

281-283

## [<sup>3</sup>H]二氢埃托啡与大鼠脑膜阿片受体的结合

王丹心, 秦伯益 (军事医学科学院毒物药物研究所, 北京 100850, 中国)

R 966

R 971.1

### Binding of [<sup>3</sup>H]dihydroetorphine to opioid receptors in rat brain membrane

WANG Dan-Xin, QIN Bo-Yi (Institute of Pharmacology & Toxicology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China)

**KEY WORDS** dihydroetorphine; opioid receptors; brain; radioligand assay

**AIM:** To study the binding characteristics of dihydroetorphine (DHE) to opioid receptors. **METHODS:** The binding of [<sup>3</sup>H]DHE to rat brain membrane opioid receptors was observed by radioligand binding study. **RESULTS:** Saturation study showed the binding of [<sup>3</sup>H]DHE to rat brain membrane presented a single high-affinity class of binding sites with  $K_d = 0.19 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$  and  $B_{\text{max}} = 115 \text{ pmol/g protein}$ . Kinetics study showed the association rate of [<sup>3</sup>H]DHE to opioid receptor was very rapid and dissociation very slow. NaCl  $100 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  + guanosine triphosphate (GTP)  $50 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  inhibited the binding of [<sup>3</sup>H]DHE and made  $K_d$  increase to  $7.87 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ , without effect on  $B_{\text{max}}$ . Competitive inhibition of agonists and antagonists indicated that the affinity of [<sup>3</sup>H]DHE to  $\mu$  opioid receptor was higher than to  $\delta$  and  $\kappa$  opioid receptors. **CONCLUSION:** DHE is a selective agonist of  $\mu$  opioid receptors.

**关键词** 二氢埃托啡; 阿片受体; 脑; 放射配体测定

**目的:** 观察二氢埃托啡(DHE)与阿片受体的结合情况。 **方法:** 采用放射配体受体结合实验, 观察了[<sup>3</sup>H]DHE与大鼠脑膜阿片受体的结合。 **结果:** 饱和实验显示[<sup>3</sup>H]DHE的结合呈高亲和力单一位点,  $K_d = 0.19 \pm 0.05 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $B_{\text{max}} = 115 \pm 21 \text{ pmol/g protein}$ 。动力学实验表明[<sup>3</sup>H]DHE与阿片受体结合极快, 解离很慢。 NaCl  $100 \text{ mmol}$

$\cdot \text{L}^{-1}$  + 鸟苷三磷酸(GTP)  $50 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 可使[<sup>3</sup>H]DHE的 $K_d$ 值提高为  $7.87 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $B_{\text{max}}$ 值不变。激动剂和拮抗剂的竞争抑制实验均表明[<sup>3</sup>H]DHE与 $\mu$ 阿片受体的亲和力大于 $\delta$ 和 $\kappa$ 受体。 **结论:** DHE对 $\mu$ 阿片受体具有一定选择性。

二氢埃托啡(dihydroetorphine, DHE)为一高效麻醉性镇痛药, 具有高镇痛活性、低身体依赖性的特点<sup>(1,2)</sup>, 临床上用于镇痛和戒毒因类毒瘾都取得了很好的疗效<sup>(3,4)</sup>。DHE对[<sup>3</sup>H]DAGO、[<sup>3</sup>H]DPDPE和[<sup>3</sup>H]U69593与大鼠脑阿片受体结合的竞争抑制实验及小鼠镇痛实验均表明DHE对 $\mu$ 阿片受体具有一定选择性<sup>(5)</sup>。本文研究[<sup>3</sup>H]DHE与大鼠脑膜阿片受体的结合情况。

### MATERIALS AND METHODS

Wistar大鼠, 体重250-300g, 雌雄兼用。

大鼠脑膜制备的方法和结合实验参考文献<sup>(6)</sup>。每管含膜蛋白0.5mg, 饱和实验[<sup>3</sup>H]DHE浓度为0.02-0.64  $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ , 其它实验[<sup>3</sup>H]DHE浓度均为0.5  $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。在DAGO和DPDPE的实验中加50  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 杆菌肽。非特异结合管加10  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 非标记DHE。最后以Tris-HCl缓冲液(pH 7.4)补足到0.5 mL。反应在35℃中进行30 min, 冰浴终止反应后经4.9型玻璃纤维滤纸快速抽滤。滤膜凉干后置闪烁杯中, 加5 mL闪烁液(0.5% PPO + 0.03% POPOP的二甲苯溶液), 用液闪仪测放射性强度。

**药物** DHE、埃托啡(etorphine, Eto), 海洛因(heroin, Her), 丁丙诺啡(buprenorphine, Bup), 纳洛酮(naloxone, Nal)为本所合成; 吗啡(morphine, Mor)由青海制药厂生产; 美沙酮(methadone, Met), 天津中央药厂生产; 羟甲芬太尼(ohmefentanyl, Ohm), 中国科学院上海药物研究所合成(池志强教授赠送); DAGO, DPDPE, 杆菌肽为Sigma公司产品; U-50488H为Upjohn公司产品; Naloxonazine (NAZ),  $\beta$ -funaltrexamine ( $\beta$ -FNA), naltrindole (NTI)和nor-binaltorphinmine (nor-BNI)为RBI公司产品。[<sup>3</sup>H]DHE (1.29 PBq/mol, 放射纯度>97%)为本所合成。

**数据处理** 数据均由计算机按程序(Ligand, 汤仲明教授编写)算出。显著性检验采用t检验。

**RESULTS**

**[<sup>3</sup>H]DHE 与大鼠脑膜阿片受体的饱和结合**

[<sup>3</sup>H]DHE 的结合呈可饱和性, Hill 作图显示 Hill 系数为 1.114, 提示为单一位点结合. DHE 与阿片受体结合的亲和力极高,  $K_d$  值为  $0.19 \pm 0.05$  nmol · L<sup>-1</sup>,  $B_{max}$  为  $115 \pm 21$  pmol/g protein (Fig 1).

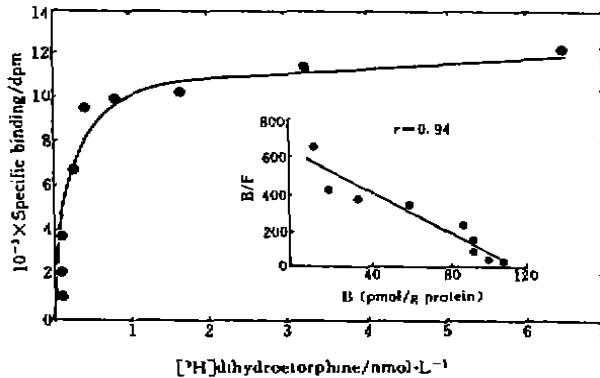


Fig 1. Saturation curve and scatchard plot of [<sup>3</sup>H]dihydroetorphine binding to rat brain membrane opioid receptors.

**Na<sup>+</sup> 鸟苷三磷酸(GTP)对[<sup>3</sup>H]DHE 结合的影响** 在 NaCl 100 mmol · L<sup>-1</sup> + GTP 50 μmol · L<sup>-1</sup> 存在下, [<sup>3</sup>H]DHE 与阿片受体结合的  $K_d$  值提高了 41 倍, 为  $7.9 \pm 0.8$  nmol · L<sup>-1</sup> ( $P < 0.01$ ),  $B_{max}$  不变, 为  $112 \pm 14$  pmol/g protein ( $P > 0.05$ ). 提示 DHE 为一纯激动剂.

**[<sup>3</sup>H]DHE 结合的动力学** [<sup>3</sup>H]DHE 与阿片受体结合极快, 2 min 即达最大结合的一半以上, 8 min 即达平衡, 60 min 内结合没有明显改变. 结合速率常数  $K_{+1} = 0.627$  nmol · L<sup>-1</sup> · min<sup>-1</sup>. 加 10 μmol · L<sup>-1</sup> 的非标 DHE 使 [<sup>3</sup>H]DHE 与受体解离, DHE 的解离速度很慢, 可分解为两相, 快相的解离速率常数  $K_{-1} = 0.103$  min, 慢相的解离速率常数  $K'_{-1} = 0.0032$  min.  $K_d = K_{-1}/K_{+1} = 0.164$  nmol · L<sup>-1</sup>, 与饱和实验所得的  $K_d$  值相似(Fig 2).

**阿片类受体激动剂和拮抗剂对[<sup>3</sup>H]DHE 结合的竞争抑制作用** 激动剂中 μ 选择性激动剂 Ohm 和 DAGO 的  $K_i$  值分别为 1.44 和 146 nmol · L<sup>-1</sup>. 小于 δ 和 κ 激动剂 DPDPE ( $K_i = 18$  μmol · L<sup>-1</sup>) 和

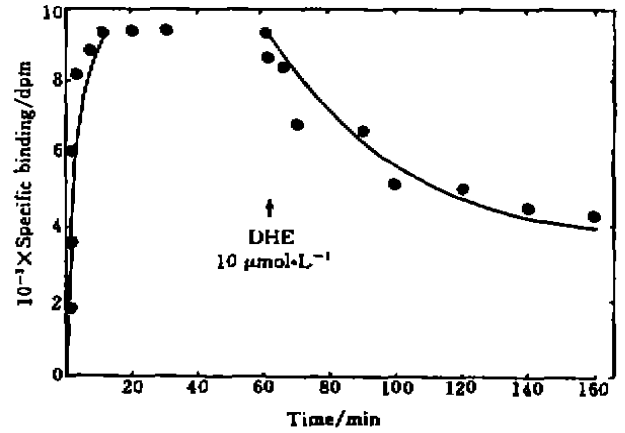


Fig 2. Association-dissociation of [<sup>3</sup>H] dihydroetorphine ( $0.5$  nmol · L<sup>-1</sup>) binding to rat brain membrane opioid receptors.

U-50488H ( $K_i = 9.2$  μmol · L<sup>-1</sup>). 拮抗剂中, μ 选择性拮抗剂 β-FNA 的  $K_i$  值为  $3.4$  nmol · L<sup>-1</sup>, 也比 δ 和 κ 拮抗剂 NTI ( $K_i = 89$  nmol · L<sup>-1</sup>) 和 nor-BNI ( $K_i = 0.3$  μmol · L<sup>-1</sup>) 的小(Tab 1). 说明 DHE 对 μ 受体的亲和力大于 δ 和 κ 受体.

Tab 1. Effects of opioid agonists and antagonists on binding of [<sup>3</sup>H]DHE  $0.5$  nmol · L<sup>-1</sup> to rat brain opioid receptors.  $n = 3$  homogenate (each was pooled from 10 rats and assayed in duplicate).

Compounds	$K_i$ /mol · L <sup>-1</sup>
Dihydroetorphine	$(4.4 \pm 0.7) \times 10^{-12}$
Etorphine	$(4.92 \pm 0.10) \times 10^{-11}$
Ohmfentanyl	$(1.44 \pm 0.21) \times 10^{-9}$
Heroin	$(1.3 \pm 0.3) \times 10^{-7}$
DAGO	$(1.46 \pm 0.16) \times 10^{-7}$
Methadone	$(2.49 \pm 0.18) \times 10^{-7}$
Morphine	$(2.52 \pm 0.06) \times 10^{-7}$
U-50488H	$(9.2 \pm 1.9) \times 10^{-6}$
DPDPE	$(1.80 \pm 0.30) \times 10^{-5}$
β-Funaltrexamine	$(3.4 \pm 0.4) \times 10^{-9}$
Naloxonazine	$(7.2 \pm 1.4) \times 10^{-9}$
Naloxone	$(1.27 \pm 0.20) \times 10^{-8}$
Buprenorphine	$(1.33 \pm 0.12) \times 10^{-8}$
Naltrindole	$(8.9 \pm 1.7) \times 10^{-8}$
Nor-binaltorphimine	$(3.0 \pm 0.3) \times 10^{-7}$

**DISCUSSION**

本实验结果表明 DHE 为一阿片受体高亲和

力激动剂,对 $\mu$ 阿片受体具有一定的选择性,这对于研究DHE的作用机制具有一定意义.过去一般认为 $\mu$ 受体是介导成瘾性的主要受体,而DHE的身体依赖性却很小,因此我们认为 $\mu$ 激动剂不一定身体依赖性都强.

在激动剂的竞争抑制实验中,除了Eto, Ohm和DHE本身对 $[^3\text{H}]\text{DHE}$ 抑制作用较强外,其它激动剂对 $[^3\text{H}]\text{DHE}$ 抑制作用很弱.象DAGO, Mor, Met等激动剂对其它标记配体如 $[^3\text{H}]\text{DAGO}$ 抑制作用的 $K_i$ 值一般在 $10^{-9}\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 水平<sup>[7]</sup>,而对 $[^3\text{H}]\text{DHE}$ 抑制作用的 $K_i$ 值在 $10^{-7}\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 水平.拮抗剂Nal和Bup拮抗 $[^3\text{H}]\text{DHE}$ 的 $K_i$ 值也比它们抑制其它 $\mu$ 激动剂结合的 $K_i$ 值大10倍左右<sup>[7]</sup>.对这一现象,我们的解释是:DHE可能作用于 $\mu$ 受体的某-亚型,此亚型对各激动剂的亲和力为 $\text{DHE} > \text{Eto} > \text{Ohm} \gg \text{DAGO, Mor, Met, Her}$ .

## REFERENCES

- 1 Huang M, Qin BY. Analgesic and other CNS depressive effects of dihydroetorphine. *Acta Pharmacol Sin* 1982; 3: 9-13.
- 2 Huang M, Qin BY. Physical dependence of dihydroetorphine in mice and monkeys. *Acta Pharmacol Sin* 1982; 3: 81-4.
- 3 Qin BY. Research advances of dihydroetorphine from analgesia to detoxification. *New Drugs Clin Remedies* 1993; 12: 119-123.
- 4 Qin BY, Wang DX, Huang M. The application of dihydroetorphine to detoxification of heroin addicts. *Regul Pept* 1994; 1 Suppl: 293-4.
- 5 Wang DX, Lu XQ, Qin BY. Dihydroetorphine is a  $\mu$  receptor selective ligand. *J Pharm Pharmacol* 1995; 47: 669-673.
- 6 Wang DX, Huang M, Qin BY. Binding characteristics of dihydroetorphine to opioid receptors in rat brain. *Chin J Pharmacol* 1991; 5: 161-3.
- 7 Magnan J, Paterson SJ, Tavani A, Kosterlitz HW. The binding spectrum of narcotic analgesic drug with different agonist and antagonist properties. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 1982; 319: 197-205.

## The 4th International Symposium on Biopeptides Medical Sciences

1996 Aug 27 - 30

Kunming, China

Please contact Prof OKADA Yoshio,  
Department of Medicinal Chemistry,  
Faculty of Pharmaceutical Sciences,  
Kobe-Gakuin University,  
Nishi-ku, Kobe 651-21, Japan.  
Phone 81-78-974-1551, ext 2772.  
Fax 81-78-974-5689.

Prof YAO Ming-Hui,  
Department of Pharmacology,  
School of Basic Medical Sciences,  
Shanghai Medical University,  
Shanghai 200032, China.  
Phone 86-21-6404-1900, ext 228.  
Fax 86-21-6403-7260.