

顺铂的肾毒性

王翔文¹、张世武、杨 彤¹、邓侠进、许广沅²、李维才

(遵义医学院药理教研室, 病理教研室, 电镜室, 遵义 552000)

摘要 顺铂一次 ip 5 (mg/kg) 和 1 mg/(kg·d) × 5 d 可使大鼠血中尿素氮和血浆肌酐明显增加, 尤以 5 mg/kg 一次给药增加显著; 超微结构观察肾小管上皮细胞变性, 以近曲小管为重。顺铂对大鼠及人胎肾细胞培养的细胞存活率和完整细胞%有抑制作用, 亦可抑制 [³H]TdR 对大鼠肾细胞 DNA 的参入, 提示顺铂的肾毒性可能与抑制肾细胞 DNA 合成有关。

关键词 顺铂; 培养的细胞; 人胎肾; [³H]胸腺嘧啶核苷; 电镜术; 大鼠肾

顺二氯二氨铂 (cis-dichlorodiaminoplatinum) 药名顺铂 (cisplatin), 70 年代初国外已试用于临床, 对某些癌症有良好疗效, 但因对肾脏有毒性, 可引起血尿素氮和血浆肌酐升高, 并有明显蛋白尿, 往往限制临床广泛使用。虽然顺铂对肾脏的毒性已有不少资料⁽¹⁻⁴⁾, 但其毒性机理仍不清楚⁽⁵⁾。近年来我国自制的顺铂也已进入临床试用阶段^(6,7), 尚未见其肾毒性研究的报道。我们进行了实验探讨, 并对其肾毒性机理作了初步分析。

材 料

顺铂系昆明贵金属研究所合成, 乔树民教授惠赠, 用前以生理盐水或 Hank's 液配制; 合成培养液 No.199 由中国科学院生物物理所生化试剂厂生产, 小牛血清由上海食品公司牛羊经营部生产, 胰蛋白酶系新疆伊犁地区生化制药厂出品, 其它试剂均为 AR, 用灭菌双蒸馏水配制。透射电镜为国产 DXB₂-12 型。

1985年4月11日收稿 1986年1月20日修回
本文曾在1984年第三届全国药理学术会议上宣读

¹ 现在大连医学院药理教研室

² 现在大连医学院组胚教研室

方法与结果

对大鼠肾脏的毒性 大鼠 22 只, ♀♂兼用, 体重 113 ± SD 12 g, 随机分为 4 组 ip 顺铂: 1 mg/kg 一次给药组, 1 mg/(kg·d) × 5 d 组, 5 mg/kg 一次给药组, 对照组。各组均于第一次给药后 d 5 测血中尿素氮和血浆肌酐, 并于浅麻醉下剖腹取肾脏作病理及电镜切片。

1. 对肾脏功能的影响 结果如表 1, 除 1 mg/kg 组血中尿素氮和血浆肌酐与对照组无差别外, 其余两组皆有明显升高, 尤以 5 mg/kg 组显著, $p < 0.01$ 。

Tab 1. Effects of cisplatin on blood urea nitrogen (BUN) and serum creatinine of rats. $\bar{x} \pm SD$. * $p > 0.05$, *** $p < 0.01$

Cisplatin (mg/kg)	ip days	Rats	BUN (mmol/l)	Creatinine (μmol/l)
0	0	5	18 ± 3	88 ± 26
1	1	6	20 ± 4*	106 ± 26*
1	5	6	37 ± 10***	150 ± 60*
5	1	5	85 ± 9***	530 ± 70***

2. 对肾脏结构的影响 光镜观察可见肾皮质与髓质交界处的肾小管轻度扩张, 皮质肾小管有水肿样病变, 皮质深层肾小管上皮细胞脱落, 许多管腔可见透明管型, 提示病变以变性为主, 有坏死存在, 以 5 mg/kg 组为重, 全组大鼠均有病变, 1 mg/(kg·d) × 5 d 组半数大鼠肾脏有病变, 1 mg/kg 组仅 1/3 大鼠有轻度病变。

电镜观察 5 mg/kg 组大鼠肾小管各段均有病变, 表现为管腔扩大, 上皮细胞微绒毛减少、变短, 线粒体嵴稀少、基质浅淡, 部分内

外膜破裂, 粗面内质网腔扩大、脱颗粒, 次级溶酶体形不规则, 数量增多。有的上皮细胞核呈染色质边集或固缩。病变主要在近曲小管(图1见图版4), 其次为髓祥细段, 集合管和远曲小管病变轻微, 肾小球无变化。1 mg/(kg·d) × 5 d 组及 1 mg/kg 组超微结构改变依次减轻。

对大鼠和人胎肾细胞的毒性

1. 对完整细胞%和细胞存活率的影响
仿新鲜肾细胞原代培养法⁽⁸⁾, 在无菌条件下摘取 6-8 wk 或 4-5 月龄水囊引产胎儿的肾脏, 制备成 $2-5 \times 10^5/\text{ml}$ 肾细胞悬液, 加入不同浓度的顺铂, 终浓度为: 0.1, 1 和 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 并设空白对照组和 ZnCl_2 阴性对照组, 置 37°C 培养, 计数每 mm^3 内形态完整的肾细胞%, 以染料排斥试验计算肾细胞存活率, 观察顺铂对培养不同时间后肾细胞上述指标的影响。结果发现大鼠及人胎肾细胞培育 1 h 后, 不同浓度顺铂组的完整细胞%及细胞存活率均已明显下降, 与对照组相比 $p < 0.01$, 见图 2。

2. 大鼠肾细胞的 ID_{50} 及 TD_{50} ⁽⁹⁾ 于大鼠肾细胞悬液中加入不同浓度的顺铂, 置 37°C 培育 24 h, 测定细胞悬液中完整细胞%和细胞存活率。根据概率单位分析法, 分别计算出顺铂对大鼠肾细胞 ID_{50} 及 95% 置信限为: 2.82 nmol (2.78-2.86 nmol); TD_{50} 及 95% 置信限为: 28.2 nmol (27.8-28.6 nmol)

对大鼠肾细胞 DNA 合成的影响 给药组(含顺铂 0.1, 1 和 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$)和对照组各有复管 7 个, 肾细胞数 $1 \times 10^5/\text{ml}$, 置 37°C 培育 4 h 后, 立即分别加入 74 kBq [^3H]TdR (比度 370 kBq/mmol), 于 37°C 中保温 8 h, 取出置冰浴

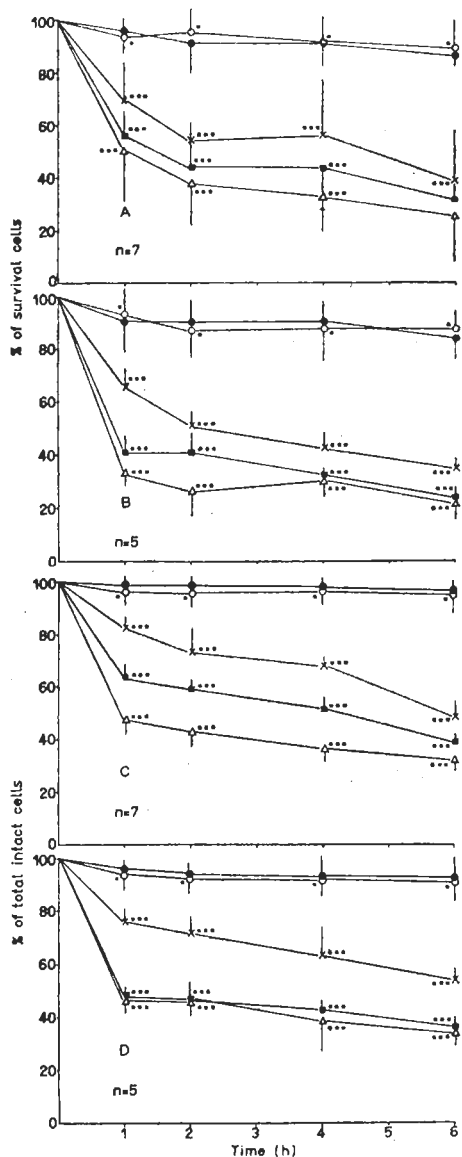


Fig 2. Effect of cisplatin on % of survival cells in primary cell culture of rat (A) and human fetal (B) kidney cells, and on total intact cells in primary cell culture of rat (C) and human fetal (D) kidney cells, (●) control; (○) ZnCl_2 ; (×) cisplatin 0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$; (■) cisplatin 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$; (□) cisplatin 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$. $\bar{x} \pm \text{SD}$. * $p > 0.05$, ** $p < 0.05$, *** $p < 0.01$

Tab 2. Effect of cisplatin on incorporation of [^3H]TdR into DNA of cultured kidney cells of rat. 7 tubes/group. $\bar{x} \pm \text{SD}$. ** $p < 0.05$, *** $p < 0.01$

Cisplatin ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	cpm/ 1×10^5 cells	Incorporation of [^3H]TdR (%)	% of inhibition in DNA synthesis
0	1150 \pm 130	100.0	0
0.1	780 \pm 130**	70.7	29.3
1	670 \pm 110***	60.7	39.3
5	400 \pm 40***	36.1	63.9

中终止反应,以 SSC 液(含 NaCl 150 mmol/L,柠檬酸钠 15 mmol/L)和 5%TCA 洗涤,按 S-T-S 法提取 DNA⁽¹⁰⁾,加入闪烁液,以 YS-A 型闪烁仪测定,实验结果给药组参入比明显小于对照组,差别显著,见表 2

讨 论

本实验结果表明国产顺铂对大鼠肾脏具有明显毒性,病变部位以近曲小管为重,与国外文献记载结果基本一致。值得注意的是发现顺铂亦可引起肾脏髓袢细段病变,这种改变尚未见文献报道。实验所见 5 mg/kg 组肾毒性大于 1mg/(kg·d)×5 d 组,可能与顺铂在血浆中与蛋白结合率高,小剂量单次注射后达到肾脏的药物浓度低有关。

一般药物引起整体动物肾脏功能和形态的损害,继发于该药对肾细胞的毒性。近十年来,细胞培养技术已被广泛用于毒理学实验研究⁽¹¹⁾,我们利用大鼠和人胎肾细胞原代培养法对顺铂作进一步分析,结果说明顺铂对靶细胞具有直接肾毒性作用。虽然血球计数法有一定误差,但从对照组与给药组结果之间的明显差别和给药组之间较好的量效关系,表明新鲜肾细胞原代培养法,只要尽量保持其结构的完整和生理功能的正常,是可以用来分析药物对肾细胞毒性。

[³H]TdR 参入实验结果表明顺铂对肾细胞 DNA 合成有明显抑制作用,可能是造成顺铂肾毒性的原因之一,这与该药能与癌细胞 DNA 形成链间交联和/或链内交联而引起细胞损伤的结果⁽¹²⁾基本一致。

致谢 黄新忠、徐艳丽、王有煜、周晓燕参加有关技术工作

参 考 文 献

- 1 Ward JM, Fauvie KA. The nephrotoxic effects of cis-diamine-dichloroplatinum (NSC-119875) in male F₃₄₄ rats. *Toxicol Appl Pharmacol* 1976; 38 : 535
- 2 Choie DD, Delcampo AA, Guarino AM. Subcellular localization of cis-dichlorodiamineplatinum in rat kidney and liver. *Ibid* 1980; 55 : 245
- 3 Madias NE, Harrington ST. Platinum nephrotoxicity. *Am J Med* 1978; 65 : 307
- 4 Gonzalez-Vitale JC, Hayes DM, Cvitkovic E, Sternberg SS. The renal pathology in clinical trials of cis-platinum diaminedichloride. *Cancer* 1977; 39 : 1362
- 5 Goldstein RS, Mayor GH. The nephrotoxicity of cisplatin. *Life Sci* 1983; 32 : 685
- 6 乔树民. 顺铂治疗癌症的初步研究. *中华肿瘤杂志* 1983; (5) : 51
- 7 蔡桂凤、熊荣超、赵丽娟、乔树民. 顺铂治疗晚期原发性卵巢恶性肿瘤. *肿瘤防治研究* 1984; (11) : 78
- 8 金泰虞、夏元洵. 氯化高汞对离体肾细胞毒性作用的研究. *劳动卫生和环境医学* 1982; (5) : 48
- 9 Gabliks J. Response of cell cultures to insecticides. IV Toxicity of several organophosphates in mouse cell cultures. *Proc Soc Exp Biol Med* 1967; 125 : 1002
- 10 Schmid G, Thannhauser ST. A method for the determination of deoxyribonucleic acid, ribonucleic acid and phosphoproteins in animal tissues. *J Biol Chem* 1945; 161 : 83
- 11 Nardone RM. Toxicity testing *in vitro*. In: Rothblat GH, Cristofalo VJ, eds. *Growth, nutrition and metabolism of cells in culture*; vol 3. NY: Academic Press, 1977 : 471-95
- 12 Zwelling LA, Kohn KW. Mechanism of action of cis-dichlorodiamine platinum. *Cancer Treat Rep* 1979; 63: 1439

Nephrotoxicity of cisplatin

WANG Li-Wen, ZHANG Shi-Wu, YANG Tong, DENG Xia-Jin, XU Guang-Yuan,
LI Wei-Cai

(Depts of Pharmacology, Pathology, and Electron Microscopy, Zun-yi Medical College, Zun-yi 552000)

ABSTRACT A single ip injection 5 mg/kg and 1 mg/(kg·d) × 5 d of cisplatin to rats caused the increases in blood urea nitrogen and serum creatinine. Ultrastructural observation revealed that the degenerative changes in the epithelial cells of tubules were predominantly in the proximal convoluted tubules. These data indicated that the nephrotoxicity after a single ip injection of 5 mg/kg was severer than that after 5 daily injections of 1 mg/kg.

Cisplatin killed the primarily cultured

kidney cells of rat and human fetus, and also inhibited the [³H] TdR incorporation into DNA in kidney cells of rats.

These observations suggest that the nephrotoxicity of cisplatin might be related to its inhibitory effects on the synthesis of DNA in kidney cells.

KEY WORDS cisplatin; cultured cells; human fetal kidney; [³H]thymidine; electron microscopy; rat kidney

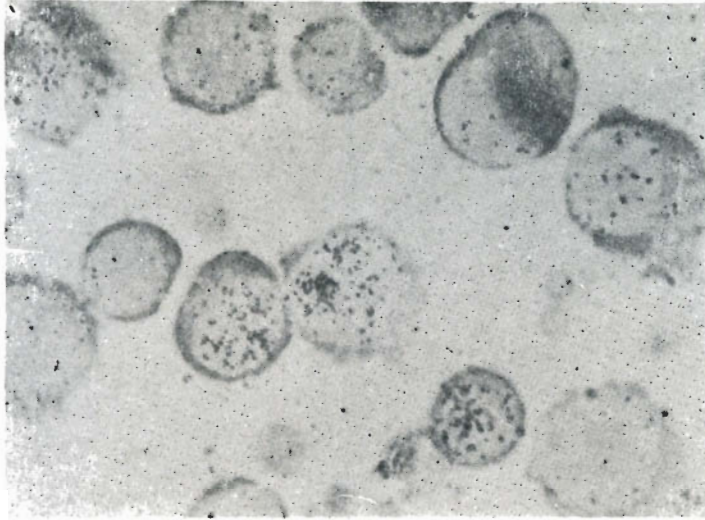


Fig 2. Autoradiography of $[^3\text{H}]\text{TdR}$ incorporation into L1210 cells.

(See p 164)

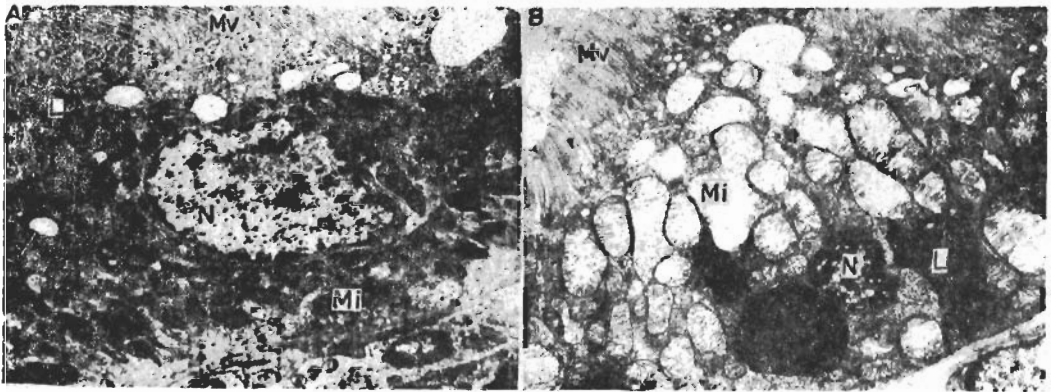


Fig 1. Electron micrographs of renal proximal convoluted cells of rats. $\times 4500$ (A) control rat; (B) treated rat, 5 d after ip cisplatin 5 mg/kg. L=lysosome; Mi=mitochondria; Mv=microvilli; N=nucleus, Δ =swollen mitochondria; \downarrow =irregular form of secondary lysosome; \Downarrow =karyopychosis

(See p 167)