

M 阿片和 ghrelin 受体杂合肽的设计及镇痛作用的研究

马莹 李臣鸿*

中南民族大学, 湖北省武汉市, 430074;

摘要: 本研究设计了一种新型的杂合肽 ghrelin(1-5)-EM1, 结合了内啡肽和 ghrelin 的活性片段。实验结果表明, ghrelin(1-5)-EM1 在 CFA 慢性炎症痛和醋酸扭体急性内脏痛模型中均表现出剂量和时间依赖性的镇痛效果。其镇痛作用可被阿片受体拮抗剂纳洛酮和 ghrelin 受体拮抗剂 DLS 完全拮抗, 说明其通过这两种受体机制产生镇痛效应, 在有效剂量范围内不会显著影响大鼠的运动活性或胃肠运动, 未表现出明显的副作用。该杂合肽为开发新型镇痛药物提供了新的思路, 并可能成为解决阿片类药物副作用的潜在替代方案。

关键词: 炎症痛; 杂合肽 μ -阿片/ghrelin 受体

DOI: 10.69979/3029-2808.25.02.039

引言

疼痛作为长期存在的公共卫生问题, 深刻影响人民生活, 涉及情绪、睡眠、认知等多个方面^[1]。随着疼痛种类和病因增加, 急性痛和慢性痛的治疗需求不断上升^[2]。现有镇痛药物虽有疗效, 但因成瘾性、呼吸抑制、胃肠损害等副作用而受限^[3]。

内源性配体内啡肽 (Enkephalin) 作为阿片受体的天然激动剂, 具有显著的镇痛效果, 尤其在缓解神经病理性疼痛方面^[4], 主要包括两种形式: 内啡肽 1 (EM-1, Tyr-Pro-Trp-Phe-NH₂) 和内啡肽 2 (EM-2, Tyr-Pro-Phe-Phe-NH₂)^[5]。它们具有较高的亲和性, 与阿片 μ 受体结合在中枢和外周发挥镇痛作用^[6]。EM-1 和 EM-2 能够有效缓解神经病理性疼痛模型大鼠的疼痛反应, 展现了它们在镇痛治疗中的潜力^[7], 但会引起一定的副作用。

随着针对多靶点药物的研究逐步深入, 我们发现其治疗复杂疾病方面具有更为广泛的应用前景^[8]。他能够同时作用于多个靶点提高治疗效果, 规避单靶点药物可能带来的副作用和耐药性等问题^[9]。一种新型的脑肠肽 ghrelin, 引起了我们的关注。它不仅能够调节食欲, 还能够通过其受体 GHS-R1 α 发挥镇痛效果^[10]。此外, ghrelin 及其受体激动剂在阿片类药物引起的副作用 (如便秘) 中也表现出了积极的干预作用^[11]。Ghrelin 是一种由 28 个氨基酸组成的肽类激素, 于 1999 年由日本研究者从大鼠胃组织中提取和纯化出来, 其氨基酸序列为 GSSFLSPEHQKAQRKESKPPAKLQPR^[12]。Ghrelin 的 N 端第三位的丝氨酸侧链经过辛酰基化修饰, 是生长激素促分泌受体 (growth hormone secretagogue receptor, 简

称 GHS-R) 的内源性配体, 在大脑中高度表达, 且已发现其存在两种亚型: 一种是功能性受体 GHS-R1 α , 另一种是功能尚不明确的选择性剪接变异体 GHS-R1 β ^[13]。Ghrelin 主要与 GHS-R1 α 结合, 其辛酰基化作用对激活 GHS-R1 α 至关重要, 也是目前已知的唯一一种高等生物蛋白发生的辛酰基化修饰^[14]。Ghrelin 的前五个氨基酸序列 (GSSFL-[NH₂]) 组成的五肽, 对于 ghrelin 的辛酰基化必不可少^[15]。

基于以上背景, 本文设计了一种能够结合阿片受体发挥镇痛作用, 并且通过调节受体改善阿片类药物副作用的杂合肽。该杂合肽通过作用于阿片受体和 ghrelin 受体发挥作用, 旨在既缓解疼痛, 又减少阿片类药物引发的副作用。设计中将 Ghrelin 的前五个氨基酸序列 (GSSFL-[NH₂]) 与 EM1 连接, 合成了 G(1-5)-EM1。

1 材料与方法

1.1 实验动物

实验所用 150g~220g 的无特定病原体 (Specific Pathogen Free, SPF) 级 Sprague Dawley (SD) 雄性大鼠由湖北疾控中心实验动物中心提供。在实验开始前, 所有的动物均可以随意获取食物和水。动物被放置在 24 $\pm$ 2℃ 的温度下, 接受 12 小时的光照/暗循环 (上午 6 点至晚上 6 点的光照阶段)。

1.2 试剂及仪器

G(1-5)-EM1 (武汉星皓医药有限公司, 中国); 盐酸纳洛酮 (华素制药, 中国); 完全弗式试剂 (Sigma 公司, 美国); 冰醋酸; DLS; 足底热电测痛仪 (Ugo Basile, 意大利); 手术器械 (上海医药器械厂, 中国); 疲劳转

棒仪；微量注射器。

1.3 实验方法

1.3.1 腹腔注射

轻度固定大鼠，腹部皮肤清洁并消毒。选择腹部的左下方，距离脐部约 1-2 厘米的位置将针头以约 30 度角插入腹部，进入腹腔后缓慢注射药物，避免气体进入。注射后观察大鼠有无不良反应反应，确保药物顺利进入腹腔。

1.3.2 鞘内注射

使用微型注射器，将 29 号针头垂直刺入大鼠的腰椎 5 和 6 节段之间以每分钟 10 毫升的速度缓慢注射，每次 4 微升。通过观察尾巴的反射性横向轻弹或尾巴呈“S”形弯曲来确认是否成功。

1.3.3 CFA 慢性炎症痛研究

将大鼠放置在有机玻璃盒中，适应环境 15-20 分钟后，测定其基础疼痛阈值。使用微量进样器向大鼠右后脚掌注射 20 微升 CFA，随后将每只大鼠编号并单独安置在笼子中饲养。2 天后，大鼠的脚掌出现肿胀并表现出痛觉过敏，此时测定其机械热痛阈值。进行腹腔 (i. p.) 注射不同剂量的药物或盐水，并在注射药物前 10 分钟注射拮抗剂，记录给药后 5、10、15、30、45、60、90 分钟时的大鼠热痛阈值 (n=7)。

1.3.4 醋酸扭体炎症痛研究

将大鼠放置在实验环境中，适应 15-20 分钟。后鞘内注射 (i. t.) 不同剂量的药物，5 分钟后，进行腹腔注射 (i. p.) 10 mL/kg 0.6% 冰醋酸水溶液，以引发疼痛或刺激反应。5 分钟后，开始记录大鼠的行为表现，观察其是否发生扭体反应，并在接下来的 10 分钟内统计大鼠发生扭体反应的次数 (n=7)。大鼠出现腹部内凹，腹部收缩成“S”形，后肢伸展，臀部高起并匍匐前行等典型表现。

1.3.5 大鼠转棒实验

大鼠提前在转速为 16 圈/min 的转棒上训练两天，每天连续训练 3 次。为了防止大鼠疲劳，每次训练最长时间为 300 s。训练结束后，剔除仍然不能在转棒上停留 180 s 的大鼠。实验的第三天，大鼠通过鞘内或腹腔注射药物，然后检测药物注射后不同时间点大鼠在转棒上的停留时间。

1.3.6 大鼠胃肠运动实验

实验前，给予大鼠 16 小时禁食，期间可自由饮水。对大鼠进行腹腔注射药物，注射后等待 15 分钟，随后

将含 5% 活性炭和 10% 阿拉伯树胶的生理盐水悬浮液，按每 10g 体重 0.1mL 的剂量灌注到大鼠胃中。灌注后 30 分钟，使用颈部脱臼法将大鼠处死，取出从幽门到盲肠的完整小肠，测量小肠总长度以及活性炭悬浮液在胃部开始移动的最远距离。结果以“胃肠运动百分比的平均值 ± 标准误” (Means ± S. E. M.) 表示，评估药物对胃肠运动的影响。计算公式如下：

$$\text{胃肠运动百分比} = (\text{活性炭移动距离} / \text{小肠总长度}) \times 100$$

2 结果

2.1 ghrelin(1-5)-EM1 在炎症痛模型中的镇痛作用

2.1.1 ghrelin(1-5)-EM1 在 CFA 慢性炎症痛中的镇痛作用

完全弗氏佐剂 (CFA) 可刺激机体释放促炎介质，如 PGE₂、TNF-α 和 IL-1，导致啮齿类动物后爪发生红肿、热感和疼痛，并引发机械痛和热痛过敏。炎症症状持续 1 至 3 周。统计分析表明，ghrelin(1-5)-EM1 在 CFA 引起的炎症痛中具有剂量和时间依赖性的镇痛作用。

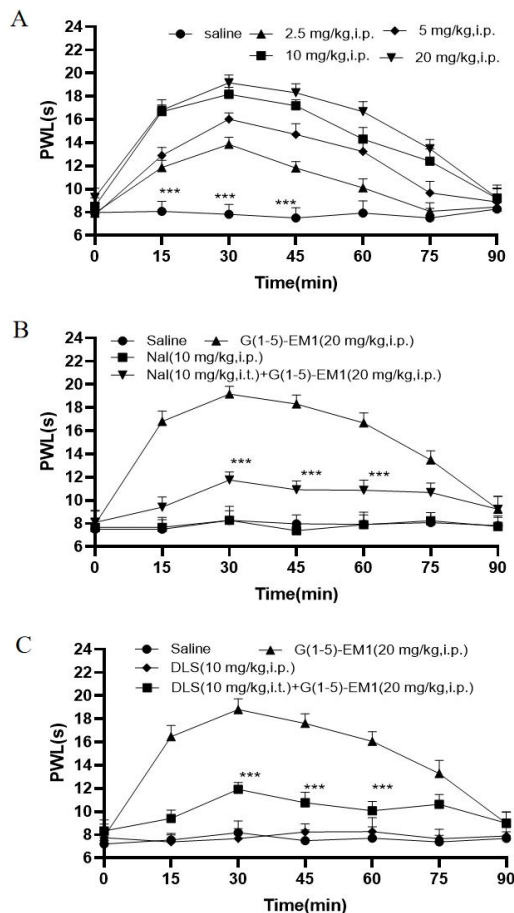


图 1. 腹腔注射 ghrelin(1-5)-EM2 可缓解 CFA 疼痛

(A) 2.5、5、10/20 mg/kg ghrelin(1-5)-EM1 对 CFA 炎症痛的镇痛作用($n=7$)。(B) 纳洛酮(10 nmol/只, $n=7$, i. t.) 对 ghrelin(1-5)-EM1 镇痛作用的影响。G(1-5) EM1: Ghrelin(1-5)-EM1, Nal: 纳洛酮 (C) DLS (10 nmol/只, $n=7$, i. t.) 对 ghrelin(1-5)-EM1 镇痛作用的影响。DLS: ghrelin 受体拮抗剂。

如图 1A 所示, ghrelin(1-5)-EM1 在 CFA 炎症痛情况下天能够产生剂量和时间依赖性镇痛作用。

如图 1B 所示: 拮抗实验结果显示, 通过注射纳洛酮(10 nmol/只, i. t.)能拮抗 ghrelin(1-5)-EM2 在 CFA 炎症痛中的镇痛作用 ($P<0.001$)。表明在 CFA 慢性炎症痛中, ghrelin(1-5)-EM2 是通过阿片受体产生镇痛作用的。

如图 1C 所示: 拮抗实验结果显示, 通过注射 DLS (10 nmol/只, i. t.)能拮抗 ghrelin(1-5)-EM2 在 CFA 炎症痛中的镇痛作用 ($P<0.001$)。表明在 CFA 慢性炎症痛中, ghrelin(1-5)-EM2 也可通过 ghrelin 受体产生镇痛作用。

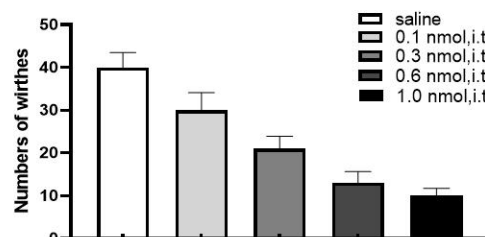
2.1.2 ghrelin(1-5)-EM1 在醋酸扭体炎症痛中的镇痛作用

大鼠腹腔注射 0.6%冰醋酸后, 会引发明显且持续的疼痛反应。醋酸扭体模型主要用于模拟临床中的急性内脏疼痛。如图 2A 所示, 在醋酸扭体实验中, 提前 5 分钟鞘内注射 ghrelin(1-5)-EM1 可明显减少醋酸扭体实验中大鼠的扭体次数, 且呈剂量依赖性(与生理盐水组比较, 各 $P<0.01$)。鞘内注射 0.1、0.3、0.6、1 nmol/只 ghrelin(1-5)-EM1 后 20 分钟内大鼠扭体次数分别是 30.42 ± 4.12 、 21.00 ± 2.94 、 12.57 ± 2.64 、 10.43 ± 1.72 次(与生理盐水组比较, $P<0.001$, 差异具有统计学意义)。表明剂量为 1 nmol/只的 ghrelin(1-5)-EM1 在醋酸扭体炎症痛中即可产生显著的镇痛作用。

如 2B, 纳洛酮能完全拮抗 ghrelin(1-5)-EM1 的镇痛作用($P<0.001$), DLS 也可拮抗 ghrelin(1-5)-EM1

的镇痛作用($P<0.001$)。以上结果表明, ghrelin(1-5)-EM1 在醋酸扭体中的镇痛作用是通过阿片受体和 ghrelin 受体产生作用的。

A



B

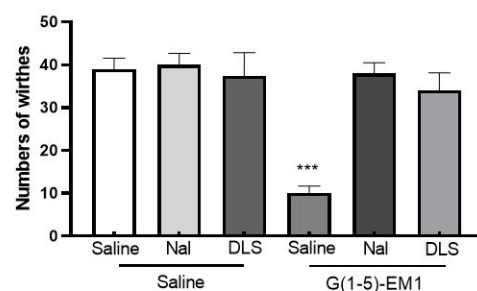


图 2. 腹腔注射 ghrelin(1-5)-EM2 可缓解醋酸扭体炎症痛

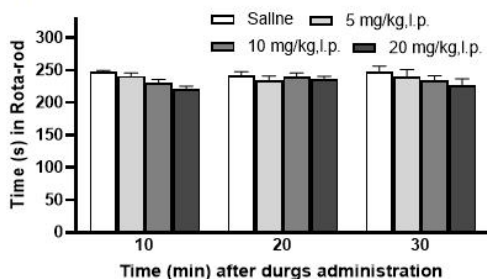
(A) 0.1、0.3、0.6、1 nmol/只 ghrelin(1-5)-EM1 (i. t.) 对醋酸扭体炎症痛的镇痛作用($n=7$)。(B) 纳洛酮及 DLS (10 nmol/只, $n=7$, i. t.) 预处理对 ghrelin(1-5)-EM1 镇痛作用的影响。

2.2 ghrelin(1-5)-EM1 的副作用研究

2.2.1 ghrelin(1-5)-EM1 对大鼠运动活性的影响

如图 3A 所示, ghrelin(1-5)-EM1 的剂量选用疼痛模型中的鞘内注射最高剂量 1 nmol/只, 实验结果表明, 各个剂量的 ghrelin(1-5)-EM1 均对大鼠的运动活性没有显著影响。如图 3B 所示, ghrelin(1-5)-EM1 的剂量选用疼痛模型中的腹腔注射最高剂量 20 mg/kg, 实验结果表明, 对大鼠运动活性没有显著影响。

A



B

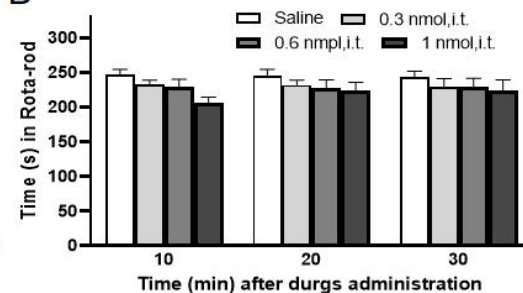


图 3. ghrelin(1-5)-EM1 不影响大鼠运动活性

(A)在旋转棒试验中,腹腔注射 ghrelin(1-5)-EM1 对大鼠运动性能的影响。(B)在旋转棒试验中,鞘内注射 ghrelin(1-5)-EM1 对大鼠运动性能的影响。每个值代表平均值 $\pm$ S.E.M.组大小如图所示。根据单因素方差分析和 Dunnett 事后检验,没有观察到显著差异。

2.2.2 ghrelin(1-5)-EM1 对大鼠胃肠运动活性的影响

如图 4 所示,鞘内注射 ghrelin(1-5)-EM1 的药物剂量为 5、10、20、30 mg/kg,每组大鼠 7 只。结果表明,生理盐水对照组的胃肠运动百分比为 $65.33 \pm 10.37\%$,鞘内注射 ghrelin(1-5)-EM1 的药物剂量为 5、10、20、30 mg/kg 的胃肠运动百分比分别为 $51.04 \pm 7.60\%$ 、 $44.74 \pm 7.56\%$ 、 $24.67 \pm 3.47\%$ 、 $20.82 \pm 2.48\%$ 。腹腔注射剂量大于 20 mg/kg 时会对胃肠产生显著的抑制性作用。因此在有效剂量范围内,ghrelin(1-5)-EM1 无便秘副作用。

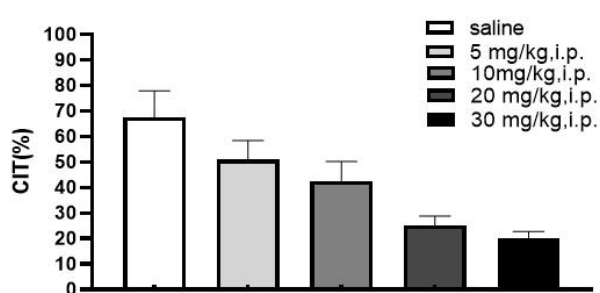


图 4. 腹腔注射 DN-9 对大鼠胃肠道转运的影响

数据点表示平均值 $\pm$ S.E.M.组大小如图所示。根据单因素方差分析和 Dunnett 事后检验,腹腔注射剂量大于 20 mg/kg 时与生理盐水组相比存在显著差异。

3 讨论

本文设计了双靶点药物 ghrelin(1-5)-EM1。初步探讨了 ghrelin(1-5)-EM1 在炎症性疼痛模型中的镇痛作用,并结合阿片受体机制分析了其药效与副作用。ghrelin(1-5)-EM1 通过与阿片受体和 ghrelin 受体相互作用,在缓解炎症性疼痛和急性内脏疼痛方面展现出良好效果,且无显著副作用,特别是对运动活性和胃肠道。这可能为阿片类药物的替代提供新方向未来需进一步探索其长期使用的安全性和疗效。

参考文献

[1]Finnerup NB,Kuner R,Jensen TS. Neuropathic pain:from mechanisms to treatment[J]. PhysiolRe

v,2021,101(1):259-301.

[2]Borsook D, Youssef A M,Simons L,et al.When pain gets stuck: the evolution of pain chronification and treatment resistance [J].Pain,2018,159(12):2421-2436.

[3]Bindu S, Mazumder S, Bandyopadhyay U. Non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) and organ damage: A current perspective. Biochem Pharmacol[J]. 2020, 180: 114147.

[4]吴鹏翔,谢健豪,郭雅茹,等.镇痛多肽类分子研究进展[J].药学进展,2017,41(12):934-942.

[5]Yue W, Youwen Z, F J D, et al.Structures of the entire human opioid receptor family. [J]. Cell,2023,186(2):413-427. e17.

[6]Zhao L, Luo K, Wang Z, et al.Design, synthesis, and biological activity of new endomorphin analogs with multi-site modifications[J]. Bioorganic & Medicinal Chemistry,2020,28(9):115438

[7]Gupta A, Gullapalli S, Pan H, et al.Regulation of Opioid Receptors by Their Endogenous Opioid Peptides[J].Cellular and Molecular Neurobiology,2021,41(5):1-16.

[8]Bird Mark F,Lambert David G. Simultaneous targeting of multiple opioid receptor types. [J]. Current opinion in supportive and palliative care,2015,9(2):98-102.

[9]Steven B, Markus P, D A A. Multiple ligands in opioid research. [J].Protein and peptide letters,2008,15(7):668-82.

[10]曾萍,魏洁.Ghrelin 与疼痛研究进展[J].生理科学进展,2013,44(01):49-51.

[11]Teubner J B, Garretson T J, Hwang Y, et al. Inhibition of ghrelin O-acetyltransferase attenuates food deprivation-induced increases in ingestive behavior[J].Hormones and Behavior,2013,63(4):667-673.

[12]Inge S, L P J, B P T, et al.Multi-species sequence comparison reveals conservation of g

ghrelin gene-derived splice variants encoding a truncated ghrelin peptide. [J]. Endocrine, 2016, 52(3):609-17.

[13] Takahiro S, Yuki N, Yuki S, et al. Structure, regulation and function of ghrelin. [J]. Journal of biochemistry, 2012, 151(2):119-28.

[14] Shiimura Y, Horita S, Hamamoto A, et al. Structure of an antagonist-bound ghrelin receptor reveals possible ghrelin recognition mode. [J]. Nature communications, 2020, 11(1):4160-416

0.

[15] Delporte C. Structure and Physiological Actions of Ghrelin [J]. Scientifica, 2013, 2013:518909.

作者简介：马莹（2000--），女，回族，安徽合肥，在校学生，硕士，中南民族大学，研究方向为：膜离子通道与药物研发

通讯作者：李臣鸿，男，汉族，湖北武汉，教授，博士，中南民族大学，研究方向为：膜离子通道与药物研发