

尿液新型生物标志物对顺铂诱导大鼠急性肾早期损伤的诊断效能研究

朱思睿^{1,2}, 屈哲¹, 杨艳伟¹, 刘鑫磊¹, 黄芝瑛², 周晓冰^{1*}, 张河战¹, 李波¹

1. 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

2. 中山大学 药学院, 广东 广州 510006

摘要: 目的 在顺铂诱导的大鼠急性肾损伤模型中, 系统评价短时间采尿下系列尿液肾毒性生物标志物的诊断性能。方法 Wistar大鼠单次ip 6 mg·kg⁻¹顺铂构建急性肾损伤模型, 在检疫期、给药后第3和6天分别收集给药后5 h对照组和顺铂组动物尿液和血样, 使用日立7180全自动生化仪测定血清中丙氨酸氨基转移酶(ALT)、天冬氨酸氨基转移酶(AST)、总胆红素(TBIL)、尿素氮(BUN)、肌酐(CRE)以及尿液样本中尿葡萄糖苷酶(NAG)、尿总蛋白(uTP)、尿肌酐(uCr)水平; 使用Luminex仪器测定尿液中丛生蛋白(CLU)、谷胱甘肽S转移酶- α (GST- α)、干扰素诱导蛋白-10(IP-10)、肾损伤因子-1(KIM-1)、骨桥蛋白(OPN)、组织金属蛋白酶抑制剂-1(TIMP-1)、血管内皮生长因子-A(VEGF-A)、酸性糖蛋白(AGP)、白蛋白(Alb)、 β_2 微球蛋白(β_2 M)、半胱氨酸蛋白酶抑制剂C(CysC)、表皮生长因子(EGF)、中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白(NGAL)水平。结合动物肾脏组织病理学检查, 制作受试者操作特性曲线(ROC)进行肾毒性标志物的灵敏度和特异性分析。**结果** 顺铂组动物AST、ALT、TBIL值与各自对照组比较无统计学差异, 且解剖大体检查并未发现除肾脏以外其他组织器官病变, 排除其他组织器官病变对肾生物标志物变化的影响。组织病理学结果证实顺铂诱导动物模型均出现典型急性肾损伤: 外髓质外带肾小管上皮细胞变性/坏死和髓质蛋白管型等。与对照组比较, 传统标志物血清BUN和CRE在顺铂给药第6天、动物严重肾损伤时才出现显著升高($P < 0.05$); 而IP-10、KIM-1、Alb、 β_2 M和CLU生物标志物则在给药第3天已出现显著增加($P < 0.05$), 且持续升高, 增幅明显高于传统指标。ROC分析结果表明, IP-10、CysC、KIM-1和Alb的曲线下面积(AUC)明显优于BUN和CRE, 具有更高的灵敏度和特异性。**结论** 尿液IP-10、CysC、KIM-1和Alb的肾毒性诊断性能优于传统生物标志物BUN和CRE, 建议可作为药物致急性肾毒性早期诊断的生物标志物。**关键词:** 急性肾损伤; 生物标志物; 顺铂; 临床前安全性评价; 干扰素诱导蛋白-10(IP-10); 半胱氨酸蛋白酶抑制剂C(CysC); 肾损伤因子-1(KIM-1); 白蛋白(Alb)

中图分类号: R965 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2022)06-1046-06

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2022.06.005

Novel biomarker evaluation for early detection of cisplatin-induced acute kidney injury in rats

ZHU Sirui^{1,2}, QU Zhe¹, YANG Yanwei¹, LIU Xinlei¹, HUANG Zhiying², ZHOU Xiaobing¹, ZHANG Hezhan¹, LI Bo¹

1. National Center for Safety Evaluation of Drugs, National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 100176, China

2. School of Pharmaceutical Sciences, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510006, China

Abstract: Objective To systematically evaluate the diagnostic performance of a series of newly reported urine nephrotoxicity biomarkers in a rat model of acute kidney injury induced by cisplatin. **Methods** A single ip injection with 6 mg·kg⁻¹ cisplatin in Wistar rats was used to construct an acute kidney injury (AKI) model. During the quarantine period and on the 3rd and 6th day following the administration, animal urine and blood samples in control and cisplatin group were collected five hours after administration. Alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), total bilirubin (TBIL), urea nitrogen (BUN), creatinine (CRE) in serum and urinary glucoside enzyme (NAG), total urinary protein (uTP), urinary creatinine (uCr) in urine samples were determined by Hitachi 7180 automatic biochemical analyzer. Clumping protein (CLU), glutathione S-transferase - α

收稿日期: 2021-10-26

基金项目: 国家自然科学基金项目(81603210); 国家“重大新药创制”科技重大专项(2018ZX09201017-001)

第一作者: 朱思睿, 女, 硕士研究生, 研究方向为药物安全性评价。E-mail: cielzsr@foxmail.com

*通信作者: 周晓冰, 女, 研究员, 研究方向为药物安全性评价。E-mail: zhxb@nifdc.org.cn

(GST- α), interferon inducible protein-10 (IP-10), kidney injury factor-1 (KIM-1), osteopontin (OPN), tissue metalloproteinase-1 (TIMP-1), vascular endothelial growth factor-A (VEGF-A), acid glycoprotein (AGP), albumin (Alb), β_2 microglobulin (β_2 M), cysteine protease inhibitor C (CysC), epidermal growth factor (EGF), and neutrophil gelatinase-associated lipid carrier protein (NGAL) were determined by Luminex instrument. Combined with animal kidney histopathological examination, a receiver operating characteristic curve (ROC) were established for sensitivity and specificity analysis of nephrotoxicity markers. **Results** Histopathological results confirmed that all animal models induced by cisplatin had typical acute kidney injury: Degeneration/necrosis of renal tubule epithelial cells and myeloid protein tubule type. Compared with control group, the traditional markers serum BUN and CRE did not increase significantly until the 6th day following administration with cisplatin when the animals suffered severe kidney injury ($P < 0.05$), while IP-10, KIM-1, Alb, β_2 M and CLU biomarkers were found to be significant increased on the third day of administration ($P < 0.05$), and continues to increase. The degree of increase was significantly higher than the traditional biomarkers. ROC results showed that the area under the curve (AUC) of IP-10, CysC, KIM-1 and Alb were significantly better than BUN and CRE, suggesting these biomarkers had more high sensitivity and specificity. **Conclusion** Diagnostic performance of urine IP-10, CysC, KIM-1 and Alb were better than the traditional biomarkers BUN and CRE. It is suggested that they can be used as candidate biomarkers for the early diagnosis of acute nephrotoxicity caused by drugs

Key words: acute kidney injury; biomarker; cisplatin; preclinical safety evaluation; interferon inducible protein-10 (IP-10); cysteine protease inhibitor C (CysC); kidney injury factor-1 (KIM-1); albumin (Alb)

药物肾毒性是临床前药物中止研发和临床不良反应的主要原因之一。据估计,药物造成的肾损伤占有急性肾损伤病例中的19%~25%。如何及时、准确、快速地评价肾毒性已成为药物研发中的一个重要问题^[1-2]。尽早发现新药对肾脏的损伤,不仅有利于保障新药受试者的安全,同时也有利于制药公司和监管部门尽早评估受试药的风险,以便决策是否继续研究。美国食品药品监督管理局(FDA)和欧洲药品管理局(EMA)均将开发高效性的安全性生物标志物列为未来医药发展规划的重点^[3-4]。因此,寻找和发现有价值的肾毒性生物标志物已经成为目前研究的一个重要热点^[2]。

随着生物技术尤其是组学技术的不断发展,一些潜在的肾毒性生物标志物被发现,文献报道可能与肾脏损伤相关的标志物已达数十种之多^[5]。其中包括肾损伤因子-1(KIM-1)、丛生蛋白(CLU)、尿总蛋白(uTP)、 β_2 微球蛋白(β_2 M)、半胱氨酸蛋白酶抑制剂C(CysC)、骨桥蛋白(OPN)、中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白(NGAL)和白蛋白(Alb)等^[6-7]。新的肾毒性标志物已被欧美、日本的药物监管部门批准可用于药物的临床和临床前大鼠安全性评价中,但这些尿液标志物的验证研究中尿样采集的时间长达16~24 h,且尿液需低温收集,在实际临床前大鼠长期毒性研究中,存在样本采集不便、长时间禁食采样对动物状态可能存在影响等问题;此外,还有一些其他潜在的生物标志物,如组织金属蛋白酶抑制剂-1(TIMP-1)、血管内皮生长因子-A(VEGF-A)、酸性糖蛋白(AGP)、表皮生长因

子(EGF)、谷胱甘肽S转移酶- α (GST- α)、干扰素诱导蛋白-10(IP-10)等,对肾脏损伤的预测价值也有文献报道^[5-7],但其灵敏度、特异性及有效性仍需要进一步确认。因此,为了探索这些新型尿液生物标志物在短时间采集尿液样本中预测药物的肾脏毒性中的诊断价值,本研究应用顺铂诱导Wistar大鼠急性肾损伤模型,与传统生物标志物尿素氮(BUN)和肌酐(CRE)比较,系统评价短时间采尿下系列新型尿液生物标志物的诊断效能,以期给后续国内临床前安全性应用评价研究奠定基础。

1 材料

1.1 实验动物

SPF/VAF级8周龄雄性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,实验动物生产许可证号SCXK(京)2016-0006。试验方案及动物使用经中国食品药品检定研究院国家药物安全评价监测中心实验动物福利伦理委员会(IACUC)审查批准(审查批号IACUC-2019-056)。实验动物饲养于屏障环境,每笼3只,温度20~26 °C,日温差<3 °C,相对湿度40%~70%,最小换气次数15次·L⁻¹,12 h/12 h明暗周期,自由摄食饮水。

1.2 主要试剂和仪器

顺铂(Sigma-Aldrich,批号MKCH8501);Luminex液相芯片大鼠肾毒性MILLIPLEX® MAP试剂盒(Merck Millipore,批号MAGPX14093702);其他试剂为国产分析纯。全自动生化分析仪(日本Hitachi公司,7180型);Luminex液相芯片分析平

台(美国 Luminex 公司, Magpix 型)。

2 方法

2.1 大鼠急性肾损伤模型的构建

32只雄性 Wistar 大鼠入室后检疫驯化 3 d, 检疫结束后根据最新体质量将动物随机均分为 2 组, 即对照组和顺铂组, 顺铂组每只动物单次 ip 6 mg·kg⁻¹ 顺铂给药^[8], 给药体积为 6 mL·kg⁻¹, 对照组给予生理盐水。

2.2 生物样本的采集

分别在检疫期、给药后第 3 和 6 天定时收集动物 5 h (8:00—13:00 时) 尿液。每次每组采集 8 只动物, 4 °C 条件下 1 000×g 离心 5 min, 取上清液分装, -80 °C 保存备用。给药后第 3 和 6 天 ip 舒泰(50 mg·kg⁻¹) 进行麻醉, 麻醉后从腹腔后大静脉进行采血和分离血清备用, 然后解剖, 收集肾脏进行病理学检查。

2.3 生物标志物检测分析

使用日立 7180 全自动生化仪测定各种生物标志物, 包括血清中丙氨酸氨基转移酶(ALT)、天门冬氨酸氨基转移酶(AST)、总胆红素(TBIL)、CRE、BUN 以及尿液样本中尿葡萄糖苷酶(NAG)、uTP、尿肌酐(uCr)水平。

按照试剂说明书推荐方法, 使用 Luminex 仪器测定尿液中 CLU、GST-α、IP-10、KIM-1、OPN、TIMP-1、VEGF-A、AGP、Alb、β₂M、CysC、EGF、NGAL 水平。

2.4 组织病理学分析

将固定后的左、右肾脏组织修块取材后, 经脱水、包埋、切片, 应用苏木素-伊红(HE)染色后进行镜检。参照文献中报道的方法^[9], 进行组织病理学评估分级(0~4 级), 包括无(-)、极轻度(+)、轻度(++)、中度(+++)和重度(++++)。

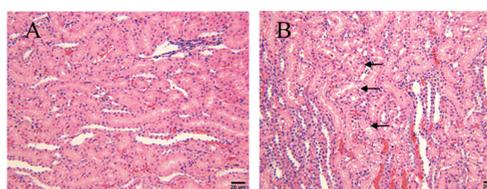
2.5 统计学分析

所有尿样数据经 uCr 校正, 使用 SPSS 25.0 软件对实验与对照组间、时间点之间进行方差分析。使用 GraphPad Prism 8 软件绘制图并制作受试者操作特性曲线(receiver operating characteristic, ROC) 进行肾毒性标志物诊断价值评估, 分析其灵敏度和特异性。

3 结果

3.1 急性肾损伤模型建立与病理损伤

病理结果证实本研究所用顺铂给药剂量均能造成肾脏组织不同程度、不同部位、不同损伤类型, 包括外髓质外带肾小管上皮细胞变性/坏死和髓质蛋白管型等组织病理损伤(图 1), 且随着时间的推进损伤加重, 而对照组动物仅偶见极轻微肾小管变性/再生背景性变化。



箭头指向肾脏外髓质外带肾小管轻度上皮细胞变性/坏死

Arrow points to mild epithelial degeneration/necrosis of renal tubules in outer medulla of kidney

图 1 对照组(A)及单次 ip 顺铂(B)后第 6 天的 Wistar 大鼠的肾脏组织病理学结果(HE 染色, 200×)

Fig. 1 Renal histopathological examination results in Wistar rats in control group (A) and on sixth day following single ip with cisplatin (B) (HE stain, 200×)

如图 2 所示, 血生化分析结果显示, 顺铂给药组动物 AST、ALT、TBIL 值与各自对照组比较无统计学差异, 且解剖大体检查并未发现除肾脏以外其他组织器官病变, 排除其它组织器官病变对肾生物标志物变化的影响。

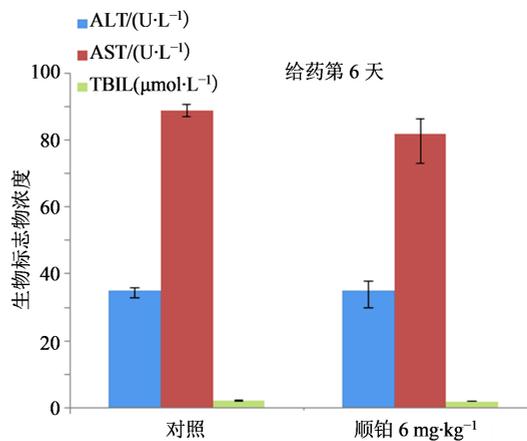
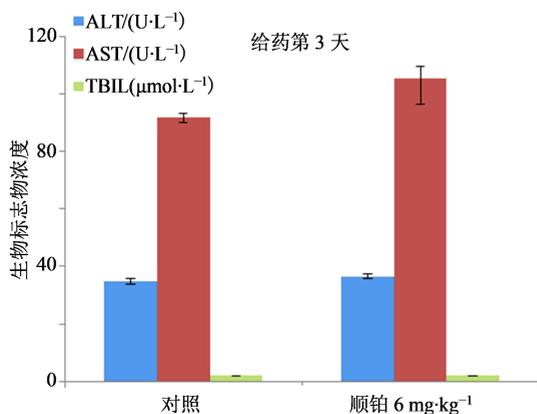


图 2 Wistar 大鼠单次 ip 顺铂对血清 ALT、AST 和 TBIL 的影响($\bar{x}\pm s, n=8$)

Fig. 2 Effect on serum ALT, AST and TBIL level in Wistar rats following single ip with cisplatin ($\bar{x}\pm s, n=8$)

3.2 顺铂诱导急性肾损伤中肾毒性生物标志物的变化

单次 ip $6 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 顺铂大鼠在给药后第3天出现病理损伤时,与对照组比较,顺铂组传统肾毒性生物标志物 BUN 和 CRE 未出现显著性升高变化,仅在给药后第6天出现显著性地上升 ($P < 0.001$),且个体动物之间浓度差异较大。结果见图3。

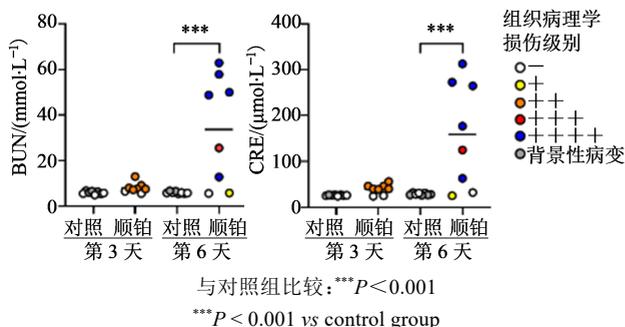


图3 Wistar大鼠单次ip顺铂后血清BUN和CRE的变化
Fig. 3 Change of serum BUN and CRE in Wistar rats following single ip with cisplatin

与对照组比较,顺铂组尿液中新型的生物标志物 IP-10、KIM-1、Alb、 $\beta_2\text{M}$ 和 CLU 在给药后第3天就出现了具有统计学意义的显著性升高 ($P < 0.05$ 、 0.001),提示这些肾毒性标志物的灵敏度较好;在给药第6天,上述5种生物标志物表达持续增加 ($P < 0.05$ 、 0.001)。此外,与对照组比较,顺铂组除了 EGF、GST- α ,其他9种生物标志物也都出现了病理损伤相关表达水平显著性增加变化,其中 Cys、NGAL、AGP 和 CLU 显著性差异较大 ($P < 0.001$)。结果见图4。

3.3 ROC分析

ROC分析结果显示,本研究中绝大多数生物标志物,包括 IP-10、CysC、KIM-1、Alb、CRE、 $\beta_2\text{M}$ 、NGAL、EGF、BUN、AGP、NAG 和 CLU 的 AUC 值均大于 0.9,其中 IP-10、CysC、KIM-1 和 Alb 的 AUC 分别为 0.996、0.992、0.988、0.988,均大于 BUN (0.957) 和 CRE (0.973) 的 AUC 值,提示这4种生物标志物的对顺铂诱导肾毒性诊断性能的敏感性和特异性均优于2个传统标志物。结果见图5。

4 讨论

本研究中选择顺铂作为肾毒性阳性药物,根据本课题组前期研究经验及相关文献,选择单次 ip $6 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 剂量构建大鼠急性肾损伤模型^[8]。组织病理学结果表明,单次 ip $6 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 顺铂后,在大鼠肾脏出现的预期组织病理学改变,并随着时间的进展(给药第6天)逐步加重,发展到髓质,出现蛋白管型的病变,从而证实了实验的有效性。

本实验选择采集5h尿液样本,短时间采尿对动物机体影响小,更符合动物福利,且操作简便,适用于临床前研究的动态监测。研究结果与本课题组在庆大霉素诱导大鼠急性肾损伤模型上生物标志物研究结果基本一致^[10],尽管使用不同肾毒性阳性药物建模,但均发现传统的肾损伤生物标志物血清 BUN 和 CRE 在肾损伤后期才出现显著性升高,敏感性相对较差,且不同动物个体差异大,也进一步提示血清中 BUN 和 CRE 水平易受到多种因素影响,例如机体新陈代谢的水平不同等^[11-12]。与此相反,无论是在庆大霉素或顺铂诱导大鼠急性肾损伤模型中,动物尿中 KIM-1 水平在发生肾损伤初期就急剧上升,表现出明显与组织损伤的相关性,对急性肾损伤诊断具有优越的灵敏度和特异性。

IP-10 为 IFN- γ 诱导产生的相对分子质量为 1×10^4 的 Th1 型促炎趋化因子,其通过与受体 CXCR3 作用发挥多种生物学功能^[13]。研究发现在肾移植急性排斥期,患者血清 IP-10 的 mRNA 表达水平和尿液中 IP-10 浓度显著升高,建议可作为急性排斥反应的早期生物标志物^[14-15]。本研究证实了尿液 IP-10 在顺铂诱导大鼠急性肾损伤模型中预测肾损伤的实用性。在给药第3天后,动物尿中 IP-10 就开始明显升高,具有很高的敏感性;ROC 分析结果也表明 IP-10 的 AUC 为 0.996,进一步支持其敏感性和特异性。

此外,多项研究报道,CysC 和 Alb 可作为人和小鼠早期急性肾损伤诊断的生物标志物^[3,7-8,16]。本研究结果也进一步支持 CysC 和 Alb 可用于药物顺铂诱导急性肾损伤的诊断。不同以前其他研究报道^[7,17-18],本研究发现给药组动物尿液中 OPN、TIMP-1、VEGF-A、AGP、 $\beta_2\text{-M}$ 、NGAL、VEGF-A、NAG 和 CLU 浓度尽管在给药第3或第6天出现显著性升高,但经 ROC 分析,AUC 值并不高于传统肾毒性生物标志物 BUN 和 CRE。不同实验室研究结果差异可能与所采用不同肾毒性阳性药物建模、给药剂量或给药方式等密切相关,同时也提示在推动这些新的生物标记物纳入我国药物临床前安全性评价体系中,应全面开展生物标志物验证研究。

多重检测技术可以利用一个待测样本同时检测多个生物标志物,达到高通量检测。与其他的检测方法,例如 ELISA 方法相比较,其主要优点在于高通量、敏感、重复性好与检测用样本量少^[19]。本研究用 Luminex 液相芯片技术同时检测尿液中 13 种生物标志物,结果准确,所需尿样少,且耗时短,

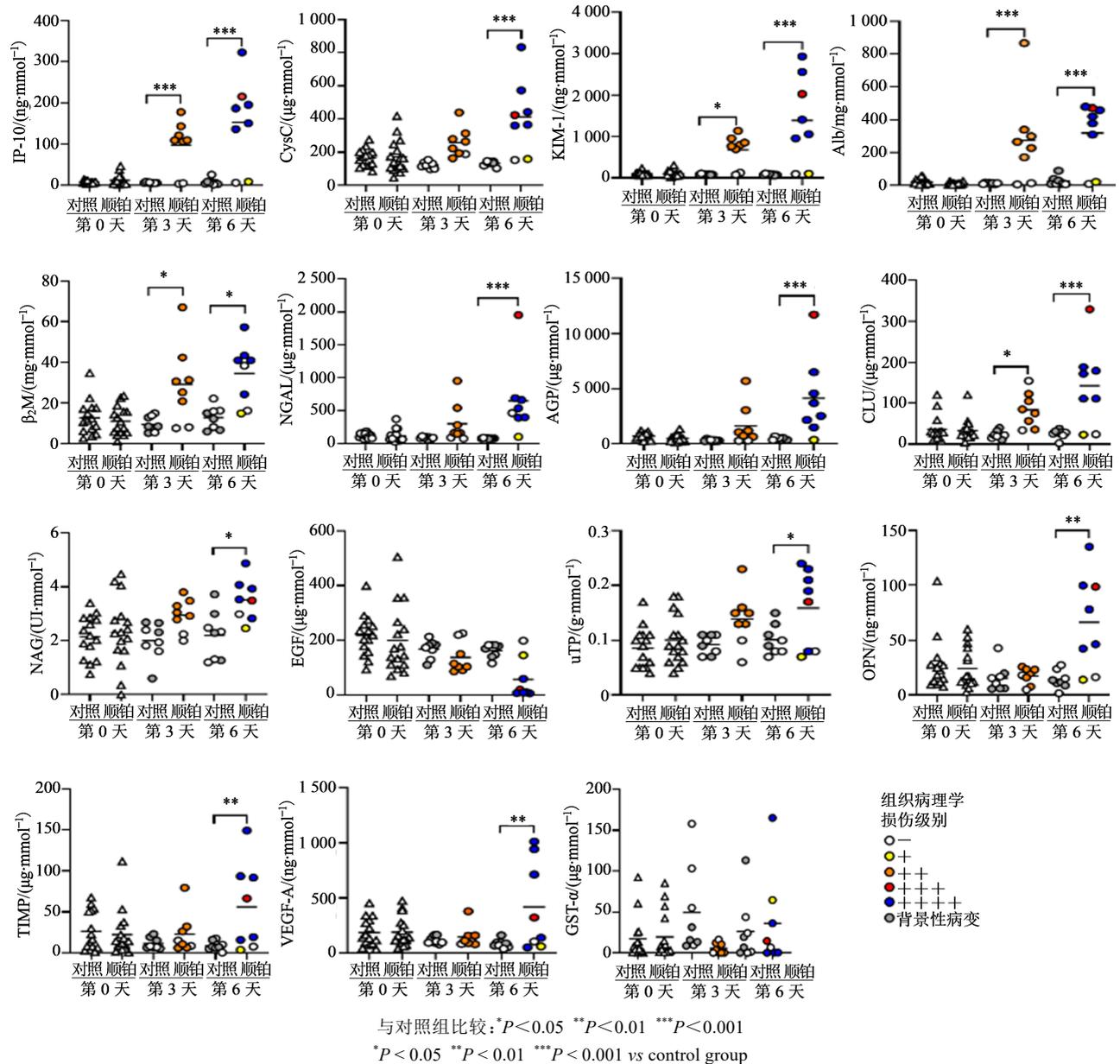


图4 Wistar大鼠单次ip顺铂后尿液中生物标志物的水平变化

Fig. 4 Change of urinary biomarkers in Wistar rats following single ip with cisplatin

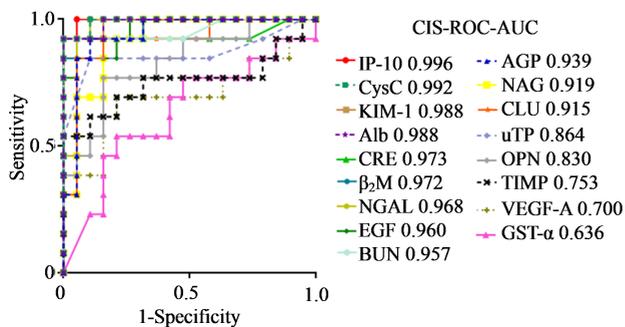


图5 肾毒性生物标志物ROC分析

Fig. 5 ROC analysis of nephrotoxicity biomarkers

建议多重检测技术将成为未来肾毒性生物标志物检测最重要的技术手段。

本研究在顺铂诱导急性肾损伤模型中系统地评价了15种生物标志物,证实了短时间尿液IP-10、CysC、KIM-1和Alb对药物致急性肾毒性早期诊断效能优于传统生物标志物BUN和CRE,其中KIM-1、CysC、Alb已经过部分试验证实,并被国际监管部门批准应用,IP-10仅有少数文献报道,尚未被国家监管部门认证和采纳,本研究的结果为这些新的标志物的诊断性能确认以及后续应用研究奠定了基础。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

[1] Oh D J. A long journey for acute kidney injury biomarkers [J]. Ren Fail, 2020, 42(1): 154-165.

- [2] Burczynski M E. Pharmacogenomic approaches in clinical studies to identify biomarkers of safety and efficacy [J]. *Toxicol Lett*, 2009, 186(1): 18-21.
- [3] Hong H X, Goodsaid F, Shi L M, et al. Molecular biomarkers: A US FDA effort [J]. *Biomark Med*, 2010, 4(2): 215-225.
- [4] Butterfield L H, Disis M L, Fox B A, et al. A systematic approach to biomarker discovery; preamble to "the iSBTC-FDA taskforce on immunotherapy biomarkers" [J]. *J Transl Med*, 2008, 6: 81.
- [5] Amaral Pedroso L, Nobre V, Dias Carneiro de Almeida C, et al. Acute kidney injury biomarkers in the critically ill [J]. *Clin Chim Acta*, 2020, 508: 170-178.
- [6] Dieterle F, Sistare F, Goodsaid F, et al. Renal biomarker qualification submission: A dialog between the FDA-EMA and predictive safety testing consortium [J]. *Nat Biotechnol*, 2010, 28(5): 455-462.
- [7] EMA. final conclusions on the pilot joint emea/fda vxds experience on qualification of nephrotoxicity biomarkers [EB/OL]. (2009-01-22) [2021-09-26] http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Regulatory_and_procedural_guideline/2009/10/WC500004205.pdf. 2009.
- [8] Liu Q, Hu S Y, He Y, et al. The protective effects of Zhen-Wu-Tang against cisplatin-induced acute kidney injury in rats [J]. *PLoS One*, 2017, 12(6): e0179137.
- [9] 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.
- [10] 周晓冰, 朱 聪, 屈 哲, 等. 尿肾损伤分子-1对药物肾毒性诊断性能的研究 [J]. *药物评价研究*, 2016, 39(2): 183-186.
- Zhou X B, Zhu C, Qu Z, et al. Urinary biomarker Kim-1 analysis on drug-induced renal injury model [J]. *Drug Eval Res*, 2016, 39(2): 183-186.
- [11] Fuchs T C, Hewitt P. Preclinical perspective of urinary biomarkers for the detection of nephrotoxicity: What we know and what we need to know [J]. *Biomark Med*, 2011, 5(6): 763-779.
- [12] 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(1/2/3): 49-58.
- [13] Agostini C, Calabrese F, Rea F, et al. Cxcr3 and its ligand CXCL10 are expressed by inflammatory cells infiltrating lung allografts and mediate chemotaxis of T cells at sites of rejection [J]. *Am J Pathol*, 2001, 158(5): 1703-1711.
- [14] Segerer S, Cui Y, Eitner F, et al. Expression of chemokines and chemokine receptors during human renal transplant rejection [J]. *Am J Kidney Dis*, 2001, 37(3): 518-531.
- [15] Matz M, Beyer J, Wunsch D, et al. Early post-transplant urinary IP-10 expression after kidney transplantation is predictive of short- and long-term graft function [J]. *Kidney Int*, 2006, 69(9): 1683-1690.
- [16] Guo S J, Xue Y F, He Q M, et al. Preoperative serum cystatin-C as a potential biomarker for prognosis of renal cell carcinoma [J]. *PLoS One*, 2017, 12(6): e0178823.
- [17] 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.
- [18] 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.
- [19] 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.

[责任编辑 兰新新]