

# 五个3-氮杂二环[3,3,1]壬烷类衍生物镇痛活性与鸦片受体结合亲和力的关系

汪大渊\* 池志强 (中国科学院上海药物研究所, 上海 200031)

**提要** 5个3-氮杂二环[3,3,1]壬烷类衍生物具有强效的镇痛活性; 油/水分配系数大于3; 与鸦片受体具有较高的结合亲和力。它们的镇痛强度主要取决于与受体的结合亲和力, 而与油/水分配系数无关。钠商值、GTP反应比和GTP+NaCl反应比提示P 7542, P 7522和P 7534具有激动性质, 而P 7521和P 7520可能具有激动-拮抗性质。

**关键词** 镇痛药; 内啡肽受体; 放射配体测定法; 高压液相层析法; 鸟苷三磷酸

Ohki等<sup>(1)</sup>首先报道3-氮杂二环[3,3,1]壬烷类衍生物(简称P类化合物)具有镇痛活性。我所对此类化合物的化学合成和镇痛活性也曾作了研究<sup>(2)</sup>。由于P类化合物的镇痛活性及其与鸦片受体结合亲和力的关系至今未见详细报道, 因此我们选择了5个化学结构相近, 经初试镇痛活性差异显著的化合物(化学结构见表1)来研究它们的镇痛活性及其与鸦片受体结合亲和力的关系。

1983年4月2日收稿 1983年11月15日修回

\* 现在上海医药工业研究院

## 材 料 和 方 法

5个P类化合物由本所合成。吗啡、纳洛酮和鸟苷三磷酸(GTP)系国内产品。<sup>[3H]</sup>双氢吗啡(<sup>[3H]</sup> DHM, 85 Ci/mmol)和<sup>[3H]</sup>纳洛酮(<sup>[3H]</sup> naloxone, 57 Ci/mmol)由上海第一医学院生产。<sup>[3H]</sup>羟甲芬太尼(<sup>[3H]</sup> ohmefentanyl, 或<sup>[3H]</sup> 7302, 59 Ci/mmol)本所和上海原子核所合成, 是一个新的 $\mu$ 受体激动型配基<sup>(3)</sup>

## 镇痛实验

1. 小鼠热板法 选取 $19.8 \pm (\text{SD}) 1.3 \text{ g}$ 的♀小鼠240只, 每组10只。测定ip给药后30 min内镇痛ED<sub>50</sub>值。在比较P 7520, P 7534, P 7542, P 7522, P 7521和吗啡的镇痛作用时间时, 所用剂量为小鼠热板法上的镇痛ED<sub>50</sub>值, 分别为3.4, 1.75, 0.318, 0.145, 0.014和15.5 mg/kg。选用 $20 \pm 1.4 \text{ g}$ 的♀小鼠120只。每个药物试20鼠。ip给药后3, 8, 15, 30和45 min测定各鼠60 s内痛反应出现的时间,

以后一般 1 h 测定一次。凡药物延长痛反应出现时间在 100% 以上的为药物的有效作用时间，低于 100% 的为无效作用时间。

2. 小鼠扭体法 选取  $21.4 \pm 2.1$  g ♀ 小鼠 260 只。每组 10 只。sc 给药后 10 min 再 ip 1% 乙酸 0.2 ml/只，观察给药后 45 min 内的镇痛  $ED_{50}$  值。





3. 大鼠甩尾法<sup>(4)</sup> 选取  $240 \pm 24$  g 的 ♀ 大鼠 144 只。每组 8 只。测定 sc 给药后 45 min 内的镇痛  $ED_{50}$  值。在比较吗啡和 P 7521 的镇痛作用时间时，选取  $239 \pm 29$  g 的 ♀ 大鼠 40 只。每组 20 鼠。剂量为大鼠甩尾法的镇痛  $ED_{50}$  值，分别为 9.1, 0.0033 mg/kg。给药后的 30, 60 min，以后每小时测一次甩尾反应时间；以 10 s 为界限。结果用大鼠镇痛反应率对测定时间作图表示。

油/水分配系数的测定<sup>(5)</sup> 仪器由往复式高压输液泵。日立 200-182 型 uv 可变波长检测器和记录仪组成。层析柱长 50 cm，内径 3 mm。柱压 40 kg。固定相为 Permaphase ODS。

移动相为 60% 甲醇-水溶液(含 35 mM 氯化铵)以氨水调节 pH 至 7.4。流速为 1.4 ml/min。待测样品的 uv 检测波长为 220 nm。已知 log P 值样品的 uv 检测波长为 254 nm。根据  $\log P = \log k' + \log K$  (式中 K 为常数， $k'$  与冲洗时间有关， $k' = [tr - t_0]/t_0$ ) 这一方程式，我们选择了一组已知 log P 值的化合物。它们是萘。联苯。菲。二苯甲烷。丙咪嗪。二苯胺和葱。然后在 60% 甲醇-水溶液(含 35 mM 氯化铵)系统中，测定它们的 log  $k'$ 。根据 log P 值和 log  $k'$  值间的线性关系，求得线性回归方程式，以后，实测 5 个化合物在这一溶液系统中的 log  $k'$  值，代入线性回归方程式，求得它们的 log P 值。

受体结合试验 受体(P<sub>2</sub> 部分)的制备参照文献<sup>(6)</sup>。实验步骤为：每管加 200  $\mu$ l(相当于 2 mg 蛋白)的小鼠脑突触浆膜受体匀浆；加 20  $\mu$ l [<sup>3</sup>H]ohmefentanyl 或 [<sup>3</sup>H]naloxone 或 [<sup>3</sup>H]DHM 使最终浓度分别为 2.57, 1.5 和 1 nM。载体管加 20  $\mu$ l ohmefentanyl 液或纳洛酮或吗

Tab 1. Chemical structures, analgesic activities, durations of analgesia and partition coefficients for 5 derivatives of 3-azabicyclo[3, 3, 1] nonanes.

No.	Chemical structure		Analgesic $ED_{50}$ values and 95% confidence limits (mg/kg)			Analgesia (min)			log $k'$ log P	
	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	Hot plate (mice ip)	Writhing (mice sc)	Tail-flick (rats sc)	Latent time	Peak time	Duration		
P 7520	CH <sub>3</sub> O	CH <sub>3</sub> O	2.503 (2.424-2.584)	1.297 (1.225-1.374)	0.859 (0.815-0.907)	8	20	352	0.451	4.21
P 7534	CH <sub>3</sub> O		1.111 (1.042-1.184)	5.166 (4.896-5.45)	>10	3	3	17	1.033	5.09
P 7522	CH <sub>3</sub> O		0.085 (0.08-0.091)	0.105 (0.101-0.108)	0.158 (0.144-0.173)	8	45	292	0.826	4.78
P 7542	OH		0.169 (0.158-0.181)	0.031 (0.029-0.034)	0.033 (0.031-0.036)	3	8	42	-0.241	3.16
P 7521	CH <sub>3</sub> O		0.0066 (0.0059-0.0073)	0.0043 (0.0041-0.0047)	0.0017 (0.0015-0.0019)	3	20-60	417	0.176	3.80
Morphine			11.898 (11.54-12.27)	1 (0.824-1.214)	6.563 (6.29-6.85)	8	20	112	—	—

啡液,使最终浓度分别为 0.5, 1 和 5  $\mu\text{M}$ , 样品管加待测药液 20  $\mu\text{l}$ . 对照管不加药液. 各管用 Tris 缓冲液(50 mM, pH 7.7)加至总容量为 0.4 ml. 混合物在 30 $^{\circ}\text{C}$  恒温 20 min. 在测定 GTP 和 GTP + NaCl 对药物亲和力的影响时, [ $^3\text{H}$ ]naloxone 的最终浓度为 0.48 nM. GTP 和 NaCl 的最终浓度分别为 50  $\mu\text{M}$  和 100 mM. 混合物在 25 $^{\circ}\text{C}$  恒温 50 min 后立即置冰水中终止反应,然后在 Millipore Model 1225 微孔过滤器上经 Whatman GF/C 滤纸过滤. 每管用冰冷的 Tris 缓冲液冲洗 2 次. 每次 4 ml. 烘干后的滤纸移入有 5 ml 亲脂性闪烁液的闪烁杯中,用国产 FJ 2101 双道液体闪烁计数仪(计数效率 47%)测定放射性. 被测药物抑制 [ $^3\text{H}$ ]标记配基特异结合的 % 为:对照管计数-样品管计数/对照管计数-载体管计数  $\times$  100%. 每个药物选用 4-5 组不同的浓度, 每组三复管(测定 GTP 和 GTP + NaCl 的影响时,为二复管)取平均值,误差  $<15\%$ . 每次实验均重复一次,取二次结果的平均值,误差  $<10\%$ .

受试药物的  $\text{ED}_{50}$  值和  $\text{IC}_{50}$  值均按 Finney 氏法<sup>(7)</sup> 测算.

## 结 果

### 镇痛活性的比较 5 个 P 类化合物在小鼠

扭体法,热板法和大鼠甩尾法上的镇痛活性见表 1. (1) P 7521 镇痛活性最强. 它在小鼠扭体法,热板法和大鼠甩尾法上的镇痛  $\text{ED}_{50}$  值分别是吗啡的 1/233, 1/1802 和 1/3861. P 7542 和 P 7522 的镇痛活性居中. P 7534 和 P 7520 的镇痛活性弱. 三种方法测定的镇痛作用趋势基本一致. (2) 从方法的敏感性方面显示大鼠甩尾法为最敏感者. P 7534 在大鼠甩尾法上镇痛活性明显减弱和测痛时间与之不相适应有关.

**镇痛作用时间的比较** 从表 1 可见, 5 个 P 类化合物在给药后的 3-8 min 就出现镇痛作用. 镇痛作用时间最长的是 P 7521 近 7 h. 最短的是 P 7534, 仅 17 min. P 7522 和 P 7520 镇痛作用虽较 P 7521 弱, 但作用时间也较吗啡

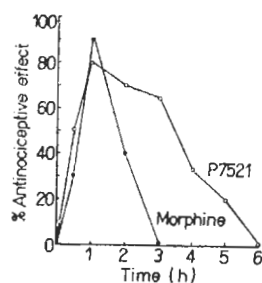


Fig 1. Duration of analgesic action (Doses of morphine and P 7521 were 9.1 and 0.0033 mg/kg. sc. rat tail-flick test).

Tab 2. Effects of 5 derivatives of 3-azabicyclo [3, 3, 1] nonanes for inhibition of binding [ $^3\text{H}$ ]dihydro-morphine, [ $^3\text{H}$ ]ohmefentanyl and [ $^3\text{H}$ ] naloxone in the presence/absence of 100 mM NaCl or 50  $\mu\text{M}$  guanosine triphosphate or 50  $\mu\text{M}$  guanosine triphosphate and 100 mM NaCl.

	[ $^3\text{H}$ ]dihydro-morphine	[ $^3\text{H}$ ]ohme-fentanyl	$\blacktriangle$ [ $^3\text{H}$ ]naloxone	Sodium shift	$\blacktriangle\blacktriangle$ [ $^3\text{H}$ ]naloxone	GTP response ratio	GTP + NaCl response ratio		
	$\text{IC}_{50}$ (Tris)	$\text{IC}_{50}$ (Tris)	$\text{IC}_{50}$ (Tris)		$\text{IC}_{50}$ (GTP)	$\text{IC}_{50}$ (GTP + NaCl)			
P 7520	139.0 nM	376.0 nM	286.0 nM	450.0 nM	1.6 94.7 nM	66.6 nM	119.0 nM	0.70	1.26
P 7534	12.7 nM	43.1 nM	23.1 nM	344.0 nM	14.9 5.46 nM	118.0 nM	999.0 nM	21.6	182.9
P 7522	5.41 nM	32.9 nM	1.83 nM	76.4 nM	41.7 0.34 nM	4.88 nM	31.7 nM	14.4	93.2
P 7542	0.17 nM	0.74 nM	1.18 nM	9.84 nM	8.3 0.13 nM	4.26 nM	4.31 nM	32.8	33.2
P 7521	0.098 fM	0.088 nM	0.12 fM	0.16 fM	1.3 0.52 fM	1.12 fM	1.59 fM	2.2	3.1
Morphine	4.91 nM	73.7 nM	21.8 nM	513.0 nM	23.5 0.97 nM	8.85 nM	271.0 nM	9.1	279.6
Naloxone	—	69.1 nM	—	—	— 0.30 nM	0.31 nM	0.08 nM	1.03	0.27

$\blacktriangle$  1.5 nM. Incubation at 30 $^{\circ}\text{C}$  for 20 min.  $\blacktriangle\blacktriangle$  0.48 nM. Incubation at 25 $^{\circ}\text{C}$  for 50 min.

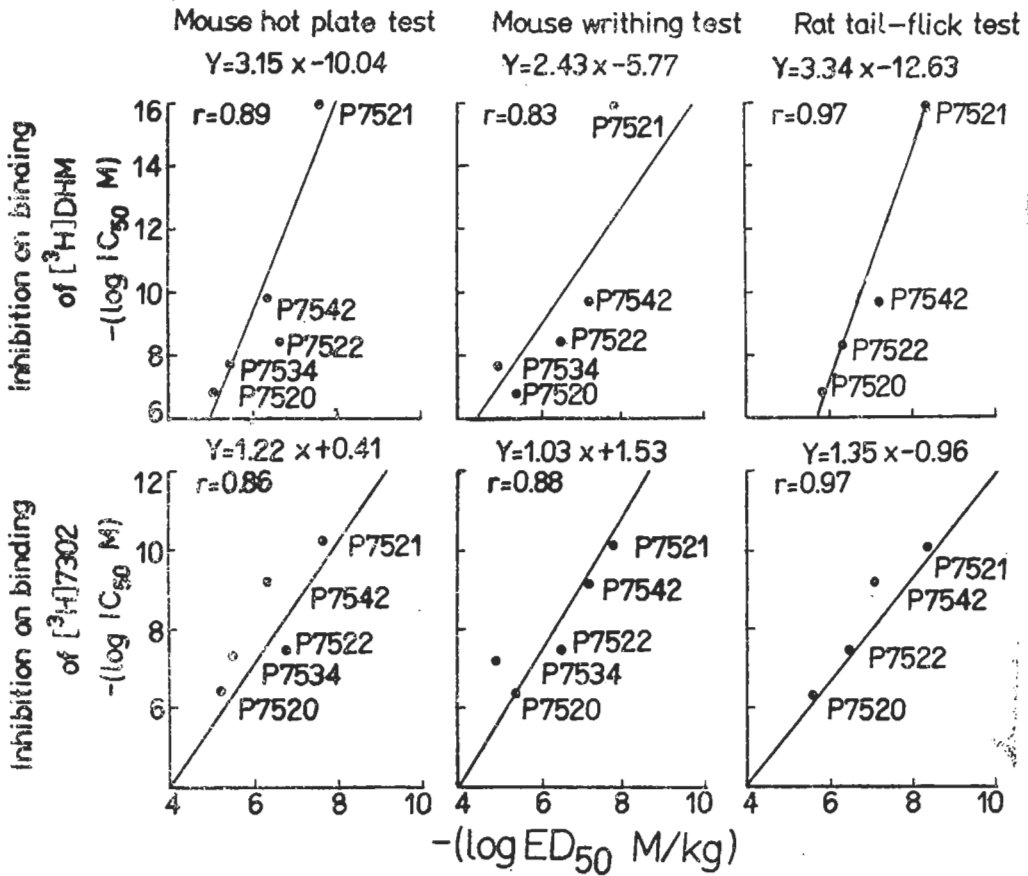


Fig 2. Correlations between the analgesic activities in the mouse hot plate, writhing and rat tail-flick tests and the potencies to reduce  $[^3\text{H}]$  dihydromorphine ( $[^3\text{H}]$  DHM, 1 nM) or  $[^3\text{H}]$  ohmefentanyl ( $[^3\text{H}]$  7302, 2.57 nM) binding in mice brain plasma membranes for 5 derivatives of 3-azabicyclo[3,3,1]nonanes.

长。从图 1 可见, 吗啡和 P 7521 在大鼠甩尾法上的镇痛作用分别在给药后的 3 和 6 h 消失, 与小鼠热板法上测定的结果相近。

**油/水分配系数的测定** 已知  $\log P$  值化合物在 60% 甲醇-水溶液 (含 35 mM 氯化铵) 系统中的  $\log k'$  值与其  $\log P$  值间的线性回归方程式为:  $\log P = 3.529 + 1.513 \log k'$  ( $n = 7$ ,  $r = 0.97$ )。5 个 P 类化合物在上述溶液系统中的  $\log k'$  值和  $\log P$  值见表 1。从表 1 可见, 它们的  $\log P$  值均大于 3, 有的可达 5.09。

**抑制  $[^3\text{H}]$  标记配基与鸦片受体特异结合试验** 从表 2 可见, 5 个 P 类化合物均能抑制  $[^3\text{H}]$  标记的鸦片受体激动剂或拮抗剂与受体的结合, 且  $\text{IC}_{50}$  值在  $0.4 \mu\text{M}$  以下, 表明它们均具有较高的与鸦片受体的结合亲和力。除

P 7521 外, 其它化合物抑制  $[^3\text{H}]$  DHM,  $[^3\text{H}]$  ohmefentanyl 和  $[^3\text{H}]$  naloxone 特异结合的能力大致相同, P 7521 抑制  $[^3\text{H}]$  DHM 和  $[^3\text{H}]$  naloxone 特异结合的能力基本相同, 抑制效力极强。  $\text{IC}_{50}$  值分别为 0.098 和 0.115 fM, 但抑制  $[^3\text{H}]$  ohmefentanyl 特异结合的能力较抑制  $[^3\text{H}]$  DHM 和  $[^3\text{H}]$  naloxone 的弱。5 个 P 类化合物抑制三种  $[^3\text{H}]$  标记配基特异结合能力的总趋势为: P 7521 > P 7542 > P 7522 > P 7534 > P 7520。此外, 从表 1 和 2 可见, 镇痛作用强的化合物如 P 7521, 与受体的结合亲和力也强; 反之, 镇痛作用弱的化合物如 P 7520, 与受体的结合亲和力也弱。如果把受试物在小鼠热板法, 扭体法和大鼠甩尾法上的镇痛强度  $-(\log \text{ED}_{50})$  与其抑制  $[^3\text{H}]$  DHM,  $[^3\text{H}]$  ohmefentanyl

和 $[^3\text{H}]\text{naloxone}$ 与受体特异结合的效力 $(-\log \text{IC}_{50})$ 作图(图2)可发现它们之间均存在着良好的线性关系,相关系数( $r$ )分别为0.89,0.83,0.97;0.86,0.88,0.97和0.92,0.83,0.95.

**NaCl, GTP 和 GTP + NaCl 联用对所试药物作用性质的观察** 从表2可见,100 mM NaCl能使吗啡, P 7522, P 7542 和 P 7534 与受体的结合亲和力降低,钠商值在8-41.7之间;而对 P 7521 和 P 7520 几无影响,钠商值分别为1.3和1.6.

GTP反应比和GTP + NaCl反应比(有或无GTP存在下,和有或无GTP + NaCl下,鸦片类药物抑制 $[^3\text{H}]\text{naloxone}$ 特异结合的 $\text{IC}_{50}$ 值之比)区分受试物作用性质的结果表明(表2),50  $\mu\text{M}$  GTP也使吗啡, P 7542, P 7522 和 P 7534 与受体的结合亲和力明显降低,GTP反应比在9-33之间;而对纳洛酮, P 7521 和 P 7520 与受体的结合亲和力影响小,GTP反应比在0.7-2.2之间.另一方面,50  $\mu\text{M}$  GTP和100 mM NaCl联用则使吗啡, P 7542, P 7522 和 P 7534 与受体的结合亲和力更明显地降低,GTP + NaCl反应比在33-280之间.50  $\mu\text{M}$  GTP和100 mM NaCl联用对纳洛酮, P 7521 和 P 7520 与受体的结合亲和力影响小,GTP + NaCl反应比在0.3-3之间.以上的结果表明,GTP反应比和GTP + NaCl反应比区分5个P类化合物作用性质的结果与钠商值区分的结果相一致.

## 讨 论

从结构上分析,在5个P类化合物中,P 7521的化学结构中同时保持 $R_1$ 为甲氧基, $R_2$ 为间-羟苯基对其强效的镇痛活性十分重要.如其结构上 $R_1$ 的甲氧基换以羟基或 $R_2$ 苯上的间-羟基改为甲基,甲氧基或 $R_2$ 为甲氧基取代,均使镇痛活性大为减弱.同理,P 7521的化学结构对镇痛作用时间的延长也十分重要.

镇痛药的脂溶性是影响其镇痛强度的主要因素之一<sup>(8)</sup>.由于大多数中枢性药物的最适亲脂值为2左右,而5个P类化合物的油/水分配

系数均大于3,说明它们的脂溶性很大,极易透过血脑屏障到达作用部位.因此它们的脂溶性不再是造成其镇痛强度相差悬殊的主要因素.5个P类化合物的镇痛强度及其与受体的结合亲和力和间存在着良好的相关性,而与油/水分配系数无关.由此可见,它们的镇痛强度主要取决于与鸦片受体的结合亲和力.由于本文选用了 $\mu$ 受体的特异性氚标记配基,因此也说明5个P类化合物的镇痛作用主要与 $\mu$ 受体有关.它们与鸦片受体其它亚型的关系尚在研究中.

必须指出P 7521经7次重复试验(抑制1.5 nM $[^3\text{H}]\text{naloxone}$ 特异结合的 $\text{IC}_{50}$ 值)表明较镇痛强度相当的其它类型的强效镇痛药有更高的受体结合亲和力,它的作用特性值得进一步研究.

钠商值可区分鸦片类激动剂,拮抗剂和激动-拮抗剂.钠商值 $> 8$ 的为激动剂;等于1的为拮抗剂;介乎其中的为激动-拮抗剂<sup>(9)</sup>.本文的结果提示P 7542, P 7522 和 P 7534 具有激动剂性质,而P 7521 和 P 7520 可能具有激动-拮抗性质.

GTP反应比能区分鸦片类药物的作用性质,而且GTP + NaCl反应比能更明显地区分之<sup>(10)</sup>.本文结果表明GTP反应比和GTP + NaCl反应比区分吗啡,纳洛酮和5个P类化合物的结果与钠商值区分的一致.

钠商值,GTP反应比和GTP + NaCl反应比提示P 7521 和 P 7520 可能具有激动-拮抗性质.然而,从化学结构上分析,典型的激动-拮抗剂一般往往具有N甲基为烯丙基或环丙基取代的结构特征,而P 7521 和 P 7520 结构上的N则与苯乙基连接,但这对它们并不是一个唯一的例外,象苯基吡咯烷类中的Profadol,它的化学结构也不具备N与烯丙基或环丙基连接的结构特征,却也具有激动-拮抗性质.而且拮抗作用是以不能抑制对吗啡依赖猴的戒断症状为指标<sup>(11)</sup>.最近我们已在小鼠甩尾法上证实,P 7521 具有微弱的拮抗吗啡镇痛的作用,有关结果将另文报道.

## 参 考 文 献

- 1 Ohki E, Ohashi Y, Yoshida A, Kamoshita K, Takagi H. *Chem Pharm Bull* 1974; 22: 1014
- 2 周德和、方苏南、葛邦轮,等. *药学学报* 1982; 17: 503
- 3 徐 珩、陈 洁、池志强. *中国科学* 待发表
- 4 任民峰、韩济生. *生理学报* 1978; 30: 204
- 5 徐修容、徐 珩、陆一安、陈 洁. *药学学报* 1979; 14: 246
- 6 徐 珩、金文桥、夏兴林、池志强. *中国药理学报* 1980; 1: 76
- 7 Finney DJ. *Probit analysis*. 2nd ed. London: Cambridge Univ Press, 1952
- 8 Herz A, Teschemacher HJ. Activities and sites of antinociceptive action of morphine-like analgesics. In: Harper NJ, Simmonds AB, eds. *Advances in drug research*; vol 6, 1st ed. NY: Academic Press, 1971: 79-91
- 9 Pert CB, Snyder SH. *Mol Pharmacol* 1974; 10: 868
- 10 Childers SR, Snyder SH. *J Neurochem* 1980; 34: 583
- 11 McCarthy DA. Arylpyrrolidines as narcotic antagonists. In: Braude MC, Harris LS, May EL, Smith JP, Villarreal JE, eds. *Narcotic antagonists*. 1st ed. NY: Raven Press, 1974: 145-55

*Acta Pharmacologica Sinica* 1984 Sep; 5 (3) : 158-163

## RELATIONSHIP BETWEEN ANALGESIC ACTIVITY AND OPIATE RECEPTOR BINDING AFFINITY FOR 5 DERIVATIVES OF 3-AZABICYCLO [3, 3, 1] NONANES

WANG Da-yuan, CHI Zhi-qiang

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

**ABSTRACT** By means of mouse hot plate test, writhing test and rat tail-flick test; high-pressure liquid chromatography and receptor-binding assay, the results are as follows: 1) 5 derivatives of 3-azabicyclo [3,3,1] nonanes showed potent analgesic activities. 2) Their partition coefficients were  $>3$ . 3) 5 derivatives possessed higher binding affinities for opiate receptors in mice brain. 4) There was a good correlation between the analgesic activities and the potencies to inhibit the binding of  $\mu$ -receptor specific [ $^3\text{H}$ ] ligands to opiate receptors for 5 derivatives. However, the analgesic activities of 5 derivatives did not correlate with

their partition coefficients. From the above-mentioned results, it is concluded that the analgesic activities of 5 derivatives mainly depend on their binding affinities to opiate receptors and their analgesia is mainly related to  $\mu$  receptor. In addition, sodium response ratio, GTP response ratio and GTP+NaCl response ratio suggest that P 7542, P 7522 and P 7534 are opioid agonists, but P 7521 and P 7520 may be mixed agonist-antagonists.

**KEY WORDS** analgesics; endorphin receptors; radioligand assay; high pressure liquid chromatography; guanosine triphosphate