

3-甲基芬太尼类7个化合物与硫酸脑甙酯的相互作用

周德和 李志毅 倪崇虎 池志强 (中国科学院上海药物研究所, 上海 200031)

摘要 从猪脑中分离纯化和鉴定得到CS。将CS与 $[^3\text{H}]$ 纳洛酮在正庚烷/水相系统中进行受体专一性结合试验是高亲和的, 饱和时的解离常数 $K_d = 8.5 \times 10^{-8} \text{ M}$ (20°C)。具有强效镇痛作用的3-甲基芬太尼类7个化合物对CS的亲合力与镇痛强度之间有较好的相关性, 其相关系数 $r = 0.96$ 。因此, CS可能是3-甲基芬太尼类化合物作用受体的一个重要组成部分。复证了CS可能是阿片受体的组成部分。

关键词 硫酸脑甙酯; 阿片受体; $[^3\text{H}]$ 纳洛酮; 3-甲基芬太尼类化合物; 天蓝I。

在探索分离纯化阿片受体的研究中, 对阿片受体的组成性质提出了不同的见解。有人用溶剂萃取法, 从小鼠脑内分得部分纯化的阿片受体是蛋白脂⁽¹⁾。也有藉助非离子型去垢剂Brij-36T萃取大鼠脑突触浆膜(P_2)部分与 $[^3\text{H}]$ etorphine的孵育物, 经Amberlite XAD-4柱分得可能为 $[^3\text{H}]$ etorphine-阿片受体的复合物, 是大分子量蛋白质⁽²⁾。罗浩等认为脑内源性物质硫酸脑甙酯(cerebroside sulfate, 简称CS)可能是阿片受体的组成部分^(3,4)。李等也认为阿片受体具有蛋白质和脂类的双重属性, 提出了蛋白质-脂类的复合模型⁽⁵⁾。对于用猪脑内CS作受体结合特性的研究, 迄今未见报道。本文介绍从猪脑组织匀浆中分离纯

化和鉴定CS; 测定 $[^3\text{H}]$ 纳洛酮(naloxone)与制备CS的结合特性; 试验了具有强效镇痛作用的3-甲基芬太尼类(3-methyl fentanyl)7个化合物对CS的结合亲合力与镇痛之间的关系。

材 料 和 方 法

标准CS(牛脑)是美国加利福尼亚大学医学中心罗浩教授赠; $[^3\text{H}]$ 纳洛酮(57 Ci/mM)由上海第一医学院制备; $[^3\text{H}]$ DHM(37 Ci/mM)由上海原子核研究所制备; 3-甲基芬太尼类化合物(表1)由本所合成, 测定时均为游离碱。亲脂性闪烁液由PPO 2g, POPOP 50mg, 加甲苯500ml配制。

一、CS的分离与测定 新鲜猪脑除去小脑及部分皮层后匀浆, 用氯仿: 甲醇(2:1)萃取, 然后参照分离蛋白脂的方法⁽⁷⁾分离CS; 用酚-硫酸比色法⁽⁸⁾测定脑甙。测定CS改用天蓝I作阳离子复合剂, 操作按Kean氏法⁽⁹⁾。

二、受体结合测定 用正庚烷/水相分配法, 脂溶性很大的 CS 因结合标记的阿片类药物, 增加了正庚烷相中的放射活性 dpm 数, 分别测定有 CS 以及没有 CS 存在下正庚烷相中的 dpm 数, 可以计算出结合能力。测定有竞争药物存在下正庚烷相中的 dpm 数, 可以计算出竞争药物抑制%。

实验用有磨口的玻璃小试管(15×75 mm), 分样品管、竞争管与对照管 3 组, 每组均为 3 复管。样品管加³H]纳洛酮(浓度为 2×10^{-7} M) 50 μ l, 另加 Tris (2 mM pH 7.4) 450 μ l 使³H]纳洛酮的最终水相浓度为 2×10^{-8} M, 再加 CS 的氯仿: 甲醇(2:1) 溶液 10 μ l (含 CS 5 μ g) 与正庚烷 490 μ l。竞争管加料同样品管, 仅水相中含不同浓度的欲测竞争药物。对照管加料也同样品管, 仅正庚烷相中不含 CS。于 20°C 震荡 15 min, 以 $300 \times g$ 离心 10 min, 吸取正庚烷 100 μ l, 加闪烁液 6 ml, 国产 YSJ-78 型液体闪烁器测定。

样品管计数代表³H]纳洛酮在正庚烷相中结合与游离总值, 对照管计数代表正庚烷相中游离值, 两者之差表示结合值。样品管计数与竞争管计数之差表示被抑制值。被测药物的抑制%(或竞争率)为:

$$\frac{\text{样品管计数} - \text{竞争管计数}}{\text{样品管计数} - \text{对照管计数}} \times 100\%$$

三、Scatchard 分析 按上述结合试验方法, 用水相最终浓度为 2×10^{-8} M 的³H]纳洛酮和 5 个不同浓度的未标记纳洛酮, 进行结合测定。纳洛酮在正庚烷相中与 CS 的结合量与游离量, 根据下列公式⁽¹⁰⁾计算:

$$B = n[X - P(T - X)/T]$$

$$F = nP(T - X)/T$$

B 表示纳洛酮与 CS 在正庚烷相中的结合量; F 表示纳洛酮在正庚烷相中游离量; P 表示纳洛酮在两相中的分配系数; n 表示最初加入到水相中纳洛酮浓度; T 代表加入的³H]纳洛酮的 dpm 数; X 代表正庚烷相中测得的 dpm 数。

以 B 作为纵座标, F 作为横座标作图, 得纳洛酮与 CS 在正庚烷相中的结合饱和曲线。以 B/F 为纵座标, B 为横座标作图, 回归线斜率倒数即为纳洛酮与 CS 结合的解离常数 Kd。

结果与讨论

一、CS 的纯化与鉴定 猪脑匀浆的溶剂萃取物, 经 Sephadex LH-20 柱层析分离(图 1), 测其洗脱液在 280 nm 处的吸收, 得到 3 个主要的蛋白峰, P₁、P₂ 和 P₃, 经用³H]DHM 与吗啡进行受体结合测定, 这些蛋白部分均无特异性受体活性。用酚-硫酸比色测定其洗脱液的各个部分, 得到 3 个脑甙峰 C₁、C₂ 和 C₃。CS 是脑甙的硫酸酯化物, 为了测定 C₁、C₂ 和 C₃ 中哪一个峰是含 CS 的峰, 我们采用天蓝 I 作阳离子复合剂得到了良好的结果, 只有 C₃ 峰(63 管附近)于 645 nm 处显示出很强的吸收。如果将标准的 CS 置于相同的柱上分离, 用同样的洗脱溶剂及天蓝 I 测定, 也只有 63 管附近具有很强的吸收。因此, C₃ 峰就是 CS 部分。这个部分也是 Lowney⁽¹¹⁾ 和罗浩等⁽³⁾ 分别报道的具有阿片受体活性的部分。

将 C₃ 峰各管合并, 在 35°C 以下减压浓缩

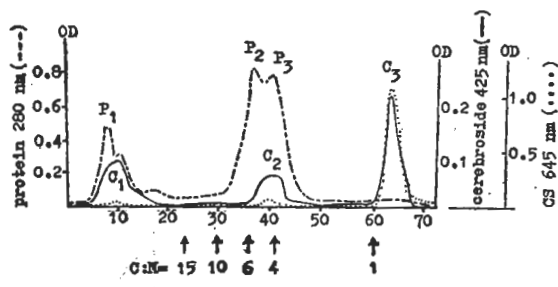


图 1. Elution pattern of pig brain extract through Sephadex LH-20 column (2×20 cm). Aliquots of 4 ml were collected in each tube. Arrows indicate fraction in which successive eluting mixtures first emerge. Cerebroside was determined by phenol-sulfuric acid method at 425 nm. CS was determined by azure I method at 645 nm. (C = CHCl₃, M = MeOH)

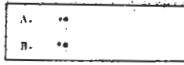


图 2. Thin-layer chromatograms of CS on silica gel plate. Solvent systems = CHCl₃: MeOH:25% NH₄OH (65:25:5). CS spots were visualized with iodine vapor.

A) Standard CS; B) Preparation CS

得微黄色粉状物，再溶解在醋酸乙酯:氯仿:甲醇(50:10:5)中，在 25°C 左右静置挥发溶剂，逐渐析出粉状结晶。用硅胶 G 薄板层析，制备的 CS 与标准的 CS 各出现 2 个斑点，R_F 值分别为 0.28 和 0.24 (图 2)。但制备的 CS 中，R_F 值为 0.24 的部分含量甚微。据报道⁽⁸⁾ CS 是羟基型 CS 与非羟基型 CS 的混合物，因此显示出 R_F 值很接近的两个斑点。而哺乳动物脑中 CS 是羟基型 CS 占大多数，所以我们制备的 CS，经纯化后可能主要是羟基型 CS。

二、[³H] 纳洛酮与制备的 CS 结合特性

用制备的 CS 同标准 CS 作受体结合活性的比较，在相同的实验条件下，制备的 CS 与标准的 CS 结合活性分别是 2200 dpm/μg CS 和 2260 dpm/μg CS，可见结合活性基本相同。

纳洛酮与 CS 的结合是可饱和的，当纳洛酮的浓度增加到 2.6×10^{-7} M 时达到饱和，此时结合曲线变平(图 3)。平衡数据的 Scatchard 分析指出解离常数 $K_d = 8.5 \times 10^{-8}$ M (20°C)，这与罗浩等报道的羟基型 CS 与 [³H] levor-

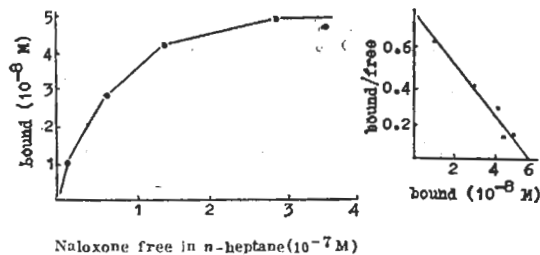


图 3. Binding curve and Scatchard plot of naloxone to CS in *n*-heptane.

phanol 结合的解离常数 $K_d = 9.1 \times 10^{-8}$ M 比较接近。根据 Scatchard 作图，在 X 轴截距计算纳洛酮与 CS 的结合能力 $B_{max} = 12$ nM/μg CS。

浓度为 10 mM 的 Na⁺ 对 [³H] 纳洛酮与 CS 结合的影响不大，对照管与含 Na⁺ 管计数分别为 29589 ± 516 dpm 和 30524 ± 419 dpm。但在 100 mM 时对照管与含 Na⁺ 管计数分别为 29589 ± 516 dpm 和 36960 ± 1116 dpm，此时显著地增加结合，这与 Na⁺ 增加阿片拮抗剂与受体的结合是一致的。

三、天蓝 I 对 [³H] DHM 与 CS 结合的抑制作用

我们用天蓝 I 作阳离子复合剂来测定 CS，那么天蓝 I 对 [³H] DHM 与 CS 的结合是否会产生竞争性的抑制作用？我们用氯仿代替结合测定方法中的正庚烷相，在 [³H] DHM 的水相浓度为 1×10^{-7} M，天蓝 I 的水相浓度为 5×10^{-5} M 时，抑制结合达 58%。天蓝 I 本身并没有镇痛作用，但其分子结构中含有碱性氮部分，可能同 CS 的分子中阴离子(SO₄⁻)部分形成盐键结合，从而对 [³H] DHM 产生竞争性抑制作用。Law 等⁽⁴⁾给小鼠 iv 天蓝 A (不对称二甲基硫紫，阳离子型生物染色剂) 4.4 mg/kg，再用吗啡作镇痛试验，结果在 2 h 内使吗啡 AD₅₀ 较对照小鼠的 AD₅₀ 提高 2 倍。我们的实验结果与天蓝 A 对抗吗啡的镇痛作用是一致的，说明了脑组织中的 CS 在中枢镇痛作用中起着重要的角色。

四、3-甲基芬太尼类 7 个化合物对 CS 的亲和力与镇痛活性之间的关系

3-甲基芬太尼类 7 个化合物以及芬太尼、Levorphanol 和吗啡对 [³H] 纳洛酮与 CS 结合具有明显的抑制作用。图 4 表明了它们抑制 [³H] 纳洛酮与 CS 结合能力和药物浓度之间有较好的线性关系。

3-甲基芬太尼类 7 个化合物以及芬太尼对 CS 的亲和力 IC₅₀ 值与镇痛强度 ED₅₀ (小鼠 ip, 热板法)⁽⁶⁾ 之间有较好的相关性 (表 1)，也就是镇痛作用强的化合物与 CS 的亲和力也强，镇痛作用弱的化合物与 CS 的亲和力也较弱。

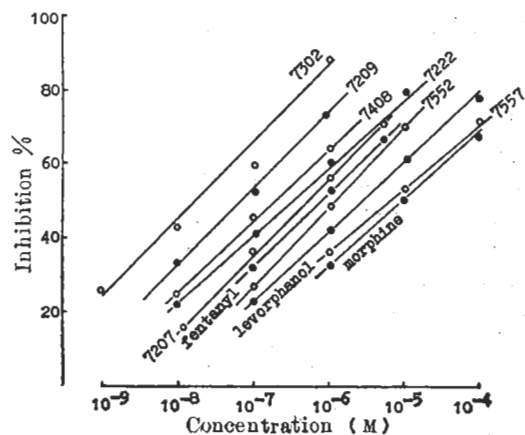


图 4. Dose-response curves depicting inhibition of $[^3\text{H}]$ naloxone binding for seven 3-methyl fentanyl compounds.

将这些化合物的 IC_{50} 作为纵坐标, ED_{50} 作为横坐标作图, 可得到较好的线性关系, 其相关系数 $r=0.96$ (图 5)。

3-甲基芬太尼类化合物的小鼠脑突触浆膜 (P_2) 部分的受体亲和力与镇痛强度之间有良好的线性关系⁽⁶⁾。从 3-甲基芬太尼类化合物对 CS 的亲和力与对突触浆膜 (P_2) 部分的亲和力, 分别同它的镇痛强度之间都存在着较好的相关性来看, CS 和 P_2 部分都表现了阿片受体的特性, 因此, CS 可能是 3-甲基芬太尼类化合物作用受体的重要组成部分。实验证实了罗浩等提出的 CS 可能是阿片受体的组成部分。

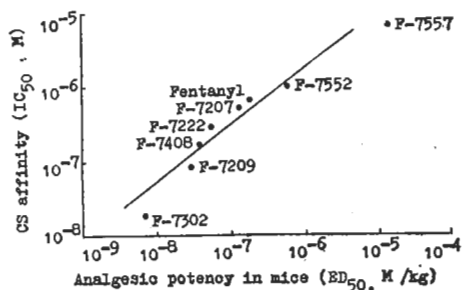


图 5. Correlation between analgesic potencies in mice and CS affinity for 3-methyl fentanyl derivatives.

表 1. Comparison of analgesic activity (ED_{50}) and CS affinity (IC_{50}) of seven 3-methyl fentanyl compounds

Structure	$\text{ED}_{50}(\text{M/kg})$	$\text{IC}_{50}(\text{M})$
F-7302 <chem>O=C(O)c1ccc(cc1)N2CCN(C2)C(C)Cc3ccc(O)cc3</chem>	6.01×10^{-9}	3×10^{-8}
F-7209 <chem>O=C(O)c1ccc(cc1)N2CCN(C2)CCc3ccccc3</chem>	2.85×10^{-8}	9×10^{-8}
F-7408 <chem>O=C(O)c1ccc(cc1)N2CCN(C2)C(C)Cc3ccc(OC(=O)C)cc3</chem>	3.2×10^{-8}	2.1×10^{-7}
F-7222 <chem>O=C(O)c1ccc(cc1)N2CCN(C2)C(C)Cc3ccccc3</chem>	4.74×10^{-8}	5×10^{-7}
F-7207 <chem>O=C(O)c1ccc(cc1)N2CCN(C2)C(C)Cc3ccc(O)cc3</chem>	1.2×10^{-7}	7×10^{-7}
Fentanyl <chem>O=C(O)c1ccc(cc1)N2CCN(C2)C(C)Cc3ccccc3</chem>	1.66×10^{-7}	8×10^{-7}
F-7552 <chem>O=C(O)c1ccc(O)cc1N2CCN(C2)C(C)Cc3ccc(O)cc3</chem>	5×10^{-7}	9×10^{-7}
F-7557 <chem>O=C(O)c1ccc(O)cc1N2CCN(C2)C(C)Cc3cc(O)csc3</chem>	1.1×10^{-5}	8×10^{-6}
Morphine <chem>O=C(O)c1ccc(O)cc1N2CCN(C2)C(C)Cc3cc(O)csc3</chem>	4.32×10^{-5}	9×10^{-6}

在药物浓度与抑制率曲线上, 吗啡对 CS 的亲和力小于所有被测定的 3-甲基芬太尼类化合物, 这同 ED_{50} 之间的排列是一致的(表 1)。而吗啡对 P_2 部分的亲和力仅次于 F-7207, 居于被测定的 3-甲基芬太尼类化合物之中, 这个差异可能是由于吗啡的极性大, 脂溶性小, 在正庚烷/水相系统中难以进入正庚烷相同 CS 结合。这与吗啡在动物给药后, 由于极性大, 脂溶性小, 不易穿透血脑屏障到达中枢作用部位的道理是一致的。

近年来越来越多的实验室证实阿片受体是多型的⁽¹¹⁾, 以及是由蛋白质与脂类共同组成

的⁽⁶⁾。CS学说只是其中之一。不同的配体，不同的抑制剂，不同的分离纯化手段，可从不同的角度深入了解和探讨阿片受体的结构与功能。

参 考 文 献

- 1 Lowney LI, Schulz K, Lowery PJ, Goldstein A. *Science* 1974 Feb 22; 183(4126):749
- 2 Simon EJ, Hiller JM, Edelman I. *ibid* 1975 Oct 24; 190(4212):389
- 3 Loh HH, Law PY, Ostwald T, Cho TM, Way EL. *Fed Proc* 1978 Feb; 37(2):147
- 4 Law PY, Harris RA, Loh HH, Way EL.

- 5 Lee NM, Smith AP. *J Pharmacol Exp Ther* 1978 Nov; 207(2):458
- 6 金文桥、徐珩、朱友成、方苏南、夏兴林、黄忠明、葛邦轮、池志强. *中国科学* 1980年12月; (12):1219
- 7 Soto EF, Pasquini JM, Placido R, Latorre JL. *J Chromatogr* 1969 May 20; 41(3-4):400
- 8 Hess HH, Lewin E. *J Neurochem* 1965 Mar; 12(3):205
- 9 Kean EL. *J Lipid Res* 1968 May; 9(3):319
- 10 Johnson DA, Cho TM, Loh HH. *J Neurochem* 1977 Dec; 29(6):1101
- 11 Chang KJ, Cuatrecasas P. *J Biol Chem* 1979 Apr 25; 254(8):2610

Acta Pharmacologica Sinica 1981 Dec; 2(4):226—230

INTERACTION OF SEVEN 3-METHYL FENTANYL COMPOUNDS WITH CEREBROSIDE SULFATE

ZHOU De-he, LI Zhi-yi, NI Chong-hu, CHI Zhi-qiang

(Shanghai Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031)

ABSTRACT Cerebroside sulfate (CS) was isolated and identified from pig brain. It was bound to [³H]naloxone with high affinity. The dissociation constant was 8.5×10^{-8} M (20°C). Displacement potencies of [³H]naloxone binding to CS by 3-methyl fentanyl compounds, synthesized in our Institute, correlated significantly with their analgesic potencies. The CS may be

an important component of receptor of 3-methyl fentanyl compounds. The results supported the hypothesis that CS may be a component of the opiate receptor.

KEY WORDS cerebroside sulfate; opiate receptor; [³H]naloxone; 3-methyl fentanyl compounds; azure I