

· 临床研究 ·

特发性膜性肾病与 M 型磷脂酶 A2 受体基因多态性的相关性

周广宇 孙延霞 周立祥 于晶 郭莹 尹敏

【摘要】 目的 研究 M 型磷脂酶 A2 受体 (PLA2R) 的基因多态性与中国东北汉族人群特发性膜性肾病 (IMN) 的相关性。方法 应用聚合酶链反应-限制性片段长度多态性 (PCR-RFLP) 技术检测 95 例 IMN 患者 (IMN 组) 及 232 例健康体检者 (HC 组) PLA2R 基因 rs35771982 和 rs3828323 两个位点的基因型和等位基因频率。结果 IMN 组和 HC 组间性别、体质指数 (BMI) 相匹配。IMN 组的平均年龄、Scr、总胆固醇 (TC) 和 24 h 尿蛋白量均显著高于 HC 组 (均 $P < 0.01$); 血清 Alb 和 eGFR 显著低于 HC 组 ($P < 0.01$)。IMN 组 rs35771982 位点 CC 基因型和 C 等位基因的频率均显著高于 HC 组 ($\chi^2 = 13.658, P = 0.001$; $\chi^2 = 15.315, P = 9.10 \times 10^{-5}$)。而两组间 rs3828323 位点基因型和等位基因频率的差异无统计学意义。rs35771982 位点 CC 基因型与年龄、性别、BMI、血压、血清 Alb、TC、Scr、eGFR 及 24 h 尿蛋白量等指标无相关性。rs35771982 位点基因型、年龄、TC、Scr 及 eGFR 与 IMN 的发病相关, rs35771982 位点的 CC 基因型是 IMN 的危险因素 ($OR = 4.408, 95\% CI 1.488 \sim 13.058$)。结论 中国汉族人群 PLA2R rs35771982 位点基因多态性可能与 IMN 易感性相关, 而 rs3828323 位点基因多态性与 IMN 无相关。rs35771982 位点 CC 基因型是 IMN 的危险因素。

【关键词】 肾小球肾炎, 膜性; 受体, M 型磷脂酶 A2; 多态性, 单核苷酸

Correlation of M-type phospholipase A2 receptor genetic polymorphism with idiopathic

membranous nephropathy ZHOU Guang-yu, SUN Yan-xia, ZHOU Li-xiang, YU Jing, GUO Ying, YIN Min. Department of Nephrology, China-Japan Union Hospital, Jilin University, Changchun 130033, China

【Abstract】 **Objective** To investigate the correlation of M-type phospholipase A2 receptor (PLA2R) genetic polymorphism in two single nucleotide polymorphisms (SNPs) with idiopathic membranous nephropathy (IMN) of Chinese Han population in Northeast China. **Methods** A total of 327 individuals were enrolled in the study including 95 adult patients with biopsy-proved IMN (IMN group) followed up for (25.4±11.6) months and 232 healthy people identified by healthy examination in China-Japan Union Hospital of Jilin University (HC group). Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) was used to detect the genotype and allele frequency of rs35771982 and rs3828323 site in PLA2R gene. The χ^2 test was performed to compare the distribution difference of allelic frequency and genotype frequency of the two sites in PLA2R gene between two groups. Unconditional Logistic regression analysis was used to determine the risk factor of IMN. **Results** IMN and HC group were matched in male predominance and body mass index (BMI). Patients with IMN were older than the healthy controls and had higher Scr, serum total cholesterol (TC), 24-hour urine protein level and lower serum albumin (Alb) level, lower estimated glomerular filtration

DOI: 10.3760/cma.j.issn.1001-7097.2013.01.001

基金项目: 吉林省科技厅国际科技合作项目 (20100738); 吉林大学基本科研业务费项目——科学前沿与交叉学科创新项目 (2011.01-2012.12); 吉林大学与日本北里大学校际交流项目 (2011.01-2012.01)

作者单位: 130033 长春, 吉林大学中日联谊医院肾病内科 (周广宇、于晶、郭莹、尹敏), 血液科 (孙延霞); 吉林大学第一医院神经创伤外科 (周立祥)

rate (eGFR) than the healthy controls (all $P < 0.01$). The CC genotype frequency and the C allele frequency at SNP rs35771982 site of PLA2R gene in IMN group were significantly higher than those in HC group ($\chi^2 = 13.658$, $P = 0.001$; $\chi^2 = 15.315$, $P = 9.10 \times 10^{-5}$), whereas there was no distribution difference of genotype and allele frequency at rs3828323 site between two groups ($\chi^2 = 2.844$, $P = 0.241$; $\chi^2 = 2.959$, $P = 0.085$). The CC genotype at rs35771982 site in patients with IMN was not related to age, gender, BMI, blood pressure and several laboratory indexes such as Alb, TC, Scr, eGFR and 24-hour urine protein level (all $P > 0.05$). Unconditional Logistic regression analysis revealed that the genotype at rs35771982, age, TC, Scr and eGFR were correlated with IMN occurrence. The CC genotype at rs35771982 was the risk factor of IMN ($OR = 4.408$, 95%CI 1.488-13.058). **Conclusions**

The CC genotype and C allele at rs35771982 site in PLA2R may be associated with the susceptibility to IMN, whereas the correlation between gene polymorphism at rs3828323 site and IMN is not demonstrated. The CC genotype at rs35771982 is the independent risk factor of IMN in Chinese Han population in Northeast China.

【Key words】 Glomerulonephritis, membranous; Receptor, M - type phospholipase A2; Polymorphism, single nucleotide

特发性膜性肾病(IMN)是成人原发性肾小球疾病的常见病理类型之一,占成人原发性肾病综合征(NS)的25%~40%^[1];在我国东北地区IMN占原发性肾小球疾病的11%,而≥60岁的老年人中IMN发病率上升至23.8%^[2]。其临床表现轻重不一,预后差别也较大,部分病例可自发缓解,近半数患者最终进入慢性肾衰竭^[3]。近年在IMN患者血循环中检测到M型磷脂酶A2受体(M-type phospholipase A2 receptor, PLA2R)的自身抗体,并且其滴度与患者尿蛋白的消长有一定的相关性,表明PLA2R可能是IMN重要的靶抗原^[4]。磷脂酶A2受体基因和PLA2R基因多态性与IMN发病密切相关^[5-7]。本研究探讨中国东北汉族人群PLA2R基因多态性与IMN的关系。

对象和方法

一、研究对象

选取本科2007年1月至2012年5月经肾活检证实的成人IMN患者95例(IMN组)及性别匹配的健康体检者232例(健康对照组,HC组),所有受试者均为中国汉族人,均无血缘关系。(1)IMN组:95例,其中男58例、女37例;平均年龄(52.2±7.2)岁;平均病程(4.7±3.6)个月;平均随访时间(25.4±11.6)个月;均行肾活检组织光镜、免疫荧光、电镜病理检查。排除标准:狼疮肾炎、肿瘤相关性膜性肾病、乙肝相关性膜性肾病、药物性膜性肾病等继发性膜性肾病;妊娠或哺乳妇女;心、

脑、肝和造血系统等严重原发性疾病;重症感染;大手术及严重外伤者。随访过程定期复查Scr,以Scr升高1倍以上、进展为终末期肾病(ESRD)或死亡为观察的终点事件。(2)健康对照组:232例,其中男141例、女91例;平均年龄(31.5±5.7)岁,无高血压、糖尿病及肾脏疾病。

二、方法

1. 临床及实验室检查:年龄、性别、身高、体重质量指数(BMI)、血压等和血清白蛋白(Alb)、血清总胆固醇(TC)、Scr、24 h尿蛋白量、估算的肾小球滤过率(eGFR)等指标。分别应用溴钾酚紫法检测Alb,胆固醇酶法检测TC,苦味酸法检测Scr,考马斯亮蓝法检测24 h尿蛋白量。按Cockcroft-Gault公式估算eGFR。

2. DNA提取:采外周静脉血2 ml,5% EDTA抗凝,按照DNA提取试剂盒(美国Qiagen)说明书,从外周血白细胞中提取DNA,标本置-20℃保存。

3. PLA2R基因多态性检测:应用PCR-限制性片段长度多态性分析技术(PCR-RFLP)检测PLA2R基因外显子区两个位点的单核苷酸多态性(SNP)。根据文献[5]及SNP数据库检索,选择位于人类PLA2R基因(gene ID:22925)第5号外显子区的rs35771982和第22号外显子区的rs3828323两个位点。根据PLA2R基因的核苷酸序列分别设计扩增引物,由日本TaKaRa公司合成。rs35771982:上游引物5'-CGCTGTTAAGTATTACAGATGAACTG-3',下游引物5'-ATTTACCTCTGGCTCCAATTC-3',扩增长度为167 bp。rs3828323:

上游引物 5'-CTGGA AAAATGGTATTTTGAAGAC-3', 下游引物 5'-TGTAAGTTCTGTTTCCATATTCTAAG-3', 扩增长度为 144 bp。PCR 反应条件: 95℃ 预变性 10 min, 95℃ 变性 1 min, 49℃ 退火 1.5 min, 72℃ 延伸 3 min, 40 个循环, 72℃ 延伸 10 min。分别应用限制性内切酶 BbsI 和 HpyCH4III 酶切 rs35771982 位点和 rs3828323 位点的 PCR 扩增产物, 37℃ 过夜, 3.5% 琼脂糖凝胶电泳, 凝胶成像分析系统观察扩增条带并记录基因型条带。

4. 统计学分析: 计算样本基因型频率, 确认其符合 Hardy-Weinberg 平衡。计量资料正态分布数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 非正态分布数据以中位数(全距)表示, 计数资料以百分率表示。分别采用 χ^2 检验分析两组间 PLA2R 基因型频率和等位基因频率分布的差异, 并对上述遗传分析结果采用 Bonferroni 多重比较校正, 显著性水平为单位点 α 值/位点数, 即 $P < 0.025 (0.05/2)$ 被认为差异有统计学意义。两组间临床参数的计量资料比较采用 t 检验, 计数资料比较采用 χ^2 检验。IMN 的危险因素分析采用非条件 Logistic 二元回归。应用 Kaplan-Meier 生存曲线分析肾存活率, 通过时序检验(Log rank test)。用 SPSS 16.0 软件进行统计学分析。

结 果

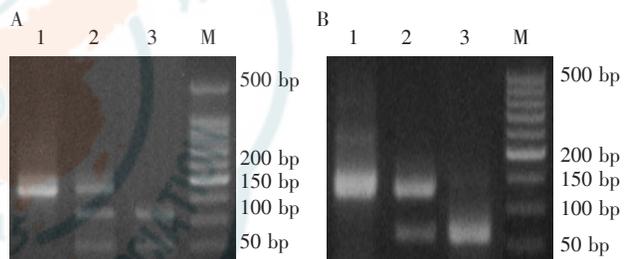
1. 临床资料: IMN 组和 HC 组两组间的性别及 BMI 相匹配。IMN 组的平均年龄显著高于 HC 组 ($P < 0.01$); 收缩压显著高于 HC 组 ($P < 0.05$); 血清 Alb、eGFR 均显著低于 HC 组 (均 $P < 0.01$), 而 Scr、TC、24 h 尿蛋白量均显著高于 HC 组 (均 $P < 0.01$)。两组间舒张压的差异无统计学意义。见表 1。

2. PLA2R 基因两个位点的基因型分析: PLA2R 基因 rs35771982 位点存在 G-C 基因突变, 基因型具有多态性, 包括野生型 GG、杂合突变 CG 和纯合突变 CC。从基因组 DNA 扩增出含 rs35771982 位点的片段长度为 167 bp, 经限制性内切酶 BbsI 酶切后, 可检测到 3 种基因型: GG 基因型(167 bp)、CG 基因型(167 bp、116 bp 和 51 bp)、CC 基因型(116 bp、51 bp), 见图 1。PLA₂R 基因 rs3828323 位点存在 C-T 基因突变, 基因型具有多态性, 包括野生型 CC、杂合突变 CT 和纯合突变

表 1 两组的临床资料 ($\bar{x} \pm s$)

项目	IMN 组	HC 组
例数	95	232
年龄(岁)	52.22±7.19 ^b	31.45±5.71
男/女	58/37	141/91
BMI(kg/m ²)	22.9±1.0	22.7±1.0
收缩压(mm Hg)	139.9±18.7 ^a	121.7±13.4
舒张压(mm Hg)	81.2±11.4	74.6±9.6
eGFR	45.89±17.73 ^b	81.57±17.22
Scr(μmol/L)	104.01±65.98 ^b	67.44±11.10
Alb(g/L)	24.18±3.24 ^b	43.55±2.54
TC(mmol/L)	7.76±1.25 ^b	4.05±0.90
24 h 尿蛋白量[g, M(全距)]	5.32(3.50~9.08) ^b	0.06(0.01~0.27)

注: eGFR 单位: ml·min⁻¹·(1.73 m²)⁻¹; 与 HC 组比较, ^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$



注: A: rs35771982 位点基因多态性[M: 50 bp DNA 标志; 1: GG 基因型(167 bp); 2: CG 基因型(167 bp、116 bp 和 51 bp); 3: CC 基因型(116 bp、51 bp)]; B: rs3828323 位点基因多态性[M: 50 bp DNA 标志; 1: CC 基因型(144 bp); 2: CT 基因型(144 bp、75 bp 和 69 bp); 3: TT 基因型(75 bp、69 bp)]; 因 75 bp 和 69 bp 位置接近, 电泳图显示两条条带重合]

图 1 PLA2R 基因 rs35771982 和 rs3828323 两位点基因多态性 (PCR-RFLP)

TT。从基因组 DNA 扩增出含 rs3828323 位点的片段长度为 144 bp, 经限制性内切酶 HpyCH4III 酶切后, 可检测到 3 种基因型: CC 基因型(144 bp)、CT 基因型(144 bp、75 bp 和 69 bp)、TT 基因型(75 bp、69 bp), 见图 1。

3. PLA2R 基因两个位点基因型及等位基因频率分布的比较: 分别对 PLA2R 基因 rs35771982 和 rs3828323 位点基因型分布进行 Hardy-Weinberg 平衡检验, 结果符合遗传平衡定律 ($P > 0.05$)。rs35771982 位点中, IMN 组 CC 基因型和 C 等位基因的频率均显著高于 HC 组 ($\chi^2 = 13.658, P = 0.001$; $\chi^2 = 15.315, P = 9.10 \times 10^{-5}$)。经 Bonferroni 校

表 2 两组 PLA2R 基因 rs35771982 位点的基因型及等位基因频率分布的比较[n(%)]

组别	例数	基因型		等位基因	
		CC	GG+CG	C	G
IMN	95	67(70.5%)	28(29.5%)	158(83.2%)	32(16.8%)
HC	232	114(49.1%)	118(50.9%)	316(68.1%)	148(31.9%)

表 3 两组 PLA2R 基因 rs3828323 位点的基因型及等位基因频率分布的比较[n(%)]

组别	例数	基因型		等位基因	
		TT	CC+CT	T	C
IMN	95	5(5.3%)	90(94.7%)	42(22.1%)	148(77.9%)
HC	232	21(9.1%)	211(90.9%)	133(28.7%)	331(71.3%)

正后,上述差异仍具有统计学意义。见表 2。而 rs3828323 位点两组的基因型和等位基因频率分布的差异均无统计学意义($\chi^2 = 2.844, P = 0.241, \chi^2 = 2.959, P = 0.085$),见表 3。

4. PLA2R 基因 rs35771982 位点 CC 基因型与 IMN 临床特点的相关性: 95 例 IMN 患者中, CC 基因型 67 例, GG+CG 基因型 28 例, 两基因型组间年龄、性别、BMI、血压、血清 Alb、TC、Scr、eGFR 及 24 h 尿蛋白量等指标的差异均无统计学意义。

5. PLA2R 基因 rs35771982 位点 CC 基因型与 IMN 病理分期的相关性: 根据肾病理电镜改变, 按 Ehrenreich-Churg 的 I ~ IV 期分期标准对 95 例 IMN 患者进行病理分期: I - II 期 33 例, II 期 27 例, II - III 期 18 例, III 期 10 例, III - IV 期 7 例。结果显示 PLA2R 基因 rs35771982 位点 CC 基因型与 GG + CG 基因型两组间, 病理分期差异无统计学意义。

6. PLA2R 基因 rs35771982 位点 CC 基因型与蛋白尿缓解的相关性: 67 例 CC 基因型组最后 1 次随访的尿蛋白量为 5.07 (3.50 ~ 7.91) g/d; 28 例 GG+CG 基因型组最后 1 次随访的尿蛋白量为 5.30 (3.52 ~ 9.08) g/d, 两组随访时尿蛋白量的差异无统计学意义。

7. PLA2R 基因 rs35771982 位点 CC 基因型与肾存活率的相关性: 应用 Kaplan-Meier 生存分析曲线, 以 Scr 升高 1 倍以上, 或进展为 ESRD, 或死亡为终点, 比较 rs35771982 位点 CC 基因型 67 例 IMN 患者和非 CC 基因型 28 例 IMN 患者的肾存活率。结果显示 CC 基因型患者 1、2、3 年的无事件肾存活率分别为 99.0%、92.5%、82.1%; 非 CC 基因型患者 1、2、3 年的无事件肾存活率分别为

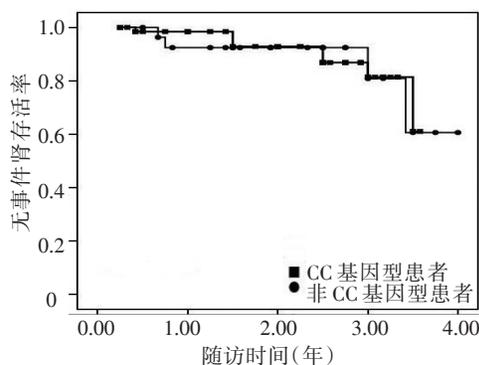


图 2 rs35771982 位点 CC 基因型和非 CC 基因型的 IMN 患者肾存活率的比较

92.5%、92.5%、82.1%。两组肾存活率的差异无统计学意义。见图 2。

8. IMN 的危险因素分析: 以 IMN 为应变量, 选择基因型、年龄、血压、血清 Alb、TC、eGFR 及 24 h 尿蛋白量等指标为自变量分别进行单因素非条件 Logistic 二元回归分析, 结果显示 rs35771982 位点的基因型、年龄、TC、eGFR 与 IMN 的发病密切相关; rs35771982 位点的 CC 基因型的优势比 (OR) = 4.408, 95%CI 1.488 ~ 13.058。见表 4。多因素分析显示, 校正年龄、TC 及 eGFR 后, rs35771982 位点的 CC 基因型的 B 值为 2.855, Wald 值为 6.205, OR = 17.382, 95%CI 1.838 ~ 164.374。

表 4 IMN 危险因素二元回归分析

自变量	B 值	Wald 值	OR 值	95% CI
rs35771982 位点的 CC 基因型	1.483	7.167	4.408	1.488~13.058
年龄	0.391	59.140	1.479	1.339~1.634
TC	3.666	28.340	39.083	10.136~150.699
eGFR	-0.108	91.466	0.897	0.878~0.917

讨 论

PLA2R 是相对分子质量为 185 000 的 I 型跨膜蛋白, 主要表达于人类肾小球的足细胞上, 通过与其配体可溶性磷脂酶 A2 结合, 参与诱导细胞增殖、细胞黏附、脂类介质的产生和花生四烯酸的释放^[8-9]。PLA2R 分子由富含半胱氨酸的 N-末端区、纤连蛋白样 II 型结构域、8 个连续排列的 C 型凝集素样结构域 (C - type lectin domains, CTLD)、1 个独特的跨膜部分和 1 个短 C-末端胞质尾区等结构组成^[8]。CTLD 与糖基结构识别域 (carbohydrate-recognition domains, CRD) 具有同源

性,可参与细胞外基质的合成、细胞内吞作用、补体的活化、识别病原体以及细胞间相互作用等多种功能^[8,10-11]。Beck 等^[4]发现 IMN 患者的 PLA2R 抗体特异性识别 PLA2R 中易被还原的表位,提示 PLA2R 只有发生分子结构改变才暴露抗原表位,刺激机体产生自身抗体,导致 PLA2R 抗原表位与 PLA2R 自身抗体结合。因此我们推测 PLA2R 的基因突变引起氨基酸改变,导致 PLA2R 分子 CTLD 区域结构的变化,从而暴露 PLA2R 的抗原表位,刺激机体产生特异性自身抗体,导致 IMN 的自身免疫发病。

PLA2R 基因存在许多单核苷酸多态性位点,rs35771982 和 rs3828323 是编码 CTLD 结构域基因的两个位点。其中 rs35771982 位于 PLA2R 基因的第 5 号外显子区,该位点存在 G-C 基因突变导致组氨酸被天冬氨酸替代,rs3828323 位于第 22 号外显子区,该位点存在 C-T 基因突变导致甘氨酸被丝氨酸替代。rs35771982 和 rs3828323 的基因多态性可能与 IMN 的易感性相关^[5-6]。本研究显示中国东北地区汉族人群 PLA2R 基因的 rs35771982 位点存在等位基因 G 和 C,健康体检者和 IMN 患者均以纯合突变的 CC 基因型多见,分别占 49.1% 和 70.5%,其次为 CG 基因型,分别占健康体检者和 IMN 患者的 37.9% 和 25.3%,而 GG 基因型仅占 12.9% 和 4.2%。IMN 患者 rs35771982 位点 CC 基因型和 C 等位基因的频率均显著高于健康体检者,与报道相符^[5-6],表明 PLA2R rs35771982 位点的基因多态性与 IMN 的发病密切相关。此外,本研究结果显示,IMN 组与健康对照组 rs3828323 位点基因型和等位基因频率的差异无统计学意义,与 Kim 等^[5]的报道不一致,其研究对象为韩国人群,原因有待探讨。

非条件 Logistic 二元回归分析显示,rs35771982 位点基因型、年龄、TC、eGFR 与 IMN 的发病密切相关;多因素校正年龄、TC 及 eGFR 后,rs35771982 位点的 CC 基因型仍与 IMN 密切相关,故我们认为 rs35771982 位点的 CC 基因型是 IMN 发病的独立危险因素,与韩国人群和中国台湾人群的结果相符^[5-6]。进一步分析显示 rs35771982 位点 CC 基因型与年龄、性别、BMI、血压、血清 Alb、TC、Scr、eGFR、24 h 尿蛋白量等指标,及病理分期等均无相关,且与随访时蛋白尿缓解也不相关,提示 CC 基因型可能与 IMN 的发病年龄、病情、病

理分期及治疗后病情缓解无相关。Kaplan-Meier 生存分析曲线结果显示,CC 基因型和非 CC 基因型患者肾存活率的差异无统计学意义,提示 CC 基因型与膜性肾病的肾衰竭进展无相关,也与报道相符^[5-6]。

综上所述,中国东北汉族人群 PLA2R rs35771982 位点基因多态性可能与 IMN 易感性相关,而 rs3828323 位点基因多态性与 IMN 无相关;rs35771982 位点 CC 基因型和 C 等位基因是 IMN 的独立危险因素。本研究将为寻找防治 IMN 的基因靶点提供理论依据。

参 考 文 献

- [1] Wasserstein AG. Membranous glomerulonephritis. *J Am Soc Nephrol*, 1997, 8: 664-674.
- [2] Wu YQ, Wang Z, Xu HF, et al. Frequency of primary glomerular disease in northeastern China. *Braz J Med Biol Res*, 2011, 44: 810-813.
- [3] Ponticelli C. Membranous nephropathy. *J Nephrol*, 2007, 20: 268-287.
- [4] Beck LH Jr, Bonogio RG, Lambeau G, et al. M - type phospholipase A2 receptor as target antigen in idiopathic membranous nephropathy. *N Engl J Med*, 2009, 361: 11-21.
- [5] Kim S, Chin HJ, Na KY, et al. Single nucleotide polymorphisms in the phospholipase A2 receptor gene are associated with genetic susceptibility to idiopathic membranous nephropathy. *Nephron Clin Pract*, 2011, 117: c253-c258.
- [6] Liu YH, Chen CH, Chen SY, et al. Association of phospholipase A2 receptor 1 polymorphisms with idiopathic membranous nephropathy in Chinese patients in Taiwan. *J Biomed Sci*, 2010, 17: 81.
- [7] Stanescu HC, Arcos -Burgos M, Medlar A, et al. Risk HLA - DQA1 and PLA(2)R1 alleles in idiopathic membranous nephropathy. *N Engl J Med*, 2011, 364: 616-626.
- [8] Lambeau G, Lazdunski M. Receptors for a growing family of secreted phospholipases A2. *Trends Pharmacol Sci*, 1999, 20: 162-170.
- [9] Hanasaki K. Mammalian phospholipase A2: phospholipase A2 receptor. *Biol Pharm Bull*, 2004, 27: 1165-1167.
- [10] Weis WI, Taylor ME, Drickamer K. The C - type lectin superfamily in the immune system. *Immunol Rev*, 1998, 163: 19-34.
- [11] Day AJ. The C - type carbohydrate recognition domain (CRD) superfamily. *Biochem Soc Trans*, 1994, 22: 83-88.

(收稿日期:2012-07-15)

(本文编辑:李耀荣)