

新型膜性肾病标志物 PLA2R 抗体的双抗原夹心-时间分辨荧光免疫分析

张艺 胡志刚 王珂 王凉 张秋花 林江 杜明华 顾涛 黄飏

214063 无锡,江苏省原子医学研究所、卫生部核医学重点实验室、江苏省分子核医学重点实验室(张艺、黄飏);214023 南京医科大学附属无锡人民医院检验科(胡志刚),肾内科(王凉、张秋花);214400 江阴市人民医院检验科(王珂、林江);210029 南京,江苏省中医院核医学科(杜明华);215300 昆山市第一人民医院检验科(顾涛)

通信作者:黄飏, Email: huangbiao@jsnm.org;顾涛, Email: kunshangt@163.com

DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-2848.2018.06.006

【摘要】 目的 建立 M 型磷脂酶 A2 受体(PLA2R)抗体的时间分辨荧光免疫分析(TRFIA)法,评估该指标在特发性膜性肾病(IMN)中的检测价值。**方法** 以 PLA2R 抗原包板并对其进行 Eu^{3+} -链霉亲和素标记,建立 PLA2R 抗体的双抗原夹心 TRFIA 法。检测 63 例 IMN 患者(男 36 例、女 27 例,年龄 25~75 岁)和 90 例健康体检者(男 30 名、女 60 名,年龄 22~53 岁)血清中的 PLA2R 抗体含量。采用 Kruskal-Wallis H 检验和 Mann-Whitney u 检验分析数据。**结果** 本方法灵敏度 $5 \mu\text{g/L}$,线性测量范围 $0\sim 10 \text{ mg/L}$,有效剂量(ED_{20} 、 ED_{50} 和 ED_{80} 分别为 (0.144 ± 0.012) 、 (0.707 ± 0.029) 和 $(3.466\pm 0.098) \text{ mg/L}$ 。批内和批间 CV 分别为 4.7% 和 5.1%。健康体检者的血清 PLA2R 抗体水平为 $0.455 (0.320, 0.593) \text{ mg/L}$,而 IMN 患者的血清 PLA2R 水平为 $2.690 (0.717, 7.750) \text{ mg/L}$,较前者升高显著($z=-3.688, P<0.05$);且血清 PLA2R 抗体水平在不同年龄组及不同病理分期患者间差异有统计学意义(χ^2 值:10.328 和 9.716,均 $P<0.05$)。由受试者工作特征(ROC)曲线可知,以血清中 PLA2R 抗体的质量浓度 0.80 mg/L 为阈值时,PLA2R 抗体检测诊断 IMN 的灵敏度为 73.0% (46/63),特异性为 95.6% (86/90)。**结论** 成功建立双抗原夹心测定人血清 PLA2R 抗体的 TRFIA 法,该法快速、简便,有助于提高对 IMN 患者的诊断准确性。

【关键词】 肾小球肾炎,膜性;受体,磷脂酶 A2;荧光免疫测定

基金项目:江苏省临床医学科技专项——新型临床诊疗技术攻关项目(BL2014022);无锡市卫生计生科研项目(MS201642)

Dual-antigen sandwich-type time-resolved fluoroimmunoassay for phospholipase A2 receptor antibody, a new marker of membranous nephropathy Zhang Yi, Hu Zhigang, Wang Ke, Wang Liang, Zhang Qihua, Lin Jiang, Du Minghua, Gu Tao, Huang Biao

Key Laboratory of Nuclear Medicine, Ministry of Health, Jiangsu Key Laboratory of Molecular Nuclear Medicine, Jiangsu Institute of Nuclear Medicine, Wuxi 214063, China (Zhang Y, Huang B); Department of Clinical Laboratory, Wuxi People's Hospital Affiliated to Nanjing Medical University, Wuxi 214023, China (Hu ZG); Department of Clinical Laboratory, Jiangyin People's Hospital, Wuxi 214400, China (Wang K, Lin J); Department of Nephrology, Wuxi People's Hospital Affiliated to Nanjing Medical University, Wuxi 214023, China (Wang L, Zhang QH); Department of Nuclear Medicine, Jiangsu Province Hospital of Traditional Chinese Medicine, Nanjing 210029, China (Du MH); Department of Clinical Laboratory, the First People's Hospital of Kunshan, Kunshan 215300, China (Gu T)

Corresponding authors: Huang Biao, Email: huangbiao@jsnm.org; Gu Tao, Email: kunshangt@163.com

【Abstract】 Objective To establish a time-resolved fluoroimmunoassay (TRFIA) method for detecting M-type phospholipase A2 receptor (PLA2R) antibody and to investigate the diagnostic value of serum PLA2R antibody for idiopathic membranous nephropathy (IMN). **Methods** The microplates coated with recombinant PLA2R antigen and Eu^{3+} -streptavidin labeled PLA2R antigen were used to establish a dual-antigen sandwich-type TRFIA for PLA2R antibody detection (anti-PLA2R-TRFIA). The serum concentrations of PLA2R antibody in 63 IMN patients (36 males, 27 females, age 25–75 years) and 90 healthy volunteers (30 males, 60 females, age 22–53 years) were quantitatively analyzed. Kruskal-Wallis H test and Mann-Whitney u test were used to analyze the data. **Results** The range of anti-PLA2R-TRFIA was $0\sim 10 \text{ mg/L}$ and the sensitivity was $5 \mu\text{g/L}$, while ED_{20} , ED_{50} and ED_{80} of the standard curve were (0.144 ± 0.012) ,

(0.707 ± 0.029) and (3.466 ± 0.098) mg/L, respectively. The CV of inter- and intra-assay were 4.7% and 5.1%, respectively. The average concentration of serum PLA2R antibody in healthy volunteers was 0.455 ($0.320, 0.593$) mg/L, but in IMN patients it was 2.690 ($0.717, 7.750$) mg/L ($z = -3.688, P < 0.05$). Meanwhile, the serum levels of PLA2R antibody in IMN patients were significantly different between different stages and ages (χ^2 values: 10.328, 9.716, both $P < 0.05$). According to the receiver operating characteristic (ROC) curve, when the diagnostic cut-off was set at 0.80 mg/L for IMN detection, the sensitivity and specificity of anti-PLA2R-TRFIA were 73.0% (46/63) and 95.6% (86/90), respectively. **Conclusions** Anti-PLA2R-TRFIA has been well established. This quick and easy-performance method could increase the diagnostic accuracy for IMN.

【Key words】 Glomerulonephritis, membranous; Receptors, phospholipase A2; Fluoroimmunoassay

Fund program: Clinical Medical Science and Technique Foundation of Jiangsu Province for New Technological Achievements of Clinical Diagnose and Treatment (BL2014022); Research Project of Wuxi Health and Family Planning Bureau (MS201642)

特发性膜性肾病 (idiopathic membranous nephropathy, IMN) 是成人肾病综合征的常见病因, 临床主要表现为无症状蛋白尿或肾病综合征, 病理特点为肾小球基底膜上皮弥漫的免疫复合物沉积伴基底膜弥漫增厚。未经治疗的 IMN 患者中有 50%~60% 在 10~20 年内进展至终末期肾病^[1-2]。2009 年 Beck 等^[3]首次发现磷脂酶 A2 受体 (phospholipase A2 receptor, PLA2R) 是成人 IMN 的靶抗原, 血清中存在 PLA2R 自身抗体。目前, IMN 的诊断主要通过肾脏穿刺、组织学检查^[4], 但上述方法存在检查时间长、操作复杂、具有创伤性、二级以下医院难以开展等问题。笔者应用时间分辨荧光免疫分析 (time-resolved fluoroimmunoassay, TRFIA) 技术, 建立了新型 IMN 标志物——PLA2R 抗体的血清学检测方法, 并探讨了其临床应用价值。

资料与方法

一、标本、试剂与材料

1. 血清标本。收集 2014 年 11 月至 2015 年 2 月间, 无锡市人民医院肾内科经病理学确诊的 63 例 IMN 患者样本 (男 36 例、女 27 例, 年龄 25~75 岁) 的血清。另从江苏省中医院体检中心和江阴市人民医院检验科选取 90 名健康体检者样本 (男 30 名、女 60 名, 年龄 22~53 岁) 的血清。所有血清样本均使用分离胶采血管, 离心分离后取 1 ml 分装保存于 -70°C 冰箱, 检测前恢复至室温后使用。

2. 主要试剂与材料。PLA2R 重组抗原和抗体标准品由本实验室制备。链霉亲和素 (streptavidin)、生物素氨基己酸-N-羟基琥珀酰亚胺酯 (biotinamido hexanoic acid N-hydroxysuccinimide ester, BNHS) 均购自美国 Sigma-Aldrich 公司, Eu 标记盒购自美国 PerkinElmer 公司, 交联琼脂糖凝胶 6B、亲和纯化层析柱购自美国 Pharmacia 公司, 反应缓冲液、洗板液和增强液由无锡市江原实业技贸总公司

提供, 其他试剂均为国产分析纯。DU-650 紫外扫描仪和 Auto DELFIA1235 全自动 TRFIA 检测仪, 为美国 PerkinElmer 公司产品。

二、方法

1. 生物素-PLA2R 抗原的制备。取 0.2 mg BNHS 加入含 1 mg 重组 PLA2R 抗原 (由本室根据 Peroutka 等^[5]报道的方法制备) 的 0.05 mol/L 磷酸盐缓冲液 (phosphate-buffered solution, PBS) 溶液 (pH 值 7.2) 中, 于 37°C 反应 1 h, 经 0.01 mol/L 的 PBS (pH 值 7.4) 透析 24 h 后, 采用紫外吸收法测定蛋白质含量, 分装, 于 -20°C 保存。

2. Eu^{3+} -链霉亲和素的制备。按照 Eu^{3+} 标记盒说明书, 将 1 mg 链霉亲和素溶解于 50 mmol/L 碳酸钠-碳酸氢钠缓冲液 (pH 值 8.5), 再加入 0.2 mg 的 Eu^{3+} - N_2 -[p-异氰酸-苄基]-二乙烯三胺四乙酸溶液于 30°C 磁力搅拌反应 20 h; 反应液经交联琼脂糖凝胶 6B 柱层析 (使用前, 用 pH 值 7.8、80 mmol/L 的 Tris-HCl 缓冲液平衡), 收集洗脱液 (1 ml/管), 测定每管的 Eu^{3+} 荧光强度。收集第 1 个高浓度 Eu^{3+} 洗脱峰, 稀释分装后备用。

3. 抗体标准品的制备。将连有 PLA2R 重组抗原的亲合层析柱用 TBST 饱和平衡, 将 0.5 ml IMN 患者血清加入上样, 用 10 倍柱料体积的 0.02 mol/L Tris-HCl (pH 值 7.2, 含 0.1% Tween-20) 冲洗 3 遍, 随后用 500 μl 0.1 mol/L 甘氨酸 (pH 值 3.5) 洗脱。收集第 1 洗脱峰, 用紫外分光光度计测定 260 nm 和 280 nm 处的吸光度 (A) 值, 并据其比值 (A_{260}/A_{280}) 计算人 PLA2R 抗体标准品原液的浓度。

4. 包被板的制备。将 100 μl PLA2R 重组抗原用 pH 值 9.6、0.05 mol/L 碳酸盐缓冲液稀释后, 包被过夜; 次日弃去包被液, 用含质量分数 2% 牛血清白蛋白 (bovine serum albumin, BSA) 的缓冲液封闭 2 h, 随后弃去封闭液, 真空抽干, -20°C 保存。

5. 血清 PLA2R 抗体质量浓度的测定。向板条

中加入 50 μl 样品或工作标准品和 50 μl 反应缓冲液,于 37 $^{\circ}\text{C}$ 下振荡 1 h;用洗板液清洗 4 次;加入反应缓冲液稀释的 100 μl 生物素-PLA2R 抗原,于 37 $^{\circ}\text{C}$ 反应 1 h;洗板 4 次;加入反应缓冲液稀释的 100 μl Eu^{3+} -链霉亲和素,于 37 $^{\circ}\text{C}$ 反应 15 min;洗板 4 次后;加入 100 μl 增强液,振荡 5 min 后进行检测。反应过程在 AutoDELFIA1235 全自动 TRFIA 检测仪上完成,PLA2R 抗体的血清质量浓度由仪器自带计算程序拟合获得。

6.方法学的验证。(1)将抗体标准品稀释至 0.05、0.20、1.00、4.00、10.00 $\mu\text{g/L}$,从而评估计量-反应曲线的线性。(2)灵敏度:同时测定 10 孔零点标准品的荧光值,将其 $\bar{x}\pm 2s$ 代入标准曲线,获得的浓度值即为方法灵敏度。(3)精密度:由测定系列标准品获得。单次复孔测定系列标准品,对其中每个浓度点的 $s/\bar{x}$ 取平均值,获批内 CV。重复 3 次测定系列标准品,获得 20%、50%、80%样品结合率对应的质量浓度[有效剂量(effective dose, ED)₂₀、ED₅₀、ED₈₀],对上述各质量浓度的 $s/\bar{x}$ 取平均,得批间 CV。(4)特异性:复孔测定高浓度标准品乙肝表面抗体 1 000 kU/L、弓形虫免疫球蛋白(immune globulin, Ig)G 抗体 200 kU/L、心磷脂 IgG 抗体 500 kU/L 和 β_2 -微球蛋白 1~100 $\mu\text{g/L}$ 系列质量浓度,当其 PLA2R 抗体含量小于 0.01 mg/L 认为无交叉反应。(5)准确性:向 1 份健康人血清中等体积添加不同质量浓度(0、0.2、1.0、5.0 mg/L)的 PLA2R 抗体标准品,复孔测定其实际质量浓度,比较实际值和理论值的偏差。

7.统计学处理。采用 Origin 8.0 绘制标准曲线,使用 IBM SPSS 19.0 软件分析数据,符合正态分布的计量数据用 $\bar{x}\pm s$ 表示,非正态分布的计量数据以 $M(P_{25}, P_{75})$ 表示。采用 Kruskal-Wallis H 检验、Mann-Whitney u 检验和 Pearson 相关分析处理数据。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. PLA2R 抗体的 TRFIA 标准曲线。经双对数线性拟合,本检测方法的线性方程为 $\lg y = 0.429\ 6 \times \lg x + 4.966\ 6$,在 0~10 mg/L 的质量浓度范围内,PLA2R 抗体的质量浓度值和荧光值线性相关($r=0.996\ 1$)。

2.方法学验证。(1)灵敏度。根据 10 个零浓度点,测得的灵敏度为 5 $\mu\text{g/L}$ 。(2)精密度。标准曲线的 ED₂₀、ED₅₀ 和 ED₈₀ 分别为 (0.144 $\pm$ 0.012)、(0.707 $\pm$ 0.029) 和 (3.466 $\pm$ 0.098) mg/L,批内 CV

4.7%,批间 CV 5.1%。(3)特异性。通过测定 β_2 -微球蛋白系列质量浓度、人乙肝表面抗体、弓形虫抗体和心磷脂抗体,得到的 PLA2R 抗体含量均小于 0.01 mg/L,该方法的特异性良好。(4)准确性。添加回收实验的结果(表 1)显示,理论值与实际值偏差小于 15%,该方法的准确性良好。

表 1 不同 PLA2R 抗体添加量时 TRFIA 检测的添加回收结果

添加量 (mg/L)	理论值 (mg/L)	实测值 (mg/L)	偏差 (%)
0	—	0.26	—
0.2	0.46	0.51	-9.80
1.0	1.26	1.11	13.51
5.0	5.26	4.92	6.91

注:“—”为无数据;PLA2R 为磷脂酶 A2 受体,TRFIA 为时间分辨荧光免疫分析

3.血清样本 PLA2R 抗体的测定。健康体检者血清 PLA2R 抗体的含量为 0.455(0.320, 0.593) mg/L, IMN 组 PLA2R 含量为 2.690(0.717, 7.750) mg/L,组间差异有统计学意义($z=-3.688, P<0.05$)。

4. PLA2R 抗体检测诊断 IMN 的准确性。对健康对照组和 IMN 组进行受试者工作特征(receiver operating characteristic, ROC)曲线分析(图 1),获得的曲线下面积(area under curve, AUC)为 0.844,说明血清 PLA2R 抗体含量检测在分析肾病方面具有意义。综合 ROC 曲线的灵敏度和特异性分析,当血清中 PLA2R 抗体的质量浓度大于 0.80 mg/L 时,PLA2R 抗体检测诊断 IMN 的灵敏度为 73.0%(46/63),特异性为 95.6%(86/90),准确性为 86.3%(132/153)。以 0.80 mg/L 为 PLA2R 抗体在 IMN 检测中的参考阈值,90 名健康体检者中,假阳性者 4 名;63 例 IMN 患者中,假阴性者 17 例。

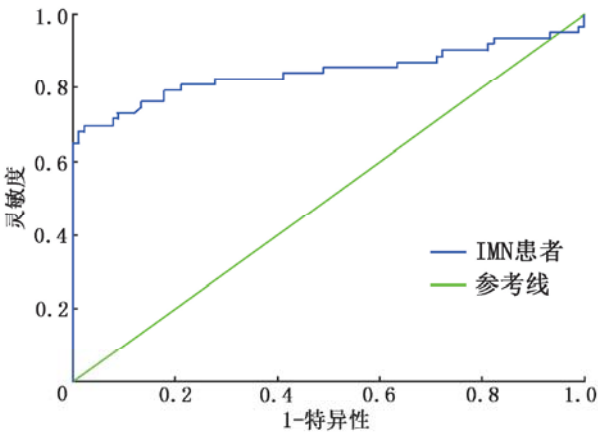


图 1 特发性膜性肾病(IMN)组患者(63 例)血清磷脂酶 A2 受体(PLA2R)抗体检测的受试者工作特征曲线

5. 影响 IMN 患者 PLA2R 抗体水平的因素分析。以 58 例有明确病理分期的 IMN 患者为对象, 观察年龄、性别、病理分期对 PLA2R 抗体水平的影响。结果(表 2)显示, PLA2R 抗体水平在不同年龄组及不同病理分期患者间差异均有统计学意义(χ^2 值: 10.328 和 9.716, 均 $P < 0.05$)。

表 2 58 例特发性膜性肾病(IMN)患者血清 PLA2R 抗体水平的影响因素分析

组 别	例数	抗体阳性 例数	PLA2R 抗体水平 [$M(P_{25}, P_{75})$;mg/L]	检验值	P 值
年龄(岁)					
<40	5	1	0.577(0.320, 0.774)	10.328	0.008
40~60	37	27	2.820(0.646, 6.640)		
>60	16	14	5.460(1.285, 23.700)		
性别					
女	26	20	2.985(0.443, 12.850)	-0.235 ^a	0.815
男	32	22	2.810(0.855, 6.413)		
病理分期					
I 期	36	23	0.717(0.342, 1.640)	9.716	0.006
I~Ⅱ期	11	9	3.640(0.464, 6.720)		
Ⅱ 期	11	10	4.645(1.223, 12.240)		

注: PLA2R 为磷脂酶 A2 受体; ^a 为 z 值, 余为 χ^2 值

讨 论

人肾小球足细胞膜上表达的 M 型 PLA2R 是 IMN 的主要自身抗原, 70%~82% 的 IMN 患者体内相应的 PLA2R 抗体是其主要自身抗体^[2,6]。M 型 PLA2R 是 N 端糖基化蛋白, 相对分子质量 1.85×10^5 , 由富含半胱氨酸的 N 端、类纤维连接蛋白 II 域、重复串联的 8 个糖类识别结构域构成的胞外区及跨膜区、短小的 C 端胞内区组成。其中, 自身抗体结合区依赖构象表位, 而非糖基化部位^[3]。研究^[7-9]发现, 针对肾小球足细胞上 PLA2R 靶抗原的抗体在 IMN 诊断中具有特异性, 临床价值显著。因此, 建立快速、定量的 PLA2R 抗体血清学检测方法有一定的临床价值。

IMN 属于自身免疫性疾病, 人 PLA2R 抗体主要以 IgG4 为主^[3], 但不排除 IgG 家族的其他亚型的存在^[10]。因检测手段和研究深度的局限性, 采用传统的抗 IgG4 二抗示踪, 虽然可以捕获血清中大部分 PLA2R 抗体, 但存在一定程度的漏检。本研究选用双抗原夹心, 以最大限度地结合血清中的 PLA2R 抗体。

TRFIA 技术采用稀土离子标记, 对免疫复合物的空间位阻影响小, 灵敏度可达到 10^{-18} mol/L^[11]。常用的稀土离子 Eu^{3+} , 以 340 nm 的波长为激发光, 发射波长为 643 nm, 发射光寿命 730 μs , 因此可以

将自然荧光和普通干扰物隔离, 通过时间门电路的延迟检测 Eu^{3+} 的发射光, 实现低背景、低干扰^[12]。本研究将生物素-链霉亲和素系统和稀土离子-增强液的放大作用整合, 进一步提高了检测灵敏度。将生物素直接标记在抗原上, 再通过能识别 4 个生物素的链霉亲和素, 实现信号的放大, 由此获得了 5 $\mu\text{g/L}$ 的高灵敏度检测。

本研究评价了血清 PLA2R 抗体检测对 IMN 的诊断价值, 结果显示 PLA2R 抗体检测诊断 IMN 的灵敏度为 73.0%, 特异性为 95.6%, ROC 曲线 AUC 为 0.844。由此可见, 该抗体的检测对 IMN 的诊断有参考价值。目前, 国内外主要采用荧光免疫分析、Western blot 和酶联免疫吸附测定 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 检测该抗体含量^[3,13-14]。因方法学的差异, 灵敏度差异较大 (60%~96.5%)^[15]。荧光免疫分析为定性或半定量方法, 对操作者的技术水平要求高, 可能存在主观误判。Western blot 操作复杂、成本高, 不适合临床推广。ELISA 技术因操作简单, 国外已有相关商品化的试剂盒供应, 但不能准确定量^[15]。本研究建立的 TRFIA 检测方法, 实现了 PLA2R 抗体的定量分析, 在解决酶标物空间位阻问题的同时, 还较大程度地降低了系统干扰问题, 发光信号较 ELISA 更为稳定^[11-12]。因此, 本方法具有更好的临床适用性。

本研究发现, ≥ 40 岁者 PLA2R 抗体阳性率较 <40 岁者明显升高, 约为后者的 5 倍。这与相关文献^[1]报道相符。通过检测 I~II 期 IMN 患者体内 PLA2R 抗体, 发现不同病理分期患者间该抗体水平差异明显。牛广华等^[13]也认为 PLA2R 抗体的阳性率随 IMN 病情进展递增; 杨雪芬等^[14]发现, 该抗体的血清浓度对病情监测和疗效评估有重要意义。因此, PLA2R 抗体可作为 IMN 病情发展和治疗效果评判指标。

以 0.80 mg/L 为 PLA2R 抗体检测 IMN 的阈值, 本研究发现 4 例假阳性和 17 例假阴性。健康体检者中的假阳性者为肾结石患者, 提示除 IMN 外, 其他肾病也有可能促使血清 PLA2R 抗体含量轻度升高。而 IMN 患者血清中的 PLA2R 抗体含量呈偏态分布并存在假阴性的可能原因是: (1) IMN 患者随着病情的变化和治疗进展, 血清中 PLA2R 抗体含量会发生变化^[14], 而本研究并未就患者是否接受过治疗做进一步的分组; (2) 体外表达的 PLA2R 重组抗原与体内病理状态下的 PLA2R 抗原存在构象上的差异, 导致体内某些 PLA2R 抗体不能识别重组抗

原,进而造成检测的误差。上述问题有待在今后的工作中逐步加以解决。

利益冲突 无

参 考 文 献

- [1] 陈耀中,岳华.特发性膜性肾病患者肾小球滤过率与临床病理的相关性[J].中华肾脏病杂志,2014,30(4):310-312. DOI:10.3760/cma.j.issn.1001-7097.2014.04.012.
Chen YZ, Yue H. Correlation between glomerular filtration rate and clinical pathology of idiopathic membranous nephropathy patients [J]. Chin J Nephrol, 2014, 30(4): 310-312. DOI:10.3760/cma.j.issn.1001-7097.2014.04.012.
- [2] Ronco P, Debiec H. Advances in membranous nephropathy: success stories of a long journey[J]. Clin Exp Pharmacol Physiol, 2011, 38(7): 460-466. DOI:10.1111/j.1440-1681.2011.05506.x.
- [3] Beck LH 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. DOI:10.1056/NEJMoa0810457.
- [4] 董鸿瑞,王艳艳,王国勤,等.免疫组织化学和免疫荧光染色在肾活检组织石蜡切片磷脂酶 A₂ 受体检测中的应用[J].中国医学科学院学报,2015,37(5):562-566. DOI:10.3881/j.issn.1000-503X.2015.05.012.
Dong HR, Wang YY, Wang GQ, et al. Application of immunohistochemistry and immunofluorescence staining in detection of phospholipase A₂ receptor on paraffin section of renal biopsy tissue[J]. Acta Acad Med Sinicae, 2015, 37(5): 562-566. DOI:10.3881/j.issn.1000-503X.2015.05.012.
- [5] Peroutka RJ, Elshourbagy N, Piech T, et al. Enhanced protein expression in mammalian cells using engineered SUMO fusions: secreted phospholipase A2[J]. Protein Sci, 2008, 17(9): 1586-1595. DOI:10.1110/ps.035576.108.
- [6] Debiec H, Hanoy M, Francois A, et al. Recurrent membranous nephropathy in an allograft caused by IgG3κ targeting the PLA2 receptor[J]. J Am Soc Nephrol, 2012, 23(12): 1949-1954. DOI:10.1681/ASN.2012060577.
- [7] Qin W, Beck LH Jr, Zeng C, et al. Anti-phospholipase A2 receptor antibody in membranous nephropathy[J]. J Am Soc Nephrol, 2011, 22(6): 1137-1143. DOI:10.1681/ASN.2010090967.
- [8] 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. DOI:10.1681/ASN.2010111125.
- [9] Hoxha E, Kneißler U, Stege G, et al. Enhanced expression of the M-type phospholipase A2 receptor in glomeruli correlates with serum receptor antibodies in primary membranous nephropathy [J]. Kidney Int, 2012, 82(7): 797-804. DOI:10.1038/ki.2012.209.
- [10] 陈幸,蔡美顺,王梅.不典型膜性肾病患者血清 M 型磷脂酶 A2 受体抗体及肾组织 IgG 亚型分布的研究[J].中华肾脏病杂志,2014,30(6):406-412. DOI:10.3760/cma.j.issn.1001-7097.2014.06.002.
Chen X, Cai MS, Wang M. Anti-PLA2R autoantibodies in serum and IgG subclass deposits on glomeruli in undetermined atypical membranous nephropathy [J]. Chin J Nephrol, 2014, 30(6): 406-412. DOI:10.3760/cma.j.issn.1001-7097.2014.06.002.
- [11] 胡志刚,刘洁,叶燕,等.抗心磷脂抗体 IgG 时间分辨荧光免疫分析法的建立[J].中国实验诊断学,2012,16(1):16-19. DOI:10.3969/j.issn.1007-4287.2012.01.006.
Hu ZG, Liu J, Ye Y, et al. Detection of anticardiolipin antibody IgG by time-resolved fluoroimmunoassay [J]. Clin J Lab Diagn, 2012, 16(1): 16-19. DOI:10.3969/j.issn.1007-4287.2012.01.006.
- [12] 吴英松,李明.时间分辨荧光免疫技术[M].北京:军事医学科学出版社,2009:6-8.
Wu YS, Li M. Time-resolved immunofluorescence technique [M]. Beijing: Military Medical Science Press, 2009: 6-8.
- [13] 牛广华,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. DOI:10.3760/cma.j.issn.1009-9158.2015.09.007.
Niu GH, Gao YJ, Wang BS, et al. Diagnostic value of serum anti-phospholipase A2 receptor antibodies (PLA2R) in idiopathic membranous nephropathy [J]. Chin J Lab Med, 2015, 38(9): 595-599. DOI:10.3760/cma.j.issn.1009-9158.2015.09.007.
- [14] 杨雪芬,潘阳彬,丁国华,等.成人特发性膜性肾病与分泌型磷脂酶 A2-I B 及抗磷脂酶 A2 受体抗体的相关性研究[J].中国全科医学,2015,18(9):1018-1022. DOI:10.3969/j.issn.1007-9572.2015.09.009.
Yang XF, Pan YB, Ding GH, et al. Correlation of secreted phospholipase A2 - I B, anti-phospholipase A2 receptor antibody with idiopathic membranous nephropathy among adult patients [J]. Chin Gen Pract, 2015, 18(9): 1018-1022. DOI:10.3969/j.issn.1007-9572.2015.09.009.
- [15] Dähnrich C, Komorowski L, Probst C, et al. Development of a standardized ELISA for the determination of autoantibodies against human M-type phospholipase A2 receptor in primary membranous nephropathy [J]. Clin Chim Acta, 2013, 421: 213-218. DOI:10.1016/j.cca.2013.03.015.

(收稿日期:2017-11-30)