

PLA2R抗原表位及其抗体在特发性膜性肾病 中的研究进展

郑天宇 黄飏 周秀梅*

(浙江理工大学生命科学与医药学院, 杭州 310018)

摘要 特发性膜性肾病(idiopathic membranous nephropathy, IMN)是一种自身免疫性疾病,是临床上导致成人肾病综合征的主要原因之一。它产生的主要原因是体内含量极低的蛋白类物质,如M型磷脂酶A2受体(M-type phospholipase A2 receptor, PLA2R)含量的升高,对肾脏的膜的滤过作用产生影响,引起机体的一系列免疫反应。该文主要介绍了近年来人们对IMN血清标志物、PLA2R抗原及抗体的研究,尤其是对PLA2R抗原表位的研究,整合了PLA2R抗原表位变化与IMN的分层预后的相关信息。希望通过对已知信息的整合,探求IMN诊断治疗未来的研究方向。

关键词 特发性膜性肾病; M型磷脂酶A2受体; 抗PLA2R抗体; 表位

Research Progresses of PLA2R Epitope and Its Antibody in Idiopathic Membranous Nephropathy

ZHENG Tianyu, HUANG Biao, ZHOU Xiumei*

(College of Life Sciences and Medicine, Zhejiang Sci-Tech University, Hangzhou 310018, China)

Abstract IMN (idiopathic membranous nephropathy) is an autoimmune disease and one of the main clinical causes of nephrotic syndrome in adults. The main reason for its occurrence is the increase of the protein with very low content in the body, such as PLA2R (M-type phospholipase A2 receptor), have an impact on the filtration of the kidney's membrane, causing a series of immune responses of the body. This article mainly introduces the research on IMN serum markers, PLA2R antigen and antibody in recent years, especially the research on the PLA2R epitope, and integrates the correlation information between the changes of PLA2R epitope and the stratified prognosis of IMN. It is hoped that through the integration of known information, future research directions for the diagnosis and treatment of IMN can be explored.

Keywords idiopathic membranous nephropathy; PLA2R; anti-PLA2R antibody; epitope

膜性肾病(membranous nephropathy, MN)是一种免疫介导的肾小球疾病,成年人MN在临床上以肾病综合征为主要表征。MN的成因是肾小球毛细血管襻基底膜上皮侧存在的大量沉积的免疫复合物,导致了肾小球基底的病理性改变^[1],MN在临床上常表现为大量的尿蛋白、低蛋白血症、严重的水肿,同时还会伴

有高血脂症,或引起无明显临床症状的非肾病范围的尿蛋白,这些都是肾病综合征的主要表现。成人MN按发病原因的不同可以分为特发性膜性肾病(idiopathic membranous nephropathy, IMN)和继发性膜性肾病(secondary membranous nephropathy, SMN)。SMN继发于多种系统性疾病,例如系统性红斑狼疮、类风湿

收稿日期: 2022-01-06 接受日期: 2022-03-07

国家自然科学基金(批准号: 82172336)和杭州市重点研发项目(批准号: 202004A23)资助的课题

*通讯作者。Tel: 0571-86843181, E-mail: zhouxiumei824@163.com

Received: January 6, 2022

Accepted: March 7, 2022

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.82172336) and the Key Research and Development Project of Hangzhou (Grant No.202004A23)

*Corresponding author. Tel: +86-571-86843181, E-mail: zhouxiumei824@163.com

性关节炎、乙肝病毒感染以及多种因素引起的肿瘤。SMN的治疗要结合原发疾病的诊治, 针对临床症状予以缓解, 在本文中不予讨论。

1 特发性膜性肾病

IMN是一种自身免疫性疾病, 机体内原本含量极低的物质大量产生和累积, 成为自身的靶抗原, 从而引起机体的一系列免疫反应。中性肽链内切酶(neutral endopeptidase, NEP)作为第一个膜性肾病的抗原标志物被发现, 2002年DEBIEC团队^[2]发现了一例NEP基因缺陷的孕妇, 其通过胎盘将自身的NEP抗体传到胎儿体内, 并使其与胎儿的NEP抗原结合形成免疫复合物, 最终导致了罕见的新生儿尿蛋白病例的出现。2009年, BECK团队^[3]研究指出, M型磷脂酶A2受体(M-type phospholipase A2 receptor, PLA2R)是IMN的主要靶抗原, 在IMN中占到了70%~80%; 2014年, 科研人员在PLA2R抗体阴性的患者血清内发现了IMN的另一种靶抗原, 1型血小板反应蛋白7A域(thrombospondin type-1 domain-containing 7A, THSD7A), 这种靶抗原主导的IMN占临床IMN的5%~8%^[4]。基于肾小球激光显微解剖技术, 以及质谱(mass spectrometry, MS)鉴定胰蛋白酶消化蛋白的检测技术^[5], 科学家们在2019至2021年发现了IMN的另外四种抗原标志物, 即外泌素1/2(exostosis 1/2, EXT1/2)、NELL-1(NEL-like protein 1)、信号量蛋白3B(Semaphorin 3B, SEMA3B)和NCAM-1(neural cell adhesion molecule 1)^[5-8]。

2 PLA2R与IMN

2.1 PLA2R对IMN的致病机制

PLA2R是IMN的主要靶抗原, 这种蛋白是足细胞表达的大跨膜糖蛋白, 诱导以IgG为主的体液免疫反应, 从而产生循环自身抗体, 因此通过对PLA2R的检测, 可以达到临床诊断和监测IMN的目的^[9]。通过免疫组织化学检测和电子显微镜能够在足细胞膜上发现IgG阳性颗粒沉积物, 其中免疫复合物的主要成分是IgG4结合PLA2R抗原的沉积复合物^[3]。IgG4是抗体IgG的亚类之一^[3]。但IMN不是唯一的IgG4相关免疫性疾病, 在肌肉特异性激酶抗体引起的重症肌无力(myasthenia gravis due to muscle-specific kinase antibodies, MuSK-MG)中, IgG4已被证明是主要的致病抗体^[10]。大多数情况下, 在IMN中肾小球免疫沉

积物和洗出液中均包含有IgG4, 但是IgG4不能结合C1q激活经典补体途径。然而在肾小球足细胞膜上的免疫沉积复合物中却存在大量C3。现在我们仍然不能确定IgG4具体是通过哪种方式引起人体的自身循环免疫反应的。如图1所示, LOU等^[11]研究表明, IgG4可能通过凝集素途径激活补体, 最终导致了C3c和C5b-9的免疫复合物的沉积。IgG4也可能参与了IgG1和IgG3联合的经典途径, 从而激活传统的补体途径, 最终导致肾小球足细胞膜上的免疫复合物的产生和沉积^[10]。

2.2 遗传因素对IMN的影响

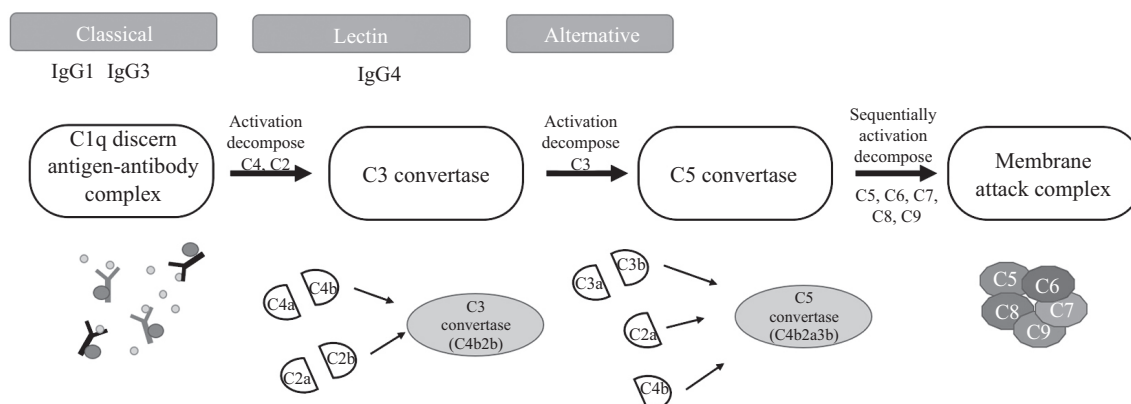
研究表明, 遗传因素也是IMN的重要病因之一。RAMACHANDRAN等^[12]在对印度地区人群进行的研究中指出, PLA2R相关的单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP) rs3749119、rs3749117、rs4664508和具有遗传多态性的等位基因HLA-DQA1中的rs2187668均与IMN显著相关。LITT等^[13]的研究表明, 在日本地区人群中, IMN的主要风险SNP是rs4664308, 其次是rs3749119。在中国的研究团队的报告中, 也提出了HLA-DRB1*15:01和DRB1*03:01是IMN的独立风险等位基因, 并且这与循环抗PLA2R抗体的含量相关^[14]。这样的结果也显示出地区人种的特异性会通过基因的方式对IMN产生一定的影响。

新的文章总结出抗PLA2R抗体的对应基因位于6号染色体上, 以HLA-DQA1为中心的一系列纯合体配对会使患MN的风险增加20倍。在与另一个强信号基因PLA2R1的联合作用下, HLA-DQA1和PLA2R1两个风险基因的纯合体会使患病率增加80倍。虽然PLA2R1中的风险等位基因是内含子, 但是在HLA等位基因存在的情况下, 遗传多态性成为了提高致病性的“隐形杀手”, 即这部分基因对于PLA2R的修饰和构象折叠作用, 才是患病率增加的最主要原因^[15]。

3 抗PLA2R抗体检测

3.1 抗PLA2R抗体体液检测

肾脏是人的重要器官, 它的基本功能是生成尿液, 借以清除体内的代谢产物及某些废物、毒物, 同时经重吸收保留水分及其他有用物质。它是机体部分内分泌激素的降解场所和肾外激素作用的靶器官。肾脏的这些功能, 保证了机体内环境的稳定, 使



补体激活的经典途径是由补体蛋白C1q识别并结合抗原抗体复合物,形成的免疫复合物识别并分解C4和C2,分解产物(C4b、C2b)结合形成C3转化酶。C3转化酶识别并分解C3,分解产物C3b分别与C4b、C2a结合,形成C5转化酶。C5转化酶依次识别并激活C5、C6、C7、C8、C9,最终形成攻膜复合物。IgG1和IgG3分别与PLA2R结合,参与补体激活的经典途径。在以IgG4为主导的PLA2R体液免疫反应中,IgG4通过凝集素途径参与C3转化酶的形成。在经典途径和凝集素途径受阻时,机体通过替代途径,直接分解补体蛋白C3,最终形成攻膜复合物。

The classical pathway of complement activation is that the complement protein C1q recognizes and binds to the antigen-antibody complex, the formed immune complex recognizes and decomposes C4 and C2, and the decomposition products (C4b, C2b) combine to form C3 convertase. C3 convertase recognizes and decomposes C3, and the decomposition product C3b combines with C4b and C2a to form C5 convertase. C5 convertase sequentially recognizes and activates C5, C6, C7, C8, C9, and finally forms a membrane attack complex. IgG1 and IgG3 bind to PLA2R and participate in the classical pathway of complement activation. In the PLA2R humoral immune response dominated by IgG4, IgG4 participates in the formation of C3 convertase through the lectin pathway. When the classical pathway and the lectin pathway are blocked, the body directly decomposes complement protein C3 through alternative pathways, and finally forms a membrane attack complex.

图1 补体激活途径

Fig.1 Complement activation pathway

新陈代谢得以正常进行。人类机体中发生的一系列反应,例如有抗PLA2R抗体参与的免疫反应,在人体的血液循环中,抗原抗体的反应能够即时起效,但在肾脏中,由于存在漫长的过滤重吸收等流程,最终的终尿中含有的抗PLA2R抗体指标会与血清抗PLA2R抗体指标存在时间差,即血清抗PLA2R抗体含量相较于尿液中抗PLA2R抗体含量的检测结果更能灵敏地反应患者的疾病发展阶段,因此我们根据血清抗PLA2R抗体指标能更好地指导用药。但在检测结果变化趋势上两者存在关联性。

通过对血清当中抗PLA2R抗体的含量检测,我们能够对IMN的病程有一个初步的判断。同时抗PLA2R抗体含量的检测结果与IMN病程的不同阶段密切相关。对病人的临床病程进行监测得知,约有50%的IMN病人的症状会在一定程度上发生自发缓解,使得尿蛋白含量有所降低。30%的病人不会发生自发缓解,而是进入终末期肾病(end stage renal disease, ESRD)阶段,这就需要利用一定的医疗手段对患者进行干预。而这样的患者大多表现出更高的抗PLA2R抗体含量和更持久反复的病程。

有研究表明,患者的尿液中的抗PLA2R抗体指标,也同样可以作为IMN的病程标志物。IMN患者的

肾小球基底膜(glomerular basement membrane, GBM)免疫球蛋白经过一系列的免疫反应,导致肾小球的毛细血管壁和细胞膜受损,影响了肾小球的滤过作用,最终导致了患者的蛋白尿含量升高。在IMN中,非选择性的蛋白尿渗漏是由于血液到粗尿的滤过屏障受损,因此在尿液中也会有PLA2R抗体的存在。而尿液抗PLA2R抗体指标的预后效果也在后续的实验得到了证实^[16]。

患者血清中抗PLA2R抗体含量处于低基线和不断降低的水平,预示着患者的症状更有可能发生自发缓解;而不断升高的抗PLA2R抗体水平会预示着患者的肾病综合征不断加重,甚至有可能导致肾功能的丧失,最终使疾病演变成ESRD^[17]。但这样的结果不排除在血清检测初期出现假阴性的情况。肾脏抗PLA2R抗体含量处于一个较高的水平,可能代表着患者的临床症状正在缓解。同样地,肾脏抗PLA2R抗体含量的下降,也并不能完全代表IMN患者的临床症状的缓解^[18],而这样的观点也更加能够证实血液抗PLA2R抗体指标的灵敏性。

3.2 抗PLA2R抗体检测方法

对抗PLA2R抗体含量的检测方法一般有蛋白质印迹法(Western blot)、酶联免疫吸附法(ELISA)

和间接免疫荧光检测(indirect immune fluorescent, IIF)。在临床检测中, ELISA是最适合抗PLA2R抗体检测的方法。一般来说, 商品化的ELISA检测试剂盒中, 将样本含量值 >14 UR/mL的指标定义为PLA2R阳性^[17]。2018年, LI等^[19]通过对113名IMN患者、34名SMN患者和53名健康对照的血清抗PLA2R抗体含量的检测, 对比了传统的ELISA检测方法方法与IIF检测的区别。在对抗PLA2R抗体对IMN疾病的敏感性的检测中, IIF的敏感性为70.8%, ELISA的敏感性为67.3%, 差异无统计学意义。IIF和ELISA检测抗PLA2R抗体结果的一致性为91.15%。IIF法测定的抗PLA2R抗体含量与ELISA法测定的抗PLA2R抗体含量总体相关系数为0.85。结果显示, ELISA与IIF具有相似的性能, 都具有定量检测和高通量的优点。

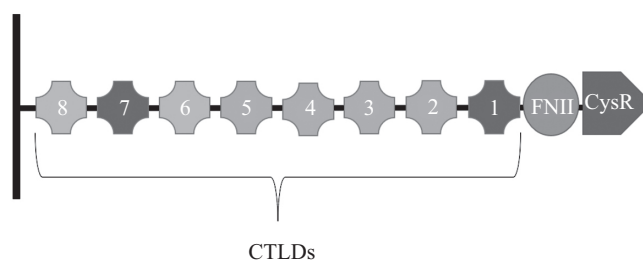
1983年首次建立的时间分辨免疫荧光免疫分析方法(time resolved fluoroimmunoassay, TRFIA)^[20-22]目前被广泛用于自身免疫性疾病的诊断、肿瘤标志物的检测和传染性疾病的检测。它利用镧系元素铕(Eu)或钐(Sm)作为示踪剂, 采用时间分辨荧光测量技术来捕捉样本中目标物质的特异性荧光。相较于以往的ELISA和IIF, TRFIA的灵敏度更高, 特异性更好, 检测范围可以达到更广的水平, 其也可以进行多指标的检测。TRFIA检测的基本原理与ELISA类似, 都要先经过固定化, 再利用抗原抗体间的特异性结合来定量分析待测样本。对抗PLA2R抗体的检测而言, 血清样本中存在许多非特异性的蛋白和复合物, 因此降低样本的背景荧光值十分重要。TRFIA中镧系元素的衰变期长、荧光谱带宽, 使得在经历一系列反应后背景荧光猝灭更加彻底, 能够消除背景干扰。此外, TRFIA利用的镧系元素的斯托克斯位移非常大, 使得激发光

和发射光的分离变得更加容易, 最终使机器在检测中能够达到高信噪比。

2017年, HUANG等^[23]将TRFIA检测方法用于抗PLA2R抗体联合IgG(anti-PLA2R-IgG)的检测, 定义了anti-PLA2R-IgG的截断值(cut-off value)为199 ng/mL, PLA2R这个指标对IMN诊断的敏感性和特异性分别达到了74%和100%。2019年, HUANG等^[24]又对抗PLA2R抗体联合IgG4(anti-PLA2R-IgG4)进行了检测, 确定了该指标的截断值为161.2 ng/mL, 检测的敏感性和特异性分别为90%和100%。

4 PLA2R抗原表位

PLA2R为甘露糖受体家族的一员, 其相对分子量为180 kDa, 分为胞外部分、跨膜部分和胞内部分3个部分。如图2所示, 胞外部分从N-端到C-端依次为1个胱氨酸富集区域(cysteine-rich ricin domain, CysR)、1个II型纤维连接蛋白区域(fibronectin type II domain, FNII)及8个串联的C型凝集素样区域(C-type lectin domains, CTLDs)^[25]。值得一提的是, PLA2R并不是MN特有的标志物, 它在人体的多个器官(如肺、胎盘、肾脏、骨骼肌等)中都能被检测到, 其中抗PLA2R抗体在肾脏中的含量最高, 能更好地作为IMN的检测指标^[18]。日前有新的观点提出, 除了肾脏微环境所必须的微量PLA2R以外, 真正的致病PLA2R初始源头可能是在于人体炎症部位、恶性肿瘤产生位点, 又或者是在表面积较大的肺中。肺作为人体中与外界接触的主要器官之一, 易受空气中的PM2.5的影响。近年来, 在中国, 环境中的空气污染导致了PLA2R在人体肺部中的含量出现明显上调。PM2.5浓度超过70 mg/m³后, 每增加10 mg/m³, MN的发病率就会增长14%^[26]。人体对这些刺激做



数字表示CTLD区域8个串联的连续表位。

The numbers represent eight sequential epitopes in series for the CTLD region.

图2 PLA2R的结构图

Fig.2 The structure diagram of PLA2R

出反应后,在源头组织部位产生抗PLA2R抗体,抗PLA2R抗体则随着体液循环到达肾脏。肾脏对抗PLA2R抗体的高敏感性使得肾脏部位的微环境平衡被打破,从而导致大量PLA2R自抗体的累积,影响肾脏的功能,最终使患者患上MN。

4.1 PLA2R抗原表位研究进程

KAO等^[27]建立了一系列PLA2R截短的片段,其中含有PLA2R的不同表位。用含有抗PLA2R抗体的血清作为样本进行Western blot,以确定PLA2R结构中起主要作用的优势表位。实验结果表明,样本中的抗PLA2R抗体能够强烈识别CysR-FnII-CTLD1构建体。该实验团队在破坏CTLD1的结构后发现,血清中的抗PLA2R抗体出现了不能识别其余构象位点的结果。此外,在将CysR-FnII-CTLD1这一连续片段的任意连接处引入凝血酶切割位点进行切割后,血清中的抗PLA2R抗体则表现为对PLA2R片段无法识别,无法与其特异性结合。因此,CysR-FnII-CTLD1被认为是PLA2R中,能够与自身抗PLA2R抗体特异性结合的最初始位点。

SEITZ-POLSKI等^[28]在随后的研究中,发现在CTLD1和CTLD7结构域中同样存在独立的能对抗PLA2R抗体产生反应性的表位,同时他还首次提出了PLA2R“表位扩展”的假说^[29]。表位扩展,是指在自身免疫性疾病或炎症中,机体产生的自身抗体,对抗原一系列的结构位点的识别,从免疫优势表位扩展到分子内的其他表位的过程。

有研究观点指出,IMN是一种涉及致病构象变化的自身免疫“构象病”,ZHANG等^[15]认为PLA2R中的CysR、CTLD1、CTLD7之所为被称为“优势表位”,是因为它们更容易受到肾脏微环境的影响,改变它们原有的空间构象,从而在表位扩展中成为更容易被影响的“优势表位”。这一表位扩展的结果引起免疫系统识别变化后的表位CysR、CTLD1和CTLD7的构象,从而最终表现为表位扩展的结果。

在HONG等^[30]的研究中,Western blot结果表明对CysR-CTLD3表位复合物起反应的PLA2R-Ab1和对CysR-CTLD1表位复合物起反应的PLA2R-Ab2对它们所对应的表位复合物有不同的亲和力,他的研究支持PLA2R-Ab2是致病性自身抗体的最终成熟形式,也就是说CysR-CTLD1表位复合物是PLA2R构象中的优势表位。

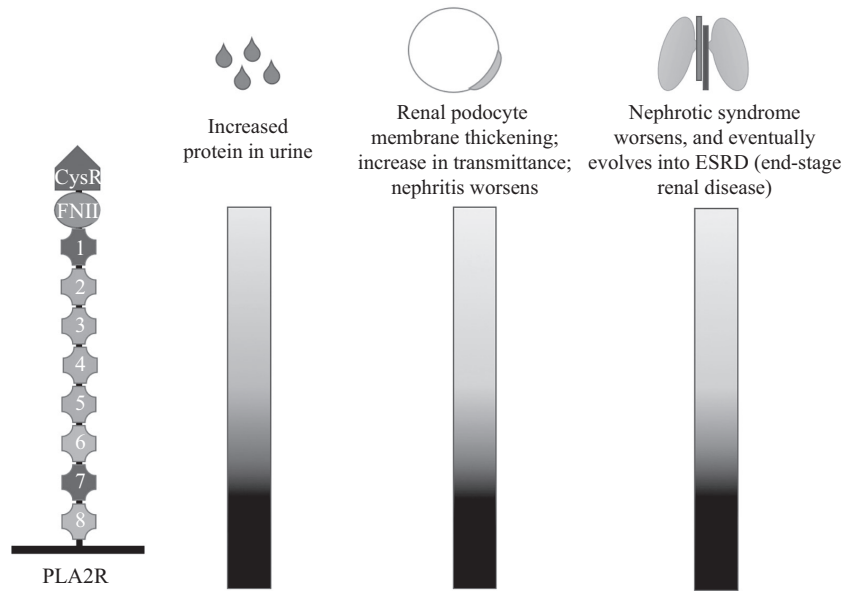
4.2 PLA2R抗原表位与IMN病程的关系

在IMN的病程发展中,SEITZ-POLSKI团队^[28]注意到,PLA2R的表位迁移与IMN患者的患病严重程度存在一定的联系。在只有CysR表位产生应答时,患者的临床病症较轻,更容易发生自发缓解。而当表位扩展到CTLD1以及CTLD678时,患者的临床指标尿蛋白含量会出现上升,患者肾病综合征的临床表现更严重(图3)。在IMN患者病症发展的过程中,在PLA2R蛋白分子上涉及到的首先是大多数抗体能识别的表位CysR,然后再扩展延伸到同一蛋白上的非交叉反应表位CTLD1和CTLD7,又或者是扩展到邻近分子上的显性表位,即分子间的扩散。这样分子内和分子间的表位扩展增强了抗体库的多样性,从而也增强了整体的免疫反应^[31]。

SEITZ-POLSKI团队^[18]在评估利妥昔单抗治疗IMN的过程中,检测法国的患者血清样本,发现在PLA2R含量处于基线时,58例患者中有38例(65.5%)发生了免疫反应的扩散。扩散是指增加CTLD1或CTLD7对CysR的反应性。表位组(CysR、CysR-CTLD1、CysR-CTLD7或CysR-CTLD1-CTLD7)与年龄、性别、诊断(肾活检)、蛋白尿或血清白蛋白的检测在时间上没有关联。但是在整体数据统计中,发现CysR表位组的研究对象年龄更小并且蛋白尿含量更少,其他表位组与研究对象的年龄和蛋白尿数据无明显相关性,这与之前的研究结论并不一致。这一差异可能是由样本数据较少以及样本所处病程偏向于中晚期而存在前中期的空缺造成的^[18]。

2016年,SEITZ-POLSKI等^[28]对MN患者的血清样本进行筛查后发现,在以PLA2R为抗原的患者体内,CysR表位首先对机体产生免疫应答反应。之后随着病程的不断加重,表位扩展至CTLD1和CTLD7。随后SEITZ-POLSKI等^[18]将PLA2R的表位扩展指标与含量指标进行对比研究,发现PLA2R的表位扩展同样对MN疾病的预后有很好的效果。

2021年,吴青青^[32]定量检测54名PLA2R相关的MN患者的血清中的抗体IgG和IgG4,发现IgG和IgG4抗体的水平与PLA2R的表位CysR、CTLD1、CTLD678特异性相关。这是由于IgG4特异性自身抗体与CysR、CTLD1和CTLD678表位中的抗原表位之间的亲和力更强,尤其是CTLD1和CTLD678表位。而后李婷^[31]的研究指出,利用特异性IgG4进行检测时,经过6个月的干预治疗,MN病症有明显缓解的



数字表示CTL D区域8个串联的连续表位。3个柱形的图片颜色由浅到深表示疾病严重程度增加,随着PLA2R表位从CysR扩展到CTL D1,表位CTL D678产生响应,患者的尿蛋白含量不断升高,肾脏足细胞膜增厚,肾脏的功能受到影响,临床表现的肾病综合征不断加重,更有甚者会演变成终末期肾病(ESRD)。

The numbers represent eight sequential epitopes in series for the CTL D region. The color of the three bars from light to dark indicates the increasing severity of the disease, as the PLA2R epitope expands from CysR to CTL D1, and when the epitope CTL D678 responds, the patient's urine protein content continues to increase, the renal podocyte membrane thickens, the function of the kidney is affected, and the clinical manifestations of nephrotic syndrome continue to aggravate. What's more, it will evolve into ESRD (end-stage renal disease).

图3 表位扩散与疾病严重程度关系图

Fig.3 Epitope spread versus disease severity

缓解组的anti-PLA2R-IgG4、anti-CysR-IgG4、anti-CTL D1-IgG4和anti-CTL D678-IgG4抗体水平的下降程度分别是未缓解组的34.3倍、6.6倍、2.1倍和13.4倍。

对抗PLA2R抗体血清浓度的检测在临床上往往指示患者的IMN中晚期,早期IMN的抗PLA2R抗体浓度检测并不能达到早发现的目的,所以对PLA2R表位扩展的研究检测,在临床早期筛查上更有发展前景。但是由于目前对PLA2R表位扩展的机制还不明确,针对不同表位的抗体还不能大范围的应用,所以病理研究中仍然以抗PLA2R抗体的浓度为检测对象,并将其作为IMN的预后指标^[13]。同时ZHANG等^[15]的文章中指出,IMN患者的PLA2R表位扩散体往往具有更高的PLA2R自抗体浓度,所以理论上我们可以在研究表位指标之前,用浓度指标作为实验分组依据。

5 总结与展望

目前对IMN的主流治疗策略,一般是建立在缓解肾病综合征和一些并发症的基础上的非特异性

治疗,例如使用利尿剂、肾素-血管紧张素系统抑制剂、他汀类药物、抗凝剂等^[10]。使用环磷酰胺和类固醇激素脉冲治疗是KDIGO最新指南^[33]建议在IMN患者的肾小球滤过率(glomerular filtration rate, GFR)下降和肾病综合征危及生命时,使用的免疫抑制治疗措施。临床上也有中西医结合治疗IMN的策略^[34]。黄葵胶囊、百令胶囊、雷公藤等中成药的研究与临床应用,同样能够达到缓解症状、治疗疾病的目的。但中药成分复杂,有效物质与副作用物质的分离还需要进一步的深入研究^[35]。

但是在实际应用中,由于患者对药物的耐受度和敏感性不同,往往是先对病人使用一种非针对性的治疗方法,一个周期后,再次检测患者的尿蛋白含量,或者是使用带有研究性的方法,检测血清抗PLA2R抗体的含量。如若治疗效果不明显,再更换治疗手段及所用药物。像这样对患者的无效治疗,不仅延误了病情,也可能为患者带来许多不良的药物反应。所以如果能够在临床初期就通过检测血清生物标志物对患者的病理病程进行确切的分析,从而选择合适的治疗方式,就能够提高临床诊疗的精

确度,减少病人不必要的生理和精神消耗。

从第一次制备PLA2R抗体片段开始,到现在针对不同亚类抗体和更细致的表位研究,对于PLA2R表位扩展的检测已被证实在对IMN的诊断中有较高的检测灵敏度和特异性。CysR表位阳性对应较低浓度的PLA2R含量;当表位扩展到CTLD1以及CTLD678时,我们能够在临床上检测到更高的PLA2R浓度。对于目前大范围应用的尿蛋白含量的检测,血清抗PLA2R抗体含量及对应活性表位的检测明显具有时间上的优势,能够更早地反映疾病的分层情况。目前对于PLA2R表位的研究,显示出我们对IMN病因更细致的探讨,是对其病理机制的更深程度的研究。但是在实际的临床诊断中,仍然存在一些问题。首先,由于PLA2R抗原存在多个构象不同的表位,这就需要大量的样本对其进行佐证。其次,高通量多指标的检测要求,对仪器的开发和试剂的统一制备要求更高。目前实验室的研究检测条件还达不到“床边检测”的要求。在今后的研究中,除了对PLA2R表位扩展机理的更深层次研究外,也需要不断以“床边检测”的要求优化检测手段和方式,以真正为临床诊断提供新的方法。

参考文献 (References)

- [1] LIU W, GAO C, DAI H, et al. Immunological pathogenesis of membranous nephropathy: focus on PLA2R1 and its role [J]. *Front Immunol*, 2019, 10: 1809.
- [2] DEBIEC H, GUIGONIS V, MOUGENOT B, et al. Antenatal membranous glomerulonephritis with vascular injury induced by anti-neutral endopeptidase antibodies: toward new concepts in the pathogenesis of glomerular diseases [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2003, doi: 10.1097/01.ASN.0000067649.64849.75.
- [3] BECK L H, JR, BONEGIO R G, 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] MEYER-SCHWESINGER C, LAMBEAU G, STAHL R A. Thrombospondin type-1 domain-containing 7A in idiopathic membranous nephropathy [J]. *N Engl J Med*, 2015, 372(11): 1074-5.
- [5] SETHI S, MADDEN B J, DEBIEC H, et al. Exostosin 1/exostosin 2-associated membranous nephropathy [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2019, 30(6): 1123-36.
- [6] SETHI S, DEBIEC H, MADDEN B, et al. Semaphorin 3B-associated membranous nephropathy is a distinct type of disease predominantly present in pediatric patients [J]. *Kidney Int*, 2020, 98(5): 1253-64.
- [7] SETHI S, DEBIEC H, MADDEN B, et al. Neural epidermal growth factor-like 1 protein (NELL-1) associated membranous nephropathy [J]. *Kidney Int*, 2020, 97(1): 163-74.
- [8] CAZA T N, HASSEN S I, KUPERMAN M, et al. Neural cell adhesion molecule 1 is a novel autoantigen in membranous lupus nephritis [J]. *Kidney Int*, 2021, 100(1): 171-81.
- [9] BECK L H, JR. PLA2R and THSD7A: disparate paths to the same disease [J]? *J Am Soc Nephrol*, 2017, 28(9): 2579-89.
- [10] SALANT D J. Unmet challenges in membranous nephropathy [J]. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, 2019, 28(1): 70-6.
- [11] LUO W, OLARU F, MINER J H, et al. Alternative pathway is essential for glomerular complement activation and proteinuria in a mouse model of membranous nephropathy [J]. *Front Immunol*, 2018, 9: 1433.
- [12] RAMACHANDRAN R, KUMAR V, KUMAR A, et al. PLA2R antibodies, glomerular PLA2R deposits and variations in PLA2R1 and HLA-DQA1 genes in primary membranous nephropathy in South Asians [J]. *Nephrol Dial Transplant*, 2016, 31(9): 1486-93.
- [13] LATT K Z, HONDA K, THIRI M, et al. Identification of a two-SNP PLA2R1 haplotype and HLA-DRB1 alleles as primary risk associations in idiopathic membranous nephropathy [J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1): 15576.
- [14] CUI Z, XIE L J, CHEN F J, et al. MHC class II risk alleles and amino acid residues in idiopathic membranous nephropathy [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2017, 28(5): 1651-64.
- [15] ZHANG P, HUANG W, ZHENG Q, et al. A novel insight into the role of PLA2R and THSD7A in membranous nephropathy [J]. *J Immunol Res*, 2021, 2021: 8163298.
- [16] WANG Y, HE Y X, DIAO T T, et al. Urine anti-PLA2R antibody is a novel biomarker of idiopathic membranous nephropathy [J]. *Oncotarget*, 2018, 9(1): 67-74.
- [17] DE VRIESE A S, GLASSOCK R J, NATH K A, et al. A proposal for a serology-based approach to membranous nephropathy [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2017, 28(2): 421-30.
- [18] SEITZ-POLSKI B, DEBIEC H, ROUSSEAU A, et al. Phospholipase A2 receptor 1 epitope spreading at baseline predicts reduced likelihood of remission of membranous nephropathy [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2018, 29(2): 401-8.
- [19] LI W, GUO Y, ZHANG Z, et al. Comparison of 2 anti-PLA2R immunoassays for the diagnosis of primary membranous nephropathy [J]. *Lab Med*, 2018, 49(4): 316-22.
- [20] SOINI E, HEMMILÄ I. Fluoroimmunoassay: present status and key problems [J]. *Clin Chem*, 1979, 25(3): 353-61.
- [21] PETTERSSON K, SIITARI H, HEMMILÄ I, et al. Time-resolved fluoroimmunoassay of human chorionic gonadotropin [J]. *Clin Chem*, 1983, 29(1): 60-4.
- [22] SOINI E, KOJOLA H. Time-resolved fluorometer for lanthanide chelates: a new generation of nonisotopic immunoassays [J]. *Clin Chem*, 1983, 29(1): 65-8.
- [23] HUANG B, WANG L, CAO Y N, et al. Improvement of idiopathic membranous nephropathy diagnosis with ultrasensitive quantitative detection of anti-phospholipase A2 receptor [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2017, 139(6): 1988-90, e2.
- [24] HUANG B, ZHANG Y, WANG L, et al. Phospholipase A2 receptor antibody IgG4 subclass improves sensitivity and specificity in the diagnosis of idiopathic membranous nephropathy [J]. *Kidney Blood Press Res*, 2019, 44(4): 848-57.
- [25] 陈施晓, 刘建华, 秦晓松, 等. 特发性膜性肾病靶抗原PLA2R抗原表位的研究进展 [J]. *中国免疫学杂志* (CHEN S X, LIU J H, QIN X S, et al. Research progress on the PLA2R epitope of the target antigen in idiopathic membranous nephropathy [J]. *Chi-*

- nese Journal of Immunology), 2020, 36(20): 2552-7.
- [26] XU X, WANG G, CHEN N, et al. Long-term exposure to air pollution and increased risk of membranous nephropathy in China [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2016, 27(12): 3739-46.
- [27] KAO L, LAM V, WALDMAN M, et al. Identification of the immunodominant epitope region in phospholipase A2 receptor-mediating autoantibody binding in idiopathic membranous nephropathy [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2015, 26(2): 291-301.
- [28] SEITZ-POLSKI B, DOLLA G, PAYRÉ C, et al. Epitope spreading of autoantibody response to PLA2R associates with poor prognosis in membranous nephropathy [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2016, 27(5): 1517-33.
- [29] VANDERLUGT C J, MILLER S D. Epitope spreading [J]. *Curr Opin Immunol*, 1996, 8(6): 831-6.
- [30] TANG H, ZHU R, WALDMAN M, et al. Structural determinants of the dominant conformational epitopes of phospholipase A2 receptor in primary membranous nephropathy [J]. *J Biol Chem*, 2022, 298(3): 101605.
- [31] 李婷. 针对PLA2R结构域特异性IgG4抗体定量检测法的建立及预后分析[D]. 杭州: 浙江理工大学, 2021.
- [32] 吴青青. 抗PLA2R不同结构域IgG的定量检测方法的建立及初步临床应用[D]. 杭州: 浙江理工大学, 2021.
- [33] OSTERMANN M, BELLOMO R, BURDMANN E A, et al. Controversies in acute kidney injury: conclusions from a Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) Conference [J]. *Kidney Int*, 2020, 98(2): 294-309.
- [34] 赵毅, 徐道亮, 江恒, 等. 特发性膜性肾病不同治疗方案疗效的对比分析[J]. 当代医学(ZHAO Y, XU D L, JIANG H, et al. Comparative analysis of the efficacy of different treatment regimens for idiopathic membranous nephropathy [J]. *Contemporary Medicine*), 2021, 27(28): 30-3.
- [35] 孙卉, 孔薇. 中西医结合治疗特发性膜性肾病的现状与展望[J]. 实用中医内科杂志(SUN H, KONG W. Current status and prospect of treatment of idiopathic membranous nephropathy with integrated traditional Chinese and Western medicine [J]. *Journal of Practical Chinese Medicine*), 2022, 36(1): 59-62.