- 1996, 12(7): 1479~ 1492
- 3 Joliot V, Martinerie C, Dambrine G, et al. Proviral rearrangements and overexpression of a new cellular gene (*nov*) in myeloblastosis-associated virus type F induced nephroblastomas. *Mol Cell Biol*, 1992, 12(1): 10~ 21
- 4 Su B Y, Cai W Q, Zhang C G, et al. A developmental study of *nov* gene expression in human central nervous system. *Development Biology*, 1998, 321: 883~ 892
- 5 苏炳银, 蔡文琴, 张成岗, 等. 肾母细胞瘤过度表达基因 mRNA 在成年大鼠中枢神经系统的原位杂交定位. *解剖学报*, 1998, 29(2): 151~ 155
- 6 张成岗, 蔡文琴, 苏炳银, 等. 用免疫组化检测肾母细胞瘤过度表达基因蛋白在大鼠中枢神经系统的分布. *解剖学报*, 1998, 29(2): 156~ 160
- 7 苏炳银, 蔡文琴, 张成岗, 等. *nov* 基因在不同种属动物脊髓中的表达. *中国神经科学杂志*, 1998, 14(4): 237~ 241
- 8 Chevalier G, Yeger H, Martinerie C, et al. *nov*: differential expression in developing kidney and Wilm's tumors. *Am J Pathol*, 1998, 152(6): 1563~ 1575
- 9 Scholz G, Martinerie C, Perbal B, et al. Transcriptional down regulation of the *nov* proto-oncogene in fibroblasts transformed by p60v-src. *Mol Cell Biol*, 1996, 16(2): 481~ 486
- 10 O'Brien T P, Yang G P, Sanders L, et al. Expression of *cyr61*, a growth factor-inducible immediate early gene. *Mol Cell Biol*, 1990, 10(7): 3569~ 3577

(1998-10-05 收稿, 1999-01-20 收修改稿)

孤啡肽及其片段的合成和构效关系

董守良 王涛 陈强 王锐*

(兰州大学生物系, 兰州 730000. * 联系人)

摘要 用固相多肽合成方法合成了孤啡肽(NC)及其4个片段, 并进行了受体选择性和亲和性测定、降血压作用及其机理和构效关系的研究. 发现 NC(1~ 13)NH₂ 是拥有 NC 全部活性的最小片段. C 端 4 肽对于 NC 可能不是完全必需的. 但继续缩短则导致受体选择性和亲和性的严重改变. 12~ 13 位的 Arg-Lys 在 NC 的活性中起到了重要作用. NC 的降压作用与肾素-血管紧张素系统的升压作用不互相拮抗.

关键词 孤啡肽 固相多肽合成 降血压 构效关系

1993~ 1994 年, Mollereau 等人^[1]克隆出了一种新型的阿片受体——阿片受体样(ORL1 或 LC132)孤儿受体. 1995 年底又几乎同时在瑞士和法国的两个实验室分别发现了它的内源性配基——孤啡肽(Nociceptin 或 Orphanin FQ, 简称 NC)^[2, 3]. 它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 受体结合活性很弱. 因为 ORL1 与其他内源性阿片肽的亲和力很低, 同时又在分布上与已知的阿片受体大不相同, 因而它和 NC 结合后可能介导许多不同于已知阿片受体的生物活性. 自从 NC 发现以来, 对它的研究有很多. 在一些生理活性方面, 如抑制毛茛菪(Forsklin)引起的 cAMP 积累和抑制电刺激引起的小鼠输精管(MVD)收缩等实验上, 它与其他内阿片肽有一定的相似性, 但不同的是它主要引起痛敏, 并对痛觉的调节是双向的^[4]. 1997 年 Champion 等人^[5]发现 NC 具有降血压功能, 同年他们又发现[Tyr¹]-NC 也有降血压活性, 并且这种作用同 NC 一样不被经典阿片受体阻断剂纳络酮所逆转^[6]. 用

<https://engine.scichina.com/doi/10.1360/csb1999-44-12-1296>

于解释内阿片肽结构功能的“信使、地址”概念表明, N端4肽或3肽决定受体结合类型, C端决定结合强度和受体亚型, 但[Tyr¹]-NC改变了NC的N端(即“信使”区)却没有改变受体结合类型. 为了进一步证明NC与ORL1受体的结合是否符合“信使、地址”概念和探讨NC分子中的关键残基, 结合我室多年取得的肽构效关系研究结果^[7,8], 设计合成了NC的4个片段, 它们均没有改变“信使”区, 并做了MVD检定、降血压作用及机理的研究. 4个片段有规律地在C端减少氨基酸残基, NC(1~15)NH₂去掉了C端的2个酰胺类氨基酸(Asn-Gln); NC(1~13)NH₂去掉了C端4个氨基酸(2个疏水的和2个酰胺类的氨基酸); NC(1~11)NH₂则又去掉了12, 13位的2个碱性氨基酸(Lys-Arg); NC(1~5)NH₂则去掉了C端大部分氨基酸. 试图找到具有母体全部活性的最小片段, 并且发现NC序列中活性必需的关键残基; 同时, 也可为内源性阿片肽的“信使、地址”假说提供证据. 通过MVD检定及对心血管的影响等活性实验, 结合其片段的序列变化, 为了解NC的构效关系提供实验依据.

NC及其片段的序列:

NC: Phe-Gly-Gly-Phe-Thr-Gly-Ala-Arg-Lys-Ser-Ala-Arg-Lys-Leu-Ala-Asn-Gln-OH,

NC(1~15)NH₂: Phe-Gly-Gly-Phe-Thr-Gly-Ala-Arg-Lys-Ser-Ala-Arg-Lys-Leu-Ala-NH₂,

NC(1~13)NH₂: Phe-Gly-Gly-Phe-Thr-Gly-Ala-Arg-Lys-Ser-Ala-Arg-Lys-NH₂,

NC(1~11)NH₂: Phe-Gly-Gly-Phe-Thr-Gly-Ala-Arg-Lys-Ser-Ala-NH₂,

NC(1~5)NH₂: Phe-Gly-Gly-Phe-Thr-NH₂.

1 材料与方法

(1) 材料. Boc-Gln(Xan)-OH, Bachem; Boc-Ala, Boc-Gly, 华美生物工程公司; 其他Boc保护氨基酸, 纳络酮(Nal), 二甲亚砜(DMSO)和二甲基甲酰胺(DMF)均为Sigma产品; 二氯甲烷(DCM), 甲醇(MeOH), 为天津市化学试剂二厂产品, 用前重蒸; 二环己基碳二亚胺(DCC), Aldrich; 三氟乙酸(TFA), Merck; 血管紧张素 [Ang(1-7)] 由本室合成^[8].

实验动物由兰州医学院动物室提供.

(2) 肽合成与纯化. 氨基酸组份分析仪, HITACHI 835-50型; HPLC为Gilson公司产品, 4.6 mm × 250 mm 半制备柱, Partisil 10 ODS-3; 分析柱, C18反相, ZORBAX-ODS.

肽的合成采用固相多肽合成法^[9]. NC采用Merrifield树脂(交联度1%, 200~400目, 氯取代值1 mmol·g⁻¹, Bachem)合成. 第一个氨基酸与树脂的连接用Loffit法^[10]. 取代值 $S = 0.40 \text{ mmol} \cdot \text{g}^{-1}$. 各片段的合成采用本室制备的BHA树脂(1%交联度, 200~400目), $S = 0.537 \text{ mmol} \cdot \text{g}^{-1}$. DCC作缩合剂, 33%TFA脱保护, 10% TEA中和, 25%醋酐封头, 茚三酮试剂测定脱保护和缩合的完成程度. 合成好的肽树脂真空干燥2 d后, 用无水HF切割(0℃, 2 Hrs). NC, NC(1~15)NH₂和NC(1~13)NH₂的粗肽经Sephadex G-25脱盐, NC(1~11)NH₂和NC(1~5)NH₂经G-15脱盐. 所有肽再经HPLC纯化(0.1%TFA和80%乙腈, 梯度洗脱, 检测波长215 nm, 流速, 1.3 mL·min⁻¹), 冷冻干燥得纯肽. 纯肽经氨基酸组份分析合格, 反相HPLC纯度分析>95%.

(3) 生物活性实验. MVD实验按文献[11]方法进行, 麦氏浴管容积10 mL, 刺激电压为50 V, 频率0.067 Hz. 用YSD-5生理多用仪, LMS-2B型二道生理记录仪. 整体降血压实验采用颈总动脉插管测定. Wistar大鼠, 300~400 g, 25%乌拉坦腹腔注射麻醉, 颈外静脉插管用于给药. 手术后30~60 min, 待血压稳定后开始实验, 每次给药后, 动物血压恢复30 min后再行下次给

药^[8,11]. 蟾蜍在体局部微循环活动的实验采用中华大蟾蜍(*Bufo gargarizans*), 20~40 g, 双毁髓, 固定于蛙板上, 剪开腹部皮肤, 拉出肠系膜, 固定于蛙板上特制的显微观察孔上, 在显微镜视野中找到背景清晰、流动正常的微动脉. 为防止标本干燥, 应立即进行实验. 把0.65%生理盐水配制的药液20 μL (总药量4 nmol) 滴加于血管上, 滴加前后记录显微镜目镜测微尺数值并进行显微照像.

2 结果与讨论

2.1 受体选择性与亲和性

MVD中主要含有ORL1和 δ 2种阿片受体, 在两种受体的激动剂存在下, 由电刺激引起的MVD收缩均可被剂量依赖的抑制. 但 δ 受体激动剂起到的作用, 可被非选择性的阿片受体阻断剂纳络酮逆转, 而ORL1受体激动剂(如孤啡肽)的作用则不被纳络酮逆转, 由此可判断药物的受体选择性^[12]. 由表1可见, NC(1~13) NH_2 , NC(1~15) NH_2 与NC具有相似的 IC_{50} , 并且它们的作用均不被纳络酮逆转, 说明它们在受体选择性和亲和性上均有着相同的活性. 但NC(1~11) NH_2 和NC(1~5) NH_2 则在受体选择性和亲和性上均发生了改变, 它们的活性至少降低了2500倍. 纳络酮可逆转NC(1~11) NH_2 的作用达46.8%, 说明它既和ORL1又和 δ 受体相结合起作用; 而NC(1~5) NH_2 能被100%逆转, 则可见它完全和 δ 受体结合.

表1 NC及其片段抑制电刺激MVD收缩的 IC_{50} ($n=6$)

药物	NC	NC(1~15) NH_2	NC(1~13) NH_2	NC(1~11) NH_2	NC(1~5) NH_2
$\text{IC}_{50}/\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$	20.3	19.0	19.2	>50000	>50000
纳络酮逆转与否	否	否	否	46.8%	100%

2.2 降血压作用

NC的降血压作用在文献[5,6]中已有报道, 但降血压机理及其氨基酸序列的变化对该活性的影响目前未见报道. 由图1~3可见NC, NC(1~15) NH_2 和NC(1~13) NH_2 的降血压作用, 在1~50 $\text{nmol}\cdot\text{kg}^{-1}$ 范围内, 三者均可产生剂量依赖的降血压作用, 维持时间大约10 min. 当剂

图1 NC的降血压作用

□为NC, ■为NC+Nal. Nal, 3 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, 提前10 min注射,

$n=7$

图2 NC(1~15) NH_2 的降血压作用

□为NC(1~15) NH_2 , ■为NC(1~15) NH_2 +Nal, 余同图1

量大于 $50 \text{ nmol} \cdot \text{kg}^{-1}$ 时, 由于血压降幅太大, 动物容易死亡. Nal 预处理的情况下, 活性无变化 ($P > 0.05$). NC(1~11)NH₂ 在正常情况下, 没有降血压作用 ($1 \sim 300 \text{ nmol} \cdot \text{kg}^{-1}$), 而 Nal 预处理后, 它却表现出降血压活性 ($100 \text{ nmol} \cdot \text{kg}^{-1}$, 降压 3 kPa). 这可能是大剂量的纳络酮阻断了 δ 受体, 于是它只能与 ORL1 受体结合, 此时产生降血压作用, 但它与 ORL1 受体结合活性较弱, 故产生的降压作用也较弱. 而在 δ 受体存在时, 它和 δ 受体结合不具有降血压作用. NC(1~5)NH₂ 在 MVD 实验中, 由于完全表现为 δ 受体结合, 所以无论纳络酮存在与否, 它均没有降血压作用 ($1 \sim 500 \text{ nmol} \cdot \text{kg}^{-1}$).

2.3 降血压机理

降血压机理的研究, 主要从三方面进行: (1) 在整体条件下与 Ang Ⅱ 和去甲肾上腺素升压作用的拮抗研究; (2) 离体条件下, 对 Ang Ⅱ 特有的胆囊肌条收缩作用的拮抗观察; (3) NC 及其片段的在体局部血管扩张作用. 无论提前注射 NC, NC(1~15)NH₂ 和 NC(1~13)NH₂ 再注射 Ang Ⅱ 或者提前注射 Ang Ⅱ 再注射 NC 及片段 (图 4, Ang Ⅱ 的升血压作用), 互相均没有拮抗作用. 在 Ang Ⅱ 导致的离体胆囊收缩实验中, NC 预处理也未发现有拮抗作用. NC 对去甲肾上腺素升血压作用也未发现有拮抗现象. 由以上实验结果可见, NC 与肾素-血管紧张素系统在调节心血管方面并不互相拮抗.

图3 NC(1~13)NH₂ 的降血压作用

□为 NC(1~13)NH₂, ■为 NC(1~13)NH₂ + Nal, 余同图1

图4 Ang Ⅱ 的升血压作用 ($n=8$)

表2 NC 及其片段的扩血管活性 ($n=12$)

药物	NC	NC(1~15)NH ₂	NC(1~13)NH ₂	NC(1~11)NH ₂	NC(1~5)NH ₂
扩张百分率/%	44.57 ± 6.8	41.11 ± 4.3	68.11 ± 15	42.86 ± 10	29.17 ± 10
Nal 预处理后的 扩张百分率/%	47.50 ± 24	45.22 ± 11	50.35 ± 9.8	54.90 ± 8.5	4.77 ± 2.52

在血管扩张实验中, NC 及其片段均表现有扩血管活性 (表 2), 这是一个意料之外的发现. 但 NC(1~5)NH₂ 相对其他片段活性稍低. 分析原因可能是由于蟾蜍肠系膜上, NC, NC(1~15)NH₂ 和 NC(1~13)NH₂ 均可与 ORL1 结合直接产生扩血管活性. 而 NC(1~11)NH₂ 既可和 ORL1 结合又可和 δ 受体结合, 和 ORL1 结合可产生扩血管活性, 和 δ 受体结合因促进乙酰胆碱释放, 从而也产生局部血管扩张作用; NC(1~5)NH₂ 也因为完全和 δ 受体结合而表现出局部扩血管作用. 以上分析在加入 Nal 预处理后充分证明. δ 受体因被 Nal 完全阻断从而 NC(1~5)NH₂ 的

作用也几乎彻底消失;NC(1~ 11)NH₂ 因只能和 ORL1 受体结合而活性还有所提高。

3 结论

综上所述,NC(1~ 13)NH₂ 是拥有 NC 全部活性的最小片断. NC 及其片段通过和 ORL1 结合介导的生物活性,均对纳络酮不敏感. 同时还发现,NC 不但可以和 ORL1 结合后在中枢神经系统产生降血压作用^[5],还可作用于外周器官(如血管),直接产生扩血管作用来调节血压和局部血流,NC 与肾素-血管紧张素系统之间不互相拮抗. NC(1~ 15)NH₂,NC(1~ 13)NH₂ 具有 NC 的全部生物活性,可见 NC 羧端的 4 个氨基酸(Leu-Ala-Asp-Gln)并不是完全必需的. NC 羧端 12~ 13位的 Arg-Lys 在活性中起到了关键的作用,它的缺失会造成活性的显著降低. 同时,从 NC(1~ 11)NH₂ 和 NC(1~ 5)NH₂ 受体选择性的改变还可发现,C 端在 NC 的受体选择性中占有重要的作用,经典阿片肽的“信使、地址”假说可能不适用于解释 NC.

致谢 本工作为霍英东教育基金、国家自然科学基金(批准号:29502007)、国家教委博士点专项基金和甘肃省自然科学基金(批准号:ZR-97-011)资助项目.

参 考 文 献

- 1 Mollereau C, Parmentier M, Mailleux P, et al. ORL1, a novel member of the opioid receptor family cloning, functional expression and localization. *FEBS Lett*, 1994, 341: 33~ 38
- 2 Meunier J C, Mollereau C, Toll L, et al. Isolation and structure of the endogenous agonist of opioid receptor. *Nature*, 1995, 377: 532~ 535
- 3 Reinscheid R K, Nothacker H P, Bourson A, et al. Orphanin FQ: A neuropeptide that activates an opioid-like G protein coupled receptor. *Science*, 1995, 270: 792~ 794
- 4 Tian J H, Xu W, Han J S, et al. Bidirectional modulatory effect of orphanin FQ on morphine-induced analgesia: antagonism in brain and potentiation in spinal cord of the rat. *Br J Pharmacol*, 1997, 120: 676~ 680
- 5 Champion H C, Kadowitz P J. Nociceptin, an endogenous ligand for the ORL1 receptor, has novel hypotensive activity in the rat. *Life Sci*, 1997, 60: 241~ 245
- 6 Champion H C, Kadowitz P J. [Tyr¹]-nociceptin, a novel nociceptin analog, decreases systemic arterial pressure by a naloxone insensitive mechanism in the rat. *Biochem Biophys Res Commun*, 1997, 234: 309~ 312
- 7 王 锐, 胡晓愚, 嘉 庆, 等. 新皮啡肽类似物的设计、合成、构象和生物活性的研究. *科学通报*, 1995, 40(13): 1197~ 1199
- 8 王 锐, 李晓旭, 胡晓愚, 等. 血管紧张素Ⅱ及其自旋标记物的合成、生物活性和顺磁共振的研究. *科学通报*, 1997, 42(15): 1670~ 1672
- 9 Stewart J M, Young J D. *Solid Phase Peptide Synthesis*, 2nd ed. Rockford: Pierce Chemical Company, 1986. 76~ 78
- 10 Loffet A. Improvement to the esterification procedure used in solid phase peptide synthesis. *Int J Protein Res*, 1971, 3: 297~ 299
- 11 徐叔云, 卞如濂, 陈修主编. *药理实验方法学*. 第二版. 北京: 人民卫生出版社, 1994
- 12 Berzeter-Gurske I P, Schwartz R W, Toll L. Determination of activity for nociceptin in the mouse vas deferens. *Eur J Pharmacol*, 1996, 302: 1~ 2

(1998-11-17 收稿, 1999-03-01 收修改稿)