

## 调节性免疫细胞在异种移植免疫中的作用

石炳毅 陈文 刘志佳

**【摘要】** 异种移植是未来解决器官短缺最有前景的方法。近年来基因编辑和免疫学技术的进步推动了异种移植的快速发展,但是异种移植的临床应用仍然存在诸多难以克服的障碍,其中排斥反应是引起异种移植失败的最重要原因。调节性免疫细胞是机体内一群具有负性调节功能的免疫细胞,能够抑制同种异体移植排斥反应,延长移植物的存活时间。本文总结了近几年调节性免疫细胞在异种移植应用的研究进展,为异种移植排斥反应预防和治疗提供参考。

**【关键词】** 调节性免疫细胞;异种移植;排斥反应;移植免疫;调节性 T 细胞 (Treg);调节性树突状细胞 (DCreg);滤泡调节性 T 细胞 (Tfr);调节性 B 细胞 (Breg)

**【中图分类号】** R617, R392.4 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1674-7445 (2020) 03-0001-05

**The function of regulatory immunological cell in xenotransplantation immunity** Shi Bingyi, Chen Wen, Liu Zhijia. *Organ Transplantation Institute of the 8th Medical Center of Chinese People's Liberation Army General Hospital, Beijing 100091, China*

Corresponding author: Shi Bingyi, Email: shibingyi666@126.com

**【Abstract】** Xenotransplantation is the most promising method to resolve the organ shortage problem in the future. In recent years, the advances in gene editing and immunological technique have driven the rapid development of xenotransplantation. However, there are still many insurmountable obstacles in the clinical application of xenotransplantation, among which the rejection is the most important cause of the xenotransplantation failure. Regulatory immunological cells are a group of immunological cells with the negative regulation function in the body, which can inhibit allotransplantation rejection and prolong the survival time of the graft. This paper summarized the research progress of regulatory immunological cells in the xenotransplantation application in recent years, providing reference for the prevention and treatment of xenotransplantation rejection.

**【Key words】** Regulatory immunological cell; Xenotransplantation; Rejection; Transplantation immunity; Regulatory T cell (Treg); Regulatory dendritic cell (DCreg); Follicular regulatory T cell (Tfr); Regulatory B cell (Breg)



作者简介:石炳毅,主任医师、教授、博士生导师,第十届全国政协委员,获国务院政府特殊津贴、何梁何利科技进步奖和中国医师奖。现任中国人民解放军总医院第八医学中心全军器官移植研究所名誉所长、北京市器官移植与免疫调节重点实验室主任,兼任中国人体器官捐献与移植委员会委员、国家级肾脏移植质控中心主任、中华医学会器官移植学分会主任委员、中国研究型医院学会移植医学专业委员会主任委员等学术职务。长期从事泌尿外科和器官移植的临床与科研工作,构建国家级肾脏移植数据平台和质控中心,主持制定器官移植相关行业标准,为推动我国器官移植事业的规范化进程做出了突出贡献。先后承担国家 863 课题、科技支撑重大项目、国家自

DOI: 10.3969/j.issn.1674-7445.2020.03.001

基金项目:国家自然科学基金(81570680、81571555)

作者单位:100091 北京,中国人民解放军总医院第八医学中心全军器官移植研究所

通信作者:石炳毅, Email: shibingyi666@126.com

然自然科学基金课题 20 余项。以第一完成人获国家科技进步二等奖 1 项，中华医学科技一等奖 2 项，军队（省部级）科技进步和医疗成果一、二等奖 5 项，国家发明专利 6 项。主编国内行业标准《临床诊疗指南》和《临床技术操作规范》器官移植分册等专著 9 部，发表论文 330 余篇，其中 SCI 收录 51 篇，培养博士（后）、硕士研究生 72 人。

异种移植是指不同种类动物器官（组织或细胞）进行移植或移植给人类，是未来解决器官短缺最有前景的方法。近年来基因编辑和免疫学技术的进步推动了异种移植的快速发展，越来越多的学者从事该领域研究。但是异种移植的临床应用仍然存在诸多难以克服的障碍，其中排斥反应是引起异种移植失败的最重要原因。相对于同种异体移植，异种排斥反应更剧烈更难克服，机制也更复杂。目前临床常用的治疗手段很难达到令人满意的效果，且可引起患者出现免疫力极度低下和病原体感染等严重并发症<sup>[1]</sup>。调节性免疫细胞是机体内一群具有负性调节功能的免疫细胞，大量临床和基础研究证实调节性免疫细胞能够抑制同种异体移植排斥反应，延长移植物的存活时间<sup>[2]</sup>。本文总结了近几年调节性免疫细胞在异种移植应用的研究进展，为异种移植排斥反应的预防和治疗提供参考。

## 1 异种移植历史回顾

1964 年 Reemtsma 等<sup>[3]</sup>首次报道了黑猩猩供肾给人类的异种移植。之后 Starzl 等<sup>[4]</sup>施行了狒狒作为供者的 6 例肾脏移植和 2 例肝脏移植。然而这些早期异种移植的受者或移植物存活时间均未超过 1 年，导致异种移植的临床与基础研究进入了低谷。上世纪 80 年代后，同种异体移植器官严重短缺引起了移植学家对异种移植的再次关注。1994 年，Starzl 等<sup>[5]</sup>报道 2 例狒狒供体的肝脏移植。1995 年 Makowa 等<sup>[6]</sup>报道了 1 例猪供肝脏移植，以暂时性移植肝支持暴发性肝衰竭患者的肝功能。

基因编辑和免疫学技术的快速发展，使得近十多年异种移植取得了飞速的进展。Mcgregor 等<sup>[7]</sup>将转人 CD55 基因猪的心脏移植给狒狒，同时应用高强度的免疫抑制方案，并输注可溶性 Gal 抗原以清除体内天然抗体，移植物中位存活时间达到 76 d，但同时受体也出现了一系列由过度免疫抑制而引起的感染并发症。Mohiuddin 等<sup>[8]</sup>利用 CD40 抗体，将敲除  $\alpha$ -1, 3-半乳糖（ $\alpha$ -1, 3-Gal）基因和过表达两种人体蛋白基因的猪心脏移植到狒狒体内，结果显示平均存活时间为 298 d，最长的 1 只已经存活了 945 d。虽然缺少

临床研究数据，其他器官大动物异种移植均取得了较大进步，肾脏、肝脏和肺脏移植物的最长存活时间分别达到了 310 d、29 d 和 7 d。猪胰岛可能是未来最早进入临床应用的异种移植器官（组织），目前已经有数种异种胰岛产品正在进行临床实验，显示异种胰岛可显著减少患者胰岛素的使用量。

## 2 异种移植排斥反应

相对于同种异体器官移植，异种移植的排斥反应更为复杂更难克服，主要包括超急性排斥反应（hyperacute rejection, HAR）、急性血管性排斥反应（acute vascular rejection, AVR）、急性细胞性排斥反应（acute cell rejection, ACR）。早期研究证实种系关系较远动物之间的大器官移植均会立即受到 HAR 的破坏，以血管内血栓和血管间出血为主要特征。HAR 常发生于非协调性异种移植后数分钟至数小时，机制是人体内预存的天然抗体与移植物血管内皮细胞表达的  $\alpha$ -1, 3-Gal 抗原结合后，引发补体级联反应，从而严重破坏移植物。AVR 以血管损害为主要特征，在 AVR 的早期即可见到移植物血管内皮表面有弥漫性的受者 IgM 或时有 IgG 的沉积。抗供者抗体、组织复合因子和凝血调节因子是 AVR 启动中重要的因素。若移植物能安全度过前两种排斥反应，人体还将对移植物产生主要由 T 细胞介导的排斥反应即 ACR。CD4<sup>+</sup> T 细胞、抗原提呈细胞和自然杀伤（natural killer, NK）细胞等在 ACR 致病过程中发挥着重要的作用<sup>[9]</sup>。

## 3 调节性免疫细胞网络

除了效应性免疫细胞，人体内还存在很多发挥负性调节功能的免疫细胞，包括调节性 T 细胞（regulatory T cell, Treg）、调节性树突状细胞（regulatory dendritic cell, DCreg）、滤泡调节性 T 细胞（follicular regulatory T cell, Tfr）和调节性 B 细胞（regulatory B cell, Breg）等。我们把这些具有负性调节功能的免疫细胞及其相互之间的复杂联系称为“调节性免疫细胞网络”，其在有效地启动免疫应答、调控应答的强度与平衡并适时终止的过程中，发挥精确的负性调节

作用<sup>[10]</sup>。

近年来调节性免疫细胞在同种异体移植领域的基础研究和临床应用均取得了许多突破性进展。Treg 是机体内最重要的调节性免疫细胞，在调控免疫应答和维持外周免疫耐受中发挥着关键作用。大量研究显示 Treg 可诱导同种异体肾脏、肝脏、心脏和肺脏免疫耐受，延长移植物的存活时间<sup>[11]</sup>。Breg 和 Tfr 均与体液免疫紧密相关，研究发现这两种调节性免疫细胞能够早期诊断和预防同种异体移植后抗体介导的排斥反应（antibody mediated rejection, AMR）的发生<sup>[12]</sup>。调节性浆细胞（regulatory plasma cell, Preg）是最新发现的一种调节性免疫细胞，通过淋巴细胞活化基因-3 分子（lymphocyte activation gene-3, LAG-3）和白细胞介素（interleukin, IL）-10 发挥抑制浆细胞和抗体生成的功能<sup>[13]</sup>。因此 Breg、Tfr 和 Preg 在预防和治疗 HAR 和 AVR 中可能具有潜在的应用价值。

## 4 Treg 与异种移植

Treg 是临床应用效果最明确的调节性免疫细胞，具有免疫抑制能力强、作用特异性高、可体外大量扩增等优点。Treg 主要通过两种方式发挥生物学功能：一是直接作用，Treg 高表达的细胞毒性 T 淋巴细胞相关抗原-4（cytotoxic T lymphocyte associated antigen-4, CTLA-4），能特异性结合 B7 分子，诱导活化的效应性 T 细胞处于免疫无能状态，此外 Treg 表面表达的人类白细胞抗原-G（human leucocyte antigen-G, HLA-G）、程序性细胞死亡受体-1（programmed cell death protein-1, PD-1）和糖皮质激素诱导的肿瘤坏死因子受体（glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor, GITR）等能够通过直接细胞接触发挥免疫抑制功能；二是分泌方式，Treg 可分泌 IL-10、转化生长因子- $\beta$ （transforming growth factor- $\beta$ , TGF- $\beta$ ）和颗粒酶 A 等，抑制 T 细胞增殖活化和炎症因子释放，对体液免疫也具有一定的抑制作用<sup>[14]</sup>。近年来，许多研究显示 Treg 可进一步分为不同亚型，不同亚型 Treg 具有不同的特异性表面标志物和生物学功能。CD150<sup>high</sup>Treg 和 IL-35-producing Treg 具有很强的免疫调控功能，而 Foxp3<sup>low</sup>CD45RA-Treg 不具有免疫抑制作用，且能分泌干扰素（interferon, IFN）- $\gamma$  等炎症因子<sup>[15-16]</sup>。

Treg 在异种移植中的应用是目前的研究热点。许多研究证实人或者啮齿类动物的 Treg 在体外可有效

抑制 T 细胞介导的抗猪异种排斥反应。Wu 等<sup>[17]</sup> 研究发现猪-啮齿类动物胰岛细胞移植后，耐受组淋巴细胞分类中 Treg 比例显著升高，清除 Treg 会显著提高异种排斥反应的发生率。Yi 等<sup>[18]</sup> 构建猪-狒狒异种心脏移植模型，发现 Treg 数量降低与排斥反应的发生紧密相关，而耐受受者体内 Treg 数量在移植早期即呈上升趋势。在猪-小鼠异种胰岛移植中，移植 3 d 后 Treg 治疗可显著延长移植物存活时间（>100 d），而对照组仅存活 35 d。也有研究显示 Treg 治疗能够通过诱导 B 细胞凋亡，降低大鼠-小鼠异种心脏移植排斥反应的发生率<sup>[19]</sup>。然而在大动物异种移植实验中，Treg 治疗效果并不理想。Shin 等<sup>[20]</sup> 进行了猪-恒河猴异种胰岛移植实验，移植后输注体外扩增的 Treg 到受者体内，结果显示停止免疫抑制剂使用后，异种胰岛依旧会发生强烈的排斥反应，也未观测到存活时间明显延长。这可能存在几个方面的原因：（1）相对于免疫抑制剂，Treg 作用更为平缓温和，很难抑制住剧烈快速的异种排斥反应；（2）异种排斥反应的微环境会严重损伤移植 Treg 的功能，部分 Treg 甚至会转换为 Foxp3<sup>low</sup>CD45RA Treg 等促排斥反应亚型；（3）目前异种移植研究主要集中在 HAR 和 AVR 这两种体液免疫相关急性排斥反应，而对 T 细胞介导的异种排斥反应机制了解很少。

## 5 DCreg 与异种移植

树突状细胞（dendritic cell, DC）分化成熟可分为 4 个阶段，因此按照成熟程度，DC 可分为 DC 前体细胞、未成熟 DC（immature DC, imDC）、迁徙期 DC 和成熟 DC（mature DC, mDC），这是目前最常用的分类方法。mDC 是最重要的抗原提呈细胞，在异种排斥反应中发挥着重要作用，可引起强烈的受者 T 细胞活化反应。imDC 也可被称为耐受性 DC，细胞表面高表达吲哚胺 2,3-双加氧酶（indoleamine 2,3-dioxygenase, IDO）和免疫球蛋白样转录子 4（immunoglobulin-like transcript 4, ILT4）等，可抑制 T 细胞增殖活化、介导 T 细胞凋亡和自噬、诱导 Treg 增殖等，因此具有诱导异种移植物免疫耐受的功能<sup>[21]</sup>。此外，许多研究报道了一种 DCreg，具有很强的免疫抑制功能。大量研究证实 DCreg 可显著延长同种异体移植物的存活时间，并诱导其免疫耐受<sup>[22]</sup>。Ezzelarab 等<sup>[23]</sup> 构建非人灵长类动物肾移植模型，在移植前 1 d 输注供者抗原冲击的 DCreg，结果显示其

可以显著延长移植物的平均存活时间,且未检测到供体特异性抗体。DCreg 进入临床实验早期主要治疗自身免疫性疾病,结果显示 DCreg 输注对类风湿性关节炎、1 型糖尿病和克罗恩病均具有一定的治疗效果,且安全性也得到了很好的验证。对于同种异体移植,多项 DCreg 治疗的临床实验已经得到了批准,目前正在美国匹兹堡大学等机构实施<sup>[24]</sup>。

DCreg 在异种移植的应用目前尚处于起步阶段。Tian 等<sup>[25]</sup>在猪-小鼠胰岛异种移植前输注 CTLA4-IgG4 修饰 imDC,结果显示其可以显著延长移植物的存活时间,增加脾脏中 Treg 数量。Madelon 等<sup>[26]</sup>使用雷帕霉素 (rapamycin, Rapa) 或者 IL-10 诱导单核细胞向 DC 分化,发现 Rapa-DC 和 IL-10-DC 均可以抑制人抗猪 NK 细胞活化及 IFN- $\gamma$  的产生,IL-10-DC 还对人抗猪细胞毒性 T 淋巴细胞激活具有很强的调控作用。Li 等<sup>[27]</sup>在培养基中加入特定抗炎分子,可以快速诱导猪耐受型 DC 产生,这种 DC 高表达 IL-10 和 TGF- $\beta_1$ ,可抑制猪效应性 T 细胞增殖和 IFN- $\gamma$  的产生。DCreg 在大动物异种移植的治疗效果目前尚不清楚,需要进一步实验验证。此外,imDC 应用于异种移植存在一定的争议,在排斥反应或者缺血-再灌注微环境下,imDC 可能会进一步分化为 mDC,加重排斥反应或者至少没有显著免疫抑制功能,采用环孢素、他克莫司或者维生素 D<sub>3</sub> 等诱导 imDC 产生致耐受原特性可能具有一定的治疗效果。

## 6 结 语

异种移植是人类多年来不懈探索的领域,临床异种移植尚无成功的经验。近年来异种移植基础研究进展迅速,大动物异种移植存活时间显著延长,猪内源性逆转录病毒感染问题也得到了解决。排斥反应依旧是导致异种移植失败的最主要原因,调节性免疫细胞治疗为这一问题解决带来了曙光。Treg 和 DCreg 均能显著延长异种移植存活时间,诱导免疫耐受。目前调节性免疫细胞治疗也存在很多问题,在大动物异种移植中的治疗效果也不甚理想。相信随着基因编辑、免疫学和外泌体技术的进一步发展,调节性免疫细胞在异种移植中的治疗效果将会满足临床需求。最后我们引用器官移植巨匠 Sir Roy Calne 的一句话: Clinical xenotransplantation is just around the corner, but it may be very long corner。

## 参考文献:

- [1] STOLF NAG. Xenotransplantation: on the way to clinical application?[J]. Braz J Cardiovasc Surg, 2019,34(3):2. DOI: 10.21470/1678-9741-2019-0604.
- [2] KRAJEWSKA M, KOŚCIELSKA-KASPRZAK K, KAMIŃSKA D, et al. Kidney transplant outcome is associated with regulatory T cell population and gene expression early after transplantation[J]. J Immunol Res, 2019:7452019. DOI: 10.1155/2019/7452019.
- [3] REEMTSMA K, MCCRACKEN BH, SCHLEGEL JU, et al. Heterotransplantation of the kidney: two clinical experiences[J]. Science, 1964, 143(3607):700-702.
- [4] STARZL TE, MARCHIORO TL, PETERS GN, et al. Renal heterotransplantation from baboon to man: experience with 6 cases[J]. Transplantation, 1964, 2:752-776.
- [5] STARZL TE, VALDIVIA LA, MURASE N, et al. The biological basis of and strategies for clinical xenotransplantation[J]. Immunol Rev, 1994, 141:213-244.
- [6] MAKOWA L, CRAMER DV, HOFFMAN A, et al. The use of a pig liver xenograft for temporary support of a patient with fulminant hepatic failure[J]. Transplantation, 1995, 59(12):1654-1659.
- [7] MCGREGOR CG, TEOTIA SS, BYRNE GW, et al. Cardiac xenotransplantation: progress toward the clinic[J]. Transplantation, 2004, 78(11):1569-1575.
- [8] MOHIUDDIN MM, SINGH AK, CORCORAN PC, et al. Chimeric 2C10R4 anti-CD40 antibody therapy is critical for long-term survival of GTKO.hCD46.hTBM pig-to-primate cardiac xenograft[J]. Nat Commun, 2016, 7:11138. DOI: 10.1038/ncomms11138.
- [9] 石炳毅, 陈文. 临床异种器官移植所面临的种种挑战 [J]. 中华器官移植杂志, 2017,38(12):705-707.  
SHI BY, CHEN W. Challenges of clinical xenotransplantation[J]. Chin J Organ Transplant, 2017,38(12):705-707.
- [10] 石炳毅. 调节性免疫细胞网络在移植免疫中的作用 [J]. 中华医学杂志, 2011,91(44):3154-3157. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0376-2491.2011.44.018.  
SHI BY. Role of regulatory immune cell networks in transplantation immunity [J]. Natl Med J China, 2011,91(44):3154-3157. DOI: 10.3760/cma.j.issn. 0376-2491.2011.44.018.
- [11] TANG Q, VINCENTI F. Transplant trials with Tregs: perils and promises[J]. J Clin Invest, 2017, 127(7):2505-2512. DOI: 10.1172/JCI90598.
- [12] CHEN W, BAI J, HUANG H, et al. Low proportion of follicular regulatory T cell in renal transplant patients with chronic antibody-mediated rejection[J]. Sci Rep,

- 2017, 7(1):1322. DOI: 10.1038/s41598-017-01625-3.
- [13] LINO AC, DANG VD, LAMPROPOULOU V, et al. LAG-3 inhibitory receptor expression identifies immunosuppressive natural regulatory plasma cells[J]. *Immunity*, 2018, 49(1):120-133. DOI: 10.1016/j.immuni.2018.06.007.
- [14] FERREIRA LMR, MULLER YD, BLUESTONE JA, et al. Next-generation regulatory T cell therapy[J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2019, 18(10):749-769. DOI: 10.1038/s41573-019-0041-4.
- [15] SAITO T, NISHIKAWA H, WADA H, et al. Two Foxp3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T cell subpopulations distinctly control the prognosis of colorectal cancers[J]. *Nat Med*, 2016, 22(6):679-684. DOI: 10.1038/nm.4086.
- [16] YANG S, SHENG X, XIANG D, et al. CD150<sup>high</sup>Treg cells may attenuate graft versus host disease and intestinal cell apoptosis after hematopoietic stem cell transplantation[J]. *Am J Transl Res*, 2019, 11(3):1299-1310.
- [17] WU J, HU M, QIAN YW, et al. In vivo costimulation blockade-induced regulatory T cells demonstrate dominant and specific tolerance to porcine islet xenografts[J]. *Transplantation*, 2017, 101(7):1587-1599. DOI: 10.1097/TP.0000000000001482.
- [18] YI S, JI M, WU J, et al. Adoptive transfer with in vitro expanded human regulatory T cells protects against porcine islet xenograft rejection via interleukin-10 in humanized mice[J]. *Diabetes*, 2012, 61(5):1180-1191. DOI: 10.2337/db11-1306.
- [19] MA Y, HE KM, GARCIA B, et al. Adoptive transfer of double negative T regulatory cells induces B-cell death in vivo and alters rejection pattern of rat-to-mouse heart transplantation[J]. *Xenotransplantation*, 2008, 15(1):56-63. DOI: 10.1111/j.1399-3089.2008.00444.x.
- [20] SHIN JS, MIN BH, KIM JM, et al. Failure of transplantation tolerance induction by autologous regulatory T cells in the pig-to-non-human primate islet xenotransplantation model[J]. *Xenotransplantation*, 2016, 23(4):300-309. DOI: 10.1111/xen.12246.
- [21] GORDY JT, LUO K, FRANCICA B, et al. Anti-IL-10-mediated enhancement of antitumor efficacy of a dendritic cell-targeting MIP3 $\alpha$ -gp100 vaccine in the B16F10 mouse melanoma model is dependent on type I interferons[J]. *J Immunother*, 2018, 41(4):181-189. DOI: 10.1097/CJI.0000000000000212.
- [22] THOMSON AW, TURNQUIST HR, ZAHORCHAK AF, et al. Tolerogenic dendritic cell-regulatory T-cell interaction and the promotion of transplant tolerance[J]. *Transplantation*, 2009, 87(9 Suppl): S86-S90. DOI: 10.1097/TP.0b013e3181a2dccc.
- [23] EZZELARAB MB, RAICH-REGUE D, LU L, et al. Renal allograft survival in nonhuman primates infused with donor antigen-pulsed autologous regulatory dendritic cells[J]. *Am J Transplant*, 2017, 17(6):1476-1489. DOI: 10.1111/ajt.14182.
- [24] THOMSON AW, HUMAR A, LAKKIS FG, et al. Regulatory dendritic cells for promotion of liver transplant operational tolerance: rationale for a clinical trial and accompanying mechanistic studies[J]. *Hum Immunol*, 2018, 79(5):314-321. DOI: 10.1016/j.humimm.2017.10.017.
- [25] TIAN M, LV Y, ZHAI C, et al. Alternative immunomodulatory strategies for xenotransplantation: CD80/CD86-CTLA4 pathway-modified immature dendritic cells promote xenograft survival[J]. *PLoS One*, 2013, 8(7): e69640. DOI: 10.1371/journal.pone.0069640.
- [26] MADELON N, PUGA YUNG GL, SEEBACH JD. Human anti-pig NK cell and CD8<sup>+</sup> T-cell responses in the presence of regulatory dendritic cells[J]. *Xenotransplantation*, 2016, 23(6):479-489. DOI: 10.1111/xen.12279.
- [27] LI M, ECKL J, ABICHT JM, et al. Induction of porcine-specific regulatory T cells with high specificity and expression of IL-10 and TGF- $\beta_1$  using baboon-derived tolerogenic dendritic cells[J]. *Xenotransplantation*, 2018, 25(1). DOI: 10.1111/xen.12355.

(收稿日期: 2020-02-18)

(本文编辑: 邬加佳 吴秋玲)