

[³H]依托啡和金仓鼠脑内 kappa 阿片受体结合的特性

吴士渭¹、金文桥、池志强 (中国科学院上海药物研究所, 上海 200031)

提要 本文进一步研究 [³H]依托啡和金仓鼠脑内 Kappa 受体结合的特性。5 μmol/L(D-Ala², D-Leu⁵) 脑啡肽可完全阻断 [³H]依托啡与 kappa 受体结合。该结合容易被苯吗啡烷类及奥列巴文类药物取代, 而不易被强啡肽 A(1-13)等取代。这些表明, [³H]依托啡所作用的金仓鼠脑内的 kappa 受体不同于经典的 kappa 受体, 可能属于 kappa₂ 受体。

关键词 金仓鼠; 脑; kappa 阿片受体; 放射配位体测定; [³H]依托啡

中枢和外周神经组织中药理学和生物化学的研究结果表明, 阿片受体主要分为 mu、delta 和 kappa 三种亚型^(1,2)。豚鼠纹状体和脊髓腰骶段中, [³H]依托啡和 [³H]乙基酮唑新与 kappa 受体的结合有明显差别, [³H]依托啡只与(D-

1986年4月5日收稿 1986年6月25日修回

¹ 上海铁道医学院生理教研室, 上海 200070

Ala², D-Leu⁵)脑啡肽(DADLE)敏感的 kappa 受体结合, 而[³H]乙基酮唑新既结合 DADLE 敏感的部位, 又结合 DADLE 不敏感的结合部位^(3,4)。前文我们测定了金仓鼠脑内阿片受体亚型的密度, 证明以 kappa 受体占优势⁽⁵⁾。本文通过 DADLE、强啡肽 A(1-13)及其它药物对[³H]依托啡结合的影响, 进一步研究[³H]依托啡和金仓鼠脑内 kappa 受体结合的特性。

材 料 和 方 法

药 物 [³H]依托啡(1.48 TBq/mmol, [³H]etorphine)和纳洛酮(naloxone)由上海医科大学合成。羟甲芬太尼(ohmfentanyl)和依托啡由我所第五研究室化学组合成。吗啡(morphine)和左啡诺(levorphanol)从青海制药厂得到。勃莱吗唑新(bremazocine)、Mr 2266 [(-)2-(3-咪喃甲基)-5,9-二乙基-2'-羟基-6,7-苯吗啡烷]、双氢环丙啡(diprenorphine)和 U-50488 H{反式-3,4-二氯-N-甲基-N[2-(1-吡咯)环己烷基]-苯乙酰胺}, Upjohn 公司出品, 由英国阿伯丁大学成瘾性药物研究室 Kosterlitz 教授惠赠。纳屈酮(naltrexone)与酮唑新(ketocyclazocine)由美国加州大学旧金山分校罗浩教授惠赠。(D-Ala², D-Leu⁵)脑啡肽和强啡肽 A(1-13) [dynorphin A(1-13)] 系 Peninsula 出品。(D-Ser², Thr⁶)亮氨酸脑啡肽(DSTLE)与乙基酮唑新(ethylketocyclazocine)分别由法国 INSERM 的 Roques 博士和美国 Sterling-Winthrop 研究所 Soria 博士赠送。

脑匀浆制备 金仓鼠(*Mesocricetus auratus* Water)体重 175 ± SD 25 g, ♀♂ 兼用。按前文⁽⁵⁾制备脑匀浆。先将脑置于冰冷的蔗糖 0.32 mol/L 溶液中漂洗, 然后以 1:10(wt/vol) 冰冷的蔗糖溶液, 用 ZS 83-1 型内切式组织匀浆器匀浆, 1000 × g 离心 10 min, 取其上清液再以 49000 × g 离心 30 min。第二次离心后, 将沉淀物悬浮于冰冷的 Tris-HCl 0.05 mol/L 缓冲液(pH 7.4, 25℃)中, 再次用匀浆器匀浆后, 以双缩脲方法测定蛋白含量(以牛血清白

蛋白为标准)。用 Tris-HCl 缓冲液稀释蛋白浓度至 10 mg/ml 左右, 分装, -40℃ 贮存备用。

受体结合试验 脑匀浆与[³H]依托啡在 25℃ 中孵育, 加入吗啡 30 nmol/L 和 DADLE 100 nmol/L 封闭 mu 受体与 delta 受体, 非特异性结合以加入左啡诺 10 μmol/L 测得。每管总容量为 0.4 ml, 内含 2 mg 左右蛋白的金仓鼠突触浆膜, 样品孵育 30 min 后, 立即置于冰浴中冷却, 在 Millipore 1225 型过滤器上经 Whatman GF/C 滤纸快速过滤, 用冰冷的 Tris-HCl 缓冲液冲洗三次, 每次 4 ml。待滤纸烘干后, 放入盛有闪烁液的计数杯中, 在 YSJ-80 自动液体闪烁仪中测定放射性。

药物竞争性抑制 所用[³H]依托啡浓度为 0.52-0.54 nmol/L。竞争药物的 IC₅₀ 值从对数剂量-机率单位作图的线性回归测得, 相应的 K_I 值按公式 $K_I = IC_{50} / (1 + L/K_d)$ 求得, 这里 L 为标记配体的浓度, K_I 为标记配体的解离常数。

本文所用数据均为三复管的平均值, 误差小于 10%, 每次实验重复 3 次以上。

结 果

Scatchard 分析 [³H]依托啡(0.05-2 nmol/L)和金仓鼠脑突触浆膜的特异性结合呈浓度依赖性和可饱和性。实验数据经过 Scatchard 分析得到[³H]依托啡的 K_d 值为 0.58 ± 0.16 nmol/L, B_{max} 为 65 ± 14 pmol/g 蛋白。说明[³H]依托啡与金仓鼠脑内阿片受体有较高的亲和力和较大的结合量。[³H]依托啡为非选择性配体, 当用吗啡 30 nmol/L 和 DADLE 100 nmol/L 分别封闭 mu 和 delta 受体后, [³H]依托啡仍以高亲和力与脑内阿片受体(可认为是 kappa 受体)特异性结合, 其解离常数基本不变, K_d 值为 0.52 ± 0.17 nmol/L, 最大结合量 B_{max} 为 34 ± 7 pmol/g 蛋白, 约为总结合(未封闭)的 50% 左右。为了测定[³H]依托啡与 kappa 受体结合对 DADLE 的敏感性, 加入 DADLE 5 μmol/L, 结果特异性结合全部丧失

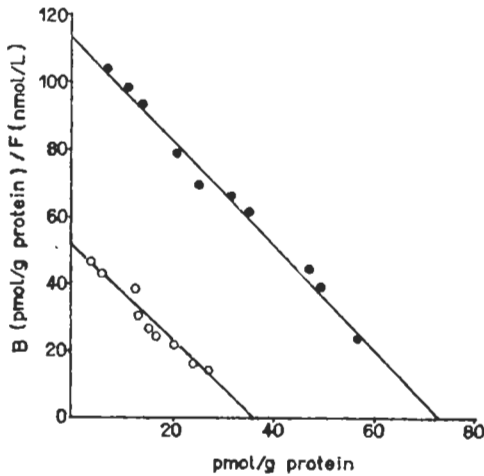


Fig 1. Scatchard analysis of [^3H]etorphine binding to golden hamster brain in the absence (●) or presence (○) of morphine 30 nmol/L and DADLE 100 nmol/L.

(图 1, 表 1)。

非标记配体的竞争性抑制 用接近 [^3H]依托啡 K_d 值的浓度测定各种代表性配体抑制 [^3H]依托啡结合的能力。因为药物的抑制强度与所用同位素浓度有关, 所以除用 IC_{50} (药物抑制 [^3H]依托啡特异性结合 50% 的浓度) 表示外, 还计算它们的抑制常数 K_i 值, 结果见表 2。mu 和 delta 受体封闭后, [^3H]依托啡的结合容易被苯吗啡烷类药物 bremazocine、Mr 2266 及奥列巴文类药物 diprenorphine、etorphine 取代, K_i 值分别为 0.42 ± 0.03 nmol/L, $6.5 \pm$

0.5 nmol/L, 0.18 ± 0.04 nmol/L, 0.88 ± 0.24 nmol/L。kappa 配体 U-50488 H 也容易取代 [^3H]依托啡结合, K_i 为 3.20 ± 0.14 nmol/L。但是, 强啡肽 A(1-13) 竞争性抑制作用较弱, K_i 为 127 ± 4 nmol/L。乙基酮唑新和酮唑新的作用分别比 bremazocine 弱 22 倍与 83 倍。拮抗剂纳屈酮与纳洛酮能取代 [^3H]依托啡结合, 前者比后者强 3 倍。mu 配体吗啡与 delta 配体 DADLE 抑制 [^3H]依托啡结合作用很弱。选择性高的 delta 配体 DSTLE⁽⁶⁾ 几乎不抑制 [^3H]依托啡结合。强效 mu 激动剂羟甲芬太尼虽然容易取代 [^3H]依托啡与 kappa 受体结合, 但与取代 mu 配体 [^3H](D-Ala², MePhe⁴, Gly-ol⁵) 脑啡肽结合比较, 作用弱 50 倍。

讨 论

前文⁽⁵⁾我们报道金仓鼠全脑匀浆中 kappa 受体量占(mu + delta + kappa)总结合量 44%。本实验中, 用吗啡 30 nmol/L 和 DADLE 100 nmol/L 封闭 mu 和 delta 受体后, 仍有 50% 左右的 [^3H]依托啡结合可以测出, 两者的结果基本一致, 证明金仓鼠脑中以 kappa 受体占优势。依托啡是一个非选择性配体⁽⁷⁾, 所以当封闭 mu 和 delta 受体后, [^3H]依托啡结合的解离常数变化不明显。

有人指出^(8,9)苯吗啡烷 (benzomorphan) 结合部位的性质与经典 kappa 结合部位的性质

Tab 1. Binding characteristics of [^3H]etorphine in homogenates of golden hamster brain. $\bar{x} \pm \text{SD}$

	specific binding at 0.5 nmol/L (cpm)	K_d (nmol/L)	B_{max} (pmol/g protein)
[^3H]etorphine	$2038 \pm 254(6)$ [NSB $278 \pm 25(6)$]	$0.58 \pm 0.16(6)$	$65 \pm 14(6)$
[^3H]etorphine + DADLE 5 $\mu\text{mol/L}$	loss of specific binding		
[^3H]etorphine + morphine 30 nmol/L + DADLE 100 nmol/L	$1331 \pm 23(5)$ [NSB $271 \pm 15(5)$]	$0.52 \pm 0.17(5)$	$34 \pm 7(5)$

The values were calculated from Scatchard plots. The number of experiments is given in parentheses. NSB; non-specific binding.

Tab 2. Affinity of various opiates and opioid peptides for [³H]etorphine binding sites measured in the presence of 30 nmol/L morphine and 100 nmol/L DADLE on membranes from golden hamster brain. n = 3, $\bar{x} \pm SD$

Substances	IC ₅₀ (nmol/L)	K _I (nmol/L)
Bremazocine	0.74 ± 0.05	0.42 ± 0.03
Ethylketocyclazocine	16.5 ± 0.7	9.4 ± 0.4
Ketocyclazocine	60.7 ± 2.5	35.0 ± 1.5
Mr 2266	11.5 ± 0.7	6.5 ± 0.5
Etorphine	1.5 ± 0.4	0.88 ± 0.24
Diprenorphine	0.31 ± 0.06	0.18 ± 0.04
Naltrexone	8.2 ± 0.5	4.7 ± 0.3
Naloxone	27 ± 6	16 ± 4
U-50488 H	5.6 ± 0.3	3.20 ± 0.14
Dynorphin A (1-13)	220 ± 80	127 ± 4
Morphine	203 ± 6	134 ± 23
Ohmefentanyl	2.30 ± 0.14	1.32 ± 0.08
DALDE	2600 ± 1000	900 ± 300
DSTLE	17400 ± 1800	9400 ± 900

K_I values were obtained from the equation

$$K_I = \frac{IC_{50}}{1 + (L)/K_d} \text{ where } K_d \text{ is the dissociation constant and } (L) \text{ the concentration of } [^3\text{H}] \text{etorphine.}$$

不同,并不反映同一实体,前者对 DADLE 作用敏感,也称 κ_2 受体,后者对 DADLE 作用不敏感,也称 κ_1 受体。对于金仓鼠脑中 [³H]依托啡结合的 κ 受体, bremazocine 及奥列巴文类药物呈现较强的亲和力。当加入 DADLE 5 $\mu\text{mol/L}$, 则 [³H]依托啡的特异性结合全部丧失。和其它内啡肽比较,强啡肽是最强的 κ_1 配体⁽¹⁰⁾, 本实验中强啡肽 A(1-13)取代 [³H]依托啡结合的作用很弱。这些结果提示,金仓鼠脑内, [³H]依托啡作用的 κ 受体属于 κ_2 受体,它不同于经典的 κ 受体(即 κ_1 受体)。

κ 受体的再分型类似于 β 肾上腺素

受体的 β_1 和 β_2 之分,因此,进一步研究选择性配体的药理作用以及受体亚型的特性,有助于阿片受体功能的阐明。

参 考 文 献

- 1 Lord JAH, Waterfield AA, Hughes J, Kosterlitz HW. Endogenous opioid peptides: multiple agonists and receptors. *Nature* 1977, 267 : 495
- 2 Chang KJ, Cooper BR, Hazum E, Cuatrecasas P. Multiple opiate receptors: different regional distribution in the brain and differential binding of opiates and opioid peptides. *Mol Pharmacol* 1979, 16 : 91
- 3 Attali B, Gouarderes C, Mazarguil H, Audigier Y, Cros J. Evidence for multiple "kappa" binding sites by use of opioid peptides in the guinea-pig lumbo-sacral spinal cord. *Neuropeptides* 1982, 3 : 53
- 4 Audigier Y, Attali B, Mazarguil H, Cros J. Characterization of [³H]-etorphine binding in guinea-pig striatum after blockade of mu and delta sites. *Life Sci* 1982, 3 : 1287
- 5 吴士涓、金文桥、池志强。金仓鼠脑内阿片受体的特性。中国药理学报 1986, 7 : 495
- 6 Gacel G, Fournie-Zaluski MC, Roques BP. Tyr-D-Ser Gly-Phe-Leu-Thr, a highly preferential ligand for delta opiate receptor. *FEBS Lett* 1980, 118 : 245
- 7 Paterson SJ, Robson LE, Kosterlitz HW. Classification of opioid receptors. *Br Med Bull* 1983, 39 : 31
- 8 Gouarderes C, Audigier Y, Cros J. Benzomorphan binding sites in rat lumbo-sacral spinal cord. *Eur J Pharmacol* 1982, 78 : 483
- 9 Chang KJ, Hazum E, Cuatrecasas P. Novel opiate binding sites selective for benzomorphan drugs. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981, 78 : 4141
- 10 Chavkin C, James IF, Goldstein A. Dynorphin is a specific endogenous ligand of the kappa opioid receptor. *Science* 1982, 215 : 413

Binding characteristics of [³H]etorphine with kappa receptors in golden hamster brain

WU Shi-Wei¹, JIN Wen-Qiao², CHI Zhi-Qiang

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

ABSTRACT In previous work, we have reported that the predominant kappa opioid receptor subtype existed in the golden hamster brain. Some more properties of [³H]etorphine binding to kappa sites in the hamster brain have been examined in this paper. After blockade of mu and delta sites by unlabelled 30 nmol/L morphine and 100 nmol/L (D-Ala², D-Leu⁵) enkephalin (DADLE), [³H]etorphine was still able to bind to residual sites with high affinity ($K_d = 0.52 \pm 0.17$ nmol/L, $B_{max} = 34 \pm 7$ pmol/g protein). The specific binding was completely abolished by 5 μ mol/L DADLE, suggesting that [³H]etorphine didn't bind to DADLE insensitive sites which correspond to the kappa₁ sites. Competition binding studies indicated that benzomorphan and

oripavine drugs showed high affinity to the kappa sites whereas dynorphin A (1-13) did not. Morphine displayed a lower affinity and DADLE had a K_i value of 940 nmol/L. On the other hand, delta ligand, (D-Ser², L-Leu⁵) enkephalyl-Thr⁶ weakly competed for the binding sites. These results suggest that the kappa sites which interacted with [³H]etorphine differ from the classical kappa sites, and the former sites may be the representatives of kappa₂ sites.

KEY WORDS *Mesocricetus*; brain; kappa opioid receptors; radioligand assay, [³H]etorphine

¹ Now in Shanghai Railway Medical College, Shanghai 200070

² To whom correspondence should be sent