

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2019.08.026
文章编号: 1005-8982 (2019) 08-0118-05

特发性膜性肾病患者血清 CTLA-4 水平及其临床意义

方华伟, 郑晓荣

(嘉兴市第二医院 肾内科, 浙江 嘉兴 314000)

摘要: 目的 探讨特发性膜性肾病患者血清细胞毒性 T 淋巴细胞抗原 4 (CTLA-4) 水平及其临床意义。**方法** 选择特发性膜性肾病患者 80 例作为膜性肾病组, 同期 80 例健康体检者作为对照组。收集两组临床资料, 测定外周血调节性 T 细胞数量和血清可溶性细胞毒性 T 细胞相关抗原 4 (sCTLA-4) 水平。**结果** 膜性肾病组患者血清白蛋白、调节性细胞计数及 sCTLA-4 水平均低于对照组 ($P < 0.05$); 而血肌酐 (Scr) 和 24 h 尿蛋白量高于对照组 ($P < 0.05$)。膜性肾病中高危组患者血清白蛋白、调节性细胞计数及 sCTLA-4 水平均低于低危组 ($P < 0.05$); 而 Scr 和 24 h 尿蛋白量高于低危组 ($P < 0.05$)。膜性肾病患者治疗后血清白蛋白、调节性细胞计数及 sCTLA-4 水平高于治疗前 ($P < 0.05$); 而 Scr 和 24 h 尿蛋白量低于治疗前 ($P < 0.05$)。与无效比较, 部分缓解和完全缓解患者血清白蛋白、调节性细胞计数及 sCTLA-4 水平升高 ($P < 0.05$); 而 Scr 和 24 h 尿蛋白量降低 ($P < 0.05$)。与部分缓解比较, 完全缓解患者血清白蛋白、调节性细胞计数和 sCTLA-4 水平升高 ($P < 0.05$); 而 Scr 和 24 h 尿蛋白量降低 ($P < 0.05$)。膜性肾病患者 sCTLA-4 水平与血清白蛋白、调节性细胞呈正相关 ($P < 0.05$); 与 Scr、24 h 尿蛋白量呈负相关 ($P < 0.05$)。**结论** 特发性膜性肾病患者血清 sCTLA-4 降低, 血清 sCTLA-4 水平可反映特发性膜性肾病患者机体免疫状态、疾病严重程度和治疗效果。

关键词: 特发性膜性肾病; 细胞毒性 T 淋巴细胞抗原-4; 调节性 T 细胞

中图分类号: R586.9

文献标识码: A

level of Serum CTLA-4 in patients with idiopathic membranous nephropathy and its clinical significance

Hua-wei Fang, Xiao-rong Zheng

(Department of Nephrology, the Second Hospital of Jiaxing City, Jiaxing, Zhejiang 314000, China)

Abstract: Objective To investigate the level of serum cytotoxic T lymphocyte antigen-4 (CTLA-4) in patients with idiopathic membranous nephropathy and its clinical significance. **Methods** Eighty patients with membranous nephropathy were selected as membranous nephropathy group, and 80 healthy subjects were selected as control group. The clinical information was collected, and the number of regulatory T cells in peripheral blood and the level of serum sCTLA-4 were determined. **Results** The serum albumin, regulatory cell count and sCTLA-4 level in the membranous nephropathy group were lower than those in the control group ($P < 0.05$), and levels of the serum creatinine and 24h urine protein were higher than those in the control group ($P < 0.05$). The serum albumin, regulatory cell count and sCTLA-4 level in the high-risk group of membranous nephropathy were lower than those in the low-risk group ($P < 0.05$), and serum creatinine and 24h urine protein were higher than those in the low-risk group ($P < 0.05$). The serum albumin, regulatory cell count and sCTLA-4 levels in patients with membranous nephropathy after treatment were higher than those before treatment ($P < 0.05$), and the serum creatinine and 24h urine protein

levels were lower than those before treatment ($P < 0.05$). Compared with the ineffectiveness, the serum albumin, regulatory cell count and sCTLA-4 levels were elevated in patients with partial remission and complete remission ($P < 0.05$), and serum creatinine and 24h urine protein were decreased ($P < 0.05$). Compared with partial remission, the serum albumin, regulatory cell count and sCTLA-4 levels were elevated in patients with complete remission ($P < 0.05$), and the serum creatinine and 24h urinary protein were decreased ($P < 0.05$). The level of sCTLA-4 in membranous nephropathy was positively correlated with serum albumin and regulatory cells ($P < 0.05$), and negatively correlated with serum creatinine and 24h urine protein ($P < 0.05$). **Conclusions** The level of sCTLA-4 is decreased in patients with idiopathic membranous nephropathy, and can reflect the immune status, severity of disease and treatment effect in patients with idiopathic membranous nephropathy.

Keywords: glomerulonephritis, membranous; CTLA-4 antigen; T-lymphocytes, regulatory

特发性膜性肾病是膜性肾病的主要类型，也是成人肾病综合征最常见的原因^[1-2]。肾小球上皮侧抗体介导免疫复合物形成，其是特发性膜性肾病肾组织损伤的主要机制^[3]。细胞毒性 T 淋巴细胞抗原 4 (cytotoxic T lymphocyte antigen-4, CTLA-4) 具有多种免疫学效应，具有下调免疫应答作用，与多种免疫性疾病关系密切^[4-5]。本文对特发性膜性肾病患者血清可溶性细胞毒性 T 细胞相关抗原 4 (soluble cytotoxic T lymphocyte associated antigen 4, sCTLA-4) 水平及其临床意义进行研究，为临床治疗提供依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取 2016 年 1 月—2017 年 6 月嘉兴市第二医院肾内科特发性膜性肾病患者 80 例作为膜性肾病组，同期 80 例健康体检者作为对照组。膜性肾病组：男性 54 例，女性 26 例；年龄 (48.57 ± 13.24) 岁。对照组：男性 51 例，女性 29 例；年龄 (47.59 ± 14.12) 岁。纳入标准：特发性膜性肾病患者均经活检确诊为特发性膜性肾病，对照组患者经体检身体健康。排除标准：特发性膜性肾病患者近 3 个月内使用过环磷酰胺、甲基泼尼松龙、他克莫司、环孢素 A 及霉酚酸酯等免疫抑制剂；系统性红斑狼疮、乙肝病毒相关性肾炎、过敏性紫癜及肿瘤等继发性膜性肾病；病史中有其他自身免疫性疾病；对照组患内外科等基础疾病，肝肾功能等体检检查结果异常。两组性别、年龄比较，差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

1.2 方法

1.2.1 特发性膜性肾病治疗方法 所有患者入院后再降压、利尿、抗凝及调脂等常规治疗的基础上给予泼尼松龙联合环磷酰胺治疗。泼尼松龙的起始剂量为 $0.8 \sim 1.0 \text{ mg}/(\text{kg} \cdot \text{d})$ ，维持 2 个月后每 2 个星期减原

始剂量的 10% 至停用；环磷酰胺的初始剂量为 $1 \sim 2 \text{ g}/\text{d}$ ，3 个月后开始减量，6 个月时维持 $0.75 \sim 1.50 \text{ g}/\text{d}$ ，12 个月时维持 $0.5 \sim 1.0 \text{ g}/\text{d}$ ，直至停药。

1.2.2 临床资料收集 收集患者性别、年龄及治疗情况，治疗前和治疗后（治疗 12 个月时）实验室检查指标 [血清白蛋白、24 h 尿蛋白量及血肌酐 (serum creatinine, Scr)] 等资料。

1.2.3 疗效评价 治疗 12 个月时判断疗效，完全缓解：患者治疗后尿蛋白 $< 0.3 \text{ g}/\text{d}$ ，肾功能和血清白蛋白恢复正常；部分缓解：治疗后患者血清白蛋白 $> 30 \text{ g}/\text{l}$ ，尿蛋白减少 $\geq 50\%$ ；无效：治疗后未达到上述标准者。

1.2.4 调节性 T 细胞测定 对照组患者抽取体检当天清晨外周静脉血、膜性肾病组患者抽取治疗前和治疗后（治疗 12 个月）外周静脉血，取 $100 \mu\text{l}$ 乙二胺四乙酸抗凝全血，加入流式专用管中，加入 CD25-PE 和 CD4-FITC 混匀，孵育 30 min 标记 CD4⁺、CD25⁺ T 细胞，经过穿膜、封闭后，加入 APC-抗人 Foxp3 单抗孵育 30 min，用 FACS Aria 型流式细胞仪（美国 BD 公司）检测调节 T 细胞 (CD4⁺、CD25⁺ 及 Foxp3⁺ T 细胞) 在外周淋巴细胞中的数量（实验所用所有抗体购自美国 Beckman Coulter 公司）。

1.2.5 血清 sCTLA-4 水平测定 对照组患者抽取体检当天清晨外周静脉血、膜性肾病组患者抽取治疗前和治疗后（治疗 12 个月）外周静脉血，采用酶联免疫吸附实验 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 法测定血清 sCTLA-4 水平 (ELISA 试剂盒购自奥地利 Bender Medsystems 公司)。

1.3 统计学方法

数据分析采用 SPSS 19.0 统计软件。计量资料以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示，比较用 t 检验或方差分析，进一步两两比较采用 LSD- t 检验；相关性分析

用 Pearson 法, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组患者各临床指标比较

两组血清白蛋白、Scr、24 h 尿蛋白量、调节性细胞计数及 sCTLA-4 水平比较, 经 t 检验, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 膜性肾病组患者血清白蛋白、调节性细胞计数及 sCTLA-4 水平低于对照组, 而 Scr 和 24 h 尿蛋白量高于对照组。见表 1。

2.2 膜性肾病不同危险程度患者各临床指标比较

膜性肾病中高危组和低危组血清白蛋白、Scr、24 h 尿蛋白量、调节性细胞计数及 sCTLA-4 水平比较, 经 t 检验, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 膜性肾病中高危组患者血清白蛋白、调节性细胞计数及 sCTLA-4 水平均低于低危组, 而 Scr 和 24 h 尿蛋白量高于低危组。见表 2。

2.3 膜性肾病患者治疗前后各临床指标比较

膜性肾病患者治疗前后血清白蛋白、Scr、24 h 尿蛋白量、调节性细胞计数及 sCTLA-4 水平比较, 经

t 检验, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 膜性肾病患者治疗后血清白蛋白、调节性细胞计数及 sCTLA-4 水平均高于治疗前, 而 Scr 和 24 h 尿蛋白量低于治疗前。见表 3。

2.4 膜性肾病不同疗效组各临床指标比较

不同疗效组血清白蛋白、Scr、24 h 尿蛋白量、调节性细胞计数及 sCTLA-4 水平比较, 经方差分析, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。部分缓解和完全缓解患者血清白蛋白、调节性细胞计数及 sCTLA-4 水平均高于无效患者, 而 Scr 和 24 h 尿蛋白量低于无效患者; 完全缓解患者血清白蛋白、调节性细胞计数及 sCTLA-4 水平均高于部分缓解患者, 而 Scr 和 24 h 尿蛋白量均低于部分缓解患者。见表 4。

2.5 治疗前 sCTLA-4 水平与各临床指标的相关性分析

膜性肾病患者治疗前 sCTLA-4 水平与血清白蛋白、调节性细胞计数呈正相关 ($r = 0.584$ 和 6.421 , 均 $P = 0.000$), 与 Scr、24 h 尿蛋白量呈负相关 ($r = -0.547$ 和 -0.628 , 均 $P = 0.000$)。

表 1 两组患者各临床指标比较 ($n = 80, \bar{x} \pm s$)

组别	血清白蛋白 / (g/L)	Scr / (μ mol/L)	24 h 尿蛋白量 / g	调节性细胞计数 / (个/ μ l)	sCTLA-4 / (ng/ml)
膜性肾病组	25.46 \pm 5.42	86.47 \pm 15.32	5.13 \pm 1.42	21.73 \pm 4.65	0.53 \pm 0.18
对照组	44.15 \pm 6.23	58.35 \pm 13.24	0.04 \pm 0.01	32.84 \pm 5.18	0.98 \pm 0.21
t 值	20.244	12.421	32.060	14.275	14.552
P 值	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

表 2 膜性肾病不同危险程度患者各临床指标比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	血清白蛋白 / (g/L)	Scr / (μ mol/L)	24 h 尿蛋白量 / g	调节性细胞计数 / (个/ μ l)	sCTLA-4 / (ng/ml)
中高危组	63	23.71 \pm 5.08	92.16 \pm 13.03	5.74 \pm 1.06	18.35 \pm 4.82	0.49 \pm 0.16
低危组	17	31.64 \pm 5.23	77.25 \pm 12.19	2.68 \pm 0.77	24.67 \pm 4.73	0.64 \pm 0.17
t 值		5.677	4.241	11.115	4.816	3.386
P 值		0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

表 3 膜性肾病患者治疗前后各临床指标比较 ($n = 80, \bar{x} \pm s$)

组别	血清白蛋白 / (g/L)	Scr / (μ mol/L)	24 h 尿蛋白量 / g	调节性细胞计数 / (个/ μ l)	sCTLA-4 / (ng/ml)
治疗前	25.46 \pm 5.42	86.47 \pm 15.32	5.13 \pm 1.42	21.73 \pm 4.65	0.53 \pm 0.18
治疗后	38.47 \pm 5.83	66.45 \pm 14.86	1.21 \pm 0.32	27.68 \pm 4.82	0.82 \pm 0.20
差值	-13.01 \pm 1.73	20.02 \pm 3.26	3.92 \pm 0.84	-5.95 \pm 0.93	-0.29 \pm 0.06
t 值	67.263	54.928	41.740	57.224	43.231
P 值	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

表 4 不同疗效组血清白蛋白、Scr、24 h 尿蛋白量、调节性细胞和 sCTLA-4 水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	血清白蛋白 / (g/L)	Scr / (μ mol/L)	24 h 尿蛋白量 / g	调节性细胞计数 / (个 / μ l)	sCTLA-4 / (ng/ml)
无效	21	24.42 ± 5.38	83.24 ± 14.53	4.97 ± 1.23	23.42 ± 4.16	0.56 ± 0.15
部分缓解	16	36.47 ± 5.97 ¹⁾	68.69 ± 14.73 ¹⁾	1.53 ± 0.38 ¹⁾	26.75 ± 4.72 ¹⁾	0.77 ± 0.17 ¹⁾
完全缓解	43	41.32 ± 6.06 ¹⁾²⁾	62.14 ± 14.65 ¹⁾²⁾	0.21 ± 0.07 ¹⁾²⁾	30.79 ± 4.63 ¹⁾²⁾	0.93 ± 0.14 ¹⁾²⁾
F 值		58.506	14.669	378.08	19.487	44.003
P 值		0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

注：1) 与无效比较, $P < 0.05$, 2) 与部分缓解比较, $P < 0.05$

3 讨论

膜性肾病主要的治疗为免疫抑制药物治疗, 部分患者经免疫抑制药物治疗后完全康复; 部分患者经免疫抑制药物治疗后尿蛋白转阴; 也有部分患者治疗无效, 可能发展为肾脏病末期, 需要透析维持治疗^[6-8]。特发性膜性肾病在特定条件下抗原暴露, 被树突细胞识别并递呈给 CD4⁺ T 细胞, CD4⁺ T 细胞在白细胞介素 4 的作用下被激活, 并分为呈 Th2 细胞。Th2 细胞分泌细胞因子促进 Th2 分化^[9-10], Th2 分泌的细胞因子激活 B 淋巴细胞, 促进特异性抗体 IgG4 释放, 形成原位免疫复合物, 激活补体系统, 促进基底膜增厚, 从而引起足细胞损伤, 发生蛋白尿^[11-12]。

CTLA-4 是 CD28 同源分子, CTLA-4 可和 CD28 竞争性结合 B7-1 分子和 B7-2 分子, 干扰 Th1/2 的转录活性, 影响 Th 细胞亚群发育, 引起 T 细胞功能下降^[13], 其主要生物学活性为下调 T 细胞反应, 抑制免疫应答反应^[14]。sCTLA-4 是膜结合 CTLA-4 蛋白的可变剪接物, sCTLA-4 序列缺失膜结合区氨基酸片段, 其表达量随着 T 细胞的活化而减少, 而膜结合 CTLA-4 的表达量则随着 T 细胞的活化而增加^[15-16]。本研究发现, 特发性膜性肾病患者血清 sCTLA-4 水平下降, 血清 sCTLA-4 水平可为特发性膜性肾病的诊断提供依据, 其水平下降程度在疾病严重程度、疗效判断及预后评估中具有重要意义。分析特发性膜性肾病时血清 sCTLA-4 水平下降, 从而对 Th1/2 的转录活性的抑制作用降低, 上调 T 细胞反应, 引起免疫应答反应, 促进肾小球上皮细胞或基底膜免疫复合物的沉积; 促进基底膜增厚, 引起足细胞损伤, 发生蛋白尿。sCTLA-4 水平越低, 对 Th1/2 的转录活性抑制作用越低, 引起足细胞损伤越严重, 尿蛋白水平越高。治疗后, 随着 sCTLA-4 水平升高, 对 Th1/2 的转录活性抑制作用增强, 对足细胞损伤减轻, 蛋白尿减少。

调节性 T 细胞 (CD4⁺、CD25⁺ Treg) 可抑制 CD4⁺ T 淋巴细胞增殖, 抑制自身反应性 CD8⁺ 细胞和白细胞介素 2 等细胞因子分泌^[17-18]。调节性 T 细胞还可抑制抗原递呈细胞活化 Th 细胞、Th 细胞活化 B 细胞及 B 细胞产生抗体, 从而减弱免疫复合物对组织的损伤^[19]。研究发现, 在膜性肾病患者外周血中调节性 T 细胞数量也减少, 调节性 T 细胞数量异常和膜性肾病的发生关系密切^[20]。调节性 T 细胞可表达 CTLA-4, 降低 CTLA-4 水平可抑制调节性 T 细胞活性, 减弱其对免疫反应的抑制作用, 从而引起自身免疫性疾病的发生^[21-22]。本研究发现, 膜性肾病患者外周血调节性 T 细胞数量减少, 血清 sCTLA-4 水平和外周血调节性 T 细胞数量呈正相关。表明血清 sCTLA-4 水平在某种程度上可反应机体的免疫状态。

综上所述, 特发性膜性肾病患者血清 sCTLA-4 水平下降, 抑制其对调节性 T 细胞的活化, 降低调节性 T 细胞对免疫的抑制作用, 从而增强免疫复合物对肾组织的损伤。

参 考 文 献:

- [1] RUGGENENTI P, FERVENZA F C, REMUZZI G. Treatment of membranous nephropathy: time for a paradigm shift[J]. Nat Rev Nephrol, 2017, 13(9): 563-579.
- [2] COUSER W G. Primary membranous nephropathy[J]. Clin J Am Soc Nephrol, 2017, 12(6): 983-997.
- [3] MASUZAWA N, NISHIMURA A, KITANI T, et al. A case of the nephrotic syndrome in bone marrow transplantation recipient, histologically showing overlapped glomerular lesions of thrombotic microangiopathy and membranous nephropathy[J]. Pathol Int, 2017, 67(12): 620-625.
- [4] MATIKAS A, MAVROUDIS D. Beyond CTLA-4: novel immunotherapy strategies for metastatic melanoma[J]. Future Oncol, 2015, 11(6): 997-1009.
- [5] VÉTIZOU M, PITT J M, DAILLÈRE R, et al. Anticancer immunotherapy by CTLA-4 blockade relies on the gut

- microbiota[J]. *Science*, 2015, 350(6264): 1079-1084.
- [6] CRAVEDI P. Rituximab in membranous nephropathy: not all studies are created equal[J]. *Nephron*, 2017, 135(1): 46-50.
- [7] van de LOGT A E, HOFSTRA J M, WETZELS J F. Pharmacological treatment of primary membranous nephropathy in 2016[J]. *Expert Rev Clin Pharmacol*, 2016, 9(11): 1463-1478.
- [8] CATTRAN D C, BRENCHLEY P E. Membranous nephropathy: integrating basic science into improved clinical management[J]. *Kidney Int*, 2017, 91(3): 566-574.
- [9] ZHANG Z, LIU X, WANG H, et al. Increased soluble ST2 and IL-4 serum levels are associated with disease severity in patients with membranous nephropathy[J]. *Mol Med Rep*, 2018, 17(2): 2778-2786.
- [10] 龙腾翔, 叶琨. 特发性膜性肾病外周血淋巴细胞亚群的免疫学研究进展 [J]. *中国临床新医学*, 2016, 9(5): 449-452.
- [11] LIU Y, WANG H, HU X, et al. A higher frequency of IL-10-producing B cells in Hepatitis B virus-associated membranous nephropathy[J]. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2016, 43(4): 417-427.
- [12] ESPOSITO P, GROSJEAN F, MANGIONE F, et al. Rituximab in primary membranous nephropathy: beyond a B-cell-centered paradigm[J]. *Clin Exp Nephrol*, 2018, 22(1): 208-209.
- [13] RAUSCH J, LOPEZ P A, BIALOJAN A, et al. Combined immunotherapy: CTLA-4 blockade potentiates anti-tumor response induced by transcutaneous immunization[J]. *J Dermatol Sci*, 2017, 87(3): 300-306.
- [14] LINCH S N, KASIEWICZ M J, MCNAMARA M J, et al. Combination OX40 agonism/CTLA-4 blockade with HER2 vaccination reverses T-cell anergy and promotes survival in tumor-bearing mice[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2016, 113(3): E319-327.
- [15] LANG C, WANG J, CHEN L. CD25-expressing Th17 cells mediate CD8⁺ T cell suppression in CTLA-4 dependent mechanisms in pancreatic ductal adenocarcinoma[J]. *Exp Cell Res*, 2017, 360(2): 384-389.
- [16] WANG C J, HEUTS F, OVCINNIKOV V, et al. CTLA-4 controls follicular helper T-cell differentiation by regulating the strength of CD28 engagement[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2015, 112(2): 524-529.
- [17] TUULASVAARA A, VANHANEN R, BALDAUF H M, et al. Interleukin-7 promotes human regulatory T cell development at the CD4⁺ CD8⁺ double-positive thymocyte stage[J]. *J Leukoc Biol*, 2016, 100(3): 491-498.
- [18] 贺丽蓉, 邵晓珊, 李宇红, 等. Th17/CD4⁺ CD25⁺ 调节性 T 淋巴细胞失衡在儿童原发性肾小球疾病中的作用 [J]. *中华实用儿科临床杂志*, 2015, 30(17): 1309-1312.
- [19] ROSENZWAJG M, LANGUILLE E, DEBIEC H, et al. B-and T-cell subpopulations in patients with severe idiopathic membranous nephropathy may predict an early response to rituximab[J]. *Kidney Int*, 2017, 92(1): 227-237.
- [20] ROCCATELLO D, SCIASCIA S, DI SIMONE D, et al. New insights into immune mechanisms underlying response to Rituximab in patients with membranous nephropathy: a prospective study and a review of the literature[J]. *Autoimmun Rev*, 2016, 15(6): 529-538.
- [21] KLOCKE K, HOLMDAHL R, WING K. CTLA-4 expressed by FOXP3⁺ regulatory T cells prevents inflammatory tissue attack and not T-cell priming in arthritis[J]. *Immunology*, 2017, 152(1): 125-137.
- [22] HOLT M P, PUNKOSDY G A, GLASS D D, et al. TCR signaling and CD28/CTLA-4 signaling cooperatively modulate T regulatory cell homeostasis[J]. *J Immunol*, 2017, 198(4): 1503-1511.

(唐勇 编辑)