

· 论 著 ·

两种方法检测血清抗磷脂酶 A2 受体抗体在膜性肾病中的应用分析^{*}

方 玲, 顾向明[△], 周泽红, 林森雄, 齐晓云

(广州中医药大学附属中山中医院检验科, 广东中山 528400)

摘要:目的 探讨酶联免疫吸附试验(ELISA)和间接免疫荧光法(IIF)检测血清抗磷脂酶 A2 受体抗体(抗 PLA2R 抗体)在膜性肾病(MN)中的阳性率,分析两种方法在 MN 的诊断效能,为临床 MN 的诊治提供特异度更高的实验指标。方法 选取该院肾内科就诊行肾病理活检并确诊的 MN 患者 31 例,对照组 50 例包括该院住院自身免疫性疾病及肾病综合征、肾功能不全患者 38 例及健康体检者共 12 例,收集血清同时进行以上两种方法检测,分析两种方法在 MN 中的诊断效能,并分析其对 MN 的诊断一致性。结果 MN 组中,ELISA 法及 IIF 法检测结果均为阳性 17 例,两种方法分别显示阳性和阴性各 1 例,两种方法同时阴性 12 例,两种方法检测阳性率为 58.06%(18/31);对照组 50 例均为阴性,阳性率为 0.00%(0/50)。两种方法检测抗 PLA2R 抗体阳性率在 MN 组和对照组间比较,差异有统计学意义($\chi^2=37.32, P<0.05$)。两种方法诊断 MN 的灵敏度、特异度、阳性预测值、阴性预测值、准确率指标依次为 58.06%(18/31),100.00%(50/50),100.00%(18/18),79.37%(50/63),83.95%(68/81);两种方法单独检验与联合检验对 MN 的诊断性能比较,差异均无统计学意义($P>0.05$)。ELISA 法在 MN 组及对照组中抗 PLA2R 抗体水平分别为 45.42(2.00,760.40)及 2.00(2.00,3.21)RU/mL,两组间抗体水平比较,差异有统计学意义($Z=-5.345, P<0.05$)。结论 ELISA 法及 IIF 法检测血清抗 PLA2R 抗体在 MN 诊断中具有较高的特异度与准确率,可作为 MN 诊断,尤其是特发性 MN 及无法行肾活检患者的必要和特异性血清学检测指标。

关键词:肾小球肾炎; 膜性肾病; 抗磷脂酶 A2 受体抗体; 酶联免疫吸附试验; 间接免疫荧光法

DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2017.15.011 文献标志码:A 文章编号:1672-9455(2017)15-2196-03

The application of two methods of detecting serum anti-phospholipase A2 receptor antibodies in patients with membranous nephropathy^{*}

FANG Ling, GU Xiangming[△], ZHOU Zehong, LIN Miaoxiong, QI Xiaoyun

(Department of Clinical Laboratory, Zhongshan Chinese Medicine Hospital Affiliated of Guangzhou Chinese Medicine University, Zhongshan, Guangdong 528400, China)

Abstract: Objective To investigate the positive rates of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and indirect immunofluorescence (IIF) in detecting serum anti-phospholipase A2 receptor antibodies (anti-PLA2R antibodies) in membranous nephropathy (MN) and to analyze the performance of the two methods in the diagnosis of MN. **Methods** A total of 31 cases of MN patients confirmed by kidney biopsy were identified as MN group. Another 38 patients with non-MN kidney diseases and 12 healthy persons at the same period were selected as the control group. The serum anti-PLA2R antibodies was tested and detected by the two methods. The performance and consistency of the two kinds of method were analyzed. **Results** ELISA and the IIF showed 17 cases with positive anti-PLA2R antibodies coincidentally, and the two methods showed the results of one case with anti-PLA2R antibodies and one case without negative anti-PLA2R antibodies, respectively. And the two methods showed 12 cases without anti-PLA2R antibodies coincidentally. The results showed that 50 cases of the control group were all negative. The positive rates of two methods in the MN group were both 58.06% (18/31), which was significantly higher than that of the control group ($\chi^2=37.32, P<0.05$). The sensitivity, specificity, positive predictive value, negative predictive value and accuracy rates of the two methods were 58.06% (18/31), 100.00% (50/50), 100.00% (18/18), 79.37% (50/63) and 83.95% (68/81). The single detection of the two methods and combined detection for MN diagnosis had no statistical significance ($P>0.05$). The level of anti-PLA2R antibodies measured by ELISA in MN group and control group were 45.42(2.00,760.40) and 2.00(2.00,3.21)RU/mL, the difference was statistically significant ($Z=-5.345, P<0.05$). **Conclusion** ELISA and the IIF in detecting the serum anti-PLA2R antibodies in MN has high specificity and accuracy in the diagnosis. Anti-PLA2R antibodies can be a specific serological detection index for MN, especially in idiopathic MN and for patients couldn't accept kidney biopsy.

Key words: glomerulonephritis; membranous nephropathy; anti-phospholipase A2 receptor antibodies; enzyme-linked immunosorbent assay; indirect immunofluorescence

膜性肾病(MN)是成人肾病综合征的一个常见病因,可分为特发性 MN(IMN)和继发性 MN(SMN)两种。MN 诊断繁复,需结合病史,进行多项相关实验室、病理及影像学检查,有时诊断困难,从而导致误诊,延误治疗。近年来有报导显示,血

^{*} 基金项目:广东省中山市科学技术基金资助项目(2015B1214)。

作者简介:方玲,女,副主任技师,主要从事临床免疫学检验方面的研究。△ 通信作者,E-mail:gxm5501@163.com。

清抗磷脂酶 A2 受体抗体(抗 PLA2R 抗体)与 IMN 发生相关,同时也是其诊断疾病活动性和治疗监测的重要指标^[1-4]。本文旨在对血清抗 PLA2R 抗体在 MN 中酶联免疫吸附试验(ELISA)及间接免疫荧光法(IIF)的诊断性能进行分析并对其一致性进行相关探讨,为临床诊治提供特异度更高的实验室指标,进一步明确该指标在 MN 中的诊断价值。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集本院肾内科 2015 年 4 月至 2016 年 6 月肾活检病理明确诊断为 MN 患者 31 例为 MN 组,其中男 22 例,女 9 例;年龄 19~68 岁,中位年龄 47 岁。选择系统性红斑狼疮、干燥综合征、肾病综合征、肾功能不全等患者共 38 例,其中男 13 例,女 25 例;年龄 8~84 岁,中位年龄 44 岁;选择健康体检者 12 例,男 6 例,女 6 例;年龄 25~53 岁,中位年龄 45 岁。将以上非 MN 患者和健康体检者 50 例作为对照组。

1.2 仪器与试剂 主要仪器为蔡司荧光显微镜, MK3 酶标仪。主要试剂为抗 PLA2R 抗体 IgG 检测试剂盒(ELISA 法,批号: E151021AY), 抗 PLA2R 抗体检测试剂盒(IIF 法,批号: F150126DB)。生产厂家均为德国欧蒙医学实验诊断股份有限公司,在试剂有效期内进行检测。

1.3 方法 收集所有研究对象空腹静脉血 4 mL, 3 500 r/min, 离心 8 min, 分离血清保存于 -20 °C 冰箱备用。标本复融后用 IIF 和 ELISA 同时检测抗 PLA2R 抗体,按试剂说明书进行操作。IIF 阳性为转染 PLA2R 抗原的人胚肾(HEK)细胞部分细胞质出现荧光,而未转染 PLA2R 抗原的 HEK 细胞质无荧光。ELISA 采用 5 点定标进行定量检测,试剂说明书推荐 14 RU/mL 为阳性界值。

1.4 统计学处理 采用 SPSS19.0 统计软件进行数据分析,非正态分布的计量资料以中位数和四分位数间距表示 [$M(P_{25}, P_{75})$], 组间比较采用秩和检验。计数资料以百分数表示,组间比较采用 χ^2 检验。MN 的诊断性能以肾活检病理结果为金标准。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两种方法在 MN 组与对照组的检测情况 ELISA 法 MN 组抗 PLA2R 抗体水平为 45.42(2.00, 760.40)RU/mL, 对照组抗体水平为 2.00(2.00, 3.21)RU/mL, 两组比较, 差异有统计学意义 ($Z = -5.345, P < 0.05$)。MN 组 31 例患者中, ELISA 法及 IIF 法检测结果均为阳性 17 例, 两种方法分别显示阳性和阴性各 1 例, 两法同时阴性 12 例。对照组 50 例研究对象中, 两种方法检测均阴性。MN 组中 ELISA 法和 IIF 法检测抗 PLA2R 抗体阳性率均为 58.06%(18/31), 与对照组比较 [0.00%(0/50)], 差异有统计学意义 ($\chi^2 = 37.327, P < 0.05$)。在 MN 组中, 两种检测抗 PLA2R 抗体阳性率的比较, 差异无统计学意义 ($\chi^2 = 0.000, P = 1.00$)。

2.2 两种方法单独与联合检验对 MN 的诊断性能评价 ELISA 法和 IIF 法检测抗 PLA2R 抗体阳性率相等, 所以两种方法单独检测抗 PLA2R 抗体灵敏度、特异度、阳性预测值、阴性预测值和准确率也相同。单独检测及联合检测的灵敏度、特异度、阳性预测值、阴性预测值和准确率见表 1。单独检测与联合检测相关指标比较, 差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。

2.3 病因分析 MN 组中有 5 例可查到明确病因从而诊断为 SMN, 其抗 PLA2R 抗体结果显示, 3 例阳性 2 例阴性。

表 1 ELISA 法及 IIF 法单项检测及联合检测对 MN 的诊断性能评价 (%)

方法	灵敏度	特异度	阳性预测值	阴性预测值	准确率
单独检测	58.06	100.00	100.00	79.37	83.95
联合检测	61.29	100.00	100.00	80.65	85.19

3 讨论

MN 是导致成人肾病综合征的一个常见病因,其特征病理学改变是在肾小球毛细血管袢上皮侧可见大量免疫复合物沉积。一直以来,该病缺乏特异性血清学指标,其诊断主要依靠肾组织活检。近年来,国内外较多报道显示,抗 PLA2R 抗体是 IMN 的特异性抗体成分^[5-6],同时抗 PLA2R 抗体与 MN,尤其是 IMN 发生相关,同时也是其诊断疾病活动性和治疗监测的重要指标^[7-8]。

本研究结果表明,ELISA 法及 IIF 法检测抗 PLA2R 抗体阳性率为 58.06%,与对照组比较,差异有统计学意义 ($P < 0.05$),这与林伟锋等^[6]报道的结果相一致,证明抗 PLA2R 抗体是一种特异的血清学指标,可用于 MN 的诊断,特别是对于身体情况不佳或需要抗凝剂治疗进行肾病理活检有风险的患者,该指标血清学阳性更具有重要意义。如阳性则可明确诊断,可不必再行肾病理活检,当抗体血清学阴性可再做肾病理活检确诊。

ELISA 法定量检测不同组间的抗体水平显示, MN 组患者显著高于对照组,差异有统计学意义 ($P < 0.05$),与朱涛等^[8]研究结果基本相一致。说明 MN 组患者抗 PLA2R 抗体水平有显著变化,定量检测同时有利于医生对病情作进一步综合判断。本结果表明,两种方法单独检验及联合检验对于 MN 的诊断性能比较,差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。ELISA 法有标准化的检测系统,可实现定性和定量检测,可为 IMN 的诊断与治疗提供动态观察指标,适合于大批量检测并可进行滴度分析; IIF 法适合于小样本量检测,适合小实验室进行检测,各实验室可根据具体情况选择相应试验方法。

对于抗 PLA2R 抗体检测, ELISA 法及 IIF 法在 MN 组检测阳性率为 58.06%,与文献^[8]报道的 IMN 患者使用不同方法检测抗 PLA2R 抗体检出率为 52%~82% 基本一致。两种方法其阳性预测值和特异度均为 100.00%,即说明只要检测到患者为阳性,则为真阳性,可以作为确诊 MN 的依据,也进一步证明抗 PLA2R 抗体在 MN 中具有较高的诊断准确率。

MN 组中有 5 例可查到明确病因如糖尿病、肿瘤、乙型肝炎,可诊断为 SMN; 其中 3 例抗 PLA2R 抗体阳性, 2 例阴性,说明 SMN 中也可能有部分患者存在病因有 IMN 与 SMN 相叠加的因素存在,导致抗体阳性。林伟锋等^[6]报道的特殊病例组也出现部分抗 PLA2R 抗体阳性,因此 MN 与上述疾病是因果关系或并存关系目前尚不明确,未来有待更多学者更进一步开展相关方面研究。

对于抗 PLA2R 抗体阴性的原因,可能有以下几个方面^[5-9]: (1) 该病可能存在除 PLA2R 以外的相关抗原,有 70% 的 MN 可检测到 M 型 PLA2R, 在 5%~10% 的 MN 患者中可检测到 1 型血小板反应蛋白 7A 域 (THSD7A) 抗原,它与 PLA2R 是两种独立的分子机制,是 IMN 的主要靶点^[5]; (2) 可

能部分患者病情有缓解或使用免疫抑制剂后导致结果出现阴性。大部分临床缓解的患者其 PLA2R 抗体也转阴,其形成的免疫复合物沉积部位在基底膜上皮细胞侧,与病理学特征相符^[6-8]; (3)大量蛋白尿患者的抗体可能从尿液中丢失^[9]; (4)免疫反应过重的患者,抗 PLA2R 抗体可能大量沉积于肾脏而导致血清阴性; (5)检测技术不够完善导致结果假阴性^[10]。以上论点均需多中心、大样本的研究进行相关验证。

综上所述,抗 PLA2R 抗体是一种新的血清学指标,具有较高的特异度与准确率,ELISA 法及 IIF 法对于 MN 的诊断性能相似,可作为无法行肾活检患者诊断 MN(尤其是 IMN)的必要及特异的血清学检测指标。

参考文献

- [1] Beck JR, Bonegio 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.
- [2] Hoxha E, Harendza S, Zahner C, et al. An immunofluorescence test for phospholipase-A2-receptor antibodies and its clinical usefulness in patients with membranous glomerulonephritis[J]. *Nephrol Dial Transplant*, 2011, 26(8): 2526-2532.
- [3] 刘志红. 膜性肾病的诊断:知其然,知其所以然[J]. *肾脏病与透析肾移植杂志*, 2008, 17(3): 252-253.

- [4] 刘琳,陈丽萌,李学旺. 特发性膜性肾病与 M 型磷脂酶 A2 受体的研究进展[J]. *中华检验医学杂志*, 2012, 35(9): 792-794.
- [5] 牛方华,高玉洁,王柏山,等. 磷脂酶 A2 受体抗体在特发性膜性肾病中的诊断价值[J]. *中华检验医学杂志*, 2015, 38(9): 595-599.
- [6] 林伟锋,李航,李雪梅,等. 抗磷脂酶 A2 受体抗体与特发性膜性肾病的关系[J]. *中华内科杂志*, 2015, 54(9): 783-788.
- [7] 管音,李航,段琳,等. 血清抗 PLA2R 抗体和肾小球 IgG4 联合检测在膜性肾病诊断中的应用[J]. *中华肾脏病杂志*, 2015, 31(3): 198-202.
- [8] 朱涛,赵涌,彭梦乐,等. 特发性膜性肾病患者血清抗 PLA2R 抗体表达研究[J]. *现代检验医学杂志*, 2016, 31(3): 4-6.
- [9] Tomas NM, Beck LH, 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.
- [10] 程虹,湛贻璞. 需尽快开展诊断特发性膜性肾病的两项检验[J]. *中华检验医学杂志*, 2016, 39(12): 873-875.

(收稿日期:2017-01-25 修回日期:2017-04-03)

(上接第 2195 页)

应,破损处皮肤可继续使用,为放射治疗计划的顺利完成提供良好的保证。

通过筛选,本研究对收集的 90 例头颈部肿瘤患者随机分配至康复新液联合医用射线防护剂组(A组)、单用医用射线防护剂组(B组)、单用康复新液组(C组),观察结果显示,3种药物治疗方案在预防及治疗头颈部肿瘤放射性皮炎过程中未发现不良反应及药物不良反应,患者均耐受良好。联合使用康复新液及皮肤防护剂防治放射性皮炎的疗效优于单独应用康复新液或者皮肤防护剂的治疗疗效,值得临床肿瘤护理中进一步推广应用。

参考文献

- [1] 谷铎之,殷蔚伯,余子豪,等. 肿瘤放射治疗学[M]. 北京:北京医科大学和中国协和医科大学联合出版社,1993: 252-480.
- [2] Younus J, Lock M, Vujovic O, et al. A case control, mono-center, open label, pilot study to evaluate the feasibility of therapeutic touch in preventing radiation dermatitis in women with breast cancer receiving adjuvant radiation therapy[J]. *Complement Ther Med*, 2015, 23(4): 612-616.
- [3] 徐敏,李建彬,田世禹. 放射性皮炎的防治现状[J]. *中华肿瘤防治杂志*, 2007, 14(17): 1354-1357.
- [4] 朱雪萍,廖惠莲,陈利,等. 自制复方芦荟汁预防鼻咽癌患

者放射性皮炎的效果观察[J]. *护理学报*, 2013, 20(16): 67-68.

- [5] Amver T, Shiman I, Badiavas V. The use of antioxidants in radiotherapy-induced skin toxicity[J]. *Integr Cancer Ther*, 2014, 13(1): 38-45.
- [6] 张静,梁婷婷. 维生素 B₁₂ 联合用药治疗 2 级放射性皮炎的护理观察[J]. *中国实用医药*, 2016, 11(4): 198-199.
- [7] 郝丽霞,赵晓叶. 紫草油配合微波热疗防治急性放射性皮肤损伤的临床疗效[J]. *重庆医学*, 2013, 42(1): 19-20.
- [8] Huang CJ, Hou MF, Luo KH, et al. RTOG, CTCAE and WHO criteria for acute radiation dermatitis correlate with cutaneous blood flow measurements[J]. *Breast*, 2015, 24(3): 230-236.
- [9] Dirix P, Nuyts S, Vander Poorten V, et al. The influence of xerostomia after radiotherapy on quality of Life: results of a questionnaire in head and neck cancer[J]. *Support Care Cancer*, 2008, 16(2): 171-179.
- [10] Hughes KS, Schnaper LA, Bellon JR, et al. Lumpectomy plus tamoxifen with or without irradiation in women age 70 years or older with early breast cancer: Long-Term Follow-Up of CALGB 9343[J]. *J Clin Oncol*, 2013, 31(19): 2382-2387.

(收稿日期:2017-01-16 修回日期:2017-03-22)