

# 长效镇痛剂 3-( $\beta$ -苯乙基)-9 $\beta$ -甲氧基-9 $\alpha$ -(间-羟苯基)-3-氮杂二环[3,3,1]壬烷(P-7521)对体外阿片受体结合的影响

周德和、葛邦钊、徐学军、池志强 (中国科学院上海药物研究所, 上海 200031)

**提要** 以 P-7521 温育大鼠脑  $P_2$  膜, 洗涤 4 次后, 受体结合 [ $^3\text{H}$ ]etorphine 的能力仅为对照组的 15%, 而吗啡或 P-7520 组仅洗涤 2 次即已恢复. 小鼠脑室注射 P-7521 后的饱和分析表明 P-7521 抑制 [ $^3\text{H}$ ]etorphine 高亲和部份达 16 h 以上. 溶性大鼠脑阿片受体经用 P-7521 孵育后, 并经长时间透析除去游离药物,

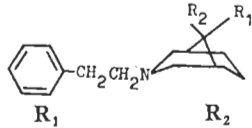

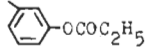


活性测得为对照组的 64%.

**关键词** [ $^3\text{H}$ ]依托啡; 内啡肽受体; 镇痛; 吗啡; 脑室注射; 放射配位体测定; 3-( $\beta$ -苯乙基)-9  $\beta$ -甲氧基-9  $\alpha$ -(间-羟苯基)-3-氮杂二环[3,3,1]壬烷(P-7521)

1987年6月13日收稿 1988年4月18日接受

氮杂二环化合物(表 1 中结构式为代表)是

Tab 1. Binding of 3-azabicyclo [3,3,1]nonane derivatives with opioid receptors and their duration of analgesia in hot plate assay. HZO = 14-hydroxydihydromorphazone

			Inhibition of [ <sup>3</sup> H]etorphine binding IC <sub>50</sub> (nmol/L)		Mice	Analgesic action	
	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	2 expts			Dose nmol/mouse	Duration (h)
P-7521		OCH <sub>3</sub>	0.18,	0.22	16	2	15.6±4.6
P-7548		OCH <sub>3</sub>	0.15,	0.18	20	1	7.9±0.7
P-7542		OH	3.56,	4.16	5	5	0.76±0.24
P-7534		OCH <sub>3</sub>	93.7,	99.8	5	50	3.7±1.6
P-7520	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	1871,	1810	8	50	4.2±1.1
HZO			18.5,	24.1	7	50	5.5±1.3
Morphine			22.2,	30.8	9	50	3.8±2.0

一类强效镇痛剂,其代表化合物 P-7521,化学名为 3-(β-苄乙基)-9β-甲氧基-9α-(间-羟苯基)-3-氮杂二环[3,3,1]-壬烷,不仅镇痛作用强,且作用持续时间长<sup>(1)</sup>,经研究其中的某些化合物,表明它们对各种亚型阿片受体均有相当强的亲和力<sup>(2)</sup>。本文从受体水平研究 P-7521 镇痛作用持续时间较长的原因,并以吗啡及 P-7521 的某些类似物作平行研究。

### 材料和方法

氮杂二环化合物 5 个(表 1)均由本所合成,吗啡盐(青海制药厂),毛地黄皂甙(杭州第一制药厂),14-羟基双氢吗啡酮(14-hydroxydihydromorphazone, HZO)上海医科大学刘懋勤教授惠赠, [<sup>3</sup>H]羟甲芬太尼(1.48 TBq/mmol)由中国科学院上海原子核所标记, [<sup>3</sup>H]etorphine (1.48 TBq/mmol)由上海医科大学标记,其它试剂均为 CP 或 AR。

**镇痛作用** 小鼠,♂性,体重 19.2±SD 0.6 g。一次 icv,剂量为 ip 的 ED<sub>50</sub> 值(吗啡为 ED<sub>40</sub> 值),每隔 30 或 60 min 用 GJ-8402 型热板测定仪测定痛反应,以给药后小鼠对痛反应所需时间超过 10 s 者认为有镇痛作用,统计镇

痛作用持续时间。

**受体结合试验** 大鼠脑膜 P<sub>2</sub> 部份的制备参阅文献<sup>(2)</sup>,实验步骤为:每管加大鼠 P<sub>2</sub> 膜,加入终浓度为 1 nmol/L 的 [<sup>3</sup>H]etorphine 20 μl,以终浓度为 1 μmol/L 的 P-7521 测定非特异结合,用 Tris 缓冲液加至总体积为 400 μl,30℃ 孵育 20 min,冰水浴冷却 5 min,在 Millipore 1225 微孔过滤器上经 Whatman GF/C 滤纸过滤,并以冰冷的 Tris 缓冲液洗滤纸 3 次,每次 4 ml,滤纸烘干后,计数。每组实验 4 复管,平均误差 <15%。

**药物与受体结合的牢固程度** 以吗啡, HZO, P-7534, P-7520(终浓度为 10 μmol/L); P-7521, P-7548, P-7542(终浓度为 1 μmol/L) 分别与大鼠脑 P<sub>2</sub> 膜孵育,30℃,25 min,冰浴冷却 5 min,离心(25 000×g, 2℃, 10 min),弃去上清液, P<sub>2</sub> 沉淀进行第一次洗涤,其过程为:加冷却的 Tris-HCl 缓冲液至原体积,匀浆 30 s,孵育(25℃)15 min,0℃ 冷却 5 min,离心(25 000×g, 2℃, 10 min),弃去上清, P<sub>2</sub> 沉淀进行下一次洗涤,用含 NaCl 100 mmol/L 的 Tris-HCl 缓冲液洗涤过程相同。以上实验用不含药物的同容量的 Tris-HCl 缓冲液同时

进行预孵育, 并经相同条件下洗涤的  $P_2$  膜作为对照组, 每次测定受体结合活性时, 测定蛋白浓度(双缩脲比色法)<sup>(3)</sup>。

**P-7521 对体外受体结合活性的影响** 小鼠 icv P-7521(剂量为 ip 的  $ED_{50}$  值)后, 用热板法测定镇痛活性, 分别于 4, 16, 48 h 断头处死小鼠, 制备脑匀浆  $P_2$  膜, 进行 [ $^3H$ ]etorphine 的饱和分析, 以 icv 等容量的生理盐水的小鼠为对照。

**P-7521 对 [ $^3H$ ] 羟甲芬太尼与溶性大鼠脑阿片受体特异结合的影响** 大鼠脑溶性阿片受体用毛地黄皂甙/ $MgSO_4$  法制得。 [ $^3H$ ]羟甲芬太尼的结合试验用 PEG 法进行<sup>(4)</sup>, 蛋白测定用 Commassie blue 法以 0.02% 毛地黄皂甙的 Tris-HCl 缓冲液溶解的  $\gamma$  球蛋白为标准<sup>(5)</sup>。大鼠脑溶性阿片受体 9.9 ml 分别与 P-7521(最终浓度为 1  $\mu$ mol/L)或 Tris-HCl 缓冲液 100  $\mu$ ml 在 25 $^{\circ}C$  孵育 30 min, 分别对 2 L Tris-HCl(50 mmol/L)缓冲液(4 $^{\circ}C$ )进行透析, 每 8 h 换一次, 24 h 后测定与 [ $^3H$ ]羟甲芬太尼的结合活性。

## 结 果

**小鼠 icv 药物的镇痛作用** 表 1 列出了各个化合物的镇痛持续时间, 以 P-7521 为最长, 达 15.6 h, P-7542 为最短, 仅 0.76 h, 这个结果与以前报道的小鼠 ip 后热板法测定的结果趋势<sup>(6)</sup>是一致的, 但持续时间更长, 吗啡在此条件下为 3.8 h。

**药物与阿片受体的结合与洗脱** 各个药物抑制 [ $^3H$ ]etorphine 与大鼠  $P_2$  膜阿片受体特异结合的  $IC_{50}$  值见表 1, 用可以产生最大抑制作用浓度的药物分别与大鼠脑  $P_2$  膜孵育, 经用 Tris-HCl 缓冲液反复洗涤, 分别测定它们对 [ $^3H$ ]etorphine 结合的恢复程度, 结果如图 1, 经 2 次洗涤后, P-7520 和吗啡预处理的  $P_2$  膜, 结合很快离解, 受体活力完全恢复; P-7542, P-7534 和 HZO 分别恢复为 45, 60 和 70%, 而 P-7521 和 P-7548 组恢复小于 10%。

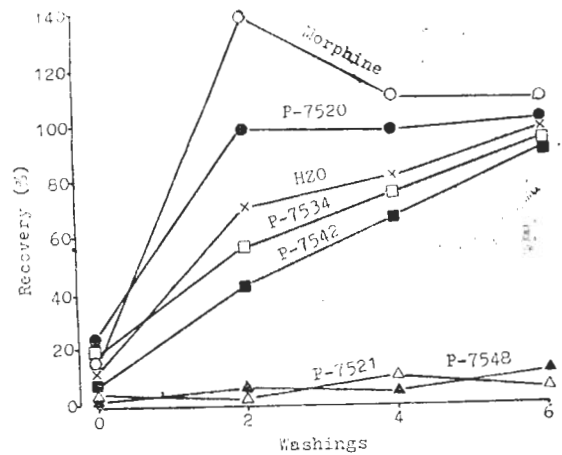


Fig 1. Recovery of binding activity of opiate receptors by repeated washing of rat brain  $P_2$  membrane pretreated with P-7521, P-7548, P-7542, P-7534, HZO, P-7520, morphine. The [ $^3H$ ]etorphine binding reactivity of opiate receptors was determined. Binding reactivity of  $P_2$  membrane treated with saline (control) was taken as 100%.

经 4 次洗涤后, P-7542, P-7534 和 HZO 组分别恢复为对照组的 70, 80 和 85%; 而 P-7521 和 P-7548 组恢复仍仅仅约 10%。6 次洗涤后, 其它化合物组基本恢复活力, 而 P-7521 和 P-7548 组仍低于 15%。如果在洗涤时, 先用含 NaCl 的 Tris-HCl 缓冲液洗 2 次以增加洗涤液的离子强度, 再用 Tris-HCl 缓冲液洗 4 次后, P-7521 和 P-7548 组活力仍低于 15%。若采用 P-7521 和 P-7548 预处理的  $P_2$  膜, 经 6 次洗涤, 再经 Tris-HCl 缓冲液透析(4 $^{\circ}C$ ), 以促其进一步离解, 其结果是受体活力仍仅恢复约 15%, 可见 P-7521 和 P-7548 与阿片受体的结合是相当牢固的。

**icv P-7521 对体外受体结合的影响** icv P-7521 后, 分别在 4, 16 和 48 h 处死并制成  $P_2$  膜, 及时对 [ $^3H$ ]etorphine 进行饱和分析。对照组 [ $^3H$ ]etorphine 结合的高亲和位点的离解常数( $K_D$ )在 0.05-0.16 nmol/L, 其最大结合量  $B_{max}$  为 14-22 pmol/g 蛋白。P-7521 处理后 4 及 16 h 的结果表明: P-7521 破坏了 [ $^3H$ ]etorphine 的高亲和结合点, 在 4 h 时对低亲和结合点的最大结合量也有明显的抑制。给予药

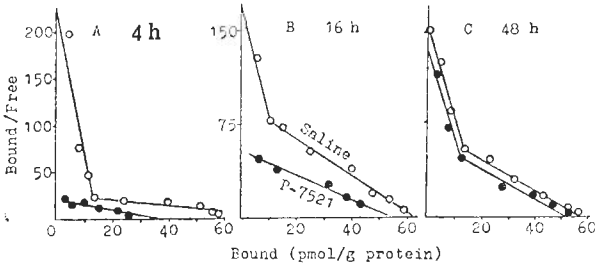


Fig 2. Scatchard analysis of P-7521 inhibition of  $[^3\text{H}]$ etorphine binding. Mice were injected icv with saline or P-7521 and sacrificed after 4, 16 and 48 h.

物 48 h 后处死的动物所制得的  $\text{P}_2$  膜,  $[^3\text{H}]$ etorphine 的高亲和结合点恢复出现, 基本与对照组一致(图 2)。

**P-7521 对溶性阿片受体与  $[^3\text{H}]$ 羟甲芬太尼结合的影响** 用 P-7521 与大鼠脑溶性阿片受体孵育, 经对 Tris-HCl 缓冲液多次反复透析以除去过量的药物, 分别用  $[^3\text{H}]$ 羟甲芬太尼测定对照组和用 P-7521 处理过的溶性阿片受体活性。结果表明: P-7521 组活性保留为对照组的  $64 \pm 15\%$ , 也就是说大约有 35% 的溶性阿片受体可能仍被 P-7521 所占据。

## 讨 论

P-7521 为一具有相当长作用时间的强效镇痛剂, 本文的结果表明 icv 可抑制  $[^3\text{H}]$ etorphine 的高亲和结合点达 16 h 以上。因为制备  $\text{P}_2$  膜要经过匀浆及多次洗涤, 这说明了 P-7521 对  $[^3\text{H}]$ etorphine 的高亲和部份的结合是相当牢固的。至于是否属非可逆结合尚待进一步研究。与此相似, Pasternak 等<sup>(7)</sup>在研究纳洛酮(naloxazone)时亦发现有类似的长时间地抑制  $[^3\text{H}]$ 纳洛酮高亲和部份的结合, 并认为这是非可逆抑制。P-7521 还能在体外结合试验中不可逆地抑制受体结合, 经 P-7521 孵育

的  $\text{P}_2$  膜不能被多次洗涤(包括含有 NaCl 的高离子强度的缓冲液)所解离。而在平行试验中, 用 P-7520 和吗啡孵育过的  $\text{P}_2$  膜, 则经 2 次洗涤即可基本上恢复受体的结合能力。P-7521 对阿片受体的牢固结合在溶性阿片受体中也获得了证实。对用毛地黄皂甙/ $\text{MgSO}_4$  制备的溶性大鼠脑阿片受体也显示了一定程度的抑制其结合能力的作用。

本工作的结果虽能对 P-7521 的持久的镇痛作用从受体水平上作一定解释。但其它的可能性诸如由于药物的较慢的清除率或由非特异结合部位不断地释放出药物而形成的脑内长时间地存在低水平的游离药物也是必须考虑的。

## 参 考 文 献

- 1 周德和、方苏南、葛邦铃, 等。氮杂二环烷类衍生物的合成及其镇痛活性。药学报 1982; 17: 503
- 2 Xu H, Chen J, Chi ZQ. Binding of 3-( $\beta$ -phenylethyl)-9 $\beta$ -methoxy-9 $\alpha$ -(m-propionoxyphenyl)-3-azabicyclo[3,3,1]nonane (7548) to different type of opiate receptors. *Chin J Physiol Sci* 1986; 2: 55
- 3 Gornall AG, Bardawill CL, David MM. Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. *J Biol Chem* 1949; 177: 751
- 4 Demoliou-Mason CD, Barnard EA. Solubilization in high yield of opioid receptors retaining high-affinity delta, mu and kappa binding sites. *FEBS Lett* 1984; 170: 378
- 5 Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principles of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976; 72: 243
- 6 汪大渊、池志强。五个 3-氮杂二环 [3,3,1] 壬烷类衍生物镇痛活性与鸦片受体结合亲和力的关系。中国药理学报 1984; 5: 158
- 7 Pasternak GW, Childers SR, Snyder SH. Naloxazone, a long-acting opiate antagonist: Effects on analgesia in intact animals and on opiate receptor binding *in vitro*. *J Pharmacol Exp Ther* 1980; 214: 455

*Acta Pharmacologica Sinica* 1988 Nov, 9 (6) : 511-515

## Effects of the long-acting analgesics 3-( $\beta$ -phenylethyl)-9 $\beta$ -methoxy-9 $\alpha$ -(*m*-hydroxyphenyl)-3-azabicycles [3,3,1]-nonane (P-7521) on opiate receptor binding *in vitro*

ZHOU De-He, GE Bang-Lun, XU Xue-Jun, CHI Zhi-Qiang

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

**ABSTRACT** After 6 washes, rat brain P<sub>2</sub> membranes preincubated with P-7521 showed only a 15% recovery of [<sup>3</sup>H]etorphine binding activity, however P<sub>2</sub> treated with morphine or 3-( $\beta$ -phenylethyl)-9-dimethoxy-3-azabicyclo[3,3,1]-nonane (P-7520) yielded 100% recovery of binding activity after only 2 washes. Scatchard analysis of saturation experiments 16 h after P-7521 treatment *in vivo* still showed a lack of high affinity binding sites of [<sup>3</sup>H]etorphine.

The binding activity of digitonin/MgSO<sub>4</sub> soluble rat brain opiate receptors

pretreated with P-7521 and then dialyzed against Tris-HCl buffer for 24 h to [<sup>3</sup>H]ohmefentanyl was restored to about 63% of control.

In conclusion, P-7521 binds tightly to rat brain opiate receptors.

**KEY WORDS** [<sup>3</sup>H]etorphine; endorphin receptors; analgesia; morphine; intraventricular injections; radioligand assay; 3-( $\beta$ -phenylethyl)-9 $\beta$ -methoxy-9 $\alpha$ -(*m*-hydroxyphenyl)-3-azabicyclo [3,3,1]-nonane (P-7521)