

·论著·

甲基强的松龙与环磷酰胺冲击治疗对狼疮肾炎患儿抗氧化功能的影响

姜红, 罗钢, 王淑兰

(中国医科大学附属第一医院儿科, 辽宁 沈阳 110001)

[摘要] 目的 探讨狼疮肾炎(LN)患儿血中一氧化氮(NO)、脂质过氧化物(LPO)、超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-px)和谷胱甘肽(GSH)的变化及甲基强的松龙(MP)与环磷酰胺(CTX)冲击治疗对它们的影响。方法 采用化学分析法检测18例活动期LN患儿MP和CTX冲击治疗前、后血中上述5项指标,对其中经治疗后达稳定期的16例LN患儿及健康儿童23例也检测了上述5项指标。结果 稳定期LN患儿仅GSH低于对照组($P < 0.05$),NO,LPO,SOD和GSH-px与正常对照组比较差异无显著性。活动期LN患儿5项指标与对照组及稳定期比较差异有显著性($P < 0.05$ 或 0.01)。NO,LPO与抗ds-DNA抗体、24h尿蛋白定量、尿素氮(BUN)、血肌酐(Scr)和血沉(ESR)呈显著正相关($P < 0.01$);与补体C3、C4、内生肌酐清除率(Ccr)呈显著负相关($P < 0.05$ 或 0.01);而SOD,GSH-px和GSH、抗ds-DNA抗体、24h尿蛋白定量、BUN、Scr和ESR呈显著负相关($P < 0.05$ 或 0.01);与C3、C4、Ccr呈显著正相关($P < 0.05$ 或 0.01)。肾功能不全组5项指标水平与肾功能正常组及对照组比较均有显著性差异($P < 0.05$ 或 0.01)。结论 MP和CTX冲击治疗能显著降低NO,LPO水平,升高SOD,GSH-px和GSH水平。NO,LPO,SOD,GSH-px和GSH可能参与了LN的发病过程,动态观察上述指标有助于判断LN的活动性、肾脏损害程度和治疗效果。

[中国当代儿科杂志,2003,5(3):229-233]

[关键词] 狼疮肾炎;氧化损伤;甲基强的松龙;环磷酰胺

[中图分类号] R593.24⁺2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-8830(2003)03-0229-05

Effect of Methylprednisolone and Cyclophosphamide Impulsive Therapy on the Anti-Oxidation Function in Children with Lupus Nephritis

Hong JIANG, Gang LUO, Shu-Lan WANG. Department of Pediatrics, First Affiliated Hospital, China Medical University, Shenyang 110001, China (Email: ssdgyz@163.com)

Abstract: **Objective** To study the changes of blood nitric oxide (NO), lipid peroxide (LPO), superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GSH-px) and glutathione (GSH) levels and the effect of impulsive therapy of methylprednisolone (MP) and cyclophosphamide (CTX) on children with lupus nephritis (LN). **Methods** The blood levels of NO, LPO, SOD, GSH-px and GSH were detected by chemical analysis in 18 active patients with this disorder (the active group) before and after MP and CTX impulsive therapy. Of the 18 cases, 16 who had become to inactive after treatment were recruited in this study. Twenty-three healthy children were served as the control group. **Results** Except the decreased GSH level, the levels of NO, LPO, SOD and GSH-px in the inactive group did not differ from those of the control group. The levels of NO and LPO in the active group were significantly higher, SOD, GSH+px and GSH were significantly lower than those of the control group and the inactive group ($P < 0.05$ or 0.01). NO and LPO in the active group were positively correlated with anti-dsDNA antibody, 24-hour proteinuria, blood urea nitrogen, serum creatinine and erythrocyte sedimentation rate, negatively correlated with complement C₃, complement C₄ and endogenous creatinine clearance rate. SOD, GSH-px and GSH were negatively correlated with anti-dsDNA antibody, 24-hour proteinuria, blood urea nitrogen, serum creatinine and erythrocyte sedimentation rate, positively correlated with

[收稿日期] 2002-11-26; [修回日期] 2003-03-18

[基金项目] 辽宁省自然科学基金资助项目(962283)

[作者简介] 姜红(1961-),女,副教授,副主任医师,硕士生导师。主攻方向:小儿肾脏疾病。

[通讯作者] 姜红,辽宁省沈阳市和平区南京北街155号,邮编:110001。

compliment C₃, compliment C₄ and endogenous creatinine clearance rate. The levels of the five parameters (NO, LPO, SOD, GSH-px and GSH) in children with LN complicated by renal damage were significantly different from those in the control group and those patients without renal damage. **Conclusions** The levels of NO and LPO would decrease and the levels of SOD, GSH-px and GSH would elevate after treatment with MP and CTX. NO, LPO, SOD, GSH-px and GSH may take part in the pathogenesis of LN. Detecting the above five parameters may help in monitoring the progress, the extent of renal damage of LN and therapeutic effect for LN patients.

[Chin J Contemp Pediatr, 2003, 5(3): 229 - 233]

Key words: Lupus nephritis; Oxidative injury; Methylprednisolone; Cyclophosphamide

狼疮肾炎(lupus nephritis, LN)是一种免疫复合物介导性炎症,免疫复合物的沉积可激活炎症细胞释放大量的氧化氮(NO)、超氧阴离子和其它活性氧自由基(ROS),使机体产生氧化损伤,加重肾脏损害^[1]。目前国内外多采用甲基强的松龙(MP)与环磷酰胺(CTX)冲击治疗LN^[2,3]。已有研究表明经MP与CTX冲击治疗使LN病情稳定时,机体氧化损伤明显减轻^[1],但此时机体抗氧化功能如何以及MP与CTX冲击前后抗氧化指标的动态变化情况国内外尚未见报道。我们检测LN患儿在MP及CTX冲击治疗前后及稳定期时血中NO、脂质过氧化物(LPO)、超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-px)和谷胱甘肽(GSH)的含量,旨在进一步探讨ROS损伤和机体抗氧化功能对LN发生、发展的影响以及MP与CTX治疗LN的作用机制。

1 对象与方法

1.1 研究对象

18例患者均符合1982年美国风湿病学会制定的系统性红斑狼疮及LN诊断标准^[4],均为活动期患儿,其中男2例,女16例,年龄9~14岁,平均12岁,病程15d~8年,平均10个月。均为初治或近8周内未接受糖皮质激素、细胞毒免疫抑制剂及维生素C、维生素E等抗氧化剂治疗的LN患儿。另根据血肌酐(Scr)水平将LN患儿分为两组:肾功能不全组5例,Scr为(261.67±48.29)μmol/L;肾功能正常组13例,Scr为(80.24±21.51)μmol/L。经系统治疗后18例中的16例病情达稳定期^[5]。23例健康儿童为对照组,其中男3例、女20例,年龄8~14岁,平均11.8岁。

1.2 方法

1.2.1 治疗方法 18例活动期LN患儿均给予MP 15~30 mg/kg加入10%葡萄糖250 ml中静脉滴注,连用3d,继之强的松常规口服,必要时MP冲击两个疗程;在MP冲击同时给予CTX 8~12 mg/kg加入生理盐水100 ml中静脉滴注,时间不少于1h,连用2d,

以后每2周冲击治疗1次,狼疮活动控制后可每3个月冲击治疗1次,累计总量≤150 mg/kg。

1.2.2 标本采集及处理 正常对照组、稳定期LN、活动期LN患儿在第1次MP和CTX冲击前1天及冲击结束后第2天均采取空腹静脉血4.0 ml,其中1.5 ml置于有0.1 ml肝素抗凝管中,从中取50 μl加入5.0 ml生理盐水中混匀,3 000 r/min离心10 min,弃上清,留沉淀物RBC备检SOD,其余血备检GSH-px和GSH;非抗凝血2.5 ml,室温下静置3 h后,3 000 r/min离心10 min,取血清放入安芬道夫管中备检LPO和NO。所有标本均置-30℃冰箱中保存,批量检测。

1.2.3 检测方法 NO含量测定采用镀铜镉粒还原法;LPO测定采用硫代巴比妥酸比色法;SOD测定采用亚硝酸盐法;GSH-px测定:DTNB直接法;GSH测定:分光光度比色法^[6]。同时对所有LN患者常规检测抗ds-DNA抗体、补体C₃,C₄和24 h尿蛋白定量、尿素氮(BUN)、血沉(ESR)、血浆白蛋白(ALB)等指标(活动期上述指标与冲击前实验指标同时采血检测),并计算内生肌酐清除率(Ccr)。公式为:

$$Ccr = \frac{0.55 \times \text{身长(cm)}}{Scr(\text{mg/dl})}$$

1.3 统计学处理

所有数据经计算机SPSS统计软件系统分析处理。采用方差分析及均数间两两比较,配对t检验,直线相关分析方法。

2 结果

2.1 LN患儿活动期、稳定期与正常对照组血中各指标水平比较

LN活动期患儿NO、LPO明显高于对照组(均 $P < 0.01$);SOD、GSH-px、GSH明显低于对照组(均 $P < 0.01$)。稳定期时NO、LPO明显低于活动期($P < 0.01$ 或0.05);SOD、GSH-px、GSH明显高于活动期(均 $P < 0.01$),但GSH仍低于对照组($P < 0.05$)。见表1。

表 1 LN 活动期、稳定期及对照组各指标水平

Table 1 Levels of five parameters in three groups						($\bar{x} \pm s$)
组别	n	NO($\mu\text{mol/L}$)	LPO($\mu\text{mol/L}$)	SOD($\mu\text{U/L}$)	GSH - px(U/mg)	GSH(mg/g)
对照组	23	51 $\pm$ 8	5.9 $\pm$ 1.4	2110 $\pm$ 384	141 $\pm$ 28	1.26 $\pm$ 0.21
LN 活动期	18	79 $\pm$ 18 ^a	9.9 $\pm$ 1.7 ^a	1221 $\pm$ 303 ^a	78 $\pm$ 22 ^a	0.41 $\pm$ 0.05 ^a
LN 稳定期	16	59 $\pm$ 15 ^c	6.4 $\pm$ 1.6 ^d	1927 $\pm$ 392 ^c	125 $\pm$ 29 ^c	0.92 $\pm$ 0.18 ^{b,c}

注 :a 与对照组比较 $P < 0.01$;b 与对照组比较 $P < 0.05$;c 与 LN 活动期比较 $P < 0.01$;d 与 LN 活动期比较 $P < 0.05$

2.2 LN 患儿肾功能不全组、肾功能正常组与正常对照组血中各指标水平比较

LN 活动期肾功能不全组 NO ,LPO 明显高于对照组 (均 $P < 0.01$) ;SOD ,GSH - px ,GSH 明显低于对照组 (均 $P < 0.01$) 。肾功能正常组 NO ,LPO 明

显低于肾功能不全组 (均 $P < 0.01$) ,但仍高于对照组 (均 $P < 0.05$) ;SOD ,GSH - px ,GSH 明显高于肾功能不全组 ($P < 0.01$ 或 0.05) ,但 SOD 和 GSH 仍低于对照组 ($P < 0.01$ 或 0.05) 。见表 2。

表 2 LN 患儿肾功能不全组、肾功能正常组及对照组各指标水平

Table 2 Levels of five parameters in the groups of abnormal and normal renal functions and control group

						($\bar{x} \pm s$)
组别	n	NO($\mu\text{mol/L}$)	LPO($\mu\text{mol/L}$)	SOD($\mu\text{U/L}$)	GSH - px(U/mg)	GSH(mg/g)
对照组	23	51 $\pm$ 8	5.9 $\pm$ 1.4	2110 $\pm$ 384	141 $\pm$ 28	1.26 $\pm$ 0.21
肾功能不全组	5	104 $\pm$ 31 ^a	13.5 $\pm$ 3.6 ^a	893 $\pm$ 322 ^a	75 $\pm$ 24 ^a	0.32 $\pm$ 0.08 ^a
肾功能正常组	13	73 $\pm$ 19 ^{b,c}	9.0 $\pm$ 3.2 ^{b,c}	1354 $\pm$ 357 ^{a,c}	122 $\pm$ 34 ^c	0.69 $\pm$ 0.18 ^{b,d}

注 :a 与对照组比较 $P < 0.01$;b 与对照组比较 $P < 0.05$;c 与肾功能不全组比较 $P < 0.01$;d 与肾功能不全组比较 $P < 0.05$

2.3 LN 活动期患儿血中各指标与临床常规实验室指标之间的关系

NO ,LPO 与抗 ds - DNA 抗体、24 h 尿蛋白定量 ,BUN ,Scr ,ESR 呈显著的正相关性 (均 $P < 0.01$) ,与补体 C3、补体 C4、Ccr 呈显著负相关 (P

< 0.01 或 0.05) ;SOD ,GSH - px ,GSH 与抗 ds - DNA 抗体、24 h 尿蛋白定量、BUN ,Scr ,ESR 呈显著负相关 ($P < 0.01$ 或 0.05) ,与补体 C3、补体 C4、Ccr 呈显著正相关 (均 $P < 0.01$) 。见表 3。

表 3 LN 活动期患儿各指标与临床指标之间的相关系数

Table 3 The correlation coefficient between experimental and clinical parameters in the patients with active LN

实验室指标	NO	LPO	SOD	GSH - px	GSH
抗 ds - DNA 抗体	0.712 ^a	0.735 ^a	- 0.753 ^a	- 0.613 ^a	- 0.598 ^a
补体 C3	- 0.535 ^a	- 0.617 ^a	0.742 ^a	0.606 ^a	0.602 ^a
补体 C4	- 0.304 ^b	- 0.446 ^a	0.631 ^a	0.312 ^b	0.641 ^a
24 h 尿蛋白定量	0.457 ^a	0.529 ^a	- 0.761 ^a	- 0.647 ^a	- 0.494 ^a
BUN	0.561 ^a	0.632 ^a	- 0.435 ^a	- 0.589 ^a	- 0.527
Scr	0.748 ^a	0.608 ^a	- 0.524 ^a	- 0.318 ^b	- 0.632 ^a
Ccr	- 0.511 ^a	- 0.627 ^a	0.672 ^a	0.641 ^a	0.622 ^a
ESR	0.723 ^a	0.724 ^a	- 0.528 ^a	- 0.711 ^a	- 0.698 ^a

注 :a $P < 0.01$;b $P < 0.05$

2.4 MP 与 CTX 冲击治疗对 LN 患儿血中 5 项指标的影响
18 例活动期 LN 患儿经 MP 与 CTX 冲击治疗

1 个疗程后 ,NO 和 LPO 较冲击治疗前明显下降(均 $P < 0.05$) ,SOD ,GSH - px 和 GSH 较冲击治疗前明显升高(均 $P < 0.01$)。见表 4。

表 4 MP 与 CTX 冲击治疗前后各指标水平

Table 4 Levels of five parameters before and after MP and CTX impulsive therapy (n = 18, $\bar{x} \pm s$)					
组别	NO($\mu\text{mol/L}$)	LPO($\mu\text{mol/L}$)	SOD($\mu\text{U/L}$)	GSH - px(U/ mg)	GSH(mg/ g)
冲击前	79 $\pm$ 18	9.95 $\pm$ 1.7	1221 $\pm$ 303	78 $\pm$ 22	0.41 $\pm$ 0.05
冲击后	63 $\pm$ 21 ^b	7.4 $\pm$ 2.3 ^b	1731 $\pm$ 259 ^a	122 $\pm$ 34 ^a	0.82 $\pm$ 0.16 ^a

注 :a 与冲击前比较 $P < 0.01$;b 与冲击前比较 $P < 0.05$

2.5 MP 与 CTX 冲击治疗一个疗程对 LN 患儿临床实验室指标的影响
与冲击前比较 ,冲击后抗 ds - DNA 抗体阳性

率、24 h 尿蛋白定量、BUN、Scr 明显下降($P < 0.01$ 或 0.05) ,ALB、补体 C3、补体 C4、Ccr 明显升高($P < 0.01$ 或 0.05)。见表 5。

表 5 MP 与 CTX 冲击治疗前后临床指标水平

Table 5 Levels of clinical parameters before and after MP and CTX impulsive therapy (n = 18, $\bar{x} \pm s$)								
组别	抗 ds - DNA 抗体(+) (%)	ALB (g/L)	C3 (g/L)	C4 (g/L)	尿蛋白 (g/24 h)	BUN (mmol/L)	Scr ($\mu\text{mol/L}$)	Ccr (ml/min)
冲击前	53 $\pm$ 11	29 $\pm$ 15	0.532 $\pm$ 0.147	0.156 $\pm$ 0.093	4.5 $\pm$ 2.9	8.1 $\pm$ 3.4	171 $\pm$ 59	65 $\pm$ 27
冲击后	21 $\pm$ 5 ^a	36 $\pm$ 14 ^b	0.912 $\pm$ 0.387 ^a	0.201 $\pm$ 0.103 ^b	1.7 $\pm$ 1.1 ^a	6.5 $\pm$ 2.4 ^b	124 $\pm$ 46 ^a	77 $\pm$ 29 ^a

注 :a 与冲击前比较 $P < 0.01$;b 与冲击前比较 $P < 0.05$

2.6 MP 与 CTX 冲击治疗不良反应

18 例活动期 LN 患儿治疗过程中出现消化道症状 9 例次 ,主要表现为上腹部不适、恶心及呕吐 ;白细胞减少 1 例 ,减至 $3.7 \times 10^9/\text{L}$;谷丙转氨酶轻度升高 2 例 ;脱发 1 例 ;库欣样面容 1 例 ;合并肺部感染 2 例。上述不良反应均经对症处理后好转 ,未影响治疗。

3 讨论

本研究结果显示 ,活动期 LN 患儿血中 NO 和 LPO 明显高于稳定期和正常对照组 ,SOD ,GSH - px 和 GSH 明显低于另两组的水平 ,而稳定期 LN 患儿与正常对照组比较 ,除 GSH 稍低外 ,其它 4 项指标均无显著性差异 ,表明 LN 患儿不仅存在 ROS 引起的氧化损伤而且还存在抗氧化功能下降 ,这与 Blount 等^[7]的报道基本一致。NO 是一种活性很强的自由基 ,在 LN 活动期 ,体内循环免疫复合物沉积于肾小球和肾小管间质中 ,激活补体 ,吸引炎症细胞聚集并释放大量的 ROS ,故血中 NO 水平增高^[8]。同时 ,细胞膜磷脂成分中的高度不饱和脂肪酸受到

ROS 的攻击 ,产生脂质过氧化 ,导致 LPO 增高^[1] ,而 SOD 可阻断 ROS 连锁反应 ,抑制脂质过氧化 ,具有保护细胞膜、激活多种辅酶的功能 ,与 GSH - px 和 GSH 一起在清除 ROS、对抗 ROS 造成的氧化损伤中发挥作用 ,故在 LN 活动期 ,SOD ,GSH - px 和 GSH 因消耗增加而体内含量明显下降 ,所以机体抗氧化能力明显降低^[6]。

已有研究表明 ,肾功能是评价狼疮活动及治疗反应的重要指标之一^[9]。从表 2 中得出 ,LN 肾功能不全组氧化损伤程度重于肾功能正常组 ,且抗氧化功能显著低于肾功能正常组 ,从而进一步说明机体氧化和抗氧化功能紊乱也与 LN 的严重程度有关。

Sasaki 等人^[10]的研究证明 :抗 ds - DNA 抗体增高和补体 C3 降低是 LN 活动的重要标志。本研究显示 NO ,LOP ,SOD ,GSH - px 和 GSH 5 项实验指标均与抗 ds - DNA 抗体、补体 C3 等临床指标有显著的相关性 ,故说明 5 项指标与 LN 患儿狼疮活动存在一定关系。

目前国内外多采用大剂量 MP 和 CTX 冲击治疗 LN ,其作用机制可能为通过抑制单核/巨噬细胞、T 细胞、B 细胞活性 ,使 B 细胞自身抗体减少、免

疫复合物的沉积减少,从而使病情得到控制^[2,3,11]。本研究应用 MP 与 CTX 冲击治疗 LN 1 个疗程后,NO 和 LPO 明显下降,SOD,GSH - px 和 GSH 明显升高,同时其临床常规指标也明显改善,狼疮活动明显减轻,提示 MP 与 CTX 冲击同时抑制细胞因子及炎症介质的产生而从多方面抑制 NO 的生成和其它 ROS 的释放,减轻肾脏的氧化损伤,使机体抗氧化功能得以恢复^[12],故推测 MP 和 CTX 对 5 项实验指标的调节作用可能是其治疗 LN 的机制之一。当然,由于病例数较少,这一观点尚需深入研究加以证明。

[参 考 文 献]

[1] 姜红,罗钢,王淑兰,等. 儿童狼疮肾炎血清一氧化氮及脂质过氧化物的变化 [J]. 中华肾脏病杂志,2001,17(6): 419.
[2] Austin HA, Balow JE. Natural history and treatment of lupus nephritis [J]. Semin Nephrol, 1999, 19(1): 2 - 11.
[3] 余学清,陈楠. 狼疮肾炎治疗现状及应注意的几个问题 [J]. 中华肾脏病杂志,2002,18(1): 7 - 8.
[4] Tan EM, Cohen AS, Fries JF, et al. The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus [J]. Arthritis Rheum, 1982, 25(11): 1271 - 1277.

[5] Bombardier C, Gladman DD, Urowitz MB, et al. Derivation of the SL EDAI:a disease activity index for lupus patients. The committee on prognosis studies in SLE [J]. Arthritis Rheum, 1992, 35(6): 630 - 640.
[6] 姜红,王淑兰,罗钢,等. 谷胱甘肽转移酶 μ 基因缺失和氧化损伤与系统性红斑狼疮相关性研究 [J]. 中华风湿病学杂志,2001,5(3): 156 - 159.
[7] Blount S, Griffiths HR, Lunec J. Reactive oxygen species damage to DNA and its role in systemic lupus erythematosus [J]. Molec Aspects Med, 1991, 12(2): 93 - 105.
[8] 张肇,陈孝文,江黎明,等. 狼疮肾炎患者白细胞介素 13 的血浆水平和基因表达 [J]. 中华肾脏病杂志,2000,16(1): 20 - 23.
[9] Gladman DD, Urowitz MB, Kagal A, et al. Accurately describing changes in disease activity in systemic lupus erythematosus [J]. J Rheumatol, 2000, 27(2): 377 - 379.
[10] Sasaki T, Muiyoi T, Ryama A, et al. Circulating anti - DNA immune complexes in active lupus nephritis [J]. Am J Med, 1991, 91(4): 355 - 362.
[11] Cameron JS. Lupus nephritis [J]. J Am Soc Nephrol, 1999, 10(2): 413 - 424.
[12] Radomski MW, Palmer RMJ, Moucade S. Glucocorticoids inhibit the expression of an inducible, but not the constitutive nitric oxide synthase in vascular endothelial cells [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1990, 87(24): 10043 - 10047.

(本文编辑:俞燕)

(上接第 228 页)

[2] China B, Ramirez Ronda CH. Infections caused by parvovirus B19 [J]. Bol Asoc Med P R, 1996, 88(1 - 3): 20 - 26.
[3] Woernle CH, Anderson LJ, Tattersall P, et al. Human parvovirus B19 infection during pregnancy [J]. J Infect Dis, 1987, 156(8530): 17 - 20.
[4] Carrington D, Gilmore DH, Whittle MJ, et al. Maternal serum alpha - fetoprotein - a marker of fetal aplastic crisis during intrauterine human parvovirus infection [J]. Lancet, 1987, 1(3): 433 - 435.
[5] Young NS. Parvovirus infection and its treatment [J]. Clin Exp

Immunol, 1996, 104(9): 26 - 30.
[6] Cassinotti P, Weitz M, Siegl G. Human parvovirus B19 infections: Routine diagnosis by a new nested polymerase chain reaction assay [J]. J Med Virol, 1993, 40(7): 288.
[7] 曹玉红,张国成,许冬亮. ELISA 法与巢式 PCR 法诊断人细小病毒 B19 感染的对比研究 [J]. 中国实用儿科杂志,2000,15(11): 689 - 690.
[8] Woolf A P. Clinical manifestations of human parvovirus B19 in adults [J]. Arch Intern Med, 1989, 149(8): 1153 - 1158.

(本文编辑:吉耕中)