

褪黑素提高吗啡依赖小鼠的免疫功能并抑制 NO 的过量释放

刘晓红, 徐 丽, 邱学才, 古力努尔, 柏 华, 卢景芬*

(北京大学药学院, 天然药物及仿生药物国家重点实验室, 北京 100083)

摘要: 目的 探讨褪黑素(MT)对吗啡依赖小鼠免疫功能的影响及其与一氧化氮(NO)的关系。方法 sc 吗啡建立小鼠身体依赖模型;纳洛酮催瘾;称量免疫器官重量;Con A 刺激的脾细胞淋巴增殖反应;碳粒廓清实验检测小鼠血中单核巨噬细胞的吞噬功能;小鼠腹腔巨噬细胞诱生 NO 含量的测定。结果 MT 可对抗吗啡引起的免疫抑制,包括阻止吗啡对淋巴细胞增殖反应的抑制;明显提高吗啡依赖小鼠巨噬细胞的吞噬指数;抑制吗啡引起的腹腔巨噬细胞过量释放 NO。MT 对巨噬细胞的吞噬功能的增强作用可被纳洛酮阻断。结论 MT 可提高吗啡依赖小鼠的免疫功能并抑制腹腔巨噬细胞中 NO 的过量释放。

关键词: 褪黑素; 吗啡依赖; 免疫功能; 一氧化氮

中图分类号: R967; R977

文献标识码: A

文章编号: 0513 - 4870(2000)11 - 0806 - 04

褪黑素(melatonin, MT)是一种主要由松果腺分泌的神经内分泌激素,化学结构为 *N*-乙酰-5-甲氧色氨酸。有镇痛、镇静、助眠、逆转时差和增强机体免疫功能等多种作用^[1]。吗啡是一种有成瘾性的强效中枢镇痛药。临床研究表明吗啡、海洛因成瘾者免疫功能低下,患者易感染多种疾病^[2]。一氧化氮(nitric oxide, NO)在免疫反应中也有复杂而广泛的作用,甚至被称为免疫调节因子^[3]。

本工作首先建立小鼠吗啡成瘾模型,以测量小鼠免疫器官重量、巨噬细胞(macrophage M ϕ)的吞噬指数(phagoc index)、脾淋巴细胞的增殖反应及腹腔 M ϕ 诱生的 NO 含量为观察指标,研究 MT 对吗啡成瘾小鼠免疫功能的影响及其与 NO 的关系。

材 料 与 方 法

动物 ♀昆明种小鼠 8~12 周龄,体重 18~22 g,北京大学医学部实验动物部提供。

试剂与药品 吗啡:青海制药厂生产,用时用 0.9%生理盐水配制成溶液备用;melatonin(MT):美国 RBI 公司出品。用 40%酒精溶解后再用生理盐水(NS)稀释成不同浓度的 MT 溶液;RPMI 1640 试剂为美国 GIBCO 公司出品;MTT、刀豆蛋白 A

(concanavalin A, Con A)、LPS 为美国 Sigma 公司出品,用前用磷酸缓冲液配成 5 g·L⁻¹ 的使用液;纳洛酮(naloxon, Na)为美国 RBI 公司出品;NO 测试盒(Griess 法)购自南京建成生物工程研究所;转移因子(Translatonio, Tran)由北京京航制药厂生产。

小鼠吗啡依赖模型的建立 将小鼠随机分组,每天 9:00 及 16:00 分别连续 sc 吗啡各 1 次,剂量为 70 mg·kg⁻¹,5 d 即可成瘾。

Con A 刺激脾淋巴细胞增殖反应的测定 常规制备脾淋巴细胞悬液^[4]。用 RPMI 1640 培养液调细胞浓度为 5×10⁶·mL⁻¹,种植于 96 孔板。每孔板加入 90 μ L 细胞悬液,终浓度为 5 μ g·mL⁻¹的 ConA 10 μ L,置于 37℃ 5% CO₂ 培养箱培养 48 h 后,弃上清液,加入无小牛血清的培养液 60 μ L,MTT 20 μ L,于 37℃ CO₂ 培养箱中培养 4 h 后加入二甲基亚砷 100 μ L,用酶标仪(Bio RAD, Model 450)读取吸光度 A 值。

小鼠血中 M ϕ 吞噬功能的测定 用碳粒廓清实验方法^[4] 721 分光光度计测量血中单核 M ϕ 的吞噬指数。

小鼠腹腔 M ϕ 诱生 NO 含量的测定 在建立动物模型的 d 5 7:00 pm,各组实验动物分别 ip 1%蛋白胨 2 mL,14 h 后取出腹腔 M ϕ ,用生理盐水洗涤 2 次,1 000 r·min⁻¹离心 5 min,然后用含 10%新生小牛血清 RPMI 1640 培养液调细胞浓度为 4×10⁶·mL⁻¹,植于 96 孔板(平底),置于 37℃ 5% CO₂ 培养箱贴壁 2 h 后,弃上清液,贴壁细胞即为腹腔 M ϕ 。

收稿日期: 1999-12-28

基金项目: 天然药物及仿生药物国家重点实验室基金资助项目

作者简介: 卢景芬,女,研究员,博士生导师。

* 联系人 Tel: (010) 62091517, E-mail: zdsjif@mail.bjmu.edu.cn

将腹腔 $M\phi$ 单层加入 $1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ LPS $10 \mu\text{L}$ 和培养液 $90 \mu\text{L}$, 置于 37°C 培养箱中培养 18 h 后收集上清液 $60 \mu\text{L}$, 加入 Griess 试剂 $120 \mu\text{L}$, 室温放置 10 min 后, 用酶标仪测定吸光度 A 值。实验以亚硝酸钠作为标准, 回归方程 $Y = 0.0038 X - 0.0006$ 。

数据处理 各组数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 以 t 检验比较两组间差异的显著性。

结 果

1 吗啡依赖小鼠的戒断反应及免疫功能的改变

16 只小鼠随机平分成空白对照组和吗啡依赖组, 每组 8 只。于吗啡成瘾后 d 6 9:00 am, ip 纳洛酮 $50 \text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 催瘾, 观察 30 min 内小鼠出现跳跃反应的次数 (jumping times/30 min), 以此表示戒断反应的强度。同时测量小鼠免疫器官重量 (g)。用碳粒廓清实验方法测量血中单核 $M\phi$ 的吞噬指数 (phagoc index)。结果表明, 成瘾小鼠出现的体重减轻及戒断跳跃反应明显高于对照组, 同时 $M\phi$ 吞噬指数明显降低 (表 1)。另外, 还伴有免疫器官胸腺和脾脏重量的减轻, 与对照组相比有明显差异。

Tab 1 The immune function and withdrawal syndromes in morphine dependent mice ($\bar{x} \pm s$, $n = 8$)

Group	Lost weight/g	Jumping (times/30 min)	Phagoc index
Control	1.0 ± 0.4	9 ± 4	3.5 ± 0.4
Morphine-dependent	$1.5 \pm 0.6^*$	$90 \pm 11^{**}$	$2.2 \pm 0.2^{**}$

Morphine dependent model in mice was established at the end of 5 days after repeated sc morphine $70 \text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ bid. Withdrawal syndromes were elicited by ip naloxon ($50 \text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) on the 6th day. The intensity of morphine withdrawal syndromes was evaluated according to the jumping time in the next 30 minutes. The immune functions were evaluated by the weight of immune organs and the phagoc index of blood-primed macrophages. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs control

2 MT对吗啡依赖小鼠脾淋巴细胞增殖反应的影响

将 18 只小鼠随机分为 3 组, 每组 6 只。一组为空白对照, 其余两组为吗啡依赖实验组, 并于吗啡依赖过程的 d 4, d 5 4:00 pm 分别 ip NS 和 $50 \text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ MT, 3 组小鼠均于 d 6 9:00 am 断头处死, 测试脾淋巴细胞增殖反应。结果表明, 吗啡依赖小鼠

脾淋巴细胞对 Con A 致分裂反应的增殖能力的 A 值为 0.030 ± 0.007 , 明显低于对照组 (0.177 ± 0.065), 差异极为显著 ($P < 0.001$), 而 ip MT 组, 脾淋巴细胞对 Con A 致分裂反应的增殖能力 (0.296 ± 0.069) 却比对照组有显著提高 ($P < 0.001$)。

3 MT对吗啡依赖小鼠的免疫功能的影响

将 40 只小鼠随机分为 5 组, 每组 8 只。一组为空白对照组, 其余 4 组为吗啡依赖实验组, 并在吗啡依赖过程的 d 5 4:00 pm, d 6 8:00 am 分别 ip NS 0.2mL 和 3 种不同剂量的 MT ($25, 50$ 和 $100 \text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)。用碳粒廓清实验方法计算单核 $M\phi$ 吞噬指数。结果表明, 3 种不同剂量的 MT 均可明显提高吗啡依赖小鼠 $M\phi$ 的吞噬指数, 并在此剂量范围内呈良好的量效关系 (图 1)。

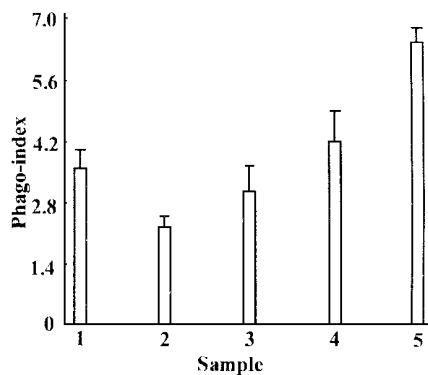


Fig 1 The effect of melatonin (MT) on the phagocytosis of macrophages in morphine dependent mice. $\bar{x} \pm s$, $n = 8$. The experimental conditions were the same as that in Tab 1: MT was given 2 times on the 5th day and the 6th day, during the establishing model of the morphine dependent mice. The immune function was evaluated by measuring the phagoc index of blood-primed macrophages

1. Control; 2. Morphine dependent, $P < 0.05$ vs control; 3. Morphine dependent + $25 \text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ MT, $P < 0.05$ vs 2; 4. Morphine dependent + $50 \text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ MT, $P < 0.05$ vs 2; 5. Morphine dependent + $100 \text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ MT, $P < 0.05$ vs 2

4 MT对小鼠腹腔 $M\phi$ 产生 NO 的影响

将 18 只小鼠随机分为 3 组, 每组 6 只。一组为空白对照, 两组为吗啡依赖实验组, 并在吗啡依赖过程的 d 4, d 5 4:00 pm, 各组动物分别 ip NS 和 $50 \text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ MT, 测量腹腔 $M\phi$ 产生的 NO 量。结果表明: 吗啡依赖小鼠腹腔 $M\phi$ 在 LPS 刺激下产生量 NO (15.92 ± 4.86) $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 与对照组 (6.57 ± 2.22) $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 相比具有明显差异 ($P < 0.001$); 而

ip 50 mg·kg⁻¹ MT 2 d 后产生的 NO 则明显减少至 (5.03 ± 3.33) μmol·L⁻¹ 与吗啡依赖组 (15.92 ± 4.86) μmol·L⁻¹ 相比, 差异显著 (P < 0.001)。

5 转移因子对吗啡依赖小鼠 Mφ 吞噬功能的影响

将小鼠随机分为 4 组, 每组 6 只。一组为空白对照组, 其余 3 组为吗啡依赖并在吗啡依赖过程的 d 5 4: 00 pm 和 d 6 8: 00 am 分别 ip NS, 100 mg·kg⁻¹ MT, 10 mg·kg⁻¹ Tran, 并于 d 6 8: 00 am 给药后 1 h, 用碳粒廓清实验方法在 721 分光光度计上测定 A 值, 计算 Mφ 吞噬指数。结果表明: ip 10 mg·kg⁻¹ Tran 可提高吗啡依赖小鼠 Mφ 的吞噬功能, 其吞噬指数为 4.41 ± 0.64, 比吗啡依赖组 (2.18 ± 0.28) 明显升高 (P < 0.01)。而 ip 100 mg·kg⁻¹ MT 组的吞噬指数 (6.40 ± 0.34) 也比吗啡依赖组 (2.18 ± 0.28) 明显升高 (P < 0.01)。但这两种药物对免疫器官重量无明显影响。

6 MT 提高吗啡依赖小鼠免疫功能与阿片受体的关系

将 18 只小鼠随机分为 3 组, 每组 6 只。第 1 组为空白对照, 第 2、第 3 两组都是吗啡依赖实验组。第 2 组在吗啡依赖过程中, d 6 8: 00 am ip 100 mg·kg⁻¹ MT, 30 min 后再注射 50 mg·kg⁻¹ 纳洛酮。第 3 组在吗啡依赖过程中 d 6 8: 00 am ip 50 mg·kg⁻¹ 的纳洛酮, 30 min 后 ip 100 mg·kg⁻¹ MT。各组均在实验后 30 min 由眼眶取血, 用碳粒廓清实验计算 Mφ 吞噬指数。结果表明: 先给纳洛酮再给 MT 使 Mφ 的吞噬指数 (1.94 ± 0.25) 明显低于先给 MT 再给纳洛酮组 (3.15 ± 0.48), 差异非常明显 (P < 0.01)。

讨 论

大量文献报道, 褪黑素具有增强机体免疫功能^[1]和在整体情况下清除自由基^[5-7]等多种生理作用。我们近来的研究证明褪黑素还可抑制吗啡戒断反应^[8]。但是关于褪黑素对吗啡引起的免疫抑制作用有何影响, 尚鲜见报道。因此本工作利用小鼠吗啡成瘾模型, 通过观察小鼠免疫器官重量、淋巴细胞增殖反应、单核巨噬系统的吞噬功能的改变以及 Mφ 释放 NO 自由基的变化等指标, 从器官、细胞、分子等不同水平分析 MT 提高吗啡依赖小鼠免疫功能的机制。

本文研究表明吗啡依赖小鼠的免疫功能有明显下降, 这不仅表现在免疫器官重量的减轻, 而且还表

现为淋巴细胞增殖反应的抑制, 以及 Mφ 吞噬功能的降低。而 MT 却能明显反转吗啡依赖引发的免疫功能低下。MT 可反转吗啡依赖引起的淋巴细胞增殖反应低下, 可能与其抑制吗啡依赖引起的 Mφ 产生过量 NO 有关, MT 使 NO 水平恢复接近正常, 即消除了过量 NO 对免疫功能的抑制作用^[9], 并且提高 Mφ 的吞噬指数。由于本实验应用 MT 的时间较短, 没有观察到对小鼠免疫器官重量的明显影响。但是在实验中观察到, MT 增强免疫功能的作用可能被纳洛酮阻断, 提示 MT 的作用可能是通过阿片受体而实现的。

近年来有些研究认为 NO 具有免疫调节作用, 当受到抗原或 LPS 等刺激时, Mφ 产生 IL-1, THF-β 等因子以自分泌和旁分泌方式协同诱导 NO 的分泌和释放; Th₁ 产生 IFN-γ 帮助激活 Mφ 产生 NO, 同时也自分泌 IL-2 作为一种生长因子促使自身增殖及分泌细胞因子。当 NO 浓度达一定水平时则抑制 Mφ 和 Th₁ 的增殖。说明适量 NO 可能作为一种重要的自身调节因子, 防止 Th₁ 过度增殖而引起一系列免疫病理^[3,10]。Fecho 的研究表明, 吗啡增加 Mφ 中 NO 的合成与释放。NO 作用于淋巴细胞, 通过 cGMP 系统而抑制淋巴细胞的增殖反应^[9]。而 MT 可能是通过 Th₁ 细胞释放 β-内啡肽而发挥免疫增强作用的。因此可以推测 MT 通过 Th₁ 细胞因子及内源性阿片类物质, 间接调节 Mφ 中 NO 的合成和释放水平, 缓解和改善因吗啡引起的过量 NO 对免疫系统的抑制作用。本实验结果可见 MT 调节免疫功能的作用与调节 NO 的水平有关, 因此提示我们对 MT 及 NO 在体内对免疫功能调节的相互关系需进行更深入的研究。

REFERENCES:

- [1] Xu JM, Xu SY, Mei Q, et al. Role of the inhibitory effect of melatonin on nitric oxide production in immunological liver injury in mice [J]. *Chin Pharmacol Bull* (in Chinese), 1998, 14(6): 533 - 535.
- [2] Lu ZW, Wu Tao, Lin ZB. Study about the inhibiting effect on immune and mechanism of morphine [J]. *Chin Bull Drug Depend* (in Chinese), 1993, 2(3): 164 - 167.
- [3] Taylor Robinson, Aw Liew FY, Seven A, et al. Regulation of immune response by NO differentially produced by T helper type 1 and type 2 cells [J]. *Eur J Immunol*, 1994, 24(4): 980 - 984.
- [4] Xue B. *Experimental Technique of Immunotoxicology* [M], Beijing Medical University and Peking Union Medical College United Publishing House. 1995. 58 - 59.

- [5] Liu ZY, Wei W, Xu SY. Progress in the mechanisms and therapy of opiates dependence [J]. *Chin Pharmacol Bull* (in Chinese), 1999, **15**(2): 97 - 102.
- [6] Ying SW, Zhang JJ. The influence of melatonin on the function of brain [J]. *Prog Physiol Sci*, 1987, **18**(3): 251 - 255.
- [7] Reiter RJ. The pineal gland and melatonin in relation to aging [J]. *Exp Gerontol*, 1995, **18**(3): 192 - 212.
- [8] Qiu Y, Kang LS, Qiu XC. The inhibitory effect of melatonin on morphine withdrawal syndromes and serum monoamines in morphine dependent mice [J]. *Natl Med J China* (in Chinese), 1998, **78**(9): 704 - 706.
- [9] Fecho K, Maslonek KA, Dykstra LA, et al. Mechanisms where by macrophage-derived NO is involved in morphine-induced suppression of splenic lymphocyte proliferation [J]. *J Pharm Exp Ther*, 1995, **272**(3): 477 - 483.
- [10] Wei XQ, Charles IG. Altered immune responses in mouse lacking inducible NO synthase [J]. *Nature*, 1995, **375**(8): 408 - 411.

THE EFFECT OF MELATONIN ON ENHANCING IMMUNE FUNCTION AND INHIBITING THE ABILITY OF NO OVER RELEASE IN MORPHINE DEPENDENT MICE

LIU Xiaohong, XU Li, QIU Xuecai, GuliNuer, BAI Hua, LU Jingfen

(Peking University, Medical Branch, National Key Laboratories of Natural and Biometric Drugs, Beijing 100083, China)

ABSTRACT: **AIM** To observe the effects and mechanism of melatonin (MT) on the immune function of morphine dependent mice. **METHODS** A physical dependent mice model was established by repeated subcutaneous injection of morphine. The intensity of morphine withdrawal syndrome was evaluated according to the weight of immune organs, the proliferation reaction of stimulated splenic lymphocytes by Con A, the phagocytosis index of blood primed macrophages and the content of NO induced in the peritoneal macrophage (pM ϕ). **RESULTS** MT reversed the inhibitory effect of morphine on the proliferation ability of splenic lymphocytes and enhanced the phagocytosis of macrophages of morphine dependent mice obviously and prevented the over release of NO from pM ϕ . The enhancing effects of MT on the phagocytosis can be prevented by naloxon. **CONCLUSION** MT can significantly enhance the immune function of morphine dependent mice and inhibit NO excessive release from pM ϕ .

KEY WORDS: melatonin; morphine dependence; immune function; nitric oxide