

去氢骆驼蓬碱衍生物 B-9-3 与 5 种传统抗肿瘤药联用的体外抑瘤作用

马芹^{1,2}, 陈伟¹, 陈文^{2*}

1. 新疆石河子大学药学院, 新疆石河子 832000

2. 新疆华世丹药物研究有限责任公司, 新疆乌鲁木齐 830011

摘要:目的 研究去氢骆驼蓬碱衍生物 B-9-3 与 5 种不同传统抗肿瘤药联用的体外抑瘤作用。方法 经 B-9-3(0.78~200.00 $\mu\text{g/mL}$) 与紫杉醇、长春新碱、5-氟尿嘧啶、顺铂和表柔比星 (0.78~200.00 $\mu\text{g/mL}$) 单独及联合作用于肺癌细胞 LLC、结肠癌细胞 HT-29、肝癌细胞 HepG2 和乳腺癌 MCF-7 48 h 后, 采用 MTT 法检测肿瘤细胞存活率, 并按照 WEBB 法计算联合用药协同系数 (Q); 进一步通过 PI/Hoechst 33342 双荧光染色和细胞划痕实验研究 B-9-3 (0.78、25.00 和 200.00 $\mu\text{g/mL}$) 作用于 LLC 细胞 24 h 后对瘤细胞活性、迁移的影响。结果 与 B-9-3 单独用药比较, 同浓度 B-9-3 与长春新碱和紫杉醇联合用药, 能够显著降低 MCF-7 和 HT-29 细胞的存活率, Q 均低于 0.3 ($Q < 1$ 为协同)。荧光染色和细胞划痕实验结果表明, 与溶剂对照组比较, B-9-3 (25 和 200 $\mu\text{g/mL}$) 组细胞凋亡明显增多、划痕修复率显著降低 ($P < 0.01$)。结论 B-9-3 显著抑制 LLC 细胞迁移能力并提高细胞凋亡率, 与不同抗肿瘤药物联合具有协同作用。

关键词: 去氢骆驼蓬碱; B-9-3; 联合用药; 抗肿瘤; 凋亡; 划痕实验

中图分类号: R965.1 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2018)01-0061-05

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2018.01.010

Inhibitory effect of harmine derivative B-9-3 combined with five traditional anti-tumor drugs on cancer cells *in vitro*

MA Qin^{1,2}, CHEN Wei¹, CHEN Wen²

1. College of Pharmacy, Shihezi University, Shihezi 832000, China

2. Xinjiang Huashidan Drug-Discovery Co., Ltd., Urumqi 830011, China

Abstract: Objective To investigate the inhibitory effect of B-9-3 combined with five anti-cancer drugs on different tumor cells. **Methods** LLC, HT-29, HepG2, and MCF-7 cells were treated with B-9-3 (0.78~200.00 $\mu\text{g/mL}$) and Vincristine, Taxol, 5-fluorouracil, Cisplatin and Epirubicin in single-group or in combination for 48 h separately. The inhibitory effect on growth of tumor cells was determined by MTT assay, and the combination index (Q) was calculated according to WEBB method. In addition, the apoptosis rate and migration of LLC cells after 24 h treatment of B-9-3 in different concentration (0.78、25.00 和 200.00 $\mu\text{g/mL}$) were determined by PI/Hoechst33342 fluorescence staining and cell scratch test. **Results** Compared with B-9-3 alone group, B-9-3 in the same concentration combined with vincristine and paclitaxel reduced the survival rate of MCF-7 and HT-29 cells significantly, and Q was less than 0.3 ($Q < 1$ for synergy). The results of fluorescence staining and cell scratch test showed that, compared with the solvent control group, the apoptosis rate of B-9-3 (25 and 200 $\mu\text{g/mL}$) group increased significantly, and the rate of scratch repairing decreased significantly ($P < 0.01$). **Conclusion** B-9-3 inhibits the migration of LLC cells and increases the rate of apoptosis significantly, and has synergistic effect with the combination of different antitumor drugs.

Key words: harmine; B-9-3; drug combination; anti-cancer; apoptosis; scratch test

现代医学研究发现, 骆驼蓬提取物去氢骆驼蓬碱 (harmine) 具有抗肿瘤、镇痛及抗菌等多种作用^[1-2]。但也有许多研究指出, 去氢骆驼蓬碱具有严

重的神经毒性, 会引起患者呕吐、震颤、幻觉甚至死亡^[3]。本实验室研究发现, 去氢骆驼蓬碱 9 位取代基的变化具有减毒增效的功能, 并依据双体柔红

收稿日期: 2017-08-25

基金项目: 兵团中青年科技创新领军人才计划 (2015BC001)

第一作者: 马芹 (1974-), 女, 硕士研究生。E-mail: 285239579@qq.com

*通信作者: 陈文, 教授, 研究方向为药物药理研究。Tel: (0991)6655599 E-mail: www.chen-001@163.com

霉素和长春新碱等药物分子设计中体现的双体分子药效活性增强现象,合成了新型抗肿瘤衍生物 B-9-3 (图 1) [4-6]。前期本课题组已经报道了 B-9-3 通过阻断转移生长因子受体-1 (TGF β RI) 及血管内皮生长因子受体 2 (VEGFR2) 信号通路,调控肿瘤微环境中免疫细胞的募集、抑制肿瘤血管的生成,在体内外具有显著的抗肿瘤效果 [7-8]。本实验拟通过建立肝癌细胞、结肠癌细胞、肺癌细胞和乳腺癌细胞模型进一步评价 B-9-3 与顺铂、表柔比星、长春新碱、紫杉醇和 5-氟尿嘧啶的联合用药效果,并利用荧光染色及细胞划痕技术分析了 B-9-3 对肿瘤细胞活性的抑制作用机制,深入评价 B-9-3 抗肿瘤活性。

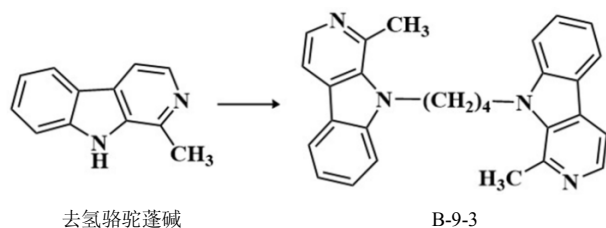


图 1 B-9-3 合成途径

Fig. 1 Synthesis of B-9-3

1 材料

1.1 主要仪器

SW-CJ-2FD 型超净工作台 (苏州安泰技术有限责任公司); 2323-2 型 CO₂ 培养箱 (美国 SHELLLAB 公司); IBE 2 000 型倒置荧光显微镜 (重庆光电仪器有限公司)。

1.2 药品及主要试剂

B-9-3, 合成于新疆华世丹药物研究有限责任公司, 批号 110506, 质量分数 > 98.9%; 顺铂 (冻干型) 注射液, 购自齐鲁制药有限公司, 批号 310027, 规格 10 mg/支; 紫杉醇注射液, 购自北京双鹭药业股份有限公司, 批号 20140203, 规格 5 mL : 30 mg; 5-氟尿嘧啶注射液, 购自上海旭东海普药业有限公司, 批号 20150203, 规格 10 mL : 0.25 g; 注射用硫酸长春新碱, 购自深圳万乐药业有限公司, 批号 1403v3, 规格 1 mg; 盐酸表柔比星注射液, 购自深圳万乐药业有限公司, 批号 1206E3, 规格 10 mg/支; 噻唑蓝细胞染料 (MTT)、细胞核染料碘化丙啶 (PI) 和细胞质染料 Hoechst 33342, 购自美国 sigma 公司, 货号分别为 M-2128、P4170 和 B-2261, 规格均为 25 mg。

1.3 细胞

肺癌细胞 LLC、结肠癌细胞 HT-29、肝癌细胞 HepG2 和乳腺癌细胞 MCF-7, 购自中科院上海细胞所。

2 方法

2.1 细胞培养

将冻存的 LLC、HT-29、HepG2 和 MCF-7 细胞于 37 °C 恒温水浴箱内复苏后, 加入含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养基, 置于 37 °C、相对湿度 90%、5% CO₂ 培养箱中培养 24~48 h。

2.2 分组与给药

设 B-9-3 (质量浓度为 0.78、3.13、12.25、25.00、50.00、100.00、200.00 μ g/mL) 组、紫杉醇、长春新碱、5-氟尿嘧啶、顺铂和表柔比星 (质量浓度均设 0.78、3.13、12.25、25.00、50.00、100.00 和 200.00 μ g/mL) 组; B-9-3 (上述 7 种浓度) + 顺铂 (3.13 μ g/mL) 组; B-9-3 (上述 7 种浓度) + 紫杉醇 (3.13 μ g/mL) 组; B-9-3 (上述 7 种浓度) + 5-氟尿嘧啶 (3.13 μ g/mL); B-9-3 (上述 7 种浓度) + 长春新碱 (3.13 μ g/mL); B-9-3 (上述 7 种浓度) + 表柔比星 (3.13 μ g/mL); 溶剂对照组 (无血清 RPMI 1640)。所有药物均用无血清 RPMI 1640 稀释, 每个药物浓度设 3 个复孔。

B-9-3 及协同药物剂量选择依据: 经过预实验, B-9-3 剂量超过 200 μ g/mL 时, 选择的肿瘤细胞系死亡率超过 95% 以上; 当 B-9-3 质量浓度低于 0.78 μ g/mL 时, 肿瘤细胞存活率高于 95%。协同药物剂量与主药设相当剂量以便进行对照观察。

2.3 MTT 法检测单独给药及联合用药细胞存活率

取对数生长期的 4 种肿瘤细胞系, 用含 10% 新胎牛血清的 RPMI 1640 培养基制成单细胞悬液 (1×10^5 / mL), 按每孔 100 μ L 接种于 96 孔培养板, 置 37 °C 培养 12 h。按照“2.2”项添加药物及 RPMI 1640 培养基, 并继续培养 48 h, 每孔加入 5 mg/mL 的 MTT, 10 μ L/孔, 继续孵育 4 h。经酶标仪测定各孔吸光度 (A_{570}) 值, 并按作图法即以 \lg [药物浓度] 为横轴, 以细胞存活率为纵轴计算 IC₅₀。

以 WEBB 分数乘法计算联合用药效果, 即协同系数 Q :

$$Q = F(A)_{1,2} / \{1 - [(1 - F(A)_1)(1 - F(A)_2)]\}$$

$F(A)_{1,2}$ 为 1、2 两种药物联用时的药效, 即细胞存活率;

$F(A)_1$ 、 $F(A)_2$ 分别为两种药物单用时的药效, 其剂量分别为联用中的剂量;

$Q > 1$ 为拮抗; $Q = 1$ 为相加; $Q < 1$ 为增强协同。

2.4 B-9-3 对 LLC 细胞凋亡的影响

采用 PI/Hoechst 33342 双荧光染色检测 B-9-3 (0.78、25.00、200.00 $\mu\text{g/mL}$) 和顺铂 (200 $\mu\text{g/mL}$) 组对 LLC 细胞凋亡情况。按每孔 0.8 mL、 1×10^6 个细胞接种于含有载玻片的 24 孔板内, 24 h 进行贴壁培养, 加入药物溶液 200 μL 孵育 48 h, 吸取上清, PBS 清洗 3 遍, 加入 800 μL PBS、200 μL Hoechst 33342 储存液, 使其终浓度为 5 $\mu\text{g/mL}$ 并混匀。置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 避光温育 15 min; 将细胞置于冰上冷却后, PBS 清洗 3 遍; 加入 800 μL PBS、200 μL PI 染液, 使其终浓度为 15 $\mu\text{g/mL}$ 并混匀, 4 $^{\circ}\text{C}$ 避光复染 10 min; PBS 洗涤 2 次, 取出载玻片用荧光显微镜观察分析。凋亡细胞的蓝色荧光比非凋亡细胞强, 其光散射能力则降低, 将二者结合起来, 可以很好地鉴定凋亡细胞。坏死细胞则由于 PI 复染, 呈红色荧光。正常细胞为低蓝色/低红色 (Hoechst 33342⁺/PI⁺), 凋亡细胞为高蓝色/低红色 (Hoechst 33342⁺⁺/PI⁺), 坏死细胞为低蓝色/高红色 (Hoechst 33342⁺/PI⁺⁺)。荧光照相, 分析不同处理组细胞凋亡情况。

2.5 B-9-3 对 LLC 细胞迁移的影响

采用细胞划痕试验检测 B-9-3 (0.78、25.00、200.00 $\mu\text{g/mL}$) 和顺铂 (200 $\mu\text{g/mL}$) 对 LLC 细胞迁移的影响。将细胞浓度为 $5 \times 10^5/\text{mL}$ 的肿瘤细胞铺于 24 孔板 (每孔 800 μL) 上, 加入等量的含 10% 胎牛血清的细胞培养基, 培养 24 h, 使形成单层细胞。在单层细胞上呈“一”字划痕, 用 PBS 清洗 3 次, 加入药物溶液, 平行 3 个样本孔, 孵育 24 h 后换成含 10% 胎牛血清的细胞培养基, 孵育 24 h。吸去培养液, 用 PBS 清洗 3 次后, 在倒置显微镜下观察并拍照。

划痕修复率 = (初始划痕宽度 - 终末划痕宽度) / 初始划痕宽度

划痕修复率大小表示药物对细胞迁移能力的抑制作用强弱, 修复率越小表明药物对细胞迁移能力抑制作用越强, 反之则越弱。

2.6 统计分析

数据分析采用 SPSS 19.0 软件处理, 细胞存活率采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间比较采用单因素分析, 组间两两比较采用 LSD-*t* 检验, 百分率或构成比比较采用 χ^2 检验。

3 结果

3.1 联合用药

药物作用于 4 种肿瘤细胞的 IC₅₀ 值见表 1。其

表 1 B-9-3 联合用药 IC₅₀ 值

组别	IC ₅₀ ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)			
	MFC-7	HT-29	HepG2	LLC
B-9-3	1.78	79.43	60.26	1.26
顺铂	17.78	199.53	17.78	10.00
盐酸表柔比星	50.12	199.53	0.63	0.63
长春新碱	39.81	199.53	199.53	199.53
5-氟尿嘧啶	199.53	199.53	70.79	199.53
紫杉醇	10.47	5.62	0.79	3.16
△B-9-3+顺铂	3.16	1.26	0.16	0.01
△B-9-3+盐酸表柔比星	3.39	12.59	0.40	0.63
△B-9-3+长春新碱	0.45	56.23	1.78	3.98
△B-9-3+5-氟尿嘧啶	0.25	3.98	1.35	6.31
△B-9-3+紫杉醇	0.01	0.01	0.01	0.01

“△”: 表示不同浓度的 B-9-3

“△”: Different concentration of B-9-3

中 B-9-3 作用于 LLC 细胞的 IC₅₀ 值最低; 与紫杉醇联合应用作用于 4 种细胞、与顺铂联合应用作用于 LLC 细胞 IC₅₀ 值下降最多, 下降至 0.01 $\mu\text{g/mL}$ 。

B-9-3 与紫杉醇联合用药对 MCF-7 细胞的抑制效果最为显著, 协同系数 *Q* 为 0.07; 与长春新碱联合用药对 LLC 和 MCF-7 细胞具有显著地协同作用, 协同系数 *Q* 分别为 0.2 和 0.1; B-9-3 与 5 种药物联合, 对 MFC-7 细胞均有显著的抑制效果 (*Q* < 0.3)。与长春新碱联合作用对 LLC 细胞的作用最为显著, 协同系数 *Q* 为 0.2。结果见表 2、3。

3.2 B-9-3 对 LLC 细胞凋亡的影响

采用荧光倒置显微镜紫外激发光观察, 溶剂对照组 LLC 细胞由于结构形态完好, 细胞呈圆形, 对荧光染料呈现拒染效应, 仅呈现淡蓝色, 细胞核无 PI 染料进入; 在阳性药物顺铂 (200 $\mu\text{g/mL}$) 作用 24 h 后, 细胞大量死亡; 而在不同浓度 (0.78、25.00 $\mu\text{g/mL}$) B-9-3 作用下, 细胞凋亡现象明显增加, 细胞呈现亮蓝色, 细胞大量空泡化, 体积明显大于溶剂对照组, 出现明显的细胞凋亡指征, 但是细胞死亡指示并不显著, PI 未大量进入细胞内; 当 B-9-3 浓度达到 200 $\mu\text{g/mL}$ 时, 细胞大量被 PI 着色, 表示细胞开始大量死亡。结果见图 2。

3.3 B-9-3 对肿瘤细胞迁移的影响

经 B-9-3 处理 24 h 后观察, 细胞横向迁移能力明显降低。B-9-3 (200 和 25 $\mu\text{g/mL}$) 抑制细胞横向迁移作用显著, 且高浓度组对细胞的迁移抑制作用明显高于阳性药物顺铂。结果见图 3。

表 2 同浓度药物作用下肿瘤细胞存活率 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 2 Survival rates of tumor cells with equal concentrations drugs ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	剂量/ ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	细胞活性/%			
		MFC-7	HT-29	HepG2	LLC
溶剂对照	3.13	100	100	100	100
B-9-3	3.13	12.47±2.54*	95.61±11.98	65.16±7.03	27.74±2.32*
顺铂	3.13	57.00±3.01	58.38±5.90	57.94±10.21	45.65±7.60
盐酸表柔比星	3.13	65.10±3.18	70.51±7.18	35.99±6.43	18.14±2.81**
长春新碱	3.13	80.21±5.82	64.49±7.22	118.85±11.7	59.09±4.55
5-氟尿嘧啶	3.13	90.32±8.33	100.16±19.8	70.22±7.41	73.07±7.9
紫杉醇	3.13	45.08±6.11*	18.73±3.04*	11.98±1.56**	16.11±0.87*
B-9-3+顺铂	3.13+3.13	15.90±1.01**	46.97±5.27	37.18±4.6*	27.25±4.75*
B-9-3+盐酸表柔比星	3.13+3.13	15.90±3.47**	50.45±6.06	27.49±3.36*	23.89±2.39*
B-9-3+长春新碱	3.13+3.13	8.13±0.92**	53.25±4.44	52.62±3.28	14.19±3.04*
B-9-3+5-氟尿嘧啶	3.13+3.13	10.18±2.35**	58.26±7.03	49.07±2.34	36.06±6.36*
B-9-3+紫杉醇	3.13+3.13	3.88±0.45**	18.62±2.58**	12.58±1.57**	12.07±1.99**

与溶剂对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs solvent control group

表 3 联合用药系数

Table 3 Combination index (Q) of combined medicine

组别	剂量/ ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	Q			
		MFC-7	HT-29	HepG2	LLC
B-9-3+顺铂	3.13+3.13	0.25	0.48	0.44	0.45
B-9-3+盐酸表柔比星	3.13+3.13	0.23	0.51	0.35	0.58
B-9-3+长春新碱	3.13+3.13	0.10	0.54	0.49	0.20
B-9-3+5-氟尿嘧啶	3.13+3.13	0.11	0.58	0.55	0.45
B-9-3+紫杉醇	3.13+3.13	0.07	0.19	0.18	0.31

经数据结果分析可知,与溶剂对照组比较,B-9-3 200 和 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组细胞划痕修复率显著降低 ($P < 0.01$),高浓度组 (200 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 修复率低于顺铂。结果表明,B-9-3 对肺癌细胞的迁移具有极强的抑制效果,对防止肺癌的扩散具有重要意义。结果见表 4。

4 讨论

现代药理学研究表明, β -咔啉类生物碱具有减少细胞氧化损伤^[9]、抗肿瘤^[10]、抗抑郁^[11]和扩张血管^[12]等多种药学功效。但是近年来报道指出, β -咔

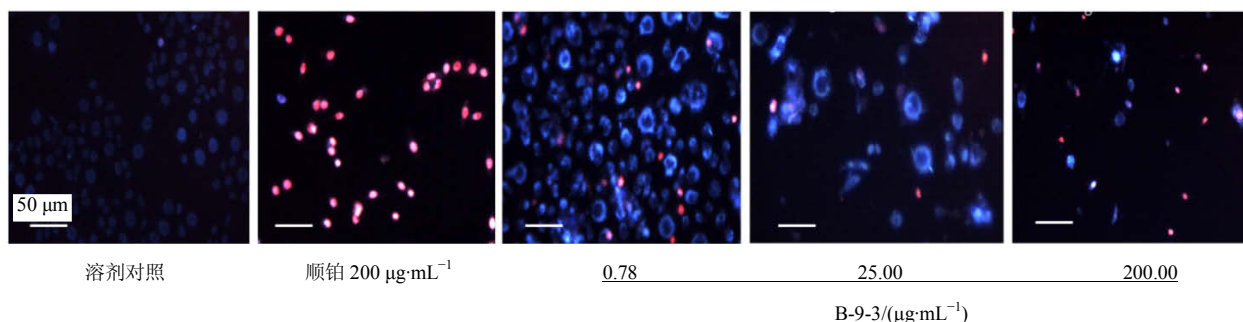


图 2 双荧光染色标记的 LLC 细胞

Fig. 2 LLC cells labeled with double fluorescent staining

啉类生物碱由于其分子结构与 1-甲基-4-苯基-1, 2, 3, 6-四氢吡啶 (MPTP) 相似,具有一定的内源性神经细胞毒性^[13]。本实验室对 β -咔啉类生物碱去氢骆驼蓬碱分子 9 位取代基进行了修饰,合成了化合

物 B-9-3,发现其抗肿瘤活性及神经细胞毒性具有显著改变^[14]。

本实验联合用药结果表明,6 种药物单独使用时对不同肿瘤细胞的抑制作用不同,B-9-3 与顺铂

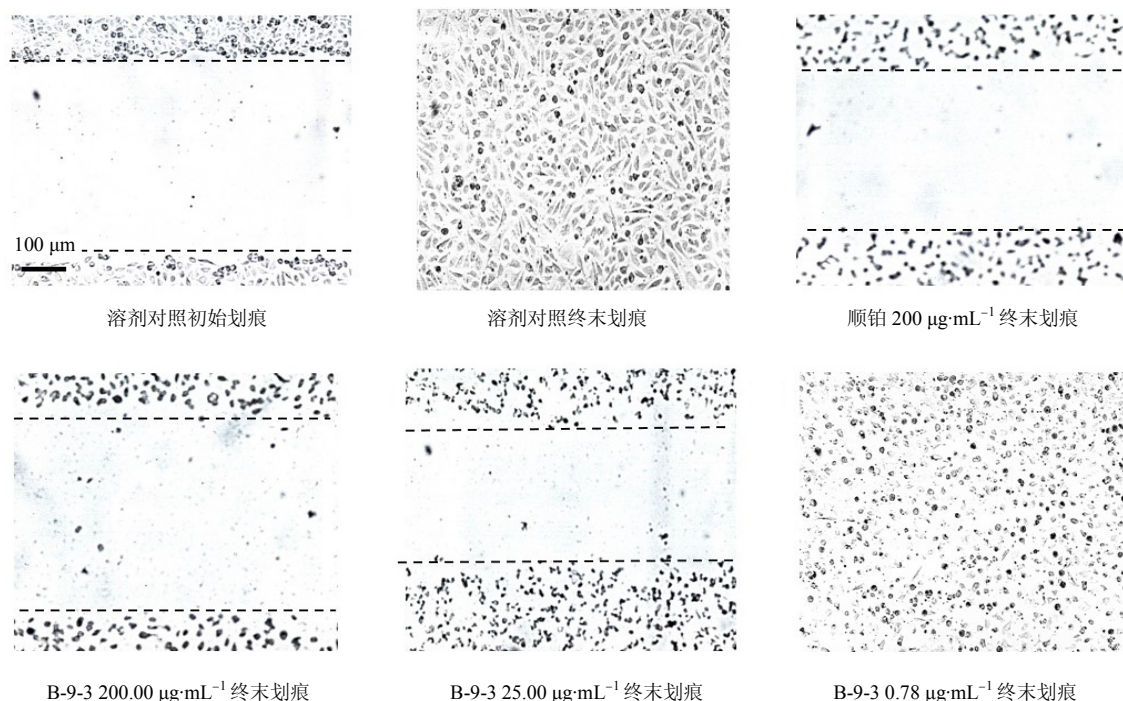


图3 B-9-3对LLC细胞横向迁移的抑制作用

Fig. 3 Inhibitory effect of B-9-3 on lateral migration of LLC cells

表4 B-9-3对LLC细胞横向迁移的抑制作用($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 4 Inhibitory effect of B-9-3 on lateral migration of LLC cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	剂量/ (µg·mL ⁻¹)	划痕修复率/%
溶剂对照	—	100.00±0.51
顺铂	200	14.95±0.32**
B-9-3	0.78	100.00±0.49
	25.00	29.61±0.67**
	200.00	6.15±0.40**

与溶剂对照组比较: ** $P < 0.01$

** $P < 0.01$ vs solvent control group

联合用药具有较强的协同作用, 推测原因, 顺铂作为一种烷化剂能够抑制肿瘤DNA的复制, 而B-9-3则趋向于是一种新型的细胞表面激酶受体阻断剂, 两种药物作用途径不同, 相加效果明显。B-9-3与紫杉醇的协同效果也非常显著, 在联合用于肿瘤的治疗上甚至存在互补关系, 推测他们可能作用于细胞同一信号通路的不同节点。基于以上的结果, 本课题组认为B-9-3与紫杉醇和顺铂组成三联用药对肿瘤的治疗效果应该更好, 但需进一步验证。

B-9-3作为一种优秀的抗肿瘤候选化合物, 在单用及与顺铂和紫杉醇联用时对多种肿瘤细胞的增

殖均有显著的抑制效果, 其单用机制可能是诱导肿瘤细胞凋亡和抑制细胞迁移, 该研究为B-9-3作为一种抗肿瘤药物的后期开发提供了参考。

参考文献

- [1] 薛小青, 何文婷, 张洪亮. 骆驼蓬抗肿瘤作用研究进展 [J]. 中医学报, 2015, 5(30):628-630.
- [2] Moloudizargari M, Mikaili P, Aghajanshakeri S, et al. Pharmacological and therapeutic effects of Peganum harmala and its main alkaloids [J]. PHA Rev, 2013, 7(14):199-212.
- [3] Frison G, Favretto D, Zancanaro F, et al. A case of β-carboline alkaloid intoxication following ingestion of peganum harmala seed extract [J]. Forensic Sci Int, 2008, 179(2/3): e37-e43.
- [4] Li S, Wang A, Gu F, et al. Novel harmine derivatives for tumor targeted therapy [J]. Oncotarget, 2015, 6(11): 8988-9001.
- [5] Piekarski M, Dolhan A, Cielecka-Piontek J, et al. The influence of pH and temperature on the stability of N-[(piperidine)methylene] daunorubicin hydrochloride and a comparison of the stability of daunorubicin and its four new amidine derivatives in aqueous solutions [J]. Sci World J, 2014, 2014: 803789.
- [6] Phalen D N, Frimberger A, Pyecroft S, et al. Vincristine chemotherapy trials and pharmacokinetics in Tasmanian

- devils with tasmanian devil facial tumor disease [J]. PLoS One, 2013, 8(6): e65133.
- [7] Daoud A, Song J, Xiao F, et al. B-9-3, a novel beta-carboline derivative exhibits anti-cancer activity via induction of apoptosis and inhibition of cell migration *in vitro* [J]. Eur J Pharmacol, 2014, 724: 219.
- [8] Ma Q, Chen W, Chen W. Anti-tumor angiogenesis effect of a new compound: B-9-3 through interference with VEGFR2 signaling [J]. Tumor Biol. 2015, 37(5): 6107-6116.
- [9] Zhang X F, Sun R, Jia Y, et al. Synthesis and mechanisms of action of novel harmine derivatives as potential antitumor agents [J] SCI REP-UK, 2016, 6: 33204.
- [10] El-Gamil D S, Ahmed N S, Gary B D, et al. Design of novel β -carboline derivatives with pendant 5-bromothienyl and their evaluation as phosphodiesterase -5 inhibitors [J]. Arch Pharm, 2013, 346(1): 23-33.
- [11] Farzin D, Mansouri N. Antidepressant-like effect of harmine and other β -carbolines in the mouse forced swim test [J]. Eur Neuropsychopharmacol, 2006, 16(5): 324-328.
- [12] Rezaei M, Nasri S, Roughani M, et al. *Peganum Harmala* L. Extract reduces oxidative stress and improves symptoms in 6-hydroxydopamine-induced Parkinson's Disease in rats [J]. IJPR, 2016, 15(1): 275-281.
- [13] Zhong Z, Tao Y, Yang H. Treatment with harmine ameliorates functional impairment and neuronal death following traumatic brain injury [J]. Mol Med Rep, 2015, 12(6): 7985-7991.
- [14] Al-Saikhan F I, Ansari M N. Evaluation of the diuretic and urinary electrolyte effects of methanolic extract of *Peganum harmala* L in Wistar albino rats [J]. Saudi J Biol Sci, 2016, 23(6): 749-753.