

尿肾损伤分子-1 对药物肾毒性诊断性能的研究

周晓冰, 朱 聪, 屈 哲, 林 志, 王 超, 霍 艳, 汪巨峰, 李 波*

中国食品药品检定研究院国家药物安全评价监测中心, 药物非临床安全评价研究北京市重点实验室, 北京 100176

摘要: **目的** 在庆大霉素诱导大鼠急性肾损伤模型中评价尿肾损伤分子-1 (Kim-1) 作为肾毒性生物标志物的诊断性能。**方法** ip 60 和 120 mg/kg 庆大霉素, 每天给药 1 次, 连续 10 d, 制备大鼠急性肾损伤模型。在给药第 2、4、8、11 天, 进行肾脏组织病理分析, 检测尿液 Kim-1、血清尿素氮 (BUN) 和肌酐 (Cr) 水平。**结果** 病理学结果显示, 庆大霉素组大鼠出现典型肾损伤变化, 呈明显的剂量及时间相关性; 与对照组比较, 庆大霉素低、高剂量组尿液 Kim-1 浓度在给药第 4 天即开始出现显著升高 ($P < 0.05$), 增幅程度明显高于传统指标 BUN 和 Cr, 并且呈显著剂量和时间相关性; 受试者操作特性曲线 (ROC) 结果表明, 尿 Kim-1 的曲线下面积 (AUC) 明显优于 BUN 和 Cr。**结论** 尿 Kim-1 的肾毒性诊断性能优于传统肾功能评价指标, 可作为一种药物肾毒性的候选生物标志物。

关键词: 肾损伤分子-1; 肾毒性; 生物标志物; 尿素氮; 肌酐

中图分类号: R994.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-6376(2016)02-0183-04

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2016.02.005

Urinary biomarker Kim-1 analysis on drug-induced renal injury model

ZHOU Xiao-bing, ZHU Cong, QU Zhe, LI Zhi, WANG Chao, HU Yan, WANG Ju-feng, LI Bo

National center for safety evaluation of drugs, National Institutes for food and drug control, Beijing 100176

Abstract: Objective To evaluate the performance of Kim-1 as nephrotoxicity biomarker on rat acute kidney injury induced by gentamicin. **Methods** A rat model of acute kidney injury was developed by daily ip injection of 60 or 120 mg/kg gentamicin for consecutive 10 d. The histopathological analysis of kidneys was performed. The level of Kim-1 in urine, BUN and Cr in serum from different time points were determined. **Results** Histopathological analysis demonstrated that traditional renal injury findings were found in gentamicin-treated animals. The number of animals with tubular cell necrosis injury appeared to increase and the severity of renal damage had been aggravated over time. Urinary biomarker analysis showed that urine Kim-1 began to increase largely in animal from low- and high-dose groups since day 4, which were higher than BUN and Cr. Obvious time- and dose-response were found. ROC analysis also demonstrated that AUCs of Kim-1 was superior to BUN and Cr. **Conclusion** Performance of Kim-1 is better than traditional renal function markers, suggesting that it could be served as a candidate biomarker for detection of drug-induced nephrotoxicity.

Keywords: Kim-1; nephrotoxicity; biomarker; BUN; Cr

肾脏是人体药物代谢和排泄的最重要器官, 由于其特殊的结构和功能, 对药物毒性作用极具易感性。当前, 药物肾毒性已成为临床前药物中止研发和临床不良反应的主要原因。据估计, 药物造成的肾损伤占有急性肾损伤病例的 19%~25%, 对患者的身心健康造成极大危害^[1]。目前临床前试验中常用的肾功能评价指标, 如血清尿素氮 (BUN) 和肌酐 (Cr), 灵敏度较差。研究发现, 当肾小球滤过

率下降至正常值的 50% 以下, 常用评价指标才表现出明显的升高, 对于大多数早期的肾损伤往往不能及时作出诊断^[2-3]。因此, 探寻能早期、快速、准确地评价药物肾毒性的方法已成为新药研发中的一个重要问题。

肾损伤分子-1 (Kim-1) 是由肾脏近曲小管上皮细胞分泌的一种跨膜 1 型糖蛋白, 属于免疫球蛋白基因超家族成员, 在正常肝脏和肾脏等组织中有微

收稿日期: 2016-01-14

基金项目: 十二五“关键技术研究”科技重大专项 (2012ZX09505001-004)

作者简介: 周晓冰, 副研究员, 博士, 研究方向为临床前药物安全性评价。

*通信作者 李 波, 研究员, 博士生导师, 研究方向为临床前药物安全性评价。Email: libo@nicpbp.org.cn

量表达^[4]。在肾脏受损后,肾近曲小管上皮细胞中 Kim-1 表达明显增强,并大量释放进入尿液,使得尿液中 Kim-1 水平增加;研究证实,在急性肾小管坏死患者的肾脏活检标本中发现 Kim-1 的表达显著增加,其尿液水平也有所升高。目前,尿液 Kim-1 已作为一种无创性肾小管毒性生物标志物应用于临床实践中^[4-5]。为了进一步研究 Kim-1 在预测药物的肾脏毒性中的灵敏度和特异性,本研究在庆大霉素诱导 Wistar 大鼠急性肾损伤模型中系统地评价尿液 Kim-1 的诊断性能,并与传统肾功能指标进行比较。

1 材料

1.1 药物及主要试剂

庆大霉素(美国 AppliChem 公司,批号 0Q0055633);Luminex 液相芯片大鼠肾毒性 MILLIPLEX®MAP 试剂盒,(美国 Merck Millipore 公司)。

1.2 仪器

7060 型全自动生化分析仪,日本日立公司;Luminex200TM 液相芯片分析平台,美国 Luminex 公司。

1.3 动物及饲养条件

雄性 VAF 级 8~9 周龄 Wistar 大鼠,体质量 230~270 g,购自北京维通利华实验动物技术有限公司,许可证号 SCXK-京-2007-0001。放置万级屏障系统饲养,每笼 3 只,自由饮食饮水。温度 20~26 °C,相对湿度 40%~70%,每小时换气 8~10 次,每天光照与黑暗各 12 h。

2 方法

2.1 大鼠急性肾损伤模型的制备

大鼠经 1 周检疫驯化合格后,根据体质量随机分为 3 组:对照组及庆大霉素低、高(60、120 mg/kg)剂量组,每组 24 只。庆大霉素组 ip 给药,给药体积 5 mL/kg,每天给药 1 次,连续给药 10 d,对照组大鼠给予等体积的生理盐水。

2.2 生物样本的采集

给药第 2、4、8、11 d 分别对每组 6 只大鼠进行解剖。每次解剖前,将各组 6 只大鼠放入代谢笼中收集 16 h 过夜尿,4 °C、1 500 r/min 离心 10 min,上清分装用于后续生物标志物检测;戊巴比妥钠(45 mg/kg)麻醉大鼠后,自下腔静脉采集血液,3 000 r/min 离心 10 min,分离血清用于后续 BUN 和 Cr 测定;解剖大鼠,取左右肾脏。

2.3 组织病理学评分

取左、右肾脏,固定后经修块取材,依次进行脱水、包埋、切片以及苏木精-伊红(HE)染色,最后镜检进行病理学评分。分级标准参照文献^[6],包括无(-)、极轻度(+),轻度(++),中度(+++),重度(++++)和极重度(++++)。

2.4 传统肾功能指标的检测

使用日立 7060 型自动生化仪检测血清 BUN 和 Cr 水平、尿液 Cr 水平。

2.5 Luminex 液相芯片检测尿液 Kim-1 水平

严格按照试剂盒说明书操作,在 96 孔板中依次加入质控、标准品和已稀释尿液样本,每孔 25 μ L,随后每孔加入 25 μ L 生物素化谷胱甘肽巯基转移酶(GST)、25 μ L 混合微珠。封板后 4 °C 摇床过夜(16~18 h)。洗板后每孔加入检测抗体 50 μ L,室温放置 1 h。每孔加入 50 μ L 链霉亲和素藻红蛋白,室温放置 30 min 后洗板,每孔加入 125 μ L 鞘液,在摇床上重悬微珠 5 min,最后在 Luminex 仪器上读板,根据标准曲线计算 Kim-1 浓度,并使用同时期 Cr 数据进行标准化。

2.6 统计学分析

不同时间点各标志物分析结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 20.0 软件进行单因素方差分析,并制作受试者操作特性曲线(ROC),以肾脏组织病理学损伤作为金标准,使用 MedCalc 12.7.7 软件进行各标志物间的 ROC 曲线下面积(AUC)统计分析,以评价各标志物的灵敏度和特异性。

3 结果

3.1 大鼠肾脏组织病理学损伤

除第 2 天个别大鼠出现极轻度的肾小管上皮细胞损伤外,肾小管上皮细胞的变性、坏死表现出明显的时间和剂量相关性。随给药剂量及给药时间的增加,庆大霉素组出现病变的动物数增加,病变程度也随之加重。结果见表 1。

3.2 尿液中 Kim-1 水平分析

与对照组比较,庆大霉素低、高剂量组大鼠尿液 Kim-1 水平在给药第 4 天即出现显著升高($P < 0.05$),分别为对照组的 1.8、3.4 倍,增幅程度明显优于传统的 BUN 和 Cr,并且随着给药时间和剂量的增加呈现出升高的趋势。至给药第 11 天,尽管 60 mg/kg 组平均增幅高达 54.7 倍,但由于个体差异较大,导致与对照组比较差异不显著,而 120 mg/kg 组的 Kim-1 平均值在第 11 天为对照组 83.7 倍,与对照比较差异显著($P < 0.01$)。结果见图 1。

表1 大鼠连续 ip 庆大霉素的肾脏组织病理学检查结果 (n = 6)

Table 1 The histopathological findings of kidneys from rats following continuous ip with gentamicin (n = 6)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	时间	肾小管上皮细胞变性、坏死病变				
			-	+	++	+++	++++
对照	—		6	0	0	0	0
庆大霉素	60	第2天	3	3	0	0	0
	120		5	1	0	0	0
对照	—		6	0	0	0	0
庆大霉素	60	第4天	6	0	0	0	0
	120		6	0	0	0	0
对照	—		6	0	0	0	0
庆大霉素	60	第8天	3	1	2	0	0
	120		1	3	1	1	0
对照	—		6	0	0	0	0
庆大霉素	60	第11天	2	2	1	1	0
	120		0	0	1	3	2

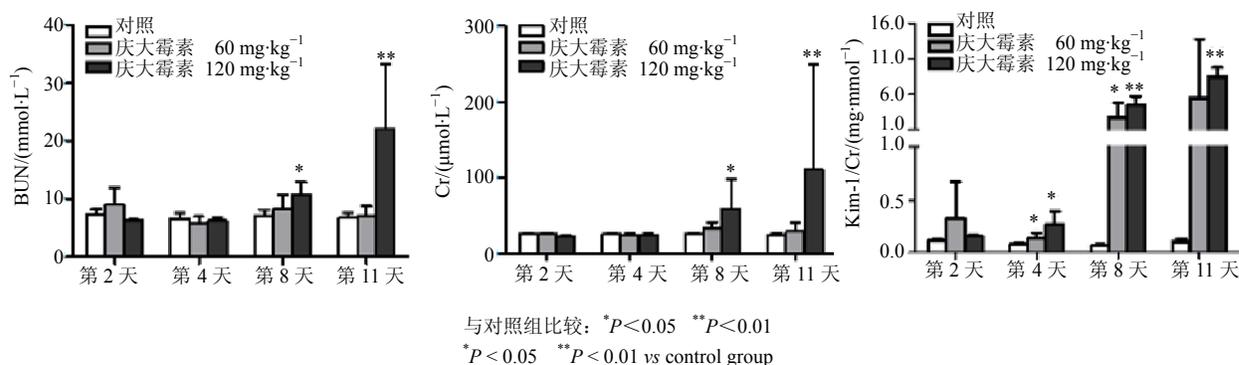


图1 大鼠连续 ip 庆大霉素后血清 BUN、Cr 以及尿液 Kim-1 的水平变化 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 1 Changes of serum BUN, Cr and urinary Kim-1 in rats following continuous ip injection with gentamicin ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

ROC 分析结果显示尿 Kim-1 的 AUC 值高达 0.915, 95%置信区间为 0.804~0.974, 显著高于传统评价指标 BUN (0.740, 95%置信区间为 0.600~0.852, $P=0.017$) 和 Cr (0.719, 95%置信区间为 0.577~0.835, $P=0.009$), 进一步证实 Kim-1 诊断性能的灵敏度和特异性高于 BUN 和 Cr。

4 讨论

本研究中, 选择庆大霉素作为肾毒性药物建立大鼠急性肾损伤模型。文献报道, 给予 40 mg/kg 以上剂量的庆大霉素即可引起明显的肾损伤^[7]。组织病理学结果表明, 连续 10 d ip 60、120 mg/kg 庆大霉素后, 在给药第 8 天大鼠肾脏出现预期组织病理学改变, 从而证实了实验的有效性。在第 2 天部分动物出现极轻度肾小管上皮细胞的变性、坏死, 可

能是由于动物间个体差异, 偶发的背景性病变。

与文献一致^[8-10], 本研究发现, 在庆大霉素诱导大鼠急性肾损伤模型上, 传统的肾损伤生物标志物血清 BUN 和 Cr 的敏感性相对较差。在给药第 8 天, 一些大鼠肾脏已出现明显损伤, 而血清中 BUN 和 Cr 并没有异常变化。相比较, 自第 4 天起, 大鼠肾脏未出现组织病理变化时, 尿液 Kim-1 浓度已发生显著性升高, 具有一定前驱效应, 可用于肾损伤的早期诊断。

本研究发现, 尿液中 Kim-1 水平自第 4 天起持续上升, 表现出明显的给药剂量及时间相关性, ROC 分析也表明尿 Kim-1 高达 0.915, 显著高于 BUN 和 Cr, 进一步证实 Kim-1 优于传统肾功能评价指标。本研究仅有一种肾毒性药物建模, 考虑到

不同药物引起肾毒性作用机制不同,应在更多的药物急性肾损伤模型中评价其灵敏度和特异性。

近些年,随着生物技术尤其是组学技术的不断发展,很多发达国家已将开发高效的安全性生物标志物列为未来医药发展的重点。国际性上两个重要的研究组织即国际生命科学学会健康和环境科学研究所(LSI/HESI)、关键路径研究所(C-Path)成立了药物安全性预测联盟,正在积极开展一系列新的肾毒性生物标志物的筛选和验证工作。目前,美国食品药品监督管理局和欧洲药品管理局已批准包括尿Kim-1在内8种肾损伤生物标志物可用于药物的临床和临床前安全性评价中,补充传统肾功能指标与肾脏组织病理分析结果^[11]。而中国药物肾毒性生物标志物研究起步较晚,为了尽快推动这些新的生物标志物纳入我国药物临床前安全性评价体系中,应在今后开展更多的生物标志物验证研究。

参考文献

- [1] Luyckx V, Naicker S. Acute kidney injury associated with the use of traditional medicines [J]. *Nat Clin Pract Nephrol*, 2008, 4(12): 664-671.
- [2] Bellomo R, Ronco C, Kellum J A, et al. Acute renal failure - definition, outcome measures, animal models, fluid therapy and information technology needs: the Second International Consensus Conference of the Acute Dialysis Quality Initiative (ADQI) Group [J]. *Crit Care*, 2004, 8(4): R204-212.
- [3] Han W K, Waikar S S, Johnson A, et al. Urinary biomarkers in the early diagnosis of acute kidney injury [J]. *Kidney Int*, 2008, 73(7): 863-869.
- [4] Bonventre J V. Kidney injury molecule-1: a translational journey [J]. *Trans Am Clin Climatol Assoc*, 2014, 125: 293-299.
- [5] Vaidya V S, Ozer J S, 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.
- [6] Kelleher S P, Robinette J B, Miller F, et al. Effect of hemorrhagic reduction in blood pressure on recovery from acute renal failure [J]. *Kidney Int*, 1987, 31(3): 725-730.
- [7] Mingeot-Leclercq M P, Tulkens P M. Aminoglycosides: nephrotoxicity [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 1999, 43(5): 1003-1012.
- [8] 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.
- [9] Hoffmann D, Fuchs T C, Henzler T, et al. Evaluation of a urinary kidney biomarker panel in rat models of acute and subchronic nephrotoxicity [J]. *Toxicology*, 2010, 277(1-3): 49-58.
- [10] 申俊, 刘妍, 张金晓, 等. 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 [J]. *药物评价研究*, 2011, 34(4): 251-254.
- [11] Dieterle F, Sistare F, Goodsaid F, et al. Renal biomarker qualification submission: a dialog between the FDA-EMEA and Predictive Safety Testing Consortium [J]. *Nat Biotechnol*, 2010, 28(5): 455-462.