



[DOI] 10.3969/j.issn.1001-9057.2020.10.015

http://www.lcnkzz.com/CN/10.3969/j.issn.1001-9057.2020.10.015

· 论著 ·

# 特发性膜性肾病患者抗磷脂酶 A2 受体抗体和 C5a 补体水平与疾病活动及预后的关系

张林波 姜文

**【摘要】 目的** 探讨血浆抗磷脂酶 A2 受体 (PLA2R) 抗体和 C5a 补体水平与特发性膜性肾病 (IMN) 患者的疾病活动度及预后的相关性。**方法** 纳入于我院接受治疗的 IMN 患者 72 例, 根据血清抗 PLA2R 抗体检测结果, 将其分为抗 PLA2R 抗体阳性组 (阳性组, 50 例) 和抗 PLA2R 抗体阴性组 (阴性组, 22 例)。收集所有患者的临床资料并进行比较, 采用酶联免疫吸附试验 (ELISA) 检测血浆中抗 PLA2R 抗体及 C5a 水平, 采用免疫荧光染色检测肾脏组织中免疫球蛋白 (Ig) 水平。采用 Spearman 相关分析评估抗 PLA2R 抗体与疾病活动度及肾小球 Ig 沉积程度的相关性; 采用单因素及多因素 logistic 回归分析评估影响 IMN 临床预后的独立危险因素。**结果** 阳性组患者血清白蛋白水平低于阴性组 ( $P=0.005$ )。血浆与肾脏组织中抗 PLA2R 抗体表达具有较强的一致性 ( $P<0.001$ )。血浆抗 PLA2R 抗体滴度与 IMN 患者的尿蛋白/肌酐 (UPCR) 呈正相关 ( $P=0.028$ )。IgG 强阳性 (IgG 评分 4~5 分) 患者的 PLA2R 抗体滴度明显高于 IgG 弱阳性患者 (IgG 评分 0~3 分,  $P=0.039$ )。抗 PLA2R 抗体阳性 ( $P=0.010$ ) 和未使用免疫抑制剂治疗 ( $P=0.019$ ) 是影响 IMN 患者 1 年内病情持续的独立危险因素。**结论** 血浆抗 PLA2R 抗体阳性可有效预测 IMN 患者的疾病活动度和预后, 为 IMN 的临床诊断和预后评估提供新的生物学标志物。

**【关键词】** 特发性膜性肾病; 抗磷脂酶 A2 受体抗体; C5a 补体

膜性肾病 (MN) 是以电子显微镜观察到的上皮免疫复合物沉积为主要病理特征, 70%~75% 的 MN 属于抗祖细胞抗原自身抗体的自身免疫性疾病, 如抗磷脂酶 A2 受体 (PLA2R) 抗体、1 型血小板反应蛋白 7A 域等<sup>[1-3]</sup>。60%~75% 的特发性 MN (IMN) 是由于抗 PLA2R 抗体所致。有研究结果发现, 肾脏组织中的 PLA2R 抗体阳性、血清 PLA2R 抗体滴度升高与疾病活动度增加和肾移植后 MN 复发风险增高相关, 揭示了抗 PLA2R 抗体对 MN 的直接致病性<sup>[4-6]</sup>。本研究旨在探讨抗 PLA2R 抗体和 IMN 疾病活动度的相关性, 并比较抗 PLA2R 抗体滴度和补体激活产物 C5a 与 IMN 短期预后的相关性。

## 对象与方法

**1. 对象:** 纳入 2015 年 1 月~2016 年 12 月于我院治疗的 IMN 患者 72 例。纳入标准: (1) 年龄 20~80 岁;

(2) 病理检查结果确诊为 IMN; (3) 在免疫抑制剂治疗前进行肾脏病理活检。排除标准: (1) 1 年内失访; (2) 合并恶性肿瘤、系统性红斑狼疮或肝炎; (3) 实验室检查结果不完整。根据血清抗 PLA2R 抗体检测结果, 将 72 例患者分为抗 PLA2R 抗体阳性组 (阳性组, 50 例) 和抗 PLA2R 抗体阴性组 (阴性组, 22 例), 其中阳性组男 33 例, 女 17 例, 年龄 37~79 岁, 平均年龄 ( $60.42 \pm 12.31$ ) 岁; 阴性组男 15 例, 女 25 例, 年龄 34~78 岁, 平均年龄 ( $58.22 \pm 14.63$ ) 岁。本研究经我院伦理委员会审批通过, 所有患者均签署知情同意书。

## 2. 方法

(1) 临床资料收集: 收集所有患者的临床资料, 包括性别、年龄、是否合并糖尿病、高血压、高脂血症。收集患者肾穿刺病理活检前的血清白蛋白、总胆固醇、血清肌酐、估算的肾小球滤过率 (eGFR) 和尿蛋白丢失量 (尿蛋白/肌酐比值, UPCR)。以 UPCR 反映蛋白尿严重程度, UPCR < 0.3 为完全缓解,  $0.3 \leq \text{UPCR} \leq 3.5$  或蛋白尿从初始值降低至少 50% 且至少 2 周 UPCR < 3.5 为部分缓解<sup>[7]</sup>。1 年内病情持续患者指患者 UPCR

>0.3 持续 1 年及 1 年以上。

(2) 血浆抗 PLA2R 抗体和 C5a 滴度检测: 采用酶联免疫吸附试验 (ELISA) 检测血浆中抗 PLA2R 抗体及 C5a 水平。在室温下全血离心 10 min 分离血清, 通过抗 PLA2R 抗体 ELISA 试剂盒 (Thermo Fisher 公司) 和 C5a Elisa 试剂盒 (Thermo Fisher 公司) 分别测定血清中抗 PLA2R 抗体和 C5a 水平。血清中抗 PLA2R 抗体滴度  $\geq 20$  RU/ml 即可诊断为抗 PLA2R 抗体阳性。

(3) 肾脏组织病理活检: 在普通光学显微镜检测中, 将肾脏组织病理标本用福尔马林固定后用石蜡包埋, 并进行苏木素-伊红 (HE) 染色。在电子显微镜检测中, 根据标准流程, 将肾脏病理组织标本浸泡于 2.5% 戊二醛溶液中进行固定, 并经锇酸染色、树脂包埋后切成 70 nm 厚薄片放置在铜网上, 复染后进行透射电子显微镜观察。采用免疫荧光染色检测肾脏组织中免疫球蛋白 (Ig), 包括 IgA、IgG 和 IgM, 并根据荧光强度, 采用半定量方法进行含量评估分析, 总分为 0~5 分, 分值越高, 则 Ig 表达量越强, 其中 0 分为阴性, 1 分为极弱阳性, 2 分为弱阳性, 3 分为中等阳性, 4 分为强阳性, 5 分为极强阳性。通过免疫荧光染色法对肾脏组织 IgG 亚型沉积情况进行分析, 包括 IgG1、IgG2、IgG3 和 IgG4。通过免疫组织化学染色检测肾脏组织中抗 PLA2R 抗体的表达情况, 并根据染色阳性细胞百分比, 分为高表达 ( $\geq 50\%$  阳性率) 和低表达 ( $< 50\%$  阳性率)。

3. 统计学处理: 应用 SPSS 23.0 软件进行统计分析。符合正态分布的计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示、组间比较采用  $t$  检验; 计数资料以例数和百分比表示, 组间比较采用  $\chi^2$  检验。采用 Spearman 相关分析评估抗 PLA2R 抗体与疾病活动度及肾小球免疫球蛋白沉积程度的相关性; 采用单因素及多因素 logistic 回归分析评估影响 IMN 临床预后的独立危险因素。以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 结 果

1. 两组患者临床资料比较: 与阴性组比较, 阳性组患者血清白蛋白水平更低、抗 PLA2R 抗体滴度更高 ( $P < 0.05$ )。但两组患者性别、年龄、合并疾病、UPCR、总胆固醇、血清肌酐、eGFR、C5a 水平和免疫抑制剂使用率比较差异均无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。见表 1。

2. 血浆与肾脏组织中抗 PLA2R 抗体表达量的相关性分析结果: 血浆与肾脏组织中抗 PLA2R 抗体表达具有较强的一致性 ( $\chi^2 = 31.001, P < 0.001$ )。见表 2。

表 2 血浆与肾脏组织中抗 PLA2R 抗体表达量的相关性分析

| 肾脏组织<br>抗 PLA2R 抗体 | 血浆抗 PLA2R 抗体 |    |
|--------------------|--------------|----|
|                    | 阳性           | 阴性 |
| 高表达                | 43           | 4  |
| 低表达                | 7            | 18 |

3. 血浆抗 PLA2R 抗体滴度与 UPCR 的关系: Spearman 相关分析结果显示, 血浆抗 PLA2R 抗体滴度与 IMN 患者的 UPCR 呈正相关 ( $r = 0.323, P = 0.028$ )。但血浆 C5a 浓度与 IMN 患者的 UPCR 无明显相关性 ( $r = -1.023, P = 0.362$ )。

4. 血浆抗 PLA2R 抗体滴度与肾小球 Ig 沉积程度的相关性分析结果: 根据肾脏病理活检结果发现, IgG 强阳性 (IgG 评分 4~5 分) 患者的 PLAR2 抗体滴度明显高于 IgG 弱阳性患者 [IgG 评分 0~3 分, ( $154.32 \pm 24.21$ ) RU/ml 比 ( $67.82 \pm 15.81$ ) RU/ml,  $P = 0.039$ ]。对不同 IgG 亚型进行分析, IgG1、IgG2、IgG3 和 IgG4 亚型患者的血浆抗 PLA2R 抗体水平比较差异无统计学意义 [( $102.31 \pm 21.18$ ) RU/ml、( $98.26 \pm 25.01$ ) RU/ml、( $116.29 \pm 27.84$ ) RU/ml 及 ( $108.39 \pm 15.20$ ) RU/ml,  $P > 0.05$ ]。肾脏组织中 IgA 阴性与 IgA 阳性沉积患者的血浆抗 PLA2R 抗体水平比较差异无统计学意义 [( $103.9 \pm 21.2$ ) RU/ml 比 ( $107.8 \pm 25.3$ ) RU/ml,  $P > 0.05$ ], 且 IgM 阴性与 IgM 阳性沉积患者的血浆抗

表 1 两组患者临床资料比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

| 组别                  | 例数 | 性别<br>(男/女) | 年龄<br>(岁)     | 合并疾病[例,(%)] |           |          | UPCR        | 血清白蛋白<br>(g/L) |
|---------------------|----|-------------|---------------|-------------|-----------|----------|-------------|----------------|
|                     |    |             |               | 糖尿病         | 高血压       | 高脂血症     |             |                |
| 阳性组                 | 50 | 33/17       | 60.42 ± 12.31 | 10(20.00)   | 17(34.00) | 8(16.00) | 6.66 ± 2.11 | 23.42 ± 5.71   |
| 阴性组                 | 22 | 15/25       | 58.22 ± 14.63 | 5(22.73)    | 11(50.00) | 3(13.64) | 6.42 ± 2.37 | 28.00 ± 7.19   |
| χ <sup>2</sup> /t 值 |    | 0.033       | 0.660         | 0.069       | 1.646     | 0.066    | 0.428       | 2.905          |
| P 值                 |    | 0.856       | 0.512         | 0.793       | 0.200     | 0.797    | 0.670       | 0.005          |

| 组别                  | 例数 | 总胆固醇<br>(mmol/L) | 血清肌酐<br>(mmol/L) | eGFR  | 抗 PLA2R 抗体滴度   | C5a             | 使用免疫抑制剂   |
|---------------------|----|------------------|------------------|---|----------------|-----------------|-----------|
|                     |    |                  |                  | [ ml · min <sup>-1</sup> · (1.73 m <sup>2</sup> ) <sup>-1</sup> ] | (RU/ml)        | (ng/ml)         | [ 例,(%) ] |
| 阳性组                 | 50 | 8.82 ± 3.21      | 95.49 ± 36.91    | 77.83 ± 28.50   | 128.31 ± 45.32 | 263.38 ± 84.29  | 40(80.00) |
| 阴性组                 | 22 | 8.81 ± 3.78      | 113.24 ± 38.42   | 74.32 ± 30.83   | 7.33 ± 2.92    | 237.43 ± 109.81 | 16(72.73) |
| χ <sup>2</sup> /t 值 |    | 0.003            | 1.309            | 0.468   | 12.468         | 1.096           | 0.468     |
| P 值                 |    | 0.998            | 0.195            | 0.641   | <0.001         | 0.277           | 0.494     |

PLA2R 抗体水平比较差异无统计学意义[ (108.3 ± 25.0) RU/ml 比 (105.2 ± 21.7) RU/ml,  $P > 0.05$  ]。

5. 影响 IMN 患者 1 年内病情持续的独立危险因素分析结果: 抗 PLA2R 抗体阳性和未使用免疫抑制剂治疗是影响 IMN 患者 1 年内病情持续的独立危险因素 ( $P < 0.05$ )。见表 3。

表 3 影响 IMN 患者 1 年内病情持续的独立危险因素分析

| 变量              | 单因素分析                     |        | 多因素分析                     |       |
|-----------------|---------------------------|--------|---------------------------|-------|
|                 | OR(95% CI)                | P 值    | OR(95% CI)                | P 值   |
| 年龄 ≥ 60 岁       | 0.972<br>(0.910 ~ 1.023)  | 0.342  | -                         | -     |
| 男性              | 1.535<br>(0.461 ~ 4.483)  | 0.460  | -                         | -     |
| 抗 PLA2R 抗体阳性    | 1.803<br>(1.234 ~ 2.876)  | 0.006  | 1.683<br>(1.208 ~ 2.654)  | 0.010 |
| C5a > 100 ng/ml | 0.892<br>(0.812 ~ 0.983)  | 0.019  | 0.903<br>(0.744 ~ 1.048)  | 0.242 |
| UPCR ≥ 6.5      | 1.203<br>(0.924 ~ 1.587)  | 0.134  | -                         | -     |
| 未使用免疫抑制治疗       | 8.971<br>(2.239 ~ 15.424) | <0.001 | 7.774<br>(2.230 ~ 13.242) | 0.019 |

## 讨 论

Beck 等<sup>[4]</sup>最早发现抗 PLA2R 抗体是 IMN 患者自身免疫性抗体的靶标。随后 Hofstra 等<sup>[8]</sup>研究发现抗 PLA2R 抗体与 MN 疾病活动度相关。尽管有研究认为抗 PLA2R 抗体与蛋白尿的严重程度无关<sup>[9]</sup>, 但其与疾病缓解程度密切相关。本研究显示抗 PLA2R 抗体与蛋白尿严重程度呈正相关, 血浆抗 PLA2R 抗体滴度与肾脏组织中的 IgG 沉积也密切相关。肾小球内低 IgG 沉积表明免疫复合物形成较少, 提示肾小球破坏和蛋白尿程度较低。

在自身抗体与足细胞抗原结合后, 免疫复合物形成可启动补体系统激活, 导致膜攻击复合物插入足细胞, 从而起到细胞毒性作用, 进而破坏过滤屏障产生蛋白尿。在补体激活过程中存在补体剪切产物产生。C3 剪切成 C5 是经典凝集素或补体替代途径的最终共同途径。剪切的补体片段可沉积在肾小球组织中如 C3c, 或释放到外周循环中如 C5a。更多自身抗体可能在肾脏组织中形成更多免疫复合物, 刺激更多补体激活, 并导致更严重蛋白尿。此外, C5a 是一种强烈的炎症激活物, 可影响 T 淋巴细胞和树突状细胞功能。本研究发现抗 PLA2R 抗体阴性组与阳性组 C5a 水平比较差异无统计学意义。血浆 C5a 水平反映了补体激活和器官清除而产生的平衡状态。由于免疫复合物形成, 在肾小球中产生的 C5a 可释放到外周循环中, 因此 IMN 患者血浆 C5a 水平明显升高。由于 C5a 分子量较小, 可轻易

透过损伤肾小球而滤出。此外, 血浆 C5a 可被高度血管化器官清除, 或在肾小球中与炎症或肾小球细胞一起被螯合而清除, 因此本研究中并未发现抗 PLA2R 抗体阴性组与阳性组 C5a 水平比较差异有统计学意义。

抗 PLA2R 抗体滴度是否与 IMN 患者预后相关目前尚无定论。Hoxha 等<sup>[10]</sup>认为抗 PLA2R 抗体滴度较高 IMN 患者的蛋白尿缓解周期明显延长。而 Bech 等<sup>[11]</sup>则认为抗 PLA2R 抗体滴度不能有效评估 IMN 患者疾病预后情况。Medrano 等<sup>[12]</sup>提出血浆抗 PLA2R 抗体滴度的改变早于蛋白尿的出现, 且抗 PLA2R 抗体滴度下降与蛋白尿缓解存在时间滞后性。Tomas 等<sup>[13]</sup>则进一步发现血浆高抗 PLA2R 抗体滴度与 IMN 患者肾功能的快速丧失有关。本研究也显示了抗 PLA2R 抗体滴度的升高是 IMN 患者病情持续的独立危险因素, 抗 PLA2R 抗体滴度升高与 IMN 患者的预后降低密切相关。

综上所述, 血浆抗 PLA2R 抗体滴度的升高可有效评估 IMN 患者疾病活动度和预后, 为 IMN 患者的治疗和疾病活动度动态检测提供了新的生物学标志物。

## 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] 尚邦娟, 杨争光. B 细胞活化因子及增殖诱导配体在膜性肾病患者中表达的临床意义[J]. 临床内科杂志, 2018, 35(12): 837-839.
- [3] 孙彬彬, 张蓓茹, 边晓慧, 等. 单独应用血管紧张素转换酶抑制剂或血管紧张素 II 受体拮抗剂治疗特发性膜性肾病患者预后及其影响因素分析[J]. 中国医药, 2019, 14(1): 77-81.
- [4] Beck LH, Fervenza FC, Beck DM, et al. Rituximab-induced depletion of anti-PLA2R autoantibodies predicts response in membranous nephropathy[J]. J Am Soc Nephrol, 2011, 22(8): 1543-1550.
- [5] Xie Q, Li Y, Xue J, et al. Renal phospholipase A2 receptor in hepatitis B virus-associated membranous nephropathy[J]. Am J Nephrol, 2015, 41(4-5): 345-353.
- [6] 陈文慧, 王雯瑾. 膜性肾病误诊为糖尿病肾病一例[J]. 临床内科杂志, 2019, 36(4): 279-280.
- [7] Beck L, Bombardieri AS, Choi MJ, et al. KDOQI US commentary on the 2012 KDIGO clinical practice guideline for glomerulonephritis[J]. Am J Kidney Dis, 2013, 62(3): 403-441.
- [8] Hofstra JM, Debiec H, Short CD, et al. Antiphospholipase A2 receptor antibody titer and subclass in idiopathic membranous nephropathy[J]. J Am Soc Nephrol, 2012, 23(10): 1735-1743.
- [9] Jullien P, Seitz Polski B, Maillard N, et al. Anti-phospholipase A2 receptor antibody levels at diagnosis predicts spontaneous remission of idiopathic membranous nephropathy[J]. Clin Kidney J, 2017, 10(2): 209-214.
- [10] Hoxha E, Thiele I, Zahner G, et al. Phospholipase A2 receptor autoantibodies and clinical outcome in patients with primary membranous nephropathy[J]. J Am Soc Nephrol, 2014, 25(6): 1357-1366.
- [11] Bech AP, Hofstra JM, Brenchley PE, et al. Association of anti-PLA2R antibodies with outcomes after therapy in idiopathic membranous nephropathy[J]. Clin J Am Soc Nephrol, 2014, 9(8): 1386-1392.
- [12] Medrano AS, Escalante EJ, Cúceres CC, et al. Prognostic value of the dynamics of M-type phospholipase A2 receptor antibody titers in patients with idiopathic membranous nephropathy treated with two different immunosuppression regimens[J]. Biomarkers, 2015, 20(1): 77-83.
- [13] Tomas NM, Hoxha E, Reinicke AT, et al. Autoantibodies against thrombospondin type 1 domain-containing 7A induce membranous nephropathy[J]. J Clin Invest, 2016, 126(7): 2519-2532.

(收稿日期: 2019-05-15)

(本文编辑: 余晓曼)