

• 论 著 •

频繁复发肾病综合征患儿 PD-L1⁺B 细胞比例及意义研究*石梦月, 关凤军[△]

徐州医科大学附属医院儿科, 江苏徐州 221000

摘要:目的 探讨频繁复发肾病综合征(FRNS)患儿外周血程序性死亡蛋白配体 1 阳性(PD-L1⁺)B 细胞比例及意义,进一步探究 FRNS 的可能发病机制。方法 选取 2021 年 4 月至 2022 年 2 月该院 68 例初次发病的原发性肾病综合征(PNS)患儿,随访 1 年,根据复发的频次,分为 FRNS 组(31 例)和非频繁复发组(NFRNS, 37 例)。另选取同期该院门诊 28 例体检健康儿童作为健康对照组。于研究组患儿糖皮质激素(GC)治疗前、治疗缓解后及健康对照组儿童体检时分别采取静脉血标本。采用流式细胞术检测各组儿童外周血 CD19⁺PD-L1⁺B 细胞比例、CD19⁺CD24^{hi}CD27⁺B 细胞、CD19⁺CD24^{hi}CD38^{hi}B 细胞。结果 GC 治疗前,与健康对照组比较,FRNS 组、NFRNS 组患儿外周血 PD-L1⁺B 细胞比例均明显升高($P < 0.05$),CD19⁺CD24^{hi}CD27⁺B 细胞比例均明显降低($P < 0.05$),CD19⁺CD24^{hi}CD38^{hi}B 细胞比例差异无统计学意义($P > 0.05$);与 NFRNS 组比较,FRNS 组 PD-L1⁺B 细胞比例明显升高($P < 0.05$),CD19⁺CD24^{hi}CD27⁺B 细胞比例明显降低($P < 0.05$)。GC 治疗后,FRNS 组较 NFRNS 组及健康对照组的 PD-L1⁺B 细胞比例均明显升高($P < 0.05$)。与治疗前比较,治疗后 FRNS 组、NFRNS 组患儿外周血 PD-L1⁺B 细胞比例均明显下降($P < 0.05$),CD19⁺CD24^{hi}CD27⁺B 细胞比例均明显升高($P < 0.05$)。FRNS 组 GC 治疗前 PD-L1⁺B 细胞比例与总 B 细胞计数($r = 0.528, P = 0.002$)、IgM($r = 0.371, P = 0.040$)呈正相关,与 ALB($r = -0.461, P = 0.009$)呈负相关。结论 FRNS 患儿中存在 PD-L1⁺B 细胞、CD19⁺CD24^{hi}CD27⁺B 细胞比例异常,其可能参与 PNS 患儿的频繁复发过程。

关键词:肾病综合征; 频繁复发; 程序性死亡蛋白配体 1; B 淋巴细胞; 儿童

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2023.19.002

中图法分类号:R725.8

文章编号:1673-4130(2023)19-2309-07

文献标志码:A

Proportion and role of PD-L1⁺B cells in children with frequent relapsing nephrotic syndrome*SHI Mengyue, GUAN Fengjun[△]

Department of Pediatrics, Affiliated Hospital of Xuzhou Medical University,
Xuzhou, Jiangsu 221000, China

Abstract: **Objective** To determine the proportion and significance of PD-L1⁺B lymphocytes in the peripheral blood of children with frequent relapses nephrotic syndrome (FRNS) and to further investigate the possible pathogenesis of FRNS. **Methods** From April 2021 to February 2022, 68 children with primary nephrotic syndrome (PNS) in this hospital were selected and followed up for 1 year, 31 children were divided into FRNS group and 37 children into the non-frequent recurrence group (NFRNS). According to the frequency of recurrence, 28 children from the outpatient health examination of this hospital during the same period were selected as healthy control. Blood samples were collected from children in each group before and after glucocorticoid (GC) treatment. The proportion of CD19⁺PD-L1⁺B lymphocytes, CD19⁺CD24^{hi}CD27⁺B lymphocytes, CD19⁺CD24^{hi}CD38^{hi}B lymphocytes in the peripheral blood of children in each group was determined by flow cytometry. **Results** Before GC treatment, compared with the healthy control group, the proportion of PD-L1⁺B cells in peripheral blood of children in FRNS group and NFRNS group increased significantly ($P < 0.05$), and the proportion of CD19⁺CD24^{hi}CD27⁺B cells decreased significantly ($P < 0.05$), while there was no significant difference in B cell proportion of CD19⁺CD24^{hi}CD38^{hi}B cells ($P > 0.05$). After GC treatment, the proportion of PD-L1⁺B cells in FRNS group was significantly higher than that in NFRNS group and healthy control

* 基金项目:国家自然科学基金项目(82173630)。

作者简介:石梦月,女,硕士研究生在读,主要从事儿童肾脏病研究。 [△] 通信作者, E-mail:guanxiaomu@sina.com。

网络首发 [http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1176.R.20230628.1159.004.html\(2023-06-28\)](http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1176.R.20230628.1159.004.html(2023-06-28))

group ($P < 0.05$). Compared with NFRNS group, the proportion of PD-L1⁺ B cells in FRNS group increased significantly ($P < 0.05$), and the proportion of CD19⁺ CD24^{hi} CD27⁺ B cells decreased significantly ($P < 0.05$). After GC treatment, the proportion of PD-L1⁺ B cells in FRNS group was significantly higher than those in NFRNS group and healthy control group ($P < 0.05$). Compared with before treatment, the proportion of PD-L1⁺ B cells in peripheral blood of children after treatment in FRNS group and NFRNS group decreased significantly ($P < 0.05$), and the proportion of CD19⁺ CD24^{hi} CD27⁺ B cells increased significantly ($P < 0.05$). The proportion of PD-L1⁺ B lymphocytes in FRNS group before GC treatment was positively correlated with IgM ($r = 0.371, P = 0.040$), while negatively correlated with ALB ($r = -0.461, P = 0.009$). **Conclusion** The proportion of PD-L1⁺ B cells and CD19⁺ CD24^{hi} CD27⁺ B cells in FRNS children is abnormal, which may be involved in the frequent recurrence process of PNS children.

Key words: nephrotic syndrome; frequent relapses; programmed death ligand 1; B lymphocytes; children

原发性肾病综合征(PNS)为儿童最常见的肾小球疾病之一。该疾病的一线用药为糖皮质激素,通常大多数患儿初次治疗对糖皮质激素(GC)敏感,但约90%患儿出现复发,其中半数患儿出现频繁复发,称为频繁复发肾脏综合征(FRNS)^[1],这部分患儿即使加用免疫抑制剂疗效仍欠佳,且频繁复发会影响患儿肾脏功能及预后。FRNS的发病机制目前尚不清楚。既往研究多认为,FRNS的发病机制与T细胞亚群紊乱及致病T细胞因子^[2]升高有关。近年来,随着B淋巴细胞耗竭剂利妥昔单抗(rituximab, RTX)在PNS中的成功应用,研究者发现其可有效地降低疾病复发频次,这提示B细胞免疫可能在FPNS的病理生理学中起关键作用^[3]。

调节性B细胞(Bregs)是一群具有免疫抑制作用的B淋巴细胞亚群,其通过分泌负性细胞因子[如白细胞介素(IL)-10]和靶细胞膜表面分子[如程序性死亡蛋白配体1(PD-L1)]的相互作用发挥抑制作用^[4]。Bregs已被证明与多种炎症和自身免疫性疾病相关^[4]。过渡性B细胞(CD19⁺ CD24^{hi} CD38^{hi})和记忆性B细胞(CD19⁺ CD24^{hi} CD27⁺)是在人类外周血中已被证明的两大富含Bregs的B细胞亚群^[4]。LI等^[5]在糖尿病肾病患者中发现,循环CD19⁺ CD24^{hi} CD38^{hi} B细胞数与肾小球滤过率(eGFR)和血清IL-10水平呈正相关,与肾病患者尿蛋白水平呈负相关。研究显示,在过敏性紫癜肾炎(HSPN)患者中,仅在患有蛋白尿或大量蛋白尿的HSPN患者中CD19⁺ CD24^{hi} CD27⁺ B细胞比例降低^[6]。以上研究提示这两大B细胞亚群参与了肾小球疾病发生发展。

CD19⁺ PD-L1⁺ B细胞可以通过膜表面分子PD-L1直接与免疫细胞相互作用,在类风湿关节炎(RA)^[7]、感染^[8]及癌症^[9]等疾病中发挥抑制T细胞免疫作用。然而,GRYWALSKA等^[10]研究表明,PD-1、PD-L1⁺ T细胞及B细胞在原发性增殖性(PGN)和非增殖性肾小球肾炎(NPGN)中均显著上升,参与疾

病炎症状态,提示CD19⁺ PD-L1⁺ B细胞可能参与肾小球疾病的免疫损伤。目前FRNS患儿中CD19⁺ PD-L1⁺ B细胞变化情况尚不清楚。本研究通过流式细胞术检测患儿外周血CD19⁺ CD24^{hi} CD38^{hi} B细胞、CD19⁺ CD24^{hi} CD27⁺ B细胞、CD19⁺ PD-L1⁺ B细胞比例,探讨FRNS患儿的可能发病机制。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取2021年4月至2022年2月在本院确诊的68例(男48例,女20例)初发激素敏感PNS患儿作为研究组,年龄1.5~14.0岁,平均(7.33±3.44)岁。另选取同期在本院体检健康的28例(男20例,女8例)儿童作为健康对照组,年龄为1.5~14.0岁,平均(6.83±3.73)岁。

研究组PNS诊断符合中华医学会儿科学分会2016年发布的《儿童激素敏感、复发/依赖肾病综合征诊治循证指南(2016)》^[11]的标准:(1)大量蛋白尿,即24h尿蛋白定量(UCFP)≥50 mg/kg,或晨尿的尿蛋白/肌酐(mg/mg)≥2.0,1周内3次晨尿蛋白定性为+++~++++;(2)低蛋白血症,血浆白蛋白<25 g/L;(3)高脂血症,即血清胆固醇高于5.7 mmol/L;(4)存在不同程度水肿。以上4项中(1)和(2)为PNS诊断的必要条件。排除标准:(1)未复发、使用免疫抑制剂患儿;(2)存在感染、免疫性疾病、内分泌疾病及恶性肿瘤等继发性因素患儿。

研究组患儿门诊定期随访1年,根据复发频次分为FRNS组(31例)和NFRNS组(37例)。非频繁复发肾病综合征(NFRNS):首次完全缓解后6个月内复发1次,或1年内复发1~3次。频繁复发肾病综合征(FRNS):经GC标准疗程治疗后缓解,但病程中半年内复发≥2次,或1年内复发≥4次。

各组儿童性别、年龄、体重等基本资料比较,差异均无统计学意义($P > 0.05$),见表1。所有研究对象均签署知情同意书,本研究经徐州医科大学附属医院伦理委员会审批通过(审批号:XYFY2022-KL136-01)。

表 1 各组儿童基本资料比较

组别	<i>n</i>	年龄 ($\bar{x} \pm s$, 岁)	性别 (男/女, <i>n</i> / <i>n</i>)	体重 [<i>M</i> (<i>P</i> ₂₅ , <i>P</i> ₇₅), kg]
NFRNS 组	37	5.99±2.90	26/11	23.00(20.00, 38.50)
FRNS 组	31	7.19±2.98	22/9	28.00(18.00, 46.00)
健康对照组	28	6.83±3.73	20/8	23.50(18.00, 39.50)
<i>F</i> / χ^2 / <i>H</i>		1.273	0.011	0.245
<i>P</i>		0.285	0.995	0.885

1.2 主要试剂与仪器 BV650 标记的抗人 CD19 抗体、APC 标记的抗人 CD24 抗体、FITC 标记的抗人 CD27 单克隆抗体、Percp-Cy5.5 标记的抗人 CD38 抗体、BV421 标记的抗人 CD274 抗体 (Biolegend 公司), LSRFortessa™ 型流式细胞仪 (美国 BD Biosciences) FACSDvia 流式细胞分析软件 (美国 BD Biosciences)。

1.3 治疗方法及疗效判定 所有研究组患儿均给予诱导缓解及巩固维持治疗,并在 GC 治疗前和治疗后缓解期 (即治疗后 4 周) 采集血液标本。初次发病时均给予醋酸泼尼松片 (江苏恒瑞制药有限公司, 批号: 200226) 2 mg/(kg·d), 分 3 次口服治疗, 正规减量。疗效判定: 完全缓解以血生化、尿检完全正常为标准。PNS 复发的诊断标准: 停药后连续 3 d, UCFP≥50 mg/kg, 或晨尿的尿蛋白/肌酐 (mg/mg)≥2.0, 或晨尿的尿蛋白由阴性转为++++~++++。

1.4 检测方法 于健康对照组儿童体检时及研究组患儿 GC 治疗前和治疗后缓解期抽取清晨空腹静脉血 2 mL, 乙二胺四乙酸 (EDTA) 抗凝。采用密度梯度离心法分离单个核细胞, 2 500 r/min 离心弃上清, 磷酸盐缓冲液 (PBS) 洗涤 2 次后, 再用 PBS 重悬细胞, 调整浓度为 1×10⁶/mL, 吸取 100 μL, 加入 CD19-BV650、CD24-APC-Cy7、CD38-Percp-Cy5.5、CD27-FITC、CD274-BV421 各 1 μL 混匀。每个对照管加入抗 APC、FITC、BV650、BV421 标记的同型抗体, 室温避光孵育 15~30 min 后加入红细胞裂解液混匀静置 15 min, 后加入 2 mL PBS 洗涤, 2 500 r/min 离心弃上清, 再加 2 mL PBS 洗涤 1 次, 弃上清, 于流式细胞仪检测并用 Cell Quest 软件进行分析。

1.5 临床数据收集 收集各组儿童血清白蛋白 (ALB)、UCFP、血尿素氮 (BUN)、血肌酐 (Scr)、总 B (CD19⁺B) 细胞计数及免疫球蛋白 IgG、IgM 水平等临床数据。

1.6 统计学处理 采用 SPSS25.0 统计软件进行数据分析。计数资料用例数或率表示, 组间比较采用 χ^2 检验。计量资料先进行正态性检验, 符合正态分布的数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间比较采用单因素方差分析

(one-way ANOVA) 检验, 两组间比较采取 LSD-*t* 检验和 Tamhanes *t*₂ 检验; 同组治疗前后比较采用配对样本 *t* 检验。不符合正态分布的计量资料用 *M*(*P*₂₅, *P*₇₅) 表示, 多组间比较采用 Kruskal-Wallis *H* 检验, 两组间比较采用 Mann-Whitney *U* 检验; 同组治疗前后比较采用配对 Wilcoxon *Z* 检验。正态性数据相关性分析采用 Pearson 相关分析法, 非正态数据相关性分析采用 Spearman 相关分析法。以 *P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 各组儿童临床数据比较 GC 治疗前, 与健康对照组比较, FRNS 组、NFRNS 组 CD19⁺B 细胞、IgM 及 UCFP 升高, ALB、IgG 降低, 差异有统计学意义 (*P*<0.05); FRNS 组较 NFRNS 组的 CD19⁺B 细胞计数和 IgM 明显升高, ALB、IgG 明显降低, 差异均有统计学意义 (*P*<0.05)。GC 治疗后, 与健康对照组比较, FRNS 组、NFRNS 组的 CD19⁺B 细胞、IgM、IgG、Scr、BUN、ALB 及 UCFP 变化差异均无统计学意义 (*P*>0.05); FRNS 组、NFRNS 组 CD19⁺B 细胞、IgM 及 UCFP 均较同组治疗前明显下降, ALB、IgG 均较同组治疗前明显升高, 差异均有统计学意义 (*P*<0.05), Scr、BUN 与同组治疗前比较差异无统计学意义 (*P*>0.05)。见表 2。

2.2 两组患儿 B 淋巴细胞比例情况比较 GC 治疗前, 与健康对照组比较, FRNS 组、NFRNS 组患儿外周血 PD-L1^{hi}B 细胞比例明显升高, CD19⁺CD24^{hi}CD27⁺B 细胞比例明显降低, 差异均有统计学意义 (*P*<0.05); FRNS 组较 NFRNS 组患儿外周血 PD-L1^{hi}B 细胞比例升高更为明显, CD19⁺CD24^{hi}CD27⁺B 细胞比例降低更为明显, 差异均有统计学意义 (*P*<0.05)。GC 治疗后, FRNS 组患儿外周血 PD-L1^{hi}B 细胞比例仍高于健康对照组, 且 FRNS 组仍高于 NFRNS 组, 差异有统计学意义 (*P*<0.05); NFRNS 组与健康对照组 PD-L1^{hi}B 细胞比例差异无统计学意义 (*P*>0.05); 各组 CD19⁺CD24^{hi}CD27⁺B 细胞比例比较, 差异无统计学意义 (*P*>0.05); FRNS 组、NFRNS 组患儿外周血 PD-L1^{hi}B 细胞比例均较同组治疗前明显下降, CD19⁺CD24^{hi}CD27⁺B 细胞比例均较同组治疗前明显升高, 差异有统计学意义 (*P*<0.05)。CD19⁺CD24^{hi}CD38^{hi}B 细胞比例在各组各时期变化差异无统计学意义 (*P*>0.05)。见表 3。

2.3 FRNS 组 PD-L1⁺B 细胞、CD19⁺CD24^{hi}CD27⁺B 细胞与临床数据的相关性分析 GC 治疗前: FRNS 组 PD-L1⁺B 细胞比例与 CD19⁺B 细胞计数 (*r*=0.528, *P*=0.002)、IgM (*r*=0.371, *P*=0.040) 呈正相关, 与 ALB (*r*=−0.461, *P*=0.009) 呈负相关, 而与 IgG 无相关性 (*r*=−0.124, 0.208, 均 *P*>0.05);

FRNS 组 CD19⁺CD24^{hi}CD27⁺B 细胞比例与 IgM、ALB、IgG、CD19⁺B 细胞计数无相关性 ($r=0.189$ 、 -0.120 、 -0.169 、 -0.149 ，均 $P>0.05$)。GC 治疗后：FRNS 组 PD-L1⁺B 细胞比例与 CD19⁺B 细胞计数 ($r=0.437$ ， $P=0.014$)、IgM ($r=0.562$ ， $P=0.001$)呈正相关，而与 ALB、IgG 无相关性 ($r=-0.342$ 、 -0.124 ，均 $P>0.05$)；FRNS 组 CD19⁺CD24^{hi}CD27⁺B 细胞比例与 IgM、ALB、IgG、CD19⁺B 细胞计数无相关性 ($r=0.163$ 、 0.063 、 0.142 、 -0.241 ，均 $P>0.05$)。见图 1、2。

表 2 各组儿童临床数据比较[$\bar{x}\pm s$ 或 $M(P_{25}, P_{75})$]

项目	NFRNS 组($n=37$)		FRNS 组($n=31$)		健康对照组($n=28$)
	治疗前	治疗后	治疗前	治疗后	
IgM(g/L)	1.48(1.14,1.89) ^{ab}	0.89(0.62,1.03)	1.81(1.50,2.25) ^{abc}	0.96(0.70,1.21)	0.96(0.77,1.17)
IgG(g/L)	3.33 $\pm$ 1.28 ^{ab}	10.49 $\pm$ 2.67	2.64 $\pm$ 1.01 ^{abc}	10.29 $\pm$ 2.26	10.72 $\pm$ 2.43
ALB(g/L)	16.50(14.90,17.45) ^{ab}	48.80(44.25,52.60)	14.30(13.53,15.64) ^{abc}	49.40(47.50,52.90)	48.75(45.98,50.98)
Scr(μ mol/L)	33.00(25.00,39.00)	29.00(23.00,36.00)	36.00(30.00,45.00)	28.00(23.36,37.00)	28.50(23.52,37.75)
BUN(μ mol/L)	4.18(3.45,5.69)	4.39(3.42,5.43)	4.06(3.08,4.47)	3.91(3.03,4.46)	3.86(3.23,5.15)
CD19 ⁺ B 细胞(个)	531.57 $\pm$ 198.98 ^{ab}	343.65 $\pm$ 93.42	634.94 $\pm$ 243.40 ^{abc}	343.06 $\pm$ 112.53	342.32 $\pm$ 127.02
UCFP(mg/kg)	110.53(82.13,163.28) ^{ab}	7.04(5.00,8.28)	110.53(76.50,214.63) ^{ab}	7.03(4.45,7.95)	7.48(6.37,9.30)

注：与健康对照组相比，^a $P<0.05$ ；与同组治疗后相比，^b $P<0.05$ ；与 NFRNS 组相比，^c $P<0.05$ 。

表 3 各组儿童各 B 淋巴细胞亚群水平比较($\bar{x}\pm s$ ，%)

组别	n	时间	PD-L1 ⁺ B 细胞	CD19 ⁺ CD24 ^{hi} CD27 ⁺ B 细胞	CD19 ⁺ CD24 ^{hi} CD38 ^{hi} B 细胞
NFRNS 组	37	治疗前	0.92 $\pm$ 0.45 ^{ab}	9.30 $\pm$ 2.88 ^{ab}	6.74 $\pm$ 2.02 ^{ab}
		治疗后	0.56 $\pm$ 0.26	10.25 $\pm$ 1.56	7.64 $\pm$ 1.46
FRNS 组	31	治疗前	1.16 $\pm$ 0.41 ^{abc}	7.80 $\pm$ 2.60 ^{abc}	6.33 $\pm$ 1.80 ^{ab}
		治疗后	0.81 $\pm$ 0.33 ^{ac}	10.74 $\pm$ 1.80 ^{ac}	7.78 $\pm$ 1.51
健康对照组	28		0.45 $\pm$ 0.26	11.21 $\pm$ 3.17	7.03 $\pm$ 2.21

注：与健康对照组相比，^a $P<0.05$ ；与同组治疗后相比，^b $P<0.05$ 。与 NFRNS 组相比，^c $P<0.05$ 。

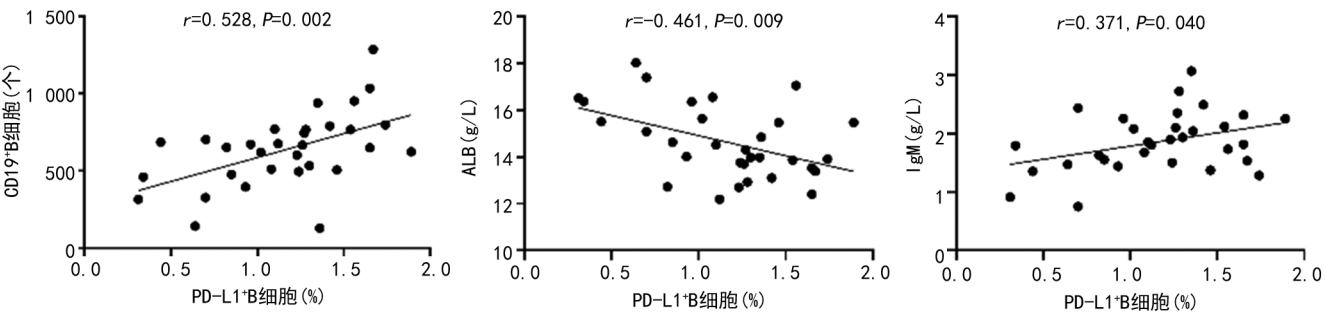


图 1 治疗前 PD-L1⁺B 细胞与 CD19⁺B 细胞及血清 ALB、IgM 的相关性分析

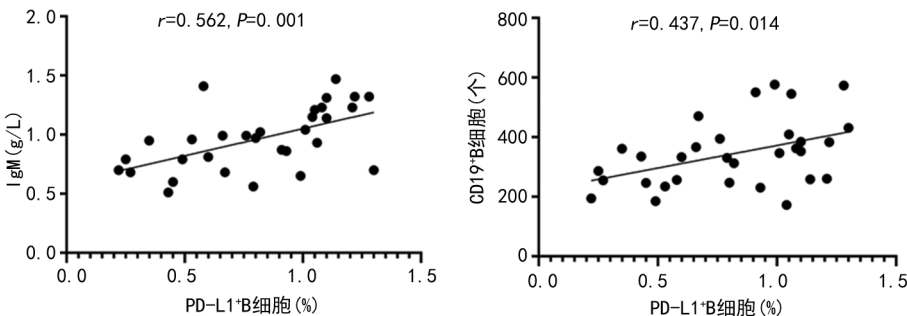


图 2 治疗后 PD-L1⁺B 细胞与 CD19⁺B 细胞及 IgM 的相关性分析

3 讨 论

FRNS 是 PNS 患儿常见的临床类型之一，属于难

治性肾病范畴，其病因未知。足细胞免疫损伤是该病中心环节。多项报道发现，FRNS 的发病机制可能与

T 细胞相关分子的异常有关^[2,12]。值得注意的是, PNS 患者外周血中免疫球蛋白的异常变化,以及作用于 B 细胞的免疫抑制剂在该病中所显现的疗效,均提示 B 细胞参与了 PNS 的发病^[13-14]。CHAN 等^[3]研究从 B 细胞耗竭剂 RTX 治疗 FRNS 中观察到了肯定的疗效,进一步证实了 B 细胞参与 PNS 的发病及频繁复发过程。因此,围绕 B 细胞的免疫疗法已成为 FRNS 的治疗选择。然而,RTX 足量疗程治疗后长期随访发现仍有部分患儿出现复发,这些患儿后期仍需要免疫制剂及重复 RTX 疗程治疗^[15]。因此,本课题组探讨 FRNS 的病理生理学发病机制,以期 FRNS 临床诊断及治疗提供新的思路。

本研究结果显示,FRNS 组及 NFRNS 组患儿在疾病活动期总 B 细胞绝对计数显著高于健康对照组,且 FRNS 组明显高于 NFRNS 组,经 GC 有效治疗后的缓解期降低,这与以往报道^[16-17]一致,提示 FRNS 患儿存在 B 淋巴细胞的异常扩增状态。KIM 等^[18]通过实验小鼠模型研究表明,在肾小球局部激活的分泌 IL-4 的 B 细胞可以诱导足细胞消失和蛋白尿。临床观察表明,总 B 淋巴细胞的清除及恢复并不能预测 PNS 患儿疾病的缓解及复发,RUGGENENTI 等^[19]对膜性肾病的研究结果同样表明,循环总 B 淋巴细胞可能不是 FRNS 中扩增的特异性 B 细胞。因此,需要进一步探究不同 B 淋巴细胞的功能分型在 FRNS 中的可能作用机制。

本研究显示,FRNS 组及 NFRNS 患儿 CD19⁺CD24^{hi}CD27⁺ B 细胞比例较健康对照组减低,且 FRNS 组低于 NFRNS 组患儿,GC 有效治疗后升高,与阳海平^[20]报道基本一致。XIONG 等^[21]研究发现,活动性 SLE 患者的 CD19⁺CD24^{hi}CD27⁺ B 细胞亚群减少,并且与疾病活动相关。过敏性紫癜肾炎患者外周血 CD24^{hi}CD27⁺ B 细胞比例降低,且只有在伴血尿、大量蛋白尿的患者中降低^[6]。此外,在接受肾移植患者中曾观察到 CD19⁺CD24^{hi}CD27⁺ B 细胞比例显著增加,延长了肾移植患者的存活时间^[22]。阳海平^[20]研究显示,PNS 患儿外周血中的 CD19⁺CD24^{hi}CD27⁺ B 细胞具有调控 Th17/Treg 免疫平衡的作用。而 Th17 分泌的 IL-17 升高可诱导 PNS 患儿肾小球足细胞凋亡^[23],Treg 降低与 RTX 治疗后 MCD 患者疾病的早期复发相关^[12]。提示 CD19⁺CD24^{hi}CD27⁺ B 细胞的功能低下可能与 FRNS 有关。

本研究显示,GC 治疗前,FRNS 组、NFRNS 组患儿外周血 PD-L1⁺ B 细胞比例较健康对照组显著上升,且 FRNS 组明显高于 NFRNS 组,经过 GC 治疗后,NFRNS 组 PD-L1⁺ B 细胞下降,但 FRNS 组 PD-L1⁺ B 细胞仍高于 NFRNS 组及健康对照组。这提示

PD-L1⁺ B 细胞可能在 FRNS 患儿体内发挥致病作用。GRYWALSKA 等^[10]也发现,PD-1⁺、PD-L1⁺ T 细胞及 B 细胞在原发性增殖性(PGN)和非增殖性肾小球肾炎(NPGN)中均显著上升,促进疾病炎症状态;该研究还发现 PGN 患者 T 和 B 细胞上的 PD-1 和 PD-L1 表达高于 NPGN 患者和健康对照组,提示 PD-1 和 PD-L1 阳性表达淋巴细胞可能与肾小球疾病的严重程度相关。在系统性红斑狼疮(SLE)中,PD-L1⁺ B 细胞的增加与疾病活动指数显著相关,其可以激活致病性 T 细胞、B 细胞应答^[24]。但这与以往在癌症等疾病中所表达的抑制机制存在不同^[9]。分析可能原因为:部分研究中 PD-L1 信号可能与 PD-1 受体结合而发挥抑制 T 细胞活化作用,而本研究的 PD-L1 信号可能是通过与一种尚未识别的受体结合发挥激活 T 细胞作用^[25]。由此推断,PD-L1⁺ B 细胞的升高可能暗示着 B 细胞的一种活化状态,在 PNS 中其可能促进肾小球损伤及疾病频繁复发而不具有调节作用。

低血清 ALB 是 PNS 诊断的特征条件之一,也是 PNS 复发的危险因素。本研究结果显示,FRNS 组血清 ALB 明显低于 NFRNS 组,相关性分析显示 FRNS 患儿外周血 PD-L1⁺ B 细胞比例与血清 ALB 呈负相关,与 PENG 等^[26]研究基本一致。YU 等^[27]研究表明,PD-1 信号的激活可以损伤肾小球足细胞。由此推测 CD19⁺PD-L1⁺ B 细胞可能与肾小球的损伤有关。

IgM 在 PNS 患儿中明显升高,据推测其升高是由于介导 IgM 合成 B 细胞发生类型转换的 T 细胞功能出现缺陷,且致病机制可能是激活了补体级联反应。本研究结果显示,FRNS 组血清 IgM 明显高于 NFRNS 组,相关性分析显示 FRNS 患儿外周血 PD-L1⁺ B 细胞比例与 CD19⁺ B 细胞和免疫球蛋白 IgM 呈正相关。近期研究显示,肾脏组织中微量 IgM 沉积可能是微小肾病综合征患儿糖皮质激素抵抗和频繁复发的重要因素^[28]。此外,在某些形式的局灶性节段性肾小球硬化(FSGS)中观察到肾小球 IgM 沉积似乎源自 IgM(连同活化的补体因子)与肾小球细胞损伤后暴露的表位的结合^[29]。这表明 IgM 可能导致疾病进展多于代表致病因素。IgM 可以触发 INS 患者肾小球补体的经典途径^[30]。由此推测,PD-L1⁺ B 细胞可能参与了 PNS 患儿的体液免疫反应,可能与患儿 IgM 分泌的异常有关。

本研究存在一些不足之处,因为 PD-L1⁺ B 细胞在人类外周血中所占比例极少,所以无法对 B 细胞上 PD-L1 表达情况进行分层比较;同时,未能检测全部的 PD-1 受体及相应的配体表达阳性 B 细胞比例和下

游靶基因;样本量较小,且研究方法简单,未能清楚展示 PD-L1⁺ B 细胞在 PNS 中的具体作用机制。因此,仍需要进一步全面研究 PD-1⁺/PD-L1⁺/PD-L2⁺ B 细胞对 FRNS 疾病的作用,并对这些 B 细胞进行功能分型。

综上所述,CD19⁺ CD24^{hi}CD27⁺ B 细胞及 PD-L1⁺ B 细胞的异常可能与 FRNS 有关,但具体机制有待进一步研究。PD-L1 信号及其在 FRNS 中的作用机制极其复杂,有待进一步完善研究该信号在儿童 PNS 中的发病机制。

参考文献

- [1] KORSGAARD T, ANDERSEN R F, JOSHI S, et al. Childhood onset steroid-sensitive nephrotic syndrome continues into adulthood[J]. *Pediatr Nephrol*, 2019, 34(4):641-648.
- [2] STANGO M, SPARTALIS M, DAIKIDOU D V, et al. Impact of Th1 and Th2 cytokines in the progression of idiopathic nephrotic syndrome due to focal segmental glomerulosclerosis and minimal change disease[J]. *J Nephropathol*, 2017, 6(3):187-195.
- [3] CHAN E Y, YU E L M, ANGELETTI A, et al. Long-term efficacy and safety of repeated rituximab to maintain remission in idiopathic childhood nephrotic syndrome: an international study[J]. *J Am Soc Nephrol*, 2022, 33(6):1193-1207.
- [4] CATALAN D, MANSILLA M A, FERRIER A, et al. Immunosuppressive mechanisms of regulatory B cells[J]. *Front Immunol*, 2021, 12:611-795.
- [5] LI T, YU Z, QU Z, et al. Decreased number of CD19(+) CD24(hi) CD38(hi) regulatory B cells in diabetic nephropathy[J]. *Mol Immunol*, 2019, 112:233-239.
- [6] YANG B, TAN X, XIONG X, et al. Effect of CD40/CD40L signaling on IL-10-producing regulatory B cells in Chinese children with Henoch-Schönlein purpura nephritis[J]. *Immunol Res*, 2017, 65(3):592-604.
- [7] ZACCA E R, ONOFRIO L I, ACOSTA C D V, et al. PD-L1(+) regulatory B cells are significantly decreased in rheumatoid arthritis patients and increase after successful treatment[J]. *Front Immunol*, 2018, 9:22-41.
- [8] EPELDEGUI M, CONTI D V, GUO Y, et al. Elevated numbers of PD-L1 expressing B cells are associated with the development of AIDS-NHL[J]. *Sci Rep*, 2019, 9(1):9371.
- [9] TONG D N, GUAN J, SUN H, et al. Characterization of B cell-mediated PD-1/PD-L1 interaction in pancreatic cancer patients[J]. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2020, 47(8):1342-1349.
- [10] GRYWALSKA E, SMARZ-WIDELSKA I, KRASOWA-KA-ZAJAC E, et al. The PD-1/PD-L1 inhibitory pathway is altered in primary glomerulonephritides[J]. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*, 2018, 66(2):133-143.
- [11] 中华医学会儿科学分会肾脏学组. 儿童激素敏感、复发/依赖肾病综合征诊治循证指南(2016)[J]. *中华儿科杂志*, 2017, 55(10):729-734.
- [12] TSUJI S, AKAGAWA S, AKAGAWA Y, et al. Idiopathic nephrotic syndrome in children: role of regulatory T cells and gut microbiota[J]. *Pediatr Res*, 2021, 89(5):1185-1191.
- [13] WANG L, ZHU J, XIA M, et al. Comparison of rituximab, cyclophosphamide, and tacrolimus as first steroid-sparing agents for complicated relapsing/steroid-dependent nephrotic syndrome in children: an evaluation of the health-related quality of life[J]. *Arch Med Sci*, 2022, 18(1):275-278.
- [14] GIANGIACOMO J, CLEARY T G, COLE B R, et al. Serum immunoglobulins in the nephrotic syndrome. A possible cause of minimal-change nephrotic syndrome[J]. *N Engl J Med*, 1975, 293(1):8-12.
- [15] OKUTSU M, KAMEI K, SATO M, et al. Prophylactic rituximab administration in children with complicated nephrotic syndrome[J]. *Pediatr Nephrol*, 2021, 36(3):611-619.
- [16] 于跑, 彭倩倩, 董晨, 等. B 淋巴细胞表型在激素依赖及频繁复发肾病综合征患儿的临床意义[J]. *实用医学杂志*, 2020, 36(7):954-958.
- [17] COLUCCI M, CARSETTI R, CASCIOLI S, et al. B cell phenotype in pediatric idiopathic nephrotic syndrome[J]. *Pediatr Nephrol*, 2019, 34(1):177-181.
- [18] KIM A H, CHUNG J J, AKILESH S, et al. B cell-derived IL-4 acts on podocytes to induce proteinuria and foot process effacement[J]. *JCI Insight*, 2017, 2(21):e81836.
- [19] RUGGENENTI P, DEBIEC H, RUGGIERO B, et al. Anti-phospholipase A2 receptor antibody titer predicts post-rituximab outcome of membranous nephropathy[J]. *J Am Soc Nephrol*, 2015, 26(10):2545-2558.
- [20] 阳海平. 调节性 B 细胞在儿童原发性肾病综合征 Th17/Treg 免疫失衡中的作用及机制研究[D]. 重庆: 重庆医科大学, 2016.
- [21] XIONG H, TANG Z, XU Y, et al. CD19(+)CD24(high)CD27(+) B cell and interleukin 35 as potential biomarkers of disease activity in systemic lupus erythematosus patients[J]. *Adv Rheumatol*, 2022, 62(1):48.
- [22] AJITH A, MAMOUNI K, MUSA A, et al. IL-10-producing memory B regulatory cells as a novel target for HLA-G to prolong human kidney allograft survival[J]. *Hum Immunol*, 2023, 84(8):366-373.
- [23] YAN X H, DONG Q L, JIN G, et al. Effect of interleukin-17 gene on glomerular ultrastructure and podocyte injury in adriamycin nephropathy rat models[J]. *J Biol Regul Homeost Agents*, 2021, 35(3):1001-1010.
- [24] JIA X Y, ZHU Q Q, WANG Y Y, et al. (下转第 2319 页)

- 巩固中国成功遏制新型冠状病毒肺炎疫情的策略与挑战[J]. 英国医学杂志中文版, 2022, 25(4): 208-211.
- [3] 中华人民共和国国家卫生健康委员会. 新冠病毒疫苗接种情况[EB/OL]. (2022-11-24) [2022-11-29]. <http://www.nhc.gov.cn/xcs/yqjzqk/202211/6fb772a75ab24163ba0af83797e9582e.shtml>.
- [4] XIA S, ZHANG Y, WANG Y, et al. Safety and immunogenicity of an inactivated SARS-CoV-2 vaccine, BBIBP-CorV: a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 1/2 trial[J]. *Lancet Infect Dis*, 2021, 21(1): 39-51.
- [5] ZHANG Y, ZENG G, PAN H, et al. Safety, tolerability, and immunogenicity of an inactivated SARS-CoV-2 vaccine in healthy adults aged 18-59 years: a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 1/2 clinical trial[J]. *Lancet Infect Dis*, 2021, 21(2): 181-192.
- [6] 徐娜妮, 胡小伟, 郑琳, 等. 接种新型冠状病毒灭活疫苗血清抗体水平分析[J]. 预防医学, 2022, 34(1): 33-36.
- [7] 葛燕梅, 韩建香, 姬文莉, 等. SARS-CoV-2 疫苗接种成人血清 SARS-CoV-2 IgM 抗体、IgG 抗体和中和抗体水平分析[J]. 检验医学, 2022, 37(1): 47-50.
- [8] YU X, WEI D, XU W, et al. Neutralizing activity of BBIBP-CorV vaccine-elicited sera against beta, delta and other SARS-CoV-2 variants of concern[J]. *Nat Commun*, 2022, 13(1): 1788.
- [9] 中华人民共和国国家卫生健康委员会. 新冠病毒疫苗接种技术指南(第一版)[J]. 中华临床感染病杂志, 2021, 14(2): 89-90.
- [10] 中国国家卫生健康委员会. 新型冠状病毒肺炎诊疗方案(试行第九版)[J]. 国际流行病学传染病学杂志, 2022, 49(2): 73-80.
- [11] 邹辉鑫, 杜伟鹏, 闫彬, 等. 接种新型冠状病毒灭活疫苗后抗体水平变化分析[J]. 检验医学与临床, 2022, 19(15): 2059-2062.
- [12] 陈慧, 杨阳, 李伊, 等. 新型冠状病毒疫苗接种后血清 IgM/IgG 抗体与中和抗体水平相关性研究[J]. 国际病毒学杂志, 2022, 29(3): 234-237.
- [13] 马南兰, 张亚平, 韩红洋, 等. 接种新型冠状病毒灭活疫苗后的新型冠状病毒肺炎患者血抗体水平及病情分析[J]. 实用临床医药杂志, 2022, 26(3): 117-119.
- [14] 中华人民共和国国家卫生健康委员会. 关于印发对新型冠状病毒感染实施“乙类乙管”总体方案的通知[EB/OL]. (2022-12-26) [2023-02-17]. <http://www.nhc.gov.cn/xcs/zhengcwj/202212/e97e4c449d7a475794624b8ea12123c6.shtml>.
- [15] 孔筱筱, 张诗晗, 李志锋, 等. 基于微量中和试验的新冠感染者血清样本中和抗体高通量检测方法评价[J]. 中华实验和临床病毒学杂志, 2022, 36(3): 306-310.
- [16] KANEKO Y, SUGIYAMA A, TANAKA T, et al. The serological diversity of serum IgG/IgA/IgM against the SARS-CoV-2 nucleoprotein, spike, and receptor-binding domain and neutralizing antibodies in patients with COVID-19 in Japan[J]. *Health Sci Rep*, 2022, 5(3): e572.
- [17] ALHOSANI F I, STANCIOLE A E, ADEN B, et al. Impact of the Sinopharm's BBIBP-CorV vaccine in preventing hospital admissions and death in infected vaccinees: results from a retrospective study in the emirate of Abu Dhabi, United Arab Emirates (UAE)[J]. *Vaccine*, 2022, 40(13): 2003-2010.
- [18] 金来润, 李楚楚, 陈聪, 等. 新型冠状病毒自然感染病例和免疫突破病例及新型冠状病毒灭活疫苗免疫人群特异性 IgG 抗体的动态变化特征[J]. 中华预防医学杂志, 2022, 56(12): 1834-1837.
- [19] 徐娜妮, 胡小伟, 李海燕, 等. 新型冠状病毒灭活疫苗免疫后特异性抗体水平调查及影响因素分析[J]. 国际流行病学传染病学杂志, 2021, 48(6): 446-450.

(收稿日期: 2022-12-30 修回日期: 2023-05-22)

(上接第 2314 页)

- The role and clinical significance of programmed cell death-ligand 1 expressed on CD19(+) B-cells and subsets in systemic lupus erythematosus[J]. *Clin Immunol*, 2019, 198: 89-99.
- [25] WANG S, BAJORATH J, FLIES D B, et al. Molecular modeling and functional mapping of B7-H1 and B7-DC uncouple costimulatory function from PD-1 interaction[J]. *J Exp Med*, 2003, 197(9): 1083-1091.
- [26] PENG Q Q, ZENG P, JIANG X H, et al. Establishment of relapse risk model and multivariate logistic regression analysis on risk factors of relapse in children with primary nephrotic syndrome[J]. *Medicine (Baltimore)*, 2022, 101(29): e29866.
- [27] YU S M, HE J C. Aged glomeruli: a link between PD-1 and podocytes[J]. *J Clin Invest*, 2022, 132(16): e162330.
- [28] 李志辉, 夏团红, 段翠蓉, 等. 肾小球系膜区微量 IgM 沉积在儿童微小病变型肾病综合征中的意义[J]. 中国当代儿科杂志, 2015, 17(3): 222-226.
- [29] PACIC A, SENJUG P, BACALJA J, et al. IgM as a novel predictor of disease progression in secondary focal segmental glomerulosclerosis[J]. *Croat Med J*, 2017, 58(4): 281-291.
- [30] TRACHTMAN H, LASKOWSKI J, LEE C, et al. Natural antibody and complement activation characterize patients with idiopathic nephrotic syndrome[J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2021, 321(4): 505-516.

(收稿日期: 2022-12-20 修回日期: 2023-04-12)