

检测血、尿 IgG4 在特发性膜性肾病中的临床意义

李 璐^{1,2}, 曲 贞¹, 张宜苗¹, 于 峰¹, 黄 婧¹, 杨 瑞¹, 赵明辉¹, 刘 刚^{1Δ}

(1. 北京大学第一医院肾内科, 北京大学肾脏病研究所, 卫生部肾脏疾病重点实验室, 北京 100034; 2. 江苏大学附属医院肾内科)

[摘要] **目的:** 探讨 IgG4/IgG 比值作为反映特发性膜性肾病病情活动和治疗预后的生物学指标的可能性。**方法:** 收集 40 例特发性膜性肾病、16 例微小病变和 10 例局灶节段性肾小球硬化患者肾活检当天的血和尿标本, 以 32 例健康志愿者的血和尿作为对照组。IgG 和 IgG4 的测定均采用夹心酶联免疫吸附法, IgG4/IgG 由 IgG4 的浓度除以 IgG 的浓度得出。**结果:** 特发性膜性肾病患者血和尿 IgG4/IgG 比值分别显著高于微小病变和局灶节段性肾小球硬化患者 (P 均 < 0.05); 特发性膜性肾病中, 肾病综合征患者血和尿 IgG4/IgG 均高于非肾病水平蛋白尿患者 ($P = 0.063, P < 0.05$), 缓解后患者血和尿 IgG4/IgG 均较治疗前显著降低 ($P < 0.05$), 而未缓解患者与治疗前比较, 该比值无显著下降, 甚至反而升高。24 例随访患者中, 2 年随访期内复发患者的尿 IgG4/IgG 显著高于未复发者 ($P < 0.05$), 肾活检时尿 IgG4/IgG $\geq 9\%$ 的患者有较高的复发趋势 ($P = 0.071$)。**结论:** IgG4/IgG 比值可能有望作为反映特发性膜性肾病病情活动和治疗预后的生物学指标之一。

[关键词] 肾小球肾炎, 膜性; 肾小球硬化, 病灶性; 免疫球蛋白 G

[中图分类号] R692.31 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-167X(2010)06-0671-04

doi: 10.3969/j.issn.1671-167X.2010.06.016

Clinical significance of detection of plasma and urine IgG4 in idiopathic membranous nephropathy

LI Jun^{1,2}, QU Zhen¹, ZHANG Yi-miao¹, YU Feng¹, HUANG Jing¹, YANG Rui¹, ZHAO Ming-hui¹, LIU Gang^{1Δ}

(1. Department of Nephrology, Peking University First Hospital, Institute of Nephrology, Peking University, Beijing 100034, China; 2. Department of Nephrology, the Affiliated Hospital of Jiangsu University)

ABSTRACT Objective: To investigate the possibility of IgG4/IgG as one of biomarkers to reflect disease activity and the relapse of idiopathic membranous nephropathy (IMN). **Methods:** Plasma and urine samples were obtained from patients with IMN (Twenty-four patients had follow-up data), minimal change disease (MCD) and focal segmental glomerulosclerosis (FSGS) before immunosuppressive therapy. Concentrations of plasma and urine IgG4 and total IgG were detected by sandwich ELISA. The ratio of IgG4/IgG was calculated as the concentration of IgG4 divided by total IgG. **Results:** Both plasma and urine IgG4/IgG ratios were significantly higher in IMN group compared with MCD or FSGS group (both $P < 0.05$). In IMN, both plasma and urine IgG4/IgG ratios in patients with nephritic syndrome were significantly higher verse those with subnephrotic proteinuria ($P = 0.063; P < 0.05$). Both plasma and urine IgG4/IgG ratios were significantly decreased with remission ($P < 0.05$) and maintained or even increased with resistance to therapy. Patients who relapsed within 2 years had higher urine IgG4/IgG-ratios than those who had no relapse ($P < 0.05$), and patients with urine IgG4/IgG-ratios $\geq 9\%$ upon renal biopsy had higher relapse tendency ($P = 0.071$). **Conclusion:** Both plasma and urine IgG4/IgG ratios might be a promising biomarker to reflect disease activity of IMN, and higher urine IgG4/IgG ratios might suggest higher relapse tendency.

KEY WORDS Glomerulonephritis, membranous; Glomerulosclerosis, focal; Immunoglobulin G

特发性膜性肾病 (idiopathic membranous nephropathy, IMN) 是成人肾病综合征常见的疾病, 目前认为该病系自身抗体识别肾小球足细胞的靶抗原, 在足突下和基底膜外侧形成原位免疫复合物, 激活补体形成亚溶解性 (sub-lytic) 的膜攻击复合物 (membrane attack complex, MAC), 继而引起足细胞

形态学改变并引发蛋白尿和低蛋白血症等临床症状^[1-2]。新近发现的 3 种 IMN 可能的“肇事”抗原——M 型磷脂酶 A2 受体、醛糖还原酶和超氧化物歧化酶, 在肾小球内与 IgG4 的沉积部位一致, 提示 IgG4 可能起关键作用, IMN 可能为 Th2 细胞介导的免疫反应所致^[3-4]。

基金项目: “教育部教育振兴行动计划特殊专项 (“九八五”工程) (985-2-033-39) 基金及长江学者和创新团队发展计划 (IRT0803) 基金资助 Supported by Special Fund for Promotion of Education, Ministry of Education P. R. C. (985-2-033-39) and Program for Changjiang Scholars and Innovative Research Team (IRT0803)

Δ Corresponding author's e-mail, liugang2003@medmail.com.cn

目前关于 IMN 患者血中 IgG4 水平的研究报道尚不多见,并且研究结果不一致,一组研究提示 IMN 患者血中 IgG4 占总 IgG 的比率高于膜型狼疮性肾炎患者、膜增生性肾小球肾炎患者及健康对照者^[5];另两组研究认为 IgG4 占总 IgG 的比率在上述三者之间无差异^[6-7];还有一组研究儿童 IMN,患儿血 IgG4 占总 IgG 的比率显著高于膜增生性肾小球肾炎患者和膜型狼疮性肾炎患者^[8]。已有的关于 IMN 患者尿 IgG4 的研究发现,尿 IgG4/IgG2 比值在 IMN 低于微小病变肾病及健康对照组^[9],环孢素治疗有效的 IMN 患者尿 IgG4 排泄率随疾病活动而降低^[10],因此,尿 IgG4 有可能成为反映肾 IgG4 沉积的无创性指标,并且可能与 IMN 的病情活动有关。

本研究旨在研究 IMN 患者血和尿 IgG4 占总 IgG 的比率 (IgG4/IgG),并与同为肾病综合征的微小病变 (minimal change disease, MCD) 患者、局灶节段性肾小球硬化 (focal segmental glomerulosclerosis, FSGS) 患者进行比较,探讨 IgG4/IgG 值是否可以作为 IMN 诊断、治疗以及预后的无创性指标。

1 资料与方法

1.1 研究对象

选择 2002 ~ 2008 年间在北京大学第一医院肾内科经肾活检确诊的 IMN 患者 40 例, MCD 患者 16 例和 FSGS 患者 10 例。IMN 患者排除继发性膜性肾病 (包括肿瘤相关 MN、乙肝相关 MN、MLN、药物及毒素相关 MN), MCD 患者排除继发性 MCD [包括淋巴瘤、非甾体类抗炎药 (non-steroidal anti-inflammatory drug, NSAIDs)、Kimura 病等], FSGS 患者排除继发性 FSGS (包括 HIV、药物、肥胖和高血压等); 所有患者均排除尿路感染和急性肾衰竭等并发症。在 40 例 IMN 患者中, 28 例表现为肾病综合征, 12 例表现为非肾病水平蛋白尿 ($< 3.5 \text{ g/d}$); 其中 10 例肾病综合征患者治疗前后的血和尿标本也予以收集。根据 Ehrenreich 等^[11] 的病理分期标准, IMN 患者 I 期 24 例, II 期 10 例, III 期 6 例。选取 32 例健康志愿者作为对照组。本研究开始前经北京大学第一医院伦理委员会审议批准, 所有参与研究的患者与志愿者均签署知情同意书。

1.2 实验方法

收集上述患者肾活检当天未曾接受激素或免疫抑制剂治疗的血和尿标本。

1.2.1 双抗体夹心酶联免疫吸附法检测 IgG 水平^[12] 兔多克隆抗人 IgG 包被酶标微孔板, 37 °C 孵育 60 min; 将稀释的标准品和待检样本加入酶标微孔

内, 37 °C 孵育 60 min; 加入辣根过氧化物酶标记的小鼠单克隆抗人 IgG (Fc 段), 37 °C 孵育 60 min; 加入底物显色液, 用酶标仪在 490 nm 读取光密度 (D) 值。

1.2.2 双抗体夹心酶联免疫吸附法检测 IgG4 水平^[7] 小鼠单克隆抗人 IgG4 包被酶标微孔板, 37 °C 孵育 60 min; 将稀释的标准品和待检样本加入酶标微孔内, 37 °C 孵育 60 min; 加入辣根过氧化物酶标记的小鼠单克隆抗人 IgG (H + L 段), 37 °C 孵育 60 min; 加入底物显色液, 用酶标仪在 490 nm 读取光密度 (D) 值。

1.2.3 计算 IgG4/IgG 比率 拟合 IgG 和 IgG4 浓度标准曲线, 确定 IgG 和 IgG4 浓度, IgG4/IgG 比率由 IgG4 的浓度除以 IgG 的浓度得出。

1.2.4 治疗评估标准 随访患者的治疗评估: (1) 完全缓解: 治疗后尿蛋白 $< 0.3 \text{ g/d}$, 血清白蛋白 $> 35 \text{ g/L}$; (2) 部分缓解: 治疗后尿蛋白下降 $> 50\%$, 且在 $0.3 \sim 3.5 \text{ g/d}$, 血清白蛋白 $> 35 \text{ g/L}$; (3) 未缓解: 治疗后未达上述指标; (4) 复发: 部分或完全缓解至少 1 个月后, 尿蛋白再次 $> 3.5 \text{ g/d}$ 。

1.3 统计学分析

计量资料用均数 \pm 标准差或中位数 (最小值, 最大值) 表示, 正态分布资料多组之间的均数比较采用方差分析法, 非正态分布资料采用非参数检验, 多组等级变量之间的比较用 Kruskal Wallis H 检验, 两组等级变量之间的检验采用 Mann-Whitney U 检验, 非参数指标与其他指标之间的相关性采用 Spearman 相关分析, 预后分析采用 K-M 生存分析, $P < 0.05$ 认为有统计学意义, 统计分析由 SPSS 统计软件包完成 (version 11.0; Chicago, IL)。

2 结果

2.1 患者的一般资料和常规肾病理检查

与 IMN 患者相比, MCD 和 FSGS 患者的性别比例、年龄、尿蛋白定量及肌酐水平差异均无统计学意义, MCD 患者的血白蛋白低于 IMN 患者 ($P < 0.05$, 表 1)。

2.2 各组患者血和尿 IgG4/IgG 比率的比较

IMN 患者血和尿 IgG4/IgG 比值均显著高于 MCD、FSGS 和健康志愿者 ($P < 0.05$, 表 2)。表现为肾病综合征的 IMN 患者血和尿 IgG4/IgG 比率高于非肾病蛋白尿者 ($P = 0.063$, $P < 0.05$, 表 3)。不同病理分期 I、II 和 III 期之间比较, 血和尿 IgG4/IgG 比率相比, 差异均无统计学意义。

IMN 患者获得完全或部分缓解后, 血白蛋白从 (28.5 ± 1.8) g/L 上升至 (40.7 ± 2.4) g/L , 而尿蛋

白由(4.9 ± 1.4) g/d 降至(1.3 ± 1.0) g/d。获得完全或部分缓解的 6 例 IMN 患者,平均血 IgG4/IgG 比率从治疗前的 7.7% ± 3.1% 降至 4.7% ± 0.7% ($P=0.031$),平均尿 IgG4/IgG 比率从治疗前 9.0% (5.7% ~ 21.5%) 降至 4.0% (1% ~ 12.6%) ($P < 0.05$);而未获得缓解的 4 例 IMN 患者,其血 IgG4/

IgG 比率由 8.6% ± 2.6% 升至 9.5% ± 2.8%,尿 IgG4/IgG 比率由 8.1% (5.3% ~ 10.6%) 升至 9.1% (5.7% ~ 12.3%);但在免疫抑制剂治疗之前,获得完全或部分缓解的 IMN 患者与未获得缓解的 IMN 患者之间,血 IgG4/IgG 比率的差异无统计学意义(表 4)。

表 1 各组患者的一般临床资料

Table 1 Comparison of baseline demographic data among groups

Baseline characteristics	IMN-NS	IMN-proteinuria	MCD	FSGS	Control
<i>n</i>	28	12	16	10	32
Age (years)	51 ± 12	47 ± 13	51 ± 11	40 ± 13	50 ± 12
Sex (M/F)	16/12	6/6	11/8	6/4	18/14
Urinary protein excretion (g/d)	5.9 ± 3.0	2.0 ± 1.0 ^Δ	7.1 ± 3.6	9.5 ± 7.0	negative
Serum albumin (g/L)	24.3 ± 4.2	34.6 ± 2.6 ^Δ	20.9 ± 4.7*	23.6 ± 5.0	40 ± 5 ^Δ
Serum creatinine (μmol/L)	74 ± 17	68 ± 10	74 ± 18	84 ± 17	70 ± 12

* $P < 0.05$, $\Delta P < 0.01$, vs IMN-NS. MCD, minimal change disease; IMN-NS, idiopathic membranous nephropathy with nephrotic syndrome; IMN-proteinuria, idiopathic membranous nephropathy with subnephrotic proteinuria (< 3.5 g/d); FSGS, focal segmental glomerulosclerosis; Control, healthy volunteer.

表 2 各组之间血和尿 IgG4/IgG 比率的比较

Table 2 Comparisons of plasma and urinary IgG4/IgG ratios among groups

	IMN	MCD	FSGS	Control
<i>n</i>	28	16	10	32
Plasma IgG4/IgG (%)	8.8 ± 3.9	6.2 ± 3.6*	5.1 ± 3.2*	6.7 ± 3.5*
Urinary IgG4/IgG (%)	11.4 (3.8 - 38.4)	5.8 ^Δ (1.0 - 13.0)	9.3* (4.5 - 14.6)	negative

* $P < 0.05$, $\Delta P < 0.01$, vs IMN.

表 3 IMN 中表现为肾病综合征与非肾病水平蛋白

尿患者之间血和尿 IgG4/IgG 比率的比较

Table 3 Comparisons of plasma and urinary IgG4/IgG ratios between IMN with nephrotic syndrome and IMN with non-nephrotic range proteinuria

	IMN-NS (<i>n</i> = 28)	IMN-proteinuria (<i>n</i> = 12)
Plasma IgG4/IgG (%)	8.8 ± 3.9	6.2 ± 3.5
Urinary IgG4/IgG (%)	11.4 (3.7 - 38.4)	6.2 (0 - 21.5)*

IMN-NS, idiopathic membranous nephropathy with nephrotic syndrome; IMN-proteinuria, idiopathic membranous nephropathy with subnephrotic proteinuria (< 3.5 g/d). * $P < 0.05$, vs IMN-NS.

表 4 IMN 治疗前后血和尿 IgG4/IgG 比率的变化 (%)

Table 4 Comparison of plasma and urinary IgG4/IgG of patients with IMN and nephrotic syndrome before and after treatment of six months (%)

	Plasma IgG4/IgG	Urinary IgG4/IgG
Remission (<i>n</i> = 6)		
Before treatment	7.7 ± 3.1	9.0 (5.7 - 21.5)
After treatment	4.7 ± 0.7*	4.0 (1 - 12.6)*
Non-remission (<i>n</i> = 4)		
Before treatment	8.6 ± 2.6	8.1 (5.3 - 10.6)
After treatment	9.5 ± 2.8	9.1 (5.7 - 12.3)

* $P < 0.05$, before treatment vs after treatment.

2.3 尿 IgG4/IgG 比率与复发的预后分析

24 例有随访和预后资料的 IMN 患者,根据其尿 IgG4/IgG 比率分为两组(每组 12 例,9% 为分界值);平均随访时间是 28 ± 16 (15 ~ 86) 月。在平均 2 年随访期内,复发的 IMN 患者尿 IgG4/IgG 比率显著高于无复发的 IMN 患者 [10.8% (3.8% ~ 21.6%) vs. 6.3% (3.4% ~ 11.1%), $P = 0.021$]。生存分析提示(图 1),尿 IgG4/IgG 比率 ≥ 9% 者有更高的复发趋势($P = 0.071$)。

2.4 相关分析

血与尿 IgG 浓度之间无相关性,血与尿 IgG4 浓度之间无相关性,尿 IgG4、IgG4/IgG 比率与尿蛋白之间也无相关性。

3 讨论

正常人血中 IgG4 是所占比率最小的 IgG 亚类,其合成主要受 Th2 细胞所分泌的细胞因子调控^[13], IMN、MCD 和 FSGS 是构成成人原发性肾病综合征的最常见疾病,目前公认的观点是,尽管 IMN 和 MCD 都与 Th2 细胞介导的免疫反应关系密切,但 IMN 中存在以 IgG4 为主的 IgG 沉积于肾小球并与足细胞的固有抗原形成免疫复合物致病,而 MCD 和

FSGS 中则完全没有免疫复合物^[13-15],其发病机制尚未被完全阐明。鉴于 IgG4 在 IMN 发病机制中可能的重要作用,较为系统地观察比较 IMN 中不同蛋白尿程度及不同治疗反应的患者之间,包括与 MCD 和 FSGS 比较,其血尿 IgG4 水平的差异可能具有十分重要的意义。

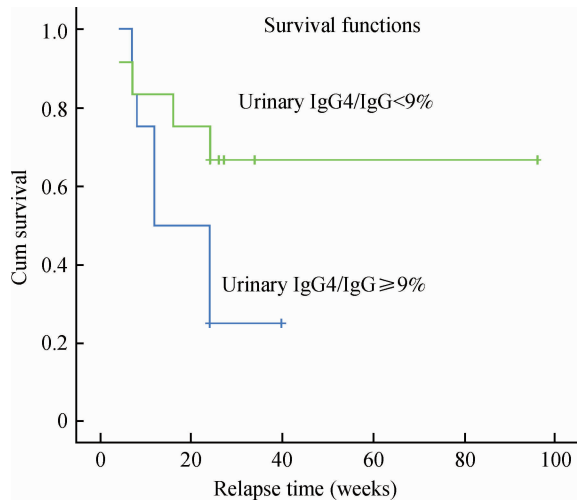


图 1 尿 IgG4/IgG 比率高组与尿 IgG4/IgG 比率低组复发可能性的预后分析

Figure 1 K-M analysis of relapse in higher and lower urinary IgG4/IgG-ratios

本研究发现,IMN 患者血和尿 IgG4/IgG 比率均显著高于 MCD 患者、FSGS 患者和健康志愿者,这印证了 Kuroki 等^[7]的研究结果。血和尿 IgG4/IgG 比率在 IMN、MCD 和 FSGS 之间有较多重叠,它尚不能作为上述疾病的鉴别诊断指标。近年来,Beck 等^[3]报道 70% 的 IMN 患者中 IgG4 是 PLA₂R 抗体的主要 IgG 亚类,并在肾中与免疫复合物共定位,因此,检测血和尿中针对 PLA₂R 的 IgG4 水平有可能在未来成为诊断 IMN 的无创性手段。

研究还发现,血和尿 IgG4/IgG 比率与 IMN 的病情活动密切相关。随病情缓解和尿蛋白的改善,血和尿 IgG4/IgG 比率下降;而在治疗抵抗的 IMN 患者中,血和尿 IgG4/IgG 比率未见下降,甚至上升。此外,表现为非肾病水平蛋白尿的 IMN 患者,血和尿 IgG4/IgG 比率显著低于肾病综合征患者,提示 IgG4 在 IMN 发病机制中可能发挥了重要作用。另外,2 年内复发的 IMN 患者具有较高的尿 IgG4/IgG 比率,而有较高尿 IgG4/IgG 比率(≥9%)的患者有较高的复发趋势。进一步分析未发现血和尿 IgG4 浓度或比率之间具有相关性,提示尿 IgG4 与肾小球

滤过的血浆 IgG4 浓度的关系不大,可能更与沉积在肾 IgG4 的清除有关,这也可能部分解释了为什么尿 IgG4/IgG 比率可以预测 IMN 患者的复发。

总之,本研究提示血和尿 IgG4/IgG 比率有可能成为反映特发性膜性肾病病情活动的指标,尿 IgG4/IgG 比率可能有助于预测复发。

参考文献

[1] Adler S, Salant DJ, Dittmer JE, et al. Mediation of proteinuria in membranous nephropathy due to a planted glomerular antigen[J]. *Kidney Int*, 1983, 23(6): 807-815.

[2] Cybulsky AV, Rennke HG, Feintzeig ID, et al. Complement-induced glomerular epithelial cell injury. Role of the membrane attack complex in rat membranous nephropathy[J]. *J Clin Invest*, 1986, 77(4): 1096-1107.

[3] Beck LH Jr, Bonogio RG, 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] Prunotto M, Carnevali ML, Candiano G, et al. Autoimmunity in membranous nephropathy targets aldose reductase and SOD2[J]. *J Am Soc Nephrol*, 2010, 21(3): 507-519.

[5] Kuroki A, Shibata T, Honda H, et al. Glomerular and serum IgG subclasses in diffuse proliferative lupus nephritis, membranous lupus nephritis, and idiopathic membranous nephropathy[J]. *Intern Med*, 2002, 41(11): 936-942.

[6] Noël LH, Aucouturier P, Monteiro RC, et al. Glomerular and serum immunoglobulin G subclasses in membranous nephropathy and anti-glomerular basement membrane nephritis[J]. *Clin Immunol Immunopathol*, 1988, 46(2): 186-194.

[7] Kuroki A, Iyoda M, Shibata T, et al. Th2 cytokines increase and stimulate B cells to produce IgG4 in idiopathic membranous nephropathy[J]. *Kidney Int*, 2005, 68(1): 302-310.

[8] Kawasaki Y, Suzuki J, Sakai N, et al. Evaluation of T helper-1/-2 balance on the basis of IgG subclasses and serum cytokines in children with glomerulonephritis[J]. *Am J Kidney Dis*, 2004, 44(1): 42-49.

[9] Tencer J, Torffvit O, Thysell H, et al. Urine IgG2/IgG4-ratio indicates the significance of the charge selective properties of the glomerular capillary wall for the macromolecular transport in glomerular diseases[J]. *Nephrol Dial Transplant*, 1999, 14(6): 1425-1429.

[10] Zietse R, Wenting GJ, Kramer P, et al. Effects of cyclosporin A on glomerular barrier function in the nephrotic syndrome[J]. *Clin Sci (Lond)*, 1992, 82(6): 641-650.

[11] Ehrenreich T, Churg J. Pathology of membranous nephropathy[J]. *Pathol Annu*, 1968, 3: 145-186.

[12] Shu PY, Chen LK, Chang SF, et al. Comparison of capture immunoglobulin M (IgM) and IgG enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and nonstructural protein NS1 serotype-specific IgG ELISA for differentiation of primary and secondary dengue virus infections[J]. *Clin Diagn Lab Immunol*, 2003, 10(4): 622-630.

[13] Satoguina JS, Weyand E, Larbi J, et al. T regulatory-1 cells induce IgG4 production by B cells: role of IL-10[J]. *J Immunol*, 2005, 174(8): 4718-4726.

[14] Doi T, Mayumi M, Kanatsu K, et al. Distribution of IgG subclasses in membranous nephropathy[J]. *Clin Exp Immunol*, 1984, 58(1): 57.

[15] Mathieson PW. Immune dysregulation in minimal change nephropathy[J]. *Nephrol Dial Transplant*, 2003, 18(Suppl 6): 26-29.

(2010-07-20 收稿)
(本 文 编 辑 : 王 蕾)