

## 移植免疫与器官再生的研究进展

刘泉<sup>1</sup>, 齐忠权<sup>2,3</sup> (1. 哈尔滨医科大学附属第二医院硬组织发育与再生实验室, 黑龙江哈尔滨 150086; 2. 广西大学医学院, 广西壮族自治区 南宁 530004; 3. 厦门大学医学院, 福建 厦门 361102)

在临床移植手术和免疫抑制取得巨大成功后的数十年间, 同种移植免疫领域堪称突破的进展较少。异种移植由于排斥和感染等障碍举步维艰, 令很多研究者失去兴趣。器官再生研究尽管方兴未艾, 但距离解决人类的实际问题还有相当长的路要走。近年来, 随着干细胞技术和基因编辑技术的发展, 移植与再生领域取得了巨大发展。在此, 我们对科学意义和应用前景较为突出的进展加以评述, 挂一漏万乃至谬误之处, 恳请同行指正。

近年来, 移植领域令人瞩目的进展之一是异种移植的“复兴”, 使异种移植真正成为了器官移植的未来<sup>[1]</sup>。这主要归功于基因修饰技术, 特别是 CRISPR/Cas 技术的发展。一方面, 基因修饰技术可消除供者异种抗原表达, 并使供者细胞表达保护性分子。例如, 基因修饰猪-非人灵长类生命支持性肾移植后, 已实现受者长期存活<sup>[2-3]</sup>。基因修饰猪-狒狒异位心脏移植, 采用  $\alpha$ CD40 单抗为基础的免疫抑制治疗, 实现了移植物长期存活<sup>[4]</sup>。由于尚未有异种原位心脏移植长期存活的动物实验, 在开展临床试验之前, 应证明异种原位心脏移植能够较长时间发挥生命支持作用; 另一方面, 通过 CRISPR/Cas9 技术灭活猪内源性逆转录病毒 (porcine endogenous retrovirus, PERV) 是异种移植近年的重要突破。尽管外源性病毒可以在猪的饲养繁殖过程中通过各种手段加以清除, 但 PERV 整合在猪的基因组中, 缺乏有效的清除方法。Yang 等<sup>[5]</sup> 采用 CRISPR/Cas9 技术破坏了 PK15 细胞 (一种猪胚胎肾细胞系) 基因组内 62 个 PERV pol 基因的高度保守区域, 从而使 PK15 细胞丧失了令 HEK

293 细胞 (一种人胚胎肾细胞系) 感染 PERV 的能力。继而, 研究人员证明了 PERV 可以从猪细胞传播至人细胞, 并可在人细胞之间相互传播<sup>[6]</sup>。更重要的是, 研究人员采用 CRISPR/Cas9 技术灭活了猪胚胎原代成纤维细胞的 PERV, 并通过体细胞核转移获得猪胚胎, 最终得到了全基因组灭活 PERV 的健康仔猪<sup>[6]</sup>。尽管异种移植还有诸如免疫排斥及生理相容性等问题需要解决, 这两项研究成果无疑对提高异种移植的安全性具有重要的意义, 使异种移植向临床应用迈进了一大步。

在同种移植领域, 有两项值得关注的进展。第一个是遗传学在临床同种移植中的应用。移植排斥从根本上讲是由于供者和受者之间基因, 特别是人类白细胞抗原 (human leukocyte antigen, HLA) 基因的不同。近年来, 随着二代测序 (next-generation sequencing, NGS) 准确率和效率的提高以及成本的下降, 采用 NGS 进行 HLA 分型将成为未来的发展趋势<sup>[7-8]</sup>。全基因组关联分析 (genome-wide association study, GWAS) 作为发掘遗传因素对表型影响的有力工具, 在移植排斥、免疫抑制药代动力学和移植后新发糖尿病等方面得到一定应用<sup>[9-12]</sup>。供者表观遗传学特征如 DNA 甲基化和组蛋白的修饰, 已被证明与缺血/再灌注损伤和移植物存活相关<sup>[13]</sup>。受者表观遗传学特征对移植排斥、免疫抑制治疗及其诱发疾病等方面影响的研究多围绕基因如 *FOXP3* 的 DNA 去甲基化, 为早期诊断提供线索<sup>[13-15]</sup>; 第二个进展来自同种移植抗原递呈途径的研究。“序贯三细胞”模型, 即 T 辅助细胞 (T helper cells, Th) - 树突状细胞 (dendritic cells, DC) - 细胞毒性 T 细胞 (cytotoxic T cells, CTL), 是 CTL 识别抗原、接受辅助并活化的途径<sup>[16-18]</sup>。然而, 移植领域既往的研究认为, 受者间接途径特异性 Th 与受者 DC 在二级淋巴器官内相

DOI: 10.3969/j.issn.2095-5332.2018.02.002

基金项目: 国家自然科学基金 (81401318)

通讯作者: 齐忠权, Email: zqqi@xmu.edu.cn

互作用,而受者直接途径CTL只能识别移植物细胞上的抗原,这样的“四细胞”模型显然与“三细胞”模型相悖。研究人员为解决这个问题提出了半直接途径的概念<sup>[19]</sup>,但缺乏物质基础和器官移植实验的证明。近来有体内实验数据支持半直接途径在移植排斥中的重要作用,即完整的供者MHC-肽复合物转运至受者DC从而激活受者的CD4和CTL,而非供者DC直接接触活化受者T细胞<sup>[20-22]</sup>。供者MHC-肽复合物以供者DC产生的外泌体为载体进行转运<sup>[20-21]</sup>,也有研究认为前者可来源于移植物实质细胞<sup>[22]</sup>。以上进展为诊治同种移植排斥反应提供了新思路。

诱导多能干细胞(induced pluripotent stem cell, iPSC)曾为器官再生带来希望<sup>[23]</sup>。然而,通过iPSC在体外构建实体脏器的研究进展非常缓慢<sup>[24]</sup>。物种间嵌合体的应用打破了这个困境<sup>[25]</sup>,成为近年来器官再生领域的亮点之一,有望产生来自患者自身细胞的器官用于移植<sup>[24]</sup>。通过构建人-动物嵌合体获得人的器官,首先要通过基因修饰去除动物体内的特定器官,从而为人器官发育提供所需的“巢”。然后将人的多能干细胞(pluripotent stem cell, PSC)引入动物早期胚胎内发育为嵌合体。发育成熟后,获取人的器官。目前已知,物种之间进化距离近容易获得嵌合体,如小鼠与大鼠之间。已经实现将小鼠-大鼠嵌合获得的小鼠胰腺细胞,用于治疗同品系小鼠链脲霉素(streptozocin, STZ)诱导的糖尿病<sup>[26]</sup>。进化距离远的较难构建嵌合体,如人和猪之间。研究人员采用不同状态的人PSC初步验证了人-猪嵌合的总体水平,但是嵌合率只有1/100 000<sup>[27]</sup>。而化学方法处理的人PSC能够使人-小鼠嵌合率达到1/100<sup>[28]</sup>。这种PSC在人-猪嵌合实验中的表现值得期待。结合前述灭活PERV猪的进展,在不远的将来人-猪嵌合体有望成为移植器官的重要来源。当然,前提是人-动物嵌合的伦理问题得到妥善解决。

数十年科技、临床和制造业发展成果的累积正在拉开新一轮科技革命的大幕。移植和再生领域的革命性进步也同样呼之欲出。我国科技、临床工作者与企业应当紧密合作,奋力抓住这次机遇,从科学研究、技术研发、应用转化和产业化等角度占领制高点。此外,可以预见的是,异种或人-动物嵌合体来源组织器官的应用将会引起医学伦理、政策法规

和社会共识等方面的问题与争论。我国科技和医药卫生行政主管部门应引导扫清这些障碍,造福人类。

## 参考文献

- [1] Cowan PJ, Tector AJ. The resurgence of xenotransplantation [J]. Am J Transplant, 2017, 17 (10): 2531-2536.
- [2] Higginbotham L, Mathews D, Breeden CA, et al. Pre-transplant antibody screening and anti-CD154 costimulation blockade promote long-term xenograft survival in a pig-to-primate kidney transplant model [J]. Xenotransplantation, 2015, 22 (3): 221-230.
- [3] 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.
- [4] 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.
- [5] Yang L, Güell M, Niu D, et al. Genome-wide inactivation of porcine endogenous retroviruses (PERVs) [J]. Science, 2015, 350 (6264): 1101-1104.
- [6] 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.
- [7] Weimer ET, Montgomery M, Petraroia R, et al. Performance characteristics and validation of next-generation sequencing for human leucocyte antigen typing [J]. J Mol Diagn, 2016, 18 (5): 668-675.
- [8] Ehrenberg PK, Geretz A, Sindhu RK, et al. High-throughput next-generation sequencing to genotype six classical HLA loci from 96 donors in a single MiSeq run [J]. HLA, 2017, 90 (5): 284-291.
- [9] Ghisdal L, Baron C, Lebranchu Y, et al. Genome-wide association study of acute renal graft rejection [J]. Am J Transplant, 2017, 17 (1): 201-209.
- [10] Sato-Otsubo A, Nannya Y, Kashiwase K, et al. Genome-wide surveillance of mismatched alleles for graft-versus-host disease in stem cell transplantation [J]. Blood, 2015, 126 (25): 2752-2763.
- [11] Oetting WS, Schladt DP, Guan W, et al. Genomewide association study of tacrolimus concentrations in African American kidney transplant recipients identifies multiple CYP3A5 Alleles [J]. Am J Transplant, 2016, 16 (2): 574-582.
- [12] McCaughan JA, McKnight AJ, Maxwell AP. Genetics of new-onset diabetes after transplantation [J]. J Am Soc Nephrol, 2014, 25 (5): 1037-1049.
- [13] Mas VR, Le TH, Maluf DG. Epigenetics in kidney transplantation: current evidence, predictions and future research directions [J]. Transplantation, 2016, 100 (1): 23-38.
- [14] Peters FS, Manintveld OC, Betjes MG, et al. Clinical potential of DNA methylation in organ transplantation [J]. J Heart Lung

- Transplant, 2016, 35 (7): 843-850.
- [ 15 ] Sherston SN, Vogt K, Schlickeiser S, et al. Demethylation of the TSDR is a marker of squamous cell carcinoma in transplant recipients [ J ]. Am J Transplant, 2014, 14 (11): 2617-2622.
- [ 16 ] Ridge JP, Di Rosa F, Matzinger P. A conditioned dendritic cell can be a temporal bridge between a CD4<sup>+</sup> T-helper and a T-killer cell [ J ]. Nature, 1998, 393 (6684), 474-478.
- [ 17 ] Bennett SR, Carbone FR, Karamalis F, et al. Help for cytotoxic-T-cell responses is mediated by CD40 signalling [ J ]. Nature, 1998, 393 (6684): 478-480.
- [ 18 ] Schoenberger SP, Toes RE, van der Voort EI, et al. T-cell help for cytotoxic T lymphocytes is mediated by CD40-CD40L interactions [ J ]. Nature, 1998, 393 (6684): 480-483.
- [ 19 ] Herrera OB, Golshayan D, Tibbott R, et al. A novel pathway of alloantigen presentation by dendritic cells [ J ]. J Immunol, 2004, 173, 4828-4837.
- [ 20 ] Liu Q, Rojas-Canales DM, Divito SJ, et al. Donor dendritic cell-derived exosomes promote allograft-targeting immune response [ J ]. J Clin Invest, 2016, 126 (8): 2805-2820.
- [ 21 ] Marino J, Babiker-Mohamed MH, Crosby-Bertorini P, et al. Donor exosomes rather than passenger leukocytes initiate alloreactive T cell responses after transplantation [ J ]. Sci Immunol, 2016, 1 (1): aaf8759.
- [ 22 ] Smyth LA, Lechler RI, Lombardi G. Continuous acquisition of MHC: peptide complexes by recipient cells contributes to the generation of anti-graft CD8<sup>+</sup> T cell immunity [ J ]. Am J Transplant, 2017, 17 (1): 60-68.
- [ 23 ] Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors [ J ]. Cell, 2006, 126 (4): 663-676.
- [ 24 ] Wu J, Greely HT, Jaenisch R, et al. Stem cells and interspecies chimaeras [ J ]. Nature, 2016, 540 (7631): 51-59.
- [ 25 ] Kobayashi T, Yamaguchi T, Hamanaka S, et al. Generation of rat pancreas in mouse by interspecific blastocyst injection of pluripotent stem cells [ J ]. Cell, 2010, 142 (5): 787-799.
- [ 26 ] Yamaguchi T, Sato H, Kato-Itoh M, et al. Interspecies organogenesis generates autologous functional islets [ J ]. Nature, 2017, 542 (7640): 191-196.
- [ 27 ] Wu J, Platero-Luengo A, Sakurai M, et al. Interspecies chimerism with mammalian pluripotent stem cells [ J ]. Cell, 2017, 168 (3): 473-486.
- [ 28 ] Yang Y, Liu B, Xu J, et al. Derivation of pluripotent stem cells with in vivo embryonic and extraembryonic potency [ J ]. Cell, 2017, 169 (2): 243-257.

(收稿日期: 2018-01-21)

刘泉, 齐忠权. 移植免疫与器官再生的研究进展[J/CD]. 实用器官移植电子杂志, 2018, 6 (2): 90-92.

## · 国外医学之窗 ·

### 新生猪胰岛细胞和间充质干细胞的联合移植能提高糖尿病小鼠的移植物功能

间充质干细胞 (mesenchymal stem cell, MSC) 具有免疫调节特性、抗炎特性和促血管生长特性, 这些特性对胰岛移植物的存活可能有促进作用。我们评估了人骨髓来源的 MSC 对新生猪胰岛 (newborn pig islet, NPI) 的影响, 并观察了联合移植后的胰岛的存活状况和代谢产物的情况。NPI 与 MSC 共培养能够增加细胞胰岛素含量和经葡萄糖刺激的胰岛素的释放。本实验将 NPI 作为控制因素, 实验组使用 NPI 与 MSC 联合移植, 对照组仅使用 NPI, 实验对象是 B6.129S7-Rag1tm1Mom/J 糖尿病小鼠。血糖和体重的监测持续到糖尿病被逆转, 然后再对小鼠进行口服糖耐量测定。胰岛移植物的评估依靠血管化程度和细胞胰岛素总含量。NPI 和 MSC 的联合移植组较对照组更早出现血糖正常和血管化, 糖耐量和细胞胰岛素含量比对照组更高。而有实验发现, 来源于自身免疫功能紊乱的供体的 MSC 则对移植物没有影响。总之, MSC 与 NPI 的联合移植能够使移植物更早血管化并提升胰岛功能, 此外, 异常供体来源的 MSC 对其在联合移植中发挥的作用与正常的相比会存在差异。

龙旺, 编译自 *Diabetes*, 2017, 66 (5): 1312-1321.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28246290>

## 本期执行主编

齐忠权



职称：教授

职务：广西大学医学院院长

齐忠权，1984年毕业于哈尔滨医科大学医疗系，在哈尔滨医科大学附属第一医院外科工作9年，留学瑞典13年，获得瑞典隆德大学外科博士学位，瑞典隆德大学马尔默医院器官移植中心客座医生。至今从事器官移植和腹部外科工作近30余年，擅长治疗普通外科常见疾病，胃肠外科和肿瘤疾病，临床肾脏、胰岛和细胞移植等。2006年回国创立厦门大学器官移植研究所，并担任所长。近年来运用干细胞、组织工程和动物克隆技术对异种移植进行了探索和研究。2012年获得国家科技部重大科学研究计划重大基础导向项目的资助。已经发表近百篇医学论文，其中70余篇SCI英文论文。1991年和1993年两次获黑龙江省科技进步一等奖；1995年获瑞典科技年会奖；2006年入典美国医学卫生保健世界名人传记 *Who's Who In Medicine And Healthcare* 第7版年鉴；2011年卢嘉锡优秀导师奖。现担任国务院经济与科技专家咨询委员，国际器官移植学会（TTS）会员，中华医学会泌尿肾移植学组委员，中国免疫学学会移植免疫分会委员。2006年4月—2017年8月担任厦门大学医学院副院长，现担任广西大学医学院院长。