

## ·论著·

# 穿心莲药物对辐射损伤效应影响的初步研究

贺欣 储小飞 罗丹 周晓靓 樊赛军

**【摘要】 目的** 探讨市售穿心莲药物制剂对辐射损伤的影响。**方法** 采用高效液相色谱法分析市售的穿心莲注射液和穿心莲内酯滴丸两种不同剂型药物中穿心莲内酯含量；体外实验采用乳腺癌细胞系（MCF-7 和 MDA-MB-231）研究穿心莲药物对  $\gamma$  射线照射后乳腺癌细胞生存率的影响；体内实验采用 C57 BL/6 鼠研究穿心莲药物对 5.0 Gy 和 9.0 Gy 的  $\gamma$  射线照射后的小鼠的辐射损伤的影响。**结果** 穿心莲注射液和穿心莲内酯滴丸的穿心莲内酯含量分别为 0.214 mg/ml 和 5.82 mg/粒；两种药物都上调了体外培养的乳腺癌细胞的放射敏感性；对 5.0 Gy 照射的 C57 BL/6 鼠的造血系统表现出一定保护作用，但是对 9.0 Gy 照射的 C57 BL/6 鼠则表现出辐射损伤协同作用。**结论** 穿心莲药物在不同照射剂量下可对辐射损伤既表现出保护又表现出协同损伤的双向作用。

**【关键词】** 穿心莲内酯；辐射损伤；辐射防护；辐射增敏

**Exploration of andrographolide effects on radiation injury** He Xin, Chu Xiaofei, Luo Dan, Zhou Xiaoliang, Fan Saijun. Tianjin Key laboratory of Radiation Medicine and Molecular Nuclear Medicine, Institute of Radiation Medicine, Chinese Academy of Medical Sciences, Tianjin 300192, China  
Corresponding author: Fan Saijun, Email: fansaijun@irm-cams.ac.cn

**【Abstract】 Objective** To explore effects of andrographolide on the injury caused by ionizing radiation. **Methods** High performance liquid chromatography was used to analyze the amount of andrographolide in andrographolide injection and paniculata lactone dropping pill which are commercially available. Two breast cancer cell lines, MCF-7 and MDA-MB-231, cultured *in vitro* were adopted to study the effects of andrographolide on survival of cells irradiated with  $\gamma$  ray. C57 BL/6 mouse were used to investigate the *in vivo* effects of andrographis paniculata on irradiation-caused injury. **Results** Andrographolide was 0.214 mg/ml and 5.82 mg/pill in andrographolide injection and paniculata lactone dropping pill, respectively. Both andrographolide injection and paniculata lactone dropping pill significantly increased the radiosensitivity of two breast cancer cell lines. Andrographolide injection provided a protective effect on the radiation-caused injury in spleen and hematopoietic system in animals irradiated by 5.0 Gy  $\gamma$  ray. However, both andrographolide injection and paniculata lactone dropping pill decreased survival of mice irradiated with 9.0 Gy  $\gamma$  ray. **Conclusion** Andrographis paniculata may provide radiosensitive and radioprotective activities dependent on the irradiation doses.

**【Key words】** Andrographis paniculata, radiation damage, radioprotection, radiosensitivity

穿心莲内酯(andrographolide)是来自爵床科植物穿心莲[*andrographis paniculata* (Burm.f.) nees]的二萜内酯类化合物，是穿心莲的主要有效成分之一，具有抗炎、抗肿瘤、抗病毒、抗氧化、免疫调

节及肝保护作用<sup>[1]</sup>，目前主要用于糖尿病、扁桃体炎、风湿、高血压、腹泻、疟疾等疾病的治疗<sup>[2]</sup>。国内外对于穿心莲内酯在放射损伤方面的研究发现，每日按体质量注射 100~200 mg/kg 穿心莲内酯，对大鼠辐射损伤有防护作用<sup>[3]</sup>，每日按体质量注射 20 mg/kg 穿心莲内酯，对小鼠放射性肺损伤有保护作用<sup>[4]</sup>，每日按体质量注射 0.25~200 mg/kg 穿心莲内酯，对小鼠具有抗疲劳作用<sup>[5]</sup>，可能的机制主要涉及抑制凋亡和抗自由基<sup>[4,6]</sup>。也有研究报

DOI: 10.3760/cma.j.issn.1673-4114.2015.05.005

基金项目：科技部科研院所技术开发研究专项(2014EG150134)；国家自然科学基金(81402541, 81403059)

作者单位：300192 天津，中国医学科学院放射医学研究所，天津市放射医学与分子核医学重点实验室

通信作者：樊赛军(Email: fansaijun@irm-cams.ac.cn)

道,穿心莲内酯对化疗和放疗( $100\sim 200\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ )有协同甚至增敏作用<sup>[7-10]</sup>,机制在于穿心莲内酯促进了放化疗引起的凋亡、自噬。本研究旨在通过体内外实验初步研究中国市售的两种穿心莲药物对细胞及动物辐射损伤的影响,为穿心莲类药物在增加肿瘤放射治疗疗效和辐射损伤防护中应用的可能性提供进一步的实验依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料和仪器

人乳腺癌细胞系 MCF-7、MDA-MB-231 由本实验室保存, RPMI1640 培养基、胎牛血清(货号 10099-141, 批号 1227693) 购自美国 Gibco 公司, 噻唑蓝购自美国 Amresco 公司。C57 BL/6 雄性健康鼠, 体质量  $22\sim 25\text{ g}$ ,  $10\sim 12$  周龄, 购自北京维通利华实验动物技术有限公司, 合格证号 SCXK(京)2012-0001。穿心莲内酯标准品(PCS0183, 含量 $>99.9\%$ )和脱水穿心莲内酯标准品(PCS0181, 含量 $>99.9\%$ )购自北京中科仪友化工技术研究院。穿心莲注射液购自海南制药厂有限公司, 国药准字 Z46020005, 批号 140801; 穿心莲内酯滴丸购自天士力制药集团股份有限公司, 国药准字 Z20040078, 批号 140737、131001。阿米福汀(注射用氨磷汀)购自大连美罗大药厂, 国药准字 H20010403, 批号 S3130502。 $^{137}\text{Cs}$   $\gamma$  射线照射源由加拿大 Nurdion 公司生产, 剂量率为  $0.75\text{ Gy}/\text{min}$ ; 流式细胞仪(Accuri C6)为美国 BD 公司生产; 高效液相色谱仪为美国 Waters Alliance 公司生产。

### 1.2 高效液相色谱分析药物有效成分含量

高效液相色谱仪配 Water Sunfire C18( $4.5\text{ mm}\times 250\text{ mm}$ )色谱柱, 流动相为甲醇:水( $60:40$ ); 流速  $1\text{ ml}/\text{min}$ , 穿心莲内酯检测波长  $225\text{ nm}$ , 脱水穿心莲内酯检测波长  $250\text{ nm}$ <sup>[11]</sup>。甲醇作溶剂, 将穿心莲内酯标准品制备成  $184\text{ }\mu\text{g}/\text{ml}$  溶液, 脱水穿心莲内酯标准品制备成  $193.6\text{ }\mu\text{g}/\text{ml}$  溶液, 穿心莲注射液不经稀释直接进样, 穿心莲内酯滴丸 1 袋(说明书标示每袋含穿心莲内酯  $0.15\text{ g}$ ), 研磨粉碎后, 用甲醇溶解, 定容为  $1\text{ L}$ , 用  $0.45\text{ }\mu\text{m}$  微孔滤膜滤过作为待检样品。每个样品进样量  $5\text{ }\mu\text{l}$ 。

### 1.3 细胞照射与给药剂量

将人乳腺癌细胞系 MCF-7、MDA-MB-231 分别按照每孔  $4\times 10^3$  个细胞接种于 96 孔板, 分为对照

组、加药组、照射组、加药+照射组, 每组 6 个复孔, 穿心莲内酯作用浓度  $30\text{ }\mu\text{g}/\text{ml}$  ( $85.6\text{ nmol}/\text{L}$ ); 穿心莲注射液经浓度换算后直接加相应体积至培养液, 对照组加生理盐水; 穿心莲内酯滴丸研磨粉碎后, 用二甲基亚砜作溶剂, 充分静置, 取上清, 配制穿心莲内酯浓度为  $8.56\text{ }\mu\text{mol}/\text{L}$  的溶液, 为  $100\times$  储存液, 相应的对照组加 1% 体积的二甲基亚砜。加药 24 h 后用  $\gamma$  射线照射, 照射剂量分别采用 2、4、8、12 Gy, 照射后继续培养 48 h, 加入  $20\text{ }\mu\text{l}$  0.5% 噻唑蓝, 孵育 4 h 后加入  $150\text{ }\mu\text{l}$  二甲基亚砜, 测定  $492\text{ nm}$  处的吸光度值, 加药组、照射组、加药+照射组的吸光度值分别除以对照组的吸光度值, 作为存活率值, 以存活率的对数为 Y 值, 绘制生存率曲线。

### 1.4 动物照射与给药

腹腔注射穿心莲注射液, 剂量 1:  $10\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ , 剂量 2:  $17\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ ; 穿心莲内酯滴丸研磨粉碎后, 加水制成混悬液, 灌胃给药, 剂量 1:  $10\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ , 剂量 2:  $17\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ , 剂量 3:  $290\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ ; 以上剂量均以穿心莲内酯含量计; 氨磷汀, 按照说明书剂量等效换算, 腹腔注射 C57 BL/6 鼠  $2.25\text{ mg}/\text{m}^2$  (即  $112.5\text{ mg}/\text{kg}$ ), 注射后立即照射, 给药一次, 照射后不再给药。动物随机分组, 每组 10 只, 照射前 4 h 给药一次, 采用  $5.0\text{ Gy}$  或  $9.0\text{ Gy}$  单次全身照射, 照射后立即补充给药一次, 之后, 每 24 h 给药一次, 连续 7 d。

### 1.5 照射后指标检测

对采用  $5.0\text{ Gy}$  照射的鼠, 停止给药后 2 d, 乙醚麻醉处死, 取主要脏器观察以下指标: 照射前、期间、处死前的体质量; 外周血计数; 单侧股骨有核细胞计数; 脾脏指数; 胸腺指数; 粒细胞集落形成数。具体实验步骤参见参考文献[12]。对采用  $9.0\text{ Gy}$  照射的鼠, 连续给药 7 d 后, 停药, 记录生存情况。

### 1.6 统计学方法

采用 SPSS 16.0 软件进行统计学分析。多组间资料比较采用完全随机设计的单因素方差分析,  $P<0.05$  表示差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 穿心莲注射液和穿心莲内酯滴丸的有效成分含量

高效液相色谱法分析结果表明: 穿心莲注射液

含有穿心莲内酯为 0.214 mg/ml, 含脱水穿心莲内酯 0.092 mg/ml; 而穿心莲内酯滴丸含穿心莲内酯 5.82 mg/粒(图 1)。

## 2.2 穿心莲药物联合 $\gamma$ 射线对乳腺癌细胞生长抑制的协同作用

采用穿心莲内酯终浓度 30  $\mu\text{g/ml}$  (85.6 nmol/L) 作用 24 h+48 h 后, 与单独照射组细胞相比, MCF-7 和 MDA-MB-231 的细胞数目没有明显的差异(数据未显示), 表明穿心莲药物本身对这两种乳腺癌细胞系的生长并不产生明显的影响。而在 2、4、8、12 Gy  $\gamma$  射线单独照射后, MCF-7 和 MDA-MB-231 细胞的生长受到了不同程度的抑制,  $\text{IC}_{50}$  在 MCF-7 细胞中为 4.5 Gy, 而在 MDA-MB-231 细胞中为 7.4 Gy。穿心莲内酯滴丸联合照射处理组与单

独照射组相比, 细胞生长表现出更明显的抑制,  $\text{IC}_{50}$  在 MCF-7 细胞中为 3.7 Gy, 在 MDA-MB-231 细胞中为 4.8 Gy(图 2)。穿心莲注射液联合照射处理组与滴丸联合照射处理组作用相似(数据未显示),  $\text{IC}_{50}$  在 MCF-7 细胞中为 3.5 Gy, 而在 MDA-MB-231 细胞中为 4.7 Gy。

## 2.3 穿心莲注射液对 5.0 Gy 照射的 C57 BL/6 鼠的辐射损伤作用

单次 5.0 Gy 照射后, 连续给药 7 d, 收集实验鼠的肝脏、肺、脾、胸腺、外周血, 计数骨髓单个核细胞数、粒细胞集落形成数, 数据总结见图 3。照射后 7 d 连续给药两种不同剂量的穿心莲注射液, 对 5.0 Gy 辐射造成的 C57 BL/6 鼠免疫系统损伤有一定保护作用, 其中, 脾脏指数和骨髓单个核细胞克隆

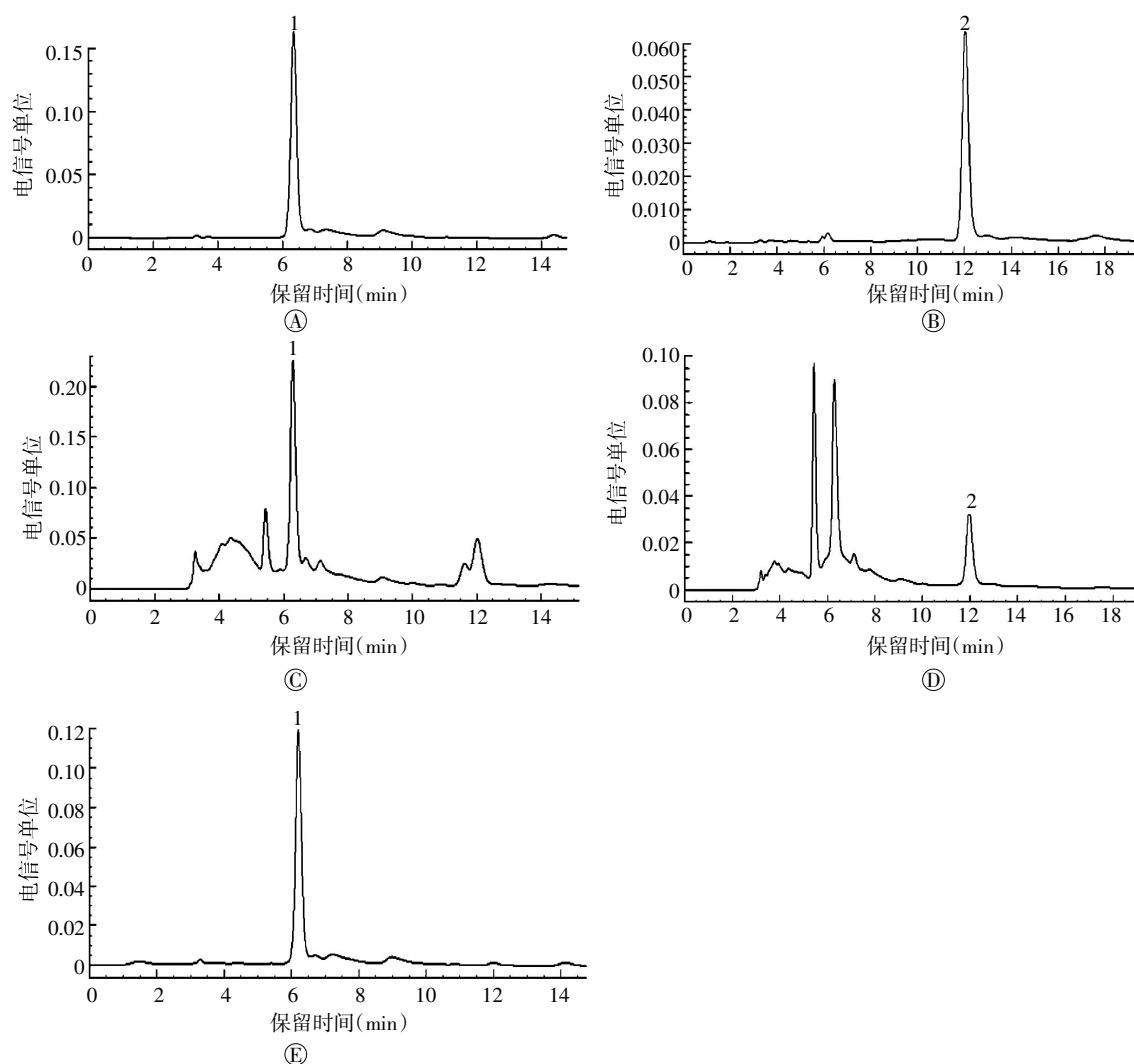


图 1 穿心莲内酯高效液相色谱图 图中, A: 穿心莲内酯对照品(225 nm); B: 脱水穿心莲内酯对照品(250 nm); C: 穿心莲注射液(225 nm); D: 穿心莲注射液(250 nm); E: 穿心莲内酯滴丸(225 nm); 峰 1: 穿心莲内酯; 峰 2: 脱水穿心莲内酯。

Fig.1 HPLC chromatograms of andrographolide

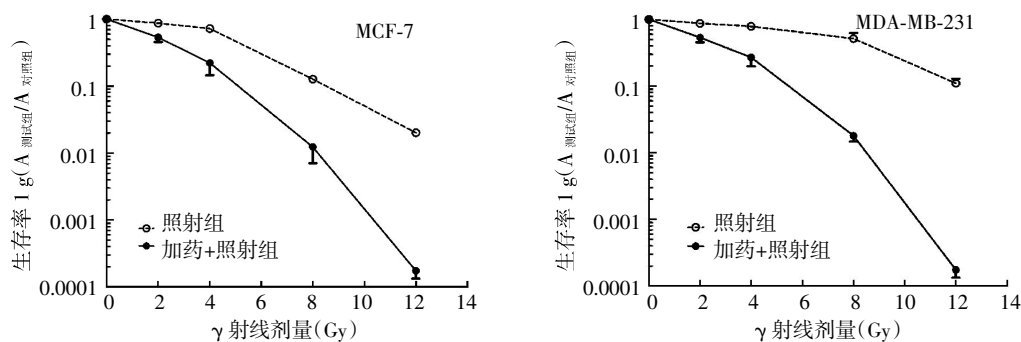


图2 穿心莲药物上调了MCF-7和MDA-MB-231细胞对γ射线的敏感性

Fig.2 *Andrographis paniculata* sensitizes MCF-7 cells and MDA-MB-231 cells to γ ray irradiation

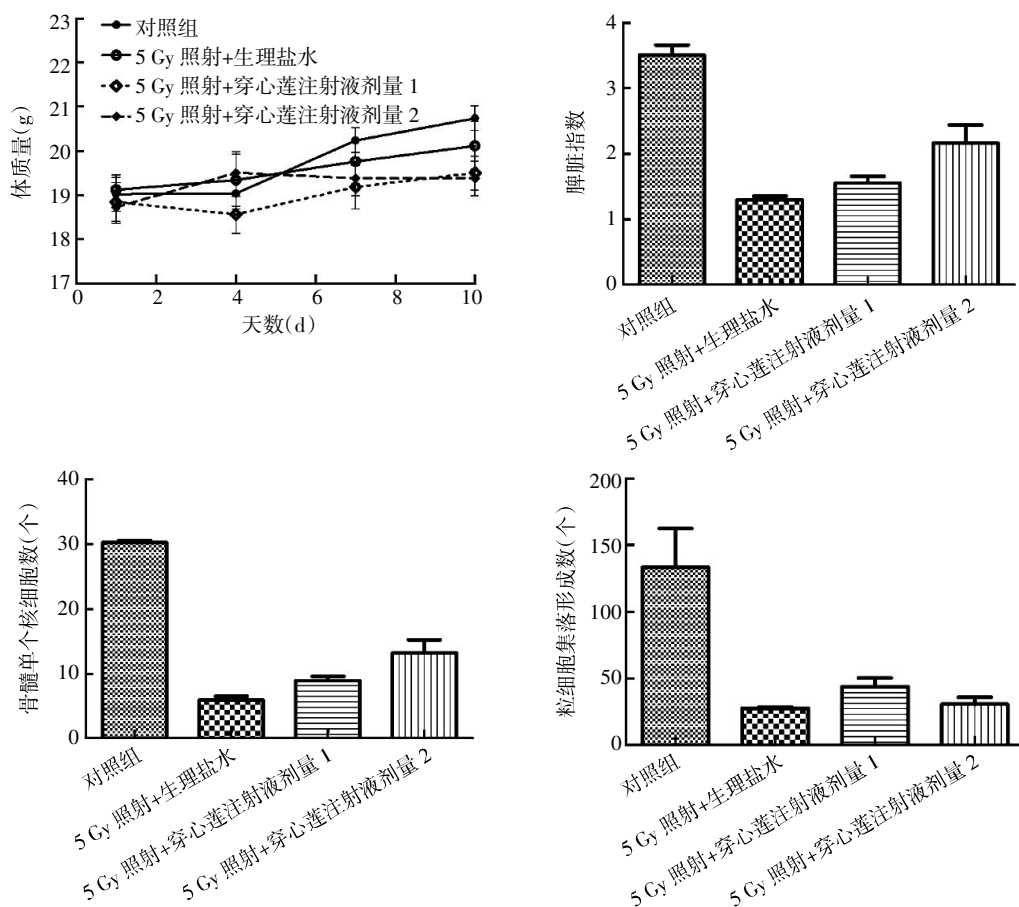


图3 穿心莲注射液对C57BL/6鼠脾脏和造血系统的辐射损伤保护作用

Fig.3 Spleen and hematopoietic system protecting effect of andrographolide injection

形成显著增多( $F=35.37$ 、 $96.46$ ,  $P<0.05$ ), 并显现出明显的剂量效应关系; 对粒细胞克隆形成也有一定帮助( $F=10.94$ ,  $P<0.05$ ), 但是剂量相关性不明显。虽然穿心莲内酯滴丸与穿心莲注射液给药方式不同, 但在相同剂量下, 也表现出相似效果(数据未在此给出)。

#### 2.4 穿心莲注射液和穿心莲内酯滴丸对9.0 Gy照射C57BL/6鼠的辐射损伤作用

如图4所示, 采用9.0 Gy照射后, C57BL/6鼠

在12 d内全部死亡, 穿心莲注射液或穿心莲内酯滴丸缩短了照射诱导的C57BL/6鼠的生存时间, 表现为生存期短于生理盐水对照组(平均生存时间: 生理盐水7 d; 穿心莲注射液剂量1: 5 d; 穿心莲注射液剂量2: 6 d; 穿心莲内酯滴丸剂量3: 5.5 d)。虽然穿心莲内酯滴丸与穿心莲注射液给药方式不同, 但在相同剂量下作用相似, 这里只呈现了穿心莲注射液剂量1[ $10(\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1})$ ]、剂量2[ $17(\text{mg} \cdot$

$\text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ )和穿心莲内酯滴丸剂量  $3[290 (\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1})]$ 与辐射照射联合的数据, 这些数据之间的差异不显著, 而阳性对照氨磷汀明显提高了照射鼠的成活率, 在第 13 天, C57 BL/6 鼠的存活率为 100%。

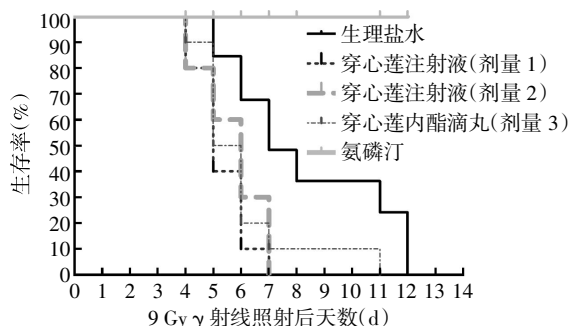


图 4 穿心莲药物降低了致死剂量照射后 C57 BL/6 鼠的生存期

Fig.4 Andrographolide reduces the survival of C57 BL/6 mice irradiated with a dose of 9.0 Gy

### 3 讨论

穿心莲内酯及其结构改造后的衍生物用于抗炎、抗病毒、抗肿瘤及免疫调节等已有上千年应用历史<sup>[13]</sup>。本研究采用了不同的乳腺癌细胞系和健康 C57 BL/6 鼠, 从体内外实验分别研究了穿心莲注射液和穿心莲内酯滴丸两种穿心莲药物与不同剂量的  $\gamma$  射线辐照结合应用的疗效。实验结果表明, 穿心莲药物与  $\gamma$  射线具有非常好的协同作用, 即可显著地提高体外培养的乳腺癌细胞的放射敏感性; 对健康 C57 BL/6 鼠来说, 穿心莲药物能对 5.0 Gy 照射剂量导致的辐射损伤表现出一定程度的保护作用, 而对 9.0 Gy 高剂量照射则表现出协同作用, 即提高了动物的死亡率, 说明辐射照射剂量对穿心莲药物的双向辐射损伤效应的走向起着至关重要的作用, 权重可能远大于穿心莲内酯的用药剂量对双向作用的影响。在本实验研究发现的穿心莲药物双向作用背后, 究竟哪些关键因素决定了最终的效应, 同时, 这个实验结果能对穿心莲药物临床用药, 特别是作为肿瘤放射治疗辅助用药有着怎样的临床意义, 还需要进一步深入地研究和讨论。

过去研究结果揭示, 穿心莲内酯的作用机制可能是通过抑制一氧化氮(NO)的产生、抑制环氧合酶 2 的表达、抑制黏附分子的产生、抑制 TNF- $\alpha$  和 IL-6 的分泌, 抑制 NF- $\kappa$ B 通路和丝裂原活化蛋白激酶等完成的<sup>[14]</sup>。穿心莲内酯药物用于肿瘤放疗和(或)化疗时, 表现出了辐射损伤保护作用 and 放化

疗的协同增敏作用<sup>[4-14]</sup>。两种方向相反, 看似矛盾, 笔者认为这主要受限于缺乏有针对性的深入研究, 可能是由于: (1)研究对象的选择, 不同类型的细胞具有不同的默认功能和基因表达谱, 同时也受环境、炎症、表观遗传影响, 所以细胞对药物的敏感性和反应程度都各不相同; 要区别药物对肿瘤细胞、同类型的非肿瘤细胞是否有差异, 避免混淆药物本身的毒性和选择性抑制作用, 测试药物联合放疗对体外实验(对肿瘤细胞)的作用与对体内实验(对荷瘤动物)的作用有可能有着非常大的差异, 因为前者的对象是单一类型的细胞, 后者的对象是系统化的生命体; (2)研究结论的推断, 在不同的实验室, 同样的药物对相同的细胞系的影响结果差异非常大<sup>[13]</sup>, 数据的可比性差, 主要在于缺乏标准化流程和结论推断标准, 大部分的机制研究仍然停留在只见局部不见整体的层面。虽然穿心莲内酯作为放疗和(或)化疗辅助药物, 无论是对现象的报道还是对机制的研究, 都是局部的, 有限定的, 缺乏深入和系统的了解。Hung 等<sup>[15]</sup>证实, 尽管穿心莲内酯和辐射有协同作用, 但是两者结合并没有进一步促进凋亡。Zhang 和 Qiu<sup>[9]</sup>近期也首次证实, 穿心莲内酯和辐射单独作用都不能激活自噬, 然而, 两者结合, 自噬被激活; 特异阻断自噬后, 穿心莲内酯和辐射联合的细胞杀伤作用消失, 可见自噬在穿心莲内酯的辐射增敏效果中起到了关键作用。自噬具有抗凋亡和促进凋亡的双向作用, 具体取决于细胞类型和外界刺激。以上这些研究结论表明了穿心莲药物辐射调节作用机制还有待深入研究。

相对于机制研究, 在应用方面, 穿心莲药物走得更远<sup>[5,13,16]</sup>, 已有多种剂型和衍生物应用于临床, 在参考文献[13]中有详细总结, 在应用于放疗辅助药物方面, 目前尚未见报道。本研究发现, 市场现有的穿心莲注射液和穿心莲内酯滴丸对体外培养的肿瘤细胞有辐射增敏作用, 而对正常 C57 BL/6 鼠的 5.0 Gy 照射有辐射保护作用, 对 9.0 Gy 照射有协同损伤作用。这与 Hung 等<sup>[15]</sup>采用局部照射和瘤周局部注射给药方式(增加了局部药物浓度)得到的显著增敏作用的研究结果相似。目前笔者实验室正在对药物在荷瘤鼠体内的放疗保护或协同损伤作用作进一步的研究, 包括: 药物剂量相关性和放射剂量相关性, 穿心莲内酯对肿瘤组织和正常组织效应是否具有差异选择性, 是否能对放疗患者起到

肿瘤局部增敏而在机体水平却有防护作用等,这都是非常值得深入研究的课题。本研究结果为探索将市场已有穿心莲药物的应用扩展到肿瘤放射治疗和辐射防护领域提供了一定的实验基础和依据。

### 参 考 文 献

- [1] 尹青, 邓明明. 穿心莲内酯抗炎作用机制研究进展[J]. 广东医学, 2014, 35(5): 786-788.
- [2] Poolsup N, Suthisisang C, Prathanturug S, et al. Andrographis paniculata in the symptomatic treatment of uncomplicated upper respiratory tract infection: systematic review of randomized controlled trials[J]. J Clin Pharm Ther, 2004, 29(1): 37-45.
- [3] 白慧云, 穆祥, 李莉, 等. 穿心莲内酯对大鼠辐射损伤防护的实验研究[J]. 中华放射医学与防护杂志, 2011, 31(2): 194-196.
- [4] 康亚辉, 王金凤, 张曲, 等. 穿心莲内酯对小鼠放射性肺损伤的防护作用[J]. 中华放射医学与防护杂志, 2014, 34(7): 507-511.
- [5] 浅见纯生, 斋藤佳世, 前田哲史, 等. 以穿心莲内酯为有效成分的抗疲劳剂及口服组合物: 中国, 101742999A[P]. 2010-06-16.
- [6] Yan GR, Zhou HH, Wang Y, et al. Protective effects of andrographolide analogue AL-1 on ROS-induced RIN-m $\beta$  cell death by inducing ROS Generation[J/OL]. PLoS One, 2013, 8(6): e63656 [2015-07-07]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23750203>.
- [7] 殷文静, 赵莉娜, 彭静, 等. 穿心莲内酯联合顺铂对抑制宫颈癌的协同作用[J]. 广东医学, 2014, 35(6): 816-819.
- [8] Zhou J, Lu GD, Ong CS, et al. Andrographolide sensitizes cancer cells to TRAIL-induced apoptosis via p53-mediated death receptor 4 up-regulation[J]. Mol Cancer Ther, 2008, 7(7): 2170-2180.
- [9] Zhang C, Qiu X. Andrographolide radiosensitizes human ovarian cancer SKOV3 xenografts due to an enhanced apoptosis and autophagy[J/OL]. Tumour Biol, 2015[2015-07-07]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26014516>. [published online ahead of print].
- [10] Lin HH, Shi MD, Tseng HC, et al. Andrographolide sensitizes the cytotoxicity of human colorectal carcinoma cells toward cisplatin via enhancing apoptosis pathways in vitro and in vivo[J]. Toxicol Sci, 2014, 139(1): 108-120.
- [11] 董海娟, 张尊建. HPLC 同时测定穿心莲药材及其注射液中 3 种内酯类成分的含量[J]. 中国现代应用药学, 2012, 29(4): 350-352.
- [12] 龙伟, 靳瑾, 白佳丽, 等. 两种苯丙烯酸类丹皮酚酯抗辐射作用初探[J]. 国际放射医学与核医学杂志, 2013, 37(3): 143-145, 159.
- [13] Aromdee C. Andrographolide: progression in its modifications and applications-a patent review (2012-2014)[J]. Expert Opin Ther Pat, 2014, 24(10): 1129-1138.
- [14] Yunus NM, Mutalip SS, Jauri MH, et al. Anti-proliferative and pro-apoptotic effects from sequenced combinations of andrographolide and cisplatin on ovarian cancer cell lines[J]. Anticancer Res, 2013, 33(10): 4365-4371.
- [15] Hung SK, Hung LC, Kuo CD, et al. Andrographolide sensitizes Ras-transformed cells to radiation in vitro and in vivo[J]. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2010, 77(4): 1232-1239.
- [16] 石强. 一种天然药物组合物: 中国, 103349681A[P]. 2013-10-16.

(收稿日期: 2015-07-17)