

离体大鼠肾灌注聚乙二醇修饰牛血红蛋白时的肾功能

包捷^{1*}, 王晓云¹, 王爱平²

(1. 兰州医学院环境卫生教研室, 甘肃 兰州 730000; 2. 中国医学科学院
协和医科大学药物研究所, 北京 100050)

摘要:目的 观察聚乙二醇修饰牛血红蛋白(PEG-Hb)是否理想的血液代用品。方法 分别以 PEG-Hb 60, 30, 15 和 6 g·L⁻¹ 浓度灌注大鼠离体肾脏, 测定肾功能。结果 60 g·L⁻¹ PEG-Hb 灌注后引起肾小球滤过率明显降低, 在 30, 60, 90 和 120 min 时分别下降了 75.5%, 73.4%, 68.2% 和 74.8%, 同时灌注阻力均有升高, 其他低浓度组无改变; 60 g·L⁻¹ PEG-Hb 还引起 Na 重吸收分数在 120 min 时降低; PEG-Hb 60, 30 g·L⁻¹ 组的尿液 *N*-乙酰 β-*D*-氨基葡萄糖苷酶含量升高, 最高可达对照组的 4 倍, 15 g·L⁻¹ 组 120 min 时该酶含量亦明显升高。结论 低浓度 PEG-Hb 不引起大鼠离体灌注肾的肾功能下降, 高浓度 PEG-Hb 灌注可使肾功能下降。

关键词: 聚乙二醇修饰牛血红蛋白; 离体灌注肾; 肾功能

中图分类号: R965.3 R977.8

文献标识码: A

文章编号: 1000-3002(2002)04-0277-05

由于血源紧张、血液污染、输血反应常有发生, 因而, 人们一直在寻找安全有效的血液代用品。分子血红蛋白曾一度被用于紧急补充血容量, 但存在一些缺点, 如易解离为二聚体, 在血循环中存留时间短, 经肾脏滤过产生强烈的肾毒性^[1]; 能与 NO 结合, 导致血管收缩; 人源血红蛋白失去红细胞内 2, 3-二磷酸甘油酸的调节, 致使氧亲和力过强等, 故人们力图寻求化学修饰的方法, 稳定血红蛋白结构, 进而减少其毒副作用。近年来, 人们通过对血红蛋白进行交联、聚合等化学修饰方法得到了一类新型的血

液代用品, 聚乙二醇修饰牛血红蛋白 (polyethylene glycol modified bovine hemoglobin, PEG-Hb) 正是这一类产品之一。在一些整体动物实验及临床试验中, 它都显示了良好的携氧、扩容作用^[2], 被认为在急性外伤、失血性休克、实体瘤治疗中有良好的应用前景。但是, 修饰后的血红蛋白毒副作用如何仍是人们关注的问题。Conover 等^[3] 给大鼠输注 6% PEG-Hb 后, 其血压和肾血流量未发生改变, 但 Lenz 等^[4] 在黑猩猩体内进行的实验表明, 修饰血红蛋白溶液增加肺动脉阻力。Biro 等^[5] 在狗体内也得到同样的肾血管收缩效应。本研究通过体外肾灌注的方法初步探讨了 PEG-Hb 对肾脏滤过、重吸收等功能的影响。

1 材料和方法

1.1 动物和试剂

Wistar 大鼠, ♂, 体重 250 ~ 350 g, 军事医学科学院实验动物中心提供。PEG-Hb 由国家北京新药安全评价研究中心提供 (PEG-Hb 质控标准为 60 g·L⁻¹, 纯度 99%)。

1.2 仪器

7020 全自动生化分析仪 (日立公司, 日本), AVL9130 钠钾氯分析仪 (AVL 公司, 美国), SYB-Z 蠕动泵 (北京国营青云仪器厂)。恒温循环仪按 Macck^[6] 的方法组装, 主要部件: 蠕动泵, 氧合器, 恒温控制仪, 热交换器, 恒温灌注室, 压力表, 流量计。

1.3 离体大鼠肾制备

大鼠术前禁食 4 h, 自由饮水。采用改良 Bowman^[7] 法取肾, 步骤如下: 苯巴比妥钠 50 mg·kg⁻¹ ip 麻醉, 开腹暴露右肾, 剥离并行右输尿管插管, 分离腹主动脉, 右肾动脉, 下腔静脉及各分支血管, 从下腔静脉注入肝素 400 U, 行下腔静脉插管及右肾动脉插管并结扎分支动静脉, 迅速切取右肾于氧合灌流液冲洗并移至 37℃ 恒温循环仪上。

收稿日期: 2001-12-20 接受日期: 2002-05-16

作者简介: 包捷 (1977 -), 女, 甘肃省兰州市人, 医学硕士研究生, 研究方向为靶器官毒理。

* 联系作者 Tel: (0931) 8289534,

E-mail: bjbaojie@sohu.com

1.4 灌流液制备和分组

灌流液用 PEG-Hb 溶剂作为母液,加入肌酐,葡萄糖,氨基酸,其组成如下:(mmol·L⁻¹) NaCl 150, NaHCO₃ 5, Na₂HPO₄ 4, NaH₂PO₄ 1, KCl 5.0, 葡萄糖 5.5, 蛋氨酸 0.5, 丙氨酸 2.0, 甘氨酸 2.0, 丝氨酸 2.0, 精氨酸 2.0, 脯氨酸 2.0, 天冬氨酸 3.0, 异亮氨酸 1.0, 半胱氨酸 1 和肌酐 100 mg·L⁻¹, pH 7.6。牛白蛋白的加入量根据不同浓度 PEG-Hb 而不同, 0, 6, 15, 30, 60 g·L⁻¹ PEG-Hb 分别加入牛白蛋白 60, 54, 45, 30, 0 g·L⁻¹。灌流液渗透压 771 ~ 797 kPa。

1.5 实验方法

肾脏分离后迅速置于 37℃ 恒温循环灌流仪, 恒速充以 95% O₂ 和 5% CO₂ 的混合气体, 100 mL·min⁻¹, 平衡 30 min。灌流液按 0.4 mL·g⁻¹ 体重, 控制流量在 10 mL·min⁻¹, 灌流持续 120 min, 每隔 30 min 收集尿液和灌流液作为测定标本。尿液收集 20 min, 在其中点时间收集肾静脉出口的灌流液。测定

肾小球滤过率(GFR), 灌流阻力(RVR, 灌流压/灌流量), 离子选择电极法测定 Na^[8] 并计算 Na 重吸收分数(FRNa, [1 - (尿钠/灌流液钠)/(尿肌酐/灌流液肌酐)] × 100%), 酶法测定尿液中 *N*-乙酰 β-*D*-氨基葡萄糖苷酶(NAG)活性^[9], 苦味酸法测定肌酐^[8]。

1.6 统计学处理

结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SAS 统计软件处理, 进行方差分析和 Dunnett *t* 检验。

2 结果

2.1 PEG-Hb 对肾小球滤过率的影响

由表 1 结果可见, 与对照组相比, 灌流 PEG-Hb 60 g·L⁻¹ 引起肾小球滤过率下降, 在 30, 60, 90 和 120 min 分别下降了 75.5%, 73.4%, 68.2% 和 74.8%, 差异具有显著性 ($P < 0.05$)。

2.2 PEG-Hb 对灌流阻力的影响

由表 2 结果可见, PEG-Hb 60 g·L⁻¹ 灌流可引起

Tab 1. Effect of perfusing polyethylene glycol-modified bovine hemoglobin (PEG-Hb) on glomerular filtration rate (GFR) in isolated kidney of rats

PEG-Hb /g·L ⁻¹	GFR/mL·min ⁻¹			
	30	60	90	120(min)
0	0.106 ± 0.017	0.128 ± 0.023	0.151 ± 0.025	0.202 ± 0.038
60	0.026 ± 0.012*	0.034 ± 0.019*	0.048 ± 0.025*	0.053 ± 0.028*
30	0.089 ± 0.019	0.114 ± 0.049	0.134 ± 0.047	0.170 ± 0.045
15	0.102 ± 0.031	0.126 ± 0.034	0.141 ± 0.020	0.183 ± 0.027
6	0.093 ± 0.017	0.117 ± 0.024	0.137 ± 0.020	0.190 ± 0.021

$\bar{x} \pm s$, $n = 5$. * $P < 0.05$, compared with control group (0 g·L⁻¹).

Tab 2. Effect of perfusing polyethylene glycol-modified bovine hemoglobin on renal vascular resistance (RVR) in isolated kidney of rats

PEG-Hb /g·L ⁻¹	RVR / kPa·mL ⁻¹ ·min ⁻¹			
	30	60	90	120(min)
0	1.09 ± 0.40	1.25 ± 0.45	1.37 ± 0.49	1.42 ± 0.56
60	1.73 ± 0.36*	1.90 ± 0.28*	1.93 ± 0.27*	2.01 ± 0.32*
30	1.44 ± 0.29	1.53 ± 0.36	1.59 ± 0.47	1.90 ± 0.43
15	1.22 ± 0.21	1.44 ± 0.21	1.46 ± 0.35	1.57 ± 0.36
6	1.09 ± 0.12	1.13 ± 0.15	1.22 ± 0.23	1.48 ± 0.21

RVR = perfusion pressure/perfusion flow. $\bar{x} \pm s$, $n = 5$. * $P < 0.05$, compared with control group (0 g·L⁻¹).

Tab 3. Effect of perfusing polyethylene glycol-modified bovine hemoglobin on fractional reabsorption of Na (FRNa) in isolated kidney of rats

PEG-Hb /g·L ⁻¹	FRNa/%			
	30	60	90	120(min)
0	90.4 ± 3.5	89.7 ± 3.2	88.7 ± 3.8	85.7 ± 2.7
60	96.2 ± 2.7	94.8 ± 3.7	85.0 ± 2.5	73.1 ± 4.6*
30	96.7 ± 3.8	93.6 ± 2.8	86.6 ± 3.6	79.3 ± 5.1
15	92.2 ± 6.8	91.5 ± 4.2	86.4 ± 4.0	79.4 ± 3.2
6	91.7 ± 5.0	89.1 ± 2.7	88.5 ± 4.5	84.6 ± 2.8

FRNa = $[1 - (U_{Na}/P_{Na}) / (U_{cre}/P_{cre})] \times 100\%$. U_{Na} : Concentration of urine Na; P_{Na} : concentration of perfusate Na; U_{cre} : concentration of urine creatinine; P_{cre} : concentration of perfusate creatinine. $\bar{x} \pm s$, $n = 5$. * $P < 0.05$, compared with control group (0 g·L⁻¹).

Tab 4. Effect of perfusing polyethylene glycol-modified bovine hemoglobin on urinary N-acetyl-beta-D-glucosaminidase (NAG) activity in isolated kidney of rats

PEG-Hb /g·L ⁻¹	NAG activity/ $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ creatinine			
	30	60	90	120(min)
0	53 ± 19	59 ± 12	69 ± 13	105 ± 39
60	187 ± 28*	184 ± 22*	206 ± 26*	221 ± 25*
30	214 ± 56*	219 ± 86*	241 ± 96*	201 ± 39*
15	80 ± 29	1 ± 23	136 ± 38	180 ± 59*
6	83 ± 11	96 ± 19	101 ± 24	119 ± 31

$\bar{x} \pm s$, $n = 5$. * $P < 0.05$, compared with control group (0 g·L⁻¹).

灌流阻力上升,在 30, 60, 90 和 120 min 比相应对照值分别升高了 58.5%, 52.1%, 40.8%, 41.1%, 差异有显著性($P < 0.05$)。30 g·L⁻¹组在 120 min 时升高较明显,但与同一时间的对照值比较无显著性差异。

2.3 PEG-Hb 对 Na 重吸收分数的影响

由表 3 结果可见,在本实验条件下,PEG-Hb 灌流对 FRNa 的影响不明显,只有 PEG-Hb 60 g·L⁻¹组在 120 min 时引起 FRNa 下降,与对照组同一时间点比较差异有显著性($P < 0.05$)。

2.4 尿液中 N-乙酰 β-D-氨基葡萄糖苷酶活性的变化

由表 4 结果可见,PEG-Hb 灌流可引起尿液中 NAG 含量升高,60 和 30 g·L⁻¹组在 30, 60, 90 和 120 min 时的酶含量均显著高于对照组,15 g·L⁻¹组在 120 min 时 NAG 活性升高与对照相比有显著性差异($P < 0.05$)。

3 讨论

研究表明 PEG-Hb 四聚体稳定性增强,血管内

存留时间延长,携氧能力不改变而氧亲和力仅受氯离子调节,是一种理想的携氧扩容剂^[2]。然而,修饰后的血红蛋白依然存在血压升高、肾功能受损等副作用^[10],研究者认为这是由于修饰后的血红蛋白溶液中仍有一些游离分子存在,或化学修饰方法不稳定致部分分子重新游离所致。我们应用离体肾灌流模型,初步探讨了体外灌流 PEG-Hb 条件下,肾脏功能的改变。

实验结果表明,60 g·L⁻¹ PEG-Hb 能引起灌流阻力升高,肾小球滤过率降低,但不能确定这种现象是因肾脏血管收缩还是血红蛋白漏出堵塞肾小管引起。一些研究者认为血红蛋白致高血压是血红蛋白与 NO 相互作用的结果^[11]。NO 是血管内皮细胞释放的松弛因子,能松弛血管平滑肌以维持全身和肺动脉血压正常。生理条件下,血红蛋白不能透过红细胞膜与 NO 结合,但当溶血或输血红蛋白溶液时,血红蛋白游离于红细胞外,透过内皮屏障与 NO 结合抑制了 NO 的舒血管作用,导致血管收缩,血压升高,有人将此称为“NO 清除效应”。大量的整体和离体实验表明,纯化的无基质分子血红蛋白溶液能引

起鼠和狗的血管收缩,导致血压升高。但是修饰血红蛋白溶液的血管作用研究结果并不一致。在本实验中,只有 $60 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 组的 PEG-Hb 引起了灌注阻力升高。这种作用差异是否由于血红蛋白溶液的制备工艺、溶液中游离分子的含量、血红蛋白透过内皮屏障的能力以及各个脏器血管对“NO 清除效应”敏感性的不同所致,还需进一步研究。

本实验结果还发现 $60 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ PEG-Hb 灌流引起尿液中 NAG 含量升高。NAG 分布于溶酶体,被认为是溶酶体的特异酶,人及动物肾单位中含量较高,尤多含于近曲小管上皮细胞内,其含量的升高表明小管细胞受到损伤,同时这一浓度组的 FRNa 在 120 min 时明显降低,也证实了肾小管细胞受损,重吸收功能下降。在实验过程中,还观察到随着灌流时间的延长,尿液中出现血红蛋白,这与其他研究相一致^[12],说明肾脏的滤过和重吸收功能都有下降。

无基质的分子血红蛋白不能直接作为血液代用品,是由于它易于透过各种屏障,产生明显的升压效应和强烈的肾毒性,研究结果表明,不仅其二聚体可以通过肾小球滤过,而且四聚体的血红蛋白分子也可以出现于尿中^[13]。化学修饰稳定了血红蛋白结构,增加了分子量,使其不能透过内皮屏障,减轻升压效应;不能通过肾小球滤过,减少肾毒性。本实验中,肾功能的改变主要发生在 $60 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 组,其他组无明显变化,这可能是因为部分修饰血红蛋白分解,游离于溶液中而引起的。所以完善化学修饰的方法,减少修饰血红蛋白的分解,将会减少其毒副作用,使之成为有应用前景的血液代用品。

4 参考文献:

- [1] Chan WL, Tang NL, Yim CC, Lai FM, Tam MS. New features of renal lesion induced by stroma free hemoglobin[J]. *Toxicol Pathol*, 2000, **28**(5):635 - 642.
- [2] Conover CD, Linberg R, Shum KL, Shorr RG. The ability of polyethylene glycol conjugated bovine hemoglobin (PEG-Hb) to adequately deliver oxygen in both exchange transfusion and top-loaded rat models[J]. *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol*, 1999, **27**(2):93 - 107.
- [3] Conover CD, Linberg R, Gilbert CW, Shum KL, Shorr RG. Effect of polyethylene glycol conjugated bovine hemoglobin in both top-load and exchange transfusion rat models[J]. *Artif Organs*, 1997, **21**(10):1066 - 1075.
- [4] Lenz G, Junger H, Schneider M, Kothe N, Lissner R, Prince AM. Elimination of pyridoxylated polyhemoglobin after partial exchange transfusion in chimpanzees [J]. *Biomater Artif Cells Immobil Biotechnol*, 1991, **19**(4):699 - 708.
- [5] Biro GP, Jing N, Anderson PJ. Studies on blood substitutes based on hemoglobin and perfluorocarbon [J]. *Biomater Artif Cells Immobil Biotechnol*, 1992, **20**(2 - 4):1013 - 1020.
- [6] Maccek T. Renal clearance and isolated kidney perfusion techniques[J]. *Kidney Int*, 1986, **30**(2):142 - 151.
- [7] Bowman RH. The perfused rat kidney[A]. In: Hash JH, eds. *Methods in Enzymology* [M]. Vol 39: Hormone Action, Part D. New York: Academic Press, 1975. 3 - 11.
- [8] He DX, li Y. Natrium and kalium test[A]. In: Li YL, eds. *Chinese Medical Test Book* (中华医学检验全书) [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 1996. 701 - 750.
- [9] Kiyatabe I. Guanidinoacetic acid in serum, urine and renal cortex from streptozotocin-induced diabetic rats[J]. *Nippon Jinzo Gakkai Shi*, 1994, **36**(6):709 - 714.
- [10] Feola M, Simoni J, Tran R, Canizaro PC. Nephrotoxicity of hemoglobin solutions[J]. *Biomater Artif Cells Artif Organs*, 1990, **18**(2):233 - 249.
- [11] Katsuyama SS, Cole DJ, Drummond JC, Bradley K. Nitric oxide mediates the hypertensive response to a modified hemoglobin solution (DCLHb) in rats[J]. *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol*, 1994, **22**(1):1 - 7.
- [12] Gilbert C, Nho K, Johnson M, Linberg R, Shorr R. Hemoglobinuria in rats: a sensitive test of renal filtering and absorption of PEG-hemoglobin, a red blood cell substitute [J]. *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol*, 1994, **22**(3):535 - 541.
- [13] Simoni J, Simoni G, Hartsell A, Feola M. An improved blood substitute. *In vivo* evaluation of its renal effects[J]. *ASAIO J*, 1997, **43**(5):M714 - M725.

Renal function at perfusion of polyethylene glycol-modified bovine hemoglobin in isolated rat kidney

BAO Jie¹, WANG Xiao-Yun¹, WANG Ai-Ping²

(1. Department of Environmental Health, Lanzhou Medical College, Lanzhou 730000, China; 2. Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences, Peking Union Medical College, Beijing 100050, China)

Abstract: **AIM** To study whether polyethylene glycol-modified bovine hemoglobin(PEG-Hb) is a rational substitute of blood. **METHODS** Isolated rat kidney was perfused with 60, 30, 15 and 6 g·L⁻¹ PEG-Hb and renal function was evaluated. **RESULTS** Only 60 g·L⁻¹ PEG-Hb-perfused kidneys showed a reduced glomerular filtration rate(GFR), at 30, 60, 90 and 120 min periods, GFR was 75.5%, 73.4%, 68.2% and 74.8% lesser respectively than that perfused with the control albumin solution. At the same time, renal vascular resistance was significantly higher. Fractional reabsorption of sodium only reduced at 120 min when perfusing with 60 g·L⁻¹ PEG-Hb. Uri-

nary *N*-acetyl-β-*D*-glucosaminidase (NAG) activity was significantly increased in 60 and 30 g·L⁻¹ PEG-Hb group at 30, 60, 90 and 120 min, it can be 4-fold as high as control group, and in 15 g·L⁻¹ group at 120 min. **CONCLUSION** Low concentration of PEG-Hb has no obvious effect on the renal function, but the high concentration decreases the renal function in the isolated perfused rat kidneys.

Key words: polyethylene glycol modified bovine hemoglobin; isolated perfused kidney; renal function

(本文编辑 董立春)

欢迎订阅 2003 年《中国药理学杂志》

《中国药理学杂志》是由中国药学会主办,中国药理学杂志编辑部出版的综合性药理学学术刊物。月刊,国内外公开发行。读者为高、中级药理学工作者及其医药卫生人员。内容包括药理学各学科,辟有专题笔谈、综述、中药与天然药物、药理、药剂、临床药理学、药品检验及质量、药物化学、药物与临床、生物技术、新药介绍、药学史、药理学人物、药事管理、学术讨论、科研简报等栏目。创刊近 50 年来在医药卫生界影响较大,享有很高声誉,连续获得国家科委、中宣部、新闻出版署共同主办的第一、二届全国优秀科技期刊评比一等奖,新闻出版署和国家科委联合主办的首届国家期刊奖以及中国科协第一、二届优秀科技期刊一等奖。2001 年被国家新闻出版总署列入中国期刊方阵“双高期刊”。

本刊为大 16 开,每期定价为 10.00 元。国内邮发代号:2-232,国外代号:M313。地址:北京东四西大街 42 号(100710);电话:(010)65229531;传真:(010)665597969。