

• 研究论文 •

肾损伤分子-1、丛生蛋白和胱抑素 C 对庆大霉素诱导的大鼠肾损伤早期预测的研究

申俊¹, 刘妍², 张金晓², 高绪聪², 王晶晶², 张宗鹏^{2*}

1. 天津中医药大学, 天津 300193
2. 天津市新药安全评价研究中心, 天津 300193

摘要: 目的 应用庆大霉素 (GM) 诱导的大鼠亚急性肾损伤模型, 研究一组新的生物标志物肾损伤分子-1 (kidney injury molecule-1, Kim-1)、丛生蛋白 (clusterin) 和胱抑素 C (cystatin C) 在尿液中的变化, 并与传统生物标志物血肌酐 (SCr) 和尿素氮 (BUN) 进行比较, 评价其对肾损伤的早期预测性。方法 建立 GM 诱导的大鼠亚急性肾损伤动物模型, 检测不同给药时间点模型组和对照组大鼠的 SCr、BUN 和尿 Kim-1、clusterin 与 cystatin C 水平, 并进行肾组织病理学检查。结果 在 SCr、BUN 和肾组织病理学未出现异常变化时, 大鼠尿 Kim-1、clusterin、cystatin C 就表现出明显的升高, 并随给药时间延长呈线性升高。在 SCr、BUN 和尿 Kim-1、clusterin 和 cystatin C 测定结果的 ROC 曲线中, 尿 Kim-1、clusterin 和 cystatin C 的曲线下面积均大于 0.9。结论 尿 Kim-1、clusterin 和 cystatin C 在肾损伤中具有较好的敏感性和特异性, 能够提高对药物诱导的肾损伤的早期预测能力。

关键词: 庆大霉素; 肾损伤分子-1; 丛生蛋白; 胱抑素 C; 肌酐; 尿素氮

中图分类号: R965.1 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2011)04-0251-04

Early prediction of urinary kidney injury molecule-1, clusterin, and cystatin C in Gentamycin-induced kidney injury in rats

SHEN Jun¹, LIU Yan², ZHANG Jin-xiao², GAO Xu-cong², WANG Jing-jing², ZHANG Zong-peng²

1. Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China
2. New Drug Evaluation Center, Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin 300193, China

Abstract: Objective To investigate the expression of a new panel of biomarkers, such as kidney injury molecule-1 (Kim-1), clusterin, and cystatin C, in rat model of subacute kidney injury induced by Gentamycin (GM). The evaluation of the urinary Kim-1, clusterin, and cystatin C was more sensitive and specific than that of SCr and BUN in monitoring generalized renal injury. The model of renal injury in the early prediction was established. **Methods** Rat model of subacute kidney injury induced by GM was established. At different time the expressions of SCr and BUN in the control and chemical-treated groups were determined, the kidney tissue was observed for histopathology, the secretion of Kim-1, clusterin, and cystatin C in urine was determined by ELISA. **Results** Urinary Kim-1, clusterin, and cystatin C showed a significant increase and a clear upward trend with time when serum creatinine, blood urea nitrogen, and renal histopathology do not appear abnormal level of minor changes; ELISA showed that the Kim-1, clusterin, and cystatin C contents in urine of model rats sharply increased. Comparison of the ROC areas of SCr, BUN, and urinary Kim-1, clusterin and cystatin C in the established model, and the areas of urinary Kim-1, clusterin, and cystatin C were always larger than 0.9. **Conclusion** Kim-1, clusterin, and cystatin C may be used as sensitive markers for early diagnosis of kidney injury induced by GM. **Key words:** Gentamycins (GM); kidney injury molecule-1 (Kim-1); clusterin; cystatin C; SCr; BUN

肾脏是药物不良反应的主要靶器官。肾脏易受药物损害的原因主要有: ①肾血液的高灌流率增加了肾脏接触毒物的机会; ②肾近曲小管由于主动重

吸收和分泌功能使毒物达到较高的浓度; ③细胞内离子转运系统使毒物在细胞内聚集; ④肾近曲小管含有多种生物转化酶能代谢活化外源性毒物。

收稿日期: 2011-04-12

基金项目: 创新药物研究开发技术平台建设 (2008ZX09305)

作者简介: 申俊 (1986—), 女, 硕士研究生, 主要从事药理学与毒理学研究。E-mail: shenjun0426@163.com

*通讯作者 张宗鹏 E-mail: zhangzp@tjipr.com Tel: (022)23006865

目前, 临床前安全性评价中判断受试药物有无肾毒性主要借助于血肌酐 (SCr) 和尿素氮 (BUN) 的检测及组织病理学检查。由于 SCr 和 BUN 易受肾外多种因素的影响, 且其水平的升高常发生在肾脏功能受损 50% 以上时, 因此不能及时、准确地反映肾功能损伤; 而组织病理学检查也只能发现已经出现器质性病变的肾损伤, 从而使得具有潜在肾毒性的候选药物漏过临床前阶段检查, 进而在临床阶段或上市后出现严重的肾毒性。因此, 寻找早期、更敏感和特异的肾毒性生物标记物, 对于临床前安全性评价工作尤为重要。

本研究选择了目前在肾毒性研究中颇受关注的 3 个生物标记物, 即肾损伤分子-1 (kidney injury molecule-1, Kim-1)、丛生蛋白 (clusterin) 和胱抑素 C (cystatin C), 通过建立庆大霉素肾损伤模型, 观察它们在尿液中的变化, 评价其对肾毒性的早期预测是否优于传统的检测方法。

1 材料与方法

1.1 试剂和仪器

硫酸庆大霉素 (GM, Sigma 公司, 批号 354k8526), 大鼠 Kim-1 ELISA 测试试剂盒 (美国 R&D 公司), 大鼠 clusterin ELISA 测试试剂盒、大鼠 cystatin C ELISA 测试试剂盒 (Biovendor 公司), SCr、尿肌酐试剂、BUN (北京中生北控生物科技股份有限公司)。

Sunrise 酶标仪 (Tecan 公司), Olympus BX51 普通光学显微镜 (日本 Olympus 公司), Canon power shat S45 病理显微摄影仪 (日本 Canon 公司), 7080 全自动生化分析仪 (日立公司)。

1.2 动物分组和给药

健康雄性 SD 大鼠 36 只, SPF 级, 体质量 250~300 g, 由北京维通利华实验动物技术有限公司提供, 动物许可证号 SCXK (京) 2006-0009。经适应期后, 随机分为对照组和模型组各 3 组, 每组 6 只, 对照

组 ip 给予生理盐水, 模型组 ip 给予 120 mg/kg GM, 每天给药 1 次, 连续给药 12 d, 给药体积 5 mL/kg。

1.3 血尿液收集和剖检

各组大鼠于剖检前 1 d 置于代谢笼内收集尿液, 禁食, 可自由饮水, 尿液经 3 000 r/min 离心 10 min 后取上清液置于 -80 °C 冰箱内冷冻保存, 用于尿液肌酐、Kim-1、clusterin 和 cystatin C 的检测。

GM 于给药 6、9、12 d 的隔日 ip 给予苯妥英钠麻醉后, 取全血经 3 000 r/min 离心 10 min 后留取血清用于 SCr 和 BUN 检测。

1.4 大鼠 SCr、BUN 和尿肌酐及尿液 Kim-1、clusterin 和 cystatin C 的检查

使用自动生化仪对 SCr、BUN 和尿肌酐进行检测。尿液 Kim-1、clusterin 和 cystatin C 分别采用 Kim-1、clusterin 和 cystatin C ELISA 试剂盒检测, 操作步骤按试剂盒说明书进行, 检测波长为 450 nm, 经酶标仪检测并读取吸光度 (A) 值, 以 A 值为纵坐标, 标准品浓度为横坐标绘制曲线, 根据样品的 A 值查找其浓度范围。

1.5 大鼠肾组织病理学观察

大鼠放血处死, 摘取肾脏, 10% 中性福尔马林固定, 用于组织病理学检查。

取各组大鼠肾组织作常规石蜡包埋、切片和 HE 染色后, 于普通光学显微镜下检查。

1.6 统计分析

采用 SPSS13.0 统计软件对各给药组与模型组间进行两样本 *t* 检验, 使用 Medcalc 软件绘制 ROC 曲线, 双尾 $P < 0.05$ 被认为有统计学意义。

2 结果

2.1 肾组织病理学检查

对照组大鼠肾组织无明显病理改变。GM 肾损伤模型组, 给药 6 d 肾脏未见明显病理改变; 给药 9 d 和 12 d 后, 引起肾小管扩张、变性、坏死和蛋白管型等病理改变。结果见图 1。

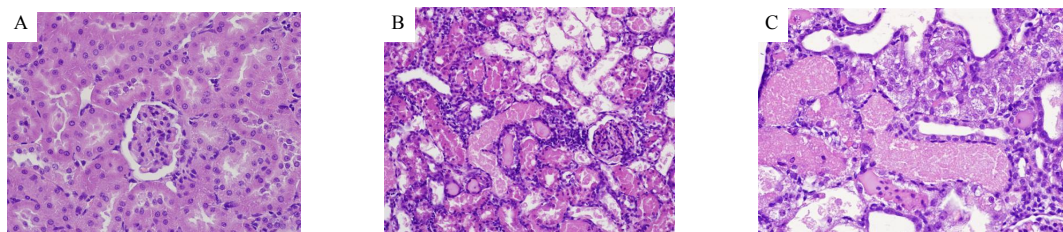


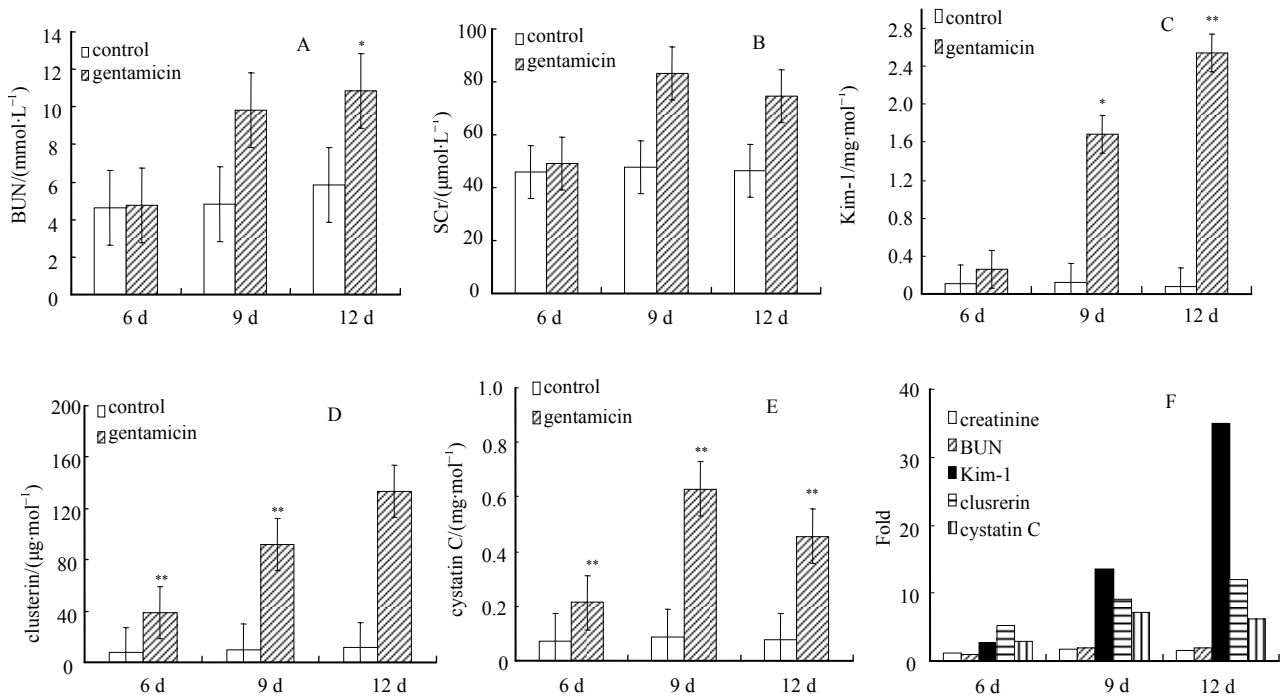
图 1 对照组 (A)、给予 GM 9 d (B)、给予 GM 12 d (C) 大鼠肾组织病理学改变 (HE 染色)

Fig. 1 Pathological changes in kidney tissues in rats of control group (A), 9-d GM treated group (B), and 12-d GM treated group (C) (HE Staining)

2.2 血尿生化和尿 Kim-1、clusterin 和 cystatin C 检测结果

给药 6 d, SCr 和 BUN 未见明显升高, Kim-1、clusterin 和 cystatin C 开始升高 ($P < 0.05$); 给药 9 d, 仅 1 只动物 SCr 和 BUN 值升高, 而 Kim-1、clusterin 和 cystatin C 较对照组明显升高 ($P < 0.05$); 给药 12 d, 仅 2 只动物 SCr 和 BUN 值升高,

而 Kim-1, clusterin 和 cystatin C 较对照组明显升高 ($P < 0.05$); 在给药 6、9、12 d, 相比于对照组尿 Kim-1 分别升高 2.6、13.5、34.9 倍, clusterin 分别升高 5.3、9.1、12.0 倍, cystatin C 分别升高 2.9、7.1、6.1 倍; 尿 Kim-1、clusterin、cystatin C、SCr 和 BUN 的 ROC 曲线下面积分别为 0.932、1.000、0.981、0.877、0.713。结果见图 2、3。



A-尿素氮 B-血肌酐 C-尿 Kim-1 D- clusterin E- cystatin C F-血肌酐、尿素氮、尿 Kim-1、clusterin、和 cystatin C 与对照组相比变化倍数
A-BUN B-SCr C- Kim-1 D-clusterin E-cystatin C F-changes of BUN, SCr, Kim-1, clusterin, and cystatin C compared with control group
与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$
* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs control group

图 2 庆大霉素后大鼠血 SCr、BUN、尿 Kim-1、clusterin 和 cystatin C 测定结果 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 2 Determination of SCr, BUN, urine Kim-1, clusterin, and cystatin C at different time after 120 mg/kg Gentamicin administrated ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

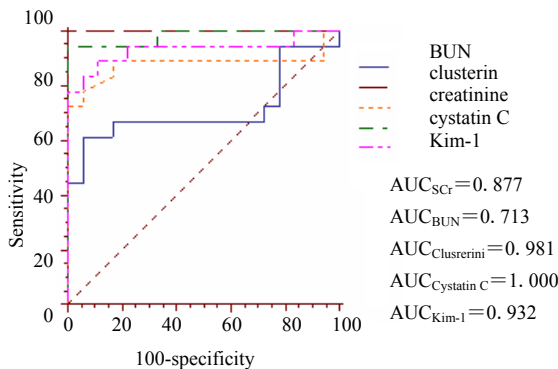


图 3 给予庆大霉素后大鼠血 SCr、BUN、尿 Kim-1、clusterin 和 cystatin C 测定结果的 ROC 曲线

Fig. 3 ROC curve measurement of SCr, BUN, urine Kim-1, clusterin, and cystatin C at different time after 120 mg/kg gentamicin administrated

3 讨论

本研究所选用的造模工具药为庆大霉素, 它是临床上广泛应用的一种氨基糖苷类抗生素, 主要用于革兰阴性菌、肠球菌和分枝杆菌感染的治疗。庆大霉素具有明确的肾毒性, 可通过溶酶体损伤、线粒体损伤、自由基损伤和抑制钠钾 ATP 酶等机制引起肾损伤^[1]。

Kim-1, 又称甲型肝炎病毒受体-1 (HAVcr-1), 或 T 细胞免疫球蛋白粘蛋白-1 (T cell immunoglobulin and mucin, TIM-1), 相对分子质量 50 000~80 000, 普遍存在于斑马鱼、狗、啮齿类、灵长类动物和人类中, 是一种跨膜糖蛋白——磷脂酰丝氨酸受体, 属免疫球蛋白基因超家族, 胞外含有免疫

球蛋白和多个糖基化位点及高度糖基化的粘蛋白子域,胞内部分则相对较短。Kim-1在正常肾脏中低表达,肾损伤后,胞外Kim-1从近曲小管上皮细胞脱落流向尿液,使尿液中Kim-1水平升高^[2-3]。

丛生蛋白又称凝集素,是一种硫化异二聚体糖蛋白,具有很强的黏附力。在急性和慢性肾损伤和疾病中表达都增加,可能与其抗凋亡、保护肾脏细胞作用有关^[4]。

胱抑素C,也称半胱氨酸蛋白酶抑制剂C,为非糖基碱性蛋白,是由120个氨基酸残基组成的多肽链。胱抑素C由大多数有核细胞产生,不受炎症、胆红素、溶血、三酰甘油等影响,且与性别、年龄、肌肉量无关。胱抑素C相对分子质量低而等电点高,能从肾小球自由滤过,并在近曲小管完全被重吸收,不再重新回到血液循环中去,同时肾小管也不分泌胱抑素C,肾脏是其唯一清除器官^[5-9]。

本研究利用庆大霉素建立肾损伤模型,检测尿中Kim-1、clusterin和cystatin C水平,结合SCr、BUN和组织病理学检查,评价3个新候选生物标记物在检测肾损伤中的优越性。结果显示,在给予庆大霉素第9天时肾脏组织病理学出现明显改变,主要表现为肾小管扩张、变性、坏死和蛋白管型等,病变随给药时间延长而加重;而SCr和BUN在第9天时,仅有1只动物表现出明显升高,在给药第12天时,也仅有2只动物表现出明显升高,说明SCr和BUN在肾损伤诊断中确实表现出滞后性和不敏感性;Kim-1、clusterin和cystatin C在给药第6天,肾脏没有出现明显病变时已经开始明显升高,相比于对照组均升高2倍以上,随给药时间延长,肾脏病变的加重,Kim-1、clusterin和cystatin C呈线性升高,其中Kim-1升高幅度最大,至给药第12天时,较对照组升高34.9倍;在对Kim-1、clusterin和cystatin C和SCr、BUN进行的ROC曲线下面积(AUC)的计算中显示,Kim-1、clusterin和cystatin C曲线下面积均大于SCr和BUN。

综上所述,在庆大霉素诱导的肾损伤模型中,Kim-1、clusterin和cystatin C这3个新的生物标志物相比于目前使用的传统生物标志物SCr和BUN有更好的敏感性和特异性,对肾毒性药物导致的肾损伤能够起到早期预测作用,而且通过对这3个新的生物标志物的监测还可以预测肾损伤的发展趋势^[10-11]。本研究联合应用尿Kim-1、clusterin和cystatin C对肾损伤进行检测,证实了尿Kim-1、clusterin和cystatin C联合应用能更早的预测肾损伤

而且敏感性更好,为尿Kim-1、clusterin和cystatin C用于药物临床前研究中肾毒性的预测和今后临床诊断提供了更加充实的依据。

参考文献

- [1] 王景霞,邓文伟,齐亚玲,等. 黄芪和白术对庆大霉素肾毒性的保护作用[J]. 解剖学研究, 2009, 31(3): 179-180.
- [2] Zhou Y, Vaidya V S, Brown R P, *et al.* Comparison of kidney injury molecule-1 and other nephrotoxicity biomarkers in urine and kidney following acute exposure to gentamicin, mercury, and chromium [J]. *Toxicological Sciences*, 2007, 101(1): 159-170.
- [3] Ichimura T, Bonvenre J V, Bailly V, *et al.* Kidney injury molecule-1 (KIM-1), a putative epithelial cell adhesion molecule containing a novel immunoglobulin domain, is up-regulated in renal cells after injury [J]. *Biol Chem*, 1998, 273(7): 4135-4142.
- [4] Correa-Rotter R, Hosrerrer T H, Nath K A, *et al.* Interaction of complement and clusterin in renal injury [J]. *Am Soc Nephrol*, 1992, 3(5):1172-1179.
- [5] Dieterle F, Perentes E, Cordier A, *et al.* Urinary clusterin, cystatin C, beta2-microglobulin and total protein as markers to detect drug-induced kidney injury [J]. *Nat Biotechnol*, 2010, 28(5):444-445.
- [6] Ozer J S, Dieterle F, Troth S, *et al.* A panel of urinary biomarkers to monitor reversibility of renal injury and a serum marker with improved potential to assess renal function [J]. *Nat Biotechnol*, 2010, 28(5): 486-494.
- [7] Herget-Rosenthal S, Poppen D, Husing J, *et al.* Prognostic value of tubular proteinuria and enzymuria in nologuric acute tubular necrosis [J]. *Clin Chem*, 2004, 50(3):552-558.
- [8] Yu Y, Jin H, Holder D, Ozer J S, *et al.* Urinary biomarkers trefoil factor 3 and albumin enable early detection of kidney tubular injury [J]. *Nat Biotechnol*, 2010, 28(5): 470-477.
- [9] Ozbek E, Cekmen M, Ilbey Y O, *et al.* Atorvastatin prevents gentamicin induced renal damage in rats through the inhibition of p38-MAPK and NF-kappaB pathway [J]. *Ren Fail*, 2009, 31(5): 382-392.
- [10] Vaidya VS, Ozer JS, Dieterle F, *et al.* Kidney injury molecule-1 outperforms traditional biomarkers of kidney injury in preclinical biomarker qualification studies [J]. *Nat Biotechnol*, 2010, 28(5): 478-485.
- [11] Liangos O, Tighiouart H, Perianayagam M C, *et al.* Comparative analysis of urinary biomarkers for early detection of acute kidney injury following cardiopulmonary bypass [J]. *Biomarkers*, 2009, 14(6): 423-431.