

孤啡肽受体的配体研究进展\*

陈勇 常民 王锐\*\*

(兰州大学生命科学学院生物化学与分子生物学系, 兰州 730000)

摘要 孤啡肽 (nociceptin 或 orphanin FQ) 发现于 1995 年底, 它是阿片受体样受体 (ORL1 或 LC 132) 的内源性配体, 在痛觉调节、心血管系统、离子通道、依赖和耐受、学习和记忆等方面具有广泛的生物学活性. 最近几年, 对孤啡肽受体与相关配体构效关系的研究成为一个新的热点. 对在研究构效关系过程中所发现的孤啡肽受体相关配体 (片段、拮抗剂、激动剂、部分激动剂和阻断剂) 的研究情况进行了介绍.

关键词 孤啡肽, ORL1 受体, 配体, 片段, 激动剂, 部分激动剂, 拮抗剂

学科分类号 Q5

1994 年初, 法国学者 Mollereau 等<sup>[1]</sup>在克隆阿片受体的过程中, 意外地克隆出了一种不同于  $\delta$ 、 $\kappa$ 、 $\mu$  经典阿片受体的阿片受体, 命名为阿片受体样受体 (opioid receptor like1 receptor, ORL1). 由于当时没有找到它的专一性配体, 所以也称之为孤儿阿片受体样受体 (orphan opioid-like receptor). 1995 年 10 月和 11 月, 瑞士和法国的两个实验室分别从大鼠和猪的下丘脑中分离出了 ORL1 受体的内源性配体<sup>[2,3]</sup>, 命名为 nociceptin 和 orphanin FQ, 国内译名为孤啡肽 (韩济生, 1996 年), 简称 NC. 它是一个以羧基结尾的 17 肽 (PheGlyGlyPhe-

ThrGlyAlaArgLysSerAlaArgLysLeuAlaAsnGln-OH).

随着研究的不断深入, NC-ORL1 系统在痛觉调节、心血管系统、离子通道、依赖和耐受、学习和记忆等方面广泛的生物活性不断被发现<sup>[4]</sup>. 但 NC 在生理和药理方面的许多作用机理还不是非常清楚, 研究其构效关系并寻找新的高效激动剂和拮抗剂对揭示其机理有重要意义. 最近几年, 发现新的高效激动剂和专一性拮抗剂成为广大科学工作者的研究热点之一. 到目前为止, ORL1 受体相关配体不断被发现 (表 1), 本文结合我们实验室的研究就近年来这些方面的工作进展进行了综述.

Table 1 Ligands of ORL1 receptor

表 1 ORL1 受体的配体

|     | 激动剂                                                                  | 部分激动剂                           | 拮抗剂                                                                            |
|-----|----------------------------------------------------------------------|---------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------|
| 肽类  | NC                                                                   | [F/G] NC (1~13) NH <sub>2</sub> | [Nphe <sup>1</sup> ] NC (1~13) NH <sub>2</sub>                                 |
|     | NC (1~13) NH <sub>2</sub>                                            | Ac-RYYRIK-NH <sub>2</sub>       | Peptide III-BTD                                                                |
|     | [Arg <sup>14</sup> , Lys <sup>15</sup> ] NC                          | Ac-RYYRWK-NH <sub>2</sub>       | [Nphe <sup>1</sup> , Arg <sup>14</sup> , Lys <sup>15</sup> ] NCNH <sub>2</sub> |
|     | [ (pF) Phe <sup>4</sup> ] NC (1~13) NH <sub>2</sub>                  | ZP-120                          |                                                                                |
|     | [Aib <sup>7</sup> , Aib <sup>11</sup> ] NCNH <sub>2</sub>            |                                 |                                                                                |
|     | c [Cys <sup>10</sup> , Cys <sup>14</sup> ] NC (1~14) NH <sub>2</sub> |                                 |                                                                                |
| 非肽类 | Ro65-6570                                                            | NalBzOH                         | J-113397                                                                       |
|     | NNC63-0532                                                           |                                 | JTC-801                                                                        |
|     | Ro64-6198                                                            |                                 |                                                                                |

1 NC 片段的研究

通过有目的、有规律地缩短其序列, 以期发现最小的活性片段, 是研究新发现的内源性神经肽的一种常规方法. 由于 NC 的 N 端序列一般是保守

\* 国家自然科学基金 (20072014) 和科技部重大基础研究前期研究专项 (2002ccc00600) 资助项目.

\*\* 通讯联系人.

Tel: 0931-8912567, E-mail: wangrui@lzu.edu.cn

收稿日期: 2003-06-30, 接受日期: 2003-09-30

的, 所以大部分工作都是保留其 N 端而缩短 C 端. 以下简要介绍了几年来对 NC 片段的研究工作.

实验证明<sup>[5]</sup>, NC (1~13) NH<sub>2</sub> 是拥有 NC 全部活性的最小片段. 在离体实验中, NC (1~13) NH<sub>2</sub> 可以抑制电刺激 (EFS) 所引起的豚鼠回肠纵行肌 (GPI) 和小鼠输精管 (MVD) 的收缩, 抑制 forskolin 引起的环腺苷酸 (cAMP) 的积聚和 5-羟色胺 (5-HT) 的释放; 在体试验中, NC (1~13) NH<sub>2</sub> 可降低大鼠和小鼠的血压和心率, 对抗吗啡所引起的镇痛等. NC (1~13) NH<sub>2</sub> 所引起的这些效果基本上和 NC 等同. NC (1~13) NH<sub>2</sub> C 端的 —NH<sub>2</sub> 对维持其活性起着非常重要的作用, 因为有实验证明, NC (1~13) 与 ORL1 受体的亲和力明显降低. 在以后的对 NC 结构改造实验中, 很多都以 NC (1~13) NH<sub>2</sub> 做为模板, 在其结构基础上进行构效关系的研究.

去掉 C 端 6 肽的 NC (1~11) NH<sub>2</sub>, 因没有 12~13 位的 Arg-Lys, 与 ORL1 受体的结合力很弱 ( $K_i > 250$  nmol/L); 同时对  $\delta$  受体有了一定的亲和力, 纳络酮可逆转其抑制 MVD 收缩达 46.8%<sup>[5]</sup>. NC (1~11) NH<sub>2</sub> 大多数的生物活性表现在痛觉调节方面, 在高强度热辐射和电刺激大鼠鼠尾试验中, NC (1~11) NH<sub>2</sub> 可使大鼠产生镇痛作用, 而低强度热辐射可使大鼠产生痛敏<sup>[6]</sup>. NC (1~11) NH<sub>2</sub> 在大鼠的中枢结合位点没有 NC 那么广泛, 在大鼠脑膜的结合区域 NC (1~11) NH<sub>2</sub> 有着和 NC 及其他阿片肽不同的结合位点, 人们推测其可能有自己的受体.

NC (1~7) NH<sub>2</sub> 因为又去掉了 8~9 位的 Arg-Lys, 则几乎丧失了与 ORL1 受体的结合活性. 在 cAMP 升高抑制实验中  $IC_{50} > 15$   $\mu$ mol/L, 鞘内单独注射 NC (1~7) NH<sub>2</sub> 对小鼠的基础痛域以及其他阿片肽所引起的镇痛作用无显著影响, 但它可以拮抗 NC 的痛敏作用<sup>[7]</sup>, 静脉注射不影响大鼠的血压.

NC (1~5) NH<sub>2</sub> 又由于失去了大部分 C 端序列而在 MVD 实验中完全表现为与  $\delta$  受体结合, 可被纳络酮完全逆转<sup>[5]</sup>. 以上内容提示: NC 与强啡肽 A 类似, 碱性氨基酸对维持其受体选择性也起到了关键作用.

NC C 端五肽 NC (13~17) 是一个于 2001 年发现的具痛觉调节作用的新的生物活性肽<sup>[8]</sup>. 在脊髓水平和外周注射 NC (13~17), 采用屈肌反射和行为测试实验发现它可使小鼠产生痛敏, 且这些作用并不受 ORL1 受体基因敲除所影响, 这表明它

所产生的痛敏作用并不通过 ORL1 受体所介导. 我们实验室的结果表明<sup>[9]</sup>: NC (13~17) 的痛敏作用要强于 NC, 并呈剂量依赖性, 这一作用并不能被纳洛酮 (非选择性的阿片受体拮抗剂) 和 [Nphe<sup>1</sup>] NC (1~13) NH<sub>2</sub> (ORL1 受体专一性的拮抗剂) 所拮抗, 这表明其具有一个不依赖于 ORL1 受体和其他阿片受体的新的作用通路. 脑室注射可加强吗啡的镇痛, 当和 NC 联合注射时, 可显著逆转 NC 的痛敏作用. 目前为止, 还不清楚 NC (13~17) 的作用机理.

## 2 ORL1 受体的激动剂

### 2.1 肽类

[Arg<sup>14</sup>, Lys<sup>15</sup>] NC: 对 NC 构效关系研究的结果提示, 在 NC 序列中, 带有正电荷的氨基酸残基即 Arg<sup>8,12</sup> 和 Lys<sup>9,13</sup> 对 NC 与受体的结合起着非常重要的作用. 基于这样的研究基础和考虑, Okada 等<sup>[10]</sup>把 Arg-Lys 分别引入到 NC 序列中的 6~7、10~11 和 14~15 这几个位点. 在表达人重组 ORL1 受体的结合实验中发现: [Arg<sup>14</sup>, Lys<sup>15</sup>] NC 与 ORL1 受体结合的活性比 NC 高 3 倍. 在 MVD、RVD、GPI 和小鼠结肠实验中, [Arg<sup>14</sup>, Lys<sup>15</sup>] NC 的最大效果基本和 NC 等同, 但在同一剂量时, 其激活 ORL1 受体的能力远大于 NC (MVD: 17 倍; RVD: 10 倍; GPI 和小鼠结肠: 5 倍). [Arg<sup>14</sup>, Lys<sup>15</sup>] NC 的这些效果不受纳洛酮影响, 但可以被 ORL1 受体的拮抗剂 [Nphe<sup>1</sup>] NC (1~13) NH<sub>2</sub> 和 J-113397 拮抗. 小鼠痛敏和抑制运动的实验发现: 其作用强度比 NC 高 30 倍, 而且作用的时间也较 NC 长. 总之, 以上的结果显示, [Arg<sup>14</sup>, Lys<sup>15</sup>] NC 是 ORL1 受体一个高效和高选择性的激动剂, 且药效明显延长.

[(pF) phe<sup>4</sup>] NC (1~13) NH<sub>2</sub> 和 [(pNO<sub>2</sub>) phe<sup>4</sup>] NC (1~13) NH<sub>2</sub>: 2001 年 Calo 等<sup>[11]</sup>对 Phe<sup>4</sup> 进行了一系列改造, 发现 [(pF) phe<sup>4</sup>] NC (1~13) NH<sub>2</sub> 和 [(pNO<sub>2</sub>) phe<sup>4</sup>] NC (1~13) NH<sub>2</sub> 与小鼠皮层脑膜上 ORL1 受体的亲和力高于 NC. 在体实验中, 两个类似物脑室注射引起的小鼠痛敏和对抗吗啡镇痛的作用明显要长于 NC, 它们降低大鼠血压动脉压和心率的作用的时间也比 NC 要长. 脑室注射 [(pF) phe<sup>4</sup>] NC (1~13) NH<sub>2</sub> 可剂量依赖地刺激大鼠进食的作用比 NC 大 10 倍.

c [Cys<sup>10</sup>, Cys<sup>14</sup>] NC (1~14) NH<sub>2</sub>: 2001 年, Ambo 等<sup>[12]</sup>从 NC 的 N 端和 C 端采用二硫键成

环后的一系列类似物中筛选出 ORL1 受体的激动剂 c [Cys<sup>10</sup>, Cys<sup>14</sup>] NC (1~14) NH<sub>2</sub>, 经受体结合实验分析, 它与 ORL1 受体的亲和力与 NC 相当, 为研究 NC 的生物活性构象提供了一个模板。

[Aib<sup>7</sup>, Aib<sup>11</sup>] NCNH<sub>2</sub>: 2002 年, Zhang 等<sup>[13]</sup> 将 Aib (C<sup>α</sup>-methyl alanine) 引入 NC 替换 Ala 得到了效价和受体亲和性均优于 NC 的激动剂 [Aib<sup>7</sup>, Aib<sup>11</sup>] NCNH<sub>2</sub>. 通过构效关系的研究推测, NC 的 5~14 位序列 (TGARKSARKL) 在与受体结合时的活性构象形成了两性的 α 螺旋. Arg<sup>8</sup>, Lys<sup>9</sup> 和 Arg<sup>12</sup>, Lys<sup>13</sup> 的碱性侧链形成的亲水面与 ORL1 受体的 EL2 上的 Glu 等酸性氨基酸相互作用, 这种作用在与受体结合时起重要作用. Aib 中 C<sup>α</sup>-methyl 的引入, 使肽链表现出更易于形成 α 螺旋. 将其引入 NC 序列后, 使得 NC 的 5~14 片段更易于形成上述所说的 α 螺旋, 从而增加 NC 与受体的亲和性. 目前来说, 其活性方面的研究还很少, 我们实验室已设计了含有 Aib 的一系列 NC 类似物, 以期从中发现 ORL1 受体更高效的配体。

## 2.2 非肽类

2000 年, 瑞士的 Roche 实验室 Wichmann 等<sup>[14]</sup> 从大量的非肽类化合物中检定出了一个和 ORL1 受体亲和力高 (等同于 NC) 的非肽类配体即 Ro-64-6198, 此化合物结合 ORL1 受体的亲和力较结合其他的阿片受体高 100 倍. 在重组 ORL1 受体细胞中进行的功能试验表明它是与 NC 相当的激动剂. 它和 NC 抑制 EFS 引起的 MVD 和大鼠输精管的收缩效果相当 ( $pEC_{50}$  和  $E_{max}$  基本相等). 但在 GPI 实验中, 其  $E_{max}$  要大于 NC. 需要注意的是, 在大鼠输精管的收缩实验中, Ro-64-6198 的抑制效果为纳络酮不敏感, 而且 [Nphe<sup>1</sup>] NC (1~13) NH<sub>2</sub> 和 J-113397 可对抗 Ro-64-6198 的作用. Ro-64-6198 抑制 EFS 所引起的 MVD 收缩作用不能被拮抗剂所拮抗. 静脉注射 Ro-64-6198, 可产生和脑室注射 NC 同样的大鼠焦虑样反应, 但小鼠的焦虑样反应强度更加明显, 这暗示 Ro-64-6198 对不同种属所产生的作用可能是不同的<sup>[15]</sup>. Ro-64-6198 和 NC 一样可以对抗吗啡所引起的大鼠急性镇痛, 但和 NC 不同, 其对吗啡所产生的依赖无影响. Ro-64-6198 在心血管、肾功能、促进进食以及焦虑实验中基本和 NC 的作用一致, 但和 NC 不同, 它并不能产生心率过缓和肾交感神经放电行为. 总而言之, Ro-64-6198 可以做为一个合适的工具药来研究 ORL1 受体系统所产生不同的生物活性. 在此类螺哌啶化合物的研

究中得到了许多 ORL1 受体配体, 如 Ro-65-6570、NNC 63-0532 等. 最近 Kolczewski 等<sup>[16]</sup> 发现六氢螺 [哌啶-4, 1'-吡咯 [3, 4-环] 吡咯] 的一系列化合物, 其中最佳的化合物与 ORL1 受体的  $K_i$  值为 0.45 nmol/L, 并对 ORL1 受体有大于 1 000 倍的选择性。

## 3 ORL1 受体的部分激动剂

[F/G] NC (1~13) NH<sub>2</sub>: 1998 年, 意大利的 Calo 等<sup>[17]</sup> 在 NC (1~13) NH<sub>2</sub> 的第 1 和 2 位之间加入了一个假肽键合成了 [F/G] NC (1~13) NH<sub>2</sub>. 他们当初的目的是想在 Phe<sup>1</sup> 和 Gly<sup>2</sup> 之间加入假肽键来防止肽酶的水解, 从而延长 NC 的作用时间, 增强药效. 偶然的是, [F/G] NC (1~13) NH<sub>2</sub> 可以竞争性地拮抗 NC 抑制 EFS 所引起的 GPI 和 MVD 的收缩, 它也可以拮抗 NC 对 EFS 所引起的大鼠回肠收缩的抑制作用, 提出了 [F/G] NC (1~13) NH<sub>2</sub> 是 ORL1 受体的拮抗剂. 同样也有人证明, [F/G] NC (1~13) NH<sub>2</sub> 可拮抗 NC 所引发的血压降低和心率过缓. 但是后来有人提出它是 ORL1 受体的激动剂或部分激动剂. 经过一段时间研究发现 [F/G] NC (1~13) NH<sub>2</sub> 可以作为 ORL1 受体的拮抗剂、激动剂以及部分激动剂, 这主要依赖于所进行研究的组织对象. 在离体组织中 [F/G] NC (1~13) NH<sub>2</sub> 主要表现为 ORL1 受体的拮抗剂 ( $pA_2 \approx 7$ ). 但是, [F/G] NC (1~13) NH<sub>2</sub> 并不是在所有的离体组织中都表现为拮抗剂, 如它可抑制小鼠和大鼠的结肠收缩, 表现为 ORL1 受体的激动剂, 可抑制 RVD 的收缩, 但其作用弱于 NC, 而且可拮抗 NC 的抑制作用, 在这里表现为 ORL1 受体的部分激动剂. 在体时, 脑室注射 [F/G] NC (1~13) NH<sub>2</sub> 可引起大鼠痛敏、清醒大鼠的心率、血压下降, 鞘内注射则对大鼠有镇痛作用; 在表达 ORL1 受体的小鼠 N1E-115 神经母细胞瘤细胞中, 它和 NC 均可抑制 forskolin 引起的 cAMP 的形成, 但其最大抑制效果低于 NC, 当它和 NC 联合使用时, 它能部分拮抗 NC 的作用, 表现为 ORL1 受体的部分激动剂, 此时 [F/G] NC (1~13) NH<sub>2</sub> 更多的情况下表现为 ORL1 受体的激动剂或部分激动剂. Calo 等最初在 Phe<sup>1</sup> 和 Gly<sup>2</sup> 之间加入假肽键想使其药效延长的目的在降低清醒大鼠血压和心率、脑室痛敏和脊髓镇痛等实验中得到了证实. [F/G] NC (1~13) NH<sub>2</sub> 产生这些复杂现象的原因目前还不清楚, 最可能的假设是 [F/G] NC (1~13) NH<sub>2</sub> 可作为 ORL1 受体

的一个低效激动剂, 它的这些不同效果依赖于其所研究的组织上 ORL1 受体的激活程度. 最近 Guerrini 等<sup>[18]</sup>在 Phe<sup>1</sup> 和 Gly<sup>2</sup> 之间加入了不同类型的假肽键得到一系列类似物, 得出 Phe<sup>1</sup> 和 Gly<sup>2</sup> 之间的肽键对于 NC 与其受体的相互作用中并不是至关重要的.

Ac-RYYXXX-NH<sub>2</sub>: 1997 年, Dooley 等<sup>[19]</sup>从含有 5000 万个不同的六肽组合库中筛选出了 15 个和 ORL1 受体有高亲和力的六肽, 它们的通式为 Ac-RYYXXX-NH<sub>2</sub>. 其中 Ac-RYYRWK-NH<sub>2</sub> 和 Ac-RYYRIK-NH<sub>2</sub> 这两个六肽与 ORL1 受体有很高的亲和力, 并和 NC 一样, 可抑制由 forskolin 刺激所引起的 cAMP 的积聚, 但其作用要弱于 NC, 并且可拮抗 NC 的作用, 随后的实验表明, 它们可抑制 EFS 引起 MVD 和 GPI 的收缩, 在这些实验中它们表现为 ORL1 受体的部分激动剂. 体内实验中, 在剂量为 0.1 nmol 时可减弱小鼠的运动行为, 50 pmol 时可促进大鼠的进食行为, 这些结果暗示它们又可作为 ORL1 受体的激动剂. 另外, 对 Ac-RYYRIK-NH<sub>2</sub> 的构效关系研究表明: N 端的三肽 RYY 特别是 1 位的 R 对 Ac-RYYRIK-NH<sub>2</sub> 结合 ORL1 受体而言是非常的重要, 且 N 端的酰化是必需的. 据推测: Ac-RYYRWK-NH<sub>2</sub> 和 Ac-RYYRIK-NH<sub>2</sub> 产生这些复杂现象的原因可能和 [F/G] NC (1~13) NH<sub>2</sub> 比较类似. 2001 年, Larsen<sup>[20]</sup>在上述肽的基础上发现了一个新的 ORL1 受体部分激动剂, 即 ZP120. 它可以拮抗 EFS 引起的 MVD 的收缩 ( $pEC_{50} = 8.88$ ), 此作用并不能被纳洛酮所逆转, 但 ORL1 受体的选择性拮抗剂 J-113397 可拮抗这一作用. 体内实验中, 脑室注射 ZP120 可产生痛敏、减弱小鼠的运动行为, 这些作用的最大效果和 NC 相当, 但作用特点和 NC 相比, 效价高、作用时间明显增长<sup>[21]</sup>.

## 4 ORL1 受体的选择性拮抗剂

### 4.1 肽类

[Nphe<sup>1</sup>] NC (1~13) NH<sub>2</sub>: 1998 年, Calo 等<sup>[22]</sup>在对 NC (1~13) NH<sub>2</sub> 的构效关系研究中发现, 用 Nphe 替换 1 位的 Phe 后所形成的类似物即 [Nphe<sup>1</sup>] NC (1~13) NH<sub>2</sub>, 可拮抗 NC 抑制 EFS 所引起的 GPI 和 MVD 的收缩 ( $pA \approx 6.0 \sim 6.4$ ), 但对其他的阿片肽的抑制作用无影响, 在浓度最高为 10  $\mu\text{mol/L}$  时依然对 MVD 和 GPI 没影响, 由此发现了 ORL1 受体选择性的专一拮抗剂 [Nphe<sup>1</sup>] NC

(1~13) NH<sub>2</sub>. 它可以对抗脑室注射 NC 所引起的痛敏和翻转 NC 对抗吗啡所引起的镇痛<sup>[22]</sup>, 拮抗 NC 抑制小鼠的运动以及所引起的大鼠空间记忆的损害. 我们实验小组的实验表明, [Nphe<sup>1</sup>] NC (1~13) NH<sub>2</sub> 可以对抗 NC 引起的大鼠血压降低、心率下降和后肢灌流压降低, 而对吗啡所引起的这些作用无显著影响. 说明在心血管系统, 它是 ORL1 受体的专一性和选择性的拮抗剂<sup>[23]</sup>. 但是也有实验证明, [Nphe<sup>1</sup>] NC (1~13) NH<sub>2</sub> 本身是有活性的, 如它在小鼠热甩尾实验中, 可使小鼠的甩尾时间明显延长而产生镇痛, 此作用是纳洛酮非敏感的, 在低剂量时, 它可加强脑室注射吗啡的镇痛作用<sup>[22]</sup>. 到目前为止, [Nphe<sup>1</sup>] NC (1~13) NH<sub>2</sub> 选择性和专一性拮抗 ORL1 受体作用的机理还不清楚, 为什么一点细微的变化而导致活性的巨大变化? Guerrini 等推测, NC (1~13) NH<sub>2</sub> N 端信使区序列中的两个药效位点即 Phe<sup>1</sup> 和 Phe<sup>4</sup> 对其与膜受体的结合和激活起着至关重要的作用, 但用 Nphe 替换 Phe<sup>1</sup> 后 [Nphe<sup>1</sup>] NC (1~13) NH<sub>2</sub> 对受体的激活作用和 NC (1~13) NH<sub>2</sub> 相比有明显不同, 这暗示两个药效位点即 Phe<sup>1</sup> 和 Phe<sup>4</sup> 的苯环要保持适当的空间距离才能很好地激活 ORL1 受体.

III-BTD: 1999 年, Becker 等<sup>[24]</sup>从 2000 万个  $\beta$ -turn 的构象限制性肽库中找到 III-BTD, 在受体结合实验中它可拮抗 NC 与 ORL1 受体的结合, 但对其他的阿片受体有激动活性. III-BTD 可拮抗 NC、Ro-64-6198 和 [(pF) Phe<sup>4</sup>] NC (1~13) NH<sub>2</sub> 抑制 forskolin 引起的 cAMP 的积聚 ( $pA_2/pK_B = 7.27 \sim 7.96$ ). 虽然 III-BTD 本身不影响 forskolin 引起的 cAMP 的积聚, 但在 GPI 和 MVD 实验中, III-BTD 却可抑制 EFS 引起的 GPI 和 MVD 的收缩, 并且可被纳洛酮所阻断. 在 RVD 实验中, 其本身无显著影响, 但在纳洛酮 (1  $\mu\text{mol/L}$ ) 的存在下, 它可拮抗 NC 抑制 EFS 刺激所引起的 RVD 的收缩 ( $pK_B = 6.6 \sim 6.9$ ). 这些资料表明: III-BTD 可能既可作为 ORL1 受体的拮抗剂, 也表现为其他阿片受体的激动剂.

[Nphe<sup>1</sup>, Arg<sup>14</sup>, Lys<sup>15</sup>] NCNH<sub>2</sub> (又名 UFP-101): 它发现于 2002 年, 实验表明<sup>[25]</sup>: 它以很高的亲和力和 ORL1 受体结合 ( $pK_i = 10.2$ ); 结合 ORL1 受体的能力比结合其他阿片受体的能力要高 3 000 倍. [Nphe<sup>1</sup>, Arg<sup>14</sup>, Lys<sup>15</sup>] NCNH<sub>2</sub> 本身对毛猴毒素所引起的 cAMP 的积聚无影响, 但可以选择

性地拮抗 NC 抑制 cAMP 的积聚. 在对抗 NC 引起的大鼠血压和心率降低实验中, [Nphe<sup>1</sup>, Arg<sup>14</sup>, Lys<sup>15</sup>] NCNH<sub>2</sub> 的拮抗效果要强于 [Nphe<sup>1</sup>] NC (1~13)NH<sub>2</sub>.

#### 4.2 非肽类

J-113397: 1999 年, 日本的 Banyu 药物公司<sup>[26]</sup>从化学库中通过扫描和筛选发现. 它可以在 nmol 水平和 ORL1 受体有很高的结合, 其选择性比其他阿片受体高 600 倍. J-113397 可以拮抗 NC 抑制钾离子 (K<sup>+</sup>) 引起的大鼠大脑皮层释放 5-HT 和去甲肾上腺素, 同时, J-113397 可翻转 NC 抑制 EFS 刺激所引起的 GPI 和 MVD 的收缩<sup>[22]</sup>, 也能拮抗 NC 的抑制中脑导水管腹外侧神经元 K<sup>+</sup> 电导. 活体内研究证实, 它可以拮抗 NC 所引起的小鼠痛敏. J-113397 不仅可以拮抗 ORL1 受体的天然配体即 NC 的作用, 也可以拮抗 ORL1 受体的其他激动剂抑制 forskolin 引起的 cAMP 生成. 以上结果提示: 在体内和体外 J-113397 均可作为研究 ORL1 受体系统的一个高效拮抗剂. 但有一点在研究中必须要加以注意: J-113397 的水溶性不是很好.

JTC-801: 它是由日本 Tobacco 公司发现的一个 4-氨基异奎琳类的 ORL1 受体拮抗剂<sup>[27]</sup>. 它与 ORL1 受体的亲和常数 K<sub>i</sub> 为 44.6 nmol/L, 能完全拮抗孤啡肽所引起的对 cAMP 积累的抑制, 这种作用不能被纳洛酮抑制.

以上介绍了 ORL1 受体的相关配体, 这些肽类和非肽类配体各有自己的药理学特性, 对研究孤啡肽与其受体系统发挥了重要作用, 但如果出于药物治疗目的, 非肽类配体则扮演了重要角色, 这也是为什么非肽类配体大都由药物公司发现并申请专利.

### 5 ORL1 受体阻断剂

痛稳素 (Nocistatin 简称 NST, 国内译名为痛稳素<sup>[28]</sup>) 是从牛脑中分离出来的<sup>[29]</sup>. 它和 NC 都是从前 NC 原中得到的, 是同一基因的产物. 前 NC 原是一个大分子多肽, NST 位于 NC 片段的上游, 并通过 -Lys-Arg-与 NC 相连. 它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-Gln-Lys-Gln-Leu-Gln-OH. 实验发现<sup>[30]</sup>: NST 能阻断 NC 鞘内注射所引起的小鼠痛敏, 减弱前列腺素 E2 (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. 到目前为止, 对 NST 的研究主要集中在痛觉调制方面: NST 能翻转 NC 对抗吗啡所引起的大鼠镇痛, 但它不影响吗啡镇痛, 也不影响神经损伤性痛觉超敏<sup>[31]</sup>. 它能阻断 NC 抑制 K<sup>+</sup> 引起的大鼠脑薄片 Glu 的释放. 另外, 脑室或脊髓注射, NST 本身在热甩尾、热板实验中不影响小鼠的基础痛域, 这似乎暗示 NST 本身并没有活性, 但我们实验室的研究结果却表明<sup>[32]</sup>: NST 可增高大鼠血压、后肢灌注压及收缩去内皮的兔腹主动脉和股动脉离体肌条. 另外, NST C 端八肽即 NST (10~17) 可以阻断鞘内注射 NC 所引起的痛敏<sup>[30]</sup>; 我们的实验结果表明: NST (10~17) 也可以翻转 NC 对抗吗啡所产生的镇痛.

### 6 结 语

最近几年, 随着 NC 与 ORL1 受体构效关系研究的不断深入, 发现了越来越多的 ORL1 受体的肽类、肽类衍生物和非肽类配体. 在研究过程中 ORL1 受体新的生理和药理作用不断被发掘. 可以通过这些配体来深入研究 ORL1 受体生物活性. 这方面的研究可能为以后 NC-ORL1 系统以及其他神经肽相关研究提供新的思路和线索.

### 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** (1): 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** (6549): 535~538
- 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** (5237): 792~794
- 4 董守良, 王 涛, 王 锐. 孤啡肽研究进展. *中国药理学通报*, 1999, **15** (4): 300~303
- 5 Dong S L, Wang T, Wang R. *Chin Pharmacol Bull*, 1999, **15** (4): 300~303
- 6 Dong S L, Wang T, Chen Q, *et al.* Synthesis, structure-activity relationship of nociceptin and its fragment. *Chin Sci Bull*, 1999, **44** (18): 1655~1658
- 7 Shane R, Lazar D A, Rossi G C, *et al.* Analgesia elicited by OFQ/nociceptin and its fragments from the amygdala in rats. *Brain Res*, 2001, **907** (1~2): 109~116
- 8 Sakurada T, Sakurada T, Katsuyama S, *et al.* Nociceptin (1~7) antagonizes nociceptin-induced hyperalgesia in mice. *Br J Pharmacol*, 1999, **128** (5): 941~944
- 9 Inoue M, Matsunaga S, Rashid M H, *et al.* Pronociceptive effects of nociceptin/orphanin FQ (13~17) at peripheral and spinal level in mice. *J Pharmacol Exp Ther*, 2001, **299** (1): 213~219
- 10 Chen L X, Wang Z Z, Wang R, *et al.* Effects of nociceptin (13~17) in pain modulation at supraspinal level in mice. *Neurosci Lett*, 2002, **331** (2): 95~98
- 10 Okada K, Sujaku T, Chuman Y, *et al.* Highly potent nociceptin

- analog containing the Arg ~ Lys triple repeat. *Biochem Biophys Res Commun*, 2000, **278** (2): 493 ~ 498
- 11 Guerrini R, Calo G, Bigoni R, *et al.* Structure ~ activity studies of the Phe<sup>4</sup> residue of nociceptin (1 ~ 13) -NH<sub>2</sub>: identification of highly potent agonists of the nociceptin/orphanin FQ receptor. *J Med Chem*, 2001, **44** (23): 3956 ~ 3964
  - 12 Ambo A, Hamazaki N, Yamada Y, *et al.* Structure-activity studies on nociceptin analogues: ORL1 receptor binding and biological activity of cyclic disulfide-containing analogues of nociceptin peptides. *J Med Chem*, 2001, **44** (23): 4015 ~ 4018
  - 13 Zhang C, Miller W, Valenzano K J, *et al.* Novel, potent ORL-1 receptor agonist peptides containing alpha-helix-promoting conformational constraints. *J Med Chem*, 2002, **45** (24): 5280 ~ 5286
  - 14 Wichmann J, Adam G, Rover S, *et al.* Synthesis of (1S, 3aS)-8-(2, 3, 3a, 4, 5, 6-hexahydro-1H-phenalen-1-yl)-1-phenyl-1, 3, 8-triaza-spiro [4.5]decan-4-one, a potent and selective orphanin FQ (OFQ) receptor agonist with anxiolytic-like properties. *Eur J Med Chem*, 2000, **35** (9): 839 ~ 851
  - 15 Jenck F, Wichmann J, Dautzenberg F M, *et al.* A synthetic agonist at the orphanin FQ/nociceptin receptor ORL1: anxiolytic profile in the rat. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, **97** (9): 4938 ~ 4943
  - 16 Kolczewski S, Adam G, Cesura A M, *et al.* Novel hexahydrospiro [piperidine-4, 1'-pyrrolo [3,4-c]pyrroles]: highly selective small-molecule nociceptin/orphanin FQ receptor agonists. *J Med Chem*, 2003, **46** (2): 255 ~ 264
  - 17 Calo G, Guerrini R, Bigoni R. Structure-activity study of the nociceptin (1-13) -NH<sub>2</sub> N-terminal tetrapeptide and discovery of a nociceptin receptor antagonist. *J Med Chem*, 1998, **41** (18): 3360 ~ 3366
  - 18 Guerrini R, Rizzi D, Zucchini M, *et al.* Nociceptin/Orphanin FQ (1 ~ 13) NH<sub>2</sub> analogues modified in the Phe<sup>1</sup>-Gly<sup>2</sup> Peptide Bond. *Bioorg Med Chem Lett*, 2003, **13** (3): 365 ~ 368
  - 19 Dooley C T, Spaeth C G, Berzetei-Gurske I P, *et al.* Binding and *in vitro* activities of peptides with high affinity for the nociceptin/orphanin FQ receptor, ORL1. *J Pharmacol Exp Ther*, 1997, **283** (2): 735 ~ 741
  - 20 Larsen B D. Novel peptide conjugates. International Patent. WO 01/98324, 2001
  - 21 Rizzi A, Rizzi D, Marzola G, *et al.* Pharmacological characterization of the novel nociceptin/orphanin FQ receptor ligand, ZP120: *in vitro* and *in vivo* studies in mice. *Br J Pharmacol*, 2002, **137** (3): 369 ~ 374
  - 22 Calo G, Guerrini R, Bigoni R, *et al.* Characterization of [Nphe<sup>1</sup>] nociceptin (1-13) NH<sub>2</sub>, a new selective nociceptin receptor antagonist. *Br J Pharmacol*, 2000, **129** (6): 1183 ~ 1193
  - 23 Chen Y, Chang M, Wang R, *et al.* [Nphe<sup>1</sup>] nociceptin (1 ~ 13) -NH<sub>2</sub> antagonizes nociceptin-induced hypotension, bradycardia, and hindquarters vasodilation in the anesthetized rat. *Can J Physiol Pharmacol*, 2002, **80** (1): 31 ~ 35
  - 24 Becker J A, Wallace A, Garzon A, *et al.* Ligands for (-)-opioid, and ORL1 receptors identified from a conformationally constrained peptide combinatorial library. *J Biol Chem*, 1999, **274** (39): 27513 ~ 27522
  - 25 Calo G, Rizzi A, Rizzi D, *et al.* [Nphe<sup>1</sup>, Arg<sup>14</sup>, Lys<sup>15</sup>] nociceptin-NH<sub>2</sub>, a novel potent and selective antagonist of the nociceptin/orphanin FQ receptor. *Br J Pharmacol*, 2002, **136** (2): 303 ~ 311
  - 26 Kawamoto H, Ozaki S, Itoh Y, *et al.* Discovery of the first potent and selective small molecular opioid receptor-like (ORL1) antagonist: 1-[(3R, 4R)-1-cyclooctylmethyl-3-hydroxymethyl-4-piperidyl]-3-ethyl-1,3-dihydro-2H-benzimidazo-2-one (J-113397). *J Med Chem*, 1999, **42** (25): 5061 ~ 5063
  - 27 Shinkai H, Ito T, Iida T, *et al.* 4-Aminoquinolines: novel nociceptin antagonists with analgesic activity. *J Med Chem*, 2000, **43** (24): 4667 ~ 4677
  - 28 王彦青, 朱崇斌, 曹小定, 等. 孤啡肽 (OFQ) 分布、特性及其可能作用. *生命科学*, 1999, **11** (1): 6 ~ 8  
Wang Y Q, Zhu C B, Cao X D, *et al.* *Chin Sci Life Sci*, 1999, **11** (1): 6 ~ 8
  - 29 Okuda-Ashitaka E, Minami T, Tachibana S, *et al.* Nocistatin, a peptide that blocks nociceptin action in pain transmission. *Nature*, 1998, **392** (6673): 286 ~ 289
  - 30 Zhao C S, Sun R Q, Li B S, *et al.* Effect of nocistatin on pain modulation. *Chin Sci Bull*, 2000, **45** (8): 716 ~ 719
  - 31 Chen Q, Chen Y, Wang R, *et al.* The effects of the synthetic nocistatin on blood vessel activities. *Chin Sci Bull*, 2001, **46** (8): 675 ~ 678
  - 32 陈勇, 陈鲤翔, 王锐, 等. 痛稳素碳末端八肽翻转孤啡肽对抗吗啡镇痛的作用. *中国药理学通报*, 2001, **17** (4): 383 ~ 385  
Chen Y, Chen L X, Wang R, *et al.* *Chin Pharmacol Bull*, 2001, **17** (4): 383 ~ 385

## Progress in The Studies of Ligands for Nociceptin Receptor\*

CHEN Yong, CHANG Min, WANG Rui\*\*

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

**Abstract** Nociceptin was discovered at the end of 1995. It is the endogenous ligand of opioid receptor like 1 (ORL1 or LC 132) receptor. It plays an important role in pain modulation, cardiovascular system, ion channel, dependence and tolerance, learning and memory, *etc.* It is becoming a new research field to investigate the structure-activity relationship of ORL1 receptor and its ligands in recent years. Now, the studies on NC fragments, agonists, partial agonists, and antagonists that were found in the course of investigating the structure-activity relationship of nociceptin are reviewed.

**Key words** nociceptin, ORL1 receptor, ligands, fragment, agonists, partial agonists, antagonists

\* This work was supported by grants from The National Nature Science Foundation of China (20072014) and The Ministry of Science and Technology of China (2002ccc00600).

\*\* Corresponding author. Tel: 86-931-8912567, E-mail: wangrui@lzu.edu.cn

Received: June 30, 2003 Accepted: September 30, 2003