

• 论 著 • doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2017.18.006

膜性肾病患者肾组织 M 型磷脂酶 A2 受体 1 抗原及其抗体的表达差异*

洪国保¹,赵学峰²,吴晓婵¹,陈健智³,罗福漳^{1△}
(南方医科大学附属南海医院:1. 肾内科;2. 检验科;3. 病理科,广东佛山 528200)

[摘要] **目的** 探讨肾组织 M 型磷脂酶 A2 受体 1(PLA2R1)抗原及其抗体在膜性肾病(MN)患者中的表达水平。**方法** 选取经肾活检证实的特发性 MN(IMN)58 例、乙型肝炎病毒相关性 MN(HBV-MN)15 例、V 型狼疮性肾炎(V-LN)17 例。采用间接免疫荧光法检测肾组织 PLA2R1 抗原,并与 IgG4 共定位。同时检测上述 MN 患者血清抗 PLA2R1 抗体。分析肾组织 PLA2R1 抗原及其抗体在 MN 中的表达差异,以及 PLA2R1 阳性与阴性患者临床资料的差异。**结果** V-LN 及 HBV-MN 患者肾组织及血清中均未发现 PLA2R1 抗体;在 81.03%IMN 患者肾组织检测到 PLA2R1 抗原,70.69% IMN 患者血清中检测到 PLA2R1 抗体,PLA2R1 抗原与 IgG4 共定位,均沿肾小球毛细血管袢呈细颗粒状沉积。PLA2R1 抗原阳性患者 24 h 尿蛋白定量高于阴性患者($P<0.05$),并且血清清蛋白低于阴性患者($P<0.05$)。**结论** 肾组织 PLA2R1 抗原在 IMN 的诊断中敏感性 & 特异性均较高,且表达与临床病情严重性明显相关。

[关键词] 特发性膜性肾病;乙型肝炎病毒相关性膜性肾病;V 型狼疮性肾炎;M 型磷脂酶 A2 受体 1

[中图分类号] R692.3+1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2017)18-2461-03

Expression difference of renal tissue M-type phospholipase A2 receptor 1 antigen and its antibody in patients with membranous nephropathy*
Hong Guobao¹,Zhao Xuefeng²,Wu Xiaochan¹,Chen Jianzhi³,Luo Fuzhang^{1△}
(1. Department of Nephrology;2. Department of Clinical Laboratory;3. Department of Pathology,Affiliated Nanhai Hospital of South Medical University,Foshan,Guangdong 528200,China)

[Abstract] **Objective** To detect the expression levels of renal tissue M-type phospholipase A2 receptor 1(PLA2R1) antigen and its antibody in the patients with membranous nephropathy(MN). **Methods** Fifty-eight cases of biopsy-proved idiopathic membranous nephropathy(IMN),fifteen cases of hepatitis B-associated membranous nephropathy(HBV-MN) and seventeen cases of V type lupus nephritis(V-LN) were selected. Renal tissue PLA2R1 antigen was detected by indirect immunofluorescence and colocalized with IgG4. Serum anti-PLA2R1 antibody was simultaneously examined. The expression difference of PLA2R1 antigen and anti-PLA2R1 antibody in MN was analyzed. And the differences of clinical data were analyzed between PLA2R1 positive and negative patients. **Results** The PLA2R1 antibody was not found in the renal tissue and serum of the patients with LN and HBV-MN; PLA2R1 antigen was found in 81.03% of IMN patients,and its antibody was found in serum of 70.69% of IMN patients. PLA2R1 antigen and IgG4 co-localization all deposited along glomerular capillary loop presenting as fine granules. The 24 h urine protein level in the patients with PLA2R1 antigen deposition in renal tissues was higher than that in the patients without PLA2R1 deposition ($P<0.05$),moreover serum albumin level was lower than that in the patients without PLA2R1 deposition($P<0.05$). **Conclusion** The sensitivity and specificity of renal tissue PLA2R1 antigen in the diagnosis of IMN are higher. The expression of PLA2R1 antigen in renal tissue by biopsy is significantly correlated with the clinical severity.

[Key words] idiopathic membranous nephropathy;hepatitis B virus associated membranous nephropathy;V lupus nephritis; M-type phospholipase A2 receptor 1

膜性肾病(membranous nephropathy,MN)是引起成人肾病综合征(nephrotic syndrome,NS)最常见的病因之一,病理以肾小球上皮下免疫复合物沉积伴基底膜增厚为特点^[1-2]。Xu 等^[3]对我国 7 万余例肾活检资料统计分析,发现 IgA 肾病(IgAN)占肾穿刺总数的 28.1%,MN 占 23.4%。MN 是继 IgAN 之后最常见的肾小球肾炎。并且 MN 是 40 岁以上人群中最主要的病理类型,推测 MN 有可能超越 IgAN 成为我国最主要的肾小球疾病。MN 可分为特发性 MN(IMN)和继发性 MN(SMN)。各国报道 IMN 比例不同^[4-7],在我国 IMN 占 31.8%。IMN 与 SMN 主要通过详细的病史询问、实验室检查和肾活检病理(包括光镜、免疫病理及电镜)以排除继发因素。Beck 等^[8]学者于 2009 年发现 M 型磷脂酶 A2 受体(PLA2R)与 IMN 的关系,并提出该抗原为 IMN 的主要靶抗原,在约 70%IMN 患者血清中发现该抗体,并且提出血清中该抗体及肾组织中该抗原可以用于鉴别 IMN 与 SMN。研究表明,MN

患者抗 PLA2R1 抗体与 PLA2R1 抗原的表达存在差异,需要在不同地区、不同种族人中验证。在 SMN 中是否有 PLA2R1 抗原的表达及该抗原的表达与临床指标的关系均未形成定论。本研究拟使用本院肾活检证实的 MN 患者 90 例临床资料进行探讨。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2013 年 5 月至 2016 年 5 月在本院经肾活检确诊的 MN 患者 90 例,其中 IMN 患者 58 例,乙型肝炎病毒相关性 MN(HBV-MN)患者 15 例,V 型狼疮性肾炎(V-LN)患者 17 例。IMN 的诊断是根据经肾活检病理检查诊断为 MN,通过病史、检验排除 SMN。本研究所纳入的病例均未长期使用免疫抑制剂或(和)激素治疗,所有肾穿刺活检均经患者及家属知情同意。

1.2 方法

1.2.1 标本收集 (1)肾组织标本:B 超声引导下肾活检,

* 基金项目: 佛山市卫生和计划生育委员会医学科研课题(20160213)。作者简介:洪国保(1982—),主治医师,在读博士研究生,主要从事肾小球疾病临床及病理研究。 △ 通信作者,E-mail:luo1844@126.com。

常规行光镜、免疫荧光和电镜检查。使用石蜡包埋组织采用间接免疫荧光法检测 IMN、SMN 肾组织 PLA2R1 抗原。(2)收集患者的血清:留取患者治疗前空腹静脉血,置于促凝剂试管中,3 000 r/min 离心 8 min,分离血清。

1.2.2 肾组织免疫荧光法检测 PLA2R1 抗原及 IgG4 共定位

(1)切片,烤片;(2)脱蜡:二甲苯;(3)复水:梯度乙醇;(4)抗原修复:蛋白酶 K 37 ℃ 孵育 30 min,PBS 冲洗;(5)一抗:兔抗人 PLA2R1 多克隆抗体(Sigma-Aldrich),37 ℃ 孵育 1.5 h,PBS 冲洗;(6)二抗:鼠抗兔 IgG(abcam),37 ℃ 孵育 1.0 h,PBS 冲洗;(7)加 IgG4 抗体(Dylight405 标记,Jackson),37 ℃ 孵育 1.0 h;(8)封片,荧光显微镜下观察,共聚焦显微镜下拍摄。

1.2.3 间接免疫法检测 IMN 患者血清抗 PLA2R1 抗体 采用欧盟检测试剂盒 FA1254-1005-50 IgG。(1)样本准备:PBST 1∶10 稀释;(2)加样:加 30 μL 至反应区;(3)室温下放置 30 min,PBST 冲洗载片;(4)加样:混匀 FITC 标记的二抗,滴加 25 μL 荧光二抗;(5)避光室温温育 30 min,PBST 冲洗载片;(6)封片荧光显微镜下观察。

1.2.4 观察指标 年龄、性别、血肌酐、血清清蛋白、24 h 尿蛋白定量。

1.3 统计学处理 采用 SPSS19.0 软件进行统计分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,三组间比较采用单因素方差分析(One-Way ANOVA)。计数资料以率表示,组间比较采用 χ^2 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 各组患者一般资料比较 3 组患者的年龄、24 h 尿蛋白定量、血清清蛋白、血肌酐比较,差异均无统计学意义($P > 0.05$),仅性别比较差异有统计学意义($P < 0.05$),见表 1。

2.2 IMN 及 SMN 患者肾组织 PLA2R1 抗原阳性率比较 在

58 例 IMN 患者中,81.03%(47/58)IMN 患者肾组织检测到 PLA2R1 抗原。PLA2R1(绿色,图 1A)与 IgG4(蓝色,图 1B)共定位(图 1C),均沿肾小球毛细血管袢呈颗粒状沉积。其中 11 例 IMN 患者肾组织中并未发现 PLA2R1 的沉积。在 SMN(V-LN 及 HBV-MN)肾组织中均未发现 PLA2R1 抗原的沉积,见图 2。

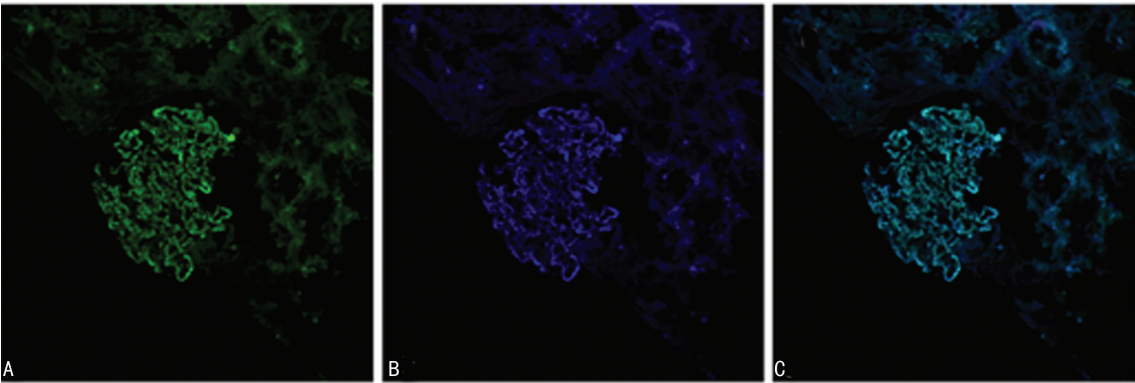
表 1 不同病理类型患者的临床特征比较

项目	IMN (n=58)	V-LN (n=17)	HBV-MN (n=15)	P
年龄($\bar{x} \pm s$,岁)	43.51±10.23	39.15±12.34	47.13±9.89	0.067
性别[男,n(%)]	35(60.34)	3(17.65)	7(46.67)	0.008
血肌酐($\bar{x} \pm s$,μmol/L)	77.18±22.34	79.19±20.45	81.23±19.15	0.098
尿蛋白($\bar{x} \pm s$,g/24 h)	4.78±5.08	4.99±5.46	5.03±4.89	0.236
血清清蛋白($\bar{x} \pm s$,g/L)	22.15±5.17	21.86±5.09	22.9±4.99	0.079

2.3 IMN 患者肾组织 PLA2R1 阳性与阴性临床资料比较 肾组织抗原阳性与阴性患者在年龄、性别、血肌酐方面比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。PLA2R1 抗原阳性患者 24 h 尿蛋白定量高于阴性患者($P < 0.05$),并且阳性患者血清清蛋白低于阴性患者($P < 0.05$),见表 2。

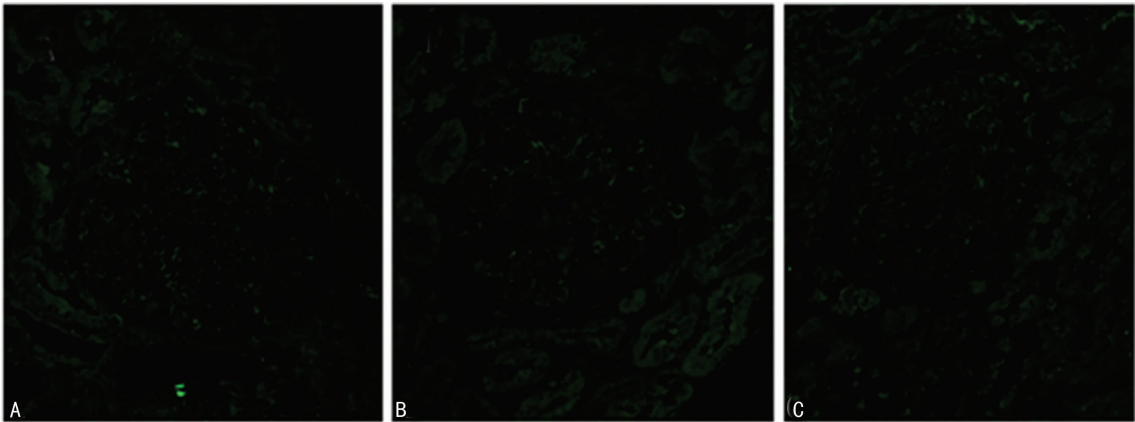
表 2 IMN 肾组织 PLA2R1 阳性与阴性患者临床资料比较

项目	PLA2R1 阳性组 (n=47)	PLA2R1 阴性组 (n=11)	P
男性[n(%)]	29(61.70)	6(54.55)	0.055
年龄($\bar{x} \pm s$,岁)	42.45±8.94	43.44±9.17	0.675
血肌酐($\bar{x} \pm s$,μmol/L)	76.45±19.37	78.18±21.34	0.589
蛋白尿($\bar{x} \pm s$,g/24 h)	5.32±4.98	4.09±5.27	0.013
血清白蛋白($\bar{x} \pm s$,g/L)	21.33±6.67	24.15±5.44	0.012



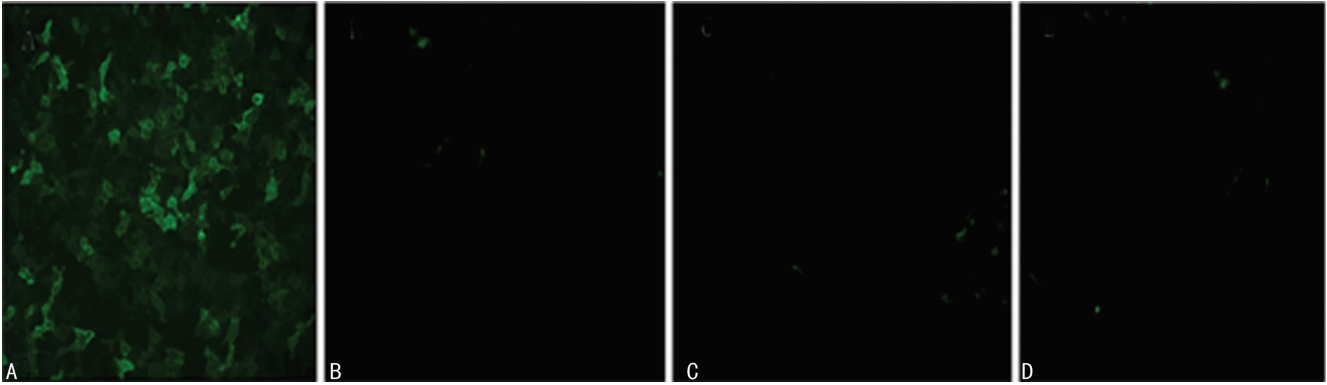
A:PLA2R1;B:IgG4;C:PLA2R1 与 IgG4 共定位图片。

图 1 IMN 患者肾组织 PLA2R1 抗原与 IgG4 免疫荧光阳性图片(×400)



A:IMN 患者;B:HBV-MN 患者;C:V-LN 患者。

图 2 肾组织 PLA2R1 抗原免疫荧光阴性图片(×400)



A:IMN 患者抗体阳性;B:IMN 患者抗体阴性;C:HBV-MN 患者抗体阴性; D:V-LN 患者抗体阴性。

图 3 MN 患者血清抗 PLA2R1 抗体间接免疫荧光图片(×400)

2.4 肾组织 PLA2R1 抗原与血清抗 PLA2R1 抗体阳性率比较 收集 90 例 MN 患者肾活检时空腹血清,检测血清中抗 PLA2R1 抗体。在 HBV-MN 及 V-LN 患者中均未发现抗 PLA2R1 抗体,在 58 例 IMN 患者中有 41 例检测出该抗体,阳性率为 70.69%。在 58 例 IMN 患者肾组织及血清均发现 PLA2R1 者 36 例;肾组织 PLA2R1 抗原阴性,并且血清抗 PLA2R1 抗体阳性者 5 例;肾组织抗原阳性,血清抗体阴性者 11 例;两者均阴性者 6 例。MN 患者血清抗 PLA2R1 抗体间接免疫荧光图片,见图 3。

3 讨 论

本研究检测 MN 患者肾组织 PLA2R1 抗原及血清抗 PLA2R1 抗体,结果提示在 IMN 患者肾组织及血清中其阳性率分别为 81.03%、70.69%。肾组织 PLA2R1 抗原与 IgG4 共定位。肾组织 PLA2R1 抗原阳性者 24 h 尿蛋白高于阴性者,并且血清清蛋白低于阴性者。此外,在 32 例 SMN(15 例 HBV-MN 及 17 例 V-LN)患者肾组织中均未发现 PLA2R1 抗原,并且在这些患者血清中均未发现该抗体。

Beck 等^[8]首次提出 PLA2R1 为 IMN 的主要靶抗原。此后 PLA2R1 在 IMN 患者肾组织及血清中的表达受到了越来越多的关注。后续研究表明不同种族及地区 PLA2R1 的表达阳性率不一致。Debiec 等^[9]研究表明,PLA2R1 抗原及该抗体阳性率分别为 74%、57%。Svobodova 等^[10]研究表明,PLA2R1 抗原及该抗体,阳性率分别为 69%、65%。Qin 等^[11]检测血清抗 PLA2R1 抗体,阳性率为 81.6%。祝爽爽等^[12]检测肾组织 PLA2R1 抗原阳性率为 85.37%。周广宇等^[13]检测 IMN 患者血清抗 PLA2R1 抗体,阳性率为 75%。本研究结果在 IMN 患者肾组织及血清中其阳性率分别为 81.03%、70.69%。本研究提示肾组织 PLA2R1 抗原敏感性高于血清该抗体敏感性,并且高于国外所报道阳性率。提示国内 IMN 患者 PLA2R1 介导者较多。

本研究并未在所有 IMN 患者肾组织中检测到 PLA2R1 抗原,分析原因可能为:(1)其他的抗原参与 IMN 的发病(如人 I 型血小板膜蛋白 7A^[14]);(2)在肾活检时患者虽然临床表现为 NS,但是不处于免疫活动期,所以 PLA2R1 抗原没有被检测出^[8];(3)虽然有些患者病理表现为 MN,电镜未见多部位电子致密物沉积、血清学检查及临床资料均未发现继发因素,但不能完全排除 SMN 的可能。

关于肾活检时 PLA2R1 抗原表达与临床资料的关系仍有争议。Xun 等^[15]分析血清抗 PLA2R1 抗体阳性患者与阴性患者肾活检时临床资料,发现该抗体阳性患者 24 h 尿蛋白明显高于阴性患者。Svobodova 等^[10]研究结果提示,肾组织该抗原

阳性者与阴性者肾活检时两组在血肌酐、24 h 尿蛋白定量、血清清蛋白水平比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。周广宇等^[13]结果提示,IMN 患者 PLA2R1 抗体阳性者 24 h 尿蛋白定量高于抗体阴性患者。祝爽爽等^[12]研究结果提示,肾组织 PLA2R1 阳性患者与阴性患者在肾活检时血肌酐、血清清蛋白、24 h 尿蛋白定量比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。本研究结果与文献^[13,15]一致,与祝爽爽等^[12]研究结果不同。分析原因可能为祝爽爽等^[12]研究中 IMN 肾组织 PLA2R1 抗原阴性者病例数较少仅 6 例,若其扩大样本可能会得出不一致结果。本研究结果提示肾组织 PLA2R1 抗原阳性者肾活检时 24 h 尿蛋白定量高于阴性者,血清清蛋白低于肾组织 PLA2R1 抗原阴性者。提示肾组织 PLA2R1 抗原阳性者病情更严重。

PLA2R1 是一种相对分子质量为 180×10^3 的 I 型跨膜糖蛋白,其参与 MN 的机制尚未被完全理解^[16-17]。PLA2R1 抗原参与 MN 发病的机制及该抗原能否用于治疗 MN,在后续工作中有必要继续研究。

综上所述,肾组织 PLA2R1 抗原在诊断 IMN 的诊断中敏感性 & 特异性较高,且肾活检时肾组织 PLA2R1 抗原表达与临床病情严重性明显相关。

参考文献

[1] Lai WL, Yeh TH, Chen PM, et al. Membranous nephropathy: a review on the pathogenesis, diagnosis, and treatment[J]. J Formos Med Assoc, 2015, 114(2): 102-111.
[2] Ronco P, Debiec H. Anti-phospholipase A2 receptor antibodies and the pathogenesis of membranous nephropathy[J]. Nephron Clin Pract, 2014, 128(3/4): 232-237.
[3] Xu X, Wang G, Chen N, et al. Long-Term exposure to air pollution and increased risk of membranous nephropathy in China[J]. J Am Soc Nephrol, 2016, 27(12): 3739.
[4] Zeng CH, Chen HM, Wang RS, et al. Etiology and clinical characteristics of membranous nephropathy in Chinese patients[J]. Am J Kidney Dis, 2008, 52(4): 691-698.
[5] Cahen R, Francois B, Trollet P, et al. Aetiology of membranous glomerulonephritis: a prospective study of 82 adult patients[J]. Nephrol Dial Transplant, 1989, 4(3): 172-180.
[6] Abe S, Amagasaki Y, Konishi K, et al. Idiopathic membranous glomerulonephritis: aspects of geographical differences[J]. J Clin Pathol, 1986, 39(11): 1193-1198.
[7] Honkanen E. Survival in idiopathic (下转第 2467 页)

sor gene NPRL2 protein treatment[J]. Biol Chem,2016, 397(11):1163-1171.

[7] 江虹锐,鲁志刚,马玉彦,等. 两歧双歧杆菌在荷瘤鼠模型中的靶向定植及对巨噬细胞的免疫激活[J]. 肿瘤,2009, 29(8):721-726.

[8] Yin X,Yu B,Tang Z,et al. Bifidobacterium infantis-mediated HSVTK/GCV suicide gene therapy induces both extrinsic and intrinsic apoptosis in a rat model of bladder cancer[J]. Cancer Gene Ther,2013,20(2):77-81.

[9] 吴瑜,易成,王树人,等. 婴儿双歧杆菌对小鼠黑色素瘤模型肿瘤组织的靶向性[J]. 四川大学学报(医学版),2003, 34(3):435-438.

[10] Leibovich BC,Lohse CM,Crispen PL,et al. Histological subtype is an independent predictor of outcome for patients with renal cell carcinoma[J]. J Urol,2010,183(4): 1309-1315.

[11] Ridge CA,Pua BB,Madoff DC. Epidemiology and staging of renal cell carcinoma[J]. Semin Intervent Radiol,2014, 31(1):3-8.

[12] Otani S,Takeda S,Yamada S,et al. The tumor suppressor

NPRL2 in hepatocellular carcinoma plays an important role in progression and can be served as an independent prognostic factor[J]. J Surg Oncol,2009,100(5):358-363.

[13] Liu AY,Liu DG,Du YJ,et al. Relationship between tumor and peripheral blood NPRL2 mRNA levels in patients with colorectal adenoma and colorectal cancer[J]. Cancer Biol Ther,2014,15(5):489-495.

[14] Huang SF,Liu DB,Zeng JM,et al. Cloning,expression, purification and functional characterization of the oligomerization domain of Bcr-Abl oncoprotein fused to the cytoplasmic transduction peptide[J]. Protein Expr Purif, 2009,64(2):167-178.

[15] Xun YH,Pan QC,Tang ZH,et al. Intracellular-delivery of a single-chain antibody against hepatitis B core protein via cell-penetrating peptide inhibits hepatitis B virus replication in vitro[J]. Int J Mol Med,2013,31(2):369-376.

(收稿日期:2017-01-02 修回日期:2017-03-16)

(上接第 2463 页)

membranous glomerulonephritis[J]. Clin Nephrol,1986, 25(3):122-128.

[8] Beck LH,Bonegio RG,Lambeau G,et al. M-type phospholipase A2 receptor as target antigen in idiopathic membranous nephropathy[J]. N Engl J Med,2009,361 (1):11-21.

[9] Debiec H,Ronco P. PLA2R autoantibodies and PLA2R glomerular deposits in membranous nephropathy[J]. N Engl J Med,2011,364(7):689-690.

[10] Svobodova B,Honsova E,Ronco P,et al. Kidney biopsy is a sensitive tool for retrospective diagnosis of PLA2R-related membranous nephropathy[J]. Nephrol Dial Transplant,2013,28(7):1839-1844.

[11] Qin W,Beck LH,Zeng C,et al. Anti-phospholipase A2 receptor antibody in membranous nephropathy[J]. J Am Soc Nephrol,2011,22(6):1137-1143.

[12] 祝爽爽,周树录,周朝敏,等. 成人特发性膜性肾病肾组织 M 型磷脂酶 A2 受体 1 抗原的检测[J]. 南方医科大学学

报,2015(4):526-529.

[13] 周广宇,金玲,于晶,等. 成人膜性肾病患者血清抗 PLA2R 抗体与病情的相关性[J]. 中华肾脏病杂志, 2012,28(2):111-114.

[14] Tomas NM,Beck LH,Meyer-Schwesinger C,et al. Thrombospondin type-1 domain-containing 7A in idiopathic membranous nephropathy[J]. N Engl J Med,2014,371(24): 2277-2287.

[15] Xun C,Shuai L,Wang W,et al. Comparison of biomarkers between PLA2Rab+ and PLA2Rab- in patients with idiopathic membranous nephropathy[J]. Int Urol Nephrol, 2015,47(5):831-835.

[16] Floege J,Amann K. Primary glomerulonephritides[J]. Lancet,2016,387(132):2036-2048.

[17] Ronco P,Debiec H. Pathophysiological advances in membranous nephropathy: time for a shift in patient's care [J]. Lancet,2015,385(9981):1983-1992.

(收稿日期:2017-01-17 修回日期:2017-03-16)

医学统计工作的基本内容

按工作性质及其先后顺序,可将医学统计工作分为实验设计、收集资料、整理资料、分析资料。实验设计是开展某项医学研究工作的关键,包括医学专业设计和统计学设计,医学专业设计的内容包括研究对象纳入和排除标准、样本含量、获取样本的方法、分组原则、观察(检测)指标、统计方法等。收集资料的方法包括各种试验、检测或调查,要求资料完整、准确、及时、有足够数量、具有代表性和可比性等。整理资料包括原始资料的检查与核对、对资料进行分组与汇总等。分析资料即对资料进行统计学分析,包括进行统计描述和统计推断。