DOI: 10.16016/j.1000-5404.1999.03.030

1.2 病毒

HFRS病毒 R_{22}株由中国预防医学科学院病毒学研究所提供。

1.3 受染 HECs的细胞的周期分析

应用流式细胞术(Flow Cytometry, FCM)对受染48 h后的 HECs的细胞周期进行分析,基本步骤如下:取病毒感染48 h后的 HECs,0.25%胰酶消化细胞,PBS制备细胞悬液(1.0×10^6/ml),加至70%冷乙醇中固定。离心,轻吸弃上清,余少量液体,振悬细胞沉淀,摇匀。RNA酶室温消化10 min,碘化丙啶(PI)室温染色10 min。用流式细胞计(FACStar PLUS,美国Becton-Dickinson公司产品)对细胞进行自动分析和计数。设置正常细胞对照组。

1.4 受染 HECs的细胞 DNA合成率分析

在应用 FCM分析受染细胞细胞周期的同时,采用^{3}H-TdR掺入法检测受染细胞 DNA合成率的改变。其基本步骤如下:用96孔细胞培养板制备 HECs单层细胞(约2000个细胞/孔),病毒感染36 h后,加入^{3}H-TdR 37 kBq/孔(^{3}H-TdR购自中国科学院原子核研究所),继续培养12 h,吸弃上清,PBS充分漂洗,0.25%胰酶消化细胞,将消化液收至闪烁瓶内。再用 PBS吹吸培养孔2次,一并收集到同一闪烁瓶内。加入水溶性闪烁液20 ml至完全溶液,室温放置2 h后,用 LKB液体闪烁计数仪测定每瓶 Bq(衰变率/min,Bq=dpm=cpm/E,cpm-计数率/分,E-管效应)。同时设置正常细胞对照组。

2 结果

2.1 受染 HECs细胞周期的分析

FCM测定细胞周期各时相的百分比,数据显示为一维单参数直方图,经计算机处理,测得感染细胞周期各时相的百分比。经统计学处理,感染组 G_2+M+S期细胞百分比(23.8%±2.0%)明显低于正常细胞组(36.2%±1.8%),两者相差非常显著。

2.2 受染细胞 DNA合成率的测定

感染细胞组^{3}H-TdR摄入量为(1498.75±91.67) Bq/孔,而正常细胞组为(1698.95±191.71) Bq/孔,经统计学处理,感染组^{3}H-TdR摄入量明显低于正常细胞组。两者相差显著($P<0.05$)。

3 讨论

张继明等[3]用76.118和 UR两株汉坦病毒感染 HECs,应用 FCM检测 HECs的细胞周期,发现病毒感染组 S期细胞的相对数明显低于正常细胞对照组($P<0.05$),认为 HFRS病毒感染对 HECs的细胞周期进程有明显的影响。为了解 HFRS病毒 R_{22}株感染是否可以影响 HECs的细胞周期及细胞 DNA合成,本实验在应用 FCM检测细胞周期的同时,采用^{3}H-TdR掺入法对感染细胞 DNA合成率进行检测,结果发现在早期(48 h)病毒感染组 G_2+M+S期细胞百分数明显低于正常细胞对照组($P<0.01$),对^{3}H-TdR的摄入量也明显减少($P<0.05$),表明 HFRS病毒感染,可明显减缓 HECs细胞周期进程,降低细胞 DNA合成率,抑制细胞的增殖,该结果为 HFRS病毒对 HECs的直接致病作用提供了证据,此外,这是否能部分说明 HFRS病毒对 HECs直接致病作用的机制,尚待进一步的研究。

关键词 肾综合征出血热病毒;内皮细胞;细胞周期;DNA合成率

中图法分类号 R373.32

参考文献

1 朱 平,杨为松,刘 健,等.肾综合征出血热病毒感染人血管内皮细胞的观察.中华医学杂志,1989,69(10):588

2 Jaffe E A, Nachman R L, Becker C G, *et al*. Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. Identification by morphological criteria. J Clin Invest, 1973, 52(11): 2745

3 张继明,孙 涛,杨佩珍,等.汉坦病毒感染对人血管内皮细胞的细胞周期进程的影响.中国媒介生物学控制杂志,1994,5(特1):87

(收稿:1998-05-19;修回:1999-01-04)

(编辑 刘 鹏)

大剂量环磷酰胺冲击治疗儿童难治性肾病35例疗效观察

The observation of effects of CTX pulse therapy on 35 cases of children with refractory nephrotic syndrome

张连丰* 王晓燕 夏正坤 高远赋 伏 洁 刘光陵 王兆全 孙安琪 (南京军区南京总医院南京大学医学院临床学院儿科)南京,210002

提 要 目的:采用大剂量环磷酰胺冲击疗法治疗35例儿童难治性肾病,对其疗效和副作用进行观察。

* 张连丰,男,34岁,主治医师,学士

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

方法: 环磷酰胺每次 650~ 950 mg /m^2,每月静脉注射 1次,共 10~ 12次,总剂量不超过 300 mg /kg,结合强的松 0. 5~ 1 mg· kg^{-1}· d^{-1}维持量治疗。结果: 除 2例放弃治疗外,余 33例肾病中临床完全缓解达 87. 9% (29/33),尤其对微小病变及系膜增殖性肾小球肾炎疗效显著,局灶节段性肾炎有较好疗效。随访 13~ 27月,平均 20月,两例复发 (2/33)占 6. 7%。副作用有轻度外周血白细胞计数偏低,恶心呕吐,脱发等,肝肾功能治疗前后无变化。结论: 大剂量环磷酰胺冲击疗法治疗儿童难治性肾病,具有提高其缓解率,减少和推迟复发等优点,虽有一定的副作用,但在临床仔细监护下仍是一种较为有效和安全的疗法。

自 60年代后期开始应用环磷酰胺 (Cytoxan, CTX)治疗小儿肾病综合征以来,取得了一定的疗效。但口服 CTX累积剂量大,毒副作用重,一直存在争议。近年国外学者已将间歇、大剂量、静脉用 CTX即所谓"CTX冲击治疗"应用于儿科难治性肾病病例的治疗,但国内报道仍较少。我科自 1994年 9月起,用该疗法治疗小儿肾病综合征的激素耐药病例和激素依赖病例,迄今已完成 35例病人的临床观察和短期随访,证实该疗法是儿童难治性肾病的一种有效治疗方法。

1　资料和方法

1. 1　临床资料

本组男 23例,女 12例,男女比为 11: 6,年龄 2~ 14岁,平均年龄 6. 9岁。35例小儿难治性肾病均符合 1981年儿科肾脏疾病科研协作组制定的诊断标准,共中包括单纯性肾病 7例,肾炎型肾病 28例,均为原发性肾病综合征。CTX冲击治疗前 35例均经过激素治疗 6月至 4年。30例为激素耐药 (经强的松 2 mg· kg^{-1}· d^{-1}治疗 8周后无效): 激素+ 长春新碱冲击治疗 6例无效,激素+ 雷公藤治疗 12例无效,余者 12例激素治疗一年以上无效; 5例为激素依赖 (经强的松中长程治疗后缓解,减量或停药 2周内复发,并重复 3次以上者)。

1. 2　病理诊断

本组病例经我科单人抽吸法穿刺肾活检,病理分类采用 1982年世界卫生组织制定的分类标准[1]: 即微小病变型肾病 (MCN) 4例,局灶节段性肾小球硬化型肾病 (FSGS) 7例,系膜增生性肾小球肾炎 (MsPGN) 19例,膜性肾病 (MN) 2例,膜性增殖性肾小球肾炎 (MPGN) 3例。

1. 3　治疗方案

强的松+ 大剂量环磷酰胺冲击: 即在强的松 2 mg· kg^{-1}· d^{-1}治疗 8周后,将强的松减量为 2 mg· kg^{-1}· d^{-1}隔日顿服,同时加和 CTX冲击,即 CTX每次 650~ 950 mg/m^2,于生理盐水稀释后静滴,同时水化疗法,补液 50~ 100 ml/kg /次,每月冲击一次,每次最大剂量不超过 1 g,总疗程 10~ 12次,积累量最大剂量不超过 12 g(300 mg /kg)。间歇期予强的松 0. 5~ 1 mg/kg维持量治疗至 CTX冲击疗程 3~ 4次后渐减量。

1. 4　疗效判断

以尿常规和 24 h尿蛋白定量的作为判断标准。有效: 尿常规正常,且 24 h尿蛋白定量小于 100 mg;无效: 有血尿、蛋白尿或管型, 24 h尿蛋白定量大于 100 mg。

2　结果

2. 1　疗效观察

35例病例中,有 2例病情较重,在冲击治疗 1~ 2疗程后,家长放弃治疗,于出院后 6月内死亡 (如下述)。余 33例小儿难治性肾病中, 29例有效,为尿常规完全正常,总有效率 87. 9%。大部分病例在 CTX冲击治疗 1次后的 2~ 5 d尿蛋白定性即有减少, 26例经 CTX冲击 2~ 3次后第 2~ 5天尿常规转阴,第 3~ 8天临床症状消失并持续缓解, 3例冲击 4次以上尿常规转阴。有 4例经 CTX冲击 5~ 10次后,尿蛋白有好转但仍波动在+ ++ 之间,血尿减轻,尿红细胞计数由原来的 150× 10^3~ 1000× 10^3 /ml降至 5× 10^3~ 100× 10^3 /ml,临床症状好转。

2. 2　肾功能的改变

所有病例的肾功能在冲击治疗前后,均无明显改变。

2. 3　疗效与病理的关系

MCNS 4例有效, MsPGN 19例中 17例有效,仅 2例无效。病理为 FSGS7例中 5例有效, 1例无效, 1例因肾活检肾小球硬化率为 70% (7/10)冲击 1次后放弃治疗后,并发原发性腹膜炎死亡。MN 22例, 1例有效, 1例无效。MPGN 3例中, 2例有效, 1例经 CTX冲击两次后放弃治疗后并发重症肺炎死亡。

2. 4　副作用

本组 35例儿童难治性肾病中有 8例出现外周血白细胞计数偏低: WBC计数: 3. 4× 4. 0× 10^9 /L范围,每次有 CTX冲击后 1~ 2周均恢复正常。有 11例患儿在 CTX冲击后于第 1~ 2天出现恶心、呕吐 1~ 2次,第 3天后消失。有 3例患儿出现轻度脱发,另有 7例出现黑发转淡等发质改变,多于第三次 CTX冲击以后出现, CTX冲击疗程结束后 2~ 4月,平均 3个月内恢复正常。未出现出血性膀胱炎和肝功能改变。因随访时间尚短,对性腺发育及成年婚育情况未能观察到。

2. 5　复发

疗程结束后,随访 1~ 2年, 33病例中仅有 2例复发,均为微小病变型,临床表现为激素依赖者,占 6. 7% (2/33)。

以上观察结果见表 1。

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

表 1 环磷酰胺冲击疗效观察

	例数	有效			无效	复发	副反应	死亡
		2~3次	4次以上					
微小病变 (MCN)	4	4				2	3	
局灶节段性肾小球硬化 (FsGS)	7	4	1	1			3	1
系膜增生性肾小球肾炎 (MsPGN)	19	16	1	2			4	
膜性肾炎 (MN)	2		1	1				
膜性增生性肾小球肾炎 (MPGN)	3	2					1	1
合计	35	29		4		2	11	2

3 讨论

小儿难治性肾病,目前尚无特效治疗措施,CTX是细胞毒药物中治疗肾病综合征的有效药物之一[2~3]。国内外均曾报道与强的松合用能减少肾病复发,延长缓解期,并可能使部分单用激素未能使尿蛋白转阴的病例得到完全缓解。有研究资料表明长期、间断、大剂量、系统用 CTX 静脉点滴即所谓冲击治疗对狼疮性肾炎是安全有效的。近年来,国内外科学家者将这种疗法试用于儿童难治性肾病的治疗[4~6],但例数尚少,观察亦不完全。

本组 35例儿童难治性肾病 (激素依赖和抵抗病例) 均用大剂量 CTX 冲击治疗,除 2例放弃治疗后死亡外,临床完全缓解有效病例明显增多 (29/33),有效率为 87.9%,仅有 4例 CTX 冲击无效,占 12.1% (4/33),包括 MsPGN2例,FSGS和 MN各 1例。尤其病理类型为微小病变型及系膜增殖性肾小球肾炎者,效果更显著 (21/33)。由此可见,对于儿童难治性肾病来说,CTX 冲击疗法是一种较为有效的方法。但由于我们的病例多为 MsPGN 和微小病变等较轻病理类型,其它类型病例数较少,且随访期短,因而,对局灶节段性肾小球硬化、膜性肾炎和膜增殖性肾小球肾炎的疗效尚有待于更多病例的观察。

在 CTX 用药过程中虽可获得一定的疗效,但这种细胞毒性药物不仅对增生活跃的肿瘤细胞有抑制和杀伤作用,而且对增殖较快的精细胞有毒害作用,小剂量连续口服 CTX 治疗肾病剂量超过 3 mg $kg^{-1}\cdot d^{-1}$,累积总量 300 mg/kg时除有骨髓抑制外周血白细胞数减少、恶心呕吐胃肠道反应、脱发、出血性膀胱炎、感染等,亦有文献报告青春发育期用药对性腺损害较重[7],随访证明婚后不育,连续口服累积量达 312~1325 mg/kg则无精子产生,认为 CTX 对精子的损害程度与剂量、疗程密切相关[8],但环磷酰胺大剂量冲击或中等剂量间歇给药疗效比小剂量持续应用 (口服) 为佳[9],本组病例多为冲击治疗后 2~3次即 CTX 剂量 1500 mg/m^2时显效。虽有 11例第一次 CTX 冲击时发生轻度的恶心呕吐等胃肠道反应,经对症治疗后很快消失,血细胞轻度减少亦很快恢复正常。脱发发生率不高且程度较轻。未见出血性膀胱炎和肝功能损伤。作者认为大剂量 CTX 冲击疗法每次用药有一个月的间歇期,随着 CTX 体内代谢、体内积累量小,结合水化疗法加强代谢对机体的毒性亦会相应减低,较小剂量持续口服者总药量要小,因而,是一种较为安全的疗法。CTX 冲击疗法的机制及其对性腺的影响尚有待于进一步的研究。

我们建议对那些正规激素治疗无效或依赖的儿童难治性肾病病变,特别是经济能力有限的非青春期病人,可试用 CTX冲击治疗。但对于接近青春期的男孩仍应慎用。

关键词 肾病综合征;环磷酰胺;冲击治疗;儿童
中图法分类号 R726.92; R979.5

参考文献

1 姜新猷."关于小儿肾小球疾病临床分类和治疗的建议"的修订意见.中华儿科杂志,1981,19(4):241
2 王文英.应用激素及环磷酰胺治疗小儿肾炎型肾病.山西医药杂志,1992;21(3):157
3 蒋百康.环磷酰胺与强的松联合治疗小儿肾病综合征的远期疗效观察.苏州医学院学报,1990,10(3):20
4 Mattoo T K. Kidney biopsy prior to cyclophosphamide therapy in primary nephrotic syndrome. Pediatr-Nephrol,1991,5(5):617
5 Gandhi R, Thomas C. Cyclophosphamide puise therapy in frequently relapsing nephrotic syndrome [letter]. Nephron,1990,55(4):444
6 Jones B F. Cyclophosphamide pulse therapy in frequently relapsing nephrotic syndrome. Nephron,1993,63(4):472
7 Radovan Bogdanovic *et al*. Testicular function following cyclophosphamide treatment for childhood nephrotic syndrome: long-term follow-up study. Pediatr Nephrol,1990,4(5):451
8 郭仁寿.环磷酰胺治疗小儿难治性肾病综合征对性腺的影响的观察.实用儿科杂志,1991,6(5):247
9 杨藻宸.医用药理学.北京:人民卫生出版社,1984.904~906

(收稿:1998-05-20;修回:1998-12-10)
(编辑 张大春)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net