

肾脏-胰岛联合移植研究进展

王唯予¹, 庄国洪¹, 夏俊杰¹, 齐忠权^{1,2} (1. 厦门大学器官移植研究所, 福建省器官与再生重点实验室, 福建 厦门 361102; 2. 广西大学医学院, 广西壮族自治区 南宁 530004)

糖尿病肾病是糖尿病最严重的并发症, 可通过间质及肾小管纤维化等机制导致肾脏功能衰竭, 最终进展为终末期肾脏病 (end stage renal disease, ESRD)^[1-2]。既往认为, 糖尿病肾病及其他慢性肾病患者更容易死于心血管疾病而不是 ESRD, 但是据一份 2 型糖尿病 (type 2 diabetes mellitus, T2DM) 随访统计, ESRD 导致的死亡比心血管疾病更为常见, 约为其 2.5 倍^[3]。同时, ESRD 也是 1 型糖尿病 (type 1 diabetes mellitus, T1DM) 的主要死亡原因, 而 T1DM 的发病率在世界范围内以每年 2% ~ 3% 的速度增长。既往常规的血液透析、胰岛素应用及相关对症治疗对于控制糖尿病肾病并发症的发生、发展有着很大的局限性, 已不能满足当今治疗的需要。随着近年来器官移植科学突飞猛进的发展, 肾脏-胰岛联合移植 (kidney-islet transplantation, KIT) 这一新技术的应用为糖尿病肾病, 尤其是为 ESRD 的治疗拓展了一条新道路, 其中异种移植扮演了重要角色。本文将从历史回顾、供体选择、供体制备及免疫支持等方面对 KIT 进行综述。

1 历史概况

自 1954 年首例临床肾移植获得成功以来, 器官移植作为治疗终末期肾脏病最有前景的手段而备受瞩目^[4]。但单凭肾脏移植不能有效控制糖尿病并发症的进展, 由于糖尿病病情没有得到缓解, 将导致移植的肾脏存活时间显著减少, 且应用免疫抑制剂对胰岛细胞具有损伤作用, 加之肾移植后糖尿病的发生风险增加、患者耐受力下降等因素, 单纯行肾脏移植并不真正适用于末期糖尿病肾病患者

者的治疗。1966 年, 研究人员为 1 例由糖尿病导致的肾衰竭患者尝试了历史上首例胰肾联合移植术, 虽然该例患者术后生存时间仅为 2 个月, 患者最终死于排斥反应, 但它为器官移植在治疗糖尿病肾病的应用打开了新思路。如今, 随着移植术式的成熟及对免疫排斥机制的深入研究, 联合器官移植已成为选择性治疗多个脏器同时衰竭的有效方法。2015 年, 国内一项长期随访报道显示, 胰肾联合移植受者术后 1、3、5 和 10 年存活率分别达到了 100%、100%、100% 和 66.7%^[5]。

然而, 胰肾联合移植虽然能取得较高的术后生存率, 但其在临床上仍具有不可避免的缺点, 例如外科手术式的复杂、排斥反应风险的增加、更易发生移植物功能的下降、具有术后严重并发症 (吻合口瘘及胰腺炎) 等。国内一项关于胰肾联合移植术 60 例的临床随访资料统计显示, 其中近 1/4 病例移植肾功能恢复延迟, 4 例移植胰腺切除^[6]。

因此, 临床实际对移植研究者们提出了更高的要求。与肾脏-胰腺联合移植相比, 近些年发展起来的 KIT 不仅继承了前者的治疗思路, 同时还具有更显著的临床优势: 术式简单、可重复性、安全高效、并发症少。研究显示, 胰岛移植结合最佳的胰岛素治疗对于维持患者接近正常的血糖水平, 其内源性胰岛素的产生是足够的。在血糖控制上, 胰岛移植的效果不亚于胰腺移植, 并且没有后者那么高的手术并发症风险及胰岛素依赖率。2005 年, 亚洲首例成人 KIT 在上海成功实施。

2 伦理限制及供体选择

要想推广 KIT 的应用, 离不开异种移植技术的发展。由于传统文化等诸多因素影响, 我国器

官捐献率仍然不高^[7]。据卫生部门2012年统计数据表明,我国每年约有150万人等待接受供体器官,实际上却只有约1万人最终能进行器官移植手术。供体器官严重缺乏不仅失去了许多挽救患者生命的机会,而且还严重限制我国器官移植学科的发展,同时也成为了全世界医学领域必须解决的重大难题。因此,人们提出异种移植这一思路,通过量产合适的供体器官解决移植难、移植贵、没有合适移植物的现状。异种移植的首要问题是挑选合适的物种作为供体来源。人们发现,猪是一种能为人类提供移植器官的理想动物,其具有世代间隔短、与人有着相似器官大小及构造、代价低、内源性逆转录病毒感染风险对人来说相对较低及符合动物保护法、相关道德准则等特点,且其胰岛素的分子结构跟人源胰岛素相似,故而成为备受移植工作者们青睐的研究对象。

3 供体制备

异种移植为KIT解决了供体数量问题,但制备异种供体对人们提出多方面要求,包括尽可能减少排斥反应的发生、保证生物安全性等诸多方面。其涉及多种技术支持,其中包括基因编辑、处理内源性逆转录病毒及基因修饰等。

3.1 基因编辑:近年来,基因编辑技术日趋成熟,随着CRISPR/Cas9等工具在制备异种抗原基因敲除猪上应用的成功^[8],异种器官移植这一设想早已不再大胆。CRISPR/Cas9广泛存在于古细菌中,是一种微生物用来保护自身免受外源性基因侵袭的核酸酶系统,它由一个核酸内切酶和一个能靶向定位DNA的向导RNA构成。当把能识别特定靶点的crRNA和辅助的tracrRNA整体设计为嵌合的向导RNA后,可用来引导Cas9切割特定区域的DNA序列。此系统具有效率高、通用性强、可编程等特点,在基因打靶和基因编辑方面具有巨大的潜力和普遍的适用性。基因编辑技术的发展使得加工供体器官成为可能,是异种移植的必要条件。

从动物实验中人们发现,异种抗原是导致超急性排斥反应的主要抗原。人类抗体所识别的主要猪细胞抗原即为 $\alpha-1, 3-$ 半乳糖抗原($\alpha-1, 3-$

galactose antigen, $\alpha-1, 3-\text{Gal}$),其位于猪的血管内皮上,是目前公认的引起猪-人异种移植超急性排斥反应的主要抗原,其表达受 $\alpha-1, 3-$ 半乳糖苷转移酶基因的控制。早在2002年,应用基因编辑技术就已成功地将 $\alpha-1, 3-$ 半乳糖苷转移酶($\alpha-1, 3-\text{galactosyl transferase}$, GGTA1)基因敲除^[9]。人们将敲除该基因后的猪称为GTKO猪,其移植物在猪-狒异种移植模型上有着较高成活率。除了 $\alpha-1, 3-\text{GAL}$ 抗原,猪还有着其他一些具有重要意义的异种抗原,如N-羟基乙酰神经氨酸(N-glycolylneuraminic acid, Neu5Gc)。控制合成该异种抗原的是CMP-N-乙酰神经氨酸羟化酶(CMAH)基因。

利用基因编辑工具,人们已经实现了多基因敲除(knockout, KO)的克隆动物。据研究报告,成功实现的GGTA1/CMAH双基因敲除猪,比起仅仅敲除GGTA1,移植物的存活时间进一步延长^[10]。近年来人们于此基础上,进一步完成了GGTA1/CMAH/ $\beta-4\text{GalNT2}$ 三基因敲除^[11]。此外有最新研究示,虽然GGTA1/CMAH/ $\beta-4\text{GalNT2}$ 三基因KO猪显著减少了异种反应性抗体的水平,但是在部分实验结果中发现了人类白细胞抗原(human leukocyte antigen, HLA)和猪白细胞抗原I类(swine leukocyte antigens class I, SLA class I)存在免疫交叉反应^[12]。另有报道显示,SLA class II也可作为异种抗原而存在^[13],均提示猪白细胞抗原很可能是异种移植基因编辑的下一个目标。

目前,CRISPR/Cas9技术本身也在不断发展中,现在有更多类型的Cas9工具可供实验挑选。当仅仅只想抑制或者活化目的基因时,可以选择dCas9(Dead Cas9),这种经过处理的Cas9失去了对DNA的切割活性,但仍能靶定目标序列,并将各种功能蛋白如转录激活或抑制因子带给目标基因。而当强调Cas9的特异性时,可以选择FokI-dCas9, FokI是一种非特异性核酸酶,且只有二聚化时才能发挥切割作用。因此,在人们将FokI与dCas9融合后,需要双重靶定目标序列才能发生切割,这显著降低了Cas9的脱靶率。目前

FokI-dCas9 已被应用于实验设计中。近年来,有实验针对性地将抗 CD2 单克隆抗体基因通过 FokI-dCas9 敲进了猪 GGTA1 基因外显子 9 中,并通过体细胞核移植技术生产出健康的小猪。被改进的小猪缺乏 α -1, 3-Gal 异种抗原的表达,并且其血清中持续存在抗 CD2 单克隆抗体^[14]。

越来越多成功的动物实验和研究数据表明,随着基因编辑技术的发展,异种移植所面临的种间屏障正被逐渐消除。

3.2 猪内源性逆转录病毒的处理:猪内源性逆转录病毒 (porcine endogenous retrovirus, PERV) 也是人们研究的热点。虽然有关其生物安全性的初步研究未显示人类受试者感染的证据^[15],但 PERV 仍具有对人传播的可能,尤其对于移植术后免疫功能低下的机体来说潜在风险无疑是巨大的,对人类健康和基因结构的长远影响更是不可预料,目前已得到了人们普遍和高度重视。目前,多种类型的猪已被证明能释放逆转录病毒颗粒,这种病毒在体外培养时会感染人类细胞,且在最新的实验中观察到了体外共培养时病毒在人类健康细胞中的水平传播。2015年,人们在处理 PERV 的研究上取得了突破性进展。Yang 等^[16]在确定了猪肾脏上皮细胞 (PK15) 中 PERV 片段的拷贝数为 62 后,利用基因编辑技术 CRISPR/Cas9 一次性打乱了 PERV 拷贝的所有副本,体外实验证实病毒的感染率被削弱了多达 1 000 倍,初步表明 PERVs 灭活猪应用到临床异种移植的可能性。但是由于当时并没有使用猪胚胎干细胞,因此并不能真正实现 PERVs 灭活的猪。2017年8月,经过 Yang 等^[16]及我国多所大学和研究机构的共同努力,两年前终于实现了 PERVs 灭活猪的设想。以猪胚胎细胞作为研究对象,再次利用 CRISPR/Cas9 技术灭活了 PERV 所有的 25 个拷贝,并且确保了病毒 100% 灭活后猪细胞正常的生长及分化,随后应用体细胞核移植克隆技术培育并收获了世界首批 PERVs 失活的幼猪^[17]。该突破性研究解决了跨物种移植的安全问题,进一步展示了基因编辑技术的强大潜能,对移植医学意义重大。

3.3 基因修饰:实施异种器官移植时不仅可激活受体的补体系统,还会引起凝血功能异常及移植体内血栓的形成,进一步加重对移植器官的损害。因此,对供体器官进行基因修饰,使之针对性表达一种或多种功能上抑制免疫反应或减少血栓形成的特定蛋白,可进一步延长移植物的存活时间。常见的基因修饰蛋白包括:人补体调节蛋白 (human complement regulatory proteins, hCRPs) 如 hCD46、hCD55 和 hCD59 等,可抑制受体补体系统的反应,减轻对移植血管内皮细胞的损害;人内皮细胞蛋白 C 受体 (human endothelial protein C receptor, hEPCR),具有与蛋白 C 结合的能力,并形成 APC。在抗炎症、抗凝血及抗凋亡方面具有重要意义,动物实验提示对于延长异种移植肾脏生存时间可能发挥重要作用;人整合素相关蛋白 (human integrin associated protein, hIAP),又称 hCD47,帮助移植物免受人体巨噬细胞的吞噬,但有最新研究显示,单独过表达时 CD200 对于巨噬细胞浸润的抑制效果好于 CD47^[18];人组织因子途径抑制物 (human tissue factor pathway inhibitor, hTFPI),可抑制组织因子凝血途径;胞外三磷酸核苷双磷酸水解酶 ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase-1, NTPDase-1),又称 CD39,可抵抗血小板聚集,同时具有一定的抗炎效果;细胞毒性 T 淋巴细胞相关抗原 4 (cytotoxic T lymphocyte associated antigen 4, CTLA4Ig),抑制体液及细胞免疫反应;血栓调节蛋白 (thrombomodulin, TM),可使凝血酶变促凝为抗凝;此外在 β 细胞特异性表达 CTLA4Ig 的变体 LEA29Y 也具有持久的免疫抑制作用等^[19]。

多基因修饰是未来研究发展的一个方向,目前,人们已经成功构建了以 GTKO 猪为基础的多抗原敲除多基因修饰猪,进一步延长了异种植物的存活时间。据动物模型研究显示,构建 GTKO/hCD39/hTFPI/pCTLA-4 Ig 的多基因修饰猪,并将其胰岛细胞移植到糖尿病模型的猴体内,接下来的 1 年内移植物的功能及受体血糖水平完全正常^[20]。构建 GTKO/CD46/CD55/EPCR/TFPI/CD47 的猪源异种肾脏移植给狒狒,其生存时间也达到了 8 个月以上,

受体最终死于感染^[21]。此外,共表达的功能蛋白之间也可能存在相互影响。据报道,在细胞毒性实验中,hCD47/hTFPI共表达的PK15细胞,其生存时间比单纯构建hCD47-PK15或hTFPI-PK15及无处理的PK15细胞都要长^[22],据推测hTFPI的表达可能具有促进hCD47-SIRPα调控的作用。

4 供体的制备及储存

KIT包括肾脏及胰岛两方面:关于肾脏移植术前保存,有研究指出常用的低温保存对移植肾功能有不良影响,而常温体外肾脏灌注可能有助于降低移植术后移植肾功能延迟恢复率,并可进一步扩大供体池^[23]。

关于胰岛移植,获得大量具有活性的供体细胞是进行胰岛移植的前提。自从胰岛自动化提纯装置被发明以来,利用胶原酶消化法成为了国际上提取活体细胞的主要途径,其原理为通过胶原酶消化胰腺组织,辅以机械震荡收集不断脱落的胰岛,最后以密度梯度离心法进行纯化。此后随着技术的不断进步,分离及提纯技术在得到不断完善。研究人员进一步改进了传统的提纯装置,通过控制酶的消化程度及机械震荡强度,大大减轻了分离过程对游离胰岛细胞的损伤,增加了胰岛细胞提纯效率。在胶原酶的选择上,以新型的Liberase释放酶最为常见,其具有较低的毒性作用,并能更好地保护胰岛的完整性。目前国际主流的提纯方式有Ficoll不连续密度梯度法等多种方式,近年来有报道称,用COBE2991连续密度梯度离心法可能较传统方法获得纯度更高的胰岛细胞^[24]。在制备过程中供体保存方面,有对照试验指出使用Custodiol HTK保护液的胰岛细胞活性及存活率均高于Belzer UW组。另外,对于猪源胰岛细胞的制备,挑选过于年轻的供体器官通常会导致胰岛的产量和存活率降低^[25]。

5 排斥反应防治支持

KIT进一步提高了免疫治疗的性价比,结合新的抗免疫排斥药物极大提升了移植成功率,但是术后抗排斥治疗带来的不良反应仍然无法回避,如胰岛功能减退、蛋白尿及卵巢囊肿等。如何找到有效且副作用低的排斥反应防治方案仍然是研究的重中之重。目前这一领域仍有许多难题和瓶颈,如处理补

体及炎症的激发、巨噬细胞的激活和吞噬、T细胞共刺激通路等都是重要的研究方向。如今,随着免疫机制的深入研究、新型免疫抑制剂的研发成功以及技术上的成熟和进步,越来越多的设想正被实现。人们借助诸如“挑选合适的移植部位”“免疫隔离-微囊化技术”“异源性嵌合体诱导移植免疫耐受”等多种途径,试图将移植术后排斥反应降至最低。

5.1 选择合适的胰岛移植部位:关于胰岛细胞的移植部位,过去常见的选择有经门静脉胰岛细胞移植,这是由于肝脏既是胰岛素的作用部位,又是相对的免疫豁免区,其结构利于胰岛的居留。有报道称,胰岛于肝内可获得较长的存活时间,并可发挥相应的内分泌功能。但必须指出的是,此种方案仍存在有一定的术后门静脉高压及肝功能损害等严重并发症风险。

与肝脏相比,大网膜可能是一个更合适的胰岛移植部位^[26],其分泌多种有利于胰岛细胞居留及生存的细胞因子,同时具有良好的血供及门静脉引流,且能容纳大量胰岛细胞。近年来,一项国外动物对照试验显示,与肝脏相比,大网膜为移植胰岛提供了更佳的植入条件^[27]。国外一项临床前动物研究提示,利用可吸收血浆-凝血酶生物支架进行经大网膜胰岛移植具有临床可行性^[28]。与此同时,国内进一步开展了经大网膜胰岛移植的临床研究。天津市第一中心医院器官研究中心的医者们挑选了2例T1DM患者,利用腹腔镜技术将提纯后的胰岛细胞直接滴散于受体大网膜上,利用可吸收血浆-凝血酶生物支架进行固定,术后监测患者血糖提示术后移植物正常发挥生理学功能,且随访数月未发现明显不良反应^[29]。

除肝脏及大网膜外,眼球前房、肾包膜下区、睾丸及脑室等其他部位因有免疫豁免特性,也可成为胰岛移植研究与选择的潜在对象。人们尝试将同种异体胰岛细胞移植到1例失明的糖尿病患者眼球前房,术后随访3个月提示移植胰岛存活并发挥功能,未造成眼睛永久损伤,初步证明了该术式的可行性^[30]。

5.2 免疫隔离-微囊化技术:微囊化技术通过在胰岛细胞表面包裹一层具有生物相容性的半通透薄

膜来阻止大分子免疫成分的进入,达到保护胰岛细胞、减轻免疫排斥反应的效果。目前,以 Sun 等人的海藻酸钠-聚赖氨酸-海藻酸钠(alginate-polylysine-alginate, APA)微囊最为经典常用,其具有较好的细胞相容性、长期的稳定性、较低的细胞毒性以及细胞黏附性等优点。尽管目前微囊技术较为成熟,但微囊材料的生物相容性、结构的强度及稳定性仍有待提高。有报道称,胰岛微囊化后,部分囊内胰岛可出现缺氧表现,囊壁可出现过度纤维化,可能与微囊材料的生物相容性较差有关^[31]。近年来有研究显示,含雷帕霉素的聚乙烯涂层可在一定程度上改善藻酸盐微囊的生物相容性^[32]。

寻找到生物相容性和通透选择性好、分子结构稳定的新材料,是微囊化技术突破的目标和关键。

5.3 异源性嵌合体诱导移植免疫耐受:自1993年嵌合体理论被提出以来,异源性嵌合体就成了研究人工诱导免疫耐受的一大方向。通俗意义上讲,嵌合体状态是指受体接受异己来源的移植植物后,受体自身与异源细胞相互移行、共同存在的现象。在至今为止的动物移植实验中,多次发现受体体内存在供者来源DNA的细胞,并且形成受体对这些异源细胞的免疫耐受。因此,长期的嵌合状态可在一定程度上诱导受体对移植物的免疫耐受。

在之前的动物试验中,输注供体特异性的骨髓细胞(donor-specific bone marrow cells, DBMC)诱导的免疫耐受已获得成功,可有效降低慢性排斥发生率并延长移植植物存活时间。但是一直以来,受体巨噬细胞快速清除猪的造血干细胞都阻碍着猪-灵长类之间异种嵌合的尝试。最新的研究在这一方面有所进展,通过基因修饰使猪表达hCD47后发现,异种嵌合现象的水平及持续时间都比处理前要更好。随后进行的猪-狒狒异种皮肤移植进一步验证,应用该方法的异种嵌合使移植物的生存时间成功延长,其中1例术后至少53天内没有出现明显排斥反应^[33]。

总的来说,嵌合体的机制复杂,目前尚存在很多争议,其缺点也很明显:降低机体免疫力、增加疾病感染和肿瘤发生风险、需依靠其他免疫抑制手

段进行诱导等。但是随着技术的不断进步,相信其内在机制的阐述会越发清晰,能在不久的将来为异种移植解决临床实际问题。

如今,人们已能通过免疫抑制疗法阻断T细胞共同刺激通路,如CD40/CD154,进而延长异种胰岛的存活时间^[34]。2C10R4作为一种新型的抗CD40抗体,表现出不错的免疫调节作用且不良反应较少^[35],但是在预防早期移植胰岛损害方面不如抗CD154单克隆抗体^[36]。另外,虽然之前有研究提示抗CD154单克隆抗体会引起血栓栓塞,不宜用于异种移植的应用,但据该研究团队最新的一份猪-猴异种胰岛移植实验报道,应用新一代抗CD154单克隆抗体后进行器官活检,并没有发现血栓栓塞的组织学特征^[37];另一研究团队的实验报道称新型的抗CD154域抗体可使抗CD154单抗缺乏Fc结合活性,不会引起血小板活化及血栓栓塞,使用安全且效果强大^[38]。

多份证据预示抗CD154抗体途径也可成为一种安全有效的异种胰岛移植方案。临床应用上,越来越多的新型免疫抑制药物如雷帕霉素、贝拉西普等也已开发并投入使用,其与传统药物(如环孢素)相比,所需剂量更少、毒性更小、疗效更好。免疫疗法研究方向诸多,未来或许还可通过Cp40等补体抑制剂有效阻断补体活化的主要途径,进一步降低异种移植时的细胞损害^[39]。相信随着理论和技术的进步,越来越多可行有效的方法会被发现。

6 展望

器官移植的不断革新已为医学带来了翻天覆地的变化,是未来最有可能攻克终末期器官衰竭的途径。这其中,前景大好的当属异种器官移植,目前已在临床应用上取得了一定进展。2011年,王维等^[40]证实了猪源异种胰岛可以在人体内存活并发挥其功能。2016年至今,其团队已成功将猪源胰岛细胞移植给数例T1DM患者,在异种移植技术的研究及临床应用上取得了阶段性突破。目前来讲,肾脏及胰岛移植技术仍处在不断摸索中,这里面还有很长的路要走,而整个移植领域都仅仅只是生命科学探究

真理的冰山一角。但不论如何,人们都有理由相信,随着时代的进步和技术的发展,这一小角冰山终将成为生命科学大拼图中不可或缺的一片天地。

参考文献

- [1] 张梅,杨涛.胰岛移植在脆性糖尿病中的治疗价值[J/CD].实用器官移植电子杂志,2016,4(6):367-370.
- [2] 李庆,宋学君,李志军.糖尿病肾病细胞因子的研究进展[J].中国中西医结合急救杂志,2017,24(1):99-100.
- [3] Packham DK, Alves DK, Alves TP, et al. Relative incidence of ESRD versus cardiovascular mortality in proteinuric type 2 diabetes and nephropathy: results from the DIAMETRIC (Diabetes Mellitus Treatment for Renal Insufficiency Consortium) database[J]. Am J Kidney Dis, 2012, 59(1): 75-83.
- [4] 吴刚,徐序广,李黔生,等.肾移植术后肺部感染早期合并急性呼吸窘迫综合征的救治体会[J].中华危重病急救医学, 2007, 19(1): 55-56.
- [5] 苗芸,于立新,邓文锋,等.器官联合移植长期随访30例临床分析[J].中华器官移植杂志,2015,36(7):394-398.
- [6] 罗鲜樟,明长生,宫念樵,等.胰肾联合移植术后外科并发症的临床分析[J].中华器官移植杂志,2013,34(6):341-344.
- [7] 李恩昌,彭松,朱小宁,等.关于我国器官捐献伦理社会体系建设研究进展的综述[J].中国医学伦理学,2016,29(1):154-157.
- [8] Sato M, Miyoshi K, Nagao Y, et al. The combinational use of CRISPR/Cas9-based gene editing and targeted toxin technology enables efficient biallelic knockout of the α -1, 3-galactosyltransferase gene in porcine embryonic fibroblasts [J]. Xenotransplantation, 2014, 21(3): 291-300.
- [9] Lai L, Kolber-Simonds D, Park KW, et al. Production of α -1, 3-galactosyltransferase knockout pigs by nuclear transfer cloning [J]. Science, 2002, 295(5557): 1089-1092.
- [10] Lutz AJ, Li P, Estrada JL, et al. Double knockout pigs deficient in N-glycolylneuraminic acid and Galactose α -1,3-Galactose reduce the humoral barrier to xenotransplantation [J]. Xenotransplantation, 2013, 20(1): 27-35.
- [11] Estrada JL, Martens G, Li P, et al. Evaluation of human and non-human primate antibody binding to pig cells lacking GGTAI/CMAH/ β 4GalNT2 genes [J]. Xenotransplantation, 2015, 22(3): 194-202.
- [12] Martens GR, Reyes LM, Butler JR, et al. Humoral reactivity of renal transplant-waitlisted patients to cells from GGTAI/CMAH/ β 4GalNT2, and SLA class I knockout pigs [J]. Transplantation, 2017, 101(4): e86-e92.
- [13] Ladowski JM, Reyes LM, Martens GR, et al. Swine leukocyte antigen (SLA) class II is a xenoantigen [J]. Transplantation, 2017, [2017-11-20]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28846555>. [published online ahead of print Aug 24, 2017].
- [14] Nottle MB, Salvaris EJ, Fisticaro N, et al. Targeted insertion of an anti-CD2 monoclonal antibody transgene into the GGTA1 locus in pigs using FokI-dCas9 [J]. Sci Rep, 2017, 7(1): 8383.
- [15] Morozov VA, Wynyard S, Matsumoto S, et al. No PERV transmission during a clinical trial of pig islet cell transplantation [J]. Virus Res, 2017, 227: 34-40.
- [16] Yang L, Güell M, Niu D, et al. Genome-wide inactivation of porcine endogenous retroviruses (PERVs) [J]. Science, 2015, 350(6264): 1101-1104.
- [17] 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.
- [18] Yan JJ, Koo TY, Lee HS, et al. Role of human CD200 overexpression in pig-to-human xenogeneic immune response compared with human CD47 overexpression [J]. Transplantation, 2017, [2017-11-10]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28968355>. [published online ahead of print Sep 29, 2017].
- [19] Buerck LW, Schuster M, Oduncu FS, et al. LEA29Y expression in transgenic neonatal porcine islet-like cluster promotes long-lasting xenograft survival in humanized mice without immunosuppressive therapy [J]. Sci Rep, 2017, 7(1): 3572.
- [20] Ayares D, Phelps C, Vaught T, et al. Multi-transgenic pigs for xenotransplantation [J]. Xenotransplantation, 2013, 20(1): 46.
- [21] Iwase H, Hara H, Ezzelarab M, et al. Immunological and physiological observations in baboons with life-supporting genetically engineered pig kidney grafts [J]. Xenotransplantation, 2017, [2017-12-10]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28303661>. [published online ahead of print Mar, 2017].
- [22] Jung SH, Hwang JH, Sang EK, et al. The potentiating effect of hTFPI in the presence of hCD47 reduces the cytotoxicity of human macrophages [J]. Xenotransplantation, 2017, [2017-12-13]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28393401>. [published online ahead of print May, 2017].
- [23] Kathis JM, Echeverri J, Chun Y M, 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.
- [24] 黑洁.不同分离及纯化方法对人胰岛分离纯化的影响[J].中国社区医师,2014(36):11-12.

- [25] Steffen A, Kiss T, Schmid J, et al. Production of high-quality islets from goettingen minipigs: Choice of organ preservation solution, donor pool, and optimal cold ischemia time [J]. *Xenotransplantation*, 2017, [2017-12-12]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28130838>. [published online ahead of print Jan, 2017].
- [26] 尹注增, 刘荣. 胰岛移植部位的选择及优缺点[J/CD]. *实用器官移植电子杂志*, 2016, 4(6): 355-359.
- [27] Espes D, Lau J, Quach M, et al. Rapid restoration of vascularity and oxygenation in mouse and human islets transplanted to omentum may contribute to their superior function compared to intraportally transplanted islets [J]. *Am J Transplant*, 2016, 16(11): 3246-3254.
- [28] Berman DM, Molano RD, Fotino C, et al. Bioengineering the endocrine pancreas: intraomental islet transplantation within a biologic resorbable scaffold [J]. *Diabetes*, 2016, 65(5): 1350-1361.
- [29] 王树森, 裴广辉, 王金山, 等. 经大网膜生物支架胰岛移植技术的探讨[J/CD]. *实用器官移植电子杂志*, 2016, 4(6): 378-380.
- [30] Nadine GH, Marc D, David G, et al. First-in-man pancreatic islet transplantation in the anterior chamber of the human eye [J]. 2017 ARVO Annual Meeting, Baltimore, MD, May 7-11, 2017.
- [31] Vaithilingam V, Kollarikova G, Qi M. Effect of prolonged gelling time on the intrinsic properties of barium alginate microcapsules and its biocompatibility [J]. *J Microencapsul*, 2011, 28(6): 499-507.
- [32] Park HS, Kim JW, Lee SH, et al. Antifibrotic effect of rapamycin containing polyethylene glycol-coated alginate microcapsule in islet xenotransplantation [J]. *J Tissue Eng Regen Med*, 2017, 11(4): 1274-1284.
- [33] Tena AA, Sachs DH, Mallard C, et al. Prolonged survival of pig skin on baboons after administration of pig cells expressing human CD47 [J]. *Transplantation*, 2017, 101(2): 316-321.
- [34] Thompson P, Badell IR, Lowe M, et al. Alternative immunomodulatory strategies for xenotransplantation: CD40/154 pathway-sparing regimens promote xenograft survival [J]. *Am J Transplant*, 2012, 12(7): 1765-1775.
- [35] O'Neill NA, Zhang T, Braileanu G, et al. Comparative evaluation of α CD40 (2C10R4) and α CD154 (5C8H1 and IDEC-131) in a nonhuman primate cardiac allotransplant model [J]. *Transplantation*, 2017, 101(9): 2038-2047.
- [36] Shin JS, Kim JM, Min BH, et al. Pre-clinical results in pig-to-non-human primate islet xenotransplantation using anti-CD40 antibody (2C10R4)-based immunosuppression [J]. *Xenotransplantation*, 2017, [2017-12-10]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29057561>. [published online ahead of print Oct 22, 2017].
- [37] Bottino R, Knoll MF, Graeme-Wilson J, et al. Safe use of anti-CD154 monoclonal antibody in pig islet xenotransplantation in monkeys [J]. *Xenotransplantation*, 2017, [2017-12-10]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28058735>. [published online ahead of print Jan, 2017].
- [38] Kim SC, Wakwe W, Higginbotham LB, et al. Fc-Silent anti-CD154 domain antibody effectively prevents nonhuman primate renal allograft rejection [J]. *Am J Transplant*, 2017, 17(5): 1182-1192.
- [39] Abicht J, Kourtzelis I, Reichart B, et al. Complement C3 inhibitor Cp40 attenuates xenoreactions in pig hearts perfused with human blood [J]. *Xenotransplantation*, 2017, 24(1).
- [40] 王维, 莫朝辉, 叶斌, 等. 新生猪胰岛移植治疗糖尿病病人的临床研究[J]. *中南大学学报(医学版)*, 2011, 36(12): 1134-1140.

(收稿日期: 2017-11-21)

王唯予, 庄国洪, 夏俊杰, 齐忠权. 肾脏-胰岛联合移植研究进展[J/CD]. *实用器官移植电子杂志*, 2018, 6(2): 152-158.