

九个慢解离阿片配体 3-氮杂二环壬烷类化合物对 μ , δ , κ 受体的作用特性

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

Characterization of 9 slowly dissociated opioid ligands azabicyclononanes compounds to μ , δ , and κ receptors

FAN Li-Qun, JIN Wen-Qiao, CHI Zhi-Qiang
(Shanghai Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031, China)

ABSTRACT In the receptor binding assay, the relative affinity ratios of P-7548 [3-(β -phenylethyl)-9 β -methoxy-9 α -(*m*-propionoxyphenyl)-3-azabicyclo(3,3,1)nonane], P-7556 [3-(β -phenylethyl)-9 β -methoxy-9 α -(*m*-benzoyloxyphenyl)-3-azabicyclo(3,3,1)nonane] and P-7618 {3-(β -phenylethyl)-9 β -methoxy-9 α -(*m*-(1-cyclopentyl-propionoxyphenyl))}-3-azabicyclo(3,3,1) nonane} were 56 : 16 : 1, 1 : 4 : 1, and 6 : 0.2 : 1 at μ , δ , and κ sites, respectively. These compounds possessed a tight binding to μ receptor. After washed 4 times, they still inhibited the [³H]ohmefentanyl binding by 70-80%. In the guinea pig ileum, they showed potent and persistent agonist activities, 607, 303, and 181 times respectively that of normorphine. These effects were readily antagonized by naloxone and Mr2266. In the mouse vas deferens (MVD), they also possessed long-lasting agonist activities. The effect of P-7556 on MVD was not antagonized by naloxone and Mr2266, indicating that P-7556 acted on δ receptor in MVD. In the rabbit vas deferens, P-7548, P-7556, and P-7618 antagonized the effect of U-50488H. We conclude that these azabicyclononanes are a series of opioid ligands with μ , δ agonist and κ antagonist activities.

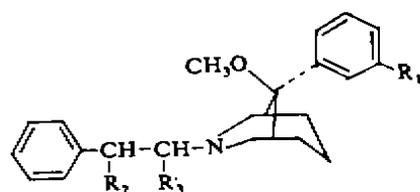
KEY WORDS azabicyclononanes; analgesics; endorphin receptors; radioligand assay; ileum; vas deferens

摘要 P-7548 对 μ , δ , κ 的相对亲和性之比为 56 : 16 : 1, 而 P-7556 为 1 : 4 : 1, P-7618 为 6 : 0.2 : 1. 这些化合物对 μ 受体的结合最为牢固, 经 4 次洗涤后

仍能抑制 70-80% [³H]F-7302 与 μ 受体的结合. P-7548, P-7556, P-7618 在豚鼠回肠上表现为长效 μ 激动剂, 在兔输精管上显示出长效 κ 拮抗剂作用, 而 P-7556 在小鼠输精管上具有长效 δ 激动剂作用.

关键词 氮杂二环壬烷类; 镇痛剂; 内啡呔受体; 放射配位体测定; 回肠; 输精管

3-氮杂二环[3,3,1]壬烷类镇痛剂(简称 P 类)是一类新型镇痛剂, 其中有些化合物的镇痛活性很强而毒性较低⁽¹⁾. 我们曾经研究了这些化合物与阿片受体的结合亲和力, 发现它们



	R ₁	R ₂	R ₃
P-7521	-OH	H	H
P-7548	-OC(=O)CH ₂ CH ₃	H	H
P-7602	-OH	OH	H
P-7608	-OH	H	CH ₃
P-7617	-OC(=O)CH=CHCH ₃	H	H
P-7616	-OC(=O)- 	H	H
P-7528	-OC(=O)- 	H	H
P-7618	-OC(=O)CH ₂ CH ₂ - 	H	H
P-7556	-OC(=O)- 	H	H

Received 1989 Jul 29

Accepted 1991 Jan 14

的钠商值较小, 提示可能具有激动-拮抗性质⁽²⁾. P类化合物对兔呼吸抑制作用比芬太尼和吗啡轻, 此呼吸抑制作用不随药物剂量的加大而呈线性增加, 它们的安全度比芬太尼或吗啡大得多⁽³⁾. 为进一步探讨P类镇痛剂的作用性质, 我们选择了9种作用较强的P类化合物, 研究它们和阿片受体不同类型的结合亲和力, 结合牢固性及其对离体器官的作用, 分析它们和 μ , δ 和 κ 阿片受体的相互作用.

MATERIALS AND METHODS

9种P类镇痛剂及DADLE([D-Ala², D-Leu⁵]enkephalin)由本所合成. 吗啡系青海制药厂出品, 纳洛酮及³H]etorphine (46 GBq · mol⁻¹)由上海医科大学合成. Mr2266[(-)-2-(3-咪喃甲基)-5,9-二乙基-2'-羟基-6,7-苯吗啡烷]和U50488H{(反式-3,4-二氯-N-甲基-N-[2-(1-吡咯)环己烷基]苯乙酰胺}由Prof Kosterlitz (University of Aberdeen, UK)赠送. 羟甲芬太尼(³H]F-7302, 40.3 μ Bq · mol⁻¹)由上海原子核所提供, ³H]DPDPE([D-Pen², Pen⁵]enkephalin, 26 μ Bq/mol⁻¹)为Amersham公司产品. GF/C玻璃纤维滤纸为Whatman公司产品.

杂种小鼠(20.0 ± 1.5 g, ♂), 老年小白鼠(29 ± 2.4 g, ♂), 豚鼠(350 ± 46 g, ♂), 兔(2.7 ± 0.3 kg, ♂)均由中国科学院上海动物中心提供.

受体结合实验 小鼠脑匀浆制备见前文⁽⁴⁾. 样品管中依次加入 Tris-HCl 50 mmol · L⁻¹ 缓冲液(pH 7.4, 25°C), 不同浓度的所试药物, 小鼠脑匀浆(蛋白含量为 2.2 mg 左右), 标记配体. 总结合管不加药物; 非特异结合管不加药物, 加非标记的 etorphine (1.6 μ mol · L⁻¹). 总温育体积为 400 μ l. 被试药物采用 4-5 个浓度, 每个浓度 3-4 复管.

加样过程均在冰浴中进行, 加样完毕后于 37°C 温育 30 min, 取出后立即置于冰浴中冷却终止反应, 用 Millipore Model 1225 微孔真空过滤器经 Whatman GF/C 玻璃纤维滤纸快速过滤, 每管用 3.5 ml 冰冷的 Tris-HCl 缓冲液 (50 mmol · L⁻¹, pH 7.4, 0°C) 冲洗 3 次, 将滤纸于红外灯上烘干后放入有 5 ml 亲脂性闪烁液的闪烁杯中, 用国产 YSJ-80 液体闪烁计数仪测定闪烁数 (cpm), 计数效率为 60%. 每次实验重复 3-4 次, 取均值. 被测药物抑制 [³H] 标记配体特异性结合的 % 之概率单位和药物浓度的对数作线性回归, 求 IC₅₀ 值. 求 $K_I = IC_{50} / (1 + L / K_D)$.

受体结合牢固性测定 小鼠脑匀浆 2.85 ml, 加非标记 P 类化合物 0.15 ml, 总体积为 3.0 ml, 30°C 温育 45 min, 取出后用 37 ml Tris-HCl (50 mmol · L⁻¹, pH 7.4, 25°C) 缓冲液稀释, 40 000 × g 离心 10 min, 沉淀用 40 ml Tris-HCl 缓冲液再次匀浆, 温育 10 min, 40 000 × g 离心 10 min, 洗涤, 重复 4 次, 最后沉淀用 3 ml Tris-HCl 缓冲液匀浆, 立即做受体结合实验. 对照组不加被测药物, 其它处理同样品组.

离体生物检定 豚鼠回肠神经丛纵行肌、小鼠及兔输精管分别用文献(5),(6)与(7)记述的方法制备.

标本置于 37°C 浴管内, 营养液为 Krebs 溶液, 内通 95% O₂ + 5% CO₂. 平衡 30 min 后, 由浴管上下两端铂电极产生的电场刺激引起纵向收缩. 刺激参数如下: 豚鼠回肠和兔输精管用波宽 1 ms 单方波, 电压 50 V, 间隔 15 s. 小鼠输精管用间隔 200 ms 的 3 次短串方波, 波宽 1 ms, 电压 40 V, 刺激间隔 15 s. 用等长换能器与自动平衡记录仪记录收缩.

化合物的作用强度以和去甲吗啡 (Normorphine) 及 DADLE 的强度比值来表

示. 拮抗平衡常数 K_i 值按单剂量方法⁽⁸⁾测定.

RESULTS

9 种 P 类镇痛剂和阿片受体亚型的亲和力

我们选用选择性 μ 配体 [³H]羟甲芬太尼 0.5 nmol · L⁻¹ 作为探测 μ 受体的配体, 选用选择性的 δ 配体 [³H]DPDPE 3.4 nmol · L⁻¹ 作为探测 δ 受体的配体. 选用 [³H]etorphine 0.5 nmol · L⁻¹, 并用羟甲芬太尼 30 nmol · L⁻¹ 和 DADLE 100 nmol · L⁻¹ 分别封闭 μ 和 δ 受体结合, 测定 κ 受体结合. Tab 1 结果表明 P 类镇痛剂对 μ , δ 和 κ 阿片受体均有较强的亲和力, 其中化合物 P-7602 和 P-7617 对 μ 受体

的选择性高且作用也强, 它们的 $\mu : \delta : \kappa$ 之比分别为 44 : 1 : 1 和 46 : 2 : 1. P-7521 和 P-7548 对 μ , δ 阿片受体的亲和力最大, 和它们强效镇痛作用的结果相一致. 前 7 个 P 类镇痛剂对阿片受体不同类型的结合强度是 μ 受体 > δ 水受体. 而化合物 P-7618 对 κ 受体的亲和力较 δ 受体的亲和力强. 化合物 P-7556 对 δ 受体的亲和力较 μ 受体和 κ 受体的亲和力都强, $\mu : \delta : \kappa$ 强度之比为 1 : 4 : 1.

3 种 P 类镇痛剂对不同类型阿片受体结合牢固性比较 我们选择了 3 种有代表性的 P 化合物: P-7548 (对 μ 受体亲和力大), P-7556 (对 δ 受体亲和力比 μ , κ 受体略大),

Tab 1. Binding affinity of 9 azabicyclononanes at opioid receptor subtype in homogenate of mouse brain. Relative affinity $\mu : \delta : \kappa$ was $K_i(\kappa) / K_i(\mu) : K_i(\kappa) / K_i(\delta) : K_i(\mu) / K_i(\delta)$. $n=3-4$, $K_i \pm SD$.

	[³ H]ohmefentanyl (μ site)	[³ H]DPDPE (δ site)	[³ H]etorphine* (κ site)	$\mu : \delta : \kappa$
P-7521	0.025 ± 0.005	0.20 ± 0.03	1.64 ± 0.22	66 : 8 : 1
P-7548	0.12 ± 0.05	0.42 ± 0.01	6.78 ± 0.26	56 : 16 : 1
P-7602	0.14 ± 0.03	4.2 ± 0.4	6.12 ± 0.09	44 : 1 : 1
P-7608	0.54 ± 0.02	2.2 ± 0.3	4.3 ± 0.9	8 : 2 : 1
P-7617	0.13 ± 0.03	3.92 ± 0.28	5.94 ± 0.03	46 : 2 : 1
P-7616	0.40 ± 0.06	2.7 ± 0.7	12.4 ± 0.5	31 : 5 : 1
P-7528	1.31 ± 0.01	5.4 ± 0.8	16.6 ± 0.4	12 : 3 : 1
P-7618	1.2 ± 0.3	42 ± 4	7.4 ± 1.6	6 : 0.2 : 1
P-7556	27.6 ± 0.3	7.4 ± 2.0	31.7 ± 2.9	1 : 4 : 1

* In the presence of unlabelled ohmefentanyl 30 nmol · L⁻¹ and DADLE 100 nmol · L⁻¹ to suppress binding to the μ and δ sites.

Tab 2. Binding tightness of 3 azabicyclononanes to opioid receptor subtypes. The remaining binding sites were measured with [³H]opioid ligands after 4 washes. $n=2$.

Drug ($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	[³ H]ohmefentanyl (0.5 nmol · L ⁻¹) μ site	[³ H]DPDPE (4.0 nmol · L ⁻¹) δ site	[³ H]etorphine* (0.5 nmol · L ⁻¹) κ site
Control	100%	100%	100%
P-7548 (0.5)	23.7%	47.4%	67.4%
P-7618 (0.5)	33.2%	54.5%	70.0%
P-7556 (0.5)	25.7%	59.2%	65.9%
Morphine (5)	98.7%	97.3%	94.3%
Normorphine (5)	92.1%	98.4%	109%

* In the presence of unlabelled ohmefentanyl 30 nmol · L⁻¹ and DADLE 100 nmol · L⁻¹.

P-7618 (对 κ 受体亲和力较强), 研究它们和 μ , δ , κ 阿片受体的结合牢固性, 结果见 Tab 2. P-7548, P-7618, P-7556 这 3 种镇痛剂对 μ , δ 和 κ 受体均有牢固的结合, 但程度有所不同. P 类化合物与 μ 受体的结合最牢, 经 4 次洗涤后仍抑制 70-80% 的 $[^3\text{H}]$ F-7302 与 μ 受体的结合, 相对而言, 这些化合物与 δ 及 κ 受体的结合易于解离, 经洗涤后抑制 40-50% $[^3\text{H}]$ DPDPE 与 δ 受体结合, 抑制 30-40% $[^3\text{H}]$ etorphine (加 F-7302 封闭 μ 受体, DADLE 封闭 δ 受体) 与 κ 受体结合, 而可逆性阿片配体吗啡及去甲吗啡经过 4 次洗涤后, 对 μ , δ 和 κ 受体的抑制基本上全部消失.

3 种 P 类镇痛剂在离体器官上的作用

1 对豚鼠回肠神经丛纵行肌的作用 3 种 P 类镇痛剂在豚鼠回肠的作用不易恢复, 故它们的强度用和去甲吗啡的作用比值来表示. P-7548, P-7556 及 P-7618 在豚鼠回肠上有较强的激动剂效应, 分别为去甲吗啡的 607, 303 和 181 倍. 这些化合物的抑制作用容易被 μ 拮抗剂纳洛酮和 ($\mu+\kappa$) 拮抗剂 Mr 2266 逆转, 说明它们作用于豚鼠回肠 μ 受体.

Tab 3. The agonist potencies of 3 azabicyclononanes and the equilibrium constants of the antagonism (K_e) in the guinea pig ileum (GPI) and mouse vas deferens (MVD). $n=3$, $\bar{x}\pm\text{SD}$.

	Relative potency	K_e (nmol \cdot L $^{-1}$)	
		Naloxone	Mr 2266
GPI	Normorphine = 1		
P-7548	600 \pm 100	2.9 \pm 0.4	1.2 \pm 0.5
P-7556	300 \pm 80	0.8 \pm 0.2	2.9 \pm 1.2
P-7618	180 \pm 40	1.3 \pm 0.5	4.6 \pm 1.0
MVD	DADLE = 1		
P-7548	0.54 \pm 0.13	2.8 \pm 0.8	2.9 \pm 0.4
P-7556	0.45 \pm 0.12	8.1 \pm 0.6	12.0 \pm 3.0
P-7618	0.056 \pm 0.014	3.7 \pm 0.3	1.7 \pm 0.8

2 对小鼠输精管的作用 结果见 Tab 3. P-7548, P-7556 和 P-7618 在小鼠输精管上

显示出较强的激动剂作用. P-7548 和 P-7556 的强度和 δ 受体激动剂 DADLE 相近. 3 种 P 类化合物在小鼠输精管上的作用不易恢复, 纳洛酮不易翻转这些化合物在小鼠输精管上的作用. 纳洛酮和 Mr 2266 拮抗 P-7556 的 K_e 值较大. 表明 P-7556 在小鼠输精管上作用于 δ 受体. 纳洛酮和 Mr 2266 拮抗 P-7548, P-7618 的 K_e 值较小, 推测这两种化合物在小鼠输精管上作用于 μ 受体.

3 对兔输精管的作用 P-7548, P-7556 和 P-7618 在兔输精管上无激动活性而显示纯的拮抗剂作用. P 类化合物在剂量高达 1 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时对兔输精管收缩无抑制作用. 这些化合物可以翻转 κ 激动剂 U50488H 的作用, 它们拮抗 U50488H 的 K_e 值见 Tab 4, 其中 P-7618 和 P-7548 K_e 值较小, 说明它们对 κ 受体的拮抗作用强. 相对而言, P-7556 的 K_e 值较大, 可能是由于它对 κ 受体的亲和力较低. 3 种 P 类化合物在兔输精管上的作用不易洗去, 洗涤前后 K_e 值无显著差异, 说明 P 类化合物在兔输精管上结合牢固, 为慢解离 κ 拮抗剂.

Tab 4. Equilibrium constant (K_e) of 3 azabicyclononanes against U50488H in rabbit vas deferens. $n=3$, $\bar{x}\pm\text{SD}$.

	Normal	After washes*
P-7548	2.3 \pm 1.0	3.8 \pm 1.4
P-7556	7.3 \pm 1.7	8.7 \pm 1.6
P-7618	2.5 \pm 0.6	2.6 \pm 0.8

* The rabbit vas deferens were incubated with azabicyclononanes for 30 min at 37°C. K_e was determined after washing 3 times consecutively and then washing 6 times at interval of 5 min.

DISCUSSION

所试的 P 类化合物对 μ 受体的亲和力一般大于 δ 和 κ 受体的亲和力, 说明它们的镇痛效应与 μ 受体关系密切. 这与文献报道的

配体与 μ 受体的亲和力和镇痛效应呈正比关系相一致。从 P-7618, P-7528, P-7556 分析构效关系, 当 R_1 位引入 $-\text{OCCH}_2\text{CH}_2-$  时, 化合物对 δ 受体的亲和力降低。当 R_1 位上引入 $-\text{OCO}-$ , $-\text{OCO}-\emptyset$ 时, 化合物对 δ 受体的亲和力增加。关于它们的结构和受体亲和力的关系值得进一步探讨。

以前的药理研究指出, P 类镇痛剂的镇痛时间较长, 为了进一步分析 P 类化合物和不同类型阿片受体的结合情况, 我们做了受体结合牢固性测定。结果表明, P 类化合物对 μ 受体呈现牢固的结合, 不易解离, 这和离体器官生物检定所得到的结果相一致, 也说明其镇痛作用和 μ 受体关系较大。

P 类化合物在兔输精管(含有单一 κ 受体)上无任何抑制作用, 显示纯的拮抗剂作用。以前的研究曾指出这些化合物可能具有激动-拮抗性质⁽²⁾。从我们得到的结果可得到以下的看法: 这些化合物对 μ , δ 受体显示激动剂性质而对 κ 受体显示拮抗剂性质。正因为这些化合物的这种性质, 所以它们在整体动物中表现出毒性低, 成瘾性小等特点。它们的临床应用价值值得进一步研究。

从以上结果, 我们认为, 这些化合物是广谱的阿片受体配体, 它们和 μ , δ 和 κ 阿片受体均有较强的亲和力, 尤其是它们与 μ 受体的结合具有很慢的解离, 可以作为分离、研究

阿片受体的有效工具药。

REFERENCES

- 1 Zhou DH, Fang SN, Ge BL, *et al.* Synthesis and analgesic activity of derivatives of azabicycloalkanes. *Acta Pharm Sin* 1982; 17: 503
- 2 Wang DY, Chi ZQ. Relationship between analgesic activity and opiate receptor binding affinity for 5- derivatives of 3-azabicyclo[3,3,1]nonanes. *Acta Pharmacol Sin* 1984; 5: 158
- 3 Zhou J, Zheng WJ, Chi ZQ. Analgesic activity and respiratory inhibition of 3-(β -phenylethyl)-9 β -methoxy-9 α -(*m*-hydroxyphenyl)-3-azabicyclo[3,3,1]-nonane (P-7521) in rabbits. *Acta Pharmacol Sin* 1987; 8: 10
- 4 Jin WQ, Fan LQ, Chen XJ, Chi ZQ. P-7521 — a new irreversible opioid ligand. *Acta Pharmacol Sin* 1989; 10: 205
- 5 Kosterlitz HW, Lydon RJ, Watt AJ. The effects of adrenaline, noradrenaline and isoprenaline on inhibitory α - and β -adrenoceptors in the longitudinal muscle of the guinea-pig ileum. *Br J Pharmacol* 1970; 39: 398
- 6 Hughes J, Kosterlitz HW, Leslie FM. Effect of morphine on adrenergic transmission in the mouse vas deferens. Assessment of agonist and antagonist potencies of narcotic analgesics. *Br J Pharmacol* 1975; 53: 371
- 7 Oka T, Negishi K, Suda M, Matsumiya T, Inazu T, Ueki M. Rabbit vas deferens: a specific bioassay for opioid κ -receptor agonists. *Eur J Pharmacol* 1981; 73: 235
- 8 Kosterlitz HW, Watt AJ. Kinetic parameters of narcotic agonists and antagonists, with particular reference to *N*-allylnoroxymorphone (naloxone). *Br J Pharmacol* 1968; 33: 266

欢迎投稿《中国药理学报》

《中国药理学报》已成为美国 Science Citation Index 所选录的中国十种期刊之一, 美国 Current Contents / Life Sciences 仅选录中国两种期刊—《中国药理学报》与《中国科学》。作者论文发表在我刊后, 一个月之内即可进入国际联机检索系统, 信息反馈非常快。欢迎投稿我刊(尤其是英文稿)。