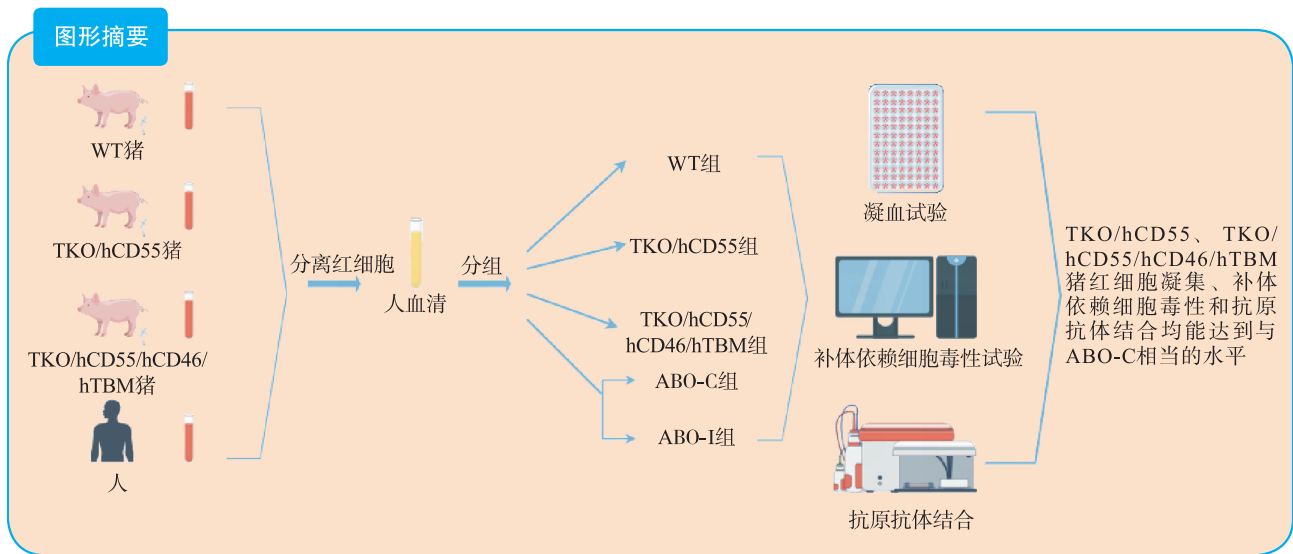


· 论著 ·

# 人源化基因修饰猪红细胞与人血清免疫相容性的体外研究

陈蕾佳 崔梦一 宋翔宇 王恺 贾志博 杨臻璞 董阳辉 左浩辰 杜嘉祥 潘登科 许文静 任洪波  
赵亚群 彭江



**【摘要】** 目的 探讨野生型 (WT)、四基因修饰 (TKO/hCD55) 和六基因修饰 (TKO/hCD55/hCD46/hTBM) 猪红细胞与人血清的免疫相容性和免疫差异。方法 收集 20 名不同血型志愿者的血液, 将 WT、TKO/hCD55 和 TKO/hCD55/hCD46/hTBM 猪红细胞、ABO-相容 (ABO-C) 及 ABO-不相容 (ABO-I) 人红细胞分别暴露于不同血型人血清中, 检测血凝集、抗原抗体结合 (IgG、IgM) 水平和补体依赖细胞毒性, 评估 2 种基因修饰猪红细胞与人血清的免疫相容性。结果 ABO-C 组未出现明显凝集; WT 组和 ABO-I 组凝集水平高于 TKO/hCD55 组和 TKO/hCD55/hCD46/hTBM 组 (均为  $P < 0.001$ )。WT 组猪红细胞裂解水平高于 ABO-C 组、TKO/hCD55 组和 TKO/hCD55/hCD46/hTBM 组; ABO-I 组猪红细胞裂解水平高于 TKO/hCD55 组、TKO/hCD55/hCD46/hTBM 组 (均为  $P < 0.01$ )。TKO/hCD55 组猪红细胞 IgM 和 IgG 结合水平均低于 WT 组和 ABO-I 组;

DOI: 10.3969/j.issn.1674-7445.2023226

基金项目: 国家重点研发计划 (2019YFA0110704); 解放军总医院青年自主创新科学基金项目 (22QNFC014)

作者单位: 075132 河北张家口, 河北北方学院研究生院 (陈蕾佳、宋翔宇、贾志博、杨臻璞、董阳辉); 中国人民解放军总医院第一医学中心神经外科医学部 (陈蕾佳、宋翔宇、赵亚群); 中国人民解放军总医院第四医学中心骨科医学部研究所 (陈蕾佳、崔梦一、宋翔宇、王恺、贾志博、杨臻璞、董阳辉、左浩辰、许文静、彭江); 邯郸市中心医院神经外科 (任洪波); 成都中科奥格生物科技有限公司 (杜嘉祥、潘登科)

作者简介: 陈蕾佳 (ORCID 0000-0002-3574-4590), 硕士研究生, 医师, 研究方向为神经外科学、异种输血等, Email: 15832080398@163.com; 崔梦一 (ORCID 0009-0006-1822-416X), 硕士, 助理研究员, 研究方向为免疫学和基因技术在异种移植和输血方面的应用研究, Email: 13501352418@163.com (陈蕾佳、崔梦一为共同第一作者)

通信作者: 赵亚群 (ORCID 0000-0001-8318-2660), 医学博士, 主任医师, 研究方向为神经外科学、颅脑创伤等, Email: zhaoyaqu2@sina.com; 彭江 (ORCID 0000-0003-4662-9288), 医学博士, 研究员, 研究方向为骨科学、组织工程技术修复骨与神经再生等, Email: pengjiang301@126.com

TKO/hCD55/hCD46/hTBM 组猪红细胞 IgG 和 IgM 结合水平低于 WT 组, IgG 低于 ABO-I 组 (均为  $P < 0.05$ )。结论 基因修饰猪红细胞的免疫相容性优于野生型猪, 并接近于 ABO-C, 人源化猪红细胞在血资源奇缺时可考虑作为血液来源。

【关键词】 输血; 异种移植; 基因修饰猪; 异种抗原; 红细胞; 抗原抗体结合; 凝集; 补体依赖细胞毒性

【中图分类号】 R457.1, R392 【文献标志码】 A 【文章编号】 1674-7445 (2024) 03-0012-07

**In vitro study of immunocompatibility of humanized genetically modified pig erythrocytes with human serum** Chen Leijia\*, Cui Mengyi, Song Xiangyu, Wang Kai, Jia Zhibo, Yang Liupu, Dong Yanghui, Zuo Haochen, Du Jiaxiang, Pan Dengke, Xu Wenjing, Ren Hongbo, Zhao Yaqun, Peng Jiang.\* Graduate School of Hebei North University, Zhangjiakou 075132, China

Corresponding authors: Zhao Yaqun, Email: zhaoyaqun2@sina.com

Peng Jiang, Email: pengjiang301@126.com

【Abstract】 **Objective** To investigate the differences and the immunocompatibility of wild-type (WT), four-gene modified (TKO/hCD55) and six-gene modified (TKO/hCD55/hCD46/hTBM) pig erythrocytes with human serum. **Methods** The blood samples were collected from 20 volunteers with different blood groups. WT, TKO/hCD55, TKO/hCD55/hCD46/hTBM pig erythrocytes, ABO-compatible (ABO-C) and ABO-incompatible (ABO-I) human erythrocytes were exposed to human serum of different blood groups, respectively. The blood agglutination and antigen-antibody binding levels (IgG, IgM) and complement-dependent cytotoxicity were detected. The immunocompatibility of two types of genetically modified pig erythrocytes with human serum was evaluated. **Results** No significant blood agglutination was observed in the ABO-C group. The blood agglutination levels in the WT and ABO-I groups were higher than those in the TKO/hCD55 and TKO/hCD55/hCD46/hTBM groups (all  $P < 0.001$ ). The level of erythrocyte lysis in the WT group was higher than those in the ABO-C, TKO/hCD55 and TKO/hCD55/hCD46/hTBM groups. The level of erythrocyte lysis in the ABO-I group was higher than those in the TKO/hCD55 and TKO/hCD55/hCD46/hTBM groups (both  $P < 0.01$ ). The pig erythrocyte binding level with IgM and IgG in the TKO/hCD55 group was lower than those in the WT and ABO-I groups. The pig erythrocyte binding level with IgG and IgM in the TKO/hCD55/hCD46/hTBM group was lower than that in the WT group and pig erythrocyte binding level with IgG was lower than that in the ABO-I group (all  $P < 0.05$ ). **Conclusions** The immunocompatibility of genetically modified pig erythrocytes is better than that of wild-type pigs and close to that of ABO-C pigs. Humanized pig erythrocytes may be considered as a blood source when blood sources are extremely scarce.

【Key words】 Blood transfusion; Xenotransplantation; Genetically modified pig; Heterologous antigen; Red blood cell; Antigen-antibody binding; Agglutination; Complement-dependent cytotoxicity

血资源紧张是全球正在面临的难题<sup>[1]</sup>。众多研究者为了应对这一问题致力于寻找其他来源的红细胞以替代采集血液, 如基于血红蛋白的氧载体、全氟碳化合物、人类诱导多能干细胞定向分化类制品等<sup>[2-4]</sup>, 虽在携氧能力等方面表现出良好效果, 但大多研究都因不可避免的并发症等问题而终止于临床试验, 目前不足以解决供血需求。

猪的解剖结构、基因组学、红细胞生理特性等与人相似<sup>[5]</sup>。相对于其他来源, 将猪作为红细胞供体的异种输血方案似乎更易实现。但在猪红细胞表面存在一些异种抗原, 主要为  $\alpha$ -1,3-半乳糖 ( $\alpha$ -1,3-galactose,  $\alpha$ Gal)、N-羟乙酰神经氨酸 (N-glycolylneuraminic

acid, Neu5Gc) 和 Sda 血型抗原, 由于人红细胞表面没有这些抗原表达, 因此直接将野生猪红细胞输入人体, 将立即发生免疫反应导致溶血<sup>[5-6]</sup>。

随着基因修饰技术的发展, 不表达这些异种抗原的基因敲除猪逐渐成为异种移植和输血的研究热点, 它们能够明显降低异种抗原性, 将其作为器官、组织和细胞来源进行异种移植和输血的研究已取得重大进展<sup>[5,7-8]</sup>。同时, 研究表明基因修饰方案中转入人补体调节蛋白, 能进一步减轻排斥反应<sup>[7]</sup>。科学家们通常使用非人灵长类动物 (non-human primate, NHP) 进行异种移植和输血研究, 为临床试验提供实验基础, 大部分实验结果显示多种基因修饰能提供更好的免疫

保护<sup>[9-11]</sup>。但将多基因修饰猪用于异种器官或组织移植前,需要进行体外免疫相关验证。因此,本研究通过体外实验初步验证人源化基因修饰猪和野生型猪红细胞与人血清的免疫相容性,旨在为临床异种移植和输血提供参考。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 实验材料

1.1.1 主要试剂和耗材 舒泰<sup>®</sup>50购自法国Virbac公司;0.9%氯化钠注射液购自山东华鲁制药有限公司;磷酸盐缓冲液(phosphate buffer saline, PBS)、杜氏磷酸盐缓冲液(Dulbecco's phosphate buffer saline, DPBS)、封闭山羊血清(原液)购自北京索莱宝科技有限公司;兔补体购自加拿大CEDARLANE公司;异硫氰酸荧光素(fluorescein isothiocyanate, FITC)标记的山羊抗人Alexa Fluor<sup>™</sup> 647 IgM、IgG购自于美国ThermoFisher公司;25 mm白细胞针头滤器购自美国颇尔公司。

1.1.2 实验动物 野生型猪(WT, 18月龄,体质量40 kg,血型为O型)购自北京市房山区北京华福源生物技术有限公司,四基因修饰猪[Gal、Sda和Neu5Gc基因敲除,人补体调节蛋白(hCD55)转入,三基因敲除(triple-knockout, TKO)/hCD55, 28月龄,体质量65 kg,血型为O型]、六基因修饰猪[αGal、Sda和Neu5Gc基因敲除, hCD55、hCD46、人血栓调节蛋白(human thrombomodulin, hTBM)转入, TKO/hCD55/hCD46/hTBM, 11月龄,体质量33 kg,血型为O型]由成都中科奥格生物科技有限公司提供[实验动物生产许可证号:SCXK(川)2020-033]。所用猪均为雄性巴马猪,饲养于北京华福源生物技术有限公司的动物饲养基地,饲养环境恒温恒湿,昼夜时间各为12 h。

1.1.3 动物血液标本 于北京华福源生物技术有限公司动物实验室完成猪的抽血[实验许可证号:SYXK(京)2021-0047]。根据体质量抽取舒泰<sup>®</sup>50(0.03 mL/kg),臀肌注射诱导麻醉,麻醉后于猪后肢血管采血,血液采集至抗凝管,4℃环境保存运输至实验室。

1.1.4 人血液标本 人A型、B型、AB型、O型血液共20个标本,来源为疾病诊治过程中常规检查后的废弃血液,由中国人民解放军总医院第四医学中心提供,并征得捐献者本人知情同意,血型已由检验科

鉴定(均为Rh阳性)。

### 1.2 研究内容及方法

1.2.1 实验分组 根据血型随机分为5组:ABO-相容组(ABO-C组),即人红细胞和血清相容的组合,如A型人红细胞+A型血清、B型人红细胞+B型血清等,作为阴性对照;ABO-不相容组(ABO-I组),即人红细胞和血清不相容的组合,如A型人红细胞+B型血清、B型人红细胞+A型血清等,作为阳性对照;WT组、TKO/hCD55组、TKO/hCD55/hCD46/hTBM组:即相应猪红细胞+人血清(1只猪的红细胞分为10份,人血清随机选取10份)。

1.2.2 血液的处理 将来自人和猪的全血1 000×g离心5 min,促凝管收集的人血液离心后分离血清立即保存至-20℃备用,抗凝全血离心后去除上清和白膜层,得到红细胞沉淀用等量PBS洗涤3次,每次洗涤以上述条件离心后均去除上清和白膜层,后经白细胞滤器滤白处理后用于后续实验。

1.2.3 血凝集试验 不同血型的人血清在56℃水浴锅中30 min热灭活后以1:64稀释,将制备的红细胞悬液20 μL分装至96孔板,加入20 μL稀释血清,轻微震荡后孵育1 h,拍照记录并观察,应用改良的Marsh评分(0=无凝集,4=最大凝集)计算各组凝集水平<sup>[12]</sup>。

1.2.4 补体依赖细胞毒性试验 上述处理好的红细胞,以 $2 \times 10^7/100 \mu\text{L}$ 悬浮于离心管中,热灭活的人血清以1:4稀释,取100 μL与等量红细胞悬液在4℃下孵育1 h,洗涤两次后与1:12稀释度的兔补体(按照正常推荐的温度保存,活性稳定)100 μL在37℃下孵育1 h。1 000×g离心5 min后,吸取上清至96孔板中,测量541 nm处上清吸光度(A)值。以单独补体或DPBS处理的样本作为对照,最终结果由归一化的A值表示。

归一化的A值= $(A_1 - A_2) / (A_3 - A_2)$ ,其中A<sub>1</sub>为实验组A值,A<sub>2</sub>为对照组A值,A<sub>3</sub>为红细胞与去离子水孵育处理后的A值。

1.2.5 红细胞的抗原抗体结合实验 上述处理好的红细胞,以 $5 \times 10^5/100 \mu\text{L}$ 悬浮于5 mL流式管中,灭活的人血清以1:4比例稀释,取100 μL与等量红细胞悬液涡旋混匀,在4℃下孵育30 min,DPBS洗涤后重悬细胞,10%的山羊血清封闭后洗涤,重悬细胞并加入IgG、IgM(1:500)在4℃下孵育30 min,洗

涂后 100  $\mu$ L DPBS 重悬细胞调整最终浓度, 采用流式细胞仪检测 IgG、IgM 结合情况。以单独用抗体处理的样本作为对照。最终结果由相对平均荧光强度表示。

### 1.3 统计学方法

采用 GraphPad Prism 9.5 软件进行统计学分析。符合正态分布的计量资料以均数 $\pm$ 标准差表示, 比较采用单因素方差分析中 Tukey 法或 Kruskal-Wallis 秩检验 (包括非参数检验) 中的 Dunn's 测试检验。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 各组血凝集水平

暴露于 1 : 64 稀释的人血清中时, ABO-C 组未出现明显凝集。WT 组和 ABO-I 组凝集水平差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ), 而两组凝集水平均高于 TKO/hCD55 组、TKO/hCD55/hCD46/hTBM 组 (均为  $P < 0.001$ )。TKO/hCD55 组、TKO/hCD55/hCD46/hTBM 组、ABO-C 组凝集水平差异无统计学意义 (均为  $P > 0.05$ , 图 1)。

### 2.2 各组补体依赖细胞毒性

WT 组猪红细胞裂解水平高于 ABO-C 组、TKO/hCD55 组和 TKO/hCD55/hCD46/hTBM 组; ABO-I 组猪红细胞裂解水平高于 TKO/hCD55 组、TKO/hCD55/hCD46/hTBM 组 (均为  $P < 0.01$ )。

TKO/hCD55 组、TKO/hCD55/hCD46/hTBM 组、ABO-C 组猪红细胞裂解水平差异均无统计学意义 (均为  $P > 0.05$ , 图 2)。

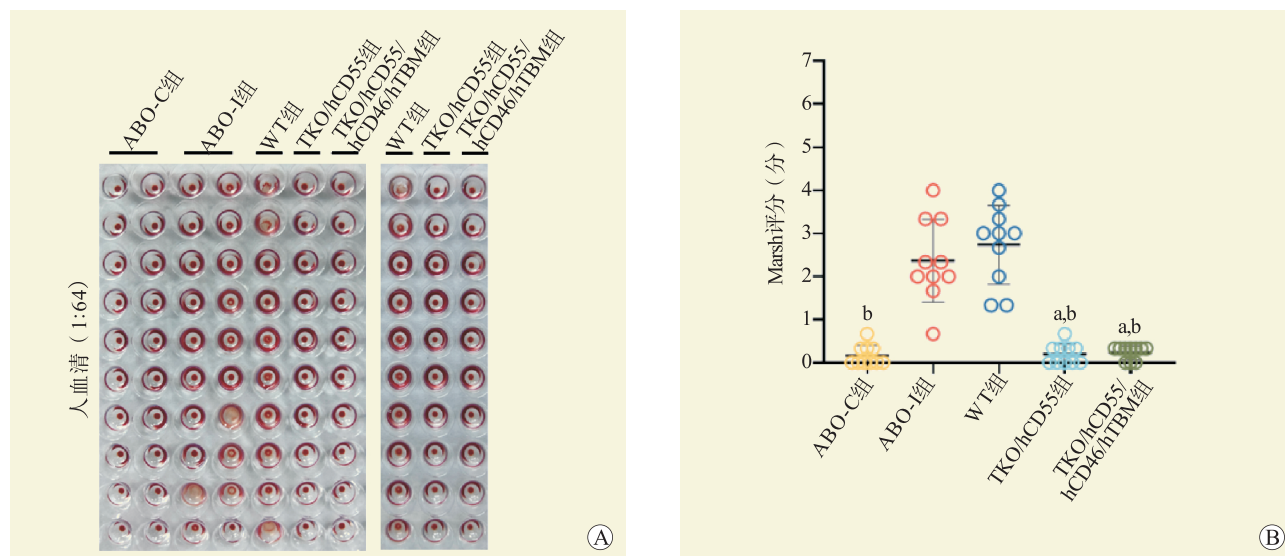
### 2.3 各组红细胞与 IgG、IgM 的结合

TKO/hCD55 组猪红细胞 IgM 和 IgG 结合水平均低于 WT 组和 ABO-I 组; TKO/hCD55/hCD46/hTBM 组猪红细胞 IgG、IgM 结合水平低于 WT 组, IgG 结合水平低于 ABO-I 组 (均为  $P < 0.05$ )。TKO/hCD55 组、TKO/hCD55/hCD46/hTBM 组、ABO-C 组猪红细胞抗体结合水平差异均无统计学意义 (均为  $P > 0.05$ , 图 3)。

## 3 讨论

临床血液供需不平衡是全球范围内的难题。创伤导致出血是全球最常见的死亡原因之一<sup>[13-16]</sup>。反复多次输血也会导致患者产生同种异体抗体, 引起迟发性溶血反应等并发症, 使得可用于输注的红细胞更少, 血液供需矛盾日益加重<sup>[17-19]</sup>。

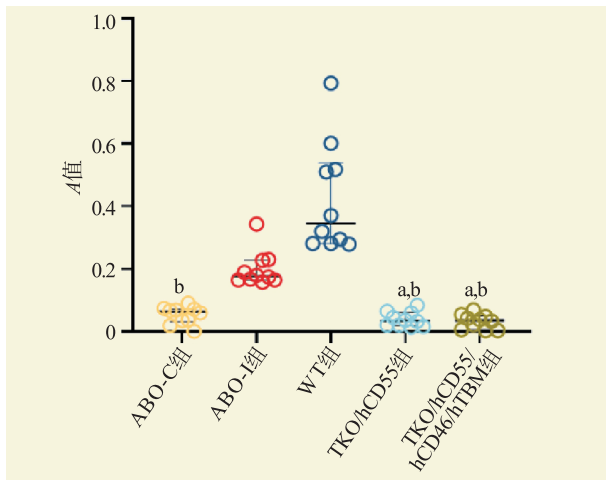
猪在多方面与人的生理学特征相似, 基因修饰猪作为异种器官或组织、细胞供体的相关研究已取得重大进展<sup>[7-8,20]</sup>。 $\alpha$ -1, 3-半乳糖基转移酶 ( $\alpha$ -1, 3-galactosyltransferase, GGTA1) 基因敲除 (GTKO) 供体猪红细胞在人血清中的抗体结合和溶血水平降低<sup>[21]</sup>, 但仍高于 ABO-C<sup>[22]</sup>。研究表明敲除 3 种主要



注: A 图为血凝集试验图像; B 图为应用改良 Marsh 评分计算凝集水平, 与 ABO-I 组比较, <sup>a</sup> $P < 0.001$ , 与 WT 组比较, <sup>b</sup> $P < 0.001$ 。

图 1 血凝集试验

Figure 1 Hemagglutination assay



注：与 ABO-I 组比较，<sup>a</sup> $P < 0.01$ ；与 WT 组比较，<sup>b</sup> $P < 0.01$ 。

图 2 补体依赖细胞毒性试验

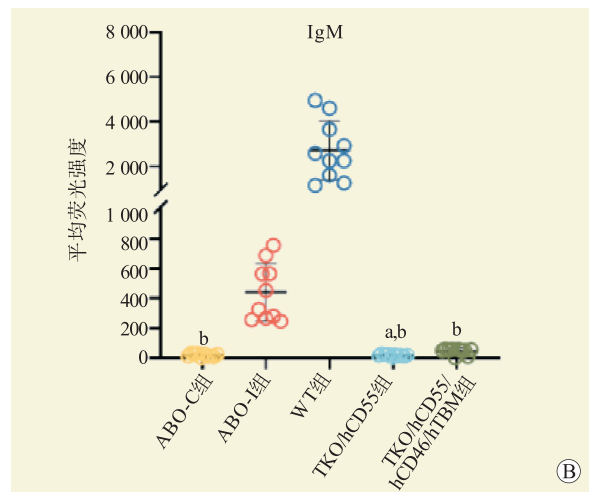
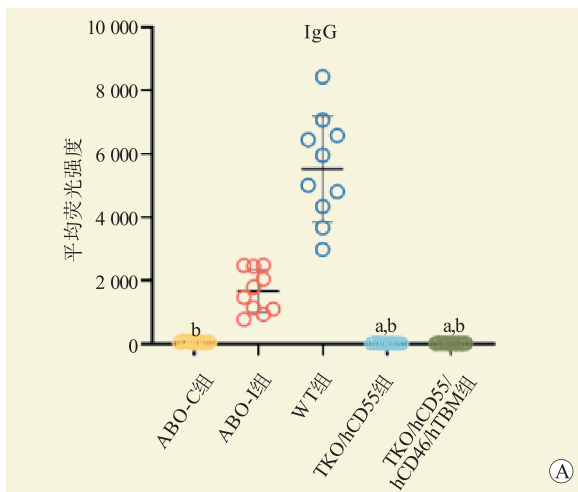
Figure 2 Complement-dependent cytotoxicity assay

异种抗原的猪红细胞与卷尾猴的抗体结合减少<sup>[23]</sup>，体内输血实验显示红细胞裂解水平明显降低，猪红细胞在受体内存活达一周<sup>[11]</sup>。当敲除 3 种主要异种抗原的猪红细胞暴露于人富血小板血浆时，与 WT 或 GTKO 相比，其血小板聚集的滞后时间显著延长<sup>[24]</sup>。因此供体猪基因修饰方案对其应用于临床输血、移植的探索非常关键。人补体调节蛋白的表达与猪红细胞在受体内存活时间紧密相关<sup>[25-26]</sup>。CD46 可有效控制补体激活途径<sup>[27]</sup>，GTKO 和 CD46 基因转入的猪外周血单核细胞在人血清中可发挥较好的免疫保护作用<sup>[28]</sup>。

CD55 可有效控制经典激活途径<sup>[29]</sup>，使猪红细胞在人补体介导的细胞裂解中获得更多的保护<sup>[30-31]</sup>，其器官在受体猴体内功能可维持数天或数周<sup>[23]</sup>，且被认为是临床异种移植肾脏的最佳来源<sup>[32]</sup>。

本研究分离了不同血型的人红细胞和不同猪红细胞，探究了不同基因修饰猪的免疫保护水平。首先通过凝血试验对比各组凝集水平，结果显示在同等稀释倍数血清中，WT 组凝集水平明显高于 ABO-C、TKO/hCD55、TKO/hCD55/hCD46/hTBM 组，而后两者均能达到接近于 ABO-C 的水平，说明这两者和人天然抗体结合的相对量与相容型人红细胞无明显差异。且抗原抗体结合水平（IgG、IgM）和红细胞裂解水平呈同样的趋势；TKO/hCD55/hCD46/hTBM 猪红细胞 IgM 结合水平与 ABO-I、ABO-C 组均无明显差异，可能与红细胞不同血型之间的免疫差异性有关，WT 组差异较明显，而基因修饰猪红细胞差异似乎并不大，与之相关的机制仍需继续探索。由于 hTBM 基因在猪内皮细胞上特异性表达<sup>[33-34]</sup>，因此本实验不予讨论。

本研究仅进行了体外实验，不能模拟输注后猪红细胞在体内的免疫反应，因此仍需进行 NHP 的体内实验来验证，包括猪红细胞在受体内循环的时间等，甚至不同基因修饰方案的供体猪的差异<sup>[35]</sup>。另外，受体巨噬细胞吞噬效应本研究未进行验证，此亦为免疫抑制中的重要途径。为了实现更为良好的免疫保护，或将需要更佳的基因修饰策略如 hCD47 基因的表达



注：A 图为 IgG 结合水平；B 图为 IgM 结合水平。与 ABO-I 组比较，<sup>a</sup> $P < 0.01$ ；与 WT 组比较，<sup>b</sup> $P < 0.01$ 。

图 3 红细胞的抗原抗体结合实验

Figure 3 Antigen-antibody binding assay of erythrocytes

等<sup>[7]</sup>。不仅如此,联合免疫抑制药对阻止免疫应答效果显著,例如抗 CD154 抗体目前在异种移植领域被广泛研究<sup>[36-38]</sup>,这也是本团队重点关注的方向。除此之外,我们未针对猪红细胞的表面抗原表达进行验证,相关实验的进一步探索仍在持续进行。

综上所述,本研究通过体外实验初步验证了 TKO/hCD55 和 TKO/hCD55/hCD46/hTBM 猪红细胞与人血清具有良好的免疫相容性。基因修饰猪-人或 NHP 异种输血的体内和体外研究仍在不断进行,随着基因修饰策略的优化,未来在紧急用血时,猪红细胞有可能是同种异体人红细胞极具潜力的替代品。

**致谢:**感谢解放军总医院各位老师的指导、成都中科奥格生物科技有限公司所有工作人员和解放军总医院骨科研究所所有参与同学的帮助!

#### 参考文献:

- [1] FREE RJ, SAPIANO MRP, CHAVEZ ORTIZ JL, et al. Continued stabilization of blood collections and transfusions in the United States: findings from the 2021 National Blood Collection and Utilization Survey[J]. *Transfusion*, 2023, 63(Suppl 4): S8-S18. DOI: 10.1111/trf.17360.
- [2] JAHR JS. Blood substitutes: basic science, translational studies and clinical trials[J]. *Front Med Technol*, 2022, 4: 989829. DOI: 10.3389/fmed.2022.989829.
- [3] CAO M, ZHAO Y, HE H, et al. New applications of HBOC-201: a 25-year review of the literature[J]. *Front Med (Lausanne)*, 2021, 8: 794561. DOI: 10.3389/fmed.2021.794561.
- [4] 刘嘉馨, 杨成民. 红细胞代用品研究进展与现状[J]. *中国输血杂志*, 2022, 35(8): 785-790. DOI: 10.13303/j.cjbt.issn.1004-549x.2022.08.002.  
LIU JX, YANG CM. Research progress and future of red blood cell substitutes[J]. *Chin J Blood Transfus*, 2022, 35(8): 785-790. DOI: 10.13303/j.cjbt.issn.1004-549x.2022.08.002.
- [5] 高菲, 王煜, 杜嘉祥, 等. 遗传修饰猪模型在生物医学及农业领域研究进展及应用[J]. *遗传*, 2023, 45(1): 6-28. DOI: 10.16288/j.ycz.22-313.  
GAO F, WANG Y, DU JX, et al. Advances and applications of genetically modified pig models in biomedical and agricultural field[J]. *Hereditas*, 2023, 45(1): 6-28. DOI: 10.16288/j.ycz.22-313.
- [6] SMOOD B, HARA H, SCHOEL LJ, et al. Genetically-engineered pigs as sources for clinical red blood cell transfusion: what pathobiological barriers need to be overcome?[J]. *Blood Rev*, 2019, 35: 7-17. DOI: 10.1016/j.blre.2019.01.003.
- [7] RYCZEK N, HRYHOROWICZ M, ZEYLAND J, et al. CRISPR/Cas technology in pig-to-human xenotransplantation research[J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(6): 3196. DOI: 10.3390/ijms22063196.
- [8] COOPER DKC. Introduction: the present status of xenotransplantation research[J]. *Methods Mol Biol*, 2020, 2110: 1-25. DOI: 10.1007/978-1-0716-0255-3\_1.
- [9] EISENSEN DL, HISADOME Y, YAMADA K. Progress in xenotransplantation: immunologic barriers, advances in gene editing, and successful tolerance induction strategies in pig-to-primate transplantation[J]. *Front Immunol*, 2022, 13: 899657. DOI: 10.3389/fimmu.2022.899657.
- [10] LEI T, CHEN L, WANG K, et al. Genetic engineering of pigs for xenotransplantation to overcome immune rejection and physiological incompatibilities: the first clinical steps[J]. *Front Immunol*, 2022, 13: 1031185. DOI: 10.3389/fimmu.2022.1031185.
- [11] YAMAMOTO T, BIKHET MH, MARQUES MB, et al. Initial experimental experience of triple-knockout pig red blood cells as potential sources for transfusion in alloimmunized patients with sickle cell disease[J]. *Transfusion*, 2021, 61(11): 3104-3118. DOI: 10.1111/trf.16667.
- [12] WANG ZY, BURLAK C, ESTRADA JL, et al. Erythrocytes from GGTA1/CMAH knockout pigs: implications for xenotransfusion and testing in non-human primates[J]. *Xenotransplantation*, 2014, 21(4): 376-384. DOI: 10.1111/xen.12106.
- [13] ABE T, KOMORI A, SHIRAIISHI A, et al. Trauma complications and in-hospital mortality: failure-to-rescue[J]. *Crit Care*, 2020, 24(1): 223. DOI: 10.1186/s13054-020-02951-1.
- [14] SZYMANSKI L, GOŁASZEWSKA K, MAŁKOWSKA J, et al. Safety and performance of hemostatic powders[J]. *Med Devices (Auckl)*, 2023, 16: 133-144. DOI: 10.2147/MDER.S407838.
- [15] MCCOY CC, BRENNER M, DUCHESNE J, et al. Back to the future: whole blood resuscitation of the severely injured trauma patient[J]. *Shock*, 2021, 56(1S): 9-15. DOI: 10.1097/SHK.0000000000001685.
- [16] HESLING JD, PAULSON MW, MCKAY JT, et al. Characterizing pediatric supermassive transfusion and the contributing injury patterns in the combat environment[J]. *Am J Emerg Med*, 2022, 51: 139-143. DOI: 10.1016/j.ajem.2021.10.032.
- [17] NARAYANAN D, HOGAN NB, SCHASER KA, et al. A case study in process improvement to minimize delays from obtaining blood for red cell exchange for a patient with sickle cell disease and multiple red blood cell alloantibodies[J]. *Case Rep Hematol*, 2022: 1562921. DOI: 10.1155/2022/1562921.
- [18] ROLLINS MR, CHOU ST. Adverse events of red blood cell transfusions in patients with sickle cell disease[J]. *Transfus Apher Sci*, 2022, 61(5): 103557. DOI: 10.1016/j.transci.2022.103557.
- [19] 刘海艇, 谢秀巧, 郭永建, 等. 立即行动充分发挥患者血液管理在疾病大流行期间的重要基础作用——国际患者血液管理基金会和血液管理促进会紧急呼吁[J]. *中国输血杂志*, 2020, 33(6): 543-547. DOI: 10.13303/j.cjbt.issn.1004-549x.2020.06.001.  
LIU HT, XIE XQ, GUO YJ, et al. Take immediate action to fully leverage the important foundational role of patient blood management during the pandemic - urgent appeal from the International Patient Blood Management Foundation and the Society for the Promotion of Blood Management[J]. *Chin J Blood Transfus*, 2020, 33(6): 543-547. DOI: 10.13303/j.cjbt.issn.1004-549x.2020.06.001.
- [20] HOZAIN AE, O'NEILL JD, PINEZICH MR, et al. Xenogeneic cross-circulation for extracorporeal recovery of injured human lungs[J]. *Nat Med*, 2020, 26(7): 1102-1113. DOI: 10.1038/s41591-020-0971-8.

- [21] ROUHANI FJ, DOR FJ, COOPER DK. Investigation of red blood cells from alpha1, 3-galactosyltransferase-knockout pigs for human blood transfusion[J]. *Transfusion*, 2004, 44(7): 1004-1012. DOI: 10.1111/j.1537-2995.2004.04002.x.
- [22] LONG C, HARA H, PAWLIKOWSKI Z, et al. Genetically engineered pig red blood cells for clinical transfusion: initial in vitro studies[J]. *Transfusion*, 2009, 49(11): 2418-2429. DOI: 10.1111/j.1537-2995.2009.02306.x.
- [23] COOPER DKC, PIERSON RN 3RD. Milestones on the path to clinical pig organ xenotransplantation[J]. *Am J Transplant*, 2023, 23(3): 326-335. DOI: 10.1016/j.ajt.2022.12.023.
- [24] LEE H, PARK EM, KO N, et al. Effect of factor H on complement alternative pathway activation in human serum remains on porcine cells lacking N-glycolylneuraminic acid[J]. *Front Immunol*, 2022, 13: 859261. DOI: 10.3389/fimmu.2022.859261.
- [25] YAMAMOTO T, HARA H, AYARES D, et al. The problem of the "4th xenoantigen" after pig organ transplantation in non-human primates may be overcome by expression of human "protective" proteins[J]. *Xenotransplantation*, 2021, 28(2): e12658. DOI: 10.1111/xen.12658.
- [26] 李丹妮, 赵艳双, 王轶, 等. 异种移植新进展: 从实验到临床[J]. *中国普外基础与临床杂志*, 2022, 29(6): 705-710.  
LI DN, ZHAO YS, WANG Y, et al. New advances in xenotransplantation: from bench to bedside[J]. *Chin J Base Clin Gen Surg*, 2022, 29(6): 705-710.
- [27] CHRISTIANSEN D, MILLAND J, THORLEY BR, et al. A functional analysis of recombinant soluble CD46 in vivo and a comparison with recombinant soluble forms of CD55 and CD35 in vitro[J]. *Eur J Immunol*, 1996, 26(3): 578-585. DOI: 10.1002/eji.1830260312.
- [28] 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.
- [29] DERNSTEDT A, LEIDIG J, HOLM A, et al. Regulation of decay accelerating factor primes human germinal center B cells for phagocytosis[J]. *Front Immunol*, 2021, 11: 599647. DOI: 10.3389/fimmu.2020.599647.
- [30] CHABAN R, COOPER DKC, PIERSON RN 3RD. Pig heart and lung xenotransplantation: present status[J]. *J Heart Lung Transplant*, 2022, 41(8): 1014-1022. DOI: 10.1016/j.healun.2022.04.010.
- [31] 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 development direction of pig lung xenotransplantation[J]. *Organ Transplant*, 2017, 8(6): 476-479. DOI: 10.3969/j.issn.1674-7445.2017.06.013.
- [32] LI T, FENG H, DU J, et al. Serum antibody binding and cytotoxicity to pig cells in Chinese subjects: relevance to clinical renal xenotransplantation[J]. *Front Immunol*, 2022, 13: 844632. DOI: 10.3389/fimmu.2022.844632.
- [33] LIN CC, COOPER DK, DORLING A. Coagulation dysregulation as a barrier to xenotransplantation in the primate[J]. *Transpl Immunol*, 2009, 21(2): 75-80. DOI: 10.1016/j.trim.2008.10.008.
- [34] KIM H, HURH S, LEE SK, et al. Additive expression of hTBM on hCD46 stable cell line has synergistic effect on complement regulation[J]. *Transplantation*, 2018, 102: S743. DOI: 10.1097/01.tp.0000543735.57229.de.
- [35] PARK S, LEE H, PARK EM, et al. Initial investigation on the feasibility of porcine red blood cells from genetically modified pigs as an alternative to human red blood cells for transfusion[J]. *Front Immunol*, 2023, 14: 1298035. DOI: 10.3389/fimmu.2023.1298035.
- [36] 于佳庆, 方一琳, 方铭慧, 等. 猪肾脏异种移植的研究进展[J]. *吉林大学学报(医学版)*, 2021, 47(3): 788-795. DOI: 10.13481/j.1671-587X.20210332.  
YU JQ, FANG YL, FANG MH, et al. Research progress in pig kidney xenotransplantation[J]. *J Jilin Univ (Med Edit)*, 2021, 47(3): 788-795. DOI: 10.13481/j.1671-587X.20210332.
- [37] LASSITER G, OTSUKA R, HIROSE T, et al. TNX-1500, a crystallizable fragment-modified anti-CD154 antibody, prolongs nonhuman primate renal allograft survival[J]. *Am J Transplant*, 2023, 23(8): 1171-1181. DOI: 10.1016/j.ajt.2023.03.022.
- [38] COOPER DKC. The long and winding road to clinical xenotransplantation: a personal journey[J]. *Eur Surg Res*, 2022, 63(4): 165-172. DOI: 10.1159/000525757.

(收稿日期: 2023-12-08)

(本文编辑: 方引超 吴秋玲)