

孤啡肽及其片段的合成、痛觉调节作用和对免疫功能的影响

董守良, 王 涛, 陈 强, 王 锐*

(兰州大学生命科学院, 生物化学与分子生物学系应用有机化学国家重点实验室, 兰州 730000)

摘要 目的: 研究孤啡肽(NC)与其4个片段(NC(1-15)NH₂, NC(1-13)NH₂, NC(1-11)NH₂, NC(1-5)NH₂)在痛觉调节和免疫活性上的变化, 探讨NC的构效关系。方法: 固相多肽合成法合成NC及其片段; 甩尾法测定它们对小鼠的痛敏作用和对吗啡镇痛作用的拮抗; T细胞玫瑰花结形成百分率和红细胞免疫粘附能力评测对免疫功能的影响。结果: 虽然NC及其片段均有痛敏作用并可拮抗吗啡的镇痛作用, 但NC(1-11)NH₂和NC(1-5)NH₂比母体活性约降低100倍, 而NC(1-13)NH₂和NC(1-15)NH₂与母体有相同的活性。NC及片段(0.3~3 nmol·kg⁻¹)对T细胞免疫功能均有促进作用; NC(1-11)NH₂(0.3 nmol·kg⁻¹)对红细胞的免疫粘附能力有促进作用; NC(1-5)NH₂(0.3~30 nmol·kg⁻¹)不影响红细胞的免疫功能。结论: C端在NC的构效关系中有重要的作用。

关键词 孤啡肽; 固相多肽合成; 痛敏作用; 免疫调节

孤啡肽(nociceptin, 另名orphanin FQ, 简称NC)是1995年底由两家实验室分别从大鼠^[1]和猪^[2]的下丘脑中分离出来的一种新的神经肽。它是阿片受体样孤儿受体的内源性配基, 与强啡肽A及其它内源性阿片肽有一定的结构相似性, 而药理学特征明显不同。从发现以来, 孤啡肽在痛觉调节、离子通道和心血管系统、运动、摄食等方面已有大量研究^[3], 构效关系方面的研究较少, 对免疫功能的影响研究目前尚未见报道。本文设计并合成了孤啡肽及其4个片段, 通过痛敏及对抗吗啡镇痛的作用, 试图探讨NC的构效关系及对免疫功能的影响。

材 料 和 方 法

实验动物 昆明系小鼠由兰州医学院动物室提供, F1系小鼠由卫生部兰州生物制品所动物房提供。

试剂 Boc·Gln(Xan)·OH, Bachem; Boc·Ala, Boc·Gly, 华美生物工程公司; 其它Boc保护氨基酸, 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), 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; 茚三酮(Nihydrin), Pierce; 淋巴细胞分层液(d = 1.0777), 日本东京化城; 盐酸吗啡, 沈阳第一制药厂。

肽合成 肽的合成按文献^[4]方法合成。NC采用Merrifield树脂(交联度1%, 200~400目, 氯取代值1 mmol·g⁻¹, Bachem产品)合成。第一个氨基酸与树脂的连接用Loffit法^[5]。取代值S = 0.40 mmol·g⁻¹。各片段的合成用本室制备的BHA树脂(1%交联度, 200~400目), S = 0.537 mmol·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两天后, 用无水HF切割(0℃, 2h)。NC, NC(1-15)NH₂和NC(1-13)NH₂的粗肽经Sephadex G25脱盐; NC(1-11)NH₂和NC(1-5)NH₂经G15脱盐。所有肽再经HPLC制备(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%。

仪器 氨基酸组份分析仪, Hitachi 835-50型; HPLC为Gilson公司产品, 4.6×250 mm半制备柱, Partisil 10 ODS-3; 分析柱, C18反相, ZORBAX-ODS。

痛敏及拮抗吗啡镇痛实验 按文献^[6]方法, 昆明系小鼠, 体重20±2 g, ♀♂兼半, 每组10只, 脑室

收稿日期: 1998-12-07

基金项目: 霍英东教育基金(第5届)、国家自然科学基金(29502007)和甘肃省自然科学基金资助项目(ZR-97-011)

*联系人 Tel: (0931)8912567 or (0931)8911255,

Fax: (0931)8610862, E-mail: wangrui@lzu.edu.cn

董守良 男, 25岁, 博士研究生

王 锐 男, 36岁, 教授, 博士生导师

注射(icv) NC 或其片段各 5 μL (20 nmol·mL⁻¹ ~ 2 mmol·mL⁻¹), 对照组注射等体积的生理盐水。预测痛阈使对照组小鼠甩尾时间平均为 10 s 左右, 过于敏感或迟钝的小鼠弃去不用。在给药后 2 h 内每 20 min 测定一次甩尾时间。对抗吗啡镇痛作用的实验与痛敏相似, 先注射(ip) 吗啡 20 μL (2 mg·mL⁻¹), 再注射(icv) NC 或其片段, 对照组注射等体积的生理盐水。

对免疫功能的影响 体重 16 ± 1 g, F1 系小鼠, ♀ ♂ 兼半, 每组 10 只。腹腔注射 NC 或其片段各 30 μL, 剂量 0.3 ~ 30 nmol·kg⁻¹。对照组注射等体积的生理盐水。注射 2 h 后开始实验, 摘眼球取血, 常规洗涤, 分离 T 细胞与红细胞^[7]。用 Hanks 液调整 T 细胞浓度为 2 × 10⁶ 个·mL⁻¹。吸取该细胞悬液 0.1 mL 分别与 3 × 10⁷ 个·mL⁻¹ 和 2 × 10⁸ 个·mL⁻¹ 的绵羊红细胞 (SRBC) 悬液 0.1 mL 在离心管内混匀, 使淋巴细胞与 SRBC 的比例为 1:15 (活性) 和 1:100 (总数)。在 37 °C 孵育 5 min 后, 1 500 r·min⁻¹ 离心 5 min。置 4 °C 冰箱分别于 5 min (活性) 和 2 h (总数) 后取出, 将上清液吸出一半, 加入等量的 0.8 % 的戊二醛混匀, 再次置 4 °C 冰箱内 5 min 后,

0.5 % 的吉氏染液染色, 滴片, 镜检计数, 计算活性 T 细胞玫瑰花结形成百分率 (Ea-RFC) 和 T 细胞总数玫瑰花结形成百分率 (Et-RFC)。红细胞用生理盐水调整浓度为 1.25 × 10⁷ 个·mL⁻¹, 分别和致敏与非致敏的啤酒酵母菌悬液 (1 × 10⁸ 个·mL⁻¹) 混合, 37 °C 孵育 30 min, 0.25 % 的戊二醛固定终止反应, 0.5 % 吉氏染液染色, 滴片镜检计数, 计算 RBC-C₃b 和 RBC-IC。

两组实验均重复两次。

统计学处理 文中数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 不同组间的差异用方差分析 (ANOVA) 进行统计学处理。

结 果

1 NC 及其片段的痛敏作用和对吗啡镇痛作用的拮抗

在导致动物的痛觉过敏方面, 高剂量和中剂量时, NC、NC(1-15) NH₂ 和 NC(1-13) NH₂ 有相似的结果 (表 1)。在低剂量时, NC(1-13) NH₂ 和 NC(1-15) NH₂ 比 NC 有更好的痛敏作用 (P < 0.05)。NC 及 4 个片段痛敏作用的药时曲线观察发现, NC 及 4 个片段在 1 h 后仍有痛敏作用。

Tab 1 The tail flick latency time (s) of mice given icv nociceptin (NC) or its fragments. The controls were given normal saline. The mouse tail flick latency times were recorded 40 min after given the drug

Comp./ Dose(nmol)	NC	NC(1-15) NH ₂	NC(1-13) NH ₂	NC(1-11) NH ₂	NC(1-5) NH ₂
10	2.80 ± 0.27* *	1.88 ± 0.34* *	1.70 ± 0.13* *	4.20 ± 1.02*	5.34 ± 1.80*
1	4.71 ± 1.23*	3.62 ± 0.74* * #	3.26 ± 0.44* * #	6.90 ± 1.64	5.47 ± 2.38
0.1	6.42 ± 2.12	4.65 ± 1.11* #	4.62 ± 0.66* #	8.04 ± 1.97	7.86 ± 2.73

n = 20, $\bar{x} \pm s$. * P ≤ 0.05, ** P ≤ 0.01. Time: s. Control: 8.59 ± 1.69. # P < 0.05 (NC(1-15) NH₂ or NC(1-13) NH₂ vs. NC at the same dose).

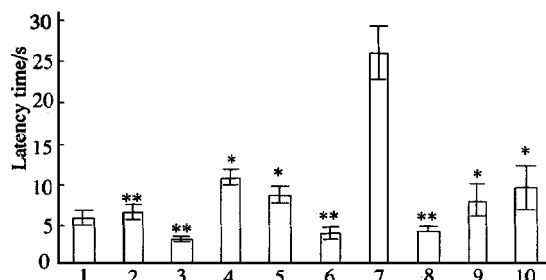


Fig 1 The effects of NC and its fragments antialgesia induced by morphine. Except control, the others were injected morphin 20 μL (2 mg·mL⁻¹), then injected NC and its fragments were (icv, 5 μL). 1: control, ip, NS, 20 μL, then icv NS 5 μL; 2: NC 0.1 nmol; 3: NC 1 nmol; 4: NC (1-13) NH₂, 0.1 nmol; 5: NC(1-13) NH₂, 1 nmol; 6: NC(1-13) NH₂, 10 nmol; 7: NS, 5 μL; 8: NC (1-15) NH₂, 0.1 nmol; 9: NC (1-11) NH₂, 100 nmol; 10: NC(1-5) NH₂, 100 nmol.

NC 及其片段对吗啡镇痛的拮抗研究发现 (图 1), NC 的拮抗效果和 NC(1-15) NH₂ 一样, 在 5 个药物中最好。NC(1-13) NH₂ 虽然在痛敏作用中表现比 NC 稍强, 但对吗啡的拮抗作用却不如 NC。NC(1-11) NH₂ 和 NC(1-5) NH₂ 的剂量高达 100 nmol 时才对吗啡有拮抗作用。

2 NC 及其片段对免疫功能的影响

NC 及 4 个片段对免疫功能的调节, 随剂量发生变化。其中 NC(1-13) NH₂ 和 NC(1-15) NH₂ 在 EAC 花结实验中, 有相似的作用 (图 3)。在 0.3 ~ 30 nmol·kg⁻¹ 剂量范围内, 随着剂量的增加, 免疫促进作用增高。NC 在低剂量时, 免疫促进作用最强, 剂量升高促进免疫的作用略有减小。NC(1-11) NH₂ 和 NC(1-5) NH₂ 的活性在 0.3 ~ 30 nmol·kg⁻¹ 剂量范围内比 NC、NC(1-15) NH₂ 和 NC(1-13) NH₂

的活性稍低。与对照组相比较,均对 T 细胞免疫功能有显著促进作用。

在 RCIA 实验中, NC(1-15) NH₂ 和 NC(1-13) NH₂ 也有相似的作用(图 2), 在 3 nmol·kg⁻¹ 剂量时, 它们对红细胞免疫功能没有影响。NC(1-5)

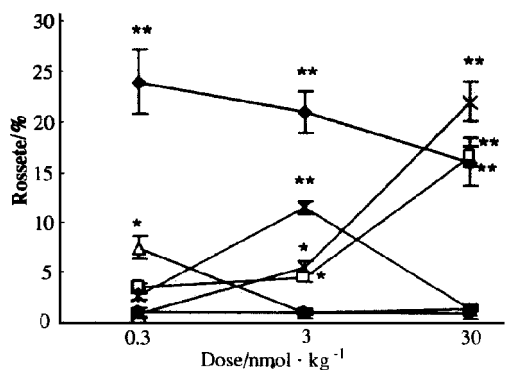


Fig 2 RBC-C₃b. n = 20, * P < 0.05; ** P < 0.01. ◆—◆ NC; □—□ NC(1-13) NH₂; △—△ NC(1-11) NH₂; ×—× NC(1-15) NH₂; *—* NC(1-5) NH₂; ●—● Control.

NH₂ 对红细胞的免疫粘附能力在 0.3 ~ 30 nmol·kg⁻¹ 的剂量下无作用; NC(1-11) NH₂ 只有在 0.3 nmol·kg⁻¹ 剂量时表现为促进作用, 其它剂量无影响。NC 在这方面的作用与对 EAC 的作用比较相似。

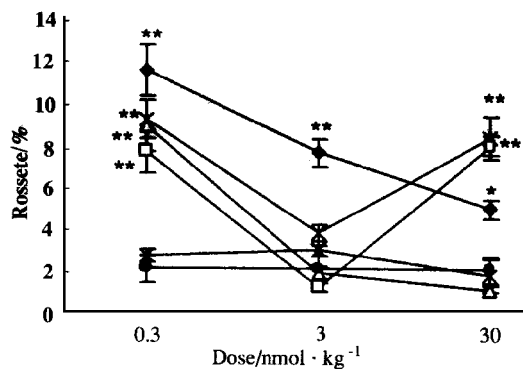


Fig 3 Ear RBC. n = 20, * P < 0.05; ** P < 0.01. ◆—◆ NC; □—□ NC(1-13) NH₂; △—△ NC(1-11) NH₂; ×—× NC(1-15) NH₂; *—* NC(1-5) NH₂; ●—● Control.

讨 论

Tab 2 The sequence of NC and its fragments

Abbreviation	The sequence
NC	FGGFTGARKSARKLANQ-OH
NC(1-15) NH ₂	FGGFTGARKSARKLA-NH ₂
NC(1-13) NH ₂	FGGFTGARKSARK-NH ₂
NC(1-11) NH ₂	FGGFTGARKSA-NH ₂
NC(1-5) NH ₂	FGGFT-NH ₂

内阿片肽的“信使-地址”概念认为, 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。1997 年 Champion 等^[10]报道了 N 端 1 位把 Phe 换成 Tyr 的类似物-[Tyr¹] NC, 不但有 NC 相似的痛敏活性而且也有相同的降血压作用, 并且这两种作用均不被经典阿片受体阻断剂纳络酮所逆转, 说明[Tyr¹] NC 也是和阿片受体样孤儿受体结合而起的作用, 于是提出 NC 的构效关系可能不符合经典阿片肽的“信使-地址”假说。本文设计并合成了 NC 的 4 个片段, 它们均没有改变 NC 的 N 端(即“信使”端)。在活性多肽中, 影响结构与功能的残基一般为同一类型的氨基酸, 故 NC(1-15) NH₂ 去掉了 C 端的两个酰胺类残基(NQ); NC(1-13) NH₂ 在它的基础上, 又去掉了两个疏水残基(LA);

NC(1-11) NH₂ 则又进一步去掉了 C 端 12-13 位的 Arg-Lys; NC(1-5) NH₂ 则去掉了 C 端大部分残基(只保留了 Thr⁵)。根据体外实验 NC 被酶水解的特点^[9], 片段均以酰胺结尾。通过以上的序列改变并结合各片段的活性变化, 试图探讨 NC 的构效关系和找出影响活性的关键残基。

痛敏实验发现, C 端的缩短确实影响了 NC 的生物活性。NC(1-13) NH₂ 拥有母体相似的活性, 而 NC(1-11) NH₂ 的活性却下降了约 100 倍, 可见 C 端 Arg¹²-Lys¹³ 在 NC 的活性中占有重要的地位, 而 C 端四肽(LANQ)则可能不是完全必需的。实验中还发现, 在 10 nmol·kg⁻¹ 的剂量时, 注射 NC、NC(1-15) NH₂ 和 NC(1-13) NH₂ 的小鼠均表现出运动功能失调。

阿片类药物对 T 细胞免疫功能的促进作用, 有文献报道^[10]是通过促进 T 细胞分化来实现的。在促进红细胞免疫功能方面, 报道相对较少。本实验室曾报道^[8]了关于 δ 阿片受体的专一激动剂新皮啡肽 I (Del I) 对红细胞免疫的促进作用, 其机理目前尚不清楚, 但从 RBC-C₃b 的成环率升高来看, 可能是通过增加红细胞表面 C₃b 受体的表达实现的。NC 对免疫功能的影响目前还未见报道, 在此从细胞免疫的角度研究 NC 对免疫功能的影响, 发现 NC

对免疫系统也具有调节作用,尤其对 T 细胞的免疫功能,NC 及其片段均有促进作用。

References

- 1 Meunier JC, Mollereau C, Toll L, *et al.* Isolation and structure of the endogenous agonist of opioid receptor. *Nature*, 1995, **377**: 532
- 2 Reinscheid RK, Nothacker HP, Bourson A, *et al.* Orphanin FQ: A neuropeptide that activates an opioid-like G protein-coupled receptor. *Science*, 1995, **270**: 792
- 3 Taylor F, Dickenson A. Nociceptin/Orphanin FQ. A new opioid, a new analgesic? *Neuroreport*, 1998, **9**: 65
- 4 Stewart JM, Young JD. Solid Phase Peptide Synthesis. 2nd Ed. Rockford: Pierce Chemical Company. 1986: 76 ~ 78
- 5 Loffet A. Improvement to the esterification procedure used in solid phase peptide synthesis. *Int J Protein Res*, 1971, **3**: 297
- 6 Zhao MM(赵明敏). Hot stimulate. In: Xu SY(徐叔云), Bian RL(卞如濂), Chen X(陈修). Ed. *Experimental Methodology of Pharmacology*. 2nd ed. Beijing: the Peoples Medical Publishing House, 1994: 693 ~ 695
- 7 Montiel JL, Cornille F, Roques BP, *et al.* Nociceptin/orphanin FQ metabolism: role of aminopeptidase and endopeptidase 24.15. *J Neurochem*, 1997, **68**: 354
- 8 Hu XY(胡晓愚), Wang R(王锐), Jia Q(嘉庆), *et al.* Studies on the synthesis and structure-activity relation of deltorphin I analogues. *Acta Pharm Sin*, 1995, **30**: 679
- 9 Xue JZ(薛建中). Immuno modulation of β -endorphin. *Immunol J*, 1993, **9**: 275
- 10 Champion HC, Kadowitz PJ. [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

SYNTHESIS, PAIN MODULATION AND IMMUNOACTIVITY OF NOCICEPTIN AND ITS FRAGMENTS

Dong Shouliang(Dong SL), Wang Tao(Wang T), Chen Qiang(Chen Q) and Wang Rui(Wang R)

(Department of Biochemistry and Molecular Biology, School of Life Science, State Key Laboratory of Applied Organic Chemistry, Lanzhou University, Lanzhou 730000)

ABSTRACT AIM: To analyse the structure-activity relationship of nociceptin (NC) by the changes of pain modulation and the sequence of its four fragments(NC(1-15) NH₂, NC(1-13) NH₂, NC(1-11) NH₂, and NC(1-5) NH₂), and to evaluate the immunσactivity of NC and its fragments. **METHODS:** Peptides were synthesized by solid phase peptide synthesis. The hyperalgesia and antagonism to analgesia induced by morphine were evaluated with tail flick method. Percentage of rosette forming cell and the red cell immuno activity were used to determine the effect on immuno system. **RESULTS:** NC and its fragments showed hyporelgesia activity and antagonized morphine induced analgesia, but the activities of NC(1-11) NH₂ and NC(1-5) NH₂ were 100 times lower than the activity of NC. NC(1-13) NH₂ and NC(1-15) NH₂ shared the same activity with NC. The percentage of rosette formed by activated T cell could be enhanced by NC and its fragments. NC(1-11) NH₂ was shown to enhance the red cell immuno activity only at the dose of 0.3 nmol•kg⁻¹. NC(1-5) NH₂ showed no effect on RCIA. **CONCLUSION:** The entire sequence of NC may be not required for full hyperalgesic activity because NC(1-13) NH₂ shares the same activity with NC. NC(1-11) NH₂ and NC(1-5) NH₂ have very low activity so the C terminal plays important role in the structure-activity relationship of NC.

KEY WORDS nociceptin; solid phase peptide synthesis; pain modulation; immuno activity