

异种器官移植免疫生物学研究进展

宋宗培 郭蝶 蔡志明 牟丽莎

【摘要】 异种器官移植是解决器官移植短缺的有效手段之一，猪作为潜在的器官移植供体来源已得到广泛认可，但是要实现猪至灵长类动物的异种器官移植的临床应用需要克服多重免疫生物学障碍。本文以异种器官移植多重免疫排斥反应发生的时间先后为顺序，依次对超急性排斥反应、急性体液异种移植排斥反应和急性细胞排斥反应、血栓性微血管病和慢性排斥反应的研究进展进行了综述。

【关键词】 异种器官移植；免疫抑制剂；基因工程猪；异种抗原；超急性排斥反应；急性体液异种移植排斥反应；急性细胞排斥反应；血栓性微血管病；慢性排斥反应

【中图分类号】 R617, R392.4 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1674-7445 (2018) 03-0013-03

近年来，随着免疫生物学的研究深入发展，异种器官移植获得了长足的进步^[1-2]。尽管猪作为潜在的器官移植供体来源得到了认可，但是灵长类动物对猪的免疫排斥仍是一个较大的障碍^[1-4]。异种器官移植需面临3道免疫生物学障碍，首先是 α -1,3-半乳糖(α -1,3-galactose, α Gal)抗原介导的超急性排斥反应(hyperacute rejection, HAR)，其次是急性体液异种移植排斥反应(acute humoral xenograft rejection, AHXR)和急性细胞排斥反应(acute cellular rejection, ACR)，最后是血栓性微血管病和慢性排斥反应。

目前，克服这些免疫生物学障碍最有效的方法是通过基因修饰猪消除两个物种之间的免疫系统差异^[5-6]。基因修饰猪具有敲除异种抗原、表达人体补体调节蛋白和凝血调节蛋白等特点，可延长猪来源移植体在灵长类动物受体中的存活时间。本文就异种器官移植中各阶段免疫生物学障碍的近期研究进展作一综述。

1 超急性排斥反应

猪到灵长类动物的异种器官移植时首先发生HAR。HAR的发生是由IgM和IgG结合于表达在猪血管内皮细胞上的 α Gal抗原所引起。 α Gal是一种糖基抗原决定簇，除类人猿、狒狒、旧世界猴等旧世界灵长类动物和人类之外

的所有哺乳动物均有表达。由于基因突变，灵长类动物已失去了表达 α Gal的能力，并产生抗体来对抗 α Gal抗原^[7]。灵长类动物体内天然存在的抗体可直接作用于移植体血管内皮细胞，通过激发补体介导的内皮细胞损伤，导致多种血管疾病如血栓形成、间质出血及水肿等，最终导致移植体功能破坏^[8]。

为解决异种器官移植中的HAR，第一个 α -1,3-半乳糖基转移酶基因敲除(α -1,3-galactosyltransferase gene-knockout, GTKO)基因修饰猪于2003年产出，研究结果表明GTKO基因修饰猪对HAR具有保护作用^[9-10]。此外，由于异种器官移植中的HAR类似于同种异体移植排斥反应中的ABO血型不合，去除灵长类动物体内天然存在的抗体可能会防止HAR的发生。研究者对异种器官移植受体静脉注射Gal寡糖以去除抗 α Gal抗体，发现其仅能延迟HAR的发生，但并不能完全避免HAR的发生^[11]。

灵长类动物细胞表面的补体调节蛋白(衰变加速因子、膜辅助因子蛋白)可使自身免受补体介导的损伤，当基因修饰猪作为异种器官移植供体来源逐渐成为可能时，构建表达补体调节蛋白的转基因猪也成为解决HAR的方案之一。研究者已对猪体内进行40多个基因的改造，一些猪已经实现6个基因的遗传改造^[6]。

DOI: 10.3969/j.issn.1674-7445.2018.03.013

基金项目: 中国博士后科学基金(2016M602575); 国家重点研发计划(2017YFC1103704); 深圳市医疗卫生三名工程(SZSM201412020); 深圳市高水平医学学科建设专项基金(2016031638); 深圳市科技计划(JCJY20160229204849975、GJHZ20170314171357556); 深圳市卫生计生系统科研项目(SZXJ2017021)

作者单位: 518035 广东深圳, 深圳市第二人民医院(宋宗培、郭蝶、蔡志明、牟丽莎); 中山大学医学院(宋宗培、牟丽莎)

作者简介: 宋宗培, 男, 博士后, 研究方向为免疫学, Email: zpsong2008@163.com

通讯作者: 牟丽莎, 女, 1983年生, 博士, 副研究员, 研究方向为异种胰岛移植, Email: molly_molly@163.com

2 急性体液异种移植排斥反应和急性细胞排斥反应

急性排斥反应通常在异种器官移植后数日至数周的时间内发生,包括 AHXR 和 ACR。

AHXR 的发生与抗体和补体对内皮的激活、先天性免疫细胞对移植物的浸润有关。抗 α Gal 抗体和抗非 Gal 抗体持续激活内皮细胞,诱导前凝血酶类、炎症分子表达和微血管血栓形成,此外由于天然抗凝物质表达和活性均下调,还会导致凝血功能紊乱。因此即便是进行 GTKO 基因修饰猪器官移植时,仍有针对非 Gal 抗原的天然抗体参与免疫反应。目前认为 AHXR 的发生主要与跨种系的补体活化有关,表达人补体调节蛋白的 GTKO 基因修饰猪,其器官在异种移植中能存活更长时间^[12-13]。阻止抗非 Gal 抗体的产生,供体器官可表达抗凝物质或低表达促凝物质,也可以在一定程度上减轻 AHXR 对供体器官的损害。

ACR 主要由 T 细胞介导, T 细胞被异种移植体内皮细胞激活,产生大量抗体,直接破坏靶细胞。然而 ACR 在猪至灵长类动物的异种器官移植的排斥反应中几乎不可见,这可能是由于异种器官移植中体液反应响应速度快于细胞反应。尽管 T 细胞介导的 ACR 与同种移植类似,但是针对同种移植中抑制 T 细胞功能的免疫抑制方案却对 ACR 的治疗效果有限。目前研究主要集中在诱导调节性 T 细胞和生物阻断 T 细胞活化等方面。

3 血栓性微血管病和慢性排斥反应

移植物血栓性微血管病是导致异种器官移植失败的重要因素。抗体、补体和先天性免疫细胞对血管内皮细胞的激活是形成血栓性微血管病的首要原因,它们使细胞由抗凝血状态变成了促凝血状态。猪和灵长类动物之间有多个凝血/抗凝因子不兼容系统,移植物和受体间的凝血失调会使器官微血管形成血栓、血管闭塞,最终导致移植物缺血坏死^[14]。因此,通过使用抗凝血剂和抗血栓剂可以适当解决灵长类动物异种器官移植的凝血功能障碍。供体猪的遗传修饰可有助于减轻移植物血栓性微血管病并有效延长移植物存活时间,例如插入血栓调节蛋白、内皮细胞蛋白 C 受体、组织因子途径抑制剂或 CD39 等抗凝血基因^[14]。最新研究发现,敲除组织因子表达的猪有作为异种移植供体猪的潜力^[15]。

慢性排斥反应即移植物血管病变,其组织病理学与同种异体移植类似^[16]。异种移植慢性排斥反应的机制鲜有报道,但比较明确的是该反应与长期低强度的免疫反应诱发的慢性低强度的移植物血管内皮细胞激活有关。Mohiuddin 等^[17]的研究显示表达人血栓调节蛋白(human thrombomodulin, hTM)的 GTKO 基因修饰猪心脏移植没有出现移植物血管病变,并且其中 1 例已存活 2 年以上。研究表明表达 hTM 的 GTKO 基因修饰猪更有利于异种器官移植, hTM 的表达阻止血小板减少,延缓血栓形成和消

耗性凝血病的发生^[18]。

4 异种器官移植面临的其他问题

前面讨论的异种器官移植面临的多重生物学障碍多是以异种心脏移植为模型,实际上猪肺移植和肝移植的免疫生物学问题更复杂,移植物只能存活数日,远低于心脏移植的存活时间^[19]。除了宏观的解剖因素,其中一个主要问题是供体猪的肺脏和肝脏血管内含有大量的炎症细胞如巨噬细胞等,巨噬细胞可吞噬受体血小板和红细胞^[20]。目前看来只有通过器官源猪的多种基因修饰来实现肺脏和肝脏的异种移植。

5 小结

异种器官移植的理想状态是诱导产生免疫耐受,受体的免疫系统被严格控制,移植的器官会被当成自身的一部分而不产生排斥反应。目前有研究者通过诱导造血细胞嵌合体 and 猪胸腺共移植等方法在诱导免疫耐受方面作出了努力,但并没有取得圆满成功^[10]。Mohiuddin 等^[17]将包含抗 α CD40 抗体的免疫抑制方案应用于 GTKO/hCD46/hTBM 基因修饰猪至狒狒的异种心脏移植,结果发现其存活时间可高达 945 d。Zhu 等^[21]将表达 2 种人体补体调节蛋白和 3 种人体凝血调节蛋白的 GTKO 基因修饰猪的肾脏移植至狒狒,结果发现供肾可存活并发挥功能 136 d。

目前异种器官移植面临多重的免疫生物学障碍,相信随着各种基因修饰猪的产生、免疫抑制剂和抗炎药物种类的大量增加,异种器官移植的诸多问题将会逐步得到解决。

参考文献:

- [1] 周明,邓阳阳,戴一凡,等.猪肺异种移植的研究进展与发展方向[J].器官移植,2017,8(6):476-479. DOI: 10.3969/j.issn.1674-7445.2017.06.013. ZHOU M, DENG YY, DAI YF, et al. Research progress and future development of swine donor lung xenotransplantation[J]. Organ Transplant, 2017, 8(6):476-479. DOI: 10.3969/j.issn.1674-7445.2017.06.013.
- [2] 刘征兆,何甜,蔡志明,等.猪胰岛异种移植的研究进展[J].器官移植,2017,8(3):246-250. DOI: 10.3969/j.issn.1674-7445.2017.03.016. LIU ZZ, HE T, CAI ZM, et al. Research progress on pig islet xenotransplantation[J]. Organ Transplant, 2017, 8(3): 246-250. DOI: 10.3969/j.issn.1674-7445.2017.03.016.
- [3] 何盛南,曲龙,邹志成,等.生物心脏瓣膜移植研究进展[J].器官移植,2017,8(5):410-412. DOI: 10.3969/j.issn.1674-7445.2017.05.016. HE SN, QU L, ZOU ZC, et al. Research progress on transplantation of bioprosthetic heart valves[J]. Organ Transplant, 2017, 8(5): 410-412. DOI: 10.3969/j.issn.1674-7445.2017.05.016.
- [4] 张青,周翠冰,戴一凡,等.神经细胞异种移植的研究进展[J].器官移植,2017,8(4):328-332. DOI: 10.3969/j.issn.1674-7445.2017.04.017. ZHANG Q, ZHOU CB, DAI YF, et al. Progress of nerve cell xenotransplantation[J]. Organ Transplant, 2017, 8(4): 328-332. DOI: 10.3969/j.issn.1674-7445.2017.04.017.
- [5] COOPER DK, EKSER B, RAMSOONDAR J, et al. The role of genetically engineered pigs in xenotransplantation research[J]. J Pathol, 2016, 238(2): 288-299. DOI: 10.1002/path.4635.
- [6] 张军方,徐佳,蔡志明,等.用于器官移植的基因修饰猪的研究

- 进展[J]. 器官移植, 2017, 8(2): 165-170. DOI: 10.3969/j.issn.1674-7445.2017.02.014.
- ZHANG JF, XU J, CAI ZM, et al. Recent advances in genetically modified pigs for transplantation[J]. Organ Transplant, 2017, 8(2): 165-170. DOI: 10.3969/j.issn.1674-7445.2017.02.014.
- [7] ROSE AG, COOPER DK. Venular thrombosis is the key event in the pathogenesis of antibody-mediated cardiac rejection[J]. Xenotransplantation, 2000, 7(1): 31-41.
- [8] DONS EM, MONTOYA C, LONG CE, et al. T-cell-based immunosuppressive therapy inhibits the development of natural antibodies in infant baboons[J]. Transplantation, 2012, 93(8): 769-776. DOI: 10.1097/TP.0b013e3182481168.
- [9] PHELPS CJ, KOIKE C, VAUGHT TD, et al. Production of alpha 1,3-galactosyltransferase-deficient pigs[J]. Science, 2003, 299(5605): 411-414. DOI: 10.1126/science.1078942.
- [10] KUWAKI K, TSENG YL, DOR FJ, et al. Heart transplantation in baboons using alpha1,3-galactosyltransferase gene-knockout pigs as donors: initial experience[J]. Nat Med, 11(1): 29-31. DOI: 10.1038/nm1171.
- [11] YAMADA K, YAZAWA K, SHIMIZU A, et al. Marked prolongation of porcine renal xenograft survival in baboons through the use of alpha1,3-galactosyltransferase gene-knockout donors and the cotransplantation of vascularized thymic tissue[J]. Nat Med, 2005, 11(1): 32-34. DOI: 10.1038/nm1172.
- [12] SIMON PM, NEETHLING FA, TANIGUCHI S, et al. Intravenous infusion of Galalpha1-3Gal oligosaccharides in baboons delays hyperacute rejection of porcine heart xenografts[J]. Transplantation, 1998, 65(3): 346-353.
- [13] HARA H, LONG C, LIN YJ, et al. In vitro investigation of pig cells for resistance to human antibody-mediated rejection[J]. Transpl Int, 2008, 21(12): 1163-1174. DOI: 10.1111/j.1432-2277.2008.00736.x.
- [14] REYES LM, ESTRADA JL, WANG ZY, et al. Creating class I MHC-null pigs using guide RNA and the Cas9 endonuclease[J]. J Immunol, 2014, 193(11): 5751-5757. DOI: 10.4049/jimmunol.1402059.
- [15] COWAN PJ, ROBSON SC, D'APICE AJ. Controlling coagulation dysregulation in xenotransplantation[J]. Curr Opin Organ Transplant, 2011, 16(2): 214-221. DOI: 10.1097/MOT.0b013e3283446c65.
- [16] LIN CC, EZZELARAB M, SHAPIRO R, et al. Recipient tissue factor expression is associated with consumptive coagulopathy in pig-to-primate kidney xenotransplantation[J]. Am J Transplant, 2010, 10(7): 1556-1568. DOI: 10.1111/j.1600-6143.2010.03147.x.
- [17] MOHIUDDIN MM, SINGH AK, CORCORAN PC, et al. Genetically engineered pigs and target-specific immunomodulation provide significant graft survival and hope for clinical cardiac xenotransplantation[J]. J Thorac Cardiovasc Surg, 2014, 148(3): 1106-1113. DOI: 10.1016/j.jtcvs.2014.06.002.
- [18] IWASE H, LIU H, WIJKSTROM M, et al. Pig kidney graft survival in a baboon for 136 days: longest life-supporting organ graft survival to date[J]. Xenotransplantation, 2015, 22(4): 302-309. DOI: 10.1111/xen.12174.
- [19] HARRIS DG, QUINN KJ, FRENCH BM, et al. Meta-analysis of the independent and cumulative effects of multiple genetic modifications on pig lung xenograft performance during ex vivo perfusion with human blood[J]. Xenotransplantation, 2015, 22(2): 102-111. DOI: 10.1111/xen.12149.
- [20] COOPER DK, SATYANANDA V, EKSER B, et al. Progress in pig-to-non-human primate transplantation models (1998-2013): a comprehensive review of the literature[J]. Xenotransplantation, 2014, 21(5): 397-419. DOI: 10.1111/xen.12127.
- [21] ZHU X, DOR FJ, COOPER DK. Pig-to-non-human primate heart transplantation: immunologic progress over 20 years[J]. J Heart Lung Transplant, 2007, 26(3): 210-218. DOI: 10.1016/j.healun.2006.12.005.

(收稿日期: 2018-02-25)

(本文编辑: 石梦辰 吴秋玲)