

[D-丙²-O-苯甲基-丝⁵]脑啡肽对阿片受体 μ 及 δ 亚型的选择性

季新泉 张鸿良 刘 魁* 邹 冈 (中国科学院上海药物研究所, 上海 200031)

提要 用放射受体分析法研究[D-丙²-O-苯甲基-丝⁵]脑啡肽对 μ 及 δ 阿片受体亚型的选择性, 发现它对[³H]纳洛酮及[³H]DADLE的结合均有较强的竞争能力, 两者相差10倍, 因此它不是一个高度选择性的

δ 激动剂。

关键词 内啡肽受体; 纳洛酮; 放射配基分析; [D-丙²-O-苯甲基-丝⁵]脑啡肽

1983年12月15日收稿 1984年3月27日修回

* 现在通讯处: 南京警犬研究所

前文⁽¹⁾报道脑啡肽合成类似物 [D-丙²-O-

苯甲基-丝⁵脑啡肽(DABS)在生物检定中对电场刺激引起的小鼠输精管收缩的抑制作用强于对豚鼠迴肠的抑制作用,提示它对 δ 受体亚型有较强的亲和力。本文进一步用放射受体分析法研究其对 μ 及 δ 受体亚型的选择性,并和经典的 μ 激动剂吗啡和FW 34-569及 δ 激动剂[D-丙²-D-亮⁵]脑啡肽(DADLE)相比较。

材 料 和 方 法

药品 DABS 由我所合成室合成,方法与前文⁽¹⁾不同。将 *N*-叔丁氧羰基-D-丙氨酸与甘氨酸乙酯在 *N*-甲基吗啉(NMM)/二环己基羰二亚胺(DCC)下缩合得到的二肽经三氟乙酸(TFA)除去保护基得到D-丙-甘氨酸乙酯,后者与 *O*-苯甲基-*N*-叔丁氧羰基-酪氨酸在 $\text{ClCOOC}_2\text{H}_5/\text{NMM}$ 中缩合得到 *O*-苯甲基-*N*-叔丁氧羰基酪-D-丙-甘氨酸乙酯,再经催化氢化除苯甲基,碱水解得到 *N*-叔丁氧羰基-酪-丙-甘氨酸。该三肽与苯丙-*O*-苯甲基-丝氨酸甲酯在 $\text{ClCOOC}_2\text{H}_5/\text{NMM}$ 中缩合,获得的 *N*-叔丁氧羰基-酪-D-丙-甘-苯丙-*O*-苯甲基丝氨酸甲酯经氢氧化钠乙醇水解。TFA 除保护基即得 DABS。

盐酸吗啡系青海制药厂产品,经重结晶。

FW 34-569 (*N*-甲基-酪-D-丙-谷-甲基-苯丙-甲硫(*O*)醇)系瑞士 Sandoz 药厂 J Pless 博士赠, DADLE 系西德慕尼黑-普精神病研究所 A Herz 教授赠。 [³H]纳洛酮系上海第一医学院工业卫生研究所产品,比度 40 Ci/mM。 [³H]DADLE 系美国 NEN 产品, 28.6 Ci/mM。

脑匀浆 P₂ 部分制备⁽²⁾ 成年豚鼠断头取脑,在小脑前缘下切断脑干,取断面前部,加 10 倍量 0.32 M 蔗糖溶液(g/ml)匀浆,4℃ 1000 × g 离心 10 min,上清液 20000 × g 离心 20 min。第二次离心的沉淀溶于 Tris-HCl 缓冲液 pH 7.6。测定蛋白后再用该缓冲液稀释至蛋白含量为 10 mg/ml,低温保存。

受体竞争结合试验 先按 Scatchard 法⁽³⁾ 求出 [³H]纳洛酮(作为 μ 配基)和 [³H]DADLE (作为 δ 配基)的平衡离解常数(K_D)。受试药

物分别与这二种放射配基竞争受体。每一样品均为三复管,每管含: P₂ 部分 0.2 ml,相当于蛋白量 2 mg;放射配基 10 μ l, [³H]纳洛酮最终浓度相当于 $1 \times K_D$, [³H]DADLE 相当于 $1 \times K_D$;总反应体积为 230 μ l,摇匀后 30℃ 孵育 30 min,立即将试管放入冰浴以中止反应。反应液经 Whatman GF/C 型滤纸经负压抽滤,用 3 ml Tris-HCl 缓冲液(pH 7.6)洗涤 3 次。滤纸烘干后放入 PPO/POPOP 及二甲苯的闪烁液 6 ml 计数。

受试药物的抑制率(%) = (总结合管 cpm - 样品管 cpm) / (总结合管 cpm - 非特异结合管 cpm) × 100%

根据受试药物不同浓度的抑制率的直线回归求抑制放射配基 50% 特异性结合浓度(IC₅₀),再求得抑制常数。 $K_1 = \text{IC}_{50} / (1 + L / K_D)$, L 是试管内加入的放射配基浓度⁽³⁾。然后根据每一药物对 [³H]纳洛酮及 [³H]DADLE 的 K₁ 求得鉴别比⁽⁴⁾:

鉴别比 = 对 [³H]DADLE 的 K₁ / 对 [³H]纳洛酮的 K₁

结 果 与 讨 论

根据 Scatchard 法⁽³⁾ 求得 [³H]纳洛酮 K_D 为 1.83 nM,最大结合值为 33 pmol/g; [³H]DADLE K_D 为 5.5 nM,最大结合 11.8 pmol/g。

吗啡, FW 34-569, DABS 及 DADLE 分别竞争 [³H]纳洛酮及 [³H]DADLE 特异性结合的 IC₅₀ 见表 1。竞争 [³H]纳洛酮的强度次序为吗啡 > DABS > FW 34-569 > DADLE。它们竞争 [³H]DADLE 特异性结合的强度次序为 DADLE = DABS > FW 34-569 > 吗啡。

由 IC₅₀ 计算的 K₁ 及鉴别比见表 1。DABS 对 [³H]纳洛酮及 [³H]DADLE 均有较强的竞争作用,鉴别比 0.1,说明对 δ 受体亚型的亲和力对 μ 受体亚型的亲和力仅差 10 倍,这可以说明它为何在小鼠脑室内注射时有较强的镇痛作用⁽¹⁾。因此 DABS 不是原来设想的 δ 受体亚型的高度选择性激动剂,其选择性不及 δ 受体

Tab 1. IC_{50} and K_i of morphine, H-Me-Tyr-D-Ala-Glu-Me-Phe-Met(O)ol(FW 34-569), (D-Ala²-O-benzyl-Ser⁵)-enkephalin (DABS), (D-Ala²-D-Leu⁵)-enkephalin (DADLE) on [³H]naloxone and [³H]DADLE binding.

	IC_{50}		K_i		Discrimination ratio
	[³ H]naloxone	nM [³ H]DADLE	[³ H]naloxone	nM [³ H]DADLE	
Morphine	7.5	500	3.9	260	66
FW 34-569	75	100	39	53	1.4
DABS	50	5	26	2.6	0.1
DADLE	100	5	53	2.6	0.05

亚型激动剂 DADLE, 近年⁽⁵⁾发现小鼠输精管的阿片受体亚型很复杂, 具有 μ 、 δ 、 κ 三种亚型, 而非纯 δ 亚型, 因此单凭此生物检定不足以完全判断药物对阿片受体亚型的选择性。

致谢 我所计算机室张明明同志协助计算 IC_{50}

参 考 文 献

1 施溥涛、钮经义、吴时祥、邹 冈. 科学通报 1981;

26: 175

2 易庆成、俞月桂、季新泉、邹 冈. 生物化学与生物物理学报 1978; 10: 41

3 Bennett JP. Methods in binding studies. In: Yamamura H, ed. *Neurotransmitter receptor binding*. 1st ed. NY: Raven Press, 1978: 58-90

4 Gillan MGC, Kosterlitz HW, Patterson ST. *Br J Pharmacol* 1980; 70: 481

5 Chang KJ, Wei ET, Killian A, Chang JK. *J Pharmacol Exp Ther* 1983; 227: 403

Acta Pharmacologica Sinica 1985 Mar; 6 (1): 3-5

SELECTIVITY OF [D-Ala²-O-Benzyl-Ser⁵]-ENKEPHALIN ON MU AND DELTA OPIATE RECEPTOR SUBTYPES

JI Xin-quan, ZHANG Hong-liang, LIU Su, ZOU Gang (K Tsou)

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

ABSTRACT The selectivity of [D-Ala²-O-benzyl-Ser⁵]-enkephalin (DABS) on μ and δ opiate receptor subtypes was studied by competing the bindings of [³H]naloxone and [³H]DADLE to the P₂ fraction of the guinea pig brain homogenate and compared with μ agonist morphine and FW 34-569 and δ agonist DADLE. DABS showed a high affinity to both

μ and δ subtypes with about 10 times higher affinity to δ subtype. Therefore, DABS is less selective than DADLE on δ subtype.

KEY WORDS endorphin receptors; naloxone; radioligand assay; [D-Ala²-O-benzyl-Ser⁵]-enkephalin