能可以增強NMDA受體功能，藉由直接補充D-serine或是給予ASCT抑制劑L-4FPG阻止D-serine在突觸間隙被回收的方式可間接提高D-serine濃度，進而改善K他命造成的NMDA受體功能低下。本研究提出三項假設，第一個為，於K他命成癮大鼠給予sarcosine、D-serine及L-4FPG可以降低K他命的增強效應。另外，已有研究顯示，GlyT1抑制劑及D-serine可用於改善古柯鹼或酒精等成癮物質的復發，因此我們提出第二個假設，給予sarcosine、D-serine及L-4FPG可以降低K他命的線索及藥物誘導之再犯反應。再者，根據Chandler及Gass的假說(Chandler and Gass, 2013)，於消除階段給予治療藥物可能可以加速消除及固化(consolidation)消除的記憶，進而降低復發的機率，因此本研究的第三個假設為在消除階段給予sarcosine、D-serine及L-4FPG可以加速和固化消除記憶，達到降低線索和藥物誘發的渴藥行為。

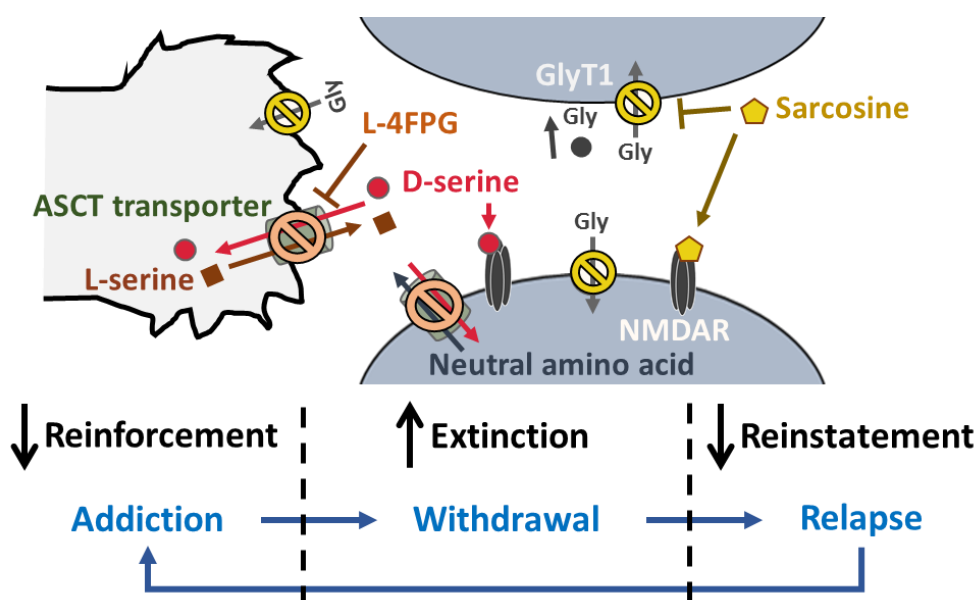


圖2.Sarcosine是甘胺酸轉運蛋白1抑制劑並且作用於 NMDA受體甘胺酸結合位點，

D-serine為NMDA受體甘胺酸結合位點之內生性共同致效劑，L-4FPG是ASCT抑制劑，藉由抑制D-絲胺酸再回收以提高突觸間隙D-絲胺酸的濃度，此三種測試藥物均可以調節NMDA受體功能。本研究假設，此三者NMDA受體調節劑能降低獲取K他命的動機及尋求K他命的再犯反應，



## 參、研究動機與目的



K他命造成嚴重的成癮問題，尋找合適的治療策略為重要課題。K他命是PCP衍生物，作用於NMDA受體的PCP結合位點上，為NMDA受體之非競爭性拮抗劑，根據過去研究(Carlezon and Wise, 1996)，PCP衍生物的成癮機轉可能與NMDA受體相關，而NMDA受體似乎也參與在線索及藥物誘發的渴藥行為(Do Couto et al., 2005; Famous et al., 2007; García-Pardo et al., 2015)。Sarcosine及D-serine存在於天然食物當中，兩者皆能調節NMDA受體活性，已有許多證據指出sarcosine可用於治療思覺失調症，D-serine也可以改善NMDA受體功能低下造成的問題。因此我們認為K他命造成的NMDA受體功能低下可能可以藉由sarcosine或提高D-serine的濃度來改善。為此我們設計了5個目標測試以上假說：(1) 在累進比率時程下，檢測急性給予sarcosine、D-serine或L-4FPG對K他命靜脈內自我給藥大鼠之劑量依賴反應。(2) 檢測在線索或K他命誘發的再犯試驗前，急性給予sarcosine、D-serine或L-4FPG之劑量依賴反應。(3) 檢測在消除階段重複給予sarcosine、D-serine或L-4FPG是否可加速消除固化形成，以及是否可以預防線索或K他命誘發的再犯反應。(4) 檢測sarcosine、D-serine及L-4FPG對於食物自我給藥的累進比率時程及線索、食物粒誘發再犯反應之效應。(5) 檢測sarcosine、D-serine及L-4FPG對於運動功能的影響。



## 肆、實驗材料、方法及結果



### 一、實驗動物

本研究使用 200-250 克的 Sprague-Dawley 公鼠，購自樂斯科生物科技有限公司。依照室溫  $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ ，相對溼度 40-70%，維持 12 小時光照、12 小時黑暗的生理狀況飼養於國家衛生研究院動物中心。除了手術及術後恢復期給予充足飲水飲食外，其餘實驗週期只提供充足飲水及每日限量飼料 16-20 克，定期更換飼養籠以維持環境整潔。

### 二、實驗藥品配置

#### (1) K 他命 (Ketalar, Pfizer pharmaceutical co., USA)

Ketamine 原液為 50 mg/ml，加入 0.9% NaCl 溶液配置成所需濃度。每劑 K 他命輸液濃度為 0.5 mg/kg/infusion，0.05 ml/infusion，每日依照大鼠體重進行配置。分組方式為，體重最高值及最低值 $\pm 20$  克的區間內各分為一組，其餘重量當作第三組。計算方式：假設一組平均體重為 300 克 ( $n=5$ )，每隻大鼠配置 8 ml，共 40 ml。

$$0.5 \text{ mg/kg/infusion} \times 0.3 \text{ kg} = 0.15 \text{ mg/infusion}$$

$$0.15 \text{ g/infusion} / 0.05 \text{ ml/infusion} = 3 \text{ mg/ml}$$

$$3 = x \text{ mg}/40 \text{ ml}, \quad x=120 \text{ mg}$$

Ketalar 濃度為 50 mg/ml，需抽取  $120 \text{ mg}/50=2.4 \text{ ml}$

→ 2.4 ml ketalar 溶液 + 37.6 ml 0.9% NaCl 溶液

#### (2) 肌胺酸 (Sarcosine, Sigma Chemical Co., USA)

直接以 0.9% NaCl 溶液配置成所需濃度，大鼠體重每 100 克給 0.1 ml，實驗前 30 分鐘以腹腔注射方式給予。

以配置 1 ml sarcosine 30 mg/kg 為例：30 mg sarcosine 溶於 1 ml 0.9% NaCl 溶液。

(3)D-絲胺酸 (D-serine,Sigma Chemical Co., USA)

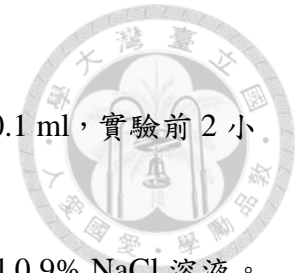
直接以 0.9% NaCl 溶液配置成所需濃度，大鼠體重每 100 克給 0.1 ml，實驗前 2 小時以腹腔注射方式給予。

以配置 1ml D-serine 30 mg/kg 為例：為 30 mg D-serine 溶於 1 ml 0.9% NaCl 溶液。

(4)L-4-氟苯基甘胺酸(4-fluorophenylglycine,TCI Co., Japan)

L-4FPG 用 1N HCl 溶解後，再以 0.9% NaCl 溶液稀釋，最後加入 1N NaOH 調整至 pH=6.8~7.2 即可。大鼠體重每 100 克給 0.1 ml，實驗前 30 分鐘以腹腔注射方式給予。

以配置 2ml L-4FPG 0.3 mg/kg 為例：0.6 mg L-4FPG 以 0.5 ml 1N HCl 溶解，加入 1 ml 0.9% NaCl 溶液稀釋，最後加入 0.5 ml NaOH 並確認 pH=6.8~7.2 即可。





### 三、實驗方法及流程

#### (1) 自我給藥系統 (Self-administration model)

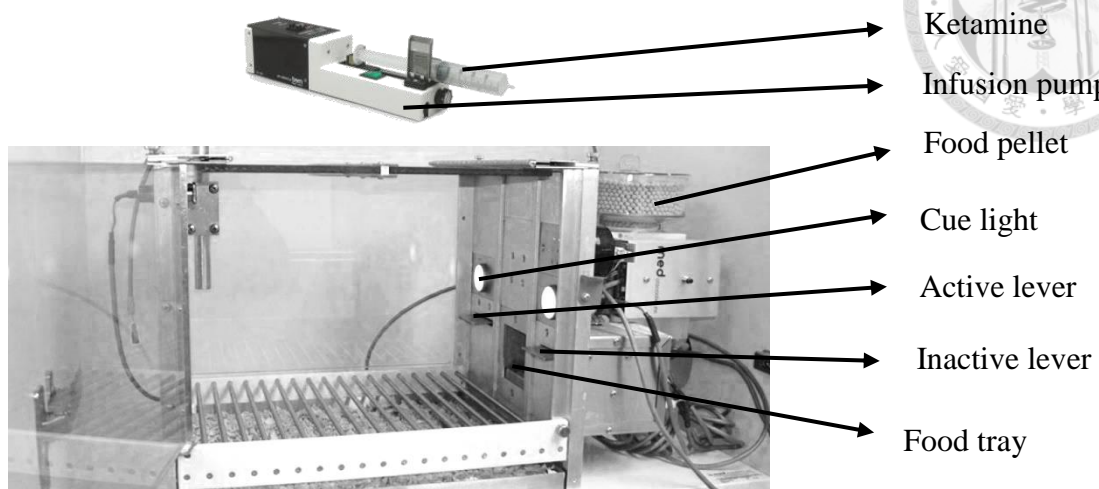
##### 1. 設備系統

##### 1.1. 大鼠自我給藥監測組裝系統 (rat self-administration packages)



1. 隔音木箱
2. 標準組件操作行為檢測箱 (附改進頂板和代謝盛盤)
3. 不鏽鋼網狀底板
4. 櫃內燈源 (house light)
5. 刺激燈源 (cue light)
6. 反應壓桿 (active and inactive lever)
7. 食物粒儲存槽 (food pellets)
8. 食物粒攝取槽 (food tray)
9. DIG-716P1 SmartCtrl 8 輸出軟體套裝
10. 注射幫浦 (infusion pump, PHM-100)

## 1.2. 標準配件操作行為檢測箱 (standard modular operant test chamber)



## 2. K 他命成癮動物模型 (Ketamine self-administration model)

動物靜脈自我給藥是常見的研究藥物成癮模式。此模式利用成癮藥物的正向強化作用，透過實驗程式設定條件，當動物做出相應的行為動作後，即可獲得相關的獎勵回饋。此設計目的在於讓動物將行為及酬賞做連結，藉由不同手段，模擬人類藥物濫用的一些情境，像是成癮習得過程(acquisition)、藥癮消除(extinction)及復發(relapse)。本實驗方法是通過手術在大鼠的頸靜脈內插入一根矽膠管，另一端則經過皮下穿出脖子，接在大鼠穿戴的灌注馬甲背心上的不銹鋼套管(infusion harness, CH95InstechLaboratoriesInc)，套管另一側接著裝有藥物注射針筒並裝置於注射幫浦上，大鼠通過按壓壓桿可獲得食物粒或藥物(如:K 他命)輸液。每當大鼠按壓壓桿時，會啟動注射幫浦，此時藥物就會被自動注射進入大鼠體內。相關參數如獲得酬賞藥物的次數及按壓次數等，皆由電腦偵測輸出，以提供後續定性和定量分析。



## 2.1. 食物粒訓練 (food training)

食物粒訓練前，大鼠需限食 48 小時(5 克/天)。為使大鼠認識食物粒會掉落至洞口(food tray)，因此第一天使用 FI-12 程序訓練，此時沒有壓桿，每 12 秒掉 1 顆 45mg 食物粒(Bioserve)。隔天使用 FR1max 100(fixed ratio, FR)程序訓練大鼠學習按壓壓桿，此時只有單側壓桿(active lever)，按壓桿 1 次可獲得 1 顆食物粒，每次訓練時間為 1 小時，大鼠得到 100 顆食物粒後，當日的訓練即完成，實驗過程約 3~7 天。連續三天皆獲得 100 顆食物粒認定為訓練完成。

## 2.2. 頸靜脈手術及恢復期 (surgery and recovery)

大鼠成功完成食物粒訓練程序後(學會按壓壓桿)，進行頸靜脈插管(ID=0.51 mm; OD=0.94mm; Dow Corning Silastic)，手術過程使用的麻醉氣體為 isoflurane (2%, v/v)，術後照護 3 天，並給予止痛及抗發炎藥物 ketoprofen (5 mg/ml, s.c.)及抗生素 baytril (5mg/ml, i.v.)溶於 heparin saline (50 IU/ml)。每日實驗結束後需注射 heparin saline 以防止靜脈血管堵塞。

## 2.3 固定比率時程 (Fix ratio, FR)

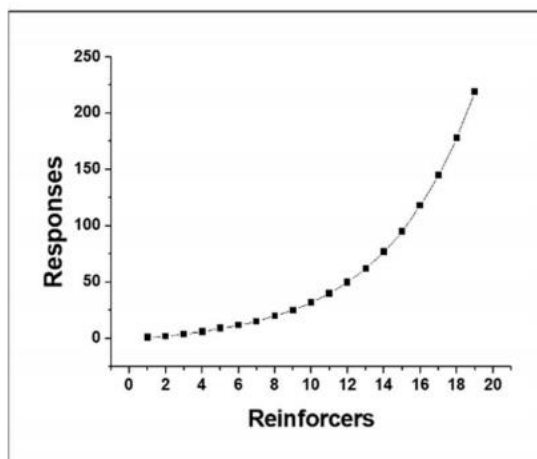
待老鼠傷口癒合，則接受 K 他命靜脈自我給藥訓練(FR1~FR2)。為確認大鼠是根據自己的意志來選擇藥物，此過程出現雙側壓桿，左側為 active lever:大鼠按壓壓桿可獲得 K 他命，且伴隨刺激燈光(cue light)，右側為 inactive lever:大鼠按壓壓桿無法獲得 K 他命，亦無刺激燈光。當老鼠按壓壓桿 1 次(FR1)或 2 次(FR2)，K 他命輸液(0.5 mg/kg/infusion)將灌入動物體內 4 秒，同時伴隨 20 秒的 cue light，此時大鼠再次按壓壓桿不會得到藥物，須待 cue light 熄滅後按壓壓桿才能再次得到 K 他命。FR 時程分為兩個階段，每一個訓練階段，須連續三日所有大鼠按壓壓桿次數的平均值無明顯統計差異為穩定標準，以及連續三日獲得 40 劑 K 他命輸液以上才可算訓練完成，實驗時間為 2 小時，評估之參數為獲得 K 他命輸液次數及按壓



壓桿次數(active lever 及 inactive lever)。

#### 2.4. 累進比率(Progressive ratio, PR)時程

利用 PR 時程來評估大鼠對 K 他命的慾望及動機，在此階段僅有單側壓桿 active lever 提供大鼠按壓，大鼠必須增加按壓壓桿次數來獲得下一次的藥物，如：大鼠想獲取第 1 劑 K 他命輸液需按壓壓桿 1 下，想獲取第 2 劑 K 他命輸液需按壓 2 下，想獲取第 10 劑 K 他命輸液則需按壓 32 下壓桿，按壓壓桿次數由累進比率公式 $[5 e^{(\text{infusion number} \times 0.2)}] - 5$ 而來，此數值稱作為按壓壓桿斷點數值(breakpoint)。實驗期間紀錄大鼠按壓壓桿次數、獲取 K 他命輸液的次數及 breakpoint，PR 時程實驗時間為 3 小時，設立連續 3 天按壓壓桿次數的平均值無明顯統計差異為穩定標準。

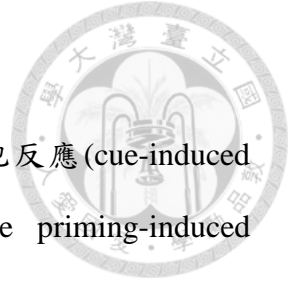


$$\text{Breakpoint} = [5 e^{(\text{infusion number} \times 0.2)}] - 5$$

Number of infusion	breakpoint	Number of infusion	breakpoint
1 <sup>st</sup>	1	11 <sup>th</sup>	40
2 <sup>nd</sup>	2	12 <sup>th</sup>	50
3 <sup>rd</sup>	4	13 <sup>th</sup>	62
4 <sup>th</sup>	6	14 <sup>th</sup>	77
5 <sup>th</sup>	9	15 <sup>th</sup>	95
6 <sup>th</sup>	12	16 <sup>th</sup>	118
7 <sup>th</sup>	15	17 <sup>th</sup>	145
8 <sup>th</sup>	20	18 <sup>th</sup>	178
9 <sup>th</sup>	25	19 <sup>th</sup>	219
10 <sup>th</sup>	32	20 <sup>th</sup>	268

#### 2.5. 消除(Extinction, EXT)

在消除階段，為使大鼠 K 他命自我給藥行為消失，此時動物在自我給藥行為箱的兩小時中，按壓壓桿無法得到藥物酬賞及 cue light，當連續 3 天按壓壓桿次數皆低於 K 他命成癮訓練時期的最後一天(last FR2 training)的 20% 以下，即認定達到消除標準。



## 2.6. 再犯反應 (Reinstatement)

本研究內容探討兩種再犯反應，第一種為線索誘導再犯反應(cue-induced reinstatement)，第二種為 K 他命誘導再犯反應(ketamine priming-induced reinstatement)。進行線索誘導再犯實驗時，大鼠按壓壓桿時 cue light 會亮起，但不會獲得 K 他命；而 K 他命誘導再犯實驗則是，大鼠先給予一劑腹腔注射的 10 mg/kg K 他命後，立即放入自我給藥操作箱開始實驗，此時按壓壓桿時 cue light 不會亮起也不會得到藥物，兩種再犯實驗的時間皆為 2 小時。分析參數為按壓 active lever 總次數。

## 3. 食物粒自我給藥模型 (Food self-administration model)

於實驗期間，大鼠按壓壓桿可獲得食物粒作為酬賞，此模型用於評估藥物對自然回饋反應(natural reward)之影響，也可作為藥物是否具有不良反應的指標。

### 3.1 食物粒固定比率模式

經過 48 小時限食(5 克/天)，大鼠藉由 FI-12 熟知食物粒會掉落至洞口後，隔天以 FR1 max 100 模式學習按壓壓桿，連續三天皆獲得 100 顆食物粒則認定為學習成功。之後以 food FR1、food FR2 進行訓練，在此時期按壓壓桿 1 次(food FR1)或 2 次(food FR2)可獲得 1 顆食物粒，連續三日壓桿次數的平均值無明顯統計差異為穩定標準，評估之參數為獲得的食物粒顆數及按壓壓桿次數(active lever 及 inactive lever)，實驗時間為 30 分鐘。

### 3.2 累進比率時程

利用 PR 時程評估大鼠對食物粒的慾望及動機，大鼠必須增加按壓壓桿次數來獲得下一次的 food 粒，在此期間僅有單側壓桿 active lever 提供大鼠按壓。大鼠為獲取第 1 顆食物粒需按壓壓桿 1 下，想獲取第 2 顆食物粒需按壓 2 下，想獲取第

10 顆食物粒則需按壓 32 下，按壓壓桿次數由累進比率公式 $[5 e^{(\text{reinforcer} \times 0.2)}] - 5$ 而來，實驗期間紀錄大鼠按壓壓桿次數、獲得的食物粒的顆數及 breakpoint，PR 時程實驗時間為 3 小時，設立連續 2 天按壓壓桿次數的平均值無明顯統計差異為穩定標準。

### 3.3 消除

在消除階段，為使大鼠食物自我給藥行為消失，此時動物在自我給藥行為箱的兩小時中，按壓壓桿無法得到食物粒及 cue light，當連續三天按壓壓桿次數皆低於 FR2 最後一天的 20% 以下，即認定達到消除標準，實驗時間為 30 分鐘。

### 3.4 再犯反應

本研究測試兩種再犯反應，第一種為線索誘導再犯反應(cue-induced reinstatement)，第二種為食物誘導再犯反應(food priming-induced reinstatement)，兩者實驗時間皆為 30 分鐘。此模型的線索誘導再犯反應與 K 他命自我給藥模型的線索誘導再犯反應相同。食物誘導再犯反應為實驗前，於食物粒攝取槽放置 2 顆食物粒，大鼠放入行為箱後等待 1 分鐘讓動物吃完食物粒即按下開始鍵，之後大鼠按壓壓桿可獲得 15 顆食物粒，此時並不會有 cue light。紀錄參數為 active lever 總次數。

## 4. 運動活性測試 (Locomotor activity test)

此測試使用 VersaMax 動物活性監測器，內部四周由透明壓克力板圍起大鼠的活動範圍(長 42 公分 x 寬 42 公分 x 高 31 公分)，蓋上透氣式透明壓克力蓋子。此動物活性監測器的四周具有紅外線光束感應器，可偵測並記錄大鼠在空間內的位置、移動速率及移動距離等。給藥前先將大鼠放入 VersaMax 動物活性監測器實驗箱記錄基礎運動活性 1 小時，給藥後再偵測 2 小時，進行實驗時，人員須離開行



為室以排除干擾。



## 5. 實驗設計

除了實驗八以組間設計方式給藥(between subject design)之外，其他實驗皆為使用對抗平衡設計(counterbalanced within subjects design)。



#### 四、實驗數據分析

實驗數據以平均值±標準誤差 (mean ± S.E.M) 表示取得資料平均值。以 Sigma-Statistical software 作為統計分析軟體。統計方式如下:

##### 1. 自我給藥

(1) PR 實驗中以 paired t-test 或 one-way repeat measure ANOVA 比較控制組及對照組的大鼠獲得 K 他命輸注、按壓壓桿的次數及 breaking point 之差異性。

(2) 線索及藥物誘導再犯反應 (cue- and drug priming-induced reinstatement): 採用 two-way repeat measure ANOVA 及 Student-Newman-Keuls 事後檢定分析方式比較組別間按壓壓桿的次數的差異, 分析因子為 1. 確認大鼠是否被誘發出再犯反應—將最後一天大鼠於消除階段按壓壓桿的次數與再犯反應的按壓壓桿的次數相比較 (last extinction vs reinstatement); 2. 比較給予 NMDA 受體調節劑的影響—控制組與對照組的大鼠按壓壓桿的次數之差異 (control vs treatment), 當  $P < 0.05$  表示結果有統計上明顯的差異。

##### 2. 運動活性測試

使用 paired t test 及 two-way repeat measure ANOVA 比較不同組別大鼠運動活性之差異性。



## 五、實驗結果

### 實驗一、K 他命自我給藥

在進入藥物測試階段前，所有老鼠均會經過 K 他命 (0.5 mg/kg/infusion) 自我給藥習得階段，大鼠於 K 他命習得階段的表現以 Fig. 1 作為代表。實驗時間軸如 Fig. 1A。大鼠經過食物粒訓練學會按壓壓桿及頸靜脈插管手術後，進入 K 他命固定比率 FR1 及 FR2 習得階段，此時按壓有效壓桿可獲得 K 他命 infusions，按壓無效壓桿則無法獲得 K 他命 infusions。FR1 為按壓 1 次壓桿獲得 1 劑 K 他命 infusion，FR2 則是按壓 2 次壓桿才能獲得 1 劑 K 他命 infusion。如 Fig. 1B、1C 顯示，大鼠在習得階段獲得的 K 他命 infusions 及有效壓桿按壓次數隨著 FR 及時間增加，獲得的 K 他命 infusions 數量從 20~40 (FR1) 增加到 60~80 個 infusions (FR2)，而有效壓桿按壓次數從 50~100 下 (FR1) 增加到 200~300 下 (FR2)，在這段過程，老鼠也學會分辨有效壓桿和無效壓桿的差異，因此，無效壓桿的次數並不會隨著固定比率及時間增加。在 FR2 時程連續三天 K 他命 infusions 及按壓壓桿次數無明顯統計差異，即可進入下一階段實驗，例如 PR 時程或消除。

### 實驗二、檢測急性給予 sarcosine 對於 K 他命自我給藥 PR 時程之劑量依賴效應。

實驗時間軸如 Fig. 2A。大鼠經過 12~15 天習得階段 (FR1+ FR2) 後，在 FR2 時程連續三天 K 他命 infusions 及按壓壓桿次數無明顯統計差異，即進入 PR 時程。直到連續 2 天 breakpoint 無明顯統計差異，則開始給藥測試，在實驗前 30 分鐘給予生理食鹽水、sarcosine 30 mg/kg 或 sarcosine 100 mg/kg。實驗結束後以 one way repeated measures ANOVA 分析大鼠所獲得之 K 他命 infusions ( $F_{2,5}=9.649$ ,  $p<0.01$ )、breakpoint ( $F_{2,5}=6.042$ ,  $p<0.05$ ) 及壓桿按壓次數 ( $F_{2,5}=8.645$ ,  $p<0.01$ )。如 Fig. 2B 所示，與給予生理食鹽水的控制組相比，給予 sarcosine 30 mg/kg 及 100 mg/kg 皆明顯降低 K 他命 infusions、breakpoint 及壓桿按壓次數。

### 實驗三、檢測急性給予 D-serine 對於 K 他命自我給藥 PR 時程之劑量依賴效應。

實驗時間軸如 Fig. 3A。大鼠經過 12~15 天習得階段(FR1+ FR2)後，在 FR2 時程連續三天 K 他命 infusions 及按壓壓桿次數無明顯統計差異，即進入 PR 時程。直到連續 2 天 breakpoint 無明顯統計差異，則開始給藥測試，因 D-serine 不易通過血腦障壁(Pernot et al., 2012)，因此我們於實驗前 2 小時給予生理食鹽水及 D-serine 100 mg/kg 進行測試。實驗結束後以 paired t-test 分析大鼠獲得 K 他命 infusions, breakpoint 及壓桿按壓次數 (infusions:  $t_{1,5}=3.114$ ,  $p<0.05$ , breakpoint:  $t_{1,5}=2.947$ ,  $p<0.05$ , lever presses:  $t_{1,5}=2.947$ ,  $p<0.05$ )顯示 D-serine 100 mg/kg 與控制組相比 K 他命 infusions、breakpoint 及壓桿按壓次數具有明顯下降情形(Fig. 3B)。接著再以低劑量 D-serine 30 mg/kg 進行測試，與控制組相比，D-serine 30 mg/kg 對於獲得 K 他命 infusions 數量、breakpoint 及壓桿按壓次數則無明顯影響(infusions:  $t_{1,5}= -0.916$ ,  $p=0.402$ , breakpoint:  $t_{1,5}= -0.64$ ,  $p=0.55$ , lever presses:  $t_{1,5}= -0.611$ ,  $p=0.568$ ) (Fig. 3C)。

### 實驗四、檢測急性給予 L-4FPG 對於 K 他命自我給藥 PR 時程之劑量依賴效應。

實驗時間軸如 Fig. 4A。大鼠經過 12~15 天習得階段(FR1+ FR2)後，在 FR2 時程連續三天 K 他命 infusions 及按壓壓桿次數無明顯統計差異，即進入 PR 時程。直到連續 2 天 breakpoint 無明顯統計差異，則開始給藥測試，於實驗前 30 分鐘給予生理食鹽水及 L-4FPG 1 mg/kg 進行測試。實驗結束後以 paired t-test 分析大鼠獲得 K 他命 infusions、breakpoint 及壓桿按壓次數 (infusions:  $t_{1,6}=3.243$ ,  $p<0.05$ , breakpoint:  $t_{1,6}=3.087$ ,  $p<0.05$ , lever presses:  $t_{1,6}=3.837$ ,  $p<0.01$ )顯示 L-4FPG 1 mg/kg 與控制組相比 K 他命 infusions、breakpoint 及壓桿按壓次數具有明顯下降情形(Fig. 4B)。接著再以低劑量 L-4FPG 0.3 mg/kg 進行測試，與控制組相比，L-4FPG 0.3 mg/kg 對於獲得 K 他命 infusions 數量、breakpoint 及壓桿按壓次數則無明顯影響( infusions:  $t_{1,4}= -1.633$ ,  $p=0.178$ , breakpoint:  $t_{1,4}= -1.20$ ,  $p=0.296$ , lever presses:  $t_{1,4}= -0.153$ ,

p=0.886) (Fig. 4C)。




#### 實驗五、檢測急性給予 sarcosine 對於線索及 K 他命引發的再犯反應之劑量依賴效應。

實驗時間軸如 Fig. 5A。大鼠經過 12~20 天習得階段(FR1+ FR2)後，在 FR2 時程連續三天 K 他命 infusions 及按壓壓桿次數無明顯統計差異，即進入消除時程，當連續兩天的有效壓桿次數達到消除標準(最後一天 FR2 有效壓桿次數的 20%)，進行線索及 K 他命誘發再犯反應給藥測試。在測試前 30 分鐘給予生理食鹽水或 sarcosine 100 mg/kg，實驗結束後以 two-way repeat measure ANOVA 分析有效壓桿按壓次數[(cue:  $F_{1,5}=168.763$ ,  $p<0.001$ , sarcosine 100 mg/kg:  $F_{1,5}=132.663$ ,  $p<0.001$ , cue x sarcosine 100 mg/kg interaction:  $F_{1,5}=247.42$ ,  $p<0.001$ ), (ketamine-priming:  $F_{1,5}=96.92$ ,  $p<0.001$ , sarcosine 100 mg/kg:  $F_{1,5}=51.726$ ,  $p<0.001$ , ketamine-priming x sarcosine 100 mg/kg interaction:  $F_{1,5}=19.975$ ,  $p<0.001$ )]顯示 sarcosine 100 mg/kg 與控制組相比，不論是對線索或是 K 他命誘發再犯反應都有明顯抑制效果(Fig. 5B)。而 sarcosine 30 mg/kg 只能抑制老鼠對線索的反應，對 K 他命誘發再犯反應則無顯著影響[(cue:  $F_{1,5}=58.659$ ,  $p<0.001$ , sarcosine 30 mg/kg:  $F_{1,5}=13.843$ ,  $p<0.05$ , cue x sarcosine 30 mg/kg interaction:  $F_{1,5}=58.659$ ,  $p<0.01$ ),(ketamine-priming:  $F_{1,5}=66.167$ ,  $p<0.001$ , sarcosine 30 mg/kg:  $F_{1,5}=0.0144$ ,  $p=0.909$ , ketamine-priming x sarcosine 30 mg/kg interaction:  $F_{1,5}=0.529$ ,  $p=0.5$ )]( Fig. 5C)。

#### 實驗六、檢測急性給予 D-serine 對於線索及 K 他命引發的再犯反應之劑量依賴影響。

實驗時間軸如 Fig. 6A。大鼠經過 12~20 天習得階段(FR1+ FR2)後，在 FR2 時程連續三天 K 他命 infusions 及按壓壓桿次數無明顯統計差異，即進入消除時程，當連續兩天的有效壓桿次數達到消除標準(最後一天 FR2 有效壓桿次數的 20%)，進行



線索及 K 他命誘發再犯反應給藥測試。在測試前 30 分鐘給予生理食鹽水或 D-serine 100 mg/kg，實驗結束後以 two-way repeat measure ANOVA 分析有效壓桿按壓次數 [(cue:  $F_{1,5}=63.208$ ,  $p<0.001$ , D-serine 100 mg/kg:  $F_{1,5}=18.167$ ,  $p<0.01$ , cue x D-serine 100 mg/kg interaction:  $F_{1,5}=20.557$ ,  $p<0.01$ ), (ketamine-priming:  $F_{1,5}=3.007$ ,  $p=0.143$ , D-serine 100 mg/kg:  $F_{1,5}=15.576$ ,  $p<0.05$ , ketamine-priming x D-serine 100 mg/kg interaction:  $F_{1,5}=3.05$ ,  $p=0.141$ )]顯示 D-serine 100 mg/kg 與控制組相比，不論是對線索或是 K 他命誘發再犯反應都有明顯抑制效果(Fig. 6B)。而 D-serine 30 mg/kg 只能抑制老鼠對線索的反應，對 K 他命誘發再犯反應則無顯著影響[(cue:  $F_{1,5}=93.968$ ,  $p<0.001$ , D-serine 30 mg/kg:  $F_{1,5}=18.718$ ,  $p<0.01$ , cue x D-serine 30 mg/kg interaction:  $F_{1,5}=14.199$ ,  $p<0.05$ ),(ketamine-priming:  $F_{1,5}=19.213$ ,  $p=0.007$ , sarcosine 30 mg/kg:  $F_{1,5}=0.914$ ,  $p=0.383$ , ketamine-priming x sarcosine 30 mg/kg interaction:  $F_{1,5}=0.141$ ,  $p=0.723$ )]( Fig. 6C)。

### 實驗七、檢測急性給予 L-4FPG 對於線索及 K 他命引發的再犯反應之劑量依賴影響。

實驗時間軸如 Fig. 7A。大鼠經過 12~20 天習得階段(FR1+ FR2)後，在 FR2 時程連續三天 K 他命 infusions 及按壓壓桿次數無明顯統計差異，即進入消除時程，當連續兩天的有效壓桿次數達到消除標準(最後一天 FR2 有效壓桿次數的 20%)，進行線索及 K 他命誘發再犯反應給藥測試。在測試前 30 分鐘給予生理食鹽水或 L-4FPG 1 mg/kg，實驗結束後以 two-way repeat measure ANOVA 分析有效壓桿按壓次數 [(cue:  $F_{1,5}=178.136$ ,  $p<0.001$ , L-4FPG 1 mg/kg:  $F_{1,5}=0.153$ ,  $p=0.712$ , cue x L-4FPG 1 mg/kg interaction:  $F_{1,5}=0.048$ ,  $p=0.835$ ), (ketamine-priming:  $F_{1,5}=5.936$ ,  $p=0.059$ , L-4FPG 1 mg/kg:  $F_{1,5}=1.538$ ,  $p=0.27$ , ketamine-priming x L-4FPG 1 mg/kg interaction:  $F_{1,5}=2.893$ ,  $p=0.15$ )]顯示 L-4FPG 1 mg/kg 與控制組相比，對線索或是 K 他命誘發再犯反應沒有影響(Fig. 7B)。故而提升劑量至 3 mg/kg 進行測試，實驗結果顯示

L-4FPG 3 mg/kg 與控制組相比，對線索或是 K 他命誘發再犯反應均出現明顯抑制效果 [(cue:  $F_{1,5}=9.381$ ,  $p<0.05$ , L-4FPG 3 mg/kg:  $F_{1,5}=7.283$ ,  $p<0.05$ , cue x L-4FPG 3 mg/kg interaction:  $F_{1,5}=7.256$ ,  $p<0.05$ ), (ketamine-priming:  $F_{1,5}=22.478$ ,  $p<0.01$ , L-4FPG 3 mg/kg:  $F_{1,5}=8.973$ ,  $p<0.05$ , ketamine-priming x L-4FPG 3 mg/kg interaction:  $F_{1,5}=3.523$ ,  $p=0.119$ )]( Fig. 7 C)。

#### 實驗八、測試在消除階段給予 sarcosine、D-serine 及 L-4FPG 是否可以預防線索及 K 他命引發的再犯反應。

實驗時間軸如 Fig. 8A。大鼠經過 14~20 天習得階段(FR1+ FR2)後，在 FR2 時程連續三天 K 他命 infusions 及按壓壓桿次數無明顯統計差異，即進入消除時程，在每次消除實驗結束後立即給予 1 劑 L-4FPG 3 mg/kg、D-serine 100 mg/kg 或 sarcosine 100 mg/kg，所有老鼠達消除標準總共耗時 7 天 7 劑。控制組平均耗時  $4.83\pm 0.65$  天、L-4FPG 組耗時  $4.33\pm 0.84$  天、D-serine 耗時  $4.5\pm 0.62$  天和 sarcosine 耗時  $4\pm 0.45$  天，以 one-way ANOVA 分析每組到達消除標準之天數，並沒有顯著的統計差異 ( $F_{3,20}=0.28$ ,  $p=0.839$ ) (Fig. 8B, 8C)，表示藥物沒有加速消除的形成的效果。之後再利用線索及 K 他命誘發再犯反應測試藥物是否可以預防再犯反應。進行下一次誘發再犯反應之前，會先經過數日的消除達消除標準後才進行再犯反應。實驗結果以 two-way repeat measure ANOVA 分析線索及 K 他命誘導再犯反應中有效壓桿按壓次數 [(cue:  $F_{1,20}=52.575$ ,  $p<0.001$ , treatment:  $F_{3,20}=6.263$ ,  $p=0.004$ , cue x treatment interaction:  $F_{3,20}=7.364$ ,  $p=0.002$ ), (ketamine-priming:  $F_{1,20}=20.696$ ,  $p<0.001$ , treatment:  $F_{3,20}=0.624$ ,  $p=0.608$ , ketamine-priming x treatment interaction:  $F_{3,20}=0.5$ ,  $p=0.687$ )]。實驗結果顯示，L-4FPG、D-serine 及 sarcosine 可以降低線索再犯反應(Fig. 8D)，但對 K 他命誘導再犯反應則無顯著影響(Fig. 8E)。



### 實驗九、食物自我給藥

動物在限食的情況下，對食物粒產生極大渴望及需求，我們透過此實驗了解治療藥物是否具有影響自然獎勵系統進而導致動物之食慾等不良反應。在進入藥物測試階段前，大鼠先經過食物自我給藥習得階段：FR1 及 FR2，大鼠於食物粒習得階段的表現以 fig.9 作為代表，實驗時間軸如 Fig. 9A。大鼠在習得階段獲得的食物粒顆數及有效壓桿按壓次數隨著時間增加(Fig. 9B, 9C)，在 FR2 時程連續三天獲得之食物粒顆數及按壓壓桿次數無明顯統計差異，即可進入下一階段實驗，例如 PR 時程或消除。

### 實驗十、檢測 sarcosine、D-serine 及 L-4FPG 對於食物自我給藥 PR 時程及線索、食物粒誘發再犯反應之效應。

**Sarcosine**：實驗時間軸如 Fig. 10A。在 PR 或再犯實驗前 30 分鐘給予 sarcosine 100 mg/kg，實驗結束後用 paired t-test 分析大鼠獲得食物粒顆數、breakpoint 及壓桿按壓次數 (infusions:  $t_{1,5}=-1.118$ ,  $p=0.314$ , breakpoint:  $t_{1,5}=0.597$ ,  $p=0.576$ , lever presses:  $t_{1,5}=0.668$ ,  $p=0.534$ )及以 two-way repeat measure ANOVA 分析線索及食物粒誘導再犯反應中有效壓桿按壓次數[(cue:  $F_{1,5}=3.726$ ,  $p=0.111$ , sarcosine:  $F_{1,5}=2.986$ ,  $p=0.145$ , cue xsarcosineinteraction:  $F_{1,5}=0.985$ ,  $p=0.366$ ), (food-priming:  $F_{1,5}=29.927$ ,  $p=0.003$ , sarcosine:  $F_{1,5}=0.519$ ,  $p=0.503$ , food-priming xsarcosine interaction:  $F_{1,5}=0.958$ ,  $p=0.373$ )]三者均無明顯統計差異，顯示 sarcosine 不會影響動物對食物粒的動機(Fig. 10B)及線索、食物粒再犯反應(Fig. 10C)。

**D-serine**：實驗時間軸如 Fig. 11A。在 PR 或再犯實驗前 30 分鐘給予 D-serine 100 mg/kg，實驗結束後用 paired t-test 分析大鼠獲得食物粒顆數、breakpoint 及壓桿按壓次數(infusions:  $t_{1,5}=1.369$   $p=0.229$ , breakpoint:  $t_{1,5}=2.064$ ,  $p=0.094$ , lever presses:  $t_{1,5}=1.553$ ,  $p=0.181$ )及以 two-way repeat measure ANOVA 分析線索及食物粒誘導再犯反應中有效壓桿按壓次數[(cue:  $F_{1,5}=6.258$ ,  $p=0.054$ , D-serine:  $F_{1,5}=0.051$ ,  $p=0.83$ ,



cue xD-serine interaction:  $F_{1,5}=0.0135$ ,  $p=0.912$ ), (food-priming:  $F_{1,5}=76.904$ ,  $p<0.001$ , D-serine:  $F_{1,5}=1.361$ ,  $p=0.296$ , food-priming xD-serine interaction:  $F_{1,5}=0.36$ ,  $p=0.575$ ) 三者均無明顯統計差異，顯示 D-serine 不會影響動物對食物粒的動機(Fig. 11B)及線索、食物粒再犯反應(Fig. 11C)。

**L-4FPG:** 實驗時間軸如 Fig. 12A。在 PR 或再犯實驗前 30 分鐘給予 L-4FPG 3 mg/kg，實驗結束後用 paired t-test 分析大鼠獲得食物粒顆數、breakpoint 及壓桿按壓次數 (infusions: $t_{1,5}=0.391$ ,  $p=0.7112$ , breakpoint: $t_{1,5}=0.515$ ,  $p=0.629$ , lever presses: $t_{1,5}=0.570$ ,  $p=0.549$ )及以 two-way repeat measure ANOVA 分析線索及食物粒誘導再犯反應中有效壓桿按壓次數 [(cue:  $F_{1,5}=21.777$ ,  $p=0.005$ , L-4FPG:  $F_{1,5}=0.334$ ,  $p=0.589$ , cue xL-4FPG interaction:  $F_{1,5}=0.0511$ ,  $p=0.83$ ), (food-priming:  $F_{1,5}=19.982$ ,  $p=0.007$ , L-4FPG: $F_{1,5}=3.101$ ,  $p=0.139$ , food-priming xL-4FPG interaction:  $F_{1,5}=2.828$ ,  $p=0.153$ )] 三者均無明顯統計差異，顯示 L-4FPG 不會影響動物對食物粒的動機(Fig. 12B)及線索、食物粒再犯反應(Fig. 12C)。

#### 實驗十一、檢測 sarcosine、D-serine 及 L-4FPG 對大鼠運動活性之影響

藉由此實驗評估藥物是否具有影響運動功能的不良作用。將大鼠放入活動力測試箱中先測試基礎運動活性 60 分鐘，之後給予 sarcosine 100 mg/kg、D-serine 100 mg/kg 或 L-4FPG 3 mg/kg 後，再測試 120 分鐘，由電腦軟體紀錄動物在箱子中的移動距離，並以 two way repeated measures ANOVA 分析動物每十分鐘的移動距離 [(time:  $F_{17,85}=23.109$ ,  $p<0.001$ , sarcosine:  $F_{1,5}=0.0404$ ,  $p=0.849$ , time xsarcosineinteraction:  $F_{17,85}=1.398$ ,  $p=0.158$ ), (time:  $F_{17,102}=32.655$ ,  $p<0.001$ , D-serine:  $F_{1,6}=0.0335$ ,  $p=0.861$ , time x D-serine interaction:  $F_{17,102}=1.38$ ,  $p=0.162$ ), (time:  $F_{17,102}=16.998$ ,  $p<0.001$ , L-4FPG:  $F_{1,6}=14.47$ ,  $p=0.009$ , time xL-4FPG interaction:  $F_{17,102}=2.598$ ,  $p=0.002$ )] 與 paired t-test 分析 2 小時內的移動總距離 [(sarcosine:  $t_{1,5}=0.201$ ,  $p=0.849$ ), (D-serine:  $t_{1,6}= -0.183$ ,  $p=0.861$ ), (L-4FPG: $t_{1,6}=0.269$ ,  $p=0.797$ )]。

結果顯示三個藥物與控制組相比，每十分鐘的移動距離及 2 小時內的移動總距離皆沒有明顯差異 (Fig. 13~15)，三個藥物皆不影響運動功能。



## 伍、討論



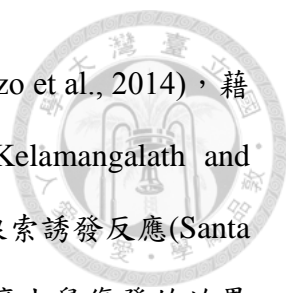
本研究欲釐清 NMDA 受體調節劑是否能降低獲取 K 他命的動機及尋求 K 他命的再犯反應。根據我們的實驗結果，sarcosine、D-serine 及 L-4FPG 具有降低 K 他命動機、抑制線索及 K 他命誘發再犯反應的效能，並且三個藥物均不會影響食物自我給藥以及運動功能，表示 sarcosine、D-serine 及 L-4FPG 可能具有發展為 K 他命成癮治療藥物的潛能。

### 1. sarcosine, D-serine 及 L-4FPG 對 K 他命增強效應之影響

K 他命是 PCP 衍生物，過去研究發現 PCP 及相關衍生物造成的獎勵及增強作用並非藉由活化多巴胺系統，可能與 NMDA 受體相關(Carlezon and Wise, 1996)，sarcosine 與 D-serine 分別被報導可以改善 K 他命造成的認知缺陷或 PCP 導致的行為障礙(Castner et al., 2014; Matsuura et al., 2015; Roberts et al., 2010)。而 L-4FPG 經由抑制 ASCT1/2 來改善因 NMDA 受體功能低下造成的視覺異常及思覺失調症(Foster et al., 2017; Li et al., 2018)，根據我們的研究成果，PR 時程前給予 sarcosine、D-serine 及 L-4FPG 顯著降低大鼠獲得 K 他命輸液、按壓壓桿反應及 breakpoint，顯示 3 個藥物均具有減輕 K 他命增強作用的效能，此抑制效果可能是透過調節 NMDA 受體功能達到減少 K 他命增強反應之自我給藥行為，而降低 K 他命的增強作用及酬賞效應有助於濫用藥物患者戒癮。

### 2. sarcosine, D-serine 及 L-4FPG 對線索及 K 他命誘發再犯反應之影響


成癮患者因將藥物—線索—欣快感連結，形成新的神經迴路，因此戒斷後經常因為暴露於線索、藥物或壓力等等因素造成藥癮復發，導致了治療的困難度，而藉由藥物來調控復發相關的分子或蛋白有助於避免復發。再犯反應與中腦邊緣皮質系統相關(Koob and Volkow, 2010)，研究指出，古柯鹼成癮大鼠伏隔核內的 D-serine



濃度會降低，導致 NMDA 受體調節的神經可塑性受損(D'Ascenzo et al., 2014)，藉由給予 D-serine 可以改善古柯鹼成癮大鼠誘發之再犯反應(Kelamangalath and Wagner, 2010)。而給予尼古丁成癮患者 D-cycloserine 也能降低線索誘發反應(Santa Ana et al., 2009)，不只如此，GlyT1 抑制劑具有防止酒精成癮大鼠復發的效果(Vengeliene et al., 2010)，顯示 NMDA 受體可能與再犯反應相關，且調節 NMDA 受體功能可能有助於降低再犯反應發生(Vengeliene et al., 2005)。我們的實驗結果指出，經過消除後的 K 他命成癮大鼠，於線索及 K 他命誘導再犯反應前給予 sarcosine、D-serine 及 L-4FPG 皆能降低線索及 K 他命誘發的再犯反應，表示 K 他命的覓藥行為可能與 NMDA 受體相關，然而，是作用在哪個腦區目前尚未明瞭，有待未來深入探討。

### **3.sarcosine, D-serine 及 L-4FPG 於消除階段之作用**

成癮是種學習記憶，在習得的階段將藥物—線索—欣快感三者連結形成記憶儲存在大腦中，消除並非是將先前的習得記憶給刪除，而是形成另外一個新的消除記憶，在大鼠古柯鹼自我給藥的研究中顯示，古柯鹼自我給藥記憶及消除記憶是由不同的神經迴路所調控(Warren et al., 2019)，曾有研究提出，在消除階段給予治療藥物有助於促進及固化消除記憶形成並且預防線索及藥物誘導再犯反應(Chandler and Gass, 2013)，例如:D-cycloserine 或 D-serine(Botreau et al., 2006; Kelamangalath et al., 2009; Kelamangalath and Wagner, 2010; Thanos et al., 2011)，其給藥的時間點可在消除階段之前給予治療藥物，這種方式雖然有助於消除記憶的固化(consolidation)，但在影響固化的同時可能會牽扯到消除記憶的習得；或是在消除階段完成之後立即給予治療藥物以幫助固化消除記憶，此方式就只影響記憶的固化。當成癮者暴露線索、藥物或壓力時，若喚醒的是習得記憶就會造成藥癮復發，因此，消除記憶被固化的越好越深刻，在接觸線索、藥物或壓力時越能克服習得記憶。已知 NMDA 受體與「消除記憶」密切相關(M Cleva et al., 2010)因此，於消



除訓練後給予 NMDA 受體調節劑可能有助於「消除記憶」的固化。動物研究顯示，D-cycloserine 促進古柯鹼場地制約偏好的消除記憶形成(Botreau et al., 2006)，在古柯鹼自我給藥小鼠的消除實驗後給予 D-cycloserine 能降低線索誘發再犯反應(Thanos et al., 2011)，而在消除實驗後給予古柯鹼成癮大鼠 D-serine 則可降低古柯鹼誘發再犯反應(Kelamangalath et al., 2009; Kelamangalath and Wagner, 2010)。由此可知，在消除階段後立即給予 NMDA 受體調節劑，似乎能促進及固化消除記憶形成，並且能預防再犯反應。但根據我們的實驗結果，sarcosine、D-serine 及 L-4FPG 只可以防止線索誘導再犯反應，不能促進消除記憶形成以及預防 K 他命再犯反應，與先前的研究指出調節 NMDA 受體能促進古柯鹼消除的結果不同(Hafenbreidel et al., 2014; Kelamangalath et al., 2009)，可能與 K 他命是 NMDA 受體拮抗劑會直接作用在 NMDA 受體上(Newcomer et al., 1999)，而古柯鹼則是經由影響多巴胺及麩胺酸等神經傳導物質來間接影響 NMDA 受體功能(Ortinski, 2014)，兩者的作用機轉不同所造成的。

消除是將大鼠放置於自我給藥操作箱，此時按壓壓桿不會出現燈光及獲得藥物，重複學習之後動物會降低壓桿按壓次數，達到消除過往成癮行為(按壓壓桿)的目的。本實驗結果顯示，在消除階段連續給予 sarcosine、D-serine 及 L-4FPG 幫助固化消除記憶只能預防線索誘發再犯反應，不能預防 K 他命誘發再犯反應。因再犯反應的機轉非常複雜，目前所知前額葉皮質是形成消除記憶的重要腦區之一(Peters et al., 2009)，可分為背側前額葉皮質(dorsal prefrontal cortex)－前緣皮質( prelimbic cortex)或腹側前額葉皮質(ventral prefrontal cortex)－下邊緣皮質(infralimbic cortex)，有許多研究指出前緣皮質或下邊緣皮質控制不同的再犯反應(Caballero et al., 2019)，但確切的神經迴路尚未明瞭，本實驗結果只能預防線索誘發再犯反應，不能預防 K 他命誘發再犯反應的原因可能也與兩者活化的神經迴路不同所造成(Warren et al., 2017)。除此之外，也有可能是因為本研究建立的動物模型，K 他命成癮大鼠本身對線索會產生較強烈的再犯反應，對 K 他命則再犯反應較弱(按壓壓桿次數低)，所



以給予治療藥物後不易看出差異。

為了釐清治療藥物預防再犯反應的效果是否與消除學習相關，未來可進行在強制戒斷時期(forced abstinence)給予治療藥物—sarcosine、D-serine 及 L-4FPG，之後以線索或 K 他命誘導再犯反應測試，以確認不需在消除學習記憶進行固化階段時給予藥物，也有療效。

#### **4.sarcosine, D-serine 及 L-4FPG 對食物自我給藥之影響**

食物是自然獎勵系統的強化物之一，sarcosine, D-serine 及 L-4FPG 不影響老鼠獲得食物的動機及線索、食物誘發的再犯反應，表示三個藥物不影響自然獎勵系統的神經迴路，而是透過影響 K 他命成癮相關的神經迴路來改善 K 他命成癮行為 (Cosme et al., 2015; Kelamangalath et al., 2009; Uslaner et al., 2010)。

#### **5. sarcosine, D-serine 及 L-4FPG 對運動活性之影響**

Sarcosine, D-serine 及 L-4FPG 在運動活性測試中不會造成運動活性改變，表示給予 K 他命成癮大鼠治療藥物後老鼠按壓壓桿的次數改變，應該與運動功能的影響無關，而是藥物本身的效果造成。

#### **6. sarcosine, D-serine 及 L-4FPG 之安全性**

Sarcosine 在臨床研究並未出現明顯的不良反應(Amiaz et al., 2015; Huang et al., 2013)，雖然尚未有對動物的不良反應數據，但因 sarcosine 已是市售的健康食品，使用上應較無安全疑慮。D-serine 已知具有腎毒性(大鼠:800 mg/kg, ip;500 mg/kg, im)(Ganote et al., 1974; Harper et al., 1970; Okada et al., 2017)，但本研究所使用的劑量(100 mg/kg, ip)低於其他研究發現的毒性劑量，因此造成腎毒性的風險應該相對較低。而 L-4FPG 是近幾年才開發的新化學物質，目前尚未有相關的毒性資料發表。

## 陸、結論

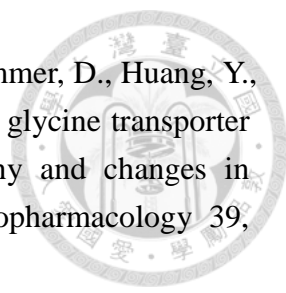
本研究發現 NMDA 受體調節劑—sarcosine, D-serine 及 L-4FPG 具有改善 K 他命成癮大鼠獲取 K 他命的動機及尋求 K 他命的再犯反應的效能，這些效果可能與調節 NMDA 受體有關，其相關的神經迴路需待日後深入探討，不過目前的初步結果顯示，這三者藥物可能具有發展為 K 他命成癮治療藥物的潛能。

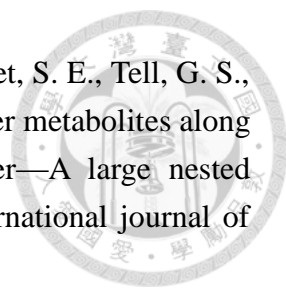
## 柒、參考資料

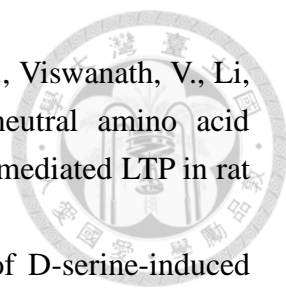


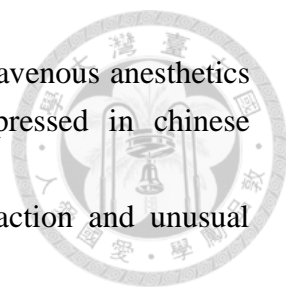
- Adamowicz, P., Kala, M., 2005. Urinary excretion rates of ketamine and norketamine following therapeutic ketamine administration: method and detection window considerations. *Journal of analytical toxicology* 29, 376-382.
- Adler, C., Goldberg, T., Malhotra, A., Pickar, D., Breier, A., 1998. Effects of ketamine on thought disorder, working memory, and semantic memory in healthy volunteers. *Biological psychiatry* 43, 811-816.
- Amiaz, R., Kent, I., Rubinstein, K., Daniel Javitt, M., Weiser, M., 2015. Safety, tolerability and pharmacokinetics of open label sarcosine added on to anti-psychotic treatment in schizophrenia-preliminary study. *The Israel journal of psychiatry and related sciences* 52, 12.
- Amico-Ruvio, S. A., Murthy, S. E., Smith, T. P., Popescu, G. K., 2011. Zinc effects on NMDA receptor gating kinetics. *Biophysical journal* 100, 1910-1918.
- Barash, P., Cullen, B. F., Stoelting, R. K., Cahalan, M., Stock, M. C., Ortega, R., 2013. *Handbook of clinical anesthesia*. Lippincott Williams & Wilkins.
- Batalla, A., Homberg, J. R., Lipina, T. V., Sescousse, G., Luijten, M., Ivanova, S. A., Schellekens, A. F., Loonen, A. J., 2017. The role of the habenula in the transition from reward to misery in substance use and mood disorders. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* 80, 276-285.
- Bossert, J. M., Marchant, N. J., Calu, D. J., Shaham, Y., 2013. The reinstatement model of drug relapse: recent neurobiological findings, emerging research topics, and translational research. *Psychopharmacology* 229, 453-476.
- Botreau, F., Paolone, G., Stewart, J., 2006. d-Cycloserine facilitates extinction of a cocaine-induced conditioned place preference. *Behavioural brain research* 172, 173-178.
- Breier, A., Adler, C. M., Weisenfeld, N., Su, T. P., Elman, I., Picken, L., Malhotra, A. K., Pickar, D., 1998. Effects of NMDA antagonism on striatal dopamine release in healthy subjects: application of a novel PET approach. *Synapse* 29, 142-147.
- Caballero, J. P., Scarpa, G. B., Remage-Healey, L., Moorman, D. E., 2019. Differential effects of dorsal and ventral medial prefrontal cortex inactivation during natural reward seeking, extinction, and cue-induced reinstatement. *Eneuro* 6.
- Carlezon Jr, W. A., Thomas, M. J., 2009. Biological substrates of reward and aversion: a nucleus accumbens activity hypothesis. *Neuropharmacology* 56, 122-132.
- Carlezon, W. A., Wise, R. A., 1996. Rewarding actions of phencyclidine and related drugs in nucleus accumbens shell and frontal cortex. *Journal of Neuroscience* 16, 3112-3122.

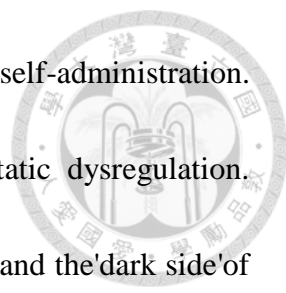


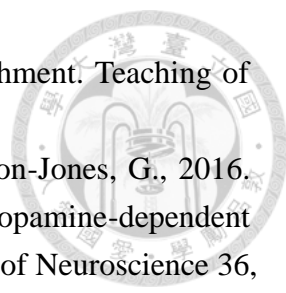
- 
- Castner, S., Murthy, N., Ridler, K., Herdon, H., Roberts, B., Weinzimmer, D., Huang, Y., Zheng, M., Rabiner, E., Gunn, R., 2014. Relationship between glycine transporter 1 inhibition as measured with positron emission tomography and changes in cognitive performances in nonhuman primates. *Neuropsychopharmacology* 39, 2742-2749.
- Cervo, L., Di Clemente, A., Orrù, A., Moro, F., Cassina, C., Pich, E. M., Corsi, M., Gozzi, A., Bifone, A., 2013. Inhibition of glycine transporter-1 reduces cue-induced nicotine-seeking, but does not promote extinction of conditioned nicotine cue responding in the rat. *Addiction biology* 18, 800-811.
- Chandler, L. J., Gass, J. T., 2013. The plasticity of extinction: contribution of the prefrontal cortex in treating addiction through inhibitory learning. *Frontiers in psychiatry* 4, 46.
- Chatterjee, M., Ganguly, S., Srivastava, M., Palit, G., 2011. Effect of 'chronic' versus 'acute' ketamine administration and its 'withdrawal' effect on behavioural alterations in mice: implications for experimental psychosis. *Behavioural brain research* 216, 247-254.
- Chen, W.-Y., Huang, M.-C., Lin, S.-K., 2014. Gender differences in subjective discontinuation symptoms associated with ketamine use. *Substance abuse treatment, prevention, and policy* 9, 39.
- Childress, A. R., McLellan, A. T., Ehrman, R., O'Brien, C. P., 1988. Classically conditioned responses in opioid and cocaine dependence: a role in relapse. *NIDA Res Monogr* 84, 25-43.
- Childress, A. R., Mozley, P. D., McElgin, W., Fitzgerald, J., Reivich, M., O'Brien, C. P., 1999. Limbic activation during cue-induced cocaine craving. *American Journal of Psychiatry* 156, 11-18.
- Collier, B. B., 1972. Ketamine and the conscious mind. *Anaesthesia* 27, 120-134.
- Cosme, C. V., Gutman, A. L., LaLumiere, R. T., 2015. The dorsal agranular insular cortex regulates the cued reinstatement of cocaine-seeking, but not food-seeking, behavior in rats. *Neuropsychopharmacology* 40, 2425-2433.
- D'Ascenzo, M., Mainardi, M., Grassi, C., 2017. Critical Role of d-Serine Signaling in Synaptic Plasticity Relevant to Cocaine Addiction. *The Neuroscience of Cocaine*. Elsevier, pp. 155-161.
- D'Ascenzo, M., Podda, M. V., Grassi, C., 2014. The role of D-serine as co-agonist of NMDA receptors in the nucleus accumbens: relevance to cocaine addiction. *Frontiers in synaptic neuroscience* 6, 16.
- Dayton, P., Stiller, R., Cook, D., Perel, J., 1983. The binding of ketamine to plasma proteins: emphasis on human plasma. *European journal of clinical pharmacology* 24, 825-831.

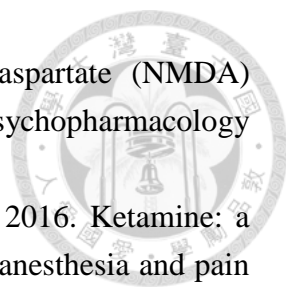
- 
- De Vogel, S., Ulvik, A., Meyer, K., Ueland, P. M., Nygård, O., Vollset, S. E., Tell, G. S., Gregory III, J. F., Tretli, S., Bjørge, T., 2014. Sarcosine and other metabolites along the choline oxidation pathway in relation to prostate cancer—A large nested case-control study within the JANUS cohort in Norway. *International journal of cancer* 134, 197-206.
- Deneau, G., Yanagita, T., Seevers, M., 1969. Self-administration of psychoactive substances by the monkey. *Psychopharmacologia* 16, 30-48.
- Di Chiara, G., 2002. Nucleus accumbens shell and core dopamine: differential role in behavior and addiction. *Behavioural brain research* 137, 75-114.
- Dinis-Oliveira, R. J., 2017. Metabolism and metabolomics of ketamine: a toxicological approach. *Forensic sciences research* 2, 2-10.
- Do Couto, B. R., Aguilar, M., Manzanedo, C., Rodriguez-Arias, M., Minarro, J., 2005. NMDA glutamate but not dopamine antagonists blocks drug-induced reinstatement of morphine place preference. *Brain Research Bulletin* 64, 493-503.
- Driesen, N. R., McCarthy, G., Bhagwagar, Z., Bloch, M., Calhoun, V., D'Souza, D. C., Gueorguieva, R., He, G., Ramachandran, R., Suckow, R. F., 2013. Relationship of resting brain hyperconnectivity and schizophrenia-like symptoms produced by the NMDA receptor antagonist ketamine in humans. *Molecular psychiatry* 18, 1199-1204.
- Dundee, J., Bovill, J., Knox, J., Clarke, R., Black, G., Love, S., Moore, J., Elliott, J., Pandit, S., Coppel, D., 1970. Ketamine as an induction agent in anaesthetics. *The Lancet* 295, 1370-1371.
- Edwards, S. R., Mather, L. E., 2001. Tissue uptake of ketamine and norketamine enantiomers in the rat Indirect evidence for extrahepatic metabolic inversion. *Life sciences* 69, 2051-2066.
- Ezquerro-Romano, I. I., Lawn, W., Krupitsky, E., Morgan, C., 2018. Ketamine for the treatment of addiction: Evidence and potential mechanisms. *Neuropharmacology* 142, 72-82.
- Famous, K. R., Schmidt, H. D., Pierce, R. C., 2007. When administered into the nucleus accumbens core or shell, the NMDA receptor antagonist AP-5 reinstates cocaine-seeking behavior in the rat. *Neuroscience letters* 420, 169-173.
- Fanta, S., Kinnunen, M., Backman, J. T., Kalso, E., 2015. Population pharmacokinetics of S-ketamine and norketamine in healthy volunteers after intravenous and oral dosing. *European journal of clinical pharmacology* 71, 441-447.
- Foster, A. C., Farnsworth, J., Lind, G. E., Li, Y.-X., Yang, J.-Y., Dang, V., Penjwini, M., Viswanath, V., Staubli, U., Kavanaugh, M. P., 2016. D-serine is a substrate for neutral amino acid transporters ASCT1/SLC1A4 and ASCT2/SLC1A5, and is transported by both subtypes in rat hippocampal astrocyte cultures. *PloS one* 11.

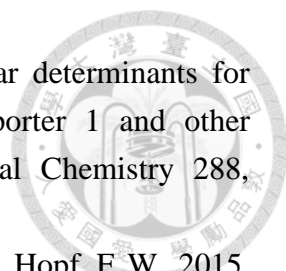
- 
- Foster, A. C., Rangel-Diaz, N., Staubli, U., Yang, J.-Y., Penjwini, M., Viswanath, V., Li, Y.-X., 2017. Phenylglycine analogs are inhibitors of the neutral amino acid transporters ASCT1 and ASCT2 and enhance NMDA receptor-mediated LTP in rat visual cortex slices. *Neuropharmacology* 126, 70-83.
- Ganote, C. E., Peterson, D. R., Carone, F. A., 1974. The nature of D-serine-induced nephrotoxicity. *The American journal of pathology* 77, 269.
- García-Pardo, M. P., Escobar-Valero, C., Rodríguez-Arias, M., Miñarro, J., Aguilar, M. A., 2015. Involvement of NMDA glutamate receptors in the acquisition and reinstatement of the conditioned place preference induced by MDMA. *Behavioural Pharmacology* 26, 411-417.
- Gass, J. T., Trantham-Davidson, H., Kassab, A. S., Glen, W. B., Olive, M. F., Chandler, L. J., 2014. Enhancement of extinction learning attenuates ethanol-seeking behavior and alters plasticity in the prefrontal cortex. *Journal of Neuroscience* 34, 7562-7574.
- Goodman, A., 1990. Addiction: definition and implications. *British journal of addiction* 85, 1403-1408.
- Gozzi, A., Herdon, H., Schwarz, A., Bertani, S., Crestan, V., Turrini, G., Bifone, A., 2008. Pharmacological stimulation of NMDA receptors via co-agonist site suppresses fMRI response to phencyclidine in the rat. *Psychopharmacology* 201, 273-284.
- Gray, J. A., Roth, B. L., 2007. The pipeline and future of drug development in schizophrenia. *Molecular psychiatry* 12, 904-922.
- Griffiths, R. R., Bradford, L. D., Brady, J. V., 1979. Progressive ratio and fixed ratio schedules of cocaine-maintained responding in baboons. *Psychopharmacology* 65, 125-136.
- Guastella, J., Brecha, N., Weigmann, C., Lester, H. A., Davidson, N., 1992. Cloning, expression, and localization of a rat brain high-affinity glycine transporter. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 89, 7189-7193.
- Hafenbreidel, M., Todd, C. R., Twining, R. C., Tuscher, J. J., Mueller, D., 2014. Bidirectional effects of inhibiting or potentiating NMDA receptors on extinction after cocaine self-administration in rats. *Psychopharmacology* 231, 4585-4594.
- Harper, A., Benevenga, N., Wohlhueter, R., 1970. Effects of ingestion of disproportionate amounts of amino acids. *Physiological reviews* 50, 428-558.
- Harsing Jr, L. G., Matyus, P., 2013. Mechanisms of glycine release, which build up synaptic and extrasynaptic glycine levels: The role of synaptic and non-synaptic glycine transporters. *Brain Research Bulletin* 93, 110-119.
- Healey, K., 2017. An Examination of D-serine Augmentation on the Behavioral and Cellular Mechanisms of Cocaine Seeking.

- 
- Hirota, K., Hashimoto, Y., Lambert, D. G., 2002. Interaction of intravenous anesthetics with recombinant human M1-M3 muscarinic receptors expressed in chinese hamster ovary cells. *Anesthesia & Analgesia* 95, 1607-1610.
- Hirota, K., Lambert, D., 1996. Ketamine: its mechanism (s) of action and unusual clinical uses. *British Journal of Anaesthesia* 77, 441-444.
- Hodos, W., 1961. Progressive ratio as a measure of reward strength. *Science* 134, 943-944.
- Huang, C.-C., Wei, I.-H., Huang, C.-L., Chen, K.-T., Tsai, M.-H., Tsai, P., Tun, R., Huang, K.-H., Chang, Y.-C., Lane, H.-Y., 2013. Inhibition of glycine transporter-I as a novel mechanism for the treatment of depression. *Biological psychiatry* 74, 734-741.
- Hustveit, O., Maurset, A., Øye, I., 1995. Interaction of the chiral forms of ketamine with opioid, phencyclidine,  $\sigma$  and muscarinic receptors. *Pharmacology & toxicology* 77, 355-359.
- Irwin, S. A., Iglewicz, A., 2010. Oral ketamine for the rapid treatment of depression and anxiety in patients receiving hospice care. *Journal of palliative medicine* 13, 903-908.
- Javitt, D. C., Balla, A., Sershen, H., Lajtha, A., 1999. Reversal of phencyclidine-induced effects by glycine and glycine transport inhibitors. *Biological psychiatry* 45, 668-679.
- Jones, J. L., Mateus, C. F., Malcolm, R. J., Brady, K. T., Back, S. E., 2018. Efficacy of ketamine in the treatment of substance use disorders: a systematic review. *Frontiers in psychiatry* 9, 277.
- Kalivas, P. W., Volkow, N. D., 2005. The neural basis of addiction: a pathology of motivation and choice. *American Journal of Psychiatry* 162, 1403-1413.
- Kantrowitz, J. T., Woods, S. W., Petkova, E., Cornblatt, B., Corcoran, C. M., Chen, H., Silipo, G., Javitt, D. C., 2015. D-serine for the treatment of negative symptoms in individuals at clinical high risk of schizophrenia: a pilot, double-blind, placebo-controlled, randomised parallel group mechanistic proof-of-concept trial. *The Lancet Psychiatry* 2, 403-412.
- Karch, S. B., Drummer, O., 2008. *Karch's pathology of drug abuse*. CRC press.
- Keilhoff, G., Bernstein, H.-G., Becker, A., Grecksch, G., Wolf, G., 2004. Increased neurogenesis in a rat ketamine model of schizophrenia. *Biological psychiatry* 56, 317-322.
- Kelamangalath, L., Seymour, C. M., Wagner, J. J., 2009. D-serine facilitates the effects of extinction to reduce cocaine-primed reinstatement of drug-seeking behavior. *Neurobiology of learning and memory* 92, 544-551.
- Kelamangalath, L., Wagner, J. J., 2010. D-serine treatment reduces cocaine-primed

- 
- reinstatement in rats following extended access to cocaine self-administration. *Neuroscience* 169, 1127-1135.
- Koob, G. F., Le Moal, M., 1997. Drug abuse: hedonic homeostatic dysregulation. *Science* 278, 52-58.
- Koob, G. F., Le Moal, M., 2005. Plasticity of reward neurocircuitry and the 'dark side' of drug addiction. *Nature neuroscience* 8, 1442-1444.
- Koob, G. F., Volkow, N. D., 2010. Neurocircuitry of addiction. *Neuropsychopharmacology* 35, 217-238.
- Li, Y.-X., Yang, J.-Y., Alcantara, M., Abelian, G., Kulkarni, A., Staubli, U., Foster, A. C., 2018. Inhibitors of the neutral amino acid transporters ASCT1 and ASCT2 are effective in in vivo models of schizophrenia and visual dysfunction. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 367, 292-301.
- Liebrenz, M., Borgeat, A., Leisinger, R., 2007. Intravenous ketamine therapy in a patient with a treatment-resistant major depression. *Swiss medical weekly* 137.
- Lodge, D. a., Mercier, M., 2015. Ketamine and phencyclidine: the good, the bad and the unexpected. *British journal of pharmacology* 172, 4254-4276.
- M Cleva, R., T Gass, J., J Widholm, J., F Olive, M., 2010. Glutamatergic targets for enhancing extinction learning in drug addiction. *Current neuropharmacology* 8, 394-408.
- Maag, J. W., 2001. Rewarded by punishment: Reflections on the disuse of positive reinforcement in schools. *Exceptional children* 67, 173-186.
- MacDonald, J., Bartlett, M., Mody, I., Pahapill, P., Reynolds, J., Salter, M., Schneiderman, J., Pennefather, P., 1991. Actions of ketamine, phencyclidine and MK-801 on NMDA receptor currents in cultured mouse hippocampal neurones. *The Journal of physiology* 432, 483-508.
- MacDonald, J., Miljkovic, Z., Pennefather, P., 1987. Use-dependent block of excitatory amino acid currents in cultured neurons by ketamine. *Journal of neurophysiology* 58, 251-266.
- MacKillop, J., Few, L., Stojek, M., Murphy, C., Malutinok, S., Johnson, F., Hofmann, S., McGeary, J., Swift, R., Monti, P., 2015. D-cycloserine to enhance extinction of cue-elicited craving for alcohol: a translational approach. *Translational psychiatry* 5, e544-e544.
- Malinovsky, J., Servin, F., Cozian, A., Lepage, J., Pinaud, M., 1996. Ketamine and norketamine plasma concentrations after iv, nasal and rectal administration in children. *British Journal of Anaesthesia* 77, 203-207.
- Matsuura, A., Fujita, Y., Iyo, M., Hashimoto, K., 2015. Effects of sodium benzoate on pre-pulse inhibition deficits and hyperlocomotion in mice after administration of phencyclidine. *Acta Neuropsychiatr* 27, 159-167.

- 
- McConnell, J. V., 1990. Negative reinforcement and positive punishment. *Teaching of Psychology* 17, 247-249.
- McGlinchey, E. M., James, M. H., Mahler, S. V., Pantazis, C., Aston-Jones, G., 2016. Prelimbic to accumbens core pathway is recruited in a dopamine-dependent manner to drive cued reinstatement of cocaine seeking. *Journal of Neuroscience* 36, 8700-8711.
- Mion, G., Villevieille, T., 2013. Ketamine pharmacology: an update (pharmacodynamics and molecular aspects, recent findings). *CNS neuroscience & therapeutics* 19, 370-380.
- Morgan, C. J., Curran, H. V., 2006. Acute and chronic effects of ketamine upon human memory: a review. *Psychopharmacology* 188, 408-424.
- Morgan, C. J., Curran, H. V., Drugs, I. S. C. o., 2012. Ketamine use: a review. *Addiction* 107, 27-38.
- Newcomer, J. W., Farber, N. B., Jevtovic-Todorovic, V., Selke, G., Melson, A. K., Hershey, T., Craft, S., Olney, J. W., 1999. Ketamine-induced NMDA receptor hypofunction as a model of memory impairment and psychosis. *Neuropsychopharmacology* 20, 106-118.
- Newcomer, J. W., Farber, N. B., Olney, J. W., 2000. NMDA receptor function, memory, and brain aging. *Dialogues in clinical neuroscience* 2, 219.
- Nishimura, M., Sato, K., Okada, T., Yoshiya, I., Schloss, P., Shimada, S., Tohyama, M., 1998. Ketamine inhibits monoamine transporters expressed in human embryonic kidney 293 cells. *Anesthesiology: The Journal of the American Society of Anesthesiologists* 88, 768-774.
- Okada, A., Nangaku, M., Jao, T.-M., Maekawa, H., Ishimono, Y., Kawakami, T., Inagi, R., 2017. D-serine, a novel uremic toxin, induces senescence in human renal tubular cells via GCN2 activation. *Scientific reports* 7, 1-13.
- Orser, B. A., Pennefather, P. S., MacDonald, J. F., 1997. Multiple mechanisms of ketamine blockade of N-methyl-D-aspartate receptors. *Anesthesiology: The Journal of the American Society of Anesthesiologists* 86, 903-917.
- Ortinski, P. I., 2014. Cocaine-induced changes in NMDA receptor signaling. *Molecular neurobiology* 50, 494-506.
- Panizzutti, R., Scoriels, L., Avellar, M., 2014. The Co-agonist site of NMDA-glutamate receptors: a novel therapeutic target for age-related cognitive decline. *Current pharmaceutical design* 20, 5160-5168.
- Pavlov, I. P., Anrep, G. V. e., 1928. *Conditioned reflexes: an investigation of the physiological activity of the cerebral cortex*. Oxford University Press London.
- Pei, J.-C., Hung, W.-L., Lin, B.-X., Shih, M.-H., Lu, L.-Y., Luo, D.-Z., Tai, H.-C., Studer, V., Min, M.-Y., Lai, W.-S., 2019. Therapeutic potential and underlying


- 
- mechanism of sarcosine (N-methylglycine) in N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor hypofunction models of schizophrenia. *Journal of Psychopharmacology* 33, 1288-1302.
- Peltoniemi, M. A., Hagelberg, N. M., Olkkola, K. T., Saari, T. I., 2016. Ketamine: a review of clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics in anesthesia and pain therapy. *Clinical pharmacokinetics* 55, 1059-1077.
- Pernot, P., Maucler, C., Tholance, Y., Vasylieva, N., Debilly, G., Pollegioni, L., Cespuglio, R., Marinesco, S., 2012. d-Serine diffusion through the blood–brain barrier: Effect on d-serine compartmentalization and storage. *Neurochemistry international* 60, 837-845.
- Peters, J., Kalivas, P. W., Quirk, G. J., 2009. Extinction circuits for fear and addiction overlap in prefrontal cortex. *Learning & memory* 16, 279-288.
- Phelps, L. E., Brutsche, N., Moral, J. R., Luckenbaugh, D. A., Manji, H. K., Zarate Jr, C. A., 2009. Family history of alcohol dependence and initial antidepressant response to an N-methyl-D-aspartate antagonist. *Biological psychiatry* 65, 181-184.
- Premack, D., 1959. Toward empirical behavior laws: I. Positive reinforcement. *Psychological Review* 66, 219.
- Qi, X., Evans, A. M., Wang, J., Miners, J. O., Upton, R. N., Milne, R. W., 2010. Inhibition of morphine metabolism by ketamine. *Drug metabolism and disposition* 38, 728-731.
- Rescorla, R. A., Wagner, A. R., 1972. A theory of Pavlovian conditioning: Variations in the effectiveness of reinforcement and nonreinforcement. *Classical conditioning II: Current research and theory* 2, 64-99.
- Ribeiro, C. S., Reis, M., Panizzutti, R., de Miranda, J., Wolosker, H., 2002. Glial transport of the neuromodulator D-serine. *Brain research* 929, 202-209.
- Robbins, T., Ersche, K., Everitt, B., 2008. Drug addiction and the memory systems of the brain.
- Roberts, B. M., Shaffer, C. L., Seymour, P. A., Schmidt, C. J., Williams, G. V., Castner, S. A., 2010. Glycine transporter inhibition reverses ketamine-induced working memory deficits. *Neuroreport* 21, 390-394.
- Rosenberg, D., Artoul, S., Segal, A. C., Kolodney, G., Radzishovsky, I., Dikopoltsev, E., Foltyn, V. N., Inoue, R., Mori, H., Billard, J.-M., 2013. Neuronal D-serine and glycine release via the Asc-1 transporter regulates NMDA receptor-dependent synaptic activity. *Journal of Neuroscience* 33, 3533-3544.
- Santa Ana, E. J., Rounsaville, B. J., Frankforter, T. L., Nich, C., Babuscio, T., Poling, J., Gonsai, K., Hill, K. P., Carroll, K. M., 2009. D-Cycloserine attenuates reactivity to smoking cues in nicotine dependent smokers: a pilot investigation. *Drug and alcohol dependence* 104, 220-227.

- 
- Scopelliti, A. J., Ryan, R. M., Vandenberg, R. J., 2013. Molecular determinants for functional differences between alanine-serine-cysteine transporter 1 and other glutamate transporter family members. *Journal of Biological Chemistry* 288, 8250-8257.
- Seif, T., Simms, J. A., Lei, K., Wegner, S., Bonci, A., Messing, R. O., Hopf, F. W., 2015. D-serine and D-cycloserine reduce compulsive alcohol intake in rats. *Neuropsychopharmacology* 40, 2357-2367.
- Sernagor, E., Kuhn, D., Vyklicky Jr, L., Mayer, M. L., 1989. Open channel block of NMDA receptor responses evoked by tricyclic antidepressants. *Neuron* 2, 1221-1227.
- Sinner, B., Graf, B., 2008. Ketamine. *Modern Anesthetics*. Springer, pp. 313-333.
- Skinner, B. F., 1963. Operant behavior. *American psychologist* 18, 503.
- Smith, K. M., Larive, L. L., Romanelli, F., 2002. Club drugs: methylenedioxymethamphetamine, flunitrazepam, ketamine hydrochloride, and gamma-hydroxybutyrate. *American Journal of Health-System Pharmacy* 59, 1067-1076.
- Smith, K. S., Tindell, A. J., Aldridge, J. W., Berridge, K. C., 2009. Ventral pallidum roles in reward and motivation. *Behavioural brain research* 196, 155-167.
- Snyder, S. H., Ferris, C. D., 2000. Novel neurotransmitters and their neuropsychiatric relevance. *American Journal of Psychiatry* 157, 1738-1751.
- Spealman, R. D., Goldberg, S. R., 1978. Drug self-administration by laboratory animals: control by schedules of reinforcement. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 18, 313-339.
- Thanos, P. K., Subrize, M., Lui, W., Puca, Z., Ananth, M., Michaelides, M., Wang, G. J., Volkow, N. D., 2011. D-cycloserine facilitates extinction of cocaine self-administration in c57 mice. *Synapse* 65, 1099-1105.
- Thomson, A. M., Walker, V., Flynn, D. M., 1989. Glycine enhances NMDA-receptor mediated synaptic potentials in neocortical slices. *Nature* 338, 422-424.
- Trullas, R., Skolnick, P., 1990. Functional antagonists at the NMDA receptor complex exhibit antidepressant actions. *European journal of pharmacology* 185, 1-10.
- Tsai, G., 2016. Ultimate translation: developing therapeutics targeting on N-methyl-d-aspartate receptor. *Advances in Pharmacology*. Elsevier, pp. 257-309.
- Tsai, G., Lane, H.-Y., Yang, P., Chong, M.-Y., Lange, N., 2004. Glycine transporter I inhibitor, N-methylglycine (sarcosine), added to antipsychotics for the treatment of schizophrenia. *Biological psychiatry* 55, 452-456.
- Tsai, Y.-n., Tzeng, W.-Y., Cheng, C. G., Liao, T. Y., Wu, H.-H., Lin, J.-K., Yu, L., 2016. Effects of sodium benzoate treatment in combination with an extinction training on the maintenance of cocaine-supported memory. *Chinese Journal of Physiology* 59,



56-61.

- Uslaner, J. M., Drott, J. T., Sharik, S. S., Theberge, C. R., Sur, C., Zeng, Z., Williams, D. L., Hutson, P. H., 2010. Inhibition of glycine transporter 1 attenuates nicotine-but not food-induced cue-potentiated reinstatement for a response previously paired with sucrose. *Behavioural brain research* 207, 37-43.
- Vengeliene, V., Bachteler, D., Danysz, W., Spanagel, R., 2005. The role of the NMDA receptor in alcohol relapse: a pharmacological mapping study using the alcohol deprivation effect. *Neuropharmacology* 48, 822-829.
- Vengeliene, V., Leonardi-Essmann, F., Sommer, W. H., Marston, H. M., Spanagel, R., 2010. Glycine transporter-1 blockade leads to persistently reduced relapse-like alcohol drinking in rats. *Biological psychiatry* 68, 704-711.
- Vengeliene, V., Roßmanith, M., Takahashi, T. T., Alberati, D., Behl, B., Bespalov, A., Spanagel, R., 2018. Targeting glycine reuptake in alcohol seeking and relapse. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 365, 202-211.
- Volkow, N. D., Baler, R. D., 2015. NOW vs LATER brain circuits: implications for obesity and addiction. *Trends in neurosciences* 38, 345-352.
- Volkow, N. D., Koob, G. F., McLellan, A. T., 2016. Neurobiologic advances from the brain disease model of addiction. *New England Journal of Medicine* 374, 363-371.
- Volkow, N. D., Morales, M., 2015. The brain on drugs: from reward to addiction. *Cell* 162, 712-725.
- Volkow, N. D., Wang, G.-J., Ma, Y., Fowler, J. S., Wong, C., Ding, Y.-S., Hitzemann, R., Swanson, J. M., Kalivas, P., 2005. Activation of orbital and medial prefrontal cortex by methylphenidate in cocaine-addicted subjects but not in controls: relevance to addiction. *Journal of Neuroscience* 25, 3932-3939.
- Volkow, N. D., Wang, G.-J., Telang, F., Fowler, J. S., Logan, J., Childress, A.-R., Jayne, M., Ma, Y., Wong, C., 2006. Cocaine cues and dopamine in dorsal striatum: mechanism of craving in cocaine addiction. *Journal of Neuroscience* 26, 6583-6588.
- Wang, C., Zheng, D., Xu, J., Lam, W., Yew, D., 2013. Brain damages in ketamine addicts as revealed by magnetic resonance imaging. *Frontiers in neuroanatomy* 7, 23.
- Warren, B. L., Kane, L., Venniro, M., Selvam, P., Quintana-Feliciano, R., Mendoza, M. P., Madangopal, R., Komer, L., Whitaker, L. R., Rubio, F. J., 2019. Separate vmPFC ensembles control cocaine self-administration versus extinction in rats. *Journal of Neuroscience* 39, 7394-7407.
- Warren, B. L., Suto, N., Hope, B. T., 2017. Mechanistic resolution required to mediate operant learned behaviors: insights from neuronal ensemble-specific inactivation. *Frontiers in Neural Circuits* 11, 28.

- 
- Weeks, J. R., 1962. Experimental morphine addiction: method for automatic intravenous injections in unrestrained rats. *Science* 138, 143-144.
- White, P., Schüttler, J., Shafer, A., Stanski, D., Horai, Y., Trevor, A., 1985. Comparative pharmacology of the ketamine isomers: studies in volunteers. *BJA: British Journal of Anaesthesia* 57, 197-203.
- Wolosker, H., Balu, D. T., Coyle, J. T., 2016. The rise and fall of the d-serine-mediated gliotransmission hypothesis. *Trends in neurosciences* 39, 712-721.
- Xu, J., Lei, H., 2014. Ketamine-An Update on Its Clinical Uses and Abuses. *CNS neuroscience & therapeutics* 20, 1015-1020.
- Yamakura, T., Shimoji, K., 1999. Subunit-and site-specific pharmacology of the NMDA receptor channel. *Progress in neurobiology* 59, 279-298.
- Yamamori, H., Hashimoto, R., Fujita, Y., Numata, S., Yasuda, Y., Fujimoto, M., Ohi, K., Umeda-Yano, S., Ito, A., Ohmori, T., 2014. Changes in plasma D-serine, L-serine, and glycine levels in treatment-resistant schizophrenia before and after clozapine treatment. *Neuroscience letters* 582, 93-98.
- Yang, F.-Y., Lee, Y.-S., Cherng, C. G., Cheng, L.-Y., Chang, W.-T., Chuang, J.-Y., Kao, G.-S., Yu, L., 2013. D-cycloserine, sarcosine and D-serine diminish the expression of cocaine-induced conditioned place preference. *Journal of Psychopharmacology* 27, 550-558.
- Yew, D. T., 2015. *Ketamine: Use and abuse*. CRC Press.
- Zafra, F., Gomeza, J., Olivares, L., Aragón, C., Giménez, C., 1995. Regional distribution and developmental variation of the glycine transporters GLYT1 and GLYT2 in the rat CNS. *European Journal of Neuroscience* 7, 1342-1352.
- Zarate, C. A., Singh, J. B., Carlson, P. J., Brutsche, N. E., Ameli, R., Luckenbaugh, D. A., Charney, D. S., Manji, H. K., 2006. A randomized trial of an N-methyl-D-aspartate antagonist in treatment-resistant major depression. *Archives of general psychiatry* 63, 856-864.
- Zeilhofer, H. U., Swandulla, D., Geisslinger, G., Brune, K., 1992. Differential effects of ketamine enantiomers on NMDA receptor currents in cultured neurons. *European journal of pharmacology* 213, 155-158.
- Zhang, H. X., Hyrc, K., Thio, L. L., 2009. The glycine transport inhibitor sarcosine is an NMDA receptor co-agonist that differs from glycine. *The Journal of physiology* 587, 3207-3220.

#### 中文部分

- 林仁政 (2016)。二甲基甘胺酸與三甲基甘胺酸對於K他命誘發抗憂鬱與擬精神病行為之效用 (未出版之博士論文)。國防醫學院，臺北市。
- 陳浩 (2017)。二甲基甘胺酸改善甲苯所誘發之行為異常(未出版之碩士論文)。清華大

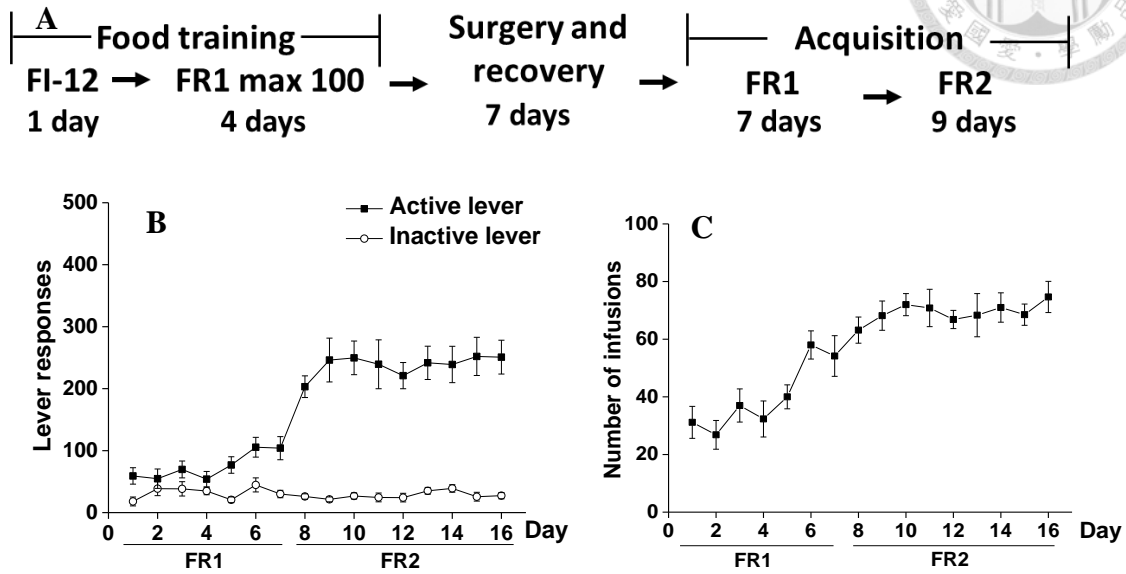
學，新竹市。

李美儀 (2018)。甜菜鹼及苯甲酸鈉調節K他命之自我給藥增強作用及復發行為 (未出版之博士論文)。慈濟大學，花蓮市。

劉亦賢 (2018)。苯甲酸鈉改善K他命誘發之行為異常 (未出版之碩士論文)。政治大學，台北市。

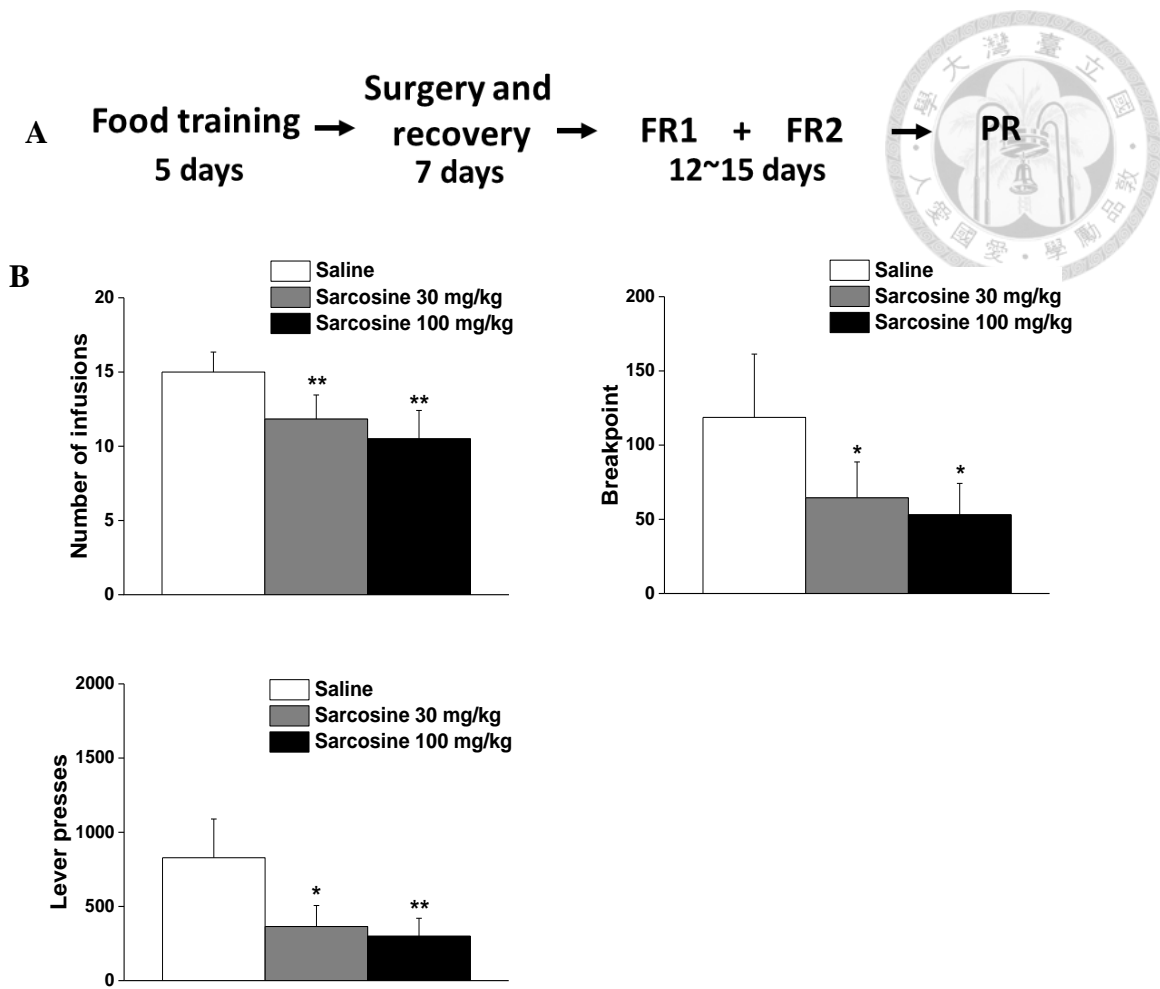


## 捌、圖表

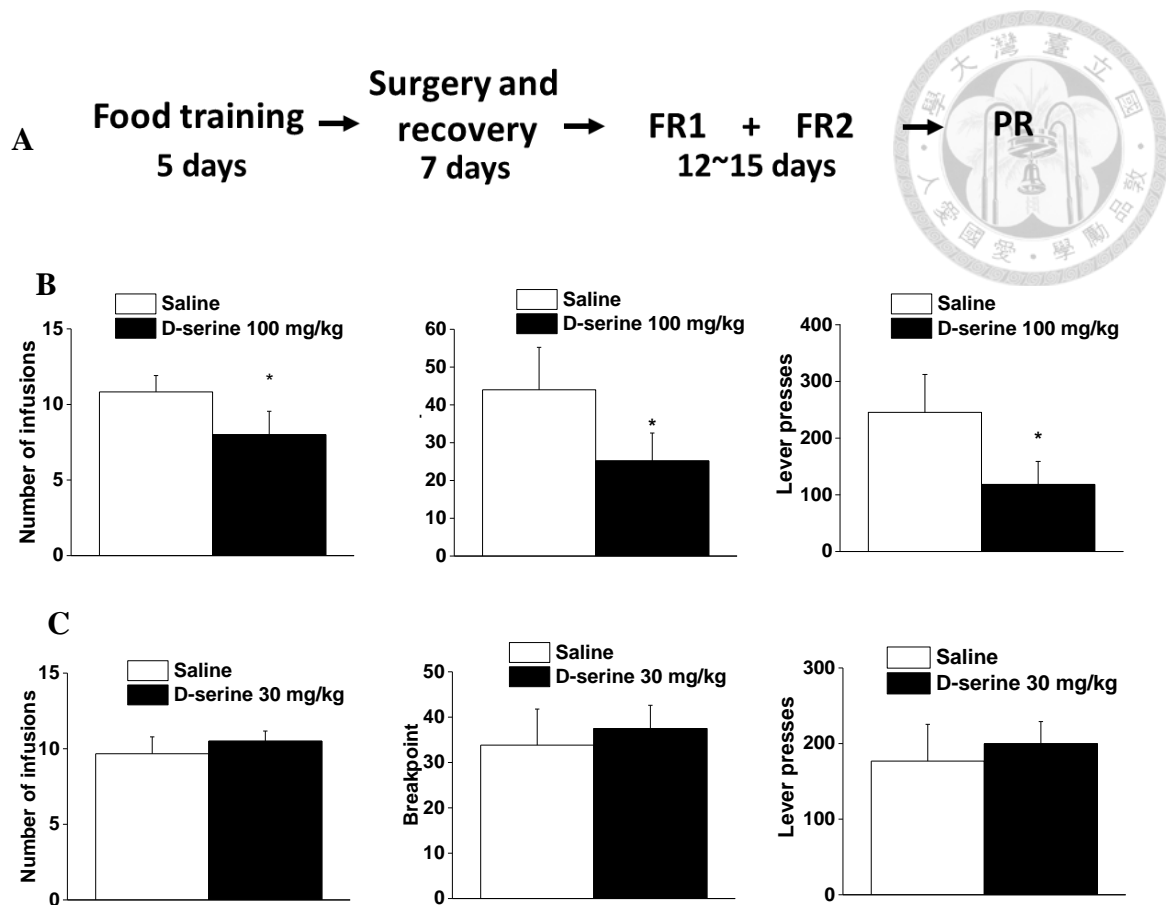


**Figure 1. Ketamine self-administration at 0.5 mg/kg/infusion.**

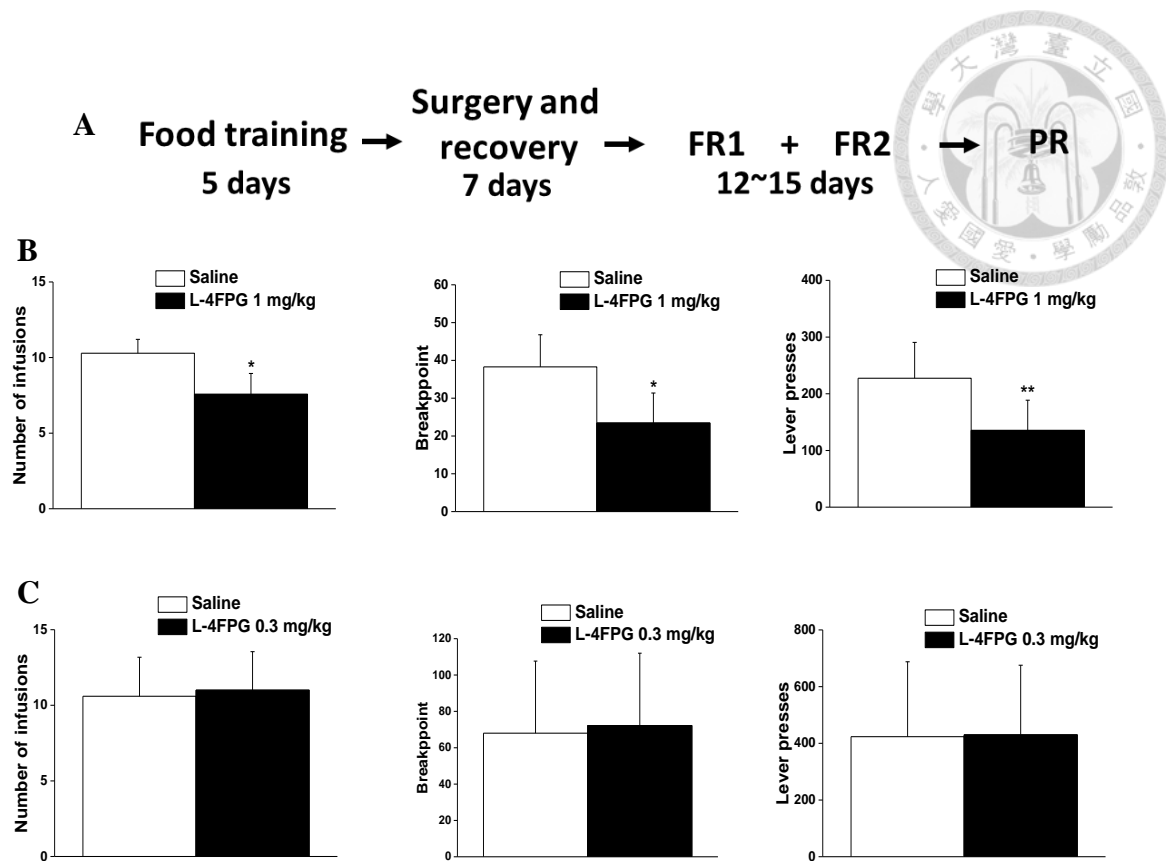
Experimental timeline (A). After food training and surgery, rat received the fixed-ratio 1 (FR1) and FR2 schedule for the acquisition of ketamine self-administration. The number of lever responses(B) and ketamine infusions (C) on FR1 and FR2 schedule were recorded. The data were presented as mean  $\pm$ SEM.(n=6)



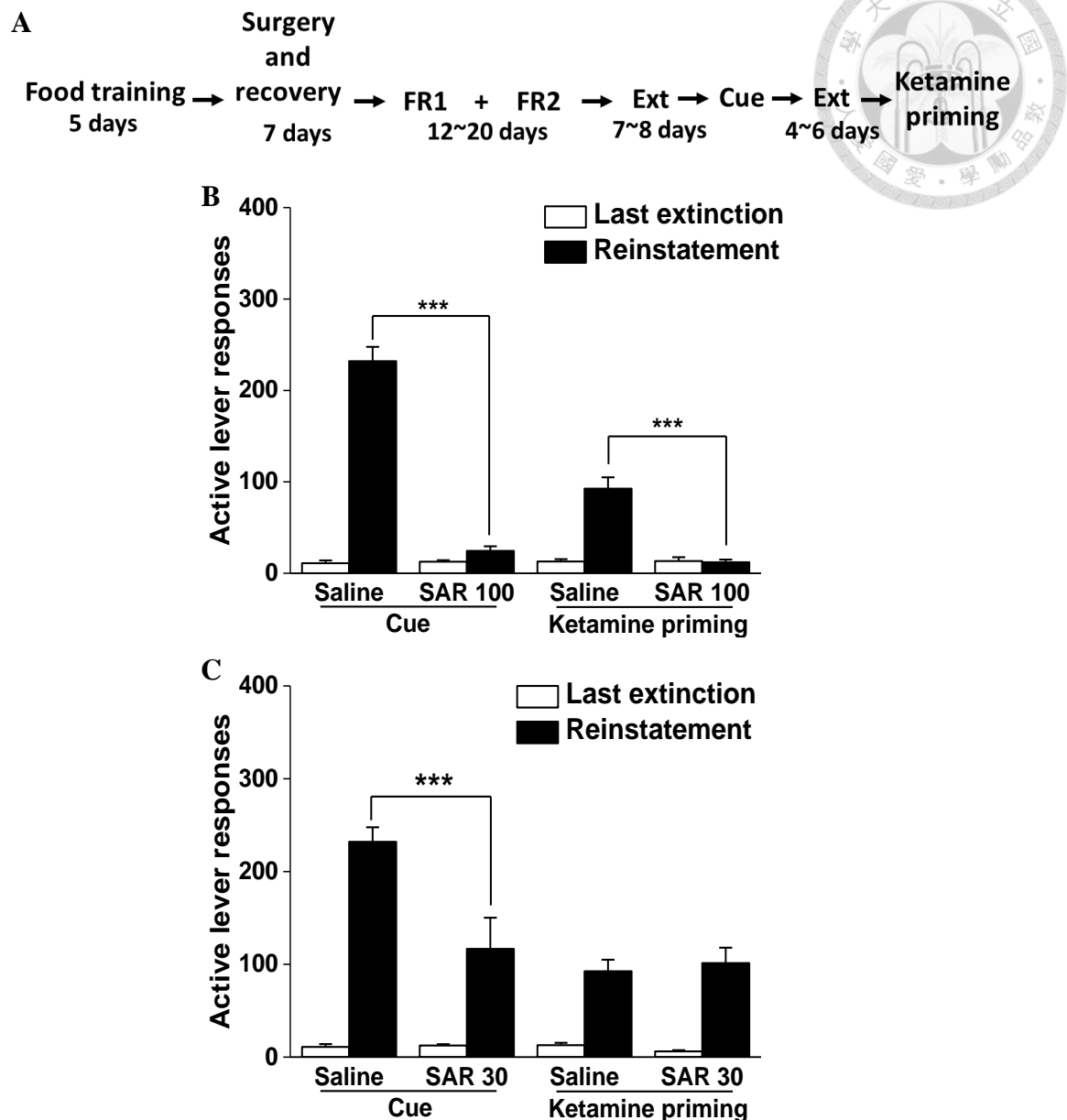
**Figure 2. Effects of acute sarcosine on the motivation to self-administer ketamine under a PR schedule of reinforcement.** Experimental timeline (A). After acquisition training of ketamine, two sets of animals were administered with sarcosine (30 or 100 mg/kg) or saline (n=6) (B) 30 min prior to ketamine self-administration. The number of lever presses, breakpoint and ketamine infusions were recorded. The data were presented as mean  $\pm$  SEM. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , compared with the saline group.



**Figure 3. Effects of acute D-serine on the motivation to self-administer ketamine under a PR schedule of reinforcement.** Experimental timeline (A). After acquisition training of ketamine, two sets of animals were administered with D-serine (100 mg/kg) or saline (n=6)(B) and D-serine (30 mg/kg) or saline (n=6)(C) 120 min prior to ketamine self-administration. The number of lever presses, breakpoint and ketamine infusions were recorded. The data were presented as mean  $\pm$ SEM. \* $P < 0.05$ , compared with the saline group.



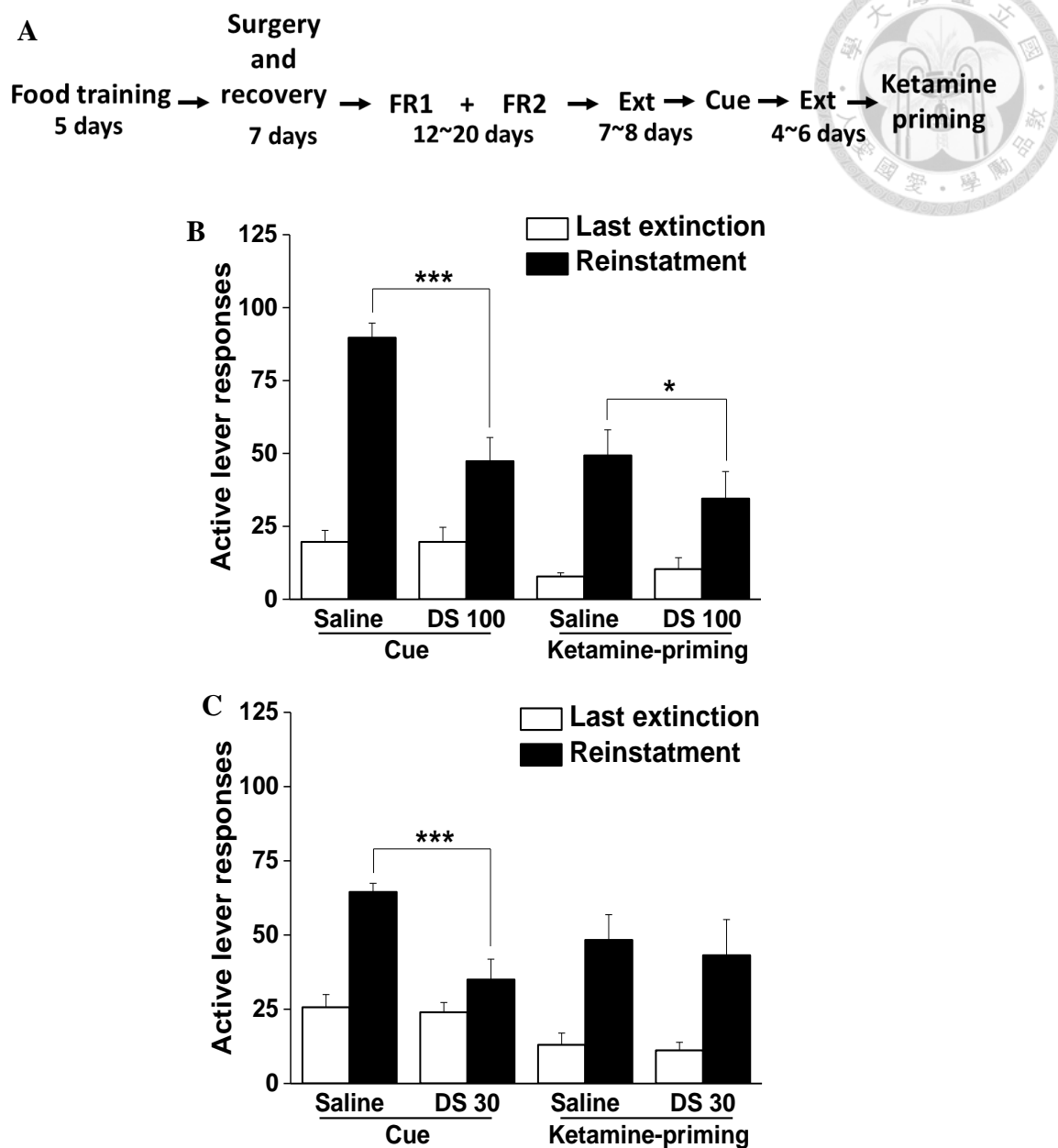
**Figure 4. Effects of acute L-4FPG on the motivation to self-administer ketamine under a PR schedule of reinforcement.** Experimental timeline (A). After acquisition training of ketamine, two sets of animals were administered with L-4FPG (1 mg/kg) or saline (n=7)(B) and L-4FPG (0.3 mg/kg) or saline (n=5)(C) 30 min prior to ketamine self-administration. The number of lever presses, breakpoint and ketamine infusions were recorded. The data were presented as mean  $\pm$ SEM. \*P<0.05, \*\*P<0.01, compared with the saline group.



**Figure 5. Effects of acute sarcosine on cue- and ketamine prime-induced reinstatement of ketamine seeking.**

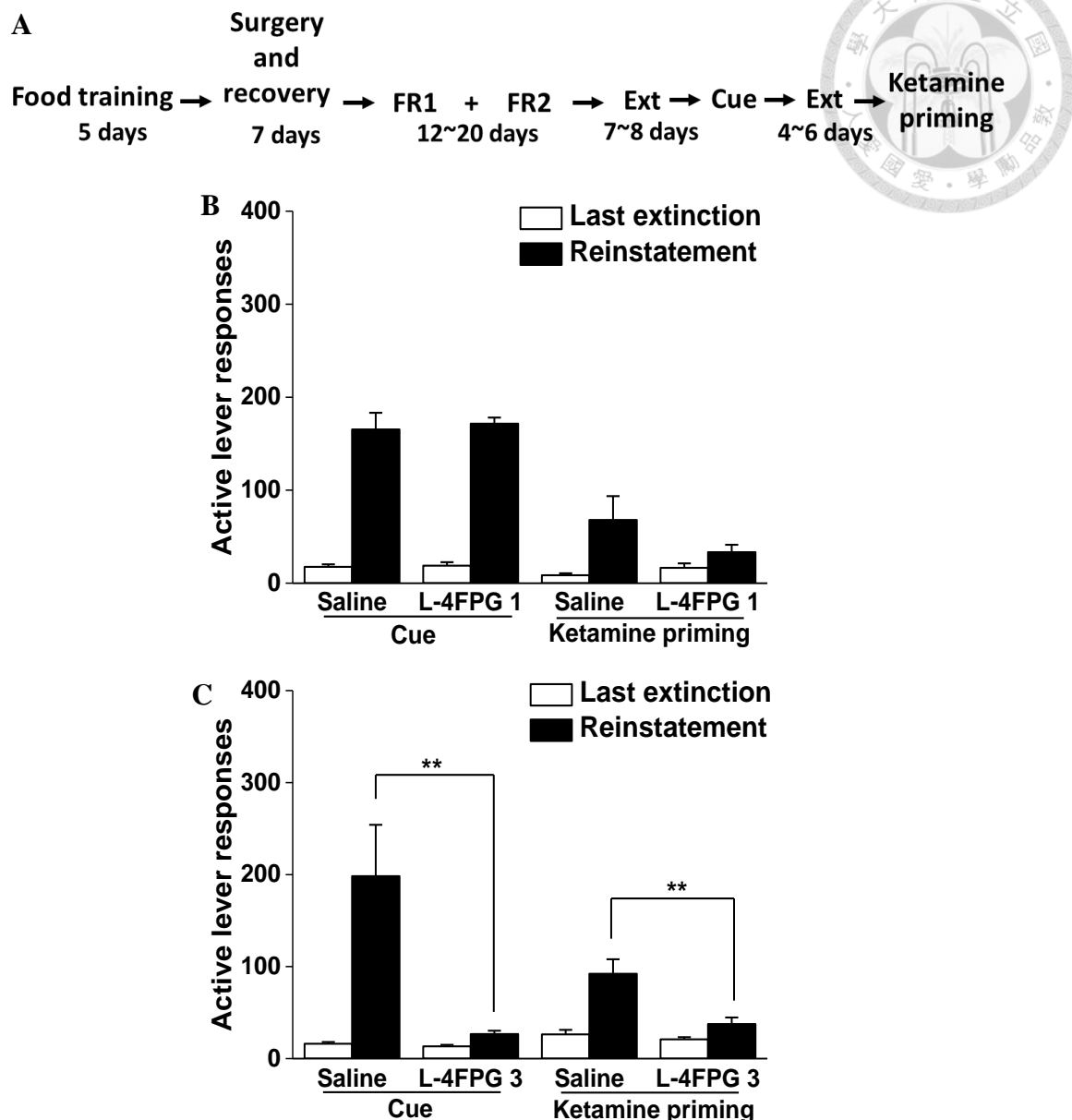
Experimental timeline (A). The animals received the ketamine self-administration under a FR1 and FR2 schedule followed by the extinction procedures until criteria were reached for at least 2 sessions. Two sets of animals were administered with sarcosine 100 mg/kg or saline (n=6)(B) and sarcosine 30 mg/kg or saline (n=6)(C) prior to cue- and ketamine (10 mg/kg, ip) priming-induced reinstatement. The number of active lever responses of last session of extinction and reinstatement induced by cue or ketamine priming were demonstrated. The data were presented as mean  $\pm$  SEM. \*\*\*P < 0.001, compared with the saline group. SAR: sarcosine.





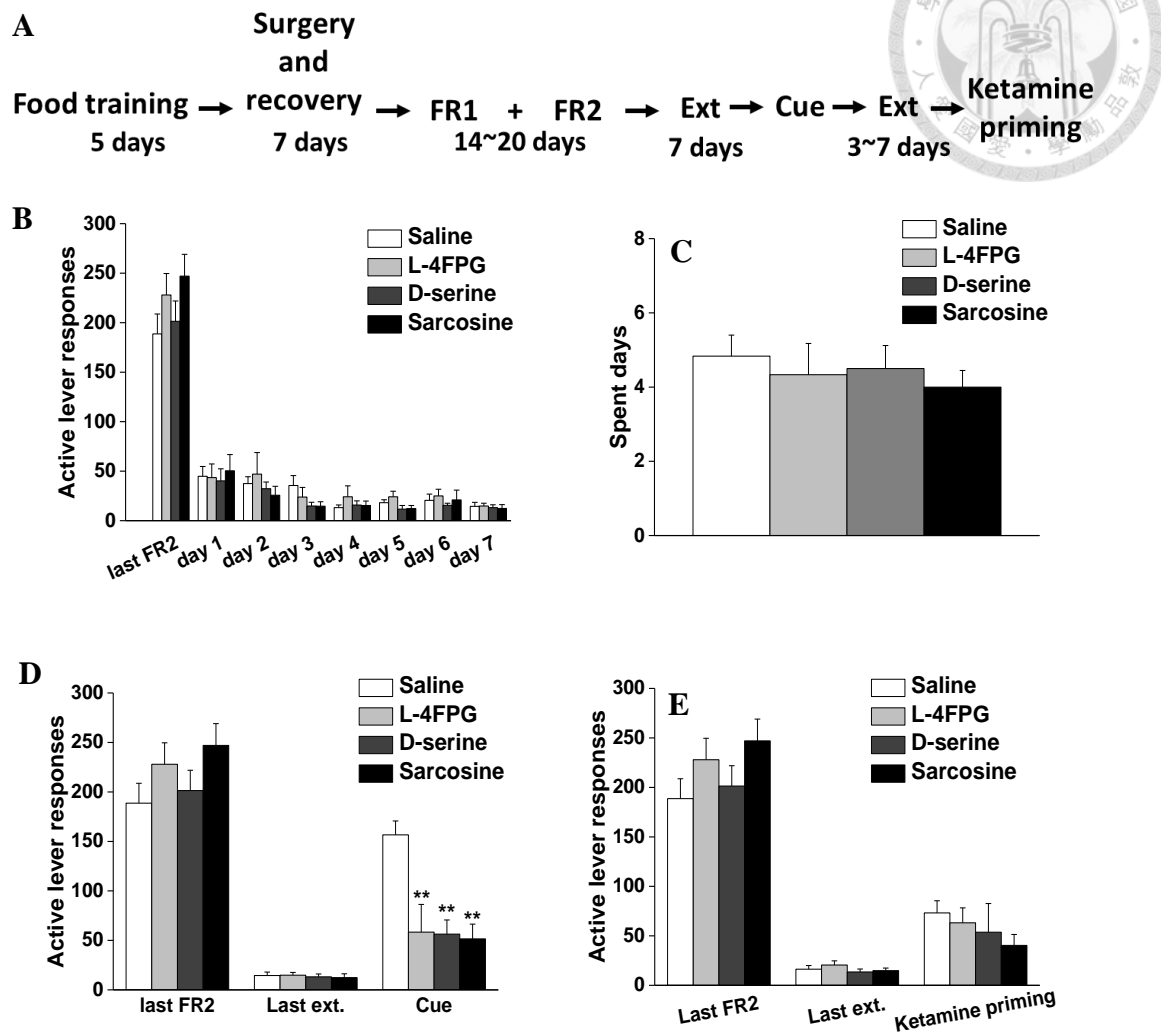
**Figure 6. Effects of acute D-serine on cue- and ketamine prime-induced reinstatement of ketamine seeking.**

Experimental timeline (A). The animals received the ketamine self-administration under a FR1 and FR2 schedule followed by the extinction procedures until criteria were reached for at least 2 sessions. Two sets of animals were administered with D-serine 100 mg/kg or saline (n=6) (B) and D-serine 30 mg/kg or saline (n=6) (C) prior to cue- and ketamine priming-induced reinstatement. The number of active lever responses of last session of extinction and reinstatement induced by cue or ketamine priming were demonstrated. The data were presented as mean  $\pm$  SEM. \*P < 0.05 \*\*\*P < 0.001, compared with the saline group. DS: D-serine



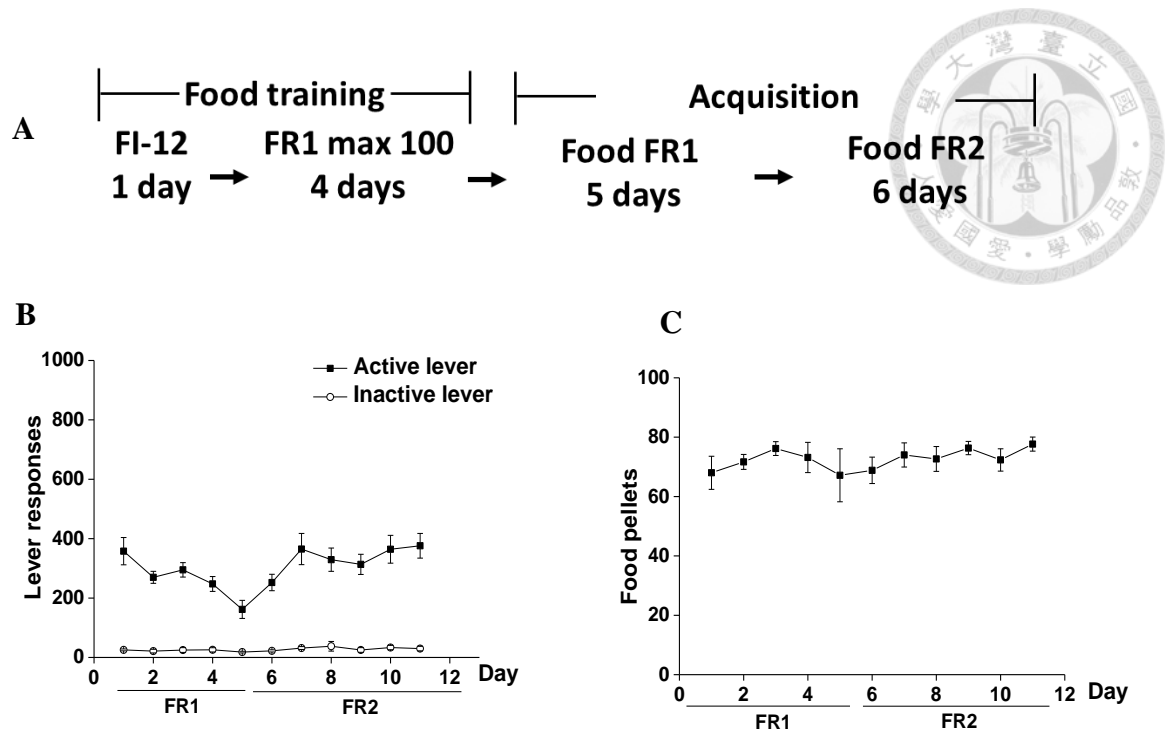
**Figure 7. Effects of acute L-4FPG on cue- and ketamine prime-induced reinstatement of ketamine seeking.**

Experimental timeline (A). The animals received the ketamine self-administration under a FR1 and FR2 schedule followed by the extinction procedures until criteria were reached for at least 2 sessions. Two sets of animals were administered with L-4FPG 1 mg/kg or saline (n=6) (B) and L-4FPG 3 mg/kg or saline (n=6) (C) prior to cue- and ketamine priming-induced reinstatement. The number of active lever responses of last session of extinction and reinstatement induced by cue or ketamine priming were demonstrated. Data were presented as mean  $\pm$  SEM. \*\*P < 0.01 compared with the saline group.



**Figure 8. Effects of sarcosine, D-serine and L-4FPG during extinction session of ketamine self-administration.**

Experimental timeline (A). After acquisition training of ketamine self-administration, rats received a daily extinction procedure for 7 days. Saline (n=6), sarcosine 100 mg/kg (n=6), D-serine 100 mg/kg (n=6) or L-4FPG 3 mg/kg (n=6) were immediately administered after each extinction sessions. The active lever press responses during extinction (B), the number of days spent for reaching extinction criteria (C), and the numbers of active lever responses of reinstatement induced by cue (D) or ketamine priming (E) were recorded. Saline, sarcosine, D-serine and L-4FPG were administered by between-subject design. The data were presented as mean  $\pm$  SEM. \*\*P < 0.01 compared with the saline group.



**Figure 9. Food self-administration.**

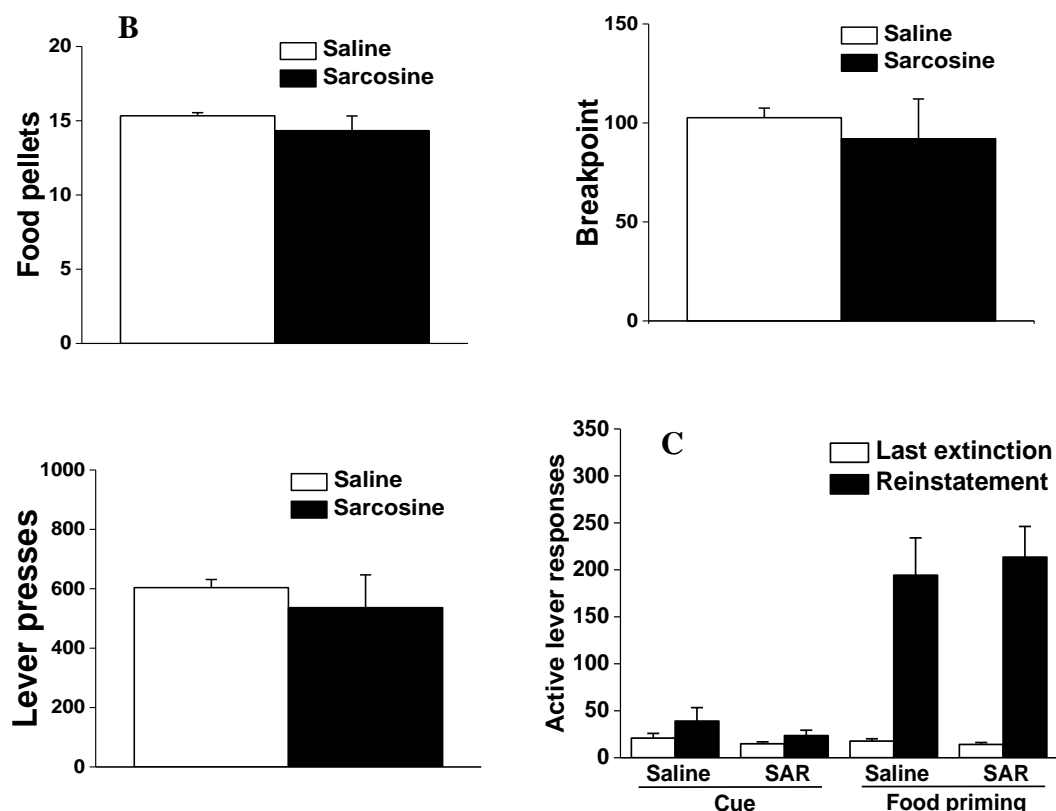
Experimental timeline (A). After food training, rat received the food self-administration under FR1 and FR2 schedules. Number of lever responses (B) and food pellets (C) were recorded. The data were presented as mean  $\pm$ SEM (n=6).



A

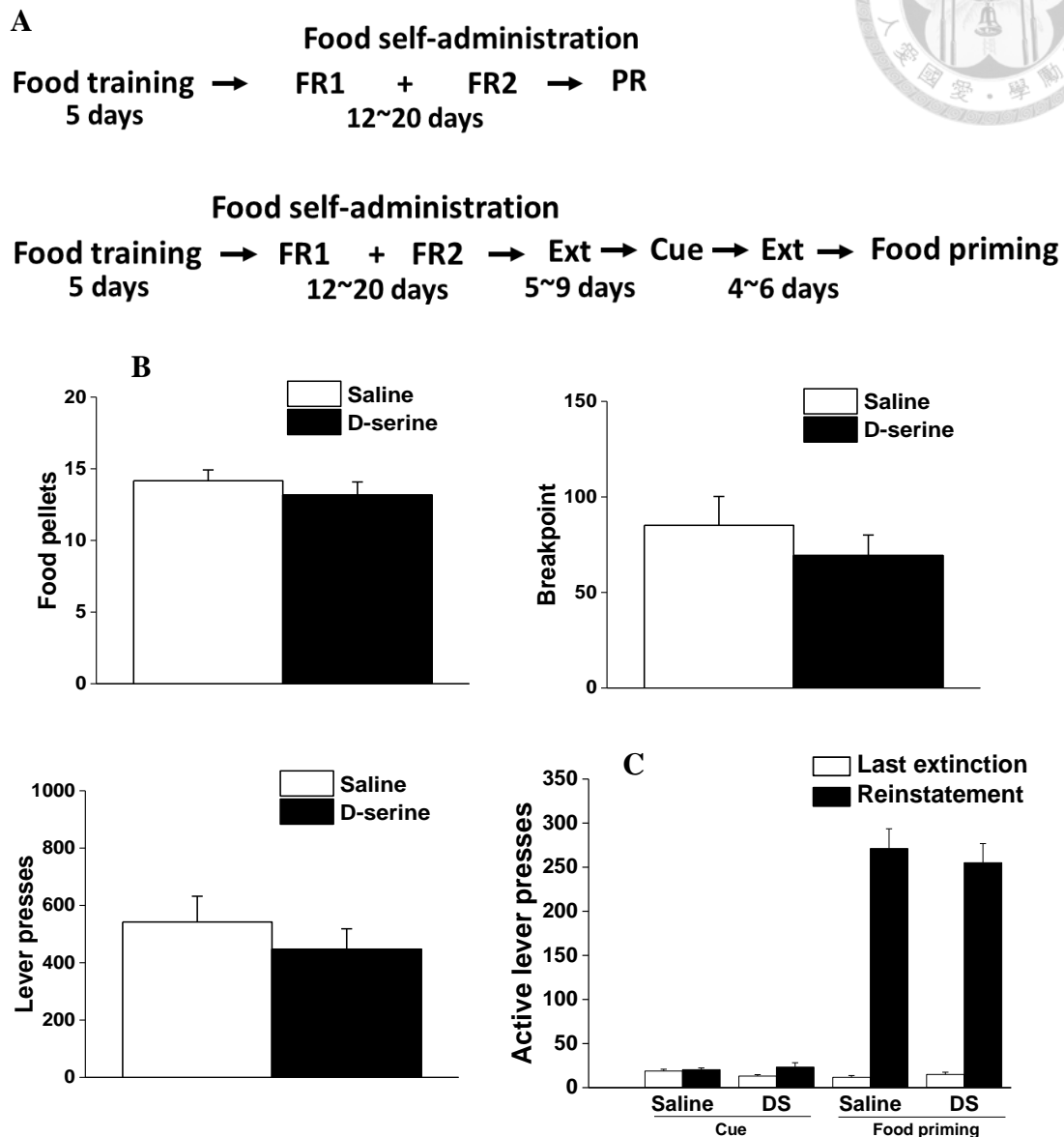
Food training → 5 days → **Food self-administration**  
FR1 + FR2 → PR  
12~20 days

**Food self-administration**  
Food training → 5 days → FR1 + FR2 → 12~20 days → Ext → 5~9 days → Cue → 4~6 days → Ext → 4~6 days → Food priming



**Figure 10. Effects of sarcosine on food reinforcement under a PR schedule and cue- and food priming-induced reinstatement of food seeking.**

Experimental timeline (A). Sarcosine (100 mg/kg) or saline were administered 30 min prior to food self-administration procedures under a PR schedule. The numbers of lever responses, breakpoints and the food pellets received were recorded (B). The animals were trained to self-administer food pellets followed by the extinction procedures. Sarcosine (100 mg/kg) or saline were administered 30 min prior to cue- and food pellet priming-induced reinstatement. The numbers of active lever responses of last session of extinction and reinstatement induced by cue or food pellet priming were demonstrated (C). The data were presented as mean  $\pm$  SEM (n=6). SAR: sarcosine

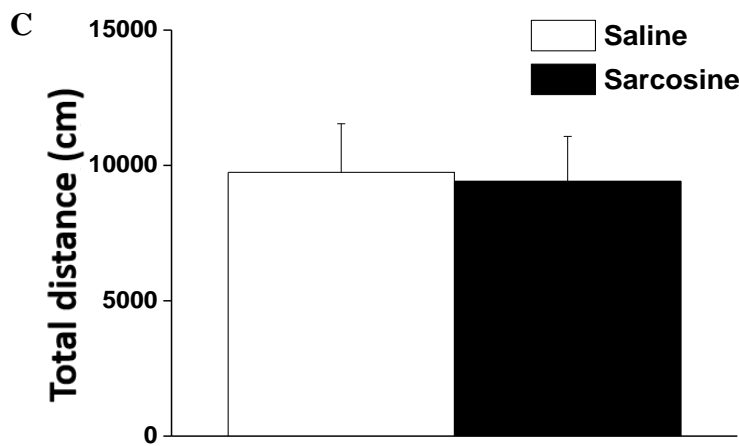
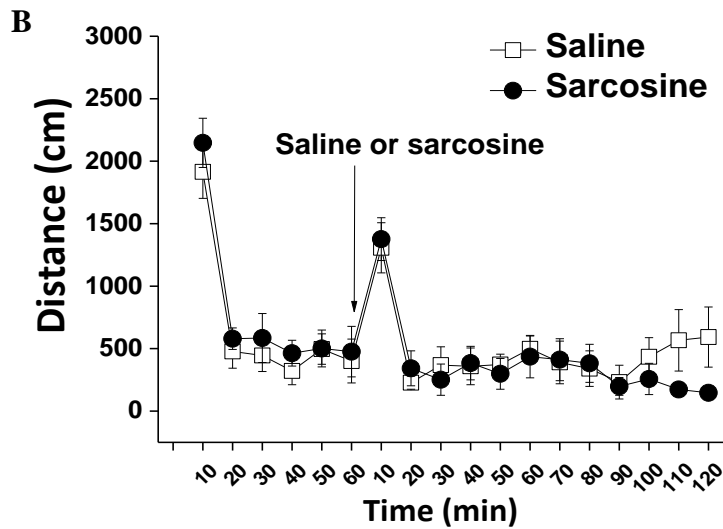
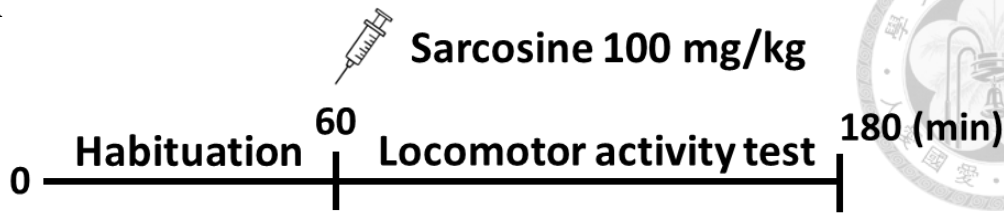


**Figure 11. Effects of D-serine on food reinforcement under a PR schedule and cue- and food priming-induced reinstatement of food seeking.**

Experimental timeline (A). D-serine (100 mg/kg) or saline were administered 120 min prior to food self-administration procedures under a PR schedule. The numbers of lever responses, breakpoints and the food pellets received were recorded (B). The animals were trained to self-administer food pellets followed by the extinction procedures. D-serine (100 mg/kg) or saline were administered 120 min prior to cue- and food pellet priming-induced reinstatement. The numbers of active lever responses of last session of extinction and reinstatement induced by cue or food pellet priming were demonstrated (C). The data were presented as mean  $\pm$ SEM (n=6). DS: D-serine



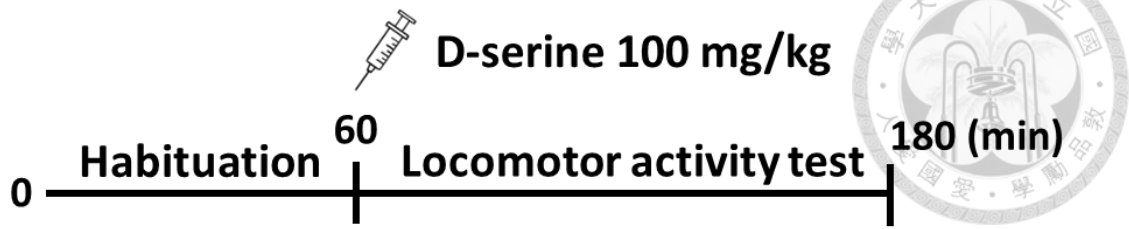
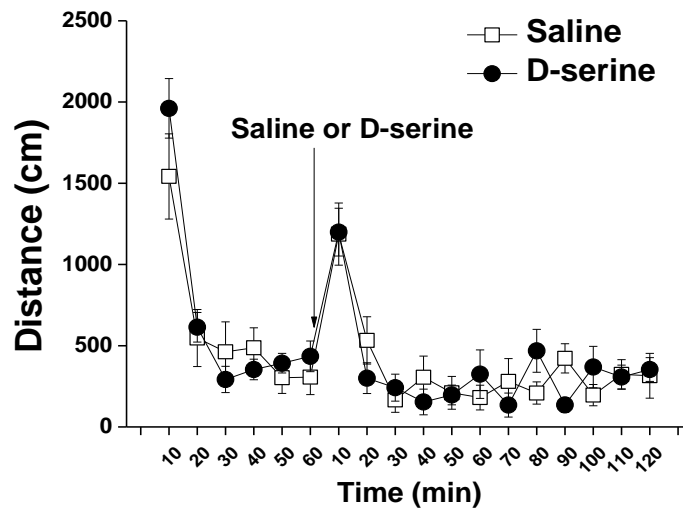
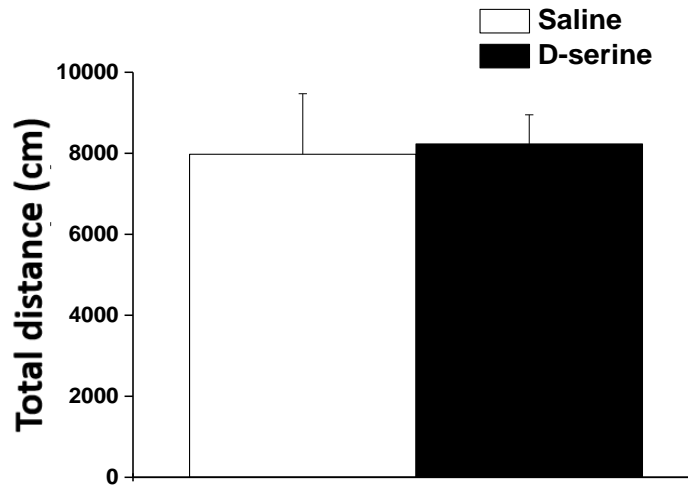
A



**Figure 13. Effects of sarcosine on locomotor activity in the open field.**

Experimental timeline (A).The basal locomotor activity was measured for 60 min, followed by administration of sarcosine (100 mg/kg) or saline and proceeded to measure for 120 min. The distance traveled for each 10 min (B) and total distance (C) after drug injection are presented as mean  $\pm$  SEM (n=6).

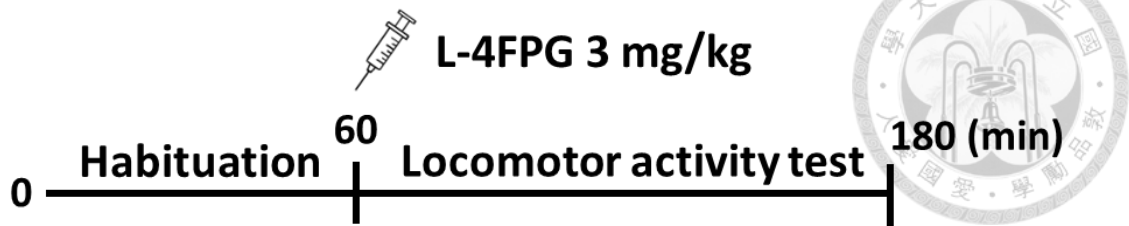


**A****B****C**

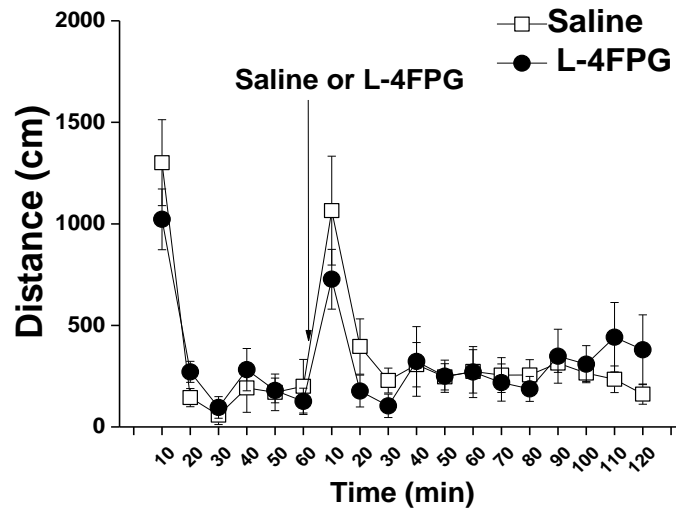
**Figure 14. Effects of D-serine on locomotor activity in the open field.**

Experimental timeline (A). The basal locomotor activity was measured for 60 min, followed by administration of D-serine (100 mg/kg) or saline and proceeded to measure for 120 min. The distance traveled for each 10 min (B) and total distance (C) after drug injection are presented as mean  $\pm$  SEM (n=7).

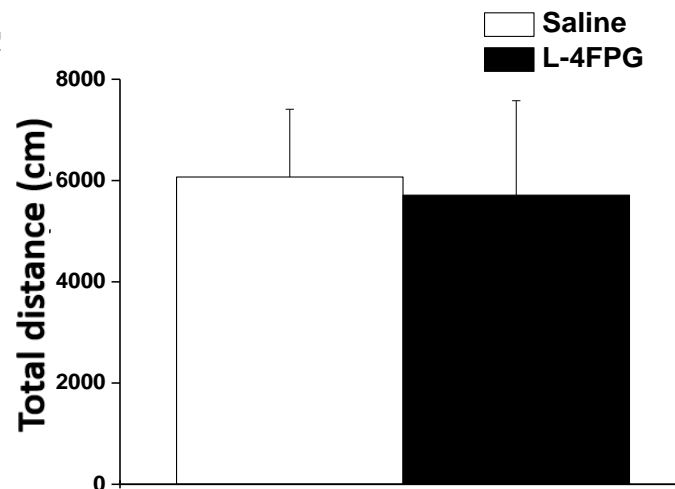
A



B



C



**Figure 15. Effects of L-4FPG on locomotor activity in the open field.**

Experimental timeline (A). The basal locomotor activity was measured for 60 min, followed by administration of L-4FPG (100 mg/kg) or saline and proceeded to measure for 120 min. The distance traveled for each 10 min (B) and total distance (C) after drug injection are presented as mean  $\pm$  SEM (n=7).