

羟甲芬太尼与大鼠脑阿片受体结合的自体放射造影

叶淑贞、李桂芬、池志强 (中国科学院上海药物研究所, 上海 200031)

提要 用体外自体放射造影术观察表明, 强效镇痛剂 [^3H]羟甲芬太尼在大鼠脑的定位分布与 [^3H]DHM 相似。3-甲基芬太尼类化合物可竞争性地取代 [^3H]DHM 与阿片受体的结合, 竞争的程度与它们的镇痛强度有关。羟甲芬太尼抑制 [^3H]DHM (μ) 与大鼠脑切片阿片受体结合的强度为抑制 [^3H]DADLE (δ) 结合强度的 159 倍, 提示羟甲芬太尼对 μ 受体有高的亲和力。

关键词 内啡肽受体; [^3H]羟甲芬太尼; [^3H]双氢吗啡; 3-甲基芬太尼类; 自体放射造影术

羟甲芬太尼, 化学名 *N*-[1-(β -羟基- β -苯乙基)-3-甲基-4-哌啶基-*N*-丙酰苯胺], (代号 F 7302) 是 3-甲基芬太尼类衍生物中镇痛作用最强的化合物, 对小鼠的镇痛强度为吗啡的 6300 倍。小鼠脑匀浆结合试验表明受体亲和力和镇痛强度之间有良好的线性关系⁽¹⁾。 [^3H]羟甲芬太尼与小鼠脑匀浆结合试验提示 F 7302 是一个强的 μ 阿片受体激动剂⁽²⁾。为进一步阐明 F 7302 与受体间的相互作用及其在大鼠脑中的分布, 我们采用体外自体放射造影术^(3,4)进行了下列研究。

材料和方法

切片制备 体重 $211 \pm \text{SD } 21 \text{ g}$ 的 σ 大鼠, 断头取脑, 液 N_2 骤冷, 贮存于干冰内, 在 -18 至 -22°C 恒冷箱切片机 (DWQ-81 型, 上海药物研究所制造) 内制成 $10-15 \mu\text{m}$ 的切片, 融贴在涂有明胶层 (明胶 5 g 和铬矾 500 mg/l 水) 的载玻片上, 为使脑切片粘牢在载玻片上, 切片在 -20°C 贮放 $4-24 \text{ h}$ 。

受体结合 将脑切片用冷风迅速吹干, 加含有标记药物 ([^3H]DHM, [^3H]F 7302, [^3H]DADLE) 的 50 mM Tris-HCl 缓冲液 (pH 7.4)

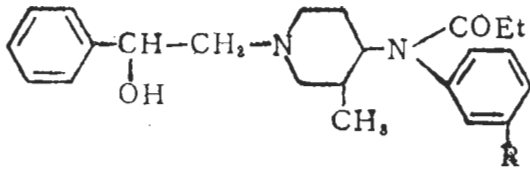
$50-100 \mu\text{l}$, 在 $24-26^\circ\text{C}$ 孵育, 然后在冰冷 Tris-HCl 缓冲液内洗涤, 再用蒸馏水洗去切片上的缓冲液, 用冷风快速吹干后进行自体放射造影术, 或放在 60°C 烘干, 将脑切片刮在计数瓶内, 加 5 ml 亲水性闪烁液, 用 FJ-2101 型双道液体闪烁计数器测定放射性。

自体放射造影术

1. 光镜自体放射造影术 酸处理过的盖玻片 ($25 \times 75 \text{ mm}$) 在暗室内以浸膜法涂敷核-4 乳胶层 (北京原子能研究所生产, 用重蒸馏水按 $1.5:1$ 稀释), 空气中干燥后, 用粘合剂 (上海合成树脂研究所生产的 SA-101 室温快固胶) 粘住载玻片, 4°C 曝射 30 d 后, 在盖玻片下插入一根软塑料管, 显影, 定影, 水洗, Carnoy 液固定, 焦油紫及 HE 染色, 用网格目镜测微器数计每格中的银颗粒, 每个视野中数计连续的 $5-10$ 个格子。银颗粒分布的部位即代表受体的所在位置。

2. 感光片自体放射造影术 将上述孵育后贴附脑切片的载玻片上覆盖一张对 [^3H] 敏感的感光片 (北京感光化学研究所试制), 4°C 曝射 $8-14$ 周后, 显影 (Kodak D-19b, 18°C , 3 min), 定影 (F-5 酸性坚膜定影液, 8 min), 水洗 1 h , 空气吹干后在氚片上可看到受体的分布, 脑切片按常规染色, 用显微镜观察, 以确定氚片所显示的受体在脑中的位置。

药物 [^3H]dihydromorphine ([^3H]DHM) 放射比活性为 3.15 TBq/mmol (上海医科大学制备), [^3H]F 7302 放射比活性为 2.18 TBq/mmol (上海原子核研究所制备), [^3H](D-Ala², D-Leu⁵)enkephalin ([^3H]DADLE) 放射比活性为 1.16 TBq/mmol (New England Nuclear Corp), F 7302 及 F 7550 由本室合成, 结构式如下:



F 7302 R = H, F 7550 R = CH₃,

结 果

[³H]F 7302 在大鼠脑内分布的体外自体放射造影

1. [³H]F 7302 与受体结合的最适条件 选用相当于文献(6)图中 A 7470 μ-A 8920 μ 厚 15 μm 的脑冠状切片做以下实验:

1.1 洗涤时间 脑切片在 2.7 nM 的 [³H]F 7302 中孵育 60 min(26℃)后,用冰冷的缓冲液洗去非特异性结合物。非特异性结合(脑切片上加 [³H]F 7302 液孵育的计数为总结合值,孵育液为 [³H]F 7302 加非标记的 F 7302 0.5 μM 为非特异性结合,总结合值减去非特异性结合为特异性结合)经洗涤后很快就下降到很低的数值,洗涤 10 min(5 min, 2 次)非特异性结合减到最低。

1.2 [³H]F 7302 与受体结合的时间 随着孵育时间的增加结合值也增加,孵育 40 min 时结合值已很高(图 1 A)。

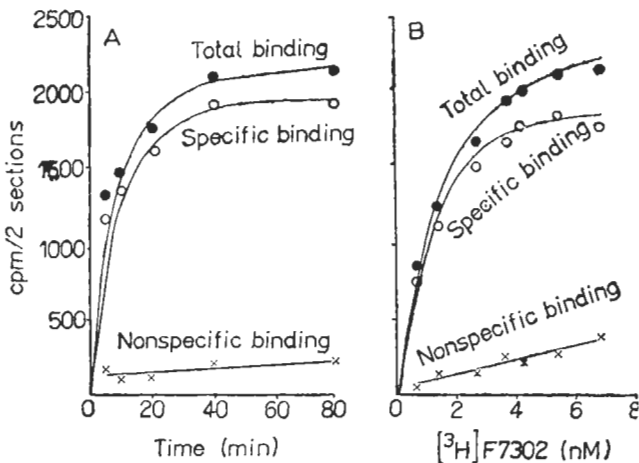


Fig 1. The time course (A) and saturation (B) of [³H]F 7302 binding in mounted brain sections. The experiment was repeated thrice.

1.3 [³H]F 7302 的浓度 (图 1 B)特异性结合随着 [³H]F 7302 浓度的增加而增加渐至饱和,非特异性结合随着 [³H]F 7302 浓度增加而直线上升,不呈饱和性,当 [³H]F 7302 浓度为 2.7 nM 时,特异性结合与非特异性结合之比为 10:1。

根据上述结果,我们选择 2.7 nM 的 [³H]F 7302 孵育 1 h,孵育后在缓冲液中洗涤 10 min 的实验条件,进行以下自体放射造影研究。

2. 大鼠脑内 [³H]F 7302 的自体放射造影观察

2.1 光镜自体放射造影术 [³H]F 7302 在大鼠脑的分布以尾、壳核(紧靠胼胝体下方的尾、壳核背部和外侧部呈条纹状,尾、壳核的中部呈斑块状分布),缰核,伏膈核,杏仁核,脊髓背角的胶状质最为密集,银粒计数 > 100/500 μm²(表 1)。丘脑,下丘,海马(CA 2 区锥体细胞层),额部皮层(I 层),上丘(表面灰质层)受体分布也较多,银粒计数为 55-100/500 μm²,小脑和白质区胼胝体的银粒数极少,接近本底。对照组(即正常脑切片按上述方法处理)未见化学显影。

2.2 感光片自体放射造影术 因氟片与标本脱离而不能在看到受体的同时看到脑组织的形态结构。图 2 A-L, (见图版 1) 显示 [³H]F 7302 在大鼠脑冠状切面上与阿片受体结合(曝光 8-14 周)的氟片自体放射造影像。由图可见 [³H]F 7302 与受体的结合是很广泛的,特别在脑的嘴端有高密度受体呈多种多样的分布。在板层结构,阿片受体呈层聚集,并且大多密集在最表面层,如上丘主要密集在表面灰质层(图 2 G-I)。大脑皮质主要在 I 层(图 2 C-F)。在尾、壳核,紧靠胼胝体下方的尾、壳核背部和外侧部受体呈条纹状分布,尾、壳核的中部呈斑块状分布(图 2 C)。在海马,分布于锥体细胞层(尤其是 CA 2 区,图 2 E,F)。在延脑除有少数区域(如三叉神经脊束核的胶状质,孤束核,疑核)较密集外,其他部位受体均

Tab 1. Distribution of [^3H]DHM (2.1 nM), [^3H]F 7302 (2.7 nM) and [^3H]DADLE (2.4 nM) in rat brain. (- <6, + 6-29, ++ 30-54, +++ 55-100, ++++ >100 grains/500 μm^2)

Brain region	[^3H]DHM	[^3H]F 7302	[^3H]DADLE
Olfactory bulb			
glomerular layers	+	+++	+
external plexiform layers	+	+++	+++
Nucleus accumbens	+++	+++	+++
Nucleus caudatus-putamen	+++	+++	+++
Olfactory tubercle	+	++	++
Layer I of frontal cortex	+++	+++	+
Septum	+	+	-
Thalamic nucle	+++	+++	++
Nucleus amygdala	+++	+++	+
Hypothalamus	+	++	-
Hippocampus (CA2 stratum pyramidale)	+++	+++	+
Nucleus habenulae	+++	+++	++
Superior colliculus	++	+++	+
Interpeduncular nucleus	+	++	-
Central gray	+	++	-
Inferior colliculus	+++	+++	+
Dorsal horn of the spinal cord	+++	+++	+
Cerebellum	-	-	-
Corpus callosum	-	-	-

很少。颈脊髓的背角胶状质受体较密集(图 2 L)。在 [^3H]F7302 加非标记的 F7302 (0.5 μM) 的实验中, 氟片上未显示脑的图像。

F7302 竞争 [^3H]DHM(μ 配基)与阿片受体结合的试验 [^3H]DHM 与大鼠脑切片阿片受体结合的预试验表明, 最适条件为: 脑切片在 2.1 nM 的 [^3H]DHM 中 24 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h, 然后在缓冲液中洗涤 5 min, 其总结合值和非特异性结合值之比为 6:1(孵育液中加 0.5 μM 盐酸吗啡代表非特异性结合)。竞争试验的结果表明, F7302 有强的竞争 [^3H]DHM 与阿片受体结合的作用, 其 IC_{50} (抑制 50% [^3H]DHM 特异性结合的浓度)为 0.63 nM, 而另一个结构式相仿, 但镇痛作用较弱的 3-甲基芬太尼类似物 F7550 的 IC_{50} 为 2 μM 。

自体放射造影结果表明, [^3H]DHM 在大鼠脑中的分布以尾、壳核和缰核最密集(表 1),

暗视野下见尾、壳核的受体呈条纹状和斑块状分布。海马各个细胞层都有银颗粒, 但锥体细胞层的银粒数目较多, 并以 CA 2 区的锥体细胞层阿片受体最为密集(表 2)。额部皮层 I 层受体较多。表 3 表明阿片受体分布密集的区域在加入 F7302(1 nM)后, 尾、壳核的银颗粒数明显减少, 但同样浓度的 F7550 组, 尾、壳核的银粒数目减少不明显。海马 CA 1-CA 3 区的锥体细胞层在加 F7302 后银颗粒数明显减少, F7550 组减少程度不如 F7302 组明显。

F7302 竞争 [^3H]DADLE(δ 配基)与阿片受体结合的试验 [^3H]DADLE 与大鼠脑阿片受体结合的最适条件为: 大鼠脑切片在 2.4 nM 的 [^3H]DADLE 中 22 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h, 然后在 Tris-HCl 缓冲液中洗涤 2 次, 每次 2 min, 其总结合值和非特异性结合值之比为 6:1(孵育液中加 1 μM levorphanol 代表非特异性结合), 竞争试

Tab 2. Autoradiographic grain density (grains/500 μm^2 , $\bar{x} \pm \text{SD}$ of 10-20 squares) of [^3H]DHM (2.1 nM), [^3H]F7302 (2.7 nM) and [^3H]DADLE (2.4 nM) in rat brain

	[^3H]DHM	[^3H]F7302	[^3H]DADLE
Background	1.9 \pm 1.4	1.6 \pm 1.3	1.9 \pm 1.6
Hippocampus			
CA 1 stratum oriens	13 \pm 5	23 \pm 5	7 \pm 3
CA 1 stratum pyramidale	29 \pm 9	43 \pm 12	13 \pm 5
CA 1 stratum radiatum	14 \pm 4	20 \pm 7	5.7 \pm 2.3
CA 2 stratum oriens	22 \pm 4	53 \pm 11	9 \pm 4
CA 2 stratum pyramidale	70 \pm 8	70 \pm 11	17 \pm 4
CA 2 stratum moleculare	55 \pm 9	36 \pm 9	8 \pm 3
CA 3 stratum oriens	12 \pm 5	35 \pm 7	6 \pm 4
CA 3 stratum pyramidale	32 \pm 7	66 \pm 9	9 \pm 4
CA 3 stratum moleculare	22 \pm 7	29 \pm 5	6.1 \pm 2.0
Frontal agranular cortex			
Lamina I	73 \pm 7	76 \pm 14	30 \pm 8
II	18 \pm 3	20 \pm 9	29 \pm 7
III	29 \pm 6	43 \pm 18	40 \pm 8
V	14 \pm 7	32 \pm 8	37 \pm 13
VI	20 \pm 4	46 \pm 9	24 \pm 4

Tab 3. Autoradiographic grain counting (grains/500 μm^2 , $\bar{x} \pm \text{SD}$) of F7302 (1 nM) and F7550 (1 nM) in competing for the binding of [^3H]DHM (2.1 nM) with opiate receptors in rat brain

	[^3H]DHM	F7550 + [^3H]DHM	F7302 + [^3H]DHM
Nucleus caudatus-putamen	143 \pm 13	110 \pm 21	27 \pm 10
Hippocampus			
CA 1 stratum pyramidale	30 \pm 5	14 \pm 5	2.4 \pm 1.4
CA 2 stratum pyramidale	71 \pm 22	30 \pm 10	4.5 \pm 1.7
CA 3 stratum pyramidale	32 \pm 8	18 \pm 9	2.9 \pm 1.0

验结果表明 F7302 竞争 [^3H]DADLE(δ)与受体结合的作用比竞争 [^3H]DHM(μ)结合作用弱, IC_{50} 为 0.1 μM 。

自体放射造影结果表明 [^3H]DADLE 在大鼠脑主要分布在尾、壳核, 伏膈核, 嗅球。尾、壳核不呈条纹状和斑块状分布, 而是弥散状分布。大脑皮质的 I-VI 层均有一定量的银粒且分布较均匀。海马除 CA 2 和 CA 3 区的锥体细胞层有少量银粒外, 其它各层银粒数目极少(表 2)。

讨 论

在 3-甲基芬太尼类衍生物和小鼠脑阿片受体亲和力的试验中观察到, 受体亲和力和镇痛强度之间有良好的相关性, 镇痛强度主要取决于与受体的结合能力⁽¹⁾。本文结果与其一致, 3-甲基芬太尼类化合物可竞争性地取代 [^3H]DHM 与脑切片阿片受体的结合, 竞争的程度与它们的镇痛强度有关, 说明该类化合物的镇痛强度与其和受体的亲和力有关。

脑内存在多种阿片受体, 其中 μ , δ 和 κ 受体的定位工作研究得较多^(4,5,7,8), 用自体放射造影术研究了分别对 μ 和 δ 阿片受体有高度选择性的配基 $[^3\text{H}]\text{DAGO}$ 和 $[^3\text{H}]\text{DTLET}$ 在大鼠脑中的分布, 结果 μ 受体分布的范围较广, 常高度集中在感觉站; 在尾、壳核呈斑块状分布。 δ 受体分布在较少的区域; 虽与感觉有关, 但主要与嗅觉有关的区域; 在尾、壳核呈弥散状分布⁽⁵⁾。本实验表明 $[^3\text{H}]\text{F 7302}$ 与 $[^3\text{H}]\text{DHM}$ 在大鼠脑中的分布基本一致。 $[^3\text{H}]\text{F 7302}$ 分布在大鼠脑的很多部位, 并也高度集中在感觉核, 如杏仁核的嗅觉部和终纹床核, 副嗅球和嗅球, 下丘的听觉, 丘脑的味觉中继核, 和视觉有关的上丘, 痛觉有关的颈脊髓背角的胶状质等处。此外 $[^3\text{H}]\text{F 7302}$ 在大脑皮质的分布以第 I 层最多, 海马分布在锥体细胞层尤以 CA 2 区域较密集, 在尾、壳核中的分布呈条纹状及斑块状, 与文献报道的 μ 阿片受体的分布^(3,5,7,9) 相一致, $[^3\text{H}]\text{F 7302}$ 的自体放射造影像与文献(4)报道的 $[^3\text{H}]\text{naloxone}$ 者一致, 表明 $[^3\text{H}]\text{F 7302}$ 在大鼠脑的分布类似 μ 受体的分布, 与 F 7302 是一个强的 μ 阿片受体激动剂结果⁽²⁾ 相一致。

吗啡、F 7302 抑制 $[^3\text{H}]\text{DHM}(\mu)$ 结合的强度分别为抑制 $[^3\text{H}]\text{DADLE}(\delta)$ 结合强度的 79 倍和 82 倍⁽²⁾。本实验表明 F7302 抑制 $[^3\text{H}]\text{DHM}(\mu)$ 与大鼠脑切片阿片受体结合的强度为抑制 $[^3\text{H}]\text{DADLE}(\delta)$ 结合强度的 159 倍, 也提示 F 7302 对 μ 受体有高的亲和力。

参 考 文 献

- 1 金文桥、徐 珩、朱友成, 等。中国科学 1980; 12: 1219
- 2 徐 珩、陈 洁、池志强, 同上 1984; 8: 733
- 3 Young WS III, Kuhar MJ. *Brain Res* 1979; 179: 255
- 4 Herkenham M, Pert CB. *J Neurosci* 1982; 2: 1129
- 5 Quirion R, Zajac JM, Morgat JL, Roques BP. *Life Sci* 1983; 33 (suppl 1): 227
- 6 König JFR, Klippel RA. *The rat brain*. 1st ed. NY: Krieger, 1963: 47
- 7 Goodman RR, Snyder SH, Kuhar MJ, Young WS III. *Proc Natl Acad Sci USA* 1980; 77: 6239
- 8 Goodman RR, Snyder SH. *Life Sci* 1982; 31: 1291
- 9 Meibach RC, Maayani S. *Eur J Pharmacol* 1980; 68: 175

Acta Pharmacologica Sinica 1986 May, 7 (3): 193-198

Autoradiography of $[^3\text{H}]\text{ohmefentanyl}$ binding with opiate receptors in rat brain

YE Shu-zhen, LI Gui-fen, CHI Zhi-qiang

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

ABSTRACT The opiate receptor localization of $[^3\text{H}]\text{ohmefentanyl}$, a potent analgesic agent, was studied by autoradiography in rat brain and compared with that of $[^3\text{H}]\text{dihydromorphine} (\mu)$ and $[^3\text{H}](\text{D-Ala}^2, \text{D-Leu}^5)\text{enkephalin} (\delta)$. $[^3\text{H}]\text{Ohmefentanyl}$ was concentrated in various areas of rat brain, the highest densities were found in nuclei caudatus-putamen (streaks and clusters), nuclei habenula, nuclei

accumbens, nuclei amygdalae and dorsal horn of spinal cord. High densities were in thalamus nuclei, inferior colliculus, hippocampus (CA2 stratum pyramidale), frontal cortex (layer I), superior colliculus. These results were similar to the distribution of $[^3\text{H}]\text{DHM}$. $[^3\text{H}]\text{DADLE}$ -binding sites were in nuclei caudatus-putamen (diffuse), nuclei accumbens and the external plexiform layer of the olfactory bulb.

3-Methyl-fentanyl derivatives competed with [^3H]DHM for binding with opiate receptors and reduced the grain counting in nuclei caudatus-putamen and hippocampus (stratum pyramidale), their competitive potencies were correlative with the analgesic effects. It suggests that the analgesic effect of 3-methyl-fentanyl derivatives closely correlates its affinity to opiate receptors.

The inhibiting potency of ohmefentanyl

for binding of [^3H]DHM with opiate receptors in rat brain section was 159 times higher than that of [^3H]DADLE, thus indicating that ohmefentanyl possessed high-affinities for μ -opiate receptors.

KEY WORDS endorphin receptors; [^3H]ohmefentanyl; [^3H]dihydromorphine; 3-methyl-fentanyl derivatives; autoradiography

* * * * *

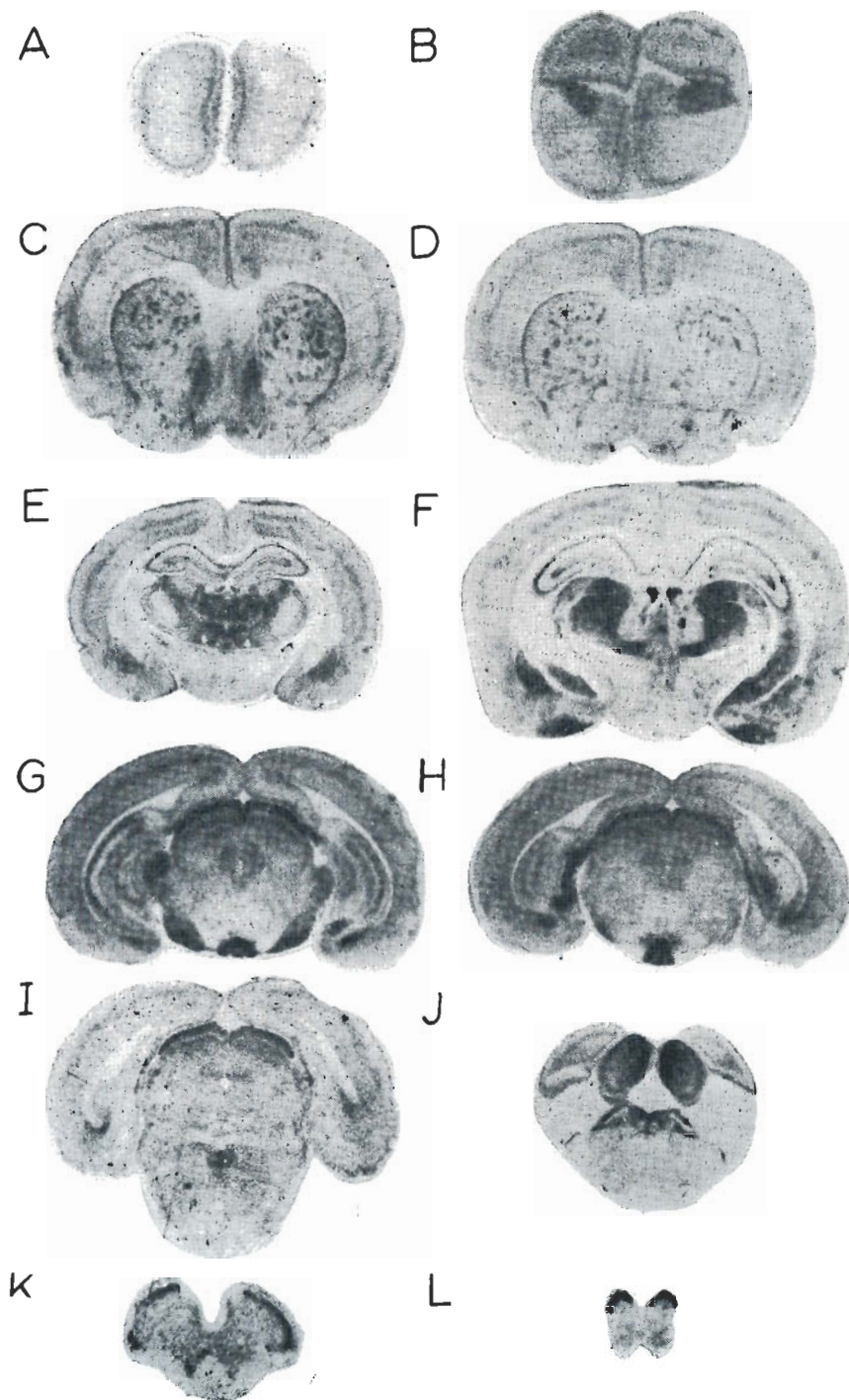


Fig 2. Autoradiograms of rat brain incubated in [^3H]F 7302. A,B) binding at levels of olfactory bulb, including bulbus olfactorius accessorius; C,D) binding at levels of striatum, including N. accumbens; E,F) level of the thalamus showing binding at the N. habenula, hippocampus, N. amygdala; G,H) binding at the interpeduncular nuclei, superior colliculus stratum griseum, substantia nigra, zona reticulata; I) binding at median raphe; J) binding at inferior colliculus, N. parabrachial; K,L) binding at the substantia gelatinosa.

(See p 194)