

## · 基础论著 ·

# 聚乙二醇修饰甲硫氨酸脑啡肽静脉注射时对热板致痛小鼠的镇痛作用

郑丽丽 王冲 文曙 赵铁华

**【摘要】 目的** 探讨甲硫氨酸脑啡肽(MEK)经不同分子量聚乙二醇(PEG)修饰对热板致痛小鼠镇痛效果的改善作用。**方法** 分别尾静脉注射 31  $\mu\text{mol}/\text{kg}$  MEK-Cys-NH<sub>2</sub>、mPEG<sub>2000</sub> 和 mPEG<sub>5000</sub> 修饰 MEK-Cys-NH<sub>2</sub>, 测定 55  $^{\circ}\text{C}$  热板致痛小鼠给药前和给药后 15、30、60、120 min 的痛阈值;以给药前后痛阈值的差值数据比较各受试物给药前后、给药后各时间点的差异,分析镇痛效果。**结果** 尾静脉注射 mPEG<sub>5000</sub> 修饰 MEK-Cys-NH<sub>2</sub> 镇痛表现有强于并长于 MEK-Cys-NH<sub>2</sub> 和 mPEG<sub>2000</sub> 修饰 MEK-Cys-NH<sub>2</sub> 趋势,在给药后 120 min 时痛阈值高于 MEK-Cys-NH<sub>2</sub> 和阳性对照药吗啡( $P < 0.0$ )。**结论** 适当相对分子质量 PEG 修饰 MEK 可提高镇痛强度和药效维持时间,对改善其成药性具有积极意义。

**【关键词】** 脑啡肽;甲硫氨酸; 聚乙烯二醇类; 镇痛; 小鼠

**Analgesic activity of met-enkephalin modified by polyethylene glycol through intravenous injection to the painful mice induced by hot plate** ZHENG Li-li, WANG Chong, WEN Shu, ZHAO Tie-hua. Drug Research Institute of Hebei Normal University, Shijiazhuang 050024, China

Corresponding author: ZHAO Tie-hua, Email: zhaotiehua@163.com

**【Abstract】 Objective** To investigate the improvement effect to analgesic activity of met-enkephalin (PEG) modified by different molecular weight to the painful mice induced by hot plate. **Methods** Tail intravenous injection MEK-Cys-NH<sub>2</sub> that modified by 31  $\mu\text{mol}/\text{kg}$  of MEK-Cys-NH<sub>2</sub>, mPEG<sub>2000</sub> and mPEG<sub>5000</sub> separately, to measure the threshold of pain before treatment and after treatment 15, 30, 60, 120 min on the painful mice induced by hot plate at 55  $^{\circ}\text{C}$ ; according to the difference date of pain threshold before and after treatment to compare the difference of test drugs with different treatment time point, analyse the analgesic activity. **Results** It has the trend that the analgesic performance of mPEG<sub>5000</sub> modified MEK-Cys-NH<sub>2</sub> was stronger and longer than MEK-Cys-NH<sub>2</sub> and mPEG<sub>2000</sub> modified MEK-Cys-NH<sub>2</sub>. The threshold of pain was higher than MEK-Cys-NH<sub>2</sub> and the positive control drug morphine ( $P < 0.01$ ) after treatment 120 min. **Conclusions** MEK modified by PEG with appropriate molecular weight could improve the strength of analgesic effect and the maintain time of drug efficacy, and has positive significance to its druggability.

**【Key words】** Enkephalin, methionine; Polyethylene glycols; Analgesia; Mice

聚乙二醇(polyethylene glycol, PEG)修饰是延长脑啡肽(Enkephalin, ENK)体内半衰期、改善其中枢神经系统释放能力、增强和延长其中枢镇痛和记忆改善等其他神经系统疾病药效的可行策略之一<sup>[1]</sup>。本文采用测试中枢镇痛药效的小鼠热板致痛模型<sup>[2]</sup>,对相对分子质量为 2000 和 5000 的直链甲氧基聚乙二醇(mPEG<sub>2000</sub> 和 mPEG<sub>5000</sub>)修饰甲硫氨酸脑啡肽(Met-En-

kephalin, MEK)进行了以未修饰原型肽为对照、经外周(静脉注射)给药的镇痛药效评价。

## 材料与amp;方法

1. 受试化合物: MEK-Cys-NH<sub>2</sub> (Tyr-Gly-Gly-Phe-Met-Cys-NH<sub>2</sub>, MEK-Cys)、MEK-Cys (mPEG<sub>2000</sub>-MAL)-NH<sub>2</sub> (简称为 MEK-PEG<sub>2000</sub>)、MEK-Cys (mPEG<sub>5000</sub>-MAL)-NH<sub>2</sub> (简称为 MEK-PEG<sub>5000</sub>) 为本实验室采用 Fmoc 固相方法合成<sup>[2-3]</sup>, RP-HPLC 方法纯化,质量分数均  $> 0.95$ ; MS 鉴定, MEK-Cys-NH<sub>2</sub> 相对分子质量为 677, MEK-Cys (mPEG<sub>2000</sub>-MAL)-NH<sub>2</sub> 在 2708 附近有一组相差 44 的峰, MEK-Cys (mPEG<sub>5000</sub>-MAL)-NH<sub>2</sub> 在

DOI:10.3877/cma.j.issn.1674-0785.2013.07.112

基金项目:河北省自然科学基金资助项目(C2005000681)

作者单位:050024 石家庄,河北师范大学药物研究所(郑丽丽、王冲、赵铁华);怀化市第一人民医院检验科(文曙)

通讯作者:赵铁华,Email:zhaotiehua@163.com

5708 附近有一组相差 44 的峰,与预期相符;使用时以生理盐水溶解,0.45  $\mu\text{m}$  滤膜过滤除菌。吗啡为东北第六制药厂生产,批号 001009;生理盐水稀释至使用浓度。

受试化合物 MEK-Cys 的修饰物 mPEG-MAL(单甲氧基马来酰亚氨基聚乙二醇,相对分子质量 2000 和 5000),本实验室以 mPEG(Fluka 产品)为起始化合物常规方法制备<sup>[3-4]</sup>;实验时同上方方法以生理盐水溶解,0.45  $\mu\text{m}$  滤膜过滤除菌。

2. 主要仪器:智能热板仪:RB-200 型,成都泰盟科技有限公司生产。

3. 动物分组及给药方法:雌性 KM 小鼠,清洁级,体质量 18~22 g[中国医学科学院实验动物研究所繁育场提供,合格证号 SCXK(京)2004-0001]。分层随机方法分 7 组,剔除痛阈值 <3 s 和 >30 s 不合格小鼠后每组至少保留 8 只以上小鼠;阴性对照、阳性药物对照、修饰物 mPEG<sub>5000</sub>-MAL 和 mPEG<sub>5000</sub>-MAL 对照、MEK-Cys、MEK-PEG<sub>2000</sub> 和 MEK-PEG<sub>5000</sub> 试验组。阴性对照组小鼠尾静脉注射生理盐水 0.2 ml/10 g,阳性药物对照组小鼠注射吗啡 10 mg/kg (31  $\mu\text{mol}/\text{kg}$ ),MEK-Cys、MEK-PEG<sub>2000</sub>、MEK-PEG<sub>5000</sub> 和 mPEG<sub>5000</sub>-MAL、mPEG<sub>5000</sub>-MAL 各组分别按 31  $\mu\text{mol}/\text{kg}$  同上方方法注射受试物。

4. 热板实验测定受试化合物的镇痛作用<sup>[5]</sup>: (20 $\pm$ 1) $^{\circ}\text{C}$  室温条件下,置小鼠于 (55 $\pm$ 0.5) $^{\circ}\text{C}$  热板,以接触热板至舔足所经历的时间为痛阈值;剔除痛阈值 <3 s 和 >30 s 小鼠;各小鼠给药前间隔 5 min 测量痛阈值 2 次,取平均值作为给药前(基础)痛阈值。分别观察记录给药后 15、30、60、120 min 各小鼠的痛阈值,并计算各小鼠给药前后痛阈值的差值。

5. 统计学分析<sup>[6]</sup>:给药前各时间点直接进行痛阈值差异的显著性分析,给药后数据的显著性分析采用与药前痛阈值差值数据。检测数据以均数 $\pm$ 标准差 ( $\bar{x}\pm s$ ) 表示。舍弃  $>\bar{x}\pm 3s$  数据。检验各组内数据的正态分布,确定组间是否进行非参数统计分析。配对  $t$  值法检验各组内给药后各时间点与给药前差异。经方差齐性检验后分别采用  $t$  检验或校正  $t'$  检验法比较同一时间点两组间差异。以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 结 果

对照及实验各组间给药前(基础)痛阈值差异无统计学意义,具有可比性。

静脉注射各受试物均有一定镇痛表现。与同组给

药前比较,多组受试物痛阈值提高表现可持续至给药后 60 min,MEK-PEG<sub>5000</sub> 组在给药后 120 min 痛阈值有提高表现 ( $P < 0.05$ );与阴性对照组比较,只有 MEK-PEG<sub>5000</sub> 和阳性对照药吗啡痛阈值提高表现持续至给药后 30 min ( $P < 0.01$  或 0.05);MEK-PEG<sub>5000</sub> 组镇痛表现有强于并长于 MEK-Cys 和 MEK-PEG<sub>2000</sub> 组趋势,在给药后 120 min 时痛阈值高于 MEK-Cys 和吗啡组 ( $P < 0.05$ )。等剂量 (31  $\mu\text{mol}/\text{kg}$ ) mPEG<sub>5000</sub>-MAL 和 mPEG<sub>5000</sub>-MAL 尾静脉注射未产生明显镇痛作用。实验结果见表 1。

## 讨 论

脑啡肽的快速酶解破坏、较高的肝脏清除以及通过血脑屏障 (blood-brain barrier, BBB) 的困难是影响其成药性的重要障碍<sup>[7-8]</sup>;Arizona 大学进行的糖基化脑啡肽和聚乙二醇修饰脑啡肽类似物的研究提示,化学修饰是克服以上困难,改善脑啡肽及其类似物成药性的可行策略<sup>[1,9]</sup>。

本实验对相对分子质量为 2000 和 5000 的 mPEG 修饰 MEK 进行了外周(静脉)给药镇痛药效的比较。在 MEK 序列中加入 Cys 的目的是利用某些 mPEG 衍生物特异性修饰游离 Cys 的特征<sup>[10]</sup>,为短肽提供 C-末段的 PEG 定点修饰部位。与 Arizona 大学以脑啡肽类似物 [D-Pen<sup>2</sup>, D-Pen<sup>5</sup>]-ENK 氨基基团作为修饰位点的 PEG 修饰方案<sup>[1,10]</sup> 比较,本方案设计的 mPEG 修饰部位可能有利于避免被修饰的 MEK (Tyr-Gly-Gly-Phe-Met) 序列活性必需的 Tyr 和第 3 位 Gly、第 4 位 Phe 残基被屏蔽(尤其是 Tyr)<sup>[11]</sup>,保留肽活性。

在本实验涉及相对分子质量范围内,较大相对分子质量(5000) mPEG 修饰有增强 MEK 外周(静脉注射)给药镇痛作用的趋势,并且药效维持时间延长。根据 Arizona 大学 PEG 修饰脑啡肽类似物的机制研究,本实验 PEG 修饰 MEK 药效改善的原因,可能与被修饰物酶解稳定性的改善、体内循环时间(半衰期)增加延长了暴露于 BBB 血管内皮细胞的时间,以及与 PEG 修饰改变合成产物的极性相关<sup>[1,9]</sup>。具体的机制分析尚待测试化合物直接的药代动力学实验证实。

本文报道的适当分子量 PEG 修饰 MEK 镇痛活性的增强和药效维持时间的延长趋势,与 Arizona 大学聚乙二醇修饰脑啡肽及其类似物的研究结论<sup>[1,9]</sup> 基本一致,对改善脑啡肽及其类似物的成药性具有积极意义。

表1 静脉注射不同分子量 mPEG 修饰甲硫氨酸脑啡肽对热板致痛小鼠疼痛反应的影响 (s,  $\bar{x} \pm s$ )

组别	鼠数	给药前	给药 15 min		给药 30 min	
			痛阈值	与基础痛阈值的差值	痛阈值	与基础痛阈值的差值
生理盐水	12	13.33 ± 4.13	12.23 ± 4.71	-1.10 ± 6.91	15.16 ± 5.81	1.83 ± 4.56
吗啡	12	15.54 ± 3.99	38.15 ± 18.41 <sup>c</sup>	22.61 ± 17.40 <sup>a</sup>	52.83 ± 12.88 <sup>c</sup>	37.30 ± 12.30 <sup>a</sup>
MEK-Cys	8	12.31 ± 4.22	18.86 ± 5.54 <sup>c</sup>	6.54 ± 4.09 <sup>a</sup>	18.17 ± 7.57	5.86 ± 5.17 <sup>a</sup>
MEK-PEG <sub>2000</sub>	10	11.99 ± 3.38	23.83 ± 7.35 <sup>c</sup>	11.85 ± 6.03 <sup>a</sup>	20.45 ± 12.64	8.50 ± 12.52
MEK-PEG <sub>5000</sub>	8	15.75 ± 4.92	29.25 ± 16.43 <sup>c</sup>	13.50 ± 15.67 <sup>a</sup>	32.24 ± 19.61 <sup>b</sup>	16.49 ± 20.80 <sup>a</sup>
mPEG <sub>2000</sub> -MAL	10	11.80 ± 6.28	15.64 ± 8.77	3.84 ± 5.57	13.17 ± 5.51	1.11 ± 4.22
mPEG <sub>5000</sub> -MAL	10	13.54 ± 5.89	15.92 ± 4.37	2.39 ± 9.03	14.69 ± 7.70	1.15 ± 5.37

  

组别	鼠数	给药 60 min		给药 120 min	
		痛阈值	与基础痛阈值的差值	痛阈值	与基础痛阈值的差值
生理盐水	12	16.94 ± 10.27	3.62 ± 7.98	19.84 ± 13.43	6.51 ± 10.75
吗啡	12	29.53 ± 18.87	14.00 ± 17.77 <sup>a</sup>	19.25 ± 6.35 <sup>d</sup>	3.42 ± 6.27
MEK-Cys	8	18.94 ± 9.82	6.63 ± 6.60 <sup>a</sup>	13.33 ± 6.66 <sup>d</sup>	1.01 ± 5.12
MEK-PEG <sub>2000</sub>	10	20.16 ± 5.01	8.17 ± 5.20 <sup>a</sup>	21.13 ± 15.31	9.14 ± 13.06
MEK-PEG <sub>5000</sub>	8	26.29 ± 15.80	10.54 ± 18.09	34.57 ± 17.53	18.83 ± 16.49 <sup>a</sup>
mPEG <sub>2000</sub> -MAL	10	12.75 ± 7.92	0.95 ± 4.83	12.90 ± 8.03	1.10 ± 6.00
mPEG <sub>5000</sub> -MAL	10	15.82 ± 8.46	2.28 ± 8.78	19.09 ± 17.75	5.51 ± 16.49

注:尾静脉注射, 给药剂量 31 μmol/kg, 给药容积 0.2 ml/10 g。与同组给药前比较, <sup>a</sup>*P* < 0.05; 与生理盐水比较, <sup>b</sup>*P* < 0.05, <sup>c</sup>*P* < 0.01; 与 MEK-PEG<sub>5000</sub> 组比较, <sup>d</sup>*P* < 0.05

参 考 文 献

[1] Witt KA, Davis TP. CNS Drug Delivery: Opioid Peptides and the Blood-Brain Barrier. *The Open Information Science Journal*, 2006, 8: E76-88.

[2] 文曙. 脑啡肽及其衍生物的合成、修饰和镇痛药理活性实验研究. 承德医学院, 2008.

[3] 王良友, 潘和平, 柳川, 等. 人甲状旁腺素(1-34)的合成与聚乙二醇化修饰. *中国生化药物杂志*, 2005, 26: 76-79.

[4] 厉保秋. 多肽药物原料药合成及药学研究 // 厉保秋. 多肽药物研究与开发. 北京: 人民卫生出版社, 2011; 51-81.

[5] 曾雪瑜, 洪庚辛. 小鼠热板实验 // 洪庚辛. 镇痛药研究方法学. 北京: 人民卫生出版社, 2009; 313-315.

[6] 黄晓晖, 孙瑞元. 药理实验统计分析 // 魏伟, 吴希美, 李建元. 药理实验方法学. 4 版. 北京: 人民卫生出版社, 2010; 63-86.

[7] Richman SJ, Goodman M, Nguyen PM, et al. Synthesis and biological activity of linear and cyclic enkephalins modified at the Gly3-Phe4 amide bond. *Chemical Biology & Drug Design*, 1985, 25: 648-662.

[8] Liederer BM, Fuchs T, Vander VD, et al. Effects of amino acid chirality and the chemical linker on the cell permeation characteristics of cyclic prodrugs of opioid peptides. *Journal of Medicinal Chemistry*, 2006, 49: 1261-1270.

[9] Witt KA, Huber JD, Egleton RD, et al. Pharmacodynamic and Pharmacokinetic Characterization of Poly (Ethylene glycol) Conjugation to Met-Enkephalin Analog [D-Pen2, D-Pen5]-enkephalin (DPDPE). *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 2001, 298: 848-856.

[10] 张修建, 王清明, 陈惠鹏, 等. 药物的聚乙二醇修饰研究进展. *解放军药学报*, 2003, 19: 213-216.

[11] 计明娟, 叶学其, 杨鹏程. 甲硫氨酸-脑啡肽的分子动力学模型. *物理化学学报*, 1999, 15: 1011-1016.

(收稿日期: 2012-12-27)

(本文编辑: 吴莹)

郑丽丽, 王冲, 文曙, 等. 聚乙二醇修饰甲硫氨酸脑啡肽静脉注射时对热板致痛小鼠的镇痛作用[J/CD]. *中华临床医师杂志: 电子版*, 2013, 7(7): 3040-3042.