

## [<sup>3</sup>H]羟甲芬太尼在大鼠纹状体中受体结合放射自显影分布

姚一禾、徐珩、李桂芬、池志强 (中国科学院上海药物研究所, 上海 200031)

**提要** 用宏观放射自显影和灰度等级测定法研究了 [<sup>3</sup>H]羟甲芬太尼([<sup>3</sup>H]OMF) 与大鼠纹状体中受体的结合部位。用 6-羟多巴胺损毁黑质纹状体多巴胺神经元使 [<sup>3</sup>H]OMF 的结合损失 26±5%, 用海人藻酸损毁纹状体神经元胞体使 [<sup>3</sup>H]OMF 的结合损失 53±10%。<sup>3</sup>H]OMF 在大鼠纹状体的分布与 [<sup>3</sup>H]DAGO 极为相似, 充分显示了 μ 受体的特征。

**关键词** 羟甲芬太尼; 内啡肽受体; 纹状体; 放射自显影术; 灰度等级测定; 6-羟多巴胺; 卡因酸

大鼠纹状体中含有丰富的 μ 和 δ 阿片受体<sup>(1)</sup>, 对这些阿片受体的生理功能还不十分清楚。羟甲芬太尼 (ohmefentanyl, OMF) 为 μ 受体的激动剂<sup>(2)</sup>, 具有选择性好, 亲和力高等特点。除了强的镇痛作用外, 对大鼠纹状体多巴胺 (DA) 系统也有明显影响<sup>(3)</sup>。本文利用放射自显影术和灰度等级测定法研究 [<sup>3</sup>H]OMF 在纹状体 DA 神经末梢及其它神经元胞体上的受体结合分布, 以进一步了解羟甲芬太尼行为作用的机理。

### 材料和方法

**药品** [<sup>3</sup>H]OMF 由本实验室合成, 上海原子核研究所标记 (2.18 TBq/mmol)。 [<sup>3</sup>H](D-Ala<sup>2</sup>, Mephe<sup>4</sup>, Gly-ol<sup>5</sup>)enkephalin ([<sup>3</sup>H] DAGO, 2.22 TBq/mmol) 和 [<sup>3</sup>H](D-Ala<sup>2</sup>, D-Leu<sup>5</sup>)enkephalin ([<sup>3</sup>H]DADLE, 1.85 TBq/mmol) 为 Amersham 产品。6-羟多巴胺 (6-OHDA) 为 Sigma 产品, 海人藻酸 (kainic acid, KA) 为 Light 公司产品。

**损毁** ♂ 大鼠, 体重 160±SD 8 g, ip 戊巴比妥 40 mg/kg。在定位仪上, 单侧黑质部位注射 10 μg 6-OHDA, 容量 4 μl。坐标参照图谱<sup>(4)</sup>: A 3.0 mm, L 2.0 mm, H 8.0 mm。6-OHDA 溶液用含 0.1% 抗坏血酸的生理盐水配制。纹状体神经元胞体损毁是在单侧纹状体注射 1 μg KA, 体积 2 μl, 坐标: A 1.2 mm, L 2.6 mm, H 5 mm。KA 溶液用生理盐水配制, NaOH 0.1 mol/L 调节 pH 至 7.5。

6-OHDA 损毁的大鼠在手术后 d 10 用阿扑吗啡 sc 2 mg/kg 进行测验, 选用每分钟对侧

旋转5次以上者进行实验.抽取其中6只大鼠,取两侧纹状体,用高效液相色谱-电化学检测(HPLC-ECD)测定DA及其代谢物的含量<sup>(5)</sup>.损毁的大鼠在手术后1wk进行实验.

**切片** 将损毁大鼠断头,取脑,在-20℃切片机(DWQ-81型,本所制)中存放0.5h左右,制成20μm的切片,然后融贴在涂有明胶层的载玻片上.

**受体结合** 将脑切片用冷风吹干,分别加上约100μl的<sup>[3H]</sup>OMF(2.70nmol/L),<sup>[3H]</sup>DAGO(2.46nmol/L)和<sup>[3H]</sup>DADLE(2.45nmol/L).标记药物用Tris-HCl 50mmol/L缓冲液(pH7.4)配制,在24-26℃孵育20min.用冰冷的Tris-HCl缓冲液洗涤2次,再用蒸馏水冲洗1次,冷风吹干后进行放射自显影.

**放射自显影术** 在上述孵育后的脑切片上覆盖一张对<sup>[3H]</sup>敏感的氟片(北京感光化学研究所试制),4℃曝射14wk,显影(Kodak D-19b,18℃,3min),定影(F-5酸性坚膜定影液,8min),水洗1h,空气中吹干后得到显示脑切片受体分布的自显影像.

**灰度等级测定** 用Hamamatsu C1000型光导摄像系统对自显影像进行受体密度测量.将氟片置于X像片观察灯前,打开摄像机,监视器荧光屏上即出现脑切片的图像,通过视频贮存器调节灰度等级从0-255,受体密度高的部位灰度等级也高,当灰度等级变化到某一值时,监视荧屏上刚好为一片白色,此时的读数即为自显影像的本底.脑片某一部位的灰度等级等于本底灰度水平读数减图像灰度水平读数,损毁侧纹状体阿片受体的损失为:(对照侧灰度等级-损毁侧灰度等级/对照侧灰度等级)×100%.

## 结 果

HPLC-ECD测定的结果表明(表1),6-OHDA单侧损毁大鼠黑质纹状体神经元后,DA含量减少了96%,DOPAC和HVA的含量各减少了84和82%.这说明90%以上的DA神

Tab 1. Contents of dopamine (DA) and its metabolites 3,4-dihydroxyphenylacetic acid (DOP-AC) and homovanillic acid (HVA) in rat corpus striatum (μg/g tissue) after lesion of nigro-striatal neurons with 6-hydroxydopamine (6-OHDA). n=6 rats,  $\bar{x} \pm SD$ . \*\*\*p<0.01

	Control side	Lesioned side	Reduction (%)
DOPAC	2.42±0.27	0.38±0.20***	84
HVA	0.91±0.08	0.16±0.03***	82
DA	10.5±0.4	0.42±0.21***	96

经元已经坏死.

图1为放射自显影像经光导摄像系统处理后的照片.A,B,C分别是6-OHDA单侧损毁黑质纹状体神经元后<sup>[3H]</sup>OMF,<sup>[3H]</sup>DAGO和<sup>[3H]</sup>DADLE受体结合位点的分布.D,E,F分别为KA单侧损毁纹状体神经元胞体后<sup>[3H]</sup>OMF,<sup>[3H]</sup>DAGO和<sup>[3H]</sup>DADLE受体结合位点的分布.照片的右侧是损毁侧.可以看到6-OHDA损毁后3个标记药物在纹状体的结合有少量减少,而KA损毁后减少十分明显.比较<sup>[3H]</sup>OMF和<sup>[3H]</sup>DAGO的照片可以发现两者十分相似,受体分布都是呈斑块状,这说明<sup>[3H]</sup>OMF所标记的是μ受体,而<sup>[3H]</sup>DADLE的结合则呈弥散状,显示了δ受体的特征.

灰度等级测定的结果表明,6-OHDA单侧损毁黑质纹状体神经元后,同侧纹状体的灰度等级较之未损侧有所减少,<sup>[3H]</sup>OMF的结合减少了26±5%,<sup>[3H]</sup>DAGO和<sup>[3H]</sup>DADLE的结合分别减少了24±4和24±6%.

KA单侧损毁纹状体神经元胞体后,损毁侧灰度等级较之未损侧有极明显减少.<sup>[3H]</sup>OMF和<sup>[3H]</sup>DAGO的结合分别损失了53±10和52±6%,而<sup>[3H]</sup>DADLE损失了72±12%(表2).

从这些数据来看,μ受体在纹状体DA神经元末梢上的分布比例与δ受体相近,而在神经元胞体上的分布较δ受体少,可能还有少部分μ受体分布在皮层-纹状体的传入纤维末梢上,

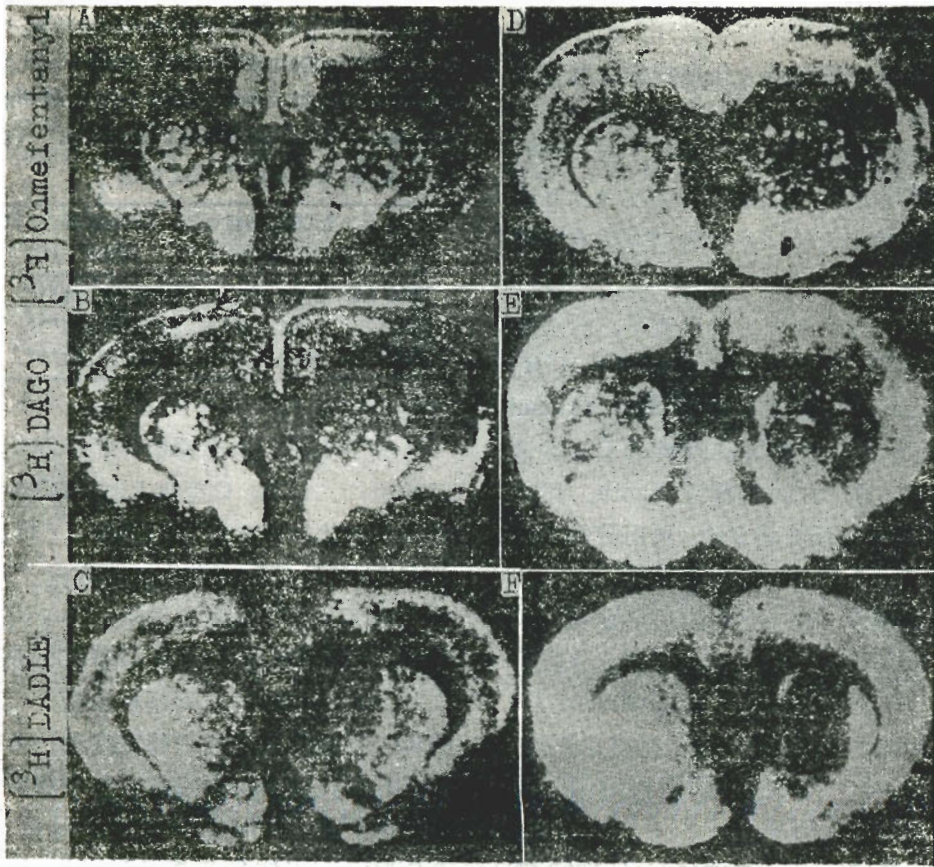


Fig 1. Autoradiographic distribution of  $[^3\text{H}]$ ligands binding sites in rat corpus striatum. A, B, C are  $[^3\text{H}]$ OMF,  $[^3\text{H}]$ DAGO and  $[^3\text{H}]$ DADLE binding sites respectively after lesion of nigro-striatal neurons with 6-OHDA. D, E, F are  $[^3\text{H}]$ OMF,  $[^3\text{H}]$ DAGO and  $[^3\text{H}]$ DADLE binding sites respectively after lesion of striatal neurons with kainic acid.

Tab 2. Reduction of  $[^3\text{H}]$ OMF,  $[^3\text{H}]$ DAGO and  $[^3\text{H}]$ DADLE binding sites induced by unilateral lesion of nigro-striatal neurons with 6-OHDA (A) or of striatal neurons with KA (B) in rat striatal slices. Gray level determination was used to estimate the receptor density.  $n=12-31$  rat striatal slices.  $\bar{x}\pm\text{SD}$ . \*\*\* $p<0.01$

	Control side	Lesioned side	Reduction (%)
$[^3\text{H}]$ OMF	$36\pm 6$	$27\pm 5^{***}$	$26\pm 5$
A $[^3\text{H}]$ DAGO	$40\pm 6$	$30\pm 5^{***}$	$24\pm 4$
$[^3\text{H}]$ DADLE	$30\pm 6$	$23\pm 5^{***}$	$24\pm 6$
$[^3\text{H}]$ OMF	$29\pm 6$	$14\pm 4^{***}$	$53\pm 10$
B $[^3\text{H}]$ DAGO	$33\pm 3$	$15\pm 3^{***}$	$52\pm 8$
$[^3\text{H}]$ DADLE	$26\pm 4$	$8\pm 3^{***}$	$72\pm 12$

## 讨 论

实验证明, 大约有 1/4 的  $[^3\text{H}]$ OMF 结合的受体分布在纹状体 DA 神经元末梢上, 大部分  $[^3\text{H}]$ OMF 结合的受体则分布在纹状体神经元胞体上.  $[^3\text{H}]$ OMF 结合的受体无论从分布还是形态来看都和  $[^3\text{H}]$ DAGO 相同, 充分表现了  $\mu$  受体的特征. 体外实验证明  $\mu$  和  $\delta$  受体对 DA 系统的调节不尽相同<sup>(6)</sup>. 这两种受体亚型在纹状体中的生理功能究竟如何还不完全清楚. 一般认为阿片类药物通过作用于 DA 神经元末梢上的阿片受体来调节 DA 能的活性, 而对大量分布在纹状体神经元胞体上的那些阿片受体了

解甚少。羟甲芬太尼对 $\mu$ 受体的选择性好,亲和力和行为作用强。由于其为生物碱,适用于各种给药途径,对于探索 $\mu$ 受体的生理功能是一十分理想的工具药。 $[^3\text{H}]\text{OMF}$ 在纹状体中的结合分布也为 $\mu$ 受体的分布提供了新的证据,同时也为阐明羟甲芬太尼对纹状体DA能系统的作用提供了形态依据。

宏观放射自显影的定量目前一般都采用光密度测量的方法进行相对定量。本文采用灰度等级测定法(待发表资料)测量两侧纹状体阿片受体的相对密度取得较好效果,这在国内还是一个新的方法。灰度等级也不是一个绝对值,只能作为相对定量的测定,但是在同一条件下测得的图象与本底两个灰度等级之间的差值是不变的。我们在同一条件下比较同一切片中损毁侧和未损毁侧纹状体的受体密度使用此法尤为合适,具有简便,快速等优点。

**致谢** 唐希灿赠送 6-羟多巴胺,符翠珍赠送 海人藻酸。

## 参 考 文 献

- 1 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
- 2 Xu H, Chen J, Chi ZQ. Ohmefentanyl—a new agonist for mu opiate receptor. *Sci Sin [B]* 1985; 28 : 504
- 3 Yao YH, Xu H, Chi ZQ. Cataleptic effect of ohmefentanyl in the rat. *Chin J Physiol Sci* 1985; 1 : 151
- 4 Pellegrino LJ, Pellegrino AS, Cushman AC. *A stereotaxic atlas of the rat brain*. 2nd ed. NY: Appleton-Century-Crofts, 1979 : 52-82
- 5 徐修容、唐琴梅、姚一禾。以D-樟脑- $\beta$ -磺酸为离子对试剂反相高效液相色谱测定大鼠脑组织中生物胺及其代谢产物。 *中国药理学报* 1987; 8 : 113
- 6 Chesselet MF, Cheramy A, Reisine TD, et al. Effects of various opiates including specific delta and mu agonists on dopamine release from nigrostriatal dopaminergic neurons *in vitro* in the rat and *in vivo* in the cat. *Life Sci* 1982; 31 : 2291

*Acta Pharmacologica Sinica* 1988 May, 9 (3) : 212-215

## Autoradiographic distribution of $[^3\text{H}]\text{ohmefentanyl}$ binding sites in rat corpus striatum

YAO Yi-He, XU Heng, LI Gui-Fen, CHI Zhi-Qiang

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

**ABSTRACT** Autoradiography and gray level determination revealed that  $[^3\text{H}]\text{ohmefentanyl}$  ( $[^3\text{H}]\text{OMF}$ ) binding sites were decreased by  $26 \pm \text{SD } 5\%$  after lesion of nigro-striatal dopamine neurons with 6-hydroxydopamine, and by  $53 \pm \text{SD } 10\%$  after lesion of striatal neurons with kainic acid. The distribution of  $[^3\text{H}]\text{OMF}$  binding sites was similar to that of  $[^3\text{H}]\text{DAGO}$ , and showed the

characteristics of  $\mu$  opioid receptors. Using gray level determination to estimate the receptor density has the advantages of simplicity and rapidity.

**KEY WORDS** ohmefentanyl; endorphin receptors; corpus striatum; autoradiography; gray level determination; 6-hydroxydopamine; kainic acid