

· 研究进展 ·

## 肾小球疾病免疫炎症发病机制的研究进展

贾晓玉<sup>1</sup> 崔昭<sup>1</sup> 于峰<sup>1</sup> 吕继成<sup>1</sup>  
陈旻<sup>1</sup> 张宏<sup>1</sup> 赵明辉<sup>1,2\*</sup>

(1. 北京大学第一医院肾脏内科暨北京大学肾脏病研究所, 北京 100034;  
2. 北京大学—清华大学生命科学联合中心, 北京 100871)

**[摘要]** 肾小球疾病是我国慢性肾脏病以及终末期肾衰竭的重要病因, 免疫炎症反应是该类疾病发病机制中的核心环节。本创新研究群体的攻关方向是肾小球肾炎的免疫炎症发病机制, 特别是最严重的新月体肾炎, 包括抗 GBM 病、ANCA 相关小血管炎、狼疮肾炎和 IgA 肾病。在国家自然科学基金的支持下, 团队在自身抗体的抗原表位研究、补体异常活化介导肾脏损伤和在 IgA 肾病中 IgA1 分子的异常糖基化方面, 取得了一系列创新的研究成果。通过这些研究, 深入探讨了肾小球肾炎的免疫炎症发病机制和可能病因, 为免疫介导的肾小球肾炎的防治提供潜在的生物标志物和治疗靶点。

**[关键词]** 肾小球疾病; 免疫炎症反应; 自身抗体; 抗原表位; 补体

肾小球疾病是导致慢性肾脏病以及终末期肾衰竭的重要病因, 免疫炎症反应是该类疾病发病机制中的核心环节<sup>[1, 2]</sup>。本创新研究群体的攻关方向是肾小球肾炎的免疫炎症发病机制, 特别是最为严重的新月体肾炎, 包括抗肾小球基底膜 (glomerular basement membrane, GBM) 病、抗中性粒细胞胞浆抗体 (anti-neutrophil cytoplasmic antibody, ANCA) 相关小血管炎 (ANCA-associated vasculitides, AAV)、狼疮肾炎和 IgA 肾病。在国家自然科学基金 (以下简称科学基金) 创新研究群体项目资助下, 我们在自身抗体的靶抗原和免疫学特性, 自身免疫性 T 细胞的抗原表位和提呈机制, 补体的异常活化及其调控机制等方面进行了深入探索, 并取得了一系列创新的研究成果, 部分成果有效改变了临床治疗策略, 引起了国内外同行的重视。

本研究群体已经发表了标注本课题科学基金资助的 SCI 论文 99 篇, 累计 SCI 影响因子 496.616。其中 26 篇发表在影响因子大于 5.0 (本领域前 10%) 的杂志, 包括 *Lancet* 1 篇, *Eur Heart J* 1 篇, *J Am Soc Nephrol* 5 篇, *Kidney Int* 5 篇。论文累计

他引 613 次, 单篇最高他引 43 次。3 次应邀为 *Nat Rev Nephrol* 杂志撰写综述并介绍本研究群体的工作进展。本文将对研究群体取得的主要研究发现进行综述。

### 1 自身抗体的靶抗原和免疫学特性

自身免疫性肾脏病的特征是自身抗体的产生, 如抗 GBM 病、ANCA 相关小血管炎、膜性肾病等。自身抗体可以通过识别肾小球的固有抗原成分而沉积于肾脏, 如抗 GBM 抗体、抗磷脂酶 A2 受体 (phospholipase A2 receptor, PLA2R) 抗体等; 也可以通过在循环中形成免疫复合物沉积在肾脏, 如抗 dsDNA 抗体等; 还可以通过激活补体或招募炎症细胞引起肾脏损伤, 如 ANCA 等。这些自身抗体不仅是疾病的诊断工具, 还与疾病的发病机制和临床表型密切相关。

#### 1.1 抗 GBM 抗体的靶抗原及免疫学特性

抗 GBM 病是循环中的抗 GBM 抗体在肾脏和/或肺组织中沉积所引起的自身免疫性疾病。肾脏受累多表现为新月体性肾炎, 是最为严重的肾小球疾

收稿日期: 2017-04-29; 修回日期: 2017-07-06

\* 通信作者, Email: mhzhao@bjmu.edu.cn

病。肺脏受累可表现为致死性的大咯血,属于内科的危急重症<sup>[3]</sup>。抗 GBM 抗体是该病的致病性抗体,识别的主要靶抗原是人基底膜Ⅳ型胶原  $\alpha 3$  链的非胶原区 1 $[\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}]$ <sup>[4]</sup>。抗体与抗原结合后可激活补体,招募炎症细胞,释放炎症因子,导致严重的局部炎症反应。

抗 GBM 抗体在  $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$  上主要识别两个构象性的抗原表位,  $E_A$  和  $E_B$ 。我们利用蛋白嵌合技术,在体外重组了抗原表位  $E_A$  和  $E_B$ ,对不同临床表型的抗 GBM 病患者,检测发病过程中抗 GBM 抗体识别的抗原表位的扩展规律。研究发现,超过 70% 的抗 GBM 病患者均可识别  $E_A$  和  $E_B$ ,两者的识别率均随着肾功能的恶化而逐渐升高。识别  $E_A$  和  $E_B$  的患者,肾脏损害也更为严重。其中,抗  $E_B$  抗体阳性是患者发生肾衰竭的独立危险因素<sup>[5]</sup>。该研究不仅证实了在抗 GBM 病的发病过程中存在分子内抗原表位扩展现象,同时也提示针对不同抗原表位的抗 GBM 抗体与肾脏损伤密切相关。

人的肾小球基底膜Ⅳ型胶原由 5 条  $\alpha$  链构成,分别命名为  $\alpha 1-5$ 。抗 GBM 抗体主要识别  $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ ,对其余  $\alpha$  链也有不同程度的识别<sup>[6]</sup>。临床研究和动物实验已经证明抗  $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$  抗体具有致病性<sup>[7]</sup>。我们在临床工作中发现,某些特殊的抗 GBM 病患者体内只存在识别  $\alpha 5(\text{IV})\text{NC1}$  的抗体,因此推测抗  $\alpha 5(\text{IV})\text{NC1}$  抗体具有独立的致病性。我们制备了  $\alpha 5(\text{IV})\text{NC1}$  重组蛋白免疫 Wistar-Kyoto(WKY)大鼠,实验动物出现了新月体肾炎和弥漫性肺泡出血等抗 GBM 病的典型表现,证明抗  $\alpha 5(\text{IV})\text{NC1}$  抗体具有独立的致病能力。我们进一步对该抗体的抗原表位进行了鉴定,发现其识别的抗原表位  $\alpha 5-E_A$  和  $\alpha 5-E_B$  是空间构象依赖的,并且与  $\alpha 3-E_A$  和  $\alpha 3-E_B$  在六聚体的空间位置上呈镜像对称,但在氨基酸序列上存在 5 个位点的显著差异。该研究首次证实了抗  $\alpha 5(\text{IV})\text{NC1}$  抗体不仅存在于循环中,也能够结合肾小球基底膜,诱导后续的免疫炎症反应,导致新月体肾炎的发生<sup>[8]</sup>。

抗 GBM 病合并膜性肾病(membranous nephropathy, MN)的报道已有数十例,但发生机制尚不明确。我们总结了 8 例抗 GBM 病合并膜性肾病的患者,发现与经典的抗 GBM 病相比,合并膜性肾病的患者肾脏损害较轻且预后较好。这些患者体内的抗 GBM 抗体对Ⅳ型胶原  $\alpha$  链的识别谱较窄,抗 EB 抗体的水平较低,抗  $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$  的 IgG1 和 IgG3 亚型的水平也较低,这些抗体的免疫学特性可

能是其肾损伤较轻的原因。同时,在这些患者的循环中未能检出原发性膜性肾病的特征性自身抗体——抗 PLA2R 抗体,也提示合并膜性肾病的抗 GBM 病可能为一组特殊的疾病类型<sup>[9]</sup>。

## 1.2 抗髓过氧化物酶抗体与其靶抗原的交互作用

ANCA 相关小血管炎(AAV)是一组以小血管壁的炎症和纤维素样坏死为主要特征的系统性自身免疫性疾病。肾脏是最易受累的器官,病理上多表现为少免疫沉积性坏死性新月体肾炎。ANCA 是识别中性粒细胞胞浆成分的自身抗体,主要靶抗原为髓过氧化物酶(myeloperoxidase, MPO)和蛋白酶 3(proteinase 3, PR3)。我国多数患者的 ANCA 均识别 MPO,即 MPO-ANCA。中性粒细胞与 MPO-ANCA 结合后发生呼吸爆发,产生大量具有致病活性的氧自由基,并且释放中性粒细胞颗粒中的各种蛋白酶,导致血管内皮细胞的损伤<sup>[10]</sup>。我们对 ANCA 与其靶抗原 MPO 之间的交互作用进行了一系列研究。发现 MPO 催化氧化反应之后,其酶活性及抗原性均会增强<sup>[11]</sup>;MPO-ANCA 的糖基化会影响其与 MPO 的结合能力以及诱发中性粒细胞呼吸爆发的能力<sup>[12]</sup>;在 MPO-ANCA 4 种 IgG 亚型中, IgG3 诱发的中性细胞呼吸爆发最强,更能逆转铜蓝蛋白(MPO 的天然抑制物)对 MPO 的抑制作用,因此具有最强的致病作用<sup>[13]</sup>。以上研究均提示 MPO-ANCA 不同的免疫学特性及其与 MPO 之间的交互作用在 AAV 的发病过程中起了重要作用。

## 1.3 糖基化异常的 IgA1 及抗糖抗体在 IgA 肾病中的作用

IgA 肾病是我国最常见的原发性肾小球肾炎,其特征性的病理表现为 IgA 在肾小球系膜区的沉积。目前该病的主流发病学说是患者体内出现半乳糖缺陷的 IgA1(galactose-deficient IgA1, Gd-IgA1)及其相关抗糖抗体,两者形成免疫复合物在肾脏沉积引发 IgA 肾病。我们对 IgA 肾病患者糖基化缺陷的 IgA1 及其相关抗糖抗体进行了研究,提出了 IgA 肾病新的病理生理机制。

### 1.3.1 半乳糖缺陷的 IgA1 的致病效应

我们检测了 497 例 IgA 肾病患者以及 499 例正常对照血清中 IgA1 水平以及 Gd-IgA1 水平,发现患者血清 IgA1 及 Gd-IgA1 水平明显高于正常对照,并且与肾脏补体沉积呈现明显的正相关,体外试验证实多聚 Gd-IgA1 可以直接激活补体;同时研究还发现,患者 Gd-IgA1 水平越高,发生肾衰竭的风险就越大。而联合 Gd-IgA1 与

IgA1 诊断 IgA 肾病具有良好的敏感性和特异性,因此提出 Gd-IgA1 可以作为 IgA 肾病诊断和判断预后的新型标志物<sup>[14]</sup>。

### 1.3.2 抗糖抗体及其抗原决定簇在 IgA 肾病发病机制中的作用

我们从脑膜炎球菌中成功提取了 HF48 酶,特异性切除 IgA1 分子,暴露抗糖抗体所识别的铰链区的 O-糖抗原(Tn-抗原),该抗原的制备方法最大程度地保证了抗原的完整性,较目前国际唯一建立了抗糖抗体检测方法的 Novark 实验室更具有优越性。我们以此为抗原采用 ELISA 和 Western 方法对 IgA 肾病患者的 IgG 型和 IgA 型抗糖抗体进行了检测,证实抗糖抗体的靶抗原为 IgA1 铰链区 O-糖,同时也证实了抗糖抗体检测方法的可靠性。

利用该方法,我们检测了不同类型 IgA 肾病患者的抗糖抗体水平。研究显示,新月体 IgA 肾病患者的抗糖抗体水平明显高于非新月体 IgA 肾病患者以及健康对照,这也支持了该极端临床表型的特殊发病机制;而非新月体 IgA 肾病患者和健康对照之间则无显著差异,且 IgA 肾病患者和健康对照都存在一定水平的抗糖抗体,提示抗糖抗体与非新月体 IgA 肾病的发病无关,这一结果对于目前国际主流认为的学术假说——“IgA 肾病是一种自身免疫肾病”提出了挑战。

我们进一步通过体外试验发现,源于新月体 IgA 肾病患者的 IgG 与 Gd-IgA1 形成的免疫复合物,诱发系膜细胞炎症反应的能力明显增强;基于体外补体激活的研究显示,源于新月体 IgA 肾病患者血浆中的 IgA1 在体外激活补体的能力明显强于其他临床表型的 IgA 肾病患者和正常对照。这些结果表明新月体 IgA 肾病患者的抗糖抗体具有致病性,且均显著高于正常对照和非新月体 IgA 肾病。

通过构建 Logistic 回归模型,我们发现新月体 IgA 肾病患者发病时血肌酐的水平是发生终末期肾衰竭的重要危险因素,当血肌酐超过 580  $\mu\text{mol/L}$  时,即使患者经过强化免疫抑制治疗也未能摆脱透析。该模型经过国内 7 家医院验证,并获得一致的结论<sup>[15]</sup>。我们通过血浆置换清除循环中抗糖抗体和致病 IgA,结果显示,在常规治疗基础上血浆置换组补体激活程度明显下降,而且预后也明显优于常规治疗组<sup>[16]</sup>。这些结果进一步支持我们关于新月体 IgA 肾病中抗糖抗体和致病性 IgA1 的研究发现。

## 2 自身免疫性 T 细胞的抗原表位和递呈机制

我们的上述研究发现,在自身免疫性肾病中,自身抗体具有直接的致病作用,抗体的免疫学特性与临床表型和疾病进展密切相关。而自身抗体的产生和免疫学特性的变化受到自身免疫性 T 细胞的介导和调控。异常的细胞免疫可能是肾小球疾病免疫炎症反应的启动环节<sup>[17-18]</sup>。因此,明确自身免疫性 T 细胞的抗原表位及其递呈过程将有利于进一步阐明疾病的病因,并探索有针对性的治疗手段。

### 2.1 $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ 的线性抗原表位及其关键氨基酸

我们构建并合成了 24 条重叠肽段(覆盖人  $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$  的全长),对抗 GBM 病患者的自身抗体及 T 细胞进行了检测。结果发现, $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$  上第 127—148 位氨基酸组成的线性抗原表位 P14 是患者的自身抗体和自身免疫性 T 细胞共同识别的抗原表位<sup>[19, 20]</sup>。我们进一步利用肽段 P14 免疫了 WKY 大鼠,成功诱发了大鼠的抗 GBM 肾炎模型,实验鼠体内不仅可以检测到识别 P14 的自身抗体和  $\text{CD4}^+$  T 细胞,还出现了经典的识别  $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$  的抗 GBM 抗体和抗原表位扩展现象<sup>[21]</sup>。由此证实: $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$  上自身免疫性 T 细胞和自身抗体共同识别的线性抗原表位是抗 GBM 病的启动因素,也是抗原表位扩展的初始位点。该动物模型与人类抗 GBM 病的临床特点十分相似,并且具有良好的稳定性,为我们进一步研究抗 GBM 病的病因学及免疫治疗提供了有利条件。

我们通过氨基酸逐个替换的方法对 P14 上的关键氨基酸基序进行鉴定。结果显示,色氨酸(W)<sub>136</sub>、异亮氨酸(I)<sub>137</sub>、亮氨酸(L)<sub>139</sub> 和色氨酸(W)<sub>140</sub> 是 P14 上关键的致病性氨基酸,也是自身免疫性 T 细胞识别的关键位点<sup>[21]</sup>,甘氨酸(G)<sub>142</sub>、苯丙氨酸(F)<sub>143</sub> 及甘氨酸(G)<sub>145</sub> 是 B 细胞识别的关键氨基酸<sup>[22]</sup>。

患者的自身免疫性  $\text{CD4}^+$  T 细胞对抗原表位的识别需要依赖人类白细胞抗原分子(human leukocyte antigen, HLA)的递呈。既往研究发现,超过 80% 的抗 GBM 病患者均携带 *HLA-DRB1 \* 1501* 基因<sup>[23, 24]</sup>。我们发现,线性抗原表位 P14 与 *HLA-DRB1 \* 1501* 具有较高的亲和力<sup>[25]</sup>。由 *HLA-DRB1 \* 1501* 编码的、位于 DR $\beta$ 1 链上第 13 位的精氨酸和第 11 位的脯氨酸与疾病的易感性相关。P14 上的异亮氨酸(I)<sub>137</sub>、色氨酸(W)<sub>140</sub>、甘氨酸(G)<sub>142</sub>、

苯丙氨酸(F)<sub>143</sub>以及苯丙氨酸(F)<sub>145</sub>是与HLA-DRB1\*1501编码的MHC II类分子的抗原提呈槽结合的位点<sup>[26]</sup>。因此,我们确定P14上的关键氨基酸基序为WIxLWxGFxF,该基序不仅是P14免疫原性的核心序列,也是其致病的关键序列。

我们在临床上观察到多数抗GBM病患者发病前都有前驱感染的病史<sup>[27]</sup>。P14的关键氨基酸基序与病原微生物之间可能进行交叉识别,从而通过分子模拟机制,诱导自身免疫反应。我们根据P14的关键基序,在UniProt数据库中进行检索,发现8条人类感染相关的致病微生物的肽段,其中5条能够被抗GBM病患者识别<sup>[28]</sup>,说明患者确实可以识别病原微生物上的抗原表位。这为感染和分子模拟机制参与抗GBM病的发病提供了依据,也为进一步研究抗GBM病的病因提供了方向。

## 2.2 MPO的线性抗原决定簇及糖基化异常的MPO

MPO-ANCA是我国AAV患者重要的血清标志物,同时也是致病性抗体,其免疫学特性与AAV的发生密切相关<sup>[29, 30]</sup>。我们利用大肠杆菌重组表达了覆盖MPO全长的不同肽段,同时对AAV患者的血清进行了检测。结果发现,超过一半的患者至少可以识别其中的一条肽段<sup>[31]</sup>。另外,在AAV患者中有4%—14%的患者合并抗GBM抗体,同时20%—40%的抗GBM病患者血清中存在ANCA。这些患者又被称为双阳性患者,其MPO-ANCA主要识别MPO的重链H1<sup>[31]</sup>。我们进一步合成了13条相互重叠的线性肽段,它们覆盖H1的全部氨基酸序列。结果显示,有64%的抗GBM病患者血浆能够识别MPO-H1段的线性肽段。其中H1-4和H1-12的识别率最高,且识别H1-12的患者肾脏损伤更重,预后更差。表明抗GBM抗体和ANCA可能存在共同的发生机制,而抗GBM病患者中的MPO-ANCA可能由H1上的线性表位扩展到整个MPO蛋白<sup>[32]</sup>。

MPO蛋白有5个糖基化位点,其中2个位点刚好分别位于H1-4和H1-12。我们合成的MPO肽段没有糖基化,可以被抗GBM病患者的血清识别,因此推测MPO的糖基化异常或缺失,可能暴露出新的抗原表位,诱导自身抗体的产生。我们利用各种糖链的剪切酶,构建MPO糖基化异常的不同表现形式,对46例抗GBM病患者的血清进行检测。发现有近一半的抗GBM病患者可以识别糖基化异常的MPO。这些自身抗体以IgG1亚型为主,体外

实验证实他们可以激活补体、诱导中性粒细胞的脱颗粒反应,因此也是致病性抗体<sup>[33]</sup>。以上工作表明,MPO的糖基化异常可以暴露新的抗原位点,产生致病性的自身抗体,导致肾脏损伤。这不仅存在于抗GBM病患者体内,也可能更广泛地存在于其他类型的新月体肾炎中。

## 2.3 HLA II类分子与特发性膜性肾病靶抗原的交互作用

特发性膜性肾病是成人肾病综合征最常见的病因,约70%的患者体内可以检测到针对足细胞上PLA2R的自身抗体。我们的前期工作及欧洲的研究均提示HLA II类分子的基因型与疾病的易感性密切相关<sup>[34, 35]</sup>。我们进一步对原发性膜性肾病患者的HLA-DRB1、DQA1、DQB1、DPB1基因座位进行测序分型,并在氨基酸水平分析其与PLA2R之间的交互作用。研究发现,DRB1\*1501和DRB1\*0301是两个独立的风险等位基因。由这2个等位基因编码的位于HLA DRβ1链上的第13位和第71位氨基酸多态性与膜性肾病的发病相关性最强,而这两个位置的氨基酸也是提呈PLA2R上T细胞抗原表位的关键氨基酸,并且与患者出现PLA2R的抗体具有相关性,进一步阐明了抗原表位的提呈与疾病发生之间的关联<sup>[36]</sup>。

## 3 补体的异常活化及其调控机制

补体系统是机体天然免疫的重要组成部分,包括30余种血浆及膜结合蛋白,在肾小球疾病免疫炎症反应介导的肾脏损伤中发挥重要作用。补体系统通过3条途径活化:经典途径、凝集素途径和替代途径。补体可以由免疫复合物激活、介导肾脏损伤,其自身也可以成为免疫反应攻击的靶点而致病。明确肾小球疾病中的补体活化途径及调节机制,有望为治疗提供新的靶点。

### 3.1 补体旁路系统活化在AAV发病机制中的作用

在AAV患者的肾组织中,我们发现了补体旁路途径的活化<sup>[37, 39]</sup>。对于不同疾病活动度的AAV患者,我们进一步检测了其循环中补体的活化情况,结果显示,AAV患者血浆中存在补体旁路途径的活化,活动期患者血浆的补体水平显著高于缓解期患者和正常对照<sup>[40]</sup>,并且补体旁路裂解产物的水平与疾病活动度密切相关<sup>[41]</sup>,提示补体的旁路激活参与AAV的发病。

我们进一步的研究发现,补体活化所形成的下游活化产物C5a是AAV发病机制中的核心环节。

一方面, C5a 与中性粒细胞上的 C5a 受体结合后, 可激活 p38MAPK、ERK、PI3K、PKC 4 条信号转导通路<sup>[42, 43]</sup>, 介导 ANCA 诱发的中性粒细胞呼吸爆发和脱颗粒, 而中性粒细胞激活后释放出的中性粒细胞细胞外网(NETs)可进一步激活补体旁途径, 产生更多的 C5a, 从而形成补体与中性粒细胞之间相互活化的恶性循环, 导致炎症的发生; 另一方面, 在 ANCA 的作用下, C5a 刺激中性粒细胞活化后还进一步激活凝血系统, 导致血栓栓塞的发生。这证实了 C5a 在炎症和凝血两大系统中发挥桥梁的作用<sup>[44]</sup>。我们还探索了 C5a 引起上述效应的细胞分子机制, 发现 1-磷酸鞘氨醇是 C5a 活化中性粒细胞的重要下游信号分子<sup>[45]</sup>。

我们进而对 C5a 在中性粒细胞表面的受体 CD88 和 C5L2 进行了研究。结果显示, CD88 在肾组织的表达水平与患者肾功能及肾脏病理严重程度相关, 有可能成为 AAV 疾病严重程度的生物标志物<sup>[46]</sup>。随后的体外实验证实, CD88 与 C5L2 在 AAV 的发病机制中均为促炎症性的受体, 即致病性受体<sup>[47]</sup>。

近年来, Toll 样受体的重要配体之一的高迁移率族蛋白 1(HMGB1)在 AAV 发病过程中的作用逐渐受到重视。我们发现 AAV 患者尿 HMGB1 水平与疾病活动度及肾脏受累密切相关<sup>[48]</sup>。体外实验发现, 补体 C5a 对中性粒细胞的刺激可以使中性粒细胞释放 HMGB1 的量增加, 而后者可预激活中性粒细胞, 使其在 ANCA 的作用下发生呼吸爆发和脱颗粒反应; 在补体 C5a-ANCA-中性粒细胞的反应体系中, 阻断 HMGB1 可以抑制中性粒细胞的活化, 从而证实补体 C5a 与 HMGB1 的协调作用在 AAV 发病机制中发挥作用<sup>[48, 49]</sup>。

### 3.2 重新评价补体活化及其调节异常在狼疮肾炎发病机制中的作用

补体系统在狼疮肾炎发病机制中起了重要的作用。我们对狼疮肾炎患者的肾脏血管病变进行了全面评价, 发现与补体异常活化相关的血栓性微血管病(thrombotic microangiopathy, TMA)的患者预后最差<sup>[50, 51]</sup>。随后的研究发现, 狼疮肾炎患者肾活检时, 补体旁途径活化的主要调节蛋白 H 因子(CFH)水平显著下降, 特别是在合并有 TMA 病变的患者<sup>[52]</sup>。

我们进一步对有或无肾脏受累的系统性红斑狼疮患者的 H 因子的全段外显子进行了测序, 发现了 3 个单核苷酸多态性(SNP)可能具有潜在的病生理

意义, 即 rs1061170、rs800292 和 rs6677604。在验证人群中, 证实肾脏病理为 III 型狼疮肾炎的患者组中 rs1061170 CC/CT 的比例要显著高于其他类型, 说明含有该 SNP 的 H 因子片段 SCR7 的生物学功能很可能与狼疮肾炎不同的病理类型相关。我们重组了正常 H 因子的 SCR7 片段, 建立了 SCR7 与其重要的配体(CRP 及 PTX3)结合的功能实验体系, 确定了正常 SCR7 片段结合的配体为单体 CRP 以及 PTX3, 但正常 SCR7 片段不能与天然的五聚体 CRP 结合。同时, 我们建立了稳定的 H 因子蛋白纯化体系, 从同时存在特定 SNP 的狼疮肾炎患者的血浆置换液中成功提纯了 H 因子, 并通过体外实验证实其存在补体调节功能的异常, 由此提示这些 SNP 可能影响了相应 SCR 的功能而参与了狼疮肾炎的发病<sup>[53]</sup>。

C1q 是补体经典途径的第一个糖蛋白, 具有清除凋亡细胞及其碎片的功能。有近 1/3 的系统性红斑狼疮患者会出现 C1q 的自身抗体。我们的工作发现, 血清抗 C1q 抗体与狼疮肾炎的发生密切相关<sup>[54]</sup>。我们从狼疮肾炎患者的血清中成功提取了抗 C1q 抗体, 体外实验证实抗 C1q 自身抗体可影响免疫复合物的清除, 并且抑制 C1q 介导的凋亡细胞的清除, 提示抗 C1q 抗体有可能通过影响 C1q 的生物学功能而参与狼疮肾炎的发病<sup>[55]</sup>。我们针对 C1q 上主要的致病性抗原表位 A08 进行了检测, 发现抗 C1qA08 抗体对诊断狼疮肾炎的敏感性和特异性均高于抗全段 C1q 的抗体, 且与患者的病理评分、疾病活动度密切相关<sup>[56]</sup>。以上研究说明抗 C1qA08 抗体是狼疮肾炎发生的特异性标志物, 并且可作为预测狼疮肾炎预后的指标。

### 3.3 补体调节蛋白影响 IgA1 免疫复合物形成并沉积的机制

IgA 肾病患者除 IgA 分子在肾小球系膜区沉积以外, 补体 C3 是最常见的沉积分子。既往研究表明 IgA 肾病患者体内存在补体活化, 并与患者的长期预后相关。IgA 肾病患者体内致病性 IgA1 分子复合物中也含有补体 C3。但具体补体活化以及调控机制并不明确。近期我们参与的国际合作全基因组关联分析(GWAS)研究发现, 补体旁途径的调节蛋白 H 因子(CFH)及其相关蛋白(CFHR1、CFHR2、CFHR3、CFHR4、CFHR5)基因所在区段(1q32)与 IgA 肾病发病相关<sup>[57]</sup>。

在此遗传线索提示下, 我们对补体调节蛋白 CFH 及其相关蛋白 CFHRs 开展了深入研究。利用

IgA 肾病 GWAS 数据,通过整合基因型信息、补体活化相关生物学表型和 IgA 肾病患者病理指标,我们揭示 IgA 肾病中多因素参与了补体活化的复杂调控机制;即糖基化异常 IgA1 分子能启动补体系统活化;CFH 基因常见遗传变异(common variant)通过调控补体 H 因子表达,并协同 CFHR1 和 CFHR3 基因与 CFH 基因编码蛋白的竞争性抑制调控,共同调节系统补体活化,并最终影响 IgA1 免疫复合物形成及其在肾小球沉积;CFHR5 基因的数个罕见变异(rare variants)通过改变 H 因子相关蛋白 5 与补体 C3b 的结合力,影响其对补体 H 因子的去调控效能,进而影响 IgA 肾病患者体内的补体活化<sup>[58, 59]</sup>。以上成果充分证实了补体相关基因变异或突变参与了 IgA 肾病发病,丰富了 IgA 肾病发病的四重打击学说中补体参与疾病发生的理论学说。

#### 4 总结和展望

针对肾小球疾病免疫炎症反应的发病机制,我们从遗传易感性、抗原暴露和识别、自身抗体的产生和特性、补体活化介导的肾脏损伤等一系列发病的关键环节进行科研攻关,并取得了一系列创新性的研究成果,部分成果有效改变了临床治疗策略,引起了国内外同行的重视。

在国家自然科学基金委员会第 2 次延续资助下,我们拟继续深入研究肾小球肾炎的免疫炎症发病机制:(1) 利用抗原表位研究揭示自身免疫性肾小球肾炎的病因学。(2) 阐明自身免疫性肾小球肾炎补体异常活化及其调控机制,发现新的治疗靶点。(3) 阐明糖基化缺陷的 IgA1 及其抗体在 IgA 肾病发病机制中的作用。希望通过上述研究,进一步揭示肾小球疾病的免疫炎症发病机理,为相关免疫介导的肾小球肾炎的防治提供潜在的生物标志物和治疗靶点。

**致谢** 本研究得到国家自然科学基金创新研究群体“肾小球免疫炎症发病机制的研究”(项目批准号:81021004)及第一次延续资助(项目批准号:81321064)、第二次延续资助(项目批准号:81621092)的支持。

#### 参 考 文 献

- [1] Zhang L, Wang F, Wang L, et al. Prevalence of chronic kidney disease in China: a cross-sectional survey. *Lancet*, 2012, 379(9818): 815—822.
- [2] Segelmark M, Hellmark T. Autoimmune kidney diseases. *Autoimmun Rev*, 2010, 9(5): A366—371.
- [3] Cui Z, Zhao MH. Advances in human antiglomerular basement membrane disease. *Nat Rev Nephrol*, 2011, 7(12): 697—705.
- [4] Leinonen A, Netzer KO, Boutaud A, et al. Goodpasture antigen; expression of the full-length alpha3(IV) chain of collagen IV and localization of epitopes exclusively to the non-collagenous domain. *Kidney Int*, 1999, 55(3): 926—935.
- [5] Chen JL, Hu SY, Jia XY, et al. Association of epitope spreading of antiglomerular basement membrane antibodies and kidney injury. *Clin J Am Soc Nephrol*, 2013, 8(1): 51—58.
- [6] Zhao J, Cui Z, Yang R, et al. Anti-glomerular basement membrane autoantibodies against different target antigens are associated with disease severity. *Kidney Int*, 2009, 76(10): 1108—1115.
- [7] Sado Y, Boutaud A, Kagawa M, et al. Induction of anti-GBM nephritis in rats by recombinant alpha 3(IV)NC1 and alpha 4(IV)NC1 of type IV collagen. *Kidney Int*, 1998, 53(3): 664—671.
- [8] Cui Z, Zhao MH, Jia XY, et al. Antibodies to alpha5 chain of collagen IV are pathogenic in Goodpasture's disease. *J Autoimmun*, 2016, 70: 1—11.
- [9] Jia XY, Hu SY, Chen JL, et al. The clinical and immunological features of patients with combined anti-glomerular basement membrane disease and membranous nephropathy. *Kidney Int*, 2014, 85(4): 945—952.
- [10] Chen M, Gao Y, Guo XH, et al. Propylthiouracil-induced antineutrophil cytoplasmic antibody-associated vasculitis. *Nat Rev Nephrol*, 2012, 8(8): 476—483.
- [11] Xu PC, Hao J, Chen M, et al. Influence of myeloperoxidase-catalyzing reaction on the binding between myeloperoxidase and anti-myeloperoxidase antibodies. *Hum Immunol*, 2012, 73(4): 364—369.
- [12] Xu PC, Gou SJ, Yang XW, et al. Influence of variable domain glycosylation on anti-neutrophil cytoplasmic autoantibodies and anti-glomerular basement membrane autoantibodies. *BMC Immunol*, 2012, 13: 10.
- [13] Xu PC, Chen M and Zhao MH. High potential to reverse the inhibition of myeloperoxidase by ceruloplasmin of anti-myeloperoxidase autoantibodies of IgG3 subclass. *Autoimmunity*, 2012, 45(3): 218—225.
- [14] Zhao N, Hou P, Lv J, et al. The level of galactose-deficient IgA1 in the sera of patients with IgA nephropathy is associated with disease progression. *Kidney Int*, 2012, 82(7): 790—796.
- [15] Lv J, Yang Y, Zhang H, et al. Prediction of outcomes in crescentic IgA nephropathy in a multicenter cohort study. *J Am Soc Nephrol*, 2013, 24(12): 2118—2125.
- [16] Xie X, Lv J, Shi S, et al. Plasma exchange as an adjunctive therapy for crescentic IgA nephropathy. *Am J Nephrol*, 2016, 44(2): 141—149.
- [17] Wu J, Hicks J, Borillo J, et al. CD4(+) T cells specific to a glomerular basement membrane antigen mediate glomerulonephritis. *J Clin Invest*, 2002, 109(4): 517—524.

- [18] Ooi JD, Chang J, O'Sullivan KM, et al. The HLA-DRB1 \* 15:01-restricted Goodpasture's T cell epitope induces GN. *J Am Soc Nephrol*, 2013, 24(3): 419—431.
- [19] Jia XY, Cui Z, Yang R, et al. Antibodies against linear epitopes on the Goodpasture autoantigen and kidney injury. *Clin J Am Soc Nephrol*, 2012, 7(6): 926—933.
- [20] Hu SY, Jia XY, Gu QH, et al. T cell responses to peptides of Goodpasture autoantigen in patients with anti-glomerular basement membrane disease. *Nephrology (Carlton)*, 2017 Feb 2. [Epub ahead of print]
- [21] Hu SY, Gu QH, Wang J, et al. The pathogenicity of T cell epitopes on human Goodpasture antigen and its critical amino acid motif. *J Cell Mol Med*, 2017 Mar 10. [Epub ahead of print]
- [22] Jia XY, Cui Z, Li JN, et al. Identification of critical residues of linear B cell epitope on Goodpasture autoantigen. *PLoS One*, 2015, 10(4): e0123277.
- [23] Phelps RG, Rees AJ. The HLA complex in Goodpasture's disease; a model for analyzing susceptibility to autoimmunity. *Kidney Int*, 1999, 56(5): 1638—1653.
- [24] Yang R, Cui Z, Zhao J, et al. The role of HLA-DRB1 alleles on susceptibility of Chinese patients with anti-GBM disease. *Clinical Immunology*, 2009, 133: 245—250.
- [25] Phelps RG, Jones VL, Coughlan M, et al. Presentation of the Goodpasture autoantigen to CD4 T cells is influenced more by processing constraints than by HLA class II peptide binding preferences. *J Biol Chem*, 1998, 273 (19): 11440—11447.
- [26] Xie LJ, Cui Z, Chen FJ, et al. The susceptible HLA class II alleles and their presenting epitope(s) in Goodpasture's disease. *Immunology*, 2017, 151(4): .395—404
- [27] Gu QH, Xie LJ, Jia XY, et al. Fever and prodromal infections in anti-glomerular basement membrane disease. *Nephrology (Carlton)*, 2017 Mar 6. [Epub ahead of print]
- [28] Li JN, Jia X, Wang Y, et al. Plasma from patients with anti-glomerular basement membrane disease could recognize microbial peptides. *PLoS one*, 2017, 12(4): e0174553.
- [29] Xiao H, Heeringa P, Hu P, et al. Antineutrophil cytoplasmic autoantibodies specific for myeloperoxidase cause glomerulonephritis and vasculitis in mice. *J Clin Invest*, 2002, 110(7): 955—963.
- [30] Ye H, Zhao MH, Gao Y, et al. Anti-myeloperoxidase antibodies in sera from patients with propylthiouracil-induced vasculitis might recognize restricted epitopes on myeloperoxidase molecule. *Clin Exp Immunol*, 2004, 138 (1): 179—182.
- [31] Gou SJ, Xu PC, Chen M, et al. Epitope analysis of anti-myeloperoxidase antibodies in patients with ANCA-associated vasculitis. *PLoS One*, 2013, 8(4): e60530.
- [32] Li JN, Cui Z, Wang J, et al. Autoantibodies against linear epitopes of myeloperoxidase in anti-glomerular basement membrane disease. *Clin J Am Soc Nephrol*, 2016, 11(4): 568—575.
- [33] Yu JT, Li JN, Wang J, et al. Deglycosylation of myeloperoxidase uncovers its novel antigenicity. *Kidney Int*, 2017, 91 (6): 1410—1419.
- [34] Stanescu HC, Arcos-Burgos M, Medlar A, et al. Risk HLA-DQA1 and PLA(2)R1 alleles in idiopathic membranous nephropathy. *N Engl J Med*, 2011, 364 (7): 616—626.
- [35] Lv J, Hou W, Zhou X, et al. Interaction between PLA2R1 and HLA-DQA1 variants associates with anti-PLA2R antibodies and membranous nephropathy. *J Am Soc Nephrol*, 2013, 24(8): 1323—1329.
- [36] Cui Z, Xie LJ, Chen FJ, et al. MHC class II risk alleles and amino acid residues in idiopathic membranous nephropathy. *J Am Soc Nephrol*, 2016, 28(5): 1651.
- [37] Ma R, Cui Z, Liao YH, et al. Complement activation contributes to the injury and outcome of kidney in human anti-glomerular basement membrane disease. *J Clin Immunol*, 2013, 33(1): 172—178.
- [38] Ma R, Cui Z, Liao YH, et al. The alternative pathway of complement activation may be involved in the renal damage of human anti-glomerular basement membrane disease. *PLoS One*, 2014, 9(3): e91250.
- [39] Xing GQ, Chen M, Liu G, et al. Complement activation is involved in renal damage in human antineutrophil cytoplasmic autoantibody associated pauci-immune vasculitis. *J Clin Immunol*, 2009, 29(3): 282—291.
- [40] Gou SJ, Yuan J, Chen M, et al. Circulating complement activation in patients with anti-neutrophil cytoplasmic antibody-associated vasculitis. *Kidney Int*, 2013, 83(1): 129—137.
- [41] Gou SJ, Yuan J, Wang C, et al. Alternative complement pathway activation products in urine and kidneys of patients with ANCA-associated GN. *Clin J Am Soc Nephrol*, 2013, 8 (11): 1884—1891.
- [42] Hao J, Meng LQ, Xu PC, et al. p38MAPK, ERK and PI3K signaling pathways are involved in C5a-primed neutrophils for ANCA-mediated activation. *PLoS One*, 2012, 7 (5): e38317.
- [43] Hao J, Chen M, and Zhao MH. Involvement of protein kinase C in C5a-primed neutrophils for ANCA-mediated activation. *Mol Immunol*, 2013, 54(1): 68—73.
- [44] Huang YM, Wang H, Wang C, et al. Promotion of hypercoagulability in antineutrophil cytoplasmic antibody-associated vasculitis by C5a-induced tissue factor-expressing microparticles and neutrophil extracellular traps. *Arthritis Rheumatol*, 2015, 67(10): 2780—2790.
- [45] Hao J, Huang YM, Zhao MH, et al. The interaction between C5a and sphingosine-1-phosphate in neutrophils for antineutrophil cytoplasmic antibody mediated activation. *Arthritis Res Ther*, 2014, 16(4): R142.
- [46] Yuan J, Gou SJ, Huang J, et al. C5a and its receptors in human anti-neutrophil cytoplasmic antibody (ANCA)-associated vasculitis. *Arthritis Res Ther*, 2012, 14(3): R140.
- [47] Hao J, Wang C, Yuan J, et al. A pro-inflammatory role of C5L2 in C5a-primed neutrophils for ANCA-induced activation. *PLoS One*, 2013, 8(6): e66305.
- [48] Ma TT, Wang H, Wang C, et al. Urinary levels of high mobility group box-1 are associated with disease activity in antineutrophil cytoplasmic autoantibody-associated vasculitis. *PLoS One*, 2015, 10(4): e0123586.

- [49] Wang C, Wang H, Chang DY, et al. High mobility group box 1 contributes to anti-neutrophil cytoplasmic antibody-induced neutrophils activation through receptor for advanced glycation end products (RAGE) and Toll-like receptor 4. *Arthritis Res Ther*, 2015, 17: 64.
- [50] Wu LH, Yu F, Tan Y, et al. Inclusion of renal vascular lesions in the 2003 ISN/RPS system for classifying lupus nephritis improves renal outcome predictions. *Kidney Int*, 2013, 83(4): 715—723.
- [51] Song D, Wu LH, Wang FM, et al. The spectrum of renal thrombotic microangiopathy in lupus nephritis. *Arthritis Res Ther*, 2013, 15(1): R12.
- [52] Wang FM, Yu F, Tan Y, et al. Serum complement factor H is associated with clinical and pathological activities of patients with lupus nephritis. *Rheumatology (Oxford)*, 2012, 51(12): 2269—2277.
- [53] Wang FM, Song D, Pang Y, et al. The dysfunctions of complement factor H in lupus nephritis. *Lupus*, 2016, 25(12): 1328—1340.
- [54] Yang XW, Tan Y, Yu F, et al. Combination of anti-C1q and anti-dsDNA antibodies is associated with higher renal disease activity and predicts renal prognosis of patients with lupus nephritis. *Nephrol Dial Transplant*, 2012, 27(9): 3552—3559.
- [55] Pang Y, Yang XW, Song Y, et al. Anti-C1q autoantibodies from active lupus nephritis patients could inhibit the clearance of apoptotic cells and complement classical pathway activation mediated by C1q in vitro. *Immunobiology*, 2014, 219(12): 980—989.
- [56] Pang Y, Tan Y, Li Y, et al. Serum A08 C1q antibodies are associated with disease activity and prognosis in Chinese patients with lupus nephritis. *Kidney Int*, 2016, 90(6): 1357—1367.
- [57] Zhu L, Zhai YL, Wang FM, et al. Variants in complement factor H and complement factor H-related protein genes, CFHR3 and CFHR1, affect complement activation in IgA nephropathy. *J Am Soc Nephrol*, 2015, 26(5): 1195—1204.
- [58] Xie J, Kiryluk K, Li Y, et al. Fine mapping implicates a deletion of CFHR1 and CFHR3 in protection from IgA nephropathy in Han Chinese. *J Am Soc Nephrol*, 2016, 27(10): 3187—3194.
- [59] Zhai YL, Meng SJ, Zhu L, et al. Rare variants in the complement factor H-related protein 5 gene contribute to genetic susceptibility to IgA nephropathy. *J Am Soc Nephrol*, 2016, 27(9): 2894—2905.

## The immune-mediated inflammatory mechanisms of glomerulonephritis

Jia Xiaoyu<sup>1</sup> Cui Zhao<sup>1</sup> Yu Feng<sup>1</sup> Lv Jicheng<sup>1</sup>

Chen Min<sup>1</sup> Zhang Hong<sup>1</sup> Zhao Minghui<sup>1,2</sup>

(1. Renal Division, Department of Medicine, Peking University First Hospital & Institute of Nephrology, Peking University, Beijing 100034;

2. Peking-Tsinghua Center for Life Sciences, Beijing 100871)

**Abstract** Glomerulonephritis is the major cause of chronic kidney disease and end-stage renal disease in China. The immune-mediated inflammation plays a key role in the pathogenesis of glomerulonephritis. Our Innovation Research Group focuses on the immunity and inflammatory pathogenesis of glomerulonephritis, especially in the most severe crescentic glomerulonephritis, including anti-GBM disease, ANCA associated vasculitis, lupus nephritis and IgA nephropathy. Under the support of science funding, we achieved a series of novel findings on the fine epitope(s) of autoimmune T/B cells, complement activation-mediated kidney damage, and aberrant glycosylated IgA1 molecules in IgA nephropathy. Based on these investigations, we have partially elucidated autoimmune and inflammation pathogenesis of glomerulonephritis and revealed potential biomarkers and therapeutic targets for prevention and treatment of immune-mediated glomerulonephritis.

**Key words** glomerulonephritis; immune and inflammation; autoantibody; epitope; complement