



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 1863923 B

(45) 授权公告日 2011.06.29

(21) 申请号 03807235.1

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2003.03.27

C12Q 1/68(2006.01)

C07H 21/04(2006.01)

(30) 优先权数据

10/108,969 2002.03.28 US

审查员 苏林

(85) PCT申请进入国家阶段日

2004.09.28

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2003/009389 2003.03.27

(87) PCT申请的公布数据

W02003/082202 EN 2003.10.09

(73) 专利权人 密执安州立大学董事会

地址 美国密执安州

(72) 发明人 D·M·库尔尼特

(74) 专利代理机构 上海专利商标事务所有限公司

司 31100

代理人 范征

权利要求书 1 页 说明书 20 页

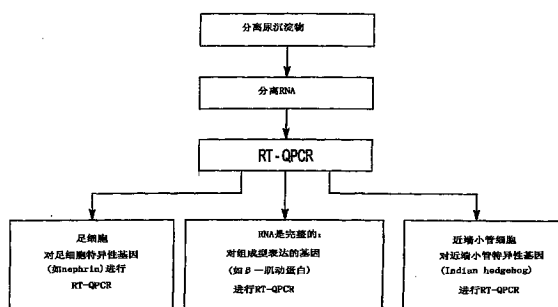
序列表 3 页 附图 3 页

(54) 发明名称

用于肾病诊断和治疗中的尿样分析的方法和组合物

(57) 摘要

本发明包括新的组合物、系统和方法来分析生物学样品如尿液样品,以便诊断和治疗肾疾病,这些肾疾病包括但不限于肾小球性肾炎、肾病综合征、糖尿病、狼疮、高血压、急性肾小管坏死、尿路塞疾病、肾癌以及其他疾病或综合征。在较佳的实施方案中,本发明包括鉴别尿道中仅在临床或科学上特别感兴趣的细胞(如足细胞或近端小管细胞)中表达的特定基因。因此,本发明能以非侵入性的方式迅速正确地分析多个疾病和紊乱中肾和尿道的状况和功能。



1. nephrin 基因的引物或探针在制备试剂盒中的用途,所述试剂盒用于通过筛选哺乳动物尿液样品中 nephrin 基因 RNA 的表达来检测肾疾病,该 nephrin 基因 RNA 在肾疾病存在时才存在于所述尿液样品中。

2. 在足状突细胞中选择性表达的 nephrin 基因的探针或引物在制备试剂盒中的用途,所述试剂盒用于通过测定所述 nephrin 基因 RNA 在哺乳动物尿液样品中的表达水平来评定哺乳动物尿液样品中存在足状突细胞。

3. 根据权利要求 2 所述的用途,其中所述测定步骤包括用逆转录酶定量聚合酶链反应试验测定所述 nephrin 基因 RNA 的表达水平。

4. nephrin 基因的探针或引物以及尿液样品中组成型表达的基因的探针或引物的组合在制备试剂盒中的用途,所述试剂盒用于通过逆转录酶定量聚合酶链反应试验测定尿液样品中 nephrin 基因 RNA 的表达水平和所述组成型表达的基因的表达水平来评价哺乳动物尿液样品中足状突细胞的存在。

5. 根据权利要求 4 所述的用途,其中所述组成型表达的基因是 β -肌动蛋白的基因。

6. 根据权利要求 4 所述的用途,所述评价还包含用逆转录酶定量聚合酶链反应试验测定尿液样品中 β -肌动蛋白基因的表达水平的步骤,其中所述试验包含一个或多个 RNA 分子,以及 β -肌动蛋白正向引物 SEQ ID NO :7、 β -肌动蛋白反向引物 SEQ IDNO :8 或 β -肌动蛋白探针 SEQ ID NO :9 中的一个或多个。

7. nephrin 基因的引物或探针在制备试剂盒中的用途,所述试剂盒用于通过测定哺乳动物尿液样品中所述 nephrin 基因 RNA 的表达水平来诊断、监控哺乳动物肾疾病过程。

8. 根据权利要求 7 所述的用途,其中所述测定步骤包括用逆转录酶定量聚合酶链反应试验测定所述 nephrin 基因 RNA 的表达水平。

9. nephrin 基因的引物或探针以及 β -肌动蛋白基因的引物或探针的组合在制备试剂盒中的用途,所述试剂盒用于通过逆转录酶定量聚合酶链反应试验测定尿液样品内足状突细胞 nephrin 基因的表达水平和 β -肌动蛋白基因的表达水平来诊断、监控哺乳动物肾疾病过程。

10. 如权利要求 1、2、4 或 7 所述的用途,其特征在于,所述检测或测定基于荧光能量转移的减量,所述减量用来测定通过 PCR 介导的用受体和供体荧光团修饰的寡核苷酸双链体的破坏。

用于肾病诊断和治疗中的尿样分析的方法和组合物

[0001] 本发明部分工作是在美国政府 NIH R01 CA78853 号文件支持下进行的。政府在本发明中享有一定的权利。

[0002] 发明领域

[0003] 本发明涉及诊断和治疗肾病中生物学样品的分析。具体地说,本发明涉及通过分析尿样来诊断和监测肾病以及与各种症状(包括但不限于肾小球性肾炎、肾病综合征、糖尿病、狼疮、高血压、急性肾小管坏死(ATN)、肾阻塞性疾病、肾癌)有关的疾病以及其他疾病或综合征的治疗进展情况。

[0004] 发明背景

[0005] 医师在治疗患者时通常需要分析肾状态和功能。对于诸如肾小球疾病,目前是通过检测尿液中的蛋白质(白蛋白),即测定从肾中排入尿液中的蛋白质的量来实现的。然而,这种方法并不灵敏,其根本原因是许多肾在异常测试结果出现之前就已丧失功能。这种方法也不正确,因为尿液中出现蛋白有许多不明确的原因,所以测试升高的变性蛋白尿(albuminuria)在许多受试者中呈假阳性。而且,对于某些肾疾病,如近端小管疾病,通常不能进行灵敏的基于尿液的测试。另一种分析方法是肾活检。该方法很昂贵,是侵入性的,而且由于存在出血和感染的危险,与有限的发病率相关。

[0006] 目前唯一可用来直接监测足细胞(即足状突细胞, podocyte)疾病的基于尿液的测试(只在实验水平采用)是用抗体测试肾分泌出的足细胞。然而,该方法并不如我们所提供的方法那样灵敏,因为它仅仅是在尿液中存在白蛋白时才会呈现出异常。因此,需要有一种特定的通常可行的测试,该测试能在肾疾病的早期、较佳是靠近开始时就显示与肾功能不良相关的阳性结果。

[0007] 本发明通过采用新的肾状态或功能的指标解决了这一情况,通过将一种该细胞特有的基因在尿道中表达,该指标能鉴定出给定细胞类型的异常脱落。

[0008] 因此,需要有在肾病期间比其他基于尿液的测试能更早和更晚地准确评价肾状态的灵敏的方法和组合物。

[0009] 发明概述

[0010] 本发明提供新的组合物、系统和方法来诊断和控制肾相关疾病、病症以及相关指标。出于本发明的目的,术语“肾病(肾疾病)”和“肾异常(失调)”可互换,其意味着肾脏或其组成部分的结构或功能的任何疾病、紊乱、综合征、异常、病变或异常情况。本发明已经发现了一种鉴定仅在临床或科学上重要的尿道细胞中表达的特定基因的独特方法,具体是一种鉴定和监测肾病治疗的方法。通过检测通常不存在于尿液中、但在有影响这些细胞的肾脏疾病存在时而存在的肾细胞(足细胞或近端小管细胞),就可以检测这些病症。

[0011] 在一个实施方案中,所述独特方法和组合物能通过检测肾小球足细胞和/或近端小管细胞的存在来确定肾脏疾病的开始以及监测足细胞和/或近端小管细胞对治疗的反应。

[0012] 在本发明中,这些细胞的存在是通过筛选一基因的表达来检测的,该基因仅仅存在于尿道中的特别感兴趣的细胞中(足细胞或近端小管细胞)。在另一实例中,本发明包括

分析尿沉淀 (urine sediment) 细胞中表达的基因,然后在许多医学疾病和紊乱中提供非侵入性的迅速准确的分析肾状况和功能。

[0013] 在其他实例中,本发明包括分析自发脱落到尿液中的细胞中的基因表达,以便使用非侵入性的基于尿液的测试来迅速诊断这些疾病和综合征。在一个实例中,基因表达的监测采用逆转录酶定量的聚合酶链反应 (RT-QPCR) 来独特地检测足细胞 (通过在尿道中这些细胞内唯一表达的 nephrin 的表达),和近端小管细胞 (通过在尿道中这些细胞内唯一表达的 Indian hedgehog 的表达)。根据本发明,这些指标能在比变性蛋白尿早的疾病过程中显示出阳性。在另一实施方案中,本发明包括用于检测感兴趣细胞中的基因表达的新的引物和探针及其试剂盒。

[0014] 附图简述

[0015] 图 1a 和 1b 显示了 TaqMan 测定步骤的一个实例。

[0016] 图 2 显示了 AmpliSensor 测定步骤的一个实例。

[0017] 图 3 是本发明的一个非限制性实例的流程框图。

[0018] 较佳实施方案详述

[0019] 在一个非限制性实施方案中,本发明包括鉴别和分析一种或多种特定的基因序列,以标记出足细胞;以及鉴别和分析一个或多个其他特异性基因序列,从而标记出近端小管细胞。已知这两类细胞受许多肾病的影响,如仅作为例子的下列疾病。在本发明中,为了减少由于正常脱落进入尿液的其他细胞类型 (如下部尿路细胞) 的基因表达所引起的混淆,单独鉴别这些细胞类型中的基因表达。

[0020] 这些基因的鉴定取决于使用的灵敏方法。例如,使用灵敏度较低的方法,认为不会在某些细胞中表达的基因实际上也会以低水平 (如已知在细胞中的基因表达水平的 1%) 表达。由于尿沉淀中的大多数细胞源自下部尿路细胞,这些细胞中的低水平转录干扰了检测上部尿路细胞的灵敏的 RT-QPCR 研究。相反,根据本发明,可以唯一地鉴定仅仅在感兴趣的上部尿路细胞中表达的基因,例如但不局限于,足细胞中的 nephrin 和近端小管细胞中的 Indian hedgehog。例如,在疾病的较晚阶段,变性蛋白尿可以始终异常,因此,对于为防止足细胞损失而设计的治疗没有反应。此时,如果治疗有效地防止足细胞尿 (podocyturia),nephrin 的 RT-QPCR 可以为正常,而变性蛋白尿测试则始终为异常,因为对足细胞的已有损伤不能被修复。

[0021] 本发明还包括鉴定具体疾病中的感兴趣细胞的脱落。在本发明中,我们出人意料地显示,正常的肾不会将足细胞或近端小管细胞释放到尿沉淀中。然而,涉及这些细胞的疾病或紊乱导致丧失足细胞或近端小管细胞进入尿沉淀中。这意味着至少一部分释放的细胞以完整细胞或细胞片段的方式存在,它们能旋转进入尿沉淀中。出于评定、诊断和治疗的目的,本发明鉴定这种脱落。

[0022] 本发明另一方面提供了与现有技术所见的那些不同的特异性探针。尽管以前的表达分析描述了潜在的探针候选物,但是没有人使用和 RT-QPCR 一样灵敏的技术,因此不能最终确定哪个是合适的标记。例如,根据灵敏度较低的表达研究,glepp1 显示出其在尿道中仅在足细胞中表达,所以 glepp1 显示出有希望作为足细胞特异性标记的候选物。然而,本发明的 RT-QPCR 技术显示,除了预计到足细胞中较大的合成外,下部尿路细胞中也有以前未检测到的较少量的 glepp1 转录。因此,glepp1 基因的表达不适合作为足细胞的标

记。这是因为下部尿路细胞中有低的有限的基因表达引起了混淆。相反,采用本发明,显示 nephrin 不在除足细胞外的尿路细胞中表达,因此其在尿沉淀中的存在可用作足细胞尿的替代标记。

[0023] 类似地,正常的尿沉淀中存在许多潜在的小管细胞的标记物,这表明这些基因在下部尿路细胞中有少量表达。甚至在用灵敏度较低的分析中显示仅在肾脏特定区域表达的候选基因(如 N-乙酰基- β -D-氨基葡萄糖苷酶、水孔蛋白(aquaporin)1、尿调素(uromodulin)和 SLC3A1)进行筛选时,也是如此。现已发现,Indian hedgehog 是近端肾曲小管细胞和近端肾直小管细胞的合适标记。某些实例的灵敏 RT-QPCR 分析显示,在大量正常受试者的尿沉淀中,Indian hedgehog 的水平不超过 10^{-4} (Indian hedgehog 转录物的丰度/ β -肌动蛋白转录物的丰度)。

[0024] 在一个非限制性实施方案中,本发明还包括用 RT-QPCR 分析尿沉淀中现存的核糖核酸(RNA),以鉴别感兴趣的细胞。这需要至少一部分脱落进入尿沉淀的细胞有足够的完整性以产生 RT-QPCR 产物(这是以前未认识到的结果)。因此,出于本发明的目的,感兴趣的细胞可以被认为是足以提供完整 RNA 的全细胞或其片段。本发明还包括使遍在转录的管家基因表达,以确认能引导逆转录的 RNA 已被分离。

[0025] 在较佳的非限制性方案中,本发明包括,在足细胞和近端小管细胞所参与的疾病中,使用 RT-QPCR 技术来分别检测尿沉淀中的足细胞和/或近端小管细胞的异常存在。然而,本领域技术人员应当理解,本发明还存在其他实施方案,可用其他技术来检测相关基因的表达。因此,通过采用本发明的方法,可以在临床上将患者分为足细胞和/或近端小管细胞脱落进入或没有进入尿液的患者。

[0026] 另外,本发明的 RT-QPCR 试验产生了一个半定量的肾关联分析结果。这样,就可以通过仅仅使用非侵入性方法获得的尿液和分子生物标记来监测肾疾病或紊乱的进展。异常可在比使用变性蛋白尿升高标记或肾功能异常更早得多的时间就被确定。

[0027] 根据本发明,用 RT-QPCR 对 nephrin(足细胞)和 Indian hedgehog(近端小管蛋白)进行灵敏测试仅需要少量尿液,而且它是非侵入性的,因为其只需要自然排泄的尿液;而且,它反映了肾脏所涉及的当前状况。这为临床医师提供监控治疗效果的机会。例如,始终有变性蛋白尿但是 nephrin RT-QPCR 呈阴性的糖尿病对象一律处于晚期治疗阶段的患者(ACE 抑制剂或血管紧张素 2 受体拮抗剂)。利用本发明,在糖尿病早期阶段,所见的 nephrin RT-QPCR 变化可先于变性蛋白尿升高和临床上明显的肾病的较后变化。在糖尿病的晚期, nephrin RT-QPCR 灵敏地检测到了药物治疗成功防止足细胞损失的患者。因此, nephrin RT-QPCR 是检测肾病异常以及监控其治疗的灵敏方式。

[0028] 本发明的实施方案还包括用 RT-PCR 方法,通过测定尿沉淀中特定类型的受损肾细胞的存在,来检测肾脏损伤。因此,本发明避免了用现有技术来检测尿液中白蛋白的灵敏度困难和不准确性。尽管 Hara 及其同事已经开发出一种免疫学测试来检测尿液中的足细胞,但是该测试是有局限性的,因为它仅仅检测已有变性蛋白尿升高情况的糖尿病受试者和儿科受试者中的异常。相反,本发明包括了一种更灵敏的测试,如本文所述,其在 nephrin RT-QPCR(足细胞)测试中比该免疫学测试更早地显示出了异常。

[0029] 为了检测许多肾病(例如包括肾小球病),本发明的一些实施方案可使用基因 nephrin,该基因在尿道中的转录仅限于足细胞。在其他实施方案中,在尿道中的转录限于

足细胞的任何基因均可用于此目的。显示尿沉淀中存在足细胞的异常状态包括（仅作为一些例子）肾小球病、肾病综合征、全身性红斑狼疮（SLE）、糖尿病和高血压。在不导致足细胞脱落的非肾小球肾疾病中，未见有这些 nephrin RT-QPCR 变化。用本发明获得的 nephrin RT-QPCR 测试结果在肾损伤的其他尿标记之前就显示出了异常水平。在糖尿病晚期，存在升高的变性蛋白尿，且伴有或不伴有 RT-QPCR 异常。此时，即使存在升高的变性蛋白尿反映了以前的足状突细胞足细胞丧失，阴性 nephrin RT-QPCR 测试结果表明有效的治疗使得足细胞不继续丧失。

[0030] 为了检测糖尿病如急性肾小管坏死或阻塞性疾病，本发明采用了基因 Indian hedgehog，该基因在尿道中的转录局限于近端小管细胞。在其他实施方案中，其在尿道中的转录局限于近端小管细胞的任何基因均可用于此目的。Indian hedgehog 数据也显示了许多肾小球疾病中近端小管细胞脱落通常在时间上与肾小球丧失无关。尽管不清楚该细胞丧失在肾小球疾病的发病机制中的作用（如果有的话），但是注意到其作为一种因子在这些疾病中起作用。

[0031] 在一些实施方案中，本发明还包括简单的保存方案，在该方案后，来自经处理的尿沉淀细胞的 RNA 在室温下稳定（可以邮寄）。尿样通过非侵入性的方法获得，仅仅小心保存即可。然后，它可以小的体积在室温下运输至集中化机构进行复杂的 RT-QPCR 分析。其结果可在收到样品后一天内获得，然后将报告返回给医师。

[0032] 实施例：

[0033] RNA 的分离。所有尿样的采集得到了知情同意。样品由大约 3-40 毫升自发排泄的尿液组成。用于此目的的尿液是新鲜的或是以前经过冷冻的。以 8000rpm 对尿液离心 10 分钟。倾析出上清液，用 pH 7.4 的磷酸缓冲盐溶液（137mM NaCl+2.7mM KCl+4.3mM Na₂HPO₄+1.4mM KH₂PO₄）洗涤沉淀一次，然后再次离心，将经空气干燥的沉淀重新悬浮于少量双蒸水中，等分并冷冻于 -80°C。

[0034] 用本发明检测尿沉淀细胞中的 RNA。尿液在排出体外之前，在体内约 37°C 下在膀胱内贮存数小时。然后，尿液通常在诊所内室温下放置（leave out）数小时。然后离心沉降尿沉淀，并用 RNA later（Ambion）或 STG 缓冲液（Biotronics, Lowell MA）处理以使 RNA 酶灭活。如果样品是在自然排泄后 12 小时内获得的，则尿液 RNA 始终是完整的，足以直接进行 RT-QPCR。在室温下培育尿液数天后显示出显著百分比样品有 RNA 降解，其体现在参照标记 β-肌动蛋白不能支持 RT-QPCR。这说明需要在 RNA 降解之前诊所之后不久就处理样品，否则 RNA 将不足以进行 RT-QPCR。然后，用本领域已知的手段分离 RNA，例如按照 Biotronics 的 RNA 分离程序用它的尿沉淀 RNA 分离试剂盒来进行。

[0035] 引物和探针

[0036] 用于某些实施方案的 AmpliSensor 反应的人 nephrin 的引物和探针包括下列：

[0037] 过量引物：5' -GCCCCGAGGGTCTGAAGGTG-3'（位于外显子 23 和外显子 24 的接头处）（SEQ ID NO :1）；

[0038] 有限的引物：5' -TGGACTGGCTGACAAAGGGACCCAG-3'（位于外显子 22 内）（SEQ ID NO :2）；和

[0039] AmpliSensor 探针：5' -TACTGGAGAACCTGAAGACCAGCTGCC-3'（位于外显子 23 内）（SEQ ID NO :3）。

[0040] 用于某些实施方案的 TaqMan 反应的人 Indian hedgehog 的引物和探针包括下列：

[0041] Indian hedgehog- 正向引物 :5' -CAATTACAATCCAGACATCATCTTCAA-3' (SEQ ID NO :4) ;

[0042] Indian hedgehog- 反向引物 :5' -CGAGATAGCCAGCGAGTTCAG-3' (SEQ ID NO :5) ;
和

[0043] Indianhedgehog-TaqMan 探针 :5' -CATGACCCAGCGCTGCAAGGAC-3' (SEQ IDNO :6), 在一个实施方案中标记为 6FAM-5' -CATGACCCAGCGCTGCAAGGAC-3' -TAMRA (标记的 SEQ ID NO :6)。

[0044] 用于某些实施方案的 TaqMan 反应的人 β -肌动蛋白的引物和探针包括下列：

[0045] β -肌动蛋白正向引物 :5' -AACTTGAGATGTATGAAGGCTTTTGG-3' (SEQ ID NO :7) ;

[0046] β -肌动蛋白反向引物 :5' -TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTAAAG-3' (SEQ ID NO :8) ;

[0047] 和 β -肌动蛋白-TaqMan 探针 :5' -CAACTGGTCTCAAGTCAGTGTACAGGTAAGCCCT-3' (SEQ ID NO :9), 在一个实施方案中, 标记为 6FAM-5' -CAACTGGTCTCAAGTCAGTGTACAGGTAAGCCT-3' -TAMRA (标记的 SEQ ID NO :9)。

[0048] 本发明另一方面提供了一种用于通过本发明方法来检测感兴趣细胞的试剂盒, 其中上述公开的一种或多种新的引物或探针提供于一容器中。

[0049] 在一些非限制性的实施方案中, 本发明包括了在美国专利 4,965,188 和 5,079,352 中公开的 PCR 方法和 / 或美国专利 5,210,015 中公开的 TaqMan RT-QPCR 方法 ; 所有这些专利均全部纳入本文作为参考。在一些非限制性的实施方案中, 本发明包括美国专利 4,965,188 和 5,079,352 中公开的 PCR 方法和 / 或美国专利 5,348,853 和 5,567,583 中公开的 AmpliSensor RT-QPCR 方法 ; 所有这些专利均全部纳入本文作为参考。

[0050] TaqMan 试验的原理。TaqMan 试验在本领域中已有描述, 是本领域普通技术人员所知道的 (见图 1A 和图 1B)。该试验所基于的原理是 : 由于 Taq- 介导的核酸外切酶消化与两个引物之间的序列同源的荧光标记的寡核苷酸, 成功的聚合酶链反应 (PCR) 产生了荧光信号。消化程度直接取决于发生的 PCR 的量, 可通过测定由能量转移的减少而引起的荧光增量来直接准确地定量测定。该测定允许在 PCR 反应的指数期进行检测, 这是测定初始基因组序列拷贝数所需要的。

[0051] AmpliSensor 试验的原理。为了测定在各种疾病中足细胞脱落进入尿液中的情况, TaqMan 系统可能不是足够的灵敏或特异, 对于这一需求可采用 AmpliSensor 试验。

[0052] AmpliSensor 试验 (图 2) 所基于的原理是 : 荧光能量转移的减量可用来测定 PCR 介导的寡核苷酸双链体 (“AmpliSensor”) 的破坏。寡核苷酸双链体的两条链分别用供体和受体荧光团修饰。在没有 PCR 的天然双链体状态下, 荧光团 (供体为荧光素, 受体为得克萨斯红) 之间的能量转移是有效的 ; 在荧光素的激发频率下刺激后, 得克萨斯红的发射频率下有高荧光信号。由于链的置换, PCR 破坏了该寡核苷酸双链体, 从而减少了能量转移 (与 2 个受激荧光源 (fluor) 之间的距离的 6 次方 (sixth power) 成反比变化)。破坏程度与 PCR 的发生量直接相关, 它可通过测定由能量转移的减少而引起的荧光减量来直接准确地定量测定。AmpliSensor 系统在本质上比 TaqMan 系统更灵敏, 因为双向 AmpliSensor 引物和探针序列是积极参与聚合酶链反应的信号分子。与之相比, TaqMan 中的探针序列被

动地依靠杂交来使能量转移介导的荧光行为发生。因此,AmpliSensor 系统比 TaqMan 系统更灵敏。

[0053] 仅与 RNA 反应的管家基因探针。用组成型表达的基因 β -肌动蛋白的探针来验证从尿液沉积物尿沉淀中成功制得了 RNA。尽管合成了探针来识别表征转录序列的被剪接的序列,这些探针并不能从经过加工的假基因中区分真实的基因。因此,在 RNA 迅速抽提中通常存在的基因组 DNA 污染会产生组成型表达的基因的假阳性物(具有经加工的假基因)。为了仅仅检测真正转录的序列,我们采用了 poly(A) cDNA 特异性方法,其中一个引物主要由一段 T 残基序列组成。该 T 残基序列与对转录物特异的聚腺苷酸尾序列杂交。寡核苷酸 3' 端的核苷酸与该信息互补,以防引物在 poly A 尾序列上打滑(stuttering)。该设置可以忽略的效率与基因组 DNA 反应(总 RNA 实现的信号的 0.1%),因此可以区分转录的序列与基因组 DNA。

[0054] A. 足细胞

[0055] 在没有肾活检时,足细胞丧失引起的肾病的早期诊断通常在蛋白(或白蛋白)排到尿液中的量升高的基础上间接实现的。然而,该测试并不是特异性的,因为有许多因素会影响白蛋白排入尿液。另外,只有当有显著量的足细胞丧失使得剩余足细胞的补偿不足以产生正常的屏障而导致蛋白泄漏到尿液中时,该测试才会有异常。由于足细胞在肾脏获得最大体积后不再复制,因此较早地检测出这些细胞的损失以防肾功能丧失是尤其重要的。

[0056] 根据本发明的一个方面,通过在足细胞中选择性表达从而在尿道中是足细胞特异性的基因异常存在于尿沉淀中,可以高灵敏度检测足细胞丧失。为描述该方法,我们采用了基因 nephrin,该基因在尿道中的转录仅发生在足细胞内。得到的发明是一种迅速的、非侵入性的方法,以筛选对影响足细胞的肾脏疾病的早期影响。

[0057] 在慢性疾病糖尿病开始后的确定时间,将 RT-QPCR 检测 nephrin 的灵敏度与尿液中蛋白质(白蛋白)的存在进行比较。另外,还将该试验对 nephrin 的灵敏度与测定足细胞特异性标记物足萼蛋白(podocalyxin)存在的抗体测试进行比较。

[0058] 足细胞的 nephrin 标记物。有多种在尿道中的表达的基因被认为是足细胞特异性的。利用这些序列,用 glepp1 和 nephrin 进行 TaqMan RT-QPCR 分析。构建了多个探针,这些探针在正常样品中没有信号或本底。然而,没有获得特异性信号,这表明这些基因在尿沉淀总 RNA 中的丰度很低,甚至在肾小球病中,足细胞组成也仅占了尿沉淀细胞中的一小部分。

[0059] 用更灵敏的 AmpliSensor 系统检查 glepp1 获得了出人意料的结果,正常个体的尿液中显示出稀疏量的 glepp1。在来自大鼠泌尿组织特定部的 RNA 上用大鼠 TaqManglepp1 探针,结果在膀胱细胞检测到低但有限的 glepp1 的转录水平。尽管该转录水平很低而不能用于大多数以前的分析技术检测到(在肾小球中约 1%的水平),但它干扰了尿沉淀的灵敏的 RT-QPCR 分析,因为大多数脱落的细胞来自膀胱。

[0060] 在尿道中对足细胞进行选择分离的下一个候选探针是 nephrin。nephrin 是足细胞中的结构蛋白,它包含用于将足细胞分开的裂缝膜锁合的分子。在来自大鼠泌尿组织特定部的 RNA 上用大鼠 TaqMan 探针,结果仅在肾小球内发现有 nephrin 转录。除了该大鼠解剖研究外,还构建了人 nephrin 探针,以避免与基因组序列之间的任何交叉反应,其利用的事实是外显子 22 和 23 以及外显子 23 和 24 被 3kb 以上的内含子序列隔开。AmpliSensor

序列组跨越了这 3 个外显子,且没有显示出与人基因组 DNA 有可检测的反应。因此,在一些实施方案中,本发明构建的 AmpliSensor nephrin 探针是非常灵敏的且是特异性的。

[0061] 表 1 显示,该 nephrin 探针不产生假阳性。平板内和平板间试验均表明,nephrin mRNA 不存在于正常个体的尿沉淀中。另外,检查了来自 40 位正常对象的超过 200 份不同的正常尿沉淀,结果显示没有阳性物 $> 2E = 00 (= 2 \times 10^0 = 2)$ nephrin mRNA 分子 / 尿沉淀试验 (对应于来自 5 毫升尿液的沉积物)。

[0062] 另外还评价了由 RNA 降解引起的假阴性的可能性。常规监测具有和 β -肌动蛋白探针的 RNA 制备物,以确保制备质量满足要求的 RNA。该质量控制是必要的,但没有表明 nephrin mRNA 是否有特异性降解还是足细胞的脱分化从而使其不再表达 nephrin。现已证实,经历局灶性节段性肾小球硬化症 (focal segmental glomerulosclerosis)、最小变化肾病或先天性肾病变的肾小球的足细胞中出现了 gleepl 的这种脱分化。然而,某些实施方案的 RT-QPCR 测试发现 nephrin 存在于所有这些疾病,这使得不表达 nephrin 的足细胞不可能说明该技术的明显问题。

[0063] 我们发现足细胞通常不分泌到尿沉淀中。因此,每种尿沉淀的 nephrin mRNA 的绝对数 > 5 可以认为是异常的。正常的样品没有大于 2 的数值,因此数值 5 用作保守性的突破点 (知道有许多关于肾体积和肾浓缩尿液能力的未知量)。尽管这不说明肾脏的浓缩能力,但很难实现标准化,因为无法对少量细胞 (即通常不存在于尿沉淀的足细胞) 的存在进行标准化。实际上,如果足细胞的脱落仅仅随时间而变,尿液浓度标记 (如肌酸酐) 进行标准化是不合适的。幸运的是,基本上任何 nephrin 的存在都是异常的。

[0064] 然而,由于对肌酸酐的标准化是用通常方法进行的,因此 nephrin RT-QPCR 数值也是通过在进行 nephrin RT-QPCR 时除以同一尿液等份的 96 份样品所得肌酸酐浓度来进行标准化的。在该标准化后,96 份样品中仅有 2 份样品偏离原始诊断 (在 nephrin RT-QPCR / 尿液肌酸酐的正常和异常数值之间,根据经验获得截断点为 5×10^{-2} dl/mg)。另外,如预计的那样,用两类分析而有不同的样品具有 RT-QPCR 的边线值。肌酸酐浓度的变化几乎不超过一个数量级,而 nephrin RT-QPCR 的绝对值变化在许多数量级内。因此,某些实施方案的 AmpliSensor 技术,无论数据是否使肌酸酐标准化,均显示了极好的特异性。

[0065] RT-QPCR 分析、u-足细胞和升高的变性蛋白尿在儿科肾病中的比较。表 2 表明, nephrin RT-QPCR、对足萼蛋白的足细胞分析和尿液中白蛋白的存在均是不一致的。u-足细胞以及尿液中白蛋白的分析由日本的 M.Hara 博士进行。除了这些分析,还用 RNAlater (Qiagen) 处理了一部分尿沉淀。将经 RNAlater 处理的样品在室温下从日本送至密歇根州。尿沉淀在密歇根州进行收集,方法是离心沉淀经 RNAlater 处理的细胞、用磷酸盐缓冲盐水洗涤一次、然后用 Biotronics 程序 (同上) 分离 RNA。如用 β -肌动蛋白探针进行的 TaqMan RT-QPCR 分析所示,用常规方式获得 PCR 级质量的 RNA。

[0066] 比较儿科肾病中尿液白蛋白、u-足细胞计数、和 nephrin RT-QPCR 的水平 (表 2)。在 u-足细胞计数异常的所有病例中均见到了升高的变性蛋白尿 (表 2)。相反,许多 nephrin RT-QPCR 异常的对象没有升高的变性蛋白尿或异常的 u-足细胞计数 (u-足细胞计数高的异常样品包括了一亚组变性蛋白尿升高的异常样品)。这些分析证明,在儿科肾病中, nephrin RT-QPCR 的异常可在没有 u-足细胞异常或升高的变性蛋白尿的情况下存在。因此,这些 nephrin RT-QPCR 异常存在于用其他基于尿液的测试未能鉴别的一组患者中。受试者中没

有升高的变性蛋白尿但有明显的neph rin RT-QPCR的现象与这些来自早期受影响但尚未发展成升高的变性蛋白尿的受试者的样品是一致的。

[0067] neph rin RT-QPCR异常是肾小球疾病特异性的。表3证明了neph rin RT-QPCR异常对肾小球疾病的特异性。在许多检查的儿科肾小球疾病中,至少一个尿沉淀显示出neph rin RT-QPCR异常。这在表3中有所描述,其显示许多儿科肾小球肾病与尿沉淀中的neph rin RT-QPCR相关。相反,没有一例检查的非肾小球疾病表明尿沉淀中有neph rin。如预计的那样,neph rin RT-QPCR不依赖于移植体的状态。异常情况注意(胱氨酸贮积症)显示了蛋白尿,但是没有显示neph rin的异常。这与该疾病中的蛋白尿来源于肾小管而非肾小球的观点是相符的,它表明尿液中的异常蛋白其本身并不引起neph rin RT-QPCR异常。

[0068] 糖尿病中肾损伤的分析随时间的比较。在1型糖尿病中,可以确切地确定疾病的开始时间。在1型糖尿病中,疾病的开始是明确的。而且,在1型糖尿病中,肾疾病需许多年才发展成为临床上明显的疾病。因此,通过在该疾病开始后确定异常何时发生来画出时间线。对于2型糖尿病可作类似的分析,尽管对于2型糖尿病开始的确切时间含糊使产生的结果也不明确。

[0069] 表4显示,在诊断糖尿病后最初10年内所见的neph rin RT-QPCR异常比在该间隔期间见到的升高的变性蛋白尿更为频繁。这着重表明,在诊断后的早期,neph rin RT-QPCR测试比寻找变性蛋白尿或u-足细胞更为敏感。表4-6的数据结合起来证明,在疾病期间,neph rin RT-QPCR异常比蛋白尿升高的发生更早。许多neph rin RT-QPCR异常的糖尿病患者的血压是正常的,因此表4-6中的异常不仅仅是由于高血压而引起的(表7)。

[0070] 在疾病早期显示RT-QPCR异常的个体的尿沉淀中,没有升高的变性蛋白尿(表2-8)。这使得RT-QPCR可作为一种有价值的肾脏损伤标记物,因为neph rin RT-QPCR对足细胞是特异性的,而且能在蛋白尿还没有发生的疾病早期灵敏的检测到。不同的是neph rin RT-QPCR测定足细胞的当前状态,而升高的变性蛋白尿测定的是损失这些细胞后的效果。总之,1型糖尿病中各事件的时间顺序是neph rin RT-QPCR异常、蛋白尿以及明显的肾脏疾病。

[0071] 电子显微镜证实,在neph rin RT-QPCR无法辨认的疾病晚期,仍尚存有足细胞。这一发现的基础有几种非限制性的可能性:

[0072] 1. 脱离的足细胞可能脱分化并且不再表达neph rin RNA。在gleppl的表达中,一些由于疾病而脱分化的足细胞已经显示出这一缺陷。

[0073] 2. 没有一个在晚期脱离的足细胞保留了足够的存活力以便有质量足够好的RNA来支持RT-QPCR。尽管用常规方式进行了 β -肌动蛋白分析来确保尿沉淀RNA足够完整以支持RT-QPCR,这却并不能保证足细胞RNA足够完整以支持RT-QPCR。

[0074] 如果在发现众多个体在疾病晚期有可测定的neph rin RT-QPCR,这两种可能性是不可靠的。

[0075] 3. 最有可能的是,治疗有效地防止了足细胞继续损失。因此,neph rin RT-QPCR是可忽视的。假定尿液中出现升高的白蛋白是由于超出肾脏修复能力的年老的足细胞损失的结果。实际上,当超过大约50%的足细胞损失时,其余足细胞不足以补充以前的损失,因而发生了永久性的升高的变性蛋白尿。因此,在没有足细胞损失的情况下能观察到升高的变性蛋白尿,所以在制止足细胞继续损失的情况下,neph rin RT-QPCR是可忽视的。

[0076] 支持第三种可能性的历史表明,所有具有正常 nephrin RT-QPCR 而变性蛋白尿升高的个体正在进行治疗以降低血压和减少足细胞损伤。表 5 说明,在疾病晚期,变性蛋白尿可以始终呈现出异常,但 nephrin RT-QPCR 保留了区分足细胞尿的能力。我们检查了 18 例具有显著的变性蛋白尿且正在进行治疗 (ACE 抑制剂或血管紧张肽 2 受体阻断剂) 的 1 型糖尿病患者。在这些病例的 8 例中,nephrin RT-QPCR 通常低,表明药物治疗有效地阻止了足细胞损失。在剩余 10 例中,仍然见到有 nephrin RT-QPCR 异常,这表明药物治疗没有有效地阻止足细胞的损失。在 2 型糖尿病中,我们见到了相同的现象:在接受药物治疗的 8 例变性蛋白尿对象中,有 4 例显示出通常低的 nephrinRT-QPCR 值。该数据证明了 nephrin RT-QPCR 如何来起到确定药物治疗效果的作用。具有低的 RT-QPCR 值的那些病例表明,药物治疗抑制了进一步的足细胞损失。根据治疗阻止了进一步的足细胞损失这一假设,此时即使电子显微镜表明仍尚有足细胞,但是尿沉淀细胞中检测不到 nephrin mRNA。具有低的 RT-QPCR 数值的那些病例表明,药物治疗抑制了进一步的足细胞损失。

[0077] 确定 2 型糖尿病的开始时间比 1 型糖尿病更为困难,这解释了为何在 2 型糖尿病中 nephrin RT-QPCR 和升高的变性蛋白尿之间在时间上的划分不如 1 型糖尿病。在个体中见到的 nephrin RT-QPCR 异常的情况比发展成末期肾脏疾病 (ESRD) 多,该灵敏分析表明亚临床肾病在 1 型和 2 型糖尿病中有高流行率。

[0078] 纵向研究 (表 6) 表明,肾脏在糖尿病中的参与比以前所认识到的更为常见。一半以上受检查的个体至少有异常的尿液沉积 nephrin RT-QPCR (nephrin RT-QPCR > 5E+00)。由于所有尿沉淀对组成型表达的 β -肌动蛋白探针呈阳性,有可能正常样品 (nephrin RT-QPCR \leq 5E+00) 确实反映了没有足细胞尿症。如果是这样,表 6 中的数据表明足细胞尿是糖尿病中的一种间歇的常见现象。如果是这样,则需要在疾病的整个期间纵向监测尿沉淀的 RT-QPCR,以监测肾脏的状态和对治疗的反应。

[0079] 因此,nephrin RT-QPCR 测试至少有两种可能的临床用途。在疾病早期,nephrinRT-QPCR 在其他测试之前变得异常,因而有可能灵敏地检测早期肾病。在治疗疾病的晚期,当存在升高的变性蛋白尿时,nephrin RT-QPCR 可以是正常的,其反映了这样一个事实:足细胞的损失不一定会成为变性蛋白尿升高的永久性疾病。因此,nephrinRT-QPCR 应当能确定,在疾病晚期,当升高的变性蛋白尿变成永久性异常时,治疗措施是否有效地治疗了足细胞损失。

[0080] 高血压和全身性红斑狼疮。在这两种疾病中,均可见到足细胞异常 (表 7-8)。同样,ESRD 病理学可能再次由该足细胞损失引起。大量个体中存在的尿沉淀 nephrinRT-QPCR 异常证实了足细胞预计在这些疾病中起的重要作用。

[0081] 肾癌。癌症与未正常粘附的细胞的增殖有关。因此,肾癌能导致正常尿沉淀中没有见到的肾细胞脱落。从斯特拉斯堡的 Pierre Oudet 博士处获得了 22 份用 RNA later 保存的尿沉淀。在 22 份沉积物中,有 21 份观察到 nephrin 的异常存在。这些结果表明,足细胞尿和 / 或肾细胞脱落而导致 nephrin 表达可用来检测肾癌。因此,本发明包括了一种新的有价值的诊断肾癌以及监测其对治疗的反应的方法,该方法是用非侵入性的方法测试尿沉淀中的 nephrin 转录。同样,对足细胞特异性转录物需要有灵敏的检测。

[0082] nephrin 和蛋白尿是不相关的。没有见到 nephrin RT-QPCR 和蛋白尿之间有关联 (通过尿液中的总蛋白 / 肌酸酐或白蛋白 / 肌酸酐来测定)。在正常样品中,这些变数均不

呈阳性,以致所有这些阳性数值表示异常。关联性的缺乏表明两种技术是测定不同的属性。nephrin RT-QPCR 是通过测定尿沉淀中足细胞特异性的基因 nephrin 的存在来评价当前的足细胞损失。在见到蛋白尿之前 RT-QPCR 测试可以异常是不奇怪的,因为明显的足细胞损失必定发生在能检测到蛋白尿之前。当 nephrin RT-QPCR 不明显时,尿液中继续显示丧失蛋白的样品可能表示个体不再损失足细胞,但是仍然存在由以前的足细胞损失而引起的显著缺陷。因此,即使没有持续的足细胞损失,仍有导致慢性蛋白尿的血液和尿液流之间的永久性联系。

[0083] 某些实施方案的 nephrin RT-QPCR 实现了非侵入性的监测影响足细胞的疾病。将 nephrin RT-QPCR 设计成用于筛选足细胞疾病是因为它所关注的是在尿道中仅在足细胞内表达的基因。nephrin RT-QPCR 测试的间断性使人联想起升高的变性蛋白尿测试,而升高的变性蛋白尿的发现并不随时间而恒定。实际上,在纵向研究的糖尿病对象中,升高的变性蛋白尿可回复成正常。这些发现与这样一个假设相一致:大多数 1 型糖尿病个体有来自其疾病的肾损伤,而其中只有一部分会继续发展成 ESRD。然而,变性蛋白尿升高的试验仍然是有用的,因为始终具有升高的变性蛋白尿的个体发展成肾病的危险在增加。将 nephrin RT-QPCR 与变性蛋白尿测试结合起来能更确切地诊断肾脏及其治疗所处的阶段。

[0084] 总之,本发明的 nephrin RT-QPCR 测试(或其类似方案)应该用来检测影响足细胞的疾病的早期效应以及监测足细胞对治疗的反应。

[0085] B. 近端小管细胞

[0086] Indian hedgehog 作为近端小管的标记物。研究了肾脏的不同解剖学部位的许多分子标记物:对于近端肾曲小管和近端肾直小管的 Indian hedgehog,针对近端小管的 n-乙酰基 β -D-氨基葡萄糖苷酶、针对近端小管和下行四肢消瘦细胞(descending thin limb cells)的水孔蛋白(aquaporin)1、针对近端肾曲小管和近端肾直小管的 SLC3A1,以及针对远端小管的尿调节蛋白(uromodulin)。这些探针的 TaqMan 分析显示,在人体内正常细胞中没有明显本底(由于下部尿路细胞的表达)的唯一探针是 Indian hedgehog 探针。这不能通过演绎得知。和 nephrin 一样,进行了扩大系列的 40 个正常对照尿沉淀的工作。这表明,在正常对照中,RT-QPCR 对 Indian hedgehog 与 RT-QPCR 对 β -肌动蛋白的比例没有出现大于 10^{-4} 的异常值(表 9)。与 nephrin 的情况(少量足细胞脱落在尿沉淀中,需要用更灵敏的 AmpliSensor 系统)不同,TaqMan 分析 Indian hedgehog 基因的表达检测到了近端小管细胞的排出。较稀少的足细胞与较丰富的近端小管细胞之间的这一定量差异是有意义的,因为一旦肾脏生长完全,有限量的高度专一化的足细胞不再活跃地复制。相反,更丰富的近端小管细胞能在成人的整个生命期间复制。

[0087] 近端小管细胞的异常定义为与 β -肌动蛋白对照信号的比例,其反映了排入尿沉淀中的近端小管细胞的比例。这种需要进行标准化体现了一个事实,即正常人能排泌少量 Indian hedgehog 转录物。因此,与 nephrin 的情况(正常人中基本上没有检测到信号)不同,正常情况中有有限量的 Indian hedgehog 信号。尽管正常的定义(对 Indian hedgehog 的 RT-QPCR 与对 β -肌动蛋白的 RT-QPCR 之比小于 10^{-4})必定包括了一些异常情况,但是采用保守的标准,从而使得基本上不会产生假的异常信号。40 份正常对照样品均未显示出 Indian hedgehog 的 RT-QPCR 与 β -肌动蛋白的 RT-QPCR 的比例大于 10^{-4} (表 9)。

[0088] 阻塞性疾病。小管疾病在阻塞性疾病的致病原因中起主要作用。在阻塞性疾病情

况下,近端小管细胞随疾病而排入尿液内(通过 Indian hedgehog mRNA 的存在来测定)。没有观察到明显的足细胞组分,因为在尿沉淀 RNA 中没有见到足细胞标记 nephrin 的表达(表 9)。Indian hedgehog 的 RT-QPCR 测试是特别有价值的,因为它将目前没有丢失近端小管细胞的阻塞性疾病与目前正丢失近端小管细胞的那些疾病区分开来(表 10A)。表 10B 描述了从给定对象的纵向试验获得的数值。通过 β -肌动蛋白标准品的 RT-QPCR 确认,所有尿沉淀被适当保存。异常数值的间断性表明对肾脏的效果的波动状态。异常现象的依次持续存在表明影响肾脏的疾病的持续存在。

[0089] 尽管在一些情况下不清楚近端小管细胞来自年老的有病的或移植的肾脏,但是显然本发明包括了一种灵敏的、非侵入性的方法来检测阻塞性疾病中的近端小管脱落。

[0090] 急性小管坏死。急性小管坏死(ATN)见于各种临床情况且对生命有威胁。实现该疾病的早期诊断是有利的,因为然后能进行特殊的治疗。对自然排泄的尿液进行非侵入性的测试并灵敏地检测作为该疾病基础的近端肾小管病变或许是监测该疾病过程的理想方式。现已注意到,在该疾病中,排斥台盼蓝的活的近端小管细胞脱落到尿液。这支持了通过 RT-QPCR 检测近端小管特异性基因产物 Indian hedgehog 来检测该近端小管细胞的原理。

[0091] 通过使用针对 Indian hedgehog 的 TaqMan 探针,尿沉淀的 RT-QPCR 成功地应用于 ATN 的问题(表 11)。因此,近端小管细胞脱落进入尿沉淀的半定量测定(从 Indianhedgehog 的 RT-QPCR 与对组成型表达的 β -肌动蛋白基因的 RT-QPCR 的比例获得)是检测该疾病的一种有用的方式。如表 11 所示,RT-QPCR 可用来检测急性小管坏死的存在和严重程度。表 11 中的所有患者均产生了与 ATN 相容的泌尿问题。然而,并不知道哪些受试者事实上患 ATN 而哪些对象患其他疾病。患者尿液中有 Indianhedgehog,则其分泌近端小管细胞,因而患有 ATN,这样,其就能和具有与 ATN 相容的临床症状、但未患该疾病的对象区分开来。因此,尿液中 Indian hedgehog 的存在代表了筛选 ATN 存在的一种方式,然后就接受治疗 ATN。

[0092] 在肾小球病理学参与的各种肾脏疾病中的 Indian hedgehog RT-QPCR 异常。Indianhedgehog 的 RT-QPCR 测试除了在阻塞性疾病和 ATN 中反映了原发性疾病对肾脏的影响,Indian hedgehog 的 RT-QPCR(数值)在被认为主要作用在肾小球上的各种疾病中也会升高。其具体包括非阻塞性肾脏疾病如肾小球性肾炎和肾病综合征、糖尿病、高血压和狼疮,所有这些疾病均被认为反映了肾小球致病机理。利用该方法,在所有这些疾病中均检测到尿沉淀中存在足细胞特异性的基因 nephrin。尽管这些疾病主要为肾小球效果,但是也注意到了对近端小管的影响。通过使用 RT-QPCR 试验,这些发现确认在这些疾病中也存在对近端小管细胞的影响(表 12-13)。

[0093] 表 12-13 表明,在各种已知的肾小球疾病(糖尿病、高血压、狼疮和儿科肾病对象中的肾小球疾病)中,在给定时间时的 nephrin 的 RT-QPCR 和 Indian hedgehog 的 RT-QPCR 通常是不一致的。为了研究这些异常的时间过程,采用了慢性疾病糖尿病,因为 1 型糖尿病的开始是急性的,且其很容易记录。然而,糖尿病中的肾脏疾病需要许多年才会发展成临床上明显的程度。表 12 表明,在诊断后的最初 10 年内,nephrin 和 Indian hedgehog 的 RT-QPCR 异常比升高变性蛋白尿更频繁。然而,即便是同一患者,足细胞异常的发生和近端小管异常的发生也是不一致的(表 13A)。Indian hedgehog 的 RT-QPCR 异常与升高的变性蛋白尿之间也是不一致的(表 13B)。表 12 和 13 的数据合起来表明,nephrin 和 / 或 Indian

hedgehog 的 RT-QPCR 异常在疾病历程中早于升高的变性蛋白尿的发生。许多 RT-QPCR 异常的糖尿病患者的血压是正常的,因此,表 12-13 中的异常不仅仅是由于高血压引起的(表 7)。

[0094] 与 nephrin RT-QPCR 正常而变性蛋白尿升高的发现一样,当变性蛋白尿升高时,Indian hedgehog/ β -肌动蛋白的 RT-QPCR 也可以是正常的。同样,升高的变性蛋白尿测定的是随时间对血液和尿液流之间足细胞屏障完整性的损伤,而 Indian hedgehog/ β -肌动蛋白 RT-QPCR 测定的是近端小管细胞的急性损失。

[0095] 对 1 型糖尿病进行了足够数量的分析,以检查 nephrin RT-QPCR、Indian hedgehog 的 RT-QPCR 或蛋白尿(通过总蛋白/肌酸酐或白蛋白/肌酸酐来测定)是否相关。没有发现有关联,因此,这些变量是独立的。注意到这些变量均没有在正常人中呈阳性,以致所有这些阳性值均表示有异常。令人惊奇的是,在所有研究的疾病中,nephrin 和 Indian hedgehog 的 RT-QPCR 测定是相互独立的(表 9)。还注意到,同一个体的纵向研究证明,一个给定的个体能随时间显示出不同的异常(数据未显示)。与同一个体内升高的蛋白尿能随时间而变化的发现相一致的是,这着重强调了用基于尿液的测试来跟踪对糖尿病、高血压和狼疮患者肾脏的影响的复杂性。然而,显然基于尿液的测试为洞察对这些疾病的肾脏的影响提供了一种独特有力的非侵入性的手段。在早期糖尿病和局灶性节段性肾小球硬化症中已经提示了近端小管缺陷,表 9 提供了其存在的直接证据。

[0096] 总之,本发明包括通过检查尿沉淀来检测肾脏的足细胞和近端小管异常的新的方法、系统和组合物。在某些实施方案中,足细胞和/或近端小管细胞的检测是通过筛选由足细胞和/或近端小管细胞独特转录的基因的转录来实现的。本发明包括的出人意料的发现是,足细胞和/或近端小管细胞的脱落发生在影响这些细胞的各种疾病中,但是不发生在正常人中。另外,脱落细胞的类型的分子鉴定可通过筛选在尿道源足细胞或近端小管细胞中选择性表达的基因(因而是足细胞特异性的或近端小管细胞特异性的基因)的转录物来实现。这两个事实是本发明之前所未知的。本发明的非限制性的较佳实施方案采用 nephrin RT-QPCR 和 Indian hedgehog RT-QPCR 来实现这一任务。

[0097] 本发明包括用 RT-QPCR 来筛选足细胞特异性基因(nephrin)或近端小管细胞特异性的基因(Indian hedgehog)。寻找这些基因转录物来鉴别脱落到尿液中的肾细胞是本发明的新颖的一部分。该策略只有在能够对尿沉淀细胞(或这些细胞的片段)中的尿 RNA 并然后对保存的 RNA 进行灵敏的分析下才是可行的。如目前某些实施方案中所用的,nephrin RT-QPCR 可检测足细胞异常,Indian hedgehog RT-QPCR 可检测小管异常。因此,nephrin RT-QPCR 代表了一种测定各种疾病对足细胞的影响的有用方法。Indian hedgehog RT-QPCR 代表了测定阻塞性疾病或急性小管坏死对近端小管的影响的有用方法。

[0098] 前面已经描述了本发明的较佳实施方案。然而,本领域技术人员应当理解,某些变化也在本发明的教导范围内。下列权利要求应当被用来研究确定本发明的真实范围和内容。另外,本发明的方法和结构可纳入各种实施方案中,而本文仅仅描述了其中的一些而已。技术人员显然知道还有不脱离本发明精神的其他实施方案。因此,所述的实施方案仅仅是描述性的,其不应被理解为具有限制性。

[0099] SEQ ID NO :列表

[0100] SEQ ID NO :1 :

- [0101] 5' -GCCCCGAGGGTCCTGAAGGTG-3'
 [0102] SEQ ID NO :2 :
 [0103] 5' -TGGACTGGCTGACAAAGGGACCCAG-3'
 [0104] SEQ ID NO :3 :
 [0105] 5' -TACTGGAGAACCTGAAGACCAGCTGCC-3'
 [0106] SEQ ID NO :4 :
 [0107] 5' -CAATTACAATCCAGACATCATCTTCAA-3'
 [0108] SEQ ID NO :5 :
 [0109] 5' -CGAGATAGCCAGCGAGTTCAG-3'
 [0110] SEQ ID NO :6 :
 [0111] 5' -CATGACCCAGCGCTGCAAGGAC-3'
 [0112] SEQ ID NO :7 :
 [0113] 5' -AACTTGAGATGTATGAAGGCTTTTGG-3'
 [0114] SEQ ID NO :8 :
 [0115] 5' -TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTAAAG-3'
 [0116] SEQ ID NO :9 :
 [0117] 5' -CAACTGGTCTCAAGTCAGTGTACAGGTAAGCCCT-3'

[0118] 表 1 nephrin RT-QPCR 的平板内和平板间差异

[0119]	平均值	标准偏差	样品数	p 值 (平板 1 对平板 2)
[0120] 平板 1				
[0121] 正常 1	4.6E-01	2.0E+00	19	p = 0.352 (不显著)
[0122] 正常 2	2.5E-01	8.8E-01	20	p = 0.285 (不显著)
[0123] 异常 1	1.9E+03	7.5E+02	17	p = 0.601 (不显著)
[0124] 平板 2				
[0125] 正常 1	0.0E+00	0.0E+00	17	
[0126] 正常 2	0.0E+00	0.0E+00	15	
[0127] 异常 1	2.1E+03	3.9E+02	16	
[0128] 异常 1 稀释 1/10	2.5E+02	8.8E+01	16	

[0129] 所有正常样品小于 2E00

[0130] 表 2 在儿科肾病样品中比较 nephrin RT-QPCR、u- 足细胞和微量白蛋白 / 肌酐

[0131]	u- 足细胞 阴性 (< 0.6)	u- 足细胞 阳性 (> 0.6)	ma/cr < 10	ma/cr > 10
[0132]				
[0133] RT-QPCR < 2	18	2	13	7
[0134] RT-QPCR > 2	10	11	7	14
[0135] u- 足细胞阴性 (< 0.6)			9	19
[0136] u- 足细胞阳性 (> 0.6)			0	13

[0137] 表 3 仅在肾小球疾病的尿沉淀中见到 nephrin

[0138] 样品编号 nephrin 尿蛋白 / 诊断

[0139] RT-QPCR 肌酐

[0140]	N-711	1.2E+02	6.68	肾病综合征
[0141]	N-712	6.6E+03	7.01	局灶性节段性肾小球硬化症
[0142]	N-724	9.0E+01	0.54	扩散性肾小球膜增殖性肾小球性肾炎
[0143]	N-725	4.6E+01	9.37	局灶性节段性肾小球硬化症, s/p 移植物
[0144]	N-729	3.9E+01	0.78	局灶性节段性肾小球硬化症, s/p 移植物
[0145]	N-739	0.0E+00	0.95	
[0146]	N-765	9.3E+00	0.2	
[0147]	N-756	0.0E+00	阴性	慢性肾小球性肾炎, s/p 移植物
[0148]	N-760	5.4E+00	4.18	急性肾小球性肾炎
[0149]	N-761	1.3E+01	5.25	扩散性增殖性肾小球性肾炎
[0150]	N-766	1.4E+04	1.62	病灶性增殖性肾小球性肾炎
[0151]	N-763	0.0E+00	阴性	发育异常, s/p 移植物
[0152]	N-767	0.0E+00	阴性	Schimke' s 疾病, s/p 移植物
[0153]	N-726	0.0E+00	阴性	阻塞性尿路病变, s/p 移植物
[0154]	N-727	0.0E+00	阴性	阻塞性尿路病变, s/p 移植物
[0155]	N-762	0.0E+00		
[0156]	N-728	0.0E+00	阴性	阻塞性尿路病变, s/p 移植物
[0157]	N-738	0.0E+00	痕量	
[0158]	N-757	0.0E+00	阴性	
[0159]	N-764	0.0E+00	阴性	
[0160]	N-731	0.0E+00	N/A	皮质性坏死, s/p 移植物
[0161]	N-743	0.0E+00	阴性	
[0162]	N-759	4.1E+00	阴性	
[0163]	N-736	0.0E+00	痕量	青少年肾消耗病 (nephronophthisis), s/p 移植物
[0164]	N-737	0.0E+00	阴性	发育异常, s/p 移植物
[0165]	N-740	0.0E+00	3+	胱氨酸贮积症, s/p 移植物
[0166]	N-758	1.4E+00	痕量	
[0167]	表 4. 糖尿病中 nephrin RT-QPCR 和变性蛋白尿异常的时间过程			
[0168]	1 型糖尿病	nephrin RT-QPCR		异常的尿白蛋白 / 肌酐
[0169]				
[0170]	0-10 年	28.3%	(15/53)	10.6% (5/47)
[0171]	11-48 年	28.9%	(11/38)	47.2% (17/36)
[0172]	0-48 年	28.6%	(26/91)	23.70% (22/83)
[0173]	2 型糖尿病	nephrin RT-QPCR		异常的尿白蛋白 / 肌酐
[0174]				
[0175]	0-10 年	45.5%	(5/11)	23.1% (3/13)
[0176]	11-40 年	45.5%	(5/11)	41.7% (5/12)
[0177]	0-40 年	45.5%	(10/22)	32.0% (8/25)
[0178]	表 5. 1 型糖尿病中 nephrin RT-QPCR 和变性蛋白尿异常之间的关系			

[0179]		nephrin RT-QPCR	尿白蛋白/肌酸酐	尿白蛋白/肌酸酐
[0180]			< 30	> 30
[0181]	nephrin-	0-5	60	9
[0182]	nephrin+	> 5	36	7
[0183]	表 6I 型糖尿病纵向分析			
[0184]	各簇表示来自 I 型糖尿病的单一个体的纵向尿沉积物样品			
[0185]		非足细胞尿		足细胞尿
[0186]		nephrin RT-QPCR		nephrin RT-QPCR
[0187]	D84	0.0E+00	D131	0.0E+00
[0188]	D121	0.0E+00	D220	9.3E+01
[0189]	D350	0.0E+00	D404	7.0E+01
[0190]	D592	0.0E+00	D574	3.5E+02
[0191]	D250	0.0E+00	D106	1.9E+02
[0192]	D517	2.8E+00	D167	0.0E+00
[0193]	D727	0.0E+00	D495	2.3E+02
[0194]			D724	0.0E+00
[0195]	D310	0.0E+00	D344	2.0E+00
[0196]	D347	1.2E+00	D492	1.3E+01
[0197]	D621	0.0E+00	D553	0.0E+00
[0198]	D155	0.0E+00	D242	4.0E+02
[0199]	D266	0.0E+00	D430	4.5E+00
[0200]	D529	2.7E+00	D566	0.0E+00
[0201]	D215	0.0E+00	D122	3.6E+02
[0202]	D436	0.0E+00	D325	0.0E+00
[0203]	D643	0.0E+00	D561	4.8E+00
[0204]			D218	3.6E+01
[0205]			D239	0.0E+00
[0206]			D300	0.0E+00
[0207]			D129	0.0E+00
[0208]			D235	1.1E+02
[0209]			D603	0.0E+00
[0210]	表 7 高血压			
[0211]	高血压样品 #	nephrin RT-QPCR	总蛋白/肌酸酐	
[0212]	128	0.0E+00		
[0213]	129	0.0E+00		
[0214]	130	0.0E+00		
[0215]	131	0.0E+00		
[0216]	132	0.0E+00		
[0217]	136	0.0E+00		

[0218]	138	0.0E+00	
[0219]	139	0.0E+00	
[0220]	140	0.0E+00	
[0221]	141	0.0E+00	
[0222]	142	0.0E+00	
[0223]	144	0.0E+00	
[0224]	146	0.0E+00	
[0225]	147	0.0E+00	
[0226]	149	0.0E+00	
[0227]	154	0.0E+00	0.16
[0228]	155	0.0E+00	0.06
[0229]	157	0.0E+00	0.07
[0230]	158	0.0E+00	1.09
[0231]	163	0.0E+00	0.09
[0232]	166	0.0E+00	0.09
[0233]	167	0.0E+00	
[0234]	168	0.0E+00	0.13
[0235]	169	0.0E+00	0.08
[0236]	161	1.1E+00	0.10
[0237]	160	1.1E+00	0.03
[0238]	145	1.1E+00	
[0239]	159	1.7E+00	0.10
[0240]	148	2.3E+00	
[0241]	162	3.0E+00	0.08
[0242]	156	4.3E+00	
[0243]	135	9.0E+00	
[0244]	143	1.0E+01	
[0245]	134	2.6E+01	
[0246]	150	7.8E+01	
[0247]	133	9.5E+01	
[0248]	151	2.0E+02	
[0249]	137	4.5E+02	
[0250]	152	1.4E+03	
[0251]	164	1.9E+03	0.06
[0252]	153	2.3E+03	0.06
[0253]	165	1.8E+04	0.05
[0254]	异常数值用粗体表示		
[0255]	表 8 全身性红斑狼疮 (SLE)		
[0256]	样品	nephrin RT-QPCR	蛋白 / 肌酸酐

[0257]	SLE12	0.0E+00	0.17
[0258]	SLE19	0.0E+00	
[0259]	SLE21	0.0E+00	
[0260]	SLE24	0.0E+00	阴性
[0261]	SLE25	0.0E+00	
[0262]	SLE26	0.0E+00	
[0263]	SLE28	0.0E+00	阴性
[0264]	SLE29	0.0E+00	阴性
[0265]	SLE30	0.0E+00	0.16
[0266]	SLE31	0.0E+00	阴性
[0267]	SLE32	0.0E+00	
[0268]	SLE33	0.0E+00	
[0269]	SLE34	0.0E+00	
[0270]	SLE35	0.0E+00	
[0271]	SLE15	1.2E+00	1.11
[0272]	SLE27	1.3E+00	
[0273]	SLE23	1.7E+00	
[0274]	SLE22	2.1E+00	
[0275]	SLE18	3.8E+00	
[0276]	SLE11	5.4E+00	2.65
[0277]	SLE17	6.2E+00	
[0278]	SLE13	4.0E+01	
[0279]	SLE16	4.5E+01	
[0280]	SLE14	7.4E+01	
[0281]	SLE20	7.6E+01	

[0282] 表 9 不同情况下尿沉淀中的 Indian hedgehog 和 nephrin mRNA 的存在

[0283]	Indian hedgehog/nephrin			
[0284]	阳性 / 阳性	阳性 / 阴性	阴性 / 阴性	阴性 / 阳性
[0285] 正常对照	0	0	0	40
[0286] 糖尿病	3	21	20	51
[0287] 高血压	1	6	7	15
[0288] 狼疮	2	1	2	9
[0289] 儿科肾病学				
[0290] 阻塞	1	10	0	12
[0291] 非阻塞性疾病	2	11	6	18

[0292] 表 10 Indian hedgehog 可异常存在于阻塞性疾病的尿沉淀中

[0293] (绝对值 > 1E-04 的用粗体表示)

[0294] 10A. 个体病例

[0295] 样品	IHH/ 肌动蛋白	诊断
-----------	-----------	----

[0296]	1	0.0E+00	后尿道瓣膜 (posterior urethral valves), s/p 多次重建
[0297]	2	0.0E+00	s/p 移植物 (父亲), 阻塞性尿路病变
[0298]	3	0.0E+00	双侧 IV 级膀胱尿管逆流, s/p 再植入, 重复左肾收集系统,
[0299]			肾盂肾炎, 于 1994 年诊断, nl u/a, 轻微的家庭性听力丧失
[0300]	4	0.0E+00	阻塞性尿路病的继发性慢性肾衰竭, 膀胱输尿管反流, 左肾
[0301]			切除和再植入后的两侧体质, 膀胱功能不良, 右面巨输尿管,
[0302]			慢性肾衰竭的继发性甲状旁腺功能亢进, u/a 2+wbc(白细胞),
[0303]			tr rbc(红细胞)
[0304]	5	0.0E+00	阻塞性尿路病引起的继发性 ESRD, u/a tr 血液
[0305]	6	0.0E+00	后尿道瓣膜史, 切除后体质
[0306]	7	3.6E-05	阻塞性杏梅腹 (prune belly) 综合征的继发性肾衰竭
[0307]	8	2.4E-03	骶骨不发生和神经源性膀胱功能不良; 阻塞性症状的孤肾
[0308]	9	6.2E-03	阻塞性尿路病的继发性慢性肾衰竭
[0309]	10	9.5E-03	具有阻塞性尿路病的后尿道瓣膜, 1995 年 3 月肾脏移植后的体
[0310]			质 (存活与来自父亲有关), u/a nl
[0311]	11	4.2E-02	2 级反流, 5 月有肾盂肾炎
[0312]	12	4.8E-02	肾盂肾炎, 阻塞性尿路病, 慢性肾衰竭
[0313]	13	1.5E-01	后尿道瓣膜, 高血压
[0314]	14	1.1E-01	s/p 尿道瓣膜, 外科手术 5/26/98
[0315]	15	5.9E-01	阻塞性尿路病的继发性末期肾病, 主要神经源性膀胱, 2 周
[0316]			前接受尸体的肾移植, u/a 3+ 血液, tr 蛋白
[0317]	10B. 纵向病例		
[0318]	样品	样品日期	IHH/ 肌动蛋白 诊断
[0319]	患者 1	08/08/00	1.1E-01 慢性肾功能不全; 阻塞性尿路病
[0320]			心包积液; 肾高血压
[0321]		11/03/00	0.0E+00
[0322]		12/26/00	3.8E-02
[0323]		01/12/01	2.3E-02
[0324]		05/29/01	0.0E+00
[0325]	患者 2	01/09/01	3.3E-02 阻塞性尿路病的继发性肾衰竭.
[0326]			尸体肾脏移植后的体质
[0327]		01/16/01	2.3E-02
[0328]		01/23/01	4.3E-03
[0329]		01/30/01	0.0E+00
[0330]		02/06/01	3.1E-01
[0331]		02/20/01	0.0E+00
[0332]		03/13/01	5.3E-02
[0333]		04/03/01	1.1E-02
[0334]		04/16/01	1.0E-01

[0335]		05/12/01	0.0E+00	
[0336]		06/05/01	0.0E+00	
[0337]	患者 3	07/18/00	0.0E+00	后尿道瓣膜,移植的
[0338]		07/25/00	9.6E-02	
[0339]		08/01/00	0.0E+00	
[0340]		08/08/00	0.0E+00	
[0341]		08/15/00	0.0E+00	
[0342]		08/29/00	4.2E-01	
[0343]		09/12/00	6.4E-02	
[0344]		10/03/00	2.0E-01	
[0345]		10/17/00	2.1E-01	
[0346]		12/21/00	1.3E-01	
[0347]		01/12/01	5.3E-03	
[0348]		01/25/01	1.6E-01	
[0349]		03/27/01	1.7E-02	
[0350]		06/05/01	1.9E-01	
[0351]	患者 4	07/20/00	0.0E+00	s/p 尸体移植,3 例中有 7 例由于阻塞性尿路病而有 BSD
[0352]		06/05/01	0.0E+00	
[0353]		07/10/01	8.1E-02	
[0354]		07/31/00	6.8E-04	
[0355]	患者 5	08/15/00	7.9E-01	后尿道瓣膜, s/p 移植,不顺从于移植治
[0356]		11/14/00	3.9E-03	
[0357]		01/16/01	6.9E-02	
[0358]		03/13/01	1.8E-02	
[0359]		04/15/01	1.1E-02	
[0360]		05/08/01	6.5E-02	
[0361]	表 11 IHH 排泄入急性小管坏死的受试者的尿液中			
[0362]	样品	RT-QPCR	Hx	
[0363]		IHH/β 肌动蛋白		
[0364]	ATN525	2.6E-03		ATN#1 (肝脏移植后外科手术);非少尿的
[0365]	ATN526	3.8E-03		ATN#2
[0366]	ATN527	1.5E-03		ATN#3
[0367]	ATN531	3.0E-03		ATN#4
[0368]	ATN528	2.3E-03		肝脏移植后 2 周急性肾衰竭
[0369]	ATN529	0.0E+00		手术后非少尿的肾衰竭,死亡
[0370]	ATN550	0.0E+00		s/p 气管切开术
[0371]	ATN551	0.0E+00		s/p 腹部手术
[0372]	A345	0.0E+00		酒精引起的肝硬化
[0373]	A346	4.5E-03		急性肾衰竭,可能 ATN s/p 手术

[0374]	A382	1.6E-03	汽车事故, s/p 手术, 急性肾衰竭, 死亡			
[0375]	A405	0.0E+00	肥胖症, DM, s/p 手术, 急性尿输出缺乏, 死亡			
[0376]	表 12 糖尿病中 nephrin、Indian hedgehog (IHH) 和变性蛋白尿异常的时间过程					
[0377]	1 型糖	nephrin	IHH/ 肌	异常的尿白蛋		
[0378]	尿病		动蛋白	白 / 肌酸酐		
[0379]	0-10 年	28.3% (15/53)	26.7% (12/45)	10.6% (5/47)		
[0380]	11-48 年	28.9% (11/38)	31.4% (11/35)	47.2% (17/36)		
[0381]	0-48 年	28.6% (26/91)	28.8% (23/80)	23.70% (22/83)		
[0382]	2 型糖					
[0383]	尿病					
[0384]	0-10 年	45.5% (5/11)	30.8% (4/13)	23.1% (3/13)		
[0385]	11-40 年	45.5% (5/11)	16.7% (2/12)	41.7% (5/12)		
[0386]	0-40 年	45.5% (10/22)	24.0% (6/25)	32.0% (8/25)		
[0387]	表 13 糖尿病中 nephrin、Indian hedgehog (IHH) 和变性蛋白尿异常之间的关系					
[0388]	表 13A					
[0389]		nephrin RT-QPCR	RT-QPCR IHH-	RT-QPCR IHH+		
[0390]			< 1E-04	> 1E-04		
[0391]	nephrin-	0-5	29	16		
[0392]	nephrin+	> 5	22	4		
[0393]	表 13B					
[0394]		RT-QPCR IHH	白蛋白 / 肌酸酐	白蛋白 / 肌酸酐		
[0395]		IHH	< 30	> 30		
[0396]	IHH-	0-1E-04	33	9		
[0397]	IHH+	> 1E-04	16	3		

[0001]

序列表

<110> D.M. 库尔尼特 (Kurnit, David M)

<120> 用于肾病诊断和治疗中的尿样分析的方法和组合物

<130> 65306-0083

<150> US 10/108,969

<151> 2002-03-28

<160> 9

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人 nephrin 过量引物

<400> 1

gccccgaggg tcctgaaggt g

21

<210> 2

<211> 25

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> Amplisensor 探针

<400> 2

tggactggct gacaaagga cccag

25

<210> 3

<211> 27

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

[0002]

<223> Amplisensor 探针	
<400> 3	
tactggagaa cctgaagacc agctgcc	27
<210> 4	
<211> 27	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> Indian hedgehog 反向引物	
<400> 4	
caattacaat ccagacatca tcttcaa	27
<210> 5	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> Indian hedgehog 反向引物	
<400> 5	
cgagatagcc agcgagttca g	21
<210> 6	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> Indian hedgehog TaqMan 探针	
<400> 6	
catgaccag cgctgcaagg ac	22
<210> 7	
<211> 26	
<212> DNA	

[0003]

- <213> 人工序列
- <220>
- <223> 人 Beta-肌动蛋白正向引物
- <400> 7
aaccttgagat gtatgaaggc ttttgg 26
- <210> 8
<211> 32
<212> DNA
<213> 人工序列
- <220>
- <223> 人 Beta-肌动蛋白反向引物
- <400> 8
tttttttttt tttttttttt ttttttttta ag 32
- <210> 9
<211> 34
<212> DNA
<213> 人工序列
- <220>
- <223> 人 Beta-肌动蛋白 TaqMan 探针
- <400> 9
caactggtct caagtcagtg tacaggttaag ccct 34

TaqMan-退火

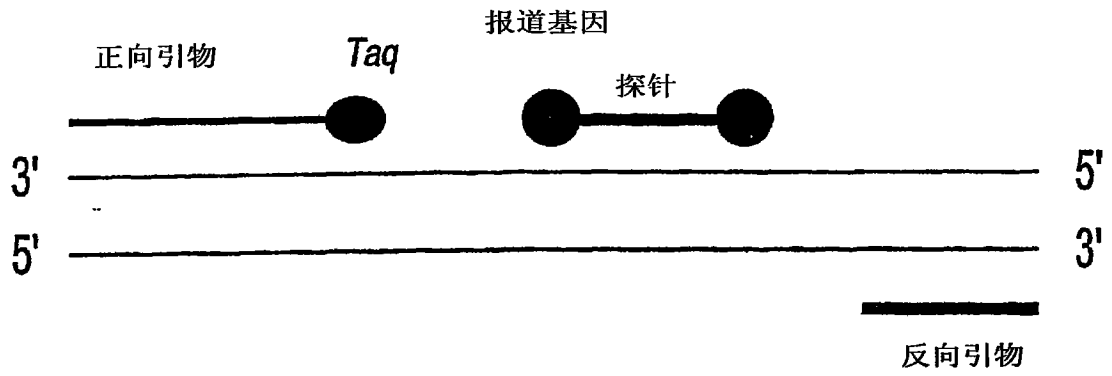


图 1A

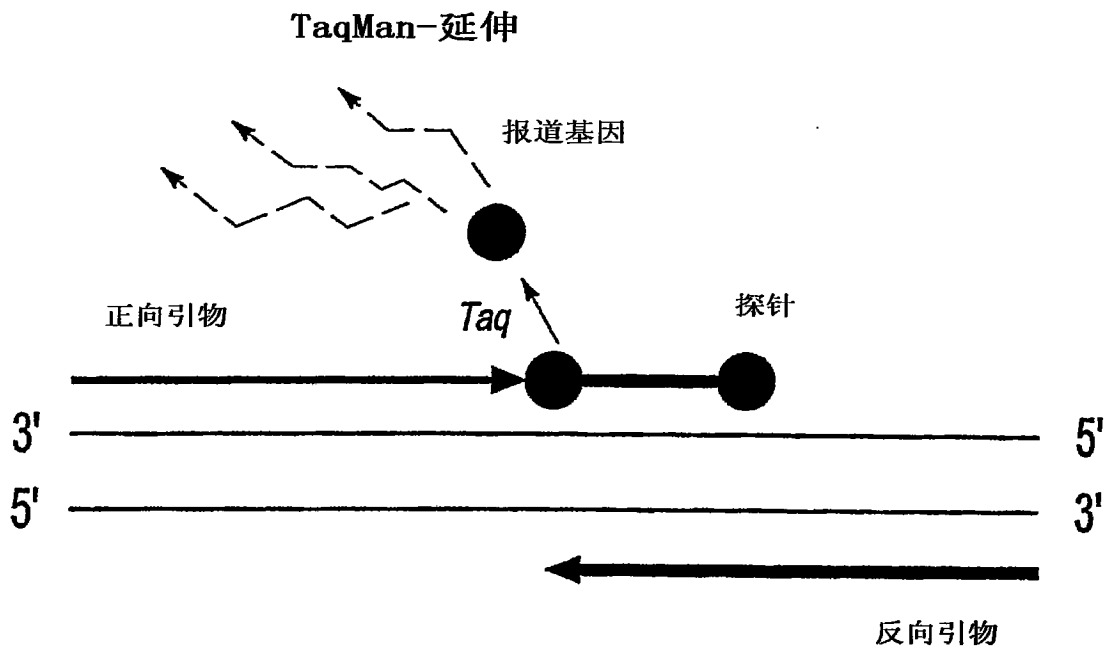


图 1B

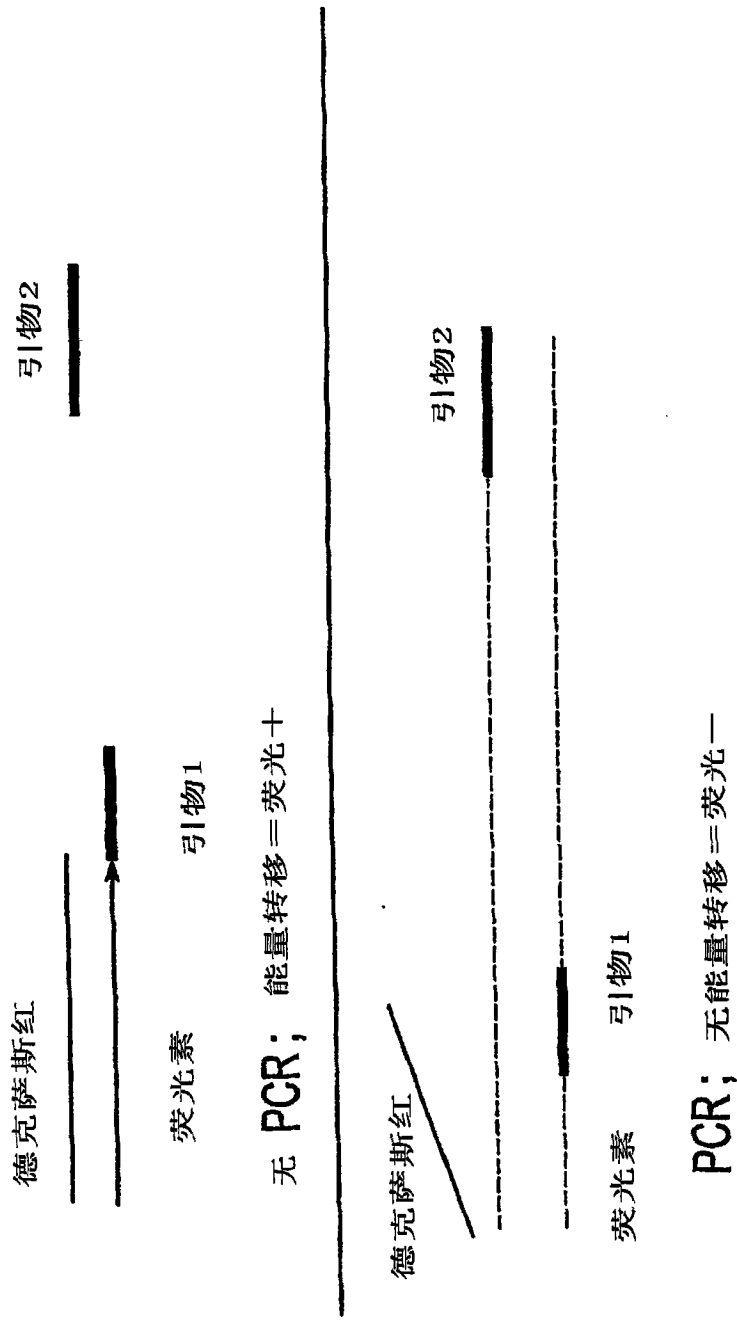


图 2 AmpliSensor (C.N. Wang)

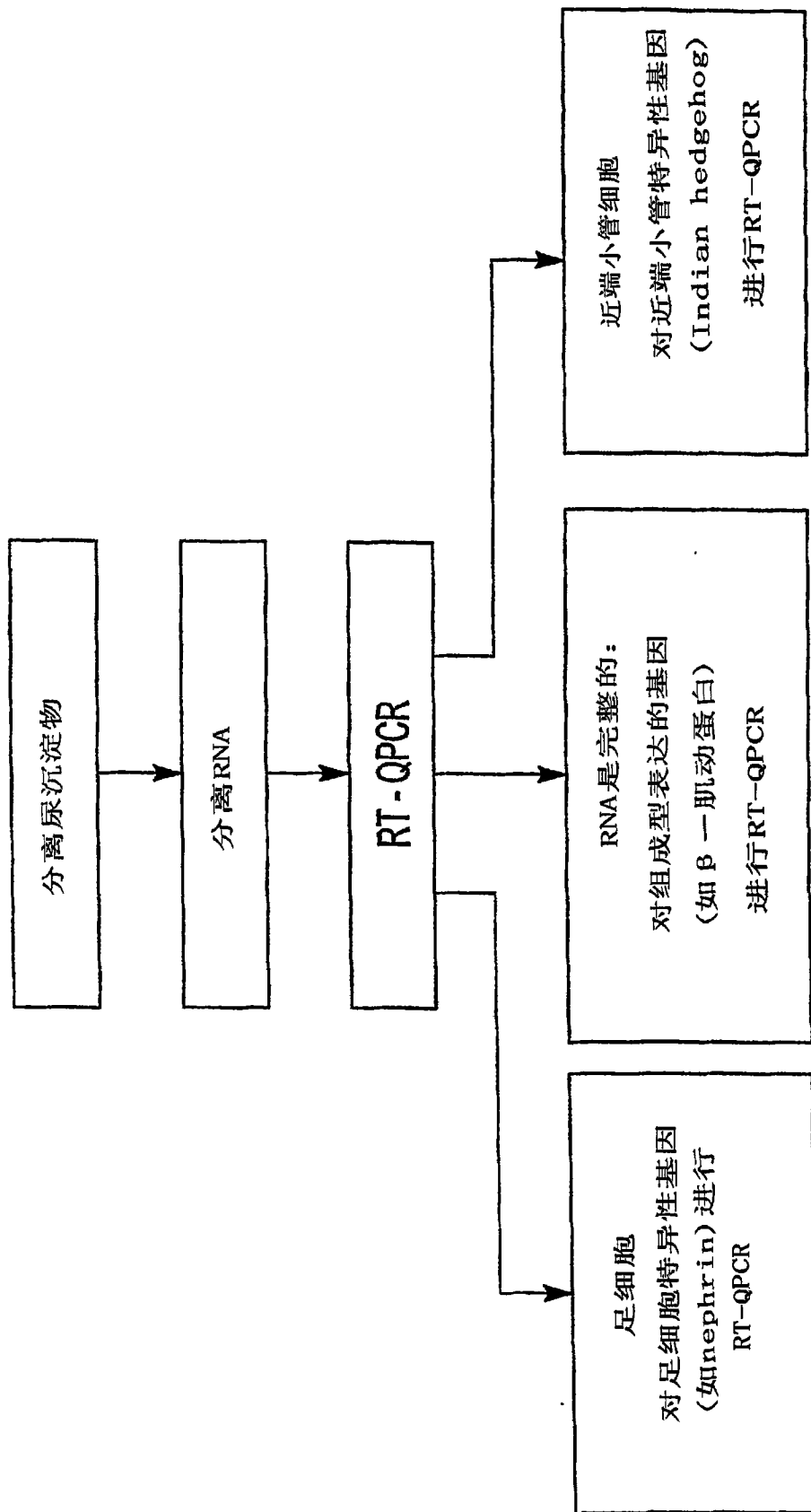


图 3