

# PLA2R 真核表达细胞株的构建及其在膜性肾病 诊断中的应用

王超男<sup>1</sup>, 李伟皓<sup>2</sup>, 沈宝艳<sup>3</sup>, 李江雪<sup>1</sup>, 张佳<sup>1</sup>, 刘晓梅<sup>2</sup>, 张菲菲<sup>2</sup>, 张智萍<sup>2</sup>, 冯晓燕<sup>1</sup>, 张贺秋<sup>1</sup>

(1. 东方海洋(北京)医学研究院, 北京 100071; 2. 河北医科大学第二医院特检科, 石家庄 050000; 3. 蒙城县  
第一人民医院肾病免疫风湿科, 安徽亳州 233500)

**摘要:**目的 构建表达磷脂酶A2受体(phospholipase A2 receptor, PLA2R)的稳定细胞株并对其在膜性肾病(membranous nephropathy, MN)诊断中的应用进行初步评价。方法 人工合成pIRES-PLA2R真核表达质粒并稳定转染CHO细胞, 筛选后分别进行RT-PCR, Western免疫印迹和细胞免疫荧光方法(immunofluorescence assay, IFA法)鉴定。以构建的稳定细胞株建立PLA2R自身抗体IFA法并对2018~2019年收集的97例肾病患者血清样本进行初步检测。结果 成功构建表达PLA2R蛋白的稳定细胞株CHO-PLA2R并以该细胞株为基础建立PLA2R自身抗体IFA法。与ELISA试剂盒检测结果相比, 阴性样本符合率为100%(55/55); 阳性样本符合率为76.2%(32/42); 总体符合率为89.7%(87/97)。Kappa检验具有一定的一致性( $P < 0.05$ )。结论 成功构建表达PLA2R蛋白的稳定细胞株, 并应用该细胞株建立了检测PLA2R自身抗体的IFA检测方法。

**关键词:**膜性肾病; 磷脂酶A2受体; 细胞株; 质粒; 免疫荧光方法

**中图分类号:** R692; R392.12 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-7414(2020)04-001-06

**doi:**10.3969/j.issn.1671-7414.2020.04.001

## Establishment of A Stable Cell Line CHO-PLA2R with High Expression of PLA2R and Its Application in the Diagnosis of Membranous Nephropathy

WANG Chao-nan<sup>1</sup>, LI Wei-hao<sup>2</sup>, SHEN Bao-yan<sup>3</sup>, LI Jiang-xue<sup>1</sup>, ZHANG Jia<sup>1</sup>, LIU Xiao-mei<sup>2</sup>, ZHANG Fei-fei<sup>2</sup>,  
ZHANG Zhi-ping<sup>2</sup>, FENG Xiao-yan<sup>1</sup>, ZHANG He-qiu<sup>1</sup>

(1. Medical Institute of Oriental Ocean (Beijing) Ltd., Beijing 100071, China; 2. Special Survey Division, the Second Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050000, China; 3. Department of Nephropathy Immunology, the First Hospital of Mengcheng, Anhui Bozhou 233500, China)

**Abstract: Objective** To establish a stable cell line CHO-PLA2R with high expression of PLA2R and evaluated its application in the diagnosis of membranous nephropathy. **Methods** The eukaryotic expression plasmid pIRES-PLA2R was artificially constructed and stably transfected into CHO cells. The cell with expression of PLA2R was obtained after G-418 screening and identified by RT-PCR, western blotting and immunofluorescence respectively. Establishment of immunofluorescence assay for PLA2R autoantibody and detection of the serum of 97 patients with nephropathy was performed. **Results** It was confirmed that CHO-PLA2R cell line was successfully constructed. An immunofluorescence assay for PLA2R autoantibody was successfully established utilizing the CHO-PLA2R cell. The preliminary evaluation showed that, compared with the results of ELISA method, the coincidence rate of negative samples was 100%(55/55), and positive samples was 76.2%(32/42), and the overall coincidence rate was 89.7%(87/97). There was no significant difference in Kappa test ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** A stable cell line with high expression of PLA2R was successfully constructed, and a immunofluorescence assay for PLA2R autoantibody was established.

**Keywords:** membranous nephropathy; phospholipase A2 receptor; cell line; plasmid; IFA

膜性肾病(membranous nephropathy, MN)是一种器官特异性自身免疫疾病,是导致成人肾病综合征的常见病因<sup>[1-3]</sup>。根据病因将膜性肾病分为两类,第一类为没有明确病因的“原发性膜性肾病

(idiopathic membranous nephropathy, IMN)”,约占总患病人数的70%。第二类为由乙型肝炎、系统性红斑狼疮、癌症和药物不良反应等引起的“继发性膜性肾病(secondary membranous nephropa-

**基金项目:** 河北省卫生计生委, 河北省2015年度医学科学研究重点课题计划(20150673)。

**作者简介:** 王超男(1990-),女,硕士研究生,研究方向:诊断试剂研发, E-mail: vanchywang@qq.com。

李伟皓(1975-),男,硕士研究生,副主任检验师,研究方向:免疫学检验, E-mail: 13722992006@139.com,共同第一作者。

**通讯作者:** 冯晓燕(1973-),女,博士,研究员,研究方向:生物标志物筛选及应用, E-mail: xyfeng2002@126.com。

thy, SMN)”，约占总患病人数的30%<sup>[4]</sup>。IMN和SMN的临床表现和组织学表现相同，但治疗方法完全不同<sup>[5-6]</sup>，IMN的治疗更为复杂，包括多种治疗方案，所以针对IMN的正确鉴别诊断尤为重要。

目前临床上IMN的诊断主要包括两类方法，一类是侵入性诊断方法，如肾脏穿刺、组织学检查或肾组织电镜检查等，但侵入性方法为有创性操作，会对患者造成一定程度上的伤害，风险高，可能会引起一系列并发症，并且不适于动态观察患者病情。2009年，BECK等<sup>[7-8]</sup>首次发现了膜性肾病的靶抗原-M型磷脂酶A2受体(phospholipase A2 receptor, PLA2R)，表明PLA2R是IMN的一个主要自身抗原。随之出现了另一类非侵入性的PLA2R自身抗体血清学诊断方法<sup>[9-10]</sup>，不仅快速、简便易行，而且可以动态观察病情，指导治疗<sup>[11]</sup>，主要包括细胞免疫荧光方法(immunofluorescence assay, IFA)和酶联免疫吸附法(enzymelinkedimmunosorbent assay, ELISA)。但ELISA方法由于存在与抗人IgG的非特异反应，易出现假阳性。而IFA方法不但具有血清学检测的优势，还能够直观观察荧光的细胞分布，提高检测的特异性和准确性，被誉为自身抗体血清学检测的“金标准”。

但是目前对于PLA2R自身抗体的检测只有德国欧蒙公司的进口试剂，且价格昂贵。因此，本研究目的在于构建表达PLA2R蛋白的稳定细胞株，并对其在膜性肾病诊断中的应用进行探索，以期能够实现PLA2R自身抗体检测试剂的国产化奠定基础。

## 1 材料与方法

1.1 研究对象 收集河北医科大学第二医院和蒙城县第一人民医院2018~2019年就诊并进行抗PLA2R抗体检测的肾病患者血清共97例，患者年龄16~74岁，平均年龄 $48.2 \pm 15.9$ 岁，男性61例，女性36例。根据欧蒙抗PLA2R抗体IgG检测试剂盒(酶联免疫吸附法)，当血清抗PLA2R抗体 $< 14$  RU/ml时，则认为血清呈抗PLA2R抗体阴性，当血清抗PLA2R抗体 $\geq 14$  RU/ml时，则认为血清呈抗PLA2R抗体阳性。阴性组55例，男性32例，女性23例，平均年龄 $48 \pm 16.2$ 岁；阳性组42例，男性27例，女性15例，平均年龄 $48 \pm 15.9$ 岁。血清无脂血、溶血等不合格情况，收集于干燥洁净EP管， $-80^\circ\text{C}$ 冻存备用。

1.2 试剂与仪器 pIRES-PLA2R质粒(北京中美泰和公司)；质粒抽提纯化试剂盒(QIAGEN公司)；Lipofectamine 2000转染试剂(ThermoFisher公司)；CHO(中国仓鼠卵巢巢脑细胞, Chinese Hamsters Ovary)细胞(ATCC)；抗生素G-418(Sigma

公司)；通用总蛋白质提取试剂盒(上海生工公司)；总RNA提取试剂盒(上海生工公司)；RT-PCR试剂盒SuperScript™ One-Step RT-PCR System(ThermoFisher公司)；兔抗PLA2R多抗(Atlas公司)；FITC-羊抗兔IgG抗体(北京中杉金桥公司)；FITC-羊抗人IgG抗体(北京中杉金桥公司)。

## 1.3 方法

1.3.1 PLA2R真核表达质粒的构建：综合生物信息学分析和文献报道，从NCBI数据库调取PLA2R的全长编码基因(NM\_007366.4)。由于PLA2R全长编码基因的长度较长，为避免在基因调取和扩增过程中产生基因突变，委托北京中美泰和公司进行基因合成并将全长基因连接到真核表达质粒pIRESneo中，构建pIRES-PLA2R质粒。用质粒纯化试剂盒抽提pIRES-PLA2R质粒并琼脂糖凝胶电泳鉴定。

1.3.2 PLA2R稳定表达细胞株的构建：pIRES-PLA2R质粒定量后用于真核细胞转染。在转染前一天将CHO细胞以 $3 \times 10^5$ 个/孔的密度接种于6孔板， $37^\circ\text{C}$ 培养过夜。按照Lipofectamine 2000转染试剂说明书，分别用PLA2R真核表达质粒pIRES-PLA2R、空质粒pIRESneo和不含质粒的PBS转染CHO细胞。转染48h后更换为含1mg/ml G-418的完全培养液，每隔3天更换新鲜培养液。

1.3.3 PLA2R稳定表达细胞株的鉴定：待CHO-PLA2R组、CHO-Control组正常生长且PBS对照组细胞全部死亡时，收取CHO-PLA2R组和CHO-Control组的部分细胞进行RT-PCR，Western免疫印迹和IFA鉴定。

1.3.3.1 RT-PCR鉴定：用总RNA提取试剂盒提取CHO-PLA2R组和CHO-Control组细胞的总RNA，进行反转录PCR鉴定。根据PLA2R全长基因，设计合成RT-PCR鉴定引物F1(序列：TCGTTTCCTTACGGTGGCCGCT)和R1(序列：TTCTGCAGAGGTGGGATCAG)。根据RT-PCR试剂盒说明书，取 $4 \mu\text{l}$  RNA提取物作为扩增模板，F1/R1作为引物对，按试剂盒要求进行一步法RT-PCR， $50^\circ\text{C}$  30 min 逆转录， $95^\circ\text{C}$  15 min 预变性后，进行PCR循环： $95^\circ\text{C}$  45 s， $58^\circ\text{C}$  15 s， $72^\circ\text{C}$  30 s，循环40次， $72^\circ\text{C}$ 延伸5 min。取PCR产物 $5 \mu\text{l}$ 进行1g/dl琼脂糖凝胶电泳。

1.3.3.2 Western免疫印迹鉴定：用细胞总蛋白提取试剂盒提取CHO-PLA2R组和CHO-Control组的细胞总蛋白，进行Western免疫印迹鉴定。取总蛋白 $80 \mu\text{g}$ 进行8g/dl SDS-PAGE，然后电转印于PVDF膜。封闭后加入1:1 000稀释的抗PLA2R抗体， $4^\circ\text{C}$

孵育过夜。洗膜后加入 1:500 稀释的 FITC-羊抗兔 IgG, 室温孵育 1 h。洗膜后 ECL 显色。

1.3.3.3 细胞免疫荧光鉴定: 在 IFA 方法鉴定前一天将经 G-418 筛选的 CHO-PLA2R 细胞和 CHO-Control 细胞以  $1 \times 10^5$  个/孔的密度接种于 96 孔板中, 37℃ 培养过夜, PBS 洗 1 次, 每次 5 min。用 4ml/dl 多聚甲醛固定, PBS 洗 3 次。PBS 洗后加入 1:100 稀释的 FITC-兔抗 PLA2R 抗体, 湿盒室温孵育 2h, PBS 洗 3 次。加入 1:400 稀释的 FITC-羊抗兔 IgG, 湿盒室温孵育 30min, PBS 洗 3 次。防荧光淬灭剂封片, 置荧光显微镜下观察, 同时设未转染的细胞作为对照。

1.3.4 PLA2R 稳定表达细胞株的细胞免疫荧光方法的初步评价: 用 CHO-PLA2R 细胞作为基质对 97 例肾病患者血清样本进行检测。在 IFA 方法检测前一天将 CHO-PLA2R 细胞以  $1 \times 10^5$  个/孔的密度接种于 96 孔板中, 37℃ 培养过夜, PBS 洗 1 次, 每次 5min。4ml/dl 多聚甲醛固定 15 min。PBS 洗后加入 1:50 稀释的血清样本, 湿盒室温孵育 2 h。PBS 洗后加入 1:300 稀释的 FITC-羊抗人 IgG, 湿盒室温孵育 30 min。PBS 洗后加入防荧光淬灭剂封片, 置荧光显微镜下观察。

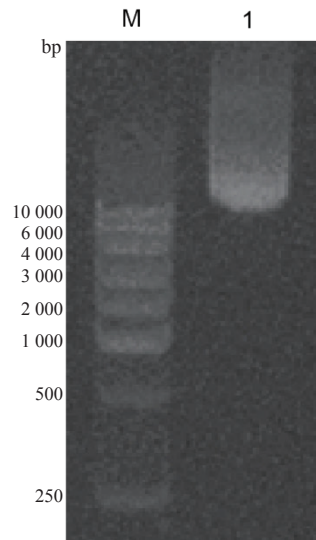
1.4 统计学分析 使用 Kappa 检验对两种方法的评价结果进行统计学分析。对 P 值和 Kappa 值进行分析。如果  $P < 0.05$ , 则具有一定的一致性。Kappa 值  $< 0.2$  则说明一致性程度较差; 0.2~0.4 则说明一致性程度一般; 0.4~0.6 则说明一致性程度中等; 0.6~0.8 则说明一致性程度较强; 0.8~1.0 则说明一致性程度很强。

## 2 结果

2.1 PLA2R 真核表达质粒的鉴定 北京中美泰和公司完成基因合成和 pIRES-PLA2R 质粒构建, 并提供测序报告证明 PLA2R 基因序列完全正确。

抽提 pIRES-PLA2R 质粒。根据 pIRESneo 质粒说明书, pIRESneo 质粒分子量大小应为 5.3kb, 合成的全长编码基因大小为 4 389bp, 因此 pIRES-PLA2R 质粒的分子量大小约为 9.8kb。琼脂糖凝胶电泳显示 pIRES-PLA2R 质粒分子量大小与预期分子量大小一致, 见图 1。成功抽提供细胞转染的 PLA2R 真核表达质粒 pIRES-PLA2R, 质粒浓度为  $0.48 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ 。

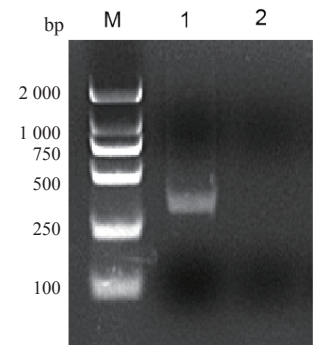
2.2 PLA2R 稳定表达细胞株 CHO-PLA2R 的鉴定 分别以 PLA2R 真核表达质粒 pIRES-PLA2R 和空质粒 pIRESneo 转染 CHO 细胞, 经 G-418 筛选后获得表达 PLA2R 的稳定细胞株 CHO-PLA2R 和对照细胞株 CHO-Control, 鉴定结果见图 1。



(Marker: DL10 000; 1: pIRES-PLA2R 质粒)

图 1 pIRES-PLA2R 质粒鉴定

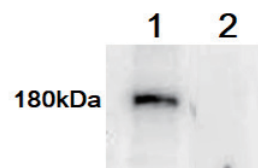
2.2.1 RT-PCR 鉴定提取 CHO-PLA2R 组和 CHO-Control 组细胞的总 RNA: 以鉴定引物 F1/R1 进行一步法 RT-PCR。结果显示 CHO-PLA2R 组在 350bp 处出现一条唯一一条带, 而 CHO-Control 组细胞未见扩增条带, 见图 2。与预期结果相符, 表明稳定转染细胞株 CHO-PLA2R 能够正常转录 PLA2R 基因。



(Marker: DL2 000; 1: CHO-PLA2R 组; 2: CHO-Control 组)

图 2 细胞总 RNA RT-PCR 鉴定

2.2.2 Western 免疫印迹鉴定提取 CHO-PLA2R 组和 CHO-Control 组细胞的总蛋白: 以 PLA2R 兔多抗为一抗进行 Western 免疫印迹实验。结果显示 CHO-PLA2R 组在约 180kD 处有明显条带, 与 PLA2R 蛋白的预期分子量相符, 而 CHO-Control 组未见相应条带, 见图 3。表明稳定转染细胞株 CHO-PLA2R 可以稳定表达 PLA2R 蛋白。



(1: CHO-PLA2R 组; 2: CHO-Control 组)

图 3 细胞总蛋白 Western 免疫印迹鉴定



2.2.3 细胞免疫荧光鉴定: 以抗 PLA2R 抗体为一抗进行 IFA 实验, 结果显示, CHO-PLA2R 细胞在细胞质部分呈现较强的绿色荧光, 而 CHO-Control

细胞则几乎无荧光 (见图 4)。表明成功构建稳定细胞株 CHO-PLA2R, 可以高水平表达 PLA2R 蛋白。

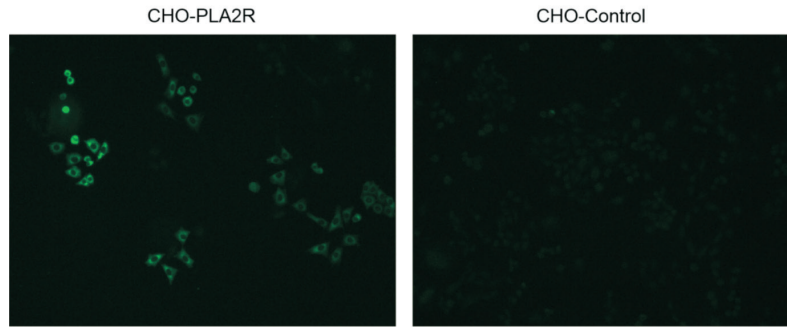


图4 CHO-PLA2R 细胞 IFA 方法鉴定

2.3 PLA2R 稳定表达细胞株 CHO-PLA2R 的初步应用 用筛选出的 CHO-PLA2R 细胞对 97 例临床肾病患者样本进行检测, 检测结果见表 1。PLA2R 自身抗体的 ELISA 检测结果为阴性 55 例, 阳性 42 例。55 例 ELISA 检测阴性 ( $< 14$  RU/ml) 样本中, CHO-PLA2R 细胞 IFA 方法检测结果均为阴性见图 5, 特异性符合率 100% (55/55)。ELISA 检测阳性 ( $\geq 14$  RU/ml) 样本共 42 例, 其中阳性高值 ( $\geq 100$  RU/ml) 样本 26 例, 阳性低值 (14 ~ 99

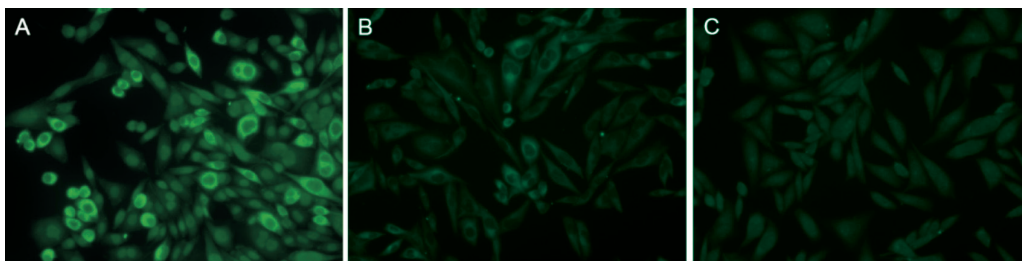
RU/ml) 样本 16 例。ELISA 检测阳性样本中, IFA 方法检测结果阳性 32 例 (见图 5), 阴性 10 例, 符合率 76.2% (32/42)。其中, ELISA 检测阳性高值 26 例样本中, IFA 方法检测结果阳性 24 例, 阴性 2 例, 符合率 92.3% (24/26); ELISA 检测阳性低值 16 例样本中, IFA 方法检测结果阳性 8 例, 阴性 8 例, 符合率 50% (8/16)。97 例肾病患者血清样本两种检测方法的总符合率为 89.7% (87/97)。

表 1

97 例肾病患者血清样本抗 PLA2R 抗体 ELISA 方法与 IFA 方法结果对比

ELISA 方法	IFA 方法			
	n	阳性例数	阴性例数	符合率 (%)
阳性 高值 ( $\geq 100$ RU/ml)	26	24	2	92.3
阳性 低值 (14 ~ 99 RU/ml)	16	8	8	50
阴性 $< 14$ RU/ml	55	0	55	100

注: ELISA 阳性样本一致性中等 ( $P < 0.05$ , Kappa=0.456); ELISA 阴性样本一致性很强 ( $P < 0.05$ , Kappa=1.0)。



A: 强阳性反应; B: 弱阳性反应; C: 阴性反应

图5 血清样本 IFA 实验结果

使用 Kappa 检验对两种方法评价结果的一致性进行统计学分析, ELISA 结果阳性样本和 ELISA 结果阴性样本均具有一定的一致性 (均  $P < 0.05$ ), 其中 ELISA 结果阳性样本一致性程度中等 (Kappa=0.456), ELISA 结果阴性样本一致性很强 (Kappa=1.0)。

### 3 讨论

慢性肾病被称为“沉默的杀手”, 很多患者早期没有症状, 其中约 30% ~ 50% 的患者将发展为

终末期肾病, 对患者的身心健康造成极大影响<sup>[1-2]</sup>。我国的 MN 发病几率逐年上升, 从 2005 年到 2017 年, MN 在我国的肾活检病人中发病率由 9.1% 增长到 26.5%<sup>[9]</sup>。MN 可根据病因分为原发性膜性肾病和继发性膜性肾病, 其中 IMN 的发病率在我国已达到 70%~80%<sup>[4]</sup>。IMN 和 SMN 的临床表现十分相近, 但治疗方法却完全不同, 因此正确鉴别 IMN 在临床诊断和治疗工作中具有十分重要的意义。目前, MN 诊断的金标准是肾穿刺活检术, 但其为有

创性操作, 不便于病情的动态观察, 也不能鉴别 IMN 与 SMN。

PLA2R 是 I 型跨膜蛋白, 属于 C 型外源性凝集素家族<sup>[12-13]</sup>。2009 年, BECK 研究团队在 70% 的 IMN 患者体内检出 PLA2R, 提示 PLA2R 可能参与了 IMN 发病过程。随后, HOXHA 等<sup>[14]</sup>人发现 IMN 患者体内抗 PLA2R 抗体的阳性率高达 81%。日本一项研究结果显示, IMN 患者体内抗 PLA2R 抗体的阳性率为 53%<sup>[15]</sup>。近期国内的一项研究结果显示, IMN 患者体内抗 PLA2R 抗体的阳性率为 57%<sup>[16]</sup>, 另一项研究中阳性率高达 85.4%<sup>[17]</sup>。以上研究提示抗 PLA2R 自身抗体可能是导致 IMN 的致病抗体。多个研究表明, 抗 PLA2R 抗体诊断 IMN 的灵敏度可达 70%~85%, 特异度更是高达 99%<sup>[18-20]</sup>。因此, 抗 PLA2R 抗体作为一种病原标志物极具诊断意义。此外, 针对 PLA2R 自身抗体开发的血清学检测不仅快速、简便易行, 还可以动态监测病情活动, 为 IMN 的治疗和预后提供参考。因此, 本文构建了表达 PLA2R 的稳定细胞株, 以期提供一种高效的 IMN 体外诊断工具。

本文首先构建了真核表达质粒 pIRES-PLA2R。用 pIRES-PLA2R 质粒对 CHO 细胞进行稳定转染, RT-PCR 实验、Western 免疫印迹实验和 IFA 实验分别从分子、蛋白和细胞水平证明成功构建表达 PLA2R 蛋白的稳定细胞株 CHO-PLA2R。

将所构建的细胞株应用于抗 PLA2R 抗体的 IFA 方法体外诊断, 与 ELISA 方法相比, 阴性样本的符合率为 100% (55/55); 阳性样本的总符合率为 76.2% (32/42), 其中阳性高值样本的符合率为 92.3% (24/26), 阳性低值样本的符合率为 50% (8/16); 样本的总体符合率为 89.7% (87/97)。使用 Kappa 检验分析两种方法的一致性, ELISA 阳性样本和 ELISA 阴性样本均具有一定的一致性, 其中 ELISA 阳性样本的一致性程度中等, 也就是对阳性样本检测的符合率较低; ELISA 阴性样本结果一致性高, 也就是对阴性样本检测的符合率高。ELISA 阳性样本结果一致性不强主要是由于弱阳性样本的符合率不高 (50%, 8/16)。

部分 ELISA 检测阳性样本在本实验中使用 IFA 方法未能成功检出, 分析原因可能是作为对照的 ELISA 方法由于酶联板的非特异吸附、二抗的非特异性结合、血清中的其他自身抗体引起的非特异反应大大增加了假阳性率, 使得 ELISA 方法弱阳性结果的准确性降低。而 IFA 方法是检测自身抗体的经典方法。理论上, 只要胞膜或胞浆中存在相应的抗原, 就可特异性检测对应抗体, 因此, 根据是否存在荧光可以检测是否存在相应的自身抗体 (图

5A, 5B)。另一方面, 根据荧光的分布特点及其与对照细胞的荧光比较可以排除非特异荧光结果, 从而能够减少假阳性, 提高准确性, 减少误诊。例如在本文的方法中, 有些样本检测时整个细胞均呈现荧光, 或者在细胞核而非细胞质呈现强荧光, 还有些样本的荧光分布与 CHO-Control 对照细胞完全相同, 即可判定为非特异性反应。实验结果显示, 基于 CHO-PLA2R 细胞株建立的 IFA 检测方法具有很高的特异性, 为 IMN 的深入研究及体外诊断提供了有力的生物学工具。但是, 该方法对 ELISA 检测灰区附近的弱阳性样本无法明确判断, 导致出现假阴性结果。我们将对 IFA 方法进一步改进, 以提高灵敏度。另外, 与 ELISA 方法相比, IFA 方法无法进行精确定量检测, 不能用于 IMN 患者的疗效评估, 在临床上需要与 ELISA 方法联合使用。

#### 参考文献:

- [1] CATTRAN D. Management of membranous nephropathy[J]. *Nephrology*, 2001, 5(4): 209-213.
- [2] DU BUF-VEREIJKEN P W G, BRANTEN A J W, WETZELS J FM. Idiopathic membranous nephropathy: outline and rationale of a treatment strategy[J]. *American Journal of Kidney Diseases*, 2005, 46(6): 1012-1029.
- [3] SEGAL P E, CHOI M J. Recent advances and prognosis in idiopathic membranous nephropathy [J]. *Advances in Chronic Kidney Disease*, 2012, 19(2): 114-119.
- [4] BECH A P, HOFSTRA J M, BRENCHLEY P E, et al. Association of anti-PLA<sub>2</sub>R antibodies with outcomes after immunosuppressive therapy in idiopathic membranous nephropathy[J]. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology : CJASN*, 2014, 9(8): 1386-1392.
- [5] SAITO T, IWANO M, MATSUMOTO K, et al. Significance of combined cyclosporine-prednisolone therapy and cyclosporine blood concentration monitoring for idiopathic membranous nephropathy with steroid-resistant nephrotic syndrome: a randomized controlled multicenter trial[J]. *Clinical and Experimental Nephrology*, 2014, 18(5): 787-794.
- [6] 李正东, 张任. 血清学 PLA2R 抗体和 THSD7A 抗体检测辅助诊断特发性膜性肾病及对评估疗效和预后的价值研究 [J]. *中国煤炭工业医学杂志*, 2019, 22 (2) : 149-157.
- [7] LI Zhengdong, ZHANG Ren. Value of serum PLA2R antibody and THSD7A antibody in efficacy assessment and prognosis of idiopathic membranous nephropathy[J]. *Chinese Journal of Coal Industry Medicine*, 2019, 22(2): 149-157.
- [7] BECH L H, BONEGIO R B, GERARD L, et al. M-Type phospholipase a2 receptor as target antigen in idiopathic membranous nephropathy[J]. *New England Journal of Medicine*, 2009, 361(1): 11-21.

(下转 13 页)