

肾损伤分子 1 对顺铂诱导的大鼠急性肾损伤的预测研究

杨佳梅¹, 刘妍², 张金晓², 申俊³, 张宗鹏^{2,4*}

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 300301

3. 江苏鼎泰药物研究有限公司, 江苏 南京 210000

4. 天津药物研究院 释药技术与药代动力学国家重点实验室, 天津 300193

摘要: **目的** 对肾损伤分子 1 (KIM-1) 预测顺铂诱导的大鼠急性肾损伤进行研究。**方法** 以顺铂为工具药, 诱导大鼠急性肾损伤模型。采集尿样、肾组织样本, 对肾组织样本进行病理切片检查, 以确定造模是否成功。用 ELISA 法测定尿样中 KIM-1 蛋白含量; RT-PCR 法检测大鼠肾脏 KIM-1 基因表达水平; Western blotting 法检测大鼠肾组织中 KIM-1 的蛋白含量, 并通过免疫组化法定性定位分析大鼠肾组织中 KIM-1 蛋白表达情况, 以确定急性肾损伤发生时 KIM-1 是否可以作为敏感的检测指标。**结果** 当模型组大鼠肾脏皮髓交界处出现程度不等的肾小管扩张, 肾小管上皮细胞变性、坏死脱落, 基底膜裸露等病理改变时, ELISA 法检测尿 KIM-1, RT-PCR 法和 Western blotting 法检测肾组织中的 KIM-1 表达水平均明显升高, 免疫组化显示模型组所有大鼠在肾皮髓交界部位可见大量的染色阳性的肾小管, 该染色阳性区域与组织病理学检查中的异常肾小管分布区域基本一致。**结论** KIM-1 可作为一种敏感的生物标志物对顺铂诱导的大鼠急性肾损伤进行预测。

关键词: 肾损伤分子 1 (KIM-1); 顺铂; 大鼠; 肾损伤

中图分类号: R962; R983 文献标志码: A 文章编号: 1674-5515(2013)02-0150-05

DOI:10.7501/j.issn.1674-5515.2013.02.012

Prediction of kidney injury molecule 1 on cisplatin-induced acute kidney injury in rats

YANG Jia-mei¹, LIU Yan², ZHANG Jin-xiao², SHEN Jun³, ZHANG Zong-peng^{2,4}

1. Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China

2. Tianjin Center for Drug Safety Evaluation and Research, Tianjin 300301, China

3. Jiangsu Tripod Preclinical Research Laboratories Inc., Nanjing 210000, China

4. State Key Laboratory of Drug Delivery Technology and Pharmacokinetics, Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin, 300193, China

Abstract: Objective To confirm the predictive role of kidney injury molecule 1 (KIM-1) on cisplatin-induced acute kidney injury in rats. **Methods** Cisplatin was used to induce the acute kidney injury in rats. Urine and kidney tissues were collected, and the pathological examination of kidney tissue was used to determine if the model was successfully established. ELISA method was used to determine KIM-1 protein content in urinary, while RT-PCR, Western blotting and qualitative immunohistochemistry were taken to examine the gene expression in kidney tissues, to evaluate the expression of KIM-1, and to determine the level of KIM-1, and to analyze the expression of KIM-1 in kidney tissues, respectively, so as to confirm whether KIM-1 was a sensitive biomarker in the prediction of acute kidney injuries or not. **Results** The pathological changes occurred in the cortico-medullary junction of the model rats and characterized with tubular dilatation, and the epithelial cells of renal tubulars showed degeneration, necrosis, and basement membrane exposed. The expression of KIM-1 was significantly increased according to the results of ELISA, RT-PCR, and Western blotting, respectively. Meanwhile, a larger amount of positive staining of renal tubulars could be observed in the cortico-medullary junction of the kidney. The areas of the positive staining are basically the same as that of the HE staining. **Conclusion** KIM-1 could be used as a predictive biomarker in the cisplatin-induced acute kidney injury in rats.

Key words: kidney injury molecule 1 (KIM-1); cisplatin; rats; kidney injury

收稿日期: 2012-11-20

基金项目: 国家重大新药创制科技重大专项 (2012ZX09505001-001)

作者简介: 杨佳梅 (1985—), 女, 硕士, 主要从事药理学及毒理学研究。Tel: (022) 84845264 E-mail: yangjm200@163.com

*通信作者 张宗鹏, 男, 研究员。E-mail: zhangzp166@163.com

肾脏是机体内最重要的排泄器官，在维持机体内环境和平衡方面起着非常重要的作用，一旦受损就会导致机体代谢紊乱。急性肾损伤是临床多发病，传统的诊断指标为血清肌酐 (serum creatinine, SCr) 和血尿素氮 (blood urea nitrogen, BUN)，但 SCr 常受一些非肾脏因素的影响，如年龄、性别、种族、肌肉、营养状况、感染和分布容积等；一些药物也能改变肾小管分泌肌酐的功能，导致 SCr 变化独立于肾小球滤过率^[1]；而 BUN 水平易受感染、消化道出血、代谢状态、饮食、血容量和大剂量使用激素的治疗等因素的影响。为此国内外学者都在致力于寻找更加敏感的肾损伤生物标志物。目前，研究较多的可以预测急性肾损伤的生物标志物为肾损伤分子 1 (kidney injury molecule-1, KIM-1)。KIM-1 存在于 CD4T⁺ 细胞核肾近曲小管上皮细胞内，是一种 I 型跨细胞膜糖蛋白，又被称为 T 细胞免疫球蛋白和黏蛋白分子 1 或 A 型肝炎病毒细胞受体 1^[2]。美国食品药品监督管理局和欧洲医药评价署已正式宣布 KIM-1 可用于药物临床前研究，但仍需验证^[3]。前期实验结果显示，顺铂急性肾损伤大鼠尿 KIM-1 变化水平明显高于 SCr、BUN。在此基础上，本研究采用分子生物学和免疫组学手段对顺铂诱导肾损伤大鼠肾组织中 KIM-1 进行评价，进而研究 KIM-1 能否作为预测顺铂引起的急性肾损伤的生物标志物。

1 材料与仪器

1.1 材料

雄性 SD 大鼠，SPF 级，约 8~9 周龄，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，许可证号：SCXK (京) 2006-0009，动物质量合格证号：0172164。天津市新药安全评价研究中心实验动物室内饲养，室温 20~26 °C，湿度 40%~70%，换气量 ≥15 次/h，光照条件：12 h 明/12 h 暗。

顺铂：100 mg/瓶，批号 029k1426，Sigma 公司；大鼠 KIM-1 ELISA 试剂盒，批号 278753，R&D 公司；大鼠 TIM-1/KIM-1/HAVCR 多克隆抗体，批号 XWS0208041，R&D 公司；免疫组化山羊超敏二步法检测试剂盒，批号 K106815B，中杉金桥公司；免疫组化 DAB 显色试剂盒，批号 753223A，中杉金桥公司；Trizol、M-MLV 逆转录酶、RNA 酶抑制剂、TaqDNA 聚合酶、dNTPs、Oligo (dT)18，Invitrogen 公司；核酸分子量标准 DNA Marker

DL-2000，精美生物工程公司；Real time PCR 试剂盒，东洋纺 (上海) 生物科技有限公司；焦碳酸二乙酯 (DEPC)，上海生工生物工程公司；β-actin、小鼠抗 GAPDH 单抗、辣根过氧化物酶 (HRP) 标记二抗，博奥森公司；ECL 试剂盒，硝酸纤维素膜，millipore 公司。

1.2 仪器

Sunrise 酶标仪，TECAN 公司；COLUMBUS 洗板机，天津开元生物技术有限公司；Olympus BX51 普通光学显微镜，日本 Olympus 公司；Canon power shat S45 病理显微摄影，日本 Canon 公司；Authorized Thermal Cycle PCR 扩增仪，英国 Hybaid 公司；DH-2000 凝胶图像采集分析系统，德国 Heraeus 公司；CFX-96 型实时荧光定量 PCR 仪，BIO-RAD 公司；电泳仪，大连竞迈公司；凝胶电泳仪和电泳槽，北京六一仪器厂；磁力架，Invitrogen 公司。

2 方法

2.1 顺铂诱导肾损伤模型制备

大鼠 12 只，随机分为 2 组，每组 6 只。设对照组 (生理盐水) 和顺铂 (7.5 mg/kg) 组。ip 给药，给药体积 5 mL/kg，给药 1 次。

2.2 样本采集及处理

12 只大鼠于剖检前一天分别放于代谢笼内，禁食不禁水，收集 24 h 尿液。尿液 3000 r/min 离心 10 min，收集上清液，每份 500 μL 取多等份后保存于 -80 °C 冰箱，用于 ELISA 测定。尿液收集完毕后，依次将 12 只大鼠麻醉放血处死，迅速取肾脏，将右侧肾脏横向剖开，其中 1/2 肾脏用 10% 中性甲醛固定用于组织病理学检查及免疫组化测定，另取剩余 1/2 肾脏约 300 mg，均分为 2 份，放入 RNA 保存液中，4 °C 过夜后转存入 -80 °C 冰箱保存用作 RT-PCR 测定。称取左侧肾组织约 400 mg，并均分为 2 份，放入 -80 °C 冰箱保存，用于 Western blotting 测定。

2.3 肾组织病理检查

将 10% 中性甲醛固定 24~48 h 的肾组织进行常规石蜡包埋、切片和 HE 染色，并于光学显微镜下观察肾脏组织病理变化。

病变情况根据以下原则进行评分。0 分：无明显病变；1 分：病变区域 ≤25%；2 分：病变区域在 25%~50%；3 分：病变区域在 50%~75%；4 分：病变区域 >75%。

2.4 ELISA 法测定尿液中 KIM-1 蛋白水平

使用 R&D 公司的 KIM-1 ELISA Kit 分析测定标本中 KIM-1 水平。首先进行预实验,对样本进行稀释,使样本符合试剂盒标准曲线的检测范围。根据预实验结果,正式实验中对照组样本测定前稀释 2 倍,模型组样本测定前稀释 16 倍。测定步骤按照说明书进行。

2.5 RT-PCR 检测大鼠肾脏 KIM-1 基因表达水平

于收集的肾组织中加入 Trizol,充分匀浆之后加入氯仿,进行离心。吸取上层水相加入异丙醇,离心,吸弃上清,将沉淀于室温干燥,得到 RNA。通过公式推算其浓度并对总 RNA 纯度进行鉴定。应用软件 generunner 进行目的片段 KIM-1、管家基因 GAPDH 的引物设计,并根据 Genebank 所发布的目的基因序列进行设计,由上海生工生物工程公司负责合成。然后进行 RT-PCR 扩增。根据 SYBR Green PCR 试剂盒定量检测目的基因 KIM-1 及管家基因 GAPDH 的表达水平。最后用待测样品 $2^{-\Delta CT}$ 值表示目的基因相对表达量。(C_T 值是每个反应管内的荧光信号到达一定阈值时所经历的循环数;待测样品 $\Delta C_T =$ 待测样品目的基因 C_T 值 - 待测样品 GAPDH C_T 值)。

2.6 Western blotting 检测大鼠肾脏 KIM-1 蛋白表达情况

首先进行膜蛋白 KIM-1 的提取,将 100 mg 肾组织在 600 μ L 细胞裂解液 RIPA 中匀浆,12 000 \times g 离心 15 min 后收集上清。按照 PIERCE 公司 BCATM 蛋白分析试剂盒使用说明,采用 BCA 法测定 KIM-1 蛋白浓度。计算样品浓度。经 SDS-PAGE 电泳、转膜、封闭制备 NC 膜,以 PBS-T 清洗 NC 膜 3 次后将其置入一杂交袋中,用封闭液倍稀释羊抗大鼠 KIM-1 多抗 (1:400) 以及小鼠抗 β -actin 单抗 (1:1 000),取 6 mL 加入封闭杂交袋 4 $^{\circ}$ C 振摇过夜。之后经 PBS-T 漂洗 3 次,将 NC 膜至于封闭液 1:5 000 稀释的二抗溶液中孵育,37 $^{\circ}$ C 振摇 1 h。采用化学发光 (ECL) 法放射自显影技术 (按照 millipore 公司提供的 ECL 试剂盒说明书进行) 采集图像,测量条带的灰度值,选用 β -actin 为内参,模型组 KIM-1 蛋白的表达强度为 KIM-1 与内参条带灰度的比值。

2.7 免疫组化定性定位分析大鼠肾脏中 KIM-1 的表达情况

将用石蜡包埋的样本进行切片,固定于多聚赖

氨酸处理过的玻片上,于 60 $^{\circ}$ C 烤箱中烤片 45 min,经脱蜡、水化、PBS 冲洗,每张玻片滴加约 150 μ L 新鲜配制的 3% H₂O₂,室温封闭 10 min, PBS 冲洗。将以上处理好的组织切片放入 95 $^{\circ}$ C 左右 0.01 mol/L 柠檬酸缓冲溶液 (pH 6.0) 进行抗原修复。经 PBS 冲洗后每张玻片滴加 5 μ g/mL 的 I 抗 (羊抗大鼠 KIM-1 抗体) 150 μ L, 37 $^{\circ}$ C 恒温湿盒孵育 1 h。再经 PBS 冲洗,每张玻片滴加约 150 μ L 聚合物辅助剂, 37 $^{\circ}$ C 恒温孵育 15 min。继而每张玻片滴加约 150 μ L 辣根酶标记 II 抗 (抗山羊 IgG 多聚体), 37 $^{\circ}$ C 恒温湿盒孵育 15 min。孵育结束后进行 DAB 显色,用蒸馏水冲洗 5 次,采用苏木素复染,盐酸酒精分化。以上玻片经脱水、透明、封片等步骤在光镜下镜检观察 KIM-1 阳性染色区域,选取最佳部位拍照。

2.8 统计学分析

计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 13.0 统计软件处理试验数据,模型组与对照组之间进行 *t* 检验。定性资料采用文字描述。

3 结果

3.1 肾组织病理学检查结果

模型组所有大鼠的肾脏皮髓交界处均出现程度不等的部分肾小管扩张,较多肾小管上皮细胞变性、坏死脱落,基底膜裸露,腔内有大量红染无结构的颗粒状物质,较多肾小管腔内有蛋白管型。病变程度平均分为 3.0,表明大鼠急性肾损伤模型造模成功。对照组中大鼠肾组织结构正常。见图 1。

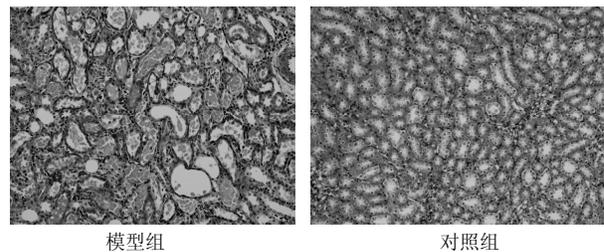


图 1 大鼠肾组织病理学检查结果

Fig. 1 Histopathological examination of kidney tissues in rats

3.2 ELISA 法测定尿液中 KIM-1 蛋白含量结果

测定结果显示,对照组大鼠尿液 KIM-1 蛋白含量为 75.7 mg/mol,模型组大鼠尿液 KIM-1 蛋白含量为 1322.1 mg/mol,为对照组的 17.5 倍。

3.3 RT-PCR 定量检测肾脏 KIM-1 基因表达水平结果

模型组和对照组肾组织 KIM-1 mRNA 表达水

平分别为 $(5.92 \pm 1.22) \times 10^{-2}$ 、 $(4.45 \pm 1.08) \times 10^{-5}$ ($n=6$)。模型组与对照组比较, 肾组织 KIM-1 mRNA 表达水平上调 1 330 倍, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。

3.4 Western blotting 法检测肾脏 KIM-1 蛋白的表达结果

对照组大鼠肾脏均可见内参 β -actin (42 kD) 表达, 未检测到 KIM-1 蛋白表达, 表明正常大鼠肾脏不表达 KIM-1 蛋白或表达水平极低 (低于检测限)。模型组大鼠肾脏均可见内参 β -actin (42 kD) 表达, KIM-1 蛋白在 95 kD 附近有明显条带, 肾组织 KIM-1 蛋白含量与内参 β -actin 条带灰度比值为 28.6 ± 11.1 , 符合 KIM-1 一抗说明书中预期相对分子质量, 说明 KIM-1 蛋白表达阳性。见图 2。

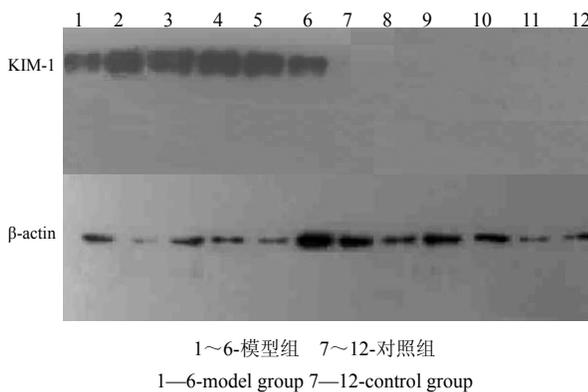


图 2 Western blotting 法检测模型组和对照组 KIM-1 蛋白的表达

Fig. 2 KIM-1 protein expression in model and control groups by Western blotting method

3.5 免疫组化法定性定位检测肾脏 KIM-1 蛋白的表达结果

KIM-1 为跨膜蛋白, 抗原表达应定位于细胞膜和细胞质中, 在其他部位的阳性反应均为非特异性染色。根据镜检结果, 对照组大鼠肾组织结构正常, 免疫组化染色阴性, 即未检测到 KIM-1 阳性表达肾组织; 模型组所有大鼠在肾皮髓交界部位的肾小管细胞膜、细胞质及管腔中可见大量的染色阳性的 KIM-1 抗原。见图 3。

模型大鼠免疫组化 KIM-1 阳性表达的肾小管在肾脏的分布区域与 HE 染色组织病理学检查中的异常肾小管分布区域基本一致。

4 讨论

本实验采用免疫学和分子生物学技术从多方面对 KIM-1 在顺铂诱导的肾损伤模型大鼠尿液和肾

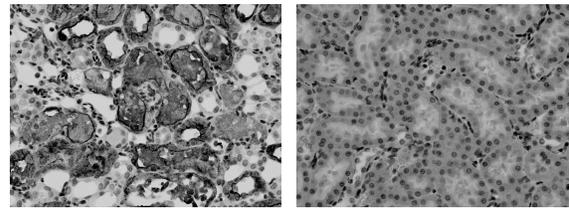


图 3 模型组和对照组肾脏中 KIM-1 蛋白表达结果

Fig. 3 KIM-1 protein expression of kidney in model and control groups

组织中的表达水平进行了研究, 结果表明顺铂诱导的急性肾损伤大鼠尿液中 KIM-1 蛋白含量以及肾组织中 KIM-1 mRNA、KIM-1 蛋白表达水平均明显升高。免疫组化结果表明, 肾损伤大鼠 KIM-1 阳性表达区主要分布在肾皮髓交界部位的肾小管上皮和管腔中, 与组织病理学检查中的异常肾小管分布区域基本一致。在本研究的前期实验中对 KIM-1 的变化水平与 SCr 和 BUN 进行了对比, 结果显示, 单次腹腔注射顺铂 (7.5 mg/kg) 后第 6 天收集的大鼠尿液中 SCr 和 BUN 水平较对照组升高倍数分别为 2.2、4.0 倍, 而 KIM-1 升高倍数达 17.5 倍^[4]。以上研究结果表明, 在急性肾损伤发生时, 尿和肾组织中 KIM-1 同步升高, 且尿 KIM-1 较 SCr 和 BUN 升高显著。KIM-1 是一种用于编码 A 型肝炎病毒受体的基因, 它的剪接变异体在一些人的肝脏、器官和组织中均有表达。Zhou 等^[2]在给予大鼠肝毒性药物半乳糖胺 12、24 h 后, 检测到大鼠血清 ALT 明显升高, 表明出现了严重的肝损伤, 而同一检测点的尿中 KIM-1 水平无明显升高, 因此可认为 KIM-1 出现与肾损伤有关, 而与肝损伤无关。综上所述, KIM-1 可以作为顺铂诱导的急性肾损伤的一个敏感、特异的检测指标。

评价一个生物标志物利用价值的重要标准之一是其检测方法是否操作简便、快捷。Vaidya 等^[5]研究发现, 尿中 KIM-1 在双侧肾缺血 10 min 后的第一天就可发生显著性增高, 在急性肾小管坏死时尿 KIM-1 能在镜下发现任何管型之前被检出, 且可持续到恢复阶段。另有文献报道, 肾损伤后, 胞外 KIM-1 可从近曲小管上皮细胞脱落流向尿液^[6]。本研究发现, 急性肾损伤大鼠肾组织中 KIM-1 高表达的同时尿 KIM-1 水平也出现明显升高。因此, 可通过无创性测定尿 KIM-1 进行急性肾损伤的诊断。并且, 由于 KIM-1 在尿中非常稳定, 即便所收集的尿样不能马上检测而需冷冻保存时, 尿样中也无需加

入额外的稳定剂, 这从另一方面体现了尿 KIM-1 作为一个理想的生物标志物的优越性。目前, 用于尿 KIM-1 定量检测的方法有 ELISA 双抗体夹心法、悬浮微阵列多项检测技术(又称 Luminex 技术)和 KIM-1 胶体金免疫色谱试纸条的方法^[7], 这使尿 KIM-1 的检测手段既准确又快捷。由于尿 KIM-1 的水平可能会受到其他因素(如慢性蛋白尿、炎症状态、纤维化疾病等)的影响^[8], 因此, 仅靠单一的 KIM-1 预测急性肾损伤也存在一定的局限性。Zhou 等^[2]发现多个生物标志物的联合检测可增加肾损伤预测的敏感性, 提示将尿液 KIM-1 同现有的肾功能相关检测指标相互结合可以更准确地预测肾损伤。

参考文献

- [1] Star R A. Treatment of acute renal failure [J]. *Kidney Int*, 1998, 54(6): 1817-1831.
- [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]. *Toxicol Sci*, 2008, 101(1): 159-170.
- [3] Bonventre J V, Vaidya V S, Schmodder R, *et al*. Next-generation biomarkers for detecting kidney toxicity [J]. *Nat Biotechnol*, 2010, 28(5): 436-440.
- [4] 申俊, 刘研, 张金晓, 等. 尿中肾损伤分子 1 水平升高对大鼠早期肾损伤的预测作用 [J]. *中国药理学与毒理学*, 2012, 26(2): 212-218.
- [5] Vaidya V S, Ramirez V, Ichimura T, *et al*. Urinary kidney injury molecule-1: a sensitive quantitative biomarker for early detection of kidney tubular injury [J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2006, 290(2): F517- F529.
- [6] Jessen B A, Mullins J S, De Peyster A, *et al*. Assessment of hepatocytes and liver slices as *in vitro* test systems to predict *in vivo* gene expression [J]. *Toxicol Sci*, 2003, 75(1): 208-222.
- [7] Liangos O, Perianayagam M C, Vaidya V S, *et al*. Urinary *N*-acetyl-beta-(D)-glucosaminidase activity and kidney injury molecule-1 level are associated with adverse outcomes in acute renal failure [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2007, 18(3): 904-912.
- [8] van Timmeren M M, van den Heuvel M C, Bailly V, *et al*. Tubular kidney injury molecule-1 (KIM-1) in human renal disease [J]. *J Pathol*, 2007, 212(2): 209-217.