

原发性膜性肾病患者外周血淋巴细胞亚群的变化及其与蛋白尿的关系

马东红, 郭明好, 许清玉, 刘云, 刘向东, 刘丽 (新乡医学院第一附属医院肾内科, 河南新乡 453100)

【摘要】 目的 分析原发性膜性肾病(PMN)患者外周血淋巴细胞亚群的变化及其与蛋白尿的关系。方法 选取新乡医学院一附院肾内科确诊的 PMN 患者 40 例, 收集其详细临床资料, 并留取外周血应用流式细胞仪测定淋巴细胞亚群(CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺、CD4⁺/CD8⁺、CD16⁺CD56⁺、CD19⁺), 同时选取 20 例健康志愿者作为健康对照组, 比较 PMN 患者外周血淋巴细胞亚群与健康对照组的差别。根据患者尿蛋白水平, 将 PMN 患者分为大量蛋白尿组(尿蛋白定量大于或等于 3.5 g/d)及非大量蛋白尿组(尿蛋白定量小于 3.5 g/d), 分析两组患者上述淋巴细胞亚群水平的差异及其可能的临床意义。结果 (1)和健康对照组相比, PMN 患者外周血 CD4⁺ 细胞计数有升高趋势(51.83±6.80 vs. 43.5±5.65, $P>0.05$), CD8⁺ 细胞计数有降低趋势(28.83±5.60 vs. 35.33±5.00, $P>0.05$), 而 CD4⁺/CD8⁺ 比值较健康对照组明显升高(1.86±0.43 vs. 1.27±0.33, $P<0.01$)。与健康对照组比较, PMN 患者外周血 CD16⁺CD56⁺ 细胞计数无明显差异, 而 CD19⁺ 细胞计数明显升高(8.00±2.76 vs. 7.33±2.66, $P<0.01$)。(2)和非大量蛋白尿组相比, 大量蛋白尿组 CD19⁺ 细胞计数明显升高(9.80±3.19 vs. 7.10±2.23, $P<0.01$), 而 CD4⁺ 细胞、CD8⁺ 细胞计数、CD4⁺/CD8⁺ 比值两者间差异均无统计学意义($P>0.05$)。结论 PMN 患者表现出明显的 B 淋巴细胞异常和 CD4⁺/CD8⁺ 细胞比值的偏移, 且 B 淋巴细胞异常程度与蛋白尿量有关, 因此, 监测 PMN 患者淋巴细胞亚群变化有助于评估病情、指导治疗。

【关键词】 原发性膜性肾病; 淋巴细胞亚群; 蛋白尿

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2015.01.021 文献标志码:A 文章编号:1672-9455(2015)01-0055-03

Changes of peripheral blood lymphocyte subgroups in patients with primary membranous nephropathy and their relationship with proteinuria MA Dong-hong, GUO Ming-hao, XU Qing-yu, LIU Yun, LIU Xiang-dong, LIU Li (Department of Nephrology, First Affiliated Hospital of Xinxiang Medical College, Xinxiang, Henan 453100, China)

【Abstract】 Objective To analyze the changes of lymphocyte subgroups in peripheral blood for the patients with primary membranous nephropathy(PMN) and their relationship with proteinuria. **Methods** 40 cases of PMN in the nephrology department of our hospital were selected and their detailed clinical data were collected. The peripheral blood was collected for detecting the levels of lymphocyte subgroups(CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺, CD4⁺/CD8⁺, CD16⁺CD56⁺, CD19⁺) by the flow cytometry. Simultaneous 20 healthy volunteers were selected as the control group. The differences in peripheral blood lymphocyte subgroups were compared between the PMN patients and the healthy control group. According to the proteinuria levels, the PMN patients were divided into the massive proteinuria group (MPG, proteinuria quantity \geq 3.5 g/d) and the non-massive proteinuria group(NMPG, proteinuria quantity $<$ 3.5 g/d). The differences in peripheral blood lymphocyte subgroups were compared between the MPG group and the NMPG group and their possible clinical significance was investigated. **Results** (1) Compared with the healthy control group, the CD4⁺ cell levels had a rising trend(51.83±6.80 vs. 43.5±5.65, $P>0.05$) and the CD8⁺ cell levels had a downward trend(28.83±5.60 vs. 35.33±5.00, $P>0.05$) in the PMN patients, while the CD4⁺/CD8⁺ ratio was significantly increased compared with the healthy control group(1.86±0.43 vs. 1.27±0.33, $P<0.01$). There was no significant difference in the CD16⁺CD56⁺ count between two groups, while the CD19⁺ cell count in the PMN patients was significantly increased(8.00±2.76 vs. 7.33±2.66, $P<0.01$). (2) Compared with the NMPG group, the CD19⁺ cell count in the MPG group was significantly increased(9.80±3.19 vs. 7.10±2.23, $P<0.01$), while the CD4⁺ cell count, CD8⁺ cell count and the CD4⁺/CD8⁺ ratio had no statistically significant differences between the MPG and NMPG groups. **Conclusion** PMN patients appear obvious abnormalities of B lymphocytes and the shift of CD4⁺/CD8⁺ cells ratio. The abnormal degree of B lymphocyte is related to proteinuria quantity. Therefore, monitoring the lymphocyte subgroups changes can help to assess the disease condition and guide the treatment.

【Key words】 primary membranous nephropathy; lymphocyte subgroups; proteinuria

原发性膜性肾病(PMN)是肾病综合征的病理类型之一, 近年来其发病率逐渐增高。PMN 的发病机制目前尚不完全清楚^[1]。有研究发现, 和对照组相比, PMN 患者体内存在严重的淋巴细胞异常^[2-3]。PMN 患者外周血淋巴细胞亚群的变化及

其与蛋白尿的关系目前尚未见报道。本文对 40 例 PMN 患者外周血淋巴细胞亚群(CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺、CD4⁺/CD8⁺、CD16⁺CD56⁺、CD19⁺)水平进行分析, 同时分析不同尿蛋白定量与淋巴细胞亚群的关系, 探讨患者临床表现与机体免疫状态之

间的可能联系,有望为 PMN 患者的治疗提供理论依据。

1 资料与方法

1.1 PMN 患者的纳入标准 (1)年龄大于或等于 18 岁,性别不限;(2)肾活检报告为膜性肾病;(3)排除了自身免疫、肿瘤、感染等继发性疾病;(4)血肌酐水平小于 133 $\mu\text{mol/L}$;(5)近 3 月内未使用过糖皮质激素及磷酰胺、他克莫司、霉酚酸酯、环孢素等免疫抑制剂。

1.2 研究对象 选择 2011 年 8 月至 2013 年 10 月在新乡医学院一附院肾内科住院的 PMN 患者 40 例,其中男 24 例,女 16 例,平均年龄(49.9 \pm 13.8)岁。同时选取健康人 20 例作为健康对照组,其中男 8 例,女 12 例,年龄 17~58 岁。PMN 患者再根据 24 h 尿蛋白定量的水平,将其分为两组,即大量蛋白尿组(U_{pro} \geq 3.5 g/d)和非大量蛋白尿组(U_{pro}<3.5 g/d)进行亚组分析。

1.3 标本留取 PMN 患者和健康对照组均于空腹采集静脉血 8~20 mL,乙二胺四乙酸二钠(EDTA-Na₂)抗凝。

1.4 淋巴细胞亚群的测定 取 100 μL EDTA 抗凝全血加入流式专用管中,再分别加入鼠抗人 CD3、CD4、CD8、CD16、CD19、CD56 荧光标记的单克隆抗体各 20 μL ,每种抗体均做一管相应的同型对照,充分混匀,4 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 15 min。孵育结束后,加入 1 mL 预冷的 0.1% BSA/PBS 缓冲液,1 500 r/min,离心 5 min,离心结束后,弃去上清液,用剩余的 100 μL 左右液体重悬细胞。再次加入预冷的 0.1% BSA/PBS 缓冲液,1 500 r/min,离心 5 min,离心结束后,弃去上清液,加入 400 μL 的 1%多聚甲醛固定液 4 $^{\circ}\text{C}$ 避光保存,24 h 内上机检测。上述制

备的标本使用美国 BD 公司 FACSCalibur 流式细胞仪进行检测,结果采用 CellQuest 软件进行分析。以外周血淋巴细胞设门,分别计算 CD3⁺、CD3⁺CD4⁺、CD3⁺CD8⁺、CD16⁺56⁺ 和 CD19⁺ 细胞在外周血淋巴细胞中的计数。

1.5 统计学处理 采用 SPSS 17.0 统计软件包进行资料分析。计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,组间两两比较采用独立样本 *t* 检验。以 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 PMN 患者外周血淋巴细胞亚群的变化 和健康对照组相比,PMN 患者外周血 CD3⁺ 细胞计数轻度降低(78.67 \pm 4.13 vs. 80.33 \pm 3.67, $P>0.05$),CD4⁺ 细胞计数轻度升高(51.83 \pm 6.80 vs. 43.5 \pm 5.65, $P>0.05$),CD8⁺ 细胞计数轻度降低(28.83 \pm 5.60 vs. 35.33 \pm 5.00, $P>0.05$),差异均无统计学意义($P>0.05$),但 PMN 患者 CD4⁺/CD8⁺ 比值较健康对照组明显升高(1.86 \pm 0.43 vs. 1.27 \pm 0.33, $P<0.01$)。见表 1。

2.2 PMN 患者淋巴细胞亚群的变化与患者尿蛋白的关系 对 PMN 患者进行了亚组分析,结果显示,大量蛋白尿组和非大量蛋白尿组相比,CD3⁺ 细胞计数(77.8 \pm 5.35 vs. 82.3 \pm 5.46, $P>0.05$)、CD4⁺ 细胞计数(37.6 \pm 4.33 vs. 40.2 \pm 7.64, $P>0.05$)、CD8⁺ 细胞计数(46.4 \pm 6.00 vs. 43.8 \pm 5.80, $P>0.05$)及 CD4⁺/CD8⁺ 比值(1.25 \pm 0.20 vs. 1.13 \pm 0.31, $P>0.05$)均差异无统计学意义。和非大量蛋白尿组相比,大量蛋白尿组患者血 CD19⁺ 细胞计数明显升高,两者之间差异有统计学意义(9.80 \pm 3.19 vs. 7.10 \pm 2.23, $P<0.01$)。见表 2。

表 1 原发性膜性肾病患者外周血淋巴细胞亚群的变化

组别	CD8 ⁺ /CD45 ⁺	CD3 ⁺ CD8 ⁺ /CD45 ⁺	CD3 ⁺ CD4 ⁺ /CD45 ⁺	CD4 ⁺ /CD8 ⁺	CD16 ⁺ 56 ⁺ /CD45 ⁺	CD19 ⁺ /CD45 ⁺
PMN 组	78.67 \pm 4.13	28.83 \pm 5.60	51.83 \pm 6.80	1.86 \pm 0.43	6.83 \pm 1.72	8.00 \pm 2.76
健康对照组	80.33 \pm 3.67	35.33 \pm 5.00	43.50 \pm 5.65	1.27 \pm 0.33	6.67 \pm 1.97	7.33 \pm 2.66
<i>P</i>	>0.05	>0.05	>0.05	<0.01	>0.05	<0.01

表 2 原发性膜性肾病患者外周血淋巴细胞亚群与蛋白尿的关系

组别	CD8 ⁺ /CD45 ⁺	CD3 ⁺ CD8 ⁺ /CD45 ⁺	CD3 ⁺ CD4 ⁺ /CD45 ⁺	CD4 ⁺ /CD8 ⁺	CD16 ⁺ 56 ⁺ /CD45 ⁺	CD19 ⁺ /CD45 ⁺
U _{pro} \geq 3.5 g/d	77.80 \pm 5.35	46.40 \pm 6.00	37.60 \pm 4.33	1.25 \pm 0.20	7.00 \pm 1.83	9.80 \pm 3.19
U _{pro} <3.5 g/d	82.30 \pm 5.46	43.80 \pm 5.80	40.20 \pm 7.64	1.13 \pm 0.31	6.90 \pm 1.97	7.10 \pm 2.23
<i>P</i>	>0.05	>0.05	>0.05	>0.05	>0.05	<0.01

3 讨论

PMN 是原发性肾病综合征的主要病理类型之一。国外资料报道,PMN 约占原发肾小球疾病病理类型的 29.4%;国内有资料显示 PMN 的比例仅次于 IgA 肾病^[4-5]。免疫异常是 PMN 的主要原因^[6],但其具体发病机制目前尚不完全清楚。本研究从 PMN 患者外周血淋巴细胞亚群水平入手,分析 PMN 患者外周血淋巴细胞亚群的变化及其与蛋白尿的关系。研究发现,PMN 患者 CD4⁺ 细胞计数较健康对照组有所升高,CD8⁺ 细胞计数有所下降,但差异均无统计学意义($P>0.05$);而 CD4⁺/CD8⁺ 较健康对照组明显升高,两组间差异有统计学意义($P<0.05$)。与健康对照组比较,PMN 患者外周血 CD19⁺ 细胞计数明显升高,两组间差异有统计学意义($P<0.05$)。说明 PMN 患者发病过程中存在着 B 淋巴细胞活化与扩增的亢进。

PMN 具体发病机制目前尚不完全清楚。已有的研究表明,PMN 是一种抗原抗体介导的自身免疫性疾病,其上皮侧免

疫复合物的形成是抗体介导的自身免疫反应。肾组织免疫荧光检测可以发现,沉积在肾小球上皮的免疫复合物以 IgG 和补体 C3 为主,其中 IgG 的沉积以免疫球蛋白 G4 亚型为主^[7]。肾组织免疫复合物的沉积与 B 淋巴细胞的功能有关,B 淋巴细胞介导机体体液免疫,识别呈递抗原,合成分泌自身抗体,调节免疫应答,在自身免疫性疾病发病中扮演着重要角色。有研究证实,PMN 患者体内的 B 淋巴细胞在 Th2 细胞所分泌的 IL-4 和 IL-10 等细胞因子的作用下,分泌 IgG4 亚型的功能明显增强^[8]。此外,PMN 患者肾组织 B 淋巴细胞的浸润,以及针对 B 细胞表面 CD20 单克隆抗体的药物利妥昔单抗(rituximab)在 PMN 患者临床治疗的应用等,均进一步为 PMN 的免疫发病机制提供了依据^[9-11]。B 淋巴细胞的激活使人们对 PMN 的发病机制的研究和认识到了一个新时代。

那么,导致 PMN 患者体内 B 淋巴细胞功能异常活化的因素是什么呢?有研究发现,CD4⁺ 辅助性 T 细胞(Th)是一类重要的免疫调节细胞,它不仅对机体特异性和非特异性免疫均具

有调节作用,还能影响 B 淋巴细胞产生抗体的功能,被称为免疫调节系统的“司令部”。传统观念将 CD4⁺ Th 细胞分为 Th1 和 Th2 两类细胞亚群,其中 Th2 细胞主要分泌白细胞介素(IL)-4、IL-5、IL-10 和 IL-13 等,主要功能为刺激 B 淋巴细胞增殖并产生免疫球蛋白抗体,参与体液免疫反应^[8]。有研究发现,Th2 和 Treg 免疫反应在 PMN 发生及病情进展中起了举足轻重的作用^[12]。根据以上研究结果,作者推测,PMN 患者体内存在着明显的 T 淋巴细胞异常,其通过分泌 IL 等多种细胞因子,刺激 B 淋巴细胞增殖,从而导致 B 淋巴细胞的激活。B 淋巴细胞激活后可介导机体体液免疫,形成抗原抗体免疫复合物参与发病。本研究未对 B 淋巴细胞激活后的免疫反应做深入探讨,是本研究的一个缺陷,亦是今后研究的方向。

那么,淋巴细胞异常活化是否和 PMN 患者临床表现、疾病活动程度有关系呢?故本研究分析了患者体内免疫异常与蛋白尿的关系。研究发现,大量蛋白尿组 CD19⁺ 细胞计数明显高于非大量蛋白尿组,提示 PMN 发病过程中 B 淋巴细胞活化与扩增程度可能和患者临床表现、疾病活动程度有一定关系。

综上所述,PMN 患者体内存在明显免疫异常,主要表现为 B 淋巴细胞的增加和 CD4⁺/CD8⁺ 比值升高。其中外周血 B 淋巴细胞数量与患者蛋白尿呈正相关。因此,监测患者体内淋巴细胞亚群的水平有助于评估病情,并有望为临床治疗提供指导意义。

参考文献

[1] Ardalan M. Triggers, bullets and targets, puzzle of membranous nephropathy [J]. *Nephrol Mon*, 2012, 4 (4): 599-602.
 [2] 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.
 [3] Hirayama K, Ebihara I, Yamamoto S, et al. Predominance

of type-2 immune response in idiopathic membranous nephropathy. *Cytoplasmic cytokine analysis* [J]. *Nephron*, 2002, 91(2): 255-261.

[4] Hanco JB, Mullan RN, O'Rourke DM, et al. The changing pattern of adult primary glomerular disease [J]. *Nephrol Dial Transplant*, 2009, 24(10): 3050-3054.
 [5] 潘俊美,尹忠诚,李胜开. 1217 例肾活检患者临床与病理资料分析 [J]. *临床内科杂志*, 2013, 30(3): 179-181.
 [6] Pereira WF, Brito-Melo GE, Guimarães FT, et al. The role of the immune system in idiopathic nephrotic syndrome; a review of clinical and experimental studies [J]. *Inflamm Res*, 2014, 63(1): 1-12.
 [7] Van der Zee JS, Aalberse RC. The role of IgG in immediate-type hypersensitivity [J]. *Eur Respir J*, 1991, 13: 91s-96s.
 [8] 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.
 [9] 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.
 [10] Remuzzi G, Chiurciu C, Abbate M, et al. Rituximab for idiopathic membranous nephropathy [J]. *Lancet*, 2002, 360(9337): 923-924.
 [11] Ruggenenti P, Cravedi P, Remuzzi G. Rituximab for membranous nephropathy and immune disease; less might be enough [J]. *Nat Clin Pract Nephrol*, 2009, 5(2): 76-77.
 [12] 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.

(收稿日期:2014-04-16 修回日期:2014-09-13)

(上接第 54 页)

[4] 中华神经科学会. 脑卒中患者临床神经功能缺损程度评分标准(1995) [J]. *中华神经科杂志*, 1996, 42(6): 62.
 [5] 贾建平. 神经病学 [M]. 6 版. 北京:人民卫生出版社, 2008: 182-183.
 [6] 张青萍,刘二泰. 急性脑梗死与客观指标关系的研究进展 [J]. *中西医结合心脑血管病杂志*, 2010, 6 (11): 1328-1329.
 [7] 李磊,唐小鹏. 注射用奥扎格雷钠药理毒理研究综述 [J]. *黑龙江医学*, 2010, 21(4): 84.
 [8] 张焕章,陈瑞坊,许雄,等. 奥扎格雷钠治疗急性脑梗死疗效观察 [J]. *中风与神经疾病杂志*, 2011, 18(3): 132-133.
 [9] 王建新,徐连荣,张文静. 奥扎格雷钠治疗急性脑梗死 60 例疗效观察 [J]. *实用神经疾病杂志*, 2011, 8(1): 63.
 [10] 李琴. 奥扎格雷钠治疗脑梗死 59 例临床疗效观察 [J]. *第四军医大学学报*, 2012, 30(5): 386.
 [11] 岑玉娇,杨文丽,蔡文杰,等. 急性脑梗死的中医研究报道

[J]. *中华传统医学杂志*, 2010, 20(15): 1134-1135.

[12] 韩书琴,邓玲玲,龚杰,等. 红花注射液治疗肢体动脉硬化闭塞症 32 例 [J]. *中国中西医结合外科杂志*, 2012, 11 (5): 522-523.
 [13] 许长罗,陶红星,徐平. 丹红注射液对脑血栓患者血浆组织因子的影响 [J]. *中国医师杂志*, 2012, 9(3): 984-985.
 [14] 曾晓和,徐丽华,王娟娟. 丹红注射液治疗急性脑梗死疗效观察 [J]. *浙江中西医结合杂志*, 2010, 20(12): 754-755.
 [15] 曹韦柱,吴宽,曾立宏,等. 丹红注射液治疗脑梗死的临床研究 [J]. *中国实用医药杂志*, 2011, 2(5): 63-65.
 [16] 李松,陈立腾,刘青飒. 丹红注射液的药理作用与临床应用概述 [J]. *中国药师*, 2010, 11(8): 987.
 [17] 许云雨,陈青凤. 奥扎格雷钠联合丹红注射液治疗急性脑梗死的疗效分析 [J]. *中国实用医学杂志*, 2011, 21(17): 1787-1788.

(收稿日期:2014-04-22 修回日期:2014-09-11)