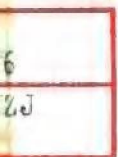


药理学进展

(1997)

金正均 王永铭 苏定冯 主 编

人民卫生出版社



药理学进展

(1997)

主 编

金正均 王永铭 苏定冯

作 者

(以姓氏笔划为序)

马仲才	王永铭	王勇为	王大猷	王革新
王兴旺	池志强	朱兴族	苏定冯	李晓玉
李 端	陈 红	吴 桐	金正均	金国章
金昔陆	周美华	胥 彬	胡国渊	钱蓓丽
殷 明	顾芝萍	顾性初	徐 翔	戚蓓茵
屠曾宏	曹 霖	楚正绪	褚云鸿	楼丽广
谭建权	潘家祐	魏文树		

江苏工业学院图书馆
藏书章

人民卫生出版社

图书在版编目 (CIP) 数据

药理学进展: 1997/金正均等主编. —北京: 人民卫生出版社, 1997

ISBN 7-117-02632-4

I. 药… I. 金… II. 药理学-进展 IV. R96

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (97) 第 01454 号

药理学进展

(1997)

金正均 王永铭 苏定冯 主编

人民卫生出版社出版发行

(100050 北京市崇文区天坛西里 10 号)

三河市宏达印刷厂印刷

新华书店经销

787×1092 16 开本 15 $\frac{1}{2}$ 印张 362 千字

1997 年 5 月第 1 版 1997 年 5 月第 1 版第 1 次印刷

印数: 00 001—4 000

ISBN 7-117-02632-4/R·2633 定价: 19.00 元

(凡属质量问题请与本社发行部联系退换)

前 言

值此开放改革之际，我们学会一直有一个心愿：想在介绍新知识方面作些贡献。本书就是在理事长王永铭教授以及各位副理事长、秘书长领导下，诸多同道努力的结果。

在编写过程中，我们首先感到近代科学之发达，进展之神速，决非一个人所能包揽一切。药理与毒理也不例外。不少篇幅均涉及分子生物学技术。中枢神经、心血管、免疫、抗癌仍是注意的中心。从微观世界来说，DNA 构成，氨基酸序列，已不少见；受体克隆化也成为机制研究的目标。

与以往比较，宏观方面的文章有了一些；申请新药的毒理要求的会议介绍，不良反应监测，药物流行病学，也有了介绍。

本书所以能成为现实，这是学会发挥了群策群力的作用，让各位专家各自写自己最熟悉的方面，并不企图包罗一切。

这是一本极有趣的书。我本人在念原稿时有念金庸小说的感觉，因为这是一本充满未来，充满幻想，而由幻想变成现实的“学科专著”。

当然也有不足之处，文献不太新，不够全面，启发还不够，例如基因疗法究竟目下如何，本书中找不到答案。不过书名既定为进展，也就不一定要下一个猜测性推论。现在的科学相互渗透，单独药理似乎有些不够丰颖，希望再版时能更多地吸收世界各国先进学科的经验。

但愿本书能对我国广大药理工作者在增进知识方面有所贡献，欢迎全国同道批评指正。

上海药理毒理学会 名誉理事长 金正均

于上海二医大

目 录

阿片受体研究新进展	金昔陆 池志强	1
左旋千金藤碱对 DA 受体的双重作用机制		
..... 金国章 陈丽娟 董兆君 邹灵龙		9
一氧化氮在中枢神经系统中作用的研究进展	朱兴族	19
突触传递长时程增强效应 (LTP) 的分子机制	胡国渊	30
可乐宁与咪唑啉受体	苏定冯	41
心肌细胞钾通道药理学	王革新	49
缺血预适应研究进展	戚蓓茵	59
γ -氨基丁酸对心血管功能的调节及药物的影响	殷 明	65
慢性心力衰竭时的神经体液异常及其药理学意义		
..... 陈红 楚正绪 苏定冯		73
前药转换酶基因联合化学药物靶向治疗肿瘤	胥彬 王兴旺	82
信息药物与肿瘤的基因治疗	王兴旺 胥彬	90
细胞信号转导与抗癌药物研究	马仲才 胥彬	96
甾体激素作用的分子机制	楼丽广 胥彬	114
药物不良反应监察研究进展	王大猷 王永铭	128
免疫细胞上的阿片受体	吴桐 李晓玉	140
中枢神经系统的免疫反应	李晓玉	148
小分子肝素的药效学与药动学	李端 徐翔	153
兴奋性氨基酸递质拮抗剂: 从基础研究到临床应用的发展		
..... 潘家祐 李端		163
药物动力学种系间的比例扩大	王勇为	176
体外试验在药物毒性评价中的意义	屠曾宏	188
酶、受体筛选新药的进展	顾性初	200
排卵后生育调节研究进展	周美华 褚云鸿 曹霖 顾芝萍	205
云芝多糖药理研究现状	魏文树 谭建权	217
经国际协调的新药临床前研究指导原则	钱蓓丽	226

阿片受体研究新进展

金昔陆* 周德和 池志强

(中国科学院上海药物研究所 上海 200031)

摘要 1992 年以来,应用表达克隆方法分别从小鼠、大鼠、豚鼠、人脑中成功地克隆出了 μ 、 δ 、 κ 阿片受体,均为 G 蛋白偶联的受体,存在七次跨膜结构。大鼠 μ 受体为 398 个氨基酸,人脑皮层中 μ 受体为 402 个氨基酸;小鼠、大鼠、人脑中 δ 受体均为 372 个氨基酸;小鼠、大鼠、豚鼠、人脑中 κ 受体均为 380 个氨基酸;研究了 μ 、 δ 、 κ 受体 mRNAs 在脑中的分布和其基因结构。应用基因定点突变、构建嵌合受体等方法,研究其对阿片受体功能的影响,提示阿片受体上存在着激动剂和拮抗剂、肽类和非肽类选择性配体的不同的结合区域,使阿片受体结构和功能的研究进一步深化。应用反义技术研究阿片受体参与生理功能中的作用。

关键词 阿片受体;阿片受体基因;孤儿受体

阿片 (Opium) 是一个历史悠久、疗效卓著的镇痛药,从中提取出其主要有效成分吗啡。人们在长期为克服吗啡的成瘾性而进行大量化学结构改造的研究中认识到,吗啡类药物可能通过体内受体起作用。1973 年证实脑内有阿片受体存在,以及解决了阿片受体的活性测定方法,掀起了研究阿片受体的热潮。已证明在脑内至少存在着 μ 、 κ 、 δ 三种阿片受体,属于 G 蛋白偶联受体;并且认为每种阿片受体仍具有多个亚型^[1]。1992 年以来已成功地克隆出了 μ 、 δ 、 κ 阿片受体,并通过基因定点突变、构建嵌合受体等方法对阿片受体结构和功能的研究取得了新的进展。本文拟主要就这些方面的研究进行综述。

一、阿片受体的克隆 (分子生物学)

对药物与受体相互作用本质的真正了解仍有待于受体的分离纯化。于是分离纯化阿片受体是神经生物学中极为引人注目的研究课题。大量工作表明由于脑内阿片受体含量甚微,阿片受体的纯化极为困难。应用亲和层析、SDS 聚丙烯凝胶电泳等蛋白纯化方法得到了纯化的阿片受体蛋白,但由于量太少尚不能搞清其氨基酸序列和蛋白质立体结构。日新月异的现代分子生物学为阐明阿片受体结构提供了方法。

(一) δ 阿片受体的克隆

1992 年,谢国玺、Goldstein 等从人胎盘中克隆出可能是阿片受体的蛋白,属于 G 蛋白偶联受体,但是对三种阿片受体配体的亲和力及选择性都不很高。同年,美国 Evans 和

* 金昔陆:上海医科大学药学院药理教研室,上海 200032

法国 Kieffer 等^[2,3]分别应用表达克隆方法首先从 NG108-15 细胞株中克隆出了 δ 阿片受体, 其由 372 个氨基酸 (Evans) 和 371 个氨基酸组成 (Kieffer; 93 年 Kieffer 报道纠正亦为 372 个氨基酸)。此后 Yasuda 等^[4]从小鼠脑 cDNA 文库中分离克隆出的 δ 受体亦为 372 个氨基酸, 与从 NG108-15 细胞株中克隆出的完全相同。克隆出的 δ 阿片受体对 δ 受体选择性激动剂 DPDPE、DSLET 及拮抗剂 naltrindole 有高亲和力, 对脑啡肽也有很高亲和力; 而对 μ 、 κ 受体选择性激动剂及拮抗剂则亲和力低; 属于 G 蛋白偶联受体, 激动剂能抑制 cAMP 形成。Fukuda 等^[5]也报道从大鼠脑中克隆出的 δ 受体由 372 个氨基酸组成, 与小鼠 δ 受体有 97% 的相同。在 NG108-15 细胞、小鼠、大鼠脑中有 1.4~9 kb 的多种 δ 受体 mRNA。用 RNA 印迹 (blotting) 法在小鼠肝中、大鼠小脑中未检测到 δ 受体 mRNA; 在大鼠大脑、脑干均存在 δ 受体 mRNA^[5,6]。Knapp、Simonin 等^[7,8]报道克隆表达出人的 δ 受体, 也为 372 个氨基酸, 与小鼠和大鼠 δ 受体氨基酸序列有 93% 的相同; 并认为此为 δ_2 亚型。人 δ 受体 mRNA 分布于皮层、嗅球、海马、杏仁核、基底神经节和下丘脑。Southern 印迹法分析得编码 δ 受体的基因分别定位在小鼠染色体的 4D 带和人染色体 1p34, 3~1p36, 1 带间; 在小鼠和人 δ 受体基因编码区域中含 2 个内含子^[8,9]。此外, 我所周德和等在中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞上表达出 δ 阿片受体, 其对 DPDPE、DSLET、Etorphine、纳洛酮有高亲和力, 而对 μ 受体选择性激动剂羟甲芬太尼、DAMGO 和 κ 受体选择性激动剂 U50488H, 以及吗啡亲和力很低。

(二) κ 阿片受体的克隆

在 Evans 和 Kieffer 等工作基础上, 以已知的 δ 受体 cDNA 为线索, 分别克隆出了 κ 、 μ 受体。Yasuda 等^[4]报道从小鼠脑 cDNA 文库中克隆出的 κ 受体为 380 个氨基酸。在 COS-1 细胞表达的 κ 受体对 κ 受体选择性激动剂 DynorphinA、U50488H、U69593 等有高亲和力, 对 κ 受体选择性拮抗剂 nor-BNI 有很高的亲和力; 对脑啡肽显示低亲和力, 对人的 β -内啡肽的亲和力低于在克隆的 δ 受体上的亲和力; 属于 G 蛋白偶联受体, 药理学特征类似于 κ_1 受体。RNA 印迹法表明在小鼠脑内有 5.2 kb 的 κ 受体 mRNA 表达, 在心脏、肺、肝、骨骼肌、肾和睾丸中未检测到上述 κ 受体 mRNA。用原位杂交法表明 κ 受体 mRNA 在小鼠新皮层、梨状皮层、海马、中松果体缰、杏仁核、下丘脑、蓝斑、臂旁核等区域有高水平的表达。于雷等^[10]、孟帆等^[11]、Minami 等^[12]、Nishi 等^[13]、刘丽云等^[14]分别从大鼠中克隆出 κ 受体, 均为 380 个氨基酸。谢国玺等^[15]从豚鼠中克隆出的 κ 受体也为 380 个氨基酸, 与小鼠和大鼠 κ 受体的氨基酸序列有 90% 的相同, 与大鼠 μ 和 δ 受体的氨基酸序列分别有 61% 和 60% 相同; 与 U50488H、Dynorphin A 等有高亲和力, 抑制胞内 cAMP 产生和 Ca^{2+} 内流。小鼠、大鼠 κ 受体的基因序列也已被分离和鉴定, 编码小鼠 κ 受体基因至少含有 4 个外显子, 编码大鼠 κ 受体的单一基因中含有 3 个内含子^[16,17]。Zhu 等^[18]克隆出人 κ 受体也为 380 个氨基酸, 与小鼠和大鼠 κ 受体的氨基酸序列分别有 93.9% 和 93.2% 相同, 与人 μ 和 δ 受体有 60% 相同; 人脑内有单一 6.0kb 的 κ 受体 mRNA 存在, 以杏仁核、尾核、下丘脑和丘脑下核团含量较高; 在 COS 细胞中表达, 表明对 U50488H、Dynorphin A、nor-BNI 等有高亲和力。在编码人 κ 受体的基因中至少有 2 个内含子存在, 定位在人染色体 8 上^[4,31]。

(三) μ 阿片受体的克隆

于雷等^[19]、Fukuda 等^[5]、Thompson 等^[20]、Minami 等^[21]、Wang 等^[22]分别从大鼠

脑 cDNA 文库中克隆出 μ 阿片受体, 均为 398 个氨基酸。在 COS-7 细胞中表达的 μ 阿片受体对 μ 受体选择性激动剂 DAMGO 及拮抗剂纳洛酮、 β -FNA、naloxonazine、cyprodine 有高亲和力, 对 DPDPE 和 U50488H 等亲和力很低, 属于 G 蛋白偶联受体, 介导激动剂抑制胞内 cAMP 产生。RNA 印迹法表明在大鼠脑中 μ 受体 mRNA 大于 10 kb。 μ 受体 mRNA 在中脑、纹状体水平很高, 在大脑皮层较低, 在小脑、心脏、肺、肝、肾中未检测到 μ 受体 mRNA。用原位杂交法表明 μ 受体 mRNA 在大鼠脑中以基底神经节有特高表达, 在丘脑中也有高水平的表达; 在大鼠腰段脊髓 I、II 和 VIII 层中有强的表达; 而 κ 受体 mRNA 在 I、II 层有强的表达, 在 III-VIII 层中有中等程度的表达; 在背根神经节 μ 受体 mRNA 的表达要比 κ 受体 mRNA 的表达为高。从大鼠克隆出的 μ 受体分别与小鼠 δ 、 κ 受体有 58%~60% 和 57% 的相同, 与大鼠 κ 受体有 59% 的相同。 κ 受体与 δ 受体的氨基酸序列有 61% 相同。Wang 等^[23] 利用大鼠 μ 阿片受体 cDNA 序列, 从人脑皮层 cDNA 文库中克隆出人 μ 阿片受体, 其为 402 个氨基酸。人 μ 阿片受体与大鼠 μ 阿片受体氨基酸序列有 95% 的相同; 与大鼠 κ 阿片受体 cDNA 序列有 50% 相同, 氨基酸序列有 59% 相同; 与大鼠 δ 阿片受体 cDNA 序列有 59% 相同, 氨基酸序列有 62% 相同; 对 cAMP 的效应与大鼠 μ 阿片受体的效应一样。在人脑内存在着 2.8、4.3、11 和 13.5 kb 的 μ 受体 mRNAs, 并高度表达于下丘脑、丘脑、丘脑下核团, 在杏仁核、尾核中等程度表达, 在海马、黑质、胼胝体中表达较低^[24]。人的 μ 阿片受体基因定位于人染色体 6q 24~25 间。应用杂交分析表明 18 kb 的人 μ 受体基因克隆含 63 和 489 bp 外显子序列, 两侧是拼接供体和接受体序列。此外 Mestek 等从人尾状核克隆出的 μ 阿片受体为 400 个氨基酸。

上述克隆出的阿片受体, 药理学特征与内源性表达的 κ_1 受体、 μ 受体和 δ_2 受体的药理学特征相似^[25]。

(四) 其它新的阿片受体的克隆

此外也克隆出一类称为“孤儿受体”(orphan receptor) 新的阿片受体。Wang 等^[26] 从大鼠脑 cDNA 文库分离克隆出另一阿片受体, 与已克隆出的 μ 、 δ 、 κ 阿片受体只有 67%~72% 相同, 称其为 XOR₁S; XOR₁SmRNA 在下丘脑表达最高; 比已克隆的大鼠 μ 阿片受体少 28 个氨基酸, 但在 COS 细胞表达既不与阿片配体有效结合也不能重现抑制腺苷酸环化酶 (AC) 的效应。Fukuda 等^[27] 利用小鼠 δ 阿片受体 cDNA 序列为探针, 从大鼠脑 cDNA 文库中克隆出另一新的阿片受体, 称其为 ROR-C, 为 367 个氨基酸; 氨基酸序列与大鼠 δ 、大鼠 μ 、大鼠 κ 阿片受体的氨基酸序列分别有 53%、52% 和 51% 的相同。RNA 印迹法和原位杂交法表明 ROR-C mRNA 在脑干蓝斑神经元高度表达和分散在臂旁核中, 在前脑腹内侧核、室旁核也有较高表达; 其它脑区未见杂交信号。Bare 等^[28] 也利用小鼠 δ 阿片受体 cDNA 序列为探针, 从人基因库中分离克隆出一个 μ 阿片受体部分基因, 利用此克隆和已发表的人 μ 阿片受体 (MOR1) 的信息, 从 SK-N-SH mRNA 中分离出另一个编码人 μ 阿片受体 (MOR1_A) 的 cDNA; 用 RT-PCR 法也可在人脑中检测到 MOR1_A。此 MOR1_A 比 MOR1 少 8 个氨基酸, 在 C-末端存在差异。在 CHO-K1 细胞, 这两个受体都有相似的结合特性, 与 DAMGO 有高亲和力, 与 DPDPE 和 U69593 等亲和力低, 与 AC 负偶联, 介导激动剂抑制胞内 cAMP 产生。另报道克隆出一个与 δ 、 μ 、 κ 阿片受体的氨基酸序列只有 36%~39% 相同的基因, 其产物能与 β -endorphin 结合, 认为可能是 ϵ 受体; 此基因定位于人染色体 10q11.2~21.1 区^[31]。

二、阿片受体的结构和功能

80年代以前,对受体特性的研究主要以动物的组织、器官等为对象而进行的。而大多数以阐明受体和相应配体的亲和力、饱和性、置换性及其调节等为特点。随着研究手段的不断进步,特别是分子生物学技术方法的应用,目前可以相应改变克隆基因的特定位点;或者在基因中嵌入一段序列,使之形成杂合体,经过这样改变的受体基因导入真核或原核细胞中表达,研究和分析表达受体的结构和功能,以及受体的基因调控等。

从证实脑内有阿片受体存在到克隆表达出三种阿片受体,经历了20余年的努力,人们对阿片受体的研究取得了突破性的进展。三种阿片受体的克隆表达成功有助于人们利用现代分子生物学技术方法对阿片受体加以详细研究。

(一) 阿片受体的结构

克隆的三种阿片受体的氨基酸序列比较显示出第2、3、7跨膜序列是高度保守的,细胞内环特别是第2个细胞内环序列也是高度保守;第1、4、5跨膜序列则差别较大;第5和6跨膜序列间的第3个细胞内环在三种阿片受体间相当相似,认为可能与G-蛋白相偶联;细胞内环上均有磷酸化的结合位点。三种阿片受体的氨基端和羧基端在氨基酸序列和数目有较大不同。此外, δ 、 κ 受体有2个N-糖基化的结合位点, μ 受体有5个N-糖基化的结合位点^[6]。

Garzon等^[29]报道在兔中制备出针对克隆的大鼠 μ 阿片受体N-末端序列的多克隆抗体,在小鼠中应用此抗体证实由于糖基化作用, μ 阿片受体以5种不同分子量形式存在。Eppler等证明提纯的66 kDa的大鼠脑 μ 阿片受体含有糖,而克隆的 μ 阿片受体约40 kDa。然而这些糖对于受体结合来说似乎并不非常重要。Uhl和Surratt等^[30,31]证明将 μ 受体上含有N-糖基化结合位点的N-末端去除64个氨基酸和C-末端去除33个氨基酸后,其与DAMGO、纳洛酮、吗啡的亲和力无明显变化。但C-末端去除33个氨基酸后DAMGO抑制AC活性的功能显著地减弱;但吗啡抑制AC的能力仍保留,说明 μ 阿片受体结合位点可能不存在于N-末端和C-末端部分。

(二) 阿片受体的结构和功能

近年利用在基因内制造定点突变(site-directed mutagenesis)方法,进行G-蛋白家族受体的结构与功能的研究。一些工作表明受体中的穿膜区域和细胞外区域的氨基酸残基与配体识别及信号转导有关。我所唐赞等^[32]对 μ 阿片受体与其激动剂羟甲芬太尼结合的计算机模拟结果表明天门冬氨酸¹⁴⁷(Asp)、组氨酸³¹⁹(His)残基与 μ 阿片受体识别配体有关。Surratt和Uhl等^[30]的结果表明在 μ 阿片受体跨膜域Ⅰ中高度保守的Asp¹¹⁴残基被丙氨酸(Ala)置换后,其与DAMGO、吗啡、纳洛酮的亲和力显著降低;被天门冬酰胺(Asn)、谷氨酸(Glu)置换后,其与DAMGO、吗啡的亲和力显著降低,而其与纳洛酮的亲和力增加。跨膜域Ⅲ中高度保守的Asp¹⁴⁷残基被Ala、Asn置换后,其与DAMGO和纳洛酮的结合显著降低;而被Glu置换后,几乎能完全保持其与DAMGO、吗啡结合的内在活性。跨膜域Ⅵ中带正电的His²⁹⁷残基被Ala置换后,能降低其与DAMGO和纳洛酮结合,此突变体仍有抑制AC的功能。在其它G-蛋白偶联受体中细胞外环半胱氨酸(CysH)残基被认为提供二硫键。Uhl等^[31]结果表明细胞外第2环和第3环上的CysH残基被突变能降低 μ 阿片受体的功能表达。

Kong 等^[33]结果表明在克隆的小鼠 δ 阿片受体第 I 跨膜域中高度保守的 Asp⁹⁵ 残基被 Asn 置换后, 此突变体与 δ 受体选择性激动剂 DPDPE、DSLET、Met-enkephalin、SIOM、Deltorphin 的亲合力显著降低; 而对 δ 受体选择性拮抗剂 naltrindole、NTB、BN-TX 以及如 Bremazocine、(-)-buprenorphine 非选择性阿片受体激动剂的亲合力没有改变。突变的 δ 受体仍与 G-蛋白偶联。在 90 mM NaCl 存在下, 突变的 δ 受体与其激动剂的结合活性几无变化。此结果提示 δ 受体上可能有激动剂和拮抗剂不同的结合区域; Asp⁹⁵ 对高亲和力的 δ 受体选择性激动剂的结合是必需的, 也可能是 Na⁺ 介导阿片受体与其激动剂结合活性下降的作用部位。跨膜域 III 中高度保守的 Asp¹²⁸ 残基被突变后, 其与激动剂的亲合力降低。跨膜域 VI 中 His 残基被突变后则对其结合几无影响^[31]。

在 G-蛋白偶联受体中第 3 个细胞内环上保守的 CysH 残基是一软脂酰化的结合位点。Liu-Chen 等^[31]结果表明当 κ 阿片受体中 CysH 被突变为酪氨酸 (Tyr) 后, 其与 G-蛋白偶联的功能丧失。Akil 等^[31]结果表明当 κ 阿片受体中跨膜域 VI 中 His²⁹¹ 被突变后, 其与 dynorphin、U50488H 和 ethylketocyclazocin 的亲合力降低。

Onogi 等^[34,35]报道使用构建嵌合受体 (chimera receptor) 的方法, 在 μ/δ 嵌合受体中发现 μ 受体的第一个细胞外环对 DAMGO 区别 μ 和 δ 受体即对 μ 受体的高亲合力是至关重要的。但此环对非肽类配体吗啡、纳洛酮来说并不能区别 μ 和 δ 受体的差别; 对肽类 μ 受体选择性配体 CTOP、dermorphin、morphiceptin 来说, 此环部分参与区别 μ 和 δ 受体选择性作用。而在 μ/κ 嵌合受体中, 有趣的则是 μ 受体的第三个细胞外环区域对 DAMGO 区别 μ 和 κ 受体选择性作用是很重要的, 且此环也参与肽类 μ 选择性配体和非肽类配体吗啡、纳洛酮区别 μ 和 κ 受体选择性作用。Wang 等^[36]在 μ/κ 杂交嵌合受体中证明人 μ 阿片受体第二个细胞外环被置换后, 仍保留 DAMGO、吗啡、纳洛酮对 μ 受体的亲合力及抑制 AC 活力的功能。Chen 等证明在大鼠 μ/κ 杂交嵌合受体中证实 μ 受体选择性拮抗剂 β -FNA 则与大鼠 μ 受体中第六和第七跨膜域间第 268 至 344 氨基酸结构域形成共价结合。

Xue 等^[37]在 μ/κ 杂交嵌合受体中证明大鼠 κ 阿片受体第二个细胞外环及第四和第五穿膜域对于 dynorphin A 的高亲合力结合是必需的; 而第三个细胞外环及第六和第七穿膜域对于 nor-BNI 结合是必需的; 而对 U50488H 来说, 其结合则需除第二个细胞外环区域外的整个 κ 阿片受体区域; 表明 κ 阿片受体有肽类和非肽类配体的不同结合区域。Hong 等证实 κ 阿片受体中第二和第三跨膜域中的 Asp¹⁰⁵ 和 Asp¹³⁸ 对于 κ 阿片受体激动剂 U69593, U50488H 的结合是必需的; 对 κ 阿片受体拮抗剂的亲合力不受影响。突变后的 κ 阿片受体仍保留与 AC 偶联, 但 κ 阿片受体激动剂抑制 AC 活性的能力降低。

使用基因定位突变、构建嵌合受体方法研究其对阿片受体功能的影响, 使阿片受体结构和功能关系的研究进一步深化, 有助于阐明阿片受体在更高层次神经功能中的作用。

(三) 阿片受体介导阿片物质的镇痛效应

反义 (antisense) 核酸是指与体内某 RNA 或 DNA 序列具有互补序列, 并能通过碱基配对与互补链杂交, 从而影响其转录或翻译过程的 RNA 或 DNA 片断。用特定反义核酸选择性抑制基因表达常用来分析某些基因产物的功能。近年反义技术也在神经科学中应用来研究受体功能。Pasternak 实验室^[38,39]设计合成不同的针对克隆出的 δ 、 κ 、 μ 阿片受体氨基酸序列特异的寡聚脱氧核苷酸 (18~20 碱基); 在 NG108-15 细胞中给予针对 δ -

受体的反义寡聚脱氧核苷酸(50 nM, 250 nM)能降低 $[^3\text{H}]$ DPDPE 的结合达 40%~50%; 在小鼠整体鞘内给予上述针对 δ -受体的反义寡聚脱氧核苷酸也能降低脊髓中 $[^3\text{H}]$ DPDPE 的结合达 25%~30%; 在小鼠整体鞘内给予上述针对 δ -受体不同区域的反义寡聚脱氧核苷酸(1 μg , 5 μg)能显著降低 DPDPE 的镇痛作用, Deltorphin I 的镇痛作用也被显著降低, 而对 DAMGO、U50488H 的镇痛作用无影响, 表明只影响 δ -受体的结合及其介导的镇痛作用, 而对 κ_1 、 μ 阿片受体介导的镇痛作用无影响。在大鼠脑导水管周围灰质区微量注射一针对克隆的 μ -受体 5'-未转译区的反义寡聚脱氧核苷酸(10 μg , 1 μl)后能完全拮抗吗啡(2.5 μg , 1 μl)的镇痛效应; 鞘内注射针对 κ -受体的反义寡聚脱氧核苷酸能阻断 U50488H 的镇痛作用, 而对 DPDPE 和吗啡的镇痛作用无影响。上述结果证实克隆出的 δ 、 κ 、 μ 阿片受体参与吗啡、U50488H、DPDPE 等的镇痛作用, 且具各自的高度特异性。在了解阿片受体介导的阿片类药物药理作用及阿片受体参与生理功能中的作用, 使用反义技术是一有价值的实验方法。

Garzon 等^[40]报道在兔中制备出针对鼠 δ 阿片受体 N-末端序列中前 16 个氨基酸的多克隆抗体。给小鼠侧脑室注射此抗 δ 阿片受体 IgGs 后, DPDPE、DADLE、Deltorphin I、 β -endorphin(1~31)的镇痛作用被降低, 剂量-效应曲线下移; 而对吗啡、DAMGO 的镇痛作用无影响。选择性 δ 阿片受体拮抗剂 ICI174864 显著降低 δ 阿片受体激动剂的镇痛作用, 其降低程度与抗血清的降低程度相同。小鼠 P_2 脑膜受体制备与抗血清预先温孵后, 可显著降低 $[^3\text{H}]$ -DPDPE 与膜结合达 30%~65%; 而对 $[^3\text{H}]$ -DAMGO 与膜的结合无影响。此实验方法与结果也证明克隆的 δ 阿片受体参与阿片类脊髓上的镇痛作用。

迄今为止, 人们围绕阿片受体的药理学特征进行了大量研究。一般认为, 脑中的 μ 阿片受体介导阿片物质的镇痛效应, 在脊髓中 μ 、 κ 、 δ 阿片受体则似乎均与镇痛效应有关。此外每一种受体都可能介导其它的阿片样效应。三种阿片受体的克隆表达成功将推动对其生理功能、阿片样物质效应和其作用耐受机制等的深入研究。

参 考 文 献

1. Goldstein A, Naidu A. Multiple opioid receptors: Ligand selectivity profiles and binding site signatures. *Mol Pharmacol* 1989; 36 (2) : 265
2. Evans CJ, et al. Cloning of a delta opioid receptor by functional expression. *Science* 1992; 258 (5090) : 1952
3. Kieffer BL, et al. The δ -opioid receptor: isolation of a cDNA by expression cloning and pharmacological characterization. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89 (24) : 12048
4. Yasuda K, et al. Cloning and functional comparison of κ and δ opioid receptors from mouse brain. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90 (14) : 6736
5. Fukuda K, et al. Primary structures and expression from cDNAs of rat opioid receptor δ - and μ -subtypes. *FEBS Lett* 1993; 327 (3) : 311
6. Reisine T, Bell GI. Molecular biology of opioid receptors. *TINS* 1993; 16 (12) : 506-10
7. Knapp RJ, et al. Identification of a human delta opioid receptor: cloning and expression. *Life Sci* 1994; 54 (25) : 463
8. Simonin F, et al. The human δ -opioid receptor: Genomic organization, cDNA cloning, functional expression, and distribution in human brain. *Mol Pharmacol* 1994; 46 (6) : 1015

9. Augustin LB, et al. Genomic structure of the mouse δ opioid receptor gene. *Biochem Biophys Res Commun* 1995; 207 (1) : 111
10. Chen Y, et al. Molecular cloning of a rat κ opioid receptor reveals sequence similarities to the μ and δ opioid receptors. *Biochem J* 1993; 295 (3) : 625
11. Meng F, et al. Cloning and pharmacological characterization of a rat κ opioid receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90 (21) : 9954
12. Minami M, et al. Cloning and expression of a cDNA for the rat κ opioid receptor. *FEBS Lett* 1993; 329 (3) : 291
13. Nishi M, et al. cDNA cloning and pharmacological characterization of an opioid receptor with high affinities for κ -subtype-selective ligands. *FEBS Lett* 1993; 330 (1) : 77
14. Li S, et al. Molecular cloning and expression of a rat κ opioid receptor. *Biochem J* 1993; 295 (3) : 629
15. Xie GX, et al. Primary structure and functional expression of a guinea pig κ opioid (dynorphin) receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91 (9) : 3779-83
16. Yakovlev AG, et al. Structure and expression of a rat κ opioid receptor gene. *J Biol Chem* 1995; 270 (12) : 6421
17. Liu HC, et al. Cloning and promoter mapping of mouse κ opioid receptor gene. *Biochem Biophys Res Commun* 1995; 209 (2) : 639
18. Zhu JM, et al. Cloning of a human κ opioid receptor from the brain. *Life Sci* 1995; 56 (9) : PL201
19. Chen Y, et al. Molecular cloning and functional expression of a μ -opioid receptor from rat brain. *Mol Pharmacol* 1993; 44 (1) : 8
20. Thompson RC, et al. Cloning and pharmacological characterization of a rat μ opioid receptor. *Neuron* 1993; 11 (5) : 903
21. Minami M, et al. Molecular cloning and in situ hybridization histochemistry for rat μ -opioid receptor. *Neurosci Res* 1994; 18 (4) : 315
22. Wang JB, et al. μ opiate receptor: cDNA cloning and expression. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90 (21) : 10230
23. Wang JB, et al. Human μ opiate receptor: cDNA and genomic clones, pharmacologic characterization and chromosomal assignment. *FEBS Lett* 1994; 338 (2) : 217
24. Raynor K, et al. Characterization of the cloned human μ opioid receptor. *J Pharmacol Exp Ther* 1995; 272 (1) : 423
25. Raynor K, et al. Pharmacological characterization of the cloned κ -, δ -, and μ -opioid receptors. *Mol Pharmacol* 1994; 45 (2) : 330
26. Wang JB, et al. cDNA cloning of an orphan opiate receptor gene family member and its splice variant. *FEBS Lett* 1994; 348 (1) : 75
27. Fukuda K, et al. cDNA cloning and regional distribution of a novel member of the opioid receptor family. *FEBS Lett* 1994; 343 (1) : 42
28. Bare LA, et al. Expression of two variants of the human μ opioid receptor mRNA in SK-N-SH cells and human brain. *FEBS Lett* 1994; 354 (2) : 213
29. Garzon J, et al. Antibodies to the cloned μ -opioid receptor detect various molecular weight forms in areas of mouse brain. *Mol Pharmacol* 1995; 47 (4) : 738
30. Surratt CK, et al. μ Opiate receptor: charged transmembrane domain amino acids are critical for agonist recognition and intrinsic activity. *J Biol Chem* 1994; 269 (32) : 20548

31. Uhl GR, et al. An opiate-receptor gene family reunion. *TINS* 1994; 17 (3) : 89
32. Tang Y, et al. Molecular modeling of μ -opioid receptor and its interaction with ohmefentanyl. *Acta Pharmacol Sin* 1996; 17 (2) : 156
33. Kong H, et al. A single residue, aspartic acid 95, in the δ opioid receptor specifies selective high affinity agonist binding. *J Biol Chem* 1993; 268 (31) : 23055
34. Onogi T, et al. DAMGO, a μ -opioid receptor selective ligand, distinguishes between μ - and δ -opioid receptors around their first extracellular loops. *FEBS Lett* 1995; 357 (1, 2) : 93
35. Minami M, et al. DAMGO, a μ -opioid receptor selective ligand, distinguishes between μ - and κ -opioid receptors at a different region from that for the distinction between μ - and δ -opioid receptors. *FEBS Lett* 1995; 364 : 23
36. Wang JB, et al. Human μ receptor; Gene structure, expression, and μ/κ chimeras that define nontransmembrane domains influencing peptide binding affinities. *Regul Pept* 1994; 317
37. Xue JC, et al. Differential binding domains of peptide and non-peptide ligands in the cloned rat κ opioid receptor. *J Biol Chem* 1994; 269 (48) : 30195
38. Standifer KM, et al. Selective loss of δ opioid analgesia and binding by antisense oligodeoxynucleotides to a δ opioid receptor. *Neuron* 1994; 12 (4) : 805
39. Rossi G, et al. Blockade of morphine analgesia by an antisense oligodeoxynucleotide against the mu receptor. *Life Sci* 1994; 54 (21) : PL375
40. Garzon J, et al. Antibodies raised against the N-terminal sequence of δ opioid receptors blocked δ -mediated supraspinal antinociception in mice. *Life Sci* 1994; 54 (11) : PL191

左旋千金藤啖碱对 DA 受体的 双重作用机制

金国章 陈丽娟 董兆君 邹灵龙

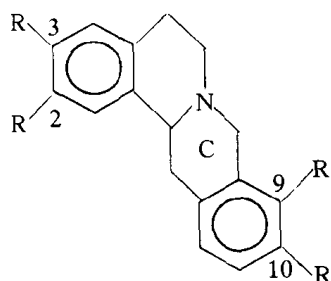
(中国科学院上海药物研究所, 上海 200031)

摘要 左旋千金藤啖碱 (*l*-stepholidine, *l*-SPD) 是四氢原小檗碱 (THPB) 的先导物, 对 DA 受体有阻滞-激动双重作用, 对常敏 DA (D_1 , D_2) 受体表现为阻滞剂。对 6-OHDA 损毁的大鼠引起 DA 受体超敏, *l*-SPD 表现为 D_1 激动剂。因为 *l*-SPD 对 D_1 受体有内在激动作用活性, 在 D_1 受体转导效率增强情况下, 转化为 D_1 激动作用, 可能有利于治疗帕金森症。

构效关系研究证实, 双羟基-THPB (包括 *l*-SPD) 对 DA 受体有拮抗-激动双重作用, 它们存在于千金藤属 (*Stephania*)、岩黄连 (*Corydalis saxicola*)、夏天无 (*Corydalis decumbens* Thunb.) 等中草药中; 单羟基-THPB、无羟基-THPB 存在延胡索 (*Corydalis ambigua*)、千金藤属、远志 (*Polygala tenuifolia* Willd) 等中草药中。这些结果有利于积极促进中医药的科学整理和发展提高。

关键词 左旋千金藤啖碱; DA 受体; 拮抗-激动双重作用; 部分激动剂; 左旋四氢巴马汀

左旋千金藤啖碱 (*l*-stepholidine, *l*-SPD, 图 1) 是四氢原小檗碱同类物 (tetrahydroprotoberberines, THPB) 的第二代药物。THPB 的神经药理研究, 在国际上甚少报道, 而在我国却有系统的研究工作, 并具有我国自己的特色, 显然, 这与我国传统的中医药学的光辉成就有密切联系, 因为 THPB 首先从中药镇痛剂延胡索 (*Corydalis*) 中分离出来。我国著名化学家赵承嘏教授研究延胡索化学组分和结构, 成为这领域的开拓者^[1]。然而, 对这些化合物药理作用的系统研究始自 1956 年, 由金国章和胥彬证明四氢巴马汀 (*dl*-tetrahydropalmatine, *dl*-THP) 是中药延胡索镇痛作用的主要成分^[2], 发现 *l*-THP (罗通定, Rotundine) 有明显的镇静安定作用, 并提出了新型中枢抑制剂的论点^[3]。1989 年以来, 金国章研究了 THPB 的构效关系, 进一步提出 *l*-THPB 是脑内多巴胺 (DA) 受体新型拮抗剂的论点^[4,5]。在天然产物中开拓了 DA 受体拮抗剂的研究领域, *l*-SPD 是 THPB 的先导物 (lead compound), 它的药理作用很有特色, 在 DA 受体超敏时, 对旋转行为显示出激动剂的作用^[6~8]。这现象的发现为锥体外系运动功能的神经生物学研究, 提出了新课题, 并为 DA 受体药物开拓新类型, 颇受国内外同行的关注。本文将重点介绍新近的研究结果, 并对 *l*-SPD 同类物的应用前景提出设想。



	R ₂	R ₃	R ₉	R ₁₀
<i>l</i> -SPD	OH	OCH ₃	OCH ₃	OH
<i>l</i> -THP	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃
THB	—O—CH ₂ —O—		OCH ₃	OCH ₃
scoulerine	OH	OCH ₃	OH	OCH ₃

图 1 THPB 同类物的化学结构

一、*l*-SPD 的药理作用特性

l-THPB 目前是 DA 受体拮抗剂中唯一的天然产物。人们希望从天然产物的先导物获得对神经药物作用的启迪, *l*-SPD 作为 THPB 的先导物, 有三点理由: (1) 它对 DA 受体的亲和力强于其它受体 (表 1)^[9]; (2) 它与 DA 受体的作用居天然 THPB 之首^[10], 是 DA 受体拮抗剂 (表 2)^[11]; (3) 药理作用特殊, 在 DA 受体超敏后, *l*-SPD 从拮抗剂转化为激动剂的作用 (表 3)^[7,12]。通过对 *l*-SPD 的研究, 揭示出 *l*-THPB 对 DA 受体作用的规律性, 促使拮抗和激动兼容的新型 DA 受体药物的诞生。

表 1 *l*-SPD 对各种受体亲和力的比较^[9]

受体	放射配体	K _i (或 IC ₅₀ , nmol/L)		
		<i>l</i> -SPD	其它药物	组织
D ₁	[³ H]-SCH 23390	13	SCH 23390 0.84	striatum (calf)
			Flupenthixol 3.1	striatum
			DA 25, APO 33	striatum
D ₂	[³ H]-spiperone	85	HAL 6.0	striatum
D ₁ 和 D ₂	[³ H]-PN-APO	19		striatum
α ₂	[³ H]-Clonidine	400	Yohimbine 2.2	striatum
5-HT ₂	[³ H]-Ketanserin	300		cortex
BZ	[³ H]-Flunitrazepam	1000		cortex
α ₁	[³ H]-Prazosine	>5000	Prazosine 47	striatum
5-HT ₁	[³ H]-5-HT	14000	5-HT 0.79	striatum
M-ACh	[³ H]-QNB	>100000		striatum
Opiate	[³ H]-Etophine	>100000		striatum
NPY	[³ H]-NPY	10000		cortex (mice)
CCK	[³ H]-CCK-8	10000		pancreas (guinea pig)
Neurotensin	[³ H]-NT	10000		cortex

表 2 THPB 对 DA 系统的作用^[11]

试 验	<i>l</i> -SPD	THB	<i>l</i> -THP	氟哌啶醇	<i>d</i> -THP
1. [³ H] -spoperone, D ₂ K _i (nmol/L)	85	750	850	6	>100000
2. [³ H] -SCH23390, D ₁ K _i (nmol/L)	13	330	1100	/	/
3. Adenylate cyclase IC ₅₀ (μmol/L)	2	9	13	/	/
4. Stereotypy	拮抗	拮抗	拮抗	拮抗	/
5. 使纹状体 ACh 含量	减少	减少	减少	减少	/
6. 纹状体 L-dopa 积累	增加	增加	增加	增加	不明显
7. 对苯丙胺兴奋活动	拮抗	拮抗	拮抗	拮抗	协同
8. 对苯丙胺旋转行为	拮抗	拮抗	拮抗	拮抗	协同
9. 对去水吗啡旋转行为	协同	拮抗	拮抗	拮抗	不明显
10. 对 6-OHDA 旋转模型	激动作用	无	无	无	无
11. DA 荧光组化强度	/	/	不明显	/	减弱荧光
12. SNC DA 神经元放电活动	翻转 APO 抑制	翻转	翻转	翻转	很弱
作 用 性 质	拮抗剂	拮抗剂	拮抗剂	拮抗剂	排空剂

表 3 *l*-SPD 对 DA 受体的拮抗和激动双重作用^[7,12]

试 验	DA 受体敏感性	<i>l</i> -SPD 的作用
1. 纹状体突触前 D ₂ 受体反馈	正 常	拮 抗
2. DA 引起 cAMP 增加 (D ₁)	正 常	拮 抗
3. 翻转APO抑制SNC DA 神经元放电 (D ₂)	正 常	拮 抗
4. 定型活动	正 常	拮 抗
5. 纹状体中释放 DA	正 常	拮 抗
6. 对苯丙胺引起的旋转行为	正 常	拮 抗
7. 协同去水吗啡引起的旋转行为	超 敏	激 动
8. 对 6-OHDA 旋转模型	超 敏	激 动

二、*l*-SPD 的拮抗-激动双重作用与 D₁ 和 D₂ 受体亚型关系

(一) *l*-SPD 对旋转行为的激动和拮抗的双重作用 (dual action)

预先将 6-OHDA 微量注射于大鼠的单侧黑质部位, 选择性损毁黑质致密区 (SNC) DA 神经元, 导致黑质-纹状体 DA 通路的退变, 形成左右双侧兴奋性的差异, 在静息时动物尚能平衡躯体运动。在 DA 受体激动剂的作用下, 这种兴奋差异更悬殊, 诱发动物向健侧旋转 (亦称对侧旋转), 而 DA 受体拮抗剂能阻滞这种旋转行为。DA 释放剂苯丙胺只能增强健侧的 DA 受体功能, 使大鼠向损毁侧方向旋转 (亦称同侧旋转), 作用温和而持久^[5]。

l-SPD 是 DA 受体新型阻滞剂, 应用 6-OHDA 旋转模型, 1981 年我们观察到 *l*-SPD 有激动作用, 当电损毁黑质后, 旋转的激动作用完全消失^[6]。当时, *l*-SPD 作为 DA 受体拮抗剂, 而有这种激动作用特性, 是非常不易解释的事实。近年来我们才证明 *l*-SPD 有

D₁ 受体激动剂的作用，其根据有：当 D₁/D₂ 混合型激动剂 APO（去水吗啡）所引起的旋转行为，在损毁 3 周后达到稳定的坪值（潜伏期短），反应明快，D₂ 激动剂 N-0437 的作用亦是一样。相反，D₁ 激动剂 SKF38393 和 *l*-SPD 对旋转行为的产生不敏感，毁后 7~8 周才达到坪值（潜伏期较长），这可能与 D₁ 受体超敏程度相关。*l*-SPD 在 6-OHDA 旋转模型的激动作用，有量效关系，优先为 D₁ 拮抗剂（SCH23390）所阻滞；又能为 D₂ 或 D₁/D₂ 激动剂所启动（priming），意指先给予激动剂 APO，数天后再给予 *l*-SPD，使 *l*-SPD 提前数周出现旋转行为，这意味着 D₂ 受体启动 D₁ 的激动作用。被 D₁ 拮抗剂 SCH23390 所拮抗、长潜伏期和启动作用是 *l*-SPD D₁ 激动作用的重要特性^[7,8]。所以，*l*-SPD 的激动剂作用属于 D₁ 受体。

进一步应用 6-OHDA+海人藻酸（KA）同时损毁黑质（SNC+SNR），使 *l*-SPD 和 D₁ 激动剂的激动作用消失^[8]，与 1984 年的电毁结果^[6]相符合。这表明 *l*-SPD 的激动作用部位与 SNR 的 D₁ 受体有密切联系。此时，APO 的旋转行为改变了方向，从健侧向损毁侧（图 2），并且作用敏感性减弱，需要增大 10 倍剂量，这显然是因 APO 作用于健侧突触后 D₂ 受体的缘故。此时，APO 的激动作用能被 *l*-SPD 完全阻滞，显示出 *l*-SPD 对常敏 DA 受体为拮抗剂作用（属于 D₂ 受体）^[7,8]。所以，*l*-SPD 对旋转行为的阻滞-激动双重作用是由于它对 D₂ 和 D₁ 受体有不同作用特性的缘故。

（二）*l*-SPD 对突触前 D₂ 受体反馈调控是阻滞剂的作用

为了探索 *l*-SPD 对 D₂ 受体是否有激动作用，采用生化方法进行观察。已知黑质-纹状体 DA 通路神经末梢上有自身受体，是观察突触前 D₂ 受体负反馈调控作用的理想脑区。因突触前有储备受体（spare receptor，D₂ 受体），对激动剂的作用比对突触后 D₂ 受体要敏感 10~20 倍，对内在活性（intrinsic activity）较低的部分激动剂能显示它的激动作用，引起负反馈调控，而 D₂ 拮抗剂能翻转激动剂的作用。试验证实 *l*-SPD 对 D₂ 受体没有激动剂或部分激动剂的特性^[13,14]，增强酪氨酸羟化酶（TH）活力，使纹状体的 L-DOPA 积累含量明显增加，并能完全翻转激动剂 APO 抑制 TH 活力的效应，表明 *l*-SPD 是 D₂ 受体拮抗剂的作用。

