

# 血栓通对顺铂肾损伤大鼠的肾功能和氧化指标的影响

席加喜, 刘晓霞, 杨玉芳, 张春花, 刘华钢\*  
(广西医科大学药学院, 南宁 530021)

**[摘要]** **目的:** 研究血栓通对顺铂肾损伤大鼠肾功能的保护作用及其对损伤大鼠氧化指标的影响。**方法:** 采用顺铂 ( $0.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ) 尾静脉注射的方法制造顺铂肾毒性模型。将 72 只大鼠随机分为 6 组, 空白组、模型组、安磷汀阳性药物组、血栓通低剂、中、高剂量组 ( $15.63, 31.35, 62.70 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ )。分别给药处理 10 d 后, 观察大鼠 24 h 尿蛋白量、尿 *N*-乙酰  $\beta$ -D 氨基葡萄糖苷酶 NAG, 血清中肌酐、尿素氮, 肾组织匀浆中超氧化物歧化酶 (SOD) 活性、谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px) 活性、丙二醛 (MDA) 含量及肾组织的病理变化。**结果:** 与模型组比较, 各治疗组大鼠血肌酐、血清尿素氮, 24 h 尿蛋白量、尿 NAG 的含量明显降低, 肾组织匀浆中 SOD 活性、GSH-Px 活性明显增高, MDA 含量明显降低 ( $P < 0.01, P < 0.05$ ); 肾脏的病理变化明显减轻。**结论:** 血栓通能有效改善顺铂肾损伤大鼠肾功能, 降低肾组织氧化水平, 减轻肾脏的病理变化, 对大鼠顺铂肾损伤有保护作用。

**[关键词]** 顺铂; 肾损伤; 血栓通; 抗氧化

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)10-0263-04

## Effect of Xueshuantong on Renal Function and Oxidation Indexes in Cisplatin-induced Nephrotoxicity Rats

XI Jia-xi, LIU Xiao-xia, YANG Yu-fang, ZHANG Chun-hua, LIU Hua-gang\*  
(Pharmacy College of Guangxi Medical University, Nanning 530021, China)

**[Abstract]** **Objective:** To study the protective effect of Xueshuantong against cisplatin-induced nephrotoxicity. **Method:** Female SD rats were randomly divided into six groups: normal saline (NS) group, model group, positive control group and the high dose group, middle dose group and low dose group of Xueshuantong, with 12 rats in each group. The model rats with nephrotoxicity were duplicated with injection of cisplatin by vena caudalis. Rats in model group, positive control group and the high dose group, middle dose group and low dose group of Xueshuantong were treated by amifostine,  $0.1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ , Xueshuantong,  $15.63, 31.35, 62.70 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  once a day. The changes of serum creatinine (SCr), blood urea nitrogen (BUN), *N*-acetyl-beta-D glucosa minidase (NAG), urine protein/24 h, the content of malondialdehyde (MDA) and the activity of superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GSH-Px) were measured and renal structure was observed after 10 days of administration. **Result:** Compared with the model group, contents of BUN, SCr in serum and urine protein /24hour, NAG in urine were significantly decreased in each treatment group ( $P < 0.01$  or  $P < 0.05$ ), the content of MDA was also significantly decreased ( $P < 0.01$  or  $P < 0.05$ ) and the activity of SOD and GSH-Px was significantly increased ( $P < 0.01$  or  $P < 0.05$ ). The pathological slice indicated that renal structure was significantly improved. **Conclusion:** Xueshuantong can effectively relieve cisplatin-induced nephrotoxicity by reducing the pathological changes of renal structure and improving the function in renal injury rats induced by cisplatin and inhibiting the oxidative damage of kidney.

**[Key words]** cisplatin-induced nephrotoxicity; Xueshuantong; antioxidation

**[收稿日期]** 20111117(001)

**[第一作者]** 席加喜, 硕士, Tel: 18277188144, E-mail: callmejiaxi@yahoo.com.cn

**[通讯作者]** \* 刘华钢, 博士, 教授, 博士生导师, Tel: 1390782166, E-mail: hgliu@263.net

顺铂(DDP)是治疗实体肿瘤最常用最有效的化疗药物之一,也是联合化疗中最常用的抗肿瘤药,但顺铂也如其他抗肿瘤药物一样,具有严重的不良反应,顺铂的肾毒性为其主要不良反应<sup>[1-2]</sup>,其不仅影响了顺铂的用药剂量及化疗进程,而且严重影响了患者的生活质量。很大程度上限制了顺铂的临床应用<sup>[3]</sup>。尽管目前临床上的综合疗法已降低了 DDP 的肾毒性<sup>[4]</sup>,但寻找有效肾保护剂仍是摆在临床医生面前的重要课题。

血栓通(Xueshuantong)注射剂的成分为三七总皂苷,具有降血脂、清除自由基、抗炎、抗氧化、抗肿瘤等多种药理作用<sup>[5]</sup>。血栓通注射液具有活血祛瘀,扩张血管,改善血液循环的作用<sup>[6]</sup>。对兔初发期急性肾小管坏死具有保护作用。但对顺铂肾损害的作用及其机制如何尚未见报道。本研究旨在研究血栓通对顺铂肾损伤性大鼠肾功能和氧化指标及肾组织形态学的影响,探讨血栓通治疗顺铂肾损伤的疗效。

## 1 材料

**1.1 试剂** 注射用血栓通,由中恒集团梧州制药有限公司提供,批号 20110115,临用前用 0.9% 生理盐水配成相应的浓度;安磷汀注射剂大连美罗大药厂,批号 53110301,临用前用 0.9% 氯化钠注射液配制成 0.1 g·L<sup>-1</sup> 的混悬液;顺铂针剂,济南齐鲁制药有限公司,批号 1020032DB;丙二醛(MDA)测试盒,批号 20101230,肌酐测试盒,批号 20101230,尿素氮(BUN)试剂盒,批号 20110115,南京建成生物有限公司。

**1.2 仪器** 普通天平,电子测温仪;721 型分光光度计(上海分析仪器总厂)。

**1.3 动物** 成年健康雄性 SD 大鼠 72 只,体重 180~200 g,由广西医科大学医学实验动物中心提供,SPF 级,试验动物生产许可证号 SCXK(桂)2003-0030。

## 2 方法

**2.1 动物分组及处理** 72 只大鼠自由饮水进食,饲养于 18~22℃ 明暗各 12 h 的清洁级动物实验室内,喂养 2 周后,随机分为 6 组,即空白对照组、模型组、安磷汀阳性药物组及血栓通低、中、高剂量组各 12 只。根据预实验结果,采用 DDP (0.5 mg·kg<sup>-1</sup>) 尾静脉注射<sup>[7]</sup>,复制 DDP 致大鼠肾损伤性模型。空白组用等量 0.9% 氯化钠注射液替代 DDP 尾静脉注射,于第 1 次注射后开始 ip 0.9% 氯化钠溶液;模型组、安磷汀组、血栓通高、中、低剂量组于造

模第 1 天分别 ip 氯化钠(0.9%)、安磷汀(1 mg·kg<sup>-1</sup>)、血栓通(15.63, 31.35, 62.70 mg·kg<sup>-1</sup>)。以上各组均每日 ip 1 次,每次用药体积均按成人临床用量换算为大鼠剂量,连续 10 d。

**2.2 尿液检测指标及方法**<sup>[8]</sup> 实验期间动物正常饮食,自由摄食饮水,3 d 后麻醉取材,麻醉取材前禁食不禁水收集 24 h 尿液测尿蛋白(Upro)、N-乙酰β-D 氨基葡萄糖苷酶 NAG 的含量。NAG 酶采用对硝基酚比色法测定,Upro 采用考马斯亮蓝法测定,严格按照试剂盒所示的操作方法和步骤。

**2.3 血液检测指标及方法** 20% 乌拉坦 4 mL·kg<sup>-1</sup> ip 麻醉,腹主动脉取血 4 mL,检测血清中 BUN、血肌酐(SCr)含量。其中 BUN 采用二乙酰一肟法测定;SCr 采用苦味酸法测定。

**2.4 肾脏组织匀浆检测指标及方法** 腹正中切口打开腹腔,游离出腹主动脉,在肾动脉分支以下行腹主动脉插管,夹闭肾动脉分支以上的近心段,剪开左肾静脉,用冷生理盐水肾脏原位灌注。待肾脏颜色由红变白后,剪下肾脏迅速放入液氮中,匀浆后于 -80℃ 冰箱保存用于 SOD,MDA,GSH-Px 的测定。SOD 活性采用黄嘌呤氧化法测定;GSH-Px 活性采用 412 nm 处测定吸光度(A);MDA 含量采用硫代巴比妥酸(TBA)法测定。

**2.5 肾脏病理组织学观察** 取出肾脏,沿冠状面切成两半,肾组织经体积分数为 10% 的甲醛固定,常规石蜡包埋,5 μm 连续切片,苏木素-伊红(HE)染色,光学显微镜下进行病理组织学观察。

**2.6 统计学处理** 统计分析应用 SPSS 13.0 软件,分析实验数据用  $\bar{x} \pm s$  表示。多组间均数比较采用单因素方差分析,检验水准  $\alpha = 0.05$ ,差异有显著性,则进一步使用 *q* 检验行两两比较。

## 3 结果

**3.1 对顺铂肾毒性大鼠 Upro/24 h, NAG 含量的影响** 与空白组比较,模型组大鼠 Upro/24 h,尿 NAG 含量明显升高( $P < 0.01$ );经用血栓通治疗后,各治疗组大鼠 Upro/24 h,尿 NAG 含量明显降低,与模型组比较差异有显著性( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ );血栓通高、中、低剂量组与阳性药物组比较及血栓通高、中、低剂量组之间比较,大鼠 Upro/24 h、尿 NAG 含量差异无显著性,见表 1。

**3.2 对顺铂肾毒性大鼠血清中 BUN, SCr 含量的影响** 与空白组比较,模型组大鼠血清中 BUN,SCr 含量明显升高( $P < 0.01$ );经血栓通治疗后,各治疗组大鼠血清中 BUN,SCr 含量明显降低,与模型

**表1 血栓通对DDP致肾损伤模型大鼠NAG,Upro含量的影响**( $\bar{x} \pm s, n = 12$ )

组别	剂量/mg·kg <sup>-1</sup>	NAG/U·L <sup>-1</sup>	Upro/mg·d <sup>-1</sup>
空白	-	2.08 ± 0.34 <sup>2)</sup>	6.03 ± 1.44 <sup>2)</sup>
模型	-	6.64 ± 0.96	15.91 ± 3.56
安磷汀	1.00	4.08 ± 0.65 <sup>2)</sup>	8.18 ± 4.33 <sup>2)</sup>
血栓通	15.63	4.73 ± 0.47 <sup>2)</sup>	7.62 ± 1.73 <sup>2)</sup>
	31.35	2.14 ± 0.57 <sup>2)</sup>	6.14 ± 1.04 <sup>2)</sup>
	62.70	3.98 ± 1.34 <sup>2)</sup>	9.14 ± 2.55 <sup>2)</sup>

注:与模型组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ , <sup>2)</sup>  $P < 0.01$  (表2~3同)。

组比较差异有显著性 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )。见表2。

**表2 血栓通对DDP致肾损伤模型大鼠血清BUN,SCr含量的影响**( $\bar{x} \pm s, n = 12$ )

组别	剂量/mg·kg <sup>-1</sup>	BUN/mmol·L <sup>-1</sup>	SCr/μmol·L <sup>-1</sup>
空白	-	8.92 ± 1.57	86.78 ± 15.46
模型	-	13.65 ± 0.51	133.22 ± 11.72
安磷汀	1.00	9.99 ± 1.94 <sup>1)</sup>	103.89 ± 12.22 <sup>2)</sup>
血栓通	15.63	11.33 ± 0.90 <sup>1)</sup>	120.08 ± 14.04 <sup>2)</sup>
	31.35	9.60 ± 0.74 <sup>2)</sup>	91.97 ± 19.08 <sup>2)</sup>
	62.70	12.11 ± 5.31 <sup>1)</sup>	122.83 ± 27.09

**3.3 对顺铂肾毒性大鼠肾组织匀浆中SOD,GSH-Px活性及MAD含量的影响** 与空白组比较,模型组大鼠肾组织匀浆中SOD,GSH-Px活性明显降低 ( $P < 0.01$ ),MAD含量明显升高;经血栓通治疗后,各治疗组大鼠肾组织匀浆中SOD,GSH-Px活性明显升高,MAD含量明显降低,与模型组比较差异有显著性 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ),见表3。

**表3 血栓通对DDP致肾损伤模型大鼠血清SOD,GSH-Px活性,MAD含量的影响**( $\bar{x} \pm s, n = 12$ )

组别	剂量/mg·kg <sup>-1</sup>	SOD	MAD	GSH-Px
		/U·mg <sup>-1</sup>	/nmol·mg <sup>-1</sup>	/U·mg <sup>-1</sup>
空白	-	268.06 ± 23.05 <sup>2)</sup>	4.75 ± 0.56 <sup>2)</sup>	299.83 ± 78.88 <sup>1)</sup>
模型	-	116.35 ± 46.33	6.76 ± 0.83	211.58 ± 42.67
安磷汀	1.00	226.22 ± 48.17 <sup>1)</sup>	4.90 ± 0.40 <sup>2)</sup>	251.23 ± 30.61
血栓通	15.63	220.36 ± 43.63 <sup>2)</sup>	4.67 ± 0.61 <sup>2)</sup>	288.25 ± 37.84 <sup>1)</sup>
	31.35	266.87 ± 14.43 <sup>2)</sup>	3.40 ± 0.65 <sup>2)</sup>	290.64 ± 70.41 <sup>1)</sup>
	62.70	178.80 ± 76.47 <sup>1)</sup>	4.77 ± 0.52 <sup>2)</sup>	247.95 ± 46.59

**3.4 对顺铂肾毒性肾组织形态学的影响** HE染色显示:空白组大鼠肾组织结构清晰,肾小球、肾小管结构正常,间质甚少;模型组大鼠近曲小管上皮细胞明显变性、水肿,部分小管上皮细胞呈片状

坏死、脱落,管腔内有大量蛋白管型和坏死物。间质水肿,可见大量淋巴细胞浸润,纤维母细胞增生明显;阳性对照组,血栓通低、中、高剂量组大鼠偶有肾小球轻度充血,小管上皮轻度细胞水肿,偶有坏死、脱落,部分肾小管轻度萎缩,部分管腔中可见少量管型,间质中有少量炎性细胞浸润、纤维母细胞增生。

#### 4 讨论

顺铂(DDP)是治疗实体肿瘤最常用最有效的化疗药物之一,也是联合化疗中最常用的抗肿瘤药,但由于具有剂量依赖性急性肾脏毒性作用,极大限制其临床应用。研究发现,氧化性损伤可能是DDP引起肾功能损伤的主要原因<sup>[9-10]</sup>,而氧化应激反应及在氧化过程中产生的多种代谢产物,一方面直接损伤细胞核酸、蛋白质、黏多糖和脂类物质,另一方面通过多种途径激活细胞内凋亡信号转导通路,引起组织细胞凋亡,从而导致有功能的肾小管细胞、肾小球和肾实质细胞损害和坏死,产生肾功能短时间内急剧衰退,表现急性肾功能损害<sup>[11]</sup>。临床上采用安磷汀作为化疗前后的辅助用药,安磷汀为一种有机硫化磷酸化合物。它在组织中被与细胞膜结合的碱性磷酸酶水解脱磷酸后,成为具有活性的代谢产物WR-1065,其化学结构式为H<sub>2</sub>N-(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-SH,因巯基具有清除组织中自由基的作用,故能减低顺铂、环磷酰胺及丝裂霉素等的毒性。这与血栓通的抗氧化作用相关。故本实验采用安磷汀作为阳性对照药,探讨血栓通对抗顺铂肾损伤的作用机制。

血栓通是以中药三七的有效成分为中药三七块根提取的有效活性成分三七总皂苷<sup>[6]</sup>,具有扩张冠状动脉、对抗血管痉挛、降低心肌耗氧量、改善微循环等作用<sup>[12]</sup>,同时还能降低胆固醇,降低血液黏稠度,能够清除自由基、抑制细胞膜脂质过氧化、提高机体对缺氧的耐受力,抑制血栓形成及ADP引起的血小板聚集、延长凝血时间,增强红细胞的变形能力<sup>[13]</sup>。

本试验中,氧化损伤机制是肾损伤的主要机制,也是国内外毒性机制研究的热点问题,故选择了与氧化损伤机制密切相关的指标(MDA,SOD,GSH-Px)作为评价指标<sup>[14]</sup>,初步探讨了血栓通对顺铂肾损伤的病理机制;尿蛋白量、NAG酶含量是肾小管损伤敏感且特异的指标<sup>[8]</sup>。本实验结果显示,模型组肾组织大鼠SOD,GSH-Px活性降低,MDA升高,说明顺铂肾病中肾脏抗氧化系统功能有所下降。

SOD 主要清除自由基两者处于动态平衡状态, GSH-Px 主要清除低浓度的  $H_2O_2$ 。当自由基代谢发生紊乱时, 导致氧自由基过剩, 使肾小管上皮细胞受到损伤。活性氧增多引起脂质过氧化并降解为 MDA, 它是判断体内脂质过氧化反应程度的特征指标。而血栓通可以提高 SOD, GSH-Px 的活性、降低 MDA 含量, 可清除肾脏局部的氧自由基, 减少肾脏损害, 延缓肾损伤的发展进程。而中剂量作用最明显的原因可能与血栓通的对机体的刺激性有关, 高剂量时增加了其对机体的刺激, 产生了机体应激反应。本实验结果可初步判断, 血栓通可降低顺铂肾损伤大鼠血肌酐和尿素氮其作用机制可能与其抗氧化作用有关。提高肾脏 SOD, GSH-Px 活性、降低 MDA 含量可能是血栓通保护肾脏功能的机制之一。

### [参考文献]

[1] Von Hoff D D, Schilsky R, Reichert C M. Toxic effect of cis-dichlorodimmineplatinum(II) in man[J]. Cancer Treatment Reports, 1979, 63:1527.

[2] Heideman H T H, Muller S T, Mertins L. Effect of a minorphylline on cisplatin nephrotoxicity: Antioxidant system[J]. Drug Chem Toxicol, 1995, 18:151.

[3] Goldstein R S, Mayor G H. The nephrotoxicity of cisplatin[J]. Life Sci, 1983, 32(7): 685.

[4] 牛东生, 王梅云, 侯永超, 等. 周剂量多西他赛联合低剂量顺铂、氟尿嘧啶治疗晚期食管癌[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(7):237.

[5] 郑鸿翱, 陈少如, 陈穗, 等. 当归或三七对兔甘油致急性肾衰的保护作用及其机制研究[J]. 中国现代医学

杂志, 2003, 13(9):36.

[6] 邓巧虹, 苑鹏, 邵爱馨, 等. 血栓通注射液质量标准的研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2002, 8(2):8.

[7] 李淑贞, 杨桂染, 郭秋红, 等. 新交泰饮对顺铂肾毒性大鼠肾功能及氧化指标的影响[J]. 河北中医, 2009, 31(5):753.

[8] 李一飞, 姚广涛. 急性肾损伤中肾小管损伤标志物的研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(23):279.

[9] Yousef M I, Saad A A, El-Shennawy L K. Protective effect of grapeseed proanthocyanidin extract against oxidative stress induced by cisplatin in rats[J]. Food Chem Toxicol, 2009, 47(6): 1176.

[10] Yu Y N, Chen H, Li Y. Protect effect of bicyclol on cisplatin-induced nephrotoxicity in mice[J]. Arch Toxicol, 2009, 83(4): 381.

[11] Bragado P, Armesilla A, Silva A, et al. Apoptosis by cisplatin requires p53 mediated p38alpha MAPK activation through ROS generation[J]. Apoptosis, 2007, 12(9): 1733.

[12] 杨文明, 张倩, 高利, 等. 血栓通治疗急性脑梗死 76 例临床研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2004, 10(3):56.

[13] 张秋谷. 血栓通治疗冠心病不稳定型心绞痛的临床观察[J]. 现代医药卫生, 2011, 27(19):2960.

[14] 孙蓉, 李素君, 黄伟, 等. 氧化损伤相关指标在中药肝毒性损伤机制中作用与研究进展[J]. 中药药理与临床, 2009, 25(1):80.

[责任编辑 聂淑琴]