中图分类号：R965；R978.1　　文献标志码：A　　文章编号：1006－4931(2025)11－0037－05
doi:10.3969/j.issn.1006－4931.2025.11.009

万古霉素肾毒性生物标志物的动物模型评价*

董文培[1]，程　霞[2]，宋华华[3]，陆嘉君[2]，于　平[2△]

（1. 复旦大学附属华东医院，上海　200040；　2. 上海交通大学医学院附属瑞金医院，上海　200025；　3. 上海交通大学医学院，上海　200025）

摘要：目的　探讨万古霉素肾毒性生物标志物在万古霉素相关急性肾损伤（VAKI）中的早期预测效果。**方法**　将 40 只大鼠随机分为空白对照组（A 组，不予任何药物）和万古霉素不同时间诱导组（B 组、C 组、D 组、E 组、F 组、G 组、H 组，分别连续腹腔注射 400 mg/kg 万古霉素 1，2，3，4，5，6，7 d，每日 1 次），各 5 只，注射后 24 h 取血清和肾组织样本。通过苏木精－伊红（HE）染色法观察大鼠肾组织病理形态变化；采用酶法检测大鼠肾组织和血清肌酐（SCr）水平，采用脲酶－谷氨酸脱氢酶法检测大鼠肾组织和血清尿素氮（BUN）水平；采用酶联免疫吸附试验法检测肾组织和血清中肾损伤分子 1（KIM－1）、中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白（NGAL）、白细胞介素 18（IL－18）、β_2－微球蛋白（β_2－MG）的水平。**结果**　与 A 组比较，B 组至 H 组大鼠肾组织肾间质水肿加重，肾小管细胞质空泡变化增加，细胞凋亡数量增加，且肾组织病理损伤程度随万古霉素使用时间的延长而加重，血清和肾组织中 KIM－1，NGAL，IL－18，β_2－MG 表达水平均显著升高（$P<0.05$）；C 组至 H 组大鼠的病理评分均显著升高（$P<0.05$），血清和肾组织中 SCr，BUN 表达水平均显著升高（$P<0.05$）。**结论**　联合检测血清和肾组织样本中生物标志物 KIM－1，NGAL，IL－18，β_2－MG 的水平可较早、准确地预测 VAKI。

关键词：万古霉素；肾毒性；急性肾损伤；生物标志物；早期预测；动物模型

Evaluation of Vancomycin Nephrotoxicity Biomarkers Based on Animal Models

DONG Wenpei[1]，*CHENG Xia*[2]，*SONG Huahua*[3]，*LU Jiajun*[2]，*YU Ping*[2]

(1. Huadong Hospital, Fudan University, Shanghai, China　200040;　2. Ruijin Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai, China　200025;　3. Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai, China　200025)

Abstract: Objective　To investigate the early predictive effect of vancomycin nephrotoxicity biomarkers in vancomycin－associated acute kidney injury (VAKI). **Methods**　A total of 40 rats were randomly divided into the blank control group (group A, without any drugs) and the vancomycin－induced groups at different times (groups B, C, D, E, F, G, and H, respectively, injected

*基金项目：国家自然科学基金[82204349]；吴阶平医学基金会临床科研专项资助基金课题[320.6750.2022－20－1]；白求恩公益基金会“耀动神州－药学科研能力建设基金”项目[Z04JKM2023E040]；华东医院国自然培育项目[GZRPY006Y]。

第一作者：董文培，男，博士研究生，主治医师，研究方向为普外科学，（电子信箱）441071407@qq.com。

△通信作者：于平，女，博士研究生，主管药师，研究方向为呼吸药理学，（电子信箱）zjypwz@163.com。

1131－1139.

[14] TIAN Y, LIU BB, LI YC, et al. Activation of RARα receptor attenuates neuroinflammation after SAH via promoting M1－to－M2 phenotypic polarization of microglia and regulating Mafb/Msr1/PI3K－Akt/NF－κB pathway[J]. Front Immunol, 2022, 13: 839796.

[15] PALRASU M, ZAIKA E, EL－RIFAI W, et al. Bacterial cagA protein compromise－s tumor suppressor mechanisms in gastric epithelial cells[J]. J Clin Invest, 2020, 130(5): 2422－2434.

[16] XIE Y, LIU L. Analysis of correlation between HP infection and activation of PI3K/Akt pathway in mucosal tissues of gastric cancer and precancerous lesions[J]. Oncol Lett, 2018, 16(5): 5615－5620.

[17] TONG YL, WANG RL, LIU X, et al. Zuojin Pill ameliorates chronic atrophic gastritis induced by MNNG through TGF－β_1/PI3K/Akt axis[J]. J Ethnopharmacol, 2021, 271: 113893.

[18] TONG YL, LIU LP, WANG RL, et al. Berberine attenuates chronic atrophic gastritis induced by mnng and its potential mechanism[J]. Front Pharmacol, 2021, 12: 644638.

[19] 李学永，康维娜，温进平. 白芍总苷对慢性萎缩性胃炎大鼠胃黏膜的保护作用及机制[J]. 现代中西医结合杂志，2023，32(12)：1638－1740.

[20] 喻春红，卢霞泱，李玲玲，等. 槲皮素介导 IRF8/IFN－γ 改善 Hp 感染诱导慢性萎缩性胃炎的机制研究[J]. 中华医院感染学杂志，2022，32(20)：3073－3077.

[21] WU Q, GAI SK, ZHANG HJ. Asperulosidic acid, a bioactive iridoid, alleviates placental oxidative stress and inflammatory responses in gestational diabetes mellitus by suppressing NF－κB and MAPK signaling pathways[J]. Pharmacology, 2022, 107(3/4): 197－205.

[22] 郭春秀，罗桂香，谭达全. 半夏泻心汤有效组分甘草酸对幽门螺杆菌相关性胃炎胃黏膜保护作用和对 TNF－α 影响的研究[J]. 新中医，2013，45(1)：144－146.

（收稿日期：2024－03－15；修回日期：2024－11－24）

intraperitoneally with 400 mg / kg of vancomycin for 1, 2, 3, 4, 5, 6, and 7 d, once a day), with five rats in each group. The serum and kidney tissue samples were taken 24 h after injection. Hematoxylin - eosin (HE) staining was used to observe the pathological changes of rats' renal tissue. Enzyme assay was used to detect the creatinine (SCr) levels in renal tissue and serum. Urease - glutamate dehydrogenase method was used to detect the urea nitrogen (BUN) levels in renal tissue and serum. Enzyme - linked immunosorbent assay (ELISA) was used to detect the levels of kidney injury molecule 1 (KIM - 1), neutrophil gelatinase - associated lipocalin (NGAL), interleukin - 18 (IL - 18), and β_2 - microglobulin (β_2 - MG) in renal tissue and serum. **Results** Compared with those in group A, the renal interstitial edema worsened, cytoplasmic vacuolar changes, the cytoplasmic vacuolar changes in renal tubules increased, the number of apoptotic cells increased, and the degree of pathological damage to renal tissue worsened with the prolonged use of vancomycin in groups B - H; the expression levels of KIM - 1, NGAL, IL - 18, and β_2 - MG in serum and renal tissue significantly increased in groups B - H ($P < 0.05$); the pathological scores significantly increased in groups C - H ($P < 0.05$), and the expression levels of SCr and BUN in serum and renal tissue significantly increased in groups C - H ($P < 0.05$). **Conclusion** The combined detection of biomarkers KIM - 1, NGAL, IL - 18, and β_2 - MG levels in serum and kidney tissue samples can predict VAKI early and accurately.

Key words: vancomycin; nephrotoxicity; acute kidney injury; biomarkers; early prediction; animal model

急性肾损伤(AKI)累及2%～7%的住院患者和13%～78%的危重患者,是导致患者发病率和死亡率升高的主要原因[1]。住院患者发生AKI多与药物暴露相关,其中抗菌药物是AKI发生的关键诱因[2-3]。万古霉素是一种高度亲水性的糖肽类抗菌药物,是治疗耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA)和耐甲氧西林表皮葡萄球菌感染的金标准[4]。万古霉素的使用与肾功能损伤密切相关[5-6],万古霉素相关AKI(VAKI)的发生率(5%～43%[7])与万古霉素剂量的增加和谷浓度升高相关[8-9]。但多数报告的病例中,AKI的感染也与其他危险因素相关,故实验室检查结果和临床判断对VAKI的明确诊断至关重要,必要时需进行肾活检。临床经万古霉素治疗的AKI患者中仅59%被诊断为VAKI[10],且多数研究是观察性的,很难评估VAKI的真实发病率。由于混杂因素而存在偏倚,如疾病严重程度、入住重症监护病房和同时接受其他肾毒素治疗均可能影响万古霉素的暴露-反应关系[11]。动物系统非常适合定义暴露-反应关系,不仅提供了滴定给药组的灵活性,还最大限度地减少了外部协变量对观察结果的影响[11]。AKI的动物模型已证实,万古霉素剂量和治疗持续时间的增加与组织病理学损伤程度、AKI尿液生物标志物水平升高相关[11]。VAKI肾小管损伤的尿液生物标志物包括肾损伤分子-1(KIM-1)、中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白(NGAL)、β_2微球蛋白(β_2-MG)等[12]。但尿液生物标志物浓度取决于患者的水合状态或利尿剂的给药情况,可能受尿液浓度和尿流速率的影响,且易污染。而血清及肾组织生物标志物不易受细菌感染,故本研究中评估了血清和肾组织中的生物标志物KIM-1、NGAL、白细胞介素18(IL-18)、β_2-MG的水平,旨在确定用于诊断VAKI的候选检测生物标志物。现报道如下。

1 材料与方法

1.1 仪器、试药与动物

仪器:RM2016型病理切片机(上海徕卡仪器有限公司);Eclipse CI型正置显微镜(日本Nikon公司);Epoch型酶标仪(美国BioTek Instruments公司);KZ-Ⅲ-F型匀浆机(武汉赛维尔生物科技有限公司)。

试药:万古霉素(大连美伦生物公司,批号为J0110C,规格为每瓶25 g);苏木精-伊红(HE)染色试剂盒(批号为CR2407045),组织固定液(批号为GP2411304),血肌酐(SCr)检测试剂盒(批号为20230613),尿素氮(BUN)检测试剂盒(批号为20230525),KIM-1检测试剂盒(批号为L15016789),NGAL检测试剂盒(批号为L240110657),IL-18检测试剂盒(批号为L240115943),β_2-MG检测试剂盒(批号为L16016799),均购于武汉赛维尔生物科技有限公司。

动物:SPF级雄性SD大鼠40只,体质量200～250 g,由上海交通大学医学院实验动物中心提供,动物使用许可证号为SYXK(Hu)2018-0027。自由饮食,12 h/12 h明暗交替,环境温度22～24 ℃,相对湿度50%～60%,适应性喂养1周。

1.2 方法

建模、分组与给药:将40只大鼠随机分为空白对照组(A组,不予任何药物)和万古霉素不同时间诱导组(B组、C组、D组、E组、F组、G组、H组,分别连续腹腔注射400 mg/kg万古霉素1,2,3,4,5,6,7 d,每日1次),各5只。注射24 h后,腔静脉取血,处死大鼠,取出肾脏,将一侧肾冻存于液氮中,另一侧肾固定于组织固定液中。

HE染色法观察肾组织病理损伤:取组织固定液中的肾脏,石蜡包埋,切成4 μm薄片,清水冲洗,完全洗净固定液,置HE染色试剂盒中染色,清水冲洗,洗去多余

的 HE 染液，封片，在正置显微镜下观察肾组织病理变化。肾小管扩张计 0 分，无损伤；小管上皮脱落计 1 分，轻度损伤；管式空泡形成计 2 分，中度损伤；间质炎症、间质水肿计 3 分，重度损伤。每张切片 3 个视野，取平均值进行统计。

血和肾组织中生物标志物水平检测：取血，离心（转速为 1 000 r / min）10 min，取血清。取液氮中的肾脏，加适量生理盐水和研磨珠，置匀浆机振荡匀浆，用蛋白定量至相同质量浓度，采用酶法检测 SCr 水平，采用以脲酶 - 谷氨酸脱氢酶法（酶偶联反应法）检测 BUN 水平，检测仪器为全自动生化分析仪；采用酶联免疫吸附试验法检测 KIM - 1，NGAL，IL - 18，β_2 - MG 水平，检测仪器为酶标仪。各种生物标志物均严格按检测试剂盒说明书操作。

1.3 统计学处理

采用 GraphPad Prism 6.0 统计学软件分析。计量资料以 $\overline{X} \pm s$ 表示，多组间比较采用单因素方差分析（ANOVA），组间两两比较行 LSD - t 检验。$P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 肾组织病理损伤

病理染色图显示，随着万古霉素诱导肾组织损伤天数的增加，B 组至 H 组大鼠的肾组织病理损伤较 A 组不断加重，诱导 2 d 后可致明显的病理损伤，诱导 7 d 后可致广泛的肾组织损伤；肾组织肾间质水肿加重，炎性细胞浸润增加，肾小管变性、扩张、细胞质空泡变化增加，细胞凋亡坏死数量增加。详见图 1 A′。与 A 组比较，C 组至 H 组大鼠的病理评分均显著升高（$P < 0.05$）。详见图 1 B′。

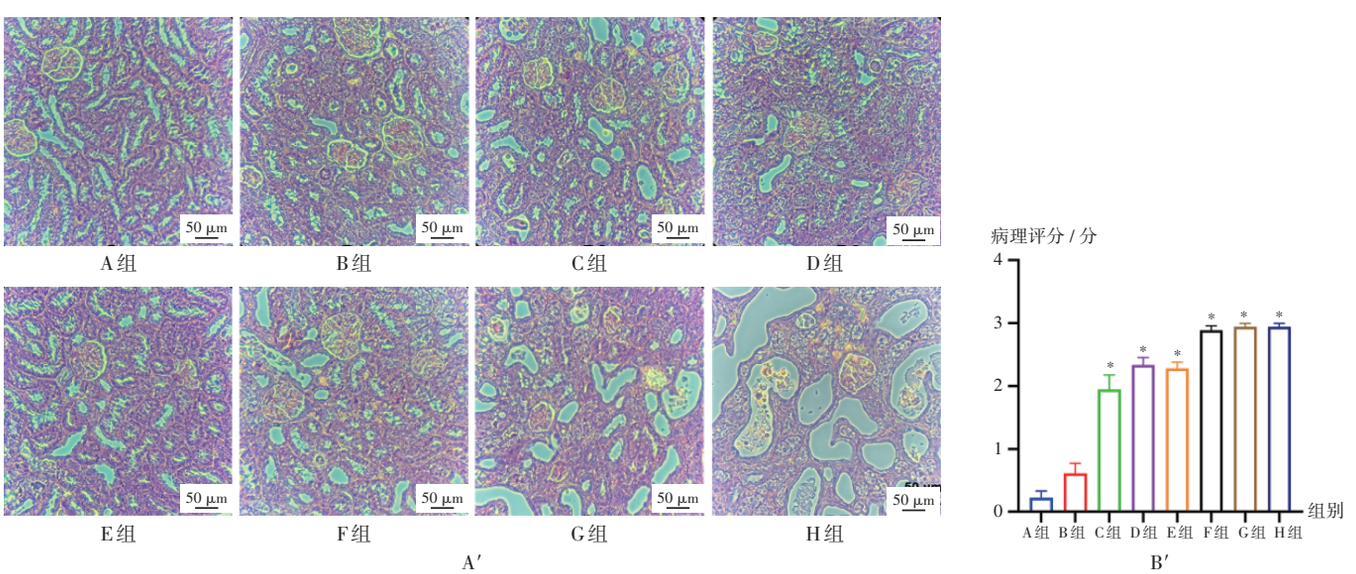
2.2 肾损伤相关生物标志物水平的影响

与 A 组比较，C 组至 H 组大鼠血清和肾组织的 SCr 和 BUN 表达水平均显著升高（$P < 0.05$），B 组至 H 组大鼠血清和肾组织的 KIM - 1，NGAL，IL - 18，β_2 - MG 表达水平均显著升高（$P < 0.05$）。详见图 2。

3 讨论

VAKI 是一种严重并发症，每年有超过 300 万例患者接受万古霉素治疗，有 5%～43% 的患者发生 VAKI[13]。VAKI 与剂量相关，尤其是在脓毒症患者中能导致高死亡率和发病率。VAKI 具有可逆性，故早期发现 VAKI 的生物标志物对预防肾功能损伤和改善预后至关重要。目前，肾脏疾病患者生存质量（KDIGO）急性肾损伤临床实践指南推荐使用 SCr 作为生物标志物，BUN 一直是肾功能不全的传统标志物，但 SCr 升高是肾小球滤过减少的下游效应，不是肾小管损伤本身的早期指标[13-14]，且 SCr 和 BUN 可能会受到许多肾功能以外的肾脏因素及一些非肾脏因素的影响[15-17]。故需寻找药物肾脏毒性更好的早期标志物。

KIM - 1 是一种Ⅰ型细胞膜糖蛋白，被认为是肾损伤的理想生物标志物。KIM - 1 在正常肾脏中不存在，但肾功能损伤后其表达显著上调，在肾上皮小管细胞中持续存在[18]。前期研究已证实，KIM - 1 水平在万古霉素诱导的肾功能损伤中显著升高[19]。本研究结果显示，KIM - 1 在万古霉素诱导 24 h 即可出现显著升高的



A′ B′

A′. HE 染色病理图（ × 200） B′. 病理评分定量统计图（$\overline{X} \pm s$）

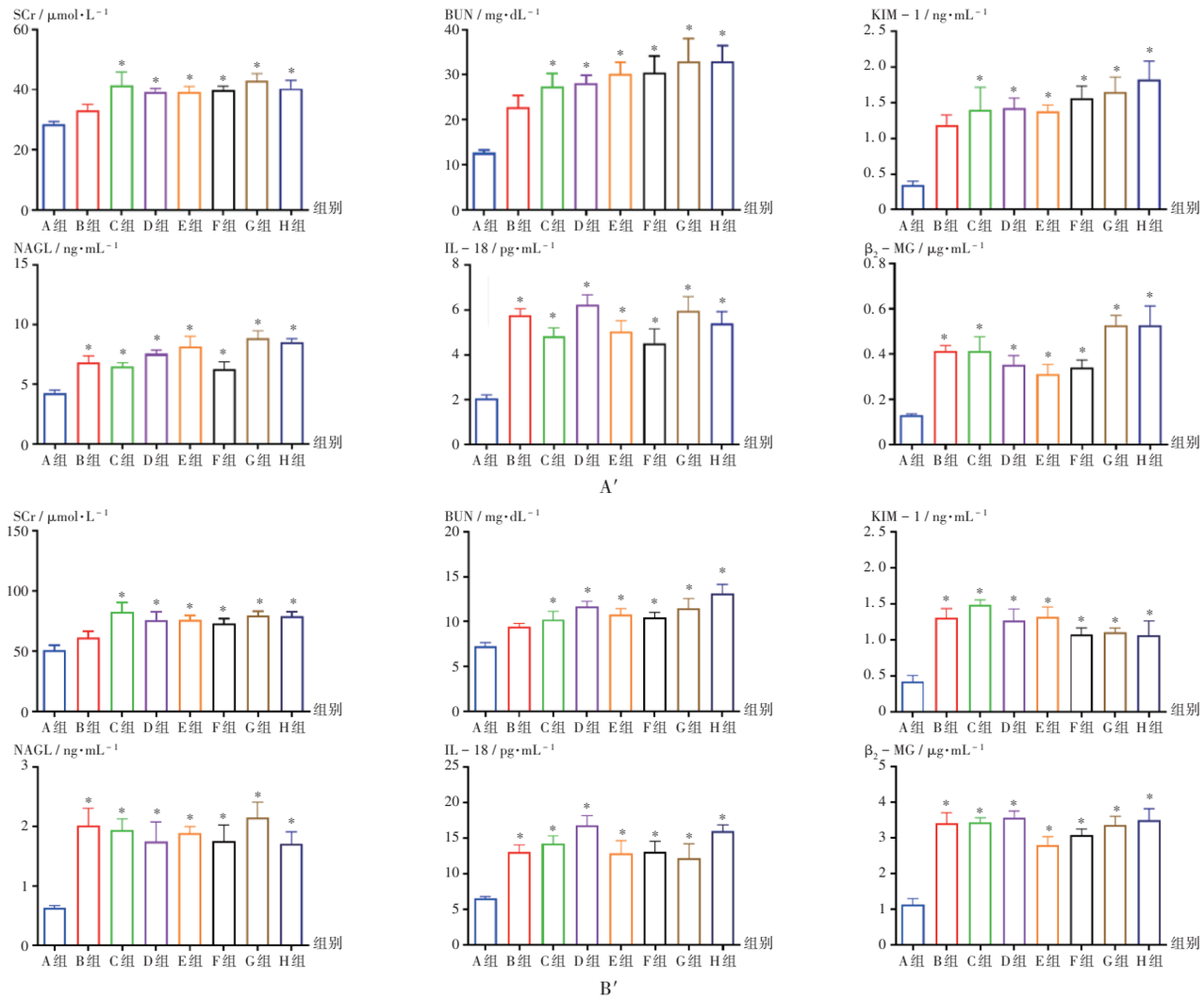
注：与 A 组比较，*$P < 0.05$。图 2 同。

图 1 各组大鼠肾组织病理损伤比较（$n = 5$）

A′. HE staining pathological image （ × 200） B′. Quantitative statistical chart of pathological score （$\overline{X} \pm s$）

Note: Compared with those in group A, *$P < 0.05$ (for Fig. 1 - 2).

Fig. 1 Comparison of pathological damage of rats' renal tissue in each group ($n = 5$)



A′. 血清 B′. 肾组织

图2 各组大鼠血清、肾组织中SCr，BUN，KIM－1，NGAL，IL－18，β_2－MG表达水平比较（$\bar{X} \pm s$，$n = 5$）

A′. Serum B′. Renal tissue

Fig. 2 Comparison of expression levels of SCr, BUN, KIM－1, NGAL, IL－18, and β_2－MG in rats′ serum and renal tissue in each group ($\bar{X} \pm s$, $n = 5$)

敏感水平。NGAL由中性粒细胞和近端肾小管上皮细胞产生，是AKI的可靠诊断和预后生物标志物，其水平在血清和尿液中升高得更早，在肾毒性药物引起的AKI中变化比SCr更敏感[20]。以往的研究显示，NGAL是AKI的敏感和特异性标志物[19]。IL－18是AKI的重要介质，作为炎性反应的一种重要分子，肾功能损伤后其在肾组织中的水平显著升高，且比SCr更早地被检测到[14]，其预测AKI尤其是AKI患儿具有很高的敏感性和特异性[21]。β_2－MG是主要组织相容性Ⅰ类分子的轻链组分，正常情况下在细胞周转过程中合成并脱落，与重链解离进入循环，被肾小球过滤，并被肾近端肾小管吸收代谢。当肾小球滤过率（GFR）正常或仅略有降低时，β_2－MG尿排泄的增加可能是肾小管损伤的重要特异性指标。β_2－MG已被证明是肾小管损伤的敏感生物标志物[22]，其缺点是在酸性尿液中不稳定。因此，本研究中检测血和肾组织中β_2－MG的含量，在一定程度上可作为VAKI的生物标志物。本研究结果显示，与A组比较，B组至H组大鼠肾组织肾间质水肿加重，肾小管细胞质空泡变化增加，细胞凋亡数量增加，且肾组织病理损伤程度随万古霉素使用时间的延长而加重，血清和肾组织中KIM－1，NGAL，IL－18，β_2－MG表达水平均显著升高（$P<0.05$）；C组至H组大鼠的病理评分显著升高（$P<0.05$），血清和肾组织中SCr和BUN表达水平均显著升高（$P<0.05$）。

但本研究尚有一些不足：1）研究仅基于动物模型展开，虽然VAKI模型已在多项研究中被证实可模拟临床万古霉素的药物性肾功能损伤状态，但动物与人体间的生理差异尚不清楚。2）本研究倾向于寻找和筛选

早期预测万古霉素肾功能损伤的指标，模型取材为万古霉素注射后 1～7 d 检测，万古霉素用药组间各指标并未出现明显差异。而在病理性损伤出现前，这些标志物已开始差异性表达，故在 24 h 或 48 h 内更早期的检测非常必要，将在今后的实验中进行优化。3）VAKI 是 AKI 的一种，与其他类型的 AKI 存在不同，这些生物标志物的意义值得更多的研究探索。4）肾小管损伤的生物标志物有很多，其他具有潜在价值的分子如 α 谷胱甘肽 S－转移酶（αGST）、三叶因子 3（TFF－3）等尚未进行检测和研究，后续研究中应进一步探索。

综上所述，KIM－1，NGAL，IL－18，β_2－MG 是 VAKI 的潜在生物标志物，但仍需开展更大规模、前瞻性、多中心的临床研究来验证这一研究结果，且需进行早期研究连续定量以确定这些生物标志物是否能检测到肾损伤，以便预防 VAKI。

参考文献

[1] KAN WC, CHEN YC, WU VC, et al. Vancomycin－Associated Acute Kidney Injury: A Narrative Review from Pathophysiology to Clinical Application[J]. Int J Mol Sci, 2022, 23: 2052.

[2] PETEJOVA N, MARTINEK A, ZADRAZIL J, et al. Acute kidney injury in septic patients treated by selected nephrotoxic antibiotic agents－pathophysiology and biomarkers－a review[J]. Int J Mol Sci, 2020, 21: 7115.

[3] MORALES－ALVAREZ MC. Nephrotoxicity of antimicrobials and antibiotics[J]. Adv Chronic Kidney Dis, 2020, 27:31－37.

[4] 徐红艳，马　菲，邓琴香，等. 万古霉素相关急性肾损伤及肾功能未恢复危险因素分析[J]. 中国药业，2024，33(4)：114－118.

[5] MITEVSKA E, WONG B, SUREWAARD BGJ, et al. The prevalence, risk, and management of methicillin－resistant staphylococcus aureus infection in diverse populations across Canada: A systematic review[J]. Pathogens, 2021, 10: 393.

[6] DIALLO OO, BARON SA, ABAT C, et al. Antibiotic resistance surveillance systems: A review[J]. J Glob Antimicrob Resist, 2020, 23:430－438.

[7] PAIS GM, AVEDISSIAN SN, O'DONNELL JN, et al. Comparative Performance of Urinary Biomarkers for Vancomycin－Induced Kidney Injury According to Timeline of Injury[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2019, 63(7): e00079－19.

[8] 张慧芳，王瑞兰，舒　文，等. 成人患者万古霉素血药浓度监测及有效性和安全性评估[J]. 中华危重病急救医学，2018，30(6)：538－543.

[9] CHUNG E, SETO W. Association between vancomycin therapeutic drug monitoring and clinical outcomes in treating neonatal sepsis[J]. Int J Antimicrob Agents, 2023, 62(4): 106958.

[10] SINHA RAYA, HAIKAL A, HAMMOUD KA, et al. Vancomycin and the risk of AKI: A systematic review and meta－analysis[J]. Clin J Am Soc Nephrol, 2016, 11: 2132－2140.

[11] RHODES NJ, PROZIALECK WC, LODISE TP, et al. Evaluation of Vancomycin Exposures Associated with Elevations in Novel Urinary Biomarkers of Acute Kidney Injury in Vancomycin－Treated Rats[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2016, 60(10): 5742－5751.

[12] KIM SM, LEE HS, KIM MJ, et al. Diagnostic Value of Multiple Serum Biomarkers for Vancomycin－Induced Kidney Injury[J]. J Clin Med, 2021, 10(21): 5005.

[13] ALBERT C, HAASE M, ALBERT A, et al. Biomarker－Guided Risk Assessment for Acute Kidney Injury: Time for Clinical Implementation[J]. Ann Lab Med, 2021, 41: 1－15.

[14] RYBAK MJ, LE J, LODISE TP, et al. Therapeutic monitoring of vancomycin for serious methicillin－resistant *Staphylococcus aureus* infections: A revised consensus guideline and review by the American Society of Health－System Pharmacists, the Infectious Diseases Society of America, the Pediatric Infectious Diseases Society, and the Society of Infectious Diseases Pharmacists[J]. Am J Health Syst Pharm, 2020, 77: 835－864.

[15] CHANG J, LIU J, KAYE KS, et al. Vancomycin Duration of Therapy Can Inform the Need for Area Under the Curve Monitoring[J]. Clin Infect Dis, 2021, 73: e1235－e1236.

[16] 钱香川，韩碧翠，张　福. 利妥昔单抗联合他克莫司治疗青少年肾病综合征伴肾功能损伤临床研究[J]. 中国药业，2021，30(23)：86－89.

[17] CHANG J, PAIS GM, VALDEZ K, et al. Glomerular Function and Urinary Biomarker Changes between Vancomycin and Vancomycin plus Piperacillin－Tazobactam in a Translational Rat Model[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2022, 66: e0213221.

[18] 杨志栋. NAG，KIM－1，NGAL 在创伤后急性肾损伤中的诊断价值[J]. 中国卫生检验杂志，2013，23(8)：1895－1897.

[19] YU P, LUO J, SONG H, et al. *N*－acetylcysteine Ameliorates Vancomycin－induced Nephrotoxicity by Inhibiting Oxidative Stress and Apoptosis in the *in vivo* and *in vitro* Models[J]. Int J Med Sci, 2022, 19(4): 740－752.

[20] ANDREUCCI M, FAGA T, PISANI A, et al. The ischemic/nephrotoxic acute kidney injury and the use of renal biomarkers in clinical practice[J]. Eur J Intern Med, 2017, 39: 1－8.

[21] QIN Z, LI H, JIAO P, et al. The value of urinary interleukin－18 in predicting acute kidney injury: a systematic review and meta－analysis[J]. Ren Fail, 2022, 44(1): 1717－1731.

[22] 魏守德，张象贤，丁国兴. 测定尿 β_2－微球蛋白观察庆大霉素的肾毒性作用[J]. 上海医科大学学报，1988，15(4)：285－288.

（收稿日期：2024－04－05；修回日期：2024－12－19）