

# 葡萄籽原花青素对顺铂诱发小鼠肾毒性的保护作用

郭卓雨, 高丽萍\*, 李 贞

(生物活性物质与功能食品北京市重点实验室, 北京联合大学应用文理学院, 北京 100191)

**摘要:**目的: 探讨葡萄籽原花青素(GSPE)对顺铂(CDDP)诱发小鼠肾毒性的作用影响, 并探讨可能的作用机制。方法: 选用60只成年雄性小鼠, 随机分为正常组、CDDP模型组、GSPE+CDDP提前组和GSPE+CDDP同时组4组, 正常组、CDDP模型组和GSPE+CDDP同时组每日喂饲常规饲料, 灌胃蒸馏水, GSPE提前组小鼠灌胃GSPE 200mg/(kg·d), 持续12d。实验第10天, 正常组小鼠腹腔注射生理盐水, 其余组一次性腹腔注射CDDP 20mg/kg以建立CDDP肾损伤模型, 同时组则同时进行GSPE 200mg/kg灌胃。腹腔注射后第3天处死动物, 测定各组小鼠血清尿素氮(BUN)、肌酐(Scr)含量及肾组织超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)、一氧化氮合成酶(NOS)活性, 同时测定丙二醛(MDA)、一氧化氮(NO)含量。结果: GSPE对CDDP所致小鼠肾组织抗氧化酶(SOD、GSH-Px)活力降低和血清尿素氮(BUN)、肌酐(Scr)及脂质过氧化物含量(MDA、NO、NOS)升高有明显抑制作用( $P < 0.01$ 或 $P < 0.05$ ), 且提前使用GSPE组其保护作用优于CDDP与GSPE同时使用组。结论: GSPE对CDDP诱发小鼠肾组织氧化损伤具有保护作用, 其机制可能与GSPE降低脂质过氧化物, 升高抗氧化酶活力有关。

**关键词:** 葡萄籽原花青素; 顺铂; 肾毒性; 保护作用

## Protective Effect of Grape Seed Proanthocyanidin Extract against Cisplatin-induced Nephrotoxicity in Mice

GUO Zhuo-yu, GAO Li-ping\*, LI Zhen

(Beijing Municipal Key Laboratory of Biological Active Substance and Functional Food, College of Applied Arts and Science, Beijing Union University, Beijing 100191, China)

**Abstract:** Objective: To investigate the protective effect and possible mechanisms of grape seed proanthocyanidin extract (GSPE) against cisplatin (CDDP)-induced nephrotoxicity in mice. Methods: A total of 60 adult male mice were randomly divided into control group, CDDP model group, GSPE + CDDP pretreatment group and GSPE + CDDP co-administration group. The blank control, CDDP model and GSPE + CDDP co-administration groups were fed a normal diet and orally administered with distilled water during the administration period, while the GSPE + CDDP pretreatment group with GSPE at 200 mg/(kg·d) for 12 consecutive days. After administration for 10 days, the blank control group was given normal saline by intraperitoneal injection while a single injection of CDDP (20 mg/kg) in the remaining groups was carried out to establish mouse model of renal injury. At the end of the administration period (13<sup>th</sup> day), all mice were sacrificed to determine serum blood urine nitrogen (BUN) and serum creatinine concentration (Scr) contents, superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GSH-Px) and nitric oxide synthase (NOS) activities, and malonaldehyde (MDA) and nitrogen oxide (NO) contents. Results: The GSPE pretreatment group could significantly inhibit the CDDP-induced inactivation of antioxidant enzymes (SOD and GSH-Px) and the increase in serum blood urine nitrogen (BUN) and serum creatinine concentration (Scr) contents as well as the levels of lipid peroxide (MDA, NO and NOS) in renal tissues of mice ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ), and these effects were better than those observed for the GSPE + CDDP co-administration group. Conclusion: GSPE has a protective effect on CDDP-induced nephrotoxicity in mice. The possible mechanism is associated with the fact that GSPE can decrease the contents of lipid peroxide, and can increase the antioxidant enzyme activities.

**Key words:** grape seed proanthocyanidin extract (GSPE); cisplatin; nephrotoxicity; protective effect

中图分类号: Q946.8

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630(2013)21-0325-04

doi:10.7506/spkx1002-6630-201321065

收稿日期: 2013-06-26

基金项目: 北京联合大学人才强校计划人才资助项目(BPHR2011A01)

作者简介: 郭卓雨(1987—), 女, 硕士研究生, 研究方向为功能性食品生化作用。E-mail: guozhuoyu0310@163.com

\*通信作者: 高丽萍(1962—), 女, 教授, 博士, 研究方向为功能性食品生化作用。E-mail: gaolip62@163.com

顺铂(cis-diamminedichloroplatinum, CDDP)是临床常用的抗肿瘤药物之一,对多种肿瘤均有显著疗效<sup>[1-2]</sup>。但与此同时,CDDP也具有明显的毒副作用,肾毒性是其临床应用受限的主要因素<sup>[3]</sup>。研究表明,顺铂肾毒性的发生率及对肾脏的损伤程度与其使用剂量呈正比,且表现形式从可逆的急性肾功能损伤到不可逆的慢性肾衰竭不等<sup>[4]</sup>。目前对于CDDP诱发肾脏毒性的机制尚不十分明确。相关研究显示,CDDP在体内会破坏氧自由基代谢平衡,引发氧化应激<sup>[5]</sup>,提示与氧化应激有关的氧化损伤可能是CDDP诱发肾脏毒性的主要原因。葡萄籽原花青素(grape seed proanthocyanidin, GSPE)是从葡萄籽中提取的天然多酚类物质,具有多种重要生物活性,因其高效、低毒、生物利用率高而在医药、保健食品领域具有广泛用途<sup>[6]</sup>。大量实验研究证实,GSPE具有极强的抗氧化活性,是一种很好的自由基清除剂和脂质过氧化抑制剂,其清除自由基能力是VE的50倍、VC的20倍<sup>[7]</sup>。本实验室前期研究显示,GSPE能有效抑制CDDP所致体外培养人胚肾细胞(HEK293)的细胞毒性<sup>[8]</sup>,为进一步证实GSPE对于CDDP所致肾毒性的保护作用,本研究利用CDDP制造小鼠肾毒性氧化损伤模型,通过测定小鼠血清尿素氮(BUN)、肌酐(Scr)、肾组织一氧化氮(NO)、丙二醛(MDA)含量以及一氧化氮合酶(NOS)、超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)活性变化,探讨GSPE对CDDP诱发小鼠肾毒性氧化损伤的保护作用,并探讨其可能的作用机理。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料、试剂与仪器

顺铂(注射用粉剂,批号H37021358,临用前用生理盐水配制) 齐鲁制药有限公司;葡萄籽原花青素提取物(纯度大于95%,HPLC级,其中二聚体56%、三聚体12%、四聚体6.6%、单体和其他大分子质量寡聚体20.4%。蒸馏水溶解至所需浓度,过滤除菌避光保存)天津尖峰天然产物研究开发有限公司;SOD、GSH-Px、MDA、NO、NOS和考马斯亮蓝蛋白试剂盒 南京建成科技有限公司;其他试剂均为分析纯。

5804R低温高速离心机 德国Eppendorf公司;Selectra E PLUS自动生化分析仪 荷兰威图科技公司;MQX-200微孔板分光光度计 美国Bio-Tek公司;TDL-5-A常温低速台式离心机 上海安亭科学仪器厂。

### 1.2 动物

成年雄性ICR小鼠(28±2)g共60只,由北京维通利华实验动物技术有限公司提供。小鼠分单笼饲养5~6d,环境温度温暖干燥,避强光、噪音,其间自由进食饮水。

### 1.3 方法

#### 1.3.1 动物分组及饲养

将60只清洁级成年雄性ICR小鼠随机分为正常组、

CDDP模型组、GSPE+CDDP提前组以及GSPE+CDDP同时组,每组15只。正常组、CDDP模型组和GSPE+CDDP同时组每日喂饲常规饲料,灌胃蒸馏水,GSPE+CDDP提前组小鼠灌胃GSPE 200mg/(kg·d),持续12d。实验第10天,CDDP模型组、GSPE+CDDP提前组以及GSPE+CDDP同时组分别一次性腹腔注射CDDP 20mg/kg(以体质量计),同时组小鼠同时灌胃GSPE 200mg/kg,正常组小鼠注射等量生理盐水。每天定时给予饲料并称质量,每隔1d换一次饮用水,每隔6d换一次垫料。腹腔注射后第3天处死小鼠并进行各项抗氧化指标检测。

#### 1.3.2 GSPE对CDDP诱发小鼠肾毒性指标的测定

取材:实验第13天采用摘眼球取血方式,将所采集小鼠血液按编号放置于1.5mL离心管内,室温静置30min后,常温离心(3000r/min)15min。另取1.5mL离心管盛放上层血清,以待自动生化分析仪测定小鼠肾脏系数(RI)、BUN、Scr等血液指标。

肾组织匀浆制作:取血完毕后,采用脱臼法处死小鼠,并于冰浴下迅速取出两侧肾脏。去被膜并称量肾质量,计算肾脏系数(用肾质量/体质量比值表示每100g体质量对应肾脏质量)。取肾组织(0.2~1.0g)在冷生理盐水中漂洗,去除血液并用滤纸拭干,称放于10mL小烧杯;量筒量取0.86%预冷生理盐水(生理盐水与肾组织质量比9:1)移入烧杯,眼科小剪剪碎组织块,冰浴条件下进行;后将碎组织倒入玻璃匀浆管,留剩其中1/3生理盐水洗涤小烧杯内残留碎组织,一并倒入玻璃匀浆管进行匀浆。一手持匀浆管将其下端盛有冰水的器皿中,一手将杆垂直插入套管中上下转动研磨数10次(6~8min),使组织均匀至无肉眼可见颗粒组织止;将制备好的组织匀浆低温离心(3000r/min)离心15min,留上清液弃去沉淀,以测定肾组织各指标,包括MDA、NO、NOS含量以及SOD、GSH-Px活力。

#### 1.3.3 GSPE对CDDP诱发小鼠肾组织MDA、NO、NOS、SOD、GSH-Px含量的影响

按1.3.2节中所述方法制得10g/100mL肾组织匀浆上清液,按试剂盒说明,采用硫代巴比妥酸(TBA)法测定肾组织匀浆中MDA含量、硝酸还原酶法测定NO、NOS含量、黄嘌呤氧化酶法测定SOD活性、二硫代二硝基苯甲酸法测定GSH-Px活性;考马斯亮蓝法测定蛋白含量。采用试剂盒进行测定。

### 1.4 数据处理

采用SPSS 12.0软件进行统计分析,实验数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,应用单因素方差分析进行多组间比较(检验水平 $\alpha=0.01$ 或 $\alpha=0.05$ )。

## 2 结果与分析

### 2.1 GSPE对CDDP诱发小鼠肾脏损伤的影响

表1 GSPE对CDDP诱发小鼠肾脏组织损伤的影响

Table 1 Effect of GSPE on CDDP-induced renal tissue injury in mice (RI, BUN and Scr)

组别	RI/%	BUN含量/(mmol/L)	Scr含量/( $\mu$ mol/L)
正常组	1.48 $\pm$ 0.15	15.00 $\pm$ 1.83	44.25 $\pm$ 5.51
CDDP模型组	1.67 $\pm$ 0.18*	45.21 $\pm$ 15.87**	59.00 $\pm$ 9.97*
GSPE+CDDP提前组	1.52 $\pm$ 0.08 $\Delta$	28.40 $\pm$ 9.64 $\Delta$	49.71 $\pm$ 6.68 $\Delta$
GSPE+CDDP同时组	1.75 $\pm$ 0.28*	46.61 $\pm$ 27.74**	53.25 $\pm$ 17.27*

注：\*，与正常组比较，具有显著性差异 ( $P < 0.05$ )；\*\*，与正常组比较，具有极显著性差异 ( $P < 0.01$ )； $\Delta$ ，与CDDP模型组比较，具有显著性差异 ( $P < 0.05$ )； $\Delta\Delta$ ，与CDDP模型组比较，具有极显著性差异 ( $P < 0.01$ )。下同。

由表1可见，CDDP模型组小鼠肾脏系数(RI)值升高，表明CDDP已诱发小鼠肾脏组织肿胀。GSPE+CDDP提前组小鼠RI值与CDDP模型组相比存在显著性差异 ( $P < 0.05$ )；而GSPE+CDDP同时组与CDDP模型组相比无显著性差异。通过测定BUN、Scr可知，CDDP模型组小鼠血清中BUN ( $P < 0.01$ )、Scr ( $P < 0.05$ )含量与正常组相比明显升高，表明CDDP诱发小鼠肾脏组织损伤。GSPE+CDDP提前组小鼠血清BUN与CDDP模型组相比显著降低 ( $P < 0.05$ )，可见提前使用GSPE对CDDP诱发肾毒性具有一定保护作用；而GSPE+CDDP同时组小鼠血清BUN、Scr含量仍较高，与CDDP模型组相比无显著性差异，表明提前使用GSPE效果优于GSPE+CDDP同时组。实验结果表明，GSPE能有效保护CDDP诱发小鼠肾脏组织损伤，GSPE+CDDP提前组效果为佳。

### 2.2 GSPE对CDDP诱发小鼠肾脏组织抗氧化指标的影响

表2 GSPE对CDDP诱发小鼠肾脏组织抗氧化指标的影响

Table 2 Effect of GSPE on CDDP-induced renal tissue antioxidant indexes in mice (MDA, SOD, GSH-Px, NO and NOS)

组别	MDA含量/(nmol/mg pro)	SOD活力/(U/mg pro)	GSH-Px活力/(U/mg pro)	NO含量/( $\mu$ mol/g pro)	NOS含量/(U/mg pro)
正常组	2.54 $\pm$ 0.56	108.42 $\pm$ 9.74	271.58 $\pm$ 29.29	1.28 $\pm$ 0.45	395.92 $\pm$ 59.32
CDDP模型组	2.96 $\pm$ 0.24*	80.23 $\pm$ 8.12**	210.63 $\pm$ 40.63**	3.27 $\pm$ 1.21**	414.45 $\pm$ 134.31*
GSPE+CDDP提前组	2.08 $\pm$ 0.33 $\Delta\Delta$	113.03 $\pm$ 14.54 $\Delta\Delta$	277.89 $\pm$ 38.56 $\Delta\Delta$	1.92 $\pm$ 0.90 $\Delta\Delta$	392.60 $\pm$ 93.34 $\Delta$
GSPE+CDDP同时组	2.97 $\pm$ 0.34	90.09 $\pm$ 15.86 $\Delta$	204.59 $\pm$ 53.75 $\Delta$	2.68 $\pm$ 1.33 $\Delta\Delta$	453.52 $\pm$ 123.50 $\Delta\Delta$

由表2可见，与正常组相比，CDDP可造成小鼠肾脏组织MDA含量显著增高 ( $P < 0.05$ )、SOD与GSH-Px酶活力极显著降低 ( $P < 0.01$ )，提前灌胃GSPE的小鼠再进行CDDP注射其肾脏组织MDA含量明显降低 ( $P < 0.05$ )，SOD、GSH-Px酶活力则明显升高 ( $P < 0.01$ )，与CDDP模型组相比具有显著性差异。此外，CDDP模型组小鼠其肾脏组织NO ( $P < 0.01$ )、NOS值较正常组有显著增高 ( $P < 0.05$ )，GSPE+CDDP提前组小鼠肾脏组织匀浆中NO ( $P < 0.01$ )、NOS ( $P < 0.05$ )值与CDDP模型组相比明显降低。本实验结果表明，GSPE

能有效保护CDDP诱发小鼠肾脏组织氧化损伤，增强小鼠肾脏组织抗氧化酶SOD、GSH-Px活性，降低脂质过氧化物MDA、NO含量，抑制NOS活性，且GSPE+CDDP提前组效果为佳。

## 3 讨论

CDDP进入机体后主要由经肾脏排泄，故肾毒性最为明显。CDDP可通过肾小球滤过游离药物，经肾小管重吸收并排泄。CDDP诱发肾毒性主要表现为肾小管间质损伤，血清肌酐水平升高，用药24h后即出现肾小管上皮细胞变性<sup>[9]</sup>。相关研究表明<sup>[10]</sup>，注射CDDP后，肾小管上皮细胞浆中CDDP浓度超过血浆中浓度5倍以上。临床患者给药最初5d，尿中检测到CDDP含量占26%~45%，表明积蓄CDDP从肾脏完全清除需很长时间。CDDP诱导肾脏组织损伤时，其血清中BUN变化最为敏锐，多在用药后1~3周出现，肾组织病理改变程度与BUN相符<sup>[11]</sup>。本研究结果显示，注射CDDP后第3天，CDDP模型组小鼠肾脏系数RI、血清BUN、Scr含量较正常组相比显著升高，提示CDDP诱发明显的小鼠肾脏组织损伤。

氧化应激是CDDP诱发肾毒性的主要原因之一<sup>[12-13]</sup>。有报道显示，CDDP可诱发肾脏SOD活性降低<sup>[14]</sup>、MDA含量增加<sup>[15]</sup>。本研究也表明，MDA在CDDP单独作用于小鼠肾脏组织中其含量显著增加，SOD、GSH-Px水平显著降低，提示氧化应激在本研究CDDP诱发肾毒性过程中起重要作用。NO又称为内皮源性舒张因子(EDTF)，是在一氧化氮合成酶(NOS)作用下，以左旋精氨酸和O<sub>2</sub>为底物催化而产生的一种扩血管物质<sup>[16]</sup>。研究表明，NO并不直接对组织造成损伤，而是与超氧化物阴离子反应生成超氧化亚硝基阴离子(ONOO<sup>-</sup>)，后者可分解产生羟自由基( $\cdot$ OH)从而产生毒性<sup>[17]</sup>。体外研究表明，外源性NO能抑制SOD活性并引发明显的脂质过氧化反应<sup>[18]</sup>。NO与超氧化物阴离子反应的速率比SOD清除超氧化物阴离子的速率快很多，因此NO会与SOD竞争超氧化物阴离子，并与超氧化物阴离子反应生成ONOO<sup>-</sup>。ONOO<sup>-</sup>可使蛋白中酪氨酸硝基化，抑制SOD活性，使经SOD清除的超氧化物阴离子减少，使得更多的超氧化物阴离子与NO反应，生成大量ONOO<sup>-</sup>，后者又可继续抑制SOD活性，形成恶性循环。目前，NO在环孢菌素A诱发急性肾功能衰竭作用中的文献报道较多<sup>[19]</sup>，而在CDDP诱发急性肾功能衰竭的研究较少，且结论不确定。本研究结果表明，给予小鼠20mg/kg CDDP后第3天，小鼠肾脏组织NOS活性、NO含量明显升高，推测NOS的产生可能是由于氧化应激反应中大量自由基引起。NOS产生增加，引起NO释放，NO进一步抑制SOD活性，导致肾脏组织损伤，肾脏组织NOS、NO变化与SOD、GSH-Px及血清BUN、

Scr变化相一致,因此,NO在CDDP诱发肾组织氧化损伤过程中起重要作用。

GSPE属于生物类黄酮类物质,其结构上的酚羟基易被氧化形成醌,对自由基有很强的捕捉和消除能力,故在体内抗氧化、消除自由基的能力很强,是一种很好的氧自由基清除剂<sup>[20-21]</sup>。本研究结果表明,200mg/kg GSPE提前灌胃10d,小鼠肾组织中SOD、GSH-Px含量明显高于CDDP模型组,血清中BUN及Scr含量及肾组织中MDA、NO、NOS含量均明显低于CDDP模型组,同时组对CDDP诱发肾毒性其保护作用不显著,提示提前给予GSPE能明显减轻CDDP诱发的肾毒性,其作用主要通过增强SOD、GSH-Px酶活力,抑制NOS酶生成NO,降低肾组织脂质过氧化物MDA含量来实现的。

#### 参考文献:

- [1] DULCE C, RITA C, MANUELA C, et al. Cisplatin-induced cell death in *Saccharomyces cerevisiae* is programmed and rescued by proteasome inhibition[J]. DNA Repair, 2013, 12(6): 444-449.
- [2] PABLA N, DONG Z. Cisplatin nephrotoxicity: mechanisms and nephroprotective strategies[J]. Kidney Int, 2008, 73: 994-1007.
- [3] HODA E M, SAHAR E E S, RASHA H M. Effect of erythropoietin therapy on the progression of cisplatin induced renal injury in rats[J]. Experimental and Toxicologic Pathology, 2013, 65(1/2): 197-203.
- [4] 邓健浩, 薛增贵, 史道华. 顺铂肾毒性的药物基因组学研究进展[J]. 中国医院药学杂志, 2012, 32(19): 1569-1571.
- [5] SOMANI S M, RAVI R, RYBAK L P. Diethyldithiocarbamate protection against cisplatin nephrotoxicity: antioxidant system[J]. Drug Chem Toxicol, 1995, 18(2/3): 151-170.
- [6] 唐瑛, 刁波, 李德忠, 等. 葡萄籽原花青素对海马细胞氧化损伤和凋亡的影响[J]. 武汉大学学报: 医学版, 2008, 29(5): 592-595.
- [7] 龚晨睿, 刘睿, 王玉娥, 等. 原花青素复合制剂对辐射损伤的保护作用研究[J]. 食品科学, 2008, 29(6): 412-414.
- [8] 李贞, 高丽萍, 冷洪涛, 等. 葡萄籽原花青素对顺铂所致人胚肾细胞毒性的拮抗作用[J]. 食品科学, 2011, 32(7): 315-318.
- [9] CHIRINO Y I, PEDRAZA C J. Role of oxidative and nitrosative stress in cisplatin-induced nephrotoxicity[J]. Experimental and Toxicologic Pathology, 2009, 61(3): 223-242.
- [10] YOUSELF M I, SAAD A A, EI-SHENNAWY L K. Protective effect of grape seed proanthocyanidin extract against oxidative stress induced by cisplatin in rats[J]. Food and Chemical Toxicology, 2009, 47(6): 1176-1183.
- [11] 王黎, 裴瑞, 杨红梅, 等. 顺铂诱导肾损伤过程中肾皮质脂质过氧化物的变化[J]. 中国应用生理学杂志, 2004, 20(4): 393-395.
- [12] 苏永华. 警惕化疗药物的肾毒性[N]. 上海中医药报, 2013-03-08(004).
- [13] 方允中. 自由基与酶[M]. 北京: 科学出版社, 1989: 229.
- [14] 陈竹红. 维生素C对顺铂所致大鼠肾损伤的保护作用药物研究[J]. 中国药业, 2009, 18(13): 20-21.
- [15] 杨钟, 李培峰. 牛黄酸鹅去氧胆酸对小鼠体内氧自由基代谢的影响[J]. 中国兽药杂志, 2006, 40(5): 32-35.
- [16] 刘华锋, 陈孝文. 一氧化氮与肾损伤的研究进展[J]. 国外医学: 泌尿系统分册, 2000(5): 198-200.
- [17] 刘丽敏, 刘华钢, 黄巨恩, 等. 改构型酸性成纤维细胞生长因子对顺铂肾损伤保护作用的研究[J]. 中国生物工程杂志, 2007, 27(6): 10-14.
- [18] 申兆菊, 沈川, 肖希龙. 外源性一氧化氮对大鼠抗氧化酶活性的影响[J]. 卫生毒理学杂志, 1997, 11(3): 148-149.
- [19] 乔晞, 陈香美, 丁瑞, 等. 小剂量环孢素A抑制大鼠缺血性急性肾衰竭中肾小管上皮细胞线粒体通透性转运[J]. 中国血液净化, 2005, 4(11): 613-617.
- [20] 陈琪, 王伯初, 唐春红, 等. 黄酮类化合物抗氧化性与其构效的关系[J]. 重庆大学学报: 自然科学版, 2003, 26(11): 48-51.
- [21] IQLESIAS J, PAZOS M, TORRES J L, et al. Antioxidant mechanism of grape procyanidins in muscle tissues: redox interactions with endogenous ascorbic acid and  $\alpha$ -tocopherol[J]. Food Chemistry, 2012, 134(4): 1767-1774.