

4 蒋萍. COPD 急发期患者血清尿酸水平的相关性研究[J]. 临床肺科杂志, 2008, 13(12): 1565 - 1567.

5 杨立菊. 慢性肺源性心脏病患者的健康教育[J]. 中国医学创新, 2010, 7(12): 142.

6 秦志强, 谭毅. 无创通气治疗慢性阻塞性肺疾病呼吸衰竭的研究进展[J]. 中国临床新医学, 2013, 6(9): 909 - 912.

7 张娜莉, 刘超. 慢性阻塞性肺疾病急性加重期血尿酸的变化

[J]. 中华全科医学, 2008, 6(8): 780 - 781.

8 卢发勇, 刘航. 慢性阻塞性肺疾病合并社区获得性肺炎 311 例临床分析[J]. 中国临床新医学, 2009, 2(10): 1083 - 1085.

9 杨亚兵, 刘梅林. 老年人高尿酸血症与痛风的诊治特点[J]. 临床药物治疗杂志, 2009, 7(4): 15 - 17, 62.

[收稿日期 2014-09-15][本文编辑 韦所苏]

新进展综述

特发性膜性肾病外周血淋巴细胞亚群的免疫学研究进展

龙腾翔(综述), 叶琨(审校)

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(编号: 81260121)

作者单位: 530021 南宁, 广西中医药大学 2013 级研究生(龙腾翔); 530021 南宁, 广西壮族自治区人民医院肾内科(叶琨)

作者简介: 龙腾翔(1990-), 女, 在读硕士研究生, 研究方向: 肾小球疾病的诊治、肾脏活检及肾脏病理诊断、肾脏纤维化的防治。E-mail: clover9037@163.com

通讯作者: 叶琨(1975-), 女, 医学博士, 副主任医师, 硕士生导师, 研究方向: 肾小球疾病的诊治、肾脏活检及肾脏病理诊断、肾脏纤维化的防治。E-mail: yezi5729@yahoo.com.cn

[摘要] 膜性肾病是成人肾病综合征常见的病因之一, 发病率逐年升高。膜性肾病从本质上来说属于自身免疫性疾病, 其公认机制为 T 淋巴细胞刺激 B 淋巴细胞的增殖和激活, 导致免疫复合物形成并沉积于肾小球基底膜上皮细胞下。外周血淋巴细胞亚群为近年的研究热点, 该文从 T 细胞亚群和 B 淋巴细胞两个方面阐述特发性膜性肾病免疫学研究的新进展, 为其防治提供新的靶点。

[关键词] 特发性膜性肾病; 免疫; T 细胞亚群; B 淋巴细胞; 利妥昔单抗

[中图分类号] R 593 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1674-3806(2016)05-0449-04

doi: 10.3969/j.issn.1674-3806.2016.05.28

Immunological research advances of peripheral blood lymphocyte subsets in idiopathic membranous nephropathy LONG Teng-xiang, YE Kun. Department of Internal Medicine, Guangxi University of Chinese Medicine, Nan-ning 530021, China

[Abstract] Membranous nephropathy is one of the common causes of adult nephritic syndrome, and its incidence has been on the rise significantly. As a kind of autoimmune disease, membranous nephropathy is generally recognized to be caused by the deposition of immune complex formation under the glomerular basement membrane epithelium as a result of B lymphocyte proliferation and activation stimulated by T lymphocytes, but its specific pathogenesis remains unclear. Peripheral blood lymphocyte subsets become a research hotspot in recent years. This paper aims to highlight the immunological research advances of T lymphocyte subsets and B lymphocytes in idiopathic membranous nephropathy, so as to provide a novel target for the prevention and treatment of idiopathic membranous nephropathy.

[Key words] Idiopathic membranous nephropathy (IMN); Immunization; T lymphocyte subsets; B lymphocytes; Rituximab

膜性肾病是成人肾病综合征的常见病因之一。在我国, 膜性肾病占原发性肾小球疾病的比例由

2004 年的 9.89% 逐年上升到 2013 年的 20% 左右, 最新研究显示, 北京与上海膜性肾病比例分别达到

15.0%及22.7%,显著升高的发病率引起我们的重视^[1,2],膜性肾病的发病机制及防治成为研究热点。膜性肾病依其病因可分为特发性膜性肾病(idiopathic membranous nephropathy, IMN)和继发性膜性肾病。继发性膜性肾病可由自身免疫性疾病、肝炎病毒感染、肿瘤、甲状腺疾病、药物等引起,而IMN的发病机制尚未完全明确。目前认为可能为抗原抗体复合物沉积在肾小球基底膜上皮细胞下,激活补体及其调节系统,刺激足细胞释放炎症介质导致了IMN的发生^[1]。有研究观察到IMN患者存在外周血淋巴细胞亚群水平的异常与失衡,本文就IMN的免疫学研究进展作一综述。

1 特发性膜性肾病T淋巴细胞亚群(CD4⁺, CD8⁺)的改变

T细胞来源于骨髓干细胞,在胸腺中发育和分化,在分化成熟的不同时期,细胞表面可以表达各种膜蛋白,如CD3、CD4、CD8分子等。经过两次选择,T细胞分化为CD4⁺T细胞或CD8⁺T细胞,随血流进入外周血或外周免疫器官,发挥抗原识别、介导免疫应答并参与免疫调节的作用。其中CD4⁺T细胞为辅助性T淋巴细胞(helper T cell, Th),具有协助体液免疫及细胞免疫的功能,可用于评价机体免疫系统的活跃程度。CD8⁺T细胞为细胞毒性T淋巴细胞(cytotoxic T cell, Tc/CTL),在自身免疫性疾病中可抑制致病性CD4⁺T细胞,并具有杀伤靶细胞的功能。正常状态下各T细胞亚群均维持一定的比例,尤其是CD4⁺/CD8⁺的比值相当稳定,两者的平衡是机体发挥正常免疫功能的关键因素。早在1982年Cagnoli等^[3]便观察到IMN患者CD4⁺/CD8⁺比值较健康对照组显著升高,其中表现为肾病综合征的患者该比值升高更为显著。随着肾病的临床缓解,CD4⁺/CD8⁺比值逐渐下降。近年多个研究均验证了IMN患者与健康对照组相比,CD4⁺细胞存在升高趋势,而CD8⁺细胞为降低趋势,且CD4⁺/CD8⁺比值显著高于对照组,以CD4⁺T细胞升高为主^[4,5]。说明在IMN的发病中存在T淋巴细胞亚群失衡导致的免疫功能紊乱,免疫活跃程度整体较高。CD4⁺T细胞根据分泌的细胞因子和其介导的功能不同,又分为Th1、Th2、Th9、Th17、调节性T细胞(regulatory cell, Treg)等细胞亚群,以下便针对各亚群在IMN发病中作用的研究作详细的阐述。

1.1 Th1/Th2细胞 传统将Th细胞仅分为Th1、Th2两个亚群。Th1细胞主要分泌以干扰素- γ (IFN- γ)为代表的细胞因子,介导细胞免疫。Th2细胞主

要分泌以白细胞介素-4(IL-4)、白细胞介素-10(IL-10)为代表的细胞因子,可激活B细胞并促使免疫球蛋白合成,介导体液免疫。Th1与Th2为一对重要的效应细胞,发挥相互抑制作用,Th1分泌的IFN- γ 及Th2分泌的IL-4均可抑制彼此的分化和功能,Th1/Th2细胞的失衡参与多种免疫性疾病的发生和发展。Masutani等^[6]通过流式细胞术定量分析各细胞亚群的比值,发现24例IMN患者IL-4⁺T细胞较对照组显著升高,Th1/Th2的比值较对照组显著降低,且血清IL-4水平与尿蛋白量显著相关,推测IMN患者是以Th2细胞主导的炎症反应为主。王涛等^[7]采用双抗体夹心法检测血清中的IL-4、IL-10和IFN- γ 水平,发现IMN组的患者IL-4、IL-10上调,而IFN- γ 则下调。这同样说明了IMN存在Th2细胞的活化和增殖,为Th2细胞主导的疾病,同时Th1细胞受到抑制。IL-4过表达可通过诱导肥大细胞分化、趋化肾小球巨噬细胞加重炎症反应,并促进纤维母细胞增殖及胶原合成从而导致纤维化,以加速肾脏病的进展。

1.2 Th17/Treg细胞 Th17为近年新发现的重要的CD4⁺辅助T细胞亚群,因其高水平分泌白细胞介素-17(IL-17)而命名为Th17细胞^[8]。Th17细胞可特异性表达核转录因子ROR γ t,并通过分泌IL-17、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-6(IL-6)和白细胞介素-23(IL-23)等细胞因子参与炎症反应和组织损伤过程^[9]。其中IL-23可促进Th17细胞活化并分泌IL-17,是Th17细胞的重要调节因子之一,对Th17细胞的分化和生长起着重要的作用^[9,10]。在T细胞介导的增殖型肾小球肾炎、狼疮性肾炎和新月体肾炎等肾脏疾病,以及其他自身免疫性疾病如急性系统性血管炎、动脉硬化、炎症性肠病等疾病中均可见实验组血清IL-17显著高于对照组,且病情缓解后IL-17较前下降,提示Th17细胞可能对以上疾病的发展起重要作用^[11]。国内外Th17细胞与IMN的相关研究较为少见。在刘莉莉^[12]对IMN的一项研究中,采用流式细胞术检测并发现实验组外周血Th17细胞百分率、IL-17和IL-23水平较健康对照组明显升高,差异具有统计学意义,说明IMN存在Th17细胞的增殖与激活。Kalarviziotti等^[13]一项为期2年的临床研究发现,IMN患者尿IL-17水平显著高于健康对照组,同时尿TNF- α 、IL-6、单核细胞趋化蛋白-1(MCP-1)水平显著升高。持续高水平的IL-17、TNF- α 及IL-6或许提示Th17型免疫应答的发生。通过IL-17、TNF- α 等促

炎因子的释放引起肾脏局部组织炎症,从而上调 IL-6 和 MCP-1 等其他促炎因子和趋化因子的表达,促进了炎症细胞浸润。Treg 亦是近年免疫学研究的热点之一,主要由一类起负性调节作用的 $CD4^+ CD25^+$ T 细胞组成,以参与其分化和发育的 Foxp3 作为特征性标志。Treg 细胞的功能主要是抑制自身反应性 T 细胞的活性和维持免疫耐受,此功能的受损可直接导致自身免疫性疾病。Treg 细胞表面高表达转化生长因子- β (TGF- β),这种细胞因子可维持外周血 Treg 细胞的正常功能。在外周淋巴器官中,TGF- β 的表达与 $CD4^+ CD25^+ Foxp3^+$ Treg 细胞的表达正相关,TGF- β 表达下调时可出现 T 细胞活化及自身免疫性综合征^[14]。Treg 与 Th17 相比,两者同样来自初始 T 细胞,但分化和功能相互抑制。近年越来越多的证据显示,Th17/Treg 的平衡对维持免疫稳态、预防自身免疫性疾病有着重要作用^[15]。刘莉莉^[12]的研究还发现 IMN 组患者外周血 Treg 细胞比率和 TGF- β_1 水平较正常对照组显著降低,其中血浆 TGF- β_1 与 Treg 百分率呈明显正相关。通过免疫组化可观察到部分患者肾间质 Foxp3⁺ Treg 细胞浸润,随访观察这部分患者经使用免疫抑制剂治疗后绝大部分 6 个月内能获得临床缓解。此外,随访发现治疗前实验组 Th17/Treg 比值较对照组明显升高,治疗 3 个月后该比值明显降低,治疗 6 个月后该比值与对照组已无差异。Ifuku 等^[15]采用逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)及免疫组化分析了几种不同类型肾小球肾炎肾组织中 Foxp3 与 IL-17 的 mRNA 的表达,发现 IL-17 在 IMN 患者肾组织中虽有表达,但不及 ANCA 相关性肾炎显著。同时,与 ANCA 相关性肾炎及膜增生性肾小球肾炎组相比较,IMN 组高表达 Foxp3,这可能是由于 IMN 疾病进程中 Th2、Th17 主导的正性免疫作用刺激了 Treg 的反应性升高。以上研究提示了外周血 Treg 细胞的减少和 Th17/Treg 免疫失衡可能与 IMN 的疾病进展密切相关。肾脏局部浸润的 Treg 细胞可能对 IMN 的临床预后起积极作用,两者的关系仍值得进一步研究。

2 特发性膜性肾病 B 淋巴细胞的改变

2.1 B 淋巴细胞 根据 IMN 可能的发病机制,T 淋巴细胞通过分泌白介素等多种细胞因子刺激 B 淋巴细胞增殖和激活。B 淋巴细胞则通过介导体液免疫,形成免疫复合物沉积于肾小球上皮细胞下,导致肾小球滤过屏障受到损伤、引发蛋白尿,参与疾病发生,为介导 IMN 发病的重要因素。CD19 作为 B 细胞表面的重要标记,是一种穿膜糖蛋白,表达于除浆

细胞外 B 细胞所有的发育分化阶段,主要参与 B 细胞的活化、信号转导和生长调节,在 B 细胞活化后不会消失。CD20 亦是 B 细胞表面的一种标记,表达于早期 B 细胞及成熟 B 细胞阶段,通过参与组成 Ca^{2+} 离子通道对 B 细胞的分化和成熟进行调控,其显著增殖提示体内免疫功能亢进,可在 B 细胞活化后消失^[16]。王波等^[4,17]通过免疫组化法观察到 IMN 患者肾组织存在高密度的 B 淋巴细胞浸润,部分病例中 B 淋巴细胞于间质纤维化区域、硬化的肾小球周围及管周毛细血管灶性聚集。流式细胞术检测外周血 $CD19^+$ 、 $CD20^+$ B 淋巴细胞表达,可见 B 淋巴细胞较正常对照显著升高,且临床表现为大量蛋白尿的 IMN 患者 B 淋巴细胞计数明显高于非大量蛋白尿患者。肾组织中 B 细胞的局灶聚集还与肾小管损伤及肾组织纤维化之间有一定联系。以上研究提示 IMN 发病过程中存在 B 淋巴细胞的活化与增殖,可能和患者临床表现、疾病活动程度有一定关系。

2.2 利妥昔单抗 王波等的发现更好地支持了利妥昔单抗在 IMN 治疗上的应用。IMN 的治疗仍是一个挑战,目前为止,主要依靠非特异性免疫抑制剂,并无公认的治疗方案。利妥昔单抗是一种人鼠嵌合型抗 CD20 单克隆抗体,能与 B 淋巴细胞 CD20 抗原高度结合,导致 B 淋巴细胞的清除。难治性肾病综合征、系统性红斑狼疮、淋巴瘤和类风湿关节炎等疾病已有成功运用利妥昔单抗治疗的报道^[18]。在 2002 年 Remuzzi 等^[19]便尝试性地使用利妥昔单抗治疗 8 例难治性 IMN 患者,应用利妥昔单抗(375 mg/m^2)静脉注射,每周 1 次,连用 4 周进行治疗,随访 1 年后大部分患者的蛋白尿明显下降,水肿改善,胆固醇亦降低。后续来自不同研究小组的多个临床研究均表明,利妥昔单抗可在显著降低 IMN 患者蛋白尿的同时稳定并改善其肾功能,对疾病的缓解起积极作用。采用利妥昔单抗治疗 IMN 可达到约 70% 的有效率,接近于已报道的激素联合烷化剂治疗的有效率^[20]。抗 M 型 PLA2R 抗体是 IMN 的特异性生物标志物,在 IMN 发生发展中起重要的作用,其滴度可反映 IMN 疾病的活动性^[21]。Beck 等^[22]选择 PLA2R 作为 IMN 的免疫活动性指标,首次发现了经利妥昔单抗治疗后循环 PLA2R 的下降早于尿蛋白的减少。Ruggenti 等^[23]在此基础上进一步采用循环 PLA2R 滴度、 $CD20^+$ B 细胞计数和尿蛋白、肾功能等检测评估利妥昔单抗的治疗效果。平均随访 10 个月后,在达到临床缓解的患者中有 50% 出现循环 PLA2R

抗体降低,且早于尿蛋白的减少,两者存在相关性。提示持续监测循环 PLA2R 抗体水平可评估利妥昔单抗治疗 IMN 的有效性并判断疾病预后。与王波等的研究结论不同的是,Ruggenti 等^[23]的研究发现循环 CD20⁺ B 细胞计数与尿蛋白并无相关性,其原因考虑为所监测的 CD20⁺ B 细胞仅能反映循环 B 细胞的总数,并非自身反应性 B 细胞的异常扩增,所以不能单纯以循环 CD20⁺ B 细胞作为判断 IMN 预后的生物学指标。有学者已建议使用利妥昔单抗作为 IMN 的一线治疗用药,但由于其价格昂贵,且当下缺乏大样本、长随访的临床试验来进一步评估其疗效及安全性,目前国内尚未广泛应用于 IMN 的治疗,仅在难治性肾病综合征中有一些病例报道^[20,24]。

3 结语

综上所述,近年来的研究均显示 IMN 患者体内存在多种免疫活性细胞数值和比例的变化,进一步阐明上述变化与疾病活动及病情进展之间的关系有助于为 IMN 的防治提供新的靶点,是具有诸多潜力的研究方向。

参考文献

- Ronco P, Debiec H. Pathophysiological advances in membranous nephropathy: time for a shift in patient's care [J]. *Lancet*, 2015, 385 (9981): 1983 - 1992.
- Xie J, Chen N. Primary glomerulonephritis in Mainland China: an overview [J]. *Contrib Nephrol*, 2013, 181: 1 - 11.
- Cagnoli L, Tabacchi P, Pasquali S, et al. T cell subset alterations in idiopathic glomerulonephritis [J]. *Clin Exp Immunol*, 1982, 50 (1): 70 - 76.
- 王波,刘志红,吴燕,等.特发性膜性肾病患者调节性 T 细胞和 B 淋巴细胞的变化及其临床意义 [J]. *肾脏病与透析肾移植杂志*, 2009, 18 (4): 322 - 328.
- 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.
- Masutani K, Taniguchi M, Nakashima H, et al. Up-regulated interleukin-4 production by peripheral T-helper cells in idiopathic membranous nephropathy [J]. *Nephrol Dial Transplant*, 2004, 19 (3): 580 - 586.
- 王涛,黄智敏,俞香宝,等.不同病理类型肾小球疾病患者血清中 IL-4、IL-10 和 IFN- γ 的改变及其临床意义 [J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2009, 29 (8): 1138 - 1141.
- Park H, Li Z, Yang XO, et al. A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17 [J]. *Nat Immunol*, 2005, 6 (11): 1133 - 1141.
- Bettelli E, Oukka M, Kuchroo VK. T(H)-17 cells in the circle of immunity and autoimmunity [J]. *Nat Immunol*, 2007, 8 (4): 345 - 350.
- Yen D, Cheung J, Scheerens H, et al. IL-23 is essential for T cell-mediated colitis and promotes inflammation via IL-17 and IL-6 [J]. *J Clin Invest*, 2006, 116 (5): 1310 - 1316.
- 徐雪. IL-17 及 Th17 细胞与系统性红斑狼疮关系的研究及地塞米松对 IL-17 的影响 [D]. 复旦大学, 2010.
- 刘莉莉. Th17/Treg 免疫平衡在特发性膜性肾病发病中的作用及环孢素 A 对其影响 [D]. 北京协和医学院, 2011.
- Kalavrizioti D, Gerolymos M, Rodi M, et al. T helper (Th)-cytokines in the urine of patients with primary glomerulonephritis treated with immunosuppressive drugs: Can they predict outcome [J]. *Cytokine*, 2015, 76 (2): 260 - 269.
- Wolf D, Hochegger K, Wolf AM, et al. CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells inhibit experimental anti-glomerular basement membrane glomerulonephritis in mice [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2005, 16 (5): 1360 - 1370.
- Ifuku M, Miyake K, Watanebe M, et al. Various roles of Th cytokine mRNA expression in different forms of glomerulonephritis [J]. *Am J Nephrol*, 2013, 38 (2): 115 - 123.
- 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.
- Wang B, Zuo K, Wu Y, et al. Correlation between B lymphocyte abnormality and disease activity in patients with idiopathic membranous nephropathy [J]. *J Int Med Res*, 2011, 39 (1): 86 - 95.
- Maloney DG, Smith B, Rose A. Rituximab: mechanism of action and resistance [J]. *Semin Oncol*, 2002, 29 (1 Suppl 2): 2 - 9.
- Remuzzi G, Chiurciu C, Abbate M, et al. Rituximab for idiopathic membranous nephropathy [J]. *Lancet*, 2002, 360 (9337): 923 - 924.
- Cravedi P, Remuzzi G, Ruggenti P. Rituximab in primary membranous nephropathy: first-line therapy, why not? [J]. *Nephron Clin Pract*, 2014, 128 (3 - 4): 261 - 269.
- Radice A, Trezzi B, Maggiore U, et al. Clinical usefulness of autoantibodies to M-type phospholipase A2 receptor (PLA2R) for monitoring disease activity in idiopathic membranous nephropathy (IMN) [J]. *Autoimmun Rev*, 2016, 15 (2): 146 - 154.
- 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.
- 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.
- Ruggenti P, Cravedi P, Chianca A, et al. 利妥昔单抗在特发性膜性肾病中的治疗 [J]. *中华肾病研究电子杂志*, 2012, (2): 128.

[收稿日期 2016-01-05][本文编辑 谭毅 黄晓红]