

表 1 UD紧急避孕效果(例)

性交 时间(d)	预期妊娠 概率(%)	例数	预期 妊娠数	实际 妊娠
<-8	0. 000	0	0. 000	0
-8	0. 001	4	0. 002	0
-7	0. 007	2	0. 028	0
-6	0. 025	4	0. 100	0
-5	0. 055	10	0. 550	0
-4	0. 104	11	1. 144	0
-3	0. 146	38	5. 548	0
-2	0. 169	62	10. 478	0
-1	0. 173	63	10. 899	0
0	0. 141	48	6. 780	0
+1	0. 091	32	2. 880	1
+2	0. 049	20	0. 980	0
+3	0. 019	12	0. 228	0
+4	0. 005	11	0. 055	0
+5	0. 001	4	0. 004	0
≥+6	0. 000	3	0. 000	0
总数		162	39. 676	1

注:避孕有效率=(39. 676-1)/39. 676×100%=97. 48%。

3 讨论

含铜 UD作为紧急避孕始于 1976年,国外报道性交后放置 UD有效率 98. 7% ~99. 3%,是 Yuzpe方法的 5倍,为紧急避孕中效果最好的方法^[2],含铜 UD用于 EC的机理为 UD及铜离子的作用,铜离子导致子宫内膜白细胞增多,锌依赖酶活性受抑制,抑制子宫内膜发生变化,不利于胚胎着床,而且铜离

子对胚胎还有直接毒杀作用而达到防止妊娠目的。药物用于 EC要求无保护性生活就诊时间在 72 h之内,而且时间越短,避孕效果越好,并只能对一次无保护性生活起阻断妊娠作用,同周期内无保护性生活无效。含铜 UD可弥补这些不足,将就诊时间延长至 120 h甚至延长 5~10 d,对不能及时就诊超过服药时限或需长期避孕不失为良好的补救措施。本组随访 24个月妊娠率为 0. 76%脱落率 1. 54%,累计续用率为 86. 92%,与文献报道正常月经后放置 UD相似^[3]。母体乐 UD符合子宫形态和子宫动力学原理,可随子宫的收缩和舒张改变形状,不易下移和脱落,无尾丝,对性生活无影响,有一次性放置器,放置时无需扩宫,是国家计生委优先推广应用的四种 UD之一^[4]。所以,我认为,作为紧急避孕,经产妇及目前无生育要求妇女,建议首选母体乐 UD。

参 考 文 献

- [1] Dixon GW, Schlesselman JJ, Ory HW, et al. Ethinyl estradiol and conjugated estrogens as postcoital contraceptives. JAMA. 1980; 244 (12): 1336-1339.
- [2] 吴尚纯. 带铜宫内节育器用于紧急避孕. 生殖医学杂志, 1997; 6 (1): 19-22.
- [3] 邹燕, 雷贞武. 宫内节育器的流行病学研究近况. 实用妇产科杂志, 2003; 19(6): 321-323.
- [4] 吴尚纯. 宫内节育器的开发和应用状况. 实用妇产科杂志, 2003; 19(6): 323.

颗粒酶在心脏移植急性排斥反应中的作用

寇应琳 牛琳

【关键词】 颗粒酶;心脏移植;急性排斥反应

心脏移植是治疗终末期心脏病的有效方法,虽然已有多种免疫抑制剂广泛应用于临床,但心脏移植的术后并发症主要仍是排斥反应,其中最常见的是急性排斥反应。治疗的关键在于如何早期确定急性排斥反应的严重程度以确定是否需用免疫抑制药物,在移植造成细胞性损伤前逆转排斥反应^[1]。同种异体移植的急性免疫排斥反应是由多种调节因子,效应细胞间复杂相互作用的结果。细胞免疫应答在急性排斥反应中发挥主要作用,其中 CD8⁺T细胞是重要的效应细胞。CD8⁺T细胞主要通过穿孔素、颗粒酶途径杀伤靶细胞^[2]。

具有杀伤作用的 CTL细胞经抗原激发,活化成为效应细胞,活化的 CTL可通过颗粒-胞吐途径介导的溶细胞作用杀伤靶细胞。活化的 CTL胞浆的颗粒中含有穿孔素和颗粒酶。CTL与靶细胞通过 T细胞受体(TCR)特异识别并连接,CTL胞浆中的颗粒定向移位于接触部位,通过细胞排粒,颗粒中的穿孔素和颗粒酶释放到细胞间隙,穿孔素以单体形式插入靶细胞膜,形成“孔道”,促使颗粒酶进入靶细胞,引起靶细胞 DNA断裂,导致靶细胞凋亡。活化的 CTL与靶细胞的接触由 Mg²⁺依赖,一旦靶细胞凋亡结束,CTL就在缺乏 Mg²⁺的状态与靶细胞脱离,参加再循环;再循环 CTL可对靶细胞重复杀伤 5~7次,

此后失去杀伤活性当靶细胞数多于 CTL时,CTL的再循环发挥关键作用^[3]。

颗粒酶分子颗粒酶是一组同源性的丝氨酸蛋白酶,人颗粒酶包括 GzmA、B、K、H等成员,与 FN一起存在于活化的 CTL和 NK细胞胞浆颗粒中,是 CTL和 NK细胞发挥细胞毒的主要效应分子。人 GzmA基因定位于 5号染色体上。GzmA分子为由两个单体通过二硫化物连接成相对分子质量为 60 000的同源二聚体,具有类胰蛋白酶的性质,在体内能缓慢引起靶细胞 DNA断裂。人 GzmB基因定位于 14号染色体上,酶相对分子质量有 30 000、32 000、35 000 3种,经葡萄糖苷酶水解后均剩下 1个相对分子质量为 27 000的蛋白核心,说明 3种形式的 GzmB是同一蛋白带有不同的糖基^[4]。GzmB具有天门冬氨酸酶的活性,是主要效应分子,能迅速引起靶 DNA断裂,作用强于 GzmA,其纯化的单克隆抗体已广泛地应用于研究中。Gzms之间高度同源,其包含胰蛋白酶家族丝氨酸蛋白酶的催化性三联体 His57、Asp102、Ser195。其他特征包括: N端 Ile-Ile-Gly-Gly序列;含有 3-4个二硫键;含有一个同样出现于中性粒细胞组织蛋白酶(cathepsin) G5、肥大细胞食糜酶(chymase)的保守基序(HSRPYMA)。

胞 DNA)的作用实验表明 单用穿孔素引起 ^{51}Cr 释放但无 ^{125}I 释放;单用颗粒酶 B不能引起任何释放;只有穿孔素和颗粒酶 B同时存在时,才能测到 ^{51}Cr 和 ^{125}I 同时迅速释放。这一试验证实了穿孔素引起靶细胞膜受损 颗粒酶 B随后引起靶 DNA断裂。 GzmB 在穿孔素存在时,在靶细胞浆内再分布 集中于细胞核时,才导致细胞凋亡。在无穿孔素存在的情况下,颗粒酶 B能够通过能量依赖途径穿过细胞膜,进入细胞浆内,但细胞并无明显的损害。这是因为 PFP可引发凋亡和影响颗粒酶 B向细胞核内转移。

颗粒酶 B进入细胞后通路何种信号转导通路诱导细胞凋亡尚还不完全清楚。现有的资料显示 GzmB 可以在细胞质、线粒体和细胞核三个层次作用于不同的分子诱导细胞凋亡。研究显示 GzmB 可能经由 Caspases途径杀伤细胞;Caspases是一组半胱天冬蛋白酶,细胞凋亡信号可引起 Caspase激活。无活性酶原 (Pro-caspases)内部两个保守性 Asp残基被特异酶切后形成双链,以类似酶原激活方式呈级联放大效应,导致细胞凋亡。试验表明, GzmB 能切割作为 DNA损伤修复传感分子的 PARP产生 1个相对分子质量为 54 000或 41 000的片段 而 caspase-3的切割产物是 1个 89 000的片段。 GzmB 在体外和体内试验中均能迅速切割 DNA-PKcs和 NuMA但所得产物片段与 caspase-3切割所得有所不同。将 IFN与 $\text{GzmA} / \text{GzmB}$ 共同在 37°C 作用于 K562细胞,用抗 IkmB 的单抗作探针,见 GzmA 对 IkmB 的切割不被 caspase的抑制剂所阻断。提示 GzmA 对 IkmB 可以直接切割,而不依赖 caspase途径。 GzmB 对 caspase-7和 caspase-10的切割是所有已知 Gzm s中最有效的,30 min内 90%的 caspase-7和 caspase-10即被有效切割。这一过程可由 IFN / GzmB 或由 Fas / FasL 介导。故有理论认为: GzmB 可能并不直接切割产生有活性的成熟 caspases也不直接加速 caspases级联放大过程,但一旦 caspase途径中某个 caspase位点 (caspase-3或 caspase-10)缺失或是切割受抑制, GzmB 将切割后续 pro-caspase GzmB 在完整的 caspase途径中不起作用^[56]。近来又同时有两个实验室报道, GzmB 可以直接酶解 Sid和 Bax等,启动细胞色素 C的释放,而且这种途径无需激活 caspase^[7]。 GzmB 除在胞浆中激活 caspase级联反应启动凋亡外,还可直接迁移至细胞核,切割 NuMA和 PARP(体外、体内)、DNA-PKcs(体外)等一系列核蛋白,启动或促进核凋亡事件。 GzmB 对核内物质具亲和力,体外除去核膜的细胞核中可观察到大量 GzmB 聚积。现又从文献中发现, GzmB 能直接作用于部分断裂的基因组 DNA,使其发生进一步裂解。总之, GzmB 进入细胞后,可能通过多种方式作用于靶细胞,诱导其凋亡。

国外学者应用免疫组化、原位杂交、Northern blot杂交和 RT-PCR等技术探讨了颗粒酶 B在同种移植免疫排斥中的作用。在人的心脏、肝、肾、肠同种异体移植的急性排斥的移植物

活检中,颗粒酶 B基因的表达式水平均显著高于同基因移植者,在急性排斥反应的早期 即移植后 24 h内,其基因 mRNA表达水平已明显升高,并急剧增加至高峰 ($< 5 \sim 6 \text{ d}$) 尔后仍处于较高水平的表达,并贯穿急性排斥反应的全过程 且与排斥反应的严重程度相平行,如表达阳性 预示将转变为严重的急性排斥反应 需附加免疫抑制治疗,如表达阴性,说明移植植物处于稳定状态,无需附加免疫抑制剂^[89]。

颗粒酶参与了介导器官移植的急性排斥反应,尽管其确切机制尚未完全清楚,但随着急性排斥机制研究的进一步深入和其他介导途径的发现 颗粒酶基因表达可能会成为诊断急性排斥反应和判断免疫抑制疗效的早期、可靠的指标 并通过反义技术封闭该基因表达来抑制器官移植的急性排斥反应。

心脏移植是治疗终末期心脏病的有效方法。近十年来,心脏移植患者数量明显增加,成活率明显提高,存活时间延长。但心脏移植的术后并发症主要是急性排斥反应。心脏移植术后第一年是否成功,主要取决于对急性排斥反应的控制情况,而控制急性排斥反应主要在于是否有恰当而确切的急性反应监测指标。颗粒酶的研究,特别是监测外周血中该种蛋白基因的表达为术后监测急性排斥反应提供了新的思路,有助于心脏移植急性排斥反应的发展。

参 考 文 献

- [1] Alexander DZ, Pearson TC. Analysis of effector mechanisms in murine cardiac allograft rejection. *Transpl Immunol* 1996; 4 (1): 46-48.
- [2] Buzza MS, Bird PJ. Extracellular granzymes: current perspectives. *Biol Chem* 2006; 387(7): 827-37.
- [3] Lewinsch NDM, Bement T T, Xu J, et al. Human purified protein derivative specific CD4+ T cells use both CD95-dependent and CD95-independent cytolytic mechanisms. *J Immunol* 1998; 160 (5): 2374-2379.
- [4] 高春芳,孔宪涛. B淋巴细胞发育及分化研究进展. *国际免疫学杂志* 1995; 18(3): 128-130.
- [5] 董红梅,徐小虎,于晓军. 穿孔素和颗粒酶 生物导弹的理想材料. *生物医学工程学杂志* 2005; 22(05): 1075-1077.
- [6] 秦卫松. 穿孔素的研究进展. *医学分子生物学杂志* 2001; 23(1): 20-23.
- [7] Zhang D, Beresford PJ, Greenberg AH, et al. Granzymes A and B directly cleave lamins and disrupt the nuclear lamina during Granzyme-mediated cytotoxicity. *PNAS USA* 2001; 98(10): 5746-5751.
- [8] 唐波,张捷. 穿孔素和颗粒酶 B在移植排斥中的研究进展. *医学综述* 2008; 15(08): 1133-1135.
- [9] 王亦斌,于立新,徐健,等. 穿孔素和颗粒酶 B mRNA在肾移植术后急性排斥反应时的变化. *中华外科杂志* 2006; 44 (22): 1576-1577.