

痛稳素和痛稳素(10~17)对孤啡肽对抗内吗啡肽-1 及内吗啡肽-2镇痛作用的影响

陈鲤翔, 陈勇, 彭雅丽, 王转子, 陈强, 王锐*

(兰州大学生命科学学院生物化学与分子生物学系, 甘肃 兰州 730000)

摘要: 目的 研究痛稳素及其碳末端八肽在小鼠脑内对孤啡肽对抗内吗啡肽-1及内吗啡肽-2镇痛作用的影响。方法 以固相多肽合成法合成了痛稳素及其碳末端八肽, 侧脑室注射孤啡肽、痛稳素及其碳末端八肽, 用辐射热尾法测定痛阈。结果 孤啡肽可对抗内吗啡肽-1及内吗啡肽-2的镇痛作用; 痛稳素及其碳末端八肽不影响小鼠的基础痛阈, 但可逆转孤啡肽对抗内吗啡肽-1及内吗啡肽-2的镇痛作用。结论 痛稳素及其碳末端八肽在脊髓以上水平可逆转孤啡肽对抗内吗啡肽-1及内吗啡肽-2的镇痛作用。

关键词: 固相多肽合成; 痛稳素; 孤啡肽; 内吗啡肽-1; 内吗啡肽-2; 镇痛

中图分类号: R965; R971.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 0513-4870(2002)11-0837-04

1993~1994年, Mollereau等^[1]克隆出一种阿片受体样(opioid receptor like receptor, ORL1)孤儿受体。它的配体即孤啡肽(nociceptin或orphnin FQ, NC), 发现于1995年^[2,3], 是一个以羧基结尾的17肽, 一级结构与强啡肽A有一定的相似性, 但与 δ, κ, μ 阿片受体的亲和力很弱。

痛稳素(nocistatin, NST)是从牛脑中分离出的。它和NC都是从前孤啡肽原蛋白中得到的, 是同一基因的产物^[4]。前孤啡肽原是一个大分子多肽, NST位于NC片段的上游, 通过-Lys-Arg-与NC相连, 也是一个以羧基结尾的17肽, 其一级结构为Thr-Glu-Pro-Gly-Leu-Glu-Glu-Val-Gly-Glu-Ile-Glu-Glu-Lys-Gln-Leu-Gln-OH。有报道发现, NST及NST(10~17)均可以抑制脊髓蛛网膜下腔注射孤啡肽引起的痛觉超敏。此外, NST羧基末端的六肽即Glu-Glu-Lys-Gln-Leu-Gln-OH存在于牛、鼠、人中, 被认为与生物活性有关。NST能阻断鞘内注射(it)NC诱导的小鼠痛敏及减弱前列腺素2(prostaglandin E₂, PGE₂)所引起的疼痛。它不结合ORL1受体, 但与大鼠脑膜和脊髓有高度的亲和性, 在此两个部位可能有其自己的受体^[4]。鞘内注射NST可在福尔马林诱导的大鼠疼痛实验中产生镇痛作用^[5]。脑室注射(icv)NST

能剂量依赖的减弱角叉菜/高岭土引起的炎症疼痛, 而对非致炎的大鼠痛阈无影响^[6]。内吗啡肽-1和内吗啡肽-2(endomorphin-1 and endomorphin-2, EM-1 and EM-2)发现于1997年^[7]。它们在迄今发现的所有阿片类物质中, 对 μ 阿片受体有高亲和力和选择性, 被认为是 μ 阿片受体的天然配体。EM-1和EM-2均可在小鼠中引起镇痛作用^[7,8]。Mogil等^[9,10]发现小鼠icv NC能拮抗阿片引起的应激性镇痛及 δ, κ, μ 阿片受体介导的镇痛。

以往的工作表明, NST在痛觉调制中起重要作用, 在一些条件下它可对抗NC在痛觉方面的作用。那么, NST及NST(10~17)会对NC对抗EM-1和EM-2的镇痛作用产生什么影响呢? 为探讨这些问题, 用固相多肽合成方法合成了NST及NST(10~17), 并主要进行了小鼠icv NST及NST(10~17)对小鼠基础痛阈的影响及小鼠联合icv NST和NC或NST(10~17)和NC对EM-1及EM-2镇痛作用的影响的工作。结果发现, NST及NST(10~17)不影响小鼠的基础痛阈, 但可显著逆转NC对抗EM-1及EM-2的镇痛作用。

材 料 和 方 法

材料 Boc-Leu和Boc-Thr, Biochem; 其余叔丁氧羰基(Boc)保护氨基酸, Sigma; 二氯甲烷(DCM)、甲醇(MeOH)、二甲基亚砜(DMSO)天津市化学试剂二厂, 用前重蒸。N, N'-二环己基碳二亚胺(DCC),

收稿日期: 2001-10-25.

基金项目: 国家自然科学基金(20072014); 教育部高等学校优秀青年教师教学科研奖励计划资助项目(第二届).

* 通讯作者 Tel: (0931)8912567, Fax: (0931)8912561,

E-mail: wangrui@lzu.edu.cn

Aldrich; 三氟乙酸(TFA), Merck。实验动物为昆明系小鼠, (20 ± 1) g, 由兰州医学院动物室提供。电子光热测痛仪购自上海嘉龙教仪厂。NC, EM-1 和 EM-2 均由本室合成^[11,12]; 氨基酸组分分析与理论值相符; HPLC 分析纯度 > 95%。

肽的合成与纯化 氨基酸组分分析仪, HITACHI 835-50 型; HPLC, Waters; 分析柱: DELTAPAK 5 μ C₁₈ 0.03 μm 3.9 mm × 150 mm; 制备柱: DELTAPAK 15 μ C₁₈ 0.03 μm 7.8 mm × 300 mm。肽的合成用固相多肽合成法^[13]。NST 及 NST(10~17) 均用 Merrifield 树脂(交联度 1%, 200~400 目, 氯取代值为 1 mmol·g⁻¹, BACHEM) 合成。第一个氨基酸与树脂的连接用 Loffit 法^[14]。取代值 $S = 0.34 \text{ mmol} \cdot \text{g}^{-1}$ 。DCC 作缩和剂, 33% TFA/DCM 脱保护, 10% TFA/DCM 中和, 25% AcO₂/DCM 封头, 茚三酮试剂检测脱保护和缩和的完成程度。合成好的肽树脂真空干燥 2 d 后, 用无水 HF 切割(0°C, 2 h), 粗肽经 Sephadex G-25 脱盐, 再经 HPLC 纯化(18% 乙腈等度洗脱, 检测波长为 220 nm, 流速 3 mL·min⁻¹)。冷冻干燥得纯肽, 纯肽经氨基酸组分分析正确, 反相 HPLC 纯度分析 > 95%。

生物活性实验 所有药物均溶于无菌生理盐水(NS)中, 脑室注射药物的体积为 5 μL, 注射时间 10~15 s, 每只鼠仅 icv^[15] 1 次。辐射热甩尾法测定甩尾反应潜伏期(tail-flick latency, TFL), 注药前每隔 5 min 测定 1 次 TFL, 共测 3 次, 取其平均值作为基础痛阈; 去除对热辐射较敏感和较不敏感的小鼠, 小鼠药前甩尾时间一般在 6~12 s。室温保持在(20 ± 1)°C。TFL 值的变化以百分变化率表示。

统计分析 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 显著性差异用 *t* 检验。

结 果

1 NST 及 NST(10~17) icv 对小鼠基础痛阈的影响

给 3 组小鼠 icv NST(8~10 只/组, 剂量分别为 6.25, 25 和 100 μg·kg⁻¹), 3 组小鼠 icv NST(10~17)(8~10 只/组, 剂量分别为 6.25, 25 和 100 μg·kg⁻¹), 1 组小鼠 icv NS(8~10 只/组) 作为对照。注药后每 10 min 测 1 次 TFL, 共 90 min。结果显示, icv NST 和 NST(10~17) 与 icv NS 相比, 小鼠的基础痛阈无明显变化。表明 icv NST 和 NST(10~17) 对小鼠的基础痛阈无明显影响。

2 NC icv 对 EM-1 及 EM-2 镇痛作用的影响

给 3 组小鼠 ip EM-1(12~15 只/组, 剂量均为 $2 \times 10^3 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$), 3 组小鼠 ip EM-2(12~15 只/组, 剂量均为 $2 \times 10^3 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$)。小鼠 ip EM-1 或 EM-2 后立即 icv NC(剂量分别为 6.25, 25 和 100 μg·kg⁻¹), 继续每隔 10 min 测 1 次 TFL, 共 90 min, 取平均值。结果显示, NC 可对抗 EM-1 和 EM-2 的镇痛(图 1, 2)。

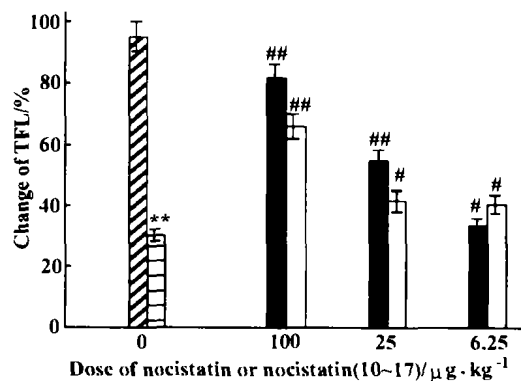


Figure 1 The effect of nociceptin (NC, 100 μg·kg⁻¹) in antagonizing endomorphin-1 (EM-1, $2 \times 10^3 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$) induced analgesia was dose-dependently reversed by nocistatin (NST) or nocistatin (10~17) in mice. Nociceptin was icv injected after ip injection of endomorphin-1. Nocistatin or nocistatin (10~17) was icv injected together with NC after ip injection of endomorphin-1. ** $P < 0.01$ vs EM-1 + NS; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ vs EM-1 + NC. ▨ EM-1 + NS; ▤ EM-1 + NC; ■ EM-1 + NC + NST; □ EM-1 + NC + NST (10~17). TFL: Tail-flick latency

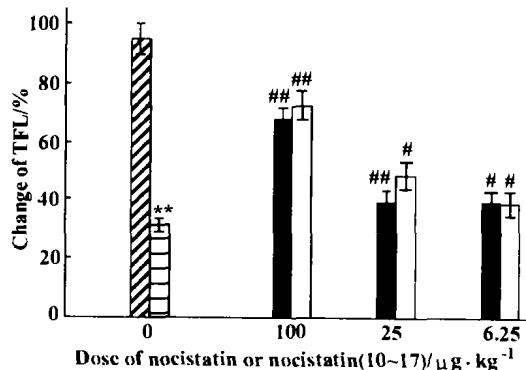


Figure 2 The effect of nociceptin (NC, 100 μg·kg⁻¹) in antagonizing endomorphin-2 (EM-2, $2 \times 10^3 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$) analgesia was dose-dependently reversed by nocistatin or nocistatin (10~17) in mice. Nociceptin was icv injected after ip injection of endomorphin-2. Nocistatin or nocistatin (10~17) was icv injected together with nociceptin after ip injection of endomorphin-2. ** $P < 0.01$ vs EM-2 + NS; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ vs EM-2 + NC. ▨ EM-2 + NS; ▤ EM-2 + NC; ■ EM-2 + NC + NST; □ EM-2 + NC + NST (10~17)

3 NST 及 NST(10~17) icv 对 NC 对抗 EM-1 及 EM-2 镇痛作用的影响

给 3 组小鼠 ip EM-1(12~15 只/组, 剂量均为 $2 \times 10^3 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$), 3 组小鼠 ip EM-2(12~15 只/组, 剂量均为 $2 \times 10^3 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$)。小鼠 ip EM-1 或 EM-2 后立即联合 icv NST 和 NC 或 NST(10~17) 和 NC[NC 的剂量为 $100 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$, NST 及 NST(10~17) 的剂量分别为 6.25, 25 和 $100 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$], 继续每隔 10 min 测 1 次 TFL, 共 90 min, 取平均值。结果显示, NST 及 NST(10~17) 可显著逆转 NC 对抗 EM-1 及 EM-2 的镇痛作用(图 1, 2)。

讨 论

痛稳素(NST)和孤啡肽(NC)来自同一前体物质, 是同一基因的不同产物。Okuda-Ashitaka 等^[4]证实, NST 及 NST(10~17) 可逆转鞘内注射 NC 引起的小鼠痛敏和痛觉超敏。有报道^[16]发现 icv NST 可以反转 NC 拮抗吗啡镇痛的作用。这说明来自同一前体的 NST 和 NC 在某些生物活性方面有功能上的拮抗作用。NST 不结合 NC 受体, 它与小鼠脑和脊髓制备的细胞膜具有高亲和性和饱和性, 提示在此两个部位有其专一受体。

内吗啡肽-1(EM-1)和内吗啡肽-2(EM-2)有镇痛作用^[7,8]。有报道^[17]icv NC 可对抗 EM-1 引起的大鼠镇痛作用。但到目前为止尚未见有关 NC 对 EM-2 镇痛作用影响的报道。本工作发现, NC 不但可以对抗 EM-1 引起的小鼠镇痛作用, 而且还可以对抗 EM-2 引起的小鼠镇痛作用。另外, 本工作还发现 icv 大于脑内正常浓度的 NST 或 NST(10~17) 可反转 NC 对抗 EM-1 和 EM-2 镇痛的作用。此结果从另一角度验证了痛稳素的确有明显的抗孤啡肽作用, 支持了 Okuda-Ashitaka 等提出的关于痛稳素对抗孤啡肽作用的假说。

到目前为止, NC 拮抗阿片引起的应激性镇痛及 δ, κ, μ 阿片受体介导的镇痛机制还不清楚。有报道^[18]认为这可能和受体与受体之间的相互作用有关系。阿片肽是一类结构相似的神经调质, 它们通过神经系统的膜受体对痛觉起重要的调控作用。而 ORL1, δ, κ 和 μ 受体均属于与 G 蛋白偶联的受体。NST 可逆转 NC 对抗 EM-1 和 EM-2 引起的镇痛作用就很有可能和它们的受体之间的相互影响有关。但 NST 是否能逆转 NC 对抗其他阿片受体如 δ, κ 受体引起的镇痛作用还需要进一步的研究和证实。

有报道^[19]NST(10~17) 和 NST 在溶液中有相同的螺旋构象, 且它们的核磁共振参数也是一致的。这也就提示, NST(10~17) 也能和可能存在的 NST 受体结合并激活之。本工作发现, NST(10~17) 也可逆转 NC 对抗 EM-1 和 EM-2 所引起的镇痛作用。说明 NST 碳末端八肽即 NST(10~17) 在此活性方面表现出类似母体的作用。但在相同剂量下(6.25, 25 和 $100 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$), NST(10~17) 反转 NC 的作用与其母体基本相同。这表明 NST(10~17) 虽然有与母体相似的作用, 但活性明显降低。提示 NST 氮末端九肽 NST(1~9) 对 NST 保持在此作用方面的完整活性可能是必须的。

总之, 本工作结果表明, NST 及 NST(10~17) 并不影响小鼠的基础痛阈, 但它们都可以逆转 NC 对抗内吗啡肽-1 和内吗啡肽-2 所引起的小鼠镇痛作用。本工作结果可能为 NC 的进一步研究以及对阿片肽所引起的疼痛、依赖及耐受等方面的研究会提供一些帮助。

REFERENCES:

- [1] Mollereau C, Parmentier M, Mailleux P, et al. ORL1, a novel member of the opioid receptor family cloning, functional expressing and location [J]. *FEBS Lett*, 1994, **341**(1): 33 - 38.
- [2] Meunier JC, Mollereau C, Toll L, et al. Isolation and structure of the endogenous agonist of opioid receptor [J]. *Nature*, 1995, **377**(6549): 532 - 535.
- [3] Reinscheid RK, Nothacker HP, Bosern A, et al. Orphanin FQ: a neuropeptide that activates an opioidlike G protein-coupled receptor [J]. *Science*, 1995, **270**(5237): 792 - 794.
- [4] Okuda-Ashitaka E, Minami T, Tachibana S, et al. Nocistatin, a peptide that blocks nociceptin action in pain transmission [J]. *Nature*, 1998, **392**(6273): 286 - 289.
- [5] Yamamoto T, Sakashita Y. Effect of nocistatin and its interaction with nociceptin/orphanin FQ on the rat formalin test [J]. *Neurosci Lett*, 1999, **262**(3): 179 - 182.
- [6] Nakagawa T, Kaneko M, Inamura S, et al. Intracerebroventricular administration of nocistatin reduces inflammatory hyperalgesia in rats [J]. *Neurosci Lett*, 1999, **265**(1): 64 - 66.
- [7] Zadina JE, Hackler L, Ge LJ, et al. A potent and selective endogenous agonist for the mu-opiate receptor [J]. *Nature*, 1997, **386**(6624): 499 - 502.
- [8] Stone LS, Fairbanks CA, Laughlin TM, et al. Spinal analgesic actions of the new endogenous opioid peptides endomorphin-1 and endomorphin-2 [J]. *Neuroreport*, 1997, **8**(14): 3131 - 3135.
- [9] Mogil JS, Grisel JE, Reinscheid TK, et al. Orphanin FQ is a functional anti-opioid peptide [J]. *Neuroscience*, 1996, **75**

- (2):333 - 337.
- [10] Mogil JS, Grisel JE, Zhang G, *et al.* Functional antagonism of δ , κ , μ opioid antinociceptin by orphanin FQ [J]. *Neurosci Lett*, 1996, **214**(2-3):131 - 134.
- [11] Dong SL, Wang T, Chen Q, *et al.* Synthesis, Structure-activity relationship of nociceptin and its fragments [J]. *Chin Sci Bull* (科学通报), 1999, **44**(12):1296 - 1300.
- [12] Huo XF, Wu N, Ren W, *et al.* Structure-activity relationship of endomorphins and their analogs [J]. *Chin Sci Bull* (科学通报), 2000, **45**(23):2015 - 2019.
- [13] Stewart JM, Young JD. *Solid Phase Peptide Synthesis* [M]. 2nd Ed. Rockford; Pierce Chemical Company, 1986. 76 - 78.
- [14] Loffit A. Improvement to the esterification procedure used in solid phase peptide synthesis [J]. *Int J Protein Res*, 1971, **3**:297 - 299.
- [15] Xu SY, Bian RL, Chen X. *Experimental Methodology of Pharmacology* (药理实验方法学) [M]. 2nd Ed. Beijing: The Peoples Medical Publishing House, 1994. 423 - 426, 804 - 807.
- [16] Zhao CS, Li BS, Zhao GY, *et al.* Nocistatin reverses the effect of orphan in FQ/nociceptin in antagonizing morphine analgesia [J]. *Neuroreport*, 1999, **10**(2):297 - 299.
- [17] Wang YQ, Zhu CB, Wu GC, *et al.* Effects of orphanin FQ on endomorphin-1 induced analgesia [J]. *Brain Res*, 1999, **835**(2):241 - 246.
- [18] Yuan L, Xu W, Han JS. OFQ and CCK-8 act synergistically in antagonizing morphine analgesia in rats [J]. *Chin Pharmacol Bull* (中国药理学通报), 1999, **15**(3):218 - 221.
- [19] Crescenzi O, Cuerrini R, Picon D, *et al.* Solution structure of nocistatin, a new peptide analgesic [J]. *Biopolymers*, 2000, **53**(3):257 - 264.

EFFECTS OF NOCISTATIN AND NOCISTATIN (10 ~ 17) ON NOCICEPTIN IN ANTAGONIZING ENDOMORPHIN-1 AND ENDOMORPHIN-2 ANALGESIA IN MICE

CHEN Li-xiang, CHEN Yong, PENG Ya-li, WANG Zhuan-zi, CHEN Qiang, WANG Rui

(Department of Biochemistry and Molecular Biology, School of Life Sciences,
Lanzhou University, Lanzhou, 730000, China)

ABSTRACT: **AIM** To investigate the effects of nocistatin and nocistatin (10 ~ 17) on nociceptin in antagonizing endomorphin-1 or endomorphin-2 analgesia in mice. **METHODS** Nocistatin and nocistatin (10 ~ 17) were synthesized by solid-phase peptide synthesis method. The mouse tail-flick test was used to assess the pain threshold of the mice and observe the effects of nocistatin and nocistatin (10 ~ 17). **RESULTS** Nociceptin was shown to antagonize endomorphin-1 and endomorphin-2 analgesia. Nocistatin or nocistatin (10 ~ 17) produced no significant effect on basic pain threshold; however, both of them were found to reverse the effects of nociceptin in antagonizing endomorphin-1 and endomorphin-2 analgesia. **CONCLUSION** Nocistatin and nocistatin (10 ~ 17) were shown to reverse the effects of nociceptin in antagonizing endomorphin-1 and endomorphin-2 analgesia at supraspinal level.

KEY WORDS: solid-phase peptide synthesis; nocistatin; nociceptin; endomorphin-1; endomorphin-2; analgesia