

穿心莲抗瘤及抗滋养叶细胞作用的实验研究

潘启超 刘宗潮 谢冰芬 张爱兰 林贤寿 何复英
(肿瘤研究所)

刘国樵 黄绛云 郭端莱 钟鸿基 黄海晖
(广州市医药工业研究所*)

赵则林 何润卿 陈惠长
(广州天心制药厂)

穿心莲, 学名 *Andrographis paniculata* Ness. 为爵床科 (Acanthaceae) 穿心莲属一年生草本植物, 又名一见喜, 榄核莲, 印度草, 苦胆草。原产热带、亚热带地区, 喜温暖、向阳和湿润环境, 我国南方各省都可栽培。有清热、解毒, 消炎等功用。所含几种主要成分均属内酯类。

广东省梅县地区人民医院用穿心莲提取物治疗恶性滋养叶肿瘤有效^[1~4]。但抗瘤有效成分未明, 所用的氯仿提取物难溶于水, 妨碍配成含量恒定的注射制剂, 影响疗效的稳定性。因此必须分离和确定穿心莲抗恶性滋养叶肿瘤细胞的有效成分, 通过实验研究, 找出抗滋养叶细胞作用的根据。尤其希望制取有效成分的水溶性制剂, 方便应用, 并保证制剂的含量。抗滋养叶细胞的成分除可用于抗绒癌外, 亦可能用于终止早、中期妊娠。

一、受试药物

本实验受试药物有穿心莲制剂M-4和穿-4 (穿心莲-4号) 注射液, 均由广州市医药工业研究所和广州市天心制药厂提供。将穿心莲全叶用95%乙醇浸渍2次, 合并过滤取得乙醇浸出液。该液用活性炭脱色, 过滤, 滤液浓缩后放置, 让其自然结晶, 可取去主要为穿心莲内酯的部分。将剩下的母液浓缩除去乙醇后, 用氯仿提取, 分得氯仿液, 浓缩成浸膏, 称为M-4组分。其总固体占90%左右。M-4组分经过分离提取可得到去氧穿心莲内酯约4%, 脱水穿心莲内酯约4.5%, 新穿心莲内酯约3%及少量穿心莲内酯、甾醇、脂类等其它成分。实验时将M-4配成20%的酏剂供灌胃使用。M-4曾配成20%口服

* 蒋仲芳、梁敬国参加工作。

酞剂(加有吐温80, 砂糖, 米酒和水), 临床试用有初步疗效, 但因病人不易接受, 要求进一步提纯。我们考虑到其中含一定量去氧穿心莲内酯和脱水穿心莲内酯可能起着抗癌作用。为了解决其水中溶解度, 制成溶解度较高的针剂, 使注入体内迅速发挥疗效, 将穿心莲内酯在适当有机溶媒中处理, 使与丁二酸酐缩合, 成为水溶性的丁二酸脱水穿心莲内酯制剂, 定名为“穿-4”。供药理试验的穿-4直接用注射剂每毫升含药100毫克。

二、抗癌作用研究

试验是根据1973年全国抗癌药物合成及筛选会议规定的方法进行。实验动物为健康非纯种大鼠, 雌雄兼有, 各批动物体重总范围在60~115毫克, 每批实验动物的体重尽量安排相差不远。接种W-256肿瘤24小时后开始给药。穿心莲M-4的剂量为3克/公斤, 每天灌胃给药1次, 共7天; 穿-4注射液, 剂量为250~300毫克/公斤, 每天腹腔注射1次, 共7天。第8天处死动物取出肿瘤称重, 计算肿瘤生长抑制率。

从表1可见, 穿心莲制剂M-4对大鼠W-256肿瘤的作用。M-4是粗提取物, 含有复杂的成分, 既可能包括有抗癌成分, 也有无效的毒性成分。在所用的耐受剂量下, 其抗癌作用不够明显, 抑制率均不超过30%, 统计学上尚不显著(P 均 >0.05)。不过, 在3克/公斤剂量的多次实验中, 抑制率常在25~30%之间, 提示具有边缘活性。而且下述妊娠家兔试验表明, 它对胎盘绒毛有破坏作用。同时, M-4制剂初步临床试用, 也发现对绒毛及恶性葡萄胎有一定程度的疗效。因此, 从M-4制剂中进一步寻找抗癌有效成分的可能性仍然存在。

表1 穿心莲制剂M-4对大鼠W-256肿瘤的作用

剂量 克/公斤/天	给药方式 及天数	动物数		动物体重(克)		平均瘤重(克)		抑制率 (%)	P值
		开始 给药/对照	结束 给药/对照	开始 给药/对照	结束 给药/对照	治疗组	对照组		
2	灌胃7	8/8	8/8	85.6/86	90/104	9.0	10.1	11	>0.05
3	"	8/8	8/7	85.75/86	93.9/104	7.2	10.1	29	>0.05
3	"	10/10	10/10	99.1/100	94.4/108.2	6.9	9.8	30	>0.05
3	"	10/10	10/9	72.5/72.3	83.7/93.8	5.0	6.9	27	>0.05
3	"	10/10	9/10	87/87	82/90.6	6.1	6.5	6	>0.05
3.5	"	10/10	8/10	87.1/87	87/90.6	5.7	6.5	12	>0.05

根据M-4制剂所含成分, 进一步探索, 制得主要含丁二酸脱水穿心莲内酯的制剂(穿-4), 经在大鼠W-256试验中证明有抑瘤作用, 其抑制率在35~53%之间(见表2)。8批实验中, 每组动物数为10只者共有7批, 统计学上差异显著($P < 0.05$)者有5批, 另2批的P值也接近0.05范围。

表2 穿-4 对大鼠 W-256 肿瘤的作用

剂 量 (毫克/公斤 /天)	给药 方式 及天数	动 物 数		动 物 体 重 (克)		平均瘤重(克)		抑制率 (%)	P 值
		开 始 给药/对照	结 束 给药/对照	开 始 给药/对照	结 束 给药/对照	治 疗 组	对 照 组		
300	腹腔 注射 7	10/10	9/10	83.5/83.7	75.5/89.3	4.3	9.1	53	<0.001
300	"	5/5	5/5	76.8/76.4	73.0/91.5	3.9	6.1	37	= 0.1
300	"	10/10	9/9	81.5/81.5	71.1/88.9	2.6	5.0	47	= 0.05
400	"	10/10	8/9	81.6/81.5	77.1/88.9	2.9	5.0	42	0.1>P>0.05
300	"	10/10	9/10	81.1/81.1	80.9/94.0	5.0	10.3	51	<0.001
270	"	10/10	10/10	81.0/81.1	82.0/94.0	5.4	10.3	48	<0.001
300	"	10/10	6/10	85.9/86.2	76.1/93.2	2.6	7.1	64	<0.001
270	"	10/10	9/10	85.9/86.2	80.3/93.2	4.6	7.1	38	<0.05

三、抗家兔胎盘滋养叶细胞的作用

实验动物为健康妊娠家兔，体重 2.4~4.0 公斤，用穿心莲 M-4 制剂（与上述抑瘤试验所用的制剂相同）。按每天剂量 1.0~2.0 克/公斤，灌胃给药，给药 3、4、6 或 7 天，即总剂量为 4~7 克/公斤；对照组灌入等容积的对照溶液。穿-4 作静脉给药，剂量为 0.2 克/公斤/天，连用 10 天，对照组则静脉注等容积的生理盐水。正常兔的妊娠期为 30 天。为了观察穿心莲两种制剂对不同妊娠期胎盘绒毛和胎兔的影响，分别在交配后 25 天、18 天、16 天、13 天和 8 天开始给药。除妊娠 25 天给药组没有设立相应的对照组外，其余各组均设立相应的对照组。停药后 1~3 天内处死并解剖家兔，取出胎盘及胎兔进行肉眼观察。胎盘进行组织学检查，其改变见表 3。

从表 3 可见，妊娠第 13 天开始用 M-4 的 3 只家兔及妊娠第 8 天开始用穿-4 的 3 只家兔均可见胚胎发生坏死，呈腐肉状，易碎，肉眼观察分不出胎盘及胎兔。镜下可见给药组的胎盘绒毛广泛坏死，细胞核团缩或碎裂，合体细胞及郎罕氏细胞部分或大部分消失，组织结构散乱，间质充血水肿。

如果开始用药较迟，上述改变即不明显，妊娠第 25 天开始用 M-4 的 3 只及妊娠后 18 天开始给 M-4 的 1 只妊娠兔，胎盘均完整，胎兔发育正常，仅在胎盘组织切片镜下可见绒毛的坏变、坏死，主质细胞消失，间质充血等现象。而在妊娠第 16 天开始用 M-4 的 3 只家兔中，镜下变化与上述相同，且在 1 只兔中发现 2 个坏死胎块，而未见完整胎兔，估计其余胎兔可能已流产。

至于对照组的 9 只家兔，分别于妊娠第 18、19、22、26 及 27 天解剖，肉眼下全部胎盘、胎兔发育正常，无论是不给任何药物灌胃处理者（6、7 号）或给予对照液灌胃兔（4、5、12、13、18、22、23 号）情况均同。镜下检查一般无明显改变或改变轻微。

表 3 穿心莲制剂对妊娠家兔的作用

家兔 编号	药 物	每天剂量 (克/ 公斤)	给药途径 及 天 数	总剂量 (克)	开始给药时间 (妊娠天数)	解剖动物时间 (妊娠天数)	肉 眼 观 察	镜 下 观 察			
								绒毛环变 及坏死	合体细胞及 朗罕氏细胞	间质改变	组织 紊乱
1	M-4	2	灌胃 3	6	25	28	宫内有10只胎兔, 胎盘完整	++	大部分消失	充血水肿	++
2	M-4	1.5	灌胃 3	4.5	25	28	宫内有3只胎兔, 胎盘完整	++	大部分消失	充血水肿	++
3	M-4	1.5	灌胃 3	4.5	25	28	宫内有6只胎兔, 胎盘完整	++	大部分消失	充血水肿	++
8	M-4	1	灌胃 6	6	18	27	宫内有7只胎兔, 胎盘完整	++	大部分消失	充血水肿	++
4	对照液		灌胃 6	0	18	27	宫内有8只胎兔	+	正常	充血	-
5	对照液		灌胃 6	0	18	27	宫内有7只胎兔	+	正常	充血	-
9	M-4	1	灌胃 7	7	16	26	宫内有10只胎兔, 胎盘完整	++	大部分消失	充血	+
10	M-4	1	灌胃 7	7	16	26	宫内有9只胎兔, 胎盘完整	++	大部分消失	充血	+
11	M-4	1	灌胃 7	7	16	26	宫内有2个坏死胎块	++	大部分消失	充血	+
12	对照液		灌胃 7	0	16	26	宫内有8只胎兔	+	基本正常	轻度充血	-
13	对照液		灌胃 7	0	16	26	宫内有8只胎兔	+	基本正常	轻度充血	-
14	M-4	1	灌胃 6	6	13	22	胚胎死亡, 呈坏死样组织, 易碎	++	大部分消失	充血水肿	++
15	M-4	1	灌胃 6	6	13	19	胚胎死亡, 呈坏死样组织, 易碎	++	大部分消失	充血水肿	++
16	M-4	1	灌胃 4	4	13	17	胚胎死亡, 呈坏死样组织, 易碎	++	大部分消失	充血水肿	++
18	对照液		灌胃 6	0	13	22	宫内有6只胎兔	-	正常	-	-
19	穿-4	0.2	静脉注射10	2	8	19	胚胎死亡, 坏死, 组织呈腐肉状	++	大部分消失	出血	++
20	穿-4	0.2	静脉注射10	2	8	19	胚胎死亡, 坏死, 组织呈腐肉状	++	绝大部分消失	出血	++
21	穿-4	0.2	静脉注射10	2	8	19	胚胎死亡, 坏死, 组织呈腐肉状	++	绝大部分消失	偶见出血点	++
22	生理盐水		静脉注射10		8	19	宫内有9只胎兔	-	正常	-	-
23	生理盐水		静脉注射10		8	19	宫内有8只胎兔	-	正常	-	-
6	未用药					18	宫内有7只胎兔	-	正常	-	-
7	未用药					18	宫内有5只胎兔	-	正常	-	-

讨 论

穿心莲在我国民间用作清热解毒的药物,过去临床上发现其对感染性疾病的治疗有一定的疗效。1970年广东梅县地区人民医院妇产科对1例恶性葡萄胎阴道结节溃破大出血的病人抢救中,用穿心莲注射剂抗感染后,阴道结节明显缩小,病理切片上发现肿瘤细胞退行性变。由此受到启发,应用穿心莲治疗滋养叶细胞肿瘤。多年来,应用穿心莲提取物静脉滴注为主辅助手术,部分病例配合应用小剂量化学治疗,收到明显疗效^[1~4]。该院应用的穿心莲提取物制剂先用水煎煮,再用有机溶剂提取,所含成分主要为氯仿提取物,此组分水难溶,加入吐温80等助溶制成的静脉滴注制剂,易于析出沉淀物,经过滤,则静滴液中氯仿提取成分含量大为降低,影响疗效的稳定性。

穿心莲有效成分已知有穿心莲内酯(Andrographolide),新穿心莲内酯、去氧穿心莲内酯和脱水穿心莲内酯等^[5]。在穿心莲全叶中含穿心莲内酯量最高,认为是抗炎有效成分。目前工艺是从穿心莲全叶乙醇浸出物中提取穿心莲内酯,提取剩下的母液仍含有不同份量的上述4种内酯成分,考虑到梅县地区人民医院的制剂仍是氯仿易溶物,估计其有效成分存在总内酯中,因此后来我们改变了该医院的工艺方法,采用了上述含总内酯的母液,再用氯仿提取得M-4组分,以供试验。为了解决该组分水难溶的特性,用含乙醇及吐温80溶剂溶解,制成糖浆剂,以供口服,初步在中山医学院附属第一医院妇科、中山医学院附属肿瘤医院妇科、广东省人民医院妇产科试用于11例绒癌、恶葡,其中7例有一定疗效。不过仍存在着疗效不够强,服用量较大,含醇量多,味苦,难于下咽等缺点。

在我们的实验中证明,M-4组分家兔灌胃给药,在妊娠13天开始用药(1g/kg/天),连用4~6天,3只家兔的胚胎均死亡,组织坏死。镜下可见绒毛坏变、坏死,主质细胞消失,间质充血水肿。抗大鼠W-256肿瘤的实验则可见抑制率不足30%,虽统计学上不够显著,但几次实验重复抑制率在25%左右,这都提示M-4组分中可能含有抗滋养叶细胞及肿瘤成分的可能性。已知M-4组分含有4种内酯(穿心莲内酯、穿心莲内酯新甙、脱氧穿心莲内酯及脱水穿心莲内酯),而我们过去的预初试验,包括体外的美兰试管法及体内试验的结果,反映含量最大的穿心莲内酯无明显抗瘤活性,因此兴趣集中于另外几种内酯类,尤其具有活性双键的脱水穿心莲内酯,为了制成水溶性制剂,又要求不破坏内酯环,不取消双键结构,就制成了丁二酸脱水穿心莲内酯的注射剂(即称穿-4)。在大鼠W-256的实验中,已证明“穿-4”有明显的抑制肿瘤生长作用,在家兔妊娠第8天开始给药10次,可见穿盘坏变,胚胎死亡。

由此证明,穿心莲制剂有抗绒毛作用,尤其“穿-4”制成水溶性而保持其双键不饱和的状态下,具有明显的抗滋养叶细胞作用。尤其在妊娠早、中期用药可能引起胚胎死亡,或可应用于计划生育中止妊娠的目的。采用的大鼠W-256移植性癌肉瘤虽非绒毛膜上皮癌的模式,但仍反映到脱水穿心莲内酯有一定的抗瘤作用。

因此,我们认为穿心莲制剂用于治疗绒癌,恶性葡萄胎是有一定的实验根据的。其中有效成分可能为穿心莲脱水内酯。同时这成分在计划生育中可能有一定的应用价值。

(本所病理免疫研究室陈剑经讲师指导观察胎盘组织切片,特此致谢。)

参 考 文 献

- [1] 广东省梅县地区人民医院: 穿心莲治疗绒毛膜上皮癌及恶性葡萄胎50例的疗效。广东肿瘤防治 1:65, 1977
- [2] 广东梅县地区人民医院妇产科: 穿心莲治疗绒毛膜上皮癌与恶性葡萄胎60例小结。中华医学杂志 57(12):755, 1977
- [3] 广东梅县地区人民医院妇产科: 穿心莲治疗绒癌及恶性葡萄胎小结。全国绒癌会议资料, 石家庄, 1979
- [4] 广东梅县地区人民医院妇产科: 穿心莲治疗绒癌及恶性葡萄胎小结。广东省妇科肿瘤会议资料, 广州, 1980
- [5] 上海穿心莲科研协作组: 水溶性穿心莲内酯的研究。中草药通讯 33:10, 1976

The Experimental Research of Anticancer and Antitrophoblastic Effect of *Andrographis Paniculata*

Pan Qichao Liu Zongchao Xe Bingfeng Zhang Ailan Lin Xiensao He Fuying
(Cancer Institute, Zhong Shan Medical College)

Liu Guochao Huang Jianguan Guo Duanlai Zong Hungji Huang Haifei
(Guangzhou Institute of Medical Industry)

Zhao Jelin He Renqing Chen Weichiang
(Tiensin Pharmaceutical Factory, Guangzhou)

Abstract

It is shown that extracts from *Andrographis paniculata* possesses definite therapeutic effect on human trophoblastomas. A component called M-4 was prepared for experimental and preliminary clinical tests, which was extracted with chloroform from the alcoholic infusum of the whole leaf of *Andrographis paniculata* after partial isolation of Andrographolide. It was shown that administration of M-4 through a stomach tube to the rabbits, starting on the 13th pregnant day, for 4-6 days; would kill all the fetus. The villi of the placenta showed degeneration and necrosis, microscopically. In the W-256 carcinosarcoma system in rats, M-4 showed marginal activity with the inhibition rate of tumor growth about 25%. Considering the main principles contained in M-4, the dehydroandrographolide succinate, called Androgr. -4, was prepared. Under the dosages of about 300mg/kg/D, Androgr. -4 induced 37-64% inhibition of growth of W-256. When 200mg/kg/D of Androgr-4 was injected intravenously to female rabbits, starting on the 8th pregnant day, for 10 days, all the fetus of the rabbits died and were necrotized.

The aforementioned results of the experiments shows, that preparations of *Andrographis paniculata* possesses anti-trophoblastic activities. They can kill the fetus when used in the early or middle stage of pregnancy. This may be of use to terminate pregnancies for the purpose of family planning. Although W-256 of the rats is not a good animal model for human choriocarcinomas, it can be shown that Androgr-4 possesses definite antitumor activity.