

# 磷脂酶 A2 受体及 1 型血小板反应蛋白 7A 域在特发性膜性肾病中的表达及意义

李菲 高丽芳 牛丹 郝敏 申宁宁 王利华 王晨

030001 太原,山西医科大学第二医院病理科/山西省肾脏病研究所肾脏病理中心(李菲,高丽芳,牛丹,郝敏,申宁宁,王晨);030001 太原,山西医科大学(李菲,牛丹,郝敏,王利华)

**【摘要】 目的** 探讨磷脂酶 A2 受体(phospholipase A2 receptor, PLA2R)和 1 型血小板反应蛋白 7A 域(thrombospondin type-1 domain-containing 7A, THSD7A)在特发性膜性肾病(idiopathic membranous nephropathy, IMN)的表达及意义。**方法** 免疫组织化学法检测 MN 患者肾组织 PLA2R(G-PLA2R)和肾组织 THSD7A(G-THSD7A)的表达,同时应用酶联免疫吸附法检测血清 PLA2R(S-PLA2R)及血清 THSD7A(S-THSD7A)的水平,评价二者在 IMN 的诊断价值。**结果** 纳入的 153 例 IMN 患者的 G-PLA2R 阳性率为 56.2%,G-PLA2R 阳性组的 IgG4 阳性率为 69.8%;G-THSD7A 阳性率为 4.6%,G-THSD7A 阳性组的 IgG4 阳性率为 85.7%。进行血清抗体检测的 36 例 IMN 患者中 S-PLA2R、S-THSD7A 阳性率分别为 69.4%、5.6%。采用 G-PLA2R、G-THSD7A、G-PLA2R + IgG4、G-THSD7A + IgG4 诊断 IMN 的灵敏度分别为 56.2%、4.6%、39.2%、3.9%,特异度分别为 65.2%、100%、78.3%、100%。**结论** G-PLA2R 和 S-PLA2R 在 IMN 患者中均有一定的阳性表达率,为 IMN 的特异性诊断指标,且与肾组织中 IgG4 联合检测可提高诊断特异度;G-THSD7A 和 S-THSD7A 在 IMN 患者中的表达率很低,可作为 IMN 补充的特异性诊断指标。

**【关键词】** 特发性膜性肾病;磷脂酶 A2 受体;1 型血小板反应蛋白 7A 域

DOI:10.3969/j.issn.1671-2390.2019.07.008

**Expression and significance of phospholipase A2 receptor and thrombospondin type-1 domain 7A in idiopathic membranous nephropathy** LI Fei, GAO Li-fang, NIU Dan, HAO Min, SHEN Ning-ning, WANG Li-hua, WANG Chen. Department of Pathology, Second Hospital of Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, China

Corresponding author: WANG Chen, E-mail: wangchen8877322@163.com

**【Abstract】 Objective** To investigate expression and significance of phospholipase A2 receptor (PLA2R) and thrombospondin type-1 domain 7A (THSD7A) in idiopathic membranous nephropathy (IMN). **Methods** Immunohistochemistry was used to detect the expression of glomerular phospholipase A2 receptor (G-PLA2R) and glomerular thrombospondin type-1 domain 7A (G-THSD7A) in the renal tissue in MN patients, and serum PLA2R (S-PLA2R) and serum thrombospondin type-1 domain 7A (S-THSD7A) levels were detected with enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) so as to evaluate the diagnostic value for IMN. **Results** The positive expression rate of G-PLA2R in 153 IMN patients included in this study was 56.2%, the positive rate of IgG4 in the G-PLA2R positive group was 69.8%; the positive expression rate of G-

THSD7A was 4.6%, and the positive rate of IgG4 in the G-THSD7A positive group was 85.7%. Detection of serum S-PLA2R and S-THSD7A in 36 IMN patients showed that the positive rates of S-PLA2R and S-THSD7A were 69.4% and 5.6% respectively. The sensitivity values of G-PLA2R, G-THSD7A, G-PLA2R + IgG4, and G-THSD7A + IgG4 for the diagnosis of IMN were 56.2%, 4.6%, 39.2%, and 3.9%, respectively; and the specificity values were 65.2%, 100%, 78.3%, and 100%, respectively. **Conclusions** Glomerular PLA2R and serum PLA2R have a certain positive expression rate in IMN patients, and are specific diagnostic indices for IMN. Its combination with glomerular IgG4 can improve the diagnostic specificity. The expression rates of glomerular THSD7A and serum THSD7A are very low in IMN patients, and can be used as specific and supplementary diagnostic indicators for IMN.

**【Key words】** Idiopathic membranous nephropathy; Phospholipase A2 receptor type 1; Thrombospondin type 1 domain 7A

膜性肾病(membranous nephropathy, MN)是成年人肾病综合征最为常见的病理类型之一,其在慢性肾脏病中的发病率逐年上升,多见于中老年患者,我中心于 2016 年统计的 10 余年肾活检病理分型数据提示 MN 增幅明显, MN 在肾活检患者中的占比由 1996~2005 年的 7.96% 增长至 2006~2015 年的 21.52%<sup>[1]</sup>。MN 按病因及病理特征分为特发性膜性肾病(idiopathic membranous nephropathy, IMN)、继发性膜性肾病(secondary membranous nephropathy, SMN)和不典型膜性肾病(undetermined atypical membranous nephropathy, UAMN)。其中 SMN 是指有明确的 MN 继发原因,如系统性红斑狼疮(systemic lupus erythematosus, SLE)、乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)感染、恶性肿瘤、毒物或药物等。而 UAMN 是指部分病理特征与 SMN 相似,部分临床特征与 IMN 相似,但又无法明确诊断的一类 MN。自 2009 年 Beck 等<sup>[2]</sup>发现磷脂酶 A2 受体(phospholipase A2 receptor, PLA2R)可以作为成年人 IMN 的主要靶抗原,随后又发现抗 PLA2R 抗体可以用于诊断 IMN 且可监测治疗反应及预测疾病复发<sup>[3]</sup>,成为了 MN 研究领域的热点。Tomas 等<sup>[4]</sup>于 2014 年将 1 型血小板反应蛋白 7A 域(thrombospondin type-1 domain-containing 7A, THSD7A)确定为成人 MN 的第二个靶抗原,其在 MN 中的阳性率为 2.5%~5%,但因其阳性率较低,故还需更大样本和多中心试验的验证。本研究选取山西医科大学第二医院确诊为 MN 的患者,观察 MN 患者肾组织 PLA2R(G-PLA2R)和肾组织 THSD7A(G-THSD7A)及血清 PLA2R(S-PLA2R)和血清 THSD7A(S-THSD7A)的表达情况,探讨 PLA2R、THSD7A 对 IMN 的诊断价值及意义。

## 资料与方法

### 一、研究对象

纳入 2017 年 2 月至 2017 年 10 月于山西医科大学第二医院肾脏病研究所肾脏病理中心确诊为 MN 的患者 176 例。纳入标准:①年龄 ≥ 18 周岁,性别不限;②经临床、病理确诊为 MN;③肾活检前无免疫抑制治疗方案(包括激素和/或免疫抑制剂及静脉注射人免疫球蛋白)的治疗史,以及无规律血管紧张素受体拮抗剂(ARB)或血管紧张素转化酶抑制剂(ACEI)类药物应用史。排除标准:①eGFR ≤ 30 mL · min<sup>-1</sup> · (1.73 m<sup>2</sup>)<sup>-1</sup> 或已进入透析的患者;②乙、丙型肝炎病毒导致的肝硬化、消化道出血的患者。所有患者均签署肾活检知情同意书及遵循的程序符合伦理学要求,并经本院伦理委员会批准。

本研究纳入的 176 例 MN 患者,按病因及病理特征分为 3 组:(1)IMN 组 153 例(86.9%),其中 I 期 IMN 35 例,II 期 IMN 113 例,III 期 IMN 5 例;(2)SMN 组 4 例(2.3%),且均为 V 型膜性狼疮性肾炎(V lupus nephritis, LN-V);(3)UAMN 组 19 例(10.8%)。

### 二、研究方法

1. 资料收集 收集患者的年龄、性别、血压、病史、肾穿刺活检病理等临床资料,并收集患者的血肌酐(Scr)、24 h 尿蛋白定量(24 h UPro)、血清白蛋白(Alb)、估计肾小球滤过率(eGFR, CKD-EPI 公式)、尿素氮(BUN)、三酰甘油(TG)、总胆固醇(TC)、胱抑素 C(Cys C)、 $\alpha_1$  微球蛋白( $\alpha_1$ -MG)、 $\beta_2$  微球蛋白( $\beta_2$ -MG)、镜下血尿、血清补体(C3, C4)、ANA、dsDNA、ANCA 系列等实验室检查指标。

2. 肾组织 PLA2R、THSD7A 及 IgG 亚型表达的检测和判读 采用免疫组织化学实验检测肾组织 PLA2R、THSD7A 及 IgG 亚型的表达,按照 Envision 二步法进行。

肾组织 PLA2R、THSD7A 及 IgG 亚型表达的判读评分是由两名对临床数据不知情的专业病理医师分别审阅。在正常肾组织中,PLA2R 在肾小球足细胞上的表达非常弱,在本研究中被判定为阴性,G-PLA2R 沿着毛细血管祥的细颗粒状沉积则判定为阳性<sup>[5]</sup>。G-THSD7A 阳性为沿着肾小球毛细血管祥呈现细颗粒状沉积,足细胞上无细颗粒状沉积的非特异性染色判定为阴性<sup>[6]</sup>。半定量法评定 IgG 亚型免疫组织化学染色强度,由阴性到最强,计为 0 到 3+,变化量为 0.5+<sup>[7]</sup>。

3. 血清 PLA2R-Ab 及 THSD7A-Ab 定量检测 血清标本均来自本院生物样本库,并将血清储存于 -80℃ 冰箱,共调取到实验可用血清 41 例(36 例 IMN 患者,5 例 UAMN 患者),每份血清均避免反复冻融。采用间接法酶联免疫吸附试验对血清 PLA2R-Ab 及 THSD7A-Ab 水平进行定量检测。实验操作步骤严格根据试剂盒说明书进行,且每份血清标本均做复孔,加入的酶结合物不能触碰较高的孔壁,避免假阳性及假阴性。

### 三、统计学处理

采用 SPSS 13.0 软件进行统计分析。计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,组间比较采用 *t* 检验。计数资料以发生率(构成比)表示,组间比较采用  $\chi^2$  检验。运用灵敏度、特异度、ROC 曲线评价 PLA2R、IgG4、THSD7A 对 IMN 鉴别诊断的价值。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 结 果

一、176 例 MN 患者肾组织中 PLA2R、THSD7A、IgG 亚型的表达

IMN 组、SMN 组和 UAMN 组患者肾组织中 PLA2R、THSD7A、IgG 亚型的阳性率见表 1。IMN 组 G-PLA2R 阳性率达 56.2%,明显高于

SMN 组和 UAMN 组,但 3 组比较差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。IMN 组以 G-IgG4(+)表达为主,伴有或不伴有不同比例的 IgG1、IgG2、IgG3 沉积,其表达率高于 SMN 组和 UAMN 组,3 组比较差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。153 例 IMN 患者中,G-PLA2R 阳性组的 IgG4 阳性率为 69.8%(表 2),G-THSD7A 阳性组的 IgG4 阳性率为 85.7%(表 3)。

二、MN 患者血清 PLA2R、THSD7A 抗体检测结果

36 例 IMN 患者血清 PLA2R、THSD7A 自身抗体的表达水平见表 4。结果显示,仅 1 例 IMN 患者为 G-PLA2R、G-THSD7A 表达双阳性,且 S-PLA2R 表达阳性,S-THSD7A 表达阴性。IMN 患者 G-PLA2R 表达率高于 S-PLA2R 阳性率(72.2% vs 69.4%, $P > 0.05$ )。G-THSD7A 抗原表达率与 S-THSD7A 阳性率持平(5.6% vs 5.6%, $P > 0.05$ )。

在 5 例 UAMN 中,G-PLA2R 及 S-PLA2R 表达阳性率均为 40.0%,G-THSD7A 和 S-THSD7A 表达均为阴性。

三、联合检测肾组织中 PLA2R、THSD7A 与 IgG4 的表达对 IMN 的诊断价值评估

评价肾组织中 IgG4、PLA2R 及二者联合检测在 IMN 中的诊断价值,其灵敏度分别为 72.5%、56.2%、39.2%,特异度分别为 47.8%、65.2%、78.3%,ROC 曲线下面积分别为 0.552(95%CI 0.475~0.627)、0.607(95%CI 0.531~0.680)、0.513(95%CI 0.436~0.589),两两比较无统计学差异( $P > 0.05$ )。(图 1)

评价肾组织中 IgG4、THSD7A 及二者联合检测在 IMN 中的诊断价值,灵敏度分别为 72.5%、4.6%、3.9%,特异度分别为 47.8%、100%、100%,ROC 曲线下面积分别为 0.552(95%CI 0.475~0.627)、0.523(95%CI 0.446~0.599)、0.52(95%CI 0.443~0.595),两两比较无统计学差异( $P > 0.05$ )。(图 2)

表 1 176 例 MN 患者肾组织中 PLA2R、THSD7A、IgG 各亚型阳性率比较

组别	总例数	男(例)	女(例)	IgG1[例(%)]	IgG2[例(%)]	IgG3[例(%)]	IgG4[例(%)]	PLA2R[例(%)]	THSD7A[例(%)]
IN	153	95	58	32(20.9)	56(36.6)	31(20.3)	111(72.5)	86(56.2)	7(4.6)
SMN	4	0	4	0(0)	2(50.0)	1(25.0)	1(25.0)	0(0)	0(0)
UAMN	19	11	8	7(36.8)	8(42.1)	6(31.6)	10(52.6)	7(36.8)	0(0)
$\chi^2$ 值				3.630	0.489	1.299	6.893	3.853	
<i>P</i> 值				0.163	0.783	0.522	0.032	0.144	

表2 153例IMN患者肾组织中IgG4及PLA2R表达情况(例)

IgG4	PLA2R		合计
	阳性(+)	阴性(-)	
阳性(+)	60	51	111
阴性(-)	26	16	42
合计	86	67	153

表3 153例IMN患者肾组织中IgG4及THSD7A表达情况(例)

IgG4	THSD7A		合计
	阳性(+)	阴性(-)	
阳性(+)	6	105	111
阴性(-)	1	41	42
合计	7	146	153

表4 36例IMN患者G-PLA2R、G-THSD7A、S-PLA2R、S-THSD7A的表达情况(例)

肾组织 血清	PLA2R+ THSD7A- (n=25)	PLA2R- THSD7A+ (n=1)	PLA2R+ THSD7A+ (n=1)	PLA2R- THSD7A- (n=9)
	PLA2R+ THSD7A-	18	0	1
PLA2R- THSD7A+	0	0	0	2
PLA2R+ THSD7A+	0	0	0	0
PLA2R- THSD7A-	7	1	0	3

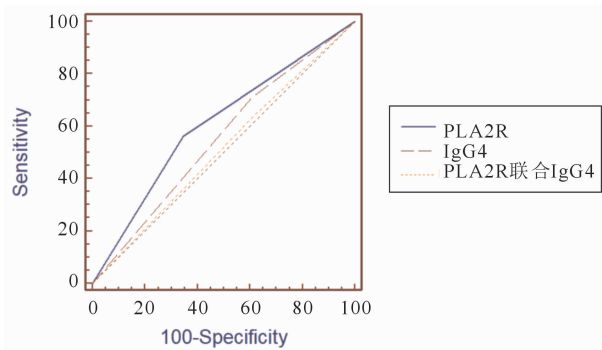


图1 IgG4、PLA2R及IgG4联合PLA2R诊断IMN的ROC曲线

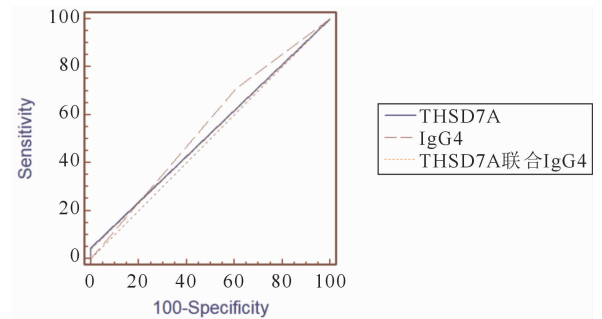


图2 IgG4、THSD7A及IgG4联合THSD7A诊断IMN的ROC曲线

### 讨论

十余年来,在膜性肾病的诊断中,PLA2R、

THSD7A相继被确认为IMN最重要的两个抗原。有研究指出通过检测IMN患者的S-PLA2R,即使在对患者未行肾活检的情况下也极有可能明确疾病机制甚至诊断IMN<sup>[8]</sup>。此外,Tomas等<sup>[9]</sup>发现了S-THSD7A在MN发展中起到推动作用,但S-PLA2R和S-THSD7A的作用机制仍尚未被完全证实。

本研究中THSD7A阳性率较Tomas等<sup>[4]</sup>检测到的阳性率低,且PLA2R阳性率略低于其他报道,可能有以下几个原因:(1)遗传背景和环境条件的差异,可能存在地区的差异性;(2)检测方法不同。

Qin等<sup>[10]</sup>发现572例IMN患者中G-PLA2R和S-PLA2R阳性率分别89.9%和68.5%,且检测到4例G-THSD7A阳性。Wang等<sup>[11]</sup>发现578例IMN患者中G-PLA2R和S-PLA2R阳性率分别为89%和68%,G-THSD7A和S-THSD7A阳性率分别为2%。两项研究均说明免疫沉积物中抗原检测的灵敏度高于抗体测定的灵敏度,S-PLA2R与G-PLA2R阳性不一致,对于THSD7A亦是。本研究结果与前述研究相似,两种血清抗体与肾组织抗原阳性率不一致,存在以下几种可能:(1)对于S-PLA2R(+)而G-PLA2R表达(-)的患者,S-PLA2R即便表达为阳性,如果其不具有致炎性或G-PLA2R抗原表位不容易暴露使抗原抗体不易结合,其抗原与抗体表达可能会发生不一致,或者G-PLA2R抗原决定簇的数目较少未检测到其表达;(2)对于S-PLA2R(-)而G-PLA2R(+ )的患者,可能患者处在IMN患病的初始阶段,S-PLA2R在肾小球的沉积和清除速率远大于S-PLA2R的出现,或G-PLA2R与S-PLA2R的充分结合未达到饱和状态使血清中S-PLA2R阴性,又或者疾病处于自发缓解阶段,血清致病抗体已消失,还可考虑病变后期血管壁超微结构改变导致大量蛋白尿,使血清抗体大量从肾小球滤过,此时与免疫活动无关;(3)IMN患者存在其他的隐藏未发现抗原。

本研究的IMN患者中G-PLA2R及S-PLA2R阳性率显著高于THSD7A阳性率,且THSD7A仅存在于IMN患者中;G-THSD7A及S-THSD7A阳性患者大部分为PLA2R阴性,提示G-THSD7A阳性在诊断IMN中具有高度特异性。但本研究发现1例双阳性表达患者,考虑可能是其中一个自身抗体使足细胞抗原暴露后造成了另一个“机会性”抗体形成了疾病亚型<sup>[12]</sup>,或是基因相关研究认为某些个体的免疫遗传性引发了足细胞抗原同时产生两种具

有致病性的自身抗体,但以上猜想还需进一步研究证实。

此外,本研究发现 IMN 组 IgG4 的阳性率较 SMN 组和 UAMN 组高,且显著高于 IgG1、IgG2、IgG3 亚型的阳性率,3 组比较差异有统计学意义,提示与肾小球固有抗原结合的自身抗体以 IgG4 亚型为最重要。

本研究还发现单独检测与联合检测用于诊断 IMN 的评估价值无显著性差异。THSD7A 诊断 IMN 的特异度为 100%,提示 THSD7A 为诊断 IMN 的高度特异性指标,然而其敏感性仅 4.6%,提示 THSD7A 抗原阴性不能除外 IMN 的诊断。PLA2R 或 THSD7A 与 IgG4 联合检测的特异度较单独检测明显提高,可为 IMN 的鉴别诊断提供更多依据。

本研究有几个局限性:(1)存在地域性差异,本试验研究患者大都来自山西地区,地区性较集中;(2)病例数较少,本试验中检测血清抗体例数仅为 41 例,我们正积极收集更多的病例验证上述的结论,使结论更具说服力;(3)试验方法上仍需改进,以进一步提高试验质量;(4)缺乏随访,我们需要进一步收集 IMN 患者治疗前后的血清及临床各项资料,对患者治疗前后的 S-PLA2R、S-THSD7A 的表达水平进行对比,观察治疗前后抗体表达的变化与尿蛋白水平变化、疾病转归关系是否一致。我们后续将开展进一步研究,以期更加深入的探讨 IMN 的发病机制,为 IMN 的临床确诊提供更为可靠的分子标记物。

综上所述,肾小球 PLA2R 抗原和血清 PLA2R 抗体在 IMN 中均有一定的表达阳性率,为 IMN 的特异性诊断指标,且与肾小球 IgG4 联合检测可提高诊断特异度;肾小球 THSD7A 抗原和血清 THSD7A 抗体在 IMN 中的表达率很低,可作为 IMN 补充的特异性诊断指标。

#### 参 考 文 献

[1] 韩伟霞. 山西省地区 20 年肾活检病理疾病谱分析及膜性肾病

分型鉴别诊断的临床病理研究[D]. 山西医科大学, 2016.

- [2] Beck LH Jr, Bonegio RG, Lambau 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.
- [3] Beck LH Jr, 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.
- [4] Tomas NM, Beck LH Jr, 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.
- [5] Dong H, Wang Y, Cheng X, et al. Retrospective study of phospholipase A2 receptor and IgG subclasses in glomerular deposits in Chinese patients with membranous nephropathy [J]. *PLoS One*, 2016, 11(5): e0156263.
- [6] Sharma SG, Larsen CP. Tissue staining for THSD7A in glomeruli correlates with serum antibodies in primary membranous nephropathy: a clinicopathological study [J]. *Mod Pathol*, 2018, 31(4): 616-622.
- [7] Qu Z, Liu G, Li J, et al. Absence of glomerular IgG4 deposition in patients with membranous nephropathy may indicate malignancy[J]. *Nephrol Dial Transplant*, 2011, 27(5): 1931-1937.
- [8] Hoxha E, von Haxthausen F, Wiech T, et al. Membranous nephropathy-one morphologic pattern with different diseases [J]. *Pflugers Arch*, 2017, 469(7-8): 989-996.
- [9] 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.
- [10] Qin HZ, Zhang MC, Le WB, et al. Combined assessment of phospholipase A2 receptor autoantibodies and glomerular deposits in membranous nephropathy[J]. *J Am Soc Nephrol*, 2016, 27(10): 3195-3203.
- [11] Wang J, Cui Z, Lu J, et al. Circulating antibodies against thrombospondin Type-I Domain-Containing 7A in Chinese patients with idiopathic membranous nephropathy[J]. *Clin J Am Soc Nephrol*, 2017, 12(10): 1642-1651.
- [12] Larsen CP, Cossey LN, Beck LH. THSD7A staining of membranous glomerulopathy in clinical practice reveals cases with dual autoantibody positivity[J]. *Mod Pathol*, 2016, 29(4): 421-426.

(收稿日期:2019-01-14)