

金仓鼠脑内阿片受体的特性

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 本文研究金仓鼠脑内阿片受体的性质。从 Scatchard 分析和药物竞争性试验的结果提示, 金仓鼠脑匀浆含有优势的 κ 受体。 [³H]etorphine 与 κ 受体结合的 B_{\max} 为 22.8 pmol/g 蛋白, K_d 值为 0.30 nM。金仓鼠全脑匀浆中 κ 受体的含量占总结合量的 44%, μ 受体占 34%, δ 受体占 22%。

关键词 金仓鼠; 脑; 内啡肽受体; 放射配位体测定; [³H](D-Ala², MePhe⁴, Gly-ol⁵)脑啡肽; [³H](D-Ala², D-Leu⁵)脑啡肽; [³H]依托啡

目前认为脑内主要存在 3 种阿片受体亚型, 即 μ 、 δ 、 κ 受体⁽¹⁾。据报道, 常用实验动物豚鼠、大鼠和兔等, μ 、 δ 和 κ 亚型受体的含量各不相同^(2,3), 并已证明不同受体亚型具有不同的生理功能^(4,5), 故比较研究不同种属动物脑内阿片受体的特性, 是一个颇有意义的问题。本文研究了金仓鼠脑内阿片受体的特性。

材料和方法

药物 羟甲芬太尼(ohmefentanyl)由我所第五研究室化学组合成。吗啡和左啡诺(levorphanol)从青海制药厂得到。U-50488 H 由英

国阿伯丁大学成瘾性药物研究室 Kosterlitz 教授惠赠, (D-Ala², D-Leu⁵)脑啡肽(DADLE)由美国 Peninsula 实验公司张肇康教授惠赠。 [³H]etorphine(1.48 TBq/mmol)由上海医科大学合成。 [³H](D-Ala², MePhe⁴, Gly-ol⁵)脑啡肽([³H]DAGO, 2.22 TBq/mmol)和 [³H]DADLE(1.85 TBq/mmol)购自 Amersham 放射化学中心。

脑匀浆的制备 金仓鼠(*Mesocricetus auratus* Water)体重 175±SD 25 g, ♀♂ 兼用。断头后取脑称重, 置于冰冷的 0.32 mol/L 蔗糖溶液中漂洗, 然后用 1:10 (wt/vol) 冰冷的蔗糖溶液匀浆, 1000×g 离心 10 min, 取其上清液再以 49 000×g 离心 30 min, 第二次离心后, 将沉淀物悬浮于冰冷的 0.05 mol/L Tris-HCl 缓冲液(pH 7.4, 25°C)中, 再次匀浆后用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, 于 -40°C 贮存备用。

受体结合试验 以高选择性 μ 配体 [³H]DAGO 测定 μ 受体的结合, 用 [³H]DADLE(加入 30 nmol/L morphine)测定 δ 受体的结合。另外, 用非选择性配体 [³H]etorphine(同时加入 30 nmol/L 吗啡和 100 nmol/L DADLE)测定 κ 受体的结合。非特异性结合通过加 10 μ mol/L

1985年10月17日收稿 1985年12月12日修回

¹上海铁道医学院生理教研室

本文曾在 1985 年 11 月全国第二届神经药理学术会议(南宁)宣读

levorphanol 测得。结合试验在 25°C 中进行，每管总体积为 0.4 ml，内含 2 mg 左右蛋白的金仓鼠脑突触浆膜，样品孵育 45 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 FJ-2101 液体闪烁仪中测定放射性。

竞争性抑制试验 竞争性抑制试验中，所用 [³H]DAGO，[³H]DADLE 和 [³H]etorphine 浓度分别为 1.3，1.0 和 0.5 nmol/L。药物 IC₅₀ 从浓度-机率单位作图的线性回归测得，相应的 K_i 值按公式 $K_i = \frac{IC_{50}}{1 + (L)/K_d}$ 求得，这里 (L) 为标记配体浓度，K_d 为标记配体离解常数。

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 2-3 次。

结 果

脑内 μ、δ 和 κ 受体 [³H]DAGO、[³H]DADLE 和 [³H]etorphine 与金仓鼠脑内阿片受体的特异性结合有良好的浓度线性关系，且呈饱和性，即随着标记配体浓度的逐渐增大，脑突触浆膜与相应的标记配体的特异性结合逐步增高，最后趋向饱和(图 1, 2, 3)。受体结合数据经 Scatchard 分析得到，选择性 μ 配体 [³H]DAGO 的平衡离解常数 K_d 为 1.3 nmol/L，最大结合量 B_{max} 为 17.8 pmol/g 蛋白。加

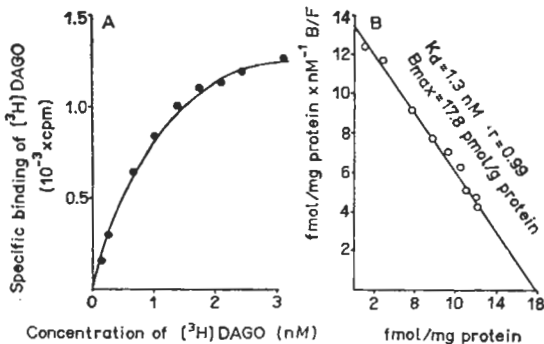


Fig 1. Saturation curve (A) and Scatchard plot (B) of the specific binding of [³H]DAGO.

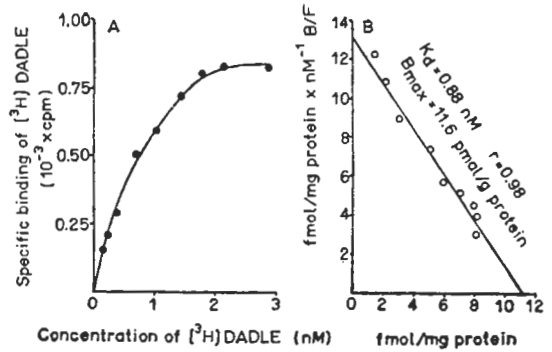


Fig 2. Saturation curve (A) and Scatchard plot (B) of the specific binding of [³H]DADLE in the presence of 30 nmol/L morphine.

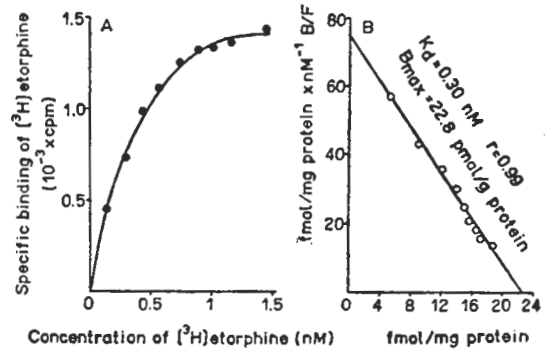


Fig 3. Saturation curve (A) and Scatchard plot (B) of the specific binding of [³H]etorphine in the presence of 30 nmol/L morphine and 100 nmol/L DADLE.

30 nmol/L 吗啡封闭 μ 受体后，[³H]DADLE 的 K_d 值为 0.88 nmol/L，B_{max} 为 11.6 pmol/g 蛋白。加入 30 nmol/L 吗啡和 100 nmol/L DADLE 封闭 μ 和 δ 受体后，[³H]etorphine 的 K_d 值为 0.30 nmol/L，B_{max} 为 22.8 pmol/g 蛋白，可见 [³H]etorphine 对金仓鼠脑内 κ 受体的亲和力最强，受体结合量最高。

非标记选择性配体的竞争性抑制 羟甲芬太尼是一个新的强效 μ 激动剂⁽⁶⁾，它对 μ、δ 和 κ 受体的 K_i 值分别为 $(2.6 \pm 0.3) \times 10^{-11}$ mol/L， $(9.3 \pm 1.1) \times 10^{-8}$ mol/L 和 $(1.7 \pm 0.3) \times 10^{-9}$ mol/L。其 K_i 值比例为 1:3577:65，可见羟甲芬太尼较强抑制 μ 受体结合，而对 δ 受体作用

Tab 1. Inhibition equilibrium constant K_I values[†] (mol/L) of selected ligands. $n = 3$ ($\bar{x} \pm SD$)

Competing ligand	[³ H]DAGO	[³ H]DADLE (+ 30 nmol/L morphine)	[³ H]etorphine (+ 30 nmol/L morphine and 100 nmol/L DADLE)
Mu-agonist Ohmefentanyl	$(2.6 \pm 0.3) \times 10^{-11}$	$(9.3 \pm 1.1) \times 10^{-8}$	$(1.7 \pm 0.3) \times 10^{-9}$
Delta-agonist DADLE	$(3.1 \pm 0.2) \times 10^{-8}$	$(1.0 \pm 0.5) \times 10^{-9}$	$(9.4 \pm 0.4) \times 10^{-7}$
Kappa-agonist U-50488 H	$(2.3 \pm 0.5) \times 10^{-7}$	$(2.5 \pm 1.1) \times 10^{-5}$	$(3.2 \pm 0.1) \times 10^{-9}$

[†] K_I values were obtained from the equation $K_I = \frac{IC_{50}}{1 + (L)/K_d}$, where K_d is the dissociation constant and (L) the concentration of [³H]ligand.

较弱。相对选择性的 δ 配体 DADLE 对 μ 、 δ 和 κ 受体的 K_I 值分别为 $(3.1 \pm 0.2) \times 10^{-8}$ mol/L, $(1.0 \pm 0.5) \times 10^{-9}$ mol/L 和 $(9.4 \pm 0.4) \times 10^{-7}$ mol/L。其 K_I 值比例为 31:1:940。 κ 配体 U-50488 H 对 μ 、 δ 和 κ 受体的 K_I 值分别为 $(2.3 \pm 0.5) \times 10^{-7}$ mol/L, $(2.5 \pm 1.1) \times 10^{-5}$ mol/L 和 $(3.2 \pm 0.1) \times 10^{-9}$ mol/L。其 K_I 值比例为 72:7800:1。说明 κ 配体 U-50488 H 容易取代 [³H]etorphine 与 κ 受体的结合, 而对 δ 受体几乎没有作用(表 1)。

以上选择性药物的竞争性抑制试验结果也确证了 [³H]DAGO、[³H]DADLE (封闭 μ 受体) 和 [³H]etorphine (封闭 μ 和 δ 受体) 的结合分别表示 μ 、 δ 和 κ 受体的结合。

讨 论

[³H]DAGO 是一个选择性较高的 μ 配体, 它与脑匀浆的特异性结合, 可代表 μ 受体结合。[³H]DADLE 是一个相对选择性的 δ 配体, 它与 δ 、 μ 受体的结合有一定的交叉反应, 过去单独用 [³H]DADLE 的结合代表 δ 受体结合, 实际上是不正确的。本文则以 μ 配体 morphine 封闭 μ 受体的结合, 故 [³H]DADLE 的结合较确切地代表 δ 受体结合。[³H]etorphine 虽然并非选择性配体, 但当用吗啡和 DADLE 阻断 μ 和 δ 的结合后, 它仍然能结合到高亲和的结合点。根据目前主要存在 μ 、 δ 和 κ 三种阿片受

Tab 2. Binding capacities (pmol/g brain) of μ 、 δ and κ binding sites

Species	μ site	δ site	κ site
Golden hamster	3.3	2.1	4.3
Rat ⁽⁸⁾	7.3	6.7	2.0
Guinea pig ⁽⁸⁾	3.0	3.9	5.4

体亚型的假设, 可以认为该结合点属于 κ 受体。以上不同标记配体的受体结合试验的结果提示, 金仓鼠脑匀浆中 μ 、 δ 和 κ 受体的密度与大鼠、豚鼠相比有明显差异^(7,8)(表 2)。金仓鼠 κ 受体的最大结合量为 22.8 pmol/g 蛋白, 占总结合量 ($\mu + \delta + \kappa$) 的 44%。U-50488 H 化合物也具有镇痛作用⁽⁹⁾, 根据该化合物选择性作用于 κ 受体的特点, 可以认为它的镇痛作用是通过 κ 受体行使的, 它不同于 morphine 类药物。

以上实验结果充分说明, 金仓鼠脑内阿片受体亚型的密度有明显的种属特异性。目前富有 κ 受体的组织有豚鼠小脑和人胎盘⁽¹⁰⁾, 但存在组织量少及来源不方便等问题。金仓鼠脑内存在优势的 κ 受体, 有可能为 κ 受体的研究提供较好的材料。此外, 通过受体特性的研究, 进一步分析药物在不同种属动物的作用性质, 这对阐明药物作用的受体机理也具有一定意义。

参 考 文 献

- Goldstein A, James IF. Multiple opioid receptors. *Trends Pharmacol Sci* 1984; 5 : 503

- 2 Maurer R. Multiplicity of opioid receptors in different species. *Neurosci Lett* 1982; 30 : 303
- 3 Meunier JC. Mu and kappa opiate binding sites in the rabbit CNS. *Life Sci* 1982; 31 : 1327
- 4 Martin WR, Eades CG, Thompson JA, Huppler RE, Gilbert PE. The effects of morphine- and nalorphine-like drugs in the nondependent and morphine-dependent chronic spinal dog. *J Pharmacol Exp Ther* 1976; 197 : 517
- 5 Pasternak GW, Gintzler AR, Houghten RA, et al. Biochemical and pharmacological evidence for opioid receptor multiplicity in the central nervous system. *Life Sci* 1983; 33 (suppl 1) : 167
- 6 徐 珩、陈 洁、池志强. 羟甲芬太尼 (Ohmefentanyl) : 一个新的 μ 阿片受体激动剂. *中国科学(B辑)* 1984; (8) : 733
- 7 Kosterlitz HW, Paterson SJ, Robson LE. Characterization of the κ -subtype of the opiate receptor in the guinea-pig brain. *Br J Pharmacol* 1981; 73 : 939
- 8 Gillan MGC, Kosterlitz HW. Spectrum of the μ -, δ - and κ -binding sites in homogenates of rat brain. *Ibid* 1982; 77 : 461
- 9 Lahti RA, Von Voigtlander PF, Barsuhn C. Properties of a selective kappa agonist, U-50,488 H. *Life Sci* 1982; 31 : 2257
- 10 Porthe G, Valette A, Cros J. Kappa opiate binding sites in human placenta. *J Biochem Biophys Res Commun* 1981; 101 : 1

Acta Pharmacologica Sinica 1986 Nov; 7 (6) : 495-498

Characterization of opioid receptors in golden hamster brain

WU Shi-wei¹, JIN Wen-qiao, CHI Zhi-qiang

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

ABSTRACT The nature of opioid receptors in golden hamster brain has been studied in this paper. The results of experiments indicated that specific binding of the three [³H]ligands is concentration-dependent and saturable. Scatchard analysis showed that the K_d and B_{max} were 1.3 nmol/L and 17.8 pmol/g protein, respectively for μ binding, 0.88 nmol/L and 11.6 pmol/g protein, respectively for δ binding and 0.30 nmol/L and 22.8 pmol/g protein, respectively for κ binding. Competition binding studies indicated that cold μ ligand, ohmefentanyl easily displaced the binding of [³H]DAGO [$K_I = (2.6 \pm 0.3) \times 10^{-11}$ mol/L]. Relatively selective δ ligand, DADLE, readily inhibited the binding of [³H] DADLE [$K_I = (1.0 \pm 0.5) \times 10^{-9}$ mol/L]. However, selective κ ligand, U-50488 H competed effectively the binding of [³H]etorphine to κ receptors

[$K_I = (3.2 \pm 0.1) \times 10^{-9}$ mol/L]. Based on our experiments, we estimate that the golden hamster brain contains 44% κ , 34% μ and 22% δ receptors. These results suggest that the high binding to κ receptors exists predominantly in the golden hamster brain. It markedly differs from the brains of rat or guinea pig. The brain tissue of golden hamster may be a better material for studying of κ receptors.

KEY WORDS golden hamster; brain; endorphin receptors; radioligand assay; [³H](D-Ala², MePhe⁴, Gly-ol⁵) enkephalin; [³H](D-Ala², D-Leu⁵) enkephalin; [³H]-etorphine

¹ Present address: Shanghai Railway Medical College, Shanghai 200070