

doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2019.07.033

View this article at: <http://dx.doi.org/10.3978/j.issn.2095-6959.2019.07.033>

特发性膜性肾病自身抗原及基因单核苷酸多态性研究

徐维茜 综述 刘晓刚 审校

(哈尔滨医科大学附属第一医院肾内科, 哈尔滨 150000)

[摘要] 特发性膜性肾病(idiopathic membranous nephropathy, IMN)是成人肾病综合征的主要病因。现已发现M型磷脂酶A2受体(phospho-lipase A2 receptor, PLA2R)和1型血小板反应蛋白7A域(thrombospondin-type 1 domain containing 7A, THSD7A)两种自身抗原与成人IMN相关。全基因组关联研究(genome-wide association study, GWAS)确定了IMN两个最重要的危险因素为PLA2R(SNP rs4664308)和HLA-DQA1(SNP rs2187668), 且两种风险等位基因纯合子的比值为78.5。随后两者之间的基因-基因相互作用在中国IMN患者中得到验证。在中国, 长期暴露于高水平的PM2.5被确定为IMN的一个环境风险因素。

[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; 单核苷酸多态性

Study on autoantigen and gene single nucleotide polymorphism of idiopathic membranous nephropathy

XU Weixi, LIU Xiaogang

(Department of Nephrology, First Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150000, China)

Abstract Idiopathic membranous nephropathy (IMN) is the main pathogen of adult nephrotic syndrome. Up to now, it has been found that both the M-type phospholipase A2 receptor (PLA2R) and the type 1 thrombospondin 7A domain (THSD7A) are associated with adult IMN. The genome-wide association study (GWAS) has identified PLA2R(SNP rs4664308) and HLA-DQA1(SNP rs2187668) as two of the most important risk factors for IMN, and also the odds ratio of homozygosity for both was 78.5. Subsequently, the gene-gene interaction between the two was confirmed in Chinese IMN patients. The high level of PM2.5 for a long time in China has been identified as an environmental hazard for IMN.

Keywords idiopathic membranous nephropathy; phospho-lipase A2 receptor; thrombospondin-type 1 domain containing 7A; single nucleotide polymorphism

膜性肾病(membranous nephropathy, MN)是成人原发性肾病综合征最主要的病因, 约占成人肾病综合征的20%, 且多发于中老年, 男性较女

性多见。近年MN发病率持续上升, 在1997至2011年间从6.48%显著增加到22.79%, 已成为在中国人IgA肾病(IgAN)后第2种常见的原发性肾小球疾

收稿日期 (Date of reception): 2018-12-26

通信作者 (Corresponding author): 刘晓刚, Email: hrb-lxg@163.com

病^[1]。MN的病理学特征是肾小球上皮免疫复合物沉积、肾小球基底膜弥漫性增厚及沿肾小球毛细血管环周边的IgG和补体C3的颗粒染色。大约75%的MN病因不明确,被称为特发性膜性肾病(idiopathic membranous nephropathy, IMN),约25%的MN继发于自身免疫疾病、感染、药物和恶性肿瘤等,称为继发性膜性肾病(secondary membranous nephropathy, SMN)。尽管约1/3的MN患者能自发缓解,但30%~40%的患者在5~15年内发展为终末期肾病。

虽然现在IMN的发病机制尚未明确,但已发现许多与其相关的足细胞自身抗原,如中性肽链内切酶(neutral endopeptidase, NEP)、磷脂酶A2受体(phospho-lipase A2 receptor, PLA2R)和1型血小板反应蛋白7A域(thrombospondin-type 1 domain containing 7A, THSD7A)等。且随着对IMN发病机制越来越深入的研究,家族性IMN提示该病可能与基因有关。

1 IMN的自身免疫性抗原

1.1 中性内肽酶

2002年的一项研究^[2]描述了罕见的产前MN中的第一个自身抗原——中性内肽酶(NEP),编码NEP的基因是金属膜内肽酶(metal membrane peptidase, MME)。在母亲的MME基因中发现截短突变,因此母亲不表达NEP蛋白是造成妊娠期同种免疫的原因。当在妊娠期间遇到胎儿NEP(父亲蛋白)时,产生抗NEP抗体(对母亲无影响),并穿过胎盘转移至胎儿体内,引起新生儿MN^[2]。一项国外的研究^[3]表明:与抗NEP IgG4抗体相比,抗NEP IgG1抗体可能是发展严重疾病表型所必需的。

1.2 PLA2R

PLA2R是分泌型磷脂酶A2的1型跨膜受体,其为甘露糖受体家族的成员。2009年,Beck等^[4]对自身抗原PLA2R的循环抗体的研究发现,使得人们对IMN作为自身免疫性疾病的认识发生了革命性的变化。PLA2R存在于正常足细胞和IMN患者的肾小球上皮免疫沉积物中,IMN患者血清中的抗PLA2R抗体主要是IgG4,其是肾小球沉积物中的主要免疫球蛋白亚类。Beck等^[4]通过蛋白质印迹法和质谱分析发现:37名患者中有26名检测到循环抗体,阳性率达70%。随后研究^[5-7]表明:在不同地域、不同种族的人群中,抗PLA2R抗体阳性检出率有一定的差异。来自中国的几项研究^[8-9]也发

现抗PLA2R阳性抗体的流行程度各不相同,阳性率最高可达82%,最低的可有59%。以上各研究的检测方法不尽相同,包括免疫荧光、ELISA或蛋白质印迹法分析等,可能是由于抗体检测的方法不同导致阳性检出率不同。

在与系统性红斑狼疮、感染性疾病、药物中毒、恶性肿瘤等相关的SMN中观察到抗PLA2R抗体的阳性率较低^[10],其看似特异于IMN,但有活动性结节病和乙型肝炎病毒相关的MN患者也具有较高的阳性率^[11-12]。由于特发性和继发性MN患者的治疗策略不同,因此区分这两组患者具有重要的临床意义。

抗PLA2R抗体效价与临床特征关系密切。研究^[13]发现:抗PLA2R抗体阳性患者与较高水平的蛋白尿、血肌酐和较低水平的肾小球滤过率(eGFR)相关;抗PLA2R抗体滴度越高的患者,发生肾功能衰竭的概率更大,自发缓解率更低。在随访过程中,低滴度抗PLA2R抗体组患者达到完全缓解的比例明显高于高滴度抗PLA2R抗体组的患者,且达到缓解的时间更快。与无抗体的患者相比,抗PLA2R抗体阳性与治疗抵抗性相关^[14]。另一项研究^[15]发现:抗PLA2R抗体阳性和肾小球PLA2R染色阳性的患者与未检出抗体阳性和肾小球阳性染色的患者相比,更有可能达不到缓解,联合阳性是未缓解的显著预测值。抗PLA2R抗体存在于疾病活动期间,而抗PLA2R抗体的下降或完全消失先于蛋白尿的消退,一般来说,抗体水平的下降先于蛋白尿的变化数月^[4,16]。此外,抗PLA2R抗体的再现是疾病复发的有力预测指标^[17]。

1.3 THSD7A

20%~30%的IMN患者可能表现出其他抗原阳性。2014年,Tomas等^[18]在血清抗PLA2R抗体阴性的原发性MN患者中发现THSD7A循环抗体,通过免疫组织化学发现肾组织中THSD7A抗体表达增强,而在其他肾小球疾病患者和健康人群中没有发现该抗体。有趣的是,抗THSD7A抗体在女性中更常见。至此,THSD7A被确定为成人MN的第2个靶抗原。2015年,一项日本研究^[19]发现9.1%的IMN患者肾组织THSD7A表达增强,与肾组织PLA2R表达增强的患者相比,THSD7A表达增强的患者更年轻。完全缓解的IMN患者无法检测到的血清抗THSD7A抗体,而部分缓解和无缓解的患者血清抗THSD7A抗体仍保持阳性^[20]。

THSD7A分子量约为250 kD,与PLA2R相似,主要表达于肾足细胞膜,而在内皮细胞及系膜细

胞少有表达, 主要通过分子模拟机制形成原位免疫复合物致病, 但具体致病机制并不清楚。与PLA2R不同的是, THSD7A在小鼠和人足细胞上均有表达, 将人抗THSD7A抗体与小鼠THSD7A结合, 导致蛋白尿和类似MN的组织病理学^[21]。这一发现证实了抗原-抗体相互作用在MN发病中起关键作用的假设。

2 IMN 的遗传学研究

2.1 IMN 全基因组关联研究

尽管IMN不是一种严格符合孟德尔遗传定律的遗传病, 但有研究^[22]发现IMN的家族性发生, 提示遗传因素在其发病机制中的重要性。到目前为止, IMN遗传因素最大的突破是在2011年发表的3个GWAS^[23]。GWAS检查所有染色体, 其最简单的形式是比较病例中变异的等位基因频率与对照的等位基因频率。GWAS通常使用常见的单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP), 其由特定人群中大于5%的等位基因频率定义。该项研究^[23]包括来自法国、荷兰和英国人群的3个独立的欧洲队列, 检测了556例IMN患者和2 338例健康对照组的242 824个常见单核苷酸多态性, 并鉴定了2个与IMN相关的重要基因组位点: 位于染色体2q24上编码PLA2R1的基因(SNP rs4664308)和位于染色体6p21上编码HLA II类 α 链的基因(HLA-DQA1)(SNP rs2187668)。然后, 该研究评估了2个风险等位基因对IMN的影响。HLA-DQA1中风险等位基因纯合的优势比是PLA2R中风险等位基因纯合的优势比的5倍, 说明HLA-DQA1等位基因与白种人IMN最密切相关。与2个基因座的保护性等位基因的纯合子相比, 风险等位基因的纯合子的优势比增加了78.5^[23]。

随后, 验证实验在全球范围内展开, 包括中国、印度、西班牙^[14,24-25], 研究证实了IMN与HLA-DQA1, PLA2R1的风险等位基因之间存在显著关联。一项大型研究^[24]还发现了这2个风险等位基因之间的基因-基因相互作用, HLA-DQA1和PLA2R1的风险基因型的优势比分别为1.54和3.42, 基因的风险基因型的组合使IMN发展的风险比2个基因座的保护基因型高11.13倍。此外, 这些风险等位基因与血清抗PLA2R抗体和肾小球PLA2R的表达存在强烈相关性。74%的PLA2R高风险基因型患者和4%的PLA2R低风险基因型患者可检测到血清抗PLA2R抗体。在具有HLA-DQA1和PLA2R1高风险基因型组合的患者中, 73%的患者可检测到自身抗体,

75%的患者肾小球中表达PLA2R。相反, 在携带2种基因的保护基因型的个体中, 没有一个具有抗PLA2R抗体, 且PLA2R在肾小球表达弱或不表达。此外, 研究^[23]显示中国人群中HLA-DQA1的风险等位基因频率较白种人群低, 但PLA2R基因变异与IMN发展以及抗PLA2R抗体的产生具有更强的相关性。来自西班牙的研究^[25]首次提出: 这2个风险基因有助于预测IMN对免疫抑制剂治疗的应答及疾病的预后, 免疫抑制治疗对携带IMN风险基因型组合的患者更有效。

2.2 PLA2R 其他 SNP 研究

GWAS的结果表明PLA2R编码区内罕见的遗传变异可能有助于抗体形成。来自亚洲的研究^[26-28]揭示了与GWAS不同的PLA2R SNP与MN之间的关联。韩国的研究^[26]检验了PLA2R中的2个SNP(rs35771982和rs3828323), 发现具有rs35771982 C/C基因型的患者对IMN具有更高的易感性, 且与继发性MN不相关。来自台湾的研究人员^[27]检验了PLA2R中的2个SNP(rs6757188和rs35771982), 发现rs35771982 G等位基因和G/G基因型可能增加IMN的发病率; 具有rs6757188 C/T基因型和rs35771982 C/G基因型的患者, 疾病进展程度高、缓解率低。日本一项研究^[28]发现: PLA2R中除SNP rs35771982外的2种新型SNP(rs2715928和rs16844715)也与IMN显著相关。与亚洲和欧洲人群不同的是, PLA2R SNP rs35771982与非洲裔美国人IMN无关。一项来自北美洲的大型研究^[29]显示: PLA2R SNP rs35771982仅与白种人PLA2R阳性的MN相关, 但与非洲裔美国人PLA2R阳性或阴性的MN无关; 同样, HLA-DQA1 SNP rs2187668与PLA2R阳性的MN呈正相关, 与白种人PLA2R阴性的MN呈负相关, 而与非洲裔美国人PLA2R阳性的MN相关, 但与PLA2R阴性的MN无关。

2.3 HLA 基因座相关研究

GWAS证实了HLA区域内的基因多态性在许多自身免疫性和炎症性疾病(包括系统性红斑狼疮、多发性硬化症、炎症性肠病、类风湿性关节炎等其他疾病)的遗传易感性中具有关键作用。该区域可以细分为I~III类。I类包括HLA-A, HLA-B和HLA-C, 其将内源性抗原肽呈递给细胞毒性T细胞; II类由HLA-DR和HLA-DQ分子组成, 参与识别和呈递外源性抗原肽, 与其受体CD4结合; III类包括补体系统中几种成分的基因, 如C4, B因子

和C2。

1979年, 英国学者^[30]首次发表了关于HLA基因座对IMN风险的遗传贡献的报告, 其中发现了HLA-DR3。日本的研究^[28]报道了IMN中的风险单倍型DRB1*1501-DQB1*0602。来自中国的2项研究^[31-32]为HLA等位基因在IMN中的作用提供了新的见解。第1项研究^[31]对HLA-DRB1, DQA1, DQB1和DPB1基因进行四位分辨率分型, 并指出2个经典等位基因, DRB1*1501和DRB1*0301对汉族人群IMN风险具有显著影响, 这些等位基因也与抗PLA2R抗体显著相关。与GWAS中的SNP相似, 两种HLA等位基因都与PLA2R SNP rs4664308存在基因-基因相互作用。PLA2R基因座上风险等位基因的纯合子与DRB1*1501或DRB1*0301相结合, 使IMN疾病风险增加高达30倍。第2项研究^[32]证实了DRB1*1501与PLA2R阳性的IMN相关, 并建议将DRB3*0202作为第二独立危险因素。通过基因型-表型相关性分析发现DRB1*1501与疾病发作的年龄密切相关。在PLA2R阳性IMN病例中, 携带DRB1*1501的患者中位年龄为35岁, 而所有不携带此基因型的患者中位年龄为50岁。

3 结论

自2009年以来, PLA2R被确定为IMN中最重要的致病性自身抗原。环境因素也参与IMN发病, 但其致病机制尚不清楚。来自中国的一项研究^[33]显示: IMN的发病率上升与长期暴露于高浓度的PM2.5有关。当PLA2R和HLA区域中的基因多态性、环境因素3个独立的风险因素结合时, 可能导致IMN疾病发生。这些等位基因中存在种族特异性差异, 并且潜在风险等位基因可能有助于预测治疗效果与疾病预后。未患IMN但具有风险等位基因的正常对照群体, 将有助于鉴别导致最终疾病的触发因素或环境因素, 以进一步了解这种复杂的遗传易感疾病。

参考文献

1. Pan X, Xu J, Ren H, et al. Changing spectrum of biopsy-proven primary glomerular diseases over the past 15 years: a single-center study in China//Chen Nan. New insights into glomerulonephritis[M]. Basel: Karger Publishers, 2013: 22-30.
2. Debiec H, Nauta J, Coulet F, et al. Role of truncating mutations in MME gene in fetomaternal alloimmunization and antenatal

- glomerulopathies[J]. Lancet, 2004, 364(9441): 1252-1259.
3. Vivarelli M, Emma F, Pellé T, et al. Genetic homogeneity but IgG subclass-dependent clinical variability of alloimmune membranous nephropathy with anti-neutral endopeptidase antibodies[J]. Kidney Int, 2015, 87(3): 602-609.
4. Beck LH Jr, Bonegio RGB, 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.
5. Hofstra JM, Debiec H, Short CD, et al. Antiphospholipase A2 receptor antibody titer and subclass in idiopathic membranous nephropathy[J]. J Am Soc Nephrol, 2012, 23(10): 1735-1743.
6. Hoxha E, Thiele I, Zahner G, et al. Phospholipase A2 receptor autoantibodies and clinical outcome in patients with primary membranous nephropathy[J]. J Am Soc Nephrol, 2014, 25(6): 1357-1366.
7. Oh YJ, Yang SH, Kim DK, et al. Autoantibodies against phospholipase A2 receptor in Korean patients with membranous nephropathy[J]. PLoS One, 2013, 8(4): e62151.
8. Qin W, Beck LH Jr, Zeng C, et al. Anti-phospholipase A2 receptor antibody in membranous nephropathy[J]. J Am Soc Nephrol, 2011, 22(6): 1137-1143.
9. Pang L, Zhang AM, Li HX, et al. Serum anti-PLA2R antibody and glomerular PLA2R deposition in Chinese patients with membranous nephropathy: a cross-sectional study[J]. Medicine (Baltimore), 2017, 96(24): e7218.
10. Debiec H, Ronco P. Immunopathogenesis of membranous nephropathy: an update[J]. Semin Immunopathol, 2014, 36(4): 381-397.
11. Xie Q, Li Y, Xue J, et al. Renal phospholipase A2 receptor in hepatitis B virus-associated membranous nephropathy[J]. Am J Nephrol, 2015, 41(4/5): 345-353.
12. Stehlé T, Audard V, Ronco P, et al. Phospholipase A2 receptor and sarcoidosis-associated membranous nephropathy[J]. Nephrol Dial Transplant, 2015, 30(6): 1047-1050.
13. Timmermans SA, Damoiseaux JG, Heerings-Rewinkel PT, et al. Evaluation of anti-PLA2R1 as measured by a novel ELISA in patients with idiopathic membranous nephropathy: a cohort study[J]. Am J Clin Pathol, 2014, 142(1): 29-34.
14. 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): 1486-1493.
15. 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.
16. 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.
17. Ruggenti 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.
 18. 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.
 19. Iwakura T, Ohashi N, Kato A, et al. Prevalence of enhanced granular expression of thrombospondin type-1 domain-containing 7A in the glomeruli of Japanese patients with idiopathic membranous nephropathy[J]. *PLoS One*, 2015, 10(9): e0138841.
 20. Hoxha E, Beck LH Jr, Wiech T, et al. An indirect immunofluorescence method facilitates detection of thrombospondin type 1 domain-containing 7A-specific antibodies in membranous nephropathy[J]. *J Am Soc Nephrol*, 2017, 28(2): 520-531.
 21. 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.
 22. Bockenbauer D, Debiec H, Sebire N, et al. Familial membranous nephropathy: an X-linked genetic susceptibility? [J]. *Nephron Clin Pract*, 2008, 108(1): c10-c15.
 23. Stanescu HC, Arcos-Burgos M, Medlar A, et al. Risk HLA-DQA1 and PLA2R1 alleles in idiopathic membranous nephropathy[J]. *N Engl J Med*, 2011, 364(7): 616-626.
 24. Lv J, Hou W, Zhou X, et al. Interaction between PLA2R1 and HLA-DQA1 variants associates with anti-PLA2R antibodies and membranous nephropathy[J]. *J Am Soc Nephrol*, 2013, 24(8): 1323-1329.
 25. Bullich G, Ballarín J, Oliver A, et al. HLA-DQA1 and PLA2R1 polymorphisms and risk of idiopathic membranous nephropathy[J]. *Clin J Am Soc Nephrol*, 2014, 9(2): 335-343.
 26. 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[J]. *Nephron Clin Pract*, 2011, 117(3): c253-c258.
 27. 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]. *J Biomed Sci*, 2010, 17: 81.
 28. Thiri M, Honda K, Kashiwase K, et al. High-density association mapping and interaction analysis of PLA2R1 and HLA regions with idiopathic membranous nephropathy in Japanese[J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 38189.
 29. Saeed M, Beggs ML, Walker PD, et al. PLA2R-associated membranous glomerulopathy is modulated by common variants in PLA2R1 and HLA-DQA1 genes[J]. *Genes Immun*, 2014, 15(8): 556-561.
 30. Klouda PT, Manos J, Acheson EJ, et al. Strong association between idiopathic membranous nephropathy and HLA-DRw3[J]. *Lancet*, 1979, 2(8146): 770-771.
 31. Cui Z, Xie LJ, Chen FJ, et al. MHC class II risk alleles and amino acid residues in idiopathic membranous nephropathy[J]. *J Am Soc Nephrol*, 2017, 28(5): 1651-1664.
 32. Le WB, Shi JS, Zhang T, et al. HLA-DRB1*15:01 and HLA-DRB3*02:02 in PLA2R-related membranous nephropathy[J]. *J Am Soc Nephrol*, 2017, 28(5): 1642-1650.
 33. 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 Nephro*, 2016, 27(12): 3739-3746.

本文引用: 徐维茜, 刘晓刚. 特发性膜性肾病自身抗原及基因单核苷酸多态性研究[J]. 临床与病理杂志, 2019, 39(7): 1576-1580. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2019.07.033

Cite this article as: XU Weixi, LIU Xiaogang. Study on autoantigen and gene single nucleotide polymorphism of idiopathic membranous nephropathy[J]. *Journal of Clinical and Pathological Research*, 2019, 39(7): 1576-1580. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2019.07.033