

· 综述 ·

## 离体肾灌注技术在药理毒理研究中的应用进展

徐婷婷, 李一飞, 金若敏\*

(上海中医药大学 药物安全评价中心, 上海 201203)

**[摘要]** 通过 Pubmed 和 CNKI 数据库查阅了近几年应用离体肾灌注(isolated perfused kidney, IPK)技术在药理毒理研究方面的文献,并进行了整理和分析。IPK 技术的主要特点是一定时间内接近体内肾的外环境,通过不同时间点从输尿管和肾静脉流出的灌注液中采样,动态观察外源性物质进入肾脏所发生的变化。IPK 技术可用于研究药物在肾脏的排泄过程、作用机制以及药物的联用等。此外,通过检测灌注液中蛋白质活性及含量的变化,结合肾组织病理学变化,还可用于研究药物对肾损伤特点、程度、机制等。该文对离体肾灌注的技术特点及其在药理毒理研究中的应用进行介绍,以供药物研究和临床应用参考。

**[关键词]** 离体肾灌注技术; 药理; 毒理

**[中图分类号]** R285 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)11-0280-04

### Application of Method of Isolated Perfused Kidney into Pharmacological and Toxicological Studies

XU Ting-ting, LI Yi-fei, JIN Ruo-min\*

(Shanghai University of Traditional Chinese Medicine Drug Safety Evaluation Center, Shanghai 201203, China)

**[Abstract]** The literature, in recent years, related to IPK in pharmacological and toxicological studies was compiled and analyzed. One of the peculiarities of its method is that the perfusion fluid may be pulled repeatedly from ureter and renal vein for dynamically detecting the change of xenobiotics and their metabolin in kidney in the short run. Therefore, the method may be applied to study the drug excretion, mechanism of action and drug combination etc. Furthermore, by determining the change of protein activity and content in perfusion fluid, combined with histopathological observation, the method may be used to study the characteristic, extent and mechanism of drug induced renal injury. This article summarized the characteristic of IPK and its application into the pharmacological and toxicological studies in order to provide reference for scientific research and clinical application of the drugs.

**[Key words]** isolated perfused kidney; pharmacology; toxicology

肾脏是代谢产物和外源性物质排泄的重要器官,由于其

生理功能的特殊性,使其极易受到外源性物质的影响,因此人们采用了一系列的体内、体外方法研究外源性物质在肾脏的代谢特性<sup>[1-3]</sup>。而体外方法(如肾灌注、肾切片、原代肾细胞培养)能够排除其他组织、脏器的干扰以及整体动物实验时的毒性等问题,被广泛地用于外源性物质在肾脏的代谢研究。在各种体外方法中,离体肾灌注(isolated perfused kidney, IPK)技术在实验条件上与体内环境十分接近,是一种与整体肾脏可比性较高的体外模型。目前,IPK 技术在国外广泛应用于内源性物质的改变,药物的滤过、清除、代谢、排泄,药物间互相作用,药物肾毒性机制及防治等方面研究。而国内对该技术报道较少。本文就 IPK 的技术特点及其近

**[收稿日期]** 20111218(005)

**[基金项目]** 国家重点基础研究发展计划(973 计划)(2009CB522807);国家“重大新药创制”科技重大专项项目(2009ZX09502-002)

**[第一作者]** 徐婷婷,在读硕士,中药安全性评价, Tel: 021-51323053, E-mail: luoyeguigen1988@163.com

**[通讯作者]** \*金若敏,博士,研究员,博士生导师,从事中药新药及其安全性评价研究, Tel: 021-51322401, E-mail: rmj801@126.com

年来在药理毒理研究中的应用作如下介绍。

## 1 离体肾灌流技术特点

离体肾灌流的手术操作程序,一般是先将实验动物麻醉,左肾动脉插管,以灌流液恒速灌流,再进行肾静脉和输尿管插管,在体灌流平衡一段时间后,左肾被摘离置于特定的体外装置进行灌流。因该技术能在一定时间内维持肾脏的生理、生化功能,所以可利用这段时间观察外源性物质对肾脏的作用。离体肾主要来源于大鼠、犬、兔、小型猪等。常用的灌流液是 Krebs-Henseleit 液 ( $\text{NaCl } 118.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $\text{KCl } 4.7 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $\text{NaHCO}_3 \text{ } 25.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $\text{CaCl}_2 \text{ } 1.8 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \text{ } 1.2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $\text{MgSO}_4 \text{ } 1.2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ , 右旋糖  $11.1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  和  $0.25\%$  BSA)。一般而言,离体肾脏能够在  $120 \text{ min}$  内基本保持功能稳定,有的甚至可达  $120 \text{ min}$  以上<sup>[4-5]</sup>。

离体肾灌流技术是在离体器官水平下进行实验,保留了肾脏完整的细胞及组织,能够在一段时间内保持良好的肾小球和肾小管功能,细胞间的相互作用以及各种代谢酶的活性,而且灌流状态下肾脏有正常的摄取、转运、代谢、排泄和分泌功能,氧、营养物和化合物可经正常的生理途径进入细胞,所以很大程度上克服了某些离体实验的缺点,如肾匀浆、游离肾细胞培养等细胞间的联系遭到破坏、酶系处于异常分布状态以及细胞器因缺氧而受损。

在离体肾灌流过程中,可多次从由输尿管和肾静脉流出的灌流液采样,分析测定其中外源性物质及其代谢产物,在一定时间内动态观察外源性物质进入肾脏内所发生的变化,进行短期的代谢动力学试验;灌流结束后可对肾脏进行组织学观察,了解外源性物质对肾组织本身的影响。此外,可通过调节灌流介质的成分和流速,严格控制进入肾脏中外源性物质的量,确定受试物在肾脏中发生的变化以及对肾脏的效应。

## 2 在药理学的应用

### 2.1 药物在肾脏的排泄过程

肾脏是一个产生尿液、排泄废物的器官,肾脏经滤过、重吸收和稀释浓缩过程,保留人体所必需的物质,排泄无用的代谢废物及毒性物质。离体肾灌流技术是将药物加入到灌流液,研究药物在肾脏中经肾小球滤过或肾小管分泌,然后随尿液排出体外的过程。Ma 等<sup>[6]</sup>采用大鼠离体肾灌流模型研究黏菌素的排泄过程。发现灌流液中黏菌素迅速减少,大部分黏菌素经肾小管再吸收入肾脏,只有少量黏菌素排泄到尿中。尿液中的 pH 影响黏菌素在肾脏中的再吸收的过程。Wang 等<sup>[7]</sup>采用大鼠离体肾灌流模型,研究 4-甲基伞形酮(4-MU)在大鼠肾脏中的排泄。发现 92% 的 4-MU 主要通过酸化形成代谢产物 4-甲基-伞形酮- $\beta$ -D-半乳糖苷(4MUG),然后经肾排泄清除。Taft 等<sup>[8]</sup>研究性别对对胺尿酸(PAH)和速尿灵(FSM)排泄过程的影响,用 HPLC 测量尿液和灌流液中 PAH 和 FSM 含量。PAH 在雄性大鼠中,肾清除率和排泄率明显增高;FSM 在雄性大鼠的肾清除率也明显高于雌性大鼠。实验显示 IPK 在评价性别影响药物排泄方面是一个有效模型。

### 2.2 药物作用机制

离体肾灌流技术可用于药物作用机制的研究,为深入了解药物临床作用本质及体内一些重要的生理生化过程提供了重要的理论依据。朱深银等<sup>[9]</sup>建立离体大鼠肾脏灌流模型,随机分为对照组和丙磺舒处理组,以含复方氨基酸和  $65 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  牛血清白蛋白的 K-H 灌流液循环灌流  $90 \text{ min}$ ,定时收集导尿液和灌流液,测定其中菊粉、钠、葡萄糖及尿酸含量,计算肾功能参数和尿酸排泄情况。与对照组比较,丙磺舒使离体肾脏尿酸排泄量增加。提示离体肾灌流可用于发现和评价促尿酸排泄药物作用。Fonseca-Magalhães 等<sup>[10]</sup>在大鼠离体肾灌流液中加入舍曲林,定时收集尿液和灌流液。分别测定肾血管阻力、尿流量以及肾小球滤过率(GFR),发现抗抑郁药舍曲林可能通过直接作用血管平滑肌细胞,抑制痉挛。它的作用与细胞途径的  $\text{Ca}^{2+}$  释放无关,但调节受体和电位控制  $\text{Ca}^{2+}$  通道的通透性,减少相关的肌纤维膜  $\text{Ca}^{2+}$ 。El-Mas<sup>[11]</sup>等分别在雄雌大鼠的离体肾灌流液中加入尼古丁,通过灌注压的改变,发现性别对尼古丁作用于异丙肾上腺素引起血管舒张的过程有影响。雌性大鼠中,尼古丁减弱异丙肾上腺素引起血管舒张的机制可能与雌性激素-NOS 信号有关;在雄性大鼠中,可能仅与单独的 NOS 有关。

### 2.3 药物间的联用

使用多种药物治疗疾病时,药物之间的联用可能影响药物治疗疾病的有效剂量。离体肾灌流可以在接近生理状况的条件下进行研究,而且离体肾灌流易于控制和改变实验的条件,为指导临床合理用药提供依据。Nakatani-Freshwater 等<sup>[12]</sup>研究甲氧苄氨嘧啶对 Apricitabine(ATC)和拉美夫定消除的影响。先以  $0.5, 1, 5, 10, 50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  的甲氧苄氨嘧啶对大鼠离体肾脏灌流,  $10 \text{ min}$  后分别加入不同剂量的 ATC 和拉美夫定对肾脏进行灌流。采用 LC-MS-MS 检测尿液和灌流液中的 ATC 和拉美夫定的含量;结果发现甲氧苄氨嘧啶的加入显著抑制了 ATC 在大鼠肾脏的代谢,与甲氧苄氨嘧啶抑制拉美夫定代谢相似。因此临床在联合应用甲氧苄氨嘧啶和 ATC 时,应考虑药物间的相互作用,增加 ATC 的剂量。Kamata 等<sup>[13]</sup>研究来源于花生四烯酸(AA)的血管松弛药与消炎药的联用。发现在链脲霉素(STZ)诱导的糖尿病大鼠肾灌流模型中,消炎药、SKF525A 或者克霉唑的加入可以完全抑制糖尿病组的 AA 诱导的血管持续松弛,而吡咯雷酸、SQ29548 或黄芩黄酮的加入不能完全抑制糖尿病组的 AA 诱导的血管持续松弛。Tamhane 等<sup>[14]</sup>在大鼠离体肾灌流模型中,发现当 VX-702 和氨甲蝶呤(MTX)联用时,可能不存在药物之间的交互作用。

## 3 在毒理学的应用

应用离体肾灌流技术,可在给予药物后的灌流液中选择性的测定有关酶的活性和蛋白质含量的变化,同时进行肾脏组织病理学检查,观察药物是否会引起肾损伤。并能较明确地判断对肾损伤的特点和程度,有助于对肾损伤机制的研究。

作为第一代铂类似物,卡铂在一定的剂量下可引起药物性肾损伤。Giustarini 等<sup>[15]</sup>通过大鼠离体肾灌流模型,研究卡铂引起肾损伤的机制。实验以不同剂量的卡铂对大鼠离

体肾脏进行灌流,分析尿液和灌流液中的尿糖、钠离子以及硫化物的含量,结合肾组织匀浆中有关酶的变化。结果发现 5~500  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  卡铂的剂量没有改变肾功能,但是显著降低了半胱氨酸、谷胱甘肽并暴露的含巯基的蛋白。实验过程中氧化应激反应不明显,含铂化合物致肾损伤机制可能与自由基无关。Ghaznavi 等<sup>[16]</sup>通过大鼠离体肾灌流技术研究一氧化氮(NO)对庆大霉素(GM)造成急性肾损伤的影响。测定尿液中的 *N*-乙酰- $\beta$ -*D*-氨基葡萄糖苷酶(NAG)、乳酸盐脱氢酶(LDH)和碱性磷酸酶(ALP)变化评价细胞损伤程度。当灌流液中的精氨酸减少,而 *L*-精氨酸甲酯增加时,GM 造成的肾毒性模型尿液中 NAG,LDH 及 ALP 增加,肾小球滤过率(GFR)降低。发现 NO 的形成可能抑制 GM 造成的肾毒性。Rosenberger 等<sup>[17]</sup>通过整体动物实验和离体肾灌流实验,研究链脲霉素(STZ)致糖尿病大鼠急性肾损伤的变化。随机分为对照组、离体肾组和 *在体肾组*。在 *在体肾组*,分析血浆和尿液中肌酐、尿素氮、钠离子、钾离子以及钠离子重吸收和钾离子清除的变化。离体肾组,分析尿液和灌流液中钠离子重吸收和钾离子清除的变化。结合组织病理学发现,在 *在体肾组*与对照组相比,糖尿病大鼠肾髓质的急性肾小管损伤有显著差异,离体肾组髓质损伤明显提高;在 *在体肾组*可见集合管损伤和细胞膨大脱落,离体肾组的集合管损伤和细胞膨大脱落更加显著。

离体肾灌流一方面有助于对肾损伤机制的深入研究,另一方面还可通过药物致肾毒性模型寻找肾损伤标志物。一些早期、灵敏、特异的肾损伤生物标志物<sup>[18]</sup>的发现对临床预测、诊断、治疗药物性肾损伤都有着重要的意义。周琦等<sup>[19]</sup>采用大鼠离体肾灌流模型,空白组给予正常灌流液,马兜铃酸(AA)组给予 0.14  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ,灌流给药 10 min 后,收集不同时间点灌流液和尿液,分别检测钾、钠、氯离子浓度,计算离子清除率,ELISA 方法检测肝型脂肪酸结合蛋白(*L*-FABP)浓度。空白对照组和 AA 组在给药 0.5,1 h 时,离子清除率均明显下降,灌流因素与药物因素差异不明显。而 *L*-FABP 在给药灌流后即刻明显升高,与空白组相比差异显著,*L*-FABP 在空白对照组排泄相对稳定,AA 组则继续升高。*L*-FABP 较其他离子清除率等肾小管损伤指标,更能特异地反映马兜铃酸致急性肾小管损伤的特点。提示尿 *L*-FABP 可作为一个早期且敏感的肾小管损伤生物标志物。

#### 4 其他

通过观察肾小球或肾小管等组织病理学改变,研究内源性物质变化及其作用机制,从而通过改变内源性物质来调节肾脏的生理活性。如离体肾灌流过程中,肾脏中的 C 型利钠肽(CNP)活性所受生理因素(如血流、血压或激素水平)影响比较小。灌流过程中可以控制 CNP 的改变,消除系统影响,进一步研究肾脏中未发现的 CNP 活性<sup>[20]</sup>。此外,在低氧造成的末端肾小管损伤中低氧诱导因子(HIF)的作用方面<sup>[21]</sup>以及连接蛋白类(Cx)、 $\alpha_1$ -肾上腺素能受体等对血管收缩和舒张的调节方面<sup>[22-26]</sup>也有一定研究。

离体肾灌流模型也用于新技术的评价。Scott 等<sup>[27]</sup>通过

离体肾灌流模型,发现采用注射阳离子铁蛋白(CF)的稳定磁共振成像(MRI)技术能精确测量肾小球的数量和位置。因此可通过无损性测量整个肾中肾小球的数目和表面肾小球的量达到早期预测肾损伤的目的。

#### 5 结语

离体肾灌流技术在一定时间内既保留着完整细胞的天然屏障和营养液的供给,又能够保持肾脏正常的生理活性和生化功能,在很大程度上模拟了在体内的情况。此外,该技术又具有离体系统的优点,能够排除其他器官组织的干扰,可控制外源性物质的浓度,定量分析外源性物质在灌流液和尿液中的浓度变化,观察外源性物质对肾脏的作用。但离体肾脏灌流技术也存在其缺点,如受时间限制、手术操作相对复杂等。

近些年来,离体肾灌流技术广泛应用于药物在肾脏的排泄过程、药物的作用机制、药物间的联用以及药物性肾损伤机制等研究。随着现代分析技术的迅猛发展,GC-MS,LC-MS 以及 LC-MS-MS 的应用,肾灌流与其结合具有广阔的应用前景。

离体肾灌流技术在用于研究中药方面也具有很大潜力。中药化学成分众多,成分之间作用复杂。离体肾灌流技术可用于研究中药单一成分或多成分在肾脏内的排泄、作用机制以及中药之间的配伍,同时该技术也为中药安全性评价及毒理学研究提供了一个有效模型。

#### [参考文献]

- [1] 张娜,谢鸣.龙胆泻肝汤中关木通配伍的肾毒性研究[J].中国实验方剂学杂志,2006,12(5):58.
- [2] 张茜,周绮,金若敏,等.吴茱萸次碱对肝肾毒性的初步研究[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(8):221.
- [3] 潘旭旺,李范珠.肾微透析技术及其在肾组织间液腺苷测定中的应用[J].中华医学杂志,2006,86(17):1221.
- [4] 袁发焕,光丽霞,谭红梅.肾脏体外灌流装置的研制及应用[J].中国现代医学杂志,2006,16(13):2015.
- [5] 殷胜勇,葛霁光,郭森.离体灌流肾脏生理功能及其内在结构动态变化研究[J].浙江大学学报,2004,38(6):789.
- [6] Ma Z, Wang J P, Nation R L, et al. Renal disposition of colistin in the isolated perfused rat kidney [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2009,53:2857.
- [7] Wang J P, Evans A M, Knights K M, et al. Differential disposition of intra-renal generated and preformed glucuronides: studies with 4-methylumbelliferone and 4-methylumbelliferyl glucuronide in the filtering and nonfiltering isolated perfused rat kidney [J]. J Pharm Pharmacol, 2011,63:507.
- [8] Taft D R, Dontabhaktuni A, Babayeva M, et al. Application of the isolated perfused rat kidney model to

- assess gender effects on drug excretion[J]. *Drug Dev Ind Pharm*, 2006,32(8):919.
- [9] 朱深银,周远大,刘庆山,等.离体大鼠肾脏灌注技术在发现和评价促尿酸排泄药物中的初步应用[J].*中国药理学通报*,2006,22(12):1452.
- [10] Fonseca-Magalhães P A, Sousa D F, Siqueiraa R J B, et al. Inhibitory effects of sertraline in rat isolated perfused kidneys and in isolated ring preparations of rat arteries[J]. *J Pharm Pharmacol*,2011, 63: 1186.
- [11] El-Mas M M, El-Gowilly S M, Gohar E Y, et al. Sex and hormonal influences on the nicotine-induced attenuation of isoprenaline vasodilations in the perfused rat kidney [J]. *Can J Physiol Pharmacol*, 2009, 87: 539.
- [12] Nakatani-Freshwater T, Babayeva M, Dontabhaktuni A, et al. Effects of trimethoprim on the clearance of apricitabine, a deoxycytidine analog reverse transcriptase inhibitor, and lamivudine in the isolated perfused rat kidney [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2006, 319:941.
- [13] Kamata, Hosokawa M, Matsumoto T, et al. Altered arachidonic acid-mediated responses in the perfused kidney of the streptozotocin-induced diabetic rat [J]. *J Smooth Muscle Res*,2006,42 (5): 171.
- [14] Tamhane M, Chakilam A R, Jayaraj A, et al. Comparative renal excretion of VX-702, a novel p38 MAPK inhibitor, and methotrexate in the perfused rat kidney model [J]. *Drug Dev Ind Pharm*, 2010, 36 (3):315.
- [15] Giustarini D, Dalle-Donne I, Paccagnin E, et al. Carboplatin-induced alteration of the thiol homeostasis in the isolated perfused rat kidney [J]. *Arch Biochem Biophys*, 2009,488:83.
- [16] Ghaznavi R, Faghihi M, Kadkhodae M, et al. Effects of nitric oxide on gentamicin toxicity in isolated perfused rat kidneys [J]. *J Nephrol*,2005,18(5):548.
- [17] Rosenberger C, Khamaisi M, Goldfarb M. Acute kidney injury in the diabetic rat: studies in the isolated perfused and intact kidney [J]. *Am J Nephrol*, 2008,28:831.
- [18] 李一飞,姚广涛.急性肾损伤中肾小管损伤标志物的研究进展 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2011, 17 (23):276.
- [19] 周绮,张泽安,金若敏.大鼠离体肾灌注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.
- [20] Hu P, Lu L, Hu B, et al. Renal action of C-type natriuretic peptide: advocating the isolated perfused rat kidney model [J]. *Saudi J Kidney Dis Transpl*,2010,21 (4):613.
- [21] Rosenberger C, Rosen S, Shina A, et al. Activation of hypoxia-inducible factors ameliorates hypoxic distal tubular injury in the isolated perfused rat kidney [J]. *Nephrol Dial Transplant*,2008,23: 3472.
- [22] Piao H L, Sato A, Nozawa Y, et al. Effects of connexin-mimetic peptides on perfusion pressure in response to phenylephrine in isolated perfused rat kidneys [J]. *Clin Exp Nephrol*,2011,15:203.
- [23] Awe S O, Adeagbo A S O. Vascular  $\alpha_1$ -adrenoceptors in isolated perfused rat kidney: inuence of ageing [J]. *Auton Autacoid Pharmacol*, 2007, 27:19.
- [24] Tölle M, Schuchardt M, Wiedon A, et al. Differential effects of uridine adenosine tetraphosphate on purinoceptors in the rat isolated perfused kidney [J]. *Brit J Pharmacol*, 2010,161:530.
- [25] Fisiologia D, Medicina F, Granada C, et al. mechanisms of hydrogen peroxide-induced vasoconstriction in the isolated perfused rat kidney [J]. *J Pharm Pharmacol*, 2010,63(3):325.
- [26] Michel F, Simonet S, Vayssettes-Courchay V, et al. Altered TP receptor function in isolated, perfused kidneys of nondiabetic and diabetic ApoE-deficient mice [J]. *Am J Physiol Renal Physiol*,2008,294: F120.
- [27] Beeman S C, Zhang M, Gubhaju L, et al. Measuring glomerular number and size in perfused kidneys using MRI [J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2011, 300: F1454.

[责任编辑 邹晓翠]