

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2024.01.039

狼疮性肾炎患者血清 NETs、TWEAK、外周血 CD4⁺T/CD8⁺T 比例 与疾病活动度及肾脏预后的关系 *

钟凤梅 易娟 郭昕 王菲 夏成云[△]

(川北医学院附属医院肾内科 四川 南充 637000)

摘要 目的:探讨狼疮性肾炎(LN)患者血清中性粒细胞胞外诱捕网(NETs)、肿瘤坏死因子样凋亡诱导剂(TWEAK)、外周血分化簇(CD)4⁺T/CD8⁺T 比例与疾病活动度及肾脏预后的关系。**方法:**选取 2021 年 8 月~2022 年 8 月川北医学院附属医院肾内科收治的 LN 患者 137 例(LN 组),根据系统性红斑狼疮疾病活动指数(SLEDAI)-2000 评分分为轻度活动组(52 例)、中度活动组(45 例)、重度活动组(40 例)。随访 1 年,根据肾脏相关终点事件发生情况分为预后不良组(43 例)和预后良好组(94 例),另选取同期 76 名体检健康志愿者(对照组)。采用酶联免疫吸附法检测血清 NETs、TWEAK 水平,流式细胞术检测外周血 CD4⁺T/CD8⁺T 比例。Spearman 相关性分析 LN 患者血清 NETs、TWEAK 和外周血 CD4⁺T/CD8⁺T 与 SLEDAI-2000 评分的相关性,多因素 Logistic 回归分析 LN 患者预后不良的因素,受试者工作特征曲线分析血清 NETs、TWEAK 和外周血 CD4⁺T/CD8⁺T 对 LN 患者预后不良的预测价值。**结果:**与对照组比较,LN 组血清 NETs、TWEAK 水平升高,外周血 CD4⁺T/CD8⁺T 降低($P<0.05$)。轻度活动组、中度活动组、重度活动组血清 NETs、TWEAK 依次升高,外周血 CD4⁺T/CD8⁺T 依次降低($P<0.05$)。LN 患者 SLEDAI-2000 评分与血清 NETs、TWEAK 呈正相关,与外周血 CD4⁺T/CD8⁺T 呈负相关($P<0.05$)。慢性肾脏病分期 4 期、SLEDAI-2000 评分升高、NETs 升高、TWEAK 升高为 LN 患者预后不良的独立危险因素,估算肾小球滤过率升高、CD4⁺T/CD8⁺T 升高为独立保护因素($P<0.05$)。血清 NETs、TWEAK 和外周血 CD4⁺T/CD8⁺T 联合预测 LN 患者预后不良的曲线下面积为 0.943,大于血清 NETs、TWEAK 和外周血 CD4⁺T/CD8⁺T 单独预测的 0.790、0.788、0.799($P<0.05$)。**结论:**LN 患者血清 NETs、TWEAK 水平升高,外周血 CD4⁺T/CD8⁺T 降低,与疾病活动度及肾脏预后不良密切相关,血清 NETs、TWEAK 联合外周血 CD4⁺T/CD8⁺T 预测 LN 患者肾脏预后的价值较高。

关键词:狼疮性肾炎;NETs;TWEAK;CD4⁺T/CD8⁺T;疾病活动度;肾脏预后

中图分类号:R593.242 文献标识码:A 文章编号:1673-6273(2024)01-194-07

Relationship between Serum NETs, TWEAK, Peripheral Blood CD4⁺T/CD8⁺T Ratio and Disease Activity and Renal Prognosis in Patients with Lupus Nephritis*

ZHONG Feng-mei, YI Juan, GUO Xin, WANG Fei, XIA Cheng-yun[△]

(Department of Nephrology, Affiliated Hospital of North Sichuan Medical College, Nanchong, Sichuan, 637000, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the relationship between serum neutrophil extracellular traps (NETs), tumor necrosis factor-like weak inducer of apoptosis (TWEAK), peripheral blood cluster of differentiation (CD) 4⁺T/CD8⁺T ratio and disease activity and renal prognosis in patients with lupus nephritis (LN). **Methods:** 137 LN patients (LN group) who were admitted to the Department of Nephrology, Affiliated Hospital of North Sichuan Medical College from August 2021 to August 2022 were selected, patients were divided into mild activity group (52 cases), moderate activity group (45 cases) and severe activity group (40 cases) according to the systemic lupus erythematosus disease activity index (SLEDAI)-2000 score. After 1 years of follow-up, patients were divided into poor prognosis group (43 cases) and good prognosis group (94 cases) according to the occurrence of kidney-related endpoint events, another 76 healthy volunteers (control group) were selected during the same period. The levels of serum NETs and TWEAK were detected by enzyme-linked immunosorbent assay, and the proportion of CD4⁺T/CD8⁺T in peripheral blood was detected by flow cytometry. The correlation between serum NETs, TWEAK, peripheral blood CD4⁺T/CD8⁺T and SLEDAI-2000 score in LN patients were analyzed by Spearman correlation analysis, the factors of poor prognosis in LN patients were analyzed by multivariate Logistic regression analysis, the predictive value of serum NETs, TWEAK and peripheral blood CD4⁺T/CD8⁺T for poor prognosis in LN patients were analyzed by receiver operating characteristic curve. **Results:** Compared with control group, the levels of serum NETs and TWEAK in LN group were increased, and the peripheral blood CD4⁺T/CD8⁺T was decreased ($P<0.05$). The serum NETs and TWEAK in mild activity group, moderate activity group and se-

* 基金项目:四川省卫生健康委员会科研课题(19ZD006)

作者简介:钟凤梅(1997-),女,硕士,住院医师,研究方向:狼疮肾炎,E-mail: Lyz19978913@163.com

[△] 通讯作者:夏成云(1968-),男,硕士,主任医师,研究方向:狼疮肾炎,E-mail: dream870709@163.com

(收稿日期:2023-06-23 接受日期:2023-07-18)

vere activity group increased in turn, and the peripheral blood CD4⁺T/CD8⁺T decreased in turn ($P<0.05$). SLEDAI-2000 score in LN patients was positively correlated with serum NETs and TWEAK, and negatively correlated with peripheral blood CD4⁺T/CD8⁺T ($P<0.05$). Chronic kidney disease stage 4, elevated SLEDAI-2000 score, elevated NETs and elevated TWEAK were independent risk factors for poor prognosis in LN patients, increased estimated glomerular filtration rate and elevated CD4⁺T/CD8⁺T were independent protective factors ($P<0.05$). The area under the curve of serum NETs, TWEAK and peripheral blood CD4⁺T/CD8⁺T combined to predict poor prognosis in LN patients was 0.943, which was greater than 0.790, 0.788 and 0.799 predicted by serum NETs, TWEAK and peripheral blood CD4⁺T/CD8⁺T alone ($P<0.05$). **Conclusions:** The levels of serum NETs and TWEAK in LN patients are increase, and the peripheral blood CD4⁺T/CD8⁺T is decrease, which are closely relate to disease activity and poor renal prognosis, serum NETs and TWEAK combine with peripheral blood CD4⁺T/CD8⁺T has a high value in predicting renal prognosis in LN patients.

Key words: Lupus nephritis; NETs; TWEAK; CD4⁺T/CD8⁺T; Disease activity; Renal prognosis

Chinese Library Classification(CLC): R593.242 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2024)01-194-07

前言

系统性红斑狼疮(systemic lupus erythematosus, SLE)是免疫细胞异常、细胞因子失衡引起补体激活和自身抗体大量产生而导致的自身免疫性疾病^[1]。近年来随着诊治技术的提升, SLE从高致死性疾病转变为可控疾病, 但其并发的狼疮性肾炎(lupus nephritis, LN)仍然是终末期肾病(end-stage renal disease, ESRD)和 SLE 患者死亡的重要原因^[2]。积极评估探索与 LN 疾病活动度及肾脏预后相关的指标, 对调节治疗方案和改善 LN 患者预后十分必要, 目前临床缺乏可靠的 LN 疾病活动度及肾脏预后相关血液标志物。相关研究表明, 自身抗原暴露增多、炎症反应和组织纤维化在 LN 中发挥重要作用^[3]。中性粒细胞胞外诱捕网(neutrophil extracellular traps, NETs)是一种纤维网状复合物, 能释放多种抗原和刺激炎症细胞释放, 促进自身抗原暴露和炎症反应^[4]。研究报道, NETs 在 SLE 患者外周血中形成增加^[5]。肿瘤坏死因子样凋亡诱导剂(tumor necrosis factor-like weak inducer of apoptosis, TWEAK)是一种 II 型跨膜蛋白, 能通过结合其受体成纤维细胞生长因子诱导因子 14(fibroblast growth factor-inducible 14, Fn14)促进炎症反应和组织纤维化^[6]。研究报道, TWEAK 在 SLE 患者脑脊液和血液中升高^[7]。T 细胞异常活化能促进自身抗体产生和炎症反应发展, 分化簇(cluster of differentiation, CD)4⁺T/CD8⁺T 比例能反映 T 细胞活化状态^[8]。研究报道, SLE 患者 CD4⁺T/CD8⁺T 降低与疾病活动度增加相关^[9]。但关于 LN 患者血清 NETs、TWEAK、外周血 CD4⁺T/CD8⁺T 比例与疾病活动度及肾脏预后的关系尚不明确, 本研究据此开展研究, 报道如下。

1 资料与方法

1.1 临床资料

选取 2021 年 8 月~2022 年 8 月川北医学院附属医院肾内科收治的 LN 患者 137 例(LN 组), 年龄范围 18~40 岁, 平均(28.42±5.65)岁; 女 101 例、男 36 例; 肾穿刺时病程范围 1~21 年, 中位 8.00(4.00, 13.00)年; 病理分型^[10]: I 型者 0 例、II 型者 11 例、III 型者 27 例、IV 型者 32 例、V 型者 37 例、III 型+V 型者 15 例、VI 型+V 型者 15 例; 慢性肾脏病(chronic kidney disease, CKD)分期^[11]: 1 期者 53 例、2 期者 32 例、3 期者 37 例、4 期者 15 例。另选取同期 76 名体检健康志愿者(对照

组), 年龄范围 18~40 岁, 平均(28.37±5.52)岁; 女 55 例、男 21 例。两组性别、年龄有可比性($P>0.05$)。LN 组纳入标准: (1) 年龄≥18 岁; (2) 患者或家属书面知情同意; (3) 符合《中国狼疮肾炎诊断和治疗指南》^[12]LN 诊断标准(符合以下任一项): ① 活动性尿沉渣, 或白细胞管型, 或红细胞管型; ② 细胞管型包括红细胞管型、管状管型、颗粒管型、血红蛋白管型或混合管型; ③ 尿蛋白/肌酐比>500 mg/g, 或随机尿检查尿蛋白+++; 蛋白尿持续>0.5 g/24 h; (4) CKD 分期 1 期~4 期; (5) 入院行肾穿刺活检术。排除标准: (1) 合并心肝肺等其他脏器严重功能损害; (2) 合并其他自身免疫性疾病; (3) 资料不完整; (4) 妊娠及哺乳期妇女; (5) 恶性肿瘤患者; (6) 确诊时已经进展为 ESRD 或接受了透析、肾移植; (7) 既往肾损伤药物、脓毒症等引起的肾损伤患者; (8) 合并糖尿病、高血压等慢性疾病; (9) 合并感染、骨头坏死、骨髓抑制。本研究经川北医学院附属医院医学伦理委员会批准。

1.2 方法

1.2.1 血清 NETs、TWEAK 水平检测 采集 LN 患者入院次日和对照组体检时外周静脉血 8 mL, 其中 4 mL 以 1500×g 离心(15 cm 半径)15 min, 收集上清液用 NETs、TWEAK 酶联免疫吸附试验试剂盒(编号: MEXN-H5258、MEXN-H2047)检测 NETs、TWEAK 水平。

1.2.2 外周血 CD4⁺T、CD8⁺T 检测 另 4 mL 外周静脉血枸橼酸钠抗凝后, 加入 RD1-CD4⁺T 和 ECD-CD8⁺T 荧光标记单克隆抗体(贝克曼库尔特有限公司, 编号: 6602864、6604728)和同型对照抗体 20 μL, 避光孵育 20 min。以阴性对照作为背景参数, 使用流式细胞仪(广州吉源生物科技有限公司, 型号: CyFlow Cube6)检测 CD4⁺T、CD8⁺T 个数和计算细胞比例, 再计算 CD4⁺T/CD8⁺T。

1.2.3 资料收集 收集 LN 患者性别、年龄、肾穿刺时病程、病理分型、CKD 分期、抗心磷脂抗体(anti cardiolipin antibody, ACA)-免疫球蛋白(immunoglobulin, Ig)M、ACA-IgG、抗 Smith 抗体、抗双链-脱氧核糖核酸(double-stranded deoxyribonucleic acid, dsDNA)抗体、抗 Ro/干燥综合征 A(sicca syndrome A, SSA)抗体、抗 La/干燥综合征 B(sicca syndrome B, SSB)抗体、抗核抗体(antinuclear antibody, ANA)、血肌酐、血尿素氮、24h 尿蛋白量、估算肾小球滤过率(estimated glomerular filtration rate, eGFR)、治疗方案和诱导治疗后完全缓解[肾功能稳定(血

肌酐正常或上升<基线的15%)、24 h内尿蛋白量<0.3 g或尿蛋白阴性、无活动性尿沉渣^[13]等资料。

1.3 疾病活动度和预后分组

LN患者确诊后根据SLE疾病活动指数(SLE disease activity index, SLEDAI)-2000评分^[12](总分值0~105分,得分越高则疾病活动性越高)分为轻度活动组(≤6分,52例)、中度活动组(7~12分,45例)、重度活动组(>12分,40例)。所有患者参考指南^[12]接受免疫抑制方案治疗,治疗后通过该门诊、电话和互联网等方式进行为期1年的随访,根据肾脏终点事件发生情况(Scr水平翻倍、进入肾末期行肾替代治疗等)分为预后不良组和预后良好组^[14]。

1.4 统计学分析

采用SPSS26.0软件。计数资料例(%)表示,行 χ^2 检验;等级资料U检验;计量资料若为正态分布,则以表示,两组行t检验,多组间行F检验,事后多重比较LSD检验;若为偏态分布则以M(P_{25} , P_{75})表示,两组行U检验;Spearman相关性分析

LN患者血清NETs、TWEAK和外周血CD4⁺T/CD8⁺T与SLEDAI-2000评分的相关性;多因素Logistic回归分析LN患者ESRD的因素;受试者工作特征(receiver operating characteristic, ROC)曲线分析血清NETs、TWEAK和外周血CD4⁺T/CD8⁺T对LN患者ESRD的预测价值,DeLong检验比较血清NETs、TWEAK和外周血CD4⁺T/CD8⁺T单独与联合预测LN患者ESRD的曲线下面积(area under the curve, AUC);差异有统计学意义为 $P<0.05$ 。

2 结果

2.1 血清NETs、TWEAK和外周血CD4⁺T/CD8⁺T在LN组与对照组中比较

LN组血清NETs、TWEAK和外周血CD8⁺T比例高于对照组,外周血CD4⁺T比例和CD4⁺T/CD8⁺T低于对照组($P<0.05$)。见表1。

表1 血清NETs、TWEAK和外周血CD4⁺T/CD8⁺T在LN组与对照组中比较($\bar{x}\pm s$)

Table 1 Comparison of serum NETs, TWEAK and peripheral blood CD4⁺T/CD8⁺T in LN group and control group($\bar{x}\pm s$)

Groups	n	NETs(ng/mL)	TWEAK(ng/mL)	CD4 ⁺ T(%)	CD8 ⁺ T(%)	CD4 ⁺ T/CD8 ⁺ T
LN group	137	1.03± 0.29	1420.34± 477.35	25.86± 4.36	32.96± 4.30	0.80± 0.17
Control group	76	0.42± 0.13	439.30± 77.38	35.88± 4.53	24.83± 3.33	1.47± 0.29
t	-	17.380	17.769	-15.836	14.273	-21.266
P	-	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

2.2 血清NETs、TWEAK和外周血CD4⁺T/CD8⁺T在不同疾病活动度LN患者中比较

轻度活动组、中度活动组、重度活动组血清NETs、TWEAK

和外周血CD8⁺T比例依次升高,外周血CD4⁺T比例和CD4⁺T/CD8⁺T依次降低($P<0.05$)。见表2。

表2 血清NETs、TWEAK和外周血CD4⁺T/CD8⁺T在不同疾病活动度LN患者中比较($\bar{x}\pm s$)

Table 2 Comparison of serum NETs, TWEAK and peripheral blood CD4⁺T/CD8⁺T in LN patients with different disease activity($\bar{x}\pm s$)

Groups	n	NETs(ng/mL)	TWEAK(ng/mL)	CD4 ⁺ T(%)	CD8 ⁺ T(%)	CD4 ⁺ T/CD8 ⁺ T
Mild activity group	52	0.75± 0.14	941.20± 259.45	30.29± 2.68	28.68± 2.01	1.07± 0.19
Moderate activity group	45	1.04± 0.07 ^a	1478.14± 91.44 ^a	25.20± 1.03 ^a	33.24± 1.30 ^a	0.76± 0.06 ^a
Severe activity group	40	1.38± 0.16 ^{ab}	1978.19± 260.77 ^{ab}	20.84± 1.77 ^{ab}	38.21± 2.11 ^{ab}	0.55± 0.07 ^{ab}
F	-	285.006	254.746	255.939	304.319	195.430
P	-	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

Note: Compare with mild activity group, ^a $P<0.05$; Compare with moderate activity group, ^b $P<0.05$.

2.3 LN患者血清NETs、TWEAK和外周血CD4⁺T/CD8⁺T与SLEDAI-2000评分的相关性

Spearman相关性分析显示,LN患者SLEDAI-2000评分与血清NETs、TWEAK和外周血CD8⁺T比例呈正相关(rs分别为0.754、0.761、0.715, P 均<0.001),与外周血CD4⁺T比例和CD4⁺T/CD8⁺T呈负相关(rs分别为-0.708、-0.767, P 均<0.001)。

2.4 单因素分析LN患者预后不良的因素

随访1年无失访病例,137例LN患者有43例预后不良,肾脏预后不良率为31.39%(43/137)。单因素分析显示,预后不

良组肾穿刺时病程长于预后不良组,CKD分期、SLEDAI-2000评分、血肌酐、血尿素氮、NETs、TWEAK、CD8⁺T高于预后良好组,eGFR、CD4⁺T、CD4⁺T/CD8⁺T低于预后良好组($P<0.05$),两组其他资料比较无差异($P>0.05$)。见表3。

2.5 多因素Logistic回归分析LN患者预后不良的因素

以LN患者肾脏预后(不良/良好=1/0)为因变量,表3单因素分析有差异项目($P<0.05$)为自变量:肾穿刺时病程、CKD分期(1期/2期/3期/4期=1/2/3/4)、SLEDAI-2000评分(原值录入)、血肌酐(原值录入)、血尿素氮(原值录入)、eGFR(原值录入)、诱导治疗后完全缓解(是/否=1/0)、NETs(原值录入)、

TWEAK (原值录入)、CD4⁺T/CD8⁺T (原值录入) 为自变量 (CD4⁺T、CD8⁺T 与 CD4⁺T/CD8⁺T 有强共线性,故排除),建立影响 LN 患者 ESRD 的多因素 Logistic 回归模型。结果显示,CKD 分期 4 期、SLEDAI-2000 评分升高、NETs 升高、TWEAK 升高为 LN 患者预后不良的独立危险因素,eGFR 升高、CD4⁺T/CD8⁺T 升高为独立保护因素($P<0.05$)。见表 4。

表 3 单因素分析 LN 患者预后不良的因素
Table 3 Univariate analysis of poor prognosis factors in LN patients

Projects	Poor prognosis group (n=43)	Good prognosis group (n=94)	$\chi^2/t/U$	P
Gender [n(%)]				
Male	8(18.60)	28(29.79)	1.904	0.168
Female	35(81.40)	66(70.21)		
Age [year, M(P_{25}, P_{75})]	29.14± 5.21	28.09± 5.84	1.014	0.312
Disease duration at renal puncture [year, M(P_{25}, P_{75})]	10.00(7.00,14.00)	7.00(2.75,12.25)	-2.589	0.010
Pathological type [n(%)]				
I type	0(0.00)	0(0.00)	8.092	0.151
II type	1(2.33)	10(10.64)		
III type	10(23.26)	17(18.09)		
IV type	11(25.58)	21(22.34)		
V type	8(18.60)	29(30.85)		
III type+ V type	5(11.63)	10(10.64)		
VI type+ V type	8(18.60)	7(7.44)		
CKD stages [n(%)]				
1 stage	8(18.60)	45(47.87)	21.809	<0.001
2 stage	8(18.60)	24(25.53)		
3 stage	16(37.21)	21(22.34)		
4 stage	11(25.59)	4(4.26)		
SLEDAI-2000 score				
[score, M(P_{25}, P_{75})]	12.00(6.00,17.00)	5.00(2.00,8.00)	-5.146	<0.001
ACA-IgM positive [n(%)]	11(25.58)	15(15.96)	1.777	0.182
ACA-IgG positive [n(%)]	11(25.58)	21(22.34)	0.173	0.677
Anti-Smith antibody was positive [n(%)]	13(30.23)	24(25.53)	0.331	0.565
Anti-dsDNA antibody was positive [n(%)]	30(69.77)	79(84.04)	3.697	0.054
Anti-Ro/SAA antibody was positive [n(%)]	24(55.81)	51(54.26)	0.029	0.865
Anti-La/SSB antibody was positive [n(%)]	7(16.28)	19(20.21)	0.297	0.586
ANA positive [n(%)]	43(100.00)	91(96.81)	-	0.552
Serum creatinine [$\mu\text{mol/L}$, M(P_{25}, P_{75})]	124.64(94.16,157.31)	102.74(67.24,142.00)	-2.377	0.017
Blood urea nitrogen (mmol/L, $\bar{x} \pm s$)	10.57± 3.50	8.76± 2.83	3.212	0.002
Urinary protein amount at 24 h [g,M(P_{25}, P_{75})]	2.49(1.54,3.53)	2.18(1.05,3.00)	-1.876	0.061
eGFR[mL/min/1.73 m ² , M(P_{25}, P_{75})]	65.91(37.11,81.67)	101.67(54.25,138.97)	-3.827	<0.001
Treatment plan [n(%)]				
Hormone	13(30.23)	41(43.62)	5.638	0.343
Hormone+cyclophosphamide	19(44.19)	29(30.85)		
Hormone+cyclosporine A	0(0.00)	3(3.19)		
Hormone+mycophenolate mofetil	8(18.60)	17(18.09)		

Hormone+tacrolimus	0(0.00)	1(1.06)		
Others	3(6.98)	3(3.19)		
Complete remission after induction therapy [n(%)]				
Yes	7(16.28)	37(39.36)	7.210	0.007
No	36(83.72)	57(60.64)		
NETs(ng/mL, $\bar{x} \pm s$)	1.24 $\pm$ 0.27	0.94 $\pm$ 0.24	6.462	<0.001
TWEAK(ng/mL, $\bar{x} \pm s$)	1759.85 $\pm$ 387.56	1265.03 $\pm$ 433.25	6.406	<0.001
CD4 ⁺ T(% , $\bar{x} \pm s$)	23.50 $\pm$ 4.02	26.94 $\pm$ 4.09	-4.582	<0.001
CD8 ⁺ T(% , $\bar{x} \pm s$)	35.16 $\pm$ 3.64	31.97 $\pm$ 4.22	4.302	<0.001
CD4 ⁺ T/CD8 ⁺ T($\bar{x} \pm s$)	0.67 $\pm$ 0.13	0.87 $\pm$ 0.17	-6.295	<0.001

表 4 多因素 Logistic 回归分析 LN 患者预后不良的因素
Table 4 Multivariate Logistic regression analysis of the factors of poor prognosis in LN patients

Factors	β	SE	Wald χ^2	P	OR	95%CI
Prolonged disease duration at renal puncture	0.046	0.102	0.203	0.653	1.047	0.858~1.278
CKD stages	-	-	6.417	0.093	-	-
2 stage	0.416	0.787	0.280	0.597	1.516	0.324~7.087
3 stage	1.344	0.737	3.323	0.068	3.833	0.904~16.247
4 stage	2.259	1.029	4.822	0.028	9.571	1.275~71.873
Elevated SLEDAI-2000 score	0.367	0.126	8.459	0.004	1.444	1.127~1.850
Elevated serum creatinine	0.012	0.014	0.827	0.363	1.013	0.986~1.040
Elevated blood urea nitrogen	0.234	0.191	1.495	0.221	1.264	0.868~1.839
Elevated eGFR	-0.045	0.016	7.696	0.006	0.956	0.925~0.987
Complete remission after induction therapy	-1.278	0.614	4.333	0.037	0.279	0.084~0.928
Elevated NETs	0.073	0.027	7.274	0.007	1.076	1.020~1.135
Elevated TWEAK	0.005	0.002	6.184	0.013	1.005	1.001~1.010
Elevated CD4 ⁺ T/CD8 ⁺ T	-0.145	0.054	7.306	0.007	0.865	0.778~0.961

2.6 血清 NETs、TWEAK 和外周血 CD4⁺T/CD8⁺T 对 LN 患者预后不良的预测价值

绘制血清 NETs、TWEAK 和外周血 CD4⁺T/CD8⁺T 单独与联合预测 LN 患者预后不良的 ROC, 计算和比较 AUC。结果显

示, 血清 NETs、TWEAK 和外周血 CD4⁺T/CD8⁺T 联合预测 LN 患者预后不良的 AUC 为 0.943, 大于血清 NETs、TWEAK 和外周血 CD4⁺T/CD8⁺T 单独预测的 0.790、0.788、0.799。见表 5 和图 1。

表 5 血清 NETs、TWEAK 和外周血 CD4⁺T/CD8⁺T 对 LN 患者预后不良的预测价值
Table 5 Predictive value of serum NETs, TWEAK and peripheral blood CD4⁺T/CD8⁺T for poor prognosis in LN patients

Factors	AUC	95%CI	Best cut-off value	Sensitivity (%)	Specificity (%)	Youden index
NETs	0.790	0.712~0.855	1.27 ng/mL	53.49	92.55	0.460
TWEAK	0.788	0.710~0.853	1321.03 ng/mL	93.02	54.26	0.473
CD4 ⁺ T/CD8 ⁺ T	0.799	0.722~0.862	0.74	72.09	73.40	0.455
Combination	0.943	0.890~0.976	-	83.02	82.98	0.660

3 讨论

肾脏因其作为免疫复合物排泄的重要场所成为 SLE 过程中最容易受损的器官, 超过 1/2 的 SLE 患者初次诊断时即并发

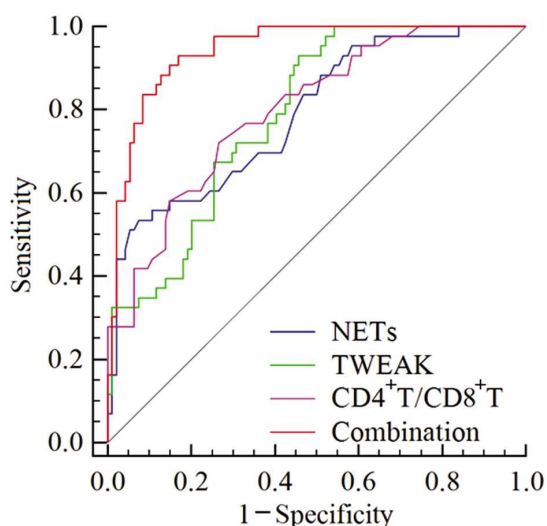


图1 血清 NETs、TWEAK 和外周血 CD4⁺T/CD8⁺T 预测 LN 患者预后不良的 ROC 曲线

Fig.1 ROC curve of serum NETs, TWEAK and peripheral blood CD4⁺T/CD8⁺T in predicting poor prognosis in LN patients

LN^[2]。LN 确诊 10 年内进展为 ESRD 的风险高达 10%~20%，严重威胁患者生存质量，尽管近年来 LN 诊治取得一定进展，但现阶段激素(糖皮质激素)联合免疫抑制剂的主导方案对增殖性 LN 完全缓解率仍然较低，加之 LN 易复发的特点，仍有较多患者面临 ESRD 风险^[15,16]。寻找能准确评估 LN 患者疾病活动性和肾脏预后的指标，对促进患者预后改善意义重大。

自身抗体大量分泌能与自身抗原结合形成免疫复合物，激活补体系统导致促炎细胞和介质大量释放，损伤肾组织细胞导致 LN 发生，最终进展为 ESRD^[3]。NETs 是中性粒细胞被招募至组织损伤或感染部位时释放的一种由蛋白质颗粒组成的细胞外网架结构，作为天然屏障能杀灭病原体以促进病原体清除和组织修复，但 NETs 大量产生能诱导大量自身抗原产生，并持续激活免疫系统加剧炎症反应，进而参与多种病理过程^[4]。在脓毒症诱导急性肾损伤小鼠模型中，阻断 NETs 形成能减轻肾脏炎症反应，改善小鼠肾损伤^[17]。双酚 A 诱导的慢性肾损伤模型中，抑制 NETs 能减少肾脏免疫复合物沉积，进而改善肾损伤^[18]。这些研究提示 NETs 参与肾损伤过程。同时既往研究指出^[9]，SLE 患者外周血 NETs 形成增多。因此推测 NETs 可能参与 LN 过程。本研究结果显示，LN 患者血清 NETs 水平升高，并随着疾病活动性增加而升高，是 LN 患者预后不良的独立危险因素，说明血清 NETs 水平升高与 LN 患者疾病活动性加重和肾脏预后不良密切相关。其原因可能是，NETs 能结合 Toll 受体和 B 细胞受体激活 B 细胞，诱导更多的自身抗体产生形成免疫复合物，沉积于肾小球毛细血管襻导致 LN 活动性增强和肾脏预后不良风险增加^[20]；同时 NETs 还能激活中性粒细胞表面受体和促炎信号，增强肾脏炎症反应，加剧肾损伤导致 LN 活动性增强和肾脏预后不良风险增加^[19]。

TWEAK 是由 T 细胞、自然杀伤细胞、树突状细胞、单核/巨噬细胞等多种免疫细胞释放的跨膜蛋白，不仅能结合 Fn14 促进组织纤维化过程，同时 TWEAK/Fn14 还能通过经典与非经典途径激活核因子- κ B(nuclear factor- κ B, NF- κ B)信号通路，从而促进炎症发生发展^[6]。顺铂诱导的肾损伤模型中，抑制

TWEAK/Fn14 信号通路能减轻肾组织炎症反应和纤维化，改善模型肾损伤^[20]。叶酸诱导的急性肾损伤小鼠模型中，下调 TWEAK 能抑制肾组织炎症反应和肾细胞凋亡^[21]。这些研究提示 TWEAK 参与肾损伤过程。马松鹤等^[23]实验发现，TWEAK mRNA 在 SLE 小鼠模型的肾组织中高表达。因此推测 TWEAK 可能与 LN 患者病情和预后有关。本研究结果显示，LN 患者血清 TWEAK 水平升高，并随着疾病活动性增加而升高，是 LN 患者预后不良的独立危险因素，说明血清 TWEAK 水平升高与 LN 患者疾病活动性加重和肾脏预后不良密切相关。其原因可能是，TWEAK 能结合其特异性受体 Fn14 激活 NF- κ B 信号通路，增强促炎细胞因子释放，加剧肾细胞(肾小管细胞、系膜细胞、足细胞等)炎症损伤，同时 TWEAK/Fn14 介导的肾脏纤维化也会进一步加重肾脏功能和结构破坏，从而导致疾病活动性和预后不良风险增加^[23,24]。Xue 等^[25]实验也指出，抑制 TWEAK 表达能阻断 NF- κ B 信号通路激活和缓解肾间质纤维化，进而改善 LN 小鼠肾功能。

T 细胞过度活化介导的异常免疫应答已被证实是 SLE 发病及相关器官功能损害的重要原因，T 细胞免疫应答过程位于 B 细胞上游，T 细胞异常免疫应答能过度激活 B 细胞，促使 B 细胞产生大量自身抗体形成免疫复合物，激活补体导致 LN 发生发展^[26]。CD4⁺T、CD8⁺T 细胞由 T 细胞表面不同表达分化抗原产生，CD4⁺T 是免疫系统的指挥中枢，能调节 T 细胞和 B 细胞的增殖分化，以产生高亲和力抗体应对损伤；CD8⁺T 具有细胞毒性，能促进 B 细胞分化成熟和 Ig 分泌^[27]。CD4⁺T/CD8⁺T 比例是反映免疫调节的重要参数，其值异常程度越高反映免疫应答异常更严重。近年有研究报道，SLE 患者外周血 CD4⁺T/CD8⁺T 降低，且 CD4⁺T/CD8⁺T 降低患者疾病活动性增加有关^[9]。然而关于 CD4⁺T/CD8⁺T 对 LN 患者的意义尚不清楚。本研究结果显示，LN 患者外周血 CD4⁺T、CD4⁺T/CD8⁺T 降低和 CD8⁺T 升高，并随着疾病活动性增加而变化。这与 Wang 等^[28]报道 LN 患者外周血 CD4⁺T 降低和 CD8⁺T 升高的结果相符。结果还显示，CD4⁺T/CD8⁺T 升高为 LN 患者预后不良的独立保护因素，这说明 CD4⁺T/CD8⁺T 降低与 LN 患者疾病活动度减轻和肾脏预后不良风险降低有关。分析其原因可能是，CD4⁺T/CD8⁺T 降低反映 T 细胞免疫应答异常，T 细胞功能向 CD8⁺T 细胞偏移，CD8⁺T 不仅能通过自身细胞毒性加剧肾细胞炎症反应，还能促进 B 细胞分泌更多的自身抗体形成免疫复合物，增强肾脏免疫复合物沉积，导致肾功能和结构损害进一步加重，进而促进疾病活动性和预后不良风险增加^[29]。

本研究结果还发现，除了疾病活动性能影响 LN 患者 ESRD 外，CKD 分期、eGFR、诱导治疗后完全缓解也能独立影响 LN 患者肾脏预后。考虑原因可能是，CKD 分期越高和 eGFR 越低说明 LN 患者肾功能更差，因此 CKD 分期 4 期患者 ESRD 风险更高，eGFR 越高的患者 ESRD 风险更低；诱导治疗后完全缓解说明治疗效果更好，疾病控制程度更高，因此 ESRD 风险更低^[30]。本研究 ROC 曲线显示，血清 NETs、TWEAK 和外周血 CD4⁺T/CD8⁺T 分别为 1.27 ng/mL、1321.03 ng/mL、0.74 时，预测 LN 患者 ESRD 的 AUC 为 0.790、0.788、0.799，血清 NETs、TWEAK 和外周血 CD4⁺T/CD8⁺T 联合预测的 AUC 为 0.943，较血清 NETs、TWEAK 和外周血 CD4⁺T/CD8⁺T 单独预测显著

增加。这说明血清 NETs、TWEAK 和外周血 CD4⁺T/CD8⁺T 可能成为 LN 患者肾脏预后预测指标,联合检测血清 NETs、TWEAK 和外周血 CD4⁺T/CD8⁺T 能更准确地预测 LN 患者肾脏预后。

综上所述,血清 NETs、TWEAK 水平升高和外周血 CD4⁺T/CD8⁺T 降低与 LN 患者疾病活动度加重有关,是肾脏预后不良的独立影响因素,血清 NETs、TWEAK 联合外周血 CD4⁺T/CD8⁺T 对 LN 患者肾脏预后具有较高的预测价值。但本研究存在病例来源单一、样本量较少,还需多中心、大样本量研究进一步验证;同时本研究随访时间较短,关于血清 NETs、TWEAK 和外周血 CD4⁺T/CD8⁺T 与 LN 患者长期肾脏预后的关系还需进一步研究。

参考文献(References)

- [1] 沈 南,赵毅,段利华,等. 系统性红斑狼疮诊疗规范[J]. 中华内科杂志, 2023, 62(7): 775-784.
- [2] 张辉,杨念生,鲁静,等. 狼疮肾炎诊疗规范[J]. 中华内科杂志, 2021, 60(9): 784-790.
- [3] 刘瑞华,余学清,阳晓. 狼疮肾炎发病机制的研究进展[J]. 中华肾脏病杂志, 2019, 35(12): 950-953.
- [4] 程怡,陈亚琳,相新新. 中性粒细胞胞外诱捕网在相关疾病中的作用[J]. 生命的化学, 2023, 43(5): 735-741.
- [5] 杨冬梅,祝静,肖剑波,等. 系统性红斑狼疮患者外周血中性粒细胞自噬和胞外诱捕网形成增加[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2023, 39(4): 356-362.
- [6] Xu WD, Zhao Y, Liu Y. Role of the TWEAK/Fn14 pathway in autoimmune diseases[J]. Immunol Res, 2016, 64(1): 44-50.
- [7] Lauvsnes MB, Tjensvoll AB, Maroni SS, et al. The blood-brain barrier, TWEAK, and neuropsychiatric involvement in human systemic lupus erythematosus and primary Sjögren's syndrome [J]. Lupus, 2018, 27(13): 2101-2111.
- [8] Linke A, Tiegs G, Neumann K. Pathogenic T-cell responses in immune-mediated glomerulonephritis[J]. Cells, 2022, 11(10): 1625.
- [9] 张钟元,刘姗姗,王凯,等. 系统性红斑狼疮患者血清 TNF- α 表达与 T 淋巴细胞亚群的关系 [J]. 分子诊断与治疗杂志, 2022, 14(11): 1883-1886.
- [10] 曾彩虹,刘志红. ISN/RPS 狼疮性肾炎病变定义及分型修订共识 [J]. 肾脏病与透析肾移植杂志, 2019, 28(1): 47-51.
- [11] Stevens PE, Levin A. Kidney Disease: Improving Global Outcomes Chronic Kidney Disease Guideline Development Work Group Members. Evaluation and management of chronic kidney disease: synopsis of the kidney disease: improving global outcomes 2012 clinical practice guideline [J]. Ann Intern Med, 2013, 158 (11): 825-830.
- [12] 中国狼疮肾炎诊断和治疗指南编写组. 中国狼疮肾炎诊断和治疗指南[J]. 中华医学杂志, 2019, 99(44): 3441-3455.
- [13] Chen W, Liu Q, Chen W, et al. Outcomes of maintenance therapy with tacrolimus versus azathioprine for active lupus nephritis: a multicenter randomized clinical trial[J]. Lupus, 2012, 21(9): 944-952.
- [14] Mok C C, Ying K Y, Ng W L, et al. Long-term outcome of diffuse proliferative lupus glomerulonephritis treated with cyclophosphamide [J]. The American journal of medicine, 2006, 119 (4): 355. e25-355. e33.
- [15] 杨文卓,王欣,陈威,等. 生物制剂在狼疮肾炎治疗中的应用[J]. 中华肾脏病杂志, 2023, 39(7): 552-558.
- [16] 孙凌云,刘昱东. 狼疮肾炎诊治新进展[J]. 中华临床免疫和变态反应杂志, 2022, 16(5): 545-547.
- [17] Ni Y, Hu BC, Wu GH, et al. Interruption of neutrophil extracellular traps formation dictates host defense and tubular HOXA5 stability to augment efficacy of anti-Fn14 therapy against septic A KI [J]. Theranostics, 2021, 11(19): 9431-9451.
- [18] Tong S, Yang S, Li T, et al. Role of neutrophil extracellular traps in chronic kidney injury induced by bisphenol-A[J]. J Endocrinol, 2019, 2(1): 125-134.
- [19] 曹文洁,许毛,余惠凡,等. 中性粒细胞胞外诱捕网在肾脏疾病中的作用[J]. 华中科技大学学报(医学版), 2023, 52(2): 276-282.
- [20] He H, Ge J, Yi S, et al. Ginkgolide A downregulates transient receptor potential (melastatin) 2 to protect cisplatin-induced acute kidney injury in rats through the TWEAK/Fn14 pathway: ginkgolide a improve acute renal injury [J]. Hum Exp Toxicol, 2023, 1 (42): 9603271231200868.
- [21] Zaghoul MS, Abdelrahman RS. Nilotinib ameliorates folic acid-induced acute kidney injury through modulation of TWEAK and HSP-70 pathways[J]. Toxicology, 2019, 11(427): 152303.
- [22] 马松鹤,夏令杰,陶熔,等. 环孢素对系统性红斑狼疮模型小鼠的肾保护作用及其机制研究[J]. 中国药房, 2018, 29(24): 3381-3386
- [23] Xu Y, Wei HT, Jing HY, et al. Emerging role of TWEAK-Fn14 axis in lupus, a disease related to autoimmunity and fibrosis [J]. Int J Rheum Dis, 2022, 25(1): 21-26.
- [24] 田浩,汪坚,张晓君,等. 不同分期慢性肾脏病患者血清 Klotho 蛋白、FGF-23、RBP4、TWEAK 水平与肾功能的相关性研究 [J]. 现代生物医学进展, 2021, 21(18): 3477-3481.
- [25] Xue L, Zhang Y, Xu J, et al. Anti-TWEAK antibody alleviates renal interstitial fibrosis by increasing PGC-1 α expression in lupus nephritis[J]. J Inflamm Res, 2021, 5(14): 1173-1184.
- [26] Li H, Boulougoura A, Endo Y, et al. Abnormalities of T cells in systemic lupus erythematosus: new insights in pathogenesis and therapeutic strategies[J]. J Autoimmun, 2022, 10(132): 102870.
- [27] Chen PM, Tsokos GC. T cell abnormalities in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus: an update [J]. Curr Rheumatol Rep, 2021, 23(2): 12.
- [28] Wang H, Lan L, Chen J, et al. Peripheral blood T-cell subset and its clinical significance in lupus nephritis patients [J]. Lupus Sci Med, 2022, 9(1): e000717.
- [29] Chen A, Lee K, Guan T, et al. Role of CD8⁺T cells in crescentic glomerulonephritis [J]. Nephrol Dial Transplant, 2020, 35 (4): 564-572.
- [30] 吴雨茜,彭媛,刘妍,等. 狼疮肾炎患者肾脏预后预测列线图的建立[J]. 中华肾脏病杂志, 2017, 33(6): 401-409.