

甲八肽酰胺对皮肤痛和内脏痛的作用¹

许绍芬、陆文孝、周恺荣、黄小华、莫浣英、徐伟民、张安中、张肇康²

(上海医科大学, 上海 200032)

摘要 在皮肤痛模型上, 小鼠和兔 icv MET 镇痛的 ED_{50} 分别为 0.86 ± 0.35 和 65 ± 33 nmol/动物。MET 的镇痛作用可为小剂量的纳洛酮和 NALA 所阻断, 提示 MET 的镇痛作用由阿片受体的 μ 亚型, 特别是 $\mu 1$ 亚型的参与。氨基酸酶抑制剂 Bestatin 显著延长 MET 的镇痛作用。

关键词 镇痛; 甲八肽酰胺; 纳洛酮; 吗啡; 内啡肽受体

甲八肽酰胺(metorphamide, Met^5 -enkephalin-Arg⁶-Arg⁷-Val⁸-NH₂, MET), 为最近从牛脑尾核和人嗜铬细胞瘤中分离得的阿片肽^(1,2)。由于 MET 的羧端酰胺化, 可能导致降解延缓, 作用延长。阿片肽的酰胺化合物存在于动物体内, 尚属罕见, 其功能也有待探讨。Kosterlitz 等发现 MET 对阿片受体 μ 亚型具有强大的亲和力, κ 亚型较弱, 而 δ 亚型几无作用。MET 对受体亚型的选择作用, 决定其生理功能。本文研究了 MET 对皮肤痛和内脏痛的作用。

材料和方法

MET 由美国 Peninsula Labs 的张肇康教授固相合成并纯化。盐酸吗啡系青海制药厂出品。Bestatin 系 Sigma 公司出品。上述药品分别用蒸馏水溶解后分装, 然后冰冻干燥, 贮存于 -35°C 待用。盐酸纳洛酮系上海医科大学药系合成。纳洛酮(naloxonazine, NALA) 系美国 G W Pasternak 教授赠送。

新西兰兔, 体重 $2.25 \pm SD 0.21$ kg, ♀♂兼用。♀小鼠由上海医科大学实验动物部培

育, 体重 19.1 ± 2.6 g。小鼠 icv⁽³⁾ 每次给药 10 μl 。兔 icv 系预先在侧脑室埋植慢性套管, 然后经套管给药, 每次 100 μl 。药物均在临用前重溶于人工脑脊液(CSF)内。

皮肤痛模型采用: (1) 小鼠热板法⁽⁴⁾。板温为 $55 \pm 0.5^\circ\text{C}$ 。观察舔后爪反应的潜伏期, 以 120 s 为砍头值, 以免烫伤皮肤。(2) 家兔 K^+ 透入法。内脏痛模型采用慢性内脏大神经刺激的测痛法⁽⁵⁾。

结果

镇痛作用的效价 在皮肤痛模型上观察了 MET 和吗啡的 ED_{50} 。90 只小鼠, 用热板法测痛, 以给药后潜伏期超过 40 s 为镇痛。兔 36 只, 用 K^+ 透入法测痛, 以给药后痛阈提高 1 mA 以上者为镇痛。测得小鼠和兔 icv MET 镇痛作用的 ED_{50} 分别为 0.86 ± 0.35 和 65 ± 33 nmol/动物; 而吗啡的 ED_{50} 分别为 0.42 ± 0.13 和 20 ± 7 nmol/动物。可见 MET 的镇痛作用稍弱于吗啡。其中 MET 对小鼠的 ED_{50} 约为

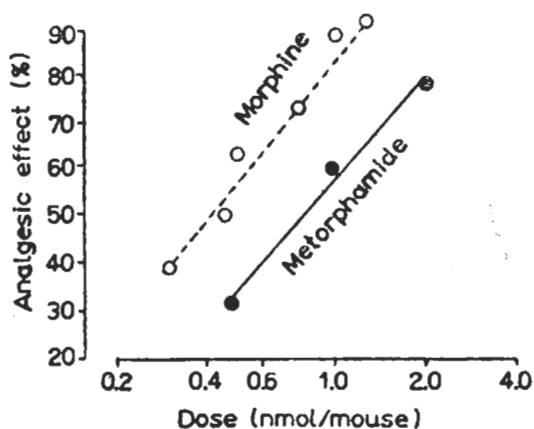


Fig 1. Analgesic effect of icv metorphamide and morphine in mouse hot plate test at $55 \pm 0.5^\circ\text{C}$ (8 mice/group).

1984年9月5日收稿 1985年2月4日修回

¹ 中国科学院科学基金资助的课题

² Peninsula Labs Inc, 611 Taylor Way, Belmont CA 94002, USA

Tab 1. Analgesic effect of metorphamide. Hot plate $55 \pm 0.5^\circ\text{C}$. The cut off time of paw lick latency 120 s. Pain threshold measurement by K^+ iontophoresis for skin pain and splanchnic nerve stimulation for visceral pain. $\bar{x} \pm \text{SD}$.

	MET	Morphine	Artificial CSF
Skin pain model			
nmol/mouse icv	6.1	1.33	10 μl
Paw lick latency (s)	81 ± 40	85 ± 45	19 ± 9
Duration of analgesia (min)	10	50	—
nmol/rabbit icv	406.4	66.5	100 μl
Elevation of pain threshold (mA)	2.2 ± 1.6	2.5 ± 1.0	0.25 ± 0.29
Duration of analgesia (min)	40	60	—
Visceral pain model			
nmol/rabbit icv	406.4	—	100 μl
Elevation of pain threshold (mA)	0.61 ± 0.49	—	-0.01 ± 0.14
Duration of analgesia (min)	30	—	—

吗啡的 2 倍, 见图 1; 对兔的 ED_{50} 约为吗啡的 3 倍。

镇痛作用的时效 在皮肤痛模型上观察到: (1) 小鼠 icv MET 6.1 nmol 后, 5 min 达高峰, 痛阈从 16 ± 3 s 增高到 81 ± 40 s, 与 icv CSF 的对照组比较 $p < 0.01$, 作用维持 10 min. 吗啡 1.33 nmol icv 后 5 min 达高峰, 维持 50 min. (2) 家兔 icv MET 406.4 nmol 后 20 min 镇痛作用达高峰, 痛阈提高了 2.2 ± 1.6 mA ($p < 0.02$). 维持 40 min, icv 吗啡 66.5 nmol 组的高峰在 40 min, 维持时间大于 60 min. 在内脏痛模型上, 兔 icv MET 406.4 nmol 后 10 min 出现镇痛作用, 维持 35 min (表 1).

上述结果表明, MET 具有较强的镇痛作用, 维持时间为 10-40 min.

纳洛酮对 MET 镇痛的拮抗作用 在皮肤痛模型上, 小鼠 ip 纳洛酮 1 mg/kg 后 10 min, 再 icv MET 6.1 nmol, 65 min 内, 痛阈无明显变化, 与单独 icv MET 6.1 nmol 组小鼠比较 $p < 0.01$ (表 2). 在内脏痛模型上, 观察到 icv MET 406.4 nmol 后 20 min, 兔痛阈显著升高时, iv 纳洛酮 0.2 mg/kg, 5-10 min 内痛阈急剧降低, 与 MET 生理盐水组比较, 分别 $p < 0.01$ 和 0.02. 结果表明, 纳洛酮 0.2-1

mg/kg, 几乎能完全拮抗 MET 的镇痛作用 (表 2).

Tab 2. Naloxone reverses the analgesic effect of metorphamide. For hot plate test, icv MET 6.1 nmol/mouse or ip naloxone 1 mg/kg 10 min prior to MET. For splanchnic nerve stimulation test, icv MET 406.4 nmol/rabbit or iv naloxone 0.2 mg/kg. $\bar{x} \pm \text{SD}$ (compared with MET, *** $p < 0.01$).

Drugs	Skin pain model (s)	Visceral pain model (mA)
MET	81 ± 40 (n = 8)	0.61 ± 0.49 (n = 8)
MET + Naloxone	15 ± 8 (n = 8)	$0.04 \pm 0.19^{***}$ (n = 8)
CSF	19 ± 9 (n = 8)	-0.01 ± 0.14 (n = 7)

NALA 对 MET 镇痛作用的拮抗 兔 24 只, 用 K^+ 透入法测痛. 兔 icv $\mu 1$ 受体阻断剂 NALA⁽⁶⁾ 50 μg , 24 h 内痛阈无明显变化. 如在 icv NALA 50 μg 后 22 h 再 icv MET 406.4 nmol, 兔痛阈仅提高 0.7 ± 0.9 mA, 与单用 MET 组比较 $p < 0.05$. 与 NALA 对照组比较, 无显著差异. 结果表明, NALA 能阻断 MET 的镇痛作用.

Bestatin 延长 MET 的镇痛作用 小鼠 25 只, 用热板法测痛. 小鼠 icv 氨基酶抑制剂

bestatin 145 nmol, 50 min 内痛阈无明显变化。如同时 icv bestatin 145 nmol + MET 6.1 nmol 后 5 min, 痛阈提高不显著; 然而其镇痛作用维持时间则显著延长, 给药后 10 和 20 min 时, 小鼠舔后爪的潜伏期比单用 MET 组显著延长, P 值分别 < 0.02 和 0.05 (表 3)。结果表明 bestatin 可显著延长 MET 的镇痛作用。

Tab 3. Bestatin (145 nmol/mouse) prolonged the analgesic effect of MET (6.1 nmol/mouse) on hot plate (55±0.5°C) latency. $\bar{x} \pm SD$ (compared with MET, **p<0.05).

Mice		Paw lick latency (s) after icv		
		5 min	10 min	20 min
MET	8	81±40	58±30	38±20
MET + Bestatin	9	110±29	96±27**	74±39**
Bestatin	8	23±13	23±6	21±14

讨 论

MET 在豚鼠回肠生物测定中呈显著的阿片样活力, 其作用比甲硫脑啡肽强 15 倍⁽²⁾。从本文结果可见对小鼠和兔的皮肤痛及兔的内脏痛都呈现良好的镇痛作用。从 icv ED₅₀ 值来看, MET 的镇痛作用略次于吗啡, 小鼠的镇痛效价约为吗啡的 48.8%, 而在兔则为吗啡的 30.7%。作用维持也较吗啡为短。这可能因为 MET 系肽类化合物, 易被酶解失活。从脑室注入到达镇痛部位的途径中, 已遭破坏, 因而使其镇痛作用弱而短。MET 对兔的镇痛作用比小鼠为弱, 可能也由于兔的这一途径较长, 降解比小鼠为多所致。MET 的羧端为酰胺基保护, 酶解时氨基端裂解的可能性较大, 氨肽酶抑制剂 bestatin 可显著延长 MET 的镇痛作用也说明了这一点。

MET 对阿片受体 mu 亚型具有强大的亲和力和^(1,2)。mu 亚型在镇痛中起有重要作用。吗啡镇痛主要通过 mu 1 亚型的参与⁽⁶⁾。本文结果 icv MET 的镇痛作用可为小剂量的纳洛酮和 NALA 阻断, 提示 MET 的镇痛作用有 mu 型, 特别是 mu 1 亚型的参与。MET 对 kappa 亚型也具弱的亲和力⁽¹⁾, 而 kappa 激动剂也具镇痛作用⁽⁸⁾。kappa 激动剂的镇痛作用难以被小剂量的纳洛酮阻断, 且其镇痛部位主要在脊髓, icv 虽给予大剂量 (8 倍脊髓有效量), 也难以产生镇痛作用⁽⁸⁾。提示 icv MET 产生的镇痛作用 kappa 的成份极少, 而 mu 1 亚型可能起重要作用。另外 kappa 激动剂有 mu 2 拮抗作用, 而 mu 2 亚型可能参与呼吸抑制作用⁽⁷⁾。因而 MET 有可能成为一个呼吸抑制较弱的具镇痛作用的阿片肽。

MET 具有镇痛作用, 内源性 MET 在体内疼痛调节过程中, 可能起到重要作用, 这种作用可能也通过 mu 1 亚型来实现。由于 MET 在体内破坏快、作用短, 故尚未作为药物应用。

参 考 文 献

- 1 Weber E, Esch FS, Böhlen P, et al. *Proc Natl Acad Sci USA* 1983; 80:7362
- 2 Matsuo H, Miyata A, Mizuno K. *Nature* 1983; 305:721
- 3 Haley TJ, McCormick WG. *Br J Pharmacol* 1957; 12:12
- 4 Eddy NB, May EL, Mosetting E. *J Org Chem* 1952; 17:321
- 5 莫浣英、黄小华、王根年. *生理学报* 1984; 36: 401
- 6 Hahn EF, Pasternak GW. In: *Abstract, Society for Neuroscience*. Bethesda: Society for Neuroscience, 1982:389
- 7 Wood PL, Sanschagrin D, Richard JW. *J Pharmacol Exp Ther* 1983; 226:545
- 8 韩济生、谢翠微. *科学通报* 1983; 28:384

ANALGESIC EFFECT OF METORPHAMIDE ON SKIN PAIN AND VISCERAL PAIN

XU Shao-fen, LU Wen-xiao, ZHOU Kai-rong, HUANG Xiao-hua, MO Wan-ying, XU Wei-min, ZHANG An-zhong, CHANG Jaw-Kang¹
(Shanghai Medical University, Shanghai 200032)

ABSTRACT Skin pain model (mouse hot plate test and rabbit potassium iontophoretic colorimetry) and visceral pain model (rabbit splanchnic nerve stimulation test) were used to measure the analgesia of metorphamide (MET), an endogenous opioid peptide isolated recently from bovine caudate nucleus and human pheochromocytoma tumor. MET elicited a potent analgesia in both models injected intracerebroventricularly (icv). The ED₅₀ for MET icv on skin pain model were 0.86 ± 0.35 nmol/mouse and 65 ± 33 nmol/rabbit; while ED₅₀ for morphine were 0.42 ± 0.13 nmol/mouse and 20 ± 7 nmol/rabbit, respectively. The analgesic effect of MET was slightly milder and shorter than that of morphine. The analgesic effect of MET was pre-

vented by naloxone (1 mg/kg, ip 10 min before icv MET in mice) and naloxonazine (50 µg, icv 22 h before icv of MET in rabbits), a selective blocker of mu 1 opiate receptor, indicating that the analgesic effect of MET is mainly mediated by mu 1 opiate binding site. Bestatin, an inhibitor of aminopeptidase, potentiated the analgesic effect of MET. It suggests that aminopeptidases play an important role in MET degradation *in vivo*.

KEY WORDS analgesia; metorphamide; naloxone; morphine; endorphin receptors

¹ Peninsula Labs Inc, 611 Taylor Way, Belmont CA 94002, USA