

采用微渗透泵测定清醒大鼠肾小球滤过率

王静波¹, 王海涛², 汪照寒³

(1. 沈阳市第六人民医院肝硬化病房, 沈阳 110006; 2. 沈阳医学院附属沈洲医院普外科, 沈阳 110001;
3. 中国医科大学附属第一医院传染科, 沈阳 110005)

【摘要】 目的 分析以荧光素异硫氰酸酯标记的菊粉(FITC-菊粉)作为标记物,通过微渗透泵,在大鼠清醒状态下,采用菊粉尿排泄率方法测定肾小球滤过率的可行性。方法 将FITC-菊粉溶解在生理盐水中配成浓度为24%的溶液,经滤过后(浓度降至8%)装在微渗透泵内。大鼠腹腔植入2个盛有上述FITC-菊粉溶液的微渗透泵,随机分成2组(需要收集24h尿量组及无需收集尿量组每组各10只),分别关在代谢笼内。植泵后第7天,需要收集24h尿量组收集24h尿量及代谢笼上残留的FITC-菊粉,在大鼠清醒状态下采集血液标本;无需收集尿量组仅采集血液标本。分别根据不同的公式计算GFR。GFR的计量单位为mL/min,分别用大鼠体重及双肾重量校正后的单位为mL/min·kg体重和mL/min·g体重。结果 需要收集24h尿量和无需收集尿量2种方法计算出来的GFR分别为(2.31±0.33)mL/min和(2.53±0.33)mL/min, $P=0.564$,两者之间差异无统计学意义;与已发表文献相比大鼠GFR平均值3.24 mL/min降低了30%,说明麻醉对GFR有较明显影响,去除麻醉因素的影响后,两者数值相近。结论 采用微渗透泵方法,用FITC-菊粉作为标记物,可以比较准确地测定清醒状态下大鼠GFR,尤其是无需收集尿量方法更加简便。

【关键词】 肾小球滤过率; 荧光素异硫氰酸酯标记菊粉; 微渗透泵

【中图分类号】 R33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2011)12-0051-05

doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2011.012.013

Determination of Glomerular Filtration Rate Using Micro-osmotic Pump in Conscious Rat

WANG Jing-bo¹, WANG Hai-tao², WANG Zhao-han³

(1. Department of Liver Cirrhosis, the Sixth People's Hospital of Shenyang, Shenyang 110006, China;
2. Department of General Surgery, The Affiliated Shenzhou Hospital of Shenyang Medical College, Shenyang 110001;
3. Department of Infectious Diseases, the first Affiliated Hospital, China Medical University, Shenyang 110005)

【Abstract】 Objective Two non-radioactive methods for determining glomerular filtration rate (GFR) in conscious rat using FITC-labeled inulin (FITC-inulin) and micro-osmotic pumps were evaluated. **Methods** FITC-inulin (24%) was dissolved in 0.9% NaCl and the concentration decreased to 8% after 24 h of dialysis. Two micro-osmotic pumps filled with 200 μ L of 8% FITC-inulin were inserted into the peritoneal cavity of rats. After their complete recovery from anesthesia, the rats were housed individually in metabolic cages. Urine and the residual fluorescence remaining on the cages were collection over 24 h on day 7 after micro-osmotic pump implantation. Blood sample was collected through the saphenous vein at the end of 24-h urine collection. Only blood was sampled using the same method in another group. GFR was evaluated on day 7 after micro-osmotic pump implantation using two methods expressed in microliters per minute, microliters per minute per kilogram body weight and per gram kidney weight. **Results** Based on the approach measuring

[基金项目] 国家自然科学基金, 编号 30270607。

[作者简介] 王静波(1972-), 女, 副主任医师, 医学博士, 从事晚期肝病及其并发症的诊治和基础研究。

urinary inulin clearance with urine collection and without urine collection the estimated GFR was (2.31 ± 0.33) microliters per minute and (2.53 ± 0.33) microliters per minute ($P = 0.564$), respectively. These values of GFR in conscious rats were only ca. 70% of that obtained in anesthetized rats determined in other previous studies. It was revealed that anesthesia may significantly influence GFR. **Conclusions** The results of the present study demonstrate the feasibility of the osmotic micropump approach to monitor GFR in conscious rat using FITC-inulin. Especially, the method without collecting urine is more convenient.

【Key words】 glomerular filtration rate; FITC-inulin; microosmotic pump; Rat

血液流经肾小球滤过膜后形成超滤液,即开始了尿液的生成,超滤液形成比率即肾小球滤过率(GFR),是评估肾脏功能、判断肾脏疾病进程的重要参考指标之一。没有生物学活性、能够自由通过肾小球滤过屏障、在肾小管既不被重吸收也不被再分泌的物质,是测定 GFR 的理想标记物。很多种物质被用于测定 GFR,如内源性物质——肌酐和胱抑素 C^[1,2],还有外源性物质——菊粉、荧光标记的 EDTA 和左旋糖等等^[3,4],其中菊粉清除率被认为是评价肾脏功能的金指标。GFR 测定主要有两种方法:①测定标记物的尿排泄率^[1,5];②标记物单剂负荷量注入静脉后,根据其血液动力学变化测定清除率^[6]。

在过去的十几年中,随着遗传学和分子生物学的发展,通过整合啮齿类动物基因组序列构建疾病模型,使多种疾病的研究不断深入^[7,8]。然而,由于缺少简单易行的 GFR 测定方法,使得肾脏疾病的研究相对滞后。由于啮齿类动物血容量有限、血中含有高浓度内源性非肌酐类似物,不宜用肌酐清除率测定 GFR^[7,9]。本研究中,我们用荧光素异硫氰酸酯(FITC)标记菊粉(FITC-菊粉)作为标记物,通过微渗透泵技术,在大鼠清醒状态下通过测定 FITC-菊粉尿排泄率计算 GFR。

1 材料和方法

1.1 材料

雄性 SD 大鼠(体重 200 ± 20 g,购自中国人民解放军军事医学科学院实验动物中心,动物合格证号: SCXK-2007-0040),FITC-菊粉(Sigma 公司,美国),微渗透泵(Alzet, model 2001),代谢笼(Columbus Instrument, 美国),透析袋(联合碳化公司)。

1.2 FITC-菊粉溶液的准备

FITC-菊粉(24%) 在沸水中溶解于生理盐水,吸入 MWCO 1,000 透析袋中,在 1,000 mL 生理盐水中室温过滤 24 h。为避光盛透析液的烧杯外包铝箔

纸。由于水分自由扩散作用,透析液扩散至透析袋内,使袋内 FITC-菊粉溶液浓度由 24% 降至 8%。吸出透析袋内 FITC-菊粉溶液,用 $0.22 \mu\text{m}$ 针头式过滤器过滤灭菌。

1.3 微渗透泵的植入

将稀释后浓度为 8% 的 FITC-菊粉溶液注入泵内,并于生理盐水中浸泡 4~6 h。大鼠麻醉后(0.8% 戊巴比妥钠,40 mg/kg,腹腔注射)置于暖床上,腹部剃毛,碘伏消毒。沿腹中线在肋窝下剪开一个 0.5 cm 的切口,把 2 个装有上述 FITC-菊粉溶液的微渗透泵分别置于腹腔左右两侧,逐层缝合切口,分笼饲养,每天查看术后大鼠状态并称量体重。

1.4 血液和尿液的收集

植泵后第 7 天将大鼠随机分成 2 组(每组 10 只),其中一组先收集 24 h 尿液,用 500 mmol/L HEPES 液洗刷代谢笼 2 次,收集残留在代谢笼上的 FITC-菊粉。24 h 尿液标本收集结束时,采用 Hem 等^[10]介绍的方法通过隐静脉采集血液标本。将大鼠放入顶端带有通气口的 100 mL 玻璃管中,两条后腿露在管外,股内侧刮毛,碘伏消毒,隐静脉采血大约 1.5 mL,离心后(4 000 r/min,10 min)收集血清。另外一组不收集尿液仅采集血液标本。装标本的试管注意外包铝箔纸避光。

1.5 血清和尿液标本 FITC 荧光量的测定

为避免 pH 值对 FITC 荧光值测定的影响,所有血液和尿液标本均用 pH 7.4 的 500 mmol/L HEPES 缓冲液调定 pH 值。一般在 400 μL 尿液或血清中加入 100 μL HEPES 缓冲液,混合液的 pH 值仍为 7.4。然后将 500 μL 上述混合液吸入杯中,荧光分光光度计测定 FITC 荧光值,激发波长 485 nm,发射波长 538 nm。

1.6 FITC 荧光值与菊粉浓度相关性的检测

通过检测已知浓度的 FITC-菊粉溶液的 FITC 荧光值来确定两者的相关性。对于尿液标本,标准曲线浓度为(0~120) $\mu\text{g}/\text{mL}$,400 μL 尿液标本中加入上述范围内不同浓度的 FITC-菊粉溶液 100 μL ,

用 pH 7.4 的 500 mmol/L HEPES 缓冲液调定 pH 值至 7.4。对于血液标本,标准曲线浓度为(0~300) μg/mL,400 μL 血清中加入上述范围内不同浓度的 FITC-菊粉溶液 100 μL,用 pH 7.4 的 500 mmol/L HEPES 缓冲液调定 pH 值至 7.4。采用线性回归分析,相关系数分别为 0.99、0.98,确定尿液和血液中 FITC 荧光值与菊粉浓度之间密切相关。

1.7 FITC-菊粉溶液稳定性的检测

通过测定滤过液中 FITC 荧光值来验证溶液中 FITC-菊粉结合的稳定性。将过滤后的 FITC-菊粉溶液室温下继续滤过 7 d,分别在第 1、3、5、7 天测定过滤液中 FITC 荧光值,计算该值占过滤液中总 FITC 荧光值的比例,分别为 0.89%、0.91%、1.18% 和 1.43%。第 1 天和第 7 天无明显不同,所以植泵 7 d 时间里 FITC 与菊粉结合稳定。

1.8 计算 GFR

参照文献[6,11],用两种方法计算 GFR:①需要收集 24 h 尿量, $GFR_1 = U_{FITC-inulin} \cdot V / P_{FITC-inulin}$ ($U_{FITC-inulin}$ 为尿液中 FITC 荧光值, V 为 24 h 尿量, $P_{FITC-inulin}$ 为血清中 FITC 荧光值);②无需收集 24 h 尿量, $GFR_2 = R / [Iss]$ (R 为 FITC-菊粉溶液泵入速率, $[Iss]$ 为血清 FITC-inulin 浓度)。GFR 计量单位为 mL/min,体重校正后为 mL/min·kg(大鼠体重),双肾重量校正后为 mL/min·g(大鼠双肾重量)。

1.9 统计学分析

采用 SPSS 13.0 软件分析,实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间均数比较采用配对 t 检验。 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 微渗透泵植入腹腔后第 1 天大鼠体重明显下降,第 3 天体重开始增加,第 4 天恢复至植泵前,第 7 天体重平均增加(9.5 ± 1.3) g。

2.2 植泵后第 7 天,采用收集 24 h 尿量方法计算 GFR 为 2.31 ± 0.33 mL/min;采用无需收集尿量方法计算 GFR 为 2.53 ± 0.33 mL/min(表 1),两者之间差异无统计学意义(图 1A)。分别用大鼠体重和双肾重量校正后,两种方法计算出的 GFR 之间无统计学意义(表 1,图 1B~1C)。

3 讨论

肾小球滤过率(GFR)是评估肾脏功能的主要参考指标之一。菊粉清除率被认为是测定 GFR 的金标准,因为菊粉能够自由通过肾小球滤过膜,在肾小管内既不被重吸收也不被分泌。用 FITC 标记后可以检测出血中微量菊粉,提高检测灵敏度。之前有学者应用 FITC-菊粉在麻醉状态下成功测定大鼠 GFR^[12,13]。检测 GFR 主要有两种方法:(1)负荷剂量菊粉一次性注入后利用 FITC-菊粉血浆清除动力学测定菊粉清除率。这种方法的优点是不需要收集 24 h 尿量,也不需要手术。(2)测定 FITC-菊粉尿排泄率,是本研究采用的方法。在大鼠腹腔内植入微渗透泵(Alzet 微渗透泵是一次性使用囊性无菌微渗透泵,容积为(200 ± 8) μL,恒定泵入速率 1 μL/h,使用时间 7 d)将 FITC-菊粉溶液持续匀速泵

表 1 大鼠 GFR 数值($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Tab.1 GFR values of the rats ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

	肾小球滤过率 ₁ GFR ₁ ($U_{FITC-inulin} \cdot V / P_{FITC-inulin}$)	肾小球滤过 ₂ GFR ₂ ($R / [Iss]$)	P 值 P value GFR ₁ vs GFR ₂
肾小球滤过率 GFR(mL/min)	2.31 ± 0.33	2.53 ± 0.33	0.207
GFR, mL/min·kg 大鼠体重	11.13 ± 1.53	11.66 ± 1.32	0.462
GFR, mL/min·g 大鼠双肾体重	1.23 ± 0.11	1.29 ± 0.12	0.146

$U_{FITC-inulin}$, 尿液中 FITC 荧光值; V , 24 h 尿量; $P_{FITC-inulin}$, 血清中 FITC 荧光值; R , FITC-菊粉溶液泵入速率; $[Iss]$, 稳态后血清中 FITC 荧光值; BW , 大鼠体重(kg); KW , 大鼠双肾重(g); P 值定义为 0.05

表 2 已发表文献中大鼠 GFR 数值

Tab.2 Rat GFR values published in the literature

状态 Status	肾小球滤过率 GFR (mL/min)	体重 BW (g)	性别 Gender	种属 Strain	标记物 Tracer	参考文献 Reference No.
麻醉 Anesthetized	3.92 ± 0.124	250 ~ 330	未注明 M&F	SD	FITC-菊粉 FITC-inulin	22
麻醉 Anesthetized	6.16	368 ± 12	雄性 Male	SD	菊粉 Inulin	23
麻醉 Anesthetized	2.38 ± 0.80	250	雄性 Male	SD	FITC-菊粉 FITC-inulin	24
麻醉 Anesthetized	1.15 ± 0.08	140 ~ 160	雄性 Male	Wistar	[¹⁴ C]菊粉 [¹⁴ C]inulin	14
麻醉 Anesthetized	1.14 ± 0.21*	350 ~ 400	雄性 M	Wistar	菊粉 Inulin	3
麻醉 Anesthetized	751 ± 42*	220 ~ 240	雄性 Male	Long-Evans	[¹⁴ C]菊粉 [¹⁴ C]inulin	15

* GFR 计量单位为 mL/min · 100 g

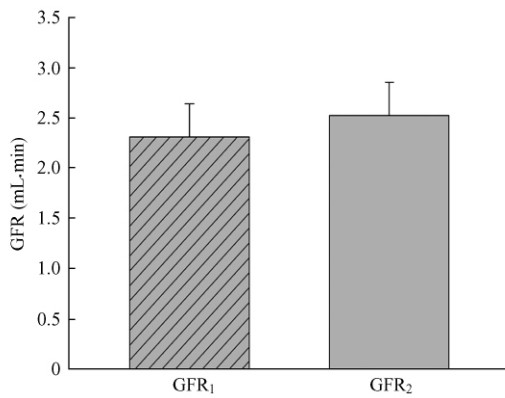


图 1A 采用微渗透泵通过两种方法测定清醒大鼠 GFR (mL/min)

GFR₁ 采用搜集 24 h 尿量方法测定的 GFR, GFR₂ 采用无需搜集 24 h 尿量方法测定的 GFR, 两者之间差异无统计学意义 ($P = 0.098$).

Fig. 1A GFR in the conscious rats determined by two methods using micro-osmotic pumping (mL/min).

GFR₁ determined by collecting 24-hour urine; GFR₂ determined without collecting 24-hour urine, $P > 0.05$, there was statistically no significant difference between the GFR values obtained by two methods.

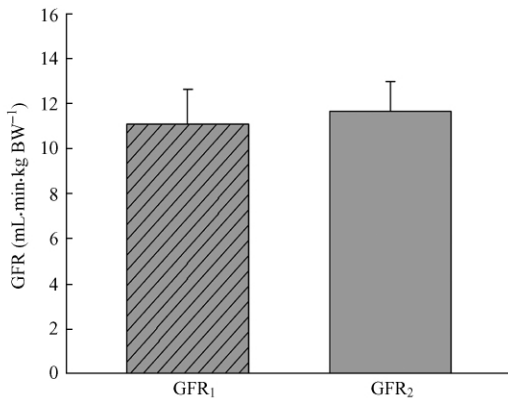


图 1B 采用微渗透泵通过两种方法测定清醒大鼠 GFR (mL/min·kg 体重)

GFR₁ 采用搜集 24 h 尿量方法测定的 GFR, GFR₂ 采用无需搜集 24 h 尿量方法测定的 GFR, 两者之间差异无统计学意义 ($P = 0.115$). BW, 大鼠体重 (kg).

Fig. 1B GFR in the conscious rats determined by two methods using micro-osmotic pumping (mL/min·kgBW).

GFR₁: determined by collecting 24-hour urine; GFR₂: determined without collecting 24-hour urine. BW: body weight. $P > 0.05$, there was statistically no significant difference between the GFR values obtained by two methods.

入腹腔,通过腹膜吸收入血,菊粉在体内逐渐蓄积,当入血速率与尿液排泄速率达到平衡时,即植泵后第 7 天,血液中 FITC-菊粉浓度达到稳态,此时测定血清中 FITC 荧光量计算 GFR。本研究采用两种方法计算 GFR: (1) 用 FITC-菊粉溶液的泵入速率除以

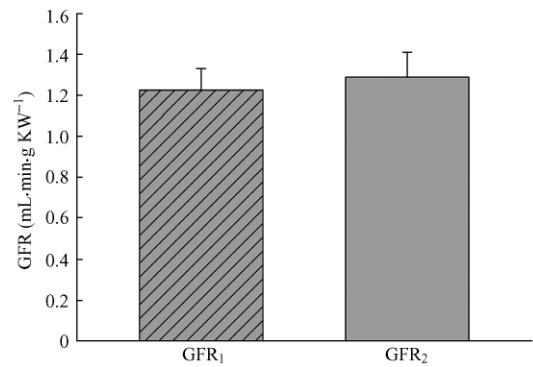


图 1C 采用微渗透泵通过两种方法测定清醒大鼠 GFR (mL/min·g 大鼠双肾重量)

GFR₁ 采用搜集 24 h 尿量方法测定的 GFR, GFR₂ 采用无需搜集 24 h 尿量方法测定的 GFR, 两者之间差异无统计学意义 ($P = 0.121$). KW, 大鼠双肾重量 (g).

Fig. 1C GFR in the conscious rats determined by two methods using micro-osmotic pumping (mL·min·g KW⁻¹).

GFR₁: determined by collecting 24-hour urine; GFR₂: determined without collecting 24-hour urine. KW: kidney weight. $P > 0.05$, there was statistically no significant difference between the GFR values obtained by two methods.

稳态时血清中菊粉浓度,此方法不需要收集 24 h 尿量; (2) 用尿液中菊粉浓度除以血清中菊粉浓度,再乘以 24 h 尿量,此方法需要收集 24 h 尿量。通过分析发现此两种方法计算出来的 GFR 数值相近。

关于大鼠 GFR 测定的研究很少,尤其是清醒状态下测定 GFR。从已发表的文献中发现大鼠 GFR 变化范围很大(表 2),主要与以下因素相关: (1) 性别^[16,17], (2) 种属^[18],这是由于性别、种属不同体重及肾脏的大小亦不同,GFR 通过体重、肾脏重量校对后,该差异可被纠正; (3) 麻醉^[19,20],GFR 是一个动力学参数,可以随生理因素的变化而改变,其中最主要的是肾血流量减少引起的肾小球血流动力学改变,据 Bouby^[21]等报道清醒状态下的 GFR 仅仅是麻醉状态下的 60% 左右。本研究大鼠在清醒状态下泵入菊粉溶液,并且在清醒状态下收集血液及尿液标本,除外麻醉对 GFR 的影响。我们测得的 GFR 数值为 2.31 mL/min、体重校正后为 11.13 mL/min·kg 体重,低于报道的 SD 大鼠 GFR 均值 3.24 mL/min 和 12.81 mL/min·kg 体重,大约降低了 30% ~ 40%,与 Bouby 等^[21]的报道相符。考虑与采集标本时大鼠处于清醒状态而非麻醉状态有关,证明了麻醉对 GFR 有较明显的影响。

总之,用 FITC 标记菊粉采用微渗透泵技术,测

定清醒状态下大鼠 GFR, 当菊粉浓度在血中达到稳态时, 采用无需收集 24 h 尿量和需要收集尿量两种方法计算出来的 GFR 相近; 在去除麻醉影响后, GFR 数值与已发表的结果无明显不同。本研究采用微渗透泵技术, 用 FITC-菊粉作为标记物, 可以比较准确地测定清醒状态下大鼠 GFR, 尤其是无需收集尿液的方法, 实验更简化, 易于操作。

致谢 感谢刘沛教授对本研究的指导。感谢中国医科大学中心实验室李春艳老师在荧光分光光度计使用方面的指导。感谢中国医科大学实验动物中心杨晨老师在动物实验方面的指导。还要感谢本科室同志们对我科研工作的大力支持。

参考文献:

- [1] Eisner C, Faulhaber-Walter R, Wang Y, et al. Major contribution of tubular secretion to creatinine clearance in mice [J]. *Kidney Int*, 2010, 77(6): 519-526.
- [2] Sharawey MA, Shawky EM, Ali LH, et al. Cystatin C: a predictor of hepatorenal syndrome in patients with liver cirrhosis [J]. *Hepatol Int*. 2011, Mar 12. [Epub ahead of print].
- [3] Fischer PA, Bogoliuk CB, Ramirez AJ, et al. A new procedure for evaluation of renal function without urine collection in rat [J]. *Kidney Int*. 2000, 58: 1336-1341.
- [4] Schock-Kusch D, Xie Q, Shulhevich Y, et al. Transcutaneous assessment of renal function in conscious rats with a device for measuring FITC-sinistrin disappearance curves [J]. *Kidney Int*. 2011 Mar 2. [Epub ahead of print].
- [5] Schock-Kusch D, Sadiq M, Henninger N, et al. Transcutaneous measurement of glomerular filtration rate using FITC-sinistrin in rats [J]. *Nephrol Dial Transplant*. 2009, 24(10): 2997-3001.
- [6] Sturgeon C, Sam AD, Law WR. Rapid determination of glomerular filtration rate by single-bolus inulin: a comparison of estimation analyses. *J Appl Physiol*. 1998, 84: 2154-2162.
- [7] Meneton P, Ichikawa I, Inagami T, et al. Renal physiology of the mouse [J]. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2000, 278: 339-351.
- [8] Li XC, Cook JL, et al. Intrarenal transfer of an intracellular cyan fluorescent fusion of angiotensin II selectively in proximal tubules increases blood pressure in rats and mice [J]. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2011, Feb 9. [Epub ahead of print]
- [9] Stridh S, Sällström J, Fridén M, et al. C-peptide normalizes glomerular filtration rate in hyperfiltrating conscious diabetic rats [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2009, 645: 219-225.
- [10] Hem A, Smith AJ, Solberg P. Saphenous vein puncture for blood sampling of the mouse, rat, hamster, gerbil, guinea pig, ferret and mink [J]. *Lab Anim*. 1998, 32: 364-368.
- [11] Qi Z, Breyer MD. Measurement of glomerular filtration rate in conscious mice [J]. *Methods Mol Biol*, 2009; 466: 61-72.
- [12] Brooks HL, Sorensen AM, Terris J, et al. Profiling of renal tubule Na⁺ transporter abundances in NHE3 and NCC null mice using targeted proteomics [J]. *J Physiol*. 2001, 530: 359-366.
- [13] Milia AF, Gross V, Plehm R, et al. Normal blood pressure and renal function in mice lacking the bradykinin B₂ receptor [J]. *Hypertension*. 2001, 37: 1473-1479.
- [14] Jobin J, Bonjour JP. Measurement of glomerular filtration rate in conscious unrestrained rats with inulin infused by implanted osmotic pumps [J]. *Am J Physiol*. 1985, 248: 734-738
- [15] Shirley DG, Walter SJ, Zewde T. Measurement of renal function in unrestrained conscious rats [J]. *J Physiol*. 1989, 408: 67-76.
- [16] Goldfarb DA, Matin SF, Braun WE, et al. Renal outcome 25 years after donor nephrectomy [J]. *J Urol*. 2001, 166: 2043-2047.
- [17] Noonan WT, Banks RO. Renal function and glucose transport in male and female mice with diet-induced type II diabetes mellitus [J]. *Proc Soc Exp Biol Med*. 2000, 225: 221-230.
- [18] Laouari D, Burtin M, Phelep A, et al. TGF- α mediates genetic susceptibility to chronic kidney disease [J]. *J Am Soc Nephrol*. 2011, 22(2): 327-335.
- [19] López-Lago MA, Thodima VJ, Guttapalli A, et al. Genomic deregulation during metastasis of renal cell carcinoma implements a myofibroblast-like program of gene expression [J]. *Cancer Res*. 2010, 70(23): 9682-9692.
- [20] Han X, Chesney RW. Stress-responsive gene TauT and acute kidney injury [J]. *J Biomed Sci*, 2010, 24; 17 Suppl 1: S28.
- [21] Bouby N, Ahloulay M, Nsegbe E, et al. Vasopressin increases glomerular filtration rate in conscious rats through its antidiuretic action [J]. *J Am Soc Nephrol*. 1996, 7: 842-851.
- [22] Sohtell M, Karlmark B, Ulfendahl H. FITC-inulin as a kidney tubule marker in the rat [J]. *Acta Physiol Scand*. 1983, 119: 313-316.
- [23] Cord S, Albert D, William R. Rapid determination of glomerular filtration rate by single-bolus inulin: a comparison of estimation analyses. *J Appl Physiol*. 1998; 84: 2154-2162.
- [24] Yu WM, Sandoval RM, Molitoris BA. Rapid determination of renal filtration using an optical ratiometric imaging approach [J]. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2007, 292: 1873-1880.

(修回日期)2011-08-29