

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

申俊¹, 刘妍², 张金晓², 高绪聪², 周飞², 姜凌², 张建军², 张宗鹏²

(1. 天津中医药大学研究生部, 天津 300193; 2. 天津市新药安全评价研究中心
毒理学研究室, 天津 300193)

摘要: **目的** 评价尿中肾损伤分子 1(KIM-1)对大鼠早期肾损伤的预测作用。**方法** 制备顺铂、庆大霉素和环孢素诱导的大鼠肾损伤模型。顺铂模型大鼠于单次 ip 给药后第 3, 5, 6 和 7 天, 庆大霉素模型于首次 ip 给药后第 3, 7, 10 和 13 天, 环孢素模型于首次 ig 给药后第 8, 15, 36 和 53 天通过腹主动脉取血, 分离血清。各组大鼠于处死前 24 h 收集尿液。用自动生化仪检测血清肌酐(SCr)和血尿素氮(BUN)及尿肌酐(UCr)水平, 采用 ELISA 法检测尿 KIM-1 水平, HE 染色进行肾脏组织病理学检查。**结果** 与正常对照组相比, 顺铂模型大鼠单次给药后第 3 天肾组织病理改变不明显, 而尿 KIM-1 升高了 4.7 倍, SCr 和 BUN 升高了 0.3 和 0.7 倍; 第 5 和 6 天, KIM-1 升高了 10.0 和 8.7 倍, SCr 升高了 1.9 和 3.3 倍, BUN 升高了 3.0 和 5.1 倍, 第 5 天肾组织出现明显的病理改变; 第 7 天, KIM-1 水平升高了 16.5 倍, SCr 和 BUN 水平略降, 为正常对照组的 1.2 和 3.0 倍。庆大霉素模型大鼠, 与正常对照组比较, 于首次给药后第 7 天, SCr 和 BUN 水平和肾组织未见明显改变, KIM-1 水平升高了 2.6 倍; 第 10 和 13 天, SCr 水平升高了 1.7 和 1.6 倍, BUN 升高了 2.0 和 1.9 倍, KIM-1 升高了 12.5 和 33.9 倍, 第 10 天肾组织出现明显的病理改变。环孢素模型大鼠, 与正常对照组比较, 在第 8 天, SCr 和 BUN 水平和肾组织未见异常, KIM-1 升高了正常对照组的 0.6 倍; 第 15, 36 和 53 天, KIM-1 分别升高了 1.7, 4.3 和 9.3 倍, SCr 分别为 1.0, 1.0 和 1.2 倍, BUN 分别升高了 0.4, 0.6 和 1.2 倍, 肾组织在第 53 天时出现明显的病理改变。顺铂模型组 SCr, BUN 和 KIM-1 的受试者操作特性曲线的曲线下面积(AUC)分别为 0.934, 0.953 和 0.979, 庆大霉素模型组 SCr, BUN 和 KIM-1 的 AUC 分别为 0.877, 0.713 和 0.932, 环孢素模型组 SCr, BUN 和 KIM-1 的 AUC 分别为 0.668, 0.766 和 0.976。**结论** 在顺铂、庆大霉素和环孢素诱导的肾损伤模型中, 尿 KIM-1 可用于早期肾损伤的预测。

关键词: 肾损伤; 肾损伤分子 1; 顺铂; 庆大霉素; 环孢素

中图分类号: R966 **文献标志码:** A **文章编号:** 1000-3002(2012)02-0212-07

DOI: 10.3867/j.issn.1000-3002.2012.02.016

肾是体内最重要的排泄器官, 也是外源性毒物在体内的主要代谢器官之一。很多化合物或药物进入体内, 通过某种或几种机制对肾脏产生毒性作用。目前, 传统并常规用来检测肾损伤的生物标志物是血清肌酐(serum creatinine, SCr)和血尿素氮(blood urea nitrogen, BUN), 但两者只有在肾损伤达一定程度时才会明显升高。SCr 和 BUN 的这种不敏感性可能会使药物顺利通过临床前安全性评价, 而在临床试验阶段或者上市后临床应用阶段导致患者肾损伤。因此, 寻找早期、敏感和可量化的肾损伤生物

标志物是新药开发和临床治疗的迫切需求。

肾损伤分子 1(kidney injury molecule-1, KIM-1) 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, 是一种 I 型跨细胞膜糖蛋白, 存在于 CD4⁺ T 细胞和肾近曲小管上皮细胞内^[1]。在正常肾组织中, KIM-1 表达非常低, 但是在不同的药物或者环境毒物导致的肾功能损伤模型中, KIM-1 会在去分化的肾脏近曲小管上皮细胞中高表达, 并可以在尿中排出^[2]。目前, KIM-1 是研究较多的早期预测肾损伤的生物标志物^[3-4]。2008 年美国食品药品监督管理局和欧洲医药评价署宣布可将 KIM-1 用于药物临床前研究^[5], 但仍需广泛验证。本研究制备顺铂、庆大霉素和环孢素诱导肾损伤大鼠模型, 检测尿 KIM-1、尿肌酐(urine creatinine, UCr)、SCr 和 BUN 以及肾脏组织病理变化, 评价尿 KIM-1 作为早期预测肾损伤敏感生物标志物的可能性, 为其作为临床前肾损伤的评价指标提供依据, 并

基金项目: 国家“重大新药创制”科技重大专项(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; 张宗鹏(1958-), 男, 研究员, 主要从事药理学与毒理学研究。

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

为临床前新药的安全性评价提供参考。

1 材料与方法

1.1 动物、试剂和仪器

健康雄性 SD 大鼠, 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, 自由摄食和饮水, 室温 20 ~ 26℃, 湿度 40% ~ 70%, 光照条件: 12 h 明/12 h 暗。顺铂(cisplatin)和硫酸庆大霉素(gentamicin sulfate), Sigma 公司; 环孢素(ciclosporine)软胶囊, 诺华制药公司; 大鼠 KIM-1 ELISA 试剂盒, 美国 R&D 公司; SCr, BUN 和 UCr 检测试剂, 北京中生北控生物技术科技股份有限公司。Sunrise 酶标仪, 奥地利 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, 日本 Canon 公司; 7080 全自动生化分析仪, 日立公司。

1.2 顺铂肾损伤模型的制备^[6]和标本采集

大鼠 48 只, 经适应性饲养 4 d 后, 随机分为 8 组(每个时间点对应 1 个正常对照组和 1 个顺铂肾损伤模型组, 共 4 个时间点), 每组 6 只, 正常对照组 ip 给予生理盐水, 模型组 ip 给予顺铂 7.5 mg·kg⁻¹, 给药 1 次, 给药体积为 5 ml·kg⁻¹。于单次给药后第 2, 4, 5 和 6 天置于代谢笼内收集 24 h 尿液, 隔日 ip 给予苯妥英钠麻醉取全血。

1.3 庆大霉素肾损伤模型的制备^[1,6]及标本采集

大鼠 48 只, 经适应性饲养 18 d 后, 随机分为 8 组(每个时间点对应 1 个正常对照组和 1 个庆大霉素肾损伤模型组, 共 4 个时间点), 每组 6 只, 正常对照组 ip 给予生理盐水, 模型组 ip 给予庆大霉素 120 mg·kg⁻¹, 每天给药 1 次, 连续给药 12 d, 给药体积为 5 ml·kg⁻¹。于首次给药后第 2, 6, 9 和 12 天置于代谢笼内收集 24 h 尿液, 隔日 ip 给予苯妥英钠麻醉后取全血。

1.4 环孢素肾损伤模型的制备^[6-7]及标本采集

大鼠 48 只, 经适应性饲养 5 d 后, 随机分为 8 组(每个时间点对应 1 个正常对照组和 1 个环孢素肾损伤模型组, 共 4 个时间点), 低盐饮食, 第 1 ~ 22 天 ig 给予环孢素(取适当的橄榄油溶解环孢素配制所需浓度)3 mg·kg⁻¹, 给药体积为 10 ml·kg⁻¹; 第 23 ~ 43 天改为 sc 给予环孢素 7 mg·kg⁻¹; 第 44 ~ 52 天 sc 给予环孢素 12 mg·kg⁻¹, 给药体积为 2.5 ml·kg⁻¹, 正常对照组 ig 给予橄榄油。于首次给药后第 7, 14, 35 和 52 天置于代谢笼内收集 24 h 尿液, 隔日 ip 给予苯妥英钠麻醉后取全血。

1.5 SCr, BUN, UCr 和尿 KIM-1 的检测

大鼠尿液和血标本, 于 1500 × g 离心 10 min, 分别取上清用于 UCr、尿 KIM-1、SCr 和 BUN 的检测。SCr, BUN 和 UCr 使用自动生化仪进行检测; 尿液 KIM-1 使用 KIM-1 ELISA 试剂盒检测, 操作步骤按试剂盒说明书进行, 经酶标仪检测并读取 450 nm 波长的吸光度(absorbance, A)值, 以 A_{450 nm} 值为纵坐标, 标准品浓度为横坐标绘制曲线, 根据样品的 A_{450 nm} 查找其浓度范围。尿 KIM-1 含量用尿 KIM-1/UCr 比值(mg·mol⁻¹)表示, 即每排出 1 mol 肌酐排出 KIM-1 的毫克数^[8]。

1.6 大鼠肾组织病理学观察

顺铂组大鼠于单次给药后第 3, 5, 6 和 7 天; 庆大霉素组大鼠于首次给药后第 3, 7, 10 和 13 天; 环孢素组大鼠于首次给药后第 8, 15, 36 和 53 天处死大鼠, 摘取肾, 10% 中性甲醛固定, 常规石蜡包埋、切片和 HE 染色, 于普通光学显微镜下观察肾组织病理变化。

1.7 统计学分析

实验结果数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用 SPSS13.0 统计软件进行两样本 *t* 检验, 使用 Medcalc v11.5.0.0 软件绘制受试者操作特性(receiver operating characteristic, ROC)曲线。

2 结果

2.1 顺铂对大鼠 SCr, BUN 和尿 KIM-1 水平的影响

表 1 结果显示, 与正常对照组比较, 于单次给顺铂后第 3, 5 和 6 天, SCr, BUN 和尿 KIM-1 均明显升高($P < 0.05$); 第 7 天, BUN 明显升高($P < 0.05$), SCr 和尿 KIM-1 由于标准差较大, 虽有升高趋势但无统计学差异。尿 KIM-1 随药后时间延长, 其升高幅度大于 SCr 和 BUN, 4 个时间点分别升高为正常对照组的 5.7, 11.0, 9.7 和 17.5 倍; SCr 为正常对照组的 1.3, 2.9, 4.3 和 2.2 倍; BUN 为正常对照组的 1.7, 4.0, 6.1 和 4.0 倍。由图 1 显示, SCr, BUN 和尿 KIM-1 给药后不同时间点 ROC 的曲线下面积(area under curve, AUC)分别为 0.934, 0.953 和 0.979。可以看出, 尿 KIM-1 与 SCr 和 BUN 相比在顺铂所致肾损伤模型中具有较好的灵敏度和特异性。

2.2 庆大霉素对大鼠 SCr, BUN 和尿 KIM-1 水平的影响

首次给药后第 7 天, SCr 和 BUN 未见明显升高, 尿 KIM-1 有升高趋势; 第 10 和 13 天, 模型组分别仅 1 只和 2 只大鼠 SCr 和 BUN 与正常对照组相比明显升高, 而尿 KIM-1 均较正常对照组明显

Tab.1 Changes of serum creatinine (SCr), blood urea nitrogen (BUN) and urinary kidney injury molecule-1 (KIM-1) levels in rats with kidney injuries induced by cisplatin

| Group | SCr/mmol·L ⁻¹ | | | |
|--------|--------------------------|----------------|-----------------|--------------|
| | 3 | 5 | 6 | 7(d) |
| Normal | 44.2 ± 1.5 | 48.1 ± 3.9 | 52.0 ± 2.4 | 53.0 ± 2.6 |
| Cis | 57.8 ± 7.2 ** | 137.6 ± 83.5 * | 225.5 ± 82.9 ** | 115.1 ± 68.7 |

| Group | BUN/mmol·L ⁻¹ | | | |
|--------|--------------------------|---------------|----------------|---------------|
| | 3 | 5 | 6 | 7(d) |
| Normal | 6.6 ± 0.5 | 5.6 ± 1.3 | 6.9 ± 0.6 | 6.2 ± 0.5 |
| Cis | 11.1 ± 4.0 * | 22.4 ± 15.3 * | 42.1 ± 15.9 ** | 24.4 ± 18.4 * |

| Group | KIM-1/mg·mol ⁻¹ | | | |
|--------|----------------------------|---------------|--------------|-------------|
| | 3 | 5 | 6 | 7(d) |
| Normal | 68 ± 9 | 100 ± 33 | 91 ± 39 | 76 ± 17 |
| Cis | 389 ± 151 ** | 1105 ± 606 ** | 883 ± 187 ** | 1322 ± 1405 |

Levels of SCr, BUN, urine creatinine (UCr) and KIM-1 were measured on the 3rd, 5th, 6th and 7th day after cisplatin model rats were single ip given cisplatin 7.5 mg·kg⁻¹. KIM-1 levels were expressed as the ratio of the urinary KIM-1 to UCr (mg·mol⁻¹) which means that the amount of KIM-1 was excluded while 1 mol UCr was excluded. $\bar{x} \pm s$, $n = 6$ (for every time point). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, compared with normal control group at the same time.

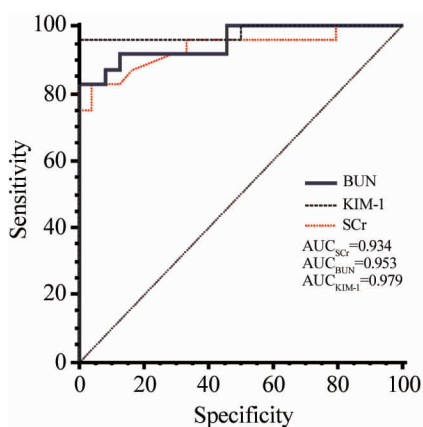


Fig.1 Receiver operating characteristic (ROC) curve for SCr, BUN and urinary KIM-1 at different times after ip given cisplatin 7.5 mg·kg⁻¹. See Tab.1 for rat treatments. AUC: area under curve.

升高 ($P < 0.05$); 且尿 KIM-1 随给药时间的延长, 与 SCr 和 BUN 比较升高幅度更为明显, 3 个时间点升高倍数分别为正常对照组的 2.6, 13.5 和 34.9 倍; SCr 为正常对照组的 1.1, 1.7 和 1.6 倍, BUN 为正常对照组的 1.0, 2.0 和 1.9 倍 (表 2)。由图 2 显示, SCr, BUN 和尿 KIM-1 给药后不同时间点 ROC 曲线的 AUC 分别为 0.877, 0.713 和 0.932。可以看出尿 KIM-1 与 SCr 和 BUN 比较在庆大霉素所致肾损伤大鼠模型中具有更好的灵敏度和特异性。

Tab.2 Changes of SCr, BUN and KIM-1 levels of rats with kidney injuries induced by gentamicin (Gen)

| Group | SCr/ mmol·L ⁻¹ | BUN/ mmol·L ⁻¹ | KIM-1/ mg·mol ⁻¹ |
|-----------------------|------------------------------|------------------------------|--------------------------------|
| Normal saline(ip) 2 d | 49.2 ± 1.2 | 6.2 ± 0.5 | 97 ± 36 |
| (ip) 6 d | 45.7 ± 2.5 | 4.6 ± 0.7 | 101 ± 38 |
| (ip) 9 d | 47.7 ± 2.1 | 4.8 ± 0.5 | 125 ± 15 |
| (ip) 12 d | 46.4 ± 1.5 | 5.9 ± 0.6 | 73 ± 42 |
| Gen 120(ip) 2 d | 49.4 ± 3.3 | 6.7 ± 0.6 | 62 ± 10 * |
| (ip) 6 d | 49.2 ± 5.5 | 4.7 ± 0.8 | 266 ± 224 |
| (ip) 9 d | 83.0 ± 60.7 | 9.8 ± 7.8 | 1679 ± 1218 * |
| (ip) 12 d | 75.0 ± 28.0 | 10.8 ± 5.2 * | 2544 ± 1673 ** |

Rats in gentamicin group were ip given gentamicin 120 mg·kg⁻¹ once daily, for 2, 6, 9 or 12 d. Levels of SCr, BUN, UCr and KIM-1 were detected on the 3rd, 7th, 10th and 13th day after the first ip administration. $\bar{x} \pm s$, $n = 6$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, compared with normal control group at the same time.

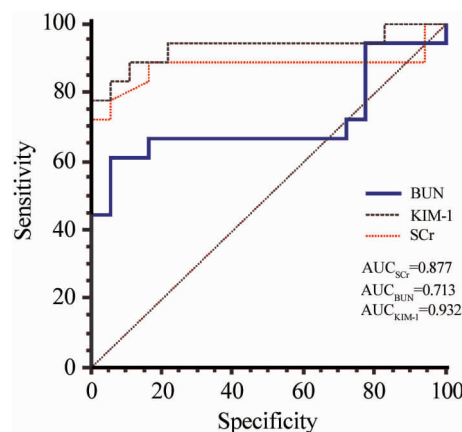


Fig.2 ROC curve for SCr, BUN and urinary KIM-1 at different times injected with 120 mg·kg⁻¹ gentamicin for 12 d. See Tab.2 for rat treatments.

2.3 环孢素对大鼠 SCr, BUN 和尿 KIM-1 水平的影响

由表 3 看出, 首次给药后第 8 天, SCr 和 BUN 水平未见明显改变, 尿 KIM-1 明显高于正常对照组 ($P < 0.05$); 第 15 和 36 天, BUN 和尿 KIM-1 显著高于正常对照组, SCr 未见明显改变; 第 53 天, SCr, BUN 和尿 KIM-1 均明显升高 ($P < 0.01$)。尿 KIM-1 随给药时间延长, 比 SCr 和 BUN 升高幅度更为明显, 4 个时间点升高倍数分别为正常对照组的 1.6, 2.7, 5.3 和 10.3 倍, SCr 分别为正常对照组的 1.1, 1.0, 1.0 和 1.2 倍, BUN 分别为正常对照组的 0.8, 1.4, 1.6 和 2.2 倍。由图 3 所示, SCr, BUN 和尿 KIM-1 给药后不同时间点 ROC 曲线的 AUC 分别为 0.668, 0.766 和 0.976。可见尿 KIM-1 与 SCr 和 BUN 相比具有更好的灵敏度和特异性。

Tab. 3 Changes of SCr, BUN and KIM-1 levels of rats with kidney injuries induced by ciclosporine(Cyc)

| Group | SCr/mmol·L ⁻¹ | BUN/mmol·L ⁻¹ | KIM-1/mg·mol ⁻¹ |
|--|--------------------------|--------------------------|----------------------------|
| Normal olive oil(ig) 7 d | 63.5 ± 2.4 | 7.7 ± 1.0 | 158 ± 16 |
| (ig) 14 d | 56.9 ± 2.9 | 6.4 ± 1.1 | 112 ± 29 |
| (ig) 22 d + (sc) 13 d | 61.1 ± 4.0 | 8.4 ± 1.1 | 64 ± 15 |
| (ig) 22 d + (sc) 21 d + (sc) 9 d | 60.4 ± 1.6 | 7.5 ± 0.8 | 74 ± 21 |
| Cyc 3(ig) 7 d | 71.6 ± 10.9 | 6.5 ± 1.3 | 256 ± 100* |
| 3(ig) 14 d | 58.3 ± 2.4 | 9.2 ± 1.5** | 300 ± 97** |
| 3(ig) 22 d + Cyc 7(sc) 13 d | 62.7 ± 4.8 | 13.7 ± 3.6** | 340 ± 333 |
| 3(ig) 22 d + Cyc 7(sc) 21 d + Cyc 12(sc) 9 d | 71.6 ± 7.2** | 16.4 ± 5.2** | 760 ± 556* |

Rats in model group were ig given ciclosporine 3 mg·kg⁻¹ from the first to twenty-second days, sc given ciclosporine 7 mg·kg⁻¹ from the twenty-third to forty-third days and sc given ciclosporine 12 mg·kg⁻¹ from the forty-fourth to fifty-second days. Levels of SCr, BUN, UCr and KIM-1 were detected on the 8th, 15th, 36th and 53th day after the first given ciclosporine. $\bar{x} \pm s$, n = 6. * P < 0.05, ** P < 0.01, compared with normal control group at the same time.

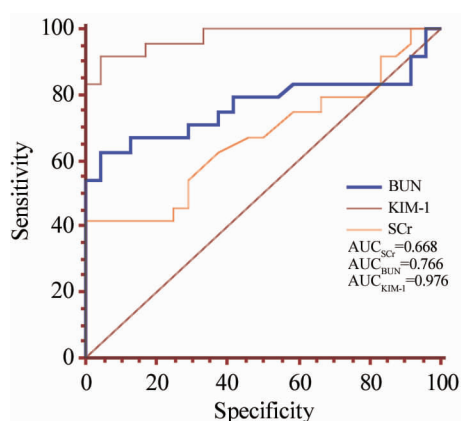


Fig. 3 ROC curve for SCr, BUN and urine KIM-1 at different times after administered with ciclosporine for 52 d. See Tab. 3 for rat treatments.

2.4 顺铂对大鼠肾组织病理变化的影响

图 4 显示,正常对照组大鼠肾组织无明显病理改变(图 4A),模型组单次给药后第 5 天(图 4B),第 6 天(图 4C)和第 7 天(图 4D)肾组织均出现程度不等的皮髓交界处部分肾小管扩张,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。

2.5 庆大霉素对大鼠肾组织病理变化的影响

图 5 显示,正常对照组大鼠肾组织无明显病理改变(图 5A);而模型组首次给药后第 10 天(图 5B)和第 13 天(图 5C),肾脏组织可见肾小管扩张、变性、坏死和蛋白管型等病理改变。

2.6 环孢素对大鼠肾组织病理变化的影响

图 6 显示,正常对照组大鼠肾组织无明显病理改变(图 6A);而模型组首次给药后第 53 天所有大鼠肾组织可见较多肾小管变性,胞浆疏松淡染,严重者出现空泡样,较多肾小管嗜碱性变,胞浆淡染,胞核增大嗜碱性增强。

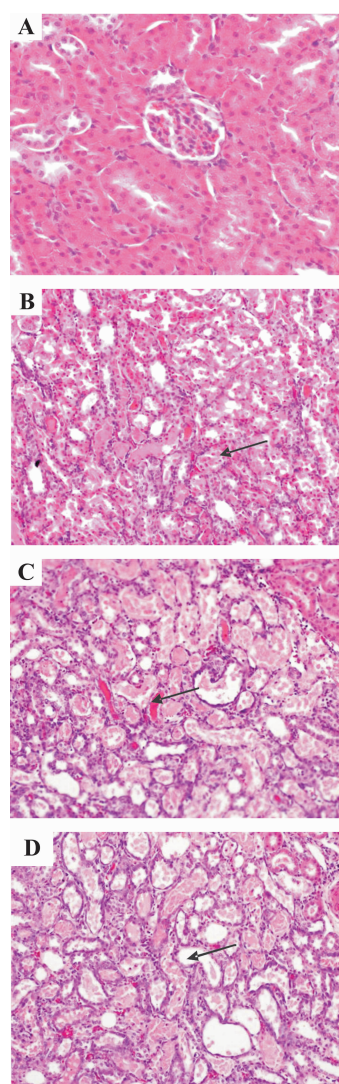


Fig. 4 Effect of cisplatin on histopathological changes of kidneys in rats (HE × 400). See Tab 1 for rat treatments. A: normal control group; B: model group, on the 5th day after cisplatin was once ip treated (Arrow shows: tubular degeneration and necrosis); C: model group, on the 6th day after cisplatin was once ip treated (Arrow shows: protein casts); D: model group, on the 7th day after cisplatin was once ip treated (Arrow shows: tubular regeneration and dilatation).

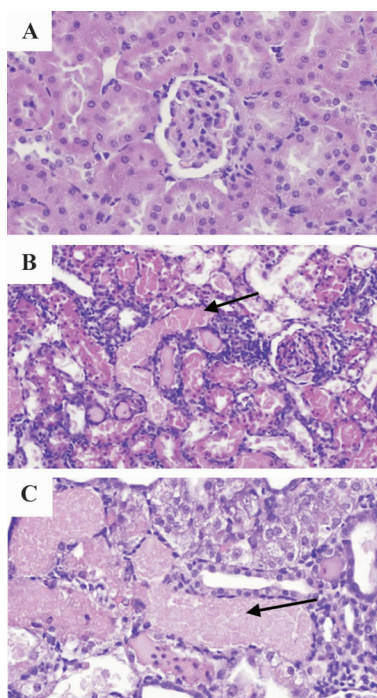


Fig. 5 Effect of gentamicin on histopathological changes of kidneys in rats (HE $\times 400$). See Tab 2 for rat treatments. A: normal control group; B: model group, on the tenth days after gentamicin was first ip treated (Arrow shows: tubular degeneration and necrosis); C: model group, on the thirteenth days after gentamicin was first ip treated (Arrow shows: protein casts).

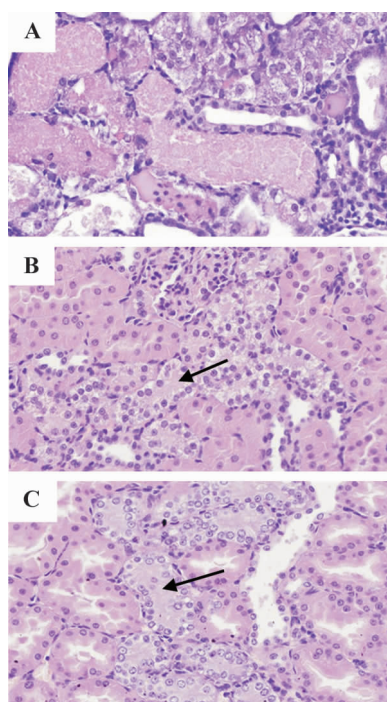


Fig. 6 Effect of ciclosporine on histopathological changes of kidneys in rats (HE $\times 400$). See Tab 3 for rat treatments. A: normal control group; B: model group, on the 53rd day after ciclosporine was first ip treated (Arrow shows: tubular degeneration); C: model group, on the 53rd day after ciclosporine was first ip treated (Arrow shows: tubular regeneration).

3 讨论

SCr 和 BUN 是反映肾损伤最主要的生物标志物^[9-10],是临床前安全性评价中常规的检测指标^[6],但有下列局限:① SCr 易受年龄、性别、种族、饮食和机体内环境等因素影响;② SCr 常于肾组织学改变达 50% 以上时升高,无法预测早期病变;③ SCr 血液蓄积只与肾小球滤过率降低相关,不能反映肾小管损伤和坏死;④ BUN 不仅受肾功能的影响,还受肾外因素的影响,如高蛋白饮食、消化道出血及高分解代谢等。因此,SCr 和 BUN 在检测肾功能方面显示出明显的不准确性和滞后性。

KIM-1 是肾脏近曲小管上皮细胞表达的一种跨膜蛋白,在正常肾组织中表达水平极低,但在肾损伤因素的作用下,可特征性升高,表达于肾损伤的肾小管上皮细胞顶膜并持续到细胞损伤完全修复。KIM-1 的胞外功能区受金属基质蛋白酶的调节,可裂解并释放入尿。KIM-1 的上述特性,使它可能成为一种检测肾损伤的理想生物标志物。尿中 KIM-1 水平采用 UCr 加以校正,可以校正因尿量变化对 KIM-1 含量的影响。

顺铂的肾毒性机制包括引起肾血管收缩,使肾血流量及肾小球滤过率下降,从而引起蛋白尿和肾功能损伤等症状;引起近端肾小管上皮细胞缺血、缺氧甚至坏死^[3]。庆大霉素的肾毒性机制有溶酶体损伤学说和线粒体损伤学说等,主要表现为近端肾小管 S1 段和 S2 段的上皮细胞变性坏死,坏死多成局灶性,坏死灶周围可有炎症细胞浸润^[4]。环孢素是一种强效的免疫抑制剂,肾毒性是其严重的不良反应之一,主要通过前列腺素代谢失衡和肾素-血管紧张素系统激活等导致肾细胞、组织和器官的损伤^[6]。

在本实验顺铂所致的肾损伤模型中,于单次给药后第 3 天,病理显示除部分大鼠肾小管腔内有蛋白管型外,未见其他明显病变,此时 SCr 和 BUN 水平略有升高,而 KIM-1 明显升高,表明在肾组织发生轻微病变时,KIM-1 较 SCr 和 BUN 相比即表现出明显的升高;第 5 天,肾组织皮髓交界处开始出现部分肾小管扩张,肾小管上皮细胞变性、坏死脱落,基底膜裸露,并随药后时间延长,损伤程度加重,SCr 和 BUN 随病变的加重表现为先高后低的趋势,而 KIM-1 随药后时间延长,持续大幅度升高,与肾损伤程度呈一致性。庆大霉素所致的肾损伤模型中,在第 10 天,肾组织出现明显病变,表现为部分大鼠肾小管变性、坏死、蛋白管型和肾小管扩张,间质较多炎症细胞浸润等,此时 SCr 和 BUN 也开始明显升高,而 KIM-1 在给药后第 7 天,已经开始有升高趋

势;随着给药时间的延长,肾组织病变加重,KIM-1 持续明显升高,至第 13 天时,升高到正常对照组的 34.9 倍,而 SCr 和 BUN 升高水平与第 10 天时持平。环孢素所致的肾损伤模型中,于首次给药后第 53 天,肾组织出现明显的病理改变,表现为肾小管变性,胞浆疏松淡染,严重者出现空泡样,较多肾小管嗜碱性变;SCr 和 BUN 分别于第 15 天和第 53 天出现升高,而 KIM-1 在第 8 天时开始明显升高,早于 SCr 和 BUN 升高及病理改变,并随给药时间延长持续明显升高。根据上述结果可以认为,在不同药物造成的肾损伤中,尿 KIM-1 在未出现或仅出现轻微病理改变时即明显升高,与肾损伤程度表现出良好的正向相关性。与 SCr 和 BUN 相比,尿 KIM-1 升高更早且升高幅度更为明显。

本研究采用 ROC 曲线下 AUC 分析 SCr, BUN 和尿 KIM-1 的灵敏度和特异性,显示 3 个药物模型组尿 KIM-1 的 AUC 值均最高,在 0.9 以上,表明尿 KIM-1 在灵敏度和特异性方面优于 SCr 和 BUN。

综上所述,KIM-1 相比于传统的生物标志物 SCr 和 BUN,在评估药物诱导的肾毒性中,不仅具有更好的灵敏度和特异性,而且能够对肾损伤进行早期预测,并有助于确定肾损伤部位。在新药的临床前开发阶段,可更准确地预测候选药物的肾毒性,有利于早期鉴别,尽快淘汰有潜在肾毒性的化合物,减少新药开发中不必要的时间和成本的耗费。

参考文献:

- [1] Zhou YZ, Vaidya VS, Brown RP, Zhang J, Rosenzweig BA, Thompson KL, *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.
- [2] Ichimura T, Bonventre JV, Bailly V, Wei H, Hession CA,

Cate RL, *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]. *J Biol Chem*, 1998, **273**(7):4135-4142.

- [3] Liangos O, Tighiouart H, Perianayagam MC, Kolyada A, Han WK, Wald R, *et al.* Comparative analysis of urinary biomarkers for early detection of acute kidney injury following cardiopulmonary bypass [J]. *Biomarkers*, 2009, **14**(6):423-431.
- [4] Han WK, Bailly V, Abichandani R, Thadhani R, Bonventre JV. Kidney Injury Molecule-1 (KIM-1): a novel biomarker for human renal proximal tubule injury [J]. *Kidney Int*, 2002, **62**(1):237-244.
- [5] Bonventre JV, Vaidya VS, Schmoouder R, Feig P, Dieterle F. Next-generation biomarkers for detecting kidney toxicity[J]. *Nat Biotechnol*, 2010, **28**(5):436-440.
- [6] Vaidya VS, Ozer JS, Dieterle F, Collings FB, Ramirez V, Troth S, *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.
- [7] Feria I, Pichardo I, Juárez P, Ramírez V, González MA, Uribe N, *et al.* Therapeutic benefit of spironolactone in experimental chronic cyclosporine A nephrotoxicity[J]. *Kidney Int*, 2003, **63**(1):43-52.
- [8] Qin XG. Several attentive problems during application of urine creatinine ratio[J]. *Chin J Lab Med*(中华医学检验杂志), 1991, **14**(5):279-282.
- [9] Ozbek E, Cekmen M, Ilbey YO, Simsek A, Polat EC, Somay A. Atorvastatin prevents gentamicin-induced renal damage in rats through the inhibition of p38-MAPK and NF-kappaB pathways[J]. *Ren Fail*, 2009, **31**(5): 382-392.
- [10] Zhou D, Sun W. The research status of kidney toxicity mechanism of cisplatin and its prevention [J]. *Chin J Integrated Tradit West Nephrol*(中国中西医结合肾病杂志), 2004, **5**(10):617-618.

Predictability of increasing level of kidney injury molecule-1 in urine for rat early kidney injury

SHEN Jun¹, LIU Yan², ZHANG Jin-xiao², GAO Xu-cong², ZHOU Fei²,
JIANG Ling², ZHANG Jian-jun², ZHANG Zong-peng²

(1. Graduate Department, Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China;
2. Toxicology Department, New Drug Evaluation Center, Tianjin Institute of
Pharmaceutical Research, Tianjin 300193, China)

Abstract: OBJECTIVE To evaluate the predictive ability of urine kidney injury molecule-1 (KIM-1) for early renal injuries in rats. **METHODS** The renal injury models of rats were induced

by cisplatin, gentamicin and ciclosporine, respectively. Serum samples taken from abdominal aorta were collected on the 3rd, 5th, 6th and 7th day after cisplatin was once ip treated; on the 3rd, 7th, 10th and 13th day after gentamicin was first ip treated and on the 8th, 15th, 36th and 53th day after ciclosporine was first ig treated. Urine was collected before necropsy (24 h collected period). The levels of serum creatinine (SCr), blood urea nitrogen (BUN) and urine creatinine (UCr) were detected using automatic biochemical analyzer. KIM-1 concentration in urine was analyzed with ELISA. Pathological changes in renal tissue were observed with optical microscope following HE staining. **RESULTS** In cisplatin treated group, the rat kidney had no observable histomorphological change, but urine KIM-1, SCr and BUN increased by 5.7, 1.3 and 1.7-fold relative to normal control on the 3rd day. KIM-1 increased by 11.0 and 9.7-fold, SCr increased by 2.9 and 4.3-fold, and BUN increased by 4.0 and 6.1-fold on the 5th and 6th days compared with control group. Kidney tissue had remarkable changes on the 5th day compared with control group. KIM-1 increased by 17.6-fold but SCr and BUN only increased by 2.2 and 4.0-fold compared with control group on the 7th day. For gentamicin treated group, SCr, BUN and kidney tissue had no significant change, but KIM-1 increased by 2.6-fold on the 7th day relative to the normal control. SCr, BUN and KIM-1 increased significantly on the 10th and 13th day compared with control group. They increased by 2.7 and 2.6-fold for SCr, 3.0 and 2.9-fold for BUN and 13.5 and 34.9-fold for KIM-1 compared with control group. Histomorphological changes were observed in renal tissue on the 10th day. For ciclosporin treated group, SCr, BUN and kidney tissue had no significant change, but KIM-1 increased by 1.6-fold on the 8th day. Compared with control group, KIM-1 had increased by 2.7, 5.3, and 10.3-fold on the 15th, 36th and 53th day, while SCr increased by 2.0, 2.0 and 2.2-fold and BUN increased by 1.4, 1.6 and 2.2-fold. Nephridial tissue had significantly histomorphological changes on the 53th day. When compared with the area under curve (AUC) of the 3 biomarker's receiver operating characteristic, the AUC of cisplatin were 0.934, 0.953 and 0.979, the AUC of gentamicin were 0.877, 0.713 and 0.932 and the AUC of ciclosporin were 0.688, 0.766 and 0.976. **CONCLUSION** KIM-1 increases significantly before kidney tissue has slight or observable pathological changes, and KIM-1 is a good predictor for early renal injury.

Key words: kidney injuries; kidney injury molecule-1; cisplatin; gentamicin; cyclosporine

Foundation item: The project supported by National Mega-project of Science Research of China(2008ZX09305)

Corresponding author: ZHANG Zong-peng, E-mail: zhangzp@tjpr.com, Tel: (022)23006865

(收稿日期: 2011-05-04 接受日期: 2011-12-04)

(本文编辑: 齐春会)

欢迎订阅《中国药理学与毒理学杂志》

《中国药理学与毒理学杂志》(CJPT)是新闻出版署正式批准,由中国药理学会、中国毒理学会及军事医学科学院毒物药物研究所共同主办的学术期刊。主要刊登实验药理学与实验毒理学各分支学科的研究论著、综述、短讯及新技术方法。投稿请登录 www.cjpt.ac.cn 在线投稿;通过本刊网站还可以免费阅读全文。

CJPT 为双月刊,国内外公开发行。国内统一刊号 CN11-1155R,国内邮发代号:82-140,国外邮发代号:BM-1051。国内每期定价为 15.0 元,全年定价 90.0 元。可以通过邮局订阅,也可以直接联系编辑部补订。

地址:北京市海淀区太平路 27 号毒物药物研究所《中国药理学与毒理学杂志》编辑部,邮编 100850

电话:(010)68276743,66931617

E-mail: cjpt@nic.bmi.ac.cn