



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 200480013336.6

[43] 公开日 2006年6月21日

[11] 公开号 CN 1791797A

[22] 申请日 2004.3.26
 [21] 申请号 200480013336.6
 [30] 优先权
 [32] 2003. 3. 27 [33] US [31] 60/458,143
 [32] 2003.11. 4 [33] US [31] 60/481,596
 [86] 国际申请 PCT/US2004/009191 2004.3.26
 [87] 国际公布 WO2004/088276 英 2004.10.14
 [85] 进入国家阶段日期 2005.11.15
 [71] 申请人 儿童医院医疗中心
 地址 美国俄亥俄州
 共同申请人 哥伦比亚大学受托人
 [72] 发明人 普拉塞德·德瓦拉简
 乔纳森·M·巴拉施

[74] 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所
 代理人 巫肖南 封新琴

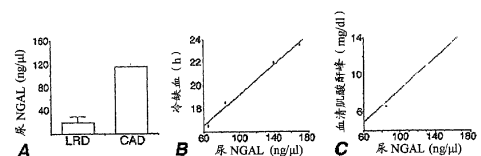
权利要求书 3 页 说明书 30 页 附图 10 页

[54] 发明名称

用于检测肾小管细胞损伤的早发的方法和试剂盒

[57] 摘要

用于检测肾小管细胞损伤的早发的方法和试剂盒，应用 NGAL 作为早期的尿生物标记物。NGAL 是小的分泌的多肽，其为蛋白酶抗性的并因而在肾小管细胞损伤之后容易地在尿中检测到。主要在近端小管细胞中检测到 NGAL 蛋白表达，其类似于一种分泌蛋白在细胞质中以点状分布。尿中的表观 NGAL 与肾缺血和肾毒血症的量和持续时间有关，并为肾小管细胞损伤和肾衰竭的诊断特征。NGAL 检测也是用于监测药物或其它治疗剂的肾毒性副作用的有用的标记物。



1. 用于检测哺乳动物中肾小管细胞损伤的方法，所述损伤包括缺血性肾损伤和肾毒性损伤，包含以下步骤：
 - 5 1) 从哺乳动物实验体得到尿样；
 - 2) 将尿样与肾小管细胞损伤生物标记物的抗体接触，所述的生物标记物包含 NGAL，以允许形成抗体和生物标记物的复合物；和
 - 3) 检测所述的抗体-生物标记物复合物。
2. 权利要求 1 的方法，其中来自所述的实验体的尿样的大多数是间断地得到的。
10
3. 权利要求 2 的方法，其中所述的尿样是连续得到的。
4. 权利要求 1 的方法，其中检测抗体-生物标记物复合物的步骤包括将所述的复合物与用于检测生物标记物的第二抗体接触。
5. 权利要求 1 的方法，其中所述的哺乳动物实验体是人类患者。
- 15 6. 监测肾小管细胞损伤的治疗的有效性的方法，包含以下步骤：
 - 1) 对正遭受肾小管细胞损伤的哺乳动物实验体提供治疗；
 - 2) 得到至少一种来自所述实验体的治疗后的尿样；和
 - 3) 在治疗后的尿样中检测肾小管细胞损伤的生物标记物的存在。
7. 权利要求 6 的方法，其中所述的生物标记物含有 NGAL。
- 20 8. 权利要求 6 的方法，进一步包括得到一种或一种以上后续的治疗后的尿样的步骤，其中提供治疗的步骤是连续的，直到在后续的治疗后的尿样中检测不到所述的生物标记物的存在。
 9. 权利要求 6 的方法，其中检测的步骤包括步骤为：
 - 25 i) 将尿样与生物标记物的捕获抗体接触以允许形成抗体和生物标记物的复合物；和
 - ii) 检测所述的抗体-生物标记物复合物。
 10. 权利要求 9 的方法，其中检测抗体-生物标记物复合物的步骤包括步骤为：
 - (1) 将尿样的任何未结合物质与捕获抗体-生物标记物复合物分离；
 - 30 (2) 将捕获抗体-生物标记物复合物与用于检测生物标记物的第二抗体接触，以允许形成生物标记物和第二抗体之间的复合物；

- (3) 将任何未结合的第二抗体与生物标记物-第二抗体复合物分离；和
(4) 检测生物标记物-第二抗体复合物中的第二抗体。

11. 权利要求 10 的方法，其中步骤(i)包括将尿样与具有附加于其上的第一抗体的介质接触的步骤。

- 5 12. 用于在实验体的尿液中检测肾小管细胞损伤，包括缺血性肾损伤和肾毒性损伤的立即或早期发病生物标记物的存在的试剂盒，包括：

1) 用于获得一定量尿样的手段；

2) 具有附加于其上的捕获抗体的介质，所述捕获抗体能够与肾小管细胞损伤的生物标记物复合，所述的生物标记物包含 NGAL；和

- 10 3) 用于检测生物标记物和捕获抗体的复合物的测定。

13. 权利要求 12 的试剂盒，其中尿样的量小于 1 ml，更通常地小于 10 微升。

14. 权利要求 12 的试剂盒，其中所述的获得手段包括含有表面的器具，所述的表面含有所述介质。

- 15 15. 权利要求 12 的试剂盒，其中所述的获得手段包括用于接受尿样的容器，其中容器的尿接触面含有所述的介质。

16. 权利要求 12 的试剂盒，其中所述的测定包含 ELISA。

17. 权利要求 12 的试剂盒，其中所述的获得手段包括器具，该器具包括含有所述介质的盒。

- 20 18. 权利要求 12 的试剂盒，其为病人身边检验试剂盒。

19. 权利要求 18 的病人身边检验试剂盒，其中尿样的量小于 1 ml，更通常地小于 10 微升。

20. 权利要求 19 的病人身边检验试剂盒，其中所述的获得手段包括含有蘸取棍的器具，该蘸取棍表面含有所述的介质。

- 25 21. 权利要求 19 的病人身边检验试剂盒，其中所述的测定包括蘸取棍比色测定。

22. 竞争性酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂盒，所述试剂盒用于测定哺乳动物实验体的肾小管细胞损伤的状态，所述损伤包括缺血性肾损伤和肾毒性损伤，所述试剂盒包含特异于 NGAL 以测定其在所述实验体的尿样中的存在的第一抗体。

30

23. 权利要求 22 的 ELISA 试剂盒，其中所述的尿样可包含大约 1 毫升

或 1 毫升以下的液量。

24. 鉴定由事件引起的肾小管细胞损伤,包括缺血性肾损伤和肾毒性损伤的程度的方法,包括步骤为:

- 1) 得到至少一个来自所述哺乳动物实验体的尿样;
- 5 2) 在所述的尿样中检测肾小管细胞损伤的生物标记物的存在; 和
- 3) 根据尿样中生物标记物的存在的发生时间,相对于所述事件的时间确定肾小管细胞损伤的程度。

25. 权利要求 24 的方法,其中所述的生物标记物包含 NGAL。

26. 权利要求 24 的方法,其中所述的事件为手术操作。

- 10 27. 权利要求 24 的方法,其中所述的事件为对肾脏供血不全、心功能受损、手术操作、在重症监护病房中的患者、及将药物、放射性对照染料或其它药剂物质给予所述的实验体。

28. 检测哺乳动物中肾小管细胞损伤,包括缺血性肾损伤和肾毒性损伤的方法,包括步骤为:

- 15 1) 得到含有多至 1 毫升的来自哺乳动物实验体的第一次尿的尿样;
- 2) 将所述的尿样与肾小管细胞损伤的生物标记物的抗体接触,以允许形成抗体和生物标记物的复合物; 和
- 3) 检测所述的抗体-生物标记物复合物。

29. 权利要求 28 的方法,其中所述的生物标记物包含 NGAL。

用于检测肾小管细胞损伤的早发的方法和试剂盒

5 背景技术

继发于肾小管细胞损伤(包括缺血性损伤或肾毒性损伤)的急性肾功能衰竭(Acute renal failure) (ARF), 尽管在支持疗法中取得重大的进展, 仍是临床医学和肾病学(nephrology)中的普遍而具有潜在破坏性的难题, 其具有持续的高死亡率和高发病率。几十年来的前期研究已经说明持续的血管收缩、肾小管阻塞、细胞结构和代谢改变和炎症反应在 ARF 发病机理中的作用。虽然这些研究已经在动物模型中显出可能的治疗手段, 但是到人体中平移研究的努力却产生令人失望的结果。其原因可包括肾对于缺血性损伤和肾毒素的多方面的反应, 和 ARF 早期生物标记物的缺乏, 造成迟误开始治疗。

15 当患者的血清肌酸酐(creatinine)值或者: (1) 当基线血清肌酸酐水平小于 2.0 mg/dL 时, 增加至少 0.5 mg/dL; (2) 当基线血清肌酸酐水平大于或等于 2.0 mg/dL 时, 增加至少 1.5 mg/dL; 或(3) 不管基线血清肌酸酐水平为何, 作为暴露于放射成像剂(radiographic agent)的结果增加至少 0.5 mg/dL 时, 即认为个体患有急性肾功能衰竭。

20 人们相信, 在所述的疾病过程中治疗的早期介入会降低与 ARF 有关的死亡率并缩短各种类型的肾小管细胞损伤的治疗时间, 所述的肾小管细胞损伤包括但不限于缺血性和肾毒性肾损伤。肾小管细胞损伤的可靠的早期生物标记物的鉴定对于促进早期治疗干预是有用的, 并通过提供肾毒性的指标有助于指导药物开发。

25 检测肾病的传统的实验室方法包括测定血清肌酸酐、血液尿素氮、肌酸酐清除率、尿电解质、尿沉淀物的显微镜检查及放射学研究。这些指标既没有敏感性和特异性, 又不能用于该疾病的早期检测。实际上, 虽然血清肌酸酐的升高被普遍地认为是检测 ARF 的“黄金标准(gold standard)”, 但是很显然, 在血清肌酸酐变化的时间内, 肾功能已经丧失 50%之多。

30 较早已经描述了少数缺血性肾损伤的尿生物标记物, 包括肾损伤分子-1 (KIM-1)和半胱氨酸富含蛋白 61 (Cyr61)。KIM-1 是一个涉及肾再生的假

定的粘附分子。在缺血-再灌注损伤的大鼠模型中，发现 KIM-1 在初始损伤后的 24-48 小时上调，使其成为可靠但有些晚期的标记物。近期研究已经显示，KIM-1 可在肾活组织检查中和患有缺血性急性肾小管坏死的患者的尿中检测到。然而，这种检测在已形成确定的缺血性肾损伤的患者中、在该疾病的晚期也已证明。测定尿 KIM-1 用于检测早期 ARF 或临床症状不明显的肾损伤的效用还远远没有得到验证。

发现所述的蛋白 Cyr61 为分泌的富含半胱氨酸的蛋白，其可以在缺血性肾损伤后 3-6 小时的动物模型的尿中检测到。然而，此检测需要生物亲和纯化和应用肝素-琼脂糖珠的浓缩步骤，然后是 Western 印迹步骤。即使在生物亲和纯化之后，几种非特异性的交叉反应肽是明显的。因此，就特异性以及所述步骤的繁冗特性而言，尿中 Cyr61 的检测是有问题的。

因此，鉴定改进的用于早期缺血性和肾毒性肾损伤的生物标记物仍然有紧迫的需要。

15 发明内容

本发明涉及在哺乳动物中检测肾小管细胞损伤的方法，包括以下步骤：

1) 从哺乳动物实验体得到尿样；2) 将尿样与肾小管细胞损伤生物标记物的抗体接触，所述的肾小管细胞损伤生物标记物包含 NGAL，以允许形成抗体和肾小管细胞损伤生物标记物的复合物；和 3) 检测所述的抗体-生物标记物复合物。

本发明涉及监测治疗肾小管细胞损伤的有效性的方法，包括以下步骤：

1) 提供对于正遭受肾小管细胞损伤的哺乳动物实验体的治疗；2) 得到至少一种来自所述实验体的治疗后的尿样；和 3) 在治疗后的尿样中检测肾小管细胞损伤的生物标记物的存在。

25 本发明进一步涉及用于在实验体的尿液中检测肾小管细胞损伤的立即或早期发病生物标记物的存在的试剂盒，包括：1) 用于获得一定量尿样的方法；2) 一种介质，其具有附加于其上的能够与肾小管细胞损伤的生物标记物复合的捕获抗体 (capture antibody)，所述的生物标记物为 NGAL；和 3) 检测肾小管损伤生物标记物和捕获抗体的复合物的测定法。

30 本发明也涉及一种竞争性酶联合的免疫吸附剂测定(ELISA)试剂盒，其用于测定哺乳动物实验体的肾小管细胞损伤的状态，包含对于肾小管细胞

损伤生物标记物有特异性的第一抗体，以测定其在所述实验体的尿样中的存在。

本发明进一步涉及鉴定由一个事件引起的肾小管细胞损伤的程度的方法，包括步骤为：1) 得到至少一种来自所述哺乳动物实验体的尿样；2) 在所述的尿样中检测肾小管细胞损伤的生物标记物的存在。3) 相对于所述事件的时间，根据尿样中 IRI 生物标记物的存在的发生时间，确定肾小管细胞损伤的程度。

本发明进一步涉及检测哺乳动物中肾小管细胞损伤的方法，包括以下步骤：1) 得到含有多至 1 毫升的来自怀疑有肾小管细胞损伤的哺乳动物实验体的第一次尿的尿样；2) 将所述的尿样与肾小管细胞损伤的生物标记物的抗体接触，以允许形成抗体和生物标记物的复合物；和 3) 检测所述的抗体-生物标记物复合物。

优选的肾小管细胞损伤生物标记物为 NGAL。

15 附图说明

图 1 显示缺血之后小鼠肾 NGAL mRNA 的诱导。上图显示应用小鼠肌动蛋白和 NGAL 的引物进行代表性的 RT-PCR，其应用自对照(C)小鼠的肾或在如图所示的不同再灌注时间(小时)之后提取的 RNA。通道 M 包含分子量标准标记物。下图显示来自对照物(CON)在不同时间点 NGAL mRNA 表达的增加倍数。由微阵列(实线)对比 RT-PCR(虚线)得到的值是来自至少 3 次实验的平均 \pm 标准偏差(SD)。

图 2A 显示单侧缺血之后小鼠肾 NGAL 蛋白的诱导。上图显示应用完整肾样品进行代表性的 Western 印迹，所述的肾样品从对照(Con)小鼠中得到或在如图所示的再灌注时间(小时)之后得到，该 Western 印迹以 NGAL 的多克隆抗体或微管蛋白的单克隆抗体为探针进行探测(以显示相同的蛋白上样量)。分子量标记物在最左边。下图显示来自对照物(CON)在不同时间点 NGAL 蛋白表达的增加的倍数。由密度测定(densitometry)得到的值是来自至少 3 次实验的平均值 \pm SD。

图 2B 显示双侧缺血之后小鼠肾 NGAL 蛋白的诱导。上图显示应用完整肾样品进行代表性的 Western 印迹，所述的肾样品从对照(Con)小鼠中得到或在如图所示的再灌注时间(小时)之后得到，该 Western 印迹以 NGAL 的

多克隆抗体或微管蛋白的单克隆抗体作为探针进行探测(以显示相同的蛋白上样量)。分子量标记物在最左边。下图显示来自对照物(CON)在不同时间点 NGAL 蛋白表达的增加的倍数。由密度测定得到的值是来自至少 3 次实验的评价 \pm SD。

5 图 3 显示缺血之后小鼠肾 NGAL 蛋白的诱导。在小鼠肾的冻结切片上得到代表性的免疫组织化学的结果,所述的冻结切片从对照小鼠中得到或在如图所示的不同回流(reflow)时间(小时)之后得到,该操作以 NGAL 的多克隆抗体为探针进行探测。“G”表示肾血管球。最右边的图是 100 \times 放大图,而其它图为 20 \times 放大图。

10 图 4A 显示早期测定患有单侧缺血性 ARF 的小鼠的尿中的 NGAL 蛋白。在单侧肾动脉钳夹(clamping)后,在如图所示的再灌注时间(小时)得到的未处理尿样(每个通道 1-2 μ l,对肌酸酐含量归一化)的代表性的 Western 印迹。分子量标记物在右边显示。该 Western 印迹以 NGAL(上图)或 β 2-微球蛋白(Beta2-M)(中图)作为探针进行探测。在如图所示的不同再灌注时间从总共五只动物中检测了五只动物尿的 N-乙酰- β -D-氨基葡萄糖苷酶(NAG)。值为平均 \pm SD。在每个时间段与对照物比较 $*P < 0.05$,方差分析(ANOVA)。

15 图 4B 显示早期测定患有双侧缺血性 ARF 的小鼠的尿中的 NGAL 蛋白。在双侧肾动脉钳夹后,在如图所示的再灌注时间(小时)得到的未处理尿样(每个通道 1-2 μ l,对肌酸酐含量归一化)的代表性的 Western 印迹。分子量标
20 记物在右边显示。该 Western 印迹以 NGAL(上图)或 β 2-微球蛋白(Beta2-M)(中图)作为探针进行探测。在如图所示的不同再灌注时间从总共八只动物中检测了五只动物尿的 N-乙酰- β -D-氨基葡萄糖苷酶。值为平均值 \pm SD。在每个时间段与对照物比较 $*P < 0.05$,方差分析(ANOVA)。

25 图 5 显示在患有临床症状不明显的肾缺血的小鼠的尿中测定 NGAL 蛋白。在双侧肾动脉钳夹 5、10 或 20 分钟之后,对未处理的尿样(每个通道 1-2 μ l,对肌酸酐含量归一化)进行代表性的 Western 印迹,所述未处理的尿样是在如图所示的再灌注时间(小时)得到的。分子量标记物显示在左边。这些动物在 24 小时回流时显示正常的血清肌酸酐。

30 图 6 显示在患有缺血性 ARF 的大鼠的尿中测定 NGAL 蛋白。在大鼠双侧肾动脉钳夹 30 分钟之后,对未处理的尿样(每个通道 1-2 μ l,对肌酸酐含量归一化)进行代表性的 Western 印迹,所述未处理的尿样是在如图所示的

再灌注时间(小时)得到的。分子量标记物显示在左边。这些动物在 24 小时回流时显示血清肌酸酐的显著增加。

图 7 显示缺血之后 NGAL mRNA 的体外诱导。上图显示用人 NGAL 的引物进行代表性的 RT-PCR, 所述 RT-PCR 应用在如图所示的部分 ATP 消耗的不同时间(小时)之后, 提取自肾近端小管上皮细胞(RPTEC)的 RNA。通道 M 含有 100 bp DNA 序列梯。中图显示在距离对照(0)的不同时间点, NGAL mRNA 表达增加的倍数, 以甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)的表达归一化。显示的值是来自每个点的至少三次实验的平均值 \pm SD。下图显示在如图所示的部分 ATP 消耗的不同时间之后, 用 RPTEC 样品进行(三个独立实验的)代表性的 Western 印迹, 所述 RPTEC 样品是从细胞小团 (Pel)或培养基(Sup)的等量细胞中获得的, 该 Western 印迹以 NGAL 的多克隆抗体作为探针进行探测。分子量标记物在左边显示。

图 8A 显示在所述的尿中 NGAL 蛋白的早期测定在顺氯氨铂诱导的损伤的小鼠中进行检测。对未处理的尿样(每个通道 1-2 μ l, 对肌酸酐含量归一化)进行代表性的 Western 印迹, 所述的未处理的尿样是在给予顺氯氨铂之后在如图所示的天数获得的, 该 Western 印迹以 β -2-微球蛋白的抗体(上图)和 NGAL(中图)作为探针进行探测。分子量标记物在左边显示。

图 8B 显示在图 8A 中给予顺氯氨铂(n=4)之后的不同天数(n=4)的尿 NAG 测定。值表示平均值 \pm SD。与第 0 天比较*P<0.05。

图 9 显示给予顺氯氨铂导致小管细胞坏死和细胞凋亡。在经过顺氯氨铂处理的肾中(中上图), 苏木紫-曙红染色显示肾小管扩张、内腔碎片和展平的上皮。在高倍下, 以星号标记的肾小管显示浓缩的强烈染色的细胞核(箭头), 显示细胞凋亡(右上图)。TUNEL 染色在经过顺氯氨铂处理的肾中显示 TUNEL-阳性的细胞核(中下图)。在高倍下, 以星号指示的肾小管显示浓缩的破碎的细胞核(箭头), 其为细胞凋亡的特征(右下图)。标记为高倍的图为 100 \times 放大图, 而其它为 20 \times 。对照小鼠的结果显示在左上图和左下图中。

图 10 显示给予顺氯氨铂导致肾 NGAL 的快速诱导的结果。将肾裂解物进行代表性的 Western 印迹, 所述的肾裂解物来自经过腹膜内顺氯氨铂(20 μ g/kg)处理的小鼠, 并且在所示的不同时间点(小时)得到, 该 Western 印迹以 NGAL 的多克隆抗体或微管蛋白的单克隆抗体作为探针进行探测。分子量标记物在左边显示。

图 11 显示顺氯氨铂给药导致肾小管上皮细胞内 NGAL 的快速诱导。在冻结肾切片上进行代表性的免疫组织化学, 所述的肾冻结切片来自经过腹膜内的顺氯氨铂(20 μ g/kg)处理的小鼠, 并且在所示的不同时间点(小时)得到, 该免疫组织化学以 NGAL 为探针检测。G, 肾小球。标记为 HP 的图为 5 100 \times 放大图, 而其它图为 20 \times 放大图。

图 12 显示 20 μ g/kg 的顺氯氨铂给药导致尿中的 NGAL 的快速出现。未处理的尿样(3-5 μ l/通道, 对肌酸酐含量归一化)进行代表性的 Western 印迹(上图), 所述的未处理的尿样是在如图所示的顺氯氨铂注射之后, 在不同时间点之前或在不同时间点得到的。分析相同尿样的 NAG 分泌(中图), 并对来自相同动物的血清进行肌酸酐测定(下图)。与对照物比较* $P < 0.05$ 。 10

图 13 显示 5 μ g/kg 的顺氯氨铂给药导致尿中的 NGAL 的快速出现。未处理的尿样(3-5 μ l/通道, 对肌酸酐含量归一化)进行代表性的 Western 印迹(上图), 所述的未处理的尿样是在如图所示的顺氯氨铂注射之后, 在不同时间点之前或在不同时间点得到的。分析相同尿样的 NAG 分泌(中图), 并对来自相同动物的血清进行肌酸酐测定(下图)。与对照物比较* $P < 0.05$ 。 15

图 14 显示顺氯氨铂注射之后尿 NGAL 的定量。将已知量的纯化的重组 NGAL 进行考马斯蓝(CB)染色(左上图)和增强化学发光(Enhanced Chemiluminescence)(ECL)分析(右上图)。20 μ g/kg 或 5 μ g/kg 的顺氯氨铂给药之后, 在不同时间点 NGAL 分泌的定量, 通过 Western 印迹的密度分析和与在同样条件下进行的纯化 NGAL 的确定标准的 Western 印迹的比较进行测定。 20

图 15 在图 A 中显示采用尸体的肾移植体(transplant)(CAD, $n = 4$)的患者对比采用活体亲属供者(living related donor)移植体(LRD, $n = 6$)患者的尿 NGAL 的测定($p < 0.005$)。图 B 显示 CAD 中冷缺血时间与尿 NGAL 之间的相关性($p < 0.001$, $r = 0.98$, Spearman 分析)。图 C 显示 CAD 中血清肌酸酐峰和尿 NGAL 之间的相关性($p < 0.001$, $r = 0.96$, Spearman 分析)。 25

图 16 在图 A 中显示开放心脏手术后患者的尿 NGAL 的系列测定结果, 对旁路(bypass)后的时间(小时)作图($n = 15$)。图 B 显示发生 ARF 的患者($n = 5$)旁路的时间与 2 小时尿 NGAL 之间的相关性($p < 0.01$, $r = 0.76$, Spearman 分析)。图 C 显示发生 ARF 的患者血清肌酸酐变化与 2 小时尿 NGAL 之间的相关性($p < 0.01$, $r = 0.66$, Spearman 分析)。 30

发明详述

贯穿此申请，在括号内引用了各种出版物和未出版的原稿。所述出版物整体的公开在此并入本申请作为参考以更充分地描述本申请属于的技术的状况。这些参考文献的完整的文献资料出处可在本申请的末尾权利要求之前找到。

本发明提供了一种方法和试剂盒，所述方法和试剂盒用于在早期发生肾小管细胞损伤的实验体的尿中检测肾小管细胞损伤的生物标记物的存在。该损伤发生的早期测定能够减少治疗损伤的时间，并可减少发生临床的急性肾衰竭(ARF)的危险。所述的肾小管细胞损伤可包括，但不限于缺血性肾损伤(IRI)或肾毒性肾损伤(NRI)。

一种简单的病人身边检测(point-of-care)试剂盒，其利用与广泛采用的尿妊娠测试试剂盒相似的原理，用于在病床边快速检测尿 NGAL，所述的试剂盒使临床医生能快速诊断 ARF、快速进行研究室验证及用有效的方法治疗和预防。该试剂盒的应用可代表给予所有处于 ARF 发病危险的患者的护理标准，包括用于心脏手术、肾移植、中风、外伤、败血症、脱水和肾毒素(抗生素、抗炎剂、放射性对比剂(radio-contrast agent)和化疗剂)。目前在临床实践中，当 ARF 在这些发病诱因条件的背景下发生时，诊断是非常滞后的，而且相关的死亡率和发病率之高令人难以接受。具有讽刺甚至悲剧意味的是，虽然有效的预防和治疗方法是普遍可以得到的，但由于缺乏 ARF 的早期生物标记物，几乎从未能以及时的方式给药。可以预期，NGAL 的多重系列测定不仅对于初始肾损伤的诊断和定量，而且对于监视早期治疗的反应和预测长期结果来说，将是不可或缺的。

肾小管细胞损伤的生物标记物(也被称为 RTCI 生物标记物)可以是即时的 RTCI 生物标记物，如 NGAL，其可出现在发生肾小管细胞损伤 2 小时之内的尿中。即时的 RTCI 生物标记物能够，如在 NGAL 的情况下，立即出现在发生肾小管细胞损伤的实验体的第一次尿出物中。RTCI 生物标记物也可以是早-发 RTCI 生物标记物，其可出现于发生肾小管细胞损伤的最初 24 小时之内。同样地，NGAL 也是早-发 RTCI 生物标记物的实例。

有效的 RTCI 生物标记物通常为分泌的蛋白，它可以通过肾分泌到尿中。有效的 RTCI 生物标记物通常也为蛋白酶-抗性的蛋白，如 NGAL。然

而, RTCI 生物标记物也可为蛋白酶-敏感的蛋白, 只要该蛋白的稳定片段可以在尿中, 例如应用如下文所述的 NGAL 的抗体检测到。

所述 RTCI 生物标记物可以是缺血性肾损伤生物标记物(IRI 生物标记物)、肾毒性肾损伤生物标记物(NRI 生物标记物)或它们的混合物。NGAL 是 IRI 生物标记物和 NRI 生物标记物两者的实例。

本发明的方法可为各种事件检测肾小管细胞损伤的发生, 并监测其治疗, 所述的各种事件包括各种各样的肾供血不全、心功能受损、手术操作、在重症监护病房中的患者、及将药物、放射性对照染料或其它药剂物质给予所述的实验体。肾小管细胞的损伤可以是缺血性肾损伤、肾毒性肾损伤或影响肾小管细胞的其它损伤。所述事件可以包括大量和多种肾毒素的给药或者摄入, 所述肾毒素包括, 但不限于癌症化疗(顺氯氨铂、环磷酰胺(cyclophosphamide)、异磷酰胺(isosfamide)、甲氨蝶呤(isosfamide))、抗生素(庆大霉素(gentamicin)、万古霉素(vancomycin)、妥布霉素(tobramycin))、抗真菌剂(两性霉素(amphotericin))、抗炎剂(NSAIDs)、免疫抑制剂(环孢霉素(cyclosporine)、他克莫司(tacrolimus))和放射对比剂。所述方法可用于评价新开发的化合物和已知化合物的肾毒性。

本发明也提供了一种方法和试剂盒, 所述方法和试剂盒用于根据损伤程度和实验体排出的尿中存在的 NGAL 的量之间的比例关系, 来评价肾损伤的程度, 所述的损伤程度可为从肾小管细胞损伤的最开始起病到临床 ARF。本发明为临床医生提供了一种方法, 以在初期评定时估计肾损伤程度, 并根据在尿中检测到的 NGAL 的量监测损伤状况的变化(恶化、症状改善或保持不变)。

通常, 临床医生会建立在选择的时间间隔从患者收集并分析一定量新鲜尿样的规程。通常地, 所述尿样是在规定的时间内间歇地得到的。间歇取样的时间段可由实验体的条件支配, 可为从每 24 小时取样到连续取样的范围, 更通常地从每 4 小时至每 30 分钟取样。

应用此处描述的方法和技术, 不仅能够分析和估测存在于尿中的 RTCI 生物标记物的定性水平, 而且能分析和测定存在于尿中的 RTCI 生物标记物的定量水平。临床医生可根据患者的状态, 选择所述的定性方法、定量方法或两者都选。通常, 收集的尿量小于 1 毫升, 更通常小于 10 μ l。通常的样品可为大约 1 μ l 至大约 1 ml 的范围。通常, 较大量的尿样(大约 1 ml)用于

定量测定。通常这些少量的尿可容易而迅速地从易于发生或已经发生 ARF 的临床实验体中得到。

一旦检测到肾小管细胞损伤或急性肾衰竭的指标，对该疾病或条件的干预和治疗就开始了，临床医生可以应用本发明的方法和试剂盒监测所述治疗或干预的过程。通常，当肾损伤的治疗开始并持续时，可取得一个或一个以上后续的治疗后的尿样，并分析 RTCI 生物标记物的存在。持续所述的治疗直到在后续的治疗后的尿样中检测不到 RTCI 生物标记物的存在。随着治疗和干预改善病症，RTCI 生物标记物的表达及其在尿中的存在也会相应地减少。改善的程度可以表示为样品中测定的 RTCI 生物标记物，如 NGAL 水平的相应的降低。当肾损伤接近完全治愈时，可采用本方法检测 RTCI 生物标记物的完全缺失，这标志着治疗过程的完成。

与 RTCI 生物标记物结合的单克隆抗体和多克隆抗体在发明的方法和试剂盒中是有用的。所述的抗体可以通过本技术领域已知的方法制备。例如，在“Characterization of two ELISAs for NGAL, a newly described lipocalin in human neutrophils”, Lars Kjeldsen et al., (1996) Journal of Immunological Methods, Vol. 198, 155-16 中，描述了优选的 RTCI 生物标记物 NGAL 的单克隆抗体，上述文献此处并入以作参考。NGAL 的单克隆抗体的实例，如 HYB-211-01、HYB-211-02 和 NYB-211-05 可以从 Antibody Shop, Copenhagen, Denmark 获得。通常，HYB-211-01 和 HYB-211-02 可与 NGAL 的还原的和非还原的形式一起使用。NGAL 的多克隆抗体的一个实例在“An Iron Delivery Pathway Mediated by a Lipocalin”, Jun Yang et al., Molecular Cell, (2002), Vol. 10, 1045-1056 中描述，在此并入作为参考。为了制备这种多克隆抗体，用重组经过凝胶过滤的 NGAL 蛋白免疫兔子。血清与 GST-琼脂糖 4B 珠子一起保温以去除污染物，得到血清中的多克隆抗体，如申请人在 Jun Yang et al., Molecular Cell (2002) 中所描述的。

通常，检测捕获抗体和 RTCI 生物标记物的复合物的步骤包括将该复合物与第二抗体接触以检测生物标记物。

检测 RTCI 生物标记物与初级抗体的复合物的方法包括以下步骤：将尿样中任何未结合的物质与捕获抗体-生物标记物复合物分离；将捕获抗体-生物标记物复合物与检测 RTCI 生物标记物的第二抗体接触，以允许形成 RTCI 生物标记物和第二抗体之间的复合物；将任何未结合的第二抗体与

RTCI 生物标记物-第二抗体复合物分离; 和检测 RTCI 生物标记物-第二抗体复合物中的第二抗体。

用于所述方法中的试剂盒通常包括一种介质, 所述介质具有附加于其上的捕获抗体, 由此将尿样与所述介质接触以将捕获抗体暴露给样品含有的 NGAL。所述试剂盒包括一种获取方法, 该方法可包括一种器具, 如匙形物(spatula)或普通的小棍(stick), 该器具具有包含所述介质的表面。所述获取方法还可以包括接受尿样的容器, 其中所述容器具有包含所述介质的接触尿的表面。在另一个具体的实施方案中, 检测 RTCI 生物标记物和所述抗体的复合物的试验可以包含 ELISA, 并可用于尿样中 NGAL 的定量。在可替换的实施方案中, 所述获取方法可以包括一种器具, 所述器具包括含有所述介质的盒(cassette)。

RTCI 生物标记物的早期检测可以在短期内提供尿样中存在所述蛋白的指示。一般地, 本发明的方法和试剂盒可以在肾小管细胞损伤之后的 4 小时内, 更具代表性为 2 小时内, 最具代表性 1 小时内检测尿样中的 RTCI 生物标记物。优选地, 可以在肾小管细胞损伤之后的 30 分钟内检测到所述 RTCI 生物标记物。

本发明用于检测 RTCI 生物标记物的方法和试剂盒可以通过修改本领域中已知的方法和试剂盒制备, 以用于生物学样品中的其它蛋白和配基的快速检测。可以修改为本发明的方法和试剂盒的实例在 1997 年 8 月 12 日授权的 May et al. 的美国专利 5,656,503、在 2002 年 12 月 31 日授予 O'Conner et al. 的美国专利 6,500,627、在 1989 年 9 月 26 日授予 Smith-Lewis 的美国专利 4,870,007、在 1993 年 12 月 28 日授予 Ahlem et al. 的美国专利 5,273,743 和在 1986 年 12 月 30 日授予 Valkers et al. 的美国专利 4,632,901 中描述, 所有上述参考文献在此并入作为参考。

检测 RTCI 生物标记物的快速一步方法可以减少检测肾小管细胞损伤的时间。通常的方法可以包括如下步骤: 获得怀疑含有 RTCI 生物标记物的尿样; 将该样品的一部分与和 RTCI 生物标记物特异性结合的检测抗体混合, 以启动检测抗体和样品中的 RTCI 生物标记物的结合; 将样品和检测抗体的混合物与和 RTCI 生物标记物特异性结合的固定化的捕获抗体接触, 其中所述捕获抗体不与检测抗体交叉反应, 以将检测抗体与 RTCI 生物标记物结合, 而将 RTCI 生物标记物与捕获抗体结合, 形成一种可检测的复合物;

从所述复合物中去除未结合的检测抗体和任何未结合的样品；和测定该复合物的检测抗体。所述可检测的抗体用可检测的标记物进行标记，所述可检测的标记物如放射性标记、酶、生物染料、磁珠或者生物素，如本技术领域中所熟知的。

- 5 为了鉴定可以伴随及标记肾小管细胞损伤，如缺血性和肾毒性肾损伤的最早发作的潜在的基因及其蛋白，可以应用 cDNA 微阵列检测大量潜在的基因靶物中哪些是显著上调的。应用这个筛选方法，与中性白细胞明胶酶(neutrophil gelatinase)相关的脂笼蛋白(lipocalin) (NGAL)被鉴定为一个基因，其在小鼠模型中的表达在缺血性肾损伤之后的最初数小时内上调 10 倍
- 10 以上。

- NGAL 属于超过 20 个结构上相关的分泌的蛋白的脂笼蛋白超家族，所述分泌的蛋白被认为在 β -筒形肾盏(β -barreled calyx)中转运各种配基。人 NGAL 最初被鉴定为一种与来自人中性白细胞的明胶酶共价结合的 25 kDa 蛋白，其中它代表中性白细胞第二颗粒蛋白质(secondary granule proteins)中
- 15 的一种。分子克隆研究揭示，人 NGAL 与小鼠 24p3 基因相似，所述小鼠 24p3 基因起初在被诱导增殖的小鼠肾的原代培养物中得到鉴定。NGAL 在其它人组织中，包括肾、气管、肺、胃和结肠中以非常低的水平表达。NGAL 表达在受刺激的上皮中被显著地诱导。例如，它在结肠上皮细胞的炎症或瘤形成区域中上调，但是在未进行干预的区域或在转移性病灶内缺失。
- 20 NGAL 浓度在患有急性细菌感染的患者的血清内，在患有哮喘或慢性梗阻性肺病(chronic obstructive pulmonary disease)的实验体的痰中、及来自肺气肿的支气管液(bronchial fluid)中上升。在所有这些病例中，假定 NGAL 诱导是炎症细胞和上皮层(epithelial lining)之间的相互作用的结果，而在中性白细胞和上皮组织中 NGAL 表达的上调是显而易见的。

- 25 人们认为，检测到的 NGAL 诱导代表肾近端小管细胞对于肾小管细胞损伤，包括缺血性和肾毒性损伤的新的内在的反应，而且并不仅仅源自激活的中性白细胞。首先，所述的反应是快速的，NGAL 与肾动脉阻塞之后第一次尿出物一起出现在损伤的 2 小时之内的尿中，而肾中性白细胞的累积在此缺血性 ARF 的模型中通常在损伤后的 4 小时最显著。第二，NGAL
- 30 诱导和中性白细胞累积的时间图型是离散(divergent)的。NGAL mRNA 和蛋白表达在回流的 12 小时是最显著的，然而中性白细胞累积在 24 小时得到

峰值，而此时 NGAL 表达已经显著地降低。第三，在检测的肾样品中通过免疫荧光没有检测到表达 NGAL 的中性白细胞(图 3)。第四，证明体外缺血后 NGAL mRNA 和蛋白诱导在培养的人近端小管细胞中发生，在完全不存在中性白细胞的系统中，NGAL 在 ATP 消耗的 1 小时以内分泌到培养基中。

5 然而，可存在渗透的中性白细胞对于观察到的 NGAL 上调中的作用。肾小管细胞中 NGAL 的上调，可以通过局部释放细胞因子进行诱导，所述细胞因子来自缺血性损伤后早期在微循环内捕获的中性白细胞。

缺乏受刺激的上皮细胞诱导 NGAL 的适当的解释，而且仍然不清楚 NGAL 对于损伤是否是保护性的或前后相接(proximate)的，或者甚至是一种

10 无害的旁观者。近期的证据显示，至少在细胞类型的一种亚类中，NGAL 可代表一种原-细胞凋亡(pro-apoptotic)分子。在小鼠原-B 淋巴细胞的细胞系中，细胞因子的撤回(withdrawal)导致显著的 NGAL 诱导以及细胞凋亡的发生。纯化的 NGAL 产生与缺失细胞因子同样的原-细胞凋亡反应，包括 Bax 的激活，这显示出，NGAL 是与程序性细胞死亡(programmed cell death)前后

15 相接的。NGAL 也已经与生殖组织中的细胞凋亡相连。复旧的乳腺和子宫的上皮细胞表达高水平的 NGAL，时间上与最大细胞凋亡(maximal apoptosis)期一致。很可能 NGAL 通过诱导细胞凋亡调控细胞种群的一个亚类。受刺激的上皮细胞可以上调 NGAL 以诱导渗透的中性白细胞的凋亡，由此允许定居细胞(resident cell)幸免于炎症反应的破坏。可选自地，上皮细胞可应用

20 此机理调控它们自己的死亡(demise)。然而，有趣地表明，肾缺血-再灌注损伤之后的 NGAL 诱导主要发生在近端小管细胞中，而同样情况下的细胞凋亡则主要为远端小管细胞现象。

其它的近期研究已经揭示，NGAL 增强了上皮的表型。NGAL 通过穿透大鼠输尿管芽(ureteric bud)表达，并且通过激发间质细胞向肾上皮细胞的

25 转化来引发肾发生(nephrogenesis)。已经显示另一种脂笼蛋白，生殖糖蛋白(glycodelin)，当其在人乳癌细胞中表达时，诱导上皮细胞的表型。这些发现尤其适合于成熟的肾，其中对于缺血性损伤已充分证明的反应之一是沿近端小管排列的去分化的(dedifferentiated)上皮细胞的显著出现。缺血性损伤后，肾再生和修复的一个重要方面包括上皮细胞表型的重新取得

30 (reacquisition)，此过程概括了正常发育的几个方面。这说明，NGAL 可以由损坏的肾小管表达以诱导再上皮细胞化(re-epithelialization)。对此观点的支

持源自近期将 NGAL 鉴定为一种铁转运蛋白，其在肾发生的过程中与转铁蛋白(transferrin)互补。已知铁向细胞的传递对于细胞生长和发育是极其重要的，而且这可能对于缺血后的肾再生，正如它在个体发育过程中那样，是非常关键的。由于 NGAL 看来结合并转运铁，NGAL 也很可能作为从损坏的
5 的近端小管上皮细胞流出的铁的汇点(sink)。因为已观察到 NGAL 可被近端小管胞吞(endocytose)，该蛋白可能将铁循环进入活细胞。这可刺激生长和发育，以及从组织损伤的位点去除反应分子-铁，由此限制铁-介导的细胞毒性。

NGAL 是顺氯氨铂诱导的肾毒性肾损伤的新型的尿生物标记物，它比
10 以前描述的生物标记物更加敏感。一个实例是肾损伤分子-1 或 KIM-1，一个推定的涉及肾再生的粘附分子。在顺氯氨铂肾毒性的大鼠模型中，KIM-1 在初始损伤后的 24-48 小时是可以定量检测的，使其成为肾小管细胞损伤的一种有些晚期的标记物。与此相反，在顺氯氨铂以已知导致肾衰竭的剂量给药后 3 小时内，方便而定量地检测到 NGAL。此外，尿 NGAL 检测先于
15 尿中其它标记物如 NAG 的出现。NGAL 在尿中的出现也先于血清肌酸酐的增加，所述血清肌酸酐的增加已广泛地用于诊断肾毒性肾衰竭。

甚至在轻微的“临床症状不明显的”顺氯氨铂剂量之后，尿 NGAL 是明显的，尽管血清肌酸酐仍为正常水平。因此，本发明对于经受顺氯氨铂治疗的患者的临床管理具有重要的含义。顺氯氨铂的有效性是依赖于剂量的，
20 但肾毒性的发生经常阻碍应用更高剂量以使其抗肿瘤的潜力最大化。顺氯氨铂治疗后的肾毒性是常见的，并且可在单次剂量后出现急性肾衰竭。虽然几种治疗的方法已经证明在动物体内顺氯氨铂诱导的肾毒性的治疗中是有效的，但是成功的人体实验很大程度上仍然是轶事奇闻。其中一个原因可能是缺乏肾毒性急性肾衰竭的早期标记物，而因此延迟治疗的开始。在
25 目前的临床实践中，急性肾损伤通常是通过测定血清肌酸酐进行诊断的。然而，众所周知，肌酸酐在肾功能急性变化的过程中，是一种不可靠而且延迟的指标。首先，血清肌酸酐浓度不会变化，直到大约 50%的肾功能已经丧失。第二，血清肌酸酐不能准确地描述肾功能，直到可能需要几天的时间以达到一种稳态。因此，应用血清肌酸酐测定在肾损伤的早期过程中
30 削弱检测和定量肾损伤的能力。然而，动物研究表明，虽然肾毒性急性肾衰竭可以预防和/或治疗，但是只有狭窄的“机会窗口”实现它，而且治疗必

须在初始损伤后非常早就开始。肾损伤的早期生物标记物的缺乏削弱了临床医生以及及时的方式开始可能的有效治疗的能力。在实验体系中，应用 NGAL 对于检测已经存在或形成的治疗干预或预防干预，以及对于其它药剂的潜在肾毒性的早期评价也有价值。NGAL 检测对于顺氯氨铂诱导的肾损伤是新型的、非侵入性的、早期尿生物标记物。早期检测能够使临床医生给予及时的治疗干预，并建立防止发展成明显的肾毒性肾衰竭的方法。

已经发现，在小鼠和大鼠中，用少至 1 μ l 的肾缺血后最初未处理的尿出物，容易而快速地将 NGAL 检测为 Western 印迹中相对洁净的免疫反应肽。此外，甚至在非常轻微的“临床症状不明显的”肾缺血后，尿 NGAL 是明显的，尽管血清肌酸酐仍为正常水平。尿 NGAL 检测也远远先于尿中传统标记物，包括 β 2-微球蛋白和 NAG 的出现。

NGAL 的上调和尿排泄可说明肾小管细胞对于各种损伤的快速反应，而 NGAL 在尿中的检测可提供一种广泛应用的非侵入性的临床工具，其用于小管细胞损伤的早期诊断。

NGAL 是一种敏感的、非侵入性的、肾小管细胞损伤，包括肾缺血和肾毒血症的尿生物标记物。检测在患有急性、轻微和早期形式的肾小管细胞损伤的患者的尿中 NGAL 的表达，应用本发明的快速而简单的检测方法和试剂盒，能够提醒并使临床医生在经历急性肾衰竭的患者中及时地开始干预努力，并提醒临床医生实施一些方法，旨在防止患有轻微的临床症状不明显的肾小管细胞损伤(如肾毒素、肾移植、血管外科和心血管的事件)的患者发展成明显的 ARF。

单在美国，每年就进行大约 16,000 例肾移植。这个数字还在逐年稳定上升。其中大约 10,000 例是尸体的肾移植，并有 ARF 的风险。这些患者中的每个人会极大地受益于系列的 NGAL 检测，其可代表日常护理。

缺血性肾损伤也与开放性心脏手术有关，原因在于此过程中固有的血流的短暂中断。可以估计每年进行的开放性心脏手术的数目。在任何中度繁忙的成人医院中，每年大约进行 500 例这样的手术。假定单在美国有至少 400 所这样的中度繁忙的医院，可保守地估计出每年进行 200,000 例开放性心脏手术。这些病人的系列 NGAL 测定又是无价的，并可代表护理的标准。

实验步骤

1. 肾缺血-再灌注损伤的小鼠模型:

我们应用已经建好的肾缺血-再灌注损伤的鼠类模型，其中肾缺血的短期的结构和功能的结果先前已经得到证明(3-7)。简单地，给重 25-35 g 的雄性 Swiss-Webster 小鼠(Taconic Farm, Germantown, NY)提供带有 12:12 小时光暗循环的住所，并允许自由地接触食物和水。所述动物用戊巴比妥钠(50 mg/kg 向腹膜内)麻醉，并放置在加热台(warming table)上以保持 37°C 的直肠温度。应用三种单独的操作步骤：(a)单侧缺血，(b)双侧缺血及 ARF，和(c)双侧轻微的临床症状不明显的缺血。对于第一组(单侧缺血)实验，将其左肾蒂用非-外伤性的血管钳堵塞 45 分钟，在此期间保持所述的肾温暖和湿润。然后除去夹钳，观察到肾的血液回流，并缝合切口。允许所述的小鼠在温暖的笼中恢复。再灌注的 0、3、12 或 24 小时后，将所述动物再次麻醉，打开其腹腔，由下腔静脉穿刺得到的血通过定量比色测定试剂盒(Sigma, St. Louis, MO)进行血清肌酸酐的测定。所述小鼠用腹膜内戊巴比妥致死。然后将左室(left ventricle)用 10 ml 的 1×PBS 灌注，然后用 10 ml 含 4%多聚甲醛(paraformaldehyde)的 PBS 灌注以实现肾的原位固定(*in situ fixation*)。收获两个肾(每个动物的右肾作为对照物)。在每个回流期，对至少三个独立的动物进行检查。将每个肾的一半在液氮中急速冷冻并贮存在-70°C直到进一步的处理；将样品在福尔马林中固定，用石蜡包埋并切片(4μm)。石蜡切片用苏木紫-曙红染色并进行组织学检查。经钳夹的肾显示出由缺血-再灌注损伤引起的特征性的形态学的改变，如先前由别人(3-6)和我们(2)发表的。每个肾的另一半在 OCT 化合物(Tissue-Tek)中包埋并得到冰冻切片(4μm)用于免疫组织化学。

对于第二组(双侧缺血)实验，将两个肾钳夹 30 分钟，并在如前详述的不同回流期检查。此组的八个动物被设计为代表 ARF，并在损伤后 24 小时显示血清肌酸酐的显著上升。

对于第三组(双侧轻微的临床症状不明显的缺血)实验，将不同动物的双肾仅钳夹 5、10 或 20 分钟，并在如前详述的不同回流期检查。这非常轻微程度的损伤被设计为模拟临床症状不明显的肾缺血，而且这组中的小鼠在损伤后 24 小时测定的血清肌酸酐不显示任何上升。

2. 肾缺血-再灌注损伤的大鼠模型:

我们应用已经建好的肾缺血-再灌注损伤的啮齿动物模型(2)。简单地, 重 200-250 g 的雄性 Sprague-Dawley 大鼠(Taconic Farm, Germantown, NY)用 氯胺酮(ketamine) (150 μ g/g)和赛拉嗪(xylazine) (3 μ g/g)麻醉, 并用微血管钳进 5 行双侧肾动物阻塞 30 分钟, 如在小鼠操作中详述的。定时的尿收集物在再 灌注的 3、6、9、12 和 24 小时得到, 而且在致死的时间(24 小时)收集血液 用于肌酸酐测定。

3. 分离 RNA:

10 小鼠整个肾组织(或培养的人近端小管细胞, 见下文)用 Tissue Tearor (Biospec Products, Racine, WI)破碎。来自对照物和缺血的肾的总 RNA 应用 RNeasy Mini Kit (Qiagen, Valencia, CA)分离, 并通过分光光度法定量。

4. 微阵列步骤:

15 微阵列硬件和步骤的详细说明先前已经发表了(3)。简单地, 对于每个 实验, 100 μ g 纯化的总小鼠肾 RNA 在用于对照物的 Cy3-dUTP(Amersham, Piscataway, NJ)和用于缺血性样品的 Cy5-dUTP 存在的条件下, 用 Superscript II 反转录酶(Life Technologies, Rockville, MD)进行反转录。所述 cDNA 样品 应用 Microcon YM-50 过滤器(Millipore, Madison, WI)纯化, 并与含有 8,979 20 个独特的序列经验证的小鼠探针的微阵列板杂交(3)。在每个回流期, 至少 检查三个独立的动物, 而且对于每个动物至少进行两次独立的微阵列实验。 所述阵列片用微阵列扫描仪(GenePix 4000B, Axon Instruments, Foster City, CA)进行扫描以得到分别用于 Cy3 和 Cy5 荧光的独立的 TIFF 图像。单个基 因的 Cy3 和 Cy5 的信号强度用 GenePix Pro 3.0 数据提取软件(Axon 25 Instruments)进行检测。如先前所描述的(3)完成质量控制和数据分析。

5. 半定量反转录-聚合酶链式反应(RT-PCR):

来自对照物和实验的小鼠肾的等量(1 μ g)的总 RNA, 在随机六聚物存在的 条件下, 按照使用说明书用 Superscript II 反转录酶(Life Technologies)进行 30 反转录。PCR 应用一个试剂盒(Roche, Indianapolis, IN)和下列引物完成:

小鼠 NGAL 有义 5'-CACACGGACTACAACCAGTTCGC-3';

小鼠 NGAL 反义 5'-TCAGTTGTCAATGCATTGGTCGGTG-3';

人 NGAL 有义 5'-TCAGCCGTCGATACTGGTC-3'; 和

人 NGAL 反义 5'-CCTCGTCCGAGTGGTGAGCAC-3';

5 小鼠和人 β -肌动蛋白和甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)的引物对从 Clontech (La Jolla, CA)得到。无 cDNA 的模拟反应作为阴性对照物。通过琼脂糖凝胶电泳然后用溴化乙锭染色分析 PCR 产物,并通过密度测定法定量。在 β -肌动蛋白或 GAPDH 扩增的归一化之后,显示在缺血的肾对比对照肾中 NGAL mRNA 表达的倍数变化。

10 6. 免疫组织化学:

冰冻切片用含 0.2% Triton X-100 的 PBS 渗透 10 分钟,以山羊血清阻断 1 小时,并与 NGAL 的初级抗体(1:500 稀释)一起温育 1 小时。然后将载玻片在黑暗中暴露于与 Cy5 结合的第二抗体(Amersham, Arlington Heights, IL)30 分钟,并用装配若丹明滤光器的荧光显微镜(Zeiss Axiophot)观察。

15 为了将 NGAL 与 Rab11 协同定位(co-localization),首先将系列的切片与 NGAL 抗体或者 Rab11 的单克隆抗体(1:500 稀释; Transduction Laboratories)一起温育,然后与结合 Cy5(对于 NGAL)或结合 Cy3(对于 Rab11)的第二抗体一起温育,并分别以若丹明或荧光素滤光器进行观察。为了将 NGAL 与增殖的细胞核抗原(PCNA)协同定位,将切片与 NGAL 抗体和 PCNA
20 的单克隆抗体(1:500 稀释; Upstate)共同温育,并通过免疫过氧化物酶染色 (immunoperoxidase staining) (ImmunoCruz Staining System, Santa Cruz Biotechnology)完成检测。对于 TUNEL 测定,我们应用 ApoAlert DNA Fragmentation (Assay Kit Clontech)。石蜡切片通过二甲苯和渐降的 (descending grade)乙醇脱除石蜡(deparaffinize),以 4%甲醛/PBS 在 4℃
25 固定 30 分钟,以蛋白酶 K 在室温渗透 15 分钟,以 0.2% Triton X-100/PBS 在 4℃渗透 15 分钟,并以核苷酸和 TdT 酶的混合物在 37℃温育 60 分钟。该反应以 2×SSC 终止,用 PBS 洗涤所述切片并以 Crystal/mount (Biomed, Foster City, CA)包埋。TUNEL-阳性的细胞凋亡的核通过观察荧光显微镜进行检测。

30 7. 尿的收集:

将小鼠或大鼠置于代谢笼(metabolic cage) (Nalgene, Rochester, NY), 并

在双侧肾动脉阻塞之前以及阻塞之后的每小时收集尿。尿样以 5000×g 离心以除去碎片，而得到的上清通过 Western 印迹分析。尿肌酸酐通过定量比色测定试剂盒(Sigma)进行测定以归一化用于尿 NGAL 检测的样品。用于检测尿中的 N-乙酰-β-D-氨基葡萄糖苷酶(NAG)的比色测定试剂盒从 Roche 得到。

8. 细胞培养:

人肾近端小管上皮细胞(RPTEC)从 Clonetics(San Diego, CA)得到。细胞生长于补充有 REGM 复合物的肾上皮细胞基础培养基(Renal Epithelial Cell Basal Medium) (0.5μl/ml 氢化可的松、10 pg/ml hEGF、0.5μg/ml 肾上腺素、6.5 pg/ml 三碘甲腺原氨酸、10μg/ml 转铁蛋白、5 μg/ml 胰岛素、1μg/ml 硫酸庆大霉素和 2% FBS), 如制造商所推荐的。

9. 培养的细胞的温和的 ATP 消耗:

我们修改了先前描述的体外的缺血的操作步骤，所述的体外的缺血由具有氧化磷酸化的抑制子的 ATP 消耗引起(8,9)。在汇流后(post-confluence)的第二天，RPTEC 细胞与 1μl 抗霉素 A (Sigma)一起温育不同的时间直至 6 小时。我们在先前已经显示，在其它类型的培养的肾上皮细胞，如 MDCK (8) 和 786-O (9)细胞中，这导致温和的部分可逆的 ATP 消耗，并且无细胞生存能力的损失。应用基于荧光素酶(luciferase)的测定试剂盒(Sigma)监测 ATP 水平，并将其表示为对照值的百分比。在 ATP 消耗的不同时间点收获细胞，并通过 RT-PCR 分析 NGAL mRNA 表达，而通过 Western 分析分析 NGAL 蛋白表达。也监测 NGAL 向培养基中的分泌。

10. 顺氯氨铂肾毒性的小鼠模型:

我们应用已经建好的鼠类模型，其中顺氯氨铂诱导的肾毒性的结构上和功能上的结果在先前已经得到证明(12-14, 18)。简单地，给重 25-30 g 的雄性 Swiss-Webster 小鼠(Taconic Farm, Germantown, NY)提供带有 12:12 小时:暗循环的住所，并允许自由地接触食物和水。给所述小鼠单次腹腔内注射顺氯氨铂，其剂量为 5μg/kg 或者 20μg/kg 体重。先前已经显示，较大的剂量导致小管细胞的坏死和细胞凋亡，并在注射顺氯氨铂的 3-4 天内削弱肾

功能(12-14, 18)。将动物置于代谢笼(Nalgene, Rochester, NY), 并在注射顺氯
氨铂之前以及注射之后的不同时间点(3、12、24、48、72 和 96 小时)收集尿。
在相似的时间点, 所述动物用戊巴比妥钠(50 mg/kg, 向腹膜内)麻醉, 打开
其腹腔, 由下腔静脉穿刺得到的血, 通过定量比色测定试剂盒(Sigma, St.
5 Louis, MO)进行血清肌酸酐的测定。杀死所述的小鼠, 它的肾用含 4%多聚
甲醛的 PBS 灌注固定(perfusion fixed)在原位, 并收获双肾。将每个肾的一
半在液氮中急速冷冻并贮存在-70℃直到进一步的处理: 将样品在福尔马林
中固定, 用石蜡包埋并切片(4 mm)。石蜡切片用苏木紫-曙红染色并进行
TUNEL 测定。剩余的部分用于进行 Western 印迹。全肾在冰冷的裂解缓冲
10 液(20 mM Tris, pH 7.4, 250 mM 蔗糖, 150 mM NaCl, 1% NP-40 和
1×Complete[®]蛋白酶抑制剂)中用 Polytron 均质器进行均质化。均质物在冰上
保温 30 分钟, 在 4℃以 1,000×g 离心 5 分钟以除去细胞核及细胞碎片, 并
通过 Bradford 法(Bio-Rad, Hercules, CA)分析蛋白质含量。每个肾的另一半
包埋在 OCT 化合物(Tissue-Tek)中, 并将得到的冰冻切片(4μm)用于免疫组
15 织化学。

11. 重组鼠科动物 NGAL 的表达、纯化和 Western 印迹:

将全长的小鼠 NGAL cDNA 克隆到 pGEX 表达载体(Pharmacia, Nutley,
NJ), 在细菌中表达为与谷胱甘肽-S-转移酶(GST)融合的融合蛋白, 并用谷
20 胱甘肽-琼脂糖柱(Amersham)纯化, 然后再用凝血酶切割, 如先前所述(16, 19,
20)。蛋白通过 SDS-PAGE, 之后进行考马斯蓝染色或以 NGAL 的多克隆抗
体进行 Western 印迹来分析。蛋白浓度采用 Bradford 法(Bio-Rad, Hercules, CA)
测定。

25 12. 通过 Western 印迹定量尿 NGAL:

尿中 NGAL 的量通过与重组的纯化的 NGAL 的规定标准进行比较而测
定。采用已知的重组 NGAL 浓度和已知的尿体积, 在转移和暴露的相同条
件下进行 Western 印迹的密度分析。

所有的化学药品除非另外指出均购自 Sigma。为了进行 Western 印迹,
30 通过 Bradford 法(Bio-Rad, Hercules, CA)测定蛋白浓度, 并将等量的总蛋白
在每个通道上样。除非另外指出, 将 1:10,000 稀释的 α -微管蛋白的单克隆

抗体用于确认等量蛋白上样，而 NGAL 的多克隆抗体以 1:500 应用(15)。除非另外指出，转移的蛋白的免疫检测应用增强化学发光(enhanced chemiluminescence) (Amersham)完成。

5 实施例 1

NGAL 是一种小的蛋白酶抗性的、分泌的多肽，其可以在尿中检测出来。NGAL mRNA 和蛋白水平的显著上调已经在小鼠肾脏缺血后的早期显现出来。主要在近端小管细胞中检测到 NGAL 蛋白表达，其类似于一种分泌蛋白在细胞质中以点状分布。实际上，在 ARF 的小鼠和大鼠模型中，可
10 容易而快速地在缺血性损伤后的尿中(在第一次尿出物中)检测到 NGAL，此时没有观察到肾的白细胞渗透。来自小管细胞的 NGAL 的来源在培养的经受体外缺血损伤的人近端小管细胞中得到进一步确认，其中 NGAL mRNA 在所述细胞中被显著且立即诱导，而在温和的 ATP 消耗的 1 小时内，在培养基中可容易地检测到 NGAL 蛋白。我们的结果说明，NGAL 可以代表
15 缺血性肾损伤的新的早期尿生物标记物。

鉴定肾缺血-再灌注损伤后早期上调的新基因：

在基因组范围搜索在小鼠模型中肾缺血-再灌注损伤稍后诱导的转录物，鉴定了 7 种早期生物标记物。在每个再灌注时间(3、12 和 24 小时)检查
20 3 只独立的小鼠，并对于每只检查的动物进行至少两次独立的微阵列实验。对照物和缺血肾的转录组(transcriptome)分布型(profile)的比较得到 7 个基因的小子集，所述的 7 个基因其一贯被诱导超过 10 倍。近来已经确认这些转录物中的一种，半胱氨酸富含蛋白 61 (Cyr61)，被肾缺血(1)诱导。令人惊讶地，其它 6 种差别表达的基因的行为对于 ARF 文献是新的。我们选择进
25 一步描述这些先前未鉴定的基因中的一种的特性，即与中性白细胞凝胶酶相关的脂蛋白(NGAL)。

早期肾衰竭的动物模型的特征：

使用缺血-再灌注损伤的鼠模型，在该模型中肾缺血的短期的结构和功
30 能的结果已经得到证明 (3-7)。缺血损伤的特征性组织病理特点在单侧缺血(45 分钟)和双侧缺血(30 分钟)之后的 24 小时再灌注样品中是显而易见的。

这些包括刷状缘膜(brush border membrane)的丧失、小管扩张(tubular dilation)、展平的小管上皮(flattened tubular epithelium)、腔内碎片(luminal debris)和间隙渗透(interstitial infiltrate) (图 1)。凋亡的细胞的存在通过 TUNEL 试验证明。细胞凋亡主要位于远端小管细胞和髓袢(Henle's loop)的升支(ascending limb), 既在腔内分离的细胞也在附着的细胞中。近端小管细胞也偶然地凋亡, 但肾小球基本上无细胞凋亡。在对照肾或在忽视 TdT 的缺血性样品中, 没有检测到 TUNEL-阳性的细胞(未给出)。上面的组织变化和细胞凋亡的变化在经受较轻微程度缺血(双侧缺血 5、10 或 20 分钟)的肾中缺失(未给出)。血清肌酸酐水平反映了观察到的组织病理的变化。因此, 患有单侧肾缺血或轻度的临床症状不明显的双侧缺血的小鼠显示其血清肌酸酐水平与对照动物难以区别, 然而双侧缺血 30 分钟的小鼠显示血清肌酸酐的显著升高(图 1)。

NGAL mRNA 在肾缺血后的早期被显著诱导:

通过微阵列分析, 发现 NGAL 在缺血的小鼠肾中再灌注 3、12 和 24 小时, 与相同动物的对照肾相比, 一贯被诱导 3.2 ± 0.5 倍、 11.1 ± 1.2 倍和 4.3 ± 0.6 倍(来自三个动物在每个时间点的平均值 \pm SD)。这个发现通过半定量 RT-PCR 加以证实, 使用以 β -肌动蛋白或 GAPDH 进行的归一化操作。在任何进行检测的再灌注时间, 没有记录到 β -肌动蛋白或 GAPDH mRNA 表达的显著变化, 如前所述(3)。然而, 应用小鼠特异性的引物, 我们检测到 NGAL mRNA 表达的显著上调(在再灌注 3、12 和 24 小时分别为 4.1 ± 0.5 倍、 9 ± 0.6 倍和 4.2 ± 0.4 倍, 其中的值代表三个单独动物的平均值 \pm SD)。这些结果在图 1 中说明, 并与通过转录组分析检测到的变化总的来说一致。

NGAL 蛋白在缺血小鼠肾的早期的近端小管中显著地过量表达:

NGAL 蛋白在肾中的缺血后表达平行于 mRNA 的表达。通过 Western 分析, NGAL 可在对照小鼠肾中作为 25 kDa 免疫反应肽被检测到。此条带作为 NGAL 的身份在独立的实验组中建立, 其中将初级抗体与重组小鼠脂蛋白预-温育完全阻断了此免疫反应性(未给出)。在单侧缺血实验中, 通过密度分析法, NGAL 表达在来自损伤 3 小时以内的三个独立的动物的缺血肾中被诱导 3-4 倍, 如图 2, A 图面所示。在来自八个独立的动物的双

侧缺血实验中，此反应得到显著的增强。这些小鼠中的 NGAL 在再灌注后 3 小时被诱导 3 倍，在 24 小时样品中在 12-倍以上得到峰值，并在 72-h 恢复期内降低到正常水平(图 2，图面 B)。

应用免疫组织化学技术，在对照小鼠肾中几乎检测不到 NGAL 蛋白，
5 但是它在缺血 3 小时以内的近端小管中却被显著地上调，如图 3 所示。基于刷状缘膜的存在、核与细胞大小的比例以及细胞形态鉴定这些部分中的近端小管。诱导的 NGAL 在近端小管细胞中以点状细胞质分布出现，其类似于一种分泌的蛋白。这种表达模式在缺血再灌注损伤的单侧和双侧模型中是同样的，并在每个所研究的动物中一贯是显而易见的。肾小球没有
10 NGAL 表达，而且表达 NGAL 的中性白细胞是不明显的。因为已经显示 NGAL 在培养的 Wilms 肿瘤肾细胞中至少部分地与核内体(endosome)协同定位(11)，在连续肾切片(serial kidney section)中检验 NGAL 和 Rab11(一种晚期再循环核内体的标记物)的分布。合并的图像显示 NGAL 与 Rab11 显著的协同定位(未给出)。为了确定缺血后 NGAL 表达增强的功能意义，检验连续肾
15 切片的 NGAL 表达、TUNEL-阳性核或 PCNA-阳性核。然而过量表达 NGAL 的小管细胞不是 TUNEL-阳性的(未给出)，NGAL 与 PCNA 显著的协同定位在 48 小时回流期在增殖和再生细胞中是明显的(未给出)。

在小鼠中 ARF 的诱导之后立即在尿中容易地检测到 NGAL 蛋白：

20 本实验说明了检测尿 NGAL 作为缺血性肾损伤的早期非侵入性生物标记物的应用。应用尿肌酸酐浓缩物以使上样一致，NGAL 在缺血之前的尿中缺失。与此明显相反的是，NGAL 在所有检测的动物中，损伤 2 小时以内(在缺血后的第一次尿出物中)显示为 25 kDa 条带，如图 4A 和 4B 所示。此条带作为 NGAL 的身份在独立的实验组中建立，其中将初级抗体与重组
25 小鼠脂蛋白一起预-温育完全阻断此免疫反应性(未给出)。在仅仅 1 μ l 的未处理的尿中通过 Western 分析可容易地检测 NGAL，而且在整个检验期间(再灌注的 24 小时)持续。然后，我们将尿 NGAL 分泌与先前建立的损伤的标记物，如 β 2-微球蛋白和 NAG 的分泌进行比较。尽管尿 NGAL 在缺血的 2 小时内是明显的，但是在只有单侧缺血 12 小时后的同样的尿样中(图 4，图
30 面 A)和双侧缺血 8 小时之后(图 4，图面 B)， β 2-微球蛋白是可检测的。类似地，尿 NAG 分泌只有在单侧缺血 12 小时之后(图 4 的下图，图 A)和双侧

缺血 8 小时之后(图 4 的下图, 图面 B), 与非缺血性对照动物相比是显著增加的。

在小鼠中甚至轻微的肾缺血之后在尿中容易地检测到 NGAL 蛋白:

- 5 为了在无明显的 ARF 的条件下确定尿 NGAL 检测的敏感性, 我们应用了将不同的小鼠组经过只有 5、10 或 20 分钟的双侧肾动脉阻塞的实验步骤。这些研究被设计为在轻微的临床症状不明显的肾缺血之后评价尿 NGAL 分泌。回流 24 小时之后测定的血清肌酸酐在所有这些小鼠中在正常限度之内。惊人地, 在这些动物的仅仅 1 μ l 的未处理的尿中容易地检测到 NGAL(图 5),
- 10 虽然它的出现与患 ARF 的动物相比有些延迟。因此, 虽然双侧缺血 30 分钟导致在 2 小时之内尿 NGAL 分泌(图 4), 双侧缺血 20 或 10 分钟的小鼠在 4 小时以后显示尿 NGAL, 而缺血 5 分钟的只能在 6 小时之后分泌 NGAL(图 5)。因此, NGAL 在尿中的出现看起来与肾缺血的量(dose)和持续时间(duration)相关。

15

实施例 2

在大鼠中 ARF 的诱导之后立即在尿中容易地检测到 NGAL 蛋白:

- 因为有关对肾动脉阻塞的反应中的物种差异存在争论, 下面我们检验了 NGAL 在不同动物模型, 即建好的肾缺血-再灌注损伤的大鼠模型的行为。
- 20 应用尿肌酸酐浓度以使上样一致, NGAL 在大鼠肾缺血之前的尿中缺失。与此明显相反的是, NGAL 在损伤的 3 小时以内(在缺血后的第一次尿出物中)显示为 25 kDa 免疫反应性, 如图 6 所示。比较起来, 此缺血损伤模型中的血清肌酸酐只在再灌注的 24 小时之后升高(未给出)。再一次, 在仅仅 1 μ l 的未处理的尿中可检测到 NGAL, 而且在整个检验期间(再灌注的 24 小时)
- 25 持续。

实施例 3

在早期轻微缺血之后在培养的人近端小管细胞中 NGAL mRNA 被诱导:

- 30 为了确认来自缺血的近端小管细胞的 NGAL 的来源, 我们修改了先前描述的体外缺血的操作, 所述体外缺血是培养的人近端小管细胞(RPTEC)

中通过 ATP 消耗造成的。在 $1\mu\text{m}$ 抗霉素中温育产生温和的部分 ATP 消耗，在 1 小时内变为对照物的大约 $83\pm 3\%$ ，到 6 小时为止更缓慢地下降为对照物的大约 $75\pm 3\%$ (来自四个实验的平均值 \pm SD)。此温和 ATP 消耗的形态学结果是不可辨别的。NGAL mRNA 在静息细胞中刚刚可以检测。然而，部分 ATP 消耗后，快速的依赖于持续时间的 NGAL mRNA 诱导通过 RT-PCR 是明显可见的，如图 7 所示。

在体外早期缺血之后在培养基中容易地检测到 NGAL 蛋白：

我们下一步在轻微 ATP 消耗后 RPTEC 细胞和培养基中检测 NGAL 蛋白表达。NGAL 蛋白在对照 RPTEC 细胞中是可以检测的，而且 ATP 消耗之后，它的表达以依赖于持续时间的方式增加，如图 7 所示。在来自对照细胞的培养基中没有发现 NGAL 免疫反应性蛋白，但是 NGAL 在轻微 ATP 消耗的 1 小时以内可容易地检测到。注意到 NGAL 蛋白丰度的进一步增加与 ATP 消耗的持续时间相关。这些结果说明，诱导的 NGAL 蛋白迅速地分泌到培养基中，类似于 NGAL 在体内肾缺血后的尿中的快速出现。

实施例 4

在小鼠轻微肾毒血症早期的尿中容易地检测到 NGAL 蛋白：

为了测定肾毒血症是否造成尿中 NGAL 蛋白的表达，由此说明其作为肾毒性肾损伤的早期非侵入性生物标记物的用途在小鼠中诱导顺氯氨铂诱导的肾毒血症。在顺氯氨铂肾毒性的已建立的小鼠模型中，NGAL 在顺氯氨铂给药的一天之内的尿中可容易地检测到(图 8A，下行轨迹)。相比之下，在顺氯氨铂给药 2 天后几乎检测不到尿 $\beta 2$ -微球蛋白，并且直到顺氯氨铂给药后 4-5 天仍不能可靠地检测尿 $\beta 2$ -微球蛋白(图 8，图面 A，上行轨迹)。类似地，增加的尿 NAG 分泌直到顺氯氨铂给药后的 4 和 5 天才是明显的(图 8，图面 B)。

顺氯氨铂肾毒性的特征在于肾小管细胞的凋亡和坏死：

给予小鼠单次顺氯氨铂的腹膜内注射，其剂量为 5 mg/kg 或 20 mg/kg 体重。对照小鼠和那些接受较大剂量顺氯氨铂的小鼠中的结果在图 9 中显示。较大的剂量导致小管细胞坏死，通过用苏木紫-曙红染色的切片中存在

肾小管扩张、内腔碎片和展平的上皮而得到证明(中上图)。也通过显示浓缩的强烈-染色的细胞核,证明了小管细胞在经受程序性细胞死亡(programmed cell death)(右上图)。这通过 TUNEL 实验得到证实,其显示细胞凋亡所特有的浓缩的、破碎的细胞核(中下和右下图)。在对照肾中没有检测到坏死或细胞凋亡(左上和左下图)。以较小剂量顺氯氨铂处理的小鼠肾也显示正常,与未处理的对照物相似(未给出)。图 9 是 5 次单独实验的代表。

NGAL 蛋白在肾小管中被顺氯氨铂快速诱导:

由于 NGAL 在肾的缺血性损伤之后被诱导(17),检测了对于顺氯氨铂-诱导的肾毒性损伤的反应。通过 Western 分析,NGAL 在来自对照小鼠的肾裂解物中几乎检测不到,但在顺氯氨铂给药(20 mg/kg)的 3 小时之内被快速地诱导,如图 10 所示。肾 NGAL 表达增加,此增加依赖于持续时间,在 48 小时具有峰值并且持续上调直到 96 小时。这些结果通过免疫荧光染色确认,在图 11 中显示。在注射顺氯氨铂之后 3 小时(3h)(右上图)和 12 小时(12h)(左下图)收获的肾显示 NGAL 蛋白的诱导。在 12 小时收获的切片的高倍放大图(HP)(右下图)也在图 11 中显示。左下图中的箭头表示在 HP 图中显示的区域。NGAL 在顺氯氨铂注射 3 小时之内主要在近端小管细胞中被诱导,但在对照小鼠(Con)的细胞中缺失(左上图)。基于刷状缘膜的存在、核与细胞大小的比例以及细胞形态鉴定这些切片中的近端小管。诱导的 NGAL 在近端小管细胞中以点状细胞质分布出现,其类似于一种分泌的蛋白。诱导的 NGAL 在近端小管细胞中以点状细胞质分布出现,其类似于一种分泌的蛋白。这种表达模式与在缺血再灌注损伤的小鼠模型中所观察到的相类似(17)。肾小球没有 NGAL 表达,而且表达 NGAL 的中性白细胞是不明显的。图 11 代表在每个时间点的 5 个动物。

25

在大剂量顺氯氨铂之后的尿中可容易地检测到 NGAL 蛋白:

在大剂量顺氯氨铂(20 mg/kg)之后的尿中检测到 NGAL 蛋白,由此说明其作为肾毒性肾损伤的早期非侵入性的生物标记物的应用。采用尿肌酸酐浓度以使上样一致,NGAL 在缺血之前的尿中基本上缺失。与此明显相反的是,在所有检测的动物中,顺氯氨铂损伤(20 mg/kg)的 3 小时以内容易地检测到尿 NGAL,如图 12(上图)中所示。此条带作为 NGAL 的身份在独立

的实验组中建立，其中将初级抗体与重组小鼠脂蛋白一起预-温育以完全阻断此免疫反应性(未给出)。在仅仅 5 μ l 的未处理的尿中通过 Western 分析可容易地检测到 NGAL。尿 NGAL 分泌增加，此增加依赖于持续时间，在 48 小时具有峰值并且持续上调直到 96 小时。然后，我们将尿 NGAL 分泌与先前建立的损伤标记物，如 NAG 进行比较。鉴于尿 NGAL 在顺氯氨铂的 3 小时之内是明显的，然而尿 NAG 分泌只有在损伤的 96 小时之后才显著地增加(中图)。此外，通过血清肌酸酐测量评价肾功能，只有在顺氯氨铂的 96 小时之后才显示显著的改变(下图)。此图代表在每个时间点的 5 个独立的实验。

10

甚至在小剂量顺氯氨铂之后的尿中也可以检测到 NGAL 蛋白：

对不同的鼠组进行仅 5 μ g/kg 的顺氯氨铂注射以在临床症状不明显的肾毒性损伤之后确定尿 NGAL 检测的敏感性，在图 13 中显示。在这些动物仅仅 5 μ l 的未处理的尿中可检测到 NGAL(上图)，尽管其出现从量上相比 20 μ g/kg 顺氯氨铂的动物显得较小(图 12，上图)。因此，尿中出现的 NGAL 与肾毒素的剂量相关。鉴于尿 NGAL 分泌在顺氯氨铂的 3 小时之内是明显的，这组动物中的尿 NAG 分泌甚至在损伤的 96 小时之后也没有显著地增加(中图)。此外，通过血清肌酸酐测量评价肾功能显示，甚至在小剂量顺氯氨铂的 96 小时之后，血清肌酸酐也没有显著地改变(下图)。此实施例说明，

20 NGAL 是比目前采用的生物标记物更敏感的肾毒性的生物标记物。

顺氯氨铂之后的尿 NGAL 分泌依赖于剂量和持续时间：

对尿 NGAL 分泌定量以确定其作为顺氯氨铂给药后的肾损伤严重程度的指标的应用，在图 14 中显示。这需要表达和纯化已知量的 NGAL 用作标准。通过 SDS-PAGE 在考马斯蓝染色后分析重组 NGAL 蛋白，显示适当大小的单一蛋白条带(左上图)。已知浓度的等分试样的 Western 印迹显示在 3-100 ng/ml 范围内信号强度的线性增加(右上图)。然后通过与这些重组纯化的 NGAL 的定义的标准物进行比较测定尿中 NGAL 的量。20 μ g/kg 顺氯氨铂之后，尿 NGAL 分泌增加，此增加依赖于持续时间(下图)。相似的、尽管有些迟钝的反应在导致临床症状不明显的肾毒性损伤的顺氯氨铂剂量处理的动物中是明显的。

25

30

实施例 5

从肾移植后 2 小时的患者得到尿样，所述的肾移植是缺血性肾损伤的可预测的人体模型，在图 15 中显示。与得到来自活体亲属供者(图 A)的肾的患者(n=6)相比，得到尸体的肾的患者(n=4)具有增加的尿 NGAL，其通过 Western 印迹和 ELISA 容易地检测到，所述尸体的肾在移植之前在冰上储存一段时间。在尿 NGAL 和冷缺血时间之间有显著的关联，说明 NGAL 分泌与肾损伤的程度成正比(图 B) ($r=0.98$, Spearman analysis)。尿 NGAL 与血清肌酸酐峰值之间也有显著的关联(图 C) ($r=0.96$, Spearman analysis)。着重强调的是，移植的 2 小时之内测定的尿 NGAL 可以预测如血清肌酸酐峰值反映的 ARF，所述血清肌酸酐峰值出现在几天以后。来自正常人对照或来自患慢性肾衰竭的患者的尿中含有的 NGAL 量几乎检测不到，这说明尿 NGAL 上调对于急性肾损伤是特异性的(未给出)。同样地，来自患尿路感染和肾移植排异(两种与中性白细胞相关的病症)的患者的尿中只含有最小量的 NGAL(未给出)，容易与在尸体的肾移植中明显较大的量(>100 ng/ml)相区别。这些数据显示，NGAL 是肾移植之后的急性肾损伤的新型早期尿生物标记物。

实施例 6

预期地从 15 位开心手术后的患者得到系列尿样，具有在图 16 中显示的结果。尿 NGAL 通过 Western 印迹和 ELISA 定量，并发现它在 15 位患者里的 5 位中升高(图 A)。每条线代表一位病人。血清肌酸酐从基线的%变化在图 A 的右边显示。同样的 5 位患者发生手术后的急性肾衰竭，所述的急性肾衰竭定义为血清肌酸酐从基线增加 50%或者 50%以上，得到大约 33% 的发病率。在没有发生急性肾衰竭的 10 位患者中，尿 NGAL 分泌有小的早期的增加(2 小时的肌酸酐值为 6.0 ± 2.0 ng/mg)，所述小的早期的增加在手术后 12 小时内迅速地归一化到几乎无法检测的水平(图 A)。与此明显相反的是，后来发生急性肾衰竭的患者显示，尿 NGAL 的 2 小时的值增长 10 倍以上(75 ± 10 ng/mg 肌酸酐)，而尿 NGAL 的 4 小时的值增长 20 倍以上(120 ± 12 ng/mg 肌酸酐)。尿 NGAL 的量与心肺旁路(cardiopulmonary bypass)时间之间有关联性，这说明 NGAL 分泌与肾损伤的程度成正比(图 B) ($r=0.76$,

Spearman 分析)。尿 NGAL 与血清肌酸酐峰值之间也有显著的关联性(图 C) ($r=0.66$, Spearman 分析)。再次着重强调的是, 心脏手术的 2 小时内测定的尿 NGAL 可以预测如血清肌酸酐峰值反映的 ARF, 所述血清肌酸酐峰值出现在几小时或甚至几天以后。这些数据显示, NGAL 是开心手术之后的急性肾损伤的新型早期尿生物标记物, 而且它的定量可以在这一易感群体中预测急性肾衰竭。

尽管已结合优选的实施例描述了本发明, 但本领域内的普通技术人员在阅读了前述的说明书之后, 能够对在这里列出的主题实施各种改变、同等物的置换和修改。因此, 本发明可以通过除了在此具体描述的方法之外的方法实施。因此, 此处的保护仅受到附加的权利要求和其同等物的限制。

参考文献

1. Muramatsu Y, Tsujie M, Kohda Y, Pham B, Perantoni AO, Zhao H, Jo S-K, Yuen PST, Craig L, Hu X, Star RA: Early detection of cysteine rich protein 61 (CYR61,CCN1) in urine following renal ischemia reperfusion injury. *Kidney Int* 62:1601-1610, 2002
2. Yoshida T, Kurelia M, Beato F, Min H, Ingelfinger JR, Stears RL, Swinford RD, Gullans SR, Tang S-S: Monitoring changes in gene expression in renal ischemia-reperfusion in the rat. *Kidney Int* 61:1646-1654, 2002
3. Supavekin S, Zhanh W, Kucherlapati R, Kaskel FJ, Moore LC, Devarajan P: Differential gene expression following early renal ischemia-reperfusion. *Kidney Int* 63:1714-1724, 2003
4. Nogae S, Miyazaki M, Kobayashi N, Saito T, Abe K, Saito H, Nakane PK, Nakanishi Y, Koji T: Induction of apoptosis in ischemia-reperfusion model of mouse kidney: Possible involvement of Fas. *J Am Soc Nephrol* 9:620-631, 1998
5. Daemen MARC, Van de Ven MWCM, Heineman E, Buurman WA: Involvement of endogenous interleukin-10 and tumor necrosis factor- α in renal ischemia-reperfusion injury. *Transplantation* 67:792-800, 1999
6. Kelly KJ, Plotkin Z, Dagher PC: Guanosine supplementation reduces

- apoptosis and protects renal function in the setting of ischemic injury. *J Clin Invest* 108:1291-1298, 2001
7. Burne NJ, Rabb H: Pathophysiological contributions of fucosyltransferases in renal ischemia reperfusion injury. *J Immunol* 5 169:2648-2652, 2002
8. Feldenberg LR, Thevananther S, del Rio M, De Leon M, Devarajan P: Partial ATP depletion induces Fas-and caspase-mediated apoptosis in MDCK cells. *Am J Physiol* 276 (Renal physiol 45):F837-F846, 1999
9. Devarajan P, De Leon M, Talasazan F, Schoenfeld AR, Davidowitz EJ, 10 Burk RD: The von Hippel-Lindau gene product inhibits renal cell apoptosis via Bcl-2-dependent pathways. *J Biol Chem* 276:40599-40605, 2001
10. Molitoris BA, Weinberg JM, Venkatachalam MA, Zager RA, Nath KA, Goligorsky MS : Acute renal failure II. Experimental models of acute renal failure: imperfect but indispensable. *Am J Physiol Renal Physiol* 278:F1-F12, 15 2000
11. Kjeldsen L, Cowland JB, Borregaard N: Human neutrophil gelatinase-associated lipocalin and homologous proteins in rat and mouse. *Biochim Biophys Acta* 1482:272-283, 2000
12. Megyesi J, Safirstein RL, Price PM: Induction of p21 WAF1/CIP/SD1 in 20 kidney tubule cells affects the course of cisplatin-induced acute renal failure. *J Clin Invest* 101:777-782, 1998
13. Shiraishi F, Curtis LM, Truong L, Poss K, Visner GA, Madsen K, Nick HS, Agarwal A: Heme oxygenase-1 gene ablation or expression modulates cisplatin-induced renal tubular apoptosis. *Am J Physiol* 278:F726-F736, 2000
- 25 14. Ramesh G, Reeves WB: TNF- α mediates chemokine and cytokine expression and renal injury in cisplatin nephrotoxicity. *J Clin Invest* 110:835-842, 2002
15. Muramatsu Y, Tsujie M, Kohda Y, Pham B, Perantoni AO, Zhao H, Jo S-K, Yuen PST, Craig L, Hu X, Star RA: Early detection of cysteine rich protein 30 61 (CYR61, CCN1) in urine following renal ischemic reperfusion injury. *Kidney Int* 62:1601-1610, 2002

-
16. Yang J, Goetz D, Li J-Y, Wand W, Mori K, Setlik D, Du T, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Strong R, Barasch J: An iron delivery pathway mediated by a lipocalin. *Mol Cell* 10:1045-1056, 2002
17. Mishra J, Ma Q, Prada A, Mitsnefes M, Zahedi K, Yang J, Barasch J, 5 Devarajan P: Identification of NGAL as a novel urinary biomarker for ischemic injury. *J Am Soc Nephrol* 14:2534-2543, 2003
18. Tsuruya K, Ninomiya T, Tokumoto M, Hirakawa M, Masutani K, Taniguchi M, Fukuda K, Kanai H, Kishihara K, Hirakata H, Iida M: Direct involvement of the receptor-mediated apoptotic pathways in cisplatin-induced 10 renal tubular cell death. *Kidney Int* 63:72-82, 2003
19. Bundgaard J, Sengelov H, Borregaard N, Kjeldsen L: Molecular cloning and expression of a cDNA encoding Ngai: a lipocalin expressed in human neutrophils. *Biochem Biophys Res Commun* 202:1468-1475, 1994
20. Del Rio M, Imam A, De Leon M, Gomez G, Mishra J, Ma Q, Parikh S, 15 Devarajan P: The death domain of kidney ankyrin interacts with Fas and promotes Fas-mediated cell death in renal epithelia. *J Am Soc Nephrol* 15:41-51, 2004

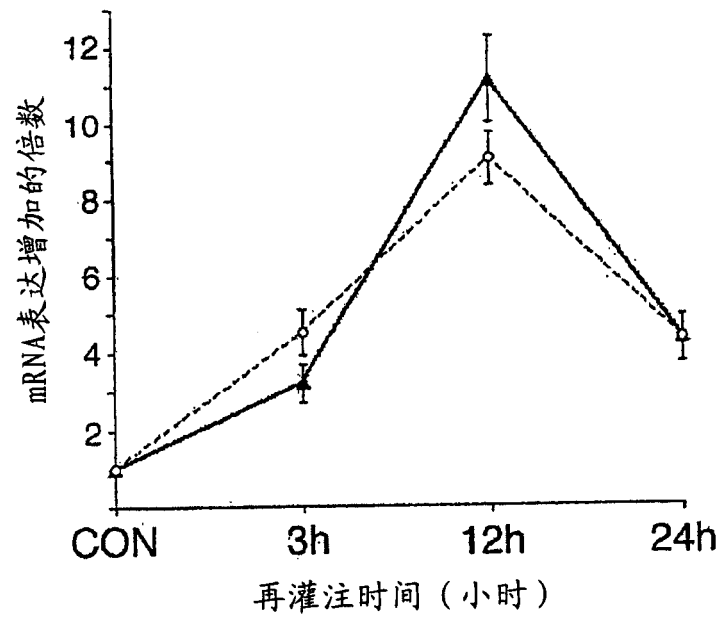
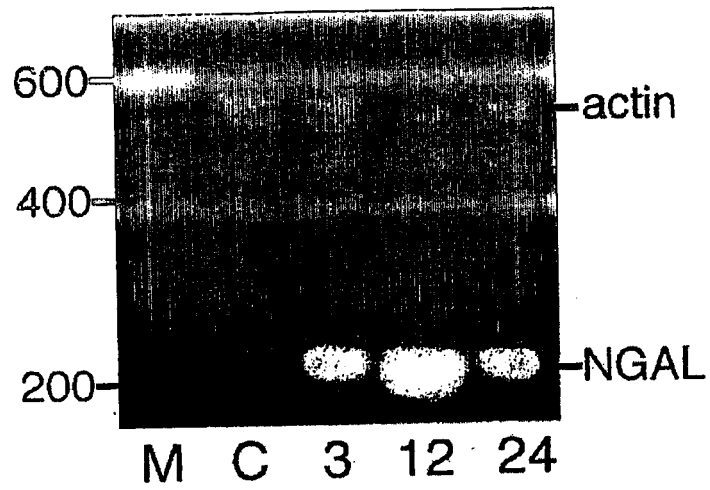


图 1

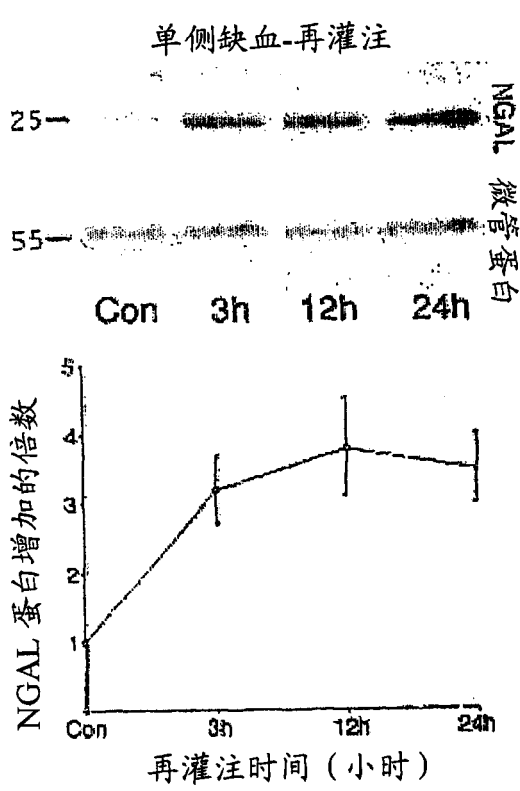


图 2A

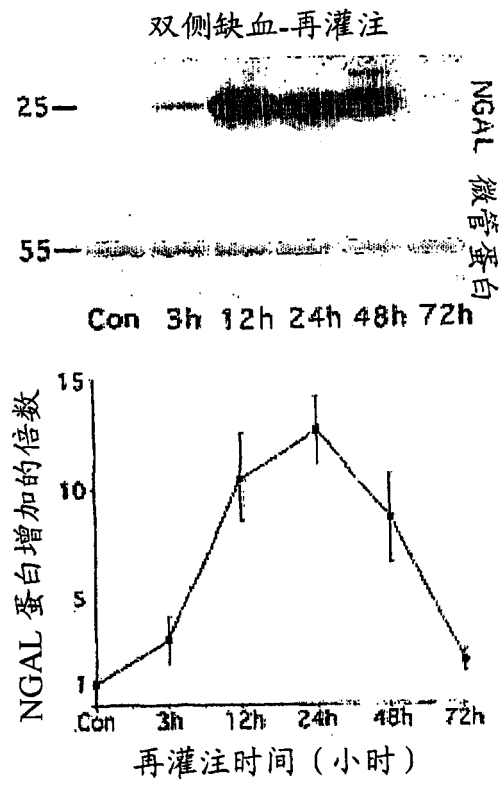


图 2B

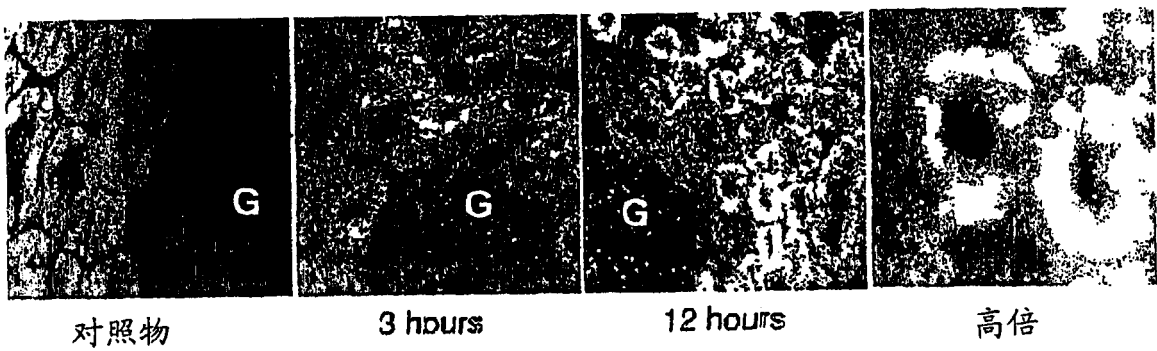


图 3

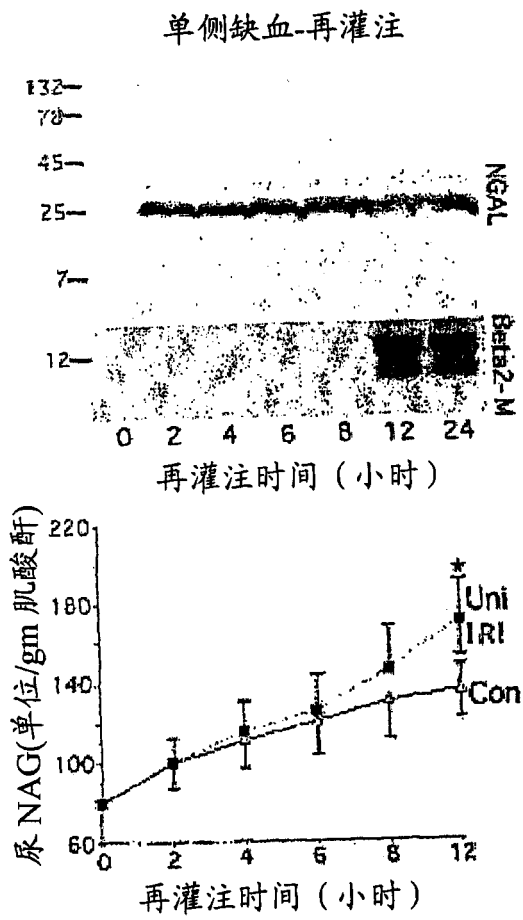


图 4A

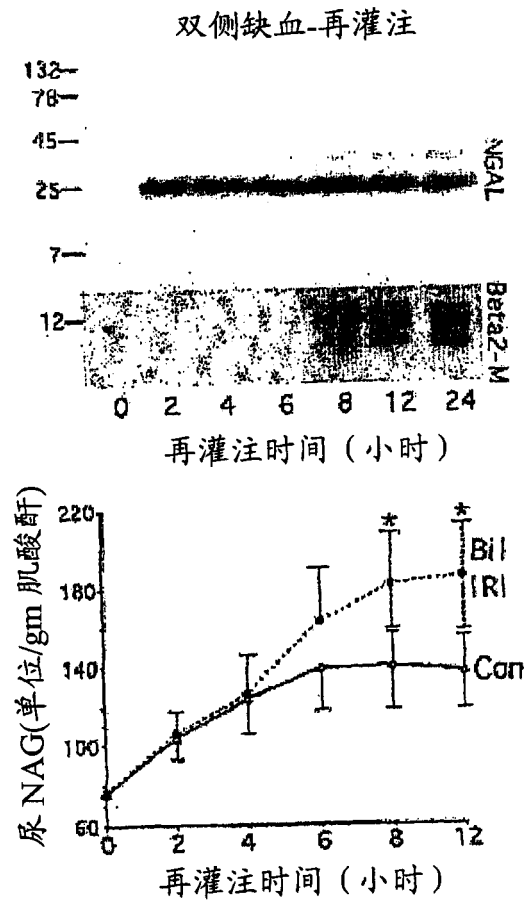


图 4B

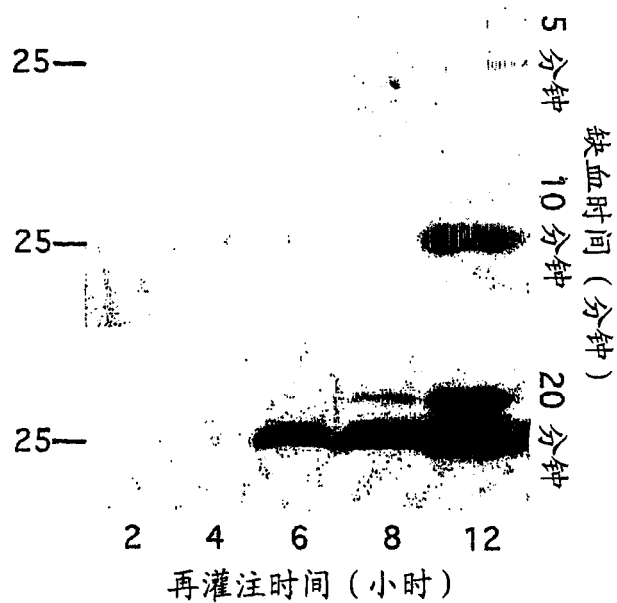


图 5

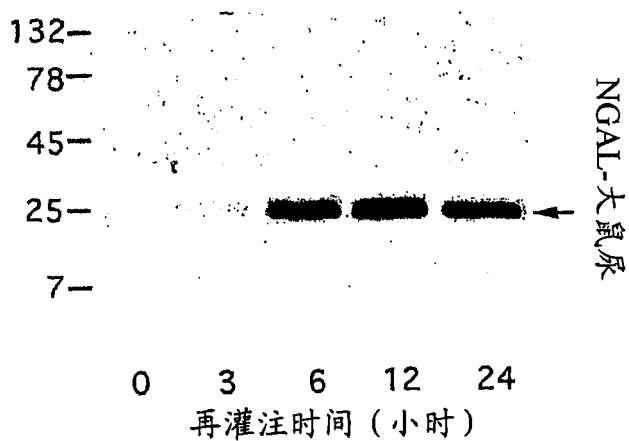


图 6

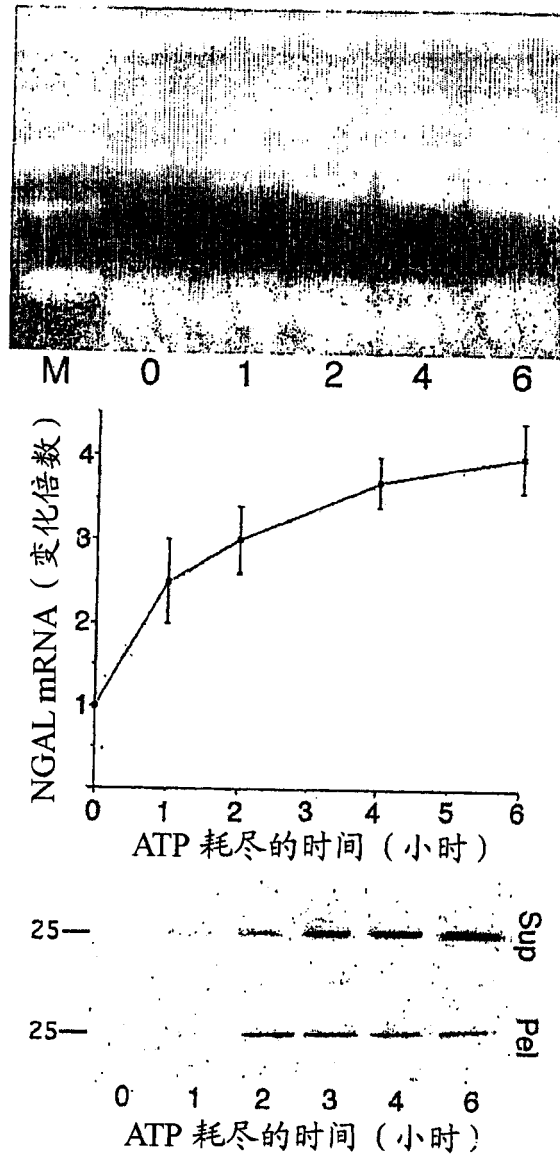


图 7

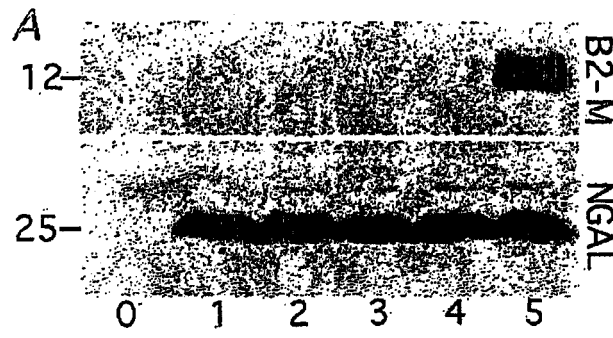


图 8A

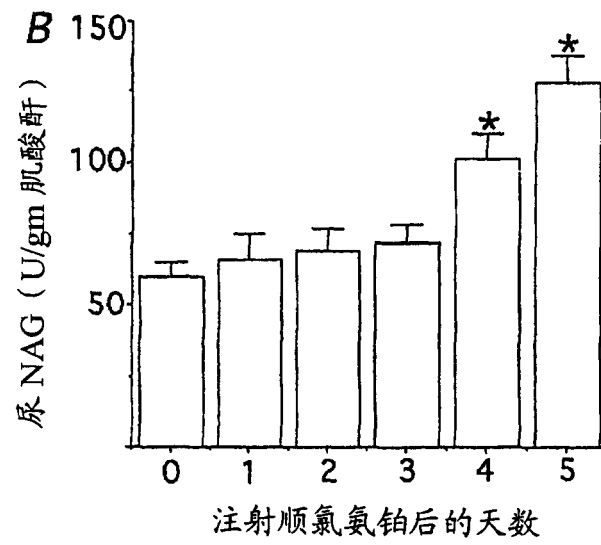


图 8B

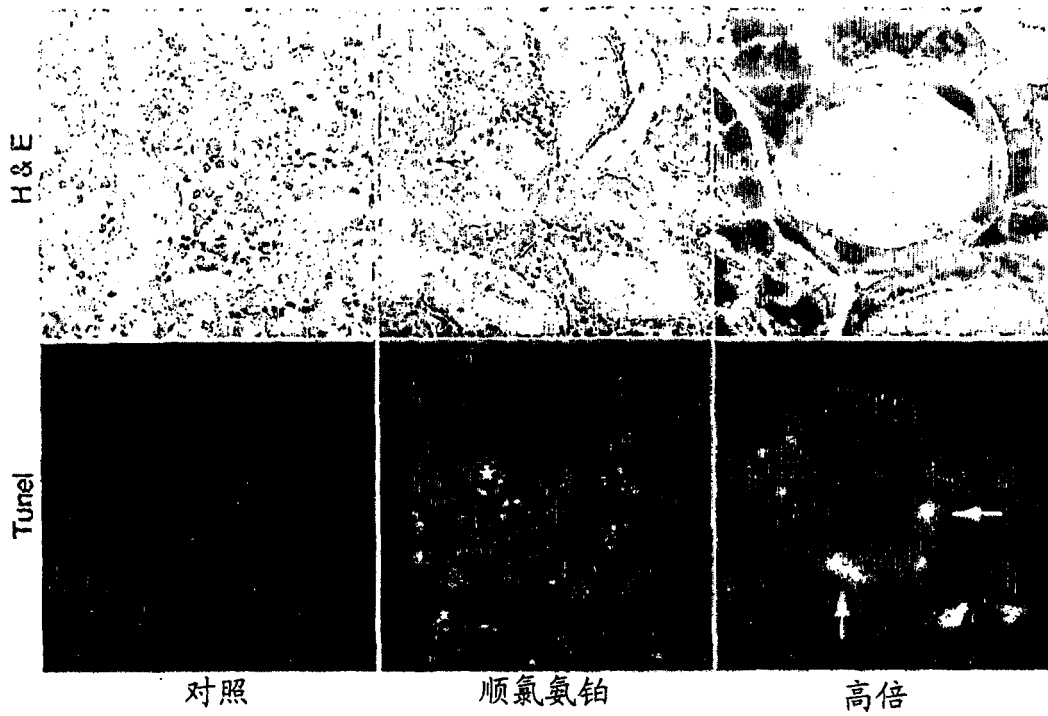


图 9

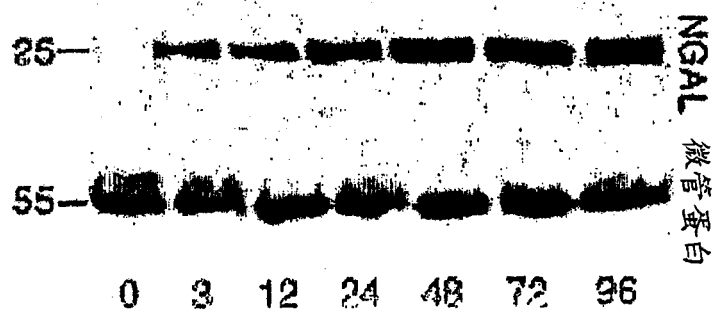


图 10

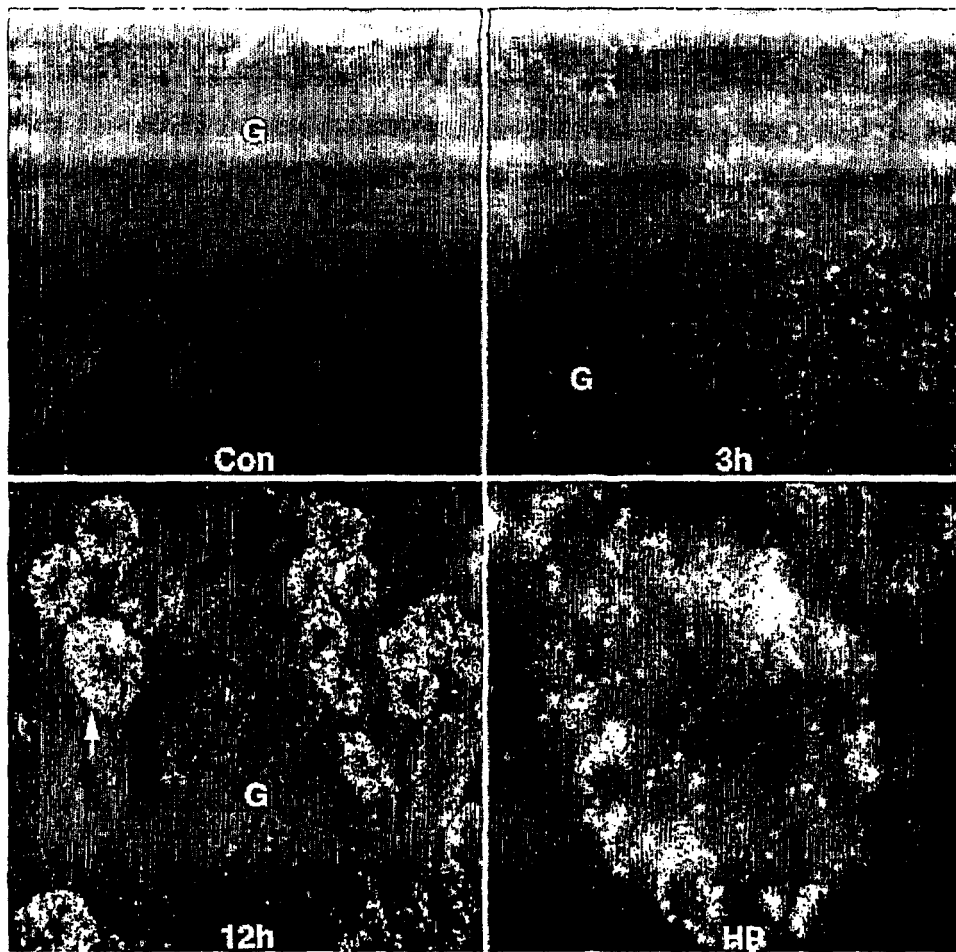


图 11

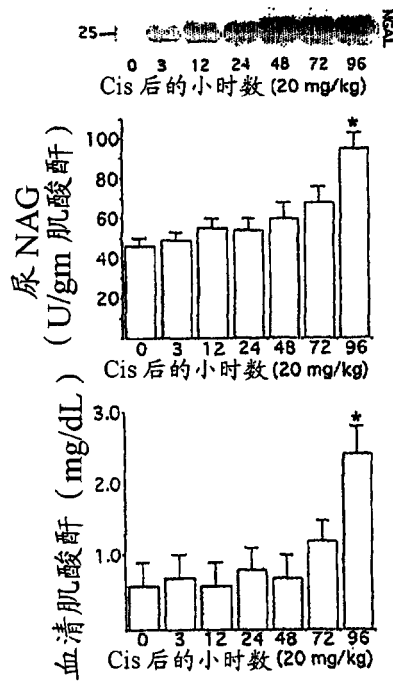


图 12

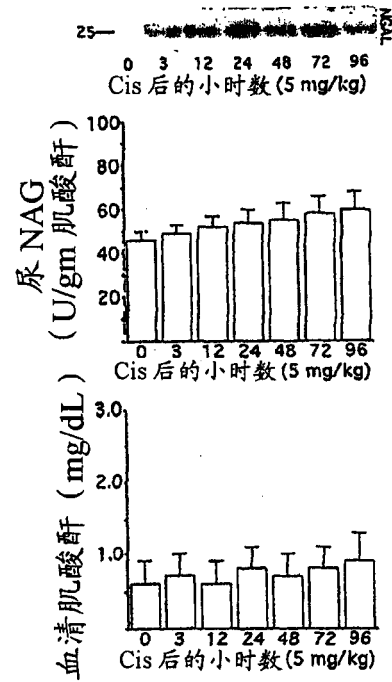


图 13

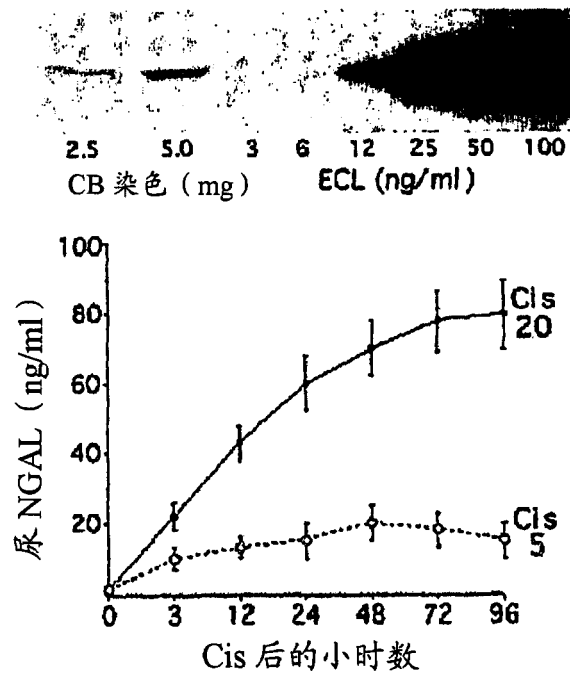


图 14

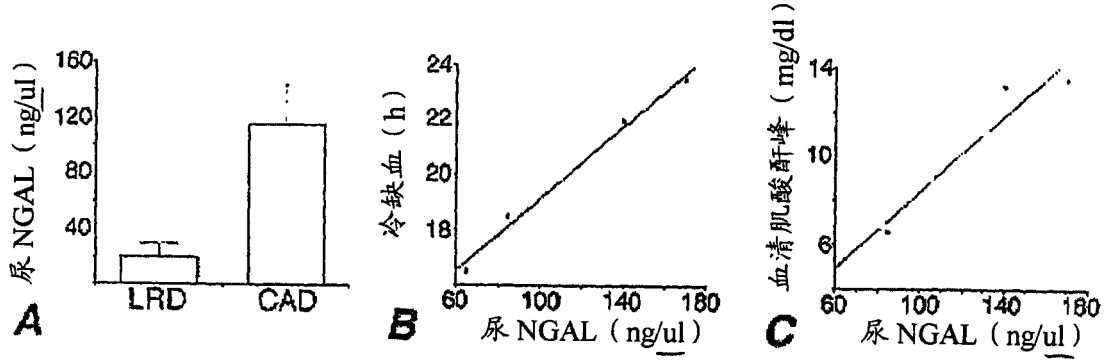


图 15

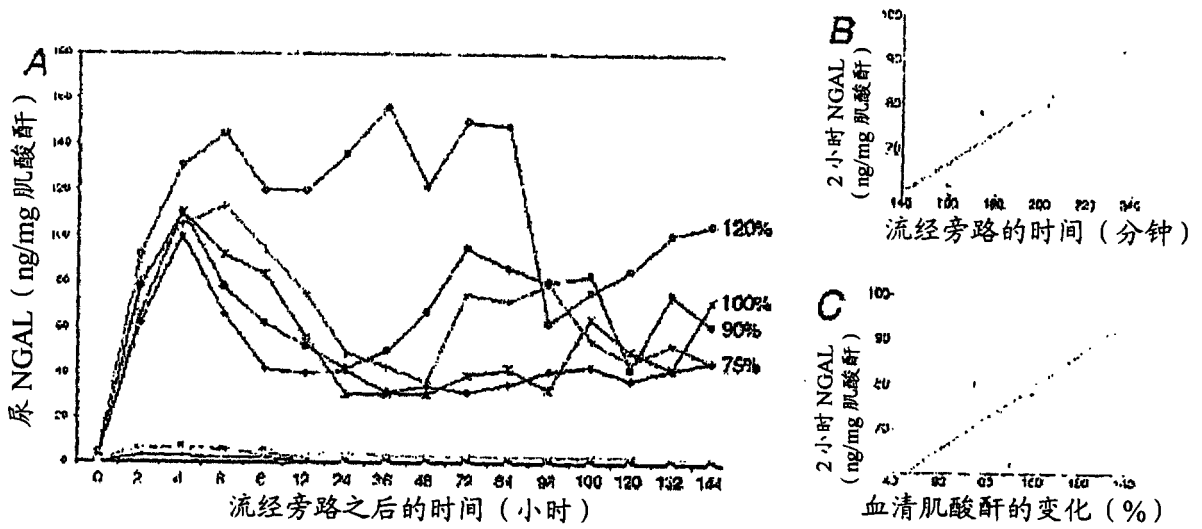


图 16

专利名称(译)	用于检测肾小管细胞损伤的早发的方法和试剂盒		
公开(公告)号	CN1791797A	公开(公告)日	2006-06-21
申请号	CN200480013336.6	申请日	2004-03-26
[标]申请(专利权)人(译)	儿童医院医疗中心		
申请(专利权)人(译)	儿童医院医疗中心		
当前申请(专利权)人(译)	CHILDRENS HOSP MEDICAL CENTER		
[标]发明人	普拉塞德德瓦拉简 乔纳森M巴拉施		
发明人	普拉塞德·德瓦拉简 乔纳森·M·巴拉施		
IPC分类号	G01N33/53		
优先权	60/458143 2003-03-27 US 60/481596 2003-11-04 US		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

用于检测肾小管细胞损伤的早发的方法和试剂盒，应用NGAL作为早期的尿生物标记物。NGAL是小的分泌的多肽，其为蛋白酶抗性的并因而在肾小管细胞损伤之后容易地在尿中检测到。主要在近端小管细胞中检测到NGAL蛋白表达，其类似于一种分泌蛋白在细胞质中以点状分布。尿中的表观NGAL与肾缺血和肾毒血症的量和持续时间有关，并为肾小管细胞损伤和肾衰竭的诊断特征。NGAL检测也是用于监测药物或其它治疗剂的肾毒性副作用的有用的标记物。

