



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 104641237 B

(45)授权公告日 2017.04.05

(21)申请号 201380048888.X

(22)申请日 2013.07.22

(65)同一申请的已公布的文献号  
申请公布号 CN 104641237 A

(43)申请公布日 2015.05.20

(30)优先权数据  
61/674,018 2012.07.20 US  
61/675,680 2012.07.25 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日  
2015.03.19

(86)PCT国际申请的申请数据  
PCT/IB2013/001944 2013.07.22

(87)PCT国际申请的公布数据  
W02014/013334 EN 2014.01.23

(73)专利权人 新加坡科技研究局  
地址 新加坡

(72)发明人 D·津克 李尧

(74)专利代理机构 上海专利商标事务所有限公  
司 31100

代理人 杨昀 沈端

(51)Int.Cl.

G01N 33/68(2006.01)

G12Q 1/68(2006.01)

G01N 33/533(2006.01)

(56)对比文件

US 2002/0045579 A1,2002.04.18,全文.

WO 2008/101231 A2,2008.08.21,全文.

CN 102245207 A,2011.11.16,全文.

US 2012/0179381 A1,2012.07.12,全文.

CN 102292106 A,2011.12.21,全文.

Astashkina AI et al.A 3-D organoid kidney culture model engineered for high-throughput nephrotoxicity assays.《Biomaterials》.2012,第33卷(第18期),4700-4711.

审查员 陈伟潘

权利要求书2页 说明书19页

序列表8页 附图37页

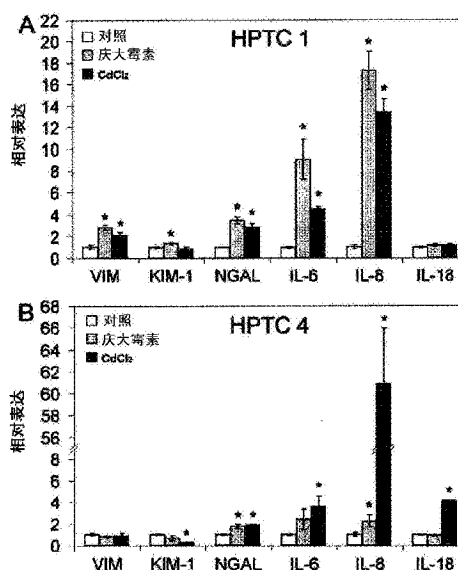
(54)发明名称

预测肾近曲小管细胞毒性的体外试验

(57)摘要

提供一种用于筛选测试化合物的肾近曲小管细胞毒性的体外试验。所述方法包括,使测试化合物与肾近曲小管细胞的测试群接触;和,测定所述测试群中白介素的表达水平,所述白介素是白介素-6(IL-6)或白介素-8(IL-8)或上述两者。若所述测试群中白介素的表达水平大于未与测试化合物接触的肾近曲小管细胞的对照群中的表达水平,则指示所述测试化合物对肾近曲小管细胞具有毒性。

CN 104641237 B



1. 一种用于筛选化合物的肾近曲小管细胞毒性的体外方法,所述方法包括:  
使测试化合物与肾近曲小管细胞的测试群接触,所述测试群是融合2D培养物;和  
检测所述测试群中白介素的表达水平,所述白介素是白介素-6 (IL-6);  
其中,若所述测试群中IL-6的表达水平大于未与所述测试化合物接触的肾近曲小管细胞的对照群中的表达水平,则指示所述测试化合物对肾近曲小管细胞具有毒性。
2. 一种用于筛选化合物的肾近曲小管细胞毒性的体外方法,所述方法包括:  
使测试化合物与肾近曲小管细胞的测试群接触;和  
检测所述测试群中白介素的表达水平,所述白介素是白介素-8 (IL-8);  
其中,若所述测试群中IL-8的表达水平大于未与所述测试化合物接触的肾近曲小管细胞的对照群中的表达水平,则指示所述测试化合物对肾近曲小管细胞具有毒性。
3. 如权利要求2所述的方法,其特征在于,所述方法还包括:  
检测所述测试群中白介素-6 (IL-6) 的表达水平;  
其中,若所述测试群中IL-6的表达水平大于未与所述测试化合物接触的肾近曲小管细胞的对照群中的表达水平,则指示所述测试化合物对肾近曲小管细胞具有毒性。
4. 如权利要求2所述的方法,其特征在于,所述肾近曲小管细胞的测试群是类器官培养物、融合2D培养物、体外小管、3D类器官培养物或在静态或微流条件下培养的3D培养物。
5. 如权利要求3所述的方法,其特征在于,所述肾近曲小管细胞的测试群是类器官培养物、融合2D培养物、体外小管、3D类器官培养物或在静态或微流条件下培养的3D培养物。
6. 如权利要求1、4和5中任一项所述的方法,其中,所述融合2D培养物是融合单层、亚融合单层或融合上皮。
7. 如权利要求1~5中任一项所述的方法,其特征在于,对于所述白介素的表达水平的所述检测包括检测编码所述白介素的mRNA的水平。
8. 如权利要求7所述的方法,其特征在于,所述检测包括定量PCR技术、northern印迹技术、微阵列技术、TRAC技术、荧光标记物技术和磷光体成像技术中的一种或多种。
9. 如权利要求1~5中任一项所述的方法,其特征在于,对于所述白介素的表达水平的所述检测包括检测分泌的白介素蛋白的水平。
10. 如权利要求9所述的方法,其特征在于,所述检测包括ELISA技术、生物传感器技术、电化学检测技术、免疫印迹技术、流式微珠阵列技术、荧光标记物技术和报告子结合技术中的一种或多种。
11. 如权利要求1~5中任一项所述的方法,其特征在于,对于所述白介素的表达水平的所述检测包括检测在IL-6或IL-8调节控制下表达的报告基因的水平。
12. 如权利要求1~5中任一项所述的方法,其特征在于,若所述测试群中所述白介素的表达水平与所述对照群中所述白介素的表达水平的比是1.5或更高,则指示所述测试化合物对肾近曲小管细胞具有毒性。
13. 如权利要求1~5中任一项所述的方法,其特征在于,若所述测试群中所述白介素的表达水平与所述对照群中所述白介素的表达水平的比是3.5或更高,则指示所述测试化合物对肾近曲小管细胞具有毒性。
14. 如权利要求1~5中任一项所述的方法,其特征在于,所述肾近曲小管细胞源自体细胞或干细胞。

15. 如权利要求14所述的方法,其特征在于,所述肾近曲小管细胞源自体细胞,并且是原生细胞或是来自稳定细胞系的细胞。

16. 如权利要求15所述的方法,其特征在于,所述肾近曲小管细胞是人原生肾近曲小管细胞、HK-2细胞,或LLC-PK1细胞。

17. 如权利要求14所述的方法,其特征在于,所述肾近曲小管细胞源自干细胞,并且从胚胎干细胞、间充质干细胞或诱导性多能干细胞分化而来。

18. 如权利要求1~5中任一项所述的方法,其特征在于,所述近曲小管细胞是人肾近曲小管细胞。

19. 如权利要求1~5中任一项所述的方法,其特征在于,所述近曲小管细胞是非人近曲小管细胞。

20. 如权利要求1~5中任一项所述的方法,其特征在于,所述接触进行8小时或更久的一段时间。

21. 如权利要求1~5中任一项所述的方法,其特征在于,所述接触在3~14天期间内重复一次或多次。

22. 如权利要求1~5中任一项所述的方法,其特征在于,所述接触包括向所述肾近曲小管细胞的测试群添加浓度为0.001~1000 $\mu\text{g}/\text{mI}$ 的所述测试化合物。

## 预测肾近曲小管细胞毒性的体外试验

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2012年7月20日提交的美国临时申请第61/674,018号,以及2012年7月25提交的美国临时申请第61/675,680号的优先权和权益,其内容通过引用纳入本文。

### 技术领域

[0003] 本发明涉及用于预测化合物对于肾近曲小管细胞的毒性(包括预测体内毒性)的体外试验方法。

### 背景技术

[0004] 肾是药物诱导毒性的主要靶器官之一。肾毒性药物和化学品会诱导急性肾损伤(AKI)或慢性肾病,随后发展成晚期肾病(ESRD)(1-3)。AKI和ESRD患者具有上升患病率和死亡率,并且依赖于透析(1,4,5)。所有住院患者中有约5%而ICU患者中有约20%-30%发展成AKI,并且这些病例中有约20%-25%归因于肾毒性药物(2-4)。当替代性药物和新药投入使用,其肾毒性可能性通常被低估(6),这再次导致临床并发症,如COX2抑制剂的情况(7)。

[0005] 通常而言,仅在药物开发的晚期才检测肾毒性,并且导致临床前研究期间药物缩减中的2%和3期中的19%(8)。并且,由于肾的大功能储备,肾毒性效应常常仅在监管方面批准之后变得明显。一个近期示例是替诺福韦,其损伤肾近曲小管(9,10)。并且,上述问题还与加入临床试验的患者和对象的风险升高,以及保健系统和制药业的基础成本相关联。

[0006] 一个主要问题是缺乏具有高度可预测性的临床前模型。动物模型的可预测性受种间差异性的影响,并且还存在着其它问题,例如高成本和低通量。此外,欧盟(EU)的法制变化(REACH和化妆品指令的第七次修正)以及美国的新法案(ToxCast和Tox21)提高了对体外模型的兴趣。经监管批准或验证的预测人类肾毒性的体外模型目前尚不可用。主要困难在于对合适细胞类型和终点的鉴定(11-13)。

[0007] 在肾中,肾近曲小管(PT)细胞是药物诱导的毒性的主要目标,这归因于其在药物及有机化合物运输和肾小球过滤物浓缩中的作用(2,3)。PT源性的细胞系,例如人和猪细胞系HK-2(人肾-2)和LLC-PK1(Lewis肺癌-猪肾1),已在体外肾毒理学中频繁应用。然而,永生细胞的敏感性低于人原生肾近曲小管细胞(HPTC)(14)并且对熟知的肾毒性物质不敏感(13),这归因于与永生化相关联的功能变化和药物转运体表达变化(15-17)。此外,与一般细胞毒性相关联的终点,例如细胞死亡、代谢活性或ATP损耗,均不能用于器官特异性毒性的研究。检测用肝毒性、肾毒性和心脏毒性化合物处理肝脏、肾PT和心脏源性细胞系的ATP损耗的近期研究发现,大多数化合物对所有三种细胞系具有相似作用(18)。

[0008] 管控替代性方法的审核与批准的欧洲和美国监管机构(欧洲动物实验替代方法验证中心(ECVAM)和毒理学替代评估国家跨部门毒理学规划评价中心/替代方法验证跨部门协调委员会(NICEATM/ICCVAM))目前尚未对体外肾毒理学的验证方法采取任何措施。ECVAM已经对一项采用15种药物的验证前研究给予了基金支持(19)。已采用有限数量的药物测试

了在此后的过去10年间开发的用于体外肾毒理学的其它模型(20-24),但其可预测性不明。近期开发的高通量线粒体肾毒性物质试验基于兔细胞(25);非人类的动物模型的应用可能会引发关于种间差异性的问题。在采用新鲜分离自鼠肾的PT的模型中也是相同情况(23, 24)。

### 发明内容

[0009] 本发明的方法涉及用于预测化合物的肾近曲小管毒性的体外试验,且所述体外试验可包括预测体内毒性。所述方法利用肾近曲小管细胞中的IL-6和/或IL-8的表达水平来评估测试化合物的毒性。

[0010] 所述体外试验可采用人细胞进行,因此可提供用于预测对于人体中肾近曲小管的毒性的模型。

[0011] 在一些情况中,所述模型的可预测性可以相当高,例如,约76%-85%。

[0012] 当作为人类疾病的模型使用时,所述方法可允许预测药物开发过程中的早期临床前阶段的肾近曲小管毒性。所述预测能力对于开发较安全的药物而言具有重要性,并且对于肾毒性的早期预测可协助在药物开发过程中节约大量成本。

[0013] 在一个方面,本发明提供用于筛选化合物的肾近曲小管毒性的体外方法。所述方法包括,使测试化合物与肾近曲小管细胞的测试群接触;和,测定所述测试群中白介素的表达水平,所述白介素是白介素-6(IL-6)或白介素-8(IL-8)或上述两者。若所述测试群中白介素的表达水平大于未与所述测试化合物接触的肾近曲小管细胞的对照群中的表达水平,则指示所述测试化合物对肾近曲小管细胞具有毒性。

[0014] 对于白介素表达水平的测定可包括:测定编码白介素的mRNA的水平,并且可包括定量PCR技术、northern印迹技术、微阵列技术、TRAC技术、荧光标记物技术和磷光体成像(phosphorimaging)技术中的一种或多种。

[0015] 对于白介素表达水平的测定可包括:测定分泌的白介素蛋白的水平,并且可包括ELISA技术、生物传感器技术、电化学检测技术、免疫印迹技术、流式微珠阵列技术、荧光标记物技术和受体结合技术中的一种或多种。

[0016] 对于白介素的表达水平的测定可包括检测在IL-6或IL-8调节控制下表达的报告基因的水平。

[0017] 若测试群中白介素的表达水平与对照群中白介素的表达水平的比率是约1.5或更高,或约3.5或更高,则指示所述测试化合物对肾近曲小管细胞具有毒性。

[0018] 所述肾近曲小管细胞可源自体细胞或源自干细胞。在一些实施方式中,所述肾近曲小管细胞源自体细胞或可以是原生细胞或来自稳定细胞系的细胞,包括例如人原生肾近曲小管细胞、HK-2细胞或LLC-PK1细胞。

[0019] 肾近曲小管细胞可源自干细胞,并且可以从胚胎干细胞、间充质干细胞或诱导性多能干细胞分化而来。

[0020] 在一些实施方式中,所述近曲小管细胞是人肾近曲小管细胞。在一些实施方式中,所述近曲小管细胞是非人肾近曲小管细胞。

[0021] 所述接触可进行约8小时或更久的时间。所述接触可以是在约3~约14天的一段时间内重复一次或多次。

[0022] 所述接触可包括向所述肾近曲小管细胞测试群添加浓度为约0.001~约1000 $\mu\text{g}/\text{mI}$ 的测试化合物。

[0023] 所述测试群可以是融合单层、亚融合单层、融合上皮、类器官培养物、融合2D培养物、体外小管、3D类器官培养物或在静态或微流条件下培养的3D培养物。

[0024] 本领域技术人员根据本发明下面的具体实施方式的描述以及附图将会明白本发明的其它方面和特征。

## 附图说明

[0025] 本申请的附图如下所述,其仅通过示例方式说明本发明的实施方式。

[0026] 图1. 响应肾毒素的标志物基因表达。源自不同供体的两个批次的HPTC (1和4) 用2.5mg/mI庆大霉素(浅灰色柱形)和10 $\mu\text{g}/\text{mI}$  CdCl<sub>2</sub>(深灰色柱形;载体对照:白色柱形)处理。应用这些肾毒素的高剂量以排除因剂量问题所致的缺乏响应。X轴上所指示的标志物基因的相关表达水平通过qPCR测定(参见表19的引物(图27))。柱形显示相比于载体对照的平均倍数表达 $\pm$ 标准偏差(s.d.;n=3)。将各实验的载体对照的平均值设定为1。相对于载体对照的显著性差异(P<0.05)由星号表示。

[0027] 图2. 剂量响应曲线。使HPTC 1接触近曲小管(PT)-特异性肾毒素(组1,左图),对近曲小管无毒的肾毒素(组2,中图)或无肾毒性化合物(组3,右图),其浓度按x轴指示(标注对数刻度)。该图显示IL-6(灰线)和IL-8(黑线)相对于载体对照的表达水平(平均值 $\pm$ s.d.)。在顺铂情况中,在测试的最高浓度出现细胞大量死亡。

[0028] 图3. 灵敏度、特异度和与临床数据的总体一致性。该图以图示形式显示表5中所示的灵敏度和特异度的百分比。此外,该图显示与临床数据的总体一致性。分别对三个不同批次的HPTC以及HK-2和LLC-PK1细胞进行计算。阈值(x轴)范围是0.3-4.0。80%的值由点线指示以便于比较。

[0029] 图4. 受者工作特征(ROC)曲线。计算对于各细胞批次/类型的各单一标志物或两种标志物的组合的ROC曲线。对应的曲线下面积(AUC)值总结于表6。为了比较,图F同时显示测试的所有不同细胞批次/类型获得的ROC曲线(两种标志物组合)。

[0030] 图5. 在四个不同批次的HPTC (1-4) 中通过qPCR测定的标志物基因表达。(x轴)指示的31个基因的相对表达水平以GAPDH表达的百分比显示(y轴)。柱形显示平均值 $\pm$ 标准偏差(s.d.;n=3)。由于表达水平不同,不同图表的y轴上的标度不同,并且对于 $\alpha$ 平滑肌肌动蛋白(SMA)和波形蛋白(VIM;底图)采用I<sub>og</sub>标度。除了转分化和脱分化的这两种标志物以外,以下上皮、HPTC特异性、肾和肾损伤特异性标志物包括:水通道蛋白-1(AQP1)、氨肽酶N(CD13)、闭锁小带1(ZO-1)、N-钙粘蛋白(N-CAD)、E-钙粘蛋白(E-CAD)、 $\gamma$ -谷氨酰转移酶(GGT)、25-羟基维生素D31 $\alpha$ -羟化酶(VIT D3)、葡糖转运子5(GLUT5)、Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>ATP酶、肾特异性钙粘蛋白(KSP-CAD)、嗜中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白(NGAL)、肾损伤分子-1(KIM-1)、维尔姆氏(WiIm's)肿瘤基因1(WT1)、成对盒基因2(PAX2)、多抗药基因1(MDR1)、MegaLin蛋白(MEG)、Na<sup>+</sup>HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>共转运子1(NBC1)、有机阴离子转运子1(OAT1)、OAT3、有机阳离子转运子1(OCT1)、有机阳离子/肉毒碱转运子2(OCTN2)、质子偶联肽转运子2(PEPT2)、钠依赖性葡萄糖共转运子2(SGLT2)。此外,包括对肾单位的其它部分具有特异性的如下标志物:足糖萼蛋白(podocalyxin)样(PODXL,肾小球)、氯离子通道Kb(CLCNKB,远侧肾单位)、噻

嗉敏感性钠-氯共转运子 (NCCT, 远端小管)、Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>/2Cl<sup>-</sup>-共转运子 (NKCC2, HenIe髓袢升支粗段)、尿调素 (UMOD, HenIe髓袢升支粗段和远端肾曲小管) 和AQP3 (集合管)。引物参见参考文献27和28以及图27 (表19)。分析第1代 (P) 的HPTC。本文所示结果与我们先前采用培养至P5的HPTC所获得的结果一致 (参见参考文献27)。例如, 与我们先前采用更高传代数的HPTC所获得的结果一致, OAT3和OCT1以极低水平表达, 并且HPTC以相对高的水平表达一些在肾单位/肾的其它部分体内表达的标志物 (NCCT和AQP 3)。并且, VIM以高水平在体外表达的结果也与先前结果一致 (参考文献27和46)。一些HPTC特异性标志物, 如GGT、CD13和ZO-1以低水平表达 (在获自ATCC的HPTC 1中有约0.4%的GAPDH表达)。在GGT定量PCR数据已于先前公开 (A. Saito, K. Sawada和S. Fujimura, *Hemodial Int*, 2011, 15, 183-192.) 的情况下, 其与本文观察到的低表达水平相一致。然而, GGT在获自ATCC的HPTC中有功能 (参考文献27和28) 并且CD13以及ZO-1可通过免疫印迹和免疫染色检测到 (参见图6)。

[0031] 图6. 通过免疫染色和免疫印迹测定的HPTC 1和4中的标志物表达。通过免疫染色检测的 (A) ZO-1、(B) URO-10和 (C) CD13。紧密连接蛋白ZO-1被组织进入特征性细丝网状图样指示形成了广泛的紧密连接。比例尺: 50 $\mu$ m (A和C) 和100 $\mu$ m (B)。(D) CD13和Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>ATP酶的 $\alpha$ 亚基通过免疫印迹检测。采用 $\alpha$ -微管蛋白作为上样对照。100kDa和50kDa分子大小标志物条带的位置示于左侧。抗体和免疫印迹和免疫染色方法描述于参考文献27。

[0032] 图7. 术语和定义。该象限图 (matrix) 说明与阳性 (+) 和阴性 (-) 临床和体外结果相关的真阳性 (TP)、假阳性 (FP)、假阴性 (FN) 和真阴性 (TN) 的定义。提供性能度量 (performance metrics) 的定义。

[0033] 图8. GAPDH水平和细胞数。通过qPCR测定GAPDH水平 (蓝色线) 并且通过HCS对细胞数量计数 (红色线)。所示图表显示以不同浓度 (x轴) 的指示化合物测定的值 (平均值 $\pm$ s.d., n=3)。所有值以载体对照的百分比表示。用HPTC 1获得结果。

[0034] 图9. (表1) 测试化合物和IL-6和IL-8在HK-2和LLC-PK1细胞中的最高表达水平。该表列出41种测试化合物, 其被分为三组。组1 (化合物1-22) 代表直接损伤PT的肾毒素。组2 (化合物23-33) 包含不直接损伤PT但通过不同机制损伤肾的肾毒素。组3 (化合物34-41) 代表非肾毒性化合物。使HK-2和LLC-PK1细胞接触1 $\mu$ g mL<sup>-1</sup>~1000 $\mu$ g mL<sup>-1</sup>的这些化合物。该表列出采用该范围的任何给定药物浓度观察到的IL-6和IL-8的最高表达水平。数字显示相对于载体对照的平均表达倍数 $\pm$ s.d. (n=3)。本文表1中显示的最高表达水平在表15-18中突出显示, 其详细显示所有测试药物浓度获得的表达水平。

[0035] 图10. (表2) HPTC中的IL-6和IL-8的最高表达水平。使源自不同供体的三个不同批次的HPTC与浓度为1 $\mu$ g mL<sup>-1</sup>~1000 $\mu$ g mL<sup>-1</sup>的41种测试化合物接触。该表列出采用该范围的任何给定药物浓度观察到的IL-6和IL-8的最高表达水平。数字显示相对于载体对照的平均表达倍数 $\pm$ s.d. (n=3)。本文表2中显示的最高表达水平在表9-14中强调, 其详细显示所有测试药物浓度获得的表达水平。

[0036] 图11. (表3) 阈值设定、阳性和阴性结果确定以及灵敏度和特异度计算的实施例。本图所示的HPTC 1数据集与表2中所示的相应数据相同。采用2.0的阈值。若对于给定的药物, 至少一种标志物基因的表达值等于或大于阈值, 则将结果归类为阳性 (+)。若对于给定的药物, 两种标志物基因的表达水平均低于阈值, 则将结果归类为阴性 (-)。基于这些阳性和阴性结果, 计算灵敏度和特异度。灵敏度定义为阳性的组1药物 (TP) 的数量除以22种组1

药物的总数。特异度定义为阴性的组2和3的药物(TN)的数量除以19种组2和3的药物的总数。

[0037] 图12.(表4) 阈值设定、阳性和阴性结果确定以及灵敏度和特异度计算的实施例。HPTC 1数据集与图11所示数据集相同(表3)。本图表4中,对该数据集采用不同阈值水平,该阈值为3.5。详细解释请见图11的说明(表3)。

[0038] 图13.(表5) 对真阳性(TP)、真阴性(TN)、灵敏度和特异度的测定。TP定义为通过该试验被正确检测为阳性的真PT特异性肾毒素(22种药物,组1)。TN定义为在我们的试验中仍呈阴性的非PT特异性肾毒素和非肾毒性药物(19种药物;组2和3)。如何以不同阈值水平获取阳性和阴性试验结果示于表3和4。TP和TN在指示的0.3~4.0的阈值水平范围内确定,并且显示数量。通过这些数量,计算灵敏度百分比( $TP/组1药物的总数 \times 100\%$ )和特异度百分比( $TN/组2+3药物的总数 \times 100\%$ )百分比。灵敏度和特异度的百分比示于括号中,与TP(灵敏度)和TN(特异度)的相应数量一同显示。基于来自所有41种药物的结果,确定所有细胞类型和批次的TP和TN的数量以及相应的灵敏度和特异度百分数。本图所示的灵敏度和特异度的百分比均以图表形式示于图3。

[0039] 图14.(表6) AUC值。该表提供所测每个细胞批次/类型的ROC曲线的AUC值(图4)。对于HPTC,还显示平均值和中值。分开测定IL-6或IL-8或这两种标志物的组合的AUC值。AUC值 $>0.5$ 表示预测模型优于偶然事件(chance)。

[0040] 图15.(表7) 性能标准。该表总结了如下性能度量的值:平衡的精度(定义为灵敏度和特异度之间的平均值)、灵敏度、特异度、阳性预测值(PPV)、阴性预测值(NPV)和AUC。在灵敏度、特异度、PPV和NPV的情况中,显示以3.5为阈值获得的值(参见图3)。关于AUC值,提供采用两种标志物的组合获得的结果。这些值与图14(表6)的那些一致,出于完整目的于本图再次显示。

[0041] 图16.(表8) 对IL-6/IL-8表达和细胞数量的药物作用的比较。使HPTC 1、HK-2和LLC-PK1细胞接触所述41种测试化合物。对于IL-6/IL-8表达的数据基于先前的结果(表1和2)。当有至少一种标志物在任何浓度下显示的表达增加3.5倍或更高时,则将结果确定为阳性(+)。如果标志物表达值保持低于3.5倍,则将该结果归为阴性(-)。基于HCS测定的细胞数量计算 $IC_{50}$ 值。若在化合物的最高浓度( $1000\mu g\ mI^{-1}$ )时,细胞活力 $>50\%$ ,则赋予 $>1000\mu g\ mI^{-1}$ 的值。在一些情况中未测定细胞数量(ND)。(表8包括SEQ ID NO:5-18)。

[0042] 图17-26.(表9-18) IL-6和IL-8的表达水平。使三个不同批次的HPTC(1-3)以及HK-2和LLC-PK1细胞接触浓度为 $1\mu g/mI$ 、 $10\mu g/mI$ 、 $100\mu g/mI$ 和 $1000\mu g/mI$ 的41种测试化合物(载体对照: $0\mu g/mI$ 药物浓度)。载体对照包含所测药物的相应载体。这些表列出通过qPCR测定的IL-6或IL-8表达的水平。数字显示相对于载体对照的平均表达倍数 $\pm s.d.$  ( $n=3$ )。在一些情况中,因大量细胞死亡而未测定表达水平(ND)。所测整个药物浓度范围( $1\mu g-1000\mu g$ )中,对于给定药物和细胞类型/批次组合测定的IL-6或IL-8表达的最高水平突出显示(粗体)。采用特定药物和细胞类型/批次组合获得的这些最高表达值列入表1和2。

[0043] 图27.(表19) 引物对和扩增子的详细信息。显示针对不同标志物的引物对(正向:F,反向:R)序列。扩增子的大小以碱基对(bp)表示。

[0044] 图28.源自人胚胎干细胞(HUES-7)或人诱导性多能干细胞(iPS(包皮)-4)的HPTC样细胞中的IL-6和IL-8的表达水平。测试化合物 $CuCl_2$ (PT特异性肾毒素)、乙二醇(非PT特

异性肾毒素)和地塞米松(非肾毒性)以x轴所示浓度施加。通过qPCR测定基因表达水平,并且显示为相对于载体对照的表达水平(平均值 $\pm$ s.d., n=3,载体对照设置为1)。

[0045] 图29. 灵敏度、特异度与与临床数据的一致性。用表1中所列的41种化合物的组对源自人胚胎干细胞(HUES-7)或人诱导性多能干细胞(iPS(包皮)-4)的HPTC样细胞进行测试。按照关于HPTC所述那样测定灵敏度、特异度和与临床数据的一致性(图3和表3-5)。

[0046] 图30. (表20)对于HUES-7源性或iPS(包皮)-4源性HPTC样细胞获得的性能度量。以关于HPTC所述的相同方式测定性能度量(表7)。

[0047] 图31. 测试各细胞群的ROC曲线。灰色曲线(HPTC和HK-2/LLC-PK1)与图4F所示那些相同,并出于比较目的示于本文。

### 具体实施方式

[0048] 本文所述的试验方法涉及体外应用肾近曲小管细胞来评估损伤近曲小管的化合物的肾毒性。所述方法可用于预测化合物对肾近曲小管的体内毒性。

[0049] 该方法利用两种细胞因子,白介素-6(IL-6)和白介素-8的表达水平。IL-6和IL-8在近曲小管和近曲小管细胞中体内和体外表达。在该方法中,相对于对照群而言,IL-6和IL-8之一或两者的表达增加指示肾近曲小管毒性。

[0050] 该方法可提供灵敏和特异的结果,并且可采用人原生肾近曲小管细胞(HPTC)进行。该方法提供一种模型,该模型采用IL-6和/或IL-8作为终点,结合人肾近曲小管细胞(PTC),从而允许预测人体内的PT特异性毒性。并且,源自干细胞(包括人干细胞)的PTC样细胞也可用于本方法。

[0051] 因此,提供了一种用于筛选化合物的肾毒性,特别是筛选对于肾近曲小管(PT)的毒性的方法。简言之,所述方法包括使肾近曲小管细胞的测试群与待评估PT毒性的测试化合物接触,并检测所述测试群的细胞。所述接触后,检测该测试群中IL-6、IL-8或两者的表达水平,并将其与未接触所述测试化合物的肾近曲小管细胞的对照群中的表达水平做比较。若测试群中的IL-6或IL-8或两者的表达水平较高,则指示该测试化合物是损伤肾近曲小管细胞的毒素。

[0052] 用于所述方法中的细胞(包括测试群和对照群的细胞)均可以是任何类型的PTC,或可以是已从干细胞分化的任何类型的PTC样细胞。所述细胞可来自具有肾近曲小管细胞的任何物种,包括哺乳动物,例如猪或人。

[0053] 因此,所述细胞可源自体细胞。所述细胞可以来自自己建立的肾近曲小管细胞系,或可以是原生肾近曲小管细胞。例如,所述细胞可以是分离自肾样品的原生PTC,包括分离自人肾的PTC。所述细胞可以是获自市售来源的原生PTC,包括例如获自美国典型培养物保藏中心(ATCC)。所述细胞可以是已建立的肾近曲小管细胞系,包括例如人肾(HK)-2细胞或猪LLC-PK1细胞。

[0054] 在具体实施方式中,所述细胞是人肾近曲小管细胞,其为原生人肾近曲小管细胞(HPTC)或来自自己建立的细胞系。

[0055] 或者,所述细胞可以是分化自干细胞的肾近曲小管细胞样(PTC样)细胞,所述干细胞包括胚胎干细胞、成体干细胞例如间充质干细胞或诱导性多能干细胞。PTC样细胞是已分化以表达某些肾近曲小管细胞标志物的细胞,所述肾近曲小管细胞标志物有例如水通道蛋

白(AQP)-1(其具有运水功能)、CD13(氨基酶N)和肾特异性钙粘素。PTC样细胞在体外形成被体外紧密连接封闭的分化的和极化的上皮,并且在体外和体内产生微管结构。其显示PTC典型的酶促功能,且响应甲状旁腺激素。已公开将干细胞分化成肾近曲小管细胞样细胞的方法,例如WO 2009/011663和Narayanan等(27)中所述。可采用市售可得的干细胞系,包括例如人胚胎干(HUES-7)细胞。

[0056] 在一些情况中,HPTC可能会受供体间(inter-donor)差异性的影响,或者难以获得。此外,体外HPTC通常显示一定程度的脱分化,这可能反映了细胞分离后的损伤样状态,并且能够解释在暴露至PT特异性肾毒素后可观察到的缺乏异常(novel)AKI生物标志物的显著上调。在一些实施方式中,干细胞源性的PTC样细胞的应用能避免采用HPTC时的一些或全部问题。

[0057] 如本申请公开内容中所用,在内容允许的情况下,述及肾近曲小管细胞或PTC意在包括述及已从干细胞分化的肾近曲小管细胞样(PTC样)细胞。

[0058] 应理解,应采用相同细胞类型作为测试群和对照群。

[0059] 本文中所用的术语“细胞”在述及肾近曲小管细胞或肾近曲小管样细胞时,意在指单细胞以及多细胞或细胞群。类似地,在内容允许的情况下,术语“多个细胞”也意在指单细胞。

[0060] 因此,在该方法中,先按照标准组织培养方法培养细胞。用于培养的方法也在下述实施例中描述。用于肾近曲小管细胞的组织培养条件和技术是已知的。应注意,组织培养基中的高血清浓度可能会有导致细胞脱分化的作用。因此,限制组织培养基中的血清浓度(例如限制到约0.5%血清或更少)可能是有利的。

[0061] 可将测试群的细胞培养成任何形式,包括融合单层、亚融合单层、融合上皮、类器官培养物、融合2D培养物、体外小管、3D类器官培养物或3D培养物(包括静态3D培养物或在微流条件下生长的3D培养物)。

[0062] 在一些实施方式中,使细胞生长成单层,例如融合或亚融合单层。应注意,以融合单层的细胞密度能够获得良好细胞分化。

[0063] 例如,细胞可以高密度(例如50000个细胞/cm<sup>2</sup>)接种于多孔板中。组织培养聚苯乙烯通常不需要用被覆、凝胶等进行任何处理。在与化合物接触之前可将细胞培养3天,从而为细胞提供形成分化上皮的时间,其将会是融合单层上皮的形式(与可用于其它实施方式中的亚融合或多层不同)。然后可使与测试化合物的接触进行过夜,例如约8小时~16小时,或甚至更长。合适的培养条件的例子提供于,例如,Li等,Tox.Res,2013(DOI:10.1039/c3tx50042j)。

[0064] 在一些实施方式中,可使细胞在微流体生物反应器中生长,包括融合单层或2D融合上皮形式。微流体生物反应器可有利于长期培养以及与测试化合物的重复接触(如本文所述)。该形式可有利于在培养物中产生化合物浓度梯度。

[0065] 在该方法中,使体外培养的细胞与待测试对PTC的体内毒性的化合物接触。

[0066] 所述测试化合物可以是待评估PT特异性毒性的任何化合物。所述测试化合物可以是预计将与对象接触(包括被对象吸收或摄取)的任何化合物。例如,所述测试化合物可以是药物化合物、有机化合物、杀虫剂、环境毒素、含重金属的化合物、有机溶剂、食品添加剂、化妆品或纳米颗粒。

[0067] 所述接触可通过向其中培养有所述细胞的组织培养基添加所述化合物来进行。

[0068] 所述接触可进行一段时间,例如,通过将待测试化合物与培养物中的细胞一起孵育。所述接触可进行约8小时或更久,约16小时或更久,24小时或更久,72小时或更久。

[0069] 待用的测试化合物的浓度可不同,并且可取决于待测试的化合物。通常而言,当在约1 $\mu\text{g}/\text{mI}$ ~约1000 $\mu\text{g}/\text{mI}$ 的浓度下观察到PTC体外毒性时,该毒性趋于预测临床相关浓度下的PTC体内毒性。如下文实施例中所示,测试化合物1~22显示临床相关浓度下对人的PT特异性毒性。

[0070] 例如,可使浓度为约0.001 $\mu\text{g}/\text{mI}$ 或更高、约0.01 $\mu\text{g}/\text{mI}$ 或更高、约0.1 $\mu\text{g}/\text{mI}$ 或更高、约1 $\mu\text{g}/\text{mI}$ 或更高、约10 $\mu\text{g}/\text{mI}$ 或更高、约100 $\mu\text{g}/\text{mI}$ 或更高或约1000 $\mu\text{g}/\text{mI}$ 或更高的测试化合物与细胞群接触。可使浓度为约0.001 $\mu\text{g}/\text{mI}$ ~约1000 $\mu\text{g}/\text{mI}$ 、约0.005 $\mu\text{g}/\text{mI}$ ~约1000 $\mu\text{g}/\text{mI}$ 或约0.01 $\mu\text{g}/\text{mI}$ ~约500 $\mu\text{g}/\text{mI}$ 的测试化合物与细胞群接触。

[0071] 应理解,尽管未使肾近曲小管细胞的对照群接触测试化合物,但可使其接触阴性对照溶液,例如,用于溶解该测试化合物以与测试群接触的溶剂或溶液(载体对照)。

[0072] 可以重复接触。例如,所述接触可在给定时间内进行两次或更多次,三次或更多次,四次或更多次或五次或更多次。

[0073] 例如,在第一阶段接触完成之后,组织培养基可用包含所述化合物的新鲜培养基替换。或者,所述培养基可用不包含测试化合物的新鲜培养基替换,并且在无接触的一段时间之后,可再次使细胞测试群接触测试化合物。

[0074] 因此,所述接触可另外重复一次或多次(在第一步接触之后),例如,在约3~约14天期间。不接触任何测试化合物(即,使细胞接触新鲜培养基)的间隔可在接触期间之间持续,例如持续1天~14天。

[0075] 所述接触可在测定IL-6和/或IL-8表达水平之前的短期内重复或即刻重复。

[0076] 在与测试化合物接触之后,评估该测试群的关于IL-6和IL-8之一或两者的表达水平。

[0077] 应理解,IL-6或IL-8的表达水平可通过如下方式评估:检测所述细胞分泌的蛋白质的表达水平,检测所述细胞中表达的mRNA的水平,或检测IL-6或IL-8调控区域控制下的报告基因的表达水平。

[0078] 因此,为测定相关白介素的表达水平,获取来自所述测试群的细胞或培养基样品,并且检测相关白介素的蛋白质水平或mRNA水平,或者检测相关白介素控制下表达的报告子的蛋白质水平。由于某些测试化合物可能会影响蛋白质合成,mRNA水平的检测可提供能够应用于更宽范围的测试化合物的更加有用的方式。

[0079] IL-6和IL-8均为分泌型蛋白质,因此可在培养细胞的细胞培养基中发现。蛋白质检测方法是已知的,并且包括例如ELISA技术、生物传感器技术、电化学检测技术、免疫印迹技术、免疫染色技术、流式微珠阵列技术、荧光标记物技术和报告子结合技术。

[0080] 例如,细胞样品或包含分泌蛋白质的培养基样品可经收集并用于免疫印迹,采用 $\alpha$ -IL-6或 $\alpha$ -IL-8抗体以捕获或鉴定所述样品中存在的任何IL-6或IL-8。免疫分析可包括可检测标记物,例如荧光、有色或放射性标记的标志物,其连接至 $\alpha$ -IL-6或 $\alpha$ -IL-8抗体,或连接至针对 $\alpha$ -IL-6或 $\alpha$ -IL-8一抗的二抗。可使 $\alpha$ -IL-6或 $\alpha$ -IL-8抗体吸附至表面,或可后续检测样品的白介素-抗体结合复合物。

[0081] 不同生物体的IL-6和IL-8蛋白质序列是已知的。在一些实施方式中,检测的IL-6蛋白质包含SEQ ID NO:1所示序列、由SEQ ID NO:1所示序列组成或基本由SEQ ID NO:1所示序列组成:

[0082] MNSFSTSAFGPVAFSLGLLLVLPAAFPAPVPPGEDSKDVAAPHRQPLTSSERIDKQIRYILDGISALRK ETCNKSNMCESSKEALAENNLNLPKMAEKDGCQSGFNEETCLVKIITGLLEFEVYLEYLQNRFESSEEQARAVQMS TKVLIQFLQKKAKNLDAITTPDPTTNASLLTKLQAQNWQLQDMTTHLILRSFKEFLQSSLRALRQM

[0083] 在一些实施方式中,检测的IL-6蛋白包含SEQ ID NO:2所示序列、由SEQ ID NO:2所示序列组成或基本由SEQ ID NO:2所示序列组成:

[0084] MNSLSTSAFSPVAFSLGLLLVMATAFPPTPERLEEDAKGDATSDKMLFTSPDKTEELIKYILGKISAMRK EMCEKYEKENSKEVLAENNLNLPKMAEKDGCQSGFNQETCLMRITGLVEFQIYLDYLQKEYESNKG NVEAVQIS TKALIQTLRQKGNPKATTPNPTTNAGLLDKLQSQNEWMKNTKIILILRSLEDFLQFSLRAIRIM

[0085] 在一些实施方式中,检测的IL-6蛋白包含如下蛋白质、由如下蛋白质组成或基本由如下蛋白质组成:所述蛋白质与SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2具有75%或更高、约80%或更高、约85%或更高、约90%或更高、约95%或更高、约96%或更高、约97%或更高、约98%或更高,或约99%或更高的序列相同性但仍具有IL-6功能。

[0086] 本文中所述的“基本由……组成”或“基本由……构成”指的是,所述蛋白质序列在(包括)所述序列内或在所述序列的一端或两端还包含一个或多个氨基酸残基,但该额外氨基酸不本质影响所述蛋白质的功能。

[0087] 在一些实施方式中,检测的IL-8蛋白包含SEQ ID NO:3所示序列、由SEQ ID NO:3所示序列组成或基本由SEQ ID NO:3所示序列组成:

[0088] MTSKLAVALLAAFLISAALCEGAVLPRSAKELRCQCICKTYSKPFHPKFIKELRVIESGPHCANTEIIVK LSDGRELCLDPKENWVQRVVEKFLKRAE

[0089] 在一些实施方式中,检测的IL-8蛋白包含SEQ ID NO:4所示序列,由SEQ ID NO:4所示序列组成或基本由SEQ ID NO:4所示序列组成:

[0090] MTSKLAVAFVAVFLLSAALCEAAVLARVSAELRCQCINTHSTPFHPKFIKELRVIESGPHCENSEIIVK LVNGKEVCLDPKEKVVQKVVQIFLKRTEKQQQQQ

[0091] 在一些实施方式中,检测的IL-8蛋白包含如下蛋白质、由如下蛋白质组成或基本由如下蛋白质组成:所述蛋白质与SEQ ID NO:3或SEQ ID NO:4具有75%或更高、约80%或更高、约85%或更高、约90%或更高、约95%或更高、约96%或更高、约97%或更高、约98%或更高,或约99%或更高的序列相同性但仍具有IL-8功能。

[0092] RNA检测方法是已知的,包括例如定量PCR技术、northern印迹技术、微阵列技术、TRAC技术、荧光标记物技术和磷光体成像技术。

[0093] 例如,定量PCR(qPCR)技术可用于检测包含来自测试群的细胞的样品中的编码IL-6或IL-8的mRNA的水平。总RNA可获自细胞样品,而cDNA可采用所述细胞中的mRNA群作为模板通过逆转录来生成。然后,所生成的cDNA可用作PCR模板,采用允许检测所生成的扩增子的定量方法,例如通过在整合进入该生成的扩增子的核苷酸或引物上纳入荧光标记物来进行所述检测。

[0094] 对于不同生物体的IL-6和IL-8 mRNA序列也是已知的,并且本领域技术人员能够检测编码IL-6或IL-8的mRNA的存在。

[0095] 此外,可采用分子遗传技术和转基因PTC检测在IL-6或IL-8启动子/调控区的控制下表达的报告基因的水平来检测IL-6和/或IL-8的表达水平。例如,可采用在IL-6或IL-8调控区控制下表达可检测产物的报告子基因。可将此类报告子基因表达盒纳入载体,例如质粒或病毒载体,以瞬时或稳定转染或转导PTC群。或者,可利用敲入表达盒来将报告子基因序列插入PTC群的基因组IL-6和/或IL-8基因座。分子遗传技术是已知的,并且此类技术可容易与本文所述的体外方法联用,包括采用从干细胞分化的PTC样细胞。合适的报告子基因可包括编码绿色荧光蛋白(GFP)或荧光素酶的基因,或编码其它荧光蛋白质的基因或编码能够催化产生可检测产物的蛋白质的基因。不同生物体的IL-6和IL-8基因调控区的序列是已知的。

[0096] 由上文说明可见,采用计算机辅助检测技术可有助于检测IL-6或IL-8表达水平。所述试验可采用机械手或自动化装置或微流体装置进行,以加快速度。可同时检测给定细胞群的IL-6和IL-8,进一步加快所述试验的速度和通量。并且,如果采用遗传方法来检测IL-6或IL-8表达水平,则可采用例如高内涵筛选的技术以观察并检测测试群中报告子基因的表达水平。高内涵筛选技术是本领域中已知并应用的。此类技术可涉及自动化成像分析以评估在IL-6和/或IL-8调控的控制下的荧光蛋白的表达水平。

[0097] 一旦评估,即将所得的测试群的IL-6和/或IL-8表达水平与在相同条件下但未接触所述测试化合物的肾近曲小管细胞对照群所得的值做比较。测试群相对于对照群的IL-6和IL-8中至少一种的表达水平的变化指示该测试化合物是对肾近曲小管细胞具有直接毒性的肾毒素。因此,响应与测试化合物的接触而发生的IL-6或IL-8表达的增加可视为指示所述测试化合物是直接损伤肾近曲小管细胞的肾毒素。

[0098] 可能需要设定关于IL-6或IL-8表达水平的检测的阈值水平。这可通过采用阳性对照群和阴性对照群和一组已知不具肾毒性的化合物、一组已知具有肾毒性但是对肾近曲小管细胞不具有特异性毒性的化合物,以及一组已知对肾近曲小管细胞具有特异性毒性的化合物来进行。可确定真阳性、假阴性、真阴性和假阴性的数量,以及主要性能度量(PPV、NPV、灵敏度和特异度)。可计算曲线下面积值,并且所述ROC分析方法是本领域中已知且应用的。

[0099] 此外,可确定阈值以决定测试结果是阳性还是阴性。所述阈值涉及IL-6或IL-8相对于载体对照的表达的倍数增加。

[0100] 例如,若至少一种标志物基因(IL-6或IL-8)的表达水平的增加接近或高于阈值,则测试结果可为阳性。最优阈值可通过检测较宽范围的阈值来确定,如下文实施例(包括图3中)所示。实际阈值可视所用细胞类型和所用培养与接触条件而定。

[0101] 在一些实施方式中,阈值(即,测试群中IL-6表达或IL-8表达水平与对照群中相同水平之比)是约1.5或更高、约3.5或更高、约5或更高,或约10或更高。

[0102] 对于任何给定的测试化合物而言,可通过测试递增浓度下的化合物并将各浓度的结果与对照群结果做比较来计算剂量响应曲线。通过该方法,可获得发现对肾近曲小管细胞具有毒性的测试化合物的EC<sub>50</sub>或IC<sub>50</sub>值。

[0103] 所示方法可允许以高精度预测早期临床前阶段的人体内的肾近曲小管特异性毒性,这在先前无法实现。所述预测可在药物开发的先导物发现(hit-to-lead)和先导物优化过程中提供额外的有价值的信息,而且能在早期阶段研究PT特异性毒性的潜在机制。可靠预测PT特异性毒性的临床前结果也将有助于设计临床研究并决定是否需要更广泛且更频

繁的临床安全性评估,或者在获得更多信息之前,是否应当从II期研究中排除具有升高的肾毒性风险的患者(例如,高龄、糖尿病)。就此而言,引起关注地发现在用所述方法测试时,四环素总是给出阳性结果,如下文实施例所述。该药物通常不具明显肾毒性效应,但可诱导已患肾病的患者中的AKI和ESRD(51,52)。期望用于检测肾毒性的新生物标志物(31-35)能够在临床研究中发挥作用,对于临床研究而言应通过临床前模型预测来谨慎监测肾毒性效应。

[0104] 因此,本文所述的方法可用于预测化合物在该化合物的临床相关浓度下是否对人的PTC有毒性。如上所述,下文实施例中所述的化合物1-10和19-22均在临床相关浓度下显示人体内的PT特异性肾毒性。当以 $1\mu\text{g}/\text{mI}\sim 1000\mu\text{g}/\text{mI}$ 的浓度体外应用时,这些化合物中的大多数被所述方法鉴定为阳性。因此,化合物在 $1\mu\text{g}/\text{mI}\sim 1000\mu\text{g}/\text{mI}$ 浓度下体外测试时呈阳性测试结果可允许预测临床相关浓度下的体内PT特异性毒性。

[0105] 本文所述的方法通过下文非限制性实施例进一步说明。

[0106] 实施例

[0107] 实施例1

[0108] 用于预测人肾近曲小管毒性的模型采用HPTC,并且采用白介素(IL)-6和IL-8的表达水平作为终点。该模型采用41种成熟表征的药物和化学品进行评价。结果显示,该模型具有高度预测性,并且其预测性在约76%-85%范围内。

[0109] 材料和方法

[0110] 测试化合物:测试了41种化合物。这些化合物的性质,以及其在不同组的分类示于表1(图9)。化合物3-5、8、14、18-20、23、30、34和37获自默克公司(Merck)(德国达姆施塔特)。化合物1购自PAA实验室股份有限公司(PAA Laboratories GmbH)(奥地利巴兴)。化合物10获自化学品供应公司(ChemService)(美国宾夕法尼亚州西赤斯特),而化合物22购自Tocris生物科学公司(英国布里斯托尔)。全部其它测试化合物购自西格玛奥德里奇公司(Sigma-Aldrich)(美国密苏里州圣路易斯)。采用生物技术级别的水(1st Base公司,新加坡)制备如下测试化合物的可能的储液( $10\text{mg}/\text{mI}$ ):化合物1、2、4-6、9-18、23、25、28、30-36和40。或者采用二甲亚砜(DMSO;西格玛奥德里奇公司;化合物3、7、8、19、22、27和41)或乙醇(化合物20、21、24、26、29、37和39)制备储液( $6.8\text{mg}/\text{mI}\sim 100\text{mg}/\text{mI}$ ,视个体化合物的溶解度而定)。载体对照试验采用相应溶剂进行。所有储液避光储存于 $4^{\circ}\text{C}$ 。金属氧化物和无机盐(化合物11-16和18)的储液储存至多6个月。有机化合物的储液储存不超过3个月,且大多数储液在广泛系列测试过程中消耗得快得多。

[0111] 细胞培养:HPTC购自美国典型培养物保藏中心(ATCC,美国弗吉尼亚州马纳萨斯;HPTC 1)或按照描述(26)分离自肾切除样品(HPTC 2-4)。采用4代(P)和P5的市售的HPTC(HPTC 1),以及P3和P4的HPTC 2-4。肾切除样品源自肿瘤患者,并且由病理学家在检测后选择正常组织区域分离HPTC。相应的匿名化的正常组织样品获自国立大学医学组织的组织库(NUHS,新加坡)。HK-2和LLC-PK1细胞购自ATCC。按照描述,在供应商推荐的培养基中培养不同细胞类型(14)。用于HPTC的培养基包含0.5%胎牛血清。采用所用的人肾样品(DSRB-E/11/143)和细胞类型(NUS-IRB编号:09-148E)进行研究已获机构审查委员会(Institutional Review Board)批准。所有细胞在使用前均经冷藏。

[0112] 为了确保合适的细胞质量和标志物表达概况,采用31种标志物基因通过定量实时

聚合酶链式反应 (qPCR) 评估所有批次的HPTC (图5)。在蛋白质水平,通过免疫染色和免疫印迹确认了一些标志物的表达 (图6)。对于方法,抗体和引物参见表19 (图27) (也见参考文献27,28)。

[0113] qPCR:将细胞以50,000个细胞/cm<sup>2</sup>的密度接种至24孔微板 (Nalgene Nunc,美国纽约州彭菲尔德)。细胞培养72小时,然后用测试化合物处理16小时。总RNA采用NucleoSpin® RNA II (Macherey-NageI,德国迪伦) 或RNeasy® 迷你试剂盒 (凯杰公司 (Qiagen),德国希尔登) 分离。cDNA采用SuperScript® III First Strand合成系统 (英杰公司 (Invitrogen),美国加利福尼亚州卡尔斯巴德) 和 MyCycler® 热循环仪 (伯乐公司 (Bio-Rad),美国加利福尼亚州赫拉克勒斯) 合成。然后采用7500快速实时PCR系统 (应用生物系统公司 (Applied Biosystems),美国加利福尼亚州卡尔斯巴德) 进行qPCR (至多40个循环)。按照生产商说明,采用装置中内含的软件进行各程序。采用Sequence Detection Software 7500 Fast 2.0.5版软件进行数据分析。用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 方法测定基因表达水平。引物用Primer Express Software 3.0版软件设计。所用引物 (购自西格玛奥德里奇公司) 的详情于参考文献27、28和表19提供。

[0114] 高内涵筛选 (HCS):HPTC和HK-2细胞以50,000个细胞/cm<sup>2</sup>的密度接种至96孔微板 (Becton Dickinson公司,美国新泽西州富兰克林),而LLC-PK1细胞以16,000个细胞/cm<sup>2</sup>接种。细胞培养72小时,然后用测试化合物处理16小时。用内含3.7%甲醛的磷酸盐缓冲盐水固定10分钟后,细胞核用4',6-二脒基-2-苯基吲哚 (Merck) 染色,并用ImageXpress Micro高内涵筛选系统 (分子设备公司 (Molecular Devices),美国加利福尼亚州桑尼维尔) 成像。各细胞类型、药物和浓度进行3个重复。对3孔中的每一孔获取9张图像。对个体图像进行细胞核计数,并从这些数据获得每孔的平均细胞数量。数据获取和分析通过MetaXpress2.0 (分子设备公司,美国加利福尼亚州桑尼维尔) 进行。

[0115] 数据分析:采用Microsoft Office Excel 2003进行所有计算。若在测试的任何化合物浓度下,有至少一种标志物基因 (IL-6或IL-8) 的表达增加等于或高于阈值,则在体外模型中将该化合物定义为阳性并预测为PT特异性肾毒素。检测0.3~4.0的阈值。标准定义如图7中所示并提供。真阳性 (TP) 定义为在体外模型中给出阳性结果的人PT特异性肾毒素 (表1,化合物1-22,组1)。真阴性 (TN) 定义为在体外模型中给出阴性结果的非肾毒性化合物 (表1,组3,化合物34-41) 或不损伤人体内的PT的肾毒性化合物 (表1,组2,化合物23-33)。灵敏度通过将TP数量除以PT特异性肾毒素 (组1,化合物1-22) 的总数来计算。特异度通过将TN数量除以非PT损伤性化合物 (组2和3,化合物23-41) 的总数来计算。平衡的精度定义为灵敏度和特异度的平均值。阳性预测值 (PPV) 通过将TP数量除以通过该体外模型鉴定为阳性的总数来计算。阴性预测值 (NPV) 通过将TN数量除以通过该体外模型鉴定为阴性的总数来计算。与临床数据的一致性如下计算:TP+TN/41种药物的总数。提供百分比时,将数字乘以100%。受者工作特征 (ROC) 曲线通过对0.3-4.0的所有阈值 (与图3中相同的阈值) 处的(1-特异度) 标绘灵敏度来生成。统计学分析采用不成对t检验 (Microsoft Office Excel 2010)。数据的正态分布采用SigmaStat (3.5) (Systat软件公司,美国伊利诺斯州芝加哥) 确认。

[0116] 结果

[0117] 模型设计和终点:我们选择HPTC作为细胞模型用于开发方法以避免动物细胞和细胞系相关的问题。所有批次HPTC均通过显微实验和qPCR常规表征,所示qPCR用于测定31种不同标志物基因的表达水平(参见图5和材料与方法)。在蛋白质水平,通过免疫染色和免疫印迹确认一些标志物的合适表达(图6)。这些分析确保合适且可比的细胞表型和质量。细胞在常规未被覆的多孔板中培养。未被覆的组织培养聚苯乙烯使HPTC性能持续优于有或没有胞外基质覆层的其它材料(29,30)。细胞在药物处理之前以高密度接种并培养三天,以允许形成分化的上皮,其如上所述在对照实验中进行确认(数据未显示)(14)。细胞分化状态对于获得细胞类型特异性的响应而言极其重要。

[0118] 首先,我们通过评估涉及PT损伤的不同标志物基因的表达行为来确定合适终点。这些包括间充质标志物波形蛋白(VIM)。损伤后,肾损伤分子-1(KIM-1)和嗜中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白(NGAL)均在小管上皮中上调,并且对AKI的早期检测而言是潜在的新型生物标志物(31-35)。白介素(IL)-18在患病和损伤的肾中的PT上皮中上调,并且可能是用于检测肾毒性的有用生物标志物(31,36,37)。

[0119] IL-6和IL-8在PT和PT源性细胞中体内和体外表达(14,38-41)并且在促炎性过程中起重要作用,其在损伤后出现。不同研究显示,IL-6和IL-8在受损和患病肾中上调(42-44)。认为促炎性细胞因子在AKI(包括肾毒素诱导的AKI)中起重要作用(45)。此外,已在肾培养模型中采用纯化的PT证明与肾毒素接触后,IL-6显著上调(24)。

[0120] 为了测定肾毒素对这六种标志物基因的体外作用,两个不同批次的HPTC用高剂量的庆大霉素和CdCl<sub>2</sub>处理,并用qPCR分析表达水平。所有单个结果均标准化至表达水平甘油醛3-磷酸脱氢酶(GAPDH),其与细胞数量一致(图8)。如果特定标志物基因的表达适合于作为终点,则该基因应在未处理细胞中显示相对低表达,而响应肾毒素显示高水平的诱导。此外,所述基因应响应不同肾毒素并在不同批次的HPTC一致上调。图1显示IL-6和IL-8满足这些标准。就测试的标志物基因而言,在用肾毒素处理后,IL-8显示最高水平的上调。

[0121] NGAL也显示一致上调,但其上调水平仅为1.8倍~3.5倍,这低于IL-6和IL-8的上调水平。VIM仅在一个细胞批次中上调。KIM-1和IL-18仅在一个细胞批次中响应一种化合物上调。就NGAL(脂质运载蛋白-2)和KIM-1而言分别观察到低水平或缺乏上调,这与采用人肾近曲小管细胞和PT源性细胞系的其它体外模型的结果一致(PREDICT-IV,第三次和第四次项目周报(Project Periodic Report),2012年6月30日)。应注意,通过破坏器官获得的原生细胞通常显示一定程度的损伤响应。我们观察到VIM、NGAL和KIM-1均已经以相对高的水平在未处理的对照细胞中表达(图5),这与VIM情况中的先前结果一致(46)。这可能能够解释在用肾毒素处理后缺乏上调或仅中度上调的现象。就测试的所有标志物基因而言,IL-6和IL-8在未处理的HPTC中的表达水平最低,并且均一致地<0.1%的GAPDH表达。

[0122] 采用41种化合物分析预测性能:接下来,我们测定了对41种成熟表征的和化学品的响应。本文所用的这41种化合物中的大多数是常规且广泛应用于临床实践中的药物。一些化合物,如CdCl<sub>2</sub>或林丹,是成熟表征的环境毒素,并且对于所有化合物而言,均有可获得的大量人类和动物体内及体外数据。作为起始点,我们从根据化合物的人体肾毒性及其对肾和肾单位的不同部分的作用从所述化合物分类的公开列表中选择化合物(2,3,18,19)。然后,我们进行了广泛的文献检索(PubMed),并且采用Google和ChemIDplus高级数据库来进一步获得关于各个所选化合物的信息,以确认其分类。

[0123] 22种化合物被归为已知直接损伤PT的肾毒素(组1,表1,化合物1-22;除了PT特异性损伤以外,这些药物中的一些对肾具有不同阴性效果)。此外,这41种化合物包括不直接损伤PT且对肾具有其它作用的11种肾毒素(组2,表1,化合物23-33)。此外,包括8种非肾毒性药物(组3,表1,化合物34-41)。该试验采用源自不同供者的三个批次的HPTC并且终点是通过qPCR测定的IL-6和IL-8的表达。为比较,所有实验均采用HK-2和LLC-PK1细胞(表1)。

[0124] 在以融合密度培养细胞3天后,进行16小时的药物接触。初始时,我们检测了覆盖5个量级的0.01 $\mu\text{g}/\text{mI}$ ~1000 $\mu\text{g}/\text{mI}$ 的宽浓度范围。由于通常在两个最低浓度观察不到药物诱导的变化(相较于对照),我们缩小了范围并且在所有情况中检测1 $\mu\text{g}/\text{mI}$ 、10 $\mu\text{g}/\text{mI}$ 、100 $\mu\text{g}/\text{mI}$ 和1000 $\mu\text{g}/\text{mI}$ 的浓度。因此,在所有实验中应用最宽的有用浓度范围,其中低于下限的浓度缺乏药物诱导的变化,而高于上限的浓度则影响许多化合物的溶解性。所有结果对载体对照标准化,并且以IL-6和IL-8表达的倍数变化表示。

[0125] 采用HPTC和选自各组的三种药物获得的剂量响应曲线示于图2。对于各细胞批次/类型和各浓度下的各药物而言,IL-6和IL-8表达水平的详细结果列于表9-18(图17-26)。就各药物和细胞批次/类型以测试范围内的任何给定药物浓度测定的IL-6和IL-8表达的最高水平于表9-18中突出显示。这些最高表达水平汇总于表1和2。结果显示不同药物对IL-6和IL-8的表达具有不同作用,并且一些药物诱导两种标志物基因,而另一些药物仅诱导一种标志物基因或不诱导标志物基因(图2)。在接触PT特异性肾毒素之后,通常有至少一种标志物基因的表达显著升高(组1,表1和2(图9和10),图2),而在接触组2和3的药物之后,所有浓度下的基因表达水平通常保持在低水平(表1和2,图2)。通过ELISA评估IL-6和IL-8的分泌时,获得总体相当的结果(数据未显示)。然而,所用药物中的许多抑制蛋白质合成,因而qPCR数据更为可靠。

[0126] 为了将采用特定药物和细胞类型/批次获得的结果归为阳性或阴性,测定了最高表达水平(平均值;表1和2)是否等于或高于阈值。若所述标志物(IL-6和IL-8)中有至少一种的基因表达的最高增幅等于或高于阈值(表1和2),即将该药物归为阳性并预测为PT特异性肾毒素。由于并不清楚何种阈值最为合适,该分析就0.3~4.0范围的阈值水平进行研究。

[0127] 说明数据处理的示例示于表3和4。这两个表格均显示由HPTC 1获得的相同数据集。该数据集与表2中的HPTC 1数据集相同,并且显示IL-6和IL-8的最高表达水平。对该数据集分别应用2.0的阈值(表3(图11))或3.5的阈值(表4(图12))。若至少一种标志物基因的表达水平等于或高于阈值,则将测试结果归为阳性,且归类示于表3和4。基于这些结果,计算灵敏度(组1化合物的阳性测试结果数量(TP)/22种组1化合物总数)和特异度(组2和3化合物的阴性测试结果数量(TN)/19种组2和3化合物总数)。

[0128] 通过该方式,以7个不同阈值水平计算各细胞类型和批次的灵敏度和特异度。结果汇总于表5(图13),并且以图表形式示于图3。此外,图3显示与临床数据的总体一致性。

[0129] 结果显示3.5的阈值对两个HPTC批次而言最为合适(图3;HPTC 1和2)。在该阈值水平,灵敏度、特异度和与临床数据的总体一致性是约90%(HPTC 1)和约80%(HPTC 2)。若对第三批(HPTC 3)应用相同阈值(3.5),则特异度仍为约80%,而灵敏度和与临床数据的总体一致性分别为约64%和约71%。如同预料,这些数据显示在不同批次的原生细胞之间存在一些供体间差异性。相较于HPTC, HK-2和LLC-PK1细胞的最优阈值水平不同,并且总体数据显示,采用这些细胞系的预测性低于采用HPTC(图3)。例如,采用3和更高的阈值,对于

LLC-PK1细胞而言最为合适,所有的值保持在低于80%并且在约64%~约74%的范围内。

[0130] 为了进一步分析预测性,我们计算了ROC曲线并测定了曲线下面积(AUC)值。图4显示采用各细胞批次/细胞系获得的ROC曲线,并且显示IL-6或IL-8或标志物组合的结果。相应AUC值示于表6(图14)。结果证实,采用HPTC时具有更高的预测性(相较于HK-2和LLC-PK1细胞),并且这适用于平均值和中值以及各单一批次的HPTC。相较于仅采用IL-8而言,采用两种标志物的组合仅使结果略有改善。采用标志物组合获得的AUC值的范围是0.71(HK-2)~0.94(HPTC 1)。

[0131] 最重要的性能度量(平衡的精度、灵敏度、特异度、PPV、NPV和AUC值)汇总于表7(图15)。就表7和进一步分析而言,我们采用IL-6和IL-8作为终点的联合表达数据。HPTC的平均PPV是0.85,这表示有85%的次数中,化合物被正确判定为PT特异性毒素。HK-2和LLC-PK1细胞的相应值分别是0.73和0.74。HPTC的平均NPV是0.79。此处,细胞系的值是0.6(HK-2)和0.67(LLC-PK1)。

[0132] 终点影响:接下来,我们比较了采用IL-6/IL-8表达或细胞死亡作为终点时的试验性能。细胞数量通过高内涵筛选(HCS)测定,以定量细胞死亡。表8(图16)汇总结果。当采用HPTC 1时,以IL-6/IL-8表达作为终点,有91%(20/22)的PT特异性肾毒素给出阳性结果,并且被正确预测。相反,仅在42%(8/19)的测试例中观察到可用于计算IC<sub>50</sub>值的大量细胞死亡。即便在发生>50%细胞死亡的所有这些测试例被归为阳性时,灵敏度也未优于偶然事件。采用HK-2和LLC-PK1细胞获得的结果相同,其中关于组1化合物的大量细胞死亡在43%(6/14)和53%(8/15)的测试例中观察到。

[0133] 这些结果支持了用于检测一般细胞毒性的终点可能并不适用于器官特异性试验的想法。应注意,本文中通过测定细胞数量而检测的细胞死亡,也通过其它广泛应用的试验检测,例如中性红摄取试验或MTT试验(MTT试验检测代谢活性,其通常用作细胞数量的间接指示)。基于这些结果,我们避免了采用用于检测一般细胞毒性的其它终点。

[0134] 本文中,我们开发了用于预测人体PT特异性毒性的模型。该模型基于HPTC并采用41种化合物测试。为了比较,还评估了HK-2和LLC-PK1细胞。当采用三个批次的HPTC时,主要性能度量的平均值和中值(平衡的精度、灵敏度、特异度、PPV、NPV和AUC值)范围是0.76~0.85。这些结果显示所述模型具有高度预测性,并且预计在其中化合物被预测为阳性或阴性的约76%~85%的测试例中的预测是准确的。

[0135] 我们的模型与预测PT特异性毒性的其它模型可由两个主要特征区分:i)采用HPTC和ii)采用IL-6/IL-8表达作为终点。另一个差异在于,融合上皮的应用,但该参数的影响目前不明。我们的结果显示,采用HPTC和选定的终点提供了较好结果。当采用HK-2或LLC-PK1细胞而不是HPTC时,关键性能度量仅为0.60~0.79。并且,当采用细胞死亡而不是IL-6/IL-8表达作为终点时,灵敏度严重降低。IL-6和IL-8由广泛细胞类型响应广泛刺激和损伤机制而表达(参见例如,参考文献47-50和其中的引用),因此我们的模型具有惊人的特异度。然而,可能有用的其它细胞类型并没有在基于一种细胞类型的体外模型中显示作用。如果在该体外模型中,除了HPTC损伤,没有其它参数增加标志物基因的表达,那么预计该响应是特异性的。

[0136] 实施例2

[0137] 该试验采用两种类型的肾近曲小管样细胞,在上述实施例1中所述的条件下,采用

相同的经鉴定的41种化合物进行。所述两种细胞类型是从人胚胎干细胞(HUES-7细胞,可获自霍华德·休斯医学研究所(Howard Hughes Medical Institute))和人诱导性多能干细胞(其源自人包皮(iPS(包皮)-4;WiCell研究所(WiCell Research Institute),美国威斯康星州)分化的细胞群。采用先前所述技术(参见参考文献27)使两种干细胞类型分化成肾近曲小管样细胞。

[0138] 选定的化合物在两种类型的细胞群上测试的结果示于图28。

[0139] 阈值=3.5时,两个肾近曲小管样细胞群均显示>70%的灵敏度和特异度以及与人临床数据的总体一致性,如图29和30所示。采用干细胞源性肾近曲小管样细胞的试验的主要性能度量范围是0.70~0.82(图30)。各测试细胞群的ROC曲线示于图31。预计通过优化干细胞向肾近曲小管样细胞的分化的方案能进一步改进该试验。

[0140] 本说明书引用的所有发表物和专利申请通过引用纳入本文,就好像各发表物或专利申请特定和单独地通过引用纳入本文那样。任何出版物的引用针对提交日之前的公开而不应解释为承认本发明不具有通过先发明先于这些出版物的权利。

[0141] 在本说明书和权利要求书中所用的单数形式“一个”、“一种”和“该”包括多个指示物,除非上下文中有明显的表示。在本说明书和所附权利要求书中所用的术语“包含”、“含有”、“包括”以及其它这些术语的形式意味着非限制性包含的意义,即,包括具体引用的元素或成分,但不排除任何其它元素或成分。如本说明书和所附权利要求中所用,给出的全部范围或队列均意在表述任何中间值或范围或其中所含的任何子队列。除非另有说明,本文所用的所有科技术语与本发明所属领域普通技术人员所理解的通常含义相同。

[0142] 虽然出于阐明目的已经通过说明和举例的方式对本发明有所描述,但本领域普通技术人员根据本发明的教导不难了解,可以对本发明作出某些改变和修改而不背离所附权利要求书的构思和范围。

[0143] 参考文献

[0144] 1.E.M.Levy,C.M.ViscoIi和R.I.Horwitz,JAMA,1996,275,1489-1494.

[0145] 2.D.Choudhury和Z.Ahmed,Nat Clin Pract Nephrol,2006,2,80-91.

[0146] 3.X.Guo和C.Nzerue,Cleve Clin J Med,2002,69,289-290,293-284,296-287passim.

[0147] 4.K.Nash,A.Hafeez和S.Hou,Am J Kidney Dis,2002,39,930-936.

[0148] 5.B.S.Moffett和S.L.GoIdstein,Clin J Am Soc Nephrol,2011,6,856-863.

[0149] 6.C.C.Szeto和K.M.Chow,Ren Fail,2005,27,329-333.

[0150] 7.M.A.Perazella,Hosp Pract (Minneap),2001,36,43-46,55-46.

[0151] 8.W.S.Redfern,L.Ewart,T.G.Hammond,R.Bialecki,L.Kinter,S.Lindgren,C.E.Pollard,R.Roberts,M.G.RoIf和J.P.Valentin,The Toxicologist,2010,114,231.

[0152] 9.H.Izzedine,M.Harris和M.A.Perazella,Nat Rev Nephrol,2009,5,563-573.

[0153] 10.P.P.Kapitsinou和N.Ansari,J Med Case Rep,2008,2,94.

[0154] 11.W.Pfaller和G.Gstraunthaler,Environ Health Perspect,1998,106增刊2,559-569.

[0155] 12.P.Prieto,Altern Lab Anim,2002,30增刊2,101-106.

[0156] 13.Y.Wu,D.Connors,L.Barber,S.Jayachandra,U.M.Hanumegowda和S.P.Adams,

Toxicol In Vitro,2009,23,1170-1178.

[0157] 14.Y.Li,Y.Zheng,K.Zhang,J.Y.Ying和D.Zink,Nanotoxicology,2012,6,121-133.

[0158] 15.P.H.Bach,D.K.Obatomi和S.Brant,In vitro methods for nephrotoxicity screening and risk assessment (《用于肾毒性筛选和风险评估的体外方法》),学术出版社有限公司(Academic Press Ltd),圣迭戈,1997.

[0159] 16.M.Bens和A.Vandewalle,Pflugers Arch,2008,457,1-15.

[0160] 17.S.E.Jenkinson,G.W.Chung,E.van Loon,N.S.Bakar,A.M.DaIzeII和C.D.Brown,Pflugers Arch,2012,464,601-611.

[0161] 18.Z.Lin和Y.Will,Toxicol Sci,2012,126,114-127.

[0162] 19.T.Duff,S.Carter,G.Feldman,G.McEwan,W.PfaIIer,P.Rhodes,M.Ryan和G.Hawksworth,Altern Lab Anim,2002,30增刊2,53-59.

[0163] 20.W.Li,D.F.Choy,M.S.Lam,T.Morgan,M.E.Sullivan和J.M.Post,Toxicol In Vitro,2003,17,107-113.

[0164] 21.W.Li,M.Lam,D.Choy,A.Birkeland,M.E.Sullivan和J.M.Post,Toxicol In Vitro,2006,20,669-676.

[0165] 22.Limonciel,L.Aschauer,A.Wilmes,S.Prajczner,M.O.Leonard,W.PfaIIer和P.Jennings,Toxicol In Vitro,2011,25,1855-1862.

[0166] 23.I.Astashkina,B.K.Mann,G.D.Prestwich和D.W.Grainger,Biomaterials,2012,33,4712-4721.

[0167] 24.I.Astashkina,B.K.Mann,G.D.Prestwich和D.W.Grainger,Biomaterials,2012,33,4700-4711.

[0168] 25.C.Beeson,G.C.Beeson和R.G.SchneIImann,Anal Biochem,2010,404,75-81.

[0169] 26.D.A.Vesey,W.Qi,X.Chen,C.A.PoIIock和D.W.Johnson,Methods Mol Biol,2009,466,19-24.

[0170] 27.K.Narayanan,K.M.Schumacher,F.Tasnim,K.Kandasamy,A.Schumacher,M.Ni,S.Gao,B.Gopalan,D.Zink和J.Y.Ying,Kidney Int,2013,83,593-603.

[0171] 28.F.Tasnim,K.Kandasamy,J.S.Muck,M.S.Bin Ibrahim,J.Y.Ying和D.Zink,Tissue Eng Part A,2012,18,262-276.

[0172] 29.M.Ni,J.C.Teo,M.S.Ibrahim,K.Zhang,F.Tasnim,P.Y.Chow,D.Zink和J.Y.Ying,Biomaterials,2011,32,1465-1476.

[0173] 30.M.Ni,P.K.Zimmermann,K.Kandasamy,W.Lai,Y.Li,M.F.Leong,A.C.Wan和D.Zink,Biomaterials,2012,33,353-364.

[0174] 31.J.V.Bonventre,V.S.Vaidya,R.Schmouder,P.Feig和F.Dieterle,Nat Biotechnol,2010,28,436-440.

[0175] 32.F.Dieterle,F.Sistare,F.Goodsaid,M.PapaIuca,J.S.Ozer,C.P.Webb,W.Baer,A.Senagore,M.J.Schipper,J.Vonderscher,S.Sultana,D.L.Gerhold,J.A.Phillips,G.Maurer,K.Carl,D.Laurie,E.Harpur,M.Sonee,D.Ennulat,D.HoIder,D.Andrews-Cleavenger,Y.Z.Gu,K.L.Thompson,P.L.Goering,J.M.Vidal,E.Abadie,

- R.Maciułaitis,D.Jacobson-Kram,A.F.Defelice,E.A.Hausner,M.Blank,A.Thompson,P.Harlow,D.Throckmorton,S.Xiao,N.Xu,W.Taylor,S.Vamvakas,B.Flamion,B.S.Lima,P.Kasper,M.Pasanen,K.Prasad,S.Troth,D.Bounous,D.Robinson-Gravatt,G.Betton,M.A.Davis,J.Akunda,J.E.McDuffie,L.Suter,L.Obert,M.Guffroy,M.Pinches,S.Jayadev,E.A.BIomme,S.A.Beushausen,V.G.Barlow,N.CoIIins,J.Waring,D.Honor,S.Snook,J.Lee,P.Rossi,E.Walker和W.Mattes,Nat Biotechnol,2010,28,455-462.
- [0176] 33.T.Ichimura,C.C.Hung,S.A.Yang,J.L.Stevens和J.V.Bonventre,Am J Physiol Renal Physiol,2004,286,F552-563.
- [0177] 34.W.S.Waring和A.Moonie,Clin Toxicol (Phila),2011,49,720-728.
- [0178] 35.J.Mishra,Q.Ma,A.Prada,M.Mitsnefes,K.Zahedi,J.Yang,J.Barasch和P.Devarajan,J Am Soc Nephrol,2003,14,2534-2543.
- [0179] 36.D.Liang,H.F.Liu,C.W.Yao,H.Y.Liu,C.M.Huang-Fu,X.W.Chen和S.H.Du,Nephrology (Carlton),2007,12,53-61.
- [0180] 37.K.Miyauchi,Y.Takiyama,J.Honjyo,M.Tateno和M.Haneda,Diabetes Res Clin Pract,2009,83,190-199.
- [0181] 38.Z.I.Niemir,H.Stein,A.Ciechanowicz,P.Olejniczak,G.Dworacki,E.Ritz,R.Waldherr和S.Czekałski,Am J Kidney Dis,2004,43,983-998.
- [0182] 39.J.S.Gerritsma,P.S.Hiemstra,A.F.Gerritsen,W.Prodjosudjadi,C.L.Verweij,L.A.Van Es和M.R.Daha,Clin Exp Immunol,1996,103,289-294.
- [0183] 40.J.S.Gerritsma,C.van Kooten,A.F.Gerritsen,A.M.Mommaas,L.A.van Es和M.R.Daha,Exp Nephrol,1998,6,208-216.
- [0184] 41.S.C.Tang,J.C.Leung和K.N.Lai,Contrib Nephrol,2011,170,124-134.
- [0185] 42.M.Araki,N.Fahmy,L.Zhou,H.Kumon,V.Krishnamurthi,D.Goldfarb,C.Modlin,S.Flechner,A.C.Novick和R.L.Fairchild,Transplantation,2006,81,783-788.
- [0186] 43.D.N.Grigoryev,M.Liu,H.T.Hassoun,C.Cheadle,K.C.Barnes和H.Rabb,J Am Soc Nephrol,2008,19,547-558.
- [0187] 44.D.Tramma,M.Hatzistyllianou,G.Gerasimou和V.Lafazanis,Pediatr Nephrol,2012,27,1525-1530.
- [0188] 45.A.Akçay,Q.Nguyen和C.L.EdeIstein,Mediators Inflamm,2009,2009,137072.
- [0189] 46.G.Elberg,S.Guruswamy,C.J.Logan,L.Chen和M.A.Turman,Cell Tissue Res,2008,331,495-508.
- [0190] 47.T.A.Luger和T.Schwarz,J Invest Dermatol,1990,95,100S-104S.
- [0191] 48.P.Trayhurn,C.A.Drevon和J.Eckel,Arch Physiol Biochem,2011,117,47-56.
- [0192] 49.M.RossoI,H.Heine,U.Meusch,D.Quandt,C.Klein,M.J.Sweet和S.Hauschildt,Crit Rev Immunol,2011,31,379-446.
- [0193] 50.R.A.Swerlick和T.J.Lawley,J Invest Dermatol,1993,100,111S-115S.

- [0194] 51.C.S.MiIIer和G.J.McGarity,J Am Dent Assoc,2009,140,56-60.
- [0195] 52.M.E.PhiIIips,J.B.Eastwood,J.R.Curtis,P.C.Gower和H.E.De Wardener,Br Med J,1974,2,149-151.
- [0196] 53.A.Saito,K.Sawada和S.Fujimura,HemodiaI Int,2011,15,183-192.



Glu Lys Asp Gly Cys Phe Gln Ser Gly Phe Asn Glu Glu Thr Cys Leu  
 100 105 110

Val Lys Ile Ile Thr Gly Leu Leu Glu Phe Glu Val Tyr Leu Glu Tyr  
 115 120 125

Leu Gln Asn Arg Phe Glu Ser Ser Glu Glu Gln Ala Arg Ala Val Gln  
 130 135 140

Met Ser Thr Lys Val Leu Ile Gln Phe Leu Gln Lys Lys Ala Lys Asn  
 145 150 155 160

Leu Asp Ala Ile Thr Thr Pro Asp Pro Thr Thr Asn Ala Ser Leu Leu  
 165 170 175

Thr Lys Leu Gln Ala Gln Asn Gln Trp Leu Gln Asp Met Thr Thr His  
 180 185 190

[0002]

Leu Ile Leu Arg Ser Phe Lys Glu Phe Leu Gln Ser Ser Leu Arg Ala  
 195 200 205

Leu Arg Gln Met  
 210

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 212

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 野猪(Sus scrofa)

&lt;400&gt; 2

Met Asn Ser Leu Ser Thr Ser Ala Phe Ser Pro Val Ala Phe Ser Leu  
 1 5 10 15

Gly Leu Leu Leu Val Met Ala Thr Ala Phe Pro Thr Pro Glu Arg Leu  
 20 25 30

Glu Glu Asp Ala Lys Gly Asp Ala Thr Ser Asp Lys Met Leu Phe Thr  
 35 40 45

Ser Pro Asp Lys Thr Glu Glu Leu Ile Lys Tyr Ile Leu Gly Lys Ile  
 50 55 60

Ser Ala Met Arg Lys Glu Met Cys Glu Lys Tyr Glu Lys Cys Glu Asn  
 65 70 75 80

Ser Lys Glu Val Leu Ala Glu Asn Asn Leu Asn Leu Pro Lys Met Ala  
 85 90 95

Glu Lys Asp Gly Cys Phe Gln Ser Gly Phe Asn Gln Glu Thr Cys Leu  
 100 105 110

Met Arg Ile Thr Thr Gly Leu Val Glu Phe Gln Ile Tyr Leu Asp Tyr  
 115 120 125

[0003] Leu Gln Lys Glu Tyr Glu Ser Asn Lys Gly Asn Val Glu Ala Val Gln  
 130 135 140

Ile Ser Thr Lys Ala Leu Ile Gln Thr Leu Arg Gln Lys Gly Lys Asn  
 145 150 155 160

Pro Asp Lys Ala Thr Thr Pro Asn Pro Thr Thr Asn Ala Gly Leu Leu  
 165 170 175

Asp Lys Leu Gln Ser Gln Asn Glu Trp Met Lys Asn Thr Lys Ile Ile  
 180 185 190

Leu Ile Leu Arg Ser Leu Glu Asp Phe Leu Gln Phe Ser Leu Arg Ala  
 195 200 205

Ile Arg Ile Met  
 210

<210> 3

<211> 97  
 <212> PRT  
 <213> 智人(Homo sapiens)

<400> 3

Met Thr Ser Lys Leu Ala Val Ala Leu Leu Ala Ala Phe Leu Ile Ser  
 1 5 10 15

Ala Ala Leu Cys Glu Gly Ala Val Leu Pro Arg Ser Ala Lys Glu Leu  
 20 25 30

Arg Cys Gln Cys Ile Lys Thr Tyr Ser Lys Pro Phe His Pro Lys Phe  
 35 40 45

Ile Lys Glu Leu Arg Val Ile Glu Ser Gly Pro His Cys Ala Asn Thr  
 50 55 60

[0004] Glu Ile Ile Val Lys Leu Ser Asp Gly Arg Glu Leu Cys Leu Asp Pro  
 65 70 75 80

Lys Glu Asn Trp Val Gln Arg Val Val Glu Lys Phe Leu Lys Arg Ala  
 85 90 95

Glu

<210> 4  
 <211> 103  
 <212> PRT  
 <213> 野猪(Sus scrofa)

<400> 4

Met Thr Ser Lys Leu Ala Val Ala Phe Leu Ala Val Phe Leu Leu Ser  
 1 5 10 15

Ala Ala Leu Cys Glu Ala Ala Val Leu Ala Arg Val Ser Ala Glu Leu  
 20 25 30

Arg Cys Gln Cys Ile Asn Thr His Ser Thr Pro Phe His Pro Lys Phe  
 35 40 45

Ile Lys Glu Leu Arg Val Ile Glu Ser Gly Pro His Cys Glu Asn Ser  
 50 55 60

Glu Ile Ile Val Lys Leu Val Asn Gly Lys Glu Val Cys Leu Asp Pro  
 65 70 75 80

Lys Glu Lys Trp Val Gln Lys Val Val Gln Ile Phe Leu Lys Arg Thr  
 85 90 95

Glu Lys Gln Gln Gln Gln Gln  
 100

[0005]

<210> 5  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> 人工

<220>  
 <223> 合成引物

<400> 5  
 acctgagggg aactaatctg 20

<210> 6  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> 人工

<220>  
 <223> 合成引物

<400> 6  
 cgttgataac ctgtccatct 20

<210> 7  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> 人工

	<220>		
	<223>	合成引物	
	<400>	7	
		caggetgatc ccataatgea	20
	<210>	8	
	<211>	22	
	<212>	DNA	
	<213>	人工	
	<220>		
	<223>	合成引物	
	<400>	8	
		ctgcctctec accaaccttt ac	22
	<210>	9	
	<211>	23	
	<212>	DNA	
	<213>	人工	
[0006]	<220>		
	<223>	合成引物	
	<400>	9	
		caaggagctg acttcggaac taa	23
	<210>	10	
	<211>	20	
	<212>	DNA	
	<213>	人工	
	<220>		
	<223>	合成引物	
	<400>	10	
		tgcactcage cgtcgataca	20
	<210>	11	
	<211>	20	
	<212>	DNA	
	<213>	人工	
	<220>		

	<223> 合成引物	
	<400> 11	
	tggetgcagg acatgacaac	20
	<210> 12	
	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> 人工	
	<220>	
	<223> 合成引物	
	<400> 12	
	tgaggtgecc atgetacatt t	21
	<210> 13	
	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> 人工	
	<220>	
[0007]	<223> 合成引物	
	<400> 13	
	ttggcagect tctgatttc t	21
	<210> 14	
	<211> 22	
	<212> DNA	
	<213> 人工	
	<220>	
	<223> 合成引物	
	<400> 14	
	gggtggaaag gtttgagta tg	22
	<210> 15	
	<211> 25	
	<212> DNA	
	<213> 人工	
	<220>	
	<223> 合成引物	

	<400> 15	
	gaaccagtag aagacaatg catca	25
	<210> 16	
	<211> 24	
	<212> DNA	
	<213> 人工	
	<220>	
	<223> 合成引物	
	<400> 16	
	ccaggttttc atcatcttca gcta	24
	<210> 17	
	<211> 23	
	<212> DNA	
[0008]	<213> 人工	
	<220>	
	<223> 合成引物	
	<400> 17	
	ccccttcatt gacctcaact aca	23
	<210> 18	
	<211> 19	
	<212> DNA	
	<213> 人工	
	<220>	
	<223> 合成引物	
	<400> 18	
	gacggtgccca tggatttg	19

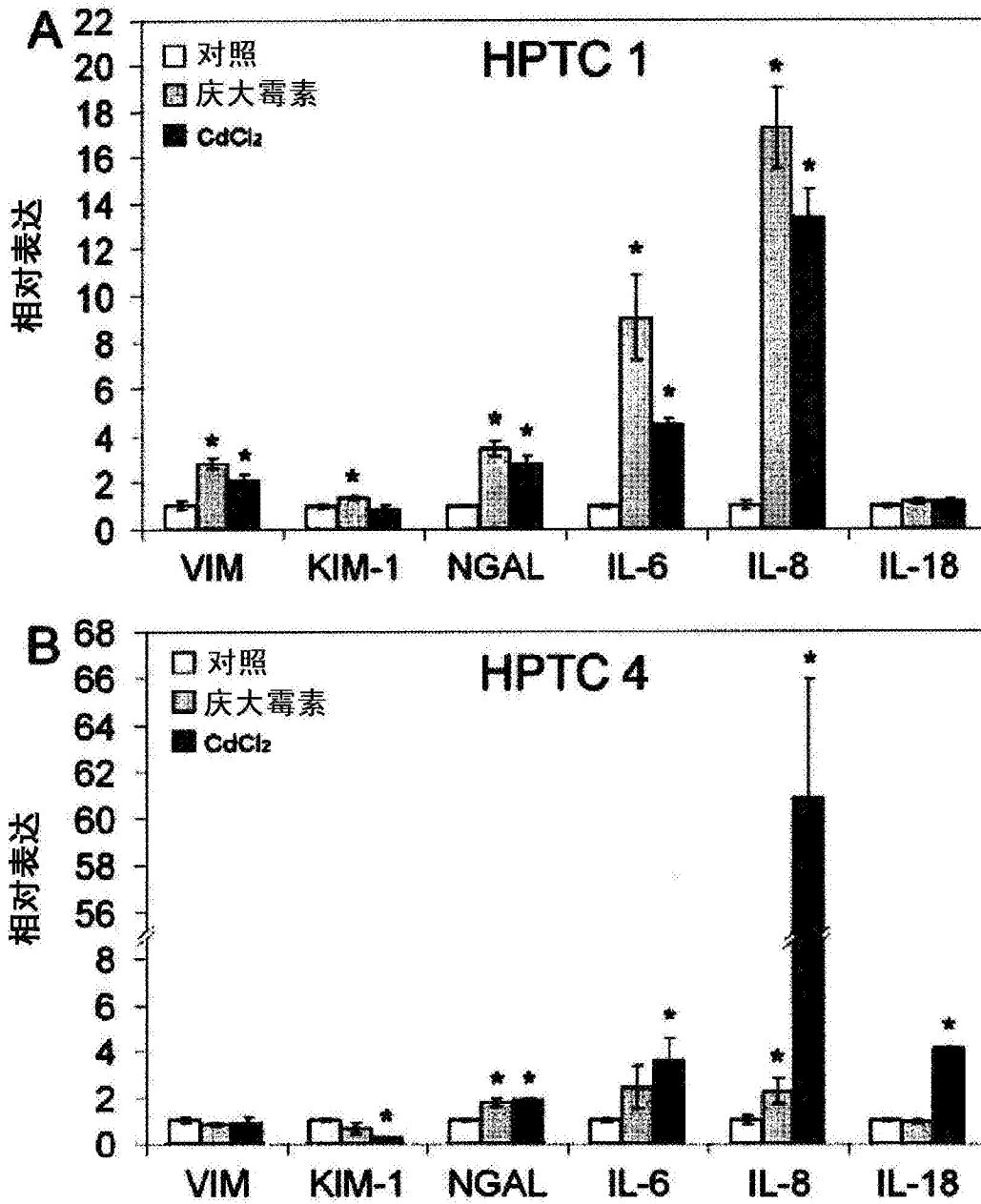


图1

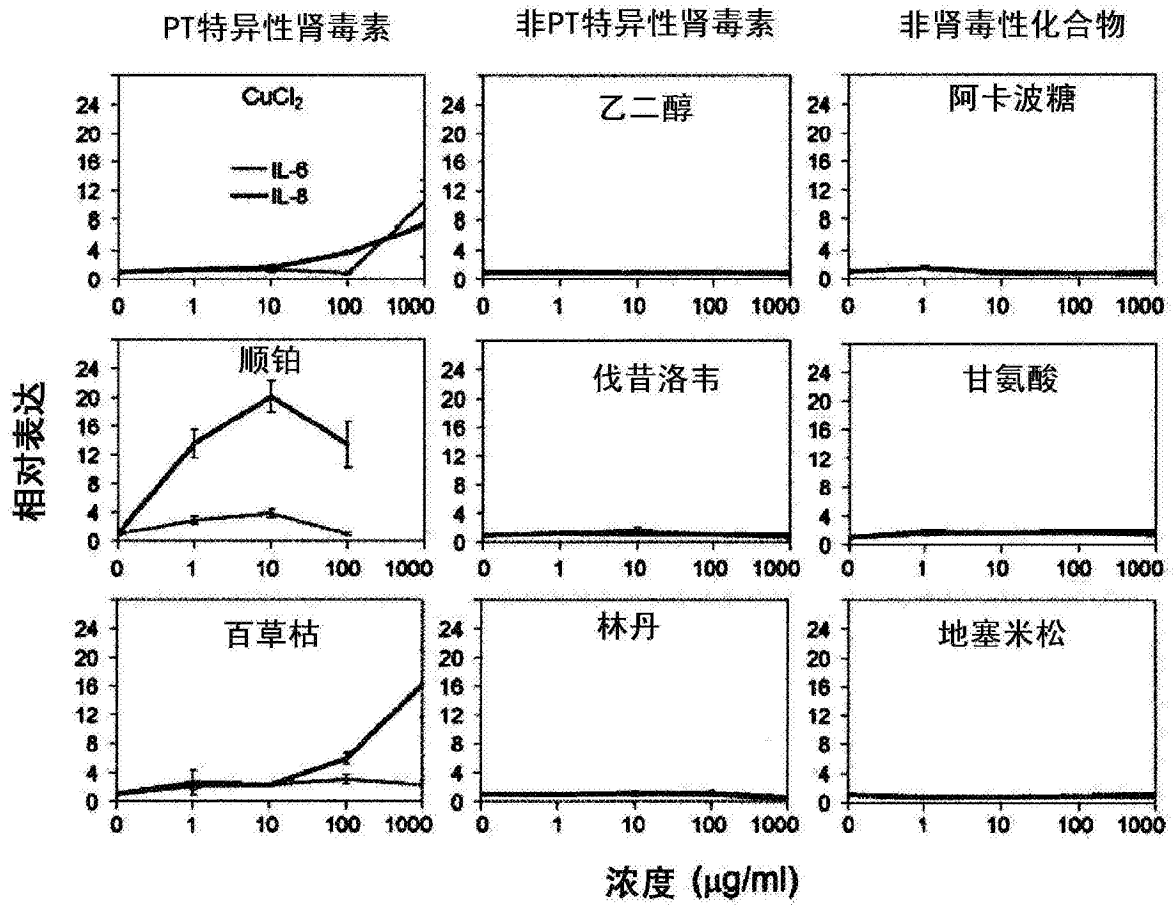


图2

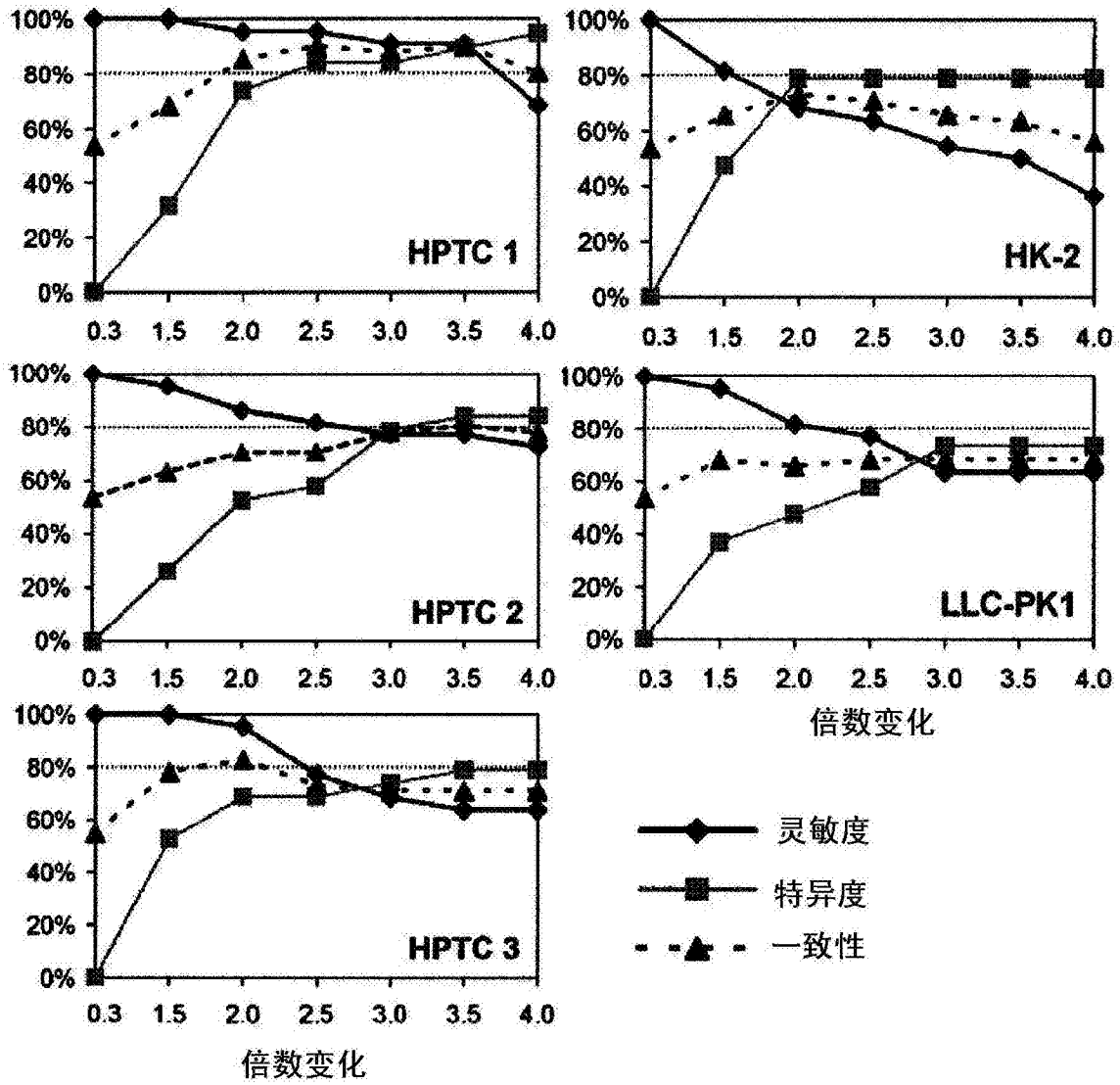


图3

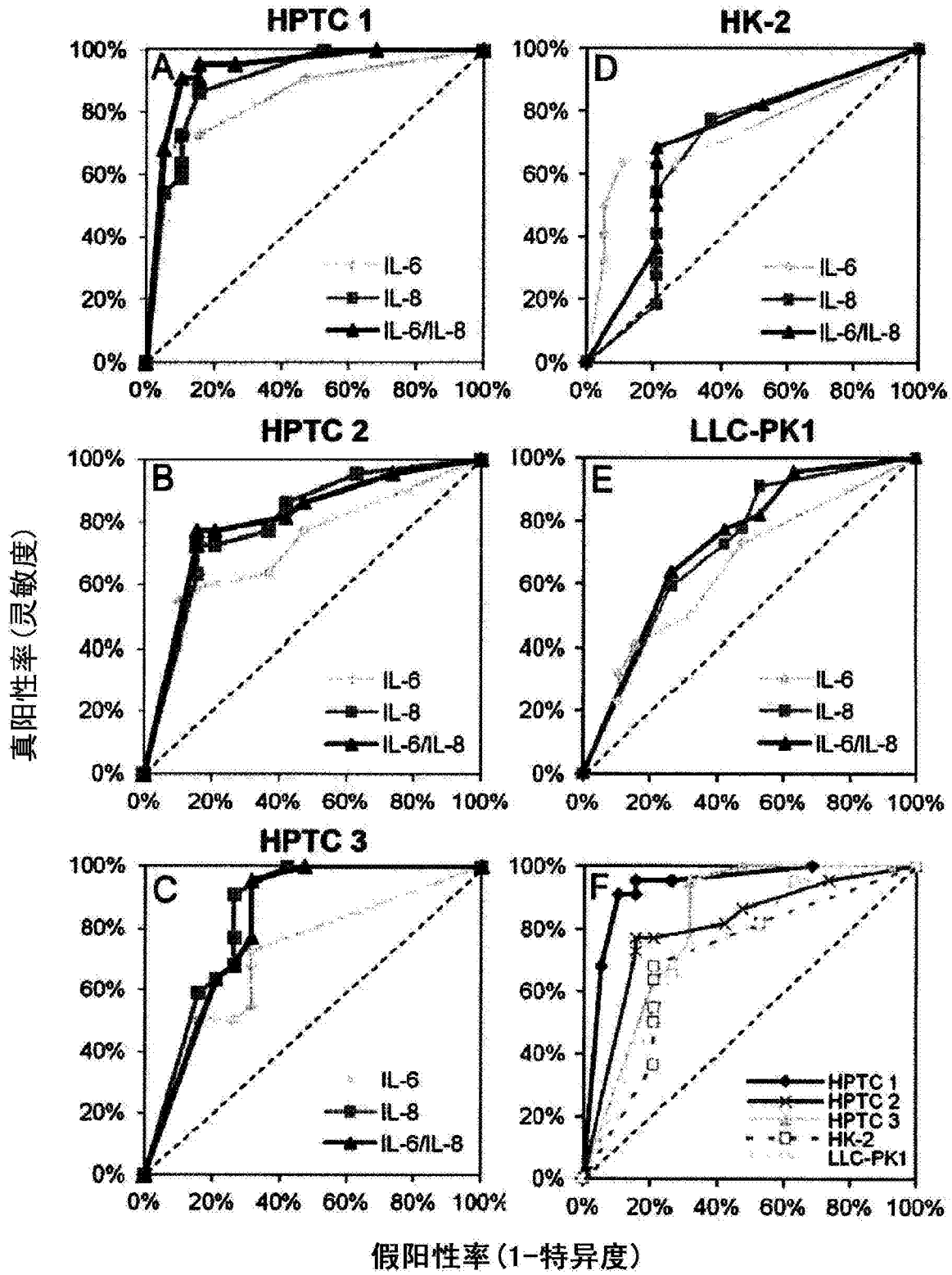


图4

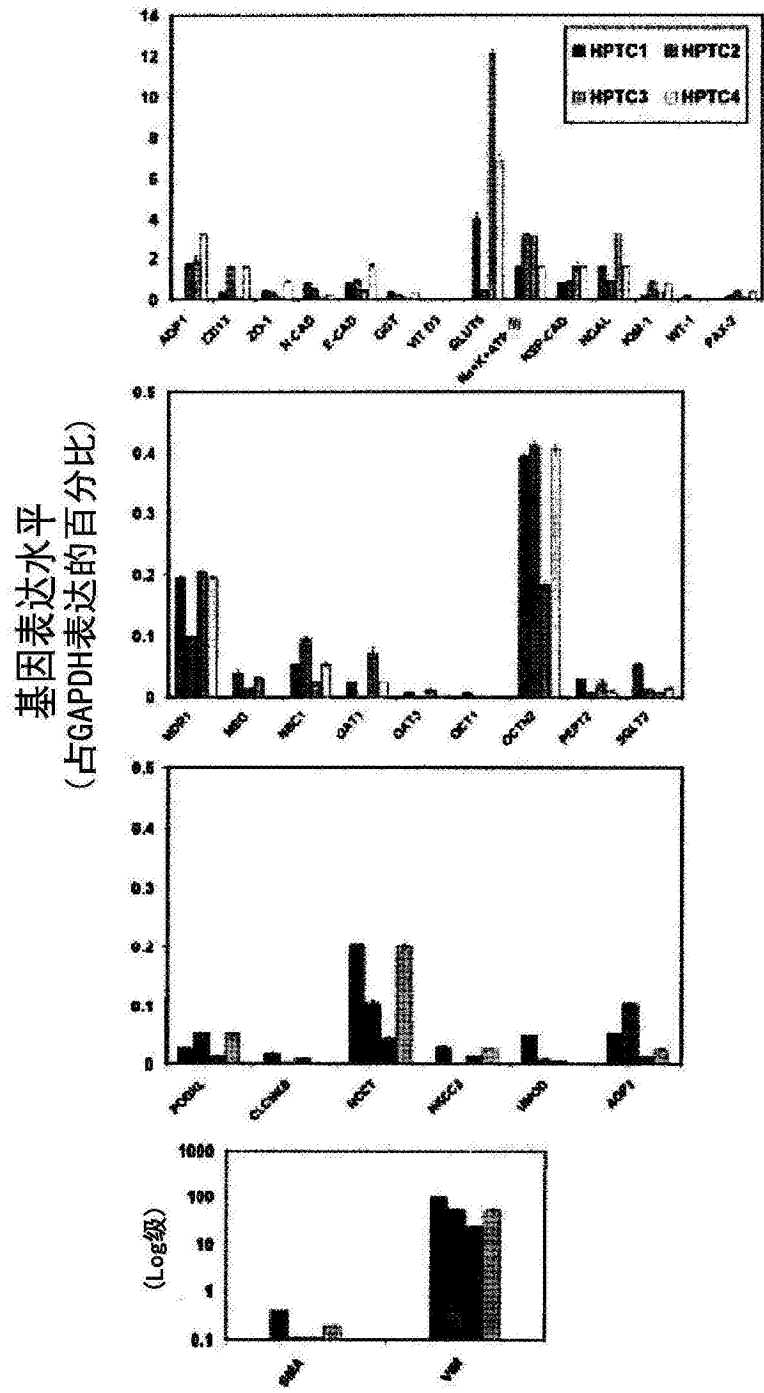


图5

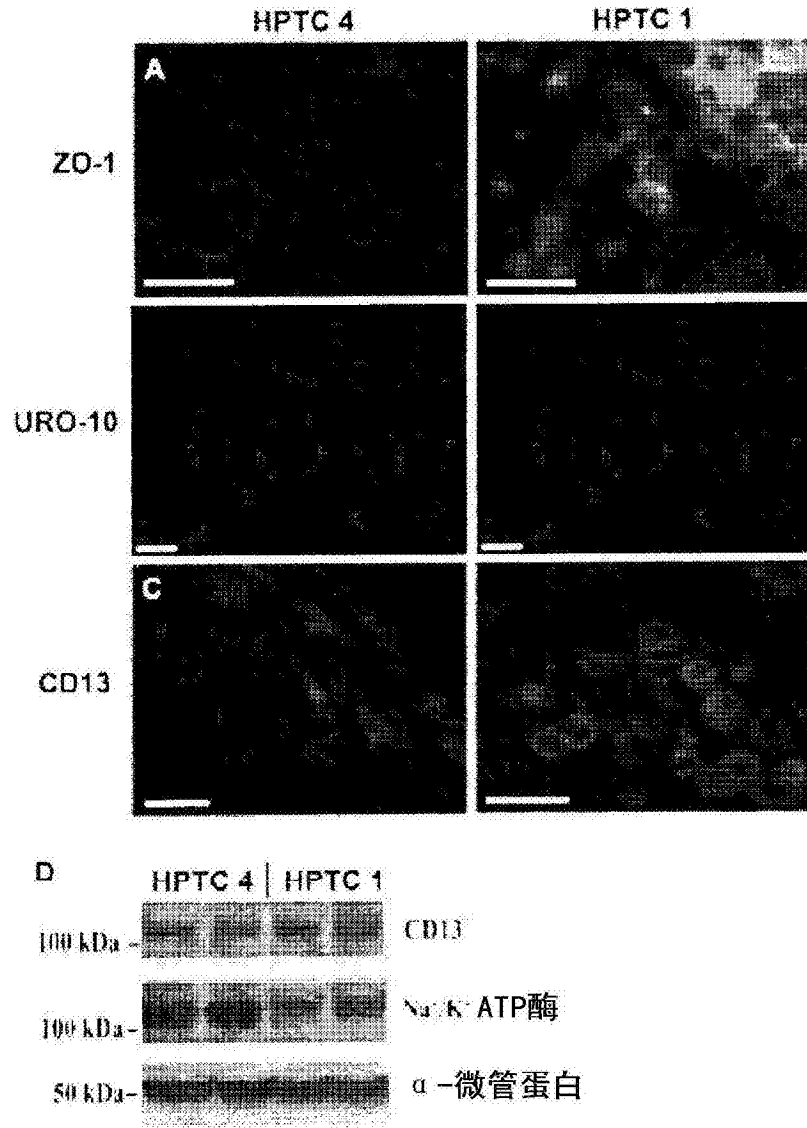
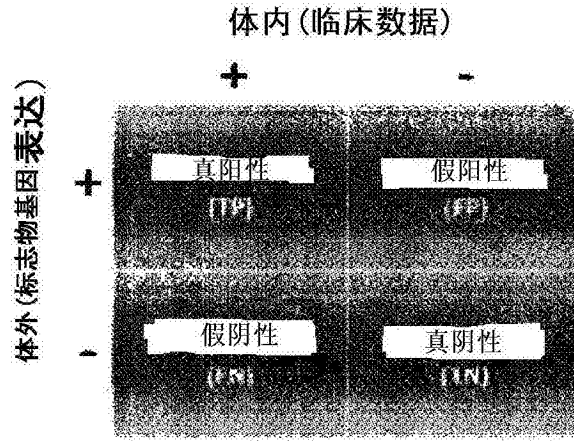


图6



灵敏度 =  $TP / (TP + FN)$   
 特异度 =  $TN / (FP + TN)$   
 一致性 =  $(TP + TN) / (TP + FP + FN + TN)$   
 平衡的精度 =  $(灵敏度 + 特异度) / 2$   
 阳性预测值 (PPV) =  $TP / (TP + FP)$   
 阴性预测值 (NPV) =  $TN / (TN + FN)$

图7

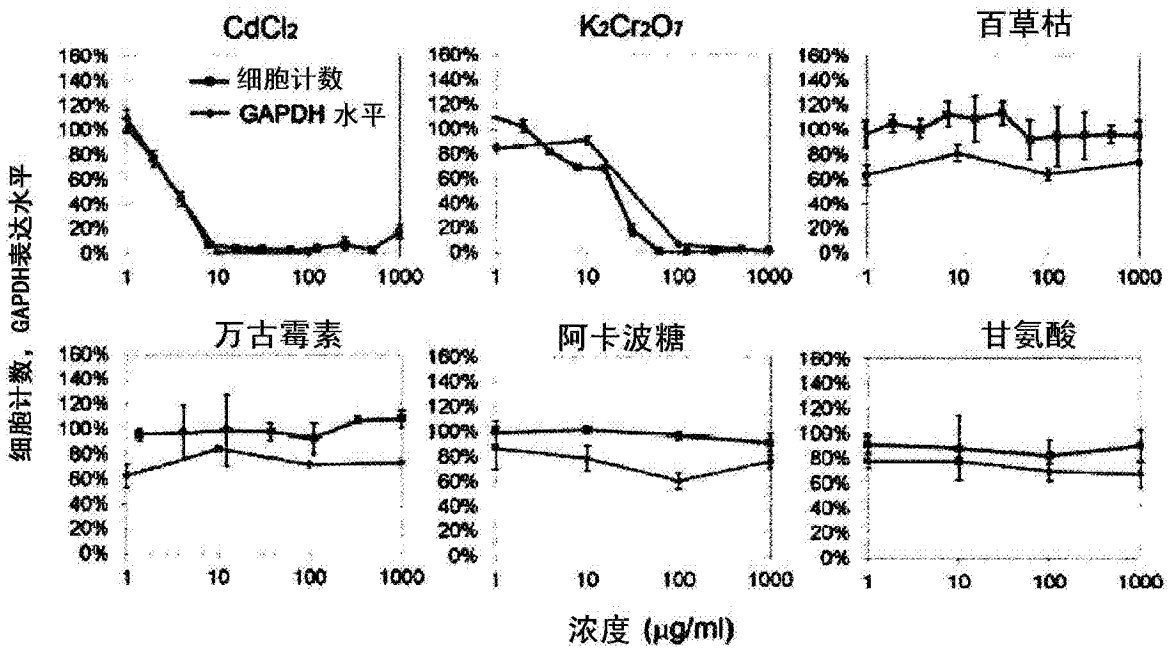


图8

表1

编号	化合物	HK-2		LLC-PK1	
		IL-6	IL-8	IL-6	IL-8
1	庆大霉素	1.2±0.1	1.3±0.5	5.2±1.0	2.7±0.1
2	托普霉素	1.4±0.2	1.1±0.1	1.2±0.0	2.3±0.2
3	利福平	12.8±1.7	5.1±0.2	1.4±0.2	8.4±0.1
4	四环素	8.6±1.3	18.8±5.3	4.8±0.3	8.9±0.3
5	嘌呤霉素	120.5±26.1	30.5±2.7	313.7±31.4	839.4±305.9
6	头孢菌素G	2.6±0.3	1.9±0.3	1.1±0.0	1.6±0.2
7	5-氟尿嘧啶	3.6±0.8	14.3±1.2	1.8±0.1	10.1±0.7
8	顺铂	1.7±0.1	2.5±0.1	1.7±0.1	1.2±0.4
9	异环磷酰胺	1.2±0.1	1.7±0.1	1.0±0.1	1.7±0.0
10	百草枯	1.2±0.1	1.4±0.5	6.3±0.3	20.3±2.0
11	氯化钾 (III)	5.9±0.5	2.0±1.0	0.9±0.1	6.9±0.3
12	氯化钾 (III)	1.3±0.0	3.0±0.0	1.8±0.1	4.3±0.9
13	氯化钾 (II)	2.8±0.8	3.7±0.7	12.9±7.2	12.2±4.3
14	氯化铜 (II)	16.1±1.1	1.2±0.1	3.7±0.2	37.0±4.4
15	氯化钙 (IV)	0.7±0.1	1.5±0.2	2.4±0.0	2.5±0.1
16	氯化金 (I)	3.5±0.5	1.9±0.4	2.8±0.0	1.6±0.3
17	乙酸铅	2.0±0.4	2.1±0.1	2.5±0.2	16.3±4.3
18	重铬酸钾	0.6±0.0	0.6±0.1	0.9±0.0	1.4±0.2
19	他克莫司	7.8±0.4	2.8±0.1	7.4±1.0	301.3±27.5
20	环孢霉素A	1.2±0.1	1.6±0.3	2.4±0.6	4.9±1.2
21	环孢霉素	14.7±1.5	1.7±0.0	1.7±0.5	2.6±0.3
22	替诺福韦	2.0±0.3	3.9±0.5	1.5±0.1	4.0±0.3
23	万古霉素	0.8±0.0	1.2±0.2	0.9±0.1	1.2±0.1
24	非那西汀	0.7±0.1	4.7±0.6	1.3±0.1	16.1±0.4
25	酮氯酚	1.2±0.2	1.2±0.1	2.3±0.4	1.8±0.3
26	布洛芬	0.9±0.5	0.5±0.2	2.1±0.5	2.9±1.0
27	吡喃苯胺酸	1.0±0.1	8.3±0.7	2.6±0.1	13.7±1.2
28	氟化铯	1.6±0.0	1.4±0.1	1.0±0.0	1.0±0.1
29	林丹	1.5±0.6	0.5±0.0	0.9±0.2	1.2±0.1
30	乙二醇	1.3±0.1	1.6±0.1	1.1±0.1	2.6±0.1
31	伐昔洛韦	1.4±0.0	1.7±0.3	1.6±0.3	1.3±0.0
32	林肯霉素	0.9±0.2	1.1±0.2	1.6±0.1	2.1±0.1
33	环丙沙星	1.1±0.1	1.2±0.1	8.2±2.6	9.1±0.6
34	利巴韦林	1.3±0.1	1.3±0.1	1.8±0.0	0.8±0.0
35	甘氨酸	1.3±0.1	1.5±0.0	0.9±0.1	1.0±0.0
36	地塞米松	1.0±0.1	0.8±0.1	0.8±0.0	0.7±0.1
37	褪黑素	0.8±0.0	0.3±0.0	2.4±0.3	2.6±0.2
38	左旋多巴 (DOPA)	1.5±0.3	1.2±0.1	0.8±0.0	1.1±0.0
39	三碘甲状腺氨酸	2.4±0.6	10.2±3.5	7.7±0.6	164.4±4.0
40	阿卡波糖	1.2±0.1	1.0±0.0	1.1±0.0	1.1±0.0
41	阿托伐他汀	35.0±4.3	82.4±8.2	0.9±0.0	11.0±1.0

图9

表2

No.	HPTC 1		HPTC 2		HPTC 3	
	IL-6	IL-8	IL-6	IL-8	IL-6	IL-8
1	16.9 ± 0.2	8.6 ± 1.3	1.7 ± 0.1	2.0 ± 0.1	1.6 ± 0.1	1.9 ± 0.3
2	8.0 ± 0.9	8.9 ± 1.2	1.4 ± 0.0	1.5 ± 0.1	1.4 ± 0.1	2.0 ± 0.1
3	38.9 ± 3.0	130.8 ± 39.0	3.6 ± 0.7	13.1 ± 3.0	5.3 ± 0.4	7.3 ± 2.7
4	6.3 ± 0.7	1.5 ± 0.1	2.3 ± 0.3	3.6 ± 0.8	23.6 ± 2.8	35.5 ± 4.4
5	8.5 ± 1.0	9.5 ± 0.6	7.9 ± 1.7	14.6 ± 3.1	80.4 ± 3.7	46.4 ± 1.2
6	3.9 ± 0.1	2.3 ± 0.2	3.6 ± 0.3	9.2 ± 0.2	1.4 ± 0.1	2.4 ± 0.6
7	3.6 ± 0.8	2.4 ± 0.2	4.8 ± 0.6	3.8 ± 0.9	12.0 ± 1.8	5.4 ± 0.4
8	3.8 ± 0.6	20.1 ± 2.2	27.9 ± 0.8	32.7 ± 0.9	12.1 ± 0.4	21.9 ± 0.8
9	3.1 ± 0.7	1.5 ± 0.2	1.3 ± 0.1	1.8 ± 0.4	2.9 ± 0.3	2.6 ± 0.2
10	3.1 ± 0.7	16.3 ± 4.6	7.5 ± 0.0	13.2 ± 0.3	11.8 ± 0.5	9.7 ± 0.2
11	3.0 ± 0.1	6.0 ± 0.1	1.6 ± 0.0	25.7 ± 3.8	31.4 ± 12.8	22.8 ± 4.0
12	1.1 ± 0.3	11.9 ± 6.2	1.9 ± 0.3	22.5 ± 2.0	4.0 ± 0.1	9.5 ± 1.8
13	6.6 ± 0.5	9.7 ± 2.5	12.9 ± 0.6	165.2 ± 14.7	10.8 ± 1.2	13.3 ± 1.4
14	10.4 ± 2.9	7.5 ± 4.4	12.4 ± 1.4	119.0 ± 5.4	0.9 ± 0.2	9.9 ± 1.1
15	1.7 ± 0.5	2.9 ± 1.7	3.6 ± 0.2	5.7 ± 0.2	2.2 ± 0.2	3.4 ± 0.5
16	10.0 ± 1.3	2.2 ± 0.7	13.6 ± 1.0	8.3 ± 0.5	5.8 ± 2.5	3.5 ± 1.0
17	3.5 ± 0.4	3.3 ± 0.1	8.6 ± 0.4	23.8 ± 2.9	2.3 ± 0.2	2.8 ± 0.4
18	1.7 ± 0.2	3.8 ± 1.0	0.8 ± 0.0	2.7 ± 0.3	0.6 ± 0.2	10.1 ± 0.9
19	24.6 ± 5.7	3.9 ± 1.3	37.6 ± 0.7	29.3 ± 4.3	38.1 ± 1.2	25.0 ± 0.8
20	1.1 ± 0.2	5.6 ± 1.3	3.4 ± 0.7	67.4 ± 3.1	1.3 ± 0.1	17.8 ± 1.6
21	3.9 ± 0.7	2.3 ± 0.7	1.3 ± 0.1	4.9 ± 0.1	2.3 ± 0.3	1.5 ± 0.1
22	1.6 ± 0.1	4.3 ± 0.4	0.7 ± 0.0	1.0 ± 0.0	1.1 ± 0.1	2.0 ± 0.2
23	1.4 ± 0.2	1.6 ± 0.3	1.4 ± 0.2	1.8 ± 0.4	1.0 ± 0.4	0.8 ± 0.2
24	1.2 ± 0.1	1.3 ± 0.1	0.8 ± 0.1	0.9 ± 0.2	6.2 ± 1.0	3.6 ± 0.3
25	1.3 ± 0.0	1.5 ± 0.1	2.9 ± 0.2	2.6 ± 0.1	0.8 ± 0.1	0.9 ± 0.0
26	2.6 ± 0.8	3.1 ± 1.4	16.1 ± 1.2	4.3 ± 0.3	2.9 ± 0.1	1.5 ± 0.3
27	1.7 ± 0.4	1.9 ± 0.5	2.6 ± 0.2	2.6 ± 0.2	9.0 ± 0.6	8.2 ± 0.7
28	0.7 ± 0.1	0.5 ± 0.1	17.4 ± 0.8	20.5 ± 0.8	1.1 ± 0.2	1.3 ± 0.3
29	1.0 ± 0.3	1.1 ± 0.4	0.8 ± 0.0	1.5 ± 0.1	0.9 ± 0.2	1.2 ± 0.0
30	1.0 ± 0.1	1.1 ± 0.1	1.8 ± 0.1	2.0 ± 0.1	1.0 ± 0.2	1.2 ± 0.3
31	1.7 ± 0.4	1.3 ± 0.1	1.6 ± 0.3	1.2 ± 0.2	1.4 ± 0.2	1.3 ± 0.2
32	1.3 ± 0.1	1.2 ± 0.0	1.3 ± 0.1	1.4 ± 0.1	1.0 ± 0.2	1.1 ± 0.2
33	4.7 ± 0.6	5.3 ± 1.1	1.3 ± 0.1	1.6 ± 0.2	2.9 ± 0.1	3.2 ± 0.3
34	1.5 ± 0.1	1.4 ± 0.1	1.2 ± 0.1	1.4 ± 0.1	1.2 ± 0.3	1.7 ± 0.4
35	1.7 ± 0.2	2.0 ± 0.1	2.7 ± 0.8	1.3 ± 0.0	1.0 ± 0.1	1.2 ± 0.1
36	0.9 ± 0.1	1.1 ± 0.1	2.7 ± 0.1	2.9 ± 0.0	1.4 ± 0.2	1.7 ± 0.3
37	1.2 ± 0.1	1.5 ± 0.3	1.1 ± 0.3	1.4 ± 0.2	0.9 ± 0.1	1.3 ± 0.1
38	1.8 ± 0.0	1.3 ± 0.1	1.2 ± 0.2	3.1 ± 0.2	0.6 ± 0.1	1.3 ± 0.2
39	3.4 ± 1.0	1.8 ± 0.1	3.1 ± 0.3	24.0 ± 3.4	3.4 ± 0.3	5.1 ± 0.3
40	1.6 ± 0.2	1.5 ± 0.1	1.2 ± 0.0	1.3 ± 0.0	1.3 ± 0.1	1.3 ± 0.1
41	1.0 ± 0.3	3.6 ± 1.2	1.0 ± 0.0	1.6 ± 0.1	128.5 ± 21.1	38.2 ± 7.1

图10

表3

	HPTC 1		阈值 = 2.0	
	IL-6	IL-8	+/- 测试	灵敏度/特异度
1	16.9 ± 0.2	8.6 ± 1.3	+	灵敏度 = 21/22 = 96% 阳性
2	8.0 ± 0.9	8.9 ± 1.2	+	
3	38.9 ± 3.0	110.8 ± 39.0	+	
4	6.3 ± 0.7	1.5 ± 0.1	+	
5	8.5 ± 1.0	9.5 ± 0.6	+	
6	3.9 ± 0.1	2.3 ± 0.2	+	
7	3.6 ± 0.8	2.4 ± 0.2	+	
8	3.8 ± 0.6	20.1 ± 2.2	+	
9	1.7 ± 0.2	1.5 ± 0.2	-	
10	3.1 ± 0.7	16.3 ± 4.6	+	
11	3.0 ± 0.1	6.0 ± 0.1	+	
12	1.1 ± 0.3	11.9 ± 6.2	+	
13	6.6 ± 0.5	9.7 ± 2.5	+	
14	10.4 ± 2.9	7.5 ± 4.4	+	
15	1.7 ± 0.5	2.9 ± 1.7	+	
16	10.0 ± 1.3	2.2 ± 0.7	+	
17	3.5 ± 0.4	3.3 ± 0.1	+	
18	1.7 ± 0.2	3.8 ± 1.0	+	
19	24.6 ± 5.7	3.9 ± 1.3	+	
20	1.1 ± 0.2	5.6 ± 1.3	+	
21	3.9 ± 0.7	2.3 ± 0.7	+	
22	1.6 ± 0.1	4.3 ± 0.4	+	
23	1.4 ± 0.2	1.6 ± 0.3	-	特异度 = 14/19 = 74% 阴性
24	1.2 ± 0.1	1.3 ± 0.1	-	
25	1.3 ± 0.0	1.5 ± 0.1	-	
26	2.6 ± 0.8	3.1 ± 1.4	+	
27	1.7 ± 0.4	1.9 ± 0.5	-	
28	0.7 ± 0.1	0.5 ± 0.1	-	
29	1.0 ± 0.3	1.1 ± 0.4	-	
30	1.0 ± 0.1	1.1 ± 0.1	-	
31	1.7 ± 0.4	1.3 ± 0.1	-	
32	1.3 ± 0.1	1.2 ± 0.0	-	
33	4.7 ± 0.6	5.3 ± 1.1	+	
34	1.5 ± 0.1	1.4 ± 0.1	-	
35	1.7 ± 0.2	2.0 ± 0.1	+	
36	0.9 ± 0.1	1.1 ± 0.1	-	
37	1.2 ± 0.1	1.5 ± 0.3	-	
38	1.8 ± 0.0	1.3 ± 0.1	-	
39	3.4 ± 1.0	1.8 ± 0.1	+	
40	1.6 ± 0.2	1.5 ± 0.1	-	
41	1.0 ± 0.3	3.6 ± 1.2	+	

图11

表4

HPTC 1			阈值 = 3.5	
IL-6	IL-8	+/- 测试	灵敏度/特异度	
1	16.9 ± 0.2	8.6 ± 1.3	+	灵敏度 = 20/22 = 91% 阳性
2	8.0 ± 0.9	8.9 ± 1.2	+	
3	38.9 ± 3.0	110.8 ± 39.0	+	
4	6.3 ± 0.7	1.5 ± 0.1	+	
5	8.5 ± 1.0	9.5 ± 0.6	+	
6	3.9 ± 0.1	2.3 ± 0.2	+	
7	3.6 ± 0.8	2.4 ± 0.2	+	
8	3.8 ± 0.6	20.1 ± 2.2	+	
9	1.7 ± 0.2	1.5 ± 0.2	-	
10	3.1 ± 0.7	16.3 ± 4.6	+	
11	3.0 ± 0.1	6.0 ± 0.1	+	
12	1.1 ± 0.3	11.9 ± 6.2	+	
13	6.6 ± 0.5	9.7 ± 2.5	+	
14	10.4 ± 2.9	7.5 ± 4.4	+	
15	1.7 ± 0.5	2.9 ± 1.7	-	
16	10.0 ± 1.3	2.2 ± 0.7	+	
17	3.5 ± 0.4	3.3 ± 0.1	+	
18	1.7 ± 0.2	3.8 ± 1.0	+	
19	24.6 ± 5.7	3.9 ± 1.3	+	
20	1.1 ± 0.2	5.6 ± 1.3	+	
21	3.9 ± 0.7	2.3 ± 0.7	+	
22	1.6 ± 0.1	4.3 ± 0.4	+	
23	1.4 ± 0.2	1.6 ± 0.3	-	特异度 = 17/19 = 90% 阴性
24	1.2 ± 0.1	1.3 ± 0.1	-	
25	1.3 ± 0.0	1.5 ± 0.1	-	
26	2.6 ± 0.8	3.1 ± 1.4	-	
27	1.7 ± 0.4	1.9 ± 0.5	-	
28	0.7 ± 0.1	0.5 ± 0.1	-	
29	1.0 ± 0.3	1.1 ± 0.4	-	
30	1.0 ± 0.1	1.1 ± 0.1	-	
31	1.7 ± 0.4	1.3 ± 0.1	-	
32	1.3 ± 0.1	1.2 ± 0.0	-	
33	4.7 ± 0.6	5.3 ± 1.1	+	
34	1.5 ± 0.1	1.4 ± 0.1	-	
35	1.7 ± 0.2	2.0 ± 0.1	-	
36	0.9 ± 0.1	1.1 ± 0.1	-	
37	1.2 ± 0.1	1.5 ± 0.3	-	
38	1.8 ± 0.0	1.3 ± 0.1	-	
39	3.4 ± 1.0	1.8 ± 0.1	-	
40	1.6 ± 0.2	1.5 ± 0.1	-	
41	1.0 ± 0.3	3.6 ± 1.2	+	

图12

表5

阈值	HK-2	LLC-PK1	HPTC 1	HPTC 2	HPTC 3
0.3	TP 22 (100%)	22 (100%)	22 (100%)	22 (100%)	22 (100%)
	TN 0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
1.5	TP 18 (82%)	21 (96%)	22 (100%)	21 (96%)	22 (100%)
	TN 9 (47%)	7 (37%)	6 (32%)	5 (26%)	10 (53%)
2.0	TP 15 (68%)	18 (82%)	21 (96%)	19 (86%)	21 (96%)
	TN 15 (79%)	9 (47%)	14 (74%)	10 (53%)	13 (68%)
2.5	TP 14 (64%)	17 (77%)	21 (96%)	18 (82%)	17 (77%)
	TN 15 (79%)	11 (58%)	16 (84%)	11 (58%)	13 (68%)
3.0	TP 12 (55%)	14 (64%)	20 (91%)	17 (77%)	15 (68%)
	TN 15 (79%)	14 (74%)	16 (84%)	15 (79%)	14 (74%)
3.5	TP 11 (50%)	14 (64%)	20 (91%)	17 (77%)	14 (64%)
	TN 15 (79%)	14 (74%)	17 (90%)	16 (84%)	15 (79%)
4.0	TP 8 (36%)	14 (64%)	15 (68%)	16 (73%)	14 (64%)
	TN 15 (79%)	14 (74%)	18 (95%)	16 (84%)	15 (79%)

图13

表6

细胞类型	AUC		
	IL-6/IL-8	IL-6	IL-8
HPTC 1	0.94	0.85	0.90
HPTC 2	0.81	0.72	0.80
HPTC 3	0.82	0.71	0.84
HPTC 平均值	0.85	0.76	0.85
HPTC 中值	0.82	0.72	0.84
HK-2	0.71	0.74	0.68
LLC-PK1	0.73	0.65	0.72

图14

表7

细胞类型	平衡的精度	灵敏度	特异度	PPV	NPV	AUC
HPTC 1	0.90	0.91	0.90	0.91	0.94	0.94
HPTC 2	0.81	0.77	0.84	0.85	0.76	0.81
HPTC 3	0.71	0.64	0.79	0.78	0.68	0.82
HPTC 平均值	0.81	0.77	0.84	0.85	0.79	0.85
HPTC 中值	0.81	0.77	0.84	0.85	0.76	0.82
HK-2	0.65	0.50	0.79	0.73	0.60	0.71
LLC-PK1	0.69	0.64	0.74	0.74	0.67	0.73

图15

表8

编号	HPIC 1		HK-2		LLC-PK1	
	IL-6/IL-8	IC <sub>50</sub> (μg ml <sup>-1</sup> )	IL-6/IL-8	IC <sub>50</sub> (μg ml <sup>-1</sup> )	IL-6/IL-8	IC <sub>50</sub> (μg ml <sup>-1</sup> )
1	+	>1000	-	>1000	+	>1000
2	+	>1000	+	>1000	-	>1000
3	+	707	+	632	+	795
4	+	>1000	+	ND	+	>1000
5	+	>1000	+	ND	+	ND
6	+	47	-	94	+	38
7	+	ND	+	>1000	+	469
8	+	ND	-	ND	-	ND
9	-	>1000	-	>1000	-	>1000
10	+	>1000	-	>1000	+	69
11	+	21	+	7	+	19
12	+	>1000	-	>1000	+	>1000
13	+	4	+	ND	+	9
14	+	147.0	+	116	+	79
15	+	>1000	+	ND	+	>1000
16	+	96	+	ND	-	ND
17	+	>1000	-	ND	+	>1000
18	+	23	+	14	-	ND
19	+	45	+	44	+	45
20	+	>1000	-	>1000	+	ND
21	+	ND	+	ND	-	ND
22	+	>1000	+	>1000	+	ND
23	-	>1000	-	>1000	-	>1000
24	-	>1000	+	>1000	+	>1000
25	-	>1000	+	>1000	+	>1000
26	-	742	+	678	-	945
27	-	>1000	+	>1000	+	>1000
28	-	>1000	-	>1000	-	>1000
29	-	>1000	-	>1000	-	>1000
30	-	>1000	-	>1000	-	>1000
31	-	>1000	-	>1000	-	>1000
32	-	>1000	-	ND	-	>1000
33	+	>1000	-	>1000	+	>1000

图16



表9

化合物	HPTC 1, IL-6 表达				
	0	1	10	100	1000
1	1.0±0.0	1.0±0.0	1.2±0.0	2.9±0.1	16.9±0.2
2	1.0±0.2	1.3±0.1	1.5±0.1	1.8±0.3	8.0±0.9
3	1.0±0.2	3.2±0.5	3.1±0.2	1.7±0.9	38.9±3.0
4	1.0±0.0	1.1±0.1	1.4±0.9	6.3±0.7	1.0±0.1
5	1.0±0.1	1.0±0.1	8.5±1.0	5.0±0.4	6.8±1.3
6	1.0±0.2	0.9±0.0	1.0±0.0	0.7±0.1	3.9±0.1
7	1.0±0.1	1.4±0.2	1.7±0.3	2.6±0.1	3.6±0.8
8	1.0±0.1	2.9±0.6	3.8±0.6	1.0±0.2	ND
9	1.0±0.1	1.5±0.1	1.7±0.2	1.6±0.1	0.8±0.1
10	1.0±0.3	2.0±0.5	2.4±0.2	3.1±0.7	2.4±0.5
11	1.0±0.1	1.1±0.1	0.8±0.1	0.4±0.0	3.0±0.1
12	1.0±0.1	1.1±0.3	1.1±0.2	1.0±0.4	ND
13	1.0±0.1	1.5±0.1	6.6±0.5	2.9±1.5	ND
14	1.0±0.3	1.2±0.2	1.4±0.4	0.9±0.1	10.4±2.9
15	1.0±0.1	0.8±0.1	1.0±0.4	1.2±0.0	1.7±0.5
16	1.0±0.1	1.0±0.1	1.7±0.3	0.8±0.1	10.0±1.3
17	1.0±0.1	1.4±0.3	1.8±0.6	2.4±0.3	3.5±0.4
18	1.0±0.2	0.0±0.0	0.3±0.1	0.6±0.1	1.7±0.2
19	1.1±0.6	7.7±1.6	7.7±0.4	11.7±3.5	24.6±5.7
20	1.0±0.1	0.9±0.2	1.1±0.2	0.9±0.1	0.6±0.2
21	1.0±0.1	1.1±0.3	1.1±0.1	0.6±0.1	3.9±0.7
22	1.0±0.0	1.5±0.2	1.6±0.1	1.5±0.1	0.8±0.0
23	1.0±0.2	1.3±0.0	1.4±0.2	1.3±0.3	0.8±0.2
24	1.0±0.3	1.1±0.2	1.2±0.1	1.1±0.2	0.1±0.0
25	1.0±0.1	1.2±0.1	1.3±0.0	1.0±0.1	0.2±0.0
26	1.1±0.3	0.5±0.1	0.8±0.1	0.9±0.1	2.6±0.8
27	1.1±0.5	0.3±0.0	0.4±0.0	0.2±0.0	1.7±0.4
28	1.0±0.0	0.7±0.1	0.4±0.2	0.4±0.0	0.1±0.0
29	1.0±0.2	0.9±0.0	1.0±0.3	1.0±0.2	0.4±0.0
30	1.0±0.2	0.9±0.1	1.0±0.2	1.0±0.1	0.7±0.1

图17

表9 (续)

<b>31</b>	<b>1.0 ± 0.1</b>	<b>1.3 ± 0.1</b>	<b>1.7 ± 0.4</b>	<b>1.1 ± 0.1</b>	<b>0.7 ± 0.3</b>
<b>32</b>	<b>1.0 ± 0.2</b>	<b>1.3 ± 0.1</b>	<b>1.1 ± 0.1</b>	<b>1.0 ± 0.0</b>	<b>0.9 ± 0.1</b>
<b>33</b>	<b>1.0 ± 0.1</b>	<b>1.6 ± 0.2</b>	<b>1.4 ± 0.2</b>	<b>2.3 ± 0.2</b>	<b>4.7 ± 0.6</b>
<b>34</b>	<b>1.1 ± 0.2</b>	<b>1.5 ± 0.1</b>	<b>0.9 ± 0.1</b>	<b>0.3 ± 0.0</b>	<b>0.3 ± 0.0</b>
<b>35</b>	<b>1.0 ± 0.1</b>	<b>1.5 ± 0.1</b>	<b>1.6 ± 0.2</b>	<b>1.7 ± 0.2</b>	<b>1.4 ± 0.1</b>
<b>36</b>	<b>1.0 ± 0.1</b>	<b>0.9 ± 0.0</b>	<b>0.8 ± 0.0</b>	<b>0.9 ± 0.1</b>	<b>0.8 ± 0.1</b>
<b>37</b>	<b>1.0 ± 0.0</b>	<b>1.2 ± 0.1</b>	<b>1.0 ± 0.0</b>	<b>0.8 ± 0.0</b>	<b>0.1 ± 0.0</b>
<b>38</b>	<b>1.1 ± 0.3</b>	<b>1.1 ± 0.1</b>	<b>1.8 ± 0.0</b>	<b>0.4 ± 0.0</b>	<b>0.3 ± 0.1</b>
<b>39</b>	<b>1.0 ± 0.2</b>	<b>1.2 ± 0.1</b>	<b>0.9 ± 0.1</b>	<b>0.4 ± 0.1</b>	<b>3.4 ± 1.0</b>
<b>40</b>	<b>1.0 ± 0.4</b>	<b>1.6 ± 0.2</b>	<b>1.0 ± 0.1</b>	<b>0.9 ± 0.1</b>	<b>0.9 ± 0.0</b>
<b>41</b>	<b>1.0 ± 0.2</b>	<b>1.0 ± 0.3</b>	<b>0.5 ± 0.1</b>	<b>0.7 ± 0.2</b>	<b>ND</b>

图17 (续)

表10

化合物	HPTC 1, IL-8 表达				
	0	1	10	100	1000
1	1.0±0.3	0.9±0.0	0.8±0.1	0.7±0.0	8.6±1.3
2	1.0±0.2	1.2±0.1	1.2±0.1	1.5±0.3	8.9±1.2
3	1.0±0.4	6.9±1.0	6.0±0.7	4.1±1.4	110.8±39.0
4	1.0±0.0	0.9±0.0	1.2±0.1	1.5±0.1	0.8±0.0
5	1.0±0.0	0.3±0.0	9.5±0.6	8.8±0.9	4.8±0.5
6	1.0±0.3	0.9±0.1	1.0±0.1	2.2±1.1	2.3±0.2
7	1.0±0.0	1.2±0.2	1.2±0.2	2.4±0.2	2.2±0.4
8	1.0±0.1	13.6±2.0	20.1±2.2	13.4±3.2	ND
9	1.0±0.1	1.4±0.1	1.5±0.2	1.5±0.1	0.9±0.2
10	1.0±0.2	2.6±1.7	2.3±0.1	5.9±0.8	16.3±4.6
11	1.0±0.0	1.1±0.1	1.6±0.2	0.8±0.0	6.0±0.1
12	1.0±0.0	1.6±0.3	6.1±0.5	11.9±6.2	ND
13	1.0±0.0	1.9±0.1	2.4±0.1	9.7±2.5	ND
14	1.0±0.2	1.4±0.2	1.7±0.4	3.6±0.3	7.5±4.4
15	1.0±0.2	0.8±0.1	1.4±0.3	1.5±0.1	2.9±1.7
16	1.0±0.0	0.8±0.0	2.2±0.7	1.4±0.4	0.5±0.1
17	1.0±0.1	1.2±0.3	1.5±0.2	2.6±0.4	3.3±0.1
18	1.1±0.5	0.5±0.1	3.8±1.0	2.2±0.4	1.3±0.4
19	1.1±0.4	3.5±0.8	2.8±0.2	3.9±1.3	2.7±1.1
20	1.0±0.0	1.0±0.2	1.1±0.2	2.6±1.9	5.6±1.3
21	1.0±0.1	1.3±0.4	1.1±0.2	0.7±0.1	2.3±0.7
22	1.0±0.1	4.1±1.0	4.3±0.4	4.0±0.5	1.3±0.0
23	1.0±0.3	1.3±1.0	1.5±0.3	1.6±0.3	1.1±0.2
24	1.0±0.1	1.2±0.1	1.3±0.1	1.0±0.2	0.0±0.0
25	1.0±0.1	1.4±0.2	1.5±0.1	1.1±0.1	0.4±0.1
26	1.0±0.2	0.3±0.0	0.5±0.1	0.2±0.0	3.1±1.4
27	1.1±0.4	0.5±0.0	0.4±0.0	0.2±0.0	1.9±0.5
28	1.0±0.0	0.5±0.1	0.5±0.1	0.2±0.0	0.2±0.0
29	1.0±0.3	1.0±0.1	1.1±0.3	1.1±0.4	0.7±0.1
30	1.0±0.2	1.1±0.1	1.0±0.2	0.9±0.0	1.0±0.2

图18

表10 (续)

<b>31</b>	<b>1.0 ± 0.1</b>	<b>1.3 ± 0.1</b>	<b>1.2 ± 0.0</b>	<b>1.2 ± 0.1</b>	<b>1.1 ± 0.1</b>
<b>32</b>	<b>1.0 ± 0.1</b>	<b>1.2 ± 0.0</b>	<b>1.0 ± 0.0</b>	<b>0.9 ± 0.0</b>	<b>0.8 ± 0.0</b>
<b>33</b>	<b>1.0 ± 0.3</b>	<b>1.5 ± 0.2</b>	<b>0.9 ± 0.1</b>	<b>0.6 ± 0.1</b>	<b>5.3 ± 1.1</b>
<b>34</b>	<b>1.0 ± 0.1</b>	<b>1.4 ± 0.1</b>	<b>0.9 ± 0.0</b>	<b>0.6 ± 0.1</b>	<b>0.4 ± 0.0</b>
<b>35</b>	<b>1.0 ± 0.2</b>	<b>1.9 ± 0.1</b>	<b>1.7 ± 0.1</b>	<b>2.0 ± 0.1</b>	<b>2.0 ± 0.1</b>
<b>36</b>	<b>1.0 ± 0.0</b>	<b>0.7 ± 0.1</b>	<b>0.8 ± 0.1</b>	<b>1.0 ± 0.0</b>	<b>1.1 ± 0.1</b>
<b>37</b>	<b>1.0 ± 0.0</b>	<b>1.5 ± 0.3</b>	<b>1.3 ± 0.1</b>	<b>0.7 ± 0.0</b>	<b>0.0 ± 0.0</b>
<b>38</b>	<b>1.1 ± 0.3</b>	<b>0.8 ± 0.0</b>	<b>1.3 ± 0.1</b>	<b>1.3 ± 0.1</b>	<b>0.3 ± 0.0</b>
<b>39</b>	<b>1.0 ± 0.1</b>	<b>1.8 ± 0.1</b>	<b>1.3 ± 0.0</b>	<b>0.9 ± 0.1</b>	<b>1.6 ± 0.5</b>
<b>40</b>	<b>1.0 ± 0.0</b>	<b>1.5 ± 0.1</b>	<b>0.8 ± 0.0</b>	<b>0.8 ± 0.1</b>	<b>0.7 ± 0.1</b>
<b>41</b>	<b>1.0 ± 0.1</b>	<b>1.2 ± 0.3</b>	<b>0.6 ± 0.1</b>	<b>3.6 ± 1.2</b>	<b>ND</b>

图18 (续)

表11

化合物	HPTC 2, IL-6 表达				
	0	1	10	100	1000
1	1.0±0.0	0.9±0.0	1.0±0.0	1.0±0.0	1.7±0.1
2	1.0±0.0	1.1±0.1	0.9±0.0	1.2±0.1	1.4±0.0
3	1.0±0.1	1.7±0.2	1.8±0.1	1.2±0.0	3.6±0.7
4	1.0±0.1	0.8±0.1	1.0±0.0	2.0±0.1	2.3±0.3
5	1.0±0.1	1.2±0.3	2.2±0.2	49.9±3.2	79.5±1.7
6	1.0±0.0	1.1±0.0	1.1±0.1	1.6±0.1	3.6±0.3
7	1.0±0.1	2.1±0.1	2.5±0.1	4.8±0.6	1.2±0.4
8	1.0±0.1	8.3±0.2	9.3±0.5	27.9±0.8	3.6±0.7
9	1.0±0.1	0.9±0.1	1.3±0.3	1.2±0.1	1.3±0.1
10	1.0±0.2	0.9±0.1	1.4±0.1	4.4±0.6	7.5±0.0
11	1.0±0.0	1.1±0.1	0.2±0.0	1.6±0.0	ND
12	1.0±0.0	0.8±0.0	0.9±0.0	1.6±0.3	1.9±0.3
13	1.0±0.0	1.3±0.0	12.9±0.6	3.2±0.1	3.1±0.0
14	1.0±0.0	1.2±0.1	1.1±0.0	5.4±0.1	12.4±1.4
15	1.0±0.1	1.3±0.1	1.1±0.1	1.6±0.2	3.6±0.2
16	1.0±0.0	1.1±0.0	1.2±0.1	3.1±0.4	13.6±1.0
17	1.0±0.1	0.9±0.0	1.1±0.0	2.0±0.4	8.6±0.4
18	1.0±0.0	0.8±0.0	0.2±0.0	0.8±0.0	ND
19	1.0±0.1	1.4±0.1	0.9±0.0	37.6±0.7	15.8±0.6
20	1.0±0.1	0.8±0.1	3.4±0.7	0.9±0.0	1.4±0.1
21	1.0±0.1	0.9±0.0	0.8±0.1	0.3±0.1	1.3±0.1
22	1.0±0.1	0.7±0.0	0.7±0.0	0.6±0.0	0.6±0.0
23	1.0±0.0	1.4±0.2	1.2±0.2	1.1±0.2	1.3±0.1
24	1.1±0.4	0.6±0.0	0.8±0.1	0.6±0.0	0.1±0.0
25	1.0±0.1	1.4±0.1	1.3±0.2	1.6±0.4	2.9±0.2
26	1.0±0.1	1.6±0.0	1.7±0.1	4.4±0.1	16.1±1.2
27	1.0±0.1	2.4±0.1	2.4±0.0	2.6±0.2	0.6±0.1
28	1.0±0.1	1.1±0.0	1.0±0.1	1.5±0.1	17.4±0.8
29	1.0±0.1	0.8±0.0	0.7±0.0	0.7±0.0	0.8±0.0
30	1.0±0.0	1.8±0.1	1.3±0.1	1.2±0.1	1.1±0.0

图19

表11 (续)

<b>31</b>	$1.0 \pm 0.1$	$1.2 \pm 0.1$	$1.1 \pm 0.1$	$1.2 \pm 0.1$	<b><math>1.6 \pm 0.3</math></b>
<b>32</b>	$1.0 \pm 0.1$	<b><math>1.3 \pm 0.1</math></b>	$1.2 \pm 0.1$	$1.0 \pm 0.0$	$1.2 \pm 0.1$
<b>33</b>	$1.0 \pm 0.2$	<b><math>1.3 \pm 0.1</math></b>	$1.1 \pm 0.1$	$0.9 \pm 0.1$	<b><math>0.4 \pm 0.1</math></b>
<b>34</b>	$1.0 \pm 0.0$	<b><math>1.2 \pm 0.1</math></b>	$0.8 \pm 0.0$	$0.5 \pm 0.1$	<b><math>0.7 \pm 0.1</math></b>
<b>35</b>	$1.0 \pm 0.1$	<b><math>2.7 \pm 0.8</math></b>	$1.6 \pm 0.1$	$1.5 \pm 0.2$	<b><math>0.2 \pm 0.0</math></b>
<b>36</b>	$1.0 \pm 0.0$	<b><math>2.7 \pm 0.1</math></b>	$2.4 \pm 0.1$	$1.8 \pm 0.5$	<b><math>0.3 \pm 0.0</math></b>
<b>37</b>	$1.0 \pm 0.0$	<b><math>1.1 \pm 0.3</math></b>	$0.8 \pm 0.0$	$0.7 \pm 0.0$	<b><math>0.3 \pm 0.1</math></b>
<b>38</b>	$1.0 \pm 0.1$	$1.0 \pm 0.0$	$0.8 \pm 0.1$	<b><math>1.2 \pm 0.2</math></b>	<b><math>0.9 \pm 0.1</math></b>
<b>39</b>	$1.0 \pm 0.0$	$1.7 \pm 0.5$	$1.2 \pm 0.1$	$1.8 \pm 0.3$	<b><math>3.1 \pm 0.3</math></b>
<b>40</b>	$1.0 \pm 0.0$	$1.1 \pm 0.0$	<b><math>1.2 \pm 0.0</math></b>	$1.1 \pm 0.1$	$1.1 \pm 0.0$
<b>41</b>	$1.0 \pm 0.0$	<b><math>1.0 \pm 0.0</math></b>	$0.7 \pm 0.1$	$0.3 \pm 0.1$	ND

图19 (续)

表12

化合物	HPTC 2, IL-8 表达				
	0	1	10	100	1000
1	1.0±0.0	1.1±0.0	1.3±0.0	1.4±0.1	2.0±0.1
2	1.0±0.0	1.3±0.1	1.2±0.1	1.3±0.1	1.5±0.1
3	1.0±0.1	1.9±0.2	1.9±0.0	1.8±0.0	13.1±3.0
4	1.0±0.1	0.7±0.1	0.9±0.0	2.2±0.1	3.6±0.8
5	1.0±0.0	1.4±0.4	21.3±4.7	89.1±4.5	146.1±3.1
6	1.0±0.2	1.6±0.1	1.6±0.2	9.2±0.2	3.3±0.2
7	1.1±0.3	1.9±0.2	1.8±0.2	3.8±0.9	1.7±0.2
8	1.0±0.1	4.6±0.2	5.0±0.2	32.7±0.9	3.9±0.7
9	1.0±0.1	1.2±0.0	1.8±0.4	1.4±0.1	1.8±0.2
10	1.1±0.3	1.0±0.2	1.3±0.2	5.7±0.8	13.2±0.3
11	1.0±0.1	1.2±0.1	25.7±3.8	2.3±0.5	ND
12	1.0±0.1	1.2±0.1	1.3±0.0	3.3±0.7	22.5±2.0
13	1.0±0.1	1.9±0.0	165.2±14.7	3.1±0.5	3.9±0.1
14	1.0±0.1	1.4±0.1	1.4±0.2	119.0±5.4	11.3±0.7
15	1.0±0.1	1.5±0.1	1.3±0.1	1.7±0.3	5.7±0.2
16	1.0±0.0	1.4±0.1	1.3±0.2	8.3±0.5	2.2±0.2
17	1.0±0.1	1.2±0.1	1.6±0.2	4.1±1.2	23.8±2.9
18	1.0±0.1	1.8±0.0	2.7±0.3	2.0±0.1	ND
19	1.0±0.1	0.9±0.1	0.7±0.0	29.3±4.3	15.1±0.3
20	1.0±0.1	1.7±0.2	6.5±1.6	5.5±0.7	67.4±3.1
21	1.0±0.1	1.6±0.1	1.3±0.1	4.9±0.1	1.8±0.2
22	1.0±0.2	1.0±0.0	0.9±0.0	0.7±0.0	0.5±0.0
23	1.0±0.1	1.8±0.4	1.5±0.4	1.5±0.3	1.5±0.2
24	1.1±0.3	0.6±0.0	0.9±0.2	0.4±0.0	0.4±0.1
25	1.0±0.1	1.4±0.1	1.5±0.1	1.5±0.3	2.6±0.1
26	1.0±0.1	0.6±0.0	0.4±0.0	1.1±0.2	4.3±0.3
27	1.0±0.0	2.6±0.2	2.4±0.0	2.3±0.1	2.3±0.1
28	1.0±0.1	1.1±0.1	1.0±0.1	0.6±0.1	20.5±0.8
29	1.0±0.1	0.9±0.1	0.8±0.0	0.8±0.1	1.5±0.1
30	1.0±0.1	2.0±0.1	1.4±0.1	1.3±0.0	1.2±0.0

图20

表12 (续)

<b>31</b>	<b>1.0 ± 0.1</b>	<b>0.9 ± 0.1</b>	<b>0.9 ± 0.1</b>	<b>0.9 ± 0.1</b>	<b>1.2 ± 0.2</b>
<b>32</b>	<b>1.0 ± 0.1</b>	<b>1.3 ± 0.1</b>	<b>1.3 ± 0.1</b>	<b>1.2 ± 0.0</b>	<b>1.4 ± 0.1</b>
<b>33</b>	<b>1.0 ± 0.1</b>	<b>1.6 ± 0.2</b>	<b>1.1 ± 0.1</b>	<b>1.0 ± 0.0</b>	<b>0.7 ± 0.1</b>
<b>34</b>	<b>1.0 ± 0.0</b>	<b>1.2 ± 0.1</b>	<b>0.9 ± 0.0</b>	<b>0.8 ± 0.0</b>	<b>1.4 ± 0.1</b>
<b>35</b>	<b>1.0 ± 0.1</b>	<b>1.1 ± 0.1</b>	<b>1.1 ± 0.1</b>	<b>1.3 ± 0.0</b>	<b>0.3 ± 0.0</b>
<b>36</b>	<b>1.0 ± 0.0</b>	<b>2.8 ± 0.0</b>	<b>2.9 ± 0.0</b>	<b>2.4 ± 0.7</b>	<b>0.5 ± 0.0</b>
<b>37</b>	<b>1.0 ± 0.1</b>	<b>1.2 ± 0.1</b>	<b>1.0 ± 0.0</b>	<b>0.7 ± 0.0</b>	<b>1.4 ± 0.2</b>
<b>38</b>	<b>1.0 ± 0.1</b>	<b>1.2 ± 0.0</b>	<b>1.1 ± 0.2</b>	<b>3.1 ± 0.2</b>	<b>2.1 ± 0.1</b>
<b>39</b>	<b>1.0 ± 0.1</b>	<b>1.6 ± 0.2</b>	<b>1.3 ± 0.0</b>	<b>2.0 ± 0.3</b>	<b>24.0 ± 3.4</b>
<b>40</b>	<b>1.0 ± 0.0</b>	<b>1.1 ± 0.0</b>	<b>1.3 ± 0.0</b>	<b>1.2 ± 0.0</b>	<b>1.2 ± 0.0</b>
<b>41</b>	<b>1.0 ± 0.0</b>	<b>1.6 ± 0.1</b>	<b>1.1 ± 0.2</b>	<b>0.9 ± 0.4</b>	<b>ND</b>

图20 (续)

表12

化合物	HPTC 3, IL-6 表达				
	0	1	10	100	1000
1	1.0±0.2	1.6±0.1	0.9±0.1	0.8±0.1	0.9±0.1
2	1.0±0.1	1.4±0.1	1.1±0.2	1.1±0.0	1.2±0.0
3	1.0±0.1	5.3±0.4	2.9±0.8	1.4±0.3	ND
4	1.0±0.1	1.5±0.2	1.4±0.1	23.6±2.8	3.5±0.1
5	1.0±0.0	0.7±0.1	9.3±0.7	59.2±2.6	80.4±2.7
6	1.0±0.1	1.1±0.0	1.2±0.0	1.4±0.1	0.2±0.0
7	1.1±0.4	7.5±1.0	5.9±0.2	12.0±1.8	0.5±0.1
8	1.0±0.2	11.3±0.7	12.1±0.4	11.9±0.9	5.2±0.5
9	1.0±0.0	1.3±0.1	1.1±0.1	1.1±0.0	2.9±0.3
10	1.0±0.1	1.1±0.1	1.4±0.0	4.4±0.1	11.8±0.5
11	1.0±0.0	0.9±0.0	0.2±0.1	31.4±12.8	ND
12	1.0±0.1	1.5±0.1	1.3±0.0	1.3±0.1	4.0±0.1
13	1.1±0.4	2.7±0.2	10.8±1.2	3.5±0.1	6.0±0.4
14	1.0±0.2	0.4±0.1	0.5±0.0	0.3±0.0	0.9±0.2
15	1.0±0.0	1.3±0.1	1.1±0.1	1.5±0.0	2.2±0.2
16	1.0±0.0	1.2±0.1	1.1±0.0	0.9±0.1	5.8±2.5
17	1.0±0.0	1.2±0.1	1.3±0.2	1.1±0.2	2.3±0.2
18	1.0±0.1	0.6±0.2	0.3±0.1	0.5±0.0	0.4±0.0
19	1.0±0.0	0.9±0.0	1.0±0.0	38.1±1.2	8.3±0.3
20	1.0±0.0	0.9±0.1	0.9±0.1	1.3±0.1	ND
21	1.0±0.0	0.8±0.0	0.8±0.0	1.2±0.3	2.3±0.3
22	1.0±0.2	0.9±0.0	1.1±0.1	1.0±0.1	0.8±0.0
23	1.2±0.6	1.0±0.4	0.9±0.0	0.7±0.1	0.6±0.1
24	1.6±1.1	3.9±0.5	3.1±0.1	6.2±1.0	0.6±0.4
25	1.0±0.1	0.6±0.1	0.8±0.1	0.6±0.1	0.2±0.0
26	1.1±0.3	1.4±0.6	0.5±0.2	0.9±0.2	2.9±0.1
27	1.1±0.3	9.0±0.6	8.4±0.3	8.1±0.2	0.6±0.2
28	1.0±0.1	1.1±0.2	0.9±0.1	0.6±0.1	0.2±0.0
29	1.0±0.1	0.9±0.2	0.9±0.1	0.7±0.1	0.9±0.2
30	1.0±0.2	0.9±0.1	0.9±0.1	0.9±0.1	1.0±0.2

图21

表12(续)

<b>31</b>	<b>1.0 ± 0.0</b>	<b>1.2 ± 0.2</b>	<b>1.1 ± 0.0</b>	<b>1.4 ± 0.2</b>	<b>1.4 ± 0.2</b>
<b>32</b>	<b>1.1 ± 0.3</b>	<b>1.0 ± 0.2</b>	<b>0.4 ± 0.0</b>	<b>0.4 ± 0.1</b>	<b>0.5 ± 0.1</b>
<b>33</b>	<b>1.1 ± 0.4</b>	<b>1.1 ± 0.2</b>	<b>0.4 ± 0.0</b>	<b>ND</b>	<b>2.9 ± 0.1</b>
<b>34</b>	<b>1.0 ± 0.2</b>	<b>1.2 ± 0.3</b>	<b>0.4 ± 0.0</b>	<b>0.5 ± 0.2</b>	<b>0.7 ± 0.3</b>
<b>35</b>	<b>1.0 ± 0.0</b>	<b>1.0 ± 0.1</b>	<b>0.9 ± 0.1</b>	<b>0.8 ± 0.0</b>	<b>0.9 ± 0.1</b>
<b>36</b>	<b>1.0 ± 0.2</b>	<b>1.4 ± 0.2</b>	<b>1.0 ± 0.1</b>	<b>1.1 ± 0.1</b>	<b>0.9 ± 0.2</b>
<b>37</b>	<b>1.0 ± 0.0</b>	<b>0.9 ± 0.1</b>	<b>0.8 ± 0.0</b>	<b>0.8 ± 0.0</b>	<b>0.1 ± 0.0</b>
<b>38</b>	<b>1.1 ± 0.3</b>	<b>0.6 ± 0.1</b>	<b>0.3 ± 0.0</b>	<b>0.3 ± 0.0</b>	<b>0.2 ± 0.0</b>
<b>39</b>	<b>1.0 ± 0.1</b>	<b>1.2 ± 0.1</b>	<b>1.2 ± 0.1</b>	<b>2.8 ± 0.4</b>	<b>3.4 ± 0.3</b>
<b>40</b>	<b>1.0 ± 0.0</b>	<b>1.3 ± 0.1</b>	<b>1.0 ± 0.1</b>	<b>1.0 ± 0.1</b>	<b>1.0 ± 0.1</b>
<b>41</b>	<b>1.0 ± 0.1</b>	<b>0.7 ± 0.0</b>	<b>0.5 ± 0.1</b>	<b>20.6 ± 1.9</b>	<b>128.5 ± 21.1</b>

图21(续)

表12

化合物	HPIC 3, IL-8 表达				
	0	1	10	100	1000
1	1.0 ± 0.2	1.9 ± 0.3	0.8 ± 0.1	0.8 ± 0.0	1.2 ± 0.1
2	1.0 ± 0.0	2.0 ± 0.1	1.3 ± 0.2	1.3 ± 0.0	1.8 ± 0.2
3	1.2 ± 0.5	3.2 ± 0.6	3.0 ± 0.4	7.3 ± 2.7	ND
4	1.0 ± 0.1	1.6 ± 0.4	1.3 ± 0.1	35.5 ± 4.4	8.2 ± 0.9
5	1.0 ± 0.1	0.9 ± 0.0	18.9 ± 0.4	29.1 ± 3.6	46.4 ± 1.2
6	1.0 ± 0.2	1.1 ± 0.0	1.1 ± 0.1	2.4 ± 0.6	0.1 ± 0.0
7	1.0 ± 0.2	2.2 ± 0.2	2.6 ± 0.1	5.4 ± 0.4	4.4 ± 0.5
8	1.1 ± 0.3	17.2 ± 2.6	21.9 ± 0.8	18.8 ± 0.5	3.2 ± 0.5
9	1.0 ± 0.0	1.5 ± 0.1	1.3 ± 0.1	1.1 ± 0.0	2.6 ± 0.2
10	1.0 ± 0.1	0.8 ± 0.1	1.0 ± 0.0	3.3 ± 0.1	9.7 ± 0.2
11	1.0 ± 0.0	0.7 ± 0.0	5.3 ± 0.3	22.8 ± 4.0	ND
12	1.0 ± 0.1	1.4 ± 0.2	1.2 ± 0.1	1.5 ± 0.3	9.6 ± 1.8
13	1.1 ± 0.4	2.2 ± 0.3	13.3 ± 1.4	2.4 ± 0.1	1.5 ± 0.1
14	1.1 ± 0.3	0.6 ± 0.1	1.5 ± 0.2	9.9 ± 1.1	2.6 ± 0.2
15	1.0 ± 0.0	1.3 ± 0.1	1.1 ± 0.0	1.5 ± 0.2	3.4 ± 0.5
16	1.0 ± 0.0	1.1 ± 0.1	1.3 ± 0.0	3.5 ± 1.0	1.0 ± 0.2
17	1.0 ± 0.1	1.3 ± 0.2	1.3 ± 0.2	1.1 ± 0.2	2.8 ± 0.4
18	1.0 ± 0.0	1.6 ± 0.3	2.2 ± 0.3	2.2 ± 0.4	10.1 ± 0.9
19	1.0 ± 0.0	1.1 ± 0.0	1.2 ± 0.0	25.0 ± 0.8	9.5 ± 0.3
20	1.0 ± 0.1	1.2 ± 0.1	1.2 ± 0.1	17.8 ± 1.6	ND
21	1.0 ± 0.0	1.2 ± 0.0	1.1 ± 0.1	1.5 ± 0.1	1.3 ± 0.0
22	1.1 ± 0.3	1.4 ± 0.1	1.7 ± 0.1	2.0 ± 0.2	1.0 ± 0.2
23	1.3 ± 0.6	0.8 ± 0.2	0.7 ± 0.0	0.6 ± 0.1	0.5 ± 0.0
24	1.2 ± 0.5	1.4 ± 0.1	1.8 ± 0.1	3.6 ± 0.3	2.3 ± 0.7
25	1.0 ± 0.1	0.9 ± 0.0	0.9 ± 0.0	0.6 ± 0.0	0.2 ± 0.0
26	1.0 ± 0.1	0.7 ± 0.3	0.8 ± 0.1	1.5 ± 0.3	0.3 ± 0.1
27	1.0 ± 0.2	8.2 ± 0.7	7.5 ± 0.3	5.8 ± 0.1	3.8 ± 0.6
28	1.0 ± 0.1	1.3 ± 0.3	0.9 ± 0.1	0.8 ± 0.0	0.5 ± 0.0
29	1.0 ± 0.1	1.1 ± 0.2	1.0 ± 0.0	0.8 ± 0.0	1.2 ± 0.0
30	1.0 ± 0.1	1.2 ± 0.3	0.8 ± 0.2	0.9 ± 0.2	1.1 ± 0.1

图22

表14(续)

<b>31</b>	<b><math>1.0 \pm 0.1</math></b>	<b><math>1.2 \pm 0.2</math></b>	<b><math>1.1 \pm 0.1</math></b>	<b><math>1.3 \pm 0.2</math></b>	<b><math>1.0 \pm 0.1</math></b>
<b>32</b>	<b><math>1.0 \pm 0.1</math></b>	<b><math>1.1 \pm 0.2</math></b>	<b><math>0.8 \pm 0.1</math></b>	<b><math>0.8 \pm 0.0</math></b>	<b><math>0.8 \pm 0.1</math></b>
<b>33</b>	<b><math>1.0 \pm 0.1</math></b>	<b><math>0.8 \pm 0.1</math></b>	<b><math>0.5 \pm 0.1</math></b>	<b>ND</b>	<b><math>3.2 \pm 0.3</math></b>
<b>34</b>	<b><math>1.0 \pm 0.1</math></b>	<b><math>1.0 \pm 0.1</math></b>	<b><math>0.6 \pm 0.1</math></b>	<b><math>0.8 \pm 0.2</math></b>	<b><math>1.7 \pm 0.4</math></b>
<b>35</b>	<b><math>1.0 \pm 0.0</math></b>	<b><math>1.0 \pm 0.1</math></b>	<b><math>0.8 \pm 0.1</math></b>	<b><math>0.8 \pm 0.1</math></b>	<b><math>1.2 \pm 0.1</math></b>
<b>36</b>	<b><math>1.0 \pm 0.1</math></b>	<b><math>1.7 \pm 0.3</math></b>	<b><math>1.0 \pm 0.2</math></b>	<b><math>1.0 \pm 0.0</math></b>	<b><math>1.1 \pm 0.1</math></b>
<b>37</b>	<b><math>1.0 \pm 0.0</math></b>	<b><math>1.3 \pm 0.1</math></b>	<b><math>1.2 \pm 0.1</math></b>	<b><math>0.9 \pm 0.0</math></b>	<b><math>1.3 \pm 0.0</math></b>
<b>38</b>	<b><math>1.0 \pm 0.2</math></b>	<b><math>1.0 \pm 0.3</math></b>	<b><math>0.9 \pm 0.0</math></b>	<b><math>1.2 \pm 0.0</math></b>	<b><math>1.3 \pm 0.2</math></b>
<b>39</b>	<b><math>1.0 \pm 0.1</math></b>	<b><math>0.4 \pm 0.0</math></b>	<b><math>0.4 \pm 0.0</math></b>	<b><math>1.2 \pm 0.3</math></b>	<b><math>5.1 \pm 0.3</math></b>
<b>40</b>	<b><math>1.0 \pm 0.1</math></b>	<b><math>1.2 \pm 0.1</math></b>	<b><math>1.1 \pm 0.1</math></b>	<b><math>1.3 \pm 0.1</math></b>	<b><math>1.3 \pm 0.1</math></b>
<b>41</b>	<b><math>1.0 \pm 0.2</math></b>	<b><math>0.4 \pm 0.0</math></b>	<b><math>0.4 \pm 0.1</math></b>	<b><math>27.7 \pm 0.8</math></b>	<b><math>38.2 \pm 7.1</math></b>

图22(续)

表15

化合物	HK-2, IL-6 表达				
	0	1	10	100	1000
1	1.0±0.0	1.2±0.1	1.1±0.2	1.0±0.1	0.9±0.1
2	1.0±0.0	1.4±0.2	0.9±0.0	0.9±0.2	1.0±0.0
3	1.0±0.1	8.3±0.2	7.6±0.3	6.1±0.1	12.8±1.7
4	1.0±0.1	1.4±0.3	0.9±0.0	8.6±1.3	4.0±0.7
5	1.0±0.2	0.7±0.2	3.6±0.2	25.2±2.7	120.5±26.1
6	1.0±0.1	1.3±0.1	1.0±0.1	1.0±0.0	2.6±0.3
7	1.0±0.2	3.6±0.8	2.2±0.2	2.8±0.0	1.5±0.0
8	1.0±0.2	1.7±0.1	1.1±0.1	0.2±0.1	ND
9	1.0±0.2	1.2±0.1	0.7±0.2	0.5±0.2	0.8±0.0
10	1.0±0.0	1.1±0.1	1.0±0.0	1.2±0.1	0.8±0.1
11	1.0±0.1	0.3±0.0	1.6±1.0	4.0±1.4	5.9±0.5
12	1.1±0.3	0.7±0.1	0.5±0.0	0.8±0.4	1.3±0.0
13	1.0±0.1	1.5±0.0	2.3±0.0	2.8±0.8	2.6±0.0
14	1.0±0.1	1.0±0.1	0.9±0.0	0.5±0.0	16.1±1.1
15	1.0±0.2	0.7±0.1	0.7±0.1	0.6±0.0	0.3±0.0
16	1.0±0.1	1.6±0.3	1.1±0.2	1.1±0.1	3.5±0.5
17	1.0±0.2	1.4±0.2	0.9±0.1	1.5±0.2	2.0±0.4
18	1.0±0.1	0.1±0.0	0.1±0.0	0.6±0.0	ND
19	1.0±0.1	4.0±0.3	5.1±0.2	7.8±0.4	5.8±1.6
20	1.0±0.1	0.8±0.1	0.6±0.1	1.1±0.1	1.2±0.1
21	1.0±0.1	1.5±0.0	1.4±0.0	1.3±0.0	14.7±1.5
22	1.0±0.1	2.0±0.3	1.8±0.1	2.0±0.1	1.1±0.0
23	1.0±0.1	0.8±0.0	0.6±0.0	0.4±0.0	0.7±0.1
24	1.4±0.8	0.7±0.1	0.5±0.0	0.2±0.0	0.4±0.1
25	1.1±0.3	1.2±0.2	0.6±0.1	0.7±0.1	0.6±0.1
26	1.0±0.1	0.9±0.5	0.3±0.1	0.3±0.0	ND
27	1.1±0.5	1.0±0.1	0.7±0.1	0.5±0.0	0.2±0.0
28	1.0±0.1	1.6±0.0	1.1±0.0	0.9±0.1	0.4±0.0
29	1.0±0.1	0.3±0.0	1.5±0.6	0.1±0.0	0.1±0.0
30	1.0±0.2	1.3±0.1	1.0±0.2	1.0±0.1	0.9±0.0

图23

表15(续)

<b>31</b>	<b>1.1 ± 0.3</b>	<b>1.4 ± 0.0</b>	<b>0.7 ± 0.0</b>	<b>0.6 ± 0.0</b>	<b>0.8 ± 0.0</b>
<b>32</b>	<b>1.0 ± 0.1</b>	<b>0.8 ± 0.1</b>	<b>0.7 ± 0.0</b>	<b>0.9 ± 0.2</b>	<b>0.8 ± 0.0</b>
<b>33</b>	<b>1.1 ± 0.3</b>	<b>1.1 ± 0.1</b>	<b>0.8 ± 0.0</b>	<b>0.9 ± 0.1</b>	<b>ND</b>
<b>34</b>	<b>1.0 ± 0.1</b>	<b>1.3 ± 0.1</b>	<b>0.8 ± 0.1</b>	<b>0.6 ± 0.1</b>	<b>0.7 ± 0.0</b>
<b>35</b>	<b>1.0 ± 0.1</b>	<b>1.3 ± 0.1</b>	<b>1.1 ± 0.0</b>	<b>0.8 ± 0.3</b>	<b>1.3 ± 0.0</b>
<b>36</b>	<b>1.0 ± 0.2</b>	<b>1.0 ± 0.1</b>	<b>0.7 ± 0.1</b>	<b>0.6 ± 0.1</b>	<b>0.5 ± 0.0</b>
<b>37</b>	<b>1.1 ± 0.4</b>	<b>0.5 ± 0.1</b>	<b>0.3 ± 0.0</b>	<b>0.2 ± 0.0</b>	<b>0.8 ± 0.0</b>
<b>38</b>	<b>1.0 ± 0.1</b>	<b>1.5 ± 0.3</b>	<b>0.7 ± 0.2</b>	<b>0.6 ± 0.0</b>	<b>0.2 ± 0.0</b>
<b>39</b>	<b>1.0 ± 0.1</b>	<b>0.9 ± 0.1</b>	<b>0.5 ± 0.0</b>	<b>0.4 ± 0.1</b>	<b>2.4 ± 0.6</b>
<b>40</b>	<b>1.0 ± 0.1</b>	<b>1.2 ± 0.1</b>	<b>0.9 ± 0.1</b>	<b>0.9 ± 0.1</b>	<b>0.8 ± 0.1</b>
<b>41</b>	<b>1.0 ± 0.1</b>	<b>2.2 ± 0.1</b>	<b>0.9 ± 0.0</b>	<b>0.7 ± 0.0</b>	<b>35.0 ± 4.3</b>

图23(续)

表16

化合物	HK-2, IL-8 表达				
	0	1	10	100	1000
1	1.0±0.0	1.1±0.1	1.0±0.1	1.0±0.1	1.3±0.5
2	1.0±0.0	1.1±0.1	0.8±0.1	0.8±0.1	0.7±0.0
3	1.0±0.1	5.1±0.2	4.3±0.1	3.5±0.1	4.1±0.2
4	1.0±0.0	1.6±0.6	1.0±0.1	13.9±2.6	18.8±5.3
5	1.0±0.0	1.3±0.4	5.0±1.1	13.5±1.8	30.5±2.7
6	1.0±0.1	1.2±0.2	1.0±0.1	1.0±0.1	1.9±0.3
7	1.0±0.1	9.0±0.7	8.6±0.5	14.3±1.2	0.9±0.0
8	1.0±0.2	2.5±0.1	2.2±0.1	1.6±0.1	ND
9	1.0±0.2	1.7±0.1	0.8±0.0	0.6±0.1	0.7±0.0
10	1.0±0.1	1.2±0.1	0.9±0.0	0.9±0.1	1.4±0.5
11	1.0±0.1	0.2±0.0	2.0±1.0	1.3±0.5	1.0±0.1
12	1.0±0.2	1.3±0.1	1.2±0.1	1.2±0.1	3.0±0.0
13	1.0±0.1	0.9±0.1	3.7±0.7	2.3±0.4	2.5±0.0
14	1.0±0.1	1.0±0.0	0.8±0.1	0.2±0.0	1.2±0.1
15	1.0±0.1	1.5±0.2	1.5±0.2	1.5±0.1	1.1±0.2
16	1.0±0.0	1.9±0.4	1.5±0.3	1.1±0.2	0.4±0.0
17	1.0±0.1	1.4±0.1	1.2±0.2	2.1±0.1	2.1±0.4
18	1.0±0.0	0.5±0.1	0.6±0.1	0.4±0.0	ND
19	1.0±0.0	2.8±0.1	2.1±0.2	2.6±0.3	2.5±0.5
20	1.0±0.2	0.6±0.1	0.5±0.0	1.3±0.2	1.6±0.3
21	1.0±0.0	1.1±0.0	1.1±0.0	0.8±0.1	1.7±0.0
22	1.0±0.0	3.9±0.5	3.8±0.4	3.1±0.5	1.2±0.2
23	1.0±0.1	1.2±0.2	0.8±0.1	0.7±0.1	0.7±0.1
24	1.1±0.3	4.7±0.6	3.6±0.8	2.2±0.0	0.5±0.3
25	1.0±0.1	1.2±0.1	1.2±0.1	1.1±0.1	1.1±0.1
26	1.0±0.0	0.5±0.2	0.3±0.0	0.4±0.1	ND
27	1.0±0.2	8.3±0.7	5.4±0.2	3.2±0.2	2.4±1.0
28	1.0±0.0	1.4±0.1	1.3±0.1	1.4±0.1	0.8±0.1
29	1.0±0.0	0.3±0.1	0.1±0.0	0.4±0.1	0.5±0.0
30	1.0±0.2	1.6±0.1	1.2±0.2	1.1±0.1	1.3±0.0

图24

表16(续)

<b>31</b>	$1.0 \pm 0.1$	$1.7 \pm 0.3$	$1.1 \pm 0.1$	$1.0 \pm 0.1$	$1.0 \pm 0.0$
<b>32</b>	$1.0 \pm 0.1$	$1.1 \pm 0.1$	$1.0 \pm 0.1$	$1.1 \pm 0.2$	$1.1 \pm 0.0$
<b>33</b>	$1.0 \pm 0.2$	$0.9 \pm 0.1$	$1.0 \pm 0.1$	$1.2 \pm 0.1$	ND
<b>34</b>	$1.0 \pm 0.0$	$1.2 \pm 0.1$	$1.3 \pm 0.1$	$0.8 \pm 0.0$	$0.5 \pm 0.0$
<b>35</b>	$1.0 \pm 0.1$	$1.4 \pm 0.1$	$0.9 \pm 0.1$	$0.9 \pm 0.0$	$1.5 \pm 0.0$
<b>36</b>	$1.0 \pm 0.0$	$0.8 \pm 0.1$	$0.6 \pm 0.1$	$0.5 \pm 0.0$	$0.4 \pm 0.0$
<b>37</b>	$1.0 \pm 0.1$	$0.3 \pm 0.0$	$0.3 \pm 0.0$	$0.2 \pm 0.0$	$0.3 \pm 0.0$
<b>38</b>	$1.0 \pm 0.1$	$1.1 \pm 0.0$	$0.8 \pm 0.1$	$0.7 \pm 0.0$	$1.2 \pm 0.1$
<b>39</b>	$1.0 \pm 0.0$	$0.4 \pm 0.0$	$0.4 \pm 0.0$	$0.4 \pm 0.0$	$10.2 \pm 3.5$
<b>40</b>	$1.0 \pm 0.0$	$1.0 \pm 0.0$	$0.9 \pm 0.0$	$0.9 \pm 0.1$	$0.9 \pm 0.1$
<b>41</b>	$1.0 \pm 0.0$	$4.3 \pm 0.4$	$1.7 \pm 0.1$	$2.1 \pm 0.1$	$82.4 \pm 8.2$

图24(续)

表17

化合物	LLC-PK1, IL-6 表达				
	0	1	10	100	1000
1	1.0 ± 0.1	0.7 ± 0.2	2.3 ± 0.8	5.2 ± 1.0	1.8 ± 0.5
2	1.0 ± 0.1	0.9 ± 0.1	0.9 ± 0.0	1.0 ± 0.0	1.2 ± 0.0
3	1.0 ± 0.1	1.4 ± 0.2	0.7 ± 0.1	0.5 ± 0.0	0.3 ± 0.1
4	1.0 ± 0.1	1.1 ± 0.1	1.9 ± 0.7	1.0 ± 0.0	4.8 ± 0.3
5	1.0 ± 0.1	1.2 ± 0.2	15.1 ± 2.7	313.7 ± 31.4	180.5 ± 16.1
6	1.0 ± 0.2	0.6 ± 0.1	0.5 ± 0.0	0.9 ± 0.0	1.1 ± 0.0
7	1.0 ± 0.1	1.6 ± 0.0	1.8 ± 0.1	1.8 ± 0.1	1.4 ± 0.0
8	1.0 ± 0.0	1.4 ± 0.1	1.7 ± 0.1	1.1 ± 0.1	ND
9	1.1 ± 0.3	1.0 ± 0.1	0.8 ± 0.1	0.8 ± 0.0	0.9 ± 0.0
10	1.0 ± 0.0	1.1 ± 0.2	2.8 ± 0.3	6.3 ± 0.3	4.7 ± 0.5
11	1.0 ± 0.2	0.3 ± 0.0	0.5 ± 0.0	0.9 ± 0.1	ND
12	1.0 ± 0.1	0.9 ± 0.0	1.1 ± 0.1	1.3 ± 0.1	1.8 ± 0.1
13	1.0 ± 0.1	2.2 ± 0.1	12.9 ± 7.2	ND	ND
14	1.0 ± 0.1	1.1 ± 0.0	1.1 ± 0.1	3.3 ± 0.5	3.7 ± 0.2
15	1.0 ± 0.0	0.8 ± 0.0	0.9 ± 0.0	1.0 ± 0.0	2.4 ± 0.0
16	1.0 ± 0.1	1.3 ± 0.0	1.1 ± 0.1	1.2 ± 0.1	2.8 ± 0.0
17	1.0 ± 0.0	0.9 ± 0.0	1.3 ± 0.0	1.4 ± 0.0	2.5 ± 0.2
18	1.0 ± 0.1	0.9 ± 0.0	0.5 ± 0.0	0.9 ± 0.0	0.7 ± 0.1
19	1.0 ± 0.1	1.5 ± 0.1	1.5 ± 0.0	7.4 ± 1.0	1.4 ± 0.3
20	1.1 ± 0.3	0.7 ± 0.1	1.1 ± 0.3	2.2 ± 0.2	2.4 ± 0.6
21	1.0 ± 0.0	0.9 ± 0.1	1.0 ± 0.1	0.9 ± 0.0	1.7 ± 0.5
22	1.0 ± 0.0	1.5 ± 0.1	1.5 ± 0.1	1.4 ± 0.0	1.4 ± 0.0
23	1.0 ± 0.1	0.9 ± 0.1	0.7 ± 0.0	0.8 ± 0.1	0.9 ± 0.1
24	1.0 ± 0.2	1.3 ± 0.1	0.8 ± 0.0	0.7 ± 0.0	0.8 ± 0.1
25	1.0 ± 0.1	0.9 ± 0.1	1.3 ± 0.1	2.3 ± 0.4	1.7 ± 0.4
26	1.0 ± 0.2	0.3 ± 0.0	0.3 ± 0.0	0.4 ± 0.1	2.1 ± 0.5
27	1.0 ± 0.2	1.8 ± 0.1	1.9 ± 0.2	2.6 ± 0.1	1.6 ± 0.2
28	1.0 ± 0.1	0.8 ± 0.0	1.0 ± 0.0	0.9 ± 0.0	1.0 ± 0.0
29	1.0 ± 0.1	0.6 ± 0.1	0.5 ± 0.1	0.3 ± 0.1	0.9 ± 0.2
30	1.0 ± 0.2	1.1 ± 0.1	0.8 ± 0.1	0.8 ± 0.0	1.0 ± 0.1

图25 (续)

表17(续)

<b>31</b>	<b>1.0 ± 0.0</b>	<b>1.1 ± 0.1</b>	<b>1.2 ± 0.1</b>	<b>1.4 ± 0.2</b>	<b>1.6 ± 0.3</b>
<b>32</b>	<b>1.0 ± 0.1</b>	<b>1.6 ± 0.1</b>	<b>1.6 ± 0.1</b>	<b>1.1 ± 0.2</b>	<b>0.9 ± 0.1</b>
<b>33</b>	<b>1.0 ± 0.2</b>	<b>0.9 ± 0.0</b>	<b>0.9 ± 0.1</b>	<b>1.1 ± 0.2</b>	<b>8.2 ± 2.6</b>
<b>34</b>	<b>1.0 ± 0.2</b>	<b>0.7 ± 0.0</b>	<b>0.5 ± 0.0</b>	<b>0.6 ± 0.1</b>	<b>1.8 ± 0.0</b>
<b>35</b>	<b>1.0 ± 0.0</b>	<b>0.7 ± 0.0</b>	<b>0.7 ± 0.0</b>	<b>0.7 ± 0.0</b>	<b>0.9 ± 0.1</b>
<b>36</b>	<b>1.0 ± 0.0</b>	<b>0.7 ± 0.0</b>	<b>0.7 ± 0.0</b>	<b>0.7 ± 0.1</b>	<b>0.8 ± 0.0</b>
<b>37</b>	<b>1.3 ± 0.7</b>	<b>0.5 ± 0.1</b>	<b>2.4 ± 0.3</b>	<b>1.1 ± 0.7</b>	<b>1.1 ± 0.5</b>
<b>38</b>	<b>1.0 ± 0.0</b>	<b>0.7 ± 0.0</b>	<b>0.7 ± 0.1</b>	<b>0.8 ± 0.0</b>	<b>0.7 ± 0.0</b>
<b>39</b>	<b>1.0 ± 0.0</b>	<b>0.6 ± 0.1</b>	<b>0.5 ± 0.0</b>	<b>0.7 ± 0.1</b>	<b>7.7 ± 0.6</b>
<b>40</b>	<b>1.0 ± 0.1</b>	<b>1.0 ± 0.0</b>	<b>1.1 ± 0.0</b>	<b>1.1 ± 0.0</b>	<b>1.1 ± 0.0</b>
<b>41</b>	<b>1.0 ± 0.2</b>	<b>0.9 ± 0.0</b>	<b>0.8 ± 0.0</b>	<b>0.4 ± 0.0</b>	<b>0.5 ± 0.1</b>

图25(续)

表18

化合物	LLC-PK1, IL-8 表达				
	0	1	10	100	1000
1	1.0±0.1	1.3±0.1	1.1±0.3	2.7±0.1	2.1±0.5
2	1.0±0.0	1.0±0.0	1.3±0.1	1.8±0.2	2.3±0.2
3	1.0±0.1	7.8±1.5	3.9±0.4	2.1±0.0	8.4±0.1
4	1.0±0.1	0.9±0.1	1.2±0.4	1.0±0.0	8.9±0.3
5	1.0±0.0	0.9±0.1	23.1±3.9	413.7±28.8	839.4±305.9
6	1.0±0.1	0.7±0.1	0.6±0.0	1.6±0.2	0.8±0.0
7	1.0±0.1	10.1±0.7	8.1±0.7	9.1±0.4	1.8±0.0
8	1.0±0.1	1.0±0.4	0.7±0.3	1.2±0.4	ND
9	1.0±0.2	1.7±0.0	1.5±0.2	1.5±0.1	1.2±0.1
10	1.0±0.1	0.5±0.1	1.5±0.1	20.3±2.0	15.8±2.1
11	1.1±0.3	0.8±0.4	6.9±0.3	0.4±0.0	ND
12	1.0±0.1	0.7±0.0	0.9±0.0	1.7±0.1	4.3±0.9
13	1.0±0.1	2.1±0.1	12.2±4.3	ND	ND
14	1.0±0.0	1.2±0.1	1.8±0.3	37.0±4.4	1.6±0.1
15	1.0±0.1	0.7±0.1	1.0±0.1	1.3±0.1	2.5±0.1
16	1.0±0.0	0.9±0.1	1.2±0.2	1.6±0.3	0.7±0.0
17	1.0±0.1	1.0±0.1	1.6±0.0	2.0±0.2	16.3±4.3
18	1.0±0.1	0.5±0.0	0.4±0.0	1.4±0.2	0.4±0.0
19	1.0±0.2	5.9±0.4	7.1±0.5	301.3±27.5	47.9±6.0
20	1.0±0.1	1.2±0.3	0.7±0.2	3.9±0.1	4.9±1.2
21	1.0±0.1	2.2±0.2	1.8±0.1	1.2±0.2	2.6±0.3
22	1.0±0.1	4.0±0.3	2.2±0.1	2.4±0.2	1.5±0.1
23	1.0±0.1	1.2±0.1	0.4±0.0	0.6±0.1	0.7±0.1
24	1.1±0.3	16.1±0.4	8.4±0.7	7.1±1.3	1.4±0.1
25	1.0±0.0	0.9±0.1	1.1±0.0	1.8±0.3	0.5±0.1
26	1.0±0.1	0.7±0.1	0.5±0.1	0.9±0.0	2.9±1.0
27	1.0±0.2	7.6±1.1	5.7±0.7	13.7±1.2	0.4±0.0
28	1.0±0.1	0.6±0.1	0.9±0.1	0.9±0.1	1.0±0.1
29	1.1±0.2	0.9±0.2	0.8±0.1	0.6±0.1	1.2±0.1
30	1.0±0.0	2.6±0.1	1.8±0.6	1.6±0.3	1.5±0.0

图26

表18(续)

31	1.0 ± 0.1	0.8 ± 0.0	1.0 ± 0.0	1.3 ± 0.1	1.3 ± 0.0
32	1.0 ± 0.0	2.1 ± 0.1	1.3 ± 0.1	1.1 ± 0.2	0.7 ± 0.0
33	1.0 ± 0.2	0.9 ± 0.0	0.8 ± 0.1	0.8 ± 0.0	9.1 ± 0.6
34	1.0 ± 0.1	0.8 ± 0.0	0.7 ± 0.1	0.7 ± 0.0	0.5 ± 0.0
35	1.0 ± 0.1	0.7 ± 0.1	0.7 ± 0.1	0.7 ± 0.0	1.0 ± 0.0
36	1.0 ± 0.1	0.6 ± 0.0	0.6 ± 0.1	0.7 ± 0.1	0.6 ± 0.0
37	1.2 ± 0.5	0.7 ± 0.1	2.6 ± 0.2	1.3 ± 0.7	0.9 ± 0.3
38	1.0 ± 0.0	0.9 ± 0.1	1.0 ± 0.2	0.8 ± 0.1	1.1 ± 0.0
39	1.0 ± 0.0	0.8 ± 0.0	0.7 ± 0.0	0.7 ± 0.1	164.4 ± 4.0
40	1.0 ± 0.1	1.0 ± 0.1	1.0 ± 0.0	1.0 ± 0.0	1.1 ± 0.0
41	1.1 ± 0.2	2.4 ± 0.3	1.8 ± 0.1	2.0 ± 0.1	11.0 ± 1.0

图26(续)

表19

标志物	引物对	扩增子 (bp)
VIM	F 5'-ACCTGAGGGAACTAATCTG-3' R 5'-CGTTGATAACCTGTCCATCT-3'	105
KIM-1	F 5'-CAGGCTGATCCCATAATGCA-3' R 5'-CTGCCTCTCCACCAACCTTTAC-3'	100
NGAL	F 5'-CAAGGAGCTGACTTCGGAECTAA-3' R 5'-TGCACCTCAGCCGTCGATACA-3'	120
IL-6	F 5'-TGGCTGCAGGACATGACAAC-3' R 5'-TGAGGTGCCCATGCTACATTT-3'	100
IL-8	F 5'-TTGGCAGCCTTCCTGATTCT-3' R 5'-GGGTGGAAAGGTTTGGAGTATG-3'	110
IL-18	F 5'-GAACCAGTAGAAGACAATTGCATCA-3' R 5'-CCAGGTTTTCATCATCTTCAGCTA-3'	91
GAPDH	F 5'-CCCCTTCATTGACCTCAACTACA-3' R 5'-GACGGTGCCATGGAATTTG-3'	76

图27

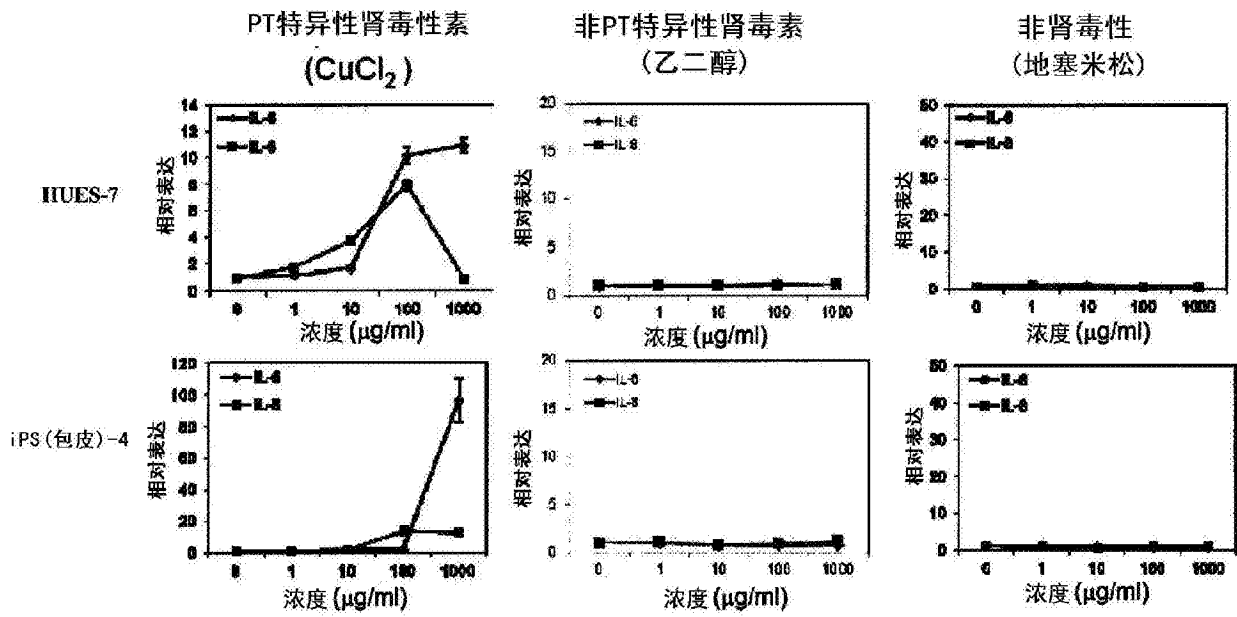


图28

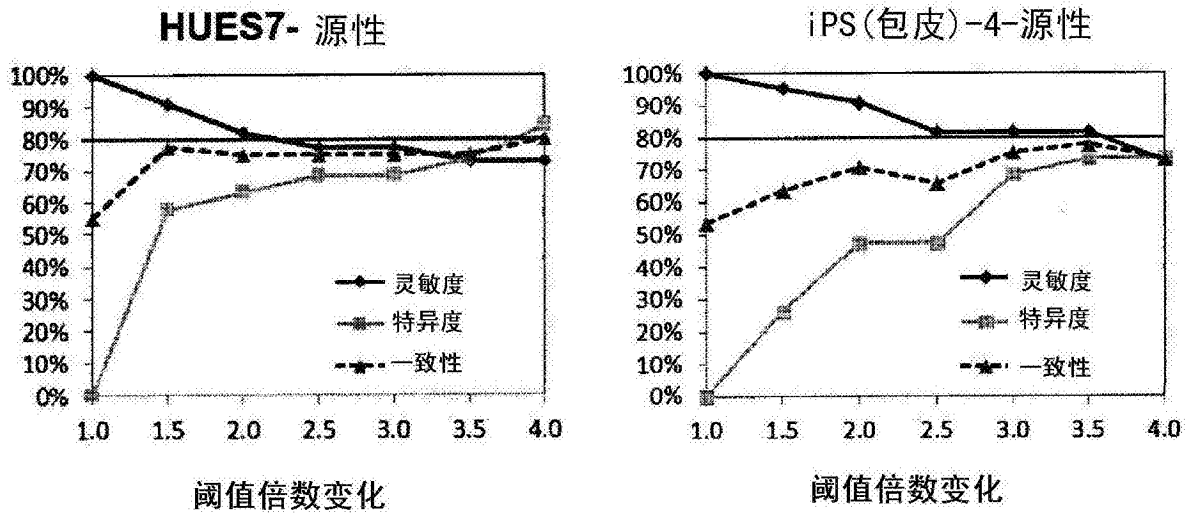


图29

表20

细胞类型	平衡的精度	灵敏度	特异性	PPV	NPV	AUC
HUES7-源性	0.73	0.73	0.74	0.76	0.70	0.80
iPS-源性	0.78	0.82	0.74	0.78	0.78	0.77

图30

各种细胞类型的ROC曲线

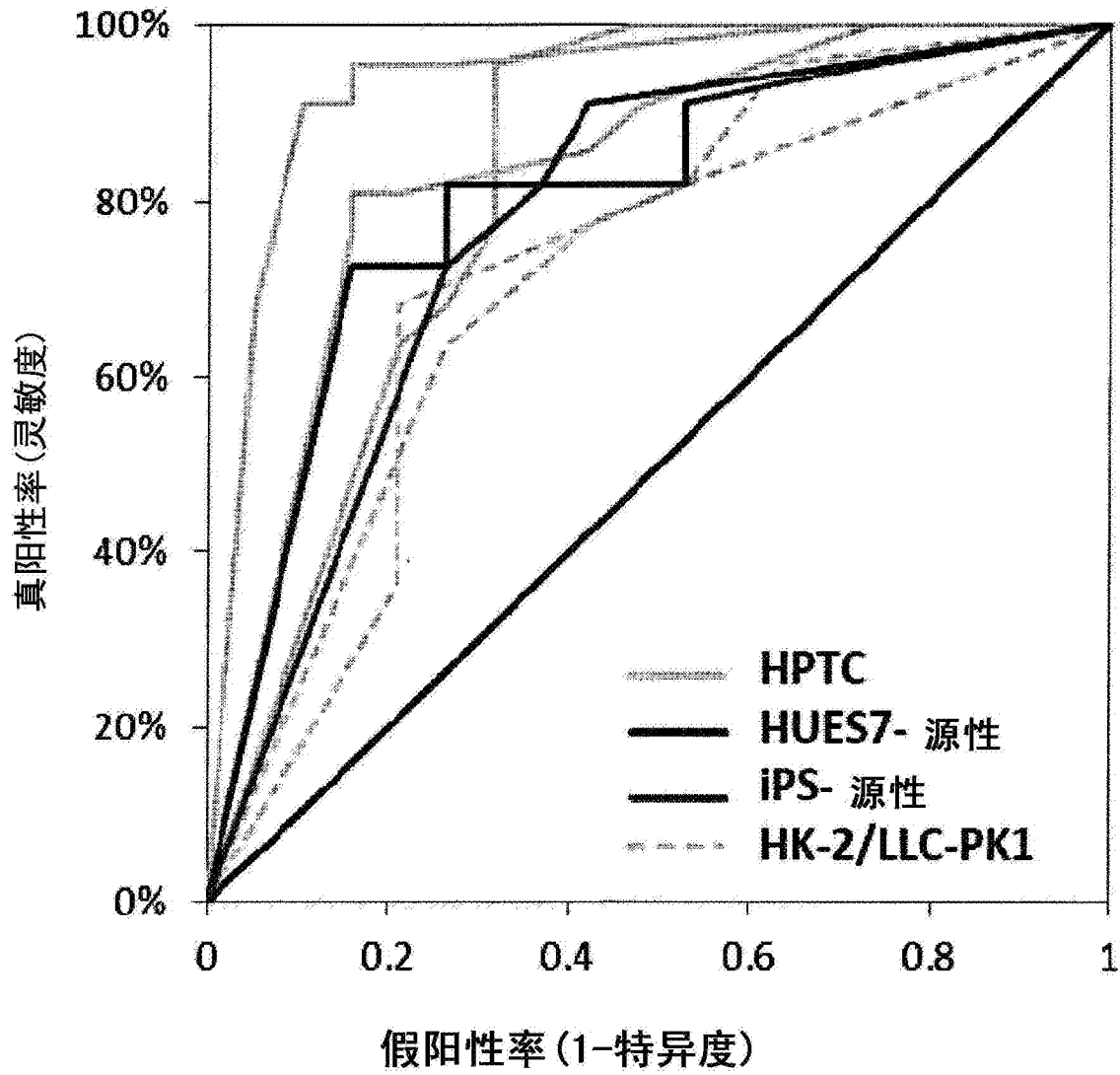


图31

专利名称(译)	预测肾近曲小管细胞毒性的体外试验		
公开(公告)号	<a href="#">CN104641237B</a>	公开(公告)日	2017-04-05
申请号	CN201380048888.X	申请日	2013-07-22
[标]申请(专利权)人(译)	新加坡科技研究局		
申请(专利权)人(译)	新加坡科技研究局		
当前申请(专利权)人(译)	新加坡科技研究局		
[标]发明人	D·津克 李尧		
发明人	D·津克 李尧		
IPC分类号	G01N33/68 C12Q1/68 G01N33/533		
CPC分类号	C12Q1/6876 C12Q1/6883 C12Q2600/142 C12Q2600/158 C12Q2600/16 G01N33/5014 G01N33/5044 G01N33/6869 G01N2333/5412 G01N2333/5421		
代理人(译)	杨昀		
优先权	61/674018 2012-07-20 US 61/675680 2012-07-25 US		
其他公开文献	CN104641237A		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

提供一种用于筛选测试化合物的肾近曲小管细胞毒性的体外试验。所述方法包括，使测试化合物与肾近曲小管细胞的测试群接触；和，测定所述测试群中白介素的表达水平，所述白介素是白介素-6(IL-6)或白介素-8(IL-8)或上述两者。若所述测试群中白介素的表达水平大于未与测试化合物接触的肾近曲小管细胞的对照群中的表达水平，则指示所述测试化合物对肾近曲小管细胞具有毒性。

