

番茄红素及维生素 E 和 C 合用对庆大霉素大鼠肾毒性 预防作用的比较

汪延辉*, 刘毅, 郭利明, 吕吟秋, 李凡凡, 徐玉兰
(温州医学院附属第一医院肾内科, 浙江温州 325000)

摘要:目的 比较番茄红素及维生素(Vit) E 和 Vit C 合用对庆大霉素大鼠肾毒性的预防作用。方法 雄性 SD 大鼠给予庆大霉素 $140 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ (ip), 连续 7 d。预防组同时予以番茄红素 $20 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ (ig) 或 Vit E $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 和 Vit C $200 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ (ig)。给药 7 d 后, 测定大鼠血清尿素氮(BUN)、血肌酐(SCr)和尿肌酐含量, 计算肌酐清除率(CCr); 测定尿 *N*-乙酰- β -D-氨基葡萄糖苷酶(NAG)活性, 肾组织中超氧化物歧化酶(SOD)和过氧化氢酶(CAT)活性及丙二醛(MDA)含量; HE 染色观察肾脏病理改变。结果 与正常对照组比较, 庆大霉素组大鼠血清 BUN 和 SCr 含量升高, CCr 降低, 尿 NAG 活性升高, 肾组织 MDA 水平增加, SOD 和 CAT 活性降低, 肾脏病理改变明显。给予番茄红素, 或 Vit E 和 Vit C 合用明显减轻上述改变, 番茄红素的作用较 Vit E 和 Vit C 合用更为明显。结论 番茄红素及 Vit E 和 Vit C 合用均可能通过抗氧化应激作用减轻庆大霉素大鼠肾毒性, 番茄红素的作用可能优于 Vit E 和 Vit C 合用。
关键词: 庆大霉素; 番茄红素; 维生素 E; 维生素 C; 肾/毒性; 超氧化物歧化酶; 丙二醛

中图分类号: R977.2, R595.3

文献标识码: A

文章编号: 1000-3002(2008)06-0436-04

DOI: 10.3867/j.issn.1000-3002.2008.06.007

庆大霉素(gentamicin)是一种典型的氨基糖苷类抗生素, 广泛应用于革兰阴性细菌感染的治疗, 然而, 由于其肾毒性在临床应用上受到了限制。庆

大霉素致肾毒性的机制仍不完全清楚, 体内、体外研究表明, 庆大霉素可增加反应性氧化产物的生成, 通过脂质过氧化引起肾功能的改变^[1-2]。研究表明, 番茄红素(lycopene)、维生素(vitamin, Vit) E 和 Vit C 均具有抗氧化作用, 有助于预防各种氧化损伤, 保护组织和细胞^[3-5]。国内尚无关于番茄红素、Vit E 和 Vit C 对庆大霉素肾毒性影响的报道。本研究观察番茄红素及 Vit E 和 Vit C 合用对庆大霉素肾毒性的预防作用。

1 材料与方法

1.1 动物、药品与试剂

SD 大鼠, 雄性, 体重 200 ~ 250 g, SPF 级, 温州医学院实验动物中心提供。硫酸庆大霉素注射液和 Vit C 片购自浙江瑞新药业股份有限公司; 番茄红素购自威海麦金利新资源食品有限公司; Vit E 胶丸购自浙江医药股份有限公司新昌制药厂。丙二醛(malondialdehyde, MDA)含量、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)及过氧化氢酶(catalase, CAT)活性测试盒购自南京建成生物工程研究所。

1.2 动物分组及给药

32 只大鼠随机分为 4 组, 每组 8 只, 实验过程中无死亡。正常对照组, 每天给予等体积生理盐水, ip, 共 7 d。庆大霉素组每天给予庆大霉素 $140 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, ip, 共 7 d。番茄红素预防组, 每天给予庆大霉素 $140 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, ip, 同时给予番茄红素 $20 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, ig, 共 7 d。Vit E 和 Vit C 合用预防组, 每天给予庆大霉素 $140 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, ip, 同时给予 Vit E $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 和 Vit C $200 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, ig, 共 7 d。实验 d 7 注射结束后将大鼠放入代谢笼中留取 24 h 尿标本。于 d 8 以盐酸氯胺酮注射液 $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 麻醉大鼠, 经右心室取血, 以 $400 \times g$ 离心 10 min 后取血清, -20°C 贮存待检。取双侧肾脏, 部分置 4% 甲醛

收稿日期: 2008-02-26 接受日期: 2008-07-09

基金项目: 温州市科学技术局资助课题(2005A081)

作者简介: 汪延辉(1975-), 男, 河南省郑县人, 医学硕士, 主要从事急、慢性肾功能衰竭的研究。

* 联系作者 E-mail: wyh@hosp1.ac.cn Tel: 13587429352

中固定,余下部分置液氮速冻后 -80°C 冰箱保存,待测。

1.3 血清、尿生化及肾组织指标测定

全自动生化分析仪测定血清肌酐、尿素氮及尿肌酐,并计算肌酐清除率($\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$)[尿肌酐浓度($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) \times 每分钟尿量($\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$)/血肌酐浓度($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)];尿 N -乙酰- β - D -葡萄糖苷酶(N -acetyl- β - D -glucosamidase, NAG)采用PNP-NAG两点法测定;肾组织中MDA含量、SOD和CAT活性测定按试剂盒说明书操作;考马斯亮蓝法测定肾组织蛋白的含量。

1.4 肾脏组织病理学检测

肾组织标本用4%甲醛固定过夜,常规脱水,透明,石蜡包埋,切成 $3\mu\text{m}$ 厚的切片,HE染色观察肾脏病理改变。

1.5 统计学方法

数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用SPSS12.0统计软件分析,组间均数比较采用单因素方差分析,均数间的两两比较用 q 检验。

2 结果

2.1 大鼠血清尿素氮、肌酐、肌酐清除率和尿NAG的变化

由表1可见,与正常对照组相比,庆大霉素组大鼠尿素氮、血肌酐水平及尿NAG活性均显著升高,肌酐清除率显著下降;与庆大霉素同时给予Vit E和Vit C,上述指标较庆大霉素组有所改善,但与正常对照组比较仍有较大差异;与庆大霉素同时给予番茄红素,可以显著减轻庆大霉素所致肾功能损伤,上述各项指标接近正常对照组水平,作用显著强于Vit E和Vit C组合用。

2.2 大鼠肾组织中MDA水平、CAT和SOD活性变化

由表2可见,与正常对照组相比,庆大霉素组大鼠肾组织中MDA水平显著升高,CAT和SOD活性显著下降;与庆大霉素组相比,给予番茄红素或Vit E和Vit C合用组大鼠肾组织中MDA水平显著下降,CAT和SOD活性显著升高;番茄红素的作用与Vit E和Vit C合用比较,无显著差异($P>0.05$)。

Tab 1. Effects of lycopene (LP) and combination of vitamin (Vit) E and Vit C on renal function injury induced by gentamicin (GM) in rats

Group	BUN/ $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$	SCr/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	CCr/ $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$	NAG/ $\text{U}\cdot\text{d}^{-1}$
Normal	6.3 ± 0.7	28 ± 3	1.49 ± 0.38	0.48 ± 0.08
GM	$20.6\pm 7.2^{**}$	$114\pm 53^{**}$	$0.58\pm 0.24^{**}$	$3.19\pm 0.75^{**}$
GM + LP	$8.7\pm 1.8^{*##}$	$45\pm 14^{*##}$	$1.12\pm 0.29^{*#}$	$1.25\pm 1.03^{##}$
GM + Vit E + Vit C	$14.5\pm 4.4^{**\#\Delta}$	$78\pm 16^{**\#\Delta}$	$0.83\pm 0.30^{**\#\Delta}$	$2.04\pm 0.86^{**\#\Delta}$

Normal: normal saline, ip, once daily for 7 d; GM: GM $140\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, ip, once daily for 7 d; GM + LP: as group GM with simultaneous LP $20\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$, ig; GM + Vit E + Vit C: as group GM with simultaneous co-supplementation of Vit E $50\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ and Vit C $200\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$, ig. BUN: blood urea nitrogen; SCr: serum creatinine; CCr: creatinine clearance rate; NAG: N -acetyl- β - D -glucosamidase in urine collected for 24 h. $\bar{x}\pm s$, $n=8$. * $P<0.05$, ** $P<0.01$, compared with normal group; # $P<0.05$, ## $P<0.01$, compared with GM group; Δ $P<0.05$, compared with GM + LP group.

Tab 2. Effects of lycopene and combination of Vit E and Vit C on malondialdehyde (MDA) level, superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) activities in renal tissue of rats injured by gentamicin

Group	MDA/ $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ protein	CAT/ $\text{kU}\cdot\text{g}^{-1}$ protein	SOD/ $\text{kNU}\cdot\text{g}^{-1}$ protein
Normal	0.89 ± 0.27	6.5 ± 1.4	5.8 ± 0.5
GM	$1.81\pm 0.16^{**}$	$2.7\pm 1.2^{**}$	$3.2\pm 0.4^{**}$
GM + LP	$1.19\pm 0.21^{*#}$	$4.1\pm 1.2^{**\#}$	$4.4\pm 0.5^{**\#}$
GM + Vit E + Vit C	$1.47\pm 0.15^{**\#}$	$3.5\pm 1.1^{**\#}$	$3.9\pm 0.4^{**\#}$

See Tab 1 for the treatments. NU: nitrite unit. $\bar{x}\pm s$, $n=8$. * $P<0.05$, ** $P<0.01$, compared with normal group; # $P<0.05$, compared with GM group.

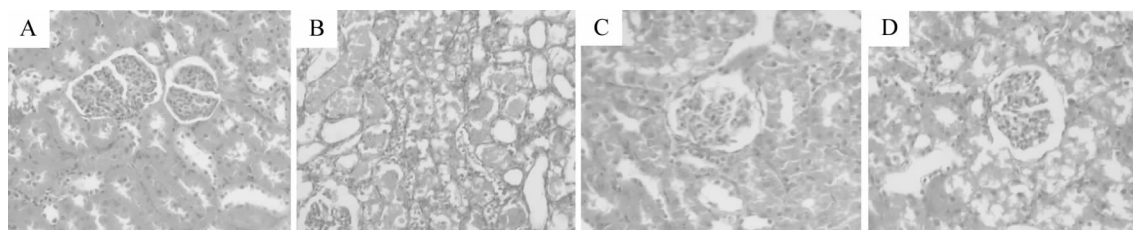


Fig 1. Effects of lycopene and combination of Vit E and Vit C on gentamicin-induced nephrotoxicity (HE staining, $\times 400$). See Tab 1 for the treatments. A: normal; B: GM; C: GM + LP; D: GM + Vit E + Vit C.

2.3 大鼠肾脏组织的病理变化

图 1 显示, 各组大鼠肾小球和肾血管无明显病变。庆大霉素组中可见近端肾小管上皮细胞崩解、脱落, 细胞碎屑阻塞管腔, 基底膜裸露, 管腔中可见透明管型。给予番茄红素组仅见单个细胞坏死和轻微的退行性改变; Vit E 和 Vit C 合用组可见片状肾小管上皮细胞空泡变性。

3 讨论

氨基糖苷类抗生素包括庆大霉素可引起严重的肾毒性。本研究连续 7 d 腹腔注射庆大霉素 $140 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, 导致大鼠产生明显的肾毒性, 表现为血肌酐和尿素氮显著升高, 肌酐清除率下降; 24 h 尿 NAG 酶活性显著升高反映了溶酶体的损伤和近曲小管受损。这些生化参数的改变与组织学的改变一致。组织学观察, 光镜下可见大鼠近端肾小管上皮细胞崩解、脱落, 细胞碎屑阻塞管腔, 基底膜裸露, 管腔中透明管型形成。

庆大霉素肾毒性的确切机制尚不明确。庆大霉素主要损害近端肾小管, 与细胞壁磷脂结合, 阻断磷脂酰肌醇的链式反应, 损伤细胞的完整性。一些研究表明, 反应性氧化产物的产生参与了庆大霉素肾毒性的发生过程^[1,6]。自由基攻击生物膜中的多不饱和脂肪酸, 引发脂质过氧化作用, 并因此形成脂质过氧化物。MDA 是组织中脂质过氧化终产物, 其含量可反映机体内脂质过氧化的程度。本研究表明, 庆大霉素注射后, 大鼠肾组织中 MDA 水平显著升高, CAT 和 SOD 活性明显下降, 表明氧化损伤参与了庆大霉素的肾毒性, 与文献[1]报道的结果一致。

抗氧化剂的种类很多, 包括类胡萝卜素、Vit E 和 Vit C 等, 可清除自由基, 防止自由基对人体组织细胞的损害。番茄红素是一种主要的类胡萝卜素, 主要从番茄提取而来, 结构中含有 11 个共轭双键及

2 个非共轭碳-碳双键, 可通过物理和化学的方式来清除活性氧。物理方式是将活化能由单线态氧转至番茄红素, 产生基态氧和活化了的三重态番茄红素, 将多余的能量以热的形式散发出去, 再产生基态番茄红素, 加入下一个循环, 这是番茄红素直接猝灭单线态氧的主要方式。化学方式是番茄红素可以和过氧化氢和二氧化氮等活性氧碎片直接反应, 从而清除氧自由基^[5]。Vit E 是一种主要的内源性抗氧化物, 通过与氧自由基反应阻止自由基链式反应来保护细胞膜。然而, 当与氧自由基发生反应时, 内源性 Vit E 逐渐减少, 由于 Vit E 可通过 Vit C 重复循环, Vit C 的给予补足了 Vit E 的储存。本研究在注射庆大霉素的同时给大鼠口服番茄红素或 Vit E 和 Vit C 合用, 大鼠血肌酐、尿素氮和尿 NAG 水平均显著下降, 肾组织中 MDA 水平下降, CAT 和 SOD 活性升高, 组织形态学损伤显著改善。番茄红素预防组较 Vit E 和 Vit C 合用组改善更为明显, 表明番茄红素及 Vit E 和 Vit C 合用均具有抗氧化应激保护作用, 且番茄红素的作用可能优于 Vit E 和 Vit C 合用。据报道, 番茄红素的抗氧化作用是 β 胡萝卜素的 2 倍, 是 Vit E 的 100 倍^[7]。因此, 考虑增加 Vit E 的剂量有可能得到与番茄红素同样的保护作用。Kadkhodae 等^[8]在原位分离的大鼠肾脏模型中, 观察到 Vit E 和 Vit C 合用显著减轻庆大霉素引起的肾毒性。

综上所述, 番茄红素或 Vit E 和 Vit C 合用可以通过抗氧化应激作用而减轻庆大霉素所致肾毒性。其确切机制待进一步研究。

4 参考文献:

- [1] Parlakpınar H, Tasdemir S, Polat A, Bay-Karabulut A, Vardi N, Ucar M, *et al.* Protective role of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) on gentamicin-induced acute

- renal toxicity in rats[J]. *Toxicology*, 2005, **207**(2): 169-177.
- [2] Du ZP, Du XH, Liu J, Chen W, Wang H, Luo J, et al. Role of reactive oxygen metabolites (ROM) in gentamicin nephrotoxicity in rats and the protective of ROM scavengers[J]. *Chin J Nephrol*(中华肾脏病杂志), 1996, **12**(2):97-100.
- [3] Kadkhodae M, Khastar H, Arab HA, Ghaznavi R, Zahmatkesh M, Mahdavi-Mazdeh M. Antioxidant vitamins preserve superoxide dismutase activities in gentamicin-induced nephrotoxicity [J]. *Transplant Proc*, 2007, **39**(4):864-865.
- [4] Atessahin A, Yilmaz S, Karahan I, Ceribasi AO, Karaoglu A. Effects of lycopene against cisplatin-induced nephrotoxicity and oxidative stress in rats[J]. *Toxicology*, 2005, **212**(2-3):116-123.
- [5] Du JR, Yao Y, Yu Y. The biological activities and applications of lycopene[J]. *Chin Pharm J*(中国药学杂志), 2006, **41**(6):408-410.
- [6] Wiland P, Szechciński J. Proximal tubule damage in patients treated with gentamicin or amikacin[J]. *Pol J Pharmacol*, 2003, **55**(4):631-637.
- [7] Sies H, Stahl W. Vitamins E and C, beta-carotene, and other carotenoids as antioxidants[J]. *Am J Clin Nutr*, 1995, **62**(6 Suppl):1315S-1321S.
- [8] Kadkhodae M, Khastar H, Faghihi M, Ghaznavi R, Zahmatkesh M. Effects of co-supplementation of vitamins E and C on gentamicin-induced nephrotoxicity in rat[J]. *Exp Physiol*, 2005, **90**(4):571-576.

Effect comparison of lycopene and combination of vitamins E and C on gentamicin-induced nephrotoxicity in rats

WANG Yan-Hui*, LIU Yi, GUO Li-Ming, LÜ Yin-Qiu, LI Fan-Fan, XU Yu-Lan

(Department of Nephrology, the First Affiliated Hospital, Wenzhou Medical College, Wenzhou 325000, China)

Abstract: **AIM** To investigate the possible protective effects of lycopene and combination of vitamin (Vit) E and Vit C against gentamicin-induced nephrotoxicity in rats. **METHODS** Male SD rats were given gentamicin 140 mg·kg⁻¹(ip), gentamicin + lycopene 20 mg·kg⁻¹(ig) and gentamicin + Vit E 50 mg·kg⁻¹ + Vit C 200 mg·kg⁻¹(ig), respectively, once daily for 7 d. Serum creatinine (SCr), blood urea nitrogen (BUN), creatinine clearance rate (CCr) and *N*-acetyl-beta-*D*-glucosamidase (NAG) in urine were assessed, as well as the malondialdehyde (MDA) level, superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) activities in renal tissue were determined. The renal morphology changes were observed by hematoxylin-eosin staining. **RESULTS** Gentamicin induced a significant increment in SCr, BUN, NAG and MDA contents and severe morphology

changes, decreased the renal SOD and CAT activities. Lycopene and combination of Vit E and Vit C significantly reversed the changes mentioned above. And lycopene was superior to combination of Vit E and Vit C. **CONCLUSION** Lycopene and combination of Vit E and Vit C provide marked protective effect against gentamicin-induced nephrotoxicity in rats, which may be related to their antagonistic effects on oxidative stress. Lycopene is more powerful than combination of Vit E and Vit C.

Key words: gentamicin; lycopene; vitamin E; vitamin C; kidney/toxicity; superoxide dismutase; malondialdehyde

Foundation Item: The project supported by Wenzhou Science and Technology Bureau (2005A081)

* Corresponding author.

(本文编辑 付良青)