

黄秋葵醇提物对顺铂致急性肾损伤的保护作用

李莹¹,高铭彤¹,李婧毓¹,刘一桐¹,曾露露¹,丁传波^{1,2},刘文丛^{1*},郑毅男^{1*}

(1. 吉林农业大学中药材学院,吉林省长春市,130118;2. 珲春华瑞参业生物工程股份有限公司,吉林省珲春市,133300)

[收稿日期] 2016-05-13 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280(2016)07-0052-05 [中图分类号] S853.74

[摘要] 为了探讨黄秋葵嫩果醇提物对顺铂致小鼠急性肾损伤是否具有保护作用,将50只SPF级ICR雄性小鼠随机均分为空白对照组(0.9%生理盐水)、模型组(0.9%生理盐水)、黄秋葵醇提物(HQK)高中低剂量组(400、200、100 mg/kg),分别灌胃给药7 d,除空白对照组,于第7天给药1 h后灌胃给顺铂20 mg/kg。再灌胃给药3 d后,眼球取血,测定血清中尿素氮(BUN)、肌酐(CRE)、超氧化物歧化酶(SOD)、还原型谷胱甘肽(GSH)和丙二醛(MDA)的含量;测定肾脏匀浆中SOD、GSH和MDA含量;并观察苏木精-伊红(HE)病理切片组织病理学变化。结果表明:与模型组比较,HQK高、中剂量组中BUN、CRE含量均降低,肾组织GSH、SOD含量均升高($P < 0.01$, $P < 0.05$),HE染色观察HQK高剂量组可显著保护顺铂致肾组织病理损害。黄秋葵醇提取物对CDDP诱导的小鼠急性肾损伤均有一定的保护作用。

[关键词] 顺铂;黄秋葵醇提取物;肾毒性;血尿素氮;肌酐

基金项目: 吉林省自然科学基金(20160101017JC);吉林省大学生创业资金项目(20160521011HJ)

作者简介: 李莹,硕士研究生,从事天然产物化学研究。

通讯作者: 刘文丛, E-mail: jwlw6803@126.com; 郑毅男, E-mail: zhengyinan@tom.com

- [13] Lee K J, Yeo M G. Homeopathic Rhus toxicodendron has dual effects on the inflammatory response in the mouse preosteoblastic cell line MC3T3-e1 [J]. *Homeopathy*, 2016, 105(1):42-47.
- [14] Shi R, Wang Q, Ouyang Y, et al. Picfeltaerin IA inhibits lipopolysaccharide-induced inflammatory cytokine production by the nuclear factor- κ B pathway in human pulmonary epithelial A549 cells [J]. *Oncol Lett*, 2016, 11(2):1195-1200.
- [15] Tursun X, Zhao Y, Alat Z, et al. Anti-inflammatory Effect of Rose rugosa Flower Extract in Lipopolysaccharide-stimulated RAW264.7 Macrophages [J]. *Biomol Ther (Seoul)*, 2016, 24(2):184-190.
- [16] Jung Y Y, Hong J T, Han S B, et al. Effect of Ixeris dentata Nakai Extract on Nitric Oxide Production and Prostaglandin E2 Generation in LPS-stimulated RAW264.7 Cells [J]. *Immune Netw*, 2015, 15(6):325-330.
- [17] Alizan A, Khalil J. Tumour Necrosis Factor: Implications for surgical patients [J]. *ANZ J Surg*, 2006, 76(11):1010-1016.
- [18] Tom L, Christian T. Intracellular survival pathways in the liver [J]. *Liver International*, 2006, 26(10):1163-1174.
- [19] Wouter M, Kooloos D J. Potential role of pharmacogenetics in anti-TNF treatment of rheumatoid arthritis and crohn's disease [J]. *Drug Discovery Today*, 2007, 12(3/4):125-131.
- [20] Park W Y, Goodman R B, Steinberg K P, et al. Cytokine balance in the lungs of patients with acute respiratory distress syndrome [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2001, 164(10):1896-1903.

(编辑:侯向辉)

Protective Effects of Alcohol Extract of Okra Cisplatin Induced Acute Kidney Injury

LI Ying¹, GAO Ming - tong¹, LI Jing - yu¹, LIU Yi - tong¹, ZENG Lu - lu¹,
DING Chuan - bo^{1,2}, LIU Wen - cong^{1*}, ZHENG Yi - nan^{1*}

(1. College of Chinese Medicinal Materials, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China;

2. Hunchun Huarui Ginseng Industry Bioengineering Co., Ltd., Hunchun 133300, China.)

Abstract: The study of okra tender fruit alcohol extract protective effects against cisplatin - induced acute kidney injury in mice. The 50 SPF ICR male mice were randomly divided into five groups: control (0.9% normal saline), model (0.9% normal saline), okra alcohol extraction from high, medium and low dose group (400、200、100 mg/kg). Respectively, 7 d of intragastric administration. After 7 d, in addition to the control group, were given one hour after administration of gastric administration of cisplatin 20 mg/kg. And then intragastric administration 3 d, after eyeball plasma, serum centrifugal stay. We tested the content of serum blood urea nitrogen (BUN), serum creatinine (CRE), superoxide dismutase (SOD), glutathione (GSH) and malondialdehyde (MDA). Also measured SOD, GSH and MDA content in kidney homogenates; and inspected the changes of pathological by hematoxylin - eosin (HE). The experimental results show, compared with the model, the okra alcohol extract high and middle dosage group, BUN, CRE content decreased and kidney tissues by GSH, SOD levels were increased ($P < 0.01$, $P < 0.05$). We discovered the okra alcohol extract better than the model could protectd renal pathological damage by HE. Therefore okra alcohol extract on cisplatin - induced acute kidney injury in mice has a protective effect.

Key words: cisplatin; okra extract; renal toxicity; blood urea nitrogen; serum create - nine

顺铂 (cis - diamminedichloroplatinum, CDDP) 是广泛应用于临床的抗肿瘤化疗药物,治疗多种实体肿瘤^[1],但 CDDP 具有一定的毒副作用,其中肾毒性最为常见,成为限制 CDDP 在临床大量使用的主要原因。已有研究表明,CDDP 的肾毒性与多种因素有关,包括一氧化氮应激^[2]、氧化应激等^[3]。因此,研究一种药物在使用 CDDP 治疗肿瘤的过程中与 CDDP 结合使其降低毒副作用,是目前药理学、毒理学研究的热点。

黄秋葵 (*Abelmoschus esculentus* Linn.) 属于锦葵科 (Malvaceae) 秋葵属 (*Abelmoschus Medic*) 一年生草本植物,别名咖啡黄葵、补肾草等^[4-5]。在欧美国家被誉为“植物伟哥”,日本称其为“绿色人参”,具有一定保护肾脏功效^[6]。目前,对于黄秋葵醇提取物 (Okra alcohol extract, HQK) 对顺铂致急性肾损伤的保护作用尚未见报道,试验通过建立顺铂诱导急性肾损伤模型,研究黄秋葵醇提取物其对肾脏保护作用的研究,以期黄秋葵对肾脏保护功能提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器 黄秋葵采购于江西萍乡,经吉林农业大学中药材学院郑毅男教授鉴定为锦葵科 (Malvaceae) 秋葵属 (*Abelmoschus Medic*) 黄秋葵;顺铂 (sigma 公司, CAS 号 15663 - 27 - 1); MK3 型酶标仪 (美国 Thermo Electron 公司); 肌酐、尿素氮、MDA、SOD、GSH、考马斯亮蓝试剂盒 (南京建成生物工程研究所,批号:20151130); SPF 级 ICR 雄性小鼠,体质量 (18 ~ 22) g (长春市亿斯实验动物技术有限责任公司,合格证号:SCXK - (吉) - 2011 - 0004) 50 只。

1.2 方法

1.2.1 药物准备 黄秋葵醇提取物 (HQK) 制备: 1 kg 黄秋葵嫩果,冷冻干燥,粉碎,20、15、10 倍量的 70% 乙醇超声提取 3 次,每次 30 min,抽滤,合并滤液,减压浓缩,用真空干燥机干燥的 HQK 367.5 g。分别取 HQK 100、200、400 mg 分别定容到 10 ml 容量瓶中,即得 10、20、40 mg/mL HQK 溶液。

顺铂:精确称取 CDDP 0.2 g,置于 100 mL 容量

瓶中,加入5%羧甲基纤维素钠定容,即得2 mg/mL 顺铂溶液。

1.2.2 实验动物分组 ICR 雄性小鼠 50 只,适应性饲养 7 d 后随机分为空白对照组、模型组、HQK 高、中、低剂量组(100、200、400 mg/kg),每组 10 只,空白对照组和模型组每天灌胃生理盐水,其他给药组分别灌胃相应药物,按 0.1 mL/10 g 剂量给药,共给药 10 d,每次灌胃前记录小鼠体重,计算小鼠顺铂造模前后体重变化率。于给药第 6 天晚上禁食不禁水,第 7 天正常给药 1h 后,除空白对照组灌胃给药 0.1 mL/10 g 顺铂后,继续正常给药 3 d。第 9 天晚上禁食不禁水,第 10 天正常给药 1 h,眼球取血,脊椎处死,取两侧肾脏组织,去包膜脂肪称重,并计算肾脏指数 = (肾脏湿重/体重) × 100%。全血室温静置 30 min 后,3500 r 离心 10 min 分离血清,4℃ 下保存。按照试剂盒说明书分别测定血清 BUN、CRE、MDA、GSH、SOD。取一定量的右肾组织制备 10% 匀浆以备分别测定 MDA、GSH、SOD。另取左肾于

4% 甲醛中固定,切片处理,HE 染色法观察肾组织病理学变化。

1.2.3 统计学方法 采用 SPSS17.0 统计学软件,数据用均值 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$),组间比较采用方差分析,采用 LSD 法进行两两比较。 $P < 0.01$, $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

与空白对照组相比,模型组小鼠少动,毛色稀疏无光泽,饮食饮水量明显下降,体重明显减轻;HQK 给药组(200、400 mg/kg)较模型组,状态明显好转,活动量明显增加,毛色较有光泽,体重略有上升。

2.1 各组体重、脏器指数比较 各组小鼠初始体重无统计学意义。建立模型后,模型组与空白对照组和 HQK 给药组相比,小鼠体重变化率、肾脏系数显著下降;HQK 给药组(200、400 mg/kg)与模型组相比,小鼠体重、肾脏指数变化率显著增加($P < 0.01$, $P < 0.05$),如表 1、表 2 所示。

表 1 HQK 对顺铂所致小鼠体重变化的影响($\bar{x} \pm s$, n = 10)

	造模前体重/g	造模后体重/g	体重变化/g
空白对照组	26.55 ± 1.35	30.21 ± 2.13	3.66 ± 1.43##
模型组	26.16 ± 1.46	25.04 ± 0.51##	-1.13 ± 1.77
HQK 高剂量组	25.15 ± 0.85	29.03 ± 0.37 * *	3.88 ± 0.85 * *
HQK 中剂量组	25.40 ± 0.75	27.65 ± 0.29 * *	2.25 ± 0.71 * *
HQK 低剂量	26.10 ± 1.39	26.46 ± 0.58 *	0.36 ± 1.32

表 2 HQK 对顺铂所致小鼠肾脏重量和肾脏指数的影响($\bar{x} \pm s$, n = 10)

	造模后体重/g	肾重/g	脏器指数/%
空白对照组	30.21 ± 2.13	0.54 ± 0.05	1.82 ± 0.29
模型组	25.04 ± 0.51##	0.38 ± 0.03##	1.53 ± 0.14#
HQK 高剂量组	29.03 ± 0.37 * *	0.50 ± 0.06 * *	1.71 ± 0.22
HQK 中剂量组	27.65 ± 0.29 * *	0.45 ± 0.06 *	1.63 ± 0.22
HQK 低剂量	26.46 ± 0.58 *	0.43 ± 0.05	1.61 ± 0.20

与空白组, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$; 与模型组, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

2.2 各组血清 BUN、CRE 比较 模型组与空白对照组相比 BUN 和 CRE 均显著升高,分别是空白对照组的 1.4 和 1.5 倍;与模型组相比,HQK 高剂量组 BUN 和 CRE 分别降低了 26% 和 32%;HQK 中剂量组分别降低了 14% 和 21%;HQK 低剂量组分别降低了 9% 和 16%,如表 3 所示。

表 3 HQK 对顺铂所致小鼠血清 BUN、CRE 影响($\bar{x} \pm s$, n = 10)

	BUN	CRE
空白对照组	6.44 ± 0.44	19.83 ± 1.54
模型组	9.02 ± 0.60##	30.25 ± 5.54##
HQK 高剂量组	6.67 ± 0.58 * *	20.64 ± 1.84 * *
HQK 中剂量组	7.28 ± 0.66 * *	23.95 ± 3.48 * *
HQK 低剂量	8.18 ± 0.46 *	25.51 ± 1.76 *

与空白组, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$; 与模型组, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

2.3 各组血清、肾组织的MDA、GSH、SOD比较与空白对照组相比,模型组血清与肾组织丙二醛(MDA)均显著升高27%和58%;谷胱甘肽(GSH)显著性降低19%和41%;超氧化物歧化酶(SOD)均显著性降低28%和40%。各给药组与模型组相比,HQK高、中、低剂量组血清与肾组织中MDA均显著性降低24%、17%、13%与31%、24%、14% ($P < 0.01, P < 0.05$); HQK高、中剂量组血清与肾组织中GSH均有显著性升高1.17倍、1.15倍与1.52倍、1.23倍 ($P < 0.01, P < 0.05$); HQK高、中剂量组血清与肾组织中SOD均有1.32倍、1.07倍与1.65倍、1.28倍增加,呈显著性差异 ($P < 0.01, P < 0.05$),证明HQK高、中剂量可以改善抗氧化性指

标,缓解肾组织损伤程度,如图1所示。

2.4 黄秋葵对小鼠肾脏组织形态学影响 空白对照组小鼠肾脏呈鲜红色,表面光滑。模型组小鼠的肾脏呈灰白色,表面粗糙,有水泡样密集小点。HQK给药组小鼠的肾脏呈暗红色,表面稍有粗糙,个别小鼠有水泡样的小点。选择“2.3”“2.4”项下作用较明显组小鼠的肾脏进行HE染色。如图2可见:与空白对照组比较,模型组小鼠的肾脏组织有明显的肾小管腔阻塞出血,管腔扩张,肾小管上皮见扁平细胞,细胞核大片固缩。与模型组相比,HQK给药组小鼠肾脏病理变化均有所改善;HQK高剂量组没有明显的肾小管腔阻塞出血,肾小管排列规则,少量细胞核固缩,变性坏死现象减轻。

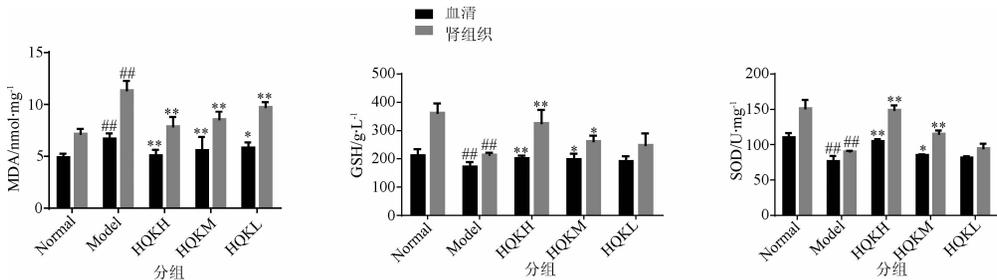


图1 黄秋葵醇提物对小鼠血清及肾脏组织中MDA、GSH、SOD的影响

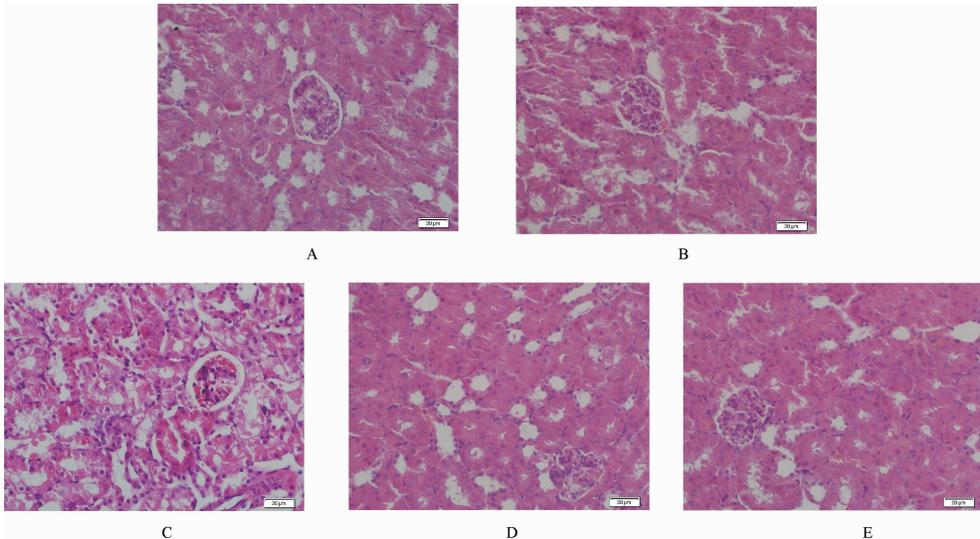


图2 空白对照组(A)、CDDP模型组(B)、黄秋葵高剂量组(C)、黄秋葵中剂量组(D)、黄秋葵低剂量组(E)结果图(HE×400)

3 讨论与小结

顺铂(CDDP)为临床上常用于治疗实体肿瘤且有效的化疗药物,但是其对正常组织中有严重的副作用,限制其在临床中的应用。其副作用有耳毒性、胃肠道毒性、骨髓抑制、变态反应及急性肾功

能损伤^[7-8],其中急性肾损伤最常见。有研究表明CDDP对肾脏损伤的最主要的原因可能是氧化应激损伤,因此,探索一种具有抗氧化作用的天然药物,并且能够降低顺铂致肾毒性和保护肾功能损伤状况的药物具有重要意义。近年来,学者们对黄秋葵

活性成分进行了许多研究,周兆祥^[9]研究表明黄秋葵茶叶富含黄酮、多糖等活性成分,具有较好抗氧化能力。刘爱静^[10]等黄秋葵中黄酮成分具有较强的自由基清除能力及还原能力。进而,对黄秋葵醇提取物对顺铂诱导急性肾损伤的保护作用提供了重要理论依据。

本试验中血清中 BUN 和 CRE 的浓度在于机体氮的分解代谢和肾脏的排泄功能有关,在一定程度上 BUN 和 CRE 的浓度可以反映肾小球滤过率功能的损伤程度,脏器指数的变化可以有效的反映药物对该器官的毒性作用^[11]。结果表明,黄秋葵醇提取物高剂量肌酐(BUN)和尿素氮(CRE)均显著性降低,对肾小球有一定的保护作用。

血清和肾脏组织中的丙二醛(MDA)和超氧化物歧化酶(SOD)测定相互结合^[12],MDA 的高低间接反映了机体细胞受自由基攻击的严重程度,而 SOD 又间接的反映了机体清除自由基的能力^[13]。并且血清与肾脏组织中的谷胱甘肽(GSH)是一种低分子清除剂,缺乏或耗竭 GSH 会促使 CDDP 对肾脏的急性损伤或加重其中毒作用^[14]。本试验中黄秋葵醇提取物高剂量组中,血清与肾脏组织的 MDA 显著性降低,GSH 和 SOD 显著性增加($P < 0.01$)。黄秋葵醇提取物可以减轻 CDDP 引起氧化应激的损伤,降低其中毒作用。并通过观察苏木精-伊红(HE)病理切片组织病理学变化,认为黄秋葵醇提取物高剂量对 CDDP 致急性肾损伤有一定的保护作用,其保护机制需进一步研究。

参考文献:

- [1] Dasari S, Tchounwou P B. Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action [J]. *Eur J Pharmacol*, 2014, 740: 364 - 378.
- [2] Chirino Y I, Pedraza - Chaverri J. Role of oxidative and nitrosative stress in cisplatin - induced nephrotoxicity [J]. *Exp Toxicol Pathol*, 2009, 61(3): 223 - 242.
- [3] Santos N A G, Catao C S, Martins N M, *et al*. Cisplatin - induced nephrotoxicity is associated with oxidative stress, redox state unbalance, impairment of energetic metabolism and apoptosis in rat kidney mitochondria [J]. *Archives of Toxicology*, 2007, 81(7): 495 - 504.
- [4] 中国科学院"中国植物志"编辑委员会. 中国植物志 [M]. 北京: 科学出版社, 1984, 49(2): 56.
- [5] Santos I F, Santos A M P, Barbosa UA, *et al*. Multivariate analysis of the mineral content of raw and cooked okra (*Abelmoschus esculentus* L.) [J]. *Microchemical Journal*, 2013, 110: 439 - 443.
- [6] 单承莺, 马世宏, 张卫明. 保健蔬菜黄秋葵的应用价值与前景 [J]. *中国野生植物资源*, 2012, 31(2): 68 - 71.
- [7] Sastry J, Kellie S J. Severe neurotoxicity, ototoxicity and nephrotoxicity following high - dose cisplatin and amifostine [J]. *Pediatric Hematology&Oncology*, 2009, 22(5): 441 - 445.
- [8] Arany I, Safirstein R L. Cisplatin nephrotoxicity [J]. *Seminars in Nephrology*, 2003, 23(5): 460 - 464.
- [9] 周兆祥, 白石琦, 邹 焯, 等. 黄秋葵茶叶的成分分析及其水提物的抗氧化活性测定 [J]. *江苏大学学报(医学版)*, 2015, 25(3): 260 - 262.
- [10] 刘爱敬, 廖争争, 郭 琳, 等. 大孔树脂纯化黄秋葵黄酮及其体外抗氧化活性研究 [J]. *食品工业科技*, 2015, 16: 284 - 288.
- [11] Kouki T, Komiya I, Masuzaki H. The ratio of the blood urea nitrogen/creatinine index in patients with acute renal failure is decreased due to dextran or mannitol [J]. *Internal Medicine*, 2010, 49(49): 223 - 226.
- [12] 连燕娜, 高丽萍. 益气补肾方药对顺铂致大鼠肾毒性及顺铂抗肿瘤活性影响 [J]. *中国临床药理学与治疗学*, 2016, 21(1): 51 - 54
- [13] 王 黎, 杨红梅, 陈 洁, 等. 灵芝多糖对顺铂致大鼠肾损伤保护作用的实验研究 [J]. *中成药*, 2003, 25(12): 990 - 993.
- [14] 李昱辰, 仲来福. 姜黄素对顺铂所致大鼠肾毒性的防护作用 [J]. *毒理学杂志*, 2006, 20(2): 91 - 93.

(编辑:陈希)