

去氢骆驼蓬碱对小鼠免疫功能的影响

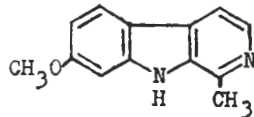
边 隼、李观海、张洪泉 (新疆医学院药理教研室, 乌鲁木齐 830054)

提要 去氢骆驼蓬碱(harmine, Har) 16, 25 mg/(kg·d) × 7 d, sc 对正常小鼠免疫系统的作用: 减轻免疫器官重量; 减少 SRFC 和抗体; 减轻 SRBC 诱导的足垫 DTH 反应; 不影响碳粒廓清功能和腹腔巨噬细胞吞噬功能。Har 30, 37 及 47 μg/ml 对体外 PHA 诱导 [³H]TdR 参入的淋巴细胞转化也有抑制作用。

关键词 去氢骆驼蓬碱; 吞噬作用; 溶血作用; 迟发型超敏感性; 淋巴细胞转化

去氢骆驼蓬碱(harmine, Har)是蒺藜科植物骆驼蓬(*Peganum harmala* L.)种子中提取的

一种生物碱。化学名为: 7-甲氧基-1-甲基-9-氢-吡啶[3, 4-b]吲哚。Har 对多种动物移植肿瘤有抑制作用(潘启超等, 内部通讯)及其它药理作用^(1,2), 但 Har 的免疫药理作用尚未见报道, 我们对此进行了研究。



Harmine

(7-methoxy-1-methyl-9H-pyrido[3,4-b]indole)

材 料

Swiss 非近交系小鼠, ♀♂兼用, 体重 $22 \pm \text{SD } 2 \text{ g}$ 由新疆医学院动物室提供。

盐酸去氢骆驼蓬由本室刘发提取, 纯度 90%, 其余 10% 是骆驼蓬碱(harmaline), 文献报道两者有相似的药理作用⁽³⁻⁵⁾。

环磷酸胺, 白色粉针剂结晶, 上海第十二制药厂出品。地塞米松注射液, 苏州长征制药厂出品。植物血凝素(PHA), 广州医药工业研究所出品。RPMI-1640 培养基, 美国 Sigma 公司出品。

[³H]TdR 放射性比度 740 GBq/mmol, 中国科学院原子能研究所制备。

Drabkin 试剂⁽⁷⁾, 自配。

方法与结果

对小鼠免疫器官重量的影响 小鼠随机分 4 组 sc 给药, 末次给药 1 h 后, 拉脱颈椎处死, 称算胸腺、脾脏重量/10 g 体重(表 1)。结果 Har 组每 10 g 体重的胸腺、脾脏重量均小于对照组, 但大于环磷酸胺组。

Tab 1. Effects of sc harmine 16 and 25 mg/(kg·d) × 7 d on the spleen and thymus weights, immune specific rosette forming cells (SRFC) and serum hemolysin formation in mice immunized with sheep red blood cells (SRBC). n = 8, $\bar{x} \pm \text{SD}$. All p values < 0.01 vs normal saline (NS) or vs cyclophosphamide (Cyc, 10 mg/(kg·d) × 7). SP: spleen cells

Drug	Organ wt/Body wt (mg/10 g)		SRFC/10 ⁶ SP (× 10 ⁻²)	50% hemolytic concn
	Spleen	Thymus		
NS	73 ± 6	36 ± 2	223 ± 27	382 ± 144
Har (25)	58 ± 8	22 ± 3	87 ± 14	116 ± 51
Har (16)	59 ± 4	22 ± 3	74 ± 13	124 ± 61
Cyc (10)	48 ± 6	14 ± 2	42 ± 9	45 ± 20

对小鼠碳粒廓清功能的影响 小鼠随机分组给药, 末次给药 1 h 后 iv 印度墨水 0.2 ml/鼠, 于 iv 2 min 和 20 min 后分别由眼眶取血

20 μl, 移入 2 ml 0.1% NaHCO₃ 溶液中摇匀, 用 72-1 型分光光度计比色, λ = 680 nm, 按下式计算廓清指数 K(表 2)。

$$K = (\log C_1 - \log C_2) / 18$$

式中 C₁, C₂ 分别为 2 min 和 20 min 吸收度的值。

Tab 2. Effects of sc harmine 16 and 25 mg/(kg·d) × 7 d on clearance rate after iv charcoal particles in mice, on phagocytosing CRBC of peritoneal macrophages in mice and on hemolytic ability of plaque forming cells in mice immunized with SRBC. Number of mice in parentheses, $\bar{x} \pm \text{SD}$. *p > 0.05, **p < 0.05, *p < 0.01 vs NS. †p < 0.05, ††p < 0.01 vs Cyc.**

Drug	Dose	Clearance index (× 10 ³)	Phagocytosis %	Optic density (× 10 ³)
NS	—	14 ± 4(8)	59 ± 8(7)	32 ± 12(7)
Har	25	16 ± 7(8) ^{†††}	56 ± 11(8) ^{†††}	18 ± 9(7) ^{†††}
Har	16	12 ± 2(9) ^{††}	57 ± 10(9) ^{††}	12 ± 8(8) ^{†††}
Cyc	10	7 ± 2(9) ^{***}	32 ± 5(10) ^{***}	6 ± 2(7) ^{***}

可见 K 值在 Har 组与对照组均无显著差异, 在环磷酸胺组小于对照组。

对小鼠腹腔巨噬细胞吞噬鸡红细胞的影响 小鼠随机分组给药, 给药后 d 3 每鼠 ip 5% 糖原生理盐水溶液 0.5 ml。于末次给药 1 h 后, 每鼠 ip 2% CRBC 1 ml, 间隔 30 min, ip 生理盐水 2 ml, 然后颈椎脱臼处死, 切开腹腔, 吸取腹腔液分别滴于两片载玻片上, 每片 0.5 ml, 置 37°C 水浴 30 min, 生理盐水漂洗载玻片, 晾干后, 用 1:1(vol:vol) 丙酮-甲醇溶液固定, 然后用 4% pH 7.0 的 Giemsa-PBS 液染色, 蒸馏水漂净, 晾干, 油镜下计数。每个样本两份, 记数后取平均值。按下式计算吞噬%(表 2)。

吞噬% = (吞噬 CRBC 的巨噬细胞数 / 200 个巨噬细胞总数) × 100%

结果表明 Har 组巨噬细胞吞噬 CRBC 的% 与对照组无显著差别, 而环磷酸胺组低于对照组和 Har 组。

对免疫特异性玫瑰花形成细胞的影响 小鼠随机分组给药, 给药次日用 5% SRBC

0.2 ml/鼠免疫小鼠, 于末次给药 1 h 后拉脱颈椎处死, 剖腹取脾制成 8×10^6 /ml 脾细胞悬液, 计数 RFC⁽⁶⁾, 换算为 SRFC 数/ 10^6 个脾细胞(表 1)。

结果表明 Har 组 SRFC 数均比对照组小, 而比环磷酸胺组多。

对 SRBC 致敏小鼠血清溶血素形成的影响 小鼠随机分组给药, 给药次日 ip 3:5 (SRBC:NS, vol:vol) 的 SRBC 悬液 0.2 ml/鼠, 免疫小鼠。末次给药 1 h 后, 小鼠从股动脉放血 1 ml, 室温下置 1 h, $700 \times g$ 离心 5 min 分离血清, 用生理盐水 1:250 稀释, 取 1 ml 置冰浴中, 依次加入 10% SRBC 0.5 ml, 1:10 豚鼠血清 1 ml, 另设以生理盐水代豚鼠血清的空白管。移至 37°C 温箱中 30 min 孵毕, 冰浴冷却, $700 \times g$ 离心 5 min 后每管取 1 ml 上清液, 加入 3 ml Drabkin 试剂混匀, 10 min 后用 72-1 型分光光度计测光密度值, $\lambda = 540$ nm, 取 10% SRBC 悬液 0.2 ml 加 0.8 ml 生理盐水后与 8 ml Drabkin 试剂混匀, 10 min 后测出光密度作为 SRBC 半数溶血的吸收度值, 按下式算出各管的 HC_{50} ⁽⁷⁾: $HC_{50} = (\text{样品的吸收度值} / \text{半数溶血时的吸收度值}) \times \text{血清稀释倍数}$ (表 1)。

可见 Har 组的 HC_{50} 均小于对照组, 而大于环磷酸胺组。

对小鼠空斑形成细胞溶血能力的影响 小鼠随机分组给药, 次日 ip 3:5 (SRBC:NS, vol:vol) SRBC 悬液免疫小鼠。末次给药 1 h 后, 将小鼠拉脱颈椎处死, 剖腹取脾, 用 pH 7.4 的 PBS 液洗脾细胞悬液两次, $700 \times g$ 离心 5 min 重悬为 4×10^6 /ml, 每管加入悬液, 0.2% SRBC 和 1:50 的豚鼠血清各 1 ml, 混匀。另设不加补体的空白管, 37°C 温育 1 h, $1600 \times g$ 离心 10 min 后吸上清 1 ml, 加 3 ml Drabkin 试剂, 用 72-1 型分光光度计测光密度值, $\lambda = 540$ nm, 其值见表 2。

可见 Har 组的光密度值均小于对照组, 而大于环磷酸胺组, 但 Har 16 mg/kg 组与环磷酸

胺组无显著差别。

对 SRBC 诱发小鼠足垫迟发型变态反应的影响 小鼠随机分组给药, 给药前 1 h 用 10% SRBC 0.05 ml/鼠左足垫 sc 免疫小鼠, 免疫后 d 7 用 5% SRBC 0.05 ml/鼠右足垫 sc 攻击, 用千分卡尺分别记录攻击前和后 18, 24 h 每鼠右足垫厚度, 计算差值作为肿胀度(表 3)。

Tab 3. Effects of sc harmine 16 and 25 mg/(kg·d) \times 7 d on delayed hypersensitivity in mice immunized with SRBC. n = 10, $\bar{x} \pm SD$. ***p < 0.01 (vs NS).

Drug	Dose mg/(kg·d) \times 7	Footpad thickness (mm)	
		18 h	24 h
NS	—	0.7 \pm 0.2	0.6 \pm 0.2
Harmine	25	0.3 \pm 0.1***	0.2 \pm 0.1***
Harmine	16	0.3 \pm 0.1***	0.2 \pm 0.1***
Na-salicylate	75	0.7 \pm 0.2	0.6 \pm 0.2
Dexamethasone	5	0.2 \pm 0.1***	0.2 \pm 0.1***

结果表明 Har 组和地塞米松组足垫肿胀度小于对照组和水杨酸钠组。

对 [³H]TdR 参与的淋巴细胞转化的影响 无菌条件下小鼠心脏采血 0.3 ml/鼠, 置入 3 ml 加有肝素、青链霉素和小牛血清的 RPMI-1640 培养液中, 10 瓶为一组, 分别有无 PHA 的阴性对照, 有 PHA 无药物的阳性对照。37°C 温育, 48 h 时每瓶加入 20 μ l [³H]TdR 185 GBq/mmol, 继续培养至 72 h, 样品经洗涤后, 破坏细胞, 离心后的沉淀物经消化, 加入闪烁液, 用国产 FJ-2101 液体闪烁计数器计数 cpm, 所

Tab 4. Effects of harmine on PHA-induced peripheral blood lymphocyte transformation of [³H]TdR incorporation in mice. n = 10, $\bar{x} \pm SD$. ***p < 0.01 vs positive control.

Group	Dose (μ g/ml)	cpm	Suppression %
Negative†	—	156 \pm 41***	
Positive††	—	1118 \pm 328	
Har	30	451 \pm 68***	60
Har	37	370 \pm 76***	67
Har	47	300 \pm 72***	73

†Negative control without PHA, ††Positive control with PHA.

用机效率为 44%，并按下式计算抑制%：抑制% = 1 - (药物组的 cpm/阳性对照组的 cpm)。

结果表明 Har 组 cpm 数小于阳性对照组，随剂量增大抑制率增高(表 4)。

讨 论

Har 可减轻正常小鼠免疫器官的重量，但对腹腔巨噬细胞吞噬功能和碳粒廓清能力无明显作用，表明 Har 对单核-巨噬细胞系统没有影响，但尚须测定其它指标以确定 Har 对非特异性免疫系统的作用。

Har 使小鼠空斑形成细胞的溶血能力减弱，使溶血素和 SRFC 数目减少。这说明 Har 对体液免疫过程中致敏 B- 细胞的产生和抗体形成均有抑制作用。

Har 抑制 PHA 诱导淋巴细胞转化和 DTH 反应说明 Har 对细胞免疫有抑制作用⁽⁸⁾。

Har 大剂量组对小鼠免疫功能的抑制作用较小剂量组强，但其作用强度远小于环磷酰胺。根据本文的结果，我们认为 Har 是一种以抑制细胞免疫和体液免疫为主的免疫抑制剂。

参 考 文 献

1 Kelly DM, Naylor RJ. The importance of

extrapyramidal function for the induction and antagonism of harmine tremor. *Eur J Pharmacol* 1975; 32 : 76

2 Wright EE, Bird JL, Feldman JM. The effect of harmine and other monoamine oxidase inhibitors on *N*-acetyltransferase activity. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol* 1979; 24 : 259

3 Robertson HA, Baker GB, Coutts RT, Benderly A, Locock RA, Martin IL. Interaction of β -carbolines with the benzodiazepine receptor: structure-activity relationships. *Eur J Pharmacol* 1981; 76 : 281

4 Muraki T, Yamazoe Y, Kato R. Inhibition of benzodiazepine and GABA receptor binding by amino- γ -carbolines and other amino acid pyrolysate mutagens. *Ibid* 1984; 98 : 35

5 Smart L. Competitive inhibition of sodium-dependent high affinity choline uptake by harmala alkaloids. *Ibid* 1981; 75 : 265

6 龙振洲、陈慰峰。中药对免疫细胞及其功能的作用。北京医学院学报 1978; 10 : 156

7 徐学瑛、李元、许津。一个改进的体液免疫测定方法——溶血素测定法。药学报 1979; 14 : 443

8 Marchal G, Milon G, Hurtrel B, Lagrange PH. Titration and circulation of cells mediating delayed type hypersensitivity in normal and cyclophosphamide treated mice during response to sheep red blood cells. *Immunology* 1978 : 35 : 981

Acta Pharmacologica Sinica 1987 Sep; 8 (5) : 477-480

Effects of harmine on immune function of mice

BIAN Di, LI Guan-Hai, ZHANG Hong-Quan

(Department of Pharmacology, Xingjiang Medical College, Wulumuqi 830054)

ABSTRACT The effects of harmine (Har) on immune systems in normal mice were studied. At the sc doses of 16 or 25 mg/(kg·d) \times 7 d, Har decreased the thymus and spleen weights of mice, the immune specific rosette forming cells, the antibodies and the delayed hypersensitivity in footpad of mice induced by sheep red blood cells. Meanwhile there were no marked

potentiating effects of Har on the phagocytoses of monomacrophage systems in mice. Har 30, 37 or 47 μ g/ml suppressed lymphocyte transformation of [³H]TdR incorporation induced by PHA *in vitro*.

KEY WORDS harmine; phagocytosis; hemolysis; delayed hypersensitivity; lymphocyte transformation