

肾移植基础研究2017年盘点

朱彦融 苗芸

【摘要】 根据肾移植领域国际核心期刊的文献,综述2017年该领域基础研究的前沿热点和最新进展,包括排斥反应、免疫耐受、缺血-再灌注损伤、机械灌注、异种移植等方面,协助临床医师深入了解移植肾相关疾病的现象与本质,提高对移植肾相关疾病的认识,以改善移植肾受体长期存活。

【关键词】 肾移植;基础研究;长期存活;排斥反应;免疫耐受;缺血-再灌注损伤(IRI);机械灌注;调节性T细胞(Treg);异种移植

【中图分类号】 R617, R69 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1674-7445(2018)01-0005-08



作者简介:苗芸,副主任医师,现任南方医科大学南方医院器官移植科副主任。兼任中国医师学会肾脏移植分会青年委员兼副秘书长,中华医学会器官移植学分会委员、青年委员,中国医师学会器官移植分会感染学组、病理学组委员,中国研究型医院学会器官移植学专业委员会委员,中国生物医学工程学会透析移植分会委员,中国医疗保健国际交流促进会肾脏移植分会委员,广东省医学会器官移植分会委员兼秘书。兼任《器官移植》杂志编委。2002年毕业于第一军医大学临床医学系七年制。2007年于第一军医大学获得泌尿外科学博士学位,主要从事器官移植临床工作。2006年至2009年在美国俄亥俄州辛辛那提大学器官移植中心完成博士后工作。主持国家自然科学基金、广东省自然科学基金等10项。2009年和2013年分别获广东省科学技术奖二等奖。参编专著《器官移植学(第2版)》,发表论文40多篇,SCI论文3篇,单篇最高被引用68次。

近年来,随着移植器官的保存和合理应用以及移植术后强效免疫抑制剂的使用,移植肾受体近、中期存活率及生活质量显著提高,但并未显著改善其长期存活。排斥反应、免疫耐受和缺血-再灌注损伤(IRI)等是影响移植肾长期存活的关键因素。本文就2017年以来肾移植相关的排斥反应、免疫耐受、机械灌注、IRI和异种移植等基础研究的新进展综述如下。

1 检索策略

为了解2017年肾移植基础研究文献发表的基本

情况,限定条件进行文献检索,检索策略如下:利用PubMed,时间限定为2016年12月1日至2017年1月13日;通过主题词“kidney transplantation [MeSH Terms]”,检索出948篇文献;为避免较多的遗漏进一步限定题目或摘要进行检索,检索词为“kidney transplantation [Title/Abstract] OR renal transplantation [Title/Abstract]”,检索结果为2310篇文献,将两者检索结果通过连接词“OR”组合,得到文献2726篇;随后,在此检索结果上,利用“AND animals [MeSH Terms]”得到基础研究相关的文献1025篇文献,通过限制文献类型,“NOT

DOI: 10.3969/j.issn.1674-7445.2018.01.005

基金项目:国家自然科学基金(81500573);广东省高等教育学会高等教育科学研究“十三五”规划重点调研课题(16GZD009);南方医科大学南方医院院级教育课题(14NJ-ZL01);南方医科大学大学生创新创业训练项目基金(201612121006、201712121307)

作者单位:510515 广州,南方医科大学第一临床医学院(朱彦融);南方医院肾移植科(苗芸)

作者简介:朱彦融,研究方向为囊性肾病的免疫微环境,Email: michelle0012@vip.qq.com

通讯作者:苗芸,Email: miaoyuncho@126.com

review [PublicationType]”，排除综述类型文章，最后检索结果为 862 篇文献，基础研究文献全年占比约 30%。利用最新颁布的 2017 年 SCI 影响因子 (impact factor, IF) 数据，结合 PubMed 检索网址自带的 IF 分类功能，将 IF 分为“IF > 10 分”，“5 分 ≤ IF ≤ 10 分”，“3 分 ≤ IF < 5 分”和“IF < 3 分”4 个范围，在检索的 862 篇文献里，分别占比 1%、3%、22% 和 74%，发现大部分文献的 IF 不高，这或许与肾移植专业领域高 IF 杂志较少有关。

2 肾移植基础研究进展

2.1 排斥反应

近年来，研究认为慢性排斥反应主要是由于体内存在供体特异性抗体 (donor specific antibody, DSA)，激活内皮细胞和补体，募集免疫细胞等引起移植肾小球病变的发生，进而导致移植肾功能减退，蛋白尿产生，最终移植肾失活。国外学者认为其机制可能是 DSA 通过脾脏酪氨酸激酶 (spleen tyrosine kinase, Syk) 传递多种细胞信号，聚集和活化白细胞^[1]。并指出利用 Syk 抑制剂可以减少巨噬细胞浸润，并同时减少 M₁ 巨噬细胞导致的促炎反应，如显著减少中性粒细胞、自然杀伤 (natural killer, NK) 细胞浸润以及毛细血管血栓的形成，并且 Syk 抑制剂能够显著减少由抗体介导严重的移植肾损伤。另外，有学者认为跨性别移植也会引起相应的免疫反应，供肾中众多基因在不同性别供体中的表达水平不同^[2]。通过小鼠模型，发现跨性别移植的小鼠白细胞介素 (IL)-6 和趋化因子基因 *KC* 的信使核糖核酸 (mRNA) 水平是对照组的 5~20 倍，提示跨性别移植可能会因为改变基因表达水平而诱发炎症反应以影响移植物的长期功能。

目前，器官移植的成功得益于受体体内 T 细胞被有效抑制，但如果 T 细胞被激活，其促发的排斥反应将较难被抑制，从而导致移植肾失功。临床常用的免疫抑制剂贝拉西普的作用是阻断 CD80/86、CD28 和其选择性配体细胞毒性 T 淋巴细胞抗原 4 (cytotoxic T lymphocyte-associated antigen, CTLA4) 之间的作用。肾移植临床经验表明，使用贝拉西普，尤其是其强化方案更容易发生排斥反应，提示阻断 CTLA4 是不利于移植物的。Ville 等^[3] 团队分别采用 FR104 (不阻断 CTLA4 通路的选择性 CD28 拮抗剂) 和贝拉西普作为动物模型的免疫抑制剂，结果大部分使用贝拉西普的移植肾受体出现严重的肾上腺皮质激素 (激素)

抵抗型急性细胞性排斥反应，而 FR104 治疗组未出现排斥反应，且活组织检查 (活检) 少见参与排斥反应的 T 细胞。此外，他们的体外实验表明 FR104 能更好地抑制预存在机体内的滤泡型辅助性 T 细胞的增殖。Oshima 等^[4] 也报道了类似的结论，他们选择使用 DNA 定向改组设计出 CTLA4 免疫球蛋白 (CTLA4-Ig) 变体，然后将其选择性地与 CD86 结合，这种变体剂量更小且能更高效抑制 T 细胞应答。

同时也有其他研究探讨 B 细胞与免疫排斥反应的关系。动物实验证实 B 细胞的 Fcγ 受体 II B 表达在器官移植的急性排斥反应 (AR) 中起作用，并且应用静脉注射免疫球蛋白 (intravenous immunoglobulin, IVIG) 和 CD28 单克隆抗体可以调节大鼠移植后的 AR^[5]。

相对肾移植术后应用免疫抑制剂，在移植前将 *LEA29Y*、*OX40Ig* 等体外基因转入移植肾可以避免慢性排斥反应。Tomasoni 等^[6] 通过编码 *LEA29Y* 基因的腺病毒载体转入大鼠模型中，其可表达 *LEA29Y* mRNA，以此预防慢性移植肾排斥反应，而且避免了使用全身性免疫抑制剂，这些蛋白仅在移植肾中被检测到，提示临床应用基因转染技术可为移植肾提供了靶向给药的可能性。其他学者选择利用此技术抑制 T 细胞表达，通过脂肪组织来源的间充质干细胞 (adipose tissue-derived mesenchymal stem cell, ADSC) 治疗和共刺激阻断 OX40 通路治疗抑制同种异体抗原免疫应答^[7]。体内试验中，发现未转导 OX40Ig 的 ADSCs 和已转导 OX40Ig 的 ADSCs 均能明显抑制 T 细胞增殖，并在同种异体混合淋巴细胞反应 (mixed lymphocyte reaction, MLR) 中检测到 CD4⁺CD25⁺ 调节性 T 细胞 (Treg) 的百分比上升，且 ADSCsOX40Ig 中增加的效果更加明显。此外，使用 ADSCsOX40Ig 治疗能明显下调移植肾干扰素 (IFN)-γ 的 mRNA 表达，上调 IL-10、转化生长因子 (TGF)-β 和 Foxp3 的 mRNA 表达，减少了同种异体移植排斥反应，延长移植肾平均存活时间。

同种异体移植物的排斥反应会引发进行性移植肾纤维化，最终导致移植肾功能丧失。腺苷 (adenosine) 已被证明在纤维化过程中起重要作用。Li 等^[8] 在大鼠实验中发现肾移植术后发生 AR 时腺苷水平升高，认为 AR 可能通过腺苷信号通路 (adenosine signaling pathways) 促进移植肾纤维化。还有学者通过巨噬细胞和肌成纤维细胞标志物的共表达展示了巨噬细胞向

肌成纤维细胞转化的过程,且共表达细胞数量与移植物纤维化的严重程度相关^[9]。此外,通过敲除 *Smad3* 基因后发现可以减少骨髓来源的 M₂ 型巨噬细胞向肾同种异体移植物中肌成纤维细胞的转变,从而减少了肾纤维化。Palin 等^[10] 发现在接受移植肾的小鼠体内血清激活素 B (serum activin B) 显著升高,而在局部移植肾组织内产生激活素 A (activin A)。使用激活素抑制剂能有效地减少移植肾早期的固有免疫反应,阻止嗜中性粒细胞、巨噬细胞和树突状细胞 (DC) 浸润,并且可以调节血清中的细胞因子,减少早期成纤维细胞在移植器官间质中的积累。

当然,术后监测免疫排斥反应极具重要意义。Vallabhajosyula 等^[11] 在肾移植术后超过 5 年的临床随访中发现,受体的血浆中会出现供体肾上皮细胞分泌的特异性外泌体,并成为发生排斥反应的特征。

2.2 免疫耐受

移植免疫耐受是指在不使用任何免疫抑制剂的情况下移植植物能长期存活且具有良好稳定的功能。研究表明受体 Treg 对免疫耐受具有一定的影响。Duran-Struuck 等^[12] 发现给接受同种异体骨髓移植 (bone marrow transplant, BMT) 的小鼠注射受体 Treg 可促进小鼠产生持久的混合造血嵌合体 (mixed hematopoietic chimerism) 及同种异体移植免疫耐受。接受 Treg 注射的动物,存活时间长的动物中超过 90% 体内出现了新的胸腺产物 (CD45RA⁺ CD31⁺ T 细胞); 骨髓移植后 4 个月接受肾移植的实验动物中, Treg 组可以在没有任何免疫抑制剂的作用下存活 294 d,而无 Treg 组则在肾移植后 3~4 周内发生排斥反应。但无论是否注射 Treg,如果早期存在巨细胞病毒 (CMV) 感染,则无法生成此类嵌合体。因此,若没有早期 CMV 感染和抗病毒治疗,移植受体的 Treg 可以促进同种异体嵌合体的生成以及增强受体对供体的耐受性。

Purroy 等^[13] 证实了促红细胞生成素 (erythropoietin, EPO) 通过影响 Treg 进行免疫调节,依赖 EPO 受体和在抗原提呈细胞上的 CD131 诱导分泌活性 TGF- β ,从而将幼稚 CD4⁺T 细胞转化为功能性 Foxp3⁺Treg。在移植小鼠模型中,下调肾脏生成的 EPO 减少 Treg 的生成。临床给予纠正贫血剂量的 EPO 可增加患者外周血中的 CD4⁺ CD25⁺ CD127^{low} T 细胞数量。研究表明在体外 EPO 通过酪氨酸磷酸酶依赖的 SHP-1 通路解偶联 IL-2R β 信号,持续抑制 IL-2R β 信号并增强

IL-2R γ 信号,由此直接抑制常规的 T 细胞增殖。动物模型表明重组 EPO 还可延长移植心脏小鼠的存活时间;当肾脏产生的 EPO 下调时 TGF- β mRNA 表达减少,导致肾移植后免疫不耐受。

值得注意的是, Litjens 等^[14] 发现接受透析的终末期肾病 (end-stage renal disease, ESRD) 患者血液内存在大量具有诱导免疫耐受潜力的自然调节性 T 细胞 (natural Treg, nTreg), 实验表明 nTreg 与正常健康人群中的 Treg 功能相同,这意味着 ESRD 患者的循环 nTreg 有可能用于大规模生成高度特异性抗异种抗原的 Treg。

2.3 缺血-再灌注损伤

肾脏 IRI 是肾移植术后常见的并发症,主要发生在微小血管网,是造成急性肾衰竭的主要原因。Maiga 等^[15] 通过观察肾缺血-再灌注 (ischemia reperfusion, IR) 后最易受影响的皮质段肾血管网,发现 IRI 导致血管节段减少,尤其在内侧皮质容积小于 30 μ m 的节段;血管显像提示整个皮层的分叉血管数量增加。此外,早期移植肾皮质血流量下降,并在移植术后 3 个月维持较低水平。微血管减少可能导致肾功能减退,导致蛋白尿、管型尿,促进纤维化进展,提示临床医师在手术中应注意保护移植 IRI 中的微血管。

血管的改变易导致血管闭塞,这是肾移植术后罕见但严重的并发症,往往导致移植植物丢失。Amdisen 等^[16] 的研究分别比较了通过植入式多普勒探针或者微量渗析 (microdialysis) 来检测血管闭塞的情况。在肾血流量减少 2/3 且持续 30 min 后,微量渗析测得谷氨酸和乳酸盐显著增加,提示早期动脉和静脉闭塞后局部代谢的变化;而植入式多普勒探头在静脉完全闭塞之前无法检测流量变化。

在 IRI 的病理生理学过程中,异常的基因表达和表观遗传调控发挥着作用。Zhao 等^[17] 使用简化代表性重亚硫酸盐测序 (reduced representation bisulfite sequencing, RBBS) 来检测 IRI 期间肾组织的 DNA 甲基化水平以及假手术组肾组织中的 C57BL/6 基因情况。与假手术组的肾脏相比,不论是急性还是慢性 IRI 都可明显降低全基因组的甲基化水平 (1.1%~1.8%)、启动子 CpG 甲基化水平 (0.4%~0.5%)、CpG 岛 (0.5%~1.3%)、外显子 (1.3%~1.9%) 和内含子 (0.8%~1.1%)。他们还发现 IRI 期间 5 个基因的启动子出现甲基化并且被表

达, 包括 *2700049A03Rik*、*Ccr9*、*Fgd2*、*Pfkfb3* 以及 *Sdc4*。*2700049A03Rik* 和 *Ccr9* 的启动子甲基化水平和其肾组织中的 mRNA 表达没有必然的相关性。这项研究不仅首次证明了在 IRI 的肾脏组织中全基因组 DNA 甲基化模式, 还表明启动子甲基化的调控是一种重要的可能长期修改基因表达的机制。

凝血是 IRI 病理生理学的重要途径。心脏死亡器官捐献 (DCD) 供体的肾脏经历无血流期, 凝血因子被激活。Tillet 等^[18] 在体外实验中使用抗凝血因子 X a / II a 高度特异且有效的拮抗剂 EP217609 来观察动物模型中移植肾的损伤情况。添加了拮抗剂的内皮细胞再氧合后凝血酶生成减少, 肿瘤坏死因子 (TNF) - α 减少, 细胞间黏附分子 (ICAM) -1 和血管细胞黏附分子 -1 的 mRNA 表达减少。体内实验中, 添加拮抗剂显著改善移植物功能延迟恢复, 而且再灌注 60 min 后凝血酶 - 抗凝血酶复合物的水平降低。另外, 移植后 3 个月发现纤维化、上皮 - 间质转化、炎症和白细胞浸润的水平较低。这说明 EP217609 在肾脏冲洗和保存期间可抑制凝血因子 X a 和 II a, 从而减少在血运重建时凝血酶的产生, 以此改善早期功能恢复并减少慢性损伤。

IRI 期间, 微小核糖核酸 (micro RNA, miR) 可能参与调控细胞死亡。Wu 等^[19] 提出了肾脏发生 IRI 时细胞死亡的一条新的信号通路 miR-155/FoxO3a/ARC。实验发现半胱天冬酶 -1、半胱天冬酶 -11、IL-1 β 和 IL-18 等细胞死亡相关的蛋白水平在 IRI 后显著升高, 而且低氧 - 复氧损伤 (hypoxia-reoxygenation injury, HRI) 导致了 HK-2 细胞的死亡。此外, 在 IRI 和 HRI 大鼠的 HK-2 细胞中, miR-155 表达大幅上升。在 HRI 中, miR-155 的上调促进 HK-2 细胞死亡; 相反地, 敲除 miR-155 后这个进程就被抑制了。研究人员认为内源性 miR-155 可以上调半胱天冬酶 -1、超敏反应细胞因子 IL-1 β 和 IL-18 的水平, 并且通过半胱天冬酶募集结构域 (caspase recruitment domain, CARD) 直接抑制 FoxO3a 下游抑制细胞凋亡的蛋白表达。其他研究团队也报告有关 mRNA 影响 IRI 的机制。高度保守的真核起始因子 5A (eukaryotic initiation factor 5A, eIF5A) 可在羟丁赖氨酸作用下翻译出活化氨基酸合酶和氨基酸化酶的蛋白, 由此参与缺氧的过程。Melis 等^[20] 发现 GC7 (活化氨基酸合酶的靶向药) 处理的细胞能够可逆性地诱导细胞代谢转向糖酵解以及重塑线粒体, 这导致了呼吸链复合物表

达和活性下调、线粒体沉默。GC7 治疗也可降低细胞在缺氧条件下诱导产生的活性氧, 并在正常氧条件下减少细胞和小鼠的线粒体耗氧。另外, 大鼠腹腔注射 GC7 可显著降低肾上腺素 eIF5A 的水平并保护肾脏免受 IRI。最后, 动物模型中移植前静脉注射 GC7 可显著改善移植术后功能恢复和晚期移植物功能, 减少移植术后肾间质纤维化。这条信号通路为人类缺氧缺血性疾病以及器官移植提供了新的治疗靶点。

自噬功能的紊乱和炎症反应可能是 IRI 的重要机制。Bao 等^[21] 证实高比重氧化作用 (hyperbaric oxygenation, HBO) 可显著升高肾移植小鼠的血清肌酐 (Scr) 和 IL-6 水平, 同时提高反映细胞吞噬功能的 LC-3 蛋白及其 mRNA 的表达量, 且 LC-3 蛋白主要以线形沿肾小管上皮细胞分布。研究还提示 HBO 治疗是通过激活 IL-6 通路来保护机体肾组织免受早期 IRI 的损伤。其他学者则认为 IRI 可能与激活 DC 交叉提呈肾内抗原有关^[22]。健康人的肾组织中肾单核吞噬细胞 (renal mononuclear phagocyte, RMP) 具有不同的表型和功能多样性。实验利用 IRI 诱导改变 RMP 的表型和功能, 发现 IRI 使单核细胞、DC、巨噬细胞和嗜中性粒细胞向肾脏的聚集。另外, IRI 期增加的 RMP 主要是新产生的单核细胞衍生的炎症 DC, 缺血后期的肾内 DC 的树突数量和活性均增加。除此之外, 研究者还发现 IRI 期一氧化碳 (CO) 可作为信号通路中重要的小分子参与炎症反应^[23]。在小鼠近端肾小管上皮细胞中 CO 释放分子 -2 (carbon monoxide releasing molecule-2, CORM-2) 可明显抑制高迁移率族蛋白 B1 (high mobility group protein B1, HMGB1) 核质转运效率, 他们推测可能与其防止 HMGB1 乙酰化有关。另有学说认为一氧化氮合酶 (nitric oxide synthase, NOS) 的解偶联也是内皮细胞和巨噬细胞活化的重要机制, 而 Boels 等^[24] 的研究否定了肾小球屏障损害与 NOS 机制有关的可能。

IRI 可导致急性肾损伤 (acute kidney injury, AKI), 临床常采用肌酐清除率、Scr、血尿素氮 (BUN) 或肾活检评估 AKI。然而, 目前还没有更精确的方法来直接评估 AKI 状态。Nielsen 等^[25] 发现原位乳酸脱氢酶活性有可能被用作 AKI 的生物标志物, 他们应用超极化 ¹³C- 丙酮酸核磁共振非侵入性精确测量出丙酮酸向乳酸、丙氨酸和碳酸氢盐的体内转化过程, 发现乳酸脱氢酶对于预测 AKI 及其预后具有很高的价值。Decuyper 等^[26] 在近端肾小管上皮细胞刷状

缘找到一种叫血浆绒毛蛋白 1 (plasmatic villin 1) 的蛋白质, 发现血浆绒毛蛋白 1 可以在早期 (3 h) 特异性地反映出 IRI 的情况, 这也许可作为一种新的生物标记物。在治疗方面, El-Sisi 等^[27] 发现在诱导的大鼠肾 IRI 模型中使用他达拉非联用地尔硫草的方案具有 IRI 保护的作用。联合使用后发现大鼠肾脏髓过氧化物酶 (myeloperoxidase, MPO) 活性, 丙二醛 (malondialdehyde, MDA)、TNF- α 、IL-1 β 、ICAM-1 含量, BUN 以及 Scr 水平降低, 而肾脏超氧化物歧化酶 (SOD) 活性增高。此外, 组织病理学检查显示部分肾脏恢复正常的细胞结构。

2.4 机械灌注

通常认为低温机械灌注 (hypothermic machine perfusion, HMP) 是一种可改善移植肾功能的有效方法, 但其中潜在的机制还不清楚。在 Liu 等^[28] 的研究中认为 HMP 降低 DCD 肾炎发生的可能机制为上调了枯否样因子 (Krüppel-like factor, KLF) 2 表达和抑制了 TGF- β 信号通路。使用 HMP 的兔肾皮质中 KLF2 表达显著高于使用静态冷保存 (static cold storage, SCS) 者, 而 TGF- β 及 SMAD4 蛋白表达均显著低于 SCS 组。另外, HMP 还有辅助药物调理移植物的作用, 比如 HMP 条件下预处理移植器官内皮细胞膜上的异常细胞内抗凝肽, 可改善微血管血栓导致的移植后并发症。Hamaoui 等^[29] 发现 HMP 可以加快扩散微血管系统中的凝血酶抑制剂并使其在微血管中停留更长时间, 使肾脏灌注流量提升 26.4% 并且灌注流量指数提高了 28.9%, 并降低了作为组织缺血或代谢标志物的皮质乳酸盐水平, 也减少了肾生成纤维蛋白的数量。

同时也有其他学者报道 HMP 并不能改善移植肾功能, 其利用机械控制氧复温 (machine-controlled oxygenated rewarming, COR) 寻求一个合适的复温温度^[30]。与 SCS 组相比, 在 4 $^{\circ}\text{C}$ 时, COR 再灌注功能良好供肾和功能受损供肾之间的灌注参数差异不大, 但是在 20 $^{\circ}\text{C}$ 下两者的差异增大, 而且 20 $^{\circ}\text{C}$ 时肌酐清除的效果最佳。表明将 COR 的温度提升至 20 $^{\circ}\text{C}$ 可以改善再灌注的移植肾功能, 并且可用于评估供肾。还有其他学者认为持续的常温灌注可以改善 DCD 的猪移植肾效果, 并提出低温保存会对移植肾功能产生有害影响。移植前肾脏冷保存大多损害了移植体线粒体, 并由此对移植物功能产生影响, 有学者认为可能是长段的视神经萎缩蛋白丢失影响关键线粒体分裂, 从而

导致移植物功能受损^[31]。因此, 目前的研究重点是寻找替代的保存技术, 如常温灌注。Kaths 等^[32] 对比了 DCD 自体移植猪模型在持续控制压力下的常温离体肾灌注 (normothermic *ex vivo* kidney perfusion, NEVKP) 与 SCS。NEVKP 组中, 移植后早期显示出 Scr 及血清中性粒细胞明胶酶相关的脂质运载蛋白水平较低, 表明在持续控制压力下, NEVKP 可以改善 DCD 肾移植中的肾功能。然而, Blum 等^[33] 通过比较猪 DCD 模型中的常温机械灌注 (normothermic machine perfusion, NMP) 和 HMP 肾脏的保存情况, 发现 NMP 组与 HMP 组保存肾功能的程度相当 (氧消耗, 尿液产生, 肌酐清除率, 排钠分数, 蛋白尿, 乳酸脱氢酶和天冬氨酸转氨酶的灌注水平和耐药性的差异无统计学意义)。两组的差异在于 NMP 肾脏中碱性磷酸酶 (alkaline phosphatase, AP) 和 γ -谷氨酰转肽酶 (gamma glutamyl transpeptidase, GGT) 的灌注水平较高, 但模拟再灌注后, HMP 保存的肾脏中 AP 和 GGT 水平较高 (分别是 NMP 保存肾脏期间的 14 倍以上)。还有学者发现通过加入冰结合蛋白以及 0 $^{\circ}\text{C}$ 以下的超低温保存比 4 $^{\circ}\text{C}$ 的保存更能延长保存时间并维持移植物的活性^[34]。与此同时, Smith 等^[35] 的研究也否定了近年热议的“IRI 在体外常温灌注时使用氩气保护器官”的可能。

2.5 异种移植

猪被公认为异种移植较为理想的供体来源, 但猪源性供体存在异种移植免疫排斥和交叉感染的风险。近年来该领域提出可能导致人兽共患病的猪内源性逆转录病毒 (porcine endogenous retroviruses, PERVs) 的问题。Niu 等^[36] 使用体细胞核移植技术培育出了失活所有的 PERV 序列的猪胚胎细胞, 出生时小猪体内的 PERV 序列被证实处于失活状态。这项研究意味着可以防止跨物种病毒传播, 并解决了异种移植中的安全问题。也有研究认为在临床异种移植中可以使用核酸酶来指导基因组同源重组修饰猪基因, 研究人员改进了 CRISPR/Cas-9 基因组编辑技术, 通过 Cas-9 载体上荧光蛋白标记选择提高了 CRISPR/Cas-9 的突变效率^[37]。此外, 同源定向修复后的核酸酶介导插入后, 可以驱动猪基因组中的特异位点的转基因表达。然而, 临床异种移植的障碍主要还基于人体内有抗猪基因抗体。Martens 等^[38] 抽取移植前受体中的血清抗体与已敲除多糖基因 3 的猪细胞和猪白细胞抗原 (swine leukocyte antigens, SLA) 1 号结合, 发现这

些血清抗体与已敲除多糖基因 3 的猪细胞结合时产生的异种抗体很少, 但高敏受体中的一些人类白细胞抗原 (HLA) 抗体与 I 型 SLA 出现交叉反应。这提示 SLA I 类抗原是异种移植中基因组编辑的目标。有学者的研究发现另一种异体抗原——HLA II 类分子的同源物 SLA II 类分子, 这种蛋白可能对具有 HLA I 类分子的人表现为异种抗原^[39]。Li 等^[40] 进行异体移植炎症反应的研究, 发现血清蛋白、C 反应蛋白 (C reactive protein, CRP)、血清淀粉样蛋白 A (serum amyloid protein A, SAA) 会升高, 游离三碘甲状腺原氨酸 (free three iodine thyroid amino acid, FT₃) 和血小板计数会减少, 且使用核因子 (nuclear factor, NF) - κ B 抑制剂塔西单抗可以减少此类炎症反应。

3 展 望

总而言之, 影响移植效果的因素很多, 包括排斥反应、各种并发症导致的损伤等, 同时也包括了长期使用免疫抑制剂的不良反应。通过单一基因或因素的改变来改善移植器官的预后还是很难实现的, 这需要多因子、多细胞、多局部微环境的整体把握。作为移植领域的学术团体可以通过加强合作, 尤其是跨学科的交流, 通过多学科交叉的优势, 共享研究数据以及患者信息来加速深入研究的进程。同时, 基于器官移植和移植免疫研究技术的快速发展, 以及新的理论不断建立, 我们相信现存难题在不久的将来可以逐个攻破。

参考文献:

- [1] RAMESSUR CHANDRAN S, HAN Y, TESCH GH, et al. Inhibition of spleen tyrosine kinase reduces renal allograft injury in a rat model of acute antibody-mediated rejection in sensitized recipients[J]. *Transplantation*, 2017, 101(8): e240-e248. DOI: 10.1097/TP.0000000000001826.
- [2] WANG L, SONG J, WANG S, et al. Cross-sex transplantation alters gene expression and enhances inflammatory response in the transplanted kidneys[J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2017, 313(2): F326-F338. DOI: 10.1152/ajprenal.00039.2017.
- [3] VILLE S, POIRIER N, BRANCHEREAU J, et al. Anti-CD28 antibody and belatacept exert differential effects on mechanisms of renal allograft rejection[J]. *J Am Soc Nephrol*, 2016, 27(12): 3577-3588. DOI: 10.1681/ASN.2015070774.
- [4] OSHIMA S, KARRER EE, KAWATO Y, et al. The effect of ASP2409, a novel CD86-selective variant of CTLA4-Ig, on renal allograft rejection in nonhuman primates[J]. *Transplantation*, 2016, 100(12): 2611-2620. DOI: 10.1097/TP.0000000000001397.
- [5] JIN J, GONG J, LIN B, et al. Fc γ RIIb expression on B cells is associated with treatment efficacy for acute rejection after kidney transplantation[J]. *Mol Immunol*, 2017, 85: 283-292. DOI: 10.1016/j.molimm.2017.03.006.
- [6] TOMASONI S, TRIONFINI P, AZZOLLINI N, et al. AAV9-mediated engineering of autotransplanted kidney of non-human primates[J]. *Gene Ther*, 2017, 24(5): 308-313. DOI: 10.1038/gt.2017.21.
- [7] LIU T, ZHANG Y, SHEN Z, et al. Immunomodulatory effects of OX40Ig gene-modified adipose tissue-derived mesenchymal stem cells on rat kidney transplantation[J]. *Int J Mol Med*, 2017, 39(1): 144-152. DOI: 10.3892/ijmm.2016.2808.
- [8] LI M, DAI Y, LEI J, et al. Acute rejection after kidney transplantation promotes graft fibrosis with elevated adenosine level in rat[J]. *PLoS One*, 2017, 12(6): e0180211. DOI: 10.1371/journal.pone.0180211.
- [9] WANG YY, JIANG H, PAN J, et al. Macrophage-to-myofibroblast transition contributes to interstitial fibrosis in chronic renal allograft injury[J]. *J Am Soc Nephrol*, 2017, 28(7): 2053-2067. DOI: 10.1681/ASN.2016050573.
- [10] PALIN NK, SAVIKKO J, PASTERNAK A, et al. Activin inhibition limits early innate immune response in rat kidney allografts—a pilot study[J]. *Transpl Int*, 2017, 30(1): 96-107. DOI: 10.1111/tri.12876.
- [11] VALLABHAJOSYULA P, KORUTLA L, HABERTHEUER A, et al. Tissue-specific exosome biomarkers for noninvasively monitoring immunologic rejection of transplanted tissue[J]. *J Clin Invest*, 2017, 127(4): 1375-1391. DOI: 10.1172/JCI87993.
- [12] DURAN-STRUUCK R, SONDERMEIJER HP, BÜHLER L, et al. Effect of ex vivo-expanded recipient regulatory T cells on hematopoietic chimerism and kidney allograft tolerance across MHC barriers in cynomolgus macaques[J]. *Transplantation*, 2017, 101(2): 274-283. DOI: 10.1097/TP.0000000000001559.
- [13] PURROY C, FAIRCHILD RL, TANAKA T, et al. Erythropoietin receptor-mediated molecular crosstalk promotes T cell immunoregulation and transplant survival[J]. *J Am Soc Nephrol*, 2017, 28(8): 2377-2392. DOI: 10.1681/ASN.2016101100.
- [14] LITJENS NH, BOER K, ZUIJDERWIJK JM, et al. Natural regulatory T cells from patients with end-stage

- renal disease can be used for large-scale generation of highly suppressive alloantigen-specific tregs[J]. *Kidney Int*, 2017, 91(5): 1203-1213. DOI: 10.1016/j.kint.2016.09.043.
- [15] MAÏGA S, ALLAIN G, HAUET T, et al. Renal auto-transplantation promotes cortical microvascular network remodeling in a preclinical porcine model[J]. *PLoS One*, 2017, 12(7): e0181067. DOI: 10.1371/journal.pone.0181067.
- [16] AMDISEN C, JESPERSEN B, MØLDRUP U, et al. The unsuitability of implantable doppler probes for the early detection of renal vascular complications - a porcine model for prevention of renal transplant loss[J]. *PLoS One*, 2017, 12(5): e0178301. DOI: 10.1371/journal.pone.0178301.
- [17] ZHAO Y, DING C, XUE W, et al. Genome-wide DNA methylation analysis in renal ischemia reperfusion injury[J]. *Gene*, 2017, 610: 32-43. DOI: 10.1016/j.gene.2017.02.005.
- [18] TILLET S, GIRAUD S, KERFORNE T, et al. Inhibition of coagulation proteases Xa and IIa decreases ischemia-reperfusion injuries in a preclinical renal transplantation model[J]. *Transl Res*, 2016, 178:95-106. DOI: 10.1016/j.trsl.2016.07.014.
- [19] WU H, HUANG T, YING L, et al. MiR-155 is involved in renal ischemia-reperfusion injury via direct targeting of Foxo3a and regulating renal tubular cell pyroptosis[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2016,40(6): 1692-1705. DOI: 10.1159/000453218.
- [20] MELIS N, RUBERA I, COUGNON M, et al. Targeting eIF5A hypusination prevents anoxic cell death through mitochondrial silencing and improves kidney transplant outcome[J]. *J Am Soc Nephrol*, 2017, 28(3): 811-822. DOI: 10.1681/ASN.2016010012.
- [21] BAO DS, WU YK, FU SJ, et al. Hyperbaric oxygenation protects against ischemia-reperfusion injury in transplanted rat kidneys by triggering autophagy and inhibiting inflammatory response[J]. *Ann Transplant*, 2017, 22: 75-82.
- [22] SNELGROVE SL, LO C, HALL P, et al. Activated renal dendritic cells cross present intrarenal antigens after ischemia-reperfusion injury[J]. *Transplantation*, 2017, 101(5): 1013-1024. DOI: 10.1097/TP.0000000000001427.
- [23] JIA Y, WANG L, ZHAO GY, et al. Carbon monoxide inhibits the nuclear-cytoplasmic translocation of HMGB1 in an in vitro oxidative stress injury model of mouse renal tubular epithelial cells[J]. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci*, 2016, 36(6): 791-795. DOI: 10.1007/s11596-016-1663-y.
- [24] BOELS MG, VAN FAASSEN EE, AVRAMUT MC, et al. Direct observation of enhanced nitric oxide in a murine model of diabetic nephropathy[J]. *PLoS One*, 2017, 12(1): e0170065. DOI: 10.1371/journal.pone.0170065.
- [25] NIELSEN PM, LAUSTSEN C, BERTELSEN LB, et al. In situ lactate dehydrogenase activity: a novel renal cortical imaging biomarker of tubular injury?[J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2017, 312(3): F465-F473. DOI: 10.1152/ajprenal.00561.2015.
- [26] DECUYPERE JP, CEULEMANS LJ, WYLIN T, et al. Plasmatic villin 1 is a novel in vivo marker of proximal tubular cell injury during renal ischemia-reperfusion[J]. *Transplantation*, 2017, 101(11): e330-e336. DOI: 10.1097/TP.0000000000001876.
- [27] EL-SISI AE, SOKAR SS, ABU-RISHA SE, et al. Combination of tadalafil and diltiazem attenuates renal ischemia reperfusion-induced acute renal failure in rats[J]. *Biomed Pharmacother*, 2016, 84: 861-869. DOI: 10.1016/j.biopha.2016.10.009.
- [28] LIU Z, ZHONG Z, LAN J, et al. Mechanisms of hypothermic machine perfusion to decrease donation after cardiac death graft inflammation: through the pathway of upregulating expression of KLF2 and inhibiting TGF- β signaling[J]. *Artif Organs*, 2017, 41(1): 82-88. DOI: 10.1111/aor.12701.
- [29] HAMAOU K, GOWERS S, BOUTELLE M, et al. Organ pretreatment with cytotoxic endothelial localizing peptides to ameliorate microvascular thrombosis and perfusion deficits in ex vivo renal hemoreperfusion models[J]. *Transplantation*, 2016, 100(12): e128-e139. DOI: 10.1097/TP.0000000000001437.
- [30] MINOR T, SUTSCHET K, WITZKE O, et al. Prediction of renal function upon reperfusion by ex situ controlled oxygenated rewarming[J]. *Eur J Clin Invest*, 2016, 46(12): 1024-1030. DOI: 10.1111/eci.12687.
- [31] PARAJULI N, SHRUM S, TOBACYK J, et al. Renal cold storage followed by transplantation impairs expression of key mitochondrial fission and fusion proteins[J]. *PLoS One*, 2017, 12(10): e0185542. DOI: 10.1371/journal.pone.0185542.
- [32] KATHS JM, ECHEVERRI J, CHUN YM, et al. Continuous normothermic ex vivo kidney perfusion improves graft function in donation after circulatory death pig kidney transplantation[J]. *Transplantation*, 2017, 101(4): 754-763. DOI: 10.1097/TP.0000000000001343.
- [33] BLUM MF, LIU Q, SOLIMAN B, et al. Comparison of normothermic and hypothermic perfusion in porcine

- kidneys donated after cardiac death[J]. *J Surg Res*, 2017, 216: 35-45. DOI: 10.1016/j.jss.2017.04.008.
- [34] TOMALTY HE, HAMILTON EF, HAMILTON A, et al. Kidney preservation at subzero temperatures using a novel storage solution and insect ice-binding proteins[J]. *Cryo Letters*, 2017, 38(2): 100-107.
- [35] SMITH SF, ADAMS T, HOSGOOD SA, et al. The administration of argon during ex vivo normothermic perfusion in an experimental model of kidney ischemia-reperfusion injury[J]. *J Surg Res*, 2017, 218: 202-208. DOI: 10.1016/j.jss.2017.05.041.
- [36] NIU D, WEI HJ, LIN L, et al. Inactivation of porcine endogenous retrovirus in pigs using CRISPR-Cas9[J]. *Science*, 2017, 357(6357): 1303-1307. DOI: 10.1126/science.aan4187.
- [37] BUTLER JR, SANTOS RMN, MARTENS GR, et al. Efficient generation of targeted and controlled mutational events in porcine cells using nuclease-directed homologous recombination[J]. *J Surg Res*, 2017, 212:238-245. DOI: 10.1016/j.jss.2017.01.025.
- [38] MARTENS GR, REYES LM, BUTLER JR, et al. Humoral reactivity of renal transplant-waitlisted patients to cells from GGTA1/CMAH/B4GalNT2, and SLA class I knockout pigs[J]. *Transplantation*, 2017, 101(4): e86-e92. DOI: 10.1097/TP.0000000000001646.
- [39] LADOWSKI JM, REYES LM, MARTENS GR, et al. Swine leukocyte antigen (SLA) class II is a xenoantigen[J]. *Transplantation*, 2017, DOI: 10.1097/TP.0000000000001924 [Epub ahead of print].
- [40] LI T, LEE W, HARA H, et al. An investigation of extracellular histones in pig-to-baboon organ xenotransplantation[J]. *Transplantation*, 2017, 101(10): 2330-2339. DOI: 10.1097/TP.0000000000001676.

(收稿日期: 2017-11-14)

(本文编辑: 邬加佳 吴秋玲)

(上接第 23 页 from page 23)

病毒清除有重要相关。法国 Grellier 等研究显示: 应重视活体肾移植供肾 BK 病毒潜伏感染的发现, 供肾 BK 病毒感染将使肾移植受体 BK 病毒感染风险增加 6.5 倍。

7 异种移植

美国 Sykes 教授介绍了目前异种移植的进展概要, 通过应用诱导耐受的混合嵌合技术可以使 T 细胞、B 细胞及 NK 细胞耐受, 从而使诸多异种移植的免疫学障碍得到克服。人兽共患病是异种器官移植需要克服的重大难关, 其中, 猪内源性逆转录病毒 (porcine endogenous retroviruses, PERVs) 整合在猪的基因组中, 常规筛查和管理手段既往无法去除, 美国哈佛医学院一项基础研究通过 CRISPR/Cas-9 技术, 一次性将猪肾上皮细胞系 (PK15) 基因组中 PERVs 的 62 个元件拷贝全部敲除, 实现了猪全基因组清除 PERVs。

克服了 PERVs 的限制, 为猪器官异种移植奠定了基础, 迈出了异种移植突破性的一步, 临床试验的前期工作正在准备中。

参考文献:

- [1] 2017 American Transplant Congress Abstracts[J]. *Am J Transplant*, 2017, 17 (Suppl 3): 5-815. DOI: 10.1111/ajt.14304.
- [2] Pullen LC. 2017 American Transplant Congress focuses on hot issues[J]. *Am J Transplant*, 2017, 17(8): 1963-1964. DOI: 10.1111/ajt.14405.
- [3] JORDAN SC, LORANT T, CHOI J, et al. IgG endopeptidase in highly sensitized patients undergoing transplantation[J]. *N Engl J Med*, 2017, 377(5): 442-453. DOI: 10.1056/NEJMoa1612567.

(收稿日期: 2017-11-22)

(本文编辑: 邬加佳 吴秋玲)