

• 论 著 •

M 型磷脂酶 A2 受体抗体及免疫球蛋白 IgG 亚型在乙型肝炎病毒相关膜性肾病中的检测*

李 隽, 卓 莉, 高红梅, 芦建华, 邹古明, 李文歌[△]

(中日友好医院肾内科, 北京 100029)

摘 要:目的 通过比较原发性膜性肾病(IMN)和乙型肝炎病毒相关膜性肾病(HBV-MN)患者血清中 M 型磷脂酶 A2 受体抗体(PLA2R)水平及肾活检组织中 IgG 亚型沉积情况,探讨 PLA2R 抗体和 IgG 亚型对 HBV-MN 诊断的意义。方法 应用 ELISA 法检测了 10 例 IMN 患者和 25 例 HBV-MN 患者血清中浓度,以同期 7 例微小病变肾病(MCD)患者血清检测作为阴性对照。通过免疫荧光方法检查免疫球蛋白 IgG 亚型在 IMN 和 HBV-MN 患者肾活检组织中的沉积。结果 在 IMN 组,患者血清 M 型 PLA2R 抗体浓度显著高于 HBV-MN 组患者,分别是 (15.4 ± 7.2) 和 $(10.3 \pm 5.7) \mu\text{g/mL}$, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。IgG 亚型(IgG1、IgG2、IgG3 和 IgG4)在 IMN 组和 HBV-MN 组患者肾活检组织肾小球毛细血管壁的沉积无显著性区别。结论 检测血清 M 型 PLA2R 抗体水平对区分 HBV-MN 和 IMN 患者具有一定价值,而 IgG 亚型在 HBV-MN 和 IMN 患者肾活检组织的分布则未发现明显不同。

关键词: M 型磷脂酶 A2 受体; IgG 亚型; 原发性膜性肾病; 乙型肝炎病毒相关膜性肾病

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2015.16.047

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2015)16-2401-03

The clinical value of plasma M type phospholipase A2 receptor antibody and IgG subtypes deposition in diagnosis of hepatitis B virus-associated membranous nephropathy

Li Jun, Zhuo Li, Gao Hongmei, Lu Jianhua, Zou Guming, Li Wenge[△]

(Nephrology Department, China-Japan Friendship Hospital, Beijing 100029, China)

Abstract: **Objective** To investigate the different expressions of plasma M type phospholipase A2 receptor antibody and IgG subtypes deposition of kidney tissues in idiopathic membranous nephropathy and hepatitis B virus-associated membranous nephropathy, and to evaluate the significance of plasma M type phospholipase A2 receptor antibody and IgG subtypes in diagnosis of hepatitis B virus-associated membranous nephropathy. **Methods** Plasma samples were obtained from patients with idiopathic membranous nephropathy, hepatitis B virus-associated membranous nephropathy and minimal change disease, respectively, before immunosuppressive therapy. Concentration of plasma M type phospholipase A2 receptor antibody was detected by sandwich ELISA and concentration of IgG subtypes were measured by immunofluorescence. **Results** Concentration of plasma M type phospholipase A2 receptor antibody was $(15.4 \pm 7.2) \mu\text{g/mL}$ in idiopathic membranous nephropathy group, higher than that in the hepatitis B virus-associated membranous nephropathy group $(10.3 \pm 5.7) \mu\text{g/mL}$ ($P < 0.01$), between idiopathic membranous nephropathy group and hepatitis B virus-associated membranous nephropathy group. There was no distinct difference of IgG subtypes deposition in glomerular capillary wall. **Conclusion** There is obvious clinical significance of concentration of plasma M type phospholipase A2 receptor antibody in differential diagnosis of idiopathic membranous nephropathy and hepatitis B virus-associated membranous nephropathy, while no distinct significance of IgG subtypes deposition.

Key words: M type phospholipase A2 receptor antibody; IgG subtypes; idiopathic membranous nephropathy; hepatitis B virus-associated membranous nephropathy

磷脂酶 A2(PLA2)包括分泌型(sPLA2)、胞浆型(cPLA2)和非钙离子依赖型(iPLA2)三个亚型,随着其更多亚型及相应受体的发现,观察到 PLA2 在抗感染、抗凝、动脉硬化、肿瘤诊断和炎症反应等方面具有重要作用^[1]。Lambeau 等^[2]使用¹²⁵I 标记的蛇毒 PLA2 在兔骨骼肌细胞中首次发现 PLA2 受体存在,其高敏感性受体亚型有两个,根据其分布部位分别命名为神经型(N 型)受体和肌肉型(M 型)受体。2009 年 Beck 等^[3]首次在原发性膜性肾病(IMN)患者血清中检测到 M 型 PLA2R 抗体,并且发现其浓度与患者尿蛋白水平的消长呈显著相关性,认为 M 型 PLA2R 可能是 IMN 罹患的重要靶抗原。最近有多项研究分别在乙型肝炎病毒相关膜性肾病(HBV-

MN)及肿瘤相关膜性肾病等继发性膜性肾病患者血清中检测出 M 型 PLA2R 抗体,但阳性率均较低,分别为 30.0% 和 16.7%^[4-5]。免疫球蛋白 IgG 亚型包括 IgG1、IgG2、IgG3 和 IgG4,以往研究显示,免疫球蛋白 IgG 亚型分布在 IMN 和系统性红斑狼疮等疾病导致的膜性肾病中存在差异,在 IMN 患者肾小球毛细血管壁分布主要以 IgG4 为主^[6-9]。

中国是乙型肝炎病毒(HBV)感染的高发区,病毒携带者约占总人口的 7.18%^[10],当前 HBV-MN 已成为中国主要的继发性肾小球肾炎。本研究旨在通过比较 M 型 PLA2R 抗体在 IMN 和 HBV-MN 患者血清中的水平,以及免疫球蛋白 IgG 亚型在 IMN 和 HBV-MN 患者肾活检组织中分布差异,探讨

* 基金项目:中日友好医院青年科技英才计划(2015-QNYC-B-12);中日友好医院院级课题(2013-QN-23)。 作者简介:李隽,女,医师,主要从事临床生化检验工作。 [△] 通讯作者, E-mail: wenge_lee2002@126.com。

M 型 PLA2R 抗体和 IgG 亚型检测对 HBV-MN 诊断的意义。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取中日友好医院肾内科 2012 年 7 月至 2013 年 5 月经肾活检正式诊断的 IMN、HBV-MN 患者共 35 例,包括 IMN 患者 10 例,其中男 7 例,女 3 例,年龄 30~62 岁,平均(50.3±10.9)岁。HBV-MN 患者 25 例,其中男 12 例,女 13 例,年龄 19~77 岁,平均(44.4±18.2)岁。并在此期间 7 例行肾穿刺活检的微小病变肾病(MCD)患者血清为对照。所有患者均未细胞毒性药物、糖皮质激素及免疫抑制剂使用史;均无肿瘤病史及重金属接触史。

1.2 实验室指标 记录患者肾活检时实验室检查结果,包括血压、血常规、肝功能、总蛋白、清蛋白、血肌酐、乙肝病毒五项、乙肝病毒 DNA、尿红细胞、24 h 尿蛋白定量等。肾小球率过滤的估算使用 MDRD 公式。

1.3 肾脏病理 经皮肾穿刺,所有病例获得肾组织标本分 3 部分,分别做光镜和免疫荧光检查,所有病例送电镜检查。(1)光镜:光镜标本均含 10 个以上肾小球,进行石蜡包埋,切片厚 2 μm,分别行 HE、PAS、PASM、MASSON 染色。(2)免疫荧光:采用冰冻切片,用直接免疫荧光法检测 IgG、IgA、IgM、C3、C4、C1q 及 IgG 亚型(IgG1、IgG2、IgG3、IgG4)。(3)电镜:所有病例肾活检标本送中日友好医院电镜室检查。

1.4 肾组织乙肝抗原检查 在冰冻切片上采用间接免疫荧光法检查 HBsAg、HBcAg,试剂购自北京中杉生物工程公司。

1.5 HBV-MN 的诊断标准 主参照 1989 年北京座谈会的标准^[11-12]。

1.6 肾活检临床病理分型依据 参考邹万忠教授的《肾活检病理学》^[13-14]。

1.7 检测血清抗 M 型 PLA2R 抗体浓度 采用双抗体两步夹心酶联免疫吸附法(ELISA)。温育 30 min 后,将标准品、待测样本 100 μL 加入到预先包被人 M 型 PLA2R 多克隆抗体透明酶标包被板中,再加入酶标工作液 50 μL,37 ℃温育 1 h 后,洗涤 5 次除去未结合的成分。依酶标板拍干后依次加入显色剂 A、B 各 50 μL,避光 37 ℃反应 10min 后加终止液,终止反应。在 450 nm 波长下测定光密度(A)值,根据标准品和样品的 A 值,计算样本中人 M 型 PLA2R 抗体浓度。试剂灵敏度的最低值是 0.1 μg/mL。

1.8 统计学处理 计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS19.0 统计软件进行统计分析,组间比较用 *t* 检验,*P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 一般临床资料 IMN 组患者平均血压为收缩压(136.2±36.4)mm Hg、舒张压(91.0±38.5)mm Hg,HBV-MN 组平均血压为收缩压(135.5±16.6)mm Hg、舒张压(80.5±10.8)mm Hg,两组比较差异无统计学意义(*P*>0.05)。实验室检查中 IMN 组和 HBV-MN 组患者的尿红细胞计数、血常规中白细胞、血红蛋白、血小板数、肝功能 ALT、血清总蛋白、血清清蛋白、血清肌酐及 eGFR 之间比较差异均无统计学意义。

2.2 乙型肝炎病毒血清学检测结果 IMN 组患者血清中乙型肝炎病毒抗原及 DNA 均为阴性,其中 2 例分别 HBsAb 阳性和 HBcAb 阳性。HBV-MN 组患者血清中 HBeAb、HBcAb 及 DNA 均为阴性,其中 2 例患者 HBsAg 阳性,4 例患者 HBsAb 阳性,2 例患者 HBcAb 阳性。

2.3 肾活检组织病理检查

2.3.1 光镜检查 IMN 组和 HBV-MN 组患者肾组织光镜下

均可见肾小球毛细血管袢僵硬,基底膜增厚,无明显内皮细胞增生;未见肾小球节段袢坏死、新月体形成等病变。部分患者肾小球内有少量炎症细胞浸润,多数为单个核细胞和中性粒细胞。IMN 组部分患者肾组织光镜下可见基底膜弥漫增厚,Masson 染色可见上皮下嗜复红蛋白沉积,PSAM 染色可见基底膜呈钉突样改变。HBV-MN 组患者肾组织光镜下均可见系膜细胞明显增生,见图 1、2(见《国际检验医学杂志》网站主页“论文附件”)。

2.3.2 电镜检查 IMN 组 9 例患者肾组织电镜下可见肾小球系膜细胞和基质轻度增生,基底膜轻度增厚,上皮电子致密物沉积,上皮细胞足突弥漫融合,其中 1 例患者肾组织电镜下可见基底膜明显增厚,上皮有较大块电子致密物沉积,之间有钉突形成。HBV-MN 组患者肾组织电镜下可见肾小球系膜细胞和基质增生,基底膜弥漫增厚,上皮、系膜内、内皮下、系膜区等多处电子致密物沉积,上皮细胞足突弥漫性融合。两组患者肾小管和肾间质无特殊病变。

2.3.3 免疫荧光检查 免疫荧光检查阳性判定标准:沉积量大于等于 2+。阴性判定标准:沉积量小于 2+,见图 3~9(见《国际检验医学杂志》网站主页“论文附件”)。两组患者免疫荧光主要以 IgG 和 C3 沿肾小球毛细血管壁呈细颗粒样沉积为主要表现,HBV-MN 组患者肾组织可见 IgA 和 C1q 在系膜区沉积及乙型肝炎病毒抗原。IgG 亚型及乙型肝炎病毒抗原在 IMN 及 HBV-MN 组患者肾组织中的沉积情况见表 1,两组数据比较差异均无统计学意义(*P*>0.05)。

表 1 IMN 和 HBV-MN 两组患者肾活检组织 IgG 及亚型和乙型肝炎病毒抗原沉积比较

项目	IMN 组(<i>n</i> =10)		HBV-MN 组(<i>n</i> =25)	
	<i>n</i>	阳性率(%)	阳性例数(<i>n</i>)	阳性率(%)
IgG	10	100	25	100
IgG1	8	80	23	92
IgG2	1	10	6	24
IgG3	2	20	2	8
IgG4	4	40	21	84

2.4 血清抗 M 型 PLA2R 抗体检测结果 IMN 组患者血清 M 型 PLA2R 抗体浓度显著高于 HBV-MN 组,见表 2,IMN 组 M 型 PLA2R 抗体浓度与 HBV-MN 组比较,差异有统计学意义(*P*<0.05)。若以 HBV-MN 组患者平均浓度作为血清 M 型 PLA2R 抗体检测阳性阈值,IMN 和 HBV-MN 两组患者血清 M 型 PLA2R 抗体检查阳性率见表 3 所示。

表 2 IMN 组、HBV-MN 组和 MCD 组 A 值及 M 型 PLA2R 抗体浓度比较($\bar{x} \pm s$)

分组	<i>n</i>	A 值	浓度(μg/mL)
IMN 组	10	0.873 1±0.146 5	15.4±7.2
HBV-MN 组	25	0.740 9±0.135 9	10.3±5.7
MCD 组	7	0.600 7±0.097 8	<0.1

表 3 IMN 组和 HBV-MN 组 M 型 PLA2R 抗体阳性率比较

分组	<i>n</i>	阳性浓度阈值大于 10.3 μg/mL	
		例数(<i>n</i>)	所占比例(%)
IMN 组	10	7	70
HBV-MN 组	25	7	28

3 讨 论

MN 是引起肾病综合征(NS)常见的病理类型,根据病因分特发性和继发性两种类型,主要以大量蛋白尿、低蛋白血症为主要表现,病理以肾小球基底膜上皮细胞下弥漫性免疫复合物沉积伴基底膜弥漫增厚为特点,多不伴有明显的炎性反应。

MN 是免疫复合物介导的自身免疫性疾病^[15]。Debiec 等^[16]研究证实 M 型 PLA2R 是存在于正常足细胞表面的膜蛋白,Beck 等^[3]检测了高加索白人和非裔美国黑人 37 例 IMN 患者,有 26 例(70%)检出了 PLA2R 抗体,主要为 IgG4 型,为 MN 肾病免疫沉积物中的主要免疫球蛋白亚类,并与 IgG4 共定位于 IMN 患者肾小球的免疫沉积物中,认为 PLA2R 可能是导致 IMN 的一个主要靶抗原。在继发性膜性肾病(SMN)如 V 型狼疮肾炎,其他肾小球疾病如 IgA 肾病中则未发现此现象。Qin 等^[17]用免疫荧光的方法检测 42 例 IMN 患者血清和肾活检组织中的 PLA2R 抗体,发现血清和肾组织的敏感性分别为 57% 和 74%,认为可能由于患者就诊时血液循环中的自身抗体已被较快清除,或已沉积于肾小球。Hoxha 等^[18]使用 Western 印迹法对 96 例 MN 患者进行 PLA2R 抗体检测,其中 IMN 患者 60 例,结果近 60 例的 IMN 患者可测出 PLAR 抗体,检出率接近 100%,在 SMN 患者 V 型狼疮肾炎、HBV-MN 及 Tumor-MN 中 PLA2R 抗体增加方法的灵敏性亦不能检出。刘金荣等^[19]应用免疫荧光的方法测定 IMN 及 SMN 患者体内的 PLA2R 抗体,结果发现 IMN 患者检出 PLA2R 抗体,检出率为 52%,并且其中 66% 的患者 24 h 尿蛋白定量大于 3.5 g,而在继发性 MN 如 V 型狼疮肾炎、Tumor-MN 和其他类型的肾小球肾炎中未检测到。周广宇等^[4]检测了 46 例肾小球疾病患者血清中 PLA2R 抗体水平,并用 Quantity One 软件分析 PLA2R 抗体阳性条带的 A 值,发现 IMN 患者的杂交条带相对 A 值与尿蛋白量呈正相关,而与血浆清蛋白呈负相关。

PLA2R 是否为 IMN 的主要致病抗原,PLA2R 抗体是否为 IMN 的致病性自身抗体及具体的发病机制,目前尚未完全清楚。多项研究显示,PLA2R 抗体血清浓度与 IMN 患者的尿蛋白水平及血清清蛋白水平相关,对 IMN 的发病、进展、预后及复发的预测有一定临床意义,PLA2R 抗体可为 IMN 的诊断和判断 IMN 病情活动及复发提供协助诊断手段,若能提高检测血清 PLA2R 抗体在诊断 IMN 中的敏感性和特异性,则可为 IMN 的诊断和治疗提供更多便利。

国外多项研究表明 IMN 患者肾组织中 IgG 沉积于肾小球毛细血管壁并与足细胞的固有抗原形成免疫复合物,进而导致足细胞和基底膜损伤,主要以 IgG4 亚型沉积为主^[6-8]。国内也研究报告显示,在 IMN 患者肾小球中以 IgG4 沉积为主,在 HBV-MN 患者中则以 IgG1 沉积为主^[9]。本研究两组患者肾组织 IgG 亚型的沉积情况为:IgG1 亚型 IMN 组 8 例阳性(阳性率 80%),HBV-MN 组 23 例阳性(阳性率 92%);IgG4 亚型 IMN 组 4 例阳性(阳性率 40%),HBV-MN 组 21 例阳性(阳性率 84%),检查结果无统计学意义,与以往研究结果不一致,是否与本研究样本数少有关,还是其他原因,或是 IgG 亚型沉积在 IMN 与 SMN 患者中无明显区别,尚有待进一步验证。国内也有类似研究显示,IgG 各亚型在 IMN 和 HBV-MN 表达的阳性率无明显差别。

综上所述,通过外周血 ELISA 方法检测,IMN 组患者血清 PLA2R 抗体浓度显著高于 HBV-MN 患者,对 IMN 诊断及

其与 HBV-MN 鉴别诊断具有临床意义。

参考文献

- [1] 何德明,梁宁生. 磷脂酶 A2 受体研究的新进展[J]. 国际检验医学杂志,2008,29(4):327-329.
- [2] Lambeau G. 2 of a membrane receptor for secretory phospholipases A expression[J]. J Biol Chem,1994,58(1):1575-1578.
- [3] 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.
- [4] 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.
- [5] 李世军,秦卫松,张明超,等. 肿瘤相关膜性肾病:抗足细胞自身抗体与肾组织 IgG 亚型的检测[J]. 肾脏病与透析肾移植杂志,2011,20(1):12-17.
- [6] Satoguina JS, Weyand E, Larbi J, et al. Tregulatory-1 cells induce IgG4 production by B cells; role of IL-10[J]. J Immuno,1984,58(1):57-68.
- [7] Mathieson PW. Immune dysregulation in minimal change nephropathy[J]. Nephrol Dial Transplant,2003,18(6):26-29.
- [8] 何志军,杨琪,潘涛. IgG 亚型在乙型肝炎病毒相关性膜性肾病与特发性膜性肾病肾小球中沉积特点的研究[J]. 诊断病理学杂志,2007,14(6):464-465.
- [9] Wang Y, Jia JD. Control of hepatitis B in China: prevention and treatment[J]. Expert Rev Anti Infect Ther,2011,9(1):21-25.
- [10] 中华内科杂志编委会. 乙型肝炎相关性肾炎座谈会纪要[J]. 中华内科杂志,1990,29(9):519-521.
- [11] 林清渊. 乙型肝炎病毒相关性肾炎[C]. 北京:人民卫生出版社,2009:1507-1512.
- [12] 邹万忠. 膜性肾病[C]. 北京:北京大学医学出版社,2009:71-75.
- [13] 邹万忠. 微小病变性肾病和肾小球轻微病变[C]. 北京:北京大学医学出版社,2009:61-63.
- [14] 王瑞石,刘志红. 膜性肾病的发病机制[J]. 肾脏病与透析肾移植杂志,2006,15(2):161-166.
- [15] Laurence H, Jr B, DM, et al. M-Type phospholipase a2 receptor as target antigen in idiopathic membranous nephropathy[J]. N Engl J Med,2001(361):11-21.
- [16] Debiec H, Ronco P. PLA2R autoantibodies and PLA2R glomerulodeposits in membranous nephropathy[J]. N Engl J Med,2011(364):689-690.
- [17] 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.
- [18] Hoxha E, Harendza S, Zahner G, et al. An immunofluorescence test for phospholipase-A₂ receptor antibodies and its clinical usefulness in patients with membranous glomerulonephritis [J]. Nephrol Dial Transplant,2011,26(8):2526-2532.
- [19] 刘金荣,汪蕾,杜文军,等. 乙肝相关性膜性肾病中 IgG 亚型的表达及意义[J]. 山东大学学报:医学版,2012,50(10):111-114.

(收稿日期:2015-04-15)

