

氨磷汀预防顺铂所致肾毒性

胡全¹, 张丽慧¹, 耿宝琴^{2a}, 许敬尧^{2b} (1. 杭州师范大学基础医学部药理学教研室, 杭州 310018; 2. 浙江大学医学院, a. 药理学教研室; b. 病理学教研室, 杭州 310058)

摘要:目的 观察氨磷汀对顺铂所致肾毒性的预防性保护作用。方法 随机将大鼠分成 5 组, 即空白对照组, 顺铂 $5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组, 顺铂 $7.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组, 顺铂 $5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ + 氨磷汀 $200 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组和顺铂 $7.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ + 氨磷汀 $200 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组, 分别测定肾脏脏系数、血尿素氮、肌酐水平, 并做肾组织病理学检查。结果 顺铂 $5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 及 $7.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组大鼠 BUN、Cr 值均明显高于对照组和加用氨磷汀组, 差异有显著性 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 氨磷汀组肾脏脏系数明显下降, 病理分级显示氨磷汀肾损害保护率分别为 61.5% 和 56.8%。结论 氨磷汀能有效地预防顺铂所致肾毒性。

关键词: 氨磷汀; 顺铂; 肾毒性; 化疗

中图分类号: R965.3; R979.1

文献标识码: A

文章编号: 1007-7693(2008)05-0382-05

作者简介: 胡全, 女, 讲师

Tel: (0571) 28865673

E-mail: huq0203@yahoo.com.cn

HU Quan¹, ZHANG Li-hui¹, GENG Bao-qin^{2a}, XU Jing-yao^{2b} (1. Department of Pharmacology, Hangzhou Normal University, Hangzhou 310018, China; 2. Medical College of Zhejiang University, a. Department of Pharmacology; b. Department of Pathology, Hangzhou 310058, China)

ABSTRACT:OBJECTIVE Amifostine, a cytoprotector of broad-spectrum, protects normal tissues from the toxic effects of certain anticancer drugs. This study aims to observe the protective effect of amifostine angainst cisplatin-induced nephrotoxicity. **METHODS** Thirty-five Sprague-Dawley rats were randomly divided into 5 groups: control group(0.9% saline solution), cisplatin 5 mg · kg⁻¹ group, cisplatin 7.5 mg · kg⁻¹ group, cisplatin 5 mg · kg⁻¹ + amifostine 200 mg · kg⁻¹ group and cisplatin 7.5 mg · kg⁻¹ + amifostine 200 mg · kg⁻¹ group. Organ coefficient of kidneies, serum BUN, creatinine were measured. Renal histopathological lesions were examined by light microscopy. **RESULTS** Compared with control group and cisplatin 5 mg · kg⁻¹ + amifostine 200 mg · kg⁻¹ or cisplatin 7.5 mg · kg⁻¹ + amifostine 200 mg · kg⁻¹ group, serum BUN and creatinine were significantly elevated in cisplatin 5 mg · kg⁻¹ and cisplatin 7.5 mg · kg⁻¹ groups ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). The organ coefficients of kidneies with amifostine were decreased obviously. The rate of nephroprotection in pathological grade was 61.5% and 56.8%, respectively. **CONCLUSION** Amifostine is able to protect the nephrotoxicity induced by cisplatin.

KEY WORDS: amifostine; cisplatin; nephrotoxicity; chemotherapy

化疗是癌症的主要治疗手段之一。顺铂(cisplatin, c-DDP)是常用的抗癌药,对各种实体瘤均显示出令人信赖的抗癌效果。对已转移的膀胱癌、卵巢癌、睾丸癌、肺癌而言,顺铂的疗效十分显著。但是,动物和人体实验均显示其毒性较大,可产生肾毒性、耳毒性、神经毒性、骨髓抑制等,但其主要剂量依赖性的毒性仍然是肾毒性,大剂量顺铂(> 100 mg · m⁻²)或长期使用均可造成严重的肾损害,甚至出现急性肾功能衰竭,有报道顺铂造成的肾毒性约20%发展为急性肾功能衰竭^[1],这成了增大顺铂临床用量的障碍。因此,如何减轻顺铂所致肾毒性成为基础和临床研究的热点。氨磷汀(amifostine, WR-2721)是一种细胞保护剂,最初用作辐射损伤的放射防护剂,后来发现在化疗中,除中枢神经系统外,氨磷汀可以保护几乎所有的正常组织,减轻化疗药物的毒性,而不降低抗肿瘤药物的疗效^[2]。最近也有骨肉瘤患者接受顺铂和多柔比星治疗,同时合用氨磷汀未显示肾保护作用($P = 0.318$)^[3]。加上氨磷汀的药理学特性尚存在许多争论,因此,本实验对氨磷汀是否有效预防或解救顺铂所致大鼠肾毒性进行观察。

1 材料和方法

1.1 实验动物与分组

Sprague-Dawley(SD)大鼠35只,体重250 g左右,雌雄各半,由中国科学院上海实验动物中心提供。随机分为5组,每组均为7只动物,空白对照组:以无菌生理盐水0.5 mL · 100 g⁻¹腹腔注射;顺铂组(c-DDP)5 mg · kg⁻¹组;c-DDP 7.5 mg · kg⁻¹组;c-DDP 5 mg · kg⁻¹ + 氨磷汀200 mg · kg⁻¹组;c-DDP 7.5 mg · kg⁻¹ + 氨磷汀200 mg · kg⁻¹组。先腹腔注射氨磷汀200 mg · kg⁻¹,30 min后再腹腔注射c-DDP 5 mg · kg⁻¹或7.5 mg · kg⁻¹。

1.2 体重和肾脏脏器系数的测定

分别于实验0,1,3,5 d称体重1次;注射药物5 d后取

血,处死全部动物,测定大鼠肾脏的脏器系数。

1.3 BUN和Cr检测

注射药物后第5天由尾静脉取血,离心后将血清作自动生化检测仪测定。

1.4 组织病理学检查

将双肾横剖,肾组织固定于10%福尔马林液中,经乙醇、二甲苯处理后,用常规石蜡包埋切片,然后用苏木精和伊红(HE)染料进行染色,再在光镜下观察肾脏的病理变化。

1.5 统计

结果以 $\bar{x} \pm s$ 来表示,组间差异用 t 检验。

2 结果

2.1 对体重的影响

各给药组动物自用药后体重均有下降趋势,但统计学上差异不显著,顺铂单用组与顺铂加氨磷汀组相比,差别亦无统计学意义,结果见表1。

表1 顺铂单用及合用氨磷汀对大鼠体重的影响

Tab 1 Influence of cisplatin on body weight with or without amifostine in rats

组别	实验天数(d)大鼠体重/g			
	0	1	3	5
对照	249 ± 58	249 ± 51	248 ± 60	251 ± 48
c-DDP 5 mg · kg ⁻¹	249 ± 61	239 ± 69	225 ± 70	220 ± 69
c-DDP 5 mg · kg ⁻¹ + 氨磷汀 200 mg · kg ⁻¹	249 ± 59	241 ± 56	241 ± 55	237 ± 52
c-DDP 7.5 mg · kg ⁻¹	263 ± 62	255 ± 54	230 ± 41	216 ± 47
c-DDP 7.5 mg · kg ⁻¹ + 氨磷汀 200 mg · kg ⁻¹	250 ± 59	236 ± 53	228 ± 59	226 ± 62

2.2 对肾功能的影响

对血清 BUN 及 Cr 的影响 顺铂 5 mg · kg⁻¹ 及 7.5 mg · kg⁻¹ 组的大鼠在实验第 5 天测定血清 BUN 及 Cr 水平均明显高于正常大鼠,升高的程度与剂量呈正相关。当顺铂 5 mg ·

表2 顺铂单用及合用氨磷汀对大鼠肾功能及脏器系数的影响

Tab 2 Influence of cisplatin on renal function and organ coefficient with or without amifostine in rats

组 别	BUN/mmol · L ⁻¹	升高倍数	Cr/μmol · L ⁻¹	升高倍数	肾脏脏器系数
对照	5.6 ± 1.2		36.8 ± 11.4		6.72 ± 0.40
c-DDP 5 mg · kg ⁻¹	17.7 ± 10.9 ¹⁾	2.2	99.7 ± 47.2 ²⁾	1.7	8.72 ± 1.13 ²⁾
c-DDP 5 mg · kg ⁻¹ + 氨磷汀 200 mg · kg ⁻¹	6.2 ± 0.9 ³⁾	0.1	40.3 ± 16.0 ⁴⁾	0.1	7.17 ± 0.84
c-DDP 7.5 mg · kg ⁻¹	67.8 ± 23.1 ²⁾	11.1	555.3 ± 234.8 ²⁾	14.1	9.89 ± 1.04 ²⁾
c-DDP 7.5 mg · kg ⁻¹ + 氨磷汀 200 mg · kg ⁻¹	7.3 ± 1.0 ¹⁾⁴⁾	0.3	70.6 ± 27.3 ²⁾	0.9	7.37 ± 0.91

注:与对照组相比,¹⁾ P < 0.05, ²⁾ P < 0.01;与相应单用 c-DDP 组相比,³⁾ P < 0.05, ⁴⁾ P < 0.01

Note: ¹⁾ P < 0.05, ²⁾ P < 0.01, compare with control group; ³⁾ P < 0.05, ⁴⁾ P < 0.01, compare with c-DDP alone

2.3 对肾脏脏器系数的影响

大鼠腹腔注射顺铂 5 mg · kg⁻¹ 或 7.5 mg · kg⁻¹ 后肾脏明显肿大,脏器系数与正常大鼠的相比,差别显著,当氨磷汀分别与顺铂 5 mg · kg⁻¹ 及 7.5 mg · kg⁻¹ 合用后,肾脏的脏器系数明显下降,接近正常大鼠。

2.4 对肾脏病理变化的影响

光镜检查,发现对照组及各用药组大鼠的肾脏切片中肾小球均无明显异常,正常对照组大鼠肾脏的肾小管上皮亦无异常,而各用药组的肾脏以肾小管上皮损害为主,且主要位于肾皮质和肾髓质交界处,肾小管上皮呈凝固性或溶解性坏死,表现为细胞核固缩,胞浆嗜酸性,颗粒状,重者核溶解消失,胞浆碎裂呈嗜酸性团块或消失,可为单个散在或呈片块状,严重者出现广泛弥漫性坏死,图 1 显示了不同程度的肾小管上皮细胞坏死。除肾小管上皮坏死外,另一个明显的病变为肾小管管腔内出现匀质的蛋白管型,散在或成片出现或呈弥漫性分布,图 2 是皮质部和髓质部的蛋白管型。根据肾小管坏死及肾小管蛋白管型这两种病变程度的不同,按照以表 3 所示的标准计分来判断肾脏损害的轻重。

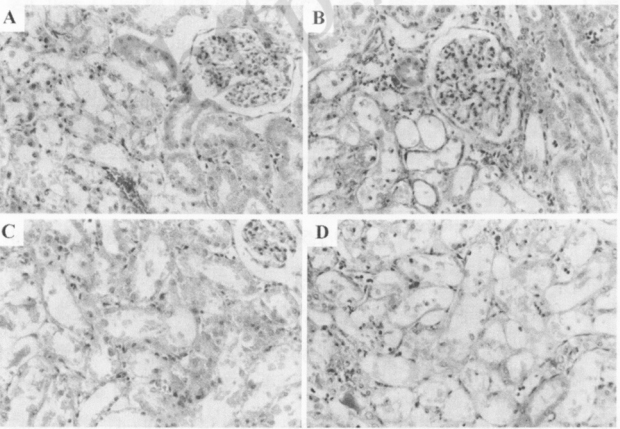


图1 肾小管上皮细胞坏死(HE × 200)

Fig 1 Necrosis of renal tubular epithelial cells (HE × 200)

kg⁻¹ 合用氨磷汀后,BUN 水平明显降低,恢复到正常水平,Cr 水平亦明显下降,且与正常大鼠相仿,顺铂 7.5 mg · kg⁻¹ 与氨磷汀合用时 BUN 及 Cr 水平亦明显降低(P < 0.01),但未恢复到正常大鼠水平,结果见表 2。

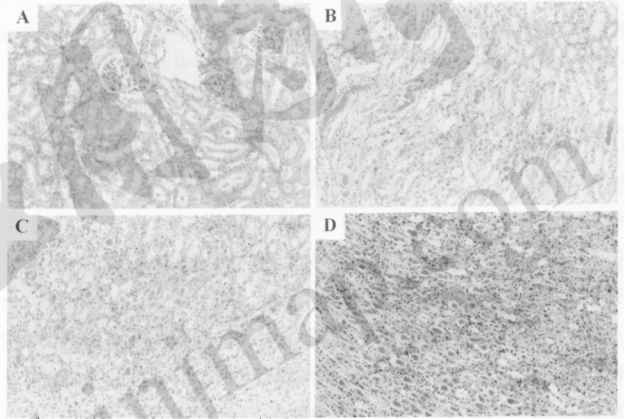


图2 肾小管蛋白管型(HE × 100)

A - 皮质部蛋白管型(1 +);B-D - 骨髓质部蛋白管型(2 +, 3 +, 4 +)

Fig 2 protein casts of renal tubules (HE × 100)

A - protein casts in cortical part (1 +);B-D - protein casts in medullary part (2 +, 3 + and 4 +)

表3 顺铂所致大鼠肾毒性反应的病理分级标准

Tab 3 Pathological grade for cisplatin-induced nephrotoxicity in rats

分级	得分	肾小管坏死	肾小管蛋白管型
0	0	无	无
1	3	散在或小片或片块状	散在小灶性或片状
2	6	呈大片状,占低倍镜视野 2/3	较弥漫分布,局部区域的蛋白管型可占据低倍视野的 1/2
3	9	广泛、弥漫性分布,占据整个低倍视野	弥漫分布,局部区域可占据整个低倍视野

肾脏损害的计分,数字越高代表损害越严重。肾损害保护率的计算方法:

$$\frac{\text{c-DDP 单用组分数} - \text{c-DDP 与氨磷汀合用组分数}}{\text{c-DDP 单用组分数}} \times 100\%$$

经光镜检查,应用顺铂 5 mg · kg⁻¹ 或 7.5 mg · kg⁻¹ 的大鼠肾脏出现明显肾小管上皮坏死,大量肾小管蛋白管型,其

中尤以高剂量组为重,见图 1D 和图 2D。当分别合用氨磷汀 200 mg · kg⁻¹后,病变明显减轻,如顺铂 5 mg · kg⁻¹加氨磷汀组有一半动物的肾小管无病变。从肾脏病理损害分级来

表 4 顺铂单用及合用氨磷汀对大鼠肾脏病理分级的影响

Tab 4 Influence of c-DDP on pathological grade with or without amifostine in rats

组 别	肾损害分级				总分	保护率/%
	0 级(0 分)	1 级(3 分)	2 级(6 分)	3 级(9 分)		
对照	14(0)				0	
c-DDP 5 mg · kg ⁻¹	0(0)	5(15)	6(36)	3(27)	78	
c-DDP 5 mg · kg ⁻¹ + 氨磷汀 200 mg · kg ⁻¹	7(0)	4(12)	3(18)	0(0)	30	61.5
c-DDP 7.5 mg · kg ⁻¹	0(0)	2(6)	1(6)	11(99)	111	
c-DDP 7.5 mg · kg ⁻¹ + 氨磷汀 200 mg · kg ⁻¹	2(0)	8(24)	4(24)	0(0)	48	56.8

3 讨 论

顺铂是细胞周期非特异性肿瘤化疗药物,在机体能耐受的情况下,剂量越大,其对肿瘤的杀伤力也越大,但其毒性也加大,尤其是剂量依赖性的肾毒性,这与顺铂以原形从肾脏清除有关。因此,为了减轻顺铂所致肾毒性,提高疗效,一方面是不断开发低毒高效的铂类化合物,最近,一项研究显示第二代铂类化合物 nedplatin(15 mg · kg⁻¹)造成的肾损害程度要比顺铂(7.5 mg · kg⁻¹)轻^[4];另一方面则是积极寻找能保护正常细胞而不影响疗效的药物,如各种抗氧化剂维生素 C 和维生素 E、硒、还原型谷胱甘肽、含硫化合物硫代硫酸钠等。最近,还发现一氧化氮供体精氨酸可提高顺铂治疗指数,产生肾保护效应^[5]。但这些方法不够理想,维生素 E 疗程长达 3 个月,同时予维生素 C、维生素 E 和硒也未见明显肾保护作用^[6]。氨磷汀是从 4000 多种化合物中筛选出的一种前体药物,本身并无细胞保护作用,经碱性磷酸酶催化产生活性代谢产物 WR-1065,后者可结合烷化剂及铂类化合物的活化代谢产物,清除自由基,从而产生解毒作用,减轻肾毒性、心脏毒性、骨髓抑制等。

本研究结果显示,顺铂单用或合用氨磷汀后,大鼠体重虽呈下降的趋势,但统计学上差异不显著,但顺铂组肾脏的绝对重量和相对重量即肾脏脏系数均增大,与对照组相比 $P < 0.01$ 。作为药物安全性评价的一种必要的检测指标,脏器系数的变化反映了药物毒性的变化,从本实验结果看,合用氨磷汀 200 mg · kg⁻¹后,肾脏脏系数明显下降,提示氨磷汀有减轻顺铂所致肾毒性的作用。

另外发现,顺铂 5 mg · kg⁻¹ 及 7.5 mg · kg⁻¹ 组,作为检测肾功能损害常用指标的 BUN 和 Cr 值均高于正常,说明此时有效肾单位的 60% ~ 70% 已受损害,且剂量越大,肾损害越严重,本实验第 5 天达最高峰,这与病理切片中肾组织细胞坏死的程度完全吻合。而在使用大剂量顺铂前 30 min,腹腔注射氨磷汀 200 mg · kg⁻¹,各异常增高的指标均下降,这表明氨磷汀可对顺铂引起的肾损害有一定的保护作用。

病理学检查发现肾毒性损伤主要发生于肾皮质髓质交界处肾近端小管直段的上皮细胞,与文献报道一致,呈散在或片状的坏死,在肾小管管腔生成匀质的蛋白管型。本实验

看,氨磷汀 200 mg · kg⁻¹ 分别与顺铂 5 mg · kg⁻¹ 或 7.5 mg · kg⁻¹ 合用后对肾脏病理学保护率分别达 61.5% 和 56.8%。见表 4。

根据坏死和蛋白管型出现的多少及损害程度进行病理学分级评分,定量比较各实验组肾损害的程度,所得结果显示氨磷汀明显地减轻了顺铂所致肾毒性。

氨磷汀对顺铂所致肾毒性的保护作用,与其吸收和转化的特性有关。正常组织细胞对氨磷汀有较高的摄取率,并能更快地活化氨磷汀形成 WR-1065,肝脏、肾脏、骨髓、唾液腺和心脏中 WR-1065 可保持较高的药物浓度,相反肿瘤组织中浓度很低,正常组织和肿瘤组织中药物浓度相差 50 ~ 100 倍^[7],而且两者的浓度在 1 h 内保持 10 倍之差。此外,氨磷汀在人体内的分布半衰期和消除半衰期都非常短 ($t_{1/2\alpha} < 1$ min, $t_{1/2\beta} = 8.8$ min),90% 的药物在 6 min 内从血浆中清除,而大多数抗肿瘤药包括顺铂在内的半衰期相对较长,有报道在使用顺铂后 30 min 使用该药,则无肾脏保护作用。本实验也证实,在给药前 30 min 预先给予单剂量的氨磷汀 200 mg · kg⁻¹,显示了一定的预防性的肾保护作用。WR-1065 能防止铂-DNA 复合物形成,但只能轻度减少已形成的铂-DNA 复合物,这也提示氨磷汀的肾保护作用是预防而不是解救,同时也提示氨磷汀的最佳应用时间是在顺铂之前。

氨磷汀对顺铂所致肾毒性的保护作用,与给药时间有关。Asna 等^[8]选择不同的时间给药,结果显示上午 8 时予氨磷汀则 BUN 下降明显,肾保护作用最大;同时逆转顺铂的骨髓抑制效应,因此建议上午给药。今后可通过采取适当的给药方案或改变剂型、给药途径,提高氨磷汀的生物利用度,使氨磷汀的剂量增加,最大限度地保护机体正常组织器官,降低化疗不良反应。

近年来认为氨磷汀细胞保护作用是通过抑制细胞凋亡实现的。有研究证实氨磷汀可激活 NF- κ B/Rel 转录因子, P53 蛋白、AP-1 转录因子的激活也与氨磷汀抑制细胞凋亡有关^[9-10]。已有实验证明顺铂能诱导肾小管上皮的凋亡,氨磷汀减轻肾毒性是否与其抑制凋亡信号传导通路有关,还有待进一步的研究证实。

REFERENCES

[1] BERNS J S, FORD P A. Renal toxicities of antineoplastic drugs and bone marrow transplantation[J]. Semin Nephrol, 1997, 17 (1): 54-66.

- [2] LEWIS C. A review of the use of chemoprotectants in cancer chemotherapy[J]. Drug Saf, 1994, 11(3):153-162.
- [3] SERGIO G C, ARMANDO M A, ALEJANDRO M B, *et al.* Toxicity prevention with amifostine in pediatric osteosarcoma patients treated with cisplatin and doxorubicin [J]. Pediat Hematol Oncol, 2007, 24(6):403-408.
- [4] UEHARA T, WATANABE H, ITOH F, *et al.* Nephrotoxicity of a novel antineoplastic platinum complex, nedplatin: a comparative study with cisplatin in rats[J]. Arch Toxicol, 2005, 79(8): 451-460.
- [5] SALEH S, EI-DEMERDASH E. Protective effects of L-arginine against cisplatin- induced renal oxidative stress and toxicity: role of nitric oxide[J]. Basic Clin Pharmacol Toxicol, 2005, 97(2): 91-97.
- [6] WEIJL N I, ELSEENDOORN T J, LENTJES E G, *et al.* Supplementation with antioxidant micronutrients and chemotherapy induced toxicity in cancer patients treated with cisplatin-based chemotherapy: a randomized, double-blind, placebo-controlled study[J]. Eur J Cancer, 2004, 40(11):1713-1723.
- [7] KEMP G, ROSE P, LURAIN J, *et al.* Amifostine pretreatment for protection against cyclophosphamide-induced and cisplatin-induced toxicities results of a randomized control trial in patients with advanced ovarian cancer[J]. J Clin Oncol, 1996, 14(9): 2101-2112.
- [8] ASNA N, LEWY H, ASHKENAZI I E, *et al.* Time dependent protection of amifostine from renal and hematopoietic cisplatin induced toxicity[J]. Life Sci, 2005, 76(16):1825-1834.
- [9] ROMANO M F, LAMBERTI A, BISOGNI R, *et al.* Amifostine inhibits hematopoietic progenitor cell apoptosis by activating NF-kappaB/Rel transcription factors[J]. Blood, 1999, 94(12): 4060-4066.
- [10] SHEN H S, CHEN Z J, ZILFOU J T, *et al.* Binding of the aminothiol WR-1065 to transcription factors influences cellular response to anticancer drugs[J]. J Pharmacol Exp Ther, 2001, 297(3):1067-1073.

收稿日期:2008-04-23