

DOI:10. 16305/j. 1007-1334. 2016. 08. 004

血清标志物组合对于药源性不同类型肾损伤模型的评价研究

李一飞, 徐婷婷, 金若敏, 姚广涛

上海中医药大学(上海 201203)

【摘要】 目的 探讨半胱氨酸蛋白酶抑制蛋白 C(CysC)和中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白(NGAL)在阿霉素和庆大霉素诱导的大鼠肾损伤中的变化特征,及相关血清标志物组合在药源性肾损伤检测中的意义。**方法** 将 66 只 Wistar 大鼠随机分为阿霉素组、庆大霉素组和对照组,分别建立肾小球和肾小管损伤模型。各组于不同时间点采集血样,采用生化分析仪检测血清尿素氮(BUN)、肌酐(Scr)含量,酶联免疫吸附法(ELISA)检测血清 CysC 和 NGAL 浓度,光镜下观察肾脏病理组织形态学改变。以肾脏病理组织学检查结果作为药源性肾损伤的阳性诊断标准,采用受试者工作特征曲线(ROC)和 Logistic 回归分析,评估上述血清标志物及组合对肾小球/肾小管损伤的诊断价值。**结果** ①阿霉素、庆大霉素所致的两种类型的肾损伤大鼠,其 CysC 和 NGAL 出现显著性变化的时间均早于形态学和 BUN、Scr 改变。②ROC 分析结果显示,CysC 和 NGAL 在阿霉素模型中的 AUC 分别为 0.866 和 0.691,在庆大霉素模型中的 AUC 分别为 0.632 和 0.698,均大于 BUN 和 Scr;CysC、NGAL 分别与 BUN 和 Scr 组合,对肾小球和肾小管损伤均表现出较高的检验效能;CysC 和 NGAL 组合对两种类型的肾损伤均有一定的检测价值,AUC、敏感性和特异性均大于 0.7。**结论** CysC 和 NGAL 在药源性肾损伤模型中出现显著性变化的时间均早于形态学改变和传统的血清标志物,在一定程度上可预测肾损伤的发生部位和发展变化;二者分别与 BUN、Scr 组合,对肾小球和肾小管损伤均表现出较高的检验效能,其中 CysC + NGAL 组合可用于评价不同类型的肾损伤。

【关键词】 肾损伤;模型;阿霉素;庆大霉素;半胱氨酸蛋白酶抑制蛋白 C;中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白;ROC 分析

Combination of serum biomarkers in the evaluation of drug-induced different kidney injury models

LI Yi-fei, XU Ting-ting, JIN Ruo-min, YAO Guang-tao

Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai, 201203

Abstract: Objective To explore the change characteristics of serum kidney biomarker cystatin C(CysC) and neutrophil gelatinase-associated lipocalin(NGAL) in adriamycin(ADR) and gentamicin(GM)-induced kidney injury in rats and the significance of the combined detection. **Methods** Wistar rats were randomly divided into the drug and the control group, and the kidney injury models of glomerular and renal tubular type were established respectively. The contents of serum blood urea nitrogen(BUN) and creatinine(Scr) were detected by means of biochemical analyzer. The concentrations of serum CysC and NGAL were measured by enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA). The morphological changes of renal pathology were observed by light microscopy. The curve areas of various serum biomarkers and the combinations were compared by receiver operating characteristic curve(ROC curve) and logistic regression analysis based on renal pathology as positive diagnosis criteria. **Results** ①The significant changes of CysC and NGAL in both types of injury were earlier than the changes of morphology and BUN and Scr. ②ROC analysis showed that the area under curve(AUC) of CysC and NGAL were 0.866, 0.691 in ADR model and 0.632, 0.698 in GM model respectively, which higher than that of BUN or Scr. BUN + Scr combined with CysC or NGAL showed higher efficiency for glomerular and renal tubular injury, respectively. The combination of CysC and NGAL had certain value for two types of renal injury, which AUC, sensitivity and specificity were all more than 0.7. **Conclusion** The significant changes of CysC and NGAL were earlier than morphological changes and traditional serum markers, which can predict the occurrence and development of renal injury in a certain degree. BUN + Scr combined with CysC or NGAL had higher efficiency for glomerular and renal tubular injury, respectively. Combination CysC + NGAL can be used to evaluate different types of drug-induced renal injury.

Keywords: kidney injury; model; adriamycin; gentamicin; CysC; NGAL; ROC curve analysis

[基金项目] 科技部国家“重大新药创制”项目(2009ZX09502-002);科技部国家重点基础研究发展计划(973 计划)项目(2009CB522807);上海市教委预算内项目(2010JW30)

[作者简介] 李一飞,女,博士,主要从事中药新药开发及安全性评价工作

[通讯作者] 姚广涛,博士,副研究员,硕士生导师。

E-mail: yaoguangtao1969@126.com

随着中药、中成药在临床中应用的日益广泛,有关中药引起脏器损害的报道也逐年增多。与单纯的化学药物相比,中药具有多成分、多靶点、多效应等特点,引起肾毒性的表现更为复杂,毒性机制更为多样,甚至一种肾毒性中药可能有多种成分作用于多个肾脏靶部位,进而给药源性肾损伤的早期发现和精确诊断带来特殊的困难。在目前临床常用的药物肾毒性的评价方法中,病理检查属于有创性检查,不宜作为临床常规的

监测措施;目前临床常用的肾损伤血清标志物虽各具特点,但都有不足,单一标志物检测很难同时兼具较高的敏感性和特异性,而且往往是损伤形成后的表现,缺乏敏感性,不能判断药物毒性的早期效应。因此,有必要探讨一种临床适用的更灵敏、更准确的药源性肾损伤的评价方法。

本研究以肾毒性明确且损伤特点各异的阿霉素和庆大霉素诱导大鼠肾损伤,分别建立肾小球和肾小管损伤模型,比较半胱氨酸蛋白酶抑制蛋白 C(cystatin C, CysC) 和中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白(neutrophil gelatinase-associated lipocalin, NGAL) 的变化特征;以肾脏病理组织学检查结果作为药源性肾损伤的阳性诊断标准,采用受试者工作特征曲线(receiver operating characteristic curve, ROC) 和 Logistic 回归分析,评估上述血清标志物及其组合对肾小球/肾小管损伤的诊断价值,并与经典肾损伤标志物尿素氮(blood urea nitrogen, BUN) 和肌酐(serum creatinine, Scr) 的诊断效能相比较,以期为中药的安全性评价及药源性肾损伤的防治提供参考。

1 材料与方法

1.1 动物 清洁级健康 Wistar 大鼠 66 只,体质量(180±20) g;购自上海西普尔-必凯实验动物有限公司;动物许可证号:SCXK(沪)2008-0016。所有动物均饲养于上海中医药大学实验动物中心清洁级饲养室。

1.2 药物、试剂与仪器 注射用盐酸多柔比星(又名阿霉素),山西普德药业股份有限公司(批号:02110301);硫酸庆大霉素注射液,上海第一生化药业有限公司(批号:091002)。以上药物均用 0.9% NaCl 溶液稀释至所需浓度。

BUN(R1 批号:A124;R2 批号:A125)、CR(R1 批号:A126;R2 批号:A125),日本世诺临床诊断制品株式会社。

大鼠 CysC、NGAL ELISA 试剂盒,上海达为科生物科技有限公司(批号:201110)。

日立 7080 全自动生化分析仪,日本 HITACHI 公司;Thermo MK3 酶标仪,热电(上海)科技仪器有限公司。

1.3 动物分组及造模 将 66 只大鼠随机分为阿霉素(adriamycin, ADR)组 24 只、庆大霉素(gentamicin, GM)组 18 只和对照组(control)24 只。

阿霉素组分别于试验第 1 天和第 5 天尾静脉注射阿霉素溶液,剂量分别为每克体质量 5 μg、3 μg。

庆大霉素组腹腔注射硫酸庆大霉素注射液,每天 1 次,连续给药 5 天,剂量为每克体质量 80 μg。

对照组参照庆大霉素组方法,腹腔注射等容量的

0.9% NaCl 溶液。

1.4 检测项目与方法 依据药物的作用特点^[1-2],确定阿霉素组观察时间为 28 天,庆大霉素组观察时间为 12 天。各组分别于试验的第 1、3、6、8、12、28 天(庆大霉素组除外),取 6 只动物进行眼球后静脉丛采血,备测肾损伤标志物;于第 4、7、12 和 28 天(庆大霉素组除外),取 6 只动物麻醉后解剖,取两侧肾脏进行组织病理学检查。

1.4.1 肾损伤标志物检测 血液样本以 5 000 r/min 离心 15 min 后吸取上清液,采用全自动生化分析仪检测血清 BUN、Scr 水平,采用 ELISA 方法检测血清标志物 CysC、NGAL 含量。

1.4.2 肾组织形态学观察 参照有关文献^[3-4],将肾组织标本分别进行 HE 和 PAS 染色,光镜下观察肾组织形态学变化。肾脏病变程度分为 4 个等级:“-”,肾组织结构正常;“+”,轻度损伤(可见较多的细胞变性或坏死,病变呈局灶性);“++”,中度损伤(可见肾小管或肾小球结构变化,病变呈多灶性);“+++”,重度损伤(可见明显的肾小管或肾小球结构变化,病变呈弥漫性)。

1.5 ROC 曲线分析 参照有关文献^[5]方法进行 ROC 曲线分析。以肾脏病理组织学检测结果作为肾损伤的阳性诊断标准,选取最早出现显著性差异的时间点及此点前各时间点的数据,在 SPSS 软件中输入对照组和药物组在以上时间点各血清标志物的检测值。

二元 Logistic 回归法以组别为因变量,以目标组合的几个标志物为协变量,生成预测概率值(在分析中作为中间变量),建立目标组合的回归方程。

ROC 分析以组别为状态变量,以各标志物的检测值或组合的预测概率值为检验变量,绘制曲线并计算曲线参数,包括敏感性、特异性和曲线下面积(area under curve, AUC)。曲线上最靠近左上方的点即为临界值(cut-off,敏感性和特异性均较高)。

1.6 统计学方法 观察数据采用 SPSS 18.0 软件进行统计学分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用两独立样本 *t* 检验;等级资料采用 Ridit 分析。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组 Scr、BUN 水平比较 阿霉素组与相同时点的对照组相比,Scr 在第 8 天和 28 天差异有统计学意义($P < 0.05$, $P < 0.01$),其中第 28 天的 Scr 水平显著性升高(第 8 天 Scr 水平变化无生物学意义);BUN 在第 6 天和 12 天差异有统计学意义($P < 0.05$),但均无生物学意义。见表 1。

庆大霉素组与相同时点的对照组相比,Scr 在第 6、

8 天差异有统计学意义($P < 0.01$),且显著性升高;性升高。见表 1。

BUN 在第 8 天差异有统计学意义($P < 0.01$),且显著

表 1 各组不同时点血清 Scr、BUN 水平比较($n = 6, \bar{x} \pm s$)

组别	指标	时点(d)					
		1	3	6	8	12	28
对照组	Scr($\mu\text{mol/L}$)	21.38 $\pm$ 2.33	21.25 $\pm$ 3.58	22.63 $\pm$ 2.13	22.75 $\pm$ 1.91	23.38 $\pm$ 2.33	26.13 $\pm$ 1.96
	BUN(mmol/L)	4.95 $\pm$ 0.79	4.78 $\pm$ 0.48	5.25 $\pm$ 0.88	4.75 $\pm$ 0.60	4.94 $\pm$ 0.47	6.04 $\pm$ 0.55
阿霉素组	Scr($\mu\text{mol/L}$)	19.38 $\pm$ 1.41	19.88 $\pm$ 3.52	21.50 $\pm$ 2.73	20.13 $\pm$ 1.64 *	24.00 $\pm$ 2.27	35.50 $\pm$ 10.27 *
	BUN(mmol/L)	4.53 $\pm$ 0.57	4.46 $\pm$ 0.60	4.15 $\pm$ 0.85 *	4.28 $\pm$ 0.73	4.28 $\pm$ 0.49 *	5.89 $\pm$ 0.86
庆大霉素组	Scr($\mu\text{mol/L}$)	20.25 $\pm$ 1.83	24.25 $\pm$ 3.06	29.00 $\pm$ 4.24 **	28.75 $\pm$ 3.37 **	27.38 $\pm$ 4.78	—
	BUN(mmol/L)	5.09 $\pm$ 0.52	4.88 $\pm$ 0.29	5.37 $\pm$ 0.73	6.01 $\pm$ 0.86 **	4.81 $\pm$ 0.81	—

注:与对照组相同时点比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

2.2 各组 CysC、NGAL 水平比较 阿霉素组与相同时点的对照组相比,CysC 在第 1、6、8、12、28 天差异有统计学意义($P < 0.05$, $P < 0.01$),且显著性升高;NGAL 在第 3、28 天差异有统计学意义($P < 0.05$, $P < 0.01$),且显著性升高。见表 2。

表 2 各组不同时点血清 CysC、NGAL 水平比较($n = 6, \bar{x} \pm s$)

组别	指标	时点(d)					
		1	3	6	8	12	28
对照组	CysC($\mu\text{g/L}$)	114.88 $\pm$ 13.06	110.62 $\pm$ 12.95	115.92 $\pm$ 4.67	110.90 $\pm$ 9.38	102.15 $\pm$ 19.00	111.08 $\pm$ 11.30
	NGAL(ng/L)	817.47 $\pm$ 116.88	808.80 $\pm$ 89.57	968.94 $\pm$ 152.47	866.01 $\pm$ 76.02	892.16 $\pm$ 137.32	839.28 $\pm$ 23.54
阿霉素组	CysC($\mu\text{g/L}$)	136.17 $\pm$ 13.62 *	119.83 $\pm$ 14.50	136.09 $\pm$ 11.61 **	123.91 $\pm$ 4.09 *	131.72 $\pm$ 10.02 **	140.81 $\pm$ 13.51 **
	NGAL(ng/L)	857.63 $\pm$ 84.43	918.67 $\pm$ 44.56 *	969.74 $\pm$ 136.76	935.51 $\pm$ 92.90	1 083.21 $\pm$ 184.81	1 259.75 $\pm$ 149.30 **
庆大霉素组	CysC($\mu\text{g/L}$)	113.74 $\pm$ 11.18	101.79 $\pm$ 17.17	126.97 $\pm$ 8.94 *	124.48 $\pm$ 8.22 *	113.12 $\pm$ 13.93	—
	NGAL(ng/L)	854.81 $\pm$ 114.40	902.70 $\pm$ 50.09 *	1 026.44 $\pm$ 116.79	944.75 $\pm$ 55.42	924.44 $\pm$ 118.37	—

注:与对照组相同时点比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

2.3 各组肾组织病理变化比较 阿霉素组动物肾组织经 HE 染色显示,第 12 天肾小管管腔内出现少量蛋白管型(图 1-B),第 28 天皮质肾小管出现嗜碱性病变,近、远曲小管管腔内出现大量管型(图 1-C);PAS 染色显示,第 12 天肾小球基底膜轻微增厚(图 1-E),第 28 天肾小球轻微充血、肿胀,肾小球囊和毛细血管丛粘连(图 1-F)。阿霉素组与对照组相同时点比较,第 12 天、第 28 天的肾组织病理分级差异有统计学意义($P < 0.01$)。见表 3。

庆大霉素组动物肾组织经 HE 染色显示,第 7 天近曲小管上皮细胞坏死(图 2-B),第 12 天皮质肾小管发生嗜碱性病变(图 2-C),肾小管管腔内出现较多管型(图 2-D)。庆大霉素组与对照组相同时点比较,第 7 天、第 12 天的肾组织病理分级差异有统计学意义($P < 0.01$)。见表 3。

2.4 单一标志物的 AUC 分析 依据组织病理学肾损伤程度出现显著性变化的时间点,阿霉素组选取第 1、3、6、8、12 天的数据,庆大霉素组选取第 1、3、6 天的数据进行分析。

庆大霉素组与相同时点的对照组相比,CysC 在第 6、8 天差异有统计学意义($P < 0.05$),且显著性升高;NGAL 在第 3 天差异有统计学意义($P < 0.05$),且显著性升高。见表 2。

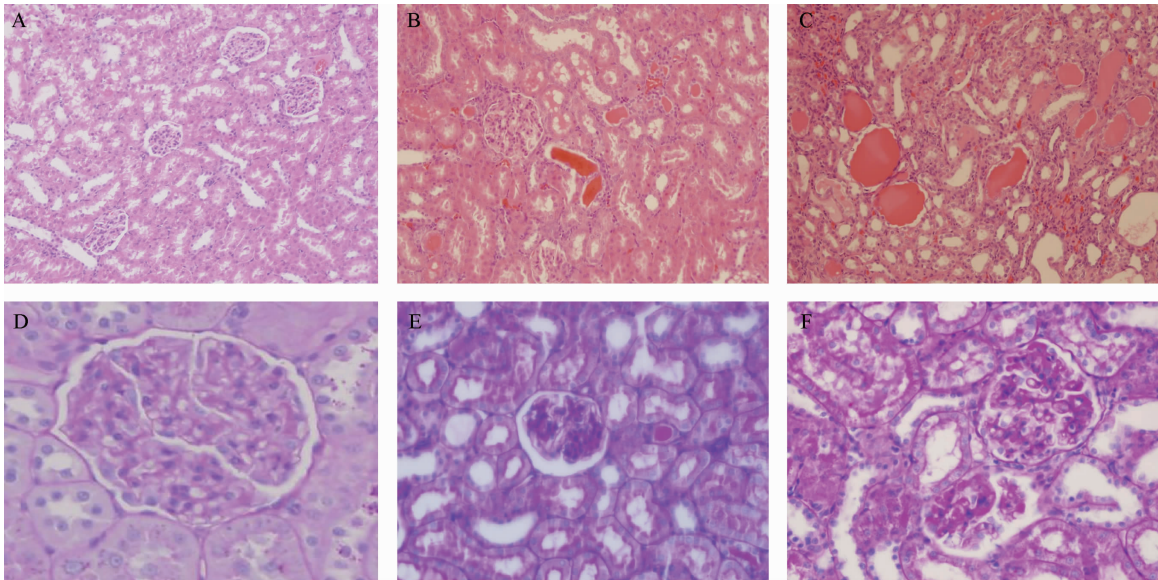
单一标志物的 AUC 分析结果显示,在阿霉素模型中,血清标志物 CysC 和 NGAL 的 AUC 分别为 0.866 和 0.691,远大于 BUN 和 Scr (AUC 分别为 0.252 和 0.293);在庆大霉素模型中,BUN 和 Scr 的 AUC 分别为 0.623 和 0.672,CysC 的 AUC 为 0.632(高于 BUN),NGAL 的 AUC 为 0.698(高于 BUN 和 Scr)。见表 4。

2.5 血清标志物组合的 ROC 分析 对血清标志物 BUN、Scr、CysC、NGAL 进行组合的 ROC 曲线分析结果显示,与单一血清标志物相比,组合检测均能在一定程度上提高检验效能,表现为 AUC 的增大。

在阿霉素组中,BUN + Scr + CysC 组合与其他组合相比,具有较高的检验效能,AUC > 0.9 ,敏感性 > 0.8 。见表 5、图 3。

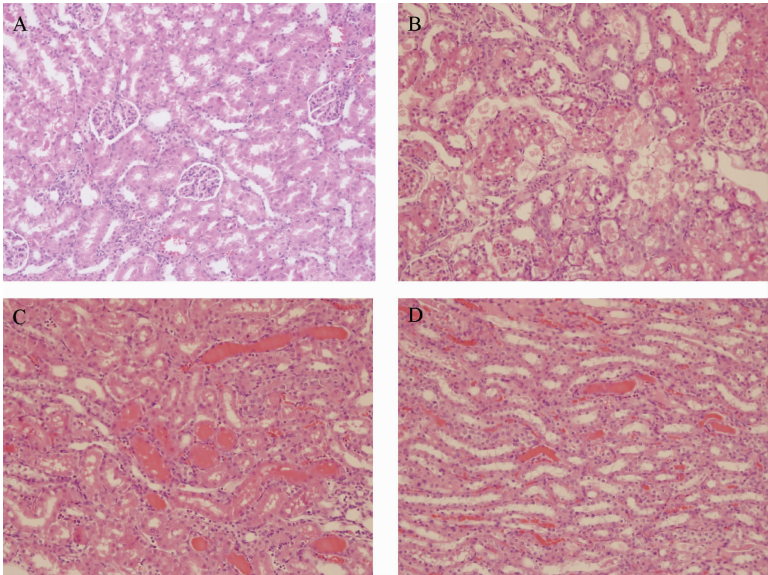
在庆大霉素组中,BUN + Scr + NGAL 组合与其他组合相比,具有较高的检验效能,AUC 和敏感性均 > 0.7 。见表 5、图 4。

与 BUN + Scr 的组合相比,CysC + NGAL 组合在两种模型中均表现出一定的检测价值(AUC > 0.7),具有较高的敏感性。见表 6。



注:A-C 为 HE 染色(×200);D-F 为 PAS 染色(×400);A 和 D 为对照组;B 和 E 为阿霉素组第 12 天;C 和 F 为阿霉素组第 28 天

图 1 阿霉素组肾脏病理变化情况



注:A-D 为 HE 染色(×200);A 为对照组;B 为庆大霉素组第 7 天;C 和 D 为庆大霉素组第 12 天

图 2 庆大霉素组肾脏病理变化情况

表 3 各组不同时点肾组织病理分级情况比较(只)

组别	病理分级	时点(d)			
		4	7	12	28
对照组	—	6	6	6	6
	+	0	0	0	0
	++	0	0	0	0
	++++	0	0	0	0
阿霉素组	—	4	3	0	0
	+	2	3	4	1
	++	0	0	2	3
	++++	0	0	0	2
庆大霉素组	—	3	0	0	—
	+	3	4	0	—
	++	0	2	4	—
	++++	0	0	2	—

表 4 两组单一标志物的 AUC 分析

组别	BUN	Ser	CysC	NGAL
阿霉素组	0.252	0.293	0.866	0.691
庆大霉素组	0.623	0.672	0.632	0.698

表 5 两组血清标志物组合的 ROC 分析

组别	组合	AUC	敏感度
阿霉素组	BUN + Ser	0.761	0.733
	CysC + NGAL	0.870	0.733
	BUN + Ser + CysC	0.907	0.833
	BUN + Ser + NGAL	0.793	0.600
庆大霉素组	BUN + Ser + CysC + NGAL	0.904	0.800
	BUN + Ser	0.659	0.640
	CysC + NGAL	0.702	0.809
	BUN + Ser + CysC	0.673	0.500
	BUN + Ser + NGAL	0.715	0.820
	BUN + Ser + CysC + NGAL	0.715	0.720

表 6 两组 CysC +NGAL 组合的 ROC 分析

组别	敏感度	特异度	临界值	回归方程
阿霉素组	0.733	0.933	0.6392	$P=1/[1+e^{-(-18.520+0.144X1+0.001X2)}]$
庆大霉素组	0.809	0.783	0.4672	$P=1/[1+e^{-(-5.567+0.008X1+0.005X2)}]$

注: P 为预测概率值; e 为数学常数, 自然对数的底数; X_1 为 CysC; X_2 为 NGAL

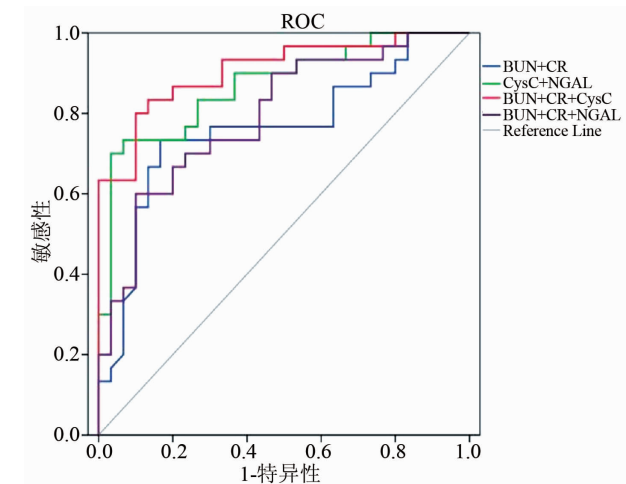


图 3 阿霉素组血清标志物组合检验的 ROC 曲线

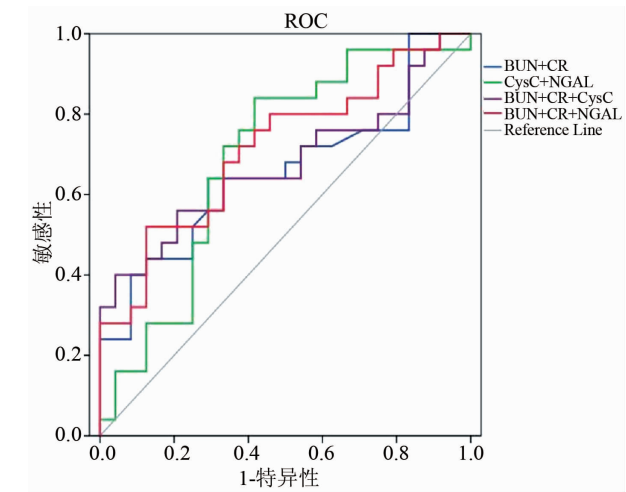


图 4 庆大霉素组血清标志物组合检验的 ROC 曲线

3 讨论

药物引起肾损伤的病理类型多种多样,主要包括肾小球损伤、肾小管损伤和血管损伤等几大类。对于某个肾毒性药物而言,很难对其进行简单归类。因为肾脏的结构复杂,不同结构间联系紧密,肾小球滤过功能的改变也会逐渐影响肾小管上皮细胞的变性。本研究参考药物的临床用法以及国内外研究进展,以肾毒性明确且损伤特点各异的阿霉素和庆大霉素诱导大鼠肾损伤,分别建立肾小球和肾小管损伤模型,并将采样时间点选择给药期、停药时和恢复期三个阶段,以模拟临床肾损伤发生、发展的不同时期和程度,进而探讨新型血清标志物的特征和相关组合在药源性肾损伤评价中的意义。

标志物 CysC 可自由通过基底膜,从肾小球中完全滤过^[6],在近端小管被完全重吸收。由于肾小管上皮细胞不会分泌此蛋白,因此其较 Scr 更能够以及更早地反映肾小球滤过率的改变。NGAL 在肾脏近端小管上皮细胞受到刺激时会显著高表达^[7],并参与肾细胞再生、修复及凋亡的调控。

本研究中阿霉素诱导的肾损伤模型大鼠,从第 12 天起肾组织出现蛋白管型改变,提示肾小球滤过功能受损;PAS 染色亦可见肾小球局部结构改变,第 28 天出现了肾小管嗜碱性病变,表明后期肾小管亦有损伤,病变由肾小球损伤累及肾小管。而 Scr 至第 28 天才有显著性升高,远滞后于病理损伤。CysC 表现出对肾小球损伤的高度敏感,从第 1 天起显著性升高的变化状态持续存在,提示了损伤的发生和持续状态;NGAL 在第 3 天即出现显著性差异,且作为肾小管损伤的特异性标志物,在后期的病理观察中也得到了印证。

庆大霉素诱导的肾损伤模型,从第 7 天起肾小管的特异性损伤明显,到第 12 天蛋白管型的出现,也反映出肾小球滤过功能受损,病变由肾小管损伤累及肾小球。BUN 和 Scr 从第 6 天起有显著性升高,同步于病理损伤。而 NGAL 在第 3 天即有显著升高,更早提示了肾小管特异性损伤的发生;CysC 在第 6、8 天显著性升高,说明后期肾小球滤过率下降,其生物学意义与病理特征一致。

ROC 分析是医学诊断研究应用最为广泛的统计学方法之一,也是国际公认的比较 2 种或 2 种以上诊断方法效能差异性的客观标准^[8-9]。其以敏感性为纵坐标(代表真阳性率)、以特异性为横坐标(代表假阳性率)绘制成曲线,曲线下面积越大,则表明诊断准确性越高。而曲线上最靠近坐标图左上方的点即为敏感性和特异性均较高的临界值。其本质是动态分析,比较不同诊断试验在多个诊断界值相对应的敏感性、特异性的差异。

在本研究结果中,血清单一标志物的 ROC 分析凸显出早期敏感性,但很难同时具有较高的特异性。两种模型中血清标志物的变化意义和病变特征均提示,在肾损伤进程中肾小球和肾小管间可相互影响,体现出药物性肾损伤多部位且多形式的特点。所以采用多种血清标志物组合才能更大范围、更灵敏地评价药物

对肾脏各部分的影响。标志物组合检测的价值已在一些临床和临床前研究中得到了证实^[10-13]。事实上,目前的临床检验中 BUN 和 Scr 常作为一个组合来应用,与单一指标的升高相比,两者的比值对肾脏疾病的诊断具有更为真实的意义和有效价值。本研究结果显示,血清标志物组合对于药源性肾损伤的检测具有明显的优越性。与单一标志物相比,组合检测能在一定程度上提高检验效能。其中,反映肾小球功能的 CysC 组合 BUN + Scr,对于阿霉素诱导的肾小球损伤具有较高的检验效能;反映肾小管功能的 NGAL 组合 BUN + Scr,对于庆大霉素诱导的肾小球管损伤具有较高的敏感性。研究结果说明了相关的血清标志物组合对肾小球/肾小管型肾损伤的检测意义。CysC + NGAL 组合在两种模型中均表现出较高的敏感性和特异性,提示其对于未知型或复合型肾损伤具有检测价值。

本研究采用 Logistic 回归结合 ROC 分析,可间接地分析单变量或多协变量的原始数据,与只能分析单变量原始数据的传统 ROC 模型相比更具优势,同时可消除干扰因素^[5]。血清标志物组合对模型的 Logistic 回归方程,可用于未知样本的脏器损伤预测。比如,对来自某个药物肾损伤模型的未知样本,测定其 CysC 和 NGAL 的含量值,代入方程即可得到该样本的预测概率值。若相关数据大于血清标志物组合在该模型中的评价值,则可推测肾损伤的发生。

值得注意的是,血清标志物的检测数值在不同试验中有一定的波动,这可能与动物品系、试剂盒、试验方法、样本差异等多种因素有关。为避免误差对评价结果的影响,本研究对血清标志物变化意义的分析均采用与相应时间点的对照组比较的方法。

综上所述,对阿霉素诱导的肾小球损伤和庆大霉素诱导的肾小管损伤,传统肾功能检测指标 BUN 和 Scr 具有一定的检验效能,但不能在早期预测肾损伤的发生;而 CysC 和 NGAL 出现显著性变化的时间均早于形态学改变和传统的血清标志物,在一定程度上可预测肾损伤的发生部位和发展变化。经 ROC 分析,两者分别与 BUN、Scr 组合,对肾小球和肾小管损伤均表现出较高的检验效能。其中,CysC + NGAL 组合可用于评价不同类型的肾损伤。

课题组前期已对尿液生物标志物进行联合检测,用以评价中药商陆和中药单体马兜铃酸的肾毒性^[14-15]。与尿液标志物相比,血清样本更为稳定,且可与血清 BUN 和 Scr 同步检测。药物早期肾毒性的筛选评价和临床防治研究常需设置阳性对照组,而本研究

结果可为中药肾毒性早期评价的研究提供阳性药物的实验数据。同时,多标志物的组合检测,也为药物肾毒性的评价提供了新的思路和方法。

参考文献:

- [1] Korzets Z, Pomeranz A, Golan E, et al. Pefloxacin in adriamycin induced nephrotic syndrome in the rat[J]. Nephrol Dial Transplant, 1997,12(2):286-288.
- [2] Zhang J, Goering PL, Espandiani P, et al. Differences in immunolocalization of Kim-1, RPA-1, and RPA-2 in kidneys of gentamicin-, cisplatin-, and valproic acid-treated rats: potential role of iNOS and nitrotyrosine[J]. Toxicol Pathol, 2009,37(5):629-643.
- [3] 徐婷婷,李一飞,金若敏,等. 商陆水煎液致大鼠肾损伤的初步研究[J]. 中国药理学杂志,2015,50(5):403-407.
- [4] Luo L, Sun Z, Wu W, et al. Mycophenolate mofetil and FK506 have different effects on kidney allograft fibrosis in rats that underwent chronic allograft nephropathy[J]. BMC Nephrology, 2012,13(1):53.
- [5] 刘润幸. 使用 SPSS 作多变量观察值的 ROC 曲线分析[J]. 中国公共卫生, 2003,19(9):1151-1152.
- [6] Grubb AO. Cystatin C: Properties and use as diagnostic marker[J]. Adv Clin Chem, 2000(35):63-99.
- [7] Mishra J, Ma Q, Prada A, et al. Identification of neutrophil gelatinase-associated lipocalin as a novel early urinary biomarker for ischemic renal injury[J]. J Am Soc Nephrol, 2003,14(10):2534-2543.
- [8] 高培毅,林燕,张红梅. 颅内恶性胶质瘤术后早期 MR、CT 对残存肿瘤检出的受试者操作特性分析[J]. 中华放射学杂志, 2000,34(4):240-243.
- [9] Alemayehu D, Zou KH. Applications of ROC analysis in medical research: recent developments and future direction[J]. Acad Radiol, 2012,19(12):1457-1464.
- [10] 刘宝利,杨宝友,郑桂敏,等. Logistic 回归和 ROC 曲线综合评价检测四种尿蛋白排泄对早期肾小球疾病的诊断价值[J]. 中国中西医结合肾病杂志, 2011,12(8):695-697.
- [11] 范海燕,孟凡云,章阳,等. Logistic 回归及 ROC 曲线综合评价 CA15-3、CA125、CK19、CEA、AFP 和 CA199 在乳腺癌术后监测中的应用价值[J]. 重庆医科大学学报, 2010,35(11):1693-1696.
- [12] 孙华宝,叶德强,曹立,等. Logistic 回归和 ROC 曲线评价 8 种原发性肝癌实验室诊断指标的临床价值[J]. 广东医学, 2010,31(20):2650-2653.
- [13] 乔靖怡,周璐,金若敏,等. 四氯化碳致大鼠肝损伤早期血清总胆汁酸、 α -谷胱甘肽 S 转移酶、嘌呤核苷磷酸化酶和鸟氨酸氨基甲酰转移酶的变化[J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2013,27(4):1-7.
- [14] 李一飞,徐婷婷,姚广涛,等. 尿液 NGAL、KIM-1、IL-18 在商陆所致的大鼠肾损伤中的变化特征及其联合检测的意义[J]. 中国中药杂志, 2012,37(23):3611-3617.
- [15] 李一飞,徐婷婷,金若敏,等. 尿液多标志物组合检测在马兜铃酸肾毒性评价中的应用[J]. 中国新药与临床杂志, 2015,34(7):511-516.

编辑:李艳红

收稿日期:2016-03-11