

内吗啡肽及其类似物的构效关系

霍笑风 吴宁 任维华 王锐*

(兰州大学生命科学学院生物化学与分子生物学系, 兰州 730000. *联系人, Email: wangrui@lzu.edu.cn)

摘要 对内吗啡肽(endomorphins, EMs)和合理替换其 2-/3-位氨基酸(amino acid, Aa)而得到的 8 个类似物进行了受体结合作用、镇痛活性和舒血管效应研究, 探讨了 EMs 的构效关系. 结果表明: 相对而言, 2-Aa 与 EMs 的选择性更相关, 而 3-Aa 则与其亲和性更相关; EMs 及其类似物的镇痛和舒血管效应不完全由它们的受体结合作用(*in vitro*)所决定, [D-Pro²]EM-2 作用独特; EMs 在中枢系统中的镇痛作用和在外周系统中的舒血管作用的失活机制是不同的, 前者可能与降解有关, 而后者可能与反馈抑制有关.

关键词 内吗啡肽 构效关系 受体结合作用 镇痛 舒血管 失活机制

1997 年 4 月, Zadina 等人^[1]宣布在牛脑内发现了两种 μ 型阿片受体(μ -opioid receptor, MOR)的内源性专一配基, 分别命名为内吗啡肽-1 和内吗啡肽-2(endomorphin-1, EM-1; endomorphin-2, EM-2), 这是阿片肽研究领域的一次重大突破. 随后人们对内吗啡肽(endomorphins, EMs)在 G 蛋白、离子通道、痛觉调节和心血管系统等方面的作用进行了较多的研究, 并指出了其生物活性构象^[2, 3], 但对其构效关系研究较少^[4, 5]. 对于只有 4 个氨基酸的内吗啡肽而言, 它的每一个结构单元都蕴含了大量且精微的信息. 用化学方法控制和改造肽的氨基酸序列和空间构象在肽的构效关系研究方面已经有了长足的发展和广泛的应用^[6]. 鉴于此, 我们结合我室多年取得

的肽构效关系研究成果^[7, 8], 合理替换了内吗啡肽第2位和第3位氨基酸(amino acid, Aa), 液相合成了8个类似物, 并对它们的受体结合作用、镇痛活性和舒血管效应进行了研究, 以进一步了解内吗啡肽的构效关系, 并为其应用研究提供一定的理论指导. EMs 及其类似物的氨基酸序列如下:

EM-1: Tyr-Pro-Trp-Phe-NH₂, EM-2: Tyr-Pro-Phe-Phe-NH₂, [Gly³]EM: Tyr-Pro-Gly-Phe-NH₂, [L-Tyr³]EM: Tyr-Pro-Tyr-Phe-NH₂, [L-Pro³]EM: Tyr-Pro-Pro-Phe-NH₂, [Gly²]EM-1: Tyr-Gly-Trp-Phe-NH₂, [D-Pro²]EM-1: Tyr-D-Pro-Trp-Phe-NH₂, [D-Ala²]EM-1: Tyr-D-Ala-Trp-Phe-NH₂, [D-Pro²]EM-2: Tyr-D-Pro-Phe-Phe-NH₂, [D-Ala²]EM-2: Tyr-D-Ala-Phe-Phe-NH₂.

1 材料与方法

(i) 材料. 盐酸纳洛酮(naloxone, Nx), Sigma 产品; 盐酸吗啡(morphine), 沈阳第一制药厂; 内吗啡肽及其类似物由本室合成^[9]; 其余药品均为国产分析纯. 豚鼠(*Cavia caviidae*)、F₁系小鼠由卫生部兰州生物制品所提供, Wistar 大鼠、昆明系小鼠由兰州医学院提供.

(ii) 离体生物检定. 参照文献^[10]进行. 小白鼠输精管(MVD)实验, 昆明系小鼠, 雄性, 体重 32~37 g. 豚鼠回肠纵行肌(GPI)实验, 豚鼠, 雌雄不限, 体重 300~400 g, 实验前禁食 12 h. 拮抗剂的平衡解离常数(*Ke*)值按照 Kosterlitz 的单剂量法测定. 以半数抑制剂量(IC₅₀)衡量其亲和性, 以 *Ke* 值衡量其选择性.

(iii) 镇痛实验. 采用小白鼠温浴甩尾法^[10]. F₁系小鼠, 雌雄不限, 体重 16~18 g, 环境温度(20±0.5)℃, 水浴温度(44±0.5)℃. 给药前先测定基础甩尾域(5~10 s). 侧脑室注射, 体积 10 μL. 做 Nx 拮抗时, 提前 10 min 皮下注射(1 mg·kg⁻¹). 给药后 10~30 min 每 5 min 测一次; 30~60 min 每 10 min 测一次; 60~120 min 每 20 min 测一次. 为防止烫伤, 浸入时间不超过 2 倍基础甩尾域. 结果以最大可能效应百分率(percent of maximum possible effect, MPE%)表示:

$$\text{MPE}\% = (\text{给药后甩尾域} - \text{基础甩尾域}) / (\text{截止时间} - \text{基础甩尾域}) \times 100.$$

(iv) 局部血管阻力实验. 采用大鼠后肢血管恒速灌流法^[10]. Wistar 大鼠, 雄性, 体重 280~350 g. 腹腔注射 20%乌拉坦(1.0~1.2 g·kg⁻¹)麻醉. 灌流泵流速 4.5~6.0 mL·min⁻¹, 基础灌流压(11.70±0.59) kPa. 给药体积 100 μL, 注射时间 10~15 s. 做 Nx 拮抗时, 提前 10 min 注射(2 mg·kg⁻¹). 结果以外周阻力变化百分率(percent of changes in peripheral resistance, PR%)表示:

$$\text{PR}\% = (\text{给药后灌流压} - \text{基础灌流压}) / \text{基础灌流压} \times 100.$$

(v) 实验控制. 阳性对照物为吗啡, 阴性对照物为生理盐水, 拮抗剂为纳洛酮.

(vi) 统计方法. 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 结果以 *t*-测验检验.

2 结果

2.1 受体亲和性和选择性

在 MVD 和 GPI 检定中, 除[Gly²]EM(0~100 μmol·L⁻¹)无抑制作用和[L-Pro³]EM 只有 70% 的最大抑制程度之外, 其他化合物都能 100%地抑制标本的收缩, 并且可分别被 50 和 10 nmol·L⁻¹ 的 Nx 完全逆转. 它们的亲和性强弱顺序为 EMs>[D-Ala²]EMs>Morphine>[D-Pro²]EMs>[Gly²]EM-1>[Xaa³]EMs, 这表明 3-Aa 的替换更显著地减弱了亲和力. 在 GPI 检定中, Nx 拮抗所有被测物的 *Ke* 值均在 1.9 nmol·L⁻¹^[11] 范围内([L-Pro³]EM 除外), 显示了它们的 MOR 选择性; 在 MVD 检定中, Nx 拮抗所有被测物的 *Ke* 值均超出 1.6 nmol·L⁻¹^[11] 范围(EMs 除外),

这表明所有的类似物都对 δ 阿片受体(DOR)产生了一定的选择性. 因此它们的 MOR 选择性高低顺序为 EMs > [D-Pro²]EMs = [L-Tyr³]EM > [D-Ala²]EMs = [L-Pro³]EM > Morphine, 这说明 2-/3-Aa 的替换对 EMs 的选择性的影响大致相当, 以上数据见表 1. [Gly²]EM-1 在 GPI 实验中有弱的激动活性和拮抗活性($pA_2 = 5.76 \pm 0.64$, 对吗啡), 而在 MVD 实验中无任何作用, 这表明它可能不与 DOR 结合. 其他类似物均无拮抗活性(数据未显示).

表 1 内吗啡肽及其类似物的离体生物检定

药物	GPI		MVD	
	IC ₅₀ / nmol · L ⁻¹	Nx 的 Ke / nmol · L ⁻¹	IC ₅₀ / nmol · L ⁻¹	Nx 的 Ke / nmol · L ⁻¹
Morphine	125.9 ± 16.3	1.89 ± 0.27 ^{a)}	304.5 ± 16.8	11.07 ± 0.67 ^{c)}
EM-1	3.41 ± 0.30	1.17 ± 0.12 ^{a)}	47.40 ± 9.75	0.91 ± 0.19 ^{a)}
EM-2	7.27 ± 0.79	1.37 ± 0.17 ^{a)}	34.83 ± 4.36	0.97 ± 0.13 ^{a)}
[D-Pro ²]EM-1	454.1 ± 4.2	1.40 ± 0.02 ^{a)}	604.1 ± 176.4	2.23 ± 0.46 ^{c), d)}
[D-Pro ²]EM-2	170.1 ± 27.2	1.91 ± 0.16 ^{a)}	250.0 ± 4.6	2.40 ± 0.20 ^{c), d)}
[D-Ala ²]EM-1	26.11 ± 1.40	1.96 ± 0.10 ^{a)}	64.50 ± 5.13	3.37 ± 0.28 ^{c), d)}
[D-Ala ²]EM-2	17.35 ± 1.16	2.16 ± 0.16 ^{a)}	29.88 ± 8.18	3.11 ± 0.68 ^{b), d)}
[Gly ²]EM-1	37 760 ± 730	— ^{g)}	N ^{f)}	—
[L-Tyr ³]EM	38 970 ± 2 260	2.10 ± 0.14 ^{a)}	48 830 ± 4 490	2.13 ± 0.21 ^{b), e)}
[L-Pro ³]EM	60 840 ± 3 400	3.47 ± 0.25 ^{c)}	129 400 ± 26 600	3.48 ± 0.83 ^{b), e)}
[Gly ³]EM	N	—	N	—

a) $P > 0.05$, b) $P < 0.05$, c) $P < 0.01$ (GPI: Ke vs 1.9, MVD: Ke vs 1.6), d) $P < 0.05$ ([D-Ala²]EMs vs [D-Pro²]EMs), e) $P < 0.01$ ([L-Tyr³]EM vs [L-Pro³]EM), f) 0~100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 无抑制作用, g) 未做. MVD: $n=10$, GPI: $n=8$

2.2 镇痛与舒血管作用

选取在离体生物检定中表现出了高效价的类似物和母体进行生物活性研究. 它们的生物学效应呈剂量依赖性(图 1),并可被 Nx 完全逆转(数据未显示), 说明这两种效应是由阿片受体介导的. 表 2 显示, 它们镇痛作用的强弱顺序为 EM-1 = [D-Pro²]EM-2 > Morphine > EM-2 > [D-Ala²]EM-1 > [D-Ala²]EM-2>[D-Pro²]EM-1, 舒血管作用的强弱顺序为 EM-1>EM-2>Morphine>[D-Pro²]EM-2

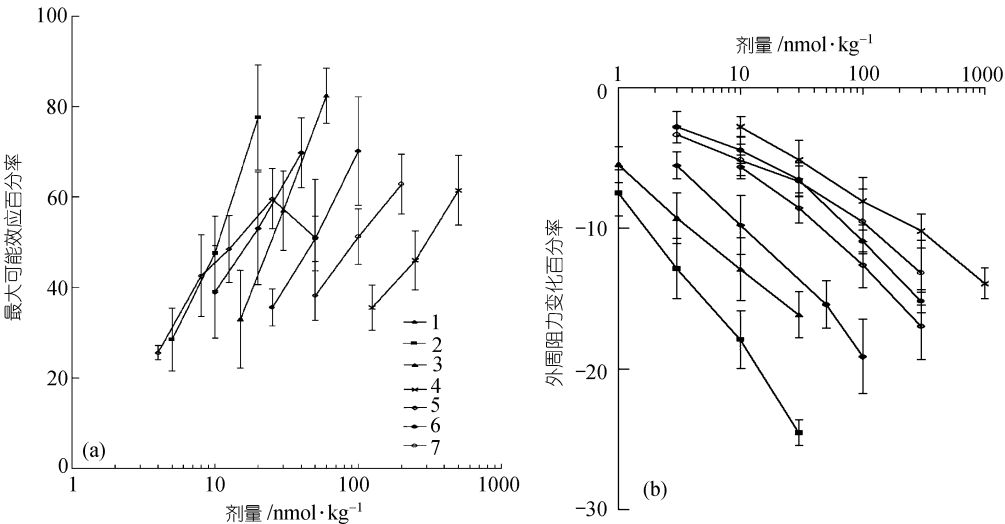


图 1 内吗啡肽及其类似物的镇痛((a) $n=10$)和舒血管((b), $n=7$) 效应的量效曲线

(a) 1 示 Morphien; 2 示 EM-1; 3 示 EM-2; 4 示[D-Pro2]EM-1; 5 示[D-Pro2]EM-2; 6 示[D-Ala2]EM-1; 7 示[D-Ala2]EM-2.
(b) 符号编码同(a)

> [D-Ala²]EM-1 = [D-Ala²]EM-2 > [D-Pro²]EM-1. [D-Pro²]EM-2 在镇痛方面表现得尤为异常(见图 1(a)), 且大剂量易致死. 所有类似物的镇痛持续时间都显著长于母体, 而舒血管持续时间则是 EMs = Morphine = [D-Ala²]EMs > [D-Pro²]EM-1 > [D-Pro²]EM-2.

表 2 内吗啡肽及其类似物的镇痛和舒血管效应

药物	镇痛效应		舒血管效应	
	剂量比 ^{a)} (MPE% = 50)	持续时间 / h	剂量比 ^{a)} (PR% = -10)	持续时间 / min
Morphine	1.6	≤1	4.2	4.96 ± 0.94 ^{b)}
EM-1	1.0	≤1	1.0	4.91 ± 0.81
EM-2	2.3	≤1	1.5	4.21 ± 0.70 ^{b)}
[D-Pro ²]EM-1	27	> 2	125	2.41 ± 1.31 ^{c), d)}
[D-Pro ²]EM-2	1.2	> 2	20	1.62 ± 0.35 ^{c), d)}
[D-Ala ²]EM-1	4.5	> 2	30	3.00 ± 0.88 ^{b)}
[D-Ala ²]EM-2	8.7	> 2	44	4.58 ± 1.37 ^{b)}

a) EM-1 为 1.0; b) $P > 0.05$, vs EM-1; c) $P < 0.05$, vs EM-1; d) $P < 0.05$, [D-Pro²]EM-1 vs [D-Pro²]EM-2

3 讨论

Fiori 等人[3]认为 EM-1 处于膜结合环境中时, 主链采取伸展构象, 2-Pro 采取顺式构型; 1-Tyr 的侧链与 3-Trp 的侧链距离较近, 而与 4-Phe 的侧链反向排列. 按照 Yamazaki 等人^[12]的观点, 作为间隔子的 2-Aa 的性质及数目和 3-位氨基酸的性质及其侧链与 1-Tyr 侧链的相对位置基本上决定了 EMs 的选择性; Zadina 等人^[1]则认为 4-Phe 主要是使 EMs 具有了高亲和性.

在我们的离体生物检定中, [Xaa³]EMs 的亲合性的急剧下降主要是因为替代氨基酸的性质与 Trp/Phe 不同所造成的. 这不但使 3-Aa 与受体的相互作用减弱了, 还引起了主链构象的变化, 改变了 4-Phe 的侧链与 1-Tyr 的相对位置, 从而失去了其增强亲和性的作用, 导致亲和性的进一步下降(如[Gly³]EM, 它极易形成 *b* 转角). [Gly³]EM 和[Gly²]EM-1 亲和性的差别反证了 3-Trp 对亲和性的重要性. [Xaa³]EMs 的 MOR 选择性的高低顺序与它们亲和性的强弱顺序一致, 这可能是由于 3-Aa 对受体不同强度的亲和力不同程度地影响了 2-Pro 的与 MOR 相匹配的构象, 从而相应地降低了各自的选择性. [D-Xaa²]EMs 的 MOR 选择性的变化则与替换氨基酸的间隔子作用和 2-Pro 的间隔子作用的相异程度有关. D-Ala 比 D-Pro 更大的柔性使其与 L-Pro 相差更远, 所以[D-Ala²]EMs 的选择性就更低. 尽管 Gly 的柔性更强, 但由于受数量的限制, 2-Gly 的间隔子作用能够类似于 L-Pro 而非 Gly²-Gly³的作用, 所以[Gly²]EM-1 对 MOR 无选择性. [D-Xaa²]EMs 的亲合性也降低了, 原因可能在于 2-Aa 在选择 MOR 的过程, 即由各自的低能构象向 EM-1 的低能构象转变的过程中, 需要克服不同的能障^[5], 因此不同程度地影响了 3-Aa 与受体精确而稳固的结合, 甚至会进而影响到 4-Phe 的作用(如[Gly²]EM-1, 它倾向于形成 *b* 转角), 从而导致了亲和性不同程度的下降. 因此, 尽管对 EMs 的 2-/3-Aa 的替换都导致了其受体亲和性和选择性的变化, 但相对而言, 2-Aa 更与其选择性相关, 而 3-Aa 则更与其亲和性相关.

阿片肽的生物学效应是由其受体介导的, 因此决定于配基与受体的作用性质. 在镇痛和舒血管实验中, 从作用强度上看, 吗啡比 EMs 类似物更强, 但其在生物离体检定中表现出的效价却弱于它们. 原因可能在于吗啡对 MOR 较弱的选择性使其不但能通过与 EMs 相似的 MOR 介导机制发挥作用, 还能通过与其他亚型的阿片受体相作用而表现活性. 但令人意外的是, 尽管[D-Pro²]EM-2 的亲合性及选择性与其他类似物相比均处于中等水平, 但它的生物学

尽管[D-Pro²]EM-2 的亲及选择性与其他类似物相比均处于中等水平,但它的生物学效应却是其中最强的,镇痛强度甚至近于母体.原因可能在于:MOR 不但具有较大的组织特异性,还存在着不同的配基结合区域^[11];而[D-Pro²]EM-2 与其他类似物可能在不同的 MOR 上结合的区域不同,从而以不同的机制引发了下游的生物学效应.[D-Pro²]EM-2 的特异表现暗示了 EMs 及其类似物的生物学效应与其受体结合作用(*in vitro*)不完全相关.

从作用时间上看,所有 2-位被 D-Aa 替换的类似物的镇痛持续时间都显著长于母体;但它们舒血管作用的持续时间却都不比母体长.这一矛盾的结果表明了 EMs 在中枢系统中的镇痛作用和循环系统中的舒血管作用的丧失是由不同机制造成的.前者主要由二肽氨基肽酶 IV(dipeptidyl aminopeptidase IV, DPIV, EC 3.4.14.5)——此酶作为 EMs 的主要灭活者^[13],能专一裂解 N-端第 2 位的 L-Pro 或 L-Ala 的羧基端肽键,而对 2-D-Aa 的羧基端肽键无裂解作用——的降解造成的;后者可能与 DPIV 和其他肽酶^[14]的降解作用无关,而是由于引起了对自身的反馈抑制造成的.在此, [D-Pro²]EM-2 再次表现独特,它对自身功能的反馈抑制更强烈,导致其舒血管持续时间最短.这进一步表明,对于 EMs 这样一个较小的信息分子而言,细微的结构变化将引起其功能的显著差异.

致谢 感谢兰州大学生命科学学院陈强副教授和杨顶建讲师的帮助.本工作为国家自然科学基金(批准号:29972016)、甘肃省科技攻关项目基金(批准号:GS992-A43-087)和甘肃省自然科学基金(批准号:ZS991-A23-056Y)资助项目.

参 考 文 献

1. Zadina J E, Hackler L, Ge L J, et al. A potent and selective endogenous agonist for the μ -opiate receptor. *Nature*, 1997, 386(6624): 499~502
2. Podlogar B L, Germana P M, Ferguson D M, et al. Conformational analysis of the endogenous μ -opioid agonist endomorphin-1 using NMR spectroscopy and molecular modeling. *FEBS Lett*, 1998, 439(1-2): 13~20
3. Fiori S, Renner C, Cramer J, et al. Preferred conformation of edomorphin-1 in aqueous and membrane-mimetic environments. *J Mol Biol*, 1999, 291(1): 163~167
4. Yang Y R, Chiu T H, Chen C L, et al. Structure-activity relations of naturally occurring and synthetic opioid tetrapeptides acting on locus coeruleus neurons. *Eur J Pharmacol*, 1999, 372(3): 229~236
5. Parterlini M G, Avitabile F, Ostrouski B G, et al. Stereochemical requirements for receptor recognition of the μ -opioid peptide endomorphin-1. *Biophys J*, 2000, 78(2): 590~599
6. 杜雨苍. 神经肽与脑功能. 上海: 上海科技教育出版社, 1998. 51~57
7. 王 锐, 胡晓愚, 嘉 庆, 等. 新啡肽类似物的设计、合成、构象和生物活性研究. *科学通报*, 1995, 40(13): 1197~1199
8. 董守良, 王 涛, 陈 强, 等. 孤啡肽及其片段的合成和构效关系研究. *科学通报*, 1999, 44(12): 1296~1300
9. Huo X F, Ren W H, Wu N, et al. The design and synthesis of endomorphins and their analogs. In: Hu X Y, Wang R, Tam J P, eds. *Peptide: Biology and Chemistry (Proceeding of the Fifth International Chinese Peptide Symposium)*. Dordrecht: Kluwer Acad Publ, 2000. 115~118
10. 徐叔云, 卞如濂, 陈 修, 主编. 药理实验方法学. 第 2 版. 北京: 人民卫生出版社, 1994. 695, 703~706, 974~975
11. 邹 冈, 主编. 基础神经药理学. 第 2 版. 北京: 科学出版社, 1999. 309~311, 318
12. Yamazaki T, Ro S, Goodman M, et al. A topochemical approach to explain morphineceptin bioactivity. *J Med Chem*, 1993, 36(6): 708~719
13. Shane R, Wilk S, Bondar R J. Modulation of endomorphin-2-induced analgesia by dipeptidyl peptides IV. *Brain Res*, 1999, 815(2): 278~286
14. Peter A, Toth G, Tomboly C, et al. Liquid chromatographic study of the enzymatic degradation of endomorphins, with identification by electrospray ionization mass spectrometry. *J Chromatogr A*, 1999, 846(1-2): 39~48

(2000-06-12 收稿, 2000-09-06 收修改稿)