

BNP 在不同缓冲体系中的血管舒张功能评价

高 昊, 刘利平, 马 鑫, 陈 蕴, 金 坚*

(江南大学 药学院, 江苏 无锡 214122)

摘要: 为了明确能使人脑钠肽(Brain Natriuretic Peptide)保持活性的适用缓冲溶液条件,采用常规离体血管灌流实验,观察人脑钠肽的不同缓冲溶液对家兔离体兔胸主动脉血管片段舒张功能的影响。研究发现,在以柠檬酸/磷酸氢二钠为基质的缓冲液条件下,BNP 在 10^{-8} ~ 10^{-5} mol/L 浓度区间对家兔血管舒张均呈良好的剂量依赖关系,而以醋酸/醋酸钠或磷酸氢二钾/磷酸二氢钾为基质的这两种缓冲液虽有一定的舒张效果,但没有剂量依赖关系。由此表明,在合适的 pH 条件下(4 或 5),柠檬酸/磷酸氢二钠缓冲液具有作为改进 BNP 注射剂处方的潜在价值。

关键词: 人脑钠肽;柠檬酸/磷酸氢二钠缓冲溶液;离体血管灌流;注射剂处方

中图分类号: R 972 **文献标志码:** A **文章编号:** 1673—1689(2013)09—0933—06

Vasodilating Effect of BNP in Different Kind of Buffer Systems

GAO Hao, LIU Li-ping, MA Xin, CHEN Yun, JIN Jian*

(School of pharmaceutical Sciences, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: To investigate the vasodilating effect of BNP in different buffer solutions, rabbit thoracic aorta was rapidly dissected out and the effect of BNP on the tension of aortic rings was measured in an organ bath system. The results showed that BNP in Citric acid/ Na_2HPO_4 buffer caused a concentration-dependent relaxation. However, BNP in NaAc/HAC or $\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$ buffer has vasodilating effect in dose-independent manner. The results indicate that BNP in Citric acid/ Na_2HPO_4 buffer could keep its vasodilating effect in a dose-dependent manner, implying that they may be effective in BNP formulation.

Keywords: brain natriuretic peptide, citric acid/ Na_2PO_4 buffer, isolated vascular perfusion, injectable prescription

BNP 作为心脏分泌的利尿钠肽家族的一员,起初是从猪脑中被提取纯化的^[1]。内源性人 BNP 是一种主要由心室肌分泌的循环多肽,其分泌水平与心室内容量和压力负荷状态相关^[2]。心脏在功能受损时分泌 BNP,起到对抗性调节激素作用,即通过与

RAAS 内皮质素-1 和 SNS 等生理性拮抗和抑制作用来维持心功能与体液平衡^[3]。随着心脏功能的进一步恶化,血管神经激素系统和保钠滞水激素系统的过度激活,机体陷入循环系统病理生理紊乱,最终掩盖了内源性 BNP 心脏保护的代偿作用^[4]。适时

收稿日期: 2013-03-28

基金项目: 国家自然科学基金项目(81273437)。

* 通信作者: 金 坚(1960—),男,浙江东阳人,医学博士,教授,主要从事药物设计与分子药理学研究。E-mail: jinjian31@126.com

给予外源性 BNP,使其血浆浓度增加 2~6 倍,可迅速改善急性失代偿患者血流动力学、神经激素水平和临床体征,降低患者的死亡率^[5]。

重组人脑钠肽 (recombinant human brain natriuretic peptide, rhBNP) 注射液已先后被美国 FDA 和中国 SFDA 批准上市,用于急性失代偿性心衰的治疗,其临床治疗方式为静注,疗程在 2 周以上。经过 10 余年的临床应用,The Connor Group 等机构通过欧美多个医学中心的 6 000 多个治疗病例,分析发现 FDA 批准上市的奈西立肽(重组人脑钠肽商品名)治疗心衰患者后,其死亡率和再住院率没有明显的改善,却与患者中低血压病例的数量增长有直接的联系,因此 Connor 等机构不推荐奈西立肽作为心衰病人的一线治疗药物^[6]。在国内,作者在与一些心血管医师的沟通中也获得该类药物存在疗效不稳定的缺陷。从 FDA 公布的资料来看,BNP 类药物是一类有效的血管扩张剂,但利尿作用不明显,且成药性研究也与临床应用结果差距颇大。作者推测其问题可能主要存在两个方面:第一, rhBNP 因原核表达除了产物完整性的因素外,缺乏对其有效二级结构进行必要的构象限定;第二,生产厂家在制剂制备过程中未对 rhBNP 进行系统的微环境研究,导致高活性 rhBNP 的二级结构不稳定。作者以化学合成获得的完整 BNP 为研究对象,通过设计不同的缓冲体系来提高和稳定 BNP 的活性,为开展更有效的 BNP 注射剂配方研究打下基础。

1 材料与方法

1.1 材料

BNP (氨基酸序列:SPKMVQSGCGFRKMDRISSSSGLGCKVLRH),由上海生工生物工程有限公司合成,纯度>99%,未对其第 10 位和 26 位的 Cys 进行氧化形成链内二硫键。新活素(冻干重组人脑利钠肽),为成都诺迪康生物制药有限公司产品(国药准字 S20050033),其注射剂组成为 0.5 mg 重组人脑利钠肽、8 mg 甘露醇、1.73 mg Na₂HPO₄、0.93 mg NaH₂PO₄、9 mg NaCl。去氧肾上腺素,系阿拉丁产品。其他试剂均为国产分析纯,购自于国药集团化学试剂有限公司。

Krebs 溶液的配制:NaCl 9.0 g、KCl 0.42 g、CaCl₂ 0.24 g、NaHCO₃ 0.1~0.3 g、葡萄糖 1.0~2.5 g (1 000 mL),葡萄糖在使用前加入。

新西兰家兔,体质量 2~2.5 kg,雌雄不限,由江苏省血吸虫防治研究所实验动物中心提供。

1.2 方法

1.2.1 离体血管的灌流实验 家兔耳缘静脉空气推注处死后,取其胸主动脉,在预冷的氧饱和 Krebs 液中分离结缔组织,制成系列 3~4 mm 长的血管片段,每个实验所用的血管条数均为 6。将兔胸主动脉血管片段于 37 ℃通氧条件下悬吊入含 4 mL Krebs 溶液的平滑肌浴槽中,接张力换能器到生物机能实验系统(改良型血管、胃肠和子宫等离体灌流实验系统,medase 改良型,南京美易科技有限公司),记录血管张力的变化。初始张力定位 2.5 g,经 6 μmol/L KCl 溶液灌洗和去 KCl 溶液平衡 20 min 后,给予 6 μmol/L 的去氧肾上腺素作为预刺激。待收缩张力稳定后,再给予 10⁻⁸~10⁻⁵ mol/L BNP 观察血管片段张力变化。以新活素的纯水溶液作为阳性对照,逐步增加以制成累计浓度—舒张反应曲线,待药物浓度达到 10⁻⁵ mol/L 时,停止加药并记录舒张反应。详见文献^[7]。

舒张率按下列公式计算:

$$\text{舒张率} = \frac{\text{血管初始张力} - \text{给药后的张力}}{\text{血管初始张力}} \times 100\%$$

1.2.2 pH 梯度缓冲液的配备 考察 pH 分别为 4、5、6、7、8 (偏差±0.2),缓冲液体系分别为醋酸/醋酸钠(醋酸盐)、磷酸氢二钾/磷酸二氢钾(磷酸盐)和柠檬酸/磷酸氢二钠(柠檬酸盐)3 种体系下 BNP 的活性表现。按表 1 所列浓度配置母液,然后按表 2 的比例制备缓冲液。各缓冲液的 pH 均在其缓冲范围内^[8],如表 3 所列。

1.2.3 斑马鱼体内试验 取数尾斑马鱼幼鱼置于六孔板中,加入 3 mL 鱼水,再加入的特非那定溶液至一定浓度,诱导一定时间后,移除诱导剂,用鱼水清洗 3 次,在显微镜下挑选静脉淤血明显的斑马鱼进行注射。用微量加样枪头吸取 3 μL 待测药液,推注入显微注射针中,将针装入注射柄中,调节压力和注射时间使注射量为 10 nL。随后将挑选的斑马鱼幼鱼置于含 160 μg/mL 的 MS222(间氨基苯甲酸乙酯甲磺酸盐,鱼用麻醉药)的鱼水中,麻醉至无触碰反应后,对其进行静脉注射,注射结束后用正常鱼水进行清洗,直至复苏,放置 28 ℃培养箱进行孵育。在给药后 2 h,针对斑马鱼的心脏及静脉淤血部位进行照相,观察淤血有无消除。

表 1 母液的制备

Table 1 Preparation of mother solution

组分	浓度/(mol/L)
醋酸钠	1
醋酸	1
磷酸氢二钾	1
磷酸二氢钾	1
柠檬酸	0.25
磷酸氢二钠	0.5

表 2 缓冲液的制备

Table 2 Preparation of buffer

pH	$v(\text{醋酸钠}):v(\text{醋酸})$	$v(\text{磷酸氢二钾}):v(\text{磷酸二氢钾})$	$v(\text{柠檬酸}):v(\text{磷酸氢二钠})$
4.0±0.2	18:82	—	60:40
5.0±0.2	70:30	—	48:52
6.0±0.2	95:5	13:87	37:63
7.0±0.2	—	52:38	18:82
8.0±0.2	—	94:6	3:97

表 3 缓冲容量

Table 3 Buffer capacity

pH	醋酸/ 醋酸钠	磷酸氢二钾/ 磷酸二氢钾	柠檬酸/ 磷酸氢二钠
4.0±0.2	0.06	—	0.0002
5.0±0.2	0.14	—	0.002
6.0±0.2	0.03	0.03	0.018
7.0±0.2	—	0.11	0.05
8.0±0.2	—	0.05	0.02

1.2.4 统计学方法 实验数据均用均值±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,并用 Graphpad Prism5 软件作数据表格和药物浓度—舒张率相关曲线,采用 t 检验, $P<0.05$ 为具有显著差异性。

2 结果与讨论

2.1 重组 BNP 醋酸/醋酸钠缓冲溶液对离体血管的影响

将药物对数浓度和舒张率的数据收集并绘制累计浓度—舒张反应曲线,计算各个 pH 条件下 BNP 的 EC₅₀ 和 95%可信区间,并与阳性药物做统

计分析。如图 1 和表 4 所示,BNP 在 pH 为 4 和 5 的醋酸/醋酸钠条件下,均对血管具有显著的舒张效应,且在 pH=5 醋酸/醋酸钠缓冲液条件下,BNP 舒张兔胸主动脉血管片段作用的最适浓度为 10^{-7} mol/L。而 pH=6 的 BNP 缓冲溶液与阳性对照组相比没有显著性差异($P>0.05$)。在实验观察的干预药物浓度内均优于 pH=6 的溶液条件,暗示接近生理 pH 的醋酸溶液对 BNP 活性保持有利。EC₅₀ 的提高,则说明酸性条件下有利于稳定 BNP 的活性。

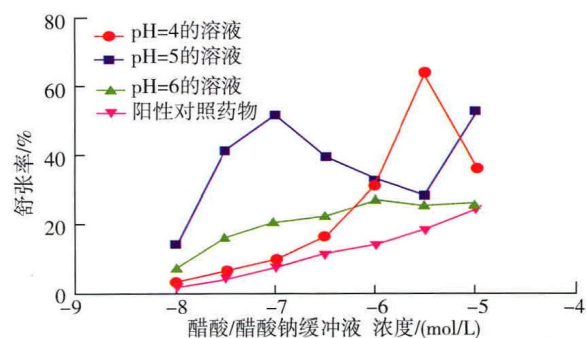


图 1 BNP 的醋酸/醋酸钠缓冲溶液与家兔离体血管舒张效应的剂量关系

Fig. 1 Relationship between BNP in HAc/NaAc buffer concentration and relaxation effects on isolated vascular

表 4 醋酸/醋酸钠缓冲液的 EC₅₀ 及其 95%可信区间Table 4 EC₅₀ and 95% Confidence Intervals of 醋酸/醋酸钠 buffer

pH	logEC ₅₀	95%可信区间
4	-5.139	-5.502~-4.776
5	-4.034	-6.607~-1.460
6	-2.342	-4.968~0.2846
阳性	-3.353	-4.352~-2.354

2.2 重组 BNP 磷酸氢二钠/磷酸二氢钠缓冲溶液对离体血管的影响

从图 2 和表 5 可知,在 pH 为 6 和 7 的磷酸盐缓冲条件下,BNP 均能明显表现出舒张兔胸主动脉血管环的作用;而当 pH=8 时,BNP 则失去活性。与 pH=6 时的舒张血管效果不同,pH=7 时舒张血管没有剂量依赖关系,但作用浓度范围明显加宽,效果稳定性提高。与图 1 中的醋酸/醋酸钠缓冲溶液相比,BNP 在近中性的生理条件下能保持较高的生物活性是磷酸盐缓冲条件的显著优势。

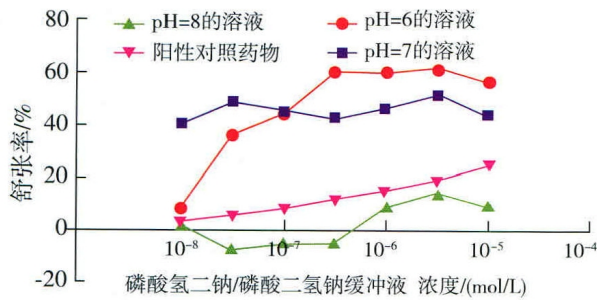


图 2 BNP 的磷酸氢二钾/磷酸二氢钾缓冲溶液与家兔离体血管舒张效应的剂量关系

Fig. 2 Relationship between BNP in K_2HPO_4 / KH_2PO_4 buffer concentration and relaxation effects on isolated vascular

表 5 磷酸氢二钾/磷酸二氢钾缓冲液的 EC50 及其 95% 可信区间

Table 5 EC50 and 95% Confidence Intervals of K_2HPO_4 / KH_2PO_4 buffer

pH	logEC50	95%可信区间
6	-6.322	-6.616~-6.028
7	-2.833	-16.28~10.61
8	—	—
阳性	-3.353	-4.352~-2.354

2.3 重组 BNP 柠檬酸/磷酸氢二钠缓冲液对离体血管的影响

由图 3 和表 6 分析得知, BNP 在柠檬酸缓冲条件下活性与剂量依赖关系更明确。当 pH 为 4~6 时, 实验高浓度 BNP 的柠檬酸缓冲溶液对兔胸主动脉血管片段不仅表现出了更好的舒张效果 (50% vs 100%, 50% vs 100%), 而且在 $10^{-8} \sim 10^{-5}$ mol/L 浓度区间内呈良好的剂量依赖性, 因而 BNP 在这个条件下会有更佳的安全性和更高的活性。

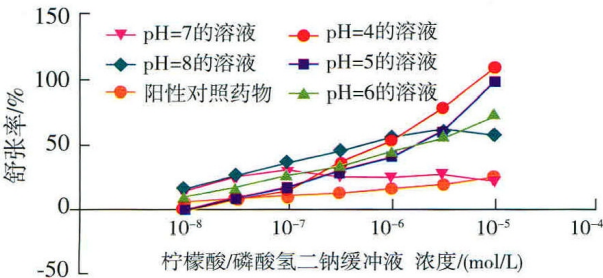


图 3 BNP 的 Citric acid/ Na_2HPO_4 缓冲溶液与家兔离体血管舒张效应的剂量关系

Fig. 3 Relationship between BNP in Citric acid/ Na_2HPO_4 buffer concentration and relaxation effects on isolated vascular

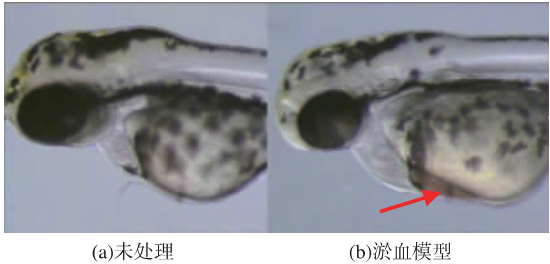
表 6 柠檬酸/磷酸二氢钾缓冲液的 EC50 及其 95% 可信区间
Table 6 EC50 and 95% Confidence Intervals of Citric acid/ Na_2HPO_4 buffer

pH	logEC50	95%可信区间
4	-6.158	-6.273~-6.042
5	-5.876	-6.005~-5.746
6	-5.835	-5.994~-5.676
7	11.48	-17.82~40.79
8	-6.02	-6.263~-5.777
阳性	-3.353	-4.352~-2.354

2.4 斑马鱼体内试验

虽然离体血管灌流实验能够有效地观察到 BNP 在不同缓冲溶液中的活性, 但是体外试验的局限性并不能够了解 BNP 对于心脏的作用, 因此随后委托杭州环特生物有限公司在斑马鱼上做体内试验来评价 BNP 在不同缓冲体系的体内活性。

2.4.1 给药前处理 挑选生长发育完整的斑马鱼成体, 使用特非那定在斑马鱼模型上制造心衰淤血模型, 如图 4 所示斑马鱼给药后患有心包水肿, 同时伴有淤血。



(a) 未处理 (b) 淤血模型

图 4 斑马鱼模型
Fig. 4 Zebra fish model

2.4.2 给药注射观察 分别给斑马鱼心衰模型注射空白缓冲液和 BNP 缓冲液, pH 值分别为 4 和 5, 注射后的心脏形态如图 5 和图 6。根据图 5 和图 6 能够发现: BNP 在 pH=4 和 pH=5 的柠檬酸缓冲液体系中对心脏具有良好的活性和疗效。两者都有效地改善了斑马鱼的心包水肿症状并消除了显著淤血。并且 BNP 在 pH=4 的条件下其消除淤血的能力比 pH=5 的条件下要强, 而这也与家兔离体血管实验中对于血管舒张的结果相吻合。

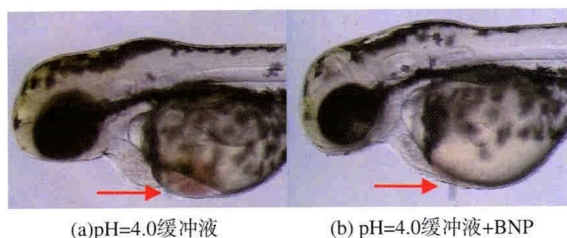


图 5 pH=4.0 的 BNP 缓冲液对模型的影响

Fig. 5 Effect of BNP in pH=4.0 buffer in zebra fish model

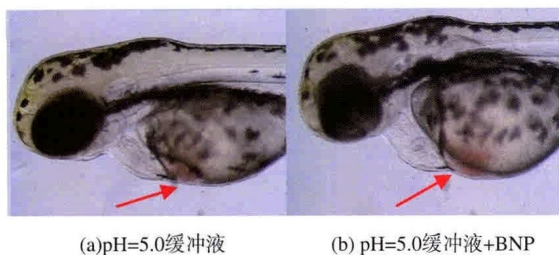


图 6 pH=5.0 的 BNP 缓冲液对模型的影响

Fig. 6 Effect of BNP in pH=5.0 buffer in zebra fish model

2.5 讨论

BNP 等多肽药物的共性需要有效二级结构的构象限定才能保持活性^[9],本实验中虽然不同缓冲条件的 BNP 溶液在离体兔胸主动脉血管片段上都表现出了一定的舒张作用,但差异性很大,更加值得重视的是在实验设计的条件下,对照药物都未获得有效的结果,也进一步证明微环境研究对不稳定的多肽药物二级结构的重要性。实验结果显示,偏酸的多数缓冲条件均利于 BNP 活性的保持,偏碱则反之。在微偏酸的醋酸/醋酸钠缓冲液条件下,BNP 活性保持的效果明显,表现为有效浓度下降,但活性保持与剂量关系复杂,高剂量频繁出现舒张不应、反而收缩的表象降低了该缓冲体系的适用性。

已上市的 BNP 药物采用的磷酸盐缓冲条件,在近中性的生理条件下可保持较高的 BNP 生物活性,这是其作为制剂缓冲条件的优势。虽然 BNP 的作用

稳定性在磷酸盐缓冲条件下得以明显提高,但舒张血管作用的非剂量依赖关系,对于外源给予 BNP 改善急性失代偿性心衰的症状不利,是否是 Connor 等机构观察发现 rhBNP 对治疗指数无效性的原因之一,尚需进一步补充证明。与对照药物相比,BNP 在微偏酸的柠檬酸溶液中的离体兔胸主动脉血管片段舒张率提高了 4 倍(100% vs 20%),且呈现了良好的药物剂量依赖效应,因此柠檬酸缓冲液作为 BNP 注射剂的基质是确实可行的。急性失代偿性心衰症状缓解的治疗关键是“强心、扩血管和利尿”^[10],明确柠檬酸缓冲条件下 BNP 舒张血管的剂量依赖关系,对于临床治疗制剂的设计有利,pH 5 或 6 的柠檬酸缓冲液具有作为改进 BNP 注射剂处方的潜在价值。

3 结 语

在相同的缓冲体系条件下,BNP 的活性随 pH 值而变化,其在酸性环境下的活性明显好于中性和碱性条件下的活性,推测这是因为 BNP 在酸性条件下的结构特征能够更好地与血管上的作用受体相结合。虽然在酸性环境下 BNP 都表现出了活性,但在同一 pH 条件下,不同缓冲体系间的活性差异也极其显著,它表明 BNP 在特定缓冲体系条件下所形成的构象对于其受体也具有更高的活性。这也意味着一些看似结构简单的多肽类药物也与大分子蛋白质相类似,必须有着正确的折叠结构才会表现出更高的活性和稳定性,而这却是以往实验中常常被忽略的现象。同时也意味着在多肽类药物的生产过程中,重组表达方法并不能生产出合格的多肽类药物产品,其外在环境对多肽活性的影响也是需要考虑的,还提示化学合成的多肽原料药需要进行优化折叠和折叠后构象限定的工艺研究。

参考文献:

- [1] Potter L R, Yoder A, Flora R, et al. Natriuretic peptides: their structures, receptors, physiologic functions and therapeutic applications[J]. *Handb Exp Pharmacol*, 2009, 191: 341-366.
- [2] Alexander G, Semenov, Karina R, Seferian. Biochemistry of the human B-type natriuretic peptide precursor and molecular aspects of its processing[J]. *Clinica Chimica Acta*, 2011, 412: 850-860.
- [3] Mark Oremus, Parminder S Raina. A systematic review of BNP as a predictor of prognosis in persons with coronary artery disease [J]. *Clinical Biochemistry*, 2008, 41: 260-265.
- [4] Yunus Emiroglu, Ramazan Kargin. BNP levels in patients with long-term exposure to biomass fuel and its relation to right ventricular function[J]. *Pulmonary Pharmacology & Therapeutics*, 2010, 23: 420-424.

- [5] Lee C Y, Burnett J C. Natriuretic peptides and therapeutic applications[J]. **Heart Fail Rev**, 2007, 12: 131-142.
- [6] Chen H H, Burnett J C. Clinical application of the natriuretic peptides in heart failure [J]. **European Heart Journal Supplements**, 2006(8): E18-E25.
- [7] 王跃民, 裴建明, 朱妙章, 等. C型钠尿肽的扩血管作用及机制[J]. 中国应用生理学杂志, 2001(2): 174-177.
WANG Yue-ming, Pei Jian-ming, Zhu Miao-zhang, et al. C-type natriuretic peptides of expanding blood vessel function and mechanism[J]. **Chinese Journal of Applied physiology**, 2011(2): 174-177. (in Chinese)
- [8] 张龙翔. 生化实验方法和技术[M]. 北京: 高等教育出版社, 1997.
- [9] 徐国恒. 二硫键与蛋白质的结构[J]. 生物学通报, 2010, 45(5): 5-6.
XU guo-heng. Disulfide bond and protein structure[J]. **Bulletin of Biology**, 2010, 45(5): 5-6. (in Chinese)
- [10] 古忆. B型利钠肽在慢性心力衰竭中的应用进展[J]. 中国临床研究, 2011, 24(4): 338-339.
GU Yi. The application process of B-type natriuretic peptide in chronic heart failure [J]. **Chinese Journal of Clinical Research**, 2011, 24(4): 338-339. (in Chinese)

会 议 信 息

会议名称(中文): 2013 中国生物制品年会暨第十三次全国生物制品学术研讨会

所属学科: 生物技术与生物工程, 生物医学工程学, 药学, 公共卫生与预防医学

开始日期: 2013-11-14

结束日期: 2013-11-15

所在城市: 上海市 黄浦区

主办单位: 中华预防医学会生物制品分会 中国药学会生物药品与质量研究专业委员会

承办单位: 《中国新药杂志》国药中生上海生物制品研究所

联系人: 赵然

联系电话: 010-52245049 13810965728

E-MAIL: swzpfh@163.com

会议网站: <http://www.cbpac.org/2013/cn/index.asp?hid=>

会议名称(中文): 第五届海峡两岸杂粮健康产业研讨会

所属学科: 作物学及林木育种、生物学、动物食品科学

开始日期: 2013-10-11

结束日期: 2013-10-14

所在城市: 陕西省 西安市

主办单位: 西北农林科技大学

协办单位: 中国农业科学院作物科学研究所

山西省农业科学院农产品综合利用研究所

成都大学

台湾大学

联系人: 柴岩、冯佰利、王鹏科、高小丽、高金锋

联系电话: 029-87082889

E-MAIL: chai.yan@163.com; 7012766@163.com

会议网站: <http://www.mgcic.com/show.php?articleid=3067>

会议名称(中文): 全国富硒农产品开发学术研讨会

所属学科: 农林基础、植物营养学、动物食品科学

开始日期: 2013-10-31

所在城市: 湖南省 常德市

主办单位: 湖南省农学会、湖南省作物学会

承办单位: 湖南省常德市农学会

联系人: 吴平安

联系电话: 0736-2519876

E-MAIL: hnzwxh@163.com

会议网站: http://www.chinacrops.org/news_display.asp?keyno=156&menucode=201