IPK 在肾脏功能分子研究中的应用进展

胡亚洁[1*]，赵晓锦[2]，王晓真[1]
（1. 山东中医药大学，济南 250355；2. 山东省警官总医院，济南 250002）

［摘要］ 离体肾脏灌流（IPK）是应用比较早的离体器官灌流实验方法，具有去除神经和体液等影响、便于施加干扰因素以及实时监测肾脏功能变化的特点，可用于研究药物肾脏代谢与排泄及其机制等。本文通过对国外利用 IPK 技术进行研究的文献进行综述，旨在拓展国内利用 IPK 技术进行研究的视角。通过整理、归纳、分析大量国外利用 IPK 技术进行研究的文献，本文主要从肾小球滤过调节机制、肾小管和集合管重吸收和分泌调节机制以及肾脏局部缺血损伤模型等多个方面探讨 IPK 技术在研究肾脏分子水平上的变化以及肾脏发病机制和肾病发生发展过程中各调节因素相互作用等方面的应用。通过大量文献的分析，发现国外运用 IPK 技术比较成熟，而国内运用此技术主要研究药物的代谢排泄机制、药物性肾损伤机制或供体肾脏移植等方面，较为局限。本文针对 IPK 技术在肾脏分子水平上的变化以及肾脏发病机制等研究中的应用进行介绍，可以为国内学者利用 IPK 技术在研究药物以及致病因素刺激下肾脏功能改变及其机制等方面提供参考，并指出 IPK 技术在整体肾脏角度研究足细胞形态结构和功能改变及其分子机制方面有重要意义。

［关键词］ 离体肾脏灌流；肾脏；肾功能
［中图分类号］ R287 ［文献标识码］ A ［文章编号］ 1005-9903(2015)04-0231-04
［doi］ 10.13422/j.cnki.syfjx.2015040231

Application of IPK in Renal Functional Molecules Research

HU Ya-jie[1*], ZHAO Xiao-jin[2], WANG Xiao-zhen[1] (1. *Shandong University of Traditional Chinese Medicine*, *Ji'nan* 250355, *China*; 2. *Shandong Police General Hospital*, *Ji'nan* 250002, *China*)

［**Abstract**］ As an early isolated organ perfusion method, the isolated perfused kidney (IPK) has many advantages, such as the removal of nerves and humoral factors, convenience to exert interference factors and real-time monitoring the diversity of renal function. The IPK has great application value in studying drug metabolism, excretion and revelant mechanisms in kidney. This article aims to expand the domestic perspective of using IPK. This paper discussed the applications of IPK in the study of changes in kidney molecules, pathogenesis and interaction of various adjustment factors in nephropathy development process from many aspects, such as regulatory mechanisms of glomerular filtration, reabsorption and secretion of tubule and collecting duct, and renal ischemia injury model. By analyzing a large number of documents, we found that the using of IPK in foreign is relatively mature, while the domestic is more limited, mainly applied in metabolic excretion mechanism of drugs, mechanisms of drug-induced renal injury or donor kidney transplants, etc. This article described the use of IPK technology in the research of the molecular level changes in the kidney and renal mechanisms of pathogenesis. It could provide a reference for the domestic study of changes in renal function and mechanism stimulated by medication and risk factors. It also noted that IPK technology would be very important in morphological and functional changes of podocytes and its molecular mechanisms in the perspective of the whole kidney.

［**Key words**］ isolated perfused kidney; kidney; renal function

离体肾脏灌流（isolated perfused kidney, IPK）模型最初是由 Weiss[1] 等研究者确立用于研究红细胞缺失时离体大鼠肾脏肾血流量的自身调节，后经 Nizhiitutsuji-Uwo[2]，Bowman[3]，Lepsy[4] 和 Wang[5] 等不断改良，最终形成了现代成熟的实验方法，常用于研究药物及一些内源性物质的肾脏排泄作用。近来随着人们对肾脏的结构和功能研究的深入，发现了众多与肾脏疾病相关的分子，并确定了多个由足细胞表达、与裂孔隔膜结构和功能密切相关的分子以及与肾脏病理

［收稿日期］ 20140421(005)
［通讯作者］ *胡亚洁，硕士，讲师，从事药理学、肾脏疾病研究，Tel：13793136917，E-mail：huyajieak@163.com

生理变化密切相关的信号转导通路[6-8]。由于 IPK 技术具有排出体液和神经干扰、保持肾脏结构和功能完整性以及动态监控等优点[9],所以除了利用此技术进行药物肾脏代谢与排泄及其机制的研究外,也可用以研究肾脏分子水平上的变化以及肾脏发病机制和肾病发生发展过程中各调节因素的相互作用等等。国外运用 IPK 技术比较成熟,而国内运用此技术主要局限于研究药物的代谢排泄机制、药物性肾损伤机制或供体肾脏移植等方面[9-14],对于研究肾脏功能分子的报道甚少。近年来,一些国内学者在利用 IPK 技术研究中医药治疗 DN 尤其是中药有效成分防治 DN 方面取得了一定进展,但主要用于研究药物的肾脏排泄过程或疗效,很少探究其具体的作用机制[10-13]。所以,本文就 IPK 在肾脏功能分子研究中的应用做一介绍。

1 对肾小球滤过调节机制的研究

IPK 的肾脏具有和正常整体肾相似的肾小球通透性,可应用于肾小球滤过调节机制的研究[14],同时 IPK 技术具有给药可控、监测可控等优点,并保证了肾脏器官的完整性,为肾小球滤过调节机制的研究提供了较为理想的模型。如 Ying 等[15]通过体内实验与体外 IPK 技术相结合的方法探索肾小球滤过调节机制与一氧化氮(NO)和一氧化氮合成酶(NOS)的关系。其中体内实验通过对大鼠静脉注射 Rho 激酶选择性抑制剂 *Y*-27632 制备肾盂积水肾模型,利用 IPK 技术对肾盂积水肾在一定的灌注压范围内进行灌流,通过观察肾血流量的动力学变化,发现 *Y*-27632 和 *N*-硝基-*L*-精氨酸甲酯盐酸盐(*L*-NAME)二种化合物对血管紧张度和肾小球滤过肌源性调节机制和球-管反馈机制具有明显的抑制作用。还有 Alcaraz 等[16]利用 IPK 技术探讨 NO 和内皮依赖性/非依赖性介导的血管扩张反应与不同药物所引起的肾灌注压变化的关系,发现苯肾上腺素或 *L*-NAME 对肾脏中磷酸化细胞外信号调节激酶(*p*-ERK1/2)水平具有调节作用,而维生素 E 可抑制这一作用。

1.1 在整体动物中,肾小球滤过率受神经调节 而 IPK 技术可排除神经因素干扰。Ren 等[17]利用 IPK 技术此特点应用双极电极释放电流脉冲刺激肾动脉,使其交感神经元兴奋,通过质谱法测定肾动脉中环磷酸腺苷(cAMP)、腺嘌呤核苷酸(AMP)、阿糖腺苷和鸟苷的含量以探索上述内源性物质与肾交感神经的关系。也有研究者在肾交感神经调节肾脏血管对血管紧张素Ⅱ(Ang II)反应性方面中利用 IPK 技术,于灌流液中加入一定浓度的 Ang II,待稳定后,应用铂双极电极刺激肾动脉以促使肾交感神经兴奋,发现肾交感神经可通过神经肽 Y_1 受体激活 G_1 信号通路并调节肾脏血管的反应性[18]。

1.2 肾小球滤过率受体液因素的调节 如肾上腺髓质释放的去甲肾上腺素和肾上腺素,循环血液中的血管升压素(VP)和 Ang II,内皮细胞分泌的内皮素等可引起血管收缩,肾血流量减少,肾小球滤过率降低;而肾组织中产生的前列环素(PGI_2),前列腺素(PGE_2),NO 和缓激肽等可引起肾血管舒张,肾血流量增加,肾小球滤过率升高;其中腺苷通过促使入球小动脉收缩而导致肾小球滤过率降低[19]。为了更好的探索各个体液因素在肾小球滤过调节中如何发挥作用,较多学者采用 IPK 技术进行研究以去除其他体液因素的干扰。Sivieri 等[20]对大鼠采用右肾切除术并放银质回形针于左肾动脉附近制造高血压模型,通过 IPK 技术对高血压大鼠肾脏进行体外灌流以研究血管紧张素转换酶抑制剂(ACEI)与缓激肽之间的关系。研究发现 ACEI 通过作用于缓激肽 B_2 受体以增强缓激肽作用,且不依赖于血管紧张素转换酶(ACE)的活性是否被阻断。还有学者通过对比体内实验(对连接蛋白 40 基因敲除以及未敲除大鼠给予 ACEI 后进行肾素和 α-Smooth Muscle Actin 的免疫组织化学检查)与体外实验(对这两种基因大鼠进行 IPK 处理以检测灌流液中肾素浓度)以研究连接蛋白 40 在肾素分泌方面的作用,发现该两种方法实验结果一致,即连接蛋白 40 的缺失会导致从入球小动脉到球外肾小球系膜的肾素分泌细胞发生紊乱[21],而在灌流液中加入垂体腺苷素环化酶多肽(PACAP)后发现流出液中肾素分泌率有所增加,这一作用受 PACAP 特异性受体 PAC1 所调节,而肾素—血管紧张素—醛固酮系统(RAS)系统受 PAC1 受体活化的影响,最终致使肾血流量减少,肾小球滤过率降低[22]。第二信使 cAMP,环磷酸鸟苷(cGMP)和胞内游离钙等可影响肾素的释放。Grunberger 等[23]通过 As4.1 细胞培养与 IPK 这两种技术,分别检测细胞内 cAMP 水平、肾素的释放、钙依赖性腺苷酸环化酶(AC5/AC6)水平和灌流肾脏肾素的活性,以研究胞内钙浓度对肾素分泌细胞的影响。体外细胞培养和 IPK 两种方法一致表明胞内钙可能通过抑制 AC5 和 AC6 而抑制肾素的出胞作用,致使肾脏中的肾素水平升高,肾动脉收缩,肾血流量减少,肾小球滤过率降低。上述研究表明,IPK 技术与体内动物实验、细胞培养技术相比,其实验结果具有一致性。

也有研究利用 IPK 技术探索肾小球滤过屏障中裂孔隔膜(SD)对肾小球滤过率的影响。Macconi 等[24]发现 Ang II 可诱导体外培养大鼠足细胞 F-actin 纤维蛋白的重构和NO-1 的再分布,而且 NO-1 与足细胞细胞骨架上的肌动蛋白在生理上密切相关;同时 Ang II 可增强白蛋白对足细胞间 SD 的渗透性。相应地对大鼠肾脏进行 Ang II 短期灌流,同样 F-actin 和 NO-1 在结构上发生了改变,同时蛋白的排泄率增加,可能是足细胞发生功能紊乱受 Ang II 的 I 型受体调节,并部分依赖于 Src 激酶-磷脂酶 C 活性的结果。所以,将细胞培养技术与 IPK 技术相结合,可以更好地从分子水平、形态结构水平上诠释 SD 的作用,并且进一步探索细胞内与 SD 相关的信号转导通路对避免足细胞的再损伤具有重要意义。

2 对肾小管和集合管重吸收和分泌调节机制的研究

肾小管的重吸收主要是通过小管内外的渗透压梯度实现的。其中 Artunc 等[25]通过对高血压大鼠的近直小管体外灌注以研究生电葡萄糖转换、糖负荷以及糖代谢对肾小管重吸收的影响,发现丙酮酸脱氢酶激酶-1(PDK-1)通过活化其下游区糖皮质激素诱导性激酶(SGK)和蛋白激酶 B(PKB),进而激活肾脏和小肠内钠离子依赖性葡萄糖转运载体-1

(SGLF-1),从而促进葡萄糖的转运、代谢。同时上述激酶可活化钾离子通道,以维持肾脏近端小管顶端细胞膜内外的电位平衡。还有学者发现胆固醇抑制药甲基-β-环糊精可导致 IPK 大鼠中抗利尿激素非依赖性水通-2(AQP-2)的蓄积,从而抑制集合管细胞膜的胞吞作用,对治疗抗利尿激素 2 型受体突变所引起的遗传性 X-相关肾原性糖尿病(NDI)具有临床意义[26]。

肾小管和集合管重吸收和分泌不仅受肾交感神经的调节,还受 VP,RAS 系统、心房钠尿肽(ANP)以及肾脏自身生成的多种局部激素的调节。Dubinion 等[27]利用 IPK 技术去除神经及体液的干扰,通过对自发性高血压大鼠(SHRs)肾脏体外灌注一定浓度的 Ang II,研究胰多肽-折叠肽受体(Y_1 和/或 Y_2 受体)和 Ang II 与肾脏血管收缩的关系,发现 RAS 系统对 SHRs 的遗传性高血压的发生、发展具有重要作用,肾交感神经也与 SHRs 高血压的形成密切相关。Guillermo 等[28]通过对髓袢升支粗段进行体外灌流并灌注纯氧以检测过氧化物(O_2^-)对髓袢升支粗段 Cl^- 的吸收以及蛋白激酶 C(PKC)的活性的影响,利用显微荧光测定术检测流出的灌流液中 Cl^- 浓度以及比色法测定肾小管髓袢升支粗段中 PKC 活性,发现灌流液中 Cl^- 浓度降低,而髓袢升支粗段中 PKC 活性增强,说明 O_2^- 可能通过激活 PKC 而促进髓袢升支粗段的 Cl^- 吸收,与 O_2^- 可活化 $Na^+/K^+/2Cl^-$ 协同转运蛋白有关,但具体的信号转导机制尚不明确。

3 其他

通过 IPK 技术研究药物对肾脏叶间动脉收缩活动的影响。肾脏叶间动脉有多种缝隙连接蛋白(connexin, Cx)表达[29],而 Cx 的表达可以影响血管的舒缩作用[30]。研究发现,18β-甘草次酸可抑制 KCl 和苯肾上腺素诱导的大鼠离体肾脏叶间动脉的收缩作用,其机制与 18β-甘草次酸阻断缝隙连接有关。另外,研究提示可以将缝隙连接作为干预肾脏脉管系统病变的新靶点,并利用缝隙连接阻断剂如 18β-甘草次酸减少肾脏脉管系统引起的肾脏损伤[31]。

通过 IPK 技术制备肾脏局部缺血的损伤模型,研究药物对肾脏是否具有保护作用及其作用机制。如通过在局部缺血前以及体外灌流 8 h 后注射给予 Ghrelin(最初在胃中发现的一种生长激素促泌素受体 GHSR 的内源性配体)以检测肾脏的 NO 的释放量、cGMP 水平的变化等,发现 Ghrelin 可缓解 IPK 大鼠中局部缺血引起的再灌注损伤,而且这一作用可能与胰岛素样生长因子(IGF-1)介导的内皮组织功能的改善有关[32]。

通过 IPK 技术探寻离体移植肾脏存活的最佳环境。如 Forgiarini 等[33]研究发现,乳化氟碳液较高渗枸橼酸盐嘌呤溶液对离体肾脏细胞保护作用更佳,其可以提高离体肾脏的抗氧化和抗凋亡的能力,减少对移植肾脏的损伤[14]。

4 结语

综上所述,虽然 IPK 与整体肾脏有一定的差别,如操作过程中有可能引起局部缺血,再灌后对离体肾脏构成一定的损伤等[9,14],但 IPK 技术与整体动物实验相比,可排除神经和体液等因素的影响,条件可控;与体外肾脏固有细胞培养相比,离体灌流肾脏保持了肾脏形态和结构的完整性,对于观察肾脏固有细胞之间的相互作用、阐释肾脏病理生理改变及相应机制有一定意义。

目前,国内外运用 IPK 技术主要用于研究药物的作用机制或药物间联用以及药物性肾损伤机制等方面,如周琦[11]等运用 IPK 技术研究尿肝型脂肪酸结合蛋白在马兜铃酸致急性肾小管损伤方面的作用;还有一些学者利用 IPK 技术在研究一些中药对离体肾脏的保护作用方面取得了一定成果[12-13]。但是中药化学成分较为复杂,成分之间相互影响,尤其是中药有效成分对肾脏功能分子发挥作用的具体机制以及中药有效成分之间如何相互作用等尚需进一步探讨[34],而 IPK 技术可以为研究开发有效防治 DN 发生和恶化的中药制剂提供理想模型。

近年来,随着对肾脏疾病研究的深入,人们对足细胞在肾脏疾病发生发展中的重要性日益重视。足细胞功能的维持依赖于其在肾小球内的形态,单纯体外足细胞培养不能完全阐释足细胞的功能。目前利用 IPK 技术在足细胞以及足突裂孔隔膜形态结构和功能等方面的研究甚少,而后者对肾脏的功能、蛋白尿的产生等至关重要。所以,采用 IPK 技术从整体肾脏角度研究足细胞形态结构和功能改变及其分子机制方面有很大潜力。

[参考文献]

[1] Weiss C, Passow H, Rothstein A. Autoregulation of flow in isolated rat kidney in the absence of red cells [J]. Am J Physiol, 1959, 196(5):1115-1118.

[2] Nizhiitutsuji-Uwo J W, Ross B D, Krebs H A, et al. Metabolic activities of the isolated perfused rat kidney [J]. Biochem J, 1967, 103(3):852-862.

[3] Bowman R H. The perfused rat kidney [A]. In: Hardman J G, O'Malley B W, eds. Methods in enzymology[M]. 9th ed. New York: Academic, 1975: 3-10.

[4] Lepsy C S, Guttendorf R J, Kugler A R, et al. Effects of organicanion, organic cation, and dipeptide transport inhibitors on cefdinir in the isolated perfused rat kidney [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2003, 47(2): 689-696.

[5] Wang J, Nation R L, Evans A M, et al. Isolated rat kidney perfused with dextran and bovine serum albumin: a stable model for investigating renal drug handling[J]. J Pharmacol Toxicol Methods, 2004, 49(2):105-113.

[6] Wolf G, Chen S, Ziyadeh F N. From the periphery of the glomerular capillary wall toward the center of disease [J]. Diabetes, 2005, 54(6):1626-1634.

[7] Wagner M C, Rhodes G, Exing W, et al. Ischemic injury to kidney induces glomerular podocyte effacement and dissociation of slit diaphragm proteins Neph1 and ZO-1[J]. Biol Chem, 2008, 283(51):35579-35589.

[8] Holthofer H. Molecular architecture of the glomerular slit diaphragm: lessons learnt for a better understanding of disease pathogenesis[J]. Nephrol Dial Transplant, 2007, 22(8): 2124-2128.

[9] 朱深银, 周远大, 杜冠华, 等. 二甘醇对大鼠肾脏的损伤作用[J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2009, 23(2): 134-139.

[10] 牛丽娜. 基于肾瘀痹理论与糖尿病肾病数据库擦讨糖尿病肾病中医证治规则[J]. 北京: 北京中医药大学, 2014.

[11] 周绮, 张泽安, 金若敏. 大鼠离体肾灌流技术评价尿肝型脂肪酸结合蛋白在马兜铃酸致肾损伤中的价值[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(7): 216-219.

[12] 孙岩, 申红, 刘健, 等. 人工虫草复合液对大鼠离体肾缺血再灌注损伤的保护效应[J]. 肾脏病与透析肾移植杂志, 2010, 19(5): 440-444.

[13] 丁焦生. 丹参注射液与凯时注射液对抗离体鼠肾灌注压升高作用的影响[J]. 华夏医学, 2011, 24(3): 250-253.

[14] 彭雪梅, 刘嘉羿, 郑志雄, 等. 乳化氟碳保存液对离体保存肾脏抗氧化能力及组织结构的影响[J]. 暨南大学学报: 医学版, 2013, 34(6): 599-603.

[15] Ying S, Xuemei W, Ki H C, et al. Tubulo glomerular feedback-dependent modulation of renal myogenic autoregulation by nitric oxide[J]. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2006, 290(4): R982-991.

[16] Alcaraz A, Iyu′ D, Atucha N M, et al. Vitamin E supplementation reverses renal altered vascular reactivity in chronic bile duct-ligated rats[J]. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2007, 292(4): R1486-1493.

[17] Ren J, Mi Z, Jackson E K. Assessment of nerve stimulation-induced release of purines from mouse kidneys by tandem mass spectrometry[J]. J Pharmacol Exp Ther, 2008, 325(3): 920-926.

[18] Dubinion J H, Mi Z, Jackson E K. Role of renal sympathetic nerves in regulating renovascular responses to angiotensin II in spontaneously hypertensive rats[J]. J Pharmacol Exp Ther, 2006, 317(3): 1330-1336.

[19] Welsch S, Schordan E, Coquard C, et al. Abnormal renovascular parathyroid hormone-1 receptor in hypertension: primary defect or secondary to angiotensin II type1 receptor activation[J]. Endocrinology, 2006, 147(9): 4384-4391.

[20] Sivieri D O Jr, Bispo-da-Silva L B, Oliveira E B, et al. Potentiation of Bradykinin effect by angiotensin-converting enzyme inhibition does not correlate with angiotensin-converting enzyme activity in the rat mesenteric arteries[J]. Hypertension, 2007, 50(1): 110-115.

[21] Kurtz L, Schweda F, Wit C, et al. Lack of connexin 40 causes displacement of renin-producing cells from afferent arterioles to the extraglomerular mesangium[J]. J Am Soc Nephrol, 2007, 18(4): 1103-1111.

[22] Hautmann M, Friis U G, Desch M, et al. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide stimulates renin secretion via activation of PAC1 receptors[J]. J Am Soc Nephrol, 2007, 18(4): 1150-1156.

[23] Grunberger C, Obermayer B, Klar J, et al. Calcium suppresses renin exocytosis by inhibition of calcium-dependent adenylate cyclases AC5 and AC6[J]. Circ Res, 2006, 99(11): 1197-1206.

[24] Macconi D, Abbate M, Morigi M, et al. Permselective dysfunction of podocyte-podocyte contact upon angiotensin II unravels the molecular target for renoprotective intervention[J]. Am J Pathol, 2006, 168(4): 1073-1085.

[25] Artunc F, Rexhepaj R, Volkl H, et al. Impaired intestinal and renal glucose transport in PDK-1 hypomorphic mice[J]. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2006, 291(5): R1533-1538.

[26] Russo L M, Mckee M, Brown D. Methyl-β-cyclodextrin induces vasopressin-independent apical accumulation of aquaporin-2 in the isolated perfused rat kidney[J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2006, 291(1): F246-253.

[27] Dubinion J H, Mi Z, Zhu C, et al. Pancreatic polypeptide-fold peptide receptors and angiotensin II-induced renal vasoconstriction [J]. Hypertension, 2006, 47(3): 545-551.

[28] Silva G B, Ortiz P A, Hong N J, et al. Superoxide stimulates NaCl absorption in the thick ascending limb via activation of Protein Kinase C[J]. Hypertension, 2006, 48(3): 467-472.

[29] Hanner F, Sorensen C M, Holstein-Rathlou N H, et al. Connexins and the kidney[J]. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2010, 298: R1143-1155.

[30] Ma K T, Guan B C, Yang Y Q, et al. 2-Aminoethoxydiphenyl borate blocks electrical coupling and inhibits voltage-gated K^+ channels in guinea pig arteriole cells[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2011, 300: H335-346.

[31] 张雯, 马克涛, 王洋, 等. 18β-甘草次酸对 KCl 和苯肾上腺素诱导的大鼠离体肾脏叶间动脉收缩的抑制作用[J]. 生理学报, 2014, 66(2): 195-202.

[32] Takeda R, Nishimatsu H, Suzuki E, et al. Ghrelin improves renal function in mice with ischemic acute renal failure[J]. J Am Soc Nephrol, 2006, 17(1): 113-121.

[33] Forgiarini L A, Forgiarini L F, Darosa D P, et al. Endobronchial perfluorocarbon administration decreases lung injury in an experimental model of ischemia and reperfusion[J]. J Surg Res, 2013, 183(2): 835-840.

[责任编辑 邹晓翠]