银杏叶提取物与去铁胺合用防治顺铂耳毒性实验研究

徐 鸥[1] 路 虹[1] 李佩琴[2] 张喜琴[1] 吕 哲[1]

摘要 目的 银杏叶提取物—金纳多(extract of Ginkgo Biloba leaves injection, EGb)和铁螯合剂—去铁胺(Deferoxamine, DFO)联合应用对抗顺铂(Cisplatin, CDDP)耳毒性的作用。**方法** 将豚鼠随机分为 CDDP 组、EGb 组、DFO 组、EGb + DFO 组及对照组,测定听性脑干反应(auditory brain-stem response, ABR)、血清超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)活性和丙二醛(MDA)含量及应用光镜、及扫描电镜技术,观察用药前后各指标的变化。**结果** CDDP 组动物 ABR 阈值较其他各组明显升高($P<0.01$),其余各组间差异不显著($P>0.05$)。血清 SOD 活性和 MDA 含量检测表明,CDDP 组血清 SOD 活性较对照组明显降低($P<0.01$),MDA 含量显著升高($P<0.01$),其他组较对照组则差异无显著性($P>0.05$)。耳蜗扫描电镜显示 EGb + DFO 组和 DFO 组比 CDDP 组毛细胞受损程度明显为轻,EGb 组较 CDDP 组毛细胞受损程度略微减轻。**结论** DFO 与 EGb 合用,可有效减轻 CDDP 的耳毒性作用,其效果优于单独应用 EGb,与单独应用 DFO 效果相当,二者合用还可能减轻顺铂的骨髓抑制副作用。结果提示铁离子参与的自由基反应可能是顺铂耳毒性机制之一。

关键词 顺铂;去铁胺;金纳多;耳毒性;自由基

Effect of Combination of Ginkgo Leaf Extract and Deferoxamine in Preventing and Treating Ototoxicity of Cisplatin XU Ou, LU Hong, LI Pei-qin, et al *Department of Otorhinolaryngology, the Second Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang (050000)*

Objective To observe the effect of combined use of Jinnaduo (an injection made by extract of Ginkgo leaf, EGb) and Deferoxamine (DFO, a chelating agent) in antagonizing the ototoxicity of cisplatin (CDDP). **Methods** Guinea pigs were randomly divided into the CDDP group, the EGb group, the DFO group, the combined treated group (EGb + DFO) and the control group. Changes of auditory brain-stem response (ABR), serum superoxide dismutase (SOD) activity and malondialdehyde (MDA) content, as well as light and scanning electronic microscopic (SEM) figures were observed before and after treatment. **Results** The threshold of ABR was significantly higher in the CDDP group than that in the other groups ($P<0.01$), but was insignificantly different among the latter groups ($P>0.05$). Serum SOD activity was lower and MDA content was higher in the CDDP group than those in the control group ($P<0.01$), but in comparison of the two parameters between control and other groups, the difference was insignificant ($P>0.05$). SEM examination on cochlea showed that the damage of hair cells was milder in the DFO group and the combined treated group than that in the CDDP group, which was slightly milder in the EGb group than that in the CDDP group. **Conclusion** Combined use of EGb and DFO could effectively reduce the ototoxicity of CDDP, its effect is better than using EGb singly, and similar to that of using DFO alone. The combination could also prevent the side-effect of CDDP in bone marrow inhibition. The Fe ion participated free radical response could be one of the mechanisms of CDDP in damaging hearing.

Key words cisplatin; deferoxamine; Jinnaduo; ototoxicity; free radical

基金项目:河北省科技攻关计划项目(No.032761100D)

作者单位:1. 河北医科大学附属第二医院耳鼻咽喉科(石家庄 050000);2. 河北医科大学附属第二医院中医外科

通讯作者:徐 鸥,Tel:0311 - 7222971,E-mail:xuou1978@sina.com

顺铂被广泛应用于鼻癌、子宫癌、乳腺癌、恶性淋巴瘤及白血病等疾病的治疗,其不良反应中以耳毒性、肾毒性、骨髓抑制等为突出。近年的研究发现顺铂耳毒性与自由基密切相关,而铁离子在自由基形成过程

万方数据

中起至关重要的作用。本实验采用银杏叶提取物金纳多和铁螯合剂去铁胺联合应用，通过形态学及功能学观察，以了解两药合用对顺铂耳毒性的拮抗作用，为临床减轻顺铂应用中的不良作用，改善肿瘤患者的生存质量提供科学的理论依据。

材料与方法

1　材料

1.1　实验药物　顺铂(cisplatin，简称 CDDP，山东德州制药厂生产，批号 020601，剂量 10mg/支)；去铁胺(Deferoxamine，简称 DFO，瑞士诺华制药有限公司生产，批号 SG7100，剂量 500mg/支)；金纳多(Extract of Ginkgo Biloba leaves Injection，简称 EGb，德国威玛舒培博士药厂生产，批号 1120602，剂量 5ml/支，含银杏叶提取物 17.5mg/支)。

1.2　试剂盒　超氧化物歧化酶试剂盒(购自南京建成生物工程研究所)；丙二醛试剂盒(购自南京建成生物工程研究所)。

1.3　实验动物　Dunkan-Hartley 系白毛红目豚鼠 40 只，购自河北医科大学基础医学院动物中心，清洁级(Ⅱ级)，体重 350～400g。

2　方法

2.1　实验动物及分组　选择耳廓反应灵敏的白毛红目豚鼠 40 只，体重 350～400g，雌雄不限，随机分为 5 组，每组 8 只。CDDP 组：连续 5 天腹腔注射顺铂 2mg/(kg·d)；EGb 组：给顺铂前 2 天，腹腔注射 EGb 14mg/(kg·d)，自第 3 天起加腹腔注射顺铂 2mg/(kg·d)，共 7 天；DFO 组：股内侧皮下注射去铁胺 100mg/(kg·d)，注射 1h 后腹腔注射顺铂 2mg/(kg·d)，共 5 天；EGb + DFO 组：给顺铂前 2 天，腹腔注射 EGb14mg/(kg·d)，自第 3 天起，加股内侧皮下注射 DFO 100mg/(kg·d)，注射 1h 后腹腔注射顺铂 2mg/(kg·d)，共 7 天；对照组：连续 5 天腹腔注射生理盐水 2mg/(kg·d)。

2.2　听性脑干反应(auditory brainstem response，ABR)阈值检测　各组动物于用药前及停药后分别测试 ABR 阈值。豚鼠用 100mg/kg 氯胺酮腹腔麻醉后，将记录电极置于动物颅顶正中，地极置于鼻尖，两侧耳廓为参考电极，日本 7S－12 型电反应系统发出刺激信号。TDH－39 型耳机给声，离受试外耳道口 1cm，滤波短声刺激，扫描时间 10ms，叠加 1 000 次，反应由电极引出，经前置放大器放大，计算机处理后显示于荧光屏。ABR 反映阈以Ⅲ波为准。

2.3　血清 SOD 活性和 MDA 含量测定　各组动物于停药后用 100mg/kg 氯胺酮腹腔麻醉，颈动脉放血 2ml，检测血清 SOD 活性及 MDA 含量。SOD 活性采用黄嘌呤氧化酶法，MDA 含量测定采用硫代巴比妥酸比色法。

2.4　光镜标本制作　各组动物于停药后 1 天以断头法处死，快速取出听泡，暴露耳蜗，蜗顶钻孔，取出镫骨，挑破卵圆窗、蜗窗，用吸管以 4% 多聚甲醛(4℃，pH 7.4)，缓慢灌洗耳蜗，每个标本灌 5 遍，约 5ml。然后将其浸于固定液中，次日取出，以 0.1mol/L PBS(pH 7.4)清洗，置于 10%EDTA 中，脱钙 20 天，PBS 清洗，石蜡包埋，平行蜗轴切片，行普鲁士蓝染色，光镜观察。

2.5　扫描电镜标本制作　各组于停药后 1 天以断头法处死动物，剥离耳蜗，用 2.5% 戊二醛(4℃，pH 7.4)固定，次日以 0.1mol/L 的 PBS(pH 7.4)清洗，在解剖显微镜下剥去耳蜗骨壳及螺旋韧带，暴露基底膜，1% 四氧化锇后固定 2h；0.1mol/L 磷酸缓冲液漂洗；置于 2% 单宁酸 30min，2 次；0.1mol/L 磷酸缓冲液漂洗 1h；梯度乙醇脱水；醋酸异戊酯过度；临界点干燥；离子溅射镀膜；扫描电镜观察。

2.6　统计学方法　应用 t 检验及方差分析。

结　果

1　各组豚鼠一般变化　CDDP 组动物体重比对照组明显减轻，动物活动明显减少，毛发脱落严重，耳廓反射基本消失。而 EGb 组、DFO 组、EGb + DFO 组动物较对照组体重略减轻，毛发脱落较轻，其中 EGb 组比 DFO 组、EGb + DFO 组动物体重减轻略明显，耳廓反射较差。DFO 组、EGb + DFO 组动物耳廓反射存在，基本正常。

2　各组用药前后 ABR 阈值比较　见表 1。CDDP 组、EGb 组、DFO 组、EGb + DFO 组 ABR 阈值行自身前后对照，差异均有显著性($P<0.01$)，对照组 ABR 阈值自身前后对照，差异无显著性($P>0.05$)。CDDP 组 ABR 阈值升高，与其他各组之间比较差异有显著性($P<0.01$)，EGb 组 ABR 阈值亦升高，与对照组之间差异有显著性($P<0.05$)，与 DFO 组和 EGb + DFO 组之间差异不显著($P>0.05$)，其余各组之间差异无显著性($P>0.05$)。

3　血清 SOD 活性和 MDA 含量测定　见表 2。血清 SOD 活性 CDDP 组较对照组明显降低($P<0.01$)，其他各组较对照组则差异不显著($P>0.05$)。血清 MDA 含量以 CDDP 组升高最显著($P<0.01$)，其余各组与对照组比较，其差异无显著性($P>0.05$)。

万方数据

表 1 各组动物用药前后以及各组间 ABR 阈值比较 (dBnHL, $\bar{x} \pm s$)

组别	n	ABR 阈值	
		用药前	用药后
CDDP	8	5.00±0.00	32.50±14.14*△
EGb	8	7.50±2.67	21.88±3.72*△▲
DFO	8	7.50±2.67	15.63±6.78*△
EGb+DFO	8	8.13±3.72	16.18±4.58*△
对照	8	7.50±2.67	9.38±5.63△

注：与本组用药前比较，* $P<0.01$；与 CDDP 组用药后比较，△ $P<0.01$；与对照组用药后比较，▲ $P<0.05$

表 2 各组动物血清 SOD 活性和 MDA 含量比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	SOD 活性(NU/ml)	MDA 含量(mmol/L)
CDDP	8	47.49±18.03*	11.45±3.58*
EGb	8	97.70±18.49	8.12±1.10
DFO	8	101.71±14.41	8.03±1.20
EGb+DFO	8	105.20±9.97	7.93±1.09
对照	8	103.20±17.60	8.02±2.09

注：与对照组比较，* $P<0.01$

4 各组耳蜗光镜观察结果比较 CDDP 组动物 Corti 器严重变形，外毛细胞肿胀、变形、移位、内外隧道增宽，严重者，毛细胞溶解，核部分或全部消失，Corti 器结构破坏，病变以 2、4 回为重。EGb 组动物 Corti 器变形外毛细胞肿胀、变形、移位，间隙增宽，程度比 CDDP 组轻。DFO 组及 EGb+DFO 组动物 Corti 器结构基本正常或稍变形，毛细胞结构大致正常。对照组动物 Corti 器结构正常，毛细胞完整无移位。此外在 CDDP 组耳蜗螺旋韧带及蜗轴中可见较多的铁颗粒和少数小块，EGb 组耳蜗蜗轴中也有少量铁颗粒。

5 各组耳蜗扫描电镜观察结果比较 CDDP 组动物耳蜗各回外毛细胞均有不同程度破坏，以底回和第二回为最重，外毛细胞缺失、倒伏、粘连，内毛细胞亦有不同程度破坏(见图 1)。EGb 组动物耳蜗各回外毛细胞亦有散乱、倒伏、缺失，但比 CDDP 组略轻，内毛细胞轻度受损(见图 2)。DFO 组与 EGb + DFO 组外

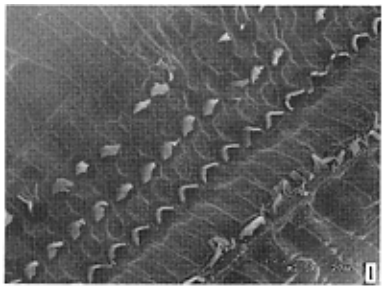
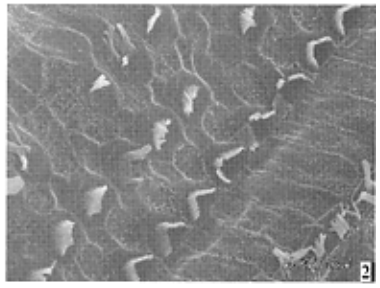
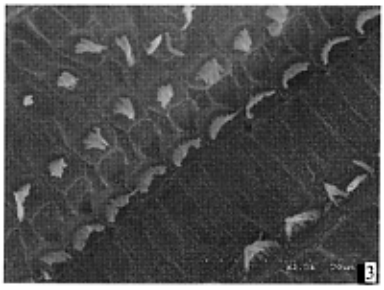
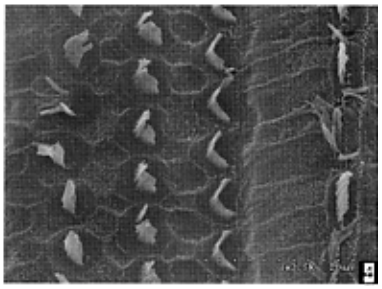
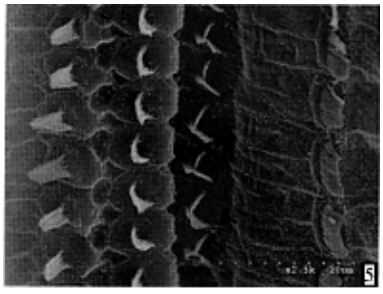

图 1 CDDP 组动物耳蜗外毛细胞大量缺失、倒伏、粘连，内毛细胞亦有倒伏、粘连(扫描电镜 × 1.5K 倍) **图 2** EGb 组动物耳蜗外毛细胞部分散乱、倒伏、缺失，内毛细胞轻度受损(扫描电镜 × 2.5K 倍) **图 3** DFO 组动物耳蜗外毛细胞偶有倒伏、散乱，内毛细胞基本排列正常(扫描电镜 × 2.5K 倍) **图 4** EGb+DFO 组动物耳蜗外毛细胞偶有散乱，内毛细胞排列基本正常 (扫描电镜 × 2.5K 倍) **图 5** 对照组外毛细胞的听毛呈 V 字形，开口向内，整齐排列为 3 排，内毛细胞的听毛排列为 1 排(扫描电镜 ×2.5K 倍)

万方数据

毛细胞偶有倒伏、散乱，内毛细胞基本排列正常，与CDDP组相比受损明显减轻(见图3、4)。对照组外毛细胞的听毛呈V字形，开口向内，整齐排列为三排，内毛细胞的听毛排列为一排(见图5)。

讨　论

诸多学者对顺铂耳毒性进行深入研究，Rybak等研究证明，顺铂耳毒性源于自由基的产生，单纯应用顺铂可消耗耳蜗内的谷胱甘肽和抗氧化酶，产生过氧化物作用，造成毛细胞损伤[1]。Dehane等研究证实，铁影响顺铂耳毒性，并且参与和促进了超氧阴离子形成。应用铁离子螯合剂(去铁胺)能对抗顺铂引起的细胞死亡，顺铂未升高细胞内螯合铁的浓度，但增加了超氧阴离子产物在感觉神经上皮的分布，尤其在毛细胞。最终证实顺铂耳毒性部分是铁依赖途径介导的，并且和超氧阴离子形成密切相关[2]。Fukaya等研究证实，银杏提取物(Extract of Ginkgo Biloba, EGb)能清除氧自由基和羟自由基，降低脂质过氧化，能降低顺铂耳毒性，并不降低抗肿瘤活性[3]。从另一个方面证实顺铂耳毒性源于自由基的形成。本实验结果显示，EGb可有效降低顺铂所致的听阈值升高，减轻毛细胞的损伤，从而拮抗顺铂耳毒性作用。这可能与金纳多的抗自由基，改善血液循环，保护神经系统等作用有关。

去铁胺是铁螯合剂，在体内通过羟圬酸基团与Fe^{3+}螯合成稳定的水溶性螯合物，易与铁蛋白、含铁血黄素中的高铁离子螯合，少量移除运铁蛋白中的铁(10%～15%)，但不能与血红蛋白中的铁离子螯合。它有效抑制了Fe催化产生的氧自由基反应，且有以下特点：(1)由于分子量小，易入细胞，通过置换特异位点上的铁、铜达到减少氧自由基产生的目的；(2)可直接作为自由基清除剂，除去过多的Fe^{3+}；(3)可抑制依赖于铁、铜催化的脂质过氧化反应，减轻由此引起的细胞损伤。

本实验从控制自由基产生和清除自由基两方面入手，研究DFO与EGb合用在顺铂耳毒性中的防治作用。结果显示DFO组动物一般情况较好，听觉阈值较CDDP组明显降低，血清SOD活性和MDA含量较CDDP组均有明显改善，毛细胞损伤程度较轻。EGb+DFO组结果与DFO组基本一致，其效果优于单独应用EGb，此结果的出现可能与EGb用药时间较短，药物作用尚未充分发挥有关。以上结果提示，顺铂耳毒性作用中，铁离子起到重要作用，自由基可进一步加重其不良反应。此外光镜结果提示，顺铂引起体内铁离子增多，在骨髓及周围组织中形成含铁血黄素沉积，进一步可影响骨髓功能。去铁胺能有效防止含铁血黄素在骨髓和外周组织的病理性积聚，从而减轻顺铂的骨髓抑制等不良反应。

参 考 文 献

1 Rybak LP, Whitworth C, Somani S. Application of antioxidants and other agents to prevent cisplatin ototoxicity. Laryngoscope 1999;109(11):1740—1744.

2 Dehane N, Lautermann J, Petrat F, et al. Cisplatin ototoxicity: involvement of iron and enhanced formation of superoxide anion radicals. Toxicol Appl Pharmacol 2001;174(1):27—34.

3 Fukaya H, Kanno H. Experimental studies of the protective effect of ginkgo biloba extract (GBE) on cisplatin induced ototoxicity in rats. Nippon Jibiinkoka Gakkai Kaiho 1999;102(7):907—917.

(收稿：2003－09－15　修回：2004－07－12)

《陕西中医学院学报》2005 年征订启事

《陕西中医学院学报》是陕西中医学院主办的国内外公开发行的中医药学术刊物。适用于从事中医、中西医结合教学、科研、临床的工作者。本刊现为中国核心期刊(遴选)数据库收录期刊；中国学术期刊综合评价数据统计刊源期刊；中文科技期刊数据库原文收录期刊；中国期刊网、中国学术期刊(光盘版)全文收录期刊。本刊为双月刊，国内统一刊号：ISSN 1002－168X，CN 61－1083/R；邮发代号 52－2，每册 5.00 元，全年 30.00 元，欢迎到当地邮局订购。地址：陕西省咸阳市渭阳中路 1 号《陕西中医学院学报》编辑部，邮编：712083。电话：0910－3166150，0910－3159543。传真：(0910)3166150。E-mail：shxhy 666@126.com

《现代中医药》2005 年征订启事

《现代中医药》是中医中药、中西医结合的全国性医学期刊，本刊辟有医论医述、专题笔谈、临床荟萃、中西医结合、专家治病、进修专题、验方集萃、新药推介、名师垂教、中药研究、典籍新悟、针灸与推拿天地、文献综述、学习之友、考试 ABC、争鸣等栏目。

本刊国内统一刊号 ISSN 1002－1523，CN 61－1397/R，面向国内外公开发行，邮发代号 52－53，国外代号 BM4334，每期定价 5.00 元。欢迎广大读者订阅(当地邮局或本刊编辑部)。地址：陕西省咸阳市渭阳中路 1 号(712083)电话：0910－3166150，3159543；E-mail：shxhy 666@126.com

万方数据