

2001
2001
2001

药理学进展

苏定冯 缪朝玉 王永铭 主编



人民卫生出版社

药理学进展

(2001)

名誉主编 金正均 张均田 林志彬

主 编 苏定冯 缪朝玉 王永铭

编者 (以姓氏笔划为序)

丁 健	丁 虹	于皆平	王伯瑶	王嘉玺	邓中平	边 琪
冯 云	冯永红	左建平	卢 建	丛文铭	刘皋林	刘兆平
刘卫军	孙 瑜	许晓倩	池志强	苏定冯	沈甫明	邱 瑜
陈杖榴	陈红专	陈安术	陈光椿	吴其夏	吴葆杰	吴绍熙
李小鹰	李晓玉	李 俊	李 新	邵宁生	余应年	杨宝峰
陆国才	林建生	林殷利	金正均	周 瑾	张 川	张 泓
张树辉	赵 一	赵 芹	郭如宁	胡佳乐	唐希灿	陶 霞
徐叔云	袁伯俊	钱蓓丽	黄 宁	蒋建飞	曾 苏	曾 艳
蒙凌华	程远国	彭仁琇	缪朝玉	蔡绍辉	魏 伟	

人 民 卫 生 出 版 社

图书在版编目(CIP)数据

药理学进展.2001/苏定冯 缪朝玉 王永铭主编.一北京:
人民卫生出版社,2001

ISBN 7-117-04646-5

I.药… II.①苏… ②缪… ③王… III.药理学-进展-
文集 IV.R96-53

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2001)第 085344 号

药 理 学 进 展

主 编: 苏定冯 缪朝玉 王永铭

出版发行: 人民卫生出版社(中继线 67616688)

地 址: (100078)北京市丰台区方庄芳群园 3 区 3 号楼

网 址: <http://www.pmph.com>

E - mail: pmph@pmph.com

印 刷: 北京市安泰印刷厂

经 销: 新华书店

开 本: 787×1092 1/16 印张: 19.75

字 数: 459 千字

版 次: 2002年1月第1版 2002年1月第1版第1次印刷

印 数: 00 001—3 000

标准书号: ISBN 7-117-04646-5/R·4647

定 价: 29.00 元

著作权所有,请勿擅自用本书制作各类出版物,违者必究

(凡属质量问题请与本社发行部联系退换)

前 言

《药理学进展(2001)》和前几本书一样,其主要内容以国内的一些学术会议的大会邀请报告为主。有关的主要会议是:第七届全国心血管药理学术大会(2000年8月3~5日,哈尔滨),第七届全国生化药理学术讨论会(2000年9月23~27日,苏州),第七届中国病理生理学术会议(2000年10月12~15日,南京),2000年上海市药理学术会议(2000年11月1日,上海),国家自然科学基金资助医学科研项目成果汇报会(2001年1月10~14日,武汉)等。

国际药理学联合会(IUPHAR)秘书长、下届主席、Journal of Cardiovascular Pharmacology 的主编 Vanhoutte 教授在哈尔滨的第七届全国心血管药理学术大会上作了一个精彩的报告。我们请他将报告内容整理成文,在《药理学进展》上发表,他欣然答应。林建生博士在法国工作近20年,在睡眠生理学和药理学研究中造诣很深,他来上海看到了我们的《药理学进展》,主动提出为本书写稿。上海药物所池志强院士为我们介绍了吗啡受体研究的一些新进展和他本人的工作。这些文章使本书锦上添花。

《药理学进展(2001)》的另一特点是内容丰富。除了经典的药理学,如神经药理学、心血管药理学、生化和化疗药物药理学等方面的文章外,我们还刊登了毒理学的研究进展、新药评价和 GLP、抗真菌药物药理以及兽医药理学的研究进展。此外,生理学和病理生理学的内容在本书也有一定的反映。

最后,我们要感谢人民卫生出版社的同志对本书的大力支持,感谢他们在短时间内的超强度工作,感谢各位作者为本书做出的贡献。

主 编

2001年10月于上海

目 录

静脉壁药理学	Vanhoutte PM(1)
羟甲芬太尼八个立体异构体与 μ 阿片受体的相互作用	池志强(8)
控制大脑皮层激活和觉醒的脑结构及机制——下丘脑后部及 组胺神经元的作用	林建生 林殷利(14)
乙酰胆碱酯酶的不同分子亚型与阿尔采末病	赵芹 唐希灿(28)
胆碱酯酶抑制剂治疗阿尔采末病的回顾与展望	周瑾 唐希灿(37)
谷氨酸的兴奋和氧化神经毒性及其机制的研究进展	邱瑜 陈红专 金正均(52)
免疫反应介导原发性高血压的作用及其机制	张泓 魏伟(58)
糜酶抑制剂研究进展	缪朝玉 边琪 苏定冯(67)
内皮细胞功能紊乱的基因转录及其跨核被膜调控	吴其夏(79)
内皮功能异常与心血管疾病	孙瑜 苏定冯(86)
一氧化氮与心血管疾病	刘皋林(101)
缺血再灌注损伤致远位器官功能障碍及其 防治	胡佳乐 张川 沈甫明(115)
抗心律失常中药存在问题的探讨	杨宝峰(126)
动脉粥样硬化炎性病变与相关药物的发展	吴葆杰 刘兆平(131)
高血压时冠状动脉小动脉及微动脉病变的临床特点	李小鹰(138)
白藜芦醇药理研究新进展	冯永红 李晓玉 左建平(142)
细胞缝隙连接与心血管疾病	陶霞 张树辉 苏定冯(151)
PPAR- γ 研究进展	曾艳 陈光椿 卢建(163)
抗炎免疫药理实验方法学的某些进展	李俊 徐叔云(169)
抗感染药理学的新概念——人类抗菌肽基因	王伯瑶 黄宁 蔡绍辉 冯云(177)
抗真菌药物研究回顾与前瞻	吴绍熙 郭宁如(182)
SELEX 技术在药物筛选中的应用	邵宁生(188)
DNA 拓扑异构酶 II 与以其为靶点的抗癌药物	蒙凌华 丁健(193)
抗肿瘤药物新靶点的研究进展	张树辉 丛文铭(203)
端粒酶及其抑制剂研究进展	刘卫军 蒋建飞 丁健(213)
中医药治癌发展了癌化疗的概念	赵一(229)
抗疟药靶标的研究进展	程远国 王嘉玺(234)
药物代谢酶重建系统在药物研究中的应用	曾苏(244)
药物 II 相代谢反应酶系及其进展	李新 曾苏 余应年(251)

新药评价与 GLP	袁伯俊	陆国才(268)
药物毒理学研究新领域的新进展.....	陈安术	邓中平 钱蓓丽(274)
细胞信号转导与肝细胞损伤.....	丁虹	彭仁琇 于皆平(281)
ACEI 在高血压以外的临床应用	许晓倩	苏定冯(290)
我国兽医药理学研究进展.....		陈杖榴(297)
高血压的治疗:老话题、新概念.....	苏定冯	缪朝玉(305)

静脉壁药理学

Paul M. VANHOUTTE

(Institut de Recherches Internationales Servier, 92415 Courbevoie, France)

要理解静脉疾病的病理生理学,需要先认识到,外周血容量的大部分是贮存在全身的静脉中,并且其中某些静脉在血液循环的控制中起动力学作用。静脉不仅仅是被动的供血液回流心脏的管道系统,而是主动地调节着右心房的灌注压^[1~3]。静脉可以被动和主动地改变其直径,以实现这个调节功能。静脉系统可分成三个部分,它们分别拥有不同的心血管控制(图 1):①内脏血管:这些静脉是真正的容量血管,它们调节血液回流心脏,并根据 Starling 定律控制心搏出量。内脏血管位于人体重心周围,可避免受重力规律的影响,所以因体位变化而引起的流体静力压变化对它们的影响很小。内脏血管受着交感神经和机体自稳反射的高度控制。②导管静脉:骨骼肌及其它组织的深部静脉经常可以被认为是一套被动的管道,它们很少受神经支配,主要由物理力量(如扩张压,肌肉泵)控制。③皮肤静脉:这些静脉在体温调节中起着特殊的生理作用。当机体需要确保其体温调节功能时,这些静脉可避免受到其它各种形式的调控。正是这部分静脉最后可能出现静脉曲张。

本文主要论述静脉扩张性、静脉扩张性异常增加的代偿机制及体温调节过程的作用。它更新了先前的综述^[1~4]。此外,本文试图将静脉病的病理生理学与其对病人生活质量的影响联系起来^[5]。

一、病理生理学

(一)静脉扩张性

静脉壁不同于动脉壁,它具有高度的可扩张性(图 2)。人体在站立时,可在心脏与足之间出现一个很大的流体静力压,此时贮留于下肢静脉的血容量受到静脉壁胶原纤维、静脉瓣及静脉平滑肌收缩作用的限制。相对于管径,静脉壁是比较薄的。静脉壁的胞外基质主要为胶原和弹性纤维,它们由平滑肌和内皮细胞分泌。观察静脉壁酶活性(胶原酶、弹性蛋白酶、透明质酸酶)被抑制后和平滑肌细胞功能被失活后所产生的效应,发现静脉扩张性与非收缩性纤维的机械特性和平滑肌细胞的肌原性均有关(图 3)^[6]。静脉压取决于小动脉扩张程度及静脉流体静力。小动脉扩张时,局部静脉容量扩大;小动脉收缩时,静脉便被动地排空。静脉血压也取决于流体重力,在下肢尤其如此。如果在离体的皮肤静脉中测量流体静力压变化时血容量的变化,则可发现压力的微小变化可引起静脉血容量的巨大变化(图 2)。因此,站立不动可导致数以升计的血液贮留于下肢静脉^[1,2]。

曲张静脉和静脉疾病的主要病变是静脉扩张性过度增大,这是静脉壁结缔组织成分异常所致。在体内和体外均可证实曲张静脉的扩张性强于正常静脉。这些结果外推到具

有这种异常病变的人身上,就意味着与正常人相比较,他们每次站立时将有更多的血液贮留于下肢静脉(特别是在出现静脉曲张病之前)。

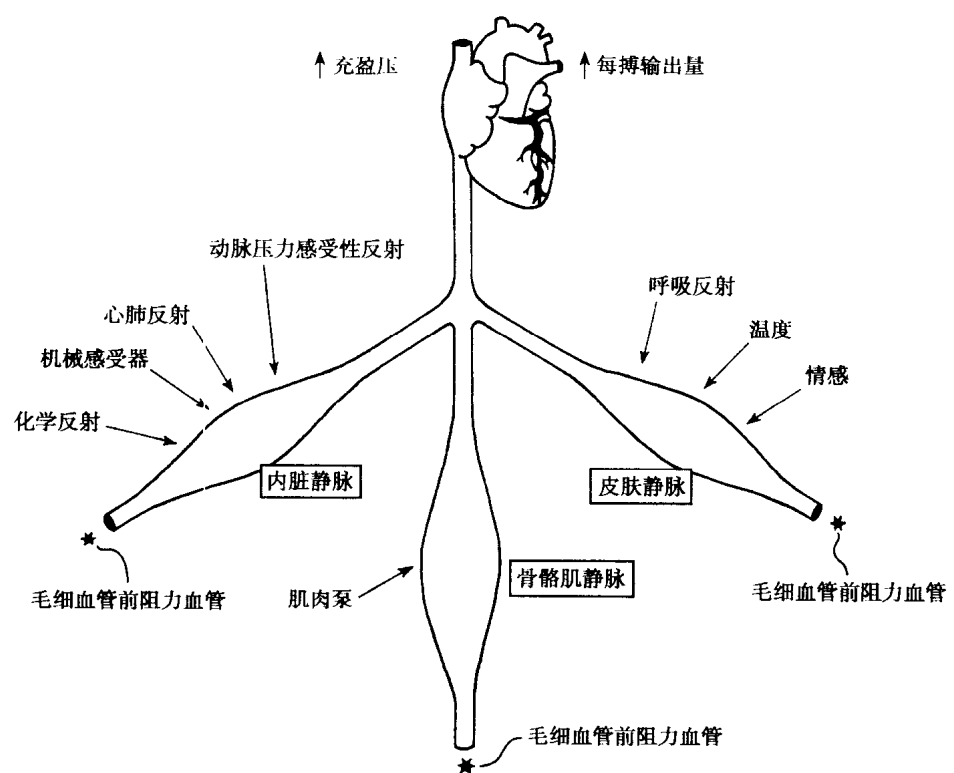


图 1 全身静脉的组成和功能

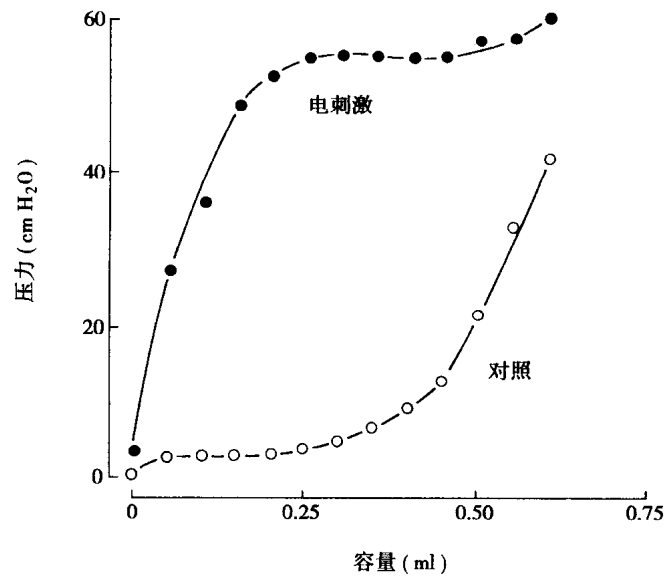


图 2 离体犬皮肤静脉的管壁扩张性

纵坐标为管腔内压,横坐标为生理盐水的灌注量,在静脉壁的胶原成分受到牵张之前,灌注量的明显增加只引起管腔内压的细微变化(○—○)。静脉平滑肌的反应也依赖于静脉壁的扩张程度,图(●—●)为静脉壁处于不同扩张程度时,电刺激(15Hz,10s)支配静脉壁的肾上腺素能神经所引起的管腔内压的变化。

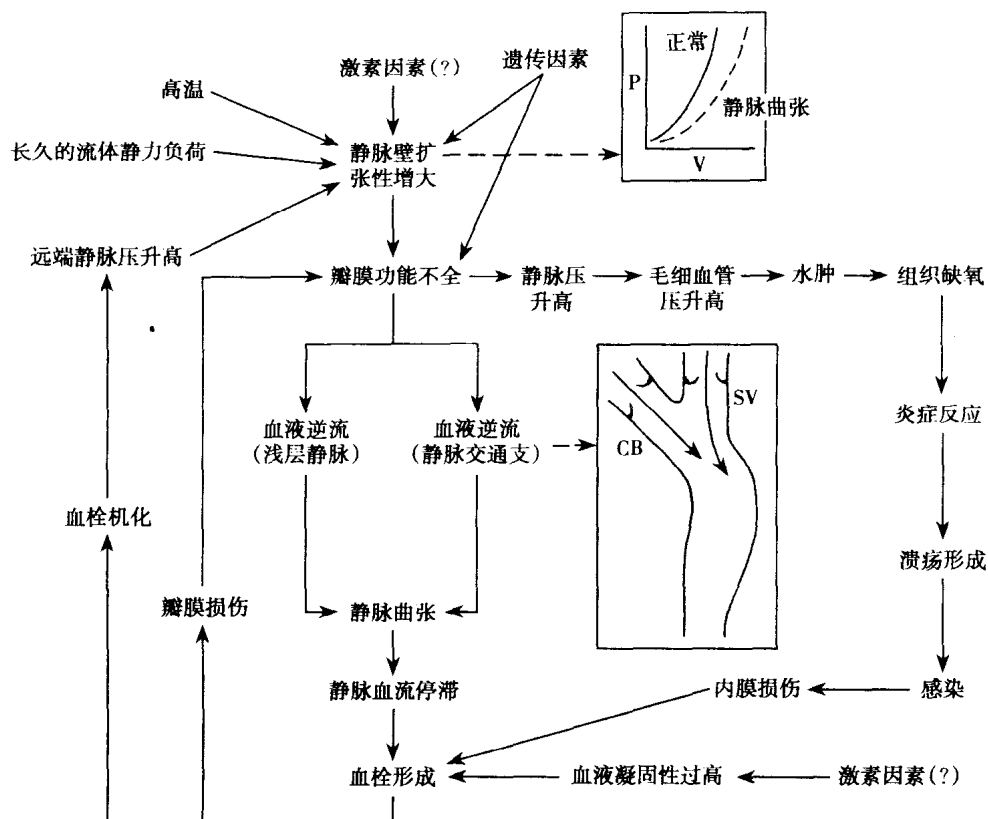


图3 静脉曲张和静脉血栓形成过程

静脉曲张病人的静脉壁扩张性大于正常人,所以流体静力压(P)升高时,曲张的静脉将比正常静脉贮留更大容量(V)的血液(上插入框)。静脉扩张性增大导致浅层静脉(SV)及其与深部静脉之间的交通支(CB)出现瓣膜功能不全(下插入框)。由此产生的血液逆流则促成静脉曲张。

静脉功能不全时,静脉壁扩张性异常不仅影响到下肢静脉,而且也累及前臂静脉。已证实,下肢静脉曲张病人的前臂静脉的扩张性也出现异常增大^[1,2]。这些资料提示,曲张静脉反映了一种全身性的静脉壁病变。静脉功能不全可能与基因改变有关,表现为线粒体DNA中染色体缺失^[7]。有实验观察到来自人曲张静脉的培养平滑肌细胞产生的胞外基质是异常的,这也证实了上面的观点^[8]。此外,在同一病人身上,这种静脉扩张性在各种因素(特别是激素)的影响下可出现变化。其中最重要的激素是雌激素和黄体酮。妊娠期间(先兆子痫除外)^[9]或服用口服避孕药期间^[1]前臂静脉的扩张性出现增大。人隐静脉的血管中层存在黄体酮受体,这提示激素可能直接作用于静脉壁,而雌激素受体水平很低,这提示在曲张静脉中黄体酮受体的合成可能与雌激素无关^[10]。相反,肥胖症和轻度高血压则使静脉扩张性下降,两者效应相当,且具有相加性^[11]。除了激素因素外,其它环境因素也能促成静脉曲张。静脉曲张的发病率差异很大,低至新几内亚妇女中的0.1%,高至瑞士化工厂女工中的68%,这证明了环境因素的重要性,而环境因素包括静态生活(坐着或站立工作)、饮食或有关疾病^[12]。

(二) 静脉瓣

静脉瓣在静脉疾病的发生中起着重要的作用。对于每个个体,其静脉瓣的数目受各自基因的控制,存在个体差异^[12]。静脉瓣的存在使从心脏到足之间的流体静力柱被分隔为许多小段。由于在各个小段中静脉瓣是关闭的,所以其流体静力压可保持在可承受的范围内。一般情况下,如果静脉瓣都是关闭的,则静脉系统的远端就不会出现过度扩张。但这只是暂时的,由于静脉壁的可扩张性是如此之大,它进行性地发生流体静力压升高,尤其处于站立体位时,如此一来,腿深部静脉的近端静脉瓣便开始出现功能不全。无论一个人是否患有静脉曲张,这种生理反应都会出现,其结果是作用于下一个静脉瓣上的流体静力柱变得更加重要。渐渐地,腿部从上到下整个静脉系统便都开放了。如果静脉壁可扩张性太大,以及由此产生的静脉交通支功能不全,临床问题便接着发生。最终,浅层静脉和静脉交通支的血液逆流导致扭曲型的静脉曲张(图3)^[1,2]。

(三)对抗静脉扩张性

血液过多滞留于下肢静脉时,主要有两条代偿途径:骨骼肌形成的肌肉泵和静脉壁平滑肌的收缩。①肌肉泵:肌肉收缩产生的挤压作用排空深部静脉,接着,促使血液由浅层进入深部静脉。因此,站立时多走动可防止血液滞留于下肢静脉。流行病学研究发现,静脉疾病常见于那些需要过长时间站立的人群^[13]。②静脉平滑肌收缩:静脉过度扩张的一个重要代偿途径是使静脉壁硬化。改变静脉壁结缔组织成分是比较困难的,不过有可能缓慢地达到。静脉曲张病人隐静脉环形肌层的肌肉细胞间出现结缔组织积聚^[14],但尚不知道这种效应是如何影响静脉壁的基础扩张性的。

静脉壁平滑肌细胞的收缩可对抗过大的扩张压(图2)。皮肤静脉壁中的平滑肌数量多于隐静脉,静脉平滑肌收缩是由胞浆钙浓度升高促发的。隐静脉平滑肌中钙浓度升高主要来源于 Ca^{2+} 经电压及受体门控性通道内流。而在皮肤静脉平滑肌中, Ca^{2+} 则主要来源于细胞浆内钙库释放。在四肢静脉中, α -肾上腺素受体激动是促发细胞钙动员的一条主要途径^[4,15]。这反映了一个事实:皮肤静脉主要由交感神经系统控制。确实,皮肤静脉和隐静脉与导管静脉及四肢深部静脉相比较,具有更多的神经分布。支配静脉的神经释放去甲肾上腺素(NA),NA通过激动 α -肾上腺素受体促发平滑肌细胞的收缩。刺激神经时,皮肤静脉突触后膜上 α_2 -肾上腺素受体优先被激动。因此,刺激交感神经是對抗静脉扩张压升高的一个很有效的途径(图2),并且只要交感神经仍然控制着皮肤静脉,就能确保产生代偿作用,即使是在静止站立时^[16,17]。

(四)体温调节

皮肤静脉对交感神经冲动的收缩反应部分取决于静脉平滑肌所处的局部环境。局部温度可明显地影响平滑肌的反应^[1,2]。

静脉直径不仅受下丘脑(通过调节支配皮肤静脉的交感传出)控制,而且受到局部温度的调控。血管平滑肌突触后膜上的 α_2 -肾上腺素受体对温度高度敏感,局部温度升高,受体的反应性下降(图4)。从而导致交感神经对局部静脉的调节失控,这可能是促发静脉曲张的关键所在^[18]。

(五)从静脉曲张到溃疡

一位女性,先天静脉壁薄弱,站立工作,身处热环境,这些因素都可以影响局部静脉血流动力学。长此以往,这些因素的综合作用最后就发生静脉曲张和浅层静脉弯曲(图3)。流体静力负荷升高造成局部静脉充血和毛细血管流体静力压升高,而这些结果又促进液

体渗出到组织中和减少淋巴回流。局部产生的自身活性物质引起的小静脉和静脉收缩可促进液体渗出,并造成局部水肿^[2,19]。在与皮炎有关的慢性静脉功能不全中,血管和淋巴管及周围结缔组织的结构变化使液体交换能力下降^[20]。在静脉血流停滞时,白细胞流变学发生改变,表现为总白细胞数量减少和各种白细胞的滤过率升高(在体外表现为毛细血管堵塞)^[21]。在这个阶段,组织出现进行性的缺氧,并易于感染。静脉壁的慢性变形构成了炎症反应的病理生理学基础,而炎症反应将发展为组织缺血、坏死及溃疡形成(图3)。20%~50%的腿部静脉溃疡与深部静脉的瓣功能不全有关^[22]。

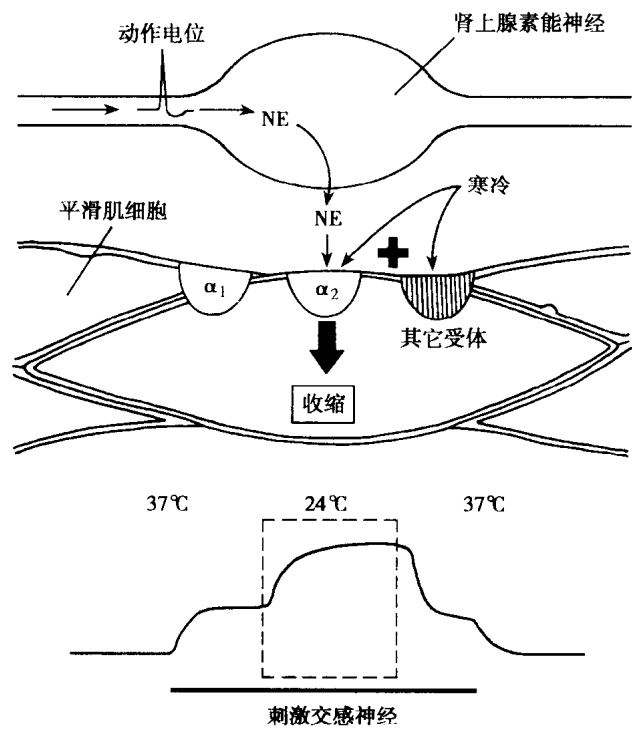


图4 温度对犬皮肤静脉中肾上腺素能神经效应器的影响
 α = 突触后膜 α -肾上腺素受体; NE = 去甲肾上腺素

二、生活质量

慢性静脉疾病的分类和分级主要根据临床体征、病因学、解剖学和病理生理学^[23]。对生活质量的评价可以证明在发达国家中,静脉功能不全对一大部分成年人有着重要的影响^[24]。确实,已观察到静脉功能不全病人表现出一定程度的生活质量问题^[25]。这使得我们可以研究病理生理学变化及临床症状与患者的生活质量之间的关系(表1)。

据报道静脉疾病在妇女中发病率较高^[26]。而且,曲张静脉的流行病学研究^[12,26~28]和相关危险因素的评价^[12,13,29]也表明,在发达国家中,静脉疾病在妇女中比较盛行。由于静脉瓣功能不全带来一个现实的美容问题,这将影响其生活质量(表1),所以,对于女性患者,在检查其它病理生理学变化(毛细血管压升高或局部缺血)之前,一般会先观察静脉曲张的情况。鉴于女性激素对静脉扩张性的影响,口服避孕药可能对有静脉功能不全

倾向的妇女的生活质量有重要的影响,故而她们最好不用这种避孕手段。局部温度升高使交感神经对血管平滑肌的调节失控可影响到病人的生活质量,提示这种病人将难以从事可导致腿部温度升高的工作,此外,这种病人也应该避开阳光及其它热源。就生活质量而言,水肿可造成衣服挑选困难。组织缺血促发的夜痉挛和疼痛可引起夜不能寐和精神紧张,此外,这些病人必须避免站立时间过长,于是他们会越来越觉得自己像一个“dead weight”,而且感觉行动不便。在工作和生活中,他们的行动受到很大的影响(表 1)。

表 1 静脉功能不全时病理生理学变化、临床症状及生活质量之间可能的联系

病理生理学变化	症状	生活质量	
		功能状态	心理和社会影响
瓣膜功能不全	静脉曲张		影响腿部美观
毛细血管压升高	水肿		衣服挑选困难
组织缺血	夜痉挛	夜不能寐	精神紧张
	疼痛		时时提防,精神紧张
	疼痛	无法长久站立	感觉像个 dead weight
		易于疲劳	行动受限 工作受影响 无法参加公众活动

(本文由谢和辉、缪朝玉翻译)

参 考 文 献

1. Shepherd JT, Vanhoutte PM. "Veins and their control". W. B. Sanders, Philadelphia, 1975. pp. 1-269
2. Shepherd JT, Vanhoutte PM. "The human Cardiovascular System, Facts and Concepts". English Edition: Raven Press, New York, 1979. pp. 1-351
3. Vanhoutte PM. The role of systemic veins; an update. Phlebology, 1988, 3: 13-25
4. Vanhoutte PM. Control of venous function. Int Angiol, 1984, 3: 40-46
5. Vanhoutte PM, Corcaud S, De Montrion C. Venous Disease: From pathophysiology to quality of life. Angiology, 1997, 48: 559-567
6. Kitoh T, Kawai Y, Ohhashi T. Effects of collagenase, elastase, and hyaluronidase on mechanical properties of isolated dog jugular veins. Am J Physiol, 1993, 264: H273-H280
7. Taheri SA, Weaver TA, Schultz RO. Genetic alterations in chronic venous insufficiency. Int angiol, 1993, 12: 1-4
8. Sansilvestri-Morel P, Nonotte I, Fournet-Bourguignon MP, Rupin JN, Fabiani JN, Verbeuren T, Vanhoutte PM. Abnormal deposition of extracellular matrix proteins by cultured smooth muscle cells from human varicose veins. J Vasc Res, 1998, 35: 115-123
9. Sakai K, Imaizumi T, Maeda H, Nagata H, Tsukimori K, Takeshita A, Nakano H. Venous distensibility during pregnancy: comparisons between normal pregnancy and preeclampsia. Hypertension, 1994, 24: 461-466
10. Perrot-Applanat M, Cohen-Solal K, Milgrom E, Finet M. Progesterone receptors expression in human saphenous veins. circulation, 1995, 92: 2975-2983

11. Stepniatowski K, Egan BW. Additive effects of obesity and hypertension to limit venous volume. *Am J Physiol*, 1995, 268
12. Evans CJ, Fowkes FGR, Hajivassiliou CA, Harper DR, Ruckley CV. Epidemiology of varicose veins. A review. *Int Angiol*, 1994, 13: 263-270
13. Allaert FA, Levardon M, Vin F. Influence de l'obésité sur la maladie veineuse. Etude des facteurs concomitants. *Phlebologie*, 1991, 44: 271-280
14. Porto LC, da Silveira PRM, de Carvalho JJ, Panico MDB. Connective tissue accumulation in the muscle layer in normal and varicose saphenous veins. *Angiology*, 1995, 46: 243-249
15. Rimele TJ, Vanhoutte PM. Differential effects of calcium entry blockers on vascular smooth muscle. *Int Angiol*, 1984, 3: 17-23
16. De Mey J, Vanhoutte PM. Uneven distribution of postjunctional alpha1 and alpha2-like adrenoceptors in canine arterial and venous smooth muscle. *Circ Res*, 1981, 48: 875-884
17. Flavahan NA, Rimele TJ, Cooke JP, Vanhoutte PM. Characterization of postjunctional alpha1- and alpha2- adrenoceptors activated by exogenous or nerve-released norepinephrine in the canine saphenous vein. *J Pharmacol Exp Ther*, 1984, 230: 699-705
18. Vanhoutte PM, Flavahan NA. Effects of temperature on alpha-adrenoceptors in limb veins. Role of receptor reserve. *Fed Proc*, 1986, 45: 2347-2354
19. Docherty JR, Hyland L. An examination of 5-hydroxytryptamine receptors in human saphenous vein. *Br J Pharmacol*, 1986, 89: 77-81
20. Scelsi R, Scelsi L, Cortinovis R, Poggi P. Morphological changes of dermal blood and lymphatic vessels in chronic venous insufficiency of the leg. *Int Angiol*, 1994, 13: 308-311
21. Ciuffetti G, Mannarino E, Paltriccia R, Malagigi V, Sergi F, Paulisch P, Pasqualini L, Lupattelli G. Leucocyte activity in chronic venous insufficiency. *Int Angiol*, 1994, 13: 312-316
22. Scurr JH, Coleridge-Smith PD. The microcirculation in venous disease. *Angiology*, 1994, 45: 537-541
23. Beebe HG, Bergan JJ, Bergqvist D, et al. Classification and grading of chronic venous disease in the lower limbs. *Int Angiol*, 1995
24. Wilson IB, Cleary PD. Linking clinical variables with health-related quality of life. A conceptual model of patient outcomes. *JAMA*, 1995, 273: 59-65
25. Launois R. At the crossroads of venous insufficiency and hemorrhoidal disease; Daflon 500mg-repercussions of venous insufficiency on everyday life. *Angiology*, 1994, 45: 495-504
26. Coon WW, Willis PW, Keller JB. Venous thromboembolism and other venous disease in the Tecumseh community health study. *Circulation*, 1973, 48: 839-846
27. Baker SR, Stacey AG, Jopp-Mckay, et al. Epidemiology of chronic venous ulcers. *Br J Surg*, 1991, 78: 864-867
28. Beaglehole R. Epidemiology of varicose veins. *World J Surg*, 1986, 10: 898-902
29. Hirai M, Naiki K, Nakayama R. Prevalence and risk factors of varicose veins in Japanese women. *Angiology*, 1990, 41: 228-232

羟甲芬太尼八个立体异构体与 μ 阿片受体的相互作用

池志强

(中国科学院上海药物研究所 上海 200031)

自 90 年代初期阿片受体 μ 、 δ 、 κ 三种类型克隆成功以来,对阿片受体的结构功能研究一直是神经生物学、神经药理学研究的一个热点。高选择性阿片受体各类型配体的研究是阿片受体结构功能研究的一个重要领域。因为,一个高选择性阿片受体各类型配体(包括激动剂、拮抗剂)是研究结构功能的必要工具。我们实验室多年来在强效镇痛剂研究的基础上,自行设计合成了大批芬太尼类似物,从中发现了羟甲芬太尼(Ohmefentanyl, OMF, *cis*-N-[1-(2-hydroxyphenylethyl)3-methyl-4-piperidyl]-N-phenylpropionamide)(见图 1)是一个镇痛作用极强的化合物,其镇痛作用强度是吗啡的 6000 ~ 10000 倍。即其镇痛作用 ED_{50} 是吗啡的 $1/6000 \sim 1/10000$ 。系统研究 OMF 作用机制,证明羟甲芬太尼是一个高选择性高亲和力 μ 阿片受体的激动剂。其与 μ 阿片受体结合的 K_d 值为 0.32nmol/L , $B_{\max}$ 为 $19.93\text{pmol/g protein}$ 。其与以 δ 受体典型激动剂 DPDPE 竞争与 δ 受体结合亲和力 K_i 值,与以 μ 受体典型激动剂 DAGO 竞争 μ 受体结合的 K_i 值之比 $K_i(\delta)$ (DPDPE)/ $K_i(\mu)$ (DAGO) 在小鼠为 363,在大鼠则为 481。说明为一高选择性 μ 受体的配体。对羟甲芬太尼与受体结合特性研究,采用竞争抑制与 $[^3\text{H}]$ naloxone 的受体结合 IC_{50} 值与加入 Na^+ 或 GTP 后 IC_{50} 值的比较,可以判断是一激动剂或为拮抗剂,如加入 Na^+ 前后反应比及加入 GTP 前后的反应比均大于 1,则为激动剂。在羟甲芬太尼的 Na^+ 反应比为 23.3, GTP 反应比为 16.3,均大于 1。故说明羟甲芬太尼是一个激动剂。在离体器官生物检定研究也证明羟甲芬太尼是一个 μ 受体选择性激动剂。另采用 $[^3\text{H}]$ OMF 在脑切片体外受体结合辐射自显术的研究,发现在脑内分布特征与典型 μ 受体激动剂吗啡、DAGO 相一致。以上工作结论得到美国斯坦福大学 Goldstein 教授实验室的重复确证。在 1991 年度获国家自然科学奖二等奖。自从 1992 年美国 Evans 等首次克隆 δ 受体成功,相继于 1993 年对 μ 受体及 κ 受体也克隆成功。阿片受体结构功能研究又进入一个新的高度。在此基础上我们对羟甲芬太尼的研究也有了进一步新的深入探索。

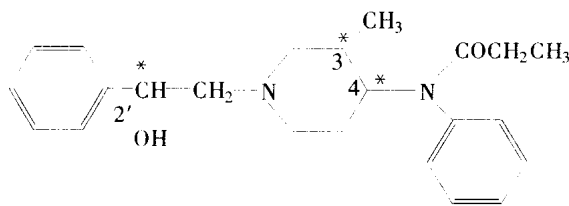


图 1 羟甲芬太尼的化学结构(*代表不对称碳原子)

(一) 羟甲芬太尼八个立体异构体与阿片受体结合选择性及其镇痛活性的比较

羟甲芬太尼在分子结构中具有三个手性中心, 存在 8 个立体异构体。比较这 8 个立体异构体的镇痛活性及与 μ 受体亲和力的差别对研究 μ 受体的结构功能及对羟甲芬太尼的作用机制均有十分重要的意义。我们实验室朱友成教授、王智贤博士定向合成了羟甲芬太尼的八个立体异构体; 金文桥教授、周德和教授研究了这八个异构体的镇痛活性及对 μ 受体结合的亲和力差别。结果如表 1 及表 2:

表 1 Analgesic ip ED₅₀ of 8 enantiomers of ohmefentanyl (mouse hot plate)

Compounds	Absolute configuration	Analgesic ED ₅₀ * /mg·kg ⁻¹	Analgesic potency
F9204	(+)-cis-(3R,4S,2'S)	0.0011(0.0008 ~ 0.0013)	6182
F9202	(-)-cis-(3R,4S,2'R)	0.0046(0.0031 ~ 0.0066)	1478
F9208	(-)-trans-(3R,4R,2'S)	0.0097(0.006 ~ 0.150)	701
F9205	(+)-trans-(3S,4S,2'S)	0.014(0.011 ~ 0.017)	486
F9206	(-)-trans-(3R,4R,2'R)	0.072(0.057 ~ 0.091)	94
F9207	(+)-trans-(3S,4S,2'R)	0.075(0.064 ~ 0.087)	91
F9201	(+)-cis-(3S,4R,2'S)	10(4/10)	
F9203	(-)-cis-(3S,4R,2'R)	> 10(0 ~ 10)	
Morphine		6.8(5.5 ~ 8.4)	1

* (95% confidence limits or the number of effective mice)

表 2 Ki value(nmol·L⁻¹) and selectivity of ohmefentanyl enantiomers for opioid receptors.

n = 3 homogenates (each was pooled from 10mice)

Compound	[³ H]DAGO(μ)	[³ H]DPDPE(δ)	Ki(δ)/Ki(μ)
F9204	0.004 ± 0.002	90 ± 10	22500
F9202	0.005 ± 0.004	114 ± 14	22800
F9208	0.06 ± 0.03	200 ± 13	3333
F9205	0.08 ± 0.07	> 1000	> 12500
F9206	0.13 ± 0.02	150 ± 10	1153
F9207	0.05 ± 0.05	230 ± 16	1533
F9201	2.9 ± 0.4	> 10000	> 3448
F9203	5.58 ± 0.21	> 10000	> 1710

从上表可见, 其中 F9204((+)-cis-(3R,4S,2'S)OMF)的镇痛 IC₅₀为 1.1 μ g/kg(小鼠热板法), 其与 μ 受体亲和力 Ki(μ)(³H-DAGO)为 0.004, 而对 δ 受体亲和力 Ki(δ)(³H-DPDPE)为 90, Ki(δ)/Ki(μ)比值为 22500 倍; 另一异构体 F9202((-)-cis-(3R,4S,2'R)OMF)其镇痛 IC₅₀为 4.6 μ g/kg, 其与 μ 受体亲和力 Ki 为 0.005, 而与 δ 受体亲和力 Ki 为 114, Ki(δ)/Ki(μ)之比为 22800 倍。而 F9201, F9203 构型也是顺式异构体, 但其镇痛效

价极低,与 μ 受体亲和力选择性 $K_i(\delta)/K_i(\mu)$ 比值为 > 3448 , > 1700 ,亲和力也极低,说明立体结构的差异对其生物活性及对 μ 受体亲和力关系极大。

美国 NIDA Rothman 实验室的徐珩博士等也验证了我们的结果。这 F9204, F9202 对 μ 受体高选择性是当前国际上 μ 受体选择性最高的配体之一。

我们实验室金文桥教授还比较了八个异构体在离体器官生物检定上的作用,证明 F9204 对豚鼠回肠标本(代表 μ 受体)抑制电场引起收缩的 IC_{50} 为 0.08nmol/L ,而对 δ 受体为主的小鼠输精管标本及代表 κ 受体的家兔输精管标本则作用很低,也证明是对 μ 受体有高亲和力和选择性。对 F9202 的结果也说明 μ 受体有高选择性。结果与受体结合试验的结论一致。

(二) μ 受体三维结构的计算机模拟及与 OMF 结合位点的对接研究

研究受体与配体结合的机制,对受体蛋白三维结构阐明十分重要。由于阿片受体是一个 G 蛋白偶联受体,有七次跨膜区域的膜蛋白,要采用 X-衍射技术分析 μ 受体的三维结构十分困难,迄今世界上尚未有 GPCR 三维结构成功阐明的报道。自 90 年代以来,对一些 GPCR 的三维结构采用计算机模拟的办法提出三维结构模型,已有不少报道,但对阿片受体的三维结构尚未有计算模拟构建模型的报道。我们与我所陈凯先教授实验室唐贇博士合作对 μ 受体三维结构模型进行了计算机模拟。以细菌 Rhodopsin 三维结构为模板,以 μ 受体蛋白已阐明一级结构为基础,以 OMF8 个异构体生物活性及对 μ 受体的高选择性高亲和力的实验结果为依据。在 Silicon Graphics IRIS Indigo XZ4000 工作站上,采用 SYBYL V6.1 软件包,对 μ 受体三维结构进行了计算机模拟建立模型。首次获得 μ 受体的三维结构模型,已在 1996 年发表。

对 8 个 OMF 异构体中镇痛活性最强,对 μ 受体亲和力最高的 F-9204 与已建模型进行对接。认为其可能结合位点为 TM-3 上的 Asp147, TM-7 上的 His319,前者可能是 OMF 在吡啶环上的 N_1 原子与 Asp147 的羧基通过强的静电 H 键结合。另 O_{16} 原子插入 TM7 His319 上的 imidazol 平面,形成在羧基上 electrostatic H 键相互作用。另 Trp318 与一个 phenyl 环插入 2-aryl 环平面及 His319 形成 π - π 键相互结合。另一 phenyl 环也可与 Tyr148 形成 π - π 键结合。这些静电, H 键, π - π 键结合使 OMF 与 μ 受体有高亲和力的结合,而产生强镇痛作用(见图 2)。

以上获得的结果还必须进一步用实验来判定,我们实验室与美国 NIDA Rothman 实验室徐珩博士合作进行了研究。采用点突变的分子生物学方法来确定究竟哪些结合位点起作用。对 TM-3 Tyr148, TM-7 Trp318 及 TM-7 His319 分别将 phenylalanine 或 alanine 取代。在 Cos-7 细胞上瞬时表达这些突变体,比较这些突变体与 OMF 及其他阿片类结合的亲和力与野生型比较有何变化,结果表明点突变 Tyr148 为 phenylalanine 取代时,其与 OMF 类结合亲和力下降 2~7 倍,而对 DAGO, naloxone 却未有改变。对非选择性配体 etorphine 及 buprenorphine 亦无影响。相反对 DADLenk, IOXY 及 dermorphin 反而增强亲和力。Trp318 点突变对亲和力无大改变,而对 His319 取代以 alanine 则显著下降,其结合亲和力达 1.3 到 48 倍。但对 naloxone 及 bremazocine 亲和力不改变。这些结果说明 Tyr148 及 His319 对芬太尼类化合物对 μ 受体亲和力有重要意义。

(三)人阿片 μ 受体在 sf9 昆虫细胞的高表达研究

由于上述计算机模拟 μ 受体模型的建立及与 OMF 对接的研究,分析其结合位点,分

析认为几个结合位点的重要意义。但是彻底阐明与配体相互作用的机制,只有对 μ 受体蛋白的三维结构真正得到阐明才能解决。由于阿片受体在脑组织中含量极低,要获得足够的受体蛋白量,供制作晶体,进行 X-衍射结构分析十分困难。因此,必须解决获得足够受体蛋白这一限制因素,寻找高效表达系统是一个可以探索的途径。Baculovirus 系统在昆虫细胞 sf-9 的转染 μ 受体是一个值得采用的高效表达系统。我们对人 μ 受体在 baculovirus 系统探索了高表达的研究。结果获得了较好的表达,对 [^3H]-diprenorphine 在转染 sf-9 细胞上 μ 受体结合 $B_{\max}$ 可达 $9.1 \pm 0.7 \text{ nmol/g protein}$, 对 [^3H]-OMF 结合的 $B_{\max}$ 可达 $6.5 \pm 0.23 \text{ nmol/g protein}$, 比一般脑膜制备的 μ 受体结合 $B_{\max}$ 要高 2 个数量级以上。这种受体结合可被 DAGO, OMF 及吗啡等 μ 激动剂高效抑制。而 δ 激动剂 DPDPE 或 κ 激动剂 U50488 则不能抑制,说明这一表达系统是成功的。而对 Na^+ 100 nmol/L 及 GTP $50 \mu\text{mol/L}$ 可以下降 μ 激动剂 OMF 及 etorphine 结合亲和力。DAGO 及 OMF 在这表达系统可以抑制由 Forskolin 刺激 cAMP 积蓄,这些作用均可被拮抗剂 naloxone 对抗。这些结果证明在这一表达系统的 μ 受体仍保留与天然 μ 受体相同的特性。这一研究观察到 OMF, DAGO 可以有有效的刺激 [^3S]GTP γS 结合, EC_{50} 分别为 2.7 nmol/L 及 6.9 nmol/L 。同时,对 forskolin 刺激 cAMP 升高可有抑制作用,其 IC_{50} 分别为 0.9 nmol/L 及 0.3 nmol/L 。而预先对细胞加入 PTX 也可以阻断这些作用。这些结果还提示在人 μ 受体 sf-9 昆虫细胞表达系统可以与内源性 Gi/o 蛋白功能性结合。这一结果说明在此系统内存在内源性 Gi/o 蛋白,这与 Massotte 等曾报道必须加入外源性 G 蛋白才发挥作用结果不同,这也是一个新的发现。

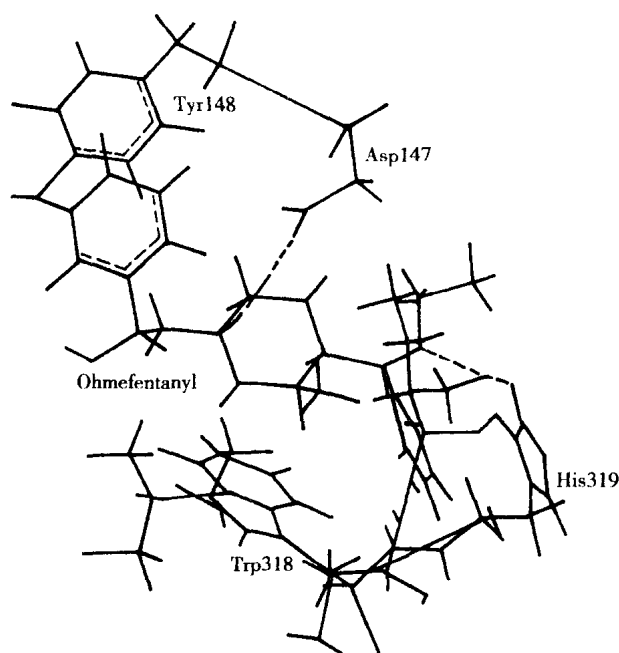


图2 A detailed view of the protonated form of ohmefentanyl with the proposed binding sites of the opioid receptor. Reproduced from Tang et al. (1996) with permission of the publisher.