



异种移植学

Xenotransplantation

主 编 / 窦科峰



人民军医出版社

PEOPLE'S MILITARY MEDICAL PRESS

异种移植学

XENOTRANSPLANTATION

主 编 窦科峰

副主编 王德盛 李 霄

编 者 (以姓氏汉语拼音为序)

安家泽	曹大勇	陈 勇	陈 战
丁 睿	窦科峰	龚振斌	郭丰成
韩 炜	何 勇	纪洪辰	季 茹
金 超	李海民	李俊杰	李庆军
李伟民	李 侠	李 霄	李小磊
刘 栋	刘卫辉	刘正才	卢 鹏
任 超	宋振顺	宋文杰	陶开山
王德盛	王 琳	王建锋	王 涛
杨 帆	杨建栋	杨雁灵	杨诏旭
易 蔚	尤 楠	于恒超	岳树强
张航宇	张洪涛	张卓超	张 宁
赵 威	周景师	周 亮	



人民军医出版社

PEOPLE'S MILITARY MEDICAL PRESS

北 京

图书在版编目 (CIP) 数据

异种移植学 / 窦科峰主编. —北京:人民军医出版社, 2014.1
ISBN 978-7-5091-7051-9

I. ①异… II. ①窦… III. ①异种移植 IV. ①R615

中国版本图书馆CIP数据核字 (2013) 第297526号

策划编辑: 郭伟疆 崔玲和 文字编辑: 刘颖 韩志 责任审读: 杜云祥

出版发行: 人民军医出版社 经销: 新华书店

通讯地址: 北京市100036信箱188分箱 邮编: 100036

质量反馈电话: (010) 51927290; (010) 51927283

邮购电话: (010) 51927252

策划编辑电话: (010) 51927272

网址: www.pmmp.com.cn

印刷: 北京天宇星印刷厂 装订: 胜宏达印装有限公司

开本: 850mm × 1168mm 1/16

印张: 23.75 字数: 853千字

版、印次: 2014年1月第1版第1次印刷

印数: 0001—1200

定价: 300.00元

版权所有 侵权必究

购买本社图书, 凡有缺、倒、脱页者, 本社负责调换

内容提要

作者全面总结了国内外异种移植学科的发展现状、应用前景和存在的问题。全书分 18 章，概述了异种移植的发展、基本概念和介导异种免疫排斥的机制；分别阐述了异种肝、心脏、肾、胰岛细胞、皮肤和细胞移植的临床技术；介绍非特异性免疫抑制治疗、生理屏障的防治、诱导免疫耐受和免疫适应等异种移植临床应用前应重点解决的免疫学、生理学难题；还介绍了基因工程技术和组织工程技术在异种移植研究领域中的应用及异种移植相关的公共健康问题。本书内容翔实、图文并茂，具有很强的可读性和实用性。适合器官移植医师阅读，也可供从事免疫学、实验动物、基因工程等研究的学者和研究生学习参考。

序 一

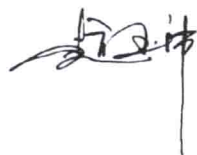
供体短缺是目前困扰器官移植发展的最大障碍，而异种移植是最有希望的解决之路。根据 WHO 的定义，异种移植是指动物源性的活细胞、组织、器官，以及经体外异种材料培养的人源性细胞、组织、器官，以移植、接种或注射的方式进入人体内的过程。

相对于同种移植而言，异种移植算是一门新兴的医学学科，但其实际已有 100 多年的发展历史，几乎与同种移植同时开展。到 20 世纪 80 年代，已进行了心脏、肝脏、肺脏和肾脏等器官移植的临床尝试，供体有猪、兔、羊、狒狒、黑猩猩、猴子等。由于缺乏有效的免疫抑制治疗手段，这些研究均以失败告终。随着对异种免疫排斥反应的深入研究和基因工程技术的飞速发展，异种移植研究进入新的发展阶段。2002 年，美国华裔科学家赖良学成功培育出 α -1, 3- 半乳糖苷转移酶基因敲除小型猪——GTKO 猪，使异种移植研究发生了革命性的变化。目前，GTKO 猪的器官在非人灵长类动物体内的最长存活时间已达到 9 个月，而胰岛细胞移植则已经开始了 II 期临床试验。可以预见，在不远的未来，GTKO 猪将有可能成为良好的器官来源，彻底解决临床移植供体匮乏的难题，并带来巨大的社会效益和经济效益。异种移植研究领域的著名专家，美国匹兹堡大学器官移植中心的 Cooper-DK 教授曾在《Lancet》上撰文称“异种移植将是下一次的医学革命”。因此，加大异种移植相关领域的研究力度对于促进我国器官移植事业发展尤为重要。



在此背景下，第四军医大学窦科峰教授带领一批中青年学者编写了这部《异种移植学》，全面总结了国内外异种移植学科的研究结果和最新动态，为相关领域的研究人员提供亟需的参考资料。窦科峰教授是我国器官移植领域的知名专家，曾主持完成国内首例活体肝部分移植、国内最小婴儿单肝段移植、世界存活时间最长的肝胰肾联合移植、亚洲首例心肝肾联合移植手术、世界首例异位（肝脏置于脾窝部）辅助性活体肝部分移植等手术，具有丰富的移植外科和基础研究经验，是我国器官移植领域的领军者之一。他主编的这部专著内容翔实、图文并茂，具有很强的可读性和实用性。全书共分为 18 章，从发展历史、基础研究、临床实例等多个角度介绍了异种移植的研究现状，融科学性、理论性和实用性为一体。不仅适合移植医师阅读，也能为从事免疫学、实验动物、基因工程等研究的青年学者和研究生提供极好的参考价值。

在此，我诚挚地将此书推荐给广大的器官移植工作者，并深信此书会受到普遍的欢迎和赞赏。



中国科学院院士

序 二

器官移植是目前终末期脏器功能衰竭患者的主要治疗手段，被誉为“21 世纪医学之巅”。迄今，全球已有近百万名患者通过他人捐献的器官而获得新的生命，但更多的患者却因供体器官短缺而无法及时接受治疗。以肝移植为例，即使是在器官捐献和分配最为发达、科学的美国，每年也有近 30 000 人因为缺乏捐献的肝脏而死亡；而我国乙型肝炎病毒携带者逾 1 亿人，每年因慢性肝病死亡人数达 300 000 人，器官短缺的形势更为严峻。因此，开展异种器官移植研究，以动物器官桥接或替代人类器官进行移植，对解决供体短缺问题具有重大意义。



异种移植研究经历了“尝试—高潮—低潮—高潮—理性”的发展进程。经过 100 余年的探索，异种移植研究进入了理性发展阶段，出现了两个明显的变化：一是研究重心由临床试验转向了基础研究；二是供体选择由非人灵长类动物趋向于猪。随着分子生物学、分子免疫学和基因工程技术等相关学科的飞速发展，异种移植研究也进入了快速发展阶段。近年来，不仅出现了专业期刊《Xenotransplantation》，每年发表数百篇相关研究论著，更重要的是其距离临床应用也越来越近。我国在异种移植方面的研究尚处于起步阶段，相关的图书资料很少，人们对异种移植研究的历史、现状和发展还了解不够深入，有必要对该领域的知识做一阶段性的全面总结，以开阔我国移植医学工作者的视野，促进我国异种移植研究的快速发展。

有鉴于此，第四军医大学西京医院肝胆胰脾外科的窦科峰教授组织有关研究人员编写了这本内容丰富的《异种移植学》。这本书分为 18 章，系统介绍了异种移植研究的发展历史和最新进展，不仅详细论述了异种移植免疫学的基础知识和基础理论，还总结了小动物、大动物乃至人类临床异种移植的研究结果。在全面反映异种移植领域研究现状的同时，窦科峰教授所领导的编写团队还凭借丰富的工作经验和研究体会，对诸多理论知识和实验报道进行深入分析与精彩点评，为未来的研究提出了很多具有前瞻性和建设性的观点与建议，值得相关研究人员阅读、参考。

我深信此书会受到普遍的欢迎，并热忱地将此书推荐给从事器官移植基础研究和临床实践的工作者，特别是年轻的移植外科医师和研究生。

郑树森

中国工程院院士

序 三

20 世纪初，自法国学者 Alexis Carrel 发明血管缝合技术后，外科医师们几乎同时开始了同种和异种器官移植的临床尝试。经过 100 余年的发展，同种移植取得了巨大的成功，而异种移植与临床应用之间的距离还较为遥远。由于进化差异，不同种属的个体在解剖、生理、病理、生化等方面都存在很大不同，异种移植一开始就比同种移植蕴含更大的风险和困难。但异种移植最显著的优势在于可持续提供移植器官，一旦获得成功，对于解决目前严峻的器官短缺情况无疑具有极大的现实意义和广阔的应用前景。

当前，以转基因猪为标志的异种移植研究已取得重要突破，使异种移植向临床应用迈出了重要的一步，但以猪作为临床移植器官来源仍有三大难题需要解决：一是移植脏器的功能与人类是否匹配；二是供受体双方的免疫学障碍能否克服；三是猪与人之间的交叉感染风险是否能承受。近 10 年来，围绕这三大问题，移植医师与实验动物学家、基础医学学者全力合作，开展大量而复杂的研究，在分子、细胞及动物实验水平上取得了卓有成效的成果，有力地推动了异种移植研究的安全、合理发展。

我国异种移植研究事业起步较晚，目前仅有北京、上海、西安、武汉、南京、长沙、成都等地的数家科研单位进行相关研究，虽然在动物培育和异种胰岛移植方面取得较为突出的成果，但与欧美国家相比仍有不小的差距。这不仅反映在研究条件和研究环境等硬件方面的不足，更重要的是研究思路的封闭和对图书情报掌握的不足。针对此情况，以窦科峰教授为核心的西京医院全军器官移植研究所工作团队，凭借在移植领域丰富的临床经验和扎实的科研实力，编写了这部内容新颖、科学实用的《异种移植学》专著。书中全面回顾了异种移植的发展历史和重大事件，及时总结了国内外相关领域的重要科研成果和最新研究动态，对诸多有争论和争议的学术问题进行分析探讨，并对未来的发展方向和研究前景做出了大胆而合理的前瞻性讨论，具有重要的参考价值和很强的可读性。

我相信，此书会给予读者丰富的科学知识和珍贵的科研灵感。我乐于为这本好书作序，并将它推荐给移植学科的医师、基础研究人员，特别是年轻而富有朝气的研究生们。



王学俊

中国工程院院士

前言

供体短缺是全世界移植学科医师共同面临的难题。据不完全统计,当前心脏移植的供求比为1:7,而肝、肾、胰、肺等脏器移植的供求比更高达1:42,绝大多数脏器功能衰竭患者在等待供体器官的过程中死亡。开辟新的器官来源、缓解供求矛盾是当前移植医学领域的重点研究课题。

将动物源性的活细胞、组织、器官,植入人体内的过程,即为异种移植,而目前公认较为合适的供体动物是猪。以猪为供体,可源源不断地提供移植器官,缓解临床同种移植物的严重匮乏,这无疑具有十分广阔的应用前景。同时,异种移植学还与免疫学、生理学、基因工程技术学、分子生物学、药理学和医学伦理学等学科互相交叉、互相渗透、密切联系,其发展促进了生命科学基础研究的进步。虽然目前异种移植的临床效果仍很有限,研究成果还不能立即应用于临床,但令人倍感欣慰的是异种器官和细胞在非人灵长类动物体内的存活时间不断延长,异种移植正逐步走向临床应用。



异种移植相关研究领域的发展极为迅速,新概念、新方法、新思路、新观点层出不穷,而争议、争论也持续进行。及时总结国内外的最新研究成果,系统介绍异种移植相关知识与动态,对于促进我国器官移植事业的持续发展具有重要意义。本书是在国家高技术研究发展计划(863计划)项目“器官移植关键技术研究”(项目编号2012AA021000)的资助下编写、出版的,主要目的在于介绍异种移植的发展现状、应用前景和存在的问题,以推动我国异种移植研究的快速发展。

全书由18章组成,前5章为总论部分,叙述异种移植的发展历史与展望(第1章),基本概念(第2章)和介导异种免疫排斥的3个主要机制(第3~5章);然后按照肝(第6章)、心(第7章)、肾(第8章)、胰岛细胞(第9章)、皮肤(第10章)和细胞(第11章)的顺序,介绍异种移植各发展方向的临床和基础研究进展;接着,从非特异性免疫抑制治疗(第12章)、生理屏障及防治(第13章)、诱导免疫耐受(第14章)和免疫适应(第15章)等方面阐述异种移植临床应用前应重点解决的免疫学、生理学难题及现有的研究对策和进展;最后,是基因工程技术(第16章)和组织工程技术(第17章)在异种移植研究领域中的应用。对于异种移植相关的公共健康问题,由于其涉及知识面较宽,且备受医学伦理学家和社会伦理学家的广泛关注,故将其单独成文一章(第18章),以供读者参考。

参与本书编写的大部分人员为从事器官移植基础与临床研究的中青年学者。他们善于搜索、查阅

和总结国内外文献资料，思维敏捷、观点清晰、文字表达能力较强，保证了本书的科学性、先进性、实用性和可读性。感谢他们在繁重的医疗、教学和科研工作之外，以极大的热情和认真细致的态度完成本书的编写工作。此外，感谢第四军医大学西京医院肝胆胰脾外科的全体工作人员和研究生们对本书稿所付出的劳动。

鉴于作者水平有限且成文时间仓促，书中存在疏漏和不完善之处，恳请各位同道和广大读者批评指正。

李树刚

第四军医大学西京医院全军器官移植研究所

目 录

第1章 异种移植的发展历史与展望.....	1
第一节 异种移植的发展历史.....	2
第二节 异种移植的典型临床案例.....	8
第三节 异种移植研究面临的挑战与希望.....	10
第2章 异种移植学基本概念.....	17
第一节 异种移植的分类.....	17
第二节 异种移植免疫排斥反应的类型与机制.....	18
第三节 异种移植抗原与天然抗体.....	22
第四节 补体系统与异种移植.....	27
第五节 细胞免疫应答与异种移植.....	31
第六节 固有免疫系统与异种移植.....	33
第3章 超急性排斥反应.....	37
第一节 异种移植超急性排斥反应的病理特征与发生机制.....	38
第二节 防治超急性排斥反应的主要策略与方法.....	50
第4章 急性血管性排斥反应.....	61
第一节 概述.....	61
第二节 急性血管性排斥反应的发生机制与病理特征.....	61
第三节 防治急性血管性排斥反应的主要策略与方法.....	69
第四节 总结与展望.....	75
第5章 细胞免疫应答在异种移植排斥中的作用及其防治.....	78
第一节 T细胞参与异种排斥的机制及防治措施.....	79
第二节 固有免疫细胞参与异种排斥的机制及防治措施.....	85
第6章 异种肝移植.....	95
第一节 异种肝移植的发展历史与临床尝试.....	95
第二节 小型猪肝解剖结构和生理特点.....	100
第三节 异种肝移植模型建立方法.....	103
第四节 GTKO猪-狒狒异种肝移植的最新进展.....	107
第7章 异种心脏移植.....	117
第一节 异种心脏移植的背景简介.....	117

第二节	异种心脏移植的发展历史.....	118
第三节	异种心脏移植的研究进展.....	121
第四节	应对异种心脏移植免疫排斥的方法.....	128
第五节	异种心脏移植仍然存在的障碍.....	142
第六节	未来的临床尝试.....	144
第8章	异种肾移植.....	146
第一节	异种肾移植的发展历史与临床尝试.....	146
第二节	异种肾移植的免疫排斥机制及组织病理特点.....	155
第三节	克服异种肾移植障碍的策略.....	166
第四节	异种肾移植的应用前景.....	170
第9章	异种胰岛细胞移植.....	173
第一节	异种胰岛细胞来源及分离技术.....	173
第二节	异种胰岛细胞移植的动物模型.....	178
第三节	异种胰岛细胞移植的免疫排斥机制及组织病理特点.....	179
第四节	异种胰岛移植排斥的防治策略.....	183
第五节	异种胰岛细胞移植的临床实验.....	194
第六节	异种胰岛细胞移植面临的问题与临床应用前景.....	194
第10章	异种皮肤移植.....	198
第一节	皮肤的结构.....	198
第二节	皮肤的功能.....	199
第三节	皮肤损伤的主要形式.....	200
第四节	自体皮植皮术.....	202
第五节	异种皮肤移植.....	203
第11章	异种细胞移植.....	215
第一节	异种细胞移植的优势与困难.....	216
第二节	克服异种细胞移植免疫排斥的策略.....	217
第三节	异种细胞移植的应用前景.....	223
第四节	异种肝细胞移植的进展.....	228
第12章	非特异性免疫抑制治疗在异种移植中的应用.....	237
第一节	免疫抑制治疗的历史与现状.....	237
第二节	异种移植常用免疫抑制药物.....	238
第三节	异种移植常用免疫抑制治疗方案.....	247
第13章	异种移植的生理屏障及防治.....	258
第一节	异种移植的补体屏障及其防治策略.....	258
第二节	异种移植的凝血屏障及其防治策略.....	264

第三节 异种移植的其他生理学屏障及其防治策略.....	271
第 14 章 异种移植免疫耐受.....	276
第一节 免疫耐受概述.....	276
第二节 异种移植免疫耐受的诱导方法.....	279
第 15 章 免疫适应与异种移植.....	294
第一节 免疫适应的定义及与异种移植的关系.....	294
第二节 异种移植免疫适应状态的发生机制.....	299
第三节 适应的研究模型.....	304
第四节 诱导适应的方法.....	305
第五节 免疫适应在大动物异种移植模型中的应用前景.....	306
第 16 章 基因工程技术在异种移植中的应用.....	309
第一节 异种移植之基因工程技术总论.....	309
第二节 基因敲除技术消除异种天然抗原表达.....	316
第三节 转基因技术突破异种移植生理屏障.....	318
第四节 基因工程技术降低种属间交叉感染风险.....	324
第五节 总结与展望.....	325
第 17 章 组织工程技术在异种移植领域的应用.....	328
第一节 免疫隔离技术与异种移植.....	328
第二节 组织工程支架与异种移植.....	333
第三节 异种细胞与生物人工肝.....	340
第 18 章 异种移植相关公共健康问题.....	347
第一节 异种移植安全问题的研究历史与现状.....	347
第二节 猪源反转录病毒的交叉感染风险及诊断方法进展.....	350
第三节 其他病原体的交叉感染风险.....	353
第四节 防治异种移植交叉感染的策略.....	364
第五节 异种移植美国联邦监管制度的介绍.....	365

第 1 章 异种移植的发展历史与展望

器官移植是目前治疗终末期脏器功能衰竭的首选方法，被誉为 21 世纪医学之巅。迄今为止，全球已有近百万患者通过他人捐献的器官而获得新的生命。随着新型免疫抑制药的不断出现，同种异体器官移植术后的排斥反应问题逐步得到解决，受体的生存时间也越来越长，而迅速增多的脏器功能衰竭患者与数量极少的人类供体器官成为限制临床器官移植发展的主要矛盾。以肝移植为例，我国是“肝病大国”，乙型肝炎病毒携带者愈 1 亿，每年因慢性肝病死亡人数达 30 万；大量患者需要进行肝移植治疗，然而每年总共能实施手术的不到 4000 例，大部分患者因不能及时得到肝移植治疗而死亡。在心脏、肺和肾的临床移植工作中，也存在着同样的困难。因此，开展异种器官移植研究，用动物器官桥接或替代人类器官，解决供体短缺问题，具有重大的现实意义。

根据世界卫生组织（World Health Organization, WHO）的定义，异种移植（xenotransplantation）是指动物源性的活细胞、组织、器官，以及经体外异种材料培养的人源性细胞、组织、器官，以移植、接种或注射的方式进入人体内的过程。简单来说，就是将某一种属个体的细胞、组织、器官移植给另一种属个体的过程。

将动物的组织、器官移植给人以治疗疾病或获得某种特殊能力，一直是人类长久以来的梦想。这一点，无论是在西方的神话传说中，还是在我国古代的神话故事中，都不难找到印证。例如，在我国的古典名著《封神演义》和《聊斋志异》中，有长着鸟类翅膀可以飞翔的人和移植狗的下肢治疗残疾的故事。而早在公元前 3 世纪，古埃及人就创造了人面狮身像 - 斯芬克斯，这可能是人类对人兽嵌合体最早的想像和设计。在希腊神话里，命运女神克罗托曾用象牙为宙斯的孙子珀罗普斯修补缺损的肩胛骨。这些故事和传说承载了人

们对异种移植的热切盼望，而临床移植医师正通过艰苦的探索和大胆的尝试，努力将这一美好的愿望化为现实。

异种移植虽然是一门新兴的医学学科，但实际已有百年的发展历史。1902 年，法国医师 Alexis Carrel（图 1-1）发明了血管缝合技术，奠定了器官移植临床应用的基础。而后，外科医师几乎同时开始了同种器官移植和异种器官移植的临床尝试。但由于进化差异，不同种属的个体在解剖、生理、病理、生化等方面都存在很大不同，因而异种移植一开始就比同种移植蕴含更大的风险和困难。经过 100 年的发展，同种移植取得了辉煌的成功，而异种移植与临床应用之间的距离还很遥远。但我们相信，随着基础研究的深入和移植技术的发展，将最终实现异种移植器官的长期存活，彻底解决供体器官短缺的难题。



图 1-1 Alexis Carrel (1873—1944)，法国人，发明血管缝合术，为临床器官移植奠定技术基础

第一节 异种移植的发展历史

一、“尝试—高潮—低潮—高潮—理性” 波浪式的发展进程

（一）早期尝试阶段（20 世纪 60 年代以前）

早在 1905 年，法国医师 Princeteau 就进行了首次临床异种肾移植尝试。他将切成薄片的兔肾组织置入尿毒症患者的肾包膜下，但未发现明显的治疗效果。同年，他又再一次进行试验，结果在一名肾衰竭的患儿体内发挥了良好的肾功能并成功收集到了尿液。但遗憾的是，该患儿 16d 后死于心力衰竭和肺部感染。1906 年，法国医师 Zabolay 将猪和山羊的肾移植给肾衰竭的患者，但移植物仅存活了 3d，随后患者仍死于尿毒症。1910 年，德国医师 Linger 首次利用非人灵长类动物的器官进行异种移植尝试。他将黑猩猩的肾植入尿毒症患者体内，结果患者于术后 32h 死于移植物血栓形成。1923 年，美国医师 Neuhof 将羊肾移植给水银中毒患者，9d 后移植物坏死，受体死亡。自此以后，异种移植的临床尝试基本消失，偶尔只有动物实验的结果报道。直到 1964 年，美国 Reemtsma 完成了现代外科学历史上第一例成功的异种肾移植后，异种器官移植才又一次吸引了人们的注意力，进入了其发展历史中的第一次研究高潮。异种移植的早期尝试阶段具有以下特点：①开始应用血管吻合技术；②没有使用免疫抑制药；③供体动物种类多样，有猪、兔、羊、猴子等。总的来说，由于缺乏对免疫排斥的了解，这个时期的异种移植研究具有一定的盲目性。

（二）第一次临床研究高潮期（20 世纪 60 年代）

1964 年，美国新奥尔良图兰大学医疗中心以 Reemtsma 医师为首的医学研究团队，用黑猩猩的肾为一例濒临死亡的肾衰竭患者实施了肾移植手术，同时对受体给予硫唑嘌呤、泼尼松、全身照射等免疫抑制治疗。最终，这例患者存活了 9 个月，第一次实现了异种器官移植的长期存活。这次临床试验表明，即使是在当时只有相对低效的免疫抑制药物的情况下，异种移植物还是能够在人体内存活较长时间并保持一定的功能。这样的结果，无疑大大增强了移植医师对异种移植研究的信心和热情。同年，被誉为现代肝移植之父的美国匹兹堡大学器官移植中心的 Starzl 教授（图 1-2）也以狒狒作为供体，完成了 6 例异种肾移植临床尝试，患者最长存活 60d。同年，美国密西西

比大学医学院的 Hardy 医师用黑猩猩的心脏为一例 64 岁先天性心脏病患者实施了世界第一例临床异种原位心脏移植手术。但术后 2h，患者因心排量不足而死亡。尸检提示有超急性排斥反应发生。1966 年，Starzl 用黑猩猩肝脏完成了世界第一例临床异种肝移植，但患者仅存活了 1d。1969 年，法国医师 Bertoye 为一例 22 岁的肝衰竭患者移植了狒狒的肝，存活 4 个月。这一时期，还有约 50 例肝衰竭患者接受了体外动物肝脏灌注治疗，获得了一定的疗效并顺利度过肝衰竭期，但最终生存时间没有超过 1 年。此后，随着同种移植的迅速发展，异种移植在随后的 15 年中销声匿迹，进入了 20 世纪 70 年代的低潮期。



图 1-2 Thomas Starzl (1926–)，美国人，完成世界首例同种及异种肝移植，被誉为“现代肝移植之父”

（三）低潮期（20 世纪 70 年代）

1960 年后期，随着环孢素 A 的问世，同种移植进入现代免疫抑制治疗时代，移植器官和受体的存活时间显著延长，同种移植有了突飞猛进的发展。此外，由于“脑死亡”概念的建立，使得同种移植有了稳定的供体来源渠道；而血液透析技术的出现也使肾衰竭患者有了等待同种肾移植的时间。这些情况均导致异种移植被研究者冷落到一旁，进入了研究低潮期。这一时期，有 6 例患者接受了大猩猩或狒狒的肝移植，但存活时间均未超过 14d。1977 年，Barnard 医师在体外循环辅助下，对 2 例患者实施了异位狒狒心脏移植。一例患者 1h 后即死亡，而另一例也于术后 4d 死于严重的排斥反应。

(四) 第二次研究高潮期(20世纪80年代)

20世纪80年代后期,随着移植外科技术的完善和新型免疫抑制药的不断出现,同种移植的疗效日趋稳定,受体的生存时间也越来越长,同种移植迅速达到饱和状态。但这个饱和状态并不是患者数量减少,而是缺少足够的人体器官。仅以美国为例,每天有114人加入器官移植分配网(united network for organ sharing, UNOS)的移植等待名单里,但仅有1/4患者能等到合适的器官捐献者,接受移植治疗。严重的器官供求矛盾再次激发了人们对异种移植的研究热情。异种移植研究进入了快速发展阶段,并日趋理性。

异种移植研究重新兴起的标志性事件是1984年10月,美国洛玛琳达大学医学中心的Barley医师为一位左心室发育不全综合征的女婴进行了狒狒心脏移植手术。患儿存活20d后死于心力衰竭。该女婴存活时间迄今仍是临床异种心脏移植中的最长记录。1992—1993年,Starzl又进行了2例异种狒狒肝移植的临床尝试,其中1例存活长达70d,最终死于真菌感染和脏器出血。1995年,Makowka完成了第一例猪肝异位辅助性肝移植。术后,供肝有功能存活20h,受体存活32h。

这一阶段除了异种器官移植临床尝试外,还进行了异种组织细胞移植的临床试验,包括猪胰岛细胞、猪神经细胞移植等,但未获得突破性进展。

在基础研究方面,1984年,Galili领导的研究团队通过诱导兔红细胞凝集反应而发现抗 α -1,3-半乳糖(α -1,3-galactose, α -1,3-Gal)的异种反应性天然抗体(xenoreactive natural antibodies, XNA)。anti-Gal是一种天然抗体,约占人免疫球蛋白总量的1%。Galili团队接着采用蜜二糖-琼脂糖免疫亲和层析柱实现了该抗体的首次分离。anti-Gal是引发异种超急性排斥反应的主要因素,它的发现使人们对异种移植免疫反应本质有了更深刻的认识,异种移植研究进入微观分子阶段。

(五) 理性发展阶段(20世纪90年代后期至今)

经过100余年的探索,异种移植研究进入了理性发展阶段,出现了两个明显的变化。一是研究重心由临床试验转向了基础研究;二是供体选择由非人灵长类动物趋向于猪。

引起研究重心转变的原因是多方面的:首先,现代医疗模式是“以患者为中心”,要求医师应把对患者的关注放在第一位,而把对科研发展的关心放在第二位。在异种移植临床疗效取得显著性突破之前,再进行盲目、粗暴的临床试验显然有悖于医德。其次,

异种移植潜在的安全风险也迫使人们暂时放弃临床试验。此外,分子生物学、基因工程等相关学科的飞速发展,有可能实现对供体动物的全面基因改造,使其成为异种移植合适的供体。这些因素均促使异种移植的重心转向基础研究方面。异种移植的发展更加合理,也更加安全。

黑猩猩、狒狒等非人灵长类动物曾经是异种移植首选的供体器官来源,因为它们在系统发育方面比别的物种都更接近于人类,与人类的种属差异较小,所以其提供器官的生理功能近似于人类,引起的超急性排斥反应程度亦较轻。但由于其面临绝种的危险和伦理学的限制,以及所携带病原微生物感染人体的概率很大,非人灵长类动物已被公认为不适于成为临床异种移植供体器官的来源,但其与人的高度相似性使其成为模拟猪对人的异种移植受体的最佳模型动物。目前大部分学者都认为猪比非人灵长类更适于成为临床异种移植的供体。相对于其他物种,猪具有很多明显优势:①资源丰富,价格低廉,易于饲养繁殖;②遗传性较为稳定,极少发生变异;③部分生理和生化指标与人相似,且适于进行基因改造和修饰;④人猪共患病发生可能性相对较小;⑤涉及的动物保护和伦理问题相对较少等。但猪作为供体器官来源也有3大障碍:一是移植脏器功能是否匹配;二是供受体双方的免疫学障碍能否克服;三是猪对人移植间的疾病风险是否能承受。当前,以转基因猪为标志的异种移植研究已取得重要突破,使异种移植向临床应用迈出了重要的一步。但急性排斥反应、供受体间的生理屏障和安全问题等仍限制着异种移植的发展。

二、转基因猪在异种移植中的应用

目前,阻碍异种移植研究发展的主要障碍仍是移植免疫排斥反应。由于灵长类动物体内预存的抗 α -1,3-Gal的异种反应性天然抗体,可直接识别广泛表达于猪血管内皮细胞上的 α -1,3-Gal抗原,激活补体和内皮细胞,导致凝血级联反应,在数分钟到数小时内出现以间质出血、水肿和小血管血栓形成为主要表现的超急性排斥反应(hyperacute rejection, HAR)。在转基因动物出现之前,异种动物移植模型研究都致力于发展各种通过预处理清除 α -1,3-Gal、XNA并抑制补体活性以减轻HAR的方法。1988年,Copper通过抗体吸附去除狒狒体内的抗猪XNA后,将猪心脏植入狒狒的颈部,移植心脏有功能存活5d,HAR反应程度明显减轻。1993年,Leventhal建立猪-狒狒心脏移植模型时,用眼镜蛇毒因子抑制狒狒体内补体的活性,明显减轻HAR,使移植心脏存活了68h。1994年,Pruitt将猪心脏移植给猕猴,在心脏恢

复再灌注前,给猕猴静脉注射重组可溶性I型补体受体,抑制了HAR发生,器官存活时间最长达90h。这些方法都没有取得令人满意的效果,要完全抑制HAR,还需要寻找另外的研究思路。20世纪90年代中后期,随着基因工程技术的发展,逐渐出现了各类基因工程改造的小型猪,在预防HAR方面取得了重大进步。

(一) α -1, 3-半乳糖苷转移酶(α -1, 3-galactosyl transferase, α -GT)基因敲除小型猪(GTKO猪)在异种移植中的应用

2002年,Science期刊报道了美籍华人科学家赖良学等通过杂合突变体缺失的成纤维细胞进行核移植,成功培育出了GTKO猪。他们首先通过同源重组方式将猪胚胎成纤维细胞基因组上的 α -GT基因灭活,然后通过核转移技术将此细胞的细胞核与剔除了核的卵母细胞融合,活化后移植到猪的输卵管中,培育出的 α -GT一个等位基因灭活的敲除猪。虽然该基因敲除猪只是敲除了等位基因上的一个 α -GT基因位点,但可以清除异种天然抗原的表达,为克服异种移植HAR带来希望。2003年,Science期刊又报道美国PPL Therapeutics公司的Phelps领导的研究团队成功构建了异种天然抗原基因 α -GT编码等位基因双敲除的克隆猪,即纯合子GTKO猪,这意味着抗HAR的猪正式问世。哈佛医学院外科教授Cooper评论说:

“这可能是异种移植研究领域迄今为止最大的进展。虽然这可能不会为我们需要解决的问题提供全部答案,但将来基因敲除可能成为必需的手段。这是一次大跨步的前进,它的成功意味着在不远的将来,移植器官匮乏的状态可以通过猪器官做为供源而得到解决”。随后全世界开展了一系列以GTKO猪为供体,狒狒为受体的异种心脏和肾移植实验,带来了令人鼓舞的研究结果。2005年,美国麻省总医院的Kuwaki等将GTKO猪心脏异位移植到8只狒狒体内,并把 α -1, 3-Gal低表达的猪心脏移植到2只狒狒体内。后者在20min内发生HAR,而接受GTKO猪心脏的狒狒却没有观察到超急性和急性排斥的发生。在8只接受GTKO猪心脏的狒狒中,3只狒狒尽管心脏还在搏动,但由于肢体局部缺血、贫血和出血,分别在16d、23d、56d后被施以安乐死。其余5例狒狒的移植心脏存活了59d、67d、78d、110d、179d。尸检发现,死亡原因为血栓性微血管病导致的移植心脏局部缺血性损伤。Yamada领导的研究团队将GTKO猪肾植入狒狒体内,同时还移植了供体的血管化胸腺组织来诱导T细胞免疫耐受,减轻急性血管性排斥反应。移植肾最长存活了83d,肾功能良好,肌酐值正常,没有组织排斥症状。而接受普通小型猪肾脏的对照组狒狒则

均死于急性血管性排斥反应和急性细胞免疫排斥反应。

但也有学者报道,除 α -1, 3-Gal抗原外,还有其他非Gal抗原的异种抗原也能引发GTKO猪-狒狒的异种肾移植急性排斥反应,所有移植肾在8~16d均被狒狒排斥。但当T细胞免疫被抑制后,上述排斥反应可完全消失,这说明对GTKO猪肾脏的排斥可能是由T细胞依赖的抗体反应所介导的,抑制T细胞免疫或诱导T细胞免疫耐受可消除免疫排斥。由于人和许多非人灵长类动物体内预存有低浓度的非 α -1, 3-Gal天然抗体,如何找到非Gal抗原和非抗Gal抗体并抑制其相互作用,是目前异种移植研究面临的新课题和新挑战。

(二) 转入补体调节蛋白基因的小型猪在异种移植中的应用

由于种属间的差异性,猪补体系统的部分组分不能在非人灵长类动物体内发挥作用,因而形成生理屏障。

补体系统在体液介导的异种排斥反应中发挥重要的免疫损伤效应,其原因除异种抗原与天然抗体结合激活受体补体系统外,猪补体调节蛋白(complement regulatory protein, CRP)不能灭活灵长类动物补体成分,也是关键因素之一。目前较为明确的是,猪的衰变加速因子(decay accelerating factor, DAF, CD55)、膜调节蛋白(membrane cofactor protein, MCP, CD46)和同源抑制因子(homologous restriction factor, HRF, CD59)与人的补体系统互不相容;一旦受体补体系统激活,猪肝脏所产生的上述补体调节因子不能灭活补体蛋白,造成移植免疫损伤。

根据以上研究结果,1995年,McCurry开始研究将hCRP编码基因导入小型猪胚胎,希望通过基因工程技术使小型猪器官获得抵御人体补体破坏的能力。McCurry构建了心脏内皮细胞表达hDAF和hCD59蛋白的小型猪。将该转基因猪的心脏植入3例狒狒体内,术后不用免疫抑制药,其中2例移植心脏存活时间长达十几个小时,显著长于对照组。组织学检查表明,3例移植心脏的免疫损伤程度较轻,均未发现HAR发生。次年,英国剑桥大学的White小组也发表了相似的研究结果。他们成功地将hDAF编码基因导入猪体内并得到表达,以此转基因猪的心脏和肺做人血浆活体灌注实验,结果发现猪心和猪肺均获得了抵御人补体系统对血管内皮细胞损伤的能力。2000年,西班牙Ramirez与White合作,以转hDAF的猪为供体,实施了2例猪对狒狒的原位异种肝移植实验。术后2h即可在狒狒的血浆中检测到猪的纤维蛋白原,次日狒狒的凝血功能基本恢复,并维持正常直至实验结束。移植肝脏分别存活4d和8d,尸检未

发现超急性和急性排斥的证据。该研究表明,给灵长类动物移植转 hDAF 基因猪的肝脏不发生 HAR,且移植肝脏可在狒狒体内维持着充分的凝血功能和蛋白水平。同年,Cozzi 等将表达 hDAF 的转基因猪肾脏植入双侧肾切除的猕猴体内,术后应用“环孢素 A+环磷酰胺+激素”的免疫抑制方案,猕猴最长存活 78d。2001 年,Adams 和 Diamond 两个研究小组均报道以转 hMCP 的转基因猪为供体、狒狒为受体的异种心脏移植实验,移植心脏最长存活 16d 和 23d。病理学检查发现补体激活受到了显著抑制。2002 年,加拿大 WesternOntario 大学报道了 24 例转 hDAF 基因猪到狒狒的肾移植实验,移植肾最长存活 75d。10 例死于急性排斥反应,14 例死于其他并发症。但所有移植肾均未发生 HAR。同年,Schuurman 等进行了大样本的实验,共实施了 234 例转 hDAF 猪对短尾猴的异种肾移植实验,并设立 11 例普通猪肾移植的对照组。转基因组无一例发生 HAR,而对照组的发生率为 27%。美国麻省总医院也进行了 10 例转 hDAF 基因猪心脏到狒狒的移植实验。术前去除抗 α -1, 3-Gal 抗原,术后应用“胸腺照射+眼镜蛇毒因子+MMF+anti-CD154 单抗+激素+肝素”的治疗方案,移植心脏最长存活了 139d。2003 年,美国 MayoClinic 医院的 McGregor 医师将转 hDAF 基因的猪心脏植入 10 例狒狒的腹部,建立异种异位心脏移植模型。术后采用“ATG+TAC+雷帕霉素+激素+抗 CD20 单抗+NEX1285”的综合免疫抑制方案。移植心脏平均存活 76d,最长存活 113d。这些实验据均表明,在猪体内表达人补体调节蛋白的编码基因,是有效预防 HAR 发生的可行策略。

(三) 转入多种目的基因的 GTKO 小型猪在异种移植中的应用

GTKO 猪和转 hCRP 基因猪的出现曾使人们相信,彻底征服 HAR 已为期不远。但在对非人灵长类动物的器官移植实验中发现,这两种基因修饰猪对免疫排斥的抑制效果尚未达到理想水平。要彻底解决免疫排斥这个难题,可能还需要对 GTKO 猪做进一

步的基因改造。例如,以 GTKO 猪为背景,在此基础上进行多种人源基因修饰,如补体调节蛋白编码基因、凝血调节蛋白编码基因等,再辅助非特异性免疫抑制治疗,可能是延长异种受体存活时间的有效策略之一。从这条思路出发,全球的研究者近年来制备了很多类型的转基因猪,其中报道最多的是在 GTKO 猪体内转入 hCD46、hCD55、hCD59 等人补体调节蛋白的编码基因。2010 年,Mohiuddin 等报道以转 hCD46 基因的 GTKO 猪为供体,狒狒为受体的 22 例异位腹腔心脏移植实验。术后给予受体“ATG+anti-CD54+CVF+MMF+CsA+Rituximab”的免疫抑制方案和“Heparin+ketorolac+PGI2”的抗凝治疗方案。移植心脏的中位存活时间为 60d,而最长存活时间>195d。这是目前 GTKO 猪-非人灵长类动物的异种心脏移植存活时间最长的记录。表 1-1 总结了近两年来,不同基因修饰的小型猪对非人灵长类动物异种器官移植的研究结果。我们可发现,转基因猪心脏在狒狒体内的存活时间有显著延长,但肝、肾存活时间与既往研究相比,尚无明显变化。为了进一步抑制免疫排斥,诱导免疫耐受或避免种间交叉感染,近年来又研制出了一些新的转基因猪类型。例如,Phelps 等制备了体内广泛高表达 CTLA4-Ig 的转基因猪,其细胞表面的 CTLA4-Ig 可与受体免疫细胞表面的 CD80/CD86 分子相互作用,从而阻断淋巴细胞活化所必需的共刺激信号通路,抑制 T 细胞介导的免疫应答。Weis 等构建了内皮细胞高表达 HLA-E 和 β 2-微球蛋白的转基因猪。这两个分子均能与人类 NK 细胞的抑制性受体 CD94/NKG2A 结合,阻止人类 NK 细胞对猪细胞的损伤。Peterson 等将人的血栓调节蛋白、hCD59 和 hCD55 的编码基因同时导入猪体内,以发挥抗凝血和抗炎的作用。Choi 等将人 FasL 基因导入小型猪体内,意图通过 FAS/FASL 介导的细胞凋亡效应,抑制人类 CD8⁺T 细胞和 NK 细胞的细胞毒作用。Dieckhoff 等和 Ramsoondar 等,将猪内源性反转录病毒(Porcine endogenous retroviruses, PERV)的小干扰 RNA 片段导入小型猪体内,以阻止 PERV 感染受体。表 1-2 初步总结了近年来新出现的转基因猪的类型及其生物学功能。

表 1-1 转基因猪-非人灵长类动物异种器官移植研究结果

研究者	移植模型	受体	供体	例数	存活时间 (d)	免疫抑制治疗方案	抗凝方案
Ekser 等	原位肝移植	GTKO	狒狒	2 例	< 1, 6	ATG+TAC+MMF+CS	PGI2
	原位肝移植	GTKO/CD46	狒狒	8 例	< 1, < 1, 1, 4, 5, 6, 6, 7	ATG 或 Cyp+TAC+MMF+CS, CL, CVF	Heparin, ketorolac, PGI2